

粒子フィルタによる細胞内カルシウム動態の推定

角田 敬正^{†1} 大森 敏明^{†2,†4} 宮川 博義^{†3}
岡田 真人^{†2,†4} 青西 亨^{†1,†4}

カルシウムイメージングには原理的に2つの問題がある。1つは、観測値は蛍光強度であるため Ca^{2+} 濃度を定量化する場合、較正の手続きが必要となる。もう1つは、カルシウムイメージングは微弱な蛍光信号を扱う光学計測であるため、ノイズの影響を強く受ける。我々は、これらの問題を解決する統計的な枠組みを提案する。カルシウムイメージングにより得られる蛍光信号を状態空間モデルで記述し、粒子フィルタの数値計算手法を用いて蛍光信号から Ca^{2+} 濃度と流量を推定するものである。数値実験によって提案手法の有効性を示し、従来の較正手法との比較を行う。

Estimation of Intracellular Calcium Dynamics by Particle Filter

TAKAMASA TSUNODA,^{†1} TOSHIKI OMORI,^{†2,†4}
HIROYOSHI MIYAKAWA,^{†3} MASATO OKADA^{†2,†4}
and TORU AONISHI^{†1,†4}

Calcium imaging method has two major problems. First, we need to calibrate the observation data to quantify the Ca^{2+} concentration, because the observation data are the fluorescent signals of Ca^{2+} indicator dyes that are only indirect information about the Ca^{2+} concentration. Second, the fluorescent signals are too noisy. To address these problems, we propose a statistical method for the calcium imaging. We make a nonlinear state-space model describing the fluorescent signals obtained by the calcium imaging method, and estimate its state vector consisting of the Ca^{2+} concentration and Ca^{2+} flux by a particle filter based on the state-space model we make. By numerical experiments, we verify the effectiveness of the proposed method, and compare our method with the conventional calibration method.

1. はじめに

近年、細胞内のカルシウムイオンをカルシウム指示色素によって光学計測するカルシウムイメージング技術が多くの生理実験で用いられている^{(13),(18),(20)}。特に、カルシウムイオン濃度変化は神経細胞の活動電位やプラトー電位などの電位変化と強い相関があるため、神経科学の分野では神経系の電氣的活動を計測する手法としてさかんに用いられている^{(11),(12),(14),(21),(22)}。

カルシウムイメージングには原理的に2つの問題がある。1つは、カルシウムイメージングの観測値はCCD (Charge-Coupled Device) カメラなどの撮像機器で計測される蛍光強度であり、実験データからカルシウムイオン濃度を定量化する際、較正の手続きを必要とすることである。一般に、カルシウム指示色素は高カルシウムイオン濃度で飽和を起こすため、蛍光強度とイオン濃度は非線形の関係にある。蛍光強度からイオン濃度を求めるには、この非線形性を較正する必要がある。Grynkiewiczらは、カルシウム指示色素から測定される蛍光強度を定式化し、決定論的な較正式(式(22))を導出した⁽⁵⁾。以後の多くの研究で、この較正式が利用されてきた^{(1),(2),(15),(16)}。しかしこの較正式の適用には、色素がカルシウムイオンと完全に結合しているときの蛍光強度(F_{max})、および色素が完全に遊離しているときの蛍光強度(F_{min})の計測が必要で、これにはこれらの基準蛍光強度を計測するための追加的な実験が必要である^{(10),(19)}。もう1つは、カルシウムイメージングは微弱な蛍光信号を扱う光学計測であるため、ノイズの影響を強く受けるという問題である。

本論文では、従来の較正手法をベイズ統計の枠組みで拡張し、これらの問題を解決する統計的手法を提案する。

まず、蛍光信号の発生機序をシステムモデルと観測モデルからなる状態空間モデルで記述する。システムモデルは、細胞質内におけるカルシウムイオンとカルシウム結合タンパク質の反応過程、およびカルシウムイオン流入のダイナミクスからなる。観測モデルは、カルシウムイオンとカルシウム指示色素の二次反応過程、そして色素と蛍光強度の関係式からな

†1 東京工業大学大学院総合理工学研究科
Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

†2 東京大学大学院新領域創成科学研究科
Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

†3 東京薬科大学生命科学部
School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

†4 理化学研究所脳科学総合研究センター
RIKEN Brain Science Institute

る。この観測モデルは、従来の較正手法で用いられている較正式に対応するものである。

このような状態空間モデルの構築により、ベイズ理論が適用できて、潜在変数であるカルシウムイオン濃度とカルシウムイオン流量の推定が可能となる。本研究では、周辺事後確率最大化 (Maximizer of Posterior Marginal: MPM) により、カルシウムイオン濃度とカルシウムイオン流量の推定を試みる。ただし、構築した状態空間モデルは非線形なので、カルマンフィルタによる MPM 推定はできない。本研究では、事後確率の周辺化をモンテカルロ法で実行する粒子フィルタを用いて MPM 推定アルゴリズムを実装する。また粒子フィルタは周辺尤度も計算できるので、未知のモデルパラメータの推定も可能である。

本論文では、数値実験により提案手法の有効性を示す。数値計算で生成した人工蛍光強度データを用いて、カルシウムイオン濃度とカルシウムイオン流量が推定できるか検証する。従来の較正手法と提案手法の推定精度を比較し、提案手法の有効性を示す。また、周辺尤度最大化によりモデルパラメータが推定可能か検証する。基準蛍光強度 F_{max} と F_{min} に対応するパラメータの推定を試みる。

2. 提案手法

2.1 カルシウムイメージングのモデル化

蛍光信号の発生機序を図 1 で示す 4 つの過程でモデル化する。

- (1) Ca^{2+} 流量ダイナミクス—細胞質内へのカルシウム流量の総和の時間変化。時間的連続に変化するものと仮定。
- (2) Ca^{2+} ダイナミクス—カルシウム流入が起こり、細胞質内の Ca^{2+} とカルシウム結合タンパク質が二次反応を示す過程。
- (3) 色素ダイナミクス— Ca^{2+} とカルシウム指示色素が二次反応を示す過程。準定常状態を仮定。

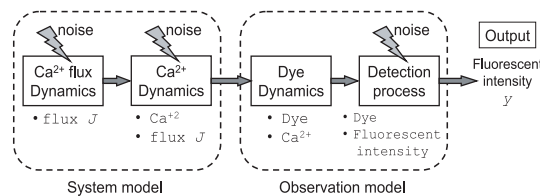


図 1 カルシウムイメージングのモデル
Fig.1 Model of Calcium imaging.

