

シリーズ「ビデオマイクロスコープ(VEC-DIC)法実験技術講座」

**Infra-red differential interference contrast (IR-DIC) 法  
による脳スライスの観察**

宮川 博 義・中 村 健・高 木 博

渡 部 重 夫\*・平 沢 孝 枝\*\*

(東京薬科大学生命科学部, \*東京大学薬学部, \*\*日本女子大学家政学部)

**1. はじめに**

脳スライスは神経生理学の標本として20年ほど前に山本長三郎(現金沢大学医学部)らによって導入され、神経生理学の今日の隆盛をもたらす一因となった[1]。山本はスライスをを用いた研究の初期から微分干渉顕微鏡によって、無染色スライス内の細胞の観察を試みている[2,3]。当時の光学系ではかなり薄い(70ミクロン程度)スライスでなければ微分干渉の効果は現れなかった。一方、Sakmann と Neher 達によって開発されたパッチ電極記録法は[4]、単一細胞、単一チャンネルの活動の電気生理的測定の基本的技術として広く用いられている[5]。パッチ電極記録法は1989年頃からスライス標本内の神経細胞にも適用されるようになり、スライスパッチ法と呼ばれている[6]。スライスパッチ法には、細胞を見ずに行うブラインドパッチ法と直視同定しながら行う方法とがある。これまでは直視同定のためには正立顕微鏡の微分干渉光学系を用いていた。最近、この方法の新しい展開として、微分干渉の観察に近赤外線領域の光を用いる工夫 (Infra-red differential interference contrast 法, IR-DIC 法, 赤外微分干渉法) が行われるようになってきた[7-9]。本稿では、この IR-DIC 法について解説する。

**2. なぜ IR-DIC か**

スライス標本内の細胞の観察を困難にしているのはスライス標本の厚さである。無染色のスライス内の細胞を微分干渉光学系の助けによってコントラストを増強して観察しようとする

と、スライスの厚みは100ミクロン以上にはできない。しかるに、生理実験の対象とできるような健康な細胞を含む脳スライスを作成しようとすると、厚さは100ミクロンよりも厚くなる。単一の神経細胞の細胞体と樹状突起から同時にパッチ電極記録を行うためには数100ミクロン、時には数1000ミクロン、にも伸びた突起が切断されずに含まれるようなスライスが必要である。このような場合、スライスの厚みは300~400ミクロンになる。

スライスの厚みが微分干渉の妨げになる理由は次の3つである。1) スライスが厚いと光が散乱されてしまい、散乱光が観察の邪魔をする。2) スライスが厚いと、透過する光が少なくなり、像が暗くなって見えなくなる。3) スライスが厚いと、媒質の性質の違いによる光路差が大きくなりすぎて、干渉すべき光の位相差が大きくなりすぎる。波長の長い光を用いればこれらの3点のいずれについても改善が期待できる。波長の長い光は、散乱が少なく、したがって透過が良い。また、波長が長ければ同じ光路差でも、位相のずれは小さいのである。しかし、あまり波長の長い光を用いると、こんどは空間解像度が悪くなる。あまり波長の長すぎない近赤外領域の光をもちいれば、より厚いスライス標本内の細胞を、微分干渉によって観察可能なのである。

近赤外光を用いる顕微鏡観察の利点は、パッチ電極記録法の際の直視観察だけではない。形態変化の観察や光散乱の観察など幾つかの応用が可能であり、実際に研究に使われはじめているが、本稿ではこれについては触れない。興味

のある方は、参考文献[10-11]を参照されたい。

近赤外光を用いて微分干渉顕微鏡による観察を行うためには、幾つかの装置と注意とが必要となる。以下に順次述べてゆく。

### 3. 一般的注意

波長が 700 nm から 900 nm あたりの近赤外光を光源として用いる。そのために以下の装置と操作が必要である。(図1参照)

