

BIOバイオテクノロジージャーナル

本コンテンツの著作権につきまして YODOSHA CO., LTD. 2006
・本コンテンツに掲載された著作物の複写権・複製権・転載権・翻訳権・データベースへの取り込みおよび送信(送信可能化権を含む)・上映権・譲渡権は、(株)羊土社が保有します。
・[JDS] <(株)日本著作出版管理システム委託出版物>
本コンテンツの無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に
(株)日本著作出版管理システム (TEL 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199) の許諾を得てください。

2006年11-12月号 掲載記事

本記事のアンケートにて協力ください。抽選で
羊土社オリジナルグッズをプレゼントいたします

■FAX ⇒ このページ
■WEB ⇒ こちらをクリック

☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆ アンケートにて協力ください ☆☆☆☆☆☆☆☆☆

抽選で毎月5名様に『羊土社ロゴ入り オリジナルタイマー』をプレゼント!!

プレゼント対象期間: 2007年3月末日まで (当選者の発表は商品の発送をもってかえさせていただきます)



私たちバイオテクノロジージャーナル編集部では、皆様方の声をお聞きして、今後の雑誌や書籍発行の参考にさせていただきたいと存じております。ぜひ、アンケートへのご協力をいただけますようお願い申し上げます。

1) バイオテクノロジージャーナル11-12月号 製品特集「顕微鏡とイメージングツールの最新アプリケーション」を読んだ感想を教えてください

役に立った 役に立たなかった どちらともいえない

◎理由

[]

2) 本特集中で、最も興味深かった、面白かった協賛企業記事はどれですか?

「ライブセルイメージングの最強のツール」 横河電機株式会社
 「ライブセルイメージングへのニコンの取り組み」 株式会社ニコンインステック
 「ライカ次世代蛍光イメージングシステム」 ライカマイクロシステムズ株式会社

◎選んだ理由

[]

3) 本特集中掲載されている協賛企業の詳しい資料をご希望される方は、□にレ印をご記入ください

*資料請求いただいた方については、羊土社がとりまとめ、該当広告主にお渡します。それ以降は各社それぞれの責任において管理され、資料のご案内をさせていただきます

全ての資料を請求する 横河電機株式会社 株式会社ニコンインステック ライカマイクロシステムズ株式会社
 アンドール・テクノロジーPLC 株式会社オptronix カールツァイスマイクロイメージング株式会社
 倉敷紡績株式会社

4) 今後、製品特集として取り上げて欲しいテーマを教えて下さい

[]

ご協力、誠にありがとうございました

FAX 03-3292-1224 羊土社 バイオテクノロジージャーナル編集部 行

送付先連絡先
ご住所
ご所属
TEL

※羊土社メール配信ならびに小社出版物のご案内に使用させていただきます。また、ご本人の許可なく第三者へ提供することはございません。内容のご確認、修正、削除のご希望がございましたら、弊社までお申し出下さい。万が一小社出版物のご案内がご不要の場合には下記チェック欄にレ印をお付けください。尚、羊土社の個人情報の取扱いに関しては次のURLをご覧いただきますようお願い申し上げます。
<http://www.yodosha.co.jp/ppi/index.html>

なまえ
お名前

E-mail

〒101-0052
東京都千代田区神田小川町2-5-1 神田三和ビル
TEL 03(5282)1215 (編集部)
E-mail:btjournal@yodosha.co.jp
URL:<http://www.yodosha.co.jp/>

「バイオテクノロジージャーナル」定期購読申し込み

本誌は定期でのご購読がお得です。定期購読をご希望でしたら、下記にご記入ください。

年・月号から 1年間 6冊 14,175円 (10% OFF 税込) 定期購読する

FAX番号: 03(3292)1224

発行 羊土社

本記事のアンケートにご協力ください。抽選で羊
土社オリジナルグッズをプレゼントいたします

- FAX ⇒ 最初のページ
- WEB ⇒ こちらをクリック

製品特集

顕微鏡と イメージングツールの 最新アプリケーション

生物医学研究において、遺伝子やタンパク質、またそれらの相互作用や機能を解析するために、顕微鏡を中心としたイメージング機器の重要性が益々高まっています。本製品特集では、顕微鏡の種類とその活用のための必須情報を概論で解説すると共に、企業協賛記事では最新の顕微鏡やイメージング機器についてアプリケーション事例と共にご紹介します。

◆概論◆
顕微鏡・イメージングツールの選び方、使い方
～ライブセルを「見る」・「録る」・「獲る」

櫻井孝司、寺川 進 754

◆協賛企業記事◆

ライブセルイメージングの最強のツール

横河電機株式会社 758

ライブセルイメージングへのニコンの取り組み

株式会社ニコンインスティック 760

ライカ次世代蛍光イメージングシステム

ライカマイクロシステムズ株式会社 762

◆協賛企業◆

アンドール・テクノロジーPLC

株式会社ニコンインスティック

株式会社オptronics

横河電機株式会社

カールツァイスマイクロイメージング株式会社

ライカマイクロシステムズ株式会社

倉敷紡績株式会社

05

06

07

08

Microscopy from Carl Zeiss

Understand the dynamic Processes of Life



カール ツアイス 株式会社 マイクロスコープディビジョンは
2006年10月1日より
カール ツアイス マイクロイメージング 株式会社
に生まれ変わりました。

輸入／販売元

カール ツアイス マイクロイメージング 株式会社

Tel 03-3355-0332 URL <http://www.zeiss.co.jp>

営業所：東京／大阪／名古屋／福岡／仙台

●本製品の仕様はお断りなしに変更させていただくことがあります。

- 本製品の色彩は印刷上に多少異なることがあります。

We make it visible.

<概論>顕微鏡・イメージングツールの選び方、 使い方～ライブセルを「見る」・「録る」・「獲る」

櫻井孝司，寺川 進

顕微鏡やイメージングツールを活用することで生きた細胞の機能を動的に測定することができる。細胞のダイナミクスを詳細に測るために、決定的瞬間を捉えて、定量性や再現性も向上させたい。さらに細胞への侵襲度も抑えて真の振る舞いも知りたい。見る技術でどこまで解るか？にフォーカスを合わせながら、優しく見て賢く録るスマートイメージング法や進化著しい培養顕微鏡法について述べる。

イメージングの入口

光学顕微鏡の操作は細胞へ光を当てることが最初のステップであるが、その前に見たいものを捉るためにひと工夫が必要である。どうやって照準を合わせるかが技術的に重要なポイントとなる。「光学的にマーキングすること」は現在考えうる最良の解の1つであり、蛍光色素や蛍光タンパク質類によるライブステイニングが汎用されている。ライブセル蛍光イメージングの特徴はダイナミクスの5次元（3次元空間・時間・波長）解析となる。顕微鏡の半自動化により高次元の測定が手軽となっており、これは光源、フィルタ類やビデオカメラなど周辺のイメージングツールの進歩によるところも大きい。ライブセルイメージングのコツとして、①近くで見る、②確実に録る、③ストレスを軽減して良い細胞を獲る、の3つのポイントが挙げられる。

近くで見る

より細かく・より明るく・より速く

顕微鏡の長所とは何か？という問い合わせの1つは、小さなものがより細かく見えること、すなわち空間解像力が肉眼より優れることである。空間解像

力は光の波長（ λ ）でほぼ決まり、光学顕微鏡ではおよそ λ が $0.3\text{~}1.1\text{ }\mu\text{m}$ の範囲の光が用いられる。2次元空間（XY）における分解能は λ とレンズの開口数（NA）で定義され、波長が短くて、NAが大きくなるほど解像力が上がる。NAが高いレンズほど物体までの距離が短くなっていて、広い範囲から光を集めることができる。NAは1.65が最高値となっているが、特殊な合成ガラス（屈折率1.78）の併用を要する。通常のカバーガラス（屈折率1.51）を用いる場合はNA1.49が最高値となり、理論的な検出限界値は $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 付近となる。NAの値が高くなると明るさ（S/N比）も向上し、分子レベルの対象でさえ明瞭に見える（図1）。像が明るくなるほど、短い時間で十分な信号を得ることができ、時間分解能も上がる。高速光スキャナと高感度デジタルビデオカメラを組み合わせると毎秒1,000枚程度の速さでも十分にきれいな画像を記録することができる（横河電機社協賛記事参照）。

