

3光子顕微鏡法、成熟期に到達

ルーカス・コンテニス、マントヴィーダス・ミクリス、ガブリエレ・スタンクナイト、ヨナス・ベルジンシュ、マルコ・アリゴーニ

3光子顕微鏡法は、2光子顕微鏡法と比べて何が異なるのだろうか。

連続波レーザーによる単光子励起の代わりに、100fsの色素パルスレーザーを使用することにより、2光子顕微鏡法(2PM)が初めて報告されたのは、1990年のことである⁽¹⁾。直ちに明らかかな2つの本質的なメリットは、2PMのほうが使用される励起波長が長いために、光退色と光損傷が抑えられる一方で、プロセスが非線形であるために、共焦点ピンホールを必要とすることなく、光学的な選択励起が行われることだった。

赤外光は生体組織内の減衰が低いためにより深部の画像化が可能であることも、すぐに明らかになった。脳組織は透過性が高いことから、2PMは、C.

elegans(線虫の一種)、ミバエ、ゼブラフィッシュ、マウスといったモデル動物の機能的脳研究に不可欠な手段となった。光干渉断層撮影(OCT)や光音響イメージング(PAI)などの他の光学手法は、さらに深部までの画像化が可能だが、2PMのような細胞レベルの分解能は得られない。

共焦点イメージング用の大半の色素が、1980年代と1990年代に広く使用されたイオンレーザーの紫外線、青色、緑色の光線に合わせて開発されたものである。しかし、2光子励起に必要なのは、半分のフォトンエネルギーにあたる、700~1000nmである。1990年代に入ってからすぐに普及した、波長可

変のチタンサファイア(Ti:sapphire)モード同期レーザーは、2PMとの相性が良いことが明らかになった。約100fsのパルス幅によって蛍光体が効率的に励起され、標準的な80MHzのパルス繰り返し周波数によって高速な走査が可能である。加えて、300nmの波長可変範囲により、ほとんどの蛍光プローブに対応する。

究極のイメージング深度を追求する中で、ウインフレッド・デンク氏(Winfred Denk)率いるチームは2003年、生きたマウスの脳の深度1mmまでの画像化に成功した。同氏らは、チタンサファイアレーザーの代わりに200kHzで動作する再生増幅器を使用

