



Cell3iMager Estier を用いた 皮膚モデルの厚み評価

はじめに

皮膚モデルとして、インサートウェル上に積層されたシート状の表皮組織が広く用いられています。積層組織のフェノタイプの1つとして、組織そのものの厚さが知られており、これは形態的な変化を捉えるための有効な手段の1つとなっています。一般的な厚さの測定方法として、パラフィン包埋法(*1)により組織切片を作製し、顕微鏡にて組織上部から下部までの長さを測定する方法がありますが、侵襲的な評価方法であるため、その他のアッセイを行うことは一般に困難です。また、組織切片での評価であるため局所的な評価となってしまう、組織全体の厚さ分布といった特徴を捉えるが難しいことや、パラフィン包埋により組織本来の形状を維持できないことがあるといった問題が指摘されています。

Cell3iMager Estierが搭載するOCT (Optical Coherence Tomography) 技術は立体的組織を断層画像として描出する技術で、使用する近赤外領域の光は生体透過性に優れ、細胞障害性が低いことがメリットです。

本実験では、皮膚モデルにどのような厚みの変化が起きるのか、Cell3iMager Estierを用いて非侵襲的に3次元画像の取得と、厚み分布の解析を行いました。

*1 パラフィン包埋法

… 組織切片を作成するためのブロックを形成する手法の1つ

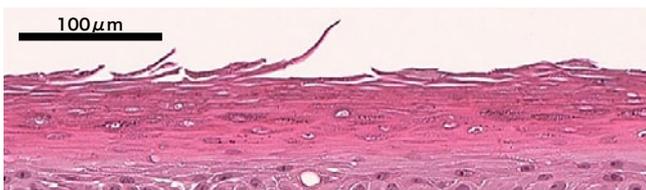


図1: 皮膚表皮モデル切片の顕微鏡画像

本実験では、表皮層における角質層と細胞層の厚さに着目しています。

Materials&Methods

使用製品

Cell3iMager Estier

外部ツール

Python (データ解析に使用)

サンプルおよび試薬

LabCyte EPI-MODEL 24

(株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)

ラウリル硫酸ナトリウム (SDS, ナカライテスク株式会社)

方法

LabCyte EPI-MODEL 24 (以下、「皮膚モデル」) を標準プロトコールに従って培養し、Cell3iMager Estierを用いて撮像を行いました。

Cell3iMager Estierの撮像方法には、高倍率モード (解像度3 μ m、最大撮像範囲(X-Y) 1000 μ m四方) と、低倍率モード (解像度10 μ m、最大撮像範囲(X-Y) 10000 μ m四方) があります。本実験ではそれぞれの倍率モードに対して、表1の条件で撮像を行いました。

取得した断層画像をもとに、皮膚モデルの表皮層領域 (低倍率モード)、表皮層の各レイヤー領域 (角質層・細胞層) (高倍率モード) の抽出とその厚さの定量化を行いました。

	高倍率	低倍率
Scan Length (μ m)	1000	8000
Scan Width (μ m)	1000	8000
Pitch (μ m)	2	10
Scan Height (μ m)	<350	<700
Layer Pitch (μ m)	20	50
Exposure Time (μ sec)	150	150

表1: 本実験での Cell3iMager Estier設定条件

領域抽出には、フィルタ処理と輝度値による2値化処理を用い、本実験での皮膚モデルの厚さは各X-Y平面上の座標点における、Z軸方向の厚さを情報としました。

高倍率モードにおいては、層構造の抽出にDeep Learning技術の1つであるセマンティックセグメンテーションを用いました。学習データとして、断片的な各層のラベル付き断面画像を用意しました。

