

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-24495

(P2019-24495A)

(43) 公開日 平成31年2月21日(2019.2.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	B 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	Y

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2018-141587 (P2018-141587)	(71) 出願人	507219686 静岡県公立大学法人 静岡県静岡市駿河区谷田52番1号
(22) 出願日	平成30年7月27日 (2018.7.27)	(74) 代理人	100087398 弁理士 水野 勝文
(31) 優先権主張番号	特願2017-147893 (P2017-147893)	(74) 代理人	100128783 弁理士 井出 真
(32) 優先日	平成29年7月31日 (2017.7.31)	(74) 代理人	100128473 弁理士 須澤 洋
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100160886 弁理士 久松 洋輔
		(72) 発明者	黒川 洵子 静岡県静岡市駿河区谷田52番1号 静岡県公立大学法人静岡県立大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心筋細胞型判定システム、心筋細胞型判定方法

(57) 【要約】

【課題】細胞型が不明な心筋細胞群についても、より簡便に細胞型を判定できる新規な技術を提供する。

【解決手段】自律拍動する心筋細胞の画像を用いて心筋細胞の動きを検出し、動きベクトルを算出する動き検出部と、動き検出部により算出された心筋細胞の動きベクトルに基づき心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出して、動きベクトルと拍動情報とを含む動き情報を生成する動き情報生成部と、動き情報生成部により生成される細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて、型判定情報を生成する型判定情報生成部と、型判定情報生成部により生成される型判定情報を用いて、動き情報生成部により動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定する細胞型判定部とを含む、心筋細胞型判定システム。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

自律拍動する心筋細胞の画像を用いて心筋細胞の動きを検出し、動きベクトルを算出する動き検出部と、

前記動き検出部により算出された心筋細胞の動きベクトルに基づき心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出して、動きベクトルと拍動情報とを含む動き情報を生成する動き情報生成部と、

前記動き情報生成部により生成される細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて、型判定情報を生成する型判定情報生成部と、

前記型判定情報生成部により生成される型判定情報を用いて、前記動き情報生成部により動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定する細胞型判定部とを含む、心筋細胞型判定システム。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載のシステムにおいて、

拍動情報が収縮速度および / または弛緩速度を示す情報を含む心筋細胞型判定システム。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のシステムにおいて、

細胞型の特定結果についての情報が、動き情報が生成された心筋細胞についての免疫細胞染色結果に関する情報を含む心筋細胞型判定システム。

20

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載のシステムにおいて、

細胞型の特定結果についての情報が、動き情報が生成された心筋細胞についての免疫細胞染色結果に関する情報を含み、

前記型判定情報生成部が、前記動き情報生成部により生成される細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて教師有学習を行うことにより型判定情報を生成する心筋細胞型判定システム。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一つに記載のシステムにおいて、

前記心筋細胞がヒト iPS 細胞に由来する心筋細胞型判定システム。

30

【請求項 6】

自律拍動する心筋細胞の画像を用い心筋細胞の動きを検出して動きベクトルを算出し、算出された心筋細胞の動きベクトルに基づき心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出して、動きベクトルに関する情報と拍動情報とを含む動き情報を生成し、

生成された細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて、型判定情報を生成し、

生成された型判定情報を用いて、動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定することを含む、心筋細胞型判定方法。

【請求項 7】

コンピュータを

40

自律拍動する心筋細胞の画像を用いて心筋細胞の動きを検出し、動きベクトルを算出する動き検出部と、

前記動き検出部により算出された心筋細胞の動きベクトルに基づき心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出して、動きベクトルに関する情報と拍動情報とを含む動き情報を生成する動き情報生成部と、

前記動き情報生成部により生成される細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて、型判定情報を生成する型判定情報生成部と、

前記型判定情報生成部により生成される型判定情報を用いて、前記動き情報生成部により動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定する細胞型判定部として機能させるためのプログラム。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は心筋細胞についての細胞型の判定に関する。

【背景技術】

【0002】

創薬研究において細胞機能性試験は簡便、迅速なアッセイ方法として汎用されている。特にヒトiPS細胞由来分化細胞は大規模な探索研究で必要とされる膨大な細胞量の供給が可能であること、そして臨床予測性が高いヒト試料であることから利用価値が高く、実用化が進められている。

10

【0003】

心筋細胞に対する機能性試験においても、ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞が利用されている。現在開発されている分化誘導法では、心室型心筋細胞と心房型心筋細胞を個別に誘導することは難しく、心室型と心房型が混合した細胞集団が得られる。心筋細胞についてその挙動を解析することにより品質評価を行う方法が提案されているが（例えば特許文献1）、心室型心筋細胞と心房型心筋細胞とを区別してその挙動を解析する手段は存在しなかった。

【0004】

一方、ヒトiPS由来誘導細胞が心室型心筋細胞および心房型心室細胞を含む複数の細胞種からなることを示す先行技術も存在する。判定法は、細胞に電極を刺して、細胞の電気活動を調べるというパッチクランプ法である。当該方法で活動電位を測定するためには細胞に電極を刺針する必要があるが、細胞に対する侵襲性が著しく高いため、長期的な計測には不向きである。さらに、電極を刺した細胞からの情報しか得られないため、スループットが高く見積もっても5データ/日であり、著しく低い。スループットをあげるためのオートパッチシステムによる測定は精度が低く、細胞種判定に至っていない。

20

また、電子依存性蛍光色素を用いて、細胞の電気活動を調べることも可能だが、感度が悪いため細胞型の判定には至っていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

30

【特許文献1】国際公開第2015/008682号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記の混合細胞系を用いた機能性試験においても心室型心筋細胞と心房型心筋細胞とは異なる挙動を示していると考えられ、心室型心筋細胞と心房型心筋細胞とは区別して機能性試験を行えることが望ましい。

本発明はこのような事情に基づきなされたものであり、細胞型が不明な心筋細胞についてより簡便に細胞型を判定することができる新規な技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

本発明の要旨は以下のとおりである。

[1] 自律拍動する心筋細胞の画像を用いて心筋細胞の動きを検出し、動きベクトルを算出する動き検出部と、

前記動き検出部により算出された心筋細胞の動きベクトルに基づき心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出して、動きベクトルに関する情報と拍動情報とを含む動き情報を生成する動き情報生成部と、

