



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス中枢神経系回路の可視化を目指した新規レーザー蛍光顕微鏡法に関する研究
Author(s)	澤田, 和明
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第13729号
Issue Date	2019-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13729
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75860
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuaki_Sawada.pdf



平成 31 年度 博士論文

マウス中枢神経系回路の可視化を目指した
新規レーザー蛍光顕微鏡法に関する研究

Research on novel laser scanning fluorescence
microscopy for visualizing neurocircuit of
mouse central nervous system

北海道大学 大学院情報科学研究科
生命人間情報科学専攻
澤田 和明

要旨

うつ病は精神疾患の中でも有病率が人口の 5~8 パーセントと高く、発症後は Quality of life を著しく損なうことから、現代社会においては大きな問題となっている。その発症機序は複雑であり不明な点が多く残されているが、過剰な精神的ストレスが一因であると考えられている。神経科学において頻繁に使用される動物モデルであるマウスにおいて、過剰な精神的ストレスは脳内の神経細胞の樹状突起などを衰退させることが、近年、明らかになっている。例えば、うつ病の責任領域の一つである前頭前野領域の神経細胞では樹状突起の長さが短くなり、興奮性シナプスの数の減少や形態異常が生じることが報告された。この興奮性シナプスは樹状突起スパイン(以下、スパイン)と呼ばれる 100 nm~1 μ m の構造を有している。その形態やサイズは、シナプスの伝達効率との間に強い相関があり、シナプス可塑性の発現に伴い変化するとされている。シナプスの微細形態の観察には電子顕微鏡や蛍光顕微鏡が用いられるが、これまではその技術的・時間的制約から単一神経細胞全てのスパイン形態を詳細に解析することが困難であった。例えば、電子顕微鏡では固定した脳組織標本を用いるためスパイン形態の経時変化を追うことは不可能であり、また、単一細胞の網羅的な解析には膨大な時間を必要とする。一方で、蛍光顕微鏡で

は、初代培養スライス標本や単離細胞を用いた場合、単一のシナプス形態を経時変化的に観察することは行われてきたが、神経細胞全体の樹上突起やスパインを網羅的に可視化、解析することは困難であった。一方、蛍光顕微鏡を用いた固定脳スライス標本の観察の場合、特に 3 次元的な観察では散乱による蛍光シグナルや空間分解能の劣化のため標本内部でシナプス形態を可視化できないという問題があった。そこで本論文では、超解像顕微鏡法や 2 光子励起蛍光顕微鏡法(以下、2 光子顕微鏡法)を改善し、蛍光シグナルや空間分解能の劣化、観察深度の限界という問題点を克服することにより、蛍光顕微鏡を用いた固定脳標本や生体脳内の単一神経細胞上のシナプス形態の可視化を目指した。

本論文ではまず、単一神経細胞上のシナプスの微細形態を固定脳内で可視化するため、超解像顕微鏡法的一种である構造化照明顕微鏡法(SIM)に着目した。SIM はサンプルを縞状パターンで励起し、モアレ現象を活用した画像処理により、空間分解能として約 110 nm を達成すると報告されていた。しかし、固定脳スライス標本の内部ではこの縞状パターンが散乱により劣化し、観察は困難であった。そこで筆者は、固定標本における光の吸収や散乱を低減するために、新規透徹化剤 LUCID を用いた固定脳スライス標本の透徹化法を確立した。その結果、固定脳スライス標本において表面から深さ 60 μm までの領域

で空間分解能 160 nm を実現した。以上から筆者は、LUCID 透徹化法と SIM 法を組み合わせることによって、単一神経細胞の樹状突起の幹上のスパインを網羅的に超解像観察することを可能にした。

次に、うつ病モデルマウスの神経系回路の解析を目指し、長期薬剤投与を行ったモデルマウスの前頭前野領域においてスパイン形態の解析を実施した。この実験では、人工ストレスホルモンである Dexamethasone を 3 週間投与したのち固定脳スライス標本を作成し、単一神経細胞におけるスパインの形態解析を網羅的に実施した。その結果、共焦点顕微鏡では薬剤投与の有無によるスパイン形態の優位な差を示すことが出来なかったが、SIM ではスパイン形態が楕円形へ変化していることを検出することができた。以上から、スパイン形態の変化を記述するためには超解像顕微鏡法が有用であることが示された。

次に、筆者は単一神経細胞上のシナプス形態を生体脳内で可視化するため、2 光子顕微鏡法の改良を実施した。2 光子顕微鏡では通常、近赤外レーザー光を励起に用いることから、生体深部観察に優れている。しかし、その観察範囲は脳表から 1 mm までが限界であり、脳表から 1.5 mm 以上の場所に位置する前頭前野領域の神経細胞を観察することは困難であった。一方で先行研究より、励起レーザー光の条件を検討することにより観察の深部到達性が向上すること

がわかっていた。そこで本論文では高ピークパワー半導体レーザーを励起レーザーとして用いることにより、さらなる深部観察を目指した。この観察法を脳内の一部の神経細胞に EYFP を発現している遺伝子改変マウスの生体脳に適用したところ、皮質全層や海馬 CA1 領域、海馬歯状回の顆粒細胞を *in vivo* 観察することに世界で初めて成功した。さらに、この方法を前頭前野領域に適用した結果、深さ 1.8 mm に位置する神経細胞の観察を達成し、前頭前野 PreLimbic 領域の可視化に成功した。

以上より本論文では超解像顕微鏡法である SIM、及び 2 光子顕微鏡法の改良を行うことで固定・生体脳内のスパイン観察方法を改善した。SIM は汎用性の高い超解像顕微鏡法であるため、スパイン形態の観察のみならず、シナプス前終末の形態やシナプス内部に局在するタンパク質の可視化などに応用可能であると考えられる。加えて、本手法により長期薬剤投与モデルにおいて、既存の蛍光顕微鏡法では捉えられない微細なスパイン形態の異常を見出した。今後はうつ病や統合失調症モデル等のシナプス機能異常が認められる病態の解明に対して応用されることが期待される。また、本論文の 2 光子顕微鏡法の改良の成果では、1.6 mm を超えるマウス脳の深部イメージングを達成した。今回の研究によってレーザーの波長や出力、パルス幅が観察の深部到達性の向上に寄与

することがわかったことは、今後の2光子顕微鏡法によるマウス脳深部イメージングの分野において大きな貢献である。また、この技術は海馬領域や神経節基底核などにおける生体脳の機能的なコネクトームにおいて、神経活動を細胞レベル及び分子レベルで明らかにするための基礎技術になることが期待される。

第1章 序論

1-1 本論文の背景と目的

1-1-1 神経細胞間の情報伝達.....	1
1-1-2 興奮性シナプス.....	2
1-1-3 うつ病.....	2
1-1-4 うつ病の病態.....	3
1-1-5 超解像顕微鏡と構造化照明顕微鏡法.....	4
1-1-6 2光子励起蛍光顕微鏡法.....	5
1-1-7 本論文の目的.....	7

1-2 本論文の構成..... 8

参考文献.....	9
-----------	---

第2章 単一細胞における樹状突起スパインを網羅的に観察するための超解像顕微鏡法の開発

2-1 背景と目的

2-1-1 従来の興奮性シナプス観察法とその課題.....	12
2-1-2 脳組織透明化技術と高解像度顕微鏡法.....	12
2-1-3 超解像顕微鏡法とその課題.....	13
2-1-4 構造化照明顕微鏡法.....	14
2-1-5 本研究の目的.....	16

2-2 材料と方法

2-2-1	実験動物.....	17
2-2-2	観察標本の作製.....	18
2-2-3	透徹化溶液の調整と透明化.....	18
2-2-4	透過率の測定.....	19
2-2-5	顕微鏡観察.....	20
2-2-6	樹状突起スパインの形態解析.....	21
2-3	透徹化標本中の SIM 観察による研究結果	
2-3-1	LUCID 透徹化標本内における超解像顕微鏡法の空間分解能評価....	23
2-3-2	共焦点顕微鏡を用いた LUCID 透徹化標本内における集光特性の評価	28
2-3-3	SIM を用いた LUCID 透徹化標本内における空間分解能の評価.....	32
2-4	考察	
2-4-1	SIM の利点.....	39
2-4-2	LUCID の利点.....	40
2-4-3	SIM 法における空間分解能.....	41
2-4-4	今後の展望.....	43
2-5	本研究のまとめ.....	44
	参考文献.....	45

第 3 章 SIM 法を用いたうつ病モデルマウスの神経系回路の解析

3-1 背景と目的

3-1-1	うつ病モデルマウスと長期薬剤投与.....	49
-------	-----------------------	----

3-1-2	長期ストレスとマウス前頭前野	49
3-1-3	本研究の目的.....	50
3-2	材料と方法	
3-2-1	実験動物.....	51
3-2-2	長期薬剤投与と標本作成.....	51
3-2-3	行動実験.....	52
3-2-4	顕微鏡観察.....	53
3-2-5	スパインの形態解析.....	53
3-3	研究結果	
3-3-1	長期薬剤投与マウスの行動実験.....	54
3-3-2	長期薬剤投与マウスにおける樹状突起スパインの形態変化.....	55
3-4	考察	
3-4-1	SIM 法のメリットと今後の展望.....	58
3-4-2	樹状突起スパインの形態変化.....	59
3-5	本研究のまとめ.....	60
	参考文献.....	61

第 4 章 生体脳における前頭前野領域観察を目指した 2 光子顕微鏡法の開発

4-1 背景と目的

4-1-1	in vivo 2 光子顕微鏡法による生体脳観察とその課題.....	63
-------	------------------------------------	----

4-1-2	励起レーザーと2光子励起確率.....	63
4-1-3	2光子顕微鏡に用いる高感度型蛍光検出器.....	66
4-1-4	本研究の目的.....	67
4-2	材料と方法	
4-2-1	実験動物.....	68
4-2-2	海馬領域観察のためのオープンスカル法.....	68
4-2-3	前頭前野領域観察のためのオープンスカル法.....	70
4-2-4	半導体励起レーザー	70
4-2-5	顕微鏡観察.....	71
4-2-6	データ解析.....	72
4-3	研究結果	
4-3-1	半導体励起レーザーを用いた in vivo 2光子顕微鏡法の開発...	74
4-3-2	半導体励起レーザーを用いた in vivo 2光子顕微鏡法観察の深部 到達性の評価.....	75
4-4	考察	
4-4-1	観察の深部到達性向上の理由.....	81
4-4-2	ピコ秒パルスレーザーによるバイオイメーキング.....	82
4-4-3	高ピークパワーレーザーを用いることによる生体へのダメージ.	84
4-4-4	成体マウスにおける歯状回観察.....	84
4-4-5	海馬 CA1 細胞の樹状突起スパイン観察.....	85

4-4-6 前頭前野領域の樹状突起スパイン観察.....	86
4-4-7 今後の展望.....	87
4-5 本研究のまとめ.....	88
参考文献.....	89
第5章 結論と考察、将来展望.....	91
参考文献.....	97
謝辞.....	98
研究業績.....	100

第1章 序論

1-1 本論文の背景と目的

1-1-1 神経細胞間の情報伝達

脳は前頭前野や海馬のような様々な領域が相互作用を行っている。このような脳内の神経回路網を包括的に理解するための試みはコネクトミクスと呼ばれている(DeFelipe, 2010)。この分野では領域間の相互作用を明らかにするため、複雑な神経細胞同士のつながりを網羅的に解析することが求められている。このようなコネクトームの解析は、解像度の観点から、電子顕微鏡レベル、光学顕微鏡レベル、非侵襲で観察される脳の構造や活動を観察するレベルの三つのレベルで行われている。その中でも光学顕微鏡レベルでは特に、どの神経細胞同士がシナプスで結合しているか、シナプスが細胞体や樹状突起のどの部分に存在しているかなど、神経細胞同士の結合性が着目される（図1－1）。

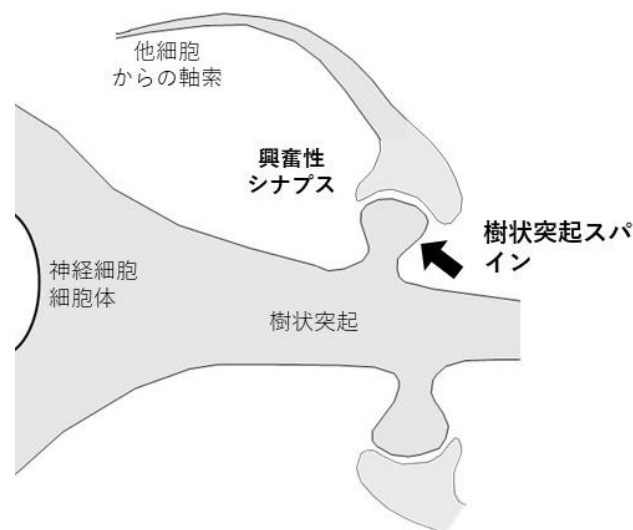


図1－1 ニューロンと興奮性シナプス

1-1-2 興奮性シナプス

シナプスは、神経情報を出力する側と入力する側の間に発達した、情報伝達のための接触構造である。その中でも興奮性のシナプスは樹状突起スパインと呼ばれる100 nm～1 μmの構造を持っている。樹状突起スパインの形態やサイズは、シナプスの伝達効率との間に強い相関があり、シナプス可塑性の発現に伴い変化するとされている (Collin *et al.*, 1997; Harris & Shepherd, 2015; Shigematsu *et al.*, 2016)。また、このスパインの形態は可塑性の発現と同期して変化することから、記憶の獲得や形成・維持に代表される神経回路機能に重要な役割を担っていると考えられている (Nusser *et al.*, 1998; Matsuzaki *et al.*, 2001; Tønnesen *et al.*, 2014) (図 1 - 1)。

1-1-3 うつ病

うつ病は精神疾患の中でも有病率が人口の5～8 パーセントと高く、発症後は Quality of lifeを著しく損なうことから、現代社会においては大きな問題となっている。その発症機序は複雑であり不明な点が多く残されているが、過剰な精神的ストレスが一因であると考えられている。研究や治療の対象であるうつ病は大うつ病 (Major depressive disorder) と呼ばれており、そのクライテリアは Diagnostic and Statistical Manual (DSM)によって定められている。最新版である DSM-Vに記述されているクライテリアを以下に示す (Bentley *et al.*, 2014)。

- A. 以下の選択肢のうち、5つ以上を2週間経験している（少なくとも抑うつ状態か無快楽症を併発している）
- B. 社会的、職業的に苦痛を感じ、機能障害を引き起こしている
- C. 以下のエピソードは、他の症状や生理的条件に寄らない
1. 一日のほぼ全てにおいて抑うつ気分を感じる（悲壮感、空虚感、絶望等）
 2. 毎日の全ての行動における興味と喜びの喪失（無快楽症）
 3. 食欲や体重の異常な増加や減少
 4. ほぼ毎日の不眠症または過眠症
 5. 精神的な興奮や精神遅滞
 6. 疲労やエネルギーの損失
 7. 無価値観や過度の罪悪感
 8. 思考力や集中力、決定能力の欠如

1-1-4 うつ病の病態

うつ病の病態は脳領域の縮小や、神経回路の機能的な低下などの症状が混ざった複雑なものである。うつ病患者では高コルチゾール血症が高率に存在しており、この高コルチゾールが海馬神経を傷害する可能性が報告されている(Gould *et al.*, 1997)。また、この高コルチゾールを原因とした海馬の萎縮が相次いで報告されることから(Sheline, 1996; Sheline *et al.*, 1996)、神経細胞の障害仮説が提

唱されている。一方で、機能的MRIを用いた研究ではうつ病患者の左前頭前野のブロードマン46野の活動低下が認められており (Okada *et al.*, 2003)、前頭前野の神経活動が減弱していることが示されている。また、マウスにおけるストレスモデルの研究により、海馬と前頭前野領域の脳由来神経栄養因子（以下、BDNF）の産生減弱が認められており、これは抗うつ薬の長期投与によって回復することが報告されている (Duman, 2004)。BDNFは神経突起の伸長・維持に重要な役割を果たす分子であるため、うつ病により神経栄養因子の産生減弱が生じ、それにより神経機能の低下や神経形態の萎縮が起きていると考えられる。また、抗うつ治療はBDNFの産生減弱を回復させるため、神経突起の伸長・維持を増強すると考えられる。以上から、うつ病では神経可塑的な変化が生じているという神経可塑性仮説が提唱されている。

1-1-5 超解像顕微鏡と構造化照明顕微鏡法

通常の蛍光顕微鏡では1つの蛍光物質は点像分布関数としてしか解像できず、2つ以上の蛍光物質が数百nm以内の距離に存在している場合、これらの蛍光物質の像は重なってしまっていて分解能に制限が生じる。超解像顕微鏡とは、従来の蛍光顕微鏡が持つ分解能の限界を超えた性能を発揮する光学的手法全てを指す。超解像顕微鏡法は理論的に数十~百数十nmの空間分解能を有しており、生体サンプルに適用することが可能であるため、生きた脳内のシナプス構造やタンパク質の局在などを見ることを期待されている。

構造化照明顕微鏡法は超解像顕微鏡法の1種である。ある特定の濃淡パターンで照明することを「構造化照明」と呼び、標本の微細構造の上にストライプ状の照明パターンを重ねると、モアレ縞と呼ばれる濃淡が出現する(図1-2)。モアレ縞は、本来であれば対物レンズ外へ発散してしまうサンプル微細構造の高周波成分と照明パターンの低周波成分が組み合わさることで発生する。そのため、モアレ縞には回折限界を超える細かい標本の情報も変調されて含まれており、モアレ縞と照明パターンの低周波成分から微細構造の高周波成分を算出することができる。構造化照明のパターンを変えて複数回撮影を行った後、フーリエ変換された周波数空間上で計算処理を行い、その後逆フーリエ変換を行うことで高解像度成分を算出する。

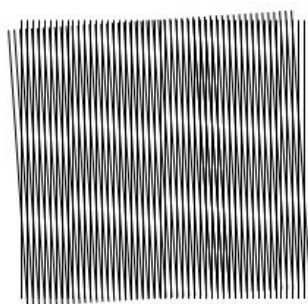


図1-2 モアレ縞

1-1-6 2光子励起蛍光顕微鏡法

2光子顕微鏡は共焦点顕微鏡に比べて優れた観察深度があり光褪色が少ないため、神経細胞の*in vivo* イメージングに広く用いられている。このような2光子の優れた観察深度や高い空間分解能という性質は、近赤外の励起光や蛍光を

集める光学系によるものである。加えて、2光子顕微鏡は光毒性が少ないことから、カルシウムイメージングなどの長時間の照明を必要とする実験に用いられてきた。これらの利点は、蛍光物質の2光子励起過程によるものであり、生体脳における長期の*in vivo* イメージングには理想的である。

共焦点顕微鏡における1光子励起過程では、蛍光体の軌道電子を励起して電子的な励起状態へ移行させるため、高いエネルギーの光子を吸収することが必要になる（図1－3）。この励起された電子が振動緩和したあと、励起した光子とは違う波長の光の光子が蛍光として放出される。2光子励起過程は二つの光子がほぼ同時に吸収されることによってこのプロセスを達成したものである。この2光子励起過程は極めて実現される確率の低い過程であるため、多くの場合、高出力のフェムト秒パルスレーザーが用いられる。2光子励起蛍光顕微鏡は2光子励起過程において発生する蛍光の強度を測定して画像を構築する顕微鏡である。

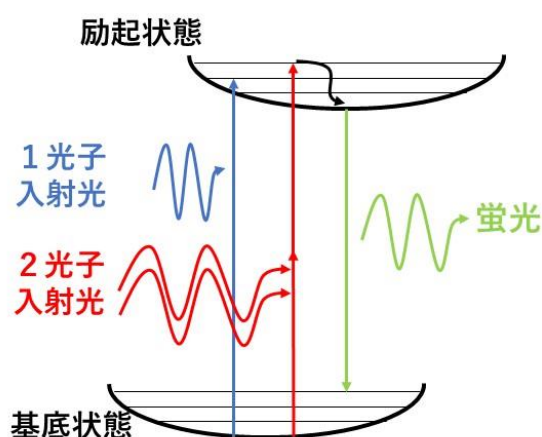


図1－3 1光子励起過程（青）と2光子励起過程（赤）

1-1-8 本論文の目的

本論文では、超解像顕微鏡法や2光子励起蛍光顕微鏡法(以下、2光子顕微鏡法)を改善し、蛍光シグナルや空間分解能の劣化、観察深度の限界という問題点を克服することにより、蛍光顕微鏡を用いた固定脳標本や生体脳内の単一神経細胞上のシナプス形態の可視化を目指した。

1-2 本論文の構成

「第1章 序論」では、本論文における研究全体の背景・目的および構成について記述した。そして、「第2章 単一神経細胞上のシナプスの微細形態を可視化するための超解像顕微鏡法の開発」では、組織透明化試薬を用いることで、固定したマウスの脳組織の透過率と屈折率を上昇させ、固定脳の深部の神経細胞をSIMで観察するための手法を確立したことについて述べる。また、「第3章 SIM法を用いたうつ病モデルマウスの神経系回路の解析」では、第2章で確立した観察手法を用いて、長期薬剤投与を行ったマウスにおける前頭前野領域のスパイン形態を解析した結果を記述する。さらに、「第4章 前頭前野領域観察を目指した*in vivo* 2光子顕微鏡法の開発」では、2光子顕微鏡に新規半導体励起レーザーを組み込むことで、焦点における2光子励起確率を上昇させ、2光子観察における深部到達性を向上させたことについて述べる。そして最後に、「第5章 結論と今後の展望」では、本論文における研究全体の結論と今後の展望を述べる。

参考文献

- Banasr, M., Dwyer, J. & Duman, R. (2011) Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Current Opinion in Cell Biology*, **23**, 730-737.
- Bentley, S.M., Pagalilauan, G.L. & Simpson, S.A. (2014) Major depression. *Med Clin North Am*, **98**, 981-1005.
- Cerqueira, J., Taipa, R., Uylings, H., Almeida, O. & Sousa, N. (2007) Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cerebral Cortex*, **17**, 1998-2006.
- Collin, C., Miyaguchi, K. & Segal, M. (1997) Dendritic spine density and LTP induction in cultured hippocampal slices. *J Neurophysiol*, **77**, 1614-1623.
- DeFelipe, J. (2010) From the connectome to the synaptome: an epic love story. *Science*, **330**, 1198-1201.
- Duman, C. & Duman, R. (2015) Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience Letters*, **601**, 20-29.
- Duman, R.S. (2004) Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*, **56**, 140-145.

- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A. & Fuchs, E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, **17**, 2492-2498.
- Harris, K.D. & Shepherd, G.M. (2015) The neocortical circuit: themes and variations. *Nat Neurosci*, **18**, 170-181.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M. & Kasai, H. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, **4**, 1086-1092.
- Nusser, Z., Lujan, R., Laube, G., Roberts, J.D., Molnar, E. & Somogyi, P. (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron*, **21**, 545-559.
- Okada, G., Okamoto, Y., Morinobu, S., Yamawaki, S. & Yokota, N. (2003) Attenuated left prefrontal activation during a verbal fluency task in patients with depression. *Neuropsychobiology*, **47**, 21-26.
- Sheline, Y.I. (1996) Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol Psychiatry*, **1**, 298-299.
- Sheline, Y.I., Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G. & Vannier, M.W. (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

93, 3908-3913.

Shigematsu, N., Ueta, Y., Mohamed, A.A., Hatada, S., Fukuda, T., Kubota, Y. & Kawaguchi, Y. (2016) Selective Thalamic Innervation of Rat Frontal Cortical Neurons. *Cereb Cortex*, **26**, 2689-2704.

Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B. & Nägerl, U.V. (2014) Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat Neurosci*, **17**, 678-685.

第2章 単一神経細胞上のシナプスの微細形態を可視化するための超解像顕微鏡法の開発

2-1 背景と目的

2-1-1 従来の興奮性シナプス観察法とその課題

興奮性シナプスにおける樹状突起スパインの形態は大きさが100 nm～数 μm 程度の非常に小さい構造であり、その形態解析は一般的に電子顕微鏡や光学顕微鏡によって行われてきている(Arellano *et al.*, 2007)。電子顕微鏡は高い空間分解能を得ることができるが、観察と解析に膨大な時間を必要とするため、単一神経細胞全てのスパインの形態や分布様式を明らかにすることが困難である。一方で、光学顕微鏡では電子顕微鏡と比べると非常に短い時間で単一の神経細胞をトレースし可視化することができるが(Kasthuri & Lichtman, 2003; Livet *et al.*, 2007; Lichtman *et al.*, 2008)、回折限界によって分解能が200 nm程に制限されるため、樹状突起スパインの詳細な形態を可視化することはできない(Conchello *et al.*, 1994)。

2-1-2 脳組織透明化技術と高解像度顕微鏡法

細胞や組織の微細な形状を3次元的に観察するための蛍光イメージング技術

が広く開発されてきていた。ScaleやSeeDBに代表される組織の透徹化法はその一つであり、生体組織内の屈折率差を低減することで光散乱を減少させることに成功していた(Hama *et al.*, 2011; Aoyagi *et al.*, 2015; Hama *et al.*, 2015; Richardson & Lichtman, 2015; Ke *et al.*, 2016)。加えて、所属する研究室の先行研究では2,2'-チオジエタノール(以下、TDE)を含んだ溶液を用いると短時間でマウス固定脳を透徹化できることを示していた(Aoyagi *et al.*, 2015)。また、この透徹化剤を用いて脳スライス標本の屈折率を調整することで集光特性を改善し、固定脳内でも共焦点顕微鏡を用いた高解像度な形態観察が可能であることが証明されていたが、スパイン形態を精細に可視化することはできなかった。また、TDEの発展型であり、溶液の屈折率がよりガラスに近いLUCIDという透徹化溶液が開発されていた(Onodera, 2014; Mizutani *et al.*, 2018)。

2-1-3 超解像顕微鏡法とその課題

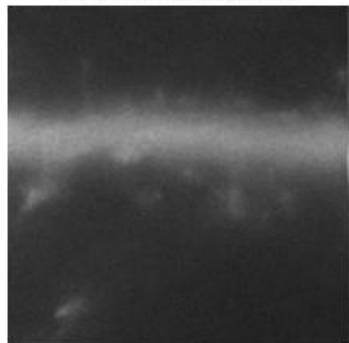
光学顕微鏡を用いた樹状突起スパイン観察における空間分解能の問題は、超解像顕微鏡を用いることによって解決できると考えられる。超解像顕微鏡はSTEDやPALM, SIMを代表とした光学限界を超えた分解能を持つ顕微鏡であり、主に培養細胞等に対して応用されてきた(Urban *et al.*, 2011; Lakadamyali *et al.*,

2012; Tønnesen & Nägerl, 2013)。しかし、これらの顕微鏡はいずれも正確な集光特性を必要とするため、高散乱体である固定脳への応用は難しかった。また、STEDやPALMは使用できる蛍光物質に制限があるため、既に作成されているサンプルに対しての応用が難しかった。

2-1-4 構造化照明顕微鏡法

構造化照明顕微鏡法(以下、SIM)は超解像顕微鏡法の一種であり、構造化照明のみを必要とすることから、蛍光物質の選択が容易である(Neil *et al.*, 1997; Gustafsson, 2000)。SIMではストライプ状照明より生じるモアレ縞を取得し、その観察像から高周波数成分を算出することで超解像を実現する(XY分解能が約115 nm)。しかし、SIMはモアレ縞からの復元過程にPC上での画像処理を用いるため、バックグラウンドノイズや輝度の低い構造から様々なアーティファクトが生じて虚像を作りやすい(図2-1)。高散乱体である固定脳内観察では励起光の集光が悪くなるため虚像を作りやすく、正確な観察が困難であると考えられる(Gibson & Lanni, 1991; Sheppard *et al.*, 1994; Kim & Wilson, 2011)。この問題点は、標本の透徹化法を用いて光透過性を向上させることで解決できると考えられる。

広視野
蛍光顕微鏡



SIM

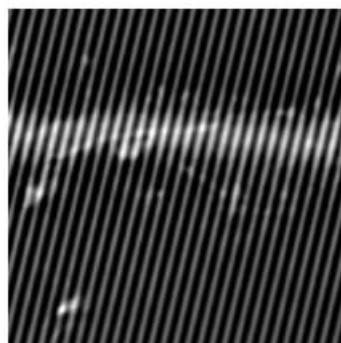


図 2 - 1 SIM 観察における虚像の例

(左)広視野顕微鏡における正常な像 (右)SIM における縦縞の虚像

2-1-5 本研究の目的

SIM と標本の透徹化法を組み合わせることによる、固定脳中の樹状突起スパインにおける超解像イメージング手法を確立することを目的とする。

2-2 材料と方法

2-2-1 実験動物

PBSまたはTDE60%溶液、LUCID溶液に浸漬した後の固定脳スライス標本の透過率の測定には、野生型成体マウス（C57BL/6）を使用した。また、樹状突起スパインの形態評価には、大脳皮質第V層と海馬の一部の神経細胞に蛍光タンパク質EYFP（最大励起波長513 nm /最大蛍光波長527 nm）を発現する成体のトランスジェニックマウス（Thy1-EYFP-Hマウス）（Feng *et al.*, 2000）を使用した。これらのマウスは、北大・人獣共通感染症センターのSPF環境の飼育室で繁殖・維持・管理された。

尚、本研究は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」と「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づき、承認を受けた遺伝子組換え実験室（承認番号第 21(57)号、第 22(48)号）及び動物実験室（承認番号第 21(25)号、第 22(12)号）において、遺伝子組換え実験計画（承認番号第 22(50)号）及びマウスを用いた動物実験の計画（承認番号 14-0127）に従って実験を実施した。

2-2-2 観察標本の作製

観察標本として、化学固定した固定脳スライス標本を使用した。固定脳スライス標本を作製するために、4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (以下、4%PFA in PBS) + 0.1% Gultalaldehyde溶液によって心臓灌流固定を行った後、ビブラトーム (7000smz; Campden Instruments Ltd, Leicestershire, UK) を用いて、冠状方向の脳スライス標本 (厚さ100 μm) を作製した。その後、作製した脳スライス標本を4% PFA in PBSに浸漬することで後固定した。

2-2-3 透徹化溶液の調整と透明化

2-1-3の項で記述したように、以下に、各種透徹化溶液を10mlずつ調製する場合を例とした具体的な分量を示す：

60%TDE (6 mlTDE, 1ml10 $\times$ PBS, 3 mlmilliQ)

LUCID前液 (2 mlTDE, 8ml30%スクロース)

LUCID後液 (5 mlTDE, 0.5 mlグリセロール, 4.5mlイオメプロール)

60%TDEの場合は、調整した60%TDE溶液に脳標本を浸漬することで、脳組織

の透明化を行った。LUCIDの場合は、前液に 3 時間浸漬したあと、後液に3時間浸漬することで透明化を行った。

2-2-4 透過率の測定

PBS または TDE60%溶液、LUCID 溶液に浸漬した後の固定脳スライス標本における透過率を測定するため、分光光度計 (U-2900; HITACHI, Tokyo, Japan) を使用した。脳の領域により透過率に違いがある可能性を考慮し、本研究では大脳皮質前頭前野領域を測定の対象とした。本研究で用いた分光光度計の光の縦幅は 8 mm であり、それは作製した固定脳スライス標本の前頭前野領域よりも大きかった。前頭前野領域以外を通過した光が検出器に届くことを防ぐため、1.2 mm の縦幅の穴を開けた厚紙を作製し、分光光度計内の光源と検出器の間に置いて、前頭前野領域の透過率を測定した。本研究では、PBS または各種 TDE 溶液に浸漬後の 3 枚の固定脳スライス標本を、それぞれ 3 回ずつ測定して平均の値を求めた。

2-2-5 顕微鏡観察

2-3-1 の項において脳の透明度を評価する際には、実体顕微鏡 (SZ61 / SZ2-ILST; Olympus, Tokyo, Japan) とカメラ (DP21; Olympus) を使用した。

また、2-3-1の項における電子顕微鏡観察では、微細構造に対するLUCIDやTDE 60%処理の効果を調べた。その際、透明スライスを0.1%四酸化オスミウム中で処理したのちに脱水し、次いでDurcupan樹脂 (ACM; Flkawa, Buchs, スイス) 中に包埋し、その後、皮質および線条体領域の対応する小さな部分 (0.5~1.0 mm) をトリミングした。70 nmの厚さの固定脳切片をPioloformでコーティングしたシングルスロットグリッド上に集め、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で2重染色を行い、Tecnai 12電子顕微鏡 (FEI, Hillsboro, OR) で観察した。

顕微鏡観察によって蛍光ビーズ及び神経細胞を観察する際には、共焦点レーザー顕微鏡 (A1R; Nikon, Tokyo, Japan) 及びSIM (N-SIM; Nikon, Tokyo, Japan)を使用した。その際、ガラスボトムディッシュ (No. 1S, Matsunami, Osaka Japan) に固定脳標本を貼り付けた状態で観察した。対物レンズとして、CFI アポクロマート TIRF 60XC Oil (numerical aperture [NA]: 1.49, working distance [WD]: 0.12 mm; Nikon) とCFI SR HP アポクロマート TIRF 100XC Oil (NA: 1.49, WD: 0.12 mm; Nikon)を用いた。本研究では、対物レンズの補正環位置を、観察対象の深さに合わせて適時調整した。励起波長は、共焦点レーザー顕微鏡

と構造化照明顕微鏡の共に 488 nm を使用した。

2-2-6 樹状突起スパインの形態解析

スパイン形態の典型的な分類 (Yuste & Bonhoeffer, 2004; 図 S1a) では、樹状突起スパインの形態は stubby、mushroom、thin、filopodia の四つに分けられる。stubby と mushroom は、thin や filopodia とは対照的に、形態が安定していてスパインヘッドが大きく、そのためシナプス後受容体の数が多い。この典型的な分類はシナプスの情報伝達強度の指標として用いられているが、大脳皮質のスパイン形態は多様であるため、この分類は大脳皮質における形態学的分析には適していなかった。一方で、他の一般的な解析手法ではスパインの大きさを分析の対象とし、大きさを体積や蛍光強度で表していた。しかしながら、本実験で用いた SIM 画像の蛍光強度は PC 上の計算によって得られること、また、SIM 画像の軸方向半値全幅 (以下、FWHM) が大きいことから、蛍光強度と体積による表現は SIM 画像には適していなかった。したがって、スパイン形態が stubby や mushroom と、thin や filopodia のどちらかであることを区別するために、スパイン形態を楕円形として表現した。この際、得られた SIM 画像の最大値投影像におけるスパインヘッドの長軸と短軸の蛍光輝度を測定し、得られ

た曲線をガウスフィッティングすることで FWHM を取得した。その後、短軸の FWHM を長軸の FWHM で割り算した値を、スパインヘッドの形態が真円からどの程度離れているかの指標”丸さ値”とした（図 2－2）。また、この際、楕円形よりも丸い形態の方がシナプス後受容体の数が多いため、丸い形態の方が情報伝達強度が高いと解釈する。スパインヘッドの解析の為、長軸と短軸の蛍光輝度をラインプロファイル（Nis Elements ver.4.13）にて取得し、その蛍光輝度から Gauss fitting を行って FWHM を得た（Origin Pro 9.0J）。得られた FWHM を長軸と短軸のそれぞれの長さとした。

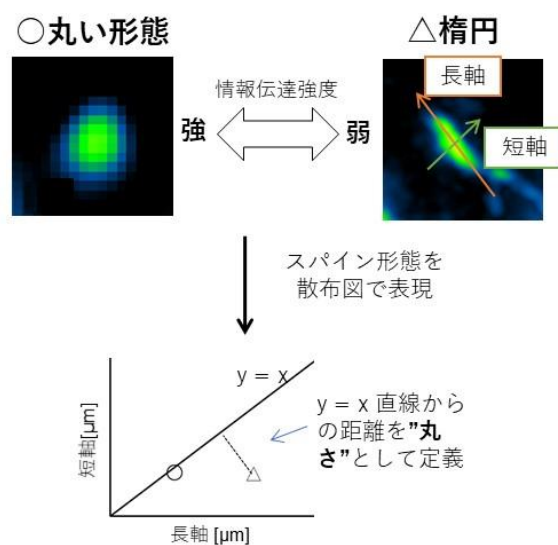


図 2－2 スパインヘッドの解析手法

2-3 透徹化標本中のSIM観察による研究結果

2-3-1 LUCID透徹化標本内における超解像顕微鏡法の空間分解能評価

透徹化溶液への浸漬による脳組織の透明度の変化を調べるため、固定した脳スライス標本（厚さ400 μm ）を各種溶液（PBS, TDE 60%, LUCID）に浸漬し、その後スライス標本に対して顕微鏡観察による画像取得を行った。この際、PBSとTDE60%の場合は6時間、LUCIDの場合は前液に3時間、後液に3時間、固定脳スライスを浸漬した。透過顕微鏡で観察した画像を比較した結果、固定脳スライスにTDE 60%またはLUCID処理をした場合は、PBS処理と比較して、背景の文字列が視認できる程、固定脳スライスの透明度は著しく上昇した（図 2-3, a）。蛍光顕微鏡下で観察した画像を比較すると、PBS処理の場合ではH-line脳スライス中のEYFP発現細胞がぼやけて観察されていることに対し、TDE60%またはLUCID処理の場合は樹状突起が識別できるほど鮮明に観察することができ、また、TDE 60%またはLUCID処理の場合はEYFPの背景光ノイズが低減していた（図 2-3, b, c）。

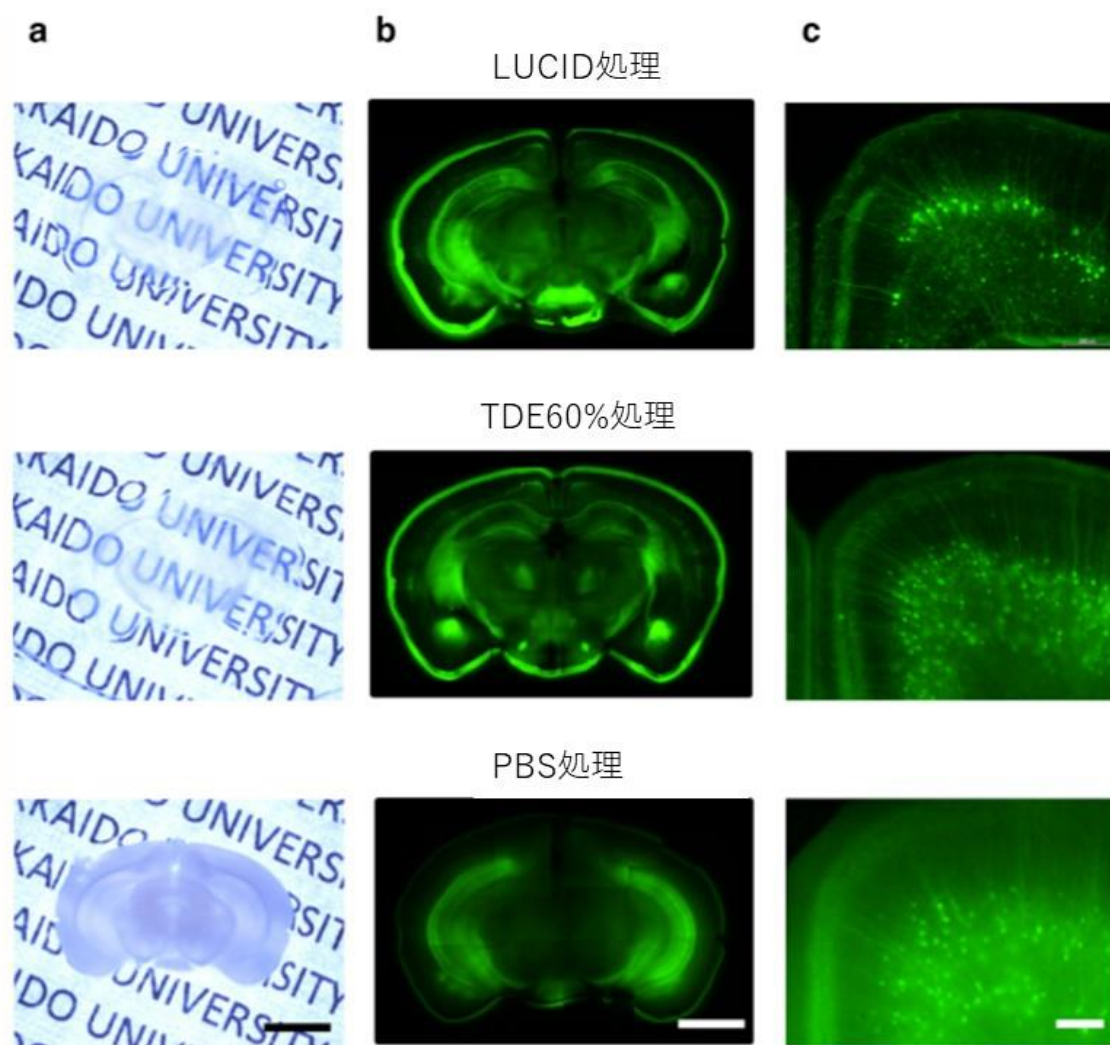


図2-3 TDE60%及びLUCID浸漬における固定脳スライス標本

(a) 透過顕微鏡を用いた画像 (b, c) 蛍光顕微鏡を用いた画像

a, bのスケールバーは2 mm、cのスケールバーは2 μ m

固定脳スライスをTDE60%およびLUCID溶液に浸漬したことによる脳組織の透明度の変化を定量的に調べるため、PBS および TDE 60%, LUCID処理を行った固定脳スライス標本の透過率を計測した。その結果、PBS に浸漬した固定脳スライス標本は、計測に用いた全波長域（400–1000 nm）において 10% 以下の透過率しか示さなかったのに対し、TDE 60%およびLUCID溶液に浸漬した脳スライスでは、全波長域において透過率が上昇していた。EYFPの励起波長である488 nmではLUCIDとTDE60%、PBS処理スライスの透過率は $63.25 \pm 0.37 \%$ と $49.45 \pm 1.30 \%$ 、 $0.95 \pm 0.07 \%$ ($n = 3$, SEM)であった。また、EYFPの最大蛍光波長である527 nmでは、それぞれ $67.51 \pm 0.25 \%$ 、 $54.25 \pm 1.28 \%$ 、 $0.98 \pm 0.06 \%$ ($n = 3$, SEM)であった。以上から、LUCID処理ではTDE60%処理よりも透過率が高いことがわかった（図2－4）。

