

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4-6年度総合報告書

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

本研究は、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMPS (Microphysiological Systems) とマルチ電極アレイ (MEA) を組み合わせ、神経毒性評価の精度と再現性を向上させるために、AIによる細胞画像解析技術の開発と応用を行った。目的は、従来のスパイク数やバースト頻度といったMEA出力に依存した指標に加え、神経細胞の形態情報を活用した新たな非破壊的評価基準を構築することである。

初年度には、細胞画像からの安定的な特徴量抽出に向けて、深層学習 (U-net) を用いた細胞セグメンテーション技術や、画像の焦点評価アルゴリズムを整備し、解析のための基盤技術を確立した。

次年度には、自動MEA区画化アルゴリズムを開発し、各電極に対応する細胞領域からの画像特徴量を抽出。細胞間隙や被覆状態とスパイク応答との間に明確な相関関係があることを初めて定量的に示した。さらに、画像特徴量のみを用いたAIによるスパイク数予測モデルの構築を行い、条件によっては高い予測精度が得られる一方、プレート間でのばらつきやバイアスの影響も顕在化した。

最終年度には、各電極の周辺細胞量を定量化する「周辺細胞領域値」を導入し、この指標によりスパイク未検出電極を効果的に除外することで、MEAデータの信頼性と均質性を向上させることに成功した。また、階層ベイズモデルによる異常スパイク検出や、VAE (Variational Auto-Encoder) による潜在特徴量の抽出により、異なる細胞種や培養条件でもロバストな画像解析が可能となった。

以上の成果は、神経毒性評価における画像情報の活用を高度化し、従来のMEA解析を補完・強化する新たな指標群の提案につながるものであり、将来的な標準化や多施設間評価にも対応可能な技術基盤を提供する。

A. 研究目的

本研究は、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、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMPS (Microphysiological Systems) による評価法の確立を目指したものである。従来の神経毒性試験に代わり得る国際的に有効な試験法を確立するため、以下の2つの技術開発を主軸とした：

1. 神経細胞の品質判定のための画像AI解析技術の開発
2. 神経毒性物質に対する神経細胞の形態応答を定量化する画像AI解析技術の開発

これらを通じて、MEA (マルチ電極アレイ) 解析を補完し、より生物学的意味のある指標を抽出することを目的とした。

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

微量解析から、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。

B. 研究方法

本研究では、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMPS評価系において、AI画像解析を活用した神経毒性評価手法の確立を目指し、3年間にわたって段階的に技術開発を行った。各年度での取り組みは以下の通りである。

【2022年度】

2022年度は、AI技術の実装に必要な基礎データの収集と、画像解析パイプラインの基盤構築を主眼とした。まず、研究代表者との連携により、MPS上で培養されたSynFire細胞の顕微鏡画像およびMEAデータを取得する環境と手順を整備した。これに基づき、画像の撮影条件(ピント、光量、視野の安定性など)に関するスコアリングアルゴリズムを開発し、安定した特徴量抽出のための前処理系を確立した。

技術面では、コンフルエント状態にある神経細胞画像のセグメンテーション技術として、深層学習モデルU-netを導入し、手動教師データとの照合に基づく評価を行った。さらに、得られた領域情報とテキスト情報を併用し、密集細胞の分布状態を特徴量として定量化するアルゴリズムを構築した。併せて、MEAから得られる多次元信号特徴量の蓄積と教師なし学習による次元削減を実施し、計測の安定性に寄与する指標の選別作業を行っ

た。

【2023年度】

2023年度は、前年度の基盤技術を発展させ、本年度は画像特徴量とMEA出力（spike数）との関係性を定量的に評価し、AIモデルによる応答予測を目指した。まず、MEAプレート上の電極位置に対応する画像領域を自動的にクロップする「自動MEA区画化アルゴリズム」を開発し、各電極における細胞被覆状況を正確に評価可能な画像処理環境を整備した。

