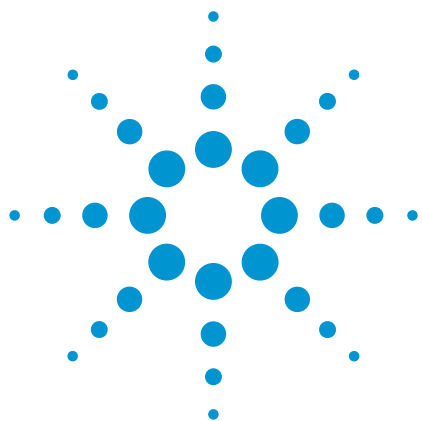




高倍率光学系を搭載した 高空間分解能 FTIR 顕微イメージングによる 生体組織サンプル測定

アプリケーションノート

生物学

著者

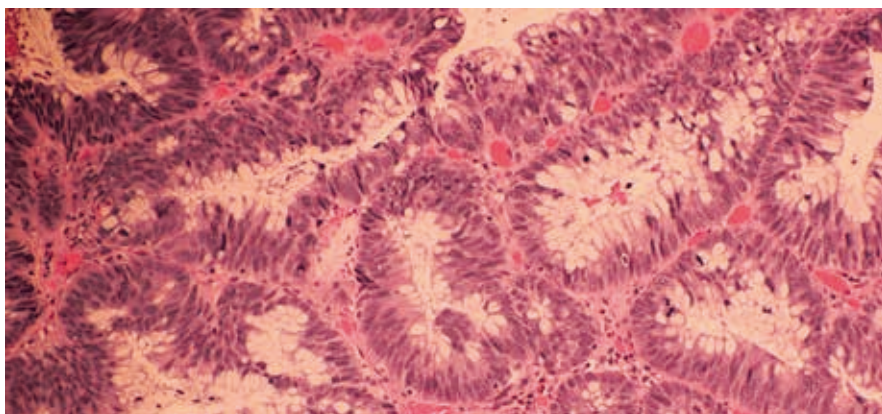
Mustafa Kansiz¹, Carol Hirschmugl², Benedict Albensi³, Catherine Liao⁴, Kathleen Gough⁴

¹ Agilent Technologies Australia Pty Ltd,
Mulgrave, Australia

² Department of Physics, University of
Wisconsin, Milwaukee, USA

³ Division of Neurodegenerative Disorders, St.
Boniface Hospital Research Centre, Winnipeg,
Canada

⁴ Department of Chemistry, University of
Manitoba, Winnipeg, Canada



はじめに

フーリエ変換赤外 (FTIR) 顕微イメージングは、ミクロンレベルの領域でスペクトル情報と空間情報を同時に測定できる分析メソッドとして確立されています。この分析メソッドは、ポリマー科学から生物学イメージングまで、多様な分野に幅広く応用されています。近年、FTIR 顕微イメージングシステムの回折限界空間分解能の向上に関心が高まっていますが、その手段として主にシンクロトロンベースのシステムが用いられています。

このアプリケーションノートでは、既存の対物レンズによる新たな高倍率光学系について取り上げます。新たな手法により、ほぼ 1 μm /ピクセルの高空間分解能イメージング機能を備えた FTIR システムが実現します。このシステムは、対物レンズを変更しなくても倍率設定を行えるため、標準的な対物レンズの比較的長い作動距離 (約 21 mm) をそのまま維持できるという特徴を備えています。



Agilent Technologies

新たなメソッドの性能を評価および比較するために、標準倍率の FTIR、高倍率の FTIR、およびマルチビームシンクロトロンベースの FTIR で生体サンプル (未固定のマウス脳凍結切片) の FTIR イメージを測定しました [1]。

実験方法

使用機器

標準倍率および高倍率条件でのデータ測定には、Agilent Cary 670 FTIR 分光光度計と、高エネルギーグローバ光源を装着した Cary 620 FTIR 顕微鏡を組み合わせたシステムを使用しました。また、比較のため、他社 FTIR 顕微イメージングシステムとマルチビームシンクロトロン (IRENI) 光源を組み合わせてデータを収集しました [1]。

