



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	2光子顕微鏡法を用いた補償光学による生体組織深部の可視化解析
Author(s)	山口, 和志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第14592号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14592
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81545
Type	doctoral thesis
File Information	Kazushi_Yamaguchi.pdf



令和 2 年度 博士論文

2 光子顕微鏡を用いた補償光学による
生体組織深部の可視化解析

Two-photon microscopic characterization
within deeper layers in biological tissues
utilizing adaptive optics

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 ナノ材料光計測研究分野
山口 和志

要旨

生体組織機能の維持には細胞間の物理・化学的な相互作用が必須であるため、相互作用を損なわない低侵襲な計測法が求められる。蛍光顕微鏡法は非接触かつ単一細胞レベルで計測できるが、組織内部の計測は困難だった。そこで、組織の三次元構造を保ちつつ、非侵襲的に計測できる2光子顕微鏡法が開発された。この手法では可視域の蛍光分子を生体組織透過性に優れる近赤外光で励起するため、組織深部の蛍光分子も励起できる。また、励起範囲が集光点付近に限局するため、焦点外の領域への侵襲性が低い、共焦点系を用いずに光学断層像が取得できるといった特徴がある。さらに、組織の局所的な刺激や障害に応用され、細胞間相互作用の解析、損傷モデルの確立に貢献している。

生命科学研究に貢献の大きい2光子顕微鏡法だが、組織内の細胞の微細形態や生理活性の計測深度には向上の余地がある。深部到達性の低下は、組織内での光吸収と散乱による励起光強度の低下と収差による焦点体積の増大によって、組織深部で2光子励起効率が低下することが原因である。深部での励起効率の向上のために様々な光学的アプローチが提案されているが、そのほとんどが顕微光学系の大幅な変更を必要とする。組織機能や疾患の解明には膨大な基礎研究が必須なため、計測技術の改良法は多くの生命科学者にとって簡便である必要がある。また、2光子顕微鏡法では三次元組織内の多くの細胞を観察できるが、解析法が確立していないために、ごく一部の細胞に関するデータしか活用できていない。細胞間の相互作用の解析のためには、多数の細胞を高精度で三

次元的に自動検出・追跡するプログラムが必要だが、その構築には高度な情報科学の技能が必須である。これらの2光子顕微鏡法の生命科学応用における光学・情報科学上の課題を踏まえて、本論文では、組織深部の2光子励起効率を高めるために、組織による光吸収・散乱・収差を低減するための汎用性の高い改良法の開発を目指した。また、三次元多細胞系において、細胞の生理活性変化やその細胞間伝搬を可視化・解析する手法の確立を目指した。

本論文ではまず、マウス生体脳を対象に、深部での2光子励起効率を向上させるための励起光の照射条件を探索した。通常、励起レーザー光のビーム径は対物レンズの瞳径より大きく設定するため、ビーム径を絞ると対物レンズ下の励起光強度が向上する。さらに、組織内での散乱や吸収、収差は光路長依存なため、ビーム径を絞って試料に対する入射角の大きい成分を削ると、それらの影響も低減できる。また、収差は屈折に起因するため、屈折率差の低減によって発生が抑えられる。そこで、顕微鏡に標準搭載されている機構で調整できるレーザー光のビーム径、および、水とグリセリンを混合することによって調整できる対物レンズの浸液の屈折率に着目した。ビーム径と屈折率の調整のために、マウス生体脳内部で焦点体積を可視化・解析する手法を開発した。この手法を用いて焦点体積をモニターし、対物レンズの瞳径に対してビーム径を3分の2に絞った場合には、脳深部の焦点体積が増大することなく対物レンズ下で2.3倍の励起光強度を得ることができた。また、同手法を用いて浸液の屈折率を1.33-1.37まで0.01刻みで変えたところ

ころ、屈折率が 1.35 もしくは 1.36 のときに脳内の焦点体積が最小になった。ビーム径を 3 分の 2 に、浸液の屈折率を 1.36 にそれぞれ変更した条件(至適条件)を用いて、深部到達性を評価した。通常の条件では大脳皮質下の構造を観察できなかったが、至適条件を用いることで海馬 CA1 細胞が可視化できた。また、至適条件の適用によって、大脳皮質全層でのシナプス構造の可視化や高コントラストの Ca^{2+} イメージング、深部局所破壊にも成功した。さらに、局所破壊後に周囲の細胞の遊離 Ca^{2+} 濃度変化を観察すると、他の細胞への活性の伝搬や同一と思しき細胞集団で繰り返し活性が起こることを発見した。この研究で新たに見出した至適条件は、極めて安価に実装でき、複雑な光学系の再調整も一切必要としないため、生命科学者が広く利用可能な特色を有する。

一方、上記の手法では複数の屈折率界面が観察系に存在する場合、収差補正効果が薄かった。より複雑な収差を補正するために、光波面の制御によって任意の収差を補正できる空間光位相変調器 SLM を既存の顕微光学系に外部導入した。具体的には、励起光路に SLM と 2 枚のレンズから成るリレー光学系を挿入する簡便な変更によって、励起光波面の位相分布の制御に成功した。さらに実測した試料の表面形状の三次元情報を基に、光線追跡によって試料内部で発生する収差量を推定し、SLM に与える位相変調量の分布を算出するプログラムを作成した。異なる形状の様々な試料で原理実証を行い、複雑な光学収差も補正できることが確認できた。さらに、本手法の適用によって、これまで観察報告のないマウス生体脳第二次運動野領域第 V 層のシナプス構造の可視化を

実現した。本手法は光線追跡法を用いて緻密に位相変調量を算出するため、複雑な形状の試料や空間分解能に優れた対物レンズにも適用できる点が既報から大きく異なる新規点である。また、本手法は試料の表面形状を実測すれば試料深部の観察対象領域を一度も撮影することなく位相変調量が決定できるため、組織への光毒性や光褪色を抑えられる利点もある。本手法を用いることで、第二次運動野深部のシナプス構造が可視化できたため、運動障害を伴う疾患の発症・進行機構の解明など様々な生物学的課題の解明に貢献することが期待される。

また、神経線維破断時に観測した細胞集団の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇の反復や伝搬の生理学的意義の解明のためにも、三次元多細胞系における細胞間シグナル伝搬の可視化・解析法の確立が必要だった。本論文では、細胞密度が高く、三次元的な細胞移動が起こるために、解析の難易度が極めて高いがんスフェロイドを三次元多細胞系のモデルとして用いた。また、がんスフェロイドは固形がんモデルとして治療法のスクリーニングに用いられるが、詳細な治療機構の解明のために単一細胞レベルでの生理活性変化の可視化・解析法の開発が求められており、この系で解析法を確立する意義は大きい特徴もある。今回は、細胞外からの刺激情報の処理や細胞の運命決定に関わる ERK の活性に着目した。まず、ERK の活性変化を可視化できる蛍光プローブを安定発現するがん細胞株を樹立し、スフェロイドを作製した。2 光子顕微鏡の優れた深部到達性と低侵襲性を活かすことで、スフェロイドを三次元的に長期間安定して撮影することに成功した。

取得した膨大なデータを、深層学習に基づく三次元核自動検出・追跡プログラムを用いて解析することで、スフェロイドを構成する 800 個以上の細胞から独立な ERK 活性変化を抽出することに成功した。解析法が確立できたため、新規がん治療法として有望視されている、金ナノ粒子を用いた光熱治療適用時における細胞応答の可視化・解析を試みた。金ナノ粒子による局所光熱刺激時の細胞応答を長期計測し、スフェロイドを構成する多数の細胞について同様に解析した。その結果、自発活動時には観られなかった、刺激部位を起点とした ERK 活性の長距離かつ三次元的な伝搬現象を発見した。以上のように、三次元多細胞系において、細胞間シグナル伝搬を単一細胞レベルで可視化・解析する手法を確立した。本手法は解析に深層学習を採用しており、教師データさえ作成すれば他の組織でも同様の解析が可能である。また、使用する蛍光プローブを変えることで、他のシグナル経路の精査にも拡張できる。さらに、固形がんモデルとしてのがんスフェロイドという観点において、本手法は、治療法適用時のスフェロイド全体の体積の減少を評価する既報とは異なり、個々の細胞の応答を評価した点に新規性がある。細胞の不均質性のがんの根治を妨げる事実を踏まえると、個々の細胞に着目して治療時の応答を解析できる本手法は、がん治療法の最適化に大きく貢献することが期待される。

第1章 序論

1-1 本論文の背景

1-1-1 レーザー走査型蛍光顕微鏡	1
--------------------	---

1-1-2 2光子顕微鏡法とその生物学応用	4
-----------------------	---

1-1-3 顕微鏡観察における収差	7
-------------------	---

1-1-4 収差補正と収差補正デバイス	9
---------------------	---

1-2 本論文の目的	11
------------	----

1-3 本論文の構成	12
------------	----

参考文献	13
------	----

第2章 収差と補償光学の原理

2-1 収差

2-2-1 収差の表現	16
-------------	----

2-2-2 収差と像強度	18
--------------	----

2-2 補償光学	21
----------	----

参考文献	25
------	----

第3章 励起光照射条件の改良によるマウス生体脳深部の2光子励起効率の向上

3-1 背景と目的

3-1-1 2光子顕微鏡法による神経回路研究	26
------------------------	----

3-1-2	2光子顕微鏡法による生体脳観察時の課題	27
3-1-3	2光子顕微鏡法の改良法	28
3-1-4	本研究の目的	30
3-2	材料と方法	
3-2-1	実験動物	31
3-2-2	標本作製	31
3-2-3	観察光学系	33
3-2-4	画像解析と統計処理	34
3-3	実験結果	
3-3-1	マウス生体脳内における集光特性の評価手法の開発	36
3-3-2	浸液の屈折率調整によるマウス生体脳内の集光特性の改善	39
3-3-3	励起光照射条件の改良によるマウス生体脳深部観察	44
3-3-4	励起光照射条件の改良によるマウス生体脳深部局所破壊	47
3-4	考察	52
3-5	本研究のまとめ	57
	参考文献	58

第4章 空間光位相変調器を用いた収差補正による生物組織内部の微細構造の可視化

4-1 背景と目的

4-1-1	生物組織観察時の課題	61
4-1-2	既存の補償光学系の課題と解決方針	62
4-1-3	本研究の目的	65
4-2	材料と方法	
4-2-1	空間光位相変調器の特性	66
4-2-2	試料内部で生じる収差の推定方法	66
4-2-3	実験生物	69
4-2-4	標本作製	70
4-2-5	画像解析	72
4-3	実験結果	
4-3-1	既存の2光子顕微鏡に対する空間光位相変調器の導入	73
4-3-2	標準試料を用いた収差補正効果の検証	75
4-3-3	がんスフェロイドを用いた収差補正効果の検証	81
4-3-4	マウス第二運動野深部における樹状突起スパインの可視化	83
4-4	考察	85
4-5	本研究のまとめ	89
	参考文献	90

第5章 三次元組織内部の細胞間シグナル伝搬の可視化・解析法の確立

5-1	背景と目的	
5-1-1	三次元組織の生理機能の解明に向けた課題	92
5-1-2	がんスフェロイドを用いた治療法のスクリーニング	93
5-1-3	がん細胞の ERK シグナルとその検出法	95
5-1-4	三次元自動核検出・追跡プログラム 3DeeCellTracker	97
5-1-5	本研究の目的	99
5-2	材料と方法	
5-2-1	標本作製	100
5-2-2	金ナノスターの合成方法	102
5-2-3	観察系と画像取得	103
5-2-4	金ナノスターの特性計測法	103
5-2-5	画像解析	104
5-3	実験結果	
5-3-1	金ナノスターの特性評価	106
5-3-2	がんスフェロイドにおける自発的 ERK 活性変化の可視化	107
5-3-3	がんスフェロイドに対する 3DeeCellTracker の適用	113
5-3-4	がんスフェロイドにおける ERK 活性の解析	115
5-4	考察	119

5－5 本研究のまとめ	122
参考文献	123
第6章 本研究の結論	127
謝辞	130
研究業績	132
付録	136

第 1 章 序論

1 – 1 本論文の背景

1 – 1 – 1 レーザー走査型蛍光顕微鏡

生物の生理機能の理解や疾患の原因究明のためには、組織の構成要素である細胞から情報を正確に計測する必要がある。情報の正確性は信号のコントラストや時間・空間的な分解能によって決定される。細胞計測に用いられてきた明視野型の光学顕微鏡法は実時間での計測が可能なため、時間分解能には優れる一方で、信号のコントラストや空間分解能に課題があった。信号のコントラスト向上のために、蛍光プローブで染色した試料から蛍光信号を分光して取得する蛍光顕微鏡法が開発された。明視野型の顕微鏡法に比べて劇的に信号のコントラストが向上したのに加え、特定の細胞内小器官に局在する蛍光プローブを使用することで、生細胞内で細胞内小器官を識別することも可能になった。一方、蛍光顕微鏡法では光軸方向の断層像を得ることはできず、焦点面外の蛍光も同時に取得してしまうため、厚い試料や散乱の強い試料では背景光成分の増大によってコントラストが低下する課題があった。この課題を解消するために、レーザー走査型の共焦点顕微鏡法が開発された (Paul Davidovits and Maurice D. Egger, 1969, 1971)。この顕微鏡法は、対物レンズの焦点と共役な位置に共焦点ピンホールを置くことで、焦点面外の蛍光が検出器まで到達しない工夫が施されている (図 1.1.1)。厚い試料や散乱の強い試料において、高いコントラストで蛍光像が取得できるようになっただけでなく、光学断層

像（Colin J. R. Sheppard and Tony Wilson, 1978）の取得によって三次元的な像も取得できるようになった（G. J. Brakenhoff *et al.*, 1979）。指向性に優れるレーザー光を用いているため、大きい開口数（Numerical Aperture: NA）の対物レンズを使用することで、優れた空間分解能も達成できる。また、走査機構を適切に制御することで任意の領域にのみレーザー光を照射することができるため、照射範囲を限定することによる時間分解能の向上や光による局所破壊が可能である。レーザー走査型の共焦点顕微鏡は医学・生物学研究に必須の装置となったが、組織や生物個体を対象とした利用には障壁がある。すなわち、広く用いられている可視域の蛍光プローブの励起のためには、より短波長の励起光源を用いる必要がある。波長の短い光は生体組織中で散乱や吸収の影響を強く受けてしまうために、組織や個体深部で十分な励起効率が得られず、蛍光信号の取得が困難だった。また、光吸収による生細胞への光毒性の影響も無視できないため、より生物試料の深部観察に適した顕微鏡法の開発が求められていた。

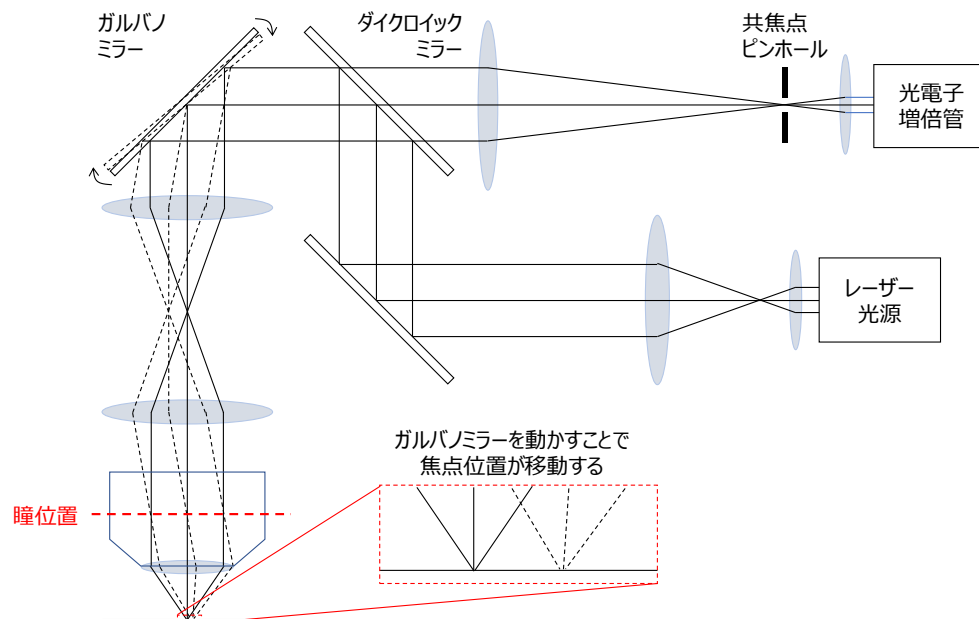


図 1.1.1 共焦点顕微鏡のシステムの概略図

対物レンズの瞳は対物レンズの内部に組み込まれており、ガルバノミラーと共役な位置関係になるように光学系が組まれる。

1 – 1 – 2 2 光子顕微鏡法とその生物学応用

1930 年に Maria Göppert-Mayer によって理論的に予測された 2 光子励起現象は、約 30 年後にレーザーを用いることで初めて実験的にその存在が確認された (Wolfgang Kaiser and Charles G. B. Garrett, 1961)。それから更に 30 年後に、Denk らによって 2 光子励起現象を応用した 2 光子顕微鏡法が開発された (Winfried Denk *et al.*, 1990)。2 光子励起現象は 2 つの光子が 1 つの分子に同時に作用することで起こるものであり、1 光子励起時の約半分のエネルギーの光子で電子を励起できる (図 1.1.2a、Chris Xu *et al.*, 1996)。そのため、可視域の蛍光プローブを励起するために、近赤外光を使用することができる。近赤外光は生体の光学的窓と呼ばれる波長域に相当するため、水やヘモグロビンによる吸収の影響が少ないのに加えて、励起光の長波長化によって散乱の影響も抑えられる。また、励起光強度は焦点面からの距離の 2 乗に反比例し、2 光子励起の確率は励起光強度の 2 乗に比例するため、光子密度が高くなる焦点近傍でのみ励起が起こる (図 1.1.2b)。この特徴から、同じ波長の 1 光子励起と比べて、励起が起こる体積が小さくなる (Collin J. R. Sheppard and Min Gu, 1990) だけでなく、光学断層像の取得に共焦点ピンホールを必要としない。蛍光検出器の手前に共焦点ピンホールを挟まないことで、試料内で散乱された蛍光信号も取得できる利点がある (Victoria E. Centonze and John G. White, 1998)。更に、励起光の吸収が焦点付近のみで起こるため、焦点面から離れた領域に対する光毒性が抑えられる利点もある。

これらの利点から 2 光子顕微鏡法は、生物組織の深部を高い空間分解能かつ低侵襲的に観察するために用いられるようになった。その中でも、神経細胞内の Ca^{2+} 活動 (Peter B. Guthrie *et al.*, 1991, Wolfgang Müller and John A. Connor, 1991, Wade G. Regehr and David W. Tank, 1992) や樹状突起スパインの形態変化 (Balazs Lendvai *et al.*, 2000, Masanori Matsuzaki *et al.*, 2004) が生きた組織の内部で観察できることが示されて以降、神経科学分野の重要な計測手法のひとつとなっている。現在では生きた動物個体の脳内において、非侵襲的かつ長期的に神経細胞を観察し続けることも可能になっており、感覚情報処理 (Kenichi Ohki *et al.*, 2005) や記憶 (Min Fu *et al.*, 2012)、神経系疾患 (Lili Guo *et al.*, 2015) の研究に活かされている。2 光子顕微鏡法の適用対象は神経科学分野のみに留まらず、がんの基礎研究にも用いられてきた (Edward B. Brown *et al.*, 2001, Jun Liu, 2014)。蛍光標識した抗ガン剤を用いることで、薬物動態の解析にも応用されている (Louisiane Perrin *et al.*, 2020)。また、生体内に移植したがん細胞の生理学研究のみならず、固形がんモデルとして用いられる三次元がんスフェロイドのイメージングにも利用されている (Kangqiang Qiu *et al.*, 2015, Tushar D. Rane and Andrea M. Armani, 2016)。2 光子顕微鏡を用いることでがんスフェロイドの内部も詳細に観察できるため、薬剤応答を単一細胞レベルで解析する試みもなされている (Taylor M. Cannon *et al.*, 2017, Maria M. Lukina *et al.*, 2018)。

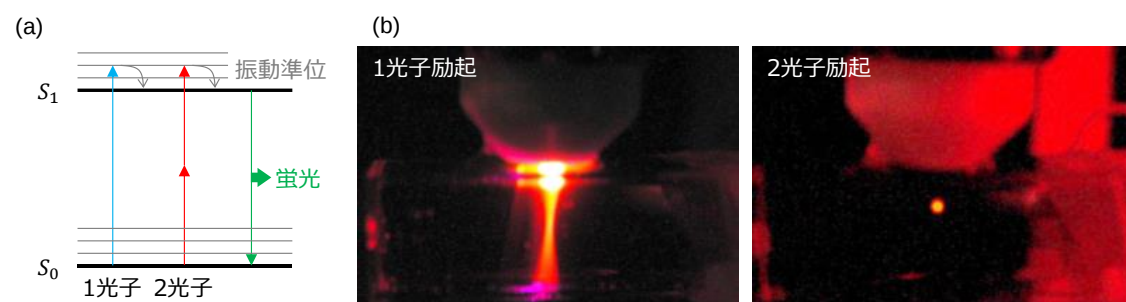


図 1.1.2 1 光子励起と 2 光子励起の比較

(a) ヤブロンスキダイアグラム。 S_0 ：基底準位、 S_1 ：第一励起準位。(b) 励起範囲の比較像。

1 - 1 - 3 顕微鏡観察における収差

顕微光学系において、対物レンズを通して光が理想的な焦点に集まらないことがある。

この理想的な集光・結像からのズレを収差と呼ぶ（図 1.1.3）。このズレは各光線の光路

長の差に由来し、屈折率界面における光線の屈折が原因である。そのため、生物組織を

顕微鏡で観察する時には、対物レンズの浸液と観察試料との間の屈折率界面や試料内部

の屈折率分布が問題となる（Alexander Egner and Stefan W. Hell, 2006）。収差がある場合、

顕微鏡の空間分解能や蛍光取得の効率が低下するため、生物組織内部の微細構造の観察

が困難になる。収差は色収差と単色収差に大別される。色収差は波長の異なる複数の光

を用いて観察する場合に、屈折率が波長依存的に変化することで発生する。波長の異なる

光を色収差補正のない対物レンズで集光する場合、波長に応じて焦点位置が変わるた

め、同一焦点面を撮像できなくなる問題がある。複数の波長の光を用いない観察の場合

には色収差は問題にならないが、他方の単色収差はあらゆる観察の際に問題となる。単

色収差はさらに光軸に対して回転対称なものと非対称なものに分けられる。代表的な対

称性収差には、対物レンズの瞳の中心を通った光線（主光線）と辺縁部を通った光線と

間の集光位置のズレを表す球面収差がある。また、非対称性収差は界面で主光線も屈折

する場合に生じる。代表的なものとしては、辺縁部を通った光線との集光位置が光軸外

でズレるコマ収差や、方位角に依存して集光位置がズレる非点収差がある。収差は、瞳

の辺縁部の光線と中心付近の光線との光路長差が主要因であるため、NA の大きい対物

レンズを使用する場合により顕著になる (Stefan W. Hell *et al.*, 1993)。高い空間分解能を得るためには NA の大きい対物レンズを使用する必要があるため、生物組織内部で微細構造を可視化するには、そのようなレンズにおいて収差を補正する技術が必須である。

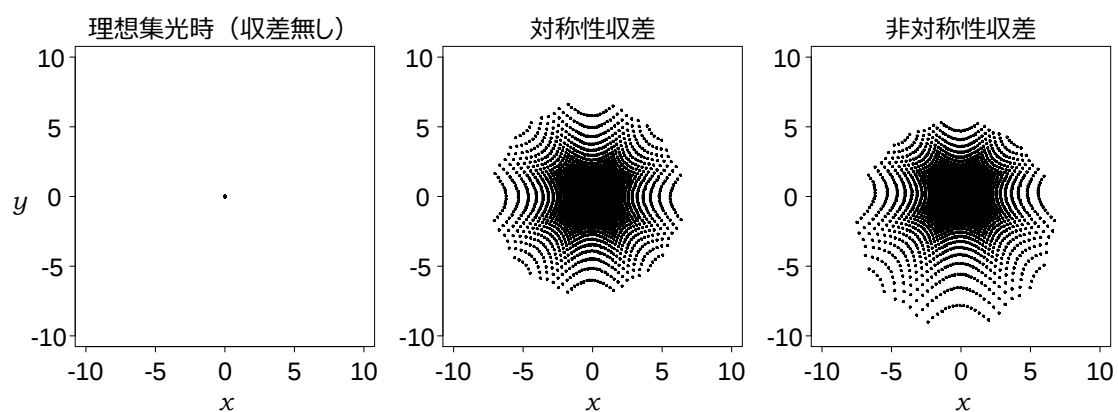


図 1.1.3 収差による焦点面上での到達位置のズレ (スポットダイヤグラム)

収差が無い理想集光時には光は一点に集まるが、収差がある場合には一点には集まらない。

1 – 1 – 4 収差補正と収差補正デバイス

収差を低減するための手段のひとつとして、観察系における屈折率差を低減することによって光線の屈折そのものを抑えることが挙げられる。屈折率差の低減のためには対物レンズの浸液と観察試料の屈折率を近づける処理を施せばよい。この考えは固定した生物試料の透明化に応用されており、実際に組織深部における高解像イメージングが実現されている（Yuka Aoyagi *et al.*, 2015, Meng-Tsen Ke *et al.*, 2016, Kazuaki Sawada *et al.*, 2018）。しかし、生細胞に対する毒性を抑えつつ屈折率を調整する技術は一部の組織を対象としたもの（Tobias Boothe *et al.*, 2017）を除いて、これまでのところ開発されておらず、生きた組織への応用はほとんどなされていない。一方、光が波であることを考えると、収差は光波の位相の差としても表現できる。すなわち、各光線上の等位相の点を含み、各光線と直交するような面（波面）を考えた場合、収差は理想集光波面からの波面の歪みとして表すことができる。この波面の歪みを打ち消すように、予め波面を整形することで収差の補正が可能である（図 1.1.4）。このような波面の整形によって収差補正を実現する技術を補償光学といい、宇宙望遠鏡を用いた天文学の発展に大きく貢献してきた（Jacques M. Beckers, 1993）。近年では顕微光学系にも応用されて、技術開発が盛んに行われている。

顕微光学系で広く用いられる収差補正のためのデバイスには対物レンズの補正環がある。補正環は、回すことによって対物レンズを構成する組レンズの相対位置を調整で

きる機構である。対物レンズに入射した光の波面に対して、光軸に回転対称な変調が加えられるため、観察系の内部で発生する球面収差が補正できる。近年では、蛍光像のフィードバックによって補正環の調整を自動で行う機構も開発されており、生物組織深部で発生する球面収差も補正可能になった (Yoshihiro Ue *et al.*, 2018)。補正環には、顕微光学系の改良が必要なく利用への障壁が低い利点があるが、非対称性の収差は補正できない問題もある。一方、反射型の形状可変ミラーや LCoS-SLM (Liquid crystal on silicon spatial light modulator)、および、透過型の液晶素子 (Ayano Tanabe *et al.*, 2015, Ayano Tanabe *et al.*, 2016) は対称性収差のみならず、非対称性収差も補正できるデバイスとして開発・利用されている。例えば、これらの収差補正デバイスを手製の 2 光子顕微鏡に外部導入し、適切な位相変調を励起光に与えることで、生物組織内部の微細構造の可視化が実現された (Na Ji *et al.*, 2012, Kai Wang *et al.*, 2014)。これらの収差補正デバイスは微細構造の可視化に効果的である一方で、特に反射型のデバイスの導入に際しては顕微光学系の設計から行う必要があったために、生命科学者に広く利用されるには至っていない。より簡便に実現できる収差補正法や収差補正デバイスの導入法の確立が求められていた。

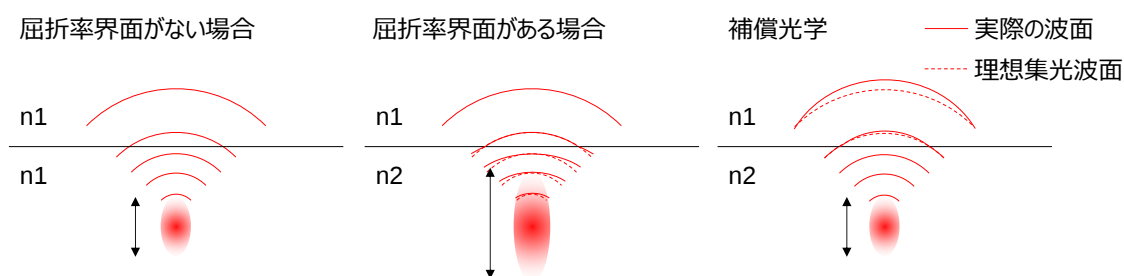


図 1.1.4 収差の発生と補償光学の適用による結像性能の回復のスキーム図

1 – 2 本論文の目的

2光子顕微鏡法は生物組織の深部の微細構造や細胞活性を三次元的かつ非侵襲的に可視化できるため、生命科学研究に広く用いられている。これまで、生物組織の微細構造をより深部で可視化するための独自の2光子顕微光学系が提案されてきたが、構築には高度な光学的知識と技術を要するため、汎用性が低かった。また、組織を構成する多くの細胞の活性を網羅的に解析する手法が確立されておらず、得られたデータの一部しか使われないことが多かった。そこで本論文では、2光子顕微鏡における励起光の照射条件について、簡便に実施できる改良法を確立し、組織内の細胞の微細形態を可視化することを目指す。また、組織内に三次元的に分布する膨大な数の細胞において、生理活性を単一細胞レベルで可視化・解析するための手法の確立を目的とする。

1 – 3 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。「第2章 収差と補償光学の原理」では、収差を数式で表現した上で、像強度に与える影響と補正するための技術である補償光学の原理について述べる。「第3章 励起光照射条件の改良によるマウス生体脳深部の2光子励起効率の向上」では、励起レーザー光のビーム径と対物レンズの浸液の屈折率を調整することで、マウス生体脳観察時の深部到達性を安価かつ簡便に向上させた結果について述べる。「第4章 空間光位相変調器を用いた収差補正による生物組織内部の微細構造の可視化」では、既存の2光子顕微光学系に対して空間光位相変調器を外部導入し、生物組織の表面形状の情報を用いて光学収差を補正する極めて組織侵襲性の低い手法を構築したことについて述べる。また、その方法論を用いて生物組織内部の微細形態を可視化した結果を記述する。また、「第5章 三次元組織内部の細胞間シグナル伝搬の可視化・解析法の確立」では、三次元多細胞系のモデルとして三次元がんスフェロイドを用い、細胞内シグナル ERK の活性を単一細胞レベルで多数の細胞から解析する手法を確立した結果について記述する。そして最後に、「第6章 本研究の結論」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

- Alexander Egner and Stefan W. Hell, “Aberrations in Confocal and Multi-Photon Fluorescence Microscopy Induced by Refractive Index Mismatch”, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, third edition (edited by James B. Pawley), Springer, Boston (2006)
- Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, and Tomomi Nemoto, “Correcting spherical aberrations in a biospecimen using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy”, *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 20(10), 101204, October (2015)
- Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, and Tomomi Nemoto, “Transmissive liquid-crystal device for correcting primary coma aberration and astigmatism in biospecimen in two-photon excitation laser scanning microscopy”, *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 21(12), 121503, December (2016)
- Balazs Lendvai, Edward A. Stern, Brian Chen, and Karl Svoboda, “Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex *in vivo*”, *Nature*, Vol. 404, pp. 876-881, April (2000)
- Chris Xu, Warren Zipfel, Jason B. Shear, Rebecca M. Williams, and Watt W. Webb, “Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 93(20), pp. 10763-10768, October (1996)
- Colin J. R. Sheppard and Tony Wilson, “Depth of field in the scanning microscope”, *Optics Letter*, Vol. 3(3), pp. 115-117, September (1978)
- Colin J. R. Sheppard and Min Gu, “Image formation in two-photon fluorescence microscopy”, *Optik*, Vol. 86(3), pp. 104-106, January (1990)
- Edward B. Brown, Robert B. Campbell, Yoshikazu Tsuzuki, Lei Xu, Peter Carmeliet, Dai Fukumura, and Rakesh K. Jain, “*In vivo* measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy”, *Nature Medicine*, Vol. 7, pp. 864-868, July (2001)
- G. J. Brakenhoff, P. Blom, and P. Barends, “Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses”, *Journal of Microscopy*, Vol. 117(2), pp. 219-232, November (1979)
- Jacques M. Beckers, “Adaptive Optics for Astronomy: Principles, Performance, and Applications”, *Annual Review of Astronomy and Astrophysics*, Vol. 13, pp. 13-62, September (1993)
- Jun Liu, “Two-photon microscopy in pre-clinical and clinical cancer reasearch”, *Frontiers of Optoelectronics*, Vol. 8(2), pp. 141-151, April (2014)
- Kai Wang, Daniel E. Milkie, Ankur Saxena, Peter Engerer, Thomas Misgeld, Marianne E. Bronner, Jeff Mumm, and Eric Betzig, “Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes”, *Nature Methods*, Vol. 11(6), pp. 625-628, June (2014)
- Kangqiang Qiu, Huaiyi Huang, Bingyang Liu, Yukang Liu, Pingyu Zhang, Yu Chen, Liangnian Ji, and Hui Chao, “Mitochondria-specific imaging and tracking in living cells with two-photon phosphorescent

iridium(III) complexes”, *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 3(32), pp. 6690-6697, July (2015)

Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Ryuichi Shigemoto, and Tomomi Nemoto, “Super-resolution structural analysis of dendritic spines using three-dimensional structured illumination microscopy in cleared mouse brain slices”, *European Journal of Neuroscience*, Vol. 47(9), pp. 1033-1042, May (2018)

Kenichi Ohki, Sooyoung Chung, Yeang H. Ch’ng, Prakash Kara, and R. Clay Reid, “Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex”, *Nature*, Vol. 433, pp. 597-603, January (2005)

Lili Guo, Huan Xiong, Jae-Ich Kim, Yu-Wei Wu, Rupa R Lalchandani, Yuting Cui, Yu Shu, Tonghui Xu, and Jun B Ding, “Dynamic rewiring of neural circuits in the motor cortex in mouse models of Parkinson’s disease”, *Nature Neuroscience*, Vol. 18(9), pp. 1299-1309, September (2015)

Louisiane Perrin, Battuya Bayarmagnai, and Bojana Gligorijevic, “Frontiers in intravital multiphoton microscopy of cancer”, *Cancer Reports*, Vol. 3(1), e1192, February (2020)

Maria M. Lukina, Varvara V. Dudenkova, Nadezhda I. Ignatova, Irina N. Druzhkova, Lyubov’ E. Shimolina, Elena V. Zagaynova, and Marina V. Shirmanova, “Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel”, *Biochemica et Biophysica Acta – General Subjects*, Vol. 1862(8), pp. 1693-1700, August (2018)

Masanori Matsuzaki, Naoki Honkura, Graham C. R. Ellis-Davies, and Haruo Kasai, “Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines”, *Nature*, Vol. 429, pp. 761-766, June (2004)

Meng-Tsen Ke, Yasuhiro Nakai, Satoshi Fujimoto, Rie Takayama, Shuhei Yoshida, Tomoya S. Kitajima, Makoto Sato, and Takeshi Imai, “Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent”, *Cell Reports*, Vol. 14(11), pp. 2718-2732, March (2016)

Min Fu, Xinzhu Yu, Ju Lu, and Yi Zuo, “Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines *in vivo*”, *Nature*, Vol. 483, pp. 92-95, March (2012)

Na Ji, Takashi R. Sato, and Eric Betzig, “Characterization and adaptive optical correction of aberrations during *in vivo* imaging in the mouse cortex”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 109(1), pp. 22-27, January (2012)

Paul Davidovits and Maurice D. Egger, “Scanning Laser Microscope”, *Nature*, Vol. 223, p. 831, August (1969)

Paul Davidovits and Maurice D. Egger, “Scanning Laser Microscope”, *Applied Optics*, Vol. 10(7), pp. 1615-1619, July (1971)

Peter B. Guthrie, Menahem Segal, and S. B. Kater, “Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines”, *Nature*, Vol. 354, pp. 76-80, November (1991)

Stefan W. Hell, Gernot Reiner, Christoph Cremer, and Ernst H. K. Stelzer, “Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index”, *Journal of Microscopy*, Vol. 169(3), pp. 391-405, March (1993)

Taylor M. Cannon, Amy T. Shah, and Melissa C. Skala, “Autofluorescence imaging captures heterogeneous

drug response differences between 2D and 3D breast cancer cultures”, *Biomedical Optics Express*, Vol. 8(3), pp. 1911-1925, March (2017)

Tobias Boothe, Lennart Hilbert, Michael Heide, Lea Berninger, Wieland B. Huttner, Vasily Zaburdaev, Nadine L. Vastenhouw, Eugene W. Myers, David N. Drechsel, and Jochen C. Rink, “A tunable refractive index matching medium for live imaging cells, tissues and model organisms”, *eLife*, 6:e27240, July (2017)

Tushar D. Rane, and Andrea M. Armani, “Two-Photon Microscopy Analysis of Gold Nanoparticle Uptake in 3D Cell Spheroids”, *PLoS ONE*, 11(2), e0167548, December (2016)

Victoria E. Centonze and John G. White, “Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging”, *Biophysical Journal*, Vol. 75(4), pp. 2015-2024, October (1998)

Wade G. Regehr and David W. Tank, “Calcium Concentration Dynamics Produced by Synaptic Activation of CA1 Hippocampal Pyramidal Cells”, *Journal of Neuroscience*, Vol. 12(11), pp. 4202-4223, November (1992)

