

# バイオイメーjingグ： 顕微鏡の性能は向上できるのか？

アントニオ・カステロ

顕微鏡技術の進歩により、生体サンプルのイメージングプロセスの効率、精度、スピードが向上する。

バイオイメーjingグとは、生体サンプルの *in vivo* (生体内)、*ex vivo* (生体外)、*in vitro* (試験管内やシャーレ上) イメージングに使われるさまざまな技術やシステムのことである。バイオイメーjingグにより、研究者は分子や細胞、組織レベルでの情報を得ることができる。

顕微鏡は、細胞内構造、タンパク質、細胞小器官を研究するためのバイオイメーjingグを目的に広く用いられている。例えば、細胞や組織が分子レベルでどのように組織化されているかを理解したり、ペプチドやRNAなどの細胞内物質を同定、研究したり、製薬業界では潜在的な薬剤候補をスクリーニングしたり、術中の手術マージン評価

のリアルタイムツールとして使われたりするのに役立っている。

## 顕微鏡のカテゴリー： 明視野と蛍光

明視野顕微鏡は、その簡便さと扱いやすさから、最も古いながらも最も広く使われている技術の1つである。しかし、白色光を使用するため、試料における吸光、散乱、偏向の影響によって得られる画像の解像度に影響を与えることがある。また、生体サンプルが薄くて透明である場合、コントラストの高い詳細な明視野画像を取得しにくいことがある。

蛍光顕微鏡には、蛍光広視野顕微鏡、共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡、ライトシート顕微鏡などがあり、通常は研究者が導入する「フルオロフォア」とよばれる蛍光染色やタンパク質を使用する。これらの分子は、励起波長という特定の波長の光を吸収し、次により長い波長の発光波長を放出する。この技術には、異なる分子を同時に検出したり、分子があまり多く存在しなくても検出できたりするなどの利点があり、単一分子のイメージングもできる。

近年進歩を遂げたコンポーネントの1つが照明だ。さまざまな顕微鏡セットアップにおいて、発光ダイオード(LED)はハロゲンランプやアークランプを凌いで最もポピュラーな照明用コンポーネントの1つとなっている。なぜなら、高い安定性、再現性、信頼性など、多くの利点があるからだ。個別の波長があり、コスト効率やエネルギー効率が高く、環境にも優しい。

英国を拠点とするクールLED社(CoolLED)は、蛍光顕微鏡や関連ツール用の新しい高輝度LEDを開発した。1つのボックスに最大16個のLEDを含むソリューションであり、280~950nmのスペクトル範囲をカバーする。同社では、固定細胞や生きた細胞に対して光毒性や光退色によるダメージを軽減するため、照明の最適化、LEDシステムの制御強化、レンズを通じた(TTL)カメラの同期の強化に取り組んでいる。光毒性や光退色は、照明光源からの光子の吸収によって生じるものであり、顕微鏡実験中に有害な作用をもたらすことがある。CoolLEDシステムには、サンプルへの照明を最適化し、光ダメージを最小限に抑えるための重要な特徴が複数ある。

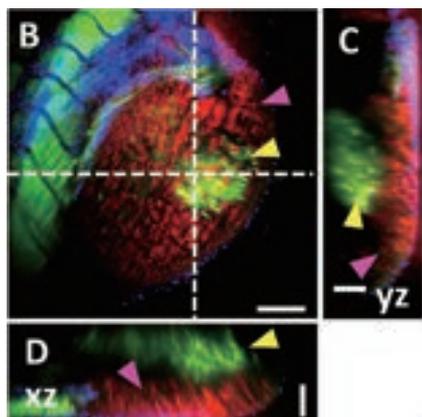


図1 二光子励起(TPEF)顕微鏡とラベルフリーCARS顕微鏡でイメージングしたゼブラフィッシュ幼生の異種移植片(黄色矢印)モデルの3Dボリュームスキャン。ラベルフリーのCARSシグナルが赤で描写され、ピンクの矢印で示している。スケールバーは100 $\mu$ m(プロスペクティブ・インストルメンツ社提供)

