

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「ホログラム光刺激による神経回路再編の
人為的創出」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2023年3月

研究代表者：和氣弘明
(名古屋大学 大学院医学系研究科、
教授)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

近年の光学技術の発達に伴って、特に中枢神経系においては 2 光子顕微鏡を用いた生体イメージングが覚醒下の動物で行われ、環境に対する感覚応答、さらには情動や学習などの高次脳機能に関連した脳領域の構造と活動が階層的に抽出されるようになった。さらに計測された活動情報をもとに光遺伝学的手法を用いた神経細胞活動操作法(オプトジェネティクス)で抽出された情報を実証することが可能となっている。しかしながらこれまでのオプトジェネティクス法では、特定の遺伝的背景を同一にする細胞集団への刺激に限局しており、時空間的な制限も多い(Kato et al., 2020; Norman et al., 2021)。そこで本研究ではデジタルホログラフィック技術を用いて、それを2光子顕微鏡と組み合わせることによって高次脳機能を操作することを目的とする。本研究によって必要とされるデジタルホログラフィック技術を神戸大学の場が2光子顕微鏡に適応し、刺激に必要なハイパワーレーザーの開発を平等が、ホログラフィック刺激を生体に応用し、人為的感覚刺激を用いた高次脳機能操作を和氣が、その基盤となる電気生理学的解析を鍋倉が行う。現在までに生体応用可能なホログラフィック刺激装置を搭載した2光子顕微鏡が完成し、神経細胞 20-50 個のパターン刺激を 30Hz で行うことが可能となっている。これを用いて炎症性疼痛モデルにおける痛み細胞の同定およびそのパターン刺激による人為的痛みの生成に成功している。今後、感覚識別学習などへの応用を展開し、生体の神経細胞の機能的結合の評価を行い、高次脳機能の操作を進めていく。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1.

概要: 炎症性疼痛の神経回路動態の変化を検証するために生体2光子顕微鏡を用いて、経日的な神経細胞集団の活動の変化を同一神経細胞の活動を追跡し明らかにし、炎症性疼痛の形成の際に活動することで炎症性疼痛の際の神経回路活動の変化が引き起こされることがわかった。さらにホログラフィック顕微鏡を用いて、神経細胞間の機能的結合を評価し、それが強化されていることによって、同期性及び活動強度が増加することを明らかにした。(Okada et al., 2021)(Kato et al., in preparation)。

2.

概要: 異種感覚の可塑的变化を検証するために視覚遮断モデルマウスを用いて、ひげ刺激に対する視覚遮断モデルマウスにおける高次視覚野の応答を明らかにし、それに対するミクログリアの関与を明らかにした。さらに責任細胞をホログラフィック刺激することで、その実証をおこなった(Hashimoto et al., in revision)。

3.

概要: 2光子励起ホログラフィック3次元複数細胞刺激システムと、2光子励起ホログラフィック3次元高速蛍光イメージングシステムを一体化したホログラフィック顕微鏡を構築した(装置論文3件, 特許2件出願)。1細胞レベルの分解能での奥行き範囲約 450 μm の層状光刺激と、奥行き範囲約 250 μm の範囲の3次元高速蛍光観察を実現した。和氣チームと共同して、生きて覚醒しているマウスでの実験に取り組み、生体応用可能とする成果を挙げた。

4.

概要: パルス幅 150ps で、繰り返し周波数を>1MHz で平均出力 1W の Nd:YVO₄/SOC マイクロチップレーザーによるマイクロ MOPA により、ホログラム適用で多点のニューロン光刺激を検証した。従来、フェムト秒程度まで短くないといけなるとされていたパルス幅が 100ps 以上でも $\eta_{TEP} \propto \frac{P^2}{f \cdot \tau} = P \cdot \bar{P}$ の関係を満たせば十分な2光子励起効率が得られる事を確認できた。これは小型化、ウェアラブル化が望めるマイクロチップレーザーにおいても脳の多点光刺激が可能となる事を示すもので意義深い。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要: 観察に特化していた光学顕微鏡に、光照射による細胞活動操作を可能にする光照明系を導入することで、生命科学やバイオ分野において新しいツールを提供する。2 件の特許出願を行い、それらを元にニコンソリューションズと共同して日本発の新規光学顕微鏡開発を進めている。また、この CREST でのチーム間共同研究を通じて、生体深部に非破壊かつ非侵襲に観察及び光操作する技術の必要性が分かり、散乱を克服する散乱透視学という学術変革領域の創成にも繋がっている。

2.

