

APPLICATION NOTE

デジタル倒立顕微鏡 ECLIPSE Ji
画像統合ソフトウェア NIS-Elements AR
オプションモジュール 2D/3Dデコンボリューション、EDF

オルガノイドのスピーディかつ鮮明な3Dイメージング ：落射蛍光と共焦点イメージングを用いた効率的なワークフロー

近年、人工知能（AI）や画像処理技術の進歩により、シンプルな操作で高品質な3D画像を迅速に得られるようになりました。落射蛍光顕微鏡は多くの画像を短時間で取得できる利点がありますが、厚みのあるサンプルでは、焦点外で生じるボケ光が原因でコントラストが低下します。3Dデコンボリューションを用いることでこのボケ光を除去し、画質を大幅に改善することができます。また、焦点画像合成（EDF）機能により、3Dデータから焦点の合った高コントラストの2D投影画像を作成できます。本アプリケーションノートでは、AIや画像処理技術を用いてオルガノイドの3D画像をスピーディに取得する方法を紹介します。

キーワード：オルガノイド、エンテロイド、三次元小腸上皮培養系、3Dイメージング、デコンボリューション、人工知能（AI）

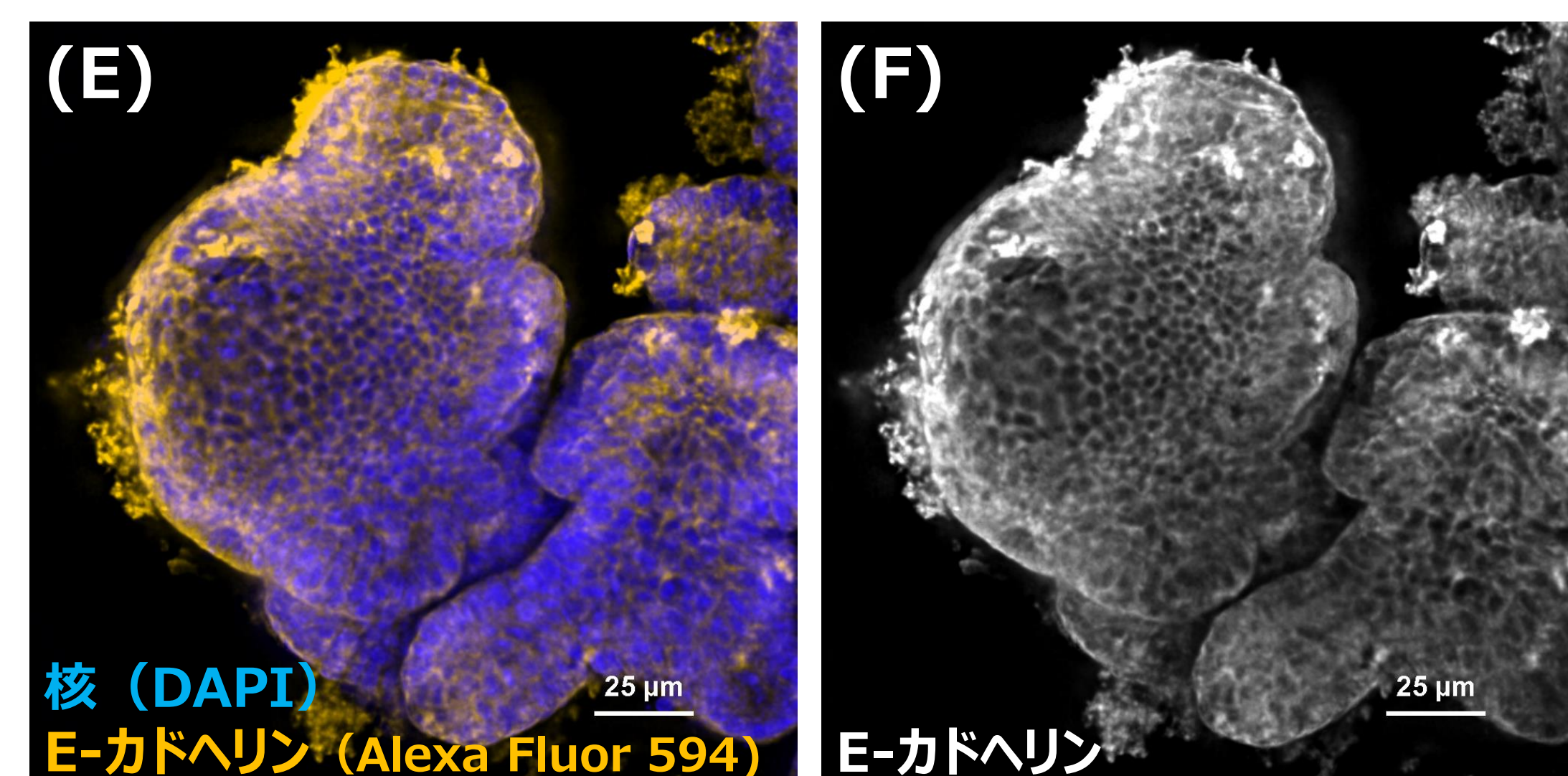
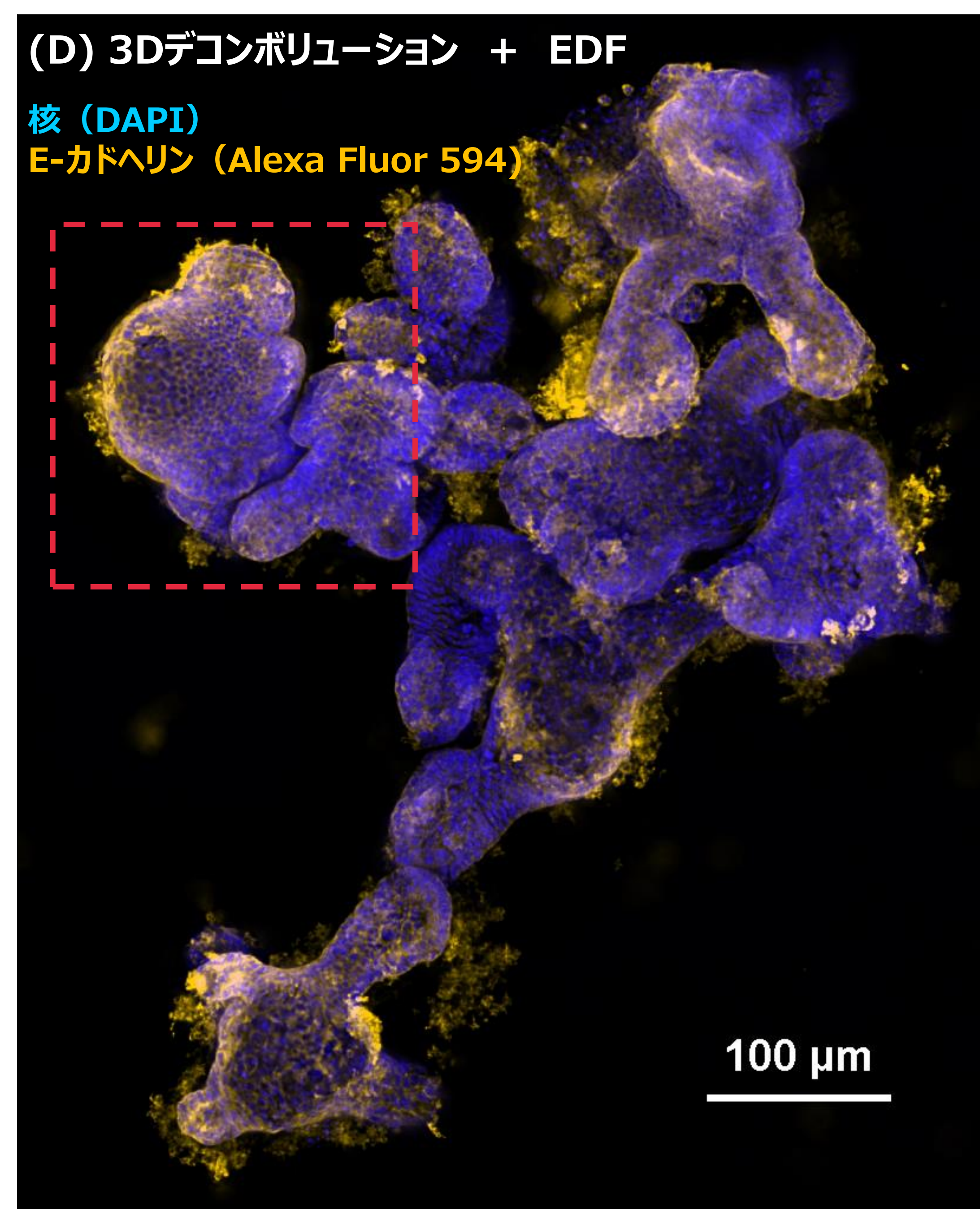
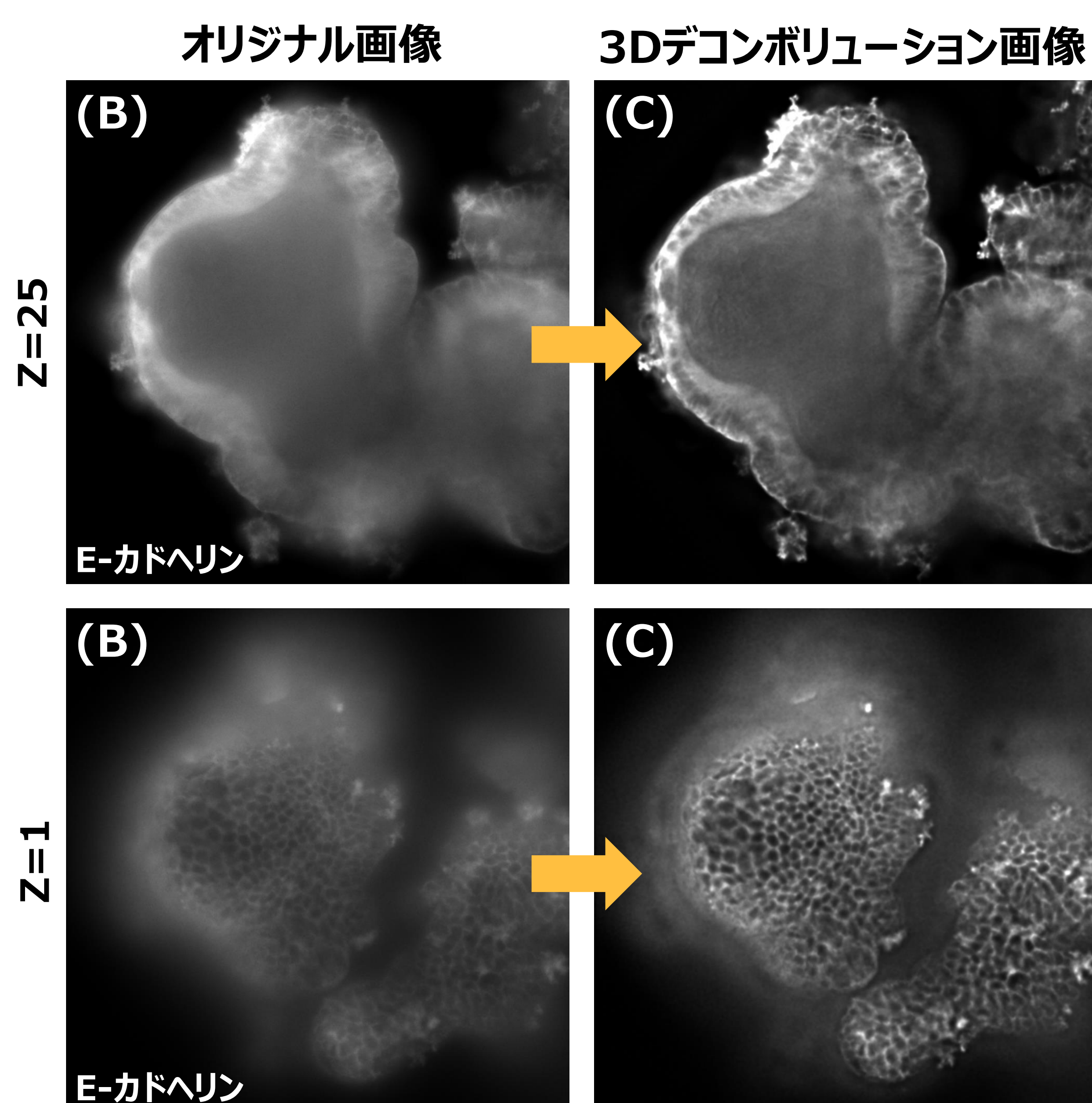
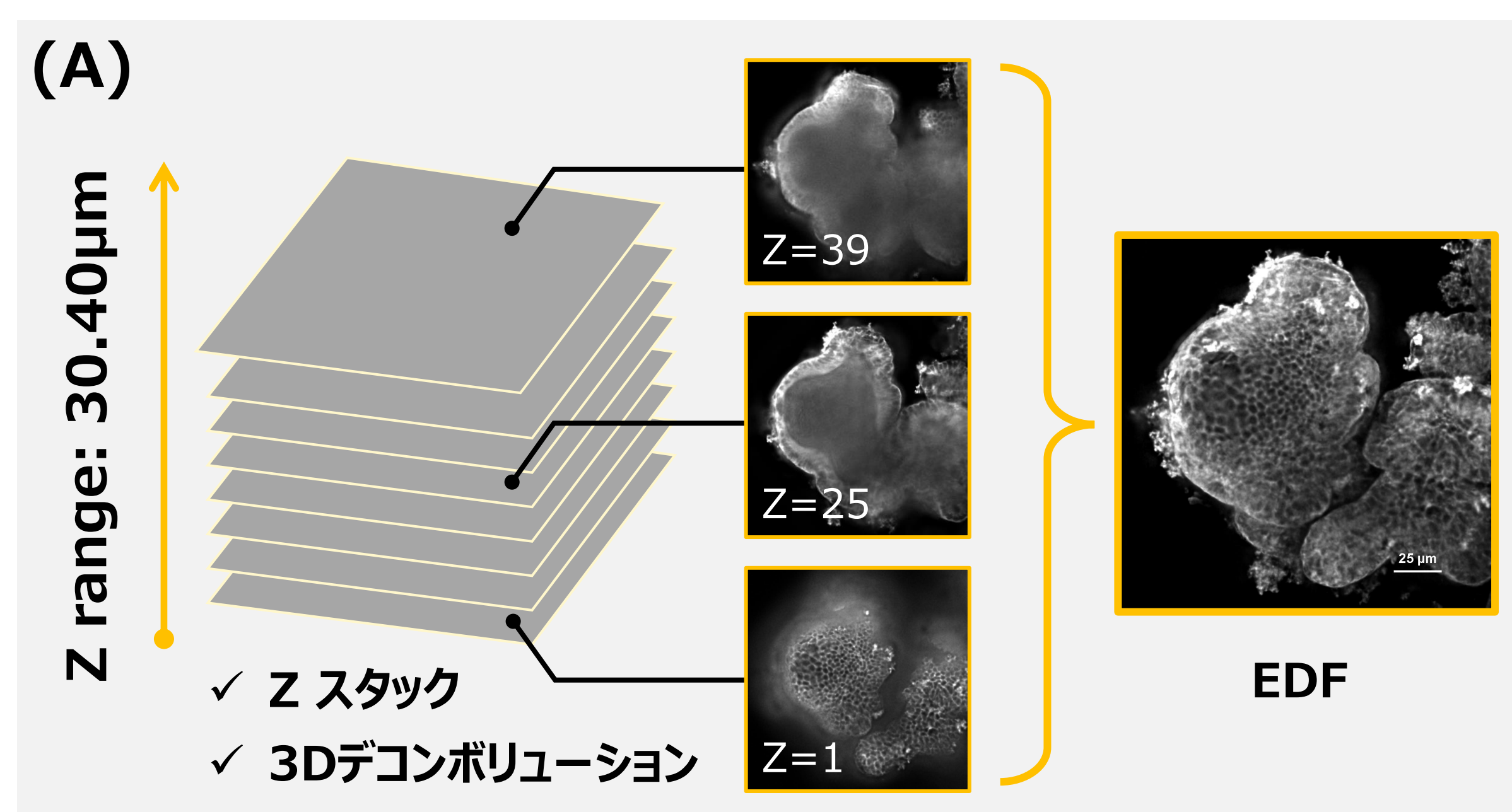