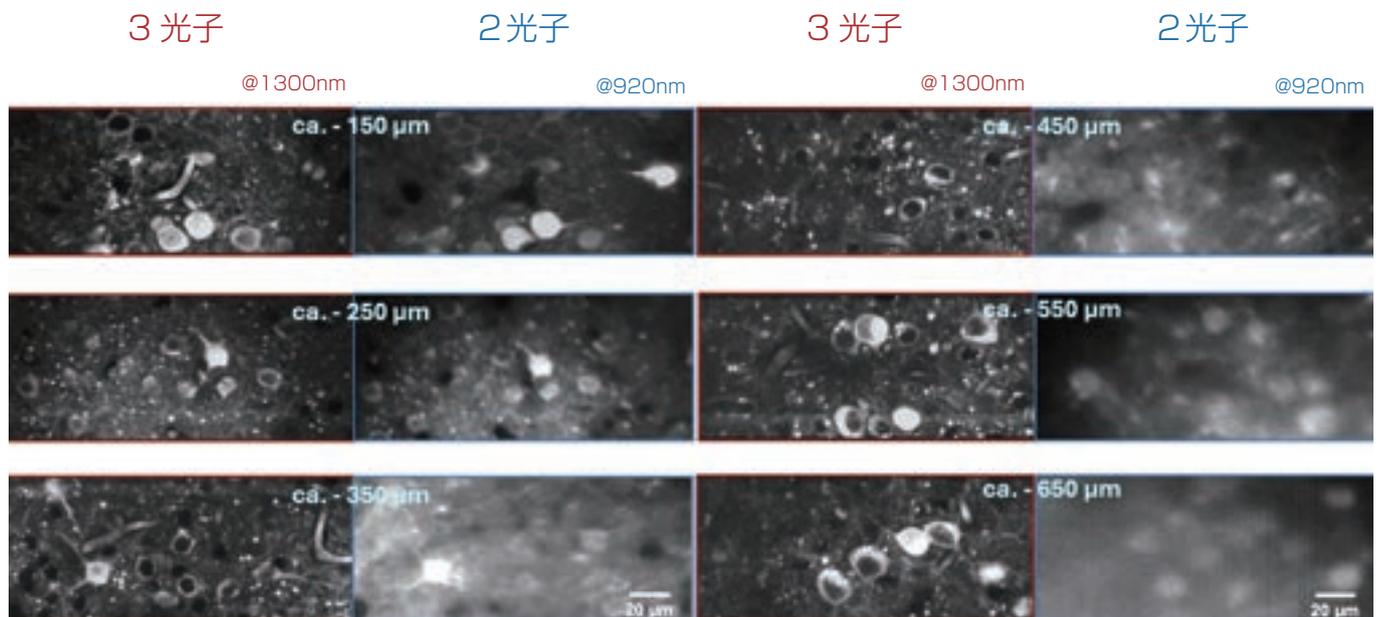


図1 マウス脳の観測深度を変えて比較した2光子と3光子の顕微鏡法の画質(提供: Albrecht Strohm氏、University Medical Center MainzとLeibniz Institute for Resilience Research所属)

して、この偉業を達成した。この再生増幅器は、チタンサファイア発振器の約100倍に相当する、 μJ レベルのパルスエネルギーを備える⁽²⁾。しかし、再生増幅器が複雑であることが、この手法の採用の妨げとなった。

高エネルギーで低繰り返し周波数の励起を使用した深部イメージングの研究がようやく前進したのは2013年、3光子顕微鏡法(3PM)では、高エネルギーの短パルスが2PMよりも大きく活用されることに、米コーネル大(Cornell)のクリス・シュー氏(Chris Xu)のチームが気づいたときだった⁽³⁾。それ以来3PMは、脳に加えて腫瘍や骨といった他の組織のより深い層を画像化することによって、2PMの能力を拡張できる手段として、普及することとなった⁽⁴⁾、⁽⁵⁾。深度を高めていった場合の2光子と3光子の画像例を比較すると(図1)、 $550\mu\text{m}$ を超えたところでコントラストの差が顕著になる。また、3PMでは頭蓋骨を貫通することも可能である(図2)。

米アレン脳科学研究所(Allen Institute for Brain Sciences)のイメージング部門(Imaging Department)の副部門長を務めるジャック・ウォーターズ博士(Jack Waters)に、3光子イメージングの複雑さについて見解を尋ねた。同氏は、3PMは現在、有用な画像の取得にユーザーがまだ苦戦していた、2PMが発明されてから5~7年後の状況と同じ段階にあると述べた。

3光子の深度のメリット

2PMのイメージング深度は、組織内の励起光の散乱と吸収によって制限される。イメージング面が深くなるほど、焦点体積に到達する光子数は少なくなるが、光の損失は、レーザー出力を増加させることによって補償できる。しか