組織切片の形態確認にはH&E染色を行いました。

結果

低倍率モードによる皮膚モデルの観察

まず、皮膚モデル全体の厚さ分布を定量化することを目的として、低倍率モードを用いて撮像をしました。Cell3iMager Estierによって撮像を行ったところ、インサートの上に積層化した皮膚モデルを捉えられていることがわかりました。(図2) 特に、Scratchedサンプル(マイクロピペットチップの先でサンプル中央部に傷をつけたサンプル)では中央部分が削れて薄くなっていることが確認できました。つまり、24well インサート内の皮膚モデル全体を3次元撮像することが可能であることが確認できました。

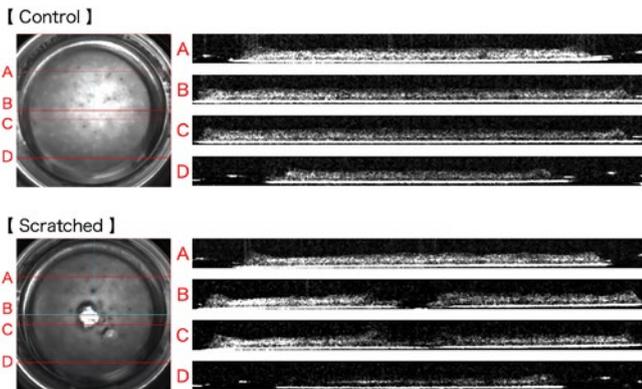


図2: Cell3iMager Estierを用いた皮膚モデル撮像結果 (低倍率モード)

(左) 顕微鏡画像

(右) Cell3iMager Estier撮像結果

(顕微鏡画像におけるA-D位置の断面を表示)

続いて、皮膚モデルの中央部分をチップ先で傷をつける前後でCell3iMager Estierを用いて撮像を行い、取得した断面画像をもとに皮膚モデルの表皮層領域の抽出をしました。(図3)

抽出結果から、それぞれの位置における厚みを算出し、ヒートマップ化を行いました。(図4)

傷をつけた領域(中央部)の厚みが減少しており、損傷領域から損傷領域周辺部に押しだされた細胞層・角質層により、厚みが増加していることが視覚的に確認することができました。さらに、厚み情報のヒストグラムから、0~100 μm、200 μm~の区間において、傷をつける前後で増加傾向がみられました。(図5)

このように、損傷領域の厚み減少と周辺部の厚み増加を、厚み分布から定量的に捉えられることが確認できました。

したがって、皮膚モデルの全体の厚さの分布を定量化することが可能であることがわかりました。

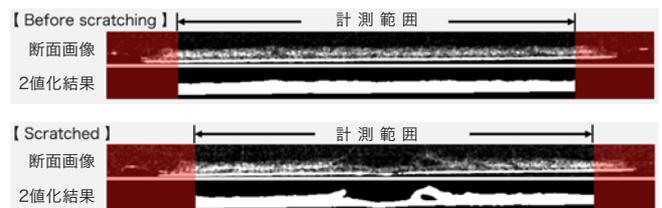


図3: Cell3iMager Estierを用いた皮膚モデル撮像結果と表皮層の2値化結果(低倍率モード)

