

光シート顕微鏡：生体観察のための新しい顕微鏡法

Light-Sheet Microscopy: A New Principle for Live Imaging

野中茂紀

Shigenori Nonaka

基礎生物学研究所時空間制御研究室

要旨 光シート顕微鏡とは、シート状の励起光を試料側方から照射することで光学断面像を得る蛍光顕微鏡である。この手法は、低褪色、低光毒性、高速性、深部観察能といった、生物個体や組織の生体イメージングに大変好都合な特徴を有する。一方で、側方から励起光を照射することに起因する特有な照射ムラなどの欠点も抱えており、その解決法としていくつかの方法が提案されている。本稿では、生物学研究のための光シート顕微鏡の特徴と近年の発展について概説する。

キーワード：光シート顕微鏡，深部イメージング，生体イメージング，蛍光顕微鏡

1. はじめに

Light sheet fluorescence microscopy (LSFM, 以下光シート顕微鏡と表記) は、読んで字のごとく、シート状の励起光を照射する蛍光顕微鏡である。このようなアイデア自体は古くから提案されているが¹⁾、生体観察用の顕微鏡としてとみに注目を集めるようになったのはここ数年のことである。筆者はこの顕微鏡を主に発生学に応用している。本稿では、生物学研究のための光シート顕微鏡の特徴と近年の発展について概説する。

2. 原理および他の顕微鏡法との比較

本稿の読者には釈迦に説法であるが、まず蛍光顕微鏡の代表的な方法をおさらいしたい。通常の落射蛍光顕微鏡法では、励起光を上（倒立型の場合は下）から照射し、照射と同じレンズを用いて蛍光を検出する（図1左）。この方法で厚い試料を観察すると、焦点面以外の場所から生じる蛍光がピンぼけの像となり画質を劣化させる。

レーザー走査共焦点顕微鏡はピンホールを用いて焦点面以外から出た光を除くことで光学断面像を得る。しかし、焦点面以外にも励起光は照射されているため、立体像を撮るために焦点をずらしながら撮影する度、試料は上下全体にわたって励起光によるダメージを受けることになる。この場合、褪色もさることながら、生きた試料を観察する際には光毒性が深刻な問題となる。体内でのタンパク質や細胞の挙動を見るために蛍光タンパク遺伝子を組み込んだトランスジェニック生

物を作製しても、それを生かした状態で長時間観察するためには、試料へのダメージを下げるために励起光を弱める、撮影インターバルを広げて時間解像度を下げるなど、イメージングにおいて大きな妥協を強いられてしまう。

これに対して光シート顕微鏡は、照射用と検出用の光路を完全に分けて、検出用対物レンズの焦点面に合わせて試料側方から励起光を当てている（図1右）。正確には、シリンドリカルレンズ（Selective Plane Illumination Microscope, SPIM²⁾）または対物レンズ（Digital Scanning Light-sheet Microscope, DSLM³⁾）を使って励起ビームを絞り、そのビームウエストを観察位置に合わせている。なお DSLM の場合はガルバノミラーと f- θ レンズによってビームを走査することで擬似的

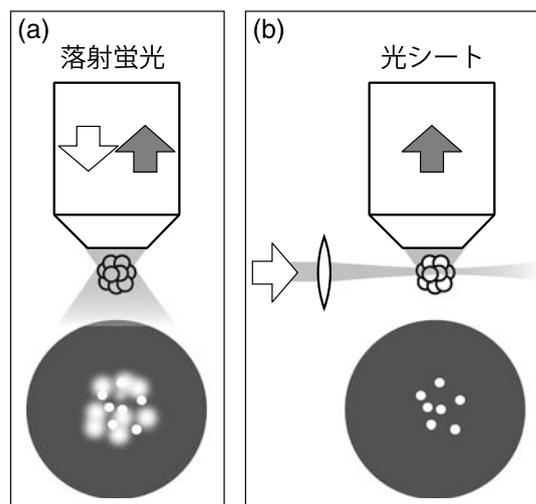


図1 顕微鏡の原理。(a) 通常の落射蛍光顕微鏡。焦点面以外からの蛍光がピンぼけの像を作る。(b) 光シート顕微鏡。励起光を焦点面のみに照射することで光学切片像が得られる。

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中38番地

TEL: 0564-55-7590; FAX: 0564-55-7595

E-mail: snonaka@nibb.ac.jp

2012年8月15日受付

表 1 光シート顕微鏡と2光子顕微鏡の比較

顕微鏡法	光シート	2光子
XY 解像度	使用できる観察用対物レンズの NA による制限	励起光に長波長を用いることによる制限
Z 解像度	光シート厚に依存 (視野広さとのトレードオフ)	励起波長や対物レンズ NA に依存
時間解像度	面撮影のため速い	点走査のため遅い
深部観察能	透明な試料ならば良好 (~ 1 mm)	散乱強い試料でも良好 (~ 1 mm)
向いた用途	透明度高い試料の広視野高速観察	透明度低い試料の高倍観察