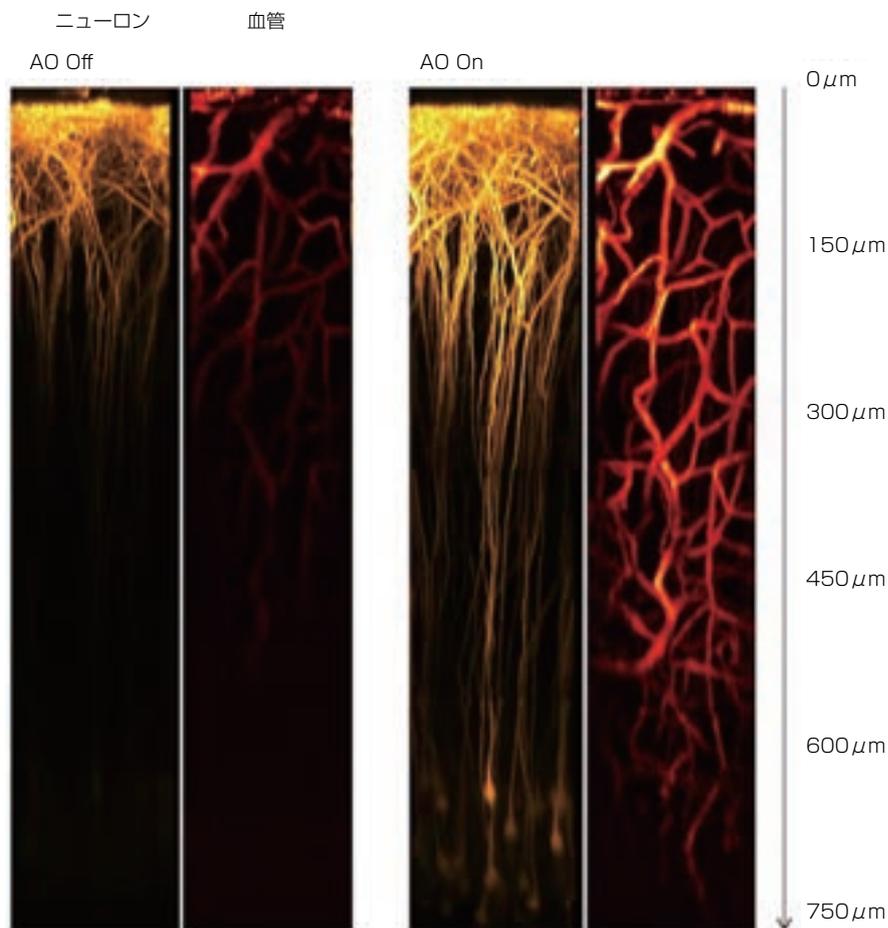


図2 補償光学系(Adaptive Optics : AO)を使用して無傷頭蓋骨を通して撮像された、マウスの神経や血管系の3光子イメージング画像(提供:Jianan Qu氏、香港科技大所属)

し、試料表面と上部層におけるレーザー出力は、最終的に損傷を引き起こす恐れがある。出力が損傷しきい値未満に保たれていたとしても、イメージング面が深くなるにつれて、励起ビームは、試料表面からイメージング面までの焦点体積内に、低効率のバックグラウンドを生成するようになる。ある深度に達すると、このバックグラウンドが信号よりも大きくなり、それがイメージング深度の限界となる。

この信号対バックグラウンドの限界に達すると、励起出力を増加させても画質はそれ以上高くなる。3光子励起は非線形性が高くバックグラウン

ドが抑えられるため、3PMはこの限界を克服する。2PMから3PMに移行するには、以下で説明するような、顕微鏡設定の変更が必要である。

励起波長の選択

3光子励起には、従来の2PMよりも長い波長が必要である。2つではなく3つの光子によって、同じエネルギー遷移が行われるためである。例えば、普遍的な緑色蛍光タンパク質の脳活動指標(GCaMP)は、2PMでは $920\sim 940\text{nm}$ で励起されるが、3PMでは 1300nm が必要である。2PMにおいて約 1100nm で励起される赤方偏移した

