

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	状態空間法による神経細胞カルシウム蛍光時系列の解析
Title(English)	Analysis of temporal sequence of Ca[2+] fluorescence by state space method
著者(和文)	角田敬正
Author(English)	Takamasa Tsunoda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第8814号, 授与年月日:2012年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:青西 亨
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第8814号, Conferred date:2012/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

状態空間法による

神経細胞カルシウム蛍光時系列の解析

Analysis of Temporal Sequence of Ca^{2+} Fluorescence

by State Space Method

角田 敬正

Takamasa Tsunoda

2012年 3月

謝辞

大学院の5年間にわたり、研究をご指導して頂いた青西亨先生に深く感謝致します。青西先生からは、大学で電気電子工学を学んだ私に数理的問題に取り組む作法を一から教えて頂きました。そして、研究に対する姿勢、最後まで粘り強く考え抜き、結果を残して行くという研究者として重要な姿勢をご教授して頂きました。心から感謝致します。

指導委託を引き受けて頂いた、東京薬科大学の宮川博義先生に深く感謝致します。先生のカルシウムイメージング黎明期から培われた深い見識とご経験は私の研究を進める上で、大変な助けになりました。生理学実験に関しほとんど無知であった私に、実験や生理学の多くのことを明快に丁寧にご教授下さいました。同時に東京薬科大学の井上雅司先生に深く感謝致します。先生の非常に広範な知識と本質を穿つ理解は、研究上の具体的な問題に的確な助言や示唆を与えて下さいました。

審査をして下さった樺島祥介先生、石井秀明先生、木賀大介先生、山村雅幸先生に感謝いたします。また、理論研究者としての姿勢や自覚を教えて下さいました岡田真人先生、いつも温かい助言や励ましを下さいました大森敏明先生に深く感謝いたします。そして、私の研究で欠くことができない実験を貴重な時間を割いて引き受けて頂き、また研究上の議論や方策の検討にも快く付き合って下さった共同研究者の織田善晃君に深く感謝致します。理論的な問題についてたくさんのお教え下さった竹田晃人先生、研究者としての貴重なご経験をお教え下さった森本高子先生、上川内あづさ先生、同じ学生という立場で議論、助言を

して頂いた青西研究室の皆様，樺島研究室の皆様，宮川研究室の皆様，岡田研究室の皆様，研究活動を円滑に行えるように支えて下さった秘書の有江かおり様に重ねて感謝致します．

最後に高校時代からの友人，大学時代からの友人，先輩，後輩，そしてよき理解者として私を様々な面で常に支えてくれた，父，母，姉達に心から感謝致します．

目次

第1章 序論	1
1.1 研究の背景	1
1.2 Ca イメージング法の技術的背景	2
1.2.1 Ca^{2+} プローブと蛍光色素	2
1.2.2 細胞内 Ca^{2+} ダイナミクス	6
1.2.3 実験セットアップ	8
1.2.4 近年の動向	9
1.3 状態空間モデル	11
1.4 研究の目標	11
1.5 研究のアプローチ	12
1.5.1 1次元の較正の問題	12
1.5.2 細胞内時空間的 Ca^{2+} ダイナミクス	13
1.6 論文の構成	13
第2章 状態空間法	15
2.1 状態空間モデル	15
2.2 状態推定の一般論	18

2.2.1	一期先予測とフィルタリング	18
2.2.2	平滑化	21
2.3	カルマンフィルタ	22
2.3.1	拡張カルマンフィルタ	24
2.4	粒子フィルタ	25
2.4.1	モンテカルロ法による数値積分	26
2.4.2	1期先予測	27
2.4.3	フィルタリング	28
2.4.4	粒子フィルタの更新則まとめ	30
2.5	まとめ	32
第3章	粒子フィルタによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の統計的推定	33
3.1	導入	33
3.2	較正式	34
3.3	提案手法	40
3.3.1	Ca^{2+} 蛍光時系列のモデル化	40
3.3.2	対数周辺化尤度と周辺化事後確率	45
3.3.3	粒子フィルタ	52
3.4	数値実験	53
3.5	結果	54
3.5.1	対数周辺化尤度に基づくパラメータ推定	54
3.5.2	周辺化事後確率に基づくパラメータ推定と Ca^{2+} 濃度推定	55

3.6	生理実験データへの適用	64
3.6.1	実験データの取得	64
3.6.2	CCD ノイズの測定	66
3.7	結果	69
3.7.1	パラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ を用いた場合	69
3.7.2	パラメータの事前分布 $P(R_f)$ を用いた場合	70
3.8	結論	74
第 4 章	拡張カルマンフィルタによる時空間 Ca^{2+} ダイナミクスの推定	78
4.1	導入	78
4.2	アルゴリズムの構築	80
4.2.1	提案モデル	80
4.2.2	非線形状態空間モデル	85
4.2.3	拡張カルマンフィルタ	85
4.2.4	パラメータ推定	87
4.2.5	データ生成モデル	91
4.3	結果	92
4.3.1	真のパラメータが既知の場合	92
4.3.2	パラメータ推定	95
4.4	結論	97
第 5 章	結論	101
5.1	総括	101

5.2 今後の展望	102
---------------------	-----

第1章 序論

1.1 研究の背景

近年，細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度変化をカルシウム指示色素によって測定するカルシウムイメージング法が，神経科学分野において盛んに利用されている．それには Fura-2 を始めとする高 SN 比プローブが開発された点 [16, 65, 60]，AM 体指示色素¹を用いた低侵襲計測や電荷結合素子 (CCD: Charge Coupled Device) イメージセンサを用いた多点同時記録が可能な点 [26, 19] など，多くの理由が挙げられるが，特に神経細胞の形態と神経細胞活動（膜興奮）を視覚的に観測できるという点に特別な優位性がある [74]．

SN 比や計測する Ca^{2+} 濃度のダイナミックレンジなど多様な目的に適う様々な Ca^{2+} 指示色素の創薬や，CCD センサ [4, 50, 28, 25] や 2 光子励起レーザ走査型顕微鏡 [8, 9] の開発など計測機器の技術革新に支えられ [73]，今日において Ca イメージング法はパッチクランプ法 [23, 79, 56] などの電気生理学的計測に並ぶ，極めて普遍的で強力な測定手法となっている．その応用はラットやマウスの小型齧歯目哺乳動物を中心に，線虫 [68, 76]，ゼブラフィッシュ [62, 54, 1]，ショウジョウバエ [47, 15] など，ラット以下の大きさの実験生物の多岐にわたる．

しかし Ca イメージングで計測される情報は蛍光強度という，潜在変数 (Ca^{2+} 濃度) に対

¹AM 体：アセトキシメチルエステル体．AM 体をもつ Ca^{2+} 指示色素を細胞外へ導入すると，細胞膜を貫通し細胞内へ到達する．そこで AM 基は色素から切断される．AM 体指示色素は細胞や組織を傷付けることなく，細胞内への Ca^{2+} 指示色素導入を可能にする [65]．

する間接的な情報で、さらに Ca イメージングは光学計測という性質上、観測時にノイズによるシグナルの劣化が避けられないという問題がある。本論文において、Ca イメージングの蛍光時系列データの解析に、近年時系列解析分野で深く発展してきた状態空間法を応用し、Ca イメージングが孕む問題の解決などを試みる。

まずこの章では、 Ca^{2+} プローブや細胞内 Ca^{2+} の挙動、実験セットアップなど Ca イメージングの原理的・技術的背景を説明し、本論文で応用する状態空間法の手法としての背景、さらに本論文における研究目的や具体的問題について述べる。

1.2 Ca イメージング法の技術的背景

1.2.1 Ca^{2+} プローブと蛍光色素

Ca イメージングは、 Ca^{2+} 感受性のある蛍光プローブを細胞に導入し、励起光の照射によって発光する蛍光を CCD イメージセンサや光電子増倍管などの光検出器で計測するという原理で行われる [74]。CCD イメージセンサや光電子増倍管は、Ca イメージングに用途が限定されず、生命科学の技術的進展とは独立に発達してきた。Ca イメージングの普及や発展において特に重要であった技術革新は、多種多様な Ca^{2+} プローブの開発にあった。Ca イメージング法の技術的背景として、まず Ca^{2+} プローブと蛍光色素について簡単に説明する。

Ca^{2+} プローブには大きく分けて 2 種類が存在する。1 つは化学的もしくは物理的方法で細胞へ導入する化学的な蛍光色素で、もう 1 つは遺伝的に導入する蛍光タンパク質を用いた Ca^{2+} プローブである [60]。さらに蛍光色素は 2 種類に分けられ、1 つは紫外光で励起される色素で、もう 1 つは可視光で励起される色素である [74]。

歴史的には、実用的なレベルの SN 比を有する蛍光色素として紫外光によって励起される Fura-2 が最初に開発された [16]。紫外光励起型の色素には Fura-2 以外にも Fura-3, Fura-4, など Fura シリーズ, Indo-1, Indo-3 など Indo シリーズがあり², これらは一般に Ca^{2+} と結合し錯体を形成すると, 吸収する励起光や発光する蛍光のスペクトラム (波長) が遷移するという性質がある (図 1.1 A)。Fura-2 にはこの性質を利用した 2 波長励起計測 (Ratiometric imaging) が行えるという優位性があるが, これは詳しくは 3 章で説明する。

可視光によって励起される色素には, Oregon Green BAPTA シリーズや Fluo シリーズ, Calcium Green シリーズなど紫外光励起型に比べ多様にあり, さらに高 SN 比という特徴がある [65]。また可視光励起型は, Ca^{2+} の結合によるコンフォメーション変化によって励起光や蛍光波長の遷移が起こらず, Ca^{2+} 濃度に対応した強度の一定波長の蛍光を発光する (図 1.1 B,C)。化学的な蛍光色素では, 2 波長励起計測を目的とする特別な場合を除いて, SN 比や種類の豊富さなどの優位性から現在ほとんどの場合でこの可視光励起型の蛍光色素が利用されている。

最後に近年登場した遺伝子方法で導入する蛍光タンパクの Ca^{2+} プローブについて簡単に述べる [51, 55]。これはカルシウムセンサの役割を果たすカルモジュリン (CaM) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) や黄色蛍光タンパク質 (YFP) が遺伝的に符号化された構造をもつ (図 1.1D)。それ自体増えることのない化学的な蛍光色素と異なり, 細胞が死なない限り蛍光タンパクは細胞内で生成され続けるので結果的に退色に強く, 生物のライフタイムというレベルでの長時間計測 (ライブイメージング) など, 蛍光タンパクの Ca^{2+} プローブは Ca イメージングの可能性をさらに押し広げた。このように優位性が多く話題性も豊富な蛍光タンパク質を用いた Ca^{2+} プローブであるが, ここでの簡単な紹介にとどめ, 本論文においては

²Fura シリーズや Indo シリーズなど同一のシリーズは官能基以外では同じ構造を持つ

現在より普及している可視光励起型の化学的蛍光色素を用いた Ca イメージングに話を限定する。

次に本論の準備として，Ca イメージングにおいて記録される Ca^{2+} 指示蛍光色素が発する蛍光量を定式化する．一般に蛍光分子は特定波長の励起光の吸収によって分子のエネルギー状態が基底状態から励起状態へ遷移する．その後，励起状態から基底状態へ再び遷移する時に，特定波長の蛍光を発光する³ (図 1.1 G)．蛍光色素を導入した体積 V の細胞が発する蛍光量は，励起光強度を I_0 ，色素の分子吸光係数を α ，色素の量子収率を Q_F ，顕微鏡の光子収集効率を Φ ，検出器 (CCD センサ) の量子効率 (Quantum efficiency: QE) を Q_D とすると⁴，

$$F = \Phi Q_D Q_F \alpha I_0 V [D] = S[D] \quad (1.1)$$

と記述できる [74]．ここで F は蛍光強度で， $[D]$ は細胞中の色素濃度， S は細胞体積と色素の性質や実験セットアップに依存する因子をまとめた定数である．

Ca^{2+} 指示色素の場合， Ca^{2+} から遊離した色素と結合した色素で，蛍光量子収率 Q_F に違いがあり，発光する蛍光量が異なる．これに注意し再び定式化すると，

$$\begin{aligned} F &= S_f [D] + S_b [D\text{Ca}] \\ &= S_f [D] + S_b ([D]_{\text{tot}} - [D]) \end{aligned} \quad (1.2)$$

³一般に励起光より蛍光の方が波長が長い．これをストークスシフトと呼ぶ

⁴色素の量子収率は (反応する分子の数)/(吸収された光子の数)，センサの量子効率は (変換された電子の数)/(入力された光子の数) で定義される

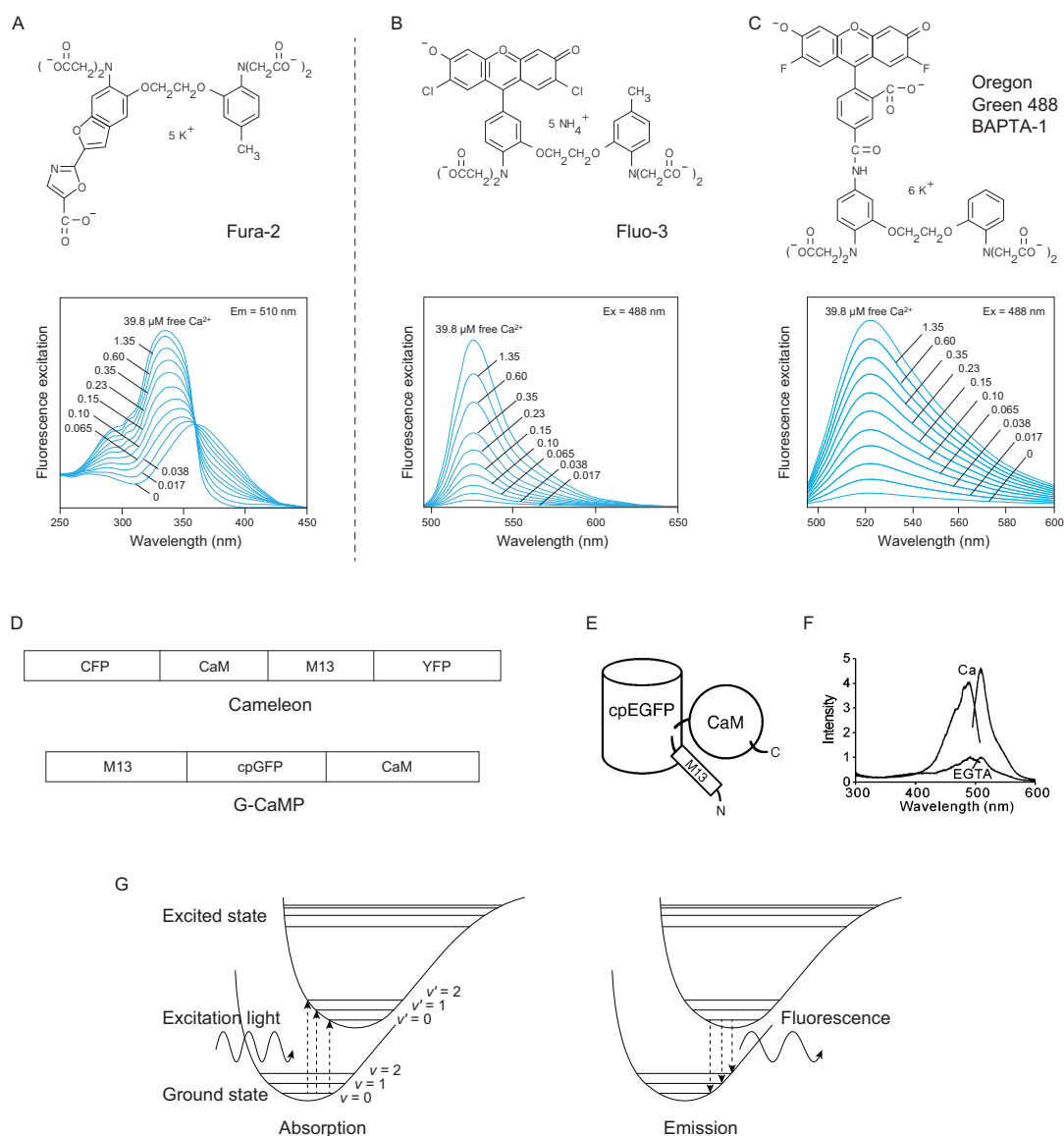


図 1.1: Ca^{2+} プロブと蛍光. A: 紫外光励起型色素, Fura-2 の構造式と $[\text{Ca}^{2+}]$ ごとの励起光の吸収スペクトラム. 蛍光スペクトラムは波長 510 nm を中心に分布する. このように紫外光励起型は $[\text{Ca}^{2+}]$ によってスペクトラムの構造が変化し蛍光分子の最大吸収波長がシフトする. B: 可視光励起型色素, Fluo-3 の構造式と $[\text{Ca}^{2+}]$ ごとの蛍光の発光スペクトラム. Fura-2 と違い発光スペクトラムである. 吸収スペクトラムは波長 488 nm を中心に分布する. 紫外光励起型と異なり $[\text{Ca}^{2+}]$ に依存してスペクトラムのピークはシフトしない. C: 可視光励起型色素, Oregon Green 488 BAPTA-1 の構造式と発光スペクトラム. D: 蛍光タンパク質を用いた Ca^{2+} プロブ, Cameleon と G-CaMP. CaM(calmodulin), M13(myosin light chain kinase), CFP(cyan-emitting mutant of green fluorescent protein(GFP)), YFP(yellow-emitting mutant of GFP), cpGFP(circularly permuted GFP). E: G-CaMP のトポロジー. CaM-M13 結合体に蛍光タンパク質 cpGFP が連なる構造をとる. F: G-CaMP の吸収と発光のスペクトラム (Ca^{2+} 添加と EGTA 添加のそれぞれの場合). 左の山が吸収スペクトラムである. G: 吸収と発光による蛍光分子のエネルギー状態の遷移. 蛍光分子は特定波長の励起光により基底状態から励起状態へ遷移する. そして励起状態から基底状態へ再び遷移するとき蛍光を発する. A, B, C は Spence(ed), 2005 [65] を参考に作成, E, F は Nakai et al., 2001 Figure 1 と 3 [55] より引用.

となる．ここで S_f は Ca^{2+} から遊離した色素の蛍光量の係数， S_b は結合した色素に関する係数， $[D]$ は遊離した色素の濃度， $[D\text{Ca}]$ は結合した色素の濃度， $[D]_{tot}$ は細胞内の全色素濃度である． $([D]_{tot} - [D])$ は結合した色素の濃度を意味することに注意する．

また， Ca^{2+} と色素の 1:1 結合を仮定すると，質量作用の法則から Ca^{2+} 濃度と色素濃度の関係は，以下のように記述できる．

$$K_d = \frac{[D][\text{Ca}^{2+}]}{[D]_{tot} - [D]} \quad (1.3)$$

ここで， K_d は色素の解離定数， $[\text{Ca}^{2+}]$ は Ca^{2+} 濃度である．

以上から， Ca^{2+} 指示蛍光色素を用いた Ca イメージングの蛍光強度データと細胞内 Ca^{2+} 濃度には定量的な関係があることがわかる．蛍光強度 F から細胞内 Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]$ を推定することを較正といい，これは Ca^{2+} 指示蛍光色素に関する古典的な問題である [16]．本論文では，この問題を 3 章で詳しく論じる．

1.2.2 細胞内 Ca^{2+} ダイナミクス

次に細胞内における Ca^{2+} の動的な挙動を簡単に説明する [22, 35, 12]．色素が導入された神経細胞で， Ca^{2+} と関連する主だった因子は図 1.2 に示すものである．

細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ には恒常性があり，休止状態において 50-100 nM の一定濃度に保たれている [22]．細胞外は約 1 mM の高濃度で，膜興奮に伴う電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VGCC) の活性化や，リガンドの受容による受容体作動性 Ca^{2+} チャネルの活性化で，細胞外から細胞内へ Ca^{2+} 流入が発生する．細胞膜にはこのほか ATP を消費する Ca^{2+} ポンプ (Ca^{2+} -ATPase) やイオンの濃度勾配を利用し Na^+ と Ca^{2+} を交換する Na^+ - Ca^{2+} 交換体 (NCE) など Ca^{2+} の

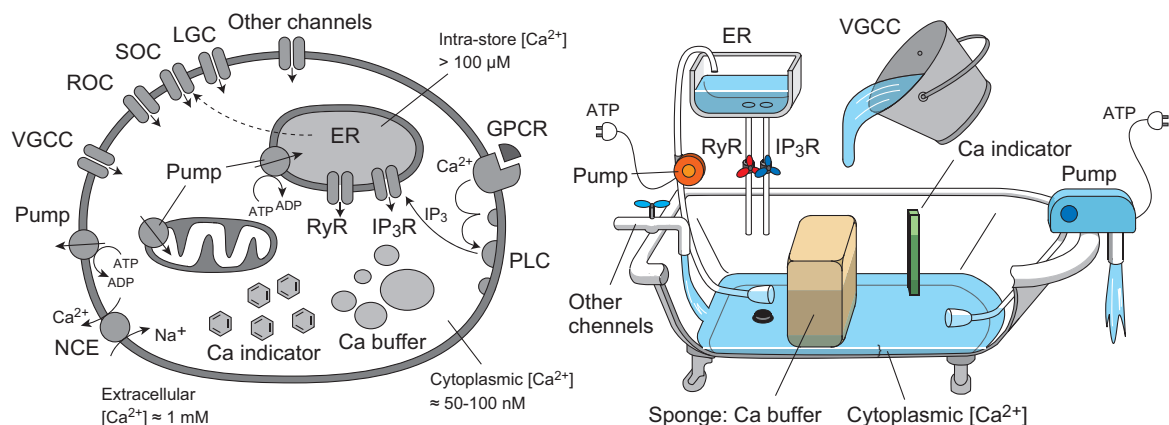


図 1.2: Ca^{2+} ダイナミクス. A: SOC, Store-operated channels; ROC, receptor-operated channels; VGCC, voltage-gated Ca^{2+} channels; LGC, ligand-gated channels. B: バスタブの模型

排出機構があり、最終的には一定濃度まで排出される．細胞内には小胞体（ER: Endoplasmic Reticulum）などの Ca^{2+} ストアがあり，小胞体内の Ca^{2+} は IP_3 受容体（ IP_3R ），リアノジン受容体（ RyR ）を通して細胞質内へ放出され， Ca^{2+} ポンプによって汲み取られる．また細胞内には Ca^{2+} と結合するタンパク質が多種存在し，総称して Ca^{2+} バッファと呼ばれる． Ca^{2+} バッファは Ca^{2+} と可逆的に結合し， Ca^{2+} 変化を緩衝する．Ca イメージングの際に導入する Ca^{2+} 指示色素も同様の反応をする．

$[\text{Ca}^{2+}]$ を制御するこれらの因子の作用は，図 1.2 右図のバスタブの模型を考えると直感的に理解できる． $[\text{Ca}^{2+}]$ をバスタブの水かさで表現すると，活動電位の発生に伴う細胞内への Ca^{2+} 流入はバスタブへ投入されるバケツの水のように表現でき，バスタブ内のスポンジが水かさの動きを緩衝する．エネルギーを消費するポンプによって恒常的には一定の水かさが保たれる．

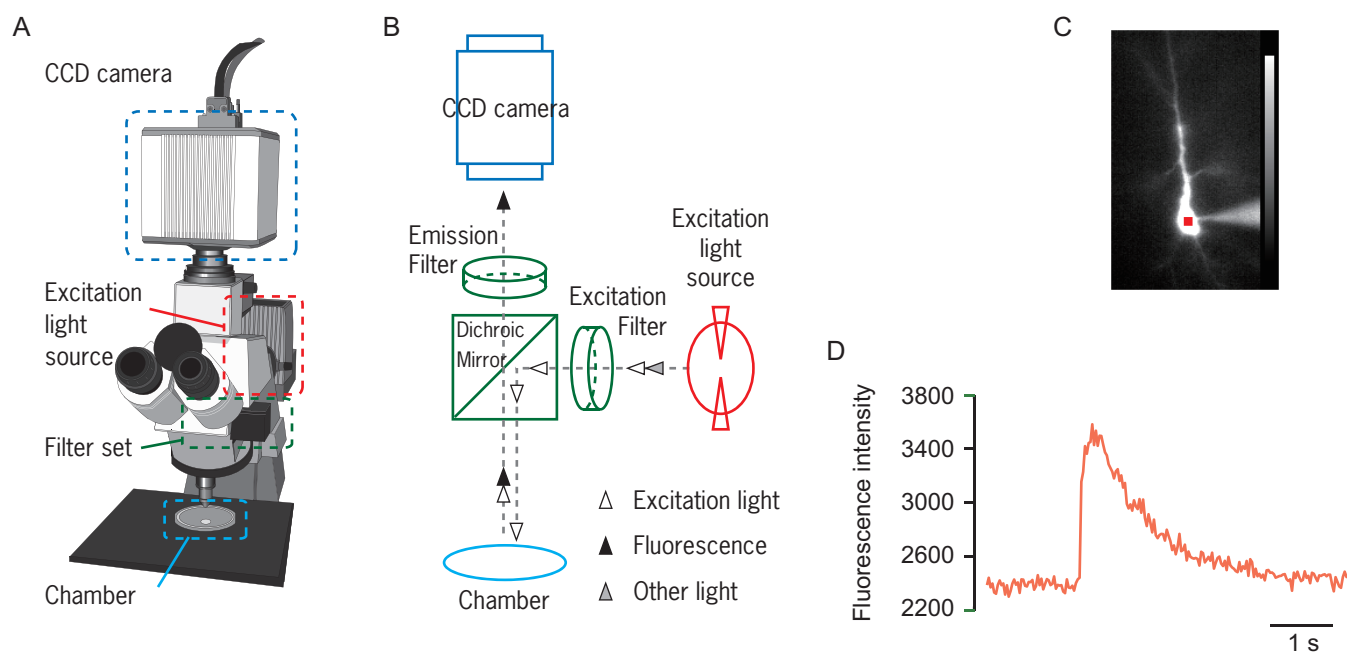


図 1.3: 実験セットアップ

1.2.3 実験セットアップ

次に Ca イメージングの実験セットアップについて説明する [74, 78]. 蛍光顕微鏡を用いたセットアップの外観を図 1.3 A に示す. 主に励起光光源, 光学フィルタ, チャンバー, CCD カメラの4つのコンパートメントから構成されている (図 1.3 B). 励起光は, 励起フィルタとダイクロイックミラーによって特定波長に濾波され, チャンバーにセットした試料 (Ca^{2+} 指示色素を導入した細胞や脳スライス標本) へ照射される. ダイクロイックミラーとは, ある波長以下の光を反射し, それ以上の光を透過させる分光器である. 励起光の照射によって発光する蛍光は, ダイクロイックミラーと発光フィルタを透過する. ここで励起光の反射光が遮断され, 特定波長の蛍光のみが濾波される. 最終的に CCD カメラによって蛍光が動画として撮像される.

図 1.3 C の画像は実際に撮像された動画中の 1 ショットである. 細胞体に位置する赤の四

角は関心領域（ROI: Region of Interest, 観測窓）を示す。その下の図は ROI が示すピクセルにおける蛍光強度の時系列である。活動電位の発生に伴う Ca^{2+} 上昇が観測できる。

Ca イメージングには、図 1.3 A が示す蛍光顕微鏡以外にも、共焦点レーザー走査顕微鏡、2 光子励起レーザー走査顕微鏡などが応用されているが、励起光と蛍光の分光の原理はどの測定装置であっても基本的には共通する。ここで共焦点レーザー走査顕微鏡とは共焦点ピンホールを用い奥行き方向に分解能を持たせた顕微鏡で、2 光子励起レーザー走査顕微鏡とは蛍光分子を通常波長の 1 光子ではなく 2 倍の波長（エネルギー 1/2）の 2 光子を同時に吸収させ励起、発光させる顕微鏡である⁵。どちらも奥行き方向に分解能を持つが、2 光子顕微鏡は共焦点顕微鏡より深部が観測でき、空間分解能も高い。逆に共焦点顕微鏡は、サンプリングレートや SN 比の点で 2 光子顕微鏡よりも優れている。この 2 つは近年登場した先進的な計測手法であるが、 Ca^{2+} 感受的な蛍光物質を励起・発光させ光学計測する原理は変わらないので、本論文においては通常の蛍光顕微鏡での Ca イメージングを問題とする。

1.2.4 近年の動向

Ca イメージングはその登場から近年にいたるまで、 Ca^{2+} プローブと計測装置の技術革新に伴って、進展を重ねてきた。現在では Ca イメージングを可能にする技術的基盤は単に蛍光測定に留まらず、広く応用されている。2 光子励起レーザー走査顕微鏡などレーザーを制御できるセットアップでは、Ca イメージングによる $[\text{Ca}^{2+}]$ 測定と同時にレーザー光が刺激方法として応用されている。例えば Noguchi らはケイジドグルタミン酸の活性化に 2 光子励起レーザー走査顕微鏡のレーザーを用い、微細な構造であるスパインでの局所的なシナプス刺激を

⁵多光子吸収と呼ばれるこのような非線形現象は通常確率的には非常にまれであるが、ピコ秒パルス、フェムト秒パルスなど光エネルギー密度が特に大きくなった際、十分起こりうる [77]。複数光路のピコ～フェムト秒パルスを同期させる技術など技術的ハードルが高いため、実験セットアップは非常に高額である。

行っている [57]. さらに近年では光遺伝学の発展により, 光を受容して開口するリガンド依存性イオンチャネルとして動作するタンパク質, チャンネルロドプシン (Channelrhodopsin) が登場し, 細胞膜にウィルス等で導入し光刺激するプロトコールも確立されてきた [42]. 光刺激とその計測を担う Ca イメージングは実験セットアップの面からも不可分な関係にあり, レーザー走査による光刺激の手法が増すにつれて, Ca イメージングは今後も利用され発展していくことが予想される.

また近年では生きた動物に対して行う *in vivo* イメージングがインパクトのある雑誌に掲載される研究に非常に増えてきた. 動的環境下への応用として, Tank らのグループが行っている頭部固定での覚醒行動下マウスでの 2 光子 Ca イメージングでは, 海馬という非常に深い部位での細胞集団の測定に成功している [11]. また Helmchen らはファイバースコープという微小な装置を用い自由行動下マウスへの 2 光子 Ca イメージングを実現している [20]. また Konnerth らのグループは, 麻酔下マウスの皮質錐体細胞樹状突起へ 2 光子イメージングによって, 枝分かれした樹状突起 1 本 1 本の方位選択性を発見している [29]. このように *in vivo* イメージングは技術的に確立されつつあり, そのうえで Tank らのように細胞集団 (Population) を見るか, Konnerth らのように単一細胞を見るか, 目的により選択されるが, ミクロな現象の観測からマクロな観測まで, Ca イメージングは広く応用されている. また実験動物としては小型齧歯目動物の場合, ラットよりマウスで行われる研究が多いことが近年の傾向である. これは遺伝子改変が使える利点のほかにも, 脳容量が小さなマウスの方が深部まで計測でき, イメージングには都合がいいという背景がある.

1.3 状態空間モデル

Ca イメージング法によって計測される蛍光強度の時系列は、常に不規則に変動していてその変動を決定論的な時間関数などで完全に記述し予測することは不可能である。これは、細胞内へ導入された蛍光分子の化学反応過程での確率的な揺らぎ、光の吸収による励起と発光の過程の揺らぎ、光検出器で光子が電荷に変換される際のショットノイズや読み出しノイズ、暗電流など電子デバイスに内在する揺らぎなどを考えれば明らかだ。

こういった記述が困難な、複雑な動的システムを、単純で扱いやすいモデルによって記述し、観測値で同化処理を行うことで予測誤差を改善させるデータ同化の枠組みが、近年盛んに用いられている [80, 52, 59, 75]。中でも状態空間法を用いた枠組みが、気象学や海洋学などの地学分野で、日本海の海底地形の推定 [24]、海面水温の予測 [43, 44] などへ応用されている。

本研究ではこの状態空間法を、Ca イメージング法の蛍光時系列データの解析に応用し、ノイズで劣化した時系列から潜在変数である細胞内 Ca^{2+} 濃度の推定などを行う。

1.4 研究の目標

Ca イメージングで測定される情報は Ca^{2+} プロブの蛍光強度であり、潜在変数に対する間接的な情報である。また Ca イメージングは、蛍光という微弱なシグナルを測定する光学計測の原理上、観測時にノイズによるシグナルの劣化が避けられないという問題をもつ。

本研究においてまず、ノイズで劣化した 1 次元の蛍光時系列から潜在変数である Ca^{2+} 濃度を推定する較正の問題を取り上げ、状態空間法により解決を試みる。

さらに空間的に拡張し、神経細胞樹状突起内での Ca^{2+} の空間的な拡散に焦点を当てる。細

胞内空間における時空間的な Ca^{2+} ダイナミクスをモデル化し, Ca イメージングの多点の蛍光データから樹状突起上で生じる Ca^{2+} 濃度変化とカルシウム流量を定量的に推定する.

