

高速共焦点レーザー顕微鏡 LSM5 LIVE を用いた、生体内の血流・血球の動態イメージング

In vivo イメージング:

高速共焦点顕微鏡を用いて、生体内で目的の細胞や分子の動態を観察することができます。LSM5 LIVEの高時間分解能により血流や細胞の速い反応を捉え、さらに共焦点の効果で奥行きのある生体組織を3次元空間で捉えることも可能にします。

サンプルの作製: (2種)

1. マウス腎臓の血流 (Fig1;)

マウスを麻酔下に開腹して腎臓を倒立型顕微鏡で観察できるように固定し、大腿静脈から蛍光色素Rhodamin-dextranを注入して血漿を標識、またCFSE (5 (and 6) -Carboxy Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester) を注入して白血球を標識しました。

2. ラット腸間膜の血流

ラットを麻酔下に開腹して腸間膜を倒立型顕微鏡で観察できるように固定し、大腿静脈から蛍光色素 (Hoechst33342) を注入して、白血球と血管内皮細胞の核を染色 (水色) をしました。

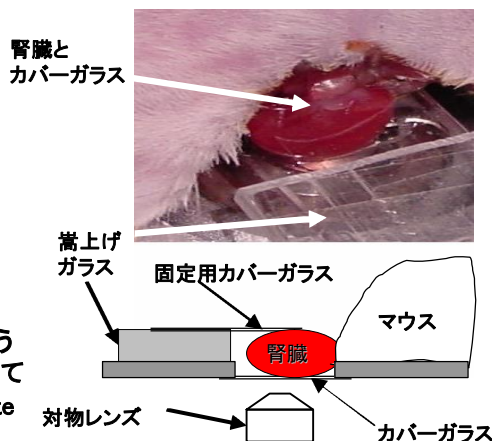


Fig1; マウス腎臓血流撮影のセッティング (断面図)

* マウスから引き出した腎臓を上からカバーガラスをあてて固定しています。

LSM5 LIVE の光学系設定:

LSM5 LIVEはラインスキャン方式を採用しています。レーザーをライン状で照射するので、Y軸方向のみのスキャンで超高速に(最速120枚/秒; 512×512 画素)撮影が可能です。また、共焦点アパーチャの変更により光学スライス像の厚みを自由に設定することができます。新開発の Achro Gate ビームスプリッタは、波長に依存せずほぼ100%の励起効率と蛍光収率を可能にするので、高速撮影においても明るい画像を得ることが出来ます。

サンプル1. (高速タイムシリーズ 撮影)

CFSE(緑)とRhodamin(赤)の2重染色を超高速撮影するために、検出器(チャンネル)を2個使用します。蛍光フィルターは BP 495 - 525 (CFSE)、BP 560 - 675 (Rhodamin)を使用します。また、2色の蛍光のクロストークを避けるため、高速 Multi Track 撮影を用います。

サンプル2. (高速タイムシリーズ + Zスタック “4D” 撮影)

Hoechst(青)撮影のためにフィルターはBP 415 - 480を使用します。ピエゾフォーカスユニットを用い、超高速 Zスタックを行います。(好中球の移動が何処で発生するか分からないため、Zスタックを用いて血管の厚みすべてのスライス像を撮影します。)

* サンプル1. 2. 共、血流を経時的に観察するため、タイムシリーズを用いて撮影を行います。

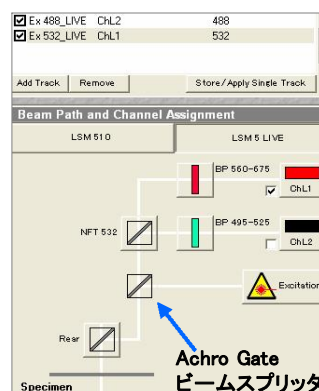


Fig2; LSMの光路設定 (サンプル1撮影用)

2色をマルチトラックで撮影
レーザーは488nm、532nmを使用

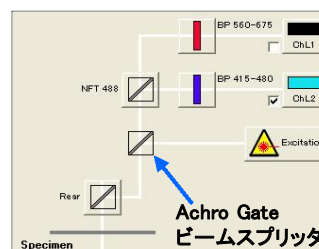


Fig3; LSMの光路設定 (サンプル2撮影用)

レーザーは405nmを使用

LSM 5 LIVE
- In vivo Application -

High Speed 4 Dimensional Blood Flow Imaging



We make it visible.

結果1: マウス腎臓の血流のイメージング

(Fig4.)

拡大撮影前の腎臓の全体像。

Rhodamin - dextranを用いて血管内の血漿部分を可視化(赤色)しました。(緑色は尿細管の自家蛍光です)血管内の赤血球は黒い影として見えます。

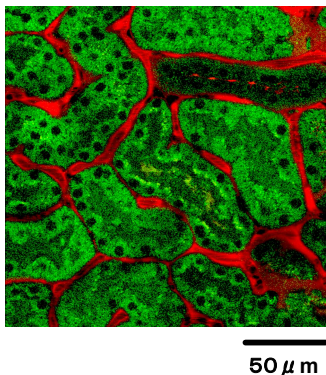


Fig4; マウス腎臓のスライス像 (20x)

(Fig5.)

