

## 研究課題別評価

1. 研究課題名：賢くなる2次元神経回路網によるパターン認識

2. 研究者氏名：工藤 卓

### 3. 研究の狙い：

本研究は賢くなる生体ユニットである培養神経回路と電子デバイスである電極と増幅器・制御コンピューターが相互作用しながら情報を創発する系を構築し、応用システムとしても研究対象としても魅力的な情報体を実現しようとするのが目標である。目的としては、分散神経回路網の情報処理能力を評価し、様々な情報処理モデルを解析できるプラットフォームを確立すること、実用化の可能性を検討することである。具体的な本研究の大項目は大きく分けて2点ある。一つは、パターンディテクタとして、生体神経細胞が既存システムと相互作用して情報処理する系を構築し、その挙動解析を行う。二点目は、培養神経回路網の機能・作動に関与する分子の挙動とネットワークのダイナミックな挙動を関連づけて解析する系として本系を用い、解析結果を応用して神経回路網制御技術を確立することである。まず、準備段階として既に予備的な結果が得られている神経活動の2次元多点長期記録系の確立と、常時刺激条件による神経回路網入出力解析法の確立を目指す。さらに電流入力パターンの記録と識別の過程を解析し、これを応用した培養環境フィードバック法による神経回路網の自己組織化を実現する。これらを総合してパターンディテクタとしての神経回路網の機能評価を行う。第2点に関しては、機能分子の空間分布と情報処理過程のマッチングを解析し、機能分子の投与による培養神経回路網の制御技術を開発する。これらの結果を踏まえて培養神経細胞自身のパターン認識によるシステム制御装置への応用を検討する。最終年度では神経回路網自身に培養条件を調節させる系を構築することを試みる。解決すべき問題点としては第一に培養神経回路網が果たしてどれだけ情報処理機能を有するか不明であることである。この点に関して神経細胞の機能的結合の様式を詳細に解析して考察する。また、神経回路網に対する適切な刺激・入力の方法を確立することが制御と言う観点からも問題点としてあげられるが、これについては溶液条件、機能蛋白質分子の投与、電気刺激パターンについて詳細な検討と解析を行う。

### 4. 研究成果：

#### 4-1. 分散培養神経回路網のネットワーク構造

分散培養神経回路網は従来ランダムで“でたらめ”な系だと言われていた。そこで、まずこの系が情報処理に適した構造をとっているのかを検討した。分散培養された2次元神経回路網が機能的にどのようなネットワーク構造をとっているか解析するために Connection Map Analysis を開発した。Connection Map Analysis は、それぞれのユニット信号(単一神経細胞由来の活動電位)間で相互相関関数を計算し、その分布形状から神経同士の機能的結合の強度を計算する。

アルゴリズムは、まず、すべてのニューロンのペアについて相互相関関数を計算し、相互相関

関数に明確なピークがあるか見積もるパラメータとして connectivity index を以下の定義に基づいて計算する(図1)。

$$Connectivity = A_{peak} \times \left( 0.01 \times \frac{A_{peak}}{A_{total}} + \frac{1}{\Delta t + 1} + \frac{1}{Kurtosis} \right)$$

次に Connectivity index の統計値を計算し、平均値+標準偏差以上の Connectivity 特徴量を持つペアを機能的結合と判定し、線を引く。この手法により、記録された全ニューロン間の全組み合わせについて機能的な結合性の有無を推測することができる。分析した結果を図2に示す。

