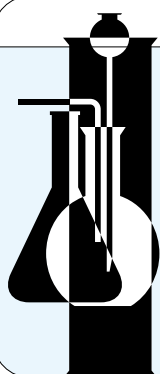


実験講座



自分でつくる広視野 2 光子顕微鏡 テクニカルノート

平 理一郎

Key words : 広視野 2 光子顕微鏡, 自作顕微鏡, 2 光子カルシウムイメージング, スキャン光学系

“Building a two-photon microscope is easy because most of the work is done by the laser itself.”
— Spencer L. Smith¹⁾

要約 広視野 2 光子顕微鏡²⁻⁵⁾による *in vivo* カルシウムイメージングは、2025 年時点で最も多くの細胞活動を記録できる計測パラダイムである。本稿では筆者の留学先である Spencer L. Smith 研究室(カリフォルニア大学サンタバーバラ校)で開発されたカスタムの広視野 2 光子顕微鏡 Diesel2p⁵⁾の組み立て方を概説する。筆者は 2020 年 4 月に帰国し、これを日本で組み上げたが、その際自分でつくらなければわからない細かいノウハウを蓄積することができた。本稿はそのテクニカルノートの一部で、実際に組み上げるときの要点をまとめている。現在、Diesel2p は世界に 20 台以上が稼働していると思われるが、この顕微鏡はシステム神経生理学実験の用途に過不足なく対応でき、安価かつ拡張性も高く、あらゆる面でよくできていると思う。その絶妙なバランスについても本稿で共有したい。また、Diesel2p を組み立てるノウハウは、一般的な 2 光子顕微鏡や、更に広い意味でカスタムの生物学用顕微鏡構築にも役立つはずであるため、幅広い読者の方に自作顕微鏡の事例として参考にしていただければ幸いである。

超短パルスレーザーがほとんどの準備を整えてくれているため、2 光子顕微鏡をつくるのは簡単である、と言われても多くの実験神経科学者は自分で 2 光子顕微鏡をつくるのは簡単ではないと思うのではないだろうか。本稿では、筆者が日本で広視野 2 光子顕微鏡 Diesel2p を組み上げる際に学んだ点を書き残したい。2 光子顕微鏡をこれか

ら自分でつくりたい方や、購入した 2 光子顕微鏡に手を加えて機能を増強したい方の役に立てば幸いである。

I. Diesel2p のスペック

まず、今回取り上げる 2 光子顕微鏡のスペックについて整理したい。目的は「できるだけ多くの神経細胞活動を一度に記録する」ことであるため、大規模カルシウムイメージングがメインである。これに加え、2 光子・1 光子光遺伝学刺激によって神経細胞集団の活動を外部から操作することをサブの目的としている。

視野に多くの神経細胞を同時に収めるため、視野は通常の 2 光子顕微鏡よりも広めの 5×5 mm 程度を想定する(図 1)。現在最も明るいカルシウム蛍光タンパク質は GCaMP8s で、これをメインの蛍光分子として用いるほか、赤色蛍光タンパク質も見えるようにする。これらは 920 nm と 1,050 nm のレーザーでそれぞれ励起可能である。

顕微鏡は、これらの波長で高い 2 光子励起光率を持ち、像面彎曲をできるだけ抑える必要がある。測定すべき蛍光波長(概ね 400-700 nm)の透過率を確保しつつ、励起光である近赤外(NIR)領域でも高い透過率が必要である。2 光子光遺伝学刺激は 920 nm または 1,050 nm でカバーでき、

Counstruction of a large field-of-view two-photon microscope

Hira Riichiro : 東京科学大学大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野 (〒 113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45)

