

Quick Guide

ZEN 3 (blue edition)
LSM900/ 980/ 980NLO

with Axio Observer

2019.11



はじめに

ZEN は、Carl Zeiss 社製共焦点レーザスキャン顕微鏡専用の制御ソフトウェアです。ZEN では、各種モードによる画像取得から、様々な画像処理、データ解析が可能です。

本冊子では通常よくお使い頂く機能をご説明しております。ソフトウェアのより詳細な操作に関しては英文マニュアルをご参照ください。

機器を有効にお使いいただくために、トレーナーによる取扱い説明を必ず受けるようにしてください。不明な点がございましたら弊社担当までご連絡下さい。

目次

取扱い注意点	1
1. システムの起動	2
2. レーザを発振する	6
3. 顕微鏡観察によりスキャンエリアを決める	7
4. レーザ顕微鏡の光路を設定する	8
5. 画像を取得する	12
6. Airyscan による撮影(オプション)	18
7. 画像の保存と読み出し	22
8. 3D 画像の作成	26
9. ビュータブについて	28
10. ビューコントローラについて	30
11. 光学顕微鏡による観察	34
12. システムの終了	40

取扱い注意点(最初に必ずお読みください)

1. レーザモジュールに関して
 - ・レーザモジュールから出ているオプティカルファイバーやケーブル類には触れないで下さい。
2. スキャンングモジュールに関して
 - ・スキャンングモジュールの上には何も載せないで下さい。
 - ・スキャンングモジュールにつながっているオプティカルファイバーやケーブル類には触れないで下さい。
3. 顕微鏡に関して
 - ・レーザ顕微鏡で画像を取り込んでいる最中は対物レンズから出ているレーザ光、散乱光を直接覗きこまないようにしてください。失明するおそれがあります。
 - ・対物レンズにオイルをつけた場合には、使用後にレンズクリーニング液(以下の混合溶液:n-ヘキサン 85%、イソプロパノール 15%)で良くふき取っておいてください。倒立型顕微鏡の場合、オイルがレンズの内部に浸潤し、正常な状態での検鏡ができなくなる恐れがあります。
 - ・使用中に対物レンズ及びレボルバに水溶液等をこぼしてしまった場合、直ちにふき取ってください。特に生理食塩水の場合には顕微鏡の金属部分がサビてしまう恐れがあります。水漏れが起こった場合には直ちに弊社担当者までご連絡下さい。
 - ・蛍光観察用の水銀ランプは高温になります。点灯中、及び消灯後しばらくは手を触れたり、ダストカバーをかけたりしないようにしてください。やけどや発火の恐れがあります
 - ・使用中、顕微鏡につながっている電源ケーブルや各種ケーブル等は外さないで下さい。故障の原因になる恐れがあります。

画像を取得するまでの流れ

画像を得るための基本的な流れは次のようになります。

システムを起動する(P. 2~5)



顕微鏡観察によりスキャンエリアを決める(P. 7)



観察する蛍光試薬に対応したレーザの光路を設定する(P. 8~11)



レーザスキャンを行い、画像を取得する(P. 12~17)

1. システムの起動

1-1. LSM980の場合

- ① **Main switch** を ON にします。
- ② PC を起動し、**LSM user** でログインします。
- ③ **Laser** のキーを ON にします。
- ④ **Components** を ON にします。
- ⑤ 多光子レーザが搭載されている場合には、コヒレント社製 Chameleon レーザ電源ユニット正面のキースイッチを Standby から ON にします。
※Chameleon レーザ電源、チラー電源は常時 ON にしておいてください。

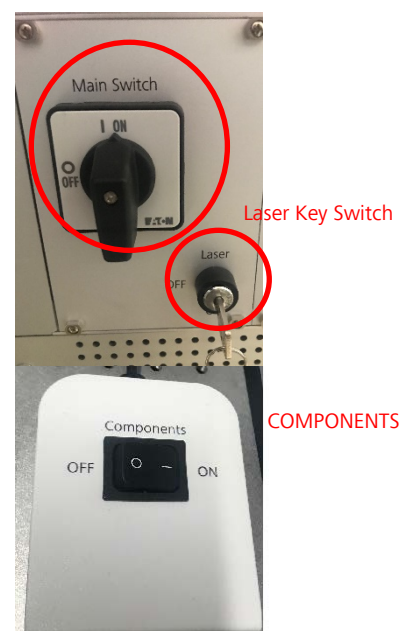


Fig 1. システム電源 (LSM980)

※ PC のみ使用する場合、①及び②のみの起動で使用可能です。

1-2. LSM900 の場合

- ① 集中電源タップのスイッチを入れます。
- ② 電源ボックス (PSU) の **SYSTEM**, **COMPONENTS** を ON にします。
- ③ 顕微鏡のタッチパネルの起動が終了してから PC を起動し、**LSM User** でログオンします。
- ④ レーザを発振させるため、キースイッチを右に 90° 回します。
30 秒～1 分ほどで起動音が鳴り、インジケータがいったん消えますので、その後ソフトウェアを起動してください。

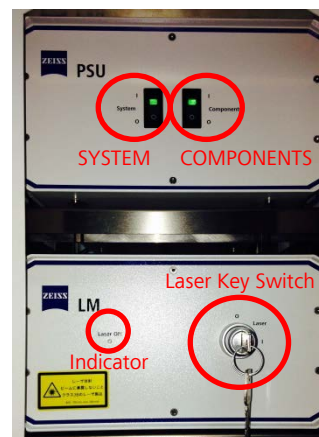


Fig 2. システム電源(LSM900)

※ PC のみ使用する場合、①及び③のみの起動で使用可能です。

※ HXP や HBO などの目視用蛍光光源を個別に ON/OFF する場合には、1-2①の後に行ってください。

1-3. オペレーティングソフトの起動



【ZEN】アイコンをダブルクリックして、オペレーティングソフトを起動すると、下記ウィンドウが現れますので、【ZEN System】を選択して下さい。



Fig.3 ソフト起動直後の画面

ZEN System : 画像取得時に選択します。ソフトウェアとハードウェアを初期化して起動します。

Image Processing : ソフトウェアのみ起動します。取得済みの画像を扱うときに選択します。

※ Image Processing で起動すると画像の取り込みは出来ません

《ソフトウェアの基本操作》

ZEN インターフェースは左、中央、右と3つの大きなワークエリアに区切られています。

左ツールエリア (Fig.4-①,②,③)

光学顕微鏡の制御や画像取得のための諸操作を行います。

①メインタブ ② アクションタブ ③ ツールグループ

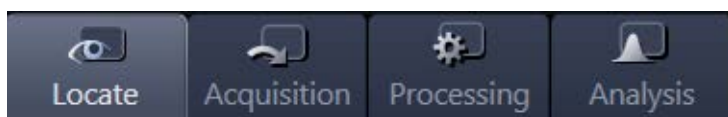


Fig.4 メインタブ

Locate: 目視観察
Acquisition: 画像取得
Processing: 画像処理
Analysis: 画像解析

センタースクリーンエリア (Fig.5 - ④,⑤,⑥)

取得した画像が表示されます。(一度に3枚までの画像を同時に表示可能です)

④ 画像ウインドウ ⑤ ビュータブ ⑥ ビューコントローラ

右ツールエリア (Fig.5 - ⑦, ⑧)

現在メモリー上で開いている画像をサムネイル表示します。

⑦ サムネイル画面 (画像取得後に表示)

⑧ Device tool 画面: Microscope (対物レンズ)、Stage (電動ステージの場合) と Focus の制御

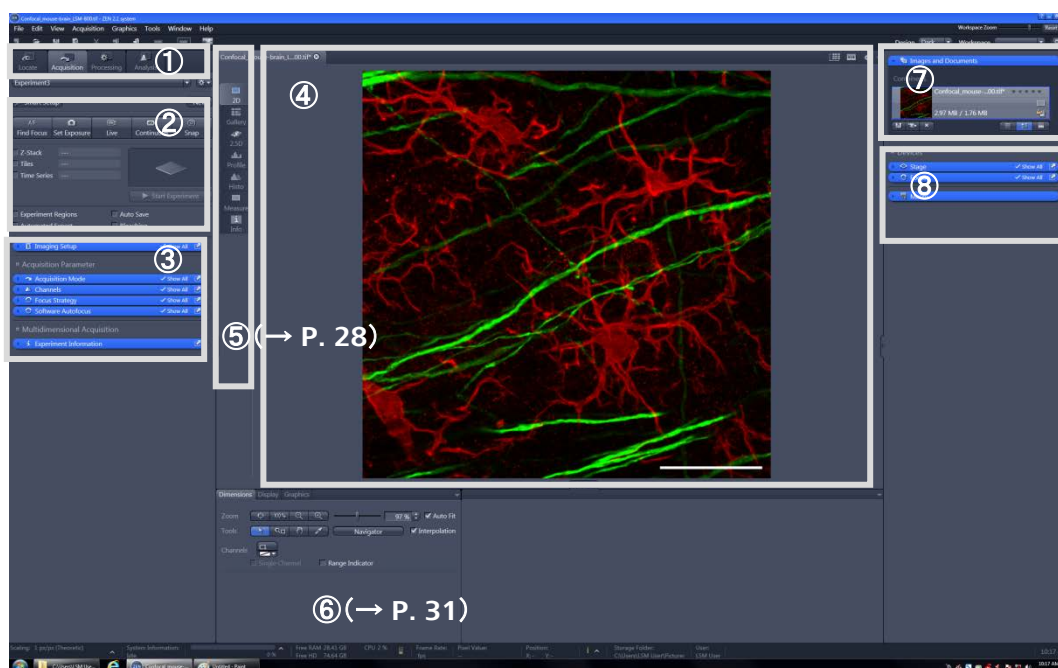


Fig.5 ソフトウェア起動後の ZEN メインアプリケーションウインドウ

※ ZEN のユーザーインターフェースを快適に使用するために、フルスクリーン表示にすることをお勧めします。

Show all

Show all にチェックを入れると、設定できる項目が全て表示されます。これにより、さらに詳細な画像取得条件を設定することができます。

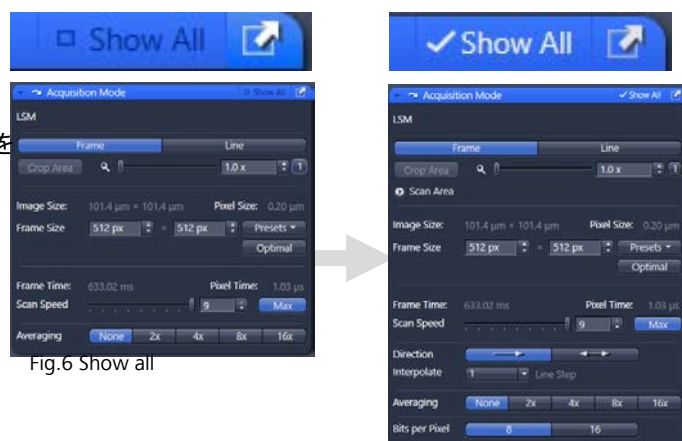


Fig.6 Show all

ワークスペースズーム

左右ツールエリアとセンタースクリーンエリアの表示(拡大)比率を変えることができます。

ツールエリアのコーディネート

ツールカラムのタイトルバーをドラッグアンドドロップすることで、レイアウトを自由に変更することができます。また、それぞれのツールは青いタイトル部分をクリックすると開閉をすることができます。左ツールエリアの各ツールは、タイトルバー右に配置したアンドックボタンの ON/OFF により、画面上のどこにでも自由に配置できます。

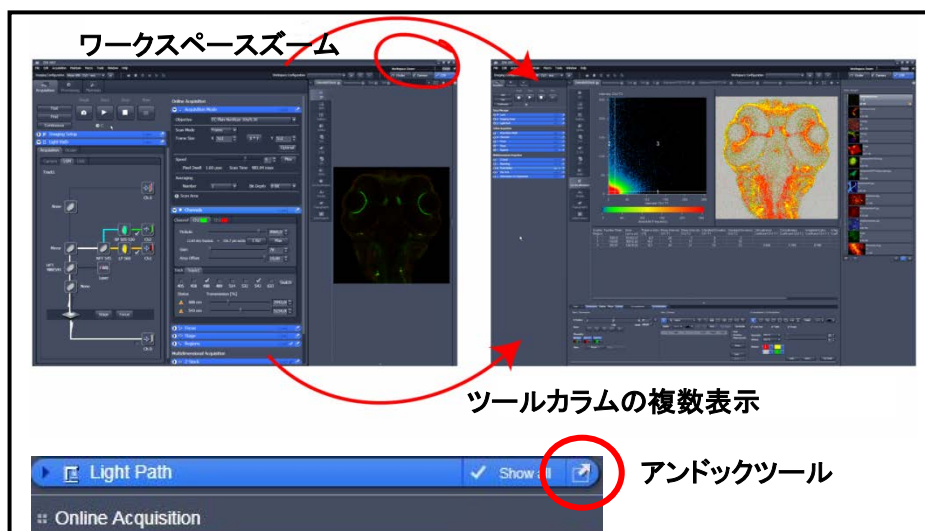


Fig.7 ZEN ウィンドウレイアウト各種機能

その他の機能

左ツールエリアについて、自分がいつも繰り返し行う作業がある程度決まっていれば、そのツール配置を自分だけのレイアウトとして保存することが可能です (Workspace Configuration)。保存した配置はソフトウェア起動後、2 クリックで呼び出すことができます。

※ここでは使用上最低限必要な機能を記しています。より詳細な機能については英文の取扱説明書をご参照ください。

2. レーザを発振する(LSM980の場合)

右ツールエリアの【Laser】ウィンドウから使用するレーザを選択し、ONにします。

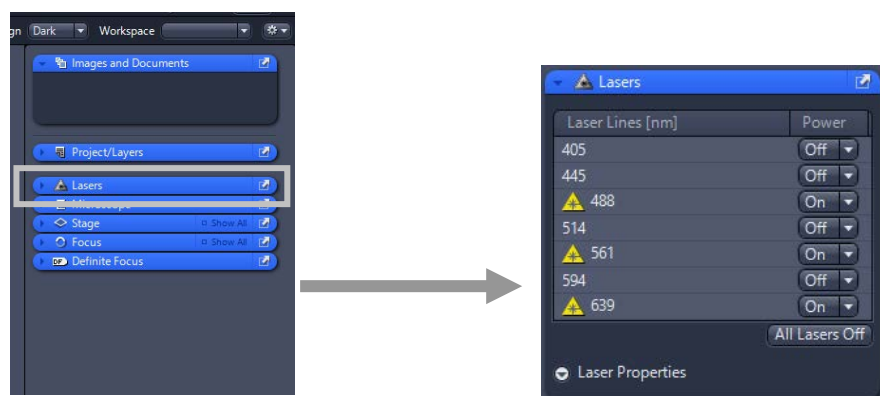


Fig.8 レーザコントロールツール

- **ダイオードレーザ(405nm, 445nm, 488nm, 514nm, 561nm, 594nm, 639nm)**

レーザ名を選択し、プルダウンで **ON** を選択します。

※仕様により搭載されるレーザは異なります。

- **NLO 用レーザ(スペクトラ・フィジックス社製 MaiTai、コヒレント社製 Chameleon など)**

レーザ名を選択し、プルダウンで **ON** を選択します。

※ NLO レーザ本体は別電源となっております。電源はあらかじめ入れておいてください。

※ Laser Properties をクリックすると、レーザの出力、接続状態などを確認することができます。

3. 顕微鏡観察によりスキャンエリアを決める

顕微鏡本体のボタンもしくは下記ウインドウから顕微鏡を操作し、接眼観察をしてサンプルの位置決めを行います。

双眼鏡筒へ光路を切り替える

接眼観察を行う際は、画面左上にある**Locate**タブを選択し、光路を切り替えます。

※この状態でのレーザによる画像の取り込みはできません。

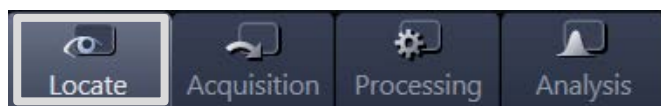



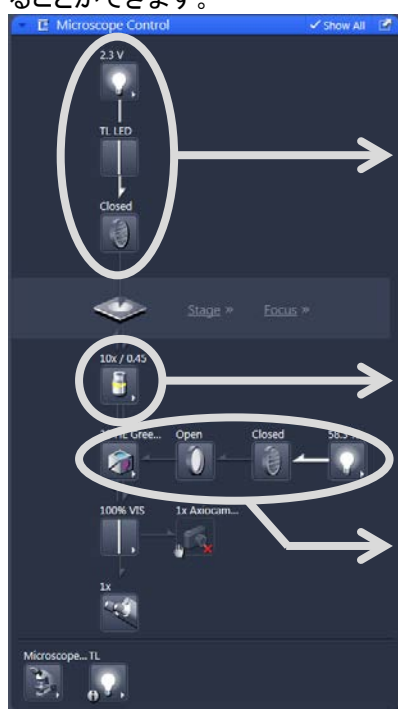
Fig.9 Locateタブ

Locate : 接眼観察モード

Acquisition : LSM観察モード

顕微鏡各部の制御

左ツールエリア内の Microscope Control ツール  **Microscope Control** をクリックします。このツール上では光学顕微鏡の電動駆動部分がボタンで表示されており、各部の選択により顕微鏡を操作することができます。