各手法の測定条件を表 1 に示します。

表 1. 機器の測定条件

パラメータ	熱源ラボ標準倍率	IRENI: マルチビームシンクロトロン放射光源 [1]	熱源ラボ高倍率	
FTIR 分光光度計	Agilent Cary 670	他社分光光度計	Agilent Cary 670	
FTIR 顕微鏡	Agilent Cary 620	他社顕微鏡	Agilent Cary 620 (64 x 64)	Agilent Cary 620 (128 x 128)
MCT FPA 検出器 (ピクセル)	64 x 64	64 x 64	64 x 64	128 x 128
対物レンズ	15 倍、0.5 NA、 作動距離 24 mm	74 倍、0.65 NA、 作動距離 1 mm	15 倍、0.62 NA、 作動距離 21 mm 顕微鏡に搭載されている 5 倍の自動倍率拡張機能を使用	15 倍、0.62 NA、 作業距離 21 mm 顕微鏡に搭載されている 5 倍の自動倍率拡張機能を使用
ピクセルサイズ (μm/ピクセル)	5.5	0.54	1.1	1.1
シングルタイル視野 (μm)	350 x 350	35 x 35	70 x 70	140 x 140
光源	標準、高エネルギー、 グローバ中赤外光源	12 ビームシンクロトロン放射光源 [1]	標準、高エネルギー、 グローバ中赤外光源	標準、高エネルギー、 グローバ中赤外光源
スキャン回数	128	256	256	256
スペクトル分解能 (cm ⁻¹)	4	4	4	4
タイル数 (面積)	1 (350 x 350 μm)	4 x 3 (138 x 104 μm)	3 x 3 モザイク (210 x 210 μm)	シングルタイル (140 x 140 μm)
合計時間 (分)	2	72	40	6
タイルあたりの時間 (分)	2	6	4	6

生体サンプル

生後 10 か月のトリプルトランスジェニック (3xTg) マウスの脳から採取した厚さ 7 μm の凍結切片をフッ化バリウム (BaF₂) 窓板に載せました。3xTg マウスは、アルツハイマー病の特徴である、脳内へのアミロイド斑の形成を誘発する特定の遺伝子変異を保有しています (表 2)。実験動物の処置に関するプロトコルは、Canadian Council for Animal Care が作成したガイドラインに準拠しました。このガイドラインは、マニトバ大学およびトロント大学の Management Review 委員会に承認されています。

表 2. 3xTg マウスモデルが保有する変異

APP のスウェーデン変異 (K670N/M671L)
プレセニリン変異 PS1 (M146V)
ヒト 4 リピータウ変異 P130

結果と考察

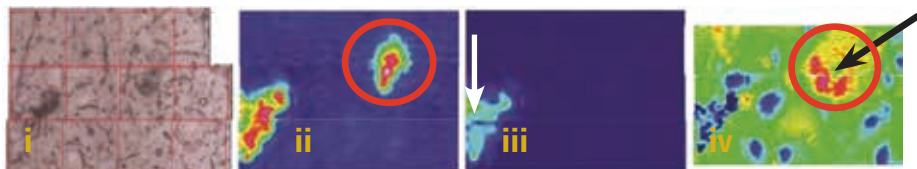
図 1 の A ～ C の写真およびイメージには、3xTG AD マウス脳の重要な成分の存在が明確に示されています。これらのイメージはそれぞれ、標準倍率構成のアジレント顕微鏡、シンクロトロン (IRENI)、および高倍率構成のアジレント顕微鏡で測定したものです。

この結果から、アジレントの新たな高分解能手法では、空間分解能が格段に高まっていることが分かります。実際、標準倍率構成のアジレント顕微鏡では $5.5\ \mu\text{m}$ のピクセル分解能が、高倍率構成では $1.1\ \mu\text{m}$ に向上しています。また、新たな改良により、広視野照明と、スペクトル全体にまたがる回折限界以上の幾何学的ピクセル分解能を持つマルチビームシンクロトロン光源を用いた IRENI を超えないまでも、それと同等の結果が得られています。

A アジレント標準倍率



B シンクロトロン光源 (IRENI)