## 新しい照明ソリューション

画像処理プロセスの効率を高め、高解像度で正確な結果を迅速に得るため、完全なシステムやコンポーネントの進歩が進んでいる。

## 超高速レーザの利点

超高速レーザは、二光子顕微鏡(TPM)、第二高調波イメージング顕微鏡、コヒーレント反ストークスラマ

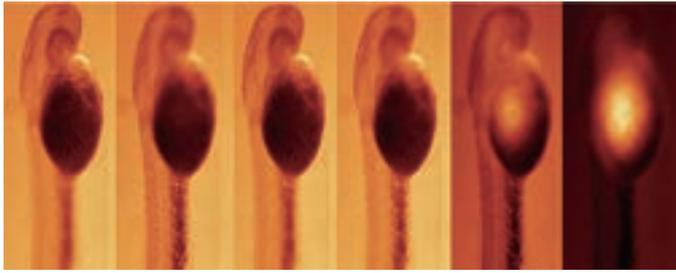


図2 ゼブラフィッシュ胚の画像スタック。画像間は50 $\mu$ m刻み (クロマシティ社提供)

ン散乱(CARS)顕微鏡など、多光子励起に依存する非侵襲的手法の扉を開いてきた。

これらの手法は、主に2つ以上の近赤外(IR)光子の同時吸収から生じる非線形励起に依存しており、従来の共焦点顕微鏡のような内部の光学的切片を作成する。

CARSの場合、時間的・空間的に同期した異なる波長をもつ2つのレーザービーム(ポンプビームとストークスビーム)がサンプルに照射されると、3次の非線形プロセスが発生する。その結果、サンプルは両方のレーザービームの波長混合プロセスによって励起される。ポンプビームはサンプルに仮想ステージを作り出し、同時にサンプルに当たるストークスビームは仮想レベルの集団を刺激する。この同時照射により、基底状態で振動の準安定状態にある高密度な集団が形成される。この振動状態は、分析対象のサンプルの化学的性質に特有なものとなる。

オーストリアのプロスペクティブ・インスツルメンツ社(Prospective Instruments)は、CARS顕微鏡向けにFSX-Dualレーザーを開発した。パルス持続時間は140フェムト秒未満、100MHzの光源であり、1030nm固定と760~940nmで調整可能な2つの発光波長をもつ。このレーザーにより、望ましくは2850 cm<sup>-1</sup>付近の波数でCARS顕微鏡法が可能となり、脂質をラベルフリーでイメージングできる。

出力レーザービーム2つを時間的に同期させるため、2つのビームのうち1つを時間遅延によってディレイさせ、両方のビームが時間ゼロでサンプルに当たり、CARS信号を発生させる。このレーザーは、ゼブラフィッシュの異種移植片の解析に使用された。ゼブラフィッシュは、がん生物学の多様な側面、例えば腫瘍の発生や進行、転移、薬物反応などを研究するための強力な費用対効果の高いプラットフォームとして、がん研究においてますます使用されているモデル系である。

図1は、骨肉腫細胞(OS143b)を注入した、異種移植片の3次元(3D)ボリュームスキャンである。移植前に、注入する細胞をLuminiCell 670蛍光ライブセルトラッカー(緑)と一晚インキュベートし、3日齢のゼブラフィッシュ幼生の卵卵腔(PVS)に注入した。24時間後、幼生を固定してHoechst(青)とPhalloidin-490LS(緑)で染色した。異種移植片の周辺にある強いラベルフリーCARSシグナル(赤)が浮袋である。

チューナブルレーザーはさまざまな多光子顕微鏡アプリケーションに広く使用されているが、波長固定レーザーに依存する技術にもいくつかの利点がある。これは二光子ライトシート顕微鏡の場合であり、スコットランドのクロマシティ社(Chromacity)は最先端画像を得るために平均出力が高くパルス持続時間が短い単一波長レーザー光源を開発している。この技術はピンホール

や画像処理を必要とせず、焦点面でのみ蛍光シグナルを検出することで臓器や胚、生物を傷つけずにイメージングするよう設計されている。切片化された画像がリアルタイムで生成され、高密度の3D画像スタックを数秒以内に記録できる。これは従来の共焦点レーザースキャン顕微鏡に対して大きな利点である。

