多光子イメージングの成熟期は到来したか

ジョン・ガーキン

超高速レーザ、ビームデリバリシステム、光学部品等の進歩は、非線形顕微鏡の新しい応用を開発する研究者を支援し、歯の疾患から脳腫瘍にいたる臨床診断の可能性を高める。

多光子顕微鏡法が成熟した暁に、この方法がライフサイエンスと光学のコミュニティにどの程度大きな影響を及ぼすかを推定しておくことは時宜を得たことであろう。光学やレーザの専門知識をほとんどもたないエンドユーザ、光学とレーザの研究コミュニティ、その製品サプライヤの間の相互作用は、発展するハイテク製品を扱う多くの分野に共通の興味深いケーススタディになるだろう。手法および機器が十分に成熟した時、研究分野を横断する技術としてどのような教訓を学ぶことができるのか、そしてその分野は将来どこに行くのか？

最初の多光子蛍光イメージングはパルス色素レーザを使って実施されたが、これは生物学の研究室で日常的に使用する機器ではまったくなかった[1]。しかし、フェムト秒Ti:サファイアレーザが登場して、取り扱いが厄介な色素レーザを使用しないですむようになった。さらに重要なことに、1990年代初期に、このレーザの全固体ポンプ光源としてのレーザダイオードが改良された。

フェムト秒光源の市場が拡大するとともに、この市場の要求を満たし、イメージングとレーザの両技術を推進させるために、「ハンズフリーな」システムが特にレーザの非専門家向けに開発された。こうして、この技術のユーザとサプライヤとの間に協力関係が発展した[2]（図1）。

図1　標準的な倒立型蛍光顕微鏡に走査ヘッドを取り付けた市販の多光子顕微鏡。倒立型は、水浸漬レンズを使用した生体内イメージングで好まれる選択肢である。

非線形顕微鏡法への挑戦

生物学的観点における非線形顕微鏡法の強みは試料をほとんど乱すことなく深部を撮像することによる。これは、研究者が生物学的機能を生体内（in vivo）で観察することを可能にする。それゆえ、小動物を、理想的には長時間にわたり撮像したいという強い意欲が駆り立てられた（図2）。しかし、この動機はビームデリバリ、パルス分散、試料誘起収差の3つの挑戦を光技術に対して提起した。