にシート状の励起光を実現している。共焦点顕微鏡と違い、焦点面以外の場所には励起光が当たらないため、スキャン回数を増やしても褪色・光毒性は最小限に抑えられる。SPIM および DSLM を開発した Ernst Stelzer らのグループはこの特徴を最大限に生かし、DSLM を用いゼブラフィッシュ胚の全細胞核を 24 時間以上にわたって追跡している³⁾。

検出系の光路は広視野顕微鏡そのものであり、時間解像度はカメラ次第である。高速高感度なカメラを用いれば高速化は容易である⁴⁾。またピンホールを用いない単純な光学系であるため、共焦点顕微鏡より深部観察に優れている。共焦点顕微鏡が実用的に使えるのは数十 μm までなのに対し、光シート顕微鏡では試料の透明度次第で数百 μm の深さからも十分な画質の画像を得られる。

解像度に関しては、XY 解像度は一般的なアップの公式に従う。しかし光シート顕微鏡は2つのレンズを直角に向き合わせるため、検出用に径の大きな対物レンズを使うと、照射用レンズと機械的に干渉する恐れがある。また深部観察のためには作動距離が長い必要がある。したがって、市販品で光シート顕微鏡に使えるのは、あまり NA の高くない、電気生理学用のノーカバー水浸対物レンズである。このことが実際上の XY 解像度を制限する。

Z 解像度は、ビームウエストの直径によって決まる。これは照射用レンズの NA に依存するが、一方で、照射用レンズの NA はビームのレイリー長をも決定する。これが観察可能な視野の大きさを決めるため、視野広さと Z 解像度はトレードオフの関係にある。ちなみに筆者らの DSLM セットアップでは視野広さを重視して $5\times\text{NA}0.16$ の対物レンズに瞳径より細いビームを入れており、Z 解像度は半値幅で $2.78\ \mu\text{m}$ ($488\ \text{nm}$) である。シリンドリカルレンズの SPIM では実際上の NA を稼げない (Z 解像度は $6\ \mu\text{m}$ と報告されている) ことが対物レンズを用いた DSLM の開発につながっている。

ところで、生体観察、深部観察に適した顕微鏡としては既に2光子顕微鏡が知られている。これは近赤外光の超短パルスレーザーを照射し、焦点のみで起きる2光子励起を検出して光学断層像を得る。よって光シート顕微鏡と同じく、褪色や光毒性の問題は最小限に抑えられる。しかし2光子励起を起こすには強く集光させる必要があるため、ある程度以上高 NA のレンズを必要とする。このことは低倍での観察を難しくする。また、点で走査していることは、高速観察を難しくする。

一方で、点で走査する2光子顕微鏡は、CCD など2次元の撮像素子を用いる光シート顕微鏡と違い、蛍光信号を結像させる必要がない。このことは、励起に波長の長い近赤外光を用いることと相まって、散乱の大きい試料に強いという利点を生む。

簡単にまとめると、光シート顕微鏡と2光子顕微鏡を較べた場合、前者の一番の特長は高速性であり、透明度の高いゼブラフィッシュやメダカのような試料を、比較的 low NA でじっくり見るのに特に適している。一方、脳組織やショウジョウ

バエ胚など見た目に白く濁った散乱の大きい試料に対しては後者が優れており、高解像度の深部観察にも分がある。表1の比較表も参照されたい。

ただし、顕微鏡メーカー各社は近年、2光子顕微鏡用に最適化した低倍、広視野、高 NA、長作動距離のレンズを開発・販売している。これと同じように光シート顕微鏡に合わせた特性の対物レンズが市販されれば、解像度については改善が期待される。さらに後述するように解像度を上げる技術も開発されてきている。

3. 光シート顕微鏡特有の問題点と改良

ここまで光シート顕微鏡について基本的に長所を紹介してきたが、一方でこの方法にも問題点がある。

照射された励起光は試料中で散乱されるとともに、水と生体組織の屈折率差 (水 1.33, 組織 1.38 程度)、試料内部のオルガネラなどの構造による屈折率差によって不規則な方向へ曲げられる。また色素や骨など不透明な構造による遮蔽も受ける。これはひとつのレンズを使う顕微鏡では試料深部での画質を損なうが、光シート顕微鏡の場合は、同じ深度の同一視野内においても、照射用レンズから遠ざかるにつれて光のにじみや不規則な照明むらを生じさせる (図2)。

この問題を軽減するために提案されている4種類の方法を以下に紹介する。1番目のマルチアングル撮影は基本的に試料側の工夫であるのに対して、他の3つは、シート状の励起光そのものに光学的な工夫を加えている。