以上の1時系列の蛍光データの解析と, よりミクロな視点で問題を拡張した多点の蛍光時系列データの解析の2点を本研究の目標とする.

1.5 研究のアプローチ

本章で述べたように, Ca イメージング法による細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には細胞内での Ca^{2+} ダイナミクスから CCD センサによる蛍光強度データの取得まで様々な生物・物理・化学的プロセスが介在し, その過程を厳密にモデル化することは極めて困難である. 複雑なシステムを単純なモデルで記述し, 観測値からシステムや潜在変数に関するナイーブな理解を得られる状態空間法を Ca^{2+} 蛍光時系列の解析に適用する.

1.5.1 1次元の較正の問題

1時系列の蛍光強度データから, 潜在変数である細胞内 Ca^{2+} 濃度を推定する較正の問題では, Ca^{2+} ダイナミクスをシステム方程式, Ca^{2+} と色素の反応から CCD センサによって蛍光強度が測定される過程を観測方程式とした状態空間モデルを構築する. そのうえで未知パラメータの推定を行うが, このとき式 1.2 で表わされるように観測方程式のパラメータは蛍光強度1時系列に対し未知パラメータは S_f と S_b の2つがあるため, パラメータは本質的に不定である. このためシステム方程式の Ca^{2+} ダイナミクスを未知パラメータが1つのランダムウォークモデルとした, 最小記述の状態空間モデルを構築する. さらに, 細胞内 Ca^{2+} に関する静的な性質や, 色素の発光量に関する性質などの事前知識を利用してパラメータに

事前分布を導入し、パラメータの不定性の解消を試みる．周辺事後確率最大化に基づくパラメータ推定を粒子フィルタによって実装し、さらに、推定したパラメータを用いた Ca^{2+} 濃度推定を行う．

1.5.2 細胞内時空間的 Ca^{2+} ダイナミクス

多点の蛍光強度データを扱った問題では、細胞内のよりミクロな現象にフォーカスし、 Ca^{2+} ダイナミクスのモデル化を行う．ここでは、錐体細胞樹の先端状突起細胞で観測される Ca^{2+} 濃度の特徴的な時空間パターンである観測される Ca^{2+} ウェーブにフォーカスし、 Ca^{2+} ウェーブ発生時の Ca^{2+} 濃度変化と正味の Ca^{2+} 流量を推定する枠組みを構築する．細胞の形態をマルチコンパートメントのシリンダーモデルとして記述し、 Ca^{2+} 、Ca バッファ、蛍光色素の反応拡散系と、細胞内 Ca^{2+} の恒常性を実現する Ca^{2+} ポンプおよび漏れを含んだ反応拡散モデルをシステム方程式とする．観測方程式は各コンパートメントで独立に、1 時系列の場合と同様のモデルで記述する．構築した高次元の状態空間モデルを、拡張カルマンフィルタに実装し、時空間的な Ca^{2+} 濃度とさらに Ca^{2+} 流量を推定するアルゴリズムを実装する．パラメータ推定は周辺尤度最大化に基づいて行い、尤度の計算の際の高次元の積分はラプラス近似によって計算する．

1.6 論文の構成

1 章では本研究の背景と目的、本研究で取り組む具体的な問題とアプローチについて述べた．2 章では、状態空間モデルと状態推定の一般論を述べ、線形ガウス型の状態空間モデルにおいて適用できるカルマンフィルタと非線形に拡張した拡張カルマンフィルタのアルゴリズム

ムを紹介する．さらに非線形非ガウス型の状態空間モデルにおいて適用可能な粒子フィルタのアルゴリズムについて述べる．3, 4 章では，本論文の主題となる問題に取り組む．3 章では，1 次元の蛍光強度データから細胞内 Ca^{2+} 濃度を推定する較正の問題に焦点を当てる．細胞内 Ca^{2+} が Ca イメージングによって蛍光強度として計測される過程を状態空間モデルで記述する．パラメータに関する事前分布を導入し，粒子フィルタによってパラメータの周辺事後確率分布を計算し，パラメータ推定を行う枠組みを構築する．パラメータの周辺事後確率を最大化するパラメータを推定値とし，パラメータの推定値を用いてさらに細胞内 Ca^{2+} 濃度を推定する．数値実験によって提案手法の有効性を検証し，さらに生理実験データへ適用する．4 章では，錐体細胞先端樹状突起で Ca^{2+} 濃度の特徴的な時空間パターンを示す Ca^{2+} ウェーブという現象に焦点を当て，多次元の蛍光データから Ca^{2+} ウェーブ発生時の Ca^{2+} 濃度と Ca^{2+} 流量を推定するアルゴリズムを構築する．樹状突起を 1 次元マルチコンパートメントのシリンダーとして扱い， Ca^{2+} ，Ca バッファ，蛍光色素の反応拡散系でモデル化する．これをシステム方程式とし，さらに 3 章でモデル化した観測方程式と合わせ，状態空間モデルを構築し，拡張カルマンフィルタで推定アルゴリズムを実装する．パラメータ推定は，対数周辺尤度を最大化するパラメータをグリッドサーチで探索することで行う．数値実験によって，構築したアルゴリズムの有効性を検証する．5 章では本研究の総括を行い，今後の展望を述べる．

第2章 状態空間法

Ca イメージングにおける観測値は Ca^{2+} 指示色素が発する蛍光の強度である．我々が知りたい情報は，観測値の背後に隠れた潜在変数で，本研究においては細胞内 Ca^{2+} 濃度である．ノイズで劣化した時系列から真の状態を推定する，このような問題では状態空間法が非常に有効である [81, 82, 18, 64, 7]．本章では，本研究における中心的な道具となる状態空間法について説明する．

本章の構成は以下の通りである．はじめに定式化された状態空間モデルを具体的に示す．次に，状態空間モデルを用いた状態推定の一般論を述べる．そして，線形ガウス型という条件のもとで解析的に導出される状態推定のアルゴリズム，カルマンフィルタとその拡張である拡張カルマンフィルタの更新式について説明する．最後に非線形非ガウス型のモデルに対しても適用できる，数値積分にモンテカルロ積分を応用した粒子フィルタについて説明する．

本論文では，粒子フィルタを3章で，拡張カルマンフィルタを4章でそれぞれ用いる．

2.1 状態空間モデル

ある時刻 t ($t = 1, \dots, T$) の観測値を y_t とし，この観測値を実現するために必要な変数を一つのベクトルに収め表現したものを状態ベクトルと呼び， x_t と記述することにする．スカ

ラーの場合, x_t となり状態変数とよぶ. これは統計や機械学習で潜在変数, 隠れ変数と呼ばれる変数と同じである.

状態空間モデルとは, これら確率変数間の関係を, 以下のような線形モデルとガウスノイズの二つの式, “システム方程式” と “観測方程式”, で表したものである.

$$[\text{システム方程式}]: \quad \vec{x}_t = F_t \vec{x}_{t-1} + \Sigma^{1/2} \vec{u}_t \quad (2.1)$$

$$[\text{観測方程式}]: \quad \vec{y}_t = H_t \vec{x}_t + Q^{1/2} \vec{v}_t \quad (2.2)$$

ここで $\vec{x}_t$ は n 次元, $\vec{y}_t$ は m 次元とし, F_t と H_t はそれぞれ $n \times n$ と $m \times n$ 次元の行列である. また, $\vec{u}$ はシステムノイズと呼ばれる n 次元の白色ガウスノイズで, $\langle \vec{u}_k \rangle = \vec{0}$, $\langle u_{ki} u_{k'j} \rangle = \delta_{ij} \delta_{kk'}$, $\vec{v}$ は観測ノイズと呼ばれる m 次元の白色ガウスノイズで, $\langle \vec{v}_k \rangle = \vec{0}$, $\langle v_{ki} v_{k'j} \rangle = \delta_{ij} \delta_{kk'}$ を満足する (ただし δ_{ij} はクロネッカーのデルタで, $i = j$ のとき $\delta_{ij} = 1$, $i \neq j$ のとき $\delta_{ij} = 0$ である). Σ と Q はノイズの相関行列である, $n \times n$ および $m \times m$ 次元の対称行列である.

このモデルは一時刻前の状態に影響される単純マルコフ過程であり, 以下の高次元ガウス密度関数で状態遷移や観測値の確率モデルが記述できる.

$$P(\vec{x}_t | \vec{x}_{t-1}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}^n \sqrt{\det \Sigma}} \exp \left(-\frac{1}{2} (\vec{x}_t - F \vec{x}_{t-1})^T \Sigma^{-1} (\vec{x}_t - F \vec{x}_{t-1}) \right) \quad (2.3)$$

$$P(\vec{y}_t | \vec{x}_t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}^m \sqrt{\det Q}} \exp \left(-\frac{1}{2} (\vec{y}_t - H \vec{x}_t)^T Q^{-1} (\vec{y}_t - H \vec{x}_t) \right) \quad (2.4)$$

ここで $\cdot^T$ は転置の演算子である. 式 (2.1), (2.2) で表現されたモデルは線形ガウス型の状態空間モデルであった. しかし記述すべき現象が線形ガウス型でない場合も当然考えられ,

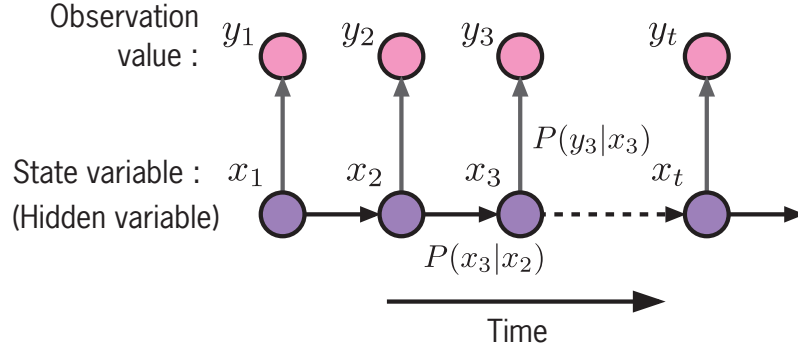


図 2.1: 状態空間モデルのグラフ表現.

そのとき状態空間モデルは以下のような表現になる.

$$\vec{x}_t = f(\vec{x}_{t-1}, \vec{u}_t) \quad (2.5)$$

$$\vec{y}_t = h(\vec{x}_t, \vec{v}_t) \quad (2.6)$$

ただしノイズの独立に同一の分布から生成されたとする. この場合もマルコフ過程であり, 一般的な高次元確率密度関数で状態遷移や観測値の確率モデルが記述できる.

$$P(\vec{x}_t | \vec{x}_{t-1}) = \int d\vec{u}_t \delta(\vec{x}_t - f(\vec{x}_{t-1}, \vec{u}_t)) p(\vec{u}_t) \quad (2.7)$$

$$P(\vec{y}_t | \vec{x}_t) = \int d\vec{v}_t \delta(\vec{y}_t - h(\vec{x}_t, \vec{v}_t)) p(\vec{v}_t) \quad (2.8)$$

ここで $p(\vec{u}_t)$, $p(\vec{v}_t)$ はそれぞれシステムノイズと観測ノイズを生成する分布である. 以上の状態空間モデルは図 2.1 に示す 1 次元のグラフ構造を持っている.

2.2 状態推定の一般論

以上のように定義された状態空間モデルにおいて、観測値 $\vec{y}_t$ から状態ベクトル $\vec{x}_t$ を推定する問題の一般論を論じたい。

2.2.1 一期先予測とフィルタリング

時刻 j までの観測値の集合を $Y_j = \{\vec{y}_1, \dots, \vec{y}_j\}$ とする。以下では観測値 Y_{t-1} に基づいて次の時刻の状態 $\vec{x}_t$ を推定する 1 期先予測と、観測値 Y_t に基づいて現在の状態 $\vec{x}_t$ を推定するフィルタリングの問題として状態推定を考える。

ここで前提としているシステムはマルコフ過程である。状態遷移が $P(\vec{x}_t|\vec{x}_{t-1})$ で決まっているので、時刻 1 から t まで取りうる可能な状態の経路の同時確率密度関数は、

$$P(\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_t) = P(\vec{x}_t|\vec{x}_{t-1})P(\vec{x}_{t-1}|\vec{x}_{t-2}) \cdots P(\vec{x}_2|\vec{x}_1)P(\vec{x}_1) \quad (2.9)$$

である。ここで $P(\vec{x}_1)$ は状態ベクトルの初期値 $\vec{x}_1$ が従う密度関数である。ノイズは各時刻で独立であるから、観測値の集合 Y_t に対する同時確率密度関数は、

$$P(Y_t|\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_t) = P(\vec{y}_t|\vec{x}_t)P(\vec{y}_{t-1}|\vec{x}_{t-1}) \cdots P(\vec{y}_1|\vec{x}_1) \quad (2.10)$$

となる。ベイズの定理、 $P(B|A) = P(A|B)P(B)/P(A)$ より、状態 $\{\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_t\}$ の事後確率密度関数は、

$$P(\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_t|Y_t) = \frac{1}{Z_t} P(Y_t|\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_t)P(\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_t) \quad (2.11)$$

となる．ここで Z_t は正規化項（分配関数），

$$Z_t = \int d\vec{x}_1 \cdots d\vec{x}_t P(Y_t | \vec{x}_1, \cdots, \vec{x}_t) P(\vec{x}_t, \cdots, \vec{x}_1) \quad (2.12)$$

である．この事後確率密度関数は次元 $\{\vec{x}_1, \cdots, \vec{x}_t\}$ を持つ大自由度の密度関数である．我々が求める推定値は任意の時刻 t についての状態 $\vec{x}_t$ であるので周辺化を行うが，その高次元の積分には以下の階層的な関係がある．

$$\begin{aligned} P(x_t | Y_t) &= \frac{1}{Z_t} \int d\vec{x}_1 \cdots d\vec{x}_{t-1} P(Y_t | \vec{x}_1, \cdots, \vec{x}_t) P(\vec{x}_t, \cdots, \vec{x}_1) \quad (2.13) \\ &= \frac{1}{N_t} P(\vec{y}_t | \vec{x}_t) \int d\vec{x}_{t-1} P(\vec{x}_t | \vec{x}_{t-1}) \\ &\quad \times \left[\frac{1}{N_{t-1}} P(\vec{y}_{t-1} | \vec{x}_{t-1}) \int d\vec{x}_{t-2} P(\vec{x}_{t-1} | \vec{x}_{t-2}) \right. \\ &\quad \vdots \\ &\quad \times \frac{1}{N_2} P(\vec{y}_2 | \vec{x}_2) \int d\vec{x}_1 P(\vec{x}_2 | \vec{x}_1) \\ &\quad \left. \times P(\vec{y}_1 | \vec{x}_1) P(\vec{x}_1) \right] \\ &= \frac{1}{N_t} P(\vec{y}_t | \vec{x}_t) \int d\vec{x}_{t-1} P(\vec{x}_t | \vec{x}_{t-1}) P(\vec{x}_{t-1} | Y_{t-1}) \quad (2.14) \end{aligned}$$

$[\cdots] = P(\vec{x}_{t-1} | Y_{t-1})$ であるので上記の階層構造になる．ここで正規化項 N_t と Z_t の関係は，

$$N_t = \int d\vec{x}_t P(\vec{y}_t | \vec{x}_t) \int d\vec{x}_{t-1} P(\vec{x}_t | \vec{x}_{t-1}) P(\vec{x}_{t-1} | Y_{t-1}) \quad (2.15)$$

$$Z_t = \prod_{t=1}^t N_t \quad (2.16)$$

である．とくに $t = 1$ では,

$$P(\vec{x}_1|Y_1) = \frac{1}{N_1} P(\vec{y}_1|\vec{x}_1) P(\vec{x}_1) \quad (2.17)$$

$$Z_1 = N_1 = \int d\vec{x}_1 P(\vec{y}_1|\vec{x}_1) P(\vec{x}_1) \quad (2.18)$$

となる．このような階層構造で記述できる理由は状態空間モデルが 1 次元鎖状の構造 (図 2.1) を持っているためである．

以上の関係から, 以下の再帰的なアルゴリズムが導出できる．

$$[\text{一期先予測 (Prediction)}] : \quad P(\vec{x}_t|Y_{t-1}) = \int d\vec{x}_{t-1} P(\vec{x}_t|\vec{x}_{t-1}) P(\vec{x}_{t-1}|Y_{t-1}) \quad (2.19)$$

$$[\text{フィルタリング (Filtering)}] : \quad P(\vec{x}_t|Y_t) = \frac{P(\vec{y}_t|\vec{x}_t) P(\vec{x}_t|Y_{t-1})}{P(\vec{y}_t|Y_{t-1})}$$

$$P(\vec{y}_t|Y_{t-1}) = \int d\vec{x}_t P(\vec{y}_t|\vec{x}_t) P(\vec{x}_t|Y_{t-1}) = N_t \quad (2.20)$$

ここで $P(\vec{y}_t|Y_{t-1})$ は観測値集合 Y_{t-1} が与えられたときの 1 時刻先の観測値 $\vec{y}_t$ の予測分布に対応する．これは正規化項 N_t であり, またパラメータ推定に必要な周辺化尤度は,

$$\ln Z_t = \ln Z_{t-1} + \ln P(\vec{y}_t|Y_{t-1}) \quad (2.21)$$

により計算できる．

この計算を再帰的に実行することで, 周辺化事後確率最大化の状態 $\vec{x}_t$ を推定できる．この操作はベイジアンネットワークにおける確率伝搬法と等価である．

2.2.2 平滑化

以上の枠組みは、時刻 t までの観測値集合 Y_t を用い、時刻 t の状態 $\vec{x}_t$ を推定するオンラインの問題である。しかしオンラインでの状態推定が必要でない場合、時刻 T までの観測値集合 Y_T が取得できたら、そのすべてを用い過去の状態 $\vec{x}_t$ ($t \leq T$) を推定した方が推定精度は当然向上する。次にこの平滑化と呼ばれる問題を考える。

平滑化は、結論から言えば $P(\vec{x}_t|Y_T)$ を計算することであるが、それにはまず以下の同時確率密度関数を導入する。

$$\begin{aligned}
 P(\vec{x}_t, \vec{x}_{t+1}|Y_T) &= P(\vec{x}_{t+1}|Y_T)P(\vec{x}_t|\vec{x}_{t+1}, Y_T) \\
 &= P(\vec{x}_{t+1}|Y_T)P(\vec{x}_t|\vec{x}_{t+1}, Y_t) \\
 &= P(\vec{x}_{t+1}|Y_T) \frac{P(\vec{x}_t|Y_t)P(\vec{x}_{t+1}|\vec{x}_t, Y_t)}{P(\vec{x}_{t+1}|Y_t)} \\
 &= P(\vec{x}_{t+1}|Y_T) \frac{P(\vec{x}_t|Y_t)P(\vec{x}_{t+1}|\vec{x}_t)}{P(\vec{x}_{t+1}|Y_t)} \quad (2.22)
 \end{aligned}$$

ここで、 Y_T と $\vec{x}_{t+1}$ から $\vec{x}_t$ を推定する場合、 t までの観測値 Y_t があればよく $t+1$ 以降の観測値は不要である。よって $P(\vec{x}_t|\vec{x}_{t+1}, Y_t)$ と変形できる。また $\vec{x}_t$ から $\vec{x}_{t+1}$ への遷移は Y_t は無関係であるので、 $P(\vec{x}_{t+1}|\vec{x}_t, Y_t) = P(\vec{x}_{t+1}|\vec{x}_t)$ となる。この関係を利用して、以下の再帰的な式が得られる。

$$[\text{平滑化 (Smoothing)}]: P(\vec{x}_t|Y_T) = P(\vec{x}_t|Y_t) \int d\vec{x}_{t+1} \frac{P(\vec{x}_{t+1}|Y_T)P(\vec{x}_{t+1}|\vec{x}_t)}{P(\vec{x}_{t+1}|Y_t)} \quad (2.23)$$

これを実行し、 $P(\vec{x}_{t+1}|Y_T)$ から $P(\vec{x}_t|Y_T)$ へ確率を伝搬させる。ここで、 $P(\vec{x}_t|Y_t)$ はフィルタリング（式 (2.20)）によって求める。また $P(\vec{x}_{t+1}|Y_t)$ は一期先予測（式 (2.19)）で求める。

さらに $P(\vec{x}_{t+1}|\vec{x}_t)$ は状態遷移確率 (式 (2.3) : 線形ガウス型, または式 (2.7) : 非線形非ガウス型) により求める.

2.3 カルマンフィルタ

以上はベイズ的な観点での状態空間モデルに関する状態推定の一般論である. すなわち, 1期先予測およびフィルタリング (式 (2.19), (2.20)) や平滑化 (式 (2.23)) を用い, 観測値 Y_j が与えられた下で状態 $\vec{x}_n$ の条件付き分布 $P(\vec{x}_n|Y_j)$ を求めることで状態推定がなされる (ただし, $j = n - 1$ のとき $P(\vec{x}_n|Y_j)$ は予測分布, $j = n$ のとき $P(\vec{x}_n|Y_j)$ はフィルタ分布, $j = T$ のとき $P(\vec{x}_n|Y_j)$ は平滑化分布となる). メモリや演算速度など計算機の性能が飛躍的に向上した現代においては, 階段関数近似やモンテカルロ近似による数値積分で式 (2.19), (2.20) や式 (2.23) を直接計算することが可能になったが, それはあまり洗練された方策ではなく状況によっては実用的でない.

線形性およびノイズの正規性という前提の下で, 状態空間モデルの最小平均2乗誤差推定量として導出されたアルゴリズムがカルマンフィルタである [33]. これは状態 $\vec{x}_n$ の条件付き周辺化分布 $P(\vec{x}_n|Y_j)$ を極めて効率的に計算できる逐次的な計算アルゴリズムである.

線形ガウス型モデルでは $P(\vec{x}_n|Y_j)$ はガウス分布となる. したがって, 状態空間モデルの状態推定の問題を考えるためには, 条件付き分布を規定する平均ベクトルと分散共分散行列だけを求めればよい. 今, 状態 $\vec{x}_n$ の条件付き平均と分散共分散行列を

$$\hat{x}_{n|j} \equiv E(x_n|Y_j) \quad (2.24)$$

$$V_{n|j} \equiv E[(\vec{x}_n - \hat{x}_{n|j})(\vec{x}_n - \hat{x}_{n|j})^T] \quad (2.25)$$

と表すことにする．ただし $j = n - 1$ で 1 期先予測， $j = n$ でフィルタリング， $j = T$ で平滑化にそれぞれ対応する，カルマンフィルタは，以下の 1 期先予測とフィルタリングで構成される（導出は他書参照 [48, 82, 81]）．

$$[1 \text{ 期先予測}] : \quad \hat{x}_{t+1|t} = F_t \hat{x}_{t|t} \quad (2.26)$$

$$V_{t+1|t} = F_t V_{t|t} F_t^T + \Sigma \quad (2.27)$$

$$[\text{フィルタリング}] : \quad K_t = V_{t|t-1} H_t^T [H_t V_{t|t-1} H_t^T + Q]^{-1} \quad (2.28)$$

$$\hat{x}_{t|t} = \hat{x}_{t|t-1} + K_t [y_t - H_t \hat{x}_{t|t-1}] \quad (2.29)$$

$$V_{t|t} = V_{t|t-1} - K_t H_t V_{t|t-1} \quad (2.30)$$

ここで， K_t はカルマンゲインと呼ばれる，システム方程式に基づいた予測と観測値の誤差を補正する補正量のゲインである．この 1 期先予測とフィルタリングを相互に繰り返すことで，時刻 n までの観測値 Y_n を使い時刻 n の状態 $\vec{x}_n$ を推定するオンライン型の状態推定が行える．

さらに式 (2.23) で示した平滑化は，以下の計算アルゴリズムで実現できる．

$$\begin{aligned} [\text{平滑化}] : \quad C_n &= V_{n|n} F_{n+1}^T V_{n+1|n}^{-1} \\ \hat{x}_{n|T} &= \hat{x}_{n|n} + C_n (\hat{x}_{n+1|T} - x_{n+1|n}) \\ V_{n|T} &= V_{n|n} + C_n (V_{n+1|T} - V_{n+1|n}) C_n^T \end{aligned} \quad (2.31)$$

ここで $\hat{x}_{n|n-1}$ ， $\hat{x}_{n|n}$ ， $V_{n|n-1}$ ， $V_{n|n}$ はカルマンフィルタで計算される変数である．すなわち平滑化を実行するにあたっては，まずカルマンフィルタによって $\{\hat{x}_{n|n-1}, \hat{x}_{n|n}, V_{n|n-1}, V_{n|n}\}$

$(n = 1, \dots, T)$ を求めた後, 式 (2.31) によって, $\hat{x}_{T-1|T}$, $V_{T-1|T}$ から順に $\hat{x}_{1|T}$, $V_{1|T}$ まで求める手順となる.

2.3.1 拡張カルマンフィルタ

カルマンフィルタが前提とするシステムの線形性やノイズの正規性は, 現実の現象に対してあまり一般的ではない. このような前提が崩れた場合, 代替となるアルゴリズムが考案されている. その一つがカルマンフィルタを非線形システムに対して適用できるよう拡張した, 拡張カルマンフィルタである.

今回, ノイズに正規性はあるが, 非線形な状態空間モデルを考える.

$$\vec{x}_{t+1} = f_t(\vec{x}_t) + \Sigma^{1/2} \vec{u}_t \quad (2.32)$$

$$\vec{y}_t = h_t(\vec{x}_t) + Q^{1/2} \vec{v}_t \quad (2.33)$$

ここで, ノイズ項は線形ガウス型状態空間モデル (式 (2.1), (2.2)) と同様に定義される. また $f_t(\vec{x}_t)$, $h_t(\vec{x}_t)$ は n 次元および m 次元非線形ベクトル関数である.

このとき拡張カルマンフィルタの計算アルゴリズムは以下のようになる.

$$[1 \text{ 期先予測}] : \quad \hat{x}_{t+1|t} = f_t(\hat{x}_{t|t}) \quad (2.34)$$

$$V_{t+1|t} = \hat{F}_t V_{t|t} \hat{F}_t^T + \Sigma \quad (2.35)$$

$$[\text{フィルタリング}] : \quad K_t = V_{t|t-1} \hat{H}_t^T \left[\hat{H}_t V_{t|t-1} \hat{H}_t^T + Q \right]^{-1} \quad (2.36)$$

$$\hat{x}_{t|t} = \hat{x}_{t|t-1} + K_t [y_t - h_t(\hat{x}_{t|t-1})] \quad (2.37)$$

$$V_{t|t} = V_{t|t-1} - K_t \hat{H}_t V_{t|t-1} \quad (2.38)$$

ここで、 $\hat{F}_t$ および $\hat{H}_t$ は、以下で定義されるヤコビ行列である。

$$\hat{F}_t := \left. \frac{\partial f_t}{\partial x} \right|_{x=\hat{x}_{t|t}}, \quad \hat{H}_t = \left. \frac{\partial h_t}{\partial x} \right|_{x=\hat{x}_{t|t-1}}. \quad (2.39)$$

すなわち、拡張カルマンフィルタは非線形関数 $f_t(\vec{x}_t)$ および $h_t(\vec{x}_t)$ を単純に線形近似した、カルマンフィルタの極めて素朴な拡張である。このアルゴリズムは、ヤコビ行列を計算するコスト ($n \times n$, $m \times m$ 次元の偏微分) がかかるため、カルマンフィルタに比べ高速とは言えない。また強い非線形性をもつシステムの場合、近似性能が悪いなど問題点がある。近年、これらの問題を改良したアルゴリズムが提案されている [31, 32]。しかし、計算コストへの要求度が高くなく非線形性も弱いシステムを対象とする場合、現在も多くの研究で拡張カルマンフィルタが用いられている [67, 41]。本研究でも 4 章においてこの拡張カルマンフィルタを用いる。

2.4 粒子フィルタ

次に、非線形非ガウス型を含めたより一般化された状態空間モデル (式 (2.5), (2.6)) での状態推定において有効な手法、粒子フィルタについて説明する。

粒子フィルタでは確率分布を多数の粒子によって近似的に表現する。たとえばサンプル X_i がある確率分布に従い、独立に同一分布から生成した乱数である場合、経験分布関数は、

$$F_N(x) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I(X_i \leq x) \quad (2.40)$$

と表現される。ここで $I(X_i \leq x)$ は、 $X_i \leq x$ で 1、それ以外で 0 を満たすステップ関数であ

り, $\frac{d}{dx}I(X_i \leq x) = \delta(x - X_i)$ を満たす. すなわち, 確率密度関数の粒子近似はサンプルしたデータを用いてデルタ関数によってなされる.

$$p_N(x) = \frac{d}{dx}F_N(x) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta(x - X_i) \quad (2.41)$$

2.4.1 モンテカルロ法による数値積分

モンテカルロ法による数値積分について簡単に述べる.

n 重積分 $I = \int_0^1 dx_1 \cdots \int_0^1 dx_n f(x_1, \cdots, x_n)$ を粒子数 N のモンテカルロ法で計算するには, 0 以上 1 以下の値をとる $n \times N$ 個の一様乱数, $0 \leq X_{i,j} \leq 1, i = 1, \cdots, n, j = 1, \cdots, N$ を生成し,

$$I_N = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N f(X_{1,j}, \cdots, X_{n,j}) \quad (2.42)$$

とすれば, I_N が積分の近似値になる. また, $p(x_1, \cdots, x_n)$ が多次元確率密度関数である場合,

$$I = \int dx_1 \cdots \int dx_n f(x_1, \cdots, x_n) p(x_1, \cdots, x_n) \quad (2.43)$$

の評価, すなわち関数 f の平均を粒子数 N のモンテカルロ法で計算するには, $p(x_1, \cdots, x_n)$ から乱数 $(X_{1,j}, \cdots, X_{n,j}), j = 1, \cdots, N$, を生成し,

$$I_N = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N f(X_{1,j}, \cdots, X_{n,j}) \quad (2.44)$$

によって実行できる. また同時に, 式 (2.43) に対し密度関数の粒子近似 (式 (2.41)) を用い

ると,

$$I_N = \int dx_1 \cdots \int dx_n f(x_1, \dots, x_n) \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \delta(x_1 - X_{1,j}) \cdots \delta(x_n - X_{n,j}) \quad (2.45)$$

と表現できる．これらは次節における数学的な道具立ての準備である．粒子フィルタは，確率伝搬法の1期先予測 (式 (2.19)) とフィルタリング (式 (2.20)) を，この数値積分によって実行するアルゴリズムである．

2.4.2 1期先予測

一般化された状態空間モデルのシステム方程式， $\vec{x}_t = f(\vec{x}_{t-1}, \vec{u}_t)$ ，において，システムノイズが各時刻で独立に同一の確率分布 $p(\vec{u})$ で生成されるものとする，1期先予測 (式 (2.19)) は，

$$\begin{aligned} P(\vec{x}_t | Y_{t-1}) &= \int d\vec{x}_{t-1} P(\vec{x}_t | \vec{x}_{t-1}) P(\vec{x}_{t-1} | Y_{t-1}) \\ &= \int d\vec{x}_{t-1} \int d\vec{u}_t \delta(\vec{x}_t - f(\vec{x}_{t-1}, \vec{u}_t)) p(\vec{u}_t) P(\vec{x}_{t-1} | Y_{t-1}) \end{aligned} \quad (2.46)$$

と表現しなおすことができる．ここで $P(\vec{x}_{t-1} | Y_{t-1})$ から生成した乱数と， $p(\vec{u}_t)$ から生成した乱数をそれぞれ，

$$\vec{f}_{t-1}^{(j)} \sim P(\vec{x}_{t-1} | Y_{t-1}), \quad j = 1, \dots, N$$

$$\vec{u}_t^{(j)} \sim p(\vec{u}_t), \quad j = 1, \dots, N$$

とすると、この N 個の粒子を用いた、モンテカルロ法による式 (2.46) の積分は以下のようになる。

$$P(\vec{x}_t|Y_{t-1}) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \delta\left(\vec{x}_t - f\left(\vec{f}_{t-1}^{(j)}, \vec{u}_t^{(j)}\right)\right) \quad (2.47)$$

したがって、 $P(\vec{x}_{t-1}|Y_{t-1})$ と $p(\vec{u}_t)$ の粒子 $\{\vec{f}_{t-1}^{(j)}\}$ および $\vec{u}_t^{(j)}$ が得られているとき $P(\vec{x}_t|Y_{t-1})$ の粒子 $\{\vec{p}_t^{(j)}\}$ は、

$$\vec{p}_t^{(j)} = f\left(\vec{f}_{t-1}^{(j)}, \vec{u}_t^{(j)}\right) \quad (2.48)$$

により得られ、確率密度関数 $P(\vec{x}_t|Y_{t-1})$ は粒子近似で、

$$P(\vec{x}_t|Y_{t-1}) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \delta\left(\vec{x}_t - \vec{p}_t^{(j)}\right) \quad (2.49)$$

と表現できる。

2.4.3 フィルタリング

つぎにフィルタリングのアルゴリズムを示す。観測方程式、 $\vec{y}_t = h(\vec{x}_t, \vec{v}_t)$ 、において観測ノイズは各時刻独立に $p(\vec{v})$ で生成されるものとする。ここでノイズが加法ノイズの場合、観測方程式は、 $\vec{y}_t = h(\vec{x}_t, \vec{v}_t) = h(\vec{x}_t) + Q^{1/2}\vec{v}_t$ 、と記述され、このとき観測値が従う確率密度

関数は以下のように表現できる.

$$\begin{aligned}
P(\vec{y}_t|\vec{x}_t) &= \int d\vec{v}_t \delta(\vec{y}_t - h(\vec{x}_t, \vec{v}_t)) p(\vec{v}_t) \\
&= p\left(Q^{-\frac{1}{2}}(\vec{y}_t - h(\vec{x}_t))\right) |Q^{-\frac{1}{2}}|
\end{aligned} \tag{2.50}$$

この式に, 1 期先予測で計算する予測分布の粒子 $\vec{p}_t^{(j)}$ と観測値 $\vec{y}_t$ を代入すると, 粒子の尤度が計算される. すなわち, $\alpha_t^{(j)}$ を尤度として, $\alpha_t^{(j)} = P(\vec{y}_t|\vec{x}_t^{(j)})$ である.

