

共焦点スキャナ CSU を用いた高速 3 次元アプリケーション事例

Unique Applications of Fast 3D Image Acquisition by the CSU System

砂川 恵輝^{*1} 太田 亜紀^{*2}

SUNAGAWA Keiki OOTA Aki

山宮 広之^{*3} 古澤 尚孝^{*2}

SANGUU Hiroyuki FURUSAWA Naotaka

横河電機の共焦点スキャナユニット CSU は、世界最高速の共焦点スキャナである。本稿では、CSU の高速性を活かしたアプリケーション事例として、工業用途からはマイクロPIV の事例を、バイオ用途からは共焦点顕微鏡システム「CSU LiveStage™ LS-2」(以下 LS-2) を用いた事例を紹介する。マイクロPIV は微細流路等の微小領域の流速を測定する技術であり、CSU による世界最高速の共焦点スキャンによって初めて実現が可能になったものである。共焦点の原理によって、微小スライスのみの流速を正確に計測できるため、計測の精度を格段に向上できることが特長である。本稿では、微細流路の流れや液滴内部の流れの計測事例を紹介する。LS-2 は、生細胞の観察(ライブセルイメージング)に適した性能を持ち、先進の多点・多チャンネル 3D タイムラプス画像取得の機能を簡単に操作できる、完全に統合された顕微鏡システムである。本稿では、システムの特徴とそれを実現するための各部の構成を説明し、3D 画像の例を紹介する。

Yokogawa CSU confocal scanner unit is the world's fastest confocal scanner. This paper describes two unique applications taking advantage of the very fast 3D image acquisition by the CSU: high-speed confocal micro PIV for industrial use and "CSU LiveStage™ LS-2" (LS-2) confocal fluorescent microscope system for bio-technology use. The measurement of micro slices is possible based on the confocal scanner principle, and this drastically improves measurement accuracy. Micro PIV is a technology for measuring and analyzing rapid fluid flow in micro region, such as micro channel, and the world's fastest confocal scanning with the CSU enables accurate 3D measurement and analysis of fluid flow. In this paper, we introduce some measurement examples of micro fluid flow and complex circulating flow inside a droplet. LS-2 is a fully integrated microscopy system with performance most suitable for live cell imaging, with the most advanced multi-point, multi-channel 3D time-lapse image acquisition capabilities by simple operation. The major features and system configurations to enable such performance are described with examples of 3D images.

1. はじめに

CSU は、自社の独自技術であるマイクロレンズ付き二ポウディスクを用いたマルチビーム方式の共焦点スキャナであり、世界最高の画像形成速度を誇っている。また、マルチビーム方式のために蛍光退色が少ないという利点がある。ここでは、CSU の優れた特長を活かしたアプリケーションについて、工業用途とバイオ用途の二つの側面から応用事例を紹介する。工業用途としては、マイクロ

PIV (Particle Image Velocimetry) という、微細流路等の微小領域の流速を測定する技術を紹介する。また、バイオ用途としては、共焦点顕微鏡システム LS-2 を用いた細胞観察事例を紹介する。

2. マイクロPIV

2.1 PIV とは

PIV とは、Particle Image Velocimetry を略したもので、微粒子の画像を利用した流速測定技術を意味している。一般的な PIV は、トレーザ粒子を混入した流場をシート状にしたレーザ光で可視化を行い、シート面内の粒子の散乱光を CCD カメラなどで撮影することによって得られた粒子画像の解析を行って、速度分布を求めている。

*1 ライフサイエンス事業部 創薬・バイオセンター開発Gr.

*2 ライフサイエンス事業部 創薬・バイオセンター営業Gr.

*3 ライフサイエンス事業部 創薬・バイオセンターマーケティングGr.

