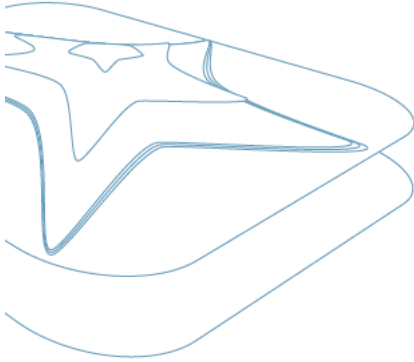


Living cells analysis: Shape and structure measurements



正確に特定の定量的な光学パラメータを提供することで、**DHM™** 技術は、標準の光学顕微鏡にはない以下を可能にする新しい有効な細胞イメージングツールです：

- 造影剤なしで透明標本の可視化
- ナノメートル解像度で、形状と構造測定
- 生物標本の動態リアルタイム解析
- タンパク質濃度に関連した細胞の光学特性

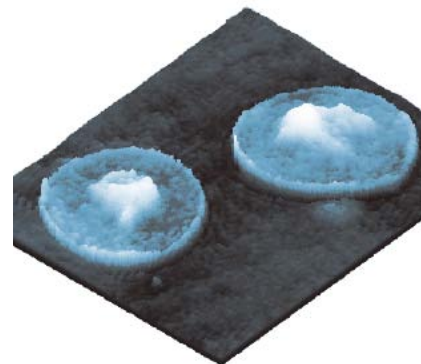
DHM システムは、生物標本解析と認識のための新しい有効な評価基準を生命科学に提供します。

生きた生物標本のリアルタイム解析は、今では、医薬品、健康管理、国家安全保障、食品産業（花粉アレルギー、伝染病、バイオテロ、またはバクテリア汚染を防ぐため）などの様々な分野でかなりの重要性を持ちます。

検査の従来からの方法は、生物学的な構造の特定のラベリングか、または位相差 (PhC) 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技術の従来顕微鏡から得られる画像から達成する認識処理を必要とします。特定のラベリング処理は、しばしば望ましくない側面の影響に関連する複雑な仕事にいつも時間を費やします。(蛍光プローブに関連する限り、退色、そして/または、光力学的な損傷) 他方では、従来顕微鏡は、正確な細胞の動的な解析にいつも十分でない標本 (2D サイズ、光の吸収または反射、色) についていくつかの情報を提供します。広く使用される PhC と DIC の技術は、対応する細胞の構造に関するそれらの画像の解釈を難しくさせる光学的なアーティファクトを受けます。さらに、従来顕微鏡の焦点合わせは、標本を動かして補うか、または別の面に位置する標本を選択することで調整されなければなりません。

この枠組みの中では、透過光で観察された標本によって、引き起こされる波面変形の正確な定量的な測定を実行する能力のおかげで、DHM™ T 1000 は、以下の利点をもつ有効な細胞構造と動的な解析を可能にします：

- サブ波長の Z 軸解像度をもつ細胞構造と動的な細胞の 3D 表示
- 細胞内のタンパク質濃度と関連する細胞光学的特性：細胞内屈折率
- 造影剤不必要
- 非侵襲
- 非光毒性 (照射光量 200 $\mu\text{W} / \text{cm}^2$)



DHM™ T 1000 で得られた 2 つのイチイの花粉粒子の透過光の定量的な位相シフトの 3D 表示

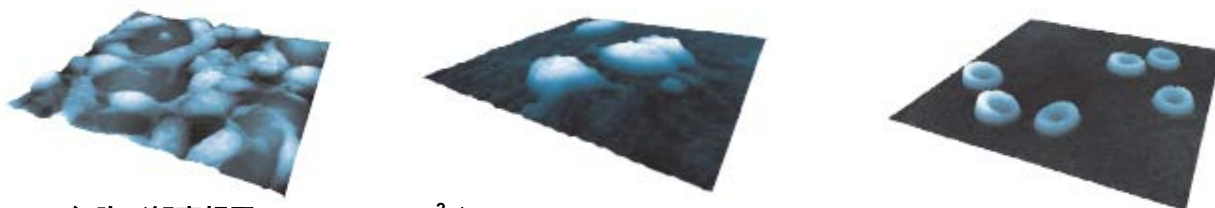
そのうえ、デジタルツールは、記録したデータの強力な後処理と同様にリアルタイム画像解析を以下のように有効に可能にします。

- 時間的なモニタリング
- デジタルフォーカシング
- 光学収差のデジタル補正

実験の間、デジタルフォーカシングは、標本位置を補うために光軸に沿ったすべての面に焦点を合わせるか、

または異なった溶液の深さにある異なった生物に焦点を合わせるために、どんな機械的な動作なしに可能にします。収差の自動補正は、実験時に、溶液チャンバーによって、引き起こされる調整ミスか変形を抑制します。

したがって、DHM™ システムは、次に示されるように、生物標本構造と微生物、細胞または花粉粒子を含む動的な解析に傑出したツールです。



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

中央：
未分化 PC 12 細胞株（観察視野 $64 \times 64 \mu\text{m}^2$ ）

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

定量的位相差

DHM™ T 1000、位相差 (PhC)、およびノマルスキー微分干渉コントラスト (DIC) 顕微鏡で、得られた培養の同じ生きているニューロン画像は、図. 1 で比較されます。ダーク PhC 画像 (a) は、ニューロンの突起を特に可視化しますが、ハロー (バックグラウンドのニューロンの本体と突起を囲む明るい区域) とシェーディングオフ (ニューロンの本体の中央の部分の位相増加は、薄いニューロン突起より明るくします) と呼ばれるよく知られた光学アーティファクトを受けます。DIC 画像 (b) の主な特徴は、仮想の側面照明か、または影を落とす効果の結果として、それらを立体的に見せます。したがって、DIC 画像のコントラストは、対称でなく、対象物の方位によって作られた角度のコサイン (余弦) と波面シヤアの方位に比例して変化します。最後に、DHM™ T 1000 は、生きているニューロン (c) の定量的な位相差と 3D 表現 を可能にします。その上、特許のデカップリング手法を使用するか、または一定の、そして、均質の細胞の屈折率を仮定することによって、ニューロンの突起と細胞体をサブ波長の解像度で厚さを測定することができます。

