解説

脳深部 Ca^{2+} イメージングへの誘い大川 宜昭^{*1,*2}, 竹川 高志^{*3}, 野本 真順^{*4}, 井ノ口 馨^{*4}獨協医科大学 先端医科学統合研究施設^{*1}, JST さきがけ^{*2}, 工学院大学 情報学部^{*3},
富山大学 学術研究部 医学系^{*4}Guide for Ca^{2+} Imaging from Deep Brain RegionsNoriaki Ohkawa,^{*1,*2} Takashi Takekawa,^{*3} Masanori Nomoto^{*4} and Kaoru Inokuchi^{*4}Comprehensive Research Facilities for Advanced Medical Science, Dokkyo Medical University^{*1}
PRESTO JST^{*2}Faculty of Informatics, Kogakuin University of Technology and Engineering^{*3}
Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama^{*4}

概要

これまで、海馬やその他の脳深部からの多数の細胞の活動様式の観察は、複数の電極を用いたマルチニューロン記録法による電気生理学的な検出が主であった。しかし近年、蛍光タンパク質の改変や光学技術の進歩によって神経活動の蛍光イメージング法が開発されたことで、筆者のように生理学に縁遠かった分子・細胞生物学をベースとした研究者も神経細胞活動を対象とした研究に着手することができるようになってきた。本稿では、脳深部の神経細胞活動を観察する *in vivo* Ca^{2+} イメージング法のための、動物の手術、イメージングで得た画像データの処理、そして、そこからの細胞の同定とその活動の数値データの取得までを解説したいと思う。

1. はじめに

特定の課題に対応する脳の情報処理の原理を理解するためには、自由に行動している動物から多数の神経細胞の活動を取得して、課題依存的な神経細胞集団の誘発活動とそれ以外の活動を区別して検討することが必要だと考えられる。これまで、多数の神経細胞の観察は、テトロドやシリコンプローブを用いたマルチニューロン記録に加え、2光子顕微鏡システムを用いた Ca^{2+} イメージング法が用いられてきた。 Ca^{2+} イメージング法を行うにあたっては、 Ca^{2+} センサーが必要となるが、複数の Ca^{2+} センサー蛍光タンパク質が開発されてきており、その中でも最も広く使われているのが現・東北大学の中井淳一博士らが開発した G-CaMP (米国 Janelia Farm の Looger 博士らが改良したものは GCaMP) である。G-CaMP/GCaMP は、 Ca^{2+} 存在下で内部の EGFP 領域の立体構造が変化

し蛍光タンパク質としての機能が発揮されるため、G-CaMP/GCaMP が発現する細胞中では、 Ca^{2+} 濃度依存的に蛍光強度が増加する¹⁾。G-CaMP/GCaMP は、遺伝子にコードされた Ca^{2+} センサー (Genetically Encoded Calcium Indicator, GECI) であることから、遺伝学的に、もしくは組換えウイルスを介して動物の脳に遺伝子導入し神経細胞に発現させることで、神経細胞が活動した際に細胞内へ流入する Ca^{2+} 量を蛍光強度に変換し神経活動を定量する、*in vivo* Ca^{2+} イメージング法に適用された²⁾。当初の脳内蛍光イメージングは、励起光を組織に透過させて脳深部に届けることができる2光子顕微鏡下で行われていたが、近年、米国 Stanford 大学の Schnitzer 博士らによって、屈折率分布型レンズ (Gradient Index lens, GRIN lens) を内視鏡として用いた1光子顕微鏡による脳深部蛍光イメージングが紹介された³⁾。通常、レンズというと曲面の形状を持つものを想像するが、GRIN レンズはガラス棒のような円柱の形状をしており (図 1A)、中心軸から外周部へ向かって放物線状に屈折率を分布させることで光を曲げ、平行に走る光を集光させることができる。このように、点光源を入射端面の中心にお

*1 〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

*2 〒 332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

*3 〒 163-8677 東京都新宿区西新宿 1-24-2

*4 〒 930-0194 富山県富山市杉谷 2630

図1 GRIN レンズと超小型蛍光顕微鏡：A) GRIN レンズの例．左から $\Phi 1.0$ mm/長さ 4.0 mm； $\Phi 0.5$ mm/長さ 6.1 mm； $\Phi 0.5$ mm/長さ 8.0 mm．B) GRIN レンズのピッチ．レンズ内を通る光線の蛇行周期を表す．株式会社ゴーフォトンより承諾を得て同社ホームページより転載．C) Inscopix 社の nVista V2 とそのベースプレート．D) UCLA ミニスコプとそのベースプレート．

いた際に平行光を得ることができる長さの単位が 0.25 ピッチであり，その倍の 0.5 ピッチの GRIN レンズは，入射端面においた物体の倒立実像が出斜端面上に結像する性質を持つ（図 1B）．この性質を内視鏡として利用することで，脳深部の標的領域で出現した蛍光像を頭蓋の外で観察することができるようになる．前出の Schnitzer 博士らは，マウスの頭部に載せてもマウスが自由に行動することができる超小型蛍光顕微鏡も開発し⁴⁾，GRIN レンズの内視鏡システムと組み合わせたことで，自由に行動中のマウス脳深部から Ca^{2+} イメージングを行うことに成功した⁵⁾．この超小型蛍光顕微鏡（nVista）（図 1C）は，6 万ドル～という価格で米国 Inscopix 社から発売されたが，その後，カリフォルニア大学の Golshani 博士と Silva 博士らのグループが，nVista と類似の超小型蛍光顕微鏡（UCLA ミニスコプ；図 1D）を考案し⁶⁾，その作製法をネット上に公開した（http://miniscope.org/index.php/Main_Page）．現在，UCLA ミニスコプのキットは，Labmaker から安価（2 千ドル以下）で購入できるようになったことから（<https://www.labmaker.org/products/miniscope-complete-set-of-components>），世界中の多くの神経科学者に普及しつつある．そこで

