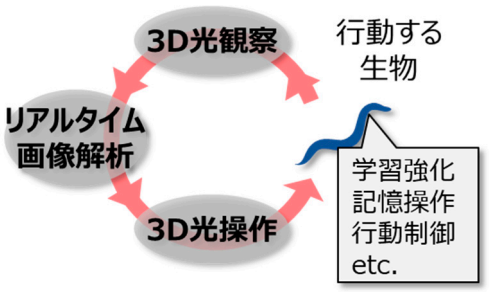
93　包括的リアルタイム3D神経系観察・制御法の開発	三上　秀治

【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 μm 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 100〜160 ms 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 10 ms 程度であり、ハードウエア起因の所要時間が 20 ms 程度であることが実験で確かめられたことから、ソフトウエア起因（データ処理）の所要時間を 10 ms 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、ハードウエ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



93. 包括的リアルタイム 3D 神経系観察・制御法の開発

三上　秀治

北海道大学 電子科学研究所 生命科学研究部門 光情報生命科学研究分野

Key words：蛍光顕微鏡，3D 撮像，光遺伝学，線虫，神経活動記録

緒　言

生命の行動を司る脳神経の働きを理解することは、基礎科学として重要であるだけでなく、脳神経系にかかわる様々な疾患の理解や治療法の開発につながるため、医学の進展にも不可欠である。現在も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ができない。また、脳神経系の活動を制御する光遺伝学（光応答性タンパク質を所望の神経細胞に発現させる技術）が 2,000 年代になって登場し、人為的に脳神経系の一部を制御することが可能になったことにより脳神経ネットワークのダイナミクスを調べる効率が飛躍的に向上したが、技術的な制約により、単純な線虫の神経系ですら、一つ一つの神経細胞の活動を任意に制御することは困難である。

このような課題に対し、行動中のマウス、ゼブラフィッシュ、線虫などのモデル生物の脳神経の活動を 3D 撮像により取得する技術や、光観察と光操作を 2 次元でリアルタイムに行う技術が報告されている［1，2］。しかし、現時点で神経系の全てを同時かつリアルタイムに観察・制御する技術、すなわち包括的リアルタイム 3D 神経系観察・制御法は実現していない。このため、既存技術では脳神経を部分的に捉えることしかできず、得られる情報は限定的である。一方、このような技術が実現すれば、脳神経系を包括的に捉えることが可能になり、複雑な神経ネットワークの機能のあらゆる側面をあらわにすることができるようになる。さらに、神経系を活動状態に基づき自在に制御できるようになるため、脳神経系の解析のみならず、人為的な操作も可能になることから、新たな脳疾患の治療法開発に繋がることも期待される。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

1. 開発概要

本研究では線虫の頭部神経系をターゲットとして包括的リアルタイム 3D 神経系観察・制御法を開発することを主たる目的とする。本手法の具体的な実装形態の概略を図 1 に示す。本手法は 3 つの要素技術、すなわち 1. 高速 3D 蛍光撮像技術、2. 二光子 3D 追跡・操作技術、3. 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。

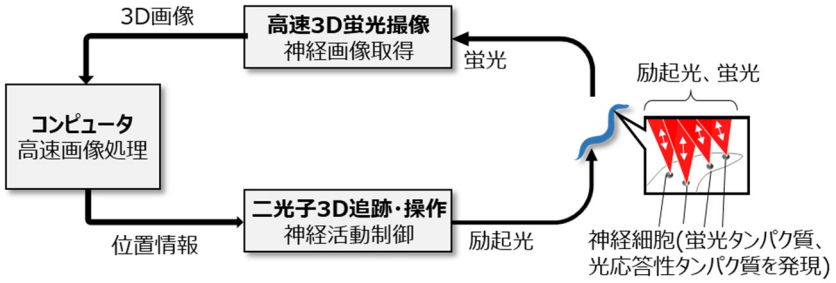


図 1. 開発技術の概略

高速 3D 蛍光撮像技術、二光子 3D 追跡撮像・操作技術、高速画像処理技術からなる。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。

