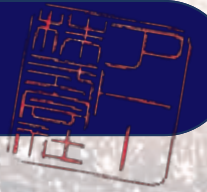


Live-cell Imaging System



Single cell Imaging
Cellgraph

*Superior performance for biological variation research
with high sensitivity, accuracy, and resolution
by ATTO imaging system*



生体内の極微弱な生物発光を捕える

セルグラフ AB-3000B は高感度 EM-CCD カメラにより一個の細胞内の微弱な発光を検出するために開発されたイメージングシステムです。

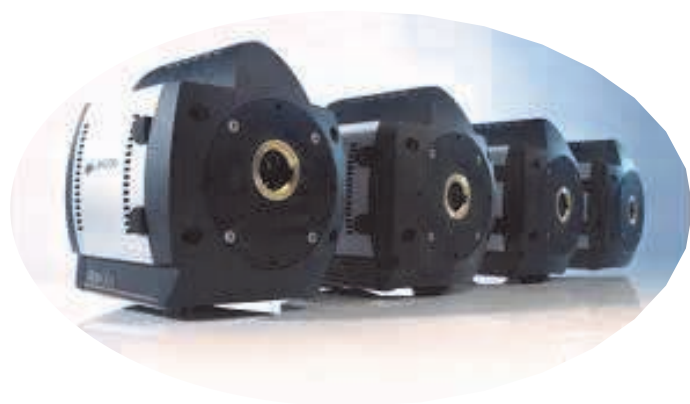
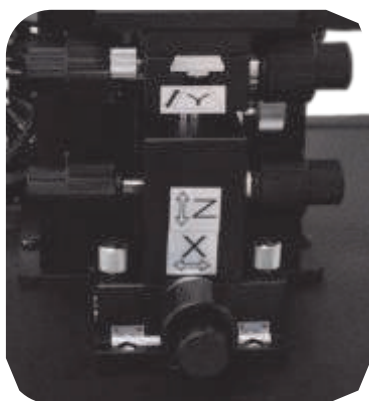
集光効率の高い光学系と最高レベルの絶対感度を有する冷却 EM-CCD カメラにより微弱発光の検出を実現しました。サンプルをセットするチャンバー内は、温度と CO₂ ガス濃度^(※)のコントロールシステムおよび加湿システムにより CO₂ インキュベーター同様の環境を提供します。そのため細胞や組織片を生きている状態で長時間にわたって観察することが可能です。また内蔵の光学フィルターによる色分離機構があり、多色のルシフェラーゼを用いたマルチカラーレポータージーンアッセイにも対応しております。さらに付属の専用解析ソフトウェアにより撮影された画像から個々の細胞の発光強度の解析が可能であり、発光強度の変化を細胞単位で継続的に追跡することができます。また光を完全に遮断するコンパクト設計なので、暗室に設置する必要はありません。フィルターの選択やライティング、撮影時間などの撮影条件やサンプルチャンバー内の環境、フォーカス合わせは専用ソフトウェアにより PC から完全にコントロールできます。

セルグラフは細胞を生きのまま長時間にわたって観察するため、そして細胞内の微弱な生物発光を捕えるために最適なイメージングシステムです。

※ CO₂ ガス導入システムはオプションになります。

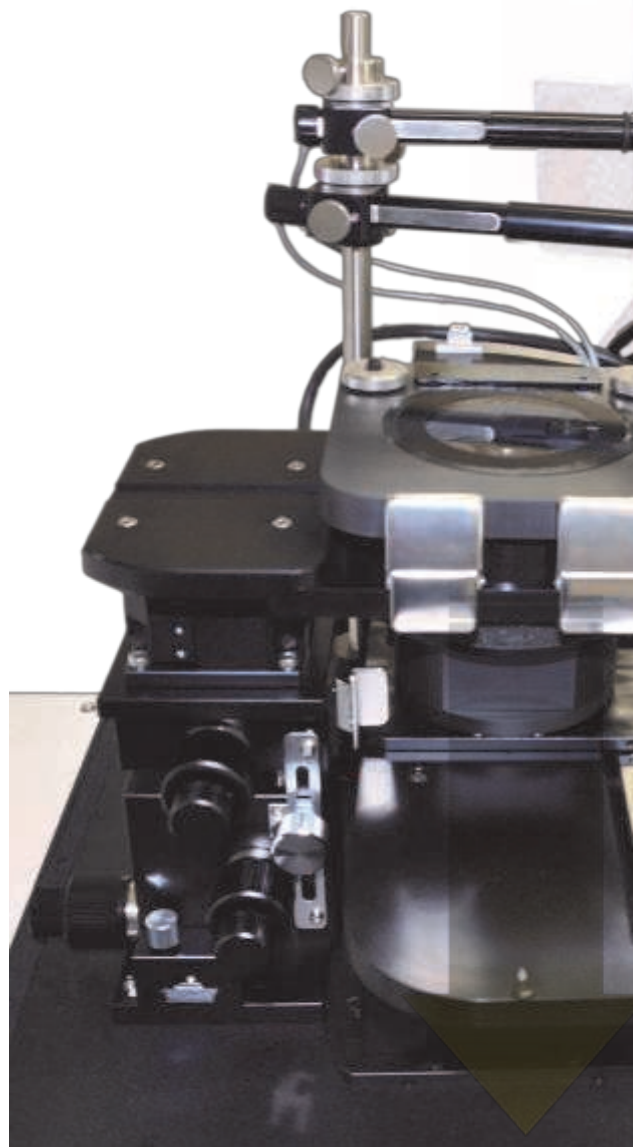
Z軸電動ステージ

発光が弱くフォーカスが合わせにくい場合、全自動でステージ (Z軸) を動かしながら撮影するモードがあります。このモードを使って最適なフォーカスを簡単に見つけることができます。