本稿では，この超小型顕微鏡による脳深部 Ca^{2+} イメージングの世界へと読者をいざなうために，GRIN レンズをマウスの脳に設置するところから，この超小型顕微鏡で G-CaMP/GCaMP 蛍光像を取得した後，自動解析プログラムで画像データ中の神経細胞 1 つ 1 つを同定しそれぞれの神経細胞の G-CaMP/GCaMP 蛍光の経時変化の定量データを取得するまでの手順を解説していく．

2. 動物の準備

まず，標的とする脳領域に G-CaMP/GCaMP を発現させることが必要となる．例えば，興奮性神経細胞に遺伝子発現を誘導する CaMKII プロモーターで GCaMP6 を発現するためのアデノ随伴ウイルス（AAV）は，米国 Addgene より購入することができる（GCaMP6f の例，<https://www.addgene.org/100834/>）．また，Thy1 プロモーター制御下で GCaMP6f や 6s を発現するトランスジェニックマウスも，複数の系統が樹立されており，米国 Jackson Laboratory から購入することができる（GCaMP6f の GP5.5 系統の例，<https://www.jax.org/strain/024276>）．AAV で G-

CaMP/GCaMP を発現させる場合、AAV のセロタイプ (カプシド構造タンパク質の種類によって分類される) ごとに感染する細胞種の嗜好性が異なることを考慮する必要がある。このため、標的とする神経細胞への感染・遺伝子導入の実績のあるセロタイプを論文等であらかじめ調べておくとよい。また、AAV で G-CaMP/GCaMP を発現させる場合、高い力価のウイルスを注入し、高発現を誘導できれば良いというものではない。G-CaMP/GCaMP の高発現状態が続くと、神経細胞が死んでしまう場合があり、いざイメージングをしようとしたときに蛍光が消えてしまっているということになりかねない。イメージングのタイミングに、最適な G-CaMP/GCaMP のシグナルを得られるよう、ウイルスを複数条件で希釈して注入し、それぞれの条件で最適な蛍光発現のタイミングを把握することが重要である。一方、トランスジェニックマウスの場合、G-CaMP/GCaMP の発現が常に一定なため、自分の標的とする脳領域に G-CaMP/GCaMP が発現する系統があれば実験をスムーズに計画できるものと考えられる。我々は、京都大学の林 康紀 博士らが樹立した海馬歯状回や CA1 領域、また、扁桃体基底外側核に G-CaMP7 が発現する Thy1-G-CaMP7 マウスの供与を受け、これまで試したいずれの週齢でも変わることなく安定した G-CaMP シグナルが得られることを確認している。

3. GRIN レンズの設置

ここでは、マウスの海馬歯状回の例を挙げて説明を進めたい。薬理学実験、組換えウイルスによる遺伝子導入、または、光遺伝学実験の経験がある読者は、その際のカニューレ刺入の手法となんら変わらないことを理解いただけるであろう。GRIN レンズは、nVista のユーザーは Inscopix 社から、UCLA ミニスコープのユーザーは、日本のゴフォトン社から CLH シリーズ [ゴフォトン社と日本板硝子 (株) が共同で、医療用内視鏡に使用されているレンズを神経科学研究用に改良したもの: <https://www.gofoton.co.jp/clh-series-lens-product-specifications.html>] が購入可能である。

まず、G-CaMP/GCaMP が標的脳領域に発現するマウスに麻酔をかけ、脳固定装置に固定し、bregma と lamda 縫合が見やすくなるよう、マウスの頭部の皮膚を正中線に沿って切開する。次に、Bregma 縫合を基準としてレンズを立てる位置を測り、油性ペンを用いて印をつけ、その位置に歯科用ドリルでレンズが通る大きさの穴を頭蓋に開ける (マウス歯状回の場合、Bregma

基準で AP=-2.0, ML=1.3 mm)。開けた穴から曝された脳は、乾かないよう生食を浸した小さな綿球で覆っておく。そして、レンズをデンタルセメントで頭蓋上に固定する際のアンカーとなる小型ビス (アンカービス、AN-3, エイコム) 用の穴を 8ヶ所開け、レンズ穴に近い側の穴にアンカービスを打ち込む。続いて、GRIN レンズを保持できる器具 (図 2A, 我々の使用しているレンズ保持器具の例や、成茂科学器械研究所の SM-15HE 等) を取り付け、脳定位固定装置との組み合わせで利用できるマニピュレーターで、GRIN レンズが垂直になるよう割れない程度にしっかりと保持する (レンズが当たる面は、ビニールテープやパラフィルム等でクッション性を持たせるとよい)。マニピュレーターを用いてレンズの先端で Bregma 縫合を計測し、レンズを刺入位置に移動させる (頭蓋に穴を開けた際と同様でマウス歯状回の場合、Bregma 基準 AP=-2.0, ML=1.3 mm)。そして、目的の深さまでレンズをゆっくり刺入する (マウス歯状回の場合、DV=1.7 mm, Bregma 基準)。刺入完了後、頭蓋の上にデンタルセメントを適量流しレンズと頭蓋、そして、あらかじめ設置しておいたアンカービスを固定する (図 2B)。デンタルセメントが完全に硬化したことを確認し、レンズを保持器具から静かに取り外す。残りのアンカービスを打ち込み、デンタルセメントを適量用いてレンズをさらに固定する (図 2C)。レンズの保護のため、PCR に使用する 0.2 ml チューブを適当な長さに切り、レンズにかぶせ、次のステップでチューブを外しやすいようにできるだけ少量のデンタルセメントでしっかりと固定する。最後に、抗生剤を傷口に塗布しその後、切開した皮膚を外科用アロンアルファや外科用縫合糸を用いて閉じて終了。

