

平成22年4月23日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19206041

研究課題名（和文） 集積知能バイオイメージングシステムの開発

研究課題名（英文） Implementation of intelligent integrated bio-imaging system

研究代表者

八木 哲也（YAGI TETSUYA）

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：50183976

研究成果の概要（和文）：

冷却 CCD チップを FPGA (Field Programmable Gate Array) 回路と組み合わせた知能バイオイメージングデバイス (IID) を開発した。IID は、生体画像計測において、画像を取得するのみでなく、画像中の蛍光の部位やパターンなどの特徴を実時間で抽出する。IID および多点電気刺激装置を顕微鏡に組み込むことによって、神経・筋組織の活動を計測かつフィードバック電気刺激し、それら組織の生理学的特性を自動計測することが可能な、新しい自動バイオアッセイシステムのプロトタイプを構築した。

研究成果の概要（英文）：

We devised an intelligent bio-imaging device (IID) consisting of a charge-coupled device (CCD) chip and Field programmable Gate Array (FPGA) circuits. IID is able to not only capture the bio-images but also calculate the locations and patterns of fluorescent changes in the image. Mounting IID and a multi-electrode stimulation apparatus on the microscope, we developed a prototype of novel bio-assay system with which we can automatically give feedback stimulations on nervous and muscle tissues in real time to study their physiological properties.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|--------|------------|------------|------------|
| 2007年度 | 19,200,000 | 5,760,000  | 24,960,000 |
| 2008年度 | 11,900,000 | 3,570,000  | 15,470,000 |
| 2009年度 | 4,600,000  | 1,380,000  | 5,980,000  |
| 年度     |            |            |            |
| 年度     |            |            |            |
| 総計     | 35,700,000 | 10,710,000 | 46,410,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学、電子デバイス・電子機器

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

脳神経系、筋組織の時空間的活動を効率よく計測することは、その生理学・解剖学的な研究のみでなく、様々な生理活性物質や薬物などの効果を検証すること、ひいては神経・筋に関わる病気の解明、治療法および治療薬の開拓につながる重要な位置づけにある。過去においてこうした活

動の計測は、電極を用いた方法が主流であった。しかしながら電極による計測方法は、細胞の活動を時間分解能よく解析できるものの、その活動を空間的にとらえることはできない。また電極を試料に刺入あるいは接触させるため、基本的に侵襲的である。そこで近年、組織・細胞の活動・反応を内因性光信号や種々の色素プローブを

用いて可視化する技術、すなわちバイオイメージングが急速に発展してきた。バイオイメージングは、顕微鏡、CCDカメラなどの撮像素子およびデジタル画像処理という別々の工学技術を生体観察に合うように組み合わせて発展した技術である。バイオイメージングは、標本の活動を画像として可視化するため、活動の空間的な広がりや大まかな時間経過を解析することができる。また非接触でありかつ毒性のない色素の開発も進展しており、今後益々重要な技術となってくることは間違いない。ただし現在の主流であるCCDカメラやCMOSイメージセンサを用いた装置では、画像処理・転送に多大な時間がかかり、解析はオフラインによって行うため非効率であり、まして刺激系と連動して試料の応答をダイナミックに解析することは不可能である。

本研究は、撮像デバイスと画像処理を融合し顕微鏡と一体化することによって、実時間でよりシステムチックなバイオイメージング実験を可能とする新システムの開発を目指したものである。特に神経系に関するイメージングでは、活動がミリ秒から数十ミリ秒のオーダーで起こるため、撮像デバイスと処理回路を高速に接続した知能センサーの開発が必須となる。こうしたシステムは、現時点では国内外を通じて見当たらない。

## 2. 研究の目的

バイオイメージングは、生物組織・細胞における生体分子の分布、局在、動体を可視化する技術であり、解剖学、生理生化学、分子生物学、生物学、医学、農学、これらの融合分野など多分野において応用されている。あの DNA チップもバイオイメージングの手法を取り入れた画期的な DNA 解析デバイスである。本申請の特徴・独創点は、この可視化技術に、システムの入出力解析という工学的な視点を導入し、イメージングと刺激系を直結させて生体組織・細胞におけるダイナミックな反応特性を解析するための装置を開発することである。