式 (2.49) で粒子近似表現された $P(\vec{x}_t|Y_{t-1})$ を用い, フィルタリング (式 (2.20)) を記述すると,

$$\begin{aligned}
P(\vec{x}|Y_t) &= \frac{P(\vec{y}_t|\vec{x}_t)P(\vec{x}_t|Y_{t-1})}{\int d\vec{x}_t P(\vec{y}_t|\vec{x}_t)P(\vec{x}_t|Y_{t-1})} \\
&= \frac{P(\vec{y}_t|\vec{x}_t) \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \delta(\vec{x}_t - \vec{p}^{(j)})}{\int d\vec{x}_t P(\vec{y}_t|\vec{x}_t) \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta(\vec{x}_t - \vec{p}^{(i)})} \\
&= \frac{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N P(\vec{y}_t|\vec{p}_t^{(j)}) \delta(\vec{x}_t - \vec{p}_t^{(j)})}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N P(\vec{y}_t|\vec{p}_t^{(i)})} \\
&= \sum_{j=1}^N \frac{\alpha_n^{(j)}}{\sum_{i=1}^N \alpha_n^{(i)}} \delta(\vec{x}_t - \vec{p}_t^{(j)})
\end{aligned} \tag{2.51}$$

となり, すなわち $P(\vec{x}|Y_t)$ は 1 期先予測の粒子 $\vec{p}_t^{(j)}$ を尤度 $\alpha_t^{(j)}$ で重み付けした分布であることが理解できる. この分布 $P(\vec{x}|Y_t)$ にしたがって生成された乱数が, フィルタリングの粒子

$$\vec{f}_t^{(j)} \sim P(\vec{x}_t|Y_t), \quad j = 1, \dots, N \tag{2.52}$$

となる．これを実装する方策は1通りではないのだが，本研究においては $P(\vec{x}|Y_t)$ (式 (2.51)) の経験分布関数を作り，図 2.2 に示すように一様乱数によってランダムにリサンプリングする方法を用いる [37, 82]．これは $\{\vec{p}_t^{(1)}, \dots, \vec{p}_t^{(N)}\}$ を $\alpha_n^{(j)}$ ($j = 1, \dots, N$) に比例した確率でリサンプリングするという操作である．

2.4.4 粒子フィルタの更新則まとめ

以上を要約すると，粒子フィルタの更新則は以下の段階的なステップにまとめることができる．

(0) 初期値の設定：初期密度関数 $P(\vec{x}_0)$ に従い，乱数 $\vec{f}_0^{(j)} \sim P(\vec{x}_0)$ ($j = 1, \dots, N$) を生成．

(1) $t = 1, \dots, T$ について以下のステップを繰り返す．

(i) 1 期先予測

1. システムノイズの生成．乱数 $\vec{u}_t^{(j)}$ ($j = 1, \dots, N$) を生成

2. 予測の粒子 $\vec{p}_t^{(j)} = f\left(\vec{f}_{t-1}^{(j)}, \vec{u}_t^{(j)}\right)$ ($j = 1, \dots, N$) を計算

(ii) フィルタ

1. 尤度の計算． $\alpha_t^{(j)} = P(\vec{y}_t|\vec{x}_t^{(j)})$ を計算する．

2. リサンプリング． $\{\vec{p}_t^{(1)}, \dots, \vec{p}_t^{(N)}\}$ から確率 $\left\{\frac{\alpha_n^{(1)}}{\sum_{i=1}^N \alpha_n^{(i)}}, \dots, \frac{\alpha_n^{(N)}}{\sum_{i=1}^N \alpha_n^{(i)}}\right\}$ にしたがってリサンプリングを行い， $\{\vec{f}_t^{(1)}, \dots, \vec{f}_t^{(N)}\}$ を生成する．

これを図で説明したものが図 2.2 である．

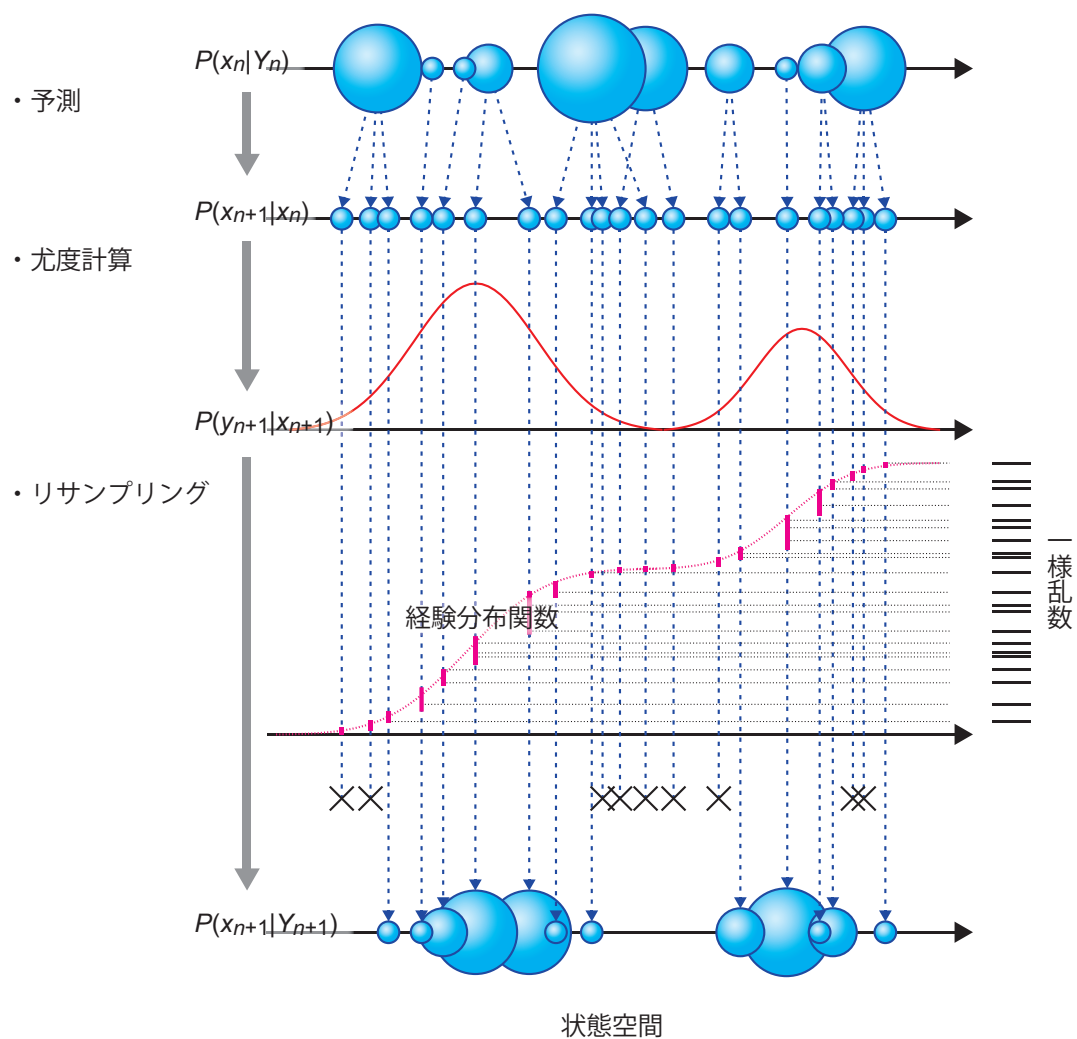


図 2.2: 粒子フィルタの更新則. 初期値が与えられた後は, $n = 1, \dots, N$ で “予測”, “尤度計算”, “リサンプリング” を繰り返し実行する.

2.5 まとめ

本章では状態空間モデルを用いた、状態推定の一般論、カルマンフィルタ、拡張カルマンフィルタ、粒子フィルタについて説明した。本研究においては、3章で粒子フィルタ、4章で拡張カルマンフィルタを用いている。

粒子フィルタは、システムの線形性やノイズの正規性を要求したいため、非常に汎用的なフィルタリング手法であるが、計算コストの問題には注意しなくてはならない。確率密度関数をいくつの粒子によって近似するか、多ければ多いほど近似精度が高まるが計算が重くなり、少なければ逆に精度が落ちけれども計算は速くなる。具体的な数字としては、3章で行った1次元の状態空間モデルでの $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定の問題では、1000 粒子から 5000 粒子ほどでモンテカルロ誤差はあるが許容できる精度で計算できた。1000 粒子より少なくなると視覚的にもモンテカルロ誤差が確認できるほど大きくなり試行ごと結果が変動し、多くした場合には 50000 粒子ほどでモンテカルロ誤差がほぼなくなった。計算時間では3章の $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定の問題に限定するならば、現在のワークステーションクラスの計算機で 1000 粒子で数 10 秒、50000 粒子では 1 時間弱程で行える。この程度なら全く問題にならない速さであるが、しかし多くの場合パラメータ推定など派生した問題も処理する必要がある。たとえばパラメータ推定に、単純な for 文で 10000 格子点のグリッドサーチを行えば 10000 倍の時間になる。並列化するとしてもメモリの制約等もあり、時間、精度を含めたいろいろなトレードオフがある。すなわち、実用に際しては状態空間モデルを近似的な簡単な記述で次元を落とすなどの工夫をしたり、または拡張カルマンフィルタなど、他の選択肢も検討してみるのがよいと思われる。どのフィルタリング手法も万能ではないので、目的に合わせた選択が必要である。

第3章 粒子フィルタによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の統計的推定

3.1 導入

本章ではカルシウムイメージング法によって計測された神経細胞 Ca^{2+} 蛍光データの、空間的に1点の時系列から細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ を推定する、較正の問題に焦点を当てる。この問題は、 Ca^{2+} 指示蛍光色素が実用化された初期の段階から重要視され、定式化されてきた問題である [16, 74, 65]。以後、決定論的な較正式が数多く提案、応用されてきたが [16, 49, 27, 40, 58, 63, 39, 46]、それらは蛍光プローブを用いたイメージングでは不可避の問題である、ノイズによるシグナルの劣化が考慮されていない。近年の神経生理学分野では2光子励起蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡の登場などにより、より細かい空間解像度とより速い時間解像度が実現され、また実験生物の自由運動下でのレコーディングなど、よりシビアな測定環境への応用がなされている。結果、より微弱なシグナルを扱う実験や、物理的な振動にさらされる実験などが増しており、すなわち較正の問題においてノイズの影響を考慮する必要性が高まっている。

近年我々を含め数グループで、このようなモチベーションの元、較正の問題に対して統計的な手法を用いる試みがなされている [71, 70, 30]。Vogelstein らや Tsunoda らは、 Ca^{2+} と色素の化学反応や蛍光検出過程を状態空間モデルで記述し、前者は活動電位の発生とそれに

伴う相対的な Ca^{2+} 変化, 後者は Ca^{2+} 流入と絶対的な $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定を試みている [71, 70]. しかし, パラメータ推定の問題に着目すると, カルシウムイメージングで得られるデータは 1 波長計測の場合で 1 時系列, 2 波長計測の場合で 2 時系列であるのに対して, モデルの潜在変数やパラメータの数が多いため, 原理上すべてのパラメータを一意に決定することは不可能である. この問題に対して Joulcla らは, 推定する全パラメータをガウス分布で生成し, $[\text{Ca}^{2+}]$ とパラメータの推定を行っている [30]. しかし, 彼らの研究では, $[\text{Ca}^{2+}]$ の時間的変化を 1 つの指数関数のみで記述しているので, 複雑な $[\text{Ca}^{2+}]$ の挙動を推定できない. また全てのパラメータに対してガウス分布の拘束が適用されており, どのパラメータが不定であるのか, その拘束が現実妥当であるのか議論があいまいである.

本研究では, これらの統計的な手法を応用した先行研究を発展させ, $[\text{Ca}^{2+}]$ の複雑な経時的变化を記述できる状態空間モデルにおいて, パラメータに事前分布を導入することで, $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定とパラメータ推定の両方の問題の解決を試みる. ここで導入するパラメータの事前分布は, 実験的に決定可能な分布であり, 先行研究においても実験的な議論がされている. この状態空間モデルを粒子フィルタで実装し, $[\text{Ca}^{2+}]$ とパラメータの推定を行う.

まずは問題を明確にするために, 最も古典的な従来手法である Grynkiewicz らの較正式とそれから派生した手法を紹介し, 観測ノイズに対してこれらの決定論的な較正式が共通に持つ問題点を例示する.

3.2 較正式

すで述べてきたように, カルシウムイメージング法によって計測される観測値は Ca^{2+} 指示色素が発する蛍光の強度である. この蛍光強度から $[\text{Ca}^{2+}]$ を定量する場合, 較正する必要

がある． 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． Ca^{2+} が結合し錯体を形成した時と Ca^{2+} から遊離した時では，蛍光量子収率に差があり，発光する蛍光量が異なる．Grynkiewicz らは，励起光の照射によって発光する蛍光量を式 (1.2) のように記述し，さらに Ca^{2+} と色素の 1:1 結合の反応に準平衡を仮定して，以下の較正式を導出した [16].

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \quad (3.1)$$

ここで K_d は色素の解離定数 (μM) である． $F_{\min}$ と $F_{\max}$ は蛍光強度の最小値と最大値で，それぞれ色素が Ca^{2+} と完全に遊離した時と完全に結合した時の蛍光強度に対応する．すなわち全色素濃度を $[D]_{\text{tot}}$ とすると $F_{\min} = S_f[D]_{\text{tot}}$ ， $F_{\max} = S_b[D]_{\text{tot}}$ である． F に観測値である蛍光強度の時系列データを入力すると較正ができる．較正に必要な 3 パラメータ $\{K_d, F_{\min}, F_{\max}\}$ のうち， K_d は色素自体に由来する性質で，細胞ごとに大きく変動することがないとされる [46]．ただし温度や pH によって変動することが知られているので，細胞質環境にできるだけ近付けた媒質での測定が望ましい [6].

$\{F_{\min}, F_{\max}\}$ は，細胞の体積¹や励起光の強度，蛍光の検出器（実験セットアップの CCD センサ）の性能，細胞内環境における蛍光量子収率などによって，サンプル（細胞）ごとに変動するため，細胞ごとに同定する必要がある²． $F_{\max}$ は，電気刺激等により細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ を意図的に高めることは可能なため，実験的同定が比較的簡単に行えるが， $F_{\min}$ の計測は非常に難しい．Kao らによって，イオノフォアを用い膜上に Ca^{2+} チャネルを導入し細胞内の Ca^{2+} を汲みだしてゼロ Ca^{2+} の状態を作り測定する方法が提案されているが，非可逆的であ

¹通常の蛍光顕微鏡の場合，深さ方向の空間分解能がないため当然同じ $[\text{Ca}^{2+}]$ でも細胞体などの厚みがあるところではより明るくなり樹状突起などの細いところでは暗くなる．すなわち画像中の細胞領域のピクセルごとに $\{F_{\min}, F_{\max}\}$ は異なる．

²蛍光色素の退色によって同じサンプルでも時間とともに変動するが，ここではその問題は無視する

り、侵襲によって細胞の状態が変わってしまうため実用的な方法とはいえない [34]. ゆえに較正式 (3.1) には $F_{\min}$ の測定の困難さという問題点がある.

Fura-2 のような 2 波長励起型の Ca^{2+} 指示色素の場合、レシオメトリック・イメージングが行え、式 (3.1) と同じく Grynkiewicz らが提案した以下の較正式が適用できる [16].

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \quad (3.2)$$

ここで、 R は蛍光強度の比 $R = F_1/F_2$ で、 F_1 と F_2 はそれぞれ波長 1 と 2 の励起光で発光する蛍光強度である³. $R_{\min}$ と $R_{\max}$ はそれぞれの励起光での蛍光強度の最小値の比 $R_{\min} = S_{f1}/S_{f2}$ と最大値の比 $R_{\max} = S_{b1}/S_{b2}$ で、 S_{f1} と S_{f2} は励起光 1 と 2 での完全に遊離した色素の単位濃度あたりの蛍光強度、 S_{b1} と S_{b2} は Ca^{2+} と完全に結合した色素の単位濃度あたりの蛍光強度である. レシオメトリック・イメージングの利点は、励起光強度の場所によるムラ、色素の退色、検出器の性能（ゲインや光子の検出性能に由来するセットアップごとの強度値の差）、体積などがキャンセルできる点である. 特に体積がキャンセルできることは非常に大きな利点で、内液をゼロ Ca^{2+} と高 Ca^{2+} に調整し色素を導入した 2 本のキャピラリーを細胞と並べて設置し、キャピラリーの蛍光強度を計測すれば、細胞内で計測しなくても $R_{\min}$ と $R_{\max}$ を計測することができる. さらにキャピラリー同士は同体積のため励起光 2 のそれぞれの蛍光強度の比を取れば S_{f2}/S_{b2} を同定できる [40]⁴. このような方法が可能のため、式 (3.2) は $[\text{Ca}^{2+}]$ の較正法として最もポピュラーでスタンダードな方法である. 同時に欠点も多く、4 パラメータ $\{K_d, R_{\min}, R_{\max}, S_{f2}/S_{b2}\}$ を同定する必要がある点、2 つの波長の励起光を分光するのに複雑な機構のセットアップが必要で、2 光子励起顕微鏡のようなレーザー走査顕微

³Fura-2 の場合、波長 1 は 350 nm、波長 2 は 380 nm である.

⁴もちろんこれらの値は細胞質内とは違う環境での測定値であるため、その違いには目をつぶるという前提に立っている

鏡や自由行動下動物への応用には実装が困難である点、2つの励起光を時間的に切り替えてそれぞれの励起光に対応する蛍光をレコーディングする必要があるため、時間分解能がカメラの性能の半分になってしまう点、2波長励起型の色素はSN比がそれほど高くなく、樹状突起やスパインのような細かい構造の観測には向かないという用途への制約がある点、蛍光強度比を取るためノイズをさらに増大させ $[Ca^{2+}]$ 推定値の誤差を大きくしてしまう点、2波長励起型は紫外光で励起されるため、UV が組織に吸収され、強い自家蛍光と組織へのダメージを与えてしまう点などがある。

Grynkiewicz らの較正式から派生した、改良された較正式が提案されている。Lev-Ram らは休止 $[Ca^{2+}]$ を用いて蛍光強度の最小値 $F_{\min}$ を消去した較正式を提案した [40]。

$$[Ca^{2+}] = \frac{[Ca^{2+}]_{\text{rest}} + K_d \frac{\Delta F/F_r}{\Delta F_{\max}/F_r}}{1 - \frac{\Delta F/F_r}{\Delta F_{\max}/F_r}} \quad (3.3)$$

ここで $\Delta F/F_r$ は、蛍光強度のベースラインで正規化した蛍光強度変化で、 $\Delta F_{\max}/F_r$ はベースラインで正規化した蛍光強度の最大値である。 $[Ca^{2+}]_{\text{rest}}$ は休止状態の $[Ca^{2+}]$ で、これは細胞種や異なる値を示す。この式において同定するパラメータは $\{K_d, [Ca^{2+}]_{\text{rest}}, F_{\max}\}$ の3パラメータである。この手法は Ca^{2+} 指示色素に Fura-2 を用いることが前提としてあり、まず2波長計測によって式 (3.2) を用い、 $[Ca^{2+}]_{\text{rest}}$ を定量する。次にこの式 (3.3) によって1波長計測の時系列 F から、 $[Ca^{2+}]$ を較正するという枠組みである。 $F_{\max}$ は色素を導入した高 Ca^{2+} のキャピラリーの蛍光強度値を用いる。1波長計測の較正式が持つ $F_{\min}$ の困難さを2波長計測で補い、かつ較正パラメータの同定以外では1波長計測の高速な蛍光時系列を用いる、双方の利点を最大限利用した手法となっている。

さらに、Maravall らは細胞の個体差に依存しない蛍光色素固有の性質である蛍光強度のダ

イナミックレンジ $R_f = F_{\max}/F_{\min}$ を用いた較正式を提案した [46].

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{F/F_{\max} - 1/R_f}{1 - F/F_{\max}} \quad (3.4)$$

この式において同定するパラメータは $\{K_d, R_f, F_{\max}\}$ であり, このうち K_d, R_f は色素固有の性質であるため, サンプル (細胞) に依存する変動が大きい.

R_f は, 蛍光強度の最小値および最大値 $F_{\min}$ と $F_{\max}$ の観測値から計算するが⁵, キュベット内で調整したそれぞれの観測値と細胞で計測する値では異なるため, キュベット内か細胞内かで値が変動する. 当然, 問題としているのは細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$, 色素導入した細胞の蛍光強度時系列 F であるため, R_f は細胞内環境での値を用いる必要がある. 彼らは以下のような方策に従い, 細胞内環境での R_f を実験的に同定した.

最大蛍光強度 $F_{\max}$ は, すべての蛍光色素が Ca^{2+} と結合した時の蛍光強度であるが, 細胞内で測定する場合は細胞膜などに光が吸収されるため, $F_{\max}$ の観測値は原理的に (キュベット内) > (細胞内) となる. このため R_f の値は, (キュベット内) > (細胞内) である. また一般に細胞内の Ca^{2+} を除去することは技術的に難しく不可逆的な侵襲を与えてしまうため, $F_{\min}$ の代わりに休止状態の蛍光強度 F_{rest} を用いた値 $F_{\max}/F_{\text{rest}}$ を考える. これは, $F_{\min} < F_{\text{rest}}$ であるため, 細胞内での $F_{\min}$ を用いた値と比べると R_f は (細胞内) > (F_{rest} を用いた値) となる. 結局 R_f は,

$$(\text{キュベット内}) > (\text{細胞内}) > (F_{\text{rest}} \text{ を用いた値})$$

であり, キュベット内での値と, $F_{\max}/F_{\text{rest}}$ は実験的に求めることが容易である. 彼らは, そ

⁵ここで $F_{\min}, F_{\max}$ は前述した定義 $F_{\min} = S_f[D]_{\text{tot}}, F_{\max} = S_b[D]_{\text{tot}}$ と同じで, 自家蛍光等バックグラウンドの信号を引いた観測値を用いる

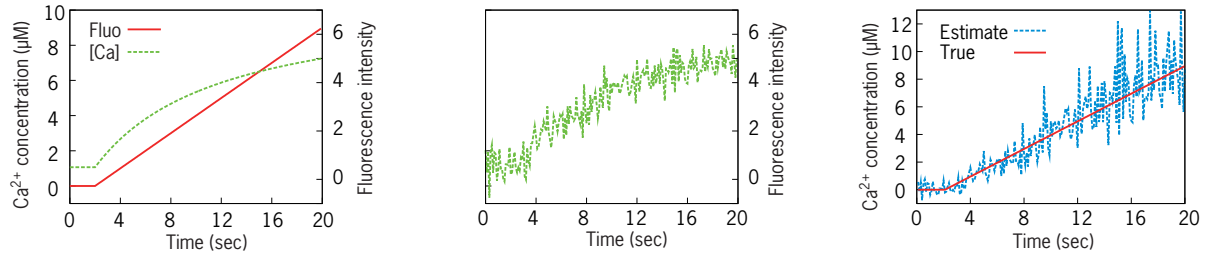


図 3.1: 決定論的な較正式が観測ノイズに対して持つ問題. 左図, 線形に上昇する $[Ca^{2+}]$ ($[Ca]$) を仮定した場合, 蛍光強度は Fluo のような飽和曲線を描く; 中央図, 観測値には観測ノイズが線形に加算される. 右図; 較正式を用いてノイズで劣化した蛍光強度から $[Ca^{2+}]$ を較正すると, 色素の飽和に対応してノイズを過剰に増大させてしまう.

の2つをいくつかサンプリングして, キュベット内での値の最小値と $F_{\max}/F_{\text{rest}}$ の最大値の間の値を細胞内での R_f とした. このようにして同定した値が, Oregon Green 488 BAPTA-1 では5.7-8.5であった. つまり, この考えに従うと R_f には幅があり, 実測値には誤差があることになるが, 彼らはこの R_f の誤差が $[Ca^{2+}]$ の推定結果にそこまで影響を与えないことも確かめている ([46] の Figure 1).

この較正手法は1波長計測が必要な点, 実験的同定が容易なパラメータである点, 同定結果の誤差に対してロバストである点など, 従来の較正式 (式 (3.1), (3.2), (3.3)) が持つ欠点をほとんど克服している.

しかし以上の方法は共通してノイズでシグナルが劣化することを考慮していない. 化学的な Ca^{2+} 指示蛍光色素は導入した細胞内での量 (分子数) が限られるので, 蛍光強度は $[Ca^{2+}]$ の変動に対し飽和曲線に従う非線形な変化を示す (図 3.15). CCD センサの読み出しノイズなどはシグナルに対して線形に加算されるので, 色素が飽和している時と飽和していない時とではシグナルノイズ比 (SN 比) が異なり, 飽和時は SN 比が悪化する. 結果として, $[Ca^{2+}]$ が線形に上昇した場合を仮定すると, パラメータが正確に同定された較正式であっても, 図 3.15 のように, 飽和時にノイズを過剰に拡大してしまう. Fluo-5F ($K_d = 90 \mu\text{M}$) や OGB-5N

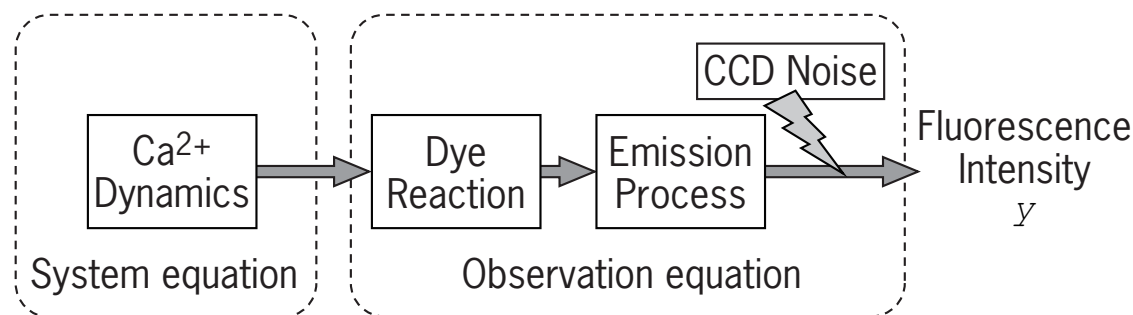


図 3.2: Ca イメージングで観測される Ca^{2+} 蛍光強度信号をモデル化した状態空間モデル ($K_d = 20 \mu\text{M}$) のような高 K_d 値の低親和性色素を用いた場合、この問題は現れにくいですが、その場合は $[\text{Ca}^{2+}]$ の急峻な変化を観測できなくなる。従来の決定論的な較正式は、共通してこのような問題を孕んである。

3.3 提案手法

決定論的な較正式が根本的に持つ問題点を克服ために、較正の問題に状態空間法を適用し、ノイズで劣化した観測値から劣化する前の潜在変数である $[\text{Ca}^{2+}]$ を推定する方法を提案する。

3.3.1 Ca^{2+} 蛍光時系列のモデル化

カルシウムイメージングにおける蛍光信号の発生機序を図 3.2 に示す以下の 4 つの過程でモデル化する。

1. **Ca^{2+} ダイナミクス** — 細胞質内で Ca^{2+} 濃度変化が起きる過程。
2. **色素反応** — Ca^{2+} とカルシウム指示色素の反応過程。
3. **発光過程** — 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発光する過程

4. CCD ノイズ — 蛍光の検出の際に、シグナルがノイズで劣化する過程

以下、各過程の具体的な数理モデルを示す [38, 66].

Ca²⁺ ダイナミクス：細胞内の Ca²⁺ 濃度 (以降 [Ca²⁺]) には恒常性があり、通常はある濃度に保たれている (およそ 0.1 μM). なんらかの要因により Ca²⁺ 流入が発生すると、[Ca²⁺] はダイナミカルに変化する. ある空間的な一点に注目しそこでの [Ca²⁺] を、連続的に変化する時系列を表現する汎用的なモデルであるトレンドモデルでモデル化する [36].

$$c_{n+1} = c_n + \gamma u_n \quad (3.5)$$

ただし、 c_n は [Ca²⁺] (μM), 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ある. γ はノイズ強度を表わし超パラメータである. ここで、 $\delta_{nn'}$ はクロネッカーのデルタで、 $\delta_{nn'} \equiv 1$ ($n = n'$), $\delta_{nn'} \equiv 0$ ($n \neq n'$) である. 添え字 “ n ” は離散時刻 n を表す.

色素反応：遊離した状態の Ca²⁺ は Ca²⁺ 指示色素と 1:1 の結合比で反応する. Ca²⁺ と色素の反応は、カルモジュリン等の内因性のカルシウム結合タンパク質と比べ十分に速く、準定常状態にあると仮定すると、色素濃度は質量作用の法則から以下の式で記述できる.

$$d_n = \frac{[D]_{\text{total}}}{c_n/K_d + 1} \quad (3.6)$$

ここで、 d_n は Ca²⁺ から遊離した色素の濃度 (μM), $[D]_{\text{total}}$ は全色素濃度 (μM) である. $[D]_{\text{total}}$ は定数を仮定する. K_d は色素の細胞内での解離定数 (μM) である.

発光過程：Ca²⁺ 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. Ca²⁺ が結合し錯体を形成した時と遊離した時では蛍光量子収率に違いがあり、発光する蛍光量が異なる.

本研究では従来手法にしたがい、蛍光量 F 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、

$$F = S_f d_n + S_b ([D]_{\text{total}} - d_n) + F_b \quad (3.7)$$

ここで、 S_f は Ca^{2+} 遊離色素の単位濃度当たりの蛍光量、 S_b は Ca^{2+} 結合色素の単位濃度当たりの蛍光量である。 F_b は、蛍光信号の検出器、CCD センサのバイアス電流 (暗電流) や自家蛍光など、着目している現象以外から定常的に印加されるバックグラウンドの蛍光量である。蛍光量 F は最終的に CCD センサが検出する階調値 (強度) を想定しているため、これらの係数には単位がない。

CCD ノイズ: 次に CCD ノイズをモデル化する [30]。発光した蛍光をイメージングする過程で、蛍光の光子が CCD センサの画素 (ピクセル) に入る。その際ピクセルに入る光子数 N がポアソン過程に従うとし、蛍光量 F と光子数 N の関係を次のように記述する。

$$P(N|F) = \frac{\exp(-F) F^N}{N!} \quad (3.8)$$

ピクセルは光子数 N に比例した電荷がチャージされ、ピクセルごとに電荷電圧変換アンプに転送される。そして同アンプによって電圧 V として読みだされる。その際、読み出し電圧 V には読み出しノイズが重畳される。読み出しノイズは標準偏差 σ_{ro} の正規分布に従うとし、光子数 N と読み出し電圧 V の関係を、

$$P(V|N) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_{ro}^2}} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma_{ro}^2}(V - N)^2\right) \quad (3.9)$$

と表現する．この σ は測定できる定数であるので，既知とする．さらにアンプは既知のゲイン G で読み出し電圧 V を増幅し， $G \cdot V$ を出力する．最後に，アナログ値である $G \cdot V$ は AD 変換され，AD 変換後に出力される信号 y を以下のように記述する．

$$y = \lfloor G \cdot V \rfloor \quad (3.10)$$

ただし， $\lfloor \cdot \rfloor$ は “ $\cdot$ ” を越えない最大の整数を出力する．

量子化誤差が十分に小さく光子数が十分に多いと仮定し，蛍光量 F と観測信号 y の関係を次のガウス過程で近似する．

$$P(y|F) = \frac{1}{\sqrt{2\pi G^2 (\sigma_{ro}^2 + F)}} \exp \left(-\frac{(y - GF)^2}{2G^2 (\sigma_{ro}^2 + F)} \right) \quad (3.11)$$

これが CCD ノイズのモデルである．なお読み出しノイズの標準偏差 σ_{ro} と CCD センサのゲイン G は，生理実験データに提案手法を適用する場合，後述する方法にて実測するものとする．さらに撮像された動画像に任意の画素からなる関心領域 (ROI: Region of Interest) を設定する場合，関心領域内の信号を平均する設定では，関心領域の画素数を n_{roi} とすると，CCD ノイズモデルの分散が n_{roi} 改善されるとモデル化する．

$$P(y|F) = \frac{1}{\sqrt{2\pi G^2 (\sigma_{ro}^2 + F) / n_{roi}}} \exp \left(-\frac{(y - GF)^2}{2G^2 (\sigma_{ro}^2 + F) / n_{roi}} \right) \quad (3.12)$$

状態空間表現

式 (3.5)-(3.7), (3.12) をまとめると, 下記の状態空間モデルが記述できる.

$$[\text{システム方程式}] : c_{n+1} = c_n + \gamma u_n \quad (3.13)$$

$$[\text{観測方程式}] : y_n = G \left(\frac{A}{c_n/K_d + 1} + B \right) + \frac{G}{\sqrt{n_{roi}}} \sqrt{\sigma_{ro}^2 + \frac{A}{c_n/K_d + 1} + B} v_n \quad (3.14)$$

ただし, $A = [D]_{\text{total}} (S_f - S_b)$, $B = [D]_{\text{total}} S_b + F_b$ であり, v_n は $\langle v_n \rangle = 0$, $\langle v_n v_{n'} \rangle = \delta_{nn'}$ を満たす白色ガウスノイズである. システム方程式 (式 (3.13)) はベイズ統計において潜在変数に対する事前分布に当たり, パラメータ γ はハイパーパラメータと呼ばれる真の値を持たないパラメータである. また観測方程式の未知パラメータは A と B である.

