

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650080

研究課題名（和文）動く神経細胞の蛍光観察におけるROI設定

研究課題名（英文）Automatic ROI Setting for Moving Nurons in Fluorescent Observation

研究代表者

橋本 浩一 (KOICHI HASHIMOTO)

東北大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：80228410

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、動く線虫の神経活動を定量的に評価するために蛍光画像の動画から蛍光発光強度を調べる領域（ROI: Region Of Interest）を自動設定する手法の開発である。顕微鏡ステージのリアルタイム制御により観察対象の運動を追跡する顕微鏡装置を用いて、多様な刺激に対する生物の反応を多様な観察手法で高い時間・空間分解能で解析・記録する装置を作成した。とくに、多細胞生物で多くの研究にモデル生物として用いられている線虫（*C. elegans*）を明視野ならびに蛍光観察できるシステムを実現した。さらに、ROIの自動追跡ソフトウェアを開発し、その有効性を確認した。

研究成果の概要（英文）：We have developed a software to track ROI (Region of Interest) in a fluorescent video. The video is taken by a microscope system that tracks a target animal motion by using real-time control of motorized stage. The system can analyze and record the response of the target animal with high time and space resolutions. Especially, we have observed *C. elegans* in bright field as well as in fluorescence images simultaneously using tracking microscope. Moreover we have evaluated the usefulness of the software by analyzing the *C. elegans* neural image.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・知覚情報処理・知能ロボティクス

キーワード：コンピュータビジョン

### 1. 研究開始当初の背景

神経活動を計測するために蛍光観察が用いられる。遺伝子操作により GFPなどをベースにしたカルシウムイオンセンサ蛍光タンパク質を神経細胞に発現させ、その発光強度でカルシウムイオン濃度を定量化する。カルシウムイオンは細胞内情報伝達物質のひとつで、神経興奮時にはカルシウムイオン濃度が上昇するため、それとともに発光強度が上昇する蛍光タンパク質が多く開発されている。また、このような蛍光タンパク質を特定の神経細胞に発現させた線虫（*C. elegans*）

も数多く開発されており、データベースを検索して入手することが可能である。

行動生物学（ethology）では、生物行動と神経活動の相関を研究する。線虫はそのモデル生物としてきわめて重要である。したがって、動く線虫の神経活動を計測することは、多くの研究者の夢である。しかし、倍率と観察フィールドのトレードオフのため、麻酔で行動を抑制するか、神経活動計測を犠牲にして大まかな移動軌跡をビデオ記録するしか方法がなかった。

研究代表者は顕微鏡ステージのリアルタイム制御により、運動を追跡するという本質的な解決法により、動く線虫の神経活動を見ることが可能な装置を開発し、特許を取得している。

## 2. 研究の目的

本研究では、

(1) 線虫自身の変形により神経細胞（細胞体と軸索）も変形するが、どの領域を画像処理して定量化すべきかは自明ではなく、研究者ごとにやり方が異なっている。それを自動化し、共通の評価基準を開発することで共有可能な基準を導入する。

(2) 複数の神経細胞を同時に計測するとき、蛍光画像中のどの光点がどの神経に対応するかを自動的に推定するソフトウェアを開発する。

(3) 動的に蛍光強度が変動するために、従来のパターンマッチングでは追跡が困難である。また、神経細胞の蛍光像が変形することも追跡を困難にする。新しいパターンマッチングアルゴリズムを開発し、動く細胞の自動追跡を実現する。

## 3. 研究の方法

本研究では、運動する生物を追跡するための画像処理アルゴリズムと顕微鏡ステージ制御手法を開発する。明視野観察でビジュアルサーボを行い、蛍光観察で生体現象を記録する。明視野観察には高速の CMOS または CCD カメラを、蛍光観察には EM-CCD カメラを用いる (図 1)。

明視野光と蛍光の波長の違いを利用してフィルタを設計することにより、それぞれの通過波長を指定する。明視野画像の解析によりトラッキング（画像取得・画像処理・ステージ制御のループ）を行い、同時に蛍光画像を取得する。

