

デジタル倒立顕微鏡に搭載した HCA 用アプリケーションの技術と実施例の紹介

林 耕磨, 門井宏平, 柴田美智太郎, 大井宏美, 星野哲朗

Introduction of HCA Application Technology and Examples Installed on Digital Inverted Microscopes

Kohma HAYASHI, Kohei KADOI, Michitaro SHIBATA, Hiromi OI and Tetsuro HOSHINO

創薬分野において、High Content Analysis (HCA) と呼ばれる顕微鏡観察により薬剤の効果を評価する技術は、重要性を増してきている。一方で、HCA を実施するためには、細胞培養、画像取得、解析等の高度な専門知識が必要となる。ニコンは、誰でも簡単に HCA を実施できるようにするため、デジタル倒立顕微鏡 ECLIPSE Ji と、本顕微鏡専用ソフトウェア、NIS-Elements SE (Smart Experiment) を開発した。本稿では、Smart Experiment に搭載された技術の紹介と、実際の撮像例に関して紹介する。1 章にて背景を説明し、2 章では Smart Experiment を利用したときの画像取得から解析結果表示までのシステムワークフローを紹介する。3 章では、Smart Experiment のシステムワークフローを実現するために開発した、CellFinder.ai によるオートフォーカス技術と NIS.ai による細胞セグメンテーション技術を紹介する。4 章では、Size and Morphological analysis と Cytotoxicity の実施例を紹介することで、Smart Experiment にてどのような実験結果を出力できるかを示す。最後に 5 章では、本技術を振り返って、今後の展望について説明したい。

In drug discovery, High Content Analysis (HCA), a microscope-based drug efficacy evaluation screening approach, is becoming increasingly important with imaging technology development. However, performing HCA requires advanced expertise in several fields (e.g., cell culture, image acquisition, analysis, etc.). Nikon developed a digital inverted microscope, ECLIPSE Ji, and corresponding software, NIS-Elements SE (Smart Experiment), for easy HCA execution using this microscope. In this study, we introduce the technology installed in Smart Experiment, along with actual imaging examples. Chapters 1 and 2 introduce the background and workflow from image acquisition to analysis result display when using Smart Experiment, respectively. Chapter 3 discusses the autofocus and cell segmentation technologies by CellFinder.ai and NIS.ai, respectively (both developed to realize Smart Experiment). Chapter 4 presents size and morphological analyses as well as cytotoxicity examples as actual assays. Finally, Chapter 5 provides a future outlook.

Key words 顕微鏡, 深層学習, 自動化, ライフサイエンス, 創薬
microscope, deep learning, automation, life science, drug discovery

1 はじめに

創薬分野において、High Content Analysis (HCA) と呼ばれる、顕微鏡観察による、薬剤の効果を評価する画像解析技術は、イメージング技術が発展する中で、重要性を増してきている [1]。一方で、HCA を実施するためには、様々な高度な専門知識が必要となる。細胞サンプルの準備及び薬剤評価用の実験系の構築知識、定量的な顕微鏡画像を取得するための知識、撮像した画像から特徴量を抽出するための画像処理の知識、抽出した特徴量から薬剤効果を示すための統計解析の知識である。これらの複合的な知識が必要なため、HCA に初めて取り組むにはハードルが高いという課題が存在する。ニコンは本課題を解決するため、

HCA の複雑なワークフローを自動化したシステムとして、デジタル倒立顕微鏡 ECLIPSE Ji と、本顕微鏡専用のソフトウェア NIS-Elements SE (Smart Experiment) を開発した。本稿では、Smart Experiment に搭載された技術の紹介と、実際の HCA 実施例について紹介する。

2 Smart Experiment のシステムワークフロー

本章では、Smart Experiment のシステムワークフローを簡単に紹介する。NIS-Elements SE では、ユーザーが種々の設定をせずにアッセイを実行できるように、Fig. 1 のシステムワークフローに従って撮像および解析が進行する。以下、各ステップを説明する。