#### 3-1. 光源：

特別な光源は必要ではない。一般の顕微鏡に附属のタングステンやハロゲンのランプが使用

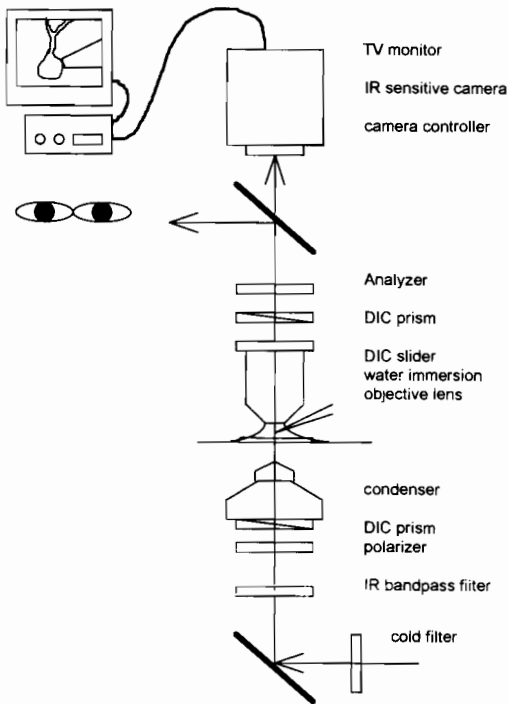


図1. IR-DIC法のシステム構成

900 nm よりも長波長をカットする防熱フィルターを介して、光源からの光を顕微鏡に導く。システム構成に応じた適正な近赤外のバンドパスフィルターにより、700~900 nm 付近の波長の光だけを顕微鏡の光路に入れる。DIC スライダーの位置またはアナライザーとポラライザーとの角度を調節して像のコントラストを調節する。正しく微分干渉像を観察していれば、調節に際して像の凹凸の逆転が見られるはずである。赤外に感度のあるビデオカメラ(浜松ホトニクス社製 C 2400-07 ER 等)によって像をとえ、TV モニター上で観察する。

できる。しかし、一般に顕微鏡の光源とコンデンサーとの間には防熱フィルターが入れている。多くの場合、防熱フィルターは可視光より長波長をカットしてしまうので、この防熱フィルターを交換して、700~900 nm の光も透過するようにする必要がある。

#### 3-2. 赤外のバンドパスフィルター：

色々な操作をする際には、可視光で双眼鏡から観察するほうが容易であるが、IR-DIC で観察する際には可視光は邪魔になる。700~900 nm 付近の光だけを透過するフィルターを光路に入れる。我々は顕微鏡のフィールドレンズとコンデンサーとのあいだに干渉フィルターを置いている。実際にどの波長範囲のバンドパスフィルターを選ぶかは、使用する顕微鏡の微分干渉光学系の性質と対物レンズの性質、さらに使用するカメラの感度特性によって異なってくる。フィルターはそれぞれの顕微鏡メーカーに相談すれば入手できるはずである。我々は下記のようなフィルターのメーカーから直接購入している。

SCHOTT(シヨット)日本株式会社

〒102 東京都千代田区九段南4-8-13,

自動車会館ビルディング

phone: 03-3239-0851, fax: 03-3230-1564

Omega Optical INC.

3 Grove st., POB 753, Brattleboro, VT 05301

phone: 802-254-2690, fax: 802-254-3937

朝日分光株式会社

〒114 東京都北区上十条2-13-1,

ガーデンア403

phone: 03-3909-1151, fax: 03-3909-1152

#### 3-3. カメラ：

赤外線はヒトの眼には見えないので何等かのカメラが必要になる。市販のビデオカメラの多くは 700 nm あたりよりも長波長側には感度がない。低倍率で観察するだけであれば、通常の CCD カメラの前についている赤外フィルターをはずして使用しても良いが、パッチ電極記録の助けにするのであれば、高倍率のレンズを使用するので赤外の感度の高いものが必要にな

る。赤外に感度のあるカメラとして浜松ホトニクス社製の C 2400-07 ER (Newvicon) や C 5999 (IR-CCD) が使用されている。この 2 機種種の比較は次の通り。

#### C 2400-07 ER (Newvicon)

撮像管を使用していて、大きく重量 (2 kg) がある。

受光面サイズ 12.7×9.5 mm  
有効走査線数 485本 (NTSC B/W)  
解像度 700×485 TV 本

#### C 5999 (IR-CCD)

CCD カメラであり小型・軽量 (200 g) である。

受光面サイズ 8.8×6.6 mm  
有効画素数 754×484  
解像度 570×485 TV 本

C 5999 のほうが軽便だが、水平方向の解像度が C 2400-07 ER に比べて 570/700 だけ劣るということになる。C 5999 でも十分な解像度だが、画質は C 2400-07 ER がやや優れている。どちらのカメラもコントローラーにはアナログのコントラスト強調とシェーディング調整の機能がある。パッチ電極記録の助けとするにはこの機能で十分であるが、形態変化等の観察を目的とするのであれば、浜松ホトニクス社製 ARUGUS-20 などの画像処理装置によってデジタルなコントラスト強調を行えば、さらに明瞭な像を得ることができる。