この画像から抽出された26種の形態特徴量に基づき、spike数との相関解析を行ったところ、細胞間隙が増加するとspike頻度が低下することが明確化された。また、ウェル全体における被覆密度や不均質性の統計量とspike応答の相関性が高いことが判明し、電極単位の情報だけでは予測が困難であることも明らかとなった。これらの解析結果に基づき、複数のウェルデータを用いて画像特徴量のみからspike数を予測するAIモデル（Lasso回帰、ランダムフォレスト等）を構築したが、特定のプレートに対する過学習傾向が認められた。

このため、バイアスの影響やプレート間変動の要因を明らかにするための追加実験と、より汎化性の高いモデル構築に向けた手法選定が次年度課題として設定された。

【2024年度】

2024年度は、2023年度に構築した画像予測モデルのロバスト性向上と、実験データ間の変動要因の抽出・補正を目的とした。まず、各電極の周辺細胞領域を定量化し、この値を基に電極を5段階に分類。周辺細胞領域が小さい電極ではスパイク未検出率が高いことを明らかにし、電極ごとの信頼性評価指標としての有用性が示された。また、スパイク未検出電極を除去する閾値処理により、平均スパイク数が増加し、Well間のばらつき（CV）が減少する傾向が確認された。この分析により、周辺細胞情報に基づく電極選別が、より安定したMEAデータ取得に寄与することが示唆された。

さらに、実験間バラツキや異常値の影響を抑制するため、階層ベイズモデルやVAE（Variational Auto-Encoder）を導入。特にVAEは、画像全体から抽出される潜在特徴量として細胞状態を抽象化できる点で有用であり、細胞種や条件が変更された場合にも解析パイプラインを維持できるモデル設計が可能となった。階層ベイズによるスパイク数の逸脱値検出もあわせて実施し、in silicoでのノイズ除去技術として有望な成果を得た。

C. 研究結果

本研究では、3年間にわたり神経毒性試験における画像AI解析技術の確立に向けた開発を段階的に進め、複数の技術的成果を得た。

【2022年度】

2022年度は、画像解析技術の基盤構築に焦点を当て、神経細胞のコンフルエント画像に対して適用可能なセグメンテーション手法として深層学習モデル（U-net）を実装した。これは、神経細胞の密集領域から構造的な特徴量を抽出し、電極位置に依存しない細胞分布情報の可視化と定量化を可能にした。また、MPSから得られる多次元MEAデータについても、教師なし学習を用いた次元削減・特徴量抽出を試み、安定性に欠ける特徴量の抽出や、冗長な指標群の整理に成功した。

焦点スコアリングアルゴリズム（図1）を開発したことで、画像撮影の標準化と最適化が進み、以降のAI学習データの品質向上にも貢献した。これらの結果により、画像データとMEAデータの同時取得・解析を行う体制が

確立され、次年度以降の予測モデル構築に向けた技術基盤が整えられた。

【2023年度】

2023年度は、画像から抽出される細胞形態特徴量とMEA出力との関係をより詳細に分析することを目的とし、得られた知見は画像AI予測モデルの構築に直結した。とくに、自動MEA区画化アルゴリズム（図2）の開発により、各電極領域を個別に切り出して解析することが可能となり、細胞被覆の不均質性を定量的に測定できるようになった。

画像中の26種類の形態特徴量のうち、spike頻度と強い負の相関を示す指標（例：細胞間隙面積など）が明らかとなり、これまで経験的に知られていた「細胞の疎密と神経活動の関連」が定量的に裏付けられた（図3）。さらに、電極単位よりもウェル全体で集約した形態統計量がスパイク応答と高い相関を示すことから、局所情報よりも全体傾向の方が評価指標として有効である可能性が示唆された。

これらの特徴量を用いて、画像のみからスパイク数を回帰予測するAIモデル（LASSO回帰、Random Forestなど）を複数構築した。一定の条件下では高い予測精度を示したが、特定プレートでは精度が著しく低下するなど、データバイアスの影響が顕在化した。

