



# 生きたままの生物を長期間観察できる広視野・ 高分解能2光子励起ライトシート顕微鏡

愛媛大学 大学院医学系研究科  
齋藤 卓, 高根沢聡太, 今村健志

## 1. はじめに

ライトシート顕微鏡は、検出光学系と照明光学系が垂直に配置された蛍光顕微鏡で、検出対物レンズの焦点面に側面から薄い光のシートを入射することによって高解像度な生物計測を実現する。生物への応用を目的に、2004年の選択的平面照射顕微鏡 (Selective plane illumination microscopy; SPIM)<sup>1)</sup>と2008年のデジタル走査ライトシート顕微鏡 (Digital scanning light-sheet microscopy; DSLM)<sup>2)</sup>の開発を起点として、これまでにマルチビュー撮像<sup>3)</sup>、ベッセルビーム<sup>4)</sup>や構造化照明の利用による超解像化<sup>5)</sup>など様々な改良版が報告されてきた<sup>6)</sup>。近赤外光を蛍光励起光源とする2光子励起現象の利用<sup>7)</sup>は、光毒性の低減、および、生体深部到達性の向上の観点から生体イメージングに有用と考えられるが、2光子励起範囲 (ライトシート顕微鏡では“視野範囲”) の狭さがその応用の制限となっていた。今回我々は、2光子励起ビーム照射範囲を伸縮させる技術によって、(1)生体光毒性の低減、(2)視野範囲の向上、(3)細胞レベルの高分解能を同時に達成した2光子励起光シート蛍光顕微鏡を技術開発した<sup>8,9)</sup>。本稿では、このライトシート顕微鏡とメダカを用いた生体イメージング応用について解説する。

## 2. ライトシート顕微鏡とは

蛍光顕微鏡における3次元計測は $\mu\text{m}$ レベルの厚さの光学切片を構成して、それを連続的に走査して撮像することを基盤としている。最も代表的な顕微鏡である共焦点レーザー走査顕微鏡は、レーザー走査による点検出とピンホールによる焦点外蛍光の除去により光学切片を実現する<sup>10)</sup>。一方で、ライトシート顕微鏡は、共焦点顕微鏡に使われる落射照明と照明の仕方が異なり、対物レンズ焦点面の側面から光を入射し光学切片を構成して、画像計測する装置である(図1A)<sup>1,2)</sup>。ライトシート顕微鏡の利点は、光学軸方向(z)の高空間分解能性と高速撮像性である。一般に、蛍光顕微鏡には視野範囲と空間分解能の間にトレードオフがある。ライトシート顕微鏡では横から励起光を入射するために、集光したビーム長が視野範囲と、ビーム幅が軸方向分解能と直結する。すなわち、視野範囲向上のためビーム長を長くすればビーム幅が太くなって分解能が低下し、ビームを細くして分解能を向上させればビーム長が短くなり視野範囲が狭くなる。この課題を克服するために提案されたのがベッセルビームの利用である<sup>4)</sup>。ベッセルビームは非回折ビームの一つで、リング形状のビームをレンズに入射することで形成され、中心のビーム形状がニードルのように光学軸方向に伸長する(図1B)。この細長いビーム形状がライトシート顕微鏡において視野範囲の向上と分解能の向上に効果的であり、加えて、ベッセルビームの有する自己回復性がレーザー光の遮蔽散乱によって物体背後にできる影を改善することからこれまでに多くの応用がされてきた。ただし、サイドローブへのエネルギーの分配がビーム長と関わっており、ガウスビームと同程度の蛍光励起を起こすためにはより多くのエネルギーが必要であることとサイドローブによる焦点外蛍光シグナルの発生がシグナルノイズ比の低下を招くことなどベッセルビームのトレードオフに関わる課題がある。