EM型超高感度CCDカメラ

シングルフォトン/カウントの絶対感度を実現したEM(電子増倍)型超高感度CCDカメラを搭載しています。



より高感度に明瞭に視覚
光は最短距離を
光量のロスを抑
明るい光学



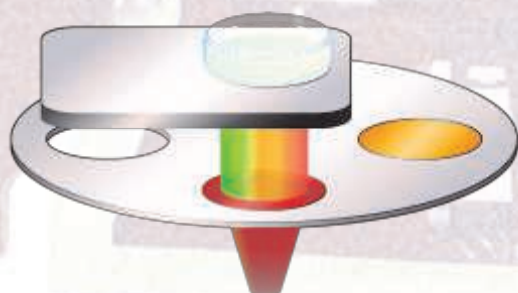
照明

明視野用のLED照明のほかに、480nmのLED透過照明が付属しているのでGFPの蛍光も観察できます。

培養チャンバー

カルチャーディッシュを設置するチャンバー内は37℃の恒温と加湿、CO₂の導入ができ、長時間の培養が可能です。

※ CO₂ ガス導入システムはオプションになります。



光学フィルター

ATTO独自の方法により、透過率の高いフィルターで分離されたそれぞれの色の発光成分のイメージングおよび定量ができます。



対物レンズ

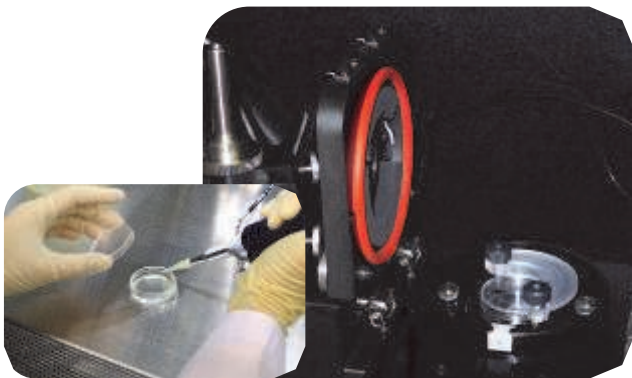
4倍から60倍まで、観察する対象や目的に合わせて様々なレンズを選択できます。

化するために
まっすぐに
えた
系

生物発光イメージングを極める

- ϕ 35mm ディッシュ上の細胞や組織サンプルを生きたままイメージング
- 温度と CO₂ 濃度のコントロール、加湿により CO₂ インキュベータ同様の環境
- EM-CCD カメラによる微弱な生物発光の高感度・高精度検出
- 複数色の微弱な生物発光を分離計測可能
- ユーザーフレンドリー設計による簡単な操作方法
- 専用ソフトウェアによる PC からの完全コントロール
- 光を完全に遮断するコンパクト設計

シンプルかつ簡単な操作



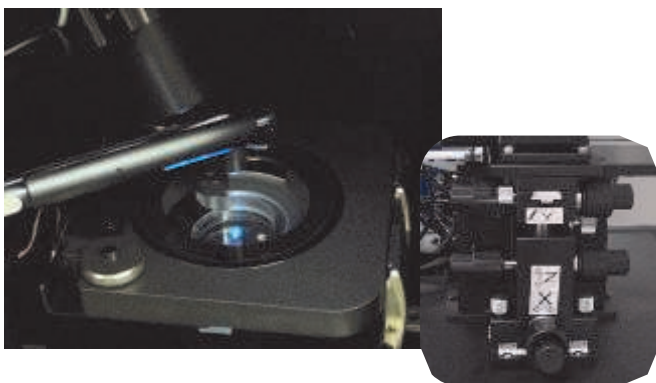
1. サンプルのセット

ルシフェリンなどの発光基質を添加したサンプルをチャンバー内にセットします。



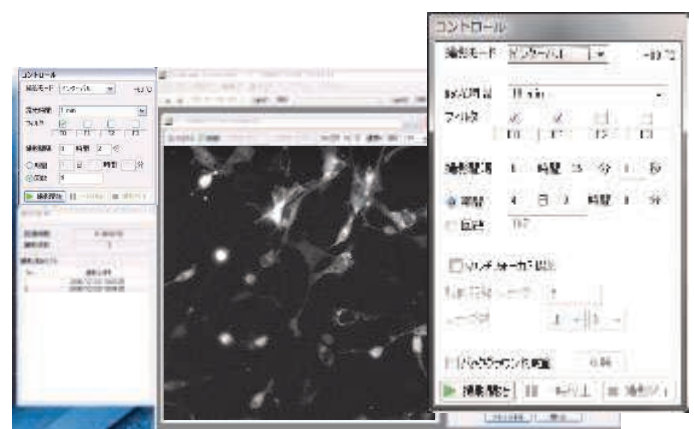
2. 対物レンズのセット

使用する対物レンズをレンズホルダーにセットします。



3. 照明とフォーカス合わせ

照明をセットし、PCの画面を見ながらフォーカスと視野を合わせます。



4. 撮影スタート

撮影条件をセットし、「撮影開始」をクリックすると撮影が開始します。

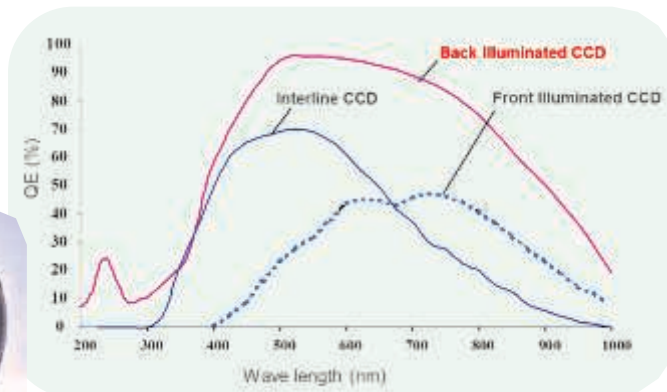
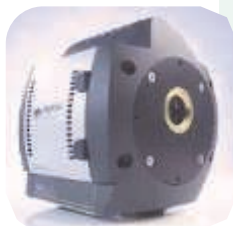
最高のパフォーマンスを実現する明るい光学系

超高感度EM-CCDカメラ

絶対感度 1カウント/フォトン (534nm) を実現した高感度バックイルミネート型冷却CCDを搭載しました。絶対感度はレーザー光源を用いた独自の方式によって求めています。この絶対感度試験により、焦点位置における総発光量を光子数として換算することも可能になりました。(特許3585439)

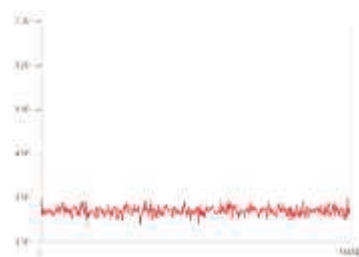
EM (Electron Multiplying) ゲインを設定して信号を増幅することにより、短時間の露光時間での撮影も可能です。

有効画素数: 512×512
画素サイズ: 16(W)×16(H) μm
イメージエリア: 8.2×8.2 mm
量子収率: 90%以上



※CCDカメラの選択はカスタマイズ対応できます。

ノイズレベル



-90°Cの冷却によるノイズ低減

CCDは露光時間が長くなるに従ってノイズレベルが高くなります。左図はセルグラフにより10分間の露光時間で撮影したダークイメージを示しています。一般的なCCDカメラと比べるとほとんどノイズがありません。セルグラフ搭載のEM-CCDカメラは、水冷による-90°Cの冷却によって(空冷では-80°Cの冷却)ノイズを最小限に抑えているため、60分間の長時間露光撮影にも対応しています。

※水冷冷却システムはオプションになります。

ダークイメージ



冷却CCDカメラ

セルグラフのEM-CCDカメラ

明るい低倍率対物レンズ

レンズを選択する上で最も重要なポイントは開口数「NA」です。同じ倍率レンズの場合、NAの値が数値が大きいほど分解能が高くて明るい像を結びます。したがって極微弱な生物発光の観察には開口数の大きなレンズが適しています。セルグラフは、組織切片等の観察に最適な光学倍率4倍レンズのNA=0.53(一般の4倍レンズ; NA=0.1~0.2)を実現しており、低倍率像を非常に明るく撮影できます。その他10、20、40、60倍などNAの大きな高倍率用の対物レンズも用意しております。