光シートを通じて照明するため、光出力はサンプル全体に広がり、生きたサンプルの光ダメージやストレスを軽減する。クロマシティ社のモデル1040は、1040nmで発光し、パルス幅は150フェムト秒未満のイッテルビウムドープファイバレーザーであり、この種のアプリケーションに最適なビーム品質といえる。その高い安定性と平均出力により、RFP、YFP、GFP、Sytoxグリーン、フルオレセインなど、500nm領域に線形吸収をもつあらゆる蛍光材を用いて、二光子ライトシート顕微鏡を実施できる。

図2は、エオシンで染色してキャピラリー内の寒天ゲルに固定したゼブラフィッシュ胚を、クロマシティ社1040レーザーで照射したセットアップで画像スタックしたものである。ゼブラフィッシュはほとんど透明で、胚全体でライトシートイメージングが可能だ。異なる深度の画像をスタックすることで標本の3D再構成が可能となる。この画像では、ゼブラフィッシュの頭部と尾部に焦点が合っており、最も強い二光子蛍光シグナルが発生している。

## マルチモーダル・プラットフォーム

マルチモーダル非線形イメージング・プラットフォームは、2光子顕微鏡(2PM)と3光子顕微鏡(3PM)の明確なアドバンテージを利用する、興味深

い手法である。透過深度という点において、3PMは2PMよりも深い組織イメージングを可能にし(図3)、神経科学者は構造的・機能的関係について深い洞察を得ることができる。3PMの他の利点は、長波長励起によって高散乱組織での減衰長が長くなること、高次非線形励起によってさらに正確な励起の閉じ込めが可能になること、すなわちシグナル・バックグラウンド比が向上することである。

しかし、3PMには2つの課題がある。第1に、水の吸収のため、3PMは1300nmと1700nmという2つの特定の励起波長に制限され、この2つの波長で励起する合成色素はごくわずしかない。第2に、3光子励起は2光子励起に比べて非線形性が高く、高いピーク電力が求められる。このため、良好なシグナル取得とサンプル損傷との間にある適切な設定を見つけることが難しくなる。チューナブル2光子レーザーと3光子レーザーを単一の顕微鏡本体に組み込むマルチモーダル・プラットフォームは、幅広い蛍光体選択による2

光子マルチカラーイメージングと、深部組織の3光子イメージングを可能にする。こうして、765nmから最大1700nmのスペクトルウィンドウ全体をカバーする

現在市販されている3光子レーザー走査型顕微鏡は、操作に過大なユーティリティを必要とし、メンテナンスが困難な傾向にあり、効果的に扱うには専門的な装置や知識が要求されることが多い。そこでプロスペクティブ・インストルメンツ社は、MPC多光子マルチモーダル・イメージングプラットフォームを開発した。これはコンパクトかつフレキシブルな顕微鏡システムで、2光子または3光子イメージング向けに、あらゆるフェムト秒レーザーとの接続を可能にする。そのレーザーキャンエンジンは、680nmから1700nmまでの全波長をカバーするように設計されており、さまざまな多光子イメージング技術やコヒーレントラマンイメージングに適している。また、エピモードまたは透過モードでの4チャンネル光電子増倍管検出も可能であり、異なるサ

ンプル厚をカバーできる。

## 顕微鏡ワークフローの自動化

バイオイメージングのもう1つのトレンドが自動顕微鏡であり、大量検査を必要とするアプリケーションで一般的に使われるプロセスとなっている。これは人工知能とディープラーニングによって推進されている。独オプト社(Opto)は顕微鏡の自動化を専門としており、サンプルの連続モニタリング向けに複雑なシステムに統合できるイメージングモジュールを開発している。ここでは、デバイスからサンプルを移動させる必要がない。このソリューションにより、ヒューマンエラーのリスクを最小化して再現性のある結果が得られる。オプト社のイメージングモジュールとオープンソフトウェアプラットフォームを組み合わせることで、ユーザーはニーズに合わせて個別に希望するソリューションを作成できる。

## 新たな分光法

新しいレーザーベースの顕微鏡技術である光子吸収リモートセンシング(PARS)は、非染色のフレッシュな組織や凍結組織、固定組織において細胞レベルの分解能を可能にする。この光吸収顕微鏡法は複数の光チャンネルを収集、分析することで、生体分子のユニークな吸収を解き明かして同定する。これにより、過去にないような細胞・分子データが得られ、光学イメージングの境界が再定義される。加イルミソニックス社(illumiSonics)は、この技術に基づく初の全光学イメージングシステムを開発し、組織に接触したり損傷を与えたりすることなく、瞬時に分子イメージングを実行する(図4)。PARS顕微鏡は病理学のワークフローを一新する可能性を秘めている。なぜ

