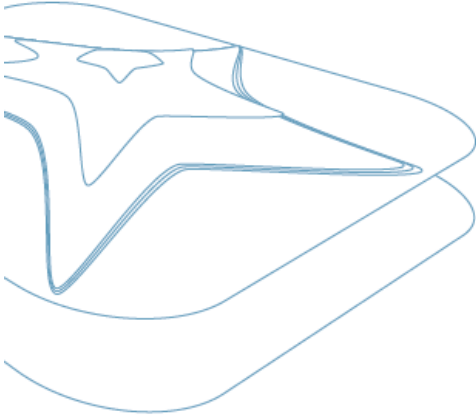


Real-time 3D monitoring of living biological specimens



DHM™ T1000 は、以下の特徴をもつ生物学的解釈のために新しい評価基準を生物学者に提供し、新しい定量的・形態学的な測定を生命科学に提供します：

- ↘ ナノメートルの Z 軸解像度をもつ 3D 表現
- ↘ リアルタイムモニタリング：細胞膨張、健康状態、刺激
- ↘ 造影剤不要
- ↘ 非侵襲
- ↘ 非光毒性

Lyncée Tec 社により提供された DHM™ T1000 とソフトウェアは、生物標本をモニターし、解析する理想的なシステムです。

自然な環境における生きた細胞の非侵襲高解像度の画像は、化学物質、特に、電気的か、熱の刺激によって、自然にまたは人工的に引き起こされた生物学的な過程を可視化するための前提条件です。

従来の光学顕微鏡は、調べられる生物標本の吸収（透過モード）または反射（反射モード）の特性に依存する強度画像を提供します。古典的な位相差とノルマスキー微分干渉コントラストは、無染色の透明な標本の可視化に生物学で広く使用されています。しかし、標本によって、引き起こされる位相変化の定量的な測定をもたらすことができません。

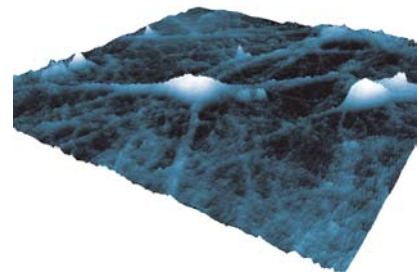
DHM™ 技術は、従来の顕微鏡のように強度を測定しますが、定量的な位相変化も測定します。生物標本によって引き起こされる位相変化は、厚さ（形態学にリンクする）と屈折率（細胞内の本質にリンクする）の両方に依存します。DHM™ システムには、生物標本の動的な研究のために理想的な機器にする以下の重要な特徴があります：

- 造影剤不要
- 非侵襲
- 非光毒性（照射強度 200 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）
- リアルタイム測定
- 10000 測定/秒までの高い画像取得レート

- デカップリング手法は、Z 軸に沿った厚さと平均屈折率
- 水平解像度は、300 nm まで
- ナノメートルの厚さの解像度（10 nm 感度）

そのうえ、Koala ソフトウェアに実装されたデジタルツールが、実験の間と後で、記録されたデータの両方を実験の有効な処理と解析を可能にします、次のように：

- 時系列のモニタリング
- デジタルフォーカシング：標本の再焦点合わせ
- 光学収差デジタル補正：アライメント不良や標本ホルダーの再配置

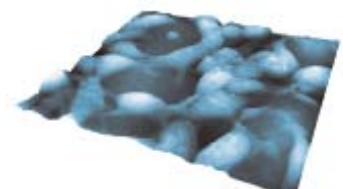
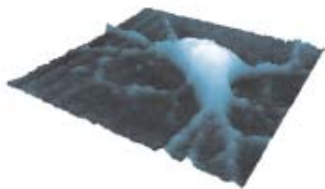