状態空間モデル (式 (3.13, 3.14)) を確率密度関数で記述し直すと, 以下の遷移確率密度関数と尤度関数を得る.

$$P(c_{n+1}|c_n, \gamma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\gamma^2}} \exp \left(-\frac{(c_{n+1} - c_n)^2}{2\gamma^2} \right) \quad (3.15)$$

$$P(y_n|c_n, A, B) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \frac{G^2}{n_{roi}} \left(\sigma_{ro}^2 + \frac{A}{c_n/K_d + 1} + B \right)}} \exp \left(-\frac{\left(y_n - G \left(\frac{A}{c_n/K_d + 1} + B \right) \right)^2}{2 \frac{G^2}{n_{roi}} \left(\sigma_{ro}^2 + \frac{A}{c_n/K_d + 1} + B \right)} \right) \quad (3.16)$$

以上, 式 (3.13, 3.14) または式 (3.15, 3.16) がカルシウム蛍光時系列のモデルである.

3.3.2 対数周辺化尤度と周辺化事後確率

本研究の最終的な目標は潜在変数である Ca^{2+} 濃度, $C_n = \{c_0, c_1, \dots, c_n\}$, を蛍光データから推定することである. そのためにまず未知パラメータ $\theta = \{\gamma, A, B\}$ を推定する. この問題に対し, われわれは2つの方法を用いる. 一つは, 統計学において通常用いられる, モデルの尤度に基づき推定する方法で, もう一つはベイズ統計の枠組みを適用した, 周辺化事後確率に基づいた推定である.

前章ですでに述べた, 観測データに基づいたモデルの尤度は下式で計算できる.

$$P(y_{n+1}|Y_n) = \int dx_{n+1} P(y_{n+1}|x_{n+1}) P(x_{n+1}|Y_n) \quad (3.17)$$

ただし y_{n+1} には実際の観測データが入力され, Y_n は時刻0から n までのデータセット $Y_n = \{y_0, y_1, \dots, y_n\}$ である. 時刻 T までのデータ Y_T が与えられたとき, 周辺化尤度は未知パラメータを θ として下式のように記述できる.

$$L(\theta) = P(y_0, \dots, y_T|\theta) = \prod_{n=0}^T P(y_{n+1}|Y_n, \theta) \quad (3.18)$$

さらに対数をとると対数周辺化尤度が計算できる.

$$l(\theta) = \log L(\theta) = \sum_{n=1}^T P(y_n|Y_{n-1}, \theta) \quad (3.19)$$

この対数周辺化尤度を最大化する点を推定値とする方法が一つ目のパラメータ推定方法で

ある。

$$\{\hat{\gamma}, \hat{A}, \hat{B}\} = \operatorname{argmax}_{\gamma, A, B} l(\theta) \quad (3.20)$$

この最大化する点の探索には、パラメータ空間 $\theta = \{\gamma, A, B\}$ に適当な格子を設定し、各格子点における対数周辺化尤度を評価し探索する方法、グリッドサーチを用いる。

次に周辺化事後確率に基づいた推定方法について述べる。まずベイズの定理から、事後確率は以下で与えられる。

$$\begin{aligned} P(c_0, \dots, c_n, \gamma, A, B | Y_n) &= \frac{1}{Z} P(c_0, \dots, c_n | \gamma) P(Y_n | c_0, \dots, c_n, A, B) P(\gamma) P(A) P(B) \\ &= P(c_n | c_{n-1}, \gamma) P(c_{n-1} | c_{n-2}, \gamma) \cdots P(c_1 | c_0, \gamma) P(c_0) P(y_n | c_n, A, B) \\ &\quad \times P(y_{n-1} | c_{n-1}, A, B) \cdots P(y_1 | c_1, A, B) P(\gamma) P(A) P(B) \end{aligned} \quad (3.21)$$

ここで、 Z は正規化項で、 $P(\gamma)$, $P(A)$, $P(B)$ はパラメータの事前分布である。これより潜在変数を周辺化したパラメータの周辺化事後確率は下式で与えられる。

$$\begin{aligned} P(\gamma, A, B | Y_T) &= \frac{1}{Z} \int dc_T \int dc_{T-1} \cdots \int dc_0 \\ &\quad \times \prod_{n=0}^{T-1} P(c_{n+1} | c_n, \gamma) P(c_0) \prod_{n=1}^T P(y_n | c_n, A, B) P(\gamma) P(A) P(B) \end{aligned} \quad (3.22)$$

パラメータ空間 $\theta = \{\gamma, A, B\}$ において、この周辺化事後確率を最大化する点をパラメータの推定値 $\hat{\theta} = \{\hat{\gamma}, \hat{A}, \hat{B}\}$ とする。

$$\{\hat{\gamma}, \hat{A}, \hat{B}\} = \operatorname{argmax}_{\gamma, A, B} P(\gamma, A, B | Y_T) \quad (3.23)$$

このようにして推定したパラメータ $\{\hat{\gamma}, \hat{A}, \hat{B}\}$ を用いて、続いて Ca^{2+} 濃度推定を行う。ある時刻 n における推定値は、次式のように周辺化事後確率の形で与えられる。

$$P(c_n|Y_T) = \frac{1}{Z} \int dc_T \cdots \int dc_{n+1} \int dc_{n-1} \cdots \int dc_0 \\ \times \prod_{n=0}^{T-1} P(c_{n+1}|c_n, \hat{\gamma}) P(c_0) \prod_{n=1}^T P(y_n|c_n, \hat{A}, \hat{B}) \quad (3.24)$$

周辺化は時刻 n 以外の時刻の状態変数に関し行う。またこのように、最終の時刻 T から遡って行う周辺化は平滑化とよばれ、 $P(c_n|Y_T)$ は平滑化分布と呼ばれる [82]。

パラメータの事前分布

パラメータの周辺化事後確率に基づく推定の利点は、パラメータの事前分布 $P(\gamma)$, $P(A)$, $P(B)$ によって探索範囲を拘束できる点にある。これによって、仮にパラメータに不定性がある場合でも、最適解を一意に決めることができる。パラメータの事前分布 $P(\gamma)$, $P(A)$, $P(B)$ の内、ハイパーパラメータ γ に関しわれわれは事前知識を有しないので、 $P(\gamma)$ は常に一様分布とする。

パラメータ A と B の事前分布は2通りの方法で生成する。一つは休止 Ca^{2+} 濃度 C_{rest} の分布 $P(C_{rest})$ を用いる方法、もう一つは指示色素のダイナミックレンジ R_f の分布 $P(R_f)$ を用いる方法である。

・ $P(C_{rest})$ を用いる場合： Ca^{2+} 濃度には恒常性があり、細胞種によって異なるが休止状態においてだいたい $50 - 100 \mu\text{M}$ の一定値をとることが知られている [22, 21, 40, 46]。これに基

づき休止 $[\text{Ca}^{2+}]$ の分布 $P(C_{rest})$ を正規分布で記述する.

$$P(C_{rest}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_{crest}^2}} \exp\left(-\frac{(C_{rest} - \bar{C}_{rest})^2}{2\sigma_{crest}^2}\right) \quad (3.25)$$

ここで, $\bar{C}_{rest}$ と σ_{crest}^2 は休止 $[\text{Ca}^{2+}]$ 分布の平均と分散である. パラメータ A に関する分布 $P(A)$ には事前知識がなく, 一様に分布するとする. 休止状態における蛍光強度の平均を y_{rest} とすると観測方程式 (式 (3.14)) から $y_{rest} = G^2(A/(C_{rest}/K_d + 1) + B)$ と記述できる. モデルの尤度関数 (式 (3.16)) から, パラメータ B の分布 $P(B|A, C_{rest})$ が以下のように得られる.

$$P(B|A, C_{rest}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \frac{G^2}{n_{roi}} \left(\sigma_{ro}^2 + \frac{y_{rest}}{G}\right)}} \exp\left(-\frac{\left(B + \frac{A}{C_{rest}/K_d + 1} - \frac{y_{rest}}{G}\right)^2}{\frac{2}{n_{roi}} \left(\sigma_{ro}^2 + \frac{y_{rest}}{G}\right)}\right) \quad (3.26)$$

ここで, C_{rest} および A は $P(C_{rest})$ および $P(A)$ によって生成された実現値であり, y_{rest} は実際に測定された休止状態における蛍光強度の平均である.

$P(C_{rest})$ を仮定する場合, 以上の $P(A)$ および $P(B|A, C_{rest})$ をパラメータの事前分布とする.

・ $P(R_f)$ を用いる場合: 蛍光強度の最大値 $F_{\max}$ と最小値 $F_{\min}$ の比である指示色素のダイナミックレンジ $R_f = F_{\max}/F_{\min}$ は, 色素固有の性質で, 休止 $[\text{Ca}^{2+}]$ やその他細胞ごとに大きく変動する因子に依存せず, 色素ごとに特定の値を取ることが知られている [46]. 例えば, Oregon green BAPTA-1 では $5.7 - 8.5$, Fluo-3 では $50 - 200$, Fluo-4 では $85 - 100$ である [46, 17]. この文献値のレンジに基づき, R_f の分布 $P(R_f)$ を正規分布で記述する.

$$P(R_f) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_{rf}^2}} \exp\left(-\frac{(R_f - \bar{R}_f)^2}{2\sigma_{rf}^2}\right) \quad (3.27)$$

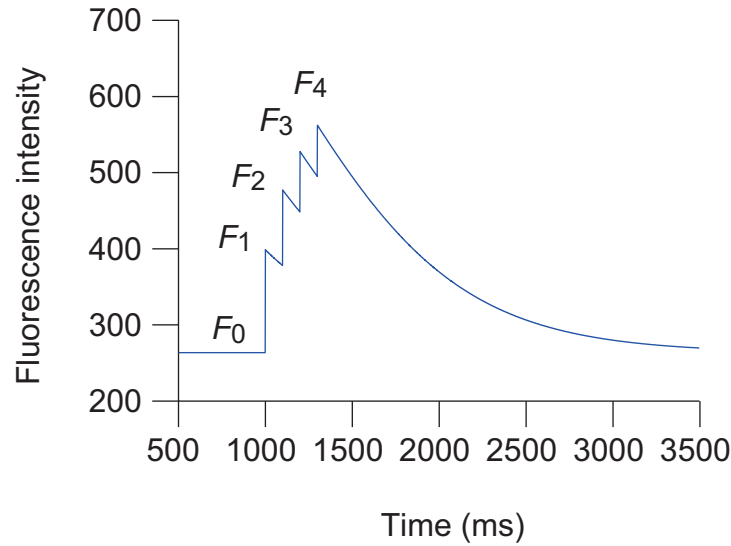


図 3.3: $F_{\max}$ の同定に用いるプロトコール

ここで, $\bar{R}_f$ と σ_{rf}^2 は文献値のレンジを参考に設定する平均と分散である. $A = [D]_{\text{total}} (S_f - S_b)$, $B = [D]_{\text{total}} S_b + F_b$ であるので, $F_{\max} = [D]_{\text{total}} S_b$, $F_{\min} = [D]_{\text{total}} S_f$ に注意すると, A と B はそれぞれ,

$$A = (1/R_f - 1)F_{\max} \quad (3.28)$$

$$B = F_{\max} + F_b \quad (3.29)$$

である. ここで, R_f はここでは分布 $P(R_f)$ から生成した実現値で, F_b はベース蛍光強度である. $F_{\max}$ を実験的に決定すれば, $P(R_f)$ を用いパラメータ A と B の事前分布が与えられる.

次に $F_{\max}$ の同定方法について説明する. $F_{\max}$ は細胞内に導入した全指示色素が全て Ca^{2+} と結合した場合の蛍光強度に対応するが, その状況を作るより簡便に見積もることができる. 以下のようなプロトコールを提案する. まず F は, ベース蛍光強度 F_b を引いた時系列とする. 100 ms 間隔 (10 Hz) くらいで細胞を刺激し, 断続的に Ca^{2+} 上昇を発生させる (図 3.3). Grynkiewicz らの較正式に従うと, 活動電位の発生以前の休止状態における蛍光強度 F_0 と

$[\text{Ca}^{2+}]$ の関係は下式のように記述できる [16].

$$C_{rest} = K_d \frac{F_0 - F_{\min}}{F_{\max} - F_0} \quad (3.30)$$

さらに, 活動電位の発生に伴って, ある一定値 Δ の Ca^{2+} 上昇が発生すると [21], 上昇時の蛍光強度 F_1 と $[\text{Ca}^{2+}]$ の関係は下式になる.

$$C_{rest} + \Delta = K_d \frac{F_1 - F_{\min}}{F_{\max} - F_1} \quad (3.31)$$

また細胞の Ca^{2+} 上昇は指数関数で減衰すると仮定すると [30, 21], 1 回の活動電位の発生に伴う Ca^{2+} 上昇の時間的減衰は, 時系列 F に対し下式のように記述できる.

$$C_{rest} + \Delta \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \quad (3.32)$$

ここで t は時間, τ は減衰の時定数である. これに基づくと 2 回目の活動電位の発生時の蛍光強度 F_2 と $[\text{Ca}^{2+}]$ の関係は下式になる.

$$C_{rest} + \Delta \left(1 + \exp\left(-\frac{1/f}{\tau}\right)\right) = K_d \frac{F_2 - F_{\min}}{F_{\max} - F_2} \quad (3.33)$$

ここで f は刺激の周波数である. 以上より, 刺激の時間間隔で生じる減衰 $\exp\left(-\frac{1/f}{\tau}\right)$ を $\exp\left(-\frac{1/f}{\tau}\right) = a$ とおくと, 各回の刺激に伴う Ca^{2+} 上昇の蛍光強度 $\{F_0, F_1, F_2, F_3, F_4, \dots\}$

と $[\text{Ca}^{2+}]$ の関係は、以下のように規則的であることが分かる．

$$C_{rest} = K_d \frac{F_0 - F_{\min}}{F_{\max} - F_0} \quad (3.34)$$

$$C_{rest} + \Delta = K_d \frac{F_1 - F_{\min}}{F_{\max} - F_1} \quad (3.35)$$

$$C_{rest} + \Delta(1 + a) = K_d \frac{F_2 - F_{\min}}{F_{\max} - F_2} \quad (3.36)$$

$$C_{rest} + \Delta(1 + (1 + a)a) = K_d \frac{F_3 - F_{\min}}{F_{\max} - F_3} \quad (3.37)$$

$$C_{rest} + \Delta(1 + (1 + (1 + a)a)a) = K_d \frac{F_4 - F_{\min}}{F_{\max} - F_4} \quad (3.38)$$

$\vdots$

これらの関係式系から (式 (3.34)-(3.37)), (式 (3.35)-(3.38)) という様に順に 4 つずつの関係式の組を連立方程式として, C_{rest} , Δ , a を消去し, $F_{\max}$ について解くと,

$$F_{\max} = \frac{A - B\sqrt{C}}{2D} \quad (3.39)$$

が 1 つの解として得られる (K_d はすべての解に現れず, また $F_{\min}$ はこの解には現れない). ただし関係式の組の順番を 0 番から数え k としたとき, A, B, C, D はそれぞれ, $A = -F_k F_{k+1}^2 + 3F_k F_{k+1} F_{k+2} - F_{k+1}^2 F_{k+2} - F_{k+1} F_{k+2}^2 - F_k F_{k+1} F_{k+3} - F_k F_{k+2} F_{k+3} + 3F_{k+1} F_{k+2} F_{k+3} - F_{k+2}^2 F_{k+3}$, $B = (F_{k+1} - F_{k+2})\sqrt{F_{k+1} - F_{k+3}}$, $C = F_k^2 F_{k+1} - 4F_k^2 F_{k+2} + 2F_k F_{k+1} F_{k+2} + 4F_k F_{k+2}^2 - 3F_{k+1} F_{k+2}^2 + 3F_{k+2}^2 F_{k+3} - 4F_k F_{k+1} F_{k+3} - 2F_k F_{k+2} F_{k+3} + 4F_{k+1} F_{k+2} F_{k+3} - F_{k+2}^2 F_{k+3}$, $D = -F_{k+1}^2 + F_k F_{k+2} + F_{k+1} F_{k+2} - F_{k+2}^2 - F_k F_{k+3} + F_{k+1} F_{k+3}$ である.

提案したプロトコールで得られる関係式系の解はこのように規則的であり, すなわちこの刺激プロトコールを用いると, 1 回の試行データから複数の $F_{\max}$ を算出することができる.

平均等の操作を行うことで、ノイズによる $F_{\max}$ の推定誤差を軽減できる。

3.3.3 粒子フィルタ

式 (3.22) や式 (3.24) で示した高次元の積分を数値的に実行することは、非常に困難な課題である。しかし状態空間モデルとして定式化された時系列データのモデルには、すでに2章で説明した、カルマンフィルタや粒子フィルタという逐次的な計算アルゴリズムが確立されている [18, 64, 7]。本章では2.4で述べた粒子フィルタを式 (3.22) や式 (3.24) の計算に応用する。ここで式 (3.24) は、2.4で説明した基本的な粒子フィルタが行う計算そのものなのでとくに付言しない。

式 (3.22) では、潜在変数が表現される状態空間のほかにパラメータについてもパラメータ空間を用意し、パラメータの事前分布 $P(\gamma)$ や $P(A)$, $P(B)$ を多数の粒子でモンテカルロ表現する。潜在変数 N 粒子に対してパラメータの事前分布を M 粒子で表現するとすると、それぞれの確率密度関数から生成された M 個の実現値について、従来の粒子フィルタの方法で対数周辺化尤度を計算する [37, 82]。パラメータ粒子に関する、ある i 番目の粒子 $\theta^{(i)}$ ($i = 1, \dots, M$) についての対数周辺化尤度を $LML^{(i)}$ とすると、周辺化尤度 $\beta^{(i)}$ は、

$$\beta^{(i)} = \exp(LML^{(i)} - LML_{\max}), \quad i = 1, \dots, M \quad (3.40)$$

で計算できる。ここで $LML_{\max}$ は $LML^{(i)}$ の最大値で、除算は $\exp$ の計算を数値的に安定に行うための操作である。そして以下の確率に従って $\theta^{(i)}$ をリサンプリングすると、周辺化事

後確率の粒子表現が得られる.

$$P(\theta^{(i)}) = \frac{\beta^{(i)}}{\sum_{k=1}^M \beta^{(k)}} \quad (3.41)$$

このようにして計算された周辺化事後確率 $P(\gamma, A, B|Y_T)$ (式 (3.22)) について, 本研究ではそれを最大化する値をパラメータの推定値 $\hat{\theta} = \{\hat{\gamma}, \hat{A}, \hat{B}\}$ とする.

3.4 数値実験

実験は, 人工的に生成したデータを使った数値実験と Ca^{2+} イメージングの生理実験データへ適用した実験をそれぞれ行った. 初めに数値実験により提案手法の有効性を検証した. 数値実験では以下のアルファ関数に白色ガウスノイズを加えて $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化を生成し, さらに観測方程式 (式 (3.14)) を用いて蛍光強度の時系列を生成した人工データを使った.

$$c_n = A \cdot \frac{n\Delta t}{\tau} \exp\left(1 - \frac{n\Delta t}{\tau}\right) \quad (3.42)$$

ただし, A は振幅 ($\mu\text{M}/\text{sec}$), τ は減衰時定数 (sec), n は離散時間, Δt はサンプリング間隔 (ms) である. 生成した $[\text{Ca}^{2+}]$ は $\Delta t = 25(\text{ms})$, 時系列の長さを $T = 200$ とした. アルファ関数のパラメータ $\{A, \tau\}$ は $\{A, \tau\} = \{1, 5\}$ を用いた. アルファ関数による $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化がない休止状態の $[\text{Ca}^{2+}]$ は, $C_{rest} = 0.1 (\mu\text{M})$ とした [22]. また観測方程式 (式 (3.14)) のパラメータは CCD カメラのゲイン $G = 1$, 読み出しノイズ $\sigma_{ro} = 0.1$, $A = -2400$, $B = 4300$ とした. 蛍光色素として Fluo-4 を想定し, 色素の解離定数を $K_d = 0.345(\mu\text{M})$ とした. 生成した $[\text{Ca}^{2+}]$ と蛍光強度を図 3.4 に示す.

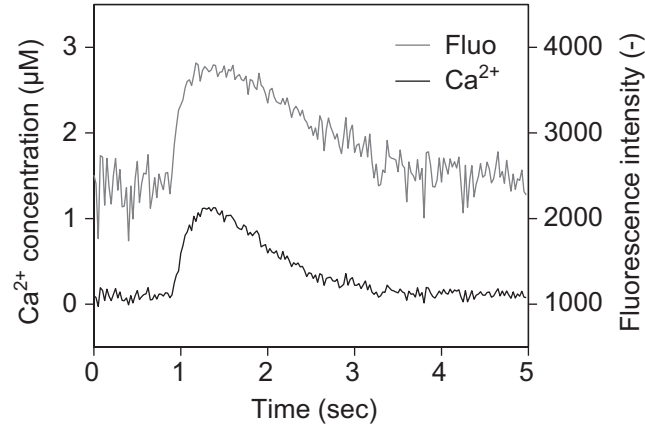


図 3.4: 数値実験で用いる人工蛍光強度の時系列

3.5.2 “パラメータの事前分布 $P(R_f)$ を用いた場合” では、同じモデルであるが異なるパラメータで生成した人工データを用いた。

3.5 結果

3.5.1 対数周辺化尤度に基づくパラメータ推定

パラメータ $\theta = \{\gamma, A, B\}$ を対数周辺化尤度に基づき推定する方法について実験した。潜在変数 $C_n = \{c_0, \dots, c_T\}$ の初期値 c_0 について、真の値である $C_{rest} = 0.1 \mu\text{M}$ と真の値からずらした 0.3μ の 2 通りの場合を試みた。グリッドサーチによって、パラメータ空間に

$$\gamma = \{0.002, 0.0025, 0.003, 0.0035, \dots, 0.115, 0.12\}$$

$$A = \{-3600, -3500, -3400, -3300, \dots, -1700, -1600\}$$

$$B = \{3400, 3500, 3600, 3700, \dots, 5300, 5400\}$$

で格子を設定し、各点での対数周辺化尤度を式 (3.19) によって評価した。このとき粒子フィルタによる数値計算において、潜在変数の粒子数は $N = 2000$ とした。

図 3.5 に計算した対数周辺化尤度のランドスケープを示す。図 3.5 A が $c_0 = 0.1$ とした時の結果、B が $c_0 = 0.3$ とした時の結果である。左列と右列でパラメータの次元はそれぞれ $\{\gamma, A\}$, $\{A, B\}$ で、それぞれ残りの B , γ については対数周辺化尤度を最大化する値で固定した。真の値 $\{A, B\} = \{-2400, 4300\}$ に対して (γ はハイパーパラメータのため、真の値を持たない)、対数周辺化尤度を最大化するパラメータ $\hat{\theta} = \{\hat{\gamma}, \hat{A}, \hat{B}\}$ は $c_0 = 0.1$ のとき $\hat{\theta} = \{0.0700, -2800, 4400\}$, $c_0 = 0.3$ のとき $\hat{\theta} = \{0.1050, -3600, 4300\}$ となった。すなわち対数周辺化尤度を基づく方法を用いた場合、潜在変数の初期値 c_0 が真の値であるならパラメータの真値に近い値を推定できるが、 c_0 が真の値からずれると、推定結果も大幅にずれることが分かった。また、 c_0 が真値の場合でも、尤度のランドスケープの傾きが特定方向に緩いため、サンプルごとにその方向に沿ってピークが変動することが分かり、パラメータには不定性があることが分かる。

3.5.2 周辺化事後確率に基づくパラメータ推定と Ca^{2+} 濃度推定

パラメータの事前分布を用いない場合

次に周辺化事後確率に基づくパラメータ推定を行い、さらに推定したパラメータ $\hat{\theta}$ を用いた $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定を行った。初めに、パラメータの事前分布 $P(\gamma)$, $P(A)$, $P(B)$ に全て一様分布を用いた場合を試した。これはパラメータに関する特定の事前知識＝事前分布を用いない場合であり、対数周辺化尤度に基づく方法と同様の結果になることが予想される。粒子フィルタの潜在変数の粒子数は $N = 2000$ 、パラメータの粒子数は $M = 2000$ として、数値計算

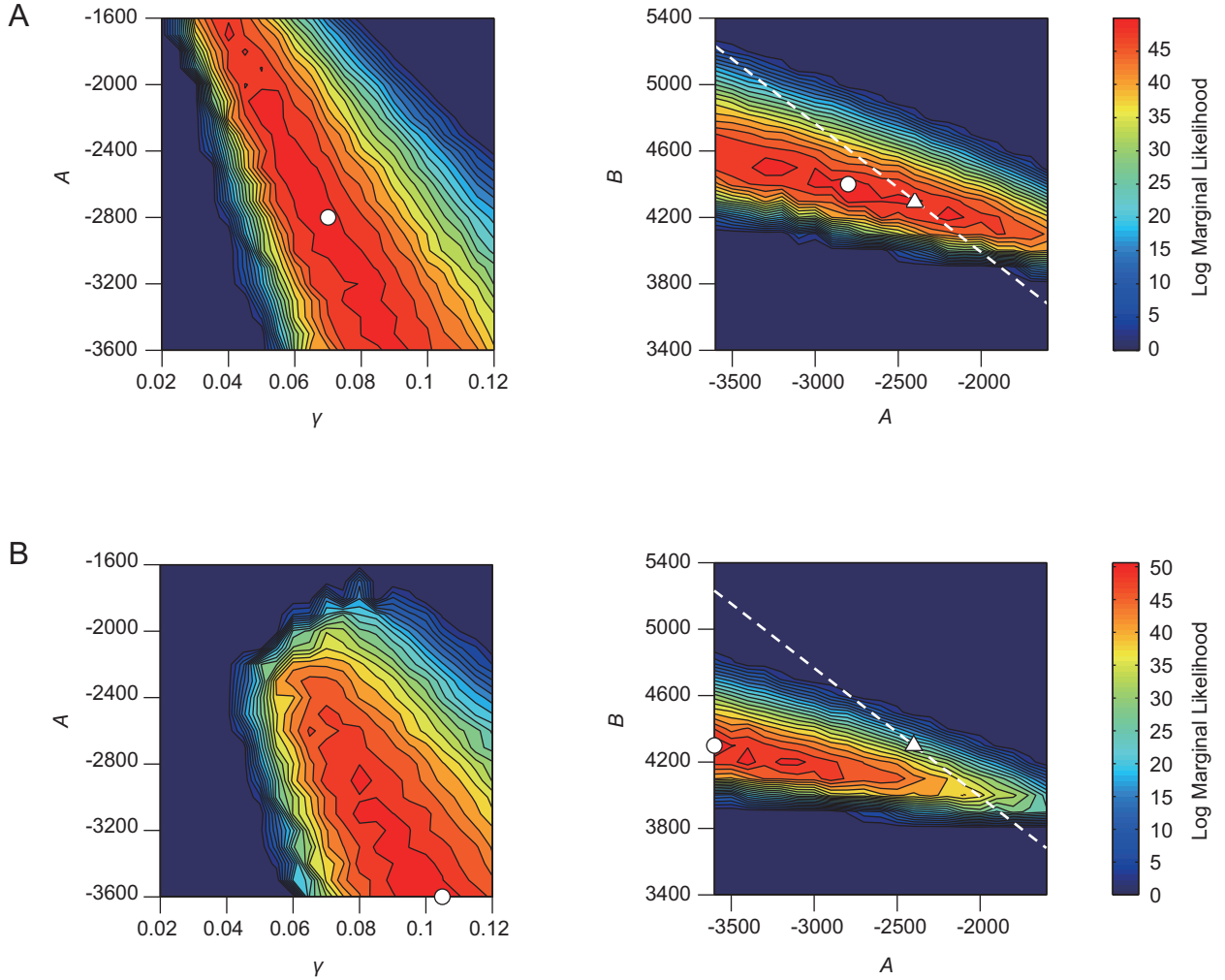


図 3.5: パラメータ空間 $\{\gamma, A, B\}$ の対数周辺化尤度のランドスケープ. A: $c_0 = 0.1$ の場合で、それぞれ2パラメータ (γ, A) または (A, B) の関数として対数周辺化尤度を等高線プロットした図である. それぞれ残りのパラメータ B または γ は対数周辺化尤度を最大にする値で固定した. 右図の破線はパラメータの事前分布 $P(B|A, C_{rest})$ の平均値をプロットしたものである. $\circ$ は対数周辺化尤度を最大にする点, $\hat{\theta} = \{0.0700, -2800, 4400\}$, $\triangle$ は真のパラメータ値, $\{A, B\} = \{-2400, 4300\}$, である. 白破線は $B = -A/(C_{rest}/K_d + 1) + y_{rest}/G$ を満たす直線で、休止状態の蛍光強度値 y_{rest} をにおいて B: $c_0 = 0.3$ の場合. 対数周辺化尤度の構造自体が $c_0 = 0.1$ に比べシフトすることが分かる. 当然推定値もずれ、対数周辺化尤度を最大にする点は $\hat{\theta} = \{0.1050, -3600, 4300\}$ となった. 潜在変数の粒子数は $N = 2000$ で計算した.

した.

結果を図 3.6 に示す. 図 3.6 A, B は, それぞれ事前分布から生成したパラメータの粒子に割り当てられた実現値をプロットしたものである. 粒子の 1 つ 1 つにはパラメータ $\{\gamma, A, B\}$ のそれぞれの値が割り当てられている. 今回, 事前分布には一様分布を用いたため, パラメータ空間中に粒子が一様に分布しているのが分かる. 図 3.6 C は生成したパラメータの粒子すべてに関し対数周辺化尤度を評価し, 得られた対数周辺化尤度を用いてパラメータの粒子をリサンプリングした結果で, モンテカルロ表現された周辺化事後確率である. 対数周辺化尤度の計算の際, 潜在変数の初期値 c_0 は真値 $C_{rest} = 0.1$ とした. 円の大きさは, リサンプリングの結果, 集積した粒子の個数に対応し, 対数周辺化尤度に比例した大きさになっている. 最も粒子を集めた点が周辺化事後確率を最大化する点で, これをパラメータの推定値とする. 推定結果は $\hat{\theta}_{0.1} = \{0.0060, -2513.40, 4423.93\}$ で平均と分散は $\bar{\theta}_{0.1} = \{0.069, -2736.55, 4387.31\}$ (平均), $\sigma_{\theta,0.1}^2 = \{0.000156, 121037.57, 11768.08\}$ (分散) となった. さらに図 3.6 D はパラメータ $\hat{\theta}_{0.1} = \{0.0060, -2513.40, 4423.93\}$ を用いた $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定結果で, 式 (3.24) の平滑化分布の平均と平均から 1σ の領域をプロットしたものである (Est および $\text{Est} \pm \sigma$).