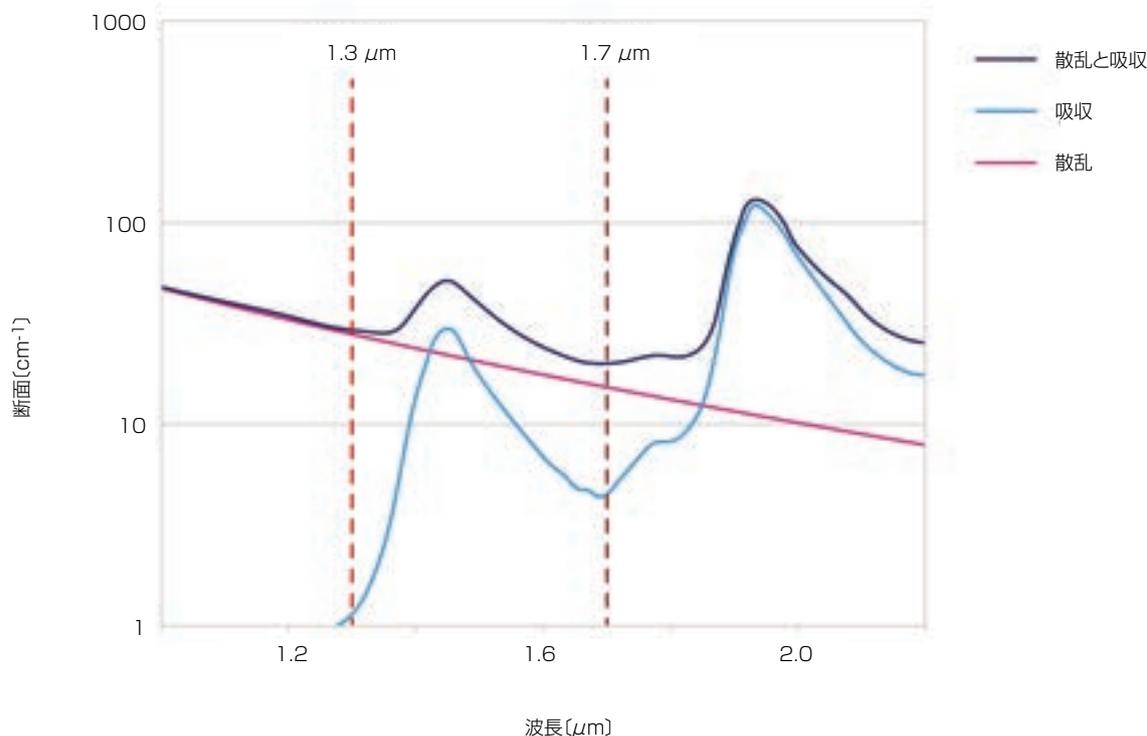


図3 800～2800nmの範囲の光に対する組織の散乱特性と吸収特性から、1300nmと1700nmに生体イメージングの透過ウィンドウが存在することがわかる

プローブには、1700nmの3光子励起が有効である。幸い、1300nmと1700nmは、水中で光減衰(吸収と散乱の組み合わせ)が極小となる波長帯である(図3)。

散乱は、波長が長くなると単調に減少するのに対し、吸収は、試料の化学組成(通常は水分が大部分を占める)に依存する。水による吸収は、920nmから1300nmおよび1700nmにかけて増加するが、散乱が減少することが、これらの長い波長にメリットを与える。しかし、吸収によって許容出力が制限される。吸収は、組織の加熱と最終的には損傷につながるためである。

ウォーターズ氏の説明によると、920nmでは250mWのレーザー出力をマウス脳に照射してもまず安全だが、1300nmでは100～150mWを超えて

はならず、1700nmになるとその値は半分になるといふ。同氏の経験では、1300nmのほうが脳イメージングに広く用いられている。赤方偏移した機能性プローブは、GCaMPよりも低い信号を生成するためである。一部のプローブは1300nmで励起も可能で、客観的性能もこの波長のほうが一般的に高い。intravitalイメージングに対しては、1700nmにメリットがある。例えば、青色から遠赤外領域の蛍光体の同時3光子/4光子励起や、骨内部の第3次高調波発生(THG)イメージングを行うことができる^{(4)、(5)}。

波長可変光源が、2光子イメージング用途の大部分を占めていることには変わりはないが、固定波長レーザーの利用も増加傾向にある。3光子イメージングにどのような波長可変特性が必要で

