

先進的な神経科学手法を支える レーザーの進歩

マルコ・アリゴーニ、エリン・ドゥウゴシュ

3光子イメージングと2光子光遺伝学刺激は、どちらも神経科学研究を真正面からターゲットとするレーザーの最新進歩によって支えられている。

神経科学研究者らは、ゆっくりとではあるが着実に、脳の仕組みの神秘を解明している。その進歩を主に支えているのは、マウスの脳を、それよりも大きな哺乳類(すなわち人間)の脳のモデルとして使用する研究である。その研究の多くで、神経回路網の接続や機能の様子をマッピングすることが行われており、それには、3次元で高い分解能(個々の神経細胞[ニューロン]単位)を持つ、解析手法が必要である。超短パルス(フェムト秒)レーザーを装備する多光子走査顕微鏡は、その3D分解能を本質的に提供する、主要な実現手段である。点走査によって、XY分解能(イメージプレーン)が提供され、非線形レーザー励起は、Z軸に沿った焦点を絞った走査においてのみ行われる。

2光子蛍光励起は、神経科学の手段

として十分に確立されている。より深く、より選択的な機能的イメージングを求めて、かなりの関心を集めているその他の手法として、3光子(3P)蛍光顕微鏡法と、2光子(2P)光遺伝学刺激法の2つがある。3P顕微鏡法は、マウス脳の厚さ1mmの皮質のさらに奥深くをイメージングするための手法として、ますます利用が増加している。オプシンと呼ばれる膜タンパク質に対する2P光刺激法は、個々の神経細胞単位で、特定の神経細胞集合を活性化または不活性化する能力を研究者らにもたらしている。研究者らは、これらの手法を組み合わせた全光学型生理学研究も開始している。この研究では、レーザーによって発火する神経細胞を刺激し、2つめのレーザーによって近くの神経細胞における活動の蛍光マッピン

グを、カルシウム指示薬の蛍光強度の変化を引き起こす、神経細胞のCa²⁺レベルの変化を利用して行う。

2光子蛍光励起、3P蛍光励起、2P光刺激という3つの最前線の手法は、パルスエネルギー、波長、繰り返し周波数などの点において、それぞれ固有で互いに全く異なるレーザー要件を持つ。本稿では、それらのビーム特性の生成を効率化して、最大限に広範囲の用途に対してその利用を簡素化する、レーザーの最新進歩を紹介する。

3光子イメージング

3P顕微鏡法は、対象蛍光体の単一光子吸収波長の3倍の波長のレーザー光を使用することにより、深いイメージングに複数のメリットをもたらす(図1)。緑色蛍光タンパク質(Green Fluores

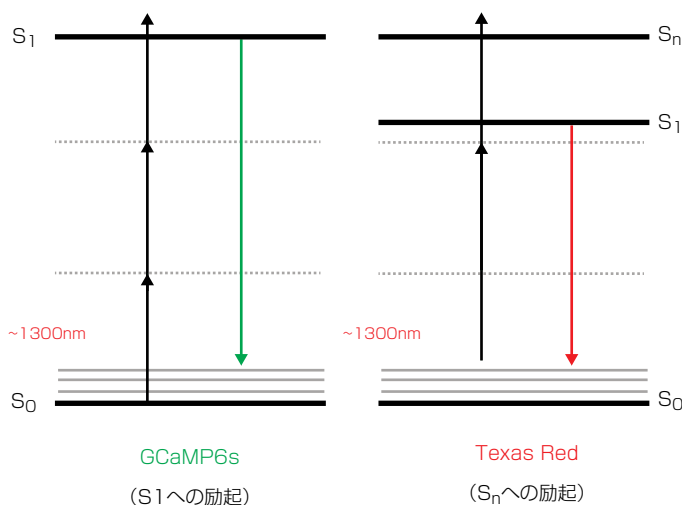


図1 3光子励起では、従来の単光子吸収の3倍の波長が使われる。この図に示されているのは、遺伝子発現のカルシウム指示薬GCaMP6sに対する、1300nm励起の仕組みである。クリス・シュウ氏とその同僚は最近、1300nmでTexas Redなどのより長波長の色素も励起できることを実証した。Texas Redは、抗体に結合して特定の細胞成分のラベル付けが可能な蛍光色素である。

