

## APPLICATION NOTE

## 超解像共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R with NSPARC

## パネト細胞顆粒の分泌を3次元的に捉える試み： 対物レンズ補正環の操作による光軸方向歪み補正の検証

共焦点顕微鏡は、生体サンプルの3次元構造を高い空間分解能で可視化することができ、生命科学研究に欠かせないツールとなっている。厚みのある生体サンプルを観察する場合、溶媒と異なる屈折率を持つサンプルの厚さに起因した球面収差が発生するため、光軸方向の歪みを排除して本来の立体構造を画像化するには、正しい知識と工夫が必要となる。本アプリケーションノートでは、厚みのあるオルガノイドの深層部で、歪みを抑えた高精細3次元タイムラプスイメージングを実現する方法を示す。

対物レンズには、補正環を有するものが存在する。この補正環は、カバーガラスの厚み誤差だけでなく、サンプルの厚みによる球面収差の補正にも適用できる。これにより、特に厚みのあるサンプルの深層部を、球面収差をなるべく排除してよりシャープに観察することが可能となる。補正環の一般的な使用法は、観察対象物に焦点を合わせつつ補正環を回転させ、対象物が最も明るく高解像度で観察できる位置を探すことである。

小腸の陰窩基底部に位置するパネト細胞は、抗菌ペプチド $\alpha$ -defensinを豊富に含む細胞質顆粒を、腸内細菌や食成分の刺激に応答して分泌することで、腸管自然免疫および腸内細菌叢の組成制御に寄与している。このパネト細胞の顆粒分泌の動態を明らかにするためには、3次元的な顆粒の動態を高い時間・空間分解能で追跡する必要がある。そこで、小腸上皮細胞の3次元培養系である小腸オルガノイドの深層部において、空間的にダイナミックに動くパネト細胞の分泌顆粒を観察対象として、顆粒分泌のより高解像度な3次元タイムラプスイメージングを試みた。対物レンズからの光がパネト細胞顆粒に到達するまでに、小腸オルガノイドを包む細胞外基質であるマトリゲルや空間的に幾層にも重なる細胞など、屈折率の異なる媒体を通過するため、補正環による球面収差の補正が必要となる。我々は、計算に基づいて決定した補正環位置を用いることで、光軸方向の歪みが最も少ない画像を得られることを証明した。得られた条件のもと、高感度なNSPARC検出器を用いて高速XYZタイムラプスイメージングを行い、小腸オルガノイド内腔に分泌されるパネト細胞の顆粒の3次元的なダイナミクスを捉えた。

キーワード：補正環、作動距離 (WD)、屈折率 (RI)、球面収差、共焦点レーザー顕微鏡、3次元画像

### サンプル準備

マウス小腸から陰窩を単離し、マトリゲル (Corning Inc., NY, 屈折率RI = 1.34) に包埋することで、小腸上皮オルガノイドを作成した。培養3日目のオルガノイドの細胞膜をCellMask™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific, MA) で、パネト細胞の分泌顆粒をZinpyr-1 (Santa Cruz Biotechnology, TX) で生細胞染色し、8 well chamber (Matsunami Glass Ind., Ltd., Japan, カバーガラス厚 No.1S; 0.16 ~ 0.19 mm) に播種した。XY平面上に細胞頂端側の顆粒と内腔が同時に認められるパネト細胞を観察対象とした。

### 実験1：オルガノイド内のパネト細胞顆粒観察における補正環位置の最適化

小腸オルガノイドは温度・湿度の変化に非常に敏感であり、顕微鏡ステージ上で活性を保つためには水の屈折率に近い1.34の屈折率を持つマトリゲルという保持媒体が必要である。またオルガノイド内のパネト細胞および分泌顆粒は透過明視野観察でも高いコントラストを有することから、1.34以上の屈折率を持つと考えられる。

対物レンズCFI SR プランアポクロマート IR 60XC/1.27 Wl (WD=0.18 mm) およびCFI プランアポクロマート Lambda S 60XC/1.30 Sil (WD=0.3 mm) を使用して、刺激による顆粒分泌を起こす前の同一の小腸上皮オルガノイドを観察し、それぞれの補正環位置ごとに、対物レンズ駆動量から光軸上の各距離を考察した (図1)。また、連続断面画像を取得して光軸方向の歪みを比較した (図2)。