0370-9531/06/¥500/論文/JCOPV

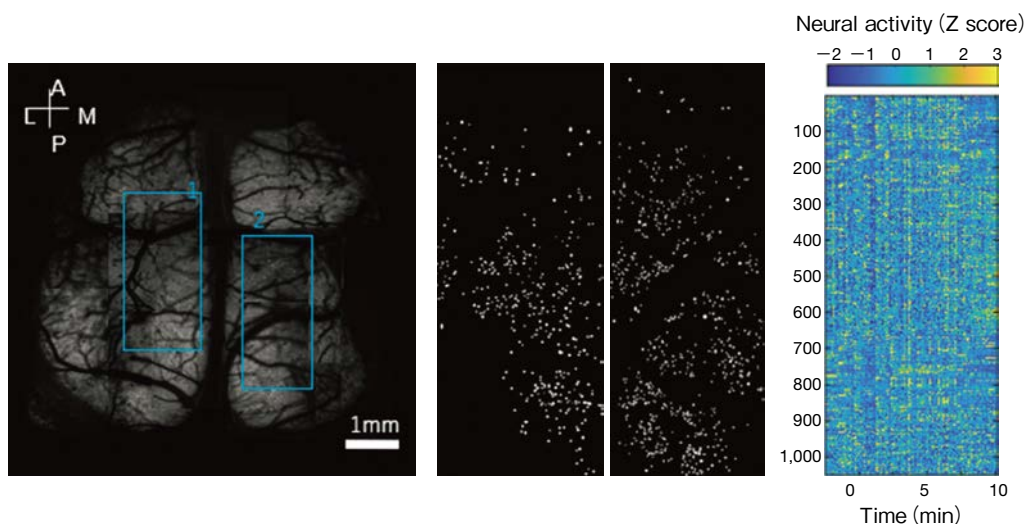


図 1 Diesel2p を用いた 2 光子カルシウムイメージングの例

6×6 mm の大きな頭蓋骨窓越しのイメージング (左)。視野には 5 万以上の細胞が記録されている。3,000 程度の細胞活動について関心領域 (region of interest; ROI) を取得し (中央)、活動の時系列を示した (右)。

1 光子光遺伝学刺激は脳深部ではそもそも高い解像度を得にくいいため、顕微鏡側のスペック要求はさほど高くない。

整理すると、5×5 mm の視野を持ち、920 nm, 1,050 nm のレーザーで 2 光子励起でき、像面彎曲が小さい、というのが主な条件で、これを満たす顕微鏡が Diesel2p なのである。筆者らはこの Diesel2p を“必要最小限のスペック”でつくることで製造コストを抑えている。いわば“モッタイナイ精神”である。この発想は、筆者の留学先のボスであり Diesel2p の開発者、そして現在もメンターである Spencer Smith 博士によるものである。彼は中古車を修理して 20 年乗るようなタイプで、実験機器の導入でも“本当に必要なスペック”を厳密に見極めて最適解を導き、実際にそのとおりの実機をつくってしまう人である。

日米問わず、お金のあるラボでは高価な物品を次々と買いそろえがちだが、Spencer 氏は潤沢な予算があっても不要に高価な買い物はしない。筆者も彼の下で、必要スペックを厳密に見積もるという考え方を身につけた。

II. 切り捨てる汎用性

話を戻すと、Diesel2p は 920 nm や 1,050 nm 付近の波長に特化しているため、1 光子イメージ

ングや、それ以外の励起光を用いた 2 光子イメージングでは性能を最大限に発揮できない。*In vivo* のシステム神経科学実験としては十分だが、多少汎用性を欠くのも事実である。

ただし、設計波長とは異なる波長でも 2 光子励起自体は可能であるため、焦点面のずれや像面彎曲の増大をうまく補正できれば、使用できないわけではない。Diesel2p の対物レンズは有効 NA (開口数) が 0.4-0.5 程度で、2 光子顕微鏡の対物レンズとしてはかなり低いほうである。しかし、脳深部をイメージングする場合は NA が多少低くても問題ないことが知られている。NA が 0.4 を下回ると、必要なレーザーエネルギーが大きくなりすぎるため、経験上 0.4 以上で使うのが妥当である。2 光子イメージングの原理的かつ本質的な拘束条件はエネルギーが組織を致命的な温度まで高めてしまわないようにすることであるため、この点は観察領域を最大限広く、そして高速に観察したいときたいへん重要になる。

