

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02437

研究課題名（和文）情報通信技術を応用した光学的大規模膜電位計測法の開拓

研究課題名（英文）Development of optical large-scale membrane potential measurement methods based on communication technology

研究代表者

三上 秀治（Mikami, Hideharu）

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：60754976

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：膜電位応答性蛍光タンパク質を用いた大規模な神経活動計測手法の開発を目的として種々の検討を行った。まず、計測条件検討のために自作の多光子顕微鏡を設計・構築し、神経細胞からの蛍光画像取得を可能とした。次に、測定対象の神経細胞が計測中に移動することを想定し、細胞位置推定・追跡アルゴリズムの開発および原理検証を実施した。さらに、入手可能な対物レンズ、スキャナ等の光学素子を用いた多点検出手法の実装形態について検討するとともに、具体的な実装形態における計測頻度の見積もりを数値シミュレーションおよび理論計算により行い、約2000個のマウスの神経細胞をおよそ1kHzで計測可能な条件を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は脳内のニューラルネットワークのふるまいを実際に記録するための手段を検討するものであり、脳に対する基本的な理解および神経疾患の機序解明につながるという点において理学、あるいは医科学としての学術的意義および社会的意義を有する。さらに、本研究では従来標準的に用いられてきたイメージングに基づく神経活動計測手法の限界を打破するための新たな計測手段を追究するものであり、工学の観点からも新たな計測学を開拓するという点で学術的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Various investigations were carried out to develop a method for large-scale measurement of neural activity using membrane potential-responsive fluorescent proteins. First, a home-built multiphoton microscope was designed and constructed to study the measurement conditions, enabling fluorescent images to be acquired from neurons. Next, assuming that the target neurons move during the measurement, we developed an algorithm for estimating and tracking the cell positions and verified the principle experimentally. Furthermore, the implementation form of the multi-point detection method using available optical elements such as objective lenses and scanners was investigated, and the measurement frequency in a specific implementation form was estimated by numerical simulation and theoretical calculation, and conditions were found under which approximately 2000 mouse neurons could be measured at approximately 1 kHz.

研究分野：バイオフォトニクス

キーワード：多光子顕微鏡 神経活動計測 膜電位イメージング

1. 研究開始当初の背景

神経科学において、神経系の活動の実態である膜電位の信号伝達ネットワークの全貌を捉えることは究極的な技術目標のひとつである。現状、大規模 (>1000 程度を想定) 神経活動計測は Ca²⁺応答性蛍光タンパク質を用いた光学イメージングが唯一の手段であるが、Ca²⁺濃度変化が低速 (~1s) のため背後にある神経活動の実態である高速 (~1ms) な膜電位ダイナミクスについて得られる情報は限定的だった。ところがここ数年で実用レベルに達した膜電位応答性蛍光タンパク質が続き報告され、大規模膜電位計測の道が開かれつつある。最新の報告では高速 CMOS カメラなどを用い、数個の神経細胞の活動電位を捉えている。しかしながら、大規模膜電位計測の実現は、光学的計測技術の性能、特に計測速度が圧倒的に不足しているために見通しが立っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、蛍光画像の撮像を通して神経活動を計測するという既成概念を根本的に見直し、神経活動の大規模計測に最適な手法を開発することである。具体的には、記録対象となる神経細胞群に対して都度撮像を行うのではなく、各神経細胞に対して最小限の記録点数により膜電位信号を取得する多点同時検出のアプローチをとり、同時検出のための各種方式の比較検討を通して最適な方式を見出すことを目指す。

3. 研究の方法

多点検出に適した手法として多光子顕微鏡法を採用し、基本特性を評価するための装置の設計および構築を行った。本装置には多点検出のための光制御デバイスとして空間光変調器を組み込み、時分割多重、周波数分割多重などの情報通信で用いられる多重化方式を実装可能とした。併せて、数値シミュレーションを実施し、各種生体試料のニューロン群の3次元配置や実際の光制御デバイスの性能を想定した上での実効的な計測頻度の見積もりを行った。また、実際の計測において必要となる、多点検出結果から細胞位置を推定するアルゴリズムの検討および動作確認を実施した。

