

次世代の超高速レーザーにより非線形細胞イメージングの障壁が低減する

ロバート・V・キメンティ

細胞を高解像度で化学イメージングする非線形顕微鏡の登場を加速させるのが、モードロックファイバとディスクレーザーだ。

生きた細胞や細胞内小器官を化学的・形態学的に解析することは、生物科学の基礎となるものである。これらの技術を組み合わせて細胞や細胞内小器官の2次元及び3次元の化学画像を作成することで、細胞機能をより深く理解できるようになり、現在の生物学や医学に多くのブレークスルーをもたらしている。過去40年以上にわたり、レーザーは高解像度な化学イメージング技術、特にラマン分光法と蛍光分光法に基づいた技術の開発において計り知れない役割を果たしてきた。本稿では、レーザー顕微鏡の歴史を簡単に振り返る。超高速レーザーシステムに焦点を当てながら、当時のレーザー技術が特定の技法の優位性にどのような影響を与えたかについても同時に議論する。

多光子蛍光顕微鏡やコヒーレントラ

マン顕微鏡のような非線形プロセスには、従来のラマン分光法や蛍光細胞イメージングと比較して幅広い利点がある。これらの技術は、感度、解像度、ラベリングの有無にかかわらず操作可能であるという点において、特に有望である。こうした技術が最初に実験的に証明されたのは30年以上前だが、超高速レーザー光源が必要なことから商業的な実行可能性は限られていた。しかし幸運にも、コンパクトなモードロックファイバレーザーとディスクレーザーの近年の急成長により、物理学や工学の研究室から生物学や生化学の研究室への導入がようやく可能になっている。例えば、図1に、独トプティカ・フォトンクス社 (TOPTICA Photonics) の Femto Fiber ultra 920 を使用して観察した幹細胞の高解像度多光子画像を示す。

レーザー顕微鏡の歴史

二光子蛍光分光法やコヒーレント反ストークスラマン分光法 (CARS) 及び誘導ラマン顕微鏡 (SRS) は、多光子蛍光顕微鏡とコヒーレントラマン顕微鏡の特定の一部分であり、それら自体が蛍光顕微鏡とラマン顕微鏡の一部である。従って、レーザー顕微鏡の進化を総じて理解するためには、これらのすべての発展を同時に見ていくことが不可欠である。生物科学におけるレーザー顕微鏡が最初に使われたのは、1982年に米海軍研究試験所 (Naval Research Laboratory) でマイケル・ダンカン氏 (Michael Duncan) らが報告したもので、タマネギ細胞の CARS 画像を作成するためだった⁽¹⁾。

皮肉なことに、2年後には、生きた細胞をイメージングできる最初の走査型共焦点蛍光顕微鏡が米オックスフォード大 (Oxford University) のインゲマル・コックス氏 (Ingemar Cox) によって構築された⁽²⁾。ラマン顕微鏡は化学的特性を欠く一方で、蛍光顕微鏡ではレーザー要件が大幅に簡素化された。コックス氏は、441.6nm で 10mW の HeCd レーザを用いることで、フルオレセインイソチオシアナート (FITC) で染色したハムスター腎臓細胞をイメージングできた。試料の前処理の必要と光化学的劣化の可能性があるにもかかわらず、よりシンプルなレーザー要件が理由となり、共焦点顕微鏡は長い間、

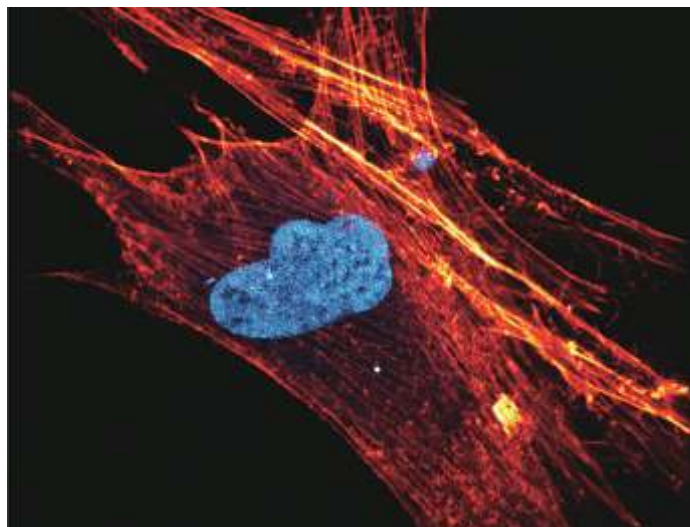


図1 アクチンをATTO、核をDAPIでラベルしたヒト幹細胞の高解像度多光子画像。(提供：ミュンヘン応用科学大のトーマス・ヘラー氏)