あるかを見定めるのは、時期尚早である。しかし、1300nmのみを対象とする用途においても、中心波長に50～100nmのチューニング範囲があれば好都合である。赤方偏移プローブの輝度が向上すれば、1700nmの光を使用して、単一細胞分解能によるさらに深部のイメージングが可能になる可能性がある。2PM用の固定波長レーザーは、安定性、コンパクト性、費用対効果の面でより優れているかもしれないが、3光子イメージングにその考え方は当てはまらない。1300nmのレーザー光源はそれとは異なり、異なる技術的トレードオフが適用されるためである。

パルス幅と圧縮

2PM用のレーザーは、100～150fs幅のパルスを生成する。3光子イメージ

(c)

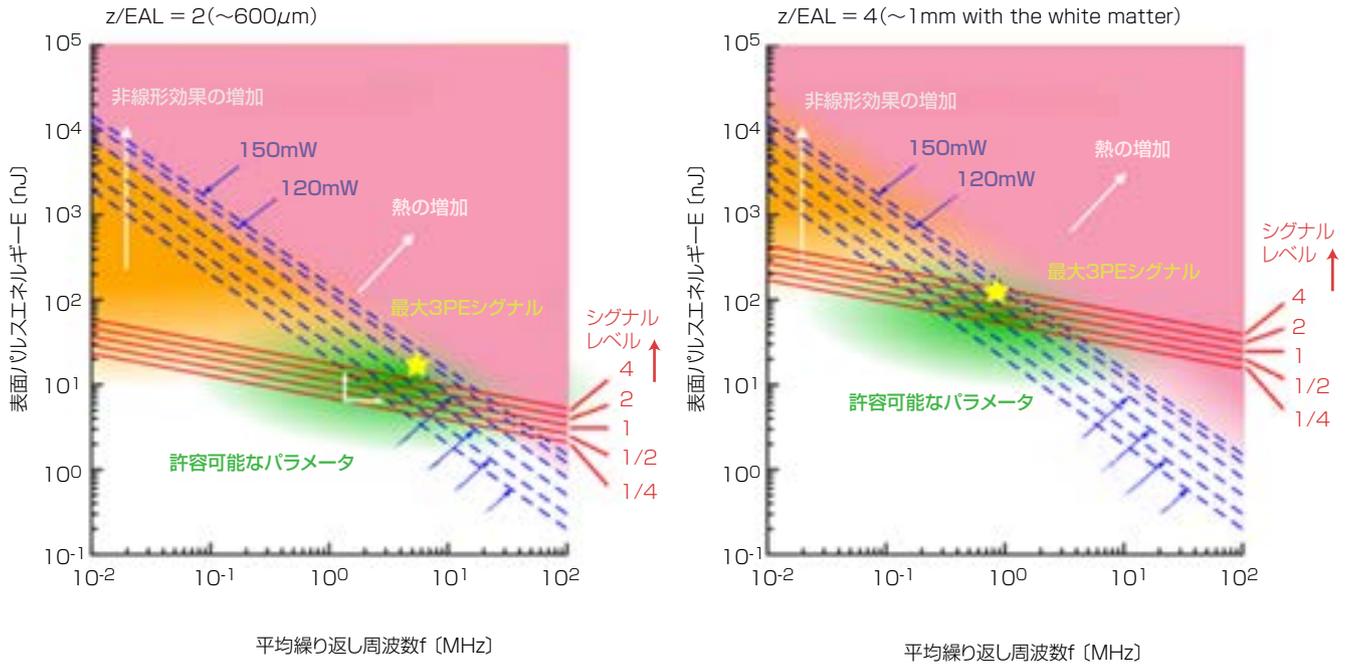


図4 実効減衰長が600 μm と1mmの散乱組織内の3光子イメージングに最適なパルスエネルギーと繰り返し周波数 (Opticaの許可を得て転載)

ングには、約50fs幅のパルスが必要である。2光子よりも高い3光子プロセスの非線形性は、パルスのピーク出力に大きく依存するためである。ほとんどの場合で、パルス幅が長くなると、2光子と比べた場合の3光子の価値である深度のメリットは、十分に発揮されなくなる。

