

研究ワークフローのための効率的な スライドベースの組織イメージング

BioTek Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーを用いた蛍光イメージング、カラー明視野イメージング、関心領域（ROI）の選択的画像取得

著者

Michael Sfregola, PhD,
Joe Clayton, PhD,
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent BioTek Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーを用いた、スライド上の組織イメージングについて紹介します。HE 染色組織切片、蛍光組織切片、組織マイクロアレイを、蛍光およびカラー明視野でイメージングしました。自動キャリブレーション、レーザーオートフォーカス、高開口数（NA）対物レンズ、および関心領域（ROI）に基づく画像取得を活用することで、組織レベルの情報と細胞レベルの詳細情報を維持しながら、研究用途に適した効率的なスライドイメージングをどのように実現できるかを示しています。

概要

組織ベースのイメージングは、研究者が細胞のメカニズム、バイオマーカーの発現、および組織構造を、アッセイの成果と結びつけるのに役立ちます。この情報は特に、マイクロプレートベースのアッセイ、生細胞と固定細胞のイメージング、スライド上の組織サンプルを複合的に使用する研究で有益です。これらのワークフローにおいて、スライドイメージングを既存の実験システムと組み合わせ、ワークフローを不必要に複雑化せずに明確な組織情報を取得できれば、その価値が高まります。

Cytation 9 細胞イメージングマルチモード・プレートリーダーは、スライドイメージングを自動化顕微鏡環境へ統合するとともに、細胞およびアッセイベースのアプリケーションにも対応することができます。本製品では、蛍光顕微鏡、カラー明視野イメージング、高解像度対物レンズ、マイクロプレートベースのイメージングの機能が 1 つのシステムに組み込まれています。このアプリケーションノートでは、スライド上の数種類のサンプルを用いて、組織切片やアレイ状の組織サンプルに対する、画像品質、画像取得効率、ならびに関心領域（ROI）を指定したターゲットイメージングの実用性を検証します。

実験方法

スライド上の蛍光サンプルとカラー明視野サンプルを、Cytation 9 自動イメージングシステムでイメージングしました。このシステムは、高開口数アポクロマート対物レンズ、レーザーオートフォーカス、蛍光フィルターセッ

ト、カラー明視野照明を備えて構成されています。画像取得、自動キャリブレーション、全体像の撮影、ROI 検出、スティッチング合成画像の生成には、イメージングおよび顕微鏡用の Agilent BioTek Gen5 ソフトウェアを使用しました。

サンプルの取得前に、自動キャリブレーションルーチンを使用して、光学キャリブレーション、フラットフィールド補正、およびホワイトバランス調整を実行しました。キャリブレーションプレートには、100 μm の高精度アパーチャと、5 つの均一な蛍光ターゲット領域が組み込まれています。キャリブレーション画像は対物レンズとカラーの組み合わせごとに撮影し、その後の画像取得時に画像補正を自動的に適用しました（図 1）。

サンプルとして、蛍光標識したマウス結腸および腎臓の組織切片、HE 染色したマウス胚およびヒト腎臓の組織切片、さらに 72 コアから構成される HE 染色ヒト正常組織ティッシュマイクロアレイを使用した。組織の位置は、低倍率のオーバービュー画像を撮影し特定しました。続いて 20 倍または 40 倍のアポクロマート対物レンズを使用し、レーザーオートフォーカスでカバーガラスの反射から焦点面を決定して、高倍率画像を取得しました。ROI ベースのワークフローでは、Agilent BioTek Gen5 自動関心領域（AutoROI）モジュールを使用して、組織が含まれる領域を特定し、スライド上の何も無い領域を高倍率撮影の対象から除外しました。

