

図1 システムの構成

Fig. 1. construction of the system  
Signals measured in sciatic nerves in a rat are used to estimate movement of legs, and a device is controlled according to a result of estimation.

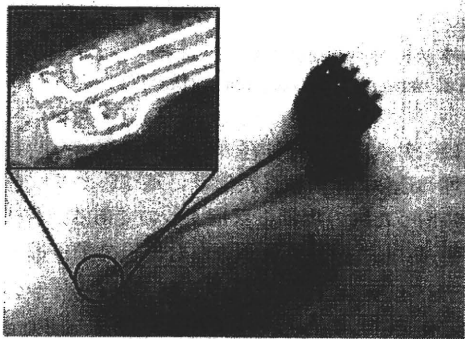


図2 使用したパリレン電極

Fig. 2. electrode used to measure signals  
Four squares at upper left of this picture are exposed parts of gold, and used to measure signal.

〈2.1〉 神経信号計測 信号計測では、図2に示すようなパリレン柔軟電極を用いた。電極のインピーダンスを下げておくことにより神経内に生じる微弱な電位をより広範囲まで計測できると考えられるので、電極は埋め込み前に白金黒メッキを施すことにより、インピーダンスを3 MΩ程度から80~400 kΩまで低下させて使用している。電極の信号計測に用いられる金の露出部は一辺100 μmの正方形となっていて、1つの電極は4チャンネルを有する。

電極の埋め込み部位については、脚を支配する神経のうち直径1 mm と他の神経に比べ太い坐骨神経とした。電極は両後肢の坐骨神経計2箇所埋め込んだ。埋め込みは、坐骨神経表面に電極を貼り付け、手術用糸等で縛る形で固定を行った。埋め込みはイソフルランガスを用い

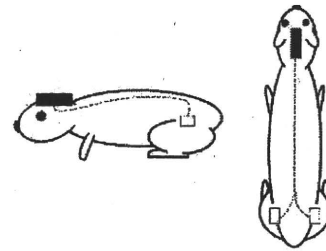


図3 ラット内部の配線の様子を模式的に表した図 (黒い部分がコネクタ, 青点線が体内の配線, 黄色い部分が電極)

Fig. 3. a picture of wiring in a rat  
(black box:connector, dot line:wiring in a rat, small box:electrode)

た麻酔下において、東京大学動物実験委員会の定めるガイドラインに準じて行われた。

坐骨神経に埋め込んだ電極から計測機器との接続を行う頭部のコネクタまでの配線の様子を図3に示す。

神経電極から得られた信号は、Multichannel Systems社の生体アンプFA-64Iによってフィルタリング(0.1 Hz~5 kHz)および5000倍に増幅し、25 kHzのサンプリングレートでコンピュータに取り込んだ。

〈2.2〉 足の動作推定アルゴリズム 本研究では以下で述べるアルゴリズムを使用した。

計測信号のうち、 $t \in N$  (自然数) 番目にラットの右後肢側から計測される信号を  $sr_{ch}[t]$ , 左後肢側から計測される信号を  $sl_{ch}[t]$  とする。ここで左右どちらも4チャンネルずつなので、 $ch = 1 \sim 4$  となっている。以下にアルゴリズムの流れを示す。

- (1)  $t$  番目のデータにおける指標  $sum[t] = \sum_i sr_i^2 - sl_i^2$  を計算
- (2) 直前0.1秒のデータ(2500データ)から  $total_{abs} = \sum_k^{2500} |sum[t-k]|$  を計算
- (3)  $total_{abs} > threshold$  であれば歩行していると推定し、4に進む
- (4) 左右の坐骨神経由来の信号のトータルパワーの大きい方の足を動作していると推定

〈2.3〉 使用デバイス 今回使用したデバイスは川淵機械技術研究所製の、全長18 cm、幅16 cm、高さ9 cm程の4足を有するものである。(図4) デバイスの中央下部の空間に覚醒状態の成獣ラット1匹を搭載できる構造となっている。

4足のうち、2足がモータ制御できるもので、残り2足は自由回転する車輪が付いている。モータ制御可能な足

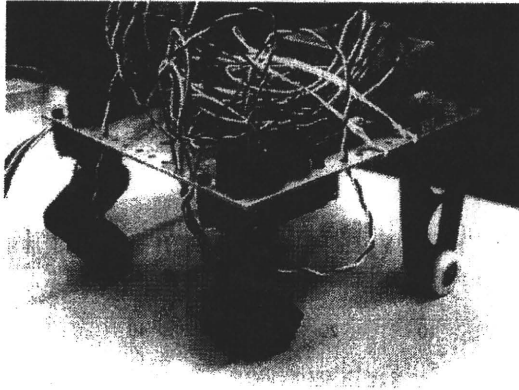


図4 今回使用したデバイス

Fig. 4. a picture of a device  
The device has four legs, two of these have three joints controlled by motor, the others have a roller which rotates freely.

は、肩、肘、手首に対応する3関節をモータによって角度制御できる。

(2・4) 制御方法 推定アルゴリズムの結果に応じて、動作していると推定された足を後ろに掻くように後ろに動かす。動作していると推定された状態から動作していないと推定された状態に移った場合は、対応する足を浮かせて前に戻すという制御を行った。

### 3. 性能評価実験

性能評価実験として、実測値でのラットの歩行速度と、計測された信号を用いて、前述のアルゴリズムによって推定された足の動作の有無についてとの比較を行う。

埋め込み日数が推定結果にどのような影響を与えるかという観点から、異なる埋め込み後経過日数についての同様のグラフを図6~図9に示す。

(3・1) 使用データ 計測は二匹のラットに対して行った。以後区別する意味でラットA、ラットBと表現する。

ラットAについては、埋め込み後1日目、5日目、10日目の3種類のデータを実験に使用し、ラットBについては埋め込み後1日目のデータを使用した。

(3・2) ラットの歩行速度の計測 ラットの位置情報については、ラットに赤と青の2色のマーカーのついたジャケットを着せ、上からカメラによりマーカー位置を検出する。ラットは60 cm × 100 cmほどのフィールド中を自由に行動させ(図5)、自由行動中の位置情報を取得する。位置情報の取得にはKEYENCE画像処理装置CV-5700を用いて1秒あたり10フレーム程度で画像取得を行う。赤と青のマーカー位置の中心をラットの

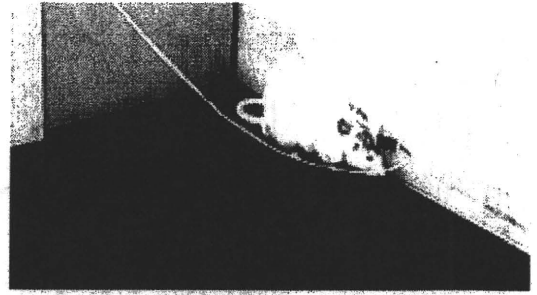


図5 自由行動下での歩行速度の計測の様子  
Fig. 5. a picture of measuring locomotion

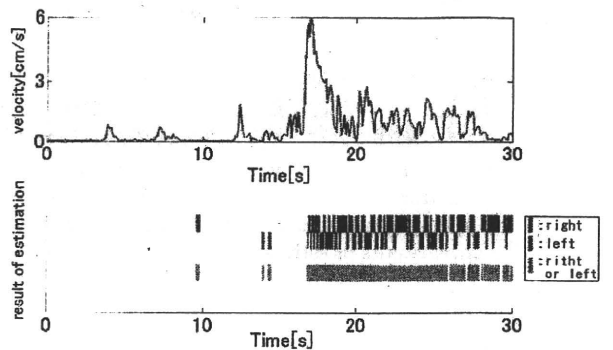


図6 ラットA、埋め込み後1日目(上:実際の歩行速度, 下:推定結果(上から右足の動作の有無, 左足の動作の有無, どちらかの足の動作の有無))

Fig. 6. ratA, 1 day after a implantation of electrodes

Upper graph shows velocity of a rat. Lower graph shows results of estimation; upper two lines show whether right/left leg moves or not, lower line shows whether (right or left) legs move or not.

位置として、ラットの位置の時間変化をラットの歩行速度として算出した。

(3・3) デバイスの制御 計測された信号を用いて得られた足の動作推定結果に応じてデバイスの動作を行う。

### 4. 結果

埋め込み翌日に計測した歩行速度と、足の動作の有無についての推定結果をプロットしたものをラットA、Bについてそれぞれ図6、図7に示す。両グラフについて、歩行速度が速い区間において、足が動いているという推定をしていることがわかる。左右の足の動きの推定を個別に見ると、交互に足を動かしているという推定結果が出ていることがわかる。

埋め込み後日数が経過した、埋め込み後5日目と10日目のデータについて同様のプロットをラットAのみに

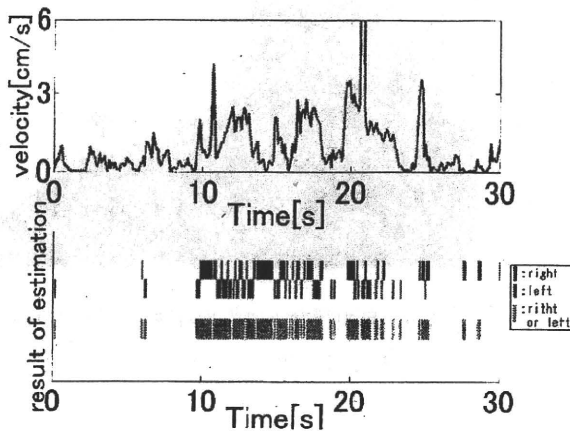


図7 ラット B, 埋め込み後1日目 (上:実際の歩行速度, 下:推定結果 (上から右足の動作の有無, 左足の動作の有無, どちらかの足の動作の有無))  
 Fig.7. ratB, 1 day after a implantation of eletrodes  
 Upper graph shows velocity of a rat. Lower graph shows results of estimation

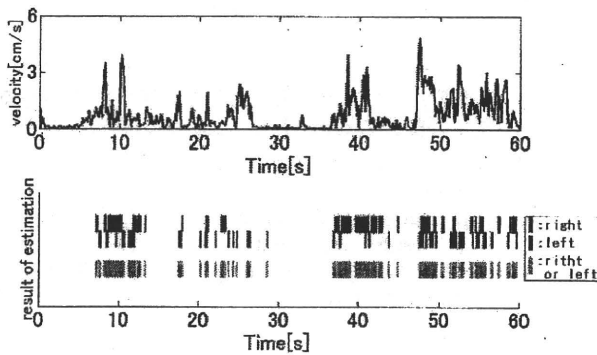


図8 ラット A, 埋め込み後5日目 (上:実際の歩行速度, 下:推定結果 (上から右足の動作の有無, 左足の動作の有無, どちらかの足の動作の有無))  
 Fig.8. ratA, 5 days after a implantation of eletrodes  
 Upper graph shows velocity of a rat. Lower graph shows results of estimation

ついて, 図8, 図9に示す。埋め込み後10日目のデータでは, 1日目のデータのような左右交互に足の動作が出るパターンが確認されない。推定アルゴリズムは同じものを用いていることから, 計測信号が変化していると考えられる。

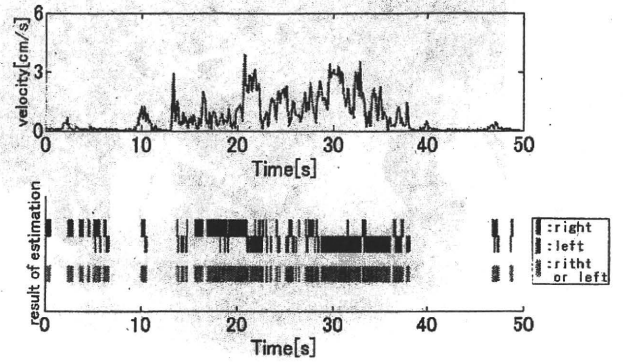


図9 ラット A, 埋め込み後10日目 (上:実際の歩行速度, 下:推定結果 (上から右足の動作の有無, 左足の動作の有無, どちらかの足の動作の有無))  
 Fig.9. ratA, 10 days after a implantation of eletrodes  
 Upper graph shows velocity of a rat. Lower graph shows results of estimation

〈4・1〉 デバイスの制御 推定結果を用いてデバイスの制御を行ったところ, デバイスの足の動作により, 地面を搔くように進むことが確認された。

## 5. 考 察

結果のグラフから歩行速度が比較的大きい時に, 交互に左右の足が動作している推定となっていることわかる。このことから, 左右の足の動作推定によって歩行の状態が再現できるような推定が得られていることがわかる。しかしながら, 左右交互に出る間隔の長さについては, 今回の実験系では, 左右の足を計測中にどのように動かしているかまでは観察できないため, 整合が取れているか検証できない。そのため, 検証を行う為には新たな実験系の構築が望まれる。

また結果でも述べたように, 埋め込み後日数が経過することにより, 計測信号に変化が起こっていると考えられる。これは, 埋め込んだ電極が計測する範囲が神経表面から別の部位に変わってしまったことが考えられる。検証のため, 埋め込みを行った後にコネクタの破損等により計測ができなくなったラットを解剖し確認したところ, 電極のまわりに肉芽ができていた様子が確認された。つまり, 肉芽の形成の際に電極が神経表面から離れてしまったものと考えられる。