DHM™ T1000 で得られたマウス皮膚ニューロンネットの透過光の位相シフトの定量的な 3D 表示

したがって、DHM™ T 1000 システムは、出版物と以下のページに要約されるいくつかの結果によって示されるように、特別な細胞の前処理（造影剤不要、染色不要）なしで、生物標本の定量的・動的・形態学的な特性（屈折率、厚さ）を測定するための理想的なツールです。可能なアプリケーションのこのリストは、広範囲ではありませんが、DHM

は、モニターして、解析する有効なツールであることを既に示しました：

- 細胞の膨張
- 細胞の健康状態
- 刺激のための生物学的な効果（薬、電子的、熱等）



左：
生きている神経細胞（観察視野 $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ ）

中央：
赤血球（観察視野 $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ）

右：
HEK 293 細胞（観察視野 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ）

ニューロンの低張ストレス

マウス皮質ニューロンの初代培養の低張ショックは、ニューロンの相対的に高いストレスを表す細胞外の浸透性を 37% に減少して、標準の灌流溶液 (229 mOsm/kg H₂O) を低張液 (144 mOsm/kg H₂O) に置き換えることによって、達成されます。図 1 で表されるように、低張液は、位相信号の低下を起こします、信号は、2 分後にグラフが平坦になります。このような位相減少は、細胞膨張として解釈されるのは難しいままです。この先験的な矛盾した位相の挙動を調べるために、特許をとったデカップリング手法は、別々に Z 軸に沿った全体の平均屈折率と神経細胞体の厚さを測定するために適用されます。得られた形態学的な画像は、明確に予想された低張のニューロンの膨張を示します。明確に 図 2 の中央パネルの低張で媒介された形状の変化を示します。ひとつは、一様でないニューロンの膨張に注目するべきです、低張ショックの前に、細胞厚さに比例して、細胞体（中央パネルの緑色-黄色領域）のいくつかの中央領域ではより弱いです。低張ショックは、全体の平均屈折率減少を引き起こします。この減少は、低張水の流入、細胞内タンパク質濃度の希釈をもたらし、全体の平均屈折率値を主に決定する細胞成分と一致します。