近いから解ること

顕微鏡像における明るさやそのパターンから調べたい対象の分布や局在がわかる。時間経過を記録することで、分子の移動や細胞内信号を解析できる（図2）。測定対象のサイズが $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 以下であったとしても、光マーキング法と照明法を組み合わせることで、存在や動きがわかる。

このようなダイナミクス解析は分子レベルだけでなく細胞や生体レベルでも応用できる。

確実に録る

できることなら効率よく記録したい。測定用のサンプル調製の過程で苦労することが多いし、サンプルの数や測定期限が限定されていれば尚更である。さらに「1回の測定」で、有意な情報を多数の細胞から録りたい。これは色を使いこなして、撮り逃しを減らすことで解決できる（ニコン社協賛記事参照）。

色の使いこなしでわかること

蛍光画像を取得するとき、フィルタ法やスペクトル法を用いることになる。フィルタ法では干渉フィルタやビームスプリッタを組み合わせることになるが、光マーキングした蛍光分子における波長の透過率に留意して用途に合ったフィルタ類（例えばSemrock社製）を選択する。スペクトル法では複数の蛍光分子を多重追跡でき（図3）、自家蛍光も検出できる特長がある。スペクトル分離法でクロストークがキャンセルでき、蛍光S/N比が相対的に向上する。蛍光共鳴エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer : FRET）の効率測定にも有効であり、リガンドと受容体、イオンと結合

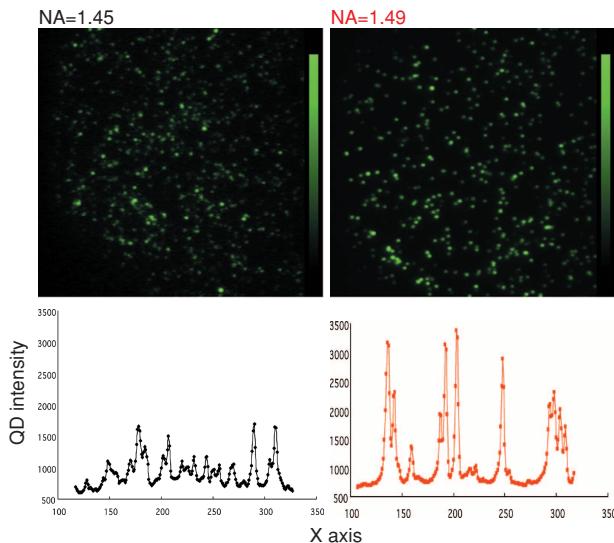


図1 単一導体ナノ粒子 (Q dot 505) のTIRF像 (上) と明るさラインプロファイル (下)

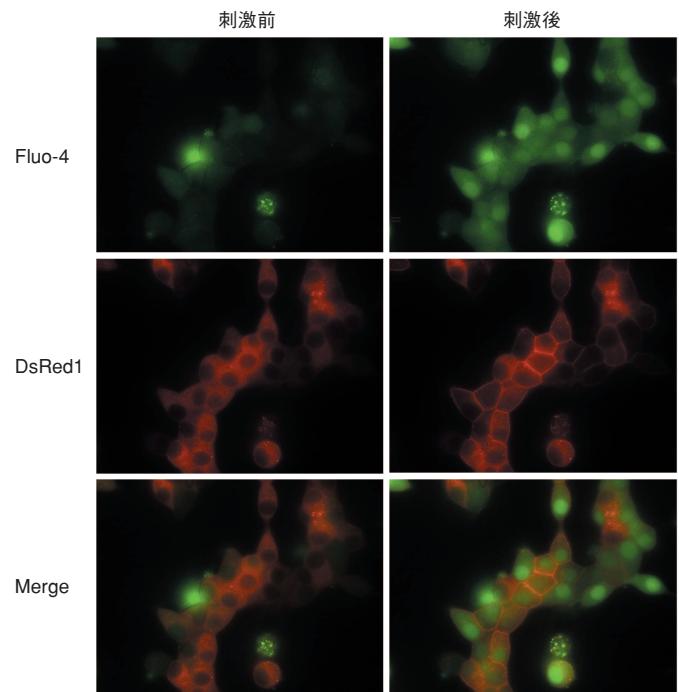


図2 細胞内シグナルCa (Fluo-4) とPKC (DsRed1) の落照蛍光像 (ライカ社協賛記事参照)

タンパク質、抗原と抗体などの分子同士での相互作用がわかる。

フォーカスを維持することの効果

ピントを自動的に維持し続ける装置が登場している。原理はカバーガラスと水など屈折率が異なる媒質間の界面で発生する部分反射光を検出して、元のピント位置へフィードバックするものである。熱膨張や衝撃などの原因で、ピントが一瞬ずれても即座に元の位置に復帰するので“より長い”期間にわたって記録ができる。また、フォーカス補正の手間やピント位置の見失いから開放され、ドリフトによる蛍光強度変化が最小限になった。したがって、Caイメージングのように蛍光強度の変化から細胞応答の定量化を行うときに有効である(図4)。ピントの連続維持は、ライブセルイメージング技術における定量性や再現性を安定させる効果があり、決定的瞬間をより捉え易くした。

ストレスを軽減して良い細胞を獲る

細胞への侵襲性を抑えることを省力で実現したい。この解の1つとして培養顕微鏡法がある。これは細胞を標準的に培養したまま、その動態や機能を計測する観察手法で、顕微鏡ステージ上での簡易インキュベーションから培養専用器内の顕微鏡法に進化したものである。培地交換や植継ぎを行えば、半永久的に同じ株のサンプルで記録し続ける事ができる。培養環境だけでなく撮像用の光による侵襲度も低く設計されており、培養細胞の動態や機能をより自然に近い状態で見ることができる。オリンパスとニコンから登場した製品では、画像を出力する記録型(図5)と、任意細胞へと調製操作するプロセス型(図6)があり、細胞毒性・記録時間・測定効率が従来の100倍程度改善している。見る細胞をランダムに選ぶこともできるので、データ取得を客観的に行うことができ、予想外の結果を得るチャンスが広がった。さらに、プロセス型装置では遺伝子の発現や細胞の分化など任意の細胞を出力として獲られるため、最適な時期の実験実行や、実験結果を培養へフィードバックできる。細胞へのストレスを軽減することによって、良い細胞を作り、それを見分けて集めることができる。培養顕微鏡はこの目的のために作られている。細胞の本来の特徴がしっかり解るようになれば、細胞を選択してグループに分けることができる。顕微鏡は画像を出力するだけでなく、バイオプロダクトの产生も担い始めた。

照明の種類と使い分け

ライブステインした細胞に励起光を照射して蛍光分子を励起する。照明の方式は見たい領域・範囲・サイズなど測定の目的に応じて、①落射、②共焦点、③全反射法などから選ぶことになる。

