

研究報告書

「生体ライブイメージングにおける最適なデータ取得のための技術革新」

研究期間：2018年4月～2020年3月
研究者番号：50208
研究者：曾我部 舞奈

1. 研究のねらい

顕微鏡を用いた生体組織解析は、生命科学や医学研究にとってなくてはならない存在である。その中でも二光子励起顕微鏡は組織透過性に優れ、固定して透明化する等の操作なしで、生きている状態のマウス内の組織や細胞を観察できる優れたツールであり、そして、二光子励起顕微鏡に求められていることは、生命現象を組織という構造がある中で、動きで捉えて可視化することで、その観察を正常組織の動態や、病態の解明につなげてきた。しかしながら、現段階では多くのリミテーションが存在するため、どのような状況、組織でも適応できる頑健性は持ち合わせていない。こういった制約を生んでいるライブイメージングの問題点としては、例えば計測機器自体のノイズ、光退色やレーザーによるダメージによるシグナルの喪失、データサイズの膨大化とそれに伴う解析処理の煩雑化等が存在している。

それだけではなく、生きた個体内の組織構造を捉える目的での生体内ライブイメージング特有の問題も存在する。ひとつ目の問題点は、呼吸や心拍による視野のブレや、素早い細胞動態撮像時のモーションブラーの影響による取得データの不鮮明化、2つ目は、細胞のダイナミックな動きに対して、従来撮像で得られる視野が狭すぎることである。そこで本研究では、これらの問題に対して、ハードウェアおよびソフトウェア的なアプローチの両者を融合させ、実際の生体イメージング環境で技術開発、検証を行い、より実用性の高いイメージングを実現することを目指した。これらの技術により、高速で動く物体やダイナミックな細胞動態を捉えることが可能になり、これまで組織の特性によって制限されてきた生体内ライブイメージングの応用可能性が広がり、正常組織の動態や、病態の解明につながることを期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

個体を用いたライブイメージング特有の問題として、呼吸や心拍のような制御できない動きが存在しており、この結果、生体内の組織動態情報を鮮明に得ることは難しかった。そこで、本研究では、顕微鏡を使うユーザー側では制御できない撮像対象の動きの影響を少なくした高速イメージングの実現し、撮像ターゲットの幅を広げることを目標とした。これにより、血流のような動きの速い、なおかつ制御できない動きの影響を受けやすい組織においても、従来に比べ細胞ひとつひとつの形態が明瞭なイメージングが可能となった。

続いて、また、二光子励起顕微鏡の利点である、深さ方向の情報取得能の高さが挙げられるが、撮像対象の動きが広範にわたる再生時の組織動態イメージング等では、深さだけでなく、視野に捉えた細胞の情報を平面方向に追跡し取得し続け、広範囲に情報を取得する

必要がある。しかし、広視野を観察するためには、時間がかかり、さらにデータ量も膨大化する。そのままでは、再び時間分解能が犠牲になる撮像しかできない。イメージングの際は、細胞の存在しない領域を撮像するメリットはないため、細胞のいる領域だけを選択して撮像すれば、時間とデータ量を削減することができる。そこで、細胞や組織構造同士のつながりの情報を取得するために十分な撮像空間を設定する多点イメージングの最適化技術の開発に取り組み、筋組織における再生像の観測において、開発手法の有用性を示した。

(2) 詳細

研究テーマA「生体の動きにロバストなイメージングの実現」

生体イメージングを行い、細胞や組織動態情報を十分に得るために重要となるファクターは、時間解像度と空間解像度、そして、撮像領域の広さである。

本フェーズにおいて、画像のスパース性を用いた画像再構成手法を提案し、筋組織において一定の画質改善効果があることを示した。

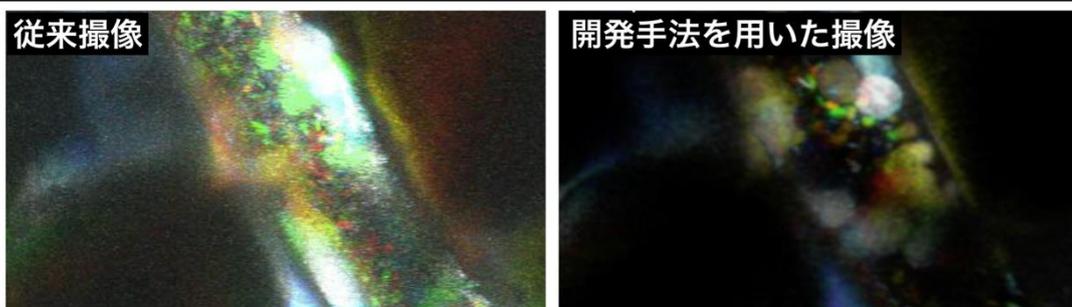


図1 開発手法を用いて撮像したマウス血管内像: Depth coding と呼ばれる疑似カラーを用いて深度情報を表示している(表層に近い部分が青色、深層部に行くに従い、緑→黄→赤と変化する)。高速撮像によりモーションブラーや生体の動きによるブレを軽減した撮像が可能となった。

