

神経細胞の形態解析に着目した AI モデルの開発

研究分担者：加藤竜司 国立大学法人東海国立大学機構 准教授

研究要旨

本研究の目標は「**神経細胞の形態解析に着目した AI モデルの開発**」であり、名古屋大学・加藤の有する技術を応用することで、国衛研・安彦らの取得した神経細胞の定量数値化技術および細胞品質管理のための AI モデル化技術の開発を行うものである。より具体的には、（1）細胞形態背景データの取得及び MPS 品質管理への AI 活用、（2）神経毒性物質による神経細胞形態変化の捕捉及び指標抽出、を実施する。令和5年度は特に開発項目（1）において、MPS 品質管理・再現性確保への活用を主眼に、国衛研より提供された MEA プレート上での神経細胞培養画像と MEA データの集積データセットを用いて、神経毒性試験においてロバストな画像特徴量についての解析を実施し、MEA センサー1 端子ごとに細胞形態画像をクロップする自動 MEA 区画化アルゴリズムの開発と、この解析アルゴリズムで得られる1 センサー単位および全ウェル単位での計測の安定性についての分析を実施した。結果、**Number of Spikes** と相関性の高い画像特徴量の発見と、センサーごとのデータだけではウェル全体としての応答性を表現できないリスクがあることを発見した。またこの課題解決のため、ウェル内の細胞形態特徴量を網羅的に組み合わせることで、**Number of Spikes** を画像のみから定量的に予測できる AI を開発し、不良ウェルなどを非破壊的に識別できる可能性が見出された。しかし一方で **Number of Spikes** 予測 AI は、いくつかのプレート間では性能を保つが、特定のプレートでは予測性能が落ちる現象がみられており、さらなる実験データの追加と、AI モデルの汎化性向上のためノイズ除去に取り組んでいる。

A. 研究目的

本研究では、神経毒性（特に急性毒性）の安定かつ定量的な *in vitro* 評価モデルとしてのヒト iPS 細胞由来神経細胞 MPS 評価を安定化・効率化するため、評価材料である神経細胞の品質評価技術として次の2つの技術開発を目指し、従来の神経毒性試験や発達神経毒性試験を代替して国際的な化学物質管理の取り組みに貢献する試験法確立に貢献する。

開発項目（1）ではヒト iPS 細胞由来神経細胞の品質判定画像 AI 解析技術を目指し、研究分担者・加藤がこれまで様々な細胞の非破壊的画像品質判定を実現してきた非破壊的画像細胞品質判定技術『細胞形態情報解析』を応用し、MPS 薬剤評価を安定に実現するための神経細胞品質を判定する画像 AI 解析技術を開発する。

開発項目（2）では、神経毒性物質への神経細胞応答表現型の定量化を実現する画像 AI 解析技術を目指し、MPS 中で薬剤に反応する神経細胞の形態応答変化の特徴量解析から、MEA 解析を補完する深い生物学的理解のための情報として細胞毒性及び細胞機能障害と連動する表現型特徴量の抽出技術開発と、特徴量の分析・特定を行う。

本年度は、開発項目（1）および（2）において、MPS 品質管理・再現性確保への活用を主眼に、AI による細胞画像解析のために集積された基礎データをもちいて、詳細に分析すると共に、細胞応答 (**Number of Spikes**) を画像のみから連続値予測する AI の開発を目指した。また、この実現のため、提供された MEA

センサー上の細胞画像から、安定にセンサーごとの細胞被覆区画を Crop する自動 MEA 区画化アルゴリズム、および、ここから得られる区画ごとの細胞形態特徴量のノイズ・バイアスの影響について詳細な検証を行うこととした。

B. 研究方法

本年度は、研究代表者・安彦と連携し、MPS プレート上において培養された SynFire の顕微鏡画像データおよび MEA データセット（48 ウェル分）の提供を受け、得られたデータの分析および画像データからの特徴量抽出技術および得られた特徴量を用いた細胞応答の画像予測 AI モデルの開発を行った。

特に今回は、提供される MEA プレート画像の特徴と、実験者からの **hearing** によって、「各センサーに細胞が常に均一にのっているわけではないこと」「培養後期には細胞がはがれてしまうエリアが発現すること」「ウェル全体の計測値のどこまでか、各センサーの情報と相関するのか、おかしなセンサーを事前に検出することができるのか」などの課題点を見出し、これを解決するための画像解析技術の開発と、データ分析を遂行した。

（倫理面の配慮）

本研究では、市販細胞を用いた培養データの解析を行うだけであるため、倫理面で配慮が必要な事項は無い。

C. 研究結果

まず、MEA プレート上で培養された神経細胞画像を

複数ウェル分析した結果、各ウェル内において全センサーが必ず細胞で被覆されているとは限らない現状が見いだされ、実際の培養プロトコルでもこれを加味して細胞播種密度を調整したことを確認した。このため、ウェル全体から得られる計測データの妥当性を評価するには、ウェル内のセンサーごとに細胞被覆率がどれだけあるのか、また、センサー以外の領域にある細胞についてもデータに含めた場合に、どこまでそれらの細胞集団情報がウェルとしての細胞応答計測結果に影響を与えるのか、詳細に分析することとした。