図 3.6 E は対数周辺化尤度の計算の際の潜在変数の初期値を真値からずらした $c_0 = 0.3$ とした結果である. この時, パラメータの推定値は $\hat{\theta}_{0.3} = \{0.1084, -3496.71, 4270.11\}$ となった. また平均は $\bar{\theta}_{0.3} = \{0.09207, -3284.17, 4307.77\}$, 分散は $\sigma_{\theta,0.3}^2 = \{0.0001627, 71849.06, 6494.85\}$ であった. 同様に図 3.6 F はパラメータ $\hat{\theta}_{0.3} = \{0.1084, -3496.71, 4270.11\}$ を用いた $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定結果である.

今回, パラメータの事前分布に一様分布を用いたため, パラメータ推定の結果は対数周辺化尤度に基づく方法とほぼ同じになったことが確認された. また, $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定では, $c_0 = 0.3$

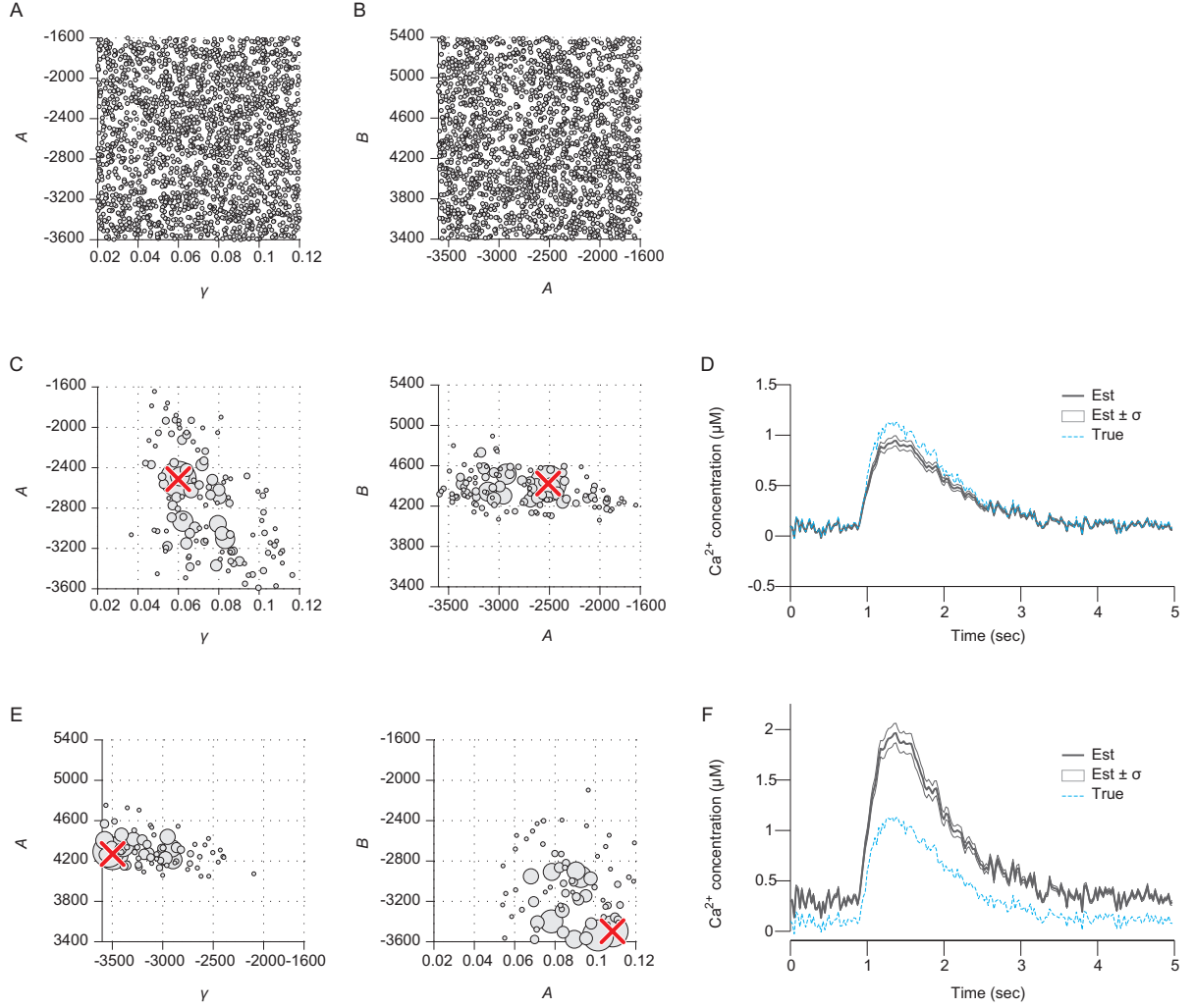


図 3.6: パラメータの事前分布を用いずに行った、周辺化事後確率に基づいたパラメータ推定. A, B: 一様分布に従って生成した $\{\gamma, A, B\}$ をプロットしたもの. C: $c_0 = 0.1$ の場合. A, B で与えられる事前分布を対数周辺化尤度でリサンプリングした周辺化事後確率の分布. 各丸の大きさはその点に集中した粒子の個数を表す. $\times$ 印は最も多くの粒子が集中した点. D: $c_0 = 0.1$ で推定したパラメータを用いた $[Ca^{2+}]$ の推定結果の分布. 平均 (Est) と平均から 1σ の範囲 ($Est \pm \sigma$). 破線 (True) は真の $[Ca^{2+}]$. E: $c_0 = 0.3$ の場合. F: 推定したパラメータを用いた $[Ca^{2+}]$ の推定結果. 潜在変数の粒子数は $N = 2000$, パラメータの粒子数は $M = 2000$ で計算した.

とした場合、真の $[\text{Ca}^{2+}]$ (図 3.6 F True) から大きくずれることが分かった。

$[\text{Ca}^{2+}]$ の推定値を真の値からの平均 2 乗誤差で評価した。

$$MSE = \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (\hat{x}_t - x_t)^2 \quad (3.43)$$

ただし $\hat{x}_n$ は推定値, x_n は真の値である。評価結果を表 3.1 “プレイヤーなし” にまとめた。

パラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ を用いた場合

次にパラメータの事前分布 $P(A)$, $P(B)$ を休止 $[\text{Ca}^{2+}]$ の分布 $P(C_{rest})$ で生成する場合の実験を行った。粒子フィルタの潜在変数の粒子数は $N = 2000$, パラメータの粒子数は $M = 2000$ として、数値計算した。

パラメータ推定と $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定の結果を図 3.7 に示す。 $P(C_{rest})$ は式 (3.25) を用いて生成した。ここで $\bar{C}_{rest}$ と σ_{crest} は文献値を参考に $\bar{C}_{rest} = 0.1$ と $\sigma_{crest} = 0.03$ を用いた。 C_{rest} の実現値のヒストグラムを図 3.7 B に示す。 $P(\gamma)$ と $P(A)$ については、一様分布で生成した (図 3.7 A 左図)。 C_{rest} と A の実現値および事前分布 $P(B|A, C_{rest})$ (式 (3.26)) を用いて B の実現値を生成した。図 3.7 A 右図に生成した粒子に割り当てられた A と B の値をプロットものを示す。式 (3.26) から分かるように、分布は平均 $B = -A/(C_{rest}/K_d + 1) + y_{rest}/G$ をとる。この直線は、パラメータ空間 $\{A, B\}$ のランドスケープ (図 3.5) 上で、破線に対応する。潜在変数の初期値 $c_0 = 0.1$ と $c_0 = 0.3$ の 2 つの場合で、生成したパラメータの粒子すべてに関し対数周辺化尤度を評価し、得られた対数周辺化尤度を用いてパラメータの粒子をリサンプリングした結果が図 3.7 C と E である (C が $c_0 = 0.1$ で、E が $c_0 = 0.3$ の結果)。それぞれの場合で推定値は $\hat{\theta}_{0.1} = \{0.06837, -2507.25, 4364.04\}$ と $\hat{\theta}_{0.3} = \{0.063330, -2730.00, 4410.30\}$ で、平均

表 3.1: 推定結果の平均 2 乗誤差

	プレイヤーなし	$P(C_{rest})$	$P(R_f)$
$c_0 = 0.1$	0.005779	0.001273	0.0001209
$c_0 = 0.3$	0.159468	0.001941	0.0003547

と分散はそれぞれ $\bar{\theta}_{0.1} = \{0.06115, -2623.15, 4464.02\}$, $\bar{\theta}_{0.3} = \{0.06844, -2538.50, 4354.76\}$, $\sigma_{\theta,0.1}^2 = \{0.00005640, 38751.90, 23585.84\}$, $\sigma_{\theta,0.3}^2 = \{0.00004824, 37555.13, 14421.94\}$ となった。そしてそれぞれのパラメータの推定値 $\hat{\theta}_{0.1}$ と $\hat{\theta}_{0.3}$ を使って行った $[Ca^{2+}]$ 推定の結果が図 3.7 D と F である。

平均 2 乗誤差 (式 (3.43)) での評価を表 3.1 $P(C_{rest})$ にまとめた。周辺化事後確率を最大にする点や分布の形に多少差が生じたが、 $[Ca^{2+}]$ 推定ではグラフからも平均 2 乗誤差からもほぼ同一の結果が得られた。

パラメータの事前分布 $P(R_f)$ を用いた場合

次にパラメータの事前分布 $P(A)$, $P(B)$ を蛍光色素のダイナミックレンジ $R_f = F_{\max}/F_{\min}$ の確率密度関数 $P(R_f)$ で生成する場合の実験を行った。蛍光色素として Fluo-4 を想定しているので、文献 [46] が記す Fluo-4 の R_f 値の範囲、85 – 100 を参考に、今回新たに人工蛍光強度データを生成した。データ生成に用いたパラメータの値は、アルファ関数 (式 (3.42)) のパラメータ $\{A, \tau\} = \{0.5, 5\}$, 観測方程式 (式 (3.14)) のパラメータ, CCD カメラのゲイン $G = 0.5$, 読み出しノイズ $\sigma_{ro} = 0.1$, 色素の解離定数 $K_d = 0.345$ (μM), $A = -8900$, $B = 14000$ である。この $A(= [D]_{total}(S_f - S_b))$ と $B(= [D]_{total}S_b + F_b)$ の値の詳細は、 $[D]_{total} = 100$ μM , $S_f = 1$, $S_b = 90$, $F_b = 5000$ であり、 $R_f = F_{\max}/F_{\min} = S_b/S_f$ が R_f 値の範囲、85 – 100 に

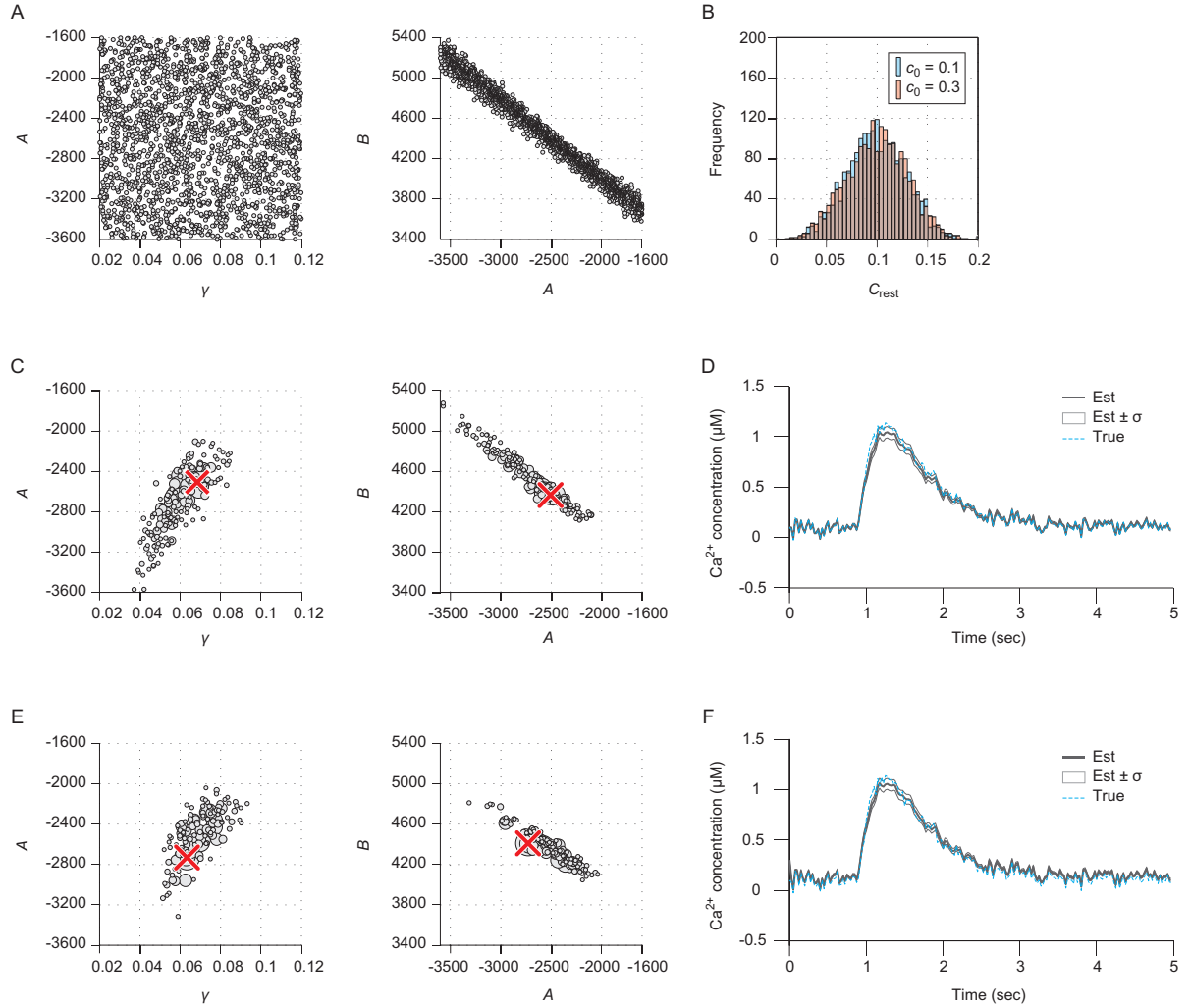


図 3.7: パラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ を用いたパラメータの推定結果. A: パラメータ γ , A , B の事前分布; 右図, パラメータ空間 $\{A, B\}$ の粒子の平均値は直線 $B = -A/(C_{rest}/K_d + 1) + y_{rest}/G$ である. B: $P(C_{rest})$ で生成した C_{rest} の実現値のヒストグラム. C: $c_0 = 0.1$ の場合. γ , A , B の事前分布を対数周辺化尤度でリサンプリングした周辺化事後確率の分布. D: $c_0 = 0.1$ の場合でのパラメータの推定結果を用いた $[Ca^{2+}]$ 推定の結果. E, F: $c_0 = 0.3$ の結果. 事前分布 $P(C_{rest})$ を用いる場合, c_0 の違いは, 推定結果にあまり影響を与えない. 数値計算における潜在変数の粒子数は $N = 2000$, パラメータの粒子数は $M = 2000$ である.

収まるように設定した値である。

確率密度関数 $P(R_f)$ は、 R_f の範囲、85 – 100 に基づき、その範囲を 1σ に収めるよう、正規分布でモデル化した $P(R_f)$ (式 (3.27)) の平均を $\bar{R}_f = 92$ 、標準偏差を $\sigma_{rf} = 8$ と設定した。

また $P(R_f)$ を用いる場合、同時に最大蛍光強度 $F_{\max}$ を同定する必要がある、同定方法を 3.3.2 で提案したが、人工データを用いる場合では、 $[\text{Ca}^{2+}]$ に対する蛍光強度値は、式 (3.34)-(3.38) で記述した枠組みと観測ノイズを除き等価であり、式 (3.34)-(3.38) の代数的な解 (式 (3.39)) から $F_{\max}$ が得られることは当然なので、式 (3.39) を用いずに $F_{\max}$ は真の値を用いた。粒子フィルタの潜在変数の粒子数は $N = 2000$ 、パラメータの粒子数は $M = 2000$ として、数値計算した。

生成した人工データ、パラメータ推定および $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定の結果を図 3.11 に示す。パラメータ粒子のリサンプリングは γ と R_f について行った。パラメータの事前分布 $P(R_f)$ は式 (3.27) を用いて生成した。ここで $\bar{R}_f$ と σ_{rf} は文献値を参考に $\bar{R}_f = 92$ 、 $\sigma_{rf} = 8$ を用いた [46]。 R_f の実現値のヒストグラムを図 3.11 B に示す。 $P(\gamma)$ は一様分布で生成した。図 3.11 A に生成した粒子に割り当てられた γ と R_f の値をプロットものを示す。

潜在変数の初期値 $c_0 = 0.1$ と $c_0 = 0.3$ の 2 つの場合での、対数周辺化尤度を用いたパラメータの粒子のリサンプリング結果がそれぞれ図 3.11 C と E である。それぞれの場合で推定値は $\hat{\theta}_{0.1} = \{0.02649, 79.43\}$ と $\hat{\theta}_{0.3} = \{0.4257, 94.83\}$ で、平均と分散はそれぞれ $\bar{\theta}_{0.1} = \{0.02750, 91.4156\}$ 、 $\bar{\theta}_{0.3} = \{0.04239, 92.53\}$ 、 $\sigma_{\theta,0.1}^2 = \{0.000002653, 60.1062\}$ 、 $\sigma_{\theta,0.3}^2 = \{0.000001337, 15.5104\}$ となった。それぞれのパラメータの推定値 $\hat{\theta}_{0.1}$ と $\hat{\theta}_{0.3}$ で行った $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定の結果が図 3.11 D と F である。

平均 2 乗誤差 (式 (3.43)) での評価を表 3.1 $P(R_f)$ にまとめた。図 3.11 D, F から $c_0 = 0.1$

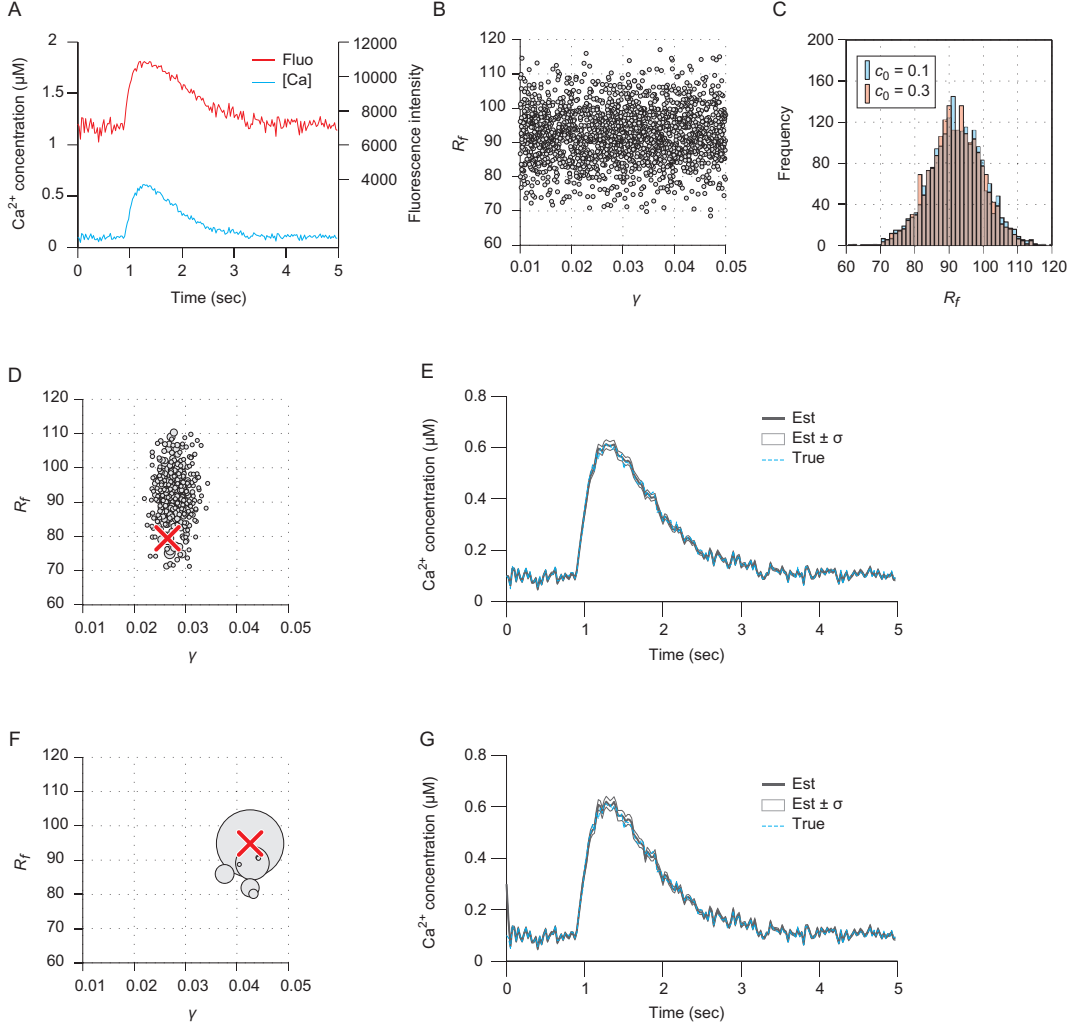


図 3.8: パラメータの事前分布 $P(R_f)$ を用いたパラメータの推定結果. A: 本実験で用いた人工蛍光データと真の $[Ca^{2+}]$ の時系列. B: パラメータ γ , R_f の事前分布. C: $P(R_f)$ から生成した実現値のヒストグラム. D: $c_0 = 0.1$ の場合. γ , R_f の事前分布を対数周辺化尤度でリサンプリングした周辺化事後確率の分布. E: $c_0 = 0.1$ の場合でのパラメータの推定結果を用いた $[Ca^{2+}]$ 推定の結果. F, G: $c_0 = 0.3$ での結果. 事前分布 $P(R_f)$ を用いる場合, c_0 の違いで, パラメータの周辺化事後確率分布の形が大きく異なるが, $[Ca^{2+}]$ の推定結果にはあまり影響を与えない. 数値計算における潜在変数の粒子数は $N = 2000$, パラメータの粒子数は $M = 2000$ である.

と $c_0 = 0.3$ で周辺化事後確率を最大にする点や分布の形に多少差が生じたが、 $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定ではほぼ同一の結果が得られた (図 3.11 E, G, 表 3.1 $P(R_f)$).

3.6 生理実験データへの適用

次に提案手法を生理実験データへ適用し、有効性の検証を行った. 提案手法は、数値実験で有効性が確認されたパラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ および $P(R_f)$ を用いる場合の2つについて検証した. $P(R_f)$ では同時に $F_{\max}$ を同定する必要がある都合上、2つの方法でそれぞれ別の実験データを用いた. 特に明記しない限り、生理実験のプロトコールは2つのデータで共通するが、仔細な実験条件は異なる.

3.6.1 実験データの取得

海馬スライス標本作製

海馬スライスは生後 15-25 日齢のオス Wistar 系ラットから作製した. ラットをジエチルエーテルで麻酔して断頭した後、すばやく脳を取り出して氷冷したスライス作製用人工脳脊髄液 (in mM) : 124 Chline Chloride, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 10 Glucose, 0.5 CaCl_2 , 7 MgCl_2 に移した. 続いてビブラトーム (Supermicroslicer Zero-1; Dosaka EM, Kyoto, Japan) を用いて厚さ 300 μm の海馬スライスを作製した. 作製した海馬スライスは記録用人工脳脊髄液 (in mM) : 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 10 Glucose, 2.5 CaCl_2 , 1.5 MgCl_2 に移し換え 36 °C で 30 分保温した後、室温で保温した. 使用した人工脳脊髄液は常に 95 % CO_2 / 5 % O_2 で飽和させた.

ホールセルパッチクランプ法

海馬 CA1 錐体細胞への蛍光色素の導入，電気刺激，電気応答の計測は，ホールセルパッチクランプ法によって行った．ホールセル用ガラス電極はボロシリケート製のキャピラリー（Warner Instruments, Hamden, CT, USA）を Micro pipet puller（SUTTER INSTRUMENT, USA）を用いて作製した（5-9 MΩ）．測定に用いた記録よう内液の組成は（in mM）：120 K-gluconate, 20 HEPES, 2 Mg-ATP, 0.2 Na-GTP, 0.1 Fluo-4, pH 7.3 とした．測定は記録用人工脳脊髄液を 2-3 mL/min の流速で灌流し， $34\pm 2^{\circ}\text{C}$ で行った．

Ca²⁺ イメージング

Ca²⁺ 指示蛍光色素 Fluo-4 を記録用内液に混ぜ（最終濃度 100 μM ），ホールセルパッチクランプ法により細胞内へ直接導入した．Fluo-4 は波長 494 nm の光でもっとも励起され，516 nm 付近の蛍光を発する．実験では定電圧電源により供給電源電圧を制御したタングステン・ハロゲンランプを励起光源として用い，光学フィルタ（450-490 nm）を通過させ励起光を照射した．試料から観察される光シグナルはダイクロイックミラーにより 510 nm 以上の光のみを通過させ，さらに 520 nm の光学フィルタにより蛍光のみに限定した．励起光の照射で生じた蛍光は顕微鏡に取り付けた EM-CCD カメラ（Hamamatsu, Japan）により 28 および 9.3 ms/frame のスピードで動画として記録した．その際，CCD カメラは後述するノイズパラメータの同定用のデータはビニング 1x1 で記録し，細胞への Ca²⁺ イメージングではビニング 2x2 で記録した．イメージング画像の撮影と電気応答記録のトリガーを刺激装置（Electronic Stimulator; Nihon Kohden, Japan）で同期し，両者を同時に記録した．

電気刺激

ホールセルパッチクランプ法による細胞体への電気刺激により活動電位を発生させ、 Ca^{2+} 上昇を誘導した。電気刺激は 200-2000 pA の電流をホールセル用ガラス電極から注入し行った。とくに最大蛍光強度値 $F_{\max}$ の同定のために、10 Hz(幅 2 ms, 間隔 98 ms), 1400 pA のパルス状の電流を注入し、周期的な Ca^{2+} 上昇を誘導した。

蛍光時系列の抽出

EM-CCD カメラ制御用のソフトウェア, AQUA COSMOS (Hamamatsu, Japan) により, 動画として記録したイメージング画像から関心領域 ROI (region of interest) を設定し, 蛍光時系列を抽出した。ノイズパラメータの同定用のデータとパラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ を用いる実験用のデータでは, 1 ピクセルの ROI, $P(R_f)$ を用いる実験用のデータでは 15×15 ピクセルの ROI を設定した。ゆえに $P(R_f)$ を用いる実験では, 観測方程式 (式 (3.14)) における関心領域のピクセル数に $n_{roi} = 225$ を設定する。

3.6.2 CCD ノイズの測定

式 (3.12) でモデル化した CCD カメラのパラメータであるゲイン G と読み出しノイズのノイズ強度 σ_{ro} を実験的に同定する。濾紙に蛍光塗料 (蛍光ペン “SPARKY-2” (メーカー型番: WKT3-Y 黄), ゼブラ社) を塗布し透明のビニールテープで防水を施した蛍光試料を, イメージングセットアップのチャンバー内の純水中に水没させ, 励起光を照射し, ビニングしないで蛍光を計測した。その際, タングステン・ハロゲンランプの電源電圧を 3 V, 4 V, ... と 1 V 刻みで変化させ, 各 4.5 s 間蛍光を記録し, 異なる強度の一定値の蛍光時系列を取得し

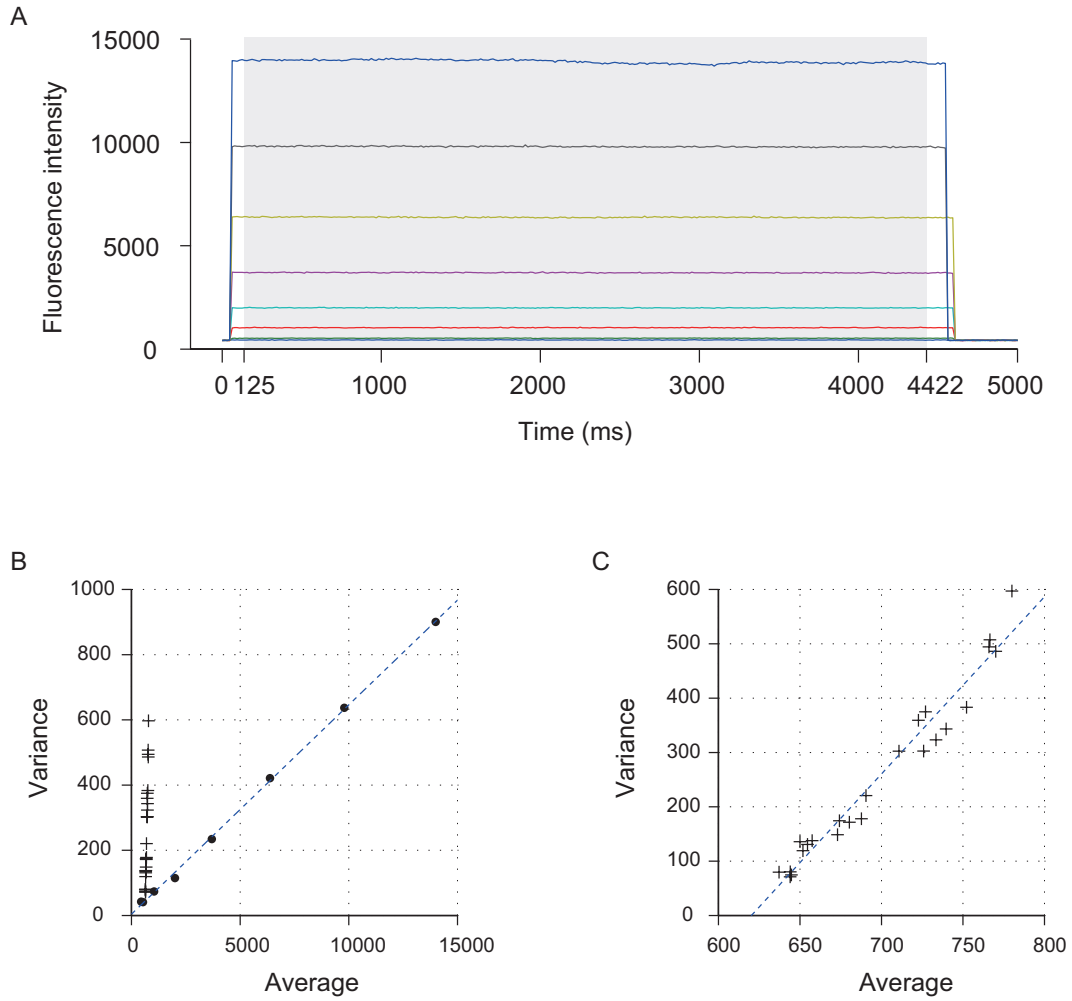


図 3.9: ノイズパラメータ G , σ_{ro} の同定. A: 照射する励起光強度を変化させ計測した, 異なる一定値の蛍光時系列. グレーの部分の平均と分散を評価した. B: ●, A の各時系列の平均と分散をそれぞれ横軸と縦軸にプロットしたもの; +, ビニング 2×2 で計測した生理実験のイメージングデータから, 一定蛍光強度値を示す部分の時系列の平均と分散をプロットしたもの. 破線は●の近似直線, $y = 00642x + 4.0502$. C: B の+だけをプロットした図. 破線は近似直線, $y = 3.2623x - 2023.2$.

た (図 3.9 A).

式 (3.12) で, CCD センサのノイズは平均 GF , 分散 $G^2(\sigma_{ro}^2 + F)$ の正規分布に従うと記述したことから, 異なる強度の一定値の蛍光時系列の平均と分散から G と σ_{ro} を同定すること

ができる [30]. 平均を X , 分散を Y とすると, X , Y と G, σ_{ro}^2 の関係は,

$$X = GF \quad (3.44)$$

$$\begin{aligned} Y &= G^2(\sigma_{ro}^2 + F) \\ &= GX + (G\sigma_{ro})^2 \\ &= aX + b \end{aligned} \quad (3.45)$$

と記述できる. ただし, a と b は平均と分散の関係を線形近似した直線の勾配と切片である. この関係から, G は勾配, σ_{ro}^2 は $\sigma_{ro}^2 = b/G^2$ で計算できる. 上述の方法で計測したデータから平均と分散を評価し, 近似直線を取得した (図 3.9 B, 直線: $y = 00642x + 4.0502$). この結果, $G = 0.00642$ と $\sigma_{ro} = 31.34752$ と計算された. 一方で生理実験データは, ビニング 2×2 で計測したデータを扱った. 生理実験データから蛍光強度が一定値を示す部分を抜き出し, 同様に近似直線を取得した (図 3.9 C, 直線: $y = 3.2623x - 2023.2$).

以上の結果から, 生理実験データに関する CCD センサのゲインは $G = 3.2623$ とする. また読み出しノイズのノイズ強度は, 式 (3.12) 自体はビニングなしのデータに関するモデルであるので, ビニングなしの場合のノイズ強度値 31.34752 が, 2×2 のビニングによって $\sqrt{2 \times 2}$ 改善され, $1/2$ 倍された値, $\sigma_{ro} = 15.673760$ を用いる.

パラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ を用いる実験では, より簡易的な方法で G と σ_{ro} を同定した. データの始点から露光開始までと, 露光終了からデータの終点までの間は原理上 CCD センサに光子が入力しないので, この間の蛍光強度値は CCD センサのバイアス信号であるとみなせる. よってノイズは読み出しノイズのみとし, バイアス信号の平均を分散を X_b, Y_b

とすると、それぞれ $X_b = GF$, $Y_b = G^2\sigma_{ro}^2$ と記述できる．すなわち、

$$\begin{aligned}
 Y - Y_b &= G^2(\sigma_{ro}^2 + F) - G^2\sigma_{ro}^2 \\
 &= G^2F \\
 &= GX
 \end{aligned} \tag{3.46}$$

であるので、これらの関係より、 G と σ_{ro} を計算すると、($G = 3.142$, $\sigma_{ro} = 8.095$) であった．

$P(C_{rest})$ を用いる実験 (3.7.1) では、この値を用いた．

3.7 結果

3.7.1 パラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ を用いた場合

本実験で用いた蛍光強度データを図 3.10 に示す．蛍光強度はビニング 2×2 、サンプリング間隔 28 ms で計測した．計測した動画データに対し CCD の制御ソフトウェア AQUA-COSMOS を用い、図 3.10 A に示す 1 ピクセルの ROI から時系列データを取得した (図 3.10 B)．3580 ms で細胞体に刺激電流 (100 ms, 200 pA) を与え、図 3.10B の Ca^{2+} 濃度上昇を起こさせている．この蛍光強度データから Ca^{2+} 上昇を含む 7000 ms を切り出し、実験用のデータとした (図 3.11 A)．粒子フィルタの潜在変数の粒子数は $N = 2000$ 、パラメータの粒子数は $M = 3000$ で計算した．

このデータに対し、パラメータの事前分布に $P(C_{rest})$ を用いてパラメータ推定と $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定を行った．推定結果を図 3.11 に示す． $P(C_{rest})$ は数値実験と同様の条件で生成した． C_{rest} の実現値のヒストグラムを図 3.11 D に示す．また、 $P(\gamma)$ と $P(A)$ については、一様分布で

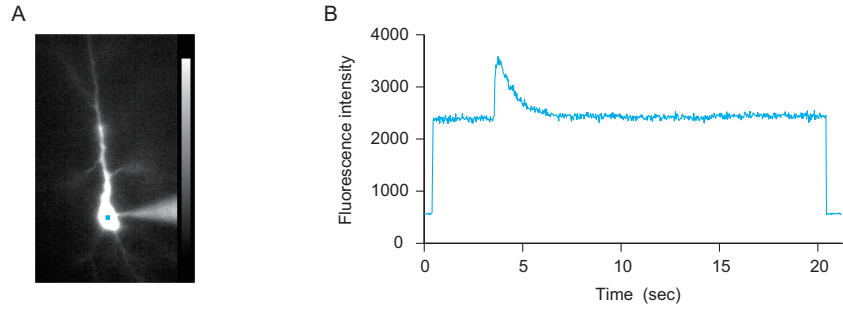


図 3.10: A：ホールセルパッチクランプにより Fluo-4 で染色した海馬 CA1 錐体細胞の蛍光画像。四角印は ROI (Region of interest) という時系列データを取得する領域。1 ピクセルとした。B：A に示した ROI の時系列。およそ 420 ms から 20440 ms まで励起光を照射し、3580 ms に細胞体を電気刺激した。時系列のサンプリング間隔は 28 ms。解析に用いたデータはここから 7000 ms を切り出したデータ。

生成した (図 3.7 C). C_{rest} と A の実現値および事前分布 $P(B|A, C_{rest})$ (式 (3.26)) を用いて B の実現値を生成した。図 3.11 C 右図に A と B の値をプロットものを示す。潜在変数の初期値を $c_0 = 0.1$ とし、生成したパラメータの粒子すべてに関し対数周辺化尤度を評価し、得られた対数周辺化尤度を用いてパラメータの粒子をリサンプリングした結果が図 3.11 E である。それぞれの場合で推定値は $\hat{\theta} = \{0.008, -1590.2, 1992.8\}$ で、平均と分散はそれぞれ $\bar{\theta} = \{0.0091, -1528.1, 1922.7\}$, $\sigma_{\theta}^2 = \{0.00097, 140.1, 117.3\}$ となった。そしてそれぞれのパラメータの推定値 $\hat{\theta}$ を使って行った $[Ca^{2+}]$ 推定の結果が図 3.11 B である。 $[Ca^{2+}]$ 推定では休止状態からの 1 回の活動電位の発生に伴う Ca^{2+} 上昇が、171.2 nM となった。これは先行研究の値 151.19 nM に近い値である [21]。

3.7.2 パラメータの事前分布 $P(R_f)$ を用いた場合

つぎにパラメータの事前分布 $P(R_f)$ を用いたパラメータ推定と $[Ca^{2+}]$ 推定を行った。今回用いた実験データを図 3.12 に示す。データはビニング 2×2 , ROI 15×15 ピクセル、サンプリング間隔 9.3 ms で計測した。ベース蛍光強度 F_b を測定するため画面端に ROI を設定した。

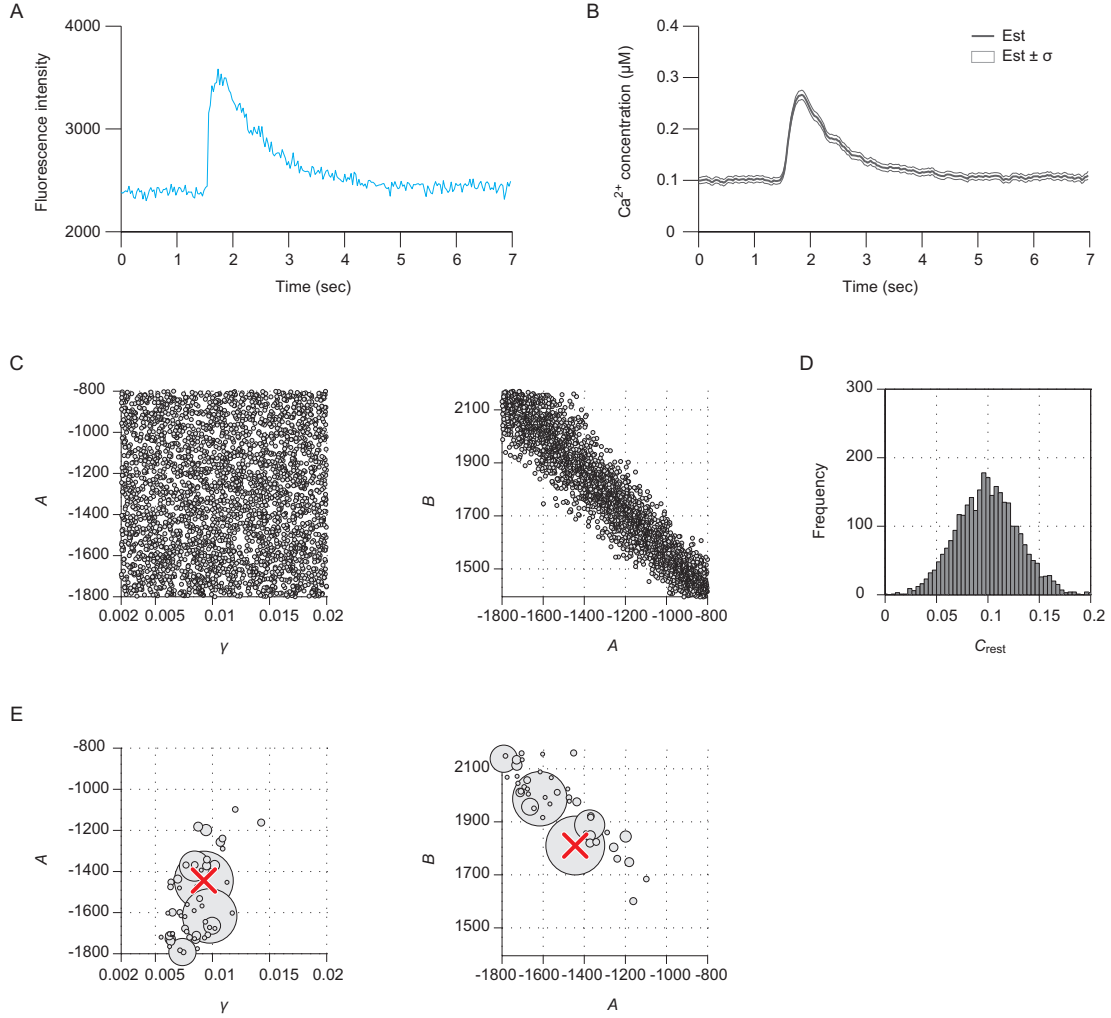


図 3.11: 事前分布 $P(C_{rest})$ の生理実験データへの応用. A: 生理実験データの蛍光強度時系列. B: 推定したパラメータ $\hat{\theta}$ を用いた $[Ca^{2+}]$ 推定の結果. 休止状態の平均値から Ca^{2+} 上昇のピーク値までは, 171.2 nM だった. C: パラメータの事前分布 $P(B|A, C_{rest})$ および $P(C_{rest})$ で生成したパラメータの粒子. D: $P(C_{rest})$ のヒストグラム. E: パラメータの周辺化事後確率の分布. 周辺化事後確率を最大にするパラメータは $\{\hat{\gamma}, \hat{A}, \hat{B}\} = \{0.008, -1590.2, 1992.8\}$ となった. これをパラメータの推定値とする. 潜在変数の粒子数は $N = 2000$, パラメータの粒子数は $M = 3000$ で計算した.

F_b はこのROIの時系列の平均値をCCDカメラのゲイン G で割った値で、 $F_b = 194.1307$ であった。今回は $F_{\max}$ 同定のため、図3.12右上に示すように、3.6.1で述べた10 Hzの電気刺激による周期的な Ca^{2+} 上昇を測定した。

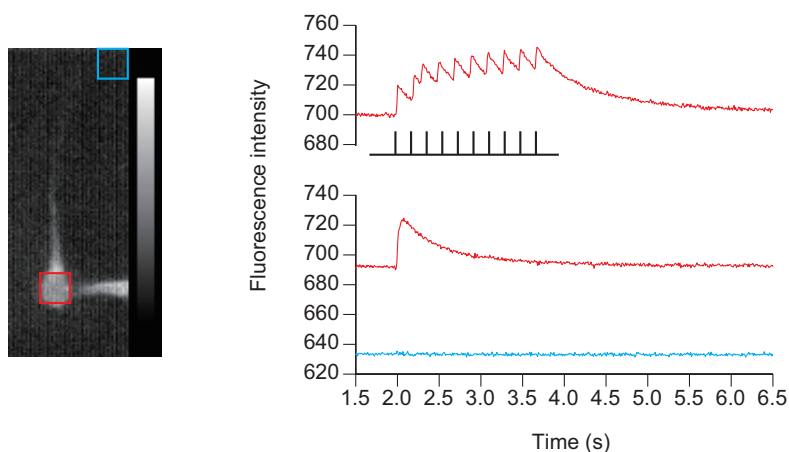


図 3.12: 細胞の蛍光画像と取得された蛍光時系列データ。左図、ROIは 15×15 ピクセルとした。細胞体のほか、ベース蛍光強度 F_b を測定するため画面端にもROIを設定した。右図上、10 Hz, 1400 pA のパルスの電流注入により、周期的な Ca^{2+} 上昇を発生させた； 下、各ROIの同じ時刻の蛍光時系列。

$F_{\max}$ の実験的同定

3.6.1で述べた刺激プロトコールにより、10 Hzの周期的な Ca^{2+} 上昇を発生させた。そのデータから、図3.12で示したベース蛍光強度を引いた時系列(図3.13)の各回の刺激時の最大値を、式(3.34)-(3.38)の蛍光強度値 $F_0, F_1, F_2, \dots$ とした。ある1つの細胞に対し複数回、一連の刺激を加え、色素の退色に伴い蛍光強度値は時間とともに低下するので、各回において休止蛍光強度 F_0 で正規化した。式(3.39)により各回で複数の $F_{\max}$ が計算できるが、それには負になる値や異常値、複素数が含まれる。それらを除外した値のみを平均し正規化して、さらにその各回の平均と分散を計算した。それぞれ、3.20500と2.038472であった。

この値に、パラメータおよび $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定に用いる蛍光時系列(図3.14 A)の休止状態の蛍

光強度の平均値をかけ、さらに同定したカメラのゲイン G で割った値を $F_{\max}$ をした。この値は $F_{\max} = 57.681$ となった。

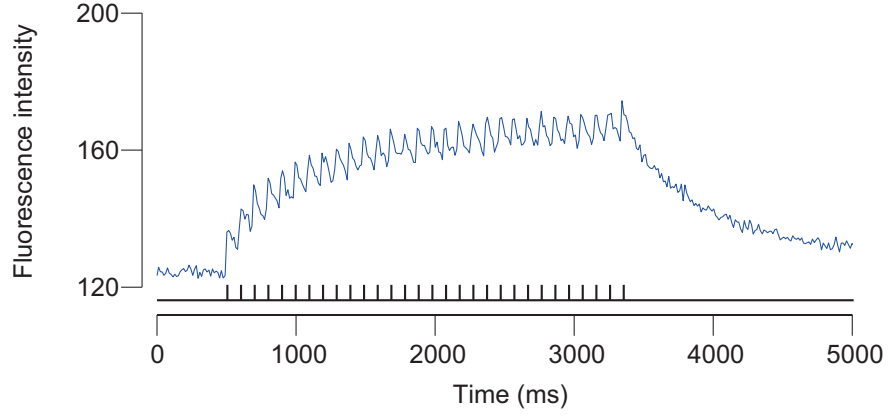


図 3.13: $F_{\max}$ の実験的同定。10 Hz, 30 回刺激の例。取得された生の蛍光強度値からベース蛍光強度を引いたもの。刺激を重ねると飽和してくるため、 $F_{\max}$ の計算には 15 回目の刺激時の値までを用いた。

実験的に同定したパラメータを用いた、ハイパーパラメータ γ および $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定

以上の実験的に同定した各パラメータ G , σ_{ro} , F_b , $F_{\max}$ と蛍光色素のダイナミックレンジ R_f の分布 $P(R_f)$ を用いて、パラメータ γ と $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定を行った。このとき粒子フィルタの潜在変数の粒子数は $N = 2000$ 、パラメータの粒子数は $M = 2000$ で計算した。

結果を図 3.14 に示す。 $P(R_f)$ は数値実験と同じ分布を用い、 $P(\gamma)$ は一様分布とした (図 3.14 C 左図, D)。潜在変数の初期値を $c_0 = 0.1$ とし、生成したパラメータの粒子すべてに関し対数周辺化尤度を評価し、得られた対数周辺化尤度を用いてパラメータの粒子をリサンプリングした結果が図 3.14 C 右図である。周辺化事後確率を最大化するパラメータの推定値 $\hat{\theta} = \{\hat{\gamma}, \hat{R}_f\}$ は、 $\hat{\theta} = \{0.003765, 90.8889\}$ で、粒子の平均と分散はそれぞれ、 $\bar{\theta} = \{0.003183, 90.7649\}$, $\sigma_{\hat{\theta}}^2 = \{0.0000003315, 53.9401\}$ であった。推定したパラメータ $\hat{\theta}$ で行った $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定結果が、図 3.14 B である。潜在変数の初期値は $c_0 = 0.1$ で計算したが、休止状態の $[\text{Ca}^{2+}]$ は約

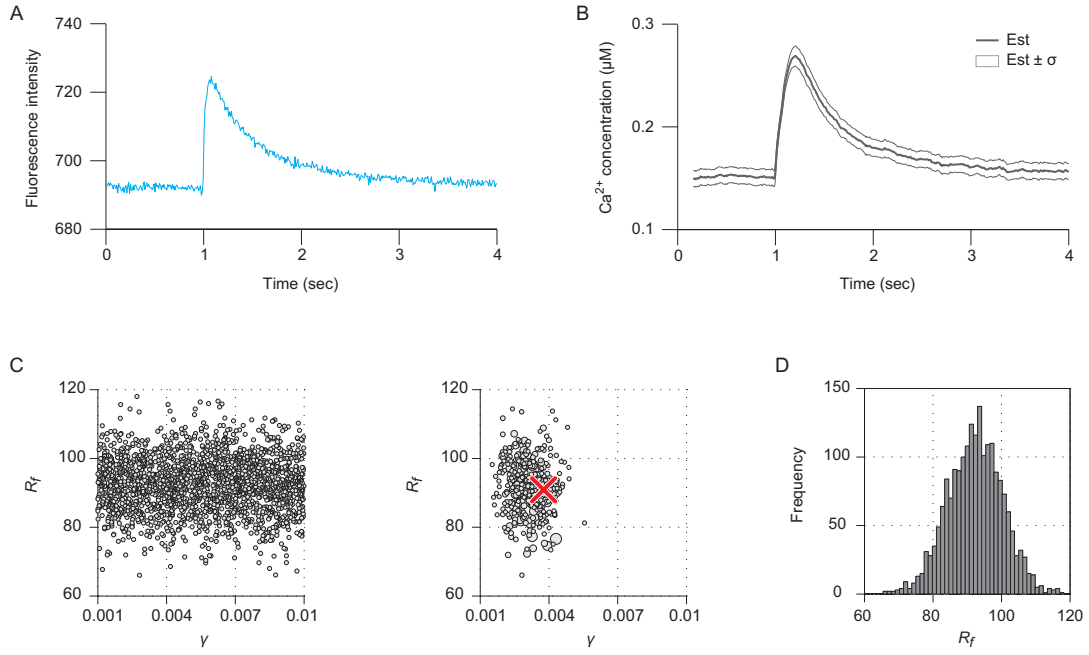


図 3.14: パラメータの事前分布 R_f の実験データへの適用. A: 推定に用いた蛍光時系列データ. B: 推定したパラメータ $\hat{\theta}$ を用いた, $[Ca^{2+}]$ の推定結果. 休止状態の平均値から Ca^{2+} 上昇のピーク値までは 117.0 nM であった. C: 左図, パラメータの事前分布 $P(R_f)$ と一様分布 $P(\gamma)$ から生成したパラメータの粒子; 右図, 生成した粒子に対する, 対数周辺化尤度に基づくリサンプリングの結果である周辺化事後確率. 周辺化事後確率を最大化する値 ($\times$ 印) は $\{\hat{\gamma}, \hat{R}_f\} = \{0.003765, 90.8889\}$ で, これをパラメータの推定値 $\hat{\theta}$ とした. D: $P(R_f)$ から生成した粒子のヒストグラム. 潜在変数の粒子数は $N = 2000$, パラメータの粒子数は $M = 2000$ で計算した.

0.15 μ M となった. また活動電位の発生に伴う Ca^{2+} 上昇は 117.0 nM となった.

3.8 結論

本研究でわれわれは, 1 次元の Ca^{2+} 蛍光時系列から, 細胞内 $[Ca^{2+}]$ を推定する較正の問題に焦点を当て, ノイズで劣化した時系列データの状態推定に対して強力な手法である状態空間法を応用し, 従来手法が持つ問題点の解決を試みた.

提案手法は, カルシウムイメージングを (1) Ca^{2+} ダイナミクス, (2) 色素反応, (3) 発光過程, (4) CCD ノイズの 4 つの過程でモデル化し, 状態空間モデルを構成した (図 3.2). そして粒子フィルタの計算手法で周辺化事後確率を求め, 周辺化事後確率最大化により Ca^{2+} 濃

度を推定した。さらに、パラメータに事前分布を導入し、粒子フィルタの計算手法を用いてパラメータの周辺化事後確率分布を計算し、未知のモデルパラメータの推定も行った。

Ca^{2+} 指示色素は、 Ca^{2+} と結合した状態、遊離した状態ともに異なる強度で発光するため、それぞれの濃度に対しての発光量を記述するため2つの係数 S_b, S_f (式 (3.7)) が必要となるが (提案モデルではさらにパラメタライズし、 A と B とした)、観測値は蛍光シグナル1時系列であるため、パラメータは本質的に不定である。これについて先行研究の事前知識や実験から決定可能なパラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ または $P(R_f)$ を用いることで、モデルが潜在的に孕んでいるパラメータの不定性を解消できることを数値実験によって示した。表 3.1 は、数値実験で検証した $P(C_{rest})$ または $P(R_f)$ を用いた方法の $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定精度を平均2乗誤差で評価したものである。事前分布なしの場合、事前分布 $P(C_{rest})$ を用いた場合と事前分布 $P(R_f)$ を用いた場合では、用いた人工データが違いため単純な比較はできないが、 $P(C_{rest})$ および $P(R_f)$ を用いると、潜在変数の初期値 c_0 に依存する推定結果の変動がほぼなく、パラメータの不定性が解消できることが確認できた。Joucla らの先行研究 [30] はパラメータ推定に、本質的に必要とする以上の拘束を用いたが、われわれの提案手法では利用可能で必要とされる最低限の拘束に抑えることができた。また Gryniewicz らの較正式 (式 (3.1), 式 (3.2)) をはじめとする従来の較正式が持つ、 Ca^{2+} 濃度を復元する際、信号に重畳したノイズを拡大してしまう問題 (図 3.15) も、本手法では非線形のモデルに加算的にノイズが加わる過程をモデル化しているため問題にならない。

パラメータの事前分布 $P(C_{rest})$ または $P(R_f)$ を用いる方法を生理実験データに適用した。 $P(C_{rest})$ を用いる方法では、活動電位の発生に伴う Ca^{2+} 上昇について、文献値 [21, 46] と近い値を推定することができた。 $P(R_f)$ を用いる方法では、休止 $[\text{Ca}^{2+}]$ が約 150 nM とな

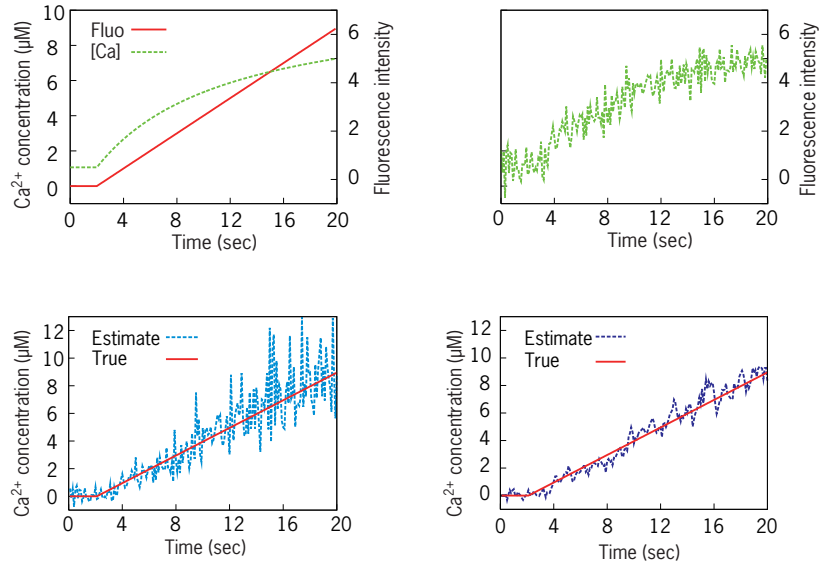


図 3.15: 観測ノイズで劣化した信号に対する決定論的な較正式と状態空間法を用いた較正法の比較. 上左図, 線形に上昇する $[Ca^{2+}]$ ($[Ca]$) を仮定した場合, 蛍光強度は Fluo のような飽和曲線を描く; 上右図, 観測値には観測ノイズが線形に加算される. 下左図; 較正式を用いてノイズで劣化した蛍光強度から $[Ca^{2+}]$ を較正すると, 色素の飽和に対応してノイズを過剰に増大させてしまう (推定値: Estimation, 真値: True). 下右図; 状態空間法を用いた提案手法の場合, 非線形な信号にノイズが重畳する過程をモデル化しているため, 色素が飽和した場合でも推定誤差が増大しない.

り, 50–100 nM とする文献値 [21, 40, 22, 2, 3, 22, 46] に対し, 大きな値となった. 活動電位の発生に伴う Ca^{2+} 上昇は 117.0 nM となり, これは文献値 [21, 46] より小さな値となった.

$P(R_f)$ を用いる方法は, 実験的に同定するパラメータ, 最大蛍光強度 $F_{\max}$, ベース蛍光強度 F_b , CCD のゲイン G に推定結果が大きく影響される. 今回 $F_{\max}$ について, 周期的な刺激に伴う Ca^{2+} 上昇の蛍光強度値から同定する手法を提案したが, Ca^{2+} 指示色素の過渡的な反応に準平衡を仮定したモデルで考えているため, この仮定により $F_{\max}$ に推定誤差が生じていることが考えられる. またベース蛍光強度 F_b を, 色素導入したスライス標本のイメージングデータから抽出した. イメージセンサの視野端に ROI を設定し, その蛍光強度値を F_b とした. この値には細胞から発せられる蛍光も微弱ながら含まれると考えられるので, 自家蛍光とデバイスのバイアス信号 (暗電流) で定義した F_b の値を正確に測定できていない可能性

がある．ゆえに， F_b を正確に測定するために， Ca^{2+} 指示色素を導入する前の試料に対して，イメージングを行う方策が考えられる．しかしながら R_f は，細胞のサンプルの違いに依存しない色素自体の性質であるので [46]，細胞によって変動する C_{rest} よりも扱いやすいプレイヤーである．ゆえに今後 $P(R_f)$ を用いる方法において，正確に $F_{\max}$ 等の同定を行い、文献値に対し整合性がある結果を出したい．

モデル自体の問題点として，本研究で用いたトレンドモデル (式 (3.5)) が急激な $[\text{Ca}^{2+}]$ の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，システムノイズ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 [36, 14]．また提案したパラメータ推定の枠組みは，粒子フィルタによりモンテカルロ表現されたパラメータの周辺化事後確率が計算可能であった．今後，このパラメータの周辺化事後確率分布全体を用いた潜在変数の推定方法であるベイズ推定によって， $[\text{Ca}^{2+}]$ の値が取りうる可能性の分布自体を計算し，ベイズ統計の枠組みによる，状態推定のより一般的な評価を行いたいと考えている．

第4章 拡張カルマンフィルタによる時空間 Ca^{2+} ダイナミクスの推定

4.1 導入

前章では、細胞内の空間を考慮せず1点の蛍光時系列からその点における Ca^{2+} 濃度（以下 $[\text{Ca}^{2+}]$ ）を推定する問題を扱った．本章では細胞内の空間を考慮し、 Ca^{2+} イメージングの動画像から空間的な $[\text{Ca}^{2+}]$ の経時的变化を推定する問題を扱う．

細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の特徴的な時空間パターンとして Ca^{2+} ウェーブと呼ばれる現象がある [35]. Ca^{2+} ウェーブとは高 $[\text{Ca}^{2+}]$ の波が細胞内空間を伝搬する現象であるが、ラット海馬 CA1 領域錐体細胞においては一過性のカルシウム上昇が先端樹状突起に沿って伝搬する現象として知られている (図 4.1). この現象は、細胞内の小胞体 (ER) 上の IP_3 受容体が樹状突起に沿って連鎖的に活性化され、小胞体からの Ca^{2+} 流出が伝搬し、結果的に孤立波のように現れると言われている [72, 13]. Ca^{2+} ウェーブは、遺伝子発現、タンパク質合成に重要であると考えられ、さらに伝搬のメカニズムは樹状突起上でのシナプスの情報統合に寄与していると考えられている．

Ca イメージングは細胞内での、このような時空間的な $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化の計測を可能にする．しかしながら、前章まで議論してきたように、 Ca イメージングの観測値は Ca^{2+} 指示色素の蛍光強度であり、これは $[\text{Ca}^{2+}]$ に関する間接的な情報である．それゆえ、イメージング手法

は Ca^{2+} ウェーブの伝搬プロセスを定性的には理解できても定量的理解の達成は置き去りにされる。一方で、 Ca^{2+} ウェーブ全般の伝搬メカニズムを解明するために、モデリングによる構成的なアプローチが行われている [35]。しかしこの現象の定量的な再現は成功していない。これはこの現象の化学的・物理的なすべての因子を数理モデルとして記述しつくすことは困難であり、構成的なモデルは過大なモデル化誤差を持つためである。

本研究では、モデルが推定する潜在変数が持つ誤差を観測データと同化することで修正し、複雑な現象を予測・推定・解明するデータ同化の枠組みを応用し [80]、Ca イメージングデータから Ca^{2+} ウェーブに伴う時空間的な $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化を定量的に推定する手法を提案する。まず構成的なアプローチに基づき、1次元反応拡散系を用いた樹状突起 Ca^{2+} 拡散モデルを記述する。次に、蛍光色素の反応、蛍光の検出、CCD センサのノイズによるシグナルの劣化プロセスで構成された Ca イメージングデータの観測過程をモデル化する。そして、 Ca^{2+} 拡散モデルと蛍光観測過程のモデルを離散化し、有限の状態ベクトルを持つ状態空間モデルを導出し、拡張カルマンフィルタを用いた状態推定アルゴリズムを実装する。

提案手法は小胞体からの流入を含め、細胞質外からの Ca^{2+} 流入をモデル化していない。そのため小胞体からの流入によって駆動される Ca^{2+} ウェーブのデータと構成したモデルの間にはモデル化誤差が存在するが、カルマンフィルタのフィードバックが誤差を修正する。すなわちそのフィードバックは細胞質外からの流入の総量だと解釈できるので、提案手法は時空間的な $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定に限らず、 Ca^{2+} 流量も見積もることができる。

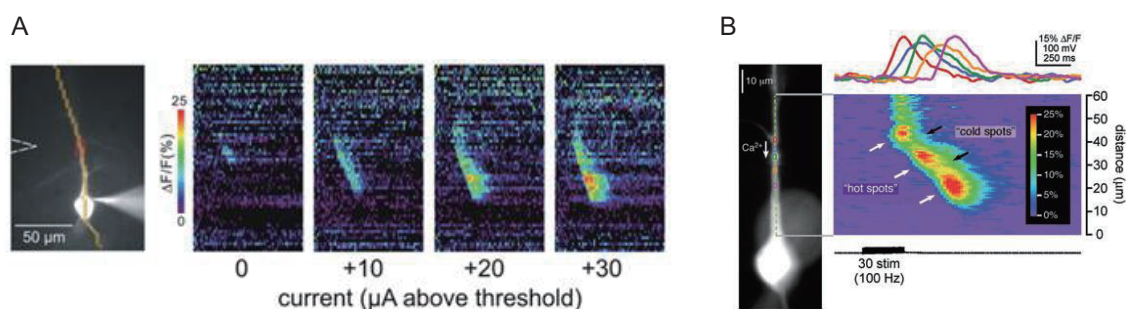


図 4.1: 海馬 CA1 錐体細胞樹状突起での Ca^{2+} ウェーブの伝搬. A: テタヌス (100 Hz 0.5 s の高頻度電流注入) でのシナプス刺激による Ca^{2+} ウェーブの発生. Ca^{2+} 指示色素 Mag-Fura-2 ($K_d = 25 \mu\text{M}$) を用いた. 刺激位置は左の写真中の白線. 右の 4 つのパネルは注入する電流の大きさごとに, 横軸を時間, 縦軸を樹状突起中での位置として蛍光強度を疑似カラープロットしたもの. [Watanabe et al. 2006 より引用 [72]]. B: Ca^{2+} 指示色素 fura-2FF を用いた観測. 細胞質内からの Ca^{2+} 流入の場所に偏りがあることが示されている (hot spots, cold spots). [Fitzpatrick et al. 2009 より引用 [13]]

4.2 アルゴリズムの構築

4.2.1 提案モデル

まず, 状態空間モデルを構成するために, Ca イメージングにより樹状突起中での時空間的な $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化が蛍光強度として観測される過程を, 2 つのプロセス “ Ca^{2+} 拡散モデル” と “蛍光観測過程” としてモデル化する.