Winfried Denk, James H. Strickler, and Watt W. Webb, “Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy”, *Science*, Vol. 248(4951), pp. 73-76, April (1990)

Wolfgang Kaiser and Charles G. B. Garrett, “Two-photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ ”, Vol. 7(6), pp. 229-231, September (1961)

Wolfgang Müller and John A. Connor, “Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca^{2+} responses”, *Nature*, Vol. 354, pp. 73-76, November (1991)

Yoshihiro Ue, Hiromu Monai, Kaori Higuchi, Daisuke Nishiwaki, Tetsuya Tajima, Kenya Okazaki, Hiroshi Hama, Hajime Hirase, and Atsushi Miyawaki, “A spherical aberration-free microscopy system for live brain imaging”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 500(2), pp. 236-241, June (2018)

Yuka Aoyagi, Ryosuke Kawakami, Hisayuki Osanai, Terumasa Hibi, and Tomomi Nemoto, “A Rapid Optical Clearing Protocol Using 2,2'-Thiodiethanol for Microscopic Observation of Fixed Mouse Brain”, *PLoS ONE*, Vol. 10(1), e0116280, January (2015)

第2章 収差と補償光学の原理

2-1 収差

2-1-1 収差の表現

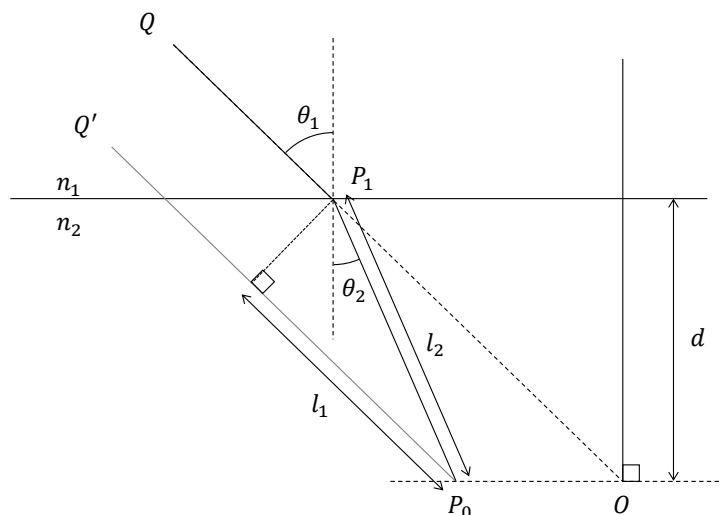


図 2.1.1 光線収差

収差 W を記述するにあたり、図 2.1.1 のような 2 次元系を考える (Martin J. Booth *et al.*, 1998)。すなわち、点 P_1 を通るような屈折率界面に対して、平面光波が斜めに入射し、距離 d だけ離れた試料面に到達する場合である。この波面を形成する光線は屈折率が n_1 の媒質を Q から伝搬し、界面がなければ試料面上の理想到達点 O に至る。しかし、屈折率が n_2 の界面がある場合には、交点 P_1 で光線は屈折し、試料面上の O からズレた位置 P_0 に到達する。この時に生じる光路長差、すなわち、平面波が屈折することなく P_0 に至る場合 (Q' を通る光線を考える) の光路長 $n_1 l_1$ と屈折した場合の光路長 $n_2 l_2$ との差がこの光線における収差 W である。ここで、 l_1 と l_2 はそれぞれ以下の式で表される。

$$l_1 = l_2 \cos(\theta_1 - \theta_2) \quad (2.1)$$

$$l_2 = \frac{d}{\cos \theta_2} \quad (2.2)$$

ここで、光路長差の計算について、スネルの法則を用いることで以下が得られる。

$$\begin{aligned} W &= n_2 l_2 - n_1 l_1 \\ &= n_2 \frac{d}{\cos \theta_2} - n_1 \frac{d}{\cos \theta_1} \cos(\theta_1 - \theta_2) \\ &= d(n_2 \cos \theta_2 - n_1 \cos \theta_1) \end{aligned} \quad (2.3)$$

このように光線の収差 W が算出できる。この(2.3)式に着目すると、屈折率界面の法線に対する光線の入射角と屈折率、試料面から界面までの距離さえ与えれば、特定の光線に対する収差が計算できることがわかる。また、任意の屈折率界面についても、界面を微小平面に分割し、その法線を全ての微小平面について求めることによって収差の算出が可能であることを示している。ここで、開口数 NA を用いて(2.3)式を表すと以下になる。

$$W = d \left[n_2 \cos \left\{ \sin^{-1} \frac{NA}{n_2} \right\} - n_1 \cos \left\{ \sin^{-1} \frac{NA}{n_1} \right\} \right] \quad (2.4)$$

この式に $d = 300$, $n_1 = 1.33$, $n_2 = 1.36$ を与えて、 NA と収差の最大値との関係を数値計算によって得た (図 2.1.2)。 NA が大きくなると、非線形的に収差が大きくなることが式(2.4)と図 2.1.2 からわかる。

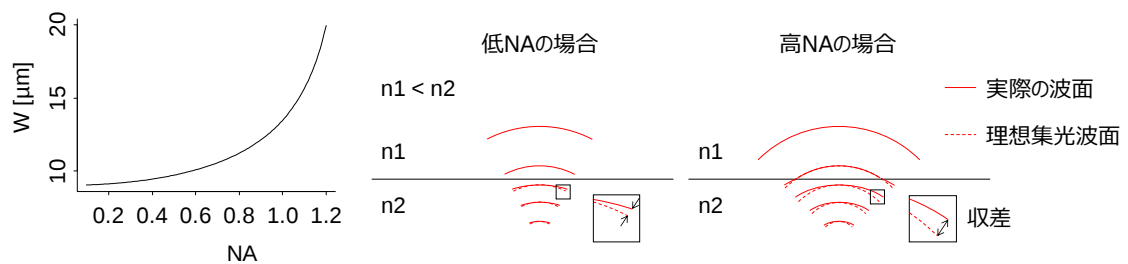


図 2.1.2 収差と NA の関係

2 - 1 - 2 収差と像強度

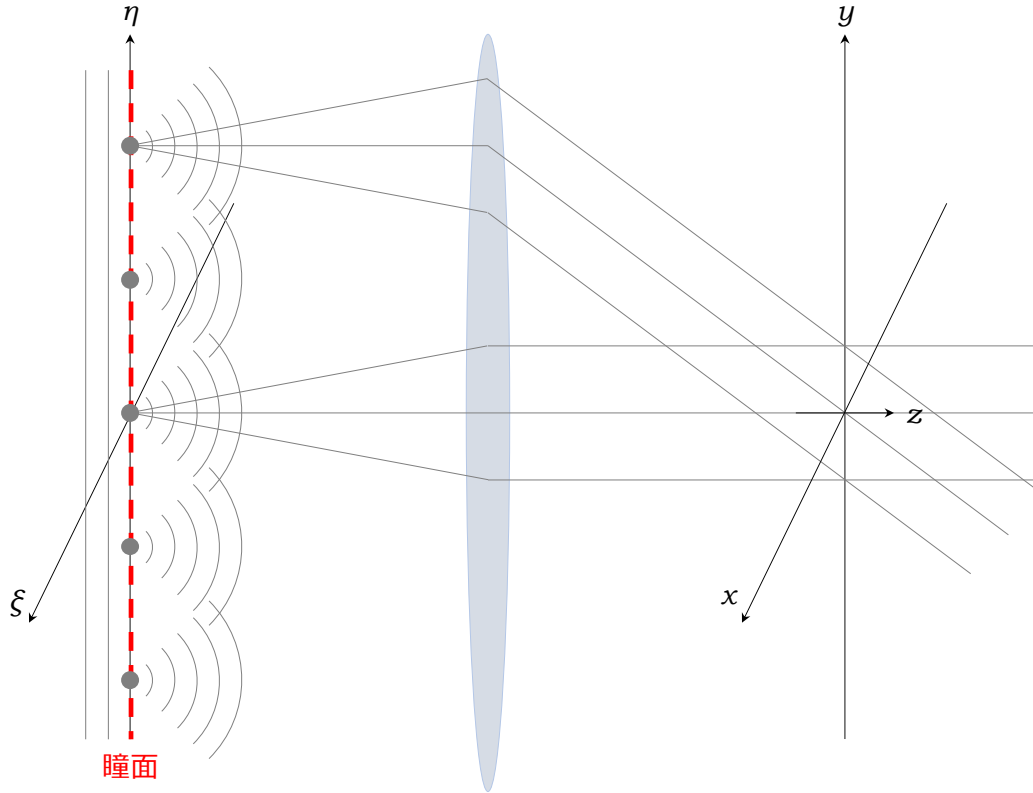


図 2.1.3 結像の考え方

次に、収差が結像強度に与える影響について記述する。正弦条件を満たすレンズの瞳面に対して、平面波が到達した場合を例とする（大木裕史, 1995）。Huygens の原理に基づいて、瞳面に定義した座標面 (ξ, η) 上に同位相の点光源が多数存在すると考える（図 2.1.3）。このレンズは正弦条件を満たすため、瞳面上の (ξ_0, η_0) 位置にある点光源から発せられた光はレンズ通過後に波数 k を用いて以下の平面波として表せる。

$$k = \frac{2\pi}{\lambda}$$

$$\exp\left\{-ik\left(\xi x + \eta y + \sqrt{1 - \xi^2 - \eta^2} \cdot z\right)\right\} \quad (2.5)$$

このとき、 λ は波長、 (x, y, z) は像空間の座標、 i は虚数単位を表す。ここで、瞳を円形開

口として、透過率に関する関数を以下のように定義する。

$$p(\xi, \eta) = \begin{cases} 1, & \xi^2 + \eta^2 \leq NA^2 \\ 0, & \text{上記以外} \end{cases} \quad (2.6)$$

像空間の任意の点 (x_1, y_1, z_1) に対する入射平面波の振幅 $u(x_1, y_1, z_1)$ は、瞳面上の全ての

点光源からの光波を像空間で足し合わせることで以下のように求めることができる。

$$u(x_1, y_1, z_1) = \iint_{-\infty}^{\infty} p(\xi, \eta) \exp \left\{ -ik \left(\xi x_1 + \eta y_1 + \sqrt{1 - \xi^2 - \eta^2} \cdot z_1 \right) \right\} d\xi d\eta \quad (2.7)$$

強度は振幅の 2 乗になるため、像空間における強度 $h(x_1, y_1, z_1)$ は以下で得られる。

$$h(x_1, y_1, z_1) = |u(x_1, y_1, z_1)|^2 \quad (2.8)$$

ここまでは収差のない場合の結像強度についてみてきたが、収差 $W(\xi, \eta)$ がある場合は、

(2.7)、(2.8)式はそれぞれ以下のように書き換えられる。

$$u'(x_1, y_1, z_1) = \iint_{-\infty}^{\infty} p(\xi, \eta) \exp \left\{ -ik \left(\xi x_1 + \eta y_1 + \sqrt{1 - \xi^2 - \eta^2} \cdot z_1 + W(\xi, \eta) \right) \right\} d\xi d\eta \quad (2.9)$$

$$h'(x_1, y_1, z_1) = |u'(x_1, y_1, z_1)|^2 \quad (2.10)$$

ここで便宜上、瞳面上の座標 (ξ, η) を極座標に変換し、収差 $W(\rho, \theta)$ を以下の式で与える。

$$\xi = \rho \sin \theta$$

$$\eta = \rho \cos \theta$$

$$W(\rho, \theta) = A(6\rho^4 - 6\rho^2 + 1) \quad (2.11)$$

ただし、 A は収差の強度を表す係数である。ここでは詳細は省くが、式(2.11)は収差を

Zernike 多項式によって冪級数として展開した場合の 3 次の球面収差に相当する

(Vasudevan Lakshminarayanan and Andre Fleck, 2011)。式(2.11)に示す収差について、強

度 A を $[0, 0.20]$ の範囲で与えた場合の像強度のピーク値を図 2.1.4 に示す。この際、 $\lambda = 488 \text{ nm}$ として、無収差の場合のピーク値で規格化した。この図から、収差の強度が大きくなるにつれて、徐々に強度のピーク値が小さくなっていくことがわかる。また、2-1-1 章で述べたように、NA の値が大きいほど収差の影響も大きくなる様子が見て取れる。以上の解析から、収差は像の強度を著しく低下させることが確認できた。なお、本章では収差と像強度との定性的な関係性を示すことに重きを置いたため、スカラー回折積分によって議論を展開した。しかし、NA の大きいレンズによって像を形成する場合には偏光の影響を無視できなくなるため、厳密には三次元的な電場の干渉を考慮したベクトル回折積分によって解く必要がある（参考：B. Richards and E. Wolf, 1959）。

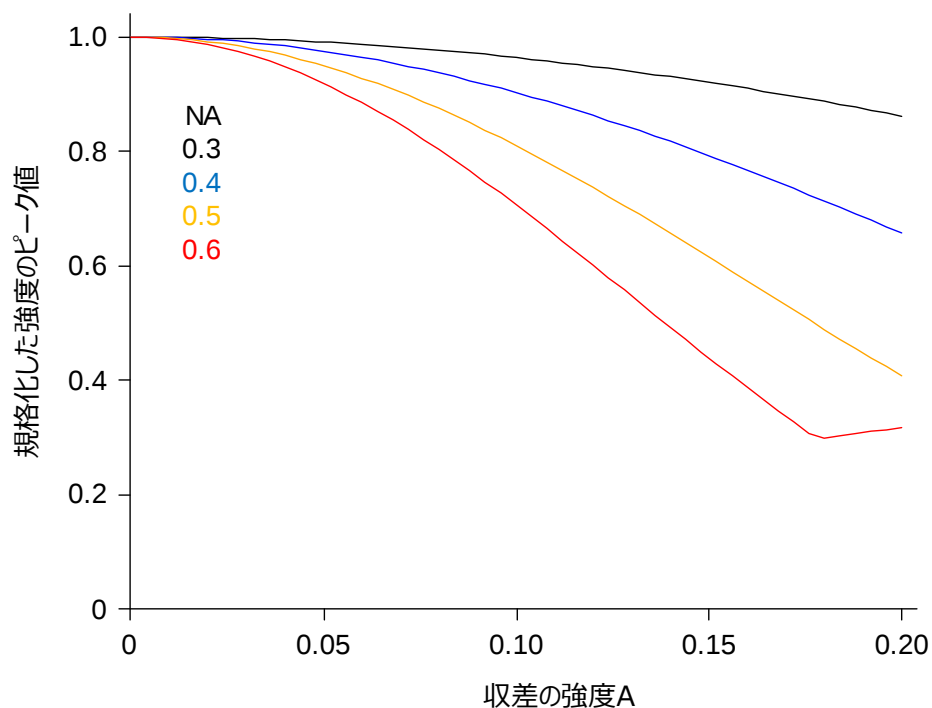


図 2.1.4 収差の強度と規格化したピーク強度値の関係

NA を 0.3 から 0.6 まで変更して計算した。

2 – 2 補償光学

2 光子顕微鏡法では光子密度の 2 乗に比例して励起効率が変化するため、集光点における励起光強度の低下によって蛍光の発生効率が著しく低下する。試料中で発生する収差を補正して理想的な集光状態に近づけることにより、蛍光の発生効率を大幅に改善できることが期待される。ここでは 1-1-4 章で触れた補償光学とデバイスについて、その原理と顕微光学系への導入方針を述べる。

2-1 章の式(2.9)で述べたように収差 $W(\xi, \eta)$ は瞳面上の位相変化量の分布として記述される。波の周期は 2π であるため、以下のような $[0, 2\pi)$ の範囲の表現に書き換えても等価である（ラッピング処理）。

$$w(\xi, \eta) \equiv W(\xi, \eta) \bmod 2\pi \quad (2.12)$$

この $w(\xi, \eta)$ を打ち消すような位相分布を入射光に与えることで、収差による像強度の低下を防ぐことができる。すなわち、瞳面上の全ての (ξ, η) について、位相が 2π になるように以下の式で表される位相分布 $w^{-1}(\xi, \eta)$ を加えれば良い（図 2.2.1）。

$$w^{-1}(\xi, \eta) = 2\pi - w(\xi, \eta) \quad (2.13)$$

ここまでは収差を持った波面が瞳面に入射する場合を考えたが、像空間で生じる収差を考える場合についても、正弦条件で言うところの「主平面（主曲面）」上で収差の大きさと分布を考えることで、同様の補正が可能である。

1-1-4 章で述べたように、SLM を用いることで位相変調が可能だが、その位相変調は

対物レンズの瞳面で行う必要がある。しかし、一般に対物レンズの瞳面は対物レンズの内部にあるため、SLM を瞳面に直接導入することはできない。また、平面波以外は伝搬によって、瞳面上で得られる位相分布と強度が変わってしまう問題がある。そこで、適切な位相変調を実現するためには、瞳面を光学的に対物レンズの外側に取り出す工夫が必要である。今、(2.7)式に着目して $z_1 = 0$ とすると以下のようなになる。

$$u(x_1, y_1, 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} p(\xi, \eta) \exp\{-ik(\xi x_1 + \eta y_1)\} d\xi d\eta \quad (2.14)$$

これは関数 $p(\xi, \eta)$ のフーリエ変換そのものである。レンズを通して瞳面をフーリエ変換し、そこで得た像に対して、更にもう一枚のレンズによる逆フーリエ変換を施すことで外部に瞳面を再生することができる。それを実現するための系が 4f 光学系である（図 2.2.2）。この光学系では、焦点距離 f_1 のレンズによって、瞳面のフーリエ変換像 $\mathcal{F}[P(\xi, \eta)]$ が焦点面上に形成される。さらにそのフーリエ変換像を焦点距離 f_2 のレンズによって逆フーリエ変換することで、以下のように瞳面を対物レンズの外側で再生する。

$$\mathcal{F}^{-1}[\mathcal{F}[P(\xi, \eta)]] \equiv P(\xi, \eta) \quad (2.15)$$

以上見てきたように、適切な位相変調を瞳面で与えるためには、4f 光学系を利用して外部に再生した瞳面に SLM を配置することが実用上は重要である。

最後に、位相変調のために本研究で使用する LCoS-SLM の構造と動作原理について概説する。LCoS-SLM は、液晶層とミラー、それらを囲む多数の画素電極から構成され、個々の画素電極への電圧印加によって液晶の配向を制御できる（図 2.2.3）。画素電極に

印加する電圧に応じて、複屈折性を示す液晶分子の起き上がりの程度を制御できる。液晶分子が起き上がった領域の屈折率は低下するため、低下の度合いに応じて、その画素を通過した光の位相は進む。その相対的な位相変調量 $\Delta\varphi$ は、電圧印加前の屈折率を n_0 、印加後の屈折率を n_1 、液晶層の厚みを d とすると、誘電体ミラーでの反射を考慮して以下の式で表される（Zichen Zhang *et al.*, 2014）。

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi(n_0 - n_1) \times 2d}{\lambda} \quad (2.16)$$

入射光の波長 λ に依存して相対的な位相変調量が決まるため、 $[0, 2\pi)$ の範囲で位相変調が行えるように各波長について印加電圧が最適化されている。

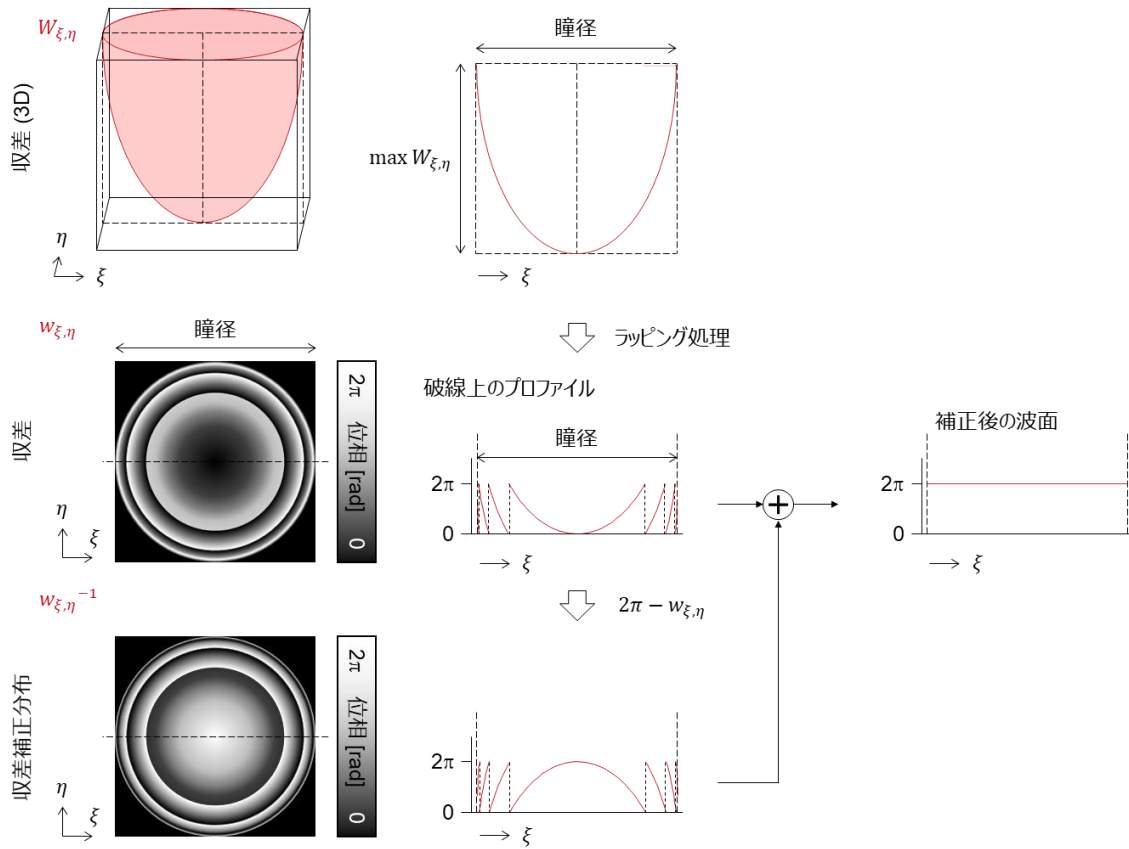


図 2.2.1 収差補正の原理のスキーム図（Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021 Fig. S1 改変）

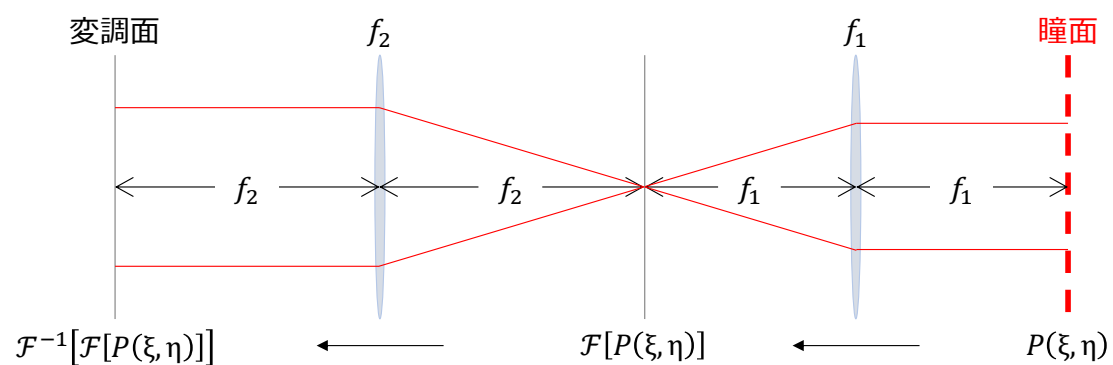


図 2.2.2 4f 光学系

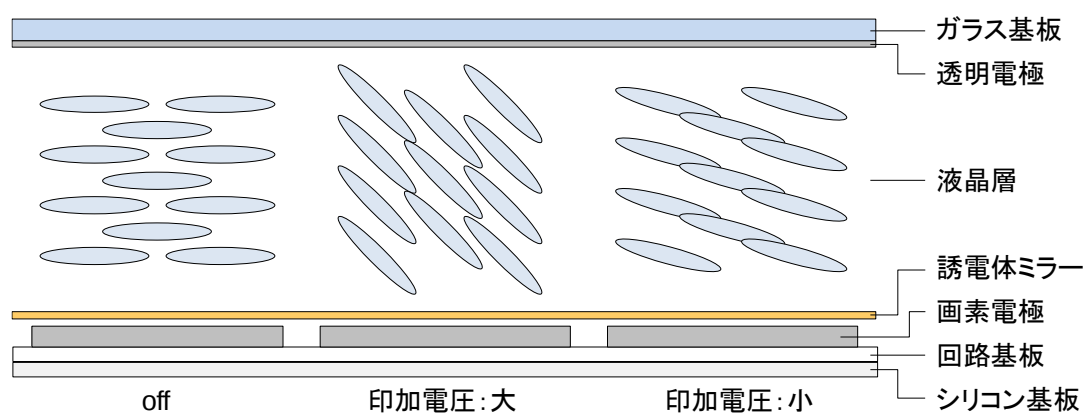


図 2.2.3 LCoS-SLM の構造

参考文献

大木裕史, “レーザースポットと回折限界”, 新しい光学顕微鏡 第一巻 レーザ顕微鏡の理論と実際, 第二章 レーザ顕微鏡の光学, 藤田哲也監修, 学際企画株式会社発行, pp. 11-16, March (1995)

B. Richards and E. Wolf, “Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system”, *Proceedings of the Royal Society A*, Vol. 253(1274), pp. 358-379, December (1959)

Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Yuichi Kozawa, Motosuke Tsutsumi, Tomoko Inose, Kenji Hirai, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, and Hiroshi Uji-I, “Adaptive Optical Two-photon Microscopy for Surface profiled Living Biological Specimens”, *ACS Omega*, Vol. 6(1), pp. 438-447, January (2021)

Martin J. Booth, M. A. A. Neil, and T. Wilson, “Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media”, *Journal of Microscopy*, Vol. 192(2), pp. 90-98, November (1998)

Vasudevan Lakshminarayanan and Andre Fleck, “Zernike polynomials: a guide”, *Journal of Modern Optics*, Vol. 58(7), pp. 541-561, April (2011)

Zichen Zhang, Zheng You, and Daping Chu, “Fundamentals of phase-only liquid crystal on silicon (LCOS) devices”, *Light: Science & Applications*, Vol. 3, e213, October (2014)

第3章 励起光照射条件の改良によるマウス生体脳 深部の2光子励起効率の向上

3-1 背景と目的

3-1-1 2光子顕微鏡法による神経回路研究

脳は、神経細胞やグリア細胞をはじめとした細胞群から構成されている。それらの細胞が協調的にはたらくことで、思考や感覚、情動といった複雑な情報処理を実現していると考えられている (Thomas D. Albright *et al.*, 2000)。一方、その情報処理機構の破綻が精神・神経系疾患の原因になると考えられており、その機構の解明が求められている。情報処理を実現するための細胞間相互作用の場が神経回路網である。脳の局所もしくは広範囲に及ぶ回路網の生理活性を詳細に解析することは、脳の基本機能だけでなく疾患の理解にも繋がる。一方、脳が障害を受けるとグリア細胞は活性が変化するため、グリア細胞を含む神経回路の生理活性を計測するためには、非侵襲的な手法を用いることが必須である。単一細胞レベルで非侵襲的に生理活性を計測できる手法のひとつが2光子顕微鏡法である。第1章でも述べたように、2光子顕微鏡法を用いることで、細胞活動や長期的な回路網の変化を捉えることができる。また、神経細胞における活動電位のような電気的応答を示さないグリア細胞においても、細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度をはじめとしたイオン濃度の変化を可視化できる蛍光プローブを用いることで、その活性を生体脳内で計測できる利点がある (Gabriele Losi *et al.*, 2017)。多色の蛍光プローブを別々の細胞に

導入することで個々の細胞や細胞種を判別し、それらの活動の相関も計測できる。さらに、2光子励起の局所性を活かすことによって、神経線維の局所破断によって回路網を人為的に変化させた損傷モデルの確立 (Leonard Sacconi *et al.*, 2007) や、光遺伝学または光化学との組み合わせによる回路網の局所光操作も実現されている (Jun Noguchi *et al.*, 2011, Rohit Prakash *et al.*, 2012)。これらの最先端技術を導入した2光子顕微鏡法を神経科学研究に応用することで、グリア細胞を含む神経回路網の生理活性が徐々に明らかになってきている (Dongdong Li *et al.*, 2013)。

3 - 1 - 2 2光子顕微鏡法による生体脳観察時の課題

2光子顕微鏡法は神経回路網の機能の解明に貢献しているが、通常のセットアップでは観察可能な深さは比較的浅い領域に限られる。すなわち、マウス生体脳内の神経細胞の観察では、大脳皮質全層が到達深度の限界であり、皮質下にある海馬をはじめとした領域を非侵襲的に観察することはできなかった。また、樹状突起スパインのような微細構造や細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度変動については、大脳皮質第 II/III 層までが計測の限界だった。さらに、励起の局所性を活かした光操作技術のひとつである局所破断についても第 II/III 層までが実施の限界だった (Leonard Sacconi *et al.*, 2007)。これまでの電気生理を用いた実験では、大脳皮質の層間や領野間、脳の領域間の協調的な神経細胞活動が報告されている (Christine M. Constantinople and Randy M. Bruno, 2013)。脳の三次元的に広い領域において、細胞活動の計測や微細形態の可視化、光操作を非侵襲的に実現できれば、

グリア細胞を含む神経回路網の研究が飛躍的に進む。そこで、2 光子顕微鏡法の改良による観察と光操作の深部到達性の改善が求められていた。

2 光子顕微鏡観察の深部到達性が損なわれている原因として、深部における 2 光子励起効率が減少することによって蛍光信号の取得効率が低下していることが挙げられる。第 1 章で述べたように、2 光子励起の効率は分子の吸収断面積を通過する光子の密度の 2 乗に比例するため、蛍光取得効率に対する光子密度の低下の影響は大きい。光子密度が低下するのは組織内部で起こる吸収、散乱、収差が原因である。これらの影響を低減することが、深部到達性の向上には必須となる。

3 - 1 - 3 2 光子顕微鏡法の改良法

光子密度の向上のためには、焦点に到達する励起光強度を向上させ、焦点体積を縮小させる必要がある。川上博士らは高出力かつ長波長の近赤外励起光源を開発・利用し、焦点に到達する励起光強度を向上させることで海馬 CA1 細胞および歯状回細胞の非侵襲的な可視化に成功した (Ryosuke Kawakami *et al.*, 2013, 2015)。また、空間光位相変調器 (SLM: Spatial Light Modulator) とシャックハルトマン型の波面センサーを外部導入した手製の顕微光学系を用いた収差補正により、大脳皮質第 VI 層における樹状突起スパインの非侵襲的な可視化も実現されている (Kai Wang *et al.*, 2015)。これらの改良法は神経回路網の非侵襲的な計測に劇的な改善をもたらしたが、光学系の構築には高度な光

学的知識と技術を要するためにその実装への障壁は高く、広く普及するには至っていない。

一方、高感度検出器の導入に加え、観察条件を改良することで海馬 CA1 細胞を可視化した報告がある (Masashi Kondo *et al.*, 2017)。この研究では対物レンズに入射するレーザー光のビーム径を絞ることで実効的な NA を 50% まで下げ、吸収・散乱・収差の影響を低減した。また、赤色の蛍光プローブの使用により、蛍光自体の吸収・散乱の影響を抑えることで深部観察を実現した。しかし、この方法では、NA の著しい低下が原因で焦点体積が増大してしまい、樹状突起スパインの観察は困難だった。一方、励起レーザー光のビーム径を絞ることで、吸収・散乱・収差の影響が低減できるだけでなく、対物レンズ下における励起光強度も向上させることができる (図 3.1.1)。脳深部で焦点体積を顕著に増大させることなく励起光強度が向上するビーム径を見出すことができれば、光子密度の向上による生体脳深部の微細形態の可視化が実現できる可能性がある。また、第 1 章、第 2 章で述べたように、観察系内部の屈折率差を減らすことで収差は低減し、焦点体積を縮小できる。水を浸液として使用する対物レンズであっても、試料の屈折率に応じて浸液の屈折率を適切に調整することで、焦点体積を縮小できることが報告されている (Der-Shen Wan *et al.*, 2000)。浸液の屈折率をマウス生体脳の屈折率に近づけることで、光子密度の向上が期待されるが、屈折率が未知であるため、マウス生体脳観察時に浸液の屈折率を調整する試みは実施されていない。浸液の屈折率を変える操作

は極めて簡便であるため、マウス生体脳観察に最適な浸液の屈折率を明らかにできれば、汎用性の高い改良法として広く用いられることが期待される。

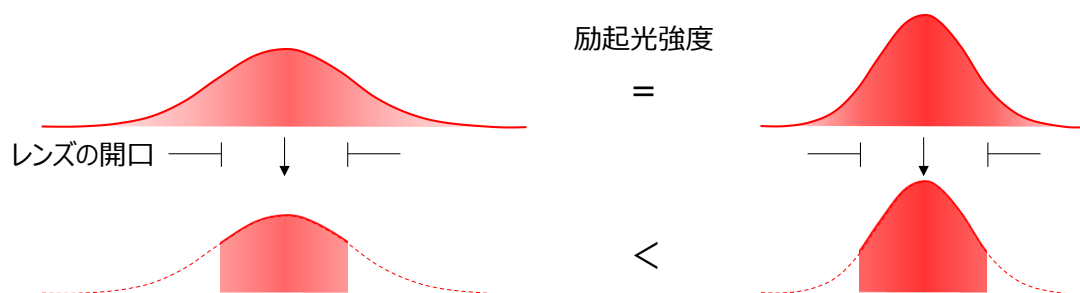


図 3.1.1 ビーム径を絞ることによる励起光強度の向上

3 - 1 - 4 本研究の目的

本章では、励起レーザー光のビーム径と対物レンズの浸液の屈折率を至適化することでマウス生体脳深部の2光子励起効率を改善し、観察と光操作の深部到達性を向上させることを目的とする。そのために、マウス生体脳内で焦点体積を評価する手法を開発し、条件の至適化を行う。また、観察条件の至適化による深部到達性の向上を観察と局所破断の実現によって明示する。

3－2 材料と方法

3－2－1 実験動物

マウス生体脳内における焦点体積の評価、及び、観察と局所破断の深部到達性の評価には、一部の興奮性神経細胞に蛍光タンパク質 eYFP を発現する 8-12 週齢の遺伝子改変マウス（Thy1-eYFP-H, Guoping Feng, *et al.*, 2000）を使用した。また、細胞活動計測の深部到達性の評価には、主にアストロサイトに Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 G-CaMP7 を発現する 8-12 週齢の遺伝子改変マウス（G7NG817, Hiromu Monai *et al.*, 2016, 理研 CBS の平瀬肇教授より提供）を使用した。さらに、神経線維破断後のアストロサイト応答の解析のために、Thy1-eYFP-H マウスと G7NG817 マウスを交配した交雑第一種のマウスを使用した。このマウスは神経細胞に eYFP を、主にアストロサイトに G-CaMP7 をそれぞれ発現する。これらの全てのマウスは、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。

なお、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、承認を得たうえでガイドラインに従って実験を実施した。（番号：17-0077）

3－2－2 標本作製

全ての手術は、ペントバルビタールの腹腔投与後、イソフルラン吸入投与による深麻酔

下で行った。マウス生体脳内における焦点体積の評価のために、麻酔下のマウス生体脳内に $\phi 0.2 \mu\text{m}$ (crimson, Molecular Probes) 及び $\phi 1.0 \mu\text{m}$ (red, Life Technologies) の蛍光ビーズを導入した。その際、歯科用ドリルを用いて頭蓋骨上（ラムダ縫合を基準として前方 1 mm、側方 1.8 mm の位置）に小孔を作製し、水平面に対して 20-30 度の浅い角度で尾側から吻側に向けてガラス細管を刺入した（図 3.2.1）。蛍光ビーズの導入完了後、頭皮を縫合し、鎮痛剤デキサメタゾンと抗炎症剤ミノサイクリンを投与した後、観察までの 2 日間は元のケージで飼育した。予後の良好なマウスのみを以降の実験で使用した。

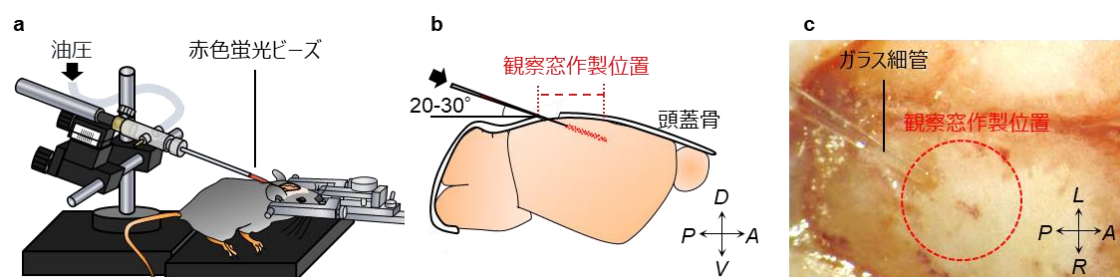


図 3.2.1 マウス脳内への蛍光ビーズの導入方法

(a, b) 導入法のスキーム図。(c) 導入中の明視野撮影像。A: anterior, P: posterior, D: dorsal, V: ventral, L: left, R: right. (Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020, Fig. 1a-c 改変)

