



APPLICATION NOTE

超解像共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX R with NSPARC

蛍光ビーズを参照データとした非線形デコンボリューションによる歪み補正技術

イメージ走査型顕微鏡（Image Scanning Microscopy: ISM）は、蛍光シグナルの強度を損なうことなく空間分解能を向上させる技術である。この技術にデコンボリューション処理と組み合わせることで、ISMは従来の光学解像度の限界を超える超解像画像を取得することが可能になる。

一方で、三次元（3D）イメージングの課題として、対物レンズの浸液媒質（水、シリコン、オイルなど）と生体試料との屈折率の不一致により、光軸方向に歪みが生じることが挙げられ、ISMによってXY平面内の分解能が向上しても依然として同じ課題が存在している。

上記課題の解決のため、様々な深さに埋め込まれた蛍光ビーズから抽出した点像分布関数（Point Spread Function: PSF）を用いて、非線形デコンボリューションによる処理を試みた。その結果、理論的なPSFモデルに基づく標準的な線形デコンボリューションによって得られた光軸分解能と比較して、非線形デコンボリューションの優位性が示された。

実験の概要

サンプル作製にあたり、まず小腸スライスの免疫染色を行った。包埋には、台湾の国立清華大学のShiue-Cheng (Tony) Tang教授の研究室が開発したアクリルアミドベースのA-haポリマー（屈折率R.I.=1.53）を使用した（Nat. Commun, 14:3395, 2023; <https://www.nature.com/articles/s41467-023-39082-4>）。この調製により、組織サンプルのスライドは高い透明性、優れた屈折率の均一性、光退色に対する強い耐性を得ることができる。

PSFは、特注のRapiClear 1.53ゲル（R.I.=1.53, SunJin Lab Co., 台湾）に埋め込まれたTetraSpeck™蛍光ビーズ（直径：100 nm, Thermo Fisher Scientific）の画像を取得して各深さでの光学スライス画像のシグナル強度の平均から抽出した。この抽出されたPSFを小腸サンプルの撮像前または撮像後に非線形デコンボリューションのパラメータとして使用した。（“Appendix：PSF Extractor の使用法”参照）

マウスの腸管L細胞におけるペプチドホルモン小胞（GLP-1）を撮像し、デコンボリューション処理の比較を行った。GLP-1は、インスリン分泌促進と代謝調節に関与し、肥満と糖尿病の研究において重要な因子である。画像取得には、油浸とシリコン浸の両方の対物レンズを使用した。3Dデータセットは、共焦点モードとISMモードの両方を用いて、共に0.1 μmのZステップで光学スライス像を取得し、線形デコンボリューションと非線形デコンボリューションで処理した小胞の半値全幅（Full Width at Half Maximum: FWHM）測定結果を比較した。