4. 研究成果

(1) 多光子顕微鏡の構築・評価：理論計算やシミュレーションでは推定が困難な蛍光信号の信号レベルを評価するための自作多光子顕微鏡を設計・構築した。光源には多光子顕微鏡において一般的に用いられる、中心波長が 920nm のフェムト秒パルスレーザーを適用した。麻酔下の線虫の頭部神経群を蛍光タンパク質で標識したものを撮像し、多光子顕微鏡としての基本動作の確認を行った。また、200nm の蛍光ビーズの撮像により空間分解能の評価を行い、面内空間分解能がおおよそ 500nm (半値全幅で評価) と、個々の細胞を分解して検出するのに十分な分解能を有することを確認した。本装置には 400Hz で動作する高速な空間光変調器も搭載可能であり、各種の多点同時検出方式の基礎評価に用いることも可能である。

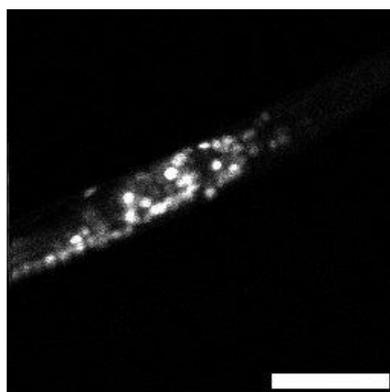


図1：製作した二光子顕微鏡で撮像した線虫の頭部神経細胞。スケールバー：30 μ m

(2) 細胞検出アルゴリズムの開発、検証：計測対象となる細胞群の位置が動かない場合は、通常の多光子顕微鏡撮像を低速で行った後に画像から一般的な画像処理プロセスにより細胞位置を特定し、各細胞座標に励起レーザー光を集光することで多点検出が可能となる。一方、計測対象となる細胞の位置が時間とともに変動する場合は、低速な多光子顕微鏡撮像では細胞位置をとらえることが困難な場合がある。このため、移動する細胞の座標を多点検出により特定するアルゴリズムの開発および検証を行った。具体的なアルゴリズムとして、前半、後半のフェーズに分け、前半ではランダムウォークにより蛍光信号を検出する動作を行い、後半では蛍光が検出された位置の周辺の複数座標での蛍光輝度を検出することにより細胞の中心座標を決定することとした。数値計算によりこの方式の検証を行い、円形で一様な蛍光輝度分布を持つ移動物体に対

して検出動作がなされることを確認した。次に、実験において当該アルゴリズムの動作を検証した。実験では複数の $10\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズに対して 1 秒おきに $1\ \mu\text{m}$ のステップで平行移動する動きを与え、これらにフェムト秒レーザー光を集光して二光子励起蛍光を検出することとした。本実験では簡単のために 2 次元平面上に配置された蛍光ビーズを用いて実験を行ったが、集光位置の変調には空間光変調器を用いたため、変調パターンの制御により容易に 3D に拡張することが可能である。実験の結果、複数の蛍光ビーズを検出、追跡する動作が確認された。位置の検出精度はおおよそ $3\ \mu\text{m}$ であり改善の余地はあるものの、アルゴリズムの修正により精度を改善する目途は立っており、今後は精度と速度の両面から適切なアルゴリズムの選定およびパラメータの調整を行う。

