

新しいレーザー光源を用いた  
生体深部を高速かつ広い視野で観察できる顕微鏡を開発

光シート顕微鏡は、生きた胚や生物個体を高速で3次元観察できる顕微鏡法として、この数年脚光を浴びています。この光シート顕微鏡と、生体深部の観察を得意とする2光子励起顕微鏡を組み合わせた顕微鏡（2光子・光シート顕微鏡）は両者の利点を併せ持ったものになりますが、これには視野が狭いという欠点があり、ショウジョウバエ胚のような小さな標本の観察にしか使えていませんでした。

今回、愛媛大学大学院医学系研究科の大嶋佑介助教、基礎生物学研究所の丸山篤史研究員、野中茂紀准教授、成瀬清准教授らの研究グループは、光源としてこれまでとは特性の違う、工業用の高パルスエネルギー赤外線レーザーを用いることで、2光子・光シート顕微鏡の視野を大幅に広げることに成功し、これがメダカの稚魚全体のような、より大きな生きた標本のイメージングに使えることを実証しました。この成果はBiomedical Optics Express 誌10月1日号に掲載されました。

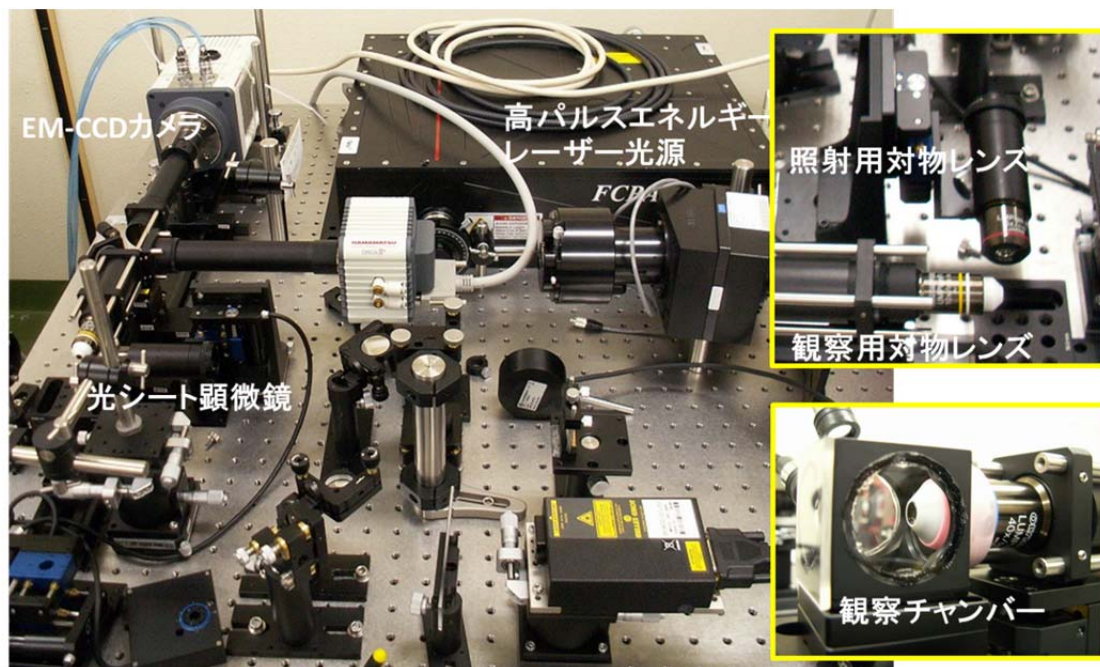


図1 本研究で開発した広い視野で2光子励起蛍光が観察できる光シート顕微鏡

## 【背景】

レーザー顕微鏡は、細胞や組織の観察、生体分子の機能解析のために生物学や医学の分野で広く使われています。特に発生のメカニズム解明などの研究のためには生体深部の細胞や分子の動きを観察する必要があります。

光シート顕微鏡は、レーザービームを平面状に成型して側面から試料に照射することで、強い光を繰り返し照射することによる生体へのダメージを抑え、さらに高速で画像を取得することができるので、生きた胚の観察などに応用されてきました。しかし、レーザー照射による試料への影響は、敏感な試料にとってはなお問題であり、加えて生体深部での観察となると試料による光の吸収や散乱が取得画質を悪化させます。そこで近年ではこの光シート顕微鏡に2光子顕微鏡法と呼ばれる、極めて短時間かつ強力な赤外線パルスを発するレーザー光を照射し2光子励起蛍光という特殊な蛍光発光を起こさせ観察する方法を組み合わせ、上記の問題点を克服しようとする試みがなされてきました。しかし従来の2光子顕微鏡に用いられていたレーザーを用いた2光子・光シート顕微鏡では、光エネルギー密度が不足するために観察できる視野は狭くなってしまい、最大でも0.25 mm以下でした。

## 【研究の成果】

本研究では、もともと材料加工用に開発されたレーザー（FCPA  $\mu$  jewel D-1000, アイシン精機の米国研究法人 IMRA America 社製）を顕微鏡光源として用いる試みを行いました（図1）。このレーザーは従来の超短パルス赤外線レーザーに比べ、パルスの繰り返し周波数が低く、その代わりに1パルスあたりのエネルギー密度が高いという特徴を持ちます。