残念ながら、そのような短パルスの生成は、ここでの課題の半分にしかすぎない。短いパルスは、スペクトル帯域幅が広く、物質を伝播するときに群遅延分散(GDD)が生じて、それが異なるスペクトル成分が時間とともに拡散する要因となる。これにより、平均出力が一定であっても、ピーク強度と多光子信号強度が低下する。

最適な信号を生成するには、レーザーから試料までの光学系におけるGDDを、パルス圧縮器によって事前補償(プリチャージ)する必要がある。パルス幅が半分になると帯域幅は2倍になり、圧縮器の設計はさらに難しくなる。実際、3PMの利用増加に伴い、ユーザーが遭遇する主な難点は、パルス幅を焦点面で確実に最短にする適切な圧縮器を構築する(当初はレーザーメーカーによってこれが行われていなかった)ことであると、ウォーターズ氏は説明している。不十分なパルス圧縮は、信号が収集されるか、それとも全く信号を得ることなく試料を焼いてしまうかを分ける要因になる場合が多い。

それでも、レーザーのパラメータを最

適化する余地はがあると、ウォーターズ氏は述べた。例えば、50fsよりも短いパルスが有効かどうかの研究はほとんど行われていない。ただし、さらに短いパルスの分散の管理は、難しい可能性がある。

パルスエネルギー、 繰り返し周波数、平均出力

2PMと3PMの励起断面積の違いは、パルス幅を50fsに短縮するだけでは得られない。パルスあたりのエネルギーを大幅に増加させることも必要である。これに加えて、顕微鏡の対物レンズやその他の要素は、3光子励起波長において高い透過性と低い分散性が得られるように、まだ完全には最適化さ

ホログラフィック光刺激のための 高エネルギーパルス

低い繰り返し周波数で高エネルギーのパルスを生成するレーザーは、顕微鏡法以外の分野でも応用されている。例えば、オールオプティカルの多光子制御や、神経回路の読み出しなどである^{(12)、(13)}。

ニューロンを刺激するには、励起光を単一ニューロンの空間分解能で生成する必要があり、広視野のホログラフィック技術とミリ秒レベルの時間分解能を使用することで達成される。この処理は、パルスピッカーを内蔵する増幅レーザーであれば簡単に行える。

ホログラフィック刺激は損失が高く、多数のニューロンを同時に刺激するには、数ワットの平均出力が必要である。幸い、多数のオプシンを1030nmの2つの光子で励起することが可能で、現在のレーザーならば100Wを超える出力でそれを供給できる。そしてそれは、3光子イメージングに使われるOPAを励起するのと同じレーザーである。従って、1030nmでの刺激と1300nmでの3光子読み出しに同じレーザーを使用したり、例えば960nmでオプシン吸収を最適化するためにOPAをチューニングしたりすることが可能である。

れていない。それは、最大90%という光学系列の高い損失につながっている。このことと上述の考察から、ピーク出力(パルスエネルギー)、平均出力、繰り返し周波数のバランスを、より慎重に図らなければならないことが明らかである。100mWが、損傷を与えることなく試料を照射するための適切な目標値であることがわかっている。

顕微鏡のスループットを10%とすると、レーザーは約1Wの出力を生成しなければならない。この出力を、1MHzで1 μ Jのパルスとして印加するべきか、それとも10MHzで100nJのパルスとして印加するべきか。これまでのところ、大半の3光子イメージングが1MHzで行われており、数マイクロ秒の滞留時間と、1回または複数回のピクセルあたりレーザー照射回数によって、数Hzのフレームレートにおける十分な信号が供給される。

共振走査は、繰り返し周波数が高いほうが効果的だが、単に繰り返し周波数を上げることによって平均出力を増加

させると、試料を損傷させる恐れがある。慎重な最適化が4~5MHzにおける共振走査に役立つ可能性がある、ウォーターズ氏は確信している。また、組織の散乱とイメージング深度の関数としての最適な繰り返し周波数については、ワン氏(Wang)とシュー氏によって詳しく論じられている(図4)⁽⁶⁾。