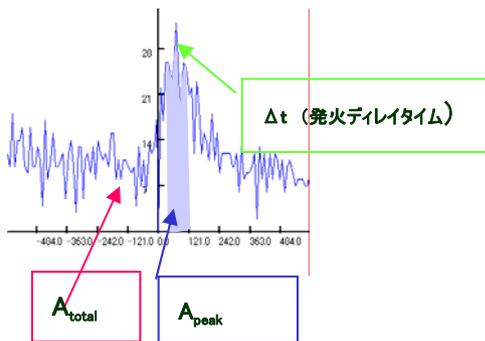


図1 相互相関関数とパラメータ

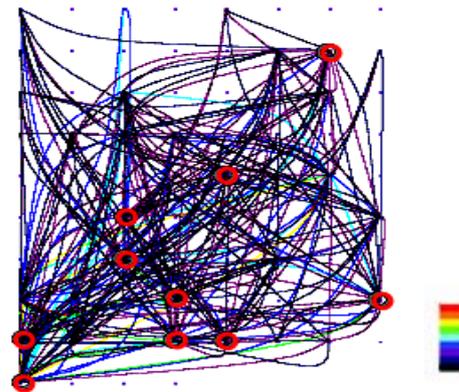


図2 Connection Map の例。カラーマップが上位のラインほど、ロバストな機能的結合を示す。赤○は入力リンク数が 10 以上のハブ的な神経細胞を表す

個々の点が 1 ユニット信号に相当し、その間

に引かれた線分が結合性を表す。結合強度が強い(より正確に同期しており、活頻度が多い)ほどカラースケールの上位の色で描画されている。これは一様に培養した神経細胞から得られた記録であるが、培養後20日前後でも、神経回路網が自己組織化により、情報が集中する集合ポイント(ハブニューロン)と沢山のニューロンに情報を出力する出力ポイントなどが出現していることが見て取れ、興味深い。さらに、神経細胞に入力するリンクの数からヒストグラムを作ると、その分布はガウシアン分布ではなく、むしろべき乗分布に近い形状を示した。このことは、神経細胞自身により自律的に再形成された回路網がスケールフリー性を有したネットワークを形成していたことを示しており、分散培養神経回路網がランダムではなく、自己組織化により情報処理に適した形を作っていたことを示している。

#### 4-2. 分散培養神経回路網による情報処理

一時的(20 分間)に培養神経回路網系全体を  $Mg^{2+}$  除去条件におき、神経活動を活発化することでシナプス増強を誘導し、この結果神経回路網を構成する神経細胞の機能的結合状態がダイナミックに変更されることを見いだした。 $Mg^{2+}$ -free によるシナプス増強前後における神経細胞間の機能的結合性の変化を同時にマッピングして描画したグラフが図3である。左側が  $Mg^{2+}$ -free 条件前、右側が  $Mg^{2+}$ -free 条件後である。一つの電極から複数のユニット記録が得られているので、各ユニット信号を表す小四角は電極の位置とは完全に対応してはいないが、相対的位置関係はほ

ぼ維持されている。シナプス増強後、新たに出現したユニット信号(同期活動に關与する神経細胞)、および消失したものがあり、機能的な結合性が大幅に変化していることが示されている。

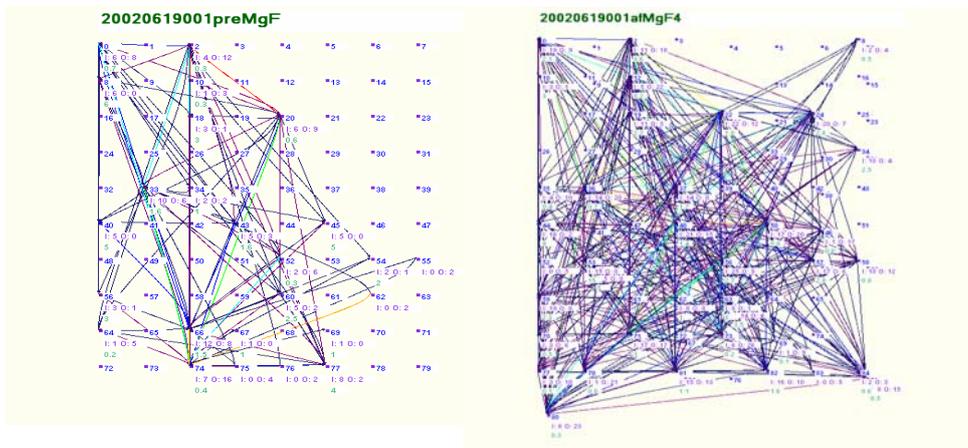


図 3 20分間の一時的な  $Mg^{2+}$ -free 条件によるシナプス伝達効率増強を、分散培養系内の様々なシナプスで誘導した結果おこった Connection Map の変化。左パネルが増強誘導前、右パネルが 増強誘導後。機能的結合の数が増大し、新たなハブの神経細胞が出現している。