なお、計測では、機械的なヒステリシスを排除するために補正環を一方方向に順次回転させた。また、浸液の拭き取りが容易な水浸対物レンズを先に使用した。実験後に同じディッシュ内の他の細胞を用いて退色が無いことを確認した。

### 実験2：パネト細胞顆粒分泌のタイムラプスイメージング

パネト細胞の顆粒分泌を誘導するために、培地中に10  $\mu$ M カルバコール (CCh) を添加し、直後よりレゾナントスキャナーとピエゾZドライブを組み合わせた高速XYZタイムラプスイメージングを行い、内腔に分泌されるパネト細胞顆粒の3次元的なダイナミクスを撮影した (図3)。

0.25  $\mu$ mインターバルのZスタック範囲で30枚の画像を0.083秒以内に取得し、最終的な3次元動画の時間分解能を2.625秒/フレームとして、連続的に取得した。なお、可能な限りレーザー照射によるダメージを回避する目的で、より高感度なNSPARC検出器を用いた。

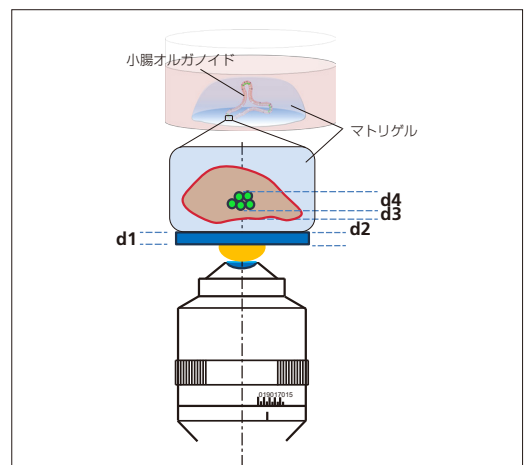


図1. カバーガラス厚換算値の算出

		想定屈折率
d1	カバーガラスの厚さ (0.17 mm固定で計算)	1.52
d2	マトリゲルの光軸に沿った厚さ (測定値平均)	1.34
d3	細胞 (顆粒以外) の光軸に沿った厚さ (測定値平均)	1.52
d4	細胞 (顆粒) の光軸に沿った厚さ (測定値平均)	1.52

d2, d3およびd4に、それぞれ、係数  $\times 1.34/1.52$ 、 $\times 1.52/1.52$  および  $\times 1.52/1.52$  をかけることで、「カバーガラス厚換算値 (d2\_CG) (d3\_CG) (d4\_CG)」を計算した。

この「カバーガラス厚換算値 (d\*\_CG)」と、「対物レンズ駆動量」との差分である ( $\Delta d^*_CG$ ) から、「実効的なカバーガラス厚 ( $d1 + \Sigma \Delta d^*_CG$ )」を求めた。これを「0.17 mmの標準的なカバーガラス厚を基準にした補正環位置 (0.17) から、どの位置まで動かせばよいのか」という目安とした (表1)。

この目安となる補正環位置において、実際に光軸方向の歪みが少なく、かつ最も明るいZスタック画像が取得できることを確認した (図2)。

図2. 同じオルガノイドの同一パネト細胞の分泌顆粒に注目したXY/XZ/YZ像。IR 60XC/1.27 WI (上段) では補正環位置が0.17の時に、Lambda S 60XC/1.30 Sil (下段) では0.16~0.15の位置の時に、最も明るく、かつ光軸方向の歪みが少ない画像が取得できた (赤点線で囲った画像)。

