

# Haliteレーザーによる小型で 高効率な二光子励起顕微鏡の実現

二光子励起顕微鏡（**Two-photon Excitation Microscopy: TPEF**または**2PEF**）は、生物学的イメージングに不可欠なツールである。低エネルギーの光子を用いて蛍光マーカを励起し、吸収過程の非線形性を利用することで、二光子励起顕微鏡は多くの利点（光退色、散乱の減少、イメージング深度の増加など）を提供することができます。

Fluence Technologyは、最も要求の厳しい**TPEF**アプリケーションに費用対効果の高いソリューションを提供するため、クラス最高のフェムト秒レーザーシリーズである **Halite**を開発しました。

## 二光子励起顕微鏡の優位性

1990年代に実証されて以来、TPEFは強力で広く使用されている生体イメージング技術に発展してきました<sup>1</sup>。

すべての蛍光顕微鏡技術の基本は蛍光マーカ（フルオロフォアと呼ばれる）であり、遺伝的に定義された種類の個々の細胞など、複雑な生体試料や生きた組織の特定の部位や構造に結合するように調整することが可能である。さらに、蛍光マーカは可視光を放出することにより、二光子顕微鏡で撮像した試料の形態や構造、組織を高コントラストに浮かび上がらせる。

可視光を発するためには、まず発色団を励起する必要がある。従来の顕微鏡観察では、発色団は発光した光よりも高いエネルギー（短波長）の光子によって励起される。TPEFは、この方法を覆し、2つの比較的lowエネルギー（長波長）の光子を用いて励起させる。この2つの光子が同時に蛍光体に吸収され、分子がより高いエネルギーレベルになることで励起が起こる。

散乱はエネルギーに比例して増加するため、2光子法は散乱を大幅に低減し、その結果、イメージング深度が向上し、生体内イメージングに適しています<sup>3</sup>。また、プロセスの非線形性とレーザー走査機構の組み合わせにより、TPEFは標準的な蛍光顕微鏡よりも厚い試料の解像度を大幅に向上させることができます。

高解像度を得るための具体的な仕組みは、次のように説明することができる。2つの光子は、光強度が閾値を超えるほど高い場合にのみ吸収される。つまり、低強度の光は、レーザービームの焦点位置で高強度になるまで、組織を透過することができるのです。事実上、3次元的に非常に精密にポイントを選択することが可能です。

周辺組織からの信号ノイズを回避しこれにより、より深い組織の層を精密に画像化することができます。

図1に、マウス大脳皮質の冠状スライスでの2PEF in-vivo イメージングの例を示します。

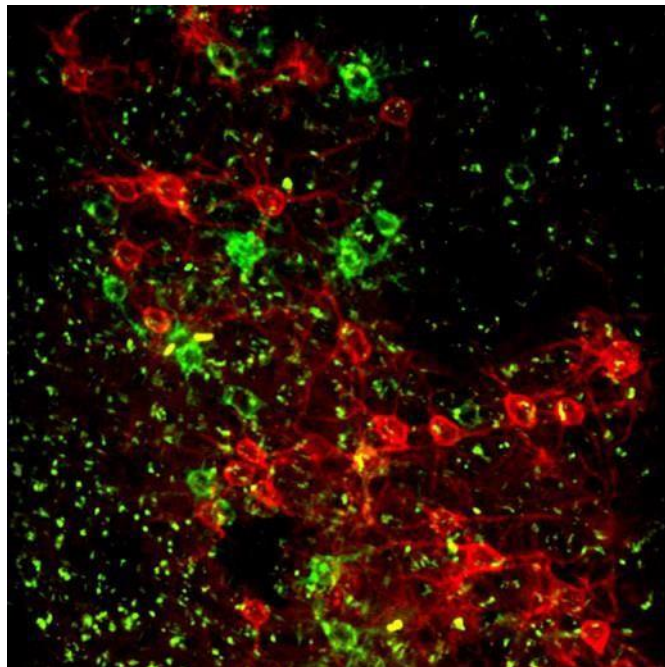


図1 マウス大脳皮質のコロナルスライス。Ace-mNeonGreenとVarnam (赤) で標識した神経細胞を用いたin vivo電圧イメージングに使用したマウスの組織像。どちらの蛍光色素も細胞膜で発現している。レーザー光源。Fluence Halite (繰り返し 周波数20 MHz、波長1030 nm)

