

X線マイクロCTによる神経回路配線図の再構築 Neuronal circuit reconstruction using X-ray micro tomography

水谷 治央^a、竹内 晃久^b、高木 利久^a

Haruo Mizutani^a, Akihisa Takeuchi^b, Toshihisa Takagi^a

^a 東京大学学術統合化プロジェクト、^b 高輝度光科学研究センター

^aScience Integration Program, University of Tokyo, ^bJapan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI)

脳高次機能の作動原理や神経変性疾患の基礎的病因を理解するためには、神経回路の配線図を解読し、その意味を考察しなければならない。神経のネットワークは3次元的な形態学的特徴を有するため、トモグラフィー法を適用することが有効である。そこで、X線マイクロCT法による神経ネットワーク再構築を代数的な手法を用いて行った。その結果、計算時間はかかるもののアーチファクトの少ない再構成像を得ることに成功した。また、統計学的手法に基づいた空間分解能上昇に関して検討を行った。

Deciphering the circuit diagrams of the actual neuronal networks is crucial to understand basic operating principals of higher functions and causes of diseases of the brain. It is effective to apply tomography method due to the three-dimensional morphological feature of the networks. Here, we have archived 3D reconstructions by x-ray micro-CT with algebraic reconstruction technique. The reconstructed images have low artifact noises although calculation cost is high. In addition, we discuss the restoration of the spatial resolution on the x-ray images on the basis of statistic technique.

背景と研究目的：

人間の脳には、神経細胞が一千億個以上存在し、それらがお互いに情報をやりとりすることで、脳の高次機能が保たれている。これまで、電気生理学や分子生物学の発展により、単一ニューロンの性質は詳細に研究されてきた。しかし、単一ニューロンの性質だけで、我々の認知機能などを説明することは難しい。それは複数のニューロンが至るところで結合し、その情報をやり取りする過程で、新たな機能が生み出されているからである。脳の高次機能は、脳内の神経回路ネットワークがある条件を満たすことで創出される。その条件を明らかにすることで、脳高次機能の理解はよりいっそう進み、人間がいかにして記憶や言語などを巧みに操るのかを解明する道筋が

できる。また同時に、アルツハイマー病やパーキンソン病などに見られる神経変性によって、神経回路が組み変わる疾患の基礎的病因を理解する手助けにもなるとも考えられる。

近年、神経回路の配線図をいかにして再構築すべきかという議論が行われており、膨大な数の電子顕微鏡スライス画像を取り込んで、神経ネットワークの立体構築を推し進めている研究[1,2]が進んでいる。しかし、超薄切片の連続画像を取得することは、たとえ自動で行ったとしても多くの手間と時間を必要とし、また、そのうち一枚でも切片化に失敗すると、その部分のデータが完全に欠落してしまう。一方、X線トモグラフィーのような非破壊的に内部構造を観察できる手法であれば、3次元再構築のために、薄切化作業を行

う必要はなく、サンプルを欠失する恐れもない。

そこで、切片化が難しくない比較的厚い脳スライスを用いて、X線マイクロCT法による再構築および画質向上の可能性を検討した。本実験の空間分解能は、電子顕微鏡に比べて低いものとなっているが、CTの原理そのものはX線顕微鏡を構築したときと変わらないため、高分解能化が進んだときにも十分適応可能と考える。

実験：

C57BL/6Jマウス的大脑を標本として用い、特に大腦皮質を観測部位とした。4%パラホルムアルデヒド/1%グルタルアルデヒド溶液でマウスの全身を灌流固定後、脳を頭蓋骨から取り出し、一昼夜後固定した。測定感度を増強するため、神経細胞にゴルジ染色を施した。エタノールと酸化プロピレンで試料を脱水処理した後、取り出した脳をエポキシ樹脂で包埋した。ゼーゲマイクロトームにて厚さが700 μm の切片を作成し、その試料を回転ステージに乗せることで、マイクロCT画像を取得した。X線検出器より大きい切片のCT撮影を行うことは、原理的に不完全再構築となるが、逆投影法以外の代数的アルゴリズムを用いて、神経細胞の立体像を得た。さらに、ベイズ推定による画像の高分解能化を目指し、点像分布関数 (PSF) によるデコンボリューションを行った

結果、および、考察：

厚さが700 μm の脳スライスを $-60^\circ \sim 60^\circ$ まで 0.1° ずつ回転させたときの投影像1201枚を用いて3次元再構築を行った。CTアルゴ

リズムとしては、通常使われる逆投影法ではなく、代数的再構成法 (ART)を採用した。再構築にかかる計算時間は、逆投影法の100倍近くに上るが、ノイズ耐性があるためアーチファクトが出にくいという利点がある。その結果を Fig. 1 に示す。

