

2光子顕微鏡と平均研究予算10万ドル 可変か固定波長フェムト秒レーザーか

アンドレイ・アンドリーフ

超高速レーザー技術に精通していない生物学者は多いが、それでも2光子顕微鏡では、可変あるいは固定波長レーザーかを決定する必要がある。

2光子顕微鏡というライフサイエンスで多くの研究者が使用する蛍光イメージング技術は、時間と共に成熟したアプリケーションになった。2光子顕微鏡のセットアップで最も高価な装置はフェムト秒レーザーだが、ほとんどの生物学者が精通していない技術である。利用される最も一般的なタイプは、チタンサファイア(Ti:sapphire)チューナブルレーザーである。これは、コストが20万ドルにもなる。しかし、同等の結果をもたらす、より安価で小型の固定波長ファイバレーザーが、入手できるようになっている。

イメージング向けにチタンサファイアとファイバフェムト秒レーザーを突き合わせて比較すると、その性能は非常に似ていることがわかる⁽¹⁾。現在、12社を超える会社が2光子顕微鏡向けのレーザー光源を出している。多数のレーザーパラメータが追加されていて、決定が難しい。本稿では、これら2種類のレーザーのどの特徴が、イメージング実験に重要であるかを説明し、研究者が十分な情報を得た上で購入を決定する際に役立つことを目的にしている。

フェムト秒レーザーと生物学的発見

フェムト秒レーザーに依拠した顕微鏡実験には、いくつかのタイプがある。ここでの焦点は、2光子蛍光と光遺伝学による、マウスの脳深部イメージングとゼブラフィッシュの全脳イメージ



ングである。蛍光タンパク質と光ゲートイオンチャネルの吸収スペクトル範囲は、通常900~1100nm(近赤外域)である。長波の光のほうが深く浸透し、散乱が少ない、また不可視光の利用により、透明動物では光に感度がある実験が可能になる。2光子蛍光は、100mWオーダーのハイパワーを必要とする。シングルフォトンイメージングでは、マイクロワットである。吸収効率は、光エネルギーにも依存する。つまりフェムト秒レーザーなどの短パルス光源の利用が好便である。

これらのアプリケーションに関心がある研究者は、伝統的に、チューナブルチタンサファイアレーザー(1986年ごろ開発された)に依拠していた。これは、700~1000nm範囲の所望の波長で光を出力する。現在、多くの企業が、こうしたシステムを提供している。波長選択機能は、多色イメージングを可

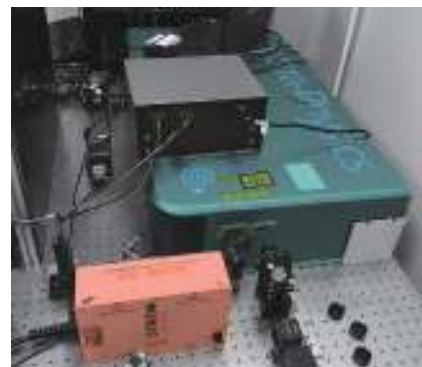


図1 固定波長超高速レーザー(上)と電源供給(左)は、チューナブルチタンサファイア代替品よりも小型である(固定波長レーザーと電源供給はオレンジ;チューナブルは青緑)。しかし、2光子顕微鏡では、おのこのレーザー技術に、研究者が慎重に考慮すべき長短がある。(提供:アンドレイ・アンドリーフ氏)

能にする。それには、柔軟な一連の蛍光色素分子を利用する。また、新しい蛍光色素分子の設計など、分光学的アプリケーションも可能になる。

チタンサファイアシステムで積み上げられた経験は豊富である。これらのシステムの主要な欠点に含まれるのは、12万ドルを超えるコスト、物理的なサイズと重量。このために、イメージングセットアップ間で光源を柔軟に動かすことができない。実験室やイメージングコアは、それほどの投資を準備するのは難しいかもしれない、というのは平均的な研究装置予算は、年に10万ドル程度だからである(2011年、Lab Managerの報告)。