セルグラフ専用4倍レンズ

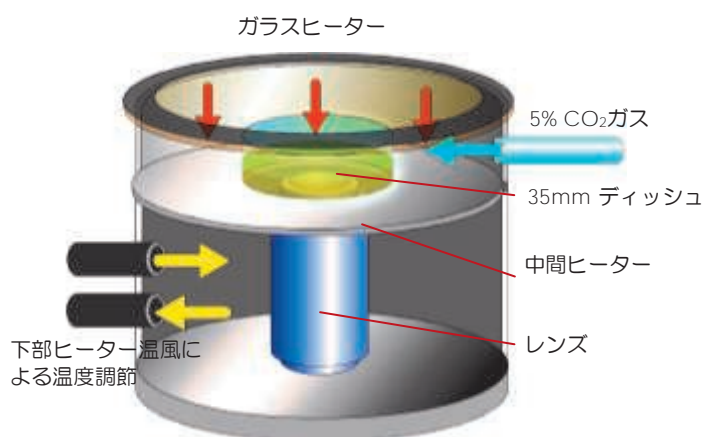


生きている細胞の観察に最適な環境設計

細胞にやさしいインキュベーター機能

セルグラフは 細胞培養用CO₂インキュベーターと同様のインキュベーター機能があります。細胞あるいは組織を生きたまま長時間にわたって観察するために適した環境（温度、CO₂ガス濃度、湿度）が、安定して供給されます。

セルグラフのインキュベータ内部は右図のような構造になっています。空調による温度調節とガラスヒーターによる恒温装置を装備しており、室温20℃で使用した場合には25～45℃に設定して、長時間にわたって一定温度に保つことができます。またCO₂ガスは、CO₂ガス導入ユニット(*)により5%に調整された適度に加湿された状態で導入されます。また観察の途中で、刺激剤等の試薬をインジェクションできるインジェクションユニットや培地を灌流できる灌流ユニットなどのカスタマイズもオプションで対応しています。



CO₂ガス導入ユニット

細胞や組織を長時間培養するときに用いるCO₂導入ユニットです。CO₂ガスは5%の濃度で加湿された状態で供給されます。



カルチャーインサート

組織切片を培養・観察する場合には、カルチャーインサート (Millipore社 Millicell、PICM ORG 50)に組織切片をセットします。



インジェクションユニット

観察途中で細胞や組織を刺激する薬剤の投与に使用するインジェクションユニットです。インキュベータ加湿用滅菌水の補充にも使用できます。



灌流ユニット

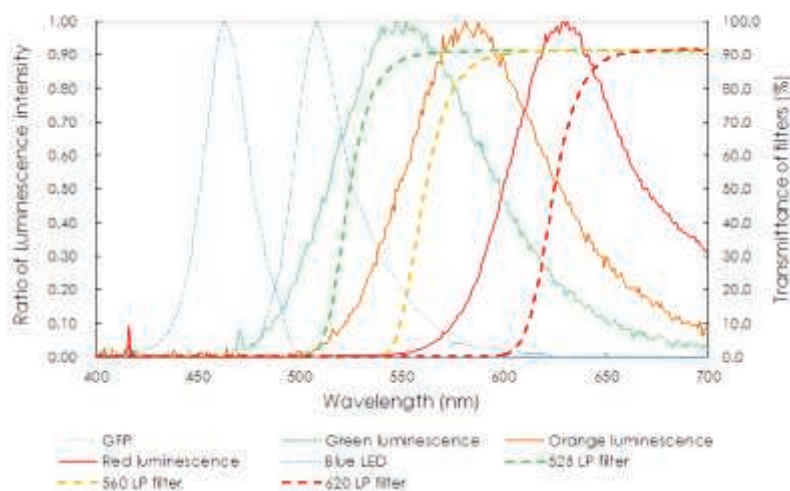
細胞や組織を灌流培養するときに使用する灌流ユニットです。灌流ユニットは実験の目的や観察するサンプルに合わせてカスタマイズできます。

様々な光を分けて捕えるフィルターシステム

セルグラフは、培養細胞、組織切片内の微弱な発光（3色）、蛍光（GFP）および明視野を、φ35mmのカルチャーディッシュ上で数時間から数日にわたって培養しながら、リアルタイムかつ継続的に計測するのに適しております。

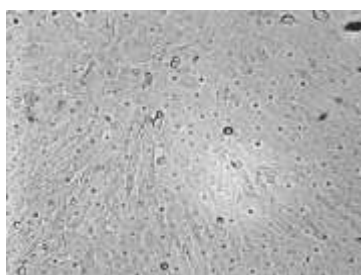
アトーの色分離方式は色分離に使用するフィルターの数が従来法よりも少ない点が特徴です。そのためフィルターによる発光量の損失を最小限に抑え、実測に近い観察像を得ることができます。かつロングパスフィルターを使用しており、またフィルターの透過率が90%以上と高いため、微弱な発光の撮影にも適しています。

（特許第4052389号）右グラフはTripluc (TOYOBO)の発光スペクトルと色分離用フィルターの波長および透過率を示しています。

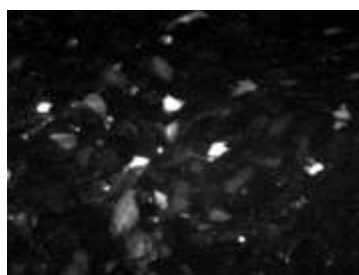


多様なシチュエーションに対応したイメージング

撮影条件は2条件まで設定可能です。明視野と発光のイメージング、蛍光と発光のイメージングなどの組み合わせで撮影できます。また撮影した画像は、セルグラフ独自の解析ソフト「Cellgraph Viewer」を使用して、簡単に発光量の定量や動画、モニターシュ、マージ像の作成など様々な解析・編集を行うことができます。



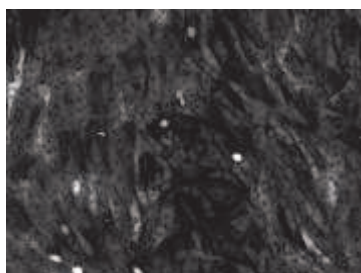
明視野像



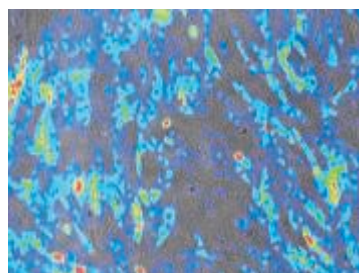
GFP像



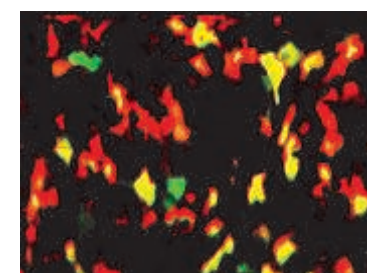
GFP光源 (Blue LED)



発光像



明視野と発光のマージ像
(疑似カラー)