4. ベースプレートの設置とイメージング

GRIN レンズ設置後、約 3 週間から 1 ヶ月で、レンズを設置した内部の組織が安定し、小型顕微鏡を近づけると組織全体が励起光下で明るく見えるとともに、レンズ下を走る血管のパターンが観察できるようになる (図 2D)。この血管像を指標として、ベースプレートの設置を行う。

マウスに麻酔をかけ、脳固定装置に固定し、GRIN レンズの保護のために固定していた PCR チューブを取り外す (歯科用ドリルでデンタルセメントを削り落とすと取り外しやすくなる)。次に、nVista もしくは UCLA ミニスコープにベースプレートを取り付け、マニピュレーターが取り付けられたクランプで小型顕微鏡を保持する (図 2E)。小型顕微鏡の下部と上部の間隔は、イメージング時のピント調整のために伸縮でき

図2 GRIN レンズ設置から Ca^{2+} イメージングまで: A) GRIN レンズを保持するマニピュレーターの例. B) GRIN レンズを脳の標的部位に刺入後、アンカービスに固定した様子. C) B) の後、さらにアンカービスを設置し、デンタルセメントで頭蓋表面を覆った様子. D) GRIN レンズと nVista を通して脳深部を観察した例. E) ベースプレート設置の際に、マニピュレーターに装着したクランプで nVista (ベースプレートが取り付けられている) を保持した様子. F) 自由行動中のマウスから Ca^{2+} イメージングを行っている様子.

るようになっているが、この時、間隔が中間になる位置で固定しておく（イメージング時に、上下両方向にピントが探れるようにするため）。続いて、マニピュレーターでゆっくりと励起光を ON にした小型顕微鏡をレンズに近づけ、得られる像の真ん中にレンズが位置するように調整する。さらにゆっくりと小型顕微鏡と GRIN レンズが当たらないように注意しながら顕微鏡を降ろしていくとかすかに血管像が現れる。その周辺を僅かに上下させ、視野が 1 番明るくなる高さで位置決めをする。そして、ベースプレートとアンカービスの間隙をデンタルセメントで壁を作るように埋めていく。GRIN レンズを囲んで、4 方向にデンタルセメントの壁ができれば完成。この段階でも、麻酔が覚めてくると僅かに G-CaMP/GCaMP の点滅が見えてくるかもしれない（図 2D）。最後に、小型顕微鏡とベースプレートを離して、ベースプレートカバーを取り付けて終了。

実際にイメージングのトライアルを行う段では、GRIN レンズを囲んだデンタルセメントの壁を摘み、ベースプレートカバーを取り外した後、小型顕微鏡をベースプレートに取り付ける（図 2F）。そして、nVista V2 の場合は、本体上部の CMOS センサー側を回して、UCLA ミニスコープの場合は、本体上部を

スライドさせて上下させることで好みの焦点視野を探す。nVista V3 や、最近 HP でアップされた UCLA ミニスコープ V4 は、オペレーションソフトウェア上で機械的に上下させてピント調節が可能である。筆者らは、この後数日間、小型顕微鏡の脱着への動物の汎化のためと、ピントが日を跨いでずれていないことを確認する目的で、各日 10 分程度のイメージングトライアルを行ってから実際の行動タスク中の Ca^{2+} イメージングを行っている。

5. Ca^{2+} イメージングからの自動細胞抽出

Ca^{2+} イメージング記録により得られた動画データには多数の細胞の活動状態が含まれており、神経回路の機能理解のために極めて有用である。近年、取得できる動画データが急激に大規模になり、動画データから実際に細胞を検出しその活動状態を利用できる形にする処理を自動化する必要性が高まっている。不便なことにこのような処理には未だ一般的な名称が存在していないようである。本稿では以降、単に細胞抽出と呼ぶことにする。これまでに、自動細胞抽出アルゴリズムが多く提案され改良が進み、かなりの程度に自動化が達成できている⁷⁻¹⁴⁾。ただし、選択する手法や調整の仕方により最終的に得られる細胞の活動時系列も異

なり、研究者は個々のデータに合わせて手法を選択しパラメータを調整するが、結果を客観的に評価することが難しく、結果に恣意性が生じてしまう。Ca²⁺ イメージング記録を用いた研究では、細胞抽出の精度は研究結果全体に大きく影響する重要な問題である。このため、チューニングが少ないアルゴリズムや細胞抽出の結果を事後的に評価する手法の開発が現在も活発に進められている。Ca²⁺ イメージングを用いた研究において、多くの研究者が共通して利用できる細胞抽出の標準手法を確立することは、本質的な部分へ科学的議論を集中させるために重要である。竹川らは、チューニングが少なく安定して高速な自動細胞抽出システムとしてHOTARU (High performance Optimizer to extract spike Timing And cell location from calcium imaging data via linear impulse) を開発している¹²⁾。本章以降、細胞抽出の基本と現在主流の考え方について紹介し、HOTARU のアルゴリズムの理解に繋がるよう、パラメータ依存性の削減や評価手法などについて議論する。