透過光路(透過光観察時に使用)

- ・ここでは透過光路に関する各種選択が可能です。
- ・ハロゲンランプの On/Off、光量調整などができます (仕様により制御できる部分が異なります)。

対物レンズの切り替え

- ・任意の倍率のレンズを手動で選択すると表示が切り替わります。
- (右ツールエリアの **Microscope** でも対物レンズの切り替えが可能です)

反射光路(蛍光観察時に使用)

- ・ここでは蛍光光路に関する各種選択が可能です。
- ・蛍光フィルタの選択/シャッターの開閉/光量調整などを制御します (装備しているパーツにより制限があります)。

Fig.10 顕微鏡制御画面 (Axio Observer 7 の例)

顕微鏡設定の保存と呼び出し

蛍光観察・透過光観察時に使用する設定は、ソフト上で保存し、簡単に呼び出すことができます。

呼び出し: マクロボタンから任意の設定を選びクリックします。



Fig.11 顕微鏡設定の呼び出し画面

4. レーザ顕微鏡の光路を設定する

Acquisition タブをクリックし、光路を LSM 画像取得モードに切り替えます。



標識に用いた蛍光試薬に応じて、あらかじめ登録された光路設定を呼び出します。
下記2種類の方法があります。

- 3-1. Experiment Managerによる光路の設定
- 3-2. Smart Setupによる光路の設定

3-1. Experiment Managerによる光路の設定

- ① **Experiment Manger** のドロップダウンボタン (Fig. 12) をクリックすると、登録されている光路設定リストが開きます。
- ② 光路設定リスト (Fig.13) より、目的の設定を選択します。

例) 単染色の場合、“Ex 488”や“GFP”のように励起波長や代表的な色素名が表示されているものを選択します。多重染色の場合、Ex 488/561/640 など 2 波長以上表示されているものを選択します。

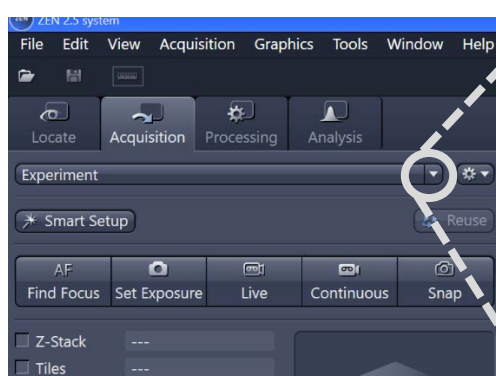


Fig.12 Experiment Manager 呼び出しボタン

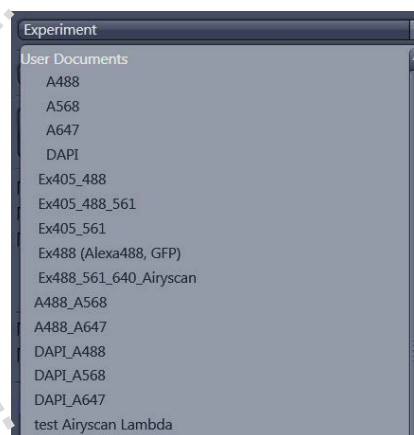
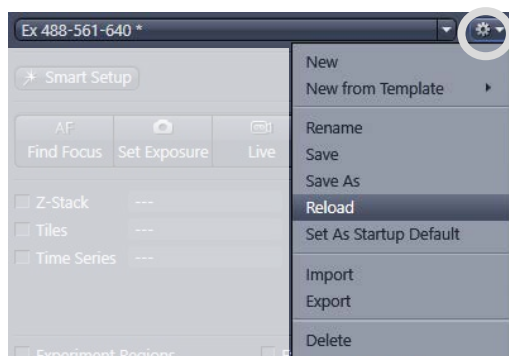



Fig.13 Experiment Manager リスト 画面



※  ボタンから設定の保存、上書き、再読み込み ならびに消去ができます。

初期設定から何か変更が加えられた場合は、光路設定の名前の後ろに「*」がつきます。初期設定に戻す場合は、**Reload**を選択してください。

3-2. Smart Setup による光路の設定

- ① **Smart Setup**をクリックします (Fig. 14)。
- ② **Detection mode**は**LSM**を選択します。
- ③ **Configure your experiment** エリアの**+**ボタンをクリックして色素選択ウインドウを開きます。
- ④ **Search**より蛍光色素名を入力、もしくは**Dye Database**より選択します。色素名をダブルクリック、もしくは選択して**Add** ボタンをクリックすることで、選択した色素がConfigure your experimentエリアに反映されます。

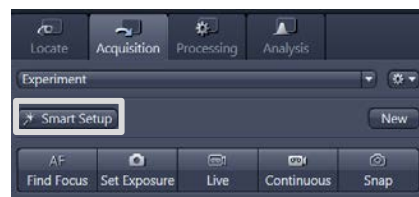


Fig.14 Acquisition画面

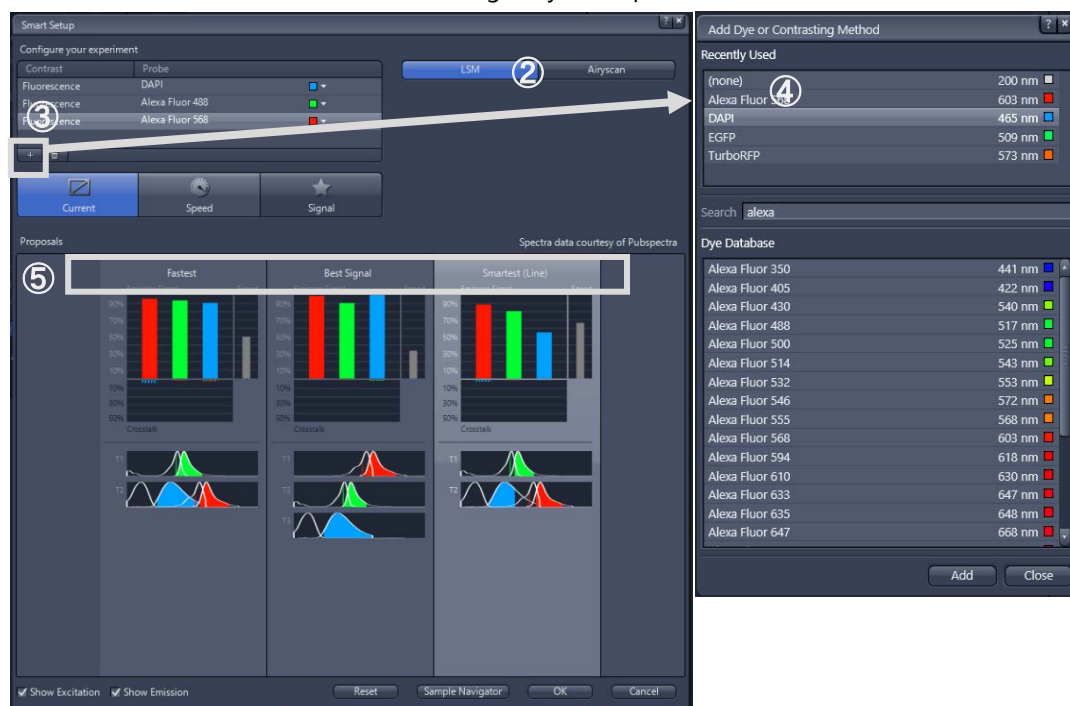


Fig.15 Smart Setup画面

- ⑤ **Fastest**, **Best Signal**, **Smartest (Line)** の3つの画像取得方法から 目的に応じた設定を選び、**OK** をクリックします。

Fastest (Simultaneous)

画像取得スピードを重視します。複数色のシグナルを可能な限り同時に取得するので、蛍光の漏れこみを生じる可能性があります。

Best Signal (Sequential)

蛍光の漏れこみを回避して画像を取得します。色素ごとに光路を組み、それぞれ光路を切り替えて画像を撮るため、Fastest モードより画像取得に時間がかかります。

Smartest (Line) (Sequential or Simultaneous)

蛍光の漏れこみを回避しつつ、取得スピードにも配慮して画像を取得します。蛍光の漏れこみを起こしにくい組み合わせはSimultaneous modeで、漏れこみが起きやすい組み合わせはSequential modeで撮ります。

- ※ **Detection mode**を**Airyscan SR**にすると、Airyscan用の光路設定を選択することができます (オプション)。マルチカラーの場合、全てSequential modelになります。

《 光路設定の確認、変更》

① **Imaging Setup** ツールを開き、光路を確認します。

Track 1, 2,...をクリックすると各蛍光の光路が表示され確認、変更することができます。

※ 必要があれば光路設定を変更し、名前をつけて Experiment Manager リストに登録しておくことも可能です。

※ 手動で光路を選択し、カスタマイズした設定を作成したい場合は、別冊「ZEN 応用編」マニュアルをご参照ください。



Fig.16 Imaging Setup ツール(LSM980 の例)

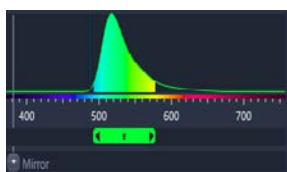


使用するレーザ波長と照射強度の設定 (LSM980 の場合)



メインダイクロイックビームスプリッター(MBS)

Vis レーザ用と InVis レーザ用があります。(LSM980 の場合)



エミッションレンジの選択

各検出器で取得する蛍光波長帯域を設定することができます。

Use	Dye	Color	Name	Range
<input checked="" type="checkbox"/>	AF488		AF488	410 nm - 570 nm
<input type="checkbox"/>			Ch2	570 nm - 649 nm
<input checked="" type="checkbox"/>	Cy5		Cy5	656 nm - 700 nm

使用する検出器(PMT)とスペクトル表示、疑似カラーの選択

Dyes リストから蛍光試薬名を選択すると、スペクトルを表示します。

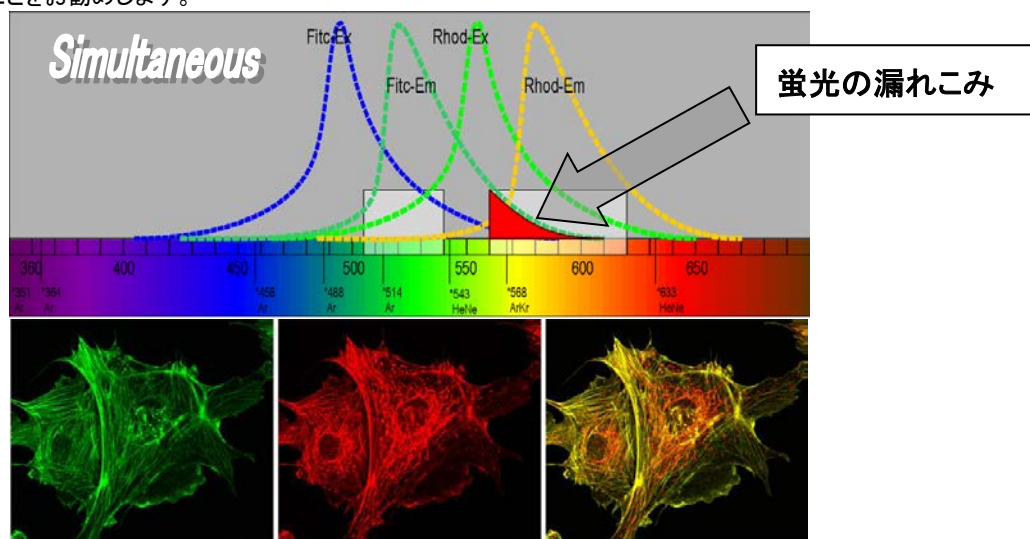


透過光像用検出器

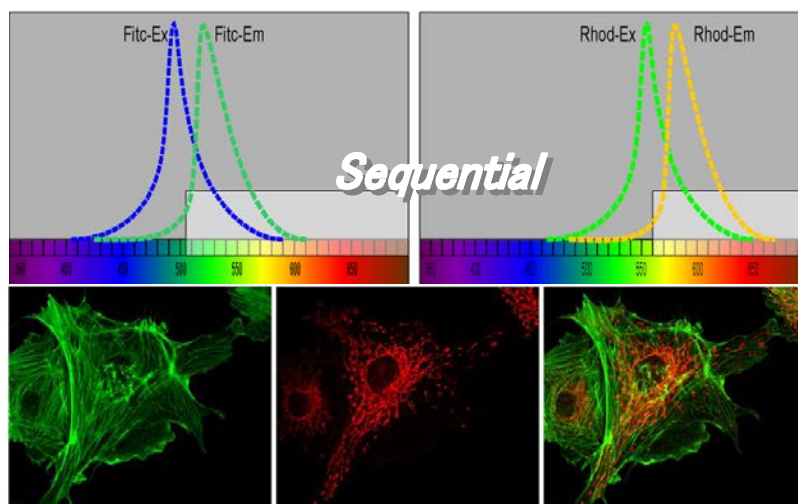
*仕様によって表記される情報は異なります。

《 2 種類の画像取得方法について 》

- 多重染色のサンプルを画像取得する際、Simultaneous (同時励起-同時検出) と Sequential (順次励起-検出) の 2 通りの画像取得方法があります。それぞれ下記のようなメリット・デメリットがありますので、目的に応じて選択することをお勧めします。

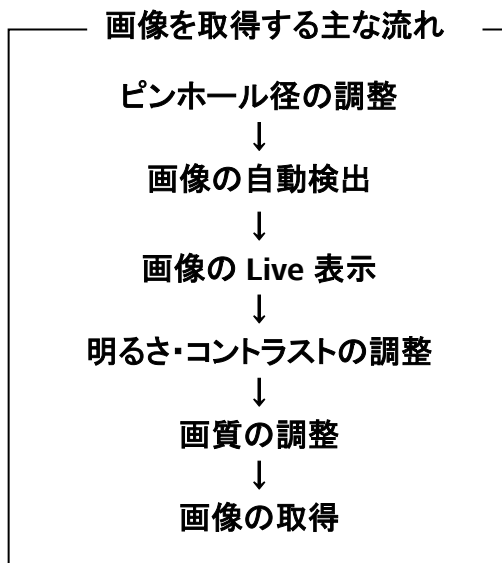


- Simultaneous では、選択した色素に対して複数のレーザ波長を同時に照射し、複数の検出器を使用して各波長帯の蛍光を検出します。そのため、画像取得速度が速いという利点があります。しかし、色素の組み合わせにより、上図のように短波長の蛍光信号が長波長側の検出帯域に漏れこんでしまうことがあります。



