

【目的】人間の脳神経の理解のため、比較的単純な神経系を持つ様々なモデル動物（マウス、線虫、ゼブラフィッシュ等）の脳神経を対象とした研究が精力的に行われているが、最も簡単な脳神経系を持つモデル生物である線虫ですら、脳神経系の働きについて未解明である点が多く残されている。線虫は約200個の神経細胞からなる、脳に相当する神経系を有するが、現在の技術を用いても、行動中の線虫における脳神経系の活動を満足にとらえることも操作することもできていない。そこで本研究では、先端光学技術および情報技術を開発、統合することにより、包括的リアルタイム3D神経系観察・制御法の開発に取り組む。

【方法】開発手法は3つの要素技術、すなわち高速3D蛍光撮像技術、二光子3D追跡・操作技術、高速画像処理技術からなる。動作としては、高速3D蛍光撮像技術によって取得された画像データに対して高速画像処理を行うことにより各神経細胞の位置を特定し、二光子3D追跡・操作により所望の神経細胞の活動を制御する。この一連の動作を、対象とする線虫の動きに追従しながら連続的に行う。本研究では、本手法の動作実証に向け、各要素技術の検討およびシステム全体の動作時定数の検証を行った。高速3D蛍光撮像技術については、本研究開始以前より開発してきた独自方式の高速ライトシート顕微鏡を用いて線虫頭部神経の3D画像を安定的に取得するための技術改良を行った。二光子3D追跡・操作については、空間光変調器を用いた計算機ホログラフィの手法を採用し、評価用実験セットアップを構築して本方式の基本的な動作の検証を行うとともに、システム全体の動作時定数の検証も併せて行った。高速画像処理技術の開発においては、複数の深層学習ネットワークを組み合わせた合成人工ニューラルネットワークを開発し、高速動作に有利な低解像度画像から高精度に細胞位置を特定することを試みた。

【結果】高速3D蛍光撮像技術については、顕微鏡装置の複数の不具合を解消することで、線虫の頭部神経の3D撮像を行い、各神経細胞が3D画像上に明瞭に表れていることが確認された。このときの撮像速度は毎秒50ボリュームであり、同一の対象をこれまでに観察した報告と比較して10倍程度高速になっている。二光子3D追跡・操作については、線虫の神経細胞を模擬した $1\mu\text{m}$ のビーズを明視野像で取得し、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し、レーザー光の集光スポットがビーズの動きに追従する動作を確認した。この動作時のループ時定数は100~160ms程度であった。高速画像処理技術の開発においては、低解像度画像を用いても細胞領域の形状を概ね推定できていることが確認された。一方で、推定が不正確な領域も確認されたため、解像度と推定の精度のトレードオフについてより詳細に検討する必要がある。本研究により、評価用実験セットアップを用いて実際のループ時定数およびその内訳が測定され、要求仕様との比較による議論が可能になった。自由行動する線虫の移動速度に基づくループ時定数の要求仕様は数10ms程度であり、ハードウェア起因の所要時間が20ms程度であることが実験で確かめられたことから、ソフトウェア起因（データ処理）の所要時間を10ms以内程度で行う必要があることが明らかになった。今後、データ処理時間についての詳細検討、ハードウェアの工夫による高速化、さらには細胞位置検出アルゴリズムの修正による要求仕様の緩和など、複数の課題に取り組んでいく。

包括的リアルタイム3D神経系観察・制御法の概念図

