基礎老化研究　33(3);13－15,2009

【トピックス】

多光子顕微鏡による生体組織の多色ライブイメージング

岡田　峰陽
理化学研究所　免疫・アレルギー科学総合研究センター　免疫細胞動態研究ユニット

1. はじめに

現在の医学生物学のほぼすべての分野において、個体レベルと分子レベルでの研究成果を、有機的に結びつける研究手法の重要性が指摘されている。最近、特に注目されている手法の一つが生体組織イメージングである。免疫システムの研究においては、運動性に富む多種類の免疫細胞の相互作用を、多光子顕微鏡を用いて観察するライブイメージングが浸透しつつある [1, 2]。多光子顕微鏡観察の特長は、組織の比較的深部を細胞レベルもしくはそれ以上の解像度で、光によるダメージを抑えてリアルタイム観察できるという点である。共焦点顕微鏡ではリンパ性組織の約100μmまでの深さが限界だが、多光子顕微鏡では約300μmまで蛍光観察が可能である。しかしながら、通常の共焦点レーザー顕微鏡と異なり、多光子顕微鏡ではレーザーの数の制限などのために、同時に励起できる蛍光色素の種類に制限がある。出来るだけ多種類の細胞の挙動を、複雑な組織構造と同時に可視化・識別することは、組織内で起こっていることをより正しく理解するために必要である。そのために多光子顕微鏡観察の多色検出能の向上をめざした技術開発が進められている。ここでは、一般に普及している多光子顕微鏡における多色性の制限と、それを克服するための最新の顕微鏡システムについて述べ、また生体イメージングへの応用が注目され始めているレーザー技術について触れたい。

2. 一般に普及している多光子顕微鏡よる免疫組織イメージングの多色性の現状

一光子励起の共焦点レーザー顕微鏡では、UVレーザーから赤色レーザー、場合によっては近赤外レーザーまで、多種類のレーザーを搭載することによって、現在ではかなりの多色同時観察が可能になっている。しかし一般に普及している生物試料観察用の多光子顕微鏡では、価格やセットアップの複雑さの理由から、多光子励起するための超短パルスレーザーは一台のみしか搭載されていない。これらの顕微鏡に用いられているフェムト秒パルスチタン・サファイアレーザーの波長可変域は、最も広いもので約700 nm弱から1000 nm強である（注釈）。よってDAPIから、GFP（Green Fluorescent Protein）、さらには一部のRFP（Red Fluorescent Protein）や、Alexa Fluor 633などまで、幅広く励起することが可能である。しかしながらスペクトル幅は10nmから数十ナノメートルであり、フェムト秒パルス発生を維持しながら可変域内で波長を変えるのに数秒から十数秒以上かかるため、同時に励起出来る蛍光色素の組み合わせは限られている。例えば、CFP（Cyan Fluorescent Protein）とGFPもしくはYFP（Yellow Fluorescent Protein）は、900nm前後のレーザー波長で効率よく同時に多光子励起できる(表1)。しかしながらtdimer2(12) [3]などのRFPを多光子励起するためには、最低でも1000nmより長波長のパルスレーザーが必要であり、この波長はGFPやCFPの励起には適さないので、これらを一台の多光子レーザーで同時にイメージングことは難しい（表1)。一方、生きた組織内の微細構造をin vivo抗体染色によって可視化する場合、染色シグナルが弱すぎて良い画像を得ることが出来ないケースが多い。この場合は、出来るだけ明るい（量子収率の高い）蛍光色素でラベルした抗体を使い、励起波長もそれに最適のものを使わざるを得ないが、そうするとそれと近い波長の蛍光を発する明るい色素は、同時に可視化する細胞のラベルに使用することが難しくなる。

我々は、リンパ節内のリンパ管（リンパ洞）の構造を、量子収率の高いAlexa Fluor488でラベルした抗LYVE-1抗体でin vivo染色し、Tリンパ球がリンパ洞に入ってリンパ節を出ていくメカニズムの研究を行った。リンパ節内深部にあるリンパ洞を明確に観るためには、Alexa Fluor488のシグナルを最も効率よく得る必要があったため、810nmでこれを励起した。しかしメカニズムの研究のためには、野生型のT細胞と、リンパ節からの移出に異常がある遺伝子欠損T細胞（sphingosine-1-phosphate受容体の一つであるS1P1の遺伝子欠損）を同時に、リンパ洞構造とともに可視化することが必要であった。そこで片方のT細胞をrhodamine類の細胞ラベル化用蛍光色素CMTMRでラベルし、もう片方のT細胞をCMTMRとfluorescein類の細胞ラベル化用蛍光色素CFSE（Alexa Fluor488とほぼ同じ波長の蛍光を発する）で二重ラベルすることによって、2種類の細胞と構造の組織深部での同時可視化を行うことができた[4]。つまり、赤蛍光（CMTMR）のT細胞、黄色蛍光（CMTMR + CFSE）のT細胞と、緑蛍光（Alexa Fluor488）のリンパ洞内皮細胞を識別した。このように多重ラベリングなど工夫も、複数種の細胞や組織内構造の同時可視化に有効である。

