

脳の解明に貢献する ファイバフォトメトリの進展

ジャスティン・マーフィー

光ファイバフォトメトリは従来の脳イメージング技術に比べ、脳の内部構造をよりよく把握できるようになっている。しかし、これは始まりに過ぎず、この手法の改良は続いている。

脳の複雑性を真に完全に理解することは、いまだに困難である。その謎を解きほぐすことは、アルツハイマー病や認知症、てんかん、多発性硬化症などの神経疾患の理解し、より効果的に治療していつかは完治できるようになる鍵である。

MRIやCTスキャンといった非侵襲的なイメージング技術が長らく利用され、脳内部を見ることができている。しかし、光ファイバ、特にファイバフォトメトリを用いる方法が有望視されている。

ファイバフォトメトリは、神経回路を研究するための光イメージング技術である。2005年に独ルートヴィヒ・マクシミリアン大ミュンヘン(Ludwig Maximilian University of Munich)のチームが、安静時の新生児マウスの皮

質(大脳の外層)のカルシウムイオン(Ca^{2+})波を記録する方法として開発された⁽¹⁾。脳に光ファイバを植え込み、脳の異なる領域内の特定の細胞のタイプから、ニューロンの集団レベルで Ca^{2+} 活性を記録する。脳内では、シナプスの活動や記憶形成などの制御に、カルシウム活性が中心的な役割を果たしている。

遺伝的にコードされたカルシウムインジケータを組み合わせ、ファイバフォトメトリによって神経活性をリアルタイムにモニタリングできるようになる。

中国の華中科技大(Huazhong University of Science and Technology)の博士候補生であるローナン・ファン氏(Ruonan Fan)は、「ファイバフォトメトリは、自由に行動する動物の細胞

のタイプ特異的に細胞集団の活性を簡便かつ安定的に記録できるというユニークな特徴がある」と話す。同氏は、同大でリン・フー氏(Ling Fu)が率いる研究室で研究をしている。フー氏は武漢光電国家実験室(Wuhan National Laboratory for Optoelectronics)の副所長で、ブリトン・チャンス生物医学フォトニクスセンター(Britton Chance Center for Biomedical Photonics)で主任研究員を務めている。

成長するアドバンテージ

フォトメトリは、時間分解能が低いという大きな課題がある。しかしながら、一光子顕微鏡や二光子顕微鏡といった他のカルシウムイメージング技術よりも好ましい方法であることに変わ