- (4) 蛍光検出過程—励起光の照射により Ca^{2+} と結合した色素と遊離した色素が、それぞれの濃度に比例した強度で蛍光を発生し、測定される過程。

以下、各過程の具体的な数理モデルを示す^{9),17)}。

Ca^{2+} 流量ダイナミクス：神経細胞における Ca^{2+} 流入経路は多様にある。たとえば細胞膜における電位依存性 Ca^{2+} チャンネル、小胞体膜上の IP_3 受容体などを通しての受動的な流入、ATP を消費する ATPase ポンプを通しての能動的な排出、そして細胞質内空間での拡散などである。これらの Ca^{2+} 流量が重畳して、蛍光信号として観測される。本研究では、これらの Ca^{2+} 流量経路の詳細なモデル化を行わず、注目する領域 (Region of Interest: ROI) への Ca^{2+} 流量の時間変化を以下の 1 次トレンドモデルで記述する、

$$J_n = J_{n-1} + \kappa u_n, \quad (1)$$

ここで、 J_n は Ca^{2+} 指示色素の解離定数 K_d でスケールした Ca^{2+} 流量の総和である。 u_n は $\langle u_n \rangle = 0$, $\langle u_n u_{n'} \rangle = \delta_{nn'}$ を満たす白色ガウスノイズで、 κ はノイズ強度を表す。ここで、 $\delta_{nn'}$ はクロネッカーのデルタであり、 $\delta_{nn'} \equiv 1 (n = n')$, $\delta_{nn'} \equiv 0 (n \neq n')$ である。添え字 “ n ” は離散時刻 n を表す。変数のスケール変換の詳細は付録に示す。ここで導入したトレンドモデルは時系列信号を平滑化する性質を持ち、連続的に変化する時系列を表現する汎用的なモデルとして知られている⁷⁾。

Ca^{2+} ダイナミクス：細胞内には多種のカルシウム結合タンパク質が分布する。遊離した Ca^{2+} とカルシウム結合タンパク質は二次反応と分類される可逆的な結合/解離の反応を起こす。カルシウム結合タンパク質が遊離した Ca^{2+} よりも十分に多いという仮定の下で、この二次反応の時間的変化を以下の 1 次遅れ系としてモデル化する、

$$C_n = \gamma C_{n-1} + J_{n-1} + \sigma v_n, \quad (2)$$

ここで、 C_n は濃度 $[\text{Ca}^{2+}]$ を Ca^{2+} 指示色素の解離定数 K_d でスケール変換したもので、 γ は一次遅れ系の時定数の逆数をスケール変換した値、 v_n は $\langle v_n \rangle = 0$, $\langle v_n v_{n'} \rangle = \delta_{nn'}$ を満足する白色ガウスノイズ、 σ はノイズ強度を表す。これらの変数や係数のスケール変換の詳細は付録に示す。

色素ダイナミクス：遊離した Ca^{2+} は Ca^{2+} 指示色素とも、カルシウム結合タンパク質と同様の二次反応を示す。 Ca^{2+} と色素の反応は、 Ca^{2+} とカルシウム結合タンパク質との反応に比べて十分に速く、準定常状態にあると仮定し、以下のミカエリス・メンテン式で記述する、

$$[D]_n = \frac{[D]_T}{C_n + 1}, \quad (3)$$

ここで, $[D]_n$ は Ca^{2+} から遊離した色素の濃度, $[D]_T$ は全色素濃度である. 詳細は付録に示す.

蛍光検出過程: Ca^{2+} 指示色素は特定波長の励起光照射によって蛍光を発するが, Ca^{2+} が結合したときと遊離したときでは蛍光量子収率に違いがあり, 蛍光強度が異なる. 本研究では従来手法に従い, 観測される蛍光強度 y_n は Ca^{2+} 結合色素濃度に比例した蛍光と Ca^{2+} 遊離色素濃度に比例した蛍光の和になるものとして, 次のようにモデル化する,

$$y_n = S_b([D]_T - [D]_n) + S_f[D]_n + \rho w_n, \quad (4)$$

ここで, S_f は Ca^{2+} 遊離色素の単位濃度あたりの蛍光強度, S_b は Ca^{2+} 結合色素の単位濃度あたりの蛍光強度である. また, w_n は $\langle w_n \rangle = 0$, $\langle w_n w_{n'} \rangle = \delta_{nn'}$ を満たす白色ガウスノイズであり, ρ はノイズ強度とする. ただし, 蛍光強度 y_n は CCD カメラで検出した階調値を想定しているため, これらの係数には次元がない.

2.2 状態空間モデル

上記の4つの過程(式(1)-(4))より, 下記の状態空間モデルを構成する,

$$\begin{aligned} [\text{システムモデル}]: \quad & \vec{x}_n := F(\vec{x}_{n-1}, \vec{s}_n) \\ & = \begin{bmatrix} \gamma & 1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \vec{x}_{n-1} + \begin{bmatrix} \sigma & 0 \\ 0 & \kappa \end{bmatrix} \vec{s}_n, \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} [\text{観測モデル}]: \quad & y_n := H(\vec{x}_n, w_n) \\ & = (S_f - S_b) \frac{[D]_T}{C_n + 1} + S_b [D]_T + \rho w_n, \end{aligned} \quad (6)$$

ただし, $\vec{x}_n = \{C_n, J_n\}^T$ は状態ベクトル, y_n は観測値, $\vec{s}_n = \{u_n, v_n\}^T$ はシステムノイズ, w_n は観測ノイズである. 関数 $F(\cdot)$ はシステムモデルを表す線形写像, $H(\cdot)$ は観測モデルを表す非線形写像である.

