

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）
令和6年度研究成果報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発
研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

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6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、令和5年度に開発した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ロバスト性の向上に向けたノイズデータ削除のためのアルゴリズム開発を行った。その結果、電極付近のデータをスコア化して集合化することでより安定したデータになることが発見された。開発項目（2）においては、コンフレント状態のより微細な変化を表現する記述特徴量化技術としてのVAEモデルを用いた潜在特徴量表現技術のための基盤モデルを検証し、ノイズデータに対するロバスト性が向上することを確認した。今回のMEAデータではまだ安定性の高い性能を達成することができなかったが、目標としていた追加データに対する安定な解析パイプライン構築にVAEが有効である可能性が示唆された。

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中で薬剤に応答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）において令和5年度に開発された解析技術について、各電極ポジションの認識安定性の向上、各電極ポジションから得られたデータのデータ品質評価法およびノイズデータの効果的削除方法を開発した。

また、開発項目（2）においては、今年度解析対象となる細胞の世界的な供給停止によって評価解析細胞が変更することを受けて、よりどんな細胞に変更された場合にもロバストかつ効果的に状態の記述が行えるように、Variational Auto-Encoder（VAE）のアルゴリズムを用いた画像特徴量抽出法を新たに開発した。

B. 研究方法

本年度も、研究代表者・安彦から提供された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）を用いて、細胞応答の画像予測AIモデルロバスト化のための各種処理の最適化およびノイズデータ影響の検証と最適化を行った。また、SynFire顕微鏡画像におけるコンフレント細胞画像からの特徴量抽出のために、VAEモデルについての開発環境整備と実装を行い。最適なモデル化環境とハイパーパラメータの最適化を進めた。

（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、令和5年には第一バージョンとして構築

していた各電極部分の画像パッチエリアをより正確かつロバストに認識するアルゴリズムの開発を行った。これは画像間において、輝度のバラツキなどが生じていることから、データが増えて行く中で同様のアルゴリズムでは自動化処理が難しくなると考えられたからである。特に、距離画素値の最大値に対し 0.8 倍を閾値として再度二値化する処理を含めることで、電極の中心部のみをロバストに認識が可能となり、さらに開演算（5×5 カーネル、2 回反復）を施すことで、ノイズを除去して正確に電極を中心とした領域を認識することが可能となった（図 1）。

MEA 区画化と数値化が可能になったので、同一条件で培養された神経細胞から得られるスパイク数データにおけるバラツキについて分析した。細胞播種後の培養日数を通じたスパイク数データの電極間でのバラツキを分析したところ、MEA データでは電極間で想像以上に大きな変動（CV>0.4）が生じることが理解された。また、その電極間のバラツキは、経時的に増大されいくことも確認された（図 2）。同一条件下の計測でありながら、このような大きなバラツキが存在するという事は、神経毒性評価をより安定な評価技術とするためには、MEA データ中のバラツキを生む原因である「ノイズデータ」を *in silico* でデータ処理で削減させ、評価の信頼性を向上させることができると考えられた。

このような MEA 計測におけるデータ内変動の原因をさらにデータ解析した結果、バラツキを生じさせる原因として、（ノイズ 1）複数の測定日にわたって測定値が逸脱するデータ（電極としての外れ値）、（ノイズ 2）同一サンプル内において特定の測定日のみスパイク数が経時的な増加傾向から逸脱するデータ（計測としての逸脱データ）が存在することが明らかとなった。

ノイズ 1 を判別するため、複数の測定日にわたって逸脱を示すサンプルを特定するため、細胞画像から定量化した細胞領域の分布を解析した。具体的には、各培養日のサンプル間で細胞領域の値を標準化し、ガウス分布による最尤推定を用いてノイズ 1 をデータとして検出できるかを検証した。結果、一定に連続する電極データのノイズを検出できることがわかった。

さらに、ノイズ 2 を自動検出するため、階層ベイズモデルを応用することで予測値に 90% 信用区間を設定することで逸脱スパイク数データを定量化し、データクレンジングを行う手法を開発した（図 3）。このデータクレンジングを実装した結果、ノイズがある状況では相関性が乱れやすい「画像中の特徴量」と「スパイク数」との相関性が、培養経過時間を通じて安定化する傾向が確認された。このため、本手法によって、ノイズデータを *in silico* で削減することによって、より安定な MEA 解析とデータの理解が可能になることが示唆された。そこで、より