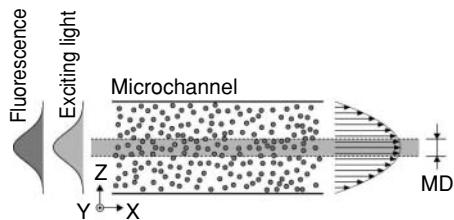


図1 従来のマイクロPIVでの計測深度
MD: 計測深さ

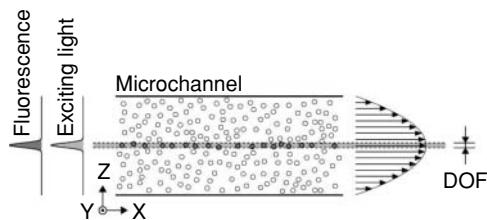


図2 共焦点マイクロPIVの被写界深度
DOF: 被写界深度

近年、分析装置の微細化などに伴い、微細な流路を利用する分野が増えてきている。これに伴い、微細流路の流れの解析を行いたいというニーズが高まっており、光学顕微鏡を用いて視野を拡大し、空間解像度をマイクロ領域に拡大したマイクロPIVが提案されている。

しかしながら、これらのマイクロ領域は前述のようなシート光の厚みよりも小さいために、シート光による断面の設定ができない、光学顕微鏡の焦点深度内の粒子全てを計測してしまうという問題点があった。

2.2 共焦点マイクロPIVの原理

共焦点スキャナを用いたマイクロPIVは、正にこの問題点を解消するために開発されたものであり、計測したい断

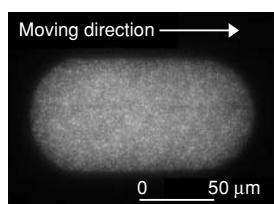


図3 従来のマイクロPIVでの観察画像

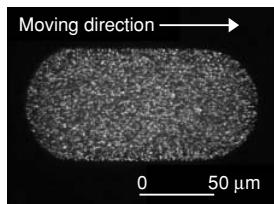


図4 共焦点マイクロPIVでの観察画像

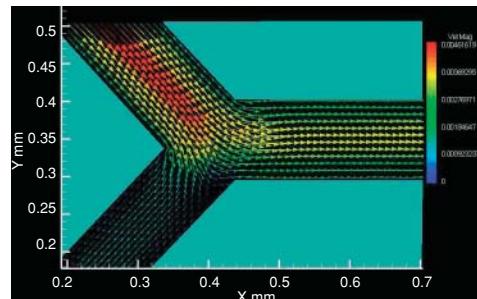


図5 Y字形流路における流速分布
(カラーバーは流速を示す)

面の流速を、正確に計測できるようにしたものである。

図1のように、従来のマイクロPIVでは顕微鏡下の微細流路を流れる蛍光粒子の画像から流速計測を行うが、図2のように共焦点顕微鏡の技術を導入することによって、微小スライス部分の流速を正確に計測できるため、計測の精度を格段に向上できるようになっている⁽¹⁾⁽²⁾。

共焦点マイクロPIVの効果は、図3、図4で顕著に示されているように、従来のマイクロPIVでは焦点面前後の粒子からの散乱光で各粒子がぼやけているが、共焦点マイクロPIVでは個々の粒子を明確に認識することができる⁽¹⁾⁽²⁾。

また、共焦点マイクロPIVでは、連続した2枚の画像から粒子の移動速度を求めるため、高いフレームレートであることが特に重要である。これは、フレームレートが高い程、流速を正確に計測できる上に、速い流速にも対応できるようになるからである。この点において、CSUシリーズの高フレームレートという特長と本アプリケーションはマッチしており、特に1秒間に2000枚の画像取得が可能なCSU-X1によって更にその性能を向上させている。

2.3 共焦点マイクロPIVの計測事例

(1) Y字形流路における流速測定

幅100 μmのY字型の流路における計測の事例を示

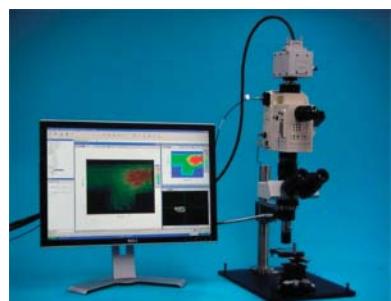


図6 共焦点マイクロPIVの構成例

(写真ご提供: 西華産業株式会社)

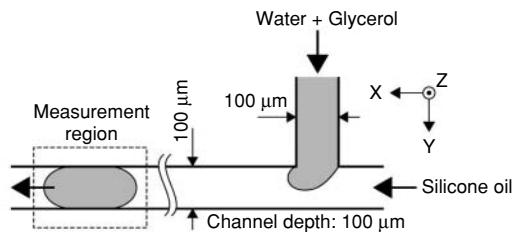


図7 液滴の発生方法

す。図5は、左上の流路から流体を流した際の計測事例であるが、分岐前の流路の中央付近の流速が高くなっていることが分かる。また、分岐後の流速も、流路の分岐の向きによって違いが生じていることが計測されている。図6に、共焦点マイクロPIVの構成例を示す。