2.3 1期先予測とフィルタリング

上記の状態空間モデルのシステムモデルと観測モデルより, 以下の遷移確率密度関数と尤度関数を得る.

$$\begin{aligned} P(\vec{x}_n | \vec{x}_{n-1}) &= \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(C_n - \gamma C_{n-1} - J_{n-1})^2}{2\sigma^2}\right) \\ &\quad \times \frac{1}{\sqrt{2\pi\kappa^2}} \exp\left(-\frac{(J_n - J_{n-1})^2}{2\kappa^2}\right), \end{aligned} \quad (7)$$

$$P(y_n | \vec{x}_n) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\rho^2}} \exp\left(-\frac{1}{2\rho^2} \left(y_n - S_b[D]_T - \frac{(S_f - S_b)[D]_T}{C_n + 1}\right)^2\right). \quad (8)$$

尤度関数 $P(y_n | \vec{x}_n)$ の最尤推定量は, 後に示す較正式(22)で得られる結果と一致する. 式(5)の単純マルコフ性とベイズの定理より, 状態ベクトル \vec{x}_n に関する事後確率密度関数が得られる.

$$\begin{aligned} P(\vec{x}_n, \dots, \vec{x}_0 | Y_n) &= \frac{1}{Z_n} \prod_{k=0}^{n-1} P(\vec{x}_{k+1} | \vec{x}_k) P(\vec{x}_0) \prod_{l=0}^n P(y_l | \vec{x}_l), \\ Z_n &= \int \prod_{j=0}^n d\vec{x}_j \prod_{k=0}^{n-1} P(\vec{x}_{k+1} | \vec{x}_k) P(\vec{x}_0) \prod_{l=0}^n P(y_l | \vec{x}_l), \end{aligned} \quad (9)$$

ただし, $P(\vec{x}_0)$ は時刻0の状態に関する初期密度関数であり, Y_n は観測データの集合 $\{y_0, \dots, y_n\}$ と定義する. また, Z_n は正規化項である.

本研究では周辺事後確率最大化(Maximizer of Posterior Marginal: MPM)より, 状態ベクトル \vec{x}_n の推定を行う. そのために, 以下の再帰的な更新則を用いて事後確率密度関数(9)を周辺化する⁷⁾.

$$[1 \text{ 期先予測}]: \quad P(\vec{x}_n | Y_{n-1}) = \int d\vec{x}_{n-1} P(\vec{x}_n | \vec{x}_{n-1}) P(\vec{x}_{n-1} | Y_{n-1}), \quad (10)$$

$$[\text{フィルタリング}]: \quad P(\vec{x}_n | Y_n) = \frac{P(y_n | \vec{x}_n) P(\vec{x}_n | Y_{n-1})}{P(y_n | Y_{n-1})}, \quad (11)$$

$$P(y_n | Y_{n-1}) = \int d\vec{x}_n P(y_n | \vec{x}_n) P(\vec{x}_n | Y_{n-1}),$$

ここで, $P(\vec{x}_n | Y_{n-1})$ は予測分布, $P(\vec{x}_n | Y_n)$ はフィルタ分布と呼ばれ, フィルタ分布が所望の周辺事後確率に対応する. フィルタ分布 $P(\vec{x}_n | Y_n)$ を最大とする \vec{x}_n の各成分が, 濃度と流量の推定値 \hat{C}_n, \hat{J}_n である.

2.4 粒子フィルタ

観測モデル(6)は非線形であるので, 1期先予測(10)とフィルタリング(11)はカルマンフィルタの形式でアルゴリズムを構成できない. 今回我々は, 粒子フィルタの数値計算手法を用いて, これらの更新則を実行する^{4),8)}.

粒子フィルタは, 予測分布とフィルタ分布を実現値の集合で表現するものである,

$$\{\vec{p}_n^{(1)}, \dots, \vec{p}_n^{(N)}\} \sim P(\vec{x}_n | Y_{n-1}), \quad (12)$$

$$\{\vec{f}_n^{(1)}, \dots, \vec{f}_n^{(N)}\} \sim P(\vec{x}_n | Y_n). \quad (13)$$

ここでは、慣例に従い実現値を粒子と呼ぶ。予測分布とフィルタ分布をそれぞれ N 個の粒子で構成する。 $\vec{p}_n^{(j)}$ は時刻 n の予測分布を表現する j 番目の粒子、 $\vec{f}_n^{(j)}$ は時刻 n のフィルタ分布を表現する j 番目の粒子である。

1 期先予測では、1 期前のフィルタリングで生成した粒子を $\vec{f}_{n-1}^{(j)}$ とし、システムノイズ \vec{s}_n の実現値 $\vec{s}_n^{(j)}$ を正規分布より生成して、次のように予測分布を表現する粒子 $\vec{p}_n^{(j)}$ を計算する、

$$\vec{p}_n^{(j)} = F(\vec{f}_{n-1}^{(j)}, \vec{s}_n^{(j)}), \quad (14)$$

ただし、 $j = 1, \dots, N$ である。

フィルタリングでは、1 期先予測で生成した粒子 $\vec{p}_n^{(j)}$ を復元抽出（リサンプリング）する。まず、以下の式により、粒子 $\vec{p}_n^{(j)}$ に対応する尤度 $\alpha_n^{(j)}$ を計算する。

$$\alpha_n^{(j)} = p(y_n | \vec{p}_n^{(j)}). \quad (15)$$

そして、フィルタ分布を構成する粒子 $\vec{f}_n^{(j)}$ ($j = 1, \dots, N$) を、粒子の集合 $\{\vec{p}_n^{(1)}, \dots, \vec{p}_n^{(N)}\}$ から、以下の確率分布に従いリサンプリングすることにより求める。

$$\left\{ \frac{\alpha_n^{(1)}}{\sum_{j=1}^N \alpha_n^{(j)}}, \frac{\alpha_n^{(2)}}{\sum_{j=1}^N \alpha_n^{(j)}}, \dots, \frac{\alpha_n^{(N)}}{\sum_{j=1}^N \alpha_n^{(j)}} \right\}. \quad (16)$$

