

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770051  
 研究課題名（和文）フェムト秒非回折レーザービームを用いた低倍率・超広視野2光子蛍光顕微鏡の開発  
 研究課題名（英文）Low-magnification and Wide-field two photon microscope by using femto-second non-diffractive laser beam  
 研究代表者  
 深野 天 (Fukano Takashi)  
 独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・研究員  
 研究者番号：80373364

## 研究成果の概要（和文）：

フェムト秒レーザーとアキシコンレンズ（円錐形状を持つ特殊なレンズ）を用いた新しい原理の蛍光顕微鏡を開発した。フェムト秒レーザー光をアキシコンレンズに入射すると、サンプル内に含有された蛍光物質が、通常のレンズとは異なり、光軸に沿って直線状に励起できる。ビームを1次元に走査しながら、それと直行する方向から観察することにより、低倍率の対物レンズを用いるにもかかわらず、広い視野の蛍光断層像を一度に得ることができた。この顕微鏡の生体サンプルへの適用可能性を検討した。

## 研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel wide-field fluorescence microscope using non-diffractive beam generated with a femto-second laser and an axicon lens. Fluorescence matters in sample can be excited along optical axis by the beam. This microscope allows to observe optically sectioned image with low-magnification objective. We have employed this microscope to image living sample and discussed its biological application.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・形態・構造

キーワード：蛍光顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

生物の研究において、レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡やフェムト秒レーザーを用いた2光子蛍光顕微鏡が広く用いられている。これらの顕微鏡の最大の特徴は、通常の顕微鏡と異なり、焦点があった部分のみを画像化

できる、いわゆる光セクション能力を有する点である。

しかし、これらの顕微鏡において、光セクション能力が有効に発揮されるのは、高倍率の観察の場合（対物レンズの開口数が高い場合）のみである。10倍以下の低倍率の観察（開口数が小

さい場合)では、光セクションングの効果はほとんど無くなってしまふ。これは、共焦点顕微鏡においては、光学の原理上、避けられない問題であり、また、2光子蛍光顕微鏡においては、開口数が小さいと、焦点における光子密度が極端に低下し、そもそも2光子蛍光が発生しないからである。

近年、蛍光たんぱく質を発現したトランスジェニック動物が盛んに作成され、生体レベルでの観察が行われている。特に、発生分野においては、従来では、スライスを作成して、それを観察していたものを、生きたままの状態、かつ、その時系列の変化をおって観察することが行われるようになってきた。このような分野においては、低倍率(視野が広く)かつ光セクションングを有する顕微鏡の必要性が急速に高まっている。しかし、上述した通り、従来の共焦点蛍光顕微鏡や2光子蛍光顕微鏡では、光セクションング能力は有するが、広い視野を確保することができなす。これを解決する1つの手段としては、上記の顕微鏡を用いて、サンプルを移動させることにより複数の視野を撮像し、それをコンピュータ上において繋ぎあわせて、大きな視野を得る、いわゆるバーチャルスライド法が用いられる。この手法は、結果的に大きな視野は得られるが、複数の視野を正確に繋ぎ合わせるためには、精密な電動ステージや繋ぎ合わせるための専用の画像処理ソフトウェアが必要である。また、複数の視野を順次、撮像していくために、変化の少ない準静的な現象のみにしか適用できない。特に、3次元的な観察を行おうとすると時間がかかり過ぎ、現実的な手法ではない。

これに対して、最近、サンプルの励起方法を工夫することで、比較的low倍率の対物レンズを用い、かつ、セクションング能力を有するSPIMという顕微鏡が提案された[J. Huisken et al. "Optical sectioning deepinside live embryos by selective plane illumination microscopy", Science 305 (2004), 1007-1009やC. J. Engellbrecht and E. H. K. Stelzer, "Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope(SPIM)", Opt. Lett. 31 (2006), 1477-1479]。この手法は、シート状に整形した可視レーザー光をサンプルの側方から入射して、サンプル内の蛍光物質を励起し、これと直角な方向から別の対物レンズで蛍光像を得る方法である。この手法を用いれば、比較的簡単な装置を用いて広い視野を確保しつつ、光セクションング能力を有する観察が可能であり、実際に、メダカやショウジョウバエの胚の3次元的な観察が可能となっている。しかし、SPIMにおいては、可視光のレーザー光を用いているため、(1)サンプル内で散乱された光によって、シート状の部分以外の蛍光物質が励起されてしまい実際のセクションング能力はそれ

