

3 次元光計測イメージングとその生命科学及び 散乱透視イメージングへの応用

神戸大学次世代光散乱イメージング科学研究センター¹，神戸大学大学院理学研究科²
的場 修¹，森田光洋²

1. はじめに

生命科学では、緑色蛍光タンパク質 GFP とチャネルロドプシンに代表される光遺伝学の進展により、侵襲的な電気的方法に代わり、非侵襲かつ非破壊で生きたマウス脳における個々の神経細胞の活動と脳機能ネットワークの可視化と操作が実現している。しかしながら、2光子吸収による蛍光イメージングや光遺伝学操作を用いても光でアクセス可能な深さは表面から 0.5 mm～1 mm 程度に限定される。特に、細胞活動の観察に用いられるカルシウムイメージングでは表面深さ 0.5 mm 程度が限界である^{1,2)}。マウス脳の大脳皮質の厚さは 1 mm 程度であるため、深さ方向をとっても一部の細胞活動を観察するに留まっている。また、2光子吸収を発現させるためには、高開口数の対物レンズを用いる必要があり、結像倍率が大きくなるため、観察可能な視野も 0.5 mm 角程度に制限される。神経細胞の大きさは 10 μm 程度であり、1細胞レベルの解像度で広く、深く細胞活動を観察できる3次元蛍光イメージング技術の開発が望まれている。また、神経細胞の活動は数ミリ秒であるため、高速計測も必要とされる。

生命科学での代表的な3次元蛍光イメージング手法に、2光子顕微鏡がある。2光子顕微鏡では、フェムト秒レーザー光を高開口数の対物レンズで集光し、時空間的に光電場の尖頭値を高めて集光点近傍のみで蛍光を発現させる。この集光スポットをガルバノミラーで2次元スキャンすることで蛍光画像を得る。さらに、対物レンズまたは物体を高さ方向に移動させることで奥行き方向を移動させて、3次元蛍光画像を得る。レゾナントミラーを用いると 10 kHz 程度でスキャンが可能であるが、奥行き方向の速度の高速化が課題であるため、複数の神経細胞活動を同時に観察することはできない。そのため、光計測技術と計算機での処理を組み合わせた3次元光計測技術が注目されている。この分野はコンピュータショナルイメージングとも呼ばれている。3次元蛍光イメージング技術として代表的なものに、デジタルホログラフィー、強度輸送方程式、ライトフィールドイメージング、シングルピクセルイメージングなどがある。その中でも高速性及び3次元蛍光イメージングを可能にする方法として、デジタルホログラフィー、強度輸送方程式、ライトフィールドイメージングが期待される。

生命現象を蛍光を介して観察する際に大きな問題となるのが散乱現象である。散乱により照明系では光の直進性が失われ、回折限界の集光スポットを得ることが難しくなり、2光子吸収による蛍光発生が起こらなくなる。さらに、蛍光が発生したとしても散乱により蛍光分布が広がるため、微弱となり、像も劣化する。そのため、照明系及び観察系で散乱の影響を除去する技術が望まれている。

本稿では、生命科学での新しいツールとして2光子ホログラフィック顕微鏡について紹介する。さらに、強度輸送方程式を用いた3次元蛍光イメージングを紹介し、散乱透視イメージング技術について述べる。

2. 2光子ホログラフィック顕微鏡

我々は、正立型蛍光顕微鏡に、ホログラフィック光刺激モジュールと3次元蛍光イメージングモジュールを導入した2光子ホログラフィック顕微鏡の開発を行い、マウス脳を対象とした生命科学研究に取