しかし、様々な要因により、明視野画像は

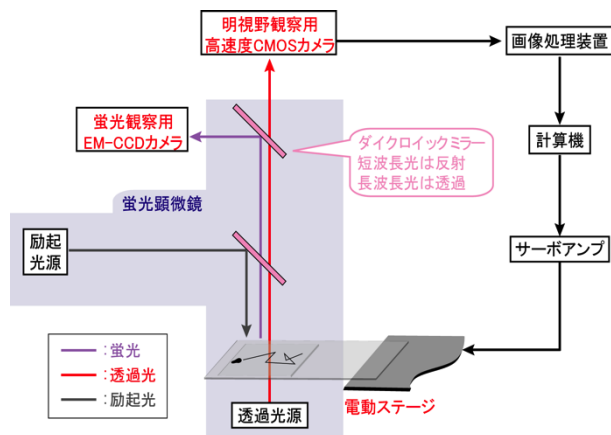


図 1 顕微鏡装置ブロック図

多様に変動するため、実時間のトラッキング

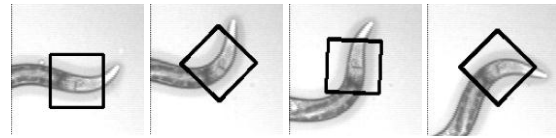


図 2 明視野像をベースにトラッキング

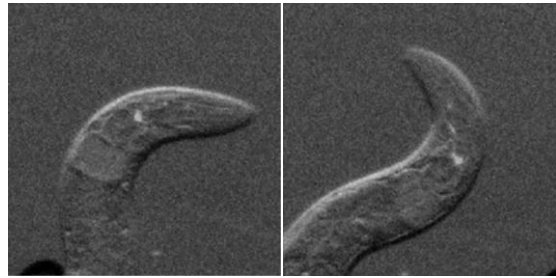


図 3 運動により変形する神経細胞

は完全に神経細胞を静止させることは期待できない (図 2)。したがって、観察したい細胞を視野内に保つことを第一段階の目的とし、蛍光画像を同時に取得した後に、第二段階としてオフラインでビデオを解析し、蛍光画像を処理することにより神経活動を精密計測することとする。本研究は第二段階の処理に関するものである。

(1) ROI の自動設定：線虫自身の変形により神経細胞（細胞体と軸索）も変形する (図 3)。このような画像に対し、注目領域 (ROI) を自動的に決定する。細胞変形モデルとモデルに基づく ROI 設定法を開発する。曖昧な輪郭を抽出するのに有効な動的輪郭モデルをベースに、パターンマッチングを行う。

(2) 神経細胞の地図と蛍光画像の照合：複数の神経細胞を同時に計測するとき、蛍光中のどの光点がどの神経細胞に対応するかを求める問題であり、地図パターンと蛍光画像のパターンマッチング問題として定式化できる。光点のクラスタリングとマッチングには期待値を最大化する EM アルゴリズムの適用を候補とする。

(3) 動的に強度変化するパターンのマッチング：蛍光強度は神経活動に伴い動的に変化し、その変化を定量化したい。従来のパターンマッチングアルゴリズムでは困難な処理である。パターン変化と強度変化を考慮したロバストなパターンマッチングアルゴリズムを開発し、蛍光光点群の自動追跡を実現する。

(4) 行動解析・神経解析：蛍光画像解析をリアルタイムで行って、行動や神経活動の重要度にしたがって解析画像を記録する。刺激に対する反応実験を実施し、蛍光強度パターンと行動を統合評価し、追跡ならびに定量化が適切であることを確認すると共に、工学と理学・脳科学の真のコラボレーションを実現する。

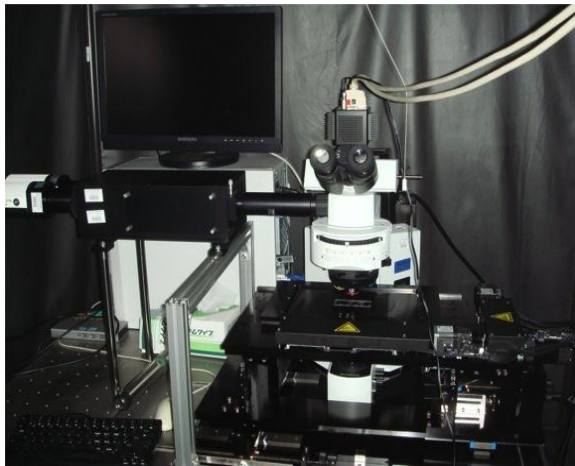


図4 トラッキング顕微鏡。上部ポートに高速カメラを、サイドポートに高感度カメラを設置する。高速カメラの画像をPCで処理し、ステージにリアルタイムフィードバックする。これにより観察対象の動作をキャンセルすることができる。

