

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies
(Brain/MINDS)

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Multi-photon super-resolution microscopy utilizing a novel
semiconductor laser based light source

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人北海道大学 電子科学研究所 教授 根本 知己
所属 役職 氏名： (英語) Research Institute for Electronic Science Hokkaido University,
Tomomi Nemoto, Professor

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 超解像多光子励起顕微鏡法のための高機能半導体レーザー光源の開発
開発課題名： (英語) Development of pulse laser light sources for multi-photon-excitation
STED microscopy

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 未来科学技術共同研究センター 教授 横山弘之
所属 役職 氏名： (英語) New Industry Creation Hatchery Center Tohoku University, Hiroyuki
YOKOYAMA, Professor

II. 成果の概要 (総括研究報告)

昨年度、北海道大学に移設された研究分担機関である東北大学の開発した多光子励起用レーザー及び STED レーザーについて光学ファントムを用いた超解像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。さらに、既設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おいて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ナノ秒精度で精密に制御可能であることを確認した。その結果、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、パルス型 STED 法の有効性を確認した。そこで、多種

の蛍光色素分子・蛍光タンパク質について、新規開発したレーザー光源装置によって最適な STED が観察されるものを網羅的に探索した。その結果、開発新規光源を用いた2光子 STED 顕微鏡に対して最も有効な色素や蛍光タンパク質の候補を決定できた。

また、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引き続き実施した。特に、開発したレーザー集光の解析法を用いて、さまざまな条件下で生体脳深部でのレーザーの集光特性を検討した。その結果、我々は世界で初めて生体脳中で 500 マクロメータ深部での神経繊維の破断に成功すると共に、その経時変化を長時間に渡って追跡することを可能とした。さらに我々は破断に必要なレーザー照射時間とその深さ依存性についても網羅的に検討をした。また、生体脳内における破断の影響を評価するために、新しい系統を確立し、アストロサイトの実時間 *in vivo* Ca²⁺イメージングを実施した。一方、透過型液晶デバイスを用いたレーザー波面操作が深部観察には極めて有効であることを実証した。特に本年度は、コマ収差や非点収差の補正についても有効な液晶デバイスを完成させた。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 領域や大脳新皮質 V 層で神経細胞活動の *in vivo* イメージングに成功した。

研究分担機関である東北大学では高性能半導体レーザーとその高速制御技術をベースとすることで、高安定な動作の電氣的制御が可能なパルスレーザー光源開発において世界屈指の高い技術を保有している。この技術基盤のもと、励起用近赤外パルスレーザー、および赤色光を主とする STED 用パルスレーザーの開発を進めて、この2つの半導体レーザー光源の同期動作を精密に制御することができた。それにより代表機関である北海道大学において2光子励起によるマウス脳の深部イメージング機能とともに赤色 STED 光パルスによる超解像効果を確認するに至った。また、この2つの半導体レーザー光源の同期動作を精密に制御するための機能を、光源システムを構成する筐体の1つに組み込んだ。さらに、STED 用パルス光源として 650nm の赤色サブナノ秒光パルスを LD から直接発生する光パルスに比して強度を1桁増大させる方策を検討しその実現を図った。その方法は、1300nm のサブナノ秒光パルスを半導体レーザーで得た後に光増幅して SHG 変換を行うというものである。これにより、狙い通りの STED 光パルスを得ることができた。

New laser light sources developed in Tohoku University for multi-photon excitation and STED have been reinstalled in Hokkaido University last fiscal year. Verification tests of these light sources using optical phantoms were then carried out for the evaluation of the super-resolution: First, the long-term stability of both multi-photon excitation and STED laser light sources were examined and verified. Next, after the light sources were combined to the biological light microscopy existing, we verified such the performance that the delay time between the STED laser pulse and the multiphoton excitation pulse was precisely controllable at the focal plane at a sub-nano second level. This function enabled us to measure STED effects and their delay-time dependencies quantitatively, which was

thought to be one of superiorities of the pulsed STED method proposed in the project. Next, we searched for fluorescent dyes or fluorescent proteins exhibiting superior STED effects comprehensively. Finally, we determined several superior candidates of fluorescent dyes and fluorescent proteins for two-photon STED microscopy utilizing these newly-developed semi-conductor based laser light sources.