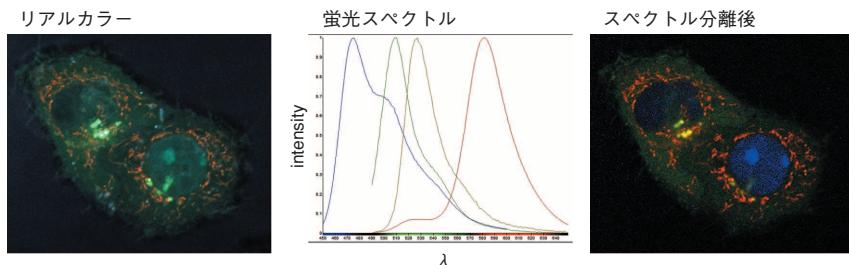


図3●4種類のオルガネラのワンショットイメージング

HeLa細胞の核（CFP）と細胞質（GFP）とゴルジ（YFP）とミトコンドリア（DsRed）のスペクトル共焦点像。参照：ニコン社協賛記事

落射照明法

比較的広い範囲を均一に見ることができる。例えば核、細胞質や細胞膜領域を同時に測定したい場合に有効であるが、S/N比は相対的に低くなる。NAが1.4を超えるような対物レンズを用いるとZ軸方向の分解能が高いためS/N比が良い。光源はキセノンランプなどを適用することで、紫外領域と可視域の両方の波長を選択できる。紫外領域光を用いる場合は、対物レンズやフィルタ類の適合性、自家蛍光の発生、DNAへの吸収などの問題がある。

共焦点法

落射法よりも高S/N比で計測したい場合に適用する。光走査法はシングルビーム法とマルチビーム法に大別される。前者はガルバノミラーによる走査であり、任意の範囲（ROI）走査やスペクトル分光が特長である。後者は回転ディスク（横河電機社協賛記事参照）による高速走査や低光毒性が特長である。マルチビーム法では光エネルギーを分散することができるので、褪色を有意に軽減できる。組織や生体を見る際は、多光子法やファイバー法などを用いると有効である。

全反射法

エバネッセント場を励起光として細胞膜近傍における変化や分子を高S/N比で見ることができる。エバネッセント場の領域を変えることで光軸方向に

せれば低NA・低倍レンズでも適用できる。

トラブルシューティング

退色や光毒性

分子に光を照射している限り、蛍光を発し続けるわけではなく、徐々に退色する。明るさの低下だけで済むなら検出器の感度を上げる対策で済むが、もう一方で產生する熱や一重項酸素が細胞に影響を与える。ローズベンガル系やポルフィリン系色素は光毒性が高いことが知られており、癌の治療などにも用いられている。余計な光は當てずに効率よく録る技術としてCLEM（Controlled Light Exposure Microscopy）法がある。

自家蛍光や背景光

自家蛍光は容器とサンプルの両方から

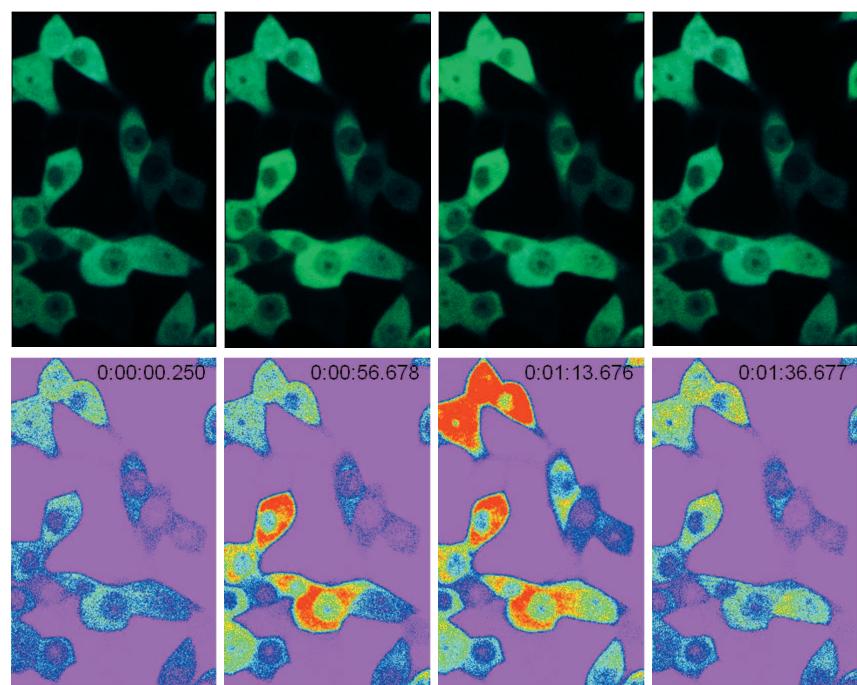


図4●FRETによるCaイメージング

Yellow Cameleonを安定発現したINS1細胞を脱分極刺激したもの。上段はCFPとVenusのmerge画像、下段はレシオ画像。参照：横河電機社協賛記事

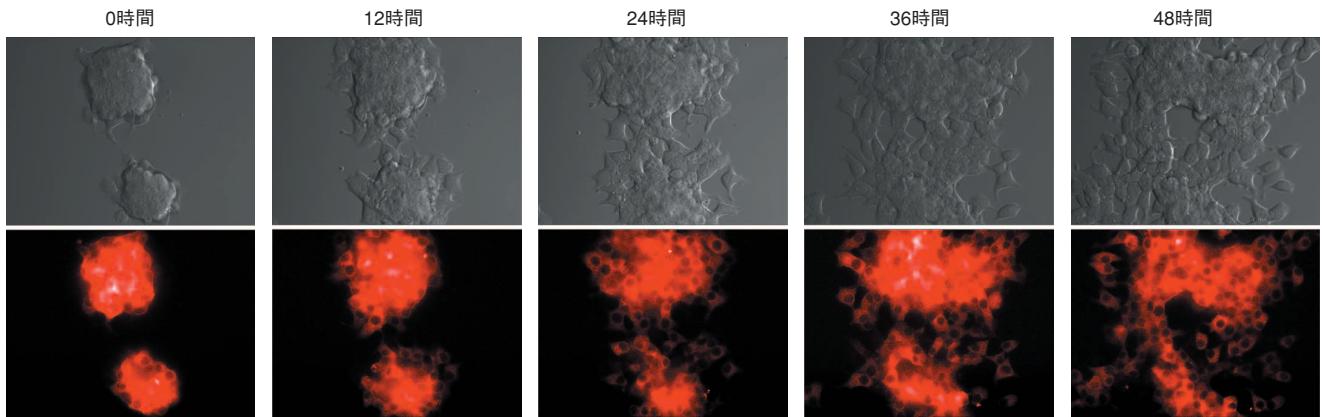


図5 記録型培養顕微鏡による細胞増殖イメージング

PKC-DsRedを安定発現したINS1細胞をスフェロイド培養したあとでガラスに接着させたもの。上段はDIC像、下段は落射蛍光像。オリンパスLCV100による

発生して背景ノイズとなる。励起光の波長が短いほど顕著になる傾向があるため、U帯～B帯を用いる場合は特に留意を要する。スペクトル分離法により、自家蛍光由来の背景光を除去することができるので、S/N比を改善できる。

細胞の選択

光マーキングをした後、どの細胞を測定するか悩むことが多い。すべての細胞は同じ状態ではないため、応答のばらつきが生じる。また、ライブステインした後、細胞は安定状態を保つとは限らないので、どれを選ぶか迷っている余裕はない。一個の培養容器において測定する座標数を増やしたり、容器数を増やしながら、測定対象をランダムとしながら母集団を増やすのが有効である。