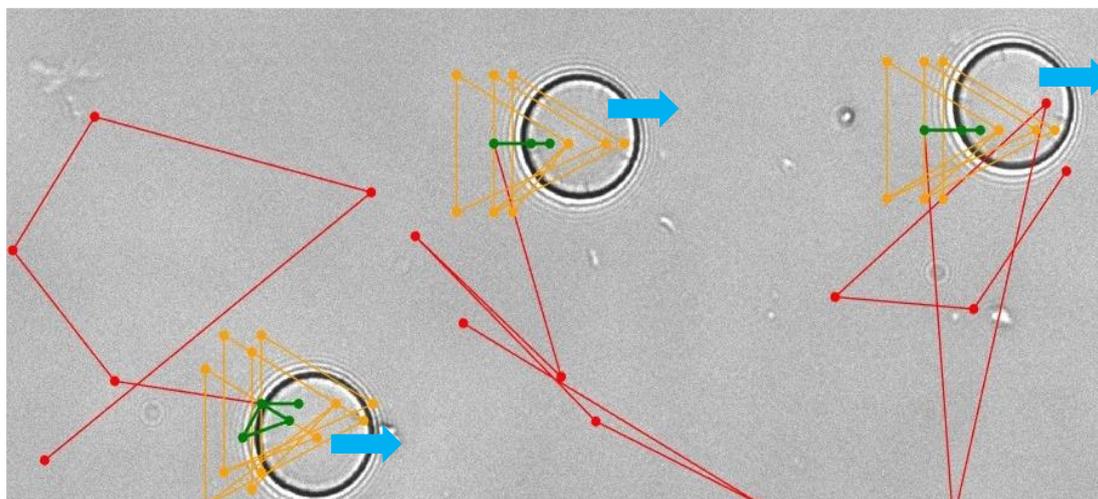


図 2：細胞検出・追跡アルゴリズムの原理実証。1 秒ごとに $1\ \mu\text{m}$ のステップで右方向に移動する 3 つの蛍光ビーズ（直径 $10\ \mu\text{m}$ ）を検出・追跡したもの。明視野像に計測点を重ねて表示した。赤は前半フェーズでの計測位置の軌跡、オレンジは後半フェーズでの計測位置の軌跡、緑は推定位置の軌跡。

(3) 計測頻度の見積もり：入手可能な対物レンズ、スキャナ等の光学素子を用いた多点検出手法の実装形態について検討するとともに、具体的な実装形態における計測頻度の見積もりを数値シミュレーションおよび理論計算により行った。方式としては時分割多重方式を想定した。計測頻度の見積もりにあたり、測定対象として線虫の全神経細胞およびマウスの脳皮質の神経細胞を想定した。前者については共焦点蛍光顕微鏡で実際の線虫（神経細胞に蛍光タンパク質を発現、麻酔により不動化したもの）の 3 次元蛍光像を取得し、画像処理により各神経細胞の座標を特定したデータを用いた。マウス脳皮質については文献①より細胞密度を $100,000\ \text{細胞}/\text{mm}^3$ と想定した。結果、線虫に対しては全神経細胞に対して 1kHz 以上での計測が可能であると見積もられた。上記実験データは使用した共焦点顕微鏡の制約により成体よりもやや小さい個体を用いたため約 160 個程度の神経細胞が検出されたが、生体ではおおよそ 300 個の神経細胞があることが知られており、別の実験によりわかっている生体の大きさや神経細胞の配置を考慮しても、 1kHz での計測が可能となる見込みである。マウスに対しては、 $1\text{mm} \times 0.5\text{mm} \times 0.04\ \text{mm}$ の視野範囲における約 2000 個の神経細胞をおおよそ 1kHz で計測可能な条件を見出した。従来報告されている膜電位計測の細胞数はおおよそ 100 個程度であり、これを大幅に上回る規模の計測が可能になることが見込まれる。

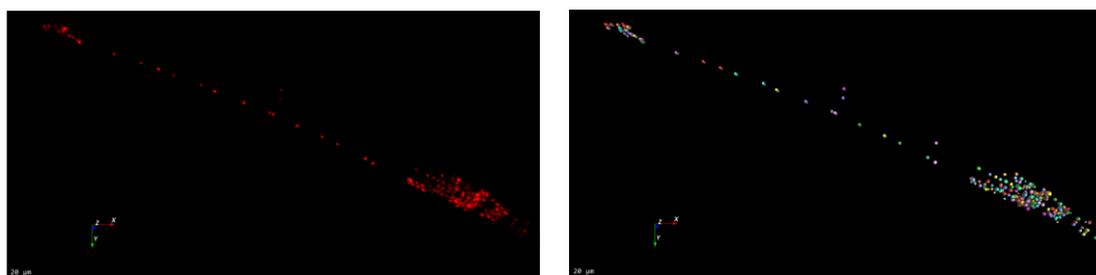


図 3：計測頻度の推定に用いた線虫の神経細胞の 3D データ。左：共焦点蛍光顕微鏡で撮像した線虫の神経細胞の 3D 画像。右：画像に対して個々の神経細胞の位置をセグメンテーションにより求めたもの。