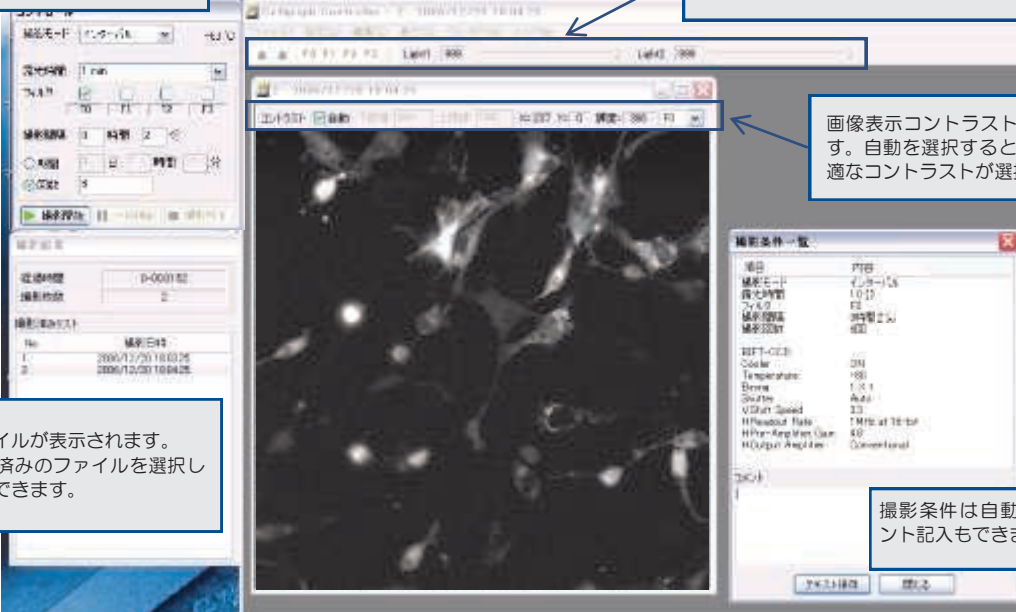


2色の発光像

現象を見逃さない多様な撮影モード

様々な撮影モード

セルグラフには様々な状況に合わせた撮影モードがあります。



撮影モード・露光時間・フィルター・撮影間隔/撮影期間の設定ができます。

LED照明のON/OFFと光量、フィルターの選択ができます。

画像表示コントラストの調整ができます。自動を選択すると、画像ごとに最適なコントラストが選択されます。

撮影済みファイルが表示されます。撮影中も撮影済みのファイルを選択して画像を表示できます。

撮影条件は自動保存です。コメント記入もできます。

項目	内容
撮影モード	マニュアル
露光時間	1.0 [1]
フィルタ	12
撮影間隔	0.5 [1]
撮影期間	0:00
LED ON/OFF	ON
Color	255
Temperature	18.0
Element	1.0 [1]
Shutter	Auto
Output Speed	3.0
HiPass Filter	1 Mic at 100nm
HiPass-Kinetics Unit	4.0
HiOutput Amplifier	Conventional

撮影モードの選択



ライブ

撮影した画像をリアルタイムで表示します。明視野像を見ながら撮影位置・フォーカスの調整を行う場合などに利用します。

インターバル

指定した期間、一定間隔で経時的に画像を1枚ずつ撮影します。発光のタイムラプス撮影に利用します。

ステージ制御

Z軸電動ステージを利用して複数の画像を撮影します。フォーカスの微調整などに利用します。

コンビネーション

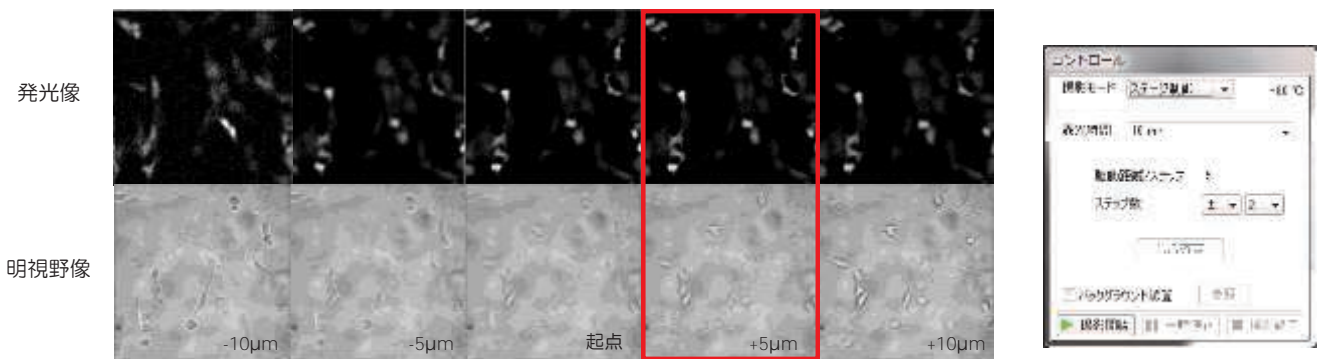
発光画像と明視野画像（あるいは蛍光画像）のタイムラプス撮影を同時に行います。

バックグラウンド

バックグラウンド画像を撮影します。発光撮影の際のバックグラウンド減算処理に利用します。

フォーカス合わせに便利なステージ制御

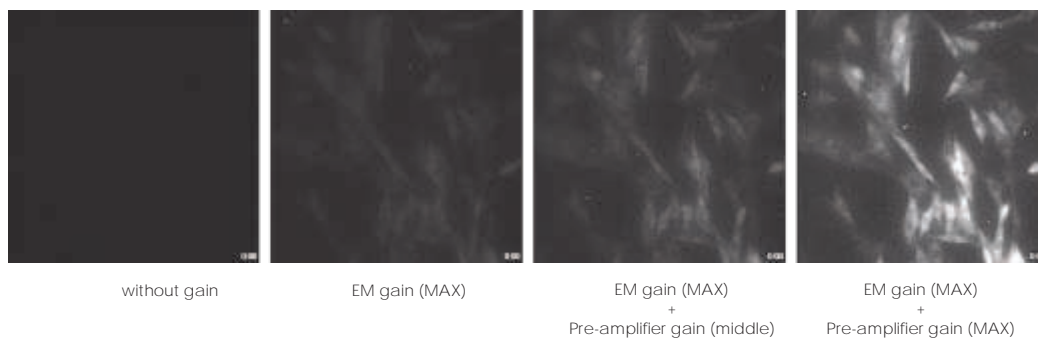
発光が微弱なサンプルの場合、撮影像を得るために長時間の露光が必要になります。その場合、手動によるフォーカスの微調整は困難です。セルグラフには自動でZ軸電動ステージの位置を切替えながら撮影するステージ制御モードがあります。Z軸の駆動距離と撮影枚数をセットし、ほかの作業をしながら撮影されるのを待つだけでフォーカスを見つけることができます。



ルシフェラーゼ安定発現NIH3T3細胞をステージ制御モードにより、40倍の対物レンズで露光時間10分、駆動距離5µm、ステップ数±2で撮影しました。赤い四角で囲った部分がフォーカスがある撮影像です。

CCDカメラの設定モード

セルグラフには微弱な発光を確実に捕えるために、様々なCCDカメラの増感設定モードがあります。



ビニング

1x1、2x2、4x4、8x8から選択できます。

Pre-amplifier gain

微小なシグナルをA/D変換する前に増幅します。

Electron multiplier gain

EMゲイン(電子増倍)によりCCDの電荷を転送する際にシグナルが増幅されます。ノイズが低減されるため、短時間でS/N比の優れた画像が得られます。x1からx1000まで設定可能です。