結果

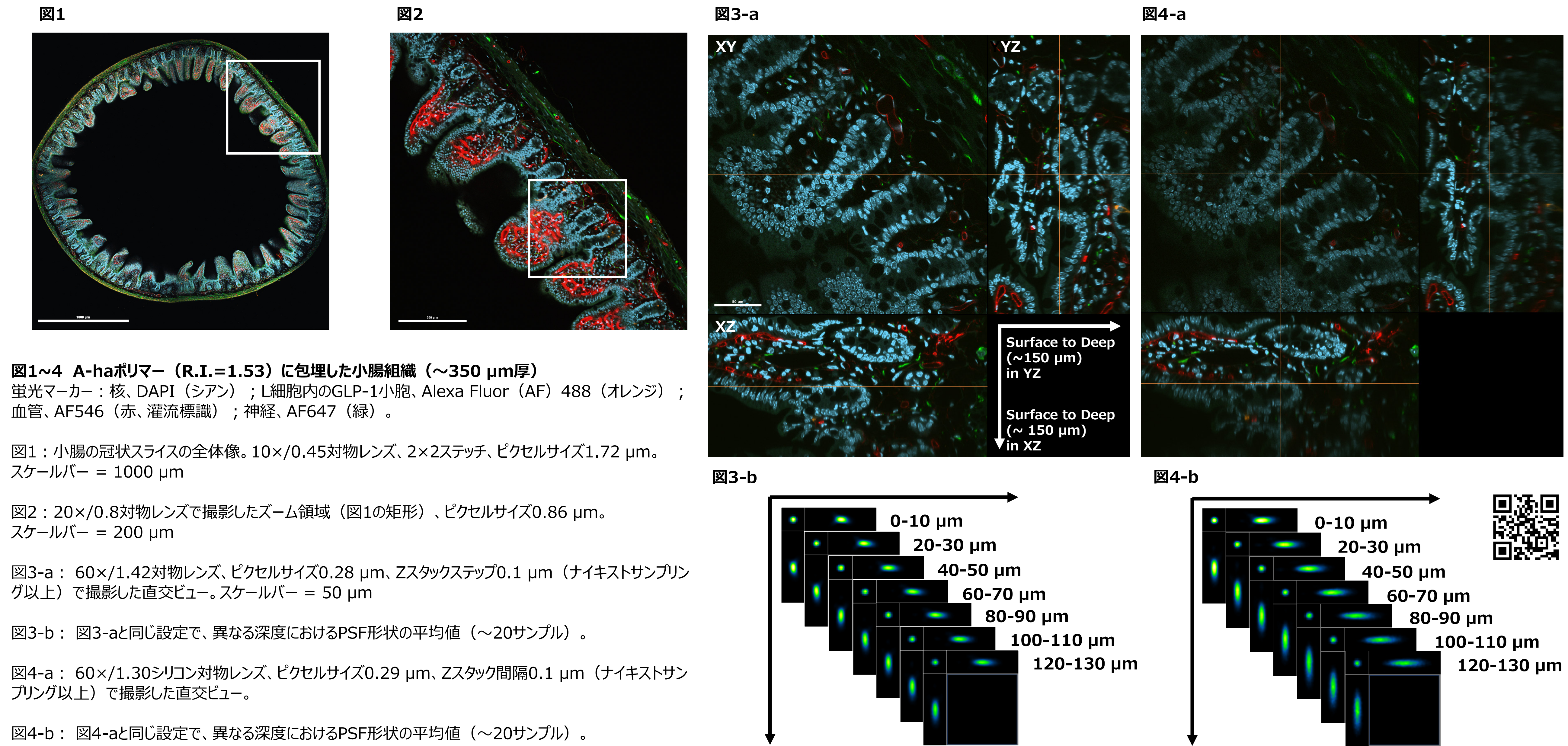


図5：L細胞の最大強度投影図。図3-aの領域に対応するボリュームデータ。スケールバー = 50 μm

図6：共焦点モードで撮像したL細胞の非線形デコンボリューション画像の直交図。細胞01、細胞02、細胞03、細胞04のGLP-1小胞。十字線はFWHM測定を行った位置を示す。挿入した画像は、図3-bから抽出した各細胞と同等の深さにあるビーズから得られたPSF。スケールバー = 5 μm

表1	GLP-1 Cell	Depth from glass surface	Objective-lens	FWHM of std DCV / psf DCV in XZ	FWHM of std DCV / psf DCV in YZ
	Cell 01	~17um~	PA60x/1.42 Oil Silicone60x/1.30	0.086 / 0.075 0.105 / 0.103	0.092 / 0.075 0.100 / 0.096
	Cell 02	~62um~	PA60x/1.42 Oil Silicone60x/1.30	1.657 / 0.961 1.996 / 1.525	1.165 / 0.874 1.841 / 1.502
	Cell 03	~100um~	PA60x/1.42 Oil Silicone60x/1.30	1.701 / 1.098 1.848 / 1.611	1.454 / 1.173 1.894 / 1.590
	Cell 04	140um~	PA60x/1.42 Oil Silicone60x/1.30	1.899 / 1.396 4.020 / 3.212	1.506 / 1.237 4.000 / 3.200

