

APPLICATION NOTE

高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム A1R MP/AX R MP

対物レンズ浸液と組織透明化試薬の屈折率不一致が深層部の解像力に及ぼす影響

はじめに

特徴的な形状を持つプルキンエ細胞は、可視光励起によるコンフォーカル観察では細胞が存在する表層から深層部位までを捉える事は、例え透明化処理した小脳組織でも困難であり、IR励起による多光子共焦点観察が適している。しかし、特に深層部位での詳細な観察では、対物レンズの浸液と組織内との屈折率の差が画像の明るさや解像力に影響する。本稿では、異なる観察深度においてこの屈折率差がどのように影響を及ぼすのか？について注目した。また蛍光ビーズを用いた深さごとの光軸方向のPFSの状態をとらえ、それを用いた非線形デコンボリューション処理を試みて、画像の光軸方向の伸びに対する改善効果を検証した。

実験の概要

プルキンエ細胞 (図1, 2, 4): LC3GFPマウスから切り出した厚さ1mmの矢状スライスを、4℃ 4%フォルムアルデヒドで一晩固定した。PBSにて洗浄後に2%トライトンX100を含むPBSで室温にて3日間処置し、その後RapiClear1.47 (SunJin Lab, RC147001)にて数日間透明化処理を行った。

PSF測定用蛍光ビーズサンプル (Bead Cake) (図3): 径200 nmのTetraSpeck beads (Thermo Fisher Scientific, T7280) を濃度 6.0×10^{10} particles/ml に調整し、RapiClear1.47のgelに混ぜた。更に4%アガロースに混ぜて厚さ1mmのi-Spacer (SunJin Lab, IS009)にて包埋した。

顕微鏡: A1R MP

対物レンズ: CFI プランアポクロマート Lambda 10X/0.45 (図1)、シリコン浸対物レンズCFI プランアポクロマート Lambda S 25XC Sil/1.05 (図2)、水浸対物レンズ CFI アポクロマート LWD Lambda S 40XC WI/1.15およびシリコン浸対物レンズCFI プランアポクロマート Lambda S 40XC Sil/1.25 (図3, 4)

結果

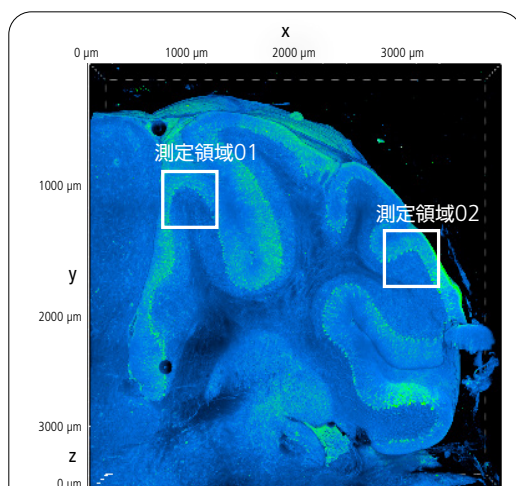


図1. 画像タイリングとZ-stackにより取得した小脳の3D画像

Pixel size: 1.23 μm

測定領域01のプルキンエ細胞が存在する領域を、488 nmと920 nmの励起光で、同一の対物レンズで取得した画像の比較を図2に示す。測定領域02を、水浸対物レンズとシリコン浸対物レンズで取得した場合の屈折率差による画像の比較を図4に示す。