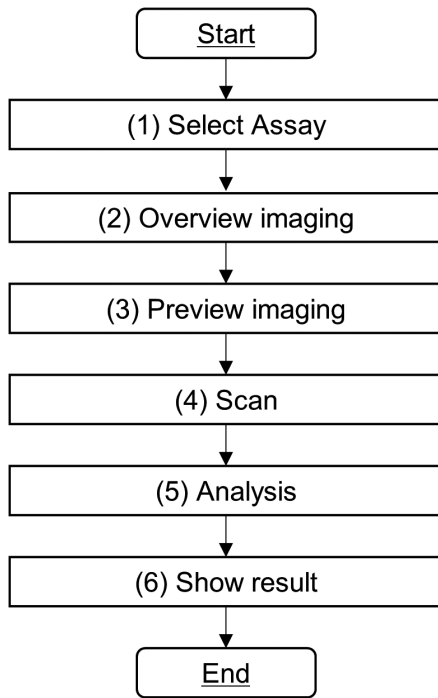


Fig. 1 Smart Experiment のワークフロー概要

(1) Select Assay

まず、サンプルを調整後、Ji のステージにサンプルをセットする、その後、NIS-Elements の SE モードから、該当のアッセイを選択する。

(2) Overview Imaging

ユーザーが設置したサンプルが、何ウェルプレートか判定し、設置されたプレートの XY 傾きを補正する。

各ウェルの中心で画像を取得し、細胞の有無を検出する。また、本画像の視野内の細胞密度および偏りを解析し、高倍観察時の最適な視野を検出する。

(3) Preview Imaging

ユーザーが選択したウェル、または撮像範囲のすべてのウェルに対して、Autosignal.ai (AI を利用した自動照明条件調整) を実行する。この結果をもとに、走査したウェルの中で、一番明るいウェルが輝度飽和しない照明条件 (LED パワー、露光時間) を算出する。また、最初に走査するウェルにて、明視野でオートフォーカスを実施したのち、撮像する各蛍光チャンネルにてオートフォーカスを実行する。これらのオートフォーカスの結果から、軸上色収差により発生する明視野における合焦位置と、各蛍光チャンネルの合焦位置のオフセット値を算出する。明視野のフォーカス算出には、CellFinder.ai (AI を利用した明視野用のオートフォーカス) を利用している。

(4) Scan

Overview で決定した XY 位置および、Preview にて決定した照明条件、明視野からの各蛍光チャンネルのオフセット値を利用し、解析に利用するための画像を取得する。

(5) Analysis

Scan 時に撮像した画像に対して、各アッセイで定義された解析レシピを実行する。

(6) Show Result

最後に、解析結果を結果表示画面に表示する。

3 Smart Experiment に利用している AI 技術

本章では、Smart Experiment に搭載した AI 技術に関して紹介する。

3.1. CellFinder.ai によるオートフォーカス**3.1.1. 原理概要**

顕微鏡で用いられる従来のオートフォーカスでは、Z 方向に画像を取得しながら、各画像の輝度情報などからピント面を探し出す方法が使われてきた。従来の手法では、Z の操作範囲内にピント面が存在している必要があるため、あらかじめ適切な Z 範囲を設定しなければならない。この範囲が狭ければ、Z の操作がピント面に届かず、オートフォーカスに失敗する。一方で、Z 範囲を広く設定しすぎてしまった場合、必要以上に時間がかかってしまう。

上記課題を回避するため、Smart Experiment 向けに、新しいオートフォーカス手法を開発した。本手法では、Fig. 2 に示した通り、Z 位置の異なる 2 枚の画像情報から、ピント面までの距離を推定する方法を採用した。ピント面の推定には、Deep Neural Network (DNN) を利用した。