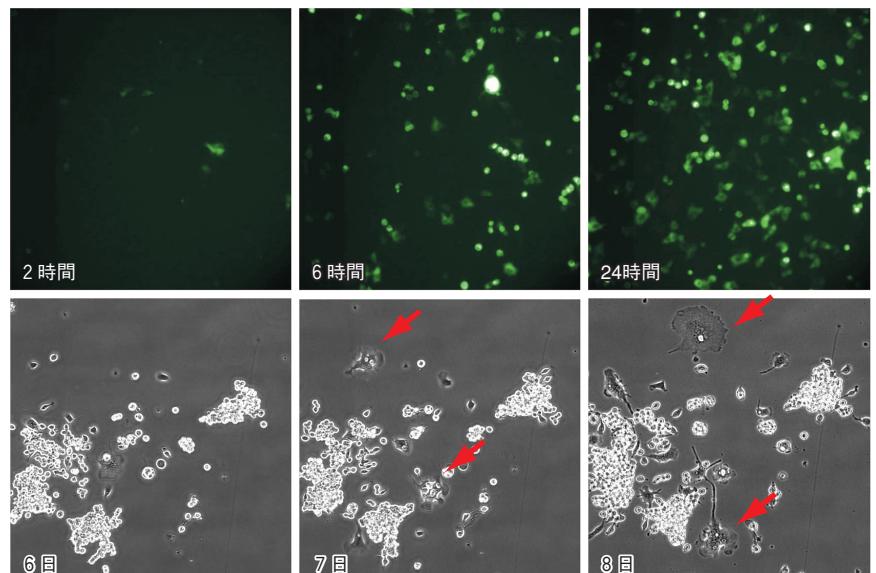


図6 プロセス型培養顕微鏡による細胞操作

上段：HiliMaxを用いてPKC-GFPを強制発現させたHeLa細胞の落射蛍光像。下段：RAW細胞へHuman RANKLを作用させて分化誘導させた破骨様細胞(→)の新位相差像。参照：[ニコン社協賛記事](#)

謝辞

本稿作成にあたり、産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・加藤薫氏・三好洋美氏、および浜松医科大学・第二生理学・最上秀夫氏より助言と試料提供いただいた。また、図2～5は産業技術総合研究所・第2回ライブセルイメージング講習会にて参加者ならびに協力各社（アンドール・PLC、オリンパス、ソリューションシステムズ、同仁化学、ニコン、横河電機、ライカマイクロシステムズ）のご支援のもと取得した。



櫻井孝司 (Takashi Sakurai)

浜松医科大学光量子医学研究センター細胞イメージング研究分野。
1996年総合研究大学院大学（岡崎生理学研究所）博士課程修了。1996年浜松医科大学・光量子医学研究センター助手。
E-mail: takker@hama-med.ac.jp
研究内容：新型走査顕微鏡の開発およびラジカルとトランスマッター放出解析への応用。

寺川 進 (Susumu Terakawa)

浜松医科大学光量子医学研究センター細胞イメージング研究分野。
現在、同学副学長、光医学研究センター長。

ライブセルイメージングの最強のツール

横河電機株式会社

共焦点顕微鏡は蛍光顕微鏡に比べて3次元で鮮明な画像が得られることから、細胞組織内の微細形態観察に活用されてきました。近年、バイオ研究分野において生細胞内の生体分子の分布や動態、相互作用の観察の重要性が増してきています。「共焦点スキャナCSUシリーズ」はこのような生細胞観察に最適なツールとして世界のバイオ研究者にご愛用いただき出荷実績1000台を越えました。

マイクロレンズ付ニポウディスク方式の原理

従来の共焦点顕微鏡では1本のレーザビームで観察領域をスキャンするシングルビームスキャン方式が用いられていましたが、CSUシリーズでは観察領域におよそ1000本のレーザビームを照射し同時にスキャンするマルチビーム方式を採用し1000フレーム/秒という高速スキャンを実現しています。さらにニポウディスクという多数のピンホールを配置した回転円板と精密に位置決めされたマイクロレンズディスクを組合せることによりレーザ光の利用効率を改善し、S/N比を向上しています。この方式では、高速に画像が得られるだけでなく、1本1本のレーザビームのパワーが従来に比べて数桁低いため細胞へのダメージが少なく、長時間の観察が可能になっています。

CSUの特徴

●世界最高速のスキャンスピード

ビデオレート(毎秒30フレーム)はもちろんのこと、最大毎秒1000フレームで共焦点画像の取得が可能です。また、従来のシングルビームスキャン方式と違い、最高速でもスキャン範囲を狭めることなく、フルフレームの画像が得られます。

●少ない光毒性/蛍光褪色

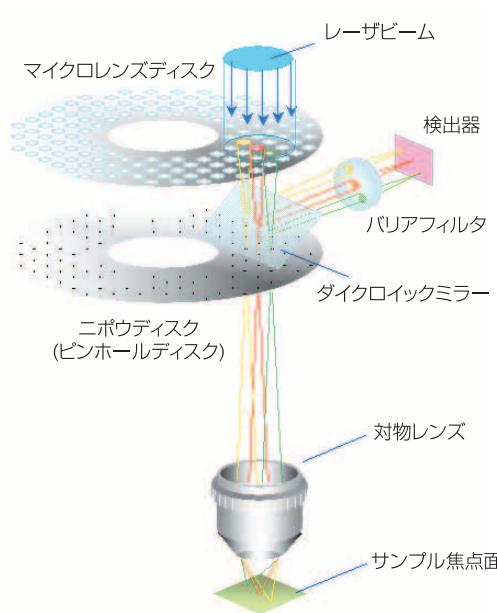
マルチビーム方式の採用により、1ビームあたりのエネルギー密度を約1/1000以下に抑制しました。これにより、光毒性や蛍光褪色を最小に抑えることができ、超長時間のタイムラプス観察も可能です。
Indiana大学のE.Wang等は、CSUと従来型(シングルポイントスキャン)共焦点を直接比較しています。これによると、GFP発現生細胞の同レベルの画像取得時に、CSUでは退色が1/15以下で、レーザ毒性も顕著に低いとの報告がされております。また、CSUは高速、高効率で蛍光の飽和がないため、小胞の3次元の動きを観察するのに最適と報告しています。(*)

●高精細

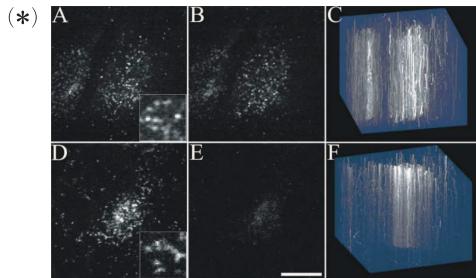
ビーム照射強度が限定されるライブセル観察の場合でも、非常に高精細な画像取得が可能です。近年進歩が著しい各種CCDカメラを用いて、生細胞のリアルタイム観察だけでなく、固定標本の高精細観察、更に従来型の共焦点では困難な超微弱蛍光観察も可能です。

●自由度の高いシステム拡張性

お手持ちの正立・倒立タイプ顕微鏡に取付け、蛍光顕微鏡を共焦点顕微鏡に機能拡張が可能です。多様なレーザ、CCDカメラ、ソフト等を組み合わせることにより、ニーズに合わせて柔軟的なシステム構成が可能です。



共焦点スキャナCSU22



CSUと従来型共焦点によるGFP発現生細胞の連続撮影データ比較

試料：MDCK細胞内のGFP発現Rab25小胞
A.B.CがCSU,D.E,Fが従来型共焦点

A.D. :撮影開始時

B.E. :200枚連続撮影後

C.F : XYT(画像縦方向は時間軸)

BCとEFを比べると、CSUでは200枚撮影後も個々のGFPシグナルが殆ど退色していないのに対し、従来型共焦点では速やかな退色が観察された。

(Journal of Microscopy, Vol. 218, Pt 2 May 2005, pp. 148-159ng:
“Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems”)