Diesel2p では、レンズの面精度もそこまで高くしていない^{註1}。大口径のレンズを高精度で特注すると極端に高額になるためである。面精度が低いと、結果的に波面収差が大きくなってしまいそうだが、脳組織中では散乱が激しく、解像度が必要なときにはいずれにしろ補償光学 (adaptive

optics) を使って励起効率を高めるため⁵⁾、多少の面精度の低さは大きな問題にならない。補償光学を用いれば、レンズ精度や組織による散乱の影響を光学的に補正できるからである。

Ⅲ. レンズの製造

Zemax で設計されたレンズのスペックは既に公開されているため、その材質、焦点距離、面精度などの情報をレンズ製造メーカーに送れば、そのままつくってもらうことができる。例えば、米国の Rocky Mountain Instrument 社や日本の京セラ SOC 社は、レンズの製造からアッセンブリ、システム全体の構築、光学性能の検査まで対応可能である。

筆者は帰国後に国内企業と相談し、最終的に京セラ SOC 社にレンズ(図2)とメカ部品の製造を、シグマ光機社に偏光ビームスプリッターとダイクロイックミラーの製造を依頼した。現在は京セラ SOC 社がシステム全体を販売している。京セラ SOC 社には工場見学までさせていただき、実際のレンズ製造工程を知ることでもできた。

もっとも、レンズ系だけつくっても、スキャナーやレーザーとの接合、光電子増倍管や AD 変換ボード、ソフトウェアなどの要素がそろわなければ、顕微鏡としては動かない。そうしたトータルな構築やフォローアップを考えると、Spencer 氏の Pacific Optica 社からシステム全体を購入するのも十分合理的ではないだろうか。そのあたりはユーザーの事情次第であろう。

Ⅳ. スキャン光学系

2 光子顕微鏡はレーザーを走査する必要があるため、スキャナーが必要である。Diesel2p は視野が広く、視野内で部分的な領域をイメージングする。もちろん視野全体を一気にスキャンすることはできるが、神経生理学的に重要な領域は連続している領域とは限らないため、飛び飛びの領域それぞれを重点的に観察する必要がある。そこで、3つのスキャナーを使用する(図3)。1つはレゾ



図2 1台の Diesel2p 顕微鏡に使用されるレンズ
リレーレンズ6個、チューブレンズ1個、対物レンズ1個。右下が通常の顕微鏡で使用される対物レンズ

ナントスキャナーで、これで線分をつくる。残りの2つがガルバノスキャナーでこの線分を視野内の見たい位置に配置する役目である。実際にレーザーの入射側から順番に X 軸のレゾナントスキャナー→X 軸のガルバノミラー→Y 軸のガルバノミラーとなる。線分をつくるスピードが最終的なスキャンスピードの律速になるため、ここはできるだけスピードの速いレゾナントスキャナーを使う必要がある。また、これらのスキャナーでスキャンされたレーザーは、対物レンズの瞳を満たす必要がある。この対物レンズの瞳の直径は、Diesel2p では 33.4 mm である。スキャンレンズとチューブレンズで4倍に拡大されるため、Y ガルバノミラーにおけるビーム径は約 8 mm となる必要がある。XY ガルバノミラーの間は対称なりレーンズのため1倍である。X ガルバノミラー

注1 面精度は高くないが、公差解析を行うことでレンズの精度や配置のずれに対する全体的な光学性能の低下が最小になるよう設計されている。詳しくは Stirman らの論文³⁾に述べられている。

