

二光子励起顕微鏡の最大の特徴は、通常の蛍光顕微鏡（共焦点顕微鏡を含む）が不得意とする不透明標本の深部観察性能であり、生体組織の内部を非侵襲のまま蛍光観察できることである。例えば、脳スライスや臓器、皮下組織など厚みのある生体組織切片の内部観察はもちろんのこと、*in vivo*での蛍光観察に最も適した顕微鏡観察手法だといえる。なお、顕微鏡以外の生体内観察手法、例えばMRIや超音波、X線CTと比較すると観察可能な深さは劣るが、細胞レベルの観察を可能とする解像力の高さでは他を圧倒している。本稿では、二光子励起顕微鏡の最も重要な特徴である、生体の深部観察を実現する光学的要素と、今後の展望について述べる。

1. 原理

従来の蛍光顕微鏡では、1つの蛍光分子が1個の光子（可視光：波長 $\lambda$ ）を吸収して発生する蛍光を利用するのに対し、二光子励起顕微鏡では、1つの蛍光分子が2つの光子（近赤外光：波長 $2\lambda$ ）を同時に吸収して励起状態となる非線形光学現象（二光子吸収）を利用する（図1）。この二光子吸収過程は、自然界では千年に1回程度しか起こらない非常に稀な現象であるが、最近の短パルスレーザー技術の向上により、容易に発生させることが可能となった。

二光子励起による蛍光の発光効率 $I$ は以下の式（1）で表され、励起光の平均パワーの2乗に比例し、集光位置でのレーザーのパルス幅に反比例する<sup>1)</sup>。

$$I \propto P_{ave}^2 / (F_p \cdot T_p) \quad (1)$$

ここで、 $P_{ave}$ は励起光の平均パワーを、 $F_p$ はパルス

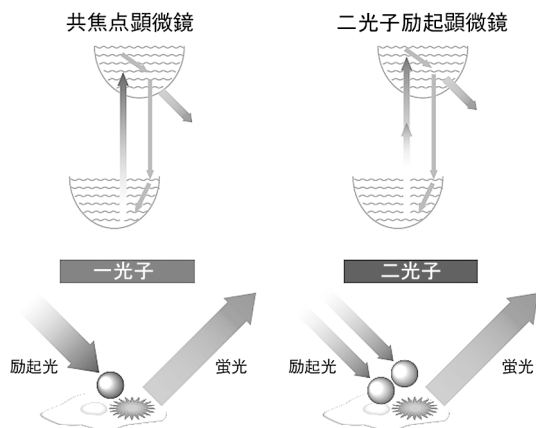


図1 原理図：一光子励起と二光子励起の違い。

繰り返し周波数を、 $T_p$ はパルス幅を表す。一光子励起では励起光が照射される全領域で蛍光が発生するが、二光子励起では、式（1）に示されるように、対物レンズによるパワーの高密度化と、レーザー光のパルス化によって光子密度を空間的に高めることにより、焦点近傍の蛍光分子のみを局所的に励起することができる（図2）。サブミクロンの空間分解能を実現する代表的な手段のひとつである共焦点顕微鏡（一光子励起）と比較すると、図2に示す通り、一光子励起顕微鏡では標本中で散乱した蛍光は共焦点ピンホールを通りぬけることができず検出が困難であるが、二光子励起では発光効率の非線形性のみを利用して三次元的に高い空間分解能が実現できるため、その効果は蛍光の検出方法に一切依存せず、散乱した蛍光も検出できるメリットを有する。

2. 特徴・メリット

生体の深部観察における二光子励起顕微鏡の特徴をまとめると、以下のようになる。

- ① 近赤外光を励起に用いるため内部散乱の影響を受けにくく、生体深部で蛍光励起が可能（図3）。
- ② 標本中で散乱した蛍光も効率よく検出が可能。
- ③ 高エネルギー密度の焦点付近以外は励起されないため、蛍光の褪色と細胞の損傷が抑えられる。

