

生体神経回路網のダイナミクスと情報処理

Dynamics of biological neural network and information processing

岡田 卓巳 箕嶋 渉 工藤 卓^{CA}

Takumi Okada Wataru Minoshima Suguru N Kudoh

関西学院大学理工学部人間システム工学科

Kwansei Gakuin University, Human System Interaction, School of Sci and Tech

The representations of outer world in the brain are considered to be undertaken by spatiotemporal activity patterns of neuronal circuits. The neuronal activity patterns were identified when specific activity pattern appeared repeatedly and reproducibility in living neuronal network. In this study, we analyzed the transition of the internal states of the rat hippocampal neurons cultured on a multi-electrodes-array (MEA) dish. Neuronal network activity was measured from 64 electrodes on the bottom of dish and detected spike in each 5 ms time window. Electrical activity pattern at a certain 5 ms time-window-width was represented as a 64-dimensional “0-1” feature vectors. Using X-means algorithm, 64-dimensional feature vectors were classified into “pattern repertory” based on the spatial distribution of activity. In addition, we analyzed the optimal time-window-width that expressed the most information. As a result, the living neuronal network expressed much information in 30-40-ms-width-time-window.

1. はじめに

脳の情報処理は、多数のニューロンで形成された神経回路網における複雑な活動パターンによって実現されている [Kandel 2012]. ラット海馬分散培養系においては動的に変化する機能的な結合によって協調的に活動する神経集団が存在することが報告されており、神経回路網における情報表象の基盤であると考えられている [Kudoh 2009]. 神経回路網の時空間パターンを解析することは、脳の情報処理を解明する上で大変重要である。また、神経が出力する応答には、自発性神経電気活動が大きく関わっており、空間的な応答パターンの根底には、自発活動の空間パターンが存在することが示唆される [Tsodyks 1999]. 自発性神経電気活動は神経細胞の相互作用によって発生し、外界からの入力無しで発生する自律的な活動であるが、単なるノイズのようなものではなく、脳の情報処理に貢献していると近年報告され、この特性を知ることは重要である。生体の脳においては同一の入力に対して必ずしも同一の出力が返される訳ではなく、ネットワークの内部状態に依存して柔軟に変化する。この内部状態の依存的な応答は、人工的なシステムでは未だ構築しきれていない特性であると言える。

脳の情報処理の原理を解明する比較的小規模なモデルとしては、ラット海馬分散培養系が有効である。底面に 64 個の微小平面電極を備えた培養皿 (MED プローブ) 上にラット海馬神経細胞を分散培養して回路網を自己組織的に再構築させ、微小平面電極から細胞外電位を同時に多点計測することで、ネットワークダイナミクスを形成する神経電気活動の時空間情報を長時間にわたって解析することができる。

本研究では、脳の本質的な機能保持した小規模モデルとしてラット海馬分散培養系を用い、自発性神経電気活動パターンの再現性と安定性を検証した。

2. 実験・解析手法

2.1 ラット海馬分散培養

培養する細胞は胚齢 18 日目 (Embryonic day 18, E18) のウイスターラット (JCL:Wistar, 日本クレア) 胎児の海馬より得た。取り出した海馬片を Ca^{2+} - Mg^{2+} 不含リン酸バッファー (PBS⁻) に置換し、3 回デカンテーションした後、0.5% トリプシン EDTA 溶液を最終濃度 0.175% となるように加え、全量を 2 ml とした。その後、37°C のウォーターバスで 10 分間トリプシン処理を行った。調整した細胞懸濁液をクローニング・リング内に細胞数を 30 万個に相当する量だけ加え、37°C・5%CO₂ のインキュベータ内で静置し、2-3 日おきに培養液の交換を行った。本研究で使用した培養液の組成を以下に示す。基礎培地である DMEM/F12 with 25% HEPES, Glutamine (Thermo Fisher Scientific) に以下の濃度で各添加物を加えた。

- インシュリン (sigma) 5 µg/ml
- ペニシリン-ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) 100 unit/ml - 100 µg/ml
- 牛胎児血清 (Thermo Fisher Scientific) 5%
- 馬血清 (Thermo Fisher Scientific) 5%

本研究における、動物実験に関する全ての手続きについては、「関西学院大学動物実験管理規定」に準拠し、動物実験委員会の承認を得た上で行った。

2.2 細胞外電位多点計測システム

神経回路網の電気活動の計測に細胞外電位多点計測 (MED64, アルファメッドサイエンティフィック) を使用した。多点電極培養皿 (MED プローブ) は中央部に 8×8 で配置された 64 個の微小平面電極と、その外側に配置された 4 個の参照電極を持った特殊な培養皿であり、長期に渡って神経電気活動の測定が可能である。アレイサイズは 3.15×3.15 mm、電極間距離は 450 µm、電極サイズは 50×50 µm のものを用いた。本研究では、胚齢 18 日培養 31-37 日目の神経回路網から自発性神経電気活動を 30 分間計測した。電気計測に際し、培養液を細胞外記録溶液 (Rec. Sol.) に液置換した。

連絡先: 岡田 卓巳, 関西学院大学理工学部人間システム工学科
神経知能工学研究室 (NI-Lab), 兵庫県三田市学園 2 丁目 1 番地, 079-565-7244, fnq66885@kwansei.ac.jp