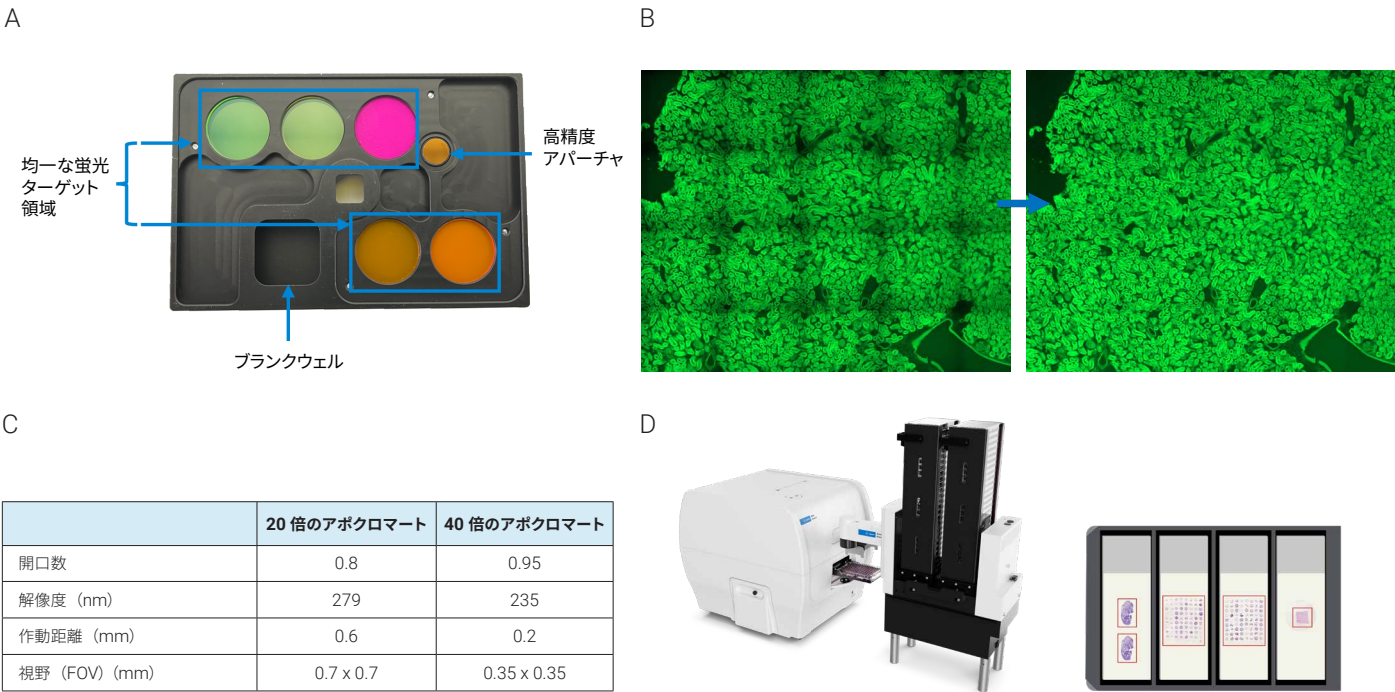


図 1. Agilent BioTek Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーは、自動スライドイメージングに対応しています。(A) 自動ステージアライメントおよび照明補正を用いた高精度キャリブレーションツール。(B) 蛍光およびカラー明視野イメージングモードにおいて、モニター取得中にタイル境界由来のアーチファクトを除去するための補正が自動的に適用されます。(C) 広視野カメラを搭載した Olympus UPLXAPO 20x 0.8 NA および UPLXAPO 40x 0.95 NA 対物レンズ。(D) Cytation 9 と対応する Agilent BioTek BioStack マイクロプレートスタッカーを組み合わせると、顕微鏡スライドの容量を 120 枚まで拡張できます。

結果と考察

マルチプレックス蛍光組織イメージング

マルチプレックス蛍光イメージングを使用すると、組織の完全性を保持した状態で、組織内のバイオマーカー、細胞の種類、構造的特徴がどのように構成されているかを調べる事が可能となります。厚さ 100 μm のマウス結腸切片（Mouse Colon、4-color、OptiSlides、Luxidea、カルガリー、アルバータ州、カナダ）に対して、核、細胞骨格、ニューロン、血管を視覚化するために 4 つの蛍光チャンネルでイメージングしました（図 2A）。

4 倍のオーバービュー画像を使用して組織領域を特定してから、DAPI、GFP、TRITC、および Cy5 チャンネルで 20 倍と 40 倍のアポクロマート対物レンズを使用して、高倍率イメージングを実行しました。20 倍の撮影では、46 秒間で 48 枚の画像を取得し、2.2 mm² のサンプル領域をカバーしました。40 倍の撮影では、4 分 30 秒間で 252 枚の画像を取得しました（表 1）。

厚さ 16 μm のマウス腎臓切片（FluoCells Prepared Slide #3、Thermo Fisher、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国）を 3 つの蛍光チャンネルでイメージングして、核、細胞膜、細胞骨格を視覚化しました（図 2B）。4 倍の DAPI オーバービュー画像を使用して組織領域を特定してから、20 倍のアポクロマート対物レンズを使用して、DAPI、GFP、および TRITC チャンネルで高倍率でイメージングをしました。最終的な画

