生体表現システム:ファジィ推論を用いた培養神経細胞における適応学習の解析 Biomodeling System: Analysis of adaptive learning in cultured neuronal network using fuzzy logic

林勲	徳田 農	清原 藍	田口 隆久	工藤 卓
I.Hayashi	M.Tokuda	A.Kiyohara	T.Taguchi	S.N.Kudoh
関西大学	関西大学	産総研	産総研	産総研
Kansai Univ.	Kansai Univ.	AIST	AIST	AIST

Abstract We have already proposed "biomodeling system", in which the "top-down bio-processing" for sending actuator signals to robot from living neuronal network cultured on a 2-dimensional electrode arrays, and the "bottom-up robot-processing" for electrical stimulation to living neuronal network from robot are connected between neuronal network and robot. In this paper, we discuss two kinds of learning mechanism, which are plasticity learning of living neural network and adaptability learning of fuzzy logic using the tracking estimation of Khepera II in a straight lane. Our goal is reconstruction of the neuronal network, which can process "thinking" in the dissociated culture system.

1. はじめに

最近,脳と外界機器とを相互結合する脳機械インタ フェース (BMI, BCI) の研究が行われている [1]. 脳は 外界の機器からの情報により環境のダイナミクス性を学 習し,機器は脳細胞の可塑性の学習機能により適応制御 が可能となる [2].また,その適応性は脳細胞に新たな 学習性を与える.すなわち,この相互インタラクション の"学習性"は脳細胞の"可塑性"と機器の"適応性"に 支えられ,全体システムは"環境ダイナミクス"に対応 する循環型ネットワークを構成している.我々[3-7]は, 脳細胞としてのラットの海馬の分散培養神経細胞と外 界認識手段としてのロボットとを相互結合して,合目的 的な知識獲得および行動表現が可能な"生体表現システ ム"を提案している.培養細胞とロボットとを接続する 研究には, S.M.Potter らの Hybrot [8] がある.彼らの 初期のシステム Animat は単純に神経細胞と外界機器と を接続するのみであり,学習機能はなく衝突回避のよう な合目的的な行動は生成されていない.

生体表現システムは培養細胞の可塑性学習とファジィ システム [9] の適応性学習により,ロボットは規範的な 制御行動だけでなく,周りの環境のダイナミクス変化に 対応した学習的な制御行動が可能である.構造的には, 培養神経細胞だけでは脳本来の多層構造による高学習性 を確立することが困難であるため,培養神経細胞はケペ ラロボットの行動結果からボトムアップ・ファジィ推論 を介して刺激を受け,ケペラはトップダウン・ファジィ 推論により培養細胞の刺激に対するパターン反応からロ ボットアクチュエータの回転数を推論して行動判断する. 本論文では,生体表現システムでの学習の実態を明らか にするため,ケペラロボットの障害物回避での直線走行 を事例として,培養細胞の可塑性とファジィ推論の適応 性の関連性や相互性,相補性等について議論する.実験 では,ケペラの直線走行の制御目的に対して,まず学習 型ファジィ推論により環境変化に適応したファジィルー ルを調整する.その後,培養神経細胞の可塑性学習によ り走行制御をより高精度に実現することを試みる.すな わち,ファジィ推論の適応学習は環境の変化に対応する 適応性を実現し,培養神経細胞の可塑性学習は状況の変 化に対応する柔軟性を実現することを想定している.こ の際,学習型ファジィ推論によるファジィルールの調整 は培養神経細胞の可塑性からの影響を受け,培養神経細 胞の可塑性はファジィ推論の適合度に反映されることが 予想される.ここでは,この2種類の学習機能と適応機 能の関係性を議論して,生体表現システムでの培養神経 細胞と外界ロボット間のボトムアップ処理とトップダウ ン処理の双方向インタラクションが学習的でかつ合目的 的な行動を実現することを示す.

2. 生体表現システム

図1~図3に本システムの概要を示す.生体表現シス テムでは,外界からの情報はボトムアップ処理とトップ ダウン処理により適応性学習(AL)や可塑性学習(PL) に影響を与えるが,ファジィ推論では,環境変化の外界 情報の変移を視覚情報などの外部情報として適応的に捉 えて学習する.ここでは,学習型ファジィ推論による適 応性学習は,第1段階の適応性学習(IstAL)と第2段 階の適応性学習(2ndAL)から構成される.培養神経細 胞では,自発的神経活動(SPT)を伴う可塑性学習(PL) により,与えられた環境下で状況に順応できる学習を想 定している.しかし,適応性学習と可塑性学習が個別に 学習するのでは統一的な評価目的は達成されない.そこ で,全体を調整する機能が必要であり,ここでは,この 機能を"コーディネイター"と呼ぶ(図1参照).

