

研究終了報告書

「学習型動態モーフィングによる神経間シグナル伝達特性の解明」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：徳永 旭将

1. 研究のねらい

自然科学分野で計測された様々な動態イメージングデータに対し、本来の時空間解像度を超えて動態を推定する学習型動態モーフィング技術の研究を行う。提案技術は、ベイズ推論に基づき動きや変形場を推定する非剛体イメージレジストレーション技術、複数の時空間解像度で計測されたイメージングデータを機械学習で統合する深さ補間、画像超解像技術などを要素技術として想定する。メインテーマとして神経科学分野の課題に取り組む。生物は外界の刺激を神経回路で処理し次の行動を選択するが、神経回路の動作原理には未解明な部分が多い。特に、神経細胞同士を連結する神経間結合には化学シナプス結合とギャップ結合が存在するが、それらが神経回路の動作原理においてどのような役割を担っているのか、包括的な理解には至っていない。近年、神経科学分野では、動態計測技術(生物が生きた状態で生体内ダイナミクスを計測する技術)の進歩により、神経回路の集団的な活動の様相が高時間・空間分解能で可視化されつつある。一方、前述の問いに答えるには、神経細胞間のシグナル伝達の特性を細胞レベルで詳細に明らかにする必要がある。そこで本研究では、外部刺激に由来する2細胞間のシグナル伝達の動態を、細胞レベルのライブセルイメージングと情報科学的手法の融合により捉えることを目標とする。それにより、生物はなぜ2種類の神経間結合を使うのか、神経科学と知能情報科学の基本的問題に挑む。さらに、神経科学分野以外にも地球科学・宇宙科学分野のイメージ解析に推定展開を試みることで、提案技術の汎用化を促進する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、神経活動のイメージングに広く用いられてきた Ca^{2+} イメージングに加え、ロドプシン型膜電位センサーを線虫 *C. elegans* (以下、線虫と記述) の特定の神経細胞に発現させ、細胞追跡や姿勢補正、セグメンテーション、クエンチング補正などの動態モーフィングパイプラインと組み合わせることで、外部刺激に対応する膜電位と Ca^{2+} 濃度の変化を同時にイメージングする革新的な計測系を確立した。開発した計測系を用い、線虫の嗅覚神経細胞である AWA に対しジアセチル水溶液による匂い刺激を付与し、その応答をライブセルイメージングにより詳細に明らかにした。その結果、 Ca^{2+} 濃度は刺激開始直後から連続的に上昇しその後下降する変化が見られるのに対し、膜電位は刺激直後の過渡的な脱分極、その後の準定常的な脱分極、そして刺激除去後の再分極と、不連続な状態変化を示すことが明らかになった。このように、連続的な変化を示す Ca^{2+} と不連続な変化を示す膜電位の応答を、細胞レベルで同時に捉えることが可能となった。

次に、ジアセチル水溶液の濃度を変えた場合の膜電位と Ca^{2+} 濃度の変化についても解析を

行った。その結果、膜電位・ Ca^{2+} ともに、ジアセチル水溶液濃度に依存する変動が確認された。ただし、 Ca^{2+} 濃度は、刺激開始後の連続的な上昇のピークがジアセチル濃度に対応するのに対し、膜電位は刺激継続中の準定常的な脱分極の大きさがジアセチル濃度に対応していることがわかった。これは、複数のイオンチャンネルが協働することで、AWA にジアセチル濃度に応じた平衡状態が形成されていることを示唆している。また、一連の結果は、ジアセチル刺激の強さ、変化、開始、継続、終了といった時々刻々変化する環境情報を、単一細胞の膜電位が全て表現できていることを示している。

これら膜電位と Ca^{2+} の同時イメージングにより、 Ca^{2+} は神経活動の重要な指標ではあるものの膜電位の変化とは本質的に異なるという事実が明らかになった。さらに、 10^8 倍に希釈したジアセチルを付与した場合には、 Ca^{2+} 濃度は変化しないが、膜電位では準定常な脱分極が形成される現象が観察された。これは、ジアセチル刺激に対するシグナル伝達経路では、 Ca^{2+} より先に N^+ など他のイオン種の流入が発生することを示唆している。このように、膜電位と Ca^{2+} の応答が同時に観察できたことで、細胞内のシグナル伝達経路にライブセルイメージングという立場から検証・議論を行うことが可能となった。

AWA のシグナル伝達経路により深く切り込んだ議論を展開するため、EGL-19 や UNC-2 といった電位依存性カルシウムチャンネル(以下、VDCC と記述)や TRP チャンネル、G タンパク質を阻害した変異株を作成し、開発した計測系でイメージングを行い標準(N2)株との比較を行った。その結果、EGL-19 を阻害すると Ca^{2+} や膜電位の非線形な上昇が見られなくなった。これは従来から知られていた挙動である。

一方、UNC-2 を阻害すると、 Ca^{2+} と膜電位の変動が不安定になることがわかった。これは、UNC-2 がさらに下流の K^+ チャンネルなどを制御している可能性を示唆している。さらに上流で機能すると考えられる TRP チャンネルである OSM-9 を阻害した変異体では、 Ca^{2+} と膜電位共にジアセチル刺激に対する応答が消失した。

