

平成 27 年度

修士論文

シリコン神経デバイスと培養神経系の接続

指導教員 小林徹也 准教授

東京大学大学院工学系研究科  
電気系工学専攻

学籍番号 37-146416

氏名 浅見周佑

# 目次

1	研究背景・目的	3
2	シリコン神経デバイス	5
2.1	ニューロンの特性	5
2.2	ニューロンモデル	6
2.3	Kohno モデル	7
3	培養神経系	9
3.1	大脳新皮質の摘出	10
3.2	MEA の洗浄	10
3.3	神経細胞の播種・培養	10
4	電極刺激生成装置	12
4.1	Micro Electrode Array	16
4.2	抑制性刺激	19
5	インターフェース装置	28
5.1	スパイク検出	31
5.2	同期発火の予測	34
5.3	レーザ刺激	43
6	まとめおよび今後の課題	47
7	謝辞	48

# 1 研究背景・目的

近年、脳の情報を読み取ろうと試みるブレインデコーディング (brain decoding) や、読み取った情報から情報処理を行う、または脳に刺激を与え脳に情報を伝達する際のインターフェースとなるブレインマシンインターフェース (brain machine interface) に関する研究が広く行われている。これらの研究の応用例としては生体の神経から読み取った情報によって制御する義手 [7] や、カメラから得た画像を脳に送信する人工網膜 [9] などがある。このような生体の機能を補うことを目的とした装置には高いリアルタイム性が要求される。また、これらの技術をさらに進歩させるためには生体の神経系に対する理解をより一層深めることが重要である。

神経系の動作を調査する方法は大きく分けて 2 種類に分類することができる。実際の神経細胞によるものと、それをモデル化したものによる方法である。前者はさらに生体内 (in vivo) で行うものと体外で行う (in vitro) とに分けることができる。両者とも実際の神経細胞を用いるためリアルタイム性の点で非常に優れる。しかし、ネットワーク内の神経細胞の細かい動作を確認することは大変困難である。後者はモデル化した物をデジタルコンピュータ上でシミュレートする方法と実際の回路で実現する方法がある。シミュレーションはネットワーク内の細かな解析に向いているが、ネットワークの規模が大きくなるに連れてリアルタイムでの処理は困難になる。実際の回路で実現する方法はさらに FPGA 等を用いたデジタル回路によるもの [4] と完全なアナログ回路によって実現するもの [5] がある。ネットワークの規模によらずリアルタイム性を確保することが可能である。

本研究の目的は実際の神経細胞からなるネットワークと数理モデルから作成したシリコン神経デバイスとを接続することでネットワークが自発的に見せる動作がネットワーク内のニューロンに与える影響、およびネットワーク内のニューロンの動作がネットワーク全体の動作に及ぼす影響の調査を可能にすることである。本研究が構築を目指すループの概略図を fig.1 に示す。

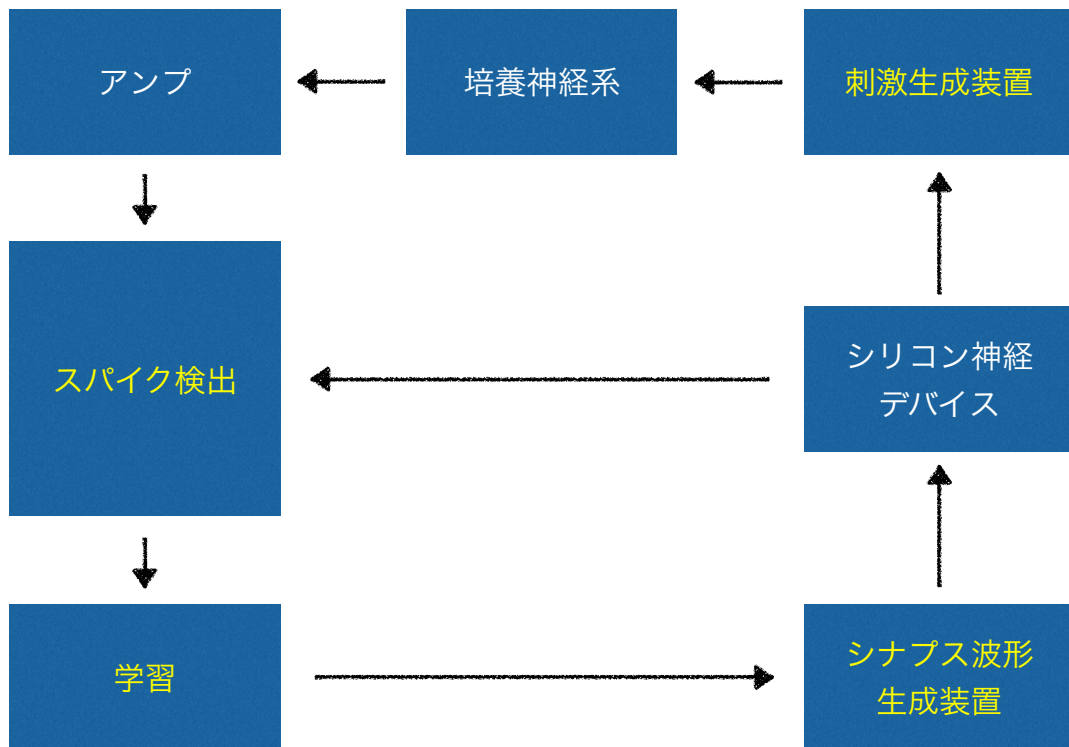


fig.1 概略図

本研究では fig.1 において黄色い字で示している刺激生成装置、スパイク検出、学習およびシナプス波形生成装置の作成を行い、刺激生成装置およびスパイク検出の動作試験を行った。また、刺激生成装置を用いて抑制性刺激、スパイク検出装置を用いて同期発火予測を試みた。なお、本研究は東京大学先端科学技術研究センター神埼・高橋研究室の安田秀策氏との共同研究で行った。培養神経系、MEA、アンプ、およびレーザー刺激に関してはすべて安田氏に準備して頂いた。

## 2 シリコン神経デバイス

本章では本研究で用いるシリコン神経デバイスについて説明する。

本研究で用いるシリコン神経デバイスは神経模倣デバイスの一種類であり、神経細胞の動作を再現した数理モデルをアナログ集積回路で実現したものである。神経模倣デバイスにはこの他にも FPGA 等を用いたデジタル回路によるものなどが存在する。

### 2.1 ニューロンの特性

ここでは神経模倣デバイスの模倣の対象であるニューロンの特性について説明する。fig.2 にニューロンの概略図を示す。

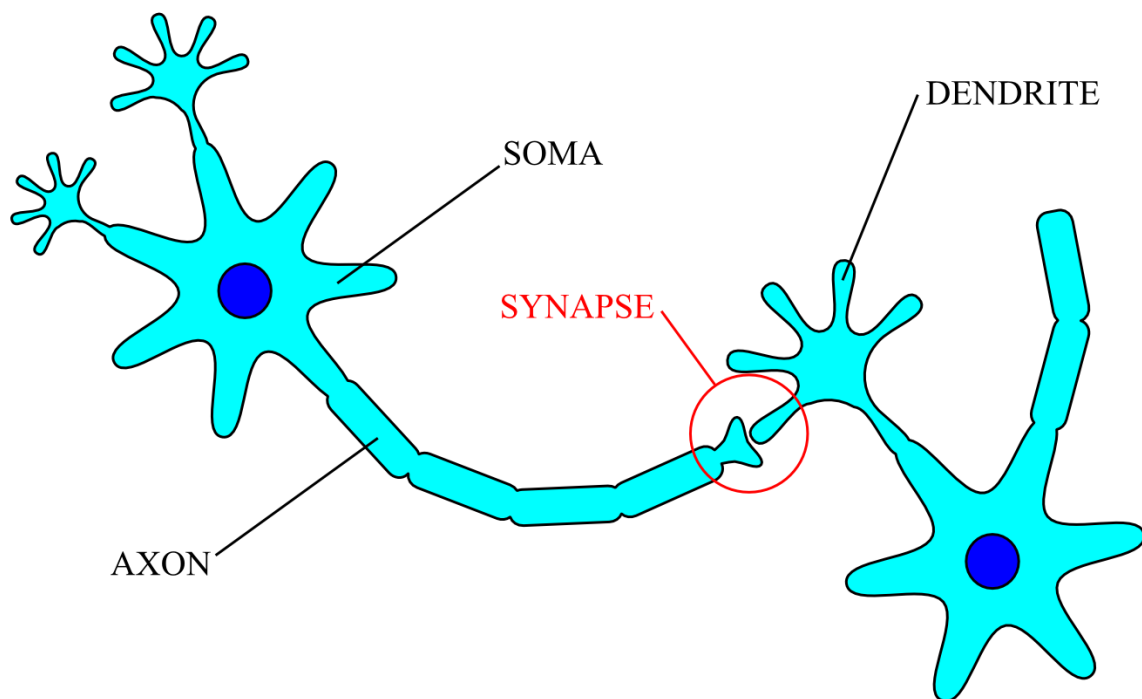


fig.2 ニューロンの概略図

ニューロンは脳を構成する最小単位であり、他の複数のニューロンと結合するこ

とでネットワークを形成している。この結合部分をシナプスと呼ぶ。ニューロンはシナプスを介して他のニューロンから情報を受け取り、受け取った情報を統合し、その結果をシナプスを介して他のニューロンに出力する [22]。人間の脳は約 860 億個のニューロンから構成されており [1]、各ニューロンが 1000 個以上のシナプスを有している [19]。しかし、その消費エネルギーは数十 W のオーダーであり [10]、神経模倣デバイスによって大規模なネットワークを実現する際には各素子の消費電力が低いことが要求される。

## 2.2 ニューロンモデル

神経模倣デバイスはニューロンの活動をモデル化したものを電子回路などによって実現したものである。そこで、ここではニューロンのモデル化について説明する。ニューロンのモデル化は conductance-based モデル、現象論的モデル、および数理的構造に基づいたモデルとに分類することができる。

Conductance-based モデルとしては Hodgkin-Huxley モデルが挙げられる。このモデルはイオンチャネルを流れるイオン電流を電圧源とコンダクタンスからなる電気的な等価回路としてモデル化しており、ニューロンの活動メカニズムを比較的忠実に再現したモデルである。しかし、数学的に複雑なモデルであり数値解析以外の論理解析は難しい [21]。

現象論的モデルは設計者がニューロンの性質のうち重要と考えられるものを抽出し、その性質のみを満たすよう設計されたモデルである。例えば現象論モデルの代表としてあげられる leaky-integrated-and-fire[3] モデルは膜電位がしきい値を超えた時に活動電位を生成するという性質のみをモデル化したものであり、ニューロンが活動電位を生成するメカニズムは無視している。現象論的モデルによる神経模倣デバイスは回路構成を単純化することが容易なため大規模なネットワークを構築する際などには非常に有益である反面、設計者が重要であると考えた性質以外を無視していることから、実際には情報処理に重要な役割を果たしている性質を無視してしまう可能性もある。

数理的構造に基づいたモデルはニューロンの活動の分岐構造など数理的な構造に着目したモデルである。例として Hodgkin-Huxley モデルをリダクションした FitzHugh-南雲モデル [21] や Morris-Lecar モデル [14] が挙げられる。これらのモデ

ルは conductance-based モデルを単純化しながらもニューロンの示す様々な活動パターンを再現することができる。本研究で接続を想定しているシリコン神経デバイスは数理的手法により電子回路として実装しやすく設計された Kohno モデル [6] を用いている。

## 2.3 Kohno モデル

ここでは Kohno モデルについて説明する。Kohno モデルの式を以下に示す。

$$C_v \frac{dv}{dt} = -g(v) + f_m(v) - n - q + I_a + I_{stim} \quad (1)$$

$$\frac{dn}{dt} = \frac{f_n(v) - n}{T_n} \quad (2)$$

$$\frac{dq}{dt} = \frac{f_q(v) - q}{T_q} \quad (3)$$

$$g(v) = S \frac{1 - \exp\left(-\frac{\kappa}{U_T}(v - \theta)/2\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\kappa}{U_T}(v - \theta_y)/2\right)} \quad (4)$$

$$f_x(v) = M_x \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\kappa}{U_T}(v - \delta_x)/2\right)} \quad (5)$$

ここで  $v$  は膜電位、 $n$ 、 $q$  はそれぞれ時定数の速いイオン電流、時定数の遅いイオン電流を抽象化したものである。 $I_a$ 、 $I_{stim}$  はそれぞれ定常電流、刺激電流であり、ともに膜電位に依存しない。 $g(v)$  および  $f_x(v)$  はシグモイド関数であり、MOSFET で実現が容易な形で記述されている。

以下の fig.3 および fig.4 に本研究で用いるシリコン神経デバイスの出力波形の一例を示す。

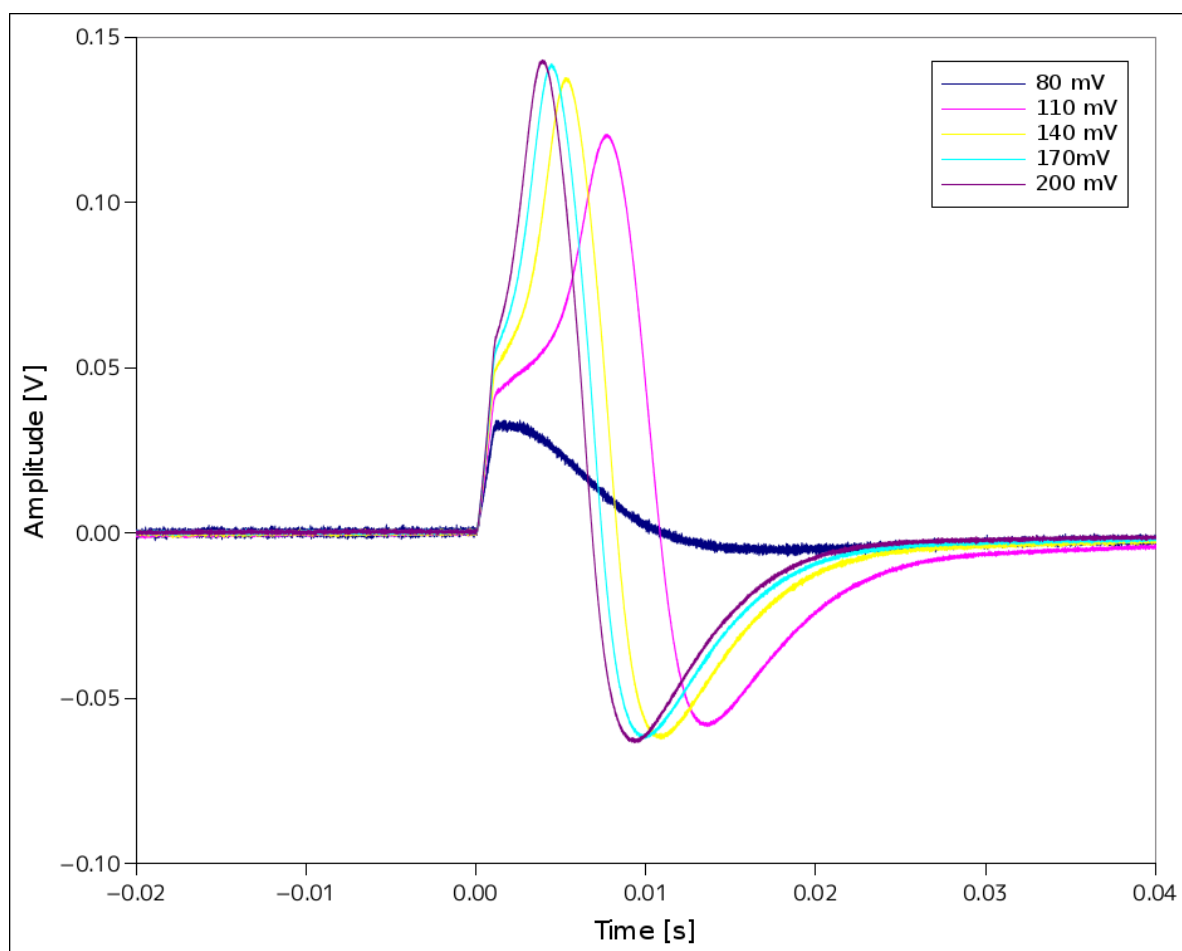


fig.3 シリコン神経デバイスの出力波形：通常の活動電位



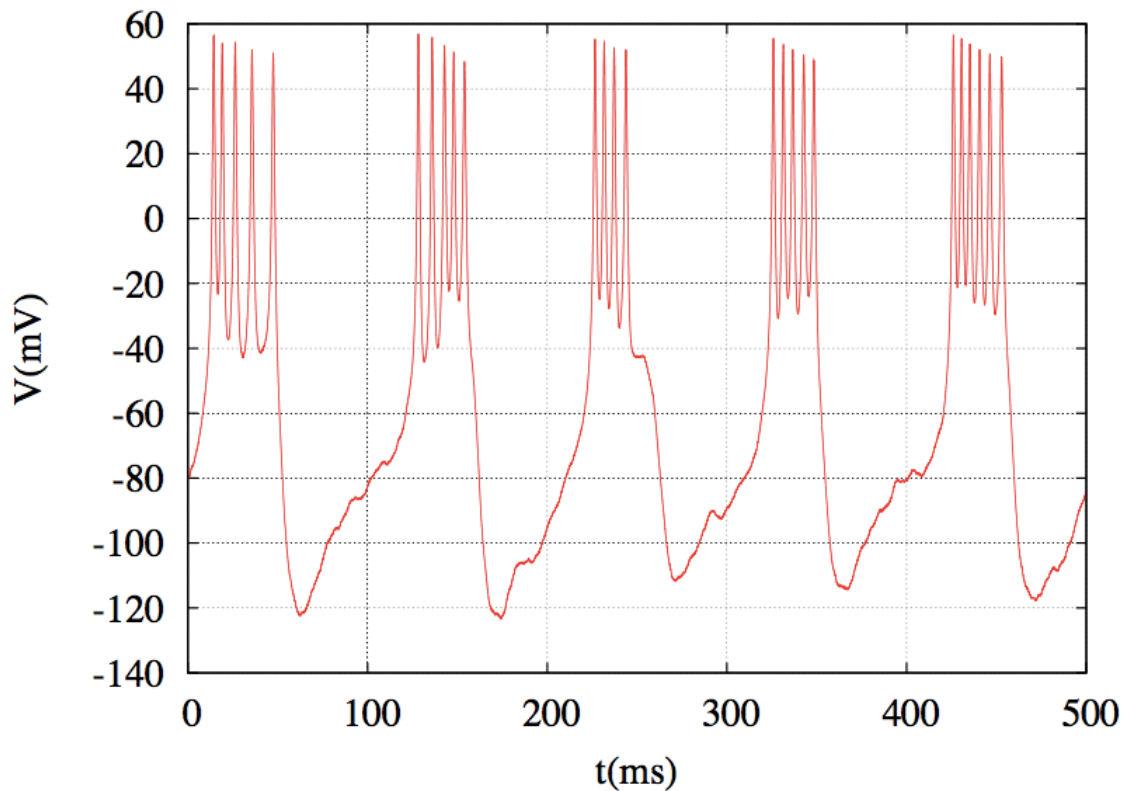


fig.4 シリコン神経デバイスの出力波形：方形波バースト [20]