さらに、自発的活動電位の一時的な活性化によらず、複数の部位からの局所的な定電流刺激を同時に印加することによって、神経回路網の情報処理パターンを調節する手法を探索した。通常の培養によりランダムに形成された神経回路網に於いても、所定の電極からのテストパルス刺激によって誘起される神経回路網の空間的活動パターンが複数パターン保持されていることを確認した(図 4 右)。さらに、それぞれこの二つのパターンを想起した入力を行った電極について、同時に高頻度刺激を印可したところ、この二つの保持パターンのうち一方が明確に変化することが確認された(図4)。つまり、この神経回路網に保持されている2パターンの神経活動について、

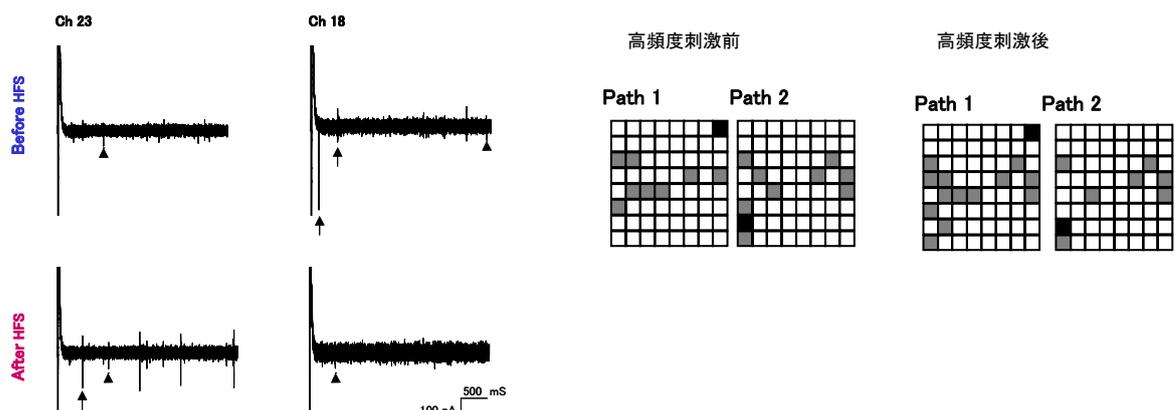


図 4 左パネル:2電極の高頻度同時刺激による誘導活動電位の変化。↑が誘導活動電位、▲が自発性活動電位。ch23では新たに活動電位が刺激によって誘導されるように変化し、ch18では逆にそれまで刺激によって誘導されていた活動電位が消滅している。左パネル:同じ神経回路網から作成した誘導活動電位のマップ。刺激電極(■)を切り替えた場合に、対応して誘導活動電位を検出できた部位(灰四角)が示されている。Path1とPath2の刺激点を同時に高頻度で刺激した後、各刺激点への刺激で誘導される活動電位パターンが変化している。高頻度刺激後は、Path1の刺激で高頻度刺激前のPath1とPath2をタdごうしたようなパターンが想起されている。

これらのパターンの同時励起を行うことで、パターンの融合が誘導されたと言うことである。入力によって引き起こされる神経活動パターンが、その入力によって一つのパターンが想起されている状態に対応していると考えれば、この現象は、パターンの同時想起によってある入力から想起されるパターンと別の入力によって想起されるパターンを融合し、想起パターンの関連づけが行われたと考えることが出来る。この結果は人工的に再構築された生体神経回路網においてパターン保持・想起・融合の操作が実際に可能であったことを証するものとして非常に興味深い結果であるといえる。これらの電氣的刺激を組み合わせることで、神経回路網をあるモードでの定常状態で安定させるための技術が確立できる。このような生体神経回路網の正規化は、神経回路網の動的制御のみならず、薬物アッセイの指標系として神経回路網を活用するには大いに有効であると考えられる。

