

細胞分裂とオルガネラの時空間ダイナミクスを ラベルフリーで可視化する位相差対物レンズの選び方

細胞には、核、核小体、ミトコンドリア、アクチンフィラメント、リソソーム、脂肪滴等の様々なオルガネラが存在します。有糸分裂時にはオルガネラの局在や形態がダイナミックに変化します。オルガネラに異常が生じると、代謝異常、神経疾患、癌、老化など多くの病気の原因になることが知られています。顕微鏡によるライブセルイメージングは時空間の局在と動態情報が得られるため、生命現象や疾患の解明に優れた技術です。長期間のライブセル観察にはラベルフリーで細胞を可視化できる位相差顕微鏡が適しています。位相差の像は位相板の種類でコントラストが決まります。本アプリケーションノートでは、位相板による像の違いと位相差対物レンズの選び方を紹介します。

位相差観察とは

位相差観察とは、透明な物体の屈折率や厚さの異なる部分を可視化する手法です。屈折率が周囲より高い部分を、背景よりも暗い(黒い)コントラストで可視化するダークコントラスト法と、背景よりも明るい(白い)コントラストで可視化するブライツコントラスト法があります。物体に到達した光は、物体を透過する直接光と、オルガネラの大きさや構造によって様々な角度を持つ回折光に分かれます(図1)。

位相差対物レンズには、位相リングを持つ位相板が設置されています(図2)。

位相リングには、下記の2つの機能があります。

- 1) 直接光の位相を位相リングで1/4波長ずらして回折光と干渉させることによって、位相の違いを明暗のコントラストとして可視化する機能
- 2) 減光フィルターで直接光の強度を弱めることにより位相差検出感度を高める機能

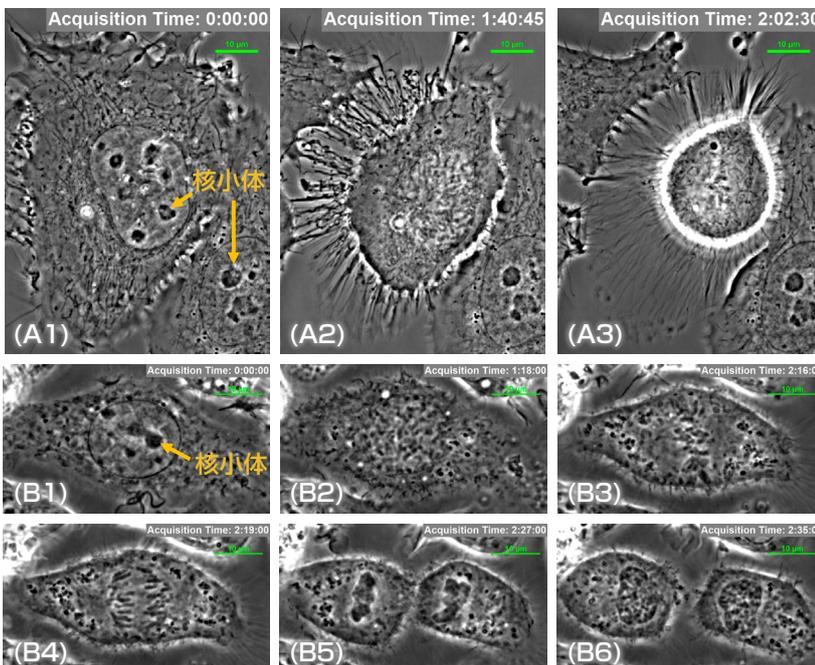
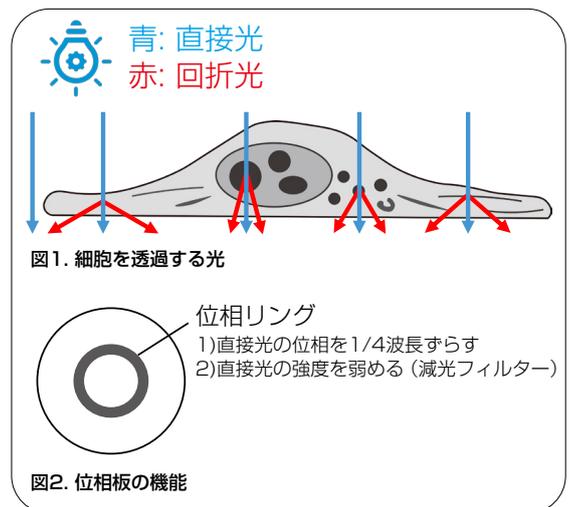