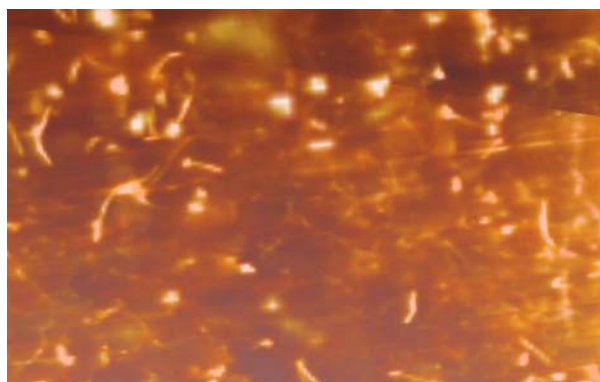


Fig. 1. Three-dimensional rendering view of the cortical neurons reconstructed by ART.

ART法によるCT再構築はメタルアーチファクトのような放射状ノイズが出にくく画質は比較的良好であった。しかし、回転角の制限により画面の両端部分に縦筋がいくつか入っていることが確認された。

一方、X線顕微鏡の空間分解能は、検出器のPSFや、結像性能などで決まるため、今後の高分解能化は、X線光学素子 (レンズやカメラ) の大幅な発展がなければならない。そこで、現在得られている画像データを数理的に処理して、空間分解能を上昇させることも検討すべきであり、ベイズ統計などを盛り込んだ超解像処理が有用である。そこで、今回は検出器のPSFをガウス分布関数で近似し、それを事前確率としたときの原画像復元処理を行った。30回の反復計算を行った後の画像を Fig. 2 に示す。

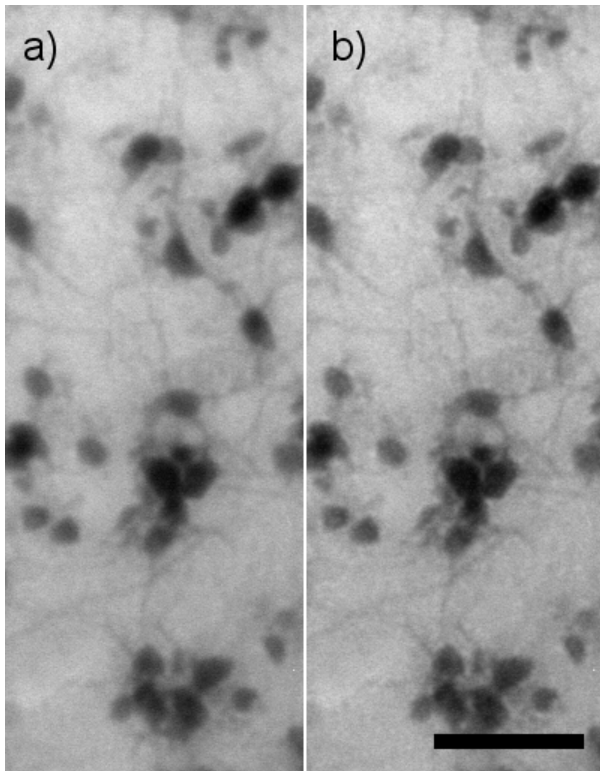


Fig. 2. Iterative deconvolution of an x-ray projection image by using Gaussian-like PSF. a) original image b) restored image after 30 iterations. Scale bar is 50 μm

30 回程度の反復計算を行うことで、画像の輪郭を明確にすることが可能であった。適切な画像を出力するためには、精確な PSF が分かればよく、計算コストもそれほどかからなかった。

今後の課題：

X線 CTによる神経回路配線図の再構築には、シナプスが同定できる程度の高分解能化と広い視野の両立が必須である。現在の X 線集光技術を用いれば、50 nm 程度の空間分解能で 3 次元再構築をすることが可能であるが、シナプスの同定には、あと一步分解能が足りない。そこで、結像性能や検出器の“くせ”を事前確率として与えることで、統計学的手法の助けを借りたシナプス同定が可能になるか

もしれない。また、CT 再構成を行うためには、原理的に全方位からの投影像が必要であるが、再構成計算アルゴリズムを工夫することで、スライスなどの生物試料にやさしい形状で 3 次元定量観察ができるようになることが望まれる。再構成法による議論は、まだ始まったばかりであるが、たとえ再構成計算に時間がかかってもノイズやアーチファクトの少ない良質な画像を得ることが、今後の 3 次元画像再構築に求められるものではないかと考えている。なぜなら、神経細胞の同定を人手で行うことは非常に困難なため、計算機で網羅的な学習処理を行わなければならない、コンピューター目 (Computer Vision) にとってやさしい顕微鏡画像が必要だからである。

参考文献：

- 1) Lichtman J.W. and Sanes J.R., *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**: 346 (2008)
- 2) Helmstaedter M., Briggman K.L. and Denk W., *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**: 633 (2008)

キーワード：

神経回路、結合様式、3 次元再構築