

# レゾナントスキャナーを用いた超短時間レーザー励起によるライブイメージング

エンテロイドは、Paneth細胞が担う自然免疫応答である抗菌ペプチド $\alpha$ ディフェンシン分泌をはじめとする、腸上皮機能を研究するための優れたツールである。しかし、エンテロイドは温度や湿度などの環境だけでなく、レーザー走査型顕微鏡による光照射に対しても非常に敏感であるため、実験においては慎重に扱う必要がある。本アプリケーションノートでは、蛍光色素の光退色のみならず、Paneth細胞における顆粒分泌に着目した腸上皮細胞機能への光毒性の影響を評価することで、レゾナントスキャナーによる超短時間レーザー光照射の利点について紹介する。

## 実験の概要

レゾナントスキャナーは、ガルバノスキャナーよりも高速スキャンが可能であり、細胞に対する光毒性の低減が期待できる。本実験では、小腸上皮細胞の三次元培養系であるエンテロイドを用いて、レゾナントスキャンとガルバノスキャンがPaneth細胞の $\alpha$ ディフェンシン含有顆粒分泌に与える影響を調べた。

最初の画像取得から14秒後に、コリン作動薬であるカルバコール (CCh) を10  $\mu$ M添加し、レゾナントスキャナーとガルバノスキャナーで画像取得した。その画像により、光退色ならびに細胞機能への影響について比較検討を行った。

## 結果

ガルバノスキャナーによる画像取得では、Zinpyr-1によるPaneth細胞顆粒染色とCellMask Deep Redによる細胞膜染色の蛍光シグナルはいずれも6分後までにほぼ光退色した。また、Paneth細胞顆粒分泌は約3分後から抑制されはじめ、約6分後に完全に停止した(図1 a)。一方、レゾナントスキャナーによる超短時間レーザー光照射では、両者の蛍光シグナルは、計10分間の実験にわたり光退色が見られなかった。また、顆粒分泌は3分後に抑制されることはなく10分間継続した(図1 b)。

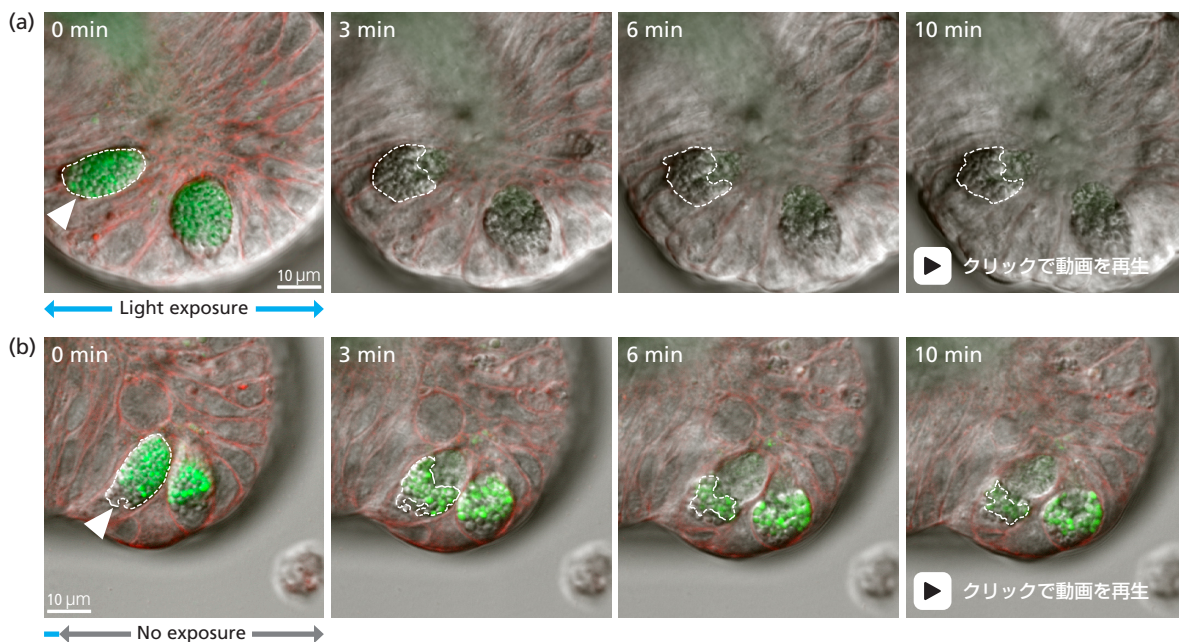


図1. ガルバノスキャナーとレゾナントスキャナーによる取得画像の比較

(a) ガルバノスキャナーによる画像の抜粋。1ピクセルあたりのレーザー照射時間：2.18  $\mu$ s、時間分解能：1秒

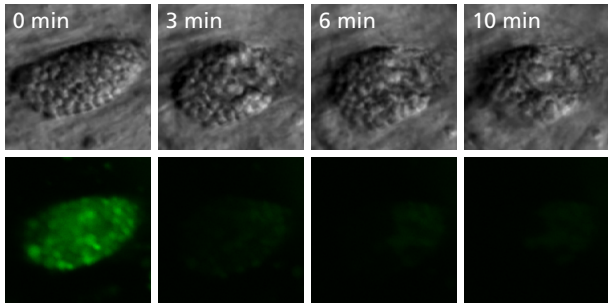
(b) レゾナントスキャナーによる画像の抜粋。1ピクセルあたりのレーザー照射時間：0.10  $\mu$ s、高速AOTF切り替えによる間欠画像取得により、時間分解能：1秒