## TPEMの課題を克服する

二光子励起顕微鏡の第一の課題は、二光子同時吸収の確率が非常に低いことである。つまり、確実に蛍光を発生させるためには、極めて高い入射光子密度が必要なのです。

その後、フェムト秒レーザーがTPEMの重要なツールとなっています。これらの装置は、連続レーザーのような高い連続出力を必要とせず、必要な光子密度を生成するために、非常に短く高強度のレーザーパルスを高速で連続して照射する。

レーザーの性能に大きく依存する2光子技術で得られる画質は、レーザーパラメーターに大きく依存する。高ピークパワーかつ可能な限り短いパルスを得るためには、パルス幅の精密な制御と、レーザー経路の光学素子に起因するGDDの最小化が不可欠である。

Fluence Technologyの[Haliteシリーズ](#)レーザーは、2光子イメージングにユニークなソリューションを提供します<sup>4</sup>。

## 低反復率

意外かもしれませんが、レーザがパルスが発生させる速度（繰り返し周波数）を下げると、性能が向上することがあります。例えば、平均出力が同じで、繰り返し率が異なる2つのレーザがあったとします。この場合、繰り返し率が低い（つまり1秒あたりのパルス数が少ない）レーザの方が、1パルスあたりのエネルギーが大きくなるはずで、その結果、繰り返し周波数が低いほど光子密度が高くなり、より高品質なイメージングが可能になります。

競合システムは通常80 MHzのパルス繰り返し周波数を提供しますが、Haliteレーザの繰り返し周波数は20 MHzと非常に低くなっています。これは、同じ公称出力を持つ80MHzレーザと比較して、Haliteレーザのパルスピーク出力は **4倍**に増加することを意味します。図2は、同じ平均出力レベルで、20 MHzレーザと80 MHzレーザのTPEFを比較したものである。パルスエネルギーが高いため、20 MHzは80 MHzレーザよりもはるかに優れた収率をもたらすことが明らかである。2 W の出力クラスでは、Haliteのフェムト秒レーザは、**1パルスあたり最大 100 nJ** という市場で入手可能な最高のパルスエネルギーを提供します。

また、繰り返し周波数が低いと、生体イメージングに不可欠な試料への熱の蓄積も少なくなります。

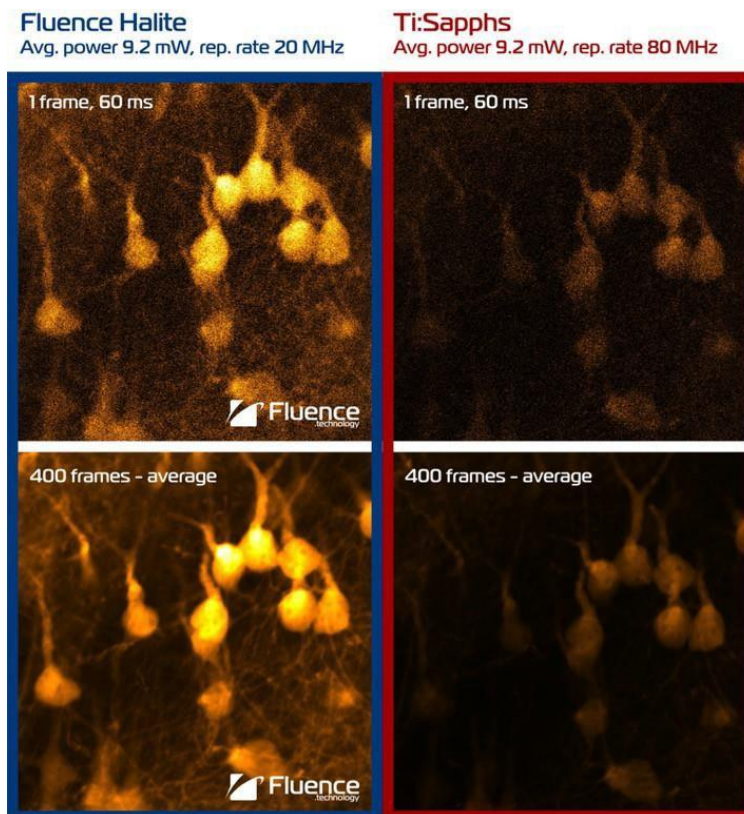


図2 レーザ光源の比較。Fluence Halite (20 MHz) vs チタンサファイアレーザ (80 MHz)。錐体細胞とその樹状突起の1030 nmでの構造2光子イメージング。固定組織、コロナルスライス、YFP-Hマウスライン。

