

昆虫の脳イメージングのための 2 光子顕微鏡の開発

趙 子豪¹ 遠藤功司²

¹電気系工学専攻 山下・セット研究室

²情報理工学系研究科 神崎研究室

著者紹介

趙子豪：超高速ファイバーレーザーとその応用に取り組んでいる。このプロジェクトでは、2 光子顕微鏡法のレーザー光源システムを担当していた。

遠藤功司：二光子顕微鏡法に取り組んでいる。このプロジェクトでは、2 光子顕微鏡とその制御ソフトウェアシステムを担当していた。

背景・目的

生物医学光学イメージング技術は、臨床診断アプリケーションと科学研究の両方でかけがえのない役割を果たしてきた。生物医学的光学イメージング技術の進歩により、生物医学的組織、細胞、さらには細胞内構造をより深く、より細かく観察することができる。2 光子顕微鏡法は、2 光子吸収に基づく非線形顕微鏡法であり、2 光子がフルオロフォアによって同時に吸収される[1]。二光子吸収の励起確率は、光強度の 2 乗に比例する。図 1 に示すように、蛍光発光は対物レンズの焦点で少量しか発生しない。通常、2 光子励起には赤外線光源が使用され、可視光に比べて生体組織での散乱が少なくなる。さらに、光が組織全体に吸収される 1 光子共焦点顕微鏡とは異なり、光は焦点でのみ吸収されるため、2 光子顕微鏡はサンプルの奥深くまで浸透する可能性がある。したがって、2 光子顕微鏡法は従来の 1 光子共焦点顕微鏡法と比較してはるかに深い侵入深さ（～1mm）を持ち、神経科学研究のための優れたツールになる。

ほとんどの市販の 2 光子顕微鏡は、励起源として Ti : サファイアレーザーを使用している。このような固体レーザーは、優れた信頼性で高いピークパワーを簡単に達成で

きる。ただし、通常はかさばり、高価だ。ファイバーレーザーは、低コストの2光子顕微鏡システムの優れた代替手段を提供する。モードロックファイバーレーザーは、2光子および3光子顕微鏡法で成功裏に実証されている[2, 3]。ソリトン自己周波数シフト、光パラメトリック増幅器、またはファイバー光パラメトリック発振器などの波長変換技術と組み合わせたモードロックレーザーは、さらに深い組織イメージングのために波長範囲を1200~1700nmに拡張した[3, 4]。低コストの特注のイッテルビウムドープモードロックファイバーレーザーは、深部組織イメージングで優れた性能を発揮することが証明されている[5]。

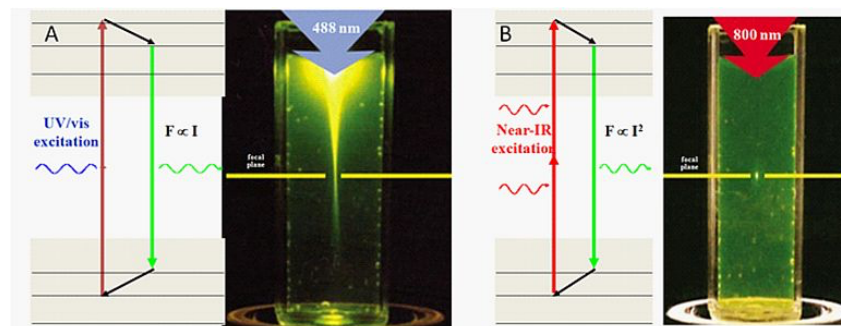


図1、1光子励起（左）と2光子励起（右）の比較。

一方、昆虫は神経科学研究に適した主題だ。昆虫の脳がどのように機能し、それをシミュレートする方法を理解することは、コンピュータサイエンス研究への特別な洞察も提供する[6]。さらに、外部刺激下で昆虫の脳をリアルタイムで観察および監視できることは非常に興味深い[7]。生物医学実験とコンピューターシミュレーションを組み合わせる概念を図2に示す。ただし、一般的な市販の2光子顕微鏡には専用のユーザーソフトウェアがあるため、このような関心のある研究の拡張性は限られている。このためには、リアルタイム対応のオペレーティングシステムと高い拡張性を備えた独自の顕微鏡を構築する必要がある。