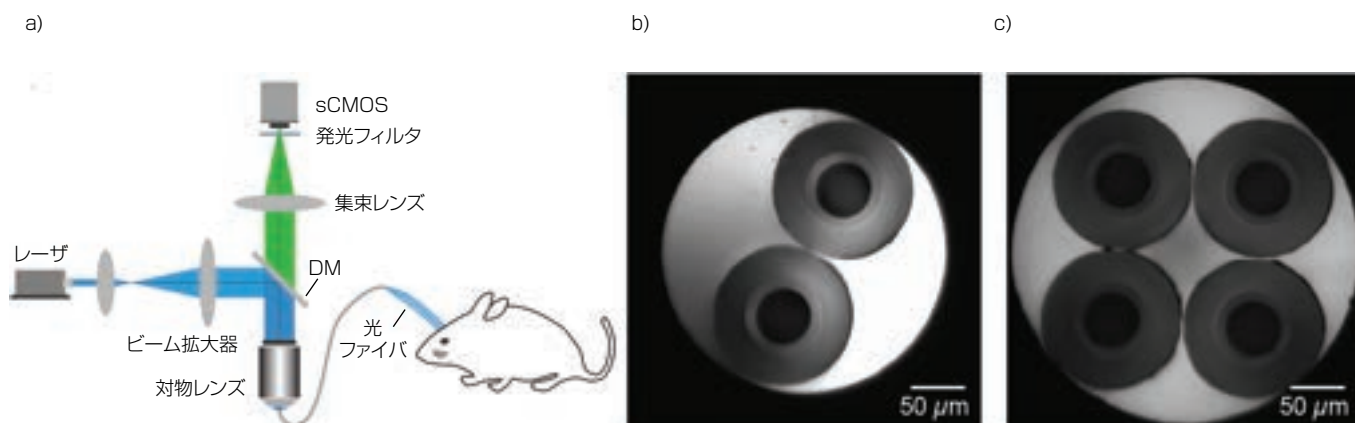


図1 マルチチャンネルのファイバフォトメトリシステムの構成。488nmレーザからの光ビームが対物レンズによってすべてのマルチモードファイバに同時に集約される。その後、蛍光は同じ光ファイバに集約され、sCMOSカメラが検出する(a)。ファイバの末端には、2チャンネルモード用のsCMOSカメラ(b)と4チャンネルモード用のsCMOSカメラ(c)が設置されている。

りはない。光ファイバは植え込むのが簡単で重量も軽いので、対象が自由に動くことができ自然な行動をとれることが、この技術の重要な点である。ファイバフォトメトリは電氣的な干渉に強くもあるため、データ収集の効率が高い。長期的な神経モニタリングに適していることが実証されている。

ファン氏は、2015年にフー氏のグループが開発した拡張可能なマルチチャンネルのファイバフォトメトリシステムが、動物のさまざまな脳領域の間、または異なる動物間でも神経活動を同時にモニタリングできるようになったこと⁽²⁾を引き合いに出し、「ファイバフォトメトリは神経科学で広く使われている光学的手法となっている」と話す。

フー氏の研究室が主導した別の研究では、2019年に軸索末端特異的なマルチチャンネルファイバフォトメトリを開発した⁽³⁾。軸索は、末端にあるシナプスを介して、あるニューロンから別のニューロンに情報を伝えると、研究グループは説明する。「自由に行動する動物において軸索末端から記録することは、動物の行動中の情報処理を理解するために必要なステップである」。

現在、フー氏のグループが主導する進行中の研究(今年5月に初めて出版された)は、従来の技術を発展させ、さらなるアドバンテージをもたらしている⁽⁴⁾。

ファン氏は、「我々は、互換性と柔軟性のある全ファイバ伝送フォトメトリを開発した」と話す。「自由に動く動物で、光遺伝学による操作と、神経活動と神経伝達物質放出のマルチカラー記録を同時に達成できた」。