マウス生体脳の観察に際しては、高散乱体である頭蓋骨をカバーガラスに置換する外科手術 Open-skull 法 (Anthony Holtmaat *et al.*, 2009) を第一次視覚野の直上（矢状縫合と冠状縫合の交点である Bregma を基準に後方 3.5-4.0 mm、側方 2.0-3.0 mm）に施した。その際、 $\phi 2.7 \text{ mm}$ もしくは $\phi 4.2 \text{ mm}$ のカバーガラス (No. 1S, Matsunami) を用いた。カバーガラスを頭蓋骨上に瞬間接着剤で固定した後、その表面に $\phi 1.0 \mu\text{m}$ (orange, Life Technologies) の蛍光ビーズを撒いて乾燥固着させた。

3 - 2 - 3 観察光学系

本研究の全ての観察は、近赤外超短レーザー光パルスを出射する Ti:Sapphire レーザー光源 (910 nm, Tsunami, Spectra Physics) と群速度分散補償光学系 (Negative Chirper) を搭載した市販の多光子顕微鏡システム (FV1000-MPE, Olympus) で行った。本システムは 1 対のレンズペアから成る可動式のケプラー型ビームエキスパンダが光路中に導入されている。レンズ間の距離を変えることで、対物レンズに入射するレーザー光のビーム径が変更可能である。本章では、レーザー光のビーム径をメーカーの推奨値 (対物レンズの瞳径に対して 115%) と瞳を充足しない値 (67%) に調整した。また、使用するキャンシステムにはラインスキャン機能が実装されているため、選択した局所領域にレーザー光を照射できる。観察には高 NA かつ長作動距離を実現した水浸対物レンズ (XLPLNW 25x NA1.05, Olympus) を用いた。浸液の屈折率は必要に応じて水とグリセリンを混合することによって調整した。その際、補正環はカバーガラス直下で蛍光強度が最大化するように、浸液の屈折率に応じて調整した。また、マウス生体脳の観察時には、カバーガラス表面に乾燥固着させた蛍光ビーズを参照してステージの傾きを調整することで、カバーガラスを光軸に対して垂直にした (Ryosuke Kawakami *et al.*, 2015)。神経細胞形態と蛍光ビーズの分光計測のために、波長 570 nm のダイクロイックミラー (DM) を用いて分光し、それぞれ 520-570 nm (CH1) と 575-630 nm (CH2) の吸収フィルタを介して蛍光を取得した。

3 - 2 - 4 画像解析と統計処理

全ての画像解析は Fiji (NIH) を用いて行い、統計処理には R (R Core Team) を用いた。

マウス生体脳内で三次元的に取得した蛍光ビーズ像については、心拍や体動の影響で歪んでいたため、以下の手順で解析した。単一の蛍光ビーズに着目し、全ての光学断面において蛍光ビーズ像を囲むような関心領域を作成し、各断面について関心領域内の最大蛍光強度を得ることで光軸方向に関する蛍光強度分布を取得した。その分布をガウス関数に当てはめ、その半値全幅を光軸方向の評価に用いた。次に、得られたガウス関数のピーク位置に相当する光学断面像を選んだ。その画像内で蛍光ビーズ像を通過するような y 方向の蛍光強度分布を取得、ガウス関数に当てはめて、そのピークに相当するピクセルを選んだ。そのピクセルを通るように取得した x 方向の蛍光強度分布を、ガウス関数に当てはめ、その半値全幅を平面方向の評価に用いた。半値全幅については、各群の平均について Welch の t 検定を行った。多重検定となる場合には、第一種の過誤を避けるために Bonferroni 補正を施した。

マウス大脳皮質第 V 層における平均信号強度の評価では、21 枚の各光学断層像について、細胞以外の領域から得た背景光成分を各断層像から引き、それらを平均化したものを用いた。また、画像コントラストの計算には、以下の式で示される Brenner gradient (J F. Brenner *et al.*, 1976) を用いた。

$$B = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M [I(i,j) - I(i+2,j)]^2$$

ここで N は x 方向の画素数、 M は y 方向の画素数、 $I(i,j)$ は画像中の座標 (i,j) における輝度値を表す。この指標は、顕微鏡観察時のオートフォーカスを実現するために一般的に用いられており、神経線維のような細かな構造が多く存在する画像のコントラストの計算に有効である。Brenner gradient を各光学断層像について計算し、それらの平均値を評価に用いた。平均信号強度と Brenner gradient の平均は、フリードマン検定及びその事後検定として DSCF 多重比較によって評価した。

また、 Ca^{2+} イメージングの解析では、ランダムな自発活動領域を自動抽出するために、蛍光タンパク質が確実に発現していない血管領域の輝度値を背景光成分として引いた。その後、タイムラプス画像における時間軸に対する最小値投影像を作成し、各ピクセルに対して差し引いた。次に、残った輝度値に対して、大津の二値化によってマスクを作成した。そこで得られた 20 ピクセル以上で表現される領域を関心領域として設定し、その領域内の輝度値の変化を評価した。

3－3 実験結果

3－3－1 マウス生体脳内における焦点体積の評価手法の開発

一般に、試料内部における焦点体積は、試料内部に導入された回折限界以下の大きさの単一蛍光ビーズの三次元像から見積もられる。本研究でも、マウス生体脳内における焦点体積の評価のために、 $\phi 0.2\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズをマウス生体脳に導入した。そのマウスに対して Open-skull 法を施し、2 光子顕微鏡を用いて観察したところ、蛍光ビーズと神経細胞構造が同時に可視化できた。取得した蛍光像を観ると、大脳皮質の第 VI 層付近においても神経細胞が観察できており、ビーズ導入後においても深部到達性は大きく損なわれていないことが確認できた (図 3.3.1a)。さらに、孤立した単一の蛍光ビーズ像を三次元的に取得することに成功した (図 3.3.1b)。脳表から $300\ \mu\text{m}$ の深さまで単一の蛍光ビーズが観察できたため、深さ $100, 200, 300\ \mu\text{m}$ で焦点体積の評価を行った。

複数の単一蛍光ビーズを、励起レーザー光のビーム径の変更前後において三次元的に撮像した (図 3.3.2a)。ここでは、取得した蛍光ビーズ像の蛍光強度分布の半値全幅 (Full Width at Half Maximum: FWHM) を焦点体積の指標として評価に用いた (図 3.3.2b、表 3.3.1)。観察面が深くなるにつれて、有意な焦点体積の増大が観られた。また、深さ $100, 200\ \mu\text{m}$ においては平面方向 ($FWHM_x$)、光軸方向 ($FWHM_z$) とともにビーム径を 67% に絞ることで有意な焦点体積の増大が観られた。これらの半値全幅の増大は、収差や NA の低下による影響を反映したもので、本手法はそれらの影響を評価できるものであるこ

とを支持している。一方、収差や NA の低下の影響を評価できる本手法を用いて、深さ 300 μm で取得した蛍光ビーズ像を評価したところ、ビーム径の変更前後で平面方向、光軸方向ともに有意な半値全幅の増大は観られなかった (図 3.3.2c, d)。ビーム径を絞ることで対物レンズ下の励起光強度を高められるため、この結果は、マウス生体脳深部における光子密度の向上にビーム径 67% が有効であることを強く示唆している。

	平面方向の半値全幅 [μm]		光軸方向の半値全幅 [μm]	
	115%	67%	115%	67%
$z = 100 \mu\text{m}$	0.41 ± 0.01 (15)	0.44 ± 0.02 (10)	2.16 ± 0.05 (15)	2.68 ± 0.05 (10)
$z = 200 \mu\text{m}$	0.40 ± 0.01 (11)	0.50 ± 0.03 (10)	2.33 ± 0.07 (11)	2.87 ± 0.11 (10)
$z = 300 \mu\text{m}$	0.53 ± 0.03 (11)	0.58 ± 0.02 (12)	4.14 ± 0.19 (11)	4.51 ± 0.19 (12)

表 3.3.1 計測結果のまとめ
 数値は全て平均値 $\pm$ 標準誤差を示し、カッコ内の数字は解析に用いたビーズの個数を表す。

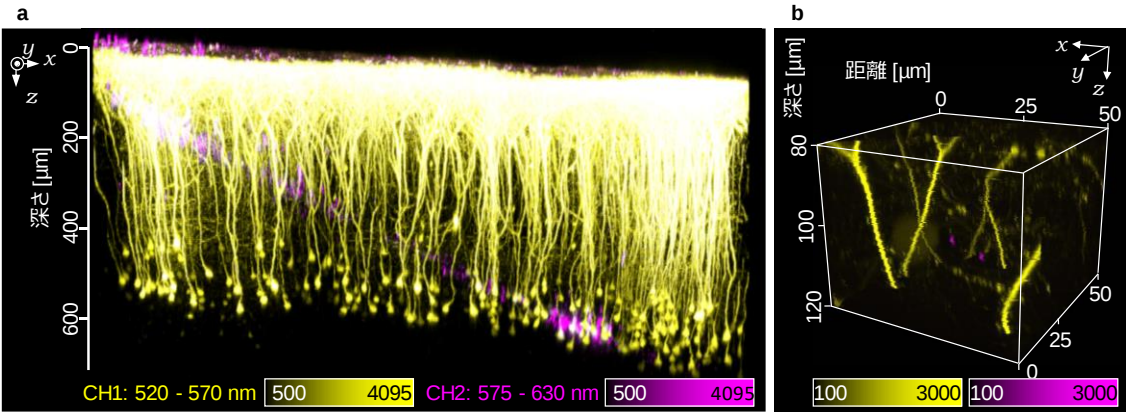


図 3.3.1 マウス生体脳内に導入した蛍光ビーズと神経細胞の同時観察像
 (a) 脳表から大脳皮質第 V 層までの三次元再構築像。神経細胞からの蛍光は主に CH1 で、蛍光ビーズからの蛍光は主に CH2 で取得した。(b) 深さ 100 μm 付近で観察された孤立した蛍光ビーズ。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020, Fig. 1d, e 改変)

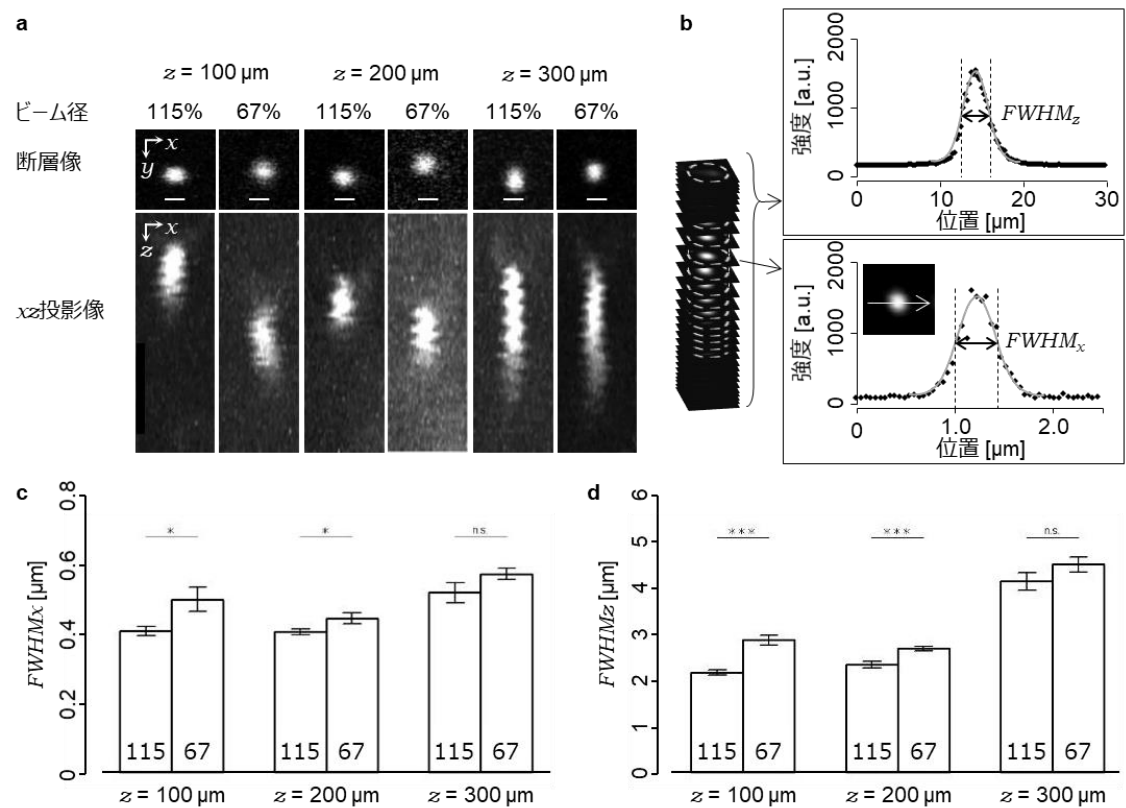


図 3.3.2 ビーム径変更前後における焦点体積の定量評価

(a) マウス生体脳内において各条件下で取得した単一蛍光ビーズ像の例。(b) 取得蛍光ビーズ像の解析方法のスキーム図。(c, d) 平面方向と光軸方向に関する半値全幅の平均値。棒グラフ中の数字はそれぞれの光束径における対物レンズ瞳の充足率を示す。エラーバーは標準誤差。*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.005$ (Welch's t-test) (Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020, Fig. 2 改変)

3-3-2 浸液の屈折率調整によるマウス生体脳内の集光特性の改善

次に 3-3-1 章で確立した評価手法を用いて、マウス生体脳内の焦点体積が最小となるような浸液の屈折率の探索を試みた。本実験で使用している対物レンズは補正環を適切に回すことで 1.33 から 1.37 までの屈折率の浸液に対応できるため、浸液の屈折率はその範囲で調整した。また、脳のより深部でも焦点体積を評価するために、 $\phi 1.0\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズをマウス生体脳内に導入した。その結果、深さ $400\ \mu\text{m}$ でも単一の蛍光ビーズが観察できた。ビーム径（2 条件、115%, 67%）と浸液の屈折率（5 条件、1.33, 1.34, 1.35, 1.36, 1.37）の全組み合わせたにおいて、深さ 100, 200, 300, $400\ \mu\text{m}$ で蛍光ビーズ像を三次元的に取得した（図 3.3.3a）。取得蛍光像を見ると、浸液の屈折率を変えることで、焦点体積も変動している印象を受けた。3-3-1 章と同様の方法で光軸方向の半値全幅を評価したところ、両方のビーム径と深さで、浸液の屈折率変更による有意な焦点体積の変化がみられた。興味深いことにすべての条件で、浸液の屈折率を 1.35 もしくは 1.36 に調整した場合に光軸方向の半値全幅が最小になった（図 3.3.3b-i、表 3.3.2、表 3.3.3）。

次に、浸液の屈折率の調整によって、たしかにマウス生体脳深部における 2 光子励起効率が向上するかを評価した。対物レンズ通過後の励起光強度をビーム径 115%の時の最大値（70 mW）に揃えたうえで、ビーム径（115%, 67%）と浸液の屈折率（1.33, 1.36）のそれぞれ 2 条件ずつを組み合わせた 4 条件でマウス生体脳大脳皮質第 V 層の同一視

野を観察した（図 3.3.4a-l）。対物レンズ通過後の励起光強度を揃えているため、2 光子励起効率に対して焦点体積の変動の影響が最も大きくなる。各条件下で取得した画像を比較すると、浸液の屈折率を 1.36 に調整することにより、神経細胞由来の蛍光強度が顕著に向上し、樹状突起スパインを鮮明に観察することができた。また、更にビーム径を 67%に絞っても顕著な像の劣化はない印象を受けた。条件ごとの信号強度の平均について定量評価したところ、浸液の屈折率変更によって統計的に有意な信号強度の向上が認められた（図 3.3.4m）。さらに、コントラストの評価として、Brenner gradient の平均を算出した結果においても、統計的に有意な向上が認められた（図 3.3.4n）。また、浸液の屈折率が 1.36 の場合にビーム径を 67%に変更しても、コントラストの有意な低下は観られなかった。この結果は 3-3-1 章の結果を支持するものである。以上の結果から、浸液の屈折率を 1.36 に調整することで、マウス生体脳深部の焦点体積が小さくなり、2 光子励起効率が向上することが確認できた。また、ビーム径 67%の条件では更に励起光強度を高めることができるため、更なる 2 光子励起効率の向上が見込まれた。

	光軸方向の半値全幅（ビーム径 115%）				
	1.33	1.34	1.35	1.36	1.37
$z = 100 \mu\text{m}$	3.12 ± 0.11 (19)	2.83 ± 0.10 (29)	2.42 ± 0.10 (27)	2.12 ± 0.07 (23)	2.30 ± 0.13 (23)
$z = 200 \mu\text{m}$	3.66 ± 0.57 (17)	3.09 ± 0.30 (44)	2.48 ± 0.07 (32)	2.56 ± 0.13 (32)	2.64 ± 0.21 (26)
$z = 300 \mu\text{m}$	3.80 ± 0.32 (18)	3.82 ± 0.61 (44)	2.91 ± 0.34 (16)	2.46 ± 0.18 (18)	2.59 ± 0.12 (16)
$z = 400 \mu\text{m}$	3.62 ± 0.78 (22)	4.38 ± 0.95 (29)	3.08 ± 0.28 (33)	2.94 ± 0.18 (20)	3.91 ± 0.98 (22)

表 3.3.2 計測結果のまとめ

数値は全て平均値±標準誤差を示し、カッコ内の数字は解析に用いたビーズの個数を表す。それぞれの深さで半値全幅が最小になったセルは灰色で示している。

	光軸方向の半値全幅（ビーム径 67%）				
	1.33	1.34	1.35	1.36	1.37
$z = 100 \mu\text{m}$	3.75 ± 0.14 (19)	4.00 ± 0.32 (29)	3.42 ± 0.08 (35)	3.13 ± 0.22 (21)	3.48 ± 0.53 (23)
$z = 200 \mu\text{m}$	4.85 ± 1.15 (17)	4.25 ± 0.61 (47)	3.60 ± 0.22 (31)	3.52 ± 0.23 (31)	3.73 ± 0.48 (26)
$z = 300 \mu\text{m}$	4.80 ± 0.38 (19)	4.88 ± 1.28 (43)	4.63 ± 0.86 (15)	3.57 ± 0.41 (16)	3.93 ± 0.24 (16)
$z = 400 \mu\text{m}$	4.41 ± 0.54 (21)	5.28 ± 0.77 (27)	3.94 ± 0.65 (32)	4.27 ± 0.63 (21)	4.63 ± 1.27 (20)

表 3.3.3 計測結果のまとめ

数値は全て平均値±標準誤差を示し、カッコ内の数字は解析に用いたビーズの個数を表す。それぞれの深さで半値全幅が最小になったセルは灰色で示している。

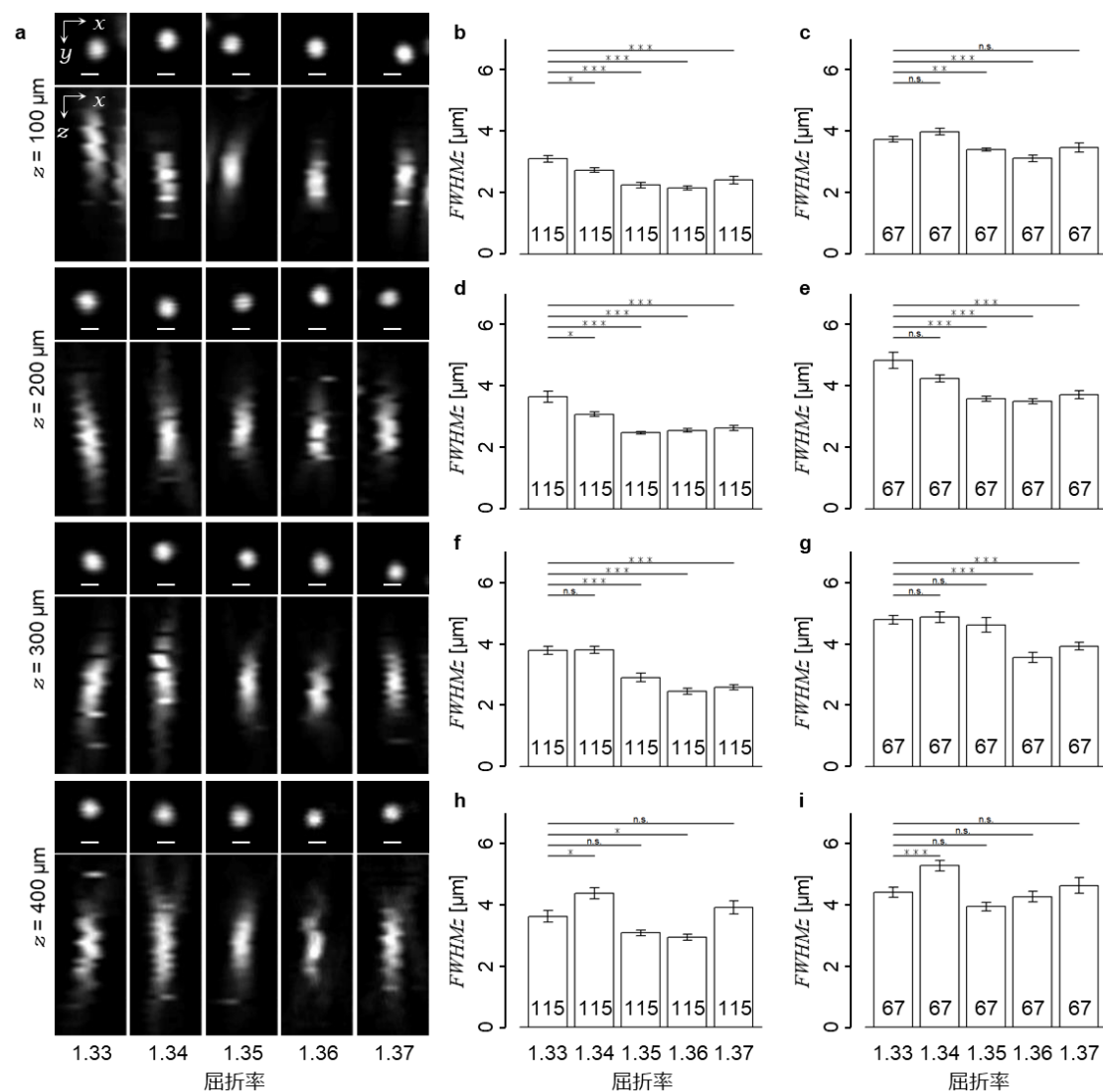


図 3.3.3 浸液の屈折率調整時における焦点体積の定量評価

(a) ビーム径を 115%に設定した場合に各条件下で取得した単一蛍光ビーズ像の例。(b-i) 光軸方向に関する半値全幅の平均値。棒グラフ中の数字はそれぞれのビーム径における対物レンズの充足率を示す。エラーバーは標準誤差。*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$ (Welch's t-test) (Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020, Fig. 3 改変)

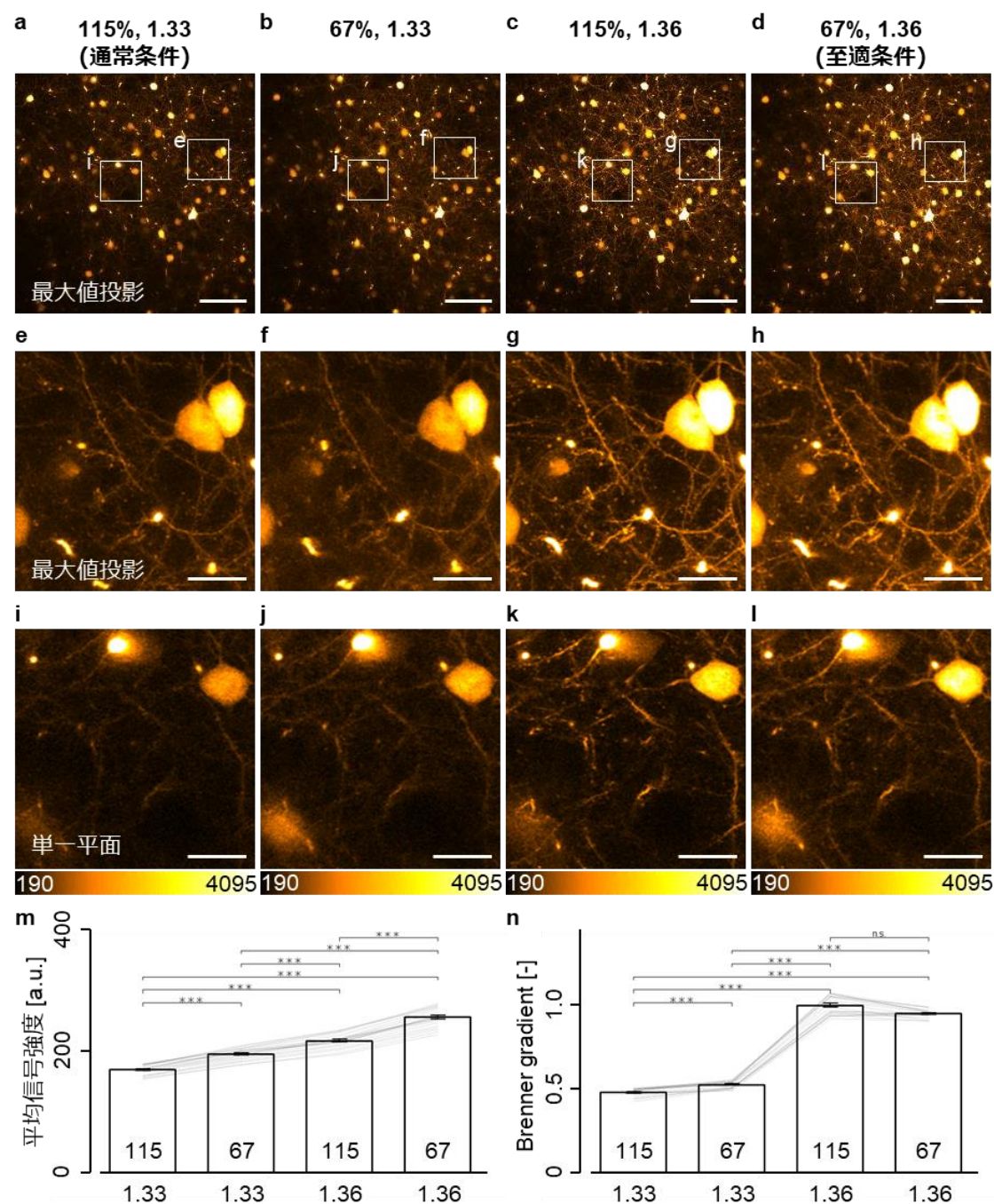


図 3.3.4 マウス生体脳大脳皮質第 V 層観察時における浸液の屈折率調整の効果の検証
 (a-d) 各条件で撮影した 10 μm 厚分の最大値投影像。スケールバーは 100 μm 。(e-h) (a-d) の白枠内の拡大像。スケールバーは 20 μm 。(i-h) (a-d) の白枠内の単一光学断層像。スケールバーは 20 μm 。(m) 各撮影条件で取得した 21 枚の断層像の平均信号強度。灰色の線分は各断層の信号強度を示す。(n) 21 枚の断層像で計算した Brenner gradient の平均値。ビーム径 115%、浸液の屈折率 1.36 の時の平均値で規格化した。エラーバーは標準誤差。***: $p < 0.001$ (Friedman test with post-hoc DSCF all-pairs comparison test)。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020, Fig. 4 改変)

3-3-3 励起光照射条件の改良によるマウス生体脳深部観察

次に、励起レーザー光のビーム径と浸液の屈折率を同時に変更（ビーム径 67%と浸液の屈折率 1.36 の組み合わせ。以下、至適条件と記載）した場合の、マウス生体脳観察の深部到達性を評価した。条件を変更しなかった場合（ビーム径 115%と浸液の屈折率 1.33 の組み合わせ。以下、通常条件と記載）には、先行研究と同様に大脳皮質全層の観察に留まり、より深部にある白質などの構造は観察できなかった（図 3.3.5a）。一方、至適条件を用いた観察では、白質だけでなく、海馬白板、海馬 CA1 領域の細胞体まで鮮明に可視化することができた（図 3.3.5b-e）。以上の結果から、至適条件がマウス生体脳深部の細胞形態観察に有効であることが示された。

次に細胞活動計測の深部到達性の向上効果を評価した。主にアストロサイトに Ca^{2+} 指示タンパク質 G-CaMP7 を発現する G7NG817 マウスの大脳皮質第 V 層を継時観察した。このマウスは蛍光強度に優れる G-CaMP7 を高い効率で発現しているため、通常条件においても、細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度の自発的な変動に起因した蛍光強度変化の検出が可能だった。しかし、脳実質と血管とのコントラストが低く（図 3.3.6a）、蛍光強度の変化量も小さい印象を受けた（図 3.3.6b）。一方、至適条件で同一視野を観察すると、血管と細胞核を影として捉えられるほどの良好なコントラストの像を取得できた（図 3.3.6d）。さらに、自発活動由来の蛍光強度の変化量も大きい印象を受けた（図 3.3.6e）。アストロサイトにおいては、細胞の局所領域で独立した Ca^{2+} 濃度変動が起こることが知られてい

るため、蛍光強度の変化が観られた領域を自動で抽出して、関心領域を作成した。その関心領域内の蛍光強度変化の大きさを比較したところ、至適条件下では、通常条件の4倍程度高い変化量でその動態を捉えられることが明らかになった（図 3.3.6c, f）。以上から、至適条件は生体脳深部における細胞活動計測にも有効であることが示された。

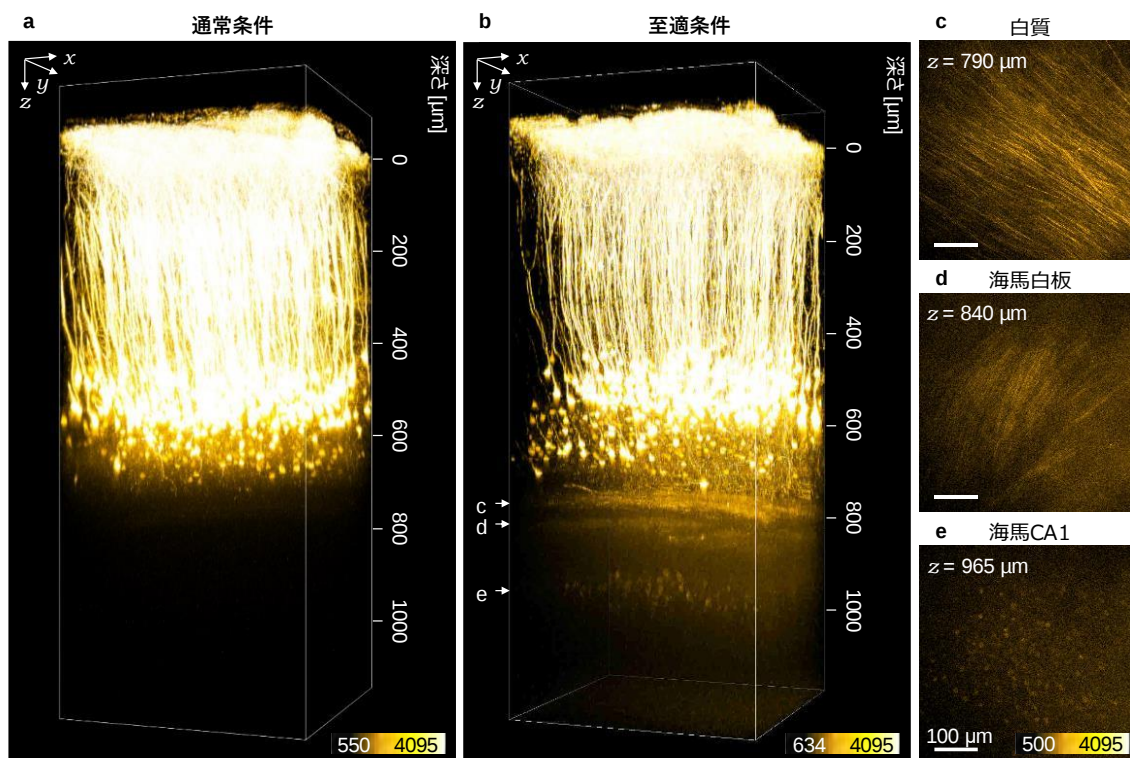


図 3.3.5 至適条件を用いたマウス生体脳内における海馬 CA1 細胞の可視化
(a) 通常条件で取得した光学断層像の三次元再構築像。(b) 至適条件で取得した光学断層像の三次元再構築像。(c-e) 光学断層像。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020, Fig. 5 改変)

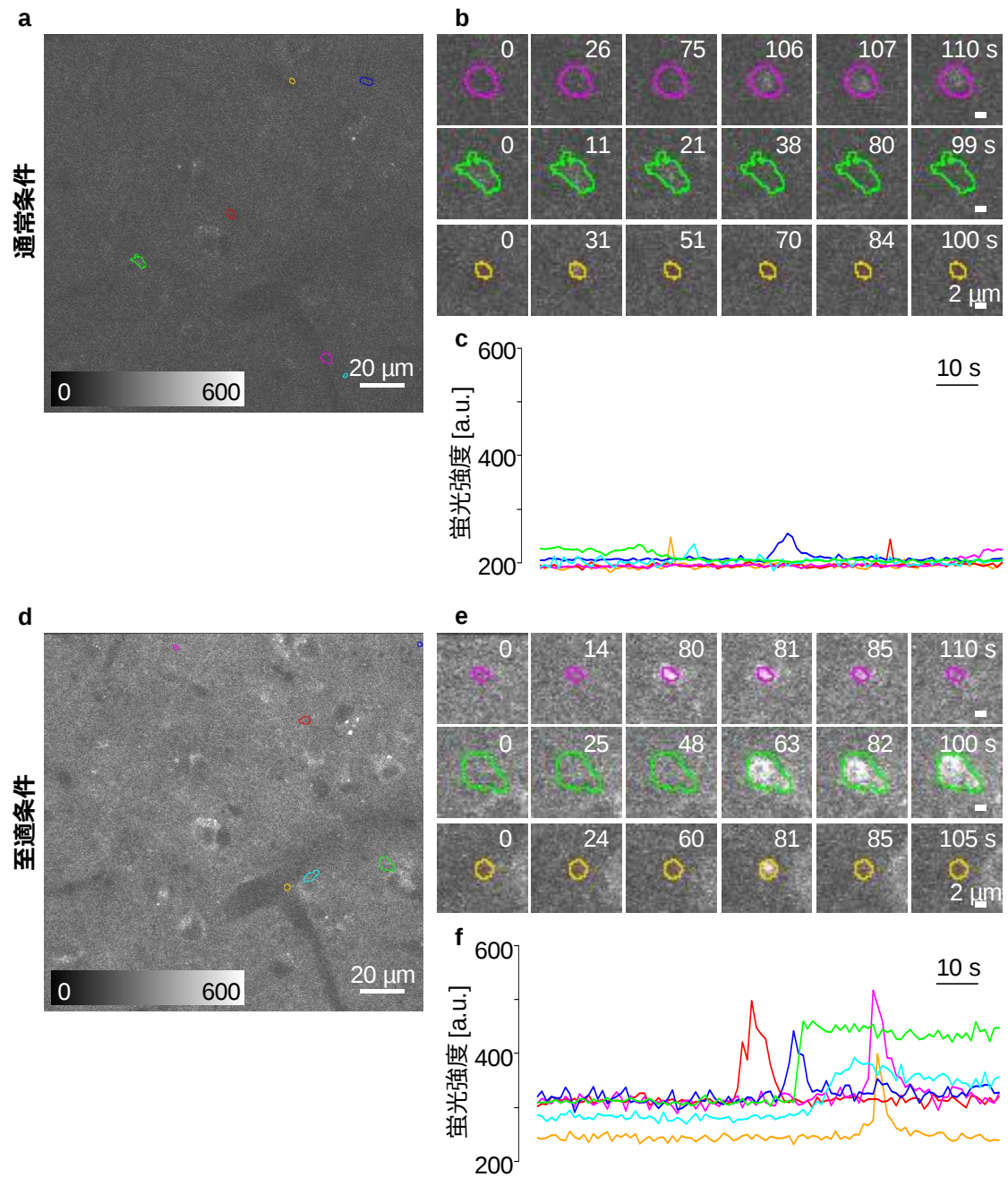


図 3.3.6 至適条件を用いたマウス生体脳深部の高コントラスト Ca^{2+} イメージング

(a, d) 各条件下での取得蛍光像。それぞれの条件について、関心領域の外枠を異なる色で 5 つずつ示している。(b, e) 各条件下での関心領域における蛍光強度変動の例。(c, f) 関心領域内における蛍光強度の時間変化を示すグラフ。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020, Fig. 6 改変)

3-3-4 励起光照射条件の改良によるマウス生体脳深部局所破壊

マウス生体脳深部における2光子励起効率の向上は、光操作技術の効率や精度の改善にも繋がることが期待される。そこで、至適条件の適用によって、レーザー光の局所照射による神経線維破断がマウス生体脳深部で実現可能になるかを評価した。通常条件では、先行研究 (Leonard Sacconi *et al.*, 2007) と同様に、深さ 250 μm では神経線維は破断できなかったが、深さ 350 μm では破断できなかった (図 3.3.7a, c)。それに対して、至適条件を用いると、深さ 500 μm でも神経線維を破断できた。驚くべきことに、第 V 層錐体細胞の基底樹状突起の破断にも成功した (図 3.3.7b)。局所破断技術を生理学研究に応用するためには、破断後の細胞応答を継時観察できることが重要である。長期観察の可能性を確かめるために、第 V 層錐体細胞の頂上樹状突起を破断し、翌日に同一視野を再度観察した (図 3.3.7d)。その結果、翌日においても対象の神経細胞は観察でき、破断された樹状突起が破断位置から遠位方向のみに 100 μm 以上の距離を退行した様子が捉えられた。このとき、より遠位の樹状突起群は退行せずにその構造が維持されていた。また、レーザー光を照射した神経線維以外では細胞形態に目立った変化は観られず、破断が局所的であることも確認できた。以上のように、至適条件の適用によって、マウス生体脳大脳皮質第 V 層の神経線維破断とその後の継時観察に成功した。

