

生体内の神経回路において 神経疾患への道を拓く3Dマッピング

アナ・リンデンバーガー

既存の2光子顕微鏡にSLM空間光変調器を使用して改良を加えると、非侵襲的プローブが皮質の奥深くまで届き観察することができる。

広範囲な研究がなされているにもかかわらず、脳機能や神経疾患はよく分かっていない。脳の神経細胞（ニューロン）の量と混合細胞型のネットワークが高密度に相互接続していることから複雑さが発生している。脳神経科学者が伝統的に依存しているパッチクランプに属するツールのプローブは、単体のニューロンの電気的活動を捉えることができ、fMRI（機能的MRI）は何百万という神経細胞を含むボリュームの活動を画像化することができる。

これらのアプローチは2つの非常に異なるスケールを対象としている。しかしながら、脳が神経回路に生じる発火パターンを通して機能しているので、神経回路または回路ダイナミクスの物理構造を変更しようとした結果、脳神経疾患が生じてしまうことが起こりえる。これらの回路は中間スケールで存在するが、パッチクランプでもfMRIでもその道筋を読み解くことはできない。神経科学者に脳機能を研究するためのさまざまなツールを与える場合に重要なのは、脳の単体セルの解像度と共に非侵襲的プローブが脳の基本であるマイクロ回路を観察する上で必要な手段であるということである。

この10年以上にわたって、カルシウムイメージングと光活性化は、回路の活動を観察し操作して全光学的手段を提供することによって、この問題の解決策になると考えられてきた。カル

シウムイメージングは、ニューロンの蛍光特性を変更するためにカルシウムと結合するカルシウム指示薬を使用する。ニューロンが発火したとき、細胞内へのカルシウムの取り込みがある。もし、発火ニューロンが発火イベント中に励起ソースと共に点灯しているなら、蛍光性の放出が増加するので、電気的活動に対応する光応答が生成される。

カルシウムイメージングを補足するのは光活性化で、感光性タンパク質（オプトジェネティクス）または光化学（ケージ）化合物を使用することにより、光を発生するニューロン発火を引き起こすことによって生じる発火パタ

ーン、またはニューロンを沈黙させることによって生じるパターンを操作することができる。このカルシウムイメージングと光活性化の組合せは、神経科学者達が単一セルの解像度によって神経回路の物理的な構造をマッピングし、ニューロン活動の時空間ダイナミクスを記録するための手段を提供している。ただし神経科学用の高度な顕微鏡無しでは、カルシウムイメージングと光活性化の利点を現実のものにすることはできない。

共焦点顕微鏡は生物学のコア技術となってきたが、神経科学のための使用を妨げる根本的な制限がある。第1の

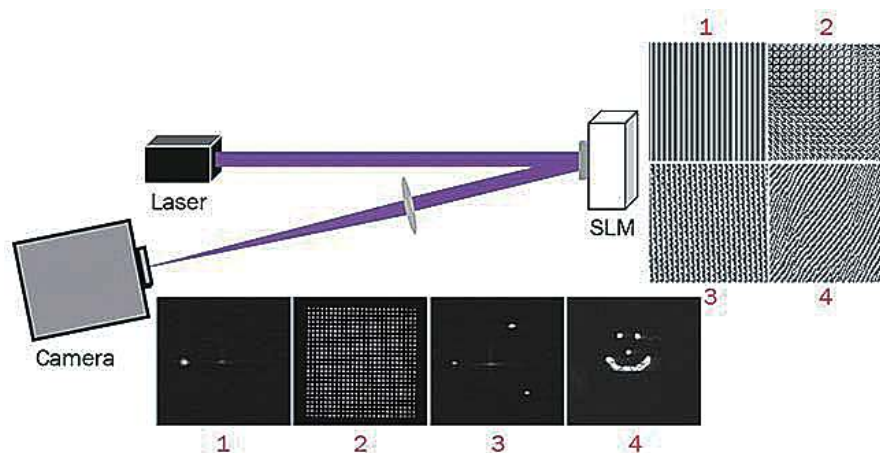


図1 3Dボリューム内に数百の焦点ポイントを同時に作成して任意の場所へ光をリダイレクトする荷重関数を使ったグレーティング格子機能とレンズをスーパーインポーズするために空間光変調器（SLM）が使用されている。単一ビームの入射波面を操作することによって空間光変調器（SLM）を機能させることができる。これは米メドドラークオプティクス社（Meadowlark Optics）光学系の基本である。