研究チームは、動物の行動中に、細胞タイプ特異性と正確な時空間分解能をもって神経活動を操作してリアルタ

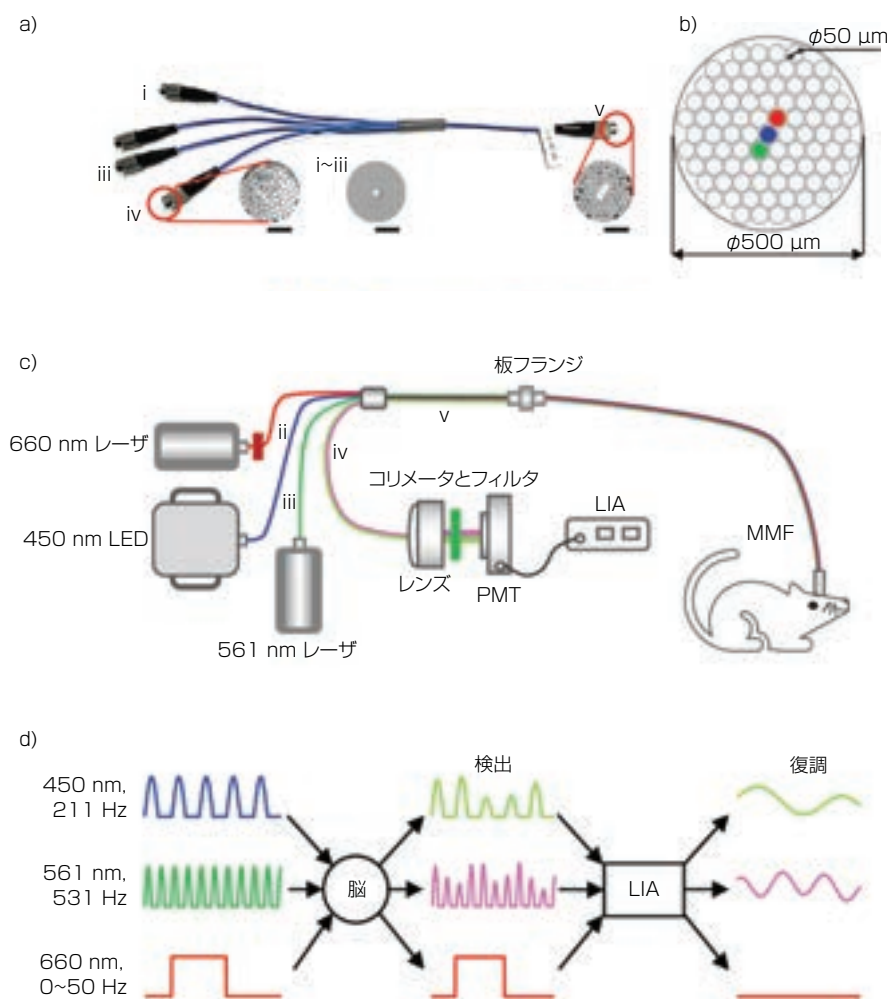


図2 特注デザインの4分岐ファイババンドルと多機能ファイバフォトメトリシステム。(a)4分岐ファイババンドルは、単一ファイバブランチ(i~iii)、収集ブランチ(iv)、共通ブランチ(v)から構成される。(b)4分岐ファイババンドルの共通ブランチ(v)の略図。共通ブランチv(500 μ m)は、六角形に並んだ光ファイバ(Φ 50 μ m、開口数0.54)が合計85本含まれている。バンドルの中心にある3本の色付きファイバは、異なる3つの励起光を集める3本の単一ファイバブランチ(i~iii)に対応する。(c)4分岐ファイババンドルで構成される多機能ファイバフォトメトリシステムの模式図。3つの異なる波長の光源がマルチモードファイバに集められ、3つの単一ファイバブランチ(i~iii)を介してマウスにつながる。(d)多機能ファイバフォトメトリシステムのためのロックイン増幅器の模式図。2つの励起光は、異なる周波数(450nmで211Hz、561nmで531Hz)の正弦波信号で変調される。