### 3 培養神経系

ここでは本研究で用いる培養神経系について説明する。培養は共同研究者である安田氏が行った。

本研究で用いる培養神経系はウイスターラットの胎児の脳新皮質にあたる部位を Micro Electrode Array(MEA) 上に培養したものである。本研究で用いた MEA は 4.1 章にて説明する。摘出から培養までの手順は文献 [12] を参考に一部改変を行ったものである。その詳細な手順を以下に示す。なお、これらの手順はすべて「東京大学動物実験マニュアル」に則って実施されている。

### 3.1 大脳新皮質の摘出

まず、妊娠 18 日目のウィスターラットを麻酔し、安楽死させた後子宮を摘出する。麻酔にはイソフルランを使用し、安楽死は頸椎脱臼により行った。摘出した子宮を Hank's Balanced Salt Solution(HBSS, ライフテクノロジーズ) に浸し、胎児を摘出した。さらに摘出した胎児から脳を摘出、大脳新皮質にあたる部位を切り出した。この大脳新皮質を Hibernate-E Medium(ライフテクノロジーズ) を入れたチューブに入れ、4℃以下で約 1 日保存した。

### 3.2 MEA の洗浄

MEA の表面を細菌による汚染を予防するため Terg-A-Zyme Enzyme-Active Powder Detergent(ALCONOX) の 1% 溶液で洗浄し、オートクレーブにかけた。MEA の温度が下がった後、表面を親水性にするために濃度 0.05% の Polyethyleneimine(PEI、シグマ アルドリッチジャパン) を 100 $\mu$ L 滴下した。室温で 30~60 分放置した後、純粋で洗浄、さらに 0.02mg/mL Laminin 15 $\mu$ L で電極部をコーティングした。細胞を播種する前に Laminin が蒸発してしまうことを防ぐため気温 37℃、二酸化炭素濃度 5% に保たれたインキュベータ内で保管した。

### 3.3 神経細胞の播種・培養

摘出した大脳新皮質から神経細胞を分離するため、先に保存しておいた大脳新皮質を濃度 0.25% の Trypsin-EDTA(ライフテクノロジーズ) 2ml に移し替え、5 分おきに軽く混ぜながら 37℃で 15 分間温めた。その後 Neurobasal(ライフテクノロジーズ) にウマ血清 (Hyclone) 10%、GultaMax(ライフテクノロジーズ) 0.25%、B-27(ライフテクノロジーズ) 2% を添加した播種用培地に移し替え、ピペッティングによって機械的に分解した。この播種用培地の上澄み液を 40 $\mu$ m セルストレイナー (Falcon) でろ過し細胞以外の物を除去する。セルカウンタ (Hirschmann EM-Techcolor) より細胞の濃度を計測し、濃度が 10,000~15,000 cell/ $\mu$ L となるように調整した。

MEA 上に濃度を調整した神経細胞の播種を行う。MEA 表面の余分な Laminin

を除去した後、細胞を含む播種用培地を 20 $\mu$ L を MEA 上の電極部分に滴下し、沈着させるためにインキュベータで 30 分保管した。その後は主要培地を 1mL 滴下し再度インキュベータに保管した。約 1 日後、播種用培地半量である 0.5ml を同量の D-MEN(ライフテクノロジーズ) にウマ血清 (Hyclone) 10%、GultaMax(ライフテクノロジーズ) 0.25%、ビルビン酸ナトリウム (ライフテクノロジーズ) 1% を添加した通常培地と交換した。

播種後は週に 2 度培地の半量を同量の通常培地と交換し分散培養系を維持した。実験には培養神経系は上記の手順により播種を行った後、3 週間以上経過し十分に発達した培養神経系を用いた。

## 4 電極刺激生成装置

ここでは作成した電極刺激生成装置について説明する。作成した電極刺激生成装置の画像を fig.5 に示す。これは fig.6 において刺激生成装置に当たる部分である。

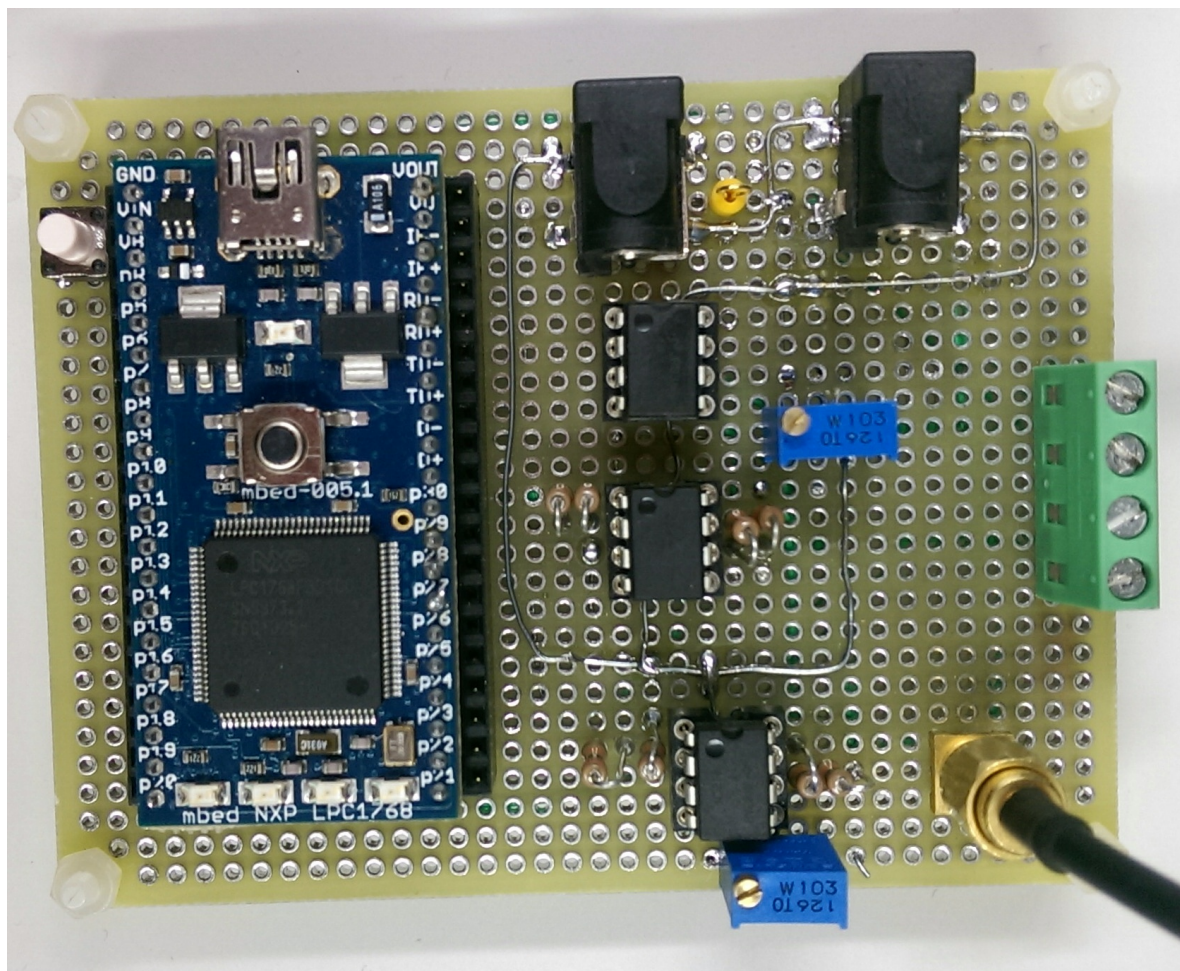


fig.5 刺激性装置

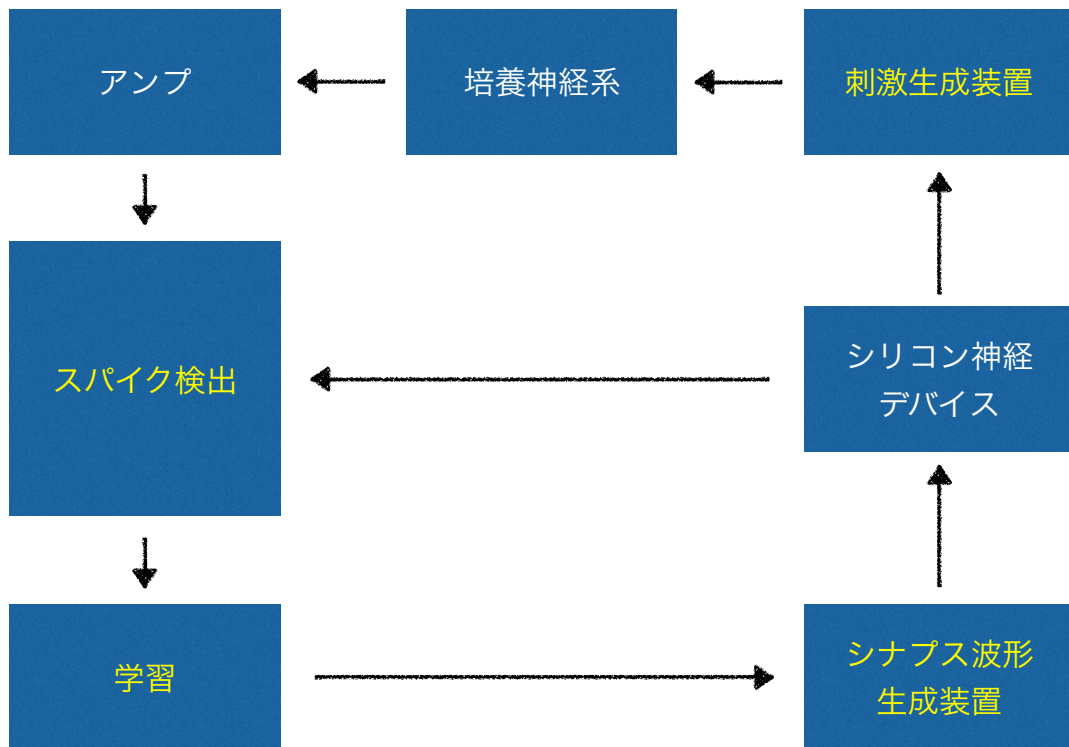


fig.6 概略図（再掲）

この装置は電極刺激の電圧波形を自由に設定し出力することができる。また、この装置は3つの出力があり、そのうち2つは片方の出力に対してもう片方が同タイミングで正負が反転したものを出力する。残りの1つはアンプにタイミングを送信するためのものである。この装置の主な処理はすべてC言語で記述し、mbedで行っている。mbedに内蔵されているデジタル-アナログコンバータの出力をオペアンプを介して増幅、反転などを行い出力を生成する。この刺激装置で生成した出力波形の一例をfig.7に示す。測定、記録にはwaveRunner 44Xi(LeCroy)を用いた。

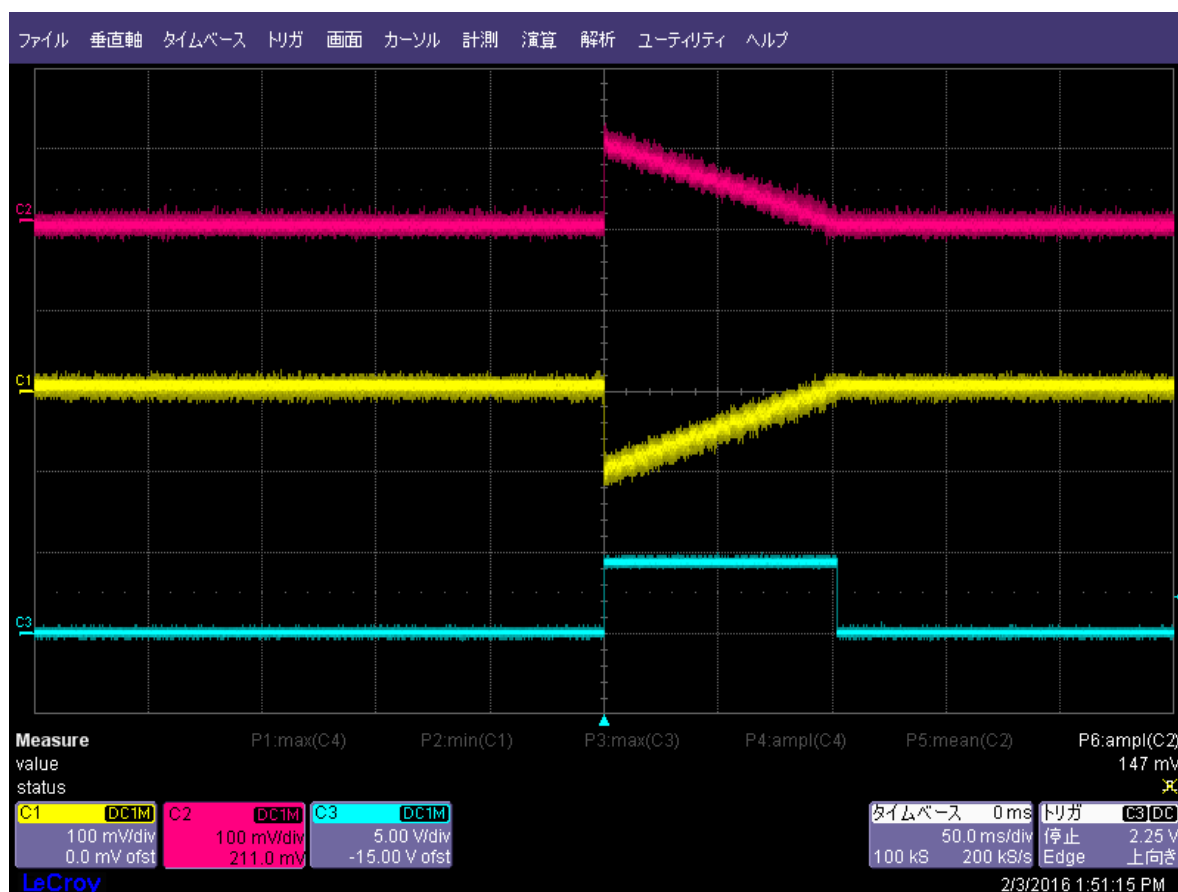


fig.7 刺激装置の出力例

赤が正の出力、黄色がその反転出力、青がアンプを遮断するための信号である。横軸は 50ms/DIV、縦軸は赤および黄色が 100mV/DIV、青が 5.00V/DIV である。

通常シナプスにはリガンド依存性のイオンチャンネルと電圧依存性のイオンチャンネルがある。活動電位の生成はリガンド依存性のイオンチャンネルが開かれることによりニューロン内部にイオン電流が流入、ニューロン内部の電位が上昇する。それにより電圧依存性のイオンチャンネルが開くことにより活動電位が生成される。電極刺激においては上記にプロセスとは異なり、細胞外の電位を意図的に下げることで細胞内外の電位差を上げることで電圧依存性のイオンチャンネルを開き活動電位を生成するというプロセスである。