ほど向上できておらず、また、(2)サンプルの散乱が強い場合、サンプルの奥深くまで励起光が到達できないため、視野を広くとれないという問題がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の問題点を鑑み、アキシコンレンズとフェムト秒レーザーとを組み合わせた非回折ビームを用いることにより、低倍率の観察において、広い視野を確保しつつ、極めて薄い光セクションングが可能な2光子蛍光顕微鏡を提案する。具体的には、(1)フェムト秒レーザーとアキシコンを用いて提案する原理を確認するとともに、(2)顕微鏡のプロトタイプを作成し、(3)その光学特性(分解能やセクションングの厚さ等)の評価を行う。また、(4)実際に蛍光たんぱく質を発現させたショウジョウバエの蛹等を用いて、生物サンプルへの適用可能性の検討を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究においては、顕微鏡装置の開発が主となるため、本項目においては、まず、提案する方法の原理およびそれを実現するに必須な要素を説明し、その後、試作した装置の概略を説明する。

図1に提案する方法の原理を示す。本研究において必須の要素は、(1)アキシコンレンズ、(2)フェムト秒レーザーの2つである。以下にこれらの2つについて簡単に説明する。

### (1) アキシコンレンズ

アキシコンレンズは、通常のレンズとは異なり円錐形状を持つ、レンズとプリズムとの合いの子のような特殊な光学素子である。このアキシコンレンズに平行なレーザー光を入射させると、通常のレンズでは一点に集光するが、アキシコンでは、集光点は1つではなく、光軸上に細長い線状に集光する。これによって作られる細いビームは、長距離伝播することから非回折ビームと呼ばれる。

### (2) フェムト秒レーザー

フェムト秒レーザーは、100フェムト秒程度の極めて短いパルス幅をもつレーザーである。このレーザーを蛍光物質に集光すると、集光した点において光子密度が極めて高くなり、その部分のみ

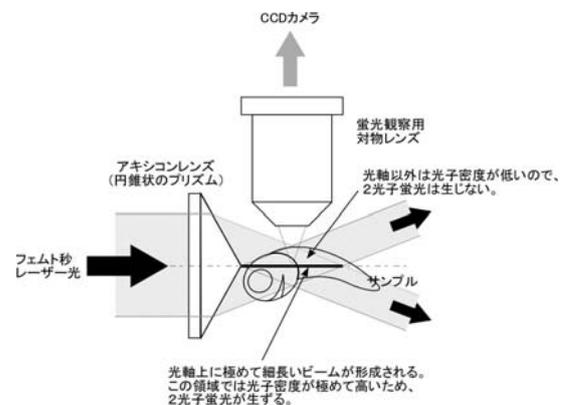


図1 提案する手法の原理図

から2光子蛍光を発生させることができる。これを用いた顕微鏡が、いわゆる、2光子蛍光顕微鏡である。

次に、このアキシコンレンズとフェムト秒レーザーとを組み合わせる提案する、顕微鏡の原理について、図1を参照しながら説明する。

フェムト秒レーザー光をアキシコンレンズに通してサンプルに照射する。サンプルには、フェムト秒レーザー光で2光子励起可能な蛍光物質が含まれているとする。このようにするとサンプル内においては、アキシコンレンズの軸上のサンプル内においては、フェムト秒レーザービームが直線状に集光され、その点において光子密度が高まり、直線状に2光子蛍光が発生する。この蛍光をアキシコンレンズと、直角な方向に配置した別の対物レンズを通し、適当な蛍光フィルターを通してカメラで観察すると直線的に励起された部分のみが観察される。さらに、この線状ビームを横にスキャンすることにより、低倍率の対物レンズを用いるにもかかわらず、広い視野で、かつ、極めてセクショニング能力(2  $\mu\text{m}$ )の高い蛍光顕微鏡を構成することが可能となる。