最後に、これらイオンチャンネルを制御する G タンパク質である ODR-3 を阻害した変異株を作成し比較を行った。その結果、 Ca^{2+} と膜電位共に、神経活動が開始するタイミングのばらつきが大きくなる傾向が確認された。また、標準株と比較して、薄い濃度のジアセチル刺激にも Ca^{2+} と膜電位が大きな変化を示すようになった。これらのことから、ODR-3 がAWA の神経活動を開始させる上で、また、ジアセチル濃度に依存した神経活動を引き起こす上で、重要な役割を担っていることがわかった。

本研究では AWA に加え、AWA とギャップ結合をもつ介在神経細胞 AIA に対しても、膜電位・ Ca^{2+} の同時イメージングを実現することができた。AIA では AWA と異なり、膜電位・ Ca^{2+} の双方とも、確率的な挙動を示すことを明らかにした。また、膜電位は Ca^{2+} と異なり、細胞体よりもギャップ結合を形成している神経突起部分の方が、より明瞭な神経活動が発生していることを示唆する結果を得た。これは、開発した計測系により、膜電位と Ca^{2+} 変動の空間構造の違いを抽出できる可能性を示しており、神経間シグナル伝達特性を明らかにする上で重要な情報が得られたと考えている。

サブテーマとして展開したオーロラ全天カメラのイメージングデータ解析では、脈動オーロラの自動追跡など、神経科学とは異なる分野の動態解析技術を開発した。脈動オーロラは、発光強度に準周期的な変動がある拡散オーロラの一つである。光学観測の進歩に伴い、その明

減周期や生存期間などの時空間特性を解明することが期待されている。しかし、非脈動の拡散オーロラが背景に存在すると、個々の脈動パッチを識別するのが困難な場合がある。そこで、神経活動応答とクエンチング成分の分離に用いた手法と同様の時空間分離技術を用いることで、非脈動の拡散オーロラと脈動パッチを分離する技術を開発した。関連するテーマとして、部分的アノテーションと半教師あり分類に基づくコストエフェクティブなオーロラセグメンテーション手法や、白色光カメラの周波数構造の予測技術を開発した。一連の成果により、オーロラの形態的特徴や動態の包括的な解明が進展すると期待される。

メインテーマとサブテーマから派生したテーマとして、正常サンプルの教師なし学習で得られた異常度マップを、視覚注視機構として異常検出に活用する技術: Layer-wise External Attention Network (LEA-Net)を開発した。工業製品、植物、航空写真など様々な実問題データセットに対する実験を通し、LEA-Net は畳み込みニューラルネットワークに基づく既存の画像分類モデルに対し、目的に応じた異常検出性能を向上できることを確認した。

(2) 詳細

研究テーマ A: 線虫 *C. elegans* の細胞レベルの膜電位・カルシウム同時イメージング

【研究成果】

A-(1) AWA における膜電位・Ca²⁺の同時イメージング

線虫 *C. elegans* (以下、線虫と記述) の神経間シグナル伝達特性解明のため、従来から神経活動のイメージングに広く用いられてきた Ca²⁺ イメージングに加え、ロドプシン型膜電位センサーを特定の神経細胞に発現させた膜電位・Ca²⁺ 同時イメージング技術を開発した。ロドプシン型 GEVI (Genetically Encoded Voltage Indicator) は、哺乳類の神経活動イメージングを目的として、近年では様々なタイプが開発されつつある。一方で、線虫の特定の神経細胞における、入力刺激に対する膜電位と Ca²⁺ の応答を同時にイメージングできた例はない。従って、Ca²⁺ 濃度と膜電位という 2 つの側面から細胞レベルの神経活動を詳細に捉えることができれば、従来の Ca²⁺ イメージングや電気生理学的測定では見えなかった、単一の神経細胞が実現する情報表現・符号化の仕組みをより掘り下げて理解できると期待される。

刺激制御の容易さという観点から、本研究では嗅覚神経細胞 AWA にジアセチル刺激を与えることで実験を行った。GEVI は paQuasAr3, Ca²⁺ センサーは GCaMP6f を最終的に採用した。匂い刺激は、ジアセチル水溶液を 10⁻⁷ に希釈して用いた。

膜電位センサーとして用いた paQuasAr3 は、Ca²⁺ センサーである GCaMP6f と比較すると蛍光強度が小さい。従って、膜電位変動を評価するには、クエンチングの影響をできるだけ補正する必要がある。また、計測されたイメージングデータには、ターゲットとなる神経細胞以外の構造も含まれるが、paQuasAr3 がターゲット細胞以外にも発現してしまうことがある。そのため、ターゲット細胞とそれ以外の領域を、できるだけ正確に分割する必要がある。さらに、線虫の姿勢も完全に固定することができないため、画像中のターゲット細胞の動きを追跡する必要がある。

それらの問題を解決するため、ターゲット細胞の追跡・クエンチング補正・姿勢補正・画像セグ

メンテーションを行う、独自の動態モーフィング画像処理パイプラインを開発した。その結果、膜電位と Ca^{2+} の両方に対して、刺激に応じた明確な蛍光強度変化を抽出できるようになった。特に膜電位は、刺激直後の過渡的な脱分極、刺激中の準定常的な脱分極、そして刺激除去直後の再分極といったこれまで知られていない不連続な神経活動応答を、再現性よく捉えることができるようになった。

