



## 共焦点顕微鏡の視野の拡大により、 信頼性の高い画像を取得

従来、共焦点システムのFOV(視野数)は、そのシステムが搭載されている顕微鏡のFOVにより制限を受けていましたが、ニコンのTi2倒立顕微鏡の発売により、25mmのFOVが利用可能になりました。ニコンはこの技術をさらに活かし、世界最大級のFOVを持つポイントスキャン共焦点システムA1 HD25を開発しました。本アプリケーションノートでは、この技術が日常の実験にもたらす効果について紹介します。

顕微鏡を利用したイメージングは、研究の重要なツールとして1600年代から継続的に進化してきました。今日の顕微鏡システムには、より優れたデータを取得するために、ハイエンドカメラやLED、レーザー、共焦点スキャナーなどの多彩な技術が応用されています。中でも近年は、スループットを向上させ、顕微鏡システムの前にいる時間を減らしながらより多くのデータを生成することが求められています。共焦点蛍光顕微鏡の場合は、より高速で、高感度なシステムへの改良に重点を置いています。しかし、蛍光標本は光子量が限られているため、照射するレーザーが強くなる、または十分な信号が生成されないなど、実用において限界があります。

ニコンはこれらの限界を認識した上で、業界をリードする高速、高感度、高画質に加えて、さらに高スループット化を目指し、より大きな画像を取得するための新たなアプローチに取り組みました。また、自社ガラスの優れた光学品質を生かし、より大型の光学部品を開発することによって、共焦点顕微鏡システムのFOVを、驚異的な25mmにまで拡大しました。このFOVの拡大が多くの研究に与える効果に重点を置き、A1 HD25が共焦点顕微鏡の新しい標準となる理由について解説します。

### 視野の拡大により、 単一画像における細胞カウント効率が向上

最も一般的な顕微鏡イメージング実験として細胞カウント解析があります。この解析は、さまざまな方法で実施され、細胞や組織の成長や死、薬物治療の効果、環境ストレス/外部ストレスの結果に関する問題の精査に使用されます。このような実験の想定モデルが顕微鏡による解析に適している場合、研究者はそれらの条件に合わせた標本を作成し、画像を取得します。

その後、画像解析を行い、それぞれの条件における細胞数をカウントします。この実験では多くの場合、研究者は顕微鏡の前で、与えられた命題の解明に必要な細胞数(n)を得るため、条件ごとに十分な数の画像を取得しなければなりません。このような一般的な顕微鏡システムにおいて、FOVはどのような影響をもたらすでしょうか。

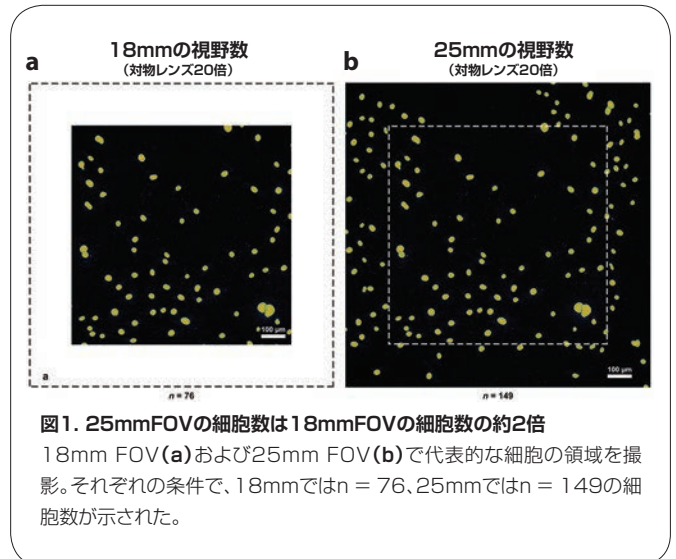


図1は、25mm FOVと18mm FOVを使用して、単一視野における細胞核の数を計測した代表的なデータを示します。18mm FOVでは、図1aの視野中で76個の細胞が計測されたのに対し、FOVを25mmに拡大しただけで、同じ領域を撮影した場合に細胞数が149個に増加しました(図1b)。このFOVの改善により、画像一枚当たりで、ほぼ2倍のデータを収集できることがわかります。これにより、同じ細胞数nを取得するのに必要な撮影枚数が少なくて済むため、実験時間を2分の1に削減できます。たとえばこの例で、1,500個の細胞数nがそれぞれの条件において必要だと仮定します。18mm FOVでは約20枚の画像が必要なのに対し、25mmFOVでは10枚以下の画像で同じ細胞数が得られることとなります。

Adam White

Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA. Eメール: adam.white@nikon.com