通常電極刺激を行う際は正負の二相性のパルスが用いられる。はじめに正のパルスを入力し次に負のパルスを入力する。fig.8 にその波形を示す。

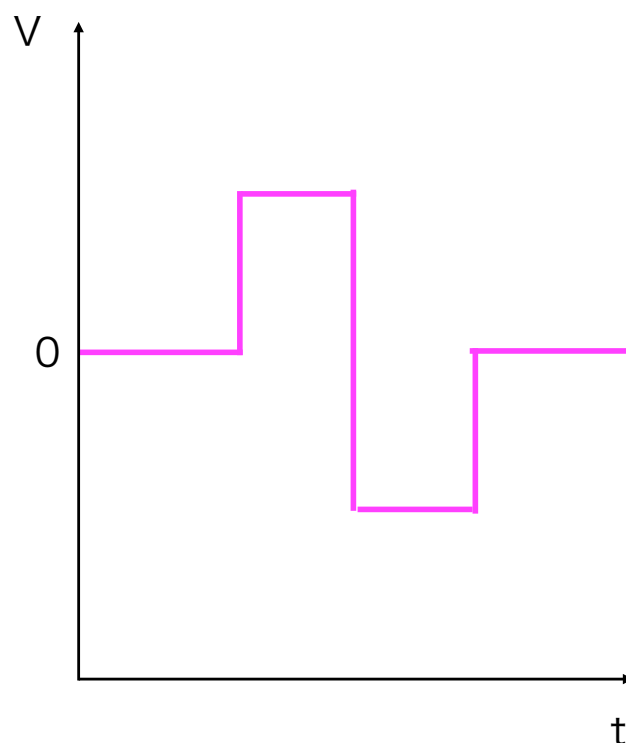


fig.8 二相性のパルス

fig.8 に示すような二相性パルスを用いる理由は2つあり、1つは培養神経系の培養液が電離してしまうことを防ぐためであり、もう1つは応答性が高いためである [17]。

Wagenaar らは波形による応答性の差を調査しており。正負の順の二相性パルスが最も応答性が高いことを示している。また、パルスの振幅および継続時間と応答性に相関があることも示している。

## 4.1 Micro Electrode Array

本研究で用いた Micro Electrode Array(MEA) について説明する。今回使用した MEA は multichannel system の 60MEA200/30iR-Ti-gr である。fig.9(a) に 60MEA200/30iR-Ti-gr を示す。

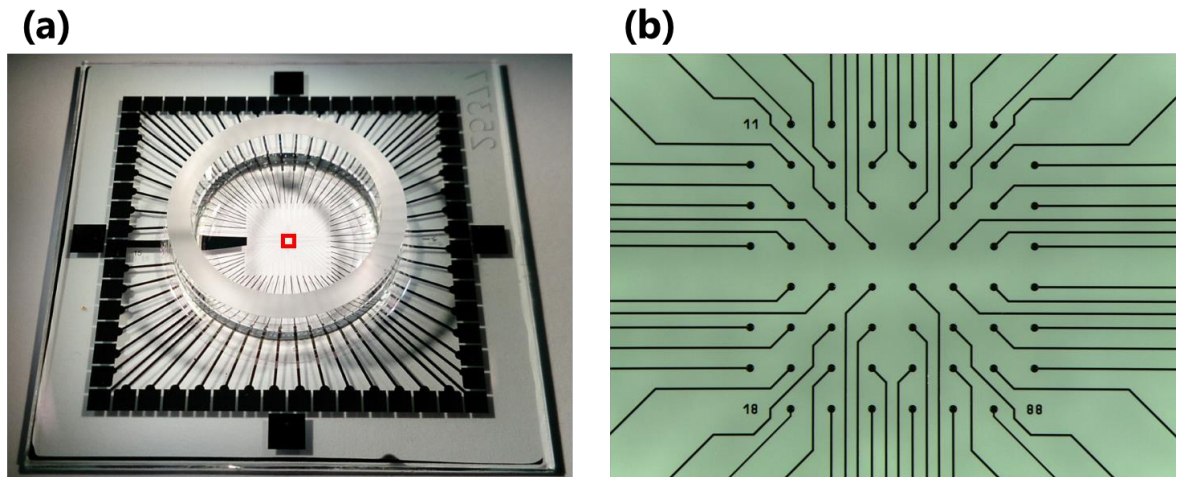


fig.9 60MEA200/30iR-Ti-gr(multichannel system)(共同研究者の修士論文より引用)

MEA の表面には TiN 製の電極が fig.9(b) の様に配置されている。59 個の刺激および観測用の電極と 1 個のリファレンス電極の計 60 電極である。電極の直径は  $30\mu\text{m}$ 、各電極間の距離は  $200\mu\text{m}$  である [11]。実験にはこの MEA 上にウイスターラットの胎児の神経細胞を培養した物を用いた。培養方法は第 3 章に示したとおりである。

次に、MEA の電極の信号を増幅し観測するために用いるアンプについて説明する。今回使用したアンプは multichannel systems の MEA1060-Up-BC-PA である。MEA1060-Up-BC の画像を fig.10 に示す。



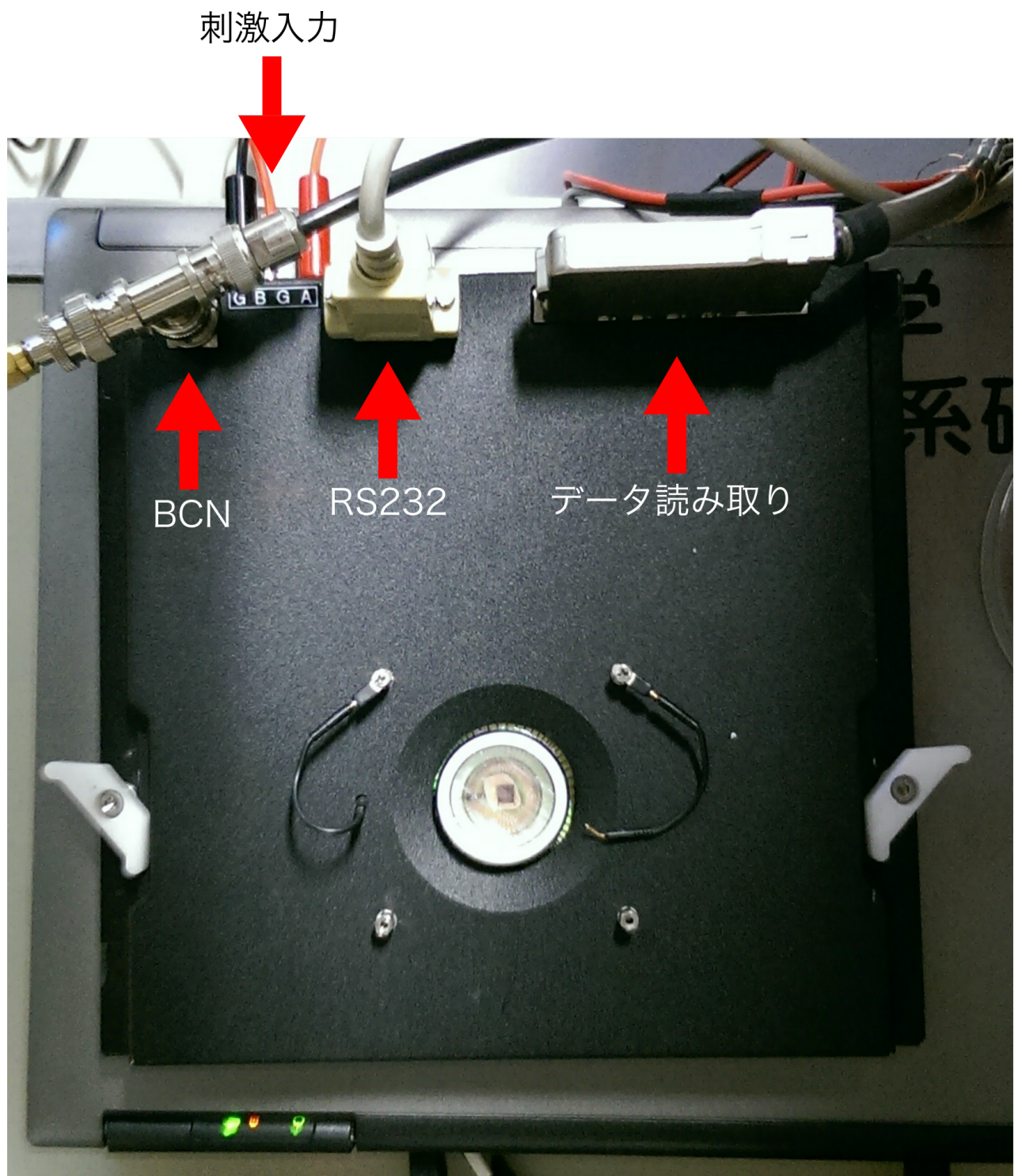


fig.10 MEA1060-Up-BC(multichannel system)

PCより、RS232端子でどの電極に刺激を行うかの情報を受信する。アンプの出力は図上のデータ読み取りより読み取ることができる。刺激入力より任意の波形を刺激として最大2種類同時に入力することが可能である。通常の刺激を行う場合は、刺激中、全電極とアンプの接続は遮断される。これは入力刺激によってアンプが飽和してしまうことを防ぐためである。これを行わずに通常の電極刺激を行うとアンプが飽和してしまい一定期間観測を行うことが不可能になる。遮断の機構を以下のfig.11に示す。

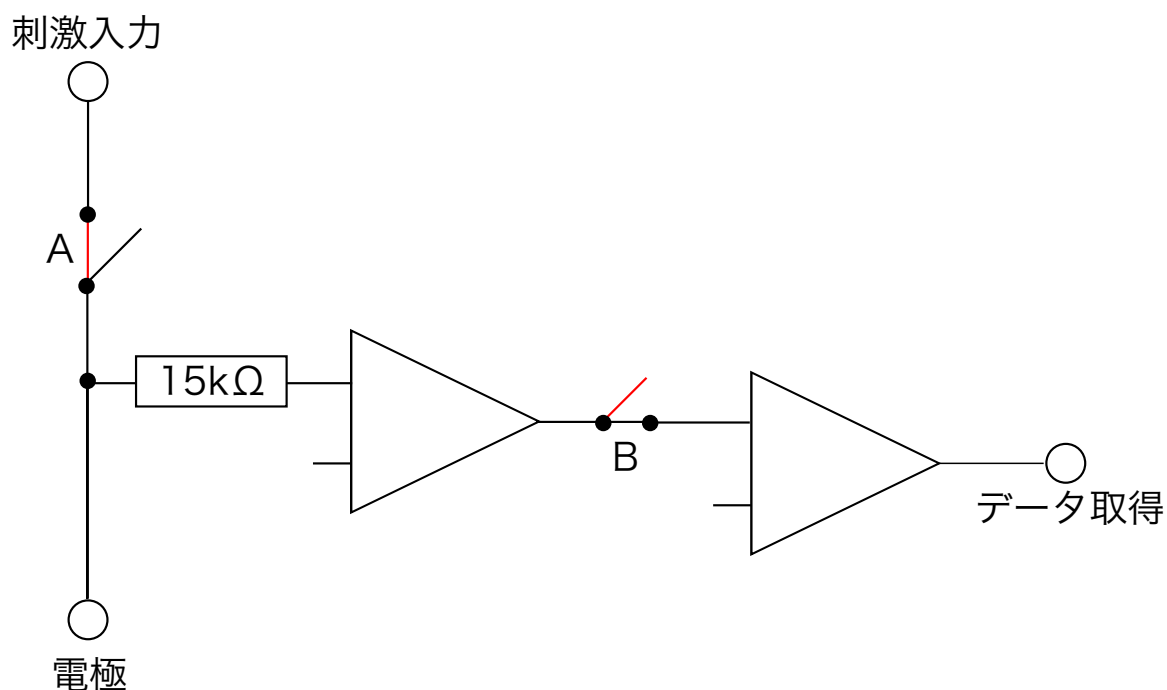


fig.11 遮断機構

アンプとの遮断、接続はBCN端子にデジタル信号を入力することで行う。信号が0の間はfig.11のスイッチAは開いており、スイッチBは閉じて電極はデータ取得端子へ接続されている。信号が1の間スイッチAが閉じ、スイッチBが開くことで電極はアンプから遮断される。また、設定を変更することで刺激にもちいる電極は常に刺激入力と接続し、計測を行う電極は常にアンプと接続することも可能である。この状態で刺激を行う場合はアンプが飽和してしまわないように工夫が必要となる。

## 4.2 抑制性刺激

ここでは抑制性の刺激について説明する。先に示した様に MEA への電極刺激では興奮性の入力が行われることが一般的である。しかし、神経系において他のニューロンからの入力は興奮性のものだけではなく、抑制性のものも存在する。そのため培養神経系を演算装置として用いる場合、抑制性の入力が必要となる可能性が高い。また、培養神経系は fig.12 に示すような全体的な同期発火を起こす [16]。

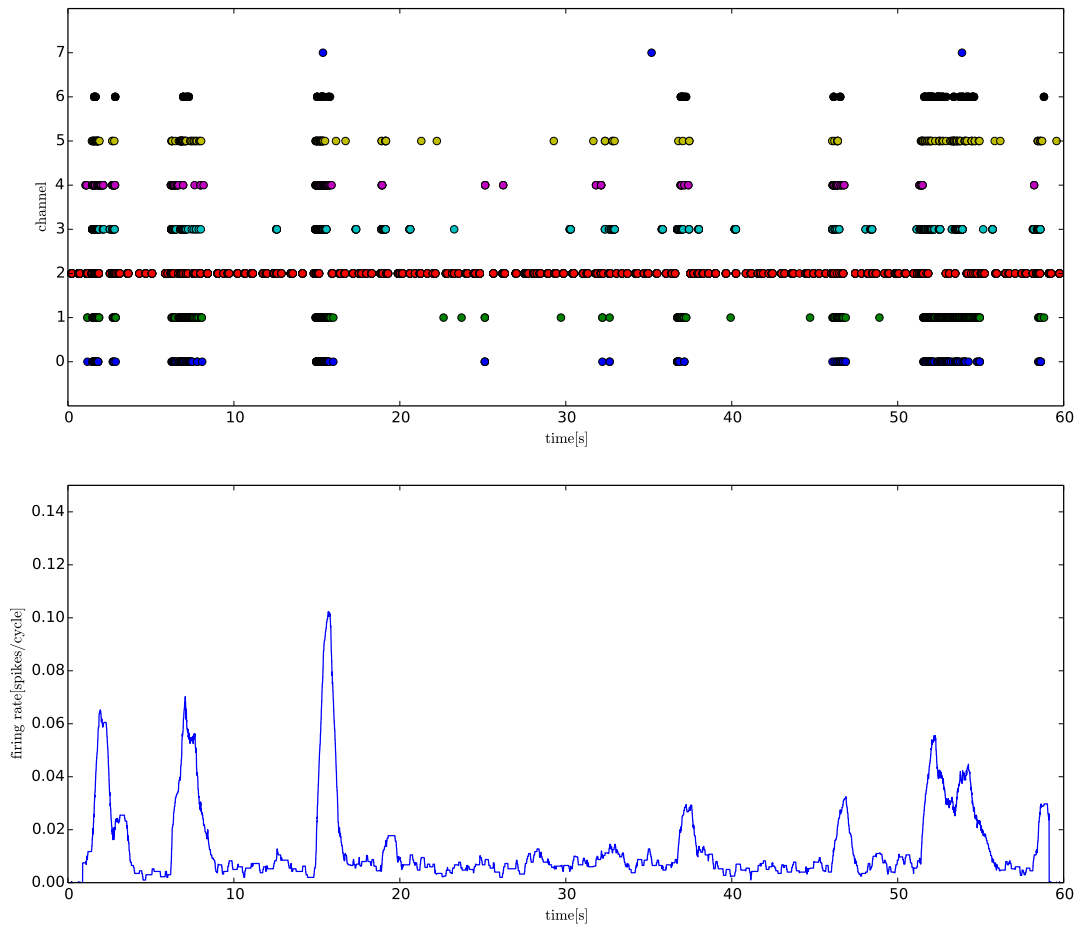


fig.12 同期発火

このような同期発火は実際の生体の神経系においても観測され、適切な接続を構築するために重要な役割を果たしていると考えられている [8]。しかし、実際の神経系においてこのような同期発火が生じるのは極初期の数日から数週間ほどの期間でのみ観測されるが、培養神経系においてはこのような同期発火がその培養神経系が死滅するまで観測される。また、このような同期発火はてんかん患者の脳においても観測される。このような同期発火を抑制することができればてんかんの治療に繋がる可能性もある [16]。Wagenaar らはこのような同期発火を抑えるために分散的

