

# コード化ライトシートにより 向上する蛍光立体イメージング

生物は3次元であるにもかかわらず、顕微鏡は2次元の平面を描写するのが本質である。Zスキャン、共焦点、2光子法では3D出力を得られるが、コストと複雑性も伴う。

ライトシート蛍光顕微鏡 (Light-Sheet Fluorescence Microscopy: LSFM) はイメージング対象物に垂直なオブジェクトの面を照射するが、ライトシートを走査するメカニズムが複雑になりやすく、照射強度が高いと標本が光退色しやすい。これらの問題に取り組んでいる香港大 (University of Hong Kong) の研究チームが開発した新しいアプローチが、コード化ライトシートアレイ顕微鏡 (Coded Light-sheet Array Microscopy: CLAM) だ。

## 非干渉的な立体照射

通常の LSFM においてレーザー光源は、サンプルの厚さよりもかなり薄いライトシートを作るように条件として設定される。ライトシート内の蛍光体が励起され、シート外では暗いままである。顕微鏡の対物レンズは、ライトシート面に垂直な方向で光を集める。ライトシートはサンプルを走査し、各面でイメージを集めて3Dモデルを作成する。走査は、複数の異なる機械システムのうちの一つが実行するが、いずれも取得プロセスに膨大な時間を要する。複数の面を同時に照射しようとすると、別々のコヒーレントなライトシートからの干渉が原因であるスペckルによって制限される。

新たなアプローチは、概念としては単純だ。1つの光源を多数の仮想光源

に分割し、お互いに非干渉となるようにする。そして、それぞれの仮想光源が、1つのライトシートを作るよう条件を設定する。これはつまり、サンプル全体に擬似的に薄い均一なシートを作り、円筒レンズを通じてそれぞれに焦点を当てることだ。さらに、これらの各ライトシートごとに、判別可能な一意のコードを刻印する。この一連の薄いシートでサンプル全体を同時に照射すると、被写界深度全体が深度コード化された画像を1回の画像取得で復元する。

コンセプトを思い描くのは簡単だが、簡単に実装することが課題だった。研究者たちは、できるだけ最もシンプルな光学システムである「合わせ鏡」から着想を得た。合わせ鏡は、比較的小さな傾きを持つ一対の平面鏡である。香港大のポスドクであるユファン・

レン氏 (Yuxuan Ren) は、有限の発散を持つレーザービームが鏡のペアに入射する方法について、「ペアとなる鏡の内側でジグザグになる」と説明した。最初の光線束のセグメントは「鏡の1つの入射角が正常になるまで反射し、同じ経路をたどってビームレットが逆反射される」(レン氏)。わずかに異なる角度を中心としたビームの別の部分は、通常の入射角になるまで、さらに2回反射する。この方法では、1つの入射ビームから1組のビームレットが生成され、隣接するビームレット間のパス長の差が十分に大きくなることで、お互いに非干渉であることを確認する。

