

特集 量子生命科学による精神神経疾患のメカニズム解明に向けた挑戦

6. 脳疾患基礎研究における 2 光子顕微鏡の利点と欠点と
新たな量子計測技術の可能性

田桑 弘之*

抄録：2 光子顕微鏡を用いた生体脳イメージング技術は、実験動物の脳内のニューロン、グリア細胞、血管をマイクロレベルで個別に観察し、細胞間の相互作用を明らかにすることが可能である。これらの技術は、脳の基盤的な仕組みを調べるのに役立つのみならず、脳疾患メカニズムの解明にも非常に有効である。一方で、2 光子顕微鏡による既存のイメージング技術では、細胞形態や組織内動態を計測できても細胞内の多様な状態変化を評価することが困難であった。ナノダイヤモンドを用いたナノ量子センサは、温度や pH、磁場、電場などの多項目計測が可能であり、既存の蛍光タンパクとの併用も可能であるため、細胞内の多様な変化を検出できる可能性がある。これまでのナノ量子センサを生体応用した研究では、線虫やげっ歯類の体内に埋め込んだセンサから組織温度の計測に成功している。今後、ナノ量子センサによる生体計測技術は、生物・医学研究への幅広い利用が期待される。

日本生物学的精神医学会誌 35 (3) : 130-134, 2024

Key words : in vivo brain imaging, two-photon microscopy, nanodiamond-based quantum sensor, brain diseases, inflammation, macrophages

はじめに

脳は「心」を生み出すきわめて重要な臓器である。身体の五感から得られた情報をもとに周囲の状況を理解し、適切に判断して行動を発現できるのは、脳が担う高度な情報処理能力のおかげである。近い将来、もし再生医療が高度に進歩して人工臓器の移植が容易に行えるようになったとしても、自分の心が宿る「脳」だけは取り換えることができない。仮に脳を移植してしまえば、別の心が宿る脳と入れ替わってしまい、本人ではなくなってしまう。我々が健康長寿をめざすのであれば、「心が宿る脳」の恒常性維持が最重要のテーマになることは言うまでもない。しかし脳は、精神疾患や神経変性疾患、がんなど多くの病気のリスクを抱えている。このような疾患を克服して、脳を健康に維持するには脳を構成するニューロンやグリア細胞、血管などのさまざまな細胞種の役割と相互関係を深く理解することが重

要である。特に、ミクログリアは、脳の免疫担当細胞として神経変性疾患だけではなく精神疾患へも深く関与するため、多くの脳疾患の治療・予防戦略のターゲットといえる。また近年は、脳血管周囲や髄膜に存在するマクロファージも脳疾患に深く関与することが言われており⁷⁾、脳実質内外の免疫細胞間の相互作用も注目を集めている。筆者らは、これまでに 2 光子励起レーザー顕微鏡（以下、2 光子顕微鏡）を用いて脳疾患を再現したモデルマウスのニューロン、グリア細胞、血管を細胞個別に観察しながら病気の原因を調べてきた（図 1）。特に、生きた動物の脳内から直接細胞を観察する技術と、麻酔を用いないで覚醒状態で測定する技術の構築を進めたことで、本来の生命環境をほとんど維持した状態で長期間の観察が可能となっている。この 2 光子顕微鏡での生体脳イメージング技術は、これまで生命科学や基礎医学の分野で多く用いられてきたが、得られる情報が主に細胞の形態的变化や組織内

Advantages and disadvantages of two-photon microscopy in basic research of brain diseases and the potential of emerging quantum measurement technologies

* 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子生命科学研究所 量子神経マッピング制御チーム (〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1) Hiroyuki Takuwa : Quantum Neuromapping and Neuromodulation Team, Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8555, Japan

【田桑 弘之 E-mail : takuwa.hiroyuki@qst.go.jp】

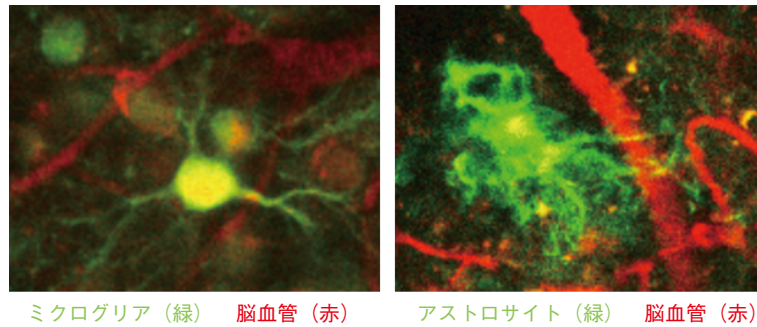


図1 2光子顕微鏡を用いて撮像した生きたマウスの脳内の各種細胞
(左: ミクログリア, 右: アストロサイト)

動態などであり, 細胞内部の情報は多くは得られないことが課題であった。近年, RNA-sequencing (以下, RNA-seq) を用いた細胞内の遺伝子発現解析などにより, 疾患に伴う炎症状態において免疫細胞が多様に遺伝子発現を変化させることがわかってきている^{7, 16)}。加えて, 遺伝子発現の変化は, 疾患や細胞種依存的に異なることが示されている。このことは, 免疫細胞が疾患状況に適応して多様な機能的変化を引き起こし, 生体内での役割の最適化を行っていることを示唆する。すなわち病態メカニズムをきちんと理解するためには, 2光子顕微鏡での細胞形態や組織内動態だけではまったく不十分であり, 遺伝子変化に基づく細胞内状態の変化を生体脳で評価できることが望ましい。近年, この細胞内状態の計測において量子計測技術がもつ多項目計測に注目が集まっており, 生体脳イメージングと量子計測技術の融合により生体量子計測の開発が進み始めている。本稿では, このミクロレベルでの生体脳イメージングの現状と課題と量子計測技術の可能性について論じる。

1. 生体脳イメージングによる 単一細胞の計測技術の現状と課題

生体脳イメージング技術は, これまでの研究で多くの計測系が確立されている。筆者らは, その中でも2光子顕微鏡と陽電子断層撮像 (positron emission tomography: PET) と磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI) を用いて研究を進めてきた。これらの生体脳イメージング技術は, 測定上の利点と欠点が相補的な関係にあり, 併用することで生命現象を理解するうえで有効性が高い。PETは, 主に体内に注入したトレーサの動態を高感度に計測できることが利点だが, 基本的には単一項目の計測しかできない。MRIは, (造影剤を用

いることもあるが)主に組織の内因性信号を計測し, 画像解析技術をもとにさまざまなパラメータを取得可能である。さらにPETとMRIは, 広い測定視野をもつためマウスなどのげっ歯類を対象とした場合は全身をくまなく撮像できるが, 一方で1細胞を観察できるほどの空間解像度はもっていない。2光子顕微鏡は, 生体組織内を1ピクセル当たり $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ 以下の空間解像度で撮像することができるため, $10 \sim 20\mu\text{m}$ の脳細胞の形態を容易に撮像することができる。さらに生体透過性の高い近赤外域のパルスレーザーを用いるため表面から深い位置にある組織を対象にイメージングが可能である。通常の蛍光顕微鏡(1光子励起)の場合では, 測定可能な深さは脳表面から約 $100\mu\text{m}$ 程度であるが, 2光子顕微鏡を用いれば撮像条件に依存するが最大で $1,000 \sim 1,500\mu\text{m}$ 程度の深さの脳組織まで撮像することができる。一方で, 2光子顕微鏡での撮像には, PETやMRIと異なり頭皮と頭蓋骨の一部を除去して脳表を露出する侵襲的な処置が必要である。そのため, できるだけ侵襲性を抑えて安定した測定環境を作るために慢性頭蓋窓法(円形に頭皮と頭蓋骨を除去し, その穴を円形のガラスプレートとデンタルセメントで密封した窓)が用いられている¹⁴⁾。さらに, 通常は麻酔によって実験動物を安静にすることで自発運動に伴うノイズを回避していたが, 麻酔のもつ作用が測定データに影響することが懸念されていた(たとえば, イソフルラン麻酔は, 神経活動や血管機能を減弱して安静時血流量を上昇させる^{11, 13)})。そこで, マウス用の固定具改良が行われて, 麻酔を使わない覚醒状態での計測が可能になり, 麻酔の影響のない生体本来の細胞の活動を観察することができるようになってきている¹²⁾。また, アデノ随伴ウイルスや遺伝子改変マウスなどを利用した技術は, 任意の細胞種に蛍光タンパク質を発現させることで簡単に細胞蛍光標識を可能にした。これにより,