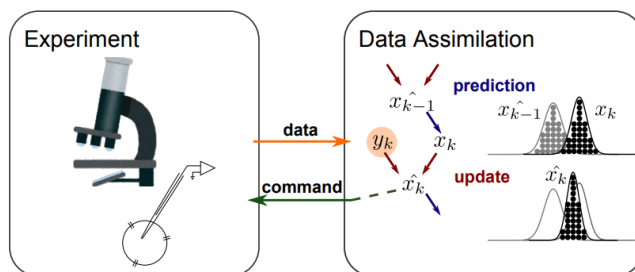


図 2、生物医学実験とコンピューターシミュレーションを組み合わせる概念。

この共同研究では、2光子励起に対応するピークパワーを備えた超高速ファイバーレーザーシステムを研究および開発した。リアルタイム対応のオペレーティングシステムと高い拡張性を備えた2光子顕微鏡も開発された。昆虫の脳の画像が正常に撮影された。画質は市販の共焦点顕微鏡と同等だった。このシステムは、両方の研究室により多くの研究機会への扉を開くと信じている。

実験装置

1. 二光子顕微鏡

図 3 に作製した顕微鏡の写真を示す。ファイバーレーザーシステムからの光は、(1) コリメータによって自由空間にコリメートされた。次に、(2) ビームエキスパンダー (ThorLabs CFP5-1064A) により、ビームを 0.82mm から 8.2mm に拡大した。次に、ビームは、カットオン波長が 650 nm の (3) ロングパスダイクロイックミラー (semrock Di03-R635-t1) を通過する。励起された蛍光光が反射されている間、赤外線レーザー光は通過する。レーザー光源からの光は、(4) 対物レンズによって (5) サンプルに焦点を合わせた。(3) ダイクロイックミラーで反射した蛍光は、(6) チューブレンズ、(7) 発光フィルターに向けられ、最終的に (8) 光電子増倍管 (PMT、ThorLabs PMT2101 / M) に到達する。対物レンズは Z 軸モーターに取り付けられた。サンプルは XY ステージに置かれた。

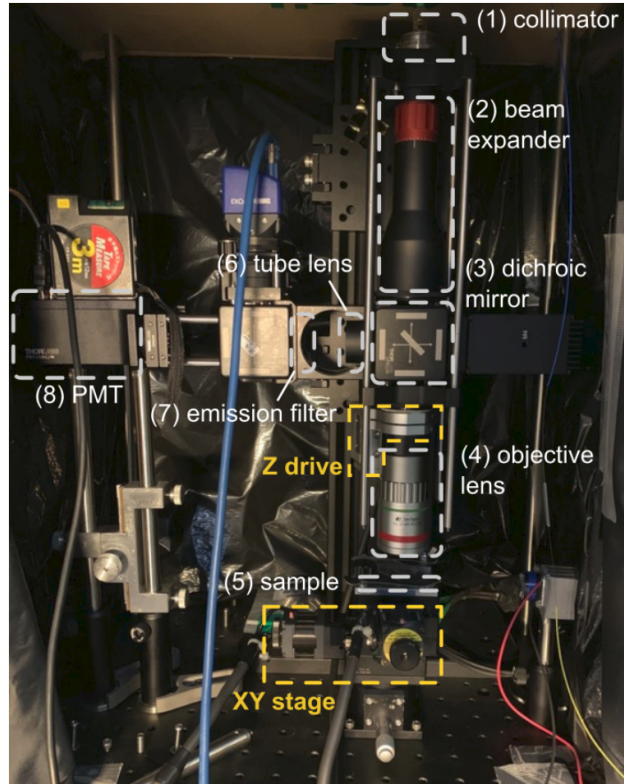


図 3、顕微鏡の光学とオプトメカニクス。

図 4 に顕微鏡装置の制御システムを示す。XY ステージ、Z 軸モーター、および AOM は、GPIO デジタル信号ピンを介して BeagleBone AI によって制御された。PMT からのアナログ信号は、AD コンバーターケーブル PRUDAQ および BeagleBone Enhanced によって受信された。2 番目の BeagleBone AI は、昆虫への外部刺激を制御するために使用された。