メンブレン中心90%のエリアを計測範囲としました。

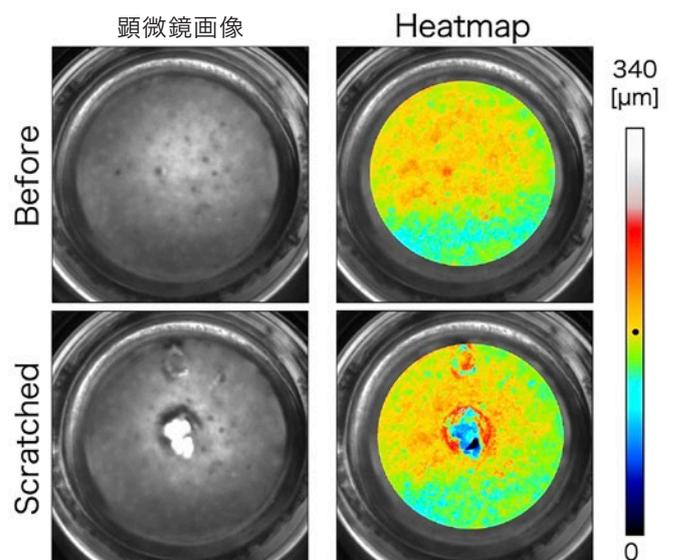


図4: 算出した厚み情報のヒートマップ

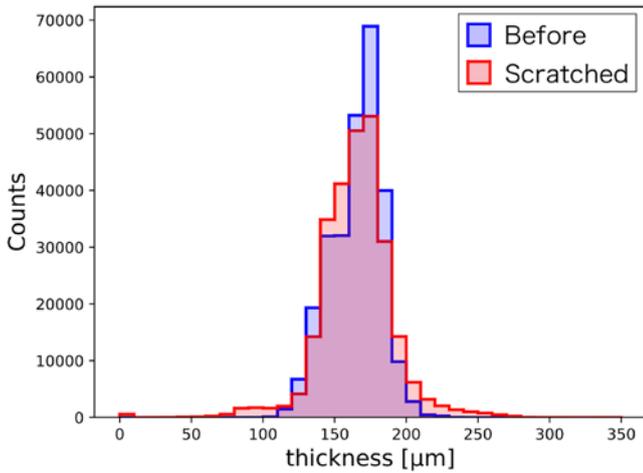


図5: 算出した厚み情報のヒストグラム(低倍率モード)

高倍率モードによる皮膚モデルの観察

次に、表皮層を構成する角質層・細胞層をレイヤーごとに定量することを目的として、Cell3iMager Estierの高倍率モードを用いて撮像をしました。皮膚モデルの中央部分にチップの先で傷をつけたサンプルを対象として、傷がついていない部分と傷がついた部分の撮像を行いました。断面画像からシグナル強度の異なる構造が層状に積層していることが確認されました。(図6) また、チップの先で傷をつけた部分においては、この層構造境界付近で上の層がはがれていることが確認できました。(図6-下)

さらに、各層構造を抽出しわけけることを目的として、Deep Learningによる領域抽出を行いました。(図7) 結果、チップの先で傷をつけた部分のような複雑な構造に対しても、各層構造の領域抽出が可能であることがわかりました。

次に、Cell3iMager Estierにより抽出できた2つの層構造(図7-黄および図7-緑)が、図8のような組織切片での角質層と細胞層の各構造を表現していると仮定し、組織切片との厚さの比較を行いました。Cell3iMager Estierでは、1mm四方の範囲の各地点での細胞層の厚みを測定しました。その比較として、H&E染色した組織切片3切片分に対してそれぞれ細胞層の厚さを5点測定し、合計で15点分測定しました。(図9)

