

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26242082

研究課題名(和文) 新規レーザー技術を駆使した神経・分泌機能の *in vivo* 超解像イメージングの開発研究課題名(英文) *in vivo* super-resolution imaging by utilizing novel laser technologies

研究代表者

根本 知己 (Nemoto, Tomomi)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：50291084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000円

研究成果の概要(和文)：液晶デバイスを用いてベクトルビーム、光渦を発生させることに成功し、超解像顕微鏡である2光子STED顕微鏡を開発した。また新たに、多重染色画像に有用な励起アンミキシング法を開発した。また、補償光学によりマウス生体脳 *in vivo* 観察時の空間分解能の向上や神経線維の光破断に成功した。うつ病モデルマウス固定脳におけるスパイン形態においては、超解像顕微鏡法を用いることで初めて、共焦点顕微鏡では検出できない微細な変化を検出できた。加えて、超解像特性の数理的な解析から従来の2光子顕微鏡と比較して、試料の微細な構造をより明瞭に観測できることがわかり、ベクトルビームの優位性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We successfully generated vector beams, optical vortex by using liquid crystal devices and developed a super-resolution microscope, two-photon STED microscope. In addition, we developed an excitation wavelength unmixing method useful for multicolor staining specimens. For *in vivo* imaging of living mouse brains, adaptive optics improved spatial resolutions and enabled laser ablation of neural fibers. In the case of depression model mice, a super-resolution microscopy could demonstrate quite finer morphological changes of dendritic spines that had not detected by conventional confocal microscopy. Moreover, numerical analyses on super-resolution effects showed that microscopy using vector beams can observe finer structure in specimens clearly, suggesting a superiority of vector beams.

研究分野：生物物理学

 キーワード：2光子顕微鏡 超短光パルスレーザー ベクトルビーム バイオイメージング 神経科学 スパイン
超解像 光操作

1. 研究開始当初の背景

多光子顕微鏡は、近赤外域のフェムト秒レーザーを励起光源として用いることで生じる非線形光学過程を利用し、他の顕微鏡法では観察不可能な、インタクトな組織深部の分子細胞機構の観察を可能としてきた。現在、生物個体中で非侵襲的に細胞や生体分子の形態・機能の解析が可能なる方法論として最も期待される。研究代表者は、この方法論の黎明期より、その確立と生命科学への応用を先導し、神経細胞や分泌腺細胞において、開口放出、神経可塑性やイオンチャネル機能の可視化により、生理的条件下での機能解析の重要性を明らかにしてきた(Nature Cell Biol., 2001; Nature Neurosci., 2001; Science, 2002; EMBO J, 2006; Nature Methods, 2009; ProSONE, 2012 など)。特に、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇がトリガーする開口放出現象は、2013 年度のノーベル医学・生理学賞を見るまでも無く、シナプス前終末の神経化学伝達物質に加え、様々な内・外分泌腺や免疫、骨代謝などの多様な生命現象の基盤にあり、しかも組織を越えて共通の分子機械が用いられていると推定されていた。しかし、その分子機構自体は、観察技術の不足のため、その解明が遅れていた。最近、申請者は、多光子顕微鏡の生体組織への透過性、低侵襲性を最大限に利用し、麻酔下のマウス個体で、新皮質全層と海馬 CA1 ニューロンの“in vivo”イメージングに世界で初めて成功し、世界でトップの約 1.4 mm という深部到達性を実現し(上図, Sci. Rep. 2013, 読売新聞等マスコミ報道 5 件など)、さらに最近、海馬歯状回の可視化にも成功した(未発表データ)。一方、研究分担者との共同研究から、新規レーザー光源「ベクトルビーム」を用いた超解像イメージングを開発し、古典的な光の回折限界を打ち破ったナノイメージングの方途を拓いた(特願 2011-042763; Opt. Express, 2011; SPIE News, 2012; Microscopy, 2013)。本研究課題では、これらの自ら開拓してきた“in vivo”イメージングを展開させ、神経伝達、開口放出の分子機構の全容解明を進めると共に、脳神経回路の機能の創発原理を理解するための方法論を構築し、新たな「光・脳科学」を切り開くことを目指した。

