

APPLICATION NOTE

超解像共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R with NSPARC

複雑な組織構造の高精細イメージング

超解像共焦点レーザー顕微鏡システム AX R with NSPARCによる
効率的な組織全体の俯瞰とサブミクロンイメージング

キーワード：糸球体、固体組織透明化、ポリマー包埋組織、高速レゾナントスキャン、ISM、エアリーユニット、屈折率

はじめに

腎臓の主な機能のひとつは、血液中の老廃物や塩分をろ過し、尿として排出することである。この機能は、腎臓内の糸球体という特殊な構造体が担っている。糸球体の複雑で「ふるい」のような構造は、腎臓を流れる血液を選択的にろ過する上で重要な役割を果たしている。腎臓内の糸球体は均一に分布しているわけではなく、皮質と髄質の境界付近に多く存在し、髄質深部には少ないといった分布の偏りがある。糸球体の分布を俯瞰的にとらえることは、腎臓内における機能の不均一性の理解につながる。このアプリケーションノートでは、ニコンの先進的な超解像共焦点レーザー顕微鏡システム AX R with NSPARCを用いて、腎臓組織標本の俯瞰像から今回のターゲットであるマウス糸球体を特定し、さらに糸球体内部の微細な3次元構造をサブミクロンレベルの超解像度で画像取得した事例を紹介する。

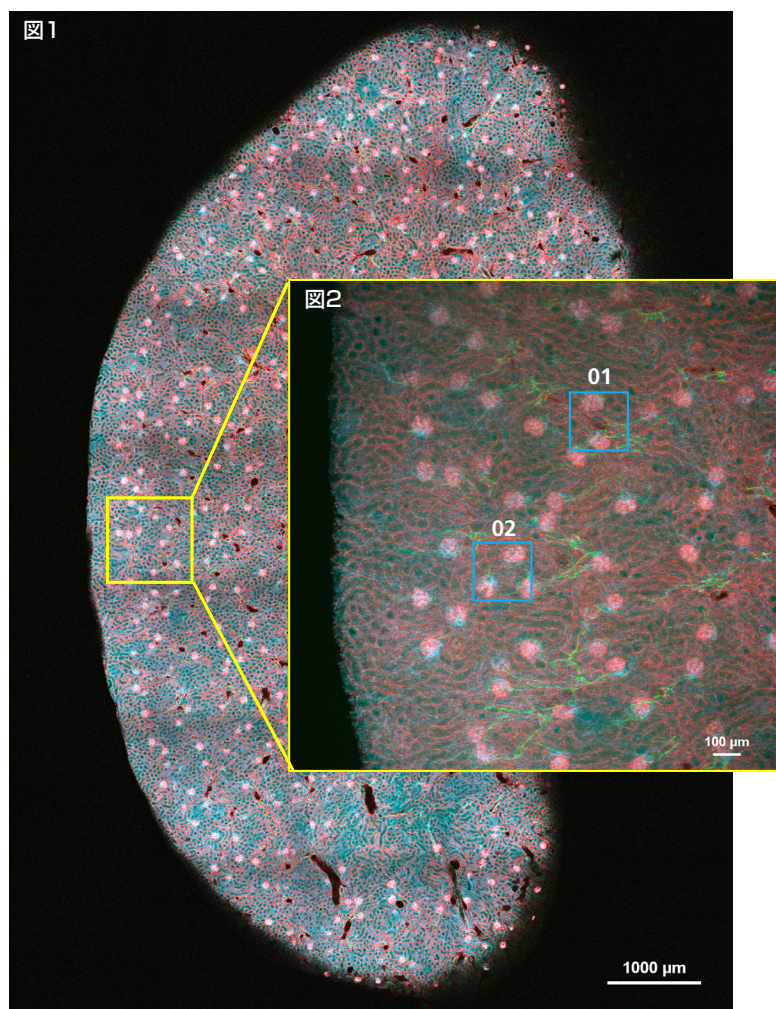


図1：マウス腎臓組織の全体像

【サンプル調製】

マウス腎臓組織サンプルをSolid-SuperR polymerで包埋し、核をDAPI（青）で、血管をWGA-AF555（赤）で、神経をTUBB3-AF647（緑）で蛍光染色した。