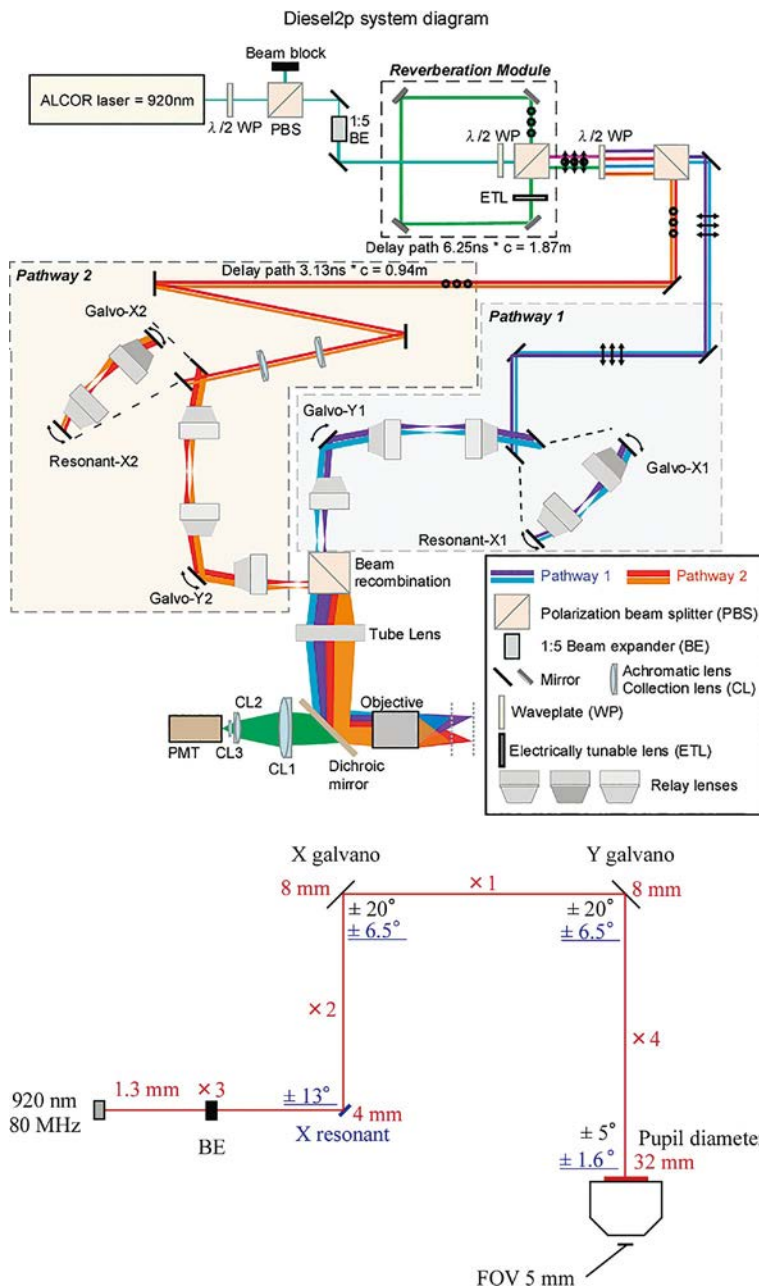


図 3 Diesel2p の光路図

(上) 現在の Diesel2p 1 号機の光路図。(下) レゾナントスキャナー、ガルバノミラー、ガルバノミラーの 3 つのスキャナーを通して対物レンズに入射するときのビーム径と振り角の変遷。直径 1.3 mm 程度のレーザーを 32 mm 程度の対物瞳を満たすことと、瞳において $\pm 5^\circ$ のスキャン角が実現するように設計されている。

とレゾナントスキャナーの間は2倍になっている。したがって、レゾナントスキャナーでのビーム径は約 4 mm である必要がある。レゾナントスキャナーはその共鳴周波数が重さに関係する。単振動の周期はばね定数 k 、質量 m として $1/2 \pi \sqrt{k/m}$ であった。これが近似的に成り立つはずであるため、質量の平方根倍だけ周波数が小さくなってし

まう。質量の制限は受光面の制限になるため結果的にレゾナントスキャナーのビーム径とその振動周波数の間にはトレードオフがある。Diesel2p が標準で使用しているのは Cambridge Technology 社の 8 kHz (CRS 8 kHz), 4 mm のレゾナントスキャナーである^{注2}。その後のガルバノミラーは Cambridge Technology 社の 8 mm のガルバノミ

ラー (6220H) である^{注3}。

このように、スキャナーと対物レンズの瞳径における要件がバランスしていることに注意が必要である。逆に、手に入るスキャナーのスピードと径、そして次に議論する振り角が、この設計を導いているとも言える。これらのミラーを適切に配置することによって、対物レンズ直上のダイクロイックミラーを外したときにその後方に約 32 mm のレーザーを視認することができる (図 4)。これが真つすぐ平行に出ていれば、スキャナーとレンズ系が機能していることが確認できる。