cent Protein : GFP)や、遺伝子発現のカルシウム指示薬 (GCaMP)などの一般的な蛍光体の場合、これは約1300nmのレーザ波長に相当する。ほとんどの組織の拡散特性と吸収特性に基づき、高い侵入深さが得られる範囲が、この波長付近にある。従って、3P顕微鏡法では必然的に、2P顕微鏡法よりも優れたイメージング深度が得られる。同等に重要な点として、3P励起を使用すると、焦点のぼけた蛍光バックグラウンドが実質的に存在しないクリーンな画像が得られる(図2)。

しかし、3P励起には、ピークレーザ出力に対する3次依存性が存在する。これは、3P顕微鏡法では、必要なピーク出力と集束強度を達成するために、短いパルス幅(50~60fs)による100~200nJのパルスエネルギーを、サンプルに対して適用しなければならないことを意味する。3P顕微鏡法では、イメージング速度とサンプルの生存能力の間のトレードオフとして、1~2MHzのパルス繰り返し周波数も必要である。残念ながら、これらの要件を満たす、使いやすいレーザ源を設計するのは難しい。例えば、このパルスエネルギーは、2P顕微鏡法でサンプルに適用される標準的なエネルギーよりも500~1000倍高く、求められるパルス幅は2~3倍短い。このような理由から研究者らは、イッテルビウムベースのウルトラファースト増幅器を使用して、1300nmの出力を生成するスタンドアロンの光パラメトリック増幅器(Optical Parametric Amplifier : OPA)を励起している。

この種のOPA源を数メガヘルツで使用しても、実験の目的は多数の神経細胞を同時に撮像することであるため(つまり、イメージング量が多い)、イメージング速度はまだ不足気味であ

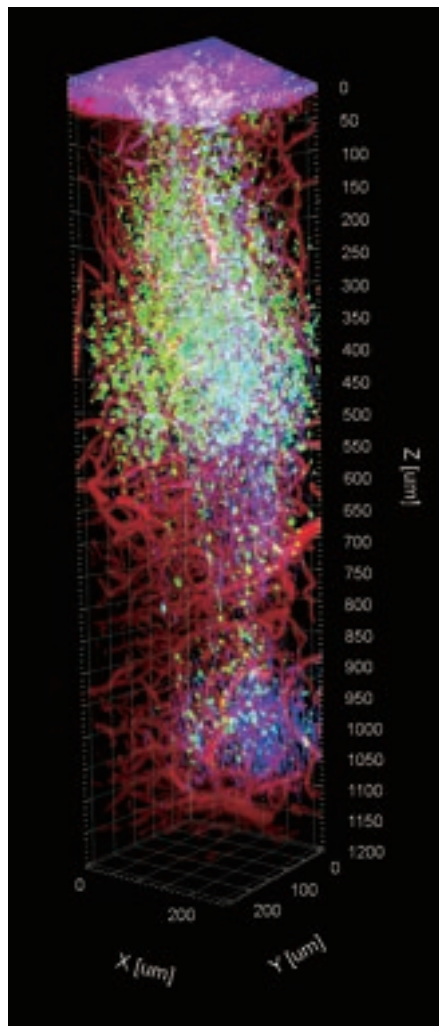


図2 マウス脳のより深いイメージングの例。この3色の画像スタックは、1200 μ mの深さにまで及んでいる。画像は、3P励起のGCaMP6s(緑色)、3P励起のTexas Red(赤色)、3次高調波発生(Third Harmonic Generation : THG、青色)で構成されている。(提供:本谷友作氏とクリス・シュウ氏)