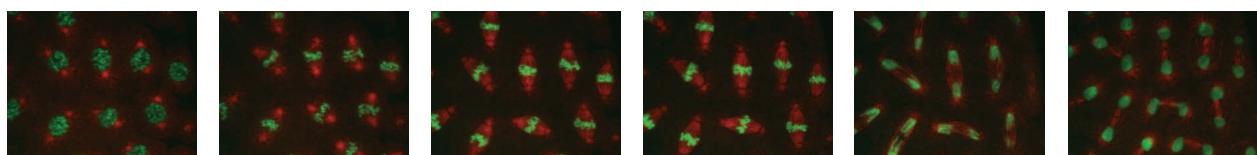
CSUアプリケーション例

1. 生細胞の高精細タイムラプス観察

細胞分裂、シグナル伝達、小胞輸送、微小管ダイナミクス、微小循環等、ダイナミックな動きを高精細に観察できます。

*ショウジョウバエ胚における細胞分裂観察

GFP-histone発現胚にrhodamine tubulinを注入、各画像は3次元スライス重ね合わせ



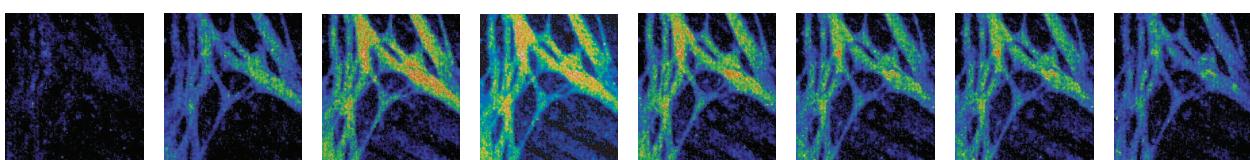
Dr.J. Sholey, Dr.D. Sharp: University of California, Davis

2. リアルタイムCa観察

最高毎秒1000フレームの高速スキャンにより、ミリ秒単位の反応記録が可能です。

*ラット灌流心臓のカルシウムトランジェント

ラット灌流心臓の心室中隔膜プルキンエ纖維におけるCa²⁺トランジェント(Fluo3)



京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学 高松哲郎先生

3. 高精細高速FRET観察

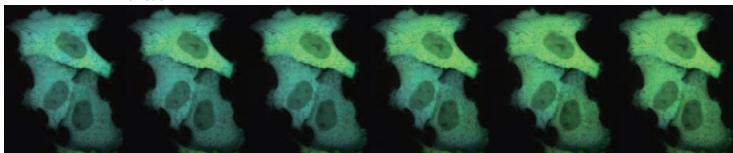
蛍光褪色が少なく高速スキャンが可能なため、FRET観察に最適です。

*カメレオン(YC3.60)を用いて測定したHeLa細胞のCa²⁺動態

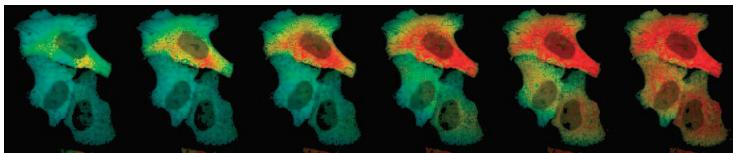
ヒスタミン刺激による細胞質カルシウム濃度の立ち上がり部分のリアルタイム・リアルカラー観察

ビデオレートFRET観察

リアルカラー画像



レシオ画像(疑似カラー)



理化学研究所脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム 宮脇敦史先生
北海道大学電子科学研究所電子計測制御部門ナノシステム生理学分野 永井健治先生

YOKOGAWA

横河電機

ライフサイエンス事業部CSUセンター

〒920-0177

石川県金沢市北陽台2-3

TEL : 076-258-7028

FAX : 076-258-7029

E-mail : csu@csv.yokogawa.co.jp

<http://www.yokogawa.co.jp/SCANNER>

ライブセルイメージングへのニコンの取り組み

株式会社ニコンインステック 及川義朗

ニコンの顕微鏡はガラス材料の開発、薄膜技術、光学設計、各種制御設計等々長い経験とノウハウの蓄積が基礎になっていますが、近年ライブセルイメージングを行うためのさまざまな技術や製品を開発いたしました。本稿では、そのうち3つの製品を例にとって、ライブセルイメージングへのニコンの取り組みをご紹介します。

パーフェクトフォーカスシステム (PFS)

フォーカスのずれは長時間にわたる記録だけでなく、ディッシュ内の細胞に薬剤を投与するようなごく短い時間における場合でも発生することがあります。そのためフォーカス維持は安定で手軽に確実にタイムラプス記録するための最大の課題でした。焦点の合った画像を撮り続けるための従来の対策は保温ボックスなどで温度環境を安定させることでしたが、顕微鏡全体を囲うほどのサイズが必要で操作性が犠牲になっていました。そこでニコンは、“フォーカスはズれるもの”という観点にたって技術開発をし、リアルタイムにフォーカス制御をするパーフェクトフォーカスシステム (PFS) を製品化しました。図1にPFSの原理を示します。任意の面に焦点を合わせPFS

をONにすると、対物レンズを通して照射されるモニタ光（赤外LED光）がカバーガラスと溶液の界面を検出し、この界面を基準に対物レンズを高精度にしかも連続的に制御してフォーカスを維持し続けます。この機構は油浸、水浸レンズはもちろんドライの対物レンズにも使用可能です。もはやPFSは決定的瞬間をとらえるために必須の装置です。

共焦点レーザ顕微鏡C1シリーズ

共焦点顕微鏡では各励起レーザ光を微妙に制御しながらX、Y、Z、t（時間）、λ（色情報）、多点までの6次元の情報を取得、管理、解析することができます。ニコンのC1シリーズの最大の特徴は、高いS/N比の画像が取得できることです。したがって励起光のパワーを抑えて細胞

への光ダメージを軽減しながら高画質な共焦点像を取得できます。前述のPFSを組み合わせることもできますので高精度な6次元タイムラプス記録が可能です。なかでもスペクトル対応C1si（図2）では32chのPMT（光電子増倍管）を有し、400 nm～750 nmの広い範囲において、2.5 nmから10 nmの波長分解能をもってスペクトル曲線を表示します。以下で、C1siの特徴を生かした3つの研究事例をご紹介いたします。

①蛍光スペクトルがオーバーラップするような蛍光プローブを同時に複数用いて各種組織や細胞の機能解明を行う場合、画像取得後に蛍光分子のスペクトルを分離(spectral unmixing)できるので蛍光信号を強調して表示することができます。

②背景光上昇の原因となる自家蛍光が大きい場合、spectral unmixingで自家蛍光成分だけを除去できるので、見たい蛍光信号のみ高いコントラストで表示することができます。

③FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）の測定の場合、CFP-YFPそれぞれのスペクトル変化を経時的に追えるので従来のフィルタ方式より効率の良いFRETイメージングが可能になります。

このような蛍光スペクトルのわかるタイムラプス法はC1siによって初めて実現

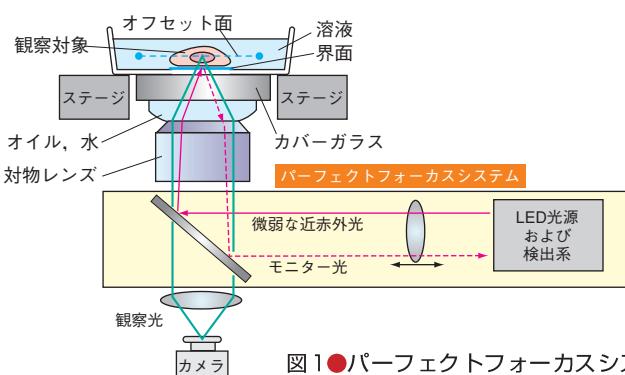


図1 パーフェクトフォーカスシステムの原理図



図2●スペクトラル対応共焦点レーザ顕微鏡C1siの製品写真

したばかりなので、今後新たなアプリケーションへ発展することを期待しています。

BioStationシリーズ

これまで細胞の状態へ悪影響を及ぼさないライブセル観察が長年の技術的課題でした。ニコンは細胞培養の環境そのものをパッケージした装置「BioStationシリーズ」を一挙に2機種開発しました(図3)。

