

氏 名 安宅 光倫

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2433 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Development of *in vivo* volumetric imaging method for mouse
brain utilizing multibeam scanning two-photon microscopy

論文審査委員 主 査 吉村 由美子
生理科学専攻 教授
根本 知己
生理科学専攻 教授
榎木 亮介
生理科学専攻 准教授
藤田 克昌
大阪大学 大学院工学研究科 教授

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full Ataka, Mitsutoshi

Title Development of *in vivo* volumetric imaging method for mouse brain utilizing multibeam scanning two-photon microscopy

Two-photon microscopy (2PM) is a laser scanning fluorescence microscopy that uses a two-photon excitation process and has been widely used in the neuroscience field as a robust tool for *in vivo* observation of neuronal activities in the mouse brain. For single-beam scanning 2PM, galvanometer-based scanning mirrors are usually equipped and the focal plane is raster-scanned by a single focus. Meanwhile, for multibeam scanning 2PM, a confocal spinning-disk scanner has been implemented for higher temporal resolution (up to 333 frame/second). This scanner splits a single excitation beam into hundreds of foci at the focal plane through the microlens-array. The fluorescence signals at the focal plane are relayed to the image plane and captured by a two-dimensional detector. In addition, a 40–100-fold increase in imaging speed compared with a single-beam scanning 2PM has been demonstrated. Moreover, volumetric imaging approaches based on the 2PM with galvanometer-based scanning mirrors were recently proposed for elucidating neuronal computations *in vivo*. To observe the neuronal activities in the mouse brain, three-dimensional (3D) scanning approaches with both sufficient temporal resolution and penetration depth of the excitation light are required. In this study, a volumetric imaging system using multibeam scanning 2PM with a spinning-disk scanner and high-peak power excitation laser source was proposed. To assess its applicability to *in vivo* volumetric imaging, first, the penetration depth limitation of the multibeam scanning 2PM in living mouse

brains was experimentally confirmed. As a result, dendritic fibers were visualized at a depth of over 300 μm . Second, *in vivo* multiplane Ca^{2+} imaging was performed with a piezo z -scanner, and Ca^{2+} transients were recorded at depths of 140 μm (single-plane) and 80–100 μm (three-planes). Next, using an electrically tunable lens (ETL), continuous axial scanning mechanics was introduced to improve the proposed volumetric imaging system; this improved imaging system is called the multibeam continuous axial scanning 2PM (MCAS-2PM) system. Using the MCAS-2PM system, a 1- μm bead phantom was observed and clearly resolved in the 3D volume as a z -projection stack with negligible axial spatial gaps. *In vivo* volumetric Ca^{2+} imaging was also performed with a synthetic Ca^{2+} indicator, Cal-590 AM, in the primary visual cortex of a mouse. As a result, spontaneous Ca^{2+} transients were successfully recorded in neurons up to a 100 μm depth from the brain surface with a $200 \times 200 \times 36 \mu\text{m}^2$ field of view. Finally, to improve the brightness of the fluorescence image, a chirped pulse amplification (CPA) system with diffraction gratings and a previously reported Yb-doped fiber amplifier were incorporated. The CPA output had an average power of 12.0 W and a pulse width of ~ 1 ps. It is expected that, compared with using the original excitation light source, a roughly 3-fold brighter fluorescence image can be obtained.

In the MCAS-2PM system, to increase the penetration depth of Ca^{2+} imaging up to 200–300 μm or the mouse cortical layer 2/3, a higher peak power of excitation laser pulses is still required. The excitation laser source with a low repetition rate might be effective in multibeam scanning 2PM. Nevertheless, there are several techniques to enhance the imaging system and specimen, such as optimizing the detection system, efficiency of illumination, and localization of fluorescence probe.

In conclusion, a multibeam scanning 2PM-based volumetric imaging system for observing living mouse brains is proposed. To realize 3D scanning, lateral scanning

with a spinning-disk and continuous axial scanning with an ETL were combined. With the proposed system, *in vivo* volumetric Ca²⁺ imaging was performed in living mouse brains up to a 100 μm depth from the surface. With further improvements, the proposed system can be a practical volumetric imaging system with a simple design and efficient scanning capability. Such features may make volumetric imaging widespread and thereby open new neuroscience pathways for many researchers.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 安宅 光倫Title
論文題目 Development of *in vivo* volumetric imaging method for mouse brain
utilizing multibeam scanning two-photon microscopy