像セットは 819 枚の画像で構成され、63 mm² のサンプル領域を 14 分未満で取得できました（表 1）。これらの例の中で、スティッチング画像では組織全体の構造と細胞レベルの詳細情報の両方を確認できるため、1 つのワークフロー内でマーカー局在と組織構造を評価できます。

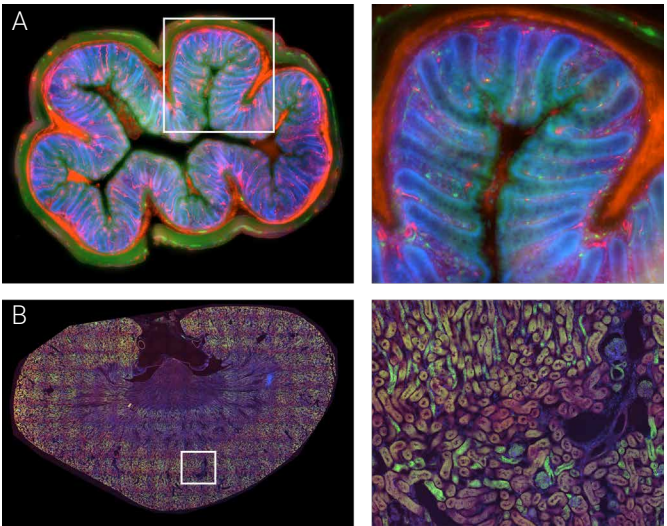


図 2. 調製済み組織スライドのマルチチャンネル免疫蛍光イメージング。(A) マウス結腸組織の 40 倍の画像。4 種類の蛍光マーカー（核（DAPI）、ニューロン（GFP）、細胞骨格（TRITC）、血管（Cy5））を使用。(B) マウス腎臓組織の 20 倍の画像。3 種類の蛍光マーカー（核（DAPI）、小麦胚芽凝集素（GFP）、アクチン（TRITC））を使用

表 1. サンプルおよびスライドの画像取得の詳細

	マウス結腸		マウス腎臓		ヒト組織 マイクロアレイ	マウス胚	ヒト腎臓
染色	核 ニューロン ビメンチン 血管	DAPI Dylight 488 Dylight 550 Dylight 649	核 WGA ファロイジン	DAPI Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 568	HE	HE	HE
チャンネル数	4		3		3	3	3
サンプル面積	2.2. mm ²		63 mm ²		156 mm ²	60 mm ²	39 mm ²
倍率	20 倍		20 倍		20 倍	20 倍	20 倍
画像総数	48		819		5841	615	1230
撮影時間（分）	0.8 分		13.7 分		37.9 分	7.5 分	5.1 分
正規化した時間（10 x 10 mm）	36 分		22 分		24 分	13 分	13 分

カラー明視野組織イメージング

カラー明視野イメージングは、組織の形態を評価し、構造的な情報を特定のマーカー情報と関連付けて解釈するための重要な手法であり続けています。Cytation 9 では、ホワイトバランスの自動調整と赤/青/緑色の照明の連続制御により、自然な色調の組織構造画像を高解像度で取得することができます。この機能を、動物およびヒトに由来する大型の HE 染色組織切片を使用して評価しました。

(地元の研究機関から寄付された) マウス胚の HE 染色切片を、20 倍のアポクロマート対物レンズでイメージングしました (図 3A)。組織領域は Gen5 AutoROI モジュールにより 4 倍のオーバービュー画像から自動検出され、これにより高倍率での撮影中に空の領域をスキップすることが可能になりました。画像取得時間は 7.5 分でした。同じワークフローを使用して、慢性腎炎を有する HE 染色ヒト腎臓組織切片 (Konus、メドレー、フロリダ州、米国) をイメージングしました (図 3C)。腎臓組織切片の面積は 38 mm^2 で、20 倍の倍率での撮像は約 5 分でした (表 1)。

最終的なスティッチング画像では、組織全体の形態学的情報を維持しつつ、拡大表示した領域では細胞の詳細情報も確認できました。これらの結果から、組織構造イメージングを関連する細胞やアッセイベースの研究から切り離すことなく、カラー明視野スライドイメージングを幅広い顕微鏡ワークフローに組み込めることがわかります。