細かく MEA による神経活動測定において、電極周囲に存在する細胞量（周辺細胞領域値）とスパイク発火頻度との関係を解析し、信頼性の高い電極選別に活用可能な評価指標の構築を試みた。電極ごとに周辺細胞領域値を算出し、その大きさに基づいて 5 群に分類したところ、培養 28 日目以降のデータにおいて、細胞領域値が小さい群ではスパイクがほとんど検出されない電極の割合が高く、逆に細胞領域値が大きい群ではスパイクが安定して検出される傾向が確認された。さらに、周辺細胞領域値に基づくフィルタリングにより、スパイク発火頻度の平均値は向上しつつ、ばらつき（CV）を抑えながら安定した電極群を抽出できることが示された（図 4）。これにより、電極単位での品質評価が可能となり、従来 Well 単位の選別では困難であった電極レベルでの標準化の有効な指標となる可能性が示唆された。

最終的に、我々はプロジェクト開始時から国衛研から提供いただいているヒト iPS 細胞由来神経細胞の共培養画像の解析パイプラインを開発して来た。我々の解析手法では、細胞被覆状態を画像から検出し、複数の特徴量を用いて定量評価していたが、細胞の種類が変わる、または、新規撮影データを受け入れるにしたがって、画像中の輝度ノイズや細胞形態の変化が大きく、特定の画像処理アルゴリズムだけでは安定した数値化ができない問題にも直面した。このため、深層学習技術の一つである VAE を用いて画像全体に共通する特徴量を潜在特徴量としてのモデル化する技術の開発を行った。残念ながら、今回の検証では、学習データの少なさからか、これまでの電極データの解析を上回るような「安定特徴量」を潜在特徴量の中に発見することはできなかった。しかし、VAE のような深層学習モデルの導入のために検証した様々なノイズデータへの適応力からは、わずかな細胞種やデータの変更の誤差に左右されにくい画像認識が可能なことを確認することはできた。このため、今後 MEA 画像データをより多く蓄積することができれば、実験日や細胞状態に左右されない電極部位画像認識と安定した評価パイプラインが構築できると期待される。

D. 考察

本年度は、令和 5 年度までに開発してきた解析技術のロバスト化のため、ノイズデータの分析とクレンジング技術および、解析パイプラインロバスト化のための深層学習モデルの導入を行った。これらの開発の結果、MEA データを安定化しながら、実験データごとにあまり解析パイプラインを変更せずに定量化につながる可能性があることが示唆された。また電極ごとにデータを標準化できる可能性も示唆された。

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 解析モデルの先端技術での不安定化克服が可能となることを見出すことができた。提供データ

が深層学習モデルに対しては少し少なすぎる問題に直面したが、可能な限り新規モデルの有効性を検証し、汎用性が高くロバストなAI解析のコンセプトの構築を実現できたと考えられる。。