6. イメージングデータの基本モデル

細胞抽出の基本的な考え方は細胞の形状を表す Region of Interest (ROI) と ROI における平均的な信号強度の変化である。古典的には、1) 動画を時間方向に統計処理を行った画像 (図 3AB) から細胞領域を見つけ ROI として設定、2) 各時刻において ROI 内の信号を平均し細胞のカルシウム変動と見なし (図 3E)、3) カルシウム変動からスパイク時系列を推定する。しかし、この方法では見落としが多く、隣り合った細胞が活動電位を生成した時に実際には活動していない細胞が活動していると誤った推定をしてしまう (図 3EF)。このような推定の誤りは、同期性やスパイクタイミングなど神経回路の活動を解析する際に事実と大きく異なった結論を導くことになるので十分な注意が必要である。そこで時系列の構造に着目した研究として Schnitzer グループの Mukamel らの独立成分分析と主成分分析を組み合わせた方法⁷⁾や、青西グループの丸山らによる非負行列因子分解による方法⁹⁾、Paninski グループの Vogelstein らによる活動電位によるカルシウム応答モデルを追加した方法などが提案された⁸⁻¹⁰⁾。その後も、様々な改良アルゴリズムおよび実装が提案されている¹¹⁻¹³⁾。

上記の方法では共通して観測される細胞の活動が細胞形状と活動強度の時間変化の直積として扱われている。つまり、動画データを時刻 t 、位置 x における観測値 $f(t, x)$ を、細胞 k の形状 $a(k, x)$ と時間変化 $v(k, t)$

を用いて、

$$f(t, x) = \sum_{k=1}^K a(k, x)v(k, t) + b(t, x) + \varepsilon(t, x), \quad 0 \leq a \leq 1$$

と仮定する (図 3CF)。ただし、 $b(t, x)$ は細胞活動のない場合の基準点を表すベースライン、 $\varepsilon(t, x)$ はノイズである。ベースラインには画像全体のムラや時間的な揺らぎも含まれることになる。形状は非負であり、信号強度は $v(k, t)$ で扱うため最大値を 1 と規定している。このとき、細胞の個数 K 、変数 a, v, b とノイズの性質を推定する。各手法は、ベースラインの定義・変数の拘束条件・推定するためのアルゴリズム・追加された工夫により違いがあるが、基本的な方針は共通である。古典的な方法では細胞活動の総和部分で重なりを考慮しないという近似をしていることになる。

7. 事前知識の導入

自動細胞抽出において重要なのは、データの持つ性質を事前知識としてモデルにどのように組み込むかである。ここでは、時間変化・ベースライン・スパース性・細胞形状の性質について解説する。4つの要素は独立したものではなく、相互に関連し解析結果に影響を与える。各論文の発表時の意図とは異なる場合もあるが、各種法を横断的に見た立場から整理して紹介する。

Ca²⁺ イメージングで得られるデータの S/N 比は小さく 1 程度のこともある。形状 (ROI) で平均化することで、各点の時間変化に比べるとノイズの影響が軽減されるが (図 3DE)、平均化による $v(k, t)$ の推定ではまだ多くのノイズ成分が含まれている。そこで、 $v(k, t)$ をスパイク時系列 $u(k, t)$ と応答関数 $\gamma(\tau)$ を用いて、

$$v(k, t) = s(k) \sum_{\tau=0}^{\tau_{max}} \gamma(\tau)u(k, t-\tau), \quad s > 0, \quad 0 \leq u \leq 1$$

と表現し、 $v(k, t)$ の拘束条件とする。拘束条件により、スパイク由来の信号のみを取り出しノイズを除去することができる (図 3EF)。Vogelstein はカルシウム濃度変動の応答関数を指数関数として記述していた⁸⁾が、Pnevmatikakis らは double exponential 関数に拡張した (図 3F)¹⁰⁾。応答関数のパラメータについても、データから自動でパラメータを推定する手法も提案されている¹¹⁾が、主に蛍光色素の性質により決まるためデータごとに調整する必要性は少ない。

Ca²⁺ 変動 $v(k, t)$ が同じ場合でもベースライン $b(t, x)$ により推定されるスパイクは大きく影響される。ベースラインが低いとスパイクが常に発火してい

図3 細胞活動と観測時系列：人工的に作成したデータの動画の時間方向の最大値を A) 元のデータ, B) 時間と空間の平均がともに 0 になるように調整した場合, について示した. C) HOTARU により検出された細胞. D) 1~3 で示された細胞の中心で観測されるカルシウム変動. E) ROI で平均化したカルシウム変動. F) HOTARU により推定されたカルシウム変動. 縦線はスパイクを表している. 2 と 3 で示した細胞は重なっており, E において別の細胞の活動が混ざり込んでいるが, F では除去されている.

る状態, ベースラインが高いとベースラインを超えた部分のみ低頻度で発火していると推定される. 丸山らはベースラインを事前に推定した上で, $F = AV$ という非負行列因子分解として解いている⁹⁾. Pnevmatikakisらはベースラインについても細胞活動と同様に空間と時間の直積 $b(t, x) = b_X(x)b_T(t)$ と仮定した¹⁰⁾. この方式は実装が簡単であるが, 細胞活動とベースライン

のどちらとして扱うかのトレードオフが生じ計算結果がパラメータにより大きく変化してしまう傾向がある. HOTARU ではベースラインを $b(t, x) = b_T(t) + b_X(x)$ のように時間と空間の和として独立に扱い, ベースラインを事前に変数消去し従属変数とすることで, ベースラインと変数のトレードオフによる不安定さを解消している¹²⁾. また, ベースラインの揺らぎの大きさを

事前知識として想定, $b_T(t)$, $b_X(x)$ それぞれが正規分布の事前分布に従うと仮定し, 縮小回帰を行うことで計算の安定化を図っている¹²⁾. Zhou らは, 細胞の周辺で局所的なベースラインの変動が起きることを利用したモデルを提案している¹³⁾.