表1. 共焦点イメージングモードで測定したGLP-1小胞のFWHM値

図6に示した各L細胞について、GLP-1小胞のサイズを光軸に沿って共焦点イメージングモードで測定（n=5）し、線形（std）と非線形（psf）デコンボリューション（共にLucy-Richardsonアルゴリズム、繰り返し10回処理）処理を実施。画像は油浸対物レンズとシリコン浸対物レンズを用いた共焦点モードで取得した。

表 2	GLP-1 Cell	Depth from glass surface	Objective-lens	FWHM of std DCV / psf DCV in XZ	FWHM of std DCV / psf DCV in YZ
	Cell 01	~17um~	PA60x/1.42 Oil Silicone60x/1.30	0.456 / 0.454 0.620 / 0.720	0.057 / 0.454 0.788 / 0.866
	Cell 02	~62um~	PA60x/1.42 Oil Silicone60x/1.30	0.869 / 0.821 2.120 / 1.735	1.083 / 0.748 1.863 / 1.722
	Cell 03	~100um~	PA60x/1.42 Oil Silicone60x/1.30	0.954 / 0.954 1.429 / 1.342	0.876/ 0.708 1.723 / 1.648
	Cell 04	140um~	PA60x/1.42 Oil Silicone60x/1.30	0.617 / 0.600 -	0.561 / 0.620 -

表2. ISMモードで測定した表1と同じ細胞の同じGLP-1小胞のFWHM値

ISMモードで測定し、線形と非線形デコンボリューションのアプローチを比較した。すべての処理はLucy-Richardsonアルゴリズム（10反復）で行った。赤でハイライトした値は、ISMイメージング中のサンプルドリフトや外部振動による偏差の可能性を示す。

図7

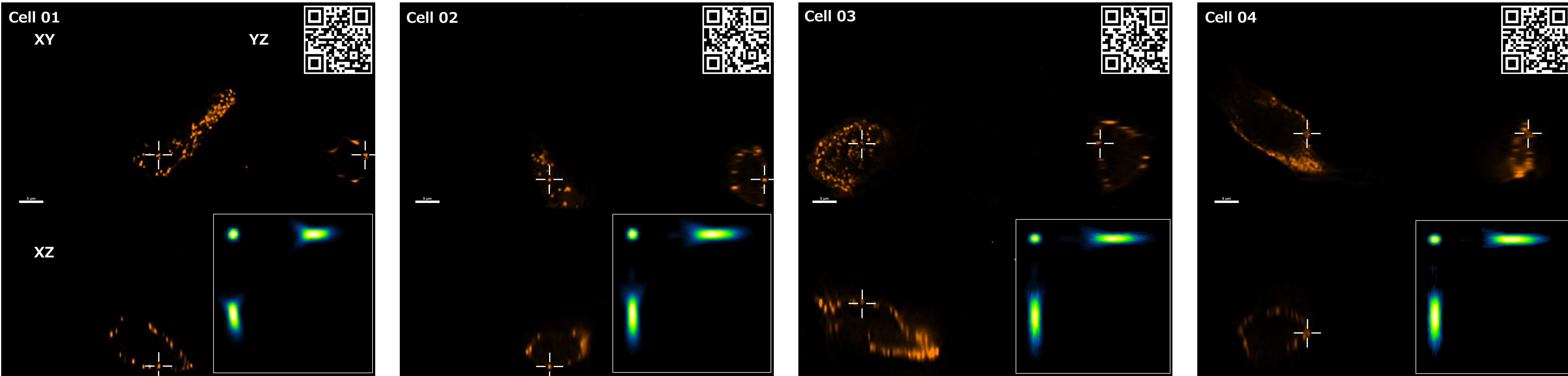


図7：ISMモードで撮像したL細胞の非線形デコンボリューション画像の直交ビュー

セル01、02：ピクセルサイズ0.041 μm、セル03、04：ピクセルサイズ0.032 μm、Zステップ0.1 μm。挿入画像は、各Lセル深度に対応するPSF形状を抽出したもの。スケールバー = 5 μm