図3. 有糸分裂期のアポディゼーション位相差タイムラプス画像

(A1-A3) HeLa 細胞
 (B1-B6) マウスマクロファージ (J774.1)
 間期 (A1, B1) では核小体が観察される。前中期 (A2, B2) では核小体が消失し、染色体凝集が生じる。中期 (A3, B3) では染色体が赤道面に配列する。後期 (B4) では染色体分体が両極へ移動する。終期 (B5, B6) では細胞が分裂し、核膜と核小体が再構築される。
 対物レンズ: CFI Plan Fluor ADH 100X (NA1.3)、倒立顕微鏡: Ti2-E、カメラ: DS-Qi2、Scale bar: 10 μm



作例動画
 HeLa細胞
 Interval: 15 sec
 Duration: 2h



作例動画
 マクロファージ
 Interval: 1 min
 Duration: 9h



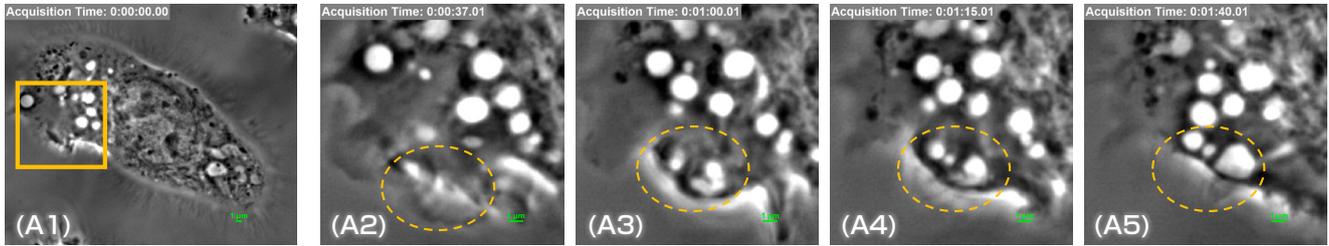


図4. 活性化マクロファージによるマクロピノサイトーシスのアポディゼーション位相画像
 (A1) LPS刺激で活性化したマクロファージ (J774.1細胞株)、(A2-A5) A1の四角枠領域の拡大画像。マクロピノサイトーシスによって取り込まれた細胞外液は、屈折率が周囲より低いいため、明るい(白い)小胞として観察される。
 対物レンズ: CFI Plan Fluor ADH 100X (NA1.3)、Scale bar: 1 μ m



作例動画
 マクロファージ
 Interval: 250 msec
 Duration: 5 min



アポディゼーション位相差

アポディゼーション位相差対物レンズの位相板には、位相リングを取り囲む2つの減光フィルター（アポディゼーション帯）があり（図5）、位相物体で生じる回折光の強度を選択的に弱めることができます。物体によって生じる回折角は、物体の大きさによって決まります（図6）。アポディゼーション位相板は、大きな標本の回折光をアポディゼーション帯で選択的に弱め（図6 (A)）、小さな標本の微細構造を高コントラストで可視化できます（図6 (B)）。

