実験技術

二光子顕微鏡を用いた脳の in vivo イメージング

鍋倉 淳一, 江藤 圭

要約: 従来のイメージング技術では生きた動物の内部で起きている現象をサブミクロンの解像度でとらえることは困難であった。2光子顕微鏡はこのような生体現象を捉えることができる強力なツールとして注目を集めている。そこで、本稿では2光子顕微鏡の動作原理、特徴と、この顕微鏡を用いた in vivo イメージング応用例について紹介する。2光子顕微鏡の動作原理である2光子励起過程は対物レンズの焦点でのみ起きるため、また、近赤外光を用いるため、低侵襲性で組織深部の構造物を観察することができる。2光子顕微鏡はこのような特殊な励起過程を誘導するために必要なフェムト秒パルスレーザーや外部光路を有している。また、大脳皮質の構造物の in vivo イメージングを行うためには動物に対し、観察窓の形成手術（頭蓋骨を薄く削る thin skull 法、または頭蓋骨を取り除く cranial window 法）を行う必要がある。それぞれの手術法には長所と短所があるため、目的によって手術法を使い分ける必要がある。観察窓を作成した動物に2光子顕微鏡を適用し、神経細胞やグリア細胞の in vivo 形態イメージングや、カルシウムイメージングを用いた機能イメージングなどを紹介する。

1. 背景

認知・行動やその発達などの脳機能発現・変化の背景には、神経細胞やそのネットワークの形態・機能の経時的変化が起こっていることが予想される。脳機能発現の基盤を理解するために機能的核磁気共鳴法 (fMRI) やポジトロン断層法 (PET) などの非侵襲的生体イメージングが盛んに用いられている。しかし、これらのイメージング法は時間・空間解像度が低く、また、血流変化など間接的なものを指標とするため、神経ネットワークやその構成単位という微細構造の

形態・機能の生体内抽出は困難であった。一方、バイオイメージングの領域で広く用いられている共焦点顕微鏡は空間分解能に優れている。しかし、深部到達度は組織表面から数十ミクロンが限界であり、また、しばしば組織・細胞に対する侵襲性が問題である。また、生体から取り出した標本から得られた情報は、生体内の形態・機能としばしば一致せず、ライフサイエンス分野での大きな壁となっていた。このように従来の技術では、生きた動物の内部での“あるがまま”の状態の細胞や微細構造の形態や機能を、高い時空間分解能で観察することは困難であり、in vitro の標本から得られた情報をもとに生体脳内で起きている現象を推測するしか手がなかった。従来の研究手法の持つ問題点を克服する有力な手段として2光子顕微鏡が近年注目されている。この顕微鏡を用いることによって、生体組織内で起きているダイナミックな現象をサブミクロンレベルの解像度で捉えることができるようになった。

2. 2光子顕微鏡の動作原理とその特徴

1) 2光子励起とは

1光子励起の場合、1個の蛍光分子が1個の光子の持つエネルギーを受け取ることにより、蛍光分子内のエネルギーレベルが基底状態から第一次電子励起状態へと遷移する。一方、2光子励起は、1光子励起の場合に比べて、理論的に半分のエネルギーを持つ光子（波長でいえば2倍波長の光子）が2個ほぼ同時に1個の蛍光分子にエネルギーを渡すことで起きる励起過程である（図1）。1個の光子が1個の蛍光分子と相互作用する場合に比べて、2個の光子が同時に蛍光分子と相互作用する確立はきわめて低い。そのため、2光子励起の効率を上げるためには、高密度の光子領域を作り出す必要がある。

キーワード: 2光子励起, 2光子顕微鏡, in vivo イメージング

自然科学研究機構 生理学研究所 発達生理学研究室 生体恒常機能発達機構研究部門

(〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38) E-mail: nabekura@nip.ac.jp 原稿受領日: 2009年12月11日, 依頼原稿

Title: In vivo imaging of the brain by two-photon laser microscopy. Author: Junichi Nabekura, Kei Eto

図1 2光子励起過程

2) 2光子励起の特徴

2光子顕微鏡の光源として、チタンサファイアレーザーなどの、フェムト秒パルスレーザーを使用する。このレーザーは共焦点顕微鏡で使用される連続発振レーザーと異なり、パルス状に発振し、対物レンズ下にレーザー光を集光し、瞬間的（フェムト秒）に極めて光子密度の高い領域を作ることができる。このため、2光子励起現象は対物レンズの焦点でのみ起きる（励起の局所性）（図2）。そのため、共焦点顕微鏡のように焦点以外で生じた蛍光をピンホールにより取り除く必要がなく、組織深部で散乱した蛍光成分も像を形成するために利用することができる。連続発振レーザーを用いて同様の光子密度領域を作成することも可能だが、効率が悪く、1光子励起が広い領域で起きてしまうため、生物標本がダメージを受けてしまう。一方で、2光子顕微鏡では、フェムト秒パルスレーザーを用いて焦点のみで蛍光分子を極短時間励起することで熱による組織傷害も減少するため、長時間観察も可能である（低侵襲性）（図2）。また、組織内での散乱吸収が少ない近赤外光を励起光として使用するため、組織の