以下では、本システムを構成することにより見られた要素技術についての改善点についての検討を行う。

#### (5.1) 神経信号計測

(5.1.1) 電極の種類、構造 上記のように、電極埋め込み後に肉芽が形成されることが確認された。このことから、安定した神経信号の計測を行うためには、肉芽の形成において神経表面から離れない電極の設置方法が望まれる。今回は電極埋め込み時に電極を神経表面に貼り付け、手術用糸等で固定したが、電極自体に固定しやすいような構造を持たせることによっても改善できると考えられる。

例えば、電極を神経束に巻きつけるような形状にしておくことなどが考えられる。埋め込みの際に神経表面に貼り付けるのではなく、神経を縛るような形で電極を巻きつける形状にしておくことにより、現在の方法よりも安定的に計測を続けることができる可能性がある。

また、神経再生型電極と呼ばれる電極の使用も考えられる。神経再生型電極とは、末梢神経の軸索が切断されると、中枢側より再生することを利用して電極孔を通して再生した軸索に対して信号入出力を行う電極である<sup>(9)</sup>。この電極では、電極孔内に神経が再生されれば、継続的に安定して電位の計測が行えると考えられる。

(5.1.2) 電極のチャンネル数 今回の使用電極では、コネクタ付けが必要であり、大きさの観点から、4チャンネルを有する電極を左右それぞれの坐骨神経に埋め込んだ。今回のような足が動作しているかどうかという比較的簡単な推定においては計8チャンネルの信号でも推定は可能であると考えられるが、より高度な推定を考えると、多くのチャンネル数が必要になると考えられる。

しかしながら、今回の電極のように、コネクタの大きさが埋め込みに際して大きさの上でボトルネックになっていることを考えると、慢性的な計測の埋め込みに特化した電極の開発が望まれる。具体的には、フレキシブルプリント基板等によって、コネクタと電極部を纏めた形の電極を作っておくことが考えられる。

(5.1.3) 電極からの配線 図3にも示したように、計測機器と接続するためのコネクタは頭部に設置し、電極からコネクタまでの配線は皮下を通す形で行った。このようにしたのは、ラットの体が非常に柔軟で、体外の異物を齧る習性を持ち、コネクタが齧られないようにする必要があったためである。そのため、コネクタまでの配線も皮下で行ったが、このような配線によってノイズが増えるというデメリットがある。そのため、配線の方法についても今後安定して計測が可能なノイズが乗りにくいものが望まれる。

(5.2) 歩行状態推定アルゴリズム 今回推定対象として、足の動作の有無という2値の状態を選んだが、歩行速度や歩行の方向といったものを推定するアルゴリズムに変えることによって、ラットの歩行状態ではなく、ラットのいる位置まで模倣できるようなシステムが構築できると考えられる。これには、電極の改善によるチャンネル数の増加や、安定した計測とともに、アルゴリズムでは既存のスパイクソーティング手法を拡張したものや機械学習といったものを使うことが考えられる。

(5.3) 歩行模倣ロボット 今回使用したデバイスは、4足中2足をモータによって制御するものであるが、歩行状態を模倣するという目標に於いては十分な性能を有していた。今回行なったように歩行の有無といった簡単な動作だけでなく、関節角度といったものまで推定することが可能となれば、デバイス面ではそれを再現することができる。また、左右どちらに進んだかどうかなども推定することができれば、足の向く方向も今回のデバイスでは制御可能となっているので、高い拡張性を有している。

## 6. おわりに

本稿では、ラットを用いた末梢神経インタフェースとして開発した歩行模倣ロボットの紹介、実験による評価を行った。実測での歩行速度と足の動作推定の結果から、ラットの歩行を模倣できるシステムを実現した。また、今後の展望として安定した計測を実現するための電極構造や固定方法について、また、ラット歩行模倣ロボットの拡張性についての検討を行った。

## 謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(H20-ナノ-一般-003)および文部科学省科学研究費補助金(基盤研究(A) 課題番号 20246045)の補助を受けて行われた。

## 文 献

- (1) Paolo M. Rossini et al. : "Double nerve intraneural interface implant on a human amputee for robotic hand control", *Clinical Neurophysiology*, Vol. 121, Issue 5, pp. 777-783 (2010)
- (2) O. Fukayama, T. Suzuki, K. Mabuchi: "RatCar: A vehicular neuro-robotic platform for a rat with a sustaining structure of the rat body under the vehicle", *Proceedings of 32nd Annual International IEEE EMBS Conference*, pp. 4168-4171 (2010)
- (3) T. Suzuki et al. : "Flexible Regeneration-type Nerve Electrode with Integrated Microfluidic Channels", *Proceedings of 2006 International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology*, pp. 303-305 (2006)

# 神経信号の信号強度最大化に向けた 赤外線送信による電極位置の自動制御

柴本 浩児\* 深山 理  
鈴木 隆文 満洲 邦彦 (東京大学)

## Automatic electrode positioning system operated by infrared transmitter for maximizing the amplitude of neural signal

Koji Shibamoto\*, Osamu Fukayama,  
Takafumi Suzuki, Kunihiko Mabuchi, (The University of Tokyo)

In this paper, an automatic electrode positioning system has been developed to chronically record clear neural spikes. The system consisted of a positioning device to move a neural electrode implanted in the brain and a laptop computer to determine its movement. First, neural spikes were detected and their amplitudes were recorded. Then, an optimizing algorithm estimated a desirable direction and a displacement to move the electrodes maximizing the recorded amplitudes. Finally, the direction and the displacement was sent to the positioning device with infrared (IR) pulse commands. Experimental results on anesthetized rats showed that our system kept electrodes in a position to record clear neural spikes continuously.

キーワード: プレイン・マシン・インターフェース, 神経信号, 細胞外計測, 超音波モータ, 微小位置決め, 赤外線

(Keywords, brain-machine interface, neural signal, extracellular recording, piezoelectric actuator, micropositioning, IR)

### 1. はじめに

機械と人間の脳を直接つなぎ、相互作用を行うシステムをブレイン・マシン・インターフェース(BMI)という[1]。このようなシステムが実現すれば、自分の手足のように自由自在に操作できる義手や義足、あるいは身体の拡張などへの応用が期待できる。BMIでの信号計測においては、自由に行動する動物からできるだけ信号強度の高い神経信号を多極から長期間計測することが望ましい。BMIの構築には電極を脳内に刺入し、計測することが重要であるが、実際には刺入した電極から神経信号を長期間にわたって得ることは困難である。その原因は電極と細胞の相対的な位置のずれなどが主な原因であり、これを補正する手段の一つとして電極を微小に移動させる機構(電極ドライブ)も提案されている[2-4]。このような電極ドライブを用いることで神経信号の強度が大きくなるように電極位置を調節することができるが、それを自動的に移動させ続けることで、神経信号の長期間計測が実現できると考えられる(図1)。

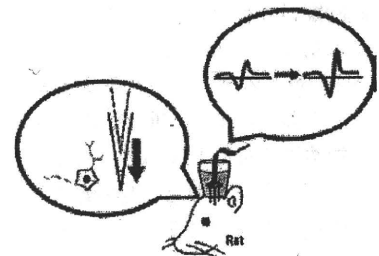


図1 電極が位置ずれを起こし細胞との距離が離れると信号強度が下がり計測が難しくなる。電極を細胞の近傍に自動的に移動させることで、強度の高い信号の計測が長期間行える。

Fig. 1. When an inserted electrode becomes misaligned, the amplitude of neural signal becomes weaker. By positioning the electrode nearby the neuron automatically, long term neural recording can be done.

次に、自由に行動する動物での計測を実現する上では、対象動物から伸びている電源線や信号線がその障害の一つ

で、対象動物の行動を阻害したり、また対象動物によって断線させられたりすることもある。このような問題を解決するために、本研究では電極ドライブから伸びる伝送線を無線化によって排除する。以上の2点を考慮し、本研究では、まず電源部と電極駆動命令部を無線化した電極ドライブを開発した。またそれに合わせて、神経信号が長期間計測できるような電極の移動アルゴリズムを提案した。

## 2. 電極埋め込み深さに応じたスパイク振幅変化

電極針と神経細胞の相対的な位置関係による神経信号の振幅特性をを急性実験により調べる。

実験には、FHC社のタングステン微小針電極(直径125 $\mu\text{m}$ 、インピーダンス2.5~5.0M $\Omega$  @1kHz)を使用した。針電極の刺入対象はラット大脳における海馬で、刺入位置はBregmaからlateral方向に2mm、posterior方向に2.85mmとした。実験結果が図2で、特定の深さに対して振幅が大きくなり、細胞に最も近接したことが示唆された。

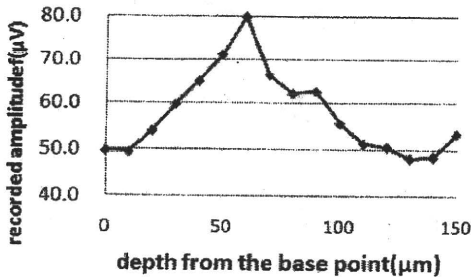


図2 深度を変化させた時のスパイク平均振幅

Fig. 2. The relation of average spike amplitude on electrode depth form the base point.

## 3. 無線制御型電極ドライブの開発

本研究で開発するドライブの要求仕様は、4mm以上の可動範囲、5 $\mu\text{m}$ 程度の移動幅を持ちながら、単純で将来的に多極化が容易な構造であることである。さらにそれに加え、小型軽量であることが求められる。そのような要求仕様に基づき製作したドライブは赤外線受光、超音波リニアアクチュエータ駆動の機能を備える。分解も容易で、アクチュエータ部分と回路を外して筐体部分を交換すれば再使用が可能である。ドライブの大きさは、38 × 22 × 41 mmに収まる大きさで、重量は19.5gであった(図3参照)。

電極ドライブのブロック図を図4に示す。まず、電極で計測した信号はPCに取り込まれ、信号強度が計算された。その計算結果を基に命令を無線送信し、ドライブでこれを受信した。受信した命令はドライブ内の処理回路により解釈され、それに従いアクチュエータを駆動させる信号を送信した。駆動回路によりアクチュエータが駆動するとそれに連動する形で電極も移動し、これにより計測位置が変化する。以上の操作を繰り返し、得られるスパイクの強度を最大化した。



図3 制作した無線制御型電極ドライブは赤外線受光モジュール、バッテリー、超音波モータ駆動回路、超音波モータから構成される

Fig. 3. Wireless-controlled electrode drive is made up of IR receiving module, battery and piezoelectric actuator.

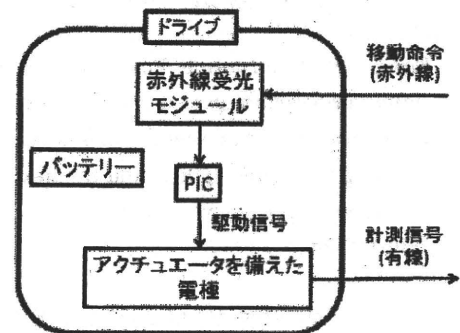


図4 電極ドライブの機能ブロック図

Fig. 4. Functional block of the electrode drive.

## 4. 電極の移動方法

電極の移動に当たり、計測状態の良好さを表わす指標  $J$  を式1のように定義する。そして、それを最大化させるように電極を移動させる。そのための目的関数  $J$  (単位:  $\mu\text{V}$ ) を以下のように定義した。

$$J = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \min (s_{\text{mean}}(i)) \dots \dots \dots (1)$$

ここで  $\min (s_{\text{mean}}(i))$  とは得られた信号の中の  $i$  種類目の神経細胞の平均スパイク波形を表わす。すなわち、 $J$  は電極周囲の複数の神経細胞の信号強度が大きくなる位置に移動するための指標と言える。

$J$  の計算のためには、まず一定時間のデータを取得し、その中からスパイク候補を検出・弁別した。次に、弁別されたスパイクごとに平均振幅を計算することで  $J$  を求めた。

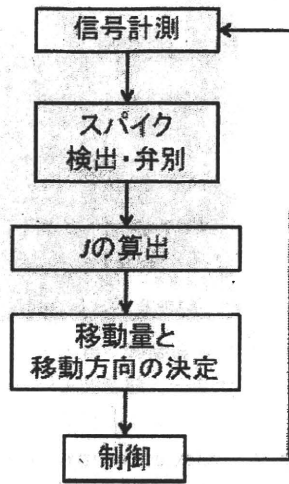


図5 システムのルーチン。まず一定時間の信号を計測し、その中からスパイク候補を検出・弁別した。次に、 $J$ を求め、その結果を基に移動量と移動方向を決定し、電極を移動させる。

Fig. 5. System routine. Firstly, record the signal for a certain period of time. Next, detect the neural spike and sort them.  $J$  is calculated by using the sorted spikes, and the next electrode displacement and direction is determined.

