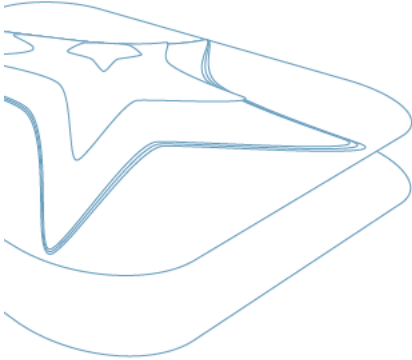


## Biological specimen 3D morphology and refractive index separation



**DHM™** 技術と特許をもつデカップリング手法は、造影剤も、生体内侵襲性も、光毒性もなく、透明の生物標本の以下の特性をリアルタイムで可視化を（10000 fps まで）提供します：

- 3D 標本形態測定
- 吸収作用
- タンパク質濃度に関連する屈折率

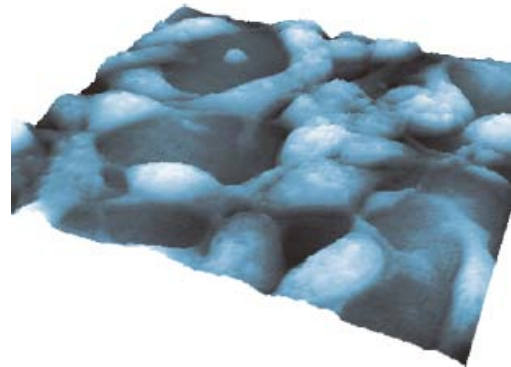
これらの異なるパラメータと共に提供することで、透明な生物標本の構造とダイナミクスを解析し、認識するために強固で、使い易く、用途の広い機器を生命科学分野に Lyncée Tec 社は、提供します。

リアルタイムの非侵襲な定量測定と 3D 形態学的な解析と細胞の屈折率、単細胞生物またはより複雑な生物標本は、それらの自然のままの環境で生きている標本に起こる生物学的な過程を可視化し、研究することは、非常に重要です。例えば、生理的、病理学的な過程か、または外部の刺激（ドラッグスクリーニング等）から結果として生じる細胞膨張を評価し、定量化するために 3D 形態学的な変化の測定に使用することができます。屈折率は、細胞内の液の流れとタンパク質濃度に関する情報を得ます。

透明な生物標本の吸収特性だけを記録する従来の光学顕微鏡は、細胞の形状と 3D 形態学的な変化を定量化することができません。他方では、広く使用される位相差顕微鏡 (PhC) そして/または、ノマルスキー微分干渉コントラスト (DIC) を含むコントラストを高める古典的なテクニックは、透明標本の可視化を可能にします。しかしながら、対応する細胞構造に関するそれらの画像の解釈を解りにくくさせるハロー (PhC) または、シェーディング オフ (DIC) を含むよく知られている光学的なアーティファクトに苦しみます。

干渉測定技術に基づいていて、観察する透明な生物標本によって、引き起こされた波面変形の正確な定量的測定を実行する能力を持つ DHM™ T 1000 は、生命科学に十分適している機器です。特許をとったデカップリング手法と組み合わせた DHM™ T 1000 は、以下の特徴をもつ 3D 形態学と屈折率測定を行います：

- 水平解像度 300 nm まで
- ナノメートルの厚さの解像度（10 nm 感度）
- Z 軸に沿った平均屈折率
- 非造影剤
- 非侵襲
- 非光毒性（照射強度 200  $\mu\text{W} / \text{cm}^2$ ）



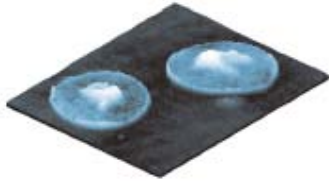
DHM™ T 1000 で得られた HEK 293 細胞の透過光の定量的な位相シフトの 3D 表現。

そのうえ、Koala ソフトウェアに搭載されたデジタルツールは、記録したデータの強力な以下のような後処理と同様に有効なオンライン画像解析を可能にします：

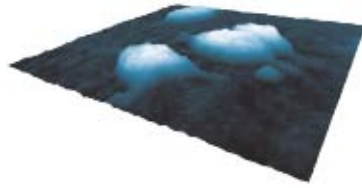
- 時間的なモニタリング
- デジタルフォーカシング：標本の動きの補正
- 光学収差のデジタル補正：調整ミスの抑制や標本灌流チャンバーの変位

生きている生物標本の動態解析のために非侵襲機器を提供することによって、DHM™ 技術は、生命

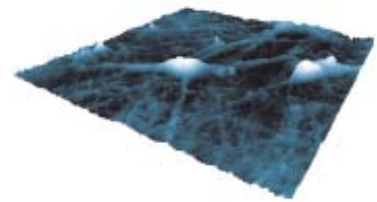
科学の必要性に完全に適合します：3D 形態学と形状、体積変化、タンパク質濃度、特に水の流動。



