

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19436

研究課題名（和文）内視鏡を用いた脳深部の新規3次元イメージング法

研究課題名（英文）Novel 3D imaging method for deep brain regions

研究代表者

林 勇一郎（HAYASHI, Yuichiro）

関西医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90378737

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：小動物の頭部に蛍光顕微鏡を装着してカルシウムイメージングにより神経活動を測定する方法は今日広く用いられるようになった。神経細胞は脳内で3次的に分布していることを考慮すると、3次元イメージングにより記録細胞数の増大、異なる層に位置する細胞の同時記録などが実現できる。本研究では、可変焦点レンズを用いて焦点面を高速に移動させ3次元画像を得る超小型顕微鏡を開発した。主要な部品はUCLA miniscopeと市販の光学部品を用い、本体は3Dプリンタにより制作した。試作顕微鏡の全重量は4g弱であり、自由行動するマウスの脳内1200×800×400マイクロメートルの領域を5Hzでイメージングできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の機能を調べるためには、脳を構成する神経細胞の活動測定が欠かせない。近年、神経活動を画像として計測する方法が急速に発展し、数百から数万におよぶ神経細胞の活動の同時計測が可能になりつつある。だが脳組織は透明度が低いため、脳の外部からでは脳表から数百マイクロメートル程度までしか観察できない。そこで脳深部の計測では脳に内視鏡を挿入してイメージングが行われる。しかし組織への侵襲性の観点から内視鏡の直径には制限があり、概ね0.5mm程度に制限される。そのため観察できる細胞数は数十個程度と少ない。本研究では、内視鏡の小さな視野から最大限の神経細胞を観察するために3次的にイメージングする方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Miniaturized fluorescence microscopes are becoming more important for deciphering neural codes underlying action, perception and memory. Considering the three-dimensional structure of neural circuits in the brain, volumetric imaging capability would increase the number of recorded neurons and enable simultaneous observation of multiple neuronal populations located in different depths. Here, I developed a head-mount miniaturized microscope for volumetric fluorescence imaging from mice. By introducing an electrically tunable lens for axial scanning, the device captures the fluorescence from a calcium sensor protein GCaMP6f within a volume of ~1200 x 800 x 400 micrometers at 5Hz from behaving mice. The overall weight of the microscope is under 4 grams. This easily constructed device with volumetric imaging capability enables large-scale and precise recording of ensemble neural activities from freely moving animals.

研究分野：神経生理学

キーワード：蛍光イメージング カルシウムイメージング 内視鏡

## 1. 研究開始当初の背景

行動中の動物の神経活動を1細胞分解能で観察する方法は、長らく微小電極による電気生理学的手法が唯一であった。だが2005年頃より、蛍光カルシウムイメージングにより一度に数百から数千個の神経細胞の活動を観察できるようになった。しかしこのような大規模なイメージングが行えるのは脳の表面近くだけであり、脳組織は透明度が低いため脳深部のイメージングは難しい。深部観察に適した2光子顕微鏡を用いても、脳表から1mm程度の深さが限界である。そのため、より深部の観察では脳に内視鏡を挿入してイメージングが行われる。だが内視鏡の直径が太いほど脳組織へのダメージは大きくなるため、観察範囲の広さと侵襲性の低さは両立しない。例えばマウスに適用する場合、脳深部に埋め込めるのは内視鏡の直径0.5mm程度が限界であり、その場合に記録可能な細胞数は数十個と少なくなってしまう。

## 2. 研究の目的

脳深部の内視鏡イメージングにおいて、低侵襲性を満たしながら観察できる細胞数を増やすため、3次元的にイメージングを行う方法を開発する。

## 3. 研究の方法

行動中の動物の脳から3次元的な蛍光イメージングを行うため、超小型の蛍光顕微鏡を開発した。超小型蛍光顕微鏡は、Schnitzerらによって開発(Ghosh, et al., 2011 Nat Meth 8 871)され、Inscopix社より市販されているnVista(www.inscopix.com)や、オープンソースの開発モデルをとるUCLA miniscope(miiniscop.org)が知られている。これらはどちらも2次元のイメージングを行う装置である。本研究では、安価かつ設計図が公開されているUCLA miniscopeを基にして3次元イメージング装置の開発を行った。3次元イメージングのために焦点面を高速移動させる方法として、液体レンズを光路に挿入して焦点距離を連続的に変化させた。

## 4. 研究成果

### 4.1 試作顕微鏡の構造

UCLA miniscope v3の主要な構成要素(イメージセンサー基板、データ取得基板、ソフトウェア)を流用し、筐体は3Dプリンタを用いて製作した(図1)。液体レンズ(Corning社Varioptic Lens)を対物レンズとダイクロイックミラーの間に挿入した。画像の取得と焦点移動を同期させるため、データ取得基板が出力する同期信号をもとに液体レンズの駆動用信号を発生させた(図2)。