さて、その振り角についてだが、Diesel2p は 5 mm 以上の視野直径を想定している。Diesel2p の対物レンズの焦点距離は 30 mm である。一般に、 $2 \times \text{対物レンズの焦点距離} \times \text{振り角} = \text{視野直径}$ であるため、視野直径が 5 mm 以上という条件は、 $30 \text{ mm} \times 2 \tan \theta \geq 5 \text{ mm}$ となる。ここで θ は瞳に入射するレーザー光の角度である。これを解くと、 $\tan \theta \geq 0.083$ 、つまり、 $\tan (5^\circ) = 0.875$ であるため、対物レンズの瞳に対し約 5° の振り角が必要ということになる。前述のように、最も対物側の Y ガルバノミラーからスキャンレンズとチューブレンズを介して瞳まできたとき、4 倍のレーザー径になるため、逆にそこでのスキャン角は瞳では 4 分の 1 になる。したがって、Y ガルバノミラーでのスキャン角 (optical) は $\pm 20^\circ$ 必要である。Cambridge Technology 社のガルバノミラー (6220H) はちょうど $\pm 20^\circ$ のスキャン角 (光学角) を有している。2つのガルバノミラーは対称なりレーンズでリレーするため 1 倍、ガルバノミラーのレゾナントはビーム径が 2 倍であるため振り角は 2 分の 1 となり、単純に言えばレゾナントスキャナーの振り角は $\pm 40^\circ$ (光学角) 必要ということになる。しかし、CRS 8 kHz のそれは $\pm 13^\circ$ であるため 3 倍程度足りない。このため、Diesel2p において、このレゾナントスキャナーで

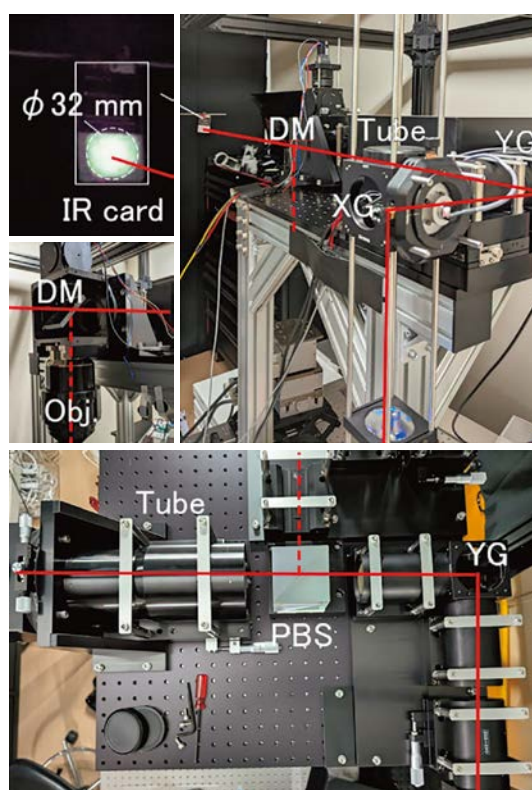


図 4 Diesel2p の組み立て

組み立てがうまくいくと、ダイクロイックミラーを外したときの後方の任意の地点で 32 mm の円形のレーザーが IR カードで確認できる。赤色実線はレーザーの軌道を示す。DM: ダイクロイックミラー, Obj: 対物レンズ, Tube: チューブレンズ, YG: Y 軸のガルバノミラー, XG: X 軸のガルバノミラー, PBS: 偏光ビームスプリッター

は視野の左右を一度にスキャンすることができないということになる。筆者らの実験では、Diesel2p のすべての視野をスキャンするためには、3つか4つの長方形をつくることになる。

対物レンズの瞳面と、それに共役な 3つの面、すなわち入射側からレゾナントスキャナー、X ガルバノミラー、Y ガルバノミラーの合計 4つの面の間に配置される 3つの光学系はそれぞれの像を拡大縮小するが、像の大きさと振り角の角度は反

