

## 2光子顕微鏡を用いたインフルエンザウイルス感染マウスの気管における好中球・単球・マクロファージの相互作用の観察

自然免疫とは、生体に先天的に備わっている働きであり、体内に侵入したウイルスなどの病原体に対する最初の生体防御です。その主な機能の一つとして、数種類の白血球を感染部位に呼び寄せることが知られており、好中球や単球・マクロファージなどが協調して働き、ウイルスに対する生体の防御力を高めています。この自然免疫の仕組みをより深く解明することは、創薬治療の発展において極めて重要です。

米国ニューヨーク州ロチェスター大学にて研究を行うKim先生らは、2光子顕微鏡を使って自然免疫の仕組みを解明する研究を行っています。本アプリケーションノートでは、光子顕微鏡FVMPE-RSを用いて、インフルエンザウイルスに感染したマウスの気管内における好中球、単球、マクロファージの動態を調べ、これまで確認されていなかった好中球、単球、マクロファージの相互作用による運動パターンを3次的に可視化することができました。

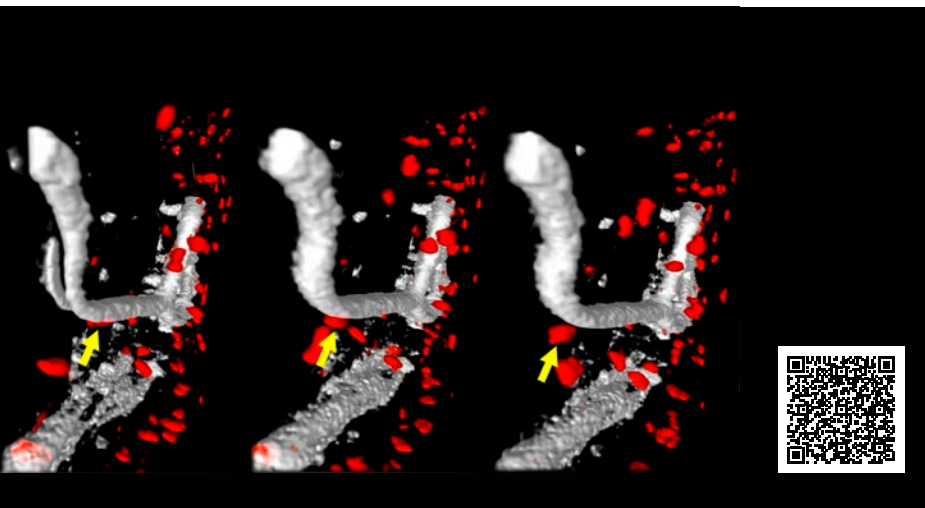


図1. インフルエンザウイルスに感染したマウスの気管における好中球の移動を示す3次元再構築画像。赤: 好中球 (tdTomato)、白: 血管 (Alexa Fluor 647) tdTomatoの蛍光は975nmで励起、575-630nmで検出。Alexa Fluor 647の蛍光は1200nmで励起、645-685nmで検出。データは文献\*より引用。左のQRコードから動画版をご覧ください。

### インフルエンザウイルス感染マウスの気管における好中球の遊走

今回の実験では、インフルエンザウイルスに感染したマウスの気管での好中球の動きを観察するため、Ly6G-Cre/ROSA-tdTomatoマウスにインフルエンザウイルスを感染させました。インフルエンザウイルス感染後3～6日のうちに一時的に好中球と単球の気管内への大量の浸潤がみられました。さらに血管を標識するために、Alexa Fluor 647で標識されたCD31抗体をイメージング前にマウスに静脈注射し、麻酔下のマウスの気管にカニューレーションした後、2光子顕微鏡を用いてイメージングを行いました。その結果tdTomato+の好中球(赤)と血管(白)の両方を観察することができ、インフルエンザウイルス感染マウスの気管では、好中球が隣接する血管の周りを遊走していることがわかりました(図1)。