最初の挑戦は、試料の皮膚下の潜在的に可能な深さまで光を送り届けることだ。作動距離が長い顕微鏡対物レンズも開発されたが、最近の技術進歩は、

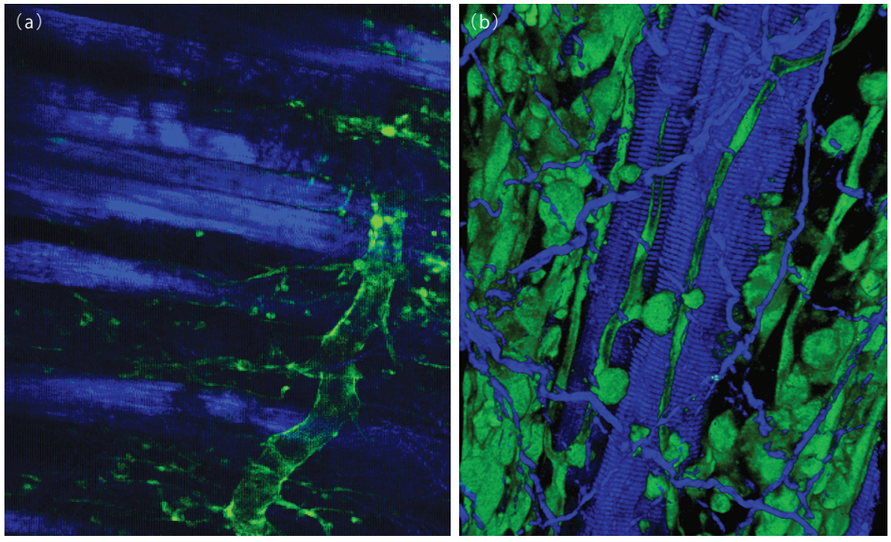


図2　Rosa 26-YFP Pdgfrb CREマウスからの前部脛骨筋（a）の光学的スライス像と筋線維（b）の3D再構成。LaVision Biotec Tri-MScope II多光子顕微鏡は光学スライス用のZeiss 10x（0.45NA）Plan-Apochromatレンズと3D再構成用のZeiss 20x（1.0 NA）Plan-Apo chromatレンズを使用している。950 nmのコヒーレントビジョンII Ti：サファイアレーザ（GDDはスライス用2250fs 2、3D用2400fs 2）で励起し、第二高調波発生（SHG）信号（青色、em=475±17.5nm）とYFP蛍光（緑色、em=536±20nm）を示した。SHG信号は筋線維と結合組織（主として膠原線維）の両方から発生した。YFP信号は特に血管周囲細胞を強調する。（資料提供：イースト・アングリア大学生物科学校のP・トーマス、I・ピエック、E・ポシュル、U・メイヤー）

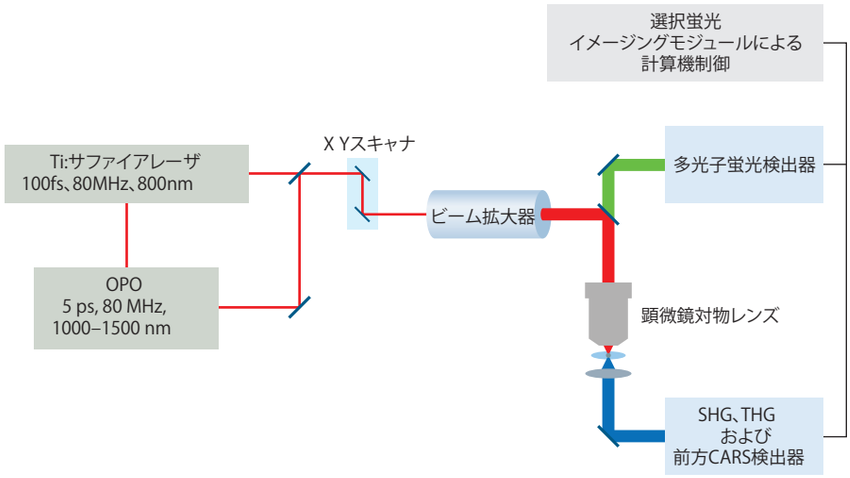


図3　イメージングの各フォームに最適な検出器を持つ総合非線形顕微鏡の構成要素。蛍光検出器は複数の波長と分光器検出用に設計することができる。蛍光X線寿命イメージングモジュールが選択されている。

GRIN光学系または光ファイバ端の直接成型、特に、フォトニック結晶ファイバ（PCF）を利用する方向へと向かった。

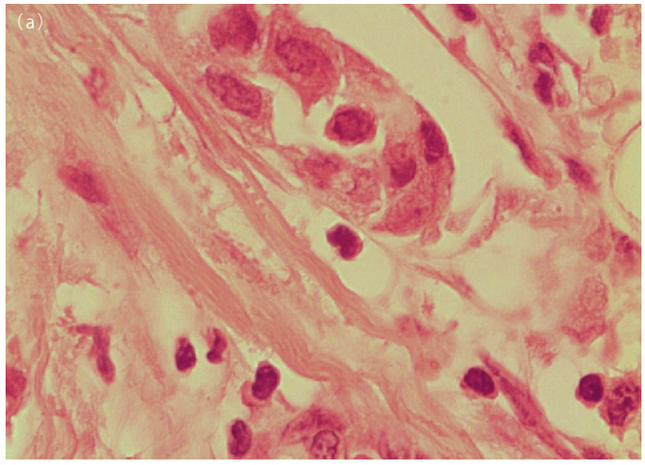
早速、米ハーバード大学、米マサチューセッツ工科大学、米スタンフォード大学、オーストラリアのスウィンバーン大学を含むいくつかの大学の研究チームは小型のビームデリバリシステムを組み立てた[(3)～(6)]。これらは2つのクラスに分類される。一方は、2枚の単純なレンズで顕微鏡対物レンズの焦点を試料へと中継する光学系であり、他方は、標準的な画像処理システムをまったく使用しない完全な小型光学系である（図3）。

