

超高速レーザーがさらに掘り下げる 神経科学

ジュリアン・クライン

赤外線におけるレーザーパフォーマンスが大きく向上しており、次世代型の高ピークパワー超高速レーザーが研究イノベーションの新たな波を巻き起こしている。遺伝的にコードされるカルシウムインジケータの継続的な開発と合わせ、2光子または3光子顕微鏡法を用いて、神経科学はこれまでにない深さに到達している。

神経科学は、脳の構造と機能をさらに解明しようとしている。技術開発によって感受性と選択性が向上し、より広大な脳内の神経ネットワークをより深いところまで観察できるようになり、ミニブレイン(脳の構造と機能を似せた細胞集団)、ゼブラフィッシュ、げっ歯類を含む幅広いモデルの研究が加速している。さらに、米コーネル大(Cornell University)のクリス・シュ氏(Chris Xu)のような研究者は、イメージングエンベロープを推し進めたいとする。たとえば、マウスにおいて、複雑な情報処理と関連する皮質や海馬を観察するといったことだ。

多光子励起蛍光顕微鏡法(MPM)は、このような研究では一般的なもの

である。なぜなら、非侵襲的であり、脳の構造と、影響を受けやすい脳組織の活性の両方を観察できるからだ。赤外線(IR)波長域の照明は優しいため、観察領域にダメージや摂動を与えることなく、長期間の連続イメージングが可能である。

さらに現在では、ウイルス感染や遺伝子発現によって、主要なモデル動物で多様な蛍光タンパク質を発現できる。特に神経活性の観察目的には、科学者は遺伝的にコードされたカルシウムインジケータ(GECI)を利用する。GECIは、神経活性のプロキシであるカルシウム存在下で、光学的励起に反応して蛍光を発する活性感受的な指標である。多光子顕微鏡法で使われる他

の蛍光タンパク質同様、GECIはIR内のさまざまな波長で励起する。たとえば、GCaMPファミリーは920~950nmで、赤方偏移種(たとえばjRCaMP1a,b)は1000~1100nmで励起する⁽¹⁾。

2光子・3光子イメージング

2光子励起蛍光顕微鏡法(2PM)は、特に10~100 μ の深さにおける*in vivo*(生体内)の神経活性のビデオレートイメージングや直接観察によく適する。2PMで選ばれる励起源は、一般的に高繰り返し率のフェムト秒レーザーであり、生きた組織内でIR侵入窓をカバーできる調整可能な高スペクトル出力をもつ。900~1300nm間の波長は、主要な蛍光タンパク質に適した励起や、IRにおける散乱抑制に特に重要である。

米スペクトラ・フィジックス社(Spectra-Physics)のInSight X3のような、新たに導入されたレーザープラットフォームでは、このレンジで高ピークパワーのパフォーマンスが可能だ。近年のパワー増強により、このプラットフォームは、900nm以上の波長では古いチタンサファイアレーザーより性能がよく、緑、黄、赤色蛍光タンパク質の2光子励起に対する有用性が証明されている(図1)。

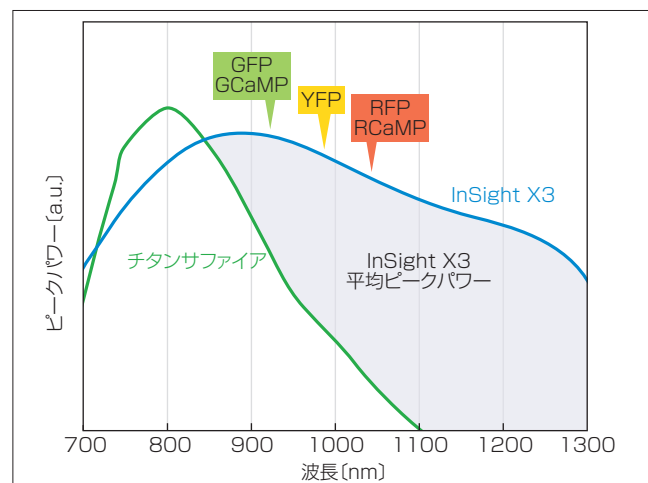
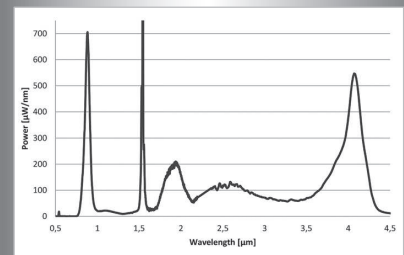


図1 スペクトラ・フィジックス社のInSight X3のピークパワーは、900nm以上の波長で古いチタンサファイアのピークパワー以上であり、*in vivo*イメージングにおける緑、赤色蛍光タンパク質やGECIが2PMで利用できる。

