

2021 年度
卒 業 論 文

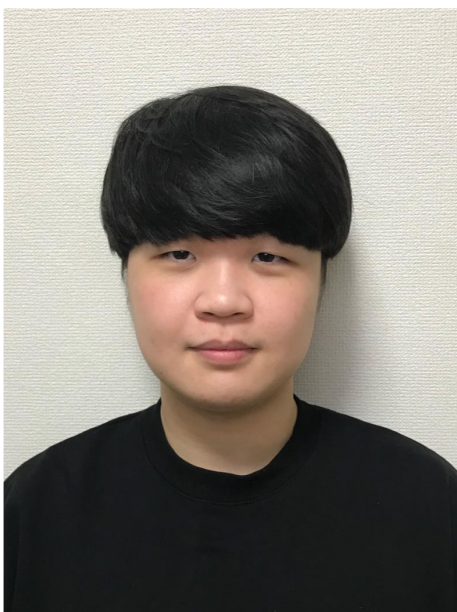
深層学習に基づく
神経細胞のカルシウムイメージングデータの解析

神戸大学工学部情報知能工学科

Jo Taehee

指導教員 滝口 哲也 教授

2022 年 2 月 14 日



深層学習に基づく 神経細胞のカルシウムイメージングデータの解析

Jo Taehee

要 旨

世の中には、通常では痛みを感じない刺激により痛むアロディニア（Allodynia）により、皮膚に風が吹いた時にも痛みを感じてしまう患者がいる。現状、アロディニアに関しては不明なものが多く、薬や治療において困難である。アロディニアは神経細胞組織の損傷により生じる症状であると知られており、神経系障害により発生する神経細胞の変化に関して様々な研究が進められている。

神経細胞の活動を調べる手法の一つとして、神経細胞の活動に伴うカルシウムイオン（ Ca^{2+} ）の濃度の変化を可視化するカルシウムイメージング（calcium imaging）が利用される。従来、カルシウムイメージングで得られたカルシウムイメージングデータから計算したカルシウム波形を用いて神経細胞間の機能的結合を解析する手法が提案されている。

本研究では、深層学習のクラス識別を用いてカルシウムイメージングデータを解析する手法を提案する。画像認識分野で良く用いられる畳み込みニューラルネットワーク（CNN：Convolutional Neural Network）を基に、カルシウムイメージングデータを入力とし、刺激された神経細胞を出力する識別モデルを構成し、学習及び評価を行う。識別モデルの学習及び評価に用いるカルシウムイメージングデータとして、マウスの特定の神経細胞へ一定時間間隔で刺激を与えた時の神経細胞活動を用いる。

次に、学習された識別モデルを Grad-CAM（Gradient-weighted Class Activation Map）で解析する。Grad-CAM を用いることで、CNN モデルの入出力やラベルのみでなく、出力に寄与する画像のピクセル情報まで確認できる。本研究では、Grad-CAM を用いて識別モデルがカルシウムイメージングデータの中で注目している部分を確認する。

Grad-CAM 結果から、刺激が与えられた際に神経細胞の活動パターンを比較するために、画像間相関を用いる。画像間相関は 2 つの画像の類似度を計算する方法である。Grad-CAM 結果を刺激細胞で分類し、Grad-CAM 結果間の類似度を計算し可視化したうえで、識別モデルがカルシウムイメージングデータを理解したことを確認し、深層学習でカルシウムイメージングデータが解析できる可能性を示す。

目次

第 1 章	序論	1
1.1	研究背景	1
1.2	本研究の目的	1
1.3	本論文の構成	2
第 2 章	カルシウムイメージング	3
第 3 章	痛み動物モデル	5
第 4 章	Grad-CAM	7
4.1	畳み込みニューラルネットワーク (CNN)	7
4.2	Grad-CAM の概要	7
4.3	Grad-CAM の仕組み	9
第 5 章	画像間相関	10
5.1	Sum of Squared Difference	10
5.2	Zero-mean Normalized Cross-Correlation	11
第 6 章	神経細胞間の機能的結合の解析方法	12
6.1	カルシウム波形を用いた解析方法	12
6.2	深層学習を用いた解析方法	14
第 7 章	実験	16
7.1	実験方法	16
7.1.1	データセット	16
7.1.2	識別モデル	17
7.1.3	識別モデルの学習及び評価方法	18
7.2	実験結果と考察	19
7.2.1	識別モデルの学習結果と考察	20

7.2.2	Grad-CAM を用いた識別モデルの解析	21
7.2.3	ZNCC を用いた Grad-CAM 結果の解析	22
第 8 章	まとめ	25
	謝辞	26
	参考文献	27

第1章

序論

1.1 研究背景

世の中には、アロディニア（Allodynia）という、通常の刺激が与えられたときに痛みを感じてしまう患者がいる。現状、アロディニアに関しては不明なものが多く、薬や治療において困難である。痛みというのは、「実際の組織損傷、あるいは潜在的な組織損傷と関連した、またはこのような組織損傷と関連して述べられる不快な感覚的情動的体験」であると、国際疼痛学会より定義されている。アロディニアの症状を持っている患者は、風が吹いても痛みを感じ、この痛みは「体性感覚神経系の病変や疾患によって引き起こされる痛み」と定義されている。この痛みは、身体への警告という意義を持たず、強さは刺激の大小に関係しない。これは痛みを皮膚などの末梢から中枢まで伝える伝達機構の異常、逆に痛みを押さえつける抑制機構の異常によって生じると知られている。アロディニアの症状の発現が神経系損傷から起因することから、神経細胞間の関係を明らかにするための様々な従来研究が行われている。神経細胞の活動を究明することが、このような神経系損傷による症状の治療へ繋がることを期待されつつある [1]。

1.2 本研究の目的

本研究では、深層学習を用いた神経細胞活動の解析手法の構築を目的とした。上記の背景を鑑み、神経細胞活動を観測した画像データを深層学習モデルで学習及び評価させ、さらに深層学習を解析することで、深層学習を用いた神経細胞活動の解析への可能性を調べた。具体的な取り組みを以下に示す。

1. まず、深層学習モデルを構築し、神経細胞活動を観測した画像データを用いて学習

した.

2. 次に, 学習済みの深層学習モデルを評価し, さらに深層学習モデルの解析手法を用いてモデルの解析を行った.
3. 最後に, 深層学習モデルの解析手法の結果から, 神経細胞活動の解析への可能性について評価した.

1.3 本論文の構成

本論文は以下の 8 章から構成される.

- 第 1 章 本研究の背景とその目的
- 第 2 章 神経細胞活動の画像データ取得の対象となる痛み動物モデルについて
- 第 3 章 神経細胞の活動を観測するための方法
- 第 4 章 深層学習モデルおよび深層学習モデルの解析手法
- 第 5 章 画像間の類似度を計算する手法
- 第 6 章 従来の解析手法と本研究で提案する解析手法について
- 第 7 章 提案手法を用いた実験の方法と結果及び考察
- 第 8 章 本論文のまとめ

第2章

カルシウムイメージング

本節では、神経細胞の観測手法の一種であるカルシウムイメージングに述べる。

カルシウムイメージングとは、細胞や組織、培養液のカルシウムイオン (Ca^{2+}) の濃度を光学的に測定する顕微鏡映像法である。神経細胞において、中と外のカルシウムイオンの濃度が異なる。神経細胞の活動と細胞内のカルシウムイオンの変動が同じであることが知られている。すなわち、カルシウムイオンが神経細胞の外から中へ移動することを観測することで、神経細胞活動を観測することができる。

カルシウムイオンを観測するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP: Green Fluorescent Protein) を利用する (Fig. 2.1) [2]。GFP を蛍光させるため、GECI (Genetically-Encoded Ca^{2+} Indicators) という指示薬を用いる。GECI を使用すると、体内に CaM (カルモジュリン) や M13 (ミオシン軽鎖キナーゼの断片) という物質が現れ、カルシウムイオンがこれらの物質とくっつくことで GFP の蛍光が強くなる [3]。