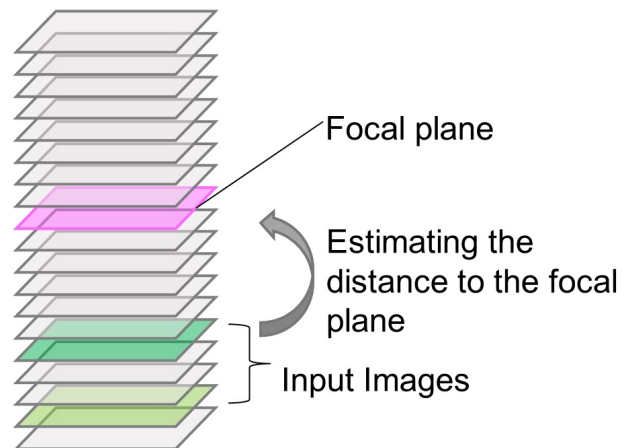


Fig. 2 CellFinder.ai 原理

3.1.2. 学習方法

対物レンズごとに、Z スタック画像を取得し、Z 位置の異なる 2 枚の画像に対して、ピント面までの距離をラベル付けして学習した。学習には、Table 1 の細胞種を利用した。

明視野観察におけるピント面は、コントラストが極小値となる Z 位置と定義した。

Table 1 CellFinder.ai に利用した細胞種

細胞種	由来
HeLa	RIKEN BRC, RCB0007
HepG2	JRCB cell bank, JCRB1054
HT-29	ATCC, HTB-38
COS-7	RIKEN BRC, RCB0539
CHO-K1	JRCB cell bank, JCRB9018
A-431	NIHS, JCRB 0004
Neuro2a	ATCC, CCL-131
iPSC derived Neurons	Elixirgen Scientific, EX-SeV-CW50065
BS-C-1	NIHS, JCRB9126
J774.1	NIHS, JCRB0018

3.1.3. 性能

ピント面からの誤差を $3 \times SD$ (Standard Deviation 標準偏差) にて評価した。検証にはピント面から $\pm 250 \mu\text{m}$ の範囲を対象とした。Table 2 に評価結果を示した。

Table 2 CellFinder.ai 評価結果

対物レンズ	ピント面からの誤差範囲 ($\pm 3 \times SD$)
Plan Apo λ D 4x	$< \pm 10 \mu\text{m}$
Plan Apo λ D 10x	$< \pm 8 \mu\text{m}$
Plan Apo λ D 20x	$< \pm 5 \mu\text{m}$

3.2. NIS.ai を利用した細胞のセグメンテーション

3.2.1. 原理概要

顕微鏡で撮像した画像を解析する最初のステップとして、細胞核や、細胞領域などの計測対象をセグメンテーションすること必要である。一般的には、輝度の閾値を設定することで画像を二値化し、さらにモルフォロジー変換等の後処理を加えることで、計測対象のオブジェクトのみをセグメンテーションすることが行われる。しかし本手法では、撮像条件や微妙なサンプル作成条件の違い（例えば染色時間や染色試薬の濃度、試薬開封からの時間）によって、閾値などのパラメータを微調整する必要がある。また、明視野や位相差画像から、細胞核や細胞領域を抽出するには、複雑な画像処理プロセスを検討する必要がある。

一方で近年、Pixel2PixelやU-netなどの、DNNを利用したセグメンテーション手法が登場し、細胞サンプルにも利用され始めてきている [2]。弊社が提供するNIS-Elementsにおいても、NIS.aiにSegmentation.aiとObjectSegment.aiという形で、上記DNNを利用したセグメンテーション技術を搭載している。本手法のメリットとして、実験条件の違いにより発生するサンプルの差異をあらかじめ学習しておくことで、パラメータの調整が不要となることや、GPUベースでの演算のため、従来手法よりも解析時間がからないことが挙げられる。本手法の詳細の原理および応用例は、Nikon Research Report Vol. 3に掲載しているた

め、本稿では割愛する。

3.2.2. 学習方法

NIS-Elements SEでは、蛍光画像から細胞核、細胞領域をセグメンテーションする学習モデルと、明視野画像から細胞核、細胞領域をセグメンテーションする学習モデルの4種類を搭載した。蛍光画像からのセグメンテーションモデルの作成には、教師画像として従来の手法で蛍光画像からセグメンテーションした二値化画像を利用した。明視野画像からのセグメンテーションモデルの作成では、蛍光染色したサンプル準備して明視野像と蛍光像を撮像し、蛍光画像を従来の手法にてセグメンテーションすることで、教師画像とした。細胞核のセグメンテーションにはHoechst33342 (ナカライテスク, 京都, 日本, 19172-51) で細胞核を染色した画像を利用し、細胞領域のセグメンテーションには、CellMask™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US, C10046) にて細胞領域を染色した画像を利用した。細胞核の学習にはSegmentObject.ai機能を、細胞領域の学習には主にSegment.ai機能を使用した。また、Table 3に、学習に利用した細胞種の一覧を掲載する。