#### 4-3. 環境と相互作用して情報処理をする神経回路網

培養9日～10日目から、自発的活動を検出してこれに対して論理演算を加えたフィードバック刺激を入力する系を構築した。最初の実験では、2カ所の電極からの電位検出を元に、1箇所にて定電流刺激を行った。2カ所から同時に10mS以内(AND)に同期した信号を検出した場合に刺激を印加する様に設定した。この実験スキームを“2-detection and 1-stimulation scheme”とする。この条件では、刺激により、神経回路網の活動が励起され、この活動によって2電極で検出される同期活動がトリガされ、これによりフィードバック刺激が引き起こされる、と言うように、繰り返しの刺激が印加される。ある時間経過後、回路網の内部状態の変化によって同期活動がずれると、この繰り返しの刺激は中断される。重要なポイントは、神経回路網に入力されるこのバースト状の刺激の周波数と刺激の長さは、全て神経回路網の内部状態によって制御されるということである。このスキームで培養10日目にフィードバック刺激を開始した結果、培養11日目にして既に明確な活動の変化を引き起こした。図5にその例を示す。

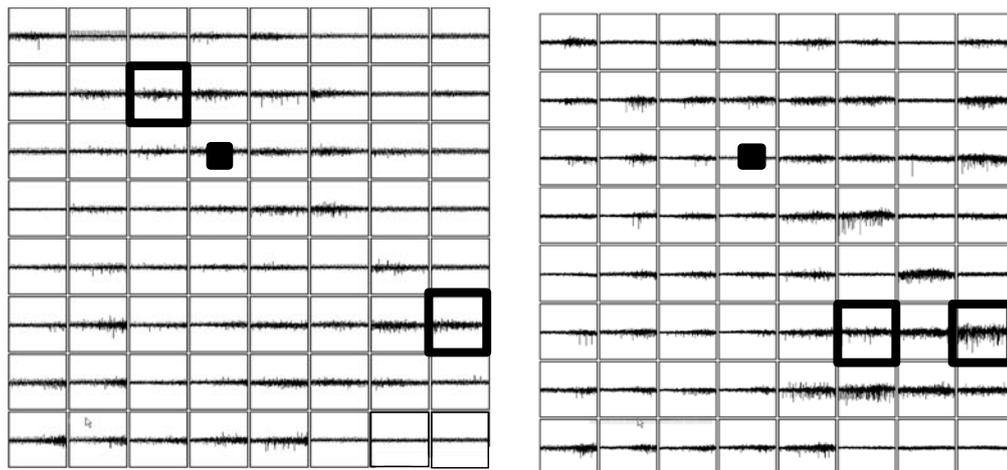


図5 フィードバック刺激による自発的活動電位パターンの変化。太枠は活動電位検出電極、■は刺激電極を示す。左パネルがフィードバック刺激前、右パネルが24時間のフィードバック刺激の後の記録である。24時間のフィードバック刺激の後、検出電極を右パネルのように変更してさらにフィードバック刺激実験を行った。

太枠が神経電気活動検出部位、■が刺激電流を印可した部位である。左のパネルがフィードバック

ク刺激前、右がフィードバック刺激を一日印加した後の実際の生体神経回路網の電気活動記録である。いずれもフィードバック刺激を停止した、自発的活動の記録である。活動パターンが明確に変わり全体的に活性が低下した。刺激電極付近でのみ活性の低下が起こっているのではなく、刺激部位から遠い部位に於いても活性の低下は起こっており、単なる神経細胞の慣化や失調ではなく、回路性の性質を反映したものであると考えられる。神経活動の活性化の低下と共に、機能的な結合が減少し、コネクションが集中するハブ的な神経細胞も減少した。さらに、電位を検出する電極のうち一カ所を別電極へ変更(右パネルの太枠)して設定した。この場合、はじめの条件より初期状態での同期活動頻度が少なくなるように電極を選定した。この設定条件で1日のフィードバック刺激を行った結果、システム全体の活動が回復し、機能的結合の数が増大する変化が起こった。これらの結果は、環境と相互作用することで、神経回路網自身がその機能的結合性を変化させて情報の流れを更新できることを示唆している。