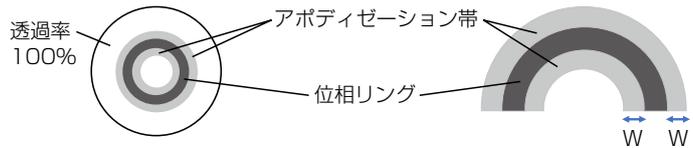


図5. 位相リングとアポディゼーション帯の模式図

位相リングとアポディゼーション帯の透過率やアポディゼーション帯の幅 (W) を変えることで、像の見え方に違いが生じる。

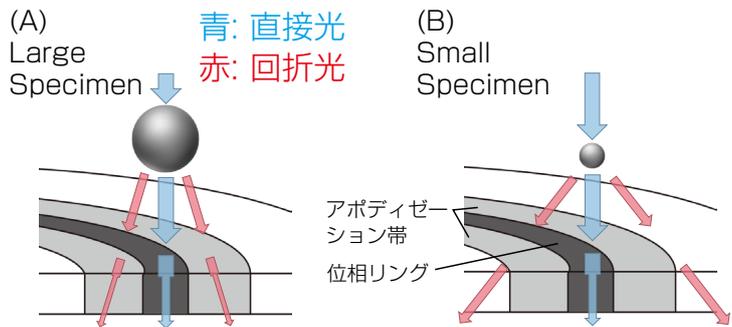


図6. アポディゼーション位相板を透過する回折光の、標本の大きさによる違い

(A) 大きな標本は回折角が小さいため、回折光（低い空間周波数）の多くはアポディゼーション帯を通過して減衰し、コントラストが低下する。
 (B) 小さな標本は回折角が大きいため、回折光（高い空間周波数）の多くは位相板の透明な部分を通過して減衰せず、コントラストが高くなる。

位相差とアポディゼーション位相差の画像比較

DLL位相差では、3 μ m以上の大きな核小体が明瞭に観察されました（図7 (A)）。アポディゼーション位相差は小さな標本のコントラストを高めるため、1 μ m以下の球状顆粒はコントラストが高く、内部は明暗が反転した明るい（白い）像として観察されました。このため、顆粒とアクチンを目視で簡単に見分けることができました（図7 (B)）。

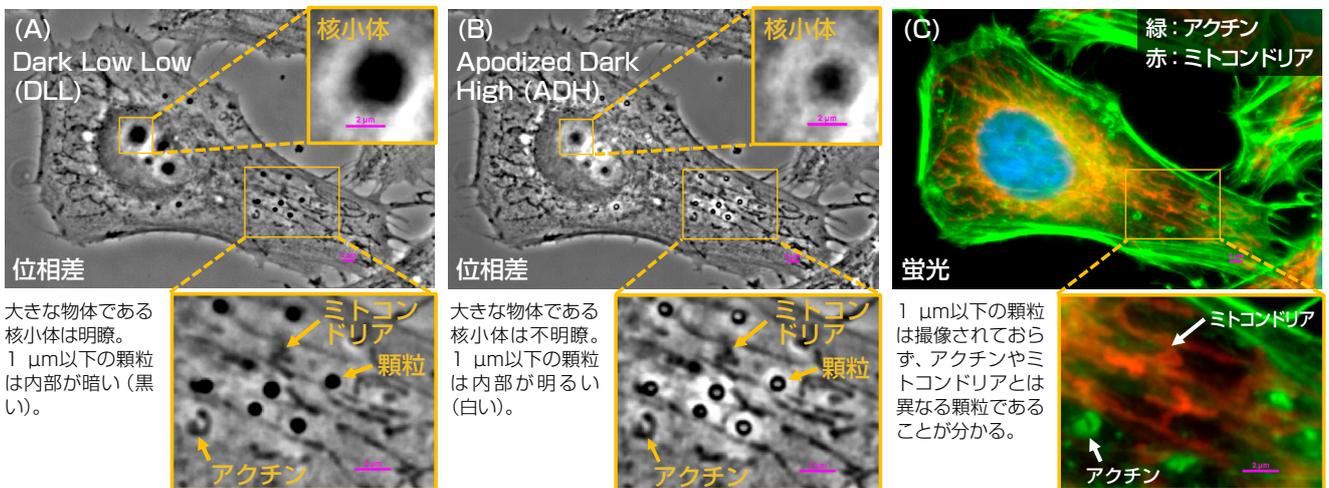


図7. 扁平形態のHeLa細胞の、DLLとADHの位相差画像の比較

(A) DLL位相差画像（対物レンズ：CFI Plan Fluor DLL 100X）、3 μ m以上の核小体が高コントラストで観察できている。
 (B) アポディゼーション (ADH) 位相差画像（対物レンズ：CFI Plan Fluor ADH 100X）、1 μ m以下の顆粒が高コントラストで観察できている。屈折率が高い顆粒は、明暗が反転して、内部が明るい（白い）像として観察される。
 (C) 蛍光画像（対物レンズ：CFI Plan Fluor ADH 100X）、青色：核、緑色：アクチン、赤色：ミトコンドリア
 倒立顕微鏡: Ti2-E、カメラ: DS-Qi2、Scale bar: 2 μ m

	コントラスト Low → High		
位相差	DLL (Dark Low Low)	DL (Dark Low)	DM (Dark Middle)
アポディゼーション位相差	ADL (Apodized Dark Low)	ADM (Apodized Dark Middle)	ADH (Apodized Dark High)

表1. 位相板の種類とコントラスト

- ・コントラストが高いと物体の明暗が反転する。
- ・コントラストが高いとハローが大きくなる。
- ・アポディゼーション位相差はハローを低減している。

アポディゼーション帯の幅によるハロー低減と微細構造のコントラスト強調

アポディゼーション帯の幅W (図5) によって、コントラストを強調する物体を制御できます。倍率20倍～40倍のアポディゼーション位相差対物レンズは、10 μm以下の物体を高コントラストで観察できるようアポディゼーション帯の幅が設計されています。さらに10 μm以上の大きな物体の回折光を弱めることにより、細胞の辺縁に現れるハローを低減し、オルガネラを観察できます。100倍の高倍率アポディゼーション位相差対物レンズは、3 μm以下の小さなオルガネラを高コントラストで観察できるよう設計されています。有糸分裂期の大きな球形のHeLa細胞は、DM対物レンズよりもADH対物レンズの方がハローが低減されています (図8 (B2), 図8 (C2))。小さくて丸形態のJ774.1細胞株 (マウスマクロファージ様細胞) は、DM対物レンズ (図9 (C)) よりも、ADH対物レンズ (図9 (B)) の方が、ハローが低減されているため、細胞内部を高コントラストで観察できます。また、ADH対物レンズ (図9 (B)) は、DLL対物レンズ (図9 (A)) よりも核小体や細部が高コントラストで観察できます。

位相差とアポディゼーション位相差 (100倍) の画像比較と物体側焦点深度

一般的に、蛍光観察では、多くの光を取り込める高NA対物レンズが必要とされますが、位相差観察では、位相板の種類で画像のコントラストが決まります (図8, 図9)。また、NAの高い対物レンズは焦点深度が浅くなり、標本の深さ方向にピントが合う範囲が狭くなります。