これらの計算ステップを繰り返すことで、事後確率の周辺化が行われる。

前述のようにフィルタ分布が所望の周辺事後確率に対応する。ここで MPM 推定は、フィルタ分布を近似表現する粒子の集合 (13) の平均値を、状態ベクトル \vec{x}_n の推定値とすることで、近似的に行った⁸⁾。

2.5 パラメータ推定

構築した状態空間モデル (5), (6) において、未知パラメータは以下の 6 つである、

$$\{S_b, S_f, \gamma, \sigma^2, \rho^2, \kappa^2\}. \quad (17)$$

ρ は観測モデルのノイズ強度である。 Ca^{2+} と色素の反応は準平衡状態を仮定し、確率的な振舞いはしないとした。つまり、観測モデルのノイズは蛍光検出過程 (4) にだけ由来する。このため ρ は、使用する CCD カメラのノイズ強度を測定することで決めることができる。

また、生体細胞の Ca^{2+} 濃度には恒常性があり、チャネルの活性化などにより Ca^{2+} 濃度が一時的に上昇しても、カルシウム結合タンパク質やカルシウム指示色素、ATPase ポンプの作用により数 sec で静止状態の Ca^{2+} 濃度に落ち着く。一般に静止状態の生体細胞での Ca^{2+} 濃度は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}} \sim 0.1 \mu\text{M}$ といわれており^{6),10)}、この静止状態に対応する蛍光強度を y_{rest} とすると、観測モデル (6) から、

$$S_f = y_{\text{rest}}(C_{\text{rest}} + 1)/[D]_{\text{T}} - S_b C_{\text{rest}}, \quad (18)$$

という関係式が得られる。ここで、 $C_{\text{rest}} = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}}/K_d$ である。よって、 S_f を S_b より決定することができる。よって、推定すべきパラメータは、以下の 4 つである。

$$\theta = \{S_b, \gamma, \sigma^2, \kappa^2\}. \quad (19)$$

粒子フィルタの枠組みでは、フィルタリングのステップで計算した尤度 $\alpha_n^{(j)}$ を用いて、対数周辺尤度を下式より求めることができる⁸⁾。

$$l(\theta) = \sum_{n=1}^T \ln \left(\sum_{j=1}^N \alpha_n^{(j)} \right) - T \ln N, \quad (20)$$

ただし時系列の時刻は T までとした。この対数周辺尤度を最大とするパラメータを、適当な探索範囲と格子幅を設定したグリッドサーチで探索し、パラメータ θ の推定値とする。

3. 実験

提案手法の有効性を検証するため数値実験を行った。単純な関数で Ca^{2+} 流量の時系列を与え、式 (2), (3), (4) を用いて人工的に蛍光信号 y_n ($n = 1, \dots, T$) を生成し、既知の $[\text{Ca}^{2+}]$ と Ca^{2+} 流量を提案手法で推定できるかを検証した。ここで、以下の数値計算での時間刻み幅を $\Delta = 0.1$ (sec) (付録参照) とし、データ数を $T = 200$ 、すなわち、20 sec 間の時系列を用いた。また、粒子フィルタの粒子数を $N = 2000$ とした。

なお数値実験には科学技術計算ソフトウェア MATLAB を用いた。

4. 結果

4.1 実験 1

実験 1 では、モデルパラメータが既知の場合の提案手法の性能を評価した。データ生成の際用いたパラメータと同じ値を推定アルゴリズムに与えて、 $[\text{Ca}^{2+}]$ と Ca^{2+} 流量の推定を行った。この実験では、 Ca^{2+} 流量が α 関数と階段関数の 2 通りの場合で、人工データを生成した。ここで α 関数は次式で定義され、イオンチャネルの活性化にともなうイオン電流

表 1 数値実験で用いたパラメータ値

Table 1 Parameter values used in numerical experiments.

	Parameter	Value	Unit
Dissociation constant	K_d	5.0	μM
Total dye concentration	$[D]_T$	0.5	μM
Resting state $[\text{Ca}^{2+}]$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}}$	0.1	μM
Noise intensity of detection process	ρ	0.1	-
Ca^{2+} bound dye fluorescence per concentration	S_b	10.0	-
Inverse of time constant in Ca^{2+} dynamics	$\tilde{\gamma}$	0.5	s^{-1}
Noise intensity of Ca^{2+} dynamics	$\tilde{\sigma}$	0.3	-

の時間変化を記述するモデルとして知られている³⁾,

$$\text{Alpha function} = A \cdot \frac{t}{\tau} \exp\left(1 - \frac{t}{\tau}\right), \quad (21)$$

A は振幅 ($\mu\text{M}/\text{sec}$), t は時間 (sec), τ は減衰時定数 (sec) である.

データ生成時に用いた各パラメータ値を表 1 に示す. 表中の $\tilde{\gamma}$, $\tilde{\sigma}$ と γ , σ の関係を付録に示す. ただし, 式 (1) のトレンドモデルのノイズ強度 κ は, Ca^{2+} 流量の時間変化の滑らかさを表すハイパーパラメータであり, α 関数や階段関数から κ を直接算出するのは困難である. よって, 例として $\kappa = 0.01$ とした.

推定結果を図 2 に示す. 図 2 A と B の両方で Ca^{2+} 濃度は推定できているが, Ca^{2+} 流量の推定値は, α 関数と階段関数の急激な変化に追従できていない. これは, 本研究で用いたトレンドモデルが不連続な変化を表現できないためである. その他の緩やかな変化に Ca^{2+} 流量の推定値は追従できている.

4.2 実験 2

実験 2 は, モデルパラメータが未知の場合の提案手法の性能を評価する. まず, モデルパラメータの推定を行い, 推定したパラメータを用いて Ca^{2+} 濃度と Ca^{2+} 流量を推定した. 以下の実験では, 図 2 A と同じ人工データ (α 関数の流入) を与えた.

ここでは, $\theta = \{S_b, \gamma, \sigma, \kappa\}$ の 4 次元のグリッドサーチを行い, 対数周辺尤度 (19) が最大となるパラメータを求めた. その際, 各パラメータを真の値を中心とした区間でそれぞれ 10 等分して, 全部で 10^4 通りのパラメータ値の組み合わせで対数周辺尤度を評価した^{*1}.

