

画像解析による超解像法 SRRF の *in vivo* イメージングへの適用

Image analysis based super-resolution two-photon microscopy for *in vivo* imaging

堤 元佐^{1,2}、高橋 泰伽^{1,2,3}、小林 健太郎⁴、根本 知己^{1,2,3,4}

¹自然科学研究機構 生理学研究所、²自然科学研究機構 生命創成探究センター、

³総合研究大学院大学 生理科学専攻、⁴北海道大学 電子科学研究所

近年、超解像顕微鏡法の普及により光の回折限界を超えて微細な生体现象を可視化できるようになってきた。しかし、既存の超解像顕微鏡法は光学特性の良いサンプルや表面付近での観察を前提としており、組織や生体深部への適用には困難を伴う。

一方で、Super Resolution Radial Fluctuation (SRRF) 法 (Gustafsson *et al.*, *Nat. Commun.* **7**; 12471) は 2016 年に発表された新規の超解像化手法である。この手法は蛍光分子局在化法をベースとしており、連続取得された顕微鏡観察像における蛍光強度の空間・時間相関解析から個々の蛍光ピークを分離し、数 10 nm の精度で重心位置を決定できる。この方法の特長は、画像解析による手法であることから既存の各種顕微鏡観察法との組み合わせが可能なことである。

本研究で我々は、深部超解像イメージングの実現に向けて、SRRF 法の 2 光子顕微鏡への適用を試した (TP-SRRF)。最初に、2 光子顕微鏡で生体脳模倣ゲル中の蛍光ビーズの蛍光像を複数枚取得し、得られた画像シリーズに対して SRRF 処理を行った。SRRF 固有のパラメーターの検討・最適化を行った結果、TP-SRRF は生体脳模倣ゲル 1.5 mm 深部でも空間分解能の向上効果を示した。同処理条件でナノルーラー (顕微鏡分解能評価ツール) の TP-SRRF 観察を試したところ、構造化照明顕微鏡 (SIM) に匹敵する約 160 nm の 2 点分解能が確認された。また、Thy1-EYFP (H-line) マウス固定脳スライスの観察では、特に透明化処理を施さずとも、表面近傍はもとより 100 μ m 深部でも神経細胞樹状突起スパインを観察することに成功した (図)。さらに、H-line マウスの *in vivo* イメージングに TP-SRRF を適用したところ、生体脳表から 500 μ m 深部において樹状突起スパインを明瞭に解像することが確認された。

以上の結果から、TP-SRRF による生体深部超解像イメージングの実用性が示された。この手法は既存の 2 光子顕微鏡に容易に適用でき、超解像観察の適用可能範囲を大きく広げ得ると期待される。

図の説明：脳深部における神経細胞の TP-SRRF イメージング

Thy1-EYFP (H-line) マウス固定脳 100 μ m 厚冠状切片の TP-SRRF 観察像。表面付近での観察像 (上図) と、スライスを裏返して約 100 μ m の組織越しに同一視野を観察した像 (下図) を示す。TP-SRRF によって、組織透明化処理を施さずとも、深部で詳細な神経細胞形態を観察することに成功した。