概要: 従来の Ti:sapphire レーザーの 100fs 程度の短いパルス幅をわざわざ 14ps 程度で延ばし、繰り返し周波数 1kHz、パルスエネルギーで mJ 以上とする事で研究に展開している。本 CREST で開発したパルス幅~50ps、高繰り返し周波数 >MHz、パルスエネルギー~10μJ のマイクロチップレーザーでは、パルス幅を少し短く、パルスエネルギーを少し増大しなければならぬが展開できる可能性はある。

ムーンショットに PI 参加予定(大森賢治 分子研)

「大規模・高コヒーレンスな動的原子アレー型・誤り耐性量子コンピュータ」

3.

概要: ①新産業の創出への手がかりにつながる基礎研究

ムーンショットに PI 参加予定(大森賢治 分子研)

「大規模・高コヒーレンスな動的原子アレー型・誤り耐性量子コンピュータ」

ここでは従来の Ti:sapphire レーザーの 100fs 程度の短いパルス幅をわざわざ 14ps 程度で延ばし、繰り返し周波数 1kHz、パルスエネルギーで mJ 以上とする事で研究に展開している。本 CREST で開発したパルス幅~50ps、高繰り返し周波数 >MHz、パルスエネルギー~10μJ のマイクロチップレーザーでは、パルス幅を少し短く、パルスエネルギーを少し増大しなければならぬが展開できる可能性はある。

②新産業の創出への手がかりにつながる基礎研究から、企業化開発の手前まで

本研究で研究開発対象としている高出力で波長変換まで含めたマイクロチップレーザー、すなわち小型集積(tiny integrated laser, TILA)の産業展開を目指して 2019 年に TILA コンソーシアムが発足した。従来のパワーレーザーが大型、不安定で効率も低かったのが TILA により劇的に改善した(図1)のを機にパワーレーザーの適用分野を広げようという試みである。製造(微細加工、ピーニング、ライダー、点火)、インフラ(光超音波打音検査、ライダー、LIBS)、医療(緑内障・白内障手術、スキンセラピー)、セキュリティ(テラヘルツ発生・検出)など、パワーレーザーの小型集積によりロボットアーム搭載、手のひらサイズとなることで開かれる新たな応用が考えられる。なお、TILA コンソーシアムにおける会員企業からの年会費を根拠として分子研では全額外部資金で運用される社会連携研究部門が発足、活動を行なっている。なお、TILA コンソーシアム会員は当初 17 団体であったが、現在、39 団体にまで増えている(図 3)。

なお、TILA の成果を元に起業するとの議論が始まっており、2023 年春頃の POC を目標に分子研、理研、さらにベンチャーキャピタルとの調整が進んでいる。

Q: 効率など従来と比較して教えてください

<ul style="list-style-type: none"> ● 波長：1064nm ● エネルギー：50mJ ● パルス幅：200ps ● 繰り返し：10Hz ● 平均出力：0.5W <p>● 効率：0.04 ~ 0.07%</p> <p>● 電源：3相200V</p>	<p>従来レーザー</p>	<p>現在 >20mJ</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 波長：1064nm ● エネルギー：3mJ ● パルス幅：500ps ● 繰り返し：100Hz ● 平均出力：0.3W <p>● 効率：~ 10%</p> <p>● 電源：バッテリー可</p>
---	---------------	---

レーザーの進化：アSEMBル ▶ 小型集積化：TILA

- 励起光源の進化：放電管 ▶ 半導体レーザー
- レーザー媒質の進化：単結晶 ▶ セラミックス
- プロセスの進化：昇温接合 ▶ 常温接合

図1 マイクロチップレーザー, さらには小型集積レーザー(TILA)のインパクト



図2 小型集積レーザー(TILA)の社会実装イメージ



図3 小型集積レーザー (TILA) コンソーシアム会員 (2022年10月)
<https://tila.ims.ac.jp/membercompanies/>