Ca^{2+} 拡散モデル

錐体細胞の先端樹状突起を伝搬する Ca^{2+} ウェーブを反応拡散方程式によって記述する. 前章と同様, システムの複雑さに起因するパラメータの不定性を考慮し, できるだけ単純なモデルとする. このため Ca^{2+} , Ca^{2+} 指示色素, Ca^{2+} バッファの 3 つの最低限の化学種を考

え，先端樹状突起の形態を長さ L μm の 1 次元シリンダーとして記述する．

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} &= D_c \frac{\partial^2[\text{Ca}^{2+}]}{\partial x^2} + k_-[CaB] + \beta[CaD] \\
&\quad - k_+[\text{Ca}^{2+}][B] - \alpha[\text{Ca}^{2+}][D] - J_{pm}([\text{Ca}^{2+}]) + J_{leak} \\
\frac{\partial[B]}{\partial t} &= D_b \frac{\partial^2[B]}{\partial x^2} + k_-[CaB] - k_+[\text{Ca}^{2+}][B] \\
\frac{\partial[CaB]}{\partial t} &= D_b \frac{\partial^2[CaB]}{\partial x^2} - k_-[CaB] + k_+[\text{Ca}^{2+}][B] \\
\frac{\partial[D]}{\partial t} &= D_d \frac{\partial^2[D]}{\partial x^2} + \beta[CaD] - \alpha[\text{Ca}^{2+}][D] \\
\frac{\partial[CaD]}{\partial t} &= D_d \frac{\partial^2[CaD]}{\partial x^2} - \beta[CaD] + \alpha[\text{Ca}^{2+}][D]
\end{aligned} \tag{4.1}$$

ここで， $[\text{Ca}^{2+}]$ は細胞内 Ca^{2+} 濃度 (μM)， $[B]$ と $[D]$ はそれぞれ Ca^{2+} から遊離したバッファとカルシウム指示色素の濃度 (μM)， $[CaB]$ と $[CaD]$ は Ca^{2+} と結合したバッファとカルシウム指示色素の濃度 (μM) である． D_c ， D_b ， D_d はそれぞれ Ca^{2+} ，バッファ，カルシウム指示色素の拡散係数 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) である．バッファとカルシウム指示色素の拡散係数は Ca^{2+} と結合しても，遊離した値と変わらないとする． k_+ と k_- は Ca^{2+} とバッファの反応における速度定数 ($\mu\text{M}/\text{s}$ ， $1/\text{s}$) で， α と β は Ca^{2+} とカルシウム指示色素の反応の速度定数である． $J_{pm}([\text{Ca}^{2+}])$ は Ca^{2+} -ATPase pump による Ca^{2+} の流出で以下の関数に従う．

$$J_{pm}([\text{Ca}^{2+}]) = \frac{V_p[\text{Ca}^{2+}]^2}{K_p^2 + [\text{Ca}^{2+}]^2} \tag{4.2}$$

ここで V_p と K_p は最大速度 ($\mu\text{M}/\text{s}$) とミカエリス - メンテン定数 (μM) である． J_{leak} はリークで，細胞の休止状態において Ca^{2+} -ATPase pump の働きを相殺し $[\text{Ca}^{2+}]$ を $[\text{Ca}^{2+}]_{rest}$ に維

持する。すなわち,

$$J_{leak} = \frac{V_p [\text{Ca}^{2+}]_{rest}^2}{K_p^2 + [\text{Ca}^{2+}]_{rest}^2} \quad (4.3)$$

である。ここで $[\text{Ca}^{2+}]_{rest}$ は休止 $[\text{Ca}^{2+}]$ (μM) である。

Ca^{2+} とバッファ, および Ca^{2+} とカルシウム指示色素の反応は拡散や排出に比べ非常に速いと仮定する (準平衡仮定)。このとき, $[B]$ と $[D]$ は質量作用の法則より,

$$[B] = \frac{B_{tot}}{[\text{Ca}^{2+}]/K_b + 1}, \quad [D] = \frac{D_{tot}}{[\text{Ca}^{2+}]/K_d + 1} \quad (4.4)$$

と記述できる。ここで, K_b と K_d は解離定数 (μM) で, $K_b = k_-/k_+$ および $K_d = \beta/\alpha$ である。

B_{tot} と D_{tot} は全バッファおよび全色素濃度 (μM) である。全バッファおよび全色素濃度を与えると, Ca^{2+} と結合したバッファと色素の濃度 $[CaB]$ および $[CaD]$ は $[CaB] = B_{tot} - [B]$, $[CaD] = D_{tot} - [D]$ と表現できる。

準平衡過程を用いると反応拡散方程式 (式 (4.1)) は, 以下のように一つの方程式に縮約できる。

$$\begin{aligned} \frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = & \frac{D_c + \theta_1 D_b + \theta_2 D_d}{1 + \theta_1 + \theta_2} \frac{\partial^2 [\text{Ca}^{2+}]}{\partial x^2} \\ & + \frac{D_b \theta'_1 + \theta'_2}{1 + \theta_1 + \theta_2} \left(\frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial x} \right)^2 - \frac{1}{1 + \theta_1 + \theta_2} (J_{pm}([\text{Ca}^{2+}]) - J_{leak}) \end{aligned} \quad (4.5)$$

ここで θ_1 および θ_2 は $[\text{Ca}^{2+}]$ に関する非線形関数,

$$\theta_1 = \frac{K_b B_{tot}}{(K_b + [\text{Ca}^{2+}])^2}, \quad \theta_2 = \frac{K_d \theta D_{tot}}{(K_d + [\text{Ca}^{2+}])^2}. \quad (4.6)$$

である．さらに，有限長ケーブルの境界条件を反射端とする．

$$\left. \frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, \quad \left. \frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial x} \right|_{x=L} = 0 \quad (4.7)$$

これらを離散化すると，以下の Ca^{2+} 反応拡散系の離散モデルが得られる．

$$\begin{aligned} c_{n,t+1} = & c_{n,t} + \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \frac{D_c + \theta_1 D_b + \theta_2 D_d}{1 + \theta_1 + \theta_2} (c_{n+1,t} - 2c_{n,t} + c_{n-1,t}) \\ & + \frac{\Delta t}{4\Delta x^2} \frac{D_b \theta'_1 + D_d \theta'_2}{1 + \theta_1 + \theta_2} (c_{n+1,t}^2 - 2c_{n+1,t}c_{n-1,t} + c_{n-1,t}^2) \\ & - \Delta t \frac{1}{1 + \theta_1 + \theta_2} (J_{pm}([\text{Ca}^{2+}]) - J_{leak}) + \tilde{w}_{n,t} \end{aligned} \quad (4.8)$$

ここで， n および t はコンパートメントの位置と離散時間， $c_{n,t}$ は $[\text{Ca}^{2+}]$ である． Δt は時間ステップサイズで， Δx は空間の離散化ステップサイズである．シリンダーの両端では， $c_{0,t} - c_{1,t} = 0$ ， $c_{N,t} - c_{N-1,t} = 0$ を満たす． $\tilde{w}_{n,t}$ は，新たに導入した白色ガウスノイズで， $\langle \tilde{w}_{n,t} \rangle = 0$ ， $\langle \tilde{w}_{n,t}, \tilde{w}_{n',t'} \rangle = \gamma^2 \delta_{nn'} \delta_{tt'}$ を満足する（ δ_{ij} はクロネッカーのデルタ， $i = j$ のとき $\delta_{ij} = 1$ ， $i \neq j$ のとき $\delta_{ij} = 0$ ）．式 (4.8) と $\tilde{w}_{n,t}$ は状態空間モデルにおいてシステム方程式とシステムノイズと呼ばれる．

蛍光観測過程

次に，蛍光強度の観測過程のモデルを示す．蛍光強度は CCD イメージセンサのピクセルの位置に依存せず，空間的に独立に観測されると仮定する．すなわち前章と同様に，各点における蛍光シグナルは Ca^{2+} から遊離した色素が発する蛍光， Ca^{2+} と結合した色素が発する

蛍光，さらに CCD のバイアス信号や自家蛍光をまとめたベース蛍光の和として記述する．

$$f = S_f[D] + S_b(D_{tot} - [D]) + F_b \quad (4.9)$$

ここで， S_f と S_b は，それぞれ Ca^{2+} 遊離色素と Ca^{2+} 結合色素の単位濃度あたりの蛍光強度で比例定数である．また F_b は自家蛍光やセンサデバイスに由来するバイアスシグナルなどバックグラウンドのシグナルを合わせたベース蛍光である．

そして，観測データは各ピクセルで独立にポアソン分布に従うショットノイズとガウス分布に従う読み出しノイズによって劣化する．ここでポアソン分布を近似的に扱い，観測される蛍光信号を以下のように記述する．

$$y_{n,t} = G \left(\frac{A}{c_{n,t}/K_d + 1} + B \right) + \frac{G}{\sqrt{n_{bin}}} \sqrt{\sigma^2 + \frac{A}{c_{n,t}/K_d + 1} + B} \tilde{v}_{n,t} \quad (4.10)$$

ここで， $y_{n,t}$ は位置 n ，時刻 t における蛍光強度である． A および B はそれぞれ $A = D_{tot}(S_f - S_b)$ と $B = D_{tot}S_b + F_b$ とする定数で， G および σ^2 は CCD カメラのゲインとガウス分布に従う読み出しノイズの分散である． n_{bin} はビニングを行うピクセル数， $\tilde{v}_{n,t}$ は $\langle \tilde{v}_{n,t} \rangle = 0$ ， $\langle \tilde{v}_{n,t}, \tilde{v}_{n',t'} \rangle = \gamma^2 \delta_{nn'} \delta_{tt'}$ を満足する白色ガウスノイズである．

推定アルゴリズムに簡単に実装のために，式 (4.10) を以下の式に簡略化する．

$$y_{n,t} = G \left(\frac{A}{c_{n,t}/K_d + 1} + B \right) + \tilde{\sigma} \tilde{v}_{n,t} \quad (4.11)$$

ここで， $\tilde{\sigma}$ は蛍光強度の時間的变化から独立な定数である．式 (4.10) において，もし B が十

分大きいなら、 $\tilde{\sigma}$ は近似的に以下のように与えられる、

$$\tilde{\sigma}^2 = \frac{G^2}{n_{bin}} \left(\sigma^2 + \frac{A}{[\text{Ca}^{2+}]_{rest}/K_d + 1} + B \right). \quad (4.12)$$

4.2.2 非線形状態空間モデル

離散化した反応拡散方程式（式 (4.8)）と観測方程式（式 (4.10)）から、下記の非線形状態空間モデルを構成する.

$$x_{n+1} = f_t(x_t) + w_t \quad (4.13)$$

$$y_t = h_t(x_t) + v_t \quad (4.14)$$

ここで、 x_n と y_n はそれぞれ N 次元状態ベクトル、 $x_t = [c_{1,t}, \dots, c_{N,t}]$, と観測ベクトル、 $y_t = [y_{1,t}, \dots, y_{N,t}]$, で、 $f_t(x_t)$ と $h_t(x_t)$ は N 次元の非線形写像（ベクトル関数）である. w_t と v_t はシステムノイズと観測ノイズで、 $\langle w_t \rangle = 0$, $\langle v_t \rangle = 0$, $\langle w_t w_t^\top \rangle = Q_t$, $\langle w_t v_t^\top \rangle = 0$, $\langle v_t v_t^\top \rangle = R_t$ を満足する多変量ガウス分布に従う. ここで $^\top$ はベクトルの転置を表し、 Q_t と R_t は対角行列 $Q_t = \gamma^2 I_N$ と $R_t = \tilde{\sigma}^2 I_N$ を表す. I_N はサイズ N の単位行列である.

4.2.3 拡張カルマンフィルタ

この研究における目的は、時空間的な蛍光データからの $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定である. 2 章において述べたが、拡張カルマンフィルタは非線形状態空間モデル (式 (4.13), (4.14)) の潜在変数の推定に有効なアルゴリズムである. 本研究では、Ca イメージングデータの潜在変数である $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定問題に拡張カルマンフィルタを応用する.

拡張カルマンフィルタは1期先予測とフィルタリングの2つのステップで構成される。

$$[1 \text{ 期先予測}] : \quad \hat{x}_{t+1|t} = f_t(\hat{x}_{t|t}) \quad (4.15)$$

$$V_{t+1|t} = \hat{F}_t V_{t|t} \hat{F}_t^T + Q_t \quad (4.16)$$

$$[\text{フィルタリング}] : \quad K_t = V_{t|t-1} \hat{H}_t^T \left[\hat{H}_t V_{t|t-1} \hat{H}_t^T + R_t \right]^{-1} \quad (4.17)$$

$$\hat{x}_{t|t} = \hat{x}_{t|t-1} + K_t [y_t - h_t(\hat{x}_{t|t-1})] \quad (4.18)$$

$$V_{t|t} = V_{t|t-1} - K_t \hat{H}_t V_{t|t-1} \quad (4.19)$$

ここで、 $\hat{x}_{t+1|t}$ と $\hat{x}_{t|t}$ は予測およびフィルタリングステップの推定値で、 $V_{t+1|t}$ と $V_{t|t}$ は予測およびフィルタリングステップでの推定誤差共分散行列である。 K_t はカルマンゲインで、 $\hat{F}_t$ および $\hat{H}_t$ は、以下のヤコビ行列である。

$$\hat{F}_t := \left. \frac{\partial f_t}{\partial x} \right|_{x=\hat{x}_{t|t}}, \quad \hat{H}_t = \left. \frac{\partial h_t}{\partial x} \right|_{x=\hat{x}_{t|t-1}}. \quad (4.20)$$

この再帰的な更新則において、 $\hat{x}_{t+1|t}$ と $V_{t+1|t}$ の初期値は $\hat{x}_{1|0} = \bar{x}_0$ と $V_{1|0} = \Sigma_0$ にセットする、ここで $\bar{x}_0$ は各要素が $[\text{Ca}^{2+}]_{rest}$ のベクトルとし、 Σ_0 は適切な小ささの値を要素とする対角化行列である。予測における $\hat{x}_{t+1|t}$ と $V_{t+1|t}$ は時刻1から $T-1$ までの観測値のデータセットに基づいており、フィルタリングにおける $\hat{x}_{t|t}$ と $V_{t|t}$ は時刻1から T のデータセットに基づいている。

このアルゴリズムによって時刻 $t = T$ までの推定値 $\hat{x}_{t+1|t}$, $\hat{x}_{t|t}$, $V_{t+1|t}$, $V_{t|t}$ が得られる。

ここで更に平滑化を適用する.

$$C_t = V_{t|t} \hat{F}_t^T (V_{t+1|t})^{-1} \quad (4.21)$$

$$\hat{x}_{t|T} = \hat{x}_{t+1} + C_t [\hat{x}_{t+1|T} - \hat{x}_{t+1|t}] \quad (4.22)$$

$$V_{t|T} = V_{t|t} + C_t [V_{t+1|T} - V_{t+1|t}] C_t^T \quad (4.23)$$

ここで, 時刻 t は $T - 1$ から逆に進み ($t = T - 1, \dots, 1$), $\hat{x}_{t+1|t}$, $\hat{x}_{t|t}$, $V_{t+1|t}$, $V_{t|t}$ は拡張カルマンフィルタですでに得られた値である. C_t は平滑化ゲインで, $\hat{x}_{t|T}$ および $V_{t|T}$ が平滑化推定値および平滑化誤差共分散行列である. 平滑化はすべてのデータセットを用いた推定を実現するアルゴリズムとなる.

4.2.4 パラメータ推定

つぎにパラメータ推定法を示す. パラメータは対数周辺尤度に基づき推定する. ここで, 時刻 $t + 1$ における尤度は下式で与えられる.

$$P(y_{t+1}|Y_t, \theta) = \int dx_{t+1} P(y_{t+1}|x_{t+1}) P(x_{t+1}|Y_t, \theta) \quad (4.24)$$

ここで, Y_t はデータセット $Y_t = [y_1, \dots, y_t]$ で, θ は推定するパラメータを要素とするパラメータベクトルである. $P(y_{t+1}|Y_t)$ と $P(y_{t+1}|x_{t+1})$ は予測分布と尤度関数で, それぞれ下式

で与えられる.

$$P(x_{t+1}|Y_t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi^n}|V_{t|t+1}|^{1/2}} \exp\left(-\frac{1}{2}(x_{t+1} - \hat{x}_{t+1|t})^T V_{t+1|t}^{-1}(x_{t+1} - \hat{x}_{t+1|t})\right) \quad (4.25)$$

$$P(y_{t+1}|x_{t+1}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi^n}|R_t|^{1/2}} \exp\left(-\frac{1}{2}(y_{t+1} - h_{t+1}(x_{t+1}))^T R_t^{-1}(y_{t+1} - h_{t+1}(x_{t+1}))\right) \quad (4.26)$$

式 (4.24) の高次元積分をラプラス近似によって計算する. まず式 (4.24) を下式の表現に書き換える.

$$P(y_{t+1}|Y_t) = \int dx_{t+1} \exp(g(x_{t+1})) \quad (4.27)$$

ここで, $g(x_{t+1})$ は,

$$\begin{aligned} g(x_{t+1}) = & -\frac{1}{2} \ln |V_{t+1|t}| - \frac{1}{2} \ln |R_t| - \frac{1}{2}(x_{t+1} - \hat{x}_{t+1|t})^T V_{t+1|t}^{-1}(x_{t+1} - \hat{x}_{t+1|t}) \\ & - \frac{1}{2}(y_{t+1} - h_{t+1}(x_{t+1}))^T R_t^{-1}(y_{t+1} - h_{t+1}(x_{t+1})) \end{aligned} \quad (4.28)$$

である. 関数 $g(x_{t+1})$ は $x_{t+1} = \hat{x}_{t+1|t+1}$ で最大値をとる. そこで関数 $g(\Delta x_{t+1} + \hat{x}_{t+1|t+1})$ を Δx_{t+1} の周りで二次まで展開すると, ラプラス近似により以下の近似的な解を得る.

$$\int dx_{t+1} \exp(g(x_{t+1})) \simeq (2\pi)^{N/2} |-\mathcal{H}(g(\hat{x}_{t+1|t+1}))|^{-1/2} \exp(g(\hat{x}_{t+1|t+1})) \quad (4.29)$$

ここで, $g(\hat{x}_{t+1|t+1})$ は,

$$g(\hat{x}_{t+1|t+1}) = -\frac{1}{2} \ln |V_{t+1|t}| - N \ln \tilde{\sigma} - \frac{1}{2\tilde{\sigma}^2} \sum_{n=1}^N (y_{n,t+1} - \eta(\hat{c}_{n,t+1|t+1}))^2 \quad (4.30)$$

$$-\frac{1}{2}(\hat{x}_{t+1|t+1} - \hat{x}_{t+1|t})^T V_{t+1|t}^{-1} (\hat{x}_{t+1|t+1} - \hat{x}_{t+1|t}) \quad (4.31)$$

である. $\hat{c}_{n,t+1|t+1}$ はベクトル $\hat{x}_{t+1|t+1}$ の n 番目の要素であり, $\eta(\hat{c}_{n,t+1|t+1})$ は以下の関数である.

$$\eta(\hat{c}_{n,t+1|t+1}) = G \left(\frac{A}{\hat{c}_{n,t+1|t+1}/K_d + 1} + B \right) \quad (4.32)$$

$\mathcal{H}(g(\hat{x}_{t+1|t+1}))$ は下式を第 (i, j) 番目の要素とする, 関数 $g(\hat{c}_{1,t+1|t+1}, \hat{c}_{2,t+1|t+1}, \dots, \hat{c}_{N,t+1|t+1})$ のヘッセ行列である.

$$\mathcal{H}(g(\hat{x}_{t+1|t+1}))_{ij} = \begin{cases} \frac{1}{2} (V_{t+1|t}^{-1})_{ij} & , \quad i \neq j \\ \frac{1}{2} (V_{t+1|t}^{-1})_{ij} + \Xi & , \quad i = j \end{cases} \quad (4.33)$$

ここで Ξ は,

$$\Xi = -\frac{1}{\tilde{\sigma}^2} \eta'(\hat{c}_{i,t+1|t+1})^2 + \frac{1}{\tilde{\sigma}^2} (y_{i,t+1} - G\eta(\hat{x}_{i,t+1|t+1})) \eta''(\hat{c}_{i,t+1|t+1}) \quad (4.34)$$

である. $\eta'(\hat{c}_{i,t+1|t+1})$ および $\eta''(\hat{c}_{i,t+1|t+1})$ は関数 $\eta(\hat{c}_{i,t+1|t+1})$ の $\hat{c}_{i,t+1|t+1}$ に関する 1 次および 2

次導関数

$$\eta'(\hat{c}_{i,t+1|t+1}) = -\frac{GA}{K_d}(\hat{c}_{i,t+1|t+1}/K_d + 1)^{-2}, \quad (4.35)$$

$$\eta''(\hat{c}_{i,t+1|t+1}) = 2\frac{GA}{K_d^2}(\hat{c}_{i,t+1|t+1}/K_d + 1)^{-3}, \quad (4.36)$$

である．式 (4.14) の定義のようにデータサンプルはそれぞれ時間的に独立であると仮定すると，周辺尤度は下式で計算できる．

$$L(\theta) = \prod_{n=1}^T P(y_n|Y_{n-1}, \theta). \quad (4.37)$$

ゆえに対数周辺尤度は，

$$l(\theta) = \ln L(\theta) = \sum_{n=1}^T \ln P(y_n|Y_{n-1}, \theta) \quad (4.38)$$

となる．パラメータ θ を推定するために，パラメータ空間における対数周辺尤度（式 (4.38)）の最大値を探索する必要がある．当研究ではこれをグリッドサーチによって行った．

パラメータ間には依存性があり式 (4.8) のすべてのパラメータの一意的な最適解を推定することはできないので，一意に同定可能な以下の3つのパラメータに焦点をあて，推定を行う．

$$\theta = \{C_0, D_d, B_{tot}\}, \quad (4.39)$$

ここで C_0 は $[\text{Ca}^{2+}]$ の初期状態である．

4.2.5 データ生成モデル

提案したモデルの有効性を検証するために、人工的に生成した蛍光強度データにて数値実験を行う。蛍光強度データの生成には観測方程式（式 (4.10)）と以下のシステム方程式を用いる。

$$\begin{aligned}
 c_{n,t+1} = & c_{n,t} + \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \frac{D_c + \theta_1 D_b + \theta_2 D_d}{1 + \theta_1 + \theta_2} (c_{n+1,t} - 2c_{n,t} + c_{n-1,t}) \\
 & + \frac{\Delta t}{4\Delta x^2} \frac{D_b \theta'_1 + D_d \theta'_2}{1 + \theta_1 + \theta_2} (c_{n+1,t}^2 - 2c_{n+1,t}c_{n-1,t} + c_{n-1,t}^2) \\
 & - \Delta t \frac{1}{1 + \theta_1 + \theta_2} (J_{pm}([Ca^{2+}]) - J_{leak}) + \Delta t \frac{1}{1 + \theta_1 + \theta_2} f(t, n) \quad (4.40)
 \end{aligned}$$

このとき、 $f(t, n)$ は細胞質外からの Ca^{2+} 流入を表現する。式 (4.8) は Ca^{2+} 流入過程を持たない。そのため上式のように入力項を新たに加え、データ生成に用いる。

ここで、 Ca^{2+} ウェーブの伝搬を模倣するための流入と、局所的な $[Ca^{2+}]$ 上昇を模倣するための流入の、2 種類の流入を考える。

Ca^{2+} ウェーブの伝搬では、すべてのコンパートメントが以下の関数で表現される Ca^{2+} 流入によって駆動されるとする。

$$f(t, n) = A \frac{t\Delta t - t_n^{on}}{\tau} \exp\left(1 - \frac{t\Delta t - t_n^{on}}{\tau}\right) \quad (4.41)$$

ここで A は振幅、 τ は時定数、 t_n^{on} はコンパートメント n の Ca^{2+} 流入の開始時間である。図 4.2 B に示すように、流入の開始時間 t_n^{on} をコンパートメントの位置に依存して移動させることで、 Ca^{2+} ウェーブの伝搬が模倣できる。

局所的な $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は下式で与える.

$$f(t, n) = \Delta C \delta_{t,0} \delta_{n,n_{on}} \quad (4.42)$$

ここで ΔC は $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇の振幅で n_{on} は入力が入るコンパートメントである. もしシステム方程式 (式 (4.8)) のコンパートメント n_{on} における初期状態 C_0 を, $C_0 = \Delta t \Delta C / (1 + \theta_1 + \theta_2)$ とする場合, 拡張カルマンフィルタで用いるシステム方程式は, 入力項 (式 (4.42)) を用いたデータ生成モデル (式 (4.40)) と等価になる. ゆえにパラメータ推定ではこのデータ生成モデルを用いる.

4.3 結果

4.3.1 真のパラメータが既知の場合

提案手法の有効性を検証するために, 真のパラメータが既知の場合で数値実験を行った. まず, 式 (4.40) と (4.41) を用い, Ca^{2+} ウェーブの伝搬を模倣する $[\text{Ca}^{2+}]$ の時空間パターンを生成した. さらに観測方程式 (式 (4.10)) を用い, 図 4.2B および D に示す蛍光データを人工的に生成した. ここでデータ生成にはパラメータは表 4.1 に示した値と, 時間ステップサイズ $\Delta t = 0.01$ s, サンプル時間 $T = 4000$ を用いた.

次に生成した人工データから拡張カルマンフィルタ・スモザーを用いて $[\text{Ca}^{2+}]$ を推定した (図 4.2 E est). このときパラメータはデータ生成と同じ値 (表 4.1) を用いたが, 拡張カルマンフィルタで用いた状態空間モデルのシステム方程式 (式 4.8) にはデータ生成モデル (式 4.40) と異なり Ca^{2+} 流入の表現がなく, モデル化誤差がある. それにもかかわらず,

表 4.1: 数値実験で用いたパラメータ

Parameter	Value	References
Morphology		
1 コンパートメントの長さ, Δx	10 μm	adjusted
コンパートメント数, N	10	adjusted
Diffusion		
遊離 Ca^{2+} の拡散係数, D_c	255 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	(Goldberg et al., 2003)
Efflux		
最大速度, V_p	2.8 $\mu\text{M}/\text{s}$	(Keener and Sneyd, 2009)
ミカエリス-メンテン定数, K_p	0.425 μM	(Keener and Sneyd, 2009)
休止カルシウム濃度, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}}$	0.1 μM	(Klingauf and Meher, 1997. Michailova et.al., 2002)
Mobile buffer		
全濃度, B_{tot}	100 μM	(Klingauf and Meher, 1997. Smith et.al., 2001)
拡散係数, D_b	15 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	(Klingauf and Meher, 1997. Smith et.al., 2001)
解離定数, K_b	10 μM	(Klingauf and Meher, 1997. Smith et.al., 2001)
Ca^{2+} indicator dye (Fluo-4)		
全濃度, D_{tot}	100 μM	adjusted
拡散係数, D_d	200 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	(Goldberg et al., 2003)
解離定数, K_d	345 μM	(Spence et al., 2005)
Observation		
係数, S_f	1	adjusted
係数, S_b	100	adjusted
ベース蛍光強度, F_b	100	adjusted
CCD カメラのゲイン, G	0.146	(Joucla et al., 2010)
読み出しノイズのノイズ強度, σ	16.4	(Joucla et al., 2010)
ビンング, n_{bin}	80 (10 $\times$ 8)	adjusted

$[\text{Ca}^{2+}]$ の推定値は真の値とよく一致した (図 4.2 E **est** と **true**) .

図 4.2 F の **fb** (青線) はカルマンフィルタのフィードバック値, $K_t[y_t - h_t(\hat{x}_{t|t-1})]$ (式 (*)) , の時間変化で, 図 4.2 でさらにフィードバック値の時間積分 (**accum**) と Ca^{2+} 流入量の時間積分 (**true**) を重ね合わせている. 両者はよく一致していることから, フィードバックはモデル化誤差をキャンセルするように働き, 結局 Ca^{2+} 流入量を表現すると言える.

この数値実験の結果は, 提案手法は $[\text{Ca}^{2+}]$ だけでなく, Ca^{2+} 流入量の推定が可能であることを示し, さらに状態空間モデルにある程度のモデル化誤差があるとしても本手法は有効であると言える.

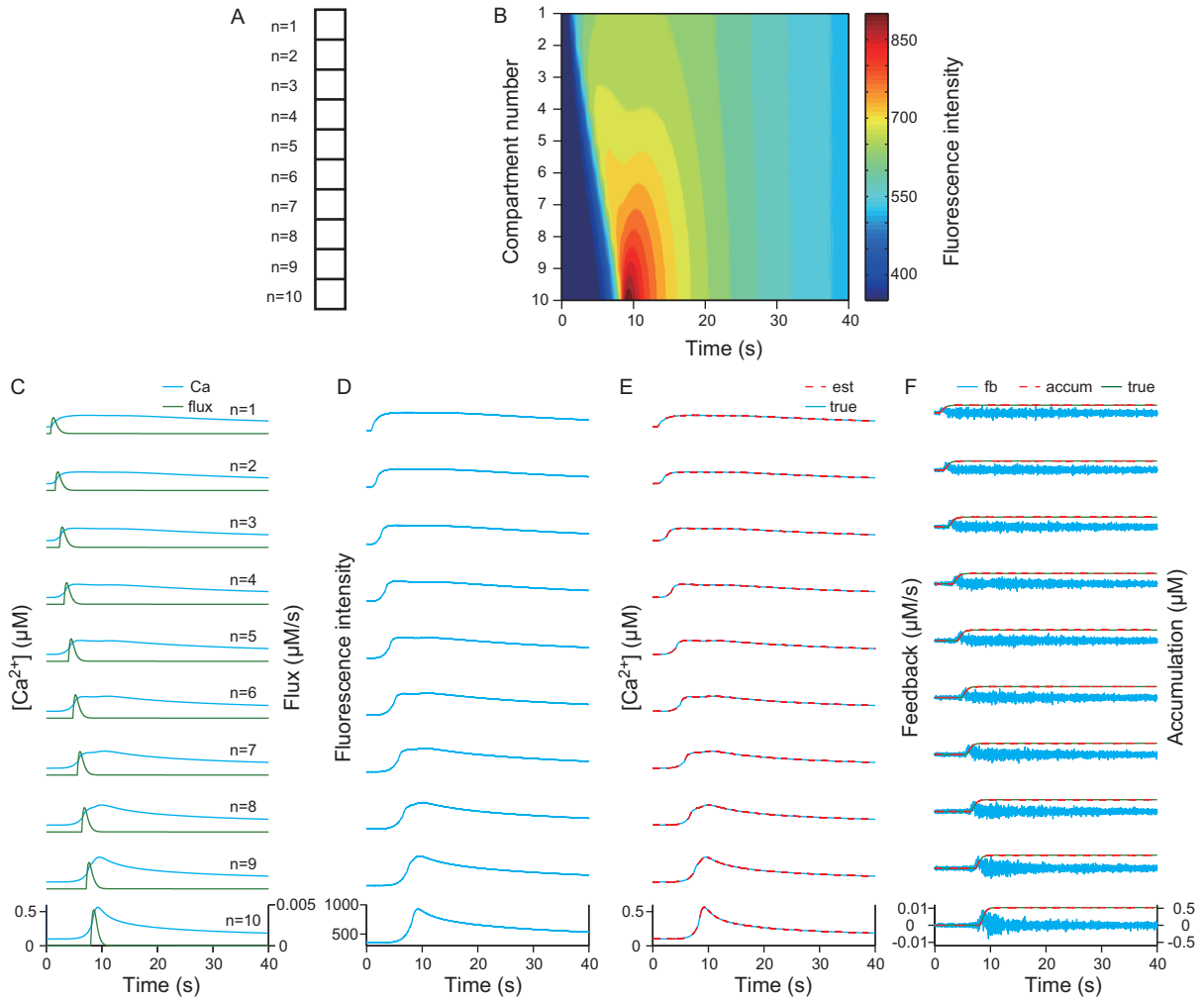


図 4.2: 真のパラメータを既知とした数値実験の結果. A: 10 コンパートメントを持つ 1 次元シリンダーモデル. B: 人工的に生成された蛍光強度の時空間的なプロファイル. 疑似カラーマップは各時刻でのシリンダーモデルの軸方向に沿った蛍光強度の分布を示す. C: 真の $[Ca^{2+}]$ および Ca^{2+} 流入量. 緑線 (flux) は各コンパートメントにおける Ca^{2+} 流入の時間変化を示し, 青線は $[Ca^{2+}]$ を示す. D: 生成された各コンパートメントでの人工蛍光強度の時間変化で, B の疑似カラーと等価のものである. E: 赤破線 (est) は推定された $[Ca^{2+}]$. 青線 (true) は真の $[Ca^{2+}]$ で, これは C の青線と同一のものである. F: 青線 (fb) は拡張カルマンフィルタのフィードバック値の時間変化をプロットしたもの. 赤破線 (accum) と緑実線 (true) は fd と C の flux を時間的に累積した値 (時間積分) をプロットしたものである. 両者はほぼ一致している.