矢印は、顆粒の占有面積を測定したPaneth細胞を示す(測定データは図3を参照)。レーザー出力(488nm、640nm)とディテクター感度の設定は、ガルバノとレゾナントのスキャンデータにおいて完全に同じである。



作例動画

### (a)ガルバノスキャナーで取得した顆粒分泌



### (b)レゾナントスキャナーで取得した顆粒分泌

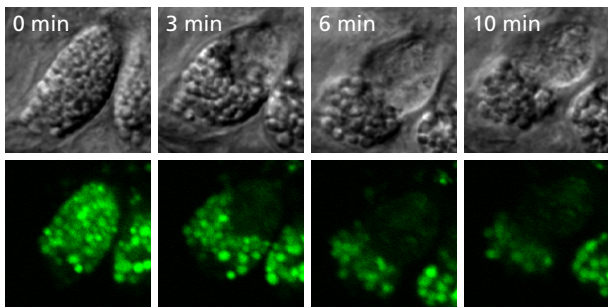


図2. ガルバノスキャンとレゾナントスキャンの画質の比較

ガルバノスキャンとレゾナントスキャンによる画質の違いを、各時点における拡大画像により示す。(a), (b)ともに上段はDIC画像、下段はZinpyr-1の蛍光画像。レゾナントスキャンによる画像(b)と比較して、ガルバノスキャンによる画像(a)は、Zinpyr-1のS/N比が優れている一方で、各顆粒は鮮明ではなく、顆粒が移動しているためぼやけて見える。

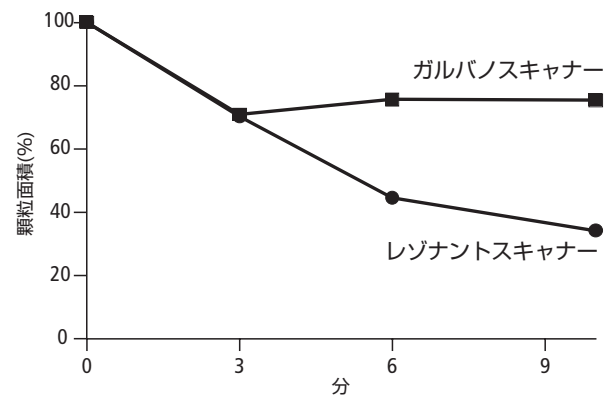


図3. ガルバノスキャンとレゾナントスキャンによるPaneth細胞顆粒分泌の比較

レゾナントスキャナーを使用した場合、CCh刺激後10分間にわたってPaneth細胞の顆粒面積が減少、すなわち分泌し続けたのに対し、ガルバノスキャナーでは、3分以降顆粒面積の減少は認められなかった。これは、図1および2で示された光退色のほかに、ガルバノスキャンによる長時間のレーザー光ピクセル滞留により惹起された光毒性によって、細胞機能が損傷を受けた可能性を示唆している。

## まとめ

本実験では、エンテロイドにおけるPaneth細胞からの顆粒分泌をモニタリングすることにより、レーザー光の超短時間ピクセル滞留を可能にするレゾナントスキャナーの利点について評価を行った。その結果、レゾナントスキャンにより蛍光色素に対する光退色を防止できるだけでなく、細胞機能に与える影響も大きく低減できることが確認できた。

今後、細胞に対する光毒性を最小限に抑え、高解像画像を得ることができるレゾナントスキャンが、細胞の分子動態やそのメカニズムの解明に貢献する、より有用な手法となることが期待される。

## 謝辞

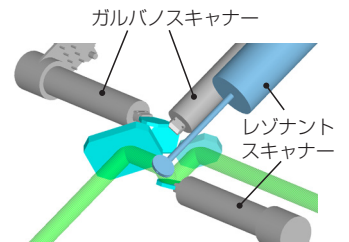
画像およびデータをご提供いただきました、北海道大学大学院先端生命科学研究所 細胞生物科学分野 自然免疫研究室の横井友樹先生、中村公則先生、ならびに綾部時芳先生に深謝いたします。

本研究は北海道大学と株式会社ニコンのシステム開発部が共同で実施しました。

## 製品情報

### ハイブリッドスキャナーシステム

超短時間のレーザー光照射による光ダメージの低減ならびに高速画像取得 (~720 fps / AXR) が可能なレゾナントスキャナーと、高解像・高精細の画像取得 (~8K / AXR) が可能なガルバノスキャナーを同時搭載。高速、高スループット、高解像などの幅広いアプリケーションに対応します。



### シリコン浸対物レンズ

CFI プランアポクロマート Lambda S 25XC/40XC Sil対物レンズは、エンテロイドなどと屈折率の近いシリコンオイルを使用することで、水浸対物レンズよりも高い解像度を実現します。また、長作動距離 (550 μm/25XC, 300 μm/40XC) のため、マトリゲル中のエンテロイドを容易に探すことができます。