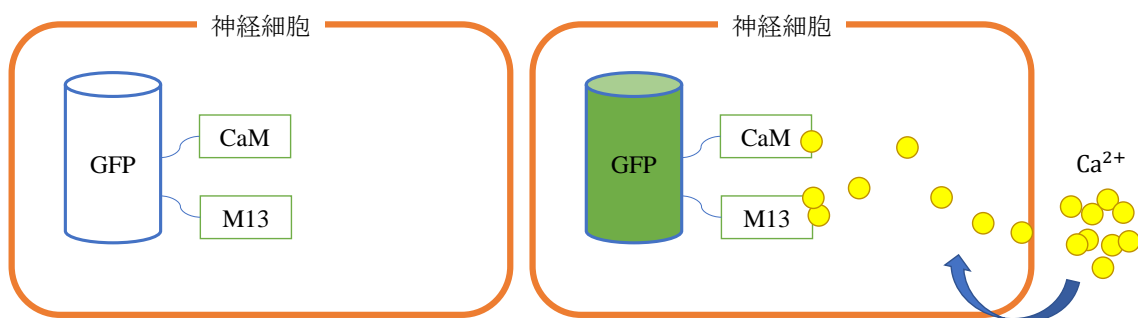


Fig. 2.1 カルシウムイオンによる GFP の蛍光

本研究でのカルシウムイメージングの対象はマウスである。イメージングを行うときには、顕微鏡のレンズの下に生きているマウスを置く。脳の神経細胞の観測を行うため、脳

に覆われている骨を取って透明なガラスに入れ替える。生きている生物をイメージングすることができる点もカルシウムイメージングの特徴である。

イメージングはある神経細胞領域に対して行われるので、多くの神経細胞を同時に観測することができる。同時に観測した神経細胞活動を定量的に解析するため、カルシウム波形とヒストグラムを生成する。カルシウム波形のヒストグラムの例を Fig. 2.2 に示す。得られたカルシウム波形とヒストグラムを用いて、神経細胞活動に関する研究ができる。

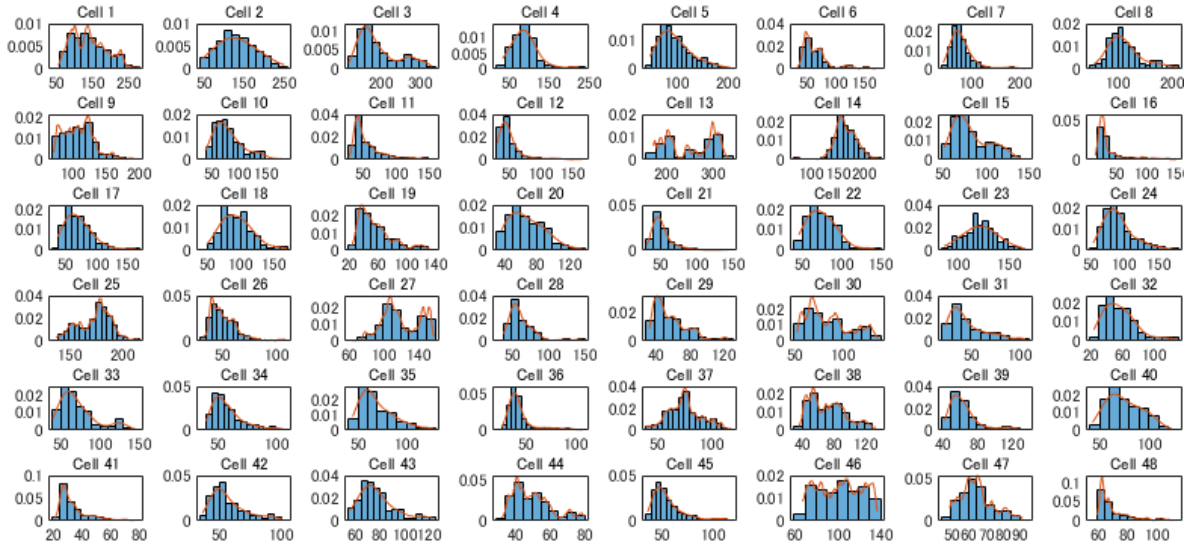


Fig. 2.2 カルシウム波形のヒストグラムの例

第3章

痛み動物モデル

本章では、本研究で用いたデータの対象となった痛み動物モデルについて述べる。

痛み動物モデルとは、動物に薬物を投与し、痛みを感じさせる生物モデルを意味する。本研究では、マウスに起炎物質である完全型フロイントアジュバント（CFA：Complete Freund's Adjuvant）を投与した痛み動物モデルから得られたデータを用いる。

1.1 節で述べたアロディニアは、神経障害性疼痛であり、末梢あるいは中枢神経の損傷や機能障害により引き起こされると考えられている。また、アロディニアの症状をもっている患者の場合、感覚野の神経活動が上昇していることが知られており、マウスに同じ変化を生じさせ、究明することが目的である。

フロイントアジュバント（Freund's adjuvant）は抗体産生における免疫原の注入に際し、抗原と油中水型（water-in-oil）エマルジョンの形成に用いられる。フロイントアジュバントで乳化された免疫原は、動物の免疫システム中において抗原をゆっくりと放出させ、強力でかつ長時間にわたり持続的な免疫応答を促進する。特に、高い免疫応答性増強効果が得られるフロイントアジュバントが CFA である [4, 5]。

CFA の反応を介する必須構成要素は、抗原沈着（antigen deposition）部位の強い炎症反応である。動物に CFA を投与することで、炎症性疼痛モデルが作製される。炎症性疼痛は、炎症局所の浮腫あるいは痛覚過敏反応（軽い痛み刺激をより強い痛み刺激と感じる症状）などの症状により特徴づけられている。マウスに CFA を投与した後、実際に痛みを感じるかは、行動テストで評価して置く。

CFA で投与し、疼痛の痛みを感じてから、約 1 ヶ月で元の感覚に戻る。また、CFA を投与してから 3 日後、7 日後に神経細胞の活動が活発となり、時間の経過により活動は減っていく [6]。CFA を投与すると、同期性が上昇し、神経細胞活動が同時に起きることが確認されている。従って、本実験で用いる痛み動物モデルのデータは、マウスに CFA

を投与した 3 日後のデータである。このデータを、CFA を投与する直前のデータと比較することで神経細胞の機能的結合の変化を調べる。

第4章

Grad-CAM

本章では、深層学習モデルの一種である畳み込みニューラルネットワークと、その畳み込みニューラルネットワークを解析する手法である Grad-CAM について述べる。

4.1 畳み込みニューラルネットワーク (CNN)

畳み込みニューラルネットワーク (CNN: Convolutional Neural Network) [7] は、画像処理分野で良く用いられる人工神経網である。CNN は、人の視覚情報取得の過程を模したものであり、画像中の局所からはじめ、広域の情報を取得していく。CNN は畳み込み層 (convolutional layer) とプーリング層 (pooling layer)、全結合層 (fully-connected layer) から構成される。畳み込み層とプーリング層の入出力を feature map という。

畳み込み層では、フィルターを入力される feature map と掛け合わせる畳み込み演算を行い、フィルターは画像中に存在する幾何学的特徴を抽出する。プーリング層では、入力される feature map を領域を区切り、各領域の代表値を取り出す作業を行い、入力をダウンサンプリングし、演算量を減らす機能をもつ。これらの畳み込み層とプーリング層から抽出された特徴量は全結合層に入力され、領域を区別していた以前の層とは異なり、全ての特徴量を同時に用いて得られた情報を合わせる。

4.2 Grad-CAM の概要

Grad-CAM[8] とは、CNN モデルが画像中のどの領域に集中しているかを可視化する手法である。我々研究者は、CNN を学習する際、学習に用いる画像データとそのラベルのみを確認できる。しかし、モデルを出力において、画像に関する情報よりモデルが予測する情報がより詳細である場合、画像データとラベルのみでは気づけられないものが存在

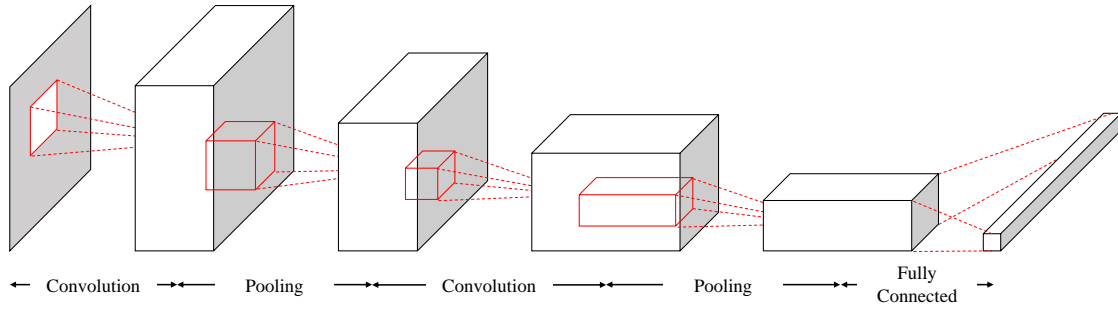


Fig. 4.1 CNN モデルの構成の概要図

する。この問題点を解決するために、CNN モデルがクラス分類を行う過程において画像のどの部分を見て出力を得るかを確認する CAM (Class Activation Mapping) が 2016 年に提案された。