左：  
イチイ花粉粒子（直径 30 μm）



中央：  
未分化 PC12 細胞株（観察視野 64 × 64 μm<sup>2</sup>）



右：  
マウス皮質のニューロンネット（100 × 100 μm<sup>2</sup>）

### 定量的位相差

DHM™ T 1000 で得られた位相画像は、細胞内の領域と比べて、灌流媒質中のより早い光の速度のために位相遅れの空間的な分布を含みます。物理的に、屈折率  $n = c/v$ 、 $c$  は、真空中での光の速度で、 $v$  は、媒質中の光の速度です。位相 ( $\Phi$ ) は、 $OPL = \Phi\lambda/2\pi$  の関係により、光路長 OPL に関連されます。 $\lambda$  は、顕微鏡光源の波長です。各画素  $i$  の現在の場合において、光路長は、以下の通りです：

$$OPL(i) = (n_{c,i} - n_m)h_i + n_m D$$

$h_i$  は、画素  $i$  に対応する細胞の厚さ、 $n_{c,i}$  は、細胞の厚さ  $h_i$  に沿った細胞内の屈折率の平均値です、全体の屈折率と呼ばれます、 $n_m$  は、灌流液の一定の屈折率です、そして  $D$  は、灌流チャンバーの高さです。製品の  $n_m D$  は、細胞外で、どこでも測定することができる参照値です。実験中に、セットアップの機械的か、または熱の不安定性の補正を可能にするので、この参照値をモニターすることは重要です。各画素  $i$  に関して、細胞に特定の信号  $(n_{c,i} - n_m)h_i$  の要素は、細胞の厚さ ( $h_i$ )、全体の屈折率 ( $n_{c,i}$ )、および細胞外の媒質屈折率 ( $n_m$ ) に依存します。

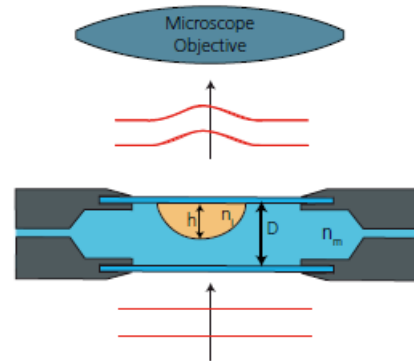


図 1：灌流チャンバーの図解は、培養中のニューロンをモニターしています。h：細胞の厚さ； $n_i$ ：細胞内屈折率；D：灌流チャンバーの高さ； $n_m$ ：灌流液の屈折率

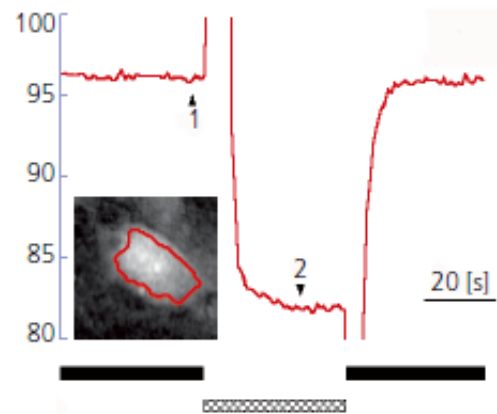


図 2：図表は、位相信号（挿入図の赤い輪郭線を描いた表面の平均）が、灌流時間に対して描かれたグラフを示します。下部の矩形は、次を示します：（黒色）のとき、標準液（Mannitol 50 mM）か、または（破線）のとき、デカップリング液（Nycodenz 50 mM）を灌流します。1 と 2 に記録された位相信号の比較は、全体の屈折率と標本の細胞の厚さの測定を別々に可能にします。

## デカップリング手法の手順

特許を取った方法は、細胞の厚さと全体の屈折率の測定を切り離すことを可能にします。連続して、標準灌流液を灌流することにより、同じ浸透性（細胞容量変化を避けるために）をもつが、異なる屈折率  $n'_m = n_m + \delta n$  の第2番目の溶液を灌流することにあります。この操作のシーケンスは、図 2 で説明されます。各画素  $i$  に関して、私たちは、2つの位相記録 ( $\Phi_{i,1}, \Phi_{i,2}$ ) を得ます。1番目のものは、標準液の灌流時に得られ（点 1）、デカップリング溶液が、灌流チャンバーの標準液を完全に置き換えるときに、2番目のものを得ます。（点 2）

$$\Phi_{i,1} = 2\pi / \lambda (n_{c,i} - n_m) h_i$$

$$\Phi_{i,2} = 2\pi / \lambda [(n_{c,i} - (n_m + \delta n))] h_i$$

この方程式を解くことで、画像の各画素の全体の屈折率  $n_{c,i}$  と細胞の厚さ  $h_i$  を得ます。

図 3 は、赤血球の厚さ測定を示します。

## 厚さと屈折率の説明

例えば、低張ショックから相応の細胞膨張として、厚さの変化を解釈することができます。屈折率は、溶媒 ( $n_0$ ) の屈折率と溶質の性質による特定の屈折増加に比例して媒質に関係づけられます：

$$n_{c,i} = n_0 + \alpha C$$

$C$  は、溶質（主にタンパク質）の濃度であり、溶液の容積あたりの質量というように表現します。したがって、屈折率の測定は、既知のパラメータ  $\alpha$  の細胞内タンパク質の濃度の良い推定を提供することができます。このパラメータの値とこの方程式の詳細は、Ref. 2（参照 2）で見つけられます。

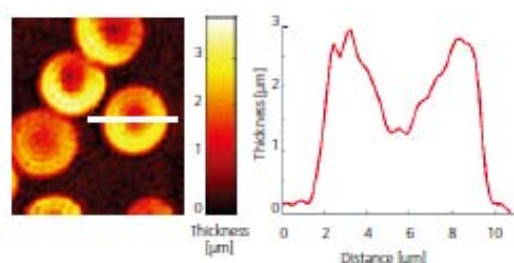


図 3: デカップリング手法を用いた赤血球の厚さ測定

## Conclusion

DHM™ T 1000 技術は、生物標本構造の非侵襲解析を可能にし、3D 形態測定とタンパク質濃度に関連する屈折率の両方に関係する定量的な位相測定のおかげでダイナミクスを提供する強力な機器です。

## References

1. 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)
2. R. Barer, "Refractometry and interferometry of living cells," J. Opt. Soc. Am. 47, 545-556 (1957)

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