連絡先：〒230-0045
神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22
TEL: 045-503-7026
FAX: 045-503-7018
E-mail: tokada@rcai.riken.jp

励起波長	第二高調波	CMAC	CFSE, Alexa 488	CMTMR
800nm	390 - 410nm	455 - 485nm	500 - 550nm	565 - 620nm

励起波長	第二高調波	CFP	GFP, CFSE (YFP)	CMTMR (Keima)
900nm	430 - 450nm	465 - 485nm	500 - 550nm (525 - 550nm)	565 - 620nm (590 - 640nm)

励起波長	第二高調波	tdimer2(12) RFP	Alexa Flour 633
1000nm	490 - 510nm	565 - 620nm	630 - 680nm

表1．フェムト秒レーザー（800nm、900nm、1000nm）による多光子励起可能な蛍光色素と、組織中のコラーゲン線維などから発生する第二高調波光（入射光の約半分の波長）、およびそれを検出するためのバンドパスフィルターの波長域の目安を示す。

（注釈）多光子顕微鏡で用いられるチタン・サファイアレーザーは、共焦点顕微鏡で使われているレーザーよりも波長が約2倍である（反対にエネルギーは約2分の1）。この長波長レーザーを超短パルス（100フェムト秒以下のパルスが、1秒間に8千万回程度発生）に圧縮して用いることで、光子を2個同時にピンポイントで観察部位に当てることができる。2光子が同時に吸収されることで得られるエネルギーは約2倍となるため、1光子励起と比べて約2倍の波長での励起が可能となる。実際には個々の分子の構造によって、2倍よりも短波長側に吸収極大がくるブルーシフトと呼ばれる現象が起こるため、表1にあるように、例えば900 nmのレーザーでYFPやCMTMRなどの色素も効率よく励起することができる。多光子顕微鏡で共焦点顕微鏡よりも組織深部が観察できる理由としては、組織内で散乱されにくい長波長レーザーを用いる点が挙げられるが、さらに重要なのはピンポイント励起であるために、検出器の前にピンホールが必要ないので、高感度蛍光検出が可能であることである。

3．新しい蛍光タンパク質と、デュアルレーザー多光子顕微鏡による多色解析能の向上

上述のようにCFPやGFPと、従来のRFPを一台の多光子レーザーで同時励起して、イメージングすることは難しい。しかし最近、宮脇らのグループは、ストークスシフトが通常の蛍光タンパク質より大きい（励起波長と蛍光波長が遠い）Keimaと呼ばれる蛍光タンパク質を開発し、これを用いれば容易にGFPやCFPとの同時多光子励起が可能であると報告している [5]。今までのところ、まだ実際に組織内イメージングに用いられている報告は少ないが、これから増えてくるだろう。

二台のチタン・サファイアレーザーを備えた多光子顕微鏡も、徐々に生体イメージングに普及しつつある。最大のメリットは勿論、同時多光子励起の難しい複数の蛍光色素を、二波長のレーザーで同時励起できることである。我々も最近、このデュアルレーザーシステムを用いており、レーザーの一つを900 nm付近で、もう一つを1000 nm付近で用いることで、CFPとRFPや、GFPとAlexa Fluor 633の同時励起観察が可能となっている（図1、表1）。これ以外にも、coumarin類の細胞ラベル化用蛍光色素CMACとYFPの組み合わせは、一波長レーザーでは多光子励起観察が不可能だが、800 nm前後と900 nm前後の二波長を用いれば、効率よく同時観察が出来る（表1）。また二つのレーザーをポッケルス素子と偏光フィルターによって、高速で切り替えて用いれば、例えばCMACとCFPのように至敵励起波長は異なるが、蛍光スペクトルは似ている蛍光色素を区別して検出することも可能となり、さらなる多色検出能の向上が可能となる [6]。

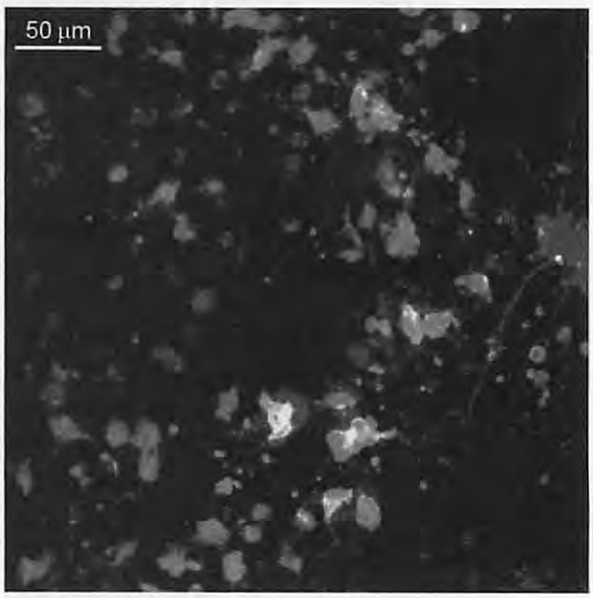

図1．(カラー図は表紙に掲載)
生きた脾臓組織における免疫応答中のGFP発現B細胞（緑）と、Alexa Fluor 633でラベルした抗CD35抗体により染色した濾胞樹状細胞（マジェンタ）を、900nmと1000nmのデュアルレーザーによって多光子励起観察を行った。濾胞樹状細胞は密なネットワークを形成し、B細胞への抗原提示の場を形成している。この画像はタイムラプスデータの一部であり、実際の動画では、B細胞が毎分約6ミクロンの速さで、濾胞樹状細胞上を移動している様子が観察される。