2.3 解析手法

活動電位スパイクの検出には、プログラミング言語 LabVIEW を用いて研究室で独自開発した解析プログラムを用いた。計測用プログラムである Spike Recorder (SPR) を用いて、MED プローブの底面に備えられた 64 個の微小平面電極にて計測した神経電気活動の波形データを取得した。得られた波形データからスパイク検出用プログラムである Spike Counter (SPC) を用いて、各 5 ms の時間窓ごとにスパイクの有無を元に 0 か 1 の値を要素に持つ特徴ベクトルを作成した。

神経電気活動の出力を 64 電極からの総発火数で構成されているとみなし、その時間推移を観察すると、複数の細胞が一斉に活動するネットワークバーストにあたる高発火数のドメインと殆ど発火する細胞が無い低発火数のドメインとが存在した。そこで、64 電極分のスパイク数を合計したものを神経電気活動が生成する出力として、この全スパイク数の 1 次元データ集合に対してクラスタリングを適用し、神経電気活動パターンを見積もった。その結果、発火数の多寡に応じて複数のクラスタが形成された。また、スパイク検出の時間窓幅を 5 ms から 10 ms, 20 ms と上げた時の総発火数に対してもクラスタリングを適用し、最も多くのクラスタを生成する時間窓幅を検討した。本研究では、時間窓幅を 100 ms まで広げた。クラスタリング手法には X-means 法を用いた。X-means 法は再帰的に 2-means クラスタリングを実行することでクラスタリングを行うデータに応じたクラスタ数を算出することが可能である [Pelleg 2000]。X-means 法では、クラスタの再帰的分割はベイズ情報量規準 (BIC) を用いられる。また、K-means クラスタリングの初期値依存の問題を引き継いでいるため、本研究では前処理として KKZ 法を適用した [He 2004]。

3. 実験結果・考察

神経電気活動から SPC によって生成した 64 次元の 0-1 特徴ベクトルにおいて、各 5 ms 時間窓幅で 64 電極からの発火数を合計し、その 1 次元データに対して X-means 法を用いることでネットワークにおける発火数の分布をクラスタリングした。この時、発火数を合計する際の時間窓幅を 10 ms, 20 ms と延ばしていき、100 ms まで延長し出力するクラスタ数の推移を観察した (Fig. 1)。時間窓幅の延長とともに出力されたクラスタ数は増加していき、30-40 ms 付近で最大となった後、減少に転ずる傾向がみられた (Fig. 2)。クラスタ数が最大となった時間窓では、ネットワークが表象する出力パターンの種類が最も多くなると考えられる。

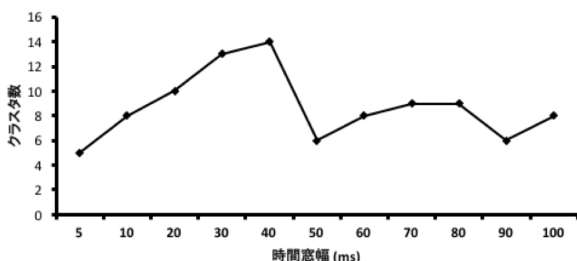


Fig. 1: クラスタ数の推移の一例 (E18DIV31)。

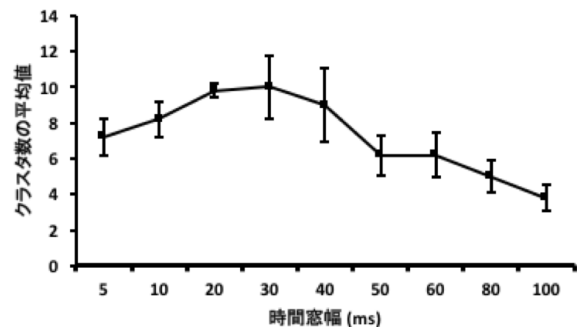


Fig. 2: 平均クラスタ数の推移, N=5, エラーバーは標準誤差。

4. 結論

ラット海馬分散培養神経回路網において、自発性神経電気活動から作成した”0-1”の特徴ベクトルを解析した。神経活動の総発火数をネットワークの出力と考えた時、5 ms の時間窓幅で生成していた特徴ベクトルよりも、約 30-40 ms の時間窓幅による解析において最も多くのクラスタ数が観察された。この時間窓幅で多くの情報が表現されることが示唆され、活動のパターンレパートリーを再現良く分類している可能性が示唆された。

参考文献

- [Kandel 2012] E. Kandel, J. Schwartz, T. Jessell, S. Siegelbaum, A. Hudspeth: "Principles of Neural Science, Fifth Edition.", McGraw-Hill Professional, 2012.
- [Kudoh 2009] S. N. Kudoh, A. Kiyohara, T. Taguchi: "The Heterogeneous Distribution of Functional Synaptic Connection in Rat Hippocampal Dissociated Cultures", Electronics and Communications in Japan, vol. 92, no. 6, pp. 41-49, 2009.
- [Tsodyks 1999] M. Tsodyks, T. Kenet, A. Grinvald, A. Arieli: "Linking Spontaneous Activity of Single Cortical Neurons and the Underlying Functional Architecture", Science, vol. 286, no. 5446, pp. 1943-1946, 1999.
- [Pelleg 2000] D. Pelleg, A. Moore: "X-means: Extending K-means with Efficient Estimation of the Number of Clusters", In Proceedings of the 17th International Conf. on Machine Learning, ICML-2000, pp. 727-734, 2000.
- [He 2004] J. He, M. Lan, C. L. Tan, S. Y. Sung, H. B. Low: "Initialization of cluster refinement algorithms: a review and comparative study.", Neural Networks, pp. 297-302, 2004.