

利点

- A.I.による魚と器官の識別
- 方向ベースの魚のデータ採用または除外
- 明視野および蛍光画像測定
- 専用プレートで80%の意図した横方向の魚のデータ取得

Application Note

尾部領域におけるストレス依存性幹細胞応答の自動化された深層学習ベースのゼブラフィッシュ画像解析

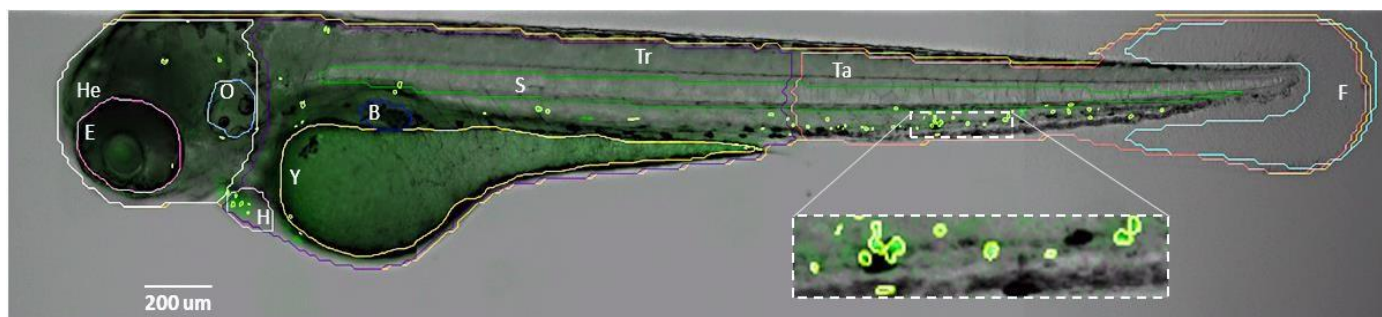


図1-GFPタグ付き幹細胞を持つトランスジェニックゼブラフィッシュ(4dpf)のオーバーレイ画像。Zスタック画像は、WiScan® Hermes HCS顕微鏡の明視野および緑色蛍光チャンネルで4倍の倍率で取得され、後述のように処理された。AI搭載の新しいゼブラフィッシュ解析アルゴリズムは、ここに示すように、魚の外郭、内臓、3つの体領域[頭部、体幹、尾部]を自動的に識別する。構造アウトラインは、魚の解剖学的構造の2チャンネル共同解析と、蛍光タグ付けされた関心細胞(GFPタグ付き幹細胞、ズームインでは薄緑色のクラスター)を示している。

器官標識: E = 眼 [濃いピンク]、O = 耳小胞 [水色]、Y = 卵黄嚢 [黄色]、B = 膀胱 [濃い青]、H = 心臓 [薄いピンク]、S = 脊椎 [濃い緑]、F = ヒレ [シアン]、体の区分: He = 頭部 [白]、Tr = 体幹 [紫]、Ta = 尾部 [オレンジ]

はじめに

ゼブラフィッシュ(Danio rerio)は、ヒトの疾患の遺伝子型、表現型、治療法を研究するための魅力的なモデル生物であるが、その可能性はまだ十分に研究されていない。

特に造血は、幹細胞の生成、維持、移動、分化を調べるために、動物全体を使った研究からすでに恩恵を受けている[1]。ゼブラフィッシュは疾患モデルとしての利点があるにもかかわらず、薬物スクリーニング研究では、形態学的変化やその他の変化をハイスループットで定量化するためのデータ取得と解析の自動化に関する困難さのため、あまり利用されていない。ユニークな課題は、適切な構造の可視化を可能にするために

魚を適切に横向きにすることである。ここでは、IDEA Bio-Medical社が開発した人工知能(A.I.)を搭載した新しい画像解析ツールについて説明する。このツールは、マイクロウェルプレート内の顕微鏡で可視化したゼブラフィッシュと内臓のスクリーニングと定量を、パラメーターなしで行うことができる(図1)。

ここでは、IDEA Bio-Medical社が開発した人工知能(A.I.)を搭載した新しい画像解析ツールについて説明する。このツールは、マイクロウェルプレート内の顕微鏡で可視化したゼブラフィッシュと内臓のスクリーニングと定量を、パラメーターなしで行うことができる(図1)。