前記動き情報生成部により生成される細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて、型判定情報を生成する型判定情報生成部と、

前記型判定情報生成部により生成される型判定情報を用いて、前記動き情報生成部によ

50

り動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定する細胞型判定部とを含む、心筋細胞型判定システム。

[2] [1]に記載のシステムにおいて、

拍動情報が収縮速度および/または弛緩速度を示す情報を含む心筋細胞型判定システム。

[3] [1]または[2]に記載のシステムにおいて、細胞型の特定結果についての情報が、動き情報が生成された心筋細胞についての免疫細胞染色結果に関する情報を含む心筋細胞型判定システム。

[4] [1]から[3]のいずれか一つに記載のシステムにおいて、

細胞型の特定結果についての情報が、動き情報が生成された心筋細胞についての免疫細胞染色結果に関する情報を含み、

前記型判定情報生成部が、前記動き情報生成部により生成される動き情報と細胞型の特定結果についての情報とに基づいて教師有学習を行うことにより型判定情報を生成する心筋細胞型判定システム。

[5] [1]から[4]のいずれか一つに記載のシステムにおいて、

前記心筋細胞がヒトiPS細胞に由来する心筋細胞型判定システム。

[6] 自律拍動する心筋細胞の画像を用い心筋細胞の動きを検出して動きベクトルを算出し、

算出された心筋細胞の動きベクトルに基づき心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出して、動きベクトルに関する情報と拍動情報とを含む動き情報を生成し、

生成された細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて、型判定情報を生成し、

生成された型判定情報を用いて、動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定することを含む、心筋細胞型判定方法。

[7] コンピュータを

自律拍動する心筋細胞の画像を用いて心筋細胞の動きを検出し、動きベクトルを算出する動き検出部と、

前記動き検出部により算出された心筋細胞の動きベクトルに基づき心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出して、動きベクトルに関する情報と拍動情報とを含む動き情報を生成する動き情報生成部と、

前記動き情報生成部により生成される細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて、型判定情報を生成する型判定情報生成部と、

前記型判定情報生成部により生成される型判定情報を用いて、前記動き情報生成部により動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定する細胞型判定部として機能させるためのプログラム。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、細胞型が不明な心筋細胞についてより簡便に細胞型を判定することができる新規な技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本実施形態の構成例を示す図である。

【図2】本実施形態の機能ブロック図を示すグラフである。

【図3】本実施形態の型判定情報の生成に係る処理フローを示す図である。

【図4】本実施形態の細胞型判定に係る処理フローを示す図である。

【図5】他の実施形態の型判定情報の生成に係る処理フローを示す図である。

【図6】他の実施形態において動きベクトルに係るピーク間の時間分散の算出に係る模式図である。

【図7】他の実施形態において動きベクトルに基づき機械学習に用いる細胞の順序を変更した例であり、(A)はより先に機械学習に用いる細胞に関し、(B)はより後に機械学

10

20

30

40

50

習に用いる細胞に関する。

【図 8】例 1 の細胞型ごとの拍動情報（収縮速度および弛緩速度）を示すグラフである。

【図 9】例 2 の機械学習により生成された細胞型判定情報を用いての細胞型判定の正解率に関するグラフ（順序の変更なし）である。

【図 10】例 2 の機械学習により生成された細胞型判定情報を用いての細胞型判定の正解率に関するグラフ（順序の変更あり）である。

【図 11】例 3 のイソプロテレノールを処理した細胞型ごとの拍動情報（収縮速度および弛緩速度）を示すグラフである。

【図 12】例 3 のイソプロテレノールを処理した細胞型ごとの拍動情報（拍動数）を示すグラフである。A は参考として示す細胞型ごとに分けていない拍動情報（拍動数）に関する。B は免疫細胞染色により分けられた心室型心筋細胞の拍動情報（拍動数）と心房型心筋細胞の拍動情報（拍動数）に関する。C は機械学習により得られた型識別情報（アルゴリズム）を用いて分けられた心室型心筋細胞の拍動情報（拍動数）と心房型心筋細胞の拍動情報（拍動数）に関する。

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下、本発明の 1 つの実施形態について、詳細に説明する。

本実施形態に係る心筋細胞型判定システムは動き検出部と、動き情報生成部と、型判定情報生成部と、細胞型判定部とを含んで構成される。

動き検出部は、自律拍動する心筋細胞の画像を用いて心筋細胞の動きを検出し、動きベクトルを算出する。

動き情報生成部は、動き検出部により算出された心筋細胞の動きベクトルに基づき心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出して、動きベクトルについての情報と拍動情報とを含む動き情報を生成する。

型判定情報生成部は、動き情報生成部により生成される細胞ごとの動き情報と、細胞型の特定結果についての情報とに基づいて、型判定情報を生成する。

細胞型判定部は、型判定情報生成部により生成される型判定情報を用いて、動き情報生成部により動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定する。

【0011】

図 1 は、本実施形態の心筋細胞型判定システムの概要図である。

心筋細胞型判定システム 100 は、演算処理装置であるプロセッサ 11、主記憶装置であるメモリ 12、補助記憶装置である HDD（ハードディスクドライブ）13 を有する。また、心筋細胞型判定システム 100 は、外部ユニットの通信を制御するネットワーク I/F（インターフェイス）14、モニタ 15、入力デバイス 16（キーボード、マウス、カメラ等の撮像装置など）、メディア読取デバイス 17 を有する。

HDD 13 には、実施形態の態様を実現するためのプログラムが事前に記憶されている。これらプログラムの導入は、インストール用の外部メディア 50（CD-ROM や DVD など）をメディア読取デバイス 17 で読み取り、HDD 13 に記憶させる方法や、ネットワーク I/F 14 を介してダウンロードして HDD 13 に記憶させる方法などがある。

【0012】

図 2 は、本実施形態の心筋細胞型判定システム 100 に係る機能ブロック図である。

本実施形態の心筋細胞型判定システム 100 は、撮像部 31、画像データ生成記録部 32、動き検出部 33、動き情報生成部 34、型判定情報生成部 35、表示部 36、細胞型判定部 37、および記憶部 40 を有している。各機能ブロックは、例えば、HDD 13 からメモリ 12 に読み出されたプログラムのプロセッサ 11 による実行および必要に応じて組み合わせられる公知の機器により実現することができる。