- Sequential では各色素に対して交互にスキャンを行い、画像の重ね合わせを行います。そのため蛍光の漏れこみを回避することができます。しかし、レーザ光の切り替えによるわずかな時間の差が生じるため、液中に浮遊しているようなサンプルを観察する場合には画素ずれ等が起こる可能性があります。

5. 画像を取得する



ピンホール径の調整

- ① 左ツールエリアの **Channels** ツールを開きます。
- ② 各 **Track** ごとに **1 AU** をクリックします。

使用している対物レンズの開口数と波長に応じて、最適なピンホール径（およそ 1 Airy Unit）に設定することができます。また、画像の光学切片厚を確認することができます。（Fig.15 下線部）

※ サンプルの状態によってはピンホール径を大きくして使用することもあります。

※ 多重染色サンプルで共局在解析を行いたい場合は、光学切片厚が揃うように各 Track のピンホール径を設定してください。

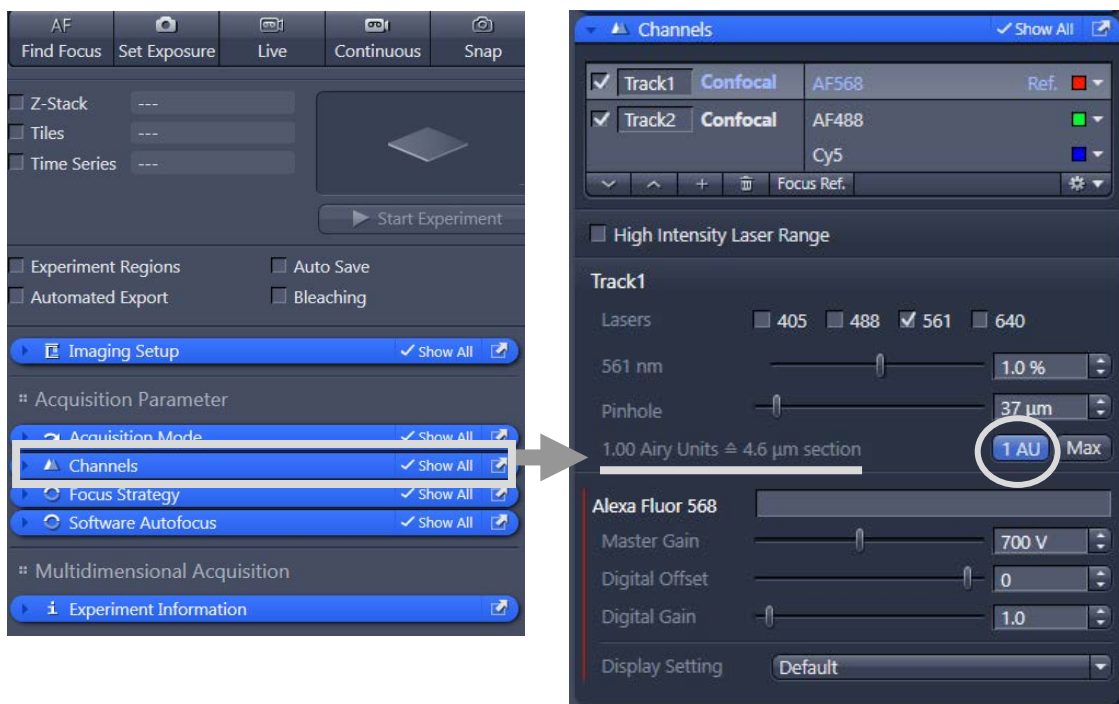


Fig.17 Channels ツール

画像の自動検出

- ③ **Set Exposure** ボタンをクリックします。

サンプルの明るさに応じて自動的に **Master Gain** と **Digital Offset** を調整します。

※ **Set Exposure** で調節された検出器のゲイン/オフセット値は、100%オペレーターの望む画像になるとは限りません。必要に応じ次ページの**明るさ・コントラストの調整**にて検出器の感度を調整し、画像の調整を行いましょう。

※ 蛍光が暗すぎる場合は正しく調整できないことがあります。フォーカスを合わせるか、レーザ強度を上げて再調整してください。

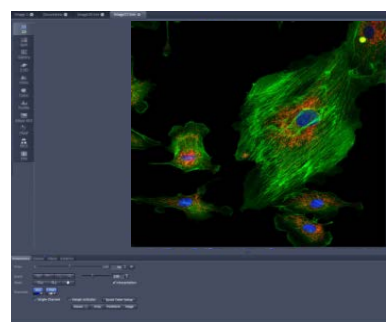
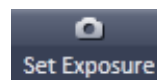


Fig.19 画像表示画面

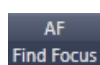
画像を Live で表示する

- ④ **Live** もしくは **Continuous** ボタンをクリックし画像を連続スキャンで表示します。

マルチカラー設定で**Live**をクリックすると、Channelsツールで選択されている(明るくハイライトされている)チャンネルのみがスキャンされます。

注) 前項までの操作で画像が上手く現れない場合、ピントがずれている可能性があります。連続スキャンしながら顕微鏡のフォーカスノブをまわすか、Ctrl+マウススクロールし、ピントの調整を行います。

画像を表示するには以下のボタンを使用します。



AF Find Focus 輝度の強いフォーカス面を探し画像を表示します。
サンプルセット後、フォーカスを自動で合わせる際に使用します。



Live 単色で一番速いスピードで連続スキャンをします。Master Gain やフォーカスなどの各種調整時に使用します。




Continuous 設定したスキャンスピードの状態で連続スキャンをします。Master Gain などの各種調整時に使用します。



Snap シングルショットのボタンです。1 画像取得したらスキャンは自動的にストップします。Averaging などの各パラメータを設定後に使用します。



Stop スキャンを止めるボタンです。
各スキャンボタンをもう一度クリックするとスキャンをストップします。
※ **Live** や **Continuous** を使用した後は褪色を防ぐためにこまめにスキャンをストップしましょう。

多重染色画像を取得した場合は、画像ウインドウ左側のビュータブ  をクリックすると、各チャンネルと Merge(重ね合わせ)画像に分割表示することができます。

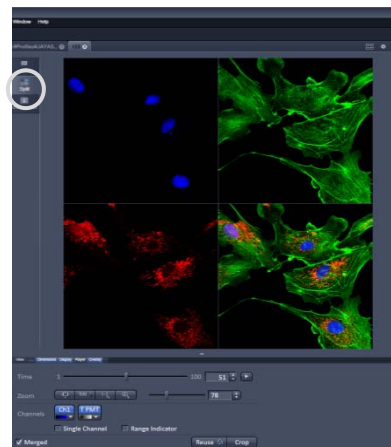


Fig.20 Split タブ - マルチカラーの分割表示

明るさ・コントラストの調整

⑤ 連続スキャンをしながら、任意の明るさになるように **Channels** ツールで調整を行います。



← Live で表示するチャンネルを選択します

LSM900 の場合、レーザ強度のレンジを決めます(全レーザ共通です)

ON: 0.2 ~ 100%

OFF: 0.01 ~ 5.0% (波長によって異なります)


Lasers : 各レーザ波長の照射強度の調整

Master Gain : 検出器の感度調整

Digital Offset : バックグラウンドレベルの調整

Digital Gain : 検出したシグナルを電氣的に増幅する機能

Fig.21 コントラスト調整画面 (LSM900 の場合)

⑥ 調整が終わったら  をクリックし、スキャンをストップして下さい。

《 参考 》

- Master Gain で検出感度を決めます。
- Digital Offset で検出感度の下限しきい値を決めます(ゼロレベル)。
- 透過像を取得する際、画像全体のムラを少なくするには、Digital Offset を 0(基準値)に設定し、下げ過ぎないようにしてください。
- できるだけ蛍光の褪色を防ぐために、こまめにスキャンをストップさせましょう。
- Lasers で各波長のスクロールバーを動かして励起レーザパワーを設定します。褪色の早いサンプルの場合は、励起レーザの%を落としてスキャンするようにします。

注) サンプルにより最適なレーザパワーは異なります。サンプル毎にテストを行い、適切な値を決めてください。(一般的には 1~5% 程度からテストすることをお薦めしています)

画像の最適化 (Range Indicator を目安に Master Gain/Digital Offset を調整する)

Range Indicator

画像ウインドウ下方のビューコントローラから **Dimensions** を開きます。

Ch 名の付いたボタン直下の擬似カラー ☐ Range Indicator にチェックを入れると、グレースケール(擬似カラー)表示と **Range Indicator** 表示を切り替えることができます。

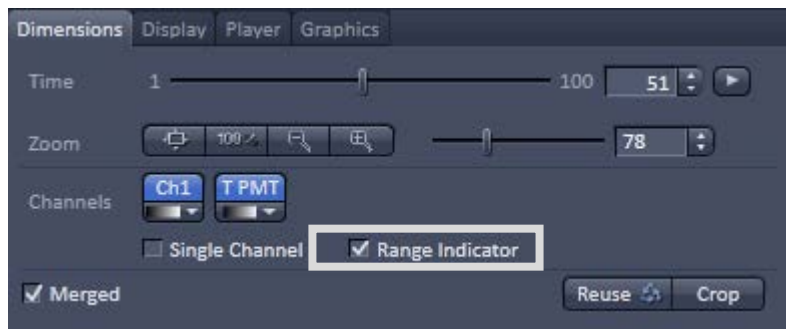



Fig.22 Dimensions コントロール画面

※  右側の▽をクリックすると擬似カラーリストが現れ、任意の擬似カラーを付けることができます。

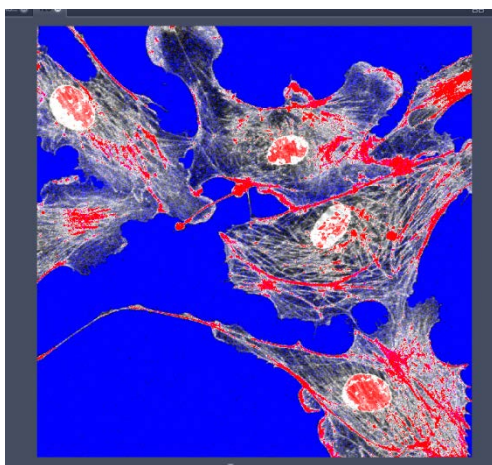


Fig.23 Range Indicator 表示

擬似カラーを **Range Indicator** 表示に変更すると、**サチュレーションしたピクセルは赤に、輝度値0のピクセルは青に、ダイナミックレンジに収まっているピクセルはグレースケール**で表示されます。

輝度解析を行いたい場合は、目的の部分がダイナミックレンジに収まるように(赤や青の表示がなくなるように) Master Gain / Digital Offset を調整します。

☆レーザー強度の調整(褪色があまり問題にならない場合)

- ・ピンホールを 1Airy に設定します (Fig.17)。
- ・Gain(Master)を高めに設定しておきます。(通常の PMT の場合 800~1000 程度) (Fig.21)
- ・この状態でサチュレーションしている場合は“Channel”ツールの中のレーザーパワー設定で使用している励起波長の%を落とします。

※ 蛍光の褪色が速い場合、レーザー強度を十分に下げ、蛍光輝度を稼ぐためにピンホールを開くなどの対策をとってください。

画質の調整

⑦ 左ツールエリアの **Acquisition Mode** ツールを開き、各種パラメータの設定を行います。

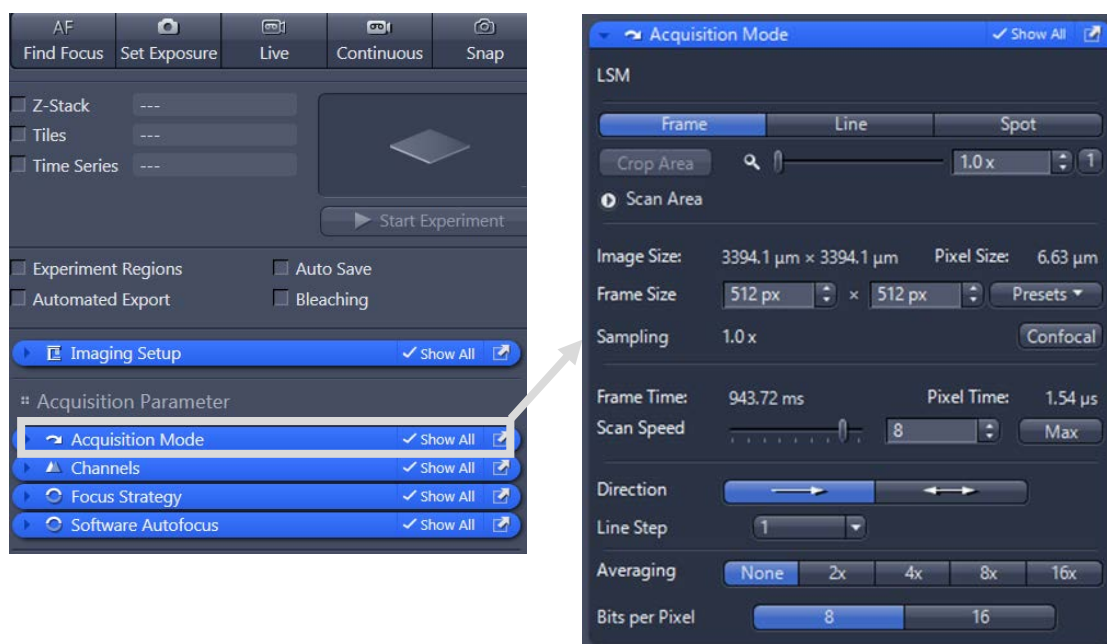


Fig.24 Acquisition Mode ツール

Scan Area(スキャンエリアの設定)

Crop Area ボタンをクリックすると、画像中にスキャンエリアを示す四角形の枠が表示されます。四隅をドラッグすることで拡大倍率を、また十字線をドラッグすることでスキャン角度を指定することができます。

また、**Show all** にチェックを入れ、**Scan Area** の ▶ を開くと、スキャンエリア設定画面が表示されますので、こちらからも指定が可能です。(Fig.25)。



Fig.25 Scan Area 設定画面

Frame Size(画素数の設定)

画像の画素数を選択することができます(初期設定では 512×512 画素です)。

Confocal ボタンをクリックすると、対物レンズの開口数及びレーザ波長より最大有効画素数が自動で設定されます。

※ 顕微鏡がマニュアル鏡基の場合は、使用している対物レンズ名を正しく選択しないと **Confocal** での画素数は正しく表示されませんのでご注意ください。

Scan Speed(スキャニングスピードの設定)

スキャニングスピードを変更することができます。**Frame Time** は一画面スキャンするのに必要な時間、**Pixel Time** は一画素あたりのレーザ照射時間を示します。



スピードが速い場合はノイズが多くなる場合があります。

- ・ スピードが遅い場合はノイズが減り **S/N** が良くなりますが、一画素あたりのレーザ照射時間が長くなるため、褪色や光毒性により注意してください。

Averaging (スキャンアベレージングの設定)

回数を指定すると、画像取得の際に**平均化**を行うことができます。



Show all にチェックを入れると、アベレージングの **Mode** と **Method** を選択できます。

Fig.26 Scan Area 設定画面

- ・ **Mode** :アベレージングを **Line** 毎に行うか **Frame** 毎に行うかの選択
- ・ **Method**:平均 (**Mean**) か積算 (**Sum**) を選択

※ 一般的には Line モードで 4 回程度の平均化 (Mean) が目安ですが、画像中のノイズの程度に応じて回数を設定してください。

※ アベレージングの回数を多くすることでノイズ成分を減らし、シグナル部分をよりクリアに表現することができます。しかし、その分サンプルに長時間レーザを照射することになりますので、褪色の速いサンプルをスキャンする場合は、回数の設定には十分注意して下さい。

Bit Depth(ダイナミックレンジの設定)