On the other hand, we continuously examined fundamental properties related to penetration depth in living brains were examined. By using the methods developed in this project, we analyzed laser focal properties in living mouse brains under various conditions. As a result, we have successfully severed neural fibers in living mouse brains at ~500 micrometer depth from the brain surface at most, and observed events occurring after serving for a long time. We also examined the laser illumination time required for severing a neural fiber and its depth dependency comprehensively. For visualizing events and effects occurring after such ablations in living mouse brains, and performed real-time *in vivo* Ca²⁺ imaging of astrocytes within deeper layers in the living mouse brain. On the other hand, we showed that the wavefront manipulation of the excitation laser beam was considerably effective for deep observations. Indeed, we constructed new useful liquid crystal devices compensating for coma, or astigmatism. Finally, by combining these techniques and the multiphoton excitation laser source newly developed in Tohoku University, we succeeded in *in vivo* imaging of neural activities both in the hippocampal CA1 and the neocortical layer V areas.

Tohoku University has a world-top-class technology for developing electrically controllable laser light sources with high stability of operation. On the basis of this technology, we developed near-infrared pulse laser for multiphoton excitation and red pulse laser for STED, and successfully controlled synchronized operations of these two semi-conductor baser lasers. In Hokkaido University, we confirmed that this laser system was implemented such the function required for two-photon deep imaging of mouse brain as well as for inducing super-resolution effects by red STED light pulses. We next packed the function for controlling such synchronized operations into the single box consisting of the light source system. Moreover, we examined and tried to realize an idea to increase the laser power of the 650nm red sub-second light pulses by one order of magnitude compared to the direct emission from LD. The basic idea was to obtain SHG signals from 1300 nm sub-nano second light pulses generated by LD. We thus realized STED light pulses successfully as expected.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4件、国際誌 3件)

- ① S. Ipponjima, T. Hibi, T. Nemoto, Three-dimensional analysis of cell division orientation in epidermal basal layer using intravital two-photon microscopy, PLoS One, vol. 11, e0163199-1 - e0163199-18
- ② A. Tanabe, T. Hibi, S. Ipponji, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. 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, 121503-1 - 121503-10
- ③ 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、235-241, 総ページ数 426

- ④ 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, 189-214
- ⑤ 大友康平、根本知己、In vivo ナノ構造の可視化のための二光子顕微鏡法の超解像化、レーザー研究 vol. 44, 658-661
- ⑥ 川上良介、根本知己、2 光子励起蛍光を用いた脳の深部イメージング、月刊オプトロニクス、vol. 35, 59-63
- ⑦ 川上良介、山口和志、根本知己、脳神経機能解明のための新規レーザー顕微鏡による生体脳深部のイメージング・光操作、光アライアンス、vol. 27, 1-4

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. In vivo two-photon imaging of brain and neurons using a high-peakpower gain-switched laser diode and adaptive optics, Tomomi Nemoto, Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Ayano Tanabe, The 6th Advanced Lasers and Photon Sources (ALPS 2017), 2017/4/19, 国内
2. Novel multiphoton microscopy by manipulating parameters of laser light, T. Nemoto and K.Otomo, The 23rd Pacific Science Congress. Academia Sinica 2016/06/16, 国外
3. Improvements and applications in "in vivo" multi-photon microscopy, Tomomi Nemoto, Biomedical Imaging and Sensing Conference 2016 (BISC'16), 2016 /5/20, 国内
4. Intravital Light Microscopy Advanced by Novel Laser and Optical Technologies, Tomomi Nemoto, Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Kohei Otomo, Sari Ipponjima, Kazuaki Sawada, and Ayano Tanabe, The Fourth Japan-China Symposium on Nanomedicine, 2016/5/12, 国内
5. 新しい技術の導入による二光子励起蛍光顕微鏡の高度化、大友康平、川上良介、根本知己、量子科学技術研究開発機構セミナー、2016/6/2、国内
6. Three-dimensional observation in living specimens by multi-photon microscopy, Tomomi Nemoto, Digital Holography & Information Photonics 2016 (DHIP2016), 2016/12/21, 国内
7. Two-photon Microscopy improved by Adaptive optics and new laser technology, T. Nemoto, R. Kawakami, T. Hibi, A. Tanabe, 10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016), 2016/11/24, 国内
8. High speed imaging for green fluorescent proteins by utilizing multi-point scanning two-photon microscopy, Kohei Otomo, Ai Goto, Yumi Yamanaka, Hiroshi Nakayama, Takashi Hori, Tomomi Nemoto, Focus on Microscopy 2017 (FOM2017), 2017/04/09, 国外
9. Correcting wavefront aberration using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy, Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto. Digital Holography & Information Photonics 2016 (DHIP2016), 2016 /12/21, 国内
10. Generation of sub-nanosecond 650-nm optical pulses having a peak-power of over 10 W at 1-MHz repetition-rate based on semiconductor laser diodes Jui-Hung Hung, Yi-Cheng Fang, Tomomi Nemoto, Shunichi Sato, Lung-Han Peng, Hiroyuki Yokoyama, Optics & Photonics Taiwan, the International Conference (OPTIC