A-(2)AWAにおける膜電位・ Ca^{2+} 応答のジアセチル濃度依存性

本研究で確立した膜電位・ Ca^{2+} の同時イメージング系の神経科学研究への有効性を実証するため、匂い刺激として線虫に与えるジアセチル水溶液の濃度を変化させた際の、膜電位・ Ca^{2+} 応答の基礎データを網羅的に収集した。その結果、 10^{-8} という濃度を境に、それより低い濃度では膜電位・ Ca^{2+} イメージングデータの蛍光強度変化は見られず、それより高い濃度では見られた。 10^{-7} では Ca^{2+} は変化しないものの、膜電位の準定常的な脱分極は見られるなど、条件によっては膜電位と Ca^{2+} が連動しない神経活動も観察できるなど、従来の計測系では観察が困難であった現象も捉えることができるようになった。

匂い刺激付与に伴う膜電位イメージングデータの蛍光強度変化がどのような情報を表現しているかを調査するため、測定中に匂い刺激としてのジアセチル濃度を変化させた場合の Ca^{2+} と膜電位変動を調査した。ジアセチル濃度を1回目の刺激時は 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} と濃度を上昇させ、2回目の刺激時は 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} と濃度を下降させた。これらの結果から、過渡的な脱分極と見られる膜電位イメージングデータの蛍光量変化は、ジアセチル濃度が上昇した時に見られる特有の現象であることがわかった。一方、膜電位の準定常的な脱分極と見られる変化は、匂い刺激の強さを反映して階段上に変化することがわかった。これは、匂い刺激の強さに対応するような平衡電位が生み出す電位依存性チャンネルの活性化機構が存在する可能性を示唆している。

A-(3)特定のカルシウムイオンチャンネルを阻害した場合のAWAの膜電位・ Ca^{2+} の応答

項目 A-(1)、(2)で示した膜電位・ Ca^{2+} イメージングデータの蛍光量変化の原因を調査するため、L型の電位依存性カルシウムイオンチャンネル(以下、VDCCと記述)EGL-19と、P/Q型のVDCCであるUNC-2を阻害した変異株を作成し、同様の実験を行った。EGL-19を阻害した株では、 Ca^{2+} と膜電位の蛍光量変化が中途半端に終わることが確認された。これは、従来知られているように、EGL-19が細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のトリガーとなる役割を果たすことから、それを阻害したことで Ca^{2+} 濃度が十分に上昇せず、結果的に膜電位の変化も抑制されたものと解釈できる。一方、UNC-2を阻害した株では、刺激付与時の膜電位・ Ca^{2+} イメージングデータの蛍光量変化が、不安定な挙動になることがわかった。これは、UNC-2を介して流入する Ca^{2+} が細胞の神経活動応答の安定化に寄与していることを示唆している。

さらに、イオンチャンネルを最上流で制御するGタンパク質であるODR-3を阻害した変異株を作成し比較を行った。その結果、 Ca^{2+} と膜電位共に、ODR-3がないと神経活動が開始するタイミングのばらつきが大きくなる(あるいは神経活動が始まらない)ことがわかった。また、薄い濃度のジアセチル刺激にも Ca^{2+} と膜電位が大きな変化を示すようになった。このODR-3変異体を用いた実験は、本研究終了時点ではデータ数が不足しており、今後の計測と解析によっては異なる傾向が見えてくる可能性もある。しかしながら、ODR-3が神経活動を安定的に開始する

ためのトリガーを担っている可能性は高いと考えられる。また、複数のシグナル伝達経路に介入し、いくつかの酵素等を活性化あるいは抑制することで、濃度依存的な神経活動応答にも重要な役割を果たしているとも考えられる。本研究では AWA のみの計測であったが、他の神経細胞についても同様の計測を行うことで、神経回路における神経活動のタイミング制御の仕組みの1つが明らかになるかもしれない。

研究テーマ B: 蛍光量変化のための動態モーフィング技術の開発

膜電位・Ca²⁺イメージングデータから、より緻密な蛍光強度変化を捉えることを目標に、ターゲットとする細胞の位置検出、位置追跡、時空間解像度・SN 比向上などを実現する動態モーフィング技術の開発を行った。以下、課題ごとに得られた成果をまとめる。

B-(1) 非対称な相互作用をもつイメージレジストレーション技術の開発

イメージデータ中のダイナミックな動態を定量化するため、ベイズ推論とマルコフ確率場に基づく非剛体イメージレジストレーション技術を開発した。特に、比較する画像間で対応していない領域の存在がもたらすレジストレーション性能の低下を緩和するため、非対称な相互作用をもつマルコフ確率場に基づくイメージレジストレーションへと拡張を行った。意図的な欠損を与えたテスト画像での実験では、非対称な相互作用の導入が非対応領域の位置合わせの性能改善に寄与することを確認した。

B-(2) マルチカーネル学習とスパース推定に基づく膜電位イメージングデータからの細胞体セグメンテーション技術の開発

膜電位センサーpaQuasAr3 は、ターゲット細胞以外にも非特異的に発現してしまうことがある。そのため、計測中の姿勢変化が大きい場合には、細胞体の蛍光量変化を正確に定量化できないことがある。言い換えると、細胞体の形状を正確に推定することで、より正確に膜電位変動を定量化できる。ところが、paQuasAr3 は蛍光が暗く、また、個体によっては細胞の周囲に細胞よりも明るい領域が存在する。そのため、画像の輝度勾配を用いるような従来の輪郭推定法では、細胞体の形状を正しく推定できない。

