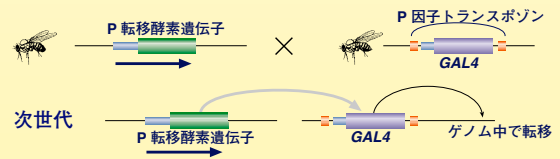


共焦点顕微鏡を使った脳神経回路の三次元画像再構成

- 厚い標本 (100~250 μm)
- 多くの切片 (100~250 枚)
 - 共焦点顕微鏡の使い分け
 - 撮影中の光量減衰
 - 媒質の屈折率による影響
 - 高性能な三次元再構成ソフト

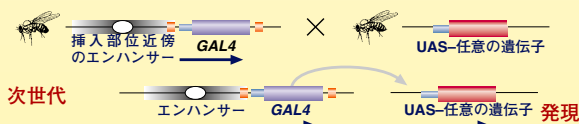
GAL4 エンハンサートラップ法

- ショウジョウバエのゲノム DNA 中で、動く遺伝子 (トランスポゾン) を使って酵母の転写活性化因子 GAL4 の遺伝子をジャンプさせる。
- GAL4 遺伝子は、飛び込んだ場所の近くにある遺伝子転写調節領域の制御を受けて発現する。



GAL4 による遺伝子発現誘導

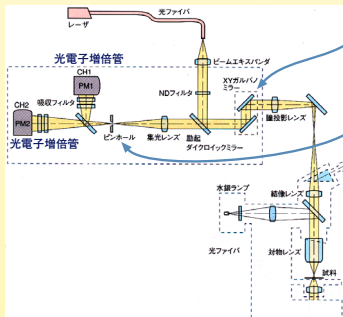
- GAL4 が入った場所によって、系統ごとに違う細胞群で発現が起きる。
- GAL4 因子の標的配列 UAS の後ろにつなげた任意の遺伝子の発現を誘導できる。
- 細胞の形態を可視化 : レポーター遺伝子
細胞の機能を阻害・転換 : エフェクター遺伝子



共焦点顕微鏡の種類

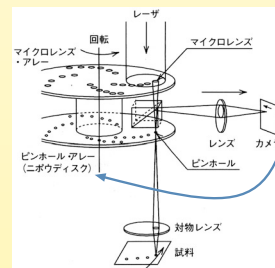
- 1 光子 通常型
バイオラッド、ツァイス、ライカ
ノラン、オリンパス、ニコンなど
- 1 光子 マルチピンホール (回転ディスク) 型
横河電機
- 2 光子 (多光子) 通常型
バイオラッド、ツァイス、ライカ

1 光子 通常型共焦点顕微鏡



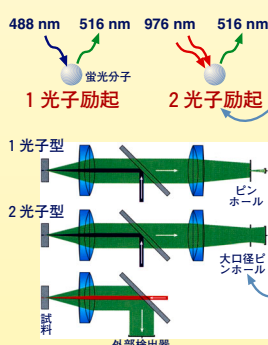
- レーザー光を 2 組の回転鏡 (ガルバノミラー) で試料にスキャン。
- 焦点面からの蛍光は集光レンズで結像し、ピンホールを通過して光電子増倍管へ。
- 焦点面以外からの蛍光はボケるので、ピンホールの周囲で遮られる。

1 光子 マルチピンホール (回転ディスク) 型



- 1 つのピンホールと回転鏡の組み合わせのかわりに、無数のピンホールを開けた板を高速回転させて試料をスキャン。
- 1 スキャンが 1/360 秒で終了するので、肉眼やビデオカメラ、冷却 CCD カメラでリアルタイムに観察可能。
- 隣接ピンホールからの光の漏れやピンホール直径の大きさの関係で、画質は劣る。

2 光子型共焦点顕微鏡



- 2 つの光子が同時に蛍光分子に当たると、エネルギーの合計に対応する蛍光が出る。
 - 倍の波長の赤外光で励起。
 - 励起光の減衰や生体細胞へのダメージが少ない。
- 光子密度を上げるためパルスレーザーを使用。
- 焦点面以外では 2 光子励起は殆ど起きないので、ピンホールは大口徑もしくは不要。
 - 検出効率高い。

共焦点顕微鏡の使い分け

- 1 光子 通常型
 - ・安定した性能、150 μm 厚標本までは OK
- 1 光子 マルチピンホール (回転ディスク) 型
 - ・簡便な設置・観察、肉眼やビデオのリアルタイム観察
 - ・画質劣る (三次元再構成には不適)、褪色速い
- 多光子型
 - ・赤外線：励起光透過率高い、生体細胞への損傷少ない
 - ・波長可変：広範な蛍光試薬に対応
 - ・高価、レーザーの管理・性能維持が大変、開発途上 (1 光子を 2 台買うか? 2 光子を 1 台買うか?)