1機種目はBioStationCTで、細胞を育てて殖やしながら履歴も自動管理するという、細胞と情報の両方を提供します。BioStationCTは大きくわけて3つの部位で構成されます。第1は温度、湿度、CO₂濃度をPC制御し、培養環境を長期間にわたって安定的に維持する「培養部」です。35mmディッシュであれば180個を収納でき、搬送ロボットが細胞に物理的ストレスを与えることなく確実に移動させます。第2はバードビュー像とミクロ観察像が取得できるデジタル顕微鏡観察部です。容器は一般によく使われる35mmから100mmまでのディッシュ、培養フラスコ、ウェルプレートのいずれも適用可能です。第3はデジタル制御部です。ここでは①インキュベーション環境、②搬送や画像取得、③データ保管、④ネットワーク、⑤ユーザ別セキュ



図3●BioStation CTとIMの製品写真

リティなどを統合制御しています。BioStationCTではサンプルを本体にセットしてしまえば培養の履歴情報(細胞画像、溶液交換、インキュベーション情報など)が自動的に保存され、インターネット経由で別の部屋やあるいは外部からも培養情報の確認や管理ができます。手作業で行っていた煩雑な操作から開放されるので、コンタミのリスクだけでなくユーザーの負担も軽減され、より優れた培養細胞の拠出に集中できます。今後の創薬や研究の現場においてはGLPやGMPなど、品質やデータの信頼性を客観的に証明するという概念が広まってきており、細胞の履歴管理においてはBioStationCTが寄与するところは大きいと期待しています。

2機種目はBioStationIMです。BioStationCTが多量のサンプルを一括管理するのに対して、BioStationIMでは厳選したサンプルの経時観察に特化したコンパクトなインキュベータ内蔵式倒立型デジタル顕微鏡です。生細胞のタイムラプス観察を行う場合、一般に必要とされるツールは顕微鏡保温装置、湿度およびCO₂制御、フィルターチェンジャー、シャッタなど複数があげられます。しかしその設定を最適とし、観察システムの状態を維持することは困難とされていました。BioStationIMでは、ライブセル観察に必要なツールをデスクトップパソコンのサイズにまとめ、セッティングフリー

でのワンステップタイムラプスを実現しました。観察チャンバの温度や湿度が維持されているため、細胞の状態とオーナーを長時間にわたって安定に保つことができます。観察モードは位相差と2色の蛍光が可能で、細胞の画像は設定した時間間隔で自動的に記録され、管理されます。BioStationIMは培養容器をチャンバ内に置くだけで本格的なライブセルイメージングをご提供します。

まとめ

以上紹介したとおり、ニコンではライブセルイメージングの世界に対して、細胞そのものの培養環境管理から、簡単な操作によりデータ管理を実現させ、最高の画質を提供する装置までラインナップをそろえて、ライフサイエンス研究、臨床研究、創薬などすべてのバイオ領域において研究者をサポートしてまいります。

株式会社ニコンインステック

及川義朗 (Yoshiro Oikawa)

株式会社ニコンインステック
バイオサイエンス営業本部 AS部ゼネラルマネジャー
〒210-0005 神奈川県川崎市川崎区東田町8/パレール三井ビル
TEL : 044-223-2169
URL : <http://www.nikon-instruments.jp/instech/>

ライカ次世代蛍光イメージングシステム

ライカマイクロシステムズ株式会社 余 涌、箱崎 和令、相澤 博一

150年にわたり培ってきた顕微鏡作りのノウハウと人間工学に基づき設計開発されたライカ倒立顕微鏡により、前例の無い鮮明な光学像が得られます。さらにデジタル技術を結集したインテリジェント設計により、従来の手動で行っていた微妙な光学調整を、すべてワンタッチスイッチ操作ができるようになりました。このインテリジェント倒立顕微鏡をベースにして、研究者のニーズに合わせた全反射蛍光顕微鏡、高速蛍光イメージングシステムを開発しました。

ライカDMI 6000B インテリジェント倒立顕微鏡

1. 倒立顕微鏡への最近のニーズ

倒立顕微鏡は、シャーレで培養している容器のまま手軽に観察できる顕微鏡として広く普及してきました。近年ではより生体内に近い状態で観察したいというニーズが高まり、より精密な空間的・時間的分解能を持ったイメージングシステムのためのツールとして、倒立顕微鏡に求められるものも変わっています。

ライカのインテリジェント倒立顕微鏡DMI 6000Bは、最新のイメージングシステムに求められる性能を満たすために開発された倒立顕微鏡として、特徴的な機能を持っています。

2. 装置の概要と特長

細胞を生きたまま観察する、いわゆる「ライブセルイメージング」においては以下の要素の低減が求められています。

- 細胞への光毒性
- 蛍光励起波長の切換+時間
- 長時間観察時のフォーカスのズレ
- 光学系の自家蛍光および顕微鏡内への光漏れ

DMI 6000Bはこの要求に対応するように対応

- PCから制御可能な励起強度調節機構(FIM;Fluorescence Intensity Manager)を開発し、顕微鏡本体で蛍光の励起

強度を約30ミリ秒で1/10まで減光可能にし、波長によって特性が変わるNDフィルターや、安定性に難のある光源の電圧可変方式を避け、メッシュ上のアッテネーターにより光量を間引きすることで、すべての波長に対して正確・高速に制御することが可能になりました。

- 蛍光フィルターターレットを限界まで高速化。約0.2秒でフィルターキューブの切換が可能です。

複数の蛍光タンパクを用いた実験でも、外付けのフィルターホイルなしに高速に画像取得が可能です。

- 顕微鏡本体のキャスト部の構造解析とフォーカス機構の見直しにより、外部アシストなしにフォーカスズレのないボディ構造を実現しました。
- 顕微鏡内の光路付近にある光センサーやLED類を排除。外部も遮断するボディ設計を採用。

長時間のタイムラプスを行ってもフォーカスズレがほとんど起こらない高剛性ボディを採用。このボディは完全暗黒を必要とする化学発光の測定においても、フロントディスプレイのバックライトを消すだけで問題なく使用することができます。

DMI 6000Bは、このように最先端のイメージングに求められる要素を満たすために開発されており、システムを構築するベースとして活用していくだけます。



FIMディスク



蛍光フィルターターレット

ライカAM TIRF 全反射蛍光顕微鏡

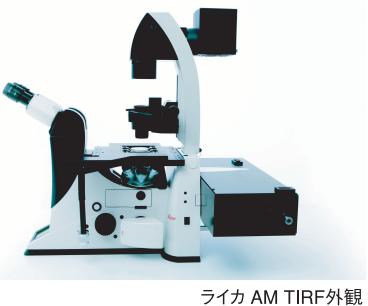
TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) 観察は、レーザー光をガラス底面から全反射させたときに発生するエバネッセント光を使用した観察方法であり、SN比が高く優れた蛍光画像が観察できることから、主に生細胞の膜観察や一分子蛍光観察の手段として使用されています。このTIRF観察には高開口数の対物レンズ(N.A.=1.4以上)とレーザー照明系を装備した顕微鏡の他に、高感度カメラや画像取り込みソフトウェアが必要になり、ユーザーはこれら複数のメーカー製品を組み合わせて使用していました。このため、観察にいたる

手動による観察光路の切換え調整には「装置の知識と経験が必要」でした。

2006年8月ライカマイクロシステムズから発売されたTIRFシステムは、これまでの手動式とは異なり、スキャナを搭載することにより自動化され、再現性を実現した次世代のTIRFシステムです。

主な特長

- TIRF角度の設定をオートアライメント化することにより、操作性を飛躍的に向上することができました。
- エバネッセント場の深度設定は70nm～310nmの範囲で7ステップ。ソフトウェア上から指定することができ、再現性良く浸透量の切換えができます。
- 照明方向を4方向から切換えることができ、ベストな照明方向から観察することができます。
- 顕微鏡から取り込みソフトウェアまで、すべてライカマイクロシステムズ社製で構成された自動化システムです。ソフトウェアから観察モード切換えができ、TIRFとDICなどを組み合わせたタイムラプス撮影も可能です。