そこで、画像の輝度勾配を用いるのではなく、入力刺激との相関規則に基づいて細胞体の形状を推定する新しい神経細胞セグメンテーション技術を開発した。具体的には、膜電位センサーを発現させた細胞体では、入力刺激と何らかの相関がある輝度変化を示すという仮定のもと、ガウシアンカーネルを用いたマルチカーネル学習によって入力刺激と相関の高い領域を推定するというアプローチを採用した。最適化問題としては、画像中に配置した代表点ごとにサブカーネルを設定し、入力刺激との相関が最大となるようなサブカーネル係数をL₁正則化とFused-Lasso 正則化の制約条件下で求める。AWA に対する実験では、提案技術により細胞の近傍に別の明るい構造があっても、細胞体の概形を自然に推定できることを確認した。

B-(3) ディープラーニングに基づく細胞体と神経突起のセグメンテーション技術の開発

AIA で計測した膜電位と Ca^{2+} の同時イメージングデータを比較すると、特に Ca^{2+} には刺激に依存しない変動が多く含まれており、刺激に依存する変動を捉えにくいことがわかった。そこで、細胞体に加え神経突起部分からも蛍光強度変化を定量化することにした。そのためには、各時刻の顕微鏡画像において神経突起に相当する領域を画像から自動推定する必要がある。そこで、先に同定した細胞体の位置を事前情報とし、ディープエンコーダデコーダネットワークの一種である U-Net を用いることで、神経突起部分をセグメンテーションする技術を開発した。図 1 に、推定した神経突起領域の例を示す。神経突起は細胞体と比較して非常に暗いが、提案手法によってセグメンテーションできていることがわかる。

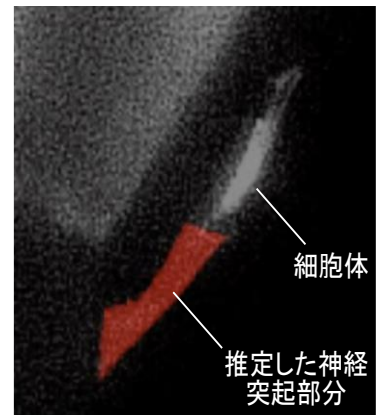


図 1. 提案手法により自動推定した AIA の神経突起領域

B-(4) ノンパラメトリックなクエンチング補正技術の開発

入力刺激に対する膜電位イメージングデータの蛍光量変化を正確に定量化する上で、蛍光のクエンチングの影響を補正することが重要な課題であった。過去の研究では、クエンチングの影響を線形関数や指数関数で表現することが多いが、本研究で計測したイメージングデータを見る限りではクエンチングの効果は多種であり、パラメトリックな関数では十分に近似できないという結論に達した。

そこで、ビデオ画像からのバイタル情報の強調などに用いられる video magnification 技術のアイデアに基づき、画像のラプラシアンピラミッドによる空間構造の階層化と、ノンパラメトリックな時系列解析手法である特異スペクトル分析による時間構造の階層化を組み合わせた動画画像分離を開発した。それにより、特定の関数型を仮定せずクエンチングの効果を補正することに成功した。図 2 に、本手法によるクエンチング補正の例を 2 つ示す。いずれの例でも、神経活動に由来する変動にほぼ影響を与えず、クエンチングの効果を補正できていることがわかる。

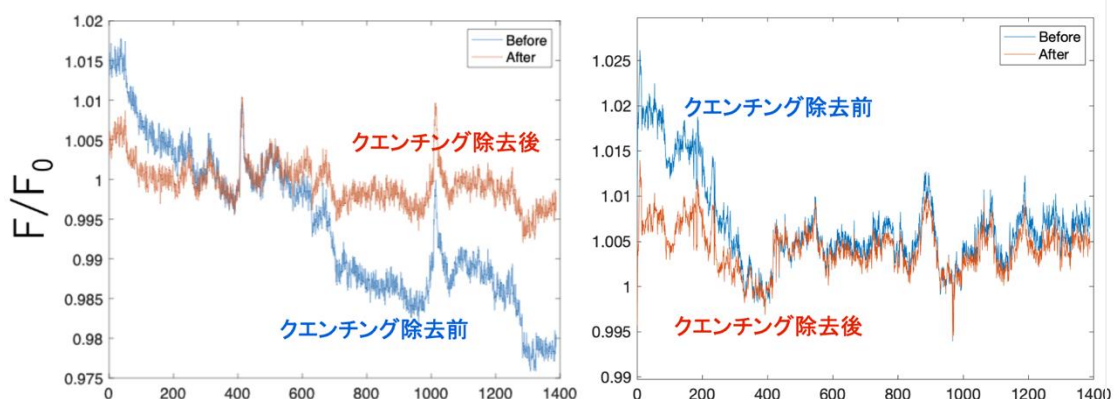


図 2. 開発したノンパラメトリックなクエンチング補正技術の適応例

研究テーマ C: オーロラ動態定量化のための画像解析技術の開発 (サブテーマ)

サブテーマとして推進する、全天オーロラ画像のイメージ解析について得られた成果をまとめ

る。

C-(1) 脈動オーロラのパッチ追跡技術

サブテーマとして、全天オーロラ画像で計測された脈動オーロラの自動追跡技術の開発を行った。提案技術では、神経活動とクエンチング成分の分離と同様の手法により、背景にある非脈動の拡散オーロラから脈動パッチ成分を分離抽出し、脈動パッチの動きを記述したモデルに基づき個々のパッチ追跡を自動化することに成功した。

