

電気刺激によって発現する生体神経回路網のメモリー現象

Memory phenomenon in living neuronal network expressed by electrical stimulus

伊東嗣功^{*1,2}
Hidekatsu Ito

箕嶋渉^{*1,2}
Wataru Minoshima

工藤卓^{*1,2}
Suguru Kudoh

^{*1} 関西学院大学

Kwansei Gakuin University

^{*2} バイオロボティクス研究センター

Reserch Institute of Bio Robotics

In order to elucidate information processing of the neuronal network, it is critical to analyze neuronal network dynamics. In this report, recording and stimulation of living neuronal network were performed by multi-electrodes array (MEA) system. Dissociated rat hippocampal neurons on a MEA probe reorganized a complex neural network. Reconstructed neuronal network on MEA probe are useful as a simple model of brain information processing system. Using the system, we previously confirmed that cultured living neuronal network was able to retain input timing. We call this phenomenon as “timing memory”. To analyze relationship between electrical stimulus and neuronal network activity, single electrical stimulus and paired stimuli applied to living neuronal network. As a result, intervals of synchronized activity in spontaneous electrical activity were changed after paired stimuli, depending on inter-stimulus-intervals of paired inputs. However, only single stimulation also changed spatiotemporal pattern of spontaneous activity, suggesting that the timing-memory is not simply retained by the timing of the population network activity in the spontaneous activity.

1. はじめに

近年、脳科学は脳の記憶、思考、認知等の複雑な脳高次機能を解明するために、情報学、生物学等の学問分野を融合させた学際的な領域になりつつある。その脳高次機能の複雑さの原因は脳の情報処理機構のダイナミクスが明確になっていないといえる。例えば、一般的に視覚情報は外側漆状体に伝達され、V1野、そこから頭頂葉、側頭葉へ伝搬していくことで、最終的に知覚が成立しているとされる。しかしながら、人間がある情報を知覚する際に、視神経を通して入力される視覚情報の最小単位はどの程度なのかは明らかになっていない。そこが明らかにならない限り、人間がある情報を知覚するのに必要な最小時間を計算する事が出来ず、最小情報量(情報表現)も理解する事が困難になる[Kudoh et al., 2011].

現在、脳の情報処理機構のダイナミクス解明に向けて、脳の様々な領野の計算モデルを用いて脳の情報処理機構を明らかにする研究[Ichisugi, 2011]や生体を用いて外部から与えられた情報がどのように脳内で処理されるのかを解析する研究が遂行されている[Miyawaki et al., 2008]. 研究の一例として、人間の脳活動を基に入力された視覚情報を復号化する技術が開発されている。この技術については、言い換えれば、提示された視覚情報と視覚野での情報表現の関係性を明らかにしたと言える。しかしながら、連続的に入力される外界からの入力が如何にして時間分割され、静的な符号に変換されるのか、詳細が明らかになったとは言えない。これは、個々の神経細胞の活動を確認しつつ、全体のネットワークレベルでの活動特性と、外界からの入力との関係性を明確にするには、脳が複雑すぎる事が一因である。

そこで本研究では複雑なダイナミクスを持つ人間の脳全体を対象にするのではなく、培養された小規模な生体神経回路網を対象とし実験を行った。培養系の利点は、より詳細に実験環境を制御しつつ刺激情報と神経活動の変化を解析することが可能な点である。生体神経回路網は培養 10 日程度で自発的な神経活動が計測され、30 日程度で生体神経回路網の同

期性に変化し、活動頻度の高いバースト状の活動が計測される[Chiappalone et al., 2006]. 培養された神経細胞は回路を再構築していく際に、適当に回路を形成する訳ではなく、他の神経細胞からの入力が集中するハブ的な回路を形成する[Kudoh et al., 2008]. また、これまでに伊東らは生体神経回路網に電気刺激を印加して、印加した電気刺激スキームと神経活動の変化に着目して解析を行ってきた[Ito et al., 2010]. 従来の報告では、0.03 Hz - 0.1 Hz の電気刺激を生体神経回路網に印加した場合は神経活動が同期するバースト現象が起こると言われており[Wagenaar et al., 2004], 1 Hz 以上の電気刺激を生体神経回路網に印加した場合は神経活動が抑制されると言われている[Shahaf and Marom, 2001][le Feber et al., 2010]. そこで我々は、さらに低 Hz の 1 分に 1, 2 回の刺激回数(1/60, 2/60Hz)で実験を行うことで、生体神経回路網の再帰的入力による影響をなるべく排除した状態で実験を行った。その結果、生体神経回路網で発現する短期的に変化するメモリー現象を発見している[Ito and Kudoh, 2013]. さらに、生体神経回路網は、電気刺激の時間間隔に伴い同期的に活動する時間周期を変化させると報告している[Ito and Kudoh, 2013]. 言い換えると、この現象は電気刺激の印加したタイミングを同期的に活動する周期に保存していると言える。これらの結果は、生体神経回路網には一定の時間履歴を保持する性質が在り、このことが外界からの入力を神経活動パターンに符号化する際の分割時間窓の幅を自律的に定めている可能性を示唆する。