に培養神経系に刺激を与えることで一定の成果を上げている [16]。しかし、この方法で同期的な発火の発生を抑えることは可能だが局所的に細胞の活動を抑制することはできない。

そこで、この実験では電極刺激による抑制性入力の実現を試みた。

Takahashi らの研究 [13] ではラットの神経束に正の電流刺激を与えることで過分極させることで伝達を阻害できることを示している。しかし、Wagenaar らによって正のパルスによる電圧刺激では神経細胞が活性化されることが示されている。また、電流制御刺激時の電極の電圧変化は電圧制御刺激時と比較して電圧変化が緩やかであることも示されている [17]。

そのためまず、fig.13~15 に示す 3 パターンの波形の電圧刺激を行いどのような差が生じるのかを調査した。簡便のためそれぞれ刺激波形 1~3 と呼称する

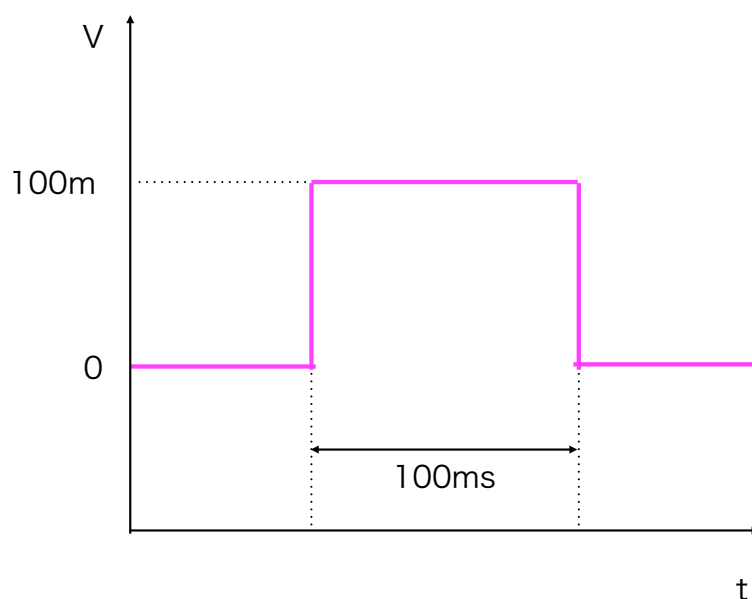


fig.13 刺激波形 1

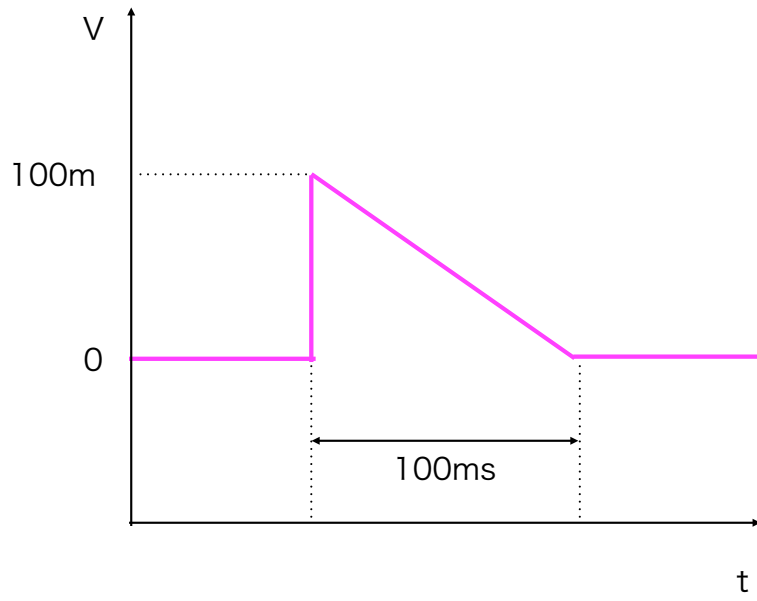


fig.14 刺激波形 2

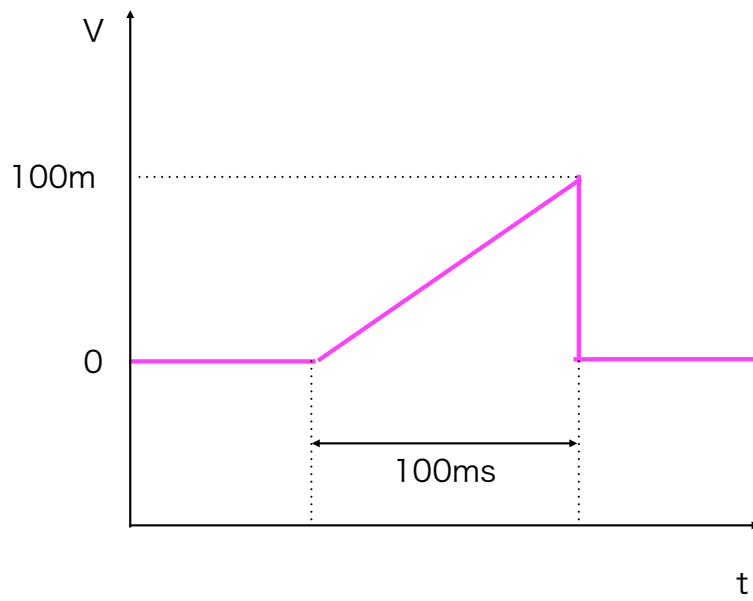


fig.15 刺激波形 3

また、実際に刺激生成装置から刺激波形 1~3 を出力した物を以下の fig.13~15 に示す。測定は全て waveRunner 44Xi(LeCroy) で行い。いずれの測定も横軸は 50ms/DIV、縦軸は赤および黄色が 100mV/DIV、青が 5.00V/DIV である。

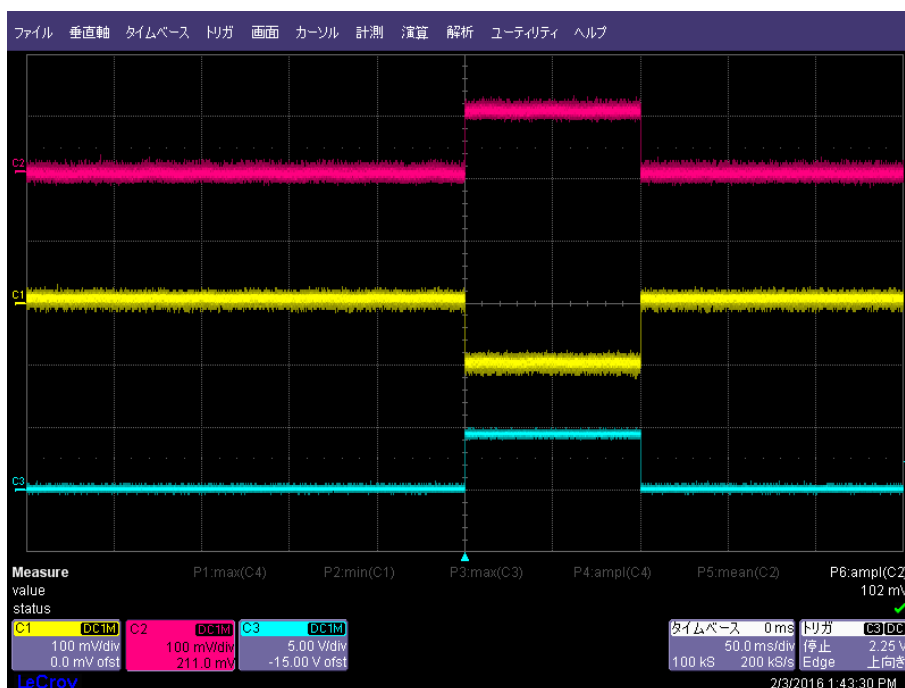


fig.16 刺激生成装置から出力した刺激波形 1

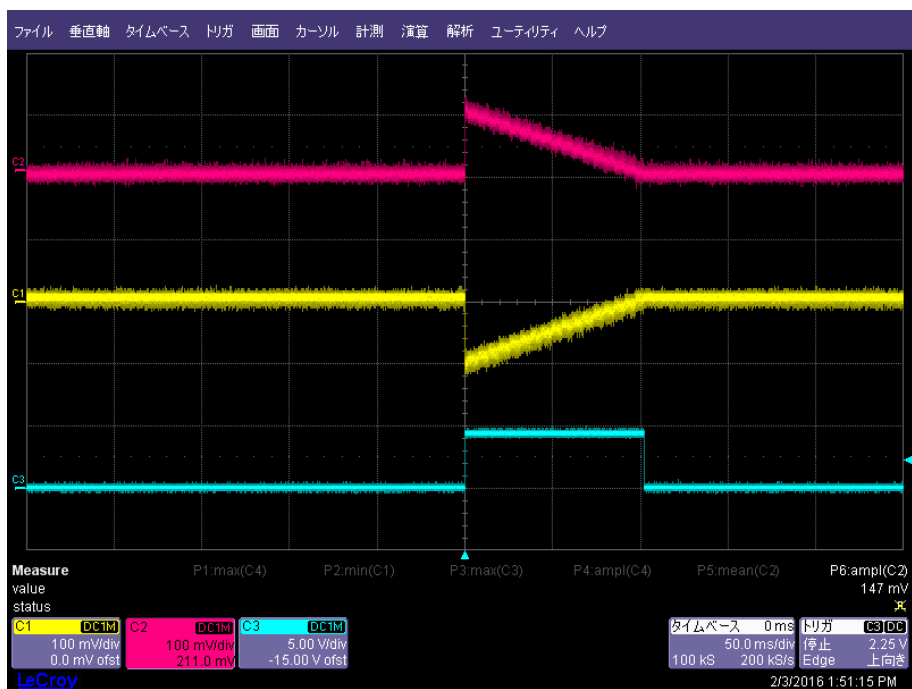


fig.17 刺激生成装置から出力した刺激波形 2



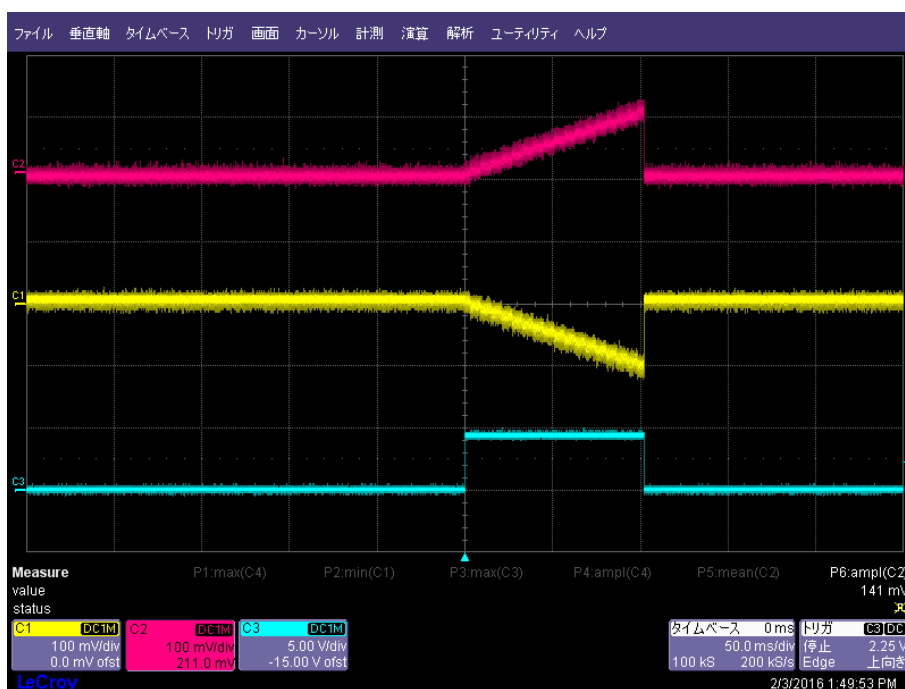


fig.18 刺激生成装置から出力した刺激波形 3

いずれの場合も意図した通りの波形を出力出来ていることがわかる。

この実験では外部の電位の変化がどのような影響を及ぼすのかを調査するため 100ms という比較的長い時間の刺激を行った。また、刺激中の神経細胞の動作を観測するためアンプと観測用の電極は常に接続、また刺激装置と刺激用の電極も常に接続した状態で実験を行った。先に述べたようにアンプを切断せずに通常の刺激を行った場合、アンプが飽和して観測を行うことができない。そこで、近接する 2 電極に同様の波形で符号が異なる刺激を入力することでアンプが飽和するのを防ぐことを考案、事前の実験で実際に刺激中の活動を観測できることを確認したうえで実験を行った。刺激を行った電極および観測を行った電極の配置を以下の fig.19 に示す。

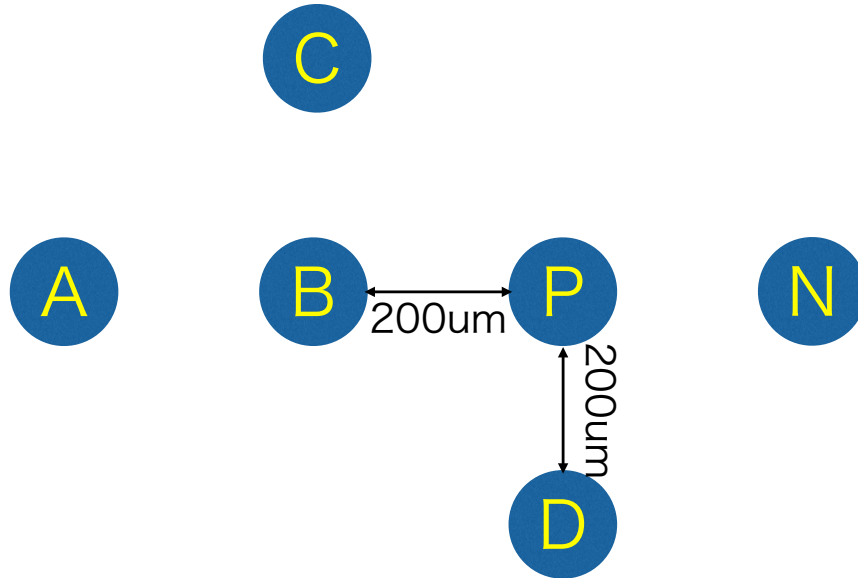


fig.19 刺激および観測を行った電極

電極 P に先に示したそれぞれの波形の刺激を行い、電極 N には P と同様の波形で符号の異なる刺激を行った。また電極 A~D で観測を行った。

実験手順は以下のとおりである。まず、刺激を入力しない状態で 1 秒ごとに 80ms 幅で 100 回神経細胞の活動を記録し各電極ごとの平均の発火率 [spike/s] を測定した。記録は MEA1060-Up-BC-PA(multichannel systems) で増幅した MEA の信号を NI CB-68LP(National Instruments) を介して PC に取り込み、MEABench を改良したもの [15] で行い、平均発火率の計算には Python を用いた。その後各刺激波形ごとに 1 秒毎に 100 回刺激を行い、刺激中の平均の発火率を計算した。その際、刺激開始直後 10ms および終了直前 10ms は計算から除外している。これは刺激開始時および刺激終了時に大きくノイズが乗り正しく計測が行えないためである。測定の結果を以下の表 1 に示す。

表 1 電極刺激波形による発火率への影響

電極	刺激波形			
	刺激なし [spike/s]	1[spike/s]	2[spike/s]	3[spike/s]
A	9.95	8.75	1.38	4.59
B	5.34	0.68	0.60	2.78
C	0.63	0.38	2.50	3.26
D	4.32	2.75	0.74	2.21

表 1 において黄色でハイライトした部分が何もしない状態での平均と比較して発火率が減少した箇所である。観測した電極中 A、B および D の 3 電極ですべての場合で発火率が減少していることがわかる。観測電極 C では刺激波形 1 のみで発火率が減少し、他の刺激波形では発火率が上昇していることがわかる。すべての刺激波形で発火率が減少した観測電極 A、B および D のいずれでも最も発火率が減少したのは刺激波形 3 の場合となった。

さらなる実験を幾度か試みたが、この実験以降刺激中にアンプからの出力にノイズが乗るようになってしまいこれ以降実験は成功しなかった。サンプル数が非常に少ないためこの結果から波形による影響を議論することは難しいが、観測電極 4 点中 3 点でいずれの波形でも発火率が減少し、またそのいずれの場合も刺激波形 3 が最も発火率が減少していることに関しては着目すべきであり、今後さらなる調査が必要である。

## 5 インターフェース装置

ここでは作成したインターフェース装置について説明する。作成したインターフェース装置の画像を fig.20 に示す。このインターフェース装置は fig.21 において同期発火検出、学習、シナプス波形出力装置を担う。