C-(2) PNU 画像分類に基づくオーロラのセグメンテーション技術

オーロラアークの向き、厚み、曲率など、オーロラの形態的特徴を定量的に評価する上で、オーロラ領域を分割したバイナリゼーションは重要な手続きである。ところが、オーロラは形状や色の多様性が大きく、教師あり学習に基づく方法では訓練データ(ピクセル単位のフルアノテーション画像)構築の作業コストが非常に高くなる。そこで、フルアノテーション画像の代わりに、オーロラに相当する領域と背景に相当する領域を、それぞれ数カ所、“点”として指定した情報(以下、これを点アノテーションと記述)から、セグメンテーションを実現する技術を開発した。本技術は、近年提案された分布を仮定しない半教師あり学習である PNU (Positive, Negative and Unlabeled) 分類を応用したものであるため、CoSPA (Cost-effective Segmentation with Partial Annotations)と名付けた。実験では、THEMIS All-sky Imager にて計測されたオーロラ画像に対し、前景(オーロラ)・背景(オーロラ以外)の点アノテーションを100箇所ずつ指定し、ラベルなしの点アノテーションを1,000箇所ランダムに抽出することで、分類器である ResNet-18 の訓練に用いた。その結果、100箇所ずつの点アノテーションの指定は15分程度で完了するが、オーロラの輝度によらず自然なセグメンテーションが実現できることを確認した。

研究テーマD: 画像からの異常検知技術

D-(1) Layer-wise External Attention 機構による画像からの異常検出技術の開発

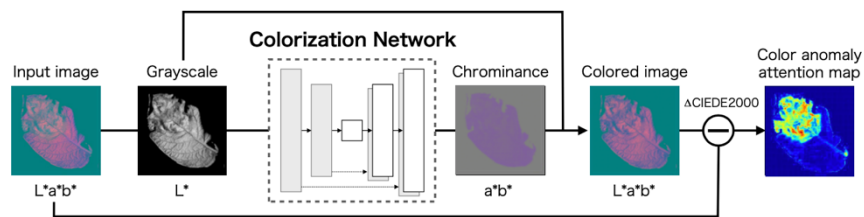
メインテーマ・サブテーマから派生したテーマとして、統計的機械学習に基づく汎用的な画像の異常検出技術を開発した。近年、画像を用いた異常検出に対して、畳み込みニューラルネットワーク(CNN)に立脚した技術が数多く提案されている。一般に、CNNの分類性能を引き出すには大規模な訓練データの準備、あるいは、類似ドメインで十分な性能を実現できる学習済みCNNが必要である。しかしながら、実問題では正常画像と同等数の異常画像を準備できないケースや、活用できる学習済みCNNが存在しないことも多い。このように、異常検出は大規模データの機械学習に立脚した手法が本質的に苦手なタスクであるため、実際の異常検出の現場では問題の性質に応じた様々な試行錯誤が求められる。

本研究では、正常サンプルで学習した敵対的生成ネットワーク(GAN)に基づき、画像の局所的な再構成可能性を評価することで、画像上の異常領域を検出する汎用的な技術を提案した[2]。植物の病変検知や異常製品の検出実験を通し、先行研究である AnoGAN と比べて検出性能、解釈性、計算効率性について提案手法の優位性を示した。

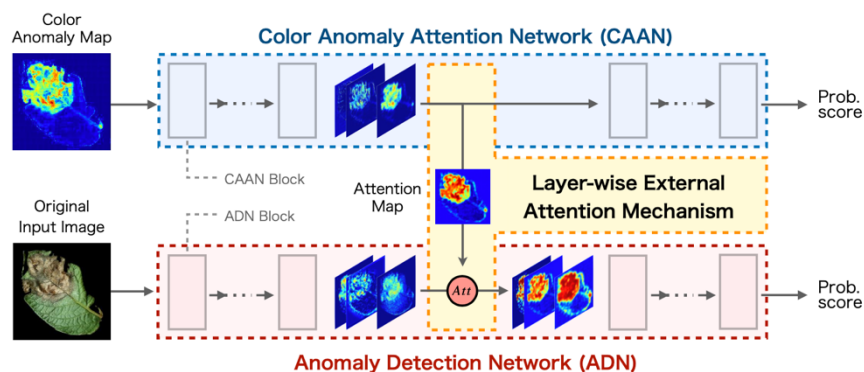
このような教師なし異常検出法は、正常サンプルのみから学習を行うため、訓練のための異常サンプルを準備する必要がないという長所がある。一方、異常サンプルが訓練にまったく活用されないという短所もある。そこで、本研究をさらに拡張し、教師なし学習によって得られた異

常に関する知見を異常検出の教師あり学習に活用する CNN に取り込むための注視機構：Layer-wise External Attention を確立した[1]。それにより、既存の画像認識 CNN による異常検出性能を増強させる技術を開発した。

本手法を LEA-Net (Layer-wise External Attention Network)と名付けた。図 3 に LEA-Net を示す。LEA-Net は、正常サンプルからの教師なし学習によって得られた異常度マップを、External Network を介して視覚注視機構として異常検出ネットワークに取り入れる仕組みを持っている。External Network は学習の段階や中間層によって、注視機構の抽象度を適切に調整する役割を担っている。工業製品、植物、航空写真など様々な実問題データセットに対する実験を通し、LEA-Net は畳み込みニューラルネットワークに基づく既存の画像分類モデルに対し、目的に応じて異常検出性能を向上できることを確認できた。