*1 S_b は [6, 15] の範囲を 10 分割, γ は [0.1, 1] の範囲で 10 分割, σ は [0.1, 0.55] の範囲で 10 分割, κ は [0.002, 0.02] の範囲で 10 分割した.

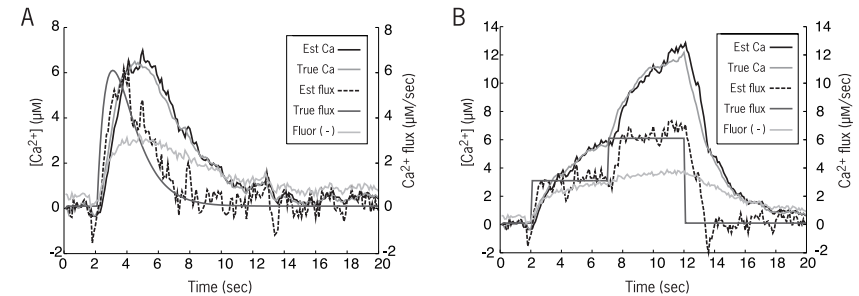


図 2 パラメータが既知の場合の実験結果. A : Ca^{2+} 流量が α 関数の場合 (式 (21) : $A=6$ ($\mu\text{M}/\text{sec}$), $\tau = 1$ (sec)). B : 階段関数の場合 ($2 \leq t < 7$) : 3 ($\mu\text{M}/\text{sec}$), ($7 \leq t < 12$) : 6 ($\mu\text{M}/\text{sec}$), otherwise : 0 ($\mu\text{M}/\text{sec}$). 各図, 横軸が時間 (sec), 左側の縦軸が Ca^{2+} 濃度 (μM), 右側の縦軸が Ca^{2+} 流量 ($\mu\text{M}/\text{sec}$) である. 各曲線は, True flux が真の Ca^{2+} 流量, Est flux が推定した Ca^{2+} 流量, True Ca が真の Ca^{2+} 濃度, Est Ca が推定した Ca^{2+} 濃度, Fluor が人工的に生成した蛍光強度である.

Fig. 2 Experimental result when all parameters are known. A : The case of the alpha function (Eq. (21) : $A=6$ ($\mu\text{M}/\text{sec}$), $\tau = 1$ (sec)). B : The case of the step function ($2 \leq t < 7$) : 3 ($\mu\text{M}/\text{sec}$), ($7 \leq t < 12$) : 6 ($\mu\text{M}/\text{sec}$), otherwise : 0 ($\mu\text{M}/\text{sec}$). In both figures, the horizontal axes denote time (sec), the left vertical axes show Ca^{2+} concentration (μM), and the right vertical axes denote Ca^{2+} flux ($\mu\text{M}/\text{sec}$). In these lines, Est Ca means MPM estimation values of $[\text{Ca}^{2+}]$, True Ca shows true values of $[\text{Ca}^{2+}]$, Est flux denotes MPM estimation values of Ca^{2+} flux, True flux means true values of Ca^{2+} flux, and Fluor denotes artificial fluorescence signal utilized in this numerical experiment.

その結果, 対数周辺尤度を最大にするパラメータ $\hat{\theta}$ は $\hat{\theta} = \{11, 0.8, 0.15, 0.008\}$ になった. 図 3 A はハイパーパラメータ κ を変化させた場合の対数周辺尤度の最大値をプロットしたものである. 対数周辺尤度は κ に対して単峰であり, $\kappa = 0.008$ のとき最も大きくなる. この推定パラメータを用いて, パラメータ推定で用いたのと同じ時系列データ y_n に対し, $[\text{Ca}^{2+}]$ と Ca^{2+} 流量の推定を行った. 推定結果を図 3 B に示す. S_b の推定値が真の値に比べ 1 大きくなったため, Ca^{2+} 濃度の推定値が全体的に真の Ca^{2+} 濃度より小さくなった. 一方, Ca^{2+} 流量の推定値の高さは真の値に近く, 時間変化の傾向を再現できている. しかし, 図 2 A と比べ推定値の時間変化は緩やかである.

4.3 実験 3

次に従来手法と比較する数値実験を行った.

Gryniewicz らにより提案された較正式 (Calibration equation) は以下の式である⁵⁾,

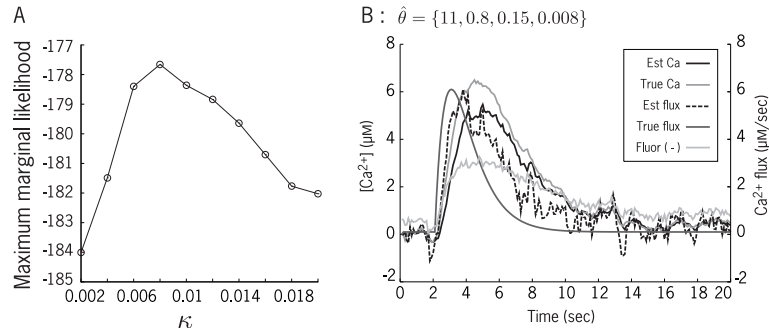


図 3 A : ハイパーパラメータ κ に対する対数周辺尤度の最大値の変化 . 横軸は κ , 縦軸は対数周辺尤度の最大値 . $\kappa = 0.008$ で最大となる . そのときの各パラメータの推定値は $\hat{\theta} = \{11, 0.8, 0.15, 0.008\}$ となった . B : 推定パラメータ $\hat{\theta}$ を用いた Ca^{2+} 濃度と Ca^{2+} 流量の推定結果 . 軸と各曲線の意味は図 2 と同じ
 Fig.3 A : Model parameters estimation. Values of the log marginal likelihood as a function of hyper-parameter κ . The log marginal likelihood is maximized at $\kappa = 0.008$, and estimated parameters become $\hat{\theta} = \{11, 0.8, 0.15, 0.008\}$. B : MPM estimation values of $[Ca^{2+}]$ and Ca^{2+} flux with estimated parameters $\hat{\theta} = \{11, 0.8, 0.15, 0.008\}$. Each axis and line of this figure corresponds to those of Fig.2B.