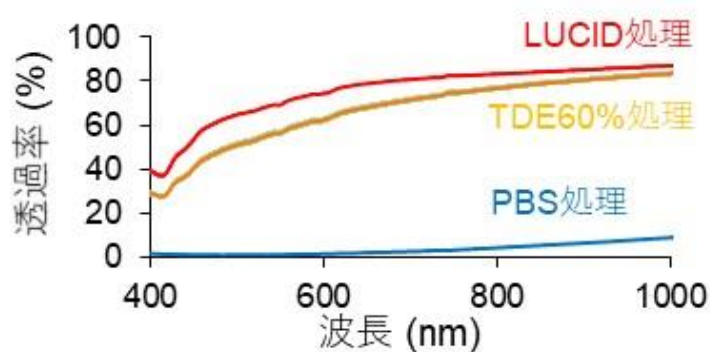


図2－4 TDE60%及びLUCID処理を行った脳スライスの透過率

LUCIDに含まれているTDEの両親媒性が細胞膜を含む脂質を取り除いてしまう可能性があるため、LUCID処理は細胞の微細構造を破壊してしまうことが考えられる。そのため次は、LUCID処理とTDE60%処理が固定脳スライス中の細胞膜構造を保持するかどうかを調べた。固定脳内の微細構造におけるLUCIDの影響を調べるため、透徹化した固定脳スライスをPBSで洗い、電子顕微鏡で観察を行った。その結果、固定脳大脳皮質内において興奮性シナプスの後シナプス構造中の連続した細胞膜やシナプス小胞を観察することができた(図2-5)。従って、細胞膜シナプス内の微細構造は保持されており、神経細胞内のオルガネラを観察することが可能であることがわかった。この結果は、線条体内の観察でも同様であった(図2-6)。これらの結果より、LUCID溶液へ固定脳標本を浸漬することにより、細胞膜や微細組織を壊すことなく、標本の透過率を迅速に向上させることが可能であることがわかった。

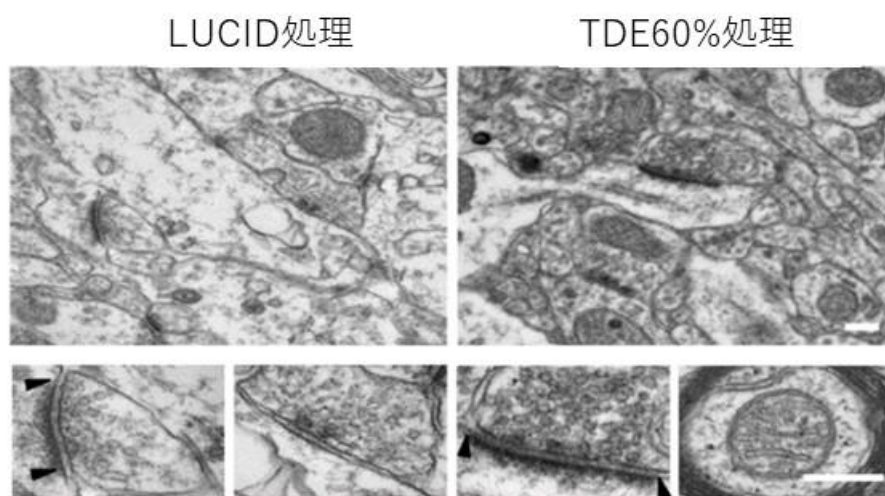


図 2 - 5 TDE60%及びLUCID処理を行った大脳皮質の電子顕微鏡画像

スケールバーは200 nm, 矢頭の範囲はPost synaptic density

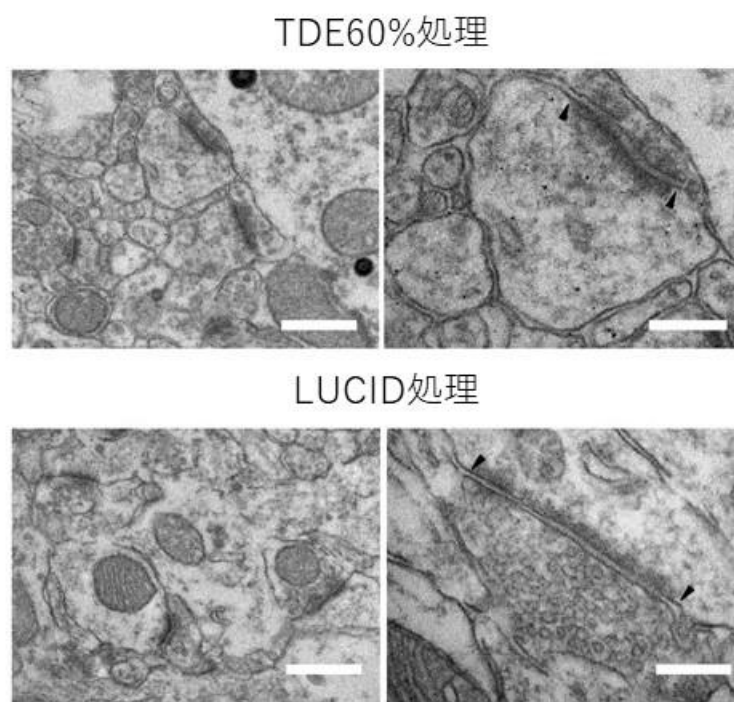


図 2 - 6 TDE60%及びLUCID処理を行った線条体の電子顕微鏡画像

スケールバーは200nm, 矢頭の範囲はPost synaptic density

2-3-2 共焦点顕微鏡を用いたLUCID透徹化標本内における集光特性の評価

先行研究において提唱されていたTDE60%透徹化を用いた高NAイメージングについて、LUCID透徹化の場合はイメージングにどのような影響を及ぼすのかを調べた。そこでまず、固定脳スライス内の励起レーザーの集光特性を調べるため、共焦点顕微鏡を用いてH-line 脳スライスの蛍光観察を行った。神経細胞の樹状突起の像を比較対象とした結果、PBS に浸漬した固定脳スライス標本では鮮明でない樹状突起の画像が得られたことに対し、TDE60%およびLUCID溶液に浸漬した脳スライスでは鮮明な樹状突起像を観察することができた。特に、樹状突起スパインにおいては、軸方向画像においてスパインが鮮明に観察できた（図2-7）。

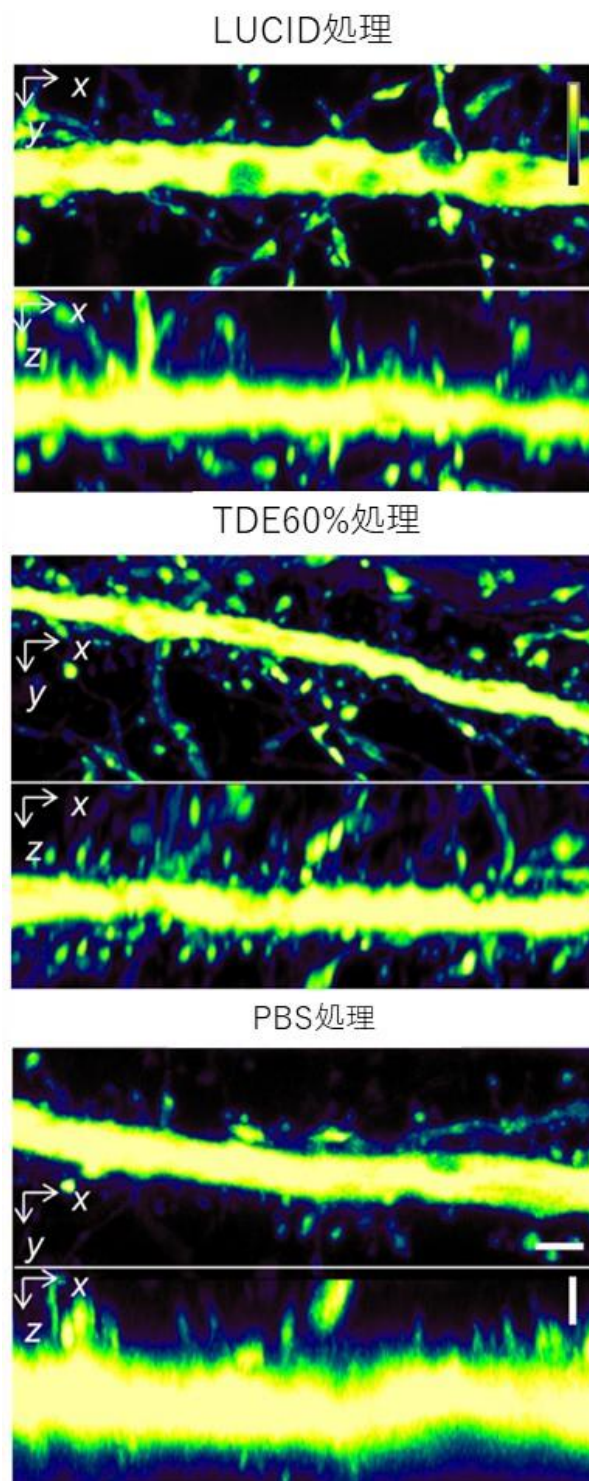


図 2 - 7 TDE60%及びLUCID処置脳スライス中の樹状突起の共焦点画像

白スケールバーは2 μ m

共焦点顕微鏡による脳スライス内観察における空間分解能を評価するため、脳内に埋め込んだ100 nm Yellow Greenビーズ（以下、YGビーズ）を共焦点顕微鏡で撮影し、YGビーズ画像のFWHMを測定した。PBS処理スライスではYGビーズが深さ10 μm までしか観察できなかったことに対し、LUCID処理スライスでは60 μm まで観察することができた（図2-8, a）。脳スライスの深さ10 μm におけるYGビーズ観察像では、LUCIDとTDE60%、PBS処理スライスにおける水平方向のFWHMは、それぞれ $201 \pm 7 \text{ nm}$ 、 $192 \pm 5 \text{ nm}$ 、 $223 \pm 9 \text{ nm}$ （ $n = 10$, SEM）であり、軸方向のFWHMはそれぞれ $731 \pm 13 \text{ nm}$ 、 $589 \pm 45 \text{ nm}$ 、 $701 \pm 46 \text{ nm}$ （ $n = 10$, SEM）だった（図2-8 b, c）。両透徹化スライス中の水平方向のFWHMは、PBS処理スライスよりも小さかった。また、両透徹化スライス中の軸方向FWHMは60 μm から80 μm までの間で飛躍的に増大した。この軸方向FWHMの増加は、対物レンズの補正環が対応しきれない程の大きな球面収差が原因と考えられる。以上の結果より、LUCID透徹化は固定脳中において集光特性を向上させ、空間分解能を改善することがわかった。

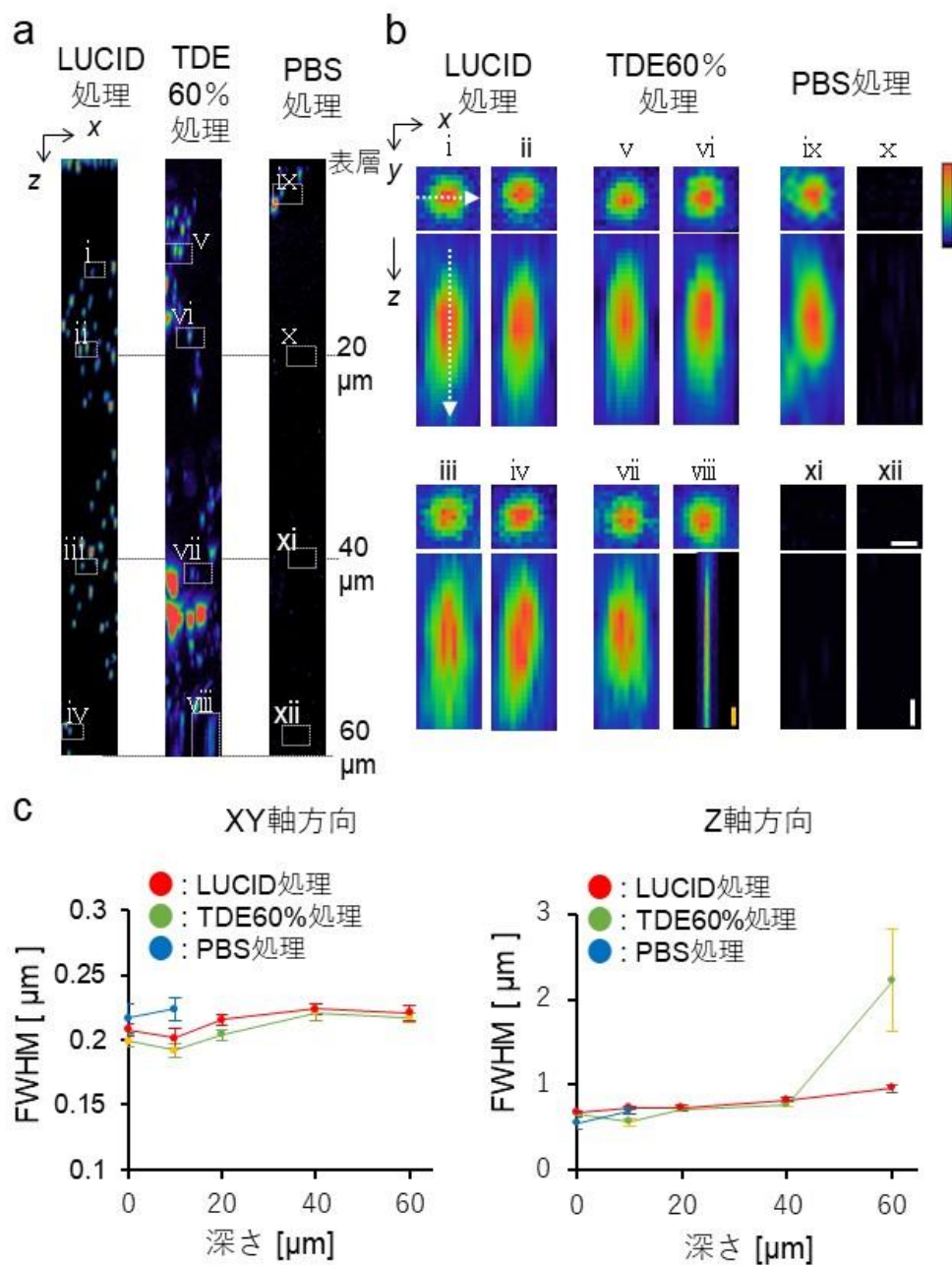


図2-8 TDE 60%及びLUCID処理スライス中の集光特性

(a, b)脳スライス中に埋め込んだ100 nm YGビーズ。aはZスタックのXZイメージ、
bは各ビーズのXY及びXZイメージ。(c)100 nm YG ビーズのFWHM(n = 10)。

白スケールバーは2 μm 、黄スケールバーは1 μm を示している。

2-3-3 SIMを用いたLUCID透徹化標本内における空間分解能の評価

LUCID処理が固定脳中の集光特性を改善することがわかったため、SIMの縞模様の励起光が固定脳深部において崩れないのではないかと推測した。そこで、LUCID処理をSIMイメージングに適用し、H-lineマウスの第五層錐体細胞の頂上樹状突起の超解像イメージングを行った。計算処理前の画像において、PBS処理を行った脳スライスでは縞模様が観察できなかったことに対し、LUCID処理を行ったスライスでは鮮明な縞模様が観察された。また、Fast Fourier Transformation (FFT) 画像では、無処理の場合に比べて鮮明で特徴的な空間周波数が現れた (図 2 - 9)。計算処理後の画像では、PBS処理を行った脳スライスではアーティファクトが多く粒状の画像が得られたことに対し、LUCID処理スライスでは鮮明な画像が得られた (図 2 - 10)。

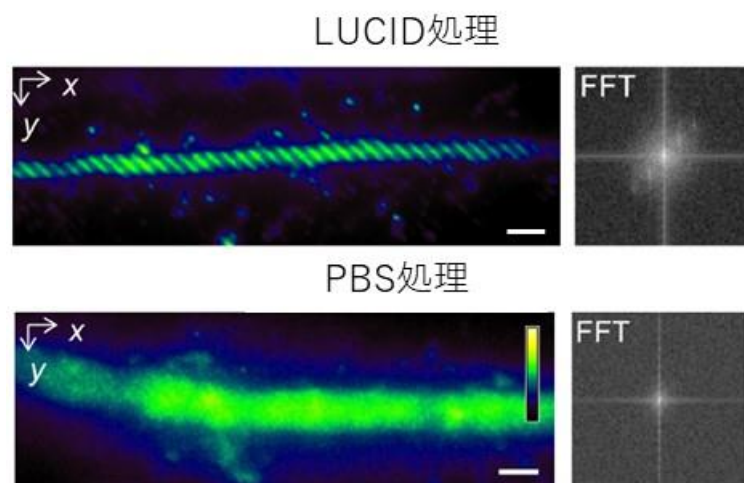
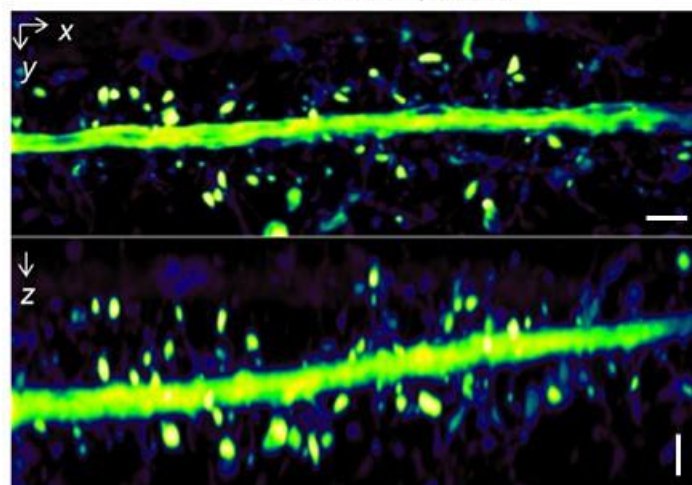