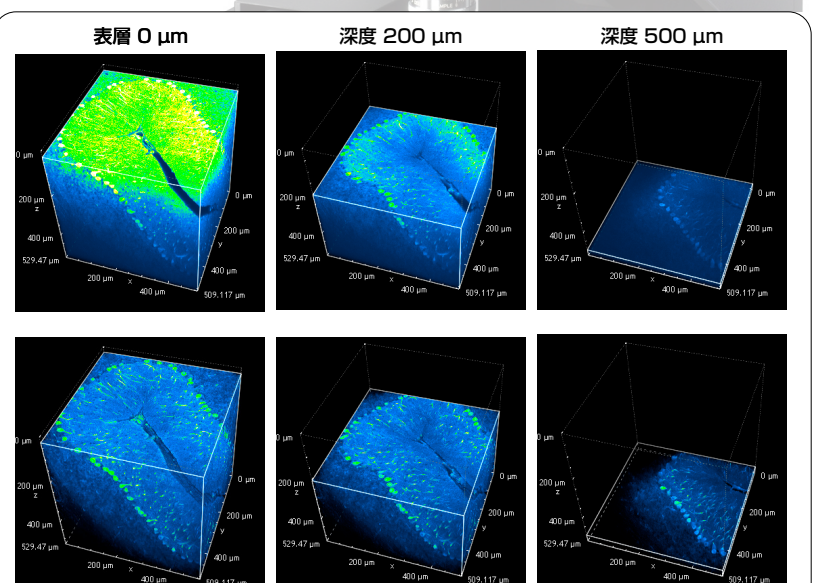


図2. 異なる波長励起で取得したプルキンエ細胞の深さごとの画像

上段は488 nm励起、下段は920 nm励起で、図1の測定領域01の表層から深層部位までを捉えた様子。上下段ともGFPの蛍光検出帯域は500-550 nmで、使用対物レンズ、擬似カラー表示のLUTs調整など励起波長以外の取得条件は全て同じ。小脳深層部位のプルキンエ細胞は、透明化した組織でさえ488 nm励起では輝度バランスを保ちながら深層部位まで捉えるのは難しいことがわかる。

Pixel size: 0.5 μm 、Z-step: 0.37 μm

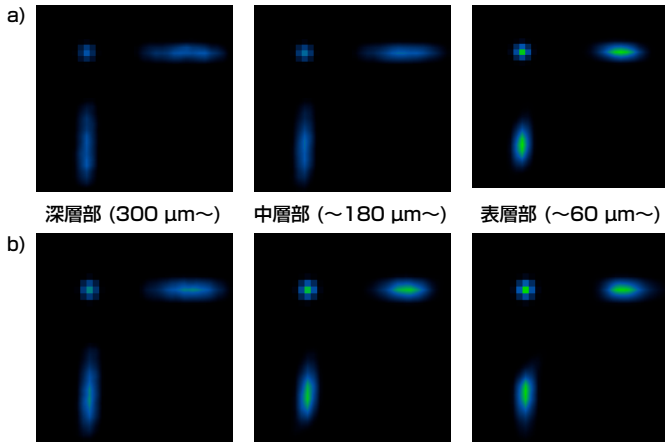


図3. 浸液の違いによるPSFの比較

Bead cakeを用いて取得した、各深さでの平均化を行ったPSF画像(XY/YZ/XZ展開図)。

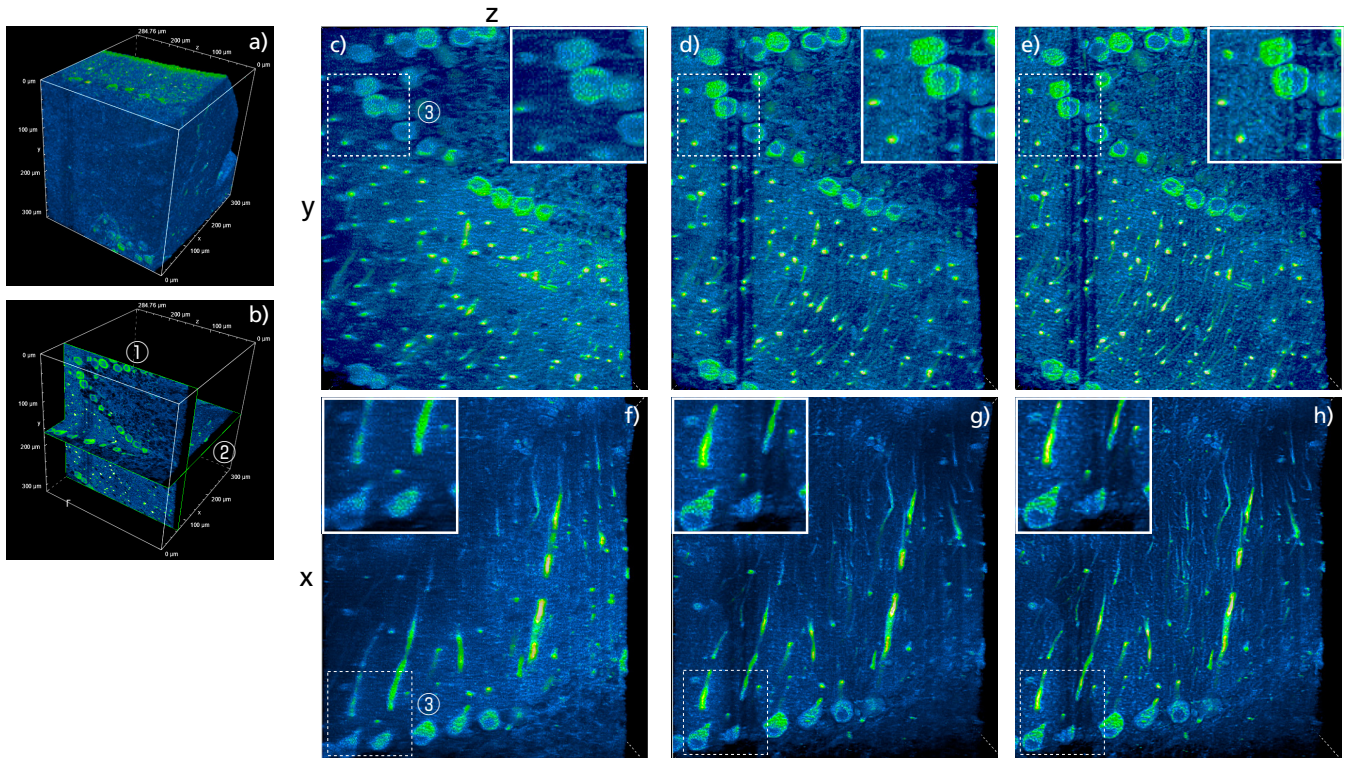
- a) 水浸対物レンズを用いて取得
Pixel size: 0.32 μm, Z-step: 0.33 μm (Nyquist)
- b) シリコン浸対物レンズを用いて取得
Pixel size: 0.31 μm, Z-step: 0.21 μm (Nyquist)