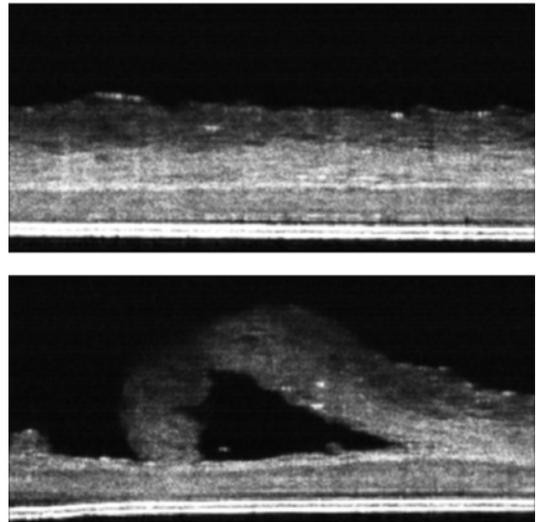


図6: Cell3iMager Estierを用いた皮膚モデル撮像結果(高倍率モード)
(下) チップ先で傷をつけた部分の結果

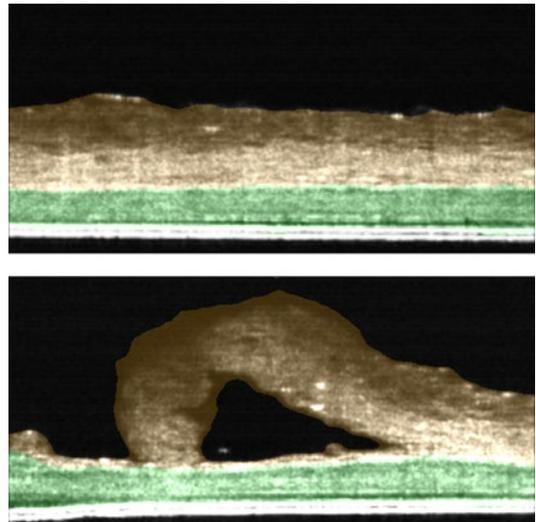
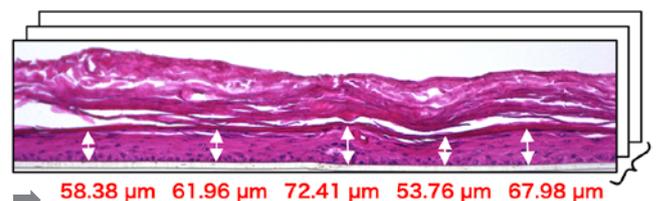


図7: Cell3iMager Estierを用いた皮膚モデル撮像結果の層構造の抽出結果
(下) チップ先で傷をつけた部分の結果



図8: 皮膚モデルの H&E染色組織切片



5点測定 x 3切片 = 15点測定

図9: H&E染色組織切片からの細胞層厚み計測方法

図10は、Cell3iMager Estierと組織切片での厚さ測定における比較結果になります。このように、組織切片からの厚み測定と有意な差は認められない結果が得られており、観察できた層構造が細胞層と角質層の構造を表現できていると考察可能な結果が得られました。

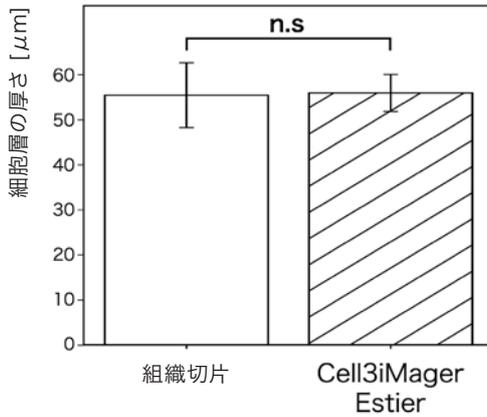


図10: 皮膚モデルの細胞層厚み計測結果

高倍率モードによる皮膚モデルの観察

次に、皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験に、Cell3iMager Estierによる厚み計測を応用することができないか検証をしました。皮膚モデルにdH2Oと0.3% ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) をそれぞれ60分間曝露したものを、低倍率モードで撮像を行いました。(図11)

各条件で、それぞれの位置における厚みを算出し、ヒートマップ化(図12)とヒストグラム化(図13)を行いました。厚み情報のヒートマップならびにヒストグラムから、SLS曝露により、全体の厚みが増加することがわかりました。