【撮影条件】

以下の条件で光学断層像を光軸方向に206層取得し、5x7枚の繋ぎ合わせ画像を生成した。
Zステップ：2.3 μm、Z移動範囲：471 μm、対物レンズ：Plan ApoChromat Lambda D 10X/0.45、総取得時間：4時間29分、画素サイズ：1.72 μm、1K x 1K 高速レゾナント走査

図2：高解像度画像取得のなされる領域01、02付近の拡大画像

【撮影条件】 69層の光学断層像、Zステップ：2.3 μm、Z移動範囲：156 μm、対物レンズ：Plan ApoChromat Lambda D 10X/0.45

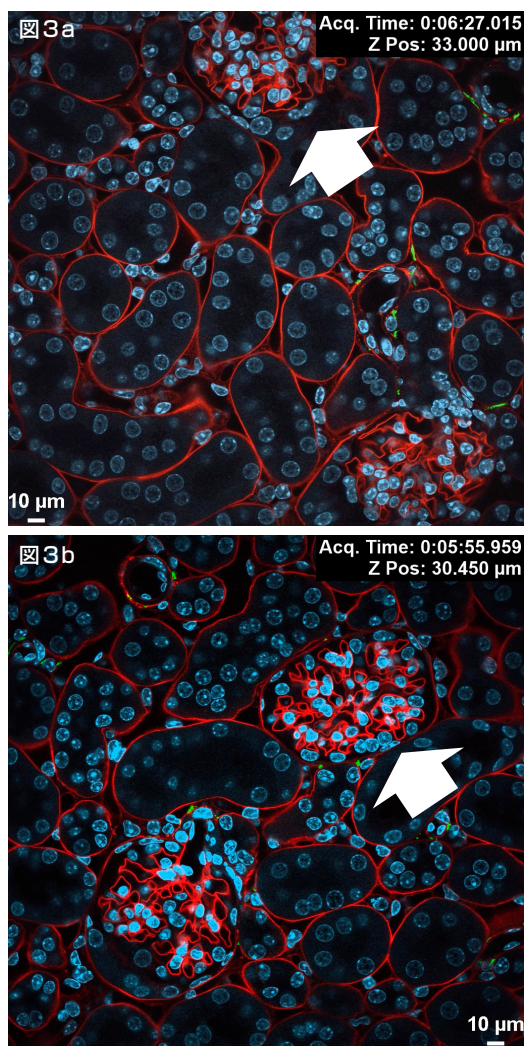


図3a：図2の領域01の高解像度光学断層像

【撮影条件】 458層の光学断層像、Z移動範囲：68.4 μm、取得時間：13分21秒、画素サイズ：0.29 μm、対物レンズ：Plan ApoChromat Lambda D 60X Oil/1.42、1K x 1K 高速レゾナント走査

図3b：図2の領域02の高解像度光学断層像

【撮影条件】 514層の光学断層像、Z移動範囲：76.8 μm、取得時間：14分57秒



図3a
動画



図3b
動画

ポリマー包埋された組織は厚さにばらつきがあり、イメージング深度が深かったため、俯瞰像撮影時に7,200枚を超えるコンフォーカルの蛍光画像を取得した。広いサンプル領域から効率的にデータを取得するため、高速レゾナントスキャン機能を用いた。得られた画像の3つのチャンネル(3色)間で蛍光のクロストークがなく、わずか数時間で大型組織の俯瞰像を取得した。

低倍率の対物レンズ(図1、図2)で糸球体を確認した後、油浸対物レンズに切り替えて詳細なイメージングを行った。Zスタック(光軸に沿った連続断層像)の撮影も高速レゾナントスキャンで行い、広範囲の概観画像の取得と、微細構造の精密な解像度の画像取得の両方を実現した(図3a、3b)。