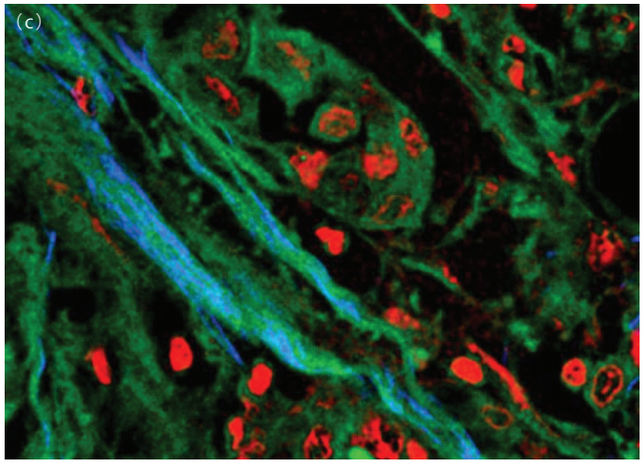
後者のソリューションは、そのシステム内に従来の大型顕微鏡を必要としないという利点を持っているが、今のところ、光学品質は対物レンズベースのシステムで予測されるほどには良くない。したがって、このようなイメージングシステムのために高品質な小型光学部品を開発する領域ではさらなる研究が必要である。ダイヤモンドや炭化ケイ素などの高屈折率材料（2以上）の利用は、いずれも他のグループによって小型レンズの作製に使用されているため、潜在的に興味深い[(7)]。

ビームデリバリシステムが開発された後、さらに発生する問題はパルス分散だ。現在、フェムト秒パルスは多数のガラスと不均一な屈折率を持つガラスを通って進行している。それらは主に材料内の群速度分散が原因のパルス広がりをもたらす。これは分散補償を利用するか、レーザパルスが光学系に入る前にチャープすることで部分的に解決できる。

現在は、この機能を持つ市販のシステムが入手可能である（例えばニューポート社製のMai Tai DeepSee）。ただし、これは完全に自動化されたとしてもさらなる複雑さをレーザ光源に追加することになる。正しい分散系を備えたPCFの利用は特に小型機器用に活発に研究されている領域である。