2. 高速 3D 蛍光撮像技術

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につき、本方式に組み込むための性能改良に取り組んだ。本顕微鏡は、カメラのイメージセンサー上に多数の 2D スライス像を並べて表示して同時に撮像することにより高速化を実現する（図 2）。本研究着手時においては 3D 撮像を従来にない高速度（400 ボリューム／秒）での撮像に成功していたが、カメラの出力画像から 3D 画像を構築する際の 2D スライス像間の相対位置が正確でないために、線虫の頭部神経に対して正確な 3D 撮像を行うことが困難であった。このため、本研究では相対位置のずれの原因を特定し、これらを取り除くことで正確な 3D 画像の構築に取り組んだ。具体的な原因として明らかになったのは、各 2D スライス像のイメージセンサー上における位置の推定が不十分であったことと、顕微鏡装置の機械的振動により 2D スライス像の位置が撮像中に変位をともなうことの 2 点である。前者については較正用画像を事前に取得することで正確な位置の推定を行うこととし、後者については顕微鏡装置のメカ設計を見直し、機械的安定性を向上させることとした。加えて、線虫頭部が常に視野中心にとどまるよう、電動ステージを用いて線虫の位置をリアルタイムに制御するシステムを構築した。

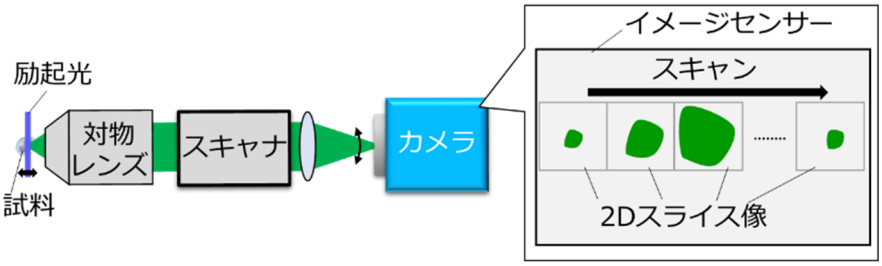


図 2. 高速 3D 蛍光撮像技術の概略

スキャナにより複数の 2D スライス像をイメージセンサー上に並べて配置し、これらを同時に読み出すことで高速な読み出しを可能とする。

3. 二光子 3D 追跡・操作

二光子 3D 追跡・操作に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、空間光変調器への入力パターンの制御により 3D 空間上の複数の空間点に二光子励起のためのレーザーの集光を行うこととした。本研究では、本方式の基本的な動作の検証を行った。具体的な検証項目として、所定位置へのレーザー光の集光動作および動作時定数の確認を重点的に行った。検証のための実験セットアップを図 3 に示す。本セットアップは基本的な特性の評価に特化したものであるが、包括的リアルタイム 3D 神経系観察・制御法の基本的な動作が組み込まれており、全体の動作時定数の検証も併せて行った。

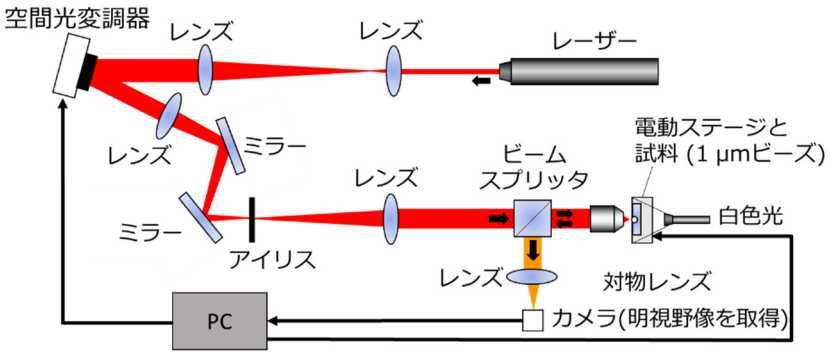


図 3. 二光子 3D 追跡・操作の基礎評価用セットアップ

レーザー光が空間光変調器に照射され、位相変調がなされた反射光が対物レンズで集光されることにより所望の位置に集光光スポットを形成する。追跡対象のビーズの像をカメラで取得し、画像から位置情報を取得し、それに応じた変調パターンを空間光変調器に駆動する。アイリスは空間光変調器からの非解説光（不要な光成分）を除去するために挿入されている。

4. 高速画像処理技術

画像処理においては撮像データから細胞位置を特定する際の精度および速度が十分である必要があることを鑑み、データ量が少なく高速化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画像処理法の開発を行った。具体的には低解像度画像を高解像度化する人工ニューラルネットワークである 3D RCAN［3］と、3D 画像から細胞位置を高精度に特定する人工ニューラルネットワークである 3D U-Net［4］を連結した合成ネットワークを構築し、これを一体として訓練用データにより学習させることで、低解像度画像を用いて細胞位置を特定することを試みた（図 4）。

