



A1R HD25：ライブセルイメージングのアプローチを一新する、最新のレゾナントスキャニング技術

従来のポイントスキャニング共焦点顕微鏡は、ガルバノミラーを使用して多彩なサンプルの高コントラスト画像を取得します。これは、通常のイメージングでは非常に有効ですが、ライブセルイメージングには適しているとは言えません。このアプリケーションノートでは、ニコンの最新のA1R HD25レゾナントスキャナーと、そのライブセルイメージングにおける利点について紹介します。

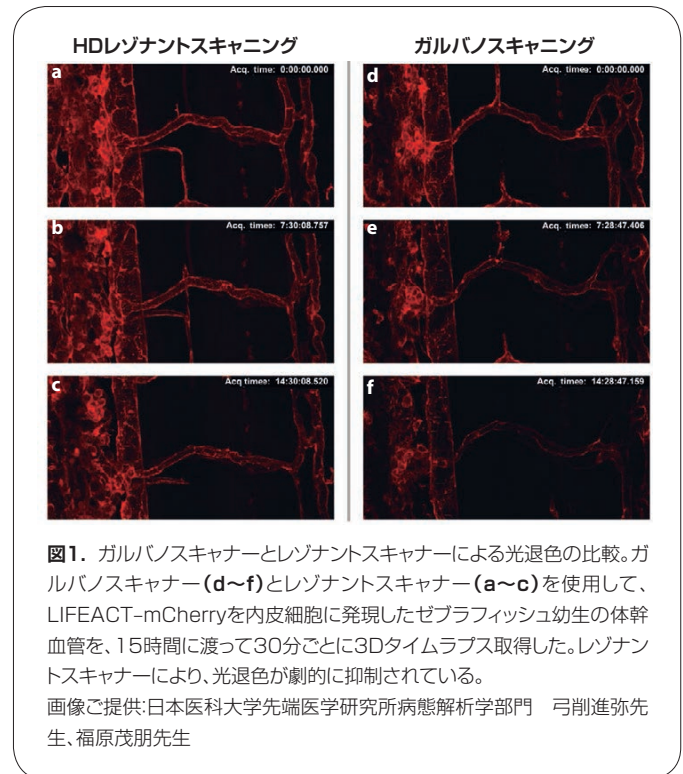
ポイントスキャニング共焦点システムは、その高い柔軟性のため、世界中の研究施設で主力の機器となっています。この柔軟性は、レーザー励起にガルバノミラーを使用していることに起因します。ガルバノミラーの駆動は適用する波形によって可変であるため、光学ズーム（およびその他のパラメータ）を柔軟に変更できます。このため、ほぼ全ての対物レンズやアプリケーションに対して画像の解像度を最適化できます。これは、スピニングディスク共焦点システムや、固定ピクセルサイズのカメラを使用する落射蛍光システムでは不可能です。通常、ポイントスキャニング共焦点はカメラベースのシステムよりも低速ですが、レゾナントスキャニングはこの限界を突破し、ポイントスキャニングの柔軟性を維持しながら、全体のフレームレートを向上できます。

レゾナントスキャンミラーは、線形のこぎり波で駆動するガルバノミラーとは異なり、高周波（A1R HD25の場合、7.8kHz）の正弦波を使用するため、モーターの応力を低減できると同時に、無制限に超高速で機能させることができます。A1R HD25は、業界最大級の25mmの広視野の全域を、毎秒最大30フレームの高速で取得できます。このアプリケーションノートでは、ライブセルイメージングを実現するニコンA1R HD25レゾナントスキャナーの独自の技術を紹介いたします。

レゾナントスキャニングにより、 光退色や光毒性を低減

レゾナントスキャニング共焦点システムの主な利点はスキャニング速度の向上ですが、副次的な効果としては、レーザー照射によるダメージの低減があります。これを30分ごとに大量の画像取得が必要な動的サンプルの例で見えます。この例では、画像取得にガルバノスキャナーとレゾナントスキャナーのいずれも選択可能です。図1は、両者を比較した結果を示します。ニコンのレゾナントスキャナー（図1 a-c）とガルバノスキャナー（図1 d-f）を使用して、100枚のZスタック画像を30分ごとに15時間に渡って取得しました。この画像が

ら、レゾナントスキャニングにより、画像の品質を保ちながら、15時間の実験を通して光退色が少なくサンプルの活性を維持できることがわかります。



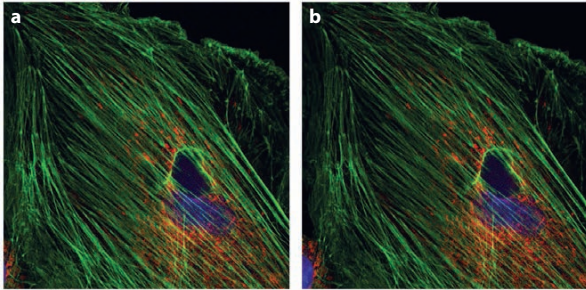
従来は、このような実験にレゾナントスキャナーを使用する場合、S/N比や画質が低下するというトレードオフがありました。図1と図2は、ニコンのHDレゾナントスキャナーの使用により、画質を犠牲にすることなくレゾナントスキャニングのメリットが得られることを示しています。A1R HD25の開発では、レゾナントスキャナーの電気回路の大幅な見直しを行いました。レゾナントスキャナーの分解能を決める要素の1つに、電気回路が画像をサンプリングしてピクセルを作