以上の結果より、従来のイメージングに依存した光学的膜電位計測法の計測速度限界を乗り越

える多点検出方式が見出され、具体的な検出アルゴリズムおよび各種生体試料へ適用する際の実験条件を検討するプラットフォームが構築された。このことは、光学的膜電位計測による神経科学の新たなパラダイム創出の端緒を開くものであるといえる。

<引用文献>

- ① Daniel Keller et al., Cell Densities in the Mouse Brain: A Systematic Review. Front Neuroanat. 2018; 12: 83

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 9件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideharu Mikami |
| 2. 発表標題 High-Speed Fluorescence Microscopy and Beyond |
| 3. 学会等名 APPC15 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideharu Mikami |
| 2. 発表標題 High-Speed Fluorescence Microscopy and Beyond |
| 3. 学会等名 ISOM'22 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideharu Mikami |
| 2. 発表標題 High-speed fluorescence microscopy for next-generation life science |
| 3. 学会等名 The University of Melbourne and Hokkaido University Workshop on Therapeutic Nanomaterials (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三上秀治 |
| 2. 発表標題 最先端光学顕微鏡で生体からビッグデータを取得する |
| 3. 学会等名 文部科学省 学術変革領域研究 2022年度市民公開シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 三上秀治 |
| 2. 発表標題 形態解析技術とともに進化する高速蛍光顕微鏡 |
| 3. 学会等名 第4回 形態解析ワークショップ (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三上秀治 |
| 2. 発表標題 超高速蛍光顕微鏡 |
| 3. 学会等名 光電相互変換 第125委員会 第255回研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三上秀治 |
| 2. 発表標題 高速蛍光顕微鏡：生命とコンピュータをつなぐ情報通信技術の未来 |
| 3. 学会等名 第6回フォトニクスワークショップ (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideharu Mikami |
| 2. 発表標題 High-Speed Fluorescence Microscopy: Lighting up the Future of Life Sciences |
| 3. 学会等名 2021 RIES-CEFMS on-line symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hideharu Mikami |
| 2. 発表標題 Frequency-Time-Division-Multiplexed Single-Pixel Imaging for Biomedical Applications |
| 3. 学会等名 OFC2022 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideharu Mikami |
| 2. 発表標題 High-Speed Light-Sheet Microscopy Using Scanned Multi-Plane Imaging |
| 3. 学会等名 Focus on Microscopy 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideharu Mikami |
| 2. 発表標題 High-speed fluorescence microscopy for next-generation life science |
| 3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2023 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 広岡 隆 |
| 2. 発表標題 3Dランダムアクセス集光による高速多細胞探索・追跡アルゴリズムの提案と数値シミュレーションによる検証 |
| 3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 米山 裕貴 |
| 2. 発表標題 3Dランダムアクセス集光による高速多細胞探索・追跡アルゴリズムの実験的検証 |
| 3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Eisuke Takahashi |
| 2. 発表標題 Development of ultrafast multiphoton microscopy for large- scale, single-cell-resolution neural activity recording in the mouse brain |
| 3. 学会等名 The 24th RIES-HOKUDAI International Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ryu Hirooka |
| 2. 発表標題 Proposal of a Fast 3D Multi-Cell Search and Tracking Algorithm using Random Access Focusing and Its Validation by Numerical Simulation |
| 3. 学会等名 The 24th RIES-HOKUDAI International Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|----------------------------------|----------------------------------|----|
| 研究協力者 | 澁川 敦史 (Shibukawa Atsushi) | 北海道大学・電子科学研究所・准教授 (10101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|------------------------------|---|----|
| 研究協力者 | 石島 歩 (Ishijima Ayumu) | 北海道大学・電子科学研究所・助教 (10101) | |

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 |
|---------|---------|
| | |