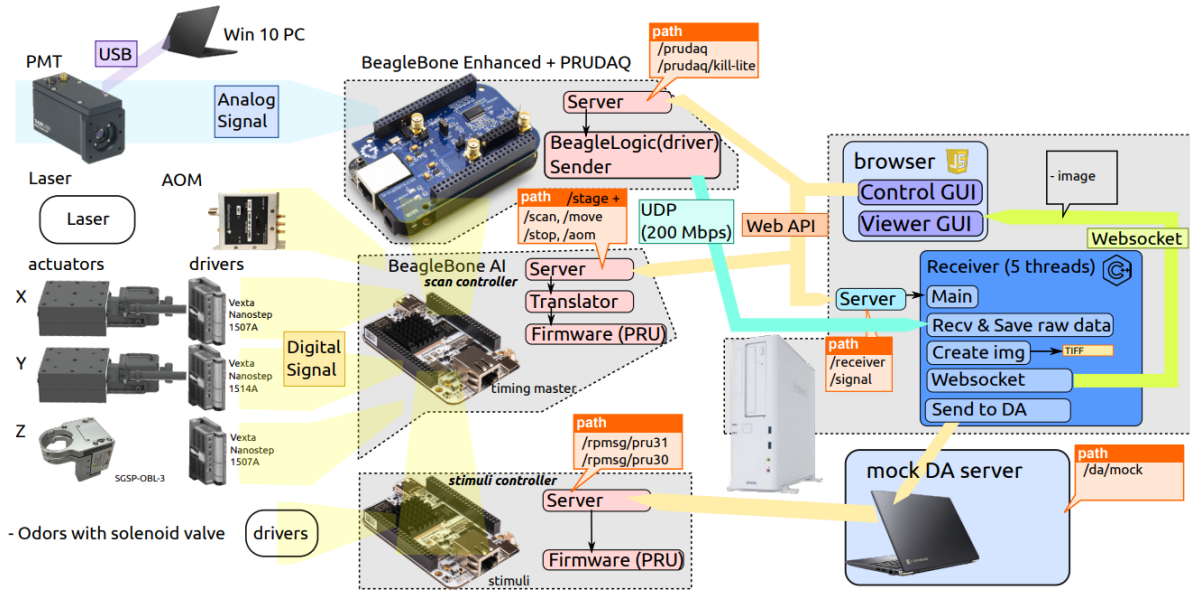


図 4、顕微鏡セットアップの制御システム。

2. ファイバーレーザー光源

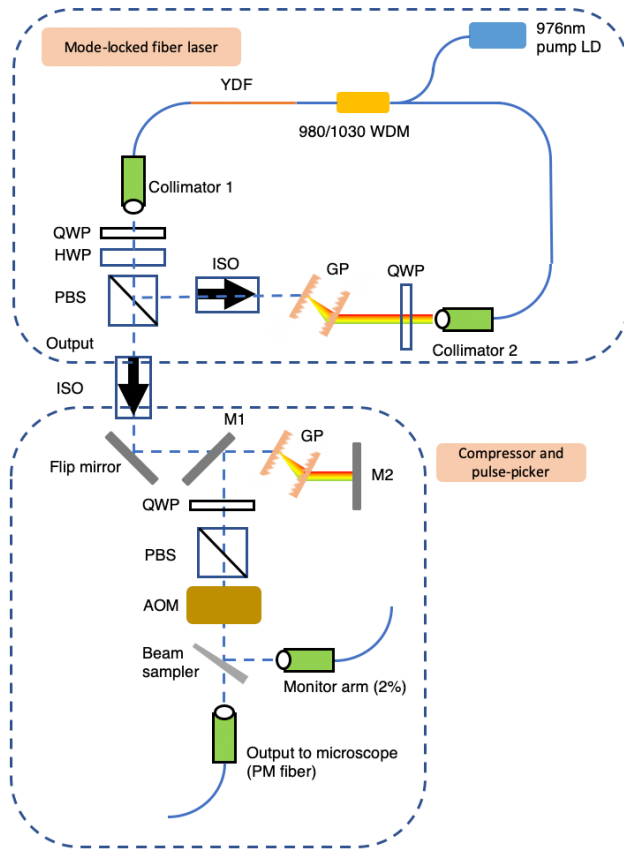


図 5、レーザーシステムの概略図。

図 5 にレーザーシステムの概略図を示す。これは、(1) モードロックファイバーレーザーと (2) コンプレッサーとパルスピッカー (電力制御) の 2 つの主要部分で構成されている。

(1)、モード同期ファイバーレーザーは、イッテルビウムドープファイバーレーザーの非線形偏光回転 (NPR) モード同期によって実現された。長さ 25cm の YDF (LIEKKI、YB1200-4 / 125) は、976nm のシングルモードレーザーダイオード (LD) によって励起された。ポンプ光は、980/1030nm WDM によってレーザーキャビティに結合された。YDF のもう一方の端は、ファイバー長 15 cm のファイバーピグテールコリメーター (HI1060 ファイバー) に接続されている。YDF とコリメータ 2 の間の全長は 49cm だった。2 つの 1/4 波長板 (QWP)、1 つの半波長板 (HWP)、および偏光ビームスプリッター (PBS) により、NPR 方式でモード同期動作を実現できた。キャビティ内のアイソレータ (ISO) は、レーザーの一方向の動作を保証した。透過型グレーティングペア (LightSmyth、T-1000-1040) を使用して異常分散を実現し、グレーティングの 1 つを 1 軸ステージに取り付けてキャビティネット分散を微調整した。自由空間での光学的長さは約 0.5m だった。キャビティ全体の長さは、167MHz の基本周波数に対応した。