小型光学系に結合させる小型スキャナが開発され、全体として小型な走査システムが可能になった。これは非線





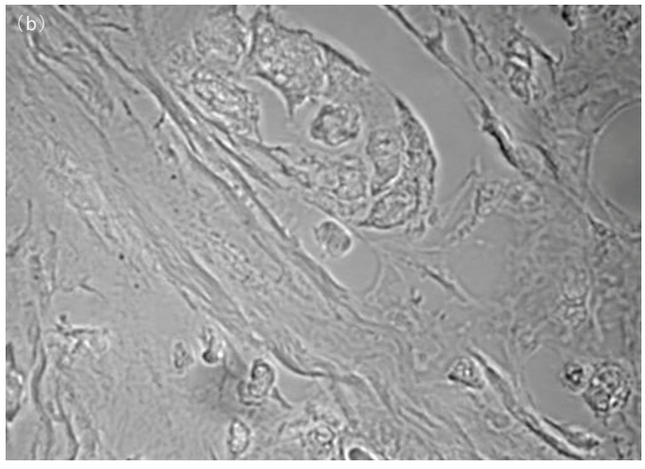


図4　乳管癌生検の多モード画像（100×75μm）。ホルムアルデヒドで固定され、パラフィンで埋め込まれた組織片は化学的に脱ろうされ、脂質も剥ぎ取られた。標準H&E染色（a）と透過光（b）を多モード画像（c）と対比させた。この多モード画像は2950cm^{-1}波数でのCARSの結果（赤）、細胞外マトリックスの自己蛍光のTPEF（緑）、線維性結合組織（コラーゲン）のSHG（青）を示している。CARSイメージングはCH_3に合わせて調整されたストークス（1064nm）とポンプ（810nm）ビームを使って実行された。試料位置におけるパワーはポンプとストークスビームのそれぞれで12と8mWであり、1画像あたりの取得時間は21sであった。（資料提供：エジンバラ大学工学校の医用生体工学センターのR・ムーラス氏とA・エルフェック氏）

形イメージングで非常に活発に研究されている分野だが、現在の主な関心は、単一スキャナでの2次元走査またはデュアルスキャナ走査のいずれかを使う斬新な設計による光コヒーレンストモグラフィー（OCT）ベースの装置に向けられている。

蛍光に基づく小型走査装置の使用は、特に、一定の蛍光タンパク質発現細胞だけを含む試料の場合、プローブがその対象内のどこにあるかを正確に知る必要があるため複雑になる。その画像は1つの蛍光画像、しかもプローブの視線方向においてだけ提供するため、精確なナビゲーションは困難である。これは初期の最小侵襲外科手術と小型カメラを含める発想で遭遇したものと同様の挑戦であり、1台の小型カメラと位置的誘導のための反射光だけを利用する発想が唯一の探求経路となり、非常に小さいが極めて敏感なカメラシステムが必要になる。

深部生体内イメージングにまつわる最後の挑戦は試料誘起収差の複雑さである。これを克服するために、元来天文学で画像から大気乱流を取り除くために開発された補償光学を採用した方法が開発されている。

いまや、非線形イメージングにおける3つの挑戦すべての改良が実証されたが、依然として各々のイメージングへの挑戦に最適な実行経路を決定しなければならない。現在、大抵のシステムは最良のミラー形状の決定に最適化アルゴリズムを使う、いわゆる「波面センサレス」アプローチに頼っている。最近、英ダラム大学、マサチューセッツ工科大学、米カリフォルニア大学サンタクルーズ校の研究グループは、必要なミラー補正を決定するために、いくつかのフォーマットにおいてレーザガイド星と波面センサを利用する標準的なアプローチの探索を開始した[(8)、(9)]。後者はより高速なイメージングを提供するが、光学系はより複雑になる。

SPIMとより長い波長

非線形イメージングにおける最近の興味深い進歩は、単一面照明顕微鏡（SPIM）での利用である[(10)]。ここでは、光シートが試料を通して投影され、結

果として生じる蛍光が照明光源に垂直に観察される。これは、望まれない散乱と光損傷を減らす非線形励起を使って、完全な光学的断面が高速で記録されることを可能にする。

非線形SPIMのインパクトと可能性がすべて示されたわけではないが、SPIM技術はゼブラフィッシュ胚やシノラブダイティス・エレガンスの生きた半透明試料のイメージングにおいてそのパワーをすでに実証した。試料はそれらが成長する間の24または48時間にわたって撮像されることが多いため、照明光源によって誘起される有害反応のリスクを減らすことの重要性は明らかであり、その結果として多光子イメージングに使われる近赤外光が果たす役割も明らかだ。

過去数年間の他の動向としては、励起波長の長波長側への移動があった。初めは標準的な可視蛍光体が、すぐに入手可能かつ十分に理解されているという理由で使われていた。しかし、非線形顕微鏡法の利点（この場合、より長い波長光を使用）が明らかになったため、水分吸収に対する注意が必要ではあるが、光散乱の効果をさらに取り除くために、より長い波長へと移動することになった。

このアプローチは、繰返し周波数が約80MHzで、波長が1800～1200nmの信頼できるフェムト秒光源の条件など、新しい課題を光学研究者に突きつけた。現在、多くの新材料がこの新しいレーザの「期待の窓」において試されているが、いずれも興味深い結果を出しているため、いずれが使用するに最良の長波長かはまだ定かでない。

