

多光子顕微鏡技術の最前線

勝木健雄(ソーラボジャパン株式会社 技術部)

1990年にWinfried Denkらによって生み出された2光子(多光子)顕微鏡技術は¹、その後30年間にわたり、日進月歩の発展を遂げてきました。多光子顕微鏡は、共焦点顕微鏡などの1光子顕微鏡に比べて波長の長い光を使うので、組織による散乱の影響を受けにくく、生きた組織の深部まで観察することができます。このため、多光子顕微鏡は、生体内のダイナミックな生命現象をとらえるために欠かせない手法となっています。

ソーラボ社は2008年に多光子顕微鏡の販売を開始して以来、[筐体回転式多光子顕微鏡 Bergamo](#)、[2光子メゾスコープ](#)、[DIY多光子キット](#)など、ユニークで斬新な製品を開発・提供してきました(図1)。本稿では、空間光変調器(SLM)、ベッセルビーム、パルス多重化などを使った、多様で高次元な生命現象をとらえるための技術を紹介します。

パルス多重化による複数平面同時イメージング

生体内の現象を測定するうえで1つの課題となるのがイメージングのスピードです。弊社では高速イメージングを可能にする[8kHzと12kHzのレゾナントスキャナ](#)のほか、より高速に、かつ異なる平面上から同時に画像を得る方法として、パルス多重化による同時複数平面イメージングというモジュールを用意しています。この方法は、多光子励起に用いるフェムト秒レーザーのパルスを2つの光路に

分けたのちにわずかな時間的遅延を導入し(パルスの多重化)、それぞれのパルスを異なる平面にフォーカスさせるという仕組みです²。これにより、データのスループットは約2倍に向上し、異なる平面内で起きている現象を同時に観察することも可能になります。

ベッセルビームによる高速3次元イメージング

ボリュームデータを高速に取得するもう1つの方法として、ベッセルビームを用いたイメージングがあります。ガウシアンビームが空間内の1点に集光するのに対して、ベッセルビームは縦に長く伸びた励起光となります。このため、ガウシアンビームでは何枚もスライス撮らなければならない厚みのある領域を1回の走査で一気に観察することができます(図2)。光軸方向の分解能が低下するので、深さ方向に細胞が重なっている場合は区別がつかなくなってしまいますが、標識された細胞が3次的にまばらに分布している場合は、データの取得効率が数十倍に向上するという利点があります³。弊社では、空間光変調器SLMを使ってベッセルビームを作り出すモジュールを提供しています。ガウシアンビームとベッセルビームを切り替えられるので、あらかじめガウシアンビームで細胞の3次元的配置を記録したうえで、高速なボリュームイメージングを行うことができます。



図1. Bergamo(左)、2光子メゾスコープ(中)、DIY多光子顕微鏡キット(右)

SLMによる多点同時刺激

生体内のイメージングにおいて近年特に重要度を増してきているのが、イメージングと光遺伝学を組み合わせた実験です。1光子ではなく多光子で光刺激を行うことのメリットは、3次元的に限局した領域（例えば組織中の細胞1個）を刺激することができる点にあります。弊社の**多光子顕微鏡 Bergamo**は、光刺激とイメージングを同時に行うための2次光路を装備できるだけでなく、SLMを用いて視野中の複数の細胞を同時に刺激するための多点同時光刺激モジュールを搭載することが可能です。これらの機能を活用すると、時間的にも空間的にもこれまでにない高い精度で細胞の活動を操作、観察することが可能となり、生体内における細胞ネットワークの働きに関する理解が深まるものと期待されず（図3）⁴。

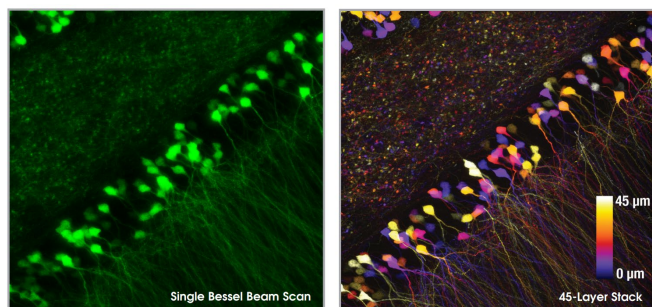


図 2. ベッセルビーム（左）とガウシアンビーム（右）によるイメージング。右は45枚のスタック画像。Ji 博士ら（University of California, Berkeley）提供。

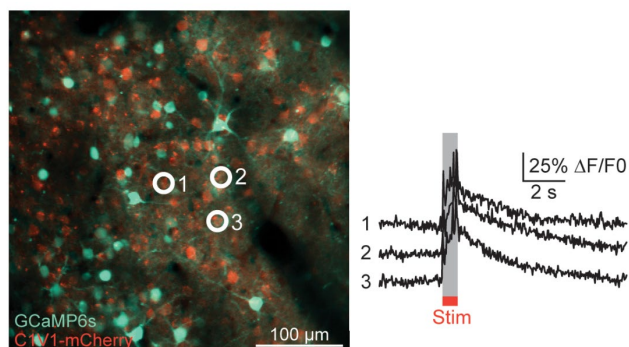


図 3. SLM による同時多点光刺激実験。Häusser 博士ら（University College London）提供。

3光子イメージング

冒頭で述べたように、光は波長が長いほど散乱の影響を受けにくいという性質があります（散乱は波長の4乗に反比例）。したがって、1光子より2光子、2光子より3光子励起の方が効率よく組織の深部に届きます（図4）。例えば、生体マウスの脳表面から600 mm程度の深さにある緑色の蛍光を920 nmと1320 nmの波長でそれぞれ2光子、3光子励起した場合、得られる蛍光の信号には数倍の差が生じることが報告されています⁵。弊社では、900 nm～1900 nmまでの波長に対応したスキャン光学系を搭載し、低繰り返し周波数レーザに対応した検出系を有する3光子励起仕様のBergamoを提供しています。

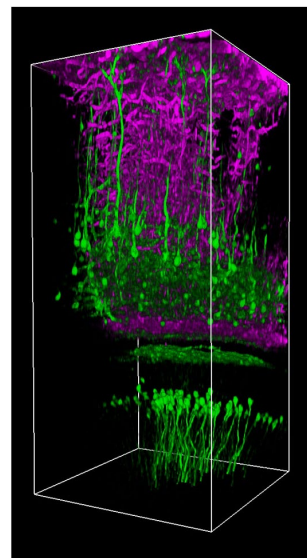


図 4. Thy1-YFP の1300 nmでの3光子イメージング。Xu 博士ら（Cornell University）提供。

おわりに

多光子顕微鏡と言えば一昔前までは非常に高額な装置でしたが、近年、比較的安価なファイバーレーザが登場したこともあり、以前に比べて格段に入手しやすい装置となりました。また、弊社の顕微鏡システムは、予算や研究の進展に応じて機能を後から追加できるモジュール構成となっています。製品に興味のある方は弊社までお気軽に[お問い合わせ](#)ください。

¹Denk, W., et al., *Science* 248 (4951), 73-76 (1990).

²Tsyboulski, D., et al., *OSA JW3A.60*(2018).

³Lu, R., et al., *Nat Neurosci* 20, 620–628 (2017).

⁴Packer, A., et al., *Nat Methods* 12, 140-146 (2015).

⁵Wang, T., et al., *eLife* 9:e53205(2020).