2. 研究の目的

研究代表者は生きたマウス脳の世界最深の蛍光断層観察に成功し、世界に先駆けて海馬 CA1・歯状回ニューロンの“in vivo”ライブイメージングを可能としている。この“in vivo”多光子顕微鏡法を、新規レーザー技術や蛍光プローブによる超解像イメージング技術を融合する。これにより、「ありのまま」状態のままで、光を用いて局所神経回路機能から神経伝達、分泌・開口放出まで網羅的可視解析する機能イメージング法を確立する。最終的には、この“in vivo”超解像ニューロイメージング法を、脳機能の創発・作動原理

を解明するための方法論として確立し、我が国の技術の世界的優位性を失うこと無く、神経細胞と脳・神経回路機能の階層間を繋ぐ新しい「光・脳科学」を開拓することを目的とした。

3. 研究の方法

新たに高出力光源を“in vivo”多光子顕微鏡システムに導入することで、生体深部到達性を向上させ、マウス生体脳深部の“in vivo”イメージングを可能とすることとした。さらに新規モデルマウス、海馬の神経活動の“in vivo”可視化を実施することで、神経回路機能の創発原理の解明へとつなげることとした。さらに、ベクトルビーム超解像法により微細形態や開口放出分子機能のイメージングを推進することとした。最終的に、実際の脳内で分子から回路、機能単位へと統合化される神経情報伝達機構の包括的な理解するための多元的方法論を構築することを目指した。本研究課題の遂行は、北大グループと東北大グループとで分担するが、全体的な進捗の調整や成果取り纏めは研究代表者(北大グループ)が実施することとした。

4. 研究成果

(1) 高出力黄色 CW レーザー光を液晶デバイスを用いてベクトルビーム化することにより、トポロジカルチャージの異なるドーナツ状のビーム(光渦、角運動量 $m = -2, -1, +1, +2$) を発生することに成功した。そのベクトルビームの性状を解析し、さらに STED (Stimulated Emission Depletion; 誘導放出抑制) 用の光源として利用することで、既存の 2 光子励起顕微鏡システムを超解像顕微鏡(2 光子励起 STED 顕微鏡)に発展させた。その結果、焦点面内の空間分解能をおよそ 2 倍向上させることに成功した。さらに、多光子顕微鏡に安定してドーナツ状の STED 光を導光するように改善を引き続き実施する共に、STED 効果の高い有機系蛍光小分子および蛍光タンパク質をスクリーニングし、各々 3、2 種類を有力な候補として同定した。最も STED 効果が高かった分子(消光率 90%)では、空間分解能が約 33%

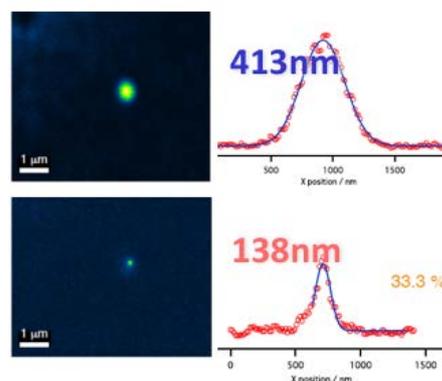


図1 微小ビーズを用いた超解像効果の測定。上は通常の2光子顕微鏡、下はSTED光を重畳させたもの。

に向上し、超解像効果の実現に成功した(図1)。

(2)一方、2光子励起用レーザー光源の点では、旧来のチタンサファイアレーザーのパルス幅の圧縮による蛍光シグナルの増強に成功すると共に、高出力の新規超短波パルス光源を導入し、マルチビームスキャン式の2光子励起顕微鏡の視野を拡大することに成功した。さらに高い時間分解能を生かしてマウス皮下血管内の血流の高速 *in vivo* イメージングに応用した。白色レーザー光源を用いた3次元ライブイメージングへの応用を検討し、励起光アンミキシングの多色イメージングにおける有用性を確認した。

(3)マウス生体脳の深部での光学特性を定量的に測定するための方法論の開発を進めた結果、マウス生体脳の深部観察において生じる空間分解能、蛍光強度の低下は励起レーザー光が生体組織を通過する際の球面収差の発生が支配的であることが明らかになった。その結果、対物レンズとカバーガラスの浸液の屈折率の補正が分解能の向上に効果的であることが判明した。そこで、液晶デバイスを用いたレーザー波面の操作による補償光学技術により球面収差補正を可能とし、光学ファントムや固定マウス脳サンプルの深部での蛍光シグナルと空間分解能の向上に成功した(図2)。さらに、コマ収差や非対称収差の補正を可能とする液晶デバイスの開発を実施した。傾けたゲル標本や円柱状ゲル標本における補償効果を確かめると共に、固定マウス全脳サンプルの太い血管直下での蛍光シグナルと空間分解能の向上に成功した。また新規ガラスナノ厚シートを用い、生体脳観察のためのオープンスカル法の改善を試みた。またマウス皮膚の基底細胞の *in vivo* イメージングと分裂軸の3次元解析を実施し新たな知見を得た。

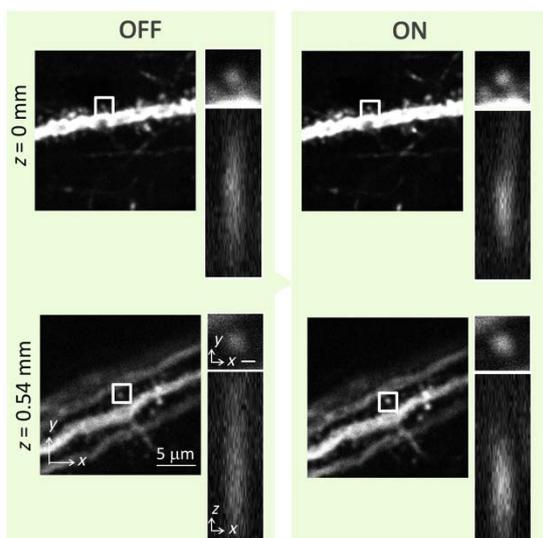


図2 球面収差補正効果

(4)うつ病モデルマウスにおいて、薬物投与が樹状突起スパインの形態分布の変化について検討する系を確立した。超解像顕微鏡による観察方法を開発し、うつ病モデルマウス固定脳において、樹上突起スパインの形態変化について定量性の高い画像解析を実施した。その結果、スパイン形態の変化は、通常の共焦点顕微鏡の分解能以下のサイズの領域で発生しており、その差異は超解像顕微鏡法を用いることで初めて検出できることを明らかにした。

(5) これまでに達成している世界最深部の *in vivo* イメージングに対して、深部到達度を一層向上させることによって、海馬全層の *in vivo* イメージングを可能とする顕微鏡システムを実現するための、高出力レーザー光源の基盤技術の開発を進めた。基本的には Yb ドープ光ファイバー増幅器を用いるが、非線形効果によるパルス品質の低下を避けるために、コア径の大きな光ファイバーを選択した。また、イメージング時の信号ノイズとなる ASE (Amplified spontaneous emission) を低減するために、できるだけ seed 光の出力を高めるように努めた。これらの工夫により、連続波の状態でも 10W を超える出力を得ることができた。しかしながら、光ファイバー中で発生する複屈折によって、増幅中にビーム品質が低下する現象が無視できなくなるため、その対策を進めることとした。主に複屈折効果を低減することが必要なため、seed 光に対して波長板による位相補償を行うことによって、最終出力のビーム品質を改善する方法を考案・実施した。その結果、40W 以上の出力と 60%以上のスロープ効率が得られ、またビーム品質の低下も 10%未満に抑制することができた。

また、ベクトルビームによる超解像特性に関して、その点像分布関数およびそのフーリエ変換である光学伝達関数を数値計算によって求め、従来の顕微鏡法と比較検討した。図3に示すように、広視野顕微鏡での限界空間周波数が $\frac{1}{\lambda}$ であるのに対して、高次ラゲールガウスベクトルビームを用いる場合は、その倍の $\frac{2}{\lambda}$ となることがわかった。この値は、共焦点顕微鏡と同じであるものの、高い空間周波数領域でより高い伝達関数を持っており、高い空間分解能を示すことがわかった。また、このベクトルビームを2光子顕微鏡に応用した場合、3 を超えるような高い空間周波数領域でさらに高い伝達関数となることが明らかとなり、従来の2光子顕微鏡と比較して、試料の微細な構造をより明瞭に観測できることがわかり、ベクトルビームの優位性を示すことができた。

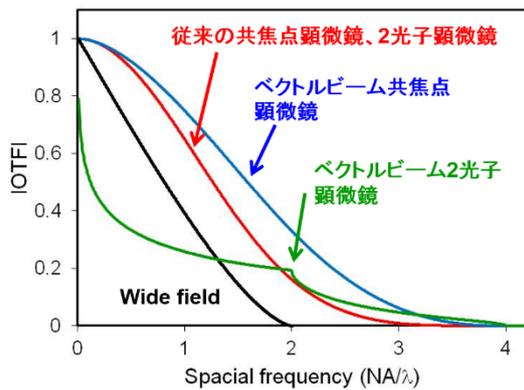


図3 ベクトルビームを用いた共焦点顕微鏡の光学伝達関数の計算結果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 32 件)

- ① Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, “Three-dimensional analysis of cell division orientation in epidermal basal layer using intravital two-photon microscopy”, PLoS One, vol. 11, No. 9, pp. e0163199-1 - e0163199-18, DOI: 10.1371/journal.pone.0163199)
- ② Masataka Kunii, Mica Ohara-Imaizumi, Noriko Takahashi, Masaki Kobayashi, Ryosuke Kawakami, Yasumitsu Kondoh, Takeshi Shimizu, Siro Simizu, Bangzhong Lin, Kazuto Nunomura, Kyota Aoyagi, Mitsuyo Ohno, Masaki Ohmuraya, Takashi Sato, Shin-ichiro Yoshimura, Ken Sato, Reiko Harada, Yoon-Jeong Kim, Hiroyuki Osada, Tomomi Nemoto, Haruo Kasai, Tadahiro Kitamura, Shinya Nagamatsu, and Akihiro Harada, “Opposing roles for SNAP23 in secretion in exocrine and endocrine pancreatic cells”, J. Cell Biol. (2016) vol. 215(1), pp. 121- 138, DOI: 10.1083/jcb.201604030
- ③ Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto, “Transmissive liquid crystal device for correcting primary coma aberration and astigmatism in biospecimen in two-photon excitation laser scanning microscopy”, J. Biomed. Opt. (2016) vol. 21, No. 12, 121503-1 - 121503-10, doi: 10.1117/1.JBO.21.12.121503
- ④ Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto, “Correcting

spherical aberrations in biospecimen using transmissive liquid crystal scanning device in two-photon excitation laser scanning microscopy”, J. Biomed. Opt. 20(10), 101204-1 - 101204-11 (2015). doi:10.1117/1.JBO.20.10.101204.

- ⑤ Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Takashi Murata, Hirotaka Watanabe, Ryosuke Kawakami, Hiroshi Nakayama, Mitsuyasu Hasebe, Tomomi Nemoto, “Multi-point scanning two-photon excitation microscopy utilising a high-peak-power 1042-nm laser”, Anal. Sci. (2015) Vol. 31, No. 4, pp. 307-31
- ⑥ Yuichi Kozawa and Shunichi Sato, Numerical analysis of resolution enhancement in laser scanning microscopy using a radially polarized beam, Optics Express, 23(3), 2076-2084 (2015)
- ⑦ Takumi Sato, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Transverse-mode selective laser operation by uncursal fast-scanning pumping, Optics Letters, 40(14), 3245-3248 (2015)
- ⑧ Susumu Segawa, Yuichi Kozawa, and Shunichi Sato, Demonstration of subtraction imaging in confocal microscopy with vector beams, Optics Letters, 39(15), 4529-4532 (2014)

他 24 件

[学会発表] (計 124 件)

- ① T. Nemoto, “Improvement of multi-photon microscopy by utilizing new optical technologies”, The 24th Congress of the International Commission for Optics (ICO24), Aug 21-25, Keio Plaza Hotel (東京都・新宿区)
- ② T. Nemoto, R. Kawakami, T. Hibi, K. Otomo, S. Ipponjima, K. Sawada, A. Tanabe, “Improvement of in vivo Two-Photon Microscopy by utilizing novel optical technologies”, CLEO PR, OECC & PGC 2017, Sands Expo and Convention Centre (Singapore, Singapore), 31 July - 4 August 2017
- ③ T. Nemoto, R. Kawakami, T. Hibi, A. Tanabe, “In vivo two-photon imaging of brain and neurons using a high-peakpower gain-switched laser diode and adaptive optics”, The 6th Advanced Lasers and Photon Sources (ALPS 2017), Apr. 19, 2017, Pacifico Yokohama (神奈川県・横浜市)
- ④ T. Nemoto, Three-dimensional observation in living specimens by multi-photon microscopy, Digital Holography & Information Photonics 2016

- (DHIP2016), 2016 Dec. 21, Sapporo convention center (北海道・札幌市)
- ⑤ T. Nemoto, R. Kawakami, T. Hibi, A. Tanabe, “Two-photon Microscopy improved by Adaptive optics and new laser technology”, 10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016), AIST (茨城県・つくば市), Nov. 24, 2016,
- ⑥ T. Nemoto and K. Otomo, “Novel multiphoton microscopy by manipulating parameters of laser light”, The 23rd Pacific Science Congress. Academia Sinica (Taipei, Taiwan), 2016 Jun 16
- ⑦ T. Nemoto, K. Otomo, “Improving “in vivo” two-photon microscopy imaging in living mouse brain”, Academia Sinica Imaging Center Workshop, Academia Sinica (Taipei, Taiwan), 2016 Jun 15
- ⑧ T. Nemoto, “Improvements and applications in “in vivo” multi-photon microscopy”, The 2nd Biomedical Imaging and Sensing Conference 2016 (BISC’16), 2016 May 18-20, Pacifico Yokohama (JAPAN)
- ⑨ T. Nemoto, R. Kawakami, T. Hibi, K. Otomo, S. Ipponjima, K. Sawada, A. Tanabe, “Intravital Light Microscopy Advanced by Novel Laser and Optical Technologies”, The Fourth Japan-China Symposium on Nanomedicine, May 12-13, 2016, Kitakyushu International Conference Center (福岡県・北九州市)
- ⑩ T. Nemoto, “Improvement of two-photon microscopy using a new optical technology”, THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015 (PACIFICHEM2015), Dec. 18, 2015, Mariotte Hotel (Honolulu, USA)
- ⑪ T. Nemoto, R. Kawakami, T. Hibi, K. Iijima, K. Otomo, “Improvement of Two-photon Microscopy for Real Time 3D Imaging of Biological Specimens”, 9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015), Mie Univ., Tsu, Mie, 2015 Dec 11
- ⑫ K. Otomo, T. Nemoto, “Improvement of two-photon excitation microscopy for biological specimens by utilizing novel technologies”, RIES-RCAS Workshop, Interdisciplinary Research Building for Science and Technology, Academia Sinica (Taipei, Taiwan), Nov. 24 (Tue), 2015
- ⑬ R. Kawakami, K. Otomo, T. Hibi, K. Iijima, *T. Nemoto, “Two-photon Microscopy with New Optical Technologies for Brain Research”, The 3rd China-Japan Symposium on Nanomedicine, Institute of Basic

Medical Sciences, Chinese Academy of Medical, Sciences & Peking Union Medical College (Beijin, China), Jun 20, 2015

他 111 件

〔図書〕 (計 5 件)

- ① Ryosuke Kawakami and Tomomi Nemoto, In vivo imaging of all cortical layers and hippocampal, CA1 pyramidal cells by two-photon excitation microscopy, Advanced Optical Methods for Brain Imaging, Nature Springer, 2017
- ② 根本知己、大友康平、日比輝正、一本嶋佐理「透過型液晶デバイスを用いたレーザー走査型顕微鏡の超解像化」、(岡田康志編)「実験医学別冊「初めてでもできる超解像イメージング」総ページ数 308, 羊土社, pp. 235-241、2016 年 7 月 1 日
- ③ Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Sari Ipponjima, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, “Super-resolution two-photon excitation microscopy utilizing transmissive liquid crystal devices”, in Alberto Diapro and Marc A. M. J. van Zandvoort (eds.), Super-resolution imaging in medicine and biology, Taylor & Francis Books, inc., Chapter 10, pp: 189-214, 2016 年 11 月 9 日、総ページ数 426
- ④ 根本知己、日比輝正、川上良介「2 光子蛍光イメージング」(2015)、「発光の事典 — 基礎からイメージングまで—」(木下修一・太田信廣・永井健治・南不二雄(共編)) 第 7. 3. 2 節, pp: 630-636. 朝倉書店(東京) A5/788 ページ/2015 年 09 月 20 日、ISBN978-4-254-10262-8
- ⑤ 根本知己、日比輝正、川上良介「生体光イメージングや光学顕微鏡で用いられる原理・装置—最新の光学顕微鏡法を中心に—」、(石井編)『生体イメージング研究 update』南山堂(東京)(2014) pp. 9-19、12 月 15 日

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：照明装置及び照明光生成方法
 発明者：田辺綾乃、橋本信幸、根本知己、日比輝正、大友康平、小澤祐市
 権利者：シチズンホールディングス(株)
 種類：特許
 番号：特願 2016-023924
 出願年月日：2016 年 2 月 10 日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：顕微鏡装置
 発明者：佐藤俊一、小澤祐市、横山弘之、根

本知己、日比輝正、橋本信幸、栗原誠
権利者：科学技術振興機構、シチズンホールディングス株式会社
種類：特許
番号：5599184
取得年月日：2014年8月22日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

<https://www.es.hokudai.ac.jp/labo/mcb/>

- ① 出張授業「脳の不思議・心の謎」北海道立札幌南高校 2016年10月27日
- ② 出張授業「脳の不思議・心の謎」北海道立札幌北高校 2015年9月25日
- ③ “The Science Of Thick Skin”, Asian Scientist, 03-Nov-2016,
<http://www.asianscientist.com/2016/11/in-the-lab/3d-imaging-skin-thickness-body/>
- ④ “Why is skin thick on the soles of the feet?”, ResearchSEA,
http://www.researchsea.com/html/article.php/aid/10117/cid/3/research/medicine/hokkaido_university/why_is_skin_thick_on_the_soles_of_the_feet_.html, 2016年10月18日
- ⑤ “Why is skin thick on the soles of the feet?”, Phys.org,
<http://phys.org/news/2016-10-skin-thick-soles-feet.html>, 2016年10月18日
- ⑥ “Why is skin thick on the soles of the feet?”, e! Science,
Newshttp://esciencenews.com/sources/physorg/2016/10/18/why_skin_thick_sole_s_feet, 2016年10月18日
- ⑦ インスリン分泌の阻害機序解明-糖尿病治療、新薬開発に期待 北海道医療新聞 2016年10月21日
- ⑧ “Why is skin thick on the soles of the feet?” “AlphaGalileo”
<http://www.alphagalileo.org/ViewItem.aspx?ItemId=169077&CultureCode=en>
2016年10月18日
- ⑨ インスリン増加 物質特定 -阪大、北大 糖尿病治療に期待 北海道新聞 2016年10月4日
- ⑩ インスリン増やす物質特定 糖尿病治療に期待、大阪大 東京新聞-2016/10/03
- ⑪ 「仕事遅い分子」がインスリン分泌抑制 阪大など発見 朝日新聞-2016/10/03
- ⑫ インスリン増やす物質特定 阪大チーム、マウス実験で 日本経済新聞-2016/10/05
- ⑬ 細胞膜のタンパク質がインスリン分泌を阻害、糖尿病新薬の可能性 大学ジャーナルオンライン -2016/10/06
- ⑭ インスリン増やす物質特定 長崎新聞 -2016/10/03
- ⑮ SPIE ジャパンニュースにおいて、田辺らの論文 J. Biomed. Opt. 20(10), 101204

(Aug 05, 2015).

doi:10.1117/1.JBO.20.10.101204 が紹介された。2016年9月1日

- ⑯ 北海道大学情報科学研究科ネットジャーナル「生体内組織の深部を高分解能で観察 -光・脳科学、光・細胞生理学の新しい研究領域を開拓」 2015年12月11日
- ⑰ 日経テクノロジーオンライン、「非侵襲で海馬を観察、生体深部の高解像イメージング技術」 2015年11月27日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本知己 (NEMOTO, Tomomi)
北海道大学・電子科学研究所・教授
研究者番号：50291084

(2) 研究分担者

佐藤俊一 (SATO, Shunichi)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号：30162431

川上良介 (KAWAKAMI, Ryosuke)
北海道大学・電子科学研究所・助教
研究者番号：40508818

大友康平 (SATO, Shunichi)
北海道大学・電子科学研究所・助教
研究者番号：40547204

日比輝正 (HIBI, Terumasa)
北海道大学・電子科学研究所・助教
研究者番号：50554292

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()