

広視野 2 光子顕微鏡の実現と 脳ネットワークの機能的構造の解明

理化学研究所 脳神経科学研究センター 触知覚生理学 research チーム

チームリーダー 村山 正 宣

概要

脳はさまざまな領域の集合体であり、領域間の相互作用により脳機能が発現すると考えられています。しかしながら、多領域から細胞レベルの活動を計測できる顕微鏡は存在せず、脳神経ネットワークの基本的な機能構造は不明でした。今回、私たちは低倍率かつ高開口数を満たす大型対物レンズ、大口径・高感度・高出力光検出器を開発することで、広視野・高解像度・高速撮像・高感度・無収差を同時に満たす 2 光子顕微鏡「FASHIO-2PM (fast scanning high optical invariant* two-photon microscopy)」を開発しました。マウス大脳新皮質 2 層に存在する 1 万 6,000 個以上の神経細胞の活動を、 9mm^2 (従来の 36 倍) の単一視野面から 7.5Hz の撮像速度で高感度に測定することに成功しました。単一神経細胞の活動に基づくネットワークを解析したところ、脳は頑健性のあるスケールフリーネットワークではなく情報処理が効率的なスモールワールドネットワークであることが明らかになりました。同時に長距離の機能的結合も含め 100 以上の細胞と協調的に活動する非常にレアなハブ細胞 (存在確率は 1% 未満) の存在も明らかにしました。

* 高い optical invariant を有する顕微鏡は広視野かつ高解像度観察を実現します。

脳機能の解明を目指した広視野かつ高解像度、高速観察

脳機能は複数の脳領域に存在する大多数の神経細胞の協調的な活動によって生まれると考えられています。現在、生きた動物の脳内における単一細胞レベルでの神経活動を記録するために 2 光子顕微鏡によるカルシウムイメージングが盛んに行われています。神経科学において 2 光子顕微鏡は脳機能を理解するために欠かせない光学計測機器です。しかしながら、これまでの 2 光子顕微鏡で観察できる視野は 0.25mm^2 程度が限界でした。そのためマウスのように小さい動物の脳であっても複数の脳領域から神経細胞を同時に観察できませんでした

(図 1 左)。近年、この限界を克服する目的で、観察視野を広げた 2 光子顕微鏡が報告されています。しかし、これらは空間解像度が低く単一細胞の観察が保証されてない、または神経細胞間の協調的な活動を捉えるには撮像速度が低速でした。このように技術革新は進んでいるものの、限界を完全に克服した状況にはありませんでした。脳機能発現を理解するために、複数領域から同時観察 (森の観察) し、かつ一つ一つの神経細胞も記録できる解像度 (木の観察) と、その活動を捉える十分な記録速度を実現する 2 光子顕微鏡の誕生が望まれていました。そこで私たちは、これら 3 つの技術要素を同時に満たす革新的な顕微鏡の開発に取り組み、従来視野 (0.25mm^2) の 36 倍に相当する 9mm^2 の視野から細胞レベルで活動を十分な速度 (7.5Hz) で観測する新しい 2 光子顕微鏡の開発に成功しました (図 1 右)。

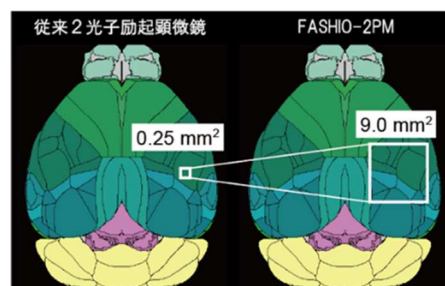


図 1：従来の顕微鏡 (左) と広視野 2 光子顕微鏡 (右) で観察できる視野の違い。従来の顕微鏡では 1 領域のみの観察であったが、本顕微鏡を用いることで 15 脳領域 (例、体性感覚野、視覚野、聴覚野、運動野、高次連合野など) から同時に神経活動を捉えることが可能となる。

大きな対物レンズによる低倍かつ高解像度顕微鏡の実現

一つ一つの神経細胞を観察するためには、高い光学的解像度を持つ顕微鏡でなければなりません。顕微鏡の光学的解像度は対物レンズの開口数（NA : numerical aperture）によって決まり、開口数が高いほど光学的解像度は上がります。一方、広視野で観察するためには、顕微鏡は低倍率でなければなりません。2光子顕微鏡では対物レンズの焦点距離を延ばすことで倍率を下げられますが、対物レンズの焦点距離を延ばすと開口数は低下してしまいます。このように低倍率と高解像度（高い開口数）は互いにトレードオフの関係にあります。このトレードオフは瞳径の大きな対物レンズの作成により解決できます。

