

生物・ロボティクス・ハイブリッドによる認知エージェントをめざして —分散培養系の中にエージェントは芽生えるか?—

工藤 卓* 清原 藍 (産業技術総合研究所)

林 勲 (関西大学) 田口 隆久 (産業技術総合研究所)

The cognitive agent by the bio-robotics hybrid.

Suguru N. Kudoh*, Ai Kiyohara, (AIST)

Isao Hayashi (Kasai univ.), Takahisa Taguchi, (AIST)

We showed that dissociated rat hippocampal neurons on a multielectrode array formed heterogeneous networks of functional connections. The connection map revealed that each culture contained some hub-like neurons with many functional connections. The cultured neuronal network can autonomously compose a certain type of network structure suitable for information processing. The functional connections between neurons were actually reconstructed by synaptic enhancement. In addition, we carried out the system integration for Khepera II robot and living neuronal network. The system provided program with fuzzy logic to link spatiotemporal pattern of SAPs and action of robot. As a result of that, the robot system can avoid collision.

キーワード：分散培養系、自発的活動電位、相互作用、自己組織化

(dissociated culture, spontaneous action potentials, interaction, self organization)

1. はじめに

エージェントと言う字句を、“環境と相互作用しうる主体的な存在”と定義するならば、認知という機能は既に部分的に含有されているはずである。改めて“認知”エージェントという概念を提唱するならば、それはエージェントの機能のうち特に認知機能にフォーカスした概念であると言えるであろう。私見としては、認知機能によってエージェントの主体性が生起する構造になっているもの、あるいは認知メカニズムが、エージェントの自律的な行動決定と不可分であるようなものを認知エージェントと呼びたい。その定義に従えば、生物の情報処理系は最も複雑な認知エージェントであると言える。このシステムの最も特徴的な点は、情報処理のためのアルゴリズムを自己獲得し、認知の結果、計画的に行動が生起されるが、その行動によって認知自体が変更されうるといった循環的な過程があるということである。既に細胞レベルにおいてもこのような特性が存在しているという事実は、認知エージェントというシステムが生命現象にとってかなり本質的なメカニズムであるということを示している。

神経細胞を分散して、培養皿に播き、人工環境下で維持する分散培養系は、個々の細胞の特性を観察しつつ、全体の情報処理の動態を解析しうるユニークな系である^(1,2)。もしこのような認知エージェントが、培養皿においても生成されるならば、発生的にシステムがどのように構成され、

調節されているかを解明する有力なモデル系となる。

このような観点から我々は技術的な蓄積が最も多いラット海馬細胞による分散培養系を用いて生体神経回路網を培養皿上に再構成し、そのネットワーク特性を解析し、情報処理過程を記述する手法を模索している。また、分散培養系それ自体は入出力装置を持たない独立したシステムであるので、これに環境と相互作用する媒体として小型ロボットを接続し、知的行動が生成されていく過程を捉えたいと考えている⁽³⁾。

2. 実験方法

〈2-1〉細胞培養

ラット海馬解離培養系はすでに報告した手法^(4,5)を一部改変したものによっている。動物実験のすべての手続きについては、産業技術総合研究所 動物実験ガイドラインに準拠している。以下に概要を示す。胚令 17~18 日のラット胎児脳から海馬領域を切り出し、0.175%トリプシン-EDTA 溶液中で 37°C、15 分間の処理により解離した。細胞外電位記録電極を有した培養皿の中心付近に、電極を囲うように内径 6 mm のクローニングリングを配置し、この内部へ解離した 30 万個の細胞を播種した。5%牛胎児血清と 5%馬血清を含む D-MEM/F12 培地を用い、炭酸ガス培養装置中で 14~60 日培養したものを電気生理学的実験に用いた。

