

研究終了報告書

「生命活動をリアルタイムに追跡する超高速 3D 蛍光顕微鏡」

研究期間：2017 年 10 月～2021 年 3 月（コロナ延長支援：2021 年 6 月まで継続）

研究者：三上 秀治

1. 研究のねらい

従来よりも桁違いに高速な、1,000 ボリューム/秒の超高速 3D 蛍光顕微鏡技術を開発する。これにより、活動する生物をリアルタイムかつ正確に記録し、神経活動をはじめとするさまざまな生命活動の組織・細胞レベルでの理解に貢献する。

技術開発はハードウェア技術、ソフトウェア技術の両面において追究し、本研究を通じて撮像速度の本質的限界を明らかにする。また、技術開発とともに、アプリケーションの探索も行う。観察対象を広げるだけでなく、光操作技術や解析技術との組み合わせにより、生命科学における新しい研究手段の開拓を目指す。開発する技術が従来よりも桁違いに高速であり、現時点の想定を超えた新規アプリケーションが見いだされる可能性が高いため、既存のアイデアにとらわれずに各分野の専門家と連携する。

本研究の開発技術は高速化に主眼を置いているが、これは言い換えれば観測対象から取得する情報量を極限まで高める研究であるとも言える。本研究の方向性が新たな技術潮流となることで、従来の単なる可視化ツールとしての顕微鏡が、マクロな生命活動からビッグデータを抽出するツールへと変革していくことが期待され、データ解析手法・観察対象の選択（種類・環境・刺激方法など）との相乗効果によって生命科学の新たな研究手法開拓の潮流を生むことを狙う。

2. 研究成果

(1) 概要

目標となる 1,000 ボリューム/秒での撮像が可能な超高速ライトシート顕微鏡を設計、開発した。高速化のためのアイデアとして、イメージセンサーでの撮像 1 回あたり複数枚の 2D スライス像を撮像可能な像スキャン法を考案し、これを実装するライトシート顕微鏡光学系を構築した（図 1）。これにより、現時点で 400 ボリューム/秒での生体試料の 3D 蛍光撮像に成功した（図 2）。撮像速度はスキャナデバイスにより制限されており、現在実装されているスキャナをより高速なスキャナに置き換えることで 1,000 ボリューム/秒を上回る速度で撮像が可能である。

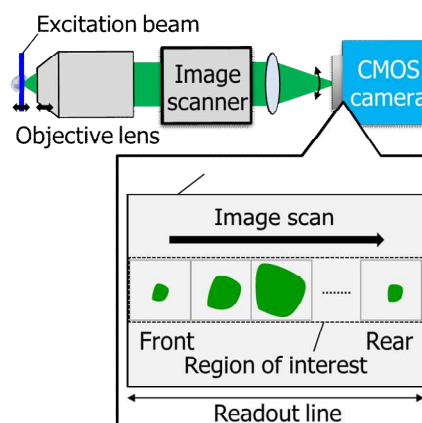


図 1 像スキャン法の概略

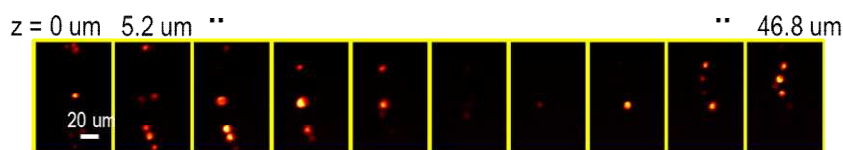


図2 400 ボリューム/秒でのクラミドモナスの 3D 蛍光画像(自家蛍光を観察)

さらなる高速化を達成するためのソフトウェア技術として、深層学習を用いた画像の解像度向上の技術開発に取り組んだ。本技術は低解像度の入力画像に対して高解像度画像を出力するものであり、より少ないデータ量から所望の画像を構築できるため、カメラのデータレートで制限される撮像速度の限界を上回ることが可能である。本研究では細胞の蛍光画像を多数用意し、低解像度と高解像度の画像をセットで深層学習機に学習させ、20x20 ピクセルの画像から 80x80 の高解像度画像の生成が可能であることを示した。これは 16 倍の解像度向上、すなわち 16 倍の高速化が可能であることを意味する。