*QRコードはGLP-1粒子のZスタックを示す動画にリンクしている（左が線形、右が非線形デコンボリューション処理）

図8

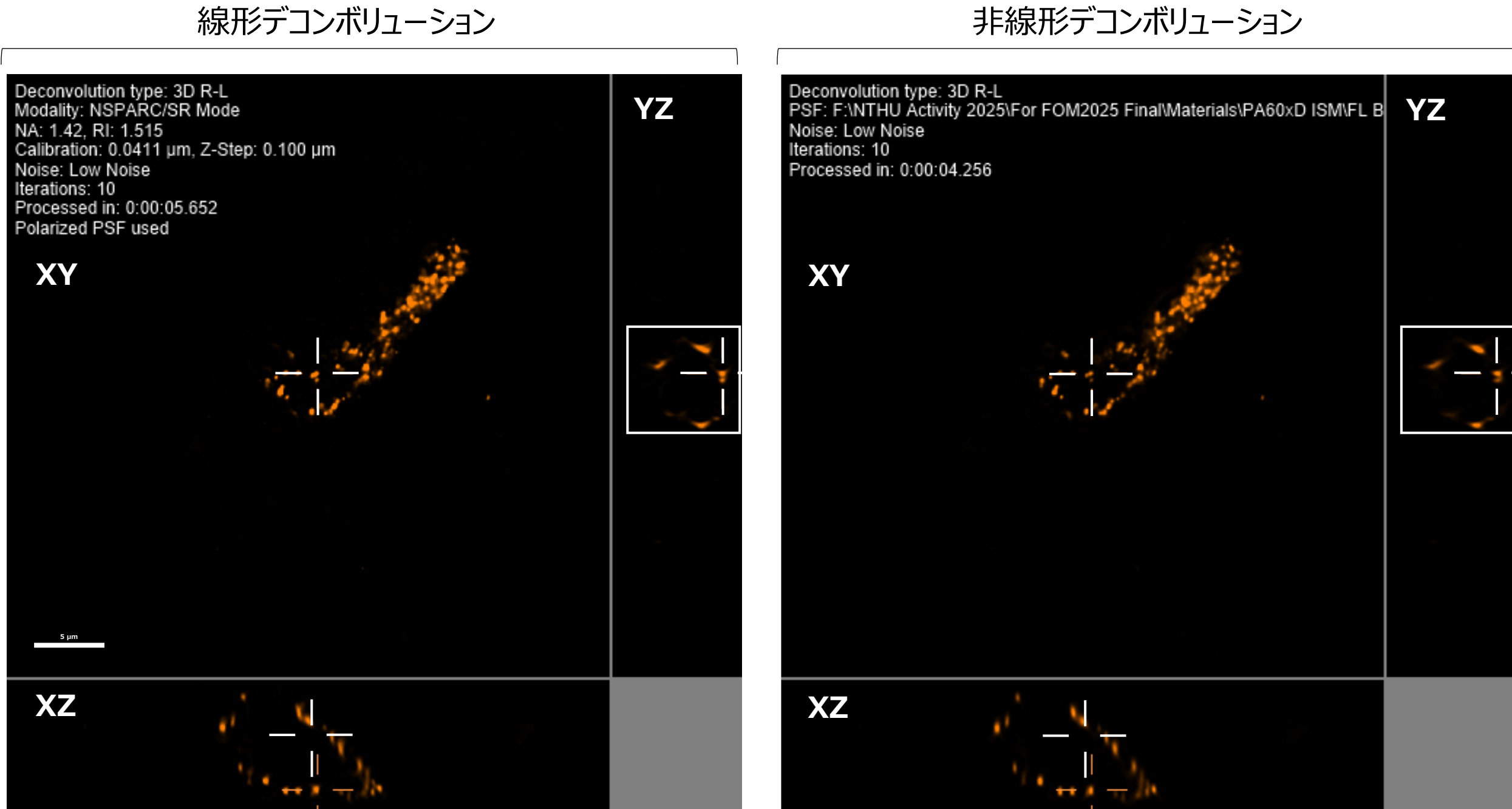


図9

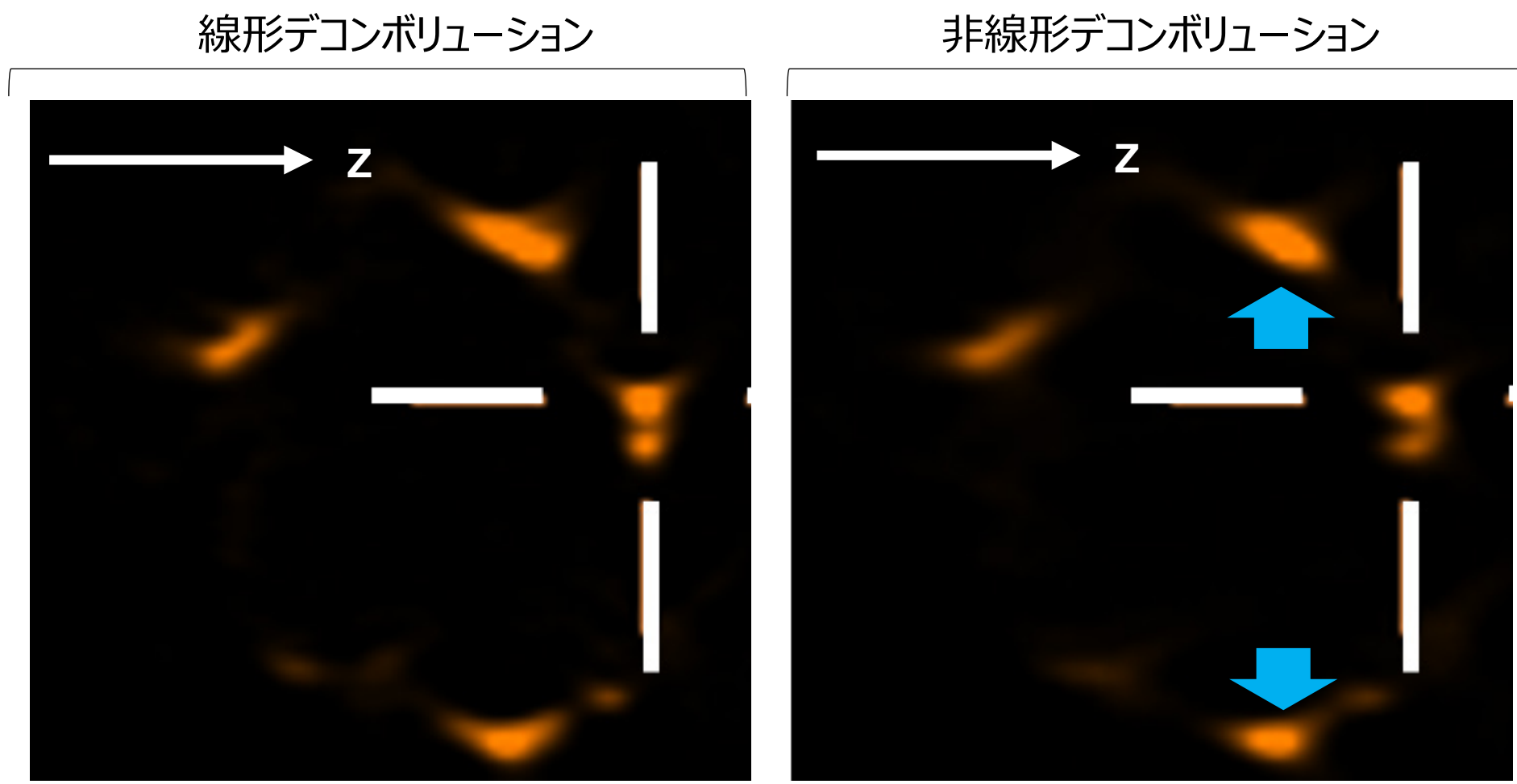


図8：ISMモードで撮像したL細胞の線形・非線形デコンボリューション画像の比較（セル01の直交ビュー；非線形デコンボリューションは図7と同一の図を示した）。スケールバー = 5 μm

図9：図7の各YZビューにて四角形で示した領域の拡大図。青矢印で示すように、非線形デコンボリューション処理後は光軸方向への赤い輝点の伸びが抑制されている。

まとめ

図3および図4に示すように、試料と浸漬媒体の屈折率が異なると、イメージング性能が大きく低下する。オイル浸漬（R.I.=1.52）は試料の屈折率（R.I.=1.53）に近いため、深さ150 μmまで明るさと解像度を維持したが、シリコン浸漬（R.I.=1.41）では、比較的浅い深度でイメージング品質が著しく低下した。