4. 多光子生体イメージングのこれからの飛躍の可能性

上述のように一部のRFPは1000 nmで励起可能だが、実際には殆どのRFPの至適な二光子励起波長は1000 nmよりも長波長域にある。このため、通常の生物試料観察用の多光子顕微鏡セットアップを用いたイメージングでは、これらのRFPのシグナル強度の制限がつきまとう。さらにこれらの顕微鏡セットアップでは、遠赤色に近い蛍光を発するHcRedやmKateといった蛍光タンパク質を励起することは不可能である。加えて、励起できるAlexa Fluorシリーズの蛍光色素は筆者らの試みたところではAlexa Fluor 633までで、Alexa Fluor 647より長波長励起のものは、多光子イメージングには使えなかった。このような問題を克服し、近赤外領域の蛍光を多光子励起でイメージングするための技術も、実はすでに生体イメージングに適用可能なところまで来ている。一つ目は、光パラメトリック発振器による波長変換であり、チタン・サファイアレーザーを光源に用いて、1000 nm－2000 nm超の長波長パルスレーザーを得ることができる。実際に、これを用いて得られた1280 nm付近のレーザー発振により、Alexa Fluor 680-dextranを静脈注射したマウスの脳内毛細血管のイメージングが報告されている [7]。また、チタン・サファイアレーザーよりも長波長のレーザーを発振できる、クロム・フォルステライトレーザーを用いることによっても、同様の遠赤色蛍光色素の二光子励起が達成される。例えば1230 nm付近のパルスレーザーによって、HcRedを発現したゼブラフィッシュ胚中の心臓の蛍光像が撮影されている [8]。このような長波長レーザーを、通常のチタン・サファイアレーザーと共に備えた多光子顕微鏡は、強力な多色性を持つことになると考えられる。

さらに長波長レーザーを使う別のメリットとして挙げられるのは、1200－1300 nmのレーザーは、800－900 nmのレーザーに比べて生体組織・細胞への光ダメージが小さいと報告されていることである [7, 8]。また、長波長レーザーによって達成される遠赤色・近赤外蛍光イメージングは、組織内の到達深度をもっと引き上げる可能性を持っている。遠赤色・近赤外波長帯域では、組織内の生体分子の自家蛍光などのバックグラウンドのシグナルが少なく、これは高感度イメージングを行う上で大きな長所である。また、長波長レーザーと近赤外蛍光は組織内で散乱されにくいので、組織深部での効率の良い多光子励起と、蛍光の回収が得られると考えられる。あとは遠赤・近赤外蛍光色素の量子収率の向上が達成されれば、組織内の到達深度を飛躍的に高める可能性がある。

おわりに

話が少しそれるが、免疫学で最も頻繁に用いられる解析方法の一つはフローサイトメトリーである。フローサイトメトリーは、近年その多色検出能が飛躍的に向上しており、複雑な免疫システムを読み解くための大きな助けとなっている。多光子顕微鏡による免疫組織イメージングは、フローサイトメトリーの多色性・定量性には永久に及ばないかもしれないが、それに少しでも近づけることが重要である。それによって、フローサイトメトリーで得られた情報とのより緻密な整合が可能となり、ライブイメージングデータの解釈の幅が広がるであろう。

文献

1. Germain RN, Miller MJ, Dustin ML, et al. Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. Nat Rev Immunol 6: 497-507, 2006.

2. Cahalan MD and Parker I. Choreography of cell motility and interaction dynamics imaged by two-photon microscopy in lymphoid organs. Annu Rev Immunol 26:585-626, 2008.

3. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, et al. A monomeric red fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA 99: 7877-7882, 2002.

4. Grigorova IL, Schwab SR, Phan TG, et al. Cortical sinus probing, S1P1-dependent entry and flow-based capture of egressing T cells. Nat Immunol 10: 58-65, 2009.

5. Kogure T, Kawano H, Abe Y and Miyawaki A. Fluorescence imaging using a fluorescent protein with a large Stokes shift. Methods 45: 223-226, 2008.

6. Zinselmeyer BH, Dempster J, Wokosin DL, et al. Chapter 16. Two-photon microscopy and multidimensional analysis of cell dynamics. Methods Enzymol 461:349-378, 2009.

7. Kobat D, Durst ME, Nishimura N, et al. Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. Opt Express 17: 13354-13364, 2009.

8. Tsai TH, Lin CY, Tsai HJ, et al. Biomolecular imaging based on far-red fluorescent protein with a high two-photon excitation action cross section. Opt Lett 31: 930-932, 2006.