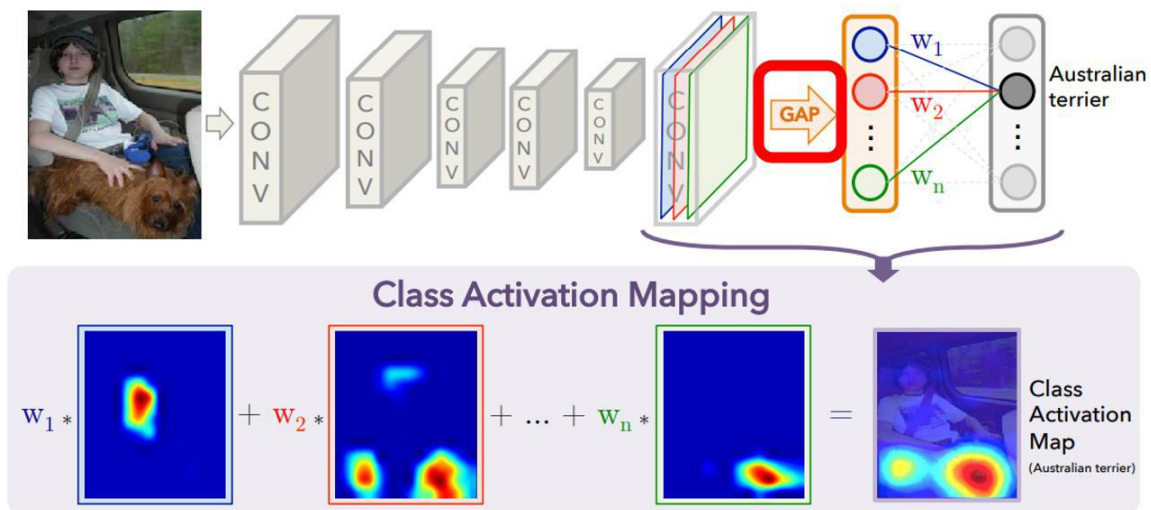


Fig. 4.2 CAM の概要図

しかし、CAM は最後の畳み込み層の以降を GAP (Global Average Pooling) 層にしなければならない。これは、CNN モデルの構造を制限しながら、学習済みの CNN モデルに GAP を適用した後、GAP においてファインチューニング (fine tuning) を行う必要がある。また、最後の畳み込み層のみにして CAM を抽出することができる制限もっている。

上記の CAM の問題を解消した Grad-CAM (Gradient-weighted CAM) が 2017 年に提案された。Grad-CAM は畳み込み層の以降に GAP を適用する必要がなく、最後の畳

み込み層に限らず、他のレイヤーの CAM 結果を取得することができ、CAM の限界点を超えた。

4.3 Grad-CAM の仕組み

Grad-CAM は、勾配 (gradient) を用いた CAM である。ニューラルネットワークにおいて、入力はいずれのニューロンを通して、また各ニューロンの重み (weight) の影響力をもって次々へと計算され、出力を得る。同様に、勾配は各ニューロンの重みの影響力で逆伝播される。すなわち、勾配は CNN モデル出力 C への入力 K の影響力と言える。

Grad-CAM は式 (4.1) で定義される。式 (4.1) で用いられる $ReLU$ は活性化関数の一種であり、0 以下の入力に対して 0 を出力し、0 以上の入力に対してはそのまま出力する関数である。式 (4.1) での k は CNN の層を、 f_k は k 番目層の feature map を、 i, j は各 feature map の座標を、 S^c はクラス C に該当するモデルの出力値を意味する。

$$L_{Grad-CAM}^c(i, j) = ReLU\left(\sum_k a_k^c f_k(i, j)\right) \quad (4.1)$$

$$a_k^c = \frac{1}{Z} \sum_i \sum_j \frac{\partial S^c}{\partial f_k(i, j)} \quad (4.2)$$

Grad-CAM を用いて得られた結果の例を Fig. 4.3 に示す。Fig. 4.3 の (a) は入力画像、(b) は猫のクラスに対しての Grad-CAM 結果、(c) は犬のクラスに対しての Grad-CAM 結果であり、Grad-CAM がクラスに該当する画像領域を良く識別していることが確認できる [9]。

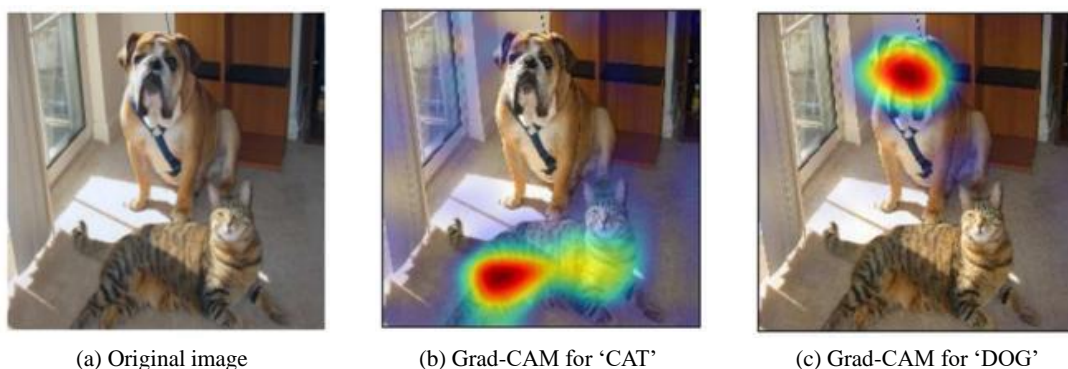


Fig. 4.3 Grad-CAM の結果例

第5章

画像間相関

本章では、画像の類似度を計算する手法である画像間相関について述べる。

我々人間は多様な画像を目前した場合においても、それらの画像が「似ている」、あるいは「似ていない」と感じることができる。しかしながら、計算機にとっては人間の感想は非常に抽象的なものであり、類似を判断するには数値的な基準が必要である。ある画像の特徴として、画像中に存在する色相及び幾何学的パターン等が存在し、数値化さえ可能であれば、画像間の類似度を判断することができ得る。ここでは、二つの画像を画像中に存在する画素値から画像間の類似度を判断する画像間相関について説明する。画像には RGB 画像、モノクロ、白黒画像などの種類が存在するが、色黒画像を前提とする。

画像間相関の対象となる二つの画像を A, B とし、それぞれの画像中の画素値を $A(x, y), B(x, y)$ とする。 x, y は画像中の画素の座標を表し、画像 A, B は同じ画像サイズをもつ。相関値は 0 以上、1 以下の値で算出される。

5.1 Sum of Squared Difference

Sum of Squared Difference (SSD) 法は、画素値の差の二乗を計算し、その和を算出する方法である。対象となる画像の画素値が類似するほど値が小さくなる。SSD の定義式を式 (5.1) で示す。

$$SSD = \sum_y \sum_x (A(x, y) - B(x, y))^2 \quad (5.1)$$

5.2 Zero-mean Normalized Cross-Correlation

Zero-mean Normalized Cross-Correlation (ZNCC) 法は、平均値引き正規化相互相関ともいう。ZNCC は画素値から画像の全ての画素値の平均を引いた後、正規化を行ったうえ、その値の相関を計算したものである。明るさに違いのある画像間の相関を計算するときに他の相関法より良い意味をもつ [10]。ZNCC の定義式を式 (5.2) で示す。

$$ZNCC = \frac{\sum_y \sum_x (A(x, y) - \bar{A})(B(x, y) - \bar{B})}{\sqrt{\sum_y \sum_x (A(x, y) - \bar{A})^2 \sum_y \sum_x (B(x, y) - \bar{B})^2}} \quad (5.2)$$

