

次世代 2 光子顕微鏡—小型化がもたらす新たな可能性

勝木健雄(ソーラボジャパン株式会社 技術部)

2 光子顕微鏡 (多光子顕微鏡) といえば、大型の除振台の上に大型のレーザと共に設置されている姿を想像する方が多いのではないのでしょうか。ソーラボ社製の [2 光子顕微鏡](#) も、5×5 mm の広視野を持つ 2 光子 [メゾスコープ](#) は、筐体重量が 700 kg (図 1 右)、90° 回転式ボディを持つ多光子顕微鏡 [Bergamo II](#) は 50 kg~100 kg の重量があり (図 1 中央)、設置には 1.2×2.0 m 程度の除振台が必要です。

しかし、ここ数年でこの状況は大きく変わりつつあります。近年の技術革新、とくに 2 光子励起に必要な超短パルスレーザ光源として小型で高性能なファイバーレーザが登場したことにより、顕微鏡の小型化が可能となり、ベンチトップサイズの 2 光子顕微鏡、そしてついには重さが 3 g を切るような「指先サイズ」の 2 光子顕微鏡まで開発されました。本稿では、2 光子顕微鏡の小型化に寄与するキーテクノロジーとして、ファイバ出力型のフェムト秒レーザ、MEMS スキャナ、[シリコンフォトマルチプライヤ \(SiPM\)](#) などを挙げ、これらの技術を取り入れた新しい 2 光子顕微鏡システム [Prelude®](#) と超小型 2 光子顕微鏡 [Mini2P](#) を紹介します。

ベンチトップサイズの 2 光子顕微鏡 Prelude®

ソーラボ社製の 2 光子顕微鏡は、観察対象の形状や姿勢に合わせて顕微鏡を傾けることができる点が

一つの特徴です。従来、光軸を維持しながら顕微鏡を傾げるためには、ペリスコープという多関節の光路と複雑なアラインメント作業が必要でした。しかし、中空コアフォトニック結晶ファイバによって伝送可能な波長固定のフェムト秒レーザが市販されたことにより、ペリスコープの代わりにファイバを用いて簡単にレーザ光を顕微鏡に導入することが可能になりました。このようなファイバ出力型レーザの利点を活かしたコンパクトな 2 光子顕微鏡が [Prelude](#) です (図 1 左)。

[Prelude](#) は、電動による XYZ 移動と手動による ±90° の回転 (図 2) に対応しているだけでなく、小型化のためのさまざまな新技術を搭載しています。スキャナには、4.7 kHz のレゾナント-MEMS スキャナを採用しています。MEMS スキャナは、従来のガルバノ-レゾナントスキャナに比べて小型で消費電力が少なく、動作音も小さいという利点があります。検出器は、超高感度の SiPM です。SiPM は、光検出効率は PMT と同等である一方、PMT に比べて小型で、ダイナミックレンジが広く、周辺光による損傷の心配もないため、[Prelude](#) の使い勝手の良さに寄与しています。

さらに [Prelude](#) には、オプションで液晶技術をベースにしたリモート焦点調整システムを搭載することが可能です。リモート焦点調整システムは、液晶

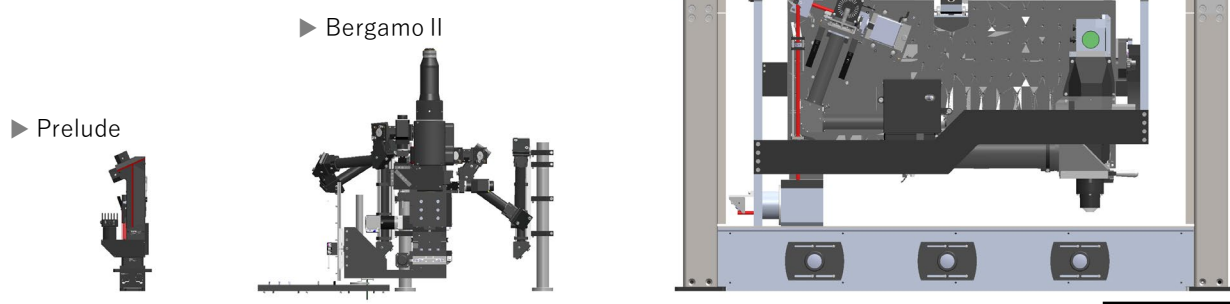


図 1. ソーラボ社製 2 光子顕微鏡のサイズ比較。左：機能イメージング用多光子顕微鏡 [Prelude](#)。中央：多光子顕微鏡 [Bergamo II](#)。右：2 光子メゾスコープ。図右下のスケールバーは 40 cm。