上記の技術開発と並行して、開発技術の応用先の探索を行った。当初は自由行動する線虫の神経系の観察を主眼に置いていたが、膜電位イメージングや光遺伝学との組み合わせをはじめとする様々な応用先が見出され、開発技術が生命科学の幅広い分野で適用されることが見込まれる。

(2) 詳細

開発項目1: ハードウェア開発

本研究では高速かつ光褪色が少なく長時間観察が可能な3D 蛍光撮像方式としてライトシート顕微鏡を採用し、高速化方式の検討を行った。種々の方式検討の結果、高速化のための独自アイデアとして像スキャン法を考案し、これを実装した。像スキャン法はイメージセンサーでの1回の撮像において複数の2D スライス像を取得する方式であり、これにより従来のライトシート顕微鏡に比べて大幅な撮像速度の向上が可能となる。

上記高速化方式の実装にあたっては、試料の奥行き方向の走査を高速に行う必要があり、そのような高速走査が可能な実装形態として斜めライトシート顕微鏡法を採用した。斜めライトシート顕微鏡法は視野特性などの結像性能が対物レンズの選定や中間結像倍率などに大きく影響されるため、結像光学系を理論計算および数値シミュレーションによりモデリングして解析し、本結果に基づいた設計の修正を行った。

上記の方式検討と設計に基づき、高速 3D 蛍光顕微鏡光学系を構築した。構築にあたっては組立て手順および光軸調整手順を確立し、本来の性能を担保した。また、本顕微鏡光学系は光スキャナやカメラなどの複数の機器の同期制御が必要であり、これらを一体制御するための制御システムを構築した。本システムを制御するソフトウェアは、将来的な汎用性を念頭に置き、3 軸方向の視野範囲や撮像速度、露光時間を各デバイスが許容する範囲で自在に調整できるようにした。これにより、さまざまな種類の試料の撮像に対応することが可能となる。

構築した顕微鏡において、生体試料(クラミドモナス、蛍光体としてはクロロフィルの自家蛍光を想定)に対して 400 ボリューム/秒での超高速 3D 撮像を行うことに成功した。また、上記ソフトウェアの設定変更により、直ちに異なる撮像条件、例えば撮像速度を 1/4 にして奥行き方向のボクセル数を 4 倍にする、等のフレキシブルな調整が可能であることも確認した。また、

400 ボリューム/秒での撮像における励起光強度や蛍光輝度より、1,000 ボリューム/秒を上回る撮像速度でも十分な輝度での撮像が可能であることを確認した。高速レゾナントスキャナの導入により、生体試料を用いた 1,000 ボリューム/秒での動作が見込まれる。

開発項目 2: ソフトウェア開発

画像の解像度を向上する複数の方式を検討し、低解像度画像から高解像度画像を復元する方式を検討した。本方式においては、まず対象となる試料の高解像度画像と低解像度画像のペアを多数用意し、これらのデータセットをニューラルネットワークに入力することによりこれらの画像の間の相関を学習する。次に低解像度画像を学習済みのニューラルネットワークに入力することで高解像度の出力を得る。本検討では多数の細胞の蛍光画像を用い、画素数を 1/4 から 1/16 程度まで少なくした粗い画像から元の画像を復元する動作を確認した。これにより、3D 蛍光撮像の解像度(すなわち 1 コマあたりのデータ量)を下げて撮像することで一定時間に取得できるコマ数を増大する、すなわち高速化する見込みを得た。画素数を 1/4 から 1/16 に低減することで、最終的に取得される画像の解像度を保ったまま撮像速度を 4 倍から 16 倍に高速化する見込みが得られた。