そこで、本研究は培養神経回路網が保持する履歴保持性質を短期のメモリー現象であると捉え、外界からの時間的な入力パターンを変えて、これに応答して発現する誘発神経活動パターンの変化を解析した。また、このとき内在する同期的神経活動パターンを解析して自律的神経活動と外界からの入力に対するメモリー効果との関連性を考察した。

2. 実験手法

2.1 生体神経回路網

本研究では、胚令 18 日目のウイスターラット胎児から海馬領域を取り出して、トリプシン処理後に解離した細胞を微小平面電極を底面に備えた培養皿(MED プローブ, α MED サイエントイフィック)上に播種し、生体神経回路網を構築させた。播種密

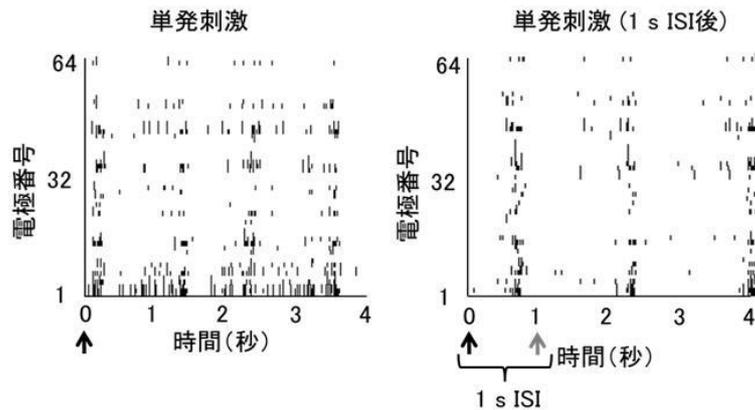


図 1. ラスタプロットによる 1 s ISI コンディショニング前後の電気活動スパイク

1つの黒いプロットは電気活動が1回起きたことを表す。黒い矢印は電気刺激を印加したタイミングを示し、灰色の矢印は2発目の電気刺激が印加されていたタイミングを示す。

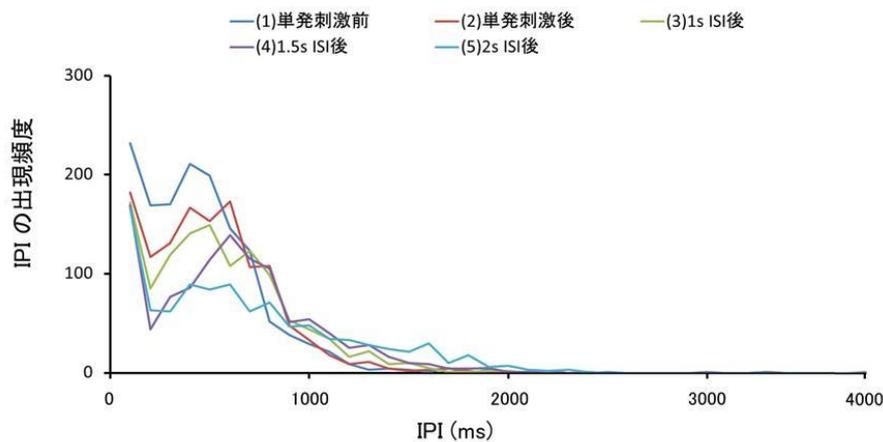


図 2. 自発性神経活動における同期的活動の時間間隔(IPI)の変化

度を制御するため、MED プローブ中央の電極を囲うように内径 7 mm のクローニングリングを配置し、リング内部へ解離細胞を 30 万個播種した(7800 cells/mm²)。播種1日後にクローニングリングを取り除き、37 °C、5% CO₂条件で培養を行った。播種された生体神経細胞は MED プローブ上で神経突起を伸張し、複雑な回路を再構築する。培地は、25% HEPES を含有するダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)/ハム F12 混合培地、5 μg/ml インシュリン(シグマ)、100 U 及び 100 μg/ml ペニシリン-ストレプトマイシン(ライフテクノロジーズ)、5% 牛胎児血清(ライフテクノロジーズ)、5% 馬血清(ライフテクノロジーズ)をそれぞれ添加したものをを用いた。全ての動物実験は関西学院大学動物実験管理規程に従い、関西学院動物実験委員会の承認を受けて行った。

