

## 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<sup>†1</sup> 大森 敏明<sup>†2,†4</sup> 宮川 博義<sup>†3</sup>  
岡田 真人<sup>†2,†4</sup> 青西 亨<sup>†1,†4</sup>

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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を定量化する場合、較正の手続きが必要となる。もう一つは、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  $\text{Ca}^{2+}$  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 Ion Concentration

TAKAMASA TSUNODA,<sup>†1</sup> TOSHIKI OMORI,<sup>†2,†4</sup>  
HIROYOSHI MIYAKAWA,<sup>†3</sup> MASATO OKADA<sup>†2,†4</sup>  
and TORU AONISHI<sup>†1,†4</sup>

Calcium imaging method has two major problems. First, we need to calibrate the observation data to quantify the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, because the observation data are the fluorescent signals of  $\text{Ca}^{2+}$  indicator dyes that are only indirect information about the  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and  $\text{Ca}^{2+}$  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。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気的活動を計測する手法として盛んに用いられている<sup>8),12),13)</sup>。

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) カメラ等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である。Grynkiwiczら(1985)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(17))を導出した<sup>2)</sup>。以後の多くの研究で、この較正式が利用されてきた<sup>1),9),10)</sup>。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<sup>7),11)</sup>。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量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

---

†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

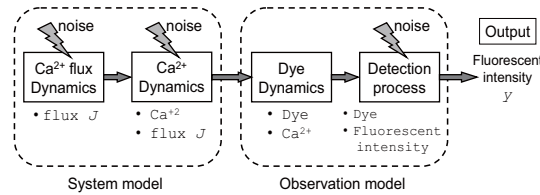


図1 カルシウムイメージングのモデル.  
 Fig.1 Model of Calcium imaging.

対応するものである。

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。ベイズの定理から得られる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入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でしめす4つの過程でモデル化する。

- (1)  $\text{Ca}^{2+}$  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)  $\text{Ca}^{2+}$  ダイナミクス— カルシウム流入が起こり、細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  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—  $\text{Ca}^{2+}$  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。
- (4) 蛍光検出過程— 励起光の照射により  $\text{Ca}^{2+}$  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値モデルを示す<sup>6)</sup>。

$\text{Ca}^{2+}$  流量ダイナミクス: 神経細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル、小胞体膜上の  $\text{IP}_3$  受容体等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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  指示色素の解離定数  $K_d$  でスケールした  $\text{Ca}^{2+}$  流量の総和である。 $u_n$  は  $\langle u_n \rangle = 0$ ,  $\langle u_n u_{n'} \rangle = \delta_{nn'}$  を満足する白色ガウスノイズで、 $\kappa$  はノイズ強度を表わす。添え字 “ $n$ ” は離散時刻  $n$  を表す。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<sup>4)</sup>。

$\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  指示色素の解離定数  $K_d$  でスケール変換したもので、 $\gamma$  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、 $\sigma$  はノイズ強度を表わす。

色素ダイナミクス: 遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{Ca}^{2+}$  指示色素と、カルシウム結合タンパク質と同様の二次反応を示す。 $\text{Ca}^{2+}$  と色素の反応は、 $\text{Ca}^{2+}$  とカルシウム結合タンパク質との反応に比べ十分に速く、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  $\text{Ca}^{2+}$  から遊離した色素の濃度、 $[D]_T$  は全色素濃度である。

蛍光検出過程:  $\text{Ca}^{2+}$  指示色素は特定波長の励起光照射によって蛍光を発生するが、 $\text{Ca}^{2+}$  が結合した時と遊離した時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したがい、観測される蛍光強度  $y_n$  は  $\text{Ca}^{2+}$  結合色素濃度に比例した蛍光と  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  遊離色素の単位濃度当たりの蛍光強度,  $S_b$  は  $\text{Ca}^{2+}$  結合色素の単位濃度当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,  $\rho$  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,

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

$$\text{[観測モデル]: } y_n = (S_f - S_b) \frac{[D]_T}{C_n + 1} + S_b [D]_T + \rho w_n, \quad (6)$$

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わす線形写像である.