る。カリフォルニア大バークレー校(University of California, Berkeley)のナ・ジ教授(Na Ji)の研究室は、レーザとOPAを組み合わせて、この制約を回避する方法を考案した。同グループは、自作のパルスコンプレッサーを使用して、サンプル平面の群遅延分散(Group Delay Dispersion : GDD)を最小限に抑えることも行っている。しかし、同教授らの最大のイノベーションは、いわゆるベッセル焦点(Bessel focus)を利用して、サンプルのZ軸に沿って長い焦点ウエスト(focal waist)を生成したことである。これによって、より厚みのある画像スライスを単一フレーム内に記録することができる。ジ

教授は、Z軸焦点深度が長くなることの付加的なメリットとして、Z軸に沿ったサンプルの小さな動きに対する耐性が高くなることを指摘している。ベッセル焦点を利用した励起では、3光子励起のメリットも活用されている。3光子励起は、その側環による蛍光発生を抑制する。

3Pイメージングの別の最近の研究として、コーネル大(Cornell University)のクリス・シュウ教授(Chris Xu)の研究室に所属する研究者らは、この1300nmのイッテルビウムレーザとOPAの組み合わせを使用して、GFPに基づくものに限らず、さらに幅広い種類の蛍光体が、この波長で励起でき

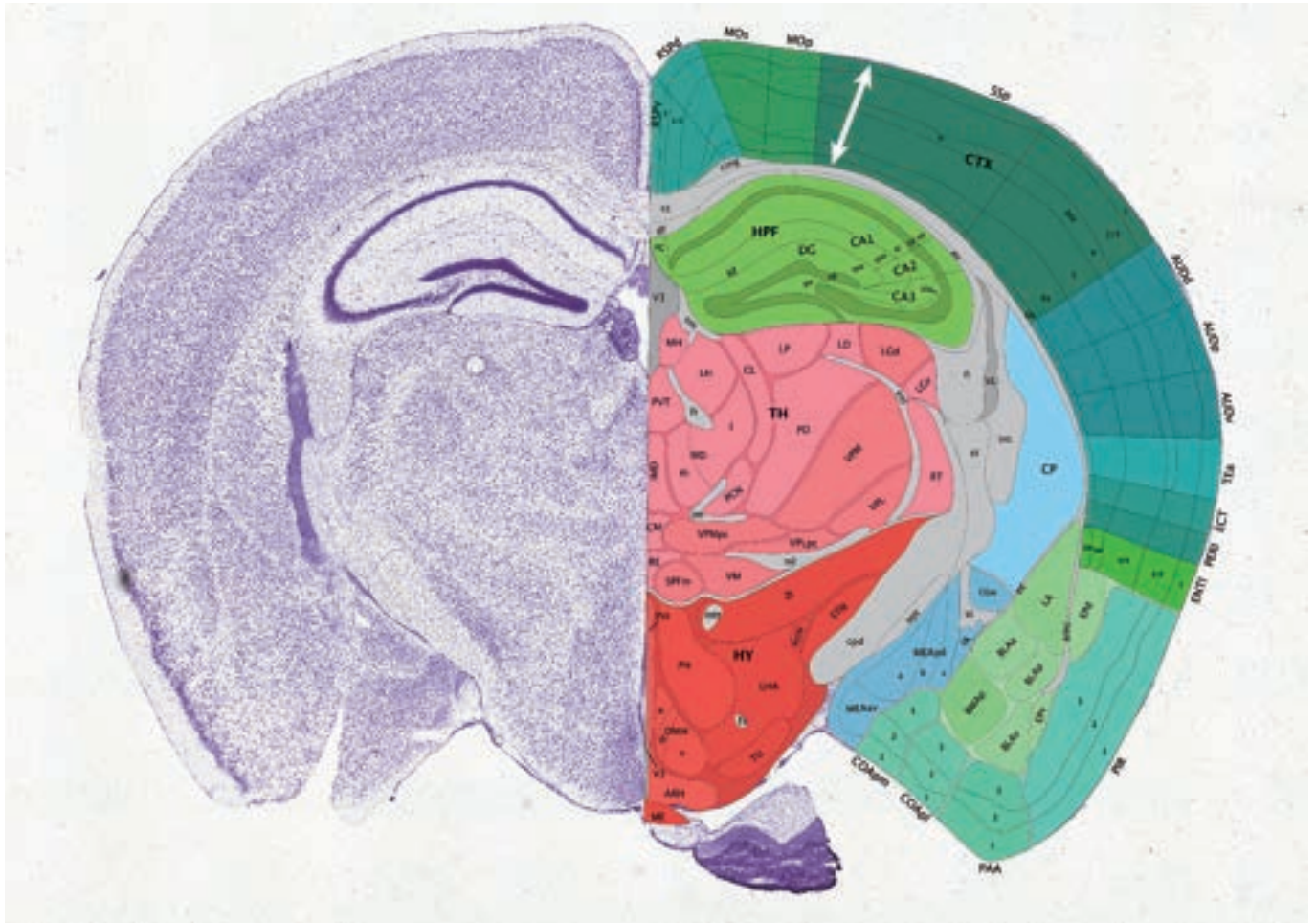


図3 生きたマウスの脳に対する2光子イメージングの実質的な深度限界は約1mmであるため、この手法は皮質の研究にしか適用できない。(提供: アレン脳科学研究所のMouse Brain Atlas)

ることを実証した。特に、多くの橙色と赤色のプローブも、この波長によってイメージングに対する十分な強度で励起できることを示した(図1)。続いて同教授らは、検出チャンネルにおけるスペクトル分離を使用して、この2種類のプローブから蛍光を分離した。

3Pイメージングを早くから採用しているグループとして、米アレン研究所(Allen Institute)のジャック・ウォータース氏(Jack Waters)の研究室がある。Laser Focus World誌(2000年2月号)に掲載された記事には、イッテルビウム増幅器とOPAの組み合わせを使用した同氏らの研究が説明されている。マウス皮質の厚みは約1mm

