

B20220228\_04\_UCSB

UCSB、脳活動を見る 2 光子顕微鏡

UCSB 研究チームは、前例のない脳イメージング能力を持つ 2 光子顕微鏡を開発する。

ヒトの脳の理解を進めるには、ラボのマウスを含め、哺乳類の神経回路の働き方の新たな洞察が必要である。この研究には、個々のニューロンとその近傍のニューロンを見ることができると高分解能の顕微鏡で脳活動をモニタリングする必要がある。

2 光子蛍光顕微鏡は、正にそれをする研究者の能力を著しく強化した。UC Santa Barbara の電気・コンピュータ工学、准教授、Spencer LaVere Smith の研究室は、その技術を進歩させる研究の温床である。

Nature Communications で、Smith と共著者は、“Dual Independent Enhanced Scan Engines for Large Field-of-view Two-Photon imaging (Diesel2p)”(大面積 2 光子イメージング用のデュアル独立強化版スキャンエンジン)という新しい顕微鏡の開発を報告している。その 2 光子顕微鏡は、前例のない脳イメージング能力を持つ。装置は、そのような計測器で最大視野(最大 25 mm<sup>2</sup>)であり、脳の多数のエリアで細胞下解像度が可能である。

「われわれは、3 つのことの最適化を行っている。個々のニューロンを見る解像度、同時に多数の脳領域を捉える視野、動作中にニューロン活動の変化を捉えるイメージング速度」と Smith は説明している。「イメージングでわれわれが関心を持っているイベントが続くのは 1 秒以下である。したがって、顕微鏡を動かす時間はない。ワンショットで全てを捉える必要がある。同時に、オプティクスがレーザー光の超高速パルスに確実に焦点が合うようにすることが必要である」。

2 光子イメージングシステムを駆動する強力なレーザーは、コストが各 250000 ドルであり、超高速、超高強度光パルスを供給する。その各々が、陽光の 10 億倍であり、0.0001ns 続く。単一ビーム、8000 万パルス/秒、は、2 つの完全独立スキャンエンジンアームに分かれ、顕微鏡は、同時に 2 つの領域をスキャンできる。その各々が異なるイメージングパラメタに構成されている。

その測定器の前の反復で、2つのレーザーが結合されて同じパラメタに構成されていた。サンプリングを強く拘束する配置である。フレイレートやスキャン領域サイズなどの最適スキャンパラメタは、分散型神経回路や実験要件で変わる。新しい測定器により異なるスキャンパラメタが両方のビームに利用可能になった。その新規デバイスは、光リレー、スキャンレンズ、円筒レンズ、対物レンズを含め、複数のカスタム設計、カスタム製造素子を含んでいる。広く散乱する脳領域で神経活動の高速イメージングを行う能力のために、その新デバイスはすでに広く採用されている。

**Smith** は、その測定器へのオープンアクセス確実にすることに取り組んでいる。**Smith** は、「これは素晴らしいことだ。われわれがしたようにゼロから出発する必要がなかった」と言う。

2 光子顕微鏡は、特殊タイプの蛍光顕微鏡である。**Smith** のラボでそのような作業を行うために研究者は、そのニューロンが、ニューロン活動の蛍光インディケータを含むようにマウスを遺伝子操作した。インディケータは、クラゲからの蛍光タンパク質と、自然に存在するカルシウム結合タンパク質を統合して作られた。そのアプローチは、ニューロンが発火する時に経験するカルシウムの短い、桁違いの増加を活用する。レーザーがニューロンを標的にし、ニューロンが発火すると、カルシウムが入り、タンパク質は、カルシウムを見つけ、最終的に蛍光を見つける。

2 光子顕微鏡は、フォトンの量子的振る舞いを利用して蛍光顕微鏡を強化する。つまり、大量の焦点ズレの蛍光の光が出ないようにする。通常の光学顕微鏡では、サンプルを励起するために使われる光源からの光は、垂直円錐光となるようにサンプルに入り、ターゲットの焦点領域に向かって狭くなる。さらにその点の下で逆円錐となる。最狭部にならない光は、すべて焦点外れである。

2 光子顕微鏡の光は振る舞いが違っており、ピントが合った光のシングルポイント(光円錐なし)を作り、イメージングレンズの到達点からのあらゆるピントずれを除去できる。「その画像は、われわれが見ている面から光だけを見せる、面の上下からの背景信号はない」(**Smith**)。「脳には、光学特性があり、バターのようなテクスチャである。脂質と水溶液でいっぱいであるので、透過して見るのは難しい。通常の光学イメージングでは、脳の最上面しか見ることができない。2光子イメージングにより、われわれは深く撮像でき、細胞下解像度まで達成できる」。

2 光子励起光のもう 1 つの利点は、それが低いエネルギー、長波長の光(NIR 域)を使うことである。そのような光は、組織を透過しても散乱は少ないので、組織深く鋭く合焦できる。さらに、低エネルギー光は、UV などの短波長よりもサンプル損傷が少ない。

Smith のラボは、マウスの実験でそのデバイスをテストした。ビデオを見たり、仮想環境をナビゲートしている間のマウスの脳を観察した。個々のマウスは、頭蓋にガラスのインプラントを受けており、顕微鏡で脳を見る文字通りのウインドウとなっている。

「興味深いことをわれわれにさせる神経回路の計算原理を理解しようとすることが動機である。これは、現状では、機械で置き換えることはできない。われわれは、われわれができるよりも多くのことをする機械を作れる。しかし、他のことでは、できない。われわれはティーンエイジャーを訓練して自動車を運転させられるが、自動運転車は、人ならしないような状況で間違える。われわれが DL で使うシステムは、脳の洞察に基づいているが、洞察はほんのわずかであり、全体ではない。システムは、非常によく機能するが、まだ脆弱である。比較すると、マウスを初めての部屋に入れる、するとマウスは、走ってどこか、わたしが行けないような場所に走って行く。マウスは、壁にぶつかることはない。これを超高信頼に行う、1W のパワーで走り回る。

人工の機械ではまだ複製できない、興味深い計算原理がある。これはマウスの脳に存在する。それを明らかにしたい、この顕微鏡を構築したかった理由は、それである」と同氏は話している。