細胞抽出におけるモデルは変数の数が膨大なため, 変数が従う確率分布を定義することも有用である. a の確率分布は細胞の大きさや形状と, u の確率分布は発火頻度とそれぞれ対応することになるが, 実際には精密な分布について直接解くことができる実装は難しい. Pnevmatikakis らは, 信号強度を含んだ成分 sa , $v = s\gamma u$ を指数分布に従うとすることで標準的なスパースモデリングの手法である LASSO と対応させている¹⁰⁾. ただし, 信号強度はデータごとに異なるため, 確率分布のパラメータについてはある程度恣意的に設定せざるを得ない. HOTARU では a , u が指数分布に従うとすることで想定される細胞の大きさとスパイク頻度に基づいてパラメータを定量的に設定する手法を提案している¹²⁾.

8. セルソーティングの実装と評価

パラメータの推定は, 正則化項付きの最小二乗法あるいは MAP 推定により定式化される. その上で, 簡易な手法で求めた a を初期値として用い, a と u , v の片方を固定して交互に解く反復解法が用いられる. 反復の各ステップは非負の拘束条件と正則化項を含む二次最適化問題となるが, 大規模データに対して単純に反復を繰り返した場合に収束せず発散してしまう. 反復による収束のためには初期値と収束を安定化させる工夫が必要である. 細胞の個数については基本的に初期値では偽の細胞候補を含んでも見落としの無いようにし, 反復中で真の細胞のみに絞り込むことになる. 細胞形状は当然局所的な構造を持っているが, 確率モデルに導入することが難しい. このため, 反復の途中で得られた $a(k, x)$ に対して何らかの画像処理を適用して局所構造を持つ $a'(k, x)$ に置き換えることで対応する場合がある.

10 章では, 現時点で大規模データにも耐えられる実装として CNMF-E¹³⁾ と竹川らが考案した HOTARU¹²⁾ の比較を実際のデータを用いて行うが, このいずれも条件付き非負因子分解 (CNMF)¹⁰⁾ を改良したものと言える. CNMF は単純な応答関数の性質から v の拘束条件を単純化することで計算量を削減する工夫により大規模データに対応している. CNMF-E では初期値をデータごとに閾値を設定して求めたピーク位置を中心とする円形の細胞候補を初期値とし, ベースライ

ンに細胞の周辺での局所的な変動を組み込んだことが特徴である.

一方, HOTARU では動画の 1 フレームごとに Laplacian of Gaussian (LoG) フィルタと watershed 法を用いて細胞候補の切り出しを行うことにより, 形状まで含めて精度の高い初期値を求めている. この手法ではデータの S/N 比に依らず得られる特徴量から, 偽の細胞候補を精度良く判別できるため適切な初期細胞数が自動的に設定される. また, すでに紹介したようにベースラインを時間と空間の和とした上で, 信号強度に依らず細胞の形状と発火率による確率分布を設定したモデルを採用することで精度の向上と反復による解の安定化を実現している. 標準の応答関数には double exponential 関数を用いるが実装上任意の応答関数を用いることができるため, 今後新しい蛍光色素の開発に柔軟に対応できる. 最新の実装では, TensorFlow ライブラリを用いて独自の proximal operator による手法を用いて最適化しており, CPU・GPU の環境に依存せずスベックに応じて自動的な並列最適化により高速に計算される (<https://github.com/tk2lab/HOTARU>; Takekawa, 2020) (図 4).

細胞抽出の定量的な評価には, 依然として人間の判定を正解として用いる場合が多い. しかし, 人間による結果も担当したオペレータにより大きなばらつきがあることが分かっており, 良い指標とは言えない. 同様に, 各種アルゴリズムで得られた細胞候補の形状から, 実際に細胞であるかをニューラルネットワークで事後的に判定する手法も提案されている¹⁴⁾が, その正当性をどのように担保するかは難しい. この後も多くの研究者により実際の細胞抽出結果を様々な角度から検証し, コンセンサスを形成していく必要がある.

9. Ca^{2+} イメージングで取得した画像データの処理

取得した生データは, マウスの行動や頭蓋内での脳の伸縮に伴い観察視野が揺れ動くこと, バックグラウンドノイズを含んでいることから, 生データを細胞抽出アルゴリズムに直接供することは難しい. 本章では, Inscopix 社の nVista を用いて 1280×800 pixel の解像度で撮影された生データを tiff 形式でエクスポートしたものを例として, オープンソースの画像処理ソフトウェア Fiji (<https://imagej.net/Fiji>) を用いた画像データの処理方法について具体的に解説する. プレ補正を行うため, TurboReg (<https://imagej.net/TurboReg>) をダウンロードし, Fiji 起動後, Plugin -> Install Plugin -> TurboReg.jar を選択してプラグインをインストールしておく. 処理するデータのファイルサイズ (サ

図4 大規模実データに対する処理：実際のデータにおける A) 検出された細胞, B) 推定されたカルシウム変動とスパイク列の一部. 計算環境にもよるが, 最大で 500×500 ピクセル $\times$ 数万フレームに対応し, 数百の細胞の活動を検出することができる.

ンプリングレート, 記録時間および撮影範囲に依存する) が大きいと, 各ステップの計算時間が大幅に長くなるため, まずデータ処理高速化のための準備をする (図 5A, Step 1). File $\rightarrow$ Open で生データの tiff ファイルを読み込む. Edit $\rightarrow$ Selection $\rightarrow$ Scale で空間 (x および y) および時間 (z) のダウンサンプリングを行う (筆者らは空間のダウンサンプリングのみ行っている). 次に, 範囲選択をした後に Image $\rightarrow$ Crop で空間トリミングを行う. 図 5 中では, すでにこのステップまで処理したデータを載せている (図 5A 左). このとき, 連結するムービーは全て同じピクセルサイズである必要がある. 続いて, ムービーの連結とブレ補正を行う (Step 2). Image $\rightarrow$ Stacks $\rightarrow$ Tools $\rightarrow$ Concatenate でムービーを連結する. 次に, PlugIn $\rightarrow$ TurboReg で TurboReg を呼び出し, Source に連結したムービー (Source: 連結画像), Target に Image $\rightarrow$ Stacks $\rightarrow$ Z Project $\rightarrow$ Average intensity で作成した平均強度投影画像 (Target: 平均強度投影画像) をそれぞれ設定し, Translation $\rightarrow$ Accurate $\rightarrow$ Batch でブレ補正されたムービーを取得し, Image $\rightarrow$ Crop で補正により発生した余分なバックグラウンドをトリムする (図 5A 右). ブレ補正は最大限補正できるまで繰り返す. 次に, 連結したムービーをセッションごとに再分割し, バックグラウンドノイズを除くためのガウシアンフィルタを用いたバンドパスフィルタ処理