神経スパイクの自動検出は Chan による Max-min spread 法 [5] を、神経スパイクの弁別には Harris による KlustaKwik を用いた。移動方向の決定に関しては、まず、初期位置から前後  $50 \mu\text{m}$  と前後  $100 \mu\text{m}$  の位置で  $5.0 \text{ s}$  の計測を行い、それぞれの場所で  $J$  を求める。次に、その  $J$  が最も高い位置に電極を移動する。その後は、基本的に前回の  $J$  と比較して大きくなる方向に移動を繰り返した。

移動方向の決定に関する詳細を述べる。まず、初期位置から前後  $50 \mu\text{m}$  と前後  $100 \mu\text{m}$  の位置で  $5.0 \text{ s}$  の計測を行い、それぞれの場所で  $J$  を求める。次に、その  $J$  が最も高い位置に電極を移動する。初期位置からの前後の移動によっておおよその近い位置に移動できた後は、その付近で最も  $J$  が大きくなる位置を前回計測の方向から決定する。前回計測による  $J$  を  $J_{\text{old}}$ 、今回計測による  $J$  を  $J_{\text{now}}$  とすると、 $J_{\text{old}} \geq J_{\text{now}}$  となった場合、電極をさらに進める。逆に  $J_{\text{old}} < J_{\text{now}}$  であった場合、電極を前回位置に戻す。ただし例外的に、局所解回避のためにある一定の確率で  $J_{\text{old}} \leq J_{\text{now}}$  となった場合電極を元に戻し、 $J_{\text{old}} > J_{\text{now}}$  であった場合に電極をさらに進める。すなわち焼きなまし法を適用する。その確率の値は  $0.2$  とした。

移動量に関しては探索を始めてから最初の  $15$  回は  $10 \mu\text{m}$  で移動し、それ以降は  $5 \mu\text{m}$  で移動させた。

## 5. シミュレーションでの電極移動実験

### 〈5.1〉実験準備

計算機シミュレーションにより前節で述べたアルゴリズムの妥当性を検討した。電極付近の神経細胞を2個と設定しそれぞれの深さを  $4450 \mu\text{m}$ 、 $4500 \mu\text{m}$ 、電極刺入軸との距離を  $50 \mu\text{m}$ 、 $60 \mu\text{m}$  とした(図6)。実験に用いるデータ列は、まずラット海馬から得られた神経スパイクを2種類取得し、それぞれ  $15 \text{ Hz}$ 、 $25 \text{ Hz}$  の頻度で距離の二乗に反比例した振幅で発火させた。神経信号の発生過程はポアソン過程に従うとした。

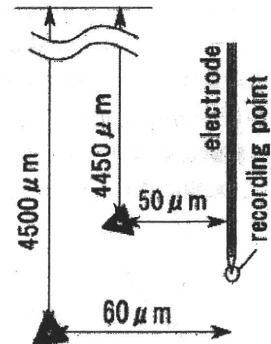


図6 シミュレーションで設定した電極と神経細胞の配置

Fig. 6. The position of electrode and neuronal cell in the simulation.

### 〈6.2〉実験結果

深さ  $4300 \mu\text{m}$  を初期位置として探索を開始したところ、その推移は図7、8、9のようになった。図7より初期位置から  $100 \mu\text{m}$  移動した時に  $J$  が最大となったので、以降の探索は以降の探索は  $4400 \mu\text{m}$  から開始した。

図8は電極位置の推移で、図9は  $J$  の推移の結果である。二つのグラフより、およそ  $35$  回程度の移動で電極は  $J$  が最大になる点付近に移動できており、以降はその近傍を維持できていることがわかる。

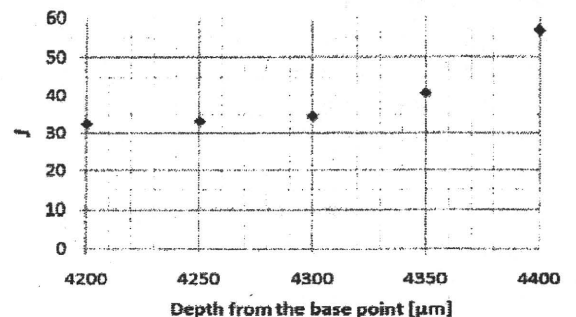


図7  $\pm 50 \mu\text{m}$ 、 $\pm 100 \mu\text{m}$  での  $J$ 。  $4400 \mu\text{m}$  にて  $J$  が最大となったため、以降の探索は  $4400 \mu\text{m}$  から開始した。

Fig. 7.  $J$  at  $\pm 50 \mu\text{m}$ ,  $\pm 100 \mu\text{m}$ .  $J$  is maximized at  $4400 \mu\text{m}$ , and subsequent searching is started from  $4400 \mu\text{m}$ .

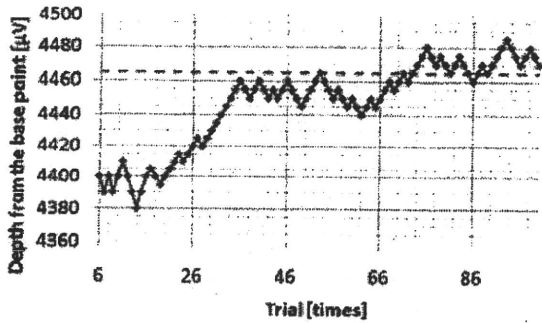


図8 電極位置の推移。およそ35回程度の移動で電極は $J$ が最大になる点付近に移動し、以降はその近傍を維持した。実線は電極の位置、点線は $J$ が最大となる位置を示す。

Fig. 8. The shift of electrode position. The electrode moves to the neighborhood of maximum  $J$  in about 35 trials, and it kept the position. Solid line is represents the electrode position, and broken line represents the maximum  $J$ .

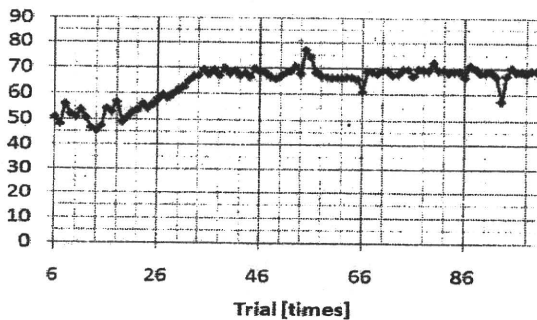


図9  $J$ の推移。 $J$ についても35回程度の移動後はほぼ一定の値を取れていることが確認できた。

Fig. 9. The shift of  $J$  after the 35 time moving,  $J$  is saturated.

## 6. 麻酔下ラットでの電極移動実験

### 〈6・1〉実験準備

開発したドライブを用いて、麻酔下ラットの海馬神経細胞に対し急性実験を行う。開頭した麻酔下のラットに電極ドライブを配置し、信号を計測する。計測した信号は生体アンプ MEG-6116(日本光電)により 300~5000Hz のバンドパスフィルタと 5000 倍の増幅がかけられる。その後 USB-6009(National Instruments)にて A/D 変換がなされ、PC に取り込む。A/D 変換におけるサンプリングレートは 20 kHz とした。比較的一定の発火頻度を持つ神経細胞に対し、細胞近傍から電極をおよそ 100  $\mu\text{m}$  程度遠ざけた場所から計測を開始した。

### 〈6・2〉実験結果

最初の $\pm 50 \mu\text{m}$ 、 $\pm 100 \mu\text{m}$ の移動では、 $-100 \mu\text{m}$ の点で

$J$ が最大となった(図10)。この時の $J$ は $3.1 \mu\text{V}$ であった。以降、 $-100 \mu\text{m}$ から $10 \mu\text{m}$ ずつの探索を行ったところ、およそ12回目以降から移動方向が一定の傾向を示さなくなった。ここで、移動による $J$ の推移を観察すると、10回目までは $J$ が増大を続け、最大で $3.5 \mu\text{V}$ となっている。しかし、12回目の移動後、 $J$ が急落しており、その後 $J = 2.0 \mu\text{V}$ 程度で停滞していることがわかった(図11参照)。

### 〈6・3〉考察

はじめの $\pm 50 \mu\text{m}$ 、 $\pm 100 \mu\text{m}$ での計測は、実際の神経細胞に対してもおおよそうまくいくことが確認された。また、それ以降の探索行動に関しても、一時的な $J$ の向上が確認された。本研究では作為的に電極と細胞の位置をずらしてから探索を開始させたが、実際の慢性計測において何らかの原因により電極がずれてしまったとしても、本研究で提案した手法を用いることによって再び細胞の近傍に向かうことができるということが示されたと言える。

しかし、ある程度移動したところで、 $J$ は次第に下がっていった。取得スパイク数の推移を見ても、時間の経過により取得スパイク数が減少していることが確認でき、これはシミュレーションでは見られなかった現象であるが、12回目の移動後以降に $J$ が急落した原因は、対象としていた神経細胞が神経発火を止めてしまったためと考えられる。神経は常に神経信号を発しているとは限らず、今回の場合のように発火しなくなる時期も多く存在する。従って、今後は発火の有無を考慮した移動アルゴリズムの追加や、電極ドライブの改良などが求められる。具体的には、まずドライブの電極を増加(多極化)し、それらを同じ視野に刺入する。そして他の電極と比べて神経信号が取得できない期間の長い電極があった場合に、その電極を積極的に移動させるなどといった移動方法が有効であると考えられる。

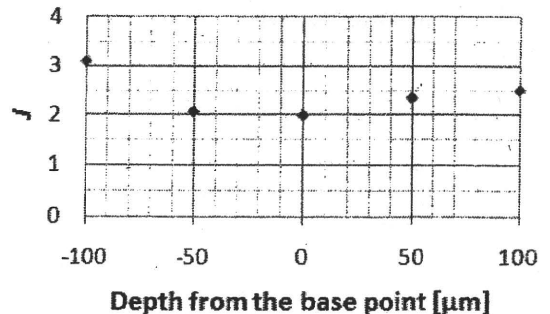


図10  $\pm 50 \mu\text{m}$ 、 $\pm 100 \mu\text{m}$ での $J$ 。 $-100 \mu\text{m}$ にて $J$ が最大となったため、以降の探索は $-100 \mu\text{m}$ から開始した。

Fig. 10.  $J$  at  $\pm 50 \mu\text{m}$ 、 $\pm 100 \mu\text{m}$ .  $J$  is maximized at  $-100 \mu\text{m}$ , and subsequent searching is started from  $-100 \mu\text{m}$ .



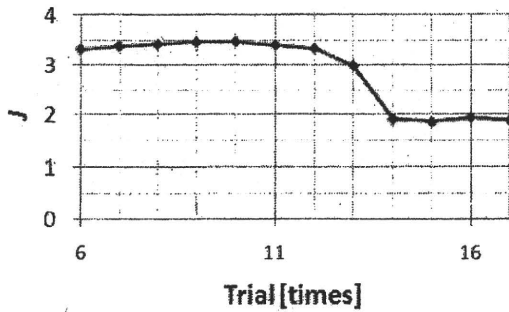


図 11 J の推移。10 回目の移動までは J が増大し続け、最大で 3.5  $\mu\text{V}$  となった。しかし、12 回目の移動後 J が急落しており、その後 J は 2.0  $\mu\text{V}$  程度で停滞している。

Fig. 11. The shift of J. Although J increases by 10th trial, J falls at 12th trial. After that, J is in stasis on about 2.0  $\mu\text{V}$ .

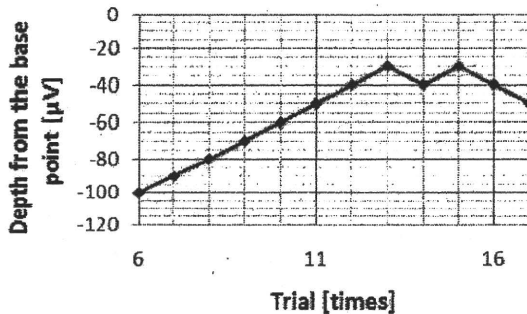


図 12 電極位置の推移。-100  $\mu\text{m}$  から 10  $\mu\text{m}$  ずつの探索を行ったところ、およそ 12 回目以降から移動方向が一定の傾向を示さなくなった。

Fig. 12. The shift of electrode position. Searching is started from -100  $\mu\text{m}$  by 10  $\mu\text{m}$ , and the moving direction didn't show a consistent trend after 12th trial.

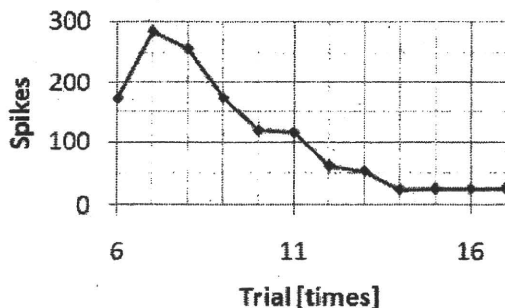


図 13 取得スパイク数。移動の度に取得するスパイクの数が減少している。

Fig. 13. Detected spikes. Number of detected spikes decrease according to the number of trial.