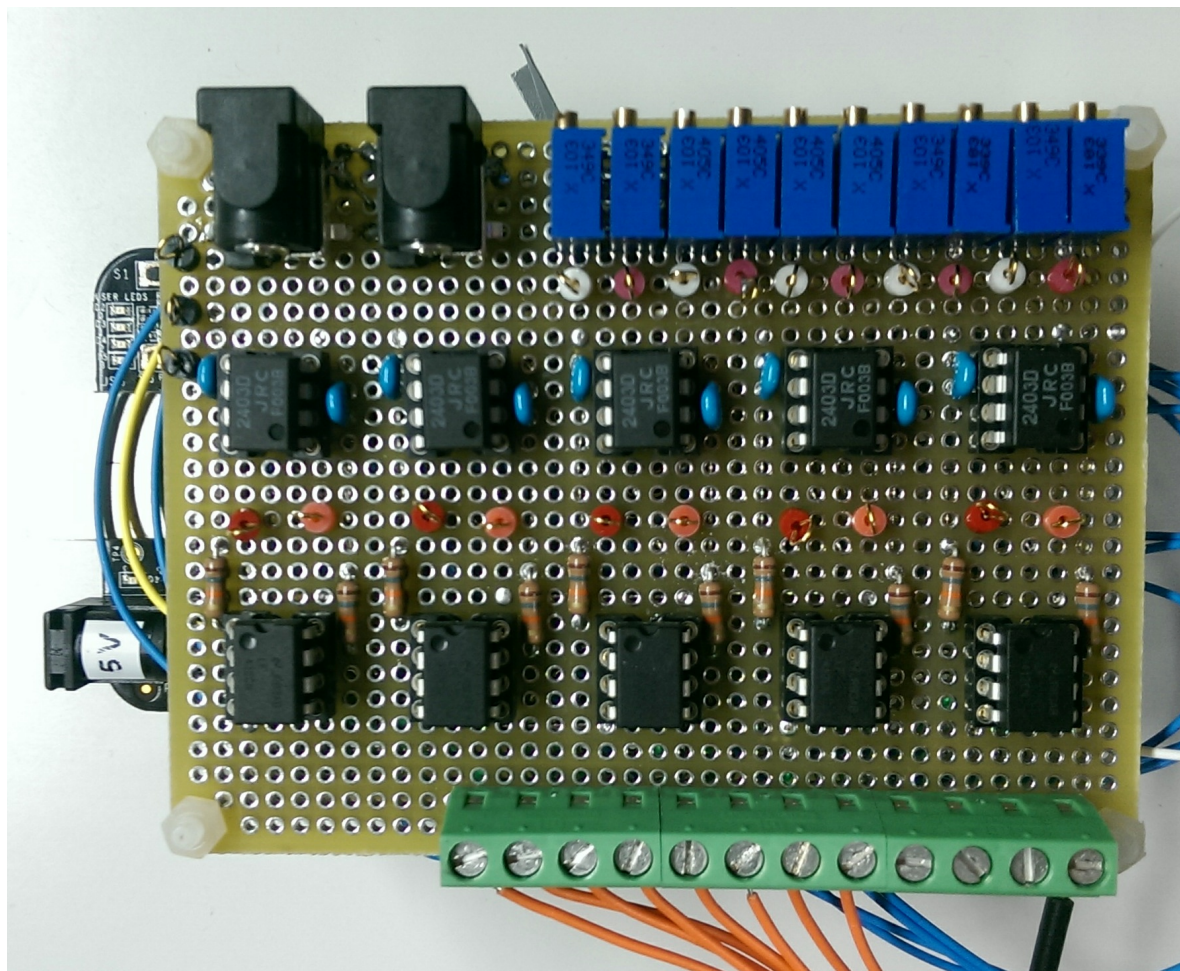


fig.20 インターフェース装置

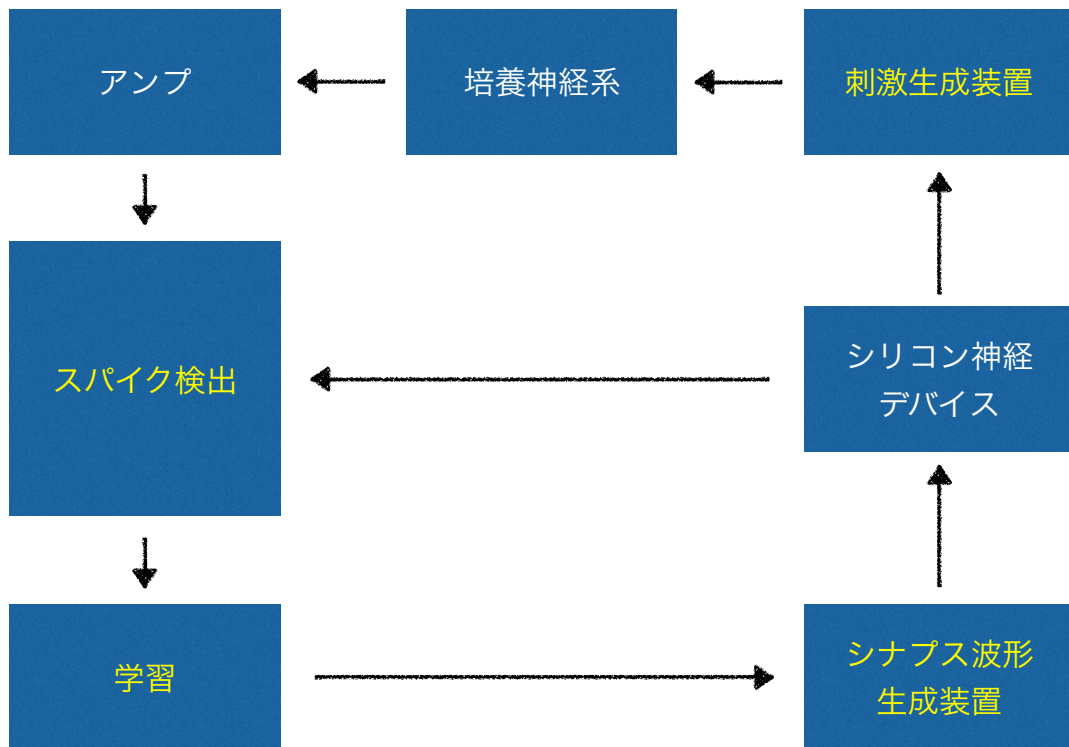


fig.21 概略図（再掲）

インターフェース装置は MEA の出力をアンプで増幅したものを入力として受け取る。入力は最大 10 個まで可能であり、またこの入力は出力段にシリコン神経デバイスを接続した際に発火の有無を受信するために用いることも想定している。入力の記録、処理などはすべて C 言語で記述し BeagleBone Black(Texas Instruments)で行っている。また、fig.22 の様にシナプス波形生成装置、シリコン神経デバイスを介さずに刺激生成装置を用いて培養神経系へ刺激を行うことも可能である。

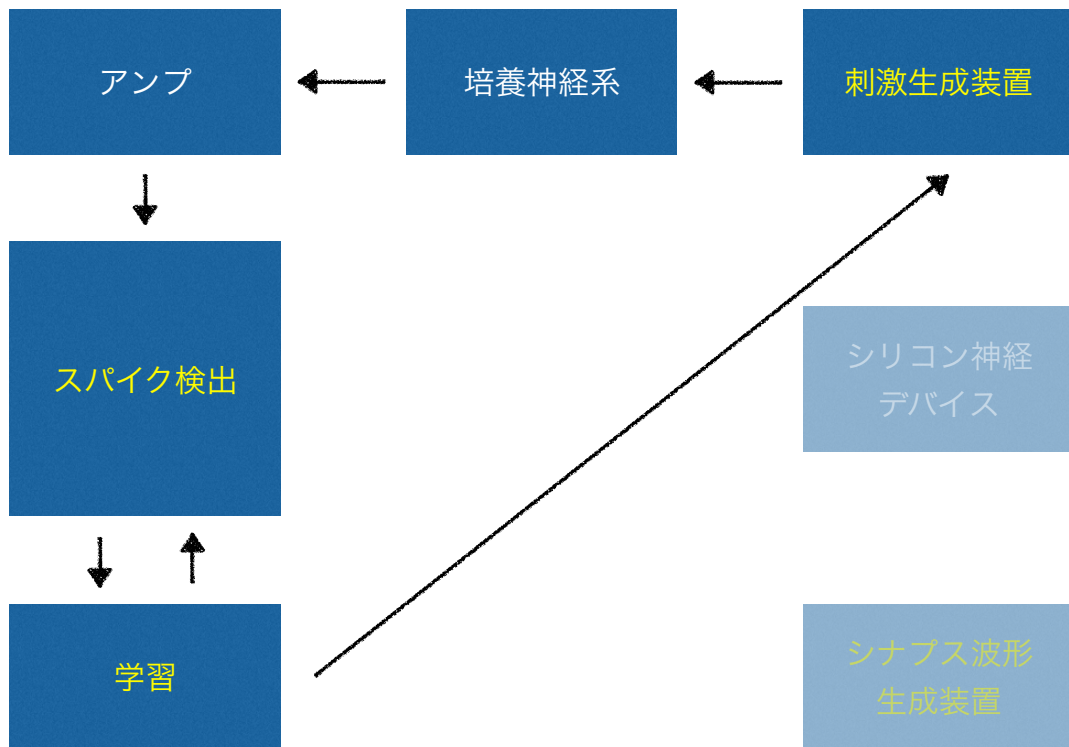


fig.22 シナプス波形生成装置、シリコン神経デバイスを介さずに刺激を行う系

## 5.1 スパイク検出

スパイク検出を行うための回路を以下の fig.23 に示す。

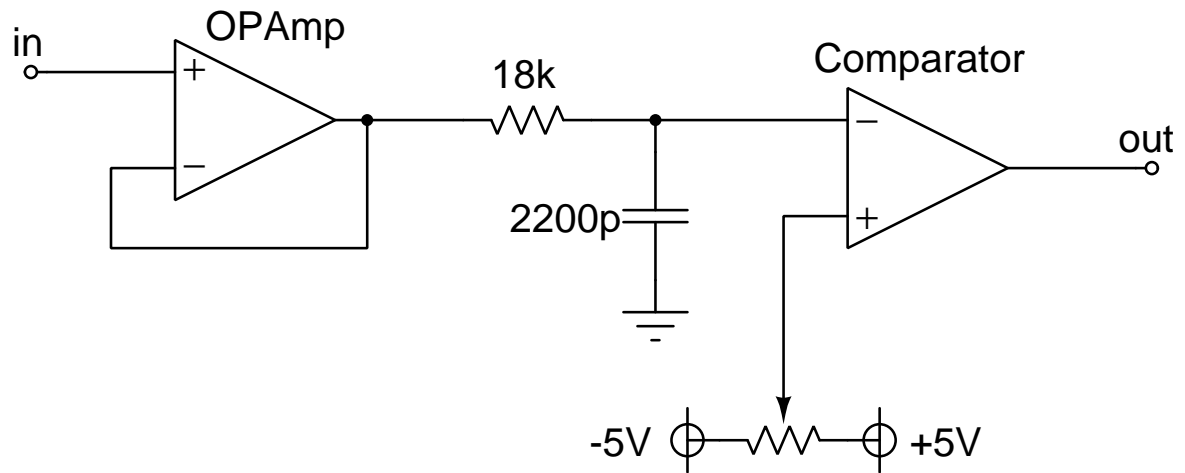


fig.23 回路図

この回路はアンプの出力波形からスパイクを検出し、パルスを生成する回路である。アンプの出力は他の装置で記録することも想定されるため、アンプの出力に影響が及ばない様にするためにバッファ回路を挿入している。また、アンプからの出力はノイズが多いため遮断周波数約 4000Hz の低域通過フィルタを挿入している。アンプの出力および低域通過フィルタの出力を fig.24 に示す。黄色が低域通過フィルタをかける前のもの、赤が低域通過フィルタをかけた後のものである。測定、記録には waveRunner 44Xi(LeCroy) を用いた。横軸が  $500\mu\text{s}/\text{DIV}$ 、縦軸がいずれも  $100\text{mV}/\text{DIV}$  である。

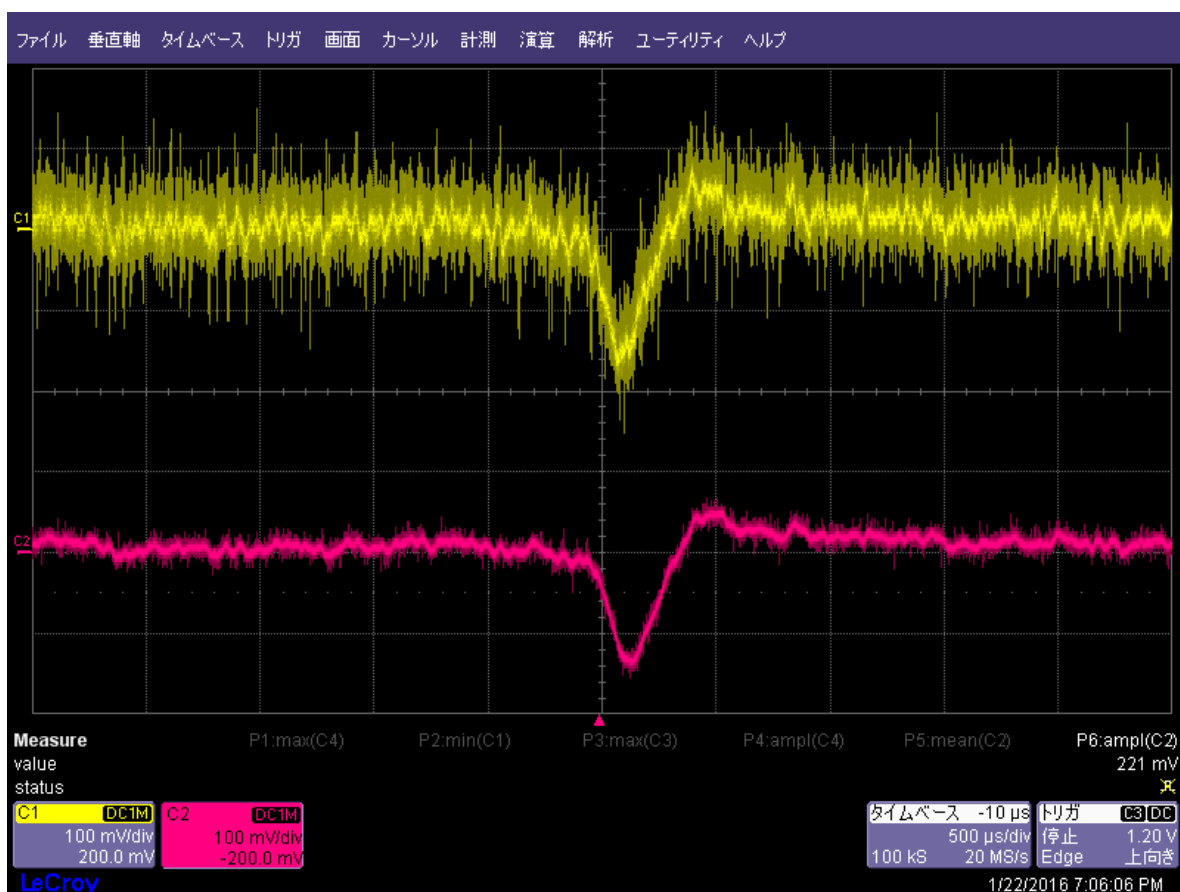


fig.24 MEA1060-Up-BC-PA の出力および低域通過フィルタの出力

上図より低域通過フィルタによりノイズが軽減されていることがわかる。

低域通過フィルタの出力をコンパレータによって 01 のデジタル信号に変換している。ポテンショメータによりしきい値を設定し、しきい値を下回った場合に 1 を出力する。コンパレータへの入力、しきい値電圧および出力を fig.25 に示す。赤が低域通過フィルタの出力、黄色がしきい値電圧、青がコンパレータの出力である。測定、記録には waveRunner 44Xi(LeCroy) を用いた。横軸が  $500\mu\text{s}/\text{DIV}$ 、縦軸は赤および黄色が  $100\text{mV}/\text{DIV}$ 、青が  $2.00\text{V}/\text{DIV}$  である。