図 2 - 9 計算処理前のSIM画像

(左) 計算前のSIM画像データ (右) FFTデータ。スケールバーは2 μm

LUCID処理



PBS処理

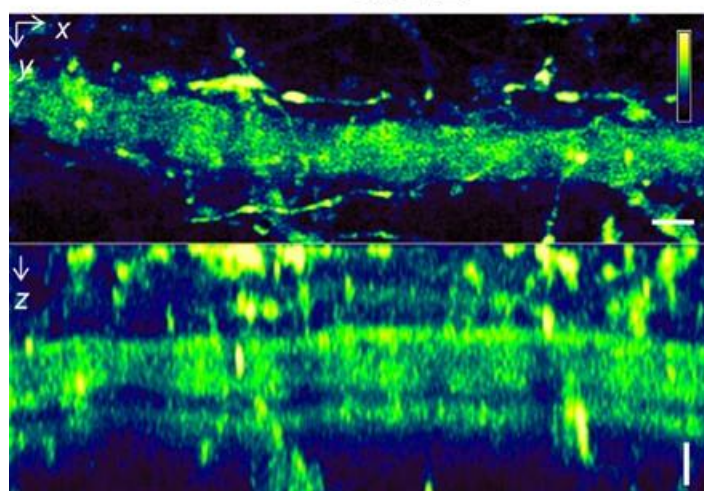


図 2 - 1 0 計算後のSIM画像

スケールバーは2 μm

SIM観察によるLUCID処理スライス中の空間分解能を評価するため、スライス中に埋め込んだ深さ $10\mu\text{m}$ に位置するYGビーズの観察を行った。その結果、無処理スライス中のFWHMは水平方向が $199 \pm 7\text{ nm}$ 、軸方向が $880 \pm 30\text{ nm}$ ($n = 10$, SEM)であったことに対し、LUCID処理スライス中では水平方向が $163 \pm 1\text{ nm}$ 、軸方向が $583 \pm 4\text{ nm}$ ($n = 10$, SEM)であった (図2-11)。LUCID処理スライス中の水平方向FWHMは回折限界を超えているため、固定脳中の超解像イメージングを達成できたと考えられる。

スライスの深さ $10\mu\text{m}$ から $60\mu\text{m}$ では、対物レンズの補正管位置を調整することで、水平方向の超解像は保持されていた (図2-12)。これらの結果より、LUCID処理スライス中の超解像イメージングはスライスの深さ $60\mu\text{m}$ まで可能であることが示唆された。

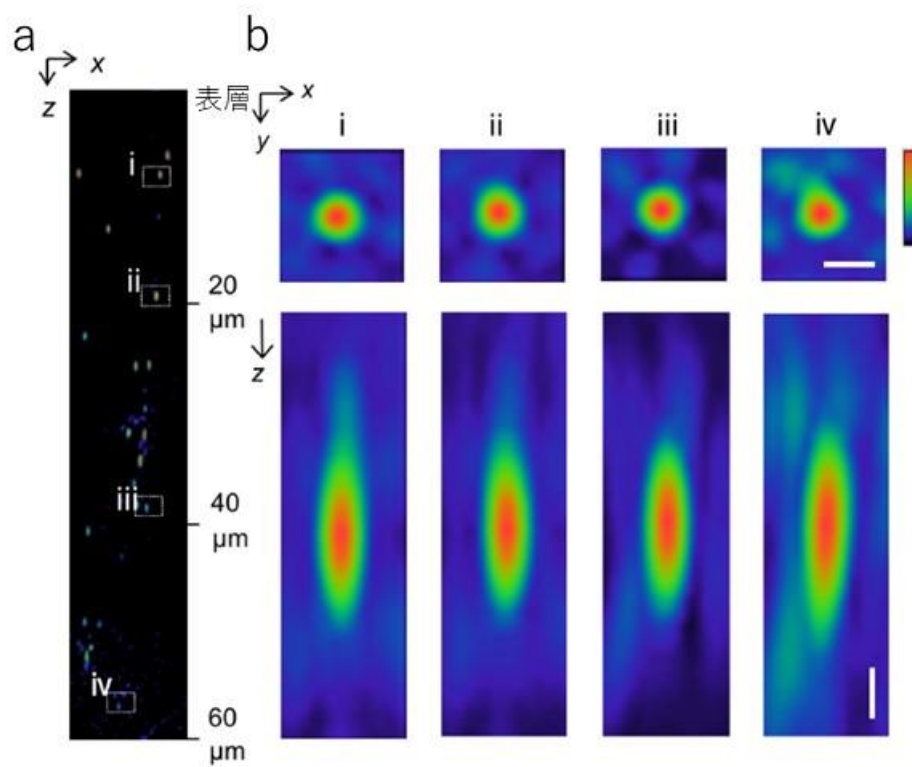


図 2 - 1 1 SIM における LUCID 処理スライス中の集光特性

(a, b)脳スライス中に埋め込んだ 100 nm YG ビーズ。a は Z スタックの XZ イメージ、b は各ビーズの XY 及び XZ イメージ。スケールバーは 200 nm。

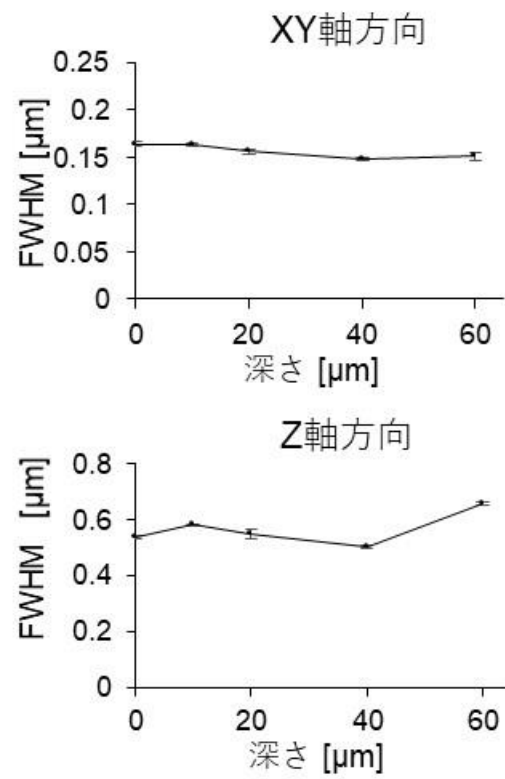


図 2 - 1 2 SIM 観察による脳スライス中 100 nmYG ビーズの FWHM

神経細胞の機能を明らかにするためには、細胞全体の樹状突起スパイン形態を可視化する必要がある。開発した SIM 法を用いて、単一神経細胞上のどれほどの範囲を網羅的に観察することができるのかを調べるため、前頭前野領域の第 V 層錐体細胞の頂上樹状突起のメインシャフトを観察した。その結果、第 V 層から第 I 層までの約 180 μm の範囲内において、樹状突起スパインを含む微細構造を観察することに成功した。(図 2 - 1 3)

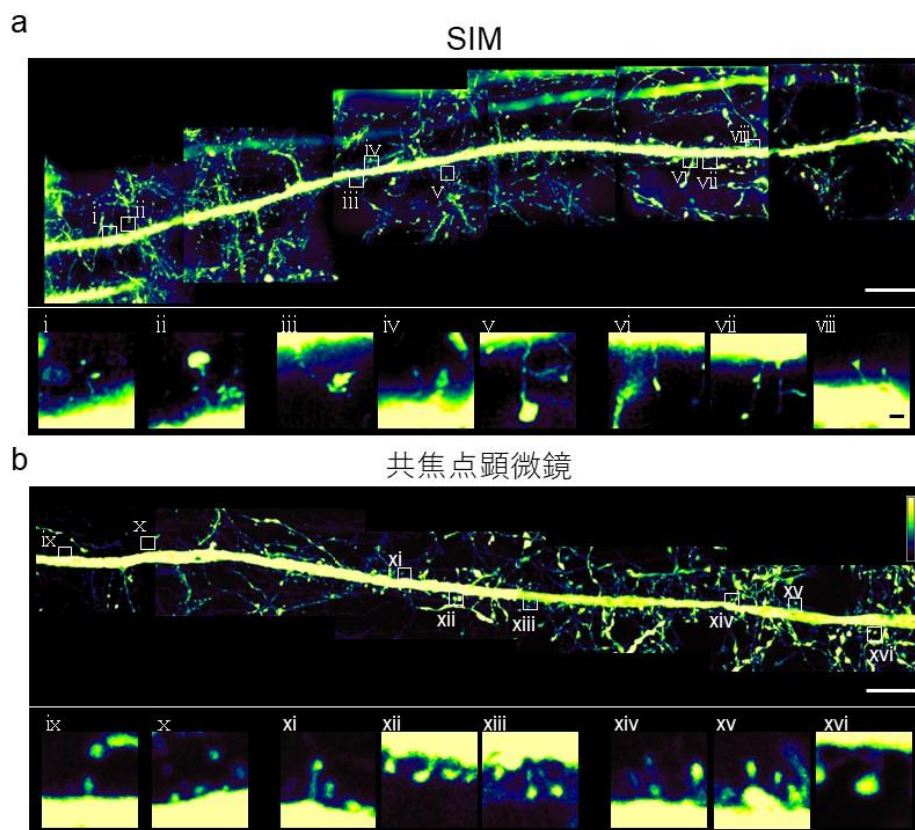


図 2 - 1 3 大脳皮質第 V 層錐体細胞の頂上樹状突起と樹状突起スパイン

(a) SIM 像。(b)共焦点像。スケールバーは上部が 10 μm 、下部が 500 nm を示している

超解像イメージングが微細なスパイン形態を可視化できているかどうか調べるため、SIM 画像と共焦点画像の樹状突起スパインを100個ずつ形態解析した。形態解析のため、スパインの最大値投影画像においてスパインヘッドを長軸と短軸で表した。その結果、長軸のヒストグラムにおいて、SIM 画像では長軸が300 nm 以下のスパインを42個検出できたことに対し、共焦点では5個しか検出できなかった(図2-14, a, b)。さらに、短軸のヒストグラムでは、SIM 画像中では短軸が200 nm 以下のスパインは28個だったことに対し、共焦点ではそのようなスパインは存在しなかった(図2-14, c)。従って、LUCID 処理スライス中のSIM イメージングでは、頂上樹状突起の広い範囲において200 nm 以下の微細な樹状突起スパインを観察することが可能であった。

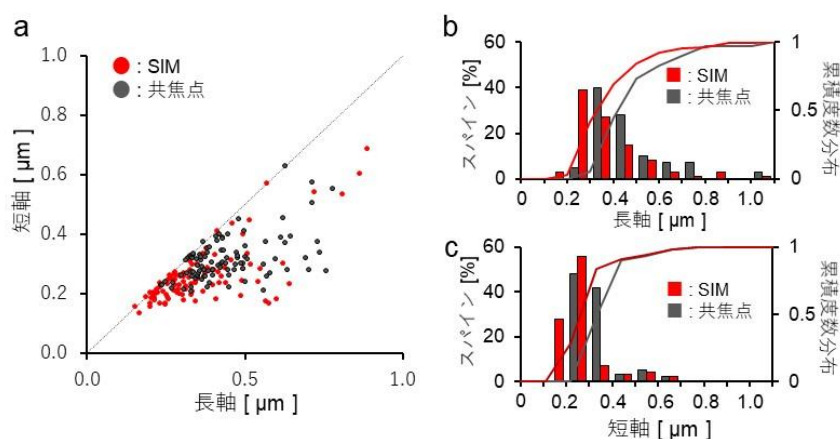


図2-14 SIM 像と共焦点像におけるスパイン形態評価

(a) 丸さ値の散布図 (b)スパインヘッド長軸のヒストグラム (C)スパインヘッド短軸のヒストグラム

2-4 考察

本章の LUCID 処理脳スライス中の 3D-SIM イメージングでは、1 本の樹状突起に沿った樹状突起スパインを FWHM160 nm の超解像で観察することができることを示した。この結果は LUCID 処理が固定脳深部における集光状態の劣化を防ぎ、縞模様の励起光を劣化させなかったことが主な要因と考えられる。

2-4-1 SIM の利点

SIM 以外の超解像技術もまた、本研究のような神経構造の微細な構造解析を可能にしてきている。例えば、STED 顕微鏡法もまた、固定脳や新鮮スライス中の樹状突起スパインの超解像イメージングを達成している (Bethge *et al.*, 2013; Takasaki *et al.*, 2013; Ke *et al.*, 2016)。さらに、初代培養細胞の研究において、STORM 顕微鏡法はシナプス上の目的分子の局在の観察に広く使われてきている (Lakadamyali *et al.*, 2012)。しかしながらこれらの顕微鏡法は特殊な観察環境を必要としており、STED では特殊な光路系や褪色に耐えうる蛍光タンパクを、STORM では明滅する蛍光タンパクを用いる必要がある。一方で 3D-SIM は励起光の縞模様のみを必要とする簡単な手法であるため、一般的に用いられているようなサンプルへの応用が容易い。そのため、SIM 法は超解像を必要と

する研究者に対して非常に汎用性の高い方法といえる。しかし、空間分解能に着目すると、SIM は他の超解像顕微鏡法と比べて劣っている。例えば、STED の空間分解能は約 50 nm、PALM や STORM の空間分解能は約 10 nm であるが、SIM の理論空間分解能は約 115 nm である。本研究の観察対象は大きさが 100 nm~1000 nm である樹状突起スパインであったため適用可能だった事と同じく、他の研究に用いる際は観察対象と必要な空間分解能をよく考慮して適切な超解像顕微鏡法を選択する必要がある。

2-4-2 LUCID の利点

本研究の透明化評価において、LUCID と TDE60%は固定脳に対して高い透明度で透明化することを示した。これらの手法を用いた際、固定脳内の蛍光シグナルはほとんど劣化しなかった。加えて、可視領域では、LUCID 処理スライスは TDE60%処理スライスよりも高い透明度を示した。この高い透明度は、LUCID が TDE 法をより改善して作成されたことで生じたものだと考えられる。

LUCID は当時の透徹化剤の中では屈折率が一番高く、油浸対物レンズを用いたイメージングには一番相性が良いと考えられる。その作用機序は両親媒性の LUCID が浸透していくことにより組織内の水分が LUCID と置換され、組織内

の屈折率差が少なくなることから光散乱が低下し、透明化するのではないかと考えられている。

固定脳の蛍光イメージングでは、TDE60%と LUCID 処理スライスにおいて観察可能な領域が無処理の場合と比べて大幅に増えた。この効果により、頂上樹状突起の幹の大部分を観察することに成功した。最近開発された透徹化剤と比べると、LUCID 処理スライスは、若干透明度が劣る。対して、LUCID 処理は SScaleS や SeeDB2, CLARITY のように多くの処理手順を必要とせず、また、CUBIC のように長い浸漬時間も必要としない。さらに、CUBIC や PACT, 3DISCO が細胞膜に傷を与えてしまうのに対して、LUCID と TDE60%は SScaleS と同じように細胞膜をほとんど壊さない(Hama *et al.*, 2015)。従って、LUCID 処理は固定脳中の樹状突起スパインの微細構造やシナプス小胞の構造解析に適していると考えられる。

2-4-3 SIM 法における空間分解能

樹状突起スパインの超解像イメージングでは 200 nm 以下の多くのスパインが SIM 像では可視化されたが、共焦点像では観察することはできなかった。この結果から、SIM イメージングは共焦点では捉えられないような微細に変化し

たスパイン形態を明らかにする可能性が示唆された。しかし、この実験の際に SIM と共焦点顕微鏡法では用いている対物レンズが異なっており、同じ観察条件で比較できていない。全く同じ対物レンズを用いた場合に比較結果が変わる可能性があるが、本研究では蛍光ビーズを用いた空間分解能の評価を前提に議論を行っているために顕微鏡法間の比較は問題ないと考えられる。

本研究では、LUCID 処理が共焦点顕微鏡法と SIM による観察において脳スライス中の空間分解能を向上させた。共焦点画像では空間分解能が 199 nm であったため、この値は理論分解能の 167 nm よりも劣っており (Pawley, 1995)、これは残存する光学収差 (球面収差など) が蛍光ビーズの FWHM を劣化させたことが原因だと考えられる。SIM イメージングでは水平方向の空間分解能 163 nm を達成し、全てではないがスパインネックを可視化した。もし、スパインネックを含むスパイン形態学を明らかにする必要があるならば、SIM の理論的空間分解能である 115 nm を達成する必要がある。本研究における SIM イメージングの空間分解能 163 nm は LUCID 処理によってインデックスミスマッチによる球面収差を低減した結果であるが、理論分解能を達成するためには全ての収差を取り除く必要がある。

2-4-4 今後の展望

本章では、LUCID 処理脳スライス中の 3D-SIM イメージング(以下、本手法)によって、1 本の樹状突起に沿った樹状突起スパインを 160 nm の超解像で観察することができることを示した。よって、本手法によって単一神経細胞上の樹状突起スパインの形態を網羅的に評価することが可能であると考えられる。また、本手法における空間分解能は理論分解能よりも劣っていた。この原因は残存した光学収差であると考えられるため、今後は透明化剤の屈折率を 1.515 に調整することで浸液とカバーガラス、サンプル間のインデックスミスマッチを完全に除去することや、液晶素子を含む収差補正素子による様々な光学収差を低減させるアプローチ(Tanabe *et al.*, 2015)によって光学収差をできるだけ少なくすることで理論分解能に近い観察を達成することに期待する。

2-5 本研究のまとめ

本研究では、マウス固定脳スライス標本を LUCID 処理することで標本の透過率と屈折率が上昇し、その結果、蛍光顕微鏡観察における蛍光強度の増加と空間分解能の向上を認めた。また、LUCID 処理スライスにおいて、SIM の励起光の縞模様が固定脳深部において崩れず、神経細胞の超解像イメージングが可能になることを示した。これらの結果により、LUCID 処理と SIM イメージングの組み合わせは、樹状突起スパインの形態学を明らかにするうえで、簡便かつ迅速なスパインの超解像イメージングとして有用であることが示された。

参考文献

- Aoyagi, Y., Kawakami, R., Osanai, H., Hibi, T. & Nemoto, T. (2015) A rapid optical clearing protocol using 2,2'-thiodiethanol for microscopic observation of fixed mouse brain. *PLoS One*, **10**, e0116280.
- Arellano, J.I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J. & Yuste, R. (2007) Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci*, **1**, 131-143.
- Bethge, P., Chéreau, R., Avignone, E., Marsicano, G. & Nägerl, U.V. (2013) Two-photon excitation STED microscopy in two colors in acute brain slices. *Biophys J*, **104**, 778-785.
- Conchello, J.A., Kim, J.J. & Hansen, E.W. (1994) Enhanced three-dimensional reconstruction from confocal scanning microscope images. II. Depth discrimination versus signal-to-noise ratio in partially confocal images. *Appl Opt*, **33**, 3740-3750.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W. & Sanes, J.R. (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, **28**, 41-51.
- Gibson, S. & Lanni, F. (1991) Experimental test of an analytical model of aberration in

an oil-immersion objective lens used in 3-dimensional light-microscopy. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, **8**, 1601-1613.

Gustafsson, M.G. (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, **198**, 82-87.

Hama, H., Hioki, H., Namiki, K., Hoshida, T., Kurokawa, H., Ishidate, F., Kaneko, T., Akagi, T., Saito, T., Saido, T. & Miyawaki, A. (2015) ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*, **18**, 1518-1529.

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A. & Miyawaki, A. (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, **14**, 1481-1488.

Kasthuri, N. & Lichtman, J.W. (2003) The role of neuronal identity in synaptic competition. *Nature*, **424**, 426-430.

Ke, M.T., Nakai, Y., Fujimoto, S., Takayama, R., Yoshida, S., Kitajima, T.S., Sato, M. & Imai, T. (2016) Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. *Cell Rep*, **14**, 2718-2732.

Kim, A. & Wilson, B.C. (2011) Measurement of ex vivo and in vivo tissue

optical properties: methods and theories. In Welch, A.J., Gemert, M.J.C.v. (eds) *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissues*. Springer, Netherlands, pp. pp. 267–319.

