

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15193

研究課題名（和文）2光子多平面同時記録とホログラフィック刺激システムの開発

研究課題名（英文）Multiplane two-photon holographic imaging and stimulation system

研究代表者

全 香玉（QUAN, XIANGYU）

神戸大学・システム情報学研究科・助教

研究者番号：40814778

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：2光子顕微鏡は生体の深部までイメージングを行う事で幅広く使われる。しかし、奥行きを含める撮影ボリュームと撮影スピードはトレードオフの関係性を持ち、膨大な脳機能を神経細胞レベルで解析することが難しい。本申請ではホログラフィック技術を適用した多平面同時スキャン、同時記録方法を実現して、生きたマウスの脳内500 μ m x 500 μ m x 300 μ mの撮影範囲内で30細胞を選択して100枚/秒の撮影スピードを実現した。本研究成果はホログラフィック光刺激方法と合わせて、学術論文（D. Kato, X. Quan et al., Jove, 2022）で発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は光遺伝学の発展とともに高次脳機能の働きを解明・治療する研究に強力なツールを提供する。提案手法では、光を使った神経細胞の制御、およびその反応をリアルタイムで計測可能とする。この研究成果は今まで行われたシングルセル解析と脳全体としての機能解析の空白を埋めることになり、さらなる神経科学の発見を促進するものと見られる。また、社会的には課題となる高齢化、認知症、精神疾患などを新たなツールを用いて接近することができ、QoLの高い長寿社会を実現することを目指す。

研究成果の概要（英文）：Two-photon microscopy is widely used in in-vivo imaging, due to its deep penetration depth. However, it is also problematic that the imaging volume and acquisition speed have trade-off relationship. It is difficult to image large volume of nerve cells with high speed. In this study, we proposed holographic method to realize multi-plane excitations and simultaneous recordings. In live mouse brain, we imaged 30 nerve cells with speed of 100 frames per second. Those excitation points are selected across 500 μ m x 500 μ m x 300 μ m volume underneath brain surface. This result is published academic journal(D. Kato, X. Quan et al., Jove, 2022).

研究分野：デジタルホログラフィ

キーワード：光学顕微鏡 デジタルホログラフィ 2光子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

高度な脳機能を解明する研究の一環として、光遺伝学が生まれました。この技術は特殊な遺伝子組み替え処理をした脳細胞に直接光を当てることによって、神経細胞を制御する事が出来る。しかしながら、光刺激中の反応を高速、かつ3次元的に計測する方法が課題と残る。市販の2光子顕微鏡では512×512ピクセルの領域をスキャンするのに0.2秒以上の時間がかかる。RAMP-3D AODでは音響光学偏向素子を用い200×200×200 μm^3 のボリューム内で14箇所の関心領域を指定し、52.8 Hzのイメージングスピードを達成した[1]。しかしながら、関心領域が増えると複数細胞の同時高速記録が出来ない。

2. 研究の目的

本研究は光刺激と多平面高速記録可能な2光子共焦点顕微鏡を開発することによって、脳神経回路の解明と再構築に向けた強力な光学的ツールを提供することを目的とする。

3. 研究の方法

提案手法では多平面同時記録においては位相型空間光変調器を用いてマルチフォーカス回折パターンを形成、2平面以上の関心領域に同時励起照射、同時記録を実現する。3次元光刺激においては、2光子吸収の面積を広げながら吸収効率を上げる為に刺激条件を定量化する。3次元刺激スポットからの蛍光信号は再び位相型空間光変調器に変調されて、2次元のイメージセンサー面にすべて集光することで、同時計測が可能となる。

4. 研究成果

a. ホログラフィック光刺激システムを構築、2光子顕微鏡に適用 [2]

本研究では1040nmの近赤外励起波長も用いて光刺激を行った。励起光の光路に位相型光変調を設置することで、波面変調を行った。その結果、面内分解能1.2 μm 、奥行分解能8.3 μm の光スポットをマウスの脳細胞に当てることによって、Ca²⁺反応を誘導させることができ

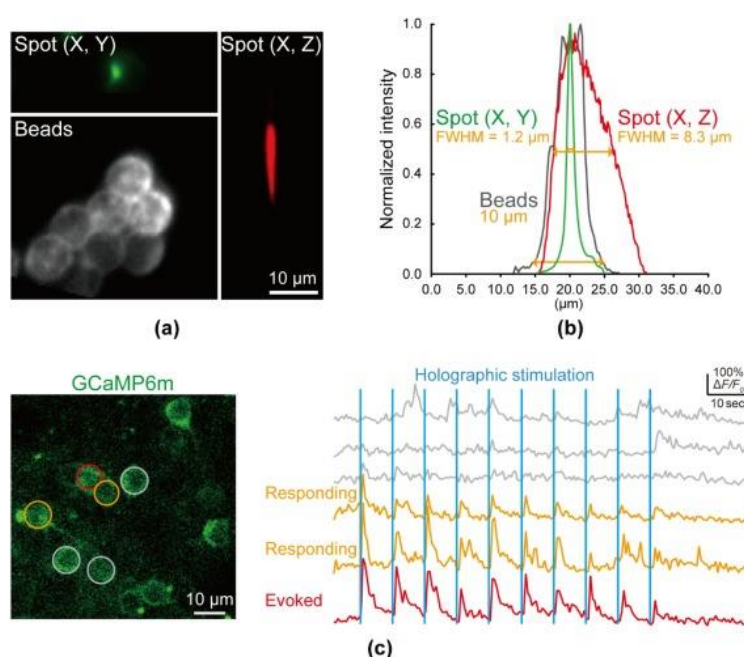


図 1. 光刺激スポットのサイズと、細胞に選択的に当てた際の Ca²⁺反応

た（図1）。記録はイメージセンサーを用い、シングル平面での Ca²⁺イメージングを行った。

b. マルチ平面同時イメージングを実現 [3]

本提案ではイメージング光路にも位相変調型空間光変調器を配置し、複数のレンズ効果を持つホログラム回折パターンを表示する。回折パターンと深さがマッチした画像は記録面に結像されピークを持つシグナルとなり、反対にマッチしない成分は広がり背景成分に加わる。狙った細胞の深さ情報によって回折パターンを設計し、すべての深さ方向で結像する画像を得ることに成功した（図2）。本提案手法を用いて、生きたマウスの脳を *In vivo* で撮影した。結果として大脳皮質の表面から深さ 300 μm の深さに2平面を指定して、500 μm x 500 μm の面積ないで30個の細胞を励起した。同時に冷却 CCD を用いて、100 枚/秒のスピードで神経細胞の Ca²⁺上昇反応を記録した。この結果を国際的学術会議“SPIE Biomedical Imaging and Sensing Conference”で発表した。また学術論文誌“*JoVE*”に採択された。

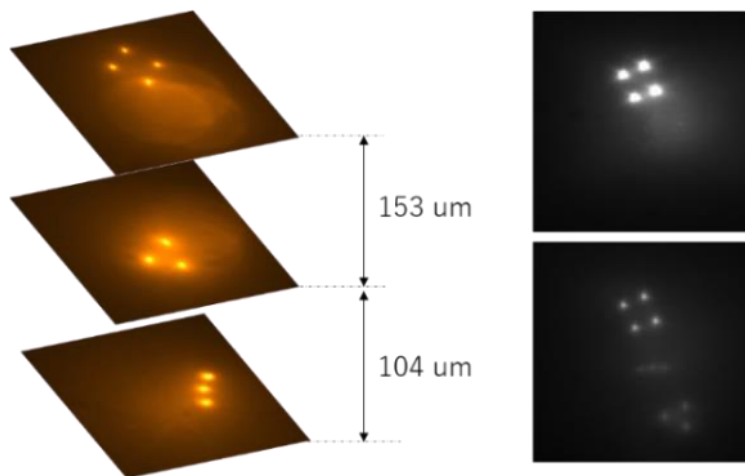


図 2. 左図は集光スポットの3次元的な分布；右図の上は通常の記録画像、下は回折パターンによって結像した結果を示す。

<引用文献>

- [1]. KMNS Nadella, et al. "Random-access scanning microscopy for 3D imaging in awake behaving animals." *Nature methods* 13.12 (2016): 1001-1004.
- [2]. X Quan, et al. "Holographic microscope and its biological application." *Neuroscience Research* 179 (2022): 57-64.
- [3]. D Kato, X Quan, et al. "Evaluation and Manipulation of Neural Activity using Two-Photon Holographic Microscopy." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 187 (2022): e64205.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Quan Xiangyu, Kato Daisuke, Daria Vincent, Matoba Osamu, Wake Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Holographic microscope and its biological application	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.10.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Xiangyu Quan, Manoj Kumar, Sudheesh K. Rajput, Yosuke Tamada, Yasuhiro Awatsuji, and Osamu Matoba	4. 巻 27
2. 論文標題 Multimodal microscopy: fast acquisition of quantitative phase and fluorescence imaging in 3D space	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/JSTQE.2020.3038403	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Xiangyu Quan
2. 発表標題 An alternative method to control and monitor neural activity in 2 photon imaging
3. 学会等名 第82回 応用物理学会秋季学術講演会 JSAP-OSA Joint Symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 全 香玉
2. 発表標題 デジタルホログラフィーを用いたマルチモーダルイメージングと光刺激システム
3. 学会等名 第15回物性科学領域横断研究会 (領域合同研究会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 全 香玉
2. 発表標題 2 光子顕微鏡を使ったホログラフィック光照明システムに関する研究
3. 学会等名 一般社団法人レーザー学会学術講演会第42回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2022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