## オールファイバー光学系

結晶技術に基づくレーザシステム（チタンサファイアレーザーなど）は、資本コストが非常に高い（通常15万ドルをはるかに超える）だけでなく、生涯コストに劇的な影響を与える追加の保守と修理が必要です。Haliteシリーズの堅牢なオールファイバー設計は、光学系からバルク光学部品（SESAMなどの可飽和吸収体を含む）を排除し、部品の劣化を防ぐとともに、将来のメンテナンスの必要性を根絶します。バルク光学部品がないことは、ミスアライメントがないことを意味し、時間のかかるアライメントや最適化の必要性を排除します。

Haliteシリーズは、独自の発振器設計により、様々な条件下で信頼性の高い性能を発揮します。HaliteのベースとなったFluence社のフェムト秒発振器は、40gの衝撃試験でも安定した動作を示し、幅広い温度範囲でも安定した性能を維持します。Haliteレーザは、出力安定性が高く、パルス幅200fsのクリーンなパルスを提供します。また、GDDプリコンペンセーション機能により、顕微鏡の光学系から発生する群遅延分散を10,000 fs<sup>2</sup> から -100,000fs<sup>2</sup> までの範囲で補正することが可能です。レーザ光源と試料間の各光学部品は、通常分散によってパルス幅を伸ばし、プロセス効率の低下を招きます。自動化されたGDD事前補償チューニングは、光学系が予測不可能で常に変化する顕微鏡のプロトタイプを作るグループにとって有益な場合があります。群遅延分散をソフトウェアレベルでパルスに加算または減算するだけで、顕微鏡の光学系がパルス幅を圧縮し、試料での最小値まで戻すことができます。従って、GDDの自動調整は、ユーザーが自由にパルス幅を調整できることも意味します。

## コンパクトな1BOX設計

コンパクトなオールインワン設計のHaliteレーザは、外部冷却ユニットやコントローラを必要としません。このクラスでは唯一、24 V 電源アダプタから電源を供給し、すべての電子機器を単一のレーザヘッドに統合したレーザです。このため、Halite はエレガントなソリューションであるだけでなく、TPEF 用の最小のフェムト秒レーザでもあります。ハライトレーザは、あらゆる2光子イメージングシステムに容易に組み込むことができる超高信頼性の光源です。そのコンパクトさと安定性により、実験室、病院、研究開発室などの枠を超えて、イメージングシステムの設計に容易に取り入れることができます。

最近、Haliteは、図3に示す新世代Halite 2で、さらにパワーアップされました。新しいHalite 2は2 W以上の平均パワーと100 nJ以上の高いパルスエネルギーを提供し、20 MHzレベルまで低下した基本繰り返し周波数によって得られました。Halite 2 の基本波長である1030 nm はTPEF に有用であり、多光子励起蛍光顕微鏡 MPEF、特に3光子顕微鏡 (3PEF) に最適です。基本波長とは別に、Halite 2 には第2高調波オプションがあり、出力時に 515 nm のレーザ光を発生させることができ、これは2光子重合 (TPP, 2PP) などのアプリケーションに最適です。Haliteシリーズやその他の高性能レーザ製品について詳しくは、Fluence Technologyの正規日本代理店の株式会社オプトサイエンスにお問合せください。



図3.独自の技術により、Halite 2は20MHzで100nJ以上のエネルギーレベルを持ち、外部コントローラを必要としない最小のフェムト秒レーザーです。

### 参考文献と参考資料

1. デンク、W、ストリクラー、J、ウェッブ、W. 二光子レーザー走査型蛍光顕微鏡。サイエンス  
248, 73-76 (1990).
2. ラーソン, A. M. 多光子顕微鏡.Nature Photon **5**, 1-1 (2011).
3. Helmchen, F., Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy.Nat Methods 2, 932-940 (2005)。 <https://doi.org/10.1038/nmeth818>.
4. Halite: シングルボックス型コンパクトフェムト秒レーザー - Fluence.technology  
Fluence.technology  
Fluence.technology <https://fluence.technology/products/halite/>