[1] Bolli, N., et al. "cpsf1 is required for definitive HSC survival in zebrafish" *Blood* (2011) **117**, pp 3996-4007, DOI: [10.1182/blood-2010-08-304030](https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-304030)

方法

プレートの準備

Hermesイメージングシステムは、35mmディッシュや6、12、24、48、96、384、1536ウェルのプレートなど、あらゆるサンプルフォーマットに対応可能である。さらに、Hermesは、丸底ウェルを含むSBS標準に準拠したプレートのカスタム定義が可能である。

市販されているプレートには、小型の魚に適したものもあれば、魚を横向きにしやすいものもある。詳細はIDEA Bio-Medical社（日本ではプネウム株式会社）に問い合わせされたい。

ウェルあたり1匹が推奨されるが、ウェルあたり複数匹でも対応可能である。加速と減速を最大にしなが、～200 gで5～10秒間プレートを静かに遠心することで、ウェル底に魚が横向きになるようにすることができる。このステップに加え、プラスチック製の長いゲルローディング用チップを用いた手動のオリエンテーションも可能である。

ユーザーは、上記のステップの有無にかかわらず、後処理分析中に自動的に望ましい横方向の魚サンプルを選択することができる。後処理で選択する場合、定義された器官（表1参照）を有する魚がプレート全体から抽出される。

注意：撮影前に培養水を交換して大きなゴミを取り除くことが重要である。粉塵を避けるため、ヒュームフードの下で作業を行うことが望ましい。

画像取得

ゼブラフィッシュの画像取得は、Zスタック取得を使用した蛍光明視野で行うことを想定している。シングルプレーンイメージングもサポートされており、スループット率が向上する。Hermes特許のオートフォーカスシステムにより、96ウェルプレート全体のスキャンを2分以内に行うことができる。サポートされている倍率（2X～60X）のいずれでも魚の画像化に使用可能である。最適なイメージングでは、2倍または4倍の対物レンズとHermesの正確なモーション機能を利用し、魚全体のスティッチされたモンタージュを作成する。

魚全体ではなく、特定の構造をより高解像度で撮影するには、より高い倍率を推奨する。このような撮像は、Hermesのオブジェクトマッピングアプリケーション（レアイベント）と組み合わせると最も効率的である。この方法では、低い倍率（2倍～10倍）でウェルの中の魚を検出し、同じ倍率または高い倍率（4倍～60倍）で自動的にスキャンを行い、目的の場所だけのZスタックを得ることができる。

画像の前処理

Hermesシステムに付属する撮影後のバッチ画像処理ソフトウェアにより、ユーザーはいくつかの撮影オプションから選択することができる：

- Zスタック取得の最適なスライス選択と強度投影
- 複数の視野にまたがる魚のステッチング／モンタージュ処理
- スポット検出を強化する蛍光デコンボリューション

Table 1 – Object Identification

Objects Identified Automatically			Features Extracted
- Fish Outline	- Brain	- Granules & Spots	- Area
- Yolk Sac	- Bladder		- Count
- Eye	- Heart	- Fish Regions	- Fluorescence Intensity
- Tail Fin	- User-definable Organ (Drawn Manually)	➤ Head	- Shape
- Spine		➤ Trunk	
		➤ Tail	

明視野画像 は、IDEA Bio-Medicalが開発した独自の人工知能(AI)搭載アルゴリズムによって解析される。ユーザー入力の必要なく、明視野中のゼブラフィッシュとその内臓が自動的に検出される。

蛍光画像 は、明視野と併用して臓器内の蛍光を測定し、顆粒、斑点、その他の標識構造を任意の色数で識別することができる。

Athena Zebrafishアプリケーションでは、ユーザー定義の手動描画オブジェクトも定義可能である。この機能により、興味のある器官や構造があらかじめ定義されたカテゴリーにない場合でも、容易に識別できる小規模な探索的プロジェクトが可能になる。