C アジレント高倍率

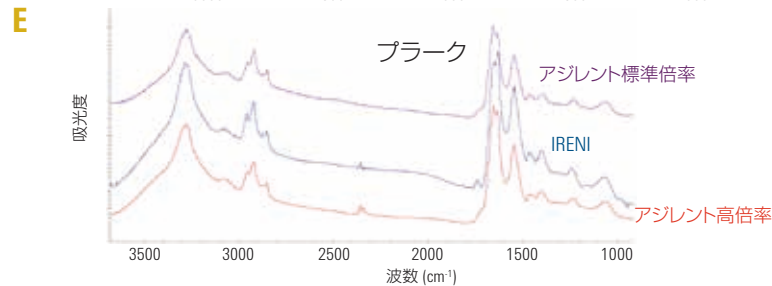
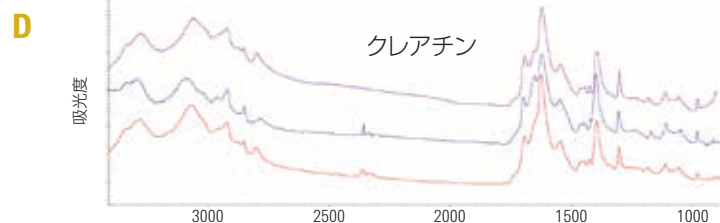
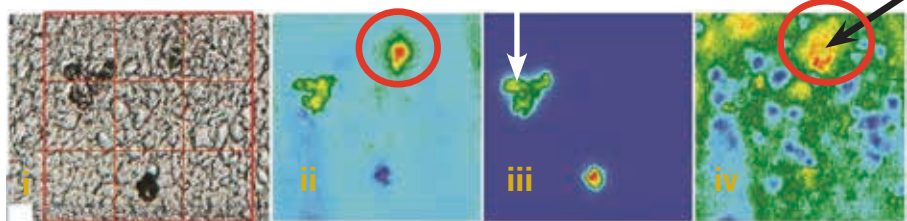


図 1. 図 1. 3 種の機器それぞれで優れたスペクトルが得られています。A、B、および C: (i) 3xTg マウス海馬の可視イメージとケミカルイメージ、ii) ブラークおよびクレアチン ($1630\ \text{cm}^{-1}$)、iii) クレアチンのみ ($1305\ \text{cm}^{-1}$)、iv) 脂質 ($2850\ \text{cm}^{-1}$)。黒および白の矢印は、それぞれ老人斑およびクレアチン蓄積物を示します。D および E: 各機器で得られた (D) クレアチン結晶性蓄積物および (E) ブラークコアのスペクトル (文字とスペクトルを色分けして表示)。太線の赤丸は、このサンプル中のブラークのための位置を示します。詳細については、次のページをご覧ください。注: 両サンプルの測定には、およそ 12 か月の時間差があります。スペクトルは類似しており、S/N 比とスペクトル分解能は非常に良好ですが、微妙な違いがあります。これらの違いは、この 12 か月間に生じたサンプルの酸化によって生じたものです。

ミクロンサイズのサンプルを扱う場合、(ピクセル間のブラーリングを抑えることにより) 空間的およびスペクトルの精細度を高めることが非常に重要になります。これは、標準倍率構成の顕微鏡では解像できない情報が明らかになるからです。

ピクセル分解能が $5.5\ \mu\text{m}$ の場合、サンプリングしたピクセル域にあるすべての化学成分の合計がスペクトルとして測定されます。一方、高倍率モードでは、 $1.1\ \mu\text{m}$ までのピクセル分解能で測定できます。これは、ソフトウェアで制御される新たな自動「高倍率メカニズム」により、有効倍率が高まるからです。また、対物レンズの変更が不要で、対物レンズの $21\ \text{mm}$ という作動距離を完全に維持できることも優れた分解能に大きく貢献します。

図 2 に示す例では、より大きいピクセル分解能では捕捉されない含有物 (矢印部分) が、物理的に小さく、より凝集性の高い物体としてイメージ内に明るく映し出されています。また、空間分解能が高まるだけでなく、より「純粋」な FTIR スペクトルが得られることも重要です。すなわち、高倍率モードでは、標準倍率モードであれば平均化されてしまう脂質含有物の CH 伸縮バンドが強く現れます。スペクトルの比較を図 2 に示します。