ライカ AM TIRF外観



HCX PL APO 100x/1.46 Oil Corr.
収差の無いクリアなTIRF画像を
観察するために温度(23 / 37°C)、
カバーガラス厚(0.4-0.22mm)
に対する補正環を装備。

ライカ AF6000シリーズ 高速蛍光イメージングシステム

ライカ AF6000シリーズは、生命科学分野の課題を解決するための蛍光画像解析システムです。生体細胞向け高速蛍光イメージング専用でカルシウムイオン計測、FRET、タイムラプス向けAF6000LX、周辺機器構成の柔軟性を持ち蛍光重ね合わせ、タイムラプス向けAF6000、さらに線虫など小動物の動態の経時変化記録用AF6000 Macroがあります。

システム構成

- ライカ蛍光イメージングソフトウェア LAS AF
- ライカインテリジェント正立顕微鏡 DM 6000B、DM 5000B、倒立顕微鏡 DMI 6000B、DMI 4000B、ライカ電動実体顕微鏡MZ16FA
- 蛍光励起装置：モノクロメーター、またはライカ外付け励起光源、蛍光フィルターホイルEFW
- Z軸取得装置：Super Z Galvo Stage、またはピエゾ装置、電動フォーカス
- 電動ステージ
- ライブセル対物レンズ
PL APO 63X/1.30 CORR Glyn 37°C
- 高速高感度デジタルカメラ：
DFC350FX、Cascade512

ライカ AF6000シリーズの主な特長

- 生物医学分野で、生体細胞、小動物を対象に、ライバルの生体分子局在性の解析及びその動態変化に照準を合わせた、生体細胞の多次元蛍光イメージングです。
- インテリジェント顕微鏡、高感度デジタルカメラ及びその他の周辺機器の電動機能を完全一括制御。
- 高速デバイスを駆動し、多次元(xyz
入tn)画像を高速取得し、保存、解析します。生体の高速“動き”を撮れる

だけでなく、蛍光試料のダメージも避けられます。

- 研究課題に応じて柔軟なシステム構成の組合せ可能。ルーチンの作業から、3次元立体像再構築、FRET、レシオイメージングなど高度蛍光アプリケーションにも対応し、さまざまなニーズにお応えできます。
- 直観的に操作できるインテリジェント設計は、ユーザーが研究結果だけに集中できます。ワークフロースタイルに沿ったユーザーインターフェイスの採用で、操作者の習熟期間を大幅に短縮します。
- 自動化システムにより取得時の個々の実験条件、パラメーターを記憶し、再現するデータの信頼性を高めます。
- ライカのトータルソリューションで、ハードウェアからソフトウェアまでの整合性を高め、信頼性の高い安定操作環境を実現しました。



ライカ AF6000LX

leica
MICROSYSTEMS

余 涌 (Yu Yong)
箱崎 和令 (Kazunori Hakozaki)
相澤 博一 (Hirokazu Aizawa)

ライカマイクロシステムズ株式会社
〒108-0072
東京都港区白金1-27-6
白金高輪ステーションビル6F
TEL : 03-5421-2814
FAX : 03-5421-2891
E-mail : marketing@leica-microsystems.co.jp



スナップショット共焦点レーザー顕微鏡
ライカ TCS SPE

共焦点の精緻なイメージングが身近になりました。
ライカからコンパクトで手頃な、共焦点イメージングシステム誕生。

高画質

設定自在なプリズム分光方式で高感度・高選択性を実現

操作性

専用蛍光イメージングソフトでだれでも簡単操作

信頼性

顕微鏡・操作部・ソフトウェア、オールライカで安心

運用性

レーザーとコントローラを一体化、維持管理も容易



ライカ マイクロシステムズ 株式会社

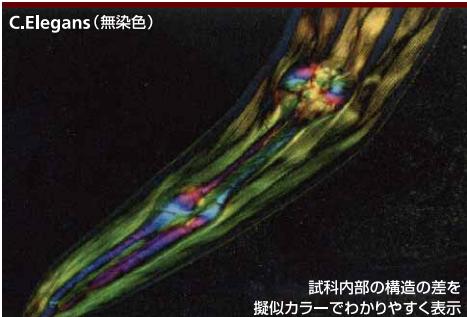
〒108-0072 東京都港区白金1-27-6 白金高輪ステーションビル6F Tel.03-5421-2814 Fax.03-5421-2891

大阪 Tel.06-6374-9771／名古屋 Tel.052-222-3939／福岡 Tel.092-282-9771

●E-mail:marketing@leica-microsystems.co.jp

製品に関する詳しい情報はWebサイトでご覧いただけます。 <http://www.leica-microsystems.co.jp>

顕微鏡用イメージングシステム



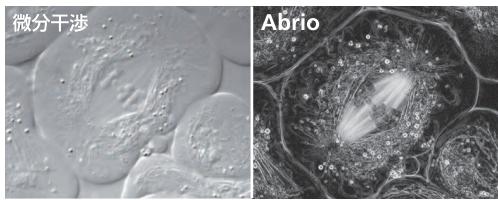
無染色&Live imagingの強力なツール

Abrio™ 偏光イメージングシステム
[アブリオ]



微分干渉法(DIC)など他の観察法よりも、細胞の構造を詳細に観察でき、無染色でのライブイメージングも可能です。

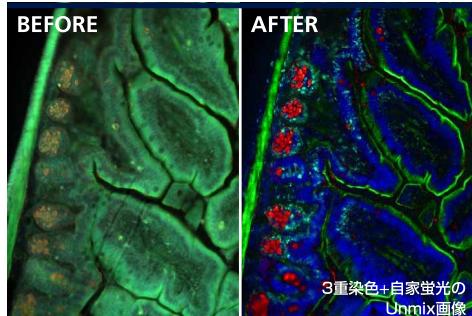
また従来型の偏光顕微鏡のようにマニュアルでの操作が不要です。



アプリケーション▶

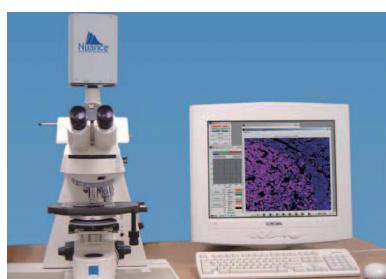
- ・生細胞を無染色で経時的に観察
- ・コラーゲンの分布調査、アクチン等の纖維状細構造の可視化

※システムには顕微鏡は含まれていません。取付顕微鏡につきましてはご相談ください。



重複した色から、
隠れた単一色を探り出し
Unmixが可能なCCDカメラ

**Nuance™ マルチスペクトル
イメージングシステム**



重複した複数の異なる可視シグナルが明瞭に選別できます。

重複した複数の蛍光シグナルが明瞭に分離可能です。

余分なバックグラウンドを除去し隠れたシグナルも見分けられます。

アプリケーション▶

- 蛍光：細胞内蛍光物質の局在観察
免疫蛍光観察
FISH
- 明視野：区別困難な発色剤の色分解
多重染色の色分解

※システムには顕微鏡は含まれていません。取付顕微鏡につきましてはご相談ください。

Semrockはバイオメディカル向け光学パーツのスタンダードです！



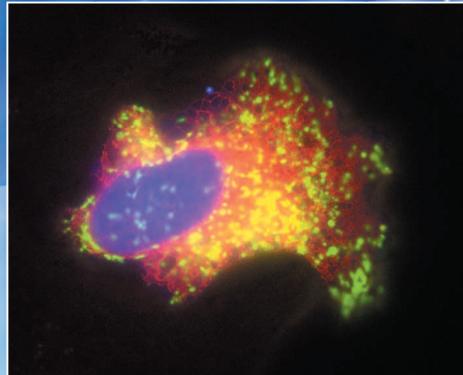
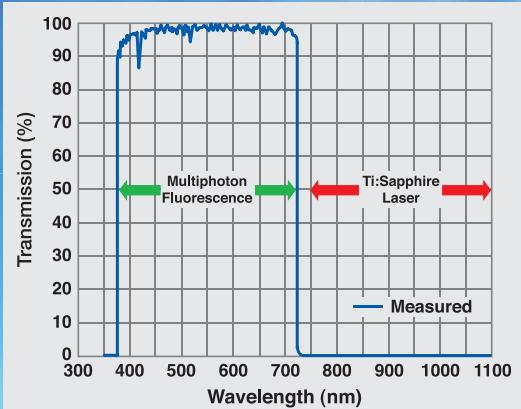
さらなるステージへ