本研究では、従来のバイオイメージングをさらに一歩進めて、撮影したイメージをリアルタイムで処理し、その情報に基づいて薬物の局所投与や電気刺激を、必要な部位に必要なタイミングで与えることができる全く新しい自動バイオアクセシシステム(ここでは集積知能バイオアクセシシステムと呼ぶ)を開発する。このためにまず、撮像と計算が一体化したイメージセンサ(ここでは知能バイオイメージャーと呼ぶ)を開発する。この知能バイオイメージャーは、従来のCCDカメラのように撮像のみを行うのではなく、撮像されたイメージをFPGA(Field Programmable Gate Array)によって瞬時に処理し、計算結果を出力する。またFPGAは、その計算結果に基づいて刺激系であるマルチ電極アレイ、ケージド化合物分解レーザー装置(化学的に不活化された生理活性物質等をレーザーによって活性化する)などに信号を送り、試料に対し必要な部位・タイミングで刺激を行う。こうして、主として神経や筋肉組織

の生理学的な応答性をダイナミックに可視化・解析できる。

この装置によって従来の実験効率が格段に上がるのみではない。生体分子の機能は、組織・細胞の定常的な活動のなかで発揮されるとは限らず、多くは外部からの刺激との関連において、極めて動的な経過の中で生まれる。特に神経系の場合にはミリ秒オーダーで活動が変化するために、刺激と反応の関係を実時間でコントロールすることによって新たな発見が生まれる可能性が十分ある。また本申請で目指すシステムが、生理活性物質や薬物効果の新しい自動アクセシシステムとして発展すれば、産業界へのインパクトも強い。加えて本申請のアイデアは、積極的に生体組織・細胞の活動を認識・制御するという側面があり、例えば超小型知能イメージャー搭載の自律マイクロ医用・手術ロボットなどの開発研究に繋がる。

## 3. 研究の方法

本申請では、知能バイオイメージングデバイスを用いて実際に脳スライス標本と培養心筋細胞のCaイメージングを行い、かつデバイスをマルチチャンネル基板電極およびケージド化合物分解レーザー装置と結合した自動バイオアクセシシステムのプロトタイプを試作した。

### 1) バイオイメージング実験

イメージングを行う生物試料として、ラットおよびマウスの培養心筋細胞と脳スライス標本を作製した。作成した試料に対し、カルシウム感受性蛍光色素(Fluo-4)のアセトキシメチルエステル体(AM体)を細胞外より負荷し、蛍光色素を導入した。95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>で飽和したACSFをかん流し(2-3 ml/min), 29-31 °Cで実験を行った。まず予備実験として正立落射蛍光顕微鏡(Olympus BX-51WI)に取りつけた市販の冷却CCDカメラを撮像部としたオフラインバイオイメージング装置により、培養心筋細胞や脳スライス標本細胞に取り込まれた蛍光強度の変化を測定し、電気刺激に対する蛍光強度の変化( $\Delta F/F$ )を[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化として解析した。電気刺激には、先端径10-20 μmの微小ガラス管電極を用い、持続時間200 μsの双極性電流刺激(40-240 μA)を行った。

さらに撮像部として、過去の本研究室で開発したシリコン網膜(集積アナログ視覚知能センサー)をもとに、新しいCMOS知能イメージセンサを開発し、この知能イメージセンサを用いて同様の実験を行った。

### 2) 解析ソフトウェアの開発

上記実験によるイメージングデータから刺激に反応する細胞の時空間的な情報を特定するソフトウェアをまずはPC上で開発した。このソフトウェアにより、1)の実験データをオフラインで処理し、ソフトウェアの性能評価を行う。次にこのソフトウェアをFPGA上でVHDLにより開発し、後述の撮像デバイスと接続する。

### 3)自動バイオアッセイシステムの構築

多点電極電気刺激装置およびケージド化合物分解レーザー装置を顕微鏡に組み込み、上述の知能バイオイメージングデバイスと接続して、自動バイオアッセイシステムのプロトタイプを完成した。

