

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15309

研究課題名(和文) 機械学習を用いた走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の高速化

研究課題名(英文) Improvement of temporal resolution of scanning ion conductance microscopy using machine learning

研究代表者

井田 大貴 (Ida, Hiroki)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：80844422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面には一般的な光学顕微鏡では観察の困難な無数の微小構造が存在しており、それらのダイナミクスが細胞機能に関与している。走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)はこの様な微細構造の変化を観察できるツールであり、本研究では機械学習との融合による時間分解能の改良を目指した。機械学習には大量の教師データが必要であるため、まずは長時間自動で計測可能な装置系、ならびに機械学習に必要な実行環境を整備した。また、作製した装置系を用いて高画素でのイメージングに成功しており、SICMで計測したデータを学習可能な形に変換するプログラムも開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外界と細胞を繋げている細胞膜のナノスケール形状を連続的に評価することは、細胞機能の理解を深める上で重要である。この様なナノ構造を生きた状態で可視化できる走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の時間分解能をさらに向上させることで、観察できる細胞現象を広げ、その直接的な評価が可能になる。また、本研究を更に発展させることで、既に取得した画像や既存の装置系に対しても追加で情報を引き出すことが出来るようになり、解像度の向上などが見込める。

研究成果の概要(英文)：Visualization of nanoscale structures on living cell membranes allows for further understanding the details of cellular mechanisms. Scanning ion conductance microscopy (SICM) is a visualization technique for sub-micrometer structures on cell membranes. To obtain further information of rapid cellular reaction at nanoscale, it was aimed to improve temporal resolution of SICM using machine learning. To collect large amount of training data needed for machine learning, a new SICM system was developed for long-term measurements. Moreover, high quality images for machine learning could be obtained using this system. Also, a program was developed to convert various sets of SICM data into training data.

研究分野：分析化学

キーワード：走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 電気化学 単一細胞計測 機械学習

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内やその表面には、光の回折限界によって規定される光学顕微鏡の分解能(およそ 200 nm)以下の構造が数多く存在し、それらが協調的に作用する事によって細胞全体の機能発現を実現している。そのため、細胞の微細構造を観察するための様々な手法が開発されてきた。例えば、電子顕微鏡は電子線を照射して試料表面からの二次電子や透過した電子から結像し、固定化細胞を高空間分解能で観察できる。この様な手法の一つである走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)は、生細胞の非侵襲での計測に特化している(図1)。50~100 nm程度の開口径を持ったガラスピペットに有機電解液を充填し、内部に疑似参照電極を挿入する。このナノピペットをプローブとして用い、試料近傍で先端を流れるイオン流が空間的に障害されることを電流値の変動から検出する事で、非接触でピペット試料間の距離制御が可能である。この距離制御を行いながら試料表面を走査することで、ナノスケールの表面形状を取得できる。

大方の走査型プローブ顕微鏡の研究の潮流と同じく SICM にもこれまで様々な高速化が行われてきた。例えば、本研究の代表者らは、SICM の走査アルゴリズムの改良や高共振周波数の位置制御装置の換装などにより従来の 50 倍以上の速度でのイメージングに成功した<sup>[1]</sup>。その後も様々なグループが SICM の走査速度の改善に挑戦しているが、現在は電流増幅器の性能限界がボトルネックとなりつつあり、ハード面での改変による高速化を達成するには電気工学的な制約を克服しなくてはならない。

### 2. 研究の目的

(1) 長期間自動でイメージングを取得できる SICM 系を開発し、教師データを収集する。

(2) 機械学習を用いて、SICM の計測データからの有用な知見の抽出や高解像度画像の生成を行い、取得できる情報量を増加させて時間分解能を改善させる。

### 3. 研究の方法

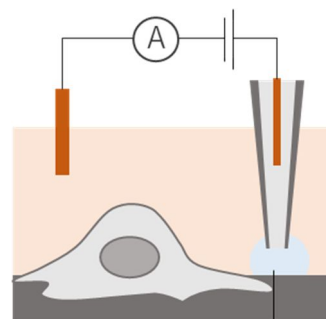
近年のハードウェアの性能向上によって一般化した深層学習は、従来では困難であったリアルな画像生成や物体の認識といった課題を解決できる。特に、低画素の画像から自然な高画素像を生成できる超解像度技術は、MRI などの高解像度化にも用いられており、医療現場などにも用いられている。しかし、深層学習には大量の教師データが不可欠であるという課題が存在し、教師データの準備段階から工夫が必要となる。

一方で、SICM の課題の一つはスループットの低さであり、これは教師データを準備するのにあたって大きな制約となる。一度の SICM 計測で取得できる領域は単一細胞の一区画と非常に狭く、計測中は SICM 系に精通した測定者が装置に張り付いている必要がある。また、SICM ではナノメートルスケールの位置制御を行うためにピエゾステージを使用しているが、ピエゾステージは可動域が数十~数百マイクロメートルスケールと非常に狭く、別の領域を測定するには粗動ステージと組み合わせる必要がある。ナノピペットの取り付けなどの準備や装置のパラメータ設定なども熟練者の測定勘に依るところが大きく、データの品質や計測速度は熟練度に大きく左右される。