Lakadamyali, M., Babcock, H., Bates, M., Zhuang, X. & Lichtman, J. (2012) 3D multicolor super-resolution imaging offers improved accuracy in neuron tracing. *PLoS One*, **7**, e30826.

Lichtman, J.W., Livet, J. & Sanes, J.R. (2008) A technicolour approach to the connectome. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 417-422.

Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R. & Lichtman, J.W. (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, **450**, 56-62.

Mizutani, H., Ono, S., Ushiku, T., Kudo, Y., Ikemura, M., Kageyama, N., Yamamichi, N., Fujishiro, M., Someya, T., Fukayama, M., Koike, K. & Onodera, H. (2018) Transparency-enhancing technology allows three-dimensional assessment of gastrointestinal mucosa: A porcine model. *Pathol Int*, **68**, 102-108.

Neil, M.A., Juskaitis, R. & Wilson, T. (1997) Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Opt Lett*, **22**, 1905-1907.

Onodera, H. (2014) Method for rendering tissue transparent, reagent for

rendering tissue transparent, and tissue observation method Google

Patents. patent number: US20160011086A1

Pawley, J.B. (1995) *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, New York.

Richardson, D.S. & Lichtman, J.W. (2015) Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, **162**, 246-257.

Sheppard, C., Gu, M., Brain, K. & Zhou, H. (1994) Influence of spherical-aberration on axial imaging of confocal reflection microscopy. *Applied Optics*, **33**, 616-624.

Takasaki, K.T., Ding, J.B. & Sabatini, B.L. (2013) Live-cell superresolution imaging by pulsed STED two-photon excitation microscopy. *Biophys J*, **104**, 770-777.

Tanabe, A., Hibi, T., Ipponjima, S., Matsumoto, K., Yokoyama, M., Kurihara, M., Hashimoto, N. & Nemoto, T. (2015) Correcting spherical aberrations in a biospecimen using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, **20**.

Tønnesen, J. & Nägerl, U.V. (2013) Superresolution imaging for neuroscience. *Exp Neurol*, **242**, 33-40.

Urban, N.T., Willig, K.I., Hell, S.W. & Nägerl, U.V. (2011) STED nanoscopy of actin dynamics in synapses deep inside living brain slices. *Biophys J*, **101**, 1277-1284.

第3章 SIM法を用いたうつ病モデルマウスの神経系回路の解析

3-1 背景と目的

3-1-1 うつ病モデルマウスと長期薬剤投与

うつ病モデルマウスの作成法は主に長期拘束ストレスや長期慢性軽度ストレス、社会的敗北ストレス、長期間の薬剤誘導による慢性ストレスなどがある (Cryan *et al.*, 2002)。薬剤投与ではコルチコイド受容体のアゴニストである Corticosterone やDexamethasone(以下、Dex)を投与する方法がある (Casarotto & Andreatini, 2007; Sigwalt *et al.*, 2011; Skupio *et al.*, 2015)。

3-1-2 長期ストレスとマウス前頭前野

うつ病モデルマウスにおいて、過剰な精神的ストレスは脳内の神経細胞の樹状突起などを衰退させることが、近年、明らかになっている。例えば、3週間の長期ストレス暴露を行ったマウスでは前頭前野領域におけるBDNFの低下 (Duman, 2004)や皮質第II～III層錐体細胞の樹状突起の衰退とシナプス密度の減少、皮質第V層錐体細胞における樹状突起の先端の衰退が報告されている (Cerqueira *et al.*, 2007b; Banasr *et al.*, 2011a; Duman & Duman, 2015)。

3-1-3 本研究の目的

長期ストレスモデルにおいて皮質第 V 層錐体細胞における樹状突起の先端の衰退が報告されているため、第 V 層錐体細胞の頂上樹状突起のシャフトにおいても樹状突起やシナプスの衰退が予想される。しかし、今までの先行研究では、第 V 層錐体細胞の樹状突起のシャフトにおけるスパインの変化はないと報告されていた (Goldwater *et al.*, 2009)。本研究では頂上樹状突起のシャフトにおけるスパインの変化は回折限界以下の大きさの変化が生じており、超解像顕微鏡を用いると今までに検出が困難であった微細な形態変化が検出できるのではないかと仮説を立てた。そのため本研究では、樹状突起スパインの SIM イメージングによって、長期ストレスモデル中の樹状突起スパインの形態分布を評価することを目的とする。

3-2 材料と方法

3-2-1 実験動物

樹状突起スパインの形態の評価には、大脳皮質第V層と海馬の一部の神経細胞に蛍光タンパク質EYFP（最大励起波長513 nm /最大蛍光波長527 nm）を発現する成体のトランスジェニックマウス（Thy1-YFP-Hマウス）（Feng *et al.*, 2000）を使用した。これらのマウスは、北大・人獣共通感染症センターのSPF環境の飼育室で繁殖・維持・管理された。

尚、本研究は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」と「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づき、承認を受けた遺伝子組換え実験室（承認番号第 21(57)号、第 22(48)号）及び動物実験室（承認番号第 21(25)号、第 22(12)号）において、遺伝子組換え実験計画（承認番号第 22(50)号）及びマウスを用いた動物実験の計画（承認番号 14-0127）に従って実験を実施した。

3-2-2 長期薬剤投与と標本作成

スパイン形態を解析する実験では神経細胞の形態変化を誘導するため、コルチコイド受容体のアゴニストであるDexamethasone（5mg/kg i.p., Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan）を21日間、毎日同時刻に腹腔内投与した。コントロールマウスには生理的食塩水（10 mL/kg, i.p., Otsuka Pharmaceutical, Tokyo,

Japan)を21日間、毎日同時刻に腹腔内投与した。SIM観察の場合はDex投与マウスとコントロールマウスはそれぞれ3匹ずつ、共焦点観察の場合はDex投与マウスを3匹とコントロールマウスを2匹用意した。神経細胞は3匹中4細胞ずつ（共焦点のコントロールの場合は2細胞）の抽出を行い、樹状突起スパインはそれぞれの頂上樹状突起の皮質第II～III層部分における20 μ mの範囲から抽出した。

観察標本の作製は、「2-2-2 観察標本の作製」と「2-2-3 透徹化溶液の調整と透明化」に準じて行った。

3-2-3 行動実験

うつ症状の評価の為、スクロース試験と尾懸垂試験を行った。

スクロース試験の際、飲用水として1%スクロース水と水道水の2種類を用意し、全飲水量から1%スクロース水を飲んだ割合を計算し、Dex投与群とコントロール群を比較した。

尾懸垂試験の際は、無音室中でマウスの尻尾を固定して10分間の逆さ吊り状態にした。そのうち4分～10分の計6分間でマウスの頭と手足が動かない時間を無動時間として算出し、Dex投与群とコントロール群を比較した。

3-2-4 顕微鏡観察

「2-2-5 顕微鏡観察」に準じて顕微鏡観察を行った。

3-2-5 スパインの形態解析

「2-2-6 樹状突起スパインの形態解析」に準じてスパインの形態解析を行った。

3-3 研究結果

3-3-1 長期薬剤投与マウスの行動試験

長期Dex投与を行ったマウスに対して、うつ症状の一つである無快楽症を評価するスクロース試験と、絶望症状を評価する尾懸垂試験を行った。スクロース試験を行った結果、Dex投与群は $89.4 \pm 2\%$ ($n = 8$, SEM)であり、コントロール群は $79.2 \pm 5\%$ ($n = 8$, SEM)だった。この2群に有意な差は見られなかった ($p = 0.0882$, 2 集団t検定)。次に尾懸垂試験を行った結果、Dex投与群は 142.7 ± 40.0 秒 ($n = 8$, SEM) であり、コントロール群は 137.2 ± 23.5 秒 ($n = 8$, SEM) だった。この2群に有意な差は見られなかった ($p = 0.90896$, 2 集団t検定)。

3-3-2 長期薬剤投与マウスにおける樹状突起スパインの形態変化

3週間、Dexを腹腔内投与したマウスにおけるスパイン形態の解析を行った。長期間のDex投与の効果を調べるために、前頭前野第V層錐体細胞の頂上樹状突起のシャフトにおける皮質II～III層の部分SIMと共焦点顕微鏡によって観察した。長期Dex処理マウスにおける頂上樹状突起のシャフトでは、コントロールと比べて顕著な萎縮は見られなかった(図3-1)。また、両方の群においてスパイン密度に変化はなかった(3.24 ± 1.62 , 3.02 ± 1.51 [個/ μm], $n = 4$, $P = 0.68$)。

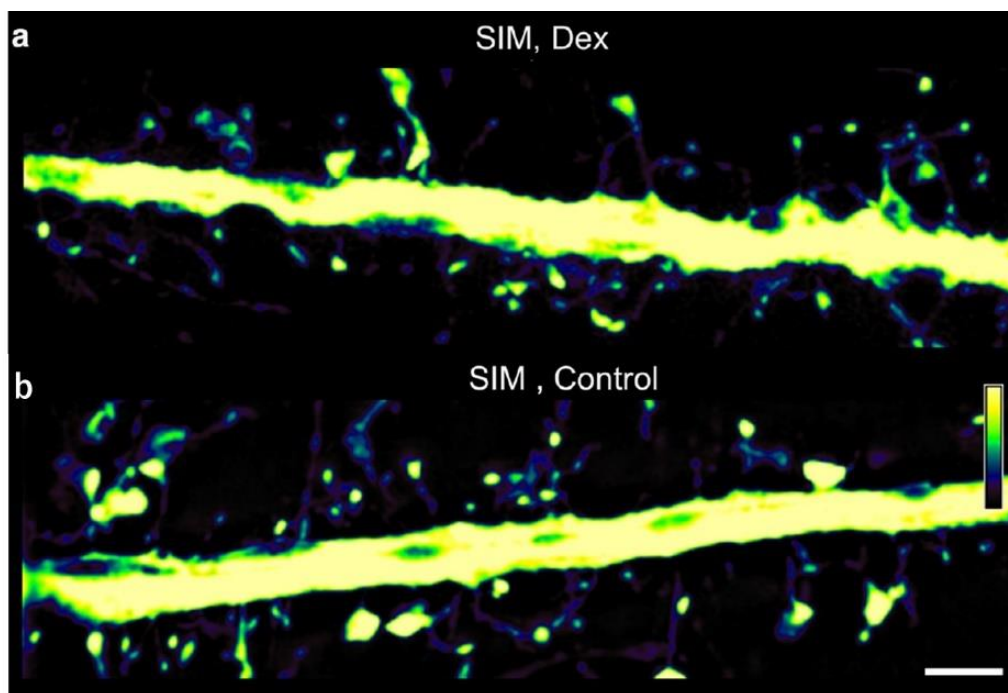


図3-1 SIMによるマウスの前頭前野第V層錐体細胞の樹状突起の観察

(a)長期Dex投与群の樹状突起, (b)生食投与群の樹状突起

樹状突起スパインの楕円性を定量的に評価するために、スパインヘッドの最長軸と、長軸と直交する短軸をプロットした。その結果、Dex処理群では $y = x$ の直線よりも遠い場所にプロットが多く、スパインヘッドが楕円形に変化しているように見られた (図3-2, a)。スパインのアスペクト比のヒストグラムでは、Dex処理群では細長いスパインが多くを占めていた (図3-2, b)。Dex処理群とコントロール群のスパインヘッドのアスペクト比の平均値はそれぞれ、1.42と1.46であり、Dex処理群はスパインヘッドが有意に細長かった ($n = 273$ (control), $n = 259$ (Dex) dendritic spines; $n = 3-4$ neurons, Mann-Whitney U-test, $p = 0.04976$) (図3-3)。

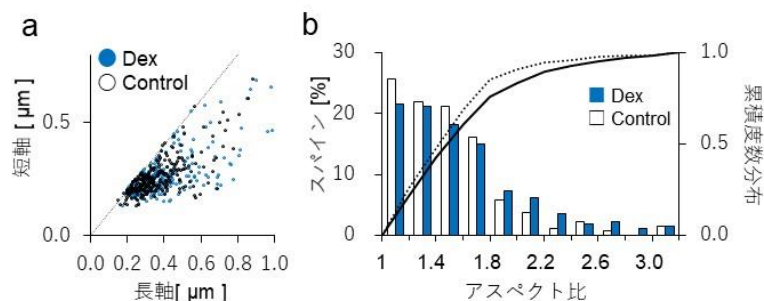


図 3-2 スパインヘッドのアスペクト比

(a) アスペクト比の散布図, (b) アスペクト比のヒストグラム, 累積度数分布の実線はDex, 破線はcontrol

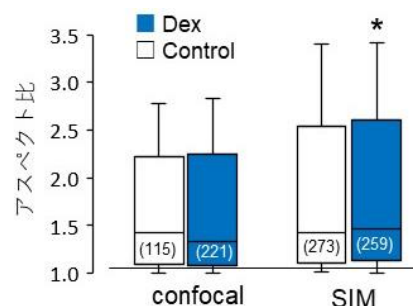


図 3-3 スパインヘッドのアスペクト値の箱ひげ図

一方で共焦点画像におけるスパインヘッドのアスペクト比のヒストグラムでは、Dex処理群とコントロール群には有意な差は見られなかった(図3-2, b, c)。Dex処理群とコントロール群のスパインヘッドのアスペクト比の平均値はそれぞれ、1.46と1.51であり、Dex処理群とコントロール群のスパインヘッドには有意な差がなかった($n = 115(\text{control})$, $n = 221 (\text{Dex})$ dendritic spines; $n = 3-4$ neurons, Mann-Whitney U-test, $P = 0.539$)。従って、SIMイメージングは共焦点顕微鏡では検出できないスパイン形態の変化を示すことができた。

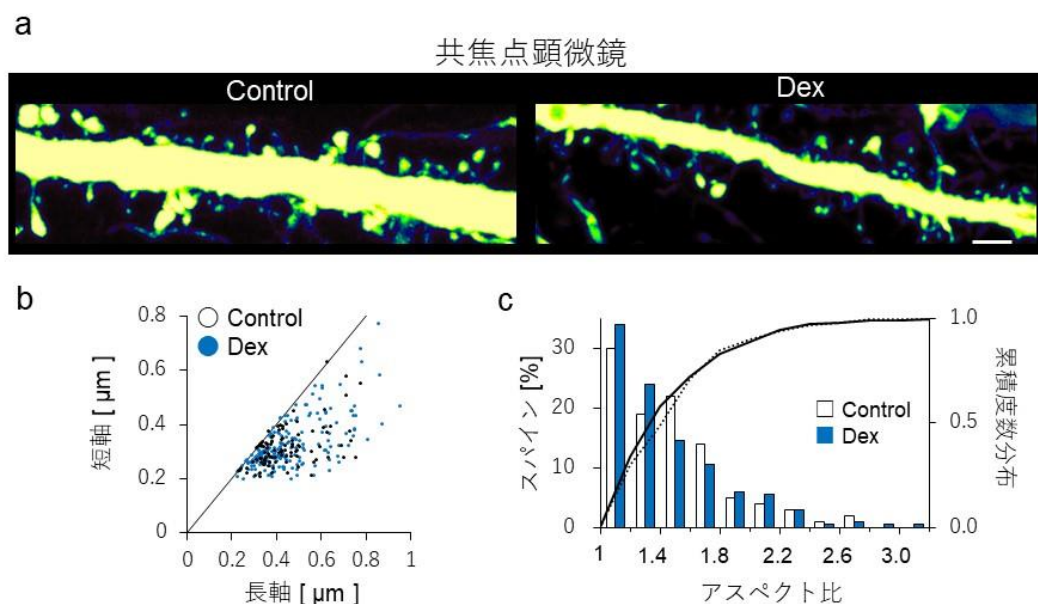


図3-4 共焦点像における、前頭前野第V層錐体細胞の樹状突起とそのスパインのアスペクト比

(a) Dex処理群とコントロール群の蛍光像、(b) アスペクト比の散布図、(c) アスペクト比のヒストグラム スケールバーは2 μm

3-4 考察

3-4-1 SIM法のメリット

本研究ではSIMイメージングを用いることで初めて長期Dex投与による前頭前野領域の第V層錐体細胞のスパイン形態分布の変化を検出することに成功した。この変化は共焦点法では見出せなかったため、本研究はスパイン形態の変化を観察するためには超解像顕微鏡法が有用であることを示した。さらに詳細な形態学的解析を行うため、SIM画像の形態構造や蛍光輝度からスパインのサイズを正確に推定する方法が必要である。一方で、SIMにより取得したスパイン画像解析のオートメーション化が既に行われている(Kashiwagi et al., 2019)。形態解析のオートメーション化によってROI (region of interest) を広げることが可能になれば、多くの領域のスパイン形態を捉えることが可能になる。しかし、この手法では単離した海馬の神経細胞をサンプルとして用いているため、本研究で用いたサンプルよりも観察時の光散乱が少なく、SIM特有の偏照明の乱れが少ない。そのため、SIM画像の空間分解能が本研究よりも高い。2章で既に述べている通り、固定脳スライス中のSIMイメージングの空間分解能が向上すれば、解析のオートメーション化は容易だと考えられる。将来的に神経細胞のSIMイメージングは、マウスの精神疾患モデルにおいて発生する神経回路の変化を正確に記述するための有用なツールになることが期待される。

3-4-2 樹状突起スパインの形態変化

本研究では長期Dex投与によるmPFC領域の第V層錐体細胞のスパイン形態分布の変化を見出した。しかし、この実験には（１）個体数が３匹ずつであるためうつ病との相関を考察するには個体数が足りないこと、（２）p値が0.04976であり0.05に近いため本当に差が出ているのか疑わしいこと、（３）うつ症状が安定して発症しなかったため症状との関連付けが困難であることという三つの問題点があり、うつ症状とスパインの形態変化を結び付けることが困難であった。この中でも、うつ症状が安定して発症しなかったことは、H-lineマウス、もしくはBL/6マウスにDexの抵抗性があったのではないかと考えられる。これらの問題点があるためうつ病との相関を考察することは困難であるが、うつ症状を呈する前の段階においてもスパイン形態に差が出ているということ意味があることではないかと考えられる。今後は本実験を参考として精神疾患マウスと樹状突起スパインの形態変化を研究することが期待される。

3-5 本研究のまとめ

本研究では、SIM イメージングを用いることで初めて、長期 Dex 投与モデルの前頭前野領域の第 V 層錐体細胞の樹上突起スパイン形態において微細な変化を検出することができた。共焦点では明らかにできないような微細な形態変化が検出できたことは、変化が生じやすい不安定な状態のスパインの変化を蛍光顕微鏡レベルで観察することが可能になったということを意味する。このようなスパインの微細な形態変化がわかることは、精神疾患モデルなどシナプス機能の異常が期待される疾患の研究に役立つと考えられる。

参考文献

- Banasr, M., Dwyer, J. & Duman, R. (2011) Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Current Opinion in Cell Biology*, **23**, 730-737.
- Casarotto, P. & Andreatini, R. (2007) Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. *European Neuropsychopharmacology*, **17**, 735-742.
- Cerqueira, J.J., Taipa, R., Uylings, H.B., Almeida, O.F. & Sousa, N. (2007) Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cereb Cortex*, **17**, 1998-2006.
- Cryan, J.F., Markou, A. & Lucki, I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 238-245.
- Duman, C. & Duman, R. (2015) Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience Letters*, **601**, 20-29.
- Duman, R.S. (2004) Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*, **56**, 140-145.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W. & Sanes, J.R. (2000) Imaging neuronal subsets

in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, **28**, 41-51.

Kashiwagi, Y., Higashi, T., Obashi, K., Sato, Y., Komiyama, N.H., Grant, S.G.N. & Okabe, S. (2019) Computational geometry analysis of dendritic spines by structured illumination microscopy. *Nat Commun*, **10**, 1285.

Sigwalt, A., Budde, H., Helmich, I., Glaser, V., Ghisoni, K., Lanza, S., Cadore, E., Lhullier, F., de Bem, A., Hohl, A., de Matos, F., de Oliveira, P., Prediger, R., Guglielmo, L. & Latini, A. (2011) Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. *Neuroscience*, **192**, 661-674.

Skupio, U., Tertilt, M., Sikora, M., Golda, S., Wawrzczak-Bargiela, A. & Przewlocki, R. (2015) Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. *Neuroscience*, **286**, 141-150.

