

和氣 弘明

神戸大学大学院医学研究科  
教授

ホログラム光刺激による神経回路再編の人為的創出

## § 1. 研究実施体制

### (1)「和氣」グループ

- ① 研究代表者:和氣 弘明 (神戸大学大学院医学研究科 教授)
- ② 研究項目
  - ・ホログラム刺激を用いた感覚学習の操作
  - ・ホログラフィック計測・刺激を行う為の顕微鏡の構築
  - ・ホログラフィックパターン刺激による神経細胞・グリア細胞の高精度時空間分解能を持つ機能操作

### (2)「平等」グループ

- ① 主たる共同研究者:平等 拓範 (自然科学研究機構分子科学研究所 准教授)
- ② 研究項目
  - ・スキャン形式でのパルスエネルギー、パルス幅、繰返しの最適化の生体組織への最適化  
ジャイアントパルス・マイクロチップレーザーのパルス幅は約 500ps 程度ある。そこで、この短パルス化を図ると同時に繰返し周波数を従来の 100Hz から >1kHz とする事に挑む。

### (3)「鍋倉」グループ

- ① 主たる共同研究者:鍋倉 淳一 (自然科学研究機構生理学研究所 教授)
- ② 研究項目
  - ・脳スライスの系において神経・グリア細胞の多点刺激による神経回路の人為的操作
  - ・in vivo での人為的神経回路再編の創出

### (4)「的場」グループ

① 研究代表者:的場 修 (神戸大学システム情報学研究科 教授)

② 研究項目

- ホログラフィック3次元光刺激技術の創成
- 3次元蛍光デジタルホログラフィによるターゲット検出
- 収差補正機能による3次元生細胞群への高品位光刺激

## § 2. 研究実施の概要

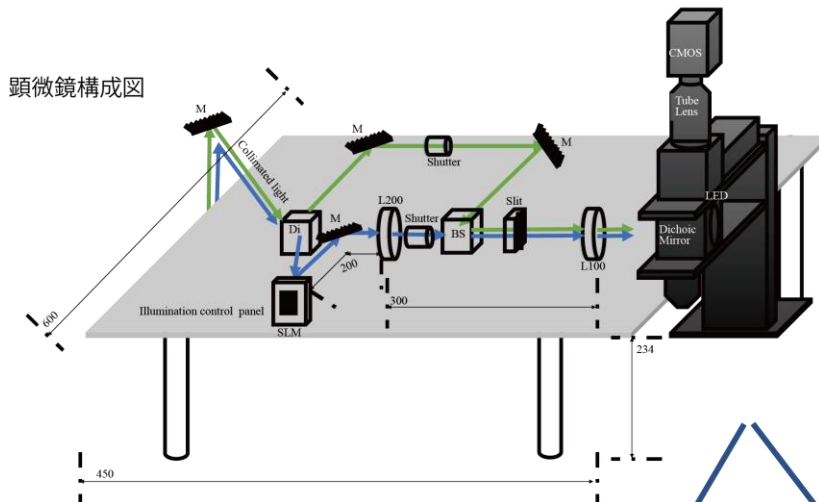
本課題においてはホログラフィックシステムを用いた、細胞活動の計測・操作の同時システムを構築し、そのシステムの検証を行った。的場グループは波長488 nmのレーザー光を励起光源として、2次元蛍光観察像を元に任意の2次元スポットをマウスクリックで生成できるインタフェースを構築した。構築した実験系を用いて蛍光板を試料として100個のスポットを同時形成することに成功した。このシステムを用いて和氣グループは培養細胞、脳切片を用い、培養細胞に光活性化蛋白質であるチャンネルロドプシン(ChR2)および赤色カルシウム感受性蛍光蛋白質(RCaMP)を発現させ、これに多色のパターン刺激を用いて、計測を、平面光を用いて行いながら、CCDカメラで検出し、そこにパターン刺激の刺激を加えて機能応答を確認する実験を行った。必要な光学システムおよびソフトウェアの開発を的場グループと共同で行った。これによってマウスの脳細胞スライスをを用いた実験では20個の細胞励起に成功した。これを応用し、次年度の刺激および計測の多光子化につなげられるようなシステムの構築を継続して行っている(添付図1構成図)。さらに平等グループはハイパワーパルスレーザーの高繰返し化の検討を行った。繰返しを100Hzから1kHzに上げるためには、その分、励起の平均電力を大きくする必要がある。そこで、励起効率の改善と、高出力化に伴う熱問題を緩和するために排熱を向上させる事に挑み、これに成功した。神戸大学に移管し、パターン刺激の実験に用いる予定である。さらに試作したジャイアントパルス・マイクロチップレーザーの生体組織への適性を和氣グループと共に検証し、スルフォローダミンの溶媒を用いて良好な2光子の点発光、線状の2光子発光がそれぞれイメージとして捉えられた。これにより生体応用への適性が検証できた(図1c)。

