

令和 3 年 10 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16188

研究課題名(和文)近赤外光ガイドスター波面シェイピングによるマウス脳最深部での神経狙い撃ち制御

研究課題名(英文) Targeted neuronal control deep inside the mouse brain by near-infrared wavefront shaping

研究代表者

渋川 敦史 (SHIBUKAWA, ATSUSHI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特任助教

研究者番号：80823244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「ガイドスター光波面整形」と「アップコンバージョンナノ粒子(UNP)注入による近赤外光照射」を組み合わせることで、2mm以上のマウス脳深部に光スポットを形成可能にする光基盤技術の確立を目指した。初年度は、ガイドスター波面整形の原理実証や擬似サンプルの作製、ホールセルパッチクランプ法の確立等を完了させた。今年度は、生きたマウス脳が示すサブミリ秒の散乱応答変化に追従するための基盤デバイスとして、高速一次元空間光変調器を提案・開発した。来年度以降も引き続き本研究を遂行し、最終目標であるマウス脳深部での光スポット生成に挑戦していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果である一次元空間光変調器は、最大25MHzのフレームレートを原理的に達成可能であり、このフレームレートは、これまでの世界記録から二桁以上の大幅な改善に相当する。この一次元空間光変調器は、本研究目的でもある「マウス脳深部での光スポット生成」を可能にするだけでなく、例えば、「大画面プロジェクタ」や「高速3D光スポット走査」、「スペクトル整形」、「光空間通信」など他分野へ応用展開できる。すなわち、一次元空間光変調器は、今後様々な分野に波及していくシース技術として大きく期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to combine "guidestar-based optical wavefront shaping" and "the use of near-infrared light via upconversion nanoparticle (UNP)" towards optical focusing spot more than 2 mm deep in the mouse brain". In the first year, we completed the proof of principle experiment for the guidestar wavefront shaping, the preparation of scattering samples that mimic in-vivo mouse brains, the whole-cell patch clamp method. In the second year, we proposed and developed a high-speed one-dimensional spatial light modulator (1D-SLM) as a fundamental device to cope with the sub-millisecond scattering response changes shown by a live mouse brain. We will continue this research next year and challenge the final goal of generating the optical focusing spot in the deep brain of mice.

研究分野：電子デバイス

キーワード：波面整形 ホログラフィ 光散乱 空間光変調 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

光遺伝学は、光を用いて細胞活動を制御可能にするため、「脳神経回路のメカニズム」を解明する新たなツールになる。従来の光遺伝学では、脳内に光を一様に照射し、神経集団の発火パターンを調べることが一般的である。一方で、光の集束スポット(サイズ $1\mu\text{m}$)を用いて神経個体(サイズ $10\mu\text{m}$)一つ一つを狙い撃ちで制御し、「神経個体レベルでの神経科学的問い」を解き明かすことも重要視されている。[S. Peron & K. Svoboda, Nat. Method (2011)]

しかしながら、現状「神経狙い撃ち制御を適用できるのは、例えばマウス脳(最深部 $\sim 5\text{mm}$)のごく表層に限定」されている。脳組織は光を激しく散乱させ、「 1mm 以上の脳深さに光の集束スポットを形成すること」が物理的に難しい。すなわち、組織透明化技術等を用いることなく、自然な状態のマウス脳深部にアクセスするためには、物理的制約である光散乱を克服することが必要不可欠になる。

2. 研究の目的

以上の背景から、「ガイドスター光波面整形」と「アップコンバージョンナノ粒子(UNP)注入による近赤外光照射」を融合させることで、動的な光散乱の影響を劇的に補償・低減可能にする光技術の確立を研究目的とした。ガイドスター光波面整形では、超音波ガイドスターによって変調された光の位相共役光を再生することで、多重散乱光が生体組織深部において集束される。また、近赤外光を可視光へ変換する UNP を対象となるマウス脳領域に予め注入しておくことで、近赤外レーザー光が使用可能になるため、マウス脳での光散乱回数を物理的に低減できる。

3. 研究の方法

(A)波面整形による光スポット生成に関する原理検証

多重散乱下において光スポットを形成可能にする波面解を求めるために、本研究では、散乱媒質の透過応答を測定する。原理検証として、すりガラスの透過応答を実験的に測定し、すりガラスを通した光スポットの形成を行う。

(B)マウス脳組織の散乱応答特性を模倣する疑似サンプルの作製

生きたマウス脳は、散乱応答特性をミリ秒スケールで時々刻々と変化させている。そこで、このような散乱特性を持つマウス脳を模倣する人工的な疑似サンプルを生成する。疑似サンプルにおける散乱応答変化の時定数は、グリセリンの温度によって調整する。また、疑似サンプルの散乱係数は、グリセリン中のポリスチレンビーズの密度によって調整する。

(C)ホールセルパッチクランプ法の実験系確立

提案光技術によって細胞活動を狙い撃ち操作できることを立証するためには、「細胞活動を計測する手法」も同時に確立しておく必要がある。そこで、本研究では、ガラスピペットを用いて、細胞膜内外で生じる電気的活動を直接測定するホールセルパッチクランプ法を確立させる。

(D)高速空間光変調器の開発

生きたマウス脳は、例えば波長 633nm のレーザー光の場合、サブミリ秒の散乱応答変化を示すことが知られている。そのため、マウス脳深部に光スポットを生成するためには、この動的なマウス脳が静かであると仮定できる僅かな時間の中で、透過応答 K の測定と最適波面解 E_{in}^{opt} の表示を完了させる必要がある。このような背景から、本研究では、「超高速空間光変調器」を基盤デバイスとして提案・開発する。さらに、開発する高速空間光変調器を基盤デバイスとして、波面解の測定・計算や波面解の表示を、ミリ秒スケールで繰り返し実行できるリアルタイム波面

整形システムを構築する。

(E)UNP を用いた近赤外光照射に関する原理検証

例えば光応答性膜タンパク質（ロドプシン）を発現した培養細胞と UNP を分散させたディッシュを用意する。また、培養細胞のディッシュ手前に研究方法（B）で作製するダイナミックな擬似サンプルを配置させる。このようなマウス脳を模倣する擬似的環境下において、波面整形システム（研究方法（A,D））によって、擬似サンプルを通して培養細胞周辺に近赤外光スポットを生成する。UNP によってこの近赤外光を可視光へ変換し、可視光を吸収する培養細胞に電流が流れることを研究方法（C）で確立するホールセルパッチクランプ法によって確認する。

以上の研究方法によって、光散乱の影響を劇的に補償・低減し、マウス脳深部への光スポット生成を可能にする基盤技術を確認させる。

4. 研究成果

(A)波面整形による光スポット生成に関する原理検証

(A-1) 最適波面解の測定・計算

媒質背後での「光集束」を実現するような光波面解 E_{in}^{opt} を求めるためには、まず入力光 E_{in} に対して散乱媒質がどのような透過光 E_{out} を出射するのかを推定可能にする透過応答 K が必要になる(図1(a)). この透過応答 K は、 A 個の入力直交アダマールパターン $H(h_1, \dots, h_a, \dots, h_A)$ に対するそれぞれの透過光 $K(k_1, \dots, k_a, \dots, k_A)$ を測定することで求められる。この透過応答 K によって入力光 E_{in} と出力光 E_{out} は数値的に関係付けられ($E_{out} = KE_{in}$), 所望の出力光 E_{out}^{des} を得るような最適波面解 E_{in}^{opt} もPC上で求めることができる($E_{in}^{opt} = K^{-1}E_{out}^{des}$). 図1(b)は、本実験で用いたすりガラスの透過応答 K の位相を示す。

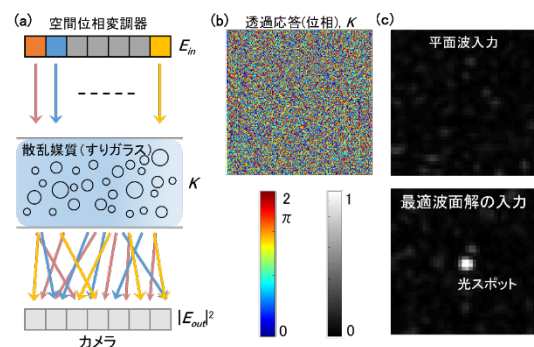


図1. 波面整形による光多重散乱の克服。(a)簡略化セットアップ。(b)256個のアダマール基を用いて測定した透過応答の位相成分 K 。(c)最適波面解 E_{in}^{opt} を入射光に与えることで、媒質背後で光スポットの生成が可能になる。

(A-2) 波面整形による媒質背後での光集束

散乱媒質（すりガラス）に平面波を入射する場合、散乱媒質背後のカメラ上では、ランダムな干渉の結果として、スペックル分布が観測される(図1(c), 上)。これに対して、光集束を実現するような光波面解 E_{in}^{opt} を空間光変調器に表示する場合、媒質からの透過光は、カメラ上で集束している様子が見て取れる(図1(c), 下)。以上の結果より、波面整形により散乱媒質を通して光スポットが生成できることを実験実証した。

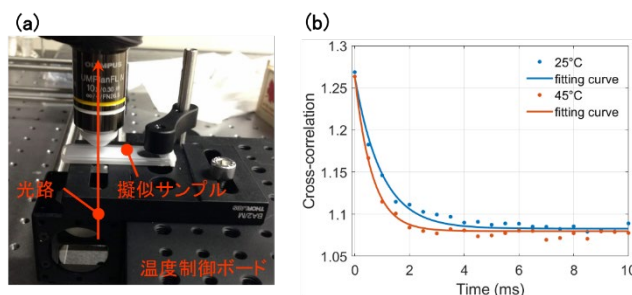


図2. (a)擬似サンプルの散乱応答を計測するためのセットアップ。擬似サンプルの温度を温度制御ボードによって調節することで、散乱応答速度がコントロール可能になる。(b)擬似サンプルにおける散乱応答。縦軸は、 $t=0$ でのスペックル強度分布 I_0 と各経過時間 t でのスペックル分布 I_t の相互相関を示す。25°Cの場合と比べ、45°Cの場合の方が相互相関値の減衰が速い。また、相互相関値の減衰時定数がおおよそ1msであり、マウス脳の散乱応答変化の速度とほぼ一致する。

(B)マウス脳組織の散乱応答変化を模倣する擬似サンプルの作製

脳組織が有する散乱応答(時間的変動の速度)や散乱係数(散乱の程度)を模倣する擬似サンプルを作製した。具体的には、グリセリンと直径 $1\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを混ぜ合わせた溶液を厚さ 5mm の石英セルに注入した。擬似サンプルの散乱係数は、ポリスチレンビーズの濃度を調整することでマウス脳組織の係数($\sigma_s=5\text{mm}^{-1}$)と同程度に設定した。また、温度制御機能付きのブレッドボード(PTC1/M, Thorlabs)上でサンプルの温度を調整し、グリセリンの

粘性をコントロールすることで、サンプルの散乱応答速度を脳組織の場合と同程度に設定した(図 2(a)). 以上のように設計した擬似サンプルは、生きたマウス脳が示すミリ秒レベルの散乱応答速度(~1ms)を再現した(図 2(b)).

(C)細胞の電気的活動を計測するホールセルパッチクランプ法の立ち上げ

八尾寛先生のご指導のもと、ホールセルパッチクランプ法の実験系を立ち上げた(図 3(a)-(b)). 図 3(c)は、一例として、青色光@480nm を照射して、アニオンチャンネルロドプシン 2(ACR2)を発現させた ND7/23 細胞に流れる膜

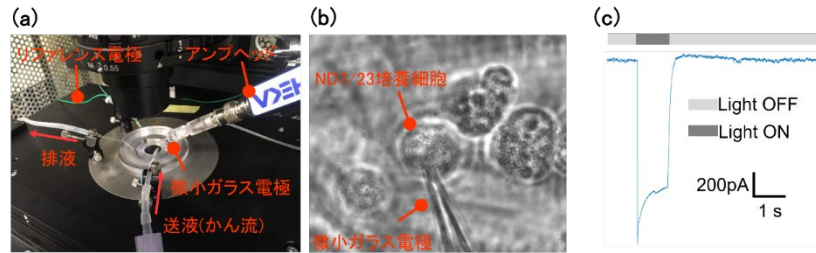


図3. (a)パッチクランプ法のセットアップ. 微小ガラス電極は、標的細胞へアプローチされ、細胞内と電氣的に導通する. リファレンス電極は細胞外液に浸され、細胞外液が基準電位とされる. 細胞外液をかん流するために、送液と排液のチューブを用意している. (b)ND7/23細胞にアプローチする微小ガラスピペット電極. 微小ガラス電極を細胞膜に吸着させ、陰圧を加えることで、細胞膜を破る. これによってガラスピペットと細胞のパッチクランプ状態が完成し、細胞の電気活動を計測する準備が整う. (c)ロドプシンACR2を発現するND7/23細胞にパッチクランプを行い、固定電位のもと膜電流を測定した結果. 光照射をONする間、1000pA以上の大きな膜電流が計測されている.

電流を電位固定で測定した結果になる.

(D)高速空間光変調器の開発

生きたマウス脳が示すサブミリ秒の散乱応答変化に対応するため、MHz クラスのフレームレートを有する世界最速の空間光変調手法(SLM)を開発した. 本手法のコンセプトを、図 4 に示す. シリンドリカルレンズによって一次元方向にのみ集光したラインビームを生成し、高速ミラースキャナー (ガルバノスキャナーや共振器スキャナー) によって、ラインビームを 2D-SLM 上を横方向へ高速走査する. 2D-SLM 上の各列に 1D 分布 $\phi\{\phi_1, \dots, \phi_N\}$ を予め表示しておくことで、高速走査されるラインビームに 1D 分布 ϕ を時系列に超高速変調できる. 一例として、12kHz で振動する共振器スキャナーと解像度 1920*1080 ピクセルの 2D-SLM を用いる場合、26MHz (24kHz*1080 列) のフレームレートと 1920 ピクセルの空間自由度を持つ一次元 SLM(1D-SLM) が得られる. 上記フレームレートは、あくまでも一例であり、4K(4096 × 2160 ピクセル)の 2D-SLM や 12kHz 以上の振動周波数を持つ共振器ミラ

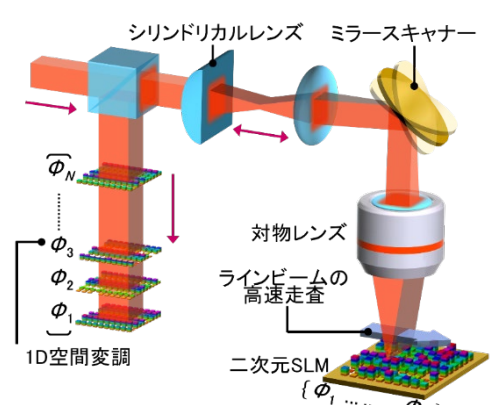


図4. 超高速空間光変調のコンセプト.

ラーあるいはポリゴンミラーを用いることで、本手法のフレームレートはさらなる向上が可能である.

本手法による MHz クラスのフレームレートを実証するために、スキャナーとして共振器スキャナーを用いた. 本実験では、散乱レンズの枠組みを使った光スポットの高速走査を通して、MHz クラスの超高速空間光変調を実証する. 本実験で用いる DMD の列数は 170, 共振器スキャナーは 12kHz で振動するため、本実験で達成できるフレームレートは単純計算で 4MHz となる. しかしながら、共振器スキャナーの運動速度は、原理上正弦波状に変化するため、本実験のフレームレートも同様正弦波状に変化する(図 5(a)). 従って、上記フレームレートはあくまでも時間平均した結果得られる値である. 本実験では、3 点の局所的なフレームレート (1MHz, 3MHz, 6MHz) を検証することで、本手法による超高速空間変調を実証するものとする. 光スポットの走査速度 (フレームレート) を示すためには、MHz スケールで走査される光スポットを個々に追跡・観察することが理想であるが、一般的な科学用カメラは MHz クラスのフレームレートを持ち合わせ

ていない. 代わりに本実験では, 露光時間 $1\mu\text{s}$ の極短露光モードを持つカメラ (acA1440-220um, Basler) を用い, 「露光時間 $1\mu\text{s}$ の間に生成される光スポットの数をカウント」することで, 光スポットの走査速度を大まかに見積もる. また, 予め 8 つの波面解を遺伝的アルゴリズムによって求め, それらの波面解を連続する DMD の各列に表示しておくことで, 8 つの異なる位置に光スポットが生成されるようにしている (図 5(c) および 5(d) における赤丸). 加えて, 光スポットが生成される順序はランダムに設定しており, これは光スポット走査における「ランダムアクセシビリティ」を示すためである.

図 5(c) に, 面方向の光スポット走査の結果を示す. ここで, カメラは光軸の垂線に対して平行に設置している (図 5(b) の上パネル). 1MHz のフレームレートでは, DMD の 2 列分が変調されるため, 8

つの位置の内, 2 つの位置で光スポットが観測されている. 同様に, 3MHz のフレームレートの場合, DMD の 4 列分

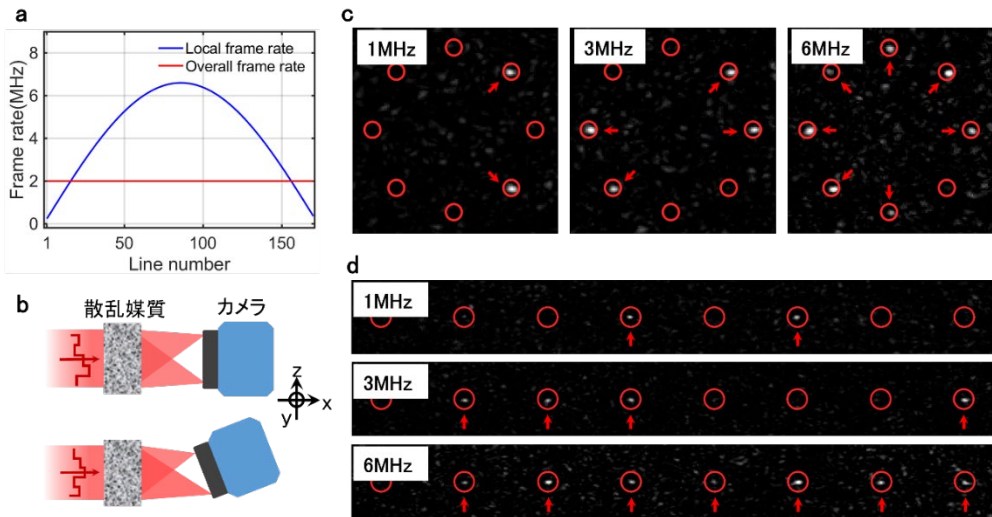


図5. 超高速空間光変調の実験実証. (a)共振器スキャナーを用いた場合の正弦波状に変化するフレームレート. (b)光スポット走査速度を実証するための光学系. 上パネル: 面方向への光スポット走査, 下パネル: 光軸方向への光スポット走査. (c)各フレームレートにおける露光時間 $1\mu\text{s}$ の間に面方向へ走査される光スポット. (d)各フレームレートにおける露光時間 $1\mu\text{s}$ の間に光軸方向へ走査される光スポット.

が変調されるため, 4 つの位置で光スポットが観測されている. 6MHz のフレームレートの場合も, 同様の結果が得られた. 一方, 図 5(d) に, 深さ方向 (z 方向) の光スポット走査の結果を示す. ここで, カメラを光軸の垂線に対して約 10 度傾けて設置することで, センサー面上での光スポット走査が深さ方向の光スポット走査に相当するように工夫している (図 5(b) の下パネル). 面方向における結果と同様, 1MHz のフレームレートでは 2 つの位置に, 3MHz のフレームレートでは 4 つの位置に, 6MHz のフレームレートでは 7 つの位置に, それぞれ光スポットが観測された. 以上の結果より, MHz クラスの速度で光スポットを三次元走査できることが示された. すなわち, 本手法は MHz クラスのフレームレートを有することが実験的に実証された.

開発した高速空間光変調器は, 高速波面整形システムの基盤デバイスになるだけでなく, 「超高速スペクトル整形」や「超高速 3D 光スポット走査」などにも応用が可能である. すなわち, 今後様々な分野に波及効果をもたらすシーズ技術を開発することができたと言える. 一方で, 「高速空間光変調器の開発に予想以上に時間を要したこと」や「コロナ禍における大学の閉鎖」等が影響し, 研究方法(E)「UNP 粒子を用いた近赤外光照射に関する原理検証」を遂行することができなかった. すなわち, 本来の研究計画を完遂することはできなかった一方, 当初想定していなかった大きな副産物として, 「超高速高速空間光変調器の開発」に成功した. 今後は, 当初の研究計画を引き続き遂行していく. 具体的には, 開発高速空間光変調器を基盤デバイスとした高速波面整形システムを構築し, その後, マウス脳深部での光スポット生成に挑戦していく.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kojima Keiichi, Shibukawa Atsushi, Sudo Yuki	4. 巻 59
2. 論文標題 The Unlimited Potential of Microbial Rhodopsins as Optical Tools	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 218 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.9b00768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibukawa Atsushi, Kojima Keiichi, Nakajima Yu, Nishimura Yosuke, Yoshizawa Susumu, Sudo Yuki	4. 巻 58
2. 論文標題 Photochemical Characterization of a New Heliorhodopsin from the Gram-Negative Eubacterium <i>Bellilinea caldifistulae</i> (BcHeR) and Comparison with Heliorhodopsin-48C12	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2934 ~ 2943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.9b00257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamanashi Taro, Maki Misayo, Kojima Keiichi, Shibukawa Atsushi, Tsukamoto Takashi, Chowdhury Srikanta, Yamanaka Akihiro, Takagi Shin, Sudo Yuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Quantitation of the neural silencing activity of anion channelrhodopsins in <i>Caenorhabditis elegans</i> and their applicability for long-term illumination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44308-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渋川 敦史, 小島 慧一, 須藤 雄気
2. 発表標題 Optical focusing and fluorescence imaging through a 2mm thick chicken slice by submillisecond wavefront shaping system
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------