しかし、これまでの画像再構成手法では、正解画像があることを前提としてきたため、他組織への汎用性は低いことが問題であった。さらに血管等のイメージングを行った際、前述した生体の持つ制御できない動きによる視野のブレ、そして血管内を高速で流れる細胞を捉えるには不十分な時間解像度など、様々な問題が判明した。そこで加速フェーズにおいては、サンプルの撮像位置を制御するステージの開発、および高速撮像手法の開発を行い、画像のスパース性を用いた再構成手法と組み合わせることにより、これまで撮像が難しいとされてきた血管動態のイメージングを実現した(図1)。

また、再構成時、パラメータ設定時に既知の形態を持つ蛍光ビーズと、非参照画像評価手法(naturalness image quality evaluator)を用いることで、これまで問題となっていた正解画像の取得が難しい組織等でのイメージング時にも本手法を適応可能となった。実際に開発した装置、プログラムを用いて様々な組織でイメージングを行なった結果、従来のイメージングと比較して良好な画質改善効果が認められ、本手法の汎用性・頑健性を示すことができた(図2)。

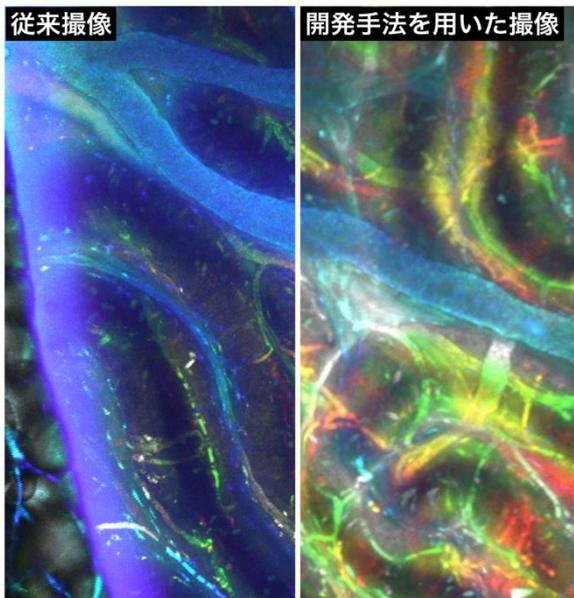


図 2 開発手法を用いて撮像したマウス血管組織全体像: 空間解像度が増加し、ノイズが軽減するため、より鮮明な画像取得が可能になった。

研究テーマ B「広範な生命動態解明のための自動多点イメージングの実現」

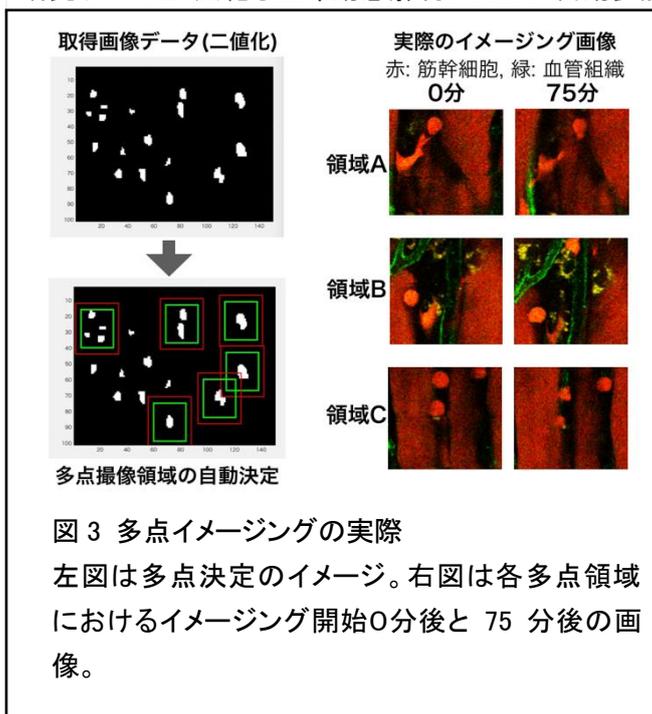


図 3 多点イメージングの実際

左図は多点決定のイメージ。右図は各多点領域におけるイメージング開始0分後と 75 分後の画像。

頑健性の高い画像再構成、取得手法が完成したことで、より広い空間の撮像に、撮像リソースを利用することが可能になった。しかしながら、すべての空間を詳細に撮像することは、時間解像度の低下を引き起こすため、時間解像度とのバランスをとった状態で、広範な撮像を実現することが望ましい。そこで、蛍光シグナルの存在密度を元に撮像の重要度を算出し、そのデータを元に、どこで撮影を行えば、少ない回数の撮影で広範な組織の生命現象を正確に網羅できるかを設定し、開発したサンプルの撮像位置を制御するステージにて撮