光の一部は、レーザー出力として PBS を介してキャビティから結合された。可能な限り最高のピークパワーを生成するために、レーザーが散逸ソリトン領域で動作するように、グレーティングペアの距離を約 3mm に設定した。

(2)、パルスコンプレッサーにはグレーティングペアダブルパス構成を採用。レーザーキャビティ内のものと同じグレーティングペアが使用された。グレーティングペア間の距離は自由に調整できる。パルスコンプレッサーは、レーザー出力を約 100 fs のパルス幅に圧縮し、柔軟な分散制御を可能にして、顕微鏡光学系とデリバリーファイバーによって導入された群速度分散を補正した。BeagleBone AI によって制御される AOM は、コンプレッサーの後に配置された。AOM を使用すると、イメージングプロセス中に定期的にレーザーを 50 μ s でオンにし、25 μ s でオフにした。高いレーザーピークパワーを維持しながら平均レーザー出力パワーを下げ、サンプルの損傷を減らすことができる。コンプレッサーと AOM の両方で、最大 3dB の電力損失が発生した。QWP と PBS を使用して、レーザー出力を直線偏光状態に調整した。くさび形のビームサンプラーは、モニタ

リングアームとして 2%の光を分割する。残りのレーザー光は PM ファイバーパッチコードに結合され、顕微鏡に送られた。顕微鏡に供給される典型的な光パワー（対物レンズ後）は、400mW のポンプパワーで 25mW だった。図 6 は、圧縮後のレーザー出力の典型的なスペクトルと自己相関トレースを示している。スペクトルの中心波長は 1030nm、帯域幅は約 60nm だった。パルス幅は約 100fs だった。レーザーのピーク出力は、サンプルで約 1.5kW と推定された。