ROI を用いた組織マイクロアレイのイメージング

組織マイクロアレイは、多くの関連する組織サンプルを、同様の染色およびイメージング条件で比較する必要がある場合に有用です。72 コア HE 染色組織マイクロアレイを、Gen5 AutoROI モジュール (FDA human normal organ tissue、US Biomax, Inc.、ダーウッド、メリーランド州、米国) を使用してイメージングしました。4 倍のオーバービュー画像を生成し、各組織コアの位置と面積が自動的に検出されました。20 倍のアポクロマート対物レンズを使用して、各組織コアの高倍率画像を取得しました (図 3B)。

コア間の空の領域を除く総組織面積は 156 mm^2 でした。コアあたりの画像取得時間は約 30 秒、合計時間は約 38 分でした (表 1)。このワークフローは、関連する組織領域を特定し、一貫性のある画像取得を行い、コア間の空の領域を除外することで、組織アレイのイメージングがより実用的になることを示しています。

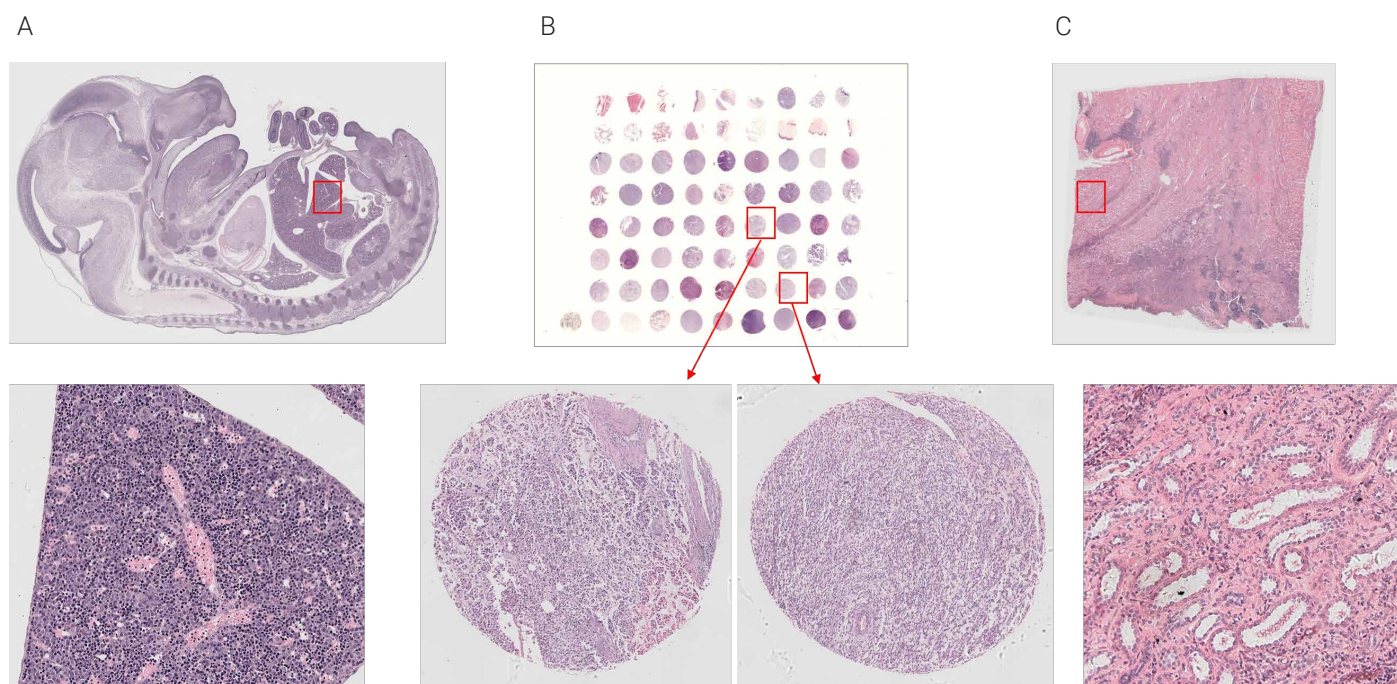


図 3. 大判 HE 組織スライドのカラー明視野イメージング。(A) マウス全胚 (上) と、その高倍率関心領域 (下)。(B) ヒト正常臓器組織マイクロアレイ (上) と、高倍率で観察した 2 つの組織コア (下)。(C) ヒト腎臓組織サンプル (上) と、その高倍率関心領域 (下)。