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{y_n - F_{\min}}{F_{\max} - y_n}, \quad (22)$$

ここで, y_n は上記と同じ蛍光強度, F_{\max} は色素に Ca^{2+} が完全に結合したときの蛍光強度, F_{\min} は完全に遊離したときの蛍光強度である . 式 (8) の尤度関数から得られる最尤推定量は, この較正式で得られる結果と一致する . 較正式と尤度関数の各変数が対応しており, $F_{\min} = S_f[D]_T, F_{\max} = S_b[D]_T$ となっている .

この較正式と提案手法で同じパラメータを設定して, Ca^{2+} 濃度推定を行い, 両手法の比較をする . ここでは, $\rho = 0.1, \sigma = 0.1$ として, その他のパラメータは表 1 に示す値を用いた . また, 本実験は両手法の精度の比較が目的であるので, 実験 1 と同様に真のパラメータを両推定器に与える .

推定結果を図 4 に示す . 式 (22) の較正式を用いて, 飽和した蛍光信号を拡大して元の Ca^{2+} 濃度に復元する際, 信号に重畳したノイズも較正式で拡大されてしまう . よって, 図 4 に示すように, 推定値は拡大されたノイズの影響により頂点付近で揺らぎが大きくなっていく . これに対して, 提案手法の推定値は, 頂点付近でも揺らぎが少ない .

定量的に両者の性能を比較するため, 平均二乗誤差 ($1/N \cdot \sum_{n=0}^{N-1} (\hat{x}_n - x_n)^2$, \hat{x}_n : 推

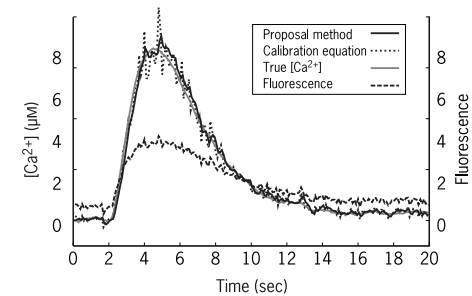


図 4 提案手法と従来手法の比較 . 横軸が時間 (sec) で左の縦軸が Ca^{2+} 濃度 ($\mu M/sec$), 右の縦軸は蛍光強度を示す . 実線が提案手法の推定結果 (Proposal method), 点線が従来手法の結果 (Calibration equation), 灰色の線が真の Ca^{2+} 濃度 (True $[Ca^{2+}]$), 破線が蛍光強度である (Fluorescence)
 Fig.4 Comparison of the proposed method and the conventional calibration method. The horizontal axis denotes time (sec), the left vertical axis shows Ca^{2+} concentration (μM), and the right vertical axis denotes fluorescence intensity. The solid line (Proposal method) shows MPM estimation values, the dotted line (Calibration equation) denotes estimation values calculated by the calibration equation (22), the gray line (True $[Ca^{2+}]$) shows true values of $[Ca^{2+}]$, and the dashed line (Fluorescence) shows artificial fluorescence signal utilized in this numerical experiment.

表 2 平均二乗誤差
 Table 2 Mean square error.

Proposal method	Calibration equation
0.0703	0.0850

定値, x_n : 真の値) で比較したものが表 2 である . ここで使用した条件では, 提案手法は従来手法と比べて 17.3% 推定精度が高い結果が得られた .

5. む す び

我々は, カルシウムイメージングの蛍光強度から, Ca^{2+} 濃度と Ca^{2+} 流量を推定する統計的手法を提案した .

提案手法は, カルシウムイメージングを Ca^{2+} 流量ダイナミクス (1), Ca^{2+} ダイナミクス (2), 色素ダイナミクス (3), 蛍光検出過程 (4) の 4 つの過程でモデル化し, 状態空間モデルを構成した . そして粒子フィルタの計算手法で周辺事後確率を求め, 周辺事後確率最大化により Ca^{2+} 濃度と Ca^{2+} 流量を推定した . そして, 粒子フィルタの計算手法を用いて周辺尤度を計算し, 未知のモデルパラメータの推定も行った .

提案手法では1期先予測とフィルタリングを再帰的に実行し、逐次状態推定を行っている。一般には時系列の全データが利用可能である場合、平滑化により全データを用いた状態推定が実行でき、推定精度の向上が望める⁷⁾。粒子フィルタの平滑化には復元抽出による粒子の縮退などの問題をはらむため⁸⁾、今回は行わなかったが、今後、それらの問題を回避して平滑化を実装し、推定精度を向上させたい。

我々は数値実験により、 Ca^{2+} 濃度だけでなく Ca^{2+} 流量の推定も可能であることを示した。 Ca^{2+} 流入経路は、細胞膜における電位依存性 Ca^{2+} チャネル、小胞体膜上の IP_3 受容体などを通しての受動的な流入、ATPを消費するATPaseポンプを通しての能動的な排出、そして細胞質内空間での拡散などが考えられる。これらの中の特定の経路に着目した生理実験と本手法を組み合わせるにより、注目している分子機構のダイナミクスの理解が促進されることが期待される。

観測モデル(6)の S_b と S_f は、較正式(22)における基準蛍光強度 F_{max} と F_{min} に対応している。従来法はこれらの基準蛍光強度を決めるため、追加的な実験が必要であった。これに対して本提案手法は、静止状態の濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_{rest} \sim 0.1 \mu\text{M}$ の仮定から求めた式(18)の S_b と S_f の拘束条件の下、蛍光信号のみから S_b と S_f が統計的に推定できる。多くのイメージング研究では、実験の制約上、蛍光強度の相対的变化に着目し、 Ca^{2+} 濃度に関する定性的議論を行ってきた^{14),22)}。本提案手法を用いることにより、定量的な議論が可能となる。

従来法では較正式(22)を用いて飽和した蛍光信号を拡大し、元の Ca^{2+} 濃度に復元する際、信号に重畳したノイズも較正式で拡大されてしまう(図4)。よって、較正式で求めた推定値は、ノイズの影響で濃度が高くなるにつれて揺らぎが大きくなる。これに対して、本提案手法では、飽和領域付近の推定値でも揺らぎが少ない。ここで、尤度関数 $P(y_n|\vec{x}_n)$ から得られる最尤推定量は較正式で得られる結果と一致するので、提案手法は従来手法をベイズ的に拡張したものといえる。提案手法の推定値の揺らぎが少ない理由は、事前確率に対応するシステムモデルがデータを平滑化したためである。