倒立か正立か？

● 倒立型

- ・培養細胞には圧倒的に便利
- ・ステージの回転による位置あわせが不可能
(前後、上下、左右の向きを揃えたい標本は不便)
- ・油浸、水浸レンズが使いにくい (垂れて汚れる)
- ・スライドガラスは裏返して設置 → 非常に使いにくい

● 正立型

- ・培養細胞を扱わない場合には、圧倒的に便利

選択基準 培養細胞を扱うかどうか？

共焦点 我々の使い分け

● 一次スクリーニング

- ・数千の系統から、脳の一部の細胞のみで特異的な発現パターンが見られる系統を探す。
- ・標本は未固定、未包埋、PBS 中。
(解剖準備から全撮影終了まで1時間以内。)
- ・1光子マルチピンホール型共焦点 (正立)。冷却 CCD カメラで前後上下の4方向から撮影、データベース化。

● 二次スクリーニング

- ・絞り込んだ系統について、細かい回路構造を調べる。
- ・標本は固定、グリセロール透徹・包埋。
- ・1光子通常型共焦点 (正立)。連続断層撮影。

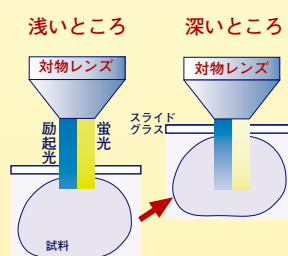
厚い標本の連続断層撮影

● 撮影中の光量減衰への対策

● 媒質の屈折率による深さ方向の座標補正

● 高精度の三次元再構成ソフトの利用

撮影中の光量減衰



- 試料の奥の方では、励起光も蛍光も散乱を受けて減衰する。
- 連続断層撮影を重ねると、褪色により後の切片ほど蛍光が弱くなる。
- シグナルを一定に保つには、
→ 励起光を徐々に強くする。
→ 検出器感度を徐々に上げる。

撮影中の光量減衰補正法

● 励起光を徐々に強くする

- ・レーザー電流の調節
→ 頻繁に変えると不安定になるので、できれば一定値に保つ
- ・AOTF による光量調節
初め数% → 最終的に 100%

● 検出器感度を徐々に上げる

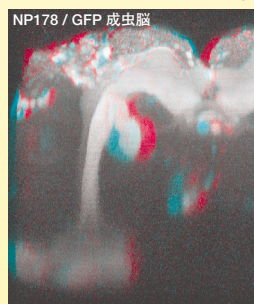
- ・光電子増倍管の電圧を徐々に上げる (600V → 950V)。
- ・そうするとノイズが増えるのでオフセットを下げる。
- ・場合によってはゲインやスキャン速度も調整。

● 検出器はノイズ量に影響するので、なるべく励起光で調節。

● 標本の中程～2/3 の深さで感度や光量を最適に調節し、そこからAOTFを絞って手前から撮影。

● 適正な露出量は標本中のシグナルの分布で微妙に決まるので、自動調節は不可能。(人間の目で判断。)

光量減衰補正の効果

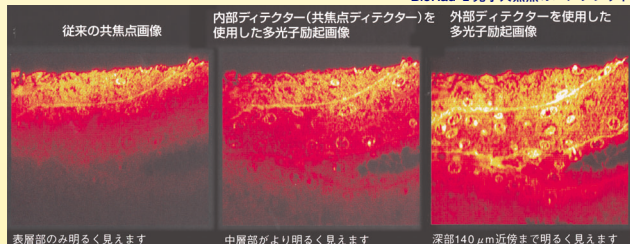


減衰補正なし

減衰補正あり

2光子は本当に必要か？

BioRad 2光子共焦点のパンフレット



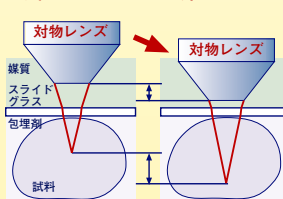
光量減衰補正をしていない・・・

光量減衰補正をすれば、150μm 程度までは1光子でも対応可能。

2光子を使う場合も、減衰補正をすればさらに画質が向上。

屈折率による深さ方向の座標補正

浅いところ 深いところ



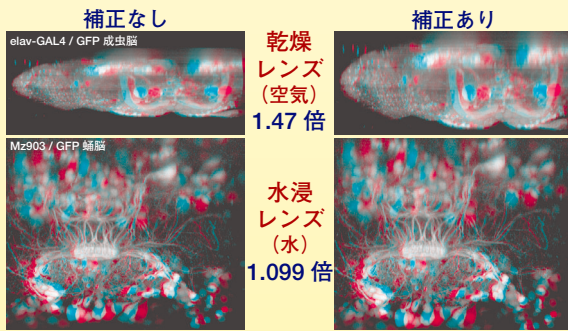
- 媒質と包埋剤の屈折率の違いにより、ステージや対物レンズの移動量と焦点面の移動量は、同じではない！