脳機能の解明に向けて、哺乳類モデル動物の生体脳を対象に神経細胞の形態や神経活動を十分な時空間分解能で 3 次元的に可視化するために、非線形光学過程の一種である 2 光子励起過程を用いた蛍光顕微鏡法の研究開発が近年実施されている。一般に 2 光子顕微鏡では、ガルバノスキャニングミラーを用いて焦点面内に結ばれた励起レーザーの焦点を走査する単点走査型が主流であり、既存の *in vivo* 脳での体積イメージングは、この単点走査型 2 光子顕微鏡に 3 次元的に走査する機能を追加する形で実現されてきた。他方で、2 光子顕微鏡法において、励起レーザー光を多数に分割し焦点面内に多数の焦点を結ばせるスピニングディスクスキャナーを用いる多点走査式のレーザー走査方式も提案されている。この方式の撮像ピクセルレートは、単点走査方式に比べて一桁以上高く、また 2 次元検出器を活用することができる。この特徴から、多点走査方式は、撮像画素数が非常に増加する体積イメージングに特に適したものであると期待された。しかし、多点走査方式では、励起光が多点に分割照射されるため、1 つの焦点における励起光強度が低下する。その結果、2 光子励起の生起する確率が劇的に低下し蛍光シグナルが減弱するという原理的な課題があった。それに対し、約 10 年前から、励起レーザー光源として新たに開発された低繰り返し周波数でハイピークパワーの近赤外超短パルスレーザー光源の導入やスピニングディスクスキャナーの改良により蛍光シグナルの強度は改善されてきていた。しかしながら、いまだマウスのような哺乳類モデル動物の生体脳の *in vivo* イメージングへの応用は進んでいなかった。

出願者は、上述の多点走査型 2 光子顕微鏡の利点と 2 光子励起蛍光像の明るさを改善した先行研究に基づき、連続的な光軸方向のスキャンを行う体積イメージングシステムを構築しマウス生体脳観察に適用することを着想した。具体的には、まず初めに、多点走査型 2 光子顕微鏡システムを用いたマウス生体脳の *in vivo* イメージングにおける深部到達性を評価した。その結果、観察窓を頭蓋に作成し麻酔をかけたマウスにおいて、生体脳の表面から 300 μm 以上の深部まで、神経線維の可視化が可能であった。次に、深さ方向の走査を実現するために、印加電流値により焦点距離を制御することが可能な液体レンズ (electrically tunable lens; ETL) を対物レンズの手前に導入した。また、励起レーザー光の発散角をノコギリ波で制御することで焦平面を周期的に移動させる走査機構を構築した。ここで、印加電流値に対する変位量 ($\mu\text{m}/\text{mA}$) は対物レンズ毎に異なる値をとったため、印加電流値と変位量の関係を求めるため、光軸方向の位置情報を有する参照画像と取得蛍光像との相互相関を用いるキャリブレーション法を開発した。さらに ETL による焦平面の移動とカメラによる画像取得、ならびに取得した $xy-t$ 画像を $xyz-t$ 画像へ再構築す

るプログラムを開発した。提案手法の原理実証のため、アガロースゲルに包埋した微小蛍光ビーズ像の体積イメージングを実施し、 $415 \times 415 \times 300 \mu\text{m}^3$ の観察視野で多数の $1 \mu\text{m}$ ビーズを3次元的に解像可能であることを示した。さらに覚醒した状態のマウスの一次視野において、 Ca^{2+} 指示薬 Cal-590 AM を負荷させた3次元的に分布する神経細胞の活動の *in vivo* Ca^{2+} イメージングを試みた。その結果、最大深度 $155 \mu\text{m}$ において $200 \times 200 \times 36 \mu\text{m}^3$ の観察視野で、異なる深度に位置する神経細胞の細胞体から 1.5 volume/sec で Ca^{2+} 応答を記録することに成功した。また、励起光を増幅して2光子蛍光像の輝度を向上させるためにチャープパルス増幅器の設計と構築を実施した。その結果、平均パワーが従来の3倍となる増幅光を得ることに成功した。本増幅光を励起光として用いることにより2光子蛍光像の輝度はおよそ3倍向上するものと考えられた。

出願者は、マウス生体脳の *in vivo* 体積イメージングのための最適な3次元走査の枠組みを自ら提案すると共にその原理実証を実施し、多点走査型2光子顕微鏡を体積イメージングの観点から意義づけた。本論文は、生物分野での新たなイメージング手法の開発に貢献できる重要な知見を含んでおり、将来的な波及効果も期待できるため、審査委員全員一致で博士学位論文に相応しいと結論した。