第6章

神経細胞間の機能的結合の解析方法

本章では，神経細胞間の機能的結合を調べるための従来の解析手法と，本研究で提案する解析手法について述べる．

6.1 カルシウム波形を用いた解析方法

従来，神経細胞の活動をカルシウムイメージングで観測して得られるカルシウムイメージングデータから，Constrained Nonnegative Matrix Factorization (CNMF) [11] を用いて神経細胞領域 (ROI : Region of Interest) と，ROI のカルシウム活動を表現するカルシウム波形を算出する手法が提案されている．さらに，神経細胞として考えられず発火する領域やノイズなどの情報まで取り出すことが可能である．

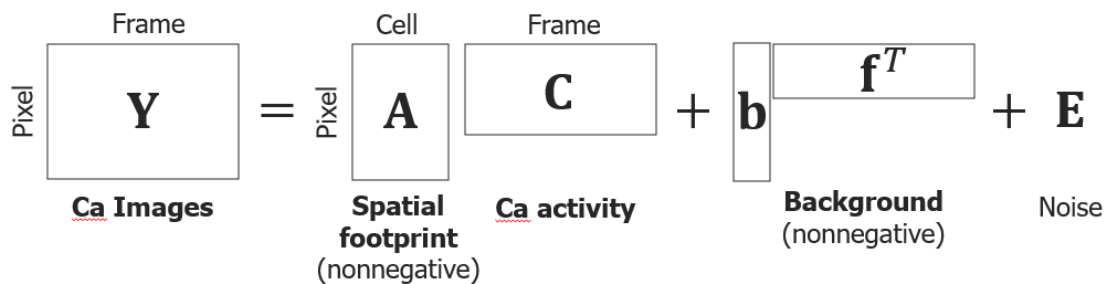


Fig. 6.1 CNMF の概要図

CNMF で得られた ROI のカルシウム波形を用いて，波形間相関を計算することで各神経細胞間の相関を測ることができる．Fig. 6.2 と 6.3 はそれぞれ ROI とカルシウム波形の例である．得られたカルシウム波形から，コサイン類似度 r_c を用いてその相関が計算される．コサイン類似度は式 (6.1) で定義される． T は時刻を， x, y は比較する二つ

の波形の時刻 T での値を意味する．コサイン類似度を用いることで，比較する二つの波形において，カルシウムの濃度が高くなる時刻が似ているほど類似度が大きくなる．さらに Fig. 6.4 のように，計算された類似度を可視化することで神経細胞間の機能的結合を推測する．

$$r_c = \frac{\sum_{t=1}^T x_t y_t}{\sqrt{\sum_{t=1}^T x_t^2} \sqrt{\sum_{t=1}^T y_t^2}} \quad (6.1)$$

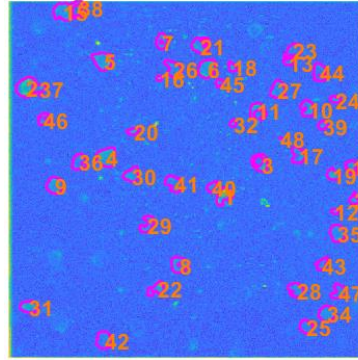


Fig. 6.2 ROI の例

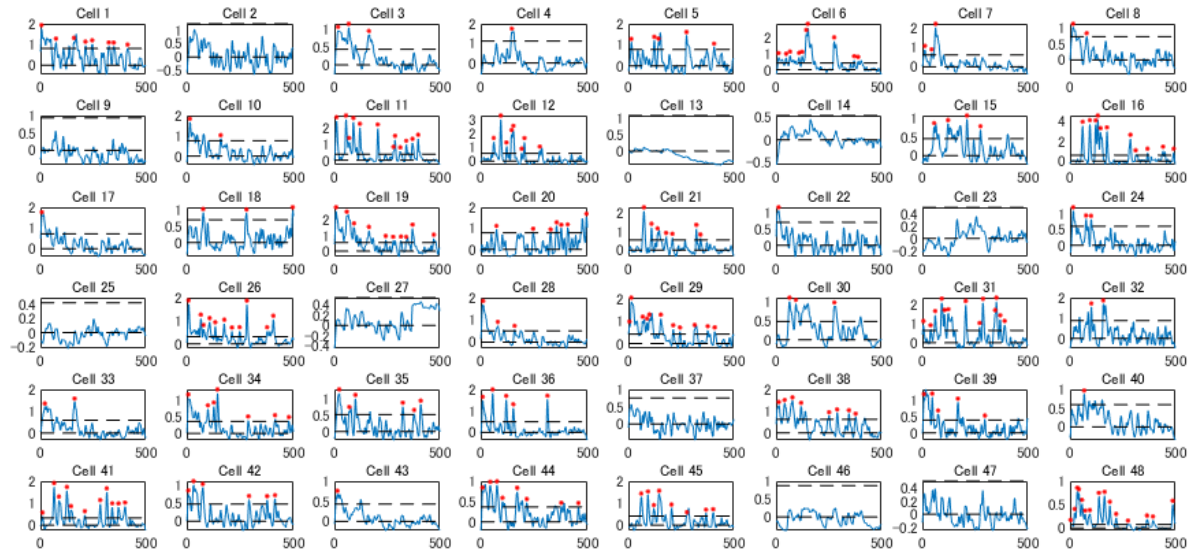


Fig. 6.3 カルシウム波形の例

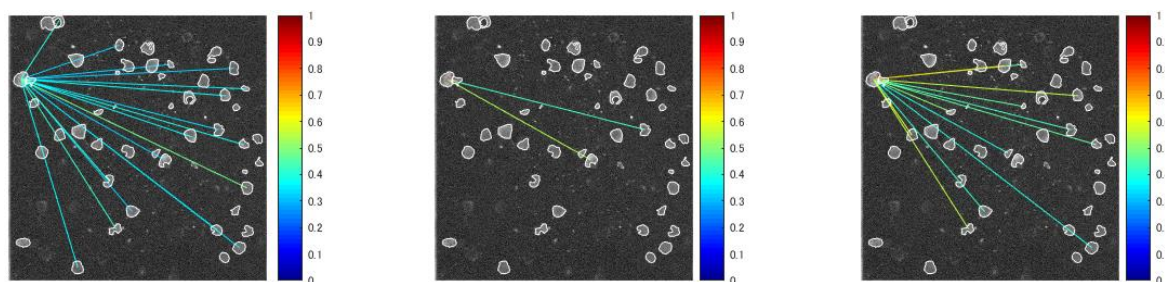


Fig. 6.4 カルシウム波形のコサイン類似度の可視化例

6.2 深層学習を用いた解析方法

本研究では、カルシウムイメージングデータを CNN に基づいて解析する。カルシウムイメージングデータは画像データであり、CNN の入力として利用できる。この点から、カルシウムイメージングデータを入力とし、刺激された細胞を識別して出力する CNN を構成する。ある神経細胞が刺激された際、他の神経細胞との関係から現れる神経細胞活動の変化を CNN が理解することを期待する。従来の波形間相関だけでは、人では気付にくい小さい数値的な違いがあると解析が困難である欠点がある。しかし、深層学習はそのようなクラス間の違いが非常に小さい場合にも識別できるように学習を行うため、波形間相関の欠点を解消できる。

次に、Grad-CAM で学習済みの CNN を解析することで、刺激細胞に対する CNN モデルが理解した内容を確認する。各神経細胞に刺激が与えられ、変化する神経細胞の活動の変化を Grad-CAM で捉える。刺激細胞によって現れる神経細胞活動のパターンが Grad-CAM で示されたうえ、画像間相関を用いて Grad-CAM の結果間の相関を測ることで、それらのパターンを比較し、神経細胞間の機能的結合を調べる。