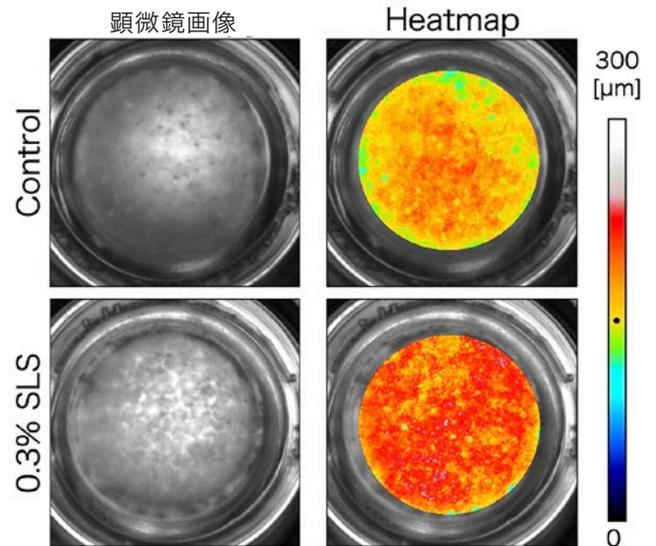


図12: 算出した厚み情報のヒートマップ(低倍率モード)

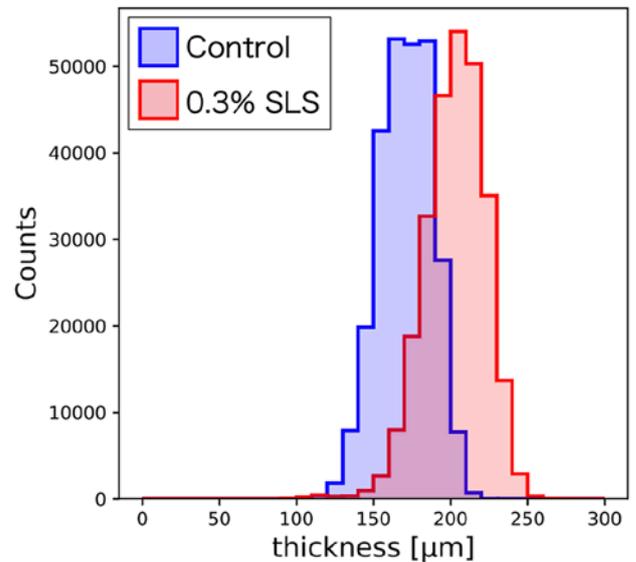


図13: 算出した厚み情報のヒストグラム(低倍率モード)

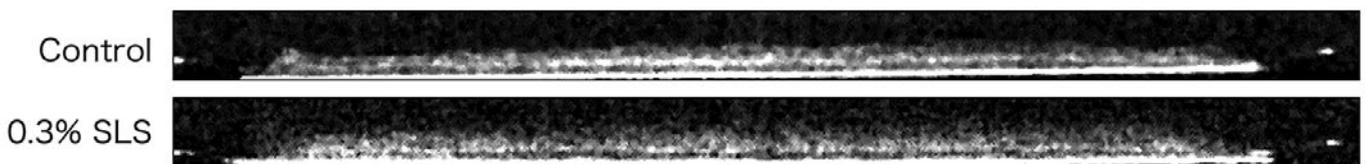
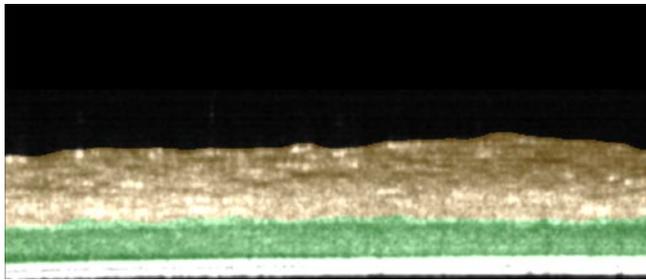


図11: 曝露後の皮膚モデル Cell3iMager Estier撮像結果(低倍率モード)

さらに高倍率モードで撮像を行ったところ、試薬添加後においても、[図6-7](#)と同様に層構造を確認することができました。また、Deep Learningを用いることで、各層構造の領域を抽出しわけることができました。[\(図14\)](#)