シンプルで使いやすい解析ソフト Cellgraph Viewer

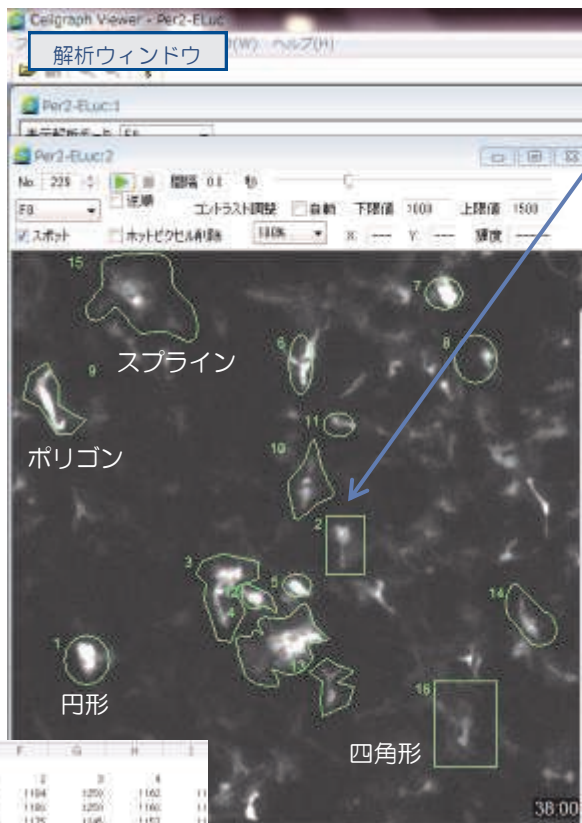
スポット解析 (ROI)

個々の細胞など任意の領域の発光量を比較したいときに使用する解析モードです。領域の選択は画像をクリックするだけです。領域の輪郭は円形、四角形、ポリゴン(多角形)、スプライン(曲線による囲み線)の4種類の方法から選べます。選択した領域の発光強度の数値化、グラフの作成も自動で行うことができます。また発光強度の解析データはCSV形式で出力できます。

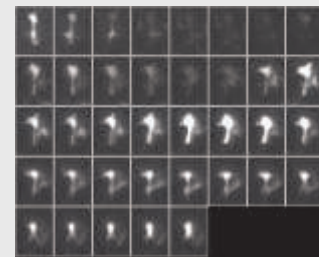
解析メニュー画面



解析ウィンドウ

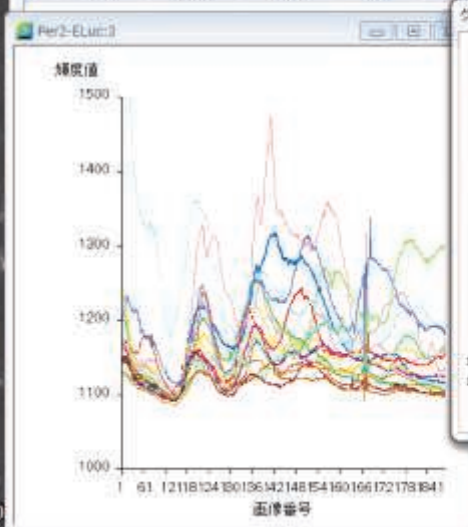


選択した1個の細胞の
経時的な連続画像を
作製することもでき
ます。
(モニタージュ)



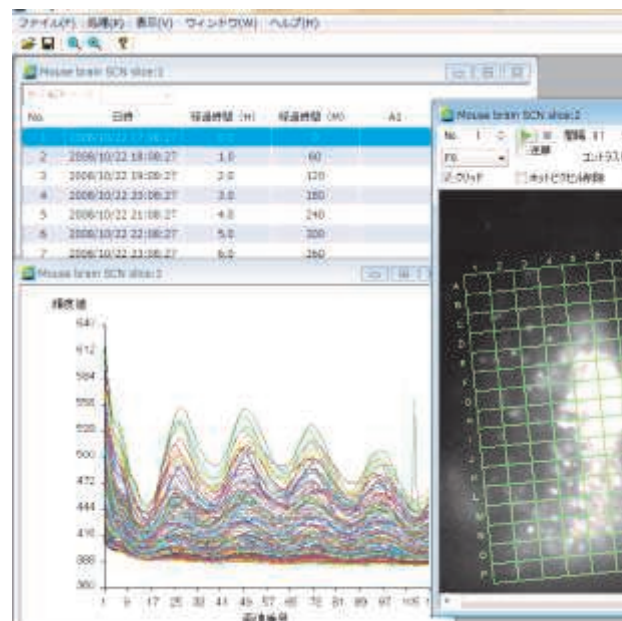
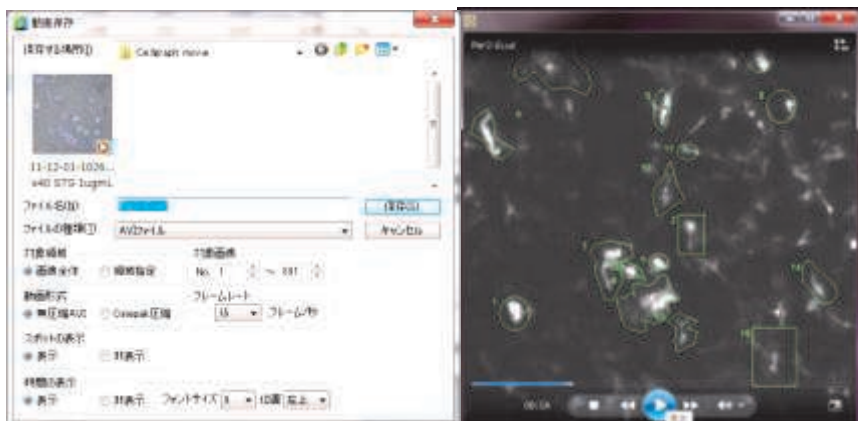
CSV形式で出力したデータ

No.	日時	経過時間 (H)	経過時間 (M)	1	2	3	4
1	2006/12/20 18:32	0	0	1172	1184	1200	1162
2	2006/12/20 18:42	0.1	17	1150	1180	1251	1160
3	2006/12/20 18:52	0.2	27	1547	1175	1245	1157
4	2006/12/20 19:02	0.5	30	1146	1171	1236	1154
5	2006/12/20 19:12	0.6	41	1145	1176	1236	1152



動画作成

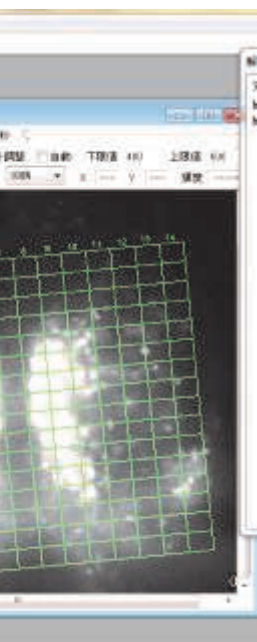
タイムラプス画像の画像全領域または指定した領域をavi形式の動画で保存できます。画像の重ね合わせ処理やスポットの囲み線を反映することも可能です。