【2024年度】

2024年度は、これまでの知見を基に画像AIモデルのロバスト性向上とノイズ除去技術の確立に注力した。まず、各電極の周囲に存在する細胞量（周辺細胞領域値）を定量化し、これをもとに電極を5段階に分類。スパイク未検出電極の割合を分析した結果、細胞量が少ない領域ほどスパイク検出率が低下する明確な傾向が確認され、電極単位での信頼性評価指標として周辺細胞領域値が有効であることを実証した（図4）。

さらに、この周辺細胞領域値を閾値としてフィルタリングを実施したところ、平均スパイク数が上昇し、Well間ばらつき（CV）が減少する結果が得られた。閾値設定によりデータの均質性が高まり、神経細胞活動の定量的評価が可能となった（図4）。

また、データのロバスト性向上に向けて、階層ベイズモデルを用いた異常スパイク値の検出と除去法の開発（図5）を行い、外れ値の除去によって画像特徴量とスパイク応答の相関性が向上することが確認された。さらに、VAEを用いた潜在特徴量抽出モデルを開発し、細胞種や撮影条件が変化しても再学習を必要とせず、共通の特徴空間で細胞状態を記述可能とする汎用的AIパイプラインの構築に成功した。

D. 考察

本研究では、神経毒性試験における画像情報活用の可能性を3年間にわたり体系的に検証した。初年度は、MEAと画像を同時解析するための撮影・蓄積・前処理基盤を構築し、次年度には画像形態情報からの予測モデル開発へと進展させた。最終年度には、実験環境間での変動を補正しうる高度なAI手法（VAE、階層ベイズなど）を導入し、ロバストな解析パイプラインへの統合を実現した。得られた知見の中でも特に重要なのは、電極周辺の細胞情報とスパイク検出率との関係が定量的に明らかとなり、電極単位での信頼性評価が可能となった点である。従来の神経毒性評価では、ウェル全体の平均応答やバースト頻度などが主な評価指標であったが、本研究はそれらを補完し、局所的な構造的背景に基づく定量的・非侵襲的な指標導入の可能性を示した。

また、細胞間隙や被覆率などの形態特徴量が、神経活動の低下と強い負の相関を持つことは、画像情報に基づ

く品質管理が神経毒性評価の信頼性向上に寄与しうることを示す科学的根拠となる。VAEによる特徴量抽出も、細胞種や条件が変わっても共通指標として用いることができる可能性を提示しており、今後の標準化や多施設間比較にも耐えうる設計が期待される。

E. 結論

本研究を通じて、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMPS神経毒性試験において、画像AI解析を活用した品質評価および機能予測の新たな枠組みが提案・実証された。特に、細胞の局所的形態情報に基づいてスパイク未検出電極を定量的に除外し、MEAデータの均質性と再現性を向上させる技術は、今後の神経毒性評価系において標準化の一翼を担うと考えられる。

また、VAEや階層ベイズといった高度なモデルにより、異なる条件下でも対応可能な解析パイプラインを実現できたことは、単なる技術開発にとどまらず、神経毒性評価の国際的な信頼性向上と普及に資する成果である。今後はさらに多様な条件・細胞株・施設において本手法の妥当性を検証し、標準試験法の一部として定着させることを将来目指すことが期待される。