第4章 前頭前野領域観察を目指した*in vivo* 2光子顕微鏡法の開発

4-1 背景と目的

4-1-1 *in vivo* 2光子顕微鏡法による生体脳観察とその課題

in vivo 2光子顕微鏡法により、生きたマウス脳内の神経回路を非侵襲的に高分解能で観察することが可能になってきている (Grutzendler *et al.*, 2002; Nemoto, 2008; Nakashiba *et al.*, 2012)。しかしながら、この手法の観察範囲は脳表層から数百 μm までに限られており、皮質の下に位置する海馬領域や、表層から深さ1.5 mmの場所に位置する前頭前野領域は可視化することはできなかった。このような生体脳の深部イメージングを妨げる原因として、生体脳が強い散乱体であるため、励起光や蛍光が散乱してしまうことが挙げられる (Oheim *et al.*, 2001)。

4-1-2 励起レーザーと2光子励起確率

2光子顕微鏡では励起光源に超短パルスレーザーを用いる。この超短パルスレーザーの性質は2光子励起過程の発生に大きく影響する。一般的によく用いられている超短パルスレーザーであるモードロックチタンサファイア（以下、Ti:Sapphire）レーザーの性質を以下の表に表す（表4-1）。

波長[nm]	700～1000 (波長可変)
レーザーパワー [W]	2
繰り返し周波数 [MHz]	80
パルス幅 [s]	80×10^{-15}

表 4 - 1 Ti: Sa レーザーの性質

2 光子励起確率とレーザーパワー、パルス幅、繰り返し周波数の関係式を以下に示す。

$$\gamma_{2\text{光子励起確率}} \propto (P_{\text{Peak power}})^2 \times \tau_{\text{パルス幅}}$$

$$P_{\text{Peak power}} = \frac{P_{\text{average power}}}{T_{\text{繰り返し周波数}} \times \tau_{\text{パルス幅}}}$$

2 光子励起確率を向上させるためには、レーザーパワーを大きく、または繰り返し周波数とパルス幅を小さくすることが必要である。先行研究では、増幅器を用いてチタンサファイアレーザーの繰り返し周波数を 400 kHz まで減少させて、2 光子励起確率を向上させた。その結果、脳内に蛍光タンパク質 GFP を発現している遺伝子改変マウスにおいて、蛍光観察の深部到達性が向上することが確認された。一方で、生体内の形態変化や機能を観察するために、共振

(resonant)型高速スキャナーによる高速イメージングが行われている。しかし、共振型高速スキャナーでは 1 pixel あたり $0.2 \mu\text{s}$ の照射を行うため、繰り返し周波数が 5 MHz 以下では各 pixel あたり 1 パルス照射することが困難であった。そのため、高速イメージングにおいて 2 光子励起効率を向上させるために、繰り返し周波数を大幅に小さくすることはできない。この問題を解決するためには、繰り返し周波数を小さくする以外の方法で 2 光子励起確率を向上させる必要があった。レーザーパワーによって 2 光子励起確率を向上させた先行研究では、2 光子顕微鏡用の誘導放出による大幅な光増幅が可能である 10 MHz 以上の繰り返し周波数、ピコ秒パルスのモードロック発振の波長 1030 nm 光源が東北大の横山弘之教授によって開発され、脳スライスにおいて 2 光子励起による観察が成功していた。さらに、先行研究ではこの波長 1030 nm 光源を種光とした新しい高ピークパワー出力レーザーを開発し、H-line マウスの *in vivo* 深度イメージングにおいてこのレーザーの性能を評価した。その結果、若週齢の H-line マウスにおいて、表面から海馬までの深さ 1.4 mm までの *in vivo* イメージングに成功した(Kawakami *et al.*, 2013)。この結果から、高ピークパワーピコ秒パルスレーザーが、マウス脳のより深い領域を観察する為の *in vivo* 2 光子顕微鏡法に適していることが示されていた。

4-1-3 2光子顕微鏡に用いる高感度型蛍光検出器

深部到達性を向上させる別のアプローチとして、蛍光検出器の改良が挙げられる。2光子顕微鏡の蛍光検出器は一般的に光電子増倍管（PMT）が用いられており、その性能の一部は光電面の量子効率で決められる。通常の光電面はマルチアルカリ光電面（Sb-Na-K-Cs）が用いられているが、蛍光顕微鏡で扱う波長ではガリウム砒素リン型光電面（Ga-As-P）の方が量子効率が高い。Nikon 社の A1R MP+では GaAsP 型 PMT を搭載しており、*in vivo* 2光子顕微鏡法による若齢の H-line マウス脳観察において深部到達性が向上することが既に示されている。

4-1-4 本研究の目的

最近の先行研究より、波長1064 nm、パルス幅7.5ピコ秒のゲインスイッチ半導体レーザー（GSLD）を光源として励起光を開発し、このシステムを用いて生体脳の皮質第V層錐体ニューロンを可視化していた(Kusama et al., 2014)。本研究では、この1064 nmの光パルスをLMA（Large Mode-Area）ファイバを用いた高出力増幅器を用いて増幅し、Nikonから市販されているGaAsP型PMTを備えた直立型レーザー走査型顕微鏡に導入することで、マウス生体脳観察における高度化、特に深部到達性の向上を目指す。

4-2 材料と方法

4-2-1 実験動物

in vivo イメージングのため、大脳皮質第V層と海馬の一部の神経細胞に蛍光タンパク質EYFP（最大励起波長513 nm /最大蛍光波長527 nm）を発現する若年成体（4週齢）および成体（9～11週齢）のトランスジェニックマウス（Thy1-YFP-Hマウス）を使用した。これらのマウスは、北大・人獣共通感染症センターのSPF環境の飼育室で繁殖・維持・管理された。

尚、本研究は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」と「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づき、承認を受けた遺伝子組換え実験室（承認番号第21(57)号、第22(48)号）及び動物実験室（承認番号第21(25)号、第22(12)号）において、遺伝子組換え実験計画（承認番号第22(50)号）及びマウスを用いた動物実験の計画（承認番号14-0127）に従って実験を実施した。

4-2-2 海馬領域観察のためのオープンスカル法

オープンスカル法による外科手術の為、H-line マウスに対しペントバルビタール（45mg/kg）を用いた腹腔内注射による麻酔を行った。その後、頭部の体毛を除毛したのち、頭皮を切開した。頭を脳定位固定装置で固定した後、頭蓋骨の冠状および矢状縫合の接合点である bregma から後方 3.5~4mm、側方に 2.0~3.0mm に、ドリルを用いて円状（ ϕ 4.2mm）に骨を削り、残った頭蓋骨を

取り除いた。その後、脳が露出している場所にカバーガラスを乗せ、アロンアルファでカバーガラスを固定した。浸液保持のため入れ物として 35mm ディッシュを用意した。具体的には、35mm ディッシュの蓋の中心に超音波カッターを用いて穴を開け、デンタルセメントにより頭蓋骨と隙間なく接着させた。カバーガラスの傾きはいくつかの収差を引き起こし、また、顕微鏡観察の画像の質に影響を与えるため、アダプターステージの傾きを最適化することでカバーガラスの水平性を担保した（図 4－1）。

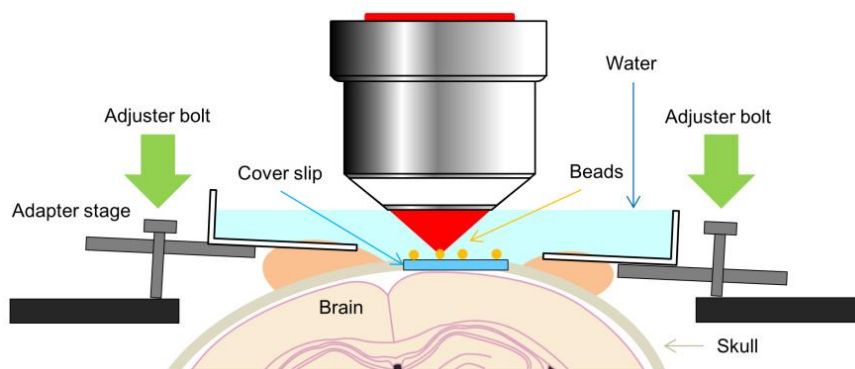


図 4－1 オープンスカル法の概略図

4-2-3 前頭前野領域観察のためのオープンスカル法

前頭前野におけるオープンスカル法は(3-2-2 海馬領域観察のためのオープンスカル法)と、手法場所のみが異なる。前頭前野領域の手術では、bregma 後方 1 mm から前方 3 mm まで、矢状静脈の直上に円形に骨を削った。

観察部位は bregma から前方約 1.98 mm の場所を観察している。

4-2-4 半導体励起レーザー

波長1064 nm、パルス幅7.5 psのGSLDベースの光源を10 MHzの繰り返し周波数で動作させた。各構成要素は光ファイバ内で結合され、最終出力もファイバ出力に対して行われた。ゲインスイッチングは電流を用いて半導体を励起してレーザーを発振させる手法であり、電流の周波数次第でレーザーの繰り返し周波数を任意に変更することが可能である。レーザーの繰り返し周波数はピークパワーに関連する変数であるため、繰り返し周波数が可変であることは*in vivo* 深部イメージングに対するピークパワーの寄与を調べるための重要な性質である。

生成された1064 nmの光パルスは、単一モードで偏光を維持する LMA フォトニック結晶ファイバ (PCF) (DC-200 / 40-PZ-Yb、NKTフォトニクス) からなる波長808 nmのポンプLDによって励起されたイッテルビウムドープファイバ増幅器 (YDFA) 内の誘導放出によって増幅された。YDFAは他の増幅器と比べて曲げることが容易であるため、アンプの小型化に適している。レーザー

の最終出力パワーを制御するために、ポンプLDの駆動電流を調整した。*in vivo* イメージングの場合、対物レンズの下で最大出力500 mWで動作させた。

4-2-5 顕微鏡観察

顕微鏡観察によってH-lineの生体脳を観察する際には、2光子顕微鏡 (A1R MP+; Nikon, Tokyo, Japan)を使用した。その際、オープンスカル法でカバーガラスと頭蓋骨を取り換えた状態のマウスを、顕微鏡下に設置した状態で観察した。対物レンズとして、Apo LWD 25x/1.10W (numerical aperture [NA]: 1.10, working distance [WD]: 2.0 mm; Nikon)を用いた。本研究では、対物レンズの補正環位置を、観察対象の深さに合わせて適時調整した。Ti:Saレーザーの場合、励起波長は1000 nm を使用した。蛍光シグナルは、GaAsP -NDDを介して検出された。EYFPおよびAlexa Fluor 546のマルチカラーイメージングの場合、GaAsP-NDDの前にあるダイクロイックミラーによって560 nmの波長で蛍光を分割した。

半導体レーザーを用いた場合、対物レンズ下の出力と走査速度は観察対象の深さに合わせて調整した。まずに、海馬歯状回の撮像のために、走査速度を1 / 32 fps、レーザー出力を300から500 mWに調整した。その後、海馬CA1領域の撮像のため、走査速度を1/16 fps、レーザー出力を200から300 mWに調整した。大

脳皮質の撮像の場合、走査速度を1/4 fps、レーザー出力を10 mWから200 mWに調整した。

4-2-6 データ解析

シグナルのピーク対バックグラウンド比（以下、R）を計算するために、白質下の全ての画像を、NIS Elements Ver.4.00（Nikon）を用いて解析した。解析前に、全ての画像は3×3 median filterを用いてフィルタリングした。各個別画像のシグナルピーク強度は、ラインプロファイル中の最大強度（錐体ニューロンのシグナル領域；n = 7）から測定した。バックグラウンド強度は、無信号領域中のラインプロファイル中の全画素の強度を平均することによって計算した。

Rは次の計算式のように定義した。

$$R = I_s / (\sum_{i \in B.G.} I_b^i / N_b)$$

ここで、 I_s は「シグナル」領域のラインプロファイルにおける最大蛍光強度である。 I_b^i は単一画素の蛍光信号強度であり、 N_b は背景のラインプロファイル内の画素数である。

4-3 研究結果

4-3-1 半導体励起レーザーを用いた*in vivo* 2光子顕微鏡法の開発

先行研究より、高度な電気パルスによって励起した波長 1064 nm、パルス幅 7.5 ピコ秒の GSLD を開発していたため、この種光を光増幅し、2光子顕微鏡へと導入した（図 4-2）。この 1064 nm-GSLD を基にした種光は 10 MHz の繰り返し周波数で発振され、発生した光パルスは平均出力が 4 W の LMA-YDFA によって増幅された。増幅後のレーザービームの M2 値は 1.3 であった。増幅した 1064 nm の光パルスは、GaAsP-NDD を組み込んだ 2 光子顕微鏡 (A1RMP+, Nikon) に導入した。ミラーは、ニコンが設計したオリジナルの Ti:Sa レーザーの光路を妨げるようにして設置し、ビーム形はペアレンズにより調整した。対物レンズ下の最大平均出力は 1 W であった。

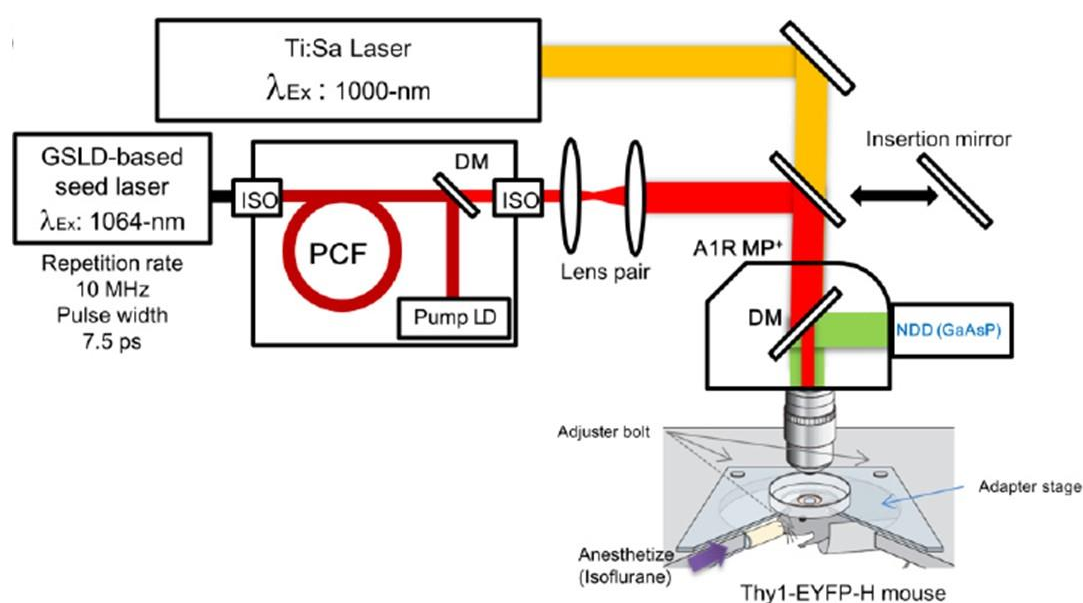


図 4-2 顕微鏡への種光の導光経路の模式図

4-3-2 半導体励起レーザーを用いた*in vivo* 2光子顕微鏡法観察の深部到達性の評価

新しく開発した1064 nm GSLDを基とした光源(以下、1064 nm GSLD)が、*in vivo* 2光子顕微鏡法においてどのようなパフォーマンスを発揮するのかを調べるため、H-lineマウスの深部到達性を評価した。

まずは若週齢マウスにおいて、波長1000 nmであり最大平均出力が約100 mW のTi:Saレーザーを用いて*in vivo* イメージングを実施した。その結果、GaAsP-NDDとTi : Sa レーザーの組み合わせでは皮質全ての層の第V層錐体細胞と海馬CA1錐体細胞が観察できた。一方で、最大平均出力が約500 mWである1064 nm GSLDでも同じように、皮質全ての層の第V層錐体細胞と海馬CA1錐体細胞が観察できた。また、1064 nm-GSLDでは海馬CA1細胞の頂上樹状突起や基底樹状突起の微細構造を高いシグナル・バックグラウンド比で観察することができた。加えて、このシステムではCA1領域の下部に位置する歯状回領域の顆粒細胞が観察できた (図4-3)。

若週齢マウス

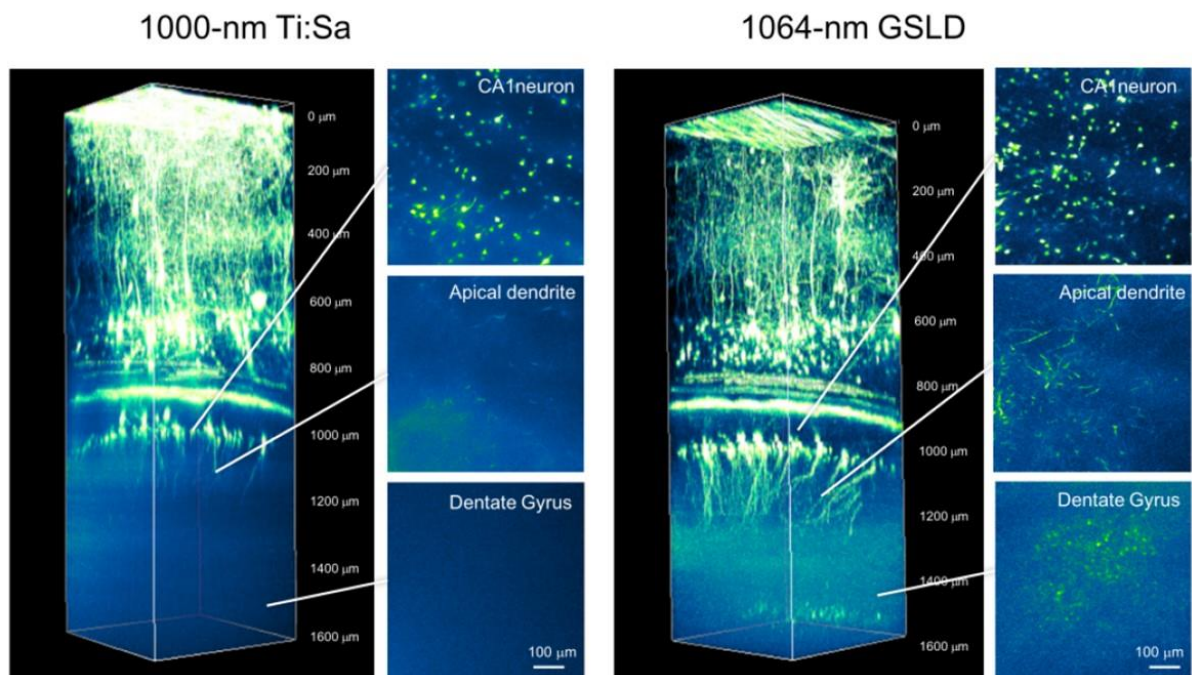


図 4-3 若週齢 H-line の *in vivo* 2 光子イメージング

次に、成体脳観察における 1064 nm GSLD の深部到達性を調べた。Ti:Sa レーザーでは、幾つかの海馬 CA1 錐体細胞を観察することができたが、その頂上樹状突起及び基底樹状突起の形状を観察することはできなかった。一方で 1064 nm GSLD では、皮質領域全層と CA1 領域の多くの神経細胞やその頂上樹状突起を観察することが可能だった。特に、脳表に血液の漏れが全くないような、オープンスカル法が最も成功した場合には、歯状回の顆粒細胞を観察することに成功した（図 4-4）。