(1000 μ m)であるため(図3)、皮質のさらに奥にまで神経科学のマッピングの研究が進むにつれて、それ以上の侵入深さを持つ手法の使用が不可欠になると、ウォータース氏は述べている。

2光子光刺激

光遺伝学は、光によって神経細胞を活性化または不活性化する手法である。具体的には、オプシンと呼ばれるタンパク質複合体が、神経細胞の外膜に位置するイオンゲート及びポンプとして機能する。適切な波長の光を照射すると、これらが開閉する。光遺伝学は、他の行動刺激方法よりもはるかに高い分解能と柔軟性を提供する、非侵

襲的な励起方法である。

光遺伝学では当初、初期のオプシンの吸収に合わせて青色光が使われていた。現在は、1000~1050nmの範囲の2光子光刺激に、高い関心が寄せられている。多光子イメージングと同じ3次元の識別が可能であるためだ。しかし、神経細胞の活性化に対し、2P励起蛍光と比べてはるかに高い出力が必要である。加えて、2P光刺激実験では、多数の神経細胞を同時に操作する回折光パターンを生成するために、空間光変調器(Spatial Light Modulator: SLM)が一般的に用いられる。この光出力の再分割と、それに伴って必然的に光学効率が低くなること(例

えば10%)から、必要な出力はさらに高くなる。結果として、研究者らには一般的に、数十ワットのレーザー源が必要ということになる。この要件を理想的に満たすのが、1035nmで出力する新世代のイッテルビウム増幅器である。

3Pイメージングと2P光刺激のためのワンボックス型レーザー源

こうした最先端の神経科学研究をさらに適切に支援するために、イッテルビウムレーザーと1300nm波長発生の方を単一のパッケージとして統合する製品が登場している。例えば、米コヒレント社(Coherent)の新製品「Monaco 1300」は、50fs未満の出力パルス幅、1、2、または4MHzのパルス繰り返し周波数、1.5または2.5Wの出力を備える。1300nm出力のワンボックス型レーザー源というこの新しいフォーマットは、3Pイメージングのパラメータ要件を満たすものである。