パルスエネルギーが高いと、深部の高散乱組織においても観測可能な、明るい多光子信号が得られるが、エネルギーが高すぎると、非線形損傷が生じる恐れがある。平均出力と繰り返し周波数を高くすることによっても、信号が強化されて高速イメージングが可能になるが、過度に高い出力は過剰な加熱につながる。これらの要因から、試料とイメージング深度によって異なる3光子イメージングのウィンドウはやや狭くなり、3光子レーザーのパラメータ選択は複雑になる。

図4では、深度が深くなると最適なパラメータ範囲(緑色の部分)がどのように変化するかを確認することができ

る。深度が600 μ mの場合は、繰り返し周波数が高いほうが良く、1mmの場合は、1MHzのほうが良い。2PMでは、レーザーが80MHzの繰り返し周波数で使用されるのに対し、それよりも繰り返し周波数が低くエネルギーが高い3PMのレーザーには、異なるアプローチが必要である。これには、一般的に1030nmで動作し、光パラメトリック増幅器(Optical Parametric Amplifier: OPA)と呼ばれる波長可変デバイスを励起する、より高エネルギーのレーザー増幅器が用いられる。

波長は可変だが、OPAは一般的に固定の励起エネルギーで動作する。OPAの繰り返し周波数と出力は増減可能だが、エネルギーは一定に維持し、所望の最も深いイメージングポイントにおいて十分なマージンを設ける必要がある。より浅い面のイメージングは、外部変調器によって出力を抑えることにより行われる。最も深い層によって、必要最大エネルギーが決まり、所望の最も高いイメージング速度によって、

必要最大繰り返し周波数が決まる。この2つの仕様を、単一のデバイスで満たすのは難しい。

最近まで、3PM用のレーザは、フェムト秒増幅器、波長可変OPA、ホームメイドの分散補償パルス圧縮器と、個別のボックスの組み合わせで構成されていた。個々のボックスは通常、異なるメーカーによって提供され、光学テーブル上で組み立てられていたため、安定性、メンテナンス、仕様保証の面で妥協を強いられることが多かった。

この状況に変化をもたらしたのが、リトアニアのライトコンバージョン社 (Light Conversion) が提供する「CRO NUS-3P」ワンボックス型(統合型)フェムト秒レーザである。この顕微鏡用光源は、すべてのコンポーネントが自社内で製造および試験されているため、3PM用のレーザ設定プロセスの大部分が効率化される。設定を市販されている2光子用のワンボックス型フェムト秒レーザ光源に近づけることで、シームレスな機能性が確保されている。

エネルギーと長期的な平均出力の安定性も、ビームモード品質と並んで非常に重要な要素である。高速な3光子イメージングのためのピクセルあたり1ショットという領域になると、ショット間のレーザノイズが画像に痕跡を残すことになるため、特に重要になってくる⁽⁷⁾。補償光学系は、3光子励起の高い非線形性によって、イメージング深度とコントラストを向上させる、多大な可能性を秘めるということが示されている⁽⁸⁾。

今後の展望

シングルボックスでターンキー式の波長可変レーザの登場は、イメージング研究施設にレーザの専門家を置く必要がなくなり、2光子顕微鏡法の普及

に貢献した。3PMもそれと同じ軌跡をたどることが予想されている。3光子レーザ光源は、信頼性が向上し、顕微鏡ユーザーの要件に適合し、小型になり、操作の複雑さとコストが軽減される見込みである。

信頼性の高いレーザを使用する場合でも、3光子顕微鏡の設定は2光子顕微鏡よりも手間がかかる。また、試料のデバッグや検証のために、同じ実験室に2光子顕微鏡も用意することが重要である。波長可変の3光子光源を使用すれば、励起波長やイメージングパラメータをさらに最適化することができる。興味深い代替策として、ファイバを制御された形で折り曲げることによる自己位相変調を利用して、パルススペクトルを直接変更する方法が、MITのシシセン・ユー氏 (Sixian You) のグループによって示されている⁽⁹⁾。