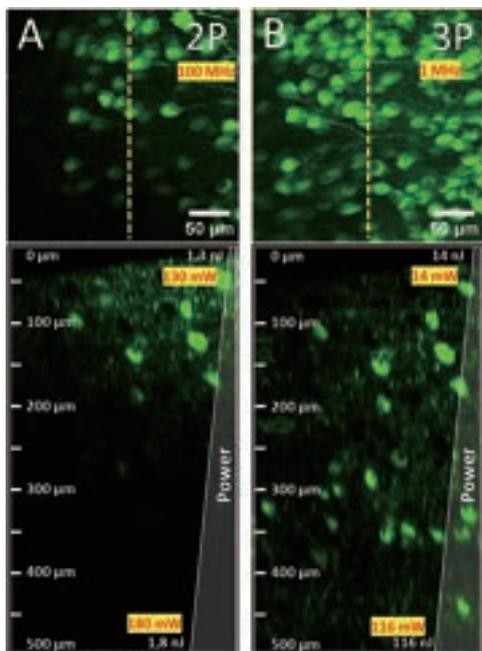


図3 2PM(a)と3PM(b)の透過深度。GFPを発現する神経細胞からなるマウス脳の非固定凍結切片における深部組織イメージング。右に示したレーザー出力が増加するにつれて、左の深度も深くなる。2光子では100MHzで130~180mW、3光子では1MHzで14~116mW(プロスペクティブ・インストルメンツ社提供)

なら、100年の歴史を持つ染色プロセスを置き換え、迅速な診断と十分な情報に基づいた治療のために、1つのサンプルから多重染色（複数の仮想染色）と分子診断を可能にするためである。PARS顕微鏡は、強化されたバイオマーカー分析とAIベースの診断と合わせてデジタル病理学を促進し、がん診断のスピードと精度を向上させることができる。

### その先は？

システム、コンポーネント、手法における複数の大きな発展により、顕微鏡とバイオイメージングはこれまでにない精度と詳細さで、生物医学研究と臨床診断に革命をもたらしつつある。

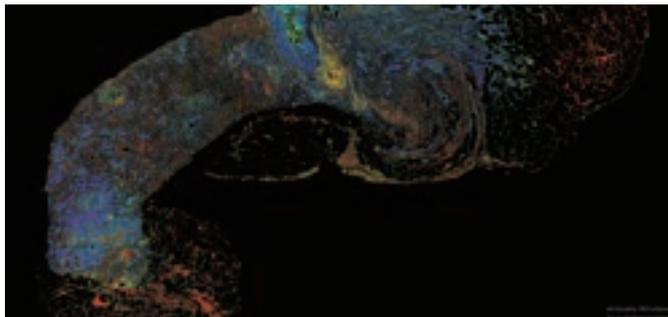


図4 サンプルの光子吸収リモートセンシング画像(イルミ・ソニクス社提供)

人工知能と機械学習の統合によって画像解析が強化され、より正確な解釈と予測が可能になるだろう。これらのイノベーションは、疾患メカニズムや医

薬品開発、個別化医療における発見を加速させ、ひいては複雑な生物システムの理解と治療を一変させることが期待される。

#### 著者紹介

アントニオ・カステロは欧州フォトニクス産業コンソーシアム (EPIC) のバイオメディカル・レーザ担当技術マネージャー。

e-mail: antonio.castelo@epic-photonics.com <https://epic-photonics.com>

LFWJ

THE FUTURE DEPENDS ON OPTICS™

# 精密光学部品 の製造業者

エドモンド・オプティクス・ジャパン株式会社  
〒113-0021 東京都文京区本駒込2-29-24  
パシフィックスクエア千石 4F  
TEL: 03-3944-6210 E-mail: sales@edmundoptics.jp



**Edmund**  
optics | japan  
詳しい情報はこちらへ:  
[www.edmundoptics.jp/114-8150](http://www.edmundoptics.jp/114-8150)