多焦点面同時多光子イメージング技術の開発

Multiplane multiphoton imaging

理研光量子 [1]，京大生命 [2]，名古屋大・院創薬科学 [3]　理研脳神経科学 [4]，○磯部 圭佑 [1,2]，恩田 将成 [3]，竹内 遼介 [3]，伊藤 慶 [3]，佐藤 彰典 [3]，道川 貴章 [1,4]，宮脇 敦史 [1,4]，小坂田 文隆 [3]，緑川 克美 [1]

RIKEN RAP[1], Kyoto Univ.[2], Nagoya Univ.[3], RIKEN CBS[4]：○Keisuke Isobe[1,2], Masanari Onda[3], Ryosuke Takeuchi[3], Kei Ito[3], Akinori Sato[3], Takayuki Michikawa[1,4], Atsushi Miyawaki[1,4], Fumitaka Osakada[3], Katsumi Midorikawa[2]

E-mail: kisobe@riken.jp

多光子顕微鏡は生体組織の透過率が高い近赤外光を用いることが可能なため，生体組織の深部イメージングに有用である．しかし，画像取得には，レーザー走査が必要であるため，脳内の３次元的に広がる神経細胞の相互作用を可視化することなどは困難である．この問題を解決するために，複数の焦点面を同時にイメージングする技術が開発されている[1]．異なる深さに集光されるパルス間に，蛍光分子の蛍光寿命以上の遅延時間を与えて試料内部へ集光することによって，異なる深さから発生した信号を時間的に分離することができる．しかし，蛍光分子の蛍光寿命が数 ns であるため，信号が互いに混入しないようにするには，光電子増倍管で検出した後の増幅器を含む回路系の周波数帯域幅が数百 MHz 必要になるなど技術的に難しい．　本発表では，簡易的な方法として，ガルバノミラーを用いた光路の高速切り替えによって，多焦点面を同時にイメージングする技術を報告する．

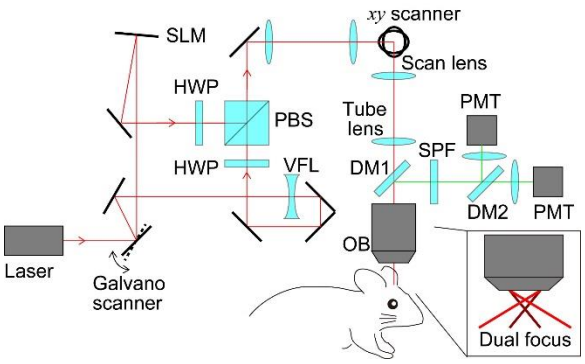

Fig.1 Schematic of dual-plane multiphoton microscopy.

Fig.1 にガルバノミラーによる光路の高速切り替えを用いた多光子顕微鏡を示す．ガルバノミラーによって，フレームごとに 2 つの光路を切り替え，各光路には，可変焦点レンズ(VFL)と空間光変調器（SLM）を配置している．VFL を用いると，２つの光路間の集光深さを変更でき，SLM を用いると，集光深さだけでなく，観察したい視野もシフトできる．さらに，SLM によって，ベッセルビームを用いたボリュームイメージング[2]への切り替えも可能になる．　GCaMP6 が発現したマウス大脳皮質において，約 350 μm 離れた第 2,3 層と第 5 層に位置する複数の神経細胞のカルシウム応答を 15 Hz で観察できた(Fig. 2)．講演では，４つの焦点面を 11　Hz 程度でイメージングした結果も報告する．

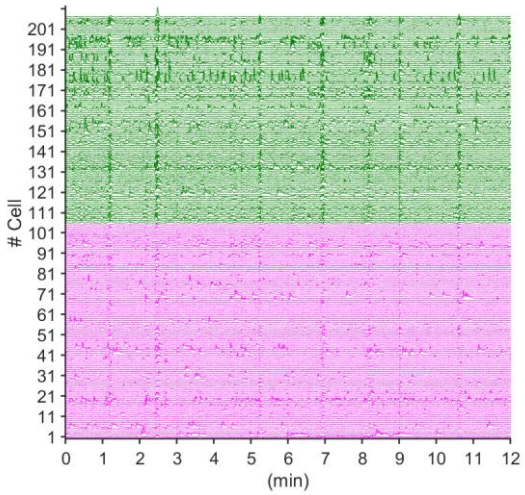

Fig.2 Ca^{2+} response of layer2/3 neurons (green) and layer 5 neurons (pink)

謝辞

本研究は，科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業　CREST (JPMJCR1851, JPMJCR1921), MEXT/JSPS KAKENHI Grant Number JP18H04750 “Resonance Bio” からの助成を受けて行われました．ここに深く感謝の意を表します．

参考文献

[1] A. Cheng *et. al.*, Nat. Methods **8**, 139 (2011).
[2] R Lu *et. al.*, Nat. Neurosci. **20**, 620 (2017).