Bits per Pixel にて、**8bit** (256 階調) もしくは **16bit** (65,536 階調) から選択することができます。

画像の取得

- ⑧ 画質の調整ができれば、最後に  をクリックし画像の取り込みをします。

※ 取得した画像を再度調整する場合は、13ページの「**画像をLiveで表示する**」からやり直してください。

5. Airyscan による撮影(オプション)

5-1. Airyscan の光路設定

- 既に Airyscan の光路設定が登録されている場合は、Experiment Manager から読み出します (Fig. 10)。
-
- 新たに光路を作成する場合は、**Smart Setup** で色素を選択し、Detection mode から **Airyscan** を選択します (Fig. 13②)。Resolution, SNR, Speed の中から優先事項に沿って選択し (Fig. 27)、Best signal もしくは Smartest から取得方法を選択して OK をクリックします。

*仕様により表示される図は異なります

- **Imaging Setup** ツールで取得波長帯域を確認、変更することができます。(Fig. 28)。



Fig. 27 Smart setup (Airyscan)

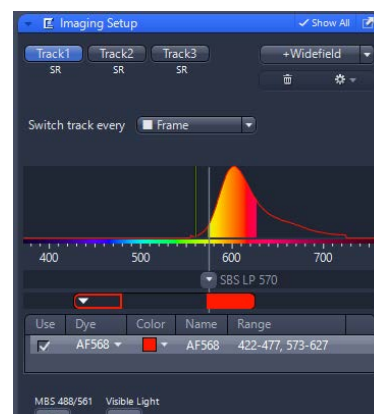


Fig. 28 Imaging Setup (Airyscan)

5-2. Airyscan mode

Airyscan では、複数のモードを使用することが可能です。Experiment Manager 内の設定、Smart setup から選択します。

【LSM980 の場合】

- SR Airyscan : 最大分解能で撮影を行える超解像モードです。
- Multiplex 4Y : Y 軸方向 4 ピクセル分を同時撮影可能な超解像モードです。
- Multiplex 8Y : Y 軸方向 8 ピクセル分を同時撮影可能な超解像モードです。
(※オプションが必要です)
- CO 8Y : Y 軸方向 8 ピクセル分を同時撮影可能なモードです。この画素数は p.16 Frame size の Confocal ボタンをクリックした際と同じです
(※オプションが必要です)

【LSM900 の場合】

- SR Airyscan : 最大分解能で撮影を行える超解像モードです。
- Multiplex 2Y : Y 軸方向 2 ピクセル分を同時撮影可能な超解像モードです。
- Multiplex 4Y : Y 軸方向 4 ピクセル分を同時撮影可能な超解像モードです
(※オプションが必要です)
- CO 2Y : Y 軸方向 2 ピクセル分を同時撮影可能なモードです。この画素数は p.16 Frame size の Confocal ボタンをクリックした際と同じです

5-3. Airyscan での画像取得

通常撮影と同様に、Channels ツールで画像の明るさを、Acquisition Mode ツールで画質を設定し、**Snap** により画像を撮影します。(Z-stack, Time Series についても同様です。)

Airyscan による**高分解能(SR)撮影の性能を最大限引き出すためには**、以下の設定について注意が必要です。

① 対物レンズ

Airyscan 撮影をする場合には、透過微分干渉像取得のための DIC スライダは、対物レンズレボルバーから外しておいてください。(推奨レンズは取り扱い説明時にご確認ください)

② Scan Zoom

LSM980 では、**Acquisition Mode** 画面の **Scan Area** の Zoom 値は **1.7 x** 以上、
LSM900 では、**1.3x** 以上に設定してください。

③ 画像の明るさ(Laser power, Gain)

Airyscan では撮影後に画像演算を行います。正しく演算を行うため、画像の輝度がサチュレートしないよう、**Live** でスキャンしながら、**Range Indicator** (14 ページ) を使って **Laser power**, **Gain** 値を設定してください。

④ Frame Size (画素数)

SR を選択してください。また Multiplex の場合には、該当のモードを選択して下さい。

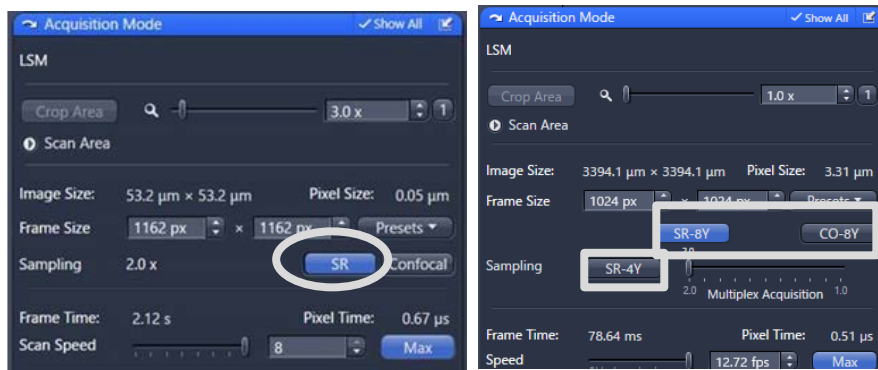


Fig. 29 Frame size と Zoom 設定

※仕様により表記は異なります。

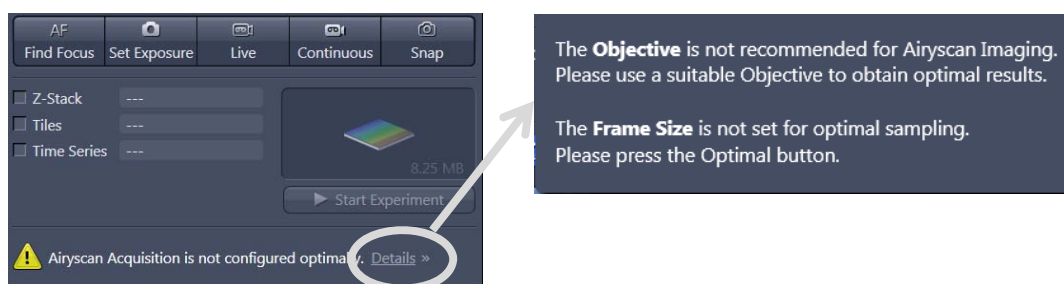


Fig. 30 Airyscan 設定の警告表示

※設定が最適でない場合、左ツールエリアに**警告が表示**されます (Fig. 30)。**Details** をクリックすると修正すべき項目が表示されますので、各ツールで設定を変更してください。警告が表示されたままでも撮影はできますが、Airyscan の性能は十分に発揮できません。

5-4. Airyscan SR image の作成

下記 2 通りの方法があります。Z スタックやタイムシリーズ画像の場合は、**Processing タブ** をご利用ください。

ビュータブ・ビューコントローラの使用

画像撮影が終了すると、Airyscan SR image が表示されます。

画像下方の Airyscan ビューコントローラで表示の ON/OFF、画像処理のパラメータを変更することができます (Fig. 31)。

※処理後の画像はダイナミックレンジが変わっているため、Display ビューコントローラにて **Min/Max** もしくは **Best Fit** をクリックして表示を最適化してください。

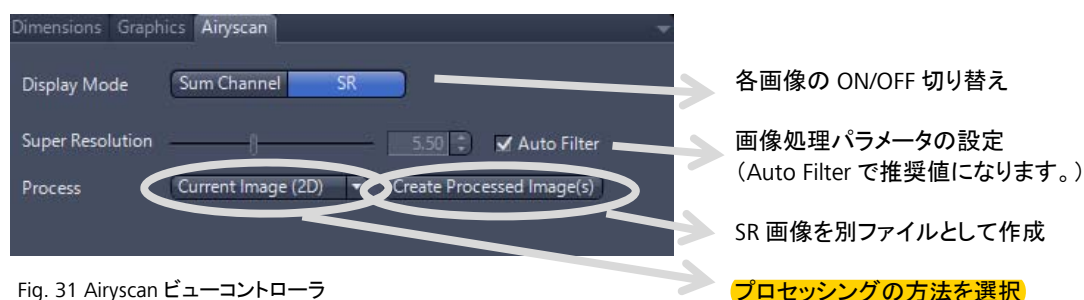


Fig. 31 Airyscan ビューコントローラ

Processing タブ

- ① Processing タブにて、Method から **Airyscan Processing** を選択します。
(Search で検索も可能です。)

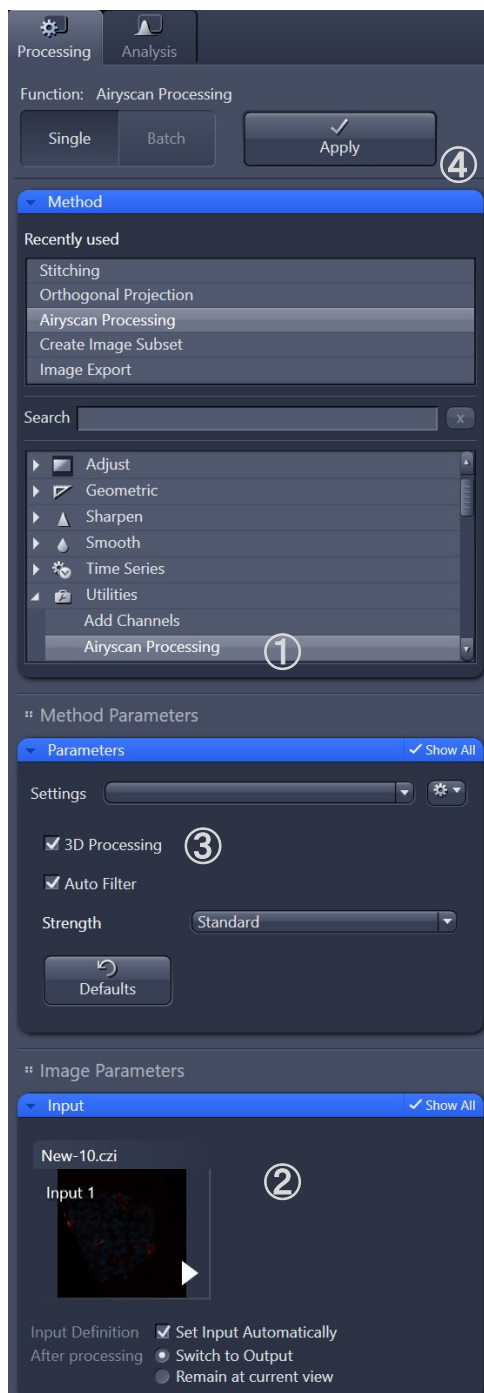


Fig. 32 Airyscan processing

- ② **Input** で画像を選択します。

- ③ Parameters ツールでパラメータを設定します。
必要に応じ、3D 画像の場合 3D processing、2D 画像の場合 2D SR processing にチェックします。
計算強度は、Auto Filter にチェックを入れ、プルダウンから Strength を Low、Standard、High から選択します。

- ④ **Apply** をクリックすると、処理後の画像が別ファイルとして作成されます

*Auto Filter で適応された Strength の数値は新しく作成されたデータの “Info” タブ内の最下段の Airyscan Mode で確認できます。

*Auto Filter のチェックを外すと Strength に任意の値を入力できます。さらに、多色データの場合、Adjust per Channel にチェックを入れるとそれぞれのチャンネル毎に Strength に任意の値を入力できます。(Fig. 32-2)

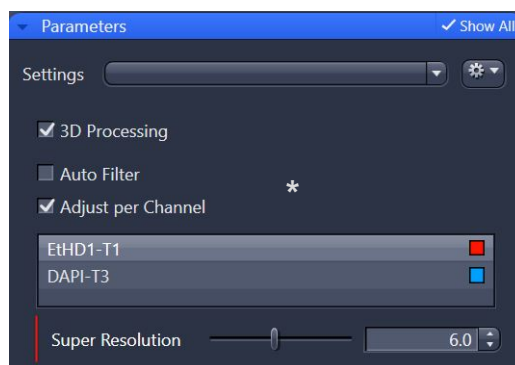


Fig. 32-2 Airyscan processing (Airyscan の strength)

6. 画像の保存と読み出し

6-1. 画像の保存

必要な画像は必ず手動で保存するようにしてください。

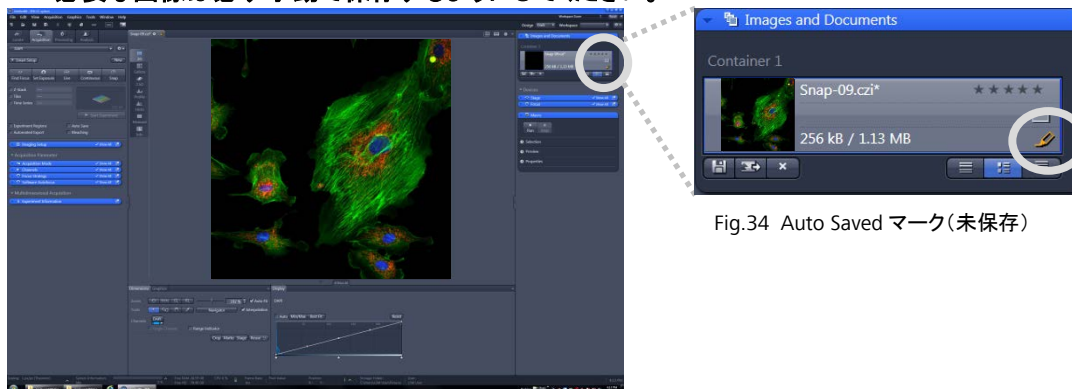


Fig.33 ZEN メインアプリケーションウィンドウ

右ツールエリアに、取得した画像がサムネイル表示されます。

Fig. 34 に示されるマークが表示されている場合は保存が完了していません。

(一時的に、My Picture\temp フォルダに保存されていますが、ソフト終了の際に消去されます。)

Fig.34 Auto Saved マーク(未保存)

画像データの保存形式について

ZEN では、画像の保存/出力について 2 つの方法があります。

1) CZI形式でオリジナルデータをハードディスクへ保存する。

長所) ・画像取得時の各情報を保持したまま保存される。

・画像取得時の撮影条件を次回撮影時に呼び出すことができる。

(Reuse機能、25ページ参照)

短所) ・他の画像処理ソフトで読み出すことはできない。

※ Carl Zeissホームページより画像閲覧ソフト'ZEN lite'を無料ダウンロードすることができます (Windows OSのみ対応)。

<http://www.zeiss.co.jp/microscopy>

2) 汎用画像フォーマットで保存する(Export)。

長所) ・様々な画像フォーマットで保存可能。

・他の画像処理ソフトで読み込みができる。

短所) ・画像取得時の情報が失われる。

上記2つの保存方法がありますが、元画像はCZI形式で保存し、必要に際して他の画像フォーマットに変換して使用することをお勧めします。

1) CZI形式(*.czi)でハードディスクへ保存する

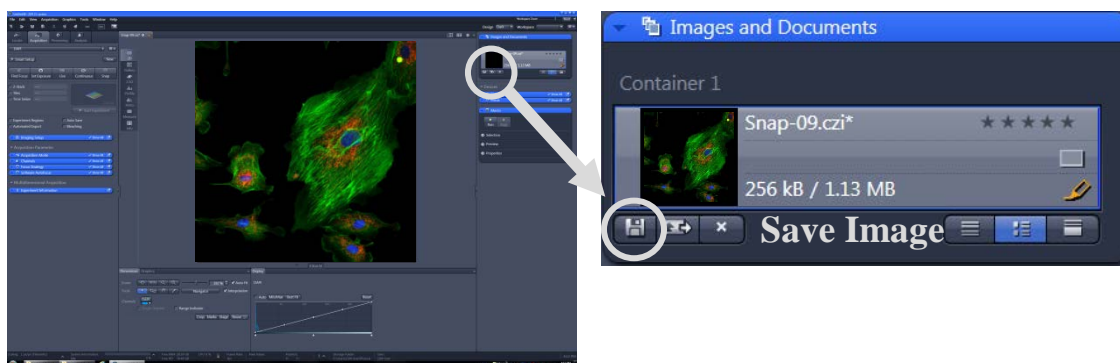



Fig.35 Save image ボタン

- ① 右ツールエリアのサムネイル表示から保存したい画像を選択します。
- ② **File – Save**(もしくは **Save as**)を選択するか、サムネイル表示中の  ボタンをクリックし、保存先を指定します (Fig. 35)。

