

連載講座

新しい光学系を使って広がる顕微鏡の世界-1

広視野多光子照明と光操作
高速多光子イメージング

磯部 圭佑

Key words : 多光子励起, 広視野照明, 高速イメージング

光学顕微鏡は電子顕微鏡に比べると空間分解能は劣るが、生物試料に大きな損傷を与えることなく生きたままの状態でイメージングが可能であるという利点があるため、生命現象を解明するための重要な技術となっている。特に多光子蛍光顕微鏡は、生体組織内部の透過率が高い近赤外光を用いることが可能であるため、深部イメージングに有用とされ、生物学・医科学分野において広く用いられるようになってきている。多光子蛍光顕微鏡の研究は、超短光パルスレーザーの性能向上に伴い劇的に発展してきた¹⁾。この背景には、吸収断面積が非常に小さい多光子吸収過程を誘起するための励起光としては、ピーク強度の高い超短光パルスが有用であることが挙げられる。また、多光子蛍光顕微鏡を容易にバイオイメージングへ応用できるようになったのは、自動波長掃引モード同期レーザーが市販されるようになったことが大きい。

多光子蛍光顕微鏡では、高い開口数の対物レンズを用いて、励起レーザー光をきつく集光することによって光軸(深さ)方向に励起光強度の分布を与える。 n 光子蛍光強度は励起光強度の n 乗に比例するため、蛍光が発生する領域は励起光強度の高い集光点近傍に局所化される。背景蛍光の発生を抑制できるため、共焦点ピンホールなしで三次元イメージングが可能である。また、光損傷や蛍

光分子の光褪色などが生じる領域も集光点近傍のみに低減される。しかしながら、集光点を走査する必要があるため、視野を広げようとすると空間分解能を維持した状態では走査点数が増加し、時間分解能が低下する。この問題を解決するために、様々な方法が提案・実現されてきた。1999年には、レゾナントスキャナーを用いることによって、8 kHzのライン走査速度、30 fpsのイメージング速度でカルシウムイメージングを実現している²⁾。音響光学偏向器を用いれば数100 kHzのライン走査速度を達成できるが、レーザー走査範囲が狭いという問題が残っている³⁾。また、1998年には、225 fpsのイメージング速度を実現可能なマイクロレンズアレイを用いた多焦点多光子顕微鏡が報告されているが、従来のレーザー走査型の多光子顕微鏡に比べ、焦点面外における背景蛍光の発生が大きいという問題があった⁴⁾。この問題は、焦点面外において多ビームが干渉することによって、局所的に励起光強度が増強されることに起因した。そのため、この問題を克服するために時間多重化プレートが提案され、多ビーム間での干渉を抑制する手法が2000年に提案されている⁵⁾。しかし、多焦点で同時に多光子励起を誘起するためには、高いレーザーパワーを必要とする。また、マイクロレンズアレイを用いた多焦点多光子蛍光顕微鏡でさえ、マイクロレンズアレイ

Wide-field multiphoton illumination and optical control: High-speed multiphoton imaging

Isobe Keisuke: 理化学研究所光量子工学研究センターアト秒科学研究チーム(〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1)

