

生命が持つ速度で見る 高解像度なマルチカラー 3D イメージング

ダン・カレン、ヘンリック・チャーデン、ミカエル・マイコフスキー

革新的なレーザ蛍光技術である掃引共焦点平面励起 (SCAPE) 顕微鏡法は、以前の手法の限界を克服し、幅広いライフサイエンス分野での有用性を提供している。

生命科学の多様な分野の研究者たちが共通して求めているものに、3D 蛍光顕微鏡ツールがある。3D 蛍光顕微鏡ツールは、高速で高画素数、一細胞分解能が特徴で、対象物に光損傷をほとんど与えずに画像を取得できる。多くの開発と技術的な改善にもかかわらず、確立された技術のほとんどは、前述したパラメータの少なくとも1つを妥協するトレードオフがいまだに存在している。

進歩とトレードオフ

例えば、共焦点顕微鏡法は、マルチヘルツの繰返周波数にて巨大な xyz 体積を高解像度で画像化できない。これ

は、単一スポットを走査する速度に物理的な限界があるからだ。さらに、1ピクセルあたりの滞留時間が短いため、最速の共焦点走査には高出力のレーザを必要とするが、結果として生きたサンプルに大きな光損傷を与えてしまう。

二光子顕微鏡法は光損傷を劇的に抑えるが、このような一点アプローチには速度・解像度・体積のトレードオフがあり、結果として同じ問題に直面する。最近開発された高速な音響光学変調器 (AOM) は、事前を選択した小さな体積を高速に走査できるが、この方法は巨大な体積または動く生物に限定される。

従来のライトシート顕微鏡法では、xy 面全体を同時にサンプリングできる

が、試料に側面からアクセスする必要があり (それゆえ特別な準備も必要)、3D データを構築するにも時間がかかる。さらに、光学系の同期とステージの移動が必要で、これらの技術は複雑かつスローである。

米コロンビア大 (Columbia University) のズッカーマン精神・脳・行動研究所 (Zuckerman Mind Brain Behavior Institute) のエリザベス・ヒルマン教授 (Elizabeth Hillman) と彼女の同僚は、マウントの有無に限らず、さまざまなサンプルの形状をサポートしながら、上記の制限を超える革新的なアプローチの開発に取り組んだ。成功した結果は、2015年に初めて掲載された⁽¹⁾。

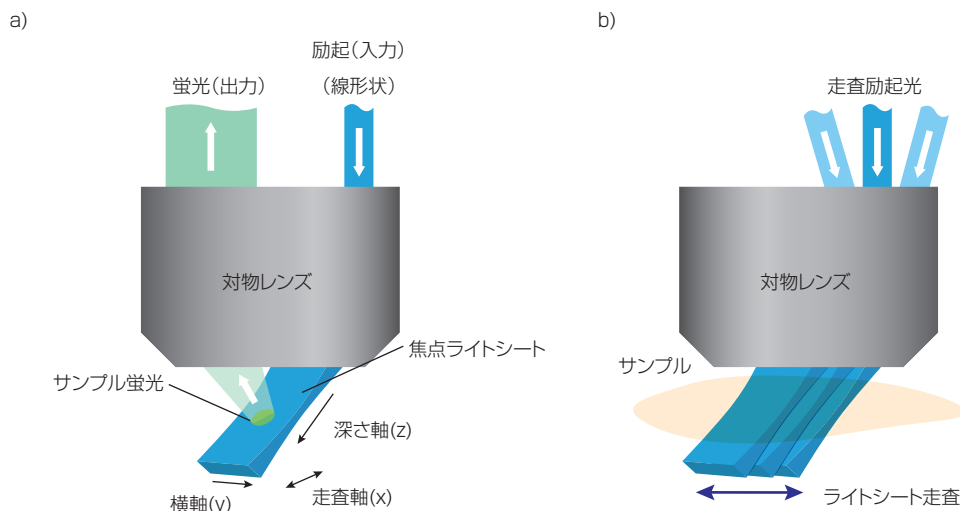


図1 SCAPEでは、線形状のビームを用いる顕微鏡の一次対物レンズの軸外照明によって、斜めにライトシートを形成する(a)。SCAPEは、照射された平面の連続イメージを取得しながらライトシートを走査することで、立体画像を構築する(b)。

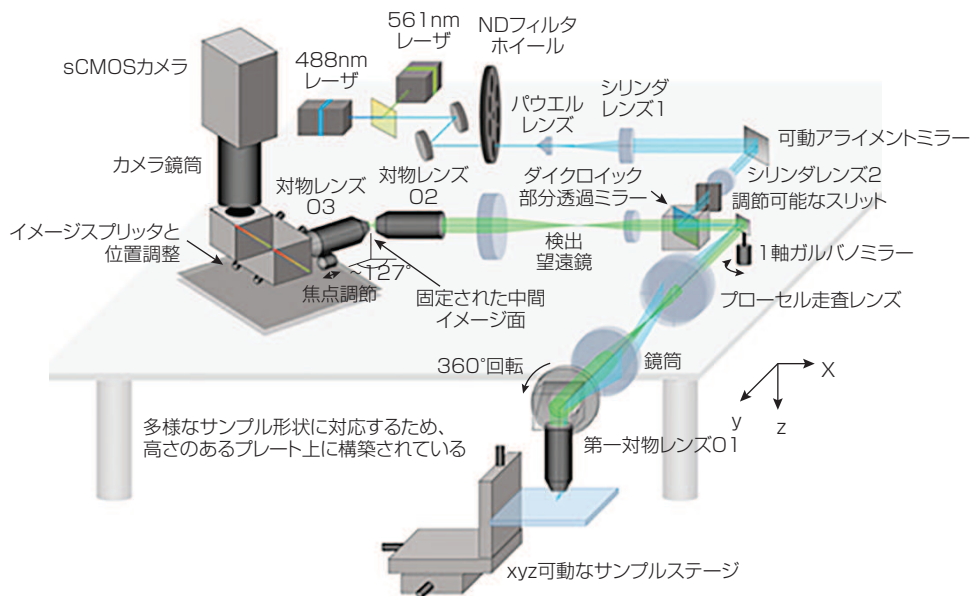


図2 可動調節ミラーはSCAPE 2.0の重要な素の1つである。ヒルマン教授提供。

アップデートされたバージョンであるSCAPE 2.0は2019年に報告され⁽²⁾、ライフサイエンスで幅広い有用性を認めた独ライカ・マイクロシステムズ社 (Leica Microsystems) が現在使用権を取得している。

SCAPEの原理

ヒルマン教授は次のように説明する。「シングルまたはマルチビーム走査では真に高速なイメージングを実現できないと考えていた。仮に必要なとする走査速度を得られたとしても、各ピクセルの滞留時間が短すぎるため、許容できるシグナルノイズ比で画像を取得できないだろう。そこで、ライトシート顕微鏡について考え始めた。当時のほぼすべてのシステムでは、試料の周辺でお互いに90度となるよう対物レンズを2つ設置する必要があった。そこで生じた疑問は、単一の対物レンズ構成の中に、ライトシートのマルチピクセルの利点を組み合わせることはできないか、ということだった」。

チームは、高開口数の対物レンズの

端を通る軸外パスを使用することで、顕微鏡の真のxy平面に対して45度の位置で励起光シートを作成できることを発見した(図1)。この斜面からの蛍光を画像化するために、斜面顕微鏡に似た手法を使用し、対物レンズのイメージング面を回転させて正確にカメラの焦点を合わせる⁽³⁾。ヒルマン教授のチームは、ライトシートを左右に動かす

ために、対物レンズの上流に走査ミラーを使用する。走査ミラーは、移動するライトシートで焦点を維持するため、蛍光を反射させてリダイレクトする役目もある。ミラーの動きに合わせて平面を重ねることで、3Dボリュームの画像を素早く、繰り返し生成できる。

SCAPE 2.0の詳細(図2)は、説明するほどの利点がある。傾斜した平面(視

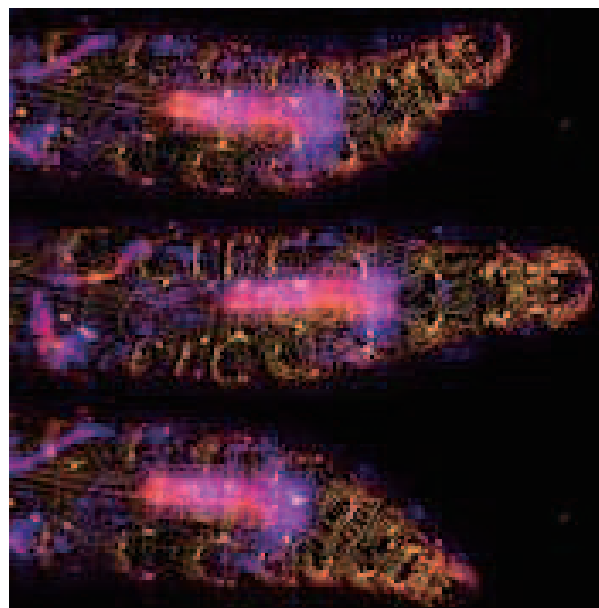


図3 SCAPE 2.0の10vpsでとらえたショウジョウバエの幼虫が動くときの3つのイメージ。ここでは、腹側固有受容ニューロンをGFPでラベルし、488nm励起を用いてイメージングした。黄色から青までの色は、サンプル中の異なる深度からの信号を示す。詳細はR. Vaadia et al.⁽⁴⁾及び本研究のリアルタイムビデオシーケンスは<http://bit.ly/SCAPE2019>を参照。

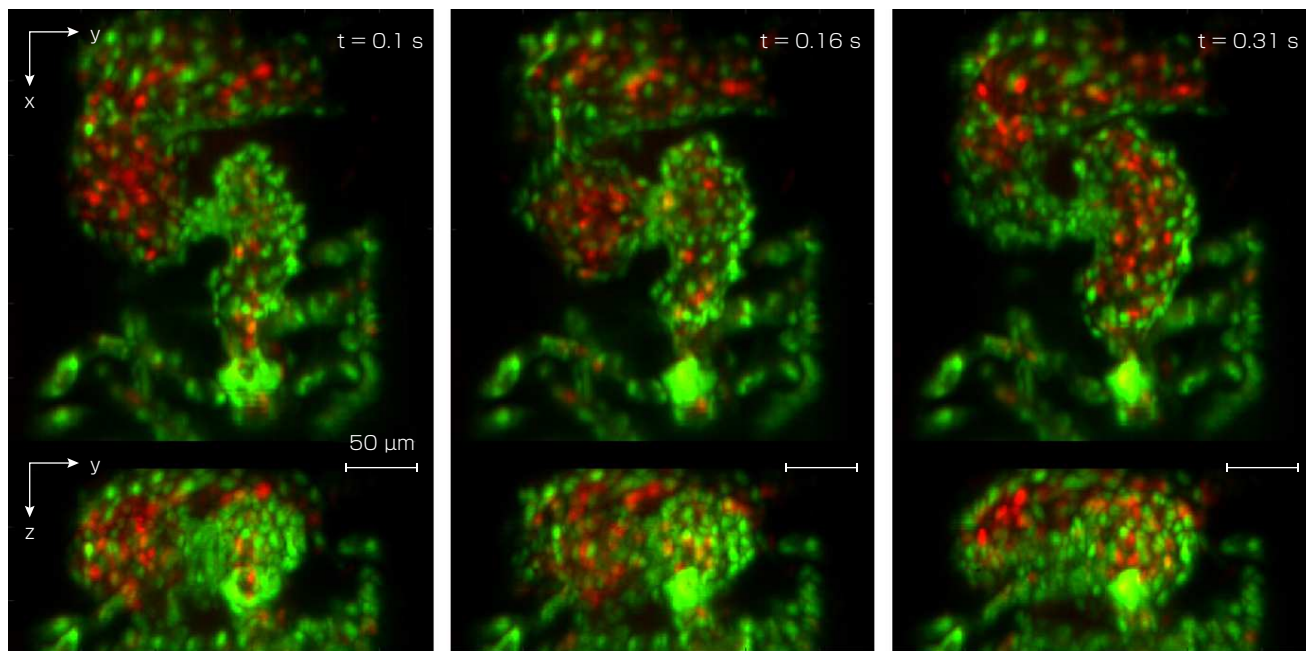


図4 3枚の写真は、ゼブラフィッシュの心臓の拍動をリアルタイムで、100vpsで撮影したビデオから作成した。上がz軸からの画像、下がx軸からの画像である。連続イメージでは、心臓の心室が圧縮されると流出弁が開き、心房から充満する。心臓壁の内皮細胞はEGFP(緑)で、赤血球はDsRed(赤)でラベルしている。2つの蛍光体は488nmレーザ光(サンプルでは0.6mW)で励起した。ビデオを含む詳細はV. Voleti et al.⁽²⁾を参照。

野軸に対して斜めにあるライトシート)をイメージングする問題は、キャプチャした蛍光を中継し、第2の対物レンズを使用して中間点で実際の斜め画像を形成することで解決した。この画像は、ライトシート面をカメラに平面的に焦点を合わせるため、約127度の角度で設置した第2の対物レンズを通じてキャプチャされる。

カメラ上の最終的な画像は、サンプル内から見た斜めのy-z平面であり、通常は長方形である。ほとんどの組織への光の透過が限られるため、yに対するz方向がより狭くなっている。そのようなサンプルでは、カメラを走査して、zの深さに対応する行数を少なくして読み出すことが有用である。これにより、より高速でイメージングできる。例えば、使用するカメラに依存するが、1000~18000fpsの間で200行を読み出すことができる。

走査同期の課題は最初、ポリゴンミラーを使用するライトシートを走査す

ることで解決した。検出パスには、励起光で使用されるファセットに隣接するファセットが含まれている。「ポリゴンミラーはSPACEで最初の発想だったが、すぐに、ガルバノミラーを1枚使用するほうがシンプルで効果的であることに気づいた。この変更により、システム構築が簡便で安価となり、より多くの光をカメラに誘導し、システムの走査パターンを制御することが容易になった」と、ヒルトン教授は説明する。

ガルバノミラーの他に可動部品がないため、SCAPEの全体スピードを制限するものは、カメラのフレームレートとシグナルノイズ比(SNR)のみである。特定の実験によっては、ガルバノミラーは10~100Hzで走査する。これは、前例のない10~100ボリューム/秒(vps)に相当する。SCAPEでは、直線的な掃引に続いてほぼ瞬時にリセットされる、従来の鋸歯状走査パターンを使用する。ガルバノミラー掃引の振

幅と、掃引ごとのカメラフレーム数によって、システムの視野とx方向のサンプリング密度が決定する。ボリュームレートやサンプリング密度、視野を上げるには、より高速なカメラを使用する。チームのイメージングのほとんどは標準的なsCMOSカメラを使用しているが、増強器を内蔵した超高速CMOSカメラを用いることで300vpsのイメージングに到達した。

ライトシートは画像視野軸zに対して斜めに掃引されるため、各深度スライスには次のスライスに対してわずかな補正がある。顕微鏡のコンピュータは簡単な変換を行い、この「傾斜」を補正して歪みのない3D画像ボリュームを生成する。

デジタルレーザ変調

機能的指標や蛍光タンパク質を含む複数の蛍光体を同時にモニタリングすることで、動的な挙動(筋肉の動きなど)と分子組成、細胞構造、神経信号

などとの相関関係を把握できる。このような応用を SCAPE が容易にサポートできるのは、米コヒレント社 (Coherent) のプラグ・アンド・プレイの OBIS 光励起半導体レーザー (OPSL) を用いた多波長励起による。スペクトルが分かれた2つ以上のイメージをカメラ上で同時に取得できるオプションがある。

ヒルトン教授は、以前のレーザータイプと比較して、本研究における OPSL 技術の革新的な利点を複数挙げる。同教授は、利用可能な波長と出力レベルの範囲が広いことに言及する。「数年前にあったのは488nm、532nm、638nmであり、これくらいしか使用可能な出力がなかった。黄色とオレンジだけが選択肢だった。しかし今日では、一般的に利用できる多くの蛍光体の励起にほぼ一致する波長で、数十から数百ミリワットのレーザー源を選択できる」。SCAPE システムのほとんどが複数の自由空間レーザーを統合しており、ファイバ結合よりもフレキシブルなものにしていると説明する。「レーザーがコンパクトで、すべて同一のフォームファクタと、同じ電子インタフェースを有していることは非常に便利だ」。これまでいくつかの実験では、5種類ものレーザー波長を使用していると、ヒルトン教授は述べる。また、SCAPE を定期的にワークショップや講義に持ち運び、入手可能な OBIS レーザーを最小限の再配置で使用していると説明する。

デジタルイメージングは、OPSL のもう1つの重要な特徴である。OPSL は最大25kHzの速度でオンオフが可能なので、連続するフレームにおいて正確なタイミングで励起波長を交互に切り替え可能。これは、研究室で製作できる、ダイクロイックフィルタとダ

イクロイックミラーで構成されるイメージスプリッターを用いた多波長検出によって補完される。この装置は、スペクトルが分かれた画像を最大1280ボクセル幅の視野で投影するが、単一波長動作と比較してイメージングスピードに影響はない。

出力と範囲の証明

SCAPE の出力と範囲を証明した、最近の共同研究を2つ紹介する。

全身、脳、神経系を含む、小さな生体のイメージングは神経科学のトレンドである。ヒルトン教授らは最近、生きたショウジョウバエの幼虫で遺伝的にコードされたカルシウム感受性蛍光タンパク質の高速3Dイメージングに関する研究を発表した(図3)。幼虫が蠕動運動しているときの体と神経系の複雑なダイナミクスをとらえることで、変形するときに体壁に沿った神経細胞がどう発火するのかをチームは追跡した。

また、チームはSCAPEを用いて、生きた齧歯類の大脳皮質内ニューロンの樹状突起や⁽⁵⁾、マウスの鼻にある嗅覚ニューロンの動的な発火の研究⁽⁶⁾、そして自由に動く線虫全体のイメージングを実施した。さらに、ゼブラフィッシュ胚の心臓の拍動の動的なビデオを作成した⁽²⁾。

ゼブラフィッシュ胚の心臓の研究では、脊椎動物の心臓発生に関する知見

をもたらした。これには、構造や機能における遺伝的要因と環境要因の影響が含まれる。従来の顕微鏡法ではタイムゲーティングが必要で、2~4Hzの自然な心拍による不規則な不整脈などの詳細を必然的に見逃してしまう。赤血球(RBC)のフロー解析に対する完全な4D粒子トラッキングも不可能である。ヒルトン教授のチームは、小児心臓学者のキマラ・ターゴフ教授(Kimara Targoff)と共同研究を実施した。ターゴフ教授の研究室では、ゼブラフィッシュを用いて、胚における心臓の先天性異常の原因となり得る遺伝的変異を解明している。この共同研究により、拍動する心臓の周辺を赤血球が駆け巡る様子を100vps以上の動画で撮影した。また、GCaMPラベルを利用して、拍動する心臓の中を駆け巡るカルシウム活性の波を個々にとらえた(図4)。

要旨

ライフサイエンス全般において、蛍光顕微鏡法は分子、細胞、器官、生体レベルで事象を結びつけるためのツールとして研究者が使用している。生命が持つ速度で、高解像度なマルチカラー(3D)画像を記録する性能である「4D顕微鏡法」は、この研究をさらに加速する上で重要な役目を果たそうとしている。

参考文献

- (1) M. B. Bouchard et al., Nat. Photonics, 9, 2, 113~119(2015).
- (2) V. Voleti et al., Nat. Methods, 16, 10, 1054~1062(2019).
- (3) C. Dunsby, Opt. Express, 16, 25, 20306~20316(2008).
- (4) R. Vaadia et al., bioRxiv, 467274(2018).
- (5) E. M. Hillman et al., Curr. Opin. Neurobiol., 50, 190~200(2018).
- (6) L. Xu et al., Science, 368, 6487, eaaz5390(2020).

著者紹介

ダン・カレンはコヒレント社プロダクトマネージャー、ヘンリック・チャーデンは同社プロダクトライインマネージャー、ミカエル・マイコフスキーはシニアサイエンティフィックセールスエンジニア。e-mail: dan.callen@coherent.com URL:coherent.com