深層学習を用いた解析方法の概要を Fig. 6.5 に示す。

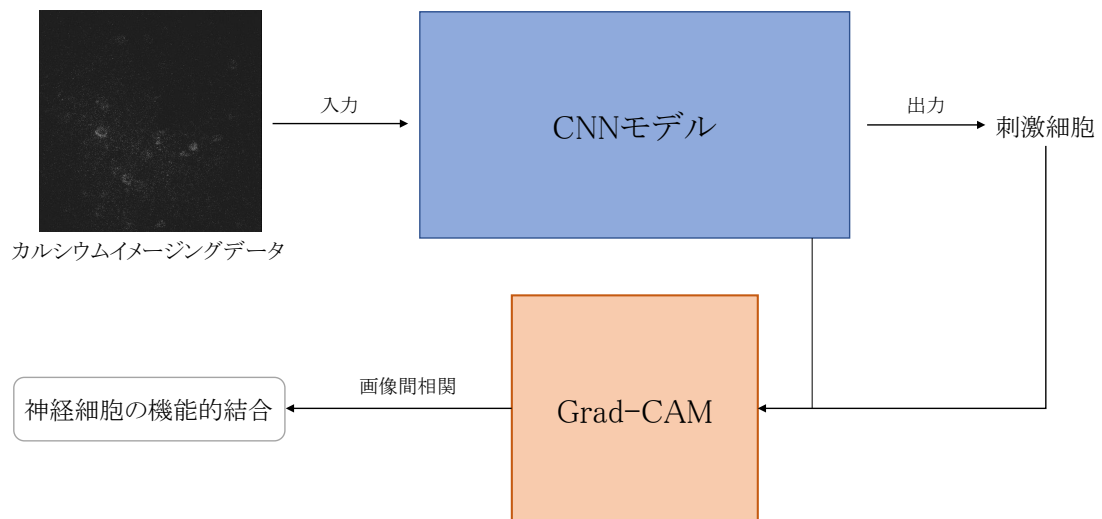


Fig. 6.5 深層学習を用いたカルシウムイメージングデータの解析の概要

第7章

実験

7.1 実験方法

7.1.1 データセット

本節では，CNN モデルの学習及び評価に用いるデータセットについて述べる．本研究で用いたカルシウムイメージングデータは， 512×512 ピクセルの画像サイズを持ち，フレームレートは 2 Hz の時系列データである．イメージング開始から終了まで 60 秒の時間を置き，一回のイメージングに当たり 120 フレームのイメージングデータが生成される．イメージング開始約 18 秒後から 8 秒間隔で 50ms の刺激が特定の神経細胞へ与えられる．刺激される細胞（刺激細胞）は 1 個（1 個刺激）または 2 個（2 個同時刺激）であり，イメージングによって 5 回または 10 回の刺激が与えられる．5 回の刺激が与えられるデータについては 4 回の刺激を学習データとし，最後の 1 回の刺激を評価データとして用いた．また，10 回の刺激が与えられるデータについては 8 回の刺激を学習データとし，最後の 2 回の刺激を評価データとして用いた．

イメージングは 3 つの領域（Area1, Area2, Area3 と呼ぶ）について観測する．Area1 には 15 個の刺激細胞が存在し，55 通りの 2 個同時刺激を行う．Area2 には 24 個の刺激細胞が存在し，62 通りの 2 個同時刺激を行う．Area3 には 24 個の刺激細胞が存在し，84 通りの 2 個同時刺激を行う．Area1 と Area2 については 5 回の刺激が与えられ，Area3 については 10 回の刺激が与えられる．イメージングを行う各領域を Fig. 7.1 に示す．

特に Area3 については，痛み動物モデルの CFA 投与による神経細胞活動の変化を調べるため，CFA 投与直前のデータである POD0 と，投与から三日後のデータである POD3 が存在する．POD0 と POD3 をそれぞれ独立したデータセットとして扱い，学習及び評価も別けて行った．

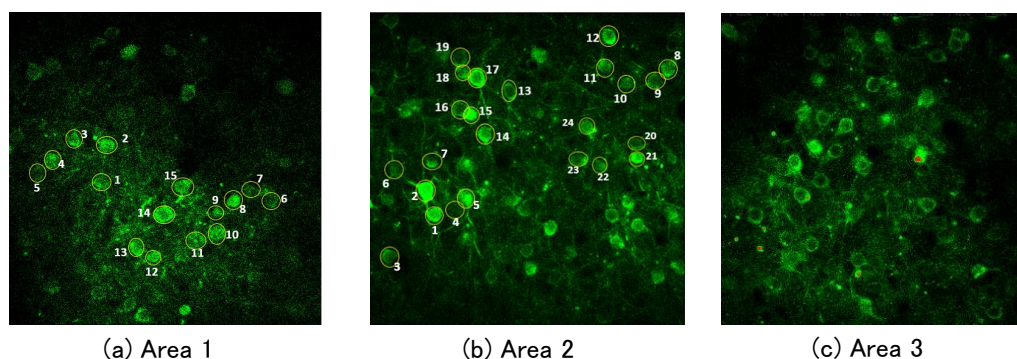


Fig. 7.1 イメージングする神経細胞領域

本実験では、カルシウムイメージングデータの各フレームを独立のデータとして用い、時間的情報をなくした。時間的情報を捕捉するため、刺激が与えられたフレームから5フレーム間を刺激の影響が残っているとみなし、「刺激有」のデータとして扱う一方で、その他のフレームについては「刺激無」のデータとして扱う。Fig. 7.2 に概要を示す。

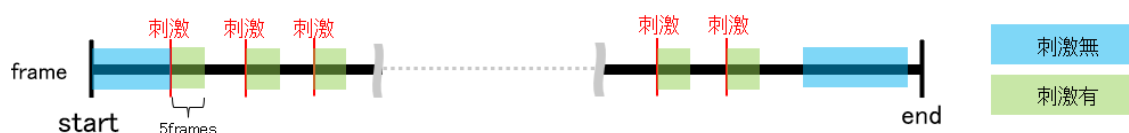


Fig. 7.2 カルシウムイメージングデータのデータセット化の概要

7.1.2 識別モデル

本実験では、識別モデルとして CNN を用いる。識別モデルの入力は、上記のデータセットで述べたように、カルシウムイメージングデータの 1 フレームであり、出力は刺激細胞である。CNN の構造は、一般的なクラス分類に用いる構造を基に、畳み込み層とプーリング層を 3 回繰り返した後に、3 層の全結合層が続き、最後にソフトマックス (softmax) 関数を通して出力するようにした。ソフトマックス関数は CNN の出力を 0 から 1 の間に整理し、総和が 1 になるようにする関数である。

識別モデルの構造を Fig. 7.3 に示す。CNN 内の括弧の数字は層の出力サイズ ($height \times width \times channels$) を意味する。イメージングした神経細胞領域毎に刺激細胞数が異なるため、それぞれ別のモデルで実験を行った。また、「刺激無」に対する識別のため、識別モデルは「非刺激」も出力するようにした。

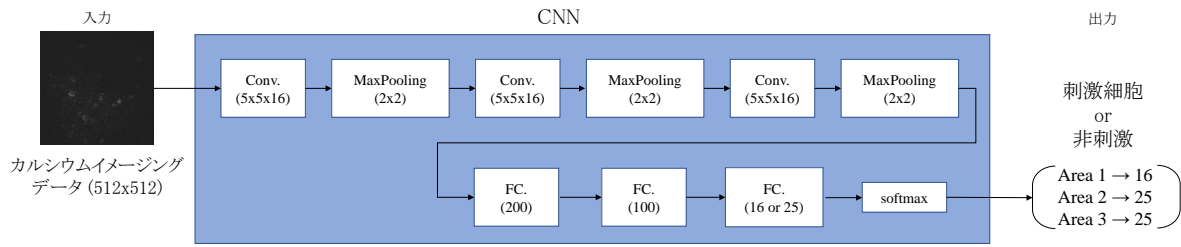


Fig. 7.3 識別モデルの構造

7.1.3 識別モデルの学習及び評価方法

識別モデルがデータセットを理解するため、データセットを用いてモデルの学習を行う。学習において、画像のラベルは刺激細胞である。しかし、モデルに提示するため、学習する神経細胞領域中の神経細胞の中、刺激を与える細胞にのみ1の値を、他の細胞は0の値を正解ラベルとして与える。モデルが「非刺激」も出力するので、正解ラベルの最後には、非刺激を意味するラベルを追加した。例えば、細胞数が5個であり、2番細胞が刺激されたときの正解ラベルは $[0, 1, 0, 0, 0, 0]$ となる。学習時に正解ラベルと識別モデルの出力間の差を計算する損失関数として、バイナリークロスエントロピーロス (binary cross entropy loss) を用いた。学習済みのモデルを評価する時には、1個刺激の場合にはその細胞を、2個刺激の場合には少なくとも1個の細胞がラベルと同じである際に正解とした。