0370-9531/04/¥500/ 論文/JCOPY

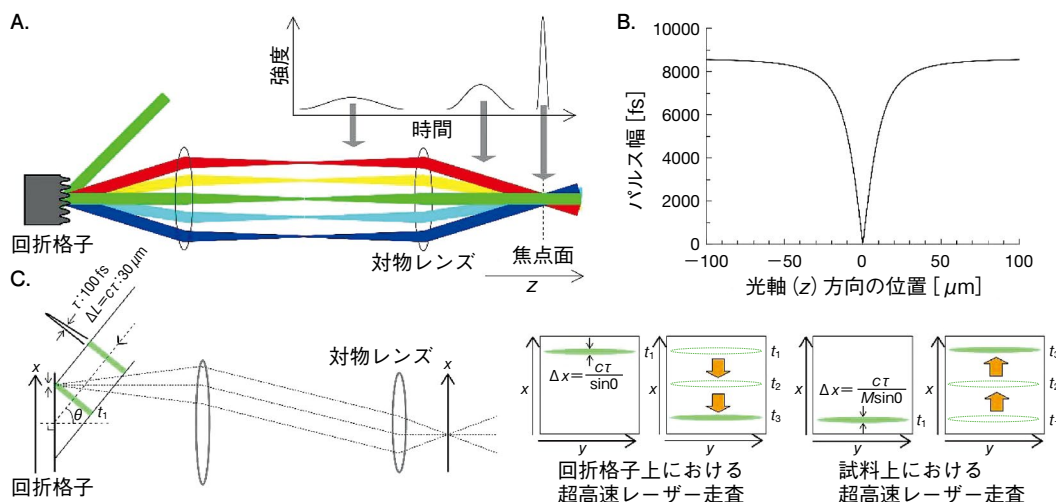


図1 TF顕微鏡の光学系(A)とTFによる光軸方向に沿ったパルス幅の変化(B)およびTFにおける超高速レーザー走査(C)

を回転させ、レーザー走査を行う必要があるため、その走査速度に合わせた早い繰り返し周波数のパルスレーザーが必要である。そのため、広視野をイメージングするためには、非常に高い平均パワーのレーザー光を試料へ照射しなければならない。したがって、熱による試料損傷の可能性が高くなるという問題があった。また、膜電位イメージングなどの1,000 fps以上の高速イメージングを必要とする場合には、これらの技術ではイメージング速度が足りていない。

近年、多細胞が相互作用して生じる早い生命現象を可視化するために、機械的なレーザー走査を行わない、広視野イメージング技術が開発されてきている。本稿では、それらの技術のなかでも、多光子蛍光顕微鏡への応用が可能なTF(temporal focusing)顕微鏡⁶⁾とFACED(free-space angular-chirp-enhanced delay)顕微鏡⁷⁾について紹介する。

I TF顕微鏡

TF技術では、図1Aに示すように、パルス幅がフェムト秒のレーザーパルスを回折格子などの分光素子を用いて分光し、対物レンズの焦点面に回折格子上を結像するような光学系を用いる⁶⁾。レーザーのパルス幅はスペクトル帯域幅に反比例するため、分光すると空間局所的なスペクトル帯域幅が狭くなる。そのため、図1Bに示すよう

に、焦点面から離れるほどパルス幅が伸び、全スペクトル帯域が空間的に重なる焦点面において、最短パルス幅となるフェムト秒のパルスが再生される。その結果、高い励起光強度を必要とする多光子吸収過程は、焦点面近傍に局所化される。しかし、空間集光の場合と異なり、ビームをきつく集光しているのではなく回折格子上のビームを焦点面に結像しているだけなので、数百μmの広視野照明も可能である。そのため、焦点面をカメラ上に結像すれば、レーザー走査を一切行うことなく二次元の蛍光断層像を取得できる。

TF顕微鏡を異なる視点から考える。光速 c を用いて、パルス幅 τ のフェムト秒のレーザーパルスを空間的な距離に換算すると $\Delta L = c\tau$ と表される。したがって、ある瞬間に回折格子上に照射されているビームスポット直径は、 $\Delta x = \Delta L / \sin\theta = c\tau / \sin\theta$ と表される。ここで、 θ は回折格子への入射角度である。図1Cに示すように、この過渡的なビームスポットが光パルスの伝播と共に回折格子上を動く、すなわち光の速度で回折格子上を超高速にレーザー走査しているとみなすことができる。回折格子上のビームは、対物レンズの焦点面に倍率 $1/M$ 倍で結像されるため、焦点面における過渡的なスポットサイズは、 $\Delta x' = c\tau / M\sin\theta$ と表される。例えば、100フェムト秒のレーザーパルスを入射角度30度で回折格子へ入射させ、 $1/M = 1/100$ 倍で結像したとすると、焦点面にお