このように、透明化技術は深部組織のイメージングを向上させるが、高分解能の結果を得るためには、試料と対物レンズ浸漬媒体の屈折率の一致を最適化することが依然として重要である。表1と表2に示すように、特に屈折率不一致の条件下で、深度整合PSFを使用した非線形デコンボリューションが線形デコンボリューションよりも優れた性能を発揮することが明らかとなった。

しかし、ISMの高い解像力を引き出すには、表2に記したように、アーチファクトを避けるために振動とサンプルのドリフトを注意深く管理する必要がある。

ISMが従来の共焦点顕微鏡に代わる新たな標準となりつつある中、非線形デコンボリューションによる軸方向の解像度の向上は、3D生物学的イメージングのさらなる進歩に貢献する。

Appendix：PSF Extractor の使用法

PSF Extractorは、デコンボリューション処理において、対物レンズの浸液とサンプル内の屈折率が異なる場合に発生する球面収差を補正するための機能です。ビーズサンプルを実測し、各深さのPSFを抽出することで、より正確な補正が可能となります。本機能を効果的にご利用いただくため、以下のガイドをご参照ください。

- Step 1: ガラスの界面から実際のサンプルの深さを決定する。
- Step 2: サンプルと同じピクセルサイズとZステップを使用して、対応する深さの蛍光ビーズのZスタック画像を取得する。（注：対物レンズの倍率に適したビーズ径を選択する事。）
- Step 3: 「PSF Extractor」（トップメニュー > Deconvolution > 「Extract PSF」）を開き、ビーズ径とレイヤー数を選択する。
- Step 4: 直交ビューでPSF形状を確認し、PSFファイルを保存する。
- Step 5: デコンボリューションのために、サンプル画像から該当するチャンネルを抽出する。
- Step 6: “3D Deconvolution”で “General”パラメータを設定し、“Advanced”タブで保存したPSFファイルをインポートする。

Product Information

超解像共焦点レーザー顕微鏡システム

AX/AX R with NSPARC

超解像ディテクターNSPARCは、25個のアレイディテクターにより、従来の共焦点レーザー顕微鏡システムAXの機能を損なうことなく、さらなる高解像度を高S/N比で実現します。

製品情報は[こちら](#)



謝辞

A-haポリマー包埋技術を用いて、均一な屈折率と高い透明度を持つ超解像最適化サンプルをご提供いただいた台湾の国立清華大学のShiue-Cheng (Tony) Tang教授に感謝いたします。

著者情報

株式会社ニコン 中村竜、名川信吾