注 2 Cambridge Technology 社 (Novanta 社が買収) のレゾナントスキャナーについては新型コロナウイルスの影響で手に入りにくい状況が続いていたが、現在は比較的納期が短くなっている。ただし、円安の影響もあり価格は高騰している。レゾナントスキャナーについては引き続き Novanta 社製のものが使用できるが、Thorlabs 社のものが近々購入可能になるという噂がある。

注 3 ほかに Thorlabs 社の QS7X-AG か ScannerMax 社の Saturn 9B などがある。受光面の直径が 8 mm、 40° の振り角で、response time が十分早いものを選定する必要があるが、それに近い性能であれば実際上ほとんど問題ない。

比例することになる。したがって、例えば瞳を満たすためにビーム径を大きくしようとするとスキャナーの振り角の制限に引っかかることになる。逆にスキャナーの振り角の制限が大きい場合には、視野全体をスキャンすることができない。振り角が大きなスキャナーを使用できたとしても、レンズの端での収差は大きくなるためにレンズの枚数が多くなり、高い面精度が必要となることも問題となる。現実的な解決策はこれをバランスすることである。Diesel2p のスキャナーの選定は、対物レンズの瞳を満たすことと、ガルバノミラーによって視野直径 5 mm 以上を実現すること、一度に部分的な視野であっても高速なスキャンができること、振り角が大きすぎないこと、という条件に対しバランスよく適合された結果になっている。

V. コレクション光学系と光電子増倍管

Diesel2p では、コレクション光学系と光電子増倍管が対物レンズの直上に置かれている。対物レンズは可視光の透過率を上げているものの、前述のように 920 nm と 1,050 nm 付近の励起光にのみ最適化された結像性能を持つ。このため、可視光である蛍光が対物レンズを通して綺麗な像を結ぶことはないはずである。それはもちろん 1 点ずつ走査することによって最終的に画像を得る 2 光子顕微鏡の場合、全く問題にはならない。コレクション光学系は、光電子増倍管の受光面が対物レンズ下の視野の任意の点からきた光を効率的に受け入れるように設計されていれば十分である。このため、Diesel2p のコレクション光学系は市販のレンズの組み合わせとなっており、ここに高価な特注レンズを使用していない。光電子増倍管は標準的な GaAsP (H10770PA-40) であり、受光面の直径は 5 mm である。この 5 mm の円状に Diesel2p の焦点の中心から 3.5 mm のところから発せられた蛍光の多くが入るように設計してある。

光電子増倍管のアンプは浜松ホトニクス社の高速な C5594 (1.5 GHz) と、ゲイン調整ができる

Edmund Optics 社の低ノイズアンプ (#59-178) を用途に応じて使っているが、Edmund Optics 社のものが使い勝手が良い印象がある。

本稿では論じないが筆者らはビームの多重化によって 4 視野を同時に観察する系を構築している^{注4}。この際、蛍光シグナルを高速にサンプリングすることが必要になり、高速アンプ (浜松ホトニクス社 C5594 など) を必要とする場合がある。

光電子増倍管のシグナルは前述のようにアンプを通したのち、AD コンバーターに入る。筆者らは AD コンバーターとして AlazarTech 社の ATS460 または ATS9146 (いずれも 14 bit, 2 ch, 125 MS/s) を用いている。5 M または 10 MS/s 程度で使用する。ソフトウェア開発キットを購入することができるため、LabVIEW ソフトウェア (National Instruments 社) からの制御が簡単になる。

VI. レーザー

レーザーは従来のようなチタンサファイヤレーザーでもよいが、Diesel2p はそもそも使用する波長を限定しているため、波長可変である必要はない。筆者らは波長固定のファイバーレーザー、ALCOR 920-2 と ALCOR 1040-2 を使用している。これらはチタンサファイヤレーザーよりも安価で性能が劣化しにくいとされている (図 5)。