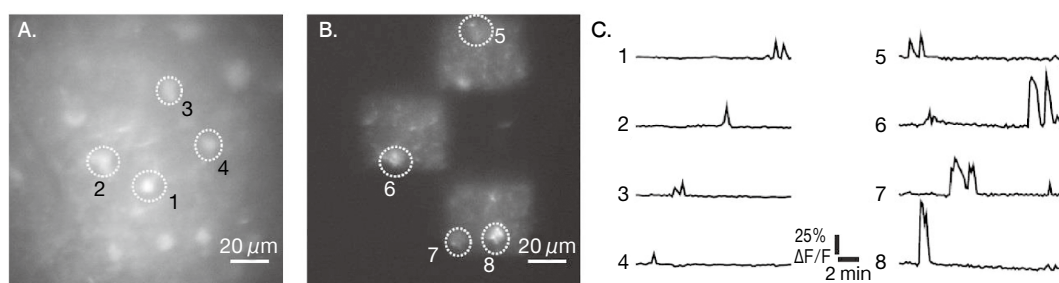


図 2 広視野 1 光子蛍光顕微鏡 (A), 2 光子パターン照明を用いた TF 顕微鏡 (B) によるカルシウムイメージングおよび A, B で示した番号の細胞におけるカルシウム応答 (C, D)⁹⁾。

Reprinted with permission from [Biomed. Opt. Express 2, 696 (2011)] © The Optical Society.

ける過渡的なスポットサイズは 600 nm と考えることができる。この大きさは回折限界の集光スポットサイズより小さくなることはないが、回折限界のスポットを生成していると考えられることができる。したがって、回折限界のスポットを光の速度で、試料を超高速走査しているのが TF 顕微鏡であるとも考えることができる。

TF 顕微鏡には、機械的なレーザー走査を行う必要が一切ないため、繰り返し周波数の低いフェムト秒レーザーを利用できる利点がある。究極的にはシングルパルスの照射で画像取得が可能であり、そのため、低い繰り返し周波数のパルスレーザーを用いることが可能である。 n 光子蛍光強度は、同じ平均パワーである場合、繰り返し周波数 f の $n-1$ 乗に反比例する。したがって、同じ平均パワーを試料へ照射したとしても、繰り返し周波数が低いほど多光子蛍光強度を高くできるため、試料へ照射する平均パワーを下げるが可能である。例えば、1,300 nm における GCaMP6f の 3 光子アクション断面積は $1.9 \times 10^{-82} \text{ cm}^6 (\text{s/photon})^2$ と非常に小さいため、2 光子蛍光顕微鏡で一般に用いられている 80 MHz のレーザーでは 100 mW の平均パワーが必要となるが、1 MHz のレーザーでは 5.5 mW の平均パワーで同じ蛍光強度が得られることになる。また、多光子蛍光顕微鏡において、パルスエネルギーが同じ場合、すなわち多光子励起確率が同じ場合、繰り返し周波数を下げたほうが蛍光分子の光褪色を抑制でき、蛍光強度が高くなると報告されている⁸⁾。このメカニズムには、蛍光分子が第 1 のパルスで多光子励起され、蛍光を発することなく三重項状態に遷

移する過程が関係している。三重項状態の寿命はマイクロ秒程度であり、三重項状態にいる間に第 2 のパルスが照射されると、更に高いエネルギー状態へと励起され光褪色するのみであり、蛍光を発することはない。しかし、三重項状態の寿命よりも長い時間間隔 (繰り返し周波数数 MHz 以下) でパルス照射すれば、蛍光分子はパルス照射前に必ず基底状態へ戻っている。そのため、第 2 のパルスで蛍光分子を励起できれば、量子効率に応じて蛍光を発生させることができる。その結果、蛍光強度が高くなる。したがって、三重項状態の寿命よりも長い時間間隔となる数 MHz 以下の繰り返し周波数のパルスレーザーを用いると、蛍光分子の光褪色を抑制すると共に、蛍光強度を増大させることが可能である。