ただし、単純に瞳径の大きな対物レンズを製作すれば解決するというわけではありません。なぜなら、一般的に、大きなレンズからは大きな収差が発生するからです。特に2光子顕微鏡ではわずかな収差によって励起効率が下がり、画像は暗くぼけてしまいます。散乱の大きい生体脳を試料として用いる場合、開口数が増えると、収差も増える傾向にあります。逆にNAを下げれば分解能が落ちますし、そもそも2光子励起現象が起こらない可能性もあります。そこで予備実験では、収差を抑えるため、理論上では細胞体の分解能を有するのに必要最小なNA 0.4の低倍対物レンズを用いて2光子励起現象が生じるのかを試験しました。市販されている実体顕微鏡用の対物レンズを2光子顕微鏡に取り付けてイメージングを行った結果、収差はひどいものの2光子励起現象が生じる事を確認しました。そこで私たちは、瞳径が大きく、NAが0.4、かつ、励起光が通過するレンズ領域だけでも無収差になる対物レンズを作製することができれば（図2、赤領域）、広視野かつ単一神経細胞を実現できると推測しました。株式会社フォブ、株式会社ニコンと共同で、NA0.4かつ視野全域にわたり回折限界に近い励起光率を有する巨大対物レンズを作製しました（図3）。また、この対物レンズの性能を最大限に生かすための巨大なチューブレンズ（結像レンズ）とスキャンレンズも開発しました（図3）。さらに、浜松ホトニクス株式会社には広視野観察用の大口径高感度光検出器（光電子増倍管）を開発していただきました（図3）。これにより、広視野かつ単一神経細胞レベルの解像度を実現しました。

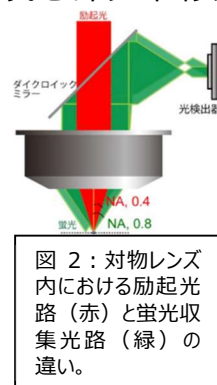


図2：対物レンズ内における励起光路（赤）と蛍光収集光路（緑）の違い。



図3：低倍（5倍）かつ高開口数（NA0.8）を実現する新型巨大対物レンズ（高さ170mm、直径84mm、重さ4.2kg）、チューブ、スキャンレンズと、大口径・高感度・大電流出力のGaAsP検出器。

最後に、高速撮像を実現しなければなりません。時々刻々と変化する神経活動を正確に観察するためには、わずかな時間で画像を1枚1枚撮像し続けなければなりません。広視野で高解像度な観察するために、励起レーザーの走査数（画素数）を上げる必要があります。また高速撮影の目的で、広視野上をレーザーで高速に走査する必要があります。この二つの必要条件を満たす場合、画素数、レーザーパルスの周波数などから計算すると、なんと、1ピクセルに励起パルスが1、2回しか当たりません。このパルス数は通常の2光子顕微鏡の3-4倍も少ない値です。つまりその分、レーザーでセンサーを励起する確率が落ちてしまい、撮像された画像は暗く、不鮮明となってしまいます。しかし、それだけ1ピクセル当たりの走査時間を短くしなければ、広視野での高速撮像は実現できませんでした。そこで私たちは、次に示す多角的なアプローチにより顕微鏡の光学性能を上げて、この問題を克服しました。

- (1) 神経活動由来の蛍光をより効率的に収集するため、対物レンズを高NA化（図2：緑領域）
- (2) 2光子励起効率を増加させるため、プリチャージ機構を開発
- (3) 高い信号対雑音比を得るため、高感度光検出器（光電子増倍管）を大出力化

これらの工夫により、高速撮像でも明るくコントラストの高い画像を得ることが可能となりました。このようにして、私たちは広視野・高解像度・高速撮像・高感度・無収差のすべてを同時に満たす 2 光子顕微鏡、FASHIO-2PM を世界で初めて開発しました。