次に、図2を参照して試作した顕微鏡装置の概略について説明する。観察用の蛍光顕微鏡とサンプル側方からフェムト秒レーザーを導入する励起光学系の2つからなる。観察用の顕微鏡は正立型蛍光顕微鏡(オリンパス BX51)を用いた。赤外フェムト秒レーザー(Spectra-Physics 社、Tsunami, 中心波長 800 nm、パルス幅 120 fs)からのフェムト秒レーザー光を、ビームエキスパンダーを通してビーム径を広げ、ミラーで折り返した後、アキシコンレンズを通してサンプル上に集光させる。サンプル内部において線状に発生した2光子蛍光は、作動距離が長い対物レンズ(10倍あるいは4倍)、蛍光フィルター、結像レンズを通して冷却 CCD カメラに到達する。線状のビームの位置と、対物レンズの焦点位置を合致させておくと、線状に励起さ

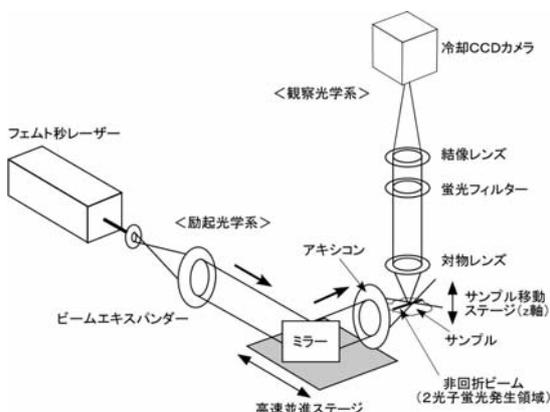


図2 試作した顕微鏡装置の概略図

れた蛍光像が CCD カメラに結像する。しかし、このままでは1次元の像しか得られないので、2次元画像を得るためには、この線状のビームを走査する必要がある。これは次のように行う。すなわち、レーザー光に対して45度に配置したミラーとアキシコンレンズとを並進ステージ上に固定し、ステージと一体になってレーザービームに沿って移動させると、サンプル内の線状のビームは、一方向にスキャンすることができる。CCD カメラの露光時間に比べて十分速くビームを走査すると、焦点面のみの蛍光像を画像化できる。さらに、サンプルをz軸ステージにより微小なステップで移動しながら画像を次々に取得していくと、試料の3次元的な蛍光情報が得られ、これをもとにコンピュータ上で3次元像を構築できる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 非回折フェムト秒レーザービームの特性の評価

まず、初めにフェムト秒パルスを入射させたときに生成される非回折ビームの特性を調べた。サンプルには、蛍光物質であるクマリンの誘導体(1光子の励起ピーク波長 420 nm、蛍光ピーク波長 448 nm)を含有させた高分子ゲルを用いた。この高分子ゲルの側方からフェムト秒レーザーを入射し、発する2光子蛍光を上方から観察した。しかしながら2光子蛍光が発生していることはわかるがその特性を評価できるほど十分な強度は得られなかった。この原因としては、次のことが推察された。

①アキシコンレンズやビームエキスパンダー等の他の光学素子をフェムト秒レンズが通過するときに、その材料の波長分散により、サンプル内においてフェムト秒レーザーのパルス幅が、伸長してしまい、サンプル内での2光子蛍光の発生効率が極端に低下している。

②レーザーから出射したビームが、そもそもあまり綺麗ではない(ガウシアンには程遠い)ため、サンプル内で形成されるベッセルビームが、綺麗な直線状にならない。

そこで、これらの問題点を解決するために次の手当を施した。

波長分散を補正するために、レーザー出射直後にプリズム・ペアを用いた可変プリチャープを自作し、挿入した。また、サンプル内における実際のパルス幅を、マイケルソン干渉計型の光学遅延を自作し、測定時のみ挿入し、2光子蛍光を光電子増倍管で検出することにより測定した。

波面歪の測定には、フェムト秒レーザービームの光束を拡大し、比較的波面が綺麗な中央部分のみを用いた。なお、波面の測定には、シャックハルトマン波面センサー(ソーラボ社、WFS150)を用いた。さらに、波面の補正には、透過型液晶空間光変調素子(HOLOEYE 社、LC2002)を光路の途中に挿入した。