識別モデルの学習を行う際、画像の明度とコントラストをランダムで調整するデータ拡張を行った。データ拡張は、カルシウムイメージングデータの輝度値がデータ毎に異なることから、入力画像のランダムな平均的な輝度のみにロバスト (robust) なモデル学習を行うために本実験に適用した。データ拡張で明度やコントラストを調整する例を Fig. 7.4 に示す。

識別モデルの学習において、モデルがカルシウムイメージングデータから刺激細胞の情報の他、ノイズなどの周囲環境を学習する可能性が存在する。そうすると、細胞へ与えられる刺激や刺激による細胞活動の変化に関係なく、周囲環境に基づいて出力が決められてしまう。従って、バイナリーマスク (binary mask) 処理をしたデータセットで、追加実験を行った。バイナリーマスクは刺激を与える神経細胞の画素の他の画素の画素値を0とし、必要でない情報をなくすための手法である。バイナリーマスクを適用した例を Fig. 7.5 に示す。

識別モデルの学習が終わった後、評価データでモデルの評価を行い、学習が上手く行われたかを確認した。さらに、識別モデルを Grad-CAM で解析し、刺激細胞を識別する

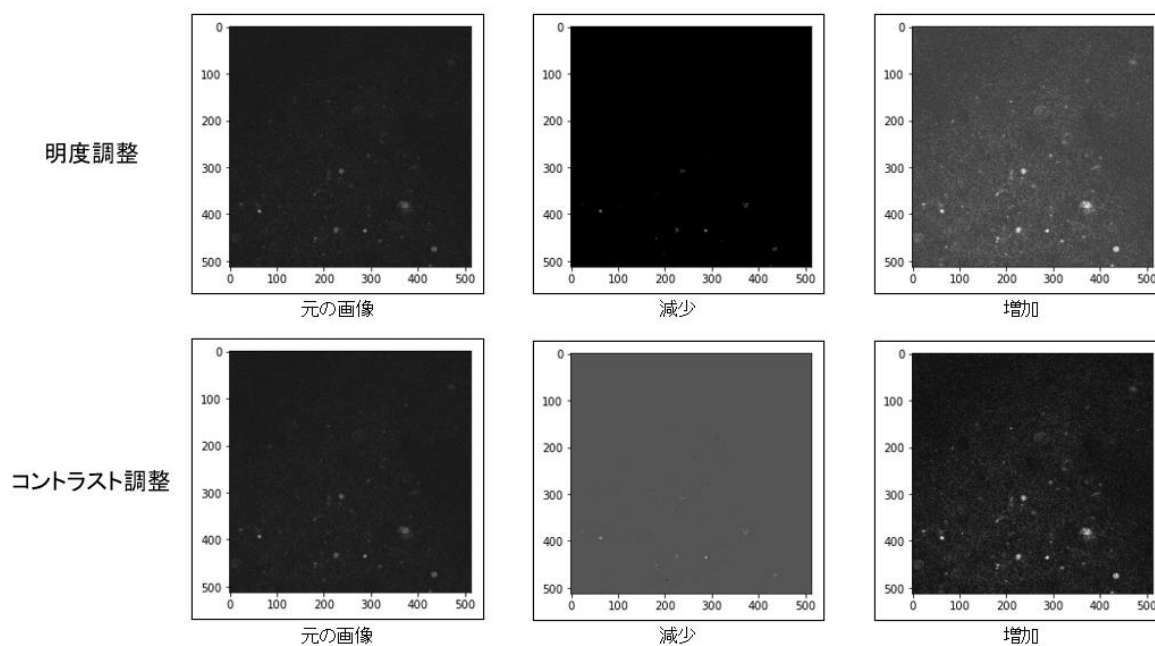


Fig. 7.4 データ拡張の例

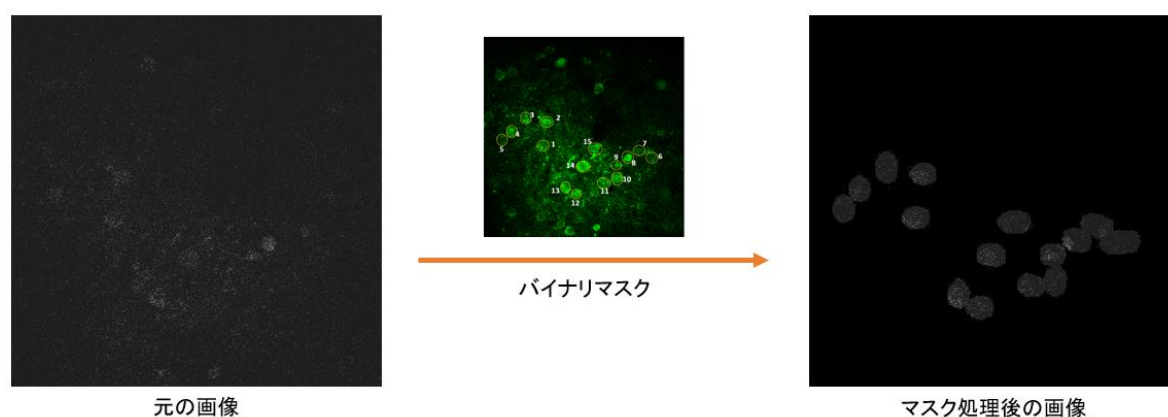


Fig. 7.5 バイナリマスク処理の例

ために重要である画像中領域が確認できた。また，Area3 の POD0 と POD3 について，CFA による神経細胞活動の変化を捉えるために，Grad-CAM で得られた解析結果を比較する。Grad-CAM 結果は画像の形をしており，人の目で見比べることが困難である場合が存在するため，画像間相関の一種である ZNCC を用いて解析した。

7.2 実験結果と考察

本節では，上記の実験条件に基づいて行った実験の結果について述べる。7.2.1 節では，本実験で設定したデータセットで識別モデルの学習及び評価を行った結果について述べ

Table 7.1 識別モデルの評価データに対する認識精度

細胞領域	no mask	masked
Area1	85%	78%
Area2	76%	77%
Area3 (POD0)	92%	90%
Area3 (POD3)	85%	80%

る. 7.2.2 節では, 学習済みの識別モデルを Grad-CAM で解析した結果について述べる. 7.2.3 節では, 画像間相関で Grad-CAM 結果を比較し, CFA による神経細胞間の機能的結合の変化の捉えについて述べる.

7.2.1 識別モデルの学習結果と考察

識別モデルを学習データで学習が終わった後, 評価データで評価した結果を Table 7.1 に示す. バイナリーマスクを用いなかった場合は no mask で, 用いた場合は masked で示している. 全ての細胞領域について 7 割以上の認識精度が得られた. また, 学習データで評価した結果, 99% 以上の認識精度が得られた. 領域別に見ると, バイナリーマスク処理を行った場合と行わなかった場合の認識精度において, 高くなる領域もある一方で低くなる領域も存在する. 従って, バイナリーマスクは本実験において有意な効果をもたない.

領域間の認識精度を比較すると, Area2 は他の細胞領域に対してより低く, Area3(POD0) はより高い. 本実験でのデータセットで CNN を学習することは, ある神経細胞の刺激による複数の細胞の活動を学習することである. 刺激した神経細胞と他の神経細胞との機能的結合により, 他の神経細胞が連携して活動するか, 活動しないかがデータから現れる. 他の神経細胞との機能的結合が, 刺激を与える神経細胞毎に異なる場合, 刺激による神経細胞活動のパターンに違いが発生する. 機能的結合が似ている場合, 神経細胞活動のパターンが良く区別できない. すなわち, Area2 についての認識精度が低いのは, Area2 の刺激細胞の機能的結合が似ていると解析できる. 一方で, Area3 (POD0) の刺激細胞の機能的結合は似ておらず, 識別モデルの学習が上手く行えたと考えられる.