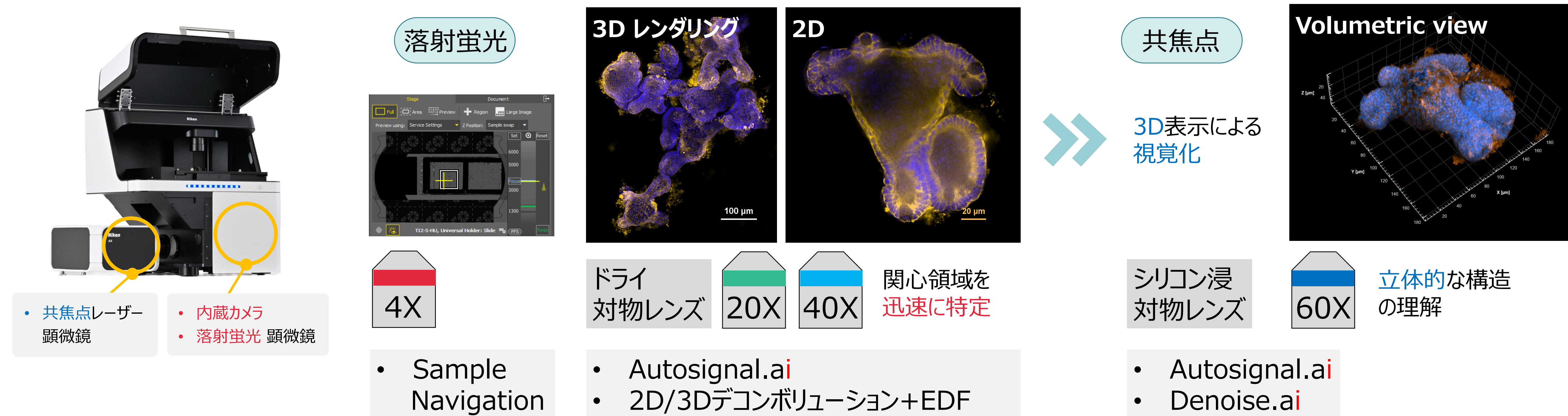
図1. 落射蛍光画像におけるボケ光の除去と画質の改善（3DデコンボリューションとEDF）
(A) EDFの概念図、(B、C) E-カドヘリン (Alexa Fluor 594) を蛍光染色したエンテロイド（3次元小腸上皮培養システム）、
(B) オリジナル画像：落射蛍光によるボケ光でコントラストが低下している。
(C) 3Dデコンボリューションを適応後の画像：ボケ光が除去され、E-カドヘリンの網目構造を鮮明に可視化できている。
(D) 3Dデコンボリューションを適応した39枚のZスタック画像に対して、全てに焦点のあった1枚のExtended Depth of Focus (EDF) 画像を構築した。核（青：DAPI）と E-カドヘリン（オレンジ：Alexa Fluor 594）の蛍光マージ画像、(E) Dの赤色点線枠の拡大画像、(F) E-カドヘリンの蛍光モノクロ画像、スケールバー：100 μm (D)、25 μm (E, F)。