制限はサンプルをレーザでラスターズキャンしてピクセルごとのイメージを構築するため、結果が出るのが遅いことである。3Dボリューム内の任意の場所へ励起光を並列化する機能無しでは、複数細胞の発火パターンを同時にモニターすることは不可能だ。複数細胞の発火パターンを同時にモニターすることは、神経回路の接続をマッピングするためおよび回路のダイナミクスを理解するために重要である。

第2の制限は2次元イメージングで、神経回路の研究には不適切である。これはニューロンの小さいサブセットの研究を制限し、神経学者がマッピングし理解しようとする回路の範囲を制限してしまう。第3の制限は、アウトフォーカスの蛍光の放出をブロックするピンホールと1光子励起の共焦点顕微鏡のカップリングである。皮質内のニューロンのようにサンプルを強く散乱させて蛍光を吸収しても深さが些細な場合、結果として低信号しか得られない。

2光子顕微鏡は、ピンホールを必要とせずサブミクロンの横方向と軸方向の励起を閉じ込めることができるので、長波長の場合も同時に散乱を最小限に抑えられる。2光子顕微鏡を空間光変調器 (SLM) と一緒に使用すると、光活性化のための並列励起および体積画像処理用の並列励起が可能である。SLMはマイクロミラーアレイやシリコンに液晶 (LC) をコーティングしたLC変調器を含むさまざまな形態をとることができる。

2光子顕微鏡において、マイクロミラーアレイはピクセルがニューロンに反射光を照らすことで励起をオンにし、そしてピクセルが反射光を消すことでブロック (オフ) するようにサンプルにイメージさせる。これは細胞体を

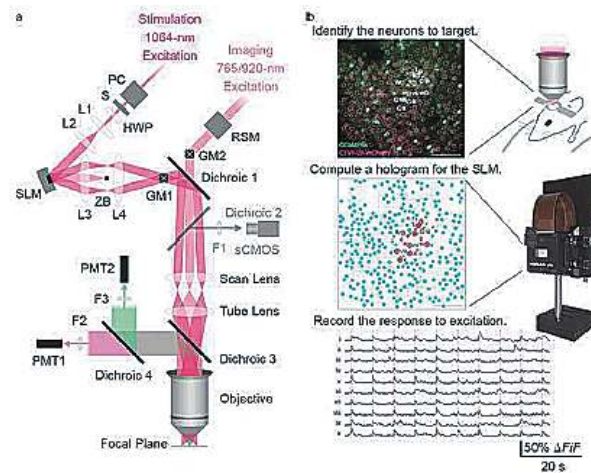


図2 3D光活性化を有効にするSLMと2光子顕微鏡の光学レイアウト(a図)。サンプル内に含まれるニューロンの場所をマッピングするために伝統的なスキャンが使用されている(b-上図)。神経細胞体が見つけられた後、SLMを使用して視野フィールド内で特定のセルを対象指定する(b-中図)。セルが活性化された時、セル細胞体からの応答はマップに接続され、記録回路ダイナミクスに記録される(b-下)。

照らすための簡単な方法である。マイクロミラーアレイは、現代の神経科学における応答時間の要求をはるかに上回る20kHz程度の応答時間を提供している。ただしマイクロミラーアレイは位相変調器ではなく振幅変調器であるため、3Dボリュームで活動するためのレンズ関数を生成することは不可能である。またサンプル内の希望する焦点位置に反射光がリダイレクトするようにすることはできない。

これらの制限は、2光子顕微鏡でLC-SLMを使用することによって克服できる。このSLMは励起ソースの波面を操作するプログラム可能なレンズとして機能する。最も単純な形ではSLMはプログラム可能なプリズムとして使用できる。水平シフトを使用して1つの焦点に光をリダイレクトする。このプリズム機能を一緒に追加して、SLMは2次元平面内で複数の焦点ポイントを作成することに使用できる。さらに重み関数とレンズ機能を追加して、SLMは3Dボリューム内に強度をプログラムして何百もの焦点ポイントに光をリダイレクトすることができる