(a) Color Anomaly Map Generation Step



(b) Anomaly Detection Step (Binary Classification)

図 3. LEA-Net と Layer-wise External Attention の概要

研究テーマ E: 新型コロナウイルス感染症に関する追加的課題

新型コロナウイルス感染症に関する追加的課題として、サーマルカメラで撮影された動画から、バイタル情報を推定する画像処理技術の開発を行った。提案技術は、顔検出・領域分割、信号抽出、信号分離の 3 つのステップから構成される。L-CAS Thermal Physiological Monitoring Dataset を用いた実験の結果、Face Mean 法、Weight Mean 法、Weight Max 法といった従来手法よりも、高い精度で脈拍情報を推定できることを確認した。

3. 今後の展開

3-(A) 結合を阻害した変異体を用いたシグナル伝達特性の解明

感覚神経細胞と化学シナプス結合あるいはギャップ結合をもつ線虫の介在神経細胞に対し、それらの結合の機能を阻害した変異株を作成し、どのような神経活動応答の特性の違いが生じ

るか網羅的に調査する。さらに、統計的機械学習に基づき、膜電位と Ca^{2+} 変動の関係性から、化学シナプス結合あるいはギャップ結合のシグナル伝達特性の違いをデータ駆動的に明らかにする。

3-(B) 細胞間相互作用が実現する神経回路の情報表現・符号化の原理解明

本研究において、線虫の細胞レベルでの詳細な膜電位・ Ca^{2+} 同時イメージングという新機軸の計測技術の基盤を築くことができた。特に、AWAの詳細な解析により、単一の神経細胞が刺激の開始・継続・終了といった時々刻々変化する環境情報を表現できている可能性が高いことが明らかになった。過去の研究では、線虫の神経細胞には、単一細胞でも育成環境を記憶する機能を有するものがあることが報告されている。これらのことを踏まえると、単一の神経細胞は形式ニューロンのような単純な機能ではなく、即時的な判断から長期記憶まで、重層的な機能を備えている可能性がある。ギャップ結合では、そのような重層的な機能を有する細胞同士が互いに情報を共有していると考えられる必要がある。重層的機能をもつ少数の神経細胞が相互作用することによりどのような情報符号化が実現され得るのかを調査・解明することは、脳型AIという観点からも野心的な課題であると考えられる。

VDCCを阻害した変異株での実験により、1つの細胞のVDCCも種類によって役割が明確に分かれており、特にUNC-19は神経活動応用の安定化に寄与することを示唆する結果を得た。それは同時に、神経細胞のモデリング研究においても、VDCCごとにその固有の機能をモデル化できなければ、単一神経細胞の情報表現・符号化の仕組みを正しく解明できないことを示唆している。本研究で得られた成果を踏まえ、VDCCごとの固有機能までモデル化した次世代の神経細胞モデリングへの展開が期待できる。

現状で、膜電位イメージングに成功している神経細胞は、AWA, AIA, AWCの3つである。今後は、計測対象を線虫神経系の感覚神経細胞AWA, AWC, ASI, ASE, AFDと、primary interneuronsに属する介在神経AIA, AIB, AIZ, AIY, RIA, RICの計11個の神経細胞に拡大する。さらに、遺伝的操作によって特定のギャップ結合を阻害した変異体を作成することによって、それらのギャップ結合が果たす機能について明らかにする。それによって、ギャップ結合を介した細胞間相互作用が実現する情報表現や符号化の原理発見や、Bio-inspired AIへの応用研究への展開が期待される。

4. 自己評価

4-(1) 研究目的の達成状況

神経間結合のシグナル伝達特性を解明するという、メインテーマの最終目標に対しては実現に至らなかった。一方で、外部刺激に対する単一細胞の膜電位と Ca^{2+} の同時動態計測は、さきがけ研究にふさわしい野心的な挑戦だったと評価している。計測と情報学的手段の融合については、単一神経細胞での計測は想定以上の科学的発見をもたらしてくれた一方で、2細胞の同時計測まで至らなかったため、当初予定していたデータ駆動的な方法により緻密な動態を推定するステージにまで到達できなかった。この点については、AWA-AIAなど2細胞での計測データが蓄積され次第、着手したい。

神経科学や地球科学のイメージングデータと向き合う過程で、LEA-NetやCoSPAのような、汎用的な目的で活用できるコストエフェクティブなイメージ解析技術を創出することができた。い

ずれも、限られた訓練データから実用的な分類器を構築することに主眼を置いた研究である。これらは、本テーマにおいて、計測とデータ解析の両方と向き合ったからこそ創出することができた成果である。

4-(2) 研究の進め方

当初計画では、 Ca^{2+} イメージングのみで神経間シグナル特性の重要な特徴を特定することを目指していた。 Ca^{2+} センサーの反応速度の問題で、 Ca^{2+} イメージングは速い応答を捉えることができないことから、細胞内でのシグナル伝達の時空間構造に注目した研究を推進する予定であった。それが、研究期間中に膜電位イメージングを導入したことで、情報アプローチを想定していた計画が計測と情報学的手段の確立を両立する、融合アプローチに近い性質に変化したと考えている。

通常、計測の専門家と情報学的手段の専門家は、共同研究においては分業体制を取ることが多いと思われる。本研究ではその双方を個人型研究として推進したことで、計測・データ解析双方の視点から研究を推進できた。もちろん、個人型研究として双方の研究を推進することは困難が伴う部分も多々あったが、前述の LEA-Net や CoSPA も計測と解析の両立を模索する中で生まれたアイデアが基軸となっており、学際的な研究の産物であると自己評価している。