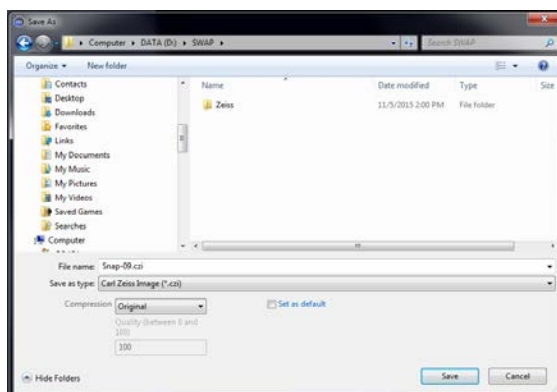


Fig.36 画像保存画面

- ③ ファイル名を入力し、**CZI 形式(*.czi)**のファイルフォーマットを選択します。
※ CZI 形式では、取得した際の諸条件を保持したまま画像を保存することが可能です。
- ④ **Save** をクリックし、画像を保存します。

注) 画像はC/Dドライブに保存することが可能です。但し、LSMが共通機器として納入されている場合、不特定多数のユーザが使用することが考えられます。その場合、コンピューターのハードディスクの管理が非常に難しくなりますので、それらを避けるためデータの一時保存などにはDドライブなど別のドライブを使用することをお勧めします。また、必ずデータのバックアップを取るようにしてください。

2) 汎用画像フォーマットで保存する(Export)

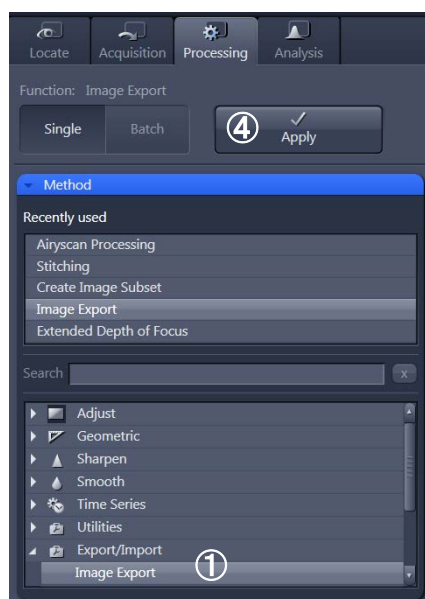


Fig.37 Processing – Image Export 画面

- ① 一般的な画像フォーマット(TIFF/JPEGなど)で画像を保存する場合は、Processingタブを開き、Method のリストから **Export/Import – Image Export** を選択します (Fig. 37)。
- ② **Input** ウィンドウでエクスポートしたいファイルを選択します (Fig. 38)。
- ③ **Parameters** ウィンドウでエクスポートの形式などを設定します (Fig. 38)。
- ④ **Apply** をクリックすると指定した場所にファイルがエクスポートされます (Fig. 37)。

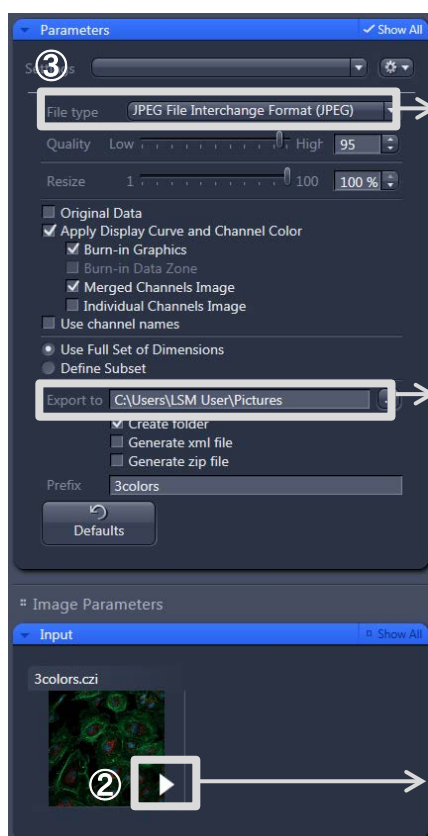


Fig.38 Export 設定画面

出力するファイル形式を選択します

Original Data : オリジナルの輝度で、グレースケールの画像を保存
Apply Display Curve and Channel Color :
 表示されている輝度・疑似カラーの画像を保存
Burn in Graphics :
 注釈(スケールバーなど)を焼き付けて保存
Merged ... : (多色の場合)重ね合わせ画像を保存
Individual ... : 各チャンネルの画像を個別に保存

出力する場所を選択します

エクスポートするファイルを選択します

6-2. 画像の読み出し

画像を開くには、**File - Open** から、もしくは下記 **New File Browser** からファイルを指定して開きます。

File Browser から画像を開く

- ① **File - Open File Browser** を選択します (Fig. 34)。

- ② センタースクリーンエリアに **File Browser** が表示され、フォルダを選択すると、その中に保存されている画像ファイルがサムネイル表示されます (Fig. 40)。

任意の画像をダブルクリックすると、画像が開きます。

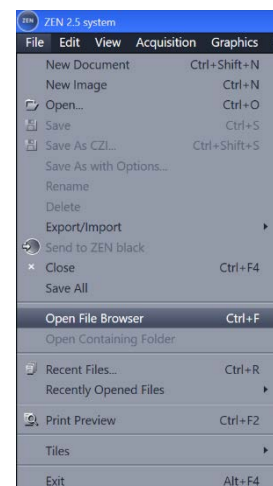


Fig.39 File Menu

HDD 上のフォルダを選択します。

フォルダ内の画像をサムネイル表示します。
Info タブから対物レンズなどの撮影条件を確認することができます。

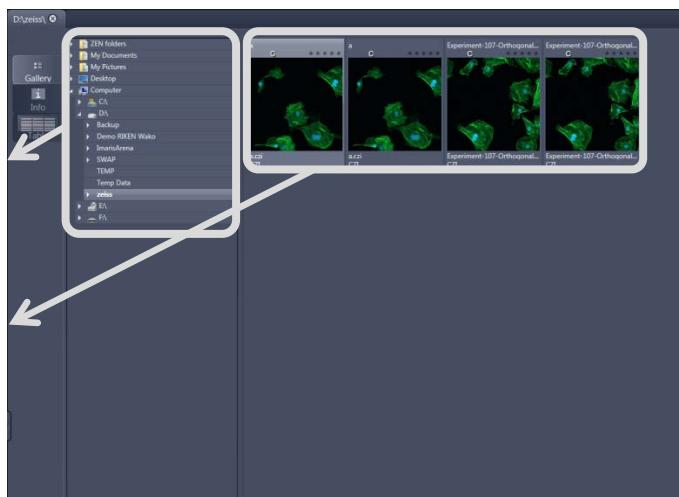


Fig.40 New File Browser 画面

Reuse 機能を使う（画像データから画像取得設定を呼び出す）

ReUse 機能を使うと、既を取得された画像の撮影条件（明るさ、画質の設定など）を現在の撮影条件として呼び出すことができます。

目的の画像を開き、**Reuse** ボタンを押すと、選択した画像の取得条件が復元します。

※ 通常、対物レンズは復元されない（自動で動かない）設定になっています。

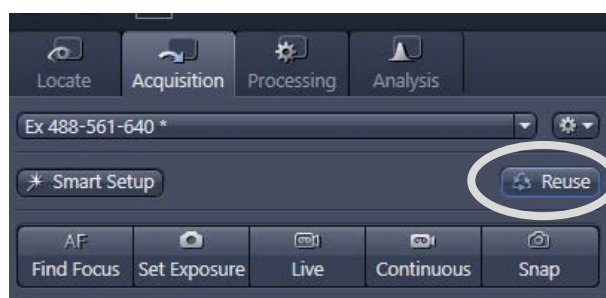


Fig.41 Reuse ボタン

7. 3D 画像の作成について

共焦点レーザ顕微鏡では、Z 軸を動かし連続的に画像を得ていくことで、試料のセクショニング像を得ることができます。セクショニング後、深さ別の擬似カラー付画像や、3D 画像の作製を行うことが可能です。

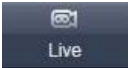
3D 画像の作製までの流れは以下のようになります。

- 1) Z-Stack モードをアクティブにする
- 2) 始点(スキャン開始面)と終点(スキャンの終了面)を決め、試料の厚みを見積もる
- 3) フォーカスインターバルと画像取得枚数を決め、スキャン(セクショニング)を行う
- 4) 取得画像を編集する

注意) 予めスキャン箇所の基礎画像(明るさ、コントラスト)の設定はしておいてください。

Z スタック画像の取得

- 1) 左ツールエリア内にある【Z-Stack】にチェックを入れ、Z-Stack ツールを表示させます。
- 2) Z-Stack ツール内の **First / Last** を選択し、フォーカス面の始点、終点を登録します。

- ①  をクリックし、連続スキャンの状態にします。

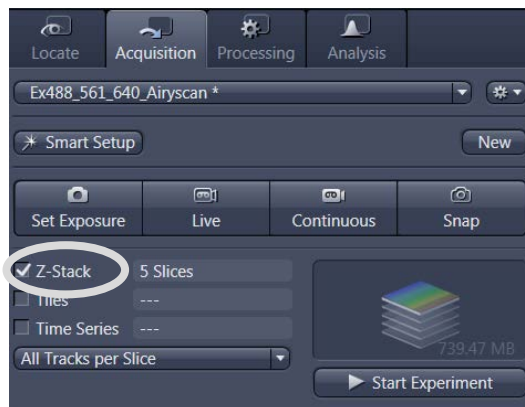


Fig.42 Application 選択画面

- ② フォーカスノブを回し、撮影したいエリアがフォーカスアウトする位置までフォーカスを下げ、**Set First** をクリックし、Z スタックのスタート面を登録します。
- ③ フォーカスノブを逆方向に回し、②と同様、撮影したいエリアがフォーカスアウトする位置までフォーカスを上げ、**Set Last** をクリックし、Z スタックの終わりの面を登録します。

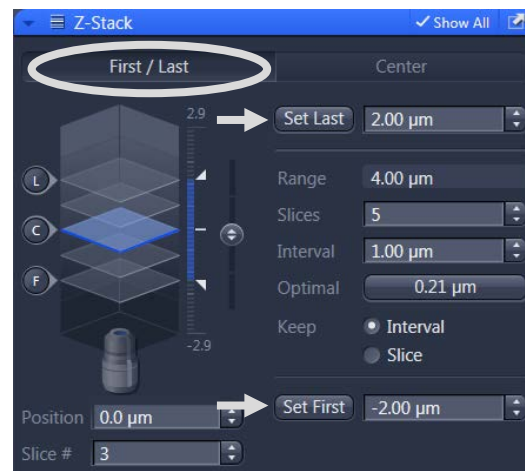


Fig.43 First / Last ボタン

- ④ スキャンを Stop  します。

- 3) インターバル(Z 方向の画像間の間隔)と枚数を決めます。

Optimal ボタンをクリックし、Z スタックのフォーカスインターバルを決定します。任意の値を **Interval** に入力することも可能です。

※ **Optimal** ボタンを押すと、フォーカスインターバルがピンホール径によって導き出された Optical Slice (光学切片厚)の半値に設定されます。

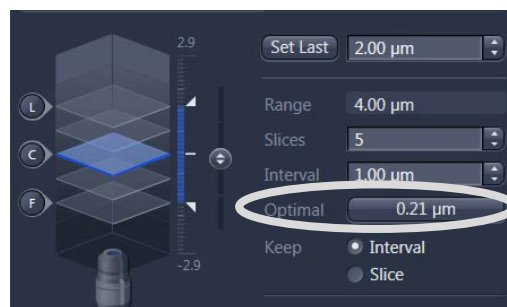


Fig.44 Optimal ボタン選択画面

- 4) **Start Experiment** をクリックし、Z スタック画像の取得を行います。

※ **Averaging** の回数や解像度を指定する場合は、スタートする前に設定してください。

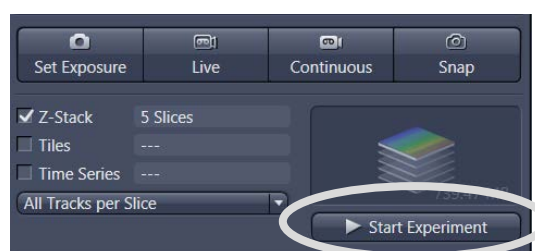


Fig.45 Application スタートボタン

Z スタック画像の表現方法と編集

スタック画像の表現方法

断面図や 3D 画像の表示については、次ページ「8. ビュータブについて」をご参照ください。

Maximum intensity projection (MIP)画像の作成

Z スタック画像を 2 次的に表現する方法のひとつに、Maximum intensity projection (最大値投影法; Z-stack の重ね合わせ)があります。

- ① **Processing** タブに切り替えます。
- ② Method から **Geometric** → **Orthogonal Projection** を選びます。
- ③ Input で目的の Z-stack 画像を選択します。
- ④ Parameters ツールで、重ね合わせ方向 (通常 **Frontal**)、計算手法 (**Maximum**)、開始点と枚数を設定します。
- ⑤ **Apply** をクリックすると、MIP 画像が新たな画像として開きます。

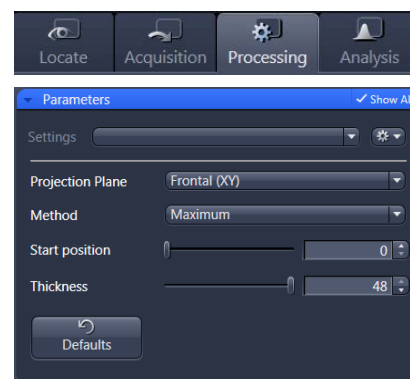
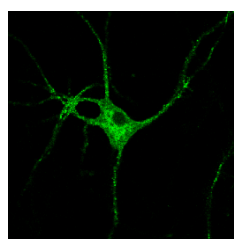
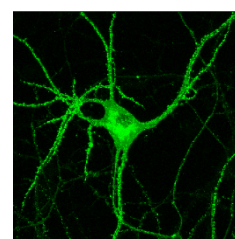


Fig.46 Orthogonal Projection



Single plane 画像



MIP 画像

8. ビュータブについて

画像を表示した際に、画像ウインドウの左側にビュータブが表示されます。

ビュータブを切り替えることにより、表示方法を変更できます。

表示されるビュータブの種類は 2D、3D、4D、 λ など、画像取り込み時の条件により異なります。

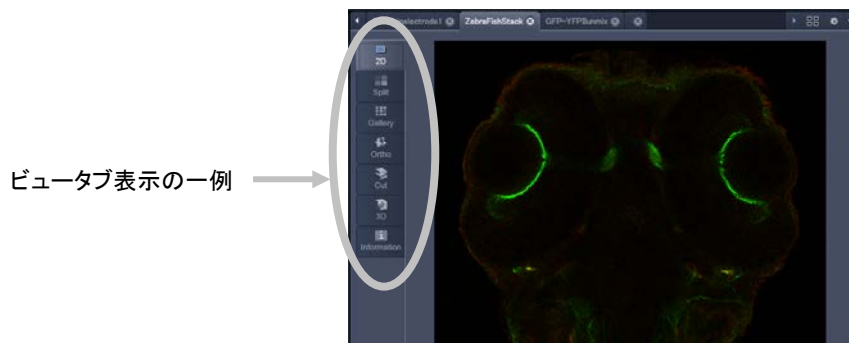
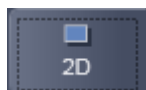


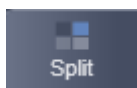
Fig.47 2D の表示 (2 重染色、Z スタック画像)

8-1. 2D



- すべての画像において標準的表示方法です。
- 指定した一枚の画像を表示します。
- 3D、Time Series、 λ Mode 画像の場合は、ビューコントローラの **Dimensions** もしくは **Player** でスタック画像の任意の 1 枚を表示することができます。

8-2. Split (多重染色画像の時に有効)