(図1)。

2光子顕微鏡において、LC-SLMは高速ボリューム回路活動⁽⁷⁾の量を記録する高速ボリュームイメージングと同様に、光活性化としてマルチサイト3次元スキャンレス励起を有効にする^{(2)~(6)}この組み合わせ(2光子顕微鏡とLC-SLM)は、神経学者が体内研究において皮質の奥深くを研究し、神経回路の物理的な構造をよりよく理解するためのツールボックスを提供してくれる。つまりニューロン発火パターンとの関連、外部刺激と結果として生じる行動、どのようにして神経障害が生じるに至ったかの経緯等の物理的な構造を理解することができる。

3D光活性化

伝統的な2光子顕微鏡には、レーザがサンプルを通して焦点をラスターズキャンするために使用されるガルバノスキャンミラーが含まれている。複数のミラーが対物レンズの後焦点面に変化を与える。SLMはガルバノミラーでスキャンする前に、追加リレーレンズを経由してシステムに追加される(図2)。

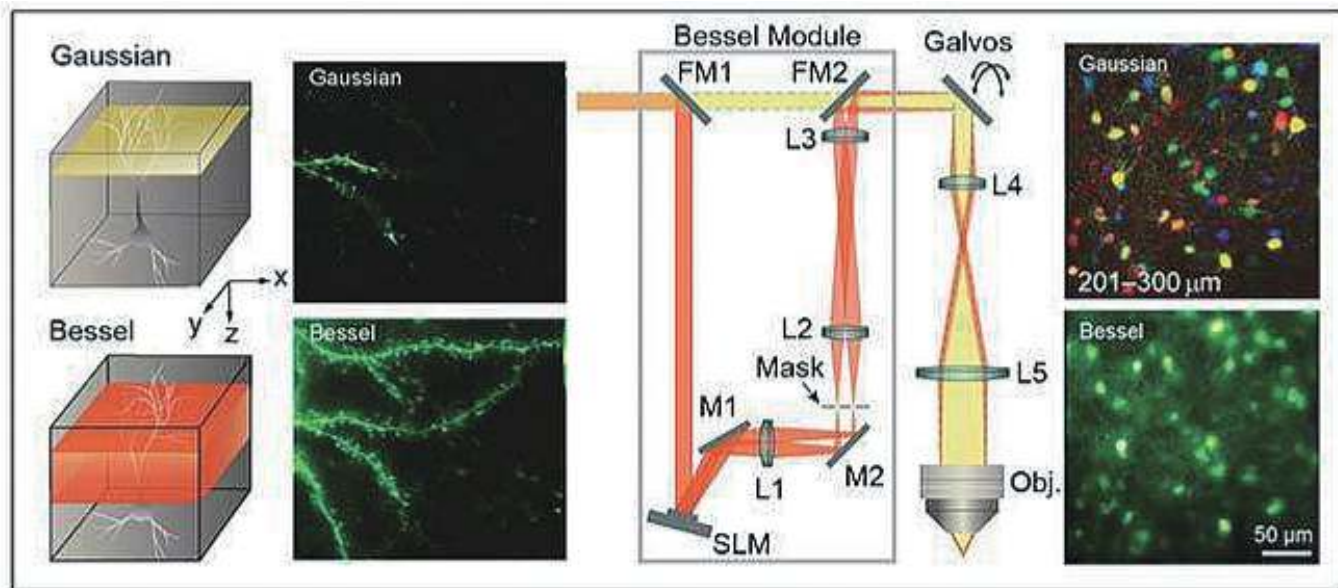


図3 マウスの樹状突起スパインのガウスイメージングとベッセルイメージングの比較（左の画像と図）。ガウスイメージングでは蛍光励起に必要な滞留時間と対応して、ガウスフォーカスでスキャン照射されたサンプルの小さい部分と蛍光励起無しで発生する活動が増加する可能性を残してしまう。ベッセルイメージングは、ガウスフォーカスのスキャン照射を用いた2次元イメージングと同じ速度でボリュームを観察することができる。「ベッセルモジュール」は既存の顕微鏡を採用し、大幅に強化された機能を上手く適合させることにより、ソフトウェアの変更なしで既存の2光子顕微鏡と簡単に統合することができる（中央のベッセルモジュール図）。マウス内の抑制的なニューロンをイメージングするために「ベッセルモジュール」を使用したデモを行った（右図）。ガウスイメージングでは、二次元2Dスキャンの一連の画像から3Dプロジェクションが構築されているが、ベッセルイメージングでは「ベッセルモジュール」により、軸スキャンをしないうでボリューム全体を画像化することができる（右下画像）。（提供：ナ・ジ氏、ジャーネリア・リサーチキャンパス）

追加されたSLMと2個のレンズによって2光子顕微鏡の機能を変換することができる。つまり視野フィールド内の任意の場所に光を届けることができ、それと同時に複数の3Dサイトを刺激するので、高速カメラを使用すればそれらの応答を画像として捉えることができるようになる⁽⁸⁾。