4.3.2 パラメータ推定

次にグリッドサーチによって対数周辺尤度を最大化する点を探索することで、3パラメータ $\theta = \{D_d, B_{tot}, C_0\}$ の推定を試みた。パラメータ推定には、 $n_{bin} = 5$, $C_0 = 0.5$ とした局所的な $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇（式 (4.42)）を模倣する流入とデータ生成モデル（式 (4.40)）および観測方程式（式 (4.10)）で生成した、局所 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇の蛍光データを用いた。この理由は、このときのデータ生成モデル（式 (4.40) および (4.40)）は拡張カルマンフィルタで用いる状態空間モデルのシステム方程式（式 (4.8)）と初期値によって等価になり、モデル化誤差が存在しないためである。図 4.3 C の左のパネルが、パラメータ推定で用いられた人工蛍光データである。その他のパラメータは前実験同様、表 4.1 に示した値と、時間ステップサイズ $\Delta t = 0.01$ s, サンプル時間 $T = 4000$ を用いた。

3次元パラメータ空間 (D_d, B_{tot}, C_0) で対数周辺尤度を評価した。それぞれの次元のレンジは、 $110 \leq D_d \leq 300$, $50 \leq B_{tot} \leq 240$, $0.05 \leq C_0 \leq 1$, とした。図 4.3 A にこれらのパラメータの関数とした対数周辺尤度のランドスケープを示す。対数周辺尤度の最大店は、 $D_d = 240$, $B_{tot} = 170$, $C_0 = 0.5$ であり、一方でパラメータの真の値は $D_d = 200$, $B_{tot} = 100$, $C_0 = 0.5$ であり、推定された C_0 は真の値と等しかったが、 D_d と B_{tot} はわずかに真の値からずれた。図 4.3A および B が示すように、 D_d 軸および B_{tot} 軸に沿った対数周辺尤度の曲率は C_0 に比べ緩やかである。このことは、 D_d および B_{tot} はデータサンプルに依存してより不安定であることを示唆している。

次に推定モデルの一般性を検証するために、推定したパラメータを用いた拡張カルマンフィルタ・スムーザーを図 4.2 B の Ca^{2+} ウェーブのデータに適用した。この実験においては、データ生成モデルと拡張カルマンフィルタのシステム方程式との間のモデル化誤差とパ

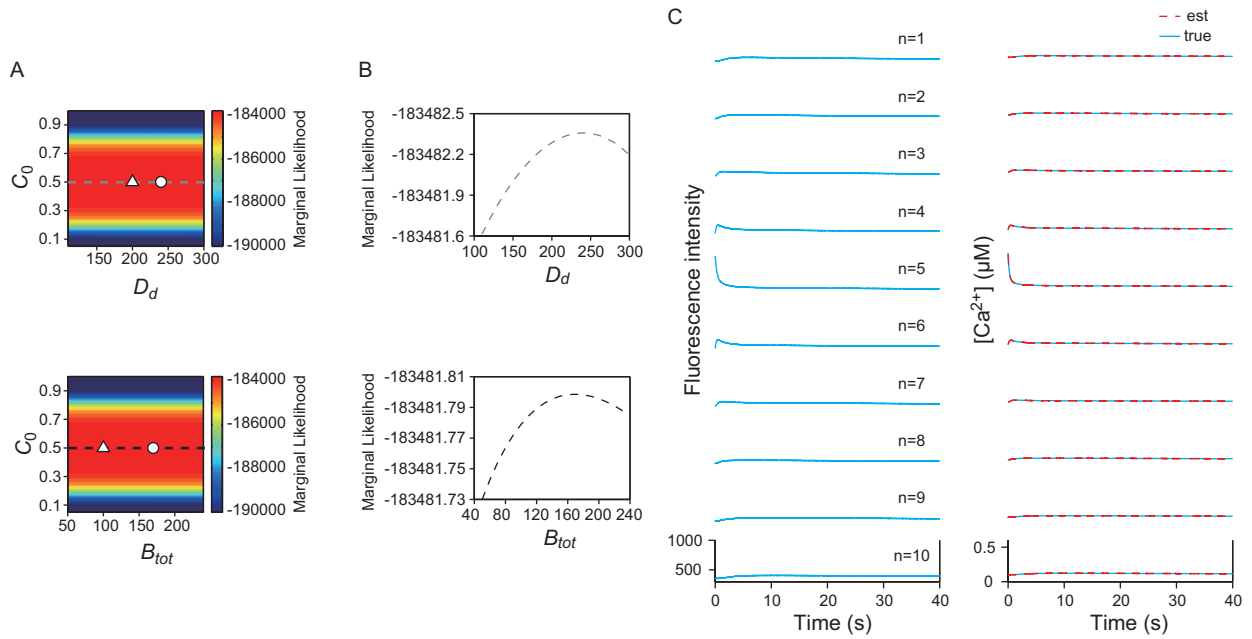


図 4.3: パラメータ C_0 , D_d , B_{tot} の推定結果. A: 2つのパネルはそれぞれ, パラメータ (D_d , C_0) または (B_{tot} , C_0) の関数として対数周辺尤度を等高線プロットした図. このときそれぞれ, 残りの1パラメータは真値に固定した. ○は対数周辺尤度の最大値を示す点で, △はパラメータの真値に対応する. B: パラメータ D_d と B_{tot} の関数として対数周辺尤度をプロットしたグラフ. このとき, 他の2つのパラメータは真値に固定した. これらはAの同じ色の破線にそれぞれ対応する. C: 左図, パラメータ推定で用いた人工蛍光強度の各コンパートメントごとの時間変化. パラメータ推定では, モデル化誤差がないパッシブな Ca^{2+} 拡散の蛍光データを用いる; 右図, 赤破線 (est) は真の $[Ca^{2+}]$ で, 青実線 (est) はグリッドサーチで推定されたパラメータを用いた $[Ca^{2+}]$ の推定値の時間変化.

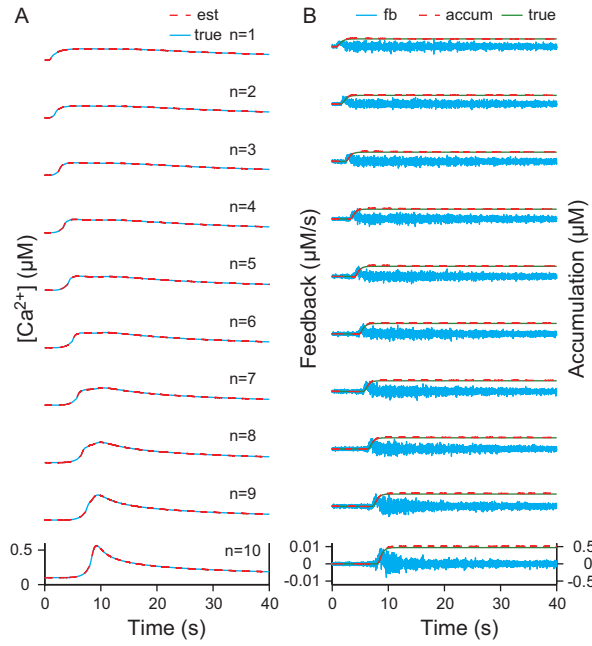


図 4.4: 推定したパラメータを用いた拡張カルマンフィルタを図 4.2 の Ca^{2+} のデータに適用した結果. A: 赤破線 (true) は $[\text{Ca}^{2+}]$ の真の時間変化. 青線 (est) は推定したパラメータを用いた $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定値の時間変化. B: 青線 (fb) は拡張カルマンフィルタのフィードバック値の時間変化. 赤破線 (accum) と緑実線 (true) は fb と真の Ca^{2+} 流入の時間積分した値をプロットしたもの.

ラメータ推定誤差とがあるにも関わらず, $[\text{Ca}^{2+}]$ 推定において真の値と良い一致を得た (図 4.4 A est と true). さらにカルマンフィルタのフィードバック値の時間積分は, 真の Ca^{2+} 流入量の積分値と良く一致した (図 4.4 B accum と true). ゆえに, 提案手法はたとえパラメータ推定誤差があっても Ca^{2+} 流量の推定も可能なことが示された.

4.4 結論

本研究においてわれわれは, 樹状突起を伝搬する Ca^{2+} ウェーブを測定した Ca^{2+} イメージングデータを想定し, それを模擬した人工データから樹状突起中の $[\text{Ca}^{2+}]$ を定量的に推定する, データ同化の枠組みを応用した手法を提案し, その有効性を数値実験によって検証した. データ同化の枠組みに基づき, まず準平衡仮定の下での非線形反応拡散モデルとして樹

状突起の Ca^{2+} 拡散過程の数値モデルを構築した。そして、離散化した反応拡散モデルをシステム方程式、CCD イメージセンサで検出される蛍光シグナルをモデル化した観測方程式で構成された状態空間モデルに基づいた拡張カルマンフィルタを実装した。パラメータ推定を実現するために、ラプラス近似を用いた対数周辺尤度の近似評価法を導入した。

提案手法の有効性を検証するために2つの数値実験を行った。1つは真のパラメータが既知である場合の評価で、図 4.2 は、提案手法が $[\text{Ca}^{2+}]$ の時空間系列の推定だけでなく、 Ca^{2+} ウェーブの伝搬における細胞質外領域からの Ca^{2+} 流入の推定も行える可能性があることを示した。実装した状態空間モデルのシステム方程式は細胞質外領域からの Ca^{2+} 流入のモデルを含んでいないが、カルマンフィルタのフィードバック項がモデル化誤差をキャンセルするように働くため、結果としてフィードバック値がモデル化していない $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化の原因である Ca^{2+} 流入量と一致した。

もう1つの実験では、パラメータ推定のための対数周辺尤度の近似評価法の評価と推定したパラメータを用いた拡張カルマンフィルタの一般性を評価した。パラメータ推定では、Manita らが報告している現象の一つとする局所的 Ca^{2+} 上昇を模擬する人工蛍光強度データを用いた [45]。それは 4.2.5 や 4.3 で述べたようにデータ生成モデル (式 (4.40) および (4.42)) と状態空間モデルのシステム方程式に間にモデル化誤差がないためである。それゆえ、図 4.3 が示すように、対数周辺尤度に基づくパラメータ推定が可能である。さらに、図 4.4 が示すように、推定したパラメータを用いた拡張カルマンフィルタにより、真のパラメータが既知の場合と同様、 Ca^{2+} ウェーブの伝搬における $[\text{Ca}^{2+}]$ 変化と細胞質外からの Ca^{2+} 流入が高精度に推定された。ここで注意すべきことは、 Ca^{2+} ウェーブの発生は細胞への不可逆的操作を伴わないので Ca^{2+} ウェーブの伝搬と局所的 Ca^{2+} 上昇は同一の細胞からデータを取得する

ことが可能であるという点である [72, 13]. Ca^{2+} ウェーブ伝搬の計測実験の後, IP_3 受容体拮抗薬 2-APB 等を用い, 小胞体からの Ca^{2+} 放出が介在する Ca^{2+} ウェーブの発生を妨げることが可能であるので, 電流注入による局所的なシナプス刺激で, 細胞膜上の Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入のみが発生し, それに起因する局所的 Ca^{2+} 上昇に伴うパッシブな Ca^{2+} 拡散を計測できる.

パラメータ推定のために, ラプラス近似を用い対数周辺尤度を評価した. すなわち, 周辺化のための高次元積分を計算するために, 式 (4.27) の被積分関数をガウス分布で近似した. それゆえ, 被積分関数がガウス分布に近ければ近いほど, 高精度の解が達成できる. 今回, 状態空間モデルの強い非線形性のために, 高 SN 比データにかかわらず, D_d と B_{tot} のパラメータ推定の結果に誤差が生じた. したがって, ラプラス近似はわれわれの問題に対して十分ではないと思われる. 近年, 生物化学やバイオインフォマティクス分野で, 状態空間モデルで形式化される非線形動的システムの推定問題に, Unscented Kalman filter [31, 32, 61] や逐次モンテカルロ法 [71, 69] などさまざまな先進的アプローチで解決する試みがなされている. 対数周辺尤度を厳密に評価するために, われわれの問題に対して, これら先進的な手法を適用することが考えられる. さらに, この分野の研究では, パラメータを状態ベクトルに組み込み, 潜在変数の状態推定に加えパラメータ推定も同時に行う自己組織的な枠組みでの推定が行われている [67, 41]. 今後, われわれもパラメータの推定問題に対し, 自己組織的な枠組みを採用することを計画している.

多点の Ca^{2+} 蛍光データから $[\text{Ca}^{2+}]$ の時空間的变化を定量的に推定する研究はこの研究以前に存在しない. 人工 Ca イメージングデータを用いた数値実験の結果が示すように, 提案手法は, $[\text{Ca}^{2+}]$ の推定ばかりでなく樹状突起に沿った Ca^{2+} ウェーブの伝搬に伴う Ca^{2+} 流

量の推定にも有効である．我々の手法は Ca ダイナミクスの細胞内メカニズムの理解に貢献できると思われる [3, 2]．また今後，提案手法を生理実験データに適用することを計画している．

第5章 結論

5.1 総括

本論文では、近年神経科学分野で広範に応用されている Ca イメージング法で計測される Ca^{2+} 蛍光時系列に着目し、1次元の蛍光時系列データから細胞内 Ca^{2+} 濃度を推定する較正の問題と、空間的に拡張し、神経細胞樹状突起内での時空間的な Ca^{2+} ダイナミクスを推定する問題を扱い、おもに状態空間法に基づく統計手法により解決を試みた。

前者の問題において、Ca イメージングの蛍光時系列データを状態空間モデルで記述するに当たり、細胞内へ導入する Ca^{2+} 指示色素は、 Ca^{2+} と結合した状態、遊離した状態ともに異なる強度で発光するため、シグナルの観測過程を記述する状態空間モデルの観測方程式は2つの未知パラメータを持つモデルとなった。観測値に対し、未知パラメータが多いためパラメータは不定であるが、それを解消するため、まず最小記述の状態空間モデルを構築した。すなわち Ca^{2+} ダイナミクスを未知パラメータが1つの単純なランダムウォークモデルで記述し、状態空間モデルのシステム方程式とした。さらに細胞内 Ca^{2+} や色素の性質に用いパラメータに関する事前分布を導入した。構築したモデルに対し、パラメータ推定と Ca^{2+} 濃度推定を行うアルゴリズムをそれぞれ粒子フィルタで実装した。状態変数の初期値を変え対数周辺尤度を計算した数値実験によって、パラメータに不定性があることを露わに示し、さらにパラメータの事前分布を導入し、周辺事後確率最大化によるパラメータ推定で不定性が

解消することを示した．推定したパラメータを用い， Ca^{2+} 濃度推定を行った．数値実験によって提案手法の有効性を確かめ，さらに実験データに適用した．

後者の問題では，錐体細胞先端樹状突起で Ca^{2+} 濃度の特徴的な時空間パターンを示す Ca^{2+} ウェーブという現象にフォーカスし，多次元の蛍光データから Ca^{2+} ウェーブ発生時の Ca^{2+} 濃度と Ca^{2+} 流量を推定するアルゴリズムを構築した．まず樹状突起をマルチコンパートメントのシリンダーでモデル化し， Ca^{2+} と Ca バッファ， Ca^{2+} と蛍光色素の反応と，それぞれの化学種の空間的な拡散を反応拡散系で記述し，細胞質外への Ca^{2+} の汲みだし行う Ca^{2+} ポンプと漏れを含めた反応拡散モデルを記述した．反応に関し準平衡を仮定し，1つの方程式に縮約，これを状態空間モデルのシステム方程式とした．状態ベクトルの各要素は各コンパートメントの Ca^{2+} 濃度である．さらに3章でモデル化した蛍光時系列の観測方程式を各コンパートメントの状態変数に適用し，状態空間モデルを構築した．この問題では状態空間モデルは高次元となり計算コストが高いため，非線形システムに適用でき，粒子フィルタより計算が簡単な拡張カルマンフィルタで推定アルゴリズムを実装した．パラメータ推定では，ラプラス近似を用いた対数周辺尤度の近似評価法を構築して対数周辺尤度を計算し，対数周辺尤度を最大化するパラメータをグリッドサーチで探索した．そして数値実験によって，構築したアルゴリズムの有効性を検証した．

5.2 今後の展望

Ca イメージングは電気生理的な計測手法に比べ歴史が浅く，また細胞内 Ca^{2+} ダイナミクスには活動電位のような神経細胞活動の極めて明快な単位が存在しないため，実験家の立場から有用な手法として盛んに利用されつつある現在においても，神経科学分野の理論家や解

析の専門家の参入は未だに多くはない。しかしながら、Ca イメージングデータは電気生理のデータに比べ膨大な情報を内包する動画データであるため、統計科学の解析手法が求められる場面がかなりあり、この分野は今後発展が望まれる豊穡な沃土といえる [59, 75, 73]。近年の研究において、Dombeck らは、K-means 法を用いラットの行動と活動する細胞をクラスタリングして細胞間の機能的接続を解析し [10]、Mukamel らは蛍光動画像から独立成分分析で細胞の形状を同定し活動の相関を解析した [53]。これらのように多細胞の集団的活動に着目した統計的な解析が近年勃興しつつある。

しかしながら多点の Ca^{2+} 蛍光データから細胞内の時空間的な Ca^{2+} ダイナミクスを定量的に推定する研究は、本論文の研究以外の報告が待たれている現状である。本論文の 5 章で着目した神経細胞樹状突起は、多くの細胞のシナプスからの情報が入力される情報統合の場であり、本論文でも紹介した 2 光子顕微鏡やケージドグルタミン酸の登場などにより、単一スパインレベルのミクロスコピックな刺激と観測のプロトコールが確立されつつあり、近年まで知られていなかった多くの現象や性質が発見されてきている [66, 5, 29, ?]。

本研究において多点の蛍光時系列データの解析技術の礎が築けたので、今後は本手法をさらに深化させ、樹状突起情報統合に根ざして、電気生理データと融合した樹状突起イオンダイナミクスのデータ同化を行う研究や、 Ca^{2+} 指示色素という一種の Ca^{2+} バッファを導入することで細胞が本来持つ性質が改変されるアーティファクトを補正し、本来の樹状突起が持つ性質を予測する研究などを行っていききたい。

参考文献

- [1] H. Baier and E.K. Scott. Genetic and optical targeting of neural circuits and behavior—zebrafish in the spotlight. *Curr Opin Neurobiol.*, Vol. 19, pp. 553–60, 2009.
- [2] M. J. Berridge. Elementary and global aspects of calcium signaling. *J. Physiol*, Vol. 499, pp. 291–306, 1997.
- [3] M. J. Berridge. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, Vol. 21, pp. 13–26, 1998.
- [4] W. S. Boyle and G. E. Smith. Charge coupled semiconductor devices. *Bell Sys. Tech. J.*, Vol. 49, pp. 587–593, 1970.
- [5] Tiago Branco, Beverley A. Clark, and Michael Hausser. Dendritic discrimination of temporal input sequences in cortical neurons. *Science*, pp. 1671–1675, 2010.
- [6] W. B. Busa. Spectral characterization of the effect of viscosity on fura-2 fluorescence: excitation wavelength optimization abolishes the viscosity artifact. *Cell Calcium*, Vol. 13, pp. 313–319, 1992.
- [7] James V. Candy. *Bayesian signal processing*. John Wiley & Sons, inc, Hoboken, New Jersey, 2009.
- [8] Winfried Denk, James H. Strickler, and Watt W. Werr. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, Vol. 248, No. 4951, pp. 73–6, 1990.
- [9] Winfried Denk and Karel Svoboda. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than gimmick. *Neuron*, Vol. 18, No. 3, pp. 351–357, 1997.
- [10] Daniel A. Dombeck, Michael S. Graziano, and David W. Tank. Functional clustering of neurons in motor cortex determined by cellular resolution imaging in awake behaving mice. *J. Neurosci.*, Vol. 29, No. 44, pp. 13751–13760, 2009.

- [11] Daniel A Dombeck, Christopher D Harvey, Lin Tian, Loren L Looger, and David W Tank. Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nature Neuroscience*, Vol. 13, No. 11, p. doi:10.1038/nn.2648, 2010.
- [12] Christopher P. Fall, Eric S. Marland, John M. Wagner, and John J. Tyson, editors. *Computational Cell Biology*. Springer, NY, 2000.
- [13] J. S. Fitzpatrick, A. M. Hagenston, D. N. Hertle, K. E. Gipson, L. Bertetto-D’Angelo, and M. F. Yeckel. Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-mediated Ca^{2+} waves in pyramidal neuron dendrites propagate through hot spots and cold spots. *J. Physiol.*, Vol. 587, No. 7, pp. 1439–1459, 2009.
- [14] S. Geman and D. Geman. Stochastic relaxation, gibbs distributions and the bayesian restoration of images. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 6, No. 6, pp. 721–741, 1984.
- [15] M. Ghannad-Rezaie, X. Wang, B. Mishra, C. Collins, and N. Chronis. Microfluidic chips for in vivo imaging of cellular responses to neural injury in drosophila larvae. *PLoS one*, Vol. 7, No. 1, p. e29869, 2012.
- [16] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Bio Chem*, Vol. 260, pp. 3440–3450, 1985.
- [17] A. B. Harkins, N. Kurebayashi, and S. M. Baylor. Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys. J.*, Vol. 65, pp. 865–881, 1993.
- [18] Simon Haykin, editor. *Kalman filtering and neural networks*. John Wiley & Sons, inc, New York, 2001.
- [19] F. Helmchen and A. Konnerth, editors. *Imaging in Neuroscience*. Cold Spring Harbor Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2011.
- [20] F. Helmchen, DW. Tank, and W. Denk. Enhanced two-photon excitation through optical fiber by single-mode propagation in a large core. *Appl Opt.*, Vol. 41, pp. 2930–4, 2002.

- [21] Fritjof Helmchen, Keiji Imoto, and Bert Sakmann. Ca^{2+} buffering and actoin potential-evoked Ca^{2+} signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys. J.*, Vol. 70, pp. 1069–1081, 1996.
- [22] B. Hille. *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, 3rd edition, 2001.
- [23] OP. Himill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, Vol. 391, No. 2, pp. 85–100, 1981.
- [24] N. Hirose. Least-squares estimation of the bottom topography using horizontal velocity measurements in the tsushima/korea straits. *J. Oceanogr.*, Vol. 61, pp. 789–794, 2005.
- [25] S. B. Howell. *Handbook of CCD Astronomy*. Cambridge Observing Handbooks for Research Astronomers. Cambridge university press, Cambridge United Kingdom, 2nd edition edition, 2006.
- [26] Shinya Inoue. *Video Microscopy*. Plenum Publishing Corporation, New York, NY, 1986.
- [27] D. B. Jaffe, D. Johnston, N. Lasser-Ross, J. E. Lisman, H. Miyakawa, and W. N. Ross. The spread of Na^+ spikes determines the pattern of dendritic Ca^{2+} entry into hippocampal neurons. *Nature*, Vol. 375, pp. 244–246, 1992.
- [28] J. R. Janesick. *Scientific charge-coupled devices*. SPIE Press, Bellingham WA, 2001.
- [29] Hongbo Jia, Nathalie L. Rochefort, Xiaowei Chen, and Arthur Konnerth. Dendritic organization of sensory input to cortical neurons in vivo. *Nature*, Vol. 464, p. doi:10.1038/nature08947, 2010.
- [30] S. Joucla, A. Pippow, P. Kloppenburg, and C. Pouzat. Quantitative estimation of calcium dynamics from ratiometric measurements: a direct, nonratioing method. *J. Neurophysiol.*, Vol. 103, pp. 1130–1144, 2010.
- [31] S. J. Julier and J. K. Uhlmann. A new extension of the kalman filter to nonlinear systems. *Pro. SPIE*, Vol. 3, pp. 182–193, 1997.

- [32] S. J. Julier and J. K. Uhlmann. Unscented filtering and nonlinear estimation. *Proc. IEEE*, Vol. 92, pp. 401–422, 2004.
- [33] R. E. Kalman. A new approach to linear filtering and prediction problems. *Transactions of the ASME?Journal of Basic Engineering*, Vol. 82 (Series D), pp. 35–45, 1960.
- [34] J. P. Kao, T. Harootunian, and R. Y. Tsien. Photochemically generated cytosolic calcium pases and their detection by fluo-3. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, pp. 8179–8184, 1989.
- [35] J. Keener and J. Sneyd. *Mathematical physiology*. Springer, NY, 2nd edition edition, 2009.
- [36] G. Kitagawa. Non-gaussian state-space modeling of nonstationary time series. *J. American Statistical Association*, Vol. 82, pp. 1032–1041, 1987.
- [37] G. Kitagawa. Monte carlo filter and smoother for non-gaussian nonlinear state space models. *J Comput. Graph. Statist.*, Vol. 5, pp. 1–25, 1996.
- [38] C. Koch and I. Segev. *Methods in neuronal modeling*. MIT press, Cambridge, 2nd edition, 1998.
- [39] P. M. Lau, R. S. Zucker, and D. Bentley. Induction of filopodia by direct local elevation of intracellular calcium in concentration. *J. Cell Biol.*, Vol. 145, pp. 1265–1275, 1999.
- [40] V. Lev-Ram, H. Miyakawa, N. Lasser-Ross, and W. N. Ross. Calcium transients in cerebellar purkinje neurons evoked by intracellular stimulation. *J. Neurophysiol.*, Vol. 68, pp. 1167–1177, 1992.
- [41] G. Lillacci and M. Khammash. Parameter estimation and model selection in computational biology. *PLoS Comput. Bio.*, Vol. 6:e1000696, pp. 1–17, 2010.
- [42] John Y. Lin. A user’s guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental Physiology*, Vol. 96, pp. 19–25, 2010.

- [43] A. Manda, N. Hirose, and T. Yanagi. Application of a nonlinear and non-gaussian sequential estimation method of an ocean mixed layer model. *Eng. Sci. Rep., Kyushu Unive.*, Vol. 25, pp. 285–289, 2003.
- [44] A. Manda, N. Hirose, and T. Yanagi. Feasible method for the assimilation of the satellite-derived sst with an ocean circulation model. *J. Atmos. Ocean. Tech.*, Vol. 22, pp. 746–756, 2005.
- [45] S. Manita and W. N. Ross. IP₃ mobilization and diffusion determine the timing window of Ca²⁺ release by synaptic stimulation and a spike in rat cal pyramidal cells. *HIPPOCAMPUS*, Vol. 20, pp. 524–539, 2010.
- [46] M. Maravall, Z. F. Mainen, B. L. Sabatini, and K. Svoboda. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.*, Vol. 78, pp. 2655–2667, 2000.
- [47] Jean-Rene Martin, Kelly L. Rogers, Carine Chagneau, and Philippe Brulet. In vivo bioluminescence imaging of Ca²⁺ signalling in the brain of drosophila. *PLoS one*, Vol. 2, No. 3, p. e275, 2007.
- [48] P. M. Mäkilä. Kalman filtering and linear quadratic gaussian control. Lecture notes, 2004.
- [49] A. Minta, J. P. Kao, and R. Y. Tsien. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, pp. 8171–8178, 1989.
- [50] K. Miyaguchi, H. Suzuki, J. Dezaki, and K. Yamamoto. Ccd developed for scientific application by hamamatsu. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, Vol. 436, pp. 24–31, 1999.
- [51] Atsushi Miyawaki, Oliver Griesbeck, Roger Heim, and Roger Y. Tsien. Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, pp. 2135–2140, 1999.

- [52] S. Miyazaki, P. Segall, J. Fukuda, and T. Kato. Space time distribution of afterslip following the 2003 tokachi-oki earthquake: Implications for variations in fault zone frictional properties. *Geophys. Res. Letters.*, Vol. 31, p. 2003GL019410, 2004.
- [53] Eran A. Mukamel, Axel Nimmerjahn, and Mark J. Schnitzer. Automated analysis of cellular signals from large-scale calcium imaging data. *Neuron*, Vol. 63, No. 6, pp. 747–760, 2009.
- [54] A. Muto and K. Kawakami. Imaging functional neural circuits in zebrafish with a new gcamp and the gal4ff-uas system. *Commun Integr Biol.*, Vol. 4, pp. 566–8, 2011.
- [55] J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto. A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotech.*, Vol. 19, pp. 137–141, 2001.
- [56] E. Neher and B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature*, Vol. 260, pp. 799–802, 1976.
- [57] Jun Noguchi, Akira Nagaoka and Satoshi Watanabe, Graham C. R. Ellis-Davies, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano, Masanori Matsuzaki, and Haruo Kasai. In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J. Neurophysiol.*, Vol. Published online before print, p. doi: 10.1113/jphysiol.2011.207100, 2011.
- [58] D. M. O’Malley. Calcium permeability of the neuronal nuclear envelope: evaluation using confocal volumes and intracellular perfusion. *J. Neurosci*, Vol. 14, pp. 5741–5758, 1994.
- [59] Liam Paninski, Yashar Ahumadian, Daniel Gil Ferreira, Shinsuke Koyama, Kamiar Rahunama Rad, Michael Vidne, Joshua Vogelstein, and Wei Wu. A new link at state-space models for neural data. *J Comput Neurosci*, Vol. 29, pp. 107–126, 2010.
- [60] R. Madelain Paredes, Julie C. Etzler, Lora Talley Watts, Wei Zheng, and James D. Lechleiter. Chemical calcium indicators. *Methods*, Vol. 46, pp. 143–151, 2008.

- [61] M. Quach, N. Brunel, and F. d’Alche Buc. Estimating parameters and hidden variables in non-linear state-space models based on odes for biological networks inference. *Bioinformatics*, Vol. 23, pp. 3209–3216, 2007.
- [62] Dale A. Ritter, Dimple H. Bhatt., and Joseph R. Fetcho. *In Vivo* imaging of zebrafish reveals differences in the spinal networks for escape and swimming movements. *J. Neurosci.*, Vol. 21, No. 22, pp. 8956–8965, 2001.
- [63] J. Schiller, F. Helmchen, and B. Sakmann. Spatial profile of dendritic calcium transients evoked by action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, Vol. 505, pp. 583–600, 1995.
- [64] Dan Simon. *Optimal state estimation*. John Wiley & Sons, inc, Hoboken, New Jersey, 2006.
- [65] M. T. Z. Spence, editor. *The handbook: A guide to fluorescence probes and labeling technologies*. Invitrogen, 10th edition, 2005.
- [66] G. Stuart, N. Spruston, and M. Hausser. *Dendrites*. Oxford university press, Oxford, 2nd edition, 2008.
- [67] X. Sun, L. Jin, and M. Xiong. Extended kalman filter for estimation of parameters in nonlinear state-space models of biochemical networks. *PLoS ONE*, Vol. 3:e3759, pp. 1–13, 2008.
- [68] Hiroshi Suzuki, Rex Kerr, Laura Bianchi, Christian Frokjaer-Jensen, Dan Slone, Jian Xue, Beate Gerstbrein, Monica Driscoll, and William R. Schafer. In vivo imaging of c. elegans mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the mec-4 channel on the process of gentle touch sensation. *Neuron*, Vol. 39, pp. 1005–1017, 2003.
- [69] Takamasa Tsunoda, Yoshiaki Oda, Toshiaki Omori, Masato Okada, Masashi Inoue, Hiroyoshi Miyakawa, and Toru Aonishi. Statistical calibration method for physiological Ca^{2+} fluorescence signals. *Australian J. Intel. Info. Oroc. Syst.*, Vol. 11, pp. 29–34, 2010.

- [70] Takamasa Tsunoda, Toshiaki Omori, Hiroyoshi Miyakawa, Masato Okada, and Toru Aonishi. Estimation of intracellular calcium ion concentration by nonlinear state space modeling and expectation-maximization algorithm for parameter estimation. *J. Phys. Soc. Jpn.*, Vol. 79, No. 12, p. 124801, 2009.
- [71] Joshua T. Vogelstein, Brendon O. Watson, Adam M. Packer, Rafael Yuste, Bruno Jerny, and Liam Paninski. Spike inference from calcium imaging using sequential monte carlo methods. *Biophys.J*, Vol. 97, pp. 636–655, 2009.
- [72] S. Watanabe, M. Hong, N. Lasser-Ross, and W. N. Ross. 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.
- [73] Brian A. Wilt, Laurie D. Burns, Eric Tatt Wei Ho, Kunal K. Ghosh, Eran A. Mukamel, and Mark J. Schnitzer. Advances in light microscopy for neuroscience. *Annual Review of Neuroscience*, Vol. 32, pp. 435–506, 2009.
- [74] R. Yuste and A. Konnerth, editors. *Imaging in neuroscience and development*. CSHL press, NY, 2005.
- [75] Rafael Yuste, Jason MacLean, Joshua Vogelstein, and Liam Paninski. *Imaging action potentials with calcium indicators*, pp. 985–989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- [76] M. Zheng, P. Cao, J. Yang, XZ. Xu, and Z. Feng. Calcium imaging of multiple neurons in freely behaving c. elegans. *J Neurosci Methods.*, Vol. 11, p. in press, 2012.
- [77] 井上, 高木, 佐々木, 朴. 光化学 I. 基礎化学コース. 丸善, 東京, 1999.
- [78] 稲澤譲治, 津田均, 小島清嗣 (編). 顕微鏡フル活用術イラストレイテッド. 秀潤社, 東京, 2000.
- [79] 岡田泰伸 (編). 新パッチクランプ実験技術法. 吉岡書店, 京都, 2001.
- [80] 淡路, 蒲地, 池田, 石川 (編). データ同化 – 観測・実験とモデルを融合するイノベーション. 京都大学学術出版会, 京都, 2009.

- [81] 片山徹. 新版 応用カルマンフィルタ. 朝倉書店, 東京, 2000.
- [82] 北川源四郎. 時系列解析入門. 岩波書店, 東京, 2005.