イメージング速度についてウォータース氏は、米ロックフェラー大 (Rockefeller University) のアリパシャ・ヴァ

ジリ氏 (Alipasha Vaziri) による高速ポリユーメトリックイメージングや、クリス・シュウ氏の適応型励起光源 (Adaptive Excitation Source: AES、レーザが一定の繰り返し周波数で動作するのではなく、スキャナがニューロンの上にあるときだけパルスを生成する) といった、注目に値する開発成果を指摘している⁽¹⁰⁾、⁽¹¹⁾。これにより、平均出力の制約を守りつつ、瞬時繰り返し周波数を上げることが可能だが、試料からレーザまでの複雑なフィードバックループが必要になる。これらの進歩は現在、原理実証の段階にあるが、ウォータース氏を含むイメージングコミュニティは、これが将来的に神経科学の研究施設に導入されることを期待している。ウォータース氏は最後に、3光子レーザ光源の高速スイッチングによって、イメージング速度を維持しつつ試料に印加される平均出力を制御することも、同氏の取り組みが目指す方向性の1つだと述べた。

参考文献

- (1) W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, *Science*, 248, 4951 (1990); <https://doi.org/10.1126/science.2321027>.
- (2) P. Theer, M. T. Hasan, and W. Denk, *Opt. Lett.*, 28, 12 (2003); <https://doi.org/10.1364/ol.28.001022>.
- (3) N. G. Horton et al., *Nat. Photonics*, 7 (2013); <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.336>.
- (4) G.-J. Bakker et al., *eLife*, 11, e63776 (2022); [doi:10.7554/elife.63776](https://doi.org/10.7554/elife.63776).
- (5) D. Tokarz et al., *PLoS ONE*, 12, 10 (2017); [doi:10.1371/journal.pone.0186846](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186846).
- (6) T. Wang and C. Xu, *Optica*, 7, 8 (2020); <https://doi.org/10.1364/optica.395825>.
- (7) L. Kontenis et al., *Proc. SPIE*, PC12384, PC1238410 (2023); <https://doi.org/10.1117/12.2649932>.
- (8) C. Rodríguez et al., *Nat. Methods*, 18, 10 (2021); [doi:10.1038/s41592-021-01279-0](https://doi.org/10.1038/s41592-021-01279-0).
- (9) T. Qiu et al., *Nat Commun.*, 15, 1 (2024); [doi:10.1038/s41467-024-46244-5](https://doi.org/10.1038/s41467-024-46244-5).
- (10) S. Weisenburger et al., *Cell*, 177, 4 (2019); [doi:10.1016/j.cell.2019.03.011](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.011).
- (11) B. Li et al., *Nat. Methods*, 2 (2019); [doi:10.1038/s41592-019-0663-9](https://doi.org/10.1038/s41592-019-0663-9).
- (12) O. A. Shemesh et al., *Nat. Neurosci.*, 20, 12 (2017); [doi:10.1038/s41593-017-0018-8](https://doi.org/10.1038/s41593-017-0018-8).
- (13) V. Emiliani et al., *J. Neurosci.*, 35, 41 (2015); [doi:10.1523/jneurosci.2916-15.2015](https://doi.org/10.1523/jneurosci.2916-15.2015).

著者紹介

ルーカス・コンテニス (Lukas Kontenis) は、リトアニアのライトコンバージョン社 (Light Conversion) のR&Dエンジニア、マントヴィーダス・ミクリス (Mantvydas Mikulis) は、同社製品マネージャー、ガブリエレ・スタンクナイト (Gabrielė Stankūnaitė) は、同社通信プロジェクトマネージャー、ヨナス・ベルジンシュ (Jonas Berzins) は、同社市場開発マネージャー。マルコ・アリゴニ (Marco Arrigoni) は、同社マーケティング担当副社長で、2007年から2023年は米コヒレント社 (Coherent) のマーケティング担当ディレクターを務めていた。