抽出結果から、それぞれの層に対して厚さの計測を行ったところ、コントロール・SLS曝露サンプル間において、細胞層では変化が少ないのに対して、角質層ではSLS曝露サンプルの厚さが大きく増加しているのが確認できました。[\(図15\)](#) [\(図16\)](#) したがって、皮膚刺激性試験における、2層(角質層・細胞層)の厚み分布変化を定量化可能であることが示唆されました。

Control



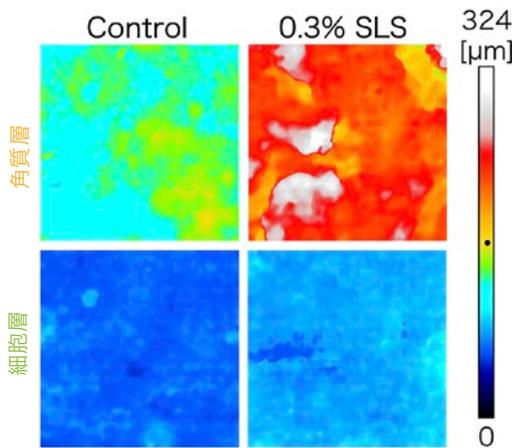
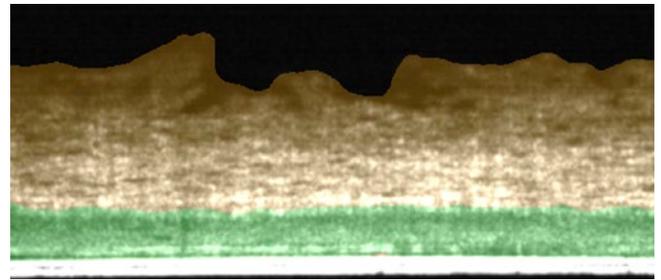
[図14](#): 曝露後の層構造の抽出結果(高倍率モード)

まとめ

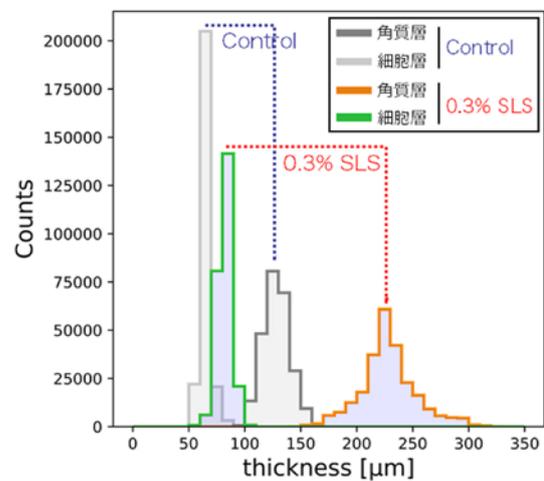
本実験により、Cell3iMager Estierを用いることで表皮皮膚モデルの厚み計測が可能であることがわかりました。また、低倍率モードにより、24well インサート内全体の厚み情報を取得することができました。高倍率モードでは、細胞層・角質層の2つの層の厚み情報を非侵襲的に取得することができました。

非侵襲的な撮像が可能なCell3iMager Estierを用いることで、例えば刺激性試験などにおける、細胞積層シートの厚さ変化をリアルタイムで取得することができます。

0.3% SLS



[図15](#): 曝露後の各層の厚さ情報のヒートマップ(高倍率モード)



[図16](#): 曝露後の各層の厚さ情報のヒストグラム(高倍率モード)

株式会社 SCREENホールディングス

京都(本社) / 〒602-8585 京都市上京区堀川通寺之内上る四丁目天神北町1番地の1

ライフサイエンス事業室

京都(洛西) / 〒612-8486 京都市伏見区羽東師古川町322
Tel: 075-931-7824 Fax: 075-931-7826

東京 / 〒135-0044 東京都江東区越中島一丁目2-21 ヤマトネビル7階
Tel: 03-4334-7977 Fax: 03-4334-7978

<https://screen-cell3imager.com/>

各種お問い合わせは
こちらのQRコードから