- ・NA 1.3の焦点深度=0.25 μm
- ・NA 1.45の焦点深度=0.20 μm

そのため、位相差画像で細胞全体を俯瞰して観察するには、ピントの合う範囲の広い低NA対物レンズが有効です。

ハローの強さ : DLL < ADH < DM

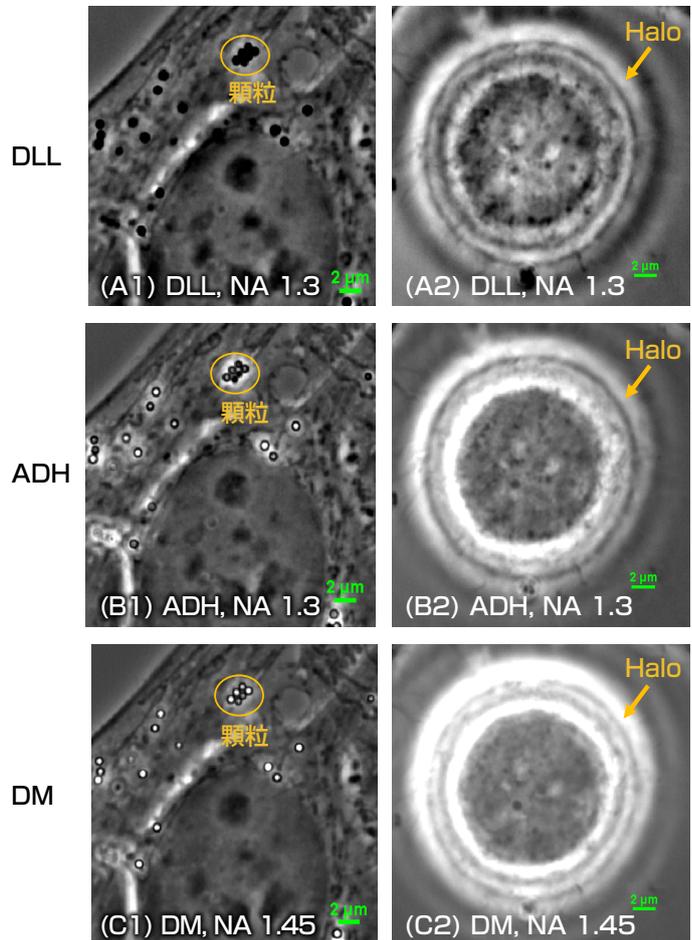


図8. 位相差とアポディゼーション位相差の画像比較 (倍率: 100倍)

標本: (左) 扁平なHeLa細胞、(右) 有糸分裂期の丸くて厚みのあるHeLa細胞

対物レンズ:

(A) CFI Plan Fluor DLL 100X (NA 1.3)

(B) CFI Plan Fluor ADH 100X (NA 1.3)

(C) CFI Plan Apo DM Lambda 100X (NA 1.45)

倒立顕微鏡: Ti2-E、カメラ: DS-Qi2

Scale bar: 2 μm

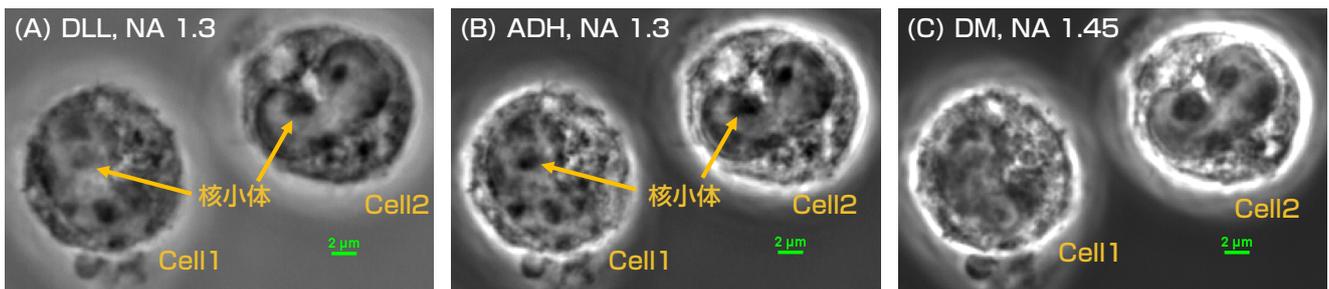


図9. 小さくて丸形態の細胞の、位相差とアポディゼーション位相差の画像比較 (倍率: 100倍)

標本: マウスマクロファージ様細胞 (J774.1)、倒立顕微鏡: Ti2-E、カメラ: DS-Qi2、Scale bar: 2 μm

対物レンズ: (A) CFI Plan Fluor DLL 100X (NA 1.3)、(B) CFI Plan Fluor ADH 100X (NA 1.3)、(C) CFI Plan Apo DM Lambda 100X (NA 1.45)



位相差対物レンズ
CFI Plan Fluor DLL
100X Oil (NA 1.3)

- 扁平なHeLa細胞
- 有糸分裂期の細胞のハローを低減
- 細胞全体にフォーカスを合わせて俯瞰的に観察
- 大きなオルガネラを高コントラストで観察
- 3 μm以上の核小体を明瞭に観察
- 図7 (A)、図8 (A2)



アポディゼーション位相差対物レンズ
CFI Plan Fluor ADH
100X Oil (NA 1.3)

- 細胞質に厚みのある細胞
- マクロファージの飲食作用
- 1 μm以下のミトコンドリア、リソソーム、脂肪滴を高コントラストで観察
- 球形の顆粒とアクチンを無染色の細胞で識別
- 図7 (B)、図9 (B)