4-(3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究により、膜電位と Ca^{2+} の細胞レベルでの同時ライブセルイメージングが実現できた。それにより、ジアセチル刺激の開始・継続・終了・濃度といった時事刻々変換する外界の情報を、AWA の膜電位が表現できていることがわかった。また、そのような情報表現を実現する機構について、シグナル伝達経路まで踏み込んだ議論が可能となった。本研究で膜電位と Ca^{2+} の同時イメージングを実現できたのは AWA と AIA の 2 細胞であったが、今後より多くの神経細胞で膜電位・ Ca^{2+} の同時イメージングが可能となれば、複数の細胞の協働により実現される多角的な情報表現が明らかになり、線虫を用いた神経科学研究のゲームチェンジャーとなる可能性がある。

本研究の波及効果は、神経科学分野にとどまらず、AI 研究にも波及すると期待できる。線虫は千を超える嗅覚受容体を持ち、中枢神経系は少数の神経細胞でも多様な匂い刺激を嗅ぎ分ける仕組みがあると考えられる。ディープラーニングをはじめとする現在主流の AI は、エネルギー消費やメモリーコストが大きな課題となっている。単一細胞が実現する情報表現を詳細に明らかにし、多様な匂いを少数の神経細胞で嗅ぎ分ける機構を AI として実装できれば、これらの限界を打破する省エネ・ロバストな新機軸の AI を創出できる可能性がある。

本研究において、イメージングデータからの現象動態を抽出するための様々なイメージ解析技術・動態モーフィング技術を開発した。そのうちのいくつかは、工学的な用途へと水平展開が可能である。本さがけ研究終了時点において、関連する技術 3 件の国内特許出願を行った。そのうちの 1 件は 2022 年度内の PCT 出願も検討している。これに加え、もう 1 件の技術を 2022 年度内に国内特許出願予定である。

自然科学分野との協働を想定していた本テーマであるが、産業界からも高い関心を寄せられており、とりわけ外観検査 AI に関連して、ものづくり企業 2 社との共同研究が始まることとなった。現在の光学的外観検査装置の市場規模は、200-300 億円/年、成長率は 5-10%程度とされている。それに対し、AI を活用した画像処理ソフトウェアの市場規模は、2023 年で 685 億円/年に達

すると予測されており、その場合の成長率は 14.3 倍 (2019 年比)である。外観検査 AI に関して革新的な技術開発に繋がれば、その経済効果は絶大なものになると予想される。

本研究で開発した部分的アノテーションからのイメージセグメンテーション技術がきっかけとなり始まった企業との共同研究テーマの1つは半導体部品の外観検査に関連する課題である。世界の半導体の市場規模は 2018 年度時点で 50 兆円を超えており、2030 年には 100 兆円に到達すると予想されている。半導体・電子回路は、AI、5G、IoT、DX、ロボティクスなど 21 世紀の産業や安全保障の土台となる基盤である。本技術により従来よりも高性能・高速な半導体の外観検査 AI の実現できれば、国内の半導体製品の生産強化・安定化へ大きく貢献することができる。

これまでに述べたように、本さがけ研究で得られた成果は、企業との共同研究 2 件、科学研究費助成事業の「学術研究助成基金助成金」基盤研究 (C)、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の「官民による若手研究者発掘支援事業共同研究フェーズ」として発展させる予定である。自然科学を対象としていた本テーマであるが、結果的には、様々な産業応用を含めた多角的な研究へと想定外の広がりを見せることとなった。

4-(4) 領域内での貢献

本領域内においては、領域会議や個別の議論を通し、多様な意見交換をすることができた。2021 年度には、ライフサイエンス分野のクラスタ会議事務局を担当した。クラスタ会議では領域内外から 3 名の研究者に招待講演を依頼した。いずれの講演も、情報科学と生物学の学際的な研究について最新の成果を含むものであり、情報計測という観点から非常に有意義な講演であったと思われる。それらの活動を通して、自らの研究の様々な着想を得ることができたと評価している。一方、情報アプローチとしては、他のさがけ・CREST 研究に、あまり具体的な貢献はできなかった。現在、本成果で得られたいくつかの技術について、ソースコードあるいはソフトウェアとして整備を進めており、さがけ卒業生として、研究終了後も様々な形で領域に貢献したいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件

1. T. Hooimin, J. I. Kurokawa, U. Ohnishi, N. Sato, M. Fujiwara, T. Kitazono, T. Tokunaga, T. Ishihara, Behavioral forgetting of olfactory learning is mediated by interneuron-regulated network plasticity in *Caenorhabditis elegans*, *eNeuro*, 2022, リバイズ中

線虫がジアセチル刺激に関する情報を忘却する仕組みにおいて、AIA が果たす役割をライブセルイメージングデータから明らかにした。本研究で確立したイメージング系の一部を用いることで、AIA の細胞体と神経突起部分の神経活動の同時イメージングが実現できた。

2. Ryoya Katafuchi, Terumasa Tokunaga, LEA-Net: Layer-wise External Attention Network for Efficient Color Anomaly Detection, 公開:arXiv:2109.05493, 査読中