#### 4-4. 環境と相互作用して賢くなる神経回路網—ロボットを媒体として

以上までに述べた研究成果から分散培養神経回路網の自発的活動時空間パターンはダイナミックに変動する機能的細胞集成体の存在を示唆していること、培養系に於いて自律的に構成された神経回路網がランダムネットワークではなく、スケール・フリーネットワークの特徴を持っているようにみえることが明らかになった。言い換えれば培養神経回路網がランダムな系ではなく、情報処理に適した機能的構造を自律的に獲得しうる系だと言うことである。さらに、培養神経回路網が、シナプス伝達効率を調整することや、適切な同期的刺激入力によってその機能的結合を変更し、シンボル操作の原型のような情報処理を行いうることが示された。また、リアルタイム・フィードバック刺激を入力しながら培養を行った結果、外界との相互作用によって、生体神経回路網がある一定の対応を保つために機能的に再編されることを示す予備的な結果を得た。これらはいずれも、人工的な環境下に再構築された分散培養神経回路網が、自己組織化過程によって再編され、ある種の情報処理を行うことが十分可能な系となっていることを示している。

培養神経回路網は、生体に於ける脳とは異なり、遺伝的に規定された入力も出力も持たない系である。体から切り離された脳だけが存在している訳で、培養神経回路網の活動は0入力状態である。この再構成された生体神経回路網に、環境と相互作用する媒体を与えたならば、外界を反映した何らかの機能構造が新たに出現するのではないかという仮説を我々は提唱している。いわば、脳だけの神経回路網に体を付与することによって知性の原型のようなものが観察できないかと言うことである。以上をふまえて、環境と相互作用する媒体としてセンサ(入力)とアクチュエータ(出力)を備えた小型ロボットを接続して継続的に解析できる系を構築した。このような系は、世界的にもいくつか立ち上がってきているが、我々は、入力と出力を予め固定して特定のルールでフィードバックをかけることで、系の活動状況がある平衡状態へ収束するか検討していること、進化的に組み込まれた回路をプログラムで代替しようとする点で先進的である。接続する小型ロボットにはKhepera IIを採用した。Khepera IIは8個の近接赤外線センサとタイヤの回転角を計測するインクリメンタル・エンコーダを感覚系として備え、2個の独立制御可能なアクチュエータを備えている。リアル通信を使ってホストコンピュータからASCIIコマンド制御することができ、これをカプセル化し

た LabView の VI が付属している。他方、細胞外電位多点計測システムの A/D 変換ボードが National Instrument 社製であり、LabView が制御プログラムの標準開発言語として使用できることから、制御プログラムは LabView を用いて開発した。LabView を用いて、生体神経回路網の活動から Khepera II を制御するプログラムを構築した。本プログラムは 3 つのモジュールからなる。第一のモジュールは、64 点の神経活動を常時モニターして、規定の閾値以上の電圧振幅を持つ信号を検出する。第一段階の試作としては、単純に任意に選んだ 2 つの神経電極から予め設定したタイムウィンドウ内の活動電位を検出し、そのスパイク数をカウントするものを構成した。第 2 のモジュールは第一のモジュールから渡されたパラメータを元に Khepera II のアクチュエータを制御する。第 3 のモジュールは Khepera II のセンサ値を監視し、刺激パルス数を設定して刺激信号をアンプに入力する。負荷を分散するため、モジュールの 1, 3 と 2 はそれぞれ 2 台のパソコン上で稼働させ、Data Socket により通信させることで連携している。本システムによって、Khepera II ロボットを神経活動を反映した動きで制御することに成功した。今後はこの系をさらに発展させ、学習などの高次脳情報処理と神経回路電気活動の時空間パターンとの関連性を実験的、理論的に研究可能とする神経物理工学プラットフォームとして確立していきたいと考えている。