Table 3 NIS.ai に利用した細胞種一覧

細胞種	由来
HeLa	RIKEN BRC, RCB0007
HepG2	JRCB cell bank, JCRB1054
COS-7	RIKEN BRC, RCB0539
CHO-K1	JRCB cell bank, JCRB9018
A-431	NIHS, JCRB 0004
J774.1	NIHS, JCRB0018
Neuro2a	ATCC, CCL-131

3.2.3. 評価方法

NIS.aiを用いて作成したセグメンテーションモデルは、学習した細胞種の画像に適用した際の検出領域の外観の確認による官能評価と定量的な評価を実施した。評価には学習データと別に取得したデータを使用した。細胞核を検出するためのモデルでは、Hoechst33342 (ナカライテスク) の蛍光画像から検出された細胞核数に対するセグメンテーションモデルで検出された核数の割合を算出し、その割合が90-110%の範囲に収まることを確認した (Fig. 3 (B))。また、細胞領域を検出するためのセグメンテーションモデルについても、CellMask™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific) の蛍光画像から検出された細胞領域の面積に対するセグメンテーションモデルで検出された細胞領域面積の割合が90-110%の範囲に収まることを確認した (Fig. 3 (C))。セグメンテーションモデル単独の精度評価に加えて、アッセイの想定用途に対しニコンが推奨する条件で作製された陽性・陰性対照間の差異が十分に検出可能かを確認す

る解析の総合評価も実施した。実施した評価の採用基準として、系の安定性を示す指標である Z-factor が挙げられる [1]。

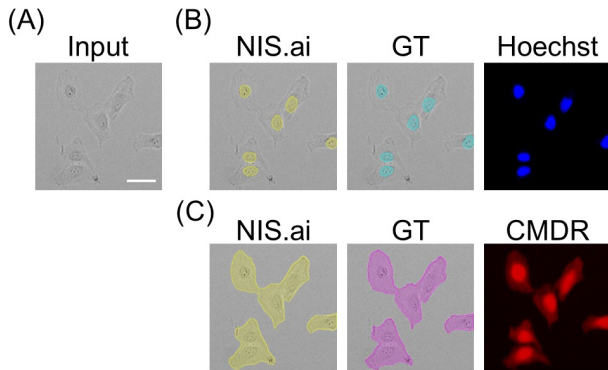


Fig. 3 NIS.ai セグメンテーションモデルによる領域検出
 (A) NIS.ai へ入力した明視野画像。スケールバーは 50 μm 。(B) 左から NIS.ai による核領域の推論結果 (黄領域), Hoechst33342 蛍光画像から検出した核領域のグランドトゥールース (水色領域), Hoechst33342 の蛍光画像 (青)。(C) 左から NIS.ai による細胞領域の推論結果 (黄領域), CellMask™ Deep Red 蛍光画像から検出した細胞領域のグランドトゥールース (マゼンダ領域), CellMask™ Deep Red の蛍光画像 (赤)。

4 Smart Experiment を利用したアッセイの実施例

本章では, Smart Experiment を実際に利用して, 計測した例を紹介する。

4.1. Size and Morphological Analysis を利用した細胞の形態解析

4.1.1. アッセイ概要

細胞は生理現象の中で様々な形態変化を引き起こす。例えば, DNA 損傷や酸化ストレス, がん遺伝子の活性化により, 細胞の老化が進むことで, 細胞の肥大化が進行することが知られている [3]。このような, 細胞形態変化に関連するカスケードをターゲットにした薬剤のスクリーニングや, 細胞形態を指標とした細胞への毒性評価は重要である。本アッセイは, 細胞および細胞核の大きさや周囲長, 真円度などの形態的特徴量を算出可能なアプリケーションを提供することを目的としている。

本アッセイでは, 画像解析用に10倍の対物レンズを利用して画像を取得し, 細胞核, 細胞領域の蛍光画像からそれぞれ細胞核領域, 細胞領域をセグメンテーションし, 形態的特徴量を計測することが可能である。

4.1.2. 評価実験概要

本アッセイの評価実験では, DNA トポイソメラーゼ I の阻害剤である Camptothecin (Sigma-Aldrich, Missouri, US) を用いた, 細胞サイズの濃度依存性の検証により実施した。HeLa 細胞を96ウェルプレート (AGC テクノグラス, 静岡, 日本5866-096) に播種し培養後, Camptothecin (Sigma-

Aldrich) の希釈系列 (0 ~ 1000 nM, 10濃度点) を添加した培地にて24時間培養した。その後, 4 % PFA にて固定し, 細胞核を Hoechst 33342, 細胞膜を CellMask™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific) にて染色した [4]。

本サンプルプレートを Ji にセットし, Size and Morphological analysis アッセイを実行した。Z-factor を算出するため, ネガティブコントロールとして Camptothecin (Sigma-Aldrich) 0 nM の区分を, ポジティブコントロールとして Camptothecin (Sigma-Aldrich) 333 nM の区分を設定した。各濃度に対し6つのリプリカントウェルを設定した。また, 生物学的複製実験として, 本実験は3回実施した。

4.1.3. 評価結果

Fig. 4に, 評価結果を示した。

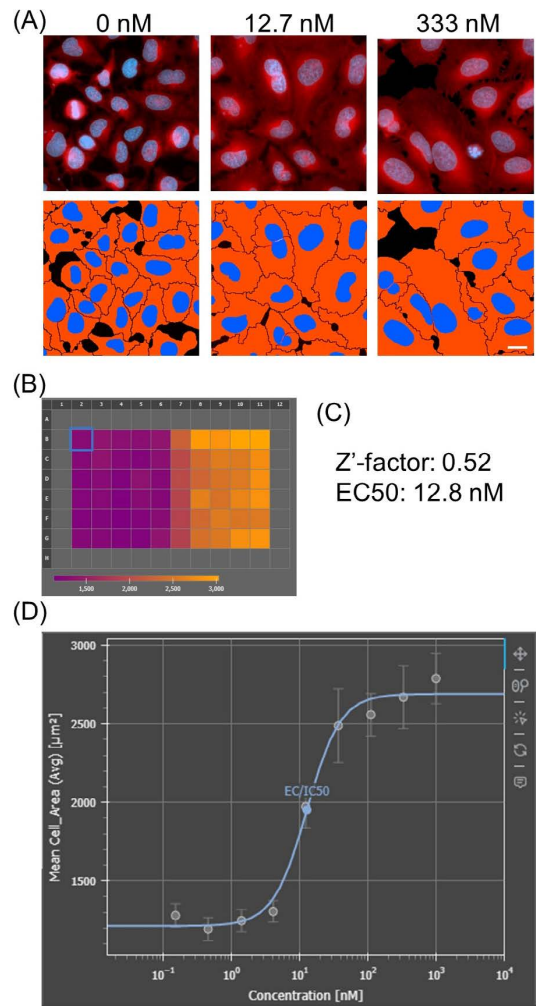


Fig. 4 Size and Morphological analysis 評価結果
 (A) 左から 0, 12.7, 333 nM 濃度点における細胞画像。上段に輝度のみの画像 (青: Hoechst 33342, 赤: CellMask™ Deep Red), 下段に, セグメンテーションしたマスクを示した (青: 細胞核領域, 赤: 細胞領域)。スケールバーは 20 μm 。(B) 細胞面積をヒートマップに示した図。(C) 細胞面積を指標としたときの Z-factor および EC50 の算出結果。(D) 縦軸に細胞面積, 横軸に Camptothecin 濃度をとった濃度依存曲線。エラーバーはリプリカント間の標準偏差。青線はプロットに対してシグモイドカーブにフィッティングした結果。