ROI ベースのワークフローとスライド処理能力

スライド上の組織のワークフローの場合、実際の効率はスライド容量だけでなく、意味のあるサンプル領域に絞って画像取得を実行できるかどうかによって左右されます。Cytation 9 は、高倍率での撮像を行う前に、関心領域ワークフローを使用して低倍率のオーバービュー画像を取得します（図 4）。その後、組織領域を手動で選択するか、Gen5 AutoROI モジュールで自動検出できます。これにより空の領域をスキップできるため、最終的なイメージング領域を制御しながら撮影時間を短縮し、ストレージ要件を削減できます。

Cytation 9 と Agilent BioTek BioStack マイクロプレートスタッカーを統合することで、処理可能なスライド数を拡張できます。4 スライドホルダを使用すれば、30 枚用プレートスタックに最大 120 枚のスライドを収納できます。バッチワークフローでは、まずオーバービュー画像を取得し、ROI を特定または修正し、バッチ全体をユーザーが承認してから、特定の組織領域を高倍率でイメージングします。この手法により、ユーザーが選択した、またはソフトウェアが検出した組織領域のみを撮影しながら、ルーチン的なバッチ撮像にも対応できます。

A



B

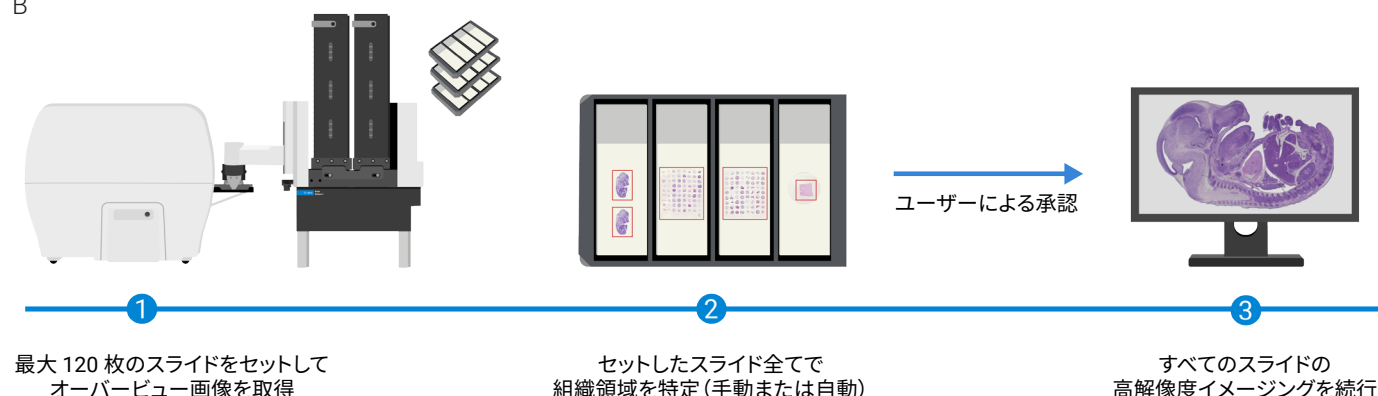


図 4. (A) スライドイメージングのワークフロー。個々のスライド領域のオーバービュー画像は自動的に取得されます。組織を手動または自動で特定した後に、特定したすべての領域について、高解像度のマルチチャネルイメージングを実行できます。(B) 大容量イメージングのワークフロー。Agilent BioTek BioStack マイクロプレートスタッカーに、最大 120 枚のスライドを収納できます。すべてのスライドのオーバービュー画像を取得してから、組織領域を特定します。ユーザーが承認してから、全スライドと全領域の高解像度イメージングを実行します (n = 96)。

結論

Agilent BioTek Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーを使用して、スライド上の複数の組織サンプルタイプ（HE 染色および蛍光組織切片と組織マイクロアレイを含む）から、高解像度の蛍光およびカラー明視野画像を生成しました。自動キャリブレーション、レーザーオートフォーカス、高開口数対物レンズ、ROI ベースの撮影により、空のスライド領域の不要な撮影を削減して、撮影の一貫性を確保できました。これらの機能により、スライド上の組織のイメージングを、生細胞および固定細胞のイメージングやマイクロプレートベースのイメージングなど、より幅広い研究ワークフローに組み込むことができます。

このアプリケーションで使用された製品

アジレント製品

BioTek Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダー [🔗](#)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

PR7005-2550

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2026

Printed in Japan, September 24, 2026

5994-9407JAJP