マルチアングル撮影：最初に提案された方法は、マルチアングル撮影⁵⁾である (図3)。位置と角度を調節可能な電動ステージからアガロース包埋された試料をつり下げ、XYZ撮影を複数回、ステージを回転させ試料の角度を変えては行い、得た3次元画像どうしの合わせ込み (registration) によって、照射用レンズと観察用レンズの双方に近い、もっとも画質のよい部分どうしを合成する。こうして、むらの少ない、かつ画質や解像度が等方的 (isotropic) な画像を得ることができる。

この方法の問題点は、撮影自体に時間がかかることと、合わせ込みの計算にさらに時間がかかることである。計算時間



図2 メダカ稚魚の断面写真。励起光は写真中左から右に向かって照射されている。照射レンズに近い側ほど画質は鮮明で、遠ざかるほど像のにじみや照明むらが目立つ。

を短縮するため、画像の合わせ込みに用いる画像の特徴点として試料自体の画像ではなく、試料と一緒にアガロース中に埋め込んだ蛍光ビーズを用いる方法も発表されている⁶⁾。

mSPIM : multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM) が Jan Huiskens らによって発表されている。SPIM と呼んでいるが DSLM 同様、ガルバノミラーと対物レンズによって光シートを得ている⁷⁾。mSPIM では2種類の工夫によって影の少ない画像を得ている。ひとつは、照射用

レンズを2つ対向させ、一平面を双方向から照射することである(図4右上)。それに加えて、光シートの平面内において励起光の向きを高速で回転させ、さまざまな方向から照明することで影の発生を抑えている(図3左下)。通常の光シート生成に使うガルバノミラーの前段に共振ミラーをおくことでこのような照明を実現している。

ベッセルビームの利用：一般的に顕微鏡に使われるレーザーの強度プロファイルはガウス分布であるため、ガウシアンビームと呼ばれる。これに対し、円錐状のアキシコンレンズを通すことで得られるベッセルビームは、光波の位相が干渉し合いながら伝搬する。このベッセルビームには自己修復性という特徴がある。つまり照射光を遮蔽する障害物があっても影はずっと続かずすぐに消える。これを光シート顕微鏡に応用した例が発表されている⁸⁾。ただしベッセルビームの発生にはアキシコンではなく SLM (空間光位相変調器) を用いている。

2P-SPIM : 光シート顕微鏡に2光子励起を組み合わせたものが、Scott Fraser らのグループから2P-SPIM として発表されている⁹⁾。この方法のメリットは、励起に散乱の少ない近赤外光を用いること、励起光の散乱がノイズ発生に寄与しないことにある。一方、蛍光は結像させねばならないので、蛍光の散乱による悪影響を被る点は1光子の光シート顕微鏡と変わらない。しかしながら、彼らはショウジョウバエ胚を観察し、胚内部の観察において1光子より改善されたと報告している。

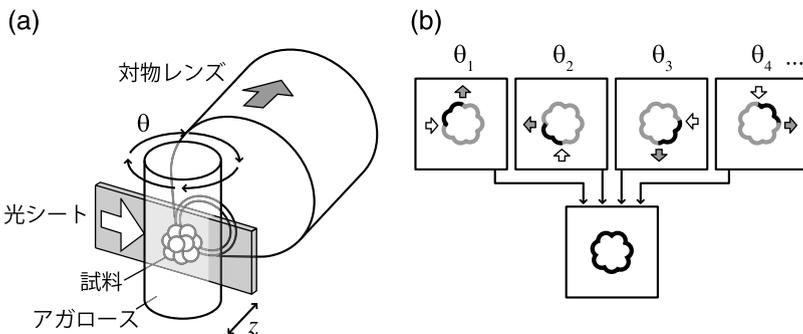


図3 マルチアングル撮影の原理。(a) 試料を包埋したアガロース棒を回し、同じ試料の3次元像を異なる角度から複数回撮影する。(b) 画像の合成。撮影した複数の画像について、コンピュータ上で角度を合わせ、合わせ込み (registration) を行う。それぞれの画像中の画質の良い部位 (黒線で表す) どうしをつなぎ合わせて最終結果を得る。