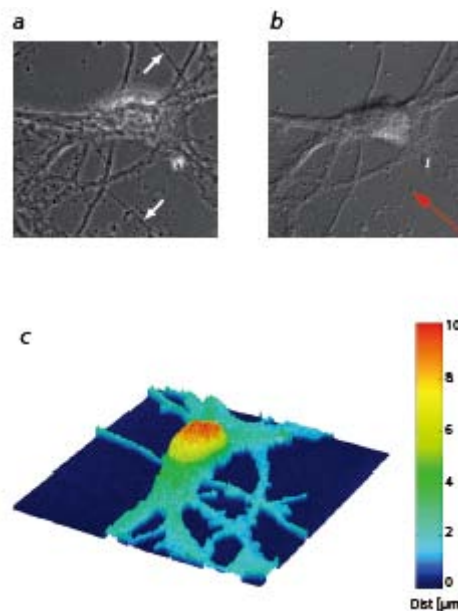


図 1: 培養液内の生きたマウス皮質ニューロン画像: a) ダーク PhC 画像; b) DIC 画像; c) DHM™ T 1000 で得られた位相分布の擬似カラーの透視画像

細胞のタイプの分類: 花粉粒

大きさが、20 μm から 30 μm の間の範囲の花粉の粒子のサンプルを調べました。図 2 は、3 つの異なった花粉のタイプの振幅（最初の行）と位相画像（2 番目の行）の典型的な例を提示します：樺、いちい、およびたんぽぽ。2 種類の画像の補完性（位相と振幅）は、明確にこの図で、明らかになります：振幅画像は、サンプルによる光の吸収に関連しますが、位相画像は、サンプルの光路長に直接に比例します、すなわち、屈折率と厚さの両方に対応します。図 2 の最後の行では、異なった花粉の粒子タイプの典型的なプロファイルを示します。屈折率をそれぞれの細胞部分（膜、核、細胞質）とそれぞれの花粉タイプでも異なるとき、それぞれの花粉タイプの位相信号のユニークさを明確に示します。

樺の花粉プロファイル（細胞の両側における 2 つの減少）で解る負の位相差は、細胞外環境（屈折率およそ 1.3 の液体）より小さい膜の屈折率によって、説明されます。これに反して、いちいの花粉プロファイルに関しては、細胞の両側における小さいスパイク波形は、細胞質と細胞外環境屈折率の両方より大きい膜の屈折率のためです。たんぽぽ花粉プロファイルに関しては、減少もスパイク波形も見られずに、そのことは、膜と、細胞質の屈折率が、細胞外環境より大きく、ほぼ同じくらいの値であることを意味します。形状、特定の細胞構造のための違い、そして、樺といちい細胞それぞれの 200° と 250° の範囲、たんぽぽ細胞の 600° は、細胞タイプの分類を達成するために使用することができます。

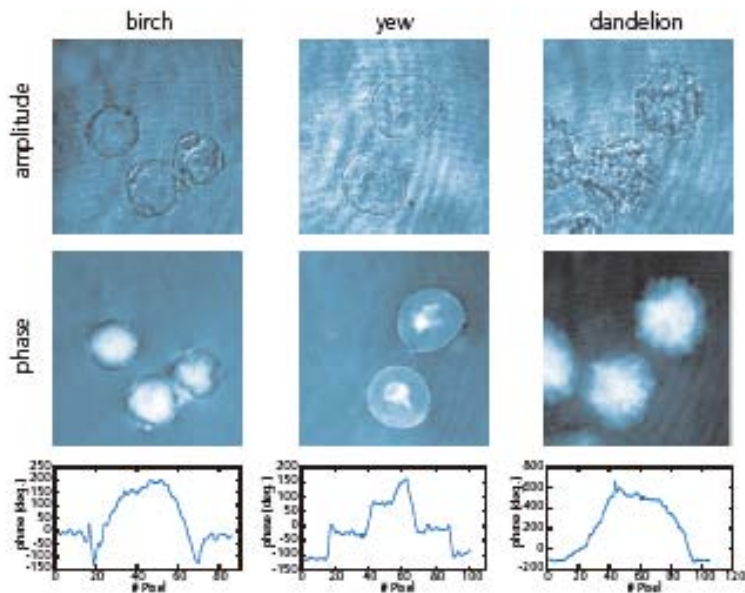


図 2: 透過型 DHMTM T 1000 で、撮った異なった花粉粒子と位相画像からのプロファイルを抽出

Conclusion

DHMTM T 1000 は、生物標本構造と定量的な位相測定のおかげで、タンパク質濃度に関連する屈折率と 3D 形態学の両方に関して正確な情報を提供する動的で、非侵襲解析を可能にする理想的な機器です。

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 subwavelength axial accuracy", *Opt. Lett.* 30, 468-470 (2005)

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

 **Lyncée tec** ^{DM}
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>