#### 3-4. TV モニター：

画像を見るためのビデオモニターも高解像度のものである。例えば SONY PVM-146 J (水平解像度 1000 TV 本)

#### 4. 主要メーカーの顕微鏡についての注意

##### ZEISS

これまでに IR-DIC 法によって細胞を直視しながらパッチ電極記録を行っている人のほとんどは ZEISS 社の AXIOSKOP もしくは AXIOPLAN を使用している。その場合、多くの方は浜松ホトニクス社製 C 2400-07 ER (Newvicon) というカメラに SCHOTT 社の RG-9 というガ

ラスフィルターを組み合わせで使用している。カメラの波長特性とフィルターの波長特性を掛け合わせると、750~850 nm あたりの波長を使っていることになる。ZEISS の DIC 用ポライザーが 780 nm あたりよりも長波長側では DIC に必要な偏光能力が落ちてくるという特性から判断すると、750~800 nm 近辺の波長で微分干渉をおこなっているようである。このシステムではスライスの表面から 120 ミクロン程度までの深さの細胞がコントラスト良く観察できる。

われわれは ZEISS 社製の AXIOSKOP-FS に浜松ホトニクスの C 5999 (IR-CCD) というカメラを取り付け、朝日分光社製のバンドパスフィルター (700~800nm) との組み合わせで使用している。上記の組み合わせとの比較を行って見たところ、画質がやや劣るものの、実用上は全く問題が無い。

使用する対物レンズによってコンデンサーを選択する必要がある。われわれは 1.4 Pol のフロントレンズをつけた 0.32 Pol のコンデンサー (44 52 45) に N. A. 0.50-1.4 用の DIC プリズムを装着したものを使用している。

AXIOSKOP-FS はスライスパッチのためにステージではなく鏡筒等が上下するように設計されており特に使い良い。水浸対物レンズが 10 X から 63 X までそろっていること (Achromat シリーズ)、対物レンズの絶縁にまで工夫がなされていることなど、スライスパッチ用の標準機というところか。

##### オリンパス

オリンパス社も最近、パッチ電極記録用に BX 50 WI という顕微鏡を開発した。この顕微鏡は対物レンズの明るさ、作動距離において AXIOSKOP よりもすぐれている。また面白いことに鏡筒上下式であるにも関わらず鏡筒の上部が本体部分に固定されていて、かなり重量のある装置を鏡筒に取り付けても鏡筒がずり落ちてこない。IR-DIC 法と顕微測光とを組み合わせようとする、重たいカメラを複数台取り付けることがあるが、その様な際には重要な特徴で

ある。

この顕微鏡に使用できる水浸対物レンズには、1200 nm 付近までの近赤外領域の結像特性に優れたものがある (LUMPlan FL 40 xW/IR N. A. = 0.8, LUMPlan FL 60 xW/IR N. A. = 0.9)。この顕微鏡の微分干渉光学系のポラライザーは 850 nm あたりまで偏光能力があるので、700~850 nm のバンドパスフィルターを C 2400-07 ER または C 5999 と組み合わせることにより IR-DIC 法が可能になる (図 2 A)。このシステムではスライスの表面から 120 ミクロン程度までコントラスト良く観察できる。近赤外対応の対物レンズは、IR-DIC 法に限らず、この近赤外光を用いた顕微測光には適当であろう。

#### ニコン

筆者はニコンの正立顕微鏡での IR-DIC については経験がないのでコメントできない。ZEISS の AXIOSKOP についてのべた注意を参考にして工夫されたい。ニコンには倒立顕微鏡 TMD 300 をもとに構成された IR-DIC のシス

テムがある。このシステムのアナライザーとポラライザーは新たに開発されたもので、1000 nm あたりまで偏光能力がある。このシステムを 830-950 nm のバンドパスフィルターと C 5999 (IR-CCD) カメラと組み合わせて使用して見たところ、スライスの底面から 250 ミクロンの深さにある神経細胞の樹状突起が観察でき