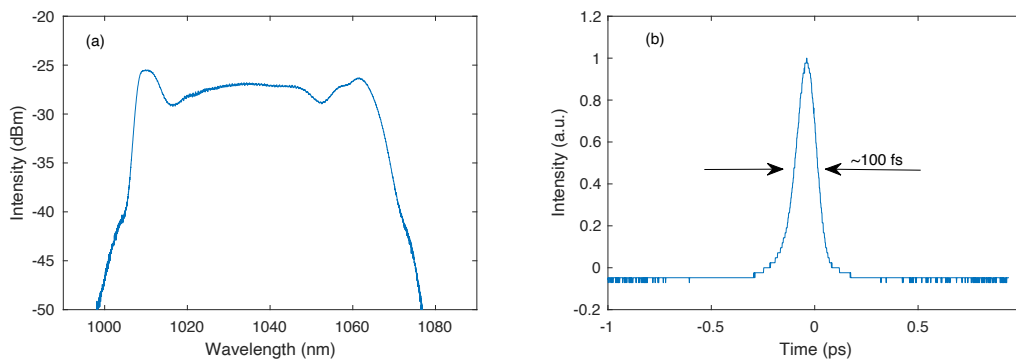


図 6、(a) スペクトルと (b) 典型的なレーザー出力の自己相関トレース。

3. イメージング結果とシステム評価

昆虫の脳の画像は、さまざまなサンプルと染料を使用して撮影された。ここでは、異なるイメージング深度で Atto488 で染色されたミツバチの脳の画像を示す（図 7）。最初の列は、右側に 2 光子顕微鏡画像のヒストグラムを示している。1%と 99%はオレンジ色の破線で示されている。（レベルが低いほど強度が高くなる）。2 番目の列は、右上隅に対応する相対的な深さを持つ 2 光子顕微鏡画像を示している（単位： μm ）。3 列目から 7 列目は、市販の共焦点顕微鏡（Zeiss LSM510）で撮影した画像を示している。列 8 は、列 3 の画像のヒストグラムを示している。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表する。