異常に関する事前知識の活用は、異常検出問題において重要な課題である。近年、視覚

注視機構は畳み込みニューラルネットワークによる物体認識性能を向上させる手段として注目されている。本研究では、物体認識でよく用いられる self-attention とは異なる、Layer-wise External attention mechanism に基づく画像の異常検出技術である LEA-Net (Layer-wise External Attention Network)を提案した。

3. Ryoya Katafuchi, Terumasa Tokunaga, Image-based Plant Disease Diagnosis with Unsupervised Anomaly Detection Based on Reconstructability of Colors, In Proceedings of the International Conference on Image Processing and Vision Engineering,

正常サンプルで学習した敵対的生成ネットワーク(GAN)に基づき、画像の局所的な再構成可能性を評価することで、画像上の異常領域を検出する汎用的な技術を提案した。植物の病変検知や異常製品の検出実験を通し、先行研究である AnoGAN と比べて検出性能、解釈性、計算効率性について提案手法の優位性を示した。

(2)特許出願

研究期間全出願件数: 3 件(特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	徳永 旭将
	発 明 の 名 称	GLCIC による欠損補間に基づく教師なし画像異常検知システム
	出 願 人	九州工業大学
	出 願 日	2021/11/21
	出 願 番 号	2021-189725
	概 要	ディープラーニング技術を活用し画像に含まれる異常を検出するには、教師あり学習のための大量の訓練画像が必要である。しかし、異常を含む画像はあまり積極的に収集されることがない。一方、社会的には正常の検出よりも異常の検出がより重要であり、少ない異常データ例、あるいは極端には異常に関する教師データなしで、異常を検出する方法が必要とされている。近年、敵対的生成ネットワーク(GAN)を用いた画像変換が盛んに研究されており、画像の欠損領域を補間する問題に対してもCLCICと呼ばれる技術が極めて自然な補間を実現し注目されている。このCLCICを用い、異常を含まない画像に対して意図的に与えた欠損を補間する過程を学習させれば、異常が含まれる領域では補間精度が有意に低下するため、異常画像例を用いずに異常領域の特定が可能となる。
2	発 明 者	徳永 旭将、野見山 陸
	発 明 の 名 称	非接触脈拍推定装置
	出 願 人	九州工業大学
	出 願 日	2022/3/09
	出 願 番 号	2022-035911
	概 要	本発明は、非接触脈拍推定装置に関し、特にサーマルカメラによる非接触脈拍推定装置等に関するものである。具体的には、サーマルカメラにより取得した画像データに対し、複数の脈波信号に周波数解析を行う周波数解析技術と、前記周波数解析部が出力した周波数成分のうち、脈拍の周波数である可能性がある周波数範囲である脈拍周波数範囲における最大の振幅を有する周波数成分を脈拍の周波数成分として決定する脈拍周波数決定部とを備える、非接触脈拍推定技術から構成されている。これにより、非接触で従来技術よりも正確に脈拍信号を推定することができるようになった。

3	発 明 者	徳永 旭将
	発 明 の 名 称	画像処理・解析装置および画像処理・解析方法
	出 願 人	九州工業大学
	出 願 日	2022/3/31
	出 願 番 号	2022-59045
	概 要	ユーザの確信度が高い領域のみにアノテーションを付与することは、比較的簡単にできる。そこで、部分的なアノテーションからセグメンテーションを実現できる技術を目指す。正例、負例、およびラベルなしインスタンスから分類器を構築する PNU 学習を用いる。半教師あり学習に基づき、部分的なアノテーションからバイナリセグメンテーションを実現する手法を構築できる。30 分以内に訓練データの構築が終わる。少数のアノテーションデータ(100-200 枚程度の部分的なアノテーション)から、実用的なセグメンテーションができるようになった。

(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)

学会発表

[1] Keiichi Nakanishi, Terumasa Tokunaga, “A Class-prior probability regularization with an extended Focal Loss for efficient Semi-supervised classification”, The 3rd International Symposium on Neuromorphic AI Hardware, 北九州, 2022 年 03 月 19 日

[2] Ryoya Katafuchi, Terumasa Tokunaga, LEA-Net: Layer-wise External Attention Network for Efficient Color Anomaly Detection, 第 24 回情報論的学習理論ワークショップ (IBIS2021), 2021 年 11 月, オンライン

[3] Takeshi Ishihara, Noriko Sato, Terumasa Tokunaga, Simultaneous measurements of membrane voltage and intracellular Ca^{2+} of AWA neurons by a gene encoded voltage indicator and GCaMP, 23rd International C. elegans Conference, 2021 年 06 月, オンライン

[4] 徳永 旭将, 線虫 *C. elegans* の細胞レベルの膜電位/カルシウム同時イメージング確立に向けて(招待講演), 第 2 回分子サイバネティクス研究会, 第 46 回分子ロボティクス定例研究会, 2021 年 5 月

[5] Ryoya Katafuchi, Terumasa Tokunaga, Image-based Plant Disease Diagnosis with Unsupervised Anomaly Detection Based on Reconstructability of Colors, International Conference on Image Processing and Vision Engineering (IMPROVE2021)

[6] Terumasa Tokunaga, Noriko Sato, Yuishi Iwasaki, Takeshi Ishihara, An image processing pipeline for quantifying spatiotemporal evolution of voltage responses inside a single cell of *C. elegans*, 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月, オンライン

解説

徳永 旭将, “計測、モデル、データ科学はどのように協調できるか”, 計測自動制御学会誌
「計測と制御」, 58(3), 2019