評価データセットについて, 神経細胞毎の認識精度を Fig. 7.6 に示す. 横軸の番号は神経細胞の番号を, no stim は「刺激無」を, 縦軸は認識精度を意味する. 全ての領域において, 「刺激無」に対する認識精度に比べ, 刺激を与えた時の認識精度が低い細胞が多数見つけられる. これは, 評価データセットはイメージング中に行われる 5 回または 10 回の刺激の最後の部分であり, 時間経過による神経細胞の反応性低下が起きるためだと考え

られる。

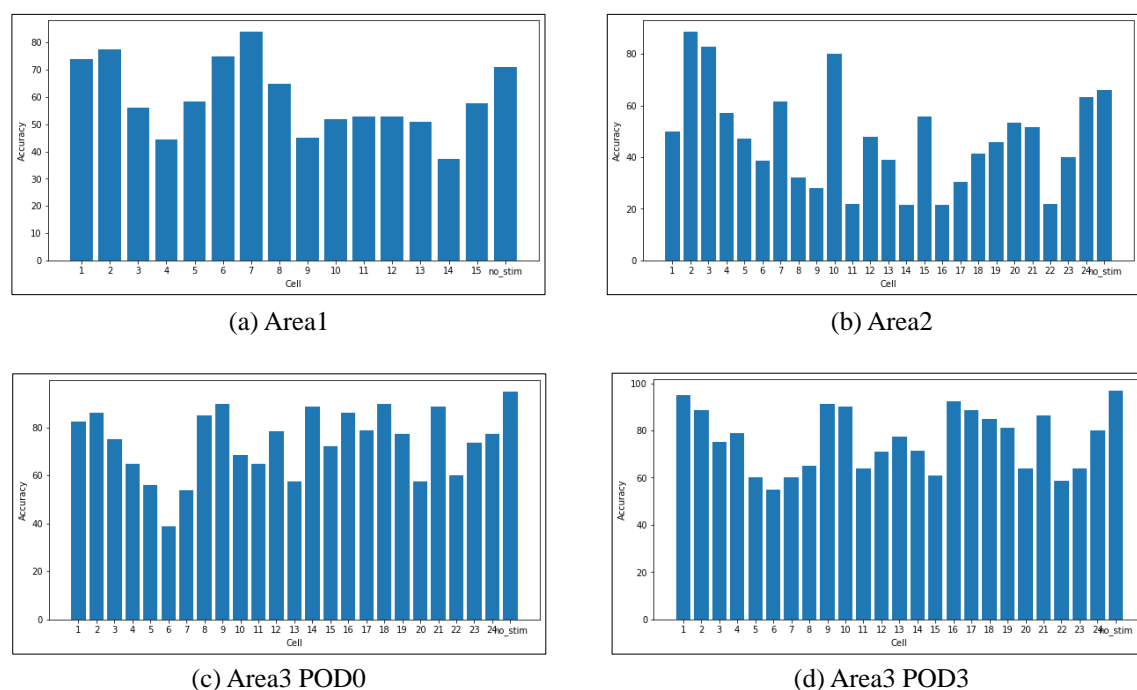


Fig. 7.6 神経細胞毎の認識精度（バイナリーマスク処理無）

7.2.2 Grad-CAM を用いた識別モデルの解析

CNN の出力を用いて解析を行う Grad-CAM は、各クラスの認識精度が低い場合には解析が困難である。7.2.1 節の結果により、学習データセットについての識別モデルの認識精度が 99% を超えることから、学習済みの識別モデルは学習データを十分に理解していると考えられる。従って、Grad-CAM を用いた識別モデルの解析には学習データを用いた。

Grad-CAM 結果は、画像の形をしており、時間的情報が抹消されたフレーム単位の結果であるため、神経細胞刺激による活動のパターンを捉えることは難しい。この問題点を補うため、同じラベルをもつ入力による Grad-CAM 結果を全て足し合わせ、平均を取ることで、時間的情報が圧縮されている Grad-CAM 結果が得られた。

時間的情報を圧縮した Grad-CAM 結果の例を Fig. 7.7 に示す。Fig. 7.7 には、画像中に赤い丸で表示されている (a) のように、刺激細胞が同じである場合には同じ規則のある結果が得られる。一方で、刺激細胞が異なる場合には、異なる特徴をもつ結果が得られる。従って、神経細胞活動のパターン情報が含まれていることが確認できた。

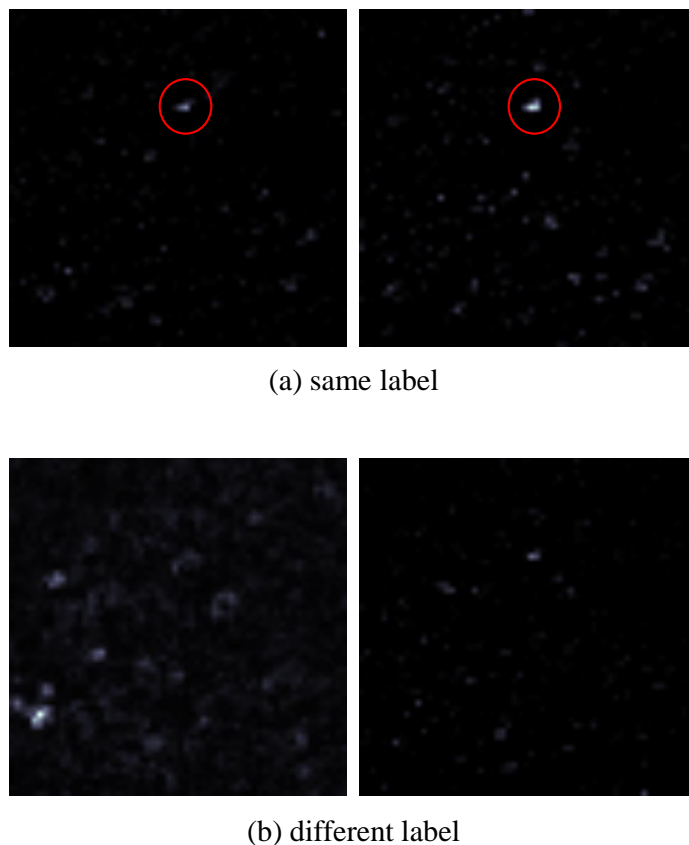


Fig. 7.7 Grad-CAM 結果の例

7.2.3 ZNCC を用いた Grad-CAM 結果の解析

7.2.2 で述べた Grad-CAM 結果の中, Area3 の POD0 と POD3 の結果を用いて ZNCC を計算し, 可視化したものを Fig. 7.8 に示す. 横軸と縦軸は, 刺激する神経細胞の種類であり, 1 個刺激と 2 個刺激を合わせて. Fig. 7.8 から, 全体的な相関値が POD0 より POD3 の場合に低くなっていると思われる. しかし, イメージングの環境を考慮しなければならない. Area3 のイメージングにおいて, Fig. 7.9 に示すように, 24 個の刺激細胞は 8 個ずつ 3 つのグループに分割される. イメージングはグループ 1, グループ 2, グループ 3 の順に 15 分間隔で行われる. カルシウムイメージングはイメージングが長時間続けられることにより, 観測される神経細胞が疲れて反応性が低くなる. 従って, 本節ではグループ 1 のみの POD0 と POD3 の解析を行う.

Area3 のグループ 1 の POD0 と POD3 について, ZNCC を可視化したものを Fig. 7.10 に示す. 横軸と縦軸は刺激する細胞の種類を意味する. 1 から 8 までは 1 番から 8 番細胞

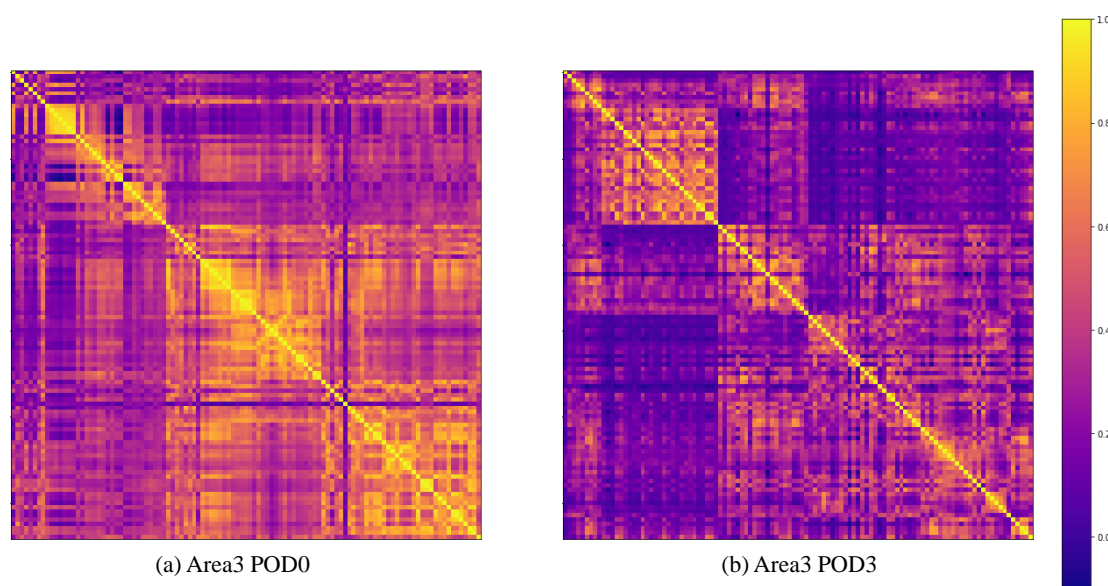


Fig. 7.8 Grad-CAM 結果の ZNCC 結果 (Area3)