900nm~4.2 μm連続発振

中赤外スーパー コンティニウム光源

SuperK MIR



■ 特徴

- 出力パワー > 450 mW
- 繰返し周波数 2.5 MHz
- 室温 & 空冷で発振
- シングルコリメートビーム出力
- シンプル操作
- FTIR分光に好適

<http://www.japanlaser.jp/>

E-mail: lase@japanlaser.jp

JLC 株式会社 **日本レーザー**
JAPAN LASER

本社 〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1
TEL: 03-5285-0863 (直)

大阪支店 **TEL: 06-6323-7286**
名古屋支店 **TEL: 052-205-9711**

2PMで到達可能な最高侵入度はバックグラウンドノイズによって決まり、生きた組織内では通常1mmが限界である。これは、多くのマウスの皮膚イメージングには適するが、1mm以下の深さにある海馬などの皮膚下構造をイメージングできない。侵入度をより拡張するために、神経科学者は3光子励起蛍光顕微鏡法(3PM)に切り替える。その理由を簡単に説明しよう。

3PM技術は、蛍光タンパク質がIR光子3つを同時に吸光するという非線形プロセスに依存する。このような励起には、狭い焦点ボリュームのみで実現しうる高い時空間的な光子密度が要求される。この空間的に限定される光学効果によって、2PMよりバックグラウンドレベルを数オーダー低くできる。IRレーザの励起波長は、対象となる主要な蛍光タンパク質やGECIの3光子吸光窓に合わせ、比較的吸水率の低いスペクトル窓に置く必要がある。リンヤン・シー氏(Lingyan Shi)と協働者が証明したように、より長いIR波長を操作することで、光学散乱をさらに減少させ、侵入度を拡張できる⁽²⁾。これらの理由により、3PMにおける最適な励起波長は、緑色タンパク質では1.3μm、赤色タンパク質では1.7μmとなる。

3光子吸光プロセスは低確率のイベントであり、蛍光シグナルが発生するためには超高ピークパワーを必要とする。2PMと比べると、瞬間的なピークパワーと光子密度は数オーダー高くなければならず、一般的には1~100MW範囲だ。このピークパワーの増加は、パルスエネルギーをマイクロジュールレベルにまで上げ、一時的なパルス幅を100fs以下にまで下げるときに最大に達するが、操作するときは適度な平均パワーレベル(通常は数十~数百mW)で

ある。これにより、損傷、特に平均パワー超過と関連する熱、光毒性、光損傷の影響を受けやすい構造のイメージングの適合性を確保する⁽³⁾。

高性能のレーザツール

ファイバまたはダイオード励起固体(DPSS)アーキテクチャをベースにする1μmのイッテルビウム超高速増幅器は、これらのニーズをサポートするのによく適する。ロバストでコンパクトであり、使いやすくするために全自動化されている。再生増幅スキームにより、アプリケーション要求に正確に一致する、さまざまな繰返し率とパルスエネルギーで操作できる。3PMの場合、1MHzの繰返し率と数十μJのパルスエネルギーが一般的である。イッテルビウム超高速レーザと増幅器の重要な制限は、スペクトル選択性がないことであり、1μm励起のアプリケーションに適合する直接使用に限定される。3PMで必要とされる1.3μmや1.7μmの波長とするために、共線・非線形ハイブリッドな光パラメトリック増幅器(OPA)が、イッテルビウム増幅器からの1μmの放出波長の第二高調波と合わせてポンプすることが考えられる(図2)。

このタイプのハイブリッドOPAを光源として使用する3PMの設定では、高パワーのイッテルビウム超高速増幅器(スペクトラ・フィジックス社の30WのSpiritレーザなど)を、最初に520nmに周波数を倍増させる。残った1040nmの一部は、適切な媒体に照射されて幅広いスーパーコンティニウムを発生する。これは、光パラメトリック増幅プロセスのシードとして作用する。増幅は、2種類の逐次段階によって実現する。第1段階で使われる非共線スキームでは、広いスペクトル波長域が発生し、

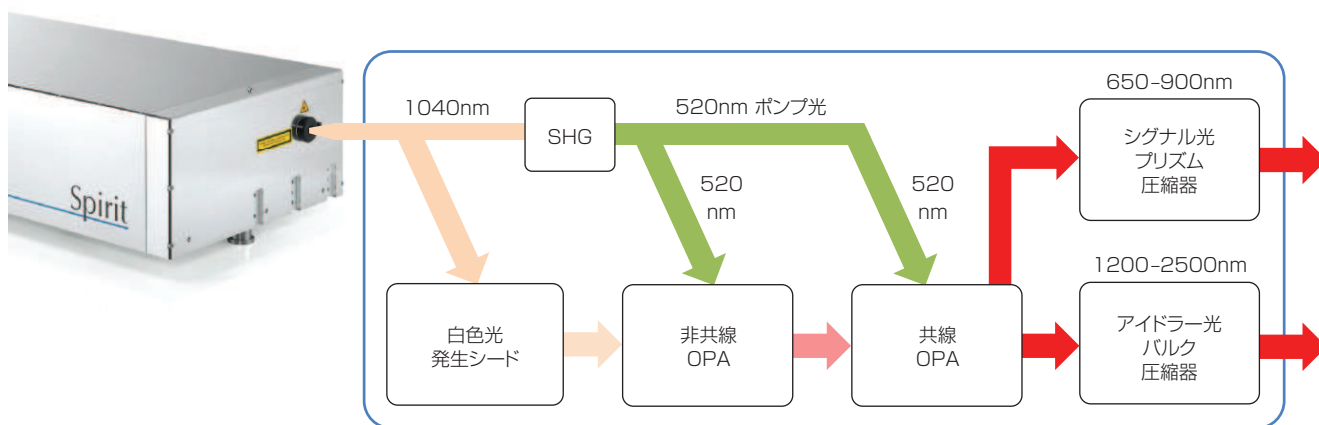


図2 ハイブリッド光パラメトリック増幅器(OPA)の一般的なアーキテクチャは、高パワーのイッテルビウムベースの超高速増幅器によって励起される。コンパクト、ロバスト、フレキシブルであり、3PMの要求を完全にサポートする。

やがて時間的に短パルスに圧縮される。第2の共線段階では、シグナル光とアイドラー光の両方の波長に広がり、広く調整可能な出力をもたらす。両方の段階で、高パワーの520nmビームをポンプする。シグナル光とアイドラー光のビームはスペクトル的に広

く、時間的に分光される。プリズムベースのスキーム内のシグナル光と、バルクスキーム内のアイドラー光の両方の出力ビームは最後に再圧縮され、極めて短いパルス持続時間(100fs未満)と超高ピークパワー(20MW以上)に到達する。特に、アイドラー光は20MW以上のピークパワーで1200~2500nmのスペクトル域をカバーする。この値は、3光子イメージングにおけるピークパワーのいき値を超える。

を光学的に記録したことを明らかにした⁽⁴⁾。「かつては不可能だったが、今では無傷のマウス内で活動中の神経細胞を一細胞解像度で見ることが出来る。これは、神経科学の研究に対して新たな可能性を開くものだ」とシュ氏は言う。

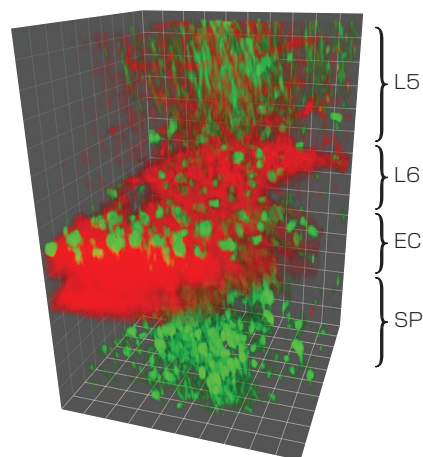


図3 マウスの皮質(L5とL6)と海馬(SP)において、遺伝的にコードされたカルシウムインジケータ(GECI)であるGcaMP6sでラベルされた神経細胞が、3PMによって緑で、第三高調波(THG)によって赤で描かれている。海馬(SP)の神経細胞の自然活動が、脳表面から1mm以下の深いところで記録された⁽⁴⁾。(提供:カーネル大、シュ氏)

in vivoの海馬に届く

シュ氏とカーネル大の協働者は、3PM開発と、脳の深部の機能的イメージング利用のパイオニアである。最近の研究では、同氏のチームは、無傷のマウス脳内で1mmより深いところにある海馬の神経細胞からの自然活動

研究(図3)は、特注の3光子顕微鏡と、シングルボックスの全自動1μm超高速増幅器(Spirit)によってポンプされた非共線光パラメトリック増幅器(Spirit-NOPA)を用いて実施された。「Spirit-NOPAシステムなど、新たに発売された商業レーザは、今では1.3μmと1.7μmに調整可能な出力を簡単に実行でき、3光子イメージングを実用的なものにしている」と同氏は述べる。「これらのレーザは扱いやすく、既存の多光子顕微鏡に組みやすい」。

参考文献

- (1) H. Dana et al., eLife, doi:10.7554/eLife.12727 (2016).
- (2) L. Shi et al., J. Biophoton., 9, 1-2, 38-43 (2016); doi:10.1002/jbio.201500192.
- (3) J. Klein, "Ultra-high peak power femtosecond lasers advance bioimaging," BioOptics World, 8, 9, 72-77 (Sept. 2015).
- (4) D. Ouzounov et al., Nat. Methods, doi:10.1038/nmeth.4183 (2017).

著者紹介

ジュリアン・クラインは米スペクトラ・フィジックス/MKSインストゥルメント社(MKS Instruments)の製品マーケティングのシニアマネージャー。