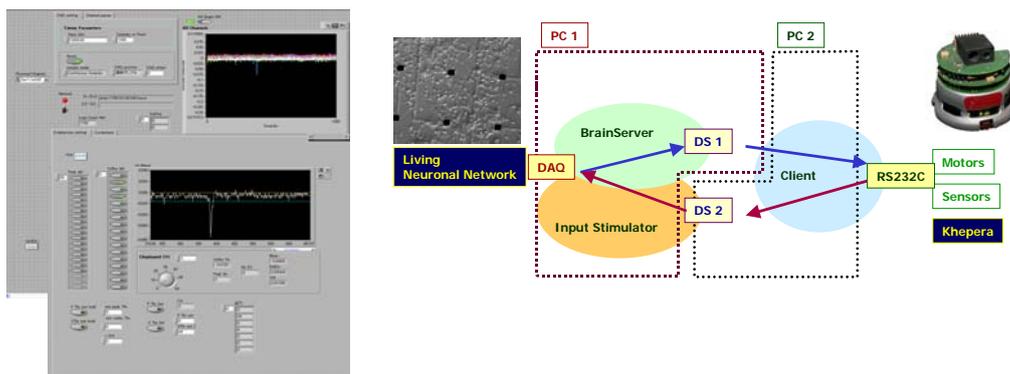


図 6 右パネル: 神経回路網—ロボットインターフェイスプログラムの中核ソフトウェア、BrainServer のフロントパネル。LabView にて開発。右パネル: 神経回路網—ロボットインターフェイスプログラムの概略図。システムは 2 台のパソコンに分散し、DataSocket プロトコルで通信することで情報をやりとりする。

## 5. 自己評価:

当初の主要な目標である「培養神経回路とコンピューターが相互作用しながら情報を創発する系を構築し、応用システムとしても研究対象としても魅力的な情報体を実現しようとする」という点についてはほぼ実現できたと自負している。特に、人工環境下に分散培養された神経回路網が情報処理に適したネットワーク形態を自律的に構築していることを見だし、情報処理を担うユニットとしての神経回路網の潜在的機能を明らかにした点は興味深い成果であると考えている。また、神経回路網がフィードバック刺激装置等、外界を反映した入力を返す系と相互作用して情報処理の流れを変更するという、さらにフィードバック刺激を的確に設定することで、神経回路網の活動をある程度「規格化」することの十分な可能性と有望な手法を見いだしたことも当初の目的にかなった研究成果である。また、神経回路網が入力刺激に応じた活動を発現すること、複数の

入力によって発現する活動パターンが連合的入力によって関連づけられることは、神経回路網がある程度のパターンの学習・識別機能を有することを示唆する結果であると考えている。

機能分子の空間分布と情報処理過程のマッチング解析に関しては、神経回路網の培養密度の高さと物理的ネットワークの複雑性、局所的刺激の難易性から当初想定していた効果が得られたとは言えない。これらに関しては刺激システム自体のブラッシュアップとさらなる開発、培養系の簡素化など課題が残っている。機能分子の投与による培養神経回路網の制御技術に関しては、脳由来神経栄養因子(BDNF)の急性効果を確認し、この分子による制御の可能性を確認できた。しかし、局所的投与の手法など、未だ解決すべきポイントは残る。神経回路網自らが培養条件を制御する系については、うまく系が安定した結果が得られていない。これには進化的陶太というファクターを新たに考え、この部分までプログラムとして作り込んで、神経回路網の活動と生存の制御との間に価値判断のプロセスを組み込む必要があるように思われる。その部分を明確化する必要性もあり、小型ロボットと相互作用する系を構築した。生体神経回路網が外界と相互作用する系としては、神経回路網への入出力が電気的活動に集約できるという点でむしろこちらの方が明確な系であると思われる。特に、先行的な研究と比べて、進化的に決定された部分をプログラムで作り込むという点で大きく進んでいる。本系は、学習などの高次脳情報処理と神経回路電気活動の時空間パターンとの関連性を実験的、理論的に研究可能とする神経物理工学プラットフォームとして非常に有効な系となると考えており、本研究テーマで得られた、当初の目的より発展した大きな成果の一つであると考えている。

## 6. 研究総括の見解:

本研究の目標は、賢くなる生体ユニットである培養神経回路と電子デバイスである電極と増幅器・制御コンピューターが相互作用しながら情報を創発する系を構築し、応用システムとしても研究対象としても魅力的な情報体を実現しようとする事である。本研究において、多点電極皿上に於いて分散培養された神経回路網のネットワークの特性を解析することにより、培養系に於いて、自発的活動時空間パターンはダイナミックに変動する機能的細胞集成体の存在を示唆していること、および自律的に構成された回路網がランダムではなく、スケール・フリーネットワークの特徴を持っていることを発見したことは大きな成果であり、高く評価できる。さらにこの結果をふまえ、環境と相互作用する媒体として小型ロボットを接続して継続的に解析できる系を構築したことも評価できる。

今後の展望として、神経回路網を制御する技術を確立して、最終的には神経回路網自身が自らの生育条件を制御する人工生命体を目指すことを期待します。

## 7. 主な論文等:

### 論文

1. Suguru N. Kudoh and Takahisa Taguchi “Operation of spatiotemporal patterns stored in living neuronal networks cultured on a microelectrode array” *Journal of Advanced Computational Intelligence & Intelligent Informatics (JACI3)*, (2003) 8(2):100–107