細胞イメージング方法論の支配的な存在となった。

それでも非線形顕微鏡技術の研究は続き、1985年にはイスラエルのバルイラン大 (Bar-Ilan University) のアイザック・フロイント氏 (Isaac Freund) とモーシェ・ドイツ氏 (Moshe Deutsch) が生体組織の第二高調波発生 (SHG) 顕微鏡画像を初めて発表した⁽³⁾。彼らはQスイッチNd:YAGレーザを用いて、ラット尾の腱のコラーゲン原線維の画像を作成し、原線維の方向と厚さを検出する性能を示した。解像度は約 $50\mu\text{m}$ と比較的粗かったが、細胞生物学においてラベルフリーな化学画像を開発する期待が高まった。

5年後、米コーネル大 (Cornell University) のウインフリート・デンク氏 (Winfried Denk)、ジェームズ・ストリックラー氏 (James Strickler)、ワット・ウェブ氏 (Watt Webb) は、約100fsのパルス幅を持つモードロック型色素レーザを用いて、生きた細胞の二光子蛍光顕微鏡画像における中心的な研究で非線形顕微鏡を次のレベルに押し上げた⁽⁴⁾。生きた細胞をイメージングするために近赤外線励起光源を用いることの利点は当初より明らかであったが、この技術が大量採用されるには当時のレーザ源は煩雑すぎた。1990年代から2000年代初頭にかけて、色素レーザに代わってセルフモードロック型チタン・サファイアレーザが登場したが、なおも高額で巨大であり、広く商業化されるには問題があった。幸い、過去10年間で、モードロックファイバレーザとディスクレーザの商業化により超高速レーザ技術にルネッサンスが起り、超高速レーザ光源のコストと複雑性が大きく削減された。例えば、トプティカ・フォトニクス社のFemto Fiber ultra 920 (図2) のレーザヘッド



図2 トプティカ・フォトニクス社のFemtoFiber ultra 920 (レーザヘッド部分のみ)。トプティカ・フォトニクス社提供。

は、サイズが $77 \times 165 \times 300\text{mm}$ 、重さが4kgしかない。一般的なモードロック型チタン・サファイアレーザは、これの40倍以上の大きさである。

二光子蛍光顕微鏡が最初に実証された同じ年に、ゲルウィン・パプルス氏 (Gerwin Pupples) と蘭トゥウェンテ大 (University of Twente) と独マックス・プランク研究所 (Max Planck Institute) の共同チームが、生きた1つの細胞をイメージングできる最初の共焦点ラマン顕微鏡を初めて開発したことも興味深い⁽⁵⁾。共焦点ラマンは優秀な空間解像度 ($1\mu\text{m}^3$ 以上) と優れた化学的特性をもたらした。残念ながら、共焦点ラマンは自発的なラマン散乱に依存するため、感度が低いという問題がある。当初の期待にかかわらず、本来は通信用に開発されたレーザと検出器の技術が共焦点ラマンに利用でき、共焦点蛍光に対抗できるようになるには、さらに15年かかることになった。

非線形顕微鏡レーザの現在の状況

約700~900nmで高度に波長可変で780nm付近でピーク効率を持つチタン・サファイアとは異なり、ほとんどのモードロックファイバとディスクレーザは900~1100nmの範囲で動作す

る。このスペクトル範囲は、生物学者が関心を寄せるほとんどの蛍光タンパク質の二光子吸収帯に見事に対応している。近赤外励起波長もまた、高い深度浸透性と低い光毒性という利点があり、生体組織のイメージングにおいて理想的なものとなっている。スイスのチューリッヒ大 (University of Zurich) のフェビアン・フォークト氏 (Fabian Voigt) らは、より長い波長による励起には利点があることを初めて実証した。彼らは2017年初頭に1027nmのパッシブなモードロック型ダイオード励起半導体レーザを開発し、チタン・サファイアレーザに匹敵する多光子イメージング性能を示した⁽⁶⁾。モードロック型ファイバレーザとディスクレーザの欠点として知られていることの1つに、単一の出力波長で動作することである。しかし今日、ターンキーの既成ソリューションとして、独アプライド・フィジックス & エレクトロニクス社 (Applied Physics & Electronics) のpicoEMERALD Sのようなものがあり、光パラメトリック発振器 (OPO) が内蔵された状態で利用できるようになる。

最近の例には、リアム・ウィルソン氏 (Liam Wilson) とウィリアム・ティッピング氏 (William Tipping) らが今年初めに発表したものがある。そこでは、

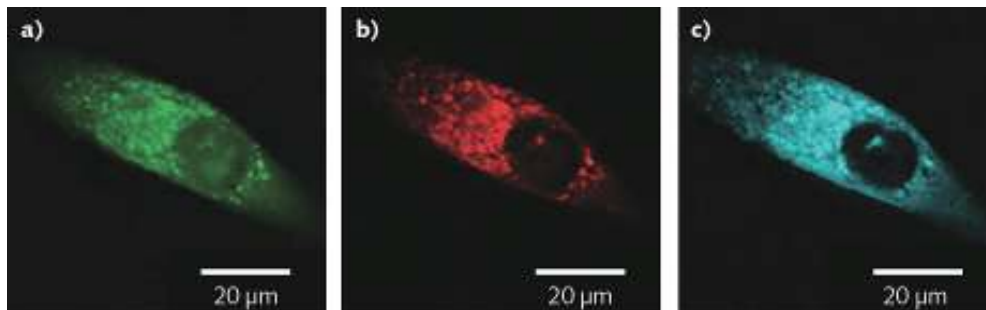


図3 細胞pHセンシングのために開発されたアルキンベースのレポーター分子で処理したヒト前立腺がん細胞の高解像度SRS画像⁽⁷⁾。緑は2933cm⁻¹のSRS強度、赤は2851cm⁻¹、シアンは2221cm⁻¹のSRS強度を示す。著者の許可を得て転載。