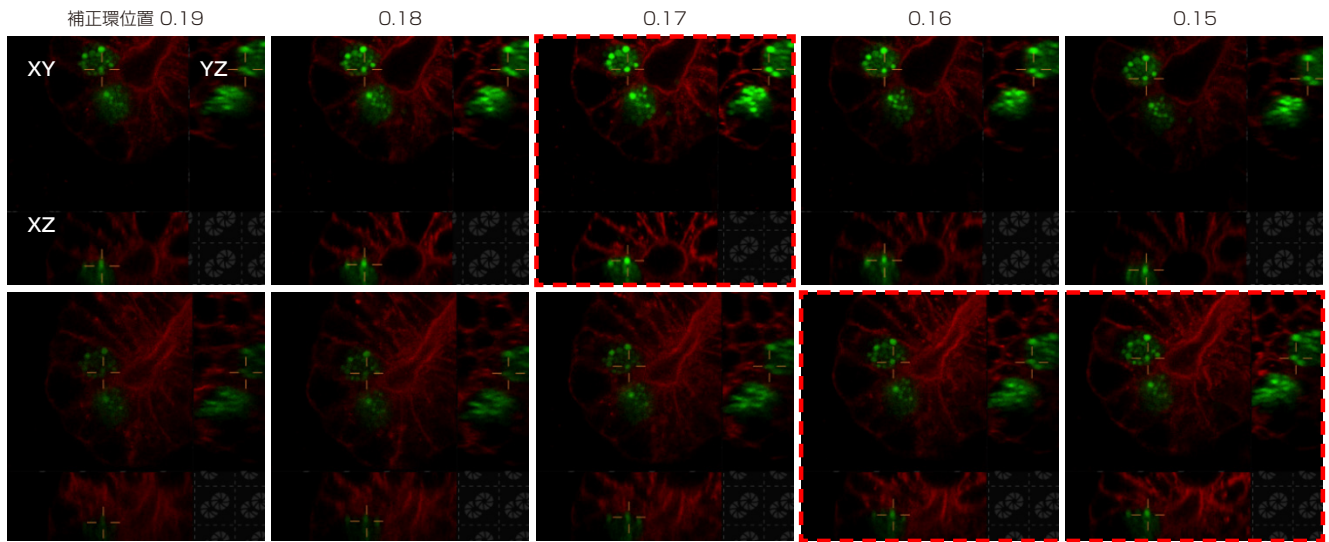
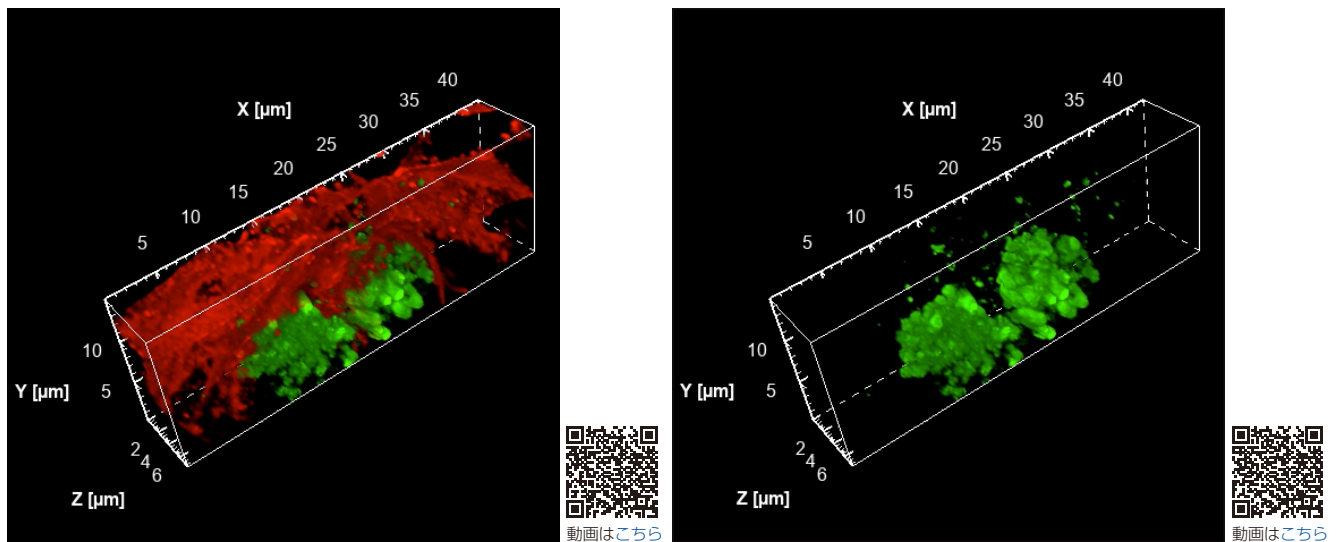