サンプルアプリケーション

尾部に特化した幹細胞クラスターのカウント

GFPタグ付き前駆幹細胞を持つトランスジェニックゼブラフィッシュを受精後3日まで培養した。魚は溶血ストレスにさらされ、目に見える幹細胞クラスターの数が増加した。ストレスの影響は、従来の手作業による分析法で立証されていた。ここでは、AIを搭載したAthena画像解析アプリケーションの活用により、完全に自動化された方法で期待された結果が検証された。画像取得後、魚はDNA配列決定にかけられ、野生型(WT)と変異型の遺伝子型が確認された。すべての幹細胞クラスターを確実に可視化するため、上記の画像前処理で説明したように、魚はZスタックで取得され、続いて最大強度投影と画像スティッチングが行われた。魚が検出され、頭部、体幹、尾部の3つの領域に自動的にセグメンテーションされた(図1)。幹細胞クラスターは緑色蛍光チャンネルで同定された(図2C)。

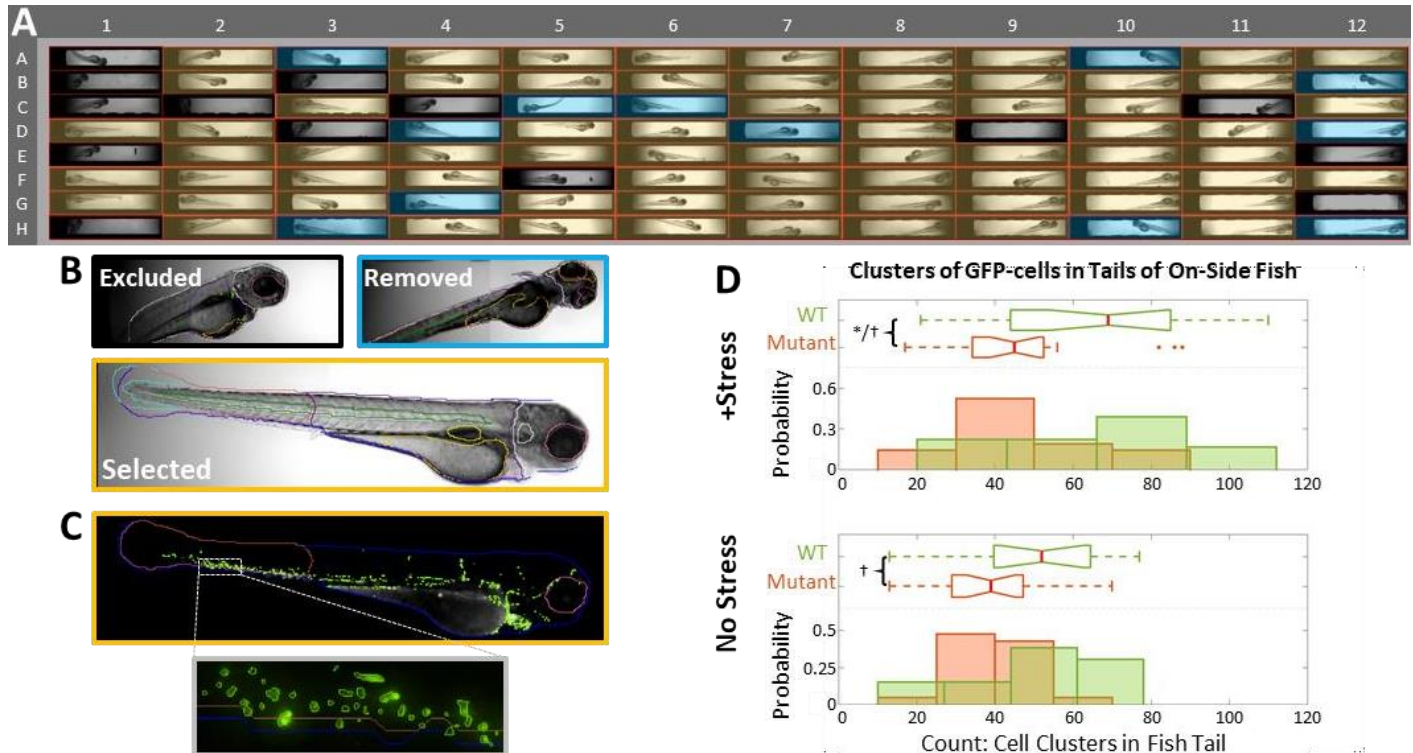


図2-方向選択によるプレート全体のスクリーニング。A) 全ウェルのプレート全体にわたる可視化: 横向き(黄)、不適切な向き(シアン)、断片化またはウェル画像領域内外(黒)。B) 内部構造(目と尾の領域)の識別により自動的に分類された3匹の魚を示す画像例[図1]。C) (B)で選択された魚の蛍光画像。魚の輪郭(青)、尾の領域(赤)、およびセグメント化された細胞クラスター(緑)を示す。D) 獲得後の遺伝子型分類(WT-野生型)後、溶血ストレスを受けた魚と対照魚の尾部領域(C)で検出された細胞クラスター数の定量化; 確率密度関数(下)とボックスプロット(上)には同じデータが含まれ、表現型の反応の違いを強調している。統計: (*) $p < 0.05$ (2標本t検定); (t) $p < 0.05$ (2標本コルモゴロフ=スミルノフ検定)

クラスターの計数は、横向きに寝ている魚の尾部に限定した(図2)。横向きの魚は、片目しか見えず、尾の領域が少なくとも0.175 mm²ある魚として選んだ。このようなサイズ要件により、尾部全体が視野内に収まることが保証された。尾部の外側、例えば卵黄囊の上にも細胞群が見えるが、それらは考慮しない。各魚の尾の細胞クラスター数を抽出し、プロット用にエクスポートした。図2Dは、予想通り、WT魚は変異体と比較して溶血ストレスに応答してより大きな表現型の変化を示すことを確認した。WT個体では細胞群数の中央値が33%増加した(52から69へ)のに対し、変異個体では15%しか増加しなかった(52から69へ)。突然変異体では15%しか増加しなかった(39から45へ)。ここで示されたような領域特異的定量化は、蛍光強度、構造的共局在化、または形態に関する腫瘍形成や免疫学的研究にそのまま適応できる。