細胞間pHセンシングのために、アルキンベースのレポーター分子の細胞質分布をマッピングするためにSRSを用いた⁽⁷⁾。図3に、レポーター分子で処理した前立腺がん細胞の高解像度SRS画像を示す。緑の画像はタンパク質濃度を示すCH₃伸縮(2933cm⁻¹)、赤は脂質分布を示すCH₂伸縮(2851cm⁻¹)、シアンは細胞内pHのプロープとしてpHレポーター分子であるアルキンバンド(2221cm⁻¹)の強度分布を表す。1031.4nmのストークスビームと、700~900nmで波長可変なポンプビームを2psパルス幅で生成するデュアル出力のpicoEMERALDを用いて、3つすべてのSRS画像を記録した。

他にも、超高速レーザーのチューニングのための将来有望な方法論にソルト自己周波数シフト(SSFS)がある。これにより、全ファイバ可変レーザーが可能となる。光ファイバにおけるSSFSの背景理論は1980年代半ばに確立されていたが⁽⁸⁾、SSFSの商業的な実装は始まったばかりだ。昨夏、独トプティカ・プロジェクト社(TOPTICA Projects)と米OFSラボラトリー社(OFS Laboratories)の提携の一端として、最大18nJのパルスエネルギーと120fsのパルス幅を持ち、1620~1990nmに波長可変な全ファイバ可変ロックモードレーザーが開発された⁽⁹⁾。この論文では、独ミュンヘン応用科学大(University of Applied Sciences

Munich)のトーマス・ヘラー氏(Thomas Hellerer)が、外付けのSHGとOPOを連結させたこのレーザーを用いて、非常に解像度の高いマウス脂肪組織のCARS画像と、さまざまな蛍光分子でラベルした単一のマウス線維芽細胞の二光子画像を生成した。

将来の展望

インドのモルドール・インテリジェンス社(Mordor Intelligence)の最新の市場分析によると、2019年現在、超高速レーザー市場の総額が14.4億ドルという驚くべき数字で、今後5年間で年平均成長率(CAGR)は12.7%になると予想された⁽¹⁰⁾。別の市場分析企業であるアイルランドのファクトMR社

(Fact.MR)は、COVID-19アウトブレイク後ですらCAGRは強気の14%を予想し、2019年にはバイオイメージングは超高速レーザー市場全体の30%を占めると述べている⁽¹¹⁾。しかし、ファクトMR社は全体的な時価総額をわずかが過小評価していることに注意する必要があるだろう。

今後数年間で超高速レーザーの開発に資金とリソースが投入されると予想される。そのため、小型でユーザーフレンドリーな低コストシステムへの傾向は加速するばかりであり、その結果、非線形レーザー顕微鏡の採用は生物学と生物医学コミュニティ、特にコヒーレントラマン及び多光子蛍光顕微鏡に関してもますます進むだろう。

参考文献

- (1) M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, *Opt. Lett.*, 7, 8, 350-352 (1982).
- (2) I. J. Cox, *J. Microsc.*, 133, 2, 149-154 (1984).
- (3) I. Freund and M. Deutsch, *Opt. Lett.*, 11, 2, 94-96 (1986).
- (4) W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, *Science*, 248, 4951, 73-76 (1990).
- (5) G. J. Puppels et al., *Nature*, 347, 6290, 301-303 (1990).
- (6) F. F. Voigt et al., *Biomed. Opt. Express*, 8, 7, 3213-3231 (2017).
- (7) L. T. Wilson et al., *Analyst*, 145, 15, 5289-5298 (2020).
- (8) J. P. Gordon, *Opt. Lett.*, 11, 10,
- (9) A. Zach et al., *Opt. Lett.*, 44, 21, 5218-5221 (2019).
- (10) See <https://bit.ly/MordorInt>.
- (11) See <https://bit.ly/FactMr>.

著者紹介

ロバート・V・キメンティは現在、米RVCフォトンクス社(RVC Photonics LLC)の取締役であり、米ローワン大(Rowan University)物理天文学部の専任講師も務める。米デイトン大(University of Dayton)で物理学、フォトンクス、経営学の学士号を取得し、さらに電気光学の修士号を取得した。光学とフォトンクスの分野で20年近くのキャリアを持ち、主に振動分光を中心に新しいレーザーと分光アプリケーションの開発に注力している。また、分析化学・分光学会連合(FACSS)にも深く関与しており、毎年開催されるSciX会議のワークショップ議長を数年間務めており、2021年のSciX会議では実行委員長に就任予定である。