2.2 電気刺激実験

神経活動の計測、電気刺激間隔の制御には本研究室で開発した Spike Recorder を使用した。電気刺激方法は 1 分に 1 回の単発刺激、もしくは 1 分に 2 回の 2 発刺激を印加し、特に 2 発刺激をコンディショニング刺激とした。本研究では 2 発刺激の電気刺激の刺激間隔(Inter-Stimulus- Interval, ISI)を、1 秒(1 s ISI)、1.5 秒(1.5 s ISI)、2 秒(2 s ISI)、とした。具体的な実験手法は、(1)単発刺激前の自発性神経活動の計測、(2)単発

刺激印加後の自発性神経活動の計測、(3)1 s ISI で印加後の自発性神経活動の計測、(4)1.5 s ISI で印加後の自発性神経活動の計測、(5)2 s ISI で印加後の自発性神経活動の計測を行った。電気刺激を印加する前後において、自発性神経活動を計測することで、印加した電気刺激が自発性神経活動に与える影響を解析した。自発性神経活動の計測時間はそれぞれ1時間計測した。

2.3 神経活動周期の検出法

全電極から計測された自発性の神経活動について、100 ms の時間窓ごとにスパイク頻度を合計した。設定した閾値を越えた頻度でスパイク活動が認められた状態を、生体神経回路網の同期的電気活動として検出した。閾値は全電極での活動において、標準偏差の 2 倍とした。同期的電気活動のピークを算出し、その時間間隔(Inter-Peak-Interval, IPI)を算出した。

2.4 時空間パターンの変動解析

これまでの研究から繰り返しの電気刺激印加の前後において、自発活動周期が変動することが示唆された。さらに、この変化に伴い、時空間パターンそのものが変化していると予想された。そこで記録された自発性電気活動から、100 ms 幅の時間窓内の電気活動スパイク数を要素とする特徴ベクトルを生成し、そ

の要素の平均値をもつ平均特徴ベクトルを計算して、テンプレートベクトルとした。コンディショニング刺激前後でテンプレートベクトルのユークリッド距離を算出し、自発性の神経活動パターンがコンディショニング前後でどの程度変化したか見積もった。

3. 結果と考察

3.1 同期的活動の周期と電気刺激間隔

コンディショニング刺激後、2 発目の刺激が印加されていないにもかかわらず、1 発目の刺激後に、コンディショニング刺激の 2 発目が印加されていたタイミングで電気活動スパイクが発現するタイミングメモリを報告していた(図 1)。タイミングメモリが観察された場合、コンディショニングの前後の自発性神経活動において同期的活動の時間間隔(Inter-Peak-Interval, IPI)が変化していると予想された。そのため本実験では、単発刺激前後、コンディショニング刺激後それぞれの IPI を算出した(図 2)。それぞれ平均 IPI は(1)単発刺激前で 551.79 ms, (2)単発刺激印加後で 601.10 ms, (3)1 s ISI 印加後で 647.87 ms, (4)1.5 s ISI 印加後で 726.95 ms, (5)2 s ISI 印加後で 789.31 ms となった。(1)単発刺激印加前は、200 ms から 600 ms 程度で同期活動の周期が表れる傾向が強く、1000 ms 以上の IPI の出現頻度が減少した。また、単発刺激印加後 200 ms から 600 ms 程度の IPI 出現頻度が減少し、1 s ISI でコンディショニング刺激印加の後、200 ms から 1000 ms の IPI 頻度が減少し、1100 ms から 1500 ms 程度の IPI の頻度値が増加する傾向が確認された。1.5 s ISI でコンディショニング刺激した後は、200 ms から 1000 ms 程度の IPI 頻度値が減少し、1100 ms から 2000 ms 程度の IPI 頻度が増加する傾向が確認された。さらに、2 s ISI で刺激印加後は、200 ms から 1000 ms 程度の IPI 頻度が減少して、1100 ms から 2000 ms 程度の IPI 頻度の増加が確認された。これらの結果から、同期的活動周期は電気刺激間隔に依存し、コンディショニング刺激の ISI の増加に相関して周期も増加する傾向があった。