図 2. A



図 2. B

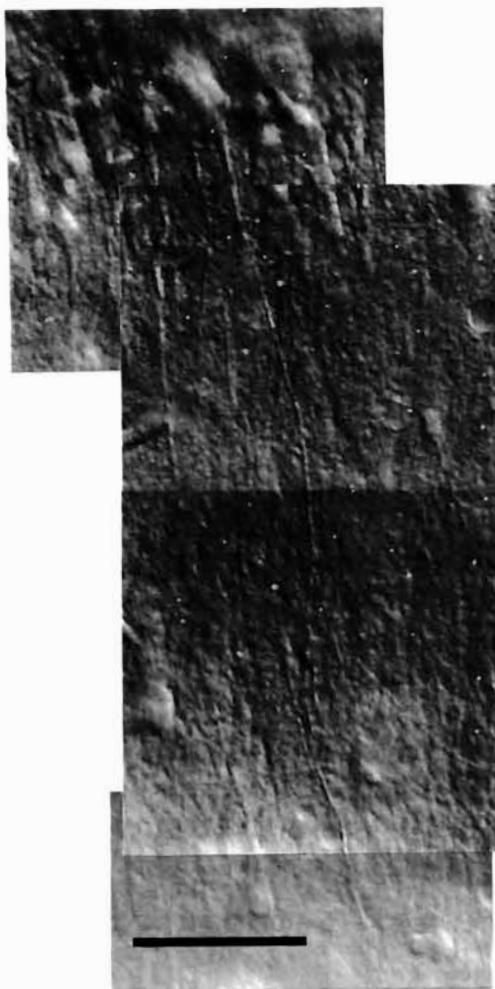


図 2. IR-DIC 法によって観察したスライス標本の例

A. ラット小脳プルキンエ細胞 オリンパス社製 BX 50 WI 顕微鏡+微分干渉光学系, 赤外フィルターは 700~850 nm バンドパス, 対物レンズは LUMPlanFL 40 xW/IR N. A. = 0.8, カメラは浜松ホトニクス社製 C 2400-07 ER. 2.5 倍の中間レンズ使用. ホールセル電極が細胞体に近い樹状突起部に押し当てられている. スケールバー: 10 ミクロン.

B. ラット海馬 CA1 錐体細胞 ニコン社製 TMD 300 倒立顕微鏡+微分干渉光学系, 赤外フィルターは 830~950 nm バンドパス, 対物レンズは Fluor 40 x/N. A. = 0.7 LWD. 上に細胞体があり先端樹状突起が下に向かって伸びている. スケールバー: 50 ミクロン.

た。波長が他のシステムよりも長い分、より深部の細胞を観察することが出来るようである。より作動距離の長いコンデンサーが使えて、上部からの電極の接近が容易になれば、底面側から観察しつつスライスパッチ記録を行うことが可能かもしれない。(図2B)

### 5. 検鏡の実際の手順

1. ケーラー照明になるように正しく光源とコンデンサーを調整する。
  - i. 標本にピントを合わせる。
  - ii. 光源絞りを小さく絞る。
  - iii. コンデンサーを上下して、光源絞りの像(8角形に見えるものが多い)が標本と共にはっきり見えるようにする。
  - iv. 光源絞りの像が視野の中心に来るようにコンデンサーの芯出しを調整する。
2. スライス標本をステージ上の実験槽に置く。実験槽の底部は薄いカバーガラスを使用しなくてはならない。スライドガラスなどの厚みのあるガラスやプラスチックでは干渉効果が起きない。スライスの目的部位を視野の中心部に置く。この作業はIR-DICを使わずに双眼鏡をのぞきながら行うほうがやりやすい。この時、明視野の観察でもコンデンサー絞りを十分に絞り、照明を明るくすると、無染色スライス標本中の細胞の輪郭が良く見える。ただしこの場合にはスライスの表面に存在する細胞しか見えていない。
3. 微分干渉光学系の部品を全て光路に入れる。近赤外用バンドパスフィルターも光路に入れる。ここからは双眼鏡をのぞいても何も見えない。TVモニターでないと像が見えないわけである。
4. コンデンサーの開口絞りを最大に開く。視野絞りは視野をカバーする程度に開けておく。
5. DICスライダの位置、又はポラライザーとアナライザーとの角度を調節して最も高い