より深部まで光が到達できる（高い透過性）（図2）。さらに、1光子励起では深部組織を観察しようとする浅層の蛍光分子に励起光が吸収されてしまうため深部まで光が届きにくくなる。2光子励起は局所においてのみ起きるためこのような励起光の減衰が起きにくい（自己遮蔽効果の回避）。これらの利点により、2光子顕微鏡を用いることで、生体組織の深部の微細構造を長期間観察することが可能となった。

3. In vivo 2光子イメージングのための装置

1) 外部光路

2光子顕微鏡と共焦点顕微鏡の違いの一つとして外部光路が必要な点が挙げられる。2光子顕微鏡はその外部にレーザー光を顕微鏡まで誘導する光路が常設されており、この光路は2つの特徴的な装置を有する（図3）。一つはチャープ補正システムである。フェムト秒光パルスはミラーやレンズなどの媒質を通過すると、波長の短い成分が長い成分より先行し（ポジティブチャープ）、パルス幅が増加してしまう。2光子励起はパルス幅が短いほど効率よく起きるため、このずれを補正（ネガティブチャープを付与）する必要がある。この補正を光学的に行うためのプリズム、チャープ補正系が外部光路に設置されている。もう一つの特徴的な装置はビームエキスパンダーである。この装置は、対物レンズのバックアパーチャーの径を満たすように励起光を導入するために用いられ、これにより、顕微鏡の分解能を最大限に引き出すことができる。我々は、いくつかの光路の独自の改良を行っている。

2) 検出器

2光子顕微鏡では前述の通り、生じた蛍光成分を全て像の形成に使うことができる。そのため、できるだけ蛍光の損失を防ぐために光電子増倍管（PMT）は可能な限り対物レンズの近傍に置くことが理想的である。

図2 1光子励起と2光子励起の比較

図3 2光子顕微鏡システムの例

図4 In vivo イメージング用の手術法

4. In vivo 2 光子イメージングのための動物手術法

2 光子顕微鏡を用いた in vivo イメージングを行うための主な手術法として、頭蓋骨を残す方法 (thin skull 法) と、頭蓋骨を取り除く方法 (cranial window 法) の 2 種類がある (図 4)。前者の手法は頭蓋骨を薄く削り 20-40 μm の厚さの骨を残すことで観察窓を作成する。この方法は、頭蓋骨を取り除かないため、脳表面の組織に対して与えるダメージを抑えることができるという利点を持つ。しかし、骨が残っているため脳組織深部の構造物・活動のイメージングには不向きであり、また、骨再生などにより観察回数が限られる。ダメージによって容易に活性化してしまう脳内免疫細胞であるミクログリアのイメージングや、大脳皮質表層にある樹状突起やスパイン構造のイメージングに適した手術法である。一方で、cranial window 法は、頭蓋骨を取り除いた後、カバーガラスで置換する。カバーガラスと脳の間はアガロース、あるいは人工脳脊髄液を充填する。この方法は、脳深部の構造物の観察に適している。脳表面の組織に対して多少ダメージを与えるという欠点はあるが、繰り返し観察が可能ため、脳の深部構造物を数カ月以上も観察する際にはこの方法が適している。また、観察領域への直接薬物投与や電極挿入などの脳内アプローチを伴う実験にも適している。生体イメージングの問題となるのは、心拍、呼吸、体動や固定に伴う振動である。この振動を抑える方法として、我々は、特殊リングを頭蓋骨観察窓に取り付けるとともに、カバーガラスの下にアガロースを充填することで物理的に脳を押さえている。

5. In vivo 2 光子イメージングの応用例

ここまで述べてきた 2 光子顕微鏡を用いた生きたマウス個体のイメージングに関する例を紹介する。

1) 大脳皮質第 5 層錐体細胞の微細構造の in vivo イメージング

大脳皮質第 5 層錐体細胞に蛍光タンパク質 (yellow fluorescent protein: YFP) が発現している遺伝子改変マウスにおいて、頭蓋骨をカバーガラスに置換した後、マウス個体の大脳皮質深部の神経細胞の微細構造を観察した (図 5)。第 5 層錐体細胞の細胞体、そして basal dendrite, apical dendrite および大脳皮質表面に延びる樹状突起、シナプス構造 (スパイン) を観察することができた。現在、皮質表面から 0.9 mm 以上の深部における微細構造をサブミクロンの解像度を保ったまま観察することが可能である。このことは、脳深部のスパインや軸索などの神経細胞の微細構造を立体的に捉えることができることを示している。さらに、2 光子顕微鏡の低侵襲性により、脳深部の神経微細構造を同一個体において、リアルタイム観察や長期的に繰り返し観察することができる (図 6)。これにより、スパインやブートン構造などのシナプス微細構造の短時間および長期間にわたる経時的構造変化を観察することが可能である。長期間の繰り返し観察では、脳表面の血管による 2 次元のマッピングや最初のイメージングで得られた Z 軸情報の他に、周辺にある血管や特徴的な細胞構造を指標として目的構造物を繰り返し探しだす。現在では数カ月間の長期間繰り返しイメージングにも成功している。この手法により、発達期、および障害時における神経回路編成を観察することが可能である。