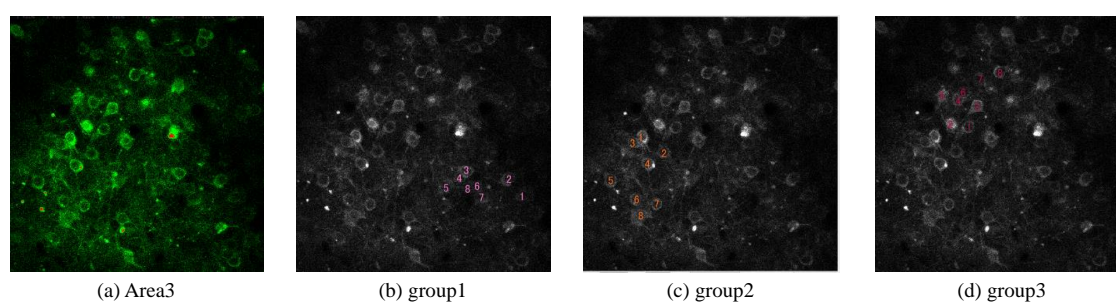


Fig. 7.9 Area3 の刺激細胞

の 1 個刺激, その後は (1, 2)...(1, 8), (2, 3), (2, 4)...(7, 8) といった番号の組み合わせで細胞を刺激する 2 個刺激である. Fig. 7.10 からは, 刺激細胞の機能的結合が現れる. 例えば, (a) の緑色の四角で表示された部分を見ると, 1 番細胞と 4 番細胞, 1 番細胞と 6 番細胞, 4 番細胞と 6 番細胞の 1 個刺激の相関が高く算出されている. 一方で, 1 番細胞と他の細胞を同時に刺激した 2 個刺激と 1, 4, 6 番細胞の 1 個刺激との相関が高く算出された. すなわち, 1, 4, 6 番細胞の機能的結合が類似していると考えられる.

また, Fig. 7.10 から, POD0 と POD3 の ZNCC 結果が明らかに異なり, CFA によって刺激細胞の機能的結合が変化することが分かる. (b) POD3 では (a) POD0 に比べ, 全体的な相関が上昇したことから, CFA 投与によって刺激細胞の機能的結合が強くなったことが分かる.

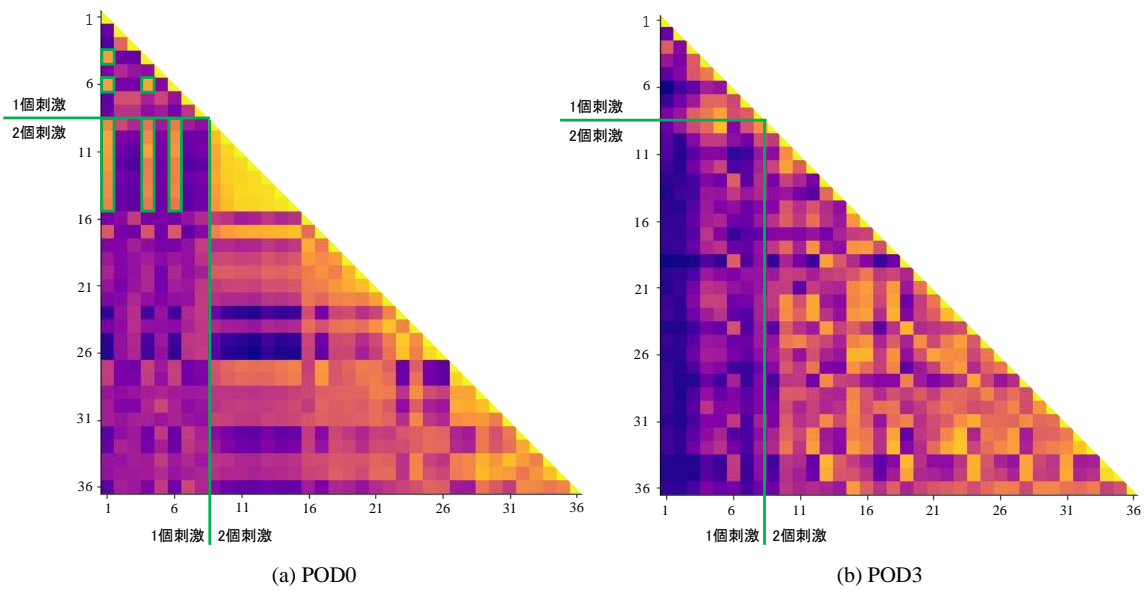


Fig. 7.10 Grad-CAM 結果の ZNCC 結果 (Area3 group1)

第8章

まとめ

本研究では、神経細胞の活動をカルシウムイメージングで観測したデータを用い、CNNモデルの学習及び評価を行った。さらに、Grad-CAMと画像間相関を用いて、学習済みのCNNモデルの解析を行った。その結果、神経細胞の刺激による活動のパターンを比較することができ、深層学習を用いて神経細胞活動を解析できることを示した。

今後の課題としては、本実験の過程で発見したカルシウムイメージングデータがもつ問題点を解決を目指し、データセットの改善が不可欠ある。また、ZNCC結果の可視化及び解析において、より分かりやすい可視化方法の工夫も必要である。一方で、新たなカルシウムイメージングデータを用いることで、本研究で述べた解析手法の信頼性を向上させることを期待する。

謝辞

本研究を始めるにあたり，ご助言とご指導をいただきました神戸大学大学院システム情報学研究科メディア情報研究室の滝口哲也教授，ならびに博士課程3年生の矢野肇先輩と，高島遼一准教授に厚く御礼を申し上げます。

本研究で用いたデータを提供していただき，ご助言をいただきました名古屋大学大学院医学系研究科の加藤大輔助教に感謝いたします。

また，1年間の研究室生活を支えていただいた滝口研究室のメンバーの方々に心より感謝を申し上げます。

参考文献

- [1] “Helping you to Understand Chronic Pain,”
<http://www.thebackdoor.org.uk/chronic-pain1.html>
- [2] “Green Fluorescent Protein,” <https://embryo.asu.edu/pages/green-fluorescent-protein>
- [3] Nakai J, Ohkura M, Imoto K (February 2001), “A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein,” *Nature Biotechnology*, Vol. 19, pp. 137–141 (2001), <https://doi.org/10.1038/84397>
- [4] “Freund’s Adjuvant,” <https://prosci-services.com/antibody-development-guide/freunds-adjuvant/>
- [5] “Freund’s adjuvant (CFA & IFA),” <https://dawinbio.com/invivogen/?q=YToxOntzOjEyOiJrZXl3b3JkX3R5cGUiO3M6MzoiYWxsIjt9&bmode=view&idx=6498391&t=board>
- [6] Wim B. van den Berg, “90 - Animal models of arthritis,” *Rheumatology (Sixth Edition)*, pp. 743–749 (2015), <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-09138-1.00090-5>
- [7] Y.LeCun et al, “Gradient-based learning applied to document recognition,” *Proceedings of the IEEE*, Vol.86, pp. 2278-2374 (1998)
- [8] R.R.Selvaraju et al, “Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-based Localization,” arXiv:1610.02391 [cs.CV], 3 Dec. 2019.
- [9] “CNN visualization: CAM and Grad-CAM,”
<https://tyami.github.io/deep%20learning/CNN-visualization-Grad-CAM/>

- [10] “image correlation,” <http://www.sanko-shoko.net/note.php?id=f7j3>
- [11] Pnevmatikakis, Eftychios A et al, “Simultaneous Denoising, Deconvolution, and Demixing of Calcium Imaging Data,” *Neuron*, Vol. 89, pp. 285-299 (2016).
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.037>