マウス大脳新皮質に広範囲にカルシウムセンサーを発現させて 2/3 層と 5 層の神経活動を記録

2 光子観察する手法を確立し、FASHIO-2PM を用いたカルシウムイメージング法によりマウス大脳新皮質 2 層（脳表から深さ 100 μm 程度）から 7.5Hz の撮像速度で観察を行いました。大規模な撮像画像から神経細胞を検出する方法も合わせて開発し、体性感覚野・視覚野・運動野などを含む全 15 脳領域から 1 万 6,000 個以上の神経細胞の活動を同時に観測することに成功しました（図 4）。これは、単一視野面で記録された細胞数と撮像速度としては世界最大・最速です。さらにマウス大脳新皮質 5 層（脳表から深さ 500 μm 程度）から、6,000 個以上の単一神経細胞の活動を観測することに世界で初めて成功しました。

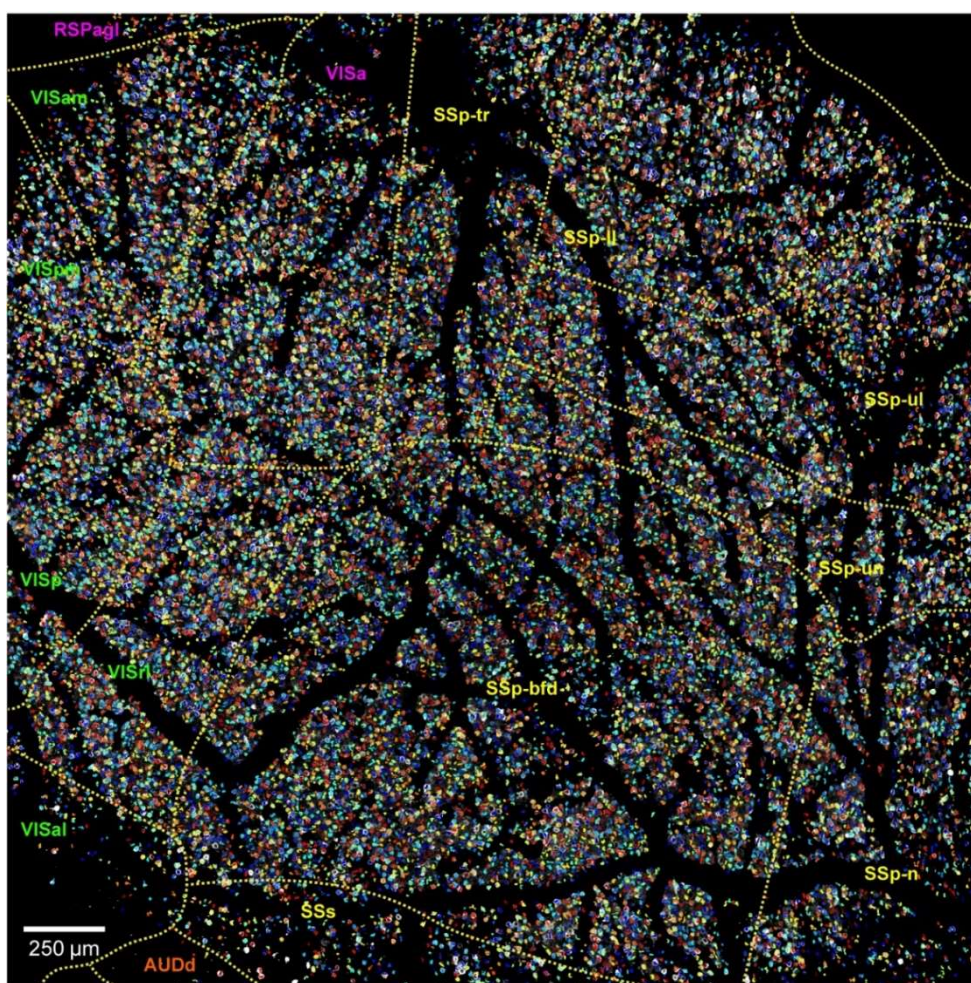


図 4 FASHIO-2PM によって観測されたマウス大脳皮質 2 層の神経細胞

覚醒中のマウス脳の 15 脳領域（3 x 3 mm²、黄色線で区別）から 16,000 個以上の神経細胞から 7.5Hz のサンプリングスピードで記録することに成功している。各細胞が判別しやすいように、ランダムに色付けされて表示されている。