を行う (Step 3). ブレ補正されたファイルを右クリックして, Duplicate $\rightarrow$ Range でフレーム数を入力してセッションごとに再分割する. 次にセッションごとに, Duplicate して, Process $\rightarrow$ FFT $\rightarrow$ Bandpass Filter を選択して, 図 5 中と同様のパラメータでバンドパスフィルタ処理をする. 次に, Process $\rightarrow$ Image Calculator で Image1: ブレ補正したムービー, Operation: Divide, Image2: フィルタ処理したイメージ, 32 bit (float) result を選択して実行する (このとき, 図 5A 左の画像のようにレンズの縁や細胞の蛍光を含まない部分はトリムしておくことが重要である). 次に, セッションごとに全体平均をベース値 F とした平均輝度変化率 ($\Delta F/F$) のムービーを作成・再連結し (Step 4), tiff ファイル形式で保存する (Step 5). 細胞検出プログラムを用いて, 各細胞の輝度変化を抽出する (Step 6).

10. 自動細胞抽出プログラムによる細胞の同定とその活動の数値データの取得

In vivo Ca^{2+} イメージングの性質上, 観察視野では数百個以上のニューロンが重なり合って蛍光を発するだけでなく, 脳内を走行している血管の脈動や修正しきれなかったブレにより見かけ上の輝度変化が生じる. 特に偽陽性シグナルはマウスの行動と連動して起きることが多く, 偽陽性を含むデータは幻を見ている

図 5

ことにもなりかねない。したがって、偽陽性を分離・排除しつつも、細胞ごとの輝度変化を高感度かつ正確に抽出可能な信頼できるアルゴリズムを使用することがデータ取得と解釈に直結する。筆者らは竹川らが考案した HOTARU¹²⁾を常用しているものの、正確なデータ取得をするため、Columbia 大学の Paninski 研究室で開発された CNMF-E¹³⁾との比較も並行して行ってきた¹⁵⁾。現在、HOTARUの方がCNMF-Eに比べて高感度かつ偽陽性を含まず細胞が検出できているとの結論に至っている。また、他の細胞検出プログラムはデモデータを使ってデモコードを動作させてもエラーを発生したりして現実的には使いづらいものが多いように感じている。

$\Delta F/F$ ムービーを実際に HOTARU に供すると、抽出された細胞のフットプリントはtiffファイル、細胞ごとの輝度変化はcsvファイルとして出力される(図 5A, Step 6; 図 5B 下)。Fiji を用いて $\Delta F/F$ 処理したムービーと HOTARU のフットプリントを Image -> Stacks -> Z Project -> Max intensity で最大値投影処理して比較すると、輝度変化が小さく $\Delta F/F$ の投影では確認しづらい細胞でも、HOTARU は高感度に検出する (Step 6, 写真左と右)。ムービーを再生するとその場所で細胞の輝度変化が認められる。また、tiff ファイルと csv ファイルで出力されるため、Fiji とエクセルを用いることで、注目したい細胞のフットプリントと輝

度変化を $\Delta F/F$ ムービーと照らし合わせながら簡単に確認することができる (図 5B)。また、フットプリントのフレーム番号と csv のカラム番号が対応しているため、初心者にも扱いやすい。次に、HOTARU あるいは CNMF-E に必要なデータセットについて説明する (図 5C)。HOTARU を使用する場合、Fiji でマスクしたい部分を範囲選択した後に、Edit -> Selection -> Create Mask で作成する 8 bit tiff 形式のマスクファイル (mask.tiff) と $\Delta F/F$ 処理された (あるいはバンドパスフィルタ処理された) 16 bit あるいは 32 bit tiff 形式のデータファイル (data.tiff) を用意する (左)。HOTARU は血管の脈動等を事前にマスクすることができるため、不運にも観察視野の中心に脈動が見られるようなムービーを解析する場合に偽陽性を抑えるアドバンテージを有し、威力を発揮する。一方、CNMF-E はデータファイルのみを読み込むため、修正しきれなかったブレや脈動が見られるようなムービーに遭遇すると偽陽性を含みやすくなる。

11. HOTARU の使い方

竹川らが考案した細胞抽出プログラム HOTARU のインストール方法から使用方法まで説明する。HOTARU は CNMF-E のように完全有償の MATLAB ではなく (CNMF-E に必要なツールボックスを含めると 50 万円程度を要する)、Python 環境で

