*in vivo*細胞内イメージングの新たな最先端領域を切り開く補償光学

バーバラ・ゲフェルト

補償光学は、行動している動物の組織を超解像度でイメージングするためのドアを開く。神経科学や他領域に素晴らしい意義をもたらしている。

「補償光学は間もなく、多細胞の試料における全深度の高解像度イメージングにおいて必須の要素となるだろう」と、ナ・ジー氏(Na Ji)が新たに発表したレビューで結論付けている[1]。彼女は、ノーベル賞受賞者のエリック・ベツィグ氏(Eric Betzig)とともに研究していた米ハワード・ヒューズ医療研究所(Howard Hughes Medical Institute)のジャネリア・リサーチキャンパス(Janelia Research Campus)の前グループリーダーで、現在はベツィグ氏とスタッフに歓迎されてPhDの母校であるカリフォルニア大バークレー校(University of California at Berkeley)の物理・神経生物学の准教授である。彼女は、神経生物学に応用するイメージング技術を開発している。最も興味があるのは、おそらく、*in vivo*(生体内)の脳研究だ。

言うまでもなく、ベツィグ氏は超解像度の蛍光顕微鏡法の開発で2014年にノーベル化学賞を受賞した。この技術は、*ex vivo*(生体外)で生物試料の細胞内イメージングを可能にするものである。しかしながら、顕微鏡のスライドに細胞を置いてしまうと、生きている生物の中にある全含有物を知るということができない。これが、彼とジー氏が、生きている、行動している動物の深い組織の細胞内イメージングを可能にしたいと考えている何よりの理由である。

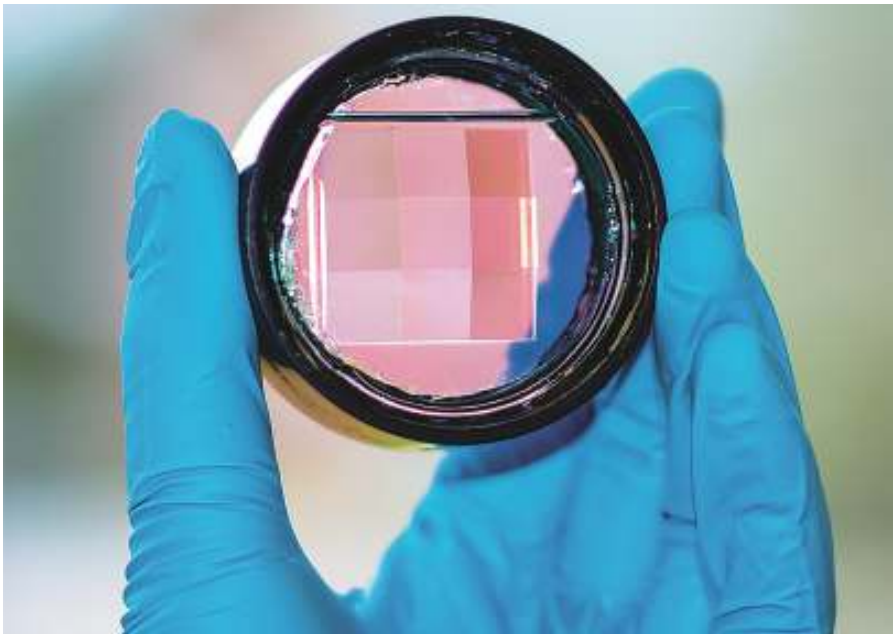

図1 Multi-Pupil Adaptive Optics(MPAO)は、広大な視野で一度に波面補正できる。(提供:パデュー大のメン・カイ氏)

なぜ補償光学なのか

光学システムの解像度の制約は、理論上、光波の回析のみである。ところが、試料(または光学システムそのもの)による光学効果がブラーをもたらす。屈折率は3次元(3D)組織を入ってから出てくるまで変わるため、構造の複雑性や深さが大きくなるほど、コントラストとシグナルが下がる。

2013年に発行された書籍『Adaptive Optics for Biological Imaging』に記載があるように、補償光学(AO)は、これらの収差を補正するために研究者が開発してきた中で最もパワフルで多用途なアプローチである[2]。AOシステムは劣化を能動的に制御、補償して、イメージをシャープにするよう設計されている。

AOは、本来は天文学で開発され、そこでも主流になるまで60年以上がかかった。AOは、生体イメージングに応用されるようになり、最初は網膜イメージング、その後は顕微鏡法であったが、それは1970年代後半になってからである。