単一波長フェムト秒レーザーは、2004年ごろに登場した比較的新しい技術である。これらの光源は、相対的に小型で価格は4万ドル程度からと安価である。チタンサファイアレーザー光源と同

等の特性を持つ光を供給するが、出力波長は可変できない。より小型で省電力動作であるため、水冷の代わりに空気が冷却を利用できる(図1)。しかし、これらのシステムには経験が不足している、特に動作安定性とサービスについてである。

現在提供されているもの

イメージング用レーザを規定するパラメータはいくつかある(表1)。何よりもまず、波長である。GFPやGCaMPなど、よく使われる蛍光たんぱく質は、920~940nmの光で励起される。一方、レッドシフトたんぱく質は、1040~1100nmの光で励起される。

イメージングと光遺伝学に求められる電力は、慎重に考慮されなければならない。レーザメーカーは、レーザパワー向上に熱心に取り組んでいるが、実際のイメージング実験では、そのようなハイパワーレベルは必要でないかもしれない。点スキャンアプリケーションは、920nmで10~100mWを使うが、ライトシート顕微鏡は、500mWまでが必要かもしれない。これらのケースでは、1~2Wを超えるレーザパワーは、一般的に50%のパワーロスを考慮した後でさえ必要はない。もっとハイパワーレーザのアプリケーションの1つでは、レーザ光源を2あるいは3顕微鏡で分けている。最後に、チューナブルレーザは、その波長範囲で出力は一定でない。例えば、920nmで2W出力するレーザは、1040nmではわずか1W出力になる。

もう1つ重要なパラメータは、レーザパルス幅である。短パルスのほうが、蛍光シグナル生成では効率がよい⁽²⁾。通常、イメージング向けのフェムト秒レーザは、80~200fsレーザパルスを生成する。3番目に重要な数字は、パ

表1

たんぱく質	2光子励起 (nm)
eGFPとGCaMP6	850~950
tdTomato、RFPとRCaMP	1050~1100
ChR2	920
ReaChR	970~1020

ルス繰り返しレートである。標準的な繰り返しレートは、80MHzである。しかし、繰り返しレートが低いほうが、同じ平均パワーで効率的な蛍光励起ができることが示されている⁽³⁾。まとめると、繰り返しレートが低く、短パルスであるほうが、光損傷が少ないことが、ゼブラフィッシュの実験で示されている⁽⁴⁾。

高速スキャンイメージング法で1つ考慮すべき重要な点は、ユーザーが最高パルスエネルギーを探していることである。この場合、シングルイメージピクセル生成に数パルスを使うだけかもしれない(共振型スキャナによるイメージングなど)。平均パワーとパルスエネルギーは、以下のとおり関連している。

$$\text{平均パワー} = \text{パルスエネルギー} \times \text{繰り返しレート}$$

実験に適切なレーザ光源を選択する問題は、チューナブル光源では、これらのパラメータは、相互に関連しているということである。より深い浸透は、より長い波長で達成可能である。しかし、パワーとパルス幅は、選択した波長の関数であるので、すべての定量的パラメータを最適化することはできない。固定波長レーザは、工場テスト仕

様となっているので、そのパラメータは、調整できない。

追加オプション

レーザシステムは、光源そのものとは別に複数の機能がついていることがある。

企業の中には、パワー調整システムをレーザに組み込んでいるところもある。これは、2光子顕微鏡セットアップの重要な部分である。適切なタイミングで適切な光量を供給する際に役立つからである。しかし、見込みユーザーは、そのようなシステム効率を考慮すべきである。パワー調整システムによっては、25%までレーザパワーを消費するものがあるからだ。ほとんどのポピュラーなものはポッケルスセルを使っているが、カスタムシステムの中には、1万~1.5万ドルのコストで、2~5%以下の消費のものもあるが、追加のエレクトロニクスや制御方式も必要になる。

もう1つの有用なオプションは、組込前置補償である。光が光学素子を進むにつれて、分散のために光パルスは時間と共に「延びる」。最初60fsのパルスは、顕微鏡の光学部品を通過した後には、サンプルで300fsに延びることがあり得る⁽⁵⁾。これは、2光子蛍光信号を最大50%低下させる。前置補