【0013】

記憶部 40 には、画像データ生成記録部 32 により生成される画像データや、動き情報生成部 34 により生成される細胞ごとの動き情報、該動き情報に基づき型判定情報生成部 35 において機械学習により生成された型判定情報（アルゴリズム）、および細胞型判定

10

20

30

40

50

部 3 7 による細胞型の判定結果が記憶される。

【 0 0 1 4 】

撮像部 3 1 は、心筋細胞 1 0 3 を撮像する。具体的には、撮像部 3 1 は、所定の期間、心筋細胞 1 0 3 を撮像し、心筋細胞 1 0 3 を被写体とする動画像を得る。

なお、心筋細胞 1 0 3 は自律拍動する心筋細胞であり、例えば、市販ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞、ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を挙げることができる。

【 0 0 1 5 】

撮像部 3 1 は、心筋細胞 1 0 3 を直接（他の部材を介さずに）撮像してもよい。また、例えば顕微鏡等のような他の部材を介して心筋細胞 1 0 3 を撮像するようにすることもできる。

10

【 0 0 1 6 】

心筋細胞 1 0 3 が入れられるディッシュは、撮像部 3 1 に対して固定されていてもよいし、固定されていなくてもよい。心筋細胞型判定システム 1 0 0 は、動き（位置の時間的変化）を検出するため、一般的には該ディッシュが撮像部 3 1 に対して固定されている方が望ましい。

【 0 0 1 7 】

撮像部 3 1 は、撮像により得られた心筋細胞 1 0 3 の画像の画像信号を画像データ生成記録部 3 2 に送出する。

【 0 0 1 8 】

画像データ生成記録部 3 2 は、撮像部 3 1 から取得した画像信号を基にして心筋細胞 1 0 3 の画像データを生成する。画像データ生成記録部 3 2 は、生成した画像データを記憶部 4 0 に記憶させる。生成される画像データは、例えば、心筋細胞 1 0 3 を撮像した画像信号から生成される動画データである。ここで、上述のとおり撮像は所定の長さの時間的区間（例えば T + 1 フレーム（T は任意の自然数））行われる。画像データ生成記録部 3 2 により生成される画像データは、例えばその区間に対応する 1 番目から（T + 1）番目までのフレーム画像データから構成される。

20

また、画像データ生成記録部 3 2 は、生成した画像データを、動き検出部 3 3 に送出する。

【 0 0 1 9 】

動き検出部 3 3 は、自律拍動する心筋細胞の画像である画像データを用いて心筋細胞 1 0 3 の動きを検出し、動きベクトル（速度-時間波形）を算出する。具体的には、動き検出部 3 3 は、画像データ生成記録部 3 2 から取得した画像データについて複数のブロックに分ける。次いで動き検出部 3 3 はブロックごとに動き検出を行い、1 つ前のフレームから現フレームへの測定ブロックの移動を心筋細胞の動きを示す動きベクトルとして算出する。動き検出部 3 3 は、算出された動きベクトルを拍動情報生成部 3 4 に送出する。

30

【 0 0 2 0 】

動き情報生成部 3 4 は、動き検出部 3 3 により算出された心筋細胞の動きベクトルを用いて心筋細胞の拍動に関する情報である拍動情報を算出し、該拍動情報と動き検出部 3 3 から得た動きベクトルに関する情報とを含む動き情報を生成する。

より具体的に説明すると、拍動情報生成部 3 4 は動き量算出部 3 4 1 と拍動情報算出部 3 4 2 とを有する。動き量算出部 3 4 1 は、動き検出部 3 3 から送出された動きベクトルに基づいて動き量を算出する。動き量算出部 3 4 1 は、算出した動き量を動きベクトルと共に拍動情報算出部 3 4 2 に送出する。

40

拍動情報算出部 3 4 2 は、取得した動き量に基づき拍動情報を算出し、動きベクトルに関する情報と拍動情報を含む動き情報を生成する。拍動情報算出部 3 4 2 は、動き情報を型判定情報生成部 3 5 および細胞型判定部 3 7 に送出する。

【 0 0 2 1 】

なお、上述した細胞ごとの動きベクトルの算出および拍動情報の生成は公知の方法により行うことができ、例えば特許文献 1 に記載の方法と同様の方法とすることができる。また、該方法はソニー株式会社により販売されているセルモーションイメージングシステム

50

SI8000を利用して行うこともできる。SI8000を用いることで、動きベクトルや、拍動数、変形速度、変形加速度、変形距離等の力学的挙動解析に必要な表1に示すパラメータを細胞ごとの拍動情報として自動的に計算することができる。本実施形態の心筋細胞型判定システム100においては、表1に示す1または2以上のパラメータを細胞ごとに拍動情報として生成し、心室型心筋細胞の拍動情報および心房型心筋細胞の拍動情報の生成に用いるようにしてもよい。

例えば、縦軸を動き量、横軸を時間とする心筋細胞103の収縮に対応するピークおよび/または弛緩に対応するピークを有する波形を生成する。次いで、該波形における収縮のピークの立ち上がりからピークに到達するまでの時間と、収縮のピークに対応する動き量から算出される収縮速度(収縮期変形速度)、および/または該波形における弛緩のピークの立ち上がりからピークに到達するまでの時間と、弛緩のピークに対応する動き量から算出される弛緩速度(弛緩期変形速度)を含むデータを生成する。該データを拍動情報として心室型心筋細胞の拍動情報および心房型心筋細胞の拍動情報の生成に用いるようにしてもよい。

【0022】

【表1】

SI8000で算出される拍動情報(力学的パラメータ)

拍動面積率

拍動数(回/min)

収縮速度($\mu\text{m/s}$)

弛緩速度($\mu\text{m/s}$)

収縮終了時速度($\mu\text{m/s}$)

加速度($\mu\text{m/s}^2$)

収縮弛緩時間(s)

収縮変形距離(μm)

弛緩変形距離(μm)

収縮時間(s)

弛緩時間(s)