従来のAO顕微鏡システムは、波面を直接計測するのではなく、光検出器で受け取る信号を処理することで波面を補正する。光学システムに波面セン

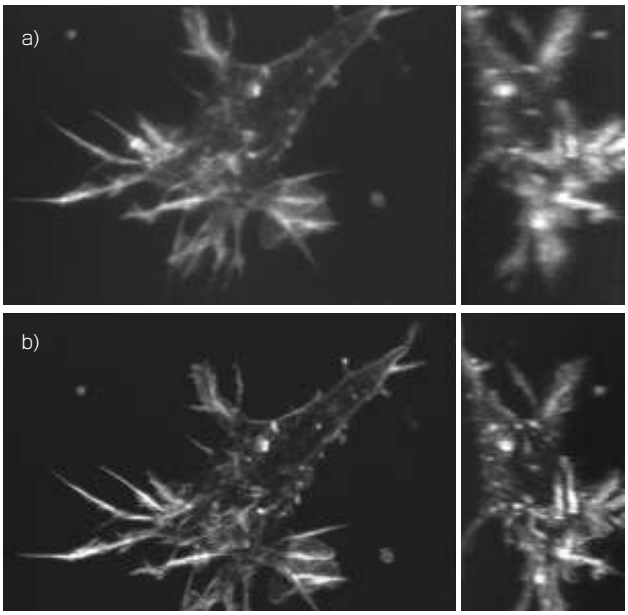

図2　(a)マウスの大動脈の内皮細胞を2P-ISIM顕微鏡で、補償光学なしで撮影した。(b)補償光学を用いて解像度が増したもの。(提供:米国立画像生物医学・生物工学研究所のハリ・シュロフ氏)

サを追加するのは複雑な問題であり、生物学では自然由来の点光源リファレンス(天文学のAOで使われる「ガイド星」などのこと)がないためである。しかし、過去15年以上にわたり、研究者はセンサレスのAOを開発しており、2光子顕微鏡法の実現を目指してきた。

近年の進展により神経科学が発展する

ジー氏とベツィグ氏は、光学イメージングがさらに野心的な神経科学研究を促進すると述べている[3]。このような研究に含まれているものに、中枢神経系の機能構築、多様なタイプの神経細胞が行う動的コミュニケーション、これらが行動に与える影響を理解するという目標がある。この目標を達成するためには、*in vivo*で巨大な神経細胞集団を1シナプス解像度で観察する性能が必要だ。彼らは、生きたマウスの脳内で深さ700μmの回析限界クオリティで、形態学的、機能的イメージングを信頼度高く実現するアプローチを開発してきた[4]。

レーザ誘導の近赤外(深部へ透過するため)のガイド星と、小型レンズの配置を使うガイド星の波面歪曲を計測するためのシャックハルトマン波面センサ(SHWS)を作るため、2光子励起を用いる。それぞれで、発生波面の一部をサンプリングし、イメージングセンサに集光する。そして、波面調整要素が収差を補正する。この補正には通常、可変鏡の表面をゆがめるアクチュエータを動作させるソフトウエアアルゴリズムが含まれており、平行面における鏡から光を離脱させる。

神経科学向けのAO顕微鏡法の進展が、2017年に多く報告されている。たとえば、フランスの研究者は、近年、脳組織の200μmの深さで不均一に標識された生体試料に対して、理論的に最適化された波面補正法を示した[5]。米国立画像生物医学・生物工学研究所(National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering、NIBIB)の研究者は、2光子励起が可変鏡動作の基礎となる歪曲計測をするガイド星を作るのと同様のシステムを、瞬間構造化照明顕微鏡法(ISIM)をベースにして製作した(**図2**)[6]。彼

らの研究は、収差補正されたイメージを高速で生成することにフォーカスしている。「生きた試料のイメージングをより速く、その環境への干渉をより少なくするほど、生物が実際にどう動いているのかをよりよく理解できる」と、NIBIBの高解像度光学イメージング（HROI）部門の幹部研究員であるハリ・シュロフチームリーダー（Hari Shroff）は述べた。