3.2 周期の変化と時空間パターンの変化

コンディショニング時の 2 発電気刺激の間隔に依存して生体神経回路網の同期的活動が変化する背景には、神経回路網において自発的活動の時空間パターンが変化し、このパターンのレパートリーが刺激によって誘発されてタイミングメモリが発現する機構が存在するのではないかと予想された。そこで、コンディショニング刺激の前後で平均的な自発活動に相当するテンプレートベクトルのユークリッド距離を算出した。

しかしながら、コンディショニング刺激ではなく、単発刺激によっても自発性電気活動パターンは変化し、刺激印加前後でのテンプレート間のユークリッド距離は単発刺激において最も大きく、コンディショニング電気刺激間隔の ISI が大きくなるに従ってむしろユークリッド距離は減少する傾向があった。

この結果は、電流刺激時に発現するタイミングメモリは、自発活動周期を変化させることで保持するような単純な機構によって発現するのではなく、パターンのレパートリーの発現確率が変動するなどのより複雑な機構によって実現されていることが示唆された。ただし、コンディショニング刺激の ISI に依存して、自発活動の活動周期が変化する背景には、やはり入力が無い状態の自発活動パターンが何らかの状態を形成していることが示唆される。

4. 結論

生体神経回路網において、タイミングメモリの保持時間と自発活動の同期的活動のタイミングには相関性が認められた。しかしながら、自発活動の時空間パターンそのものは、1 分間隔の単発刺激によっても変化し、電流刺激時に発現するタイミングメモリは、自発活動周期を変化させることで保持するような単純な機構によって発現するのではなく、パターンのレパートリーの発現確率が変動するなどのより複雑な機構によって実現されていることが示唆された。

参考文献

- [Chiappalone et al., 2006] Chiappalone, M., Bove, M., Vato, A., Tedesco, M., Martinoia, S., : Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development, *Brain research*, vol.1093, No.1, pp.41-53.
- [Ichisugi, 2012] Yuuji Ichisugi, : A Computational Model of Motor Areas Based on Bayesian Networks and Most Probable Explanations, In Proc. of The International Conference on Artificial Neural Networks, pp.726--733.
- [le Feber et al., 2010] le Feber J, Stegenga J, Rutten W. L., : The Effect of Slow Electrical Stimuli to Achieve Learning in Cultured Networks of Rat Cortical Neurons, *PLoS One*, vol.5, No.1, pp1-8.
- [Ito et al., 2010] Ito, H., Hosokawa, C., Kudoh, S. N., : Memory on a chip, *Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS)*, 2010 International Symposium on, pp121-126.
- [Ito and Kudoh, 2013] Ito, H., and Kudoh, S. N. : Hysteresis of Evoked Activity Pattern in a Cultured Neuronal Network, *IEEE Transactions on Electronics, Information and Systems*, vol.133, No.10, pp.1905-1911.
- [Ito and Kudoh., 2013] Ito, H., and Kudoh, S. N., : Fundamental short-term memory of semi-artificial neuronal network , *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 2013 35th Annual International Conference of the IEEE, pp811-814.
- [Kudoh et al., 2008] Kudoh, S. N., Kiyohara, A., Taguchi, T., : The Heterogeneous Distribution of the Functional Synaptic Connections in a Rat Hippocampal Dissociated Neurons, *IEEE Trans ELS*, vol.92, No.6, pp.1611-1618.
- [Kudoh et al., 2011] Kudoh, S. N., Kiyohara, A., Taguchi, T., : Discussions About "Synthetic Intelligence" in Dissociated Culture System, *Electronics and Communications in Japan*, Vol. 94, No.10, pp.41-56.
- [Miyawaki et al., 2008] Miyawaki, Y., Uchida, H., Yamashita, O., Sato, M., Morito, Y., Tanabe, H. C., Sadato, N., Kamitani, Y., : Visual Image Reconstruction from Human Brain Activity using a Combination of Multiscale Local Image Decoders, *Neuron*, Vol. 60, No.5, pp.915-929.
- [Shahaf and Marom, 2001] Shahaf, G., and Marom, S., : Learning in networks of cortical neurons, *J Neurosci*, vol.21, No.22, pp.8782-8.
- [Wagenaar et al., 2004] Wagenaar, D. A., Pine, J., Potter, S. M., : Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays., *J Neurosci Methods*, vol.138, No1-2, pp.27-37.