レンズ（液体レンズとは異なります）を使って、16段階の焦点位置を4msという高速で切り替えることができます。このシステムは、対物レンズ用ピエゾスキャナを用いた焦点調節と異なり、移動速度が対物レンズの重さに影響されることなく、また、焦点調節に際して振動が発生しないため、試料への影響を抑えることが可能です。

これらの革新的な技術を組み合わせた結果、Preludeは、2光子イメージングの性能を犠牲にすることなく、重量が8kg程度、必要な設置面積は0.5×0.5m以下と、小型カートに載せて移動ができるほどの可搬性を獲得しました。

桁外れの小型化を達成した Mini2P

自由行動下の動物からイメージングを行うことは、2光子顕微鏡の究極のゴールの一つと言えるのではないのでしょうか。ノルウェーのKavli研究所のWeijian Zong氏らが開発したMini2Pは、重さが3gに満たない超小型の2光子顕微鏡で、マウスのような小動物の頭部に装着し、自由に歩き回る動物の脳から2光子イメージングを行うことが可能です^{*1}。ソーラボ社では、Zong氏らの開発したシステムを基に独自の改良を加えたMini2Pを製造・販売しています（図3）。

Mini2Pは、Preludeと同様に、光源にファイバ出力型のフェムト秒レーザを使用し、スキャナにはMEMSスキャナを採用しています。また、焦点調節の機構にマイクロチューナブルレンズを用いることで、0.4msの高速な焦点切り替えを可能にしています。Zong氏らのオリジナルの設計では、検出器にPMTが用いられており、顕微鏡からPMTまで光ファイバーバンドルを用いて蛍光を伝送していましたが、ソーラボ社のMini2Pは、オンボードのシリコンフォトマルチプライヤを2基搭載することで、ファイバーバンドルによる伝送を不要とし、動物への負担の軽減とSN比の向上を達成しています。

Mini2Pは、従来の2光子顕微鏡の1万分の1以下というサイズでありながら、一つの平面から数百個の細胞を捉えることができ、さらに、高速に焦点を変えながら複数の平面をイメージングすることで1000個におよぶ細胞活動の測定に成功しています。

技術革新の粋を集めた小型化によって、2光子顕微鏡の利用範囲は大きく広がる可能性があります。

おわりに

本稿では、2光子顕微鏡技術の最近の動向として、顕微鏡の小型化を紹介しました。小型顕微鏡は、その小ささゆえに初めて実現できる応用がある一方、拡張性に制約があることも事実です。ソーラボ社では、高い拡張性を誇るBergamo IIから、超小型のMini2Pまで、幅広いニーズに応える2光子顕微鏡のラインナップを揃えております。2光子顕微鏡の導入をご検討の際は、お気軽に[お問い合わせ](#)ください。

引用文献

^{*1} Cell, Volume 185, Issue 7, 1240 - 1256.e30

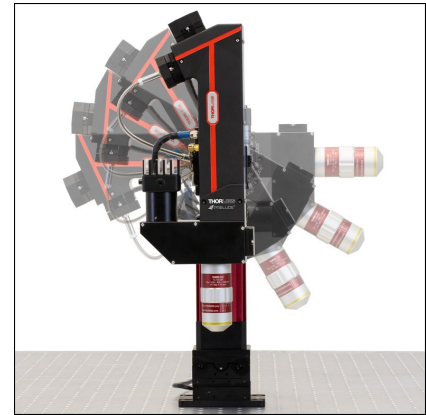


図2. 機能イメージング用多光子顕微鏡 Prelude

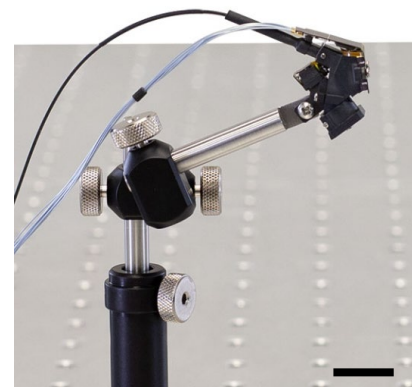


図3. 6mm径のポストに取り付けられた、超小型2光子顕微鏡(Mini2P)。図右下のスケールバーは20mm。