Adam White

Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA, e-mail : adam.white@nikon.com

APPLICATION NOTES

成する速度があります。サンプリングレートが高いほど、同じ時間内で多くのピクセルを作成できるため、より高い分解能を実現できます。ニコンは、HDスキャナーのサンプリングレートを向上し、最大1,024 × 1,024の分解能で、より鮮明な画像の取得を実現しました。また、電気回路の品質を向上させ、最終画像のノイズ成分を減少させることも大きな課題でした。ノイズ低減により画像の全体的な品質が向上するだけでなく、ピクセルの滞留時間が短く信号が少ないことにより、S/N比を効果的に改善できます。



HDレゾナントスキャンニング ガルバノスキャンニング

図2. A1R HD25レゾナントスキャナー(a)とガルバノスキャナー(b)で取得した画質の比較。レゾナントスキャナーでは高画質が維持されている。画像は、蛍光染色したウシ肺動脈の内皮細胞の同じ領域を示す。

FOV 25mmのA1R HD25レゾナントスキャナーを使用して、大型の生体サンプルを高解像度イメージング

高速レゾナントスキャンニング共焦点システムの、その他の知られざる側面として、FOVの低下があります。これは、レゾナントスキャナーが

機能する上で必要な正弦駆動波を補正(または回避)するアプローチが原因です。ニコンは、レゾナントイメージングとガルバノイメージングの両方で、常に同じスキャン領域を維持しています。これを実現したのは、ミラーの動きを物理的に追跡する、ハードウェアベースの独自のピクセルクロック補正の採用です。ミラーの位置と速度を瞬時に追跡して補正することにより、業界をリードするFOV 25mmの広視野を実現しました。これは従来のA1Rの2倍の面積であり、一部の競合技術の1.3倍以上になります。図3はFOV 25mmの優位性を表す実験例を示します。ゼブラフィッシュ幼生の全身について1,024 × 256の画像を毎秒30フレームで取得しました。血流はNIS-Elementsソフトウェアで追跡しました。このような細胞トラッキングには、高い空間分解能と時間分解能の両方が必要ですが、A1R HD25の比類のないFOV 25mmと高品質なレゾナントスキャンニングとの組み合わせにより、はじめてこの実験が可能になりました。

まとめ

ニコンのA1R HD25はポイントスキャナーの柔軟性を大幅に向上し、ユーザーに多大なメリットを提供します。HDレゾナントスキャナーにより、これまでこの技術では実現できなかった実験においてもレゾナントモードが使用できるだけでなく、光毒性の減少というメリットが得られます。特にFOV 25mmとの組み合わせにより時間分解能が改善するため、多くの画像取得アプリケーションにおいてスループットが大幅に改善できます。A1R HD25は他の共焦点システムよりも、高品質の画像を短時間で生成でき、比類のない柔軟性を提供します。

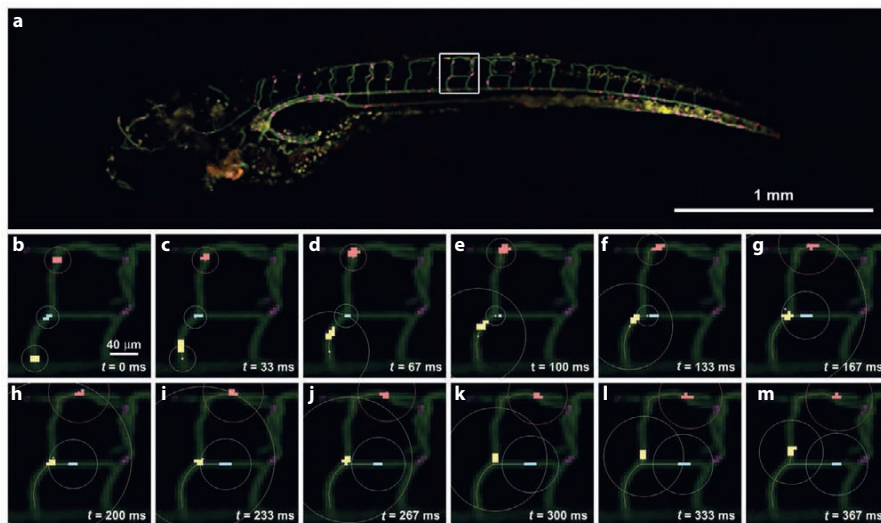


図3. ゼブラフィッシュ幼生全身の血流をA1R HD25を使用して2Dタイムラプス撮影した静止画。画像は、4X対物レンズを使用し、2Xの平均化、1,024 × 256のスキャンサイズで、毎秒30フレームを取得。a: 25mmの広視野にわたる幼生を捉えたタイムラプス画像の1フレーム。b~m: 画像a中に白い四角で示された領域のタイムラプス画像のうち、連続する時点の12フレーム。単一の血球を追跡したデータを示す。ガルバノスキャナーでは、同様の設定でこれらの追跡を正確に解像するには時間分解能が不十分である。追跡データはNIS-Elementsの2Dトラッキング機能で生成した。

画像ご提供: M. Marvin, Williams College