#### 4. 研究成果

(1) トラッキング顕微鏡：本研究で用いたトラッキング装置を図4に示す(小原、五十嵐、橋本, 2011, Maru, Chen, Hashimoto, 2011)。いくつかの共同研究(飯野教授(東大)、中井教授・安藤准教授(埼玉大)、木村准教授(阪大))を実施し、多くの実験データを得た。本研究で新たに開発したパターンマッチングアルゴリズム(図5)をトラッキング装置に適用し、共同研究成果として学会発表している(Satoh, Maru, Hashimoto, Iino 2011, Tanimoto, Yamazoe, Hashimoto, Kimura, 2012a, Tanimoto, Yamazoe, Hashimoto, Kimura 2012b)。森教授・塚田助教(名大)ともトラッキング顕微鏡を利用した共同研究を行い、学会発表を行っている(Tsukada, Chen, Yokoyama, Hashimoto, Mori, 2012, Yokoyama, Tsukada, Chen, Hashimoto, Mori, 2012)。

(2) 蛍光画像解析ソフトウェア：蛍光画像ビデオをオフラインで解析するソフトウェアを開発した(図6)。3次元の細胞アライメントに関して石原教授・寺本助教(九大)と共著で論文を発表した(Fei, Teramoto, Ishihara, Hashimoto, 2012)。2次元の神経活動解析ソフトウェアを用いた木村准教授(阪大)との共同研究は発表準備中である。

(3) パターンマッチングの高速化：追跡性能を向上するために、画像処理アルゴリズムの高速化を行った。具体的には、GPU(Graphic Processing Unit)を用いた高度並列化を行い、さらにCPUと同時並行処理するアルゴリズムを開発した。これにより、パターンマッチング処理がCPUだけ利用の場合と比較しての10倍程度の高速化を達成し

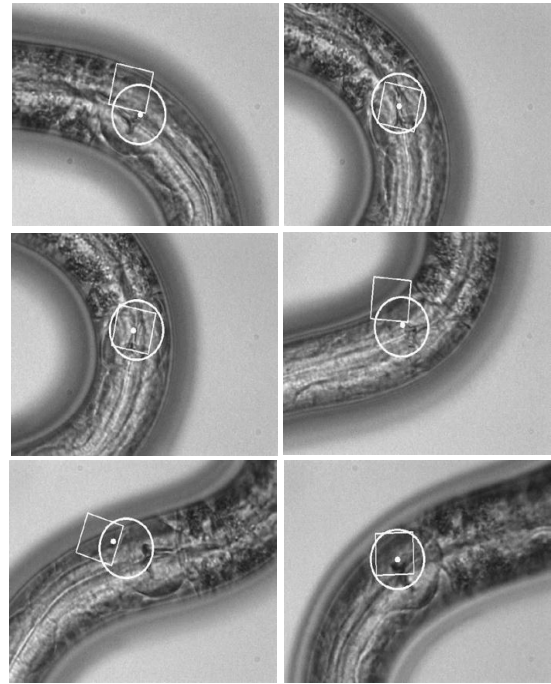


図5 パターンマッチングとフーリエ変換を用いて、変形と模様変化にロバストなアルゴリズムを実現し、トラッキング装置と連動させて線虫の動きを追跡している。

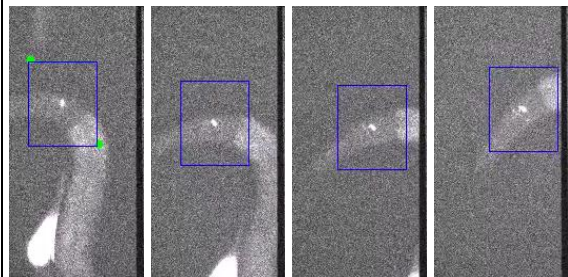


図6 運動する線虫のカルシウムセンサ部位を自動抽出し、強度変化を解析するソフトウェアを開発した。

た(Zang, Hashimoto, Moon, 2011, Zang, Hashimoto, 2011)。

(4) 光刺激装置とトラッキング顕微鏡との統合：研究計画執筆時には開発されていなかった技術であるが、オプトジェネティクスがここ2,3年で急速に発展した。本研究においてもこの技術を利用すべく研究計画を変更して、線虫の光刺激装置を開発した。これを用いた線虫の行動制御のデモは国際的に注目をされ、国際学会において招待講演を行った(Hashimoto, Fei, 2012)。