レーザー技術の進歩と共に 50年
レーザー・光技術の
ソリューションプロバイダ



レーザー光源



光計測器・測定器



光学関連部品・光周辺機器

検査装置・
イメージング機器

加工装置



光技術に関するご相談は

<https://www.japanlaser.co.jp/>

E-mail: jlc@japanlaser.co.jp



本社 〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1

TEL: 03-5285-0861

大阪支店 TEL: 06-6323-7286

名古屋支店 TEL: 052-205-9711

償は、こうした分散効果を中和する。レーザーの中には事前補償を組み込んでいるものがあり、これは、コンピュータ制御で調整し、高品質20X 1.0 NA 対物レンズやミラーなど、多くの分散要素に対処する。カスタム事前補償光学システムを組み込むには有能なエンジニアが必要になる(チャープミラーペアを使うソリューションは、3000ドル程度のコスト)。

事前補償あるいはパワー調整機能を自分で構築して、コストを節約することにメリットがあると考える人もいる。しかし、企業は、こうした項目を部品だけでなく労働、組込み時間、ユーザーインターフェース、堅牢さもベースにして見積もっている。

チタンサファイアレーザーだけで供給される1つのオプションは、デュアル出力である。この場合、レーザーはチューナブル700~1000nm レーザ光の同期パルスと、独立した出力の1040nm 固定波長の光を生成する。この機能により、チューナブル範囲の出力を変えることなく、GFPとRFPの正確に同時イメージングが可能になる。固定波長レーザーで同じ結果を達成するには、2つのレーザーが必要になる。デュアル出力オプションでは、固定波長出力は、通常、事前補償がないか、工場設定事前補償値のみのいずれかである。

参考文献

- (1) J. M. Bueno, J. Ávila, and P. Artal, *Appl. Opt.*, 58, 3830-3835 (2019); <https://doi.org/10.1364/ao.58.003830>.
- (2) C. Xu and W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B*, 13, 481-491 (1996); <https://doi.org/10.1364/josab.13.000481>.
- (3) G. Donnert, C. Eggeling, and S. W. Hell, *Nat. Methods*, 4, 81-86 (2007); <https://doi.org/10.1038/nmeth986>.
- (4) V. Maioli et al., *bioRxiv* (Jun. 3, 2020); <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.02.130377v1>.
- (5) J. B. Guild, C. Xu, and W. W. Webb, *Appl. Opt.*, 36, 397-401 (1997); <https://doi.org/10.1364/ao.36.000397>.

著者紹介

アンドレイ・アンドリーフは、カリフォルニア技術研究所、David Prober ラボのポスドク研究者。
e-mail: aandreev@caltech.edu proberlab.caltech.edu

購入プロセスの進め方

営業担当者との付き合いでは、怖気づくことがある。潜在的な購入者は、技術情報を要求しなければならない。レーザスペクトルやパルス形状(いわゆるFROG計測)、購入することになる追加オプションすべての透過パラメータ、冷却方式の詳細、パワーと周囲温度要件、無停電電源を導入する必要があるかどうかなどである。購入者が、他の最近の購入者に直接経験を聞くために接触できるように販売店に依頼することを勧める。最後に、システムサービスコストとプロセスについて尋ねること。通常、販売店は、遠隔で問題を解決できるが、われわれが見てきた1つの重要な点は、重大な問題の場合に代替装置を迅速に出荷できることである。

結論として、研究者に明確に定義されたアプリケーションがあるなら、例えば事前選択した蛍光色素分子や光遺伝学分子をベースにしたものがあるなら、固定波長レーザーが適切な投資となる。しかし、さまざまな励起波長を必要とする多数の蛍光色素分子を利用する、あるいはイメージングパラメータを新しい、つまりまだ十分に研究されていない分子に最適化するなら、チタンサファイア技術ベースのチューナブルレーザーが適切なソリューションである。