【画像取得条件】

- 落射蛍光
- 対物レンズ：PLAN APO λD 20x (NA0.8)
- Zスタック：0.8 μm x 39 steps (Z Range: 30.40 μm)

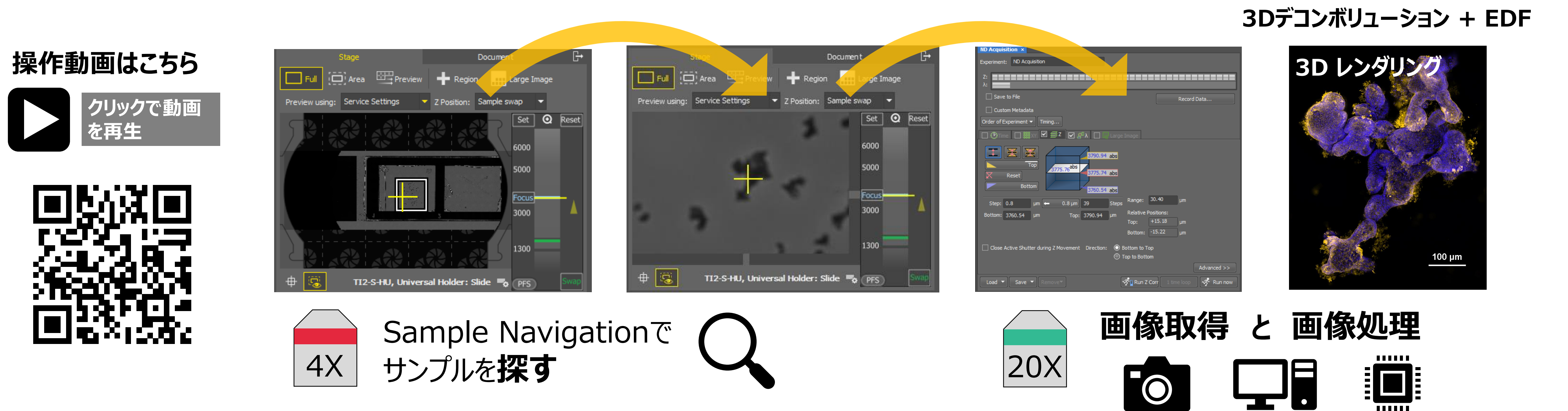
落射蛍光と共焦点イメージングを組み合わせた効率的なワークフロー

Autosignal.aiは、AIがサンプルの観察に最適な露光条件を決定するため、シンプルな操作性で撮影条件を設定できます。落射蛍光顕微鏡は関心領域を迅速に特定できます。さらに共焦点に切り替えて関心領域の3D画像を取得することにより、立体的な構造の理解が深まります。



実験 1：3DデコンボリューションとEDFを活用した落射蛍光イメージング

39枚のZスタック画像を蛍光2波長の条件で、わずか18秒で高速に画像を取得できました。今回の実験では、サンプルナビゲーションによるスライドサンプルの全域画像取得から、サンプルを探して約30μmの厚みのオルガノイドの画像取得および画像処理完了まで約3分30秒でした。オルガノイドの鮮明な画像がスピーディに得られました。



■ サンプルナビゲーションを活用したイメージングのフロー

- 1) サンプルナビゲーションでスライド全域の画像を取得し、サンプルの位置を特定。
- 2) 4倍の対物レンズで関心のあるオルガノイドを探し、20倍の対物レンズに切り替えてND AcquisitionでZスタック画像を取得。
- 3) 取得した3D画像に対して、3Dデコンボリューションでボケ光を除去し、EDFで1枚の全焦点画像を構築。

■ 画像取得と画像処理時間：合計1分38秒

- 画像取得時間：18秒（倍率：20X、Zスタック：0.8μm x 39 steps (Z Range:30.40μm)
- 画像処理時間：1分20秒（Richardson Lucyによる3Dデコンボリューション：52秒、EDF：28秒）

* NVIDIA Quadro RTX 4500 を使用

実験 2：高NA対物レンズと2Dデコンボリューションを活用した落射蛍光イメージング

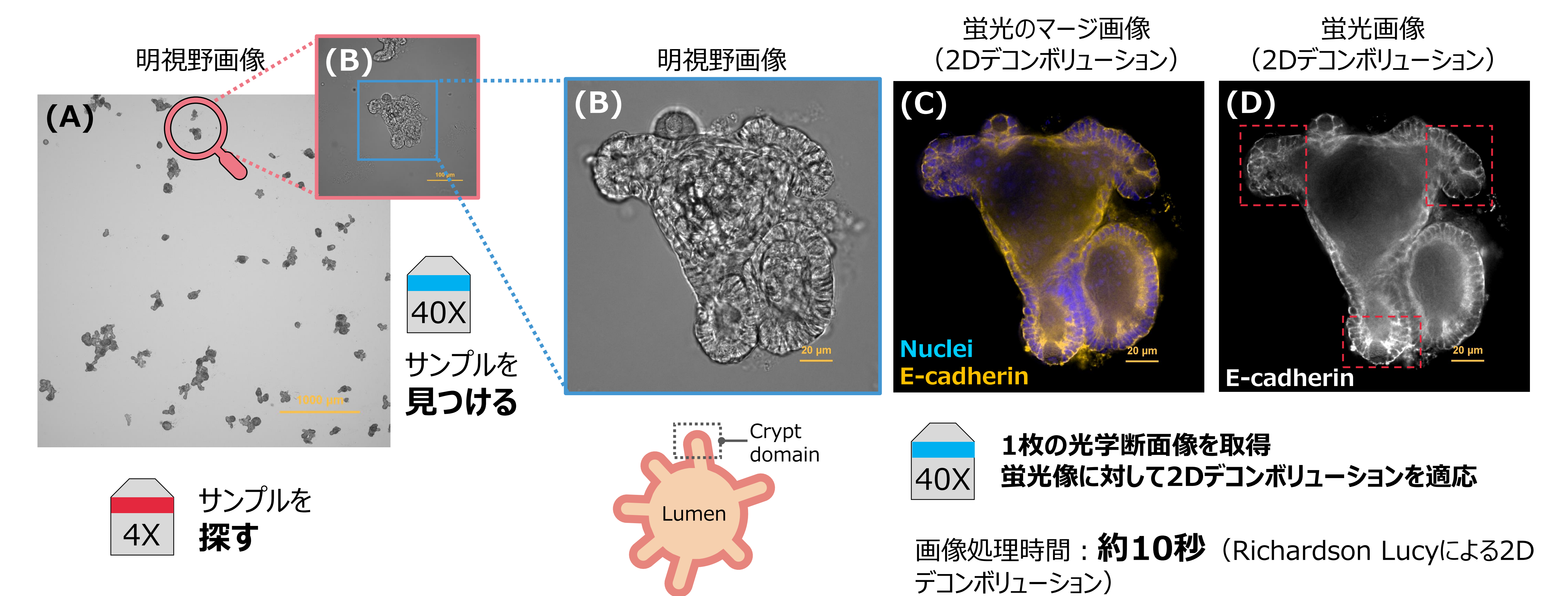


図2. クリプトドメインを有するエンテロイドの落射蛍光イメージングと2Dデコンボリューション

(A) エンテロイドの明視野画像、対物レンズ：PLAN APO λD 4x (NA0.2)、(B, C, D) 明視野画像と2Dデコンボリューションを適応した落射蛍光画像、対物レンズ：PLAN APO λD 40x (NA0.95)、(B) 明視野画像、(C) 蛍光マージ画像（核（青：DAPI）、E-カドヘリン（オレンジ：Alexa Fluor 594））、(D) E-カドヘリンの蛍光モノクロ画像、(C, D) NAが高い対物レンズを用いて被写界深度の浅い光学断面像が得られました。1枚の光学断面像を取得し、蛍光画像に対して2Dデコンボリューションを適応して、クリプトドメイン（画像Dの赤色点線枠）を鮮明に観察できました。スケールバー：1000μm（A）、20μm（B, C, D）。

実験3: 高倍率のシリコン浸対物レンズを用いた共焦点イメージング

透明化処理をしていないエンテロイドの深部領域では光が減衰して像が暗くなります。Denoise.ai機能は、学習済みニューラルネットワークを使用し、人工知能（AI）でレゾナントスキャン共焦点画像からショットノイズを除去し、画質を向上させることが可能です。高速レゾナントスキャナーで取得した画像に対してDenoise.aiを適応することによりショットノイズを除去し、暗い深部領域であっても画質が大幅に改善しました（図3. D-1, D-2）。これにより、クリプトドメインのパネト細胞周辺の領域を鮮明に観察できました。