ノイズ($\mu\text{m/s}$)

収縮弛緩ピーク間隔(s)

相関ベクトル方向標準偏差(deg)

10

20

30

40

50

【0023】

型判定情報生成部35は機械学習により型判定情報を生成する。

型判定情報生成部35は、サポートベクトルマシン等の判定器を用いて機械学習を実施し、型判定情報(アルゴリズム)を生成する。このとき型判定情報生成部35は、動き情報に含まれる動きベクトル(速度-時間波形)から抽出されるパラメータおよび拍動情報を単独もしくは複数個組み合わせ使用し、且つ免疫細胞染色の結果を利用して判定の正解を学習させる(教師有学習の実施)。

【0024】

機械学習による型判定情報の生成について、より詳細に説明する。

型判定情報生成部35は、動きベクトルから抽出されるパラメータ(表2)と、SI8000で算出される拍動情報(力学的パラメータ、表1)を単独もしくは組み合わせ判定器によるアルゴリズム作成のために用いる。

【 0 0 2 5 】

【表 2】

動きベクトル（速度・時間波形）から抽出されるパラメータ

周波数パワー（Power Spectrum）. 第 0 周波数から k 個の周波数の値

自己相関関数（Auto correlation）.時系列の自己相関関数の値（シフト：0 から k）

周波数パワーを正規化して PCA（*）をかけたもの（Spectral powers after PCA）

周波数パワーと自己相関関数の特徴量の両方を f 値の大きいものから

順位 k 個（f-value sorted features（power spectrum and auto correlation）（速度・時間波形を高速フーリエ変換して得られる周波数パワーと、周波数パワーをフーリエ逆変換して得られる自己相関関数において、周波数 f を大きいものから k 個取り出した値）

10

* P C A : Principal Component Analysis

【 0 0 2 6 】

また、機械学習に用いる判定器は、例えば表 3 に列挙されたものの少なくともいずれかを用いることができる。

【 0 0 2 7 】

【表 3】

20

機械学習に用いる判別器

サポートベクトルマシン（SVC）

L1 正則化ロジスティック回帰（L1）

L2 正則化ロジスティック回帰（L2）

RBF カーネルを用いたサポートベクトルマシン（RBF）

ランダムフォレスト回帰（RF）

決定木（Decision Tree）

線形判別関数

30

【 0 0 2 8 】

判定の正解は、例えば心筋細胞型判定システム 1 0 0 が有するキーボード等の入力デバイス等を介して入力された細胞型の特定結果を型判定情報生成部 3 5 が取得して利用することができる。また、細胞型の特定は、例えば、動き情報が生成された心筋細胞についての、免疫細胞染色による細胞型判定により行うことができる。

【 0 0 2 9 】

型判定情報生成部 3 5 は、記憶部 4 0 に型判定情報（アルゴリズム）が記憶されていない場合、動き情報生成部 3 4 から得た動き情報に基づき、型判定情報の生成を行う。記憶部 4 0 に型判定情報が記憶されている場合、型判定情報生成部 3 5 は、該型判定情報を取得し、動き情報生成部 3 4 から得た動き情報に基づきアルゴリズムを評価し、必要に応じて修正を実施する。

40

型判定情報生成部 3 5 は、生成または修正した型判定情報を記憶部 4 0 に記憶させる。また、型判定情報生成部 3 5 は、動き情報とその動き情報に対応する細胞の細胞型の特定結果についての情報とを関連付け、記憶部 4 0 に記憶させる。

また、型判定情報生成部 3 5 は型判定情報を生成または修正したことを表示部 3 6 に表示させる。

【 0 0 3 0 】

細胞型判定部 3 7 は、該型判定情報（アルゴリズム）を用いて細胞型の判定を実施する

50

。

細胞型判定部 37 は、型判定情報生成部 35 により生成される型判定情報を用いて、動き情報生成部 34 により動き情報が生成された心筋細胞についてその細胞型を判定する。

本実施形態においては、記憶部 40 に型判定情報生成部 35 により生成される型判定情報が記憶されている場合に細胞型の判定が行われる。このとき、細胞型判定部 37 は、型判定情報を用いて、拍動情報算出部 342 から送出された動き情報に対応する心筋細胞について、細胞型の判定を実施する。

細胞型判定部 37 は、判定結果を記憶部 40 に記憶させるとともに、表示部 36 に表示させる。

【0031】

次に、本実施形態における型判定情報の生成に係る処理フローについて図 3 を用いて説明する。

まず、ステップ S101 において、画像データ生成記録部 32 は、撮像部 31 から送出される画像信号に基づき心筋細胞 103 の画像データを生成する。

【0032】

ステップ S102 において、動き検出部 33 は、画像データ生成記録部 32 により生成された画像データに基づき、動きベクトル生成処理を実行する。

【0033】

ステップ S103 において、動き情報生成部 34 は、動き検出部 33 により生成された動きベクトルに基づき拍動情報を算出し、画像データが生成された細胞についての、動きベクトルに関する情報と拍動情報を含む動き情報を生成する。

【0034】

ステップ S104 において、型判定情報生成部 35 は、例えば免疫細胞染色の結果である、細胞型の特定結果についての情報が取得されたか否かを判定する。

細胞型の特定結果についての情報が取得されていない場合、型判定情報生成部 35 は、機械学習等を実施することなく処理を終了する。

一方、細胞型の特定結果についての情報が取得される場合、型判定情報生成部 35 は、ステップ S105 において、記憶部 40 に型判定情報が記憶されているか否かを判定する

。

型判定情報が記憶されていない場合、ステップ S106 において、型判定情報生成部 35 は、動き情報に基づき型判定情報を生成する。

一方、型判定情報が記憶されている場合、ステップ S107 において、型判定情報生成部 35 は、記憶部 40 に記憶されている型判定情報を取得し、動き情報に基づき評価を行う。また、その評価の結果に基づき、必要に応じてアルゴリズムを修正する。