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

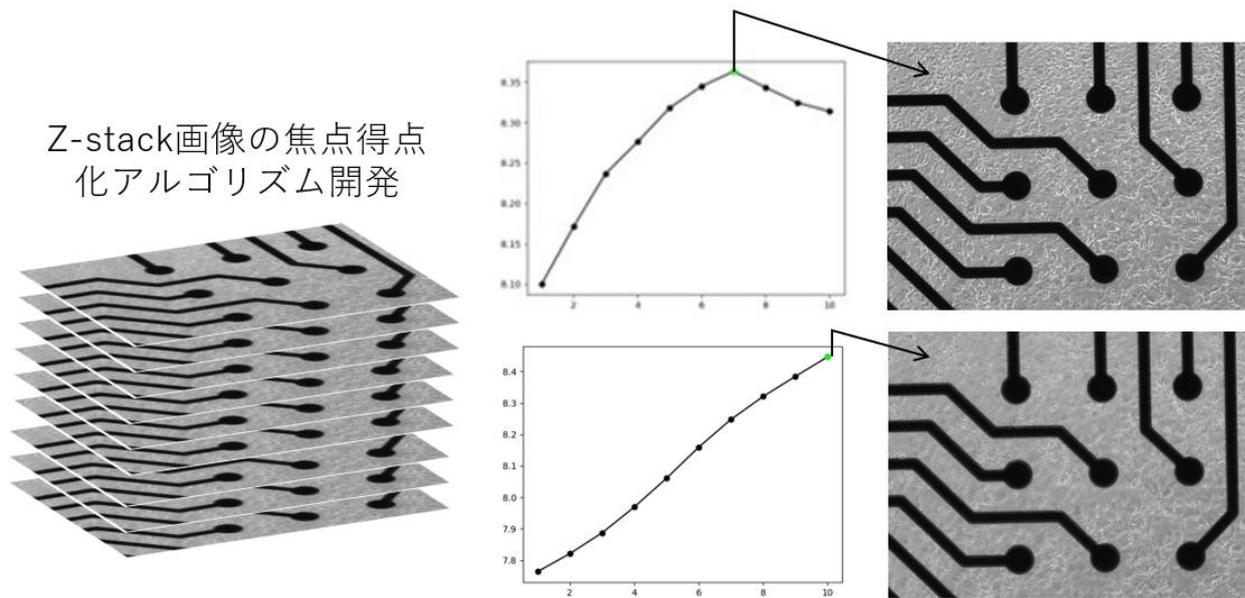
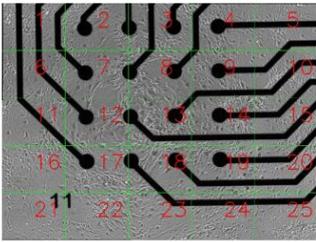
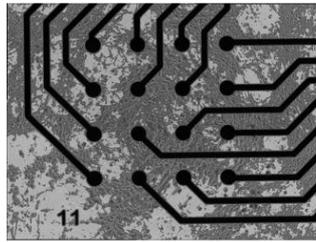


図1：神経細胞撮影条件最適化アルゴリズムの開発

- ① 画像を5×5分割
- ② 分割された画像で数値化する



- ③ 電極をセグメント
- ④ 細胞間隙をセグメント



- ⑤ 電極以外の領域だけでcell free areaを計算
- ⑥ 電極以外の領域だけでGLCM指標 (5指標)を計算
- ⑦ 電極以外の領域だけでFFT指標 (7指標)を計算

Region	cell free area	GLCM contrast	FFT frequency_bias
1	0.16	256	3045
2	0.27	382	2800
3	0.40	403	4854
4	9.12	390	3012