この統合により、顕微鏡コミュニティにとって重要な2つの機能の組み込みも容易になる。1つは、統合出力制御機能(Total Power Control: TPC)で、オンザフライの出力減衰と高速な光学ゲーティングを可能にして、高速ラスタ走査の一環として行われる、フライバック時のブランキングなどの処理を簡素化するものである。もう1つは、小型パルスコンプレッサー(Compact Pulse Compressor: CPC)で、分散事前補償を可能にして、サンプルにおけるパルス幅を最適化するものである。前述のとおり、ピーク出力に対する3次依存性に基づき、3P手法では2P以上に、サンプルにおけるパルス幅が短いことが重要になる。

最終的な1300nm出力は、3Pイメージングを特に対象として最適化されているが、この新しいレーザー源は、

1300nmモジュールをバイパスしてイッテルビウム励起レーザーのみを利用するように切り替えることができる。その場合は、1035nmで60Wという、2P光刺激に理想的な出力が得られる。ユーザーはこの出力のパルス繰り返し周波数を、イッテルビウムレーザーの最大ネイティブ速度である50MHzにまで調整可能である。

つまり、このワンボックス型レーザー源は、3Pイメージングと2P光刺激の両方に対応し、先進的な神経科学実験を行う際のコストと複雑さを軽減する。

神経科学分野の主力手段はやはり2Pイメージング

3Pイメージングは、比類なく深いイメージングを可能にする重要な新手法だが、すべての神経科学イメージング実験に対する解決策というわけでは決していない。組織表面付近のイメージングに対してはやはり、2Pイメージングの方が適している。例えば共鳴走査によって、3Pよりもはるかに高速な撮像が可能だからである。2Pイメージングは一般的に、神経細胞のトリガと反応測定の方々に光を使用する、全光学型生理学実験に対して推奨される手法である。

レーザー性能については、2Pイメージングに必要なのは、例えば920nmという短い波長と50~100MHzの繰り返し周波数で、わずか数ワットのレーザー出力である。神経科学実験に対して、以下の3つの異なるレーザー出力をすべて装備する単一のレーザー源は、まだ存在しない。

- ・3Pイメージング：波長1300nm、パルス幅100fs未満で、ワットレベルの出力
- ・2P光刺激：波長1035nm、数MHzの繰り返し周波数で、数十ワットの出力

・2Pイメージング(多くの一般的なプローブを対象とするもの)：波長920nm、数十MHzの繰り返し周波数で、数ワットの出力

一方、920nmの出力は、ここ数年の間にレーザー業界で提供され始めている、単一波長の次世代小型レーザーによって得ることができる。これらのフェムト秒レーザーは、コストの削減、複雑さの緩和、非常にコンパクトなフットプリントをOEMインテグレータとエンドユーザーの両方に提供することを目的に、一から設計されたものである。その一例が、コヒレント社の「Axon」シリーズである。これらのレーザーはコンパクトで経済的ながらも、TPCやGDD事前補償などの高性能機能を、オプションで搭載する。

多くの重要な神経科学研究において、イメージングと光遺伝学刺激の方々に、多光子励起が広く利用されている。レーザー業界は、神経科学で現在使用されている、3つの主要な多光子手法を対象に最適化された出力を提供するレーザー源によって、この研究を支えている。これには、3つの手法のうちの3Pイメージングと2P光刺激の2つに対応する単一レーザー源や、3つめの重要な手法である2Pイメージングを対象としたコンパクトで費用対効果の高いパッケージ製品などが含まれる。これらのレーザー源を組み合わせることで、神経科学研究のために高度な多光子顕微鏡法を利用する主要研究施設の現時点のすべてのニーズに、対応することができる。

著者紹介

マルコ・アリゴニ(Marco Arrigoni)は、米コヒレント社(Coherent)のマーケティング担当ディレクター、エリン・ドゥウゴシュ(Erin Dlugosz)は、同社スタッフ製品サポートエンジニア。

e-mail: marco.arrigoni@coherent.com

URL: www.coherent.com.