【0035】

次に、本実施形態における細胞型の判定に係る処理フローについて図 4 を用いて説明する。

まず、ステップ S201 において、画像データ生成記録部 32 は、撮像部 31 から送出される画像信号に基づき心筋細胞 103 の画像データを生成する。

【0036】

ステップ S202 において、動き検出部 33 は、画像データ生成記録部 32 により生成された画像データに基づき、動きベクトル生成処理を実行する。

【0037】

ステップ S203 において、動き情報生成部 34 は、動き検出部 33 により生成された動きベクトルに基づき拍動情報を算出し、画像データが生成された細胞についての、動きベクトルに関する情報と拍動情報を含む動き情報を生成する。

【0038】

ステップ S204 において、細胞型判定部 37 は記憶部 40 に型判定情報生成部 35 により生成される型判定情報が記憶されているかを判定する。

型判定情報が記憶されていない場合、細胞型判定部 37 は細胞型の判定を実施すること

10

20

30

40

50

なく処理を終了する。一方、型判定情報が記憶されている場合、細胞型判定部37は該型判定情報を用いて、取得された動き情報に対応する細胞についての細胞型の判定を実施する(ステップS205)。細胞型判定部37は判定結果をその細胞に係る動き情報と関連付けて記憶部40へ記憶させ、且つ判定結果を表示部36に表示させて処理を終了する。

【0039】

なお、本実施形態において、1の細胞について心筋細胞型判定システム100による型判定情報の生成と細胞型判定の両方を行うようにしてもよい。これにより型判定情報を用いての型判定の精度をさらに高めることができる。

一方、1の細胞について型判定情報の生成または型判定に係る処理のいずれかのみを行うようにしてもよい。

【0040】

以上、本実施形態によれば、細胞型が不明な心筋細胞についてより簡便に細胞型を判定することができる新規な技術を提供することができる。

【0041】

本実施形態においては細胞ごとに動き情報を取得し、該動き情報に含まれる情報をベンチマークとする型判定情報を機械学習(教師有学習)により生成する。また、該型判定情報を用いて心室型心筋細胞と心房型心筋細胞とを区別を実行する。

【0042】

上述のとおり、これまで心房型心筋細胞と心室型心筋細胞で活動電位波形が異なることを示している先行技術が存在する。しかしながら活動電位の測定は細胞に対する侵襲性が著しく高い。さらに、スループットが高く見積もっても5データ/日であり、著しく低い。一方、本実施形態に係る方法に基づけば、簡便、非侵襲的であり、システム構成にもよるが、一度に100個程度の観察も可能である。現行技術と比して、少なくとも10倍以上はスループット性が高いと考えられる。

すなわち、細胞型が不明な心筋細胞についてより簡便に細胞型を判定することができる。

【0043】

以上、本発明の一つの実施形態について説明したが、本発明は他の形態とすることもでき、特に限定されない。

【0044】

例えば、機械学習において、型判定情報生成部35は、所定数の複数の細胞について記憶部40に動き情報が記憶されているときに機械学習を行うようにしてもよい。さらにこのとき、型識別情報生成部35は、機械学習を行う細胞の順序を細胞の動き情報に基づき決定するようにすることができる。例えば、型識別情報生成部35は、機械学習を行う細胞の順序を並び替える(画像データが取得された時間的な順序とは異なる順序に変更する)ようにしてもよい。この場合の処理フローの一例を図5に示す。

型判定情報(アルゴリズム)の生成に先立ち、型判定情報生成部35は、記憶部40に所定数の複数の動き情報が記憶されているか否かを判定する(ステップS306)。所定数の複数の動き情報が記憶されていない場合、型判定情報生成部35は、型判定情報を生成することなく処理を終了する。一方、所定数の複数の動き情報が記憶されている場合、型判定情報生成部35は、機械学習を行う細胞の順序を細胞の動き情報に基づき決定した後(ステップS306-2)、型判定情報(アルゴリズム)の生成を生成する(ステップS306-3)。

【0045】

例えば、機械学習において、拍動情報に含まれるノイズについての情報に基づき複数の細胞について機械学習を行う順序を並び替えるようにしてもよい。具体的には例えば、ノイズの値が小さい順に細胞についての機械学習を行うようにすることができる。その結果、型判別情報(アルゴリズム)を用いての細胞型判定の精度をさらに高めることが可能である。

【0046】

10

20

30

40

50

また、動きベクトル（速度 - 時間波形）に基づき複数の細胞について機械学習を行う順序を並び替えるようにしてもよい。なお、以下の 1) ~ 3) は図 6 における 1) ~ 3) と対応する。

1) 動きベクトル（速度 - 時間波形）から所定フレーム（例えば 150 フレーム）ずつ切り出して、動きベクトルに係るピークが最大のところを first peak とする。なお、所定フレームの数は細胞の拍動周期に基づき、動きベクトルに係るピークが最大のところが含まれるように設定することができる。

2) 次に、取り出した first peak の間でさらにピークとなるところ（first peak の次に大きなピーク）を second peak とする。

3) first peak が起こった後に second peak が起こった時間の分散を求め、該分散の値の小さいものから順に細胞の機械学習を行う。

【0047】

動きベクトル（速度 - 時間波形）から first peak と second peak を検出し、ピーク間の時間分散を算出して機械学習を行う順序を並べ替えた例を図 7 に示す。このように動きベクトルの波形に基づき機械学習を行う細胞の順序を並べ替えることで、ピークがよりはっきりしている細胞から順に機械学習を行うようにする。その結果、型判別情報（アルゴリズム）を用いての細胞型判定の精度をさらに高めることが可能である。

【実施例】

【0048】

以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0049】

[例 1：心室型心筋細胞、心房型心筋細胞ごとの動き情報の生成]

市販のヒト iPS 細胞由来心筋細胞である iCell-CM (CD1, FUJI FILM 社) および Cor.4U (AxioGenesis 社) について細胞型ごとの動き情報の生成を行った。

刺激装置を用いて、0.5 Hz でフィールド刺激を印加することにより収縮した細胞を解析対象とした。

また、グリッド付きガラスボトムディッシュ（池本理化工業株式会社）を用いて画像データを取得した細胞の座標を記録し、細胞の抗体染色後の照合を容易とした。

【0050】

顕微鏡用培養システム Stage Top Incubator（株式会社東海ヒット）を用いて、細胞が入ったディッシュ全体を 37℃、5%CO₂ の状態を維持した。倒立顕微鏡（オリンパス、IX70）上にチャンパーごと細胞を設置し、顕微鏡用超高速カメラ（日立）を用いて、画像データを取得した。