〈2・2〉細胞外電位の測定

神経回路網電気活動の解析には、細胞外電位多点計測システム (MED64、アルファメッドサイエンス社製) を用いた。多点電極培養皿である MED プローブ⁽⁶⁾上に神経細胞を培養し、自律的に形成された神経回路網の自発的活動電位スパイクを記録した。記録・刺激用のソフトウェアは MED Conductor (アルファメッドサイエンス社製) を用いた。電位計測時には基本的に以下の組成の計測用の緩衝液を使用した。長期培養実験に関しては継続して培養する必要上、そのまま培養液を使用した。

120 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 ブドウ糖 および 10 Na-Hepes pH 7.3 (濃度は mM)。

解析は、独自に開発した解析ソフトウェア (MEDFAUST) を用いて信号の傾きを主な指標とするアルゴリズムによって活動電位を検出し、前処理を加えた k-means 法によって全自動でクラスターカッティングを行い、得られた信号を単一神経細胞由来と見積もられるクラスターに分類した。

〈2・3〉 Connection Map

神経細胞間はシナプスと呼ばれる構造によって間接的に相互結合し、電気的信号をやりとりしている。この機能的結合を視覚化するために、"Connection Map Analysis" を考案した。10 分間にわたって 64 電極から同時記録した自発的活動電位活動電位スパイクのタイムスタンプ列から、神経細胞のすべてのペアについて相互相関関数を計算した。相互相関関数を計算した最大ラグ時間は±100 ms、計算幅 2 ms である。この相互相関関数から Coincidence Index、分布の kurtosis、相互相関関数のピーク位置のずれ $\Delta t (>0)$ を計算した。これらの線形結合を以下のように Coincidence Index として定義した。

$$Con.I. = A_{peak} \times \left(\frac{0.01 \times A_{peak}}{A_{total}} + \frac{1}{\Delta t + 1} + \frac{1}{Kurtosis} \right)$$

ここで、 A_{peak} は相互相関関数のピークまわりのある定義した時間範囲の面積(本研究では 2 ms)、 A_{total} は相互相関関数の全面積、 Δt は相互相関関数のピーク位置と $t=0$ の度数軸からのずれ、 $Kurtosis$ は相互相関関数の分布における尖度である。 w_1 は重みである。各項の数値はほぼ同じ桁になるように経験的に重み付けを行った。ここで定義した値は、相対的な強度を比較するための尺度であり、物理的な実体を持った量として定義していない。Connection Index を指標に結合の強度を評価し、すべてのペアの Connection Index の平均+標準偏差以上のものを機能的に結合したペアと仮定して線分で結び、2次元平面にマッピングした。また、相互相関関数のピーク位置のずれの方向を元に、プラスのものを起点とし、マイナスのものを終点として結合の方向性を決定した。この Connection Map には記録された全ての神経細胞ペアの機能的結合強度、入出力ノード数が表現されていることになる。神経細胞ペアに直接的な接続関係がなく、共通入力があるために擬似的に

結合しているように見える場合は、シナプス伝達の介在が多いためシナプス遅延のばらつきが多くなって相互相関関数の尖度が大きくなると考えられる。このようなケースでは、Connection Index の値は小さくなるため、擬似的な機能的結合は完全に排せないが、ある程度は排除されていると考えられる。

〈2・4〉 ロボットの制御系

小型ロボットには Khepera II を採用した。Khepera II はスイス連邦工科大学のマイクロ・エレクトロニクス研究所によって開発された研究用の小型移動ロボットである。Khepera II は 8 個の近接赤外線センサとタイヤの回転角を計測するインクリメンタル・エンコーダを備え、2 個の独立制御可能なアクチュエータを備えている。ホストコンピュータからシリアル通信で ASCII コマンドを送受信することで連続的に制御でき、この手続きをカプセル化した LabView の VI が付属する。他方、細胞外電位多点計測システムの A/D 変換ボードが National Instrument 社製であり、LabView を制御プログラムの標準開発言語として使用している。制御プログラムのインターフェイス部分は LabView を使い、演算部分は C#.NET にて作成してダイナミック・リンク・ライブラリ化したものを LabView から使用した。

3. 結果・考察

本系は脳の中で遺伝的・発生学的に構造形成された神経回路網を個々の神経細胞に一度分散したものを構成要素として用いている。MED プローブ上に再形成された神経回路網は、基本的に無作為に分散された神経細胞が自律的に形成した神経回路網であり、進化的適応により形成された規定の入力系や出力系とは一切切り離されている。

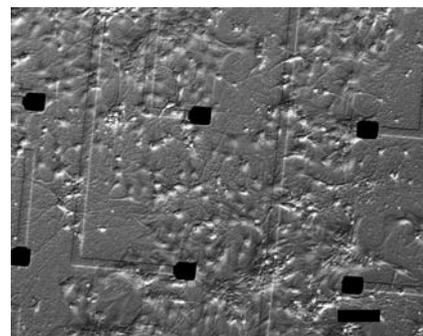


Fig.1 ラット海馬分散培養系。黒線は100 μ m。

それにもかかわらず、再構成神経回路中の細胞は神経突起、軸索を相互に接続し、シナプスを介して情報のやりとりを行い、自発的に活動電位を発生させる。外部からの入力が 0 である状態でも自発的活動電位とその伝搬が発現し、この自発活動により特定のネットワーク構造が形成される可能性がある。この一見何の意味も持たないように思

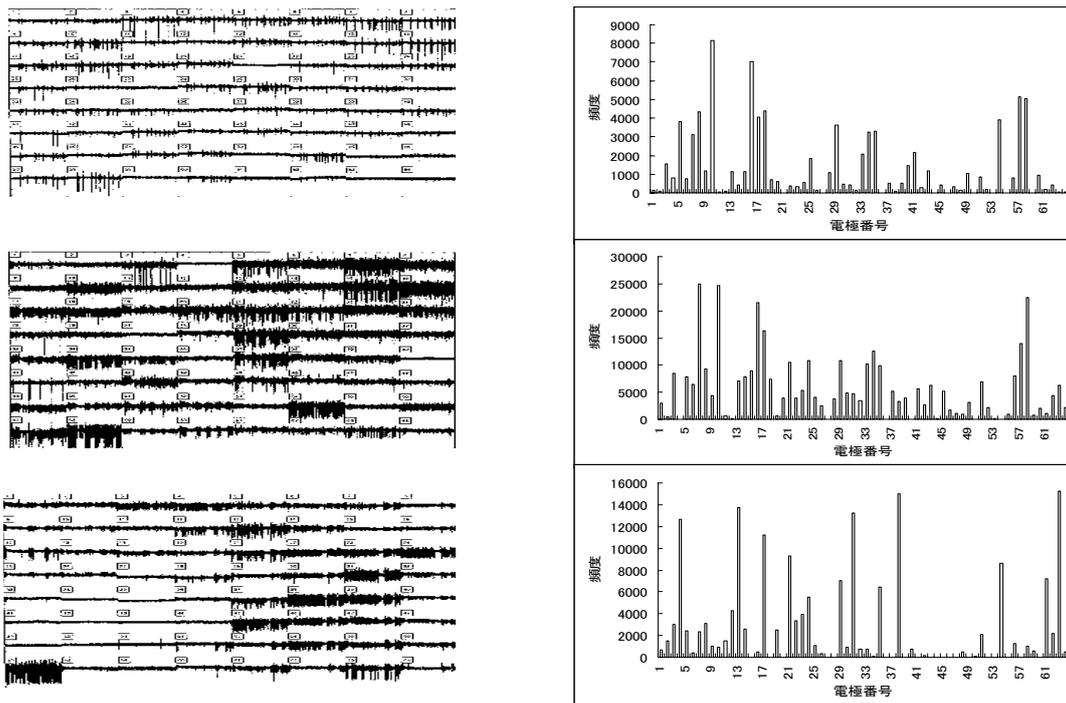


Fig.2 左：自発的活動パターンの発生依存的変化。右：左パネルのデータから得られた各電極ごとの自発的活動電位の頻度。左右共に共に上段から E18D34,37,44 のデータ