(2) 液滴内部の流れの計測

本事例は、液滴の内部の流れがどのようにになっているかを実際に計測した事例で、図7のように、シリコンオイルの流れの中に蒸留水ーグリセリンの混合液を加えることによって発生させた液滴を計測している⁽¹⁾⁽²⁾。図8のように、液滴内部には複雑な循環流が発生し、壁面近くの断面と中央付近の断面では、その回転方向も異なっている様子が示されている。したがって、マイクロチャネル内を移動する液滴の内部では、複雑で三次元的な流動になっていることが分かる。

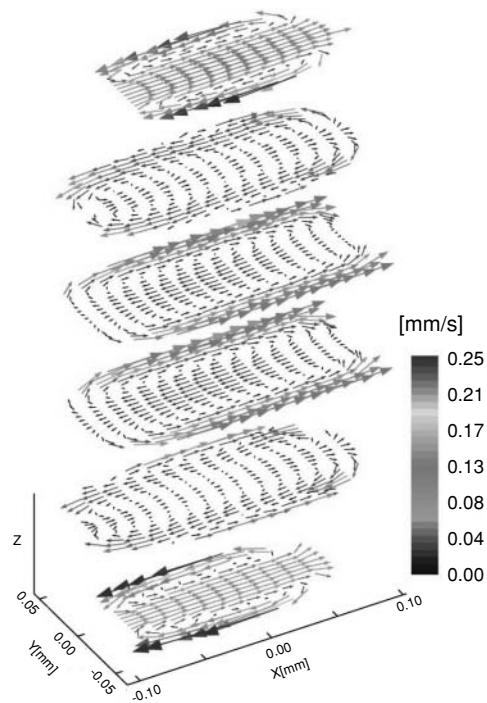


図8 液滴内の速度ベクトル図

(計測データご提供: 東京大学生産技術研究所 大島まり先生, 西華産業株式会社)



図9 LS-2システムの外観

3. CSU LiveStage™ LS-2による生細胞観察

3.1 LS-2とは

LS-2は、CSUの持つ優れた特長を余すことなく引き出す生物学用途の共焦点顕微鏡システムである。CSUの高速・低退色・低光毒性の特長を活用して、高速3D観察や長時間タイムラプス観察を可能としたため、生きた細胞内の生命現象を解明することができる画期的なツールである。

3.2 LS-2のシステム構成

LS-2のシステムの外観を図9に、システム構成を図10に示す。図10のように、LS-2システムは、CSU、顕微鏡、レーザ光源、CCDカメラ、フィルタホイール、XYZ自動ステージ、および制御用PCなどで構成される。

(1) ハードウェアの特長

・ CSU

LS-2の心臓部はCSU10/22で、これによって高速に高精細な共焦点画像取得が可能となる。また、光毒性や退色が少ないため、数時間から数日に亘る長時間のタイムラプス観察を可能にしている。

・ レーザ光源

LS-2は最大5本のレーザラインを搭載するレーザビームコンバイナを有している。各レーザには独立した高速シャッタとNDフィルタを装備しているため、高速な光源の切り替えや多色での同時励起が可能である。

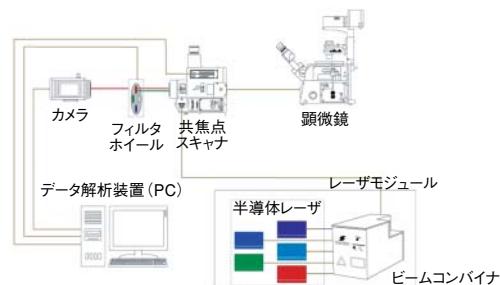


図10 LS-2システム構成

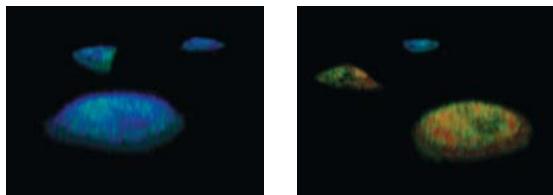


図 11 HeLa 細胞の高速 3D FRET 画像

(観察サンプルご提供：北海道大学電子科学研究所 永井健治先生)