さらにホログラフィック計測系を確立するため、的場グループと和氣グループは、干渉性の低い蛍光信号の瞬時3次元計測を実現するために位相変調型空間光変調素子を用いて自己干渉によるホログラムを形成する方法を提案し、直径10  $\mu\text{m}$ 程度の蛍光ビーズを再構成することに成功した(図1b)。さらにホログラフィック刺激の時空間分解能の向上をはかり、隣接する細胞の刺激を仕分け、またパターン刺激にも成功している(図1a)。この成果を応用物理学会で発表した。

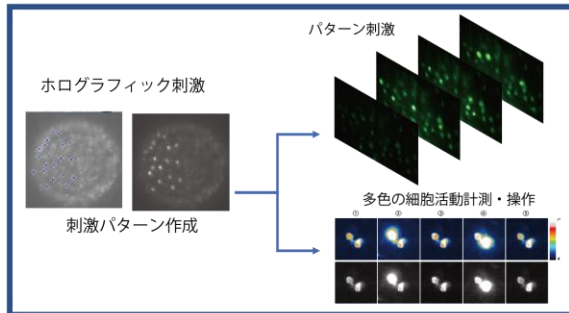
また鍋倉グループは、可視光によるLCOS顕微鏡を用い、固定脳スライスで、EYFPを発現する神経細胞の多細胞蛍光励起に成功している。

H29年度は、LCOS顕微鏡を用いた多細胞同時光刺激の系を改良し、それを用いた神経回路操作技術の確立に向け、*in vitro*脳スライスの系での検証を行うことを中心に研究を進めた。この検証には、光活性化イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン2(ChR2)を生体および組織導入したものをを用いた。電気生理学および可視化した細胞内カルシウム動態を指標に、導入条件の最適化と細胞活動制御を行う光刺激の最適条件の検討を進めた。さらにAAV1-hSyn-Chr2-YFPを大脳皮質に投与し、ChR2を神経細胞特異的に発現させたマウスに光照射によって神経活動が活性化するか、電気生理学的手法を用いて検討した。脳切片を作成し、神経細胞光刺激によるフィールド電位を計測した。その結果、複数細胞の光刺激により、フィールド電位が誘発された。今後は、ホールセルパッチ法を用いて、細胞選択的な刺激に対する光刺激の特異性の検証を行い、光刺激およびChR2発現の条件検討・最適化を進める。

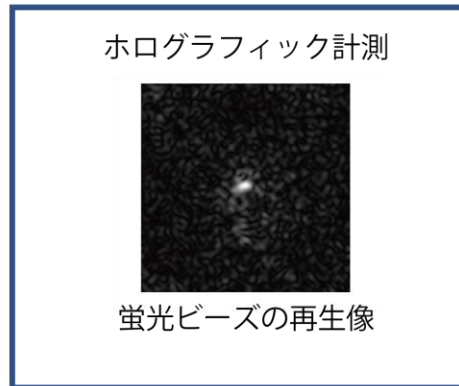
図1. ホログラフィック顕微鏡の構築とその応用



a. ホログラフィック刺激系



b. ホログラフィック計測系



c. ハイパワーパルスレーザーの生体応用