図5 取得したイメージングデータを細胞検出プログラムにかけるまで：(A) (Step 1) データ処理高速化のための準備。空間および時間のダウンサンプリング (Spatial and temporal down sampling), 取得したデータの時間的トリミング (Spatial and temporal trimming), および解析に不必要な部分の空間的トリミング (Spatial cropping) をそれぞれ行う。Spatial trimming する際は連結するムービーは全て同じピクセルサイズである必要がある。(Step 2) 適宜処理されたムービーを連結し (Concatenation), ブレ補正 (Motion correction) を行う。*Motion correction はブレ補正が最大限行われるまで繰り返す。(Step 3) ムービーの再分離とフィルター処理。連結したムービーを再度セッションごとに分割し、バックグラウンドノイズを除くためのガウシアンフィルタを用いたバンドパスフィルタ処理 (Bandpass filtering) を行い, (Step 4) セッションごとに全体平均をベース値 F とした平均輝度変化率 ($\Delta F/F$) のムービーを作成する ($\Delta F/F$ processing)。 (Step 5) $\Delta F/F$ ムービーを再連結し, tiff ファイル形式で保存する。(Step 6) 細胞検出プログラムを用いて, 各細胞の輝度変化を抽出する。実際に $\Delta F/F$ 処理したムービーを, Fiji を用いて最大値投影処理 (Maximum intensity projection : MIP) した画像 (パネル左) と HOTARU で検出された細胞のフットプリントファイルの MIP (パネル右) 比較。HOTARU は輝度変化の非常に小さな細胞も高感度に検出する。(B) HOTARU で検出された細胞 3 例のフットプリント (左), 細胞が実際に蛍光を発している $\Delta F/F$ ムービーのフレーム (右), 300 秒間の計測期間での輝度変化 (下) で表す。矢印はそれぞれの細胞の位置と蛍光が観察されたフレームをそれぞれ示す。(C) HOTARU あるいは CNMF-E に必要なデータセット。HOTARU は血管等の解析に不必要な部分を除外できる。HOTARU を使用する場合, 8 bit tiff 形式のマスクファイル (mask.tif) と $\Delta F/F$ 処理された (あるいはバンドパスフィルタ処理された) 16 bit あるいは 32 bit tiff 形式のデータファイル (data.tif) を用意する (左)。HOTARU は不要な部分がマスクされたムービーを解析する。CNMF-E はマスクファイルを読み込むことができないため, データファイルのみを解析する。

Usage for HOTARU in Windows PC

Step 1

↓ Install Anaconda and Microsoft VSCode.

Install Microsoft VSCode

Step 2

↓ Open Anaconda Prompt

↓ Create and activate conda environment

```
conda create -n winHOTARU python=3.7
conda activate winHOTARU
```

```
(base) C:\Users\%directory>conda activate winHOTARU
(winHOTARU) C:\Users\%directory>
```

↓ Install package

```
pip install hotaruk-2.1.0-py3-none-any.whl
```

Step 3

↓ Copy movie-file.tif and mask-file.tif.↓ Rename (movie-file.tif ⇒ data.tif, mask-file.tif ⇒ mask.tif).

Step 4

↓ Activate conda environment.

```
conda activate winHOTARU
```

↓ Run HOTARU.

```
hotaru
```

Analysis without mask-file

```
hotaru --mask mask.tif
```

Analysis with mask-file

```
hotaru --mask mask.tif --thr_peak_gl 0.4
```

Analysis with mask-file, and change of threshold

```
(winHOTARU) E:\demo>hotaru
[ 'avg_radius': 3.0, 'mask': 'full', 'duration': 1.0, 'bx': 0.2, 'ba
tau2': 0.18, 'opt_decay': 0.9, 'fac_eta': 0.7, 'from_step': 0, 'op
': 0.01, 'avg_firing': 0.1, 'fac_dist': 1.5, 'hz': 20.0, 'taul': 0.
s': 10000, 'max_iter': 100, 'thr_rel_gl': 0.05, 'tol': 1e-05, 'from
h_peak': 10, 'num_step': 5, 'thr_peak_gl': 0.8, 'bt': 0.2]
=== create tfrecord ===
2000 / 2000
0h 0m 1.10s
```

Analyze calcium.csv and footprint.tif files

When calculation finished... ↓

```
(winHOTARU) E:\demo>
```

図6 HOTARU の使い方: (Step 1) Anaconda 3 と Microsoft VSCode のインストール. (Step 2) Windows のスタートメニューから Anaconda Prompt を選択して実行し, winHOTARU (任意) と名付けた Python 3.7 の仮想環境 winHOTARU を構築・アクティベートする. 次に, HOTARU 実行に必要な各種パッケージをインストールする. (Step 3) E ドライブの demo フォルダ内に置いたムービーファイルとマスクファイルの名前を data.tif と mask.tif に変更する. (Step 4) コマンドラインから hotaru と入力すると, HOTARU が実行され, calcium.csv と footprint.tif ファイルが生成される. マスク処理をしたい場合, ピーク検出を調節するパラメータを変えたい場合は適宜パラメータを入力する.

Critical parameters to affect cell detection threshold in CNMF-E

図7 CNMF-Eにおける細胞検出の閾値に影響を与えるパラメータ：カラーマップで表示された、Correlation image (左)と Peak-to-Noise Ratio (PNR) (右)。パラメータ min_corr (矢印①)と min_pnr (矢印②)は、細胞として検出される最小値を定義している。

動作すること、また Windows, Mac および Linux いずれの OS でも利用できることから導入が容易である。Python 環境のインストールや仮想環境の構築には様々な手順があるが、Python 3.7 以上のどの環境においてもコマンドラインから pip コマンドを利用して HOTARU のパッケージ (.whl ファイル) をインストールすれば良い。以下、詳しく Windows における Anaconda で仮想環境を利用する場合を例に説明する (図 6)。はじめに Python の仮想環境を構築できる Anaconda の Python 3.7 version (<https://www.anaconda.com/distribution/>) を Windows にインストールする (Windows のバージョンが、64bit の場合、64bit 版をダウンロードする)。インストーラーを起動したら、設定等を特別変更せずにインストールを進め、インストール後半に出てくる Microsoft VSCode もインストールする (Step 1)。次に、Windows のスタートメニューから Anaconda Prompt を選択して、コマンドラインで HOTARU のパッケージ (.whl ファイル) が置かれたフォルダ/ディレクトリに移動後、図 6 中のコマンドを入力することで HOTARU を動作させるための仮想環境を構築し必要なパッケージをインストールする (Step 2)。

実際にムービーファイルとマスクファイルを用いて HOTARU による細胞抽出を行う手順に移る。解析用のフォルダ/ディレクトリにムービーファイルとマスクファイルをコピー後、data.tif と mask.tif に名前を変更する (解説では E ドライブの demo フォルダに data.tif と mask.tif を置いている) (Step 3)。続いて、Anaconda Prompt を開き、コマンドラインで data.tif と mask.tif が置かれたフォルダに移動する (本解説では C:\¥User¥directory にいる状態で、e: -> cd demo と入力すれば、E:\¥demo に移動できる)。あとは、作成した仮想環境に入りコマンドラインで hotaru と入力すると (hotaru --mask mask.tif と入力するとマスクされたムービーファイルを読み込む)、HOTARU が実行されて、ウィンドウ内に各種パラメータおよび計算過程が表示される (Step 4)。コマンドラインが入力可能な状態に戻っていたら計算が終了しており、ムービーファイルとマスクファイルを置いたフォルダ/ディレクトリに HOTARU が生成した各種ファイルが置かれる。本解説で用いた HOTARU のバージョンでは calcium.csv と footprint.tif が以降の解析に使用するデータとなる。

12. CNMF-E における重要なパラメータ

読者が MATLAB を使用できる環境にあり、いくつかの細胞抽出プログラムを比較して自身のデータに最もフィットするものを検討したい場合も想定されることから、CNMF-E において特に細胞検出の閾値に影響を与えるパラメータについて説明する (図 7). CNMF-E のデモコードを動作させると、データ読込後に全フレームを通じて事前に規定したニューロン形状との相関係数をもとに作成される correlation image (図 7 左) と規定したカルシウムインジケータのダイナミクスをもとに作成される Peak-to-Noise Ratio (PNR) (図 7 右) がカラーマップとして表示されるセクションがある. パラメータ min_corr (矢印①) と min_pnr (矢印②) は細胞として検出される最小値を設定するため、これらのパラメータより低い細胞は検出されなくなる. 双方のパラメータを大きな値に設定しておくことで、偽陽性を避けて細胞のみを抽出できるようにすることはできるものの、かなりの割合で蛍光シグナルの検出漏れが起きるため、あまり勧められない.

13. お わ り に

今回紹介した脳深部からの蛍光イメージング技術は、 Ca^{2+} イメージング以外の蛍光観察にも応用できる. 筆者らは、特定のイベントの記憶を獲得した細胞を KikGR という近紫外光で光変換できる蛍光タンパク質の緑色蛍光で nVista によって同定している. この際、イベントの直前に GRIN レンズから近紫外光を導入し、既に発現している KikGR の蛍光を nVista の検出できない赤色蛍光に変えておくことで、以前の記憶に対応して標識された細胞の混入を防ぐことができる¹⁵⁾. これは 1 つの例であるが、もしも本稿がきっかけとなり、日本発のユニークな脳深部イメージングの手法が発信されるならばうれしく思う.

謝辞

最後に、本稿の執筆にあたりご協力いただいた東京理科大学・佐野良威博士と株式会社ゴーフォトン、そして、筆者らが小型顕微鏡による脳深部イメージングを立ち上げるにあたりご支援いただいた、テキサス大学サウスウエスタン校・北村貴司博士と富山大学医学部生化学講座のメンバーにお礼を申し上げます.

参 考 文 献

1) Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K. (2001): A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a

single green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.*, Vol.19, pp.137–141.

2) Tian, L., et al. (2009): Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators, *Nat. Methods*, Vol.6, pp.875–881.

3) Barretto, R.P., et al. (2011): Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy, *Nat. Med.*, Vol.17, pp.223–228.

4) Ghosh, K.K., et al. (2011): Miniaturized integration of a fluorescence microscope, *Nat. Methods*, Vol.8, pp.871–878.

5) Ziv, Y., et al. (2013): Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes, *Nat. Neurosci.*, Vol.16, pp.264–266.

6) Cai, D.J., et al. (2016): A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time, *Nature*, Vol.534, pp.115–118.

7) Mukamel, E.A., Nimmerjahn, A., Schnitzer, M.J. (2009): Automated analysis of cellular signals from large-scale calcium imaging data, *Neuron*, Vol.63, pp.747–760.

8) Vogelstein, J.T., et al. (2010): Fast non-negative deconvolution for spike train inference from population calcium imaging, *J. Neurophysiol.*, Vol.104, pp.3691–3704.

9) Maruyama, R., et al. (2014): Detecting cells using non-negative matrix factorization on calcium imaging data, *Neural Netw.*, Vol.55, pp.11–19.

10) Pnevmatikakis, E.A., et al. (2016): Simultaneous denoising, deconvolution, and demixing of calcium imaging data, *Neuron*, Vol.89, pp.285–299.

11) Friedrich, J., Zhou, P., Paninski, L. (2017): Fast online deconvolution of calcium imaging data, *PLoS Comput. Biol.*, Vol.13, e1005423.

12) Takekawa, T., et al. (2018): Automatic sorting system for large calcium imaging data, *bioRxiv*, 215145; doi: <https://doi.org/10.1101/215145>.

13) Zhou, P., et al. (2018): Efficient and accurate extraction of in vivo calcium signals from microendoscopic video data, *eLife*, 7:e28728; DOI: 10.7554/eLife.28728.

14) Giovannucci, A., et al. (2019): CaImAn an open source tool for scalable calcium imaging data analysis, *eLife*, 8:e38173; DOI: 10.7554/eLife.38173.

15) Ghandour, K., et al. (2019): Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram, *Nat. Commun.*, Vol.10, p.2637.