典型的な実験では、ガルバノメーターのミラーでサンプルをラスタースキャンして、視野フィールド内の細胞の場所を見つける。その時個々のニューロンを照らす光源の波面を調節するためにホログラムが生成される。このホログラムは光活性化用の特定のセルが識別されている発火パターンを複写するために、また観察されている発火パターンを操作するために使用できる。次

に続く光活性化では、回路の応答における光活性化の影響を理解するために周囲の細胞の応答をモニターできる。

2光子顕微鏡を設計するときを考慮すべきいくつかの重要な基準がある。SLMの解像度は、サンプルに直接光を当てることができる場所の数を決定する。SLMの解像度と画素ピッチは、SLMが関与できるサンプル内のボリュームのサイズを同時に決定する⁽⁹⁾。SLMが高解像度の小さな画素ピッチを持っていると、物質の充填不足を考慮せずに、また横（側面）と軸方向の励起閉じ込めを犠牲にすることがなく広い角度に導くことができるので理想的である。

SLMの時空間の位相安定性も信頼性の高い励起を確保するために重要だ。多くのニューロン間で光を分割

し、励起が最小の閾値に近い状態で動作する場合は特に重要である。最後に、最大1kHzのレートで生じることができる空間ダイナミクスを複写するという方法において、SLMの応答時間は重要な影響を与える^{(10)、(11)}。

ボリュームイメージング

発火パターンを操作する機能において回路の動作を理解することが不可欠で、同様に重要なのは可能な限り最高のフレームレートで周辺のニューロンの応答を記録する能力である。伝統的な2光子イメージングシステムは、機械的に目的物質をスキャンし、二次元画像を収集することで体積画像を構築する（図3）。2D画像を体積画像にするのに必要な時間は、静的なサンプル

用には充分可能である「分」の単位である。

神経科学において、限られた明るさの指標と相まった滞留時間内に、伝統的な2光子イメージングでは、結果として完全な神経回路における活動電位をモニターすることはできない。これは動物の動きや現象そしてそれらの影響が、ある領域に「集中する」というローカライズされた励起の相互作用のために、活動電位を誤解する可能性がある生じてしまうからである。

米ハワード・ヒューズ医学研究所(Howard Hughes Medical Institute)のジャーネリア・リサーチキャンパス(Janelia Research Campus)グループのリーダーであるナ・ジ氏(Na Ji)によって紹介されたこの「高速ボリウムイメージング技術」を使用した、ベッセルフォーカススキャン技術(BEST)は、ガウスイメージングで2光子顕微鏡により2次元平面を画像化しているのと同様の時間で、縦・横・高さのそれぞれのディメンションで何百ものミクロン単位でのサンプルの活動をボリウムイメージングすることができる。