ALCOR はビーム径約 1.2 mm の直線偏光のパルスレーザー (80 MHz) を出力する。このレーザーパワーを制御するために、偏光ビームスプリッターと半波長板を組み合わせる。半波長板を回転させることで偏光の向きを回転させ、偏光ビームスプリッターに通すことで、任意の割合のレーザーを透過または反射することになる。パワーが調整されたレーザーを×3 または×5 のビームエキスパンダーに入射することによって、3.6 mm または 6 mm のビーム径とする。3.6 mm の場合はスキャナーの節で議論したように実行的な NA が 0.4 程度となるが、6 mm の場合はより瞳を満たすため実行的な NA は更に高くなる。

注 4 ビームの多重化を行う場合は、FPGA (field programmable gate array) で処理しながら行うため National Instruments 社の PXIe-5774 を使用している。これは日本で独自に開発したものであり、いずれ論文がオープンになる予定である。

レーザーパワーに余裕がある場合は×5のビームエクspanderを利用する。

VII. 制 御

顕微鏡システム全体の制御は、すべて National Instruments 社の LabVIEW を用いて書いている。自律的に振動し、外部から位相をコントロールすることができないレゾナントスキャナーの出力 TTL を同期信号とすることによってシステム全体を駆動する。レゾナントスキャナーが左端から右端までレーザーを走査し、線分を1本つくるタイミングで、Y方向のガルバノミラーを縦の1ピクセル分動かす。これをレゾナントスキャナーによる線分が構成されるたびに繰り返し、下端までスキャンしたら上端に戻る。これで1枚の長方形フレームをつくることができる。複数の長方形を構成するときは、このタイミングでXとYのガルバノミラーを動かし、次の長方形をつくるスタート地点に向かう。

光電子増倍管信号のデジタル化においては、5 M または 10 MHz で記録すると書いた。レゾナントスキャナーは共鳴しているだけであるため、その角度の時間変化は三角関数になる。均一の時間幅で記録しているため、視野中央付近は1サンプルにより長い線分を励起し、逆に視野の左右の端点付近では1サンプルに短い線分の励起に対する蛍光を記録することになる。したがって、これを逆算して空間的に均一な画像に戻す必要がある。筆者らのソフトウェアは、これをリアルタイムに行ったうえで左向きと右向きのスキャンタイミングのずれも補正し、画像として可視化している。

レゾナントスキャナーは左右の端点で一瞬だけ測度がゼロになる。この付近ではレーザーパルスの密度は高くなるが、蛍光の空間的な像を得ることはできない。つまり、脳を局所的に熱するだけで無駄なレーザー光となる。音響光学変調器(AOM)を使って高速にパワーをON-OFFできると、このレゾナントスキャナーの左右の端付近のみでパワーをOFFすることができる。筆者らは純粋に経済的な理由によりそのようなことをしていないが(ALCORでもオプションで100万円

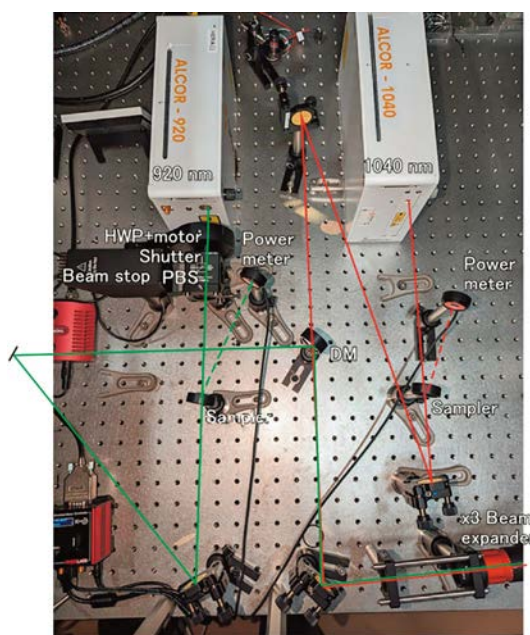


図 5 920 nm と 1,040 nm の ALCOR レーザー用のテールオブティクス

920 は AOM を内蔵していないため半波長板と偏光ビームスプリッターでパワーを調整している。いずれもサンプルで数%のレーザーを反射させパワーを確認している。ダイクロイックミラーでマージ後、×3のビームエクspanderを通してから Diesel2p に入射する。DM: ダイクロイックミラー, HWP: 半波長板, PBS: 偏光ビームスプリッター