#### 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5件)

1) Fei, X., Teramoto, T., Ishihara, T. and

- Hashimoto, K. (2012). Estimating Deformation of Neurons in Fluorescent Images, *Interdisciplinary Information Sciences*, 18(2), 113-122. 10.4036/iis.2012.113, 査読有
- 2) 小原健, 五十嵐康伸, 橋本浩一. (2011). 細胞の個体差に適応する高速オートフォーカス顕微鏡. 計測自動制御学会論文集. 47(1), 31-39. 査読有
- 3) Arai, S., Iwatani, Y. and Hashimoto, K. (2011) A condition for better estimation using asynchronous sampling than synchronous sampling. *SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration*, 4(3), 249-253. 査読有
- 4) Iwatani, Y., Arai, S. and Hashimoto, K. (2011) Stability of switched stochastic systems in discrete-time. *SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration*, 3(5), 368-371. 査読有
- 5) Arai, S., Iwatani Y. and Hashimoto, K. (2011). Fast Sensor Scheduling for Spatially Distributed Sensors. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 56(8), 1900-1905. 10.1109/TAC.2011.2141450, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- 1) Hashimoto, K. and Fei, X. (2012). Exploration of Brain Function through Behavior, Neural Activity Observation, and Optogenetic Manipulation. Invited Talk, International Symposium Optomechatronic Technologies (ISOT 2012), 1-7, Paris, France, October 29, 2012. 招待講演
- 2) Tanimoto, Y., Yamazoe, A., Hashimoto, K. and Kimura, K. (2012) A virtual reality running machine for worms – a highly integrated system for olfactory behavior. 5th East Asia C. elegans Meeting, 4-O06, Taipei, Taiwan, June 28, 2012.
- 3) Yokoyama, G., Tsukada, Y., Chen, M., Hashimoto, K. and Mori, I. (2012) Neurite fluorescence imaging of freely moving individual C. elegans animals with high-speed tracking and autofocus system. 5th East Asia C. elegans Meeting, P-56, Taipei, Taiwan, June 27, 2012.
- 4) Tanimoto, Y., Yamazoe, A., Hashimoto, K. and Kimura, K. (2012) A virtual reality running machine for worms – a highly integrated system for olfactory behavior. EMBL Conference C. elegans Neurobiology, P-126, Heidelberg,

- Germany, June 17, 2012. 査読有
- 5) Tsukada, Y., Chen, M., Yokoyama, G., Hashimoto, K. and Mori, I. (2012) High-speed tracking system for neurite fluorescence imaging during freely moving C. elegans. EMBL Conference C. elegans Neurobiology, P-196, Heidelberg, Germany, June 17, 2012. 査読有
- 6) Zang, C. and Hashimoto, K. (2011). Camera Localization by CAD Model Matching, 2011 IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII 2011), 30-35, Kyoto, Japan, December 20, 2011. 査読有
- 7) Satoh, Y., Maru, M., Hashimoto, K. and Iino, Y. (2012). Construction of a system for movement-dependent optical stimulation in C. elegans. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Yokohama, Japan, December 13, 2011. 査読有
- 8) Zang, C., Hashimoto, K. and Moon, J.J. (2011), A visual tracking strategy using Computer Graphics and Edge, 2011 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (IEEE-ROBIO 2011), 981-986, Phuket, Thailand, December 10, 2011. 査読有
- 9) Obara, T., Igarashi, Y. and Hashimoto, K. (2011). Fast and adaptive auto-focusing algorithm for microscopic cell observation. IEEE Int. Conf. Intelligent Robots and Systems (IROS 2011), 7-12, San Francisco, USA, September 25, 2011. 査読有

[その他]

ホームページ等

<http://www.ic.is.tohoku.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 浩一 (KOICHI HASHIMOTO)  
 東北大学・大学院情報科学研究科・教授  
 研究者番号：80228410

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし