

ハイコンテツイメージングシステム Opera Phenix の紹介

医学系部門 生命科学実験班

尾崎 佑子

1. はじめに

生命科学分野の研究では、様々な蛍光物質を用いて特定の細胞や蛋白質を可視化し、その局在や動態を捉えることができる「蛍光イメージング技術」が必要不可欠な実験手法となっている。原爆放射線医学研究所(以下「原医研」という)にも蛍光顕微鏡やイメージングシステムが導入されているが、こういった従来のシステムでは、高エネルギーの光を細胞に当てて可視化するため長時間の観察が困難である、使い方が複雑である、といった問題があり、研究者からは「生命現象をより正確に、早く捉えることのできる、使いやすい顕微鏡」が求められていた。

今回は、このような研究者のニーズに応えた最新機種である「ハイコンテツイメージングシステム Opera Phenix」について紹介する。

2. Opera Phenix とは

(1) 概要と特長

Opera Phenix(図 1)はマイクロプレートの蛍光ラベルした細胞のイメージを自動で取り込み、そこから得られる蛍光情報や形態情報などを数値化し、統計学的な解析を行う装置で、3つの特長を持つ。1つ目が「新しいカメラ」である。Opera Phenix は広視野かつ高感度を実現するラージフォーマット cMOS カメラを2台搭載することで、より短時間での画像取得が可能となった。2つ目が「新しい光路」で、Synchrony Optics という革新的な光学系(特許申請中)により、同時撮影時のクロストークを最小限に抑えることができるようになった。また、対物レンズの種類も豊富で、ドライレンズ、水浸レンズ合わせて7個のレンズが選択可能で、これらと組み合わせることで用途に合わせた撮像を高速かつ、高解像度で取得することが可能である。さらに3つ目は「新しいインターフェイス」

である。Opera Phenix ではすでに多くのユーザーから高い評価を得ている Harmony と呼ばれるソフトウェアを採用している。このソフトウェアでは、撮影条件の構築や、画像解析の設定など、これまで専門家でしかできないと思われていたステップを、短時間のトレーニングで誰でも実行できるようになる。

Opera Phenix は、日本ではまだ3台しか導入されておらず、大学では広島大学だけが導入している最新のハイコンテツイメージングシステムである。

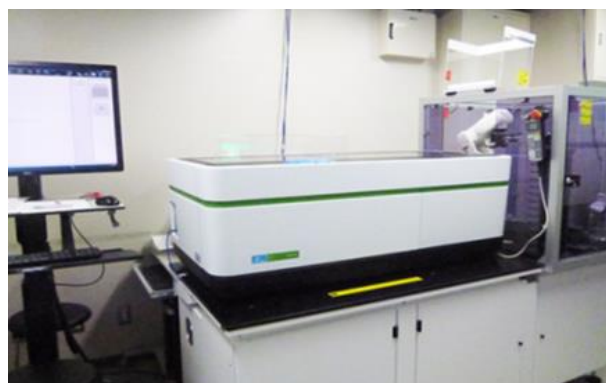


図 1. Opera Phenix

(2) 従来解析手法との比較

Opera Phenix と顕微鏡の機能を比較したものを図 2 に示す。

項目	Opera Phenix	顕微鏡
測定対象 接着細胞	☆☆☆	☆☆☆
測定対象 浮遊細胞	☆	☆☆☆
測定対象 組織切片	☆☆☆	☆☆☆
測定対象 可溶性蛋白質	—	—
処理能力	☆☆☆	☆
取得データ数	☆☆☆	☆
タイムラプス測定	☆☆☆	☆☆☆
画像/数値データのリンク機能	☆☆☆	—

図 2. Opera Phenix と顕微鏡の比較

図 2 から分かるように Opera Phenix と顕微鏡では基本的な機能は同じであるが、大きく違う点が2つあ

る。

1 つ目は、Opera Phenix が顕微鏡に比べて浮遊細胞を用いた解析にやや不向きなことである。これは Opera Phenix に限らず、他のハイコンテツイメージングシステムにも当てはまるが、その名の通り浮遊している細胞を観察するため、振動等で細胞が動くことがあり、焦点が大きくずれてしまうなどの問題が生じるためである。そのため、浮遊細胞を用いて解析を行う場合は、プレートを軽く遠心し細胞を底に集めるなどの対応をした後に解析を行うことが望ましい。