図 2 に、TF 顕微鏡を用いたカルシウムイメージングの例を示す⁹⁾。広視野 1 光子蛍光顕微鏡に比べて、背景蛍光の影響が小さく、高いコントラスト比でカルシウム応答を測定できていることがわかる。

II FACED 顕微鏡

FACED 顕微鏡では、図 3 に示すようにレーザーパルスをシリンダリカルレンズによって集光し、その集光点に第 1 のミラーを配置する⁷⁾。また、第 2 のミラーを第 1 のミラーに対して、平行ではなく、わずかに傾けることによってミラー間で多重反射したのち、シリンダリカルレンズ側へ戻ってくるように調整する。このとき、第 1 のミラーへの入射角度が、シリンダリカルレンズ上の位置によって変化している。そのため、戻ってき

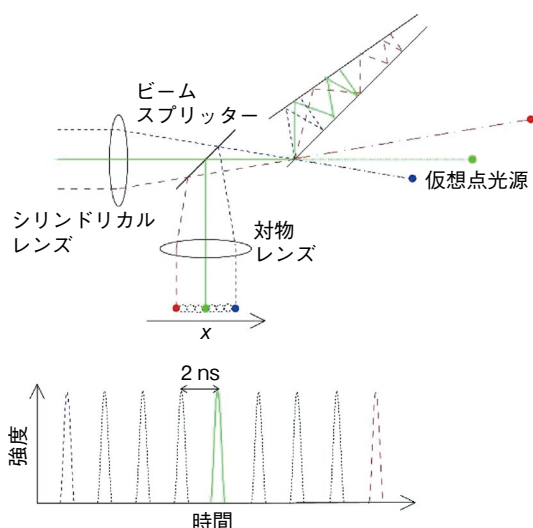


図 3 Faced 顕微鏡の光学系

た光をビームスプリッターで取り出し、対物レンズによって集光すると、集光位置は第1のミラーへの入射角度に応じて x 方向にシフトすることになる。また、ミラー間における多重反射の回数は、第1のミラーへの入射角度に依存する。多重反射される回数が増加すると、シリンダリカルレンズの集光位置からのミラー間の全伝播距離が増加する。このとき、シリンダリカルレンズの集光位置から、ミラー間における折り返し地点までの伝播距離分だけ離れた位置に、仮想点光源があるとみなすことができる。この距離に相当する時間だけ、 x 方向にシフトして集光されるパルス間に遅延時間を与えることができる。この遅延時間を蛍光寿命である 2 ns 以上に調整すると、発生した蛍光はマルチピクセル化されたカメラを用いなくとも、シングルピクセルの光電子増倍管などを用いて、時間的に分離して測定することが可能である。このように、空間を時間にマッピングすることによって、機械的なレーザー走査を行わないレーザー走査型の顕微鏡を実現できる。

Wu らは、8 MHz のライン走査速度の Faced 顕微鏡を開発し、1 秒間に 75,000 細胞のイメージングを実現している¹⁰⁾。図 4 に 1.5 m/s の流量で乳腺細胞を流し、Faced 顕微鏡で撮像した明視野像と 1 光子蛍光像の取得例を示す。細胞の形状がぼけることなく撮像できていることがわかる。

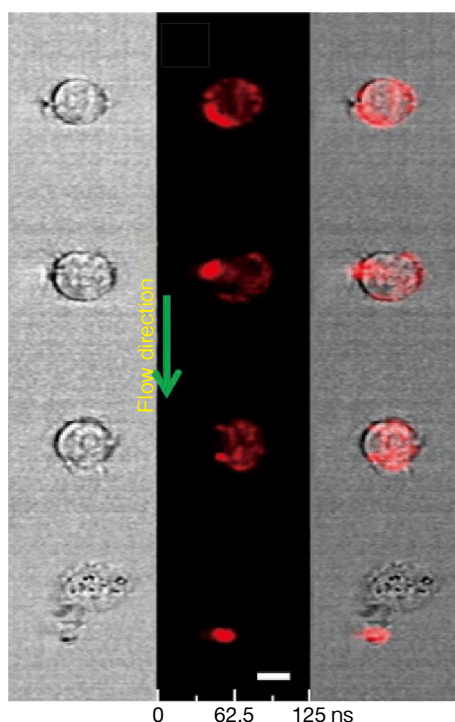


図 4 1.5 m/s の流量における Faced 明視野像(左), Faced 1 光子蛍光像(中央), Faced 明視野像と Faced 蛍光像の Merge 像(右)¹⁰⁾。

Reprinted with permission from [Biomed. Opt. Express 8, 4160 (2017)] © The Optical Society.