イムにモニタリングすることを検討している。ファン氏は、「生体内の神経回路における機能的結合性、情報伝達、生理的機能を探索するための基盤技術である」。

新しい全ファイバ伝送フォトメトリシステムは、多分岐光ファイババンドルがベースになっている(図1)。これにより、自由に動いている動物において、

光遺伝学による操作と神経のCa²⁺(または神経伝達物質のシグナル)のマルチカラー記録を同時に行うことができる。

ファン氏は、「現在のファイバフォトメトリシステムを効果的に補うものだ」と述べる。

新しいシステムは、多色励起と光遺伝学的操作を目的に可視スペクトルを完全にカバーし、励起光と放出光の全

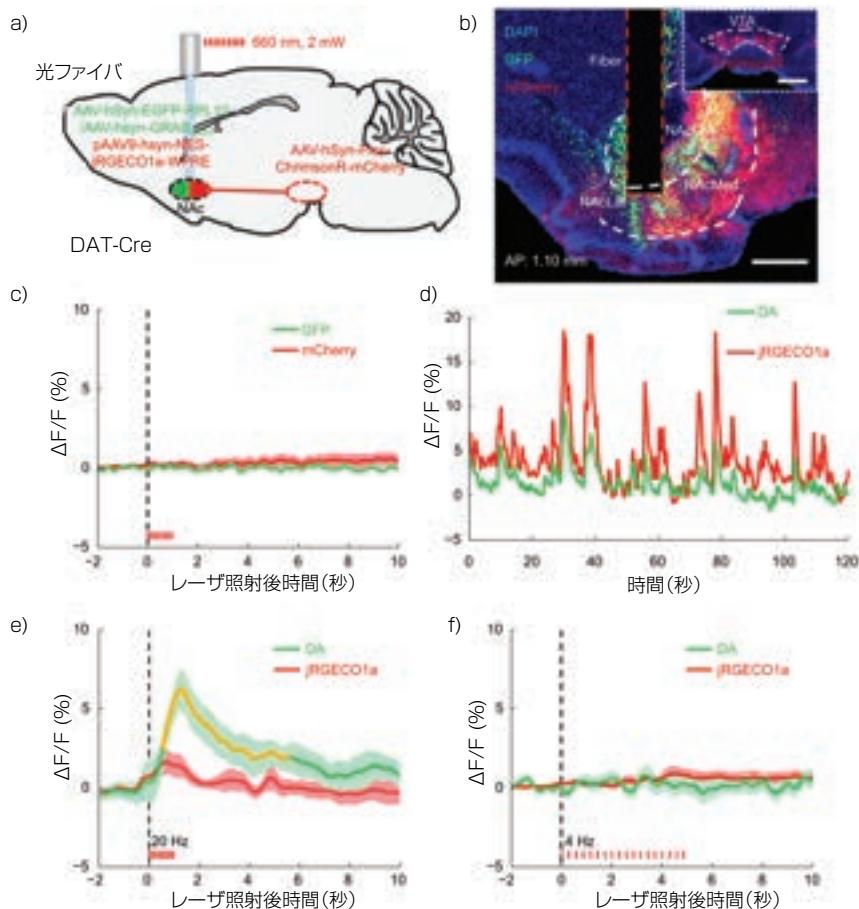


図3 自由に行動するマウスのNAcLat(側座核側シエル)において神経活動の2色記録と光遺伝学による操作を同時に行う。(a)神経活性の2色記録と光遺伝学的操作の手術の模式図。(b)NAcLatにおけるGFP(緑)でラベルした神経細胞と、ChrimsonRでラベルしたドーパミン作動性神経細胞末端発現による組織構造。脳スライスは1.1mmで、前方が頭蓋骨前項。(c)本システムで光遺伝学的操作とリアルタイム2色記録を同時に実施したとき、刺激によるアーチファクトは存在しない。(d)自由に行動するマウスのNAcLatにおいてドーパミン(DA)と神経Ca²⁺トレースを同時に記録した例。(e)一過性の光遺伝学的刺激にตอบสนองするDAシグナルと神経Ca²⁺シグナルの平均(10回試行)。赤いバーは刺激期間を示す。オレンジの部分はベースラインから統計学的に有意な増加を示す。(f)光遺伝学的トニック刺激にตอบสนองするDAシグナルと神経Ca²⁺シグナルの平均。赤いバーは刺激期間を示す。

ファイバ伝送を実現している。ファン氏によると、特に、マルチカラー記録をしながら正確な光遺伝学的刺激もサポートする非波長選択的4分岐ファイババンドルを組み合わせることで実現したという(図2)。このバンドルは、従来のイメージング構造に代わり光電子増倍管(PMT)と組み合わせている。また、特注デザインのロックイン増幅器を使っている。これにより、PMTで検出された、異なる波長をもつ2つの蛍光シグナルを正確に分離でき、光遺伝学的刺激によるアーチファクトやチャンネルのクロストークを効果的に抑制する。

「一連の実験を行い、このシステムが優れた光伝送性能を有していること

を示した。蛍光シグナルを効率的に励起、収集でき、収集効率従来システムより20~30%高い」と、ファン氏と言う。

研究チームは自由に動いているマウスにおいて、側座核(NAc、主に中型有棘神経細胞からなり、ドーパミン受容体が相対的に発現することで区別される領域)内のニューロンにおけるCa²⁺と神経伝達物質のダイナミックなシグナルの両方を同時に記録できた。このとき、同時に同部位のドーパミン作動性末端を正確に光遺伝学的に操作することにも成功した。なお、チャンネルの実質的なクロストークは観察されなかった。さらに、刺激アーチファクトという、非生理的であるためにノ