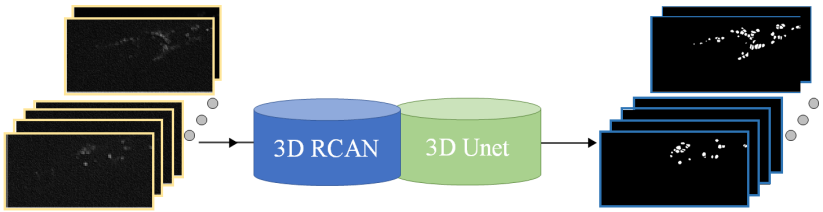


図 4. 開発したネットワークの概略

入力画像は 3D RCAN によって高解像度化され、その後 3D U-Net により細胞領域の抽出（セグメンテーション）がなされる。但し、途中の高解像度画像は出力されない。

結　果

1. 高速 3D 蛍光撮像技術

前章で述べた 2D スライス像間の相対位置のずれの原因のひとつである顕微鏡装置の機械的振動について、理論的考察から、機械的振動が撮像位置のずれに大きく影響する箇所を特定した。特定された箇所は、光学系に含まれる 3 つの対物レンズ及び試料保持部である。これらの箇所に対して保持機構を見直し、より強固な保持方法に変更することにより、振動にともなう撮像位置のずれを変更前の数μm 程度から 1 ピクセル（0.46μm）以内程度まで低減できることを確認した。もう一つの原因であるイメージセンサー上の 2D スライス像位置の推定の誤差については、較正用画像として同一の 2D スライス像をイメージセンサー上に多数配置して取得し、それらの相対位置を画像から読み取ることで誤

差が従来の約 10 ピクセル程度から 1 ピクセル以内程度に抑えられることを確認した。これらの対策を施した顕微鏡装置を用いて線虫の頭部神経の撮像を行い、正しく 3D 画像が構築されていることが確認された（図 5）。このときの撮像速度は毎秒 100 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。

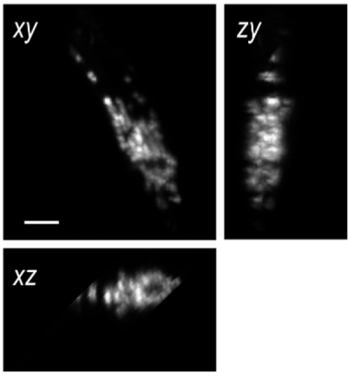


図 5. 取得した線虫頭部神経の 3D 蛍光画像
3 方向への射影（max projection）画像を表示している。
スケールバー：20 μm。

2. 二光子 3D 追跡・操作

実験セットアップを用いて、線虫の神経細胞を模擬した 1 μm 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た。さらに、ビーズを電動ステージを用いて直進方向に動かした。このとき、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が確認された（図 6a）。この動作時のループ時定数の内訳は図 6b に示すとおりであり、ループ時定数は撮像視野の大小によりおよそ 100～160 ms 程度であった。このうち二光子 3D 追跡・操作にかかわるのは空間光変調器の駆動および位相変調パターン生成であり、それぞれ 10 ms、60 ms 程度であった。前者は使用した空間光変調器の装置仕様であるが、後者はパターン生成アルゴリズムや計算ハードウエアの改良により短縮する余地がある。

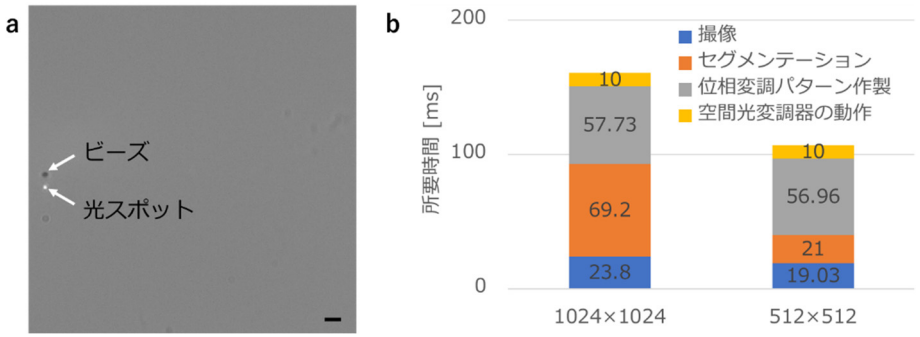


図 6. 空間光変調器を用いた集光スポット生成およびビーズの追跡実験の結果
a) カメラで取得した画像。追跡対象であるビーズに対してわずかに下方にずれた位置に光スポットが集光されている。スケールバー：10 μm。
b) ループ時定数の内訳。画像の解像度が 1,024×1,024 の場合と 512×512 の場合について測定を行った。

