

—特集 [生命の階層を可視化・操作する最先端技術：神経科学が切り拓くバイオイメージングと疾患研究の新展開 (2)]—



全光学的神経回路解析の最前線：顕微鏡による 活動計測から操作，そして機能解明へ

加藤 大輔

日本医科大学大学院医学研究科・感覚情報科学分野

1. はじめに：神経科学における

パラダイムシフトと全光学的アプローチの進化

脳機能を包括的に理解しようとする試みにおいて、神経科学は大きな技術的転換点を迎えている。神経細胞活動の「計測」と「操作」は、この分野の進歩を支える車の両輪として機能してきた。過去数十年にわたり、電気生理学的手法から光学的手法へと主軸が移り変わる中で、二光子顕微鏡と遺伝子コード化カルシウムインジケーター（GECI, 例えばGCaMP）の技術的成熟は、生体脳における数千個規模の神経細胞活動を同時に、かつ非侵襲的に計測することを可能にした。これらの技術的進歩は、特定の感覚入力、運動出力、あるいは認知機能に対応する神経細胞活動パターンを記述し、脳内における情報の相関関係を明らかにする上で多大な貢献を果たしてきた。しかしながら、受動的な観察のみに依存したアプローチには、原理的な限界が存在する。観測された特定の神経細胞活動が、標的とする行動や認知機能の直接的な原因か、あるいは単なる結果（随伴現象）に過ぎないのかを、観察データのみから厳密に区別することは困難である。この因果関係の壁を突破するためには、神経細胞活動に対して、人為的、時空間的に精密な介入操作を行うことが不可欠となる。

2000年代初頭に登場した光遺伝学（オプトジェネティクス）は、特定の神経細胞集団に光感受性タンパク質（オプシン）を発現させ、光照射によって活動を操作する手段を提供し、この課題に強力な回答を与えた。当初主流であった光ファイバーを用いた広域照射技術は、遺伝学的に定義された特定の神経細胞種を一括して興奮または抑制することを可能にした。しかし、脳の情報処理が個々の神経細胞の精密な発火タイミングや、マイクロメートルからミリメートルスケールの空間配置によって符号化されていることを考慮すれば、広域照射には空間的選択性の観点で重大な限界があった。すなわち、脳の機能単位である個々の神経細胞

を独立した演算素子として捉え、それらを自在に操作する技術の確立が、次世代の神経科学における最優先課題となった。この課題を克服し、神経細胞活動の「計測」と「操作」を単一細胞レベルの解像度で統合したのが、本稿の主題である全光学的アプローチである¹。

筆者らはこれまで、本分野における技術基盤の確立とその病態生理学的应用に取り組んできた。これまでに報告した二光子ホログラフィック顕微鏡のプロトコル²は、高精度なシステム構築と高速イメージングの実証に成功したものであり、また炎症性疼痛モデルにおける神経回路変容の解明³は、本技術が実際の生物学的課題解決にいかにも有効を示すものである。さらに、これらの成果を含む近年の進展は、大きく5つの潮流として捉えることができる。第一に、光操作精度の向上とオプシンの改良である。細胞体のみオプシンを発現させる局在化技術の普及により、単一細胞解像度が実質的に達成され、ChRmineのような高感度かつ赤色偏移したオプシンの登場は、クロストークの問題を大幅に軽減した⁴。第二に、高速ホログラフィック照射技術の確立である。空間光変調器（Spatial Light Modulator: SLM）を照射に応用することで、高速イメージングが可能となった⁵。第三に、時空間制御技術の高度化である。3D-SHOTといった光成形技術の進化により、Z軸方向の分解能が向上し、ミリ秒以下の精密な操作が実現している⁵。第四に、計測・操作規模の拡大であり、数ミリメートル四方をカバーするホログラフィック・メソスコープや、Light Beads顕微鏡による大規模計測が加速している⁶。第五に、自由行動下への適用であり、超小型顕微鏡への光刺激機能の統合が進んでいる⁷。

本稿では、これらの技術的背景を踏まえ、まず筆者らが確立した二光子ホログラフィック顕微鏡の技術的詳細²と、ホログラフィック照射による高速化の利点について詳述する。続いて、この技術を炎症性疼痛マウスモデルに応用し、痛みが誘発する神経回路の変容を