## 2.3 1期先予測とフィルタリング

本研究では事後確率最大化 (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周辺事後確率を求め<sup>4)</sup>,

$$\text{[1期先予測]: } P(\vec{x}_n | Y_{n-1}) = \int d\vec{x}_{n-1} P(\vec{x}_n | \vec{x}_{n-1}) P(\vec{x}_{n-1} | Y_{n-1}), \quad (7)$$

$$\text{[フィルタリング]: } P(\vec{x}_n | Y_n) = \frac{P(y_n | \vec{x}_n) P(\vec{x}_n | Y_{n-1})}{\int d\vec{x}_n P(y_n | \vec{x}_n) P(\vec{x}_n | Y_{n-1})}, \quad (8)$$

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る. 上式の  $P(\vec{x}_n | \vec{x}_{n-1})$ ,  $P(y_n | \vec{x}_n)$  は, 状態空間モデル (5)(6) より得られる遷移確率密度関数と尤度関数である. フィルタ分布  $P(\vec{x}_n | Y_n)$  が所望の周辺事後確率に対応し, フィルタ分布を最大とする  $\vec{x}_n$  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 (7) とフィルタリング (8) 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<sup>5)</sup>.

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,

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	$\mu\text{M}$
Total dye concentration	$[D]_T$	0.5	$\mu\text{M}$
Resting state $[\text{Ca}^{2+}]$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}}$	0.1	$\mu\text{M}$
Noise intensity of detection process	$\rho$	0.1	-
$\text{Ca}^{2+}$ bound dye fluorescence per concentration	$S_b$	10.0	-
Inverse of time constant in $\text{Ca}^{2+}$ dynamics	$\tilde{\gamma}$	0.5	$\text{sec}^{-1}$
Noise intensity of $\text{Ca}^{2+}$ dynamics	$\tilde{\sigma}$	0.3	-

$$\{\vec{p}_n^{(1)}, \dots, \vec{p}_n^{(N)}\} \sim P(\vec{x}_n | Y_{n-1}), \quad \{\vec{f}_n^{(1)}, \dots, \vec{f}_n^{(N)}\} \sim P(\vec{x}_n | Y_n). \quad (9)$$

ここでは, 慣例にしたが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,  $\vec{f}_n^{(k)}$  は時刻  $n$  のフィルタ分布を表現する  $k$  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,

$$\vec{p}_n^{(j)} = F(\vec{f}_{n-1}^{(j)}, v_n^{(j)}), \quad (10)$$

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,

$$\alpha_n^{(j)} = p(y_n | \vec{p}_n^{(j)}). \quad (11)$$

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,

$$\left\{ \frac{\alpha_n^{(1)}}{\sum_{j=1}^N \alpha_n^{(j)}}, \frac{\alpha_n^{(2)}}{\sum_{j=1}^N \alpha_n^{(j)}}, \dots, \frac{\alpha_n^{(N)}}{\sum_{j=1}^N \alpha_n^{(j)}} \right\}. \quad (12)$$

これらの計算ステップを繰り返す事により, 周辺事後確率を求める.

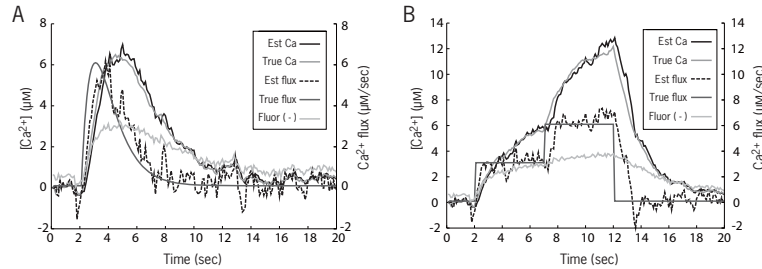


図 2 パラメータが既知の場合の実験結果 . A :  $\text{Ca}^{2+}$  流量が  $\alpha$  関数の場合 . B : 階段関数の場合 . 各図, 横軸が時間 (sec), 左側の縦軸が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $\mu\text{M}$ ), 右側の縦軸が  $\text{Ca}^{2+}$  流量 ( $\mu\text{M}/\text{sec}$ ) である . 各曲線は, True flux が真の  $\text{Ca}^{2+}$  流量, Est flux が推定した  $\text{Ca}^{2+}$  流量, True Ca が真の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度, Est Ca が推定した  $\text{Ca}^{2+}$  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. B : The case of the step function. In both figures, the horizontal axes denote time (sec), the left vertical axes show  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (uM), and the right vertical axes denote  $\text{Ca}^{2+}$  flux (uM/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  $\text{Ca}^{2+}$  flux, True flux means true values of  $\text{Ca}^{2+}$  flux, and Fluor denotes artificial fluorescence signal utilized in this numerical experiment.