- 多重染色画像においてそれぞれのチャンネルを分けて表示する機能です。
- ビューコントローラの Dimension で Merge (重ね合わせ画像) の ON/OFF を選択可能です。

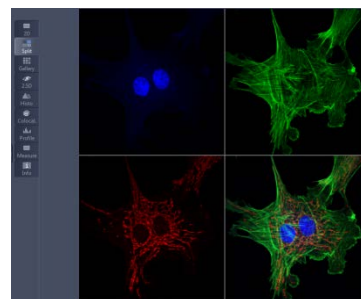


Fig.48 Split 表示

8-3. Gallery (3D、4D、 λ などのスタック画像に有効)



- スタック画像に含まれるすべての画像を並べて一括表示する機能です。
- ビューコントローラの Gallery で、Z-Stack のインターバルや Time Series の時間などが表示可能です。

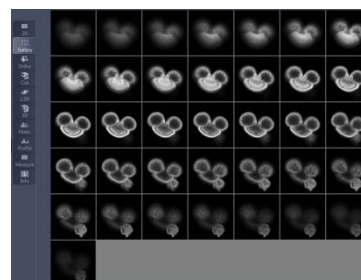


Fig.49 Gallery 表示

8-4. Ortho (Z スタック画像で有効)



- ・ Zスタックの画像における断面表示機能です。
- ・ 画面中央にある緑、赤のライン位置の断面像が、それぞれ上部/右横に表示されます。

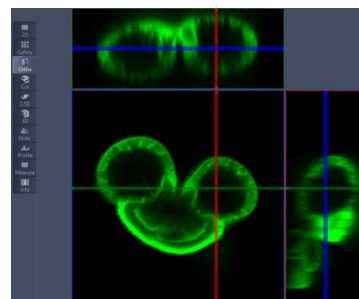


Fig.50 Ortho 画面

8-5. Cut (Z スタック画像で有効)



- ・ 自由な角度から断面を観察できます。
- ・ ビューコントローラの Cut で任意のカッティング面を指定可能です。

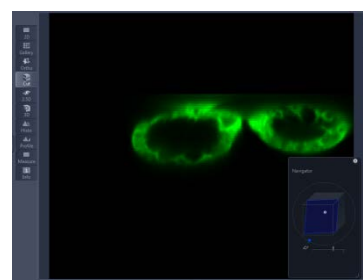
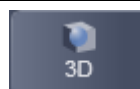


Fig.51 Cut 画面

8-6. 3D(Z スタック画像の 3 次元立体再構築像を作成)



- ・ Z-Stack で取得した画像の 3 次元立体再構築を行います。
 - ・ ビューコントローラの 3D 機能を設定することで、さまざまな立体表現を行うことが可能です。
- (回転画像の作成については「9-5. Series」をご参照ください)

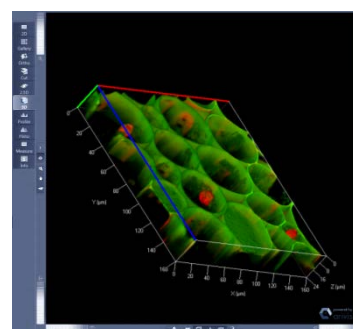
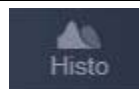


Fig.52 3D 画面

8-7. Histo (ヒストグラムの表示)



- ・ 任意の領域内の輝度情報を解析することができます。
- ・ ビューコントローラの **Histogram** 設定から関心領域を設定し、平均輝度や標準偏差を求めることができます。

※ 数値データはテキストファイルで保存可能です。

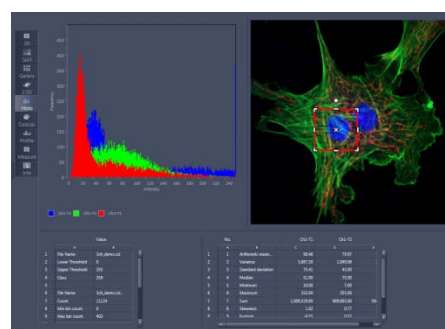


Fig.53 Histogram 解析画面

8-8. Colocal. (共局在解析画面の表示)



- ・ スキャッターグラムを使用し、蛍光2色間の共局在の解析できます。
- ・ ビューコントローラの **Coloc. Tools** 設定から任意の閾値を設定し、共局在部のみ画像化することも可能です。

※数値データはテキストファイルで保存可能です。

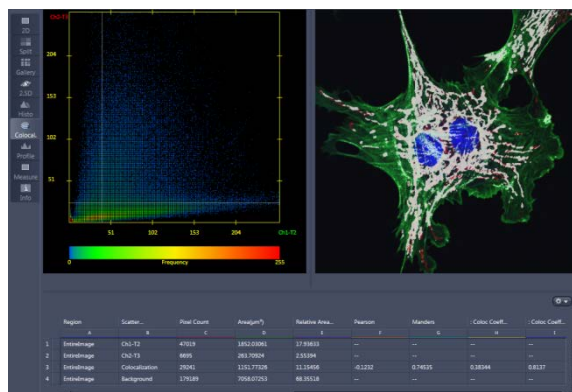
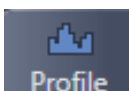


Fig.54 Co-localization 解析画面

8-9. Profile (輝度解析画面の表示)



- ・ 画像上に任意で引いた線上の輝度値を表示することができます。
- ・ ビューコントローラの **Profile Definition** から、測定したい描画の種類 (Spline など) を変更し、曲線上の輝度値を表示することも可能です。

※数値データはテキストファイルで保存可能です。

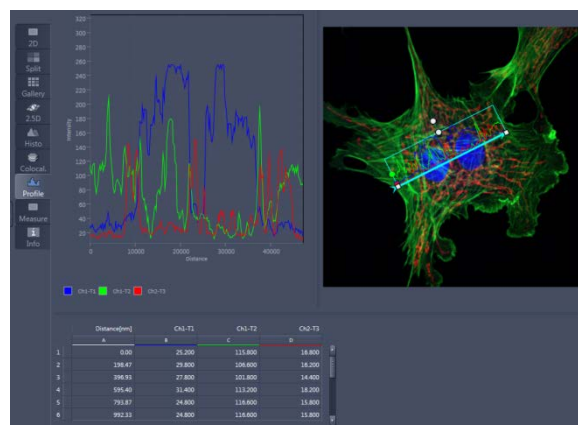
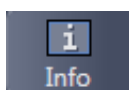


Fig.55 Profile 画面

8-10. Information



- ・ 画像取得時の装置条件などを表示します。

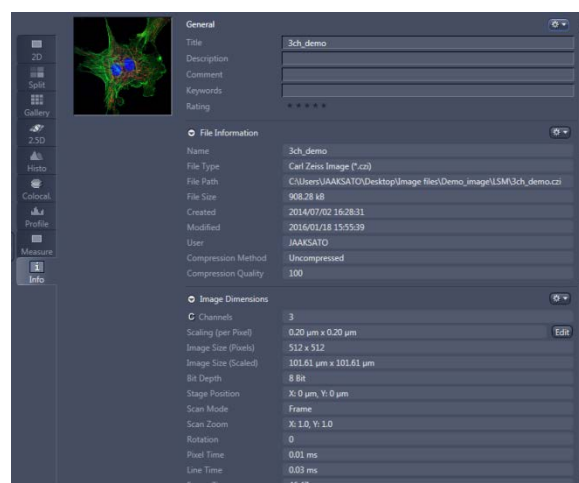


Fig.56 Information 画面

9. ビューコントローラについて

ビュータブを選択すると、対応するコントローラーが画像ウインドウ下部に表示されます。



(ビュータブに対応するコントローラーは右肩に青マーカーが入っています。上記は 3D ビュータブ。)

※ ビューコントローラの全ての機能を表示する場合、コントローラーの右側にある **Show all** を選択してください。

9-1. Dimensions

- ・ 表示している画像のズームや表示色を変更できます。
- ・ Zスタック、タイムシリーズ等のシリーズ画像については任意スライスの選択、アニメーション表示の制御が可能です。

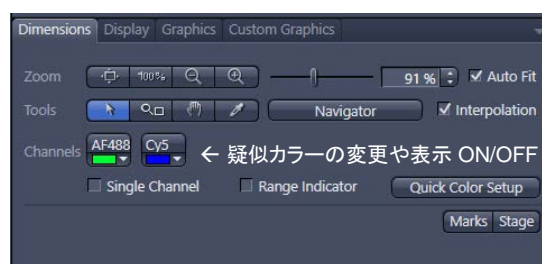


Fig.57 Dimensions 設定画面 (2ch 画像の場合)

Zoom : 虫眼鏡ツールなどを使用し、モニター上で**ディスプレイズーム**をかけることができます。

Channel(s) : 各チャンネルに対しての表示の ON/OFF、擬似カラーの変更などが行えます。

9-2. Display

- ・ 取得後の画像に対して、コントラストやブライトネス、ガンマ補正などの調整を行えます。
- ・ 各チャンネルの詳細設定が可能です。

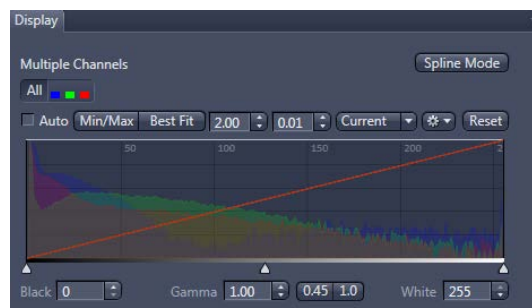


Fig.58 Display 設定画面

9-3. Player

- ・ Zスタック画像、タイムシリーズ画像のアニメーション表示を制御できます。
- ・ 動画のスピードや再生範囲、繰り返し、順送り再生などの設定が可能です。

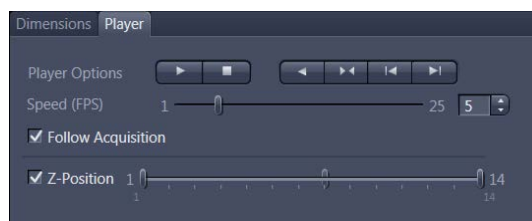


Fig.59 Player 設定画面

9-4. Graphics

- ・ 画像への描画、注釈、スケールなどの書き込みを行います。
- ・ 手動での計測(直線、曲線、周長、面積)にも対応しています。

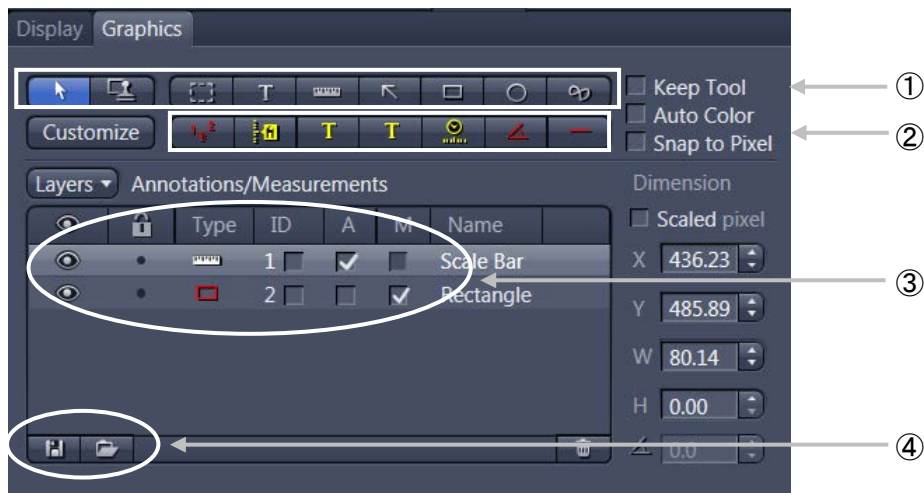





Fig.60 Graphics 設定画面

- ① 描画ツールの選択: スケールバーや矢印など代表的な図形ツールの他、パレットツールや Angle ツールなどを **Customize** ボタンから選択することができます。
- ② タイムラプスの時間表示などの注釈を入れる際に使います。
- ③  : オーバーレイ情報を隠します。
 : チェックを入れると選択した描画の計測を行うことができます。

オブジェクト名をダブルクリックすると、書式の詳細設定画面が開き、色・線幅・フォントなどを変更できます。画像上のオブジェクトを右クリックして **Format graphical element** を選択することでも詳細設定画面を開けます。



- ④ オーバーレイ情報の保存/呼び出しを行います。保存したファイルには".cz"の拡張子が付きます。また、右下の  ボタンから書き込んだ情報を消去できます。

9-5. Series

- 3D 表示画像を合成し、回転画像を作成することができます。

① ビュータブの **3D**



より 3D 表示に切り替えます。

② 表示された 3D 画像を左ドラッグし、見たい角度に動かします。

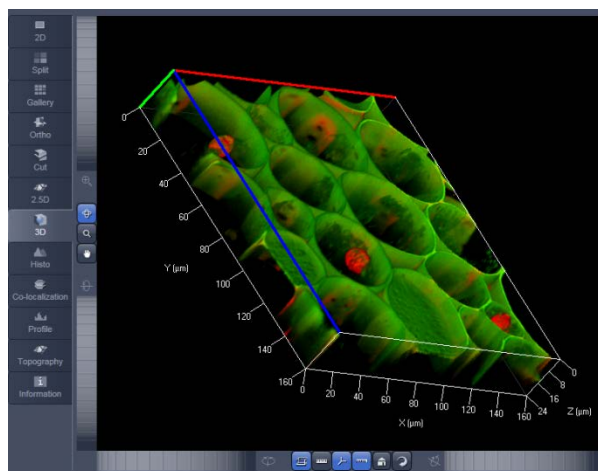


Fig.61 3D 画面

③ **Series** より回転させたい軸 (X, Y など)、回転画像の枚数、画像間の角度を設定します。

(1) 回転軸

Render series のプルダウンメニューより回転軸を選択します (X, Y など)。

(2) 回転画像の枚数

Total frames より回転画像を作成するための枚数を指定します。

(3) 画像間の角度

360 度回転する動画を作成する場合は、**360° Panorama** を選択します。部分的な回転画像を作成する場合は、**Partial Panorama** を選択し、角度を設定します。



Fig.62 回転画像 設定画面

④ **Apply** ボタンをクリックすると回転画像が作成され、新規の画像として表示されます。

⑤ ビューコントローラの **Player** から動画再生します (項目 9-3 をご参照ください)。

10. 光学顕微鏡による観察（倒立顕微鏡 Axio Observer. 7）

このシステムではレーザ顕微鏡としてだけでなく、光学顕微鏡として明視野／微分干渉／位相差／落射蛍光等の観察を行うことも可能です（使用できる検鏡法は搭載されている対物レンズ／コンデンサの仕様により異なります）。

- ・ Axio Observer. 7はレボルバー（6穴）、蛍光フィルタ（最大6個まで）、フォーカスノブ、光路切り替え、蛍光・透過光のシャッター、透過光調光スイッチが電動制御となっています。
- ・ 鏡基には各部を制御するためのボタンが付属しています。暗室内での誤動作を防ぐために、事前に確認をしておいてください（各ボタンの配置は次ページの図をご参照ください）。
- ・ また、TFTタッチパネルからも電動部分の制御を行う事ができます（次ページ参照）。



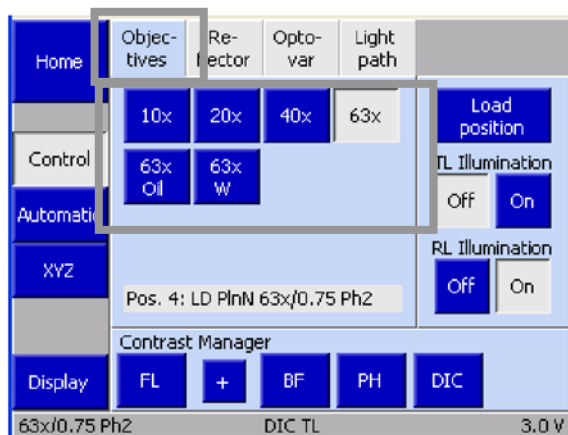
鏡筒部分を押し倒すと、ステージ上の空間が広がり試料のセットが簡便になります。
必ずスタンド（支柱の）部分に手を添えて倒してください。
また、観察時には必ず鏡筒部分を元に戻してください。