図2に培養神経細胞とロボットとの相互インタラク ションの概要を示す.培養神経細胞とケペラ間では,計 算負荷を2台のコンピュータに分散させるため,ボトム アップ処理とトップダウン処理を構成した.ボトムアッ



Fig. 1: Biomodeling System

プ処理では, Client がケペラの IR センサ情報を読み取 り, データソケット DS1 を経由して, ファジィ推論ユ ニット (FLBU) を用いて電流刺激の回数と刺激電極の位 置を推論する.その後, Input Com と DAQ を介して神 経回路網を電気刺激する.ただし,本実験装置では刺激 電極数が2点という制約があるので , ここでは , FLBU をルックアップテーブル形式のオンオフ制御に簡略化し ている. そのため, Client で左右4個のケペラのセンサ 値の平均値からの偏差を算出し,その値によって2点の 刺激電極を決定して電流刺激を行う.トップダウン処理 では, DAQ を介して BrainServer が検出時間幅に出現 した海馬培養神経細胞の活動電位の頻度を DS3 に書き 込む.ファジィ推論ユニット (FLTD) が活動頻度からケ ペラロボットの左右のアクチュエータの-20~+20の速 度を推論して,ケペラを制御する.なお,ファジィ推論 には簡易型ファジィ推論を用い,8入力1出力で,Low と High の 2 種類のファジィラベルによる 512 個のルー ルを構成した (図3参照). ただし,後件部では,右と左 のアクチュエータ速度を同一ルール内での表記としたの で,本論文ではルール番号は256個としている.

Fig. 3: Robot Control with Living Neuronal Network

Speed of R Motor

=н

Each input is the sum total

value of the frequency of SAPs in eight area.

Speed of L Motor

Fuzzy Logic _____ Fuzzy Rules (512 Rules) R_i : A_{i1} =L and A_{i2} =H and

Movement of Robot

Stimulation 2

Frequency

Fuzzy Logic _____ Fuzzy Rules (512 Rules)

8 Sensor Outputs

Stimulation 1

Frequency

3. 実験と考察

実験では,適応性学習(AL)と可塑性学習(PL)とを 同時に学習するのではなく、ケペラがまず環境に適合し て,与えられた制御目的を達成するためにケペラが状況 学習を行う状況を仮定した.まず環境変化に対応できる 適応性を実現するため,学習型ファジィ推論によりファ ジィルールを調整する.なお,培養神経細胞の制約によ り,学習型ファジィ推論によるファジィルールの調整は 2段階とし,第1段階の学習は刺激シミュレータによる 学習型ファジィ制御(第1段階の適応性学習:1stAL), 第2段階の学習は走行路での学習型ファジィ制御(第2 |段階の適応性学習:2ndAL) とする . 1stAL では , まず プログラムでケペラのセンサ信号を想定して,培養神経 細胞への2点の刺激信号を与える.次に,その培養神 経細胞の反応パターンを学習型ファジィ推論への入力と して,またケペラのセンサ信号の逆信号を教師信号とし て,ファジィルールを学習する.一方,2ndALでは,走 行路の上方に設置したカメラによるケペラへの教師信 号の代わりとしてケペラの IR センサの逆信号を用い, ファジィルールを学習する.具体的には,BrainServer において, 培養神経細胞の反応検出時間幅を 50ms とし て,細胞外電位多点計測システムの64個の電極でそれ ぞれ検出された活動電位スパイクの平均頻度数を算出



Fig. 2: Living Neuronal Network and Robot

し,スパイク頻度が多く、刺激に依存した反応が明確な 上位の8点の電極からの反応をファジィルールの入力と してFLTDへ入力する.その後,調整されたファジィ ルールを固定して,培養神経細胞のPLによりケペラは 走行する.なお,走行路は全長120mm,幅90mmの直 線を想定し,ケペラが走行路の中心に位置する走行基準 線に沿って走行することを制御目的とする.図4にケペ ラの走行路を示す.

培養神経細胞では,生体細胞としては胚令17~18日 のラット胎児脳から海馬領域を摘出し,トリプシン処 理により解離する.8×8個の微小平面電極を備えた培 養皿に内径6mmのクローニングリングを配置し,この 内部へ解離した30万個の細胞を播種する.血清を含む D-MEM / F12培地で炭酸ガス培養装置中に14~40日 培養したものを実験に用いた.

生体表現システムでは,培養神経細胞は自発的神経活動 (SPT) を有しているので,培養神経細胞の神経活動 を SPT と PL とした.したがって,図1のコーディネイ ターは SPT,PL,1stAL,2ndALの4種類の活動・学習 過程を調整することになる.本実験では,PL と AL の基本的な関連性を議論するため,特に,SPT,PL,1stAL の3種類の活動・学習過程のみに注目し,コーディネイターは1stAL (SPT,PL)を切り替えるのみとする.具体的には,次の手順に従って実験を行う.

- Step1: 1stAL において, 培養神経細胞の刺激シミュ レータを用いて, ファジィルールの後件部を学 習する.
- Step2: 培養神経細胞の SPT と PL, および SPT と学 習型ファジィ推論の 1stAL との関係を議論す るため,神経結合の強度,ポリシナプティック 伝達の確率,および自発的神経活動の頻度に影 響を与える記録外液のマグネシウムイオン量 を変化させる.
- Step3: ケペラを走行させ, 培養神経細胞の PL と 1stAL との関係を議論するため, 時間的変化 に対するファジィルールの前件部の適合度の変 化を測定する.
- Step4: ケペラの走行軌跡を観測し,走行基準線からの 隔たり面積を評価値として測定する.
- Step5:
 Step2 と Step3 の実験パラメータを変化させ、
Setp2~Step4 を繰り返して、実験パラメータ
に対する評価値の依存性を検討する。

走行路では、ケペラが壁に極端に接近すると、IR センサーにより過度の信号が刺激信号として培養神経細胞に与えられ、シナプス伝達が減弱し、細胞に損傷が起こる可能性がある.また、培養神経細胞の自発的神経活動(SPT)によりゆらぎがファジィルールのALに影響を与える.このため、Step1では、培養神経細胞の刺激シミュレータを用いて、事前にファジィルールの後件部を学習する.ここでは、培養神経細胞に入力する刺激パターンを乱数プログラムにより発生させ、後件部の実数値の中間値である5を初期値として実数値を学習する. 神経細胞の可塑的変化が起こらないようにするため、10 秒間隔で刺激を入力することとし,150回の試行,合計 25分の学習で後件部実数値を得る.

Step2 において,記録外液中のマグネシウムイオン量 を増大させると,NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害 が大きくなり,偶発的シナプス伝達物質放出による微小 シナプス電位の時間的積算可能性を減じることができる. すなわち,活動電位発生の頻度を減少させることになり, その結果,神経結合の強度と自発的神経活動の頻度が減 少する.マグネシウムイオン量は, $MgCl_2$ 濃度の1mMおよび5mMとした.なお,使用した記録外液の組成は 以下の通りである.120 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 または5 $MgCl_2$, 10 ブドウ糖および 10 Na – Hepes (pH7.3, 濃度はmM).

Step3 と Step4 では, Step1 で獲得したファジィルー ルを固定し,時間的変化に対する評価値と前件部の適合 度の変化を測定し,1stAL と PL との関係を議論する.



Fig. 4: Experimental Course



Fig. 5: Learning Process of 1stAL

実験は胚令18日培養34日目のものを使用した.Step1 における1stAL終了時のファジィルールの後件部実数値 の結果を図5に示す.(A)はケペラの左右駆動の教師値 をシミュレートした場合の学習回数に対する制御値と教 師値の差異を示す.(B)はその際の後件部実数値である. なお,"L"はケペラの左側に障害物がある想定で,多点 電極のうちの特定の一電極を刺激し,後件部のL側のア クチュエータ速度の教師値を10,R側の教師値を0とし た.一方, "R" は後件部実数値の R 側のアクチュエータ 速度の教師値を 10, L 側の教師値を 1 とした.L 側の教 師値 1 はケペラを常に駆動させるためである.1stAL で は,自発的神経活動が頻発すると学習が収束しない可能 性が考えられるため,マグネシウムイオン濃度は 5mM とした.(A)から,学習回数が 150 回までは制御値と教 師値との差異が減少していることがわかる.なお,150 回での差異はまだ大きく学習が不十分であるが,培養神 経細胞への長時間の刺激は細胞に損傷を与える危険性が あり,学習回数の決定は今後の課題といえる.1stAL 終 了時でのファジィルールの一例を以下に示す.

$$R_1: \text{ If } I_1 \text{ is } High \text{ and } \cdots \text{ and } I_8 \text{ is } High$$

$$\text{then } L_{speed} = 3 \text{ and } R_{speed} = 3$$

$$R_2: \text{ If } I_1 \text{ is } High \text{ and } \cdots \text{ and } I_8 \text{ is } Low$$

$$\text{then } L_{speed} = 7 \text{ and } R_{speed} = 3$$

$$\vdots$$

 R_{256} : If I_1 is Low and \cdots and I_8 is Low then $L_{speed} = 1$ and $R_{speed} = 1$



Fig. 6: Trace of Khepera Robot and Membership Grade of Fuzzy Logic

Step2では、マグネシウムイオン濃度は1stALと同様 に5mMとした.Step3とStep4では、1stALで得られ た後件部実数値のファジィルールを用いて、ケペラを走 行させた.図6にケペラ走行の軌跡の一例(A)とその際 のケペラのセンサ信号、すなわち、FLBUへの8入力 値の変化(B)、および走行時間に対するルールごとの前 件部の適応度の変化(C)を示す.ただし、すべてのルー ルの中で平均適合度の高い5個のルールのみを示した (A)では、ケペラは壁への衝突を回避し、壁にぶつかる ことなく蛇行的に走行した.(B)の上段のダイヤグラム では, Client が神経刺激プログラムの InputCom に"L 刺激", "R 刺激", あるいは電流刺激なしの"SPT"のい ずれかの信号を送ったかを示している."L 刺激"と"R 刺激"が培養神経細胞に加えられた場合,例えば,"L" に対しては"Input8", "R"に対しては"Input3"におい て,特徴的に高頻度のスパイクが検出される特徴的な活 動電位パターンが出現した.一方,"SPT"においては, 多様な活動パターンが見られた.(C)では,各状態に応 じて適合度の高いルールが顕著に出現している.



Fig. 7: Membership Grade Classified According to SPT, L, and R

図 6(C) の "SPT", "L", "R" を 3 状態に分割して, 図7に平均適合度の高い5個のルールの傾向を示す.図 7において, "L"と "R" は特徴的な傾向が見られた.例 えば、"L"では、(219,251,217,253) 番目のルール(図中 の黒矢印) および (251,219,249,217) 番目のルール (図中 白矢印) がそれぞれ同時発火しており , ケペラの右旋回 の行動を制御している.このルールの組み合わせが数 回出現することから, 培養神経細胞が L 刺激に対して, その都度同類な反応活動電位パターンを可塑的に発生 していることがわかる.また, "R" も同様な傾向をも つことがわかる (図 7(R)). 相対的に "SPT" の状態は神 経回路網への電流刺激がないので,神経活動は内部状態 の揺らぎを反映している可能性があり,適合度の分布も それに対応してバリエージョンが多かった.ただし,活 動がほとんどないことに対応する 256 番目のルールは , "Spontaneous", 特に後半部において, もっとも特徴的 である (図 7(Spontaneous)) .

次に,培養神経細胞の SPT と PL,および SPT と学 習型ファジィ推論の 1stAL との関係を議論するため,記 録外液のマグネシウムイオン濃度を変化させて同様の走 行実験を行った.具体的には,上述の 5mM のマグネシ ウムイオン濃度で走行実験を行った後,新たな学習を繰 り返すことなく,記録外液のマグネシウムイオン濃度を 1mM に置換して走行実験を行った.多点電極 64ch の 全ての電極において,マグネシウムイオン濃度が 1mM



Fig. 8: Number of Spontaneous Spikes of Action Potentials



Fig. 9: Input Values to Fuzzy Logic and Robot Speed in 1mM and $5mM\ MgCl_2$

の記録外液下では,5mMの場合と比較して自発活動電 位頻度が飛躍的に増大した(図8参照).また,1mMの マグネシウムイオン濃度では,電流刺激に誘導される刺 激誘導活動電位も頻度が増大した(図9参照).図9にお いて,(A)は時間変動に対するファジィ推論への8個の 入力値の変動である.(B)はその平均値である.1mM マグネシウムイオン濃度条件の方が,入力値の値が約 8% ほど大きかった.また,これらの条件の違いを反映 して,1mM マグネシウムイオン濃度ではロボットの走 行速度が増大した(図9(C)).ただし,1mM であっても 活動電位がほとんど発生していない状態もあり,5mM と比較して,自発的活動電位の頻度が高くなったとして も,全体的に活動電位が高くなるとはいえない.



Fig. 10: Trace of Khepera Robot and Membership Grade of Fuzzy Logic in $1mM MgCl_2$

図10に1mM記録外液下でのケペラ走行の軌跡の一例(A)とその際のケペラのセンサ信号,すなわち,FLBUへの8入力値の変化(B),および走行時間に対するルールごとの前件部の適応度の変化(C)を示す.ただし,(C)の上段にはすべてのルールの中で平均適合度の高い5個のルールのみを示し,下段には比較のため5mMマグネシウムイオン濃度条件下の図6において適合度が高いルールの適合度を示す.(C)の上段から,5mMマグネシウムイオン濃度条件下での図6と比較して,発火しているファジィルールが多くないことから,培養神経細胞での活動電位パターンが特定化していることがわかるまた,(C)の下段から,前件部の適応度が高いファジィルールは5mMの場合と異なっており,1mMで適合度が高いルールが必ずしも発火していないことがわかる.

これらの結果より,マグネシウムイオン濃度を減じた 場合,ゆらぎの元となる自発的活動電位頻度は増大する が,同時にシナプス伝達効率も増大して誘導活動電位発 生が安定化するので,制御の安定性を得る可能性が示唆 された.すなわち,1mMのマグネシウムイオン濃度条 件下のように,シナプス強度を一様に強化しても,マグ ネシウムイオン濃度の低減によって,特定の電流刺激に 対応した神経回路網の誘導活動電位空間パターンが安 定しており,大変興味深い.しかも,培養神経細胞の可 塑性的な神経活動と自発的神経活動の両神経活動をファ ジィルールの観点から議論でき,これらの構造が"コー ディネイター"を介して機能的に制御できるとすれば, 生物にとって最も重要であり柔軟性や自己生成機能の本 質であるゆらぎや学習機能の解明にも役に立つといえる.

4. おわりに

ここでは、培養神経細胞とケペラからなる生体表現シ ステムを構築し、ケペラの直線走行の制御を用いて、培 養神経細胞とケペラとの相互インタラクションを実現し た、今後、培養神経細胞にフィードバックに対応してシ ナプス伝達効率を変更するための"報酬系"を付与し、強 化信号を得た場合の自律学習や連合学習の可能性につい て議論し、培養神経細胞の可塑的変化と学習型ファジィ 推論の適応性の相互関連性をより議論する必要がある.

なお,本研究の一部は,文部科学省科学研究助成金 (基盤研究(C))課題番号 18500181 および(基盤研究 (A))課題番号 19200018 と「特定領域研究マルチスケー ル操作によるシステム細胞工学」課題番号 18048043 の 助成を得た.

参考文献

- M.A.Lebedev, J.M.Carmera, J.E.O'Doherty, M.Zacksenhouse, C.S.Henriquez, J.C.Principe, and M.A.L.Nicolelis: Cortical ensemble adaptation to represent velocity of an artificial actuator controlled by a brain-machine interface, *Journal* of Neuroscience, Vol.25, No.19, pp.4681-4693 (2005).
- [2] S.N.Kudoh and T.Taguchi: Operation of spatiotemporal patterns stored in living neuronal networks cultured on a microelectrode array, Advanced Computational Intelligence and Intelligent Informatics, Vol.8, No2, pp.100-107 (2003).
- [3] S.N.Kudoh, I.Hayashi, and T.Taguchi: Synaptic potentiation re-organized functional connections in a cultured neuronal network connected to a moving robot, Proc. of the 5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays (MEA2006), pp.51-52, Reutlingen, Germany in July 4-7 (2006).
- [4] S.N.Kudoh, T.Taguchi, and I.Hayashi: Interaction and intelligence in living neuronal networks connected to moving robot, Proc. of 2006 IEEE International Conference on Fuzzy Systems (FUZZ-IEEE2006) in 2006 IEEE World Congress on Computational Intelligence (WCCI2006), pp.6271-6275 (No.FUZZ4516), Vancouver, Canada in July 16-21 (2006).

- [5] I.Hayashi, T.Taguchi, and S.N.Kudoh: Biomodeling system by living neuronal network connected to moving robot, *Proc. of International Sympo*sium on Artificial Brain with Emotion and Learning (ISABEL2006), pp.164-165, Seoul, Korea in August 24-25 (2006).
- [6] 林 勲,田口 隆久,工藤 卓: ラット海馬の培養神 経細胞による小型ロボットとの生体表現システム, 第 22 回ファジィシステムシンポジウム講演論文集, pp.561-562 (2006)
- [7] 工藤 卓,林 勲,田口 隆久:神経細胞とシナプス可 塑性,知能と情報, Vol.18, No.3, pp.362-368 (2006)
- [8] D.J.Bakkum, A.C.Shkolnik, G.Ben-Ary, P.Gamblen, T.B.DeMarse, and S.M. Potter: Removing some 'A' from AI: Embodied cultured networks, in *Embodied Artificial Intelligence*, editered by F.Iida, R.Pfeifer, L.Steels, and Y.Kuniyoshi, New York, Springer, pp.130-145 (2004)
- [9] 林 勲, 古橋 武: ファジィ・ニューラルネットワーク, 朝倉書店 (1996)