図5 大脳皮質第 5 層錐体細胞の in vivo イメージング

図6 脳深部微細構造の長期 in vivo イメージング

図7 ミクログリアの突起(↓)がシナプス(スパイン, ⇄)に選択的に接触することを生体イメージングで観察

2) 様々な微細構造物のイメージング

2光子顕微鏡は蛍光タンパク質を発現している遺伝子改変動物や蛍光色素と組み合わせることで脳内の様々な構造物を観察することができる。例えば、グリア細胞の一つであるミクログリアと神経細胞がEGFPで標識されている遺伝子改変マウスを用いることで、ミクログリアと神経細胞の生体内でのダイナミックな動きを捉えることができる(1)(図7)。ミクログリアは培養系やスライス標本を用いてよく調べられているが、in vitro 標本では容易に活性化してしまうため、正常時のミクログリアの性質を調べるためには生きた動物での観察が不可欠である。さらに、cranial window法のために頭蓋骨を取り外すことによっても活性化するという報告(2)もあり、この細胞の観察の際には細心の注意を払い頭蓋骨を薄く削る thin skull 法が最適である。正常脳ではミクログリアの突起がシナプスを選択的に1時間毎に5分間接触監視していることが観察できた。梗塞周囲ペナンプラ領域においてはミクログリアのシナプス接触時間が1時間以上延長するとともに、シナプスを包括するような接触様式に変わり、

しばしば障害シナプスの消失(除去)を惹起することが生体リアルタイムイメージングを用いることで初めて観察することができた。このような蛍光タンパク質を発現させた遺伝子改変動物を用いた微細構造観察だけでなく、蛍光色素を用いて染色した脳内構造物の観察を行うことができる。例えば、グリア細胞の一つであるアストロサイトは sulforhodamine 101 によって選択的に染色されることが知られている(3)。アストロサイト細胞体やその突起の endfoot が脳血管に巻きついている像も捉えることができる。さらに、蛍光色素を用いた in vivo イメージングのもう一つの例として微小血管の観察がある。末梢の静脈(尾静脈など)から蛍光色素を注入することにより、脳微小血管を染色することが可能である(4)。さらに血中を流れる血球成分が黒い影として観察できるため、この影の動く速度をイメージングによって捉えることにより、微小血管の血流を捉えることも可能である(4)。また、投与した蛍光色素の動態を定量化することにより、毛細血管における血流の定量化が可能である。

3) 2光子顕微鏡を用いた *in vivo* カルシウムイメージング

2光子顕微鏡は微細構造およびその動態の観察だけでなく, Oregon Green 488 BAPTA-1 AM や fluo-4 AM, fura-2 AM などのカルシウム蛍光指示薬を利用することにより, 神経細胞活動のイメージングにも用いることができる. カルシウム蛍光指示色素を充填した微小ガラス管を脳内に挿入し, 弱い圧力により徐々に脳内に投与することにより, 神経細胞を染色する. この手法を用いることにより, 生きた動物の脳内の神経活動をカルシウム応答として捉えることができる. さらに, 複数の神経細胞の活動を同時に捕らえることができるため, 脳機能マッピングを調べる手段としても有効である(5).

4) ケージド試薬などの光感受性化合物を用いた非侵襲的刺激法

2光子顕微鏡は構造や機能の観察だけでなく, 刺激のためのツールとしても使用できる. 光感受性のケージド試薬を2光子顕微鏡で励起すると, 限局した領域においてのみケージド試薬を活性化させることが可能となる. この手法を用いることで, スライス標本でス

パインのような微細構造物のみをケージドグルタミン酸などで刺激(6)することや, ケージドカルシウムを用いたアストロサイト細胞(7)や神経細胞の刺激も可能である. また, Cali 法などと組み合わせると細胞内局所における機能タンパク質の活性制御や, 特定細胞への光による遺伝子導入が可能となることが期待出来る.

6. おわりに

この様に2光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングにより, 脳内の様々な細胞の微細構造, 機能を観察できるだけでなく, 光を用いた非侵襲的刺激による活動操作を組み合わせることで, 今後, 生体での未知の現象が次々に明らかになると期待できる.

文 献

- 1) Wake H, et al. J Neurosci. 2009 Apr 1;29(13):3974-3980.
- 2) Xu HT, et al. Nat Neurosci. 2007;10(5):549-551.
- 3) Nimmerjahn A, et al. Nat Methods. 2004 Oct;1(1):31-37.
- 4) Schaffer CB, et al. PLoS Biol. 2006 Feb;4(2):e22.
- 5) Ohki K, et al. Nature. 2005 Feb10;433(7026):597-603.
- 6) Matsuzaki M, et al. Nat Neurosci. 2001 Nov;4(11):1086-1092.
- 7) Takano T, et al. Nat Neurosci. 2006 Feb;9(2):260-267.

風景・春

久保