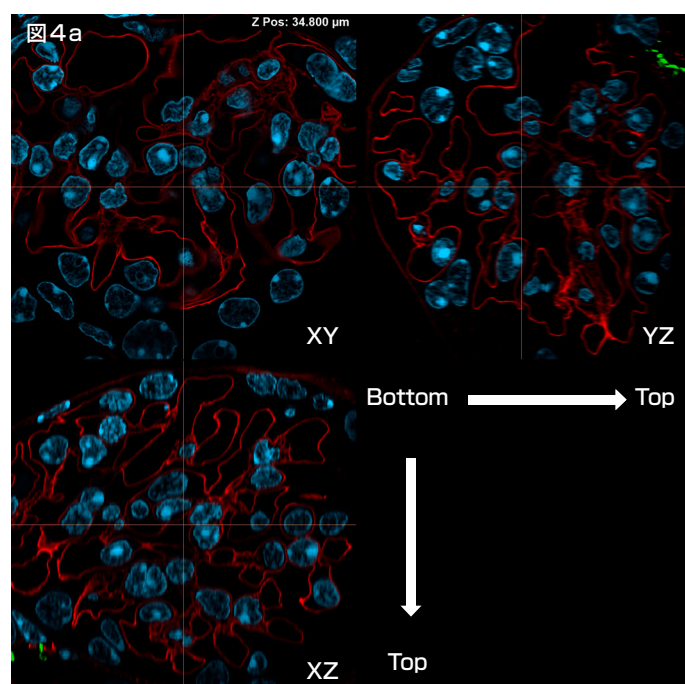


図4a: 図3aの矢印で示した糸球体の直交画像(XY, YZ, XZ面)

【撮影条件】 以下の条件で、ISMモード(NSPARC)により撮影した。
光学断層数: 469層、Zステップ: 0.15 μm、Z移動範囲: 70.05 μm、
画素サイズ: 0.07 μm、対物レンズ: Plan Apochromat Lambda D
60X Oil/1.42、1K x 1K 高速レゾナント走査



図4a 動画

図4b: 図3bの矢印で示した糸球体の直交画像

【撮影条件】 以下の条件で、ISMモード(NSPARC)により撮影した。
光学断層数: 469層、Zステップ: 0.15 μm、Z移動範囲: 74.1 μm、
画素サイズ: 0.07 μm、1K x 1K 高速レゾナント走査



図4b 動画

図5: ISM (Image Scanning Microscopy) の原理

- アレイディテクターの各チャンネルの投影画像
- 各チャンネル画像のPSFの概念図。加算後の最終PSFと明るさは、標準の1エアリーユニットのピンホールサイズに相当する。
- ピクセル再割り当て後の画像投影
- ピクセル再割り当て後のPSFの概念図。最終PSFは、0.2エアリーユニットのピンホールサイズに相当し、シグナルロスなくXY解像度が向上する。

最後に、糸球体内の複雑な血管網を超解像イメージングするために、Image Scanning Microscopy (ISM) モードを利用した。このアプローチにより、核の近くに位置する微細な血管構造を3次元的に正確に捉えることができた(図4a、4b)。

ISMでは、信号検出用のピンホール直径を、標準の1エアリーユニットより小さい0.2エアリーユニットに設定した。これによりXY及びZ方向の解像力が向上するが、通常は蛍光シグナルが弱くなってしまう(図5 a、b)。しかしISMモードの光学系セットアップとピクセル再割り当ておよびデコンボリューションを組み合わせることで、シグナルの強度を失う事なく、空間的な解像度の向上した画像を取得できる(図5 c、d)。

謝辞および参考文献

本研究に使用の試料のご準備ならびにご提供を賜りました、台湾国立清華大学のShiue-Cheng (Tony) Tang教授に深謝致します。

本研究で用いたA-haベースのSolid-SuperR包埋技術に関して:

