

神経細胞の微細な三次元構造の観察精度を 10 倍高める手法を開発

半導体の微細構造の計測に使われていた光波散乱計測を神経細胞の計測に応用することに世界で初めて成功しました。試料に照射した光の回折パターンから形状を読み取る精度を機械学習で高めるなどした成果で、従来の光学顕微鏡に比べて分解能と計測速度が 10 倍以上になりました。

脳は多数の神経細胞を基本単位として構成され、その一つひとつが情報処理の基盤となっています。しかし、その働きはいまだ十分には理解されていません。特に記憶のメカニズムは脳科学の重要な未解決問題で、その発現原理や情報処理機構は不明です。この問題を解く一つの手法として、単一神経細胞の形態や内部構造の動態を、非侵襲かつ高分解能で計測する手法が挙げられます。その中でも代表的手法が蛍光顕微鏡法です。同法では、試料中の特定の物質を蛍光色素で標識し、励起光を照射して蛍光色素が発する蛍光を観察します。しかし、蛍光標識の困難さや色素の生体毒性などの制約があり、また、高分解能計測には時間がかかるなどの課題もありました。

本研究チームは、神経細胞の微細構造を高速かつ高精度に 3 次元計測する技術を開発しました。具体的には、標識がいらず、非破壊・非接触で試料の形状などを直接解析できる光波散乱計測と呼ばれる手法を神経細胞に適用することに成功しました。この手法は、試料に照射した光の回折パターンから元の形状を直接算出するものです。従来の光学顕微鏡は、レンズを使った結像に伴い、ニセの像（アーチファクト）が生じることが解像度を下げていましたが、本手法にはそのようなことはありません。そのため、 $2\mu\text{m}$ （ $\mu\text{m}=100$ 万分の 1 メートル）径の細胞で $0.2\mu\text{m}$ の計測精度が実現できました。原理的には、細胞内部の小胞の位置や時間幅 1ms （ $\text{ms}=1000$ 分の 1 秒）で発せられる神経細胞の電気信号も計測可能です。従来比で精度・計測時間ともに一桁向上しました。

光波散乱計測は半導体分野で実用化が進んでいましたが、対象は周期性のある構造を持つものに対象は限られていました。本研究チームは、新たな計測・計算・解析手法を開発することで、この壁を乗り越えました。神経細胞は形状が比較的明確であるため、今回開発した手法の適用可能性が高く、脳の記憶メカニズムの解明などに貢献することが期待されます。

研究代表者

筑波大学医学医療系

岩田 卓 助教

筑波大学イノベティブ計測技術開発研究センター

星野 鉄哉 研究員

研究の背景

脳は一つの神経細胞、またはシナプス結合を基本単位として構成され、それらの形態や構成要素の変化が情報処理の基盤となっています。このような神経細胞の機能メカニズムを理解するため、近年では微細な領域での一分子の動きなどが観察対象となり、観察手法も、より高い時空間分解能^{注1)}が求められるようになりました。ところが、蛍光顕微鏡^{注2)}での観察に代表される、一分子に付加された蛍光標識^{注3)}を観察に使用する場合には、その化学的・物理的な特性の影響が大きく、凝集などによって観察対象となる分子の細胞内での正確な挙動を知ることができない場合が考えられます。そこで本研究では、細胞の形態や化学伝達を直接解析するため、標識が不要かつ非破壊・非接触な計測法である光波散乱計測^{注4)}に着目し、神経細胞計測での実用化に取り組むことにしました。

研究内容と成果

神経細胞では、神経突起内での小器官の輸送や電気信号の伝達が重要です。そのため、高分解能だけでなく、高速計測が求められます。本研究チームは、半導体微細構造の計測に用いられてきた光波散乱計測を神経細胞に応用しました。