全体像から好条件の位置を拡大。超高速スキャンによって血管内を移動する白血球(CFSE : 緑)を観察することができました。これらの画像から血流速度を測定することも可能です。

【撮影条件】

高速MultiTrack撮影

対物レンズ: C-Apochromat 40x / 1.2 W

Scan Time: 3.64msec / 1枚

撮影枚数: 3988枚

画素サイズ: 512 × 100

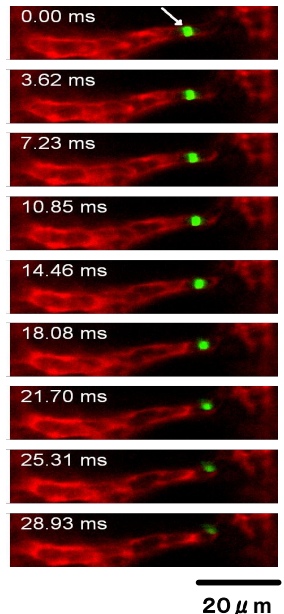


Fig5; マウス腎臓のタイムシリーズ像

結果2: ラット腸間膜血管の白血球のイメージング

血管壁に接着した白血球(好中球)が移動し、血管壁にもぐり込んで組織に遊走していく様子を観察することができました。通常では発見が困難な現象もLSM5 LIVEの高速4D撮影により、撮影後に各スライスでのTimeSeriesを確認できるため、生体内での3次元の動きも詳細に観察することが可能です。

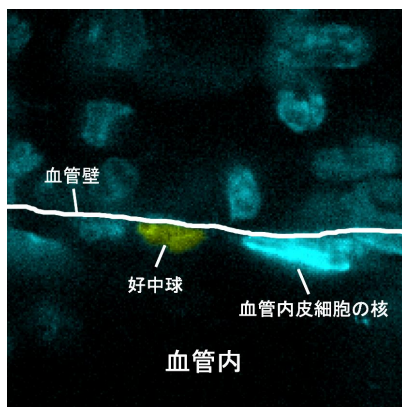


Fig6; ラット腸間膜の血管像

(好中球を見やすくするため画像処理で緑にマーキング)

【撮影条件】

対物レンズ: C-Apochromat 63x / 1.20 W、

Zスタック: 41枚、

Scan Time: 88msec / 1枚

Time Interval: 5sec、70セット

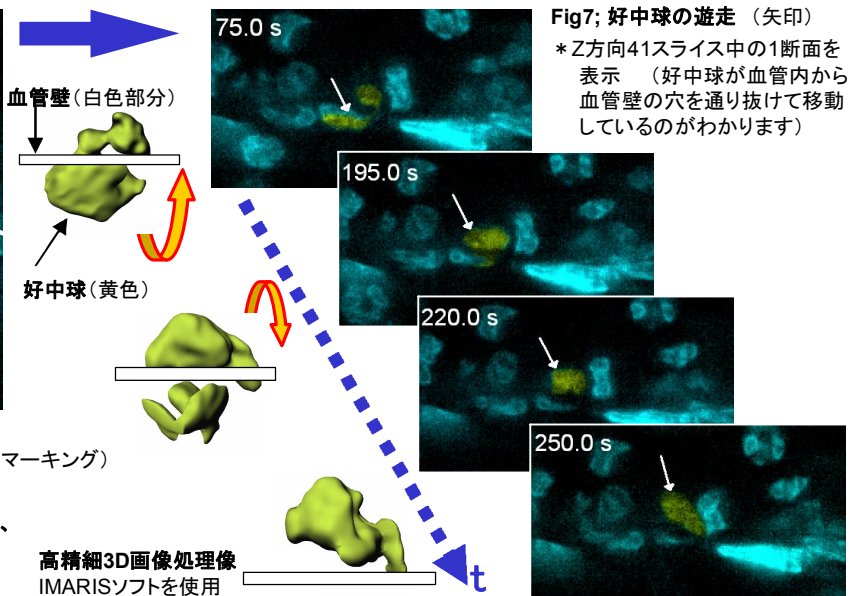


Fig7; 好中球の遊走 (矢印)

*Z方向41スライス中の1断面を表示 (好中球が血管内から血管壁の穴を通り抜けて移動しているのがわかります)

コメント:

LSM5 LIVEを用いた In vivo イメージングによって、腎臓の血流及び腸間膜血管の血管壁に接着した白血球の動きを捉えることができました。血流のような速い動きを捉えたり、組織中での3次元の動きを捉えるためには、速いスキャンスピードが必要になります。LSM5 LIVEは、生体内の生命現象の解析に有用な技術であると思われます。

画像データはLSM5 LIVEを用いて、株式会社アイカム 及び 株式会社シネ・サイエンス研究所 から提供して頂きました。

詳しくは下記のコールツァイス各営業所へお電話もしくはE-mailにて、またはマイクروسコープディビジョン機器製品取扱店へお問い合わせください。

コールツァイス マイクロイメージング 株式会社

〒160-0003
東京都新宿区本塩町22番地

Tel 03-3355-0332
Fax 03-6745-9087

E-mail micro@zeiss.co.jp

URL <http://www.microimagingzeiss.co.jp>

●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。
●本カタログ中の製品の色彩は印刷のため実物とは多少異なることがあります。

大阪営業所 〒564-0062 大阪府吹田市垂水町3-35-22
Tel 06-6337-5465 Fax 06-6337-5477
名古屋営業所 〒465-0043 名古屋市名東区宝が丘25
Tel 052-777-1411 Fax 052-777-1417
福岡営業所 〒810-0062 福岡市中央区荒戸2-1-5
Tel 092-713-7821 Fax 092-711-0776
仙台営業所 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-12-7
Tel 022-224-5621 Fax 022-224-5626