推定値と真値の間のズレの主な原因として、本研究で用いたトレンドモデルが急激な変化を表現できないことがあげられる。この問題の解決策としては、システムノイズ \vec{s}_n (5)にコーシー分布など裾の厚い分布を用いることや、ラインプロセスを状態空間モデルに組み込むことが考えられる。

本論文では数値実験により提案手法の有効性を検証してきた。今後は、生理実験データに提案手法を適用し、有効性の検証を行う予定である。

参考文献

- 1) Aponte, Y., Bischofberger, J. and Jonas, P.: Efficient Ca^{2+} buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus, *J. Physiol.*, Vol.586, pp.2061–2075 (2008).
- 2) Augustine, G.J. and Neher, E.: Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells, *J. Physiol.*, Vol.450, pp.247–271 (1992).
- 3) Dayan, P. and Abbott, P.: *Theoretical Neuroscience*, MIT Press, Cambridge (2001).
- 4) Doucet, A., Feitas, N.D. and Gordon, N.: *Sequential Monte Carlo methods in practice*, Springer, New York (2001).
- 5) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Bio. Chem.*, Vol.260, pp.3440–3450 (1985).
- 6) Hille, B.: *Ion channels of excitable membranes, 3rd edition*, Sinauer Associates, Sunderland (2001).
- 7) Kitagawa, G.: Non-gaussian state-space modeling of nonstationary time series, *J. American Statistical Association*, Vol.82, pp.1032–1041 (1987).
- 8) Kitagawa, G.: Monte carlo filter and smoother for non-gaussian nonlinear state space models, *J. Comput. Graph. Statist.*, Vol.5, pp.1–25 (1996).
- 9) Koch, C. and Segev, I.: *Methods in neuronal modeling, 2nd edition*, MIT press, Cambridge (1998).
- 10) Lev-Ram, V., Miyakawa, H., Lasser-Ross, N. and Ross, W.N.: Calcium transients in cerebellar purkinje neurons evoked by intracellular stimulation, *J. Neurophysiol.*, Vol.68, pp.1167–1177 (1992).
- 11) Major, G., Polsky, A., Denk, W., Schiller, J. and Tank, D.W.: Spatiotemporally graded NMDA spike/plateau potentials in basal dendrites of neocortical pyramidal Neurons, *J. Neurophysiol.*, Vol.99, pp.2584–2601 (2008).
- 12) Milojkovic, B.A., Zhou, W.L. and Antic, S.D.: Voltage and calcium transients in basal dendrites of the rat prefrontal cortex, *J. Physiol.*, Vol.585, pp.447–468 (2007).
- 13) 中村 健: 神経細胞内局所的カルシウム濃度変化のリアルタイムイメージング法, 日薬理誌, Vol.121, pp.357–364 (2003).
- 14) Nakamura, T., Lasser-Ross, N., Nakamura, K. and Ross, W.N.: Spatial segregation and interaction of calcium signalling mechanisms in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons, *J. Physiol.*, Vol.543, pp.465–480 (2005).
- 15) Neher, E. and Augustine, G.J.: Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells, *J. Physiol.*, Vol.450, pp.273–301 (1992).
- 16) Schiller, J., Helmchen, F. and Sakmann, B.: Spatial profile of dendritic calcium transients evoked by action potentials in rat neocortical pyramidal neurones, *J.*

Physiol., Vol.487, pp.583–600 (1995).

- 17) Stuart, G., Spruston, N. and Häusser, M.: *Dendrites, 2nd edition*, Oxford university press, Oxford (2008).
- 18) Takahashi, T., Camacho, P., Lechleiter, J.D. and Herman, B.: Measurement of Intracellular Calcium, *Physiol. Rev.*, Vol.79, pp.1089–1125 (1999).
- 19) Thomas, D., Tovey, S., Collins, T.J., Bootman, M.D. and Berridge, M.J. and Lipp, P.: A comparison of fluorescent Ca^{2+} indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca^{2+} signals, *Cell Calcium*, Vol.28, pp.213–223 (2000).
- 20) Tsien, R.Y.: Fluorescent probes of cell signalling, *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol.12, pp.227–253 (1989).
- 21) Vogelstein, J.T., Watson, B.O., Packer, A.M., Yuste, R., Jerny, B. and Paninski, L.: Spike inference from calcium imaging using sequential Monte Carlo methods, *Biophysical J.*, Vol.97, pp.636–655 (2009).
- 22) Watanabe, S., Hong, M., Lasser-Ross, N. and Ross, W.N.: Modulation of calcium wave propagation in the dendrites and to the soma of rat hippocampal pyramidal neurons, *J. Physiol.*, Vol.575, pp.455–468 (2006).

付 録

A.1 Ca^{2+} ダイナミクス

Ca^{2+} とカルシウム結合タンパク質の化学反応は可逆な二次反応である。カルシウム結合タンパク質が Ca^{2+} に比べて十分に多いと仮定し、1点 (ROI) に着目した遊離 Ca^{2+} 濃度の時間変化を1次遅れ系でモデル化する、

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]}{dt} = -\tilde{\gamma}[\text{Ca}^{2+}] + \tilde{J}(t) + \tilde{\sigma}v(t), \quad (23)$$

ただし $[\text{Ca}^{2+}]$ は Ca^{2+} 濃度 (μM)、 $\tilde{\gamma}$ は時定数の逆数 (sec^{-1})、 $\tilde{J}(t)$ は Ca^{2+} 流量 ($\mu\text{M}/\text{sec}$)、 $v(t)$ は $\langle v(t) \rangle = 0$ 、 $\langle v(t)v(t') \rangle = \delta(t-t')$ を満たす白色ガウスノイズ、 $\tilde{\sigma}$ はノイズ強度である。