実験で使った試料は、マウスの海馬由来の分散培養神経細胞^{注5)}です。この神経細胞を含む溶液をガラス基板の上に載せ、アルゴンレーザー光を照射して光波散乱計測を行いました。また、計測点を明確にするため、同じ試料についてレンズ結像^{注6)}による計測も同時に行いました(図1)。明視野像用の光は試料全体に照射されますが、散乱計測用の光は計測点のみに照射されます。そのため、神経細胞の明視野像中で計測点が明るく光り、それをレンズ結像することで位置を特定できます。

光波散乱計測自体は、結像レンズを用いず、計測点の回折パターン^{注7)}から元の形状を直接算出します。既知の形状を基に計算したデータベースと実際の散乱パターンを比較することで形状推定が可能です。今回の散乱計測では、左右非対称な神経細胞の断面を蛍光標識なしに1回の光照射で計測でき、直径 $2\ \mu\text{m}$ の細胞で $0.2\ \mu\text{m}$ の精度(分解能)を得ることができました。また、高速性を生かし、神経の情報伝達に関わる $1\ \text{ms}$ の時間幅の電気信号も、細胞の形状変化として計測できる可能性も示されました。

今回の技術的なポイントの一つは、左右非対称な神経細胞解析に深層学習を導入した点です。深層学習には教師データが必要ですが、本研究では近似を排した厳密な計算によって形状・サイズと散乱パターンの対応を作成しました。このデータベースは独自開発の計算手法によるもので、従来にない精度を有しています。さらに、左右非対称性が散乱パターンに与える特徴的影響を発見し、深層学習に組み込むことで、解析対象を従来の左右対称形状から非対称形状へと拡大しました。これにより、1回光照射の散乱パターンから三次元断面形状を算出でき、短時間での計測が可能となりました。従来の顕微鏡観察では参考図1・図2に相当する明視野像は得られますが、断層像を1回の光照射で取得することはできません。

また、従来のレンズ結像では、立体的な試料に対して偽の像が生じます。これは回折効果を考慮していないためです。その影響を評価した結果、条件が良い場合でも試料サイズが散乱計測用の光の波長を基準として、約130波長(約 $60\ \mu\text{m}$)以下では誤差が大きくなることが分かりました。実際、図2に示すように、レンズ結像では約 $2\ \mu\text{m}$ 幅の縞状の偽像が確認されました。これが分解能低下の要因です。一方、光波散乱計測ではこの回折効果を厳密に計算しています。

以上の通り本研究では、光波散乱計測により、試料サイズ $2\ \mu\text{m}$ ・分解能 $0.2\ \mu\text{m}$ を達成しました。これにより、レンズ結像に比べ、試料サイズを100分の1に縮小しつつ信頼性のある計測を可能にし、分解能も10倍向上しました。

今後の展開

光波散乱計測は、半導体計測分野での実用化が進み、ウイルス形状解析にも応用が期待されています。神経細胞は比較的形状が明確で、光波散乱計測の適用可能性が高いと考えられていましたが、これまでの研究は電気信号パルスの有無検出にとどまり、形状解析はなされていませんでした。本研究チームは、厳密計算による教師データを用いた深層学習を導入し、光波散乱計測を細胞解析に応用することに成功しました。得られた計測手法・解析プログラムにより、孤立系^{注8)}における光波散乱計測の実用性を実証し、神経科学分野で不可欠な手法となる可能性を示しました。将来的には、神経細胞内の小胞や細胞を伝わる電気信号の計測が期待されます（図3）。従来のレンズ結像で生じていた偽の像を排除することで、信頼性の高い計測が可能になると考えられます。