## 好中球と単球・マクロファージとの相互作用の運動パターン

次に、インフルエンザに感染したマウスの気管における好中球と単球・マクロファージ両方を観察するため、Ly6G-Cre/ROSA-tdTomato/CSF1r-EGFPマウスにインフルエンザウイルスを感染させました。好中球にGFPとtdTomatoの両方(赤/オレンジ)が、単球/マクロファージにGFP(緑)のみが発現されているため、2光子顕微鏡を使用してインフルエンザ感染マウスの気管を観察したところ、GFP+/tdTomato+の好中球、GFP+の単球/マクロファージの詳細な動きを可視化することができました(図2)。これにより感染後5日目に、ほとんどの単球・マクロファージが非運動性になった一方、多くの好中球は高い運動性を維持し、常に周囲の単球・マクロファージに近接して遊走していることが確認できました。本実験のような2波長励起での多色イメージングでは、励起ビームの位置ずれによるチャンネル間の画像のずれが解析を妨げとなることがあります。FVMPE-RSはレーザーラインごとに4軸での自動アライメント機構を搭載し、自動でレーザーの入射角を最適化することで精度の高い局在解析を行うことができました。

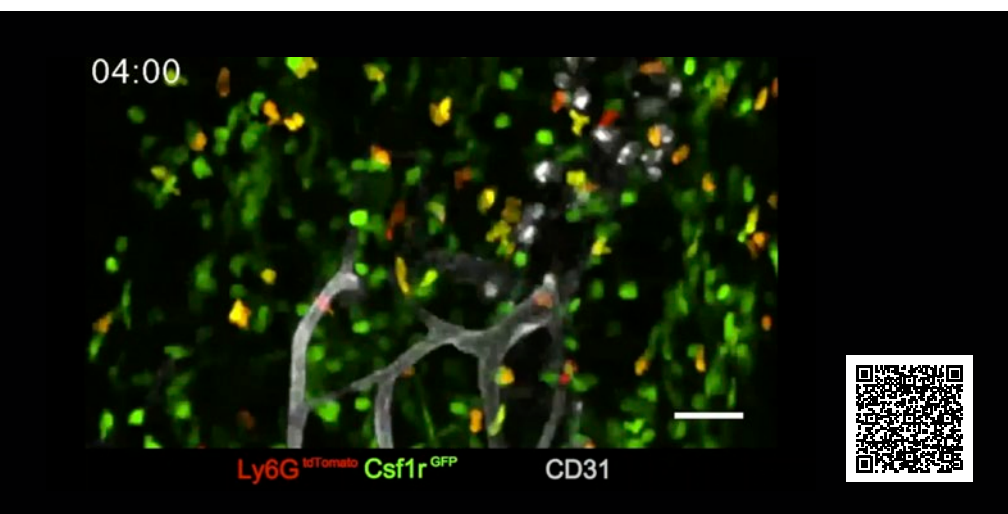


図2. インフルエンザに感染したマウスの気管内における好中球と単球・マクロファージの遊走と相互作用。赤/オレンジ:好中球 (GFP/tdTomato)、緑:単球/マクロファージ (GFP)、白:血管 (Alexa Fluor 647)。GFPとtdTomatoの蛍光はいずれも975nmで励起後、495-540nmと575-630nmで検出。Alexa Fluor 647の蛍光は1200 nmで励起し、645-685 nmで検出。スケールバー:50 $\mu$ m。データは文献\*より引用。左のQRコードから動画版をご覧ください。

さらに高倍で詳しく観察すると、好中球と単球・マクロファージ間の相互作用パターンがより詳細に明らかになりました。感染後6日目のマウス気管での単球・マクロファージ間の好中球の移動を三次元的にタイムラプス観察したところ、運動性の高い好中球(赤)が、運動性の低い単球/マクロファージ(緑)の周囲を活発に遊走している様子が確認されました。この動きにより、役目を終えた好中球が単球/マクロファージに貪食され、感染した気管から取り除かれるメカニズムが明らかになりました。