図2：自動MEA区画化アルゴリズムの概要

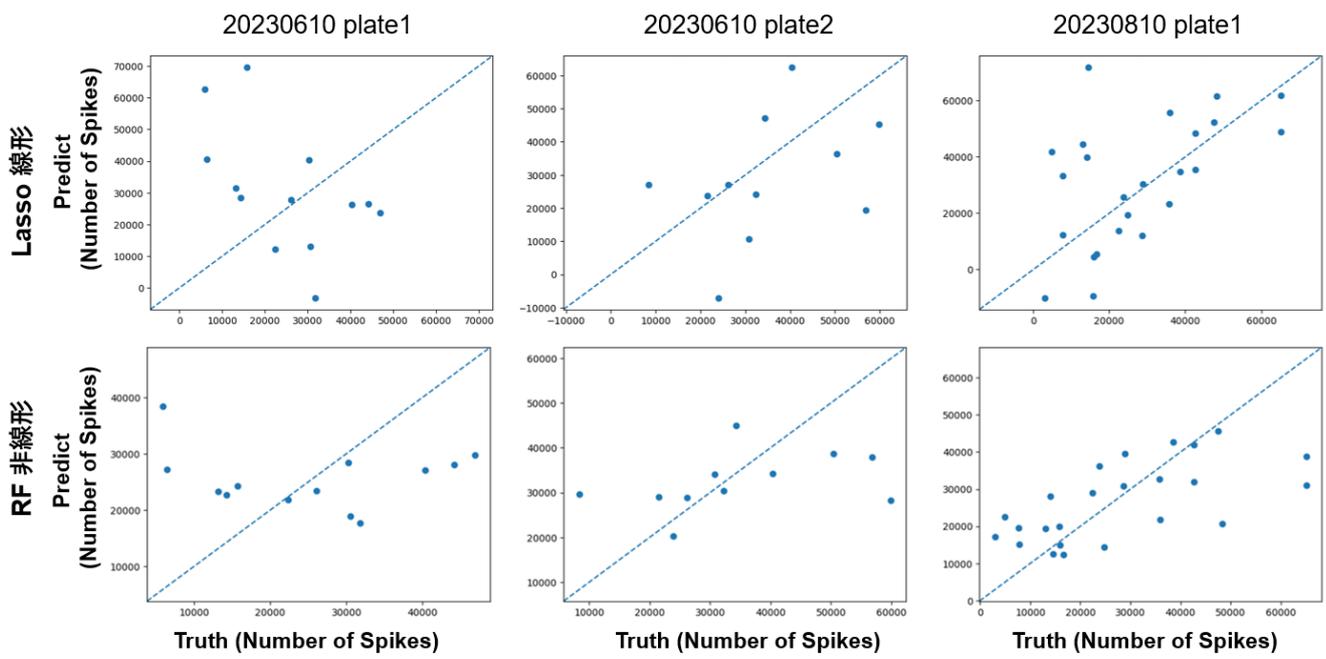


図3：画像特徴量のみを用いた予測AIモデル