より広いエリアをイメージングする

従来の補償光学システムは、一度に小さなエリアしかイメージできないという理由から制限がある。ところが、メン・カイ氏（Meng Cui）が率いる米パデュー大（Purdue University）のチームは、広大な視野で一度に波面補正できるMulti-Pupil Adaptive Optics（MPAO）を開発している（**図1**）[7]。現在実現しているものでは、MPAOは補正面積をほぼ1ケタ増やしており、レーザ走査ハードウエアの制限において32MHzボクセルまで可能だ。初期の研究では、1cm^{2}に合計9セグメントを含む、3×3のプリズム配列を使っていた。現在では、36セグメントも含む配列のサイズに増やすことで、性能を向上させようと研究している。

MPAOの独立した波面制御の性能によって、3D動態の超高速な非平面イメージングも可能である。研究者はMPAOを、*in vivo*のミクログリアや血管系、哺乳類の脳における神経ネットワークの構造やカルシウムイメージングに適応しようとしている。

「われわれは膨大な数の神経細胞を観察している。1秒あたりに計測できるデータ点の数は2000万、3000万である」と、電子・コンピュータ工学・生物科学の准教授であるカイ氏は述べた。「これら大量の神経細胞を同時に、超高速かつ高空間分解能で計測したいため、ハイスループットは極めて重要だ」。

同様に、米カリフォルニア大サンタクルーズ校（University of California, Santa Cruz、UCSC）の研究者は、単一補正で散乱層を通して大規模ボリュームの波面整形を示している[8]。この技術は共役補償光学・遠隔集束（CAORF）と呼ばれており、より広い補正ボリュームをもたらす。試験では、提唱されたシステムによって、空間光変調機で1万6384セグメントが使われた従来の共役AOシステムと比較して、10倍広い軸視野が得られた。

なお、USCSは補償光学センター（CfAO）の本部である。これは、全米科学財団（National Science Foundation）が10年間資金提供してきた科学技術センターであり、現在は米カリフォルニア大（University of California）が資金提供している。メンバーには他の8つのUCキャンパスの研究者が含まれており、センターには多くの産学提携がある。その目的は、AOを発展させ、科学、ヘルスケア、産業、教育に広めることであり、AOにおける向上に開発や発表、そして発展を促すことである。

CfAOは毎年、探求型科学教育の方法で大学院生向けのサマースクールプログラムを開催している。新しい世代の科学者、特に女性、人口に比べ少数派となっているグループに興味を持ち続けてもらうプログラムであり、この知識を応用してもらうことが目的である。サミー・ワイサー・ノバック氏（Sammy Weiser Novack）は、生体イメージング向けAOのセクションで、生物学的顕微鏡の文脈におけるAOの原理のレビューを発表する。2017年版では、USCSのジョエル・カビー氏（Joel Kubby）の研究室と共同開発したアプリケーション、他の研究室からのアプリケーションに焦点を当てる予定である。

新たな理解に向けて

ジー氏が述べるように、AO顕微鏡法の研究者は、これまでは技術的なアプローチの発展にフォーカスしている。次のステップは、進行中ではあるが、これらの手法を改良して、性能や使い勝手を向上させること、そして究極的には、生物学的な発見につながるよう活用することである。ジャネリア・リサーチキャンパスにある彼女のチームによる近年の*in vivo*イメージングの研究が、AOを用いることで新たな生物学的発見、この場合は中枢神経系の機能に関する発見を可能にする初のもにになるだろう[9]。

参考文献

(1) N. Ji, Nat. Methods, 14, 374–380 (2017).
(2) J. A. Kubby (ed.), Adaptive Optics for Biological Imaging, CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL; ISBN: 978-1-4398-5018-3 (2013).
(3) K. Wang, W. Sun, N. Ji, and E. Betzig, "In vivo brain imaging with adaptive optical microscope," Proc. CLEO 2016, paper Am4O.1 (2016); https://doi.org/10.1364/cleo_at.2016.am4o.1.
(4) K. Wang et al., Nat. Commun., 6, 7276 (2015); doi:10.1038/ncomms8276.
(5) D. Champelovier et al., Sci. Rep., 7, 42924 (2017).
(6) W. Zheng et al., Nat. Methods (2017); doi:10.1038/nmeth.4337.
(7) J.-H. Park, L. Kong, Y. Zhou, and M. Cui, Nat. Methods, 14, 581–583 (2017); doi:10.1038/nmeth.4290.
(8) X. Tao et al., Opt. Express, 25, 9, 10368–10383 (2017); doi:10.1364/oe.25.010368.
(9) W. Sun, Z. Tan, B. D. Mensh, and N. Ji, Nat. Neurosci., 19, 308–315 (2016).

LFWJ