イズ障害の原因となる短時間・高振幅の神経スパイクを、記録中に基底ノイズレベルにまで抑制できた(図3)。

ファン氏は、「ファイバフォトメトリは、その進歩とともに、遺伝的に定義されたニューロン集団を記録する便利なツールとして神経科学者の間でますますポピュラなものになっている」と話す。「その後の改良では、異なるアプリケーションの要望にほとんど焦点を当てることができる」。

以前のファイバフォトメトリ技術やシステムでは、神経活動を光遺伝学的に操作したり記録したりするとき、通常は分離されて独立に機能するため、単一波長での操作と単一チャンネル記録しかできない。また、光感受性タン

バク質の励起スペクトルと、遺伝的にコード化されたカルシウムインジケータの発光スペクトルが重なるため、マルチカラー記録と操作の際に刺激によるアーチファクトが発生することも、もう1つの課題である。

「光遺伝学的操作と2色記録を同時に行うためには、より多くの波長域の蛍光タンパク質を用意し、スペクトルに間隔をもたせる必要がある」と、ファン氏は述べる。「このため、光学システムは可視スペクトルを完全にカバーすることが求められる」。

しかし、現在利用できるファイバフォトメトリのシステムでは、ここが問題になるとファン氏は補足する。なぜなら、1つの対物レンズと2、3枚のダ

イクロイックミラーから構成される古典的な落射蛍光イメージングアーキテクチャを使っている場合は、405～600nm付近のスペクトルしかカバーできないからである。「この場合、複数の波長光ビームを1本の光ファイバに集めるにはより多くのダイクロイックミラーが必要となり、スペクトルを広げるためにシステムがより複雑になってしまう」と同氏は話す。

「異なるニューロンタイプの活動を観察し、光遺伝学的な操作とマルチカラー記録を同時に行い、神経回路における光遺伝学の介入によって生じるフィードバック作用をモニターする」ために新たな全ファイバ伝送フォトメトリシステムは利用できると、ファン氏は説明する。「これは現在、神経回路と神経疾患の原因究明のための『夢の方法』として認識されている」。

参考文献

- (1) H. Adelsberger, O. Garaschuk, and A. Konnerth, Nat. Neurosci., 8, 8, 988-990 (Aug. 2005); doi:10.1038/nm1502.
- (2) Q. Guo et al., Biomed. Opt. Express, 6, 10, 3919-3931 (Sep. 10, 2015); doi:10.1364/boe.6.003919.
- (3) H. Qin, J. Lu, W. Jin, X. Chen, and L. Fu, Neurophotonics, 6, 3, 035011 (Jul. 2019); doi:10.1117/1.nph.6.3.035011.
- (4) Z. Qi et al., Opto-Electron. Adv., 210081 (May 2022); doi:10.29026/oea.2022.210081.

LFWJ

光産業技術マンスリーセミナー



Optoelectronics Industry and Technology Development Association

プログラム (12～1月)

No. / 開催日	講演テーマ / 講師
第475回 12月20日(火) 15:30-17:30	「深紫外光を用いた新型コロナウイルスの不活化」 講師：南川 丈夫 氏 (徳島大学)
第476回 1月10日(火) 15:30-17:30	「車載ステレオカメラの広視野化技術」 講師：山崎 和良 氏 (株式会社日立製作所)

- 会場 オンライン開催 (Webex)
- 定員 各90名
- 参加費 光協会賛助会員：1,500円 (1回につき・税込み) / 一般参加：3,000円 (1回につき・税込み)
大学・公的機関：無料 (学生・院生含む)
※銀行振込でお支払いください。
- 申込方法 オンライン申込 >>> <http://www.oitda.or.jp/main/monthly-j.html>
- 申込締切 定員になり次第締め切ります。なお、締め切った場合には Web 上にその旨を掲載します。

問い合わせ先

一般財団法人光産業技術振興協会マンスリーセミナー担当 瀬戸山・村谷
〒112-0014 東京都文京区関口1-20-10 住友江戸川橋駅前ビル7F TEL: 03-5225-6431 FAX: 03-5225-6435
E-mail: mly@oitda.or.jp URL: <http://www.oitda.or.jp/>