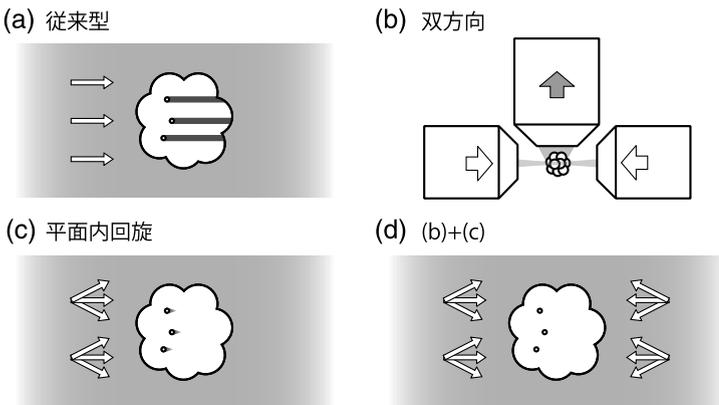


図4 mSPIM の原理。(a) 従来型の光シート顕微鏡では影が長く伸びてしまう。(b) 照射レンズをふたつ用意し、双方向から励起光を照射することで影を軽減する。(c) 光シートの内部において照射光の方向を高速で動かすことで影を軽減する。(d) (b) と (c) を組み合わせることでさらなる軽減効果を得る。

なお、2光子励起に十分な集光には高NAの照射レンズが必要なため、励起光のレイリー長は短くなってしまふ。そこでmSPIMと同じく双方向から励起光を照射し、それぞれのビームウエスト位置をずらすことで、幅150 μm のショウジョウバエ胚を見るために十分な視野を確保している。

Eric Betzigらは、ベッセルビームと2光子励起を組み合わせ、優れたZ解像度(<0.5 μm)を得ている⁴⁾。さらに高速カメラと組み合わせ、細胞の仮足や染色体の立体的な動きを見事に可視化している。

4. おわりに

光シート顕微鏡の特長を一言で表すなら、無駄な光を当たらないためシグナル取得の効率が良い、ということになる。このことは高速、長時間のイメージングを可能にするとともに、微弱なシグナルを取得する上でも役立つ。著者らのグループは、光シート顕微鏡法を生体ラマンイメージングに応用している¹⁰⁾。レーザ顕微鏡の国際会議“Focus on Microscopy”における光シート顕微鏡の演題数は年を追うごとに増えており、近い将来、共焦点や2光子と肩を並べる生物学用顕微鏡の主要な手法のひとつになることが期待される。

一方で、深部まで高速で長時間撮影できるということは、これまでなかった量の大容量データが得られることを意味する。たとえば130万画素、16bitのCCDカメラでZ方向に200枚、10分ごとに24時間のタイムラプスイメージングを行えば、得られるデータ容量は約75GBになる。このような大量のデータを、かつてのように生物学者が手作業で解析するのはほとんど不可能である。光シート顕微鏡が普及するにつれて、大容量の4次元データをどう解析するかという問

題はいつそう深刻になるはずであり、生物学と情報処理との連携がますます必要になってくる。また、数式は苦手な人が多い生物学者の側にも自己変革が必要になってくるだろう。

最後に、構造化照明によって鮮明な画像を得る方法としていくつか興味深い報告があるが、筆者の力不足によりここに詳しく紹介できなかったことをお詫びする^{11~12)}。興味のある方は原著にあたっていただきたい。

文 献

- 1) Siedentopf, H. and Zsigmondy, R.: *Ann. Phys.*, **315**, 1-39 (1903)
- 2) Huiskens, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J. and Stelzer, E.H.K.: *Science*, **305**, 1007-1009 (2004)
- 3) Keller, P.J., Schmidt, A.D., Wittbrodt, J. and Stelzer, E.H.K.: *Science*, **322**, 1065-1069 (2008)
- 4) Planchon, T.A., Gao, L., Milkie, D.E., Davidson, M.W., Galbraith, J.A., Galbraith, C.G. and Betzig, E.: *Nat Methods.*, **8**, 417-423 (2011)
- 5) Swoger, J., Verveer, P., Greger, K., Huiskens, J. and Stelzer, E.H.K.: *Opt. Express*, **15**, 8029-8042 (2007)
- 6) Preibisch, S., Saalfeld, S., Schindelin, J. and Tomancak, P.: *Nat. Methods.*, **7**, 418-419 (2010)
- 7) Huiskens, J. and Stainier, D.Y.: *Opt. Lett.*, **32**, 2608-2610 (2007)
- 8) Fahrbach, F.O. and Rohrbach, A.: *Opt. Express.*, **18**, 24229-24244 (2010)
- 9) Truong, T.V., Supatto, W., Koos, D.S., Choi, J.M. and Fraser, S.E.: *Nat. Methods.*, **8**, 757-760 (2011)
- 10) Oshima, Y., Sato, H., Kajiura-Kobayashi, H., Kimura, T., Naruse, K. and Nonaka, S.: *Optics Express.*, **20**, 16195-16204 (2012)
- 11) Breuninger, T., Greger, K. and Stelzer, E.H.: *Opt. Lett.*, **32**, 1938-1940 (2007)
- 12) Mertz, J. and Kim, J.: *J. Biomed. Opt.*, **15**, 01627-01634 (2010)