Transparent tissue in solid state for solvent-free and antifade 3D imaging,

<https://www.nature.com/articles/s41467-023-39082-4>

同様の試料はSunJin Lab Co. (台湾) より販売されています:

<https://www.sunjinlab.com/product-category/solid-superr>

編集者: 株式会社二コ 中村竜、名川信吾

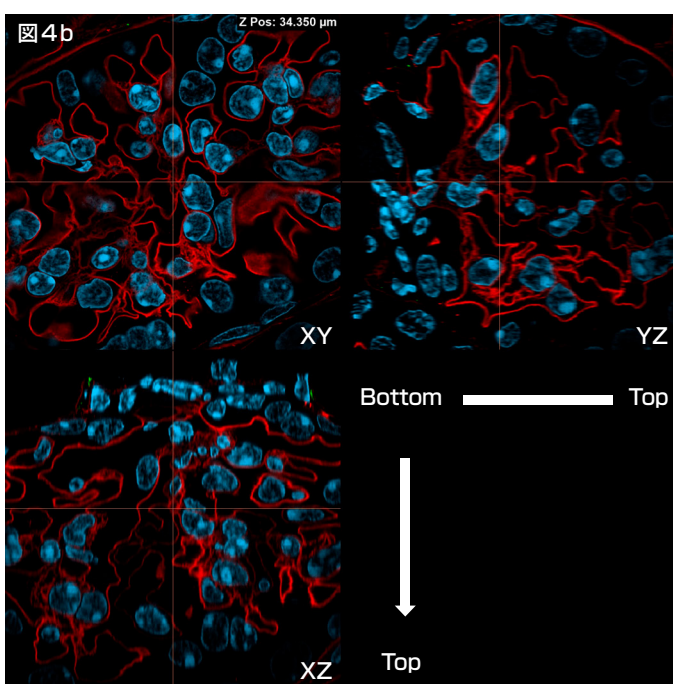
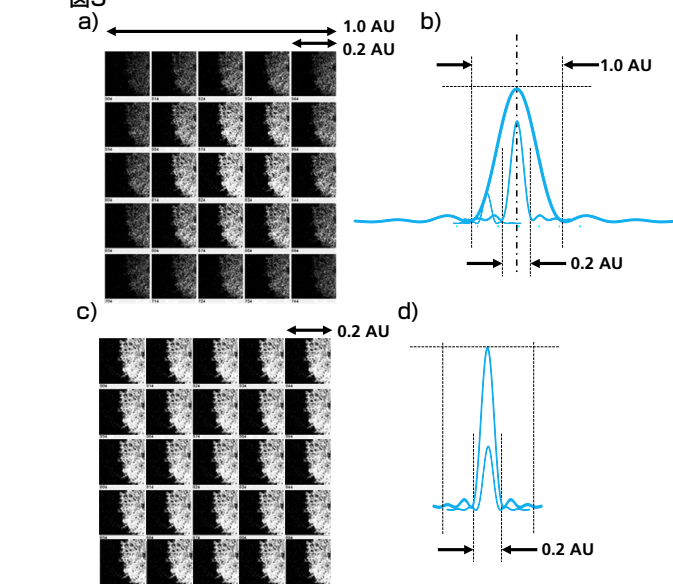


図5



結論

今回取得した画像では、カバーガラス界面から糸球体を通して反対側に至る光軸に沿って、一貫した解像度が保たれた。この安定性は、固体ポリマー包埋試料の屈折率が均一で、且つ液浸オイルの屈折率と極めて近いことに起因する。その結果、光学的な収差が最小限に抑えられ、カバーガラス界面から深層部位へ至るまで高い画質が保たれたと考えられる。

製品情報

超解像共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R with NSPARC

超解像検出モジュールNSPARCを共焦点顕微鏡AX/AX Rに搭載可能。25個のアレイ状検出器により解像度とS/N比をさらに向上し、複雑な組織構造の高速かつ超解像度のイメージングを実現します。



製品情報は[こちら](#)