大規模イメージングによって明らかになった大脳新皮質の機能的ネットワーク特性

単一細胞解像度での神経活動の同時計測は、神経細胞間の相互作用（機能的結合強度）を明らかにできます。そして大規模記録はその相互作用が生み出す大脳新皮質の機能的なネットワーク特性を評価できます。私たちは、FASHIO-2PM で観測した神経活動データから機能的ネットワーク解析を行いました。そして、大脳新皮質の機能的ネットワークは、クラスター性（図 5 左）とスモールワールド性（図 5 右）という 2 つの特性を満たすスモールワールドネットワークであることを世界で初めて見出しました。クラスター性は、ある細胞に機能的に結合している二つの

細胞も互いに結合している確率が高いことを意味します（自分の友人 Aさんと Bさんを想定すると、その2人は友人同士である確率が高いことを意味します）。一方、スモールワールド性は、無作為に選んだ2つの神経細胞はわずかな数の神経細胞を介するだけで機能的に結合していることを意味します（身近な例として、わずかな人を介するだけで有名人と繋がることを意味します）。従って、この解析結果はクラスター内（短い結合で形成された神経細胞集団）で共有された活動情報は、長距離結合によって物理的に離れたクラスターとも効率的に共有されていることを示唆します。驚くべきことに100以上の神経細胞と協調的な活動を示すハブ細胞も発見しました。ハブ細胞は極めて稀に存在します（存在確率は1%未満）。このハブ細胞の存在は、各神経細胞の活動がシステム全体に与える影響力は様ではなく、細胞ごとに偏っている可能性を示唆します。脳の中に数えきれないほどの細胞が存在しますが、私たちの社会にもリーダーが存在するように、ハブ細胞のような稀に存在する細胞が脳システム全体の舵を取っているのかもしれない。

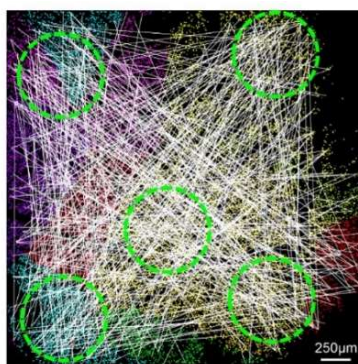
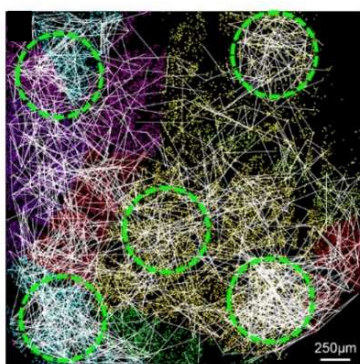


図5：FASHIO-2PMによって観測されたマウス大脳皮質2層の神経細胞と機能的結合（神経細胞間の偏相関が0.4以上）の代表例。

覚醒マウスの安静時における自発活動から、相関係数0.4以上の細胞ペアに機能的な結合があると白線で繋げた。細胞の色は脳の15領域を示す。(左)：細胞間の機能的結合距離が500 μm 以下の例。丸(緑色)内の白線は密度が高い。これは距離が近い細胞は互いに結合し合うクラスターを形成していることを示す。(右)：2500 μm 以上の例。クラスターを結ぶ離れた距離の結合が観測された。十分な記録速度での広視野観察でのみ、このような同一脳領域内の細胞間、異なる脳領域の細胞間の両者に機能的結合が観測される。

展望

今後、野生型や精神疾患モデル動物での知覚や認知、意思決定時における脳の動作原理を、従来はなかった細胞レベルでの広域ネットワーク動態として捉えることが可能になり、神経科学において新しい研究領域が開拓されると考えられます。また、FASHIO-2PMは光学特性が優れているため、広く、速く、解像度よく細胞活動を記録したい免疫、がん、植物など、さまざまな生物分野で利用できます。さらに、AI技術などの理論研究分野との連携により、脳機能低下や疾患発症の予測、また、逆に得られた知見をAI設計にフィードバックすることで、AI技術のさらなる向上などにも貢献すると期待できます。

謝辞

本研究は非常に多くの研究者、企業様のご協力のもとで行われました。またAMED革新脳プロジェクトからは長年にわたりサポートをいただきました。全ての関係者様に厚く御礼申し上げます。

論文表紙

本研究で得られた生理学的知見を示したイラストが**Neuron**誌（Volume 109 Issue 11 2022年）の表紙（右）を飾りました。線香花火はスモールワールドネットワークとハブ細胞を表現する。全体としてオールJAPAN体制の成果を表現しています。