【0051】

取得した画像データから、セルモーションイメージングシステム S I 8 0 0 0（ソニー株式会社）を用いて、拍動情報として各細胞の収縮速度および弛緩速度を算出し、該拍動情報を含む動き情報を生成した。

【0052】

次に、Small EM & Hrieg PA (2004) Molecular regulation of cardiac chamber-specific gene expression. Trends in Cardiovascular Medicine 14, 13-18. に基づき、iCell-CM および Cor.4U ごとに、これらに含まれる心室型心筋細胞と心房型心筋細胞について、以下に示す蛍光標識したマウス IgG 抗体およびウサギ IgG 抗体を用いての抗体免疫染色による細胞型の特定を行った。

Anti MLC-2a : Synaptic Systems, Cat.No.311011, 1:50 (マウスモノクローナル抗体)

Anti MLC-2v : proteintech, Cat.No.10906-1-AP, 1:50 (ウサギポリクローナル抗体)

【0053】

拍動情報（収縮速度）を含む動き情報を生成した細胞をディッシュの座標から照合し、上述の抗体免疫染色を行った後、それらの細胞の共焦点顕微鏡観察画像を取得した。共焦点顕微鏡観察画像から MLC2v もしくは MLC2a に特異的に発現している細胞に関して、MLC2v

10

20

30

40

50

については心室型心筋細胞、MLC2aについては心室型心筋細胞として特定した。該処理に基づき、特定結果を細胞ごとにコンピュータに入力して、拍動情報を心室型心筋細胞のものと心房型心筋細胞のものの2群に分けた（細胞型の特定）。なお、MLC2vおよびMLC2aを同等に発現している混合型は細胞型の特定は行わなかった。

【0054】

続いて、心室型心筋細胞群の拍動情報（収縮速度および弛緩速度）と心房型心筋細胞群の拍動情報（収縮速度および弛緩速度）について、平均および標準誤差を算出した。さらに、統計的に比較するために、Unpaired-t検定もしくはMann-Whitney検定を行った。

結果を図8に示す。図8から、収縮速度および弛緩速度について、心室型心筋細胞群と心房型心筋細胞群との間で差があることが理解できる。

【0055】

[例2：機械学習により作成した型判定情報（アルゴリズム）を用いての細胞型判定]

市販のヒトiPS細胞由来心筋細胞であるiCell-CM（CD1, FUJI FILM社）について、実施例1と同様に画像データを生成した。

SI8000を用い、動きベクトルから抽出された周波数パワーを用いて、表3に記載のサポートベクトルマシン（SVC）、L1正則化ロジスティック回帰（L1）、L2正則化ロジスティック回帰（L2）、RBFカーネルを用いたサポートベクトルマシン（RBF）、ランダムフォレスト回帰（RF）、決定木（Decision Tree）の5つの判定器を使用し、判定器ごとに型判定情報（アルゴリズム）を生成した。該型判定情報を用いて、細胞型不明の心筋細胞について細胞型判定を実施した。

結果を図9に示す。図9においては縦軸が正解率であり、心室型心筋細胞、心房型心筋細胞の2択なのでchance levelの50%に波線を入れている。図9に示すとおり、最大約70%の判定成績で細胞型が判定できた。

【0056】

また、上述の型判定情報の生成処理に先立ち、動きベクトル（速度 - 時間波形）に基づき、以下のようにして細胞について機械学習を行う順序について並び替えを行った。

- 1) 動きベクトル（速度 - 時間波形）から150フレームずつ切り出して、動きベクトルに係るピークが最大のところをfirst peakとした。
- 2) 取り出したfirst peakの間でさらにピークとなる場所（first peakの次に大きなピーク）をsecond peakとした。
- 3) first peakが起こった後にsecond peakが起こった時間の分散を求め、該分散の値の小さいものから順に型判定情報生成を行った。

【0057】

結果を図10に示す。図10に示すとおり、正解率が改善され、約80%に近い判定成績で細胞型が判定できた。

【0058】

[例3：イソプロテレノール処理心筋細胞についての分析]

撮像前にイソプロテレノールを処理した心筋細胞群（iCell-CM）についても例1と同様に心室型心筋細胞群の拍動情報（収縮速度および弛緩速度）と心房型心筋細胞群の拍動情報（収縮速度および弛緩速度）を得た。

結果を図11に示す。図11中、収縮速度および弛緩速度はイソプロテレノール処理前のものを100%として示している。

図11からイソプロテレノールを処理した場合にも心室型心筋細胞群と心房型心筋細胞群との間で差があることが理解できる。また、イソプロテレノールを処理することで心室型心筋細胞群においては収縮速度および弛緩速度が増加する傾向がある一方、心房型心筋細胞群においては収縮速度および弛緩速度は変動しない傾向があることが理解できる。

【0059】

また、図12は、撮像前にイソプロテレノールを処理した上記の心筋細胞群（iCell-CM）について、拍動情報として拍動数を用い、心室型心筋細胞群と心房型心筋細胞群を分けたグラフである（Aが細胞型について分けることなく作成された統計情報であり、Bが分

10

20

30

40

50

類されて作成された統計情報である)。図12A、Bからも免疫細胞染色により心房型と心室型を分けて解析することにより、薬剤の効果が心房型細胞に選択的に作用していることが明らかとなっている。

また、SI8000で算出される力学的パラメータの中から加速度および相関ベクトル方向標準偏差を用い、判別器にはサポートベクトルマシンを使用し、さらに免疫細胞染色の判定結果を教師データとして機械学習を行った。得られた型判別情報(アルゴリズム)を用いて細胞型を分類したのものについても同様の結果が得られた(図12C)。このことから、機械学習により得られたアルゴリズムを利用すると、アルゴリズム作成後は免疫細胞染色による判定を用いずとも心室型心筋細胞と心房型心筋細胞を判定して薬剤の作用効果を定量できることが理解できる。