## 7. おわりに

本研究では、自由行動下での神経信号の慢性計測に向けて、計測者側が無線で電極を自動制御し、神経信号の強度が大きい位置に移動させるシステムを提案した。

まず、はじめに赤外線を介した命令により駆動する電極ドライブを開発し、その電極ドライブの電極移動のためのアルゴリズムを提案した。このアルゴリズムの有効性に関しては人工データを用いて確認を行った。

最後に、開発した電極ドライブを用いて、麻酔下ラットの海馬付近の神経細胞に対し電極移動実験を行った。最も神経信号が得られる位置からおよそ 100  $\mu\text{m}$  程度ずらしたところから開始したところ、一時的に神経信号の強度を極大化させることに成功した。

## 8. 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金（基盤研究 (A) 20246045、基盤研究 (B) 22300184）および厚生労働省科学研究費補助金 (H20 - ナノ - 一般 - 003) の補助を受けて行われた。

## 文 献

- (1) 櫻井芳雄, 八木透, 小池康晴, 鈴木隆文: “ブレイン・マシン・インターフェース最前線”, 工業調査会, 2007.
- (2) H. Kaneko, T. Hiroshi S. Shinya: “Tracking of spike amplitudes for precise sorting of multiple single unit activities” Proceedings of the Symposium on Biological and Physiological Engineering, Vol. 18, pp. 173-176, 2003.
- (3) M. T. Wolf: “A Robotic Neural Interface for Autonomous Positioning of Extracellular Recording Electrodes”, The International journal of robotics research, Vol. 28, No. 9, pp. 1240, 2009.
- (4) T. Sato, T. Suzuki, and K. Mabuchi: “A new multi-electrode array design for chronic neural recording, with independent and automatic hydraulic positioning” Journal of neuroscience methods, Vol. 160, No. 1, pp. 45-51, 2007.
- (5) H. L. Chan: “Detection of neuronal spikes using an adaptive threshold based on the max-min spread sorting method”, Journal of neuroscience methods, Vol. 172, No. 1, pp. 112, 2008.

## 表面筋電信号ヒストグラムによる複数指関節角度推定 —ベイジアンフィルタによる動作指識別を用いた手法—

### Finger Joint Angle Estimation Method Using Histogram of Surface EMG Signals -A Method Using Active Finger Recognition by Bayesian Filter-

荒木 望<sup>1</sup>, 帆足 勇希<sup>1</sup>, 小西 康夫<sup>1</sup>, 満洲 邦彦<sup>2</sup>, 石垣 博行<sup>1</sup>

Nozomu ARAKI<sup>1</sup>, Yuki HOASHI<sup>1</sup>, Yasuo KONISHI<sup>1</sup>, Kunihiko MABUCHI<sup>2</sup>, Hiroyuki ISHIGAKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 兵庫県立大学, <sup>2</sup> 東京大学  
<sup>1</sup> University of Hyogo, <sup>2</sup> University of Tokyo

**Abstract** In this study, we proposed a finger joint angle estimation method based on surface electromyography (EMG) signals and their source recognition. We have previously proposed a finger joint angle estimation method based on measured surface EMG signals and a linear model. However, there were some problems with that method. When we estimate 2 or more finger angles by this method simultaneously, the estimation angle of the inactive fingers is not accurate. This is caused by interference of surface EMG signals. To solve this problem, we added the source recognition of surface EMG signals by a Bayesian filter to our angle estimation method. To confirm the effectiveness of our proposed method, we carried out joint angle estimation experiments. In addition, we also carried out a myoelectric hand experiment using actual robot hand system. In this experiment, the finger joint angles were estimated from surface EMG signals in real time using our proposed method.

#### 1. はじめに

筋電信号から手指の関節角度や動きを推定する手法は、筋電義手の性能向上に欠かせない要素のひとつである。このためこの分野では、手指の形状と筋電信号の関係を学習させるパターン分類を用いた手法[1]や、手指の関節を直接推定する手法[2]など、多くの研究がなされている。

本研究では義手使用者の望む動きを flexible に再現できる自由度の高い筋電義手を実現する手法として、皮膚表面で測定した表面筋電信号から線形モデルを用いて指関節角度を直接推定する手法の検討を行っている。著者らはこれまでに、測定した表面筋電信号のピーク値の分布であるヒストグラムを算出し、得られたヒストグラムと指関節角度の関係を線形モデルとして推定する手法を既に提案しており[3]、その結果では指1本分の角度推定を行う場合には良好な結果が得られている。しかしながら、同手法により複数の指関節角度を同時に推定する場合には、動作していない指の推定結果に大きな誤差を生じることが示されている。これは、ひとつの筋の活動による表面筋電信号が、その他の筋の活動を測定するための筋電信号に重畳することが原因と考えられる。

この問題を解決するために、本稿では表面筋電信号のヒストグラムと線形モデルを用いた指関節角度推定手法に、ベイジアンフィルタによる識別手法を加えた新たな手法を提案する。提案手法では、得られた筋電信号の変化がどの指の動作に起因するものかを、確率情報を利用したパターン分類法のひとつであるベイジアンフィルタを用いて識別し、その識別結果を指関節角度の推定結果に反映させることにより、複数の指関節角度同時推定を実現する手法である。今回の実験では、提案手法による第1指から第5指までのMP関節、第1指IP関節および第2指から第5指のPIP関節の計10関節についての同時推定実験およびロボットハンドを用いた実機検証を試みたので報告を行う。

#### 2. 推定関節と表面電極の計測位置

ここでは、本研究で行う角度推定の推定関節位置と表面筋電信号の計測位置について簡単に述べる。

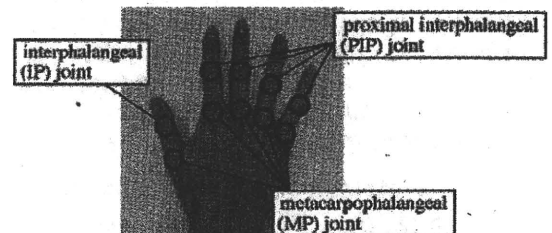


Fig.1 Finger joint positions estimated in this study.

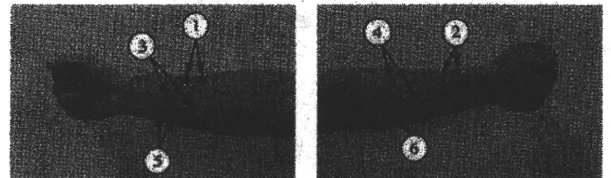


Fig.2 Electrode position for surface EMG signal measurement. (left: flexor muscle side, right: extensor muscle side)

はじめに、本研究で行う指関節角度推定の推定関節位置を Fig.1 に示す。推定する関節は第1指から第5指までのMP関節、第1指IP関節および第2指から第5指のPIP関節の計10関節であり、本研究ではこれらの関節角度を表面筋電信号から同時に推定する。また、指関節角度は伸筋と屈筋の張力のバランスにより決定されると考えられるため、表面筋電信号を計測する電極は、Fig.2 に示すように伸筋側、屈筋側それぞれ3箇所計6箇所計測することとした。Fig.2 の位置で計測した表面筋電信号については、①-②の信号を第1指の推定に、③-④の信号を第2、第3指の推定に、⑤-⑥の信号を第4、第5指の推定に用いることとした。また、これらの表面筋電信号のサンプリングは2500Hzで行った。

#### 3. 表面筋電信号のヒストグラムを用いた指関節角度推定法と問題点

ここでは、[3]で提案した表面筋電信号のヒストグラムを用いた指関節角度推定手法とその問題点について述べる。

Fig.3(a)は測定した表面筋電信号の一例である。本手法では表面筋電信号を振幅情報や周波数情報といったアナログ信

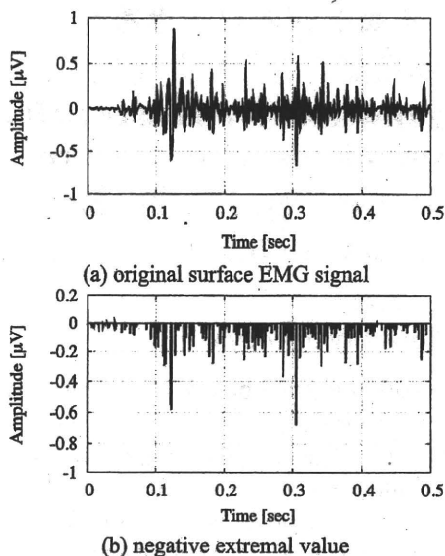


Fig.3 Sample of surface EMG signal and its negative extremal value signal.

号としての情報で扱うのではなく、パルス信号の集合とみなして扱うことが特徴である。このため、測定した表面筋電信号のうち Fig.3(b)に示す負のピーク値のみを取り出した信号を用いる。この信号は $-1\mu\text{V}$ から $0\text{V}$ の範囲で値をもつ。このピーク値のヒストグラムを算出するために、 $-1\mu\text{V}$ から $0\text{V}$ までを6つの領域に分割し、0.5秒分の取得データからそれぞれの領域での頻度 $X_1, \dots, X_6$ を算出する。

いま、時刻 $t$ において伸筋側の表面筋電から求めたヒストグラムを $\{X_1^f(t), \dots, X_6^f(t)\}$ 、屈筋側から求めたヒストグラムを $\{X_1^e(t), \dots, X_6^e(t)\}$ とする。指関節角度は伸筋と屈筋の張力のバランスにより決定されると考えられるため、ある指の関節角度 $\theta(t)$ はこれらのヒストグラムから、以下の式により与えられると仮定する。

$$\theta(t) = \theta_0 + \sum_{i=1}^6 a_i X_i^f(t) + \sum_{i=1}^6 b_i X_i^e(t) \quad (1)$$

ここで $a_i, b_i$ は伸筋および屈筋側の表面筋電信号ヒストグラムに対する重み係数であり、 $\theta_0$ はバイアス成分である。本研究における指関節角度の推定値 $\hat{\theta}(t)$ は、学習用に測定した指関節角度とこれに対応する表面筋電信号のヒストグラムを用いて最小時情報により得られたパラメータと、測定した表面筋電信号のヒストグラムから、式(1)を用いて計算される。

この表面筋電信号ヒストグラムを用いた指関節角度推定手法の性能および問題点を検証するために、第2指および第3指MP関節を対象とした角度推定実験を行った。本実験では、第2指のみを屈曲、伸展し、その他の指は動かさないものとした。Fig.4は式(1)により推定した指関節角度の推定値と、本実験の際にポテンショメータを搭載した自作のデータグローブを用いて同時に計測した指関節角度をプロットしたものである。このうち、Fig.4(a)は動作させている指である第2指の結果を示しており、Fig.4(b)は動作させていない第3指の結果を示したものである。Fig.4(a)より、動作させている指である第2指については推定値と計測値がよい一致を示していることが確認できる。しがしながら、Fig.4(b)の第3指の結果を見ると、計測値が $10\text{deg}$ 程度の変化とほぼ動作して

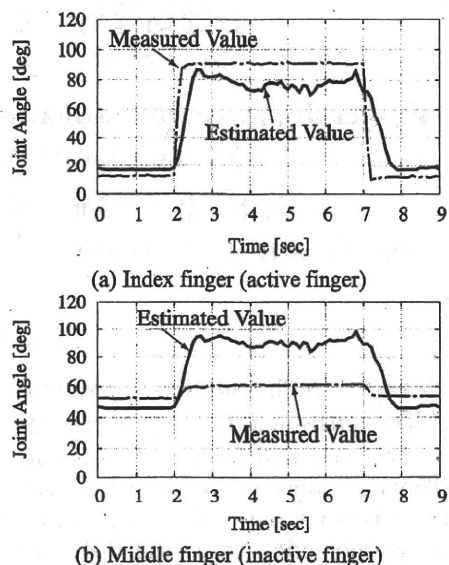


Fig.4 Estimation results of finger joint angle.

いないにもかかわらず、推定値は動作させている第2指と同様の変化を示し、大きな誤差が生じていることがわかる。これはひとつの筋の活動による表面筋電信号が、その他の筋の活動を測定するための筋電信号に重畳することが原因である。

このため本研究では、得られた筋電信号の変化がどの指の動作に起因するものかを識別する手法を提案し、筋電信号の重畳の問題を解決することを試みた。

#### 4. ベイジアンフィルタによる動作指識別

本研究では、筋電信号の変化からどの指が動作したのかを識別するために、確率情報を利用したパターン分類法のひとつであるベイジアンフィルタを用いる。ここでは、動作する指が異なると、表面筋電信号の周波数特性が変化することを利用して動作指の識別を行う提案手法について述べる。

##### 4.1 表面筋電信号の周波数特性データの処理

Fig.5(a)は、第1指曲げ動作を行った際の0.3秒間の表面筋電信号から計算した周波数特性の一例である。本研究では周波数特性により動作指識別を行うために、Fig.5(a)に示す $0\sim 500\text{Hz}$ までの正規化された周波数特性データを用いる。次

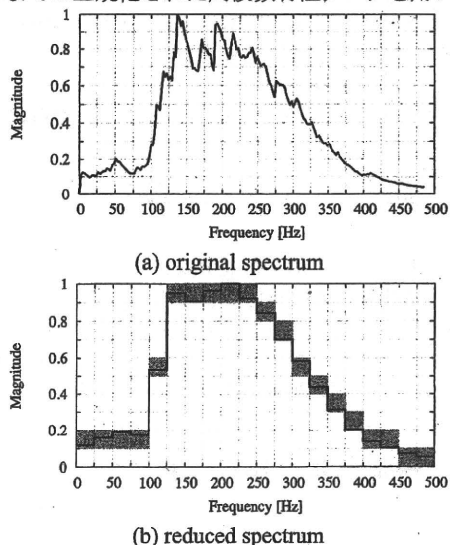


Fig.5 Sample of amplitude spectrum of a surface EMG signal.