3Dイメージングのモジュールはシンプルで既存の2光子顕微鏡、および静的な振幅マスクと3つのレンズから成るSLMと広範囲において互換性がある(図3)。レンズはSLMからの画像を中継してサンプルに届ける。振幅マスクは最初の回折内容を送信する静的パターンミラーである。モジュールの入口と出口にあるオプションのフリップミラーはボリウムイメージング用の光学機器の追加や削除ができるようにするためのもので、もし必要な場合、伝統的なガウス照射と一緒にボリウムイメージングできるような構造になっている。ここでSLMを使用することで、ユーザーが特定のサンプルのた

めの特別な光学系のBEST(ベッセルフォーカススキャン技術)を構築することが可能になり、側面サイズ、軸の長さ、軸の強度分布等を変更してベッセルフォーカスを柔軟に生成することができる。

ジ氏は、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュの幼虫、マウス、フェレットの体内において、存在する大量のニューロンとシナプスのカルシウム動態をボリウムイメージングすることにより、神経生物学の分子構造の発見を可能にするためのアプローチを実践してきた。対象物内のカルシウム信号は、ビデオレートでやっとなスパインが認識できるような微細な信号である。高速ボリウムイメージングを顕微鏡に採用したことは、神経科学分野にとって必要でかつ特別な進歩であったと考え

られる。

SLMと2光子顕微鏡の組合せによるカルシウムイメージングと光活性化は、神経科学者達にとって脳の神経回路の活動を観察し操作するための高度なツールへと繋がっている。この方法は、既存の顕微鏡に最小限の変更を加えることで使用できるので、高速ボリウムイメージング用の3D光活性化をサポートするために、研究者達が安く容易に既存のツールを採用することができる。このことが顕微鏡の能力を大幅に向上・拡大して、神経回路の研究を可能にする完全なツールを提供することができるようになった。そして神経科学者達が神経回路の活動を観察し、操作することのできる視野が拡がり、観察する深さと時間的な制限が拡張した。

参考文献

- (1) R. Yuste (2011). *Imaging*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Press.
- (2) B.O. Watson et al. (2009). Two-photon imaging with diffractive optical elements. *Front Neural Circuits*, 3:6. Epub 2009/07/29. doi: 10.3389/neuro.04.006.2009. PubMed PMID:19636390.
- (3) V. Nikolenko et al. (2008). SLM microscopy: Scanless two-photon imaging and photostimulation with spatial light modulators. *Front Neural Circuits*, Vol. 2, Issue 5. Epub 2009/01/09. doi: 10.3389/neuro.04.005.2008. PubMed PMID: 19129923; PubMed Central PMCID: PMC2614319.
- (4) C. Lutz et al. (2008). Holographic photolysis of caged neurotransmitters. *Nat Methods*, Vol.5, pp. 821-827.
- (5) A.M. Packer et al. (2015). Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution in vivo. *Nat Methods*, Vol. 12, pp. 140-146.
- (6) E. Valentina et al. (2015). All-optical interrogation of neural circuits. *J Neurosci*, Vol. 35, Issue 41, pp. 13917-13926.
- (7) R. Lu et al. (2016). Video-rate volumetric functional imaging of the brain at synaptic resolution. *bioRxiv*: 058495.
- (8) B.O. Watson et al. (2010). Two-photon microscopy with diffractive optical elements and SLM. *Front Neurosci*, 4:29. Epub 2010/09/23. doi: 10.3389/fnins.2010.00029. PubMed PMID: 20859526; PubMed Central PMCID: PMC2940544.
- (9) W. Yang et al. (2016). Simultaneous multi-plane imaging of neural circuits. *Neuron*, Vol. 89, Issue 2, pp. 269-284.
- (10) E. Ronzitti et al. (2017). Sub-millisecond optogenetic control of neuronal firing with twophoton holographic photoactivation of Chronos. *Nat Neurosci*, Vol. 20, pp. 620-628.
- (11) R.H.R. Hahnloser et al. (2002). An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature*, Vol. 419, Issue 6902, pp. 65-70.

著者紹介

アナ・リンネンバーガーは、米メドラークオプティクス社(Meadowlark optics)の上級科学者。コンピュータ工学の学士号、電気工学の修士・博士号を取得しており、同社で反射型SLMの製品ラインのサポートと研究推進に16年を費やしてきた。研究対象は、光ピンセット、光遺伝学、組織工学、生物学的イメージング等である。