これらの特徴を最大限に利用して生体の深部観察を実現するための光学的要件を、以下にまとめる。

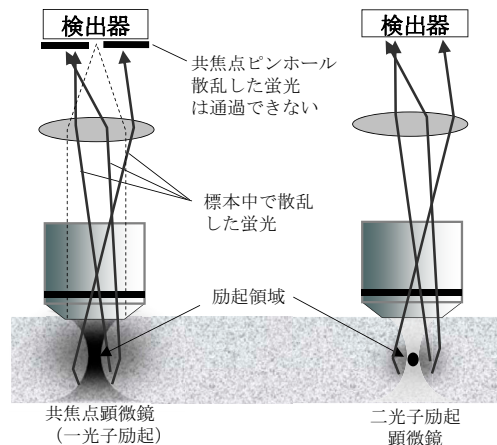


図2 共焦点顕微鏡と二光子励起顕微鏡の比較。

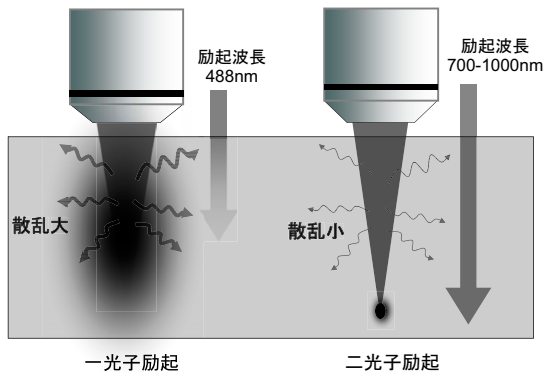


図3 励起波長の違いによる生体深部への到達度。

(1) 可視から近赤外域の透過率の高い光学系

一般に生体組織は光散乱体であるため、近赤外光を励起光として用いる二光子励起は生体の深部観察に適している(図3)。しかし、深部到達できる非散乱のレーザー光強度は、近赤外光であっても指数関数的に急激に減衰するため、十分な照射パワーが必要である。さらに、発生する蛍光を効率よく検出するためには、可視域から近赤外波長までの広い波長域で高い透過率特性をもつ光学系が必須である。

(2) 集光スポットを小さくして光子密度を上げる

近赤外光で最適設計された開口数 (NA) の高い対物レンズを使用することはもちろんであるが、生体内部を観察する場合にさらに注意すべきことは、対物レンズの浸液(水、オイル)と生体の屈折率が異なる(屈折率不整合)ことによって発生する集光スポットの劣化であり、光子密度の著しい低下を引き起こす。近年、標本と浸液の屈折率不整合を補正する補正環機構を搭載した対物レンズが実現されており、その顕著な効果が実証されている<sup>2)</sup>。

(3) NA と実視野の大きな対物レンズを使う

二光子励起による散乱体中の観察では、蛍光の検出光量はおもに対物レンズの NA と実視野の大きさで決まる。検出光量が NA の 2 乗に比例することは通常の蛍光顕微鏡と変わらないが、さらに実視野にも依存することが二光子励起顕微鏡の特徴である。二光子励起は標本中の 1 点で発生するが、そこから発する蛍光は標本内部で強く散乱され広範囲に拡散する。この拡散した蛍光をできるだけ多く取り込むには、実視野の広い“低倍率、高視野数”対物レンズが有利であり、蛍光の検出光量は実視野の面積に比例する<sup>3)</sup>。

3. 二光子励起顕微鏡の課題と今後の展望

二光子励起顕微鏡による生体の観察可能な深さは、例えばマウスの脳を用いた場合、現状、最大でも 0.7~1 mm 程度である。生体の観察可能な深さを制限している最大の要因は生体自体の内部散乱である。散乱の影響を抑えてさらなる深部観察を実現するアプローチのひとつとして、励起波長、蛍光波長の両方を長波長化することがあげられる。この方法では励起波長に適した蛍光プローブの標識さえ可能であれば、生体機能を自然な状態に維持したままで飛躍的に観察深度を伸ばせる可能性がある<sup>4)</sup>。光源の長波長化にはすでに一定の目処が立っており、近赤外域の蛍光蛋白の開発が進めば非常に有望な手段となりうる。

また、蛍光検出器にも大きな改善が図られている。一般的に普及しているマルチアルカリを光電面とした光電子増倍管は、量子効率の低さに課題があったが、最近では GaAsP を光電面とした高量子効率の光電子増倍管が使われはじめている。さらに、検出器を冷却することで熱由来のノイズを抑制し、総合的な S/N の向上が期待されている。

二光子励起顕微鏡の普及の制約として、光源の価格、光源の安定発振を維持するための設置環境、装置全体の大きさなど、おもにレーザー光源に起因する諸々の課題が存在する。光源自体のブレークスルーによりこれらの課題が解決されれば、より一般的な研究ツールとして一気に普及する可能性がある。

(オリンパス 横井英司)

文 献

- 1) W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb: "Two-photon laser scanning microscopy," *Science*, **248**, No. 4951 (1990) 73-76.
- 2) 横井英司, 齊藤荘芳, 阿部勝行: "2光子励起顕微鏡専用対物レンズの開発", *細胞*, **40**, No. 4 (2008) 41-45.
- 3) M. Oheim, E. Beaupaire, E. Chaigneau, J Mertz and S. Charpak: "Two-photon microscopy in brain tissue: Parameters influencing the imaging depth," *J. Neurosci. Methods*, **111** (2001) 29-37.
- 4) D. Kobat, M. E. Durst, N. Nishimura, A. W. Wong, C. B. Schaffer and C. Xu: "Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation," *Opt. Express*, **17** (2009) 13354-13364.