## APPLICATION NOTES

### 視野の拡大により得られる細胞数が増加し、 実験全体の統計データも改善

もちろん、共焦点顕微鏡で取得する実験データの場合、時間の節約が必ずしも最終目標ではありません。例えば、特定の条件下で微妙な変化が発生したにもかかわらず、統計解析の結果から結論が出ないという場合、個体数 $n$ を増やすことで、導かれる結論に十分な信頼性が得られる可能性があります。図2は、47枚の画像を18mmと25mmの両方のFOVで取得した実験において、視野の拡大が細胞数に与える累積効果を示しています。このデータから、これら47枚の累積細胞数が25mm FOVの場合に急速に増加することが明らかになりました(図2a)。この場合、平均輝度測定値も画像データから取得できます(図2b)。また、あまり顕著ではないが同様に重要なこととして、広視野であることにより多くのデータが取得できるということは、すなわち同じ枚数の画像ではるかに大きな $n$ 値が生成でき、統計誤差が少なくなることを意味します(図2bのエラーバーで表示)。言い換えると、広視野で画像を取得する場合、画像の総数が増えるに従い、相対的に不確実性が急速に低下します。また、不確実性が低いほど、実験結果の照合の際に、正しい結論を導き出すことが可能です。A1 HD25は、既存のツールと技術を活用してより良いデータを生成するだけでなく、よりインパクトのある研究成果を取得できます。

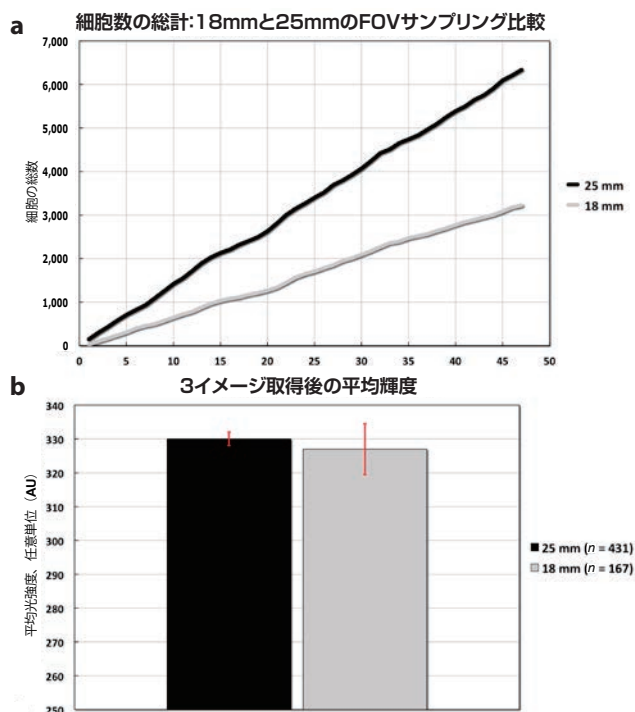


図2. FOVの拡大により、1回の実験で得られる細胞数が増加し統計の質が向上。上図は25mm FOVおよび18mm FOVで収集した47枚の画像から得た累積細胞数を示す。a、各条件での合計データ。b、3枚の画像による代表的な平均輝度測定値。 $n$ 値が高いほど、誤差が小さいことを示している。AUは任意単位。

### まとめ

ここでは記述していないものの、A1 HD25は細胞カウント以外の多くのアプリケーションにも有効であると言えます。例えば、上述の広視野は共焦点ハイコンテンツスクリーニングにも威力を発揮します。画像一枚あたりに収集できるデータ量が最大になるため、非常に高速なスクリーニングシステムが実現します。ゼブラフィッシュ胚などの大型のモデル生物も、生体全体を一つの視野で、しかも従来よりも高倍率で捉えることができます。全体像が得られることにより、従来のFOVよりも高倍率・高解像度で詳細な画像が取得できます。共焦点顕微鏡のもう一つの一般的なアプリケーションである画像タイリングにおいても、A1 HD25はその大きなFOVによって、画像を高速で生成できるだけでなく、光学再設計によりタイリング画像生成におけるアーティファクトを低減できます。(図3の例を参照)。

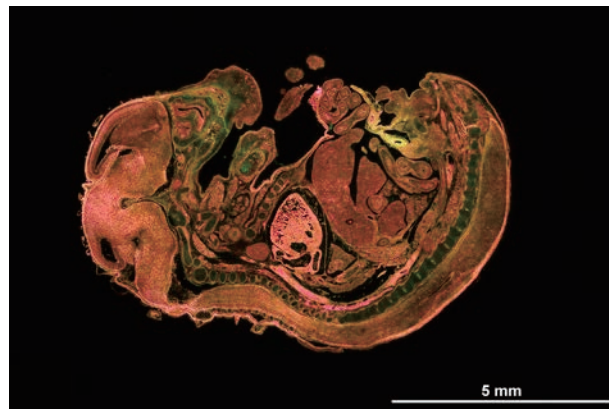


図3. A1R HD25を使用して10Xで撮影し、タイリングしたマウス胚の全景

ニコンのA1 HD25は、25mm FOVを採用した最新のポイントスキャン共焦点顕微鏡です。上記のデータや画像により、このシンプルながら重要な光学的改良が、顕微鏡イメージングの時間をどれほど有意義にするかが理解できます。A1R HD25は、いつ、いかなるイメージングにおいても、より多くの優れたデータの取得を実現します。