に、この周波数特性の形状を学習させるために、周波数軸を20の領域に分割し、それぞれの領域での平均振幅を計算する。さらに Fig.5(b)のように、振幅である縦軸を10の領域に分割し、各周波数帯域で振幅が値をもつ領域 (Fig.5(b)のグレー領域) を1、それ以外を0とする。この結果、Fig.5(b)に示す表面筋電信号の周波数特性は、各要素が0もしくは1の値をもつ  $10 \times 20$  行列  $\mathbf{M}$  としてみなすことができる。本研究では、この周波数特性の形状を表す行列  $\mathbf{M}$  を周波数特性行列と呼ぶこととし、この周波数特性行列を特徴量として、ベイジアンフィルタによる分類を行う。

#### 4.2 ベイジアンフィルタによる識別手法

ここでは、前節で述べた周波数特性行列  $\mathbf{M}$  を用いて、ベイジアンフィルタにより動作指を識別する手法について述べる。

はじめに、ベイジアンフィルタによる動作指識別のためのデータベース作成について述べる。第2章で述べたように、本研究では5本の指の関節角度を計6箇所測定した表面筋電信号から推定する。このため、1つの指の動作に対して各測定箇所ごとに計6つの  $\mathbf{M}^j, j=1, \dots, 6$  が得られることになる。いま、ある指の動作に対して  $N$  個の学習用データ  $\mathbf{M}_i^j, i=1, \dots, N, j=1, \dots, 6$  が与えられたとする。このとき、与えられた学習データに対して次のような行列  $\mathbf{H}_j$  を考える。

$$\mathbf{H}_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \mathbf{M}_i^j, j=1, \dots, 6 \quad (2)$$

式(2)の行列  $\mathbf{H}_j$  の各要素は  $[0, 1]$  の値をもつ。したがって、 $\mathbf{H}_j$  はある指の動作に対して、 $j$  番目の電極で測定された表面筋電信号の周波数特性が取り得る形状の確率分布を表しているものとみなすことができる。そこで、ある指動作に対して得られる行列  $\mathbf{H}_j$  の集合  $\mathbf{D} = \{\mathbf{H}_1, \dots, \mathbf{H}_6\}$  を、動作指識別のためのデータベースとして用いることとした。本研究では動作指を識別するために、7つのデータベース  $\mathbf{D}_k, k=0, \dots, 6$  を作成した。ここでデータベースの添え字  $k$  に対応する指の動作は Table 1 に示される。

次に、現在の動作がどの指を動かしたものであるのかを、ベイジアンフィルタを用いてデータベースから選択する手法について説明する。いま、計測した表面筋電信号から、未知の指動作に対する周波数特性行列の集合  $\mathbf{Z} = \{\mathbf{M}^1, \dots, \mathbf{M}^6\}$  が与えられたと仮定する。本研究では動作指を識別するために、与えられた  $\mathbf{Z}$  が  $k$  番目のデータベースに対応する指の動作のものである確率  $P(k|\mathbf{Z})$  を考える。この確率  $P(k|\mathbf{Z})$  は容易に計算することはできないが、すべての動作が一定の確率で発生するという仮定のものでは、Bayes の結合確率を用いることで近似的に次のように計算することができる。

Table 1 Database index and corresponding finger motion.

Database index $k$	Corresponding finger motion
0	Hyposhenia state
1	Flex action of thumb
2	Flex action of index finger
3	Flex action of middle finger
4	Flex action of medicinal finger
5	Flex action of little finger
6	Flex action of all fingers

$$P(k|\mathbf{Z}) = \frac{\prod_{i=1}^{120} \gamma(i)}{\prod_{i=1}^{120} \gamma(i) + \prod_{i=1}^{120} (1-\gamma(i))} \quad (3)$$

ここで式(3)の確率  $\gamma(i)$  は、与えられた  $\mathbf{Z}$  と  $k$  番目のデータベース  $\mathbf{D}_k$  から以下のアルゴリズムにより計算される。

```

[確率  $\gamma(i)$  の計算]
i = 1 (Initialize)
For j = 1 : 6,
  For a = 1 : 10,
    For b = 1 : 20,
      If  $\mathbf{M}^j(a,b) = 1$ , Then  $\gamma(k) = \mathbf{H}_j(a,b), i = i + 1$ .
    End For
  End For
End For

```

これらの計算を Table 1 の動作に対応するすべてのデータベース  $\mathbf{D}_k, k=0, \dots, 6$  に対して行い、最も高い確率  $P(k|\mathbf{Z})$  をもつデータベースに対応する指が、本研究の動作指識別結果となる。

次章では、このベイジアンフィルタによる動作指識別手法の結果を反映した複数指関節角度識別手法について議論する。

### 5. 動作指識別を用いた複数指関節角度推定手法

ここでは、本研究で提案する動作指識別を用いた複数指関節角度推定手法について述べる。

第3章で述べたように、従来の表面筋電信号ヒストグラムを用いた指関節角度推定手法を複数の指に適用する際の問題点は、ひとつの筋の活動による表面筋電信号が、その他の筋の活動を測定するための筋電信号に重畳することであった。この問題点を解決するために本研究では、前章で述べたベイジアンフィルタを用いることで事前にどの指が動作したのかを識別し、この識別結果を指関節角度推定結果に反映させる新たな手法を提案する。本手法では、次式を用いて指関節角度の推定を行う。

$$\theta(t) = \theta_0 + W_k \left\{ \sum_{i=1}^6 a_i X_i^f(t) + \sum_{i=1}^6 b_i X_i^e(t) \right\} \quad (4)$$

式(4)において  $a_i, b_i$  は伸筋および屈筋側の表面筋電信号ヒストグラムに対する重み係数、 $\theta_0$  はバイアス成分であり、これらは式(1)と同様に求めることができる。一方、式(4)の  $W_k$  は動作指識別結果を角度推定に反映させるための重み係数であり、 $[0, 1]$  の値をとる。この  $W_k$  が0のときには、角度推定を行った指は動作していない状態を表し、1であるときには動作状態であることを表す。したがって、 $W_k$  の値を変更することにより、前章のベイジアンフィルタによる動作指識別結果を角度推定結果に反映させることができる。この重み係数  $W_k$  の値については、Table 1 に示す各動作状態ごとに最小二乗法を用いて決定するものとした。

本手法の有効性を検証するために、第3章と同様の第2指および第3指 MP 関節を対象とした指関節角度推定実験を行った。Fig.6 に式(4)の提案手法と式(1)を用いた従来法による

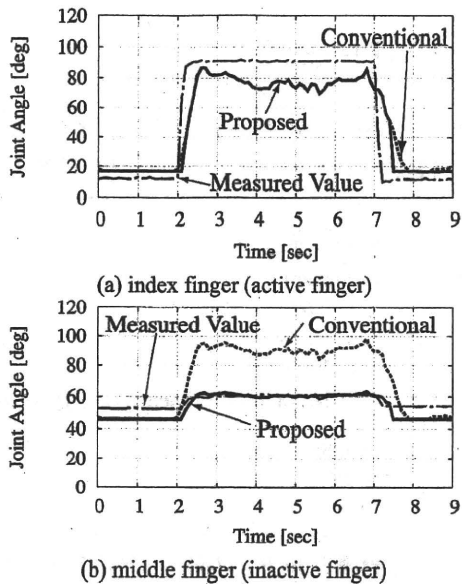


Fig.6 Estimation results of finger joint angle using proposed and conventional method.

指関節角度推定結果と、実験の際に測定した指関節角度の実測値を示す。Fig.6(a)より、動作指である第2指は提案法、従来法ともに計測値に追従していることが分かる。さらに、Fig.6(b)に示した動作を行っていない第3指については、従来法が第2指と同様の挙動を示しているのに対し、提案法では計測値とよ一致を示していることが確認できる。これは、提案法の動作指識別により、実験で行った動作が第2指によるものと識別され、この識別結果を提案法である式(4)の重み $W_k$ によって第3指の推定角度結果に反映したためである。

以上の結果より、従来法の問題点であった筋電信号の重量の問題をベイジアンフィルタによる動作指識別により解決し、複数指関節角度の同時推定が行えることを示した。

## 6. ロボットハンドを用いた提案手法の実機検証実験

本研究では、提案した動作指識別を用いた複数指関節角度推定手法を実際の義手に適用した際の挙動や問題点を明らかにするために、ロボットハンドを用いた実機検証実験を行った。実験で用いたロボットハンドは、手指部分で15自由度をもつ、DCモータによるダイレクト駆動型のロボットハンド(ロボットハンド/アームシステム、川淵機械技術研究所製、特注仕様)である。今回の実験で用いたシステムの概略図をFig.7に示す。本システムでは、推定用のPCを用いて、第2章で述べた6箇所での表面筋電信号から、提案手法を用いて計10箇所の指関節角度を同時にリアルタイムで推定する。次に、得られた推定角度をTCP/IP通

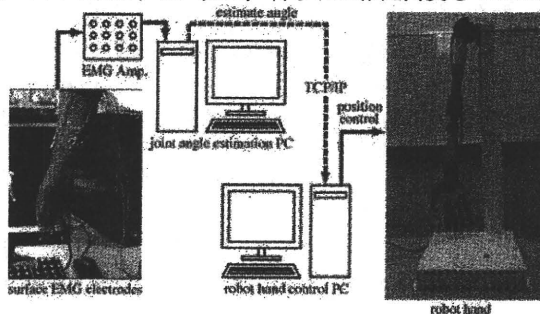


Fig.7 Schematic of myoelectric hand experiment system.

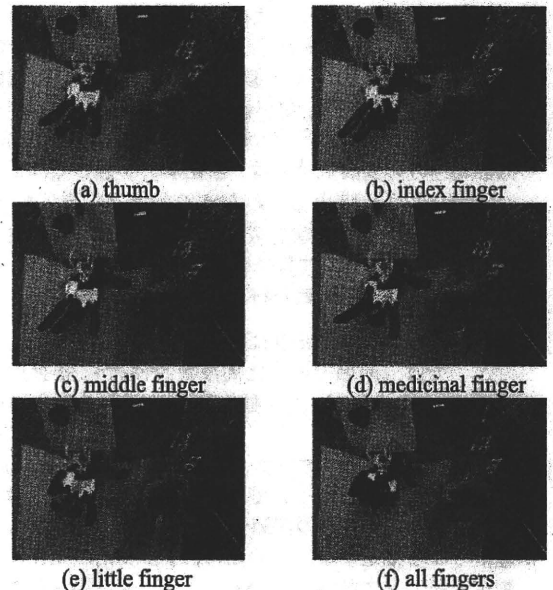


Fig.8 Motion of myoelectric hand system which implements our estimation algorithm.

信により0.1秒毎にロボットハンド制御用のPCに送信する。ロボットハンド制御用のPCは、送信された推定角度を目標値として位置制御を行うことによりロボットハンドを駆動させるシステムとなっている。なお、今回の実験では被験者の右手の表面筋電信号を用いて角度推定を行い、左手側のロボットハンドを駆動させる実験を行った。

提案手法によるロボットハンド駆動実験の様子をFig.8に示す。Fig.8から、被験者とロボットハンドが同様の形状となっていることが確認できる。このことから、提案手法により被験者の複数の指関節角度を同時に推定することが可能であり、得られた推定結果を用いることによりリアルタイムで義手を制御できる可能性を示唆した。

一方、今回のロボットハンドを用いた実験の結果から、指を屈曲状態で保持すると若干の振動を起こすという問題が明らかとなった。この振動はFig.6(a)の角度推定結果でも現れており、屈曲状態で保持すると筋電信号のパルス頻度が減少するためである。この問題については、今後推定手法を見直すことにより解決する必要がある。

## 7. むすび

本研究では、ベイジアンフィルタによる動作指識別を用いた複数指関節角度推定手法を提案した。提案手法を用いたロボットハンドによる実機検証実験を行い、6箇所での測定した表面筋電信号から計10箇所の指関節角度をリアルタイムで推定することが可能であることを示した。

## 参考文献

- [1] 横井浩史, 兪文偉, 成瀬継太郎: 筋電義手の新しい制御法, PO アカデミージャーナル, Vol.10, No.1, pp.9-12 (2002)
- [2] 高橋玄顕, 満洲邦彦, 鈴木隆文: 針筋電信号を用いた指の運動の推定 - 神経回路モデルの有効性と適用方法の検討 -, 生体医工学, 第46巻 CD-ROM (2008)
- [3] 山水康隆, 荒木望, 小西康夫, 満洲邦彦, 石垣博行: 表面筋電信号のヒストグラムを用いた指関節角度推定手法, 第23回生体・生理工学シンポジウム, pp.183-184 (2008)

# 分化誘導神経回路と初代培養神経回路の共培養系における機能的結合の形成

## Functional Integration of Stem Cell-derived Neuronal Networks and mouse primary Cultured Neuronal Networks

高山 祐三<sup>1</sup>, 森口 裕之<sup>2</sup>, 小谷 潔<sup>2</sup>, 鈴木 隆文<sup>1</sup>, 満洲 邦彦<sup>1</sup>, 神保 泰彦<sup>2</sup>  
 Yuzo TAKAYAMA<sup>1</sup>, Hiroyuki MORIGUCHI<sup>2</sup>, Kiyoshi KOTANI<sup>2</sup>, Takafumi SUZUKI<sup>1</sup>,  
 Kunihiko MABUCHI<sup>1</sup>, Yasuhiko JIMBO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院情報理工学系研究科, <sup>2</sup> 東京大学大学院新領域創成科学研究科

<sup>1</sup> Graduate School of Information Science and Technology, University of Tokyo

<sup>2</sup> Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo

**Abstract** Grafting new neurons derived from pluripotent stem cells into the damaged region is essential for restoring appropriate functions of the brain. Little is known, however, about network-wide interactions between stem cell-derived neurons and CNS neurons. In this study, we establish a co-culture method of stem cell-derived neuronal networks and CNS networks, and observe spontaneous activity in the co-culture samples. By using a microfabricated poly(dimethylsiloxane) (PDMS) device comprising two culture compartments and 20 connecting microconduits, we are able to compartmentalize P19-derived neurons and mouse cortical neurons and connect them via the microconduits. Furthermore, we combine the co-culture device and a microelectrode array (MEA)-based recording system and record spontaneous activity in the co-cultured networks. We confirm that periodic synchronized bursting in both neuronal networks occurs during the second week *in vitro* and that P19-derived neurons in the co-cultured networks show different developmental processes than those grown in monoculture.