次に、この神経線維破断時における周囲のアストロサイトの応答の評価を試みた。脳

の損傷時にはアストロサイトの細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度が上昇することが報告されていた (Kazunori Kanemaru *et al.*, 2013) ため、Thy1-eYFP-H マウスと G7NG817 マウスを交配し、その交雑第一種のマウスを作製した。その個体は両親のそれぞれの遺伝子発現を引き継いだ結果、神経細胞に eYFP を、主にアストロサイトに G-CaMP7 を発現していた。この個体の深さ 100 μm において、励起光強度を抑えた上で神経線維破断を行ったところ、その近傍で蛍光強度上昇が観られた (図 3.3.8a)。その蛍光強度上昇は一過性のものだったが、照射部位近傍にあった細胞の蛍光強度は長期間にわたって高く維持された。深さを 200 μm に変えて同じ条件で照射した場合には、一過性の蛍光強度上昇しか観られなかった (図 3.3.8b)。また、深さ 500 μm において同様の照射を行ったところ、破断も蛍光強度上昇も観られなかった (図 3.3.8c)。さらに、深さ 100 μm において、同じ局所照射を 1000 回繰り返したところ、非常に広い範囲で蛍光強度上昇が観られた (図 3.3.8d)。以上の結果から、脳実質に与えた光エネルギーの積算値と蛍光強度上昇の範囲との間に関連があると考えた。そこで最後に、深さ 100 μm において、レーザー光の局所照射の繰り返し回数(エネルギーの積算値)と蛍光強度の上昇範囲との関連を調べた。その結果、照射回数と蛍光強度上昇範囲との間に強い正の相関を見出した (図 3.3.9)。

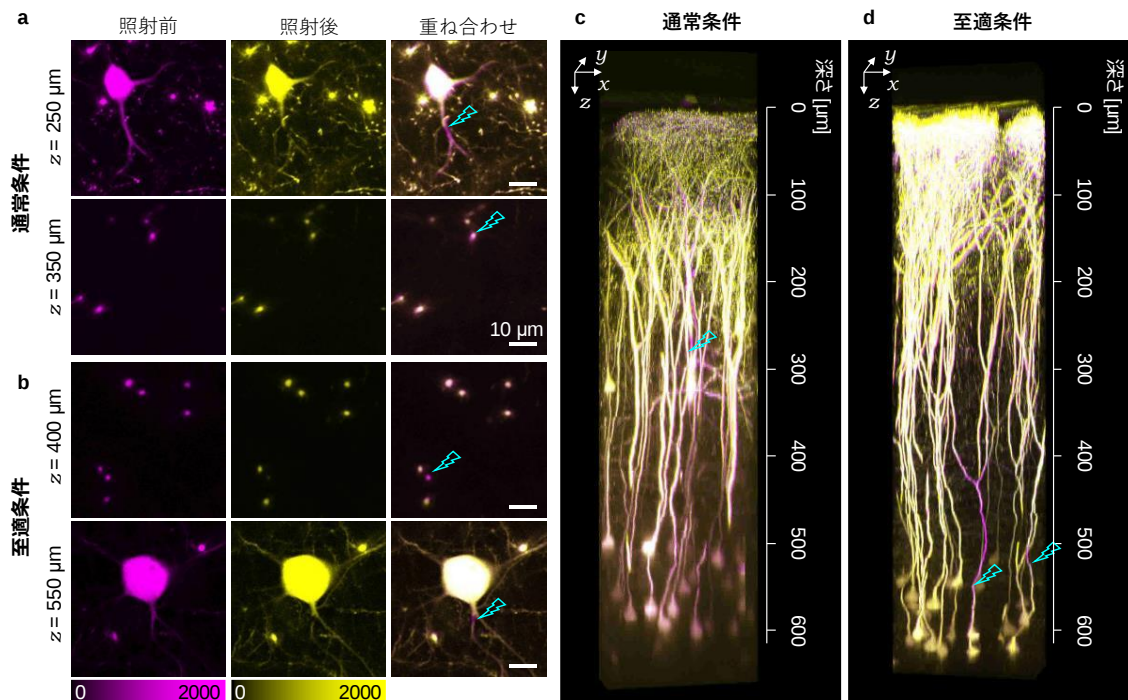


図 3.3.7 至適条件を用いたマウス生体脳深部の神経線維破断

(a) 通常条件下でのレーザー光局所照射前後の蛍光画像。深さ $250 \mu\text{m}$ では標的の神経線維が破断できたが、深さ $350 \mu\text{m}$ では破断できなかった。(b) 至適条件下でのレーザー光局所照射前後の蛍光画像。深さ $550 \mu\text{m}$ にある第 V 層錐体細胞の基底樹状突起も破断できた。(c) レーザー光局所照射前 (マゼンタ) 後 (黄色) に取得した蛍光像の三次元再構築像の重ね合わせ。(d) では樹状突起が退行した部分がマゼンタで示されている。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020, Fig. 7 改変)

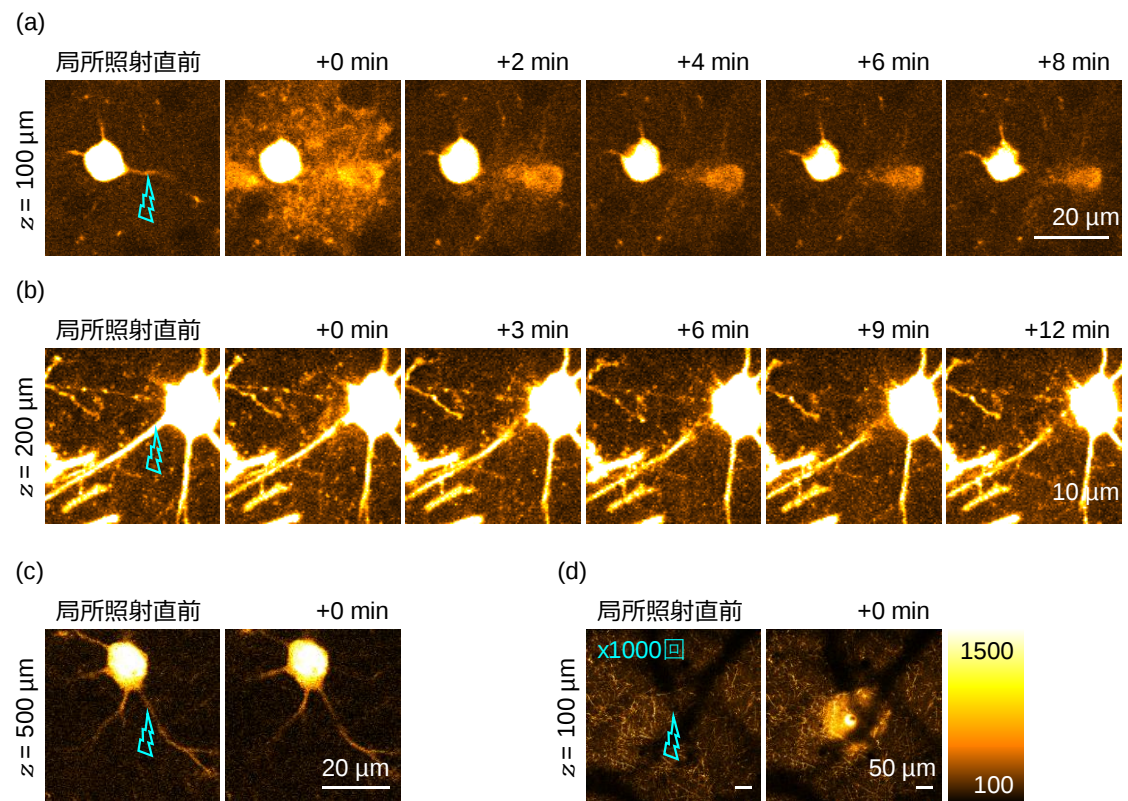


図 3.3.8 破断時のアストロサイトの Ca^{2+} 応答

(a) 深さ $100\ \mu\text{m}$ においてレーザー光の局所照射を行った場合、神経線維は破断され、照射領域近傍で一過性の蛍光強度上昇と一つの細胞で長期間に亘る蛍光強度上昇が観られた。(b) 深さ $200\ \mu\text{m}$ において同様の条件で照射した場合、神経線維は破断され、局所的な一過性の蛍光強度上昇が観られた。(c) 深さ $500\ \mu\text{m}$ において同様の条件で照射した場合、神経線維の破断も周囲の蛍光強度上昇も観られなかった。(d) 深さ $100\ \mu\text{m}$ において(a)-(c)の照射を 1000 回行った場合、非常に広範囲で蛍光強度上昇が観られた。

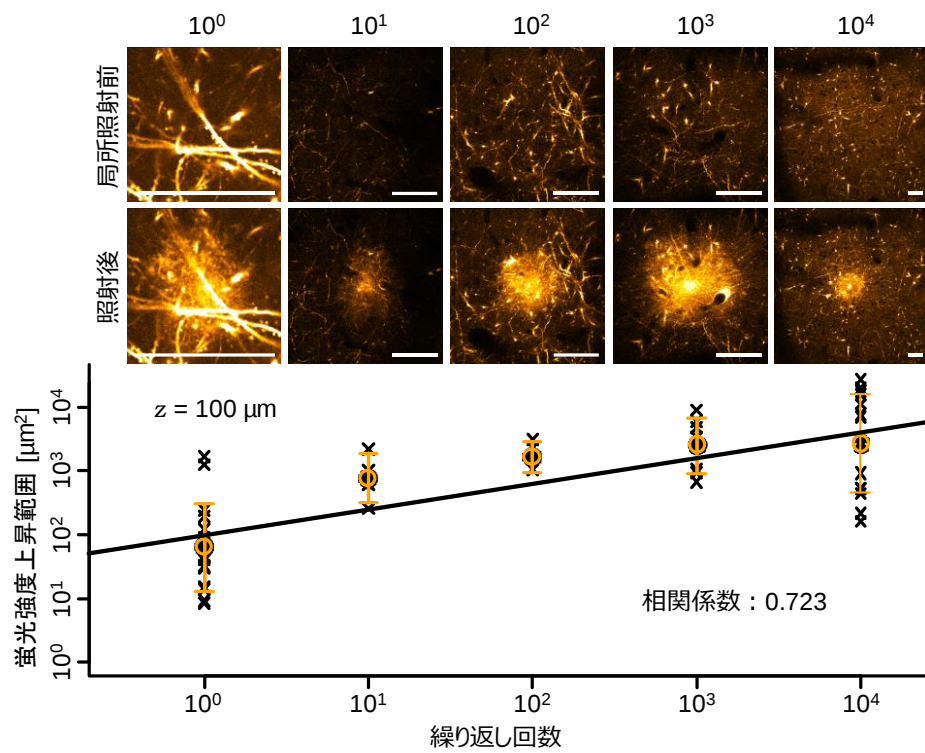


図 3.3.9 レーザー光の局所照射回数と蛍光強度上昇範囲の関係
画像中のスケールバーは全て 50 μm を表す。

3－4 考察

本章では、励起レーザー光のビーム径と対物レンズの浸液の屈折率を至適化し、観察と光操作の深部到達性が向上することを示した。これらの改良は安価かつ簡便に実装でき、汎用性が極めて高い利点がある。近年、神経回路中の単一細胞や単一樹状突起を選択的に破断することによって、神経回路中で単一の細胞や樹状突起がどのように情報処理に関与するのかを調べる試みがなされている（Simon Peron *et al.*, 2020, Jiyoung Park *et al.*, 2019）。しかし、局所破断はこれまで大脳皮質第 II/III 層での適用が限界であり、この技術を用いた神経回路機能の解析は大脳皮質のごく一部の浅い領域でしか行われていない。例えば、触知覚に関連する興奮性の神経回路は大脳皮質の各層で異なる情報処理を行っていると考えられており（Rodney J. Douglas and Kevan A. C. Martin, 2004, Alex M. Thomson and Christophe Lamy, 2007）、局所的な神経回路機能の詳細な解析のために、より深部での光局所破壊の実現が求められていた。それに対して、本研究の至適条件を用いることで大脳皮質第 V 層でも神経線維破断が実現できることが明らかになった。今後、至適条件を用いた深部における光局所破壊によって、局所神経回路の機能解明が進められることが期待される。さらに、至適条件はマウス生体脳深部におけるアストロサイトの Ca^{2+} イメージングも可能にした。近年、神経細胞・アストロサイト間、及び、アストロサイト間の相互作用が精神・神経系疾患の発症や進行に関わるとして注目されている。至適条件を用いた疾患モデルマウスの脳深部における Ca^{2+} イメージングによっ

て、それらの細胞間相互作用の広範囲かつ詳細な解析が可能になると期待される。また、至適条件の適用による焦点体積の縮小は、光遺伝学的刺激・抑制 (Rohit Prakash *et al.*, 2012) や光化学顕微鏡法 (Jun Noguchi *et al.*, 2011) の効率や精度の向上にも貢献する。

また本研究では、脳実質への局所的なレーザー光の照射によって、照射直後にその近傍で細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇に起因した蛍光強度の上昇を観測した。アストロサイトは P2X 受容体を介して ATP を検知すると、 IP_3 を利用して ER から細胞内に Ca^{2+} を放出することが知られている (Andrea Volterra *et al.*, 2014)。また、脳に損傷を与えた場合でも、 IP_3R_2 のノックアウトマウスでは、脳実質の局所障害後の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇は観測されないことが報告されている (Kazunori Kanemaru *et al.*, 2013)。これらの報告に基づくと、今回観測された現象は主に、損傷を受けた神経線維からの ATP の放出によって引き起こされた可能性が高いと考えている。また、レーザー光の照射回数が増えると蛍光強度上昇の範囲が広くなることも見出した。範囲が広がったことは、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度が上昇した細胞の数が増えたことに因ると推定される。損傷を受けた神経線維の数が増えることで ATP の放出量が増えて、応答する細胞数が増えた可能性はあるが、詳細なメカニズムや意義は現在においても不明である。また、継時観察によって、損傷領域から離れる特定の方向に細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇の伝搬が観測された。この現象は単純な拡散では説明がつかず、何かしらの細胞間シグナル伝搬によって引き起こされたと考えている。P2X 受容体を介した ATP の検知によって、アストロサイトは細胞外に

グルタミン酸や ATP を更に放出し、周囲のアストロサイトの細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇を誘起することが知られており (Christopher M. Anderson *et al.*, 2004, Sylvia O. Suadicani *et al.*, 2006)、このようなシグナル伝搬メカニズムがはたらいた可能性があると考えている。さらに、破断後の長期観察によって、損傷部位周囲の広い領域でアストロサイト集団の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇が繰り返し起こる現象も観測した (図 3.3.10)。短期間のうちにほぼ同じ領域で蛍光強度の上昇が観られたため、同一のアストロサイト集団で繰り返し細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇が起こっている可能性が高い。損傷領域を取り囲むような領域で起こっていることから、その後の炎症応答や回復の過程に影響する現象であると考えているが、この現象の意義の解明には、より長期かつ詳細な解析が必要である。また、今回の撮影は全て、特定の光学断面に着目したものであったが、近年、ある光学断面に着目した撮像ではアストロサイトの細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度変動の 10% 程度しか捉えられないことが報告された (Erika Bindocci *et al.*, 2017)。今回観られた現象の詳細なメカニズムや意義に迫るためには三次元的な画像取得と解析が必須であると考えている。個々の細胞を判別した状態で三次元的に細胞活性やその伝搬を評価する系が確立できれば、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇の伝搬のメカニズムや意義に迫ることができると期待される。

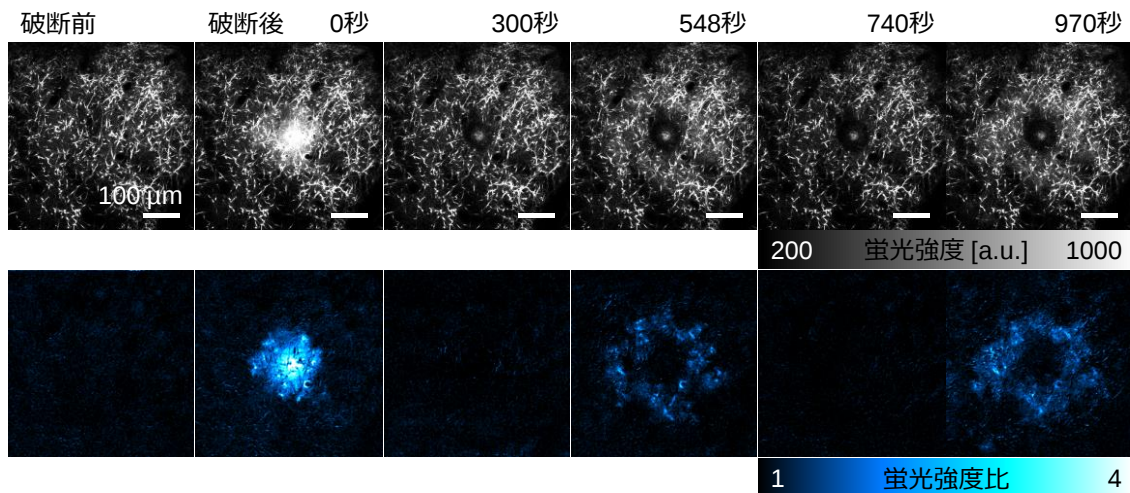


図 3.3.10 同一領域で繰り返し観測される蛍光強度上昇

(上段) 取得蛍光像。(下段) 蛍光強度比の画像。全て 100 秒前時点での画像で割算をして算出した。シグナル変動があった領域がシアンで示されている。

また、第 3-3-2 章では、浸液の屈折率が 1.35 もしくは 1.36 のときにマウス生体脳内の焦点体積が最小になることを示した。今回の観察系は光軸に対してほぼ垂直な屈折率界面のみを含んだものであるため、この焦点体積の縮小は、主にマウス生体脳と浸液との間の屈折率差の低減に起因した球面収差の補正によるものと考えられる。すなわち、マウス生体脳の平均屈折率は 1.35-1.36 程度であることが推定される。この値は、先行研究 (Yoshihiro Ue *et al.*, 2018) において、電動補正環の回転角から推定されたものとも一致している。このことは、生物試料の平均屈折率の推定にも本評価法が利用可能であることを示唆している。また、浸液の屈折率を変えることで脳内の焦点体積が縮小できた結果は、収差補正時に脳を均質な屈折率体と仮定して補正量を決定することが有効であることを示している。一方、浸液の屈折率を調整することで大部分の収差は取り除けたと推測しているが、焦点体積が回折限界程度にまで小さくならなかったことから、未

だ収差が残存していると考えられる。残存する収差は、脳を構成する血管やミエリン、細胞外マトリックスといった異なる屈折率の構造に起因する可能性が高い（Wonshik Choi *et al.*, 2007, Jonas Binding *et al.*, 2011）。空間光位相変調器による励起光波面の微調整（Ayano Tanabe *et al.*, 2016）を追加で行うことで、これらの構造に起因した残収差を補正できるだろう。

本章で見出した至適条件は、すでに報告されている数多の 2 光子顕微鏡法の改良法と併用が可能である。高感度検出器と高ピークパワーの励起光源を備えた 2 光子顕微鏡（Ryosuke Kawakami *et al.*, 2015）において、高輝度の赤色 Ca^{2+} 指示蛍光タンパク質 XCaMP-R を海馬 CA1 領域に発現させたマウス生体脳を至適条件下で観察した。その結果、世界で初めてビデオレート（30 frame/sec）での海馬 CA1 細胞の Ca^{2+} イメージングも達成した（Masatoshi Inoue *et al.*, 2019）。複雑な光学系の改良を必要としない至適条件は、既存の開発技術（Na Ji *et al.*, 2012, Ayano Tanabe *et al.*, 2016, Hirokazu Ishii *et al.*, 2019）や今後新たに開発される技術と組み合わせが容易であるため、神経回路機能の研究を加速させる標準的な観察方法になると期待される。

3－5 本研究のまとめ

本研究では、マウス生体脳内に導入した微小蛍光ビーズを三次元的に撮像し、その蛍光強度分布の半値全幅を評価することで、焦点体積を推定する手法を新たに開発した。それを用いて生体脳深部における2光子励起効率の向上に適した励起レーザー光のビーム径と浸液の屈折率を明らかにした。この2条件の至適化によって、海馬CA1細胞の可視化及び大脳皮質第V層における樹状突起スパインの可視化、高コントラストなCa²⁺イメージングを実現した。更には、これまで不可能だった大脳皮質第V層における神経線維破断を実現した。また、神経線維破断時には、その損傷の程度に応じて広範囲でアストロサイトの細胞内遊離Ca²⁺濃度の上昇が起こっており、その濃度上昇は他のアストロサイトへと伝搬し、アストロサイト集団での活性が反復する現象を発見した。以上のように、今回発見した励起光の照射条件が、2光子顕微鏡法によるマウス生体脳深部観察に有効であることを示した。これまで提案されてきた数多の改良法と比べて、今回の照射条件の改良法は安価かつ簡便に実現が可能で、汎用性が極めて高いことが特徴である。

参考文献

- Alex M. Thomson and Christophe Lamy, “Functional maps of neocortical local circuitry”, *Frontiers in Neuroscience*, Vol. 1, pp. 19-42, October (2007)
- Andrea Volterra, Nicolas Liaudet, and Iaroslav Savtchouk, “Astrocyte Ca^{2+} signaling: an unexpected complexity”, *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 15, pp. 327-335, May (2014)
- Anthony Holtmaat, Tobias Bonhoeffer, David K. Chow, Jyoti Chuckowree, Vincenzo De Paola, Sonja B. Hofer, Mark Hübener, Tara Keck, Graham Knott, Wei-Chung A. Lee, Richard Mostany, Tom D. Mrsic-Flogel, Elly Nedivi, Carlos Portera-Cailliau, Karel Svoboda, Joshua T. Trachtenberg, and Linda Wilbrecht, “Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window”, *Nature Protocols*, Vol. 4(8), pp. 1128-1144, July (2009)
- Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, and Tomomi Nemoto, “Transmissive liquid-crystal device for correcting primary coma aberration and astigmatism in biospecimen in two-photon excitation laser scanning microscopy”, *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 21(12), 121503, December (2016)
- Christine M. Constantinople and Randy M. Bruno, “Deep Cortical Layers Are Activated Directly by Thalamus”, *Science*, Vol. 340(6140), pp. 1591-1594, June (2013)
- Christopher M. Anderson, Jennifer P. Bergher, and Raymond A. Swanson, “ATP-induced ATP release from astrocytes”, *Journal of Neurochemistry*, Vol. 88, pp. 246-256, January (2004)
- Der-Shen Wan, Milind Rajadhyaksha, Robert H. Webb, “Analysis of spherical aberration of a water immersion objective: application to specimens with refractive indices 1.33-1.40”, *Journal of Microscopy*, Vol. 197(3), pp. 274-284, March (2000)
- Dongdong Li, Cendra Agulhon, Elke Schmidt, Martin Oheim, and Nicole Ropert, “New tools for investigating astrocyte-to-neuron communication”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 7(193), October (2013)
- Erika Bindocci, Iaroslav Savtchouk, Nicolas Liaudet, Denise Becker, Giovanni Carriero, and Andrea Volterra, “Three-dimensional Ca^{2+} imaging advances understanding of astrocyte biology”, *Science*, Vol. 356(6339), eaai8185, May (2017)
- Gabriele Losi, Letizia Mariotti, Michele Sessolo, and Giorgio Carmignoto, “New Tools to Study Astrocyte Ca^{2+} Signal Dynamics in Brain Networks *In Vivo*”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 11(134), May (2017)
- Guoping Feng, Rebecca H. Mellor, Michael Bernstein, Cynthia Keller-Peck, Quyen T. Nguyen, Mia Wallace, Jeanne M. Nerbonne, Jeff W. Lichtman, and Joshua R. Sanes, “Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP”, *Neuron*, Vol. 28(1), pp. 41-51, October (2000)
- Hirokazu Ishii, Kohei Otomo, Jui-Hung Hung, Motosuke Tsutsumi, Hiroyuki Yokoyama, and Tomomi

Nemoto, “Two-photon STED nanoscopy realizing 100-nm spatial resolution utilizing high-peak-power sub-nanosecond 655-nm pulses”, *Biomedical Optics Express*, Vol. 10(7), pp. 3104-3113, July (2019)

Hiromu Monai, Masamichi Ohkura, Mika Tanaka, Yuki Oe, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Katsuhiko Mikoshiba, Shigeyoshi Itoharu, Junichi Nakai, Youichi Iwai, and Hajime Hirase, “Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain”, *Nature Communications*, 7:11100, March (2016)

Jun Noguchi, Akira Nagaoka, Satoshi Watanabe, Graham C. R. Ellis-Davies, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano, Masanori Matsuzaki, and Haruo Kasai, “*In vivo* two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice”, *Journal of Physiology*, Vol. 589(10), pp. 2447-2457, May (2011)

Kazunori Kanemaru, Jun Kubota, Hiroshi Sekiya, Kenzo Hirose, Yohei Okubo, and Masamitsu Iino, “Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 110(28), pp. 11612-11617, July (2013)

Jiyoung Park, Athanasia Papoutsis, Ryan T. Ash, Miguel A. Marin, Panayiota Poirazi, and Stelios M. Smirnakis, “Contribution of apical and basal dendrites to orientation encoding in mouse V1 L2/3 pyramidal neurons” *Nature Communications*, 10:5372, November (2019)

J. F. Brenner, B. S. Dew, J. B. Horton, T. King, P. W. Neurath, and W. D. Selles, “An automated microscope for cytologic research a preliminary evaluation”, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 24(1), pp. 100-111, January (1976)

Jonas Binding, Juliette Ben Arous, Jean-François Léger, Sylvain Gigan, Claude Boccara, and Laurent Bourdieu, “Brain refractive index measured *in vivo* with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy”, *Optics Express*, Vol. 19(6), pp. 4833-4847, March (2011)

Kai Wang, Wenzhi Sun, Christopher T. Richie, Brandon K. Harvey, Eric Betzig, and Na Ji, “Direct wavefront sensing for high-resolution *in vivo* imaging in scattering tissue”, *Nature Communications*, 6:7276, June (2015)

Kazushi Yamaguchi, Ryoji Kitamura, Ryosuke Kawakami, Kohei Otomo, and Tomomi Nemoto, “*In vivo* two-photon microscopic observation and ablation in deeper brain regions realized by modifications of excitation beam diameter and immersion liquid”, *PLoS ONE*, 15(8): e0237230, August (2020)

Leonard Sacconi, Rodney P. O’Connor, Audrius Jasaitis, Alessio Masi, Mario Buffelli, and Francesco S. Pavone, “*In vivo* multiphoton nanosurgery on cortical neurons”, *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 12(5), 050502, September/October (2007)

Masashi Kondo, Kenta Kobayashi, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, and Masanori Matsuzaki, “Two-photon calcium imaging of the medial prefrontal cortex and hippocampus without cortical invasion”, *eLife*, 6:e26839, September (2017)

Masatoshi Inoue, Atsuya Takeuchi, Satoshi Manita, Shin-ichiro Horigane, Masayuki Sakamoto, Ryosuke Kawakami, Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Hiroyuki Yokoyama, Ryang Kim, Tatsushi Yokoyama,

Takeshi Imamura, Kenji Sakimura, Tomomi Nemoto, Masanobu Kano, Hajime Fujii, Karl Deisseroth, Kazuo Kitamura, and Haruhiko Bito, “Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for *In Vivo* imaging of Complex Brain Circuit Dynamics”, *Cell*, Vol. 177(5), pp. 1346-1360, May (2019)

Na Ji, Takashi R. Sato, and Eric Betzig, “Characterization and adaptive optical correction of aberrations during in vivo imaging in the mouse cortex”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 109(1), pp. 22-27, January (2012)

Rodney J. Douglas and Kevan A. C. Martin, “Neuronal circuits of the neocortex”, *Annual Review of Neuroscience*, Vol. 27, pp. 419-451, July (2004)

Rohit Prakash, Ofer Yizhar, Benjamin Grewe, Charu Ramakrishnan, Nancy Wang, Inbal Goshen, Adam M. Packer, Darcy S. Peterka, Rafael Yuste, Mark J. Schnitzer, and Karl Deisseroth, “Two-photon optogenetic toolbox for fast inhibition, excitation and bistable modulation”, *Nature Methods*, Vol. 9(12), pp. 1171-1179, December (2012)

Ryosuke Kawakami, Kazuaki Sawada, Aya Sato, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, and Tomomi Nemoto, “Visualizing hippocampal neurons with *in vivo* two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser”, *Scientific Reports*, 3:1014, January (2013)

Ryosuke Kawakami, Kazuaki Sawada, Yuta Kusama, Yi-Cheng Fang, Shinya Kanazawa, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, and 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”, *Biomedical Optics Express*, Vol. 6(3), pp. 891-901, March (2015)

Simon Peron, Ravi Pacholi, Bettina Voelcker, Jason D. Wittenbach, H. Freyja Ólafsdóttir, Jeremy Freeman, and Karel Svoboda, “Recurrent interactions in local cortical circuits”, *Nature*, Vol. 579, pp. 256-259, March (2020)

Sylvia O. Suadicani, Celia F. Brosnan, and Eliana Scemes, “P2X₇ Receptors Mediate ATP Release and Amplification of Astrocytic Intercellular Ca²⁺ Signaling”, *Journal of Neuroscience*, Vol. 26(5), pp. 1378-1385, February (2006)

Thomas D. Albright, Thomas M. Jessell, Eric R. Kandel, and Michael I. Posner, “Neural Science: A Century of Progress and the Mysteries that Remain”, *Neuron*, Vol. 25, S1-S55, February (2000)

Yoshihiro Ue, Hiromu Monai, Kaori Higuchi, Daisuke Nishiwaki, Tetsuya Tajima, Kenya Okazaki, Hiroshi Hama, Hajime Hirase, and Atsushi Miyawaki, “A spherical aberration-free microscopy system for live brain imaging”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 500(2), pp. 236-241, June (2018)

Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen, Kamran Badizadegan, Seungeun Oh, Niyom Lue, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld, “Tomographic phase microscopy”, *Nature Methods*, Vol. 4(9), pp. 717-719, August (2007)

第4章 空間光位相変調器を用いた収差補正による 生物組織内部の微細構造の可視化

4-1 背景と目的

4-1-1 生物組織観察時の課題

第3章で観察対象とした表面が平らな脳領域の様に、カバーガラスで押さえつけなくとも、カバーガラスと脳表の間に異なる屈折率の層がほとんど存在しない場合には、対物レンズの浸液の屈折率調整による収差の低減が非常に有効だった。しかし、多くの生物組織の表面形状は曲率を有しており、屈折率の異なる層が間に形成される余地があるため、浸液の屈折率調整だけでは十分な収差補正効果は期待できない。曲率を有する試料の表面では複雑な非対称性の収差が生じるため、組織内部における微細構造の観察はより困難になる。カバーガラスを押さえつけて組織表面と密着させることで、内部の微細構造を可視化する工夫が施されることもある。しかし、組織の変形がストレスとなり細胞の応答が変わってしまうことで、計測した情報にアーチファクトが生じる。例えば、生体脳観察時には、カバーガラスで脳表面を強く押さえつける場合がある（Victoria Phoumthippavong *et al.*, 2016）が、血流が阻害される上にグリア細胞の活性化が誘起されるため、神経細胞の活動に影響が及ぶ可能性が高い。そのため、組織形状を保った状態で内部の微細構造を可視化する手法の開発が求められていた。そこで、第1章、第2章で述べた、より複雑な収差の補正デバイスを顕微鏡に導入する試みがなされている。

4-1-2 既存の補償光学系の課題と解決方針

空間光位相変調器 SLM を用いた収差補正技術と 2 光子顕微鏡法を組み合わせることで、様々な生物組織内部の微細構造を鮮明に可視化できることが近年報告されている (Na Ji, 2017)。収差補正のためには、第 2 章で述べたように適切な位相変調量の分布を SLM に与える必要があるが、その分布の決定方法は主に 2 種類が報告されている (Daniel J. Wahl *et al.*, 2019)。1 種類目は、試料内で発せられた蛍光をシャックハルトマン型の波面センサーを用いて撮影することで、試料内で生じる光学収差を直接計測する手法である (図 4-1-1a, Kai Wang *et al.*, 2014, Javier M. Brajones *et al.*, 2019)。この手法では、適切な位相変調量を一度の撮影で決定できる利点がある。一方で、波面センサーは蛍光を多点に分割して取得するため、十分な信号を得るためには微小かつ高輝度な蛍光体 (ガイドスター) が試料内部に必要である。すなわち、試料の内部にガイドスターを導入する必要があるため、侵襲性を伴う問題があった。さらに、蛍光像を波面センサーの受光面まで光学的にリレーする必要があるため、光学系が複雑になる問題もあった。2 種類目は、図 4.1.1b に示すような観察像のフィードバックによって、対象の蛍光強度が最大化するように位相変調量の微調整を繰り返す手法である (Mark A. A. Neil *et al.*, 2001, Na Ji *et al.*, 2012)。この手法は前述のガイドスターを必要としない特徴がある。しかし、観察対象を繰り返し撮像するため、試料への光毒性や蛍光分子の光褪色が問題になる。これらの問題解消のために、波面センサーやガイドスター、試料の繰り返しの撮影も必要としな

い位相変調量の決定方法の開発が求められていた。さらに、これまでに報告された SLM の導入例は全て手製の顕微光学系に対するものであり、市販の 2 光子顕微鏡を流用した系は報告されていない。汎用性を高めるためには、市販の顕微光学系に SLM を外部導入する方法論の構築が必須と考えた。

一方、位相変調量の分布は第 2 章で述べたように、屈折率界面から焦点面までの距離と屈折率、屈折率界面の法線に対する光線の入射角を与えれば、数値計算によって算出可能である。ここで、屈折率界面から焦点面までの距離は観察面の深さに対応し、実験者が観察対象に応じて任意に決めることができる。また、屈折率界面の法線に対する光線の入射角は、試料の表面形状の三次元情報から算出できるため、蛍光標識した試料表面を三次元的に撮影することで実験的に求められる。すなわち、屈折率値のみが未知のパラメータとして存在し、屈折率値を仮定すれば位相変調量の分布を求めることができる。このとき、観察面が十分に試料表面から離れていれば、表面形状の三次元情報の取得時に観察面を一度も撮像することがないため、光毒性や光褪色のリスクを負うことなく位相変調量が決定できると着想した。また、SLM を導入する場合、第 2 章で述べたように対物レンズの瞳面と共役な位置に SLM の位相変調面を配置する必要がある。レーザー走査型顕微鏡の場合にはガルバノミラーを間に挟むため、SLM とガルバノミラーの間で 4f 光学系を構築する必要がある (Martin J. Booth and Brian R. Patton, 2014)。しかし、市販のレーザー走査型顕微鏡の場合には、顕微鏡体内でのガルバノミラーの位置

が不明であり、このことが市販の顕微光学系に対する SLM の外部導入を困難にしていた。また、市販のレーザー走査型顕微鏡では、系の最小化のために x 方向、 y 方向の走査に対応する 2 枚のガルバノミラーが近接して配置されている（近接ガルバノ方式）。近接ガルバノ方式では、対物レンズの瞳面が 2 枚のガルバノミラーの中間位置に投影されるようにリレー光学系が組まれるのが一般的である。過去には、筐体から独立した近接ガルバノミラーを外部導入した顕微光学系に対して、2 枚のガルバノミラーの中間位置と共役な位置に SLM を配置することで適切に位相変調できることが報告されている（Vologymyr Nikolenko *et al.*, 2008）。すなわち、ガルバノミラーの中間位置を明らかにしたうえで、4f 光学系を用いてリレーした共役な位置に SLM を置くことによって、近似的には波面制御を行えると着想した。