これにより、1 mm程度の広い視野での観察が可能になりました（図2）。一方で金属加工にも使われるような高いエネルギーのレーザー照射は生体へのダメージが懸念されるのですが、本研究ではメダカを生かしたままイメージングできることを実証し、心臓が拍動するようすを高速（0.05 sec/frame）で観察することにも成功しました（図3）。メダカはがん移植モデルや薬物スクリーニングなど医学研究のモデル生物としても近年注目されており、このような小型モデル動物の生体深部高速ライブイメージングの系の開発は、発生学に加え医学研究への貢献も期待されます。

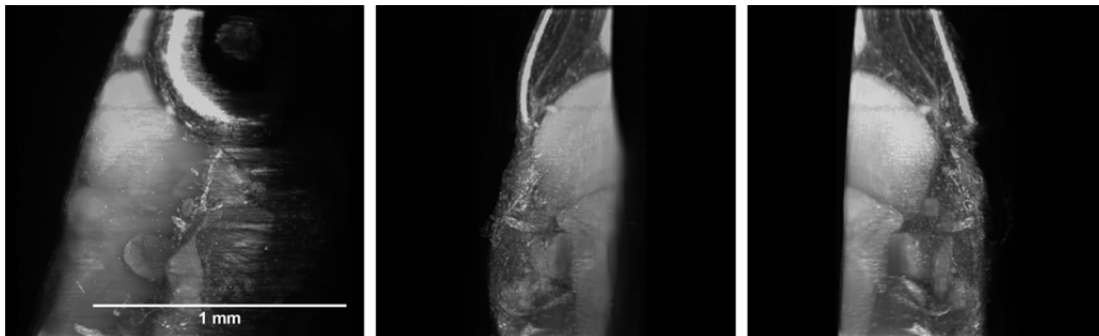


図2 メダカ稚魚の2光子励起蛍光による3次元観察

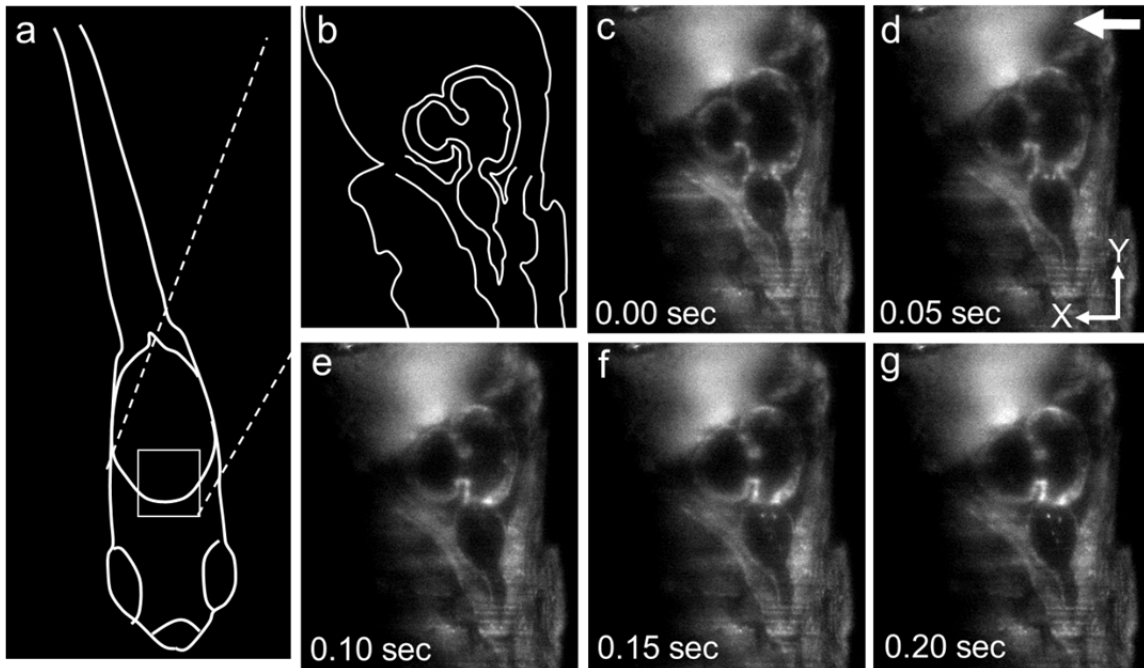


図3 生きたメダカの高速ライブイメージング

【研究グループ】

本研究は、愛媛大学大学院医学系研究科の大嶋佑介助教，今村健志教授，基礎生物学研究所時空間制御研究室の丸山篤史研究員，小林弘子技術職員，野中茂紀准教授と，同研究所バイオリソース研究室の成瀬清准教授による共同研究です。

【発表雑誌】

米国科学雑誌 Biomedical Optics Express, Vol. 5, Iss. 10, pp. 3311–3325 (2014)

“Wide field intravital imaging by two-photon-excitation digital-scanned light-sheet microscopy (2p-DSLM) with a high-pulse energy laser”

「高エネルギーパルスレーザーが実現した広視野な2光子励起光シート顕微鏡による生体内イメージング」

著者：Atsushi Maruyama, Yusuke Oshima, Hiroko Kajjura-Kobayashi, Shigenori Nonaka, Takeshi Imamura, and Kiyoshi Naruse

【研究サポート】

本研究は，科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業（CREST）「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」領域のサポートを受けて行われました。また，文部科学省科学研究費補助金および基礎生物学研究所 個別共同利用研究のサポートを受けました。