### 4. 研究成果

#### 1) 既存システムによる培養心筋細胞および脳スライスからの記録

既存システムを用いて、培養心筋細胞、大脳基底核スライスおよび視覚野スライス標本から無刺激時の応答を取得した。培養心筋の活動例を図1に示す。図に示すとおり、培養心筋細胞から、自発的に起こる細胞内 Ca の上昇が観測された。

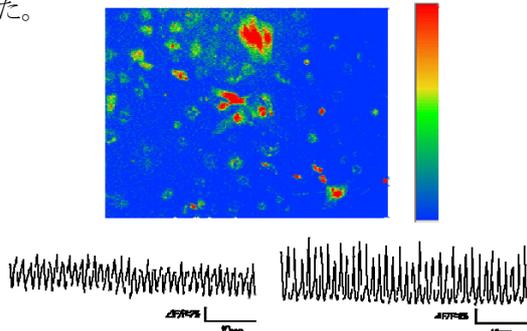


図1 培養心筋細胞の Ca イメージング図:上図は Ca 蛍光画像、下図は細胞位置における Ca 蛍光の振動を時間を横軸に示したもの

また同時にこれらの試料に電気刺激を行い、その応答を画像計測した。

2) 1) の結果を受けて、イメージング結果から細胞活動の時空間的な情報を特定するソフトウェアをまず PC 上で開発した。図2は、自発的な活動が見られた基底核スライスのイメージングデータから、自発活動を行っている細胞を特定するアルゴリズムの例である。このアルゴリズムでは、画像内で律動的に変化する蛍光の位置とパターンを特定する。計算結果を図3に示す。図中、黄色の領域が律動的な Ca 濃度変化が見られた箇所である。この領域には細胞が存在することが確認できた。同様のソフトウェアを、培養心筋細胞においても開発した。

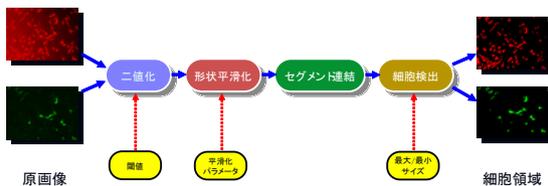


図2 バイオイメージング画像から特定の情報を抽出する例:ここでは細胞の領域を抽出している

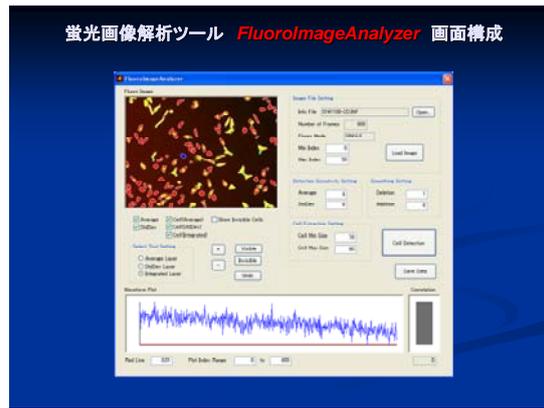


図3 Ca 蛍光が振動する細胞領域を自動抽出した例

### 3)CMOSイメージャーおよびCCDカメラとFPGA回路を融合した知能イメージャーの設計・製作

以前研究室において開発した知能イメージャーの設計を元に、新たに128x128画素を持った知能イメージャーを開発した(図4)。この知能イメージャーを用いて、時空間的に複雑に変動するバイオイメージから、反応部位、反応の伝播範囲および伝播方向・速度を2次元(すなわちオブティカルプレー)で計算し、その結果を毎秒200フレームで出力するFPGA回路を設計した。この知能イメージャーの計算機能を評価するために、市販の冷却CCDカメラによって取得した前述のイメージングデータを液晶プロジェクターで投影し、実時間で知能イメージャーが所望の画像処理を実行することを確認した。以上の結果を受け、この知能イメージャーを顕微鏡に装着し、実際の試料からの計測を行ったが、光センサー部の感度が低すぎることから、Caイメージングには適応できなかった。