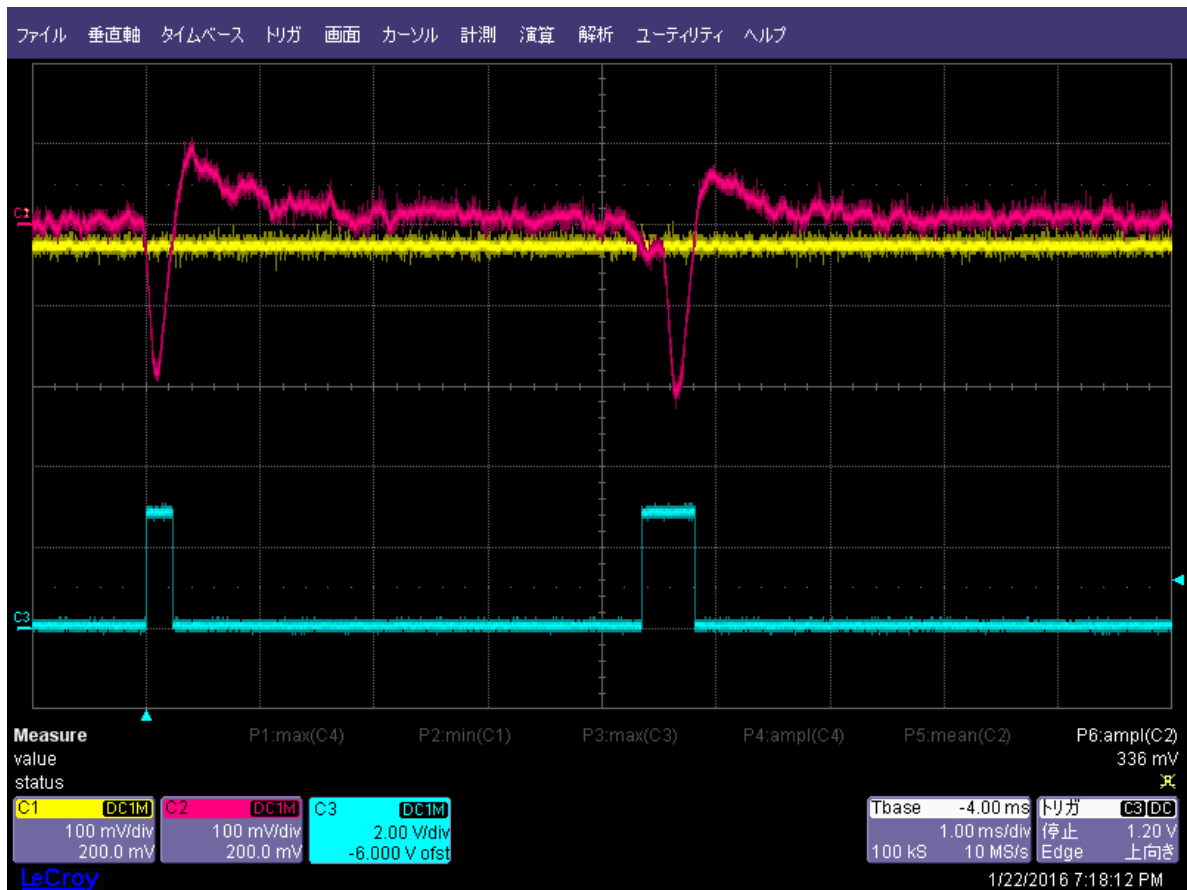


fig.25 低域通過フィルタの出力、しきい値およびコンパレータの出力

上図より低域通過フィルタの出力がしきい値を上回っている間コンパレータが 1 を出力していることが確認できる。

このコンパレータの出力を BeagleBone Black の GPIO から  $200\mu\text{s}$  ごとにビット列として読み取る。この Beaglebone Black はリアルタイム性を向上させるためリアルタイムフレームワークである Xenomai[18] を導入している。まず、GPIO の入力に当たるアドレスから 32bit のビット列を取得する。取得したビット列と入力に当たるビットが 1 となるようなビットマスクとの論理積をとることで入力の有無を得る。また、1 サイクル前の状態と現在の状態の排他的論理和をとり、さらにそれと現在の状態との論理積を取ることで立ち上がりを検出している。処理を式で表すと以下のようになる。

$$R(t) = (V(t-1) \text{ XOR } V(t)) \text{ AND } V(t) \quad (6)$$

ここで  $R(t)$  は時刻  $t$  での立ち上がり、 $V(t)$  および  $V(t-1)$  はそれぞれ時刻  $t$ 、 $t-1$  での入力の状態を示している。実際にスパイク検出を行った結果の一例を以下の fig.26 に示す。入力は 0~7ch の計 8 入力で計測を行った。

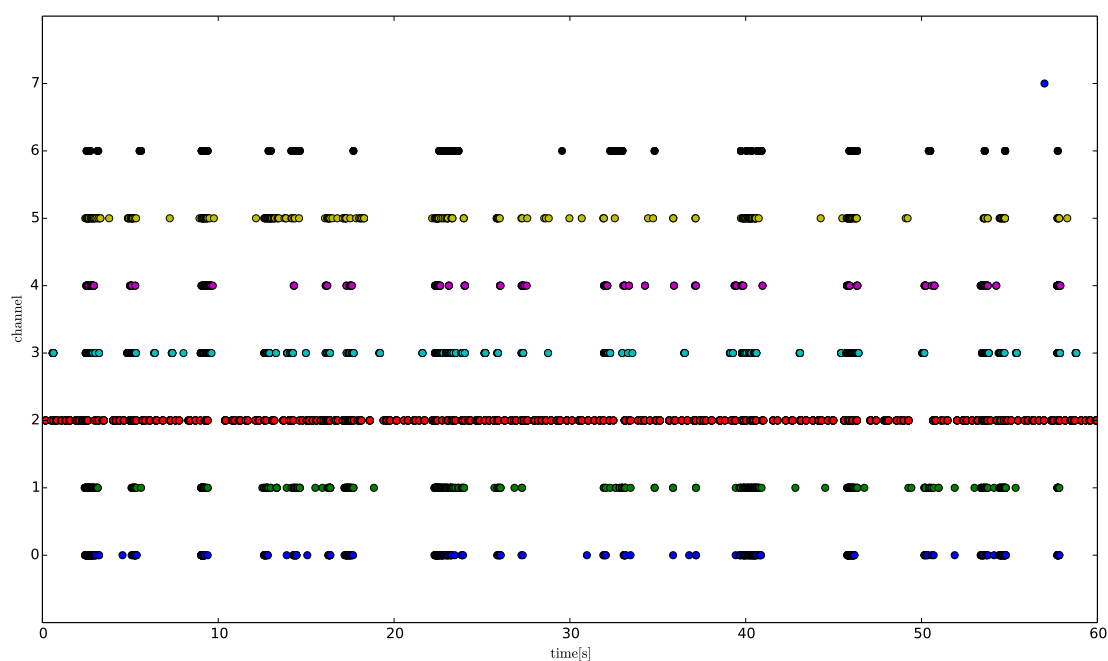


fig.26 スパイク検出

## 5.2 同期発火の予測

次に同期発火の予測について説明する。先に説明したインターフェース回路のスパイク検出機能を用いて培養神経系の同期発火の予測を試みた。大まかな手順は以下のとおりである。まず、インターフェース装置のスパイク検出機能を用いて学習用のデータとして 1 分間培養神経系の活動を記録する。記録したデータを PC へ送信し、同期発火を検出する。検出した同期発火の時刻を教師データとして学習を行い、重みを決定する。決定した重みをインターフェース装置に入力し、予測を実行する。

### 5.2.1 データのレコード

まずはレコードについて説明する。先に述べたように MEA、アンプを通した培養神経系の活動をインタフェース装置のバッファ、低域通過フィルタおよびコンパレータを用いて 01 のデジタル信号に変換する。それを BeagleBone BlackGPIO ピンから  $200\mu\text{s}$  ごとに読み取り CSV ファイルとして記録する。記録したデータを以下の fig.27 に示す。

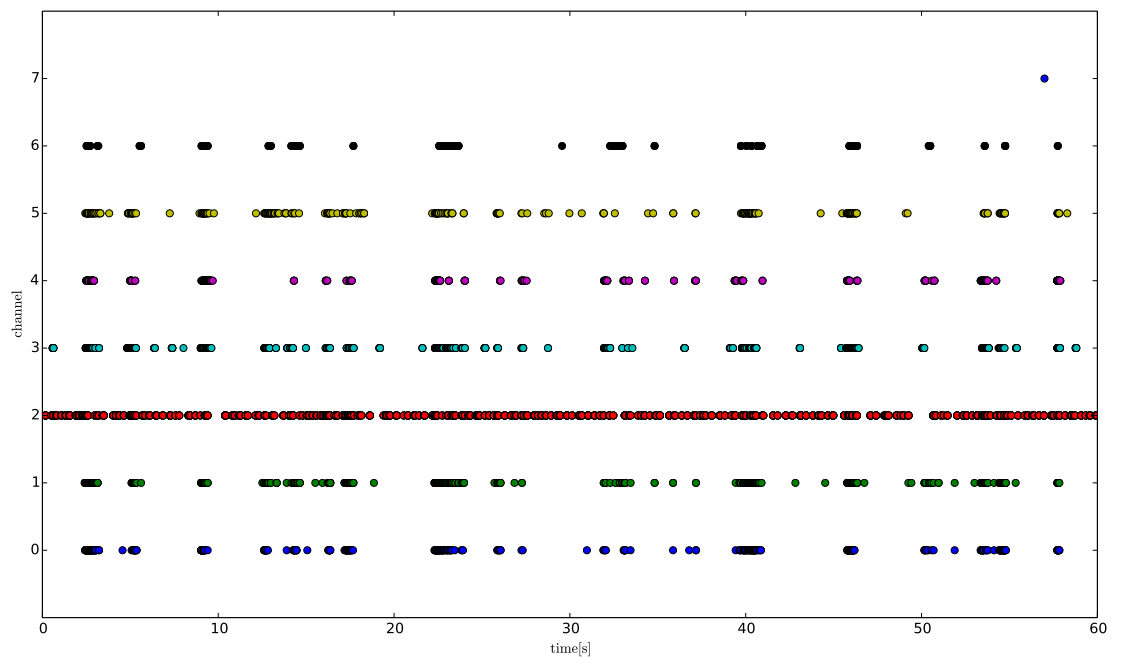


fig.27 レコードしたスパイクデータ

### 5.2.2 同期発火の検出

次に同期発火の検出について説明する。この作業は PC で Python で書いたプログラムにより行っている。

同期発火が生じると発火率が急激に上昇する。ここでは平均の発火率を超えた点を同期発火のスタート点と定めてこれを求めた。ある時点の発火率 [spike/cycle] を

そのある時点から 4000 点先、1 サイクル  $200\mu\text{s}$  であるので約 0.8 秒後までの発火数の加算平均をその時点での発火率とする。実際に予測を行う場合はある時点より前のデータから予測を行う必要が有るため、最も厳しい条件としてある時点から先の時点までの発火率を用いている。次に全体の平均発火率 [spike/cycle] を求め先に求めた発火率と比較し、発火率が平均を上回った点を同期発火のスタート点とした。それによって得られた結果を以下の fig.28 に示す。

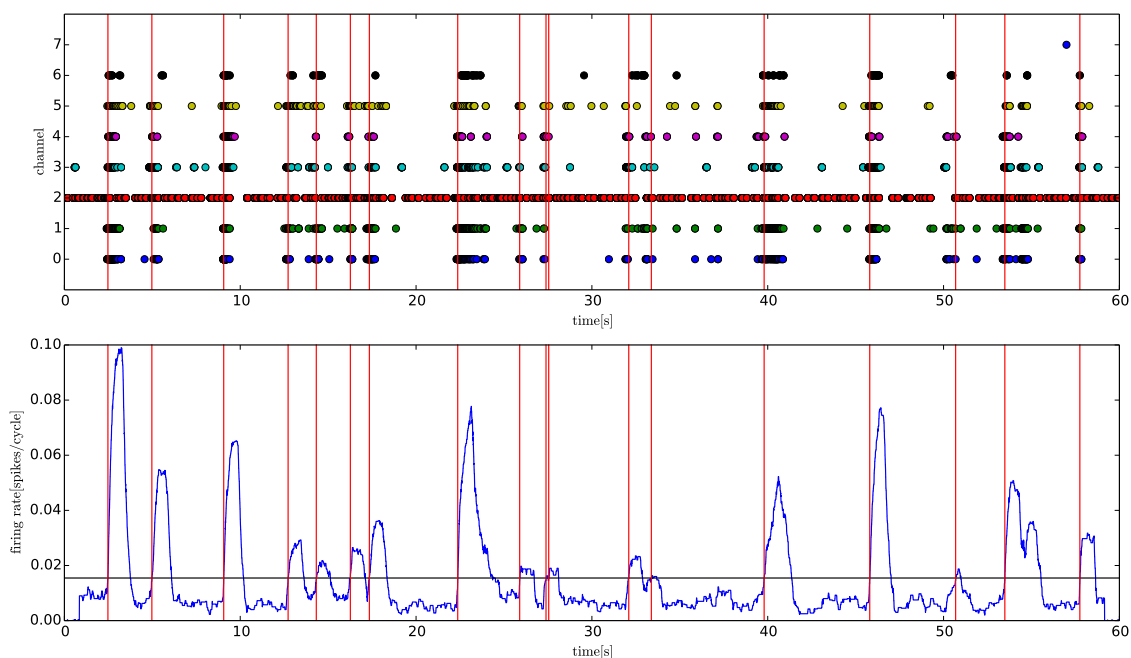


fig.28 発火率と同期発火のスタート点

上段は記録したスパイクデータ、下段青線は発火率を示している。下段の黒線は平均の発火率を表しており、赤線は青線で示した発火率が平均の発火率を上回った時刻を示している。この赤線で示した同期発火のスタート点を教師データとして用いる。

### 5.2.3 学習

ここでは学習について説明を行う。この作業は PC で Python で書いたプログラムにより行っている。

まず、インターフェース回路内で動作している同期発火の検出方法について説明する。今回、同期発火を記録したスパイクデータのような時系列データからパターンから認識するためにパーセプトロンのようにあるしきい値を超えた際に 1 を出力する判定機構とスパイクが入力されない間指数関数的に増加し、スパイクが入力された時リセットされる機構を組み合わせる同期発火の検出をこころみた。これらの機構は記録したスパイクデータを観察した際、同期発火が起きる前に全体の発火率が落ち込む期間が見られることから着想を得た。

まず、判定機構への入力について説明を行う。この入力はスパイク検出器の数（今回は 8 器分）用意されている。スパイク検出器に入力があった時にリセットされ、入力が無い期間指数関数的に増大する。この指数関数は処理時間を短縮するために整数演算で実現している。以下にその式を示す。これは  $dx/dt = \lambda x$  をオイラー法で解いたものである。

$$\frac{dx}{dt} = \lambda x \quad \text{より} \quad (7)$$

$$\frac{x(t+1) - x(t)}{h} = \lambda x(t) \quad (8)$$

$$x(t+1) = x(t) + h\lambda x(t) \quad (9)$$

ここで、 $x(t)$  の係数  $h\lambda$  は計算量を小さくするためにシフト演算で行っている。

また判定機構が 1 を出力した際も同様にリセットされる様になっている。入力の動作を以下の fig.29 に示す。

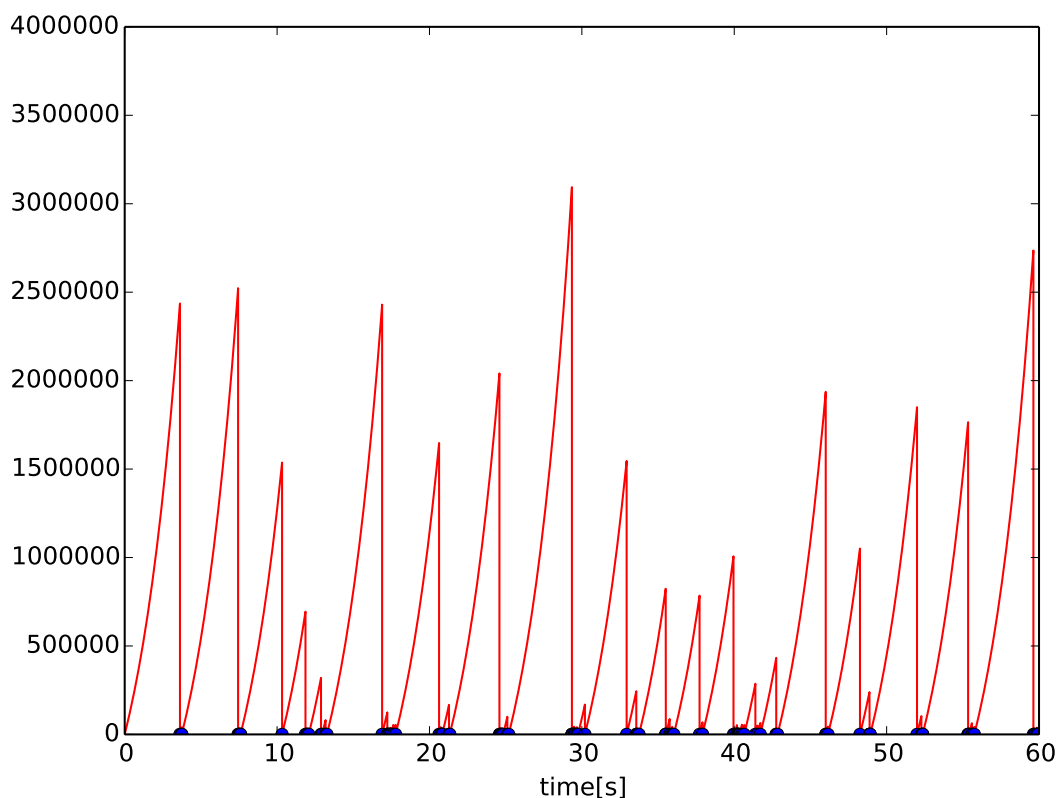


fig.29 判定機構への入力の動作

横軸上の点がスパイクを検出した時刻を示している。スパイクが検出された際にリセットされ、検出されない期間は指数関数的に増大していることがわかる。縦軸の値が大きいのは処理の時間を短縮するために整数で演算を行っているためである。

