

2 光子顕微鏡を用いた生体イメージング (In vivo imaging using two-photon microscopy)

江藤 圭

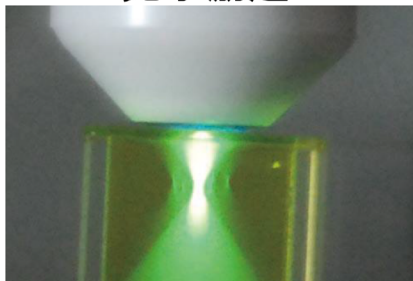
(生理学研究所 生体恒常性発達研究部門)

2 光子顕微鏡は生体イメージングに最適な顕微鏡であり、神経科学をはじめ様々な研究領域において、広く使用されている。2 光子顕微鏡の動作原理である 2 光子励起は、蛍光分子に 2 つの光子が同時に相互作用することで起きる。通常の蛍光顕微鏡では、1 つの蛍光分子が 1 つの光子のエネルギーを吸収することで、蛍光が生じる (1 光子励起)。一方、2 光子励起では 2 つの光子 (波長は 1 光子励起の 2 倍) が同時に 1 つの蛍光分子に吸収されることで起きる。2 光子励起の発生確率は極めて低いことから、顕微鏡の焦点面でのみ蛍光が生じる。そのため、生じた蛍光を全て像の形成に用いることができる。また、焦点面以外の蛍光を除去する必要がなく、ピンホールの設置が不要である。さらに、フェムト秒パルスレーザーを用いて焦点のみを励起することで熱による組織傷害も減少するため、長時間観察も可能である。そして、1 光子励起に比べて長波長の光 (近赤外光) を使用できるため、組織透過性が高く、生体深部組織の観察を行うことができる。これらの特性から、2 光子顕微鏡は生体脳深部のイメージングに適している (鍋倉、江藤 2010)。2 光子顕微鏡を用いた生体イメージングの例として、神経細胞の樹状突起やスパインのイメージングが挙げられる。スパインは神経細胞間のつなぎ目であるシナプスであり、1 μ m ほどの微小構造であるが、2 光子顕微鏡を用いることで生きたマウスの脳でスパインを観察することができる。また、同一個体の同一シナプスを数か月にわたって繰り返し観察することも可能であるため、学習、障害のシナプスへの影響を長期に渡って追跡することが可能である (Kim and Nabekura 2011)。もう一つの例として、GCaMP などのカルシウム感受性蛍光蛋白質を神経細胞に発現させることで、神経活動を観察することが可能である。大脳皮質だけでなく (Ishikawa et al., 2018)、視床、海馬などの深部領域、さらに脊髄や末梢神経など様々な部位で神経活動を単一細胞レベルの解像度で生きた固体から計測することができる。

参考文献:

- ・鍋倉 淳一、江藤 圭 日本薬理学雑誌 135: 104-108 (2010)
- ・Kim SK, Nabekura J. *J. Neurosci.* 31: 5477-5482 (2011)
- ・Ishikawa T et al. *Pain* 159: 1592-1606 (2018)

コンフォーカル顕微鏡 1光子励起



- 短波長の励起光(350-650nm):
組織透過性が低い
- 広域の励起:
高侵襲性、背景光の問題
- ピンホールが必要

2光子顕微鏡 2光子励起



- 長波長の励起光(700-1000nm):
組織透過性が高い
- 局所の励起: 低侵襲性
- 生じた蛍光を効率よく検出できる