各グリッドの発光値(輝度値)を経時的に表示したグラフです。グラフの縦軸はLog値による表示もできます。

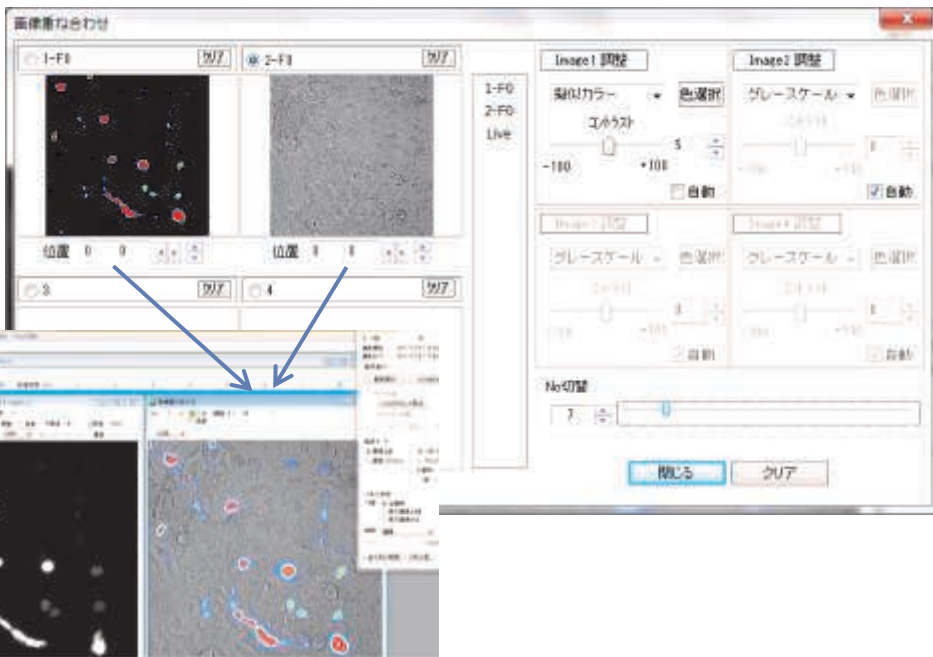


選択した領域それぞれの発光値（輝度値）を継続的に表示したグラフです。グラフの縦軸はLog値による表示もできます。



グリッド解析

画像上にグリッドを設定し、グリッドで仕切られた各区画内のシグナル強度値を出力します。グリッドは任意の行列数・大きさに設定でき、また任意の角度に回転できます。

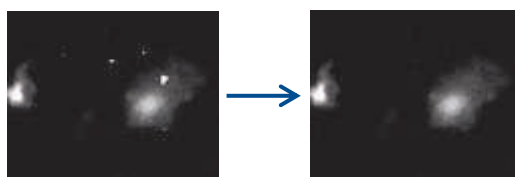
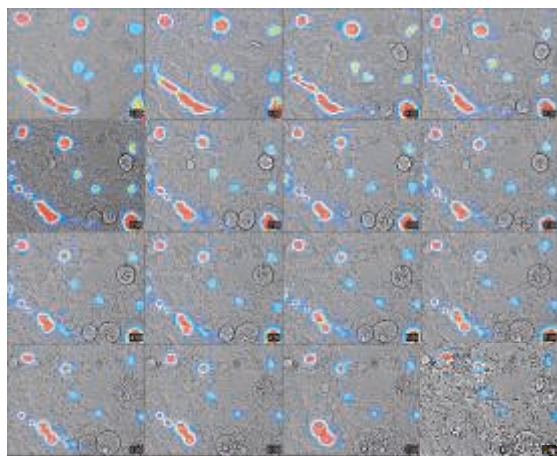


画像重ね合わせ

各フィルターで撮影した画像を重ね合わせて表示および加工することができます。重ね合わせる際に、それぞれの画像の表示方法はグレースケール、カラー、疑似カラーから選択でき、また画像のコントラストや細かな位置の修正もできます。さらに重ね合わせた画像ファイルから連続画像や動画に加工することも可能です。

連続画像の作成

継続的な変化を連続画像（モンタージュ）として加工できます。スポット表示、疑似カラー表示、重ね合わせ表示にも対応しています。



ホットピクセル削除

画像上の点状のノイズを削除します。ノイズ削除したピクセルには、そのピクセル周囲の輝度値の平均値が補填されます。

あらゆる研究分野で、様々な現象の高度な解析へ

● リアルタイムレポータージーンアッセイ

転写因子活性
時計遺伝子（時間薬理学）
遺伝子発現挙動（遺伝子導入試薬、RNAi等）

● さまざまな細胞応答の解析

薬物刺激応答（抗ガン剤、DDS等）
ストレス応答（ホルモン、炎症、抗酸化等）
細胞毒性評価

● シグナル伝達系の解析

シグナル伝達系（カルシウム濃度変化等）
アポトーシス現象

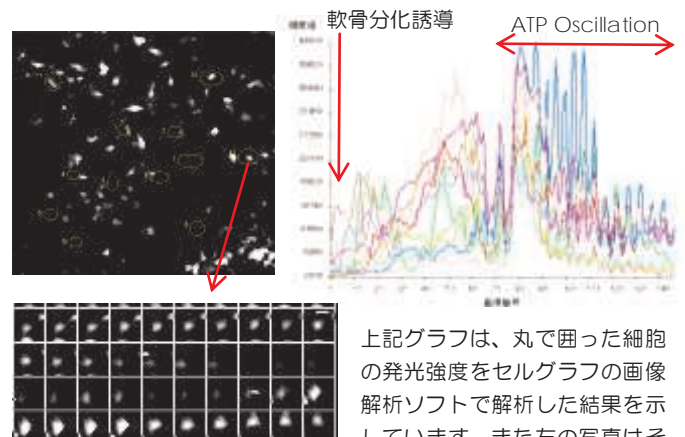
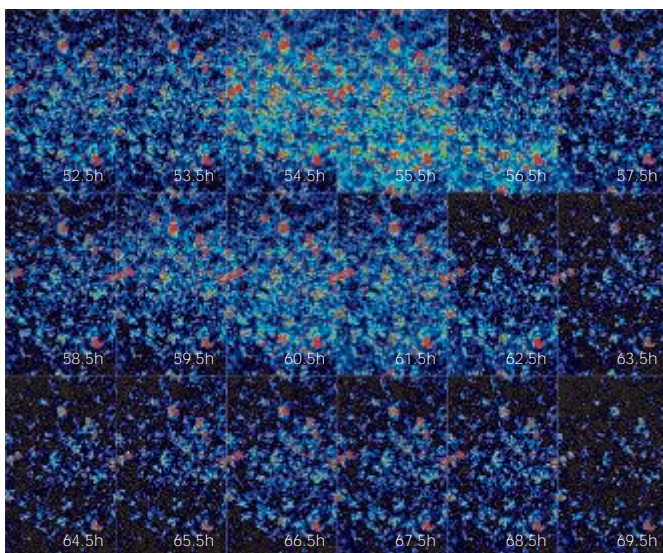
生物発光と蛍光の特徴

	生物発光	蛍光
プローブ	ルシフェラーゼ、イクオリン、...など	GFP, YFP, RFP, ...など
光の励起	酵素基質（ルシフェリンなど） 励起光は必要ない	基質などは不要 励起光が必要
長所	バックグラウンドが低い 定量的な解析に適している ダイナミックレンジが広い 細胞へのダメージが少ない 長期間の観察に適する	解像度が高い 輝度が高い 露光時間が短い
短所	輝度が低い 露光時間が長い	励起光による細胞ダメージ バックグラウンドが高い 光退色する

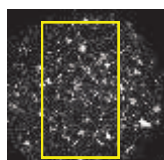


軟骨細胞への初期分化で生じるATPオシレーションのイメージング

胚肢で観察される軟骨分化初期に特有の細胞凝集は細胞接着分子や細胞外マトリックスの分泌に重要だといわれています。しかし、これらの分泌因子がどのようにコントロールされているかはこれまで明らかにされていませんでした。下記のデータはATP依存的に光る *Phycothrix hirtus* ルシフェラーゼ遺伝子を導入したATDC5細胞を用いて、軟骨分化誘導後に生じるATPのオシレーションのイメージングをセルグラフによって撮影した結果を示しています。ATPのオシレーションを阻害すると軟骨分化初期に特有の細胞凝集が起きず、またATPオシレーションの頻度に依存して細胞凝集が生じることから、ATPオシレーションが軟骨分化初期に生じる現象に重要であることが判りました。このようにセルグラフは細胞内の代謝メカニズムを研究する上でも効果的なツールといえます。