## 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,

$$\{S_b, S_f, \gamma, \sigma^2, \rho^2, \kappa^2\}. \quad (13)$$

$\rho$  は観測モデルのノイズ強度であるので, 使用する光学計測機器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, 一般に静止状態の生体細胞での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}} \sim 0.1\mu\text{M}$  といわれており<sup>3),7)</sup>, 静止状態の蛍光強度を  $y_{\text{rest}}$  とすると, 観測モデル (6) から,

$$S_f = y_{\text{rest}}(C_{\text{rest}} + 1)/[D]_T - S_b C_{\text{rest}}, \quad (14)$$

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,

$$\theta = \{S_b, \gamma, \sigma^2, \kappa^2\}. \quad (15)$$

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<sup>5)</sup> .

$$l(\theta) = \sum_{n=1}^T \ln \left( \sum_{j=1}^N \alpha_n^{(j)} \right) - T \ln N, \quad (16)$$

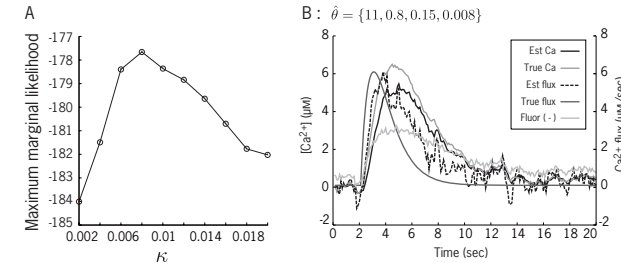


図 3 A : ハイパーパラメータ  $\kappa$  に対する対数周辺尤度の最大値の変化 . 横軸は  $\kappa$ , 縦軸は対数周辺尤度の最大値 .  $\kappa = 0.008$  で最大となる . そのときの各パラメータの推定値は  $\hat{\theta} = \{11, 0.8, 0.15, 0.008\}$  となった . B : 推定パラメータ  $\hat{\theta}$  を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と  $\text{Ca}^{2+}$  流量の推定結果 . 軸と各曲線の意味は図 2 と同じ .

Fig.3 A : Model parameters estimation. Values of the log marginal likelihood as a function of hyper-parameter  $\kappa$ . 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  $[\text{Ca}^{2+}]$  and  $\text{Ca}^{2+}$  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. 2 B.

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探索し, 推定値とする .

## 3. 結 果

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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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) 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 .

### 3.1 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  $\text{Ca}^{2+}$  流量の推定を行った . この実験では,  $\text{Ca}^{2+}$  流量が  $\alpha$  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 . データ生成時に用いた各パラメータ値を表 1 に示す . ただし, 式 (1) のトレンドモデルのノイズ強度  $\kappa$  は,  $\text{Ca}^{2+}$  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,  $\alpha$  関数や階段関数から  $\kappa$  を直接算出できない . よって, 例として  $\kappa = 0.01$  とした .

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

Proposal method	Calibration equation
0.0703	0.0850

推定結果を図 2 に示す。図 2 A と B の両方で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は推定できているが、 $\text{Ca}^{2+}$  流量の推定値は、 $\alpha$  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  $\text{Ca}^{2+}$  流量の推定値は追従できている。

### 3.2 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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と  $\text{Ca}^{2+}$  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 ( $\alpha$  関数の流入) を与えた。

ここでは、 $\theta = \{S_b, \gamma, \sigma, \kappa\}$  の 4 次元の全探索を行い、対数周辺尤度 (16) 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<sup>\*1</sup>。

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  $\kappa$  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  $\kappa$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の推定値が全体的に真の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度より小さくなった。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  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。

### 3.3 実験 3

次に従来手法と比較する数値実験を行った。

Gryniewicz ら (1985) により提案された較正式は以下の式である<sup>2)</sup>、

\*1  $S_b$  は [6, 15] の範囲を 10 分割、 $\gamma$  は [0.1, 1] の範囲で 10 分割、 $\sigma$  は [0.1, 0.55] の範囲で 10 分割、 $\kappa$  は [0.002, 0.02] の範囲で 10 分割した。