3. 高速画像処理技術

構築した合成ネットワークを用いてセグメンテーションを行った結果の一例を図 7 に示す。このときの入力画像は真値の作製に用いた高解像度画像に対して解像度を 1／8 に低下させたものであるが、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（図の赤矢印で示す箇所）。このため、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。また、計算速度についても今後の検証が必要である。



図 7. 開発したネットワークを用いた細胞画像セグメンテーションの例
左は真値（白色の領域が細胞領域）、右は開発したネットワークによる推定結果。右の画像における濃淡は細胞の存在確率を表し、白に近いほど存在確率が高い。赤矢印はセグメンテーションに明確なエラーが存在する箇所。

考　察

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は実験条件により異なるが、典型的には数 10 μm/sec 程度であり、二光子 3D 追跡撮像・操作におけるレーザー集光スポットの位置精度を 1 μm とすると、ループ時定数の要求仕様は数 10 ms 程度である。本研究の方式において、ハードウエアに起因する所要時間は空間光変調器およびカメラについてそれぞれ 10 ms 程度であり、計 20 ms 程度と見積もられる（カメラについては高速 3D 蛍光顕微鏡の撮像速度 100 ボリューム／秒から算出した）。したがって、ソフトウエア部分の所要時間を 10 ms 以内程度とすることで、本方式を線虫へ適用可能となる見込みである。ソフトウエア部分の検討は現時点では精度に重きを置いた評価を行っていたため、今後計算時間に着目し、今回得られた暫定仕様である 10 ms 以内の所要時間を達成するための検討を行う必要がある。なお、ハードウエアに起因する所要時間は、将来のより高速なデバイスの登場によりさらに短縮される可能性があるほか、複数の空間光変調器を用いる等の工夫により短縮する余地がある。また、細胞位置の特定の際にあわせて各細胞の動きを推定するアルゴリズムの開発により、ループ時定数の要求仕様が緩和される可能性がある。本開発技術はさまざまな要素からなる複合的システムであり、今後、左記の要素技術の開発を進め、適宜取捨選択したうえで目標仕様の達成に向けた検討をすすめる。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、東京大学大学院理学系研究科の飯野雄一博士、豊島有博士には有意義なご議論をいただいた。

文　献

1） Susoy V, Hung W, Witvliet D, Whitener JE, Wu M, Park CF, Graham BJ, Zhen M, Venkatachalam V, Samuel ADT. Natural sensory context drives diverse brain-wide activity during C. elegans mating. Cell. 2021 Sep 30;184(20):5122-5137.e17. Epub 2021 Sep 16. PMID: 34534446 DOI: 10.1016/j.cell.2021.08.024.

2) Tanimoto Y, Zheng YG, Fei X, Fujie Y, Hashimoto K, Kimura KD. In actio optophysiological analyses reveal functional diversification of dopaminergic neurons in the nematode C. elegans. Sci Rep. 2016 May 19;6:26297. PMID: 27193056 DOI: 10.1038/srep26297

3) Chen J, Sasaki H, Lai H, Su Y, Liu J, Wu Y, Zhovmer A, Combs CA, Rey-Suarez I, Chang HY, Huang CC, Li X, Guo M, Nizambad S, Upadhyaya A, Lee SJ, Lucas LAG, Shroff H. Three-dimensional residual channel attention networks denoise and sharpen fluorescence microscopy image volumes. Nat Methods. 2021 Jun;18(6):678-687. Epub 2021 May 31. PMID: 34059829 DOI: 10.1038/s41592-021-01155-x.

4) Wen C, Miura T, Voleti V, Yamaguchi K, Tsutsumi M, Yamamoto K, Otomo K, Fujie Y, Teramoto T, Ishihara T, Aoki K, Nemoto T, Hillman EM, Kimura KD. 3DeeCellTracker, a deep learning-based pipeline for segmenting and tracking cells in 3D time lapse images. Elife. 2021 Mar 30;10:e59187. PMID: 33781383; DOI: 10.7554/eLife.59187.