### 1. はじめに

近年, ヒト iPS 細胞[1]に代表される幹細胞を利用し損傷を受けた脳組織の回復を試みる「神経再生医療」が大きな注目を集めているが, これまで生体由来神経細胞と幹細胞より人為的に誘導された神経細胞との機能的結合とその相互作用について細胞活動レベルで報告した例はない。これは脳内に移植した幹細胞由来神経細胞の形態・機能の経時変化を追跡することの技術的困難さに大きな要因があると考えられる。

そこで, 本研究では幹細胞由来神経回路網と CNS 神経細胞の初代培養神経回路網の共培養を行い, 両者の間に生じる自発電気活動現象とその相互作用を観測することを目的とする。著者らはポリマー樹脂の一種である PDMS (ポリジメチルシロキサン) と微細加工技術を用いて 20 個の微細トンネル構造を有する共培養チャンバーの作製を行った。この培養チャンバーを用いることで生体 CNS 由来, 幹細胞由来の二種の神経細胞をそれぞれ混在させず独立した状態で培養することを可能とした。本発表ではマウス大脳皮質神経細胞とマウス胚性腫瘍幹細胞(P19 細胞)由来の神経細胞との共培養と, 微小電極アレイ基板 (Microelectrode arrays; MEA)を用いて自発電気活動計測を行った結果を報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 培養チャンパー作製

共培養チャンパーはソフトリソグラフィ技術を用いて PDMS に微細加工を行うことで作製した。培養チャンパーの鋳型作製はガラス基板上に厚型フォトレジスト (SU-8 3005, 3050; Microchem.)を二層パターンニングして行った。まず SU-8 3005 を厚さ 5 μm でスピコートし, 20 個の微細トンネル構造鋳型を作製した (幅 50 μm)。次に, SU-8 3050 を厚さ 100 μm でスピコートし, スペーサ構造を作製した。このスペーサ構造は, 後述のように, パンチを用いて PDMS シートに培養部を作製する際の目印として, また微細トンネル構造を長さを一定に保つために用いられる。以上の通りに作製した

鋳型構造付きガラス基板上に PDMS を厚さ 3 mm で流し込み, 固化させる。固化した PDMS をガラス基板上より剥離し, パンチで 2 つの培養部を貫通した後に, 培養ディッシュ又は MEA 上に接着させ, 共培養チャンパーを作製した。

#### 2.2 細胞培養

2.1 で作製した PDMS 培養チャンパー内に胎令 16 日の ICR マウス胎児から採取した大脳皮質神経細胞及び P19 細胞から誘導した神経細胞を播種し, 培養を行った。著者らは P19 細胞より人為的に誘導された神経細胞もシナプス結合を形成し神経回路網特有の活動を示すことを報告しており[2], その培養・分化誘導法の簡便さから本研究の対象として最適な対象であると考えている。

また, 2 種の神経細胞を分離した状態で共培養を行った結果を定量的に評価するために, 培養チャンパー内への播種前にそれぞれの神経細胞種を脂肪親和性マーカーを用いてラベリングを行った。本実験では PKH マーカー (Sigma-Aldrich) を使用して P19 由来神経細胞を PKH26 (赤色蛍光)で, マウス大脳皮質神経細胞を PKH67 (緑色蛍光)を用いて染色を行った。

#### 2.3 自発電気活動計測

共培養を行った各種神経回路網における自発電気活動を MEA 計測システムを用いて多点同時計測を行った。本研究で用いた MEA 基板は, 電極配置は 8×4 の電極を 1 ブロックとし, 間隔 500 μm の 2 ブロック構造からなるものを用いた。電極サイズは 30 μm 角, 電極中心間距離は 180 μm である。また, 電極インピーダンスは 1 kHz で数 100 kΩ である。

64 点の電極を通じて測定される細胞外電位変化を, 増幅器を通した後, A/D 変換を行いハードディスクに記録する。計測信号帯域は 100-5000 Hz を使い, 標本化周波数 25 kHz, 12 bit でサンプリングを行った。尚, 全てのデータ解析ソフトウェアは PV-WAVE (Visual Numerics) を利用して作成した。

### 3. 実験結果と考察

図1に作製したPDMS共培養チャンバーの概略図と、MEA基板上に接着させた様子を示す。高さ5  $\mu\text{m}$ の微小トンネルは細胞体は侵入できないが神経突起はその内部に伸展が可能な構造となっている [3]。この微小トンネル構造部を2つの電極ブロックの間に配置することで2種の培養神経回路をトンネル構造を介したシナプス結合を形成させた状態で共培養を行い、またそれぞれの神経回路における自発電気活動の計測が可能となる。

P19由来神経細胞とマウス大脳皮質神経細胞の共培養系における自発電気活動計測結果を図2に示す。ここでは共培養開始後11, 18日目の試料における全64点ラスタプロットと、8点の測定電極における細胞外電位波形を示している。培養11日目において、マウス大脳皮質培養神経回路とP19由来神経回路の両者に渡る周期的な同期バースト現象が観測されていることがわかる。こうした同期バースト発火は同培養時期(2週目付近)の大脳皮質初代培養神経回路において特徴的な活動現象であるのに対して、同時期のP19由来培養神経細胞の単独培養においては自発電気活動はほぼ観測されていない[2]。この結果より、本実験で行った共培養法により、両者の神経回路間に機能的結合が形成され、特にP19由来培養神経回路における自発電気活動の生成に大きな影響を与えることがわかった。一方で、培養18日目ではこうした両者の神経回路網に及ぶ自発電気活動の相互作用は観測されず、P19由来神経回路の活動がほぼ抑制されるとの結果となった ( $n=4$ )。これは、培養2週目付近において、両者の神経回路における電気活動の相互作用により誘発された現象

である可能性も考えられる。今後は薬理操作や電気刺激、または培養開始時期の調節を行うことで、生体 CNS 神経回路と幹細胞由来神経回路の機能的結合の形成とその維持機能について更に検討と考察を行う予定である。

### 4. 結言

本研究では、微細加工技術を応用し、幹細胞由来神経回路と生体 CNS 神経回路の共培養系の構築と、その活動計測を行った。2つの培養部を微小トンネルで接続したPDMSシートとMEA計測システムを用いることで、CNS初代培養系と分化誘導系培養神経回路網との間の自発電気活動相互作用について新たな知見を得ることができた。

### 参考文献

- [1] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors", *Cell*, Vol. 131, pp. 861-872 (2007)
- [2] 高山 祐三, 斎藤 淳史, 森口 裕之, 小谷 潔, 神保 泰彦, "幹細胞由来培養神経回路の構築と電気活動計測", *電気学会論文誌C*, Vol. 129, No. 1, pp.8-16 (2009).
- [3] A.M. Taylor, M. Blurton-Jones, S.W. Rhee, D.H. Cribbs, C.W. Cotman and N.L. Jeon, "A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport," *Nature Methods*, vol. 2, pp. 599-605 (2005)

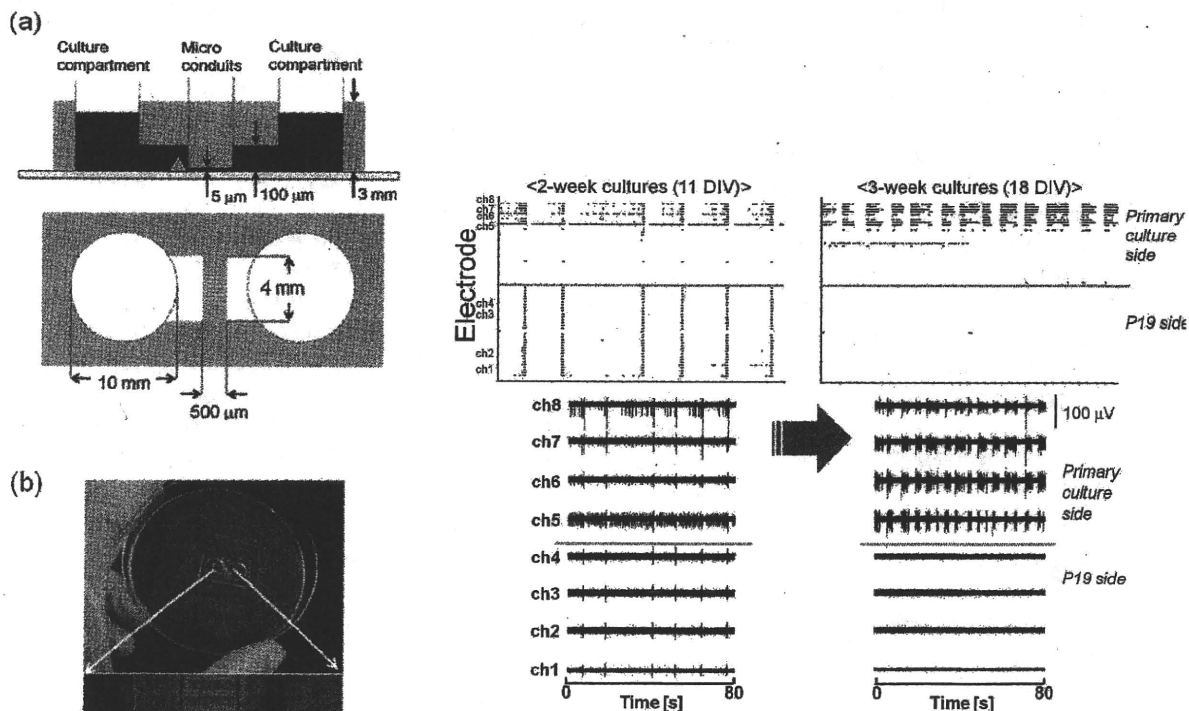


Fig. 2. Spontaneous electrical activity in the co-cultured networks.

Fig. 1. Design of the PDMS-based co-culture device. (a) Schematic outline of the device. (b) The PDMS device was attached to the MEA substrate. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ .

## 培養神経細胞を用いた刺激パターンの学習に関する研究 Learning of Stimulation Patterns using Cultured Nerve Cells

藤原 正浩<sup>1</sup>, 芳賀 達也<sup>1</sup>, 鈴木 隆文<sup>1</sup>, 満淵 邦彦<sup>1</sup>  
Masahiro FUJIWARA<sup>1</sup>, Tatsuya HAGA, Takafumi SUZUKI<sup>1</sup>, Kunihiko MABUCHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院情報理工学系研究科

<sup>1</sup> Graduate School of Information Science and Technology, University of Tokyo

**Abstract** It is important to obtain the knowledge of the property of the neuronal network to use the network as a information processor exceeding conventional computers in the performance. In this research, we examined the possibility of the pattern learning of the network by measuring the response from the cultured neuronal network stimulated spatial electrical patterns through the MED(multi-electrode dish). And we find that the temporal distribution of the firing rate vary distinctively when the network stimulated by the corresponding pattern. As a result, it was shown to be able to learn the single pattern by changing temporal distribution of the firing rate by the tetanic stimulation.