位相差対物レンズ
CFI Plan Apo DM
Lambda 100X Oil
(NA 1.45)

- 高NA対物レンズ
- 蛍光+位相差のマージ画像
- 浅い焦点深度で特定のオルガネラを高コントラストで観察
- 図8 (C1)

図10. 位相差 (DLL、DM)、アポディゼーション位相差 (ADH) 対物レンズ (倍率:100倍) の特長と、観察に適した標本

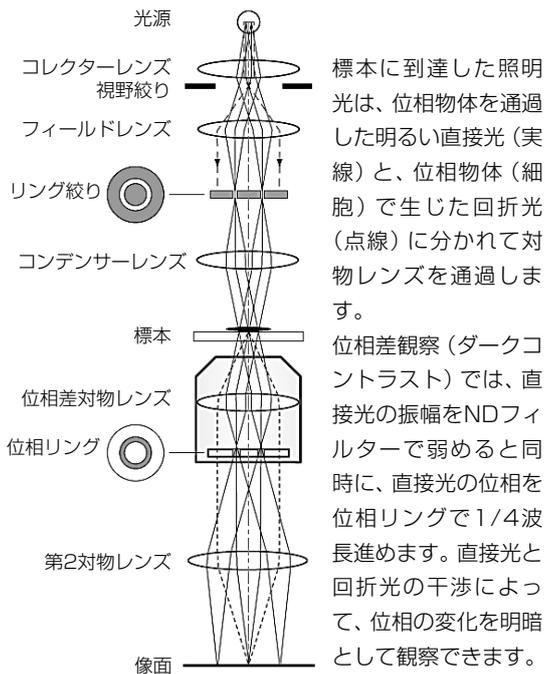


図11. 位相差顕微鏡の光路図

まとめ

- 位相差イメージングは、長期にわたる細胞の変化やオルガネラダイナミクスをラベルフリーで可視化し、生命現象や疾患の理解を深めることができる重要なツールです。
- DLL位相差対物レンズは、細胞全体を俯瞰的に観察したいユースケースに適しています。
- アポディゼーション位相差 (ADH) 対物レンズ (100倍) は、1 μm以下の顆粒を高コントラストで観察できます。
- アポディゼーション位相差 (ADH) は、小さなオルガネラのコントラストを高め、同時にハローを低減して細胞内構造を可視化できます。
- 高NAの位相差対物レンズ (100倍) は蛍光像+位相差のマージ画像の撮影に適しています。

参考文献

- Zernike, F. *Technische Physik*, 16: 454-457 (1935).
- Tatsuro Otaki, Artifact halo reduction in phase contrast microscopy using apodization. *Optical Review* 7: 119-122 (2000).
- Tatsuro Otaki et al. Apodized phase contrast microscopy yields refined dynamic images of organelles in living cultured cells. *Proceedings of the 29th Kogaku Symposium (Japan)*: 43-46 (2004).
- Kaoru Katoh et al. *Biophysics* 44 (6), 260-264 (2004).
- Nikon Research Report 24-30, Vol.2 2020
- Nikon MICROSCOPYU Apodized Phase Contrast (<https://www.microscopyu.com/tutorials/apodized-phase-contrast>)

著者情報

株式会社ニコン 小林千春、大瀧達朗



さらに詳しい位相差顕微鏡の原理の説明は、MICROSCOPYUの "Introduction to Phase Contrast Microscopy" をご参照下さい。

<https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>

製品情報

研究用倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti-2-E

自動焦点維持装置 (PFS) により、フォーカスずれを高い精度でリアルタイムに補正できるため、長時間にわたるタイムラプス撮影においてもフォーカスの合った画像を取得できます。



位相差対物レンズ (ダークコントラスト)

- CFI Plan Fluor DLL 100X Oil (NA 1.3)
 - CFI Plan Fluor ADH 100X Oil (NA 1.3)
 - CFI Plan Apo DM Lambda 100X Oil (NA 1.45)
- 無色透明なライブセルを高コントラストで可視化できます。オルガネラの局在と動態を長期にわたり観察できます。