2 つ目は、Opera Phenix は処理能力、取得データ数とも顕微鏡に比べはるかに優れており、また、細胞形態情報や複数の蛋白質の局在、発現情報などをリンクさせた結果が得られる点である。例えば、Opera Phenix ではスライドはもちろん、6 ウェルプレートから最大 1536 ウェルプレートを用いた解析が可能であるが、顕微鏡ではスライドやシャーレなどに限定され、1 回で観察できるサンプル数が大きく違ってくる。また、顕微鏡ではオプション解析ソフトウェアによる解析が必要であるが、Opera Phenix は付属の Harmony ソフトウェアを用いることで簡単に蛍光強度、細胞の大きさや形状などの形態変化、蛋白質局在など様々な情報を数値化し、解析を行うことができる。

次に、Opera Phenix と従来イメージングシステムの機能を比較したものを図 3 に示す。

	Opera Phenix	従来イメージングシステム
共焦点光学系	○	×
水浸レンズ	○	×
撮影・解析時間	速い	遅い
搭載カメラ	2台	1台
ソフトウェア	簡単	複雑

図 3. Opera Phenix と従来システムの比較

Opera Phenix は共焦点光学系を有するため、焦点距離が違う厚みのある試料であっても、ボケの少ないクリアな像を得ることができる。また、水浸レンズを採用することで、ドライレンズと比較してより高画質な画像を得られるようになった。さらに、2 台のカメラを搭載し、2 色同時に撮影することで、撮影速度、解析速度ともに速くなっている。例えば 96 ウェルプレート、

1 視野で 3 色同時に撮影した場合、約 3 分で撮影が完了する。また、4 本の固体レーザーを搭載し、明視野光源には細胞へのダメージを最小限に抑えることができる 740nm 波長の LED 光源を用いることで、細胞毒性が低いという点から、従来システムに比べて生命現象をより正確に捉えることができるようになった。また、前章でも述べたように、解析ソフトの使い方も簡単で、まさに最新の機能を兼ね備えた機種となっている。

(3) 操作の流れ ～撮影から解析まで～

Opera Phenix の操作は Harmony ソフトウェア画面上に表示されるナビゲーションバー(図 4)にある Setup(画像取得条件設定)、Run Experiment(画像取得)、Image Analysis(画像解析プロトコル作成)、Evaluation(解析・結果表示)に沿って行うことで、撮影から解析までを進めることができる。



図 4. ソフトウェア Harmony

ここで、簡単に操作の流れを記す。まず、専用のプレートに細胞を播種、培養し、ラベリング等の処理を行い、プレートを Opera Phenix にセットする。次に「Setup」で画像取得条件の設定、例えば、対物レンズや光源パワーの設定、使用する蛍光物質や露光時間の設定、撮影するウェルやウェル内の場所などの設定を行う。画像取得条件設定後「Run Experiment」で設定した条件を呼び出し、スタートボタンを押すと、画像の取込みが開始される。図 5 は実際に撮影した画像で、青色が核(DAPI)、緑色が微小管(Tubulin)、黄色が細胞骨格(Phalloidin)を示している。40 倍(左写真:ドライレンズ)でも解像度の高

いきれいな画像を得られるが、63倍(右写真:水浸レンズ)を使用すると、細胞内の細かい構造までさらに高感度に撮影することが可能である。

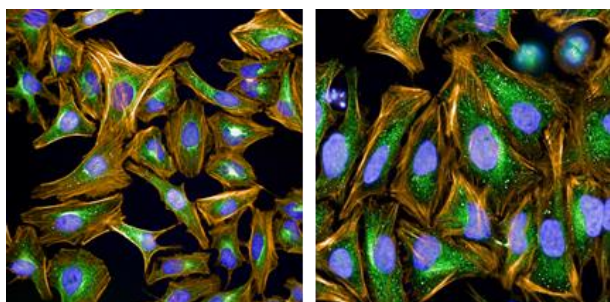


図 5. 実際の画像 (提供:Perkin Elmer)