## ライトシートのコード化

次のステップは、ライトシートそれぞれに一意なコードを刻印することだ。ここでも、開発者はシンプルさに

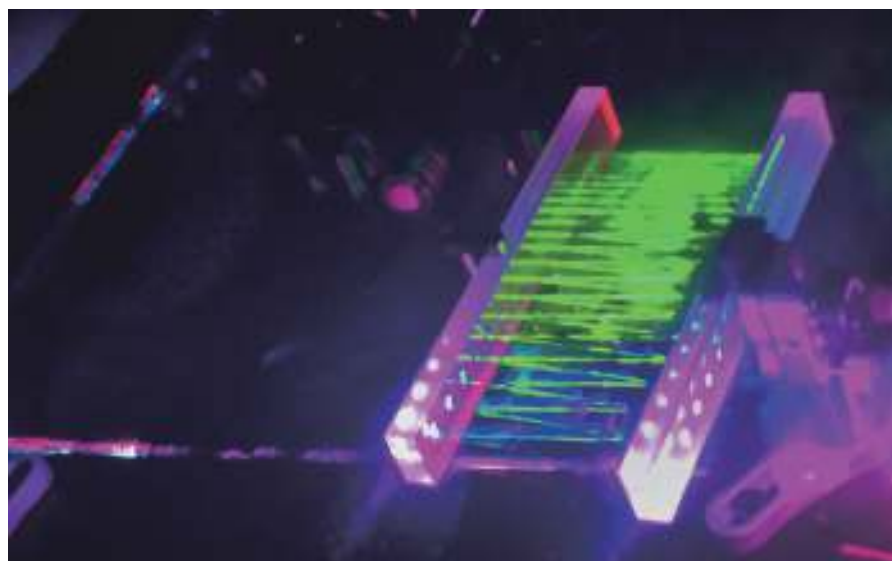


図1 コード化ライトシートアレイ顕微鏡 (CLAM) では、ほぼ並行な2枚の平面鏡の間でレーザービームを反射させることで、相互に非干渉な仮想光源の1セットを作成する。仮想光源は並行なライトシートを作ると同時に、生物学サンプルの全ボリュームを照射する。(提供:ケビン・ツィア氏)

立ち返ることで着想を得た。リレー光学系は、各ビームレットを1つのラインに集中させる。その共役面で、回転するレチクルマスクを挿入し、集光させたビームレットをレチクルの半径上に配置する。レチクル上のパターンが、各ビームレットに一意の変調周波数を刻印する。ビームレットの間隔、マスクの設計、レチクルの回転速度の組み合わせにより、各ライトシートのコードが所定の積分時間で直交するようになる。空間的に分離され、そして時間的に変調されたビームは円筒レンズで集光され、並行なライトシートを形成する(図1)。

他のLSFMと同様、対物レンズはライトシート面に垂直な軸に沿って光を

集める。しかしこの場合、各ピクセルは同時にすべてのライトシートから光を集める。取得時間はライトシートの変調周波数と一致しており、ピクセル単位のフーリエ分解により直交する周波数成分を分離できる。

CLAMは、本質的に再構成可能である。ライトシートの数、その間隔、時間遅延、周波数を調整でき、制限されるのはカメラのフレームレートのみだ。この方法の汎用性を証明するために、ケビン・ツァ氏(Kevin Tsia)のチームは分岐する血管、ナノ粒子を含浸させた組織ファントム、マイクロ流体チャネルを通過するビーズの流れ、及びマウス解剖で組織を透明にした断面をイメージングした。レン氏によると、「実際

のイメージングアプリケーションでは、柔軟で再構成可能な視野が必要だ」として、13、24、27、34、40枚のライトシートを持つシステムを構築し、最大で毎秒13ボリュウムのイメージング速度を実現した。各深度面からの光を全取得時間にわたって取得するため、強度を下げることで、シグナルノイズ比(SNR)を損なわずに光退色を防ぐ。照射面はお互いに干渉しないので、スペックルによるSNRの低下もない。

この柔軟性が、「発生物理学の研究で求められる長期的なモニタリングと、神経科学を進展させるための全脳イメージングの両方」においてCLAM技術に適しているとツァ氏は考えている。(Richard Gaughan)

LFWJ

## THE FUTURE DEPENDS ON OPTICS™



**NEW**

### Edmund Optics® 2020 Laser Optics Catalog!

2020年、新創刊の全164ページの本カタログは、レーザーオプティクスに特化したテクニカルリソースです。50ページを超えるテクニカルコンテンツ、広範囲に及ぶ製品情報、更には方程式や用語集までも網羅し、複雑なレーザーオプティクスの理解に役立つ情報源として編集されています。



電子書籍バージョンも閲覧可能!

エドモンド・オプティクス・ジャパン株式会社

〒113-0021 東京都文京区本駒込2-29-24

パシフィックスクエア千石 4F

TEL: 03-3944-6210 E-mail: sales@edmundoptics.jp



詳しい情報はこちらへ:

[www.edmundoptics.jp/090-8153](http://www.edmundoptics.jp/090-8153)