ランジュバン方程式 (22) を離散時間 Δn で離散化し、 Ca^{2+} 指示色素の解離定数 K_d でスケール変化する、

$$\frac{1}{K_d} [\text{Ca}^{2+}](\Delta(n+1)) = \frac{(1-\Delta\tilde{\gamma})}{K_d} [\text{Ca}^{2+}](\Delta n) + \frac{\Delta}{K_d} \tilde{J}(\Delta n) + \frac{\sqrt{\Delta}}{K_d} \tilde{\sigma}v_n, \quad (24)$$

ただし Δ は離散時間のステップサイズ (sec) である。

ここで、スケール変換した変数とパラメータを $C_n = [\text{Ca}^{2+}](\Delta n)/K_d$ 、 $\gamma = (1-\Delta\tilde{\gamma})$ 、 $J_n = \Delta\tilde{J}(\Delta n)/K_d$ 、 $\sigma^2 = \Delta(\tilde{\sigma}/K_d)^2$ と定義すると、

$$C_{n+1} = \gamma C_n + J_n + \sigma v_n, \quad (25)$$

が得られる。

A.2 色素ダイナミクス

Ca^{2+} 指示色素と Ca^{2+} は二次反応を示し化学反応式は、



となる。ただし、D は Ca^{2+} 指示色素、 α と β はそれぞれ正反応と逆反応の反応速度定数である。

ここで、全色素濃度を $[\text{D}]_T$ 、遊離色素濃度を $[\text{D}]$ 、 Ca^{2+} と結合した色素濃度を $[\text{DCa}^{2+}]$ (それぞれ μM) で表すと、次式が成り立つ、

$$[\text{D}]_T = [\text{D}] + [\text{DCa}^{2+}], \quad (27)$$

二次反応の濃度ダイナミクスは、

$$\frac{d[\text{D}]}{dt} = -\alpha[\text{D}][\text{Ca}^{2+}] + \beta([\text{D}]_T - [\text{D}]). \quad (28)$$

となり、化学平衡を考えると $[\text{D}]$ と $[\text{Ca}^{2+}]$ の非線形な関係式が得られる、

$$[\text{D}] = \frac{[\text{D}]_T}{[\text{Ca}^{2+}]/K_d + 1}, \quad K_d = \frac{\beta}{\alpha}, \quad (29)$$

ただし K_d は色素の解離定数 (μM) である。 $[\text{Ca}^{2+}]/K_d$ を C_n と書き換えると、式 (3) になる。

(平成 21 年 11 月 19 日受付)

(平成 22 年 1 月 4 日再受付)

(平成 22 年 1 月 12 日採録)



角田 敬正

2007年東京農工大学工学部電気電子工学科卒業、2009年東京工業大学大学院総合理工学研究科修士課程修了、現在、同博士課程在学中。理論神経科学、時系列解析の研究に従事。2009年日本神経回路学会奨励賞受賞。日本神経科学会、日本神経回路学会各会員。



大森 敏明 (正会員)

1999年筑波大学第一学群自然科学類物理卒業, 2003年日本学術振興会特別研究員(DC), 2004年東北大学大学院情報科学研究科博士課程修了, 2004年科学技術振興機構研究員, 2006年日本学術振興会特別研究員(PD), 2007年アリゾナ大学博士研究員, 2008年東京大学大学院新領域創成科学研究科特任助教, 同年10月同助教. 博士(情報科学). 理論神経科学, 数理生理学, 生物物理学, 神経回路網理論の研究に従事. 電子情報通信学会, 日本神経回路学会, 計測自動制御学会, Society for Neuroscience, 日本神経科学会, 日本物理学会各会員.



宮川 博義

1974年東北大学理学部化学科卒業, 1975~1979年東北大学大学院理学研究科化学第二専攻在籍, 1983年東北大学大学院医学研究科生理学専攻博士課程修了, 1983年山形大学医学部生理学第二講座助手, 1987年8月New York Medical College・Post Doctoral Fellow, 1990年2月山形大学医学部生理学第二講座助手, 1993年10月山形大学医学部生理学第二講座助教授, 1994年東京薬科大学生命科学部生体高次機能学助教授, 2005年東京薬科大学生命科学部脳神経機能学教授. 医学博士. 神経科学の研究に従事. 日本神経科学会, 日本生物物理学会, Society for Neuroscience, 日本神経回路学会, 日本生理学会各会員, Marine Biological Laboratory・corporation member.



岡田 真人

1985年大阪市立大学理学部物理学科卒業, 1987年大阪大学大学院理学研究科博士前期課程修了, 同年三菱電機(株)入社, 1991年大阪大学基礎工学部生物工学科助手, 1996年科学技術振興財団川人学習動態脳プロジェクト研究員, 2001年理化学研究所脳科学総合研究センター脳数理研究チーム副チームリーダー, 2004年東京大学大学院新領域創成科学研究科教授. 博士(理学). 物性物理, 統計力学, 半導体, 神経回路モデル, 計算論的神経科学, 統計的学習理論, 画像処理, 通信工学, 情報理論の研究・開発に従事. 1993, 1995年神経回路学会研究賞, 1997年度(社)計測自動制御学会生体・生理工学部会研究奨励賞, 第17回AVIRG(視聴覚情報研究)賞受賞. 計測自動制御学会, 日本神経回路学会, Society for Neuroscience, 日本神経科学会, 日本物理学会各会員.



青西 亨

1993年九州工業大学情報工学部制御工学科卒業, 1995年日本学術振興会特別研究員(DC), 1998年大阪大学大学院基礎工学研究科博士課程修了, 1998年日本学術振興会特別研究員(PD), 1998年理化学研究所脳科学総合研究センター研究員, 2004年東京工業大学大学院総合理工学研究科講師, 2008年同准教授. 博士(工学). 非平衡統計力学, 非線型動力学, 生物物理学, 計算論的神経科学の研究に従事. 1994年ICONIP'94 Best Student Award, 1995年日本神経回路学会奨励賞, 1996年電子情報通信学会論文賞, 1998年日本神経回路学会研究賞受賞. 電子情報通信学会, 日本神経回路学会, Society for Neuroscience, 日本神経科学会, 日本物理学会各会員.