図4 開発した集積知能イメージングデバイス

研究室で開発した CMOS イメージャーの感度では、Ca イメージングができないことがわかったので、市販の冷却 CCD カメラの CCD 撮像部(チップ)のみを利用し、これを FPGA 回路と組み合わせることにより、知能イメージャーを製作した。このシステムの計算とアーキテクチャと概観を、それぞれ図5および図6に示す。図5に示すとおり、開発した FPGA 回路システムは、CCD カメラ制御及び画像処理部、刺激装置から構成される。CCD は、蛍光強度として生体から発せられる細胞の活動を二次元的にとらえ、後段の FPGA へ時々刻々と送信する。FPGA では、この細胞の時空間的な活動状況を解析し、前述 PC 上で開

発したソフトウェアを元にして、その結果がある条件を満たした場合(ある位置に活動のピークが達する等)に、刺激装置へ信号を送信する。刺激装置では、信号を受けると同時に、細胞へと刺激を行う。刺激装置は図では電極となっているが、ケイジド化合物分解用のレーザー刺激も可能である。これらフィードバック刺激を受けた細胞の活動は、FPGA から送信されるデータによって PC にて観測することが出来る。

### 3)自動バイオアッセイシステムの構築

以上、本研究で開発した撮像デバイスと画像処理を融合した知能バイオイメージセンサーを、多点基板電極およびケイジド化合物分解レーザーとを自作のインターフェイスにより結合し、自動バイオアッセイシステムのプロトタイプを作成した。現在実際の組織からの応答計測と実時間フィードバック刺激の実験を行っている。

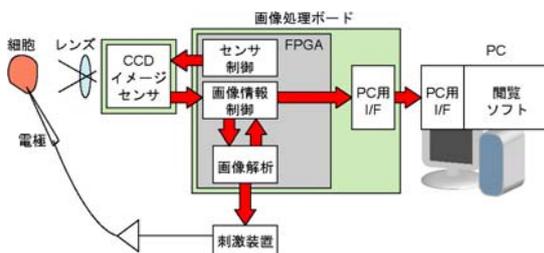


図5 生体組織の活動を撮像した CCD チップの画像出力から、実時間で特徴を計算し、計算結果に基づき電気刺激を組織にフィードバックするブロック図



図6 CCD チップと FPGA により構成された知能バイオイメージャーの概観

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

①Okazaki Y., Sawai H., Yagi T. In vivo optical measurements of cortical response evoked by electrical stimulation in the mouse visual cortex. 電子情報通信学会技術研究報告, 査読無し, 109:119-122(2010).

②奥野弘嗣, 松岡 優, Tamas Fehervari, 八木哲也. 視覚野電気刺激によって誘発される光覚

のシミュレーション. 電子情報通信学会技術研究報告, 査読無し, 109: 363-366 (2010).

③Okuno H., Yagi T. A mixed analog-digital vision sensor for detecting objects approaching on a collision course. Robotics and Autonomous Systems, 査読あり, 57:508-516(2009).

④Hasegawa J., Yagi T. Real-time emulator of dynamical features of sustained and transient channels in the vertebrate retina. in Proc 2009 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference, 査読有, 197-200 (2009).

⑤奥野弘嗣, 今井快多, 八木哲也. 実時間画像処理機能を備えた広ダイナミックレンジイメージセンサ, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 福岡, 2009

講演論文集, 査読無し, 18(1)-(3).

⑥島堀貴秀, 橋本歩, 海藏博之, 岡崎祐香, 八木哲也. 電位感受性色素を用いたマウス視覚野における視覚刺激応答のイメージング, 第 24 回生体・生理工学シンポジウム論文集, 読無, p.153-156 (2009)

⑦田村篤史, 八木哲也. 小山内実, 視床下核電気刺激に対する神経応答のカルシウムイメージングによる計測, 第 24 回生体・生理工学シンポジウム, 仙台, 講演論文集, 査読無し, p.161-164 (2009)

⑧岡崎 祐香, 八木哲也. マウス一次視覚野内電気刺激による皮質神経活動の in vivo 膜電位感受性色素イメージング, 第 24 回生体・生理工学シンポジウム演論文集, 査読無し, pp.7-160 (2009)

⑨Jun Hasegawa and Tetsuya Yagi. "Real-Time Emulation of Neural Images in the Outer Retinal Circuit," The Journal of Physiological Sciences, 査読有, vol.58, no.7, pp.507-514, 2008.

⑩H. Okuno and T. Yagi. A visually guided collision warning system with a neuromorphic architecture, Neural Networks, 査読有, vol.21, pp.1431-1438, 2008.

Shimonomura, K., Yagi, T. Neuromorphic VLSI vision system for real-time texture segregation, Neural Networks, 査読有, pp.1197-1204, 2008.

[学会発表](計 13 件)

①Hasegawa J., Yagi T. Real-time emulator of dynamical features of sustained and transient channels in the vertebrate retina. 2009 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS 2009). Nov.26-28,2009, Beijing, China.

②眞田忠, 長谷川潤, 奥野弘嗣, 八木哲也. 網膜神経節細胞層ニューラルイメージの再構成—生体視覚系における画像通信のエミュレーション—. 第3回ブレイン・バイオコミュニケーション研究会, 2009/11/6, 大阪.

③松岡優, Tamas Fehervai, 奥野弘嗣, 八木哲也.

大脳皮質電極刺激によって誘発される知覚のシミュレーション, 第3回ブレイン・バイオコミュニケーション研究会,2009/11/6, 大阪.

④岡崎祐香,八木哲也. マウス一次視覚野内電気刺激による皮質神経活動の in vivo 膜電位感受性色素イメージング. 第 24 回生体・生理工学シンポジウム, 2009/9/24-26, 仙台

⑤田村篤史,八木哲也,小山内実. 視床下核電気刺激に対する神経応答のカルシウムイメージングによる計測. 第 24 回生体・生理工学シンポジウム,2009/9/24-26,仙台.

⑥畠堀貴秀,橋本歩,海藏博之,岡崎祐香,八木哲也. 電位感受性色素を用いたマウス視覚野における視覚刺激応答のイメージング. 第 24 回生体・生理工学シンポジウム,2009/9/24-26, 仙台.

⑦志岐卓也,田中哲史,小山内実,八木哲也. 視覚野神経回路網における興奮性と抑制性信号の動的競合特性. 神経回路学会第 19 回全国大会, 2009/9/24-26, 仙台.

⑧長谷川潤,眞田忠,八木哲也. ダイナミクスを考慮した網膜神経節細胞の時空間発火パターンの実時間再構成. 神経回路学会第 19 回全国大会, 2009/9/24-26, 仙台.

⑨Fehervari T., Yagi T. Voltage Sensitive Dye Measurement of Responses Evoked by Electrical Stimulation in V1 and V2 in Mouse Visual Cortex. 生体医工学シンポジウム 2009, 2009/9/19, 千葉.

⑩ Yagi T., Shimonomura K., Okazaki Y., Okuno H., Osanai M., Hajime S. Analog VLSI vision device for cortical implants. the 36th international congress of physiological sciences, Jul. 27 - Aug. 1, 2009, Kyoto, Japan.

⑪奥野弘嗣,八木哲也. ロボット車両の衝突回避のための知能視覚システム. 日本機会学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2009, 2009/5/24-26, 福岡.

⑫奥野弘嗣,今井快多,八木哲也. 実時間画像処理機能を備えた広ダイナミックレンジイメージセンサ. 日本機会学会ロボティクス・メカトロニクス講演会,2009/5/24-26, 福岡.

⑬下ノ村和弘,長谷川潤,八木哲也. 眼球運動下における視覚細胞の時空間応答エミュレーションのためのロボットビジョン. 日本機会学会ロボティクス・メカトロニクス講演会,2009/5/24-26, 福岡.

[その他]

ホームページ

[http://neuron.eei.eng.osaka-u.ac.jp/index\\_j.html](http://neuron.eei.eng.osaka-u.ac.jp/index_j.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

八木 哲也(YAGI TETSUYA)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号:50183976

### (2)研究分担者

小山内 実(OSANAI MAKOTO)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号:90286419

下ノ村 和弘(SHIMONOMURA KAZUHIRO)

立命館大学・理工学部・准教授

研究者番号:80397679