参考図

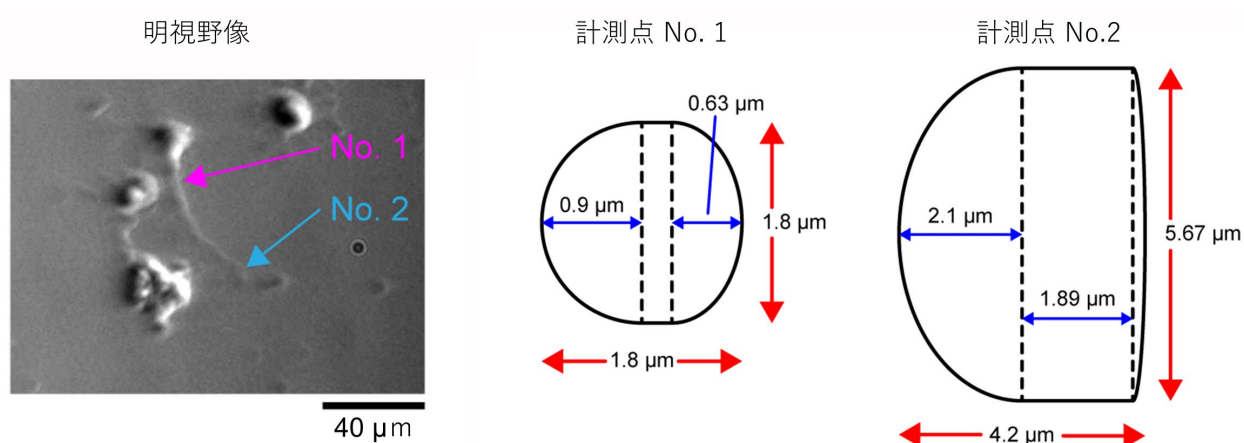


図1 神経細胞の明視野像と二つの計測箇所 No.1・No.2 および、それぞれの光波散乱計測で得られた断層像

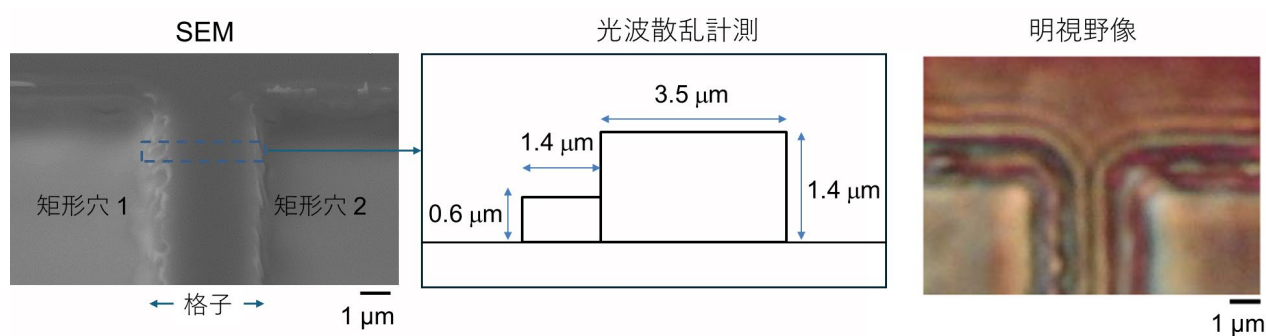


図2 モデル試料である格子（神経細胞ではない）の SEM(走査型電子顕微鏡)^{注9)}、光波散乱計測、および透過明視野の像。光波散乱計測では SEM 像の点線部分の断層像が得られる。明視野像の格子部分に典型的な偽の像である縞の筋がみられる。