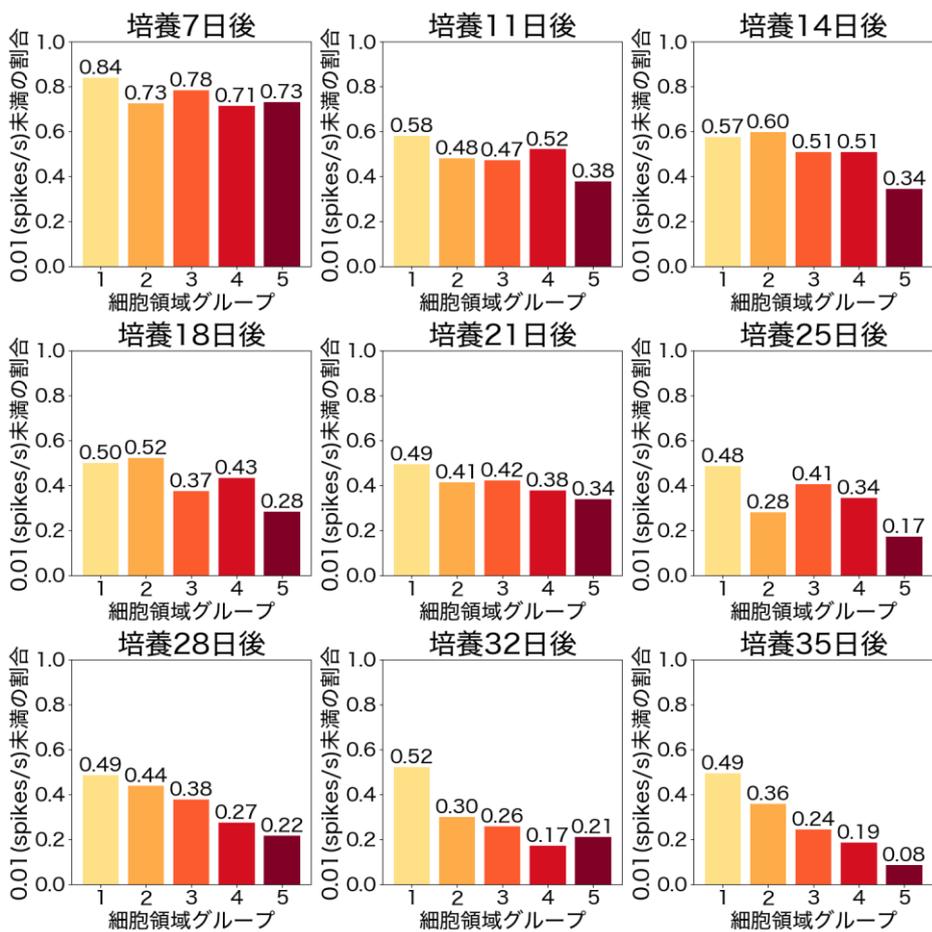
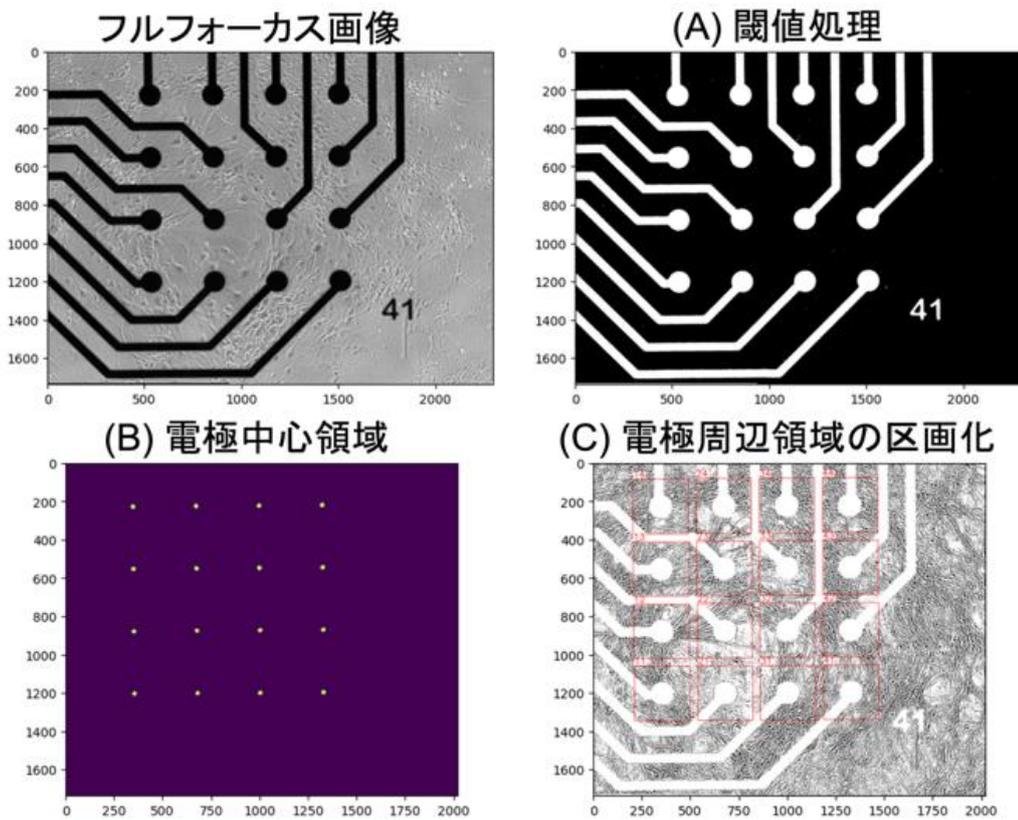