③ 科学技術イノベーションに大きく貢献する成果

- ・「マイクロチップレーザー適用長尺光ファイバー伝送 LIBS 分析技術に関する研究」(日本原子力研究機構からの委託研究) 令和3年度, 令和4年度
 マイクロチップレーザーが小型軽量であることを活かし、ジャイアントパルスレーザーを燃料デブリ近くに持ってゆき、そこで Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) を行うことでデブリの同定を行うもので福島原発の廃炉加速に寄与すると考えている(図4)。
- ・加速に向けたレーザー装置の開発課題と解決策「レーザー駆動による量子ビーム加速器の開発と実証」(JST 未来社会創造事業(大規模プロジェクト型, 代表:熊谷孝孝→佐野雄二(平成17年度より))

プロジェクトとしてはレーザープラズマ加速技術によって粒子加速器の大幅な小型化を達成し、新材料や新薬の開発、粒子線がん治療への応用など、社会実装を通して工学、化学、医学など幅広い分野に貢献し、科学技術創造立国としての基盤を提供する。ただ、このためのレーザーが巨大化することが深刻な問題となっており、TILA によりレーザーの小型集積化

を図る事を担当している。本 CREST でも議論している超小型のジャイアントパルスレーザ、接合は重要な基盤技術である。

・「ジャイアント・マイクロフォトニクスによる高出力極限固体レーザ」(令和 2 年度安全保障技術研究推進制度:大規模研究課題(タイプ S), 研究代表)

レーザに用いる原材料、その表面処理、接合の方法などを研究することにより、テラヘルツ波を利用する中で世界最大の出力と輝度を誇る固体レーザの卓上サイズでの実現を目指しており、本 CREST でも議論している超小型のジャイアントパルスレーザ、接合は重要な基盤技術である。

・「次世代アト秒レーザー光源と先端計測技術の開発」(Q-LEAP, 代表:山内薫(平成 18 年度より))