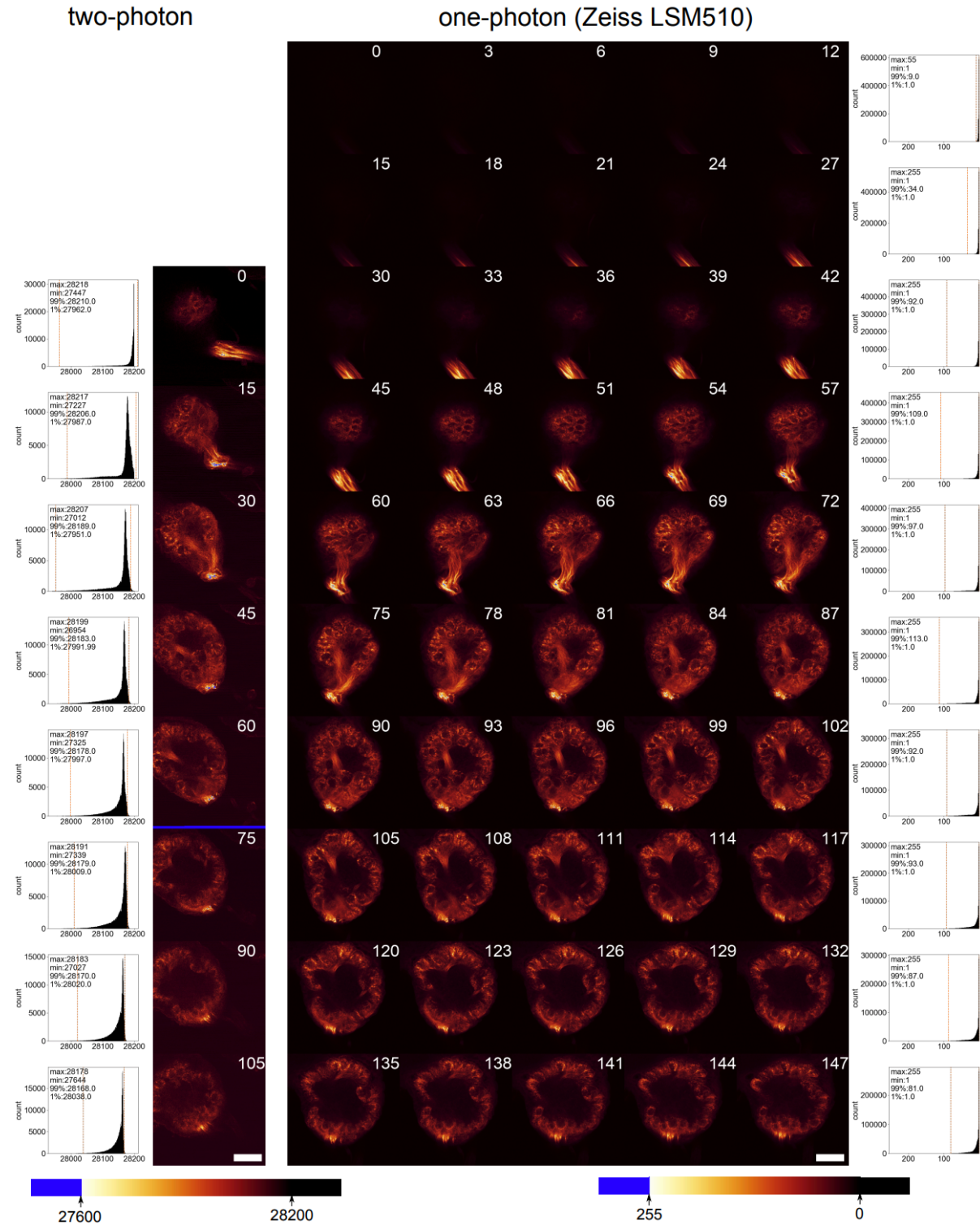


図7、異なるイメージング深度でAtto488で染色されたミツバチの脳の画像。左：構築された2光子顕微鏡、右：市販の共焦点顕微鏡（Zeiss LSM510）

システム評価：

(1) レーザー光源システム：ファイバーレーザーは、振動や温度などの環境変化に敏感な NPR モード同期技術に基づいていた。実験中に、モード同期を開始できないことがあり、レーザーを再調整する必要があることがわかった。2 つ目の問題は、コンプレッサーと AOM によるパワー損失だった。レーザー光源から直接出力される元の出力は、100mW を超える可能性がある。しかし、さまざまなパワー損失の後、対物レンズの後で、通常のパワーは約 25mW しか得られなかった。微調整は、損失を減らすのに役立つ可能性がある。

(2) スキャン速度：セットアップでサンプルをスキャンするために XY ステージが使用された。現在のイメージング速度は、スキャン速度によって制限されていた。たとえば、400x400 μm の画像をスキャンするのに 96 秒かかる。ガルボスキャナーは、より高速またはリアルタイムのイメージング速度を実現するために必要だ。

(3) 波形ノイズ：図 8 の左下部分 A は波形ノイズを示している。これは、X 軸ステージが開始された後のいつかで発生する。図 8、B は、異なるスキャン速度間のノイズ比較を示している。スキャン速度が速いほど、波形ノイズが悪化した。実験では、左側のノイズを取り除くために画像をトリミングした。ガルボスキャナーに切り替えると、このノイズを取り除くことができる可能性がある。