レンズが1μm 移動したときの焦点面の移動量は (グリセロール包埋)

乾燥レンズ (空気)	: 1.47 μm
水浸レンズ	: 1.099 μm
油浸レンズ	: 0.97 μm

光の入射角が小さいとき: 焦点面移動量 / 標本移動量 = 包埋剤の屈折率 / 媒質の屈折率
屈折率: 空気 1.0 水 1.338 グリセロール 1.47 ガラス 1.525 油浸オイル 1.515

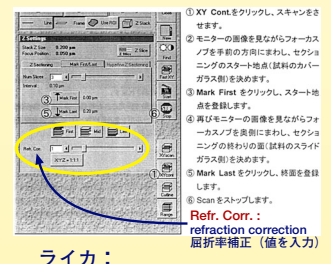
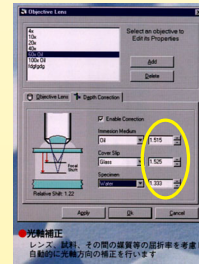
屈折率補正の効果



屈折率補正の設定法

BioRad LaserSharp2000

Zeiss LSM 510



以前のバージョン (OS2) では補正不能

ライカ:
現バージョンは補正機能なし

共焦点を用いた三次元再構成

- 連続断層撮影→データを合成して立体像作成
北欧で開発、モレキュラーダイナミクス社で製品化
Sarastro 2000 / MultiProbe 2001 共焦点顕微鏡
ImageSpace 三次元再構成ソフト
- モレキュラーダイナミクス社が基本特許取得
→製品開発中止、他社からの特許料で収益
- アマシャム・ファルマシア社に吸収

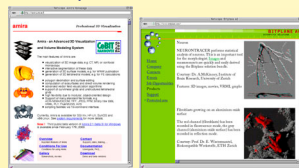


三次元再構成の方法

- 顕微鏡付属のソフトを利用
 - ・ 簡便。
 - ・ 機能が限られる。
- 専用ソフトを利用
 - ・ ノイズ除去、コントラスト増加などの画像処理。
 - ・ 任意の方向からの立体像構築。
 - ・ 各社の共焦点のデータを共通に処理。
 - ・ 屈折率による厚み補正、遠近感や透明度を考慮した再構成アルゴリズム。
 - ・ Unix ワークステーションの用意、データファイルの転送など、設定が煩雑。高価。

三次元再構成用のソフト

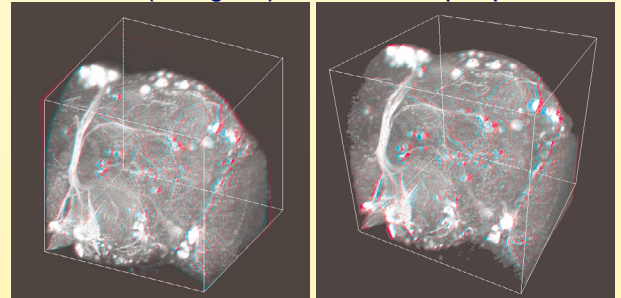
- 汎用ソフト (AVS, Voxel View など)
 - ・ プログラムを組んで非常に高度な処理が可能。
 - ・ 標準では共焦点のデータ読み込みなどの設定がない。
→ 相当の知識がないと、全然使えない。
- 専用ソフト
 - ・ Imaris (BitPlane 社, ツアズ扱い)
<http://www.bitplane.com/>
シリコングラフィクス,
WindowsNT
 - ・ Amira (Amira 社)
<http://amira.zib.de/>
シリコングラフィクス,
Linux, Windows



投影法の設定

正則投影 (orthogonal)

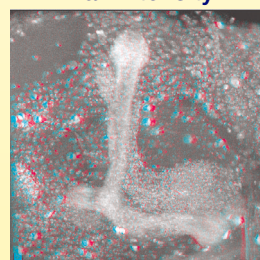
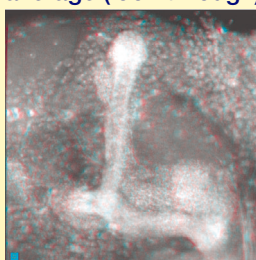
遠近法 (perspective)



簡単な三次元再構成

average (look through)

max intensity

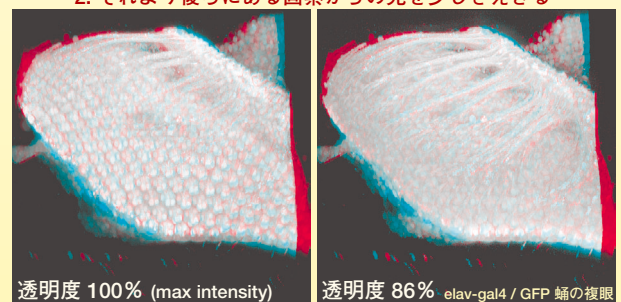


各画素の明るさを全
切片で串刺し平均

各画素ごとに全切片
の中で一番明るい値

レイ・トレーシングによる再構成

各画素は明るさに応じて 1: 光を出す と同時に、
2: それより後ろにある画素からの光を少しさえぎる

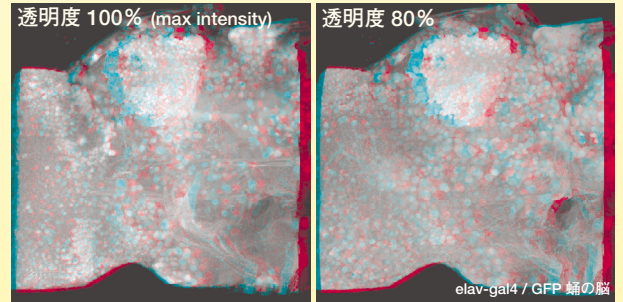


画像を解釈するときの注意点

- 三次元再構成の結果「消えて」しまう細胞
- 撮影時の露出調節で「消えて」しまう細胞
- 整然とした構造に目を奪われる人間の心理
- 「発現の強弱」の正確な解釈

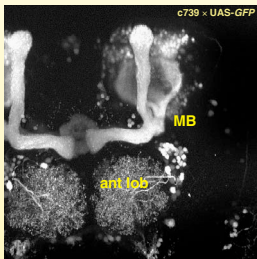
max intensity による再構成の問題点

手前にあるシグナルの弱い細胞は、奥にシグナルの強い細胞があると、消されてあたかも存在しないように見える。

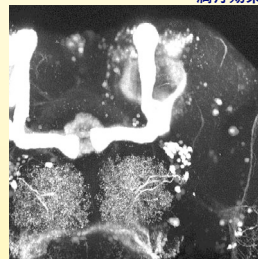


強いシグナルは周囲の弱いシグナルを隠す

満月効果

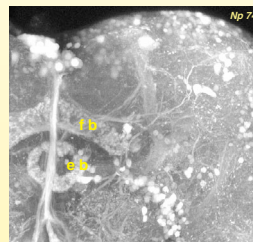


強いシグナルに露出をあわせると・・・
非常に特異的な染色に見えるが、



弱いシグナルに露出をあわせると・・・
実は多数の細胞が染まっている

整然とした構造は、雑然とした構造より、人の注意を惹きつける

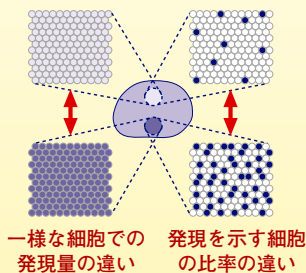


fb, eb 特異的?



MB 特異的?

発現が強い、弱いとは？



「○○の領域で強い発現が見られる」 強い弱い
「○○の領域では発現を示す細胞の比率が大きい」 多い少ない
同じ意味だと思っている研究者が相当に多い・・・
5倍や10倍でなく40倍や100倍の対物レンズで細胞レベルで発現を確認

バリアフリーの二重染色

幹細胞クローン：GFP、anti FasII 抗体：テキサスレッド



- フィルムの蛍光写真と異なり共焦点では、蛍光色素の色と画像の色が一致する必要は全くない。
 - 白人男性の1割は赤緑色盲。(赤緑以外の色盲や女性の赤緑色盲は、非常にまれ。)
- 赤と緑の組み合わせは避ける
- 1000人読者がいれば、男女同数としても50人には画像が理解できない! (レフェリーも色盲かも。。。)