### 1. はじめに

実物の神経細胞を用いて生物のように柔軟性に富んだ情報処理を行うには、神経細胞ネットワークレベルでの脳機能の解明が不可欠である。また、それを新たな原理で動作するコンピュータとして利用するためには、神経細胞を同一の条件下で培養し、経時変化や個体差によってその機能が変わらないように再現性を高く維持する必要がある。

現在のところ培養神経細胞ネットワークを情報処理装置に利用したものとしては、ロボットの行動制御に用いた例がある[1]。また、培養神経細胞ネットワークそのものの性質を解析した研究としては、ネットワークの一部の神経細胞に対し高頻度な電気刺激を与えることでシナプス可塑性に基づいたネットワーク結合の変化を促し、神経細胞間の信号伝達の長期増強(LTP; long-term potentiation)や長期抑圧(LTD; long-term depression)を誘導した例が報告されている[2, 3]。特に、文献[3]では空間的に分布したパターンの電気刺激によって神経細胞ネットワーク全体のLTPを誘導し、単一パターンの学習を行っている。しかし、LTPが誘導されるためには各ネットワーク固有の数以上の箇所を同時に刺激しなければならないなど制約もあり、また複数のパターンの学習が可能かどうかについても明らかではない。

本研究では神経細胞ネットワークに複数の刺激パターンを入力することでそのパターン間で差異が生じるかどうかについて検討し、それによって神経細胞ネットワークでパターン識別ができるかどうかについても検討を行うことを目的とした。具体的には、細胞外電極アレイであるMED(multi-electrode dish)を用いて、培養神経細胞ネットワークに複数の空間パターンをテタヌス刺激として印加し、その後に入力されたパターン刺激に対する応答を解析することで入力パターンによる差異が生じるかどうかについて検討を加えた。

### 2. 実験系

#### 2.1 神経細胞の培養

神経細胞を培養する培養皿には、一辺 50  $\mu\text{m}$  の正方形電極が底面に 8 行 8 列の合計 64 個配列されたアルファメッドサイエンティフィック社製のMED-P545Aを用いた。電極中心間距離は 450  $\mu\text{m}$  で、電極は白金黒により界面インピーダンスが調節されている。また、電極の配線は無色透明な導電

性物質であるITO(Indium Tin Oxide)によってチャンパー外部へ配線されており、顕微鏡による細胞の観察がしやすくなっている。MED は細胞を播種する前に、ガスバーナーで数分間加熱することで親水化し、ポリエチレンイミン(PEI)溶液とラミニンによって、電極表面と細胞との親和性を高めるコーティングを行った。

神経細胞の培養には住友ベークライト社の神経細胞培養システムを用いた。神経細胞には培養の容易なラット大脳皮質細胞を用い、液体窒素下で保存していた組織片を分散してコーティングしたMEDに播種した。MEDに播種した細胞は内部を温度 37°C、湿度 100%、CO<sub>2</sub>濃度 5%に保ったインキュベータ内で培養し、培養液は住友ベークライト社の神経細胞培養液 MB-X9501を用い、培養期間中は 1 週間ごとに培地を半量ずつ交換した。

#### 2.2 計測系と刺激系

構成した計測・刺激系のブロック図を Fig. 1 に示す。MED はアルファメッドサイエンティフィック社製のMEDコネクタにネジで締結し、MEDの配線とMEDコネクタの端子をインピーダンスが十分低くなるように接触させた。MEDコネクタの端子とバンドパスフィルタ内蔵のアンプ(日本光電社製 AB-611J)はシールドケーブルで接続した。ケーブルをアンプに接続する際、配線がケーブルのシールドで覆われてない区間があるため、その区間は別途シールドで覆い、すべてのシールドは計測系のグラウンドに接続した。アンプで増幅された信号はPC1に接続した12bitAD変換ボードでサンプリングし、パーソナルコンピュータPC1のハードディスクに収録した。PC1での信号のリアルタイムでの観察及び収録にはNational Instruments社のLabViewで作成したソフトウェアを用いた。

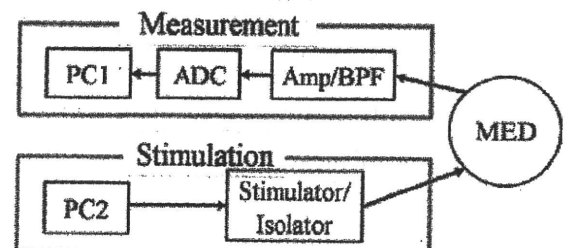


Fig. 1 Block diagram of the experimental setup  
使用したMEDには8行8列の計64チャンネルの電極のほ



かに、同一底面上に4チャンネルの基準電極がある。これらの基準電極では細胞の活動とは独立した培地内の電位を計測できる。そのため、これらのうちの1チャンネルを基準電位としてMED電極の64チャンネル中の32チャンネルの電位との差動計測を行なった。

MED電極で神経細胞に電気刺激を印加する場合、MEDとアンプをつなぐケーブルのアンプ側を電気刺激装置(日本光電社製)に接続し、電気刺激を加える電極はアンプから切り離れた。これは、刺激装置につながっている電極で計測される信号に大きなノイズが重畳するのを避けるためである。刺激装置はアイソレータを内蔵したもので、電圧、パルス幅、周波数を調節できるが、複数のテタヌス刺激を周期的に加えるなどの変調は単体ではできないため、PC2から変調信号を刺激装置に印加した。PC2の変調信号もLabViewによって作成したソフトウェアで行なった。

信号計測中はコンタミネーションを防ぐため、MEDをクリーンベンチ内に設置し、ディッシュの上皿をMEDにかぶせた。また、培地の温度が低下すると細胞の活性に影響を及ぼすため、ガスパーナーによってクリーンベンチ内を保温した。ただし、CO<sub>2</sub>濃度がインキュベータ内と異なることに対しては対策を施していないため、長時間にわたる計測ではないが、結果に影響した可能性はある。

### 3. パターン学習の実験方法

#### 3.1 計測条件

使用したアンプは感度を10 $\mu$ V/V、バンドパスフィルタの低域遮断周波数を50Hz、高域遮断周波数を3kHzとした。また、AD変換ボードは分解能が12ビットのものをを用い、サンプリング周波数は25kHzとした。

MEDの電極にはFig. 2に示すチャンネル番号を付し、実験を通してそれぞれのMEDで各電極に対応するチャンネル番号と神経細胞の位置関係が変わらないようにした。アンプのチャンネル数の都合上、チャンネル0からチャンネル31までの32チャンネルを実験に用い、チャンネル0からチャンネル14とチャンネル17からチャンネル22までを計測のためのチャンネルとし、残りは刺激パターンを印加するための電極とした。

高頻度刺激を与えて学習させるパターンはFig. 2に示すように3種類のパターンで、パターン1はチャンネル0-7, 15, 23, 31, パターン2はチャンネル0,8,16,24-31, パターン3はチャンネル0, 7, 8, 15, 16, 23, 24, 31で構成される。刺激電極はパターン1についてはチャンネル7を陰極とし、残りのチャンネルを陽極とした。またパターン2, パターン3についてはチャンネル24を陰極とし、残りのチャンネルを陽極とした。

MED電極にはFig. 3に示すテスト刺激(a)とテタヌス刺激(b)の2種類の電気刺激を印加した。テスト刺激は神経細胞の発火を促すことを目的とするもので、パルス幅0.2ms、振幅1Vのパルス状電圧刺激をFig. 2の刺激パターンを構成する電極に印加した。テスト刺激によって誘導される発火の時間分布が、テタヌス刺激前後でどのように変化するかを調べた。1度のテスト刺激入力に対して神経細胞の応答を計測することを1試行とし、それぞれの試行では刺激後およそ1-3秒程度の間応答発火が見られるため、各々の試行が独立とみなせるように5秒間隔でテスト刺激を印加した。テスト刺激を印加しなくとも十分に成長した培養大脳皮質細胞からはバースト状の自然発火が観察され、本実験ではそれが観察される細胞播種後71日目のMEDを用いたが、そのバースト発火は発火時間間隔が不規則であるために、タイミングを合わせて

それぞれのバースト発火の発火数分布を平均するなどの、定常的な性質を解析することが難しくなる。また応用面でも不規則な発火によって情報処理の結果を解析するのは再現性が低いためにテスト刺激を用いた。

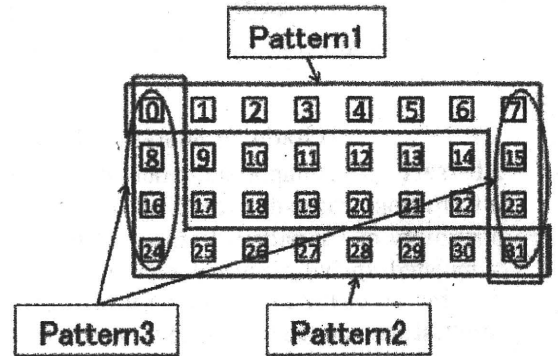


Fig. 2 Spatial Stimulation Patterns

テタヌス刺激は神経細胞間のシナプス伝達強度を変化させることを目的とするもので、パルス幅0.2ms、振幅1Vのパルス電圧を200Hzの周波数で80パルス印加するものを1列とした。これをFig. 2の各パターンに対し、2秒間隔で40列印加した。テタヌス刺激の印加は応答の計測を目的としないため記録は行っていないが、刺激中は計測電極にテタヌス刺激によるアーティファクトが重畳していることを確認した。

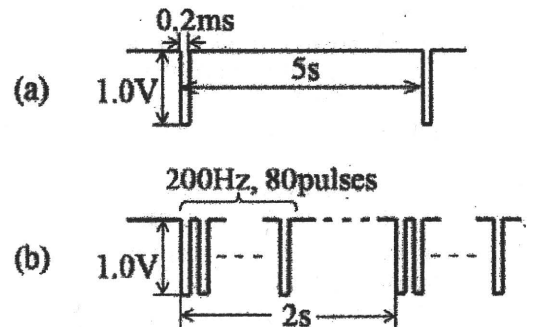


Fig. 3 Temporal Stimulation Patterns.

(a) Test stimulus (b) Tetanus stimulus

#### 3.2 実験方法

複数の異なるパターンをテタヌス刺激として印加した場合に、それらのそれぞれでテスト刺激に対する平均発火率がどのように変化するか確認するため、以下のような手順の実験を行なった。

1. パターン1, パターン2, パターン3のそれぞれでテスト刺激を加え、応答を300秒間(60試行)計測する。
2. パターン1にテタヌス刺激を加える。
3. 手順1と同様に応答を計測する。
4. パターン1にテタヌス刺激を加える。
5. 手順1と同様に応答を計測する。
6. パターン2にテタヌス刺激を加える。
7. 手順1と同様に応答を計測する。

手順2, 4と手順6においてそれぞれパターン1とパターン2のテタヌス刺激を印加し、その後のテスト刺激に対する神経発火の時間分布がテタヌス刺激以前とどのように異なるかを確認する。

#### 3.3 計測信号の解析

##### 3.3.1 スパイク発火時刻の抽出

神経細胞の応答を解析する準備として、計測信号(原波形)から神経細胞のスパイク発火が生じている時刻を抽出する。以降の応答信号の解析には、このスパイク発火の時刻列を用いる。ただし原波形にはアーティファクトやノイズが重畳しているために、スパイクのピーク電圧によってはそれがノイズなのかスパイクなのかが見た目にはわかりづらい。また、全チャンネルのスパイク発火の総数も多いため、以下のようなアルゴリズムでスパイク発火時刻を抽出する。

まず、テスト刺激直後には刺激に由来するアーティファクトがそれぞれのチャンネルで 30ms 程度重畳するので、これを除去する。このアーティファクトの波形は底面電極のインピーダンスによって決まるため、各チャンネルの試行間で似た波形になる。したがって、各チャンネルごとにテスト刺激時刻を時刻原点にそろえて原波形を 30ms の間加算平均し、それを元の波形から差し引くことによって除去した。ただし、刺激後 1ms の間はアーティファクトの飽和によりスパイクの検出ができていないため、解析には用いないようにした。

次に、ノイズ標準偏差の 5 倍を閾値とし、絶対値がそれを超える振幅の観測時刻をスパイク発火の時刻として抽出した。また、典型的な活動電位の幅が 2ms 程度であることから、発火が観測された時刻からこの期間は閾値を超えてもスパイク発火とみなさないようにした。

### 3.3.2 発火頻度の評価

次に、印加する刺激パターンごとに応答に違いがあるか確認するために、抽出したスパイク発火時刻列から発火頻度の時系列変化を評価する。応答観察に用いる発火頻度は、ネットワーク全体の定常的な変化を見るため、チャンネルごと、試行ごとに平均をとったものを用いる。まず、第  $i$  試行目の第  $j$  チャンネルにおける時刻  $t$  の発火率  $FR_j^{(i)}(t)$  は、時間を 10ms の小区間に分割し、各小区間で発火したスパイクの個数として定義する。そして、発火率  $FR_j^{(i)}(t)$  を  $i, j$  で平均したものを発火率  $AFR(t)$  とする:

$$AFR(t) = \frac{1}{NM} \sum_j \sum_i FR_j^{(i)}(t)$$

ここで  $M, N$  はそれぞれ試行回数、応答の計測されたチャンネル数である。

## 4. 結果

以上のような方法にしたがって行なった実験結果を Fig. 4 に示す。この実験では、パターン 1 に 2 回、パターン 2 に 1 回のテタヌス刺激を印加し、各テタヌス刺激を印加するごとにテスト刺激による応答を計測した。どの応答もテスト刺激後 0.05 秒から 0.1 秒程度で発火率が下がり、1 秒程度でほとんど 0 になっている。

パターン 1 のテスト刺激に対する応答(b), (c)に注目すると、テタヌス刺激を印加するごとに 0.1 秒以降でピークとなる時刻が早くなっている。2 回目のテタヌス刺激によるピーク時刻の変化は 1 回目のテタヌス刺激によるものよりも小さいが、テタヌス刺激前では 0.4 秒程度にあったピークの時刻が、2 回のテタヌス刺激によって 0.25 秒まで移動している。それに対し、パターン 2、パターン 3 についてはテタヌス刺激の印加ごとにピークとなる時刻が遅くなっている。

また、パターン 2 のテタヌス刺激を印加した場合(d)にも、パターン 2 の応答のピークが印加後に早くなっていることが観察される。つまり、ある電極パターンにテタヌス刺激を印加すると、そのパターンのテスト刺激を印加した時の発火率

が最大となる時刻が、より早い方へ遷移することがわかった。

しかし、パターン 2 のテタヌス刺激を印加する前後で比較してみると、パターン 1 のテスト刺激に対する応答のピーク時刻が遅れており、パターン 1 のテタヌス刺激を印加する 0.4 秒程度まで移動している。また、パターン 3 の応答はテタヌス刺激を印加していないにも関わらずピーク時刻が早くなっている。これは、パターン間の重なりと、電極と培養神経細胞ネットワークとの位置関係による応答変化と考えられる。

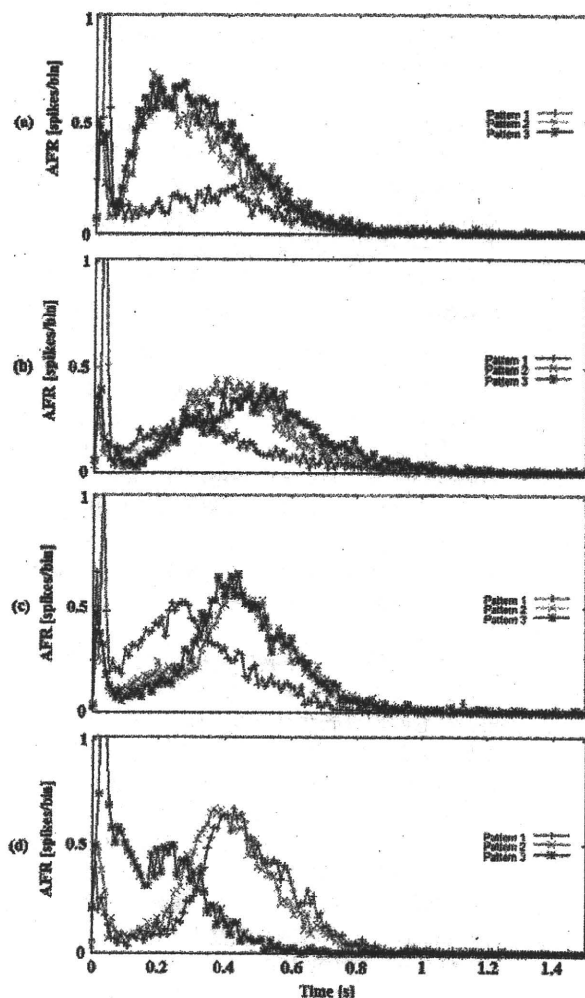


Fig. 4 Time-dependency of AFR

(a) AFR prior to any tetanus. (b) AFR after first pattern1 tetanus. (c) AFR after second pattern1 tetanus. (d) AFR after pattern2 tetanus.