図4：MEA区画化アルゴリズムと評価結果

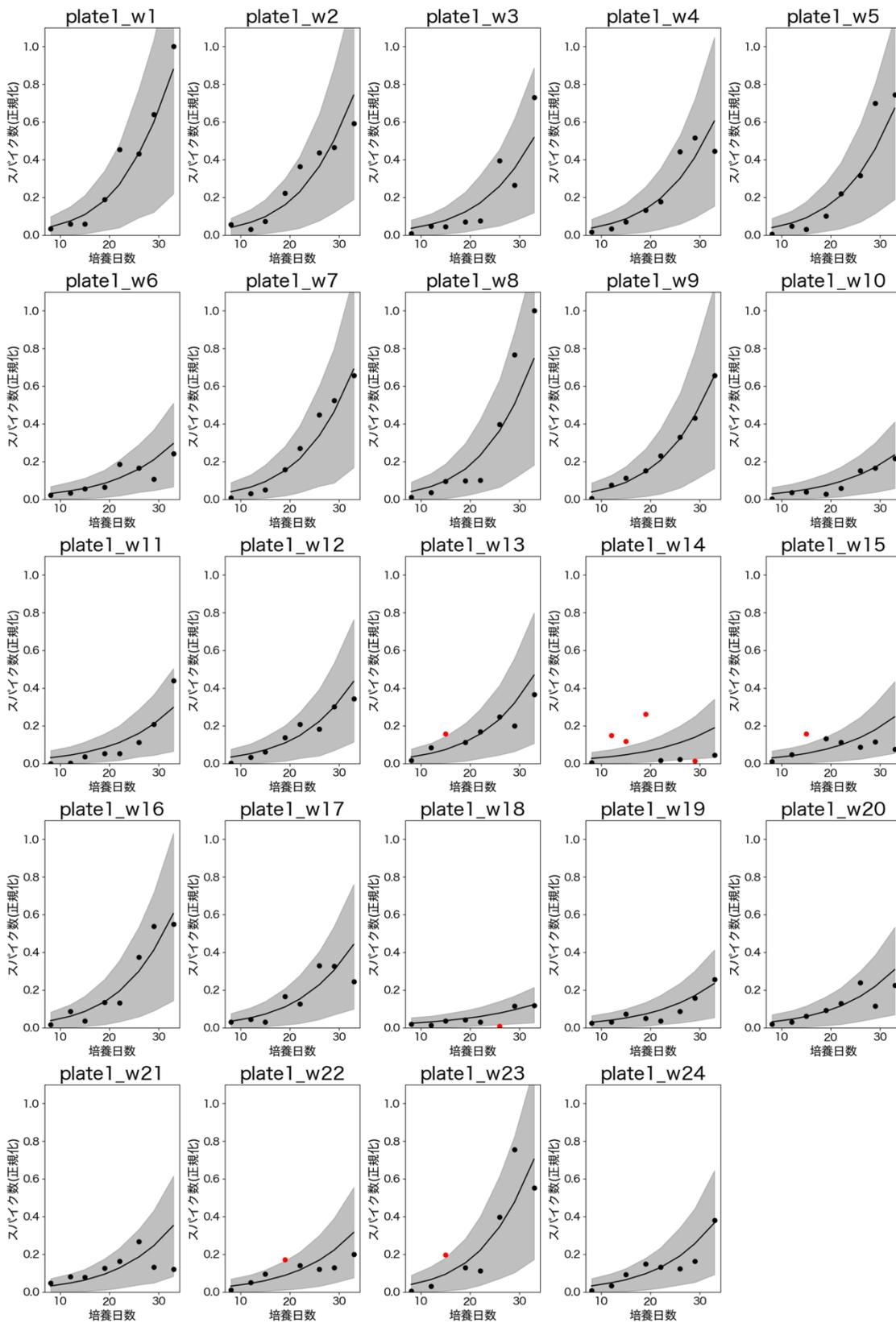


図5：階層ベイズを用いたノイズデータ検出の例