Fig. 4 (A) に示した、各濃度点における代表的な画像例、Fig. 4 (B) に示した細胞面積のヒートマップ、Fig. 4 (D) に示した濃度依存曲線の結果から、濃度依存的に、細胞の面積が大きくなることが確認できた。また Fig. 4 (C) に示した通り、 $Z\text{-factor} > 0.5$ (0.52) であることから、アッセイとしても十分な性能が出ていることが確認できた。また、本実験での EC_{50} は 12.8 nM となった。

4.2. Cytotoxicity を利用した薬剤の毒性評価結果

4.2.1. アッセイ概要

細胞毒性を評価することは、薬剤の評価や、培養条件や環境の評価、その他細胞へのストレスを評価する上で重要である。本アッセイでは、染色した死細胞の割合を算出することを目的としている。

本アッセイでは、画像解析用に10倍の対物レンズを利用して画像を取得し、細胞核および死細胞の蛍光画像から、全細胞数、死細胞数を算出し、生細胞、死細胞の割合を算出することが可能である。

4.2.2. 評価実験概要

本アッセイの評価実験では、プロテインキナーゼの阻害剤である Staurosporine (Sigma-Aldrich, Missouri, US) を利用して細胞死を誘導し、死細胞数の濃度依存性の検証により実施した [5]。HeLa 細胞を96ウェルプレート (AGC テクノガラス) に播種し培養後、Staurosporine (Sigma-Aldrich) の希釈系列 (0 ~ 1000 nM, 10段階) を添加した培地で48時間培養した。

その後、細胞核を Hoechst 33342 (ナカライテスク)、死細胞を Ethidium homodimer-I (EthD-1) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US, L3224) にて染色した。

本サンプルプレートを Ji にセットし、Cytotoxicity アッセイを実行した。ネガティブコントロールとして Staurosporine (Sigma-Aldrich) 0 nM の区分を、ポジティブコントロールとして Staurosporine (Sigma-Aldrich) 1000 nM の区分を設定し、 $Z\text{-factor}$ を算出した。各濃度に対し6つのリプリカントウェルを設定した。また、生物学的複製実験として、本実験は3回実施した。

4.2.3. 評価結果

評価結果を Fig. 5 に示した。

Fig. 5 (A) に示した、各濃度点における代表的な画像例、Fig. 5 (B) に示した死細胞率のヒートマップ、Fig. 5 (D) に示した濃度依存曲線の結果から、濃度依存的に、死細胞率が上昇することが確認できた。また Fig 5 (C) に示した通り、 $Z\text{-factor} > 0.5$ (0.923) であることから、アッセイとしても十分な性能が出ていることが確認できた。また、本実験での EC_{50} は 56.43 nM となった。