## 5. 考察

先行研究[3]ではパターン 1 の形のテタヌス刺激により、パターン 1 のテスト刺激に対する発火頻度がパターン 2 のテスト刺激によるものより高くなることが確認されている。ただし、その発火頻度上昇は、パターンに含まれる刺激電極の個数がある値以上大きくなければならず、その値は当然培養されたそれぞれの神経細胞ネットワークに依存する。Fig. 4 を見ると、テタヌス刺激を印加したパターンのみが発火頻度が高くなるという傾向はみられず、発火頻度上昇を引き起こすために十分な個数の電極を用いて刺激されていないことが分かる。

パターン1とパターン2は、それらを構成する電極にほとんど重なりがない。したがって、一方を刺激した場合に他方の電極上の神経細胞はあまり刺激されないことになる。このことが、一方にテタヌス刺激を印加したときにそのパターンのみ応答のピーク時刻が早まり、他方の応答のピーク時刻はあまり変化しないか遅くなることに関係していると思われる。また、パターン3はそれを構成する全ての電極がパターン1かパターン2のどちらかに含まれている。したがって、パターン1とパターン2のテタヌス刺激を印加したことで、結果的にパターン3を構成する電極上の神経細胞も刺激され、Fig. 4のようなパターン3の応答が得られたと考えられる。

発火率のピーク時刻をパターンごとに調節することによってパターン学習を行うと考えたとき、この実験結果からは複数のパターンを学習することは難しいことが示唆される。テタヌス刺激によってパターンごとに発火率のピーク時刻を調節したとき、それぞれのパターンはテスト刺激に対する応答としての発火率のピーク時刻に対応する。つまり学習後のパターン認識の段階では、あるパターンのテスト刺激が入力された時の応答として計測されるスパイク列の、単一または複数の試行から発火率  $FR_j^{(i)}(t)$ ,  $AFR(t)$  を算出し、そのピーク時刻を学習したものと比較して入力パターンを推定することになる。しかし、本実験のパターン1とパターン2のように空間上で重なりがほとんどないようなパターンでも、複数のパターンのテタヌス刺激を印加した場合には直近の刺激パターンのピーク時刻が最も早くなるため、複数のパターンのピーク時刻をそれぞれ独立に調整することは難しい。さらに、パターン3のように他のパターンとの重なりがあるものはそれらのテタヌス刺激に大きく影響されるため、パターン認識の段階で誤ったパターンに認識される可能性が高くなる。

以上の実験から、培養神経細胞における単一パターン学習の方法として、発火率の時間変化で値がピークとなる時刻を用いたものの可能性が示唆された。テタヌス刺激を印加する回数、あるいは時間によって、このピーク時刻をある程度移動させることができ、これをパターン別に行うことでパターンと発火率のピーク時刻を対応させられることが期待できる。ただし、本研究ではある1つのパターンに対する発火率のピーク時刻のみを早くすることができており、単一パターンの学習には成功しているが、複数のパターンについてそれぞれ独立にピーク時刻を調整することはできていない。これは、パターン間の重なりと培養によって形成される神経ネットワークの位置関係によるものが大きく、どのような入力パターンの組み合わせであればピーク時刻を調整できるかは検証の余地があると思われる。また、この実験に用いたMEDが少ないため、培養細胞の個体差や電極間距離の違いなどが

あっても再現性があるか確認する必要がある。

また、本実験で用いた培養71日目の神経細胞ではFig. 4のように0.1秒程度で発火率が下がり再び上昇するという傾向が見られているが、培養30日目以内の比較的培養日数の短い神経細胞ネットワークでは発火率がほとんど単調に下がり、Fig. 4のような発火率分布にはならなかった。発火率分布が培養日数の経過とともに連続的に変化すると仮定すると、ほとんど単調に減少していた発火率分布が、培養日数の経過によって再度上昇する成分を含むようになる。本実験で観察されたピーク時刻の遷移は、その成分のピーク時刻に着目しているため、これをパターン認識に用いるためには少なくともFig. 4のような発火率分布が得られるほどに培養日数が経過したものをを用いる必要がある。

## 6. おわりに

MED上に培養したラット大脳皮質細胞に複数の空間パターンをテタヌス刺激として印加することで、神経細胞ネットワークのパターン学習の可能性を検討した。

テタヌス刺激によって発火頻度のピーク時刻が早まることが確認できたため、これによるパターン学習の可能性が示唆された。ある空間パターンでテタヌス刺激を印加するごとに、そのパターンのテスト刺激に対する発火率が最大となる時刻が早まる。これにより、学習の段階でテタヌス刺激を印加したパターンにおける発火率のピーク時刻と、新たに入力されたテスト刺激に対する応答から算出した発火率のピーク時刻を比較することで、単一パターンの認識を行えることを示せた。複数のパターンにテタヌス刺激を印加した場合には、直近に印加したパターンのピーク時刻が特に早まるため、これをそのままパターン認識に用いるのは難しいが、どのような入力パターンの組み合わせであればそれぞれのピーク時刻を個別に調整できるか検討することで、より再現性の高いパターン認識をできると思われる。

## 参考文献

- [1] 工藤卓, 徳田農, 清原藍, 細川千絵, 林勲, 田口隆久: "試験管"としてのニューロ・ロボット・ハイブリッドにおけるin vitro学習, BPES2008 第23回生体・生理工学シンポジウム論文集, 69/72 (2008)
- [2] Y. Jimbo, T. Tateno, and H. Robinson: Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons, *Biophys. J.*, Vol. 76, 670/678 (1999)
- [3] M. E. Ruaro, P. Bonifazi, and V. Torre: Toward the Neurocomputer: Image Processing and Pattern Recognition With Neuronal Cultures, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 52, No.3, 371/383 (2005)

# Multi-Electrode-Array Dish 上の培養神経細胞ネットワークの リアルタイム結合推定・可視化システムの構築 Development of Real-Time System for Estimation and Visualization of Neuronal Network Cultured on Multi-Electrode-Array Dish

芳賀 達也<sup>1</sup>, 深山 理<sup>1</sup>, 鈴木 隆文<sup>1</sup>, 満洲 邦彦<sup>1</sup>  
Tatsuya HAGA<sup>1</sup>, Osamu FUKAYAMA<sup>1</sup>, Takafumi SUZUKI<sup>1</sup>, Kunihiko MABUCHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学

<sup>1</sup> University of Tokyo

**Abstract** The brain is considered as the synaptic network of neurons, and information in the brain is processed mainly with neuronal interactions. Synaptic plasticity can change network dynamics which enables animal to memorize and adapt to environment. So there were many researches about neuronal interaction estimated from extracellular recording, so-called "Functional Connectivity". We have developed a method to estimate dynamical change of neuronal interaction from spontaneous firing extracellularly recorded. In this paper, we developed real-time system for estimation and visualization of neuronal network cultured on Multi-Electrode-Array Dish (MED) with the method. Under no stimulus, static neuronal network on MED was estimated with the system.

## 1. 序論

脳は神経細胞がシナプス結合でつながり合ったネットワークであり、シナプス結合の重みが増減する(シナプス可塑性)ことにより生物の適応や学習が起こると考えられている。神経細胞のネットワークや可塑性に着目し、多点電極を配した培養皿(Multi-Electrode-Array Dish; MED)上に培養した神経細胞ネットワークから細胞外電位計測を行い、計測信号から細胞間の活動伝播の強さ(機能的結合強度; Functional Connectivity)を解析する研究がこれまで多く行われている[1],[2],[3],[4]。

私たちは過去に、時々刻々変化する結合強度に対し動的に各時刻推定を行う手法を提案した。提案手法の特徴として、各時刻の処理が独立かつ因果的であり、かつ実装上の工夫により高速に計算できることがあるため、計測に並行してリアルタイムに計測対象の結合構造および変化が推定可能と考えられる。

本稿ではリアルタイムに MED 上の神経細胞ネットワークの結合強度を推定・可視化するシステムの構築を行い、そのシステムによる推定結果を示す。

## 2. 手法

MED を通して観測される時刻  $t$ 、神経細胞  $i$  の発火系列(発火を 1, 非発火を 0 とした系列)を  $x_t^{(i)}$  とし、この発火系列から確率モデルに基づいた結合強度の推定を行う。

### 2.1 確率モデルに基づくパラメータ推定

以下の仮定をおく。

1. 時刻  $t-\tau (1 \leq \tau \leq T)$  である神経細胞  $m$  が発火したとき、時刻  $t$  において神経細胞  $n$  に  $a_{\tau}^{(m,n,t)}$  の膜電位変化が起こる。  
 $a_{\tau}^{(m,n,t)}$  を細胞から細胞への結合強度とする。
  2. 膜電位変化が重なって起こった場合、線形の重ね合わせが起こる。
  3. 結合強度および静止膜電位  $\xi^{(n,t)}$  は時間変化する。
  4. 膜電位には標準偏差  $\sigma$  の正規雑音を加わっている。
  5. 神経細胞  $n$  の膜電位が  $\theta^{(n,t)}$  を超えたとき発火する。
- 以上を考えると次の確率モデルが導出される。

$$P(x_t^{(n)}=1) = F\left(\sum_{m=1}^N \sum_{\tau=1}^T a_{\tau}^{(m,n,t)} x_{t-\tau}^{(m)} + \xi^{(n,t)}\right) \quad (1)$$

ここで、 $\xi^{(n,t)} = \xi^{(n,t)} - \theta^{(n,t)}$  であり、 $F(x)$  は平均 0, 標準偏差  $\sigma$  の正規累積分布関数である。

確率モデルに基づき、各時刻観測されるデータを用いてパラメータを推定する。具体的には対数尤度関数

$$Q_t = \sum_{n=1}^N (x_t^{(n)} \log(P(x_t^{(n)}=1)) + (1-x_t^{(n)}) \log(P(x_t^{(n)}=0))) \quad (2)$$

を考え、これを増加させるように勾配法を用いてパラメータ更新を行う。更新式は

$$a_{\tau}^{(m,n,t+1)} = a_{\tau}^{(m,n,t)} + K \frac{\partial Q_t}{\partial a_{\tau}^{(m,n,t)}} \quad \forall m, n, \tau \quad (3)$$

$$\xi^{(n,t+1)} = \xi^{(n,t)} + K \frac{\partial Q_t}{\partial \xi^{(n,t)}} \quad \forall n \quad (4)$$

となる。ここで、 $K$  は学習係数(任意定数)である。

### 2.2 リアルタイム推定の実装

2.1 の推定手法により、リアルタイムに MED 上の結合強度の推定およびネットワークの可視化を行うシステムの実装を行った。系はアルファメッドサイエンティフィック社製 64CH MED および 64CH Integrated Amp, National Instruments 社製 A/D ボード PCI-6071E 2 枚, PC(CPU: Intel Core i7 2.80GHz, Memory: 2GB) により構成される。C++ プログラムによりサンプリングレート 10000Hz, 64CH での計測信号から閾値によるスパイク検出により得た発火系列を用いて結合を推定し、ネットワーク可視化ソフトウェア graphviz を用いて推定された MED 上のネットワークの可視化を行った。

ここで、更新式(3)・(4)をそのまま実装した場合、各時刻において全細胞組み合わせについての計算が行われる。だが、文献[4]でも触れられているとおり、 $x_t^{(n)}$  がほぼいたるところ 0 である性質(スパース性)により、 $x_t^{(n)}=1$  である  $n, t$  のみを記憶・演算す