ここで紹介した例は 1 光子蛍光顕微鏡の結果であるが、Faced 顕微鏡はパルスレーザー光による励起を行うため、多光子蛍光顕微鏡へも容易に応用可能である。また、TF 顕微鏡と同様に、パルスレーザーの繰り返し周波数を数 MHz 程度まで低下させてもイメージング速度は低下しない。そのため、低い繰り返し周波数のフェムト秒レーザーを利用できる。

おわりに

TF 顕微鏡や Faced 顕微鏡では、機械的なレーザー走査を行うことなく高速にイメージングできることを紹介した。これらの顕微鏡では、機械的なレーザー走査が必要ないため、低い繰り返し周波数のパルスレーザーを用いることが可能である。2 光子蛍光顕微鏡がフェムト秒レーザーの性能向上に伴って発展してきたように、これらの顕微鏡の発展には低い繰り返し周波数のパルス

レーザーの性能向上が必要不可欠である。これらの顕微鏡の性能を十分に引き出せる光源を用いれば、1,000 fps 以上のイメージング速度で生体組織の深部イメージングが可能になる。1,000 fps 以上のイメージング速度を達成できれば、カルシウムイメージングではなく、膜電位イメージングが広視野多光子イメージングによって実現できるようになると期待できる。また、TF 技術は高速イメージングだけでなく、多光子超解像イメージングにおける背景蛍光発生抑制^{11,12)}や、多光子励起パターン照明による光操作¹³⁾における非標的分子の励起抑制などにも応用されており、応用範囲は非常に広い。特にオプトジェネティクスにおいて TF 技術は有用である。焦点面外における背景蛍光の発生は、ピンホールを用いることや画像処理などによっても実現可能である。しかし、光操作における非標的分子の励起はアーティファクトにつながるため、非標的分子の励起抑制は必須技術である。そのため、TF 技術はオプトジェネティクスにおいて今後のコア技術になると考えられる。

●文 献

- 1) Hoover EE, Squier JA : *Nat Photonics*. **7** : 93-101, 2013
- 2) Fan GY, Fujisaki H, Miyawaki A et al : *Biophys J*. **76** : 2412-2420, 1999
- 3) Lechleiter JD, Lin DT, Sieneart I : *Biophys J*. **83** : 2292-2299, 2002
- 4) Bewersdorf J, Pick R, Hell SW : *Opt Lett*. **23** : 655-657, 1998
- 5) Egner A, Hell SW : *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. **17** : 1192-1201, 2000
- 6) Oron D, Tal E, Silberberg Y : *Opt Express*. **13** : 1468-1476, 2005
- 7) Wu JL, Xu YQ, Xu JJ et al : *Light Sci Appl*. **6** : e16196, 2017
- 8) Donnert G, Eggeling C, Hell SW : *Nat Methods*. **4** : 81-86, 2007
- 9) Therrien OD, Aubé B, Pagès S et al : *Biomed Opt Express*. **2** : 696-704, 2011
- 10) Wu J, Tang AHL, Mok ATY et al : *Biomed Opt Express*. **8** : 4160-4171, 2017
- 11) Vaziri A, Tang J, Shroff H, Shank CV : *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105** : 20221-20226, 2008
- 12) Isobe K, Takeda T, Mochizuki K et al : *Biomed Opt Express*. **4** : 2396-2410, 2013
- 13) Papagiakoumou E, Anselmi F, Bègue A et al : *Nat Methods*. **7** : 848-854, 2010