図 3 は、凝集ブランクコア (A) と、それを包囲し、侵透している脂質様成分 (B) のイメージです [2]。この図から、高倍率機器により、この波長域において IRENI (図 1 B iv を参照) で期待されるものと同等の精細度が得られていることが分かります。

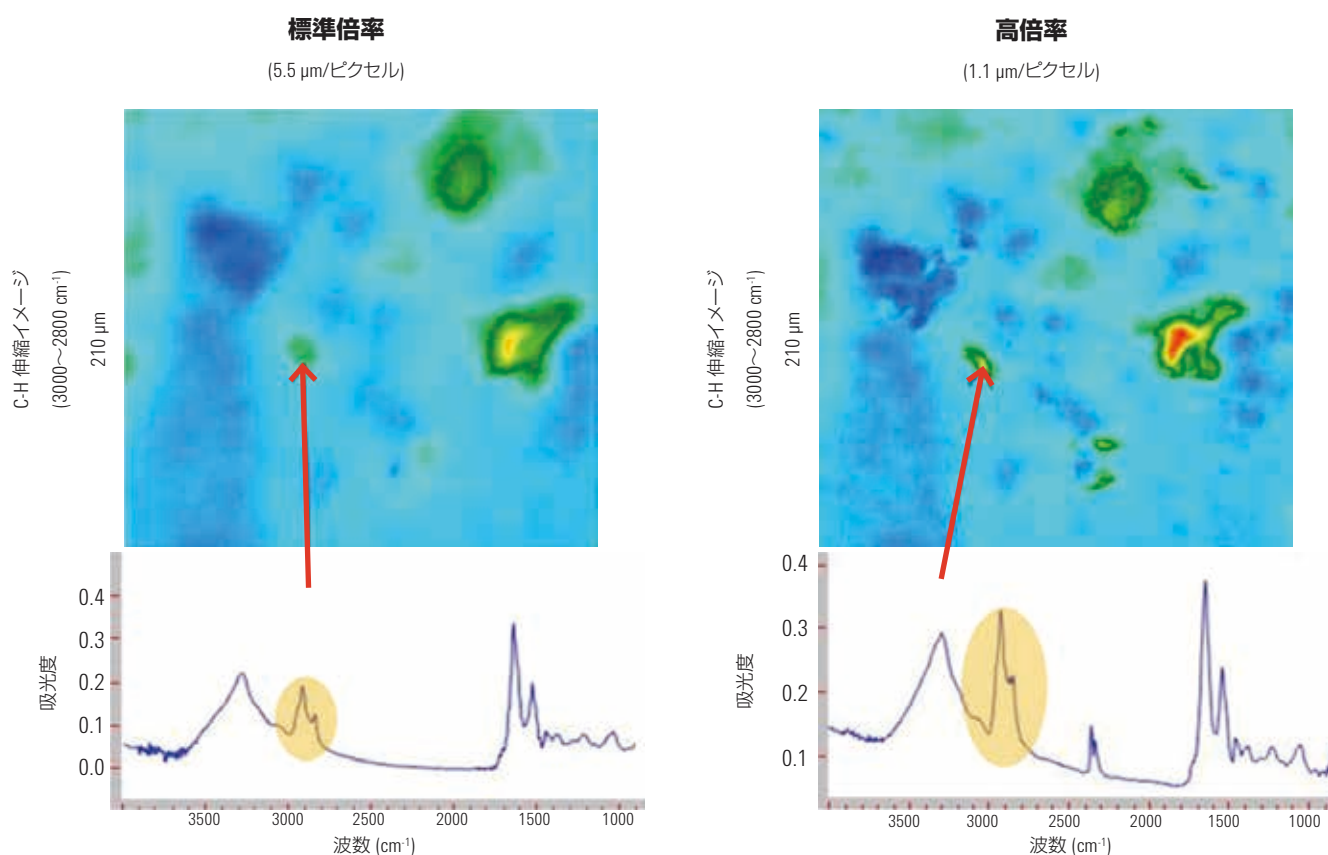


図 2. アジレント顕微鏡の標準倍率モードと高倍率モードの比較。CH 伸縮バンドの結合により生成された擬似カラーイメージ。左側のイメージは、標準倍率の低分解能シングルタイルから、高倍率イメージと同じ部分を切り取って拡大したものです。各イメージの同じ箇所 (赤の矢印) で得られたスペクトル: スペクトル内の黄色で示した領域は CH 伸縮を示します。