われるこのような自発的活動電位にもいくつか判別可能な時空間パターンが存在しており、短い時間範囲の中では安定して見える。培養時間が経過し、細胞の数や神経活動がある程度定常的な状態になった時点で connection map を作成すると、興味深い構造が存在していた。つまり、本系には他の神経細胞からのコネクションが集中するハブ的な神経細胞が存在していることを昨年までに報告してきた⁽⁷⁾。自発的活動電位のパターンは培養日数とともに変化し、特に時系列パターンは複雑化して頻度も増加する。しかしながら、その進行は培養細胞ごとに大きくばらつきがあった。興味深いことに、自発活動の頻度は一過性に最大になり、その後、各電極で観察される活動電位頻度のばらつきが大きくなるという変化が観察された。自発活動頻度がピークに達する培養日数は培養ごとにばらつきが認められたが、その変化の特徴は共通して観察された(Fig.2)。ハブ的な神経の存在などのネットワークコネクションの不等分布の出現は、自発活動頻度の一過的な上昇が重要な役割を果たしている可能性があり⁽⁸⁾、電極間活動電位頻度のばらつきの増大は機能的結合の不等分布を反映したものである可能性が高い。

上記の活動電位頻度の一過性上昇後の、安定した培養細胞 (E18D30-60) を用いて小型ロボットと分散培養神経回路網を相互作用させるための系の構築と、制御プログラムを開発した。このような系を初めて提唱したグループではこれを Hybrot (Hybrid living+robotic)と呼んでいる⁽³⁾。分散培養系は進化の結果、神経回路網の配線パターンの形で

固定された特定の前提ルールが存在しないため、外界に対して合目的行動をとることが本質的にできない。我々は、あらかじめ前提となるルールをファジィ論理を使って用意することを試みた。これは神経回路と感覚器・効果器の結合様式や本能行動などに対応するものであり、このような前提ルールを含むシステムを我々は” 生体表現システム (biomodeling system) ”と呼んでいる(Fig.3)。実際に刺激を特定の電極に入力し、誘発された活動電位パターンを前件部として、このときにロボットがとるべき行動をアクチュエータの回転数というパラメーターで表現してこの値を後件部として設定することで、神経回路網の内的活動パターンと外界を対応づけた。その結果ロボットに衝突回避行動をとらせることに成功した。本システムでは、神経回路網を小規模の上位脳システムとし、ロボットを外界とのインターフェイス、すなわち生物の体と捉えた。ロボットの IR センサからの情報もファジィ論理によって集約し、2点設定した刺激電極のうちのどちらを刺激するかを決定した。ロボットから神経回路網へのボトムアップ処理として、ロボットの8個のセンサ出力値を読み取り、ファジィ推論ユニット(FLBU)において電流刺激の回数を決定した。神経回路網からロボットへのトップダウン処理としては、50 msec の検出時間窓内に発生した活動電位の頻度を8電極分合計して8入力としてファジィ推論ユニット(FLTD)に入力し、ロボットの左右アクチュエータ速度を独立に制御した。推論には簡易型ファジィ推論を用いた。神経回路網への入出力としては、64点の電極からのシグナルを8個づつ合計して合計8入力とし、出力は右側センサと左側セン

サにそれぞれ対応する 2 出力とした。ファジィ論理システムとしては、入力側、出力側ともに高頻度、低頻度の 2 種類のファジィラベルによる 256 個のルールを作成した。Fig.3 生体表現システムの構成。5つの要素プログラム(ユニット)が2台の PC に分散されて稼働している。各ユニット間の通信はデータソケット (DS) を用いている。

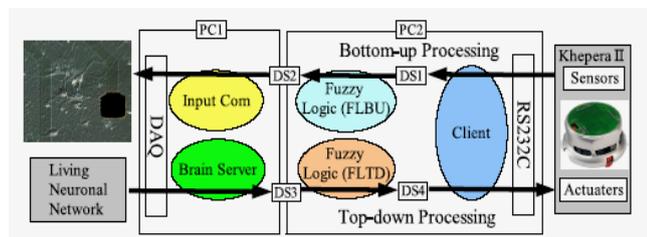


Fig.3 生体表現システムの構成。5つの要素プログラム(ユニット)が2台の PC に分散されて稼働している。各ユニット間の通信はデータソケット (DS) を用いている。