屈折率1.47の状況下において光軸方向のPSFを比較した。より屈折率に近い浸液のシリコン浸対物レンズでは、補正環をカバーガラス厚に固定した状態でも、深さ180 μm付近まで良好な明るさとPSFを維持できる事がわかる。

図4. シリコン浸対物レンズおよび非線形デコンボリューション処理を施した像質の向上

図1の測定領域O2の3D画像(a, b)から、上段(c, d, e)はYZ面における断面図①を、下段(f, g, h)はXZ面における断面図②を表示。

- c~h) の各画像は、右側が表層部、左側が約300 μmの深層部を表す。
- c), f) 水浸対物レンズを用いて取得。③は深層部における明るさの低下と光軸方向の伸びを表す。
- d), g) シリコン浸対物レンズを用いて取得。c), f)と比較して、深層部における明るさ、光軸方向の伸びが改善されている。
- e), h) 蛍光ビーズを用いて測定した光軸方向のPSF(図3, b)をパラメータに使用し、d), g)のデータに対して非線形デコンボリューション処理を実施。d), g)と比較して、PSFがさらに改善されていることがわかる。



まとめ

屈折率1.47のBead cakeを用いた測定では、より屈折率に近いシリコン浸対物レンズの方が、水浸対物レンズよりも、カバーガラス面から深層部までにわたり明るさおよび光軸方向PSFの状態が良好に保たれる結果となった(図3)。次に、屈折率1.47の試薬で透明化した小脳組織内でプルキンエ細胞を観察すると、蛍光ビーズを用いたデータとほぼ同様に、水浸対物レンズで取得した画像(図4, c, f)よりも、シリコン浸対物レンズで取得した画像(図4, d, g)のほうが、180 μm付近の深さまでにおいて光軸方向への画像の伸びが抑えられ、明るさも深層部まで保たれた。さらに蛍光ビーズを用いて各深さで取得した光軸方向のPSFをパラメータに使用し、非線形デコンボリューション処理を施したところ、より深層部まで光軸方向PSFの改善が観察できた(図4, e, h)。

謝辞

LC3GFPマウスの小脳切片および組織透明化をご提供いただいたPAnTher UMR703 INRAE/Oniris, Nantes FranceのDr. Laurence Dubreil, Dr. Julien Pichon, Pr Marie-Anne Colleおよび、Bead cakeをご提供いただいたSunJin Lab Co. TaiwanのDr. Daniel LINIに深謝いたします。

製品情報

高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム AX R MP
FOV22の広視野、最速毎秒720フレーム(2048 x 16画素/レゾナント)の高速、最大8K(ガルバノ)の高解像度を実現。