タッチパネルによる顕微鏡の操作

システムの起動後、タッチパネル画面上より**Microscope**のタブをタッチすると以下の画面が表示されます。

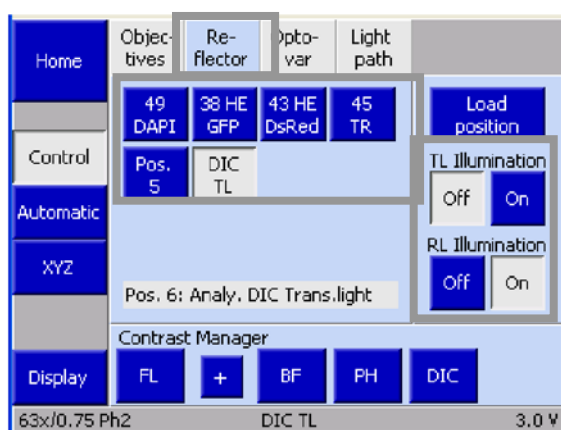
対物レンズの切り替え

- ① **Objectives** のタブをタッチします。
- ② セットしたい対物レンズの倍率を選択します。



リフレクターターレットの切り替え

- ① **Reflector** のタブをタッチします。
- ② セットしたい蛍光リフレクターを選択します（代表的な蛍光名で表示されています）。

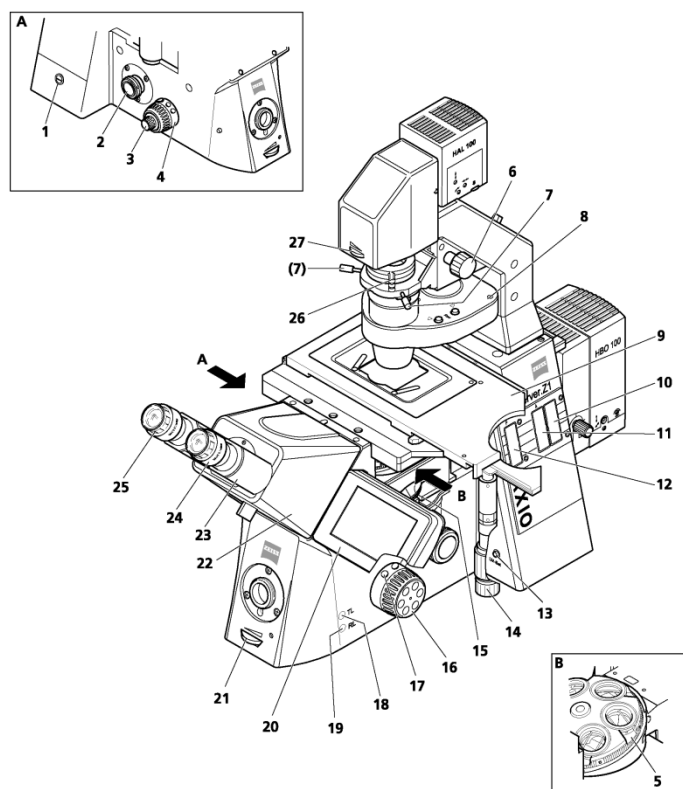


ハロゲンランプのシャッターの開閉

TL Illumination の **On**、または **Off** をタッチします。

水銀ランプのシャッターの開閉

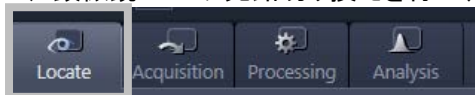
RL Illumination の **On**、または **Off** をタッチします。



- 1 メインスイッチ
- 2 光学ポート(左サイドポート) *1
- 3 フォーカシング ノブ L:粗動/微動(左側は微動ノブつき)
- 4 操作ボタン "キー リング"(左側)
- 5 対物レンズ レボルバ
- 6 コンデンサ上下動ハンドル
- 7 コンデンサ センタリングノブ(左右同位置にあります。)
- 8 コンデンサ(1.2 参照)
- 9 メカニカル ステージ *1
- 10 25mm フィルタ用スロット
- 11 反射光開口絞り/フロスト フィルタ スライド用スロット
- 12 反射光視野絞りスライド用スロット
- 13 LM set ボタン
- 14 X/Y 軸ハンドル
- 15 リフレクター ターレット
- 16 フォーカシング ノブ L:粗動/微動(右側は平坦)
- 17 操作ボタン "キー リング"(右側)
- 18 透過光 On/Off ボタン: ハロゲンランプ側シャッターの開閉を行います。2 秒以上押しつづけると、自動的に色温度を 3200 ケルビンに設定します。
- 19 反射光 On/Off ボタン: 水銀光源側シャッターの開閉を行います。
- 20 TFT タッチ パネル
- 21 輝度調整トグルスイッチ: ハロゲンランプ輝度の調節を行います。
- 22 双眼鏡筒
- 23 双眼鏡
- 24 接眼レンズ
- 25 接眼レンズ視度補正環
- 26 透過光フィルタ キャリア: 微分干渉組合せの場合は、ポラライザに変更となる場合があります。
- 27 透過光視野絞り

10-1. 明視野検鏡

1) 顕微鏡/レーザ光路切り換えを行い、光路を接眼観察モード(Locate)に切り替えます。

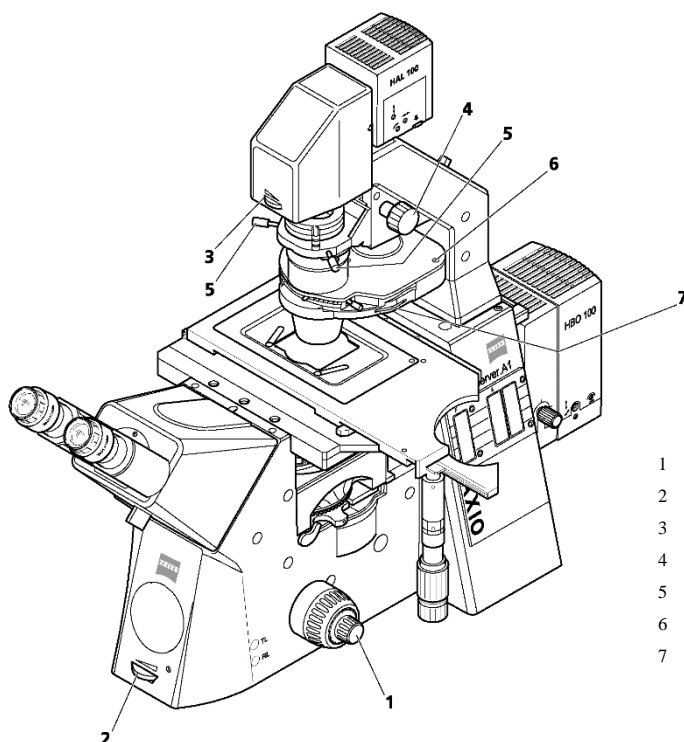


2) 鏡基のボタン もしくはTFTパネルから透過光シャッターボタン (HAL ON/OFF) を押し、透過光をONの状態にします。

3) コンデンサーターレットを動かしHのポジションにします。

4) 光量調節などを行って観察します。

注) サンプルの見えが悪いときは、ケーラー照明の調整を行って下さい。

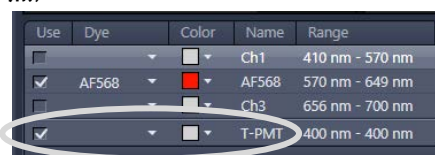


- 1 フォーカシング ノブ
- 2 輝度調整トグルスイッチ
- 3 視野絞り
- 4 コンデンサ上下動ハンドル
- 5 コンデンサ センタリング ノブ(左右同位置にあります。)
- 6 LD コンデンサ
- 7 開口絞りダイヤル

透過像と蛍光像を同時に取得するには

透過像(微分干渉像、位相差像など)と蛍光像を同時に取得するには、**Smart Setup** や **Experiment Manager** から光路設定を行った後、**Imaging Setup** ツールにて**T-PMT**もしくは**ESID Detector**にチェックを入れます。(10ページ Fig.16参照)

その後、Gainの調整を行ってください。



10-2. 透過微分干渉検鏡

無染色の標本(～200μm 程度)をガラス製プレパラート、ガラスディッシュ上で可視化できる検鏡法です。必要なコンポーネントは、ポラライザとアナライザ、コンデンサに内蔵される DIC プリズムと各対物レンズに対応した専用 DIC スライドです。

- 1) 2つの偏光板(ポラライザとアナライザ)を光路に挿入して下さい。



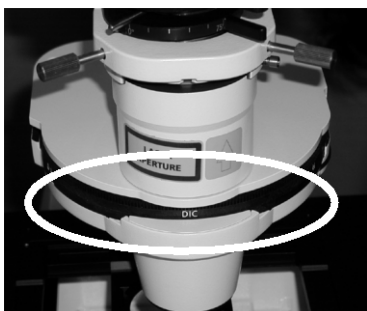
ポラライザ(写真は光路に挿入した状態)
接眼観察時には、角度を0°に合わせます。

**注) ポラライザは常に光路に入った状態
かまいません。**



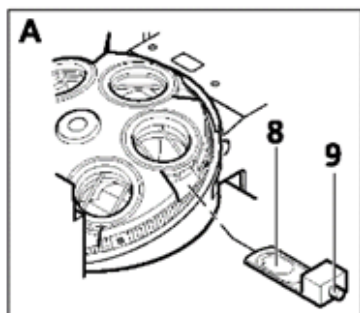
アナライザはリフレクターターレット(蛍光フィルタ
の入っているところ)に内蔵されています。
PC もしくは顕微鏡本体のボタンを操作し、光路に
挿入します(スライド仕様の場合はスライドを挿
入してください)。

- 2) 使用している対物レンズに応じて、コンデンサを**DIC II** または**DIC III** に設定して下さい。



DIC II : 対物レンズは乾燥系の 40 倍まで。
DIC III : 対物レンズは 40 倍以上の油/水浸
レンズ。

- 3) DIC像をのぞき、レンズ下部に挿入してあるDICスライドのネジを回し、DICのかかり具合、像のコントラストを最適なものに調節して下さい。



10-3. 位相差検鏡

- 1) コンデンサをPh1~3(対物レンズ表面に表記)の位置にあわせて下さい。



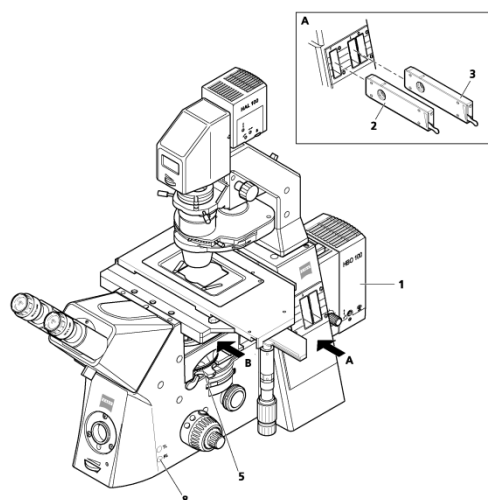
対物レンズの表記にあわせてコン
デンサの位置を合わせて下さい。

- 注1) 位相差検鏡は対応した対物レンズ(レンズ表記の文字が緑色のもの)でないと観察できませんので注意して下さい。
- 注2) 微分干渉検鏡で光路に挿入した偏光板(アナライザ)は光路から外しておいて下さい。

10-4. 落射蛍光検鏡

注) 蛍光光源となる水銀ランプの電源がONになっていることを確認してください。

- 1) シャッター開閉ボタン 8 を押して、シャッターが閉じられていることを確認します。
- 2) スライダ 2 のレバーを押し上げて、絞りを全開にします。
- 3) フィルターターレット 5 を回転させて、観察したい蛍光色素*1に合致した蛍光フィルターキューブ 4 のポジションに合わせます。
- 4) シャッター開閉ボタン 8 を押してシャッターを開き、スライダ 3 のホイールを回転させて適度に励起光を減光させて観察します。



- 1 ランプ ハウス(HBO)
- 2 反射光スライダ(Field Stop 位置)
- 3 反射光スライダ(Aperture Stop 位置)
- 4 蛍光フィルターキューブ FL P&C
- 5 フィルターターレット カセット
- 6 フィルターターレット カバー
- 7 クランプ ノブ
- 8 反射光シャッター開閉ボタン

注) 褪色防止のため蛍光のシャッターは観察が終わったらこまめに閉じるようにして下さい。

11. システムの終了(電源のOFF)

11-1. LSM980 の場合、レーザを全て OFF にします。

右ツールエリアの【Laser】ウインドウから使用するレーザを選択し、**OFF** にします。

11-2. 液浸用対物レンズのクリーニングを行い、最も低倍率のポジションに戻します。

クリーニング液の組成:n-ヘキサン 85%、イソプロパノール 15%

11-3. ZEN ソフトウェアを終了します。

File - Exit を選択、またはソフトウェア右上の **Close** ボタンをクリックします。

保存していないファイルがある場合、確認画面が表示されます。

11-4. Windows を終了します。

ZEN を終了後、モニター右下の ZEN アイコン(顕微鏡のマーク)が消えたのを確認してください(30 秒程度)。その後スタートメニューから Shut Down を選択し、終了します。
数秒後に PC の電源も自動的に OFF になります。

11-5. システムの電源を OFF にします。

【LSM980 の場合】

- ① COMPONENTS を OFF にします。
- ② Laser key switch を OFF にします。
- ③ Main Switch を OFF にします。

【LSM900 の場合】

- ① レーザのキースイッチを OFF にします。
- ② SYSTEM と COMPONENTS を OFF にします。
- ③ Main Switch (集中電源タップ) を OFF にします。

※ レーザ及び水銀ランプの再点灯は少なくとも 15 分以上時間を置いてから行ってください。

使用方法でご不明な点は

050-3537-8704

システムのトラブルは

050-3537-8783

月～金曜(祝日除く)、9:00~17:30

までお電話ください。

※専任スタッフの状況に応じて即日の対応ができない場合もございます。

※サポートの内容によってはメール等での対応になる場合もございます。

よくあるご質問

Q1：接眼観察でフォーカスをしっかり合わせているはずなのに、スキャンするとモニター上ではフォーカス位置がずれた画像がでてきます。どうしたらよいですか？

A1：試料がしっかり試料ホルダーに固定されていることを確認してください。また、接眼レンズの視度補正を行ってみてください。手順は次の通りです。

- ① 接眼観察で対象物にフォーカスを合わせた後、一度スキャンして、モニター上で画像を見ながらしっかりとフォーカスを合わせます。
- ② 再度接眼観察モードに切り替え、顕微鏡のフォーカスノブには触らず、接眼レンズの縁の目盛部分を回してピントの合う位置を探します。+側から-側に回していき、左右それぞれ調節してください。

視度は個人差があります。特に長時間観察を行う場合は、観察の最初に視度補正を行っておくと、目への負担も軽減することができます。

Q2：なんだか画像がざらざらしていて粗い感じなのですが。

A2：ざらざらした印象を与える大きな要因の一つとして、検出器のノイズがあります。検出器のゲインを高め設定すると、シグナルだけでなくノイズ成分も増加します。画質の良さを決定するのは、「**ノイズに対するシグナルの比率(S/N 比)**」です。S/N 比を上げるためには、次のような方法があります。（「4.画像を取得する - 画質の調整」も合わせてご参照ください。）