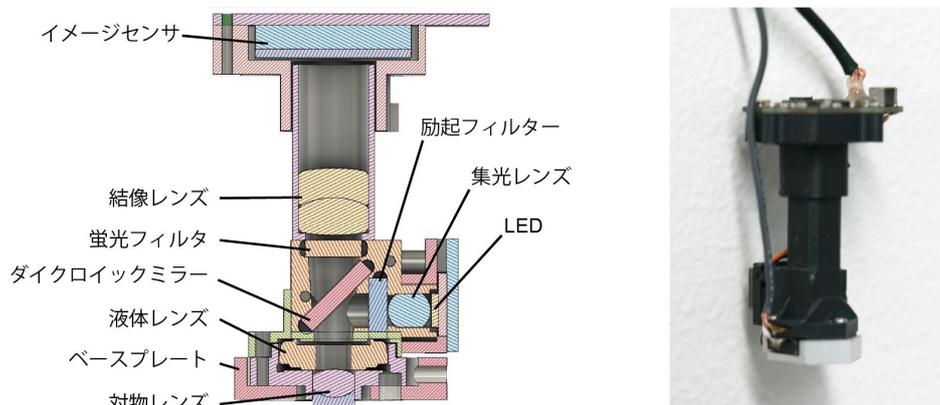


図1 試作顕微鏡の断面図(左)および外観(右)

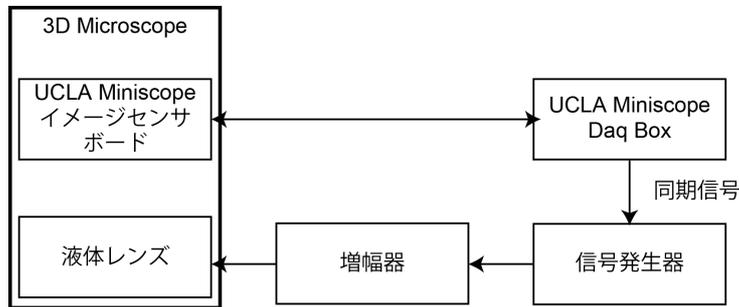


図2 試作顕微鏡の電気信号経路図

UCLA miniscope v3 の画像取得速度は最大 60Hz であるため、Z scan の速度を 5 Hz とし、Z 方向に 1 2 スライスの画像を取得している。最大 60Hz の制限を満たせば Z scan の速度を変更することもできる。

#### 4.2 試作顕微鏡の光学特性

Z 方向の走査範囲は対物レンズにより変わるが、焦点距離 4.5mm, NA0.3 のレンズを用いた場合約 700  $\mu\text{m}$  であった (図 3 A)。空間解像度は水平方向に 5.7  $\mu\text{m}$ 、軸方向は 18  $\mu\text{m}$  (いずれも FWHM) であり、多くの脳領域で 1 細胞分解能のイメージングが可能であると考えられた。