学習による重み付けの方法は2種類考えられる。1つは判定機構へ入力する際にシフト演算で重み付をする方法。もう1つはオイラー法で解いた指数関数に重みを加算することで指数関数の増加速度を上げる方法である。今回は後者で行っている。重みを付加した指数関数の式を示す。

$$x(t+1) = x(t) + h\lambda x(t) + w \quad (10)$$

後者で行う理由としては重みの自由度が前者と比較して大きいことである。

次に判定機構の説明を行う。この判定機構は複数の入力を持ち、その入力の総和が一定のしきい値を超えた際に 1 を出力し全入力をリセットさせる。この判定機構が同期発火のスタート点で 1 を出力するように学習を試みた。

学習方法は以下のとおりである。まず、重み 0 の状態で各入力チャンネルの判定機構への入力を計算する。その結果を時刻ごとに全チャンネル加算する。その結果の 1 例を以下の fig.30 に示す。

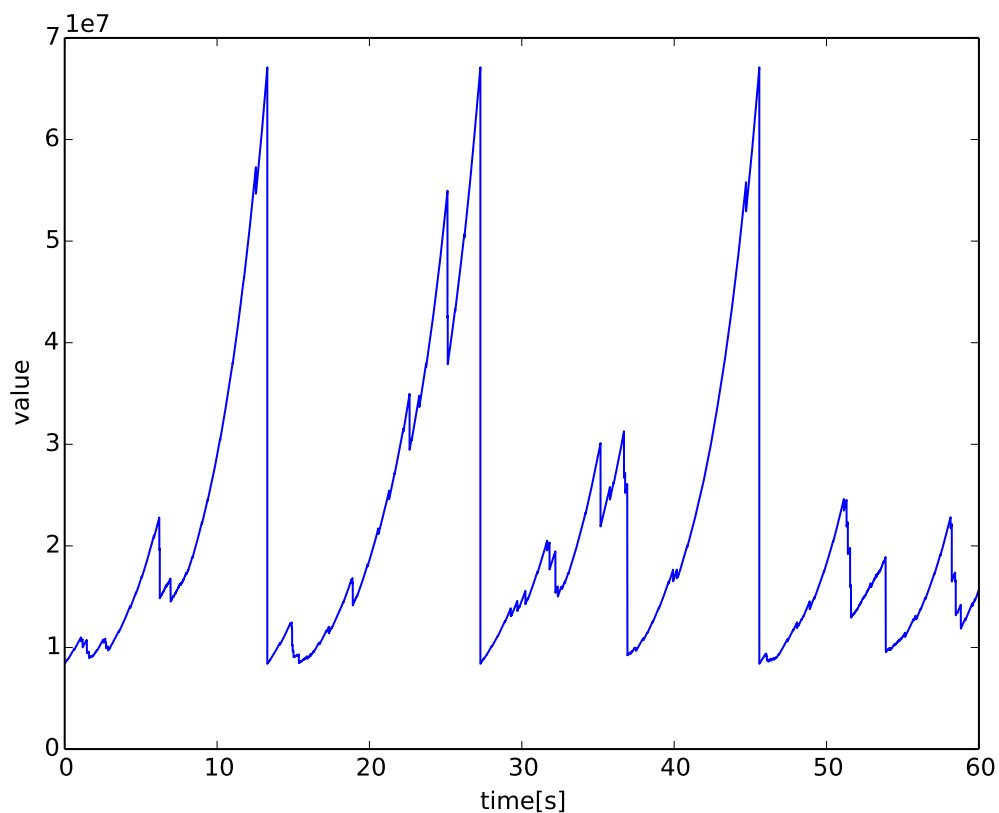


fig.30 判定機構への入力:重みの更新なし

加算した値をしきい値と比較し先に求めた同期発火のスタート点と一致しているのにしきい値を超えていない点では重みを増加、同期発火のスタート点と異なる点でかつスタート点から一定期間（今回は 100ms）前までの区間以外でしきい値を超えている場合は重みを減少させる。重みの更新するごとに判定機構への入力は fig.30

~32 のように変化していく。

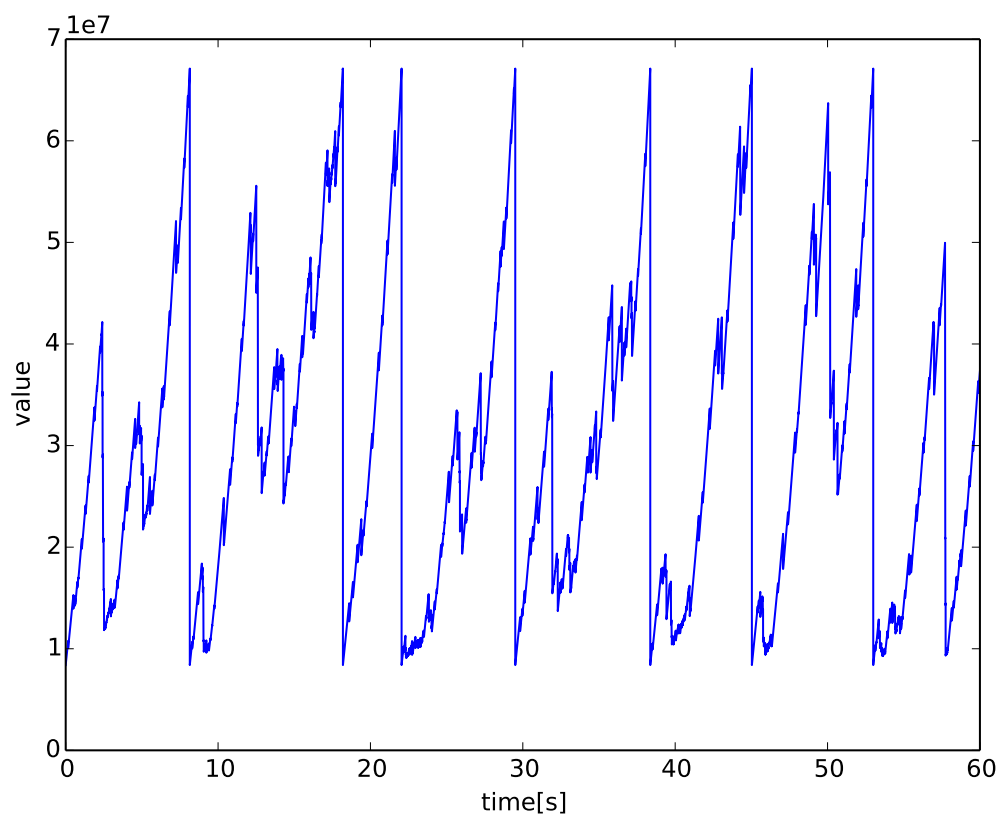


fig.31 判定機構への入力:重みの更新 3 度目



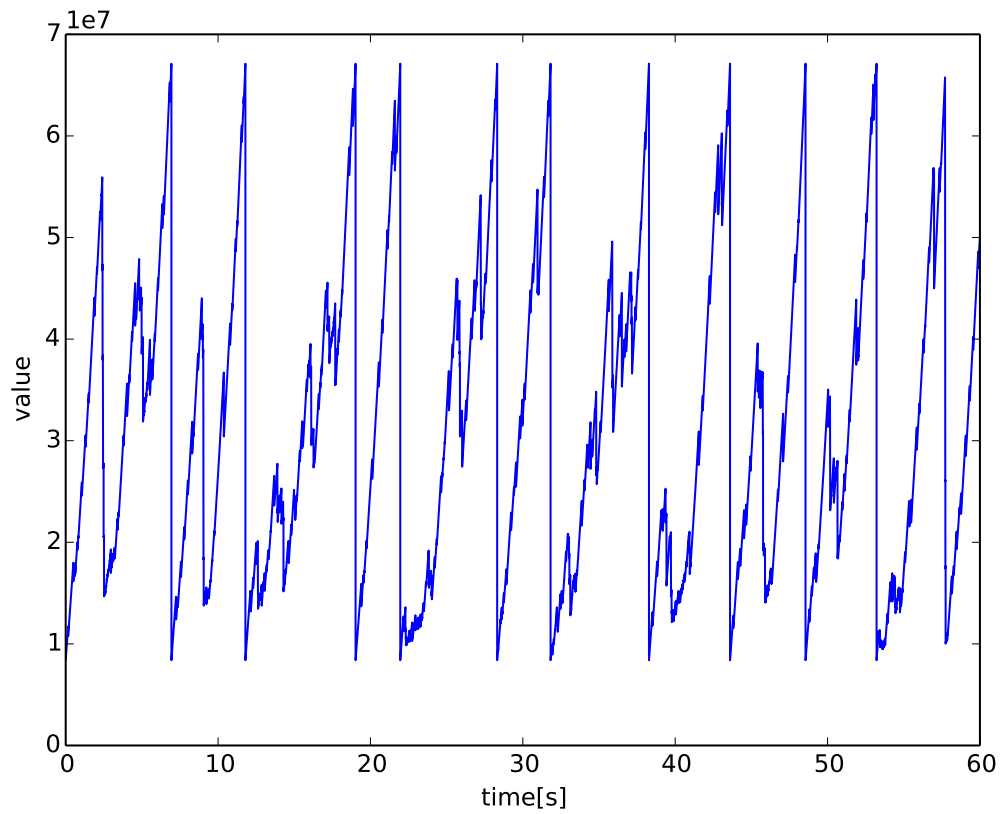


fig.32 判定機構への入力:重みの更新5度目

得られた重みを元のデータに適応して同期発火の予測を試みた物を以下の fig.33 に示す。

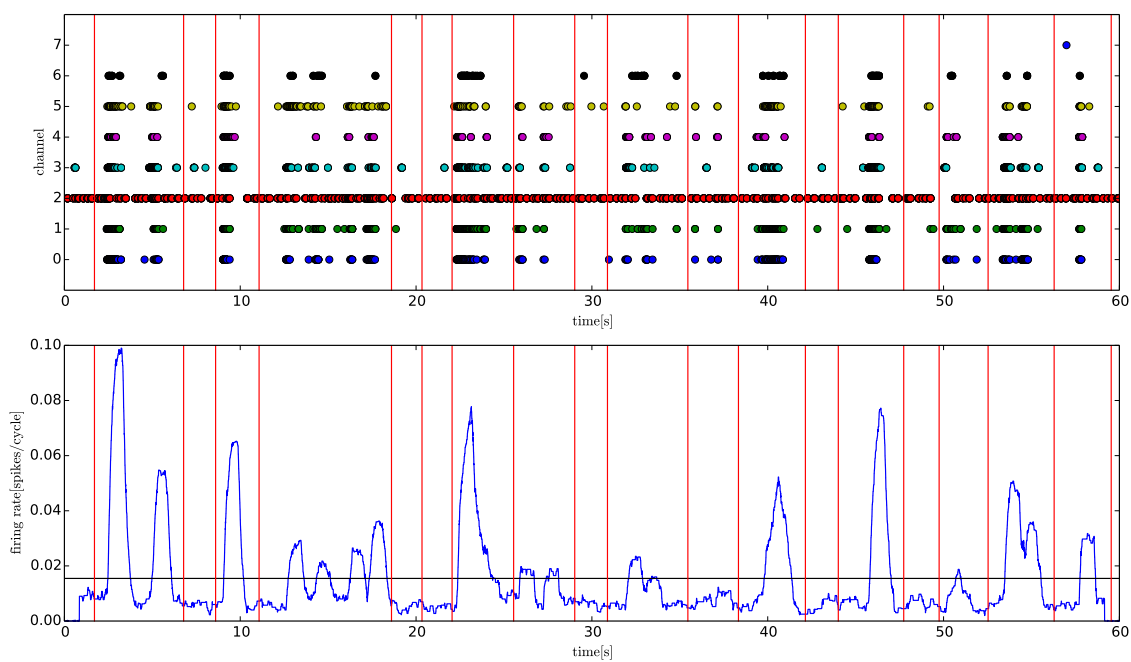


fig.33 学習で得た重みによる同期発火予測（シミュレーション）

連続で同期発火を起こしている部分で予測漏れが起きやすい、1つの動機発火の前に複数回予測が起こるなど、完全では無いものの一定の割合で予測ができていることが確認できる。

#### 5.2.4 リアルタイムでの予測

先に求めた重みをインターフェース装置に入力し、リアルタイムで同期発火の予測を試みた。その結果を以下の fig.34 に示す。

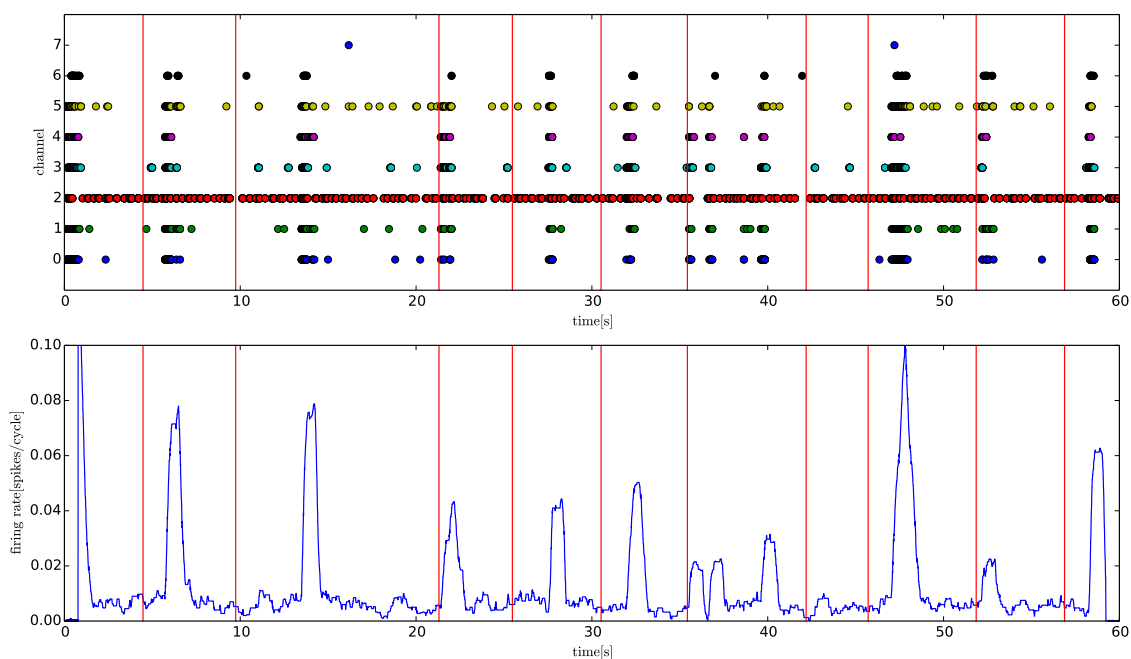


fig.34 学習で得た重みによる同期発火予測（リアルタイム）

シミュレーション同様予測漏れや、余分な予測が起きているものの、一定の割合で予測ができており、これをトリガに同期発火直前の培養神経系に何か入力を行うのに利用できると思われる。

### 5.3 レーザ刺激

ここではレーザー刺激に関して説明する。培養神経系の刺激方法として電極刺激の他にレーザー刺激を行う方法もある。

レーザー刺激にも幾つか方法があるが、本研究では RuBi-Glutamate(abcam)[2] を用いたレーザー刺激を行った。Rubi-Glutamate はグルタミン酸に RuBi 基が結合したものであり、特定の波長（1 光子励起の場合は 473nm）の光を照射されるとグルタミン酸を放出する。このグルタミン酸が神経細胞の受容体と結合することで活動を誘発することができる。本研究では波長 473nm のレーザーを用いて刺激を行った。