10

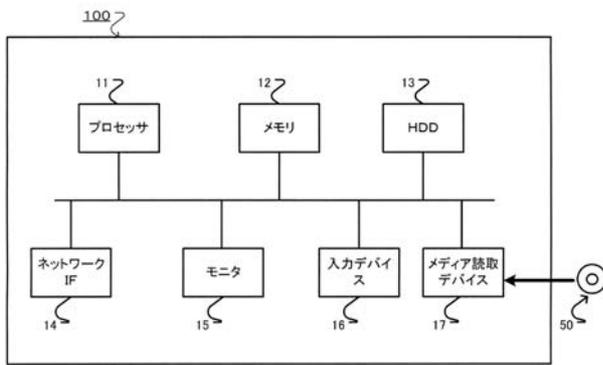
【符号の説明】

【0060】

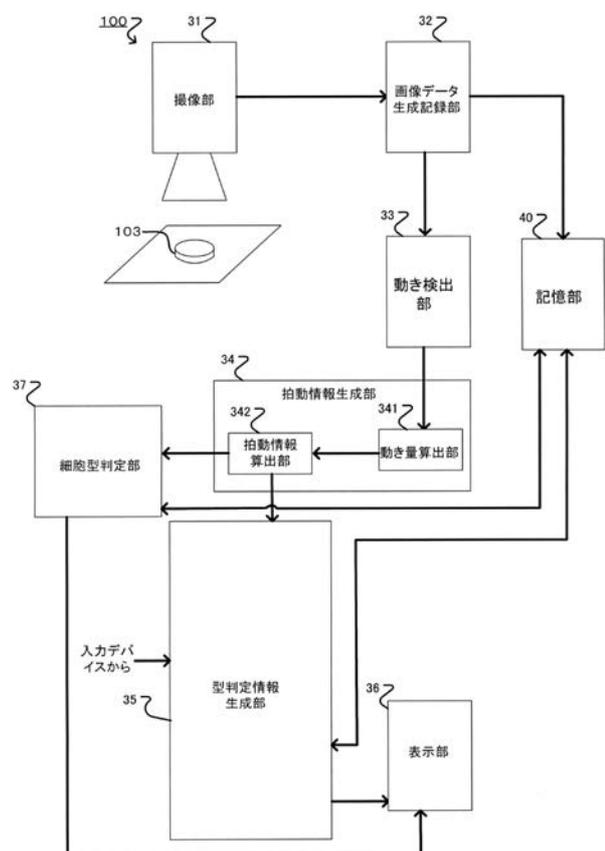
- 11 プロセッサ
- 12 メモリ
- 13 HDD
- 16 入力デバイス
- 31 撮像部
- 32 画像データ生成記録部
- 33 動き検出部
- 34 動き情報生成部
- 35 型判別情報生成部
- 37 細胞型判定部
- 40 記憶部
- 100 心筋細胞型判定システム