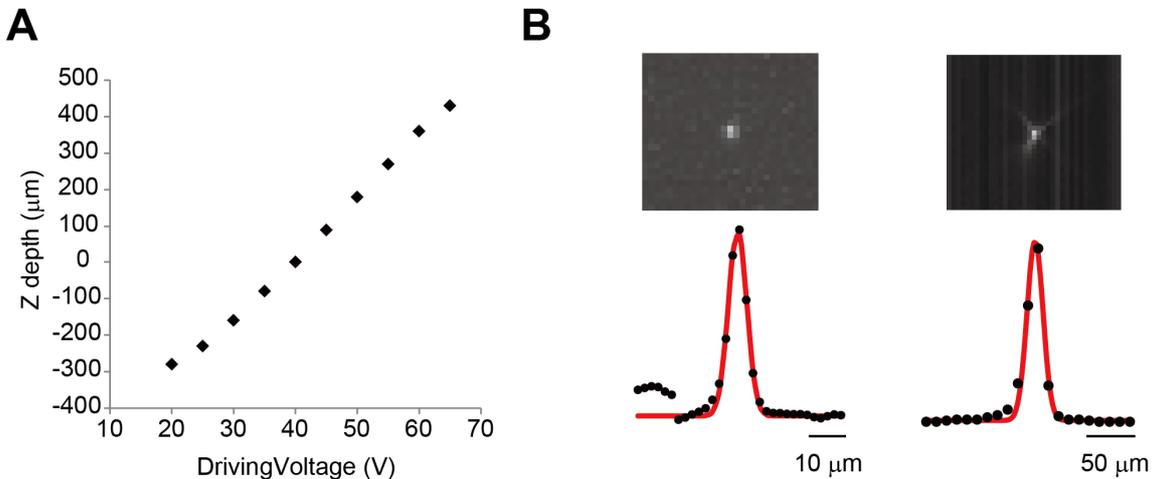


図3 試作顕微鏡の光学特性

A: 液体レンズへの印加電圧と焦点距離の関係。B: 点像分布関数。左は水平方向、右は軸方向を示す。

#### 4.3 試作顕微鏡によるカルシウムイメージング

試作顕微鏡を用いて、マウス海馬および前頭前皮質からカルシウムイメージングを行った。カルシウムセンサー蛋白質 GCaMP6f はアデノ随伴ウイルスベクター (AAV5-hSyn.GCaMP6f.WPRE, University of Pennsylvania vector core) を用いて発現させた。試作顕微鏡をマウスに装着し、自由行動させながらカルシウムイメージングを行った (図 4)。撮影された海馬 CA1 領域の 3 次元画像データから抽出したニューロンの形状を示す (図 5)。画像データからの神経活動抽出には主成分分析 (PCA) および独立成分分析 (ICA) を利用した Cellsort (Mukamel et al., 2009 Neuron 63 747) を改変して用いた。1.1  $\times$  0.7  $\times$  0.12 mm の領域から約 300 個の細胞を検出できた。また、前頭前皮質は直径 1 mm の GRIN レンズを介してイメージングを行った。こちらは約 0.6  $\times$  0.6  $\times$  0.2mm の領域から約 200 個の細胞を検出した。

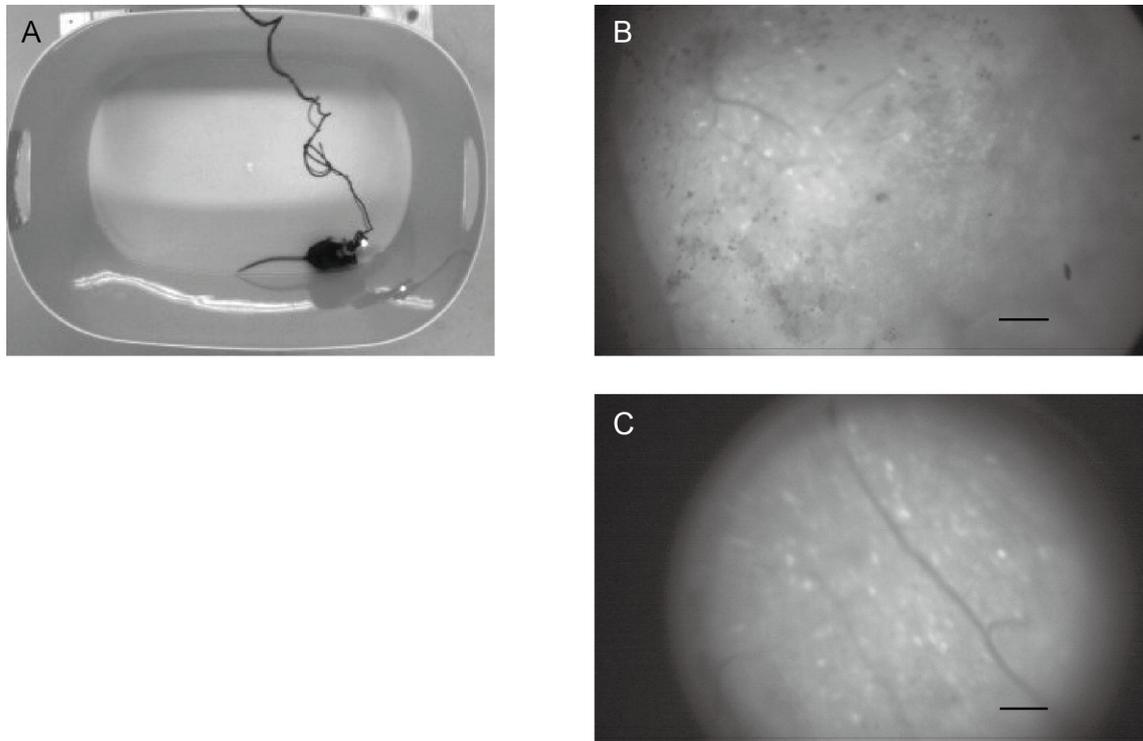


図4 自由行動状態でのマウス脳からのカルシウムイメージング。A: マウスの行動の様子。B: 海馬からのイメージング。C: 前頭前皮質からのイメージング。スケールバー 100 $\mu$ m。