応答性の強弱はレーザーの照射時間によって行えることが共同研究者によって示さ

れている。

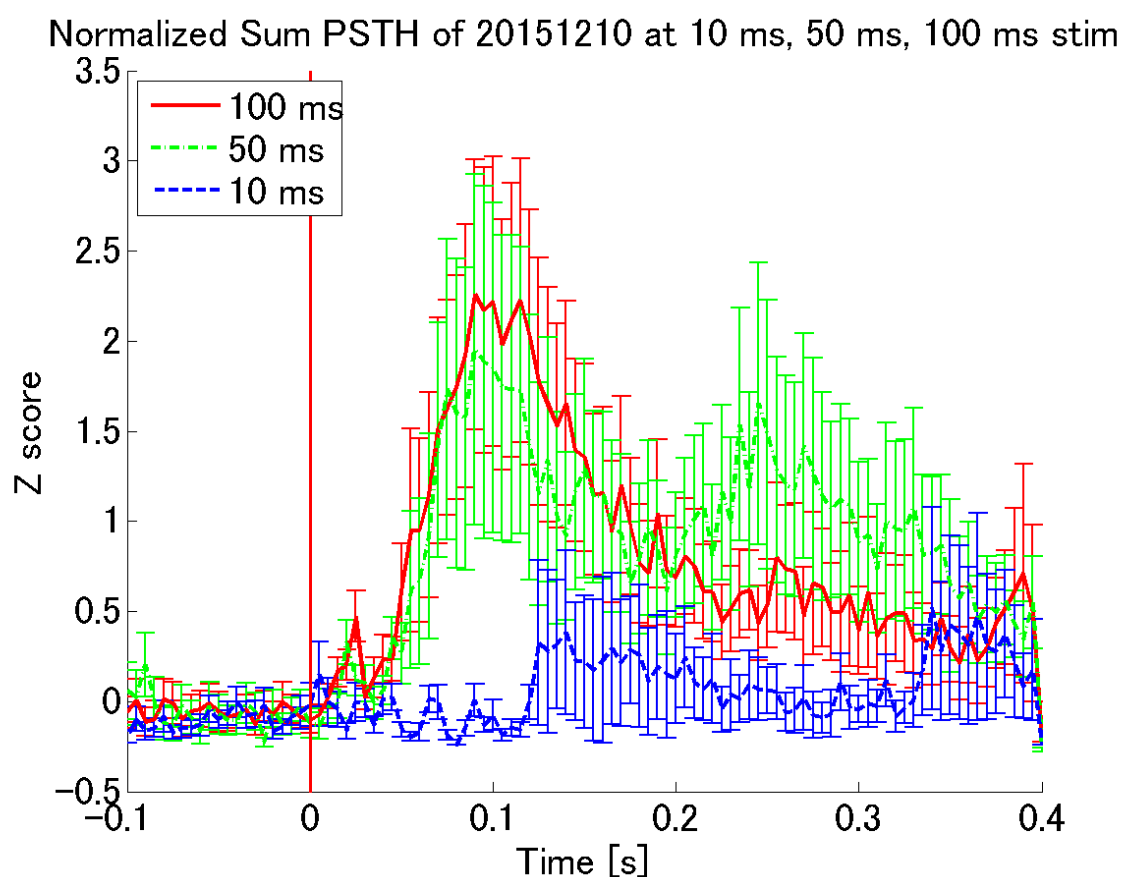


fig.35 レーザの照射時間に対する応答性の変化（共同研究者の修士論文より引用）

赤が 100ms、緑が 50ms、青が 10ms のレーザー刺激を行った際の応答の Z スコアを示している。刺激時間が長いほど応答性が高いことが確認できる。

レーザー刺激のメリットとしては電極刺激と異なり刺激中にも計測を行えることや、電極刺激よりも局所的な刺激を行うことができる点などがあげられる。しかし、今回行った RuBi-Glutamate による手法では抑制性の入力を行うことは不可能である。

なお、レーザー刺激系の構築は共同研究者によって行われた。

今回行ったレーザー刺激はインターフェース装置から直接レーザー刺激装置へ制御信号を送り行った。実験系は fig.36 に示すとおりである。

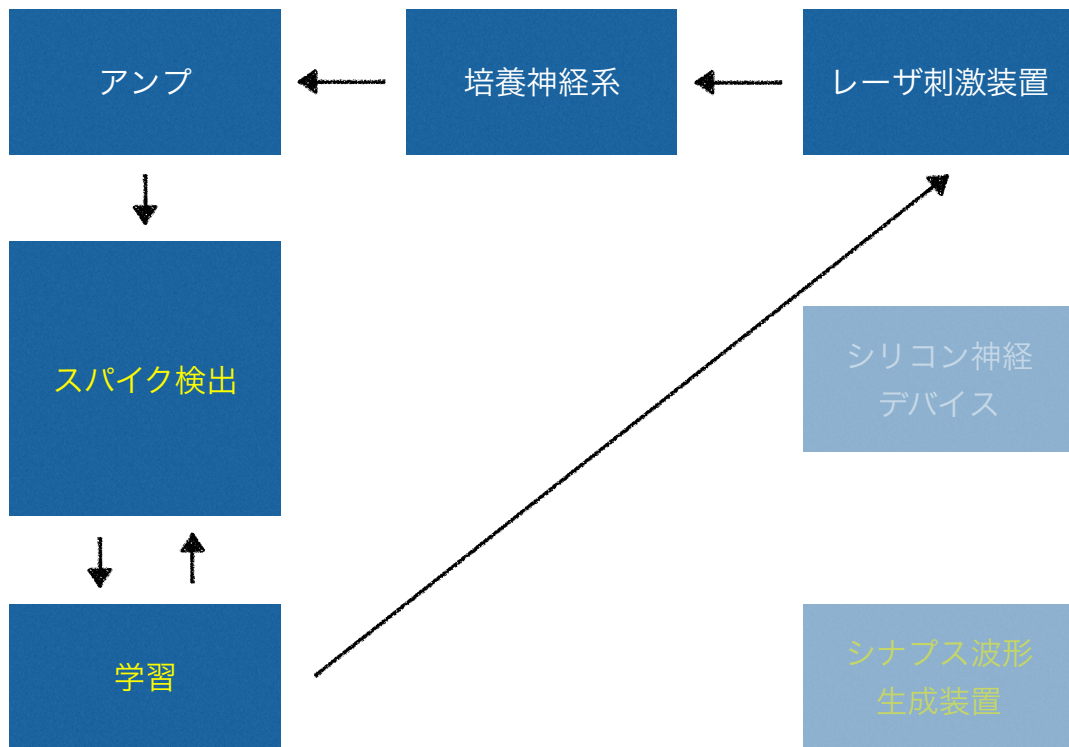


fig.36 レーザ刺激時の実験系概略図

先に示した同期発火予測の方法を用いて 3 分間計測を行い、判定機構が 1 を出力した際にレーザで 30ms の刺激を行った。その際の結果を以下の fig.37 に示す。

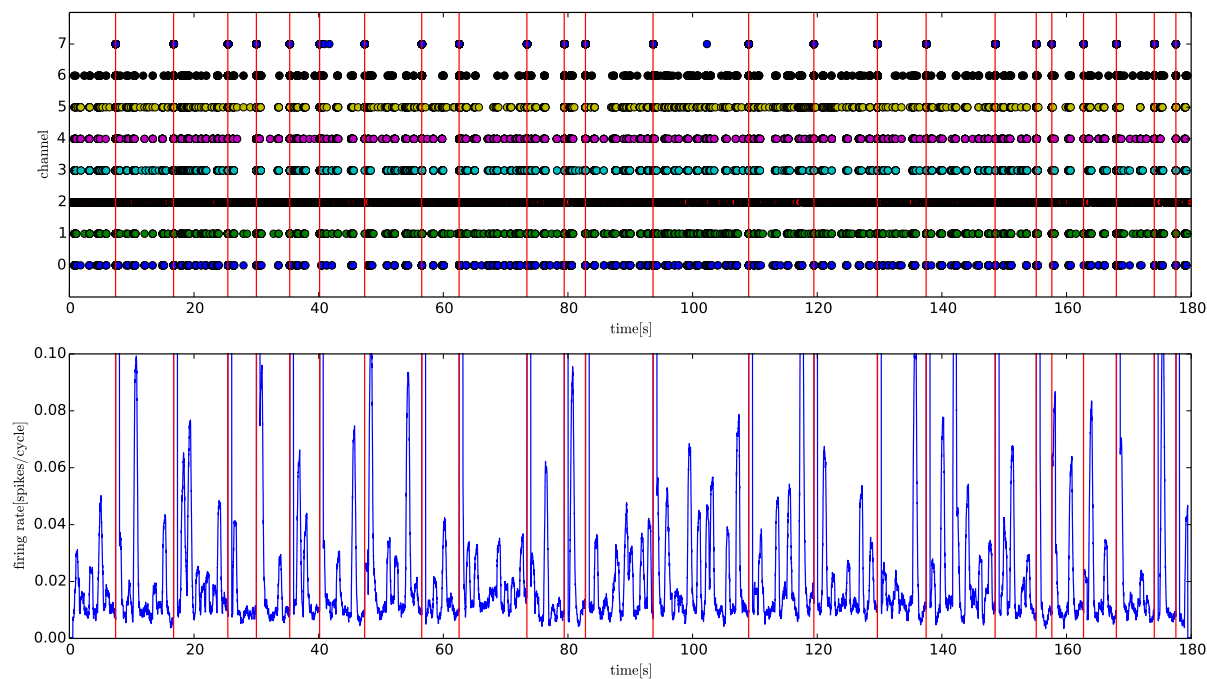


fig.37 同期発火予測を用いたレーザ刺激

グラフ上の赤線がレーザ刺激を行った点である。レーザ刺激を行った時点で発火率が上昇しているのはレーザによるアーチファクトをインターフェースがスパイクだと誤認しているためであると考えられる。このグラフから同期発火前のレーザ刺激によりどのような影響が起きるのかを議論するのは困難である。

## 6 まとめおよび今後の課題

本研究では培養神経系とシリコン神経デバイスとの接続を構築するのに必要となる刺激生成装置およびインターフェース装置の作成を行い、それらの動作を確認した。

刺激生成装置に関しては、任意の波形を出力し刺激が可能であることを確認した。抑制性の刺激に関して調査を行ったがその兆候は見られたものの刺激時のノイズにより追加の計測が行えなかった。課題としてノイズの問題を解決することおよび、ノイズの問題を解決したうえで刺激波形による応答性を調査し抑制性の刺激を実現すること、並びにシリコン神経デバイスの波形に対してそれらをどのように対応させるかを調査する必要がある。

インターフェース回路に関してはスパイク検出を行い、ある程度の同期発火の予測が可能であることを確認した。また、その予測を用いてレーザ刺激ころみた。スパイク検出に関しては本研究の装置では現状  $200\mu\text{s}$  ほどの検出が限界であるが、これは Linux OS を使用していることや装置に用いている Beaglebone Black がシングルコアのデバイスであることがあげられる。さらなる高速化を目指してベアメタルで実装することや複数コアを持つデバイスで実装することなどがあげられる。また、同期発火の予測に関しても今回はデータを PC に送信して PC 上で処理を行ったが、スタンドアロンで実行できることが望ましい。そのためにもより演算能力の高いデバイスでの実装や Python ではなく C 言語など高速化が期待できる言語での実装も検討するべきである。予測事態の性能に関しても予測漏れや連続して起きる同期発火への対応等を検討し予測精度を向上させる必要がある。また、レーザ刺激に関しては今回 1 度目の実験を行った時点で使用できる培養神経系がなくなってしまったため 1 度しか実験を行うことができなかった。そのため今後さらなる実験を行う必要がある。

学習装置およびシナプス波形生成装置に関しては実装はしていたものの十分な試験を行うことができなかった。今後、シリコン神経デバイスおよび培養神経系と実際に接続し試験を行う必要がある。

## 7 謝辞

本研究の進行に際し、共同研究者である河野崇准教授に直接的なご指導を頂きましたことをここに深く感謝致します。指導教員である小林徹也准教授には終始適切な助言と丁寧なご指導をいただいたことをここに深く感謝致します。また本研究に様々な点でご協力頂いた共同研究者の安田秀策様、ならびに幅広い視点からご指摘、助言を下された合原研究室、小林研究室、河野研究室、高橋研究室の皆様には深く感謝致します。最後に長きにわたって学生生活を応援してくれた家族に心より感謝の意を表します。



## 参考文献

- [1] Frederico AC Azevedo, Ludmila RB Carvalho, Lea T Grinberg, José Marcelo Farfel, Renata EL Ferretti, Renata EP Leite, Roberto Lent, Suzana Herculano-Houzel, et al. "equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain". *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 513, No. 5, pp. 532–541, 2009.
- [2] Elodie Fino, Roberto Araya, Darcy S Peterka, Marcelo Salierno, Roberto Etchenique, and Rafael Yuste. RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic spines. *Frontiers in neural circuits*, Vol. 3, p. 2, 2009.
- [3] Giacomo Indiveri, Bernabé Linares-Barranco, Tara Julia Hamilton, André van Schaik, Ralph Etienne-Cummings, Tobi Delbruck, Shih-Chii Liu, Piotr Dudek, Philipp Häfliger, Sylvie Renaud, Johannes Schemmel, Gert Cauwenberghs, John Arthur, Kai Hynna, Fopefolu Folowosele, Sylvain Saighi, Teresa Serrano-Gotarredona, Jayawan Wijekoon, Yingxue Wang, and Kwabena Boahen. Neuromorphic silicon neuron circuits. *Frontiers in neuroscience*, Vol. 5, No. May, p. 73, 2011.
- [4] Takashi Kohno and Kazuyuki Aihara. "digital spiking silicon neuron: concept and behaviors in gj-coupled network". In *Proceedings of International Symposium on Artificial Life and Robotics*, pp. OS3–OS6, 2007.
- [5] Takashi Kohno and Kazuyuki Aihara. A mathematical-structure-based aVLSI silicon neuron model. pp. 261–264, 2010.
- [6] Takashi Kohno, Kazuyuki Aihara, Luigi M. Ricciardi, Aniello Buonocore, and Enrica Pirozzi. A Design Method for Analog and Digital Silicon Neurons -Mathematical-Model-Based Method-. In *AIP Conference Proceedings*, Vol. 1028, pp. 113–128. AIP, 2008.
- [7] Mikhail A Lebedev and Miguel A L Nicolelis. Brain-machine interfaces: past, present and future. *Trends in neurosciences*, Vol. 29, No. 9, pp. 536–46, 2006.

- [8] X. Leinekugel. Correlated Bursts of Activity in the Neonatal Hippocampus in Vivo. *Science*, Vol. 296, No. 5575, pp. 2049–2052, 2002.
- [9] Eyal Margalit, Mauricio Maia, James D Weiland, Robert J Greenberg, Gildo Y Fujii, Gustavo Torres, Duke V Piyathaisere, Thomas M O’Hearn, Wentai Liu, Gianluca Lazzi, Gislin Dagnelie, Dean A Scribner, Eugene de Juan, and Mark S Humayun. Retinal Prosthesis for the Blind. *Survey of Ophthalmology*, Vol. 47, No. 4, pp. 335–356, 2002.
- [10] Paul A. Merolla, John V. Arthur, Rodrigo Alvarez-Icaza, Andrew S. Cassidy, Jun Sawada, Filipp Akopyan, Bryan L. Jackson, Nabil Imam, Chen Guo, Yutaka Nakamura, Bernard Brezzo, Ivan Vo, Steven K. Esser, Rathinakumar Appuswamy, Brian Taba, Arnon Amir, Myron D. Flickner, William P. Risk, Rajit Manohar, and Dharmendra S. Modha. ”a million spiking-neuron integrated circuit with a scalable communication network and interface”. *Science*, Vol. 345, No. 6197, pp. 668–673, 2014.
- [11] multichannel systems. ”60mea200/30ir-ti-gr”. <http://www.multichannelsystems.com/products/60mea20030ir-ti-gr>.
- [12] Satoru Okawa, Takeshi Mita, Douglas Bakkum, Urs Frey, Andreas Hierlemann, Ryohei Kanzaki, and Hirokazu Takahashi. Chronic Co-variation of Neural Network Configuration and Activity in Mature Dissociated Cultures. *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems*, Vol. 134, No. 3, pp. 338–344, 2014.
- [13] Hirokazu Takahashi, Masayuki Nakao, and Kimitaka Kaga. Selective activation of distant nerve by surface electrode array. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 54, No. 3, pp. 563–569, 2007.
- [14] Kunichika Tsumoto, Hiroyuki Kitajima, Tetsuya Yoshinaga, Kazuyuki Aihara, and Hiroshi Kawakami. Bifurcations in Morris - Lecar neuron model. *Neurocomputing*, Vol. 69, No. 4-6, pp. 293–316, 2006.
- [15] D. Wagenaar, T.B. DeMarse, and S.M. Potter. MeaBench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis. In *Conference Proceedings. 2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 2005.*, pp. 518–521. IEEE, 2005.

- [16] Daniel A Wagenaar, Radhika Madhavan, Jerome Pine, and Steve M Potter. Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 25, No. 3, pp. 680–8, 2005.
- [17] Daniel A. Wagenaar, Jerome Pine, and Steve M. Potter. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 138, No. 1-2, pp. 27–37, 2004.
- [18] Xenomai. "xenomai". <http://xenomai.org/>.
- [19] Shimeng Yu, Yi Wu, R. Jeyasingh, D. Kuzum, and H. S P. Wong. "an electronic synapse device based on metal oxide resistive switching memory for neuromorphic computation". *Electron Devices, IEEE Transactions on*, Vol. 58, No. 8, pp. 2729–2737, 2011. ID: 1.
- [20] 中村洋平. "数理構造に基づいたシリコンニューロンの特性評価". Master's thesis, 東京大学, 2011.
- [21] 合原一幸, 神崎亮平. "理工学系からの脳科学入門". 東京大学出版会, 2008.
- [22] 宮川博義, 井上雅司. ニューロンの生物物理. 丸善出版, 2013.