・CCD カメラ

高感度 EM-CCD カメラもしくは高解像度カラー 3CCD カメラを搭載し、微弱な蛍光強度のサンプルでも低ノイズで画像が取得できる。

・ピエゾ Z ステージ

ピエゾ Z ステージは高速な Z 方向の走査を行い、3D 観察を可能としている。ステージタイプのため、固定サンプルの他にカルチャーディッシュや、96 穴のウェルプレートも観察できる。

・フィルタホイール

蛍光側に 6 穴のフィルタホイールを装備しており、高速に複数の蛍光画像が取得可能である。

・オプション

①CO₂ インキュベータ

生細胞の長時間観察のために、ヒータを内蔵したCO₂ インキュベータが利用できる。

②FRAP モジュール

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching, 光退色後の蛍光の回復) 観察のためのモジュールも利用可能。

(2) ソフトウェアの特長

LS-2 では、画像取得／解析用ソフトウェアとして、英 Improvision® 社の Velocity® を使用している。このソフトウェアは容易な操作で前記のハードウェアを一括してコントロールができる上に、次のような特長がある。

・強力な 3D 解析機能

観察対象である細胞は平面でなく 3 次元空間内に分布している。このため、レンダリング(データ可視化), colocalization, tracking, 蛍光エネルギー共鳴移動 (FRET), 色分解, デコンボリューションなど、画像処理を全て 3D で行っている。

・長時間のタイムラプス観察が可能

カメラで取得した画像データをデータ解析用 PC のハードディスクに直接記録しており、PC 本体のメモリーを圧迫しないため、長時間の画像取得が可能となっている。実測で 90 GB の記録がある。これは 1 time point 当たり 3 色 20 スライスとして 3000 time points, 30 秒間隔の実験なら、大よそ 2 日間に相当する。

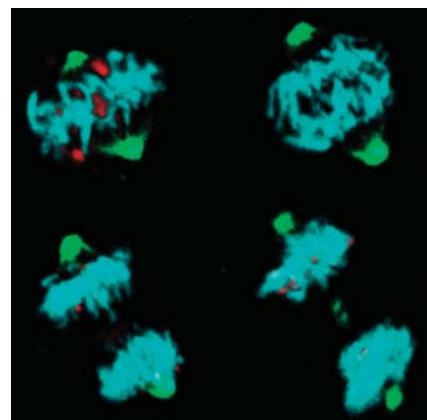


図 12 細胞分裂の 3D タイムラプス画像

(観察サンプルご提供：大阪府立大学大学院 杉本憲治先生)

3.3 LS-2 を用いた観察事例

(1) 高速 3D FRET 画像

図 11 は、ヒーラ (HeLa) 細胞に薬剤 (ヒスタミン) 刺激した際の Ca イオンの変化を、高速に 3D 画像化したものである。Ca イオンによって蛍光エネルギーの共鳴移動 (FRET) が起こり、蛍光波長が変化する Yellow Cameleon という蛍光蛋白を用いて観察しているが、2 色での 3D 画像を 1 立体当たり約 2 秒で高速撮影している。LS-2 上では、Ca イオンの濃度変化によって色が変わっていく様子が、3D アニメーションで観察できる。

(2) 細胞分裂の 3D タイムラプス画像

図 12 は、植物細胞の分裂の様子をタイムラプス観察した例である。染色体が左右に分かれしていく様子が分かるが、これは LS-2 による高速な 3D 画像取得と長時間タイムラプス機能によって観察可能となったものである。

4. おわりに

ここでは、CSU のユニークな特長を活かしたアプリケーションの中から、工業用途としては共焦点マイクロ PIV を、バイオ用途としては共焦点顕微鏡システム LS-2 を用いた細胞観察事例を紹介した。今後とも、CSU 活用の場所を拡大してゆく所存である。

参考文献

- (1) 大島まり、木下晴之、坂東佳憲、"in vitro モデル内におけるマクロ・マイクロ流れの可視化計測", ながれ, Vol. 25, No. 1, 2006, p. 5-12
- (2) 木下晴之、大島まり、藤井輝夫、山本貴富喜、金田祥、"高速共焦点スキャナを用いたマイクロ PIV システムの構築", 生産研究, Vol. 57, No. 2, 2005, p. 75-59