2016), 2016/12/03-05, 国外

11. 多光子過程を用いた in vivo イメージングの展開, 根本知己, 第 69 回日本細胞生物学会大会, 2017/6/13, 国内
12. 新規レーザー光技術の活用による生体非線形イメージングの高度化, 根本知己, ナノ学会第 15 回大会, 2017/5/10, 国内
13. 新規レーザー技術を用いた 2 光子顕微鏡の改良と生体観察応用, 根本知己, レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会, 2017/01/08
透過型液晶デバイスを用いた 2 光子顕微鏡の超解像化, 根本知己, 第 89 回日本生化学会大会 2016/09/27, 国内
14. 新規光技術を用いた多光子顕微鏡による生体イメージング, 根本知己, 第 35 回日本医用画像工学会大会, 2016/7/23, 国内
15. Correcting spherical aberration using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy, Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto, 第 39 回日本神経科学学会大会, 2016/7/20-22, 国内
16. 多光子励起顕微鏡法による生理機能の in vivo 可視化, 根本知己, 量子生命科学セミナー, 2017/3/21, 国内
17. レーザー走査型蛍光顕微鏡における透過型液晶デバイスを用いた波面収差補正, 田辺綾乃, 日比輝正, 一本嶋佐理, 松本健志, 横山正史, 栗原誠, 橋本信幸, 根本知己, 第 11 回 NIBB バイオイメージングフォーラム「光学と生物学の融合によって切り拓く新しいバイオイメージング」, 2017/2/1, 国内
18. 新規レーザー光技術を用いた多光子顕微鏡と生理機能の可視化, 根本知己, 日本顕微鏡学会先端光学顕微鏡分科会ワークショップ「先端光学顕微鏡技術・プローブ技術の開発による生命現象の理解」, 2017/2/14, 国内
19. in vivo 多光子顕微鏡の高解像化・超解像化, 根本知己, 次世代脳シンポジウム, 2016/12/20, 国内
20. 脳神経科学に向けた in vivo 2 光子顕微鏡法の改良, 川上良介, 根本知己, 第 5 回ニューロフォトンクス研究会 (レーザー学会第 498 回研究会), 2016/11/19, 国内
21. 二光子顕微鏡法の高解像化, 高速化, 大友康平, 根本知己, 第四回アライアンス若手研究交流会, 2016/11/9, 国内
22. 新規レーザービームを用いた多光子顕微鏡の高度化と応用, 根本知己, 理研シンポジウム「第 4 回光量子工学研究」, 2016/10/31, 国内
23. 2 光子顕微鏡の機能向上による蛍光バイオイメージングの高度化, 大友康平, 東北大学 学際フロンティア研究所 主催 第一回フロンティアバイオイメージング研究会, 2016/7/20, 国内
24. 新規光学技術によるレーザー走査型顕微鏡の高度化と生物学応用, 大友康平, 生化学若手の会, 生物物理若手の会 合同企画 蛍光イメージングセミナー ～基礎から応用まで～, 2016/7/1, 国内
25. 新しい技術の導入による二光子励起蛍光顕微鏡の高度化, 大友康平, 川上良介, 根本知己, 量子科学技術研究開発機構セミナー, 2016/6/2, 国内
26. Generation of multi-nano-Joule 650 nm optical pulses based on a synchronously driven gain-switched 1300 nm laser diode, Jui-Hung Hung Yi-Cheng Fang, Tomomi Nemoto, Shunichi Sato, Lung-Han Peng, Hiroyuki Yokoyama, 第 77 回日本応用物理学会秋季学術講演会, 2016/9/13, 国内
27. トップハット型レーザービームを用いた多点走査型 2 光子顕微鏡の開発, 山中祐実, 日比輝正, 小

澤祐市、大友康平、田辺綾乃、橋本信幸、根本知己、日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会
2016/6/14, 国内

28. 多点走査型二光子顕微鏡の技術開発と生物学応用、大友康平、山中祐実、後藤亜衣、渡邊裕貴、根本知己、第 2 回北大・部局横断シンポジウム

2017/3/14, 国内

29. in vivo 2 光子顕微鏡法を用いたマウス生体脳深部における単一神経線維破断、山口和志、川上良介、根本知己、第 2 回北大・部局横断シンポジウム, 2016/3/14, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

出張授業「脳の不思議、心の謎」、北海道立札幌南高等学校 2016/10/27

(4) 特許出願

無し