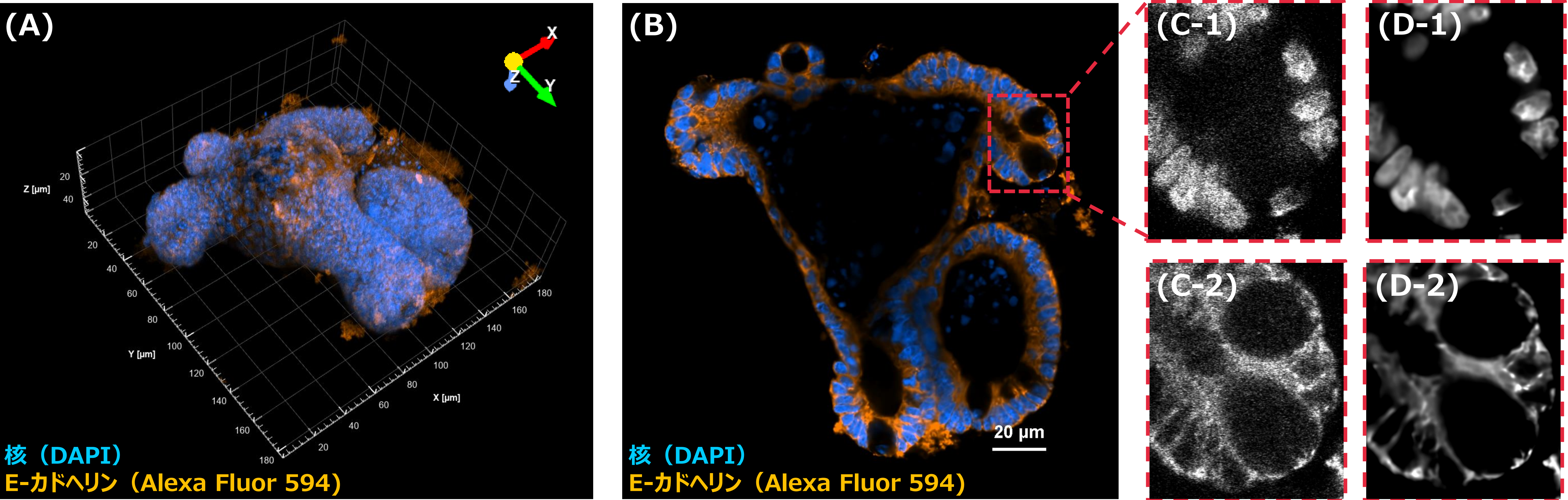


図3. クリプトドメインを有するエンテロイドの共焦点イメージングとDenoise.aiによる画質の改善

(A, B) 核（青：DAPI）とE-カドヘリン（オレンジ：Alexa Fluor 594）を蛍光染色したエンテロイドの共焦点画像
(A) 合計227層（Z range: 53.30μm）の光学断面像をポリュメトリック画像で表示した立体的な画像
(B) Z=123（Z深度：28.77μm）の光学断面像、(C, D) Bの赤色点線枠領域の拡大画像
(C-1, C-2) Denoise.ai適応前のオリジナル画像、(D-1, D-2) Denoise.ai適応後の画像
(C-1, D-1) 核（DAPI）の共焦点画像
(C-2, D-2) E-カドヘリン（Alexa Fluor 594）の共焦点画像
スケールバー：20μm（B）

【画像取得条件】

- 対物レンズ：Plan Apo Lambda S 60XC Sil (NA1.3)
- Zoom: 1.3x
- 2K x 2K pixels
- レゾナントスキャナー
- Averaging: 4x
- Z range：53.30μm（Z Step 0.236μm x 227 steps）

まとめ

- **AIの利点**
 - ✓ **簡単な操作性**：操作が簡単で、迅速に画像を取得できます。
- **落射蛍光顕微鏡と画像処理技術の利点**
 - ✓ **スピーディな画像取得**：カメラを用いて画像を取得するため、関心領域を迅速に特定できます。
 - ✓ **ボケ光の除去による画質の改善**：2D/3Dデコンボリューションは焦点外のボケ光を除去し、細部が鮮明な画像を提供します。
- **共焦点顕微鏡と画像処理の利点**
 - ✓ **3D画像の取得**：3D画像により、立体的な構造の理解を深めます。
 - ✓ **厚みのあるサンプル**：共焦点顕微鏡は、焦点外の光を除去し、高解像度で鮮明な画像を提供します。
 - ✓ **ノイズの除去**：Denoise.aiでショットノイズを除去し、高画質な画像を提供します。
- **落射蛍光と共焦点イメージングの組み合わせによる利点**
 - ✓ **効率的な関心領域の特定**：落射蛍光イメージングで高速に画像を取得し、関心領域を迅速に特定します。その後、共焦点顕微鏡で3D画像を取得し、効率的に詳細を観察できます。関心領域の特定から詳細観察までのトータル時間を短縮し、ワークフローを改善します。

関連するアプリケーションノート

- 1) 深部まで明るく鮮明に構造をとらえる ～対物レンズの選び方～
- 2) 小腸上皮細胞三次元培養系を用いた、パネト細胞による自然免疫応答のライブイメージング
- 3) レゾナントスキャナーを用いた超短時間レーザー励起によるライブイメージング
- 4) 画像統合ソフトウェアNIS-ElementsのDenoise.ai機能：ディープラーニングを応用して共焦点画像からノイズを除去

謝辞

標本をご提供いただきました、北海道大学 大学院先端生命科学研究 自然免疫研究室の横井友樹先生、中村公則先生に深謝致します。

著者情報

株式会社 ニコン 小林千春

製品情報

デジタル倒立顕微鏡 ECLIPSE Ji
共焦点レーザー顕微鏡システム AX

ECLIPSE Jiは、内蔵カメラと落射蛍光光源により高速で高解像度の画像取得が可能です。また、必要に応じて共焦点にアップグレード可能なシステムです。落射蛍光を用いた高速イメージングから、共焦点画像による立体的な構造の理解まで、この1台でシームレスに結果を得ることができます。