- ① アベレーシングをかける（ノイズはランダムに発生するため、スキャン回数を重ね平均することで S/N 比が向上します。）
- ② スキャン速度を遅くする（1 画素あたりのレーザー照射時間を長くすることにより、シグナルを多く回収できます。）
- ③ ピンホール径を大きくし、ゲインを下げる（ピンホール径を大きくすると、光学セクション厚は増えますが、シグナル量を増やすことができます。）
- ④ 励起レーザー強度を上げ、ゲインを下げる（励起レーザー強度を上げると、シグナル量が増えます。しかしこの場合、蛍光の褪色が起きやすくなるのでご注意ください。）

Q3：細胞内の構造を観察しています。もっと細かいところまではっきりとした蛍光画像を撮りたい。

A3：顕微鏡のパフォーマンスを生かすためには、推奨される(理想的な)条件がいくつかあります。

- ① カバーガラスは **0.17mm** (No.1S 規格: 0.15~0.18mm)の厚みのものを使用しましょう。多くの対物レンズは、このガラスの厚みと屈折率に対して設計されています。誤差の大きいものほど画質に影響します。補正環付き対物レンズをご使用の場合は、カバーガラス厚に合わせて補正環を調整してください。
- ② 開口数(NA)の大きい対物レンズを使用しましょう。一般に、乾燥系<水浸<油浸レンズの順に NA は大きくなり、より分解能が高く、明るい画像を取得することができます。
- ③ 蛍光像のみを取得したい場合は、対物レンズのレボルバーから、微分干渉用のスライダを取り外しておきましょう。
- ④ ピンホール径は、1Airy unit 付近で、シグナルが十分得られる大きさに設定しましょう。
- ⑤ 画素数を多くすると、より細かい部分まで描画することができます。Optimal ボタンを押すと、取得する面積に対し、使用している対物レンズや波長に応じて最大有効画素数でスキャンすることができます。



図 1. 微分干渉用スライダ

Q4：対物レンズの開口数とはなんですか？

A4：開口数とは、レンズの間口の広さを表す値で、試料上の一点から出た光が対物レンズに入る際に通る一番大きい角度(α)と、その間を満たす媒質の屈折率(n)との乗算により算出されます。Numerical Aperture : NA と表記されます($NA = n \cdot \sin \alpha$)。NA が大きいほど、試料からの情報(シグナル)を回収しやすくなるため、より明るく、分解能の高いレンズであると言えます。

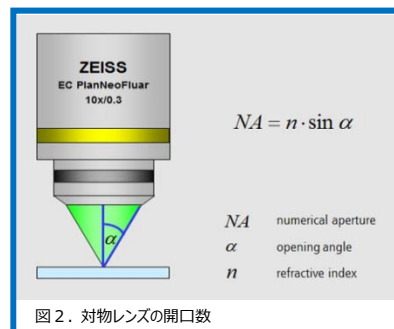


図 2. 対物レンズの開口数

Q5 : LSM では、どのくらい厚いものまで Z スタックを撮ることができるのですか？

A5 : 取得できる試料の厚みは、①対物レンズの作動距離と、②試料自体の透明度 によって限界が決まります。

作動距離とは、試料にフォーカスを合わせた時の対物レンズ先端からカバーガラス上面までの距離のことです。レンズの種類により異なりますが、一般的に油浸く水浸く乾燥系レンズの順に長い傾向があります(表 1)。

透明度が低い試料の場合、励起レーザー光が深部まで届きにくく、表層部分しか観察できない場合もあります。逆に透明度の高い試料の場合は、対物レンズの作動距離の最大値(最大数 mm)まで Z スタックを取得することが可能です。近年では試料を透明化する技術 (Scale, SeeDB, CLARITY, CUBIC など)が次々と開発され、試料の光の透過性を高めることにより、深部でのイメージングがより容易に行えるようになってきました。

対物レンズ	作動距離
Plan Neofluar 10x/0.3	5.2 mm
Plan Apochromat 20x/0.8	0.55 mm
C-Apochromat 40x/1.2 W	0.28 mm
Plan Apochromat 63x/1.4Oil	0.19 mm

表 1: 対物レンズの種類とその作動距離の例

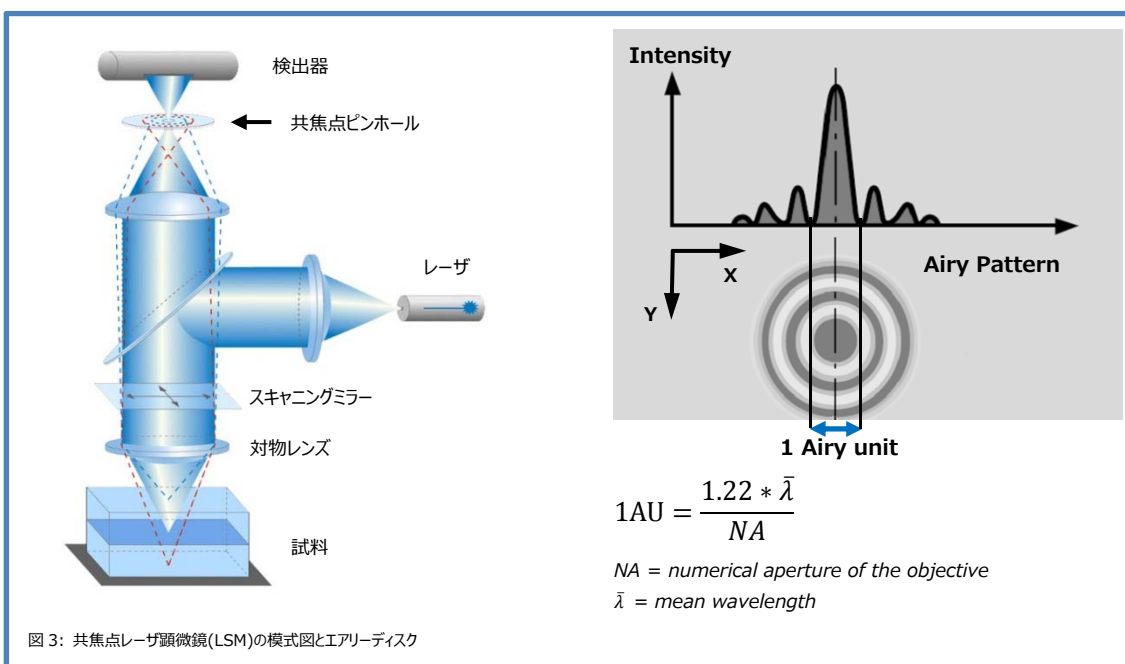
Q6 : エアリーユニットとはなんですか？

A6 : 対物レンズで光を回折限界まで絞こむと、その焦点面には、エアリーパターンと呼ばれる中心が最も明るい円(エアリーディスク)とそれを取り囲む同心円状の光の環が観察されます。この**エアリーディスクの直径(最初の暗環まで)が 1 エアリーユニット**(Airy unit : AU)と定義されています(図 3)。1AU の大きさは、対物レンズの開口径数(NA)や波長(λ)により変わり、空間分解能に直結します。そのため、LSM において AU は共焦点ピンホールの大きさを定義するための単位としても用いられています(図 4)。

また、同じく焦点面に生じた光の広がり方を XZ 方向から見ると、中心の明るい部分が光軸方向にラグビーボール状に伸びて観察されます。この 3 次元的な光の広がり方を点像分布関数(Point Spread Function: PSF)と呼びます。PSF の広がり方が、蛍光画像におけるぼけの要因になります。

Q7 : ピンホールとはなんですか？

A7 : ピンホールは LSM の最も重要なパーツのひとつで、検出器の直前に配置された絞りのことです(図 3:共焦点ピンホール)。通常、蛍光試料に対して励起光を照射すると、焦点面だけでなく、励起光の照射されている部分全てから蛍光シグナルが放出されます。ピンホールを対物レンズの焦点面と光学的に共役な位置に配置することで、焦点面外の情報が検出器に届くのをブロックすることができます。これにより、焦点面の情報のみを検出することができ、光学セクションングが可能になります。



Q8 : LSM の分解能はどのくらいなのですか？

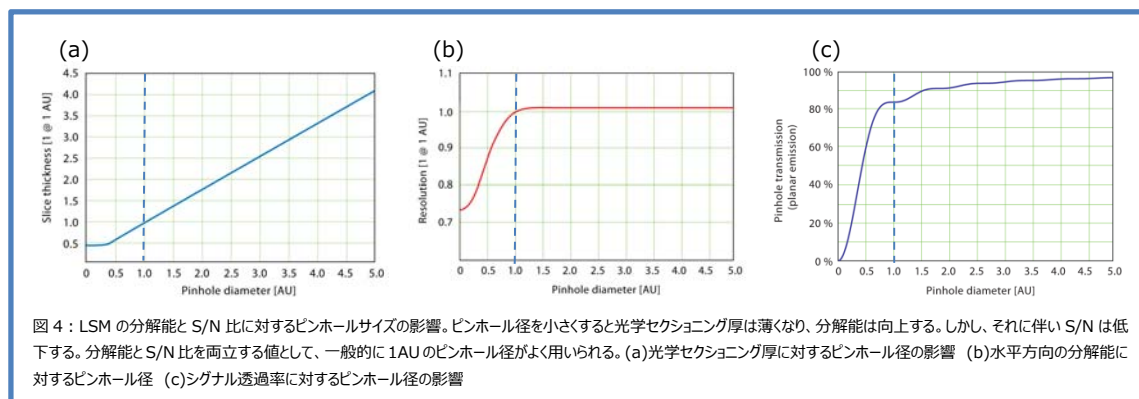
A8 : 基本的には光学顕微鏡ですので、用いる波長の半分程度が水平方向の分解能の限界といわれています。しかし、LSM には分解能を決定する要素としてピンホールがあり、条件によってはそれ以上の分解能を得ることができます。詳しくは下記をご参照ください。

共焦点レーザ顕微鏡(LSM)の分解能とピンホール

LSM で得られる画像は、励起側の PSF と検出側の PSF の畳み込みの産物ともいえます。その空間分解能は、用いる**対物レンズの開口数(NA)**、**波長(λ)**、そして**ピンホール径の大きさ**により決定されます。

理論上、LSM のもつ最大分解能は、ピンホール径を 0.25AU 未満にまで小さくした条件においてようやく達することができ、その場合、1 AU の条件と比べ約 1.4 倍高い分解能を得ることができるといわれています。しかし、ピンホール径を 1AU よりも小さくすることは、検出器に届くシグナル量の劇的な減少をも意味し、0.2AU にした際のシグナルロスは 95%にも及びます(図 4-(c))。もし検出器に届くシグナル量が減少すれば、得られる画像のクオリティもちろん低下します。多くの生体サンプルや蛍光物質は、励起光による損傷や光毒性が生じやすく、イメージングの際の十分なシグナル量(S/N 比)を保つため、医・生物学の研究分野においてピンホール径をより小さくしての使用は避けられてきました。

それに対し、1AU のピンホール径は最大分解能には達しないものの、フォーカス外のぼけ情報をカットすることで Z 軸上の分解能を良好に保つことができ、かつ全体の 80%のシグナルを回収することができる大きさです。結果として、ピンホールは分解能と S/N 比の妥協点として 1AU 程度のサイズに設定することが定石となっています。



※ 英文マニュアル巻末の「Confocal Laser Scanning Microscopy/Stefan Wilhelm 著」も合わせてご参照ください。

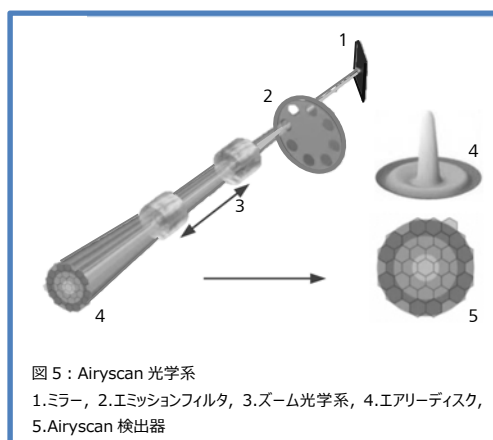
ピンホールの限界を超えた次世代コンフォーカル

2014 年に ZEISS が発表した **Airyscan** は、ピンホールを小さくした時の分解能の高さと、ピンホールを大きくした時の検出効率の高さを同時に併せ持つ、次世代の検出方式です。

Airyscan 検出器は、従来の共焦点ピンホールと単一の検出器の代わりに、ハチの巣状の高感度検出器アレイから構成されています(図 5)。従来の検出器とピンホールの関係のように、対物レンズの焦点面と光学的に共役な位置に Airyscan 検出器は配置され、その上にエアリーディスクのパターンが投影されます。

ズーム光学系により 1.25AU の情報がこのアレイ検出器に投影されると、各検出エレメントがそれぞれに小さなピンホールとして働き、0.2AU 相当の高分解能の情報を収集します。その一方で、シグナルの収率は投影された 1.25AU のピンホール径の状態を維持します。

これにより 1AU の時よりもさらに多くのシグナルを収集できるだけでなく、光軸に対する個々の検出エレメントの位置情報から、高い空間周波数のコントラストを増加させることができます。その結果、1AU で取得した LSM 画像に比べ S/N 比



を 4～8 倍も改善することができます(図 6)。また、0.2AU のピンホール径がもたらす分解能をさらに拡張するため、Airyscan はリニアデコンボリューションを用い、結果として XYZ 全方向に対して約 1.7 倍もの分解能の向上を得ることができます(最大分解能 : xy 120nm, z 350nm@488nm)。

従来の LSM で同等の S/N 比を得ようとするならば、取得スピードや分解能、もしくは感度を犠牲にしなければなりません。このことから、Airyscan が微弱なシグナルの試料や、ダメージを最小限に抑えたい生細胞試料の高解像イメージングに相性が良いと言えます。もちろん、LSM の特徴である光学セクショニング能力もまた維持され、組織深部における微細構造の解析にも威力を発揮します。

Airyscan では、スキャンした全ての位置においてピンホール面の付加的な情報を得ることにより、LSM 特有の光学セクショニング能力を保ちながら、LSM のポテンシャルを最大限に引き出した空間分解能と S/N 比の向上という、従来の LSM では両立し得なかった実質的かつ直接的な利点を得ることができます。

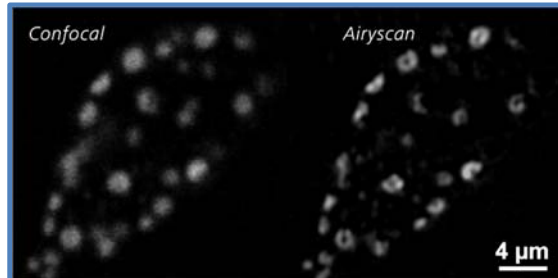


図 6 : ショウジョウバエ神経筋接合部、Bruchpilot(BRP)を染色。S/N 比が良くなければ、分解能は意味をなしません。

画像ご提供 : J. Pielage Ph.D., Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland

Q9 : GaAsP 検出器ってなんですか？

A9 : GaAsP 検出器とは、フォトマルチプライヤ(PMT)という検出器の種類の一つで、その受光面の組成にガリウム(Ga)とヒ素(As)、リン(P)を用いた、非常に高感度の検出器です。可視光域において、通常の PMT に比べ約 2 倍の感度(量子収率)を持ちます。

ZEISS では、2007 年より GaAsP 検出器をラインアップに加えており、上述の Airyscan 検出器でも採用しています。高い S/N 比の画像を低ダメージで取得できることから、近年、医学・生物学の分野において急速に普及が進んでいます。

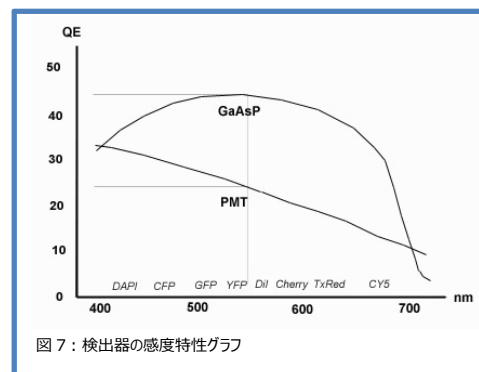


図 7 : 検出器の感度特性グラフ