後件部は事前にロボットの片側のセンサーに物体を近づけたときの神経活動のパターンに基づいて設定した。例えば、ロボットの左側に物体を近づけ、誘導される神経回路網の活動パターンへの適合度が高いファジィルールを選別してこれらの後件部を左側アクチュエータの回転速度が高くなるように設定した。ボトムアップ処理では、KheperaII のセンサー情報を Client が読み取り、データソケット DS1 を経由して、FLBU を用いて電流刺激の回数及び位置を決定し、Input Com を介して神経回路網を電気刺激するように設定した。トップダウン処理では、BrainServer が検出時間窓に発生した活動電位の頻度を計測し、DS3 に書き込み、FLTD が活動頻度からロボット KheperaII の左右アクチュエータ速度を決定して、KheperaII を制御するようにした (Fig.3)。結果として、Khepera II の行動は周辺に障害物がない場合、自発的神経活動パターンによるやや周期的な多様な行動パターンが出現した。Khepera II 周辺に障害物がある場合には、FLBU により神経回路網への刺激が入力され、Khepera II は障害物回避を発現できた (Fig.4)。

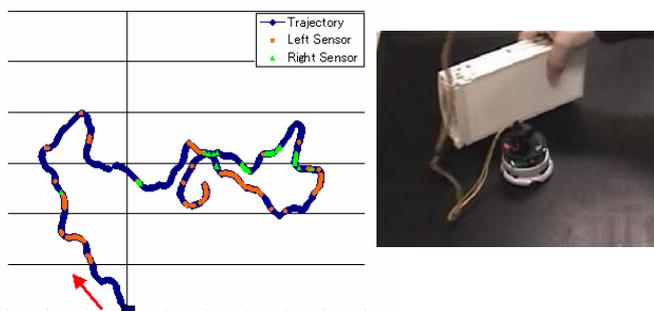


Fig.4 左：Khepera II の軌道の一例。右：衝突回避する Khepera II ロボット。

重要な点は、センサが障害物を検知しても必ずしも Khepera II は障害物回避を行わない点である。これは、障害物に対応した刺激を入力しても、神経回路網の出力はその内部状態に依存しているため、必ずしも一意に定まらないためであると考えられる。内部状態と入力の相互作用によって行動様式が決定され、これは認知エージェントの持つ機能の一つを再現しているといえる。さらに、これは未だ限定的な結果ではあるが、数回の試行の後に、障害物によって誘発される神経回路網の活動パターンに変化が生じ、ファジィルールの適合度分布が変化した例があった。神経回路網が外界と相互作用することで、シナプス伝達効率の可塑的な変化が生じているものと考えられる。このことは行動が認知の方式を変更していることを示唆する。このような変化が自律的に生じたと言うことは、生体の学習に準じた何らかの機構が分散培養系に存在していると言うことを示唆する。今後はロボットの行動様式・活動電位パターンを指標にして神経回路網の機能的結合性の変化や統合についてより詳細に解析していく。

文 献

- (1) G W Gross, E Rieske, G W Kreutzberg, and A Meyer. A new fixed-array multimicroelectrode system designed for long-term recording of. *Neurosci Lett*, Vol. 6, pp.101-105, 1977.
- (2) Y Jimbo, T Tateno, and H P C Robinson. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression. *Biophysical Journal*, Vol. 76, pp. 670-678, 1999.
- (3) Thomas B Demarse, Daniel AWagenaar, AxelWBlau and Steve M Potter. The neurally controlled animat:biological brains acting with simulated bodies. *AutonomousRobots*, Vol. 11, pp. 305-310, 2001.
- (4) S N Kudoh, R Nagai, K Kiyosue, and T Taguchi. PKC and CAMKII dependent synaptic potentiation in cultured cerebral neurons. *Brