

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
研究開発課題名		新規半導体レーザー光源を用いた超解像多光子励起顕微鏡法の開発
機関名		国立大学法人北海道大学
研究開発	所属 役職	電子科学研究所 教授
担当者	氏名	根本 知己

2. 研究開発成果の内容

①超解像イメージング技術の開発

CW 式 STED 多光子顕微鏡システムのパフォーマンスを指標にして、新規レーザーを用いた式 STED 多光子顕微鏡システムの構築とその性能の実証試験を実施した。国立大学法人東北大学（東北大学）の開発した多光子励起用レーザー及び STED レーザーを移設し、光学ファントムを用いて STED 効果の実証試験を実施した。まず STED レーザー、多光子励起レーザー光の長期安定性について実証試験を実施し十分な安定性を確認した。またスペクトル形状や、パルス形状についても東北大学でのスペックの再現性を確認した。さらに、実際の生物用光学顕微鏡に導入し、対物レンズ後の標本位置に多光子励起用のレーザーパルスと STED 用のレーザー光との間の遅延時間を精密に制御可能であることを確認した。その結果、光学ファントムを用いて STED 効果やそのパルス間遅延時間依存性を定量的に測定することに成功し、開発目標としていたパルス型 STED 法の有効性を確認し 70%以上の消光効果を得ることが出来た。

また、新たに PS、PO からのアドバイスに従い、蛍光物質の光物性の網羅的な検討を開始した。特に、文献調査の結果や他研究者からの蛍光物質の提供を受けて、新規開発した多光子励起用レーザー及び STED レーザーの組み合わせで STED 効果の顕著な物質を探索し、2 光子吸収効率や光安定性を検証した。

②超深部イメージング技術の開発

生体脳深部到達性について基本特性を検証し、マウス生体脳を用いた実証試験を開始した。特に、平成 26 年度に開発した生体脳深部でのレーザー集光の解析法を用いて、さまざまな条件下でのレーザーの集光特性を検討した。その結果、光学パラメータの網羅的な検索から深部到達性の向上や空間分解能の向上に資する浸液の屈折率やビーム径などの最適化を図った。この集光特性の向上から世界で初めて 500 マクロメートル深部での神経繊維の破断に成功すると共に、その経時変化を生体脳中で長時間に渡って追跡すること可能とした。さらに深さ依存的な照査時間についても網羅的に検討をした。一方、透過型液晶デバイスを用いたレーザー波面操作が極めて有効であることを実証し、査読付国際会議や原著論文で発表した。さらに高次の収差補正についても検討を開始した。さらに東北大学の開発した多光子励起用レーザーと、これらの成果を組み合わせることで、海馬 CA1 領域で海馬神経細胞の *in vivo* イメージングに成功し

た。次に、皮質・海馬での *in vivo* Ca²⁺イメージングのため、モデル動物として他の革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト参画のグループで開発されたCa²⁺センサー蛍光タンパク質を発現するモデル動物を導入した。

③プロジェクトの総合的推進

分担機関である東北大学との円滑な連携のためグループミーティングを7回実施した。また脳プロや他個別技術開発との連携のために研究情報の交換と打ち合わせを実施した。