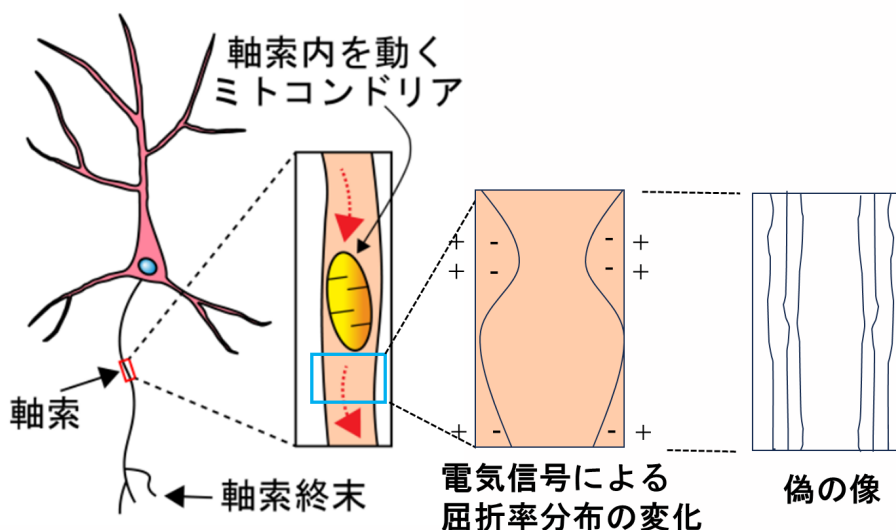


図3 今後の計測対象である神経細胞中のミトコンドリアの三次元的配置や軸索の電気信号。光波散乱計測では、理論的にこれらが計測可能である。一方、レンズ結像の偽の像は、可視光では界面に平行な約 $2\mu\text{m}$ 幅の帯になることが多く、これらの計測の障害となる。このように、光波散乱計測では、特定個所の分解能を向上させることで計測対象を広げることができる。

用語解説

注1) 分解能 (resolution)

一般的には2点間の見分けられる最小距離 (Rayleigh criterion) であるが、ここでは2点間の距離の変化量の感度を表している。

注2) 蛍光顕微鏡法 (fluorescence microscopy)

試料から発生する蛍光を観察する手法。光を結像するために、一般に対物レンズを使う。

注3) 蛍光標識 (fluorescent labeling)

蛍光を発する色素で細胞などに印をつけること。これにより、特定の箇所を選択的に感度よく計測できる。

注4) 光波散乱計測 (scatterometry)

試料に光を照射し、その際に発生する散乱光 (光の進行方向が変化した光) をレンズ結像なしで解析することで、試料の微細な形状 (寸法・断面形状) や組成などを非破壊・非接触で計測する技術。散乱パターンの計算には近似のない厳密な手法が使われることが多い。

注5) 分散培養神経細胞

脳組織 (本研究では脳内の海馬という組織) の神経細胞をばらばらにし、分散させた個々の細胞を培養する手法によって準備された神経細胞。

注6) レンズ結像 (lens imaging)

試料から出た光はレンズを通してスクリーンに像を結ぶことができる。蛍光顕微鏡法を含む従来の光学顕微鏡はほとんどがレンズ結像を利用している。

注7) 回折パターン (diffraction pattern)

レーザー光が粒子や格子などの小さい構造に当たると特有のパターンとなって広がる。例えば、球形の微粒子にあたった場合には同心円状に広がる。

注8) 孤立系

従来の光波散乱計測では、周期構造が計測対象となっていたためここでは、それと区別するために、

孤立系という語を用いている。通常の細胞は繰り返し構造ではない、孤立系である。

注 9) 走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscopy)

光ではなく電子を使って微細構造を観察する装置。対物レンズを用いた光学顕微鏡に比べて、小さい構造を精度よく観察できる。

研究資金

本研究は、筑波大学 2023 年度 系横断 R&D プロジェクトの一環として実施されました。

掲載論文

- 【題 名】 High-speed three-dimensional cross-sectional measurement of cultured neurons by scatterometry that improves resolution by an order of magnitude
(分解能の 1 桁向上を可能とする、光波散乱計測を用いた培養神経細胞の高速 3 次元断面計測)
- 【著者名】 Suguru Iwata, Tetsuya Hoshino, Sadao Aoki, Yosuke Takei and Masahide Itoh
- 【掲載誌】 *Optics Express*
- 【掲載日】 2025 年 3 月 10 日
- 【DOI】 10.1364/OE.553331

問合わせ先

【研究に関すること】

伊藤 雅英 (いとう まさひで)

筑波大学数理物質系 教授

URL: <https://imc.bk.tsukuba.ac.jp/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp