深部組織イメージング/神経科学

# 高速、深部組織イメージングの散乱制御

バーバラ・ゲフベルト

**BioOptics** 

事前に組織散乱を抑えるために、検出範囲の拡大と再構成計算を組み合わせ る新しいアプローチで、組織深部構造の高品質の広視野画像が可能になる。

組織散乱は、励起光と放出光の両方 を曲げることでイメージングを劣化さ せる(図1)。生物組織は、不均質媒質 であり、ランダムに光を散乱させる<sup>(1)</sup>。 また、強い後方散乱では、励起光は組 織に浸透する力が制限される。散乱が 少ない状況でさえ、イメージングパフ ォーマンス、焦点の歪みやクロストー クによって劣化する。このため、散乱 に対処する目的で多くの方法が提案さ れてきた。神経科学では、究極目標は、 脳深部に高速で、高品質の画像を生成 することである。

中国精華大のリンジエ・コン氏 (Lingjie Kong)の研究室は、多くの新 しい神経イメージングツールに関わって おり、最新のものは、適応補償技術と計 算を組み合わせた拡張検出である。他 のアプローチと違い、同氏のツールは、 動的に組織散乱に対処する包括的方法 である。「われわれは適応光学(アダブ ティブオプティクス)を提案した。励起 光に悩まされる散乱を克服するためで ある。また、再構成計算が放出光の散 乱信号を利用できるようにするためで ある」とコン氏は説明している。

コン氏は、精密機器学部の准教授で あり、2018年にMIT Technology Re viewで"Innovator under 35"として認 められた。これは、同氏のチームのシ ステム開発を対象にしただけでなく、 同氏とその同僚が、そのイノベーショ ンを複製し、適用しようとしている世 界中の神経科学研究室に提供している 支援もたたえられている。

### 顕微鏡からスタート

パッシブアプローチ、レーザスキャニ

ング共焦点顕微鏡は、ピンホールを使 って空間的に散乱放出光をフィルタリ ングすることで深度を強化する。散乱 を減らすより動的で直接的な方法は、 長波長の光を使うことである。レイリ ー散乱が、波長の4乗として反比例変 化することを考慮する。多光子顕微鏡 (MPM)では、近赤外光を使い、非線 形光学効果に基づいて信号を励起す る。これが散乱を弱める。非線形効果 は、局所的励起を確実にする。従って、 非デスキャン検出における発光のクロ ストークをなくする。しかし、多次元 レーザスキャニングの必要性がイメー ジング速度を遅くする。

ラインスキャニング時間集光顕微鏡 (LTFM)は有望である。強い軸閉じ込 めを維持しながら高速イメージングが できるからである<sup>(2)</sup>。LTFMでは、励



図1 均質媒質からのコリメートビームの光線が散乱組織の中に進む、混濁 媒質における光散乱。光は、1 TMFP (平均自由行程)進んだ後、拡散する。 蛍光体から出た光の光線が散乱組織に 進む様子は(b)に示した。(提供:リン ジエ・コン氏)



図2 励起光の組織散乱抵抗を示している。 Cx3Cr1-GFPマウスの25µm厚画像スタッ クのZ軸に沿った最大値投影法を含む。画像 は、(HSSCAC; [a])を利用して得た。また、 18µm厚x-zスタックy軸に沿ったMIPs([a] に破線枠でマーク)は完全補正で撮った(左、 サンプルと光学系誘起波面歪の両方を補償)、 およびシステム補正(右、光学系誘起波面歪の みを補償); (b)に示されたラインに沿った強 度プロファイルは、(c)に示している; (a)の 破線ボックスによってマークした測域の拡大 図、(d)の完全補正(上)とシステム補正(下): (d)に示したラインに沿った強度プロファイル を(e)に示している: また対物レンズの瞳裏の 補償波面は(f)に示している。(Ref.4から採 用した、リンジエ・コン氏提供図)

図3 数値シミュレーションは、拡張検出と他の時間的集光イメージング技術の比較を可能にし、神経構造(a)画像のグラウンドトルース(GT)を見せてくれる。広視野検出(WD)で得られた画像、共焦点スリット検出(CSD)、提案された拡張検出(ED)、それぞれ(b-d)である。また、(b)で破線に沿った×軸とy軸強度プロファイル - シミュレーションは、WDは両軸(e-f)でぼやけることを示している。CSDは、×軸に沿ったぼやけを低減できるが、y軸沿いでは微細構造細部の維持ができない。一方、EDは、両方向で細部を回復できる。(提供:リンジエ・コン氏)

起光は、軸に沿って空間的に集光する、 一方パルス分散は他の軸に沿って変調 される。これには「時間集光」原理を 使って、深さ解像度を保証する。点ス キャニングと比較すると、ラインスキャ ニングは、イメージング速度を1ケタ以 上改善できる<sup>(3)</sup>。とはいえ、最大深度を 達成するには、LTFMにおける組織散 乱は、制御されなければならない。

## 励起光

励起光の組織散乱は、MPMでは焦 点歪、励起効率低下に、また光学分解 能やイメージング深度低減になる。適 応光学(AO)は、こうした制約への対 処に役立つ。AOでは、サンプル誘起波 面歪が計測され、次に補償波面が、空間光変調器のような能動素子により励起光に適用される。これにより回折限 界焦点が回復される。特にLTFMでは、 波面補償は空間的次元とスペクトル的 次元の両方で必要とされている。

精華大の技術は、ハイブリッド空間ス ペクトルコヒーレント適応補償(HSS CAC)と言われ、LTFMで波面歪を完全 補償するように設計されている<sup>(4)</sup>。研究 者は、シミュレーションと実験の両方を 利用して、グローバル最適補償回収で、 HSSCACアルゴリズムの性能を評価し た。HSSCACにより、励起光の軸閉じ込 めが維持された、これは励起光の散乱を 克服する力を示唆している(**図2**)。

### 発光

特に広視野検出モードでは、LTFM は、組織散乱によって引き起こされる 放出光のクロストークに悩まされる。 レーザスキャニング共焦点顕微鏡と同 様、LTFMは、共焦点スリット検出を 使える。そこでは、共焦点スリットが ライン形状励起と対になっており、空 間的に散乱光をフィルタで除去し、イ メージング深度が改善される。そのよ うな技術は、励起ライン間の散乱で引 き起こされる黒ストークに効果的に対 処できるが、励起ラインに沿った黒ス トークには耐性がない。

従って、精華大の研究者は、より深 い検出のために共焦点スリットを除去 BioOh



図4 ED-LTFMで、生体内生物動力学の深部イメージング。30μm画像スタックに沿った一連の小グリア細胞の時間カラーコード最大値投影法。 スタックは、従来のLTFM(a)とED-LTFM(b)で取得した。(Ref. 5から、リンジエ・コン氏提供図)

し、計算による再建を行うことを提案 した。このアプローチは、拡張検出 LTFM(ED-LTFM)と言われ、明らか に、初の広視野2光子イメージング技 術である。これは、散乱フォトンから 信号を抽出し、イメージング深度を効 果的に深める<sup>(5)</sup>。2Dで各ラインの画 像を連続的に取得することで、ED-LTFM は、散乱した信号も散乱しない 信号も、すべて完全に記録する。ED 技術のアプリケーションに続いて、研 究者たちは再構成計算を利用して、取 得した画像スタックを忠実に再構成し た。また、アーチファクト低減にはヘ ッセ正則化法 (回帰の1形式)を取り込 む。数値シミュレーションの示すとこ ろでは、従来のLTFMとLTFMベー ス共焦点スリット検出の双方と比較し て、ED-LTFM はパフォーマンス改善 を示している(図3)。

研究者は、トランスジェニック(遺 伝子組み換え)マウスの脳で、生体内 深部イメージング実験を通じて強化さ れたイメージング深度のパフォーマン スを評価した。Thy1-YFPマウス脳の ニューロンを撮像し、Cx3Cr1-GFPマ ウス脳のマイクログリア (小膠細胞)の 動的イメージングを行った(図4)。

低繰り返しレート、高パルスエネル ギーでフェムト秒レーザを適用すると、 低い信号対雑音比(SNR)を維持しな がら、イメージング深度強化が可能で ある、と研究者は見ている。

### 限界を押し広げる

研究チームの成果は、統合された HSSCACと拡張検出ベース計算イメー ジング技術の能力が、励起光と放出光 の両方の、組織散乱の影響を最小化す ることを実証している。その方法の侵 入深さは、利用できるレーザで制限さ れる。研究者の報告では、約200μm でイメージングしているが、理論的に は最大深度は、点スキャニング2光子 顕微鏡の深度に一致する(これまでの ところ約1000μm)。3光子励起では、 もっと深く組織侵入が達成できると研 究者は考えている。

点スキャニング MPM と同様、基本 的イメージング深度限界<sup>(6)</sup>は、究極的 には表面近傍蛍光に寄与する。これは 焦点変調で最小化できる<sup>(7)</sup>。

上述の統合戦略は、散乱組織のイメ ージング深度の限界をさらに押し広げ る。また、脳の深部の信号を高速分解 する能力は、神経結合や機能マッピン グの研究を促進する。

#### 参考文献

(1) V. Ntziachristos, Nat. Methods, 7, 8, 603-614 (2010).

- (3) Y. Xue et al., Biomed. Opt. Express, 9, 11, 5654-5666 (2018).
- (4) Y. Zhang, X. Li, H. Xie, L. Kong, and Q. Dai, J. Phys. D: Appl. Phys., 52, 024001 (2019).
- (5) Y. Zhang et al., Opt. Express, 27, 15, 20117-20132 (2019).
- (6) P. Theer and W. Denk, J. Opt. Soc. Am. A, 23, 12, 3139-3149 (2006).
- (7) Y. Zhang, L. Kong, H. Xie, X. Han, and Q. Dai, Opt. Express, 26, 17, 21518-21526 (2018).

<sup>(2)</sup> M. E. Durst, G. Zhu, and C. Xu, Opt. Commun., 281, 7, 1796-1805 (2008).