これらの改善を行った結果、サンプル内でのフェムト秒パルスの幅は、160 fs 程度となり、レーザー出射直後の 120 fs に比べて 30 %程度の伸長

に留めることができた。この結果、サンプル内での2光子蛍光が発生する領域は、最も狭い部分の幅は $3\mu\text{m}$ で、長さは4 mm程度となった。

#### (2) 顕微鏡装置の特性評価および生体サンプルへの適用

これらの基礎実験を踏まえて、実際に顕微鏡を試作した。装置の構成は、図2とほぼ同様である。並進ステージ(シグマ光機社、SGSP26)を用いて、サンプル内において非回折ビームをスキャンできるようにした。対物レンズには、4倍および10倍の対物レンズを用いた。また、蛍光撮影用のCCDカメラには、冷却CCDカメラ(浜松ホトニクス社、ORCA-ER)を用いた。画像の取得および解析には、画像解析ソフトMetaMorph (molecular device社)を用いた。サンプルに応じて結像レンズとCCDカメラの間に変倍レンズを挿入して、CCDで撮像可能な領域を調整した。なお、CCDカメラとステージは同期させずに、CCDカメラを長時間露出させ、その間、一度、あるいは数度スキャンするようにさせ、画像を取得した。

このようにして、最大で4 mm x 4 mmの視野の2光子蛍光を測定できた。ただし、画像化した場合に、アキシコンレンズの軸に沿った方向で、中央部分の蛍光が強く周辺の蛍光が極端に弱くなるあることがわかった。これは、そもそもフェムト秒レーザービームが近似的にガウシアンに近いビームプロファイルを持っているため、アキシコンレンズを通して直線上に励起した場合に、そのプロファイルが反映され、軸上の励起ムラが生ずるものと推察される。

試作した顕微鏡を用いて、ショウジョウバエの蛹および成虫に適用した。なお、測定サンプルは、エタノールで固定した。この結果、予想通り断層像が得られた。セクショニングの厚さは5 $\mu\text{m}$ 程度と推察される。また、視野は上述したとおり4 mm X 4 mmである。現在の測定装置では、測定時間が30秒程度かかることが問題である。これは、発生する2光子蛍光が極めて弱いためである。

本研究において、提案した原理は確認され、生体サンプルへの適用も可能であることが示された。

最後に、今後、解決すべき課題および解決するための考えられる方策について述べる。

#### (1) 光利用効率の向上

現在、サンプルで発生する2光子蛍光はあまり強くはなく、測定時間がかかっている。これを解決するには、より高出力のフェムト秒レーザーを用いることが上げられるが、フェムト秒レーザーは高価なため現実的な解決策ではない。そこで、波面補償用の液晶空間光変調素子におけるロスが大きい。これはフィルファクターが55%程度しかないことがその原因の1つである。これをよりフィル

ファクターが大きい反射型のLCOS等に置き換えることにより、より光利用効率が向上し、測定時間の短縮が可能となる。

#### (2) スキャンスピードの向上

基礎実験のために取扱が簡単な並進ステージを用いたが、機械的なステージではスキャンスピードの向上は期待できない。そこで、アキシコンレンズで発生させたベッセルビームを4fの光学系を用いてリレーさせ、その途中により高速でビームの偏向が可能なガルバノミラーを配置すれば、少なくともビデオレート以上の走査は可能となるであろう。現在は、ステージの速度より、蛍光が微弱であることがスキャンスピードの律速となっている。ただし、カメラの露光時間内でもスキャンの回数を上げて積算することにより相対的にノイズを低減させることは期待できる。

また、現在では、アキシコンレンズと観察用の対物レンズは、近接しており、サンプルに対してアクセスしづらくなっている。上述したリレー光学系を用いれば、アキシコンレンズを対物レンズから離れた位置に配置させることができるため、試料の操作性の向上が期待できる。

#### (3) 励起ムラの改善

励起ムラは、アキシコンレンズに入射するものとビームのプロファイルが一様でないことがその原因である。近年、フラットトップなビーム整形素子が市販されてきたので、これを用いることが1つの解決手段であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

深野 天 (Fukano Takashi)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・研究員

研究者番号：80373364