コントラストの得られる位置をさがす。通常の微分干渉では最も輝度の低くなる位置で最も高いコントラストが得られるのだが、スライスを見るときにはかならずしもそうはならないようである。

### 6. その他

Sackmann 達のグループは、スライス標本内の単一神経細胞の距離的に離れた二ヶ所から同時にホールセル記録を行っている[12-13]。この技術を可能にしたのはIR-DIC法である。特定の神経細胞の神経突起の数100~数1000ミクロン離れた二ヶ所から同時にホールセル記録を行うためには、第一のホールセル記録電極を吸いつけた部位から突起を数100ミクロンたどって第二の記録部位を探さなければならないが、そのためにIR-DIC法が不可欠なのである。

IR-DIC法により神経細胞のスパインが見えるという報告もある[7]。この目的のためには63倍NA1.4や100倍の対物レンズが使え、かつ目的部位までの距離が短くとれる倒立型顕微鏡を使用すべきであろう。

Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH 社 (Boschstrasse 19, D-40880 Ratingen, Germany, fax: 49 (02102) 442036) では、微分干渉光学系を用いない、新しい原理にもとづく赤外光領域のコントラストシステムを発売している。これはZeissのAxioskop FSに取り付けることが出来る。光源部分に取り付ける装置なので、他のメーカーの顕微鏡にも取り付けることが可能なのである。詳しくは顕微鏡メーカーに相談されたい。

IR-DIC法の助けをかりたスライスパッチ法を顕微測光と組み合わせることがしばしばある。この際には顕微鏡の鏡筒に2台のカメラを取り付けられるようにしなくてはならない。IR-DIC用のカメラから顕微測光用のカメラに光路を切り替えるときに振動を与えると、せっかくできたタイトシールが壊れてしまうので、切替時のショックを軽減する工夫がひとつうで

ある。我々は顕微鏡の様々な所にあるバネやボールを取りはずして使用している。

いうまでもないことなのだがスライスパッチ法が成功するか否かは標本細胞の生きの良さにかかっている。IR-DIC法でスライスを観察すると、スライスの生きの良さ悪さがはっきりと分かる。どのようにみえる細胞が生きており、どのような細胞が死んでいるのかを見極めることが重要である。

#### 参 考 文 献

- 1) Yamamoto, C. and McIlwain, H.: Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J. Neurochem.* **13**: 1333-1343, 1966
- 2) Yamamoto, C.: Recording of electrical activity from microscopically identified neurons of the mammalian brain. *Experientia* **31** (1975) 309-311
- 3) Yamamoto, C., and Chujo, T.: Visualization of central neurons and recording of action potentials. *Exp. Brain Res.*, **31**: 299-301, 1978
- 4) Neher, E. and Sakmann, B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated muscle fibres. *Nature* **260**: 799-802, 1976
- 5) *Single Channel Recording*. 2nd Ed., Eds, Sakmann, B. and Neher, E., Plenum press, 1995
- 6) Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B. and Takahashi, T.: A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurons of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch.* **414**: 600-612, 1989
- 7) Dodt, H. U. and Zieglansberger, W.: Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy. *Brain Res.*, **537**: 333-336, 1990
- 8) G. J. Stuart, H. U. Dodt, B. Sakmann: Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy, *Pflugers Arch* **423**: 511-518, 1993
- 9) B. Sakmann and G. Stuart: Patch-Pipette Recordings from the Soma, Dendrites, and Axon of Neurons in Brain Slices. Chapter 8, 199-211, *Single Channel Recording*, 2nd Ed, Plenum
- 10) Holthoff, K., Dodt, H. U., and Witte, O. W.: Changes in intrinsic optical signal of rat neocortical slices following afferent stimulation. *Neurosci. Lett.* **10**: 227-230, 1994
- 11) Dodt H. U., and Zieglansberger W.: Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function. *TINS*, **17**: 453-458, 1994
- 12) G. J. Stuart and B. Sakmann: Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature*, **367**: 69-72, 1994
- 13) N. Spruston, Y. Schiller, G. Stuart, B. Sakmann: Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into Hippocampal CA1 dendrites. *Science*, **268**: 297-30, 1995