画像取得後は「Image Analysis」で、画像解析プロトコルの作成を行う。ここで、Opera Phenix の画像解析について詳しく紹介する。画像解析は細胞領域を指定する「見つける (Find)」, 指定した領域の計算を行う「測る (Calculate)」, 細胞集団を選択する「選ぶ (Select)」を繰り返すことで実行される。Perkin Elmer 社はそれぞれをブロック単位でまとめて分かりやすくした Building Block という階層構造を作成した (図 6)。

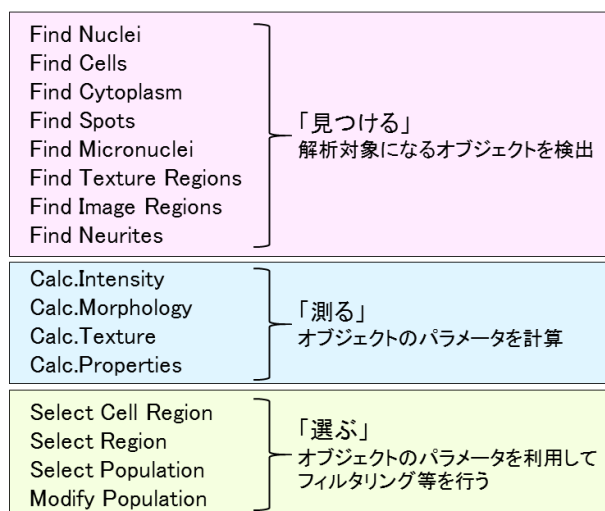


図 6. Building Block 構造

これにより、ハイコンテツイメーシングシステムにおける最大の問題点であった解析プロトコルの作成が誰でも簡単に行えるようになり、画像から必要な数値パラメータを思いのままに取り出せるようになった。Opera Phenix で解析を行う場合、Ready Made

Solution という予め作成されている解析プロトコルを適用し解析を行う方法と、自分で Building Block の解析コマンドを組み立てて解析を行う方法を選択することができる。前者の場合、すでに「見つける」「測る」「選ぶ」の解析コマンドがそれぞれ組み立てられているため、蛍光色素などを選択していただくの簡単な操作で解析プロトコルを作成することができる。一方、後者はそれぞれのコマンドの意味を理解した上で組み立てていく必要があり、少し煩雑であるが、自分の研究目的にあったプロトコルを作成することができるため、後者の方法を用いて解析プロトコルを作成する研究者が多いようである。

最後に「Evaluation」で、解析・結果表示を行う。解析結果は数値としてだけではなく、棒グラフ、散布図、ヒートマップなど様々な形で表示ことができ、自分に合った形式で結果を表現することができる。

(4) Opera Phenix の構成とデータ管理

Opera Phenix の構成を図 7 に示す。

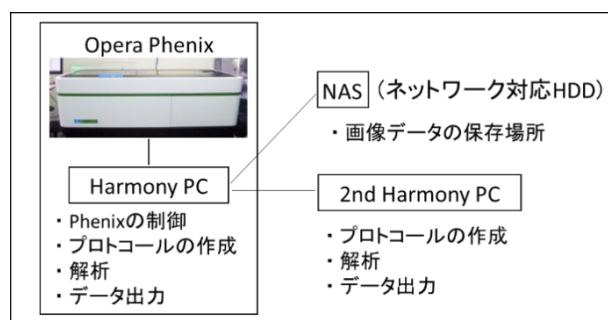


図 7. Opera Phenix の構成

Opera Phenix は Harmony と呼ばれる PC により制御されている。この PC は Opera Phenix の制御だけではなく、プロトコルの作成や解析、データの出力を行うことができる。また、大量の情報を扱う Opera Phenix は、画像撮影と解析を同時に行うと PC に過大な負荷がかかるため、画像を撮影中に解析等を行う場合は、もう 1 つの PC (2nd Harmony と呼ぶ) を用いて解析等を行う。この PC は Harmony PC とほぼ同じ機能を有しているが、Opera Phenix の制御はできない。