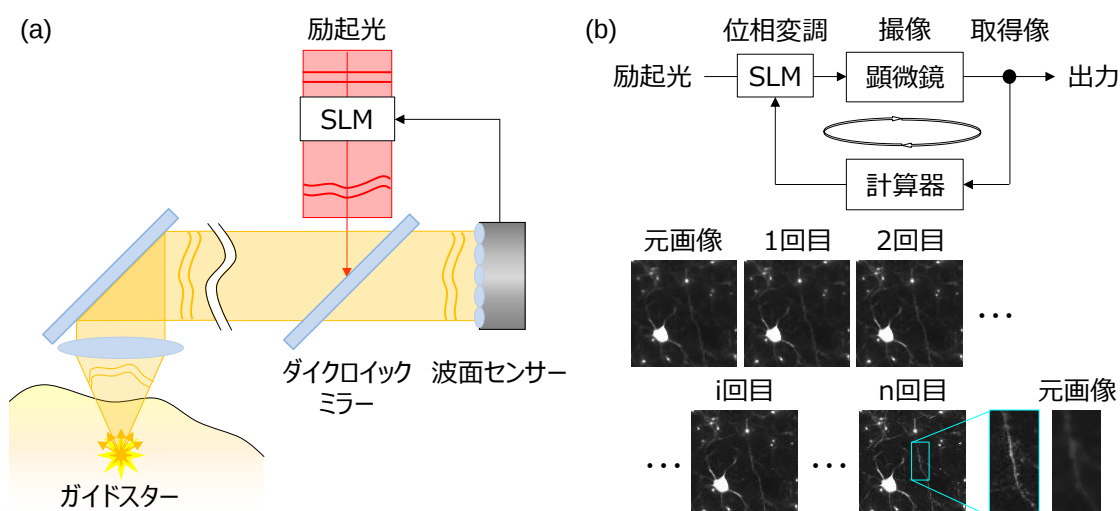


図 4.1.1 これまでに提案されてきた位相変調量の決定方法

(a) 波面センサーによる収差波面の直接計測による方法のスキーム図。(b) 画像取得と変調量の微調整を繰り返す方法、フィードバックループ方式のスキーム図。

4 - 1 - 3 本研究の目的

実測した試料表面の三次元的な形状情報と仮定した試料内部の屈折率の情報を用いた数値計算によって、SLM に与えるべき位相変調量が決定できることを第 2 章 (2.3)式から着想した。表面形状の情報を実測する際には、試料の内部の観察対象領域を一度も撮像する必要が無いため、波面センサーを用いないこれまでのフィードバック方式に比べて、侵襲性を大きく軽減できると考えた。そこで、本章ではこの着想に基づいた非侵襲的な位相変調量の決定手法を確立し、既存の 2 光子顕微鏡に空間光位相変調器を外部導入した系を用いて、収差補正を実現することを目的とする。原理実証のためには、標準試料として蛍光ビーズをゲルに包埋した非生物試料を用いる。その後、実際の生物試料に適用し、開発手法の有用性を明示する。

4 – 2 材料と方法

4 – 2 – 1 空間光位相変調器の特性

本研究では、第 2 章で動作原理を述べた反射型の空間光位相変調器 LCoS-SLM (C14280-12, Hamamatsu) を使用した (Haruyasu Itoh *et al.*, 2009)。この SLM の変調面は 1280×1024 ($12.5 \mu\text{m}$ pitch) の画素電極を備えており、外郭から 72 mm の位置にある。液晶に印加する電圧値を調整することによって、最大 256 階調で $[0, 2\pi)$ の変調を行えるため、空間的に滑らかな位相変調が可能である。SLM の変調面そのものが持つ歪みを補正するための変調パターンはメーカーから提供されており、そのパターンに重ね合わせる形で任意の変調パターンを画像として与えることによって、空間的な任意の位相変調を励起光に与えることができる。

4 – 2 – 2 試料内部で生じる収差の推定方法

第 2 章(2.3)式に基づく収差の計算のために、第 2 章での議論を三次元に展開した三次元光線追跡プログラムを実装した。以下に屈折率界面が一つの場合の計算手順の概要 (図 4.2.1) を示す。ここでは、界面を通過する前の物質の屈折率を n_0 、後の物質の屈折率を n_1 とする。また、屈折率界面の三次元的な形状情報は、すでに試料表面の三次元撮影によって取得できているものとして記述する。

1. 実測によって得た屈折率界面の三次元的な形状情報を、最小二乗法を用いて関数

$z = f(x, y)$ で近似した。

- 理想集光波面上の点 $p: (x_0, y_0, z_0)$ を始点とし、理想集光点に向かう方向成分 $(\cos \alpha, \cos \beta, \cos \gamma)$ を持った単位ベクトル $\mathbf{r}_1$ を、SLM の変調面上の使用画素数と一致する数だけ定義した。今回は SLM の変調面上に定義した直交座標系の任意の点 (ξ, η) を通る光線について考える。

- 理想集光光線と屈折率界面との交点 $p': (x_1, y_1, z_1)$ を媒介変数 t によって以下で定義した。

$$\begin{cases} x_1 = x_0 + t \cos \alpha \\ y_1 = y_0 + t \cos \beta \\ z_1 = z_0 + t \cos \gamma \end{cases}$$

- 交点 p' は $z = f(x, y)$ 上に存在することを考慮し、以下の方程式を解くことで t と交点 p' の数値解を求めた。

$$(z_0 + t \cos \gamma) - f(x_0 + t \cos \alpha, y_0 + t \cos \beta) = 0$$

- 屈折率界面に対する交点 p' を始点とした法線ベクトル $\mathbf{n} = (n_x, n_y, n_z)$ を以下の関係に基づいて計算した。

$$\mathbf{n} = \frac{(f'_x, f'_y, -1)}{\sqrt{f'^2_x + f'^2_y + 1}}$$

ここで、 f'_x と f'_y はそれぞれ関数 f の x, y に対する偏微分を表す。

- 屈折光線の方角成分 $(\cos \alpha', \cos \beta', \cos \gamma')$ を持つ単位ベクトル $\mathbf{r}_2$ を以下のスネルの法則に基づき計算した。

$$\mathbf{n} \times \mathbf{r}_2 = \frac{n_0}{n_1} \mathbf{n} \times \mathbf{r}_1$$

7. 光軸に垂直で理想集光点 $O: (0, 0, z_2)$ が存在する断面（参照平面）と光線との交点を $P: (x_2, y_2, z_2)$ として、理想集光点 O から光線に下ろした垂線と光線との交点 P' を、媒介変数 t' を用いて以下のように表した。

$$P': (x_2 + t' \cos \alpha', y_2 + t' \cos \beta', z_2 + t' \cos \gamma')$$

ここでの z_2 が観察面の深さに相当し、実験者が観察対象に応じて任意に決定できるパラメータである。

8. 光線 PP' と OP' は直交しているため、以下の内積の関係から t' を求めた。

$$(\cos \alpha', \cos \beta', \cos \gamma') \cdot (x_2 + t' \cos \alpha', y_2 + t' \cos \beta', t' \cos \gamma') = 0$$

9. 以上の計算から、以下のように SLM の変調面上の点 (ξ, η) を通る屈折光線の光路長 $L(\xi, \eta)$ を求めた。

$$L(\xi, \eta) = n_0 \overline{pp'} + n_1 \overline{p'P} + n_1 \overline{PP'}$$

10. また、主光線 $qq'O$ の光路長 L_0 は以下で表される。

$$L_0 = n_0 \overline{qq'} + n_1 \overline{q'O}$$

11. 以上の計算から、最終的に波長 λ を用いて、収差 $W(\xi, \eta)$ は以下のように算出した。

$$W(\xi, \eta) = \frac{2\pi}{\lambda} (L_0 - L(\xi, \eta))$$

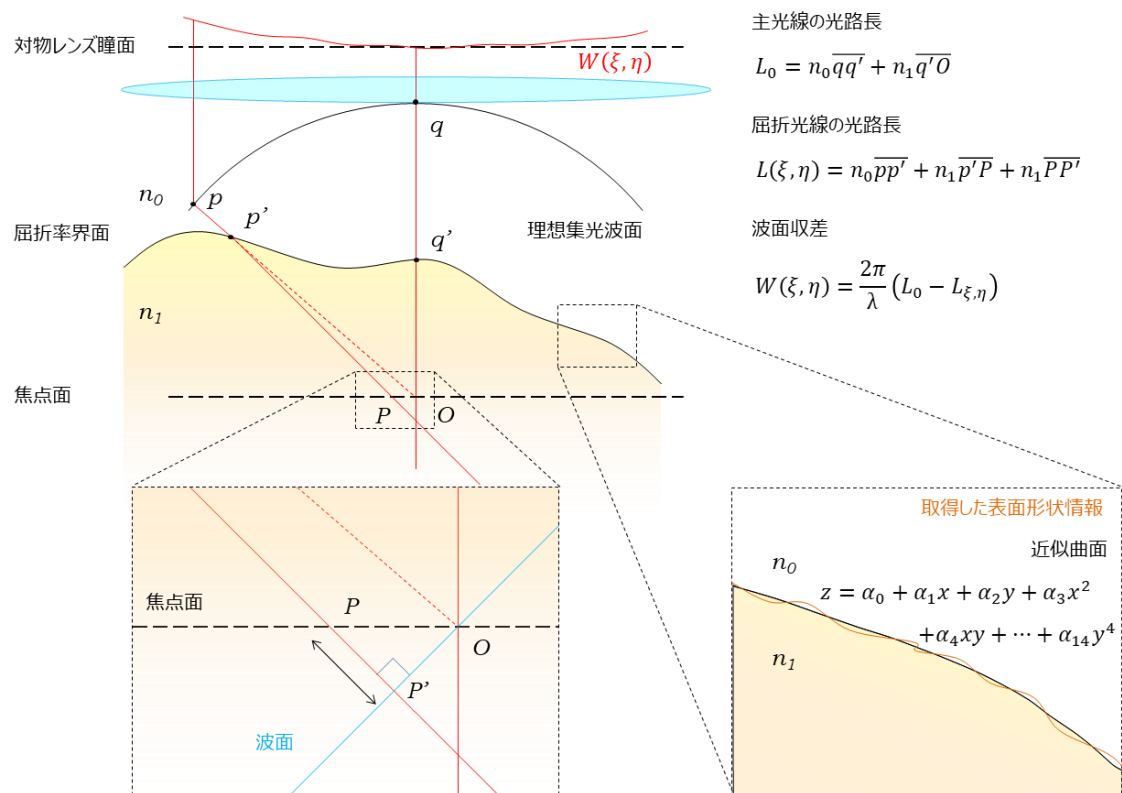


図 4.2.1 収差計算のスキーム図 (Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021 Fig. 1a 改変)

4-2-3 実験生物

がんスフェロイドにおける収差補正効果の検証には、独立行政法人理化学研究所より譲受したヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞 (RCB0007) を使用した。また、マウス生体脳内における収差補正効果の検証には、前章でも述べた 8-12 週齢の Thy1-eYFP-H マウスを使用した。このマウスは、北大・人獣共通感染症センターの SPF 環境の飼育室及び北大・電子科学研究所で繁殖・維持・管理された。なお、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、承認を得たうえでガイドラインに従って実験を実施した。(番号：17-0077)

4 - 2 - 4 標本作製

【非生物試料】

濃度 1% w/v で調整したアガロース (Nippon Gene) のゲルに $\phi 0.2 \mu\text{m}$ (yellow-green, Invitrogen) の蛍光ビーズを包埋し、ガラスボトムディッシュに注いだものを標準試料として作製した。その際、ゲルの屈折率はグリセリンを添加することで 1.36 に調整した。その試料をステージ上に直接置いたものを水平試料、 x 軸方向に水平面から傾けて置いたものを傾斜試料と以降では記述する。また、屈折率が 1.33 の同様のゲル包埋ビーズをガラス細管 (外径 1.5 mm, 内径 1.1 mm; hilgenberg) に充填した。瞬間接着剤で 35 mm ディッシュ底面にガラス細管を固定した後、表面に $\phi 1.0 \mu\text{m}$ (orange, Invitrogen) の蛍光ビーズを撒いて乾燥固着させ、ディッシュ内を水で満たした。以降、この試料は円筒試料と記述する。

【生物試料】

HeLa 細胞は、高グルコース含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) に 10% のウシ胎児血清 (FBS, Gibco) と 1% の抗生物質ペニシリン・ストレプトマイシン (Pen/Strep, 10,000 U/mL, Gibco) を加えた培地 (以下、DMEM 培地) を用いて、37°C、5% CO₂ 環境下で維持・継代した。スフェロイド作製のために、0.05% の EDTA を含むトリプシン (Trypsin-EDTA, Gibco) で処理して準備した細胞懸濁液を、低吸着 U 底 96 穴プレート (MS-9096U, Sumitomo Bakelite) に対して 1,200 cells/well 加えた。その後、DMEM

培地を用いて 37°C、5% CO₂ 環境下で 3-5 日間培養した。作製したスフェロイドを、ポリリジン (Poly-L-lysine, Sigma-Aldrich) でコーティングした 35 mm ディッシュ上に移し、接着した。細胞の蛍光染色のために、生細胞の微小管を染色可能な Tubulin Tracker Green (Invitrogen) を加えて 60 分間、37°C、5% CO₂ 環境下で維持した。Live Cell Imaging Solution (LCIS, Invitrogen) で 3 回リンスした後、Rhodamine B で標識した 70,000 MW のデキストラン溶液 (Thermo Fisher Scientific; 1 mg/mL in LCIS) で外液を満たした。スフェロイドの輪郭の情報を取得した後、LCIS で 3 回リンスした。そして、フェノールレッドを含まない DMEM と Ham's F-12 の混合液 (DMEM/F-12, no phenol red, Gibco) に 10% FBS と 1% Pen/Strep を混ぜた培地 (以下、DMEM/F-12 培地) でディッシュ内を満たして収差補正効果の検証を行った。

また、マウス生体脳の観察に際しては、Open-skull 法を第二次運動野の直上 (Bregma を基準に前方 3.0 mm、正中線上を中心) に $\phi 4.2$ mm の大きさで施した。露出した脳表に対して Rhodamine B で標識した 70,000 MW のデキストラン溶液 (5 mg/mL in PBS) を滴下し、5 秒後に余剰な色素を拭き取ってからカバーガラス (No. 1S, Matsunami) で封をした。その後、カバーガラス表面に $\phi 1.0 \mu\text{m}$ (orange, Invitrogen) の蛍光ビーズを撒いて乾燥固着させた。観察前には、第 3 章に述べた手法でカバーガラスの傾きを取り除いた。収差補正効果の検証の際には水を浸液として使用し、補正環はカバーガラス直下で最適化した。

4 - 2 - 5 画像解析

画像解析には Fiji と R を用いた。水平試料中で取得した蛍光ビーズ像の平面方向、光軸方向の半値全幅は 3-2-4 章と同様の手法で評価した。また、蛍光強度の評価には、蛍光強度分布のフィッティングに使用したガウス関数のピーク値を用いた。傾斜試料中で取得した蛍光ビーズ像の傾きは、xz 断面内で評価した。焦点面における断層像の中心を通るように、xz 断面内で線分関心領域を作成し、それを回転させながら関心領域の蛍光強度の合計を全ての角度について求めた。その合計蛍光強度が最大となる線分関心領域と光軸との成す角を評価に用いた。円筒試料中で取得した蛍光ビーズ像については、xy 平面内における蛍光像を楕円体と仮定し、その長軸と短軸の比を評価した。

また、スフェロイド内部のフーリエスペクトルの評価 (Javier M. Brajones *et al.*, 2019) の際には、細胞塊の内部にあたる画像上の領域について、連続する 10 枚の光学断面 ($42 \times 42 \times 10 \mu\text{m}^3$) を用いた。この各断面について高速フーリエ変換を施し、各空間周波数成分の絶対値を全方向成分について積算した値を得た。位相変調後の画像におけるフーリエスペクトルから位相変調前の画像のフーリエスペクトルを差し引いたものを評価に用いた。

4 - 3 実験結果

4 - 3 - 1 既存の 2 光子顕微鏡に対する空間光位相変調器の導入

筐体の内部に組み込まれているガルバノミラーの位置が不明なため、まずはガルバノミラーよりも光源に近い側に適当なレンズを置き、その伝搬光を瞳位置近傍に置いたビームプロファイラで計測した。このとき、適切な焦点距離のレンズを適切な位置に置くことができれば、対物レンズ内部にある瞳位置近傍で励起光ビームのフーリエ変換像が観測できると考えた。実際に、顕微鏡筐体から 57.5 mm 離れた位置に焦点距離が 175 mm のレンズ (f175) を置いた場合に、対物レンズ内部に相当する位置においてフーリエ変換像が観測できた。第 2 章で述べたように、ガルバノミラー中央に再生されている対物レンズの瞳面をさらに光学的にリレーするためには、空間光位相変調器 SLM と f175 のレンズとの間にもう一枚レンズを挟んで 4f 光学系を構築する必要がある。使用する対物レンズの瞳径と SLM の位相変調面のサイズを考慮し、焦点距離が 500 mm のレンズ (f500) を採用した。f175 のレンズから光源に近い側の 675 mm 離れた位置に f500 のレンズを置き、そこから更に 428 mm 離れた位置に外郭が来るように SLM を設置した。SLM よりも光源に近い側に 5x のビームエキスパンダを設置することで、励起光のビーム径を約 13 mm に広げて、平行光が SLM の位相変調面を十分に覆うようにした。構築した光学系の概略図は以下に示す (図 4.3.1)。

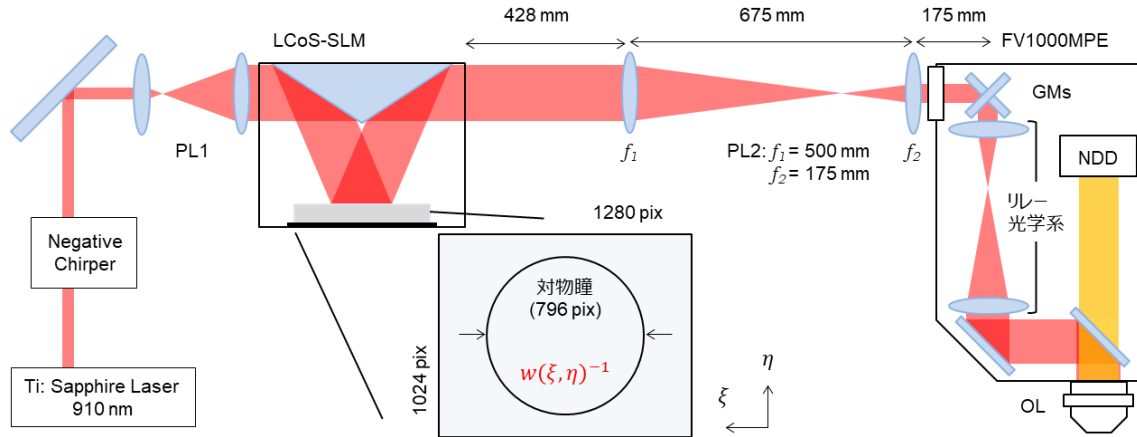


図 4.3.1 LCoS-SLM を外部導入した顕微光学系の概略図

PL1, PL2: レンズ対、GMs: 近接ガルバノミラー対、OL: 対物レンズ、NDD: 蛍光検出器。SLM のディスプレイ上の直径 796 ピクセル分の領域が、リレー光学系を経た対物レンズの瞳径に一致する。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021 Fig. 1b 改変)

4－3－2 標準試料を用いた収差補正効果の検証

外部導入した SLM に対して、光線追跡に基づいて決定した位相変調量の分布（補正パターン）を与えることで、試料内部で発生する収差が補正できるか、原理実証を試みた。

最初に、図 4.3.2a のような水平試料を用いて、屈折率界面が光軸に対して垂直な場合に生じる球面収差の補正効果を確かめた。この際、カバーガラス由来の収差は対物レンズの補正環を回すことで取り除いた。屈折率界面は定数項のみを持つ式で表し、観察面の深さ 300, 500, 800 μm での補正パターンを計算した（図 4.3.2b）。まず、補正パターンを SLM に与えなかった場合に、各深さで蛍光ビーズ像を撮影した（図 4.3.2c）。観察面が深くなるにつれて、取得した蛍光ビーズ像の蛍光強度は低下し、光軸方向に伸びていた。定量的に評価するために、撮影した蛍光ビーズ像の平面方向と光軸方向に関する蛍光強度分布の半値全幅とピーク強度を計測した。その結果、観察面の深さが深くなるにつれて、蛍光ビーズ像のピーク強度は徐々に小さくなり、平面方向と光軸方向の半値全幅は大きくなった（図 4.3.2d-f）。この結果は球面収差の影響によって、焦点体積が増大したことを示している。一方、各深さについて算出した補正パターンを適用したところ、半値全幅とピーク強度の双方で、深さ依存性が観られなくなった。また、補正パターンを適用しない場合と比較して、すべての深さで半値全幅とピーク強度の双方の顕著な改善が観られた（図 4.3.2d-f）。以上の結果から、本手法は屈折率界面が光軸に対して垂直な場合に生じる収差の補正に有効であることが示された。

次に、図 4.3.3a のように同じ試料を顕微鏡ステージ上で x 方向、水平面に対して約 12° 傾けた傾斜試料を用いて、主にコマ収差の補正効果を検証した。この際、カバーガラス表面に固着させた蛍光ビーズを三次元的に撮影することで、表面形状の情報を取得した。この屈折率界面は 1 次の多項式で表し、観察面の深さ 300, 500, 800 μm における補正パターンを計算した (図 4.3.3b)。まず、補正パターンを SLM に与えなかった場合に、各深さで蛍光ビーズ像を三次元的に取得した。得られた蛍光ビーズの xz 投影像は光軸に対して傾いていた (図 4.3.3c)。一方、各深さについて計算した補正パターンを SLM に適用すると xz 投影像における光軸に対する傾きは軽減し、蛍光強度も上昇した (図 4.3.3d)。収差補正効果の定量評価のために、撮影した蛍光ビーズ像の xz 投影像の光軸に対する傾きと蛍光強度を計測した。その結果、補正パターンを SLM に適用することで、傾きは確かに軽減され、蛍光強度も向上していることが確認できた (図 4.3.3e, f)。以上の結果から、本手法は傾いた試料で発生する非対称性の収差の補正にも効果があることが確認できた。

続いて、円筒試料を用いて、主に非点収差の補正効果を検証した (図 4.3.4a)。この際、ガラス細管表面に固着させた蛍光ビーズを三次元的に撮像することで、表面形状の情報を取得した。この屈折率界面は 1 次の交互作用項を含む 2 次の多項式で表し、観察面の深さ 100, 300, 500 μm における補正パターンを計算した (図 4.3.4b)。まず、補正パターンを SLM に与えなかった場合に、各深さで蛍光ビーズ像を撮影した (図 4.3.4c)。取得

した蛍光ビーズ像はその焦点面内でガラス細管の管方向と一致する方向に大きく伸び、観察面が深くなるほど蛍光強度は劇的に小さくなった。一方、各深さについて計算した補正パターンを SLM に適用すると焦点面内での像の伸びは解消され、蛍光強度も格段に向上した (図 4.3.4d)。収差補正効果の評価のために、焦平面内における蛍光ビーズ像を楕円と仮定し、その長軸短軸比と蛍光強度を計測した (図 4.3.4e)。その結果、補正パターン適用前には、観察面が深くなると長軸短軸比は徐々に大きくなり、蛍光強度は徐々に小さくなることが確認できた。一方、補正パターンを SLM に適用することで、長軸短軸比は 1 に近づき、蛍光強度も飛躍的に改善したことが確認できた (図 4.3.4f, g)。以上の結果から、本手法は曲面を有する試料でも補正効果が得られることが確認できた。また、表面形状情報と屈折率値、観察面の深さを与えることで算出した補正パターンを、SLM を外部導入した光学系に与えることで、収差補正が行えることが確認できた。

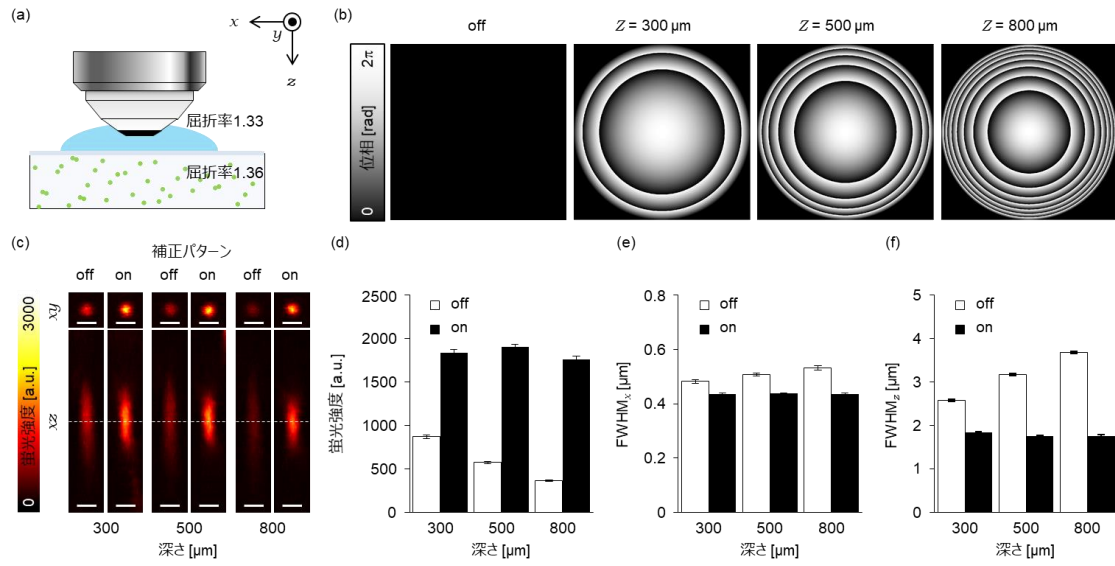


図 4.3.2 水平試料における収差補正効果の評価

(a) 観察のスキーム図。(b) 各深さについて計算した収差補正パターン。(c) 補正パターン適用前後の各深さにおける蛍光ビーズ像の例。(d) 取得した蛍光ビーズ像の平均蛍光強度。(e) 取得蛍光像の平面方向の半値全幅の平均。(f) 取得蛍光像の光軸方向の半値全幅の平均。全ての条件で 20 個ずつの蛍光ビーズを評価した。エラーバーは全て標準誤差。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021 Fig. 2 改変)

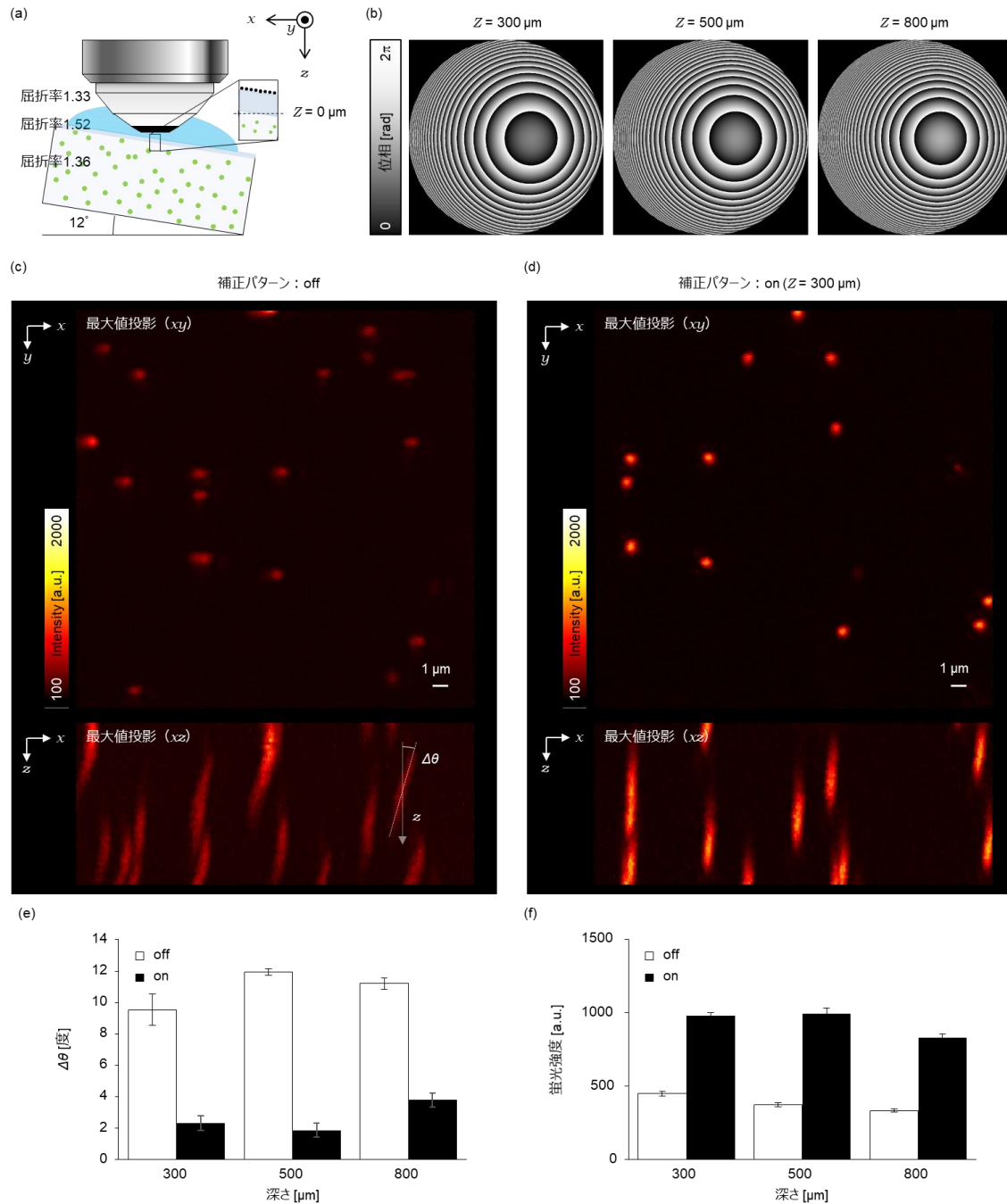


図 4.3.3 傾斜試料における収差補正効果の評価

(a) 観察のスキーム図。(b) 各深さについて計算した収差補正パターン。(c) 補正パターンを適用せずに深さ 300 μm 付近で取得した蛍光ビーズ像の例。(d) 補正パターンを適用し、(c)と同じ位置で取得した蛍光ビーズ像の例。(e) 蛍光ビーズ像の光軸に対する傾きの平均値。(f) 取得した蛍光ビーズ像の平均蛍光強度。全ての条件で 15 個ずつの蛍光ビーズを評価した。エラーバーは全て標準誤差。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021 Fig. 3 改変)

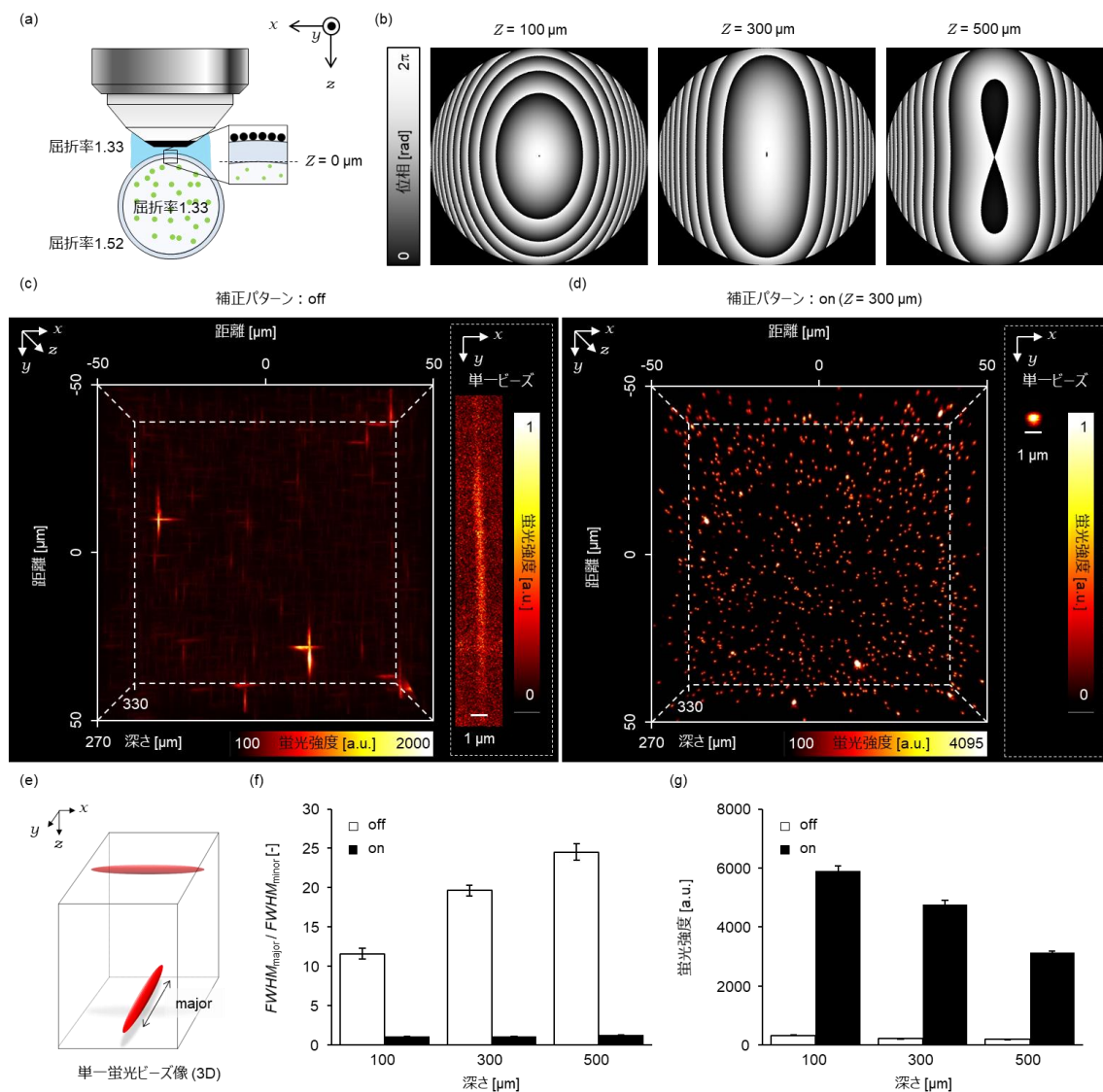


図 4.3.4 円筒試料における収差補正効果の評価

(a) 観察のスキーム図。(b) 各深さについて計算した収差補正パターン。(c) 補正パターンを適用せずに深さ 300 μm 付近で取得した蛍光ビーズ像の例。(d) 補正パターンを適用し、(c)と同じ位置で取得した蛍光ビーズ像の例。(e) 蛍光ビーズ像の解析方法のスキーム図。(f) 蛍光ビーズ像の長軸と短軸の比の平均値。(g) 取得した蛍光ビーズ像の平均蛍光強度。全ての条件で 15 個ずつの蛍光ビーズを評価した。エラーバーは全て標準誤差。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021 Fig. 4 改変)

4-3-3 がんスフェロイドを用いた収差補正効果の検証

標準試料を用いた原理実証で補正効果が確認できたため、実際の生物組織で収差補正効果の検証を行った。試料表面の曲率が大きい生物試料として、微小管を蛍光色素で染色したがん生細胞で作製したスフェロイドを観察対象にした。染色に用いた蛍光プローブは表面から精々70 μm 程度までしか浸透していなかったため、深さ 60 μm において補正効果を検証することにした。外液を蛍光デキストランで満たし、三次元的なスフェロイドの影を取得することで、表面形状の情報を抽出した (図 4.3.5a)。屈折率界面は交互作用項を含む 4 次の多項式で表した。また、スフェロイドの屈折率は先行研究 (Neelam Hari *et al.*, 2019) で報告された値 1.40 を用いて、観察面の深さ 60 μm における補正パターンを計算した (図 4.3.5b)。この補正パターンはほぼ対称的で、補正量も $[0, 2\pi)$ の範囲におおよそ収まっていた。そのため、原理実証で使用した標準試料で得られた結果と比較すると、改善効果は顕著ではないことが想定された。しかし、SLM に補正パターンを適用してみると、蛍光信号の増強によって、コントラストが改善している印象を受けた (図 4.3.5c, d)。実際に細胞上の蛍光強度分布を取得すると、明らかな蛍光強度の上昇が確認できた (図 4.3.5e)。さらに、補正前後におけるフーリエスペクトルの差を計算すると、高い空間周波数の成分においても顕著な信号強度の向上が認められた (図 4.3.5f)。以上の結果から、本手法は生物組織内部で生じる収差においても補正効果があることが明らかになった。

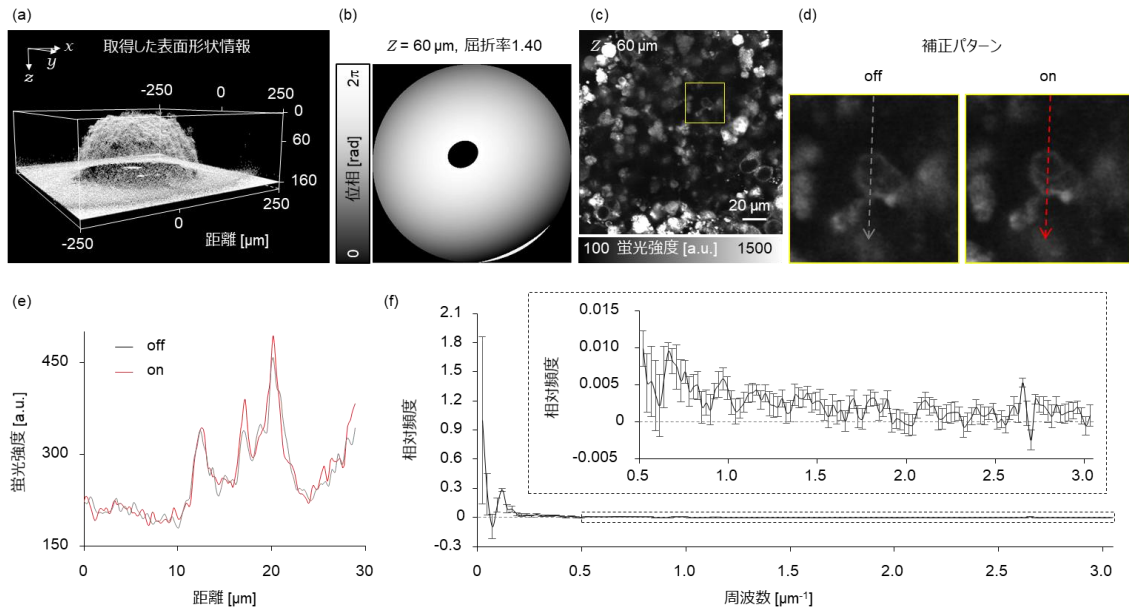


図 4.3.5 がんスフェロイドにおける収差補正効果の評価

(a) がんスフェロイドの表面座標の三次元画像表示。(b) 深さ 60 μm、屈折率を 1.40 として計算した補正パターン。(c) スフェロイドの表面から深さ 60 μm 位置で取得した光学断層像。(d) (c)の黄枠で囲った領域の拡大図。補正パターンの適用前(左)と後(右)。(e) (d)に示した矢印上の蛍光強度プロファイル。(f) 補正前後におけるフーリエスペクトルの差の平均(10 枚の画像を使用)。相対頻度が正の場合、補正パターンの適用によって蛍光強度が向上したことを表す。エラーバーは標準誤差。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021 Fig. 5 改変)