程度である)、一般的に AOM 制御は有効であるとされている。

Diesel2p は2つの光路があり、それぞれを独立に制御する。つまり、2つのレゾナントスキャナーがあるため、それぞれを完全に別に扱う必要がある。第一光路では、そのレゾナントスキャナーでトリガーして第一光路のガルバノミラー2つとそこを通ったレーザーによって励起した蛍光を記録する。第二光路でも同じである。これによって、例えば G-CaMP と R-CaMP の同時イメージング、または、G-CaMP を2つの光路を使って領域イメージングを行うことが可能である。後者の場合は、1つのパルスレーザーを多重化して使用する。これには偏光ビームスプリッターで分離したあと、片方のレーザーに1.8 m 程度の光路差を与えればよいだけである。

VIII. 一次解析

筆者らは光電子増倍管の信号をバイナリデータで保存しており、オフラインで画像に戻し、サイン補正をしてから画像のゆがみを補正している。その後関心領域 (region of interest ; ROI) を自動で取得し、ROI の周辺輝度を引き、ハイパスフィルターをかける。ここからは解析する用途にもよるが、デコンボリューション、ガウシアンフィルター、ウィナーフィルターなどを施すか、MCMC スパイクを推定するなど、幾つかの処理方法がある。これらがアクティブな細胞活動であるかどうかの指標としては、個々のトレースの skewness や kurtosis を使うことが一般的である。この基準を満たす細胞が万のオーダーで出てくるためすべてを見て確認するのは不可能だが、アクティブニューロンを数百個程度ランダムに目で見ることによって、例外がないかどうかを確認する。

ここまでの電気生理で言うところのスパイクソーティングからマニュアルキュレーションに相当する部分になる。つまり、個々の細胞の活動の時系列が細胞の個数分与えられる。これは縦が時間、横が細胞の時系列データ行列となる。その後、この時系列と行動や感覚刺激を合わせてエンコーディング・デコーディング解析をするところまでがルーティンである。何らかの行動指標との関連性を基に細胞をラベリングし、脳表面にマップすれば、機能局在を得ることができる。機能局在が得られれば、実験と解析の全体が一応うまくいっていることの基準となるため、ここまでの実験の翌朝までに確認できるようにしておくことを

ラボでは推奨している。

おわりに

本稿では、広視野 2 光子顕微鏡の組み立てにおける実務的な側面について述べた。既に稼働することがわかっているシステムであっても、ほとんど自作の部品で組んでいるときは非常にスリルがあった。でき上がってみて、2 光子励起による画像化が確認できたときは非常に安心したことを覚えている。読者の皆さんにとって、将来の実験に少しでもお役に立てると幸いである。ご質問などがあれば気軽にメールをお送りいただきたい。

謝辞 本研究は東京科学大学大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野の磯村宜和教授、今村文哉君、今村啓人君を中心に、多くのご協力をいただきました。この顕微鏡はノースカロライナ大学チャペルヒル校、カリフォルニア大学サンタバーバラ校の Spencer L. Smith, Jefferey Stirman, Che-Hang Yu らが設計したものであり、留学中から日本での立ち上げまで、多くのご助言をいただきました。京セラ SOC 社には Diesel2p の再設計・製造において高い技術を提供していただきました。それ以外にも、この顕微鏡の製造に関わっていただいた磯村研の皆様をはじめとする多くの方々に感謝の意を表します。

●文 献

- 1) Smith SL : Building a two-photon microscope is easy. In Hartvart E (ed) : *Multiphoton Microscopy*, pp1-16. Human Press, New York, 2019
- 2) Sofroniew NJ, Flickinger D, King J, Svoboda K : *Elife*. 5 : e14472, 2016
- 3) Stirman JN, Smith IT, Kudenov MW, Smith SL : *Nat Biotechnol*. 34 : 857-862, 2016
- 4) Ota K, Oisi Y, Suzuki T et al : *Neuron*. 109 : 1810-1824.e9, 2021
- 5) Yu CH, Stirman JN, Yu Y et al : *Nat Commun*. 12 : 6639, 2021