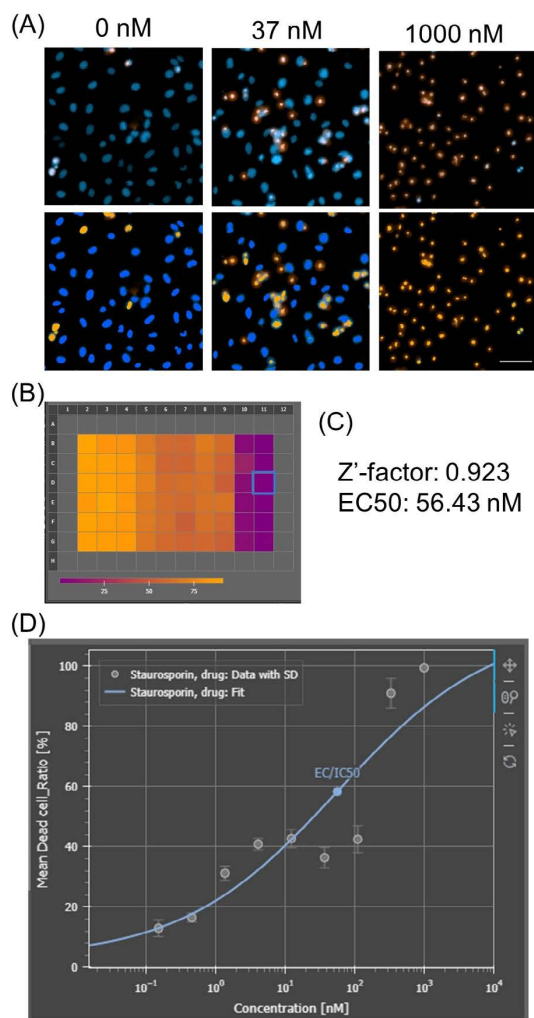


Fig. 5 Cytotoxicity 評価結果

(A) 左から 0, 37, 1000 nM 濃度点における細胞画像。上段に輝度のみの画像 (青: Hoechst33342, 赤: EthD-1), 下段に、セグメンテーションしたマスクを示した (青: 生細胞, オレンジ: 死細胞)。スケールバーは 100 μm 。(B) 死細胞率をヒートマップに示した図。(C) 細胞面積を指標としたときの $Z\text{-factor}$ および EC_{50} の算出結果。(D) 縦軸に死細胞率、横軸に Staurosporine (Sigma-Aldrich) 濃度をとった濃度依存曲線。エラーバーはリプリカント間の標準偏差。青線はプロットに対してシグモイドカーブにフィッティングした結果。

5 まとめ

NIS-Elements SE では新しく搭載した種々の AI 機能により簡単にアッセイを実行できる。本稿では、NIS-Elements SE に搭載している AI 技術と、Size and Morphological analysis と Cytotoxicity の2つのアッセイを例に、どのような計測が可能かを紹介した。本稿記載時にはその他11種のアッセイが搭載されており、多くの細胞評価実験に利用可能である。今後も機能の拡張や、アッセイ種の拡張を行うことで、特に創薬分野での研究の効率化、新規薬剤の探索への貢献を目指す。

引用文献

- [1] W. Buchser, M. Collins, T. Garyantes, R. Guha, S. Haney, V. Lemmon, Z. Li, and O. J. Trask, "Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging," *Assay Guidance Manual*, 2012.
- [2] T. Falk, D. Mai, R. Bensch, Ö. Çiçek, A. Abdulkadir, Y. Marrakchi, A. Böhm, J. Deubner, Z. Jäckel, K. Seiwald, A. Dovzhenko, O. Tietz, C. D. Bosco, S. Walsh, D. Saltukoglu, T. L. Tay, M. Prinz, K. Palme, M. Simons, I. Diester, T. Brox, and O. Ronneberger, "U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry," *Nature Methods*, vol. 16, pp. 67–70, 2019.
- [3] R. Katasho, T. Nagano, T. Iwasaki, and S. Kamada, "Nectin-4 regulates cellular senescence-associated enlargement of cell size," *Scientific Reports*, vol. 13, 21602, 2023.
- [4] Y. Futamura, M. Kawatani, S. Kazami, K. Tanaka, M. Muroi, T. Shimizu, K. Tomita, N. Watanabe, and H. Osada, "Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for drug target identification," *Chemistry & Biology*, vol. 19, no. 12, pp. 1620–1630, 2012.
- [5] H. -J. Chae, J. -S. Kang, J. -O. Byun, K. -S. Han, D. -U. Kim, S. -M. Oh, H. -M. Kim, S. -W. Chae, H. -R. Kim, "Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts," *Pharmacological Res.*, vol. 42, no. 4, pp. 373–381, 2000.

林 耕磨 Kohma HAYASHI
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

門井宏平 Kohei KADOI
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

柴田美智太郎 Michitaro SHIBATA
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

大井宏美 Hiromi OI
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

星野哲朗 Tetsuro HOSHINO
先進技術開発本部 数理技術研究所
Mathematical Sciences Research Laboratory
Advanced Technology Research & Development Division



林 耕磨
Kohma HAYASHI



門井宏平
Kohei KADOI



柴田美智太郎
Michitaro SHIBATA



大井宏美
Hiromi OI



星野哲朗
Tetsuro HOSHINO