4-3-4 マウス第二次運動野深部における樹状突起スパインの可視化

最後にマウス生体脳第二次運動野 (Secondary Motor cortex: M2) 深部において、補正効果を検証した。マウス M2 領域については、観察窓の形成が極めて困難な上に、脳表面の構造に起因する複雑な収差の発生によって、深部における樹状突起スパインの観察はこれまで実現されていなかった。この領域の観察窓形成が困難な理由として、頭蓋骨が静脈を包み込むような鉤状に形成されており、頭蓋骨除去の際に静脈を傷つけることで個体が失血死に至る点が挙げられる。本研究では、静脈を鉤状構造の包囲から解放してから、頭蓋骨を除去することで観察窓形成の成功率を大幅に向上させた (12 個体中 10 個体で成功、図 4.3.6a)。作製した観察窓を介して 2 光子顕微鏡観察を行った結果、M2 領域の第 VI 層まで観察できた。この結果は、生体脳観察を行うのに十分な質で観察窓が作製できていることを示す。脳表から深さ 500 μm の大脳皮質第 V 層に着目すると、樹状突起が観察できた一方で、樹状突起スパインを鮮明に捉えることはできなかった。また、第 3 章で見出した至適条件を適用してもなお、樹状突起スパインは観察できなかった。そこで、この深さにおいて収差補正効果を検証した。脳表面に添加した蛍光デキストランの像を三次元的に取得することで、脳の表面形状の情報を取得した (図 4.3.6b)。M2 領域の平均屈折率は報告されていなかったため、実測で得た表面形状の情報と観察面の深さの情報を基に、屈折率を 1.34-1.38 まで変化させて補正パターンを計算した (一

例として屈折率を 1.35 と仮定した場合の補正パターンを図 4.3.6c に示す)。補正無しの場合も含めたすべての補正パターンを順次 SLM に適用し、その他の撮影条件は全て揃えたうえで同一視野を撮影した (図 4.3.6d)。その結果、補正パターンを適用することで、樹状突起スパインの可視化を実現した (図 4.3.6e)。また、M2 領域の平均屈折率を 1.35 と仮定した場合に、最も鮮明に樹状突起スパインを観察できた (図 4.3.6f)。

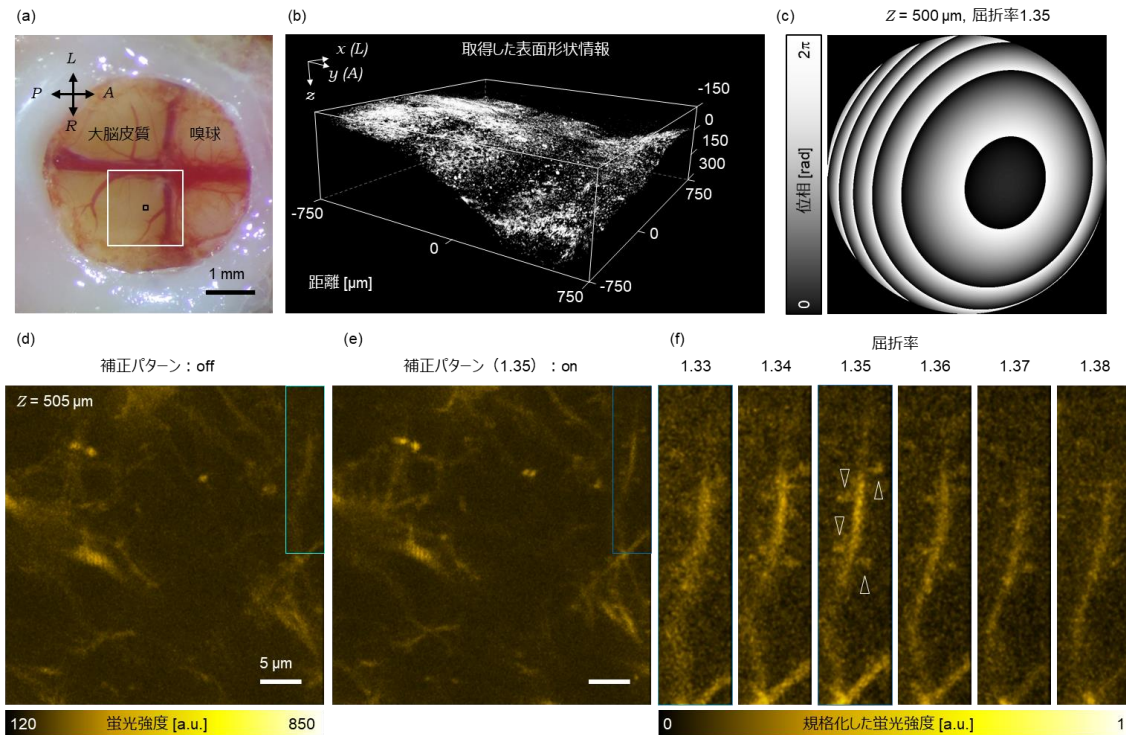


図 4.3.6 マウス生体脳第二運動野領域深部における収差補正効果の評価

(a) Open-skull 法によって作製した観察窓の写真。黒枠で囲った領域を観察した。A: anterior, P: posterior, L: Left, R: Right. (b) (a)の白枠で囲った領域の表面座標の三次元画像表示。(c) 深さ 500 μm 、屈折率を 1.35 として計算した補正パターン。(d) 脳表から深さ 505 μm 位置において補正パターンを適用しない条件で取得した光学断層像。(e) 補正パターン(c)を適用して(d)と同一視野において取得した光学断層像。スケールバーは 5 μm 。(f) 様々な屈折率を与えて算出した補正パターンを適用して、同じ樹状突起を撮影した結果。1.33 は補正パターン off に相当する。矢頭は可視化された樹状突起スパインを示す。蛍光強度は、6 つの画像の最大値を 1、最小値を 0 として規格化した。(Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021 Fig. 6 改変)

4 - 4 考察

本研究では、原理実証のために三種類（水平、傾斜、円筒）の標準試料を使用した。水平試料を用いた補正効果の検証では、300, 500, 800 μm の全ての深さにおいて、蛍光強度と焦点体積を一定値まで回復することができた。この結果は、試料の観察面が深くなるにつれて大きくなる（(2.3)式参照）対称性の収差を、補正パターンの適用によって取り除けたことを示す。すなわち、光線追跡によって求めた位相変調量の分布は正しく、位相変調を適切に行える位置に SLM を配置できていることを支持する結果であった。位相変調量の分布は正しいはずであるが、傾斜試料で取得した蛍光ビーズ像の光軸に対する傾きは、補正後も完全には解消できなかった。補正パターンの $[0, 2\pi)$ の折り返し数が多い深さ 800 μm で取得した蛍光ビーズ像については特に顕著だった $(3.80^\circ \pm 0.45^\circ)$ 。これは顕微鏡体内部のリレー光学系の配置が不明であることによって、SLM に与えた補正パターンの中心を対物レンズの瞳の中心にリレーできていないことが原因であると考えている。顕微鏡体内の光学系が明らかになることで、この問題は解消が期待できる。また、円筒試料では補正パターンの適用後においても、観察面が深くなるにつれて蛍光強度が減衰していった。これは、蛍光に対しての収差が補正できていないために、収差の影響を受けた蛍光を対物レンズで取得できなかったことが原因と考えている。

また、本研究では実測した試料の表面形状の情報に基づき、三次元に拡張した光線追跡法を用いることで SLM に与えるべき位相変調量の分布を算出する手法を提案した。

本研究と同様に、試料表面の形状から位相変調量を推定する試みは、2018 年に松本らによって ACMSS 法として報告されていた (Naoya Matsumoto *et al.*, 2018)。ACMSS 法も同様に、SLM 上の各画素を通過した光線の伝搬を考え、光線が試料表面と交わる点における接平面の傾きに着目していた。しかし、その傾きを基に光線追跡計算を行うのではなく、界面が水平と仮定した場合に算出した補正パターンをフーリエ面上で平行移動させることによって、補正パターンを決定するものだった。この手法では、移動量の計算において小角近似を用いていることから、試料の傾きや励起光の集光角が小さい場合を想定していると考えられる。実際、12 度の傾きを与えた今回の傾斜試料の例では、小角近似を与えることで移動量に約 13% の誤差が生じる (対物レンズは XLPLNW として計算)。表面形状が複雑になった場合には、SLM の各ピクセルについて異なる誤差が生じることになり、適切な補正パターンを算出することはできない。このような誤差は本研究で用いた緻密な光線追跡計算では生じず、傾きや集光角が大きい場合でも計算できることが今回の提案手法の大きな利点である。実際、我々はこの利点を活かすことで、複雑な形状を有する生物試料の内部で微細形態の可視化に成功した。

本研究では、第 3 章と同様に、試料の屈折率が均質と仮定することで補正パターンを算出した。がんスフェロイドやマウス生体脳内において補正効果が得られたことから、試料の平均屈折率を仮定して補正パターンを決定することの有効性が再度示された。光線追跡を用いる場合、屈折率界面の数に比例して計算量が増加するため、複雑な屈折率

分布を考慮する場合よりも計算コストを大幅に下げることができた。一方、生物試料はその構成要素の不均質性から必ず屈折率の分布を持つ (Wonshik Choi *et al.*, 2007) が、本提案手法では複雑な屈折率分布に由来する収差は取り切れないために回折限界程度の撮像性能を得ることはできなかった。そのような性能を実現するためには、本提案手法で求めた補正パターンを初期値として、観察像のフィードバックによる補正パターンの微調整 (Na Ji *et al.*, 2012) を行うことが有効である。提案手法によって大部分の収差は取り除けているため、極めて少ない撮像回数で最適化な補正パターンに到達できることが期待でき、4-1-2 章で述べた光毒性の影響の低減が期待できる。また、波面センサー (Kai Wang *et al.*, 2015) との併用においても効果を発揮する。波面センサーを上手く顕微光学系に導入できたとしても、ガイドスターの蛍光強度が十分でなければ補正パターンは決定できず、収差の影響が非常に大きい場合には事前にフィードバックループ方式を用いて、ある程度の収差補正を行う必要がある。そのような場合においても、今回の提案手法を用いて大部分の収差を取り除いておくことによって、ガイドスターからの信号を効率良く取得できる。そのため、光毒性の低減や蛍光強度の弱い構造をガイドスターとして利用できるようになる利点がある。

また、本研究の提案手法を用いることで、マウス生体脳第二次運動野 (M2) 領域深部の樹状突起スパインの可視化を実現した。M2 領域はシナプスレベルでの非侵襲的な研究が行われていない領域であり、本提案手法を用いた樹状突起スパインの可視化は運動

制御の神経基盤の研究の発展に貢献する。また、近年の研究において、M2 領域がパーキンソン病などの運動障害を伴う神経系疾患の主要な治療ターゲットとなり得る可能性が示されている（Masayoshi Murakami *et al.*, 2014, Florent Barthas and Alex C. Kwan, 2017, Luiz A. V. Magno *et al.*, 2019）。今後、本提案手法を用いた M2 領域のシナプスレベルでの長期観察によって、神経系疾患の発症・進行機構の解明や治療法の探索に貢献できると考えている。

4－5 本研究のまとめ

本研究では、空間光位相変調器 SLM を既存の顕微光学系に外部導入する方法論を構築した。また、実測した試料表面の形状情報と実験者が任意に定める観察面の深さに関する情報に加え、試料の平均屈折率を仮定することにより、三次元的な光線追跡に基づいて SLM に与えるべき位相変調量の分布を数値計算で求める手法を提案した。それらを組み合わせることで、標準試料のみならず、生きた生物試料の内部で生じる収差を補正することに成功した。それによって、これまで観察が困難だった細胞の微細形態を鮮明に可視化することに成功した。本提案手法を用いる場合、観察面が表面から十分に離れていれば、観察面を一度も撮像することなく適切な位相変調量の分布を決定できる。光毒性を含む侵襲性の低さがこれまでの手法から大きく異なる本手法の利点である。

参考文献

- Daniel J. Wahl, Pengfei Zhang, Jacopo Mocchi, Martino Quintavalla, Riccardo Muradore, Yifan Jian, Stefano Bonora, Marinko V. Sarunic, and Robert J. Zawadzki, “Adaptive optics in the mouse eye: wavefront sensing based vs. image-guided aberration correction”, *Biomedical Optics Express*, Vol. 10(9), pp. 4757-4774, September (2019)
- Florent Barthas, and Alex C. Kwan, “Secondary Motor Cortex: Where ‘Sensory’ Meets ‘Motor’ in the Rodent Frontal Cortex”, *Trends in Neurosciences*, Vol. 40(3), pp. 181-193, March (2017)
- Haruyasu Itoh, Naoya Matsumoto, and Takashi Inoue, “Spherical aberration correction suitable for a wavefront controller”, *Optics Express*, Vol. 17(16), pp. 14367-14373, August (2009)
- Javier M. Brajones, Gregory Clouvel, Guillaume Dovillaire, Xavier Kevecq, and Corinne Lorenzo, “Highly Sensitive Shack-Hartmann Wavefront Sensor: Application to Non-Transparent Tissue Mimic Imaging with Adaptive Light-Sheet Fluorescence Microscopy”, *Methods and Protocols*, Vol. 2(3):59, July (2019)
- Kai Wang, Daniel E. Milkie, Ankur Saxena, Peter Engerer, Thomas Misgeld, Marianne E. Bronner, Jeff Mumm, and Eric Betzig, “Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes”, *Nature Methods*, Vol. 11(6), pp. 625-628, June (2014)
- Kai Wang, Wenzhi Sun, Christopher T. Richie, Brandon K. Harvey, Eric Betzig, and Na Ji, “Direct wavefront sensing for high-resolution *in vivo* imaging in scattering tissue”, *Nature Communications*, 6:7276, June (2015)
- Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Yuichi Kozawa, Motosuke Tsutsumi, Tomoko Inose, Kenji Hirai, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, and Hiroshi Uji-I, “Adaptive Optical Two-photon Microscopy for Surface profiled Living Biological Specimens”, *ACS Omega*, Vol. 6(1), pp. 438-447, January (2021)
- Luiz A. V. Magno, Helia Tenza-Ferrer, Mélcár Collodetti, Matheus F. G. Aguiar, Ana P. C. Rodrigues, Rodrigo S. Silva, Joice P. Silva, Nycolle F. Nicolau, Daniela V. F. Rosa, Alexander Birbrair, Débora M. Miranda, and Marco A. Romano-Silva, “Optogenetic Stimulation of the M2 Cortex Reverts Motor Dysfunction in a Mouse Model of Parkinson’s Disease”, *Journal of Neuroscience*, Vol. 39(17), pp. 3234-3248, April (2019)
- Mark A. A. Neil, Rimvydas Juskaitis, Martin J. Booth, Tony Wilson, Tomokazu Tanaka, Satoshi Kawata, “Adaptive aberration correction in a two-photon microscope”, *Journal of Microscopy*, Vol. 200(2), pp. 105-108, December (2001)
- Martin J. Booth and Brian R. Patton, “Adaptive optics for fluorescence microscopy”, *Fluorescence Microscopy: Super-resolution and other Novel Techniques*, first edition (edited by Anda Cornea and P. Michael Conn), Academic Press, Cambridge (2014)
- Masayoshi Murakami, M Inês Vicente, Gil M. Costa, and Zachary F. Mainen, “Neural antecedents of self-initiated actions in secondary motor cortex”, *Nature Neuroscience*, Vol. 17, pp. 1574-1582, September (2014)

- Na Ji, Takashi R. Sato, and Eric Betzig, “Characterization and adaptive optical correction of aberrations during in vivo imaging in the mouse cortex”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 109(1), pp. 22-27, January (2012)
- Na Ji, “Adaptive optical fluorescence microscopy”, *Nature Methods*, Vol. 14(4), pp. 374-380, April (2017)
- Naoya Matsumoto, Alu Konno, Takashi Inoue, and Shigetoshi Okazaki, “Aberration correction considering curved sample surface shape for non-contact two-photon excitation microscopy with spatial light modulator”, *Scientific Reports*, 8:9252, June (2018)
- Neelam Hari, Priyanka Patel, Jacqueline Ross, Kevin Hicks, and Frédérique Vanholsbeeck, “Optical coherence tomography complements confocal microscopy for investigation of multicellular tumor spheroids”, *Scientific Reports*, 9:10601, July (2019)
- Victoria Phoumthipphavong, Florent Barthas, Samantha Hassett, and Alex C. Kwan, “Longitudinal Effects of Ketamine on Dendritic Architecture *In Vivo* in the Mouse Medial Frontal Cortex”, *eNeuro*, Vol. 3(2), e0133-15, March/April (2016)
- Volodymyr Nikolenko, Brendon O. Watson, Roberto Araya, Alan Woodruff, Darcy S. Peterka, and Rafael Yuste, “SLM microscopy: scanless two-photon imaging and photostimulation with spatial light modulators”, *Frontiers in Neural Circuits*, Vol. 2(5), December (2008)
- Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen, Kamran Badizadegan, Seungeun Oh, Niyom Lue, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld, “Tomographic phase microscopy”, *Nature Methods*, Vol. 4(9), pp. 717-719, August (2007)

第5章 三次元組織内部の細胞間シグナル伝搬の可視化・解析法の確立

5-1 背景と目的

5-1-1 三次元組織の生理機能の解明に向けた課題

臓器をはじめとする生物組織は、三次元的に分布する数多の細胞が相互に作用し合うことで正常な機能を実現すると考えられている。例えば発生過程では、三次元的な配置に応じた細胞のアポトーシス誘導によって、組織の正常な形成が実現されている。成体においても、免疫細胞による恒常性の維持や臓器の協調的活動の発現に細胞間の相互作用は必須である。細胞間の相互作用は細胞間のシグナル伝搬によって誘導される。本論文第3章においても、脳に損傷を与えた場合に、損傷部位から遠位方向にアストロサイトの細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇が伝搬する現象を観測した（図 3.3.9）。また、損傷部位周囲の同一と思しきアストロサイト集団において、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇が繰り返し起こる現象も観測した（図 3.3.10）。第3章の考察でも述べたように、このシグナル伝搬や集団での活性化の生理学的意義の解明には、三次元的に分布する数多の細胞を長期間に亘って観測し、個々の細胞を判別した上で生理応答を解析する必要がある（Erika Bindocci *et al.*, 2017）。しかし、脳内でも神経細胞（Gergely Katona *et al.*, 2012, Jérôme Lecoq *et al.*, 2019）以外の細胞は、その形態や位置を三次元的に変化させるため、細胞活性の解析は困難だった。ほとんどの組織において、細胞はその形態や位置を変化させつつ相

互に作用し合っている。そのような動的な三次元の多細胞系において細胞間の情報伝達を可視化・解析する手法を開発できれば、脳を含めた多様な組織の生理機能の解明に貢献できる。そこで本研究では、そのようなモデル系として、安定かつ大量に作製が可能ながんスフェロイドに着目した。がんスフェロイドは細胞形態が多様であるのに加えて密度が非常に高く、個々の細胞に着目した解析の難度が高い特徴を有する。このモデル系において解析手法が確立できれば、多様な他の三次元の多細胞系でも安定した解析を実現できることが期待される。また、がんスフェロイドにおける解析手法を確立することは、次節で述べるように、がんの治療法の確立にも貢献することが期待される。

5-1-2 がんスフェロイドを用いた治療法のスクリーニング

がん治療法のスクリーニングには、倫理面やコスト面からがん細胞の二次元培養系が長い間用いられている。しかし、動物個体中の固形がんに見られる三次元的な細胞間相互作用や細胞外環境、遺伝子発現を二次元培養系はほとんど模倣できておらず、抗がん剤の治療効果を適切に評価できないこともわかってきた (Bharat B. Aggarwal *et al.*, 2009)。そこで、より固形がんに近いモデルである三次元がんスフェロイドが治療法のスクリーニングに利用され始めている (Angelika Riedl *et al.*, 2017)。がんスフェロイドは表面付近の細胞が障壁となって内部への薬剤の侵入を妨げるなど、固形がんに似た治療耐性を示す (Federico Perche and Vladimir P. Torchilin, 2012, Ana S. Nunes *et al.*, 2019)。また、内

部だけでなく、外側の一部の細胞も治療耐性を示す可能性が示唆されており、固形がんで見られるような細胞の不均質性も提唱されている (Daniel S. Reynolds *et al.*, 2017)。さらに近年では、治療法適用後のがんスフェロイドの体積変動や死細胞の割合の平均をハイスループットで評価する系も確立されてきた (Yi-Chung Tung *et al.*, 2010, Oksana Sirenko *et al.*, 2015)。これらのスフェロイドの特性に関する知見の蓄積と評価技術の開発によって、がんスフェロイドの治療法のスクリーニングへの活用が益々広がっている。

また、がんの治療に向けた研究では、化学物質のみならずナノ材料を用いた治療が注目されている (Dev K. Chatterjee *et al.*, 2011)。ナノ材料は多彩な機能的表面修飾が可能 (Jung S. Suk *et al.*, 2016) で、EPR (Enhanced Permeation and Retention) 効果 (Hiroshi Maeda, 2001) によって腫瘍集積性が高い特徴がある。また、合成方法の工夫によってサイズや形状を変えることで、その性質を大きく変えられる利点もある。その中でも金を材料としたナノ粒子は、表面プラズモン共鳴効果による高い光熱変換効率と優れた生体適合性を示すため、光熱治療法への応用が期待されている (Jeremy B. Vines *et al.*, 2019)。

臨床応用を目指すにあたっては、生体組織内部で高い光熱変換を実現できる可能性が高いことから、近赤外領域の光を吸収して熱を発生する金ナノロッドや金ナノスターが治療応用の有力候補となっている (Minho Kim *et al.*, 2019)。実際、げっ歯類を用いた金ナノ粒子の光熱治療効果を実証する研究では、体表からの近赤外光の照射によって、体内の固形がんを劇的に小さくできることが報告されている (Won I. Choi *et al.*, 2011, Yang

Liu *et al.*, 2015)。明確な治療効果が得られている一方で、光熱治療時の個々のがん細胞の応答や詳細な治癒メカニズムについてはほとんど検証されていない。治癒メカニズムの解明は、金ナノ粒子の形状や表面修飾の最適化に繋がるため、光熱治療時のがん細胞の応答を詳細に解析するための手法の開発が求められていた。

5 – 1 – 3 がん細胞の ERK シグナルとその検出法

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（Mitogen-activated Protein Kinase: MAPK）ファミリーは細胞外の情報を核内に伝えるための重要な分子である。MAPK ファミリーの活性化は、細胞の増殖や分化、ストレス応答、細胞死などを制御しており、細胞や組織の運命決定に関わることが報告されている。がん化も例外ではなく、MAPK ファミリーのひとつで、細胞増殖に関わる細胞外シグナル調節キナーゼ（Extracellular Signal-regulated Kinase: ERK）の活性の異常な上昇が一因であると考えられている。ERK は活性化によって細胞質から核内へ移行し、細胞の増殖や移動だけでなくアポトーシスの制御に関わる遺伝子の転写活性を制御することが報告されている。そのため、がんの増殖を抑えてアポトーシスを誘導できるがん治療薬の有力候補として ERK の選択的阻害剤が精力的に探索されている。

がんの形成や生存に重要な ERK 活性であるが、その検出は一般的にウェスタンブロットティングや ELISA、免疫染色によって行われてきた。個々の生細胞に適用できる手法

ではなかったため、ERK 活性変化の過程をリアルタイムで捉えることはできなかった。

個々の細胞の ERK 活性変化をリアルタイムで検出することは、がんの生理学や治療法の開発にとって必須であり、検出法の開発が期待されていた。その一つとして、共鳴エネルギー移動現象 FRET (Förster Resonance Energy Transfer) を応用し、ERK 活性変化をリアルタイムで検出できる蛍光プローブ EKAREV が開発された (N. Komatsu *et al.*, 2011)。

このプローブは黄色蛍光タンパク質 YPet (以下、YFP と記載) とシアン色蛍光タンパク質 eCFP (以下、CFP と記載) をそれぞれ FRET のアクセプター、ドナーとしており、それらの間に ERK の結合部位と ERK によるリン酸化部位を有している。その部位がリン酸化されることで FRET 効率が変化し、ERK 活性変化を検出できる。核移行シグナルを付加した EKAREV-NLS 遺伝子を導入し、分散培養した細胞において、細胞の密度に依存した自発的な一過性の ERK 活性の上昇が見出されている。その一過性の ERK 活性は EGF リガンドを介して隣接する細胞へと伝搬することが報告された (Kazuhiro Aoki *et al.*, 2013)。

また、細胞分裂とアポトーシスの適切な制御が必要な発生期の管形成において、管内部のアポトーシスを示す細胞では一過性の ERK 活性上昇の頻度が低下することも報告された (Pascal Ender *et al.*, 2020)。

細胞増殖やアポトーシスへの関与が示唆されている一過性の ERK 活性は、EKAREV を恒常的に全身に発現する遺伝子改変マウスの構築によって (Yuji Kamioka *et al.*, 2012)、動物個体内でも起こることが確かめられている。このマウスを用いることで、一過性の ERK 活性上昇とその伝搬は多様な組織

で観られることが報告されており、ERK シグナルとその伝搬の生理的役割についての解析が進められている (Rei Mizuno *et al.*, 2014, Toru Hiratsuka *et al.*, 2015, Kazuhiro Aoki *et al.*, 2017)。一方で、がんスフェロイドにおいて ERK 活性の変動を単一細胞レベルで解析した例は未だにない。その原因の一つとして、スフェロイドを構成する膨大な数の細胞を追跡し、解析することは極めて困難である点が挙げられる。高密度に存在する個々の細胞を自動追跡し、その生理活性を個別に解析する手法が開発された暁には、がんスフェロイドの生物学的特性の理解や固形がんモデルとしての治療法のスクリーニングへの利用が飛躍的に進むことが期待される。

5 - 1 - 4 三次元自動核検出・追跡プログラム 3DecCellTracker

組織における三次元的な細胞間の相互作用の重要性が明らかになってきたため、三次元
の多細胞系において、生理活性を単一細胞レベルで解析する試みがなされている。近年
では、細胞の核を自動で検出・追跡することで、自由行動下の生物の核内遊離 Ca^{2+} 濃度
の動態を解析することも可能になっている (Yu Toyoshima *et al.*, 2016, Yu Toyoshima *et al.*,
2020, Felipe Delestro *et al.*, 2020)。しかし、この手法は特定の撮影条件における特定の組
織しか解析対象にできず、その対象が変わった場合にはプログラムの大幅な修正が必要
になる課題があった。観察手法や観察対象に因らず、安定的な解析を提供するために、
深層学習を取り入れた三次元組織内部における核自動検出・追跡プログラム

3DeeCellTracker が開発され、GitHub 上で公開された (Chentao Wen *et al.*, 2018, <https://github.com/WenChentao/3DeeCellTracker>)。このプログラムは 3D U-Net (Özgün Çiçek *et al.*, 2016) を採用することで、少ない教師データで高い精度の核の自動検出を実現している。また、核の三次元的な追跡には、まず三層式のフィードフォワード型の畳み込みニューラルネットワークを利用して大まかな位置合わせを行っている。その際、シミュレーションによって作成した移動データを教師データとして学習に用いている。そのうえで、非剛体位置合わせが可能な PR-GLS 法 (Jiayi Ma *et al.*, 2016) を使用して位置の調整を施し、さらに、3D U-Net で検出した核の重心の情報を反映させることで高精度の追跡を実現している。この手法は、それぞれの観察手法や観察組織について、1 つの教師データと 1 つの検証データさえ作成すれば、他の生物試料でも三次元的な追跡が高精度で行えることが報告されている (Venkatakaushik Voleti *et al.*, 2019)。ただ、これまでの適用は全て、疎に細胞核が分布している生体試料が対象となっており、スフェロイドのように密に細胞が存在する試料において高精度な検出と追跡が行えるかは不明だった。

5 - 1 - 5 本研究の目的

本章では、三次元多細胞系において、その三次元的な細胞間シグナル伝搬を可視化、解析するための汎用性の高い手法の確立を目指した。まず、細胞外の情報を細胞内に伝える働きをもつ分子 ERK の活性を、蛍光信号の変化として取得できる EKAREV-NLS を恒常発現する細胞株を樹立する。その細胞株で三次元がんスフェロイドを作製し、2 光子顕微鏡を用いて三次元タイムラプス画像を取得する。三次元核抽出・追跡プログラム 3DeeCellTracker をスフェロイドに応用し、その利用可能性を明らかにする。高精度で核の自動検出・追跡が実現できることを確認した後、自発的な ERK 活性に関する情報を多数の細胞から抽出・解析する手法を確立する。その手法を用いて、金ナノスターによる局所光熱刺激後において、スフェロイドを構成する細胞集団でどのような応答が起きるのかを解析する。

5 – 2 材料と方法

5 – 2 – 1 標本作製

三次元培養がんスフェロイドの構築には、独立行政法人理化学研究所より譲受したヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞 (RCB0007) を使用した。EKAREV-NLS の安定発現株は基礎生物学研究所の青木一洋教授よりいただいた。以下に簡潔に安定発現株の樹立方法を示す (詳細なプロトコルは巻末の付録に掲載)。DMEM 培地、37°C、5% CO₂ 環境下で維持・継代した細胞に対して、PiggyBac トランスポゾンシステムとリポフェクション法を組み合わせることで、EKAREV-NLS 遺伝子を含む DNA と PiggyBac トランスポゾン DNA を導入した (図 5.2.1、Kazuhiro Aoki *et al.*, 2012)。その際、Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) を用いて、前者の DNA を後者の DNA の 3 倍量導入した場合に、細胞における発現効率が最も高かった。0.05% の抗生物質 blasticidin (InvivoGen) によって薬剤耐性遺伝子が導入された細胞のみを選択し、EKAREV-NLS 安定発現株を樹立した。前章 3-2-4 で述べた方法を用いて三次元培養した EKAREV-NLS の安定発現株 (図 5.2.2) の well 中に、必要に応じて PBS で希釈した金ナノスター分散液を添加した。三次元培養細胞を PBS に一度潜らせることで過剰な金ナノスターを取り除いた後、ポリリジンコートした 35 mm ディッシュに移して、DMEM/F-12 培地を外液とした (詳細なプロトコルは巻末の付録に掲載)。観察開始前まで 37°C、5% CO₂ 環境下でインキュベーションした。

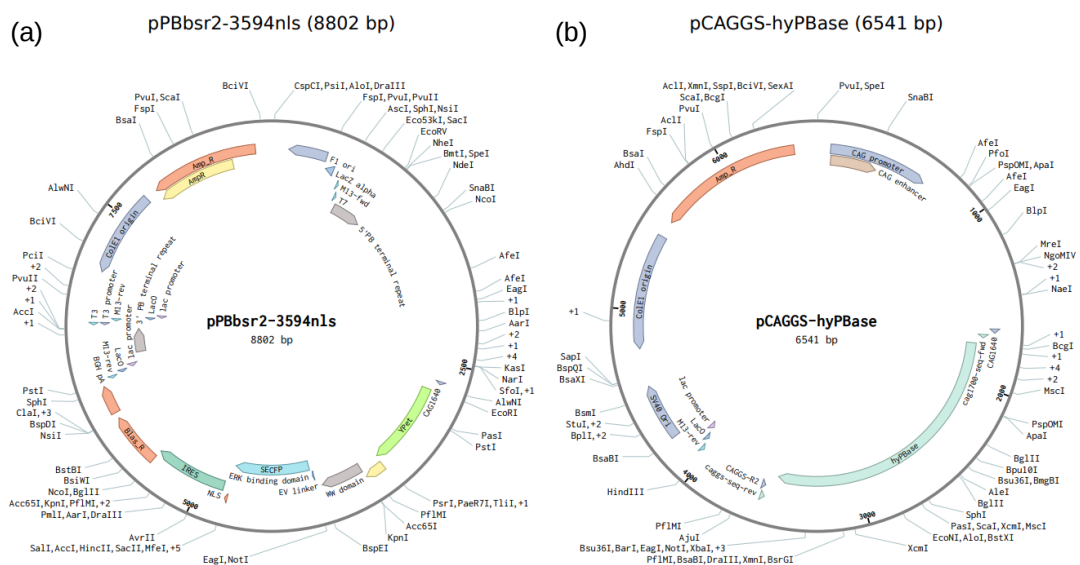


図 5.2.1 導入したプラスミドベクターの配列図

(a) EKAREV-NLS を含む DNA 配列。(b) PiggyBac トランスポゾンを含む DNA 配列

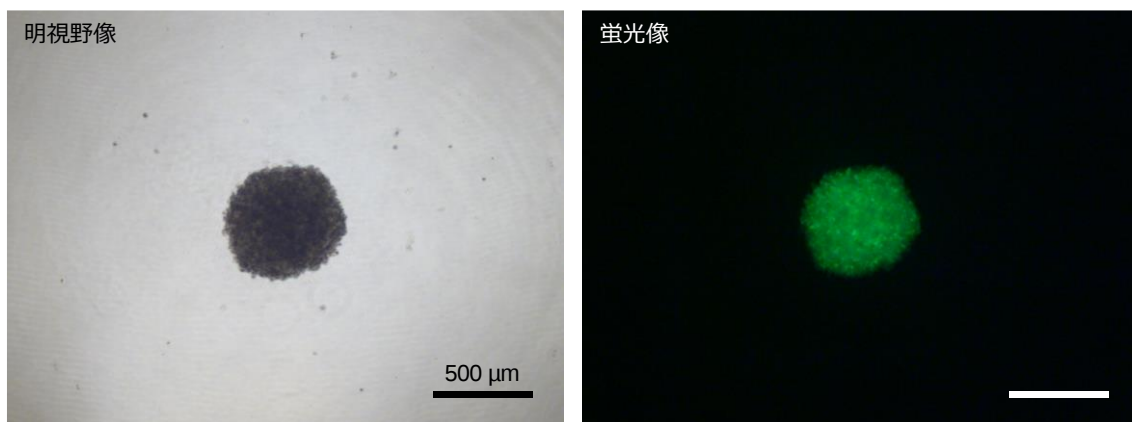


図 5.2.2 作製したがんスフェロイドの明視野像と蛍光像。

明瞭な蛍光信号が全ての細胞で得られている。

5-2-2 金ナノスターの合成方法

生細胞への毒性を抑えるために、界面活性剤を使用しない方法 (Hsiangkuo Yuan *et al.*, 2012) で金ナノスターを合成した。まず、沸騰させた 20 mL の 1 mM テトラクロリド金 (III) 酸液に対して 3 mL の 1%クエン酸溶液を加えて、110°Cのオイルバスに浸した状態で 15 分間攪拌することで金ナノ粒子のシードを作製した。シードの分散液を冷ました後、20 mL の 0.25 mM テトラクロリド金 (III) 酸液と 20 μ L の 1 M 塩酸とシードの分散液 200 μ L を混合して、攪拌した。その混合液に対して、200 μ L の 2 mM 硝酸銀と 100 μ L の 100 mM アスコルビン酸を室温下でほぼ同時に加えた。25°C、5000 rpm で 10 分間遠心して反応を終了させた後、上澄みを除去して MilliQ を加えることで金ナノスターの分散液を作製した。また、作製した金ナノスター (1.2 mg/mL) は 20 mM システアミン溶液に浸漬することで表面をコーティングし、細胞表面に対する接着能を高めた (Jing Luen Wai and Siu Yee New, 2020)。そのコーティングに際しては、まず、金ナノスターとシステアミンを等量で混合し、室温・遮光環境下で 30 分間攪拌した。3000-5000 rpm で 10 分間遠心分離した後、MilliQ で洗浄した。この工程を 2 回繰り返し行うことで、余分なシステアミン水溶液を取り除いた。最後に、元の金ナノスター分散液と等量になるように MilliQ を加えて、コーティング済みの金ナノスターを分散させた後、遮光した上で冷蔵保存した。

5 - 2 - 3 観察系と画像取得

三次元培養細胞の2光子顕微鏡観察のために、高感度 GaAsP 検出器を搭載した A1R-MP+ (Nikon) を使用した。高 NA かつ長作動距離を実現した水浸対物レンズ (Apo LWD W 25x NA1.10, Nikon) を用い、補正環は試料表面の蛍光強度が最大化するように合わせた。FRET プローブからの蛍光信号を分離するために 495 nm と 560 nm、593 nm のダイクロイックミラー (Dichroic Mirror: DM) を使用した。また、循環恒温槽を活用して、試料を含んだディッシュの外側を温めることで、顕微鏡ステージ上での培地温度を 37°C に維持した。ステージ上で一時間静置した後、観察を開始した。