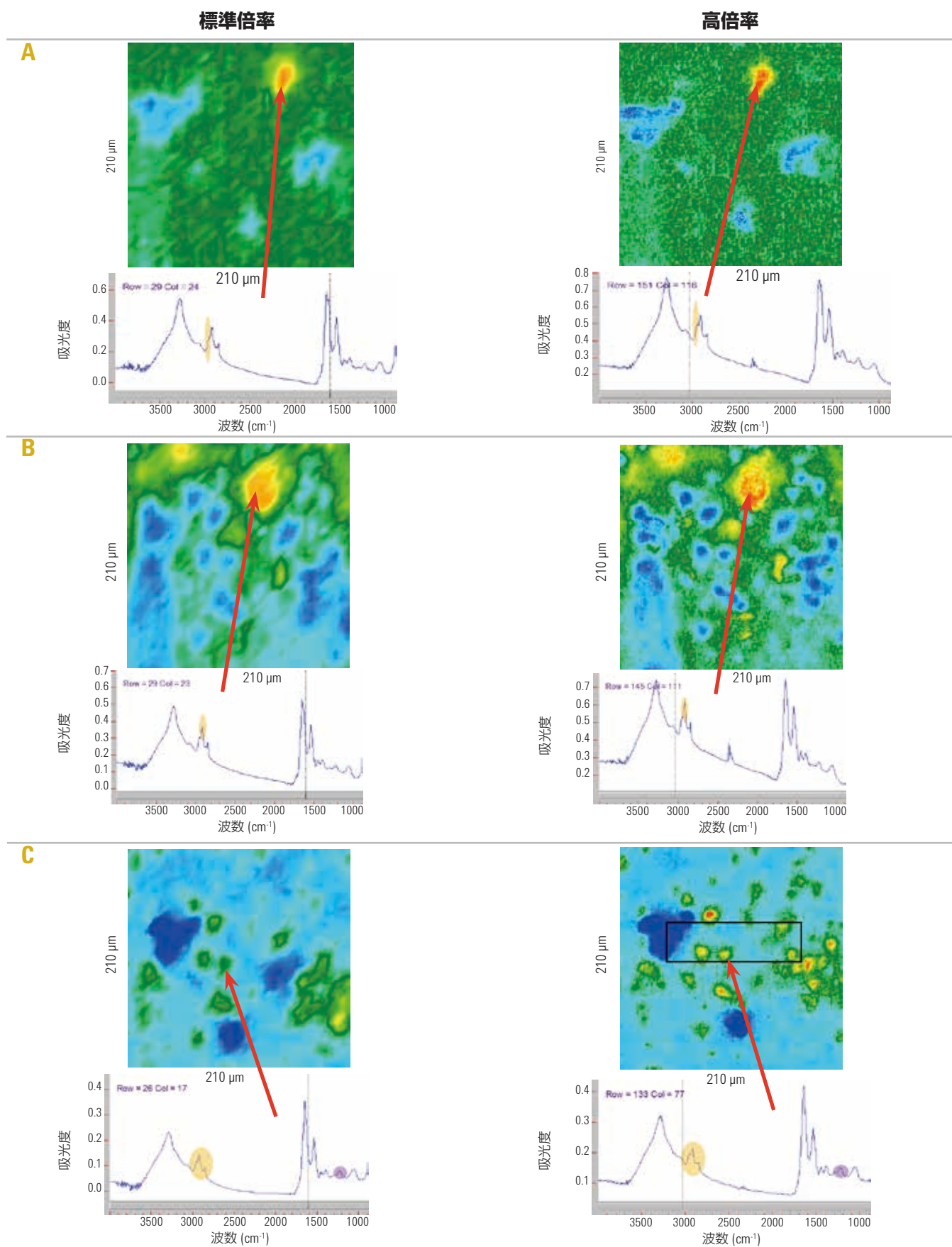


図 3. アジレントの顕微イメージングシステムにおける標準倍率モードと高倍率モードの比較。図 2 に示した擬似カラーイメージの A) ブラークコアバンド、B) 非対称 CH_2 バンド、C) リン酸バンド (スペクトル内の紫色の部分) と対称 CH_2 バンドの比率。注: 高倍率イメージ「C」に示された黒枠は、図 4B に示した切り取られた領域を表します。