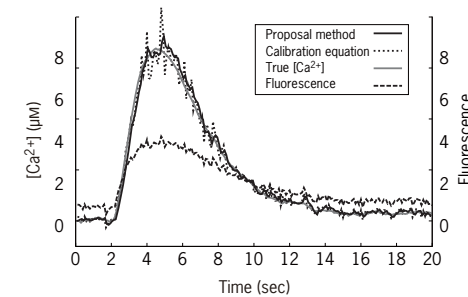


図 4 提案手法と従来手法の比較。横軸が時間 (sec) で左の縦軸が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $\mu\text{M}/\text{sec}$ )、右の縦軸は蛍光強度を示す。実線が提案手法の推定結果 (Proposal method)、点線が従来手法の結果 (Calibration equation)、灰色の線が真の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (True  $[\text{Ca}^{2+}]$ )、破線が蛍光強度である (Fluorescence)。

Fig. 4 Comparison of the proposed method and the conventional calibration method. The horizontal axis denotes time (sec), the left vertical axis shows  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $\mu\text{M}$ ), 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 (21), the gray line (True  $[\text{Ca}^{2+}]$ ) shows true values of  $[\text{Ca}^{2+}]$ , and the dashed line (Fluorescence) shows artificial fluorescence signal utilized in this numerical experiment.

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{y_n - F_{\min}}{F_{\max} - y_n}, \quad (17)$$

ここで、 $y_n$  は上記と同じ蛍光強度、 $F_{\max}$  は色素に  $\text{Ca}^{2+}$  が完全に結合した時の蛍光強度、 $F_{\min}$  は完全に遊離した時の蛍光強度である。尤度関数  $P(y_n | \vec{x}_n)$  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。較正式と尤度分布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、 $\text{Ca}^{2+}$  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 (17) の較正式を用いて、飽和した蛍光信号を拡大して元の  $\text{Ca}^{2+}$  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、ノイズの影響で推定値は頂点付近で揺らぎが大きくなっている。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

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.

#### 4. む す び

我々は, カルシウムイメージングの蛍光強度から,  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と  $\text{Ca}^{2+}$  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図 1 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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と  $\text{Ca}^{2+}$  流量を推定した. また, 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.

我々は数値実験により,  $\text{Ca}^{2+}$  濃度だけでなく  $\text{Ca}^{2+}$  流量の推定も可能であることを示した.  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路は, 細胞膜における電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル, 小胞体膜上の  $\text{IP}_3$  受容体等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ことにより, 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 (17) 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  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}} \sim 0.1\mu\text{M}$  の仮定から求めた式 (14) 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,  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に関する定性的議論を行ってきた. 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 (17) を用いて飽和した蛍光信号を拡大し, 元の  $\text{Ca}^{2+}$  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である. 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挙げられる. この問題の解決策としては, より高次のトレンドモデル

の導入や, 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  $\text{Ca}^{2+}$  buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus, *J Physiol*, Vol.586, pp.2061-2075 (2008).
- 2) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y.: A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Bio Chem*, Vol.260, pp.3440-3450 (1985).
- 3) Hille, B.: *Ion channels of excitable membranes*, Sinauer Associates, Sunderland, 3rd edition (2001).
- 4) Kitagawa, G.: Non-gaussian state-space modeling of nonstationary time series, *J. American Statistical Association*, Vol.82, pp.1032-1041 (1987).
- 5) Kitagawa, G.: Monte carlo filter and smoother for non-gaussian nonlinear state space models, *J Comput. Graph. Statist.*, Vol.5, pp.1-25 (1996).
- 6) Koch, C. and Segev, I.: *Methods in neuronal modeling*, MIT press, Cambridge, 2nd edition (1990).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) Neher, E. and Augustine, G.J.: Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells, *J Physiol*, Vol.450, pp.273-301 (1992).
- 10) 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).
- 11) Thomas, D., Tovey, S., Collins, T.J., Bootman, M.D. and Berridge, M. J.andLipp, P.: A comparison of fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator properties and their use in measuring elementary and global  $\text{Ca}^{2+}$  signals, *Cell Calcium*, Vol.28, pp.213-223 (2000).
- 12) Vogelstein, J.T., Watson, B.O., Packer, A.M., Yuste, R., Jedynak, B. and Paninsk, L.: Spike inference from calcium imaging using sequential Monte Carlo methods, *Biophysical J*, Vol.97, pp.636-655 (2009).
- 13) Watanabe, S., BHong, 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).