フェムト秒よりもさらに 3 桁短い時間パルス、アト秒レーザーの次世代化に向けた高性能 TILA 素子の研究開発。これにも CREST 成果は寄与する。

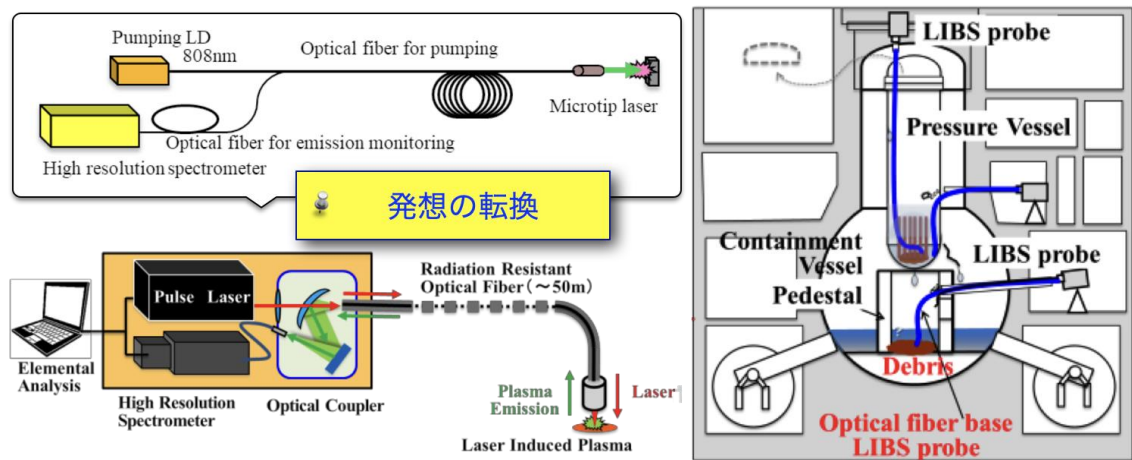


図 4 マイクロチップレーザーによるファイバー伝送 LIBS 及び事故炉適用概念

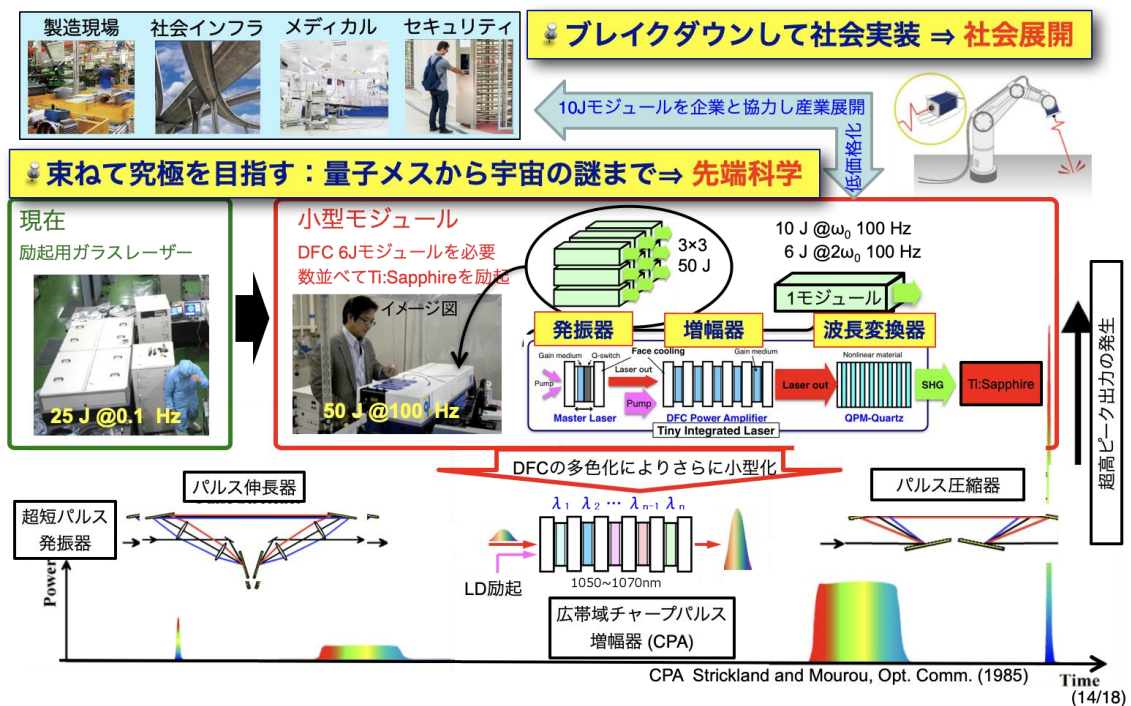


図 5 小型集積レーザー駆動による量子ビーム加速器の開発と実証における概念

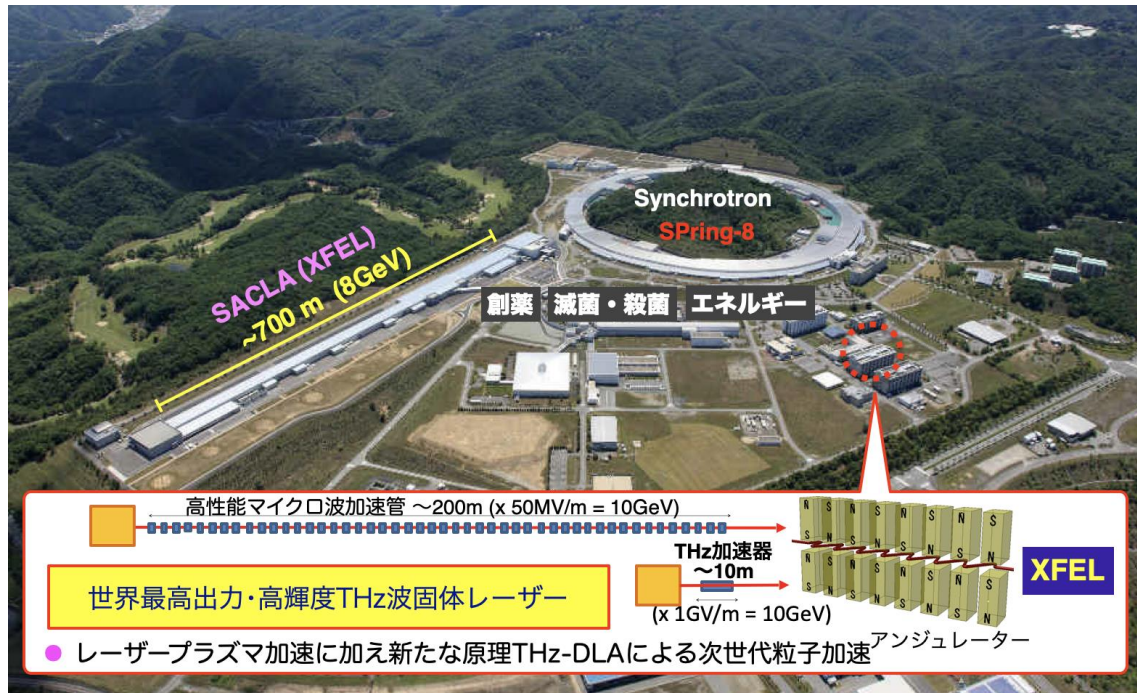


図 6 ジャイアント・マイクロフォトニクスによる高出力極限固体レーザーによるテラヘルツ波粒子加速の概念

4.

概要: Nd:YVO₄/SOC マイクロチップレーザーは、ウェアラブル化が望まれる脳の多点光刺激の可能性を示しただけでなく、量子コンピュータに求められる高性能レーザーとして検討されることとなった。一方、当初検討された Nd:YAG マイクロチップレーザーは、次世代レーザー加工のレーザーピーニングや福島廃炉加速に求められる LIBS 用の光源として実用化を目指した検討が始まっている。

< 代表的な論文 >

1.

概要: 炎症性疼痛の神経回路動態の変化を検証するために生体 2 光子顕微鏡を用いて、経日的な神経細胞集団の活動の変化を同一神経細胞の活動を追跡し明らかにし、炎症性疼痛の形成の際に活動することで炎症性疼痛の際の神経回路活動の変化が引き起こされることがわかった。さらにホログラフィック顕微鏡を用いて、神経細胞間の機能的結合を評価し、それが強化されていることによって、同期性及び活動強度が増加することを明らかにした。

Okada T, Kato D, Nomura Y, Obata N, Quan X, Morinaga A, Yano H, Guo Z, Aoyama Y, Tachibana Y, Moorhouse AJ, Matoba O, Takiguchi T, Mizobuchi S and Wake H*. Pain induces stable, active microcircuits in the somatosensory cortex that provide a new therapeutic target. Sci Adv, 2021 Mar 19;7(12):eabd8261. Doi: 10.1126/sciadv.abd8261.

2.

概要: 全身炎症に伴うミクログリアの血液脳関門の透過性制御機構を示し、ホログラフィックトランスクリプトーム開発に繋がった。

Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, Matsumoto M, Kato D, Ono R, Kiyama H, Moorhouse AJ, Nabekura J and Wake H*. Dual Microglia Effects on Blood Brain Barrier Permeability Induced by Systemic Inflammation, Nature Commun. 2019, Dec 20;10(1):5816. Doi: 10.1038/s41467-019-13812-z.3.

3.

概要: 他の手法と比較して、コンパクト可能で同軸配置による時間的安定化を実現した、蛍光と位相の 3 次元情報を同時取得可能な光学系を提案し、植物細胞等を用いて有用性を実証し

た。論文発表後の3年間弱の期間で Google Scholar で非引用数が 51 となっており、注目されている。また世界最大級の国際光工学会 (SPIE) の BiOS Hot Topics(2022 年 1 月)に講演を依頼された。

M. Kumar, X. Quan, Y. Awatsuji, C. Cheng, M. Hasebe, Y. Tamada, and O. Matoba, "Common-path multimodal three-dimensional fluorescence and phase imaging system," J. Biomed. Opt. 25, 032010 (2020).