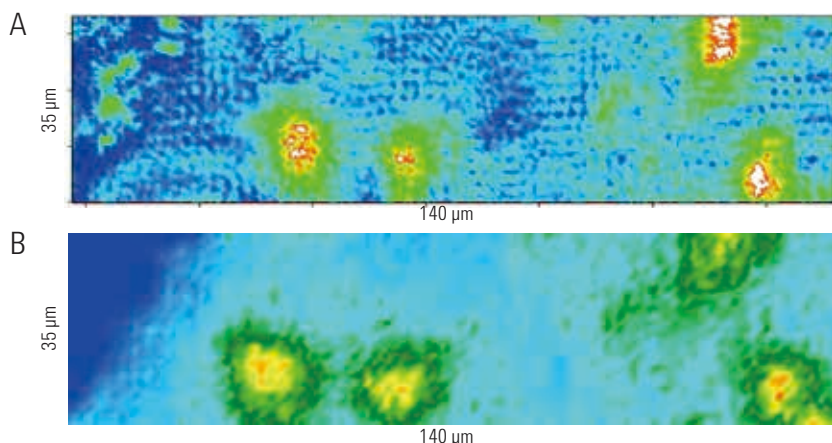


図 4. A) 低波数で生じるアーチファクトを示すため、IRENI データ (図 1B iv) の下 1 x 4 行のタイルに適用した低波数イメージング (図 3C の処理により)。B) 比較のため、アジレントの高倍率グローバル光源 FTIR イメージングから切り取られた同じ領域。IRENI のようなアーチファクトは現れていません。

現在の IRENI システムでは、比較的長い波長帯に依存するイメージにアーチファクトが生じることがあります。これは、ビームによるベースラインの変動が原因と考えられます (図 4)。一方、アジレントの FTIR 顕微イメージングシステムに搭載されている高エネルギーグローバル光源では、このような変動が生じません。このことは、図 3C のイメージに斑点のような干渉模様 (スペックルパターン) が見られないことから明かです。

結論

以上の結果から、高倍率モード (1.1 μm) では、スペクトルおよび空間的な精細度が標準倍率 (5.5 μm) より格段に高まることが実証されました。特に豊富な情報が得られる 1800 cm⁻¹ 未満の指紋領域において、対象物の観察をシンクロトンベースの高倍率システムと同等、またはそれ以上の精細度で行えることが分かりました。

また、イメージの取り込み時間は、理想的な標準測定方法とされるマルチビームシンクロトン機器の約 1/10 です。これは、視野が極めて広く、フルサイズ (128 x 128) の焦点面アレイ (FPA) を利用できるためです。

さらに、同じ対物レンズで標準倍率 (5.5 μm) モードと高倍率 (1.1 μm) モードでの測定が可能のため、21 mm という対物レンズの作動距離がそのまま維持されます。これは、顕微鏡の対物レンズの下にセットして測定できるサンプルの形状、サイズ、および形態が制限されないということです。

参考文献

1. Nasse et al. *Nature Methods*, Vol.8 No.5 pp. 413-418 2011
2. Liao, Rak et al. *NeuroImage*, 138: 3991-97, 2012

謝辞

IRENI に関する技術的支援をいただいた Julia Sedlmair 博士に感謝いたします。この研究は、NSERC Canada (KMG) の支援のもと実施されました。Benedict Albensi 博士は、Honourable Douglas Everett, Patricia Everett and the Royal Canadian Properties Endowment Fund の理事長を務めています。この研究は、NSF による助成金 #0619759 の支援のもと構築および開発された IRENI ビームラインで実施された調査にもとづいています。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2014.

Published October 23, 2014
5991-5228JAJP



Agilent Technologies