神経細胞, 脳血管, グリア細胞を簡便に長期間観察することが可能となっている (図 1)。また 2 光子顕微鏡は, 測定条件に依存するが一般的に視野サイズが $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ 程度であり, 測定視野の狭さが技術的な課題となっていたが, 近年, 広視野型の 2 光子顕微鏡が開発されており, 測定条件に依存するが数 mm \times 数 mm の広さで数千個の細胞の同時撮像が可能になっている⁸⁾。この広視野型 2 光子顕微鏡は, 視野の広さが PET や MRI より近くなったことから, PET や MRI との画像データの比較が容易になった¹¹⁾。

筆者らは, これまでに 2 光子顕微鏡と PET と MRI を駆使した脳疾患研究を進めてきた。たとえば, 認知症の発症の原因の 1 つと考えられている脳内の異常なタウ凝集体を特異的に標識する PET と 2 光子顕微鏡の両方で使えるマルチレーザーを開発した⁹⁾。このような技術を駆使して, 認知症病態において活性化ミクログリアが抑制性神経細胞の活動を減弱するメカニズムを明らかにしている⁴⁾。また, 認知症のみならず脳卒中病態メカニズムも 2 光子顕微鏡や PET, MRI を使ったマルチスケールな評価系で障害の機序を明らかにしている^{6, 10, 15)}。これまでに 2 光子顕微鏡は, 脳科学や基礎医学の分野において多くの研究者に有効に用いられてきた。しかし一方で, 2 光子顕微鏡で得られる情報量の少なさの課題もあり, 炎症下でのマクロファージやミクログリアの多様な変化を生体脳内の細胞レベルで評価することが困難な現状がある (図 2)。この技術的な課題を克服するためには, 細胞状態を反映した物理・化学的パラメータを計測することが必要であると考えられる。また, これまでに炎症状態においてミクログリアやマクロファージは, M1, M2 などのサブタイプに分かれることが報告されているが, 遺伝子発現解析から M1 や M2 の中間型のサブタイプが複数存在することが示唆されており^{7, 16)}, 炎症下における免疫細胞内の状態は, 非常に多様で複雑化していることが想定される。このような複雑な細胞状態を理解するためには, 単一項目のパラメータでは不十分であり, 多項目のパラメータを計測して相互に比較することが重要といえる。しかし, これまで細胞標識に用いられている蛍光剤や蛍光タンパクは, カルシウム濃度変化や温度や pH などの計測ができて, 単一項目の計測に限られており, 多項目の計測が困難であった。それは, 複数の蛍光剤を混ぜて使用する, または複数の蛍光タンパクを発現させても, 蛍光輝度変化が生じると相互の蛍光変化がノイズとして影響しあうため正確

な測定ができないからである。すなわち既存の蛍光剤では, 基本的に単一項目のパラメータしか計測できず, 細胞内情報の多項目計測は技術的に困難であった。このような技術的課題も含めて, 既存の計測系を超える技術として量子計測技術に注目が集まっている。

2. 生体ナノ量子センサによる細胞内情報の多項目計測の可能性

窒素と格子欠陥が形成する窒素-空孔 (nitrogen-vacancy: NV) センターをもつダイヤモンドは, もっとも安定性の高い蛍光イメージングプローブの 1 つである。この NV センターは, 緑色光で励起されると赤色蛍光を発することが知られている。この赤色蛍光は, 電子のスピン状態を反映することから, 温度や pH, 電場, 磁場などのスピン状態に影響を与える多種多様な物理・化学量を赤色蛍光の変化から定量することが可能である。重要な点として, NV センターを含むダイヤモンドであればナノサイズでも量子センサとして機能する。そのため細胞内に導入することで細胞内状態を計測することができる (図 2)。また, NV センターのスピン状態を操作する方法が, 各パラメータで異なるため相互に影響しないことから, 1 細胞からの多項目計測が可能になる。たとえば, 温度計測ではナノダイヤモンドに連続する異なる周波数のマイクロ波を加える。このマイクロ波が共鳴周波数のときに, ナノダイヤモンドの蛍光輝度が低下する。この輝度低下を引き起こす共鳴周波数の値が, ダイヤモンド周囲の温度に依存して変化するため, 共鳴周波数をもとに周囲の温度を求めることができる。pH 計測では, ナノダイヤモンドの励起光に緑色のパルスレーザーを用いる。このとき, 各パルス間隔の長さが NV センターに影響して赤色蛍光を低下させる。この赤色蛍光低下率とパルス間隔との関係がダイヤモンド周囲の pH に依存して変化するため, 両者の関係を示すグラフから pH を求めることができる¹⁾。このようにナノ量子センサによる温度と pH の計測は, マイクロ波やパルス間隔など異なる方法で蛍光輝度変化を引き起こしているため, 原則的に相互の測定値に干渉しあわない。さらに都合のいいことに, ナノ量子センサの計測方法は, 既存の蛍光タンパクを用いた計測法とも異なるため併用が可能といえる。そのため, ナノ量子センサと既存の蛍光剤や蛍光タンパクを組み合わせた細胞内状態の多項目計測が可能になるといえる。

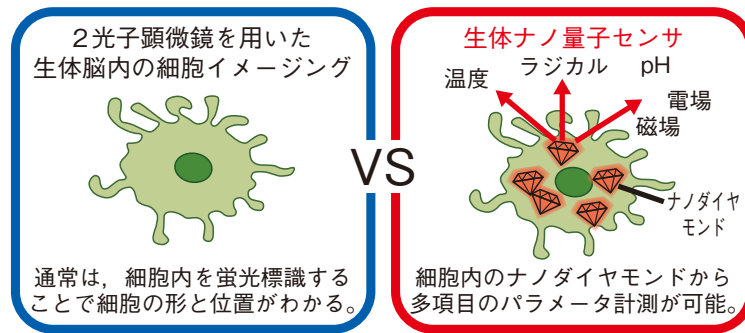


図2 2光子顕微鏡とナノ量子センサでの生体脳イメージングについて

これまですでに、ナノダイヤモンドを用いたナノ量子センサの生体測定への応用は進んでいる。たとえば、ナノダイヤモンドを線虫の体内に導入して運動時の温度変化を検出している²⁾。げっ歯類についても、皮下に埋め込んだナノダイヤモンドから温度計測に成功している³⁾。ナノダイヤモンドの生体内導入方法も、現在は主に注射針で直接生体内に注入する方法が行われているが、ナノダイヤモンドの表面修飾を工夫することで血中から体内に導入する試みも進められている⁵⁾。筆者らも、今回、データを掲載していないがマウスの脳内外の免疫細胞にナノダイヤモンドを取り込ませて細胞内温度などの多項目計測を実施している。ナノ量子センサでの細胞機能計測は、多項目のパラメータの計測が可能な利点があり、細胞内状態の多様な変化をとらえるキラーツールとなることが期待される。さらに、脳疾患の新薬の薬効評価やさまざまな用途で生物・医学研究の分野において利用が進むと考えられる。

本論文に記載した筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Fujisaku T, Tanabe R, Onoda S, et al (2019) pH nanosensor using electronic spins in diamond. *ACS Nano*, 13 (10) : 11726–11732.
- 2) Fujiwara M, Sun S, Dohms A, et al (2020) Real-time nanodiamond thermometry probing in vivo thermogenic responses. *Sci Adv*, 6 (37) : eaba9636.
- 3) Kaminaga K, Yanagihara H, Genjo T, et al (2021) Non-contact measurement of internal body temperature using subcutaneously implanted diamond micro-particles. *Biomater Sci*, 9 (21) : 7049–7053.
- 4) Kudo T, Takuwa H, Takahashi M, et al (2023) Selective dysfunction of fast-spiking inhibitory interneurons and disruption of perineuronal nets in a tauopathy mouse model. *iScience*, 26 (4) : 106342.
- 5) Moscardiello P, Raabe M, Liu W, et al (2019) Unraveling in vivo brain transport of protein-coated fluorescent nanodiamonds. *Small*, 15 (42) : e1902992.
- 6) Nishino A, Tajima Y, Takuwa H, et al (2016) Long-term effects of cerebral hypoperfusion on neural density and function using misery perfusion animal model. *Sci Rep*, 6 : 25072.
- 7) Schonhoff AM, Figge DA, Williams GP, et al (2023) Border-associated macrophages mediate the neuroinflammatory response in an alpha-synuclein model of Parkinson disease. *Nat Commun*, 14 (1) : 3754.
- 8) Sofroniew NJ, Flickinger D, King J, et al (2016) A large field of view two-photon mesoscope with sub-cellular resolution for in vivo imaging. *Elife*, 5 : e14472.
- 9) Tagai K, Ono M, Kubota M, et al (2021) High-contrast in vivo imaging of tau pathologies in Alzheimer's and non-Alzheimer's disease tauopathies. *Neuron*, 109 (1) : 42–58.
- 10) Tajima Y, Takuwa H, Kokuryo D, et al (2014) Changes in cortical microvasculature during misery perfusion measured by two-photon laser scanning microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34 (8) : 1363–1372.
- 11) Takado Y, Takuwa H, Sampei K, et al (2022) MRS-measured glutamate versus GABA reflects excitatory versus inhibitory neural activities in awake mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 42 (1) : 197–212.
- 12) Takuwa H, Autio J, Nakayama H, et al (2011) Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice. *Brain Res*, 1369 : 103–111.
- 13) Takuwa H, Matsuura T, Obata T, et al (2012) Hemodynamic changes during somatosensory stimulation in awake and isoflurane-anesthetized mice measured

- by laser-Doppler flowmetry. *Brain Res*, 1472 : 107–112.
- 14) Tomita Y, Kubis N, Calando Y, et al (2005) Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25 (7) : 858–867.
- 15) Urushihata T, Takuwa H, Seki C, et al (2018) Water diffusion in the brain of chronic hypoperfusion model mice : a study considering the effect of blood flow. *Magn Reson Med Sci*, 17 (4) : 318–324.
- 16) Zheng K, Lin L, Jiang W, et al (2022) Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 42 (1) : 56–73.

■ ABSTRACT

Advantages and disadvantages of two-photon microscopy in basic research of brain diseases and the potential of emerging quantum measurement technologies

Hiroyuki Takuwa

*Quantum Neuromapping and Neuromodulation Team, Institute for Quantum Life Science,
National Institutes for Quantum Science and Technology*

Two-photon microscopy enables the observation of neurons, glial cells, and blood vessels in the brains of experimental animals, elucidating cellular interactions at the microscopic level. While this technique is effective for studying brain mechanisms and disease, it is difficult to evaluate diverse intracellular changes. Nanodiamond-based quantum sensor technology, capable of measuring quantities such as temperature, pH, magnetic field, and electric field, can address this issue. Successful measurements in organisms like nematodes and rodents suggest that quantum sensors are a powerful tool for comprehensive analysis of the intracellular state, promising broad applications in biomedical research.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 35 (3) : 130–134, 2024)