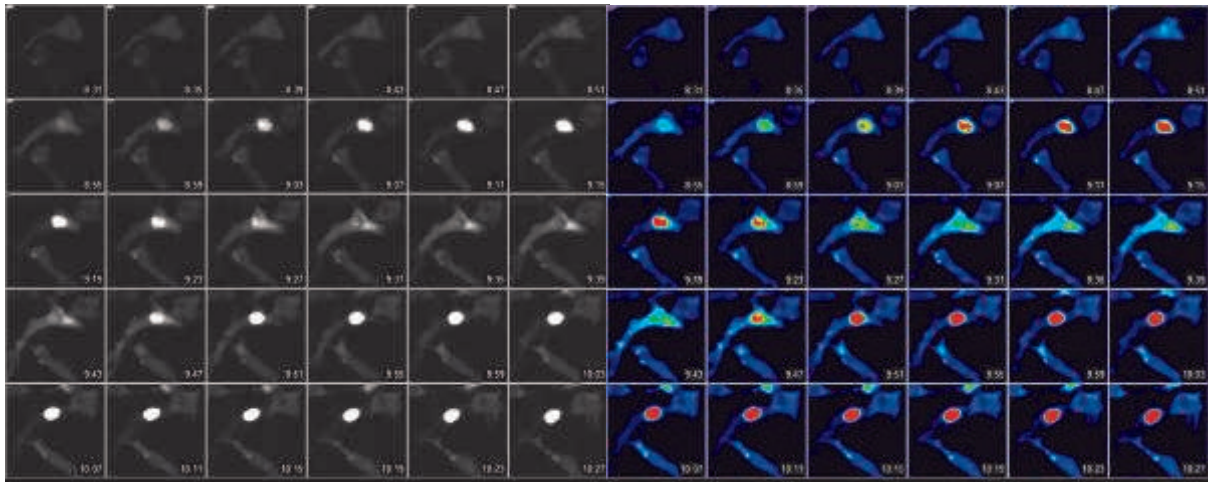
上記グラフは、丸で囲った細胞の発光強度をセルグラフの画像解析ソフトで解析した結果を示しています。また左の写真はその中の一つの細胞のイメージを継時的に連続画像として加工したモニターショットです。



上図は低倍率でATPオシレーションを観察した結果を疑似カラーで加工して示しています。左の写真の黄色く囲った部分に相当します。ATPのシグナルが波のように上から下に流れていく様子が判ります。

Data Supported: Dr. HJ.Kwon, Hokkaido Univ., JAPAN
Reference: HJ.Kwon et. al., Cell Death and Disease, Vol.3 (2012)

インポーチン α の細胞内輸送のタイムラプスイメージング



発光像

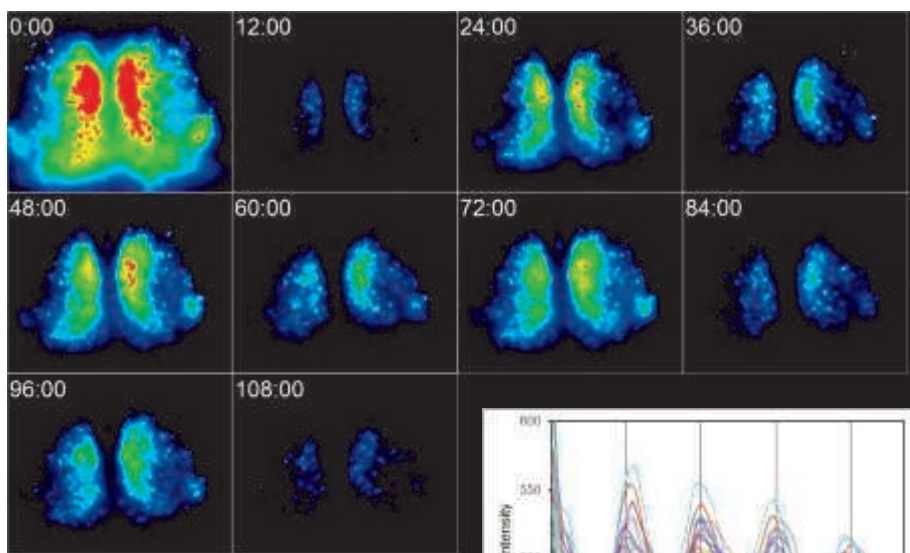
疑似カラー像

ルシフェラーゼを連結したインポーチン α 遺伝子をNIH3T3細胞で発現させ、インポーチン α の核-細胞間輸送をセルグラフで観察した結果です。上図のタイムラプスイメージは、セルグラフにより露光時間3分間、撮影間隔を4分間隔に設定して40倍の対物レンズで撮影しました。ピンング処理はしていません。発光のシグナルは、まず細胞質内で検出され、その後核内に発光が見られるようになり、徐々に核内の発光強度が強くなる様子が観察されました。このようにセルグラフは、タンパク質の細胞内輸送のような、生体内の長時間にわたる現象を観察する上で最適なツールといえます。

Data Supported: Dr. Y. Nakajima, AIST, JAPAN

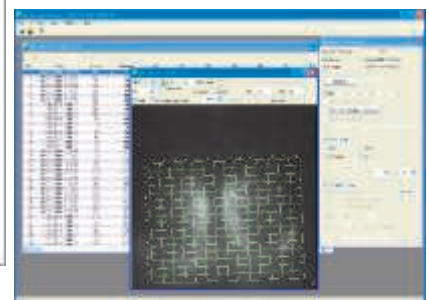
References: Y. Nakajima et al. *PLOS ONE*, Vol. 5 (2010)

マウス脳下垂体視交叉上核 (SCN) 切片の生物発光イメージング



時計遺伝子のプロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスの脳組織切片をセルグラフで解析した例です。

まず摘出した脳組織をマイクロスライサーにより100 μ mの厚さに薄切し、カルチャーインサート (Millipore) にセットしました。左の写真は、セルグラフで5日間にわたって撮影した、SCN切片のタイムラプスイメージを示しています。グリッド解析によりエリアごとの発光強度を画像解析し、数値化してグラフに示しました。



カルチャーインサート

カルチャーインサートに脳組織切片をセットします



References

1. H. Hoshino, Y. Nakajima and Y. Ohmiya, Luciferase-YFP fusion tag with enhanced emission for single-cell luminescence imaging. *Nature Methods*, 4(8), 637-639 (2007)
2. C. Wu, K. Mino, H. Akimoto, M. Kawabata, K. Nakamura, M. Ozaki and Y. Ohmiya, In vivo far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from Cypridina bioluminescence to an organic dye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(37), 15599-15603 (2009)
3. Y. Nakajima, T. Yamazaki, S. Nishii, T. Noguchi, H. Hoshino, K. Niwa, V. R. Viviani and Y. Ohmiya, Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. *PLoS One*, 5(4), e10011 (2010)
4. H. Kwon, T. Enomoto, M. Shimogawara, K. Yasuda, Y. Nakajima, and Y. Ohmiya, Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. *BioTechniques* 48(6), 460-462 (2010)
5. H.J. Kwon, Y. Ohmiya, K-i. Honma, S. Honma, T. Nagai, K. Saito and K. Yasuda, Synchronized ATP oscillations have a critical role in prechondrogenic condensation during chondrogenesis. *Cell Death and Disease* 3, e278(2012)