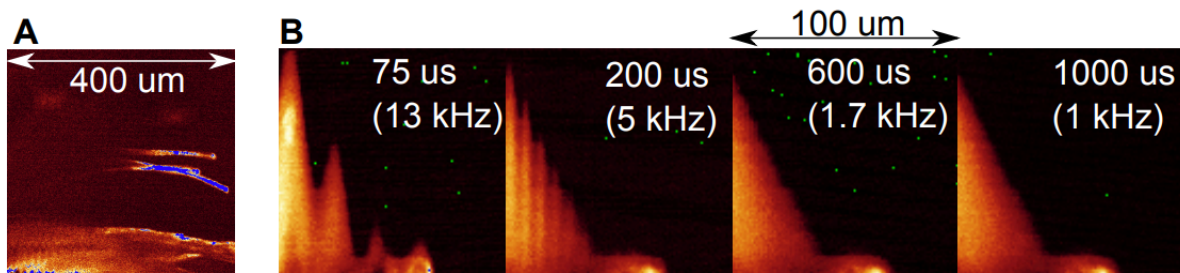


図 8、波形ノイズ。

(4) PMT トリップ：光強度が高すぎると、顕微鏡で使用される PMT がトリップする。トリップした後、制御ソフトウェアを使用して再起動する必要があった。そのため、図 9 に示す例のように、一部の画像にはいくつかのカットラインが表示されていた。

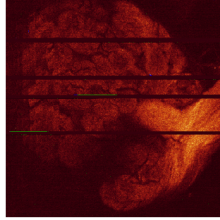


図9、PMT トリップによるカットラインのある画像。

結論

このプロジェクトでは、2光子顕微鏡の構築に成功した。リアルタイム対応のオペレーティングシステムで実行されており、高い拡張性が可能だった。また、2光子励起用のレーザーシステムを構築した。レーザーの中心波長は 1030nm だった。圧縮後のパルス幅は約 100fs だった。レーザーは、対物レンズの後に最大 1.5kW のピークパワーを提供できる。このシステムにより、ミツバチの脳の2光子画像を取得することに成功した。結果は市販の共焦点顕微鏡と同等だった。また、システムの問題を評価して要約した。このシステムは、両方の研究室へのより多くの研究機会への扉を開くことができると信じている。

謝辞

指導教員の神崎教授、山下教授の多大なるご支援に感謝申し上げます。また、神崎研究室の Haupt さん、加沢さん、山下・セット研究室のセット教授、金さんには、プロジェクトへの資金提供、デバイス、バイオサンプル、アドバイスを提供してくれたことに感謝します。Zihao Zhao はまた、副指導教員である近藤教授の指導に感謝します。特に、Zihao Zhao は、プロジェクトに大きなモチベーションを示したコラボレーションパートナーの遠藤さんに感謝の意を表します。最後に、このコラボレーションの機会を提供してくれた MERIT プログラムに感謝します。

参考文献

[1] Denk, W., Strickler, J., & Webb, W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science*, 248(4951), 73–76.

- [2] Jay R. Unruh, E. Shane Price, Roque Gagliano Molla, Lisa Stehno-Bittel, Carey K. Johnson, and Rongqing Hui, "Two-photon microscopy with wavelength switchable fiber laser excitation," *Opt. Express* 14, 9825-9831 (2006)
- [3] Horton, N., Wang, K., Kobat, D. et al. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature Photon* 7, 205–209 (2013).
- [4] D. Kobat, N. G. Horton, and C. Xu, "In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex," *J. Biomed. Opt.* 16(10), 106014 (2011).
- [5] Evan P. Perillo, Justin E. McCracken, Daniel C. Fernée, John R. Goldak, Flor A. Medina, David R. Miller, Hsin-Chih Yeh, and Andrew K. Dunn, "Deep in vivo two-photon microscopy with a low cost custom built mode-locked 1060 nm fiber laser," *Biomed. Opt. Express* 7, 324-334 (2016)
- [6] T. Kazawa, T. Fukuda, A. Goto, D. Miyamoto, S. S. Haupt, and R. Kanzaki, "Adapting CMA-ES for the massively parallelized simulation of neurons and neural circuits," *DEStech Transactions on Engineering and Technology Research*, no. amsms, 2019.
- [7] Machens, C. K., Gollisch, T., Kolesnikova, O., & Herz, A. V. (2005). Testing the efficiency of sensory coding with optimal stimulus ensembles. *Neuron*, 47(3), 447-456.