観察時は波長を 820 nm に設定して FRET プローブと金ナノスターに由来する蛍光を得た。その際、DM で分離した 495 nm までの蛍光を一つ目の検出器 (CH1) で、495-560 nm までの蛍光を二つ目の検出器 (CH2) で、560-590 nm までの蛍光を三つ目の検出器 (CH3) で取得した。この場合、主に CH1 には CFP、CH2 には YFP、CH1-3 の全てに金ナノスターの蛍光が入る。画像取得の際には、ノイズの低減とコントラストの向上のために、同一光学断面について 4 回撮影することで信号を積算した。

5 - 2 - 4 金ナノスターの特性計測法

金ナノスターのゼータ電位はゼータサイザーナノ ZS (Malvern Panalytical) を使用し、水を分散媒として室温下で計測した。同様に動的光散乱法によって粒子径分布を計測し

た。可視・近赤外域における吸収スペクトルは分光光度計 Biowave II (Biochrom) を使用し、水を分散媒として波長 400-900 nm まで 1 nm 刻みで計測した。また、金ナノスターは透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscopy: TEM, JEM1010, JEOL, 生理学研究所電子顕微鏡室のものを利用) の加速電圧を 80 keV に設定して撮影した。撮影に際して、フォルムバル膜を約 30 μm の厚みでグリッド上に張り、金ナノスターの分散液を膜上に添加した後、乾燥させることで観察可能にした。ひとつのグリッドについて複数の視野で画像取得を行い、粒子径の計測に用いた。また、金ナノスターの発光スペクトルは、ディッシュ上に金ナノスターを乾燥固着させた試料の像を A1R-MP+に搭載された標準蛍光検出器で取得することで、410-650 nm まで 2.5 nm 刻みで計測した。

5 - 2 - 5 画像解析

三次元核検出・追跡を除くすべての解析は Fiji と R を用いて行った。FRET 効率変化の解析のために CH1 と CH2 のそれぞれの画像から背景光成分を除き、CH2 の画像の輝度値を CH1 の画像の輝度値で割る処理を行った。CH1 の画像における蛍光強度に応じて明度を決定し、比の大きさに応じて色を割り当てることで FRET 効率変化を視覚的に捉えるための画像を作成した。

また、スフェロイドを構成する各細胞の FRET 効率変化の抽出については、3DeeCellTracker を利用した。教師用と検証用のセグメンテーションデータは、ITK-SNAP

(Paul A. Yushkevich *et al.*, 2006) を用いて手作業で作成した (図 5.2.3)。それらのデータを基に 3D U-Net の学習を行い、核の明らかな誤検出を手動で除いた後、以降の解析に使用した。細胞核領域から抽出した FRET 効率変化に関するデータに対して、以下に示す処理を施すことで ERK 活性が観られたタイミングの情報を抽出した。まず、個々の細胞核で得た FRET 効率の時間変化のデータについて、線形の detrend 処理を施した。その後、FRET 効率が最大となった時点とその前後の計 3 時点の FRET 効率を 0 に置換した。そのデータについて平均と標準偏差 (SD) を算出した。元データにおいて、平均値 + 2SD を越えたタイミングを有意な活性と見なして、その活性のタイミングと回数の情報を利用した。また、各時点において抽出した個々の細胞核の重心位置のデータも併せることで、伝搬の解析を行った。

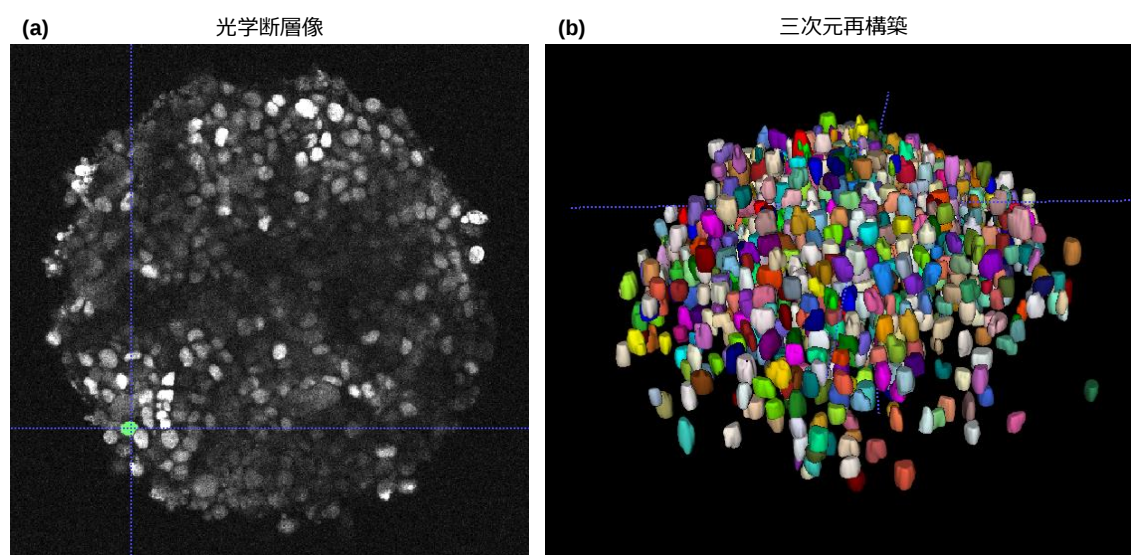


図 5.2.3 ITK-SNAP を用いた核セグメンテーション

(a) 一つの核にラベル付けを行った例。(b) 手動で作成したセグメンテーションデータの三次元再構築像。合計 1100 個の細胞核が目視で識別できた。

5－3 実験結果

5－3－1 金ナノスターの特性評価

まず、局所光熱刺激のために新たに合成した金ナノスターの特性を評価した。TEM で撮影した金ナノスターの像を図 5.3.1a に示す。観察の結果、確かに典型的なスター様の形状を持つことが確認できた。複数の視野で TEM 画像を取得し、それらの中から孤立したナノスターについて直径を計測した。その結果、平均径 $\pm$ 標準偏差は 87.0 ± 19.4 nm ($n=121$) であることがわかった。また、作製した金ナノスターの吸光スペクトルを計測したところ、近赤外領域の波長 735 nm 近辺で最大吸収を示した (図 5.3.1b)。今回使用する波長 820 nm においても最大値の 88%の吸収を示すことが確認できた。レーザードップラー法で計測した平均ゼータ電位は 18.2 mV だった (図 5.3.1c)。

平均直径 $\pm$ 標準偏差	吸収ピーク波長	吸収効率の比 (820 nm)	ゼータ電位 $\pm$ 標準偏差
87.0 ± 19.4 nm	735 nm	88%	18.2 ± 7.76 mV

表 5.3.1 金ナノスターの計測結果まとめ

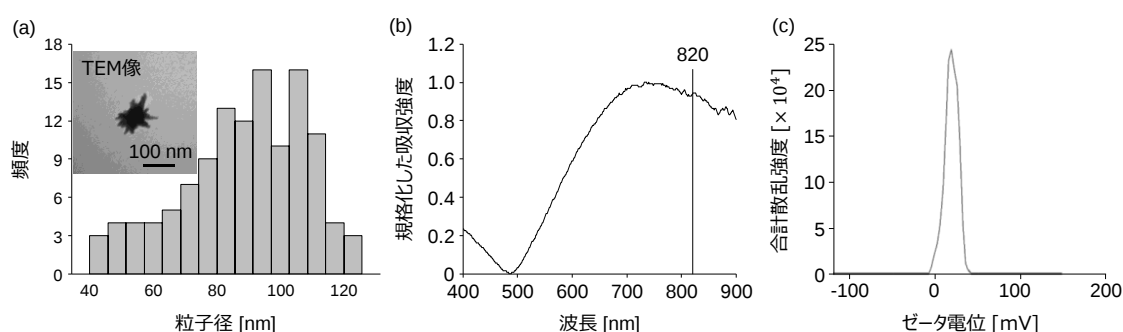


図 5.3.1 システアミンコートした金ナノスターの特性計測結果

(a) システアミンコート前の金ナノスターの TEM による粒子径計測の結果 ($n=121$)。グラフ中の図は、金ナノスターの実際の TEM 像。(b) 吸収スペクトル。(c) ゼータ電位の計測結果。

5-3-2 がんスフェロイドにおける ERK 活性変化の可視化

次に、EKAREV-NLS を安定発現する HeLa 細胞で三次元がんスフェロイドを作製した。

YFP はほとんど励起せずに CFP を励起できる波長 820 nm に設定し、作製したスフェロイドの三次元タイムラプスイメージングを行った。2 光子顕微鏡を用いることで、がんスフェロイドの中央付近に存在する核からも FRET センサーに由来する蛍光信号が取得できた (図 5.3.2a)。一方で、深部到達性に優れる 2 光子顕微鏡を用いても、スフェロイドの全体を可視化することはできなかった (図 5.3.2b)。約 2 時間のタイムラプスイメージングを行った後、画像処理によって ERK 活性の指標となる FRET 効率を算出した。FRET 効率の違いを色相の違いで表し、取得した光学断層像を三次元再構築した画像を図 5.3.3a に示す。FRET 効率の視覚化によって、がんスフェロイドを構成する細胞の ERK 活性状態は、細胞ごとに不均質であることが明らかになった。また、スフェロイドの内部でもその不均質性は保たれていた (図 5.3.3b)。同じ光学断面について、個々の細胞の ERK 活性の時間変化を観ると、いくつかの細胞で自発的な一過性の ERK 活性変化が起きていた (図 5.3.3c)。同じ光学断面で長期間に亘って観察できる核があった一方で、深さ方向に移動して、その後の ERK 活性の変化を同一平面内では追跡できなくなる核もあった (図 5.3.3d)。

次に、金ナノスターをがんスフェロイド表面に付着させて、同一の条件で三次元タイムラプスイメージングを行った。励起波長 820 nm では金ナノスターによる光熱刺激と

FRET イメージングを同時に実現できる。観察開始直後から、金ナノスターの近傍の細胞集団において一過性の ERK 活性の上昇が観られた (図 5.3.4a)。さらに、その ERK 活性が周囲の細胞へと経時的に広がっていく様子が観察された (図 5.3.4b)。細胞の表面においては、30 分ほどで ERK 活性が元の状態に戻っていた。次に、この ERK 活性がスフェロイド内部にも広がっているかを確かめるために、スフェロイド内部に位置する光学断面に着目した (図 5.3.5)。撮影開始直後において、スフェロイド内部の 40, 56 μm 位置では細胞集団の ERK 活性上昇は観られなかった。観察開始から 16 分 30 秒後には、スフェロイド内部でも細胞集団における ERK 活性上昇が観られた。さらに、33 分経過時点において、表面付近の 24 μm 位置では ERK 活性が低下したが、56 μm 位置では更に ERK 活性が広がっていた。以上の観察結果から、金ナノスター近傍の細胞から、三次元的に分布する多くの細胞へと ERK 活性が伝搬していると考えた。時々刻々と位置が変わる膨大な数の細胞核領域から ERK 活性変動に関する情報を抽出することで、伝搬の有無が解析可能になると考えた。

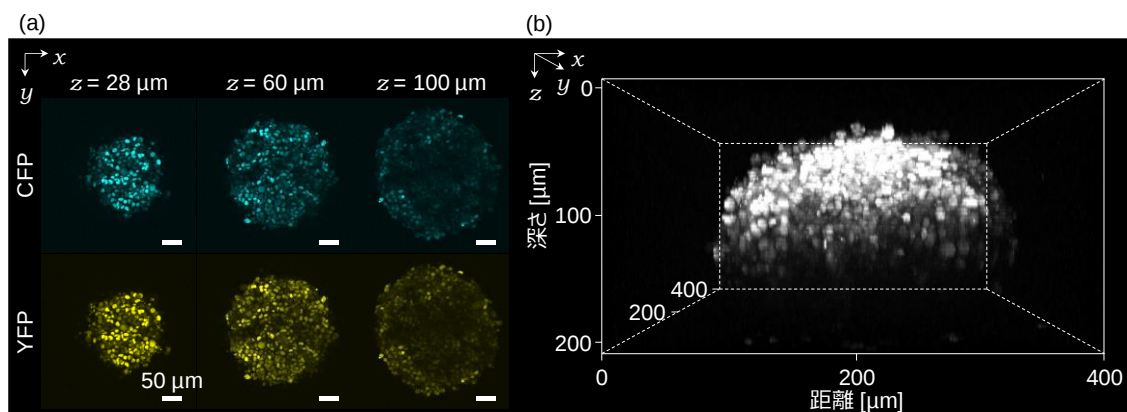


図 5.3.2 がんスフェロイドの 2 光子顕微鏡像

(a) 各深さにおける光学断層像。(b) がんスフェロイドの三次元再構築像 (CFP)。

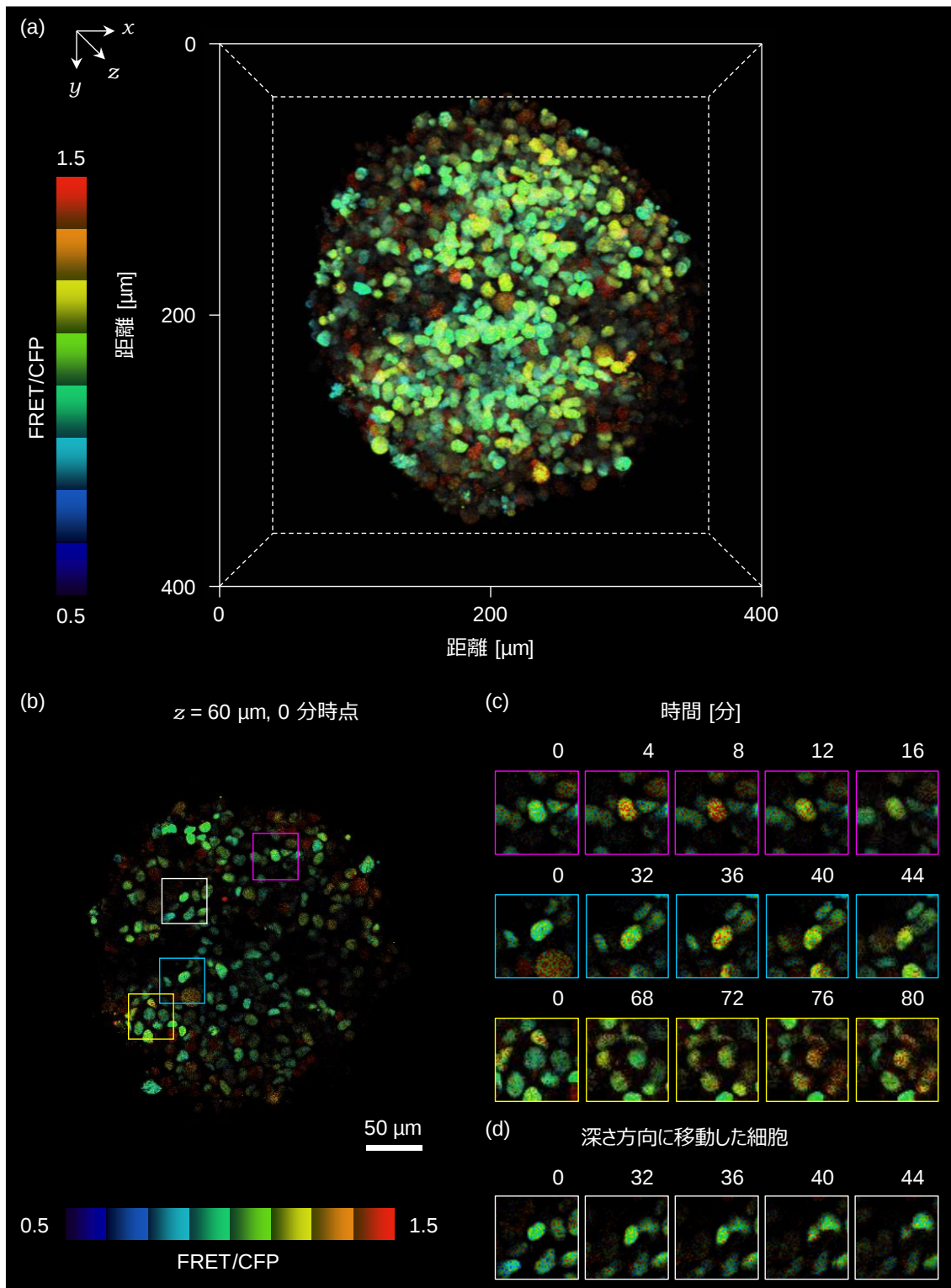


図 5.3.3 がんスフェロイドの自発的 ERK 活性変化の観測

(a) FRET 効率を色調で表現したがんスフェロイドの三次元再構築画像。(b) 深さ $60 \mu\text{m}$ の光学断面における観察開始直後の ERK 活性状態。(c) (b)のそれぞれの領域におけるタイムラプス画像。(d) 深さ方向に移動していく細胞核のタイムラプス画像。

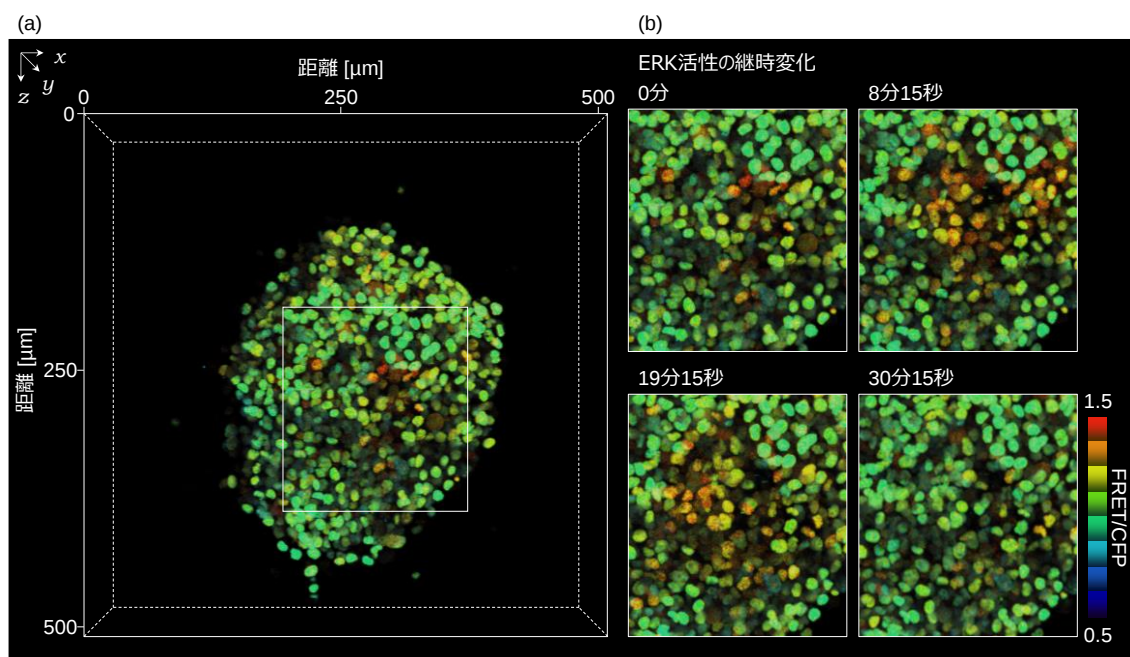


図 5.3.4 スフェロイド表面における一過的な ERK 活性の伝搬

(a) FRET 効率を色調で表現したがんスフェロイドの三次元再構築画像。(b) (a)の白枠内の各時点における FRET 効率変化。金ナノスターの近傍で ERK 活性が上昇し、徐々に広がった。

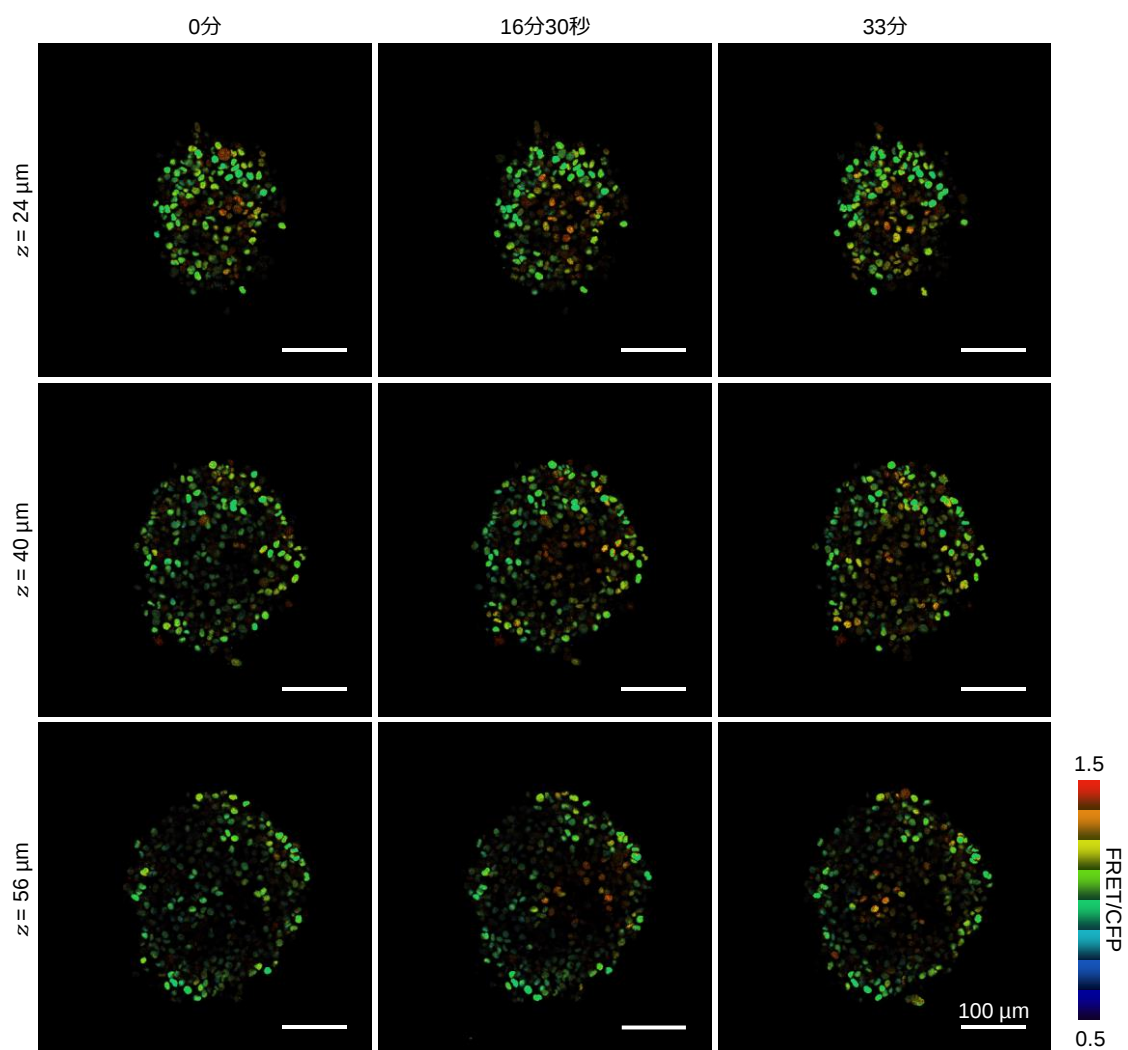


図 5.3.5 各時点におけるスフェロイドの ERK 活性変化

観察開始直後から 16.5, 33 分経過時点での深さ 24, 40, 56 μm の光学断層像。

5-3-3 がんスフェロイドに対する 3DeeCellTracker の適用

そこで、他の生物組織において、三次元的な核の検出・追跡が精度よく行えることが実証されている 3DeeCellTracker をがんスフェロイドの撮影データに応用することを試みた。スフェロイド内の細胞核にラベル付けをした教師データと検証データを作成し、3DeeCellTracker 内部に実装されている 3D U-Net の学習を行った。学習を済ませた 3D U-Net によってスフェロイドの三次元画像中で自動検出された核領域について、その精度を検証した。合計 970 個の領域が核として検出されたが、そのうちの 894 個は核の重心を囲うように上手く検出できており、検出の精度は 92%だった。残りの 76 個の領域では、分断した核と思しき領域や膨潤した核、2 つの核を 1 つと認識していたため、その後の解析から除外した。スフェロイドでは核同士が非常に近接して存在しているため、その境界はやや強調された形で表現される。そこで、近接した核の検出領域は必要に応じて手作業で修正を加え、次の追跡処理に移行した。追跡の結果についても目視で検証を行った。この検証では、3D U-Net によって形成された関心領域が動き回る核に追従し、関心領域と核とが終始 70%以上重なっている場合のみ、その後の FRET 効率の解析が可能であるとみなして追跡成功と判断した。途中で分裂や崩壊した核も、そのイベントの直前まで追えている場合には追跡成功とみなした。一方、途中で他の核を追跡した場合や、核の回転や変形によって 70%程度の重なりが観られなくなった場合は追跡失敗とみなした。この基準に基づくと、追跡の精度は 97% (894 個中 869 個が追跡成功) と

分かった。以上のように、検出から追跡までを通して、89.6%の精度で処理を行えることが明らかになった。また、ひとつのスフェロイドから 800 個以上の細胞核を解析できることが明らかになった。3DeeCellTracker の適用によって、時々刻々と変化する細胞核の重心位置の情報に加えて、蛍光強度の情報も取得できるようになった。ここまでで、スフェロイドの四次元計測と深層学習プログラムを活用した細胞の同定によって、800 個以上の細胞の生理活性を解析する評価系を確立した。

5-3-4 がんスフェロイドにおける ERK 活性の解析

核の自動検出と追跡が高精度で行えることが確認できたため、実際に ERK 活性の変化を抽出した。この際、追跡に成功した 869 個の細胞の内、観察開始から 10 枚のタイムラプス画像の取得完了時点までは追跡できた 810 個の核を対象とした。2 時間の撮影で取得した画像データから抽出した個々の細胞の FRET 効率変化の情報を基に、グラフを作成した (図 5.3.6a)。これを見ると、ほとんど変動しないものや、徐々に FRET 効率が上昇 (下降) するもの、一過的な上昇が観られるものがあった。今回はその一過的な上昇に着目し、810 個の細胞からそのタイミングに関する情報を取得した (図 5.3.6b)。

さらに、全ての細胞の三次元位置に関する時系列情報を取得することで、隣接した細胞間の ERK 活性の伝搬の評価を試みた。この際、「隣接した細胞」を細胞核の重心間の距離が 25 μm 以内、「伝搬」を平面培養系における先行研究 (Kazuhiro Aoki *et al.*, 2013) の解析結果に基づいて 6 分以内の現象として定義した。金ナノスターを付着させていないスフェロイドについて、起点となる細胞核をランダムに 10 個選んで解析を行ったところ、3 個の細胞では一切の伝搬は観られなかった。残りの 7 個では隣接した細胞への ERK 活性の伝搬が観られた (図 5.3.7)。しかし、それらは局所的かつ短期的なものだった。最後に、金ナノスターを付加したスフェロイドで取得したデータに、同じ解析法を適用した。金ナノスターに隣接する細胞のうち、撮影開始直後に ERK 活性が観られた細胞を起点として、隣接した細胞への ERK 活性の伝搬を三次元空間にプロットした (図

5.3.8)。その結果、金ナノスターによる光熱刺激によって、自発活動時とは明らかに異なる、長距離かつ三次元的な 1 時間弱に及ぶ ERK 活性の伝搬が起こっていたことが明らかにになった。

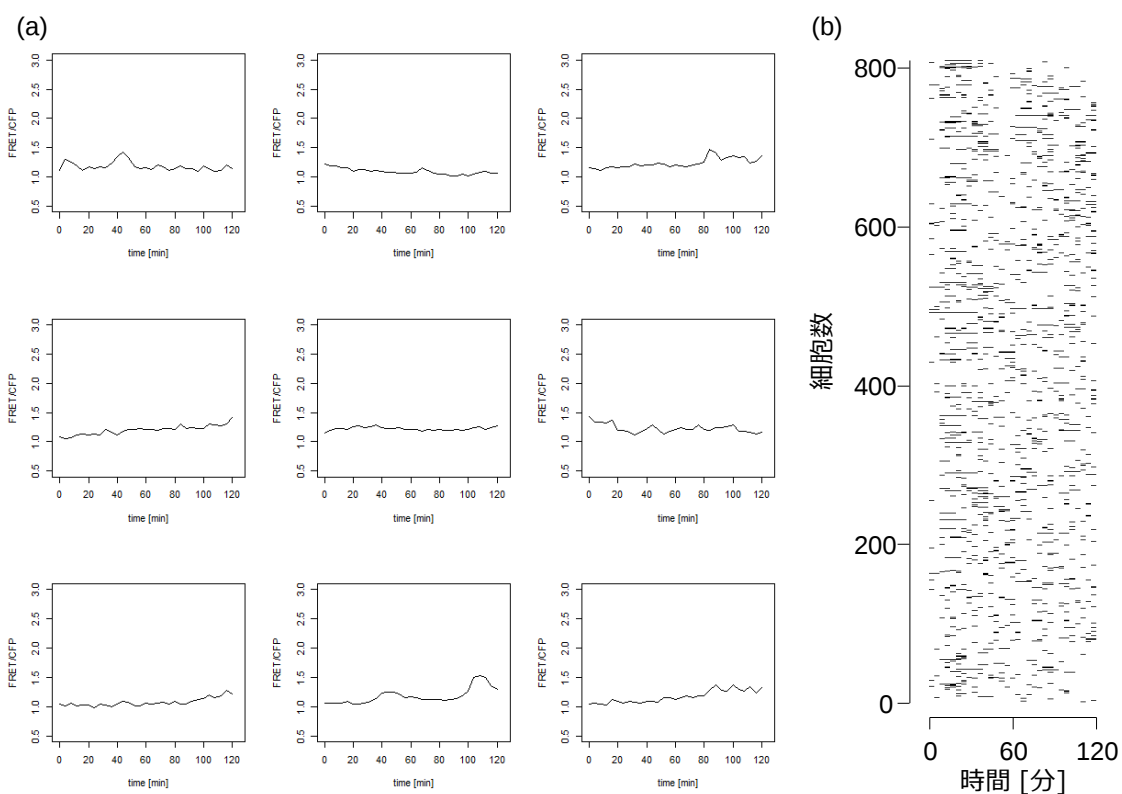


図 5.3.6 抽出した自発的な ERK 活性の時系列データ

(a) 9 個の細胞における ERK 活性変化の例。(b) 810 個の細胞について活性化したタイミングを示すラスタープロット。

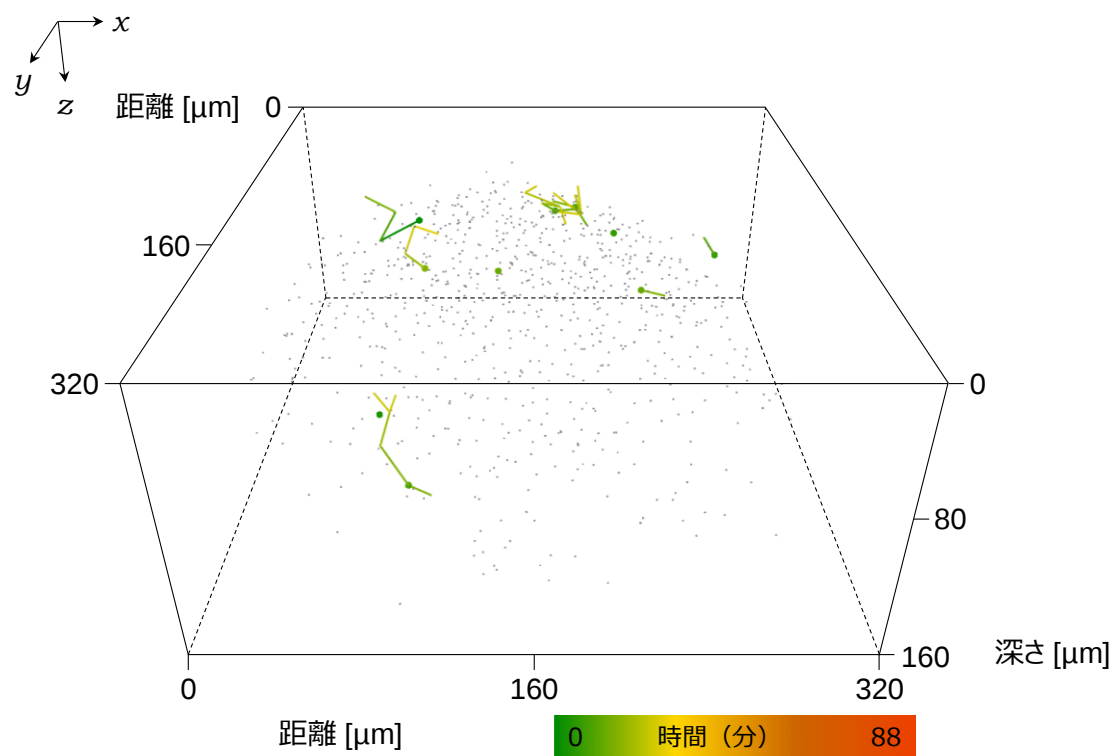


図 5.3.7 自発活動時の ERK 活性伝搬

細胞核の重心を灰色の点で、ランダムに選ばれた 10 個の核は緑の点で三次元空間にプロットした。細胞間の ERK 活性伝搬は線分で示し、その伝搬タイミングは色コードで示した。

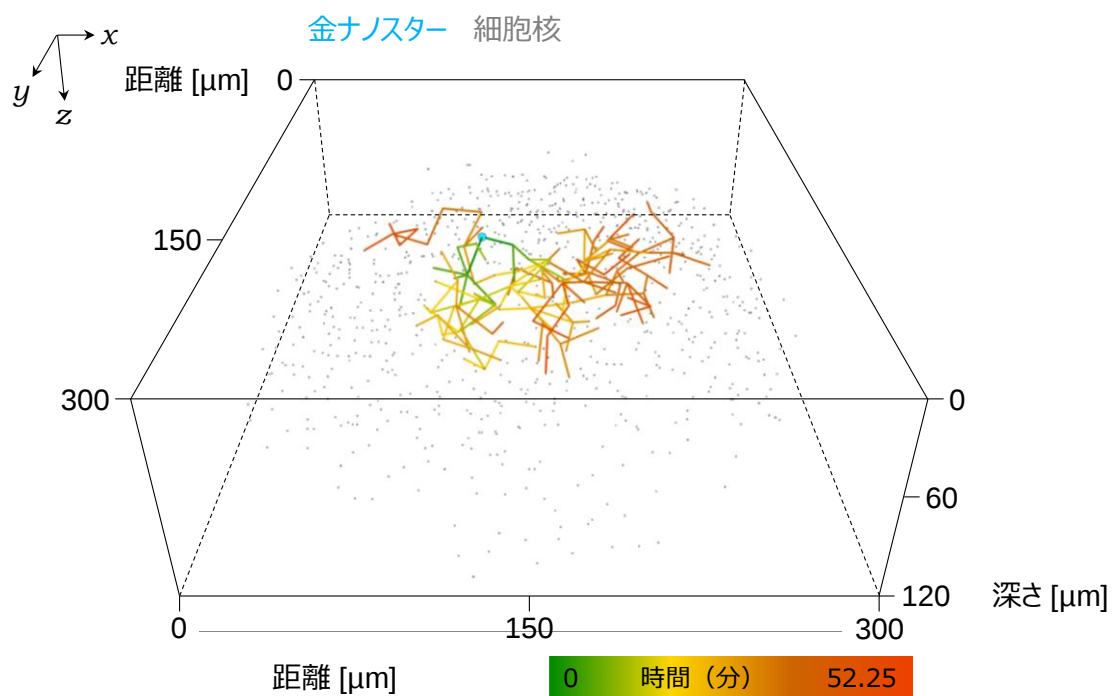


図 5.3.8 金ナノスターによる光熱刺激時の ERK 活性伝搬
細胞核の重心を灰色の点で、金ナノスターはシアン色の点で三次元空間にプロットした。細胞間の ERK 活性伝搬は線分で示し、その伝搬タイミングは色コードで示した。

5 - 4 考察

本研究では、三次元多細胞系のモデルとしてがんスフェロイドに着目し、スフェロイドを構成する個々の細胞の生理活性変化を長期間安定に捉える観察系を確立した。800 個以上の細胞の生理活性変化を捉えることができた一方で、深部到達性に優れる 2 光子顕微鏡を用いてもスフェロイド全体を可視化することはできなかった。これは光学収差に加えて、目視でも分かるほどの強い散乱が原因と推測している。収差を除去するために、先行研究 (Tobias Boothe *et al.*, 2017) に倣って一部の生体組織に対する安全性が報告されている Iodixanol をマウント剤として使用し、第 3 章のように観察系の屈折率を揃える試みも行った。しかし、全てのスフェロイド (24 個中 24 個) が崩壊し、まともにイメージングができなかった。一方、第 4 章で示したように SLM を用いることでスフェロイドにおいても収差補正が可能だった (4-3-3 章)。励起光波面の適切な変調によってスフェロイドのより深部の細胞の可視化が期待されるが、高感度の波面センサーを用いた収差補正によっても、スフェロイド全体を可視化できないことが示唆されている (Javier M. Brajones *et al.*, 2019)。すなわち、深部到達性を制限する主要因は、収差ではなく散乱である可能性が高い。固定試料においては数多くの透徹剤が見出だされている (Hiroshi Hama *et al.*, 2011, Kwanghun Chung *et al.*, 2013, Yuka Aoyagi *et al.*, 2015) が、生きた試料に使用できて (Kouichirou Iijima *et al.*, 2020)、スフェロイドで毒性の評価が行われたものはない。生きたスフェロイドに適用可能な透徹剤の開発や励起光と蛍光プロ

ープの長波長化によって、スフェロイドを構成する全細胞の生理活性の解析が実現できると期待される。

また、本研究では自発活動時には観られなかった、長距離かつ三次元的な ERK 活性の伝搬が金ナノスターによる局所光熱刺激によって誘起された。この現象の再現性の確認はもちろんのこと、メカニズムや意義の解明のためにも今後更なる検証が必要である。今回の観察では、金ナノスターが長時間同じ位置に留まっていたにも関わらず、その近傍を起点とした ERK 活性の伝搬は（2 時間の観察では）一度しか見られなかった。これは金ナノスターが付着した細胞は最初の伝搬開始時点で細胞死の過程へと移行しており、以降のシグナル伝搬には関与できなかったためと考えている。また、スフェロイドの中心付近の細胞においても ERK 活性上昇が観測されたが、十分に成熟したスフェロイドでは、中心付近の細胞は壊死性となることが知られている（Elisabete C. Costa *et al.*, 2014）。観察中に徐々にスフェロイドが潰れていったことを鑑みても、固形がんモデルとしてのスフェロイドという観点では成熟度が少し低かったものと考えられる。今回は三次元多細胞系のモデルとしてがんスフェロイドを使用し、中心付近の細胞応答も明確に捉えたいモチベーションがあったため、意図的に径の小さいスフェロイドを観察対象に選んだ。径が大きくなったとしても 3DeeCellTracker の適用には原理上の問題はないため、固形がんモデルとしての利用を考える場合には、より径の大きいスフェロイドを観察対象にするのが適切である。

また、本研究で確立した評価系を用いることで、遺伝子コード型の蛍光プローブさえ開発されていれば、他のあらゆるシグナル系の解析も可能である。他の MAPK である JNK や p38 の活性を検出するための FRET 型センサーはすでに報告されている (Haruko Miura *et al.*, 2018)。安定発現細胞株を作製することで細胞死やストレスシグナルの解析も行うことができる。これによって、がん治療のための薬剤やナノ粒子の最適化を効率よく進めることができるようになると期待している。

本研究では HeLa 細胞のみでスフェロイドを作製したが、近年ではスフェロイドの性質をより固形がんに近い状態にするための技術開発も行われている。固形がんはがん細胞だけでなく複数種の細胞で構成されているため、線維芽細胞をはじめとした他細胞との混合スフェロイドを安定して作る手法が報告されている (Christian Hirt *et al.*, 2014, Elisabete C. Costa *et al.*, 2014)。また、スフェロイド内部に血管モデルを構築することで、生体内に近い環境を構築する手法も提案された (Yuji Nashimoto *et al.*, 2020)。本研究で構築した解析に至るまでの一連の手法はこれらの改良とも組み合わせることができるため、実際の固形がんとその生理活性を比較することによってモデル系の評価にも貢献する。さらに、これらのより固形がんに近いモデルを用いた単一細胞レベルでの解析は、治療法のスクリーニングの質を飛躍的に高めることが期待される。

5 – 5 本研究のまとめ

本研究では、三次元多細胞系で細胞間シグナル伝搬を可視化・解析するためのモデル系として、FRET 型の ERK 活性センサーを細胞核内に安定発現する HeLa 細胞株を用いてがんスフェロイドを作製し、局所刺激を行った。そのがんスフェロイドを 2 光子顕微鏡で長時間安定に観察することによって、がんスフェロイドにおける自発的な ERK 活性の変化が観られることを明らかにした。また、三次元の核検出、追跡プログラム 3DeeCellTracker をスフェロイドに応用することで、800 個以上の細胞核の位置と ERK 活性の時間変化の情報を抽出する手法を確立した。それらの情報を解析することで、金ナノスターによる局所光熱刺激時には、自発活動時には観られなかった、長距離かつ三次元的な ERK 活性の伝搬が起こったことを発見した。本章で確立した手法は、三次元多細胞系の生理活性変化を膨大な数の細胞について評価可能にした全く新しいものである。スフェロイドだけでなく、オルガノイドや臓器に至るまで、広い応用が期待される。

参考文献

- Ana S. Nunes, Andreia S. Barros, Elisabete C. Costa, André F. Moreira, and Ilídio J. Correia, “3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs”, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 116(1), pp. 206-226, January (2019)
- Bharat B. Aggarwal, Divya Danda, Shan Gupta, and Prashasnika Gehlot, “Models for prevention and treatment of cancer: Problems vs promises”, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 78(9), pp. 1083-1094, November (2009)
- Chentao Wen, Takuya Miura, Yukako Fujie, Takayuki Teramoto, Takeshi Ishihara, and Koutarou D. Kimura, “Deep-learning-based flexible pipeline for segmentation and tracking cells in 3D image time series for whole brain imaging”, *bioRxiv*, August (2018)
- Christian Hirt, Adam Papadimitropoulos, Valentina Mele, Manuele G. Muraro, Chantal Mengus, Giandomenica Iezzi, Luigi Terracciano, Ivan Martin, and Giulio C. Spagnoli, ““In vitro” 3D models of tumor-immune system interaction”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 79-80, pp. 145-154, December (2014)
- Daniel S. Reynolds, Kristie M. Tevis, William A. Blessing, Yolonda L. Colson, Muhammad H. Zaman, and Mark W. Grinstaff, “Breast Cancer Spheroids Reveal a Differential Cancer Stem Cell Response to Chemotherapeutic Treatment”, *Scientific Reports*, 7:10382, September (2017)
- Dev K. Chatterjee, Parmeswaran Diagaradjane, and Sunil Krishnan, “Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy”, *Therapeutic Delivery*, Vol. 2(8), pp. 1001-1014, August (2011)
- Elisabete C. Costa, Vitor M. Gaspar, Paula Coutinho, Ilídio J. Correia, “Optimization of Liquid Overlay Technique to Formulate Heterogenic 3D Co-Cultures Models”, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 111(8), pp. 1672-1685, August (2014)
- Erika Bindocci, Iaroslav Savtchouk, Nicolas Liaudet, Denise Becker, Giovanni Carriero, and Andrea Volterra, “Three-dimensional Ca^{2+} imaging advances understanding of astrocyte biology”, *Science*, Vol. 356(6339), eaai8185, May (2017)
- Federico Perche, and Vladimir P. Torchilin, “Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols”, *Cancer Biology & Therapy*, Vol. 13(12), pp. 1205-1213, October (2012)
- Felipe Delestro, Lisa Scheunemann, Mélanie Pedrazzani, Paul Tchenio, Thomas Preat, and Auguste Genovesio, “In vivo large-scale analysis of Drosophila neuronal calcium traces by automated tracking of single somata”, *Scientific Reports*, 10:7153, April (2020)
- Gergely Katona, Gergely Szalay, Pál Maák, Attila Kaszás, Máté Veressm, Dániel Hillier, Balázs Chiovini, E Sylvester Vizi, Botond Roska, and Balázs Rózsa, “Fast two-photon *in vivo* imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes”, *Nature Methods*, Vol. 9(2), pp. 201-208, February (2012)
- Haruko Miura, Yohei Kondo, Michiyuki Matsuda, and Kazuhiro Aoki, “Cell-to-Cell Heterogeneity in p38-

Mediated Cross-Inhibition of JNK Causes Stochastic Cell Death”, *Cell Reports*, Vol. 24(10), pp. 2658-2668, September (2018)

Hiroshi Hama, Hiroshi Kurokawa, Hiroyuki Kawano, Ryoko Ando, Tomomi Shimogori, Hisayori Noda, Kiyoko Fukami, Asako Sakaue-Sawano, Atsushi Miyawaki, “Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain”, *Nature Neuroscience*, Vol. 14(11), pp. 1481-1488, August (2011)

Hiroshi Maeda, “The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting”, *Advances in Enzyme Regulation*, Vol. 41(1), pp. 189-207, May (2001)

Hsiangkuo Yuan, Christopher G. Khoury, Hanjun Hwang, Christy M. Wilson, Gerald A Grant, and Tuan Vo-Dinh, “Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging”, *Nanotechnology*, Vol. 23(7), 075102, February (2012)

Javier M. Brajones, Gregory Clouvel, Guillaume Dovillaire, Xavier Kevecq, and Corinne Lorenzo, “Highly Sensitive Shack-Hartmann Wavefront Sensor: Application to Non-Transparent Tissue Mimic Imaging with Adaptive Light-Sheet Fluorescence Microscopy”, *Methods and Protocols*, Vol. 2(3):59, July (2019)

Jeremy B. Vines, Jee-Hyun Yoon, Na-Eun Ryu, Dong-Jin Lim, and Hansoo Park, “Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy”, *Frontiers in Chemistry*, Vol. 7(167), April (2019)

Jérôme Lecoq, Natalia Orlova, and Benjamin F. Grewe, “Wide. Fast. Deep: Recent Advances in Multiphoton Microscopy of *In Vivo* Neuronal Activity”, Vol. 39(46), pp. 9042-9052, November (2019)

Jiayi Ma, Ji Zhao, and Alan L. Yuille, “Non-Rigid Point Set Registration by Preserving Global and Local Structures”, *IEEE Transactions on Image Processing*, Vol. 25(1), pp. 53-64, January (2016)

Jing Luen Wai and Siu Yee New, “Cysteamine-coated gold nanoparticles for bimodal colorimetric detection with inverse sensitivity: a proof-of-concept with lysozyme”, *RSC Advances*, Vol. 10(2) pp. 1088-1094, January (2020)

Jung S. Suk, Qingguo Xu, Namho Kim, Justin Hanes, and Laura M. Ensign, “PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 99(A), pp. 28-51, April (2016)

Kazuhiro Aoki, Naoki Komatsu, Eishu Hirata, Yuji Kamioka, and Michiyuki Matsuda, “Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research”, *Cancer Science*, Vol. 103(4), pp. 614-619, April (2012)

Kazuhiro Aoki, Yuka Kumagai, Atsuro Sakurai, Naoki Komatsu, Yoshihisa Fujita, Clara Shionyu, and Michiyuki Matsuda, “Stochastic ERK Activation Induced by Noise and Cell-to-Cell Propagation Regulates Cell Density-Dependent Proliferation”, *Molecular Cell*, Vol. 52(4), pp. 529-540, November (2013)

Kazuhiro Aoki, Yohei Kondo, Naoki Honda, Toru Hiratsuka, Reina E. Itoh, Michiyuki Matsuda, “Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration”, *Developmental Cell*, Vol. 43(3), pp. 305-317, November (2017)

Kouichirou Iijima, Takuto Oshima, Ryosuke Kawakami, and Tomomi Nemoto, “Optical clearing of living

brains with MAGICAL to extend *in vivo* imaging”, *iScience*, 101888, (2020)

Kwanghun Chung, Jenelle Wallace, Sung-Yon Kim, Sandhiya Kalyanasundaram, Aaron S. Andalman, Thomas J. Davidson, Julie J. Mirzabekov, Kelly A. Zalocusky, Joanna Mattis, Aleksandra K. Denisin, Sally Pak, Hannah Bernstein, Charu Ramakrishnan, Logan Grosenick, Viviana Gradinaru, Karl Deisseroth, “Structural and molecular interrogation of intact biological systems”, *Nature*, Vol. 497(7449), pp. 332-337, May (2013)

Minho Kim, Jung-Hoon Lee, and Jwa-Min Nam, “Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications”, *Advanced Science*, Vol. 6(17), 1900471, September (2019)

Naoki Komatsu, Kazuhiro Aoki, Masashi Yamada, Hiroko Yukinaga, Yoshihisa Fujita, Yuji Kamioka, and Michiyuki Matsuda, “Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases”, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 22(23), pp. 4647-4656, December (2011)

Oksana Sirenko, Trisha Mitlo, Jayne Hesley, Steve Luke, Windsor Owens, and Evam F. Cromwell, “High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures”, *ASSAY and Drug Development Technologies*, Vol. 13(7), pp. 402-414, September (2015)

Özgün Çiçek, Ahmed Abdulkadir, S. Liekamp, Thomas Brox, and Olaf Ronneberger, “3D U-Net: Learning Dense Volumetric Segmentation from Sparse Annotation”, *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, Vol. 9901, pp. 424-432, October (2016)

Pascal Ender, Paolo Armando Gagliardi, Maciej Dobrzynski, Coralie Dessauges, Thomas Höhener, Marc-Antoine Jacques, Andrew R. Cohen, and Olivier Pertz, “Spatio-temporal Control of ERK Pulse Frequency Coordinates Fate Decisions during Mammary Acinar Morphogenesis”, *bioRxiv*, November (2020)

Paul A. Yushkevich, Joseph Piven, Heather Cody Hazlett, Rachel Gimpel Smith, Sean Ho, James C. Gee, and Guido Gerig, “User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability”, *NeuroImage*, Vol. 31(3), pp. 1116-1128, July (2006)

Rei Mizuno, Yuji Kamioka, Kenji Kabashima, Masamichi Imajo, Kenta Sumiyama, Eiji Nakasho, Takeshi Ito, Yoko Hamazaki, Yoshihisa Okuchi, Yoshiharu Sakai, Etsuko Kiyokawa, and Michiyuki Matsuda, “In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines”, *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 211(6), pp. 1123-1136, June (2014)

Saul Kato, Harris S. Kaplan, Tina Schrödel, Susanne Skora, Theodore H. Lindsay, Eviatar Yemini, Shawn Lockery, and Manuel Zimmer, “Global brain dynamics embed the motor command sequence of *Caenorhabditis elegans*”, *Cell*, Vol. 163(3), pp. 656-669, October (2015)

Tobias Boothe, Lennart Hilbert, Michael Heide, Lea Berninger, Wieland B. Huttner, Vasily Zaburdaev, Nadine L. Vastenhouw, Eugene W. Myers, David N. Drechsel, and Jochen C. Rink, “A tunable refractive index matching medium for live imaging cells, tissues and model organisms”, *eLife*, 6:e27240, July (2017)

Toru Hiratsuka, Yoshihisa Fujita, Naoki Honda, Kazuhiro Aoki, Yuji Kamioka, Michiyuki Matsuda, “Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin”, *eLife*, 4:e05178, February (2015)

Venkatakaushik Voleti, Kripa B. Patel, Wenze Li, Citlali Perez Campos, Srinidhi Bharadwaj, Hang Yu, Caitlin Ford, Malte J. Casper, Richard Wenwei Yan, Wenxuan Liang, Chentao Wen, Koutarou D. Kimura, Kimara L. Targoff, and Elizabeth M. C. Hillman, “Real-time volumetric microscopy of *in vivo* dynamics and large-scale samples with SCAPE 2.0”, *Nature Methods*, Vol. 16(10), pp. 1054-1062, October (2019)

Yang Liu, Jeffrey R. Ashton, Everett J. Moding, Hsiangkuo Yuan, Janna K. Register, Andrew M. Fales, Jaeyeon Choi, Melodi J. Whitley, Xiaoguang Zhao, Yi Qi, Yan Ma, Genesan Vaidyanathan, Michael R. Zalutsky, David G. Kirsch, Cristian T. Badea, and Tuan Vo-Dinh, “A Plasmonic Gold Nanostar Theranostic Probe for In Vivo Imaging and Photothermal Therapy”, *Theranostics*, Vol. 5(9), pp. 946-960, May (2015)

Yi-Chung Tung, Amy Y. Hsiao, Steven G. Allen, Yu-suke Torisawa, Mitchell Ho, and Shuichi Takayama, “High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array”, *Analyst*, Vol. 136(3), pp. 473-478, October (2011)

Yu Toyoshima, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Manami Kanamori, Takayuki Teramoto, Hirofumi Sato, Moon Sun Jang, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Ryo Yoshida, and Yuichi Iino, “Accurate automatic detection of densely distributed cell nuclei in 3D space”, *PLoS Computational Biology*, Vol. 12(6), e1004970, June (2016)

Yu Toyoshima, Stephen Wu, Manami Kanamori, Hirofumi Sato, Moon Sun Jang, Suzu Oe, Yuko Murakami, Takayuki Teramoto, Chanhyun Park, Yuishi Iwasaki, Takeshi Ishihara, Ryo Yoshida, and Yuichi Iino, “Neuron ID dataset facilitates neuronal annotation for whole-brain activity imaging of *C. elegans*”, *BMC Biology*, Vol. 18(30), March (2020)

Yuji Kamioka, Kenta Sumiyama, Rei Mizuno, Yoshiharu Sakai, Eishu Hirata, Etsuko Kiyokawa, and Michiyuki Matsuda, “Live Imaging of Protein Kinase Activities in Transgenic Mice Expressing FRET Biosensors”, *Cell Structure and Function*, Vol. 37(1), pp. 65-73, January (2012)

Yuji Nashimoto, Ryu Okada, Sanshiro Hanada, Yuichiro Arima, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, Ryuji Yokokawa, “Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid”, *Biomaterials*, Vol. 229, 119547, January (2020)

Yuka Aoyagi, Ryosuke Kawakami, Hisayuki Osanai, Terumasa Hibi, and Tomomi Nemoto, “A Rapid Optical Clearing Protocol Using 2,2'-Thiodiethanol for Microscopic Observation of Fixed Mouse Brain”, *PLoS ONE*, Vol. 10(1), e0116280, January (2015)

Won I. Choi, Ja-Yong Kim, Chul Kang, Clare C. Byeon, Young Ha Kim, and Giyoong Tae, “Tumor Regression *In Vivo* by Photothermal Therapy Based on Gold-Nanorod-Loaded Functional Nanocarriers”, *ACS Nano*, Vol. 5(3), pp. 1995-2003, February (2011)

第 6 章 本研究の結語

本論文では、対物レンズに入射するレーザー光のビーム径と対物レンズの浸液の屈折率を調整することで、2 光子顕微鏡によるマウス生体脳深部の細胞形態の可視化、高コントラスト Ca^{2+} イメージング、神経線維破断を実現した。また、それらの利点を活かして、神経線維破断時のアストロサイトの Ca^{2+} 応答の伝搬とアストロサイト集団において活性化が反復される現象を見出した。2 光子顕微鏡法の改良法はこれまでも多く提案されてきたが、それらは顕微光学系の複雑な改良を要するために、汎用性が低かった。これに対し、本研究で確立した改良法は、極めて安価かつ簡便に実装できるため、利用への障壁が極めて低い利点がある。また、浸液の屈折率を調整することで脳以外の組織についても適用できる可能性が高い。今後、本研究で確立した観察条件が広く用いられ、生命科学の発展に貢献することを期待する。

また、本論文では、既存のレーザー走査型顕微鏡システムに SLM を外部導入する方法論を確立した。この方法論を用いることによって、一般的な市販の顕微鏡システムすべてに SLM を外部導入できるようになると期待される。さらに、試料の表面形状の一度の撮影によって、位相変調量を光線追跡法に基づいて推定する極めて侵襲性の低い手法を提案した。これは波面センサーも繰り返しの撮像も必要としない、新たな位相変調量の決定手法である。これまで SLM の利用はごく一部の生命科学者に限られていたが、本方法論を用いることで SLM の利用が進むのに加えて、光毒性の影響を抑えられるた

めに対象の生物試料の幅が広がるであろう。この際、光線追跡法によって位相変調量を推定するため、より NA の高い対物レンズや任意の表面形状を持つ試料にも適用可能である点が既報から大きく異なる新規点である。実際、空間光位相変調を高い空間分解能の対物レンズにおいても達成することにより、がんスフェロイドとマウス生体脳第二次運動野における微細構造に由来した蛍光信号をより効率良く取得できるようになった。これによりこれまで困難だった第二次運動野第 V 層の樹状突起スパインを非侵襲的に可視化することに成功した。本手法を用いた微細構造の可視化により、今後、運動障害を伴う精神・神経系疾患の発症・進行機構の解明など様々な生命科学の課題の解明に大きく貢献することが期待される。

また、本論文では、三次元多細胞系のモデルとしてがんスフェロイドを使用し、定常時と光熱刺激時の生理活性変化を個々の細胞のレベルで観察し、定量的に評価する手法を開発した。その手法を用いることで、光熱刺激後の ERK 活性の伝搬現象を見出したが、ERK の多様な機能を考えると、この伝搬ががん組織の運命にどのように関わるのかは非常に興味深く、今後の研究の発展に期待したい。本手法は、市販の 2 光子顕微鏡システムと試料や撮影条件の変化に柔軟に対応可能な機械学習に基づく解析手法を用いているため、汎用性が極めて高い手法であると言える。また、光熱刺激によるスフェロイド全体の体積の減少を評価するこれまでの治療効果に関する研究とは全く異なり、スフェロイドを形成する個々の細胞の応答に着目した解析を可能にした初めての手法

である。細胞の不均質性のがんの根治を妨げている事実を踏まえると、個々の細胞に着目して治療時の応答を解析する本手法は、根治のための治療法の確立に大きく貢献することが期待される。また、本手法は使用する蛍光プローブを変えることで、ERK だけでなく、Ras や JNK、p38 をはじめとしたがん関連シグナル経路の精査にも利用できるため、光熱治療法のがん細胞に対する影響や、治療の機構の詳細解明に繋がると考える。更に、本手法を用いることで、治療に適したナノ材料のスクリーニングも可能なため、材料開発の最適化に貢献することが期待される。

謝辞

本研究は2014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。その後、2019年10月から2021年3月にかけて、同専攻 ナノ材料光計測研究分野、および、生理学研究所 バイオフォトリクス研究グループにて行いました。

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雲林院宏教授より、研究の立ち上げ、具体的な実験手法から本論文の構成・執筆にいたるまで、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、自然科学研究機構生理学研究所の根本知己教授には、研究の開始時より長きに渡りご指導賜り、実験の進め方や解析法、姿勢に対する数多くのご指導を頂きました。生理学研究所への異動後も変わらぬ温かいご指導をいただきましたこと、厚く御礼申し上げます。また、情報科学研究科の平田拓教授、館野高教授には本論文の執筆および審査にあたって、数多くのご助言を賜りました。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、研究開始当時から研究計画や具体的な実験の進め方について非常に多くのご助言をいただき、研究の魅力を知るきっかけを与えてくださいました。心より御礼申し上げます。また、同研究科の大友康平助教（現 生理学研究所 助教）には、日頃から研究の進捗を気にかけて頂き、親身なご助言やご指導を非常に多くいただきました。

温かいご配慮をいただいたおかげで、本研究を完遂することができました。心より感謝申し上げます。

本研究は、学内外の非常に多くの方々にご助力を賜ることで完遂に至りました。東北大学多元物質科学研究所の佐藤俊一教授と小澤祐市准教授、基礎生物学研究所の青木一洋教授と山本啓氏、名古屋市立大学理学研究院の木村幸太郎教授と Wen Chentao 特任助教、理化学研究所の平瀬肇教授（現 コペンハーゲン大学 教授）、北海道大学情報科学研究科の平井健二准教授と猪瀬朋子助教（現 京都大学物質・細胞統合システム拠点）北村瞭次氏（当時）、石田拓都氏に、心より御礼申し上げます。また、データ取得に際して、北海道大学電子科学研究所ニコイメーシングセンター様、生理学研究所電子顕微鏡室様、基礎生物学研究所光学解析室様の機器を使用させていただきました。深く感謝申し上げます。

平素より様々なご配慮とご協力を賜りましたナノ材料光計測研究分野の皆様、脳機能工学研究室（当時）の飯島光一郎特任助教（当時）とその卒業生の皆様、榎木亮介准教授、石井宏和特任助教、堤元佐特任助教をはじめとした生理学研究所 バイオフォトンクス研究グループの皆様、北海道大学卒業生の秋田大博士、田中良昌博士、田宮裕治博士、新学術領域研究レゾナンスバイオの若手の会の皆様に厚く御礼申し上げます。

研究業績

1. 主著学術論文

- (1) Kazushi Yamaguchi, Ryoji Kitamura, Ryosuke Kawakami, Kohei Otomo, and Tomomi Nemoto, “In vivo two-photon microscopic observation and ablation in deeper brain regions realized by modifications of excitation beam diameter and immersion liquid”, *PLoS ONE*, 15(8): e0237230, doi: 10.1371/journal.pone.0237230 (2020) (IF = 2.740, TC = 1)
- (2) Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Yuichi Kozawa, Motosuke Tsutsumi, Tomoko Inose, Kenji Hirai, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, and Hiroshi Uji-I, “Adaptive Optical Two-photon Microscopy for Surface profiled Living Biological Specimens”, *ACS Omega*, Vol. 6(1), pp. 438-447, January (2021) (IF = 2.870, TC = 0)

2. 学術論文

- (1) Masatoshi Inoue, Atsuya Takeuchi, Satoshi Manita, Shin-ichiro Horigane, Masayuki Sakamoto, Ryosuke Kawakami, Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Hiroyuki Yokoyama, Ryang Kim, Tatsushi Yokoyama, Sayaka Takemoto-Kimura, Manabu Abe, Michiko Okamura, Yayoi Kondo, Sean Quirin, Charu Ramakrishnan, Takeshi Imamura, Kenji Sakimura, Tomomi Nemoto, Masanobu Kano, Hajime Fujii, Karl Deisseroth, Kazuo Kitamura, and Haruhiko Bito, “Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for *In Vivo* Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics”, *Cell*, Vol. 177(5), pp 1346-1360, doi:

10.1016/j.cell.2019.04.007 (2019) (IF = 38.637, CT = 40)

- (2) 山口和志, 川上良介, 根本知己, “超短パルスレーザーを用いたマウス生体脳局所破壊後におけるアストロサイトの Ca^{2+} イメージング”, レーザー学会第 510 回研究会報告, pp 47-52 (2017)

3. 総説

- (1) 川上良介, 山口和志, 根本知己, “脳神経機能解明のための新規レーザー顕微鏡による生体脳深部イメージング・光操作”, 光アライアンス, 株式会社日本工業出版, Vol. 27(7), pp. 1-4 (2016)
- (2) 山口和志, 根本知己, “マウス生体脳深部の 2 光子蛍光断層イメージング”, OPTORONICS, 株式会社オプトロニクス社, Vol. 38(3), pp 57-61 (2019)
- (3) 大友康平, 高橋泰伽, 山口和志, 石井宏和, 根本知己, “生命多光子顕微鏡による深部高解像・超解像イメージング”, 光学, 日本光学会, Vol. 50(4) (2021) 2021 年 4 月発行

4. 講演（学位論文関係）

- (1) 山口和志, “マウス生体脳の *in vivo* 2 光子イメージングにおける空間分解能の評価法の確立と応用”, 生物物理若手の会・生化学若手の会 北海道支部合同セミナー, 札幌 (2015) 招待講演
- (2) Kazushi Yamaguchi, Ryoji Kitamura, Ryosuke Kawakami, and Tomomi Nemoto, “Improvement in focusing properties enables *in vivo* two-photon laser ablation in deep

cortical regions of living mouse brain”, *Neuroscience 2015*, Chicago, USA (2015) poster

- (3) Kazushi Yamaguchi, Ryoji Kitamura, Ryosuke Kawakami, and Tomomi Nemoto, “*In vivo* two-photon laser ablation of neural processes within cortical layer V of mouse brain under an optimized condition”, *8th FAOPS Congress*, Bangkok, Thailand (2015) poster

- (4) Kazushi Yamaguchi, Ryosuke Kawakami, and Tomomi Nemoto, “Estimation of effects after two-photon laser ablation on surrounding astrocytes by *in vivo* Ca²⁺ imaging”, *Neuroscience 2017*, Washington DC, USA (2017) poster

5. 受賞等

- (1) 山口和志, 北村瞭次, 川上良介, 根本知己, “生体脳の光学特性に整合した集光条件の改良による生体脳2光子イメージングの劇的な改善”, 2015 年度日本生物物理学会北海道支部例会, 札幌 (2016) 支部例会発表賞

- (2) Kazushi Yamaguchi, Ryoji Kitamura, Ryosuke Kawakami, and Tomomi Nemoto, “*In vivo* two-photon laser ablation by improvement of focusing property in living mouse brains”, 第 93 回日本生理学会大会, 札幌 (2016) 学生ポスター賞

- (3) 山口和志, 北村瞭次, 川上良介, 根本知己, “*in vivo* 2 光子顕微鏡法を用いたマウス生体脳深部における単一神経線維破断”, 第 2 回北大部局横断シンポジウム, 札幌 (2017) ベストポスター賞

- (4) Kazushi Yamaguchi, Ryosuke Kawakami, Tomomi Nemoto, “*In vivo* two-photon laser

ablation can dissect single neural processes without serious damage on surrounding astrocytes”, *The 18th RIES-Hokudai International Symposium*, 札幌 (2017) Poster award

- (5) 山口和志, 北村瞭次, 川上良介, 根本知己, “励起光学条件の改善によるマウス生体脳深部観察の高度化とその応用”, 第 3 回北大部局横断シンポジウム, 札幌 (2018) ベストポスター賞

- (6) Kazushi Yamaguchi, Ryosuke Kawakami, and Tomomi Nemoto, “*In vivo* two-photon laser ablation within deep regions of living mouse brains”, *International Meeting on Bioimaging for Young Researchers*, Kunigami-gun (2018) Poster award

- (7) Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, and Tomomi Nemoto, “*In vivo* visualization of dendritic spines in deep regions of the mouse prefrontal cortex with two-photon excitation adaptive optical microscopy”, *Resonance Bio International Symposium*, Katsushika-ku (2019) Best poster award

付録

本実験の遂行にあたり、用いたプロトコルと引用許諾を以降に付録として掲載する。

PiggyBac トランスフェクション

【材料】

- ・ HeLa 細胞 (6 well プレート confluency 80%以上)
- ・ 培地 (以下を混合・分注、Pen/Strep は含まないことに注意)

DMEM high glucose : 500 mL

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11965118#/11965118>)

Fetal Bovine Serum : 50 mL

(<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs.html>)

- ・ PBS
- ・ Trypsin-EDTA
- ・ 目的の遺伝子 (EKAREV-NLS) を含む DNA (DNA1 と記載, EKAREV-NLS は基生研青木研より譲渡)
- ・ トランスポゾン DNA (DNA2 と記載, 基生研青木研より譲渡)
- ・ Lipofectamine 3000 (P3000 reagent もセットでついてくる)

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L3000001#/L3000001>)

- Opti-MEM

(<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/classical-media/opti-mem.html>)

- Blasticidin (10mg/mL in HEPES、抗生物質は導入するプラスミドに依存)

(<https://www.invivogen.com/blastacidin>)

- 60 mm ディッシュ

【手順】 (全て 1well あたりの分量で記載)

1. Opti-MEM、PBS、Trypsin-EDTA を 37°C に温めた。
2. DNA1 (1875 ng) と DNA2 (625 ng)、Opti-MEM 125 μ L、P3000 reagent 5 μ L を混合した。
3. Lipofectamine 3000 5 μ L と Opti-MEM 125 μ L を混合し vortex、室温下で 5 分間インキュベーションした。
4. 2 と 3 を混合し vortex、室温下で 20 分間インキュベーションした。
5. Trypsin-EDTA を加えて細胞懸濁液を作製した。
6. 細胞懸濁液に 4 を添加後、培地を加えた 6 well プレートに撒き直し、37°C, 5% CO₂ 環境下でインキュベーションした。

↓二日後

7. Trypsin-EDTA を加えて細胞懸濁液を作製、新しいディッシュに播種した。

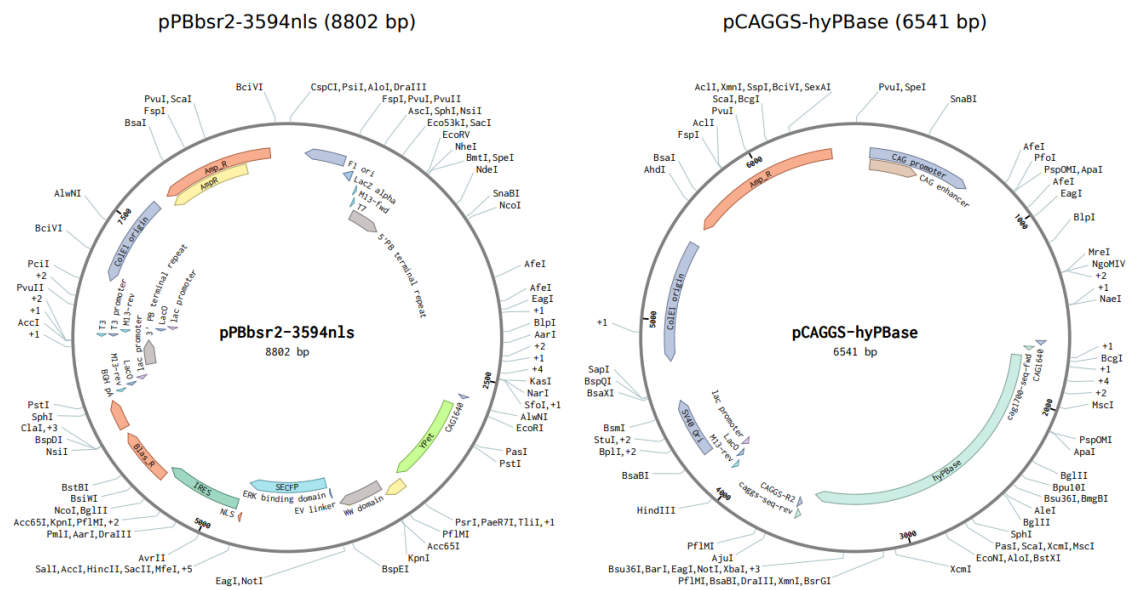
8. Blasticidin を培地全量に対して 5 µg/mL になるように加えた。

9. 37°C, 5% CO₂ 環境下でインキュベーションした。

↓二日後

10. Trypsin-EDTA を加えて細胞懸濁液を作製、60 mm ディッシュに播種した。

11. 37°C, 5% CO₂ 環境下でインキュベーションした。



HeLa スフェロイド作製方法

【材料】

- ・ HeLa 細胞 (60 mm dish confluency 80%以上)

- ・ 培地 (以下を混合・分注)

DMEM high glucose : 500 mL

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11965118#/11965118>)

Fetal Bovine Serum : 50 mL

(<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs.html>)

Pen/Strep : 5 mL

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15140122#/15140122>)

- ・ PBS

- ・ Trypsin-EDTA

(<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0120-1693.html>)

- ・ PrimeSurface プレート 96U (MS-9096U)

(<https://www.sumibe.co.jp/product/s-bio/primesurface-proteo/primesurface-96u/index.html>)

【手順】

1. 培地、PBS、Trypsin-EDTA を 37°C に温めた。
2. 通常の培地交換の手順で細胞の懸濁液を作製した。
3. MS-9096U の well ひとつあたりに培地 40 μ L を加えた。(作製したいスフェロイドの数と一致する well 数)
4. 軽くピペッティングした細胞懸濁液を手順 3 の培地入りの well に加えた。
5. 蓋をして 37°C, 5% CO₂ 環境下で 3-5 日間インキュベーションした。

スフェロイドのナノ粒子コーティングとディッシュへの固定

【材料】

・ HeLa スフェロイドを含んだ 96 well プレート

・ ナノ粒子分散液

・ PBS

・ 0.1%ポリリジン溶液

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p8920?lang=ja®ion=JP>)

・ 35 mm ディッシュ（倒立顕微鏡観察の場合はガラスボトムディッシュ）

・ 観察用培地（以下を混合・分注）

DMEM/F-12 no phenol red : 500 mL

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21041025#/21041025>)

Fetal Bovine Serum : 50 mL

(<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs.html>)

Pen/Strep : 5 mL

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15140122#/15140122>)

【手順】

1. 35 mm ディッシュの底中心付近にポリリジン溶液を加えて直径 8 mm ほどに広げた。

↓ 一日後

2. PBS と観察用培地を 37°C に温めた。

3. ナノ粒子分散液を PBS で希釈した。

4. 96 well プレーットの各 well にナノ粒子分散液を適量（濃度や最終的に付着させたい個数に応じて決定）加えた。

5. ポリリジンコートしていない 35 mm ディッシュに PBS を 3 mL ほど注いだ

6. 先端 5 mm ほどを切り落としたチップ（1000 μ L 用）を装着したピペットを用いて、スフェロイドを 5 の PBS 液中に移動させることで余分なナノ粒子を落とした。

7. 35 mm ディッシュのポリリジンコートされた位置にピペットを用いてスフェロイドを移動させた。

8. 可能な限り液体を取り除いた。

9. 37°C, 5% CO₂ 環境下で 4 分間インキュベーションした。

10. 壁面を伝わせるように観察用培地を静かに加えた。

11. 37°C, 5% CO₂ 環境下で 15 分以上インキュベーションした。

12. 顕微鏡ステージへ移動し、観察を開始した。

本論文第3章では PLoS ONE に投稿した論文 (Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2020) の図を、第4章では ACS Omega に投稿した論文 (Kazushi Yamaguchi *et al.*, 2021) の図をそれぞれ引用、一部改変したものを用いた。両雑誌ともにオープンアクセスジャーナルであり、非営利の利用について、PLoS ONE は引用許諾は必要としない。以下には、各ジャーナルの引用に関する記載のあるページのリンクを掲載する。

PLoS ONE 誌 (2021 年 1 月 8 日時点)

<https://journals.plos.org/plosone/s/licenses-and-copyright>

ACS Omega 誌 (2021 年 1 月 8 日時点)

https://pubs.acs.org/page/policy/authorchoice_termsfuse.html

Dear Dr. Yamaguchi,

Your permission requested is granted and there is no fee for this reuse. In your planned reuse, you must cite the ACS article as the source, add this direct link <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c04888>, and include a notice to readers that further permissions related to the material excerpted should be directed to the ACS.

Regards,

Dragan Lackov

ACS Publications

Customer Services & Information

Website: <https://help.acs.org>