### 4. 研究成果

(1) 自動イメージング可能な SICM 系の開発

前述の通り、機械学習に向けた SICM 系の最大の課題の一つはスループットの低さである。そこで、顕微鏡のステージと一体化し、一つの計測領域を走査し終えたあとに計測領域を自動で変更できる自作電動ステージとアルゴ



イオン流の障害

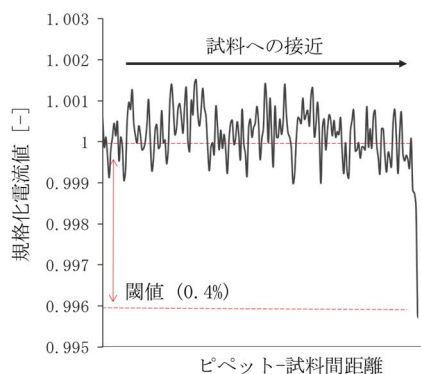


図1 SICMの測定模式図(上図)と試料近接時の電流値変化(アプローチカーブ、下図)

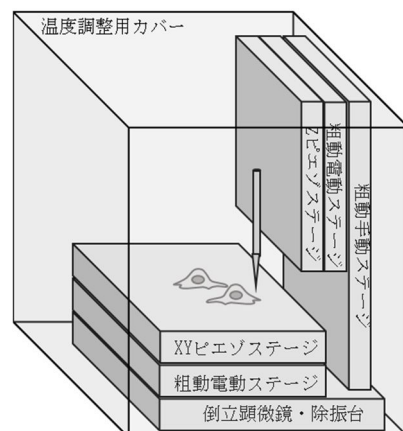


図2 連続計測用 SICM 系の模式図

リズムを開発した。また、生細胞の場合は長期間に及ぶ大気条件下での計測がストレスとなるため、前述のステージを搭載し、培養温度に保持可能な長期連続計測用の SICM 系も立ち上げた(図 2)。SICM のナノメートルスケールの空間分解能を発揮するためには、熱膨張に起因する像の歪みは大きな課題であり、本研究ではその低減にも成功した。今後はパラメータの設定などの測定者の技量に依拠する操作の自動化を目指す。

#### (2) アプローチカーブからのデータ抽出

SICM の走査手法はいくつか存在するが、現在はホッピングモードと呼ばれる手法が一般的である。この手法では、測定点ごとに針をマイクロメートルスケールで上下させて距離制御を行うが、各測定点でナノピペットの移動距離と電流値変化をプロットした電流データ(アプローチカーブ)を取得できる(図 1 下図)。アプローチカーブであれば、128\*128 pixels のイメージを一回取得すれば 16384 個のデータを得られるため、大量の教師データを用意できる。そこで、周辺の形状情報とアプローチカーブを対応させて切り出すことの出来るプログラムを開発した。一方で、教師データの質が学習に大きく影響する事がわかり、電流増幅器の帯域をあげつつ高品質な測定データを取得して再度学習に挑戦している。

#### (3) 機械学習環境の整備

深層学習が一般的な手法になりつつあるとはいえ、実行には高スペックのプロセッサと環境の構築は不可欠である。COVID-19 の世界的流行に伴う遅滞がみられたものの、実行環境を整備し、一般的な画像生成問題を解決できる状態を確立できた。

#### (4) 機械学習のための教師データ取得

新しく構築した SICM 系を用い、機械学習のための教師データの取得に挑戦した。計測領域の変更など、開発した各技術は上手く機能したものの、細胞分裂中の細胞といった盛り上がった構造を回避しつつ、ナノピペットが接触・損傷しない様にピペットを水平方向に移動させるには、Z 方向に可動域の大きいピエゾステージが必要であることがわかり、更なる機器開発が進行中である。また、計測点を増やした高画素でのイメージングを行うには時間がかかり、熱ドリフトの影響が大きくなる。しかし、本 SICM 系では従来の装置よりも安定して計測が可能であり、高画素像でも一定の品質でのイメージングに成功した。加えて、学習として使えるデータの情報量を増すため、SICM 計測と同時に光学顕微鏡像も取得したが、高 NA のレンズでは解像度が高い反面、細胞膜表面全体に焦点を合わせる事が難しい。そこで、SICM 像によって基板から細胞膜表面までの距離を算出し、膜表面に焦点のあった画像を作成できるプログラムを開発した。

#### < 引用文献 >

[1] H. Ida, *et al.*, *Anal. Chem.*, 2017, 89, 11, 6015-6020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hiroki Ida, Yasufumi Takahashi, Akichika Kumatani, Takeshi Yoshida, Rikinari Hanayama |
| 2. 発表標題<br>Aspiration and evaluation of exosomes before secretion using nanopipette              |
| 3. 学会等名<br>Pacifichem 2021（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>井田大貴                      |
| 2. 発表標題<br>ナノピペットを用いた 内因性微粒子の直接回収と評価 |
| 3. 学会等名<br>第94回日本生化学大会               |
| 4. 発表年<br>2021年                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|