まだSemrock製蛍光フィルターをお使い頂いていない皆様、時代はもうSemrockです。

その高い性能、信頼性、短い納期。

どれを取ってもSemrockは蛍光フィルター業界の“常識”を変えてきました。

そしてこれからも、Semrockは蛍光イメージング用フィルターのリーディングカンパニーであり続けます。



(上) CFP/YFP/HcRed-3X-A (Pinkelセット)を使用して撮影した画像

(ご提供：北海道大学電子科学研究所ナノシステム生理学研究分野・永井健治教授)

◀Multiphotonフィルター(VIS全域用)のスペクトル

また、これまでのフィルターに加え、高品質でありながら低価格を実現したClinicalシリーズが新登場!! 詳細については下記までお問い合わせください。

下記アドレスもしくはFAXにてカタログをご請求下さい。

Semrock社日本総代理店 **OPTO-LINE 株式会社 オプトライン**

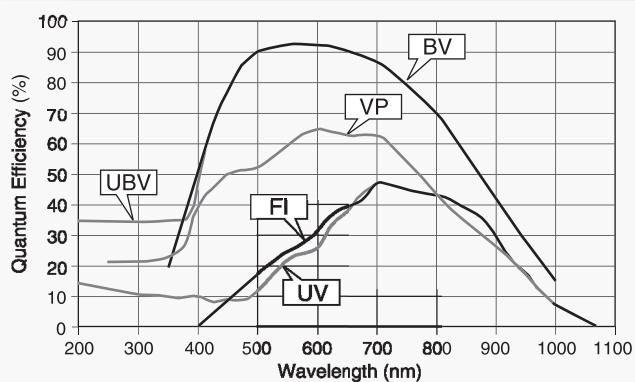
本社 〒170-0013 東京都豊島区東池袋4-6-10 ルナ大住ビル TEL:03-3981-4421 FAX:03-3989-9608

大阪営業所 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-5 新大阪INビル4階 TEL:06-6101-3151 FAX:06-6101-3152

<http://www.opto-line.co.jp> お問い合わせは opl@opto-line.co.jp へ

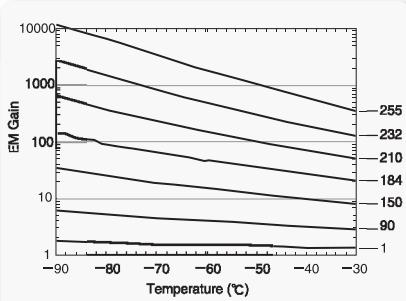
電子増幅デジタルCCDカメラ

Electron Multiplying Technology

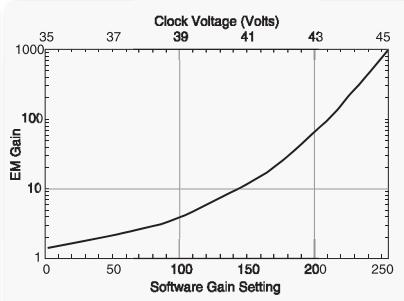


概要

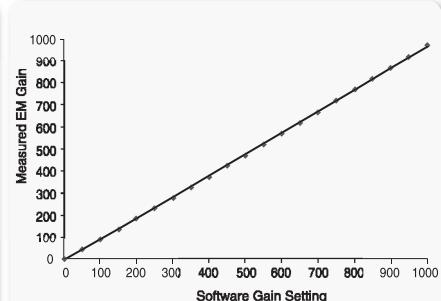
従来、EMCCDチップは冷却温度により電子増幅率が変化するために、定量的な実験は不得意とされてきました。進化したiXon+シリーズデジタルCCDカメラでは、個々にCCDチップの冷却温度による電子増幅率のキャリブレーションを行い、冷却温度-50°Cから-100°Cまでの使用条件下でソフトウェア上の表示ゲイン値と同じ電子増幅が1000倍までリニアで得られ、定量性がアップいたしました。また、高速読出しとスロースキャン型の低ノイズ読出しをソフトウェア上から切り替え可能で、iXon+一台で様々なアプリケーションに対応可能です。



冷却温度によるEMゲインの変化



ノンリニアEMゲイン



リニアEMゲイン



応用例

- 一分子蛍光観察
- ライブセルリアルタイム蛍光観察
- FRET, FRAP
- 細胞内各種イオン濃度分布測定
- ニポウ式共焦点レーザ顕微鏡によるリアルタイム蛍光観察



製品特徴

- シングルフォトン検出可能
- 電子冷却 -100°C
- 暗電流 0.001e-/p/sec
- 電子増幅ゲイン 1000倍
- >35フレーム/秒のデータ読み込み
- 真空封じ切5年保証
- 豊富なチップセレクション(128X128~1024X1024)
- ハイダイナミックレンジ(16&14bit)
- 長時間撮影可能(HDDに直接書き込み)

羊土社の顕微鏡・イメージング関連書籍

免疫染色 & *in situ* ハイブリダイゼーション 最新プロトコール

抗体・プローブの作製から手法の選択、
顕微鏡観察まで実践テクニックが
余さずわかる!

編／野地澄晴

注目のバイオ実験
シリーズ最新刊！

皆が納得するきれいな
データを出そう！

ベテラン研究者が
コツを徹底伝授！

■ B5判 ■ 定価（本体5,100円+税）
■ 200頁 ■ ISBN4-89706-419-8



染色・ バイオイメージング 実験ハンドブック

細胞や組織の形態・遺伝子・
タンパク質を観るために染色法と
顕微鏡観察のすべて

編／高田邦昭, 斎藤尚亮, 川上速人

基本的手法から、
最新のイメージング
技術までを網羅！
オールカラーの写真と
イラストが満載！

■ B5判 ■ 定価（本体6,900円+税）
■ 335頁 ■ ISBN4-7581-0804-8



改訂 顕微鏡の 使い方ノート

初めての観察から高度な顕微鏡
の使い方まで

編／野島 博

だれでも使えるデジタル
カメラ撮影や注目の共焦点
レーザー顕微鏡など、
バイオ分野で欠かせない
顕微鏡の原理と操作から
トラブル解決法まで
やさしく解説！

■ A4判 ■ 定価（本体5,400円+税）
■ 200頁 ■ ISBN4-89706-917-3

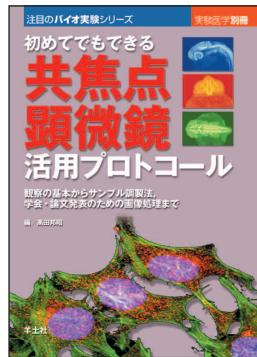


初めてでもできる 共焦点顕微鏡 活用プロトコール

観察の基本から
サンプル調製法、
学会・論文発表の
ための画像処理まで

編／高田邦昭

■ B5判 ■ 定価（本体5,600円+税）
■ 218頁 ■ ISBN4-89706-413-9



発行  羊土社

〒101-0052
東京都千代田区神田小川町2-5-1 神田三和ビル
TEL 03(5282)1211
E-mail: eigyo@yodosha.co.jp

ご注文は最寄りの書店、または小社営業部まで

FAX 03(5282)1212 郵便振替00130-3-38674
URL: <http://www.yodosha.co.jp>