型式・名称		AB-3000B セルグラフ (Cellgraph)
冷却CCDカメラ	CCDタイプ： バックイルミネート型EMCCD 有効画素数： 512 x 512ピクセル 画素サイズ： 16 x 16 μ m AD分解能： 14/16 bit 冷却温度： 室温25°Cで空冷 -80°C、水冷*（水温25°C） -90°C、 室温20°Cで空冷 -85°C、水冷*（水温16°C） -100°C （※水冷冷却システムはオプションになります。）	
対物レンズ	4x (NA 0.53) (他にオプション選択可)	
ステージ	XYZ手動ステージ Z軸電動ステージ	
培養容器	35mmカルチャーディッシュ	
恒温機能	室温+5°C~45°C/0.1°Cステップ	
照明	白色LED（調光可） 青色LED（調光可）	
フィルター	最大3枚まで取り付け可（標準付属 525LP/560LP/620LP）	
露光時間	30 msec-90 min	
撮影間隔	任意	
コントロールソフト 動作環境	OS： Windows 7/Vista/XP メモリ： 1GB以上（XPは512MB以上 HD： 30GB以上の空容量 インターフェース： Full size PCIスロット x1, シリアルポート x1, USBポート x1	
寸法（本体）	430 mm (W) x 600 mm (D) x 650 mm (H)	
質量（本体）	約40kg	
電源（本体）	AC100-240V 106VA （システム全体では構成品により異なる）	
オプション		
CCDカメラ水冷ユニット	恒温水循環装置、循環用耐熱チューブ	
CO ₂ ガス導入システム	CO ₂ ガス混合装置	
CO ₂ ガス加湿システム	加湿用パプリング装置	
灌流培養チャンバーユニット	灌流用チャンバー	

アトーがプロデュースする微弱発光測定装置



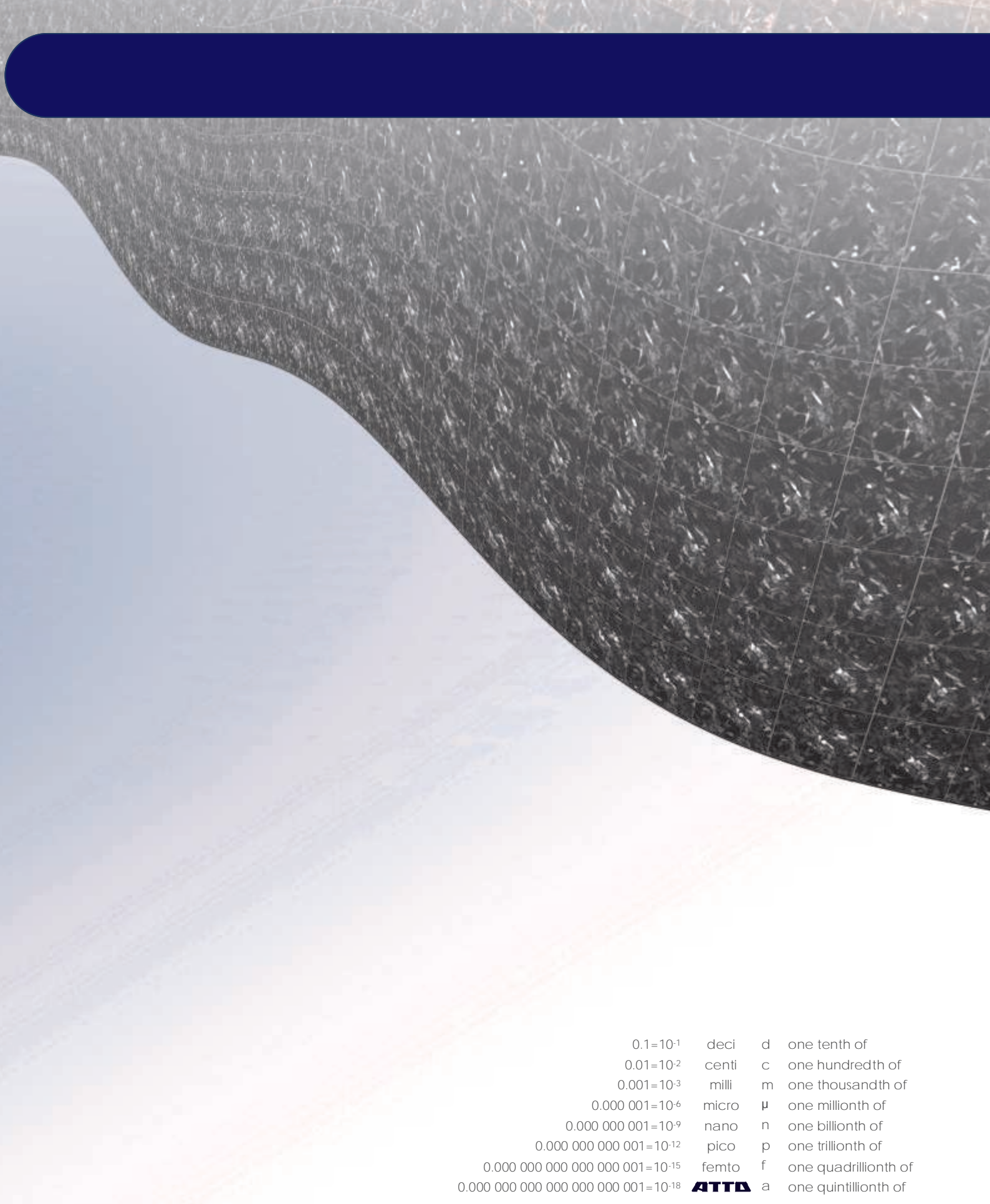
AB-2270 Luminescencer OCTA
Tube type luminometer



AB-2350 PHELIOS
96/384 well plate luminometer



AB-2550 KronosDio
Luminometer for live-cell & tissues



0.1 = 10 ⁻¹	deci	d	one tenth of
0.01 = 10 ⁻²	centi	c	one hundredth of
0.001 = 10 ⁻³	milli	m	one thousandth of
0.000 001 = 10 ⁻⁶	micro	μ	one millionth of
0.000 000 001 = 10 ⁻⁹	nano	n	one billionth of
0.000 000 000 001 = 10 ⁻¹²	pico	p	one trillionth of
0.000 000 000 000 000 001 = 10 ⁻¹⁵	femto	f	one quadrillionth of
0.000 000 000 000 000 000 001 = 10 ⁻¹⁸	ATTO	a	one quintillionth of

ご用命は下記販売店へ

お問い合わせは下記まで



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器 開発/生産/販売/サービス
(東京都許可 医療用具製造業)

■本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 TEL (03)5827-4861 (大代表) FAX (03) 5827-6647
■大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 5F TEL (06)6136-1421 (代表) FAX (06)6356-3625

■URL <http://www.atto.co.jp/>

■Mail: info@atto.co.jp