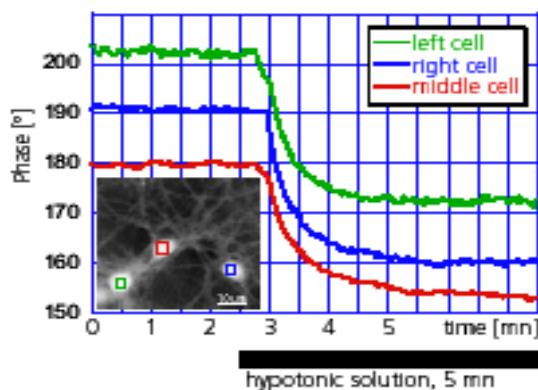


図 1: 3 つのニューロンの位相信号のリアルタイムモニターは、低張ショックの間、観察します。

挿入図：モニターされたニューロンの定量的な位相差画像。有色の矩形の位相平均値は、灌流時間に対してプロットされます。黒いバーは、5 分間の低張液の灌流を示します。

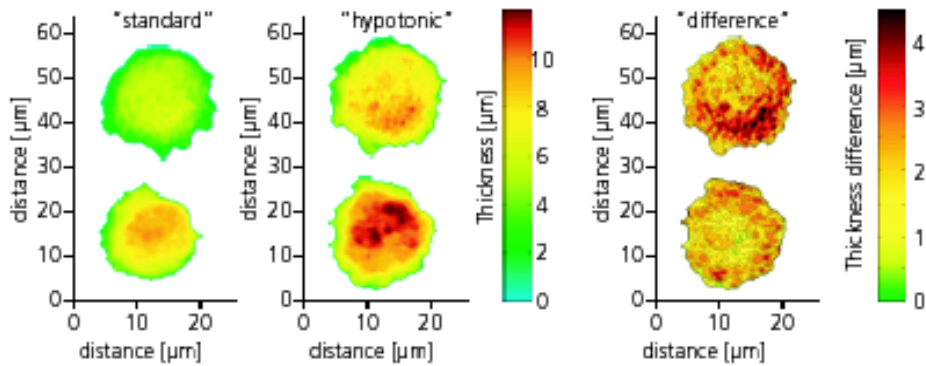


図 2: ショック前 (左のパネル)、低張ショックの開始 (中央パネル) 後 3 分間の 2 つの細胞の形態測定。ここでは、Z 軸 (細胞厚さ) は、マイクロメートル単位で表現されます。デカップリング手法の結果を使用することで、これらの値を得ます。右パネル: “hypotonic” 画像から “standard” 画像を減算して生じる厚さの変化の分布を色分けします。

赤血球膜

赤血球膜の自然に起こる時間的な変動を固定した 2 つ (図 3a) と 2 つの生きた赤血球 (図 3b) を 10 秒間 (13 frames / s) で、位相偏差を測定することで、評価します。固定したもの (白丸の内側) の中央の領域は、細胞 (白い矩形の内側) (それぞれは、 0.95° と 0.97°) の外側で取られた参照領域と同様に変動します。反対に、生きているものの中央の領域は、外側の細胞領域 (それぞれは、 1.8° と 1.1°) よりさらにかなり変動します。中央の領域での変動は、ノイズ (細胞の外側で測定される) そして、実際の膜の変動に依存します。このノイズの減算は、40 nm までの厚さ変動に対応する実際の膜の変動を測定します。例えば、膜の変動を様々な薬品の影響評価するために、この測定を実行することができます。実際に、これらの測定した変動は、細胞の健康状態に依存し、異なった実験条件で、細胞の健康を評価するのに使用することができます。

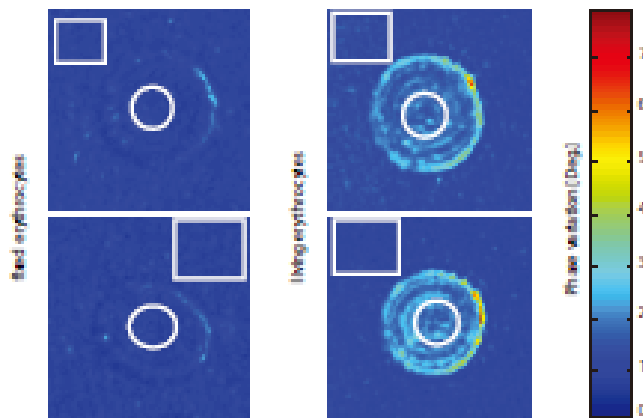


図 3: 固定した 2 つ (最初の列) と 2 つの生きている (2 番目の列) 赤血球の時間的な位相偏差マップ。白丸と矩形は、それぞれ細胞の中央の領域と外側の参照領域を示します。

Conclusion

厚さや屈折率などの生物標本の特性の定量的な正確な測定を実行するので、DHM™ T 1000 は、生命科学のための理想的な機器です。そのうえ、生物標本のメカニズムを生物学者に理解と解釈するための手助けをする使いやすいソフトウェアツールが、刺激（ドラッグ、電気的な刺激）の効果をモニターすることができます。

References

B. Rappaz, "Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy", Opt. Express 13, 9361-9373 (2006)

P. Marquet, "Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with sub wavelength axial accuracy", Opt. Lett. 30, 468-470 (2005)

<http://lynceetec.com/downloads/>

 **Lyncée tec** DHM
PSE-A
1015 Lausanne
Switzerland
info@lynceetec.com
www.lynceetec.com



株式会社 デジタルマイクロシステムズ

〒603-8167

京都市北区小山西大野町 82-2

Tel: 075-417-3311 Fax: 075-432-3116

e-mail: sales@digitalmicrosystems.co.jp

<http://www.digitalmicrosystems.co.jp>