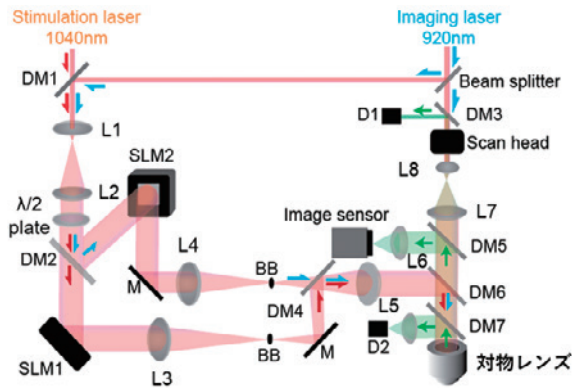


図1 二光子ホログラフィック顕微鏡の光路図
波長の異なる2つのフェムト秒レーザーを統合した光学系を示す。イメージング用にはGCaMPの励起に最適な920 nmのレーザーを使用し、ホログラフィック刺激・照射用には920 nmおよび1,040 nmのレーザーを統合している。これらのレーザーをSLMにより制御することで、横方向約1.2 μm 、軸方向約8.3 μm の単一細胞解像度での標的化が可能となる。また、1,040 nmはChRmineの励起に適し、GCaMPの信号との分離により高精度な計測と操作の同時実行を実現している。なお、神経細胞活動データは、高速イメージング時はimage sensorで、機能的結合評価時は検出器(D2)で計測する。BB: ビームブロック, D: 検出器, DM: ダイクロイックミラー, M: ミラー, L: レンズ, SLM: 空間光変調器

解明した研究³を実例として、その生物学的意義を論じる。最後に、今後の光操作・イメージング技術の展望について考察を行う。

2. 二光子ホログラフィック顕微鏡の技術的基盤と評価

全光学的アプローチの成功を左右するのは、イメージング用および操作（刺激・照射）用の二つの独立した光学系をいかに精密に統合できるかという点に集約される。筆者らが構築したシステムは、標準的な二光子顕微鏡にホログラフィック刺激・照射用の光路を追加実装する設計であり、既存の実験設備を高度化できる柔軟性を備えている。

2.1 光学系の統合と波長選択の最適化

システムの核心となる光学系は、波長の異なる2つのフェムト秒レーザーの統合によって構築されている(図1)。イメージング用光路には、カルシウムセンサーであるGCaMPの励起に最適化された920 nmのレーザーが用いられる。一方、ホログラフィック刺激・照射用光路には、920 nmに加えて1,040 nmのレーザーが統合されている。1,040 nmという波長選択により、赤色偏移オプシンであるChRmineを効率的に活性化

できるのと同時に、GCaMPの励起波長(920 nm)による意図しないオプシンの活性化(クロストーク)を軽減できる。これにより、高い信号対雑音比(S/N比)を維持したまま、神経細胞の活動「計測」と介入「操作」を同時並行で実行することが可能となった²。

2.2 空間光変調器 (SLM) による空間制御

SLMは、入射するレーザー光の位相を制御することにより、焦点面において任意の光強度分布、すなわちホログラムを形成する。この技術により、単一のレーザービームを数百の微小なスポットに分割し、3次元空間内に散らばる特定の細胞群にのみ光を届けることが可能となる。ホログラフィック刺激の空間精度は、神経細胞を個別に標的化する上で決定的な要素である。本システムでは、横方向(XY)で約1.2 μm 、軸方向(Z)で約8.3 μm という空間解像度が達成されている。マウス的大脑皮質における錐体細胞の細胞体サイズ(通常10~20 μm 程度)を考慮すれば、この精度は隣接する細胞への光の漏れ込みを最小限に抑え、真の意味で単一細胞解像度での操作を保証するものである。

2.3 座標変換と自動校正システムの重要性

高度な全光学的操作を実現するためには、イメージング座標(イメージセンサーや検出器が見ている位置)と、ホログラフィック座標(SLMが照射する位置)の厳密な一致(レジストレーション)が不可欠である。このプロセスにわずかな誤差が生じれば、意図しない細胞を刺激することになり、因果関係の解釈が根本から崩れてしまう。この課題に対し、蛍光スライドを用いた自動校正GUIが開発され、以下のステップを通じて高精度な校正を実現している。

- ・Z軸(深さ)校正: SLMのフォーカス特性を対物レンズの物理的な焦点面と一致させる。

- ・XY軸(平面)校正: アフィン変換行列を用いて、イメージング視野とホログラフィック刺激・照射視野の歪みを補正する。

- ・強度補正: SLMの回折効率の不均一性を補正し、視野内のどの位置にある細胞に対しても均一な光出力を確保する。

こうした工学的な精緻化により、実験者は複雑な光学調整に時間を費やすことなく生物学的な問いに集中できる環境を提供している。

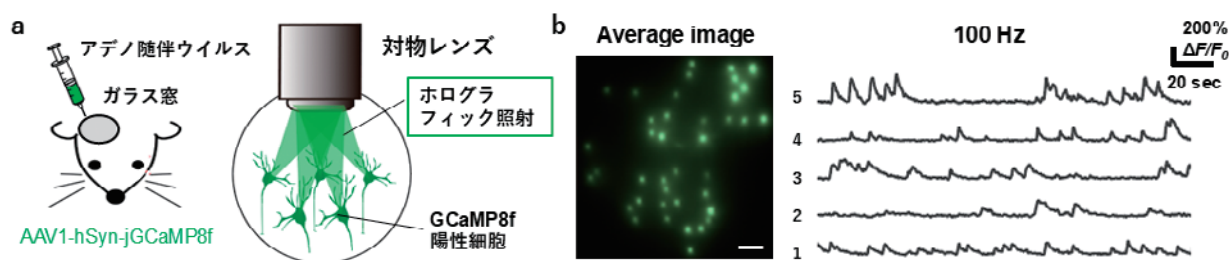


図2 ホログラフィック照射による高速イメージング

(a) 実験の概略. アデノ随伴ウイルスにより S1 の神経細胞に GCaMP8f を発現させる. 頭蓋骨にガラス窓を作製し, 特定の神経細胞のみを選択的にホログラフィック照射する. (b) 神経細胞の代表画像と活動のトレースを示す. ホログラフィック照射の実装により 100 Hz の高速記録を実現している.

2.4 ホログラフィック照射によるイメージングの高速化

本システムの技術的なハイライトの一つは, SLM を用いたホログラフィック照射によるイメージングの高速化である. 通常の二光子顕微鏡では, 視野内の全ピクセルを順次走査する点走査方式を採用しており, フレームレートは通常 30 Hz 程度に留まる. これに対し, 本手法では神経細胞が存在する複数の関心領域のみを選択的にホログラフィック照射し, イメージセンサーで一度に受光することで, 走査時間の大幅な短縮に成功した (図 2a). その結果, 400 μm 四方の領域において, 従来の 3 倍以上に相当する 100 Hz の高速記録に成功し, 神経細胞活動に伴うカルシウム応答を詳細に捉えることが可能となった (図 2b).

3. 実例研究: 炎症性疼痛による一次体性感覚野の神経回路変容

筆者らは本技術を用い, 炎症性疼痛における一次体性感覚野 (S1) の役割を解析した³.

3.1 疼痛形成に伴う神経細胞活動の同期性亢進

マウスの右後肢に完全フロイントアジュバント (CFA) を投与した炎症性疼痛モデルマウスを作製し, 左 S1 第 2/3 層の神経細胞活動を長期間にわたり追跡した結果, 疼痛行動が顕著な時期において, 自発活動時における神経細胞ペア間の活動同期性が有意に上昇していることが明らかになった. さらにこの同期性の亢進は, 疼痛行動の持続期間と相関し, 疼痛の治癒とともに正常化する可逆的な変化であった.

3.2 ホログラフィック刺激による機能的結合の因果的証明

観察された同期性の向上が S1 内部の神経細胞間の結合強化によるものかを検証するため, 全光学的操作

が導入された. S1 の神経細胞に GCaMP (計測) と ChRmine (操作) を共発現させ, ホログラフィック刺激によって単一の神経細胞を人為的に発火させた (図 3a). この実験の結果, 炎症性疼痛モデルマウスでは, 単一神経細胞の刺激に応答する周辺の神経細胞数が有意に増加していることが判明した (図 3b). これは, 疼痛形成時の S1 において, 過興奮性・高結合性の回路状態が形成されていることの直接的な証明である.

3.3 回路変容の分子基盤: 電位依存性 N 型カルシウムチャネルの同定

さらに, この神経回路変容の分子基盤を探るため, 蛍光活性化セルソーティング (FACS) を用いた遺伝子発現解析を行った. その結果, 炎症性疼痛モデルマウスの S1 において電位依存性 N 型カルシウムチャネルの発現が特異的に上昇していることが明らかとなった. 電位依存性 N 型カルシウムチャネル阻害剤を S1 局所に投与したところ, 亢進していた同期性が低下し, 同時に疼痛行動も緩和された. これにより, ミクロな分子の動きがいかにしてマクロな神経回路動態を変え, 個体の行動へと繋がるかという因果の連鎖が解明された.

4. 今後の光操作・イメージング技術の展望

神経科学はさらなる「速さ」「広さ」, そして「双方向性」を追求する新たなフェーズに突入している. 現在の主流であるカルシウムイメージングは, 神経細胞活動の代理指標であり, 神経回路の高速な演算やサブスレッショルド電位変化を捉えきれない限界があるが, 今後の重要な展望として, 膜電位そのものを可視化する膜電位イメージングとホログラフィック操作の統合が期待される. JEDI-2P や ASAP4 といった次世代膜電位センサー⁸⁹ と kHz オーダーの高速ホログラフィック刺激を組み合わせることで, 電気生理学に匹

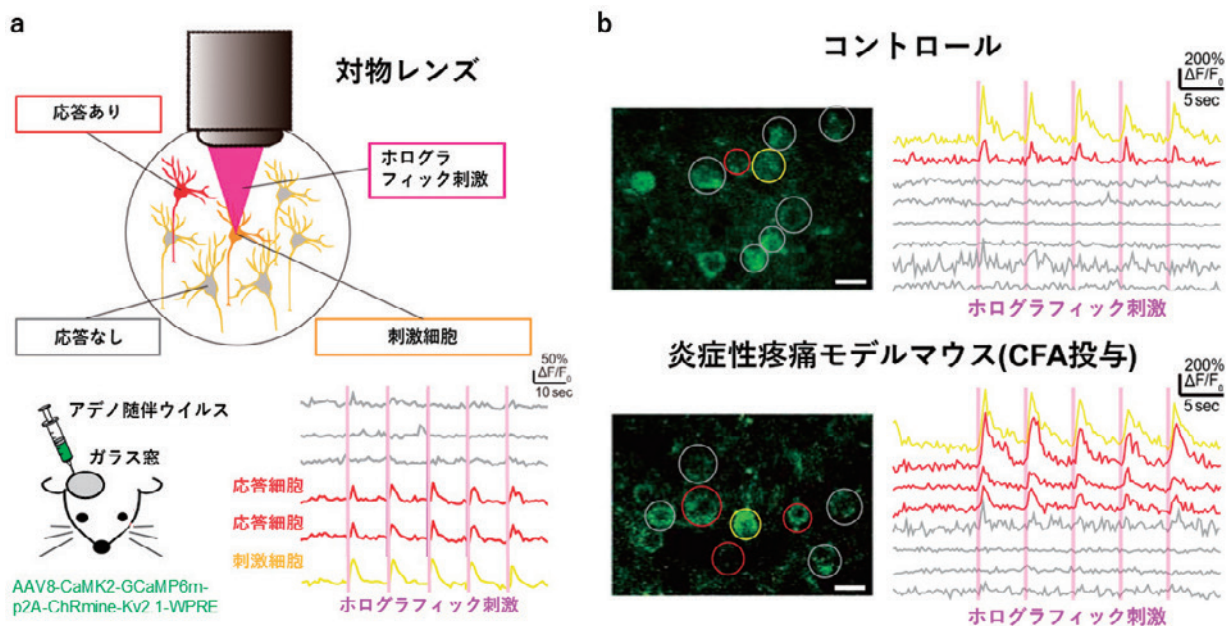


図3 疼痛形成時に増加する神経細胞間の機能的結合

(a) 実験の概略. アデノ随伴ウイルスにより, S1 の神経細胞に GCaMP6 m (計測) と ChRmine (操作) を共発現させる. 頭蓋骨にガラス窓を作製し, 単一神経細胞 (黄色) をホログラフィック刺激した際の周辺に存在する神経細胞の応答を評価する. 刺激と同期して応答した神経細胞 (赤色) を機能的結合あり, 応答しない神経細胞 (灰色) を結合なしと定義する. (b) 代表的な GCaMP6 m を発現した神経細胞画像と活動データを示す. 炎症性疼痛モデルマウスでは, コントロールマウスと比較して刺激に応答する細胞数が有意に増加しており, 疼痛形成時に神経細胞間の機能的結合が強化されていることが示されている.

敵するミリ秒以下の時間分解能での因果関係解明が可能となるだろう. また, 脳機能は大域的なネットワークによって支えられているため, 視野を数ミリメートル以上に拡大したメソスコープとホログラフィック刺激との統合¹⁰により, 領野間相互作用の因果的解析が進展する. さらに, より自然な行動中の神経細胞活動を理解するため, 自由行動下での計測・操作技術の進化も不可逆な流れである. 超小型二光子顕微鏡にホログラフィック刺激を統合する技術¹¹ は, ナビゲーションや社会性行動の神経基盤解明に貢献する. 最後に, AIを用いたクローズドループシステムの導入¹² は, 神経細胞活動をリアルタイムで解析し, 最適な刺激をフィードバックすることで, 将来的にはてんかん発作の抑制等を目的とした光学的ブレイン・マシン・インターフェースの実現に寄与すると考えられる.

5. 結論

二光子ホログラフィック顕微鏡は, 単なる計測ツールを超え, 脳という複雑なシステムに情報を「書き込み」, その応答から動作原理を逆算するための強力なインターフェースへと進化した. 筆者らによる高精度なシステム構築², 疾患における神経回路の因果的解明³

は, この技術の有効性を如実に示している. 現状, 散乱光による深部到達性の限界や一度に制御可能な細胞数の物理的上限といった技術的な制約は残されているものの, 今後はカルシウムから膜電位へ, 局所から全脳へ, そして固定下から自由行動下へとその適用範囲を広げることで, 神経科学は脳機能の因果的記述という目標にさらに近づくことができると確信している.

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし.

文献

1. Russell LE, Dalgleish HWP, Nutbrown R, et al: All-optical interrogation of neural circuits in behaving mice. *Nat Protoc* 2022; 17: 1579–1620.
2. Kato D, Quan X, Tanisumi Y, et al: Evaluation and Manipulation of Neural Activity using Two-Photon Holographic Microscopy. *J Vis Exp* 2022.
3. Okada T, Kato D, Nomura Y, et al: Pain induces stable, active microcircuits in the somatosensory cortex that provide a therapeutic target. *Sci Adv* 2021; 7.
4. Marshel JH, Kim YS, Machado TA, et al: Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception. *Science* 2019; 365.
5. Hernandez O, Papagiakoumou E, Tanese D, et al: Three-dimensional spatiotemporal focusing of

- holographic patterns. *Nat Commun* 2016; 7: 11928.
6. Demas J, Manley J, Tejera F, et al.: High-speed, cortex-wide volumetric recording of neuroactivity at cellular resolution using light beads microscopy. *Nat Methods* 2021; 18: 1103–1111.
 7. Accanto N, Chen IW, Ronzitti E, et al.: Multiplexed temporally focused light shaping through a gradient index lens for precise in-depth optogenetic photostimulation. *Sci Rep* 2019; 9: 7603.
 8. Liu Z, Lu X, Villette V, et al.: Sustained deep-tissue voltage recording using a fast indicator evolved for two-photon microscopy. *Cell* 2022; 185: 3408–3425.e29.
 9. Evans SW, Shi DQ, Chavarha M, et al.: A positively tuned voltage indicator for extended electrical recordings in the brain. *Nat Methods* 2023; 20: 1104–1113.
 10. Abdeladim L, Jagadisan UK, Shin H, et al.: Probing inter-areal computations with a cellular resolution two-photon holographic mesoscope. *bioRxiv* 2025.
 11. Accanto N, Blot FGC, Lorca-Cámara A, et al.: A flexible two-photon fiberscope for fast activity imaging and precise optogenetic photostimulation of neurons in freely moving mice. *Neuron* 2023; 111: 176–189.e6.
 12. Zhang Z, Russell LE, Packer AM, et al.: Closed-loop all-optical interrogation of neural circuits in vivo. *Nat Methods* 2018; 15: 1037–1040.

(受付：2026年2月15日)

(受理：2026年2月15日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的の場合、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。