2. 工藤 卓、田口 隆久 “外界と相互作用する生体神経回路網” 計測自動制御学会論文集 Revised
3. Suguru N. Kudoh and Takahisa Taguchi “Synaptic potentiation updates self-organized functional assemblies in cultured living neuronal networks”. J. Neural Eng. Submitted.
4. 工藤 卓、田口 隆久 “再構成生体神経回路網における知覚と知性の探求” 日本知能情報ファジィ学会論文集 Submitted.
5. T. Taguchi and S.N. Kudoh, “Network dynamics of cultured hippocampal neurons in a multi-electrode array” . Progress in biomedical optics and imaging. proceedings of SPIE, 5651 5(34) pp.243-253, 2005

#### 国際会議発表論文

1. Suguru N. Kudoh, Takahisa Taguchi and Syunsuke Yuba, “The modification of functional connectivity changes spatio-temporal patterns of spike activities in dissociated neuronal networks”. Neuroscience 2004, the Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, Sandi ego, 2004.10.27
2. Suguru N. Kudoh, Takahisa Taguchi, Syunsuke Yuba, “Synaptic enhancement induced dynamical change of functional connections between neurons in living neuronal networks.” 2004 International Symposium on Nonlinear Theory and its Applications, Kitakyushu, 2004.12.1
3. Suguru N. Kudoh and Takahisa Taguchi, “Robotic brain: interaction and intelligence in living neuronal networks connected to moving robot.” SICE Annual Conference 2005, Okayama, 2005.8.9
4. Suguru N. Kudoh and Takahisa Taguchi, “Synaptic potentiation modulates self-organized functional assemblies in cultured living neuronal networks.” Neuroscience 2005, the Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington D.C., 2005.11.16.
5. Suguru N. Kudoh and Takahisa Taguchi, “Interaction and intelligence in living neuronal networks interfaced with moving robot”. SPIE International Symposium of MEMS 2005, Brisbane, 2005.12.14

#### 国内会議発表論文

1. 工藤 卓、田口隆久、”分散神経回路網における自己組織化ネットワークのダイナミクス”、第28回大会日本神経科学 Neuroscience2005、横浜、2005.7.27
2. 工藤 卓、田口隆久、”再構成神経回路網と小型ロボットとの相互作用～神経物理工学プラットフォームの確立を目指して”、第20回生体・生理工学シンポジウム(BPES2005)、東京、2005.9.6
3. 工藤 卓、田口隆久、”ロボットと相互作用する生態神経回路網～神経物理工学プラットフォームの確立を目指して”、第21回ファジィシステムシンポジウム、東京、2005.9.8

4. 工藤 卓、“情報工学融合分野のための神経科学概論”、第11回 相互作用と賢さ 合同研究会、名古屋、2005.11.4
5. 工藤 卓、“ロボットと生体神経回路網：環境と相互作用する分散培養神経ネットワーク”、日本知能情報ファジィ学会 第17回 ファジィ・コンピューティング研究部会 ワークショップ、第2回 脳と知覚研究会 ワークショップ（協催）、芦原、2005.11.20

#### **著書、総説・解説**

1. 田口隆久、工藤 卓、『ナノバイオ辞典』「神経細胞」（株）テクノシステム、出版中

#### **招待講演**

1. 工藤 卓、田口隆久、“分散培養神経回路網における自己組織化された機能的ネットワーク”、生理学研究所セミナー、岡崎 生理学研究所、2004.2.24
2. 工藤 卓、田口隆久、“培養生体神経回路網における神経細胞機能的結合の形成と調整”、北海道大学 工学部、札幌、2004.8.5
3. 工藤 卓、田口隆久、“外界と相互作用する生体神経回路網～神経物理工学プラットフォームの確立を目指して”、北海道大学 工学部、札幌、2005.9.15
4. 工藤 卓、田口隆久、“相互作用によって自己組織化される培養神経回路網－生物の部品にロボットの体を与える試み－”、理研フォーラム、名古屋 理化学研究所、2005.11.29