時間の節約

サンプル処理ステップ

ゼブラフィッシュの顕微鏡観察には3つのステップが必要である: 魚のマウントによる方向の定義、イメージング、そして分析である。Hermes Zebrafishアプリケーションは、手作業の必要性を排除する。

表2 - サンプル手順比較

ステップ	Hermes	従来の顕微鏡
魚の体の向き	自動 向き 検出	手動操作
画像取得	マルチウェルプレート自動取得対応	手動
画像解析	自動 パラメータ定義 必要なし	手動 セグ メンテーション

時間投資の比較

本項では、Hermesイメージングシステムで得られるスループットと、2つの従来の顕微鏡モダリティを使用した表2の3つの実験ステップに必要な推定時間を比較する。サンプルマウンティングは、魚をマルチウェルプレートのウェルに希望する向きで入れる時間である。Athenaソフトウェアでは、分析後に向きを選択できるため、マウンティング要件に対する厳しさが少ない。マニュアルイメージングでは、記載された時間内にイメージングされるよりも多くの魚がマウントされる可能性がある。撮像判定は、経験豊富なユーザーがマルチチャンネルZスタックデータセットを取得する場合のものである。従来の解析手法では、ユーザーが各画像を個別に手動でセグメント化することを想定している。画像投影、ベストスライス選択、スティッチングなどの後処理は含まれていない。

表3 - 魚測定の必要時間

方法	Hermes	共焦点 (手動)	広視野 (手動)
魚の数	96	3	15
取り付け (分)	15	15	15
撮像 (分)	13 *	90	60
解析 (分)	5 ** 15 ***	15	30
合計時間 (分)	48	120	105
1魚あたり 時間(分)	0.5	40	7

* 4 視野、6 スライス、2 色の特殊な配向補助 96 ウェルプレート。

** 自動解析に必要なパラメータをユーザーが設定するのに必要な推定時間

*** AIによる画像解析アルゴリズムを実行するための上限計算時間。

IDEA BIO-MEDICAL LTD.

2 PROFESSOR BERGMAN ST., RABIN SCIENCE PARK, REHOVOT 76705, ISRAEL

TEL: 972-732-732-500

FAX: 972-8-9469556

WWW.IDEA-BIO.COM

INFO@IDEA-BIO.COM