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

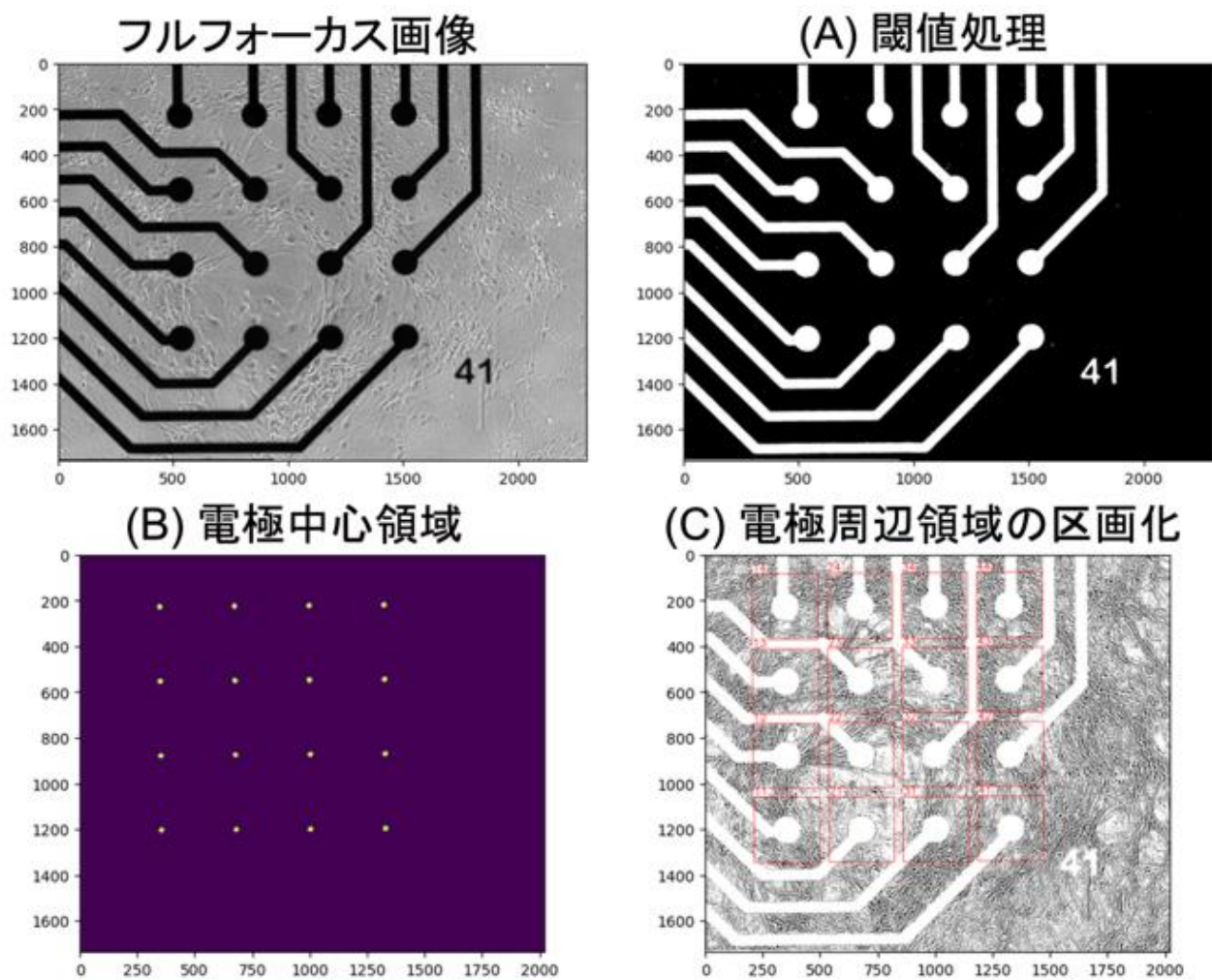


図1： MEA区画化アルゴリズムのロバスト化

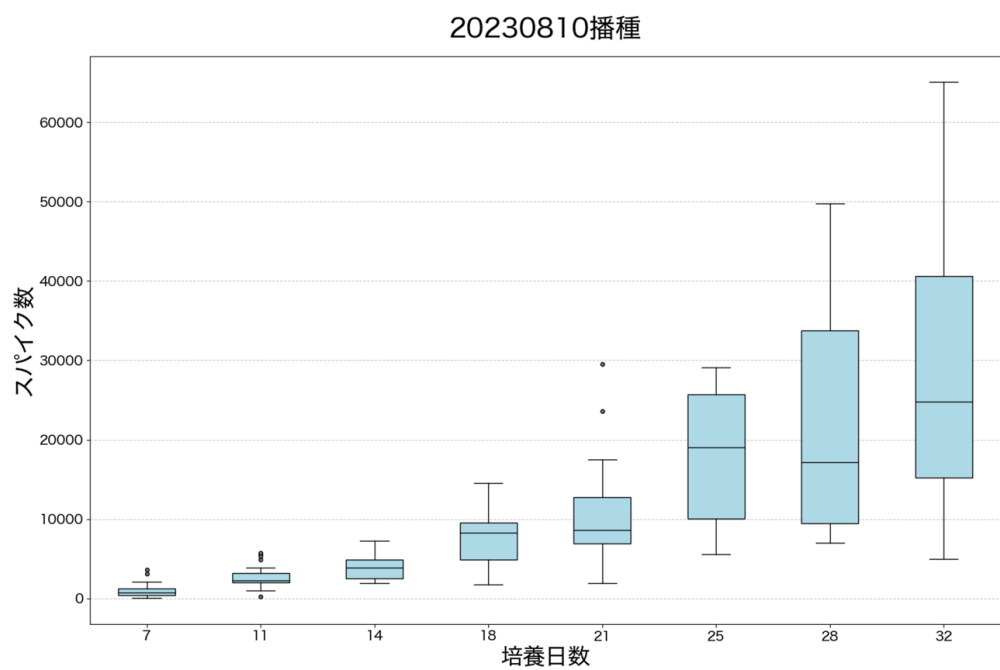
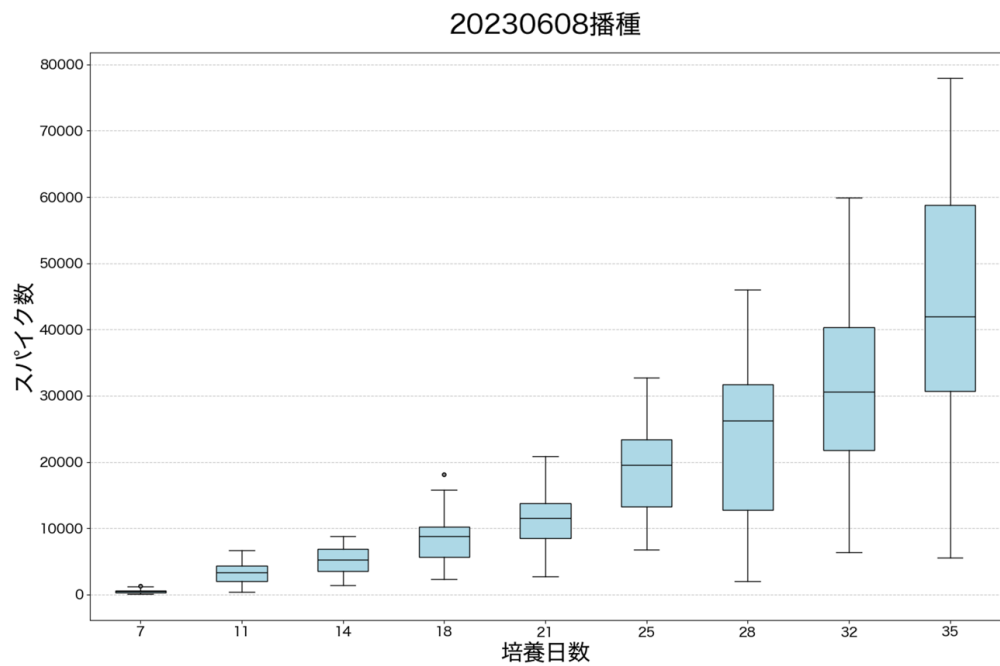