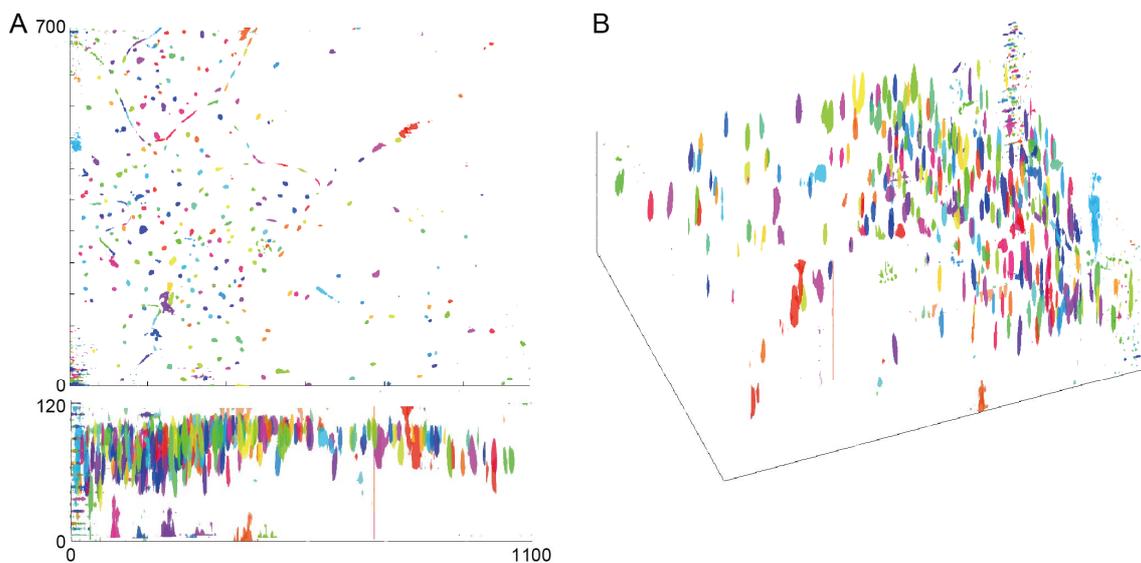


図5 海馬 CA1 領域からのカルシウムイメージング。Cellsort プログラムによりカルシウム活動が抽出された細胞を図示した。A: XY および XZ 平面図。B: 鳥瞰図を示す。

#### 4.4 結論

超小型顕微鏡による蛍光カルシウムイメージングを3次元化することによりいくつかのメリットが得られることを確認した。具体的には、

1. Z 方向に分布したニューロンを同時に検出できるので、1回のイメージングセッションによって記録できる細胞数が増加する。
2. 長期的な記録の際は焦点面が記録セッションごとにずれることがあるが、3次元イメージングでは多少ずれても記録範囲内に収まる。そのため長期記録の成功率が高まる。

一方、現状の試作顕微鏡の質量は約 4 g であり、マウスに搭載して行動させることはできるがより一層軽量化することが望ましい。現在 3D プリンタで製作している部品を、より高強度が望める樹脂切削部品に変更することで軽量化することができるだろう。また、現在神経活動の抽出には PCA/ICA を用いているが、抽出できる細胞数がより多いと言われる Constrained NMF を用いた神経活動抽出法 (Pnevmatikakis et al., Neuron 89 285) を今後検討する。

3次元イメージングを実現する別の方法として、ライトフィールドカメラを利用して自由行動するマウスからカルシウムイメージングを行った報告がある (Skocek et al., 2018 Nat Meth 15 429)。本研究で採用した方式と比較すると、ライトフィールドカメラは 1 回の撮影で 3次元画像を得るため高フレームレートが得られる。一方、マイクロレンズアレイの設計により各軸方向の解像度が決定されてしまい実験中に Z 軸方向の撮影範囲や分解能を変更することができない。また、3次元画像を直接撮影するのではなく計算により再構成するが、その計算量が多いため多大な計算機リソースと時間が必要になる。このように、ライトフィールドカメラと可変焦点レンズ方式は異なる特徴を持つので目的により使い分けられるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuichiro Hayashi	4. 巻 39
2. 論文標題 NMDA Receptor-Dependent Dynamics of Hippocampal Place Cell Ensembles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5173-5182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0243-19.2019">https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0243-19.2019</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林勇一郎
2. 発表標題 A head-mount 3D fluorescence microscope for mice
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林勇一郎
2. 発表標題 NMDA receptor-dependent dynamics of hippocampal place cell ensembles
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----