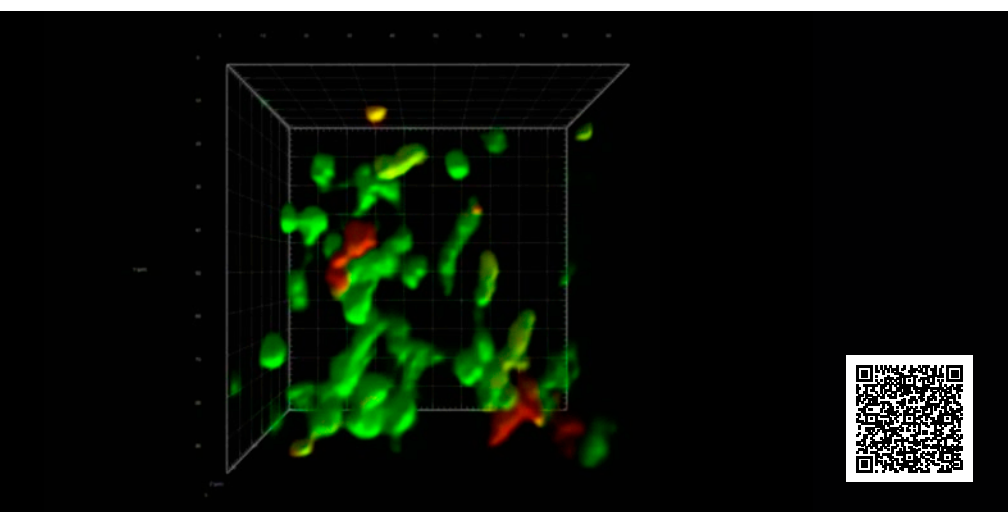
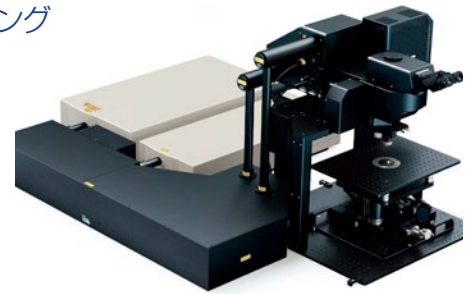


図3. インフルエンザウイルスに感染したマウスの気管における好中球と単球・マクロファージの詳細な相互作用を示す3次元再構築画像(感染後6日目)。赤:好中球 (tdTomato)、緑:単球/マクロファージ(GFP)。白:血管 (Alexa Fluor 647) GFPとtdTomatoの蛍光はいずれも975nmで励起後、495-540nmと575-630nmで検出。データは文献\*より引用。左のQRコードから動画版をご覧ください。

# 実験を可能にした多光子励起レーザー走査型顕微鏡 FVMPE-RSの技術

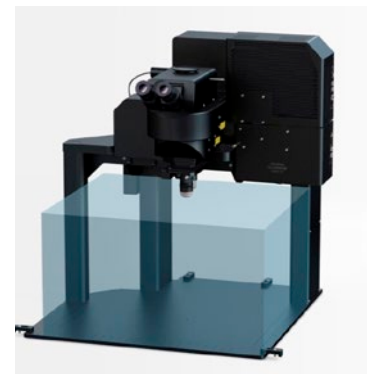
## FVMPE-RS ツインレーザーシステムによる多波長同時多光子イメージング

多光子励起に最適化されたツインレーザーシステムにより、多波長多光子励起を同時に行うことができます。レーザーの調整を繰り返すことなく、それぞれの蛍光体に対して最適な励起波長を同時に使用することができます。また、それぞれのレーザーのパワーを独立して制御することで、異なる蛍光体の輝度に最適化した画像を得ることができます。