表1. IR 60XC/1.27 WI (左) およびLambda S 60XC/1.30 Sil (右) を用いた際の、各層間の対物レンズ駆動量、標本内の厚み、カバーガラス厚換算値、対物レンズ駆動量との差分、補正環位置の目安。IR60XC/1.27 WIでは0.17が、Lambda S 60XC/1.30 Silでは基準より薄めの0.16~0.15程度が、補正環位置の目安となる。

	設計値	対物レンズ駆動量	標本内の厚み平均値 (d*)	カバーガラス厚換算値 (d*_CG)	対物レンズ駆動量との差分 ( $\Delta d^*_CG$ )	実効的なカバーガラス厚 ( $d2 + \Sigma \Delta d^*_CG$ )		設計値	対物レンズ駆動量	標本内の厚み平均値 (d*)	カバーガラス厚換算値 (d*_CG)	対物レンズ駆動量との差分 ( $\Delta d^*_CG$ )	実効的なカバーガラス厚 ( $d2 + \Sigma \Delta d^*_CG$ )
WD	0.18						WD	0.3					
対物レンズ先端~カバーガラス	0.18	0.126					対物レンズ先端~カバーガラス	0.3	0.247				
カバーガラス厚	0.17					0.17	カバーガラス厚	0.17					0.17
カバーガラス~オルガノイド下端	0	0.025	0.025	0.022	-0.003	-0.003	カバーガラス~オルガノイド下端	0	0.034	0.032	0.028	-0.006	-0.006
オルガノイド下端~分泌顆粒下端	0	0.008	0.009	0.009	0.001	0.001	オルガノイド下端~分泌顆粒下端	0	0.004	0.004	0.004	0	0
分泌顆粒のZスタック幅	0	0.017	0.02	0.02	0.002	0.002	分泌顆粒のZスタック幅	0	0.016	0.017	0.017	0.001	0.001
補正環位置の目安						0.17	補正環位置の目安						0.165

単位: mm

図3. 図2の結果より、IR 60XC/1.27 WIを用いて補正環位置が0.17の時に最も明るく光軸方向の歪みが少ないため、この条件にてCCh刺激を行い、高速4D (XYZ-t) 画像を取得した。刺激によって弾けた顆粒 (緑色) が細胞膜 (赤) から内腔側 (画面上方) に出て行く様子が判る。右は注目しているパネト細胞のみを表示。



## 結果と考察

本実験のように、観察対象物がカバーガラスに接しておらず、かつ複数の異なる屈折率の媒体が介在する場合は、球面収差を考慮する必要がある。今回は光軸中心での簡易的な光路長の検討であったが、実測値およびカバーガラス厚換算値を用いた計算によって求められる「補正環位置の目安」において、実際に明るく歪みの少ない画像が捉えられることが判った (図2)。なお、より開口数 (NA) の高いシリコン浸対物レンズの方が明るい画像が得られると思えたが、今回の屈折率条件では水浸対物レンズの方が優れていた。これはシリコンの屈折率 (RI=1.406) とオルガノイドを保持するマトリゲルの屈折率 (1.34) が大きく異なっており、水浸対物レンズ使用時よりも球面収差の影響が大きかったためと思われる。

結果として、水浸対物レンズを用いた高速XYZタイムラプスイメージングにより、小腸オルガノイド内腔に分泌されるパネト細胞の顆粒の3次元的なダイナミクスを、光軸方向の歪みを極力抑えて捉えることができた (図3)。

## 謝辞

本実験にご協力を賜りました、北海道大学 大学院先端生命科学 研究院 生命機能科学研究部門 自然免疫研究室の横井友樹助教、中村公則教授に深謝致します。

著者: 株式会社ニコン 中村竜、大内由美子、名川昌吾

## 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/AX R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](#)