また、データ管理において、例えば、通常の顕微

鏡で画像を撮影する場合、1回で撮影する枚数は限られており、そこまでデータ容量が大きくなることはない。しかし Opera Phenix では、仮に 384 ウェルでそれぞれ 9 箇所撮影を行い、さらに 3 色同時に撮影を行った場合、1回の撮影で約 1 万枚の画像を取得することとなる。その際、1枚あたりの画像サイズは顕微鏡で撮影したもの(約 4MB)と大差ないが、合計すると約 40GB となり、1度で大量のデータ容量となる。1回の撮影でこれだけの容量を必要とするため、データの保存には何らかの対策が必要である。そこで、原医研では NAS(Network Attached Storage)と呼ばれるネットワーク対応ハードディスクドライブ(HDD)を採用した。Opera Phenix で取得した画像データは一時的に Harmony PC に保存された後、Harmony ソフトウェアの Relocate 機能により定期的に NAS へと自動転送される仕組みになっており、容量不足によるシステム障害が生じないようにしている。最近では様々な容量の NAS が販売されており、先ほどの例のように、1回の実験で 40GB の画像を取得する場合、12TB 容量の NAS であれば、300 回同じ実験を行うことが可能となる。

また、複数の研究者が同時に解析を行いたいという要望から、原医研ではクラウド型の Columbus と呼ばれるネットワークシステム(図 8)を採用している。

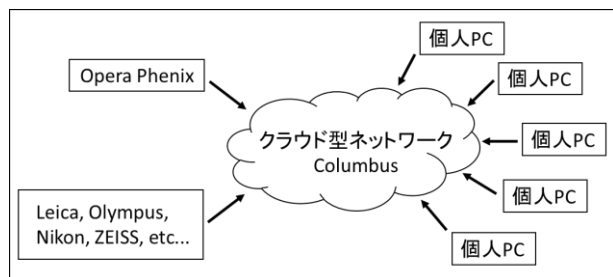


図 8. クラウド型ネットワークシステム Columbus

Columbus はイメージデータの保存、閲覧、解析、検索から、ユーザー管理までを一元化できる生命科学向けのイメージデータベースシステムである。Harmony ソフトウェアでは Opera Phenix で撮影した画像や.jpg や.tiff などの一般的なイメージファイルの保存・解析は可能であるが、各社顕微鏡のファイルフォーマットには対応していない。これに対し

Columbus は一般的なイメージファイルだけではなく、Opera Phenix はもちろん、各社顕微鏡のファイルフォーマット、例えば Carl Zeiss 社の.lsm, Olympus 社の.oif, Nikon 社の.nd2 などにも対応している。また、Harmony ソフトウェアは同時に複数の PC からアクセスすることはできないが、Columbus では同時に 5 つの PC からアクセスが可能である。

3. おわりに

原医研では多くの共通機器を導入しており、私達技術職員はこれらの機器の維持・管理や操作方法の説明、機器トラブル対応等の利用支援を行っている。その際、的確な対応を心掛けているが、そのためには専門用語など、機器に関する知識が必要となってくる。そこで、研究者の先生方に充実した研究環境を提供できるよう、今後も機器に関する知識を幅広く習得し、日々進歩する分子生物学の情報収集を行なうなど、自己研鑽を積んでいきたい。

最後に、Opera Phenix はこれまでのイメージングシステムに比べ、機能が充実しているだけでなく、使い方も簡単で、慣れれば誰でも簡単に操作・解析を行うことができるようになっている。機会があれば是非ご利用いただきたい。

参考資料

- Perkin Elmer 社
<http://www.perkinelmer.co.jp>
- GE ヘルスケアジャパン株式会社
<http://www.gelifesciences.co.jp>