非線形イメージング法は生物学内では確立されたため、次に向かう方向は医療だ。ここで概観した厄介な問題はまだいくつか残っていることは明らかで、解決しなければならない挑戦もまだある。しかし、患者に向き合うことが他の挑戦に導くことになるであろう。

臨床応用に向けて

患者にフルオロフォアを導入することは常に可能なわけではないため、ヒトのイメージングに着手する研究の多くはいくつかのイメージング方式に集中している。したがって、体内の天然フルオロフォアを使うことができるシステム、例えばNADH、コラーゲンからの第二高調波信号、そして特定の脂質構造を試験するCARSなどが好まれる[11]。

市販の機器、デルマインスペクト（DermaInspect）は皮膚損傷の検査用に患者の上を移動させるイメージングヘッドを備えた非線形顕微鏡である。今までのところ、これは、様々なイメージング方式によって様々な情報を臨床医に提供しうることを示したが、現時点の重要なステップはこの機器が診断とその後の治療計画を改善できるか否かを決定することである。

生物学での利用を目的としてすでに開発されている小型内視鏡を基礎に、臨床医は最小侵襲生検に向けて多光子イメージングの研究を開始した（図4）。現在、この研究の多くは事前に摘出された組織を考察しているが、初期の結果は良好である。

患者が関係する以上、このシステムは毎日機能し、外部環境に対して頑丈で、どのスタッフにも使いやすいものでなければならない。これは、決して過小評価するべきではない光学器械に対する挑戦であり、最新の「ワンパッケージ型」フェムト秒レーザを使ったとしても、この技術の使用は時期尚早である。今日の財政危機の状況では、医療部門であっても、新機器の費用対効果が購入を決定するますます重要な因子になっているため、コストもまた、その機器が広く受け入れられるかどうかから割り出す必要がある。

非線形顕微鏡は21歳の誕生日を迎えるころには大いに進歩しているであろうことは明らかだ。非線形顕微鏡は生物学研究のホームフィールドでは多数派のレベルに達したが、より広大で潜在的に極めて重要な医療市場に到達するにはさらに多くの研究が必要である。臨床医、ライフサイエンティスト、物理学者、技術者のすべてが一緒になって、この若き技術が確かに持っている可能性を引き出す研究を実施する必要がある。

参考文献

（1）W. Denk et al., Science, 248, 4951, 73–6（1990）.
（2）J.M. Girkin, J. Phys. D: Appl. Phys., 36, 14, R250–R258; doi:10.1088/0022-3727/36/14/204（2003）.
（3）R.P.J. Barretto et al., Nature Meth., 6, 7, 511–2; doi:10.1038/nmeth.1339（2009）.
（4）D. Kim et al., "Optical biopsy in high-speed handheld miniaturized multifocal multiphoton microscopy," Proc. SPIE, 5700, 14–22（2005）.
（5）B.G. Saar, et al., Opt. Lett., 36, 13, 2396–2398（2005）.
（6）H. Bao and M. Gu, Opt. Exp., 17, 12, 10098; doi:10.1364/OE.17.010098（2009）.
（7）H.W. Choi et al., J. Vac. Sci. and Technol. B: Microelec. and Nano. Struct., 23,1, 4–6; doi:10.1116/1.1843826（2005）.
（8）X. Tao et al., Opt. Lett., 36, 7, 1062–4（2011）.
（9）J.W. Cha et al., J. Biomed. Opt., 15, 4, 046022; doi:10.1117/1.3475954（2010）.
（10）J. Palero et al., Opt. Exp., 18, 8, 8491–8（2010）.
（11）K. König et al., Laser Phys. Lett., 8, 6, 465–468; doi:10.1002/lapl.201110014（2011）.

著者紹介

ジョン・ガーキン（John Girkin）は英ダラム大学（Durham University）生物物理科学研究所の所長。
e-mail: j.m.girkin@durham.ac.uk URL: www.bsi.dur.ac.uk

LFWJ