脳活動への自在なアクセスを可能にする次世代ミニスコープの開発

Development of a Next-Generation Miniscope for Flexible Access to Brain Activity

M21助自108

代表研究者 三上秀治 北海道大学 電子科学研究所 教授
Hideharu Mikami Professor, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University

Neuropsychiatry in the 21st century has made great progress thanks to techniques for observing and manipulating brain activity in higher organisms such as mice and monkeys at the neuron level. In particular, in recent years, compact fluorescence microscopes (miniscopes) have attracted attention as tools of acquiring neural activity in animals during behavior. However, the miniscopes that have been developed so far have focused so much on miniaturization that their basic performance has been overlooked. Therefore, this study aims to develop a next-generation miniscope toward higher functionality. To this end, we propose a new optical control concept based on two-photon microscopy that simultaneously controls the optical head and the remote-control unit, which are connected by an optical fiber bundle. Based on this concept, this study focused on the verification of elemental technologies to improve the performance of the miniscope. Specifically, we evaluated the characteristics of high-speed, high-degree-of-freedom optical modulation in the remote-control unit and the fiber bundle, and obtained the following results: (i) Real-time closed-loop operation of optical observation and manipulation with a time constant of about 100 ms was demonstrated. (ii) It was confirmed that two-photon fluorescence could be obtained through the fiber bundle. Since these results confirm the validity of the concept of this study, we will further optimize the light irradiation conditions and consider compact implementation in the future.

研究目的

21世紀の脳神経医学は、マウスやサルなどの高等生物の脳活動を神経細胞レベルで観察・操作する技術により大きな進展を遂げた。特に近年、行動中の動物の神経活動を取得する手段として、小型蛍光顕微鏡(ミニスコープ)が注目されている。ミニスコープは動物の頭部に小型(～1cm³)、軽量(数g)の顕微鏡ヘッドを取り付け、電線と光ファイバーにより外部装置と電気・光信号の送受信を行うものである。動物の自然な行動を制約することなく脳活動の

観察を可能とする画期的なツールであり、脳神経医学の強力なツールとして広まりつつある。

しかしながら、現状のミニスコープは視野や速度などの撮像性能において従来の固定型の蛍光顕微鏡に比べて大きく劣っているほか、光操作のための投射光学系が実装されていないなど、脳活動へのアクセスの自由度が著しく制限されている。このことは、脳神経医学の進展のボトルネックとなるものであり、早急に解決すべき喫緊の課題である。

そこで本研究では、従来のミニスコープ開発のコンセプトを覆し、高機能化に舵を切った次

世代ミニスコープの開発を行う。具体的には、空間選択性の高い二光子顕微鏡をベースとし、観察のみならず光操作のための刺激光導入も可能とする世界初のミニスコープを開発する。

概 要

21世紀の脳神経医学は、マウスやサルなどの高等生物の脳活動を神経細胞レベルで観察・操作する技術により大きな進展を遂げた。このような技術は神経活動を光学的に観察・操作が可能な蛍光タンパク質・光応答性タンパク質の作成技術と、これらのタンパク質を発現した神経細胞の個々の活動にアクセス(すなわち計測・操作)する光・エレクトロニクス技術が両輪となって発達してきたものであり、今後もさらなる進展が期待される。特に近年、行動中の動物の神経活動を取得する手段として、小型蛍光顕微鏡(ミニスコープ)が注目されており、動物の自然な行動を制約することなく脳活動の観察が可能なツールとして広く使われている。しかしながら、これまで開発されたミニスコープは、小型化に重点を置くあまり、顕微鏡としての基本性能が蔑ろにされてきた。そこで本研究では、従来のミニスコープ開発のコンセプトを覆し、高機能化に舵を切った次世代ミニスコープの開発を行う。具体的には、空間選択性の高い二光子顕微鏡をベースとし、対象動物に取り付けるヘッド部の光制御(主に光走査)と、ヘッド部と光ファイバーバンドルで接続されるリモート制御部の光制御を一体駆動する新しい光制御コンセプトを導入する。本研究では本コンセプトに基づき、ミニスコープの高性能化のための要素技術検証に焦点を当てて検討を行った。

空間光変調器による高速・高自由度光制御：本提案のリモート制御部における光制御の具体的方式として高速空間光変調器を用いた計

算機プログラムを採用し、高速な光パターン形成の基本特性を評価するとともに、光観察と光操作を同時に行う際の高度光制御方式のひとつとして想定される閉ループ動作の検証を行った。まず、空間光変調器システム全体の正味の応答時間(変調器への変調パターンを印加する命令を送り始めてから実際に変調器に所望のパターンが形成されるまでの時間)を計測し、正味の応答時間が4.5 ms - 7msであることを確認した。また、簡易的な閉ループ光学系を構築し、閉ループ時定数を計測した。1 μm のポリスチレンビーズを電動ステージで動かしながら明視野像で取得し、ビーズの傍にレーザー光が集光されるよう空間光変調器を駆動する動作を行い、ループ時定数が撮像視野の大小によりおよそ100 ms - 160 ms程度であることが確認された。

ファイバーバンドルによる励起光導波特性の評価：市販のイメージガイド用のファイバーバンドルに対し、それぞれの二光子励起用フェムト秒レーザー光の導波特性を評価することとした。まず、ファイバーバンドル伝搬後のビームプロファイルの評価を行い、ファイバー出射端における半値全幅が2.7 μm となることが確認された。これはヘッド部の想定結像倍率0.4倍における試料上のスポットサイズ1.1 μm に相当し、神経細胞のイメージングには十分な分解能が得られる見込みを得た。他方で周辺のコアに光が漏洩するクロストーク成分も観察されたが、クロストーク成分の蛍光信号に対する寄与はほとんど無視できる程度に小さいことが確認された。ただし、ファイバーバンドルの種類によっては無視できない程度のクロストークが生じる場合もあり、適切なファイバーバンドルの選定が必要である。さらに、時間領域でのパルス幅を評価したところ、光ファイバーバンドルの出射端においておよそ400 fsとなり、

光源のパルス幅150 fsよりも広がっていることが確認された。これはファイバーバンドル中における非線形光学効果の一種である自己位相変調によるスペクトル狭窄化が主な原因であり、補助的にシングルモードファイバーを用いてあらかじめスペクトルを広げることにより相殺可能であると考えられる。このように、ファイバーバンドル通過後のレーザー光はパルス幅の点で改善の余地があるが、現時点で蛍光試料に集光照射することで二光子蛍光が発生していることが目視で確認されており、今後はパルス幅の最適化を行うとともに、二光子蛍光強度による評価を行う。

－以下割愛－