20

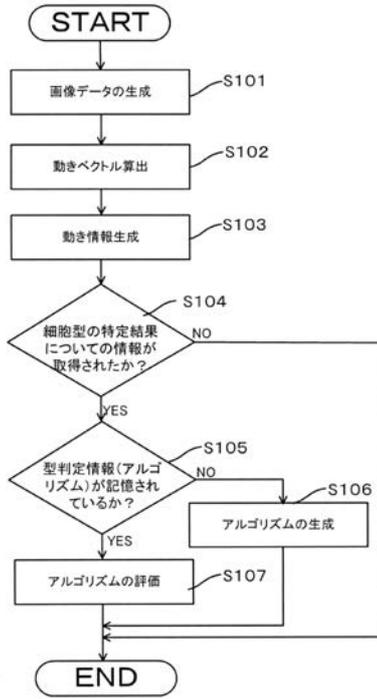
【図1】



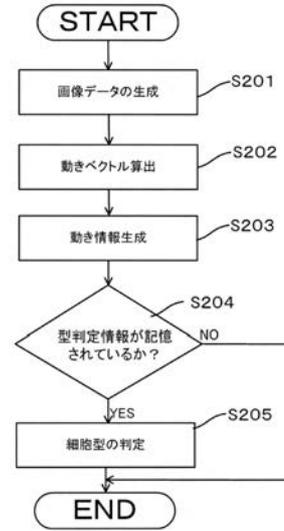
【図2】



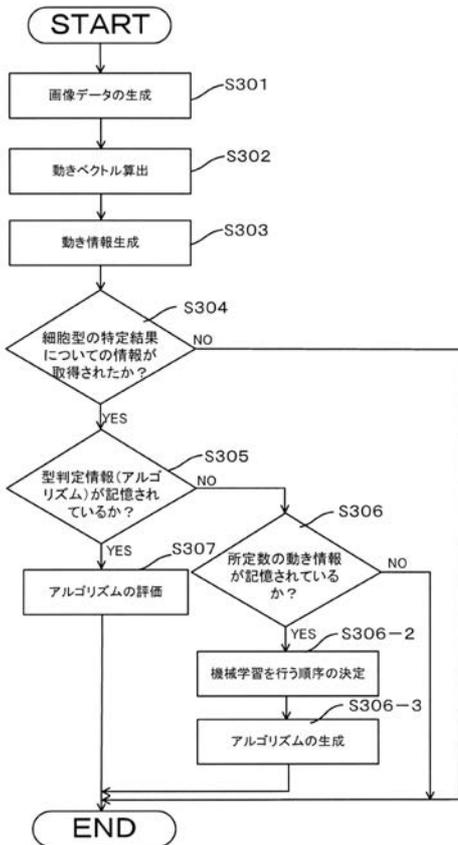
【 図 3 】



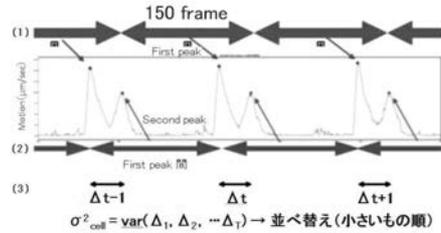
【 図 4 】



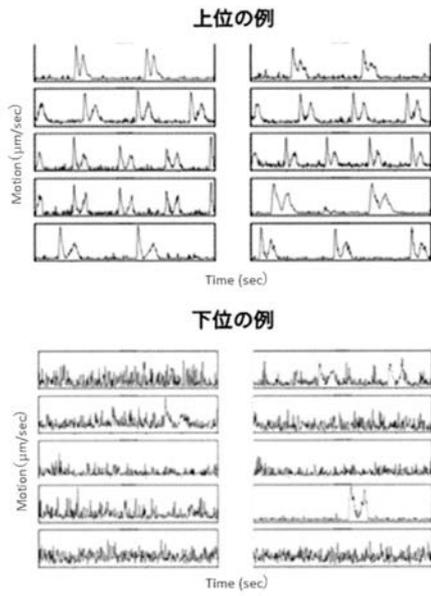
【 図 5 】



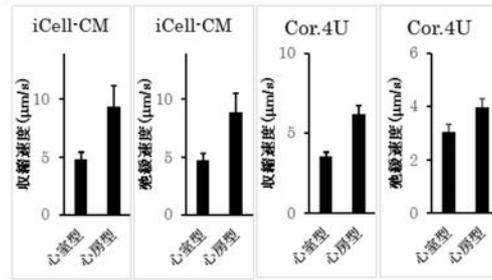
【 図 6 】



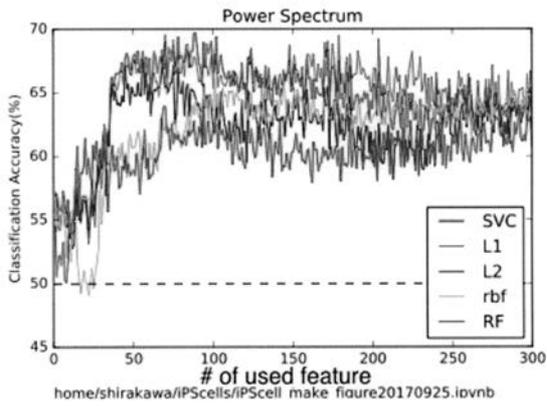
【 図 7 】



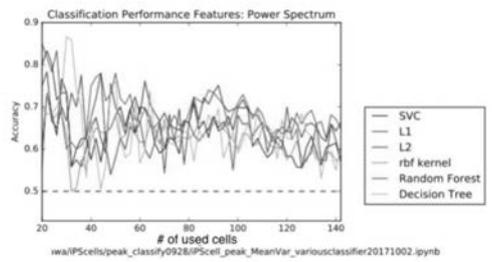
【 図 8 】



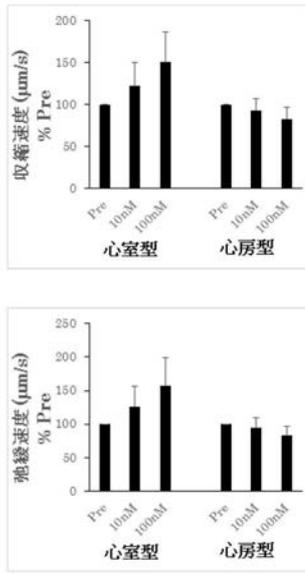
【 図 9 】



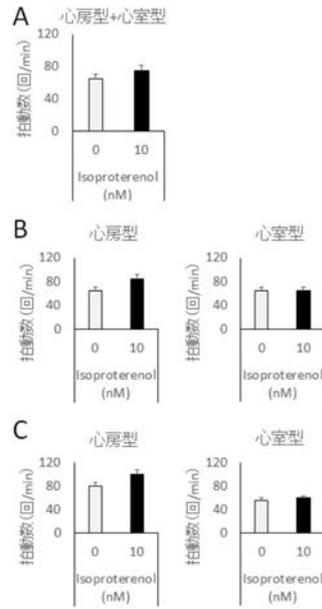
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 山口 賢彦

静岡県静岡市駿河区谷田5番1号 静岡県公立大学法人静岡県立大学内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB11 CC02 FA15

4B063 QA05 QA20 QQ08 QR77 QS39 QX01 QX10

专利名称(译)	心肌细胞类型测定系统，心肌细胞类型测定方法		
公开(公告)号	JP2019024495A	公开(公告)日	2019-02-21
申请号	JP2018141587	申请日	2018-07-27
申请(专利权)人(译)	静岡県公立大学法人		
[标]发明人	黒川 洵子 山口 賢彦		
发明人	黒川 洵子 山口 賢彦		
IPC分类号	C12M1/34 C12Q1/04 G01N33/53		
FI分类号	C12M1/34.B C12Q1/04 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/CC02 4B029/FA15 4B063/QA05 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QR77 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX10		
代理人(译)	须泽 洋		
优先权	2017147893 2017-07-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新技术，能够更容易地确定细胞类型未知的心肌细胞群的细胞类型。A和心脏肌肉细胞中自主跳动检测心脏肌肉细胞的移动，用于计算运动矢量的运动检测单元的图像，基于由运动检测单元计算出的心肌细胞的运动矢量的心肌细胞计算由运动信息生成的每个小区生成单元，细胞，其是被击败，运动信息生成单元用于生成运动信息包括运动矢量和脉冲信息相关的信息的脉冲信息和运动信息的有关特定结果类型用于产生类型确定信息，利用由类型确定信息生成单元生成的所述类型确定信息的信息，以及类型判断信息生成单元的基础上，由运动信息的运动信息生成单元生成和细胞类型确定单元，用于确定经受心肌细胞分化的心肌细胞的细胞类型。【选择图】无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2019-24495 (P2019-24495A)
	(43) 公開日	平成31年2月21日(2019.2.21)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34	4B029
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	Y
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17 頁)		
(21) 出願番号	特願2018-141587(P2018-141587)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成30年7月27日(2018.7.27)	静岡県公立大学法人
(31) 優先権主張番号	特願2017-147893(P2017-147893)	静岡県静岡市駿河区谷田5-2番1号
(32) 優先日	平成29年7月31日(2017.7.31)	100087398
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人
		弁理士 水野 勝文
		100128783
		(74) 代理人
		弁理士 井出 真
		100128473
		(74) 代理人
		弁理士 須澤 洋
		100160886
		(72) 発明者
		黒川 洵子
		静岡県静岡市駿河区谷田5-2番1号 静岡県公立大学法人静岡県立大学内
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 心筋細胞型判定システム、心筋細胞型判定方法		