像を行なった。撮像対象としては、比較的動きの小さい、筋再生初期の筋幹細胞をターゲットとした。その結果、実際の生体イメージング下において自動での多点設定及び継続的なイメージングを実現し(図 3)、本手法を用いて、3D で動き回る細胞を対象にしたイメージング制御機構の有用性を示すことができた。

3. 今後の展開

本手法のリミテーションとしては、前提条件として生体画像中のシグナルがスパースであることを利用しているため、画像全体にシグナルが存在している組織、例えば細胞質内に EGFP を発現するマウスの子宮平滑筋等では、シグナルが均一に発現し、密度が高いため、その効果が得られにくく、通常の bicubic 等のフィルター処理を用いた画像処理を行った方が良いケースもある。この点に関しては、再構成時のパラメータ調整に用いるビーズ濃度や大きさ等を検討することで、改善が可能であり、それらを最適化する手法も今後必要になると考えられる。

また、正解画像がない条件での生体画像の評価、という部分はまだ未開の領域であり、より良いパラメータ設定のために正解画像がない条件での生体画像の評価手法の改善は、今後の生体画像に対する画像処理アプローチに重要になると考えられ、評価プラットフォームの整備も今後開発する必要がある。

また、生物学分野における今後の展開としては、本手法を用いて、筋再生のイメージングから得た情報を生命現象解明へ役立て、本手法の適用モデルを示すとともに、他組織への拡張性という点について、角膜や、皮膚の病態イメージング等、他の生命動態を通して、それぞれのイメージングに適したパラメータ設定を自動で行うための、統合的な環境を構築する必要があると考えられる。

4. 自己評価

本研究では、生体内ライブイメージングが抱える様々な問題を解決するひとつの手法を提案した。その結果、深さ方向の情報を保持したまま、細胞ひとつひとつの観測が可能な血流動態イメージングを実現することが可能となった。さらに様々なニーズに合わせたイメージングができることを実証するため、実際の筋組織やリンパ管組織、脂肪組織や角膜、生殖器等を用いてイメージングを行うことで、本手法の頑健性を示すことができ、これにより、より多くの生体イメージングユーザーに有益な手法であることを示すことができたと考えられる。

今後はこれらの技術を幅広い生命科学研究者へ提供できるプラットフォームを作るとともに、本研究を応用することで生体の制御できない動きやダイナミックな変化に対応する必要性のある他の生体・医療イメージング分野へ応用し、生体計測分野の発展を目指す。

研究体制としては、研究者が単独でプログラムの実装からマウスを用いた生体イメージング等の全ての作業を担当した。研究経費は主に二光子励起顕微鏡の維持・稼働費および GPU 搭載演算 PC の購入に充当し、顕微鏡から取得した生体画像情報の処理を行なった。

研究成果については、バイオフォトンクス分野での論文発表に加えて、情報学、生物学分野の学会における招待講演、および企業関係者に向けた講演会等で発表するとともに、京都大学アカデミックデイにおいては、一般の来場者や小・中学生に対して、最先端の生体イメージング技術について発表を行った。これらの活動は、生命科学・医学研究における情報科学技術の活用促進に貢献できたものと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Sogabe M, Ohzeki M, Fujimoto K, Sehara-Fujisawa A, Nishimura S. “Restored interlaced volumetric imaging increases image quality and scanning speed during intravital imaging in living mice”. Journal of Biophotonics, 2020.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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)

- 1.「スパースモデリングを用いた生体・医療イメージング画像処理の実際」曾我部舞奈. 医療と介護の総合展 メディカルジャパン, 大阪 (2019)
- 2.「もの言わぬ動物たちのための計測」曾我部舞奈. システム制御情報学会講演会, 大阪 (2019)
3. “Improving under-Sampled Imaging Data Quality in Live Tissue Imaging”. Sogabe M, Ohzeki M, Sehara-Fujisawa A. Focus on microscopy, London (2019).
4. 京都大学アカデミックデイ「細胞たちのホームムービー撮影係」京都 (2019)