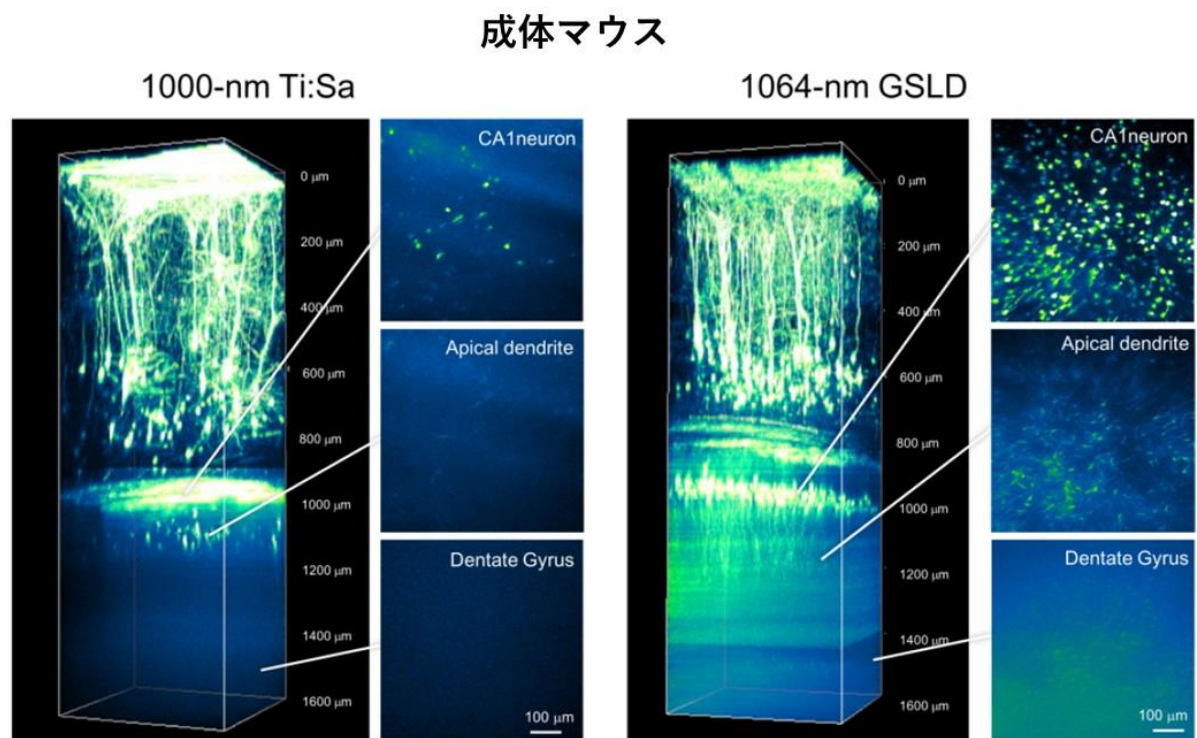


図 4-4 成体 H-line の *in vivo* 2 光子イメージング

海馬領域画像のピークシグナル対バックグラウンド比を定量的に解析した。

XY 平面の蛍光画像において、特に蛍光が暗いような深い観察場所において神経細胞のプロセスを区別するためには、シグナル輝度とバックグラウンドの比は重要な要素となる。7つの錐体細胞に着目してピークシグナル対バックグラウンド比 (R) を計算して図 4-8 に記載した。これらの解析より、若週齢と成体の両方において、Ti:Sa レーザーを使用した場合は 1100 μm を過ぎると R が急激に低下した。対照的に、1064 nm GSLD 光源を使用した場合は同じ深さであっても R は優位に高かった。特に、海馬の *in vivo* イメージでは、若週齢と生体マウスの両方において、1064 nm 光源では高い R 値が得られた (図 4-5)。

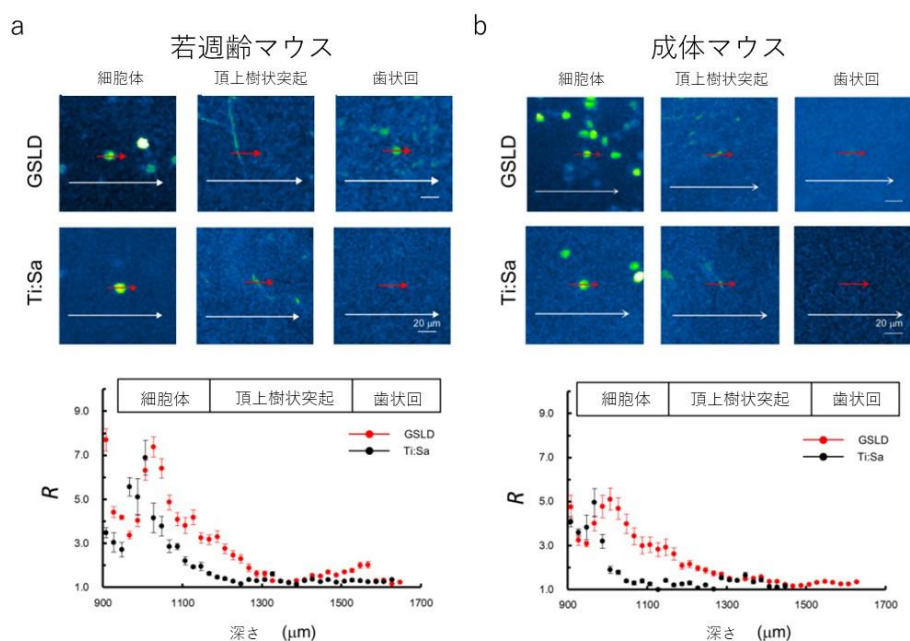


図 4-5 海馬領域画像中のピークシグナル対バックグラウンド比

(a)若週齢マウス脳観察時の R (b)成体マウス脳観察時の R

1064 nmGSLD を用いたマルチカラーイメージングの可能性を検討するため、赤色蛍光色素を尾静注（Alexa Fluor 546, 1.0 mg / ml in PBS, 0.1ml）し、H-line マウスの深部領域において神経細胞と血管のマルチカラーイメージングを行った。その結果、深さ 1000 μm において血管と海馬 CA1 細胞のマルチカラーイメージングを達成し、また、歯状回と海馬 CA1 領域の間に位置する海馬 fissure の血管を観察することができた（図 4－6）。

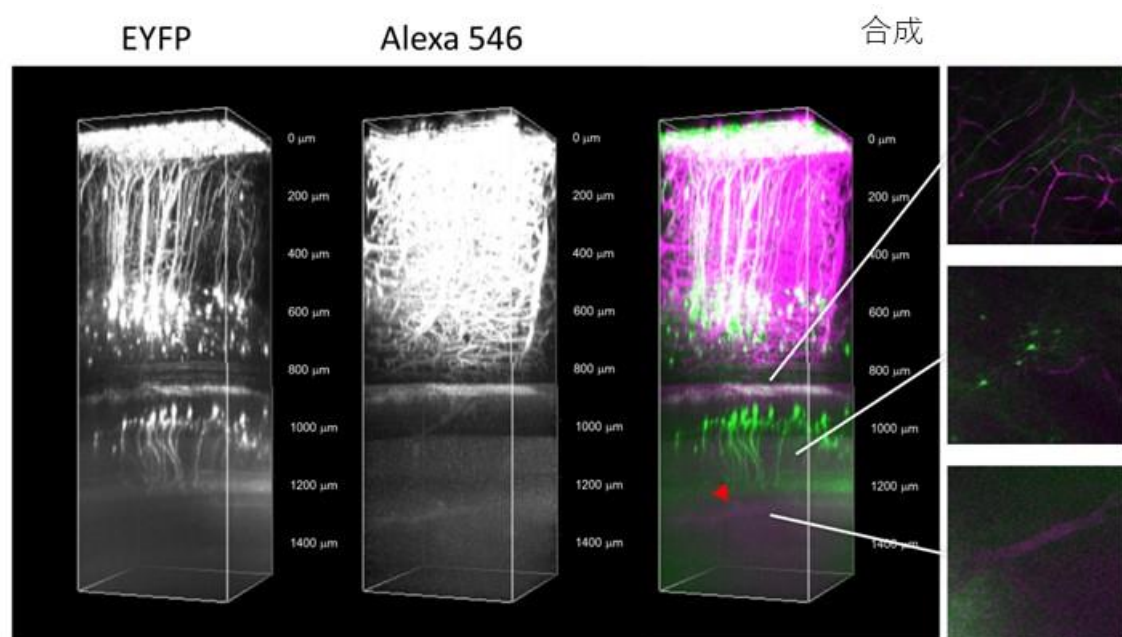


図 4－6 若週齢 H-line における *in vivo* 2 光子マルチカラーイメージング

本手法によって前頭前野領域に観察が可能になるかどうかを検討するため、若週齢H-line における 1064 nmGSLD を用いた深部イメージングを前頭前野領域の観察に応用した。その結果、GaAsP-NDD と Ti : Sa レーザーの組み合わせでは深さ 1.4 mm に位置する Cg1 領域の細胞体とその頂上樹状突起を観察することができた。一方で、1064 nm GSLD では、Cg1 領域の全域において細胞体とその頂上樹状突起が観察され、また、深さ 1.8 mm に位置する PrL 領域の細胞体を観察することができた（図 4－7）。

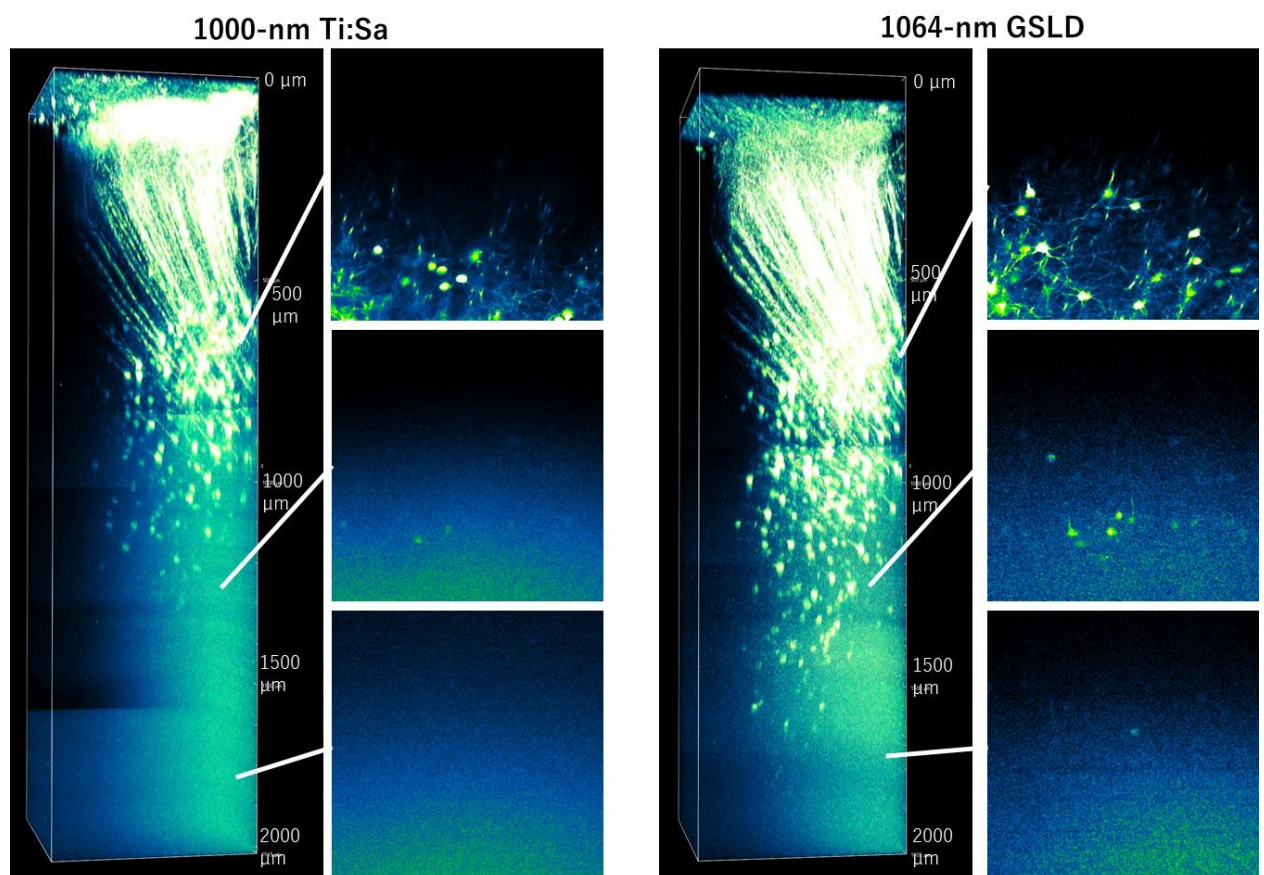


図 4－7 若週齢の前頭前野における *in vivo* 2 光子イメージング

4-4 考察

本章では、1064nm GSLD と高感度ディテクターを用いることで、若週齢と成体マウスの両方において表層から 1.5 mm 以上の深さに位置する歯状回細胞の *in vivo* イメージングに成功し、CA1 の全景を観察することができた。さらに、このシステムを前頭前野観察に応用したところ、深さ 1.8 mm に位置する前頭前野 PrL 領域の神経細胞の観察に成功した。

4-4-1 観察の深部到達性向上の理由

先行研究において 1030 nm レーザーを用いることで若週齢マウスの CA1 神経細胞の細胞体を観察できていたが、CA1 細胞の頂上樹状突起を観察することはできていなかった(Kawakami *et al.*, 2013)。本研究では成体マウスにおいて CA1 細胞の頂上樹状突起と基底樹状突起の細かなプロセスを観察することができた。錐体細胞のプロセスを高い R で観察できた理由の一つは、1064 nm 光源の高い出力であると考えられる。励起に用いられる一秒あたりの光子の数(Denk *et al.*, 1990)は 1030 nm レーザーの 13 倍であり、1000 nmTi ; Sa レーザーの 1.4 倍である (テーブル 4-1)。この高い一秒あたりの光子数が若週齢マウスにおける歯状回の顆粒細胞を観察可能にした重要な要素であると考えられる。一方で、1000

nm Ti:Sa レーザーでは、先行研究における 910 nm Ti : Sa レーザーでは観察できなかった成体マウスの海馬錐体細胞を観察することができていた (Kawakami *et al.*, 2013)。先行研究のケースを比較すると本研究では、対物レンズ下のレーザーパワーが高く、また、波長が長波長であり、高感度 GaAsP デテクターを使用している。これらの違いが、観察の深部到達性を向上させたのだろうと考えられる。

	λ_{ex}	τ_{pulse}	f_{rept}	P_{aver}	P_{peak}	Na
GSLD based laser	1064 nm	7.5 p sec	10 MHz	500 mW	6.7 kW	4.4×10^7
Mode-locked Ti:Sa laser	1000 nm	70 f sec	80 MHz	100 mW	17.9 kW	3.1×10^7
Mode-locked LD based laser	1030 nm	5.0 p sec	20 MHz	170 mW	1.7 kW	3.4×10^6

λ_{ex} : excitation wavelength. τ_{pulse} : pulse width. f_{rept} : repetition rate. P_{aver} : average power. P_{peak} : peak-power. Na : The number of photons absorbed per fluorophore per second [16].

(表 4 - 1) 励起に用いられる一秒あたりの光子数

4-4-2 ピコ秒パルスレーザーによるバイオイメーシング

Ti : Sa レーザー等のフェムト秒光源は高い繰り返し周波数と高い蛍光輝度を達成できるため、2 光子顕微鏡に広く用いられている。一方で、Ti : Sa レーザーはピコ秒のパルス幅で発振することは難しい。また、ピコ秒パルスによる 2 光子励起は一般的に困難であるとされていた。そこで先行研究では、高い繰り返し周波数におけるピコ秒パルスレーザーは蛍光物質を励起させ、バイオイメ

ージングを行うことを可能にしてきた(J.Bewersdorf, 1998)。加えて本研究では、高度に増幅したピコ秒パルスは、生体中においてマウス脳の海馬神経細胞を可視化させた(Yokoyama *et al.*, 2006; Kawakami *et al.*, 2013; Kusama *et al.*, 2014)。

ここに、1 秒間の光子吸収数[Na] は、パルス幅 τ 、ピーク値の 2 乗、繰り返し周波数と比例することを以下のように表現する。

$$N_a \propto P_{peak}^2 \tau_{pulse} f_{repi}$$

ここに、レーザーのピークパワーは以下のように示される。

$$P_{peak} = \frac{P_{average}}{\tau_{pulse} f_{repi}}$$

従って、本研究ではパルス幅と繰り返し周波数を下げ、PCF によって増幅させたピコ秒パルスによって 2 光子蛍光輝度を向上させることができた。

また、以上の式より Na は以下のように書くことができる

$$N_a \propto P_{peak} P_{average}$$

このピークパワーと平均パワーが Na と比例している関係は、ピコ秒パルスとフェムト秒パルスの光源においてピークパワーと平均パワーが同一だったとしても同じだけの 2 光子励起が期待できるということである。これらの結果は、高ピークパワーと高平均パワー、低繰り返し周波数であるピコ秒パルス光源の 2 光子顕微鏡に対する有用性を示している。

4-4-3 高ピークパワーレーザーを用いることによる生体へのダメージ

コニグらの先行研究より、ピコ秒光源を用いた2光子顕微鏡はフェムト秒光源よりも、生きている細胞に対して害が無い事が報告されていた(König *et al.*, 1999)。この報告を裏付けるように、海馬観察中、たとえ 1064 nm ピコ秒レーザーの最大出力 (500mW) を使っていても、フォトブリーチングもフォトダメージも生じなかった。焦点における脳へのダメージは 500mW 以上を使って観察したときにのみ観察された。この結果は、今回のピコ秒レーザーの平均出力 500mW は生体脳における水の吸収によるダメージの境界値を表しているだろうと考えられる。この高い境界値は、生体脳が脳脊髄液や血液の環流によって熱を継続的に取り除いているためだろうと考えられる。加えて、本研究においてカスタマイズしたヘッドチャンバーは浸液として多量の水を入れている為、これが頭からの熱を取り除いている可能性がある。このような還流性の空冷システムは生体脳内における *in vivo* 2光子顕微鏡法を可能にしていると考えられる。

4-4-4 成体マウスにおける歯状回観察

成体マウスにおいて、本研究では必ずしも歯状回顆粒細胞を観察できたわけ

ではなかった。これはマウス脳の成長による光透過性の変化が2光子励起効率や蛍光画像の取得に影響を与えているためだと考えられる。可視光や近赤外光の透過性は若い動物において高く、成長後のマウスでは低い。このような年齢依存の透過性の変化は年老いた動物内での深部観察を妨げる。加えて、血球細胞中のヘモグロ빈は光を強烈に吸い取るため、オープンスカル法の手術状況において脳表の少量の出血がある場合は、励起や蛍光波長における透過性に大きな影響を与えるだろうと予想される。

4-4-5 海馬 CA1 細胞の樹状突起スパイン観察

海馬 CA1 神経細胞の樹状突起は高い R 値で観察することができたが、神経細胞の樹状突起スパインを観察することはできなかった。CA1 神経細胞の直上に存在する白質や海馬アルベウスはミエリンを含む複雑な構造であるため、これらの高い屈折率や散乱が原因でレーザーの集光スポットが大きくなってしまうため、海馬のスパインの微細構造が観察できなかったのだろうと考えられる。加えて、観察法がラインスキニングであるため、心拍を原因とする動きが微細構造をぼやかしてしまう可能性がある。海馬領域観察中のスキンスピードは 1/32 fps であり、微細構造は心拍による反応から動いてしまうため、樹状突

起スパインの観察は技術的に難しいと考えられる。

4-4-6 前頭前野領域の樹状突起スパイン観察

本研究では、前頭前野 PrL 領域の *in vivo* イメージングを達成した。しかしながら、樹状突起の全域や樹状突起スパインを観察することはできなかった。この原因として、前頭前野直上に存在する矢状静脈が観察を阻害していること可能性として挙げられる。矢状静脈中の大量の血球やヘモグロビンが励起光及び蛍光を強く吸い取ってしまうため、励起光の光路が少しでも矢状静脈に被ってしまうと、集光スポットが乱れ、画像がぼやけてしまう。改善策としては、直上の皮質を吸い取る方法や GRIN レンズを皮質に埋め込む方法、血液の代用品である白い血液を用いて血中ヘモグロビンの割合を少なくする方法が挙げられる。しかしながら、前者二つは脳内ネットワークを大きく傷つけてしまい、また、白い血液は現状では副作用が大きいため、前頭前野領域の観察には技術的な問題点が多く残されている。

4-4-7 今後の展望

本章では、1064nm GSLD と高感度ディテクターを用いることで、若週齢と成体マウスの両方において表層から 1.5 mm 以上の深さに位置する歯状回細胞の *in vivo* イメージングに成功し、CA1 の全景を観察することができた。さらに、このシステムを前頭前野観察に応用したところ、深さ 1.8 mm に位置する前頭前野 PrL 領域の神経細胞の観察に成功した。以上から、本手法によって皮質より深部の神経細胞機能を観察することが可能になったと考えられる。将来的には、本技術が、海馬領域や前頭前野領域など、生きている脳の機能的なコネクトームにおいて、完全な神経活動を分子レベルおよび細胞レベルで明らかにするために使用できる基礎技術に貢献することが期待される。

また、本研究において、*in vivo* 2 光子顕微鏡法において、励起光におけるピークパワーとパルス幅が重要であることが示された。以上から、本研究が今後の 2 光子顕微鏡開発に貢献することが期待される。

4-5 本研究のまとめ

本章では、1064nm GSLD と高感度ディテクターを用いることで、若週齢と成体マウスの両方において表層から 1.5 mm 以上の深さに位置する歯状回細胞の *in vivo* イメージングに成功し、CA1 の全景を観察することができた。さらに、このシステムを前頭前野観察に応用したところ、深さ 1.8 mm に位置する前頭前野 PrL 領域の神経細胞の観察に成功した。これらの結果により、高ピークパワーピコ秒パルスレーザーが生体脳の *in vivo* 2 光子イメージングにおいて有用であることが示された。

参考文献

- Denk, W., Strickler, J.H. & Webb, W.W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248**, 73-76.
- Grutzendler, J., Kasthuri, N. & Gan, W.B. (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, **420**, 812-816.
- J.Bewersdorf, S.W.H. (1998) Picosecond pulsed two-photon imaging with repetition rates of 200 and 400 MHz, *J.Microsc.Oxford*, pp. 28-38.
- Kawakami, R., Sawada, K., Sato, A., Hibi, T., Kozawa, Y., Sato, S., Yokoyama, H. & Nemoto, T. (2013) Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser. *Sci Rep*, **3**, 1014.
- Kusama, Y., Tanushi, Y., Yokoyama, M., Kawakami, R., Hibi, T., Kozawa, Y., Nemoto, T., Sato, S. & Yokoyama, H. (2014) 7-ps optical pulse generation from a 1064-nm gain-switched laser diode and its application for two-photon microscopy. *Opt Express*, **22**, 5746-5753.
- König, K., Becker, T.W., Fischer, P., Riemann, I. & Halbhauer, K.J. (1999) Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes. *Opt Lett*, **24**, 113-115.

Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., Fanselow, M.S. & Tonegawa, S. (2012) Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*, **149**, 188-201.

Nemoto, T. (2008) Living cell functions and morphology revealed by two-photon microscopy in intact neural and secretory organs. *Mol Cells*, **26**, 113-120.

Oheim, M., Beaupaire, E., Chaigneau, E., Mertz, J. & Charpak, S. (2001) Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J Neurosci Methods*, **111**, 29-37.

Yokoyama, H., Guo, H., Yoda, T., Takashima, K., Sato, K., Taniguchi, H. & Ito, H. (2006) Two-photon bioimaging with picosecond optical pulses from a semiconductor laser. *Opt Express*, **14**, 3467-3471.

第5章 結論と考察、今後の展望

本論文では、超解像顕微鏡法や2光子励起蛍光顕微鏡法を改善し、蛍光シグナルや空間分解能の劣化、観察深度の限界という問題点を克服することにより、蛍光顕微鏡を用いた固定脳標本や生体脳内の単一神経細胞上のシナプス形態の可視化を目指した。

第2章ではマウス固定脳スライス標本をLUCID処理することで、標本内部の透過率と屈折率が上昇し、固定標本内のSIMイメージングが可能になることを示した。超解像イメージングはその性質上、特殊な蛍光タンパク質の使用や複雑な光学系を必要とするが、SIMは構造化照明のみを必要とすることから蛍光物質の選択が容易であり、また多色イメージングが可能であることから、他の超解像顕微鏡法と比べて汎用性が高い。本研究では透徹剤として屈折率が1.49のLUCIDを採用して透明化を行って深さ60 μm までの観察を可能としたが、LUCIDの屈折率をカバーガラスや油浸液と同じ1.51まで向上させる、または屈折率が1.51であるSeeDB2(Ke et al., 2016)等を用いることによって、さらに深部で高解像度なSIMイメージングが可能になる可能性がある。また、SIMの応用方法は固定脳のみではなく、*in vivo*脳イメージングも想定されており、実際に報告されている(Turcotte et al., 2019)。この報告では補償光学によって生体脳中の光学収差を補正して*in vivo* イメージングを可能にしていることから、固定脳内のSIMイメージングにおいても光学収差補正技術を組み合わせることでさらに高度なイメージングが可能になる可能性がある。一方で、STEDと「海馬窓」を応用した海馬の*in vivo* 超解像イメージングが行われており、海馬神経細胞におけ

る樹状突起スパインの形態変化が報告されている (Pfeiffer *et al.*, 2018)。現状の N-SIM の対物レンズは大きいワーキングディスタンスを想定していないため同じ実験を再現することはできないが、対物レンズの開発次第では同様に海馬の超解像イメージングが可能になるだろう。また、この先行研究では 4 日間で約 40 % のスパインがスパイン形態依存の変化を生じていると報告があった。大脳皮質で同じような樹状突起スパインのターンオーバーが生じているかはわからないが、SIM を用いた大脳皮質におけるスパインターンオーバーの研究は可能であると考えられる。

第 3 章では、新たに共同研究者らによって開発された PCF によって増幅されたハイピークパワーピコ秒パルスの 1064 nm GSLD と高感度ディテクターを用いることで、若週齢と成体マウスの両方において表層から 1.5 mm 以上の深さに位置する海馬歯状回細胞の *in vivo* イメージングに成功し、CA1 の全景を観察することができた。さらに観察の深部到達性を向上させるためのパラメーターとして、(1) レーザーの性質、(2) ディテクターの感度、(3) サンプル内の光散乱の低減、(4) 蛍光の長波長化、(5) 補償光学の応用、が考えられる。(1) の改善点として、レーザーの繰り返し周波数の変更が考えられる。本論文で使用した独自開発した 1064 nm GSLD の特徴として、波長やパルス幅を変更せずに繰り返し周波数のみを変更できる長所がある。この長所を用いて繰り返し周波数を 5 MHz にして同じ場所を観察した結果、通常 10 MHz の場合よりも 5 MHz の場合の方が 1.6 倍～2 倍の蛍光量が得られた。また、近年では、工業用のレーザーを用いた生体脳深部イメージングの報告もなされている。例えば、本研究室ではフェムト秒パルスのハイパワーレーザーである Femto Train (最大出力 2.2

W, 波長1040 nm, フェムト秒パルス, 繰り返し周波数10 MHz) を導入した場合、前頭前野にて1.5 mm程まで深部到達性が向上した。従って、今後に深部 *in vivo* イメージングに特化した励起レーザーが発売された場合は、2光子顕微鏡のシステムに組み込むことでさらに深い領域を可視化することが可能になるだろう。また、本研究ではGaAsPディテクターを用いて (2) 蛍光の取得量を向上させることによって深部観察を達成していた。本研究では蛍光の取得速度を最大限まで遅くして海馬歯状回の観察を行っていたことから、海馬歯状回の蛍光の光子を十分に検出できていないと予測される。以上から、さらに高感度のディテクターが開発された場合には、早い取得速度でさらに深い領域を観察することが可能になるだろう。そして、蛍光取得を増やす方法として、(3) サンプル内の光散乱を低減する手法が二つ考えられる。一つは本研究室の先行研究であるMagical を用いた手法である(Kouichirou Iijima 2019)。この手法ではグリセロール入りの飲用水をマウスに飲ませることで、最終的に観察の深部到達性を向上させる。この原理は、グリセロールによって血中の屈折率が向上し、その結果光散乱が低減しているのだろうと考えられている。もう一つの手法はマウスの血液を人工の代替血液に置換する手法である。先行研究ではラットにおいて行われているが(Haiss et al., 2009)、血管下の構造は観察できるようになるが観察の深部到達性は向上しなかった。この結果は、白い代替血液が蛍光を強く光散乱させてしまうことが原因だと考えられる。代替血液はパラフルオロカーボンをミセルで閉じ込めている構造になっており、ミセルは脂質で構成されていることから屈折率差が大きく光散乱の原因になる。そこで、脂質を使用せずにミセルの構築が可能であるナノ粒子にパラフルオロカーボンを閉じ込めること

ができれば、透明な血液が完成するのではないかと考えられる。もしこのような透明な血液を用いることができれば、*in vivo* 2光子顕微鏡法における観察の深部到達性は著しく向上するだろう。また、この手法を用いることで、前頭前野領域の観察を妨げる矢状静脈の影響を緩和することができるのではないかと考えられる。(4)の蛍光の長波長化については、生体内における散乱の強度は波長の4乗に反比例するため、できる限り長波長の蛍光の使用が望まれる。本研究では神経細胞の標識にEYFPを用いていたが、tdTomatoなど長い波長の蛍光タンパク質を用いることで深部到達性の向上が期待される。最後に、*in vivo* 2光子顕微鏡法における深部到達性の向上のためには(5)補償光学の応用が考えられ、実際に応用されている研究もある(Wang et al., 2014)。本研究で観察された海馬歯状回は蛍光輝度が低かったため、補償光学による収差補正を行うことで蛍光強度の向上させることが可能だろうと考えられる。一方で、本システムは*in vivo* 長期イメージングへの応用も考えられる。通常の長期イメージングではカバーガラス上に免疫細胞等が集まり、免疫細胞を原因とする光散乱などによってイメージングを阻害してしまう。しかし、光散乱によって減少してしまう励起光を補填するためにハイパワーレーザーを用いる、もしくはハイパワーレーザーを用いて免疫細胞そのものを焼いてしまうことによって、*in vivo* 長期イメージングにおける問題点である光散乱によるイメージング阻害を克服できるのではないかと期待される。

第4章では、SIMイメージングを用いて、長期薬剤投与による前頭前野領域の第V層錐体細胞のスパイン形態分布における微細な変化を明らかにした。この結果より、長期間のストレスによって前頭前野第V層錐体細胞の重要な樹状突起に

においてもスパイン形態の変化が生じていることが分かった。この変化の原因は、前頭前野内のBDNFの減少か、前頭前野への入力が少なくなったことが挙げられる。BDNFの減少に着目する場合は、BDNFを産生するアストロサイトの機能低下に着目する必要がある(Banasr *et al.*, 2011b)。しかし、Dexが作用するグルココルチコイドレセプターは神経細胞とアストロサイトの両方に発現しており、アストロサイトは神経細胞と相互作用しているため、Dexの長期投与がどちらに機能して第V層錐体細胞の衰退を引き起こしているのかを検討する必要がある。Dex投与によってアストロサイトと神経細胞のどちらが先に機能不全を起こすのかを調べるため、in vitroの系における実験が望まれる。一方で、変化の原因として前頭前野領域への入力に着目する場合には、シナプス前細胞がどの領域に属するのかを識別し、どの神経回路に属しているシナプスが慢性ストレスホルモン投与によって衰退しているのかを調べる必要がある。また、この場合、社会的敗北ストレスのような他のうつ病モデルマウスにおける樹状突起スパインを比較することで、そのモデル特有のストレスがどの神経回路に属している神経細胞を衰退させるのかを明らかにすることができると期待される。

本研究の将来的な展望としては、前頭前野領域のシナプス形態を生体脳観察することにより、うつ病発症過程の神経回路の変化を観察することにある。本研究により固定脳では前頭前野領域のシナプスの超解像観察を達成したため、うつ発症前後のシナプス形態を捉えることは可能になった。今後は前頭前野領域の投射先に逆行性トレーサーによる標識を行い、神経回路を識別した際の解析が求められる。次に必要なのは生体脳におけるシナプス観察技術である。現状ではPrL領域の細胞体が観察できている程度なので、上記の改善点を踏まえさ

らなる深部到達性の向上が望まれる。PrL領域の可視化を達成した際には、Ca²⁺イメージングやシナプス形態のイメージングにより、特定の神経回路に所属した神経細胞が衰退していく過程を観察することが可能になるだろう。

以上より本論文では超解像顕微鏡法や2光子励起蛍光顕微鏡法を改善し、蛍光シグナルや空間分解能の劣化、観察深度の限界という問題点を克服することにより、固定脳標本内の単一神経細胞上のシナプス形態の超解像イメージングやPrL領域における *in vivo* 深部観察を達成した。この成果は将来的にマウスの固定脳・生体脳におけるコネクトームを明らかにする為の基礎技術になることが期待される。

参考文献

- Banasr, M., Dwyer, J.M. & Duman, R.S. (2011b) Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Curr Opin Cell Biol*, **23**, 730-737.
- Haiss, F., Jolivet, R., Wyss, M.T., Reichold, J., Braham, N.B., Scheffold, F., Krafft, M.P. & Weber, B. (2009) Improved in vivo two-photon imaging after blood replacement by perfluorocarbon. *J Physiol*, **587**, 3153-3158.
- Ke, M.T., Nakai, Y., Fujimoto, S., Takayama, R., Yoshida, S., Kitajima, T.S., Sato, M. & Imai, T. (2016) Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. *Cell Rep*, **14**, 2718-2732.
- Kouichirou Iijima , T.O., Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto (2019) Optical clearing of living brains with MAGICAL to extend in vivo imaging, bioRxiv.
- Pfeiffer, T., Poll, S., Bancelin, S., Angibaud, J., Inavalli, V.K., Keppler, K., Mittag, M., Fuhrmann, M. & Nägerl, U.V. (2018) Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo. *Elife*, **7**.
- Turcotte, R., Liang, Y., Tanimoto, M., Zhang, Q., Li, Z., Koyama, M., Betzig, E. & Ji, N. (2019) Dynamic super-resolution structured illumination imaging in the living brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **116**, 9586-9591.
- Wang, C., Liu, R., Milkie, D.E., Sun, W., Tan, Z., Kerlin, A., Chen, T.W., Kim, D.S. & Ji, N. (2014) Multiplexed aberration measurement for deep tissue imaging in vivo. *Nat Methods*, **11**, 1037-1040.

謝辞

本研究は2011年4月から2019年9月にかけて、北海道大学大学院情報科学研究科 生命人間情報科学専攻脳機能工学研究室にて行いました。本研究を進めるにあたり、北海道大学大学院情報科学研究科の根本知己教授より、具体的な実験・解析手法から本論文の構成・執筆にいたるまで、長きに渡り、数多くの貴重なご指導を頂きました。心より深く感謝申し上げます。また、本論文の執筆および審査にあたり、同研究科の岡嶋 孝治教授、榎木 亮介准教授からも数多くのご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。

北海道大学大学院情報科学研究科の川上良介助教（現、愛媛大学大学院医学研究科准教授）には、研究計画等におけるご指摘を行っていただいたこと感謝申し上げます。

特に、本研究における研究成果は、学内外における非常に多くの方々にご協力いただいたおかげで遂行することができました。第2章における研究では、北海道大学ニコンイメージングセンター様にはSIMを使用させて頂きました。心より深く感謝申し上げます。第3章における研究では、東北大学 New Industry Creation Hatchery Center (NICHe)未来フォトニクス創製研究分野の横山弘之教授、研究支援者の草間裕太様（当時）には半導体ベース光源の種光に関する部分を、東北大学多元物質科学研究所プロセスシステム工学研究部門 光物質科

学研究分野の佐藤俊一教授、小澤祐市准教授には光増幅器に関する部分の開発、提供、使用方法の教授等をして頂きましたことを深く御礼申し上げます。

本研究の内容に関して様々なご指摘、ご指導を承りました愛媛大学大学院医学研究科の今村健志教授、日比輝正特任講師（当時）、大友康平助教、飯島光一郎博士（当時）に深く感謝申し上げます。

引用許諾

図 2-3 から図 2-14 、図 3-1 から図 3-4 は Wiley 社の学術雑誌 European journal of neuroscience に、図 4-2 から図 4-7 は、OSA 社の学術雑誌 Biomedical Optics Express に著者が筆頭著者と第 2 著者して投稿した論文の図を用いた。Wiley 社と OSA 社は引用許諾を必要としなかった。

研究業績

1. 主著学術論文

(1) Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Ryuichi Shigemoto, Tomomi Nemoto,
“Super-resolution structural analysis of dendritic spines using three-dimensional
structured illumination microscopy in cleared mouse brain slices”, Eur. J.

Neurosci. (2018), vol. 47, No.9, pp:1033-1042, DOI: 10.1111/ejn.13901,

IF:2.941, TC:1

(2) Ryosuke Kawakami *, Kazuaki Sawada*, Yuta Kusama, Yi-Cheng Fang,

Shinya Kanazawa, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi

Nemoto, In vivo two-photon imaging of mouse hippocampal neurons in dentate
gyrus using a light source based on a high-peak power gain-switched laser diode,

Biomed. Opt. Express (2015), Vol. 6, Issue 3, pp. 891-901, DOI:

10.1364/BOE.6.000891,

IF:3.337 ,TC:22 (*: equally contributed)

2. 査読付き国際会議

(1)Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Yi-Cheng Fang, Jui-Hung Hung, Yuichi
Kozawa, Kohei Otomo, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi Nemoto,

“Improvement of two-photon microscopic imaging in deep regions of living mouse brains by utilizing a light source based on an electrically controllable gain-switched laser diode”, SPIE Bios. 2018/01/28 *査読付国際会議 ポスター発表

3. 学術論文

- (1) Megumi Nakao, Shintaro Takemoto, Tadao Sugiura, Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, Tetsuya Matsuda, Interactive Visual Exploration of Overlapping Similar Structures for Three-dimensional Microscope Images, BMC Bioinformatics (2014), vol. 15, Article No. 415, doi:10.1186/s12859-014-0415-x, IF:2.213, TC:0 5.
- (2) Megumi Nakao, Kosuke Kurebayashi, Tadao Sugiura, Tetsuo Sato, Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, Kotaro Minato, Tetsuya Matsuda, Visualizing in vivo Brain Neural Structures Using Volume Rendered Feature Spaces, Computers in Biology and Medicine, vol. 53, pp. 85-93. (2014) doi: 10.1016/j.compbimed.2014.07.007.IF: 2.115, TC:2 6.
- (3) Ryosuke Kawakami, Kazuaki Sawada, Aya Sato, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, and Tomomi Nemoto, Visualizing

hippocampal neurons within vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser, Sci. Rep. (2013), vol. 3, Article No.1014, pp: 1014-1 - 1014-7 doi:10.1038/srep01014, IF: 5.07, TC:73 7.

(4) 澤田和明、川上良介、根本知己「透徹化固定脳における大脳皮質スパイン形態の超解像イメージング」、レーザー学会第 484 回研究会報告、p.29-34 (2015)

4. 講演（学位論文関係）

(1) Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, poster presentation: "Optimization of laser illumination in two-photon microscopy for "in vivo" deep imaging in living mouse brain", RIES international symposium 2012, Sapporo, Dec. 11, 2012 ポスター発表

(2) 澤田和明、川上良介、根本知己「Optimization of laser illumination in two-photon microscopy for in vivo deep imaging in the mouse」2013 年 6 月 21 日、第 36 回日本神経科学大会、国立京都国際会館（京都市）、ポスター発表

(3) Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, and Tomomi Nemoto," Morphological

analysis of dendritic spines in the mouse prefrontal cortex layer V pyramidal neurons induced by the depression-like symptom”, the 16th RIES-Hokudai international symposium 2015, Hotel Châteraisé Gateaux, Kingdom Sapporo, Sapporo, Nov. 11, 2015 ポスター発表

(4) 澤田和明、川上良介、根本知己、「透徹化固定脳における大脳皮質スパイン形態の超解像イメージング」、レーザー学会第 484 回研究会、p.29-34 (2015), ホテルグランドヒル市ヶ谷（東京都新宿区）、2015 年 12 月 3 日、ポスター発表

(5) Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, : ”Morphological analysis of dendritic spines in the fixed brain using the super resolution microscopy with the clearing reagent”、レゾナントバイオ班会議、2016年3月16 日 ポスター発表

(6) Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, “Morphological analysis of dendritic spines using structured illumination microscopy with a clearing method for the fixed mouse Brain”, 第93回日本生理学会大会, 2016年3月22-24日、札幌コンベンションセンター（札幌市）ポスター発表