## In Vivoイメージング用門型顕微鏡フレーム

門型フレームを採用することで、様々なサンプルに対応できる広いスペースを確保します。顕微鏡下のサンプルスペースが広く(640×520×350mm)、小動物などのin vivo生体内イメージングに最適なほか、自作の実験装置を設置した高度なin vivoイメージングにも対応できます。

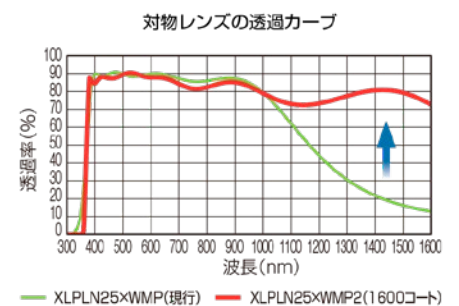


## 多光子励起専用対物レンズ XLPLN25XWMP2

多光子励起専用対物レンズは、in vivo 生体内イメージングに最適化された対物レンズです。

長波長域の透過率をさらに向上させた1600コーティングは深部でもレーザーパワーを落とさずに励起が可能です。また、短波長側も400nmまで高透過率であるため、短波長の蛍光や高調波も高効率で検出できます。

オリンパスの水浸式XLPLN25XWMP2対物レンズは、高い開口数(NA 1.05)と長い作動距離(2.0mm)、広い視野(OFN18mm)により、in vivo生体内イメージングに優れた性能を発揮します。



## Minsoo Kim先生のご紹介

Minsoo Kim先生は、Wilmot Cancer Instituteの微生物学・免疫学の学部長教授および腫瘍免疫療法研究プログラムのディレクターであり、David H. Smith Center for Vaccine Biology and Immunologyのメンバーとしてもご活躍されています。研究テーマは、自然免疫と適応免疫の反応およびがん免疫療法です。特に、生きた細胞や生きた動物モデルにおけるダイナミックな免疫反応をリアルタイムで観察・制御できる最先端のイメージング技術の開発に貢献したことで知られています。



## アプリケーションノート制作にご協力賜りました先生:

米国ニューヨーク州ロチェスター大学 微生物・免疫学部 David H. Smith Center for Vaccine Biology and Immunology  
Minsoo Kim先生、Kihong Lim先生

## 参考文献

\* Kihong Lim, Tae-hyoun Kim, Alissa Trzeciak, Andrea Amitrano, Emma Reilly, Hen Prizant, Deborah Fowell, David Topham and Minsoo Kim. In situ neutrophil efferocytosis shapes T cell immunity to influenza infection. Nature Immunology 21, 1046–1057 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0746-x>

- 当社は環境マネジメントシステムISO14001の認証取得企業です。
- 当社は品質マネジメントシステムISO9001の認証取得企業です。
- 安全にお使いいただくために:顕微鏡用照明装置には耐用年限がありますので、定期点検をお願い致します。詳細は当社HPをご覧ください。
- この機器は、EMC性能において工業環境使用を意図して設計されています。住宅環境でお使いになりますと他の装置に影響を与える可能性があります。
- このカタログに記載の社名、商品名などは各社の商標または登録商標です。
- 仕様・外観については、予告なしに変更する場合があります。あらかじめご了承ください。

[www.olympus-lifescience.com](http://www.olympus-lifescience.com)

オリンパス株式会社

〒163-0914 東京都新宿区西新宿2-3-1 新宿モノリス

OLYMPUS TECHNO LAB

TEL 03(6901)4250

(ご来場の際はあらかじめご連絡ください。)



Olympus Customer Information Center  
お客様相談センター



0120-58-0414 FAX 03(6901)4251

※携帯・PHSからもご利用になれます。

受付時間 平日8:45~17:30

お問い合わせ : [www.olympus-lifescience.com/ja/contact-us](http://www.olympus-lifescience.com/ja/contact-us)

取扱販売店名

OLYMPUS

N8602266-082021