開発項目 3: アプリケーション開発

本研究課題で開発する超高速 3D 蛍光顕微鏡を実用的場面で適用するための検討を行った。まず、当初より適用を想定している線虫の頭部神経の観察に向け、適切な光源と蛍光タンパクの組み合わせの選定を行った。具体的には FRET 型センサーと強度変化型のセンサーとで比較検討を行い、画像の輝度や光褪色、励起光波長に対応する光源の入手性などを考慮し、結果的に後者を選択することとした。また、さらなる適用範囲の拡大を検討してさまざまな研究者との議論を行い、膜電位イメージングや光遺伝学との組み合わせが有用であることが明らかになった。以下に述べる今後の展開においてこれらの知見を活かしていく。

上記に加え、開発技術を様々な生体試料に応用する準備を進めている。特に報告者が運営する北海道大学内のニコンイメージングセンターおよび先端バイオイメージング支援プラットフォームの枠組みでの共用化の準備を行い、今後幅広く利用者を受け入れるための体制作りを行った。

3. 今後の展開

本研究課題により超高速 3D 蛍光顕微鏡の基本動作の実証が確認できたため、今後は開発技術の応用展開を進めていく。当初より想定していた線虫の頭部神経活動の観察のほか、複数の有力な適用先が見つかっているため、これらの適用先に対して撮像データを取得し、必要に応じて個別の適用先に応じた装置の改良も行っていく。加えて、2. で述べたように報告者が運営する北海道大学内のニコンイメージングセンターおよび先端バイオイメージング支援プラットフォームの枠組みでの装置の共用化を推進し、新たなアプリケーションの開拓も継続的に行う。

一方で、本研究課題の遂行を通じて、開発課題の性能限界も明らかになってきた。開発技術の応用展開に加え、さらなる撮像の高速化、高性能化を可能にする技術開発を進めていく。さらに、今後は観察技術のみならず、光操作のための光波制御技術などの光技術開発を行い、光技術に基づく多面的なアプローチから生命科学に貢献することを狙う。

4. 自己評価

研究目的に鑑み、生体試料で 1000 ボリューム/秒での撮像が可能な顕微鏡技術の開発に成功したことは、明確な技術的新規性があるだけでなく、応用的な意義が高く、今後生命科学の様々な場面で適用可能なコア技術を創出したという点で、十分目的を達成したと言える。応用先については当初は線虫の頭部のみを想定していたが、研究期間を通じた様々な研究者との議論により様々な展開が可能であることが見出され、当初の想定を超えた社会的意義を生み出すことが期待される。加えて、研究期間中にはミリ秒スケールでの観察を必要とする膜電位センサーの急速な発展もあり、生命科学における高速撮像のニーズは研究着手時に比べて格段に高まっている。これまで蛍光顕微鏡の高速化にフォーカスした研究はごく限られており、時代のニーズに沿った新たな技術開発の方向性を示したという意味でも、本研究課題の遂行は社会的意義を有していると言える。

一方で、開発技術を生命科学において真に実用的な場面で応用するためにはさらなる装置の改良もしくはカスタマイズが必要であり、この点に関しては今後の継続的な技術開発が必要である。また、社会・経済への波及効果を最大化するための成果発表は、技術開発に時間を要したことから本研究期間内のみならず、研究期間終了後も原著論文や学会発表等の形で継続的に行っていく必要がある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会、研究会での発表

- (招待講演)三上秀治、「高速蛍光顕微鏡技術の最前線から見てきた未来のバイオイメーシング」、ABiS Symposium「先端バイオイメーシングの現在そして未来 ～我が国の研究戦略～」(オンライン、2021 年 2 月 24 日)
- (招待講演)Hideharu Mikami, "High-speed fluorescence imaging: toward integration of photonics, informatics, and life sciences", The 21st RIES-Hokudai International Symposium (Online, Dec. 10th, 2020)
- 三上秀治、「オプトメカニカル画像走査による高速ライトシート顕微鏡」、第 58 回日本生物物理学会年会(オンライン、2020 年 9 月 17 日)

受賞

- 2021 年 3 月 第 5 回応用物理学会フォトニクス奨励賞、応用物理学会
- 2019 年 12 月 第 60 回光学論文賞、日本光学会