図2：MEAデータの中で増大するバラツキ

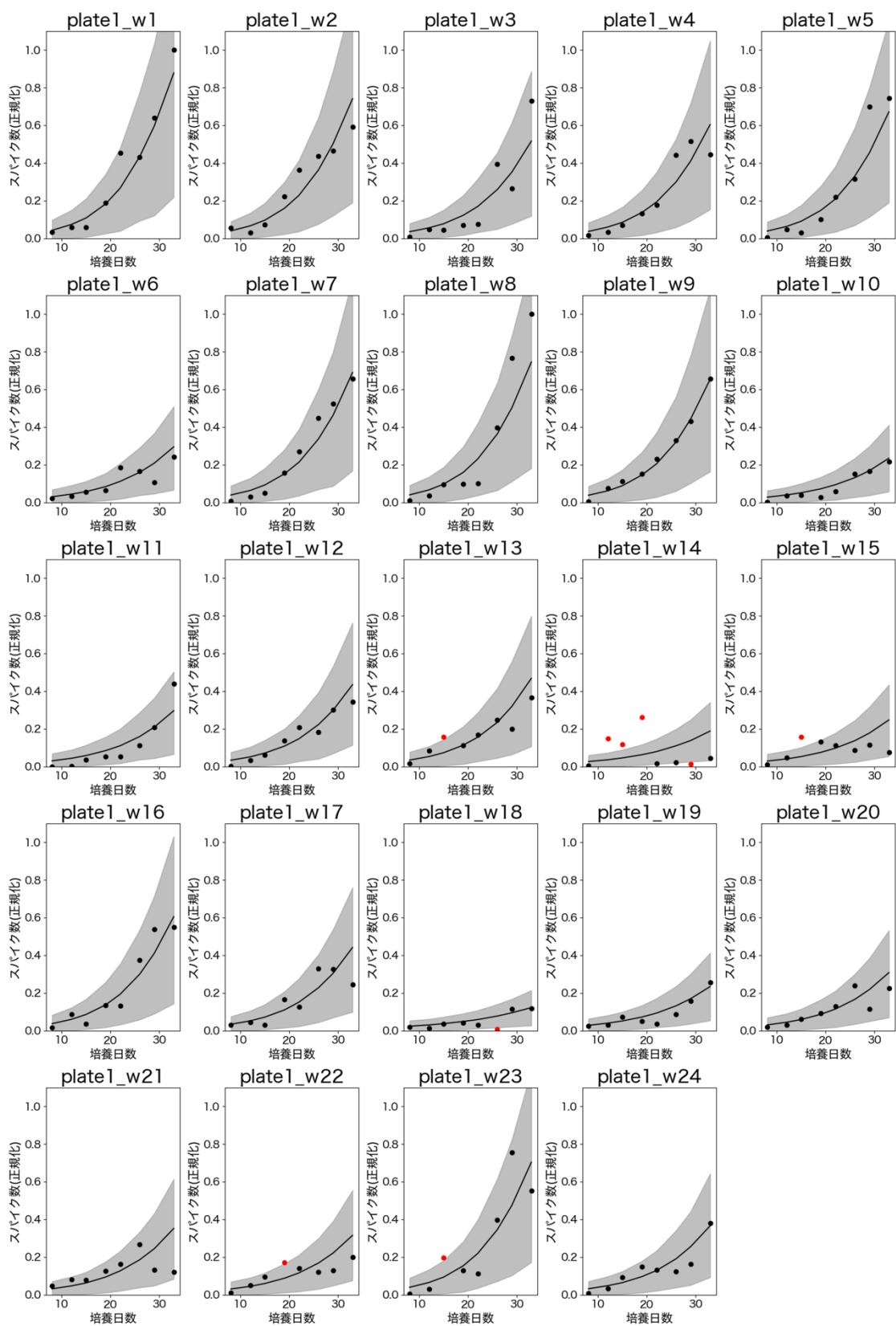


図3：階層ベイズを用いたノイズデータ検出の例

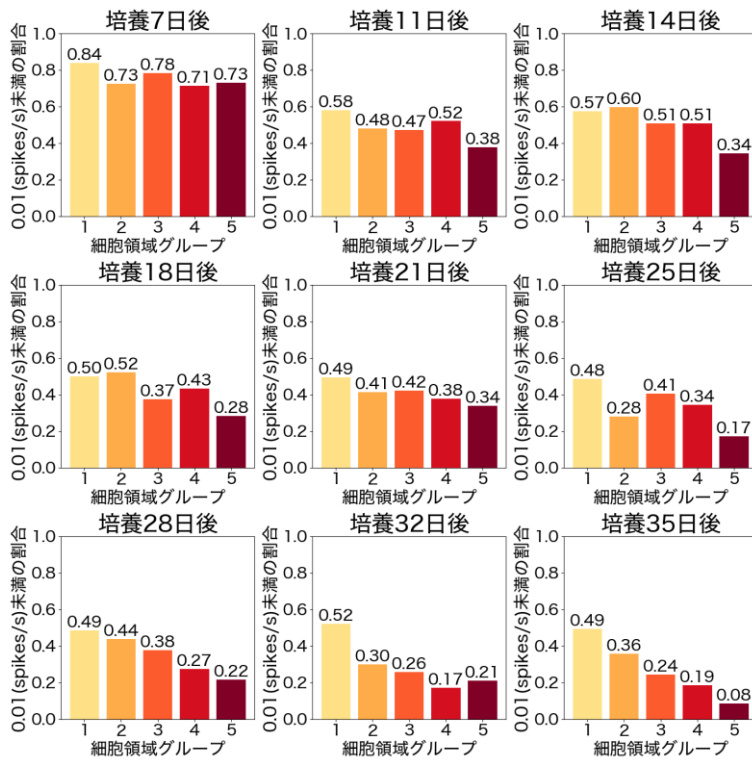
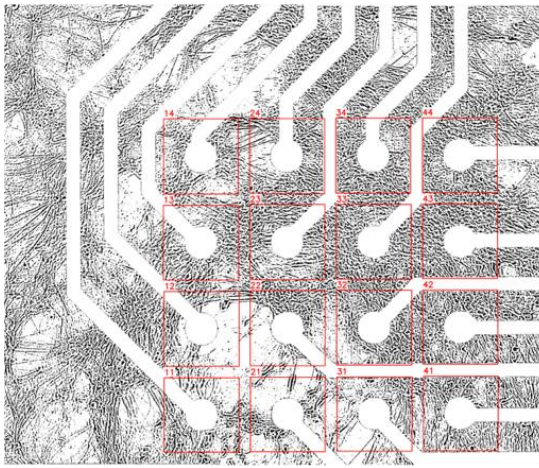


図4：領域グループによる電極データ検出効果の例