このため、本検証では、取得画像から自動的にセンサー突端の領域を自動認識すると共に、画像全体を区画化して認識したセグメンテーションエリアとの相対関係を認識し、1ウェル画像内における細胞不均質性の特徴量と、センサー付近での細胞不均質性の特徴量を別々に計測することが可能な自動区画化アルゴリズムを開発した（図1）。

次に、このアルゴリズムを用いて提供された画像データセットの解析を実施したところ、MEAから得られるデータ特徴量のほとんどは共線性が高い、即ち「計測値は多いがほとんどが同質の情報であり、独立して異なる意味を持つ情報は少ない」ことが分かった。これはある意味、MEA計測データだけでは、複雑な細胞毒性評価をすることが難しいことを示唆している。言い換えれば、MEAデータに加えて、画像から得られる情報までも加えることは、今後のMEAを用いた毒性評価にとって有益であることが示された。

次に、上記の相関解析において、いくつかの細胞画像特徴量に細胞応答（例：Number of Spikes）との相関性が見られたため、これらを抽出してみると、画像からも経験的には認識されていた「細胞被覆の状態の良否」が逆相関関係にあることが初めて明確となった。

逆の視点からは、細胞画像からは複数の特徴量（26種類）が得られるが、各区画の情報ではなく、ウェル全体としてこれらの統計量を積算的に評価した特徴量が、ウェルのMEA細胞応答と強く相関することが見出され、各センサーや、各区画の細胞状態だけを評価しても、ウェルとしての評価性能を正確かつ安定に判定することは難しいことが見出された。もともとは、各センサー付近における細胞状態までを検出・解析することでより高い性能の予測AIの構築ができる可能性を検討していたが、MEAプレートではウェル全体として実際の計測値に影響を与えていることが明確となり、汎用的なAIモデルの構築に非常に重要な知見となった。

次に、上記検討から選抜された画像および、安定かつ独立な情報を有していると考えられた画像特徴量を用いて機械学習モデルを構築した結果、特定のデータでは高い予測性能が発揮されることがわかった。逆に、全く予測性能が発揮されないプレートデータがあり、現状のAIモデルではまた特定のバイアスデータに過学習している可能性が示唆された（図2）。

現在は、このバイアスについて詳細にデータを解析すると共に、新規データの追加について安彦先生にご協力を仰いでいる。

D. 考察

本年度は、解析対象となる詳細な画像データおよびMEA計測データなどのデータセットが得られたため、実データについての統計分析と、機械学習モデル構築に

ついて検証が進んだ。

大きな発見としては、多変量情報と考えられていたMEAの計測Readoutが、想像以上に独立性が無く、画像情報特徴量を今後の予測に応用することの有効性が見出されたことである。

また、現状ではウェル全体における細胞密度の均質性、特に「細胞間隙が多くなると、Number of Spikesは大きく減少する」という傾向が明確化したことは、本研究の目標である、「MPS品質管理のための画像自動検出」と「神経細胞形態変化の指標抽出」に両方近づいた結果であると評価できる。

また、各センサーデータ付近の画像解析も自動的に画像を分割・整理して行える体制を整えたが、残念ながらここまで細胞区画を区分けしても、センサーデータの不良の検出に繋げることは難しいことがわかった。

現在、まだNumber of Spikesの予測モデルの性能が安定していない原因はまだ明らかにできていないが、次年度さらに蓄積される画像・MEAデータセットの解析を行うことで、より安定なAIモデルの開発に繋げることができると考えられた。

E. 結論

本年度の研究を通じて、MEA計測データの弱点の明確化と、MEA計測データの予測が画像情報のみを学習させたAIモデルで一部実現することができた。

今後は、より多くの画像・MEAデータセットでの検証を積み重ね、より汎化性の高いAI開発を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

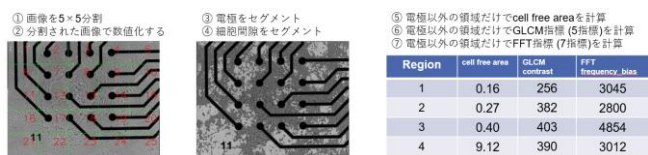


図1：自動MEA区画化アルゴリズムの概要

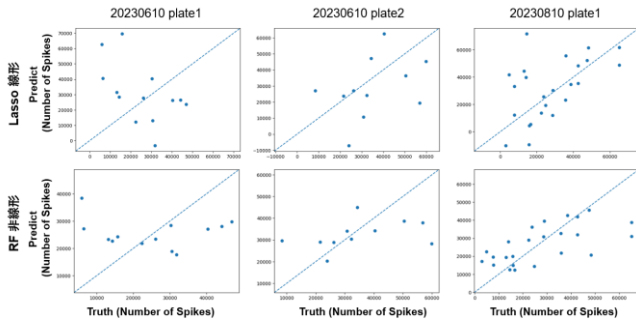


図2: 画像特徴量のみを用いた予測AIモデル(データ別)