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「和氣」グループ

研究代表者: 和氣 弘明(名古屋大学大学院医学系研究科 教授)

研究項目

- ・ホログラム光刺激システムの構築(平等・的場・和氣)
- ・ホログラム光刺激システムによる疑似感覚応答の再現(和氣・的場)
- ・人為的神経回路再編の創出による高次脳機能操作 in vitro(鍋倉) in vivo(和氣)
- ・感覚を補完するような感覚多領域間クロスモーダルシフトの実現(和氣)

② 「平等」グループ

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 特任教授)

研究項目

- ・ジャイアントパルスレーザーの生体応用への最適化

③ 「鍋倉」グループ

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
基盤神経科学研究領域生体恒常性発達研究部門、教授)

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

主たる共同研究者: 的場 修(神戸大学大学院システム情報学研究科 教授)

研究項目

- ・ホログラフィック3次元光刺激
- ・細胞核3次元位置検出のための蛍光3次元デジタルホログラフィックセンシング
- ・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) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

和氣・的場 G ではオーストラリア国立大学 Dr. Vincent Daria との国際共同研究を進め、より発展的なホログラフィック顕微鏡の開発を推進することができるようになった。さらにニコンソリューションズとの共同研究(A-STEP 採択)によって本システムの市販化に向けて、改良、製品化を進めている。

和氣 G ではマウントサイナイ大学 Dr. Anne Schaefer との国際共同研究を進め、異種感覚の可塑性に関わるメカニズムを明らかにすることに成功している。引き続き、交流をより一層促進し、共同研究を強固に確立する。

的場 G では、的場と栗辻は国際光工学会(SPIE)のバイオメディカルイメージングとセンシングの国際会議 BISC の共同実行委員長(2014~)を務め、生体応用可能なイメージング関連の国際会議を主導し、国際的な情報発信と国際研究者ネットワークの構築を進めている。応用物理学会、日本光学会、レーザー学会で「光技術と計算機処理を高度に融合させた計算光学イメージング」関連のシンポジウムを複数企画し、光学、情報科学、生物学等の異分野融合を

図るとともに若手研究者や企業研究者等への情報発信と交流を推進している。

鍋倉は、「アジア・オセアニア生理学会連合 2019 年大会 (FAOPS 2019)」にて大会長を務め、国内外における研究の促進に貢献した。また揚妻は、FAOPS2019 にて、ホログラム光刺激を元にした視覚認知研究 (Cell, 2019) で知られるメキシコ自治大学の Luis Carrilo-Reid 博士を co-chair として若手シンポジウム「Optical neuroscience: reading and manipulating neural computation behind cognition, memory, and behavior」を主催した。それをきっかけに、ホログラフィー光遺伝学、およびグラフィカルモデリングを利用した局所神経回路ネットワークの機能的結合を解明する技術を情動記憶研究へ導入するための国際共同研究を展開し、「JST 二国間交流事業共同研究」および「自然科学研究機構・分野融合型共同研究事業」における研究資金の取得へと展開した(その成果はプレプリントとして報告済み (bioRxiv 2021))。

平等 G では本研究で研究開発対象としている高出力で波長変換まで含めたマイクロチップレーザー、すなわち小型集積 (tiny integrated laser, TILA) の産業展開を目指して 2019 年に TILA コンソーシアムが発足した。従来のパワーレーザーが大型、不安定で効率も低かったのが TILA により劇的に改善した(図1)のを機にパワーレーザーの適用分野を広げようという試みである。製造(微細加工、ピーニング、ライダー、点火)、インフラ(光超音波打音検査、ライダー、LIBS)、医療(緑内障・白内障手術、スキンセラピー)、セキュリティ(テラヘルツ発生・検出)など、パワーレーザーの小型集積によりロボットアーム搭載、手のひらサイズとなることで開かれる新たな応用が考えられる。なお、TILA コンソーシアムにおける会員企業からの年会費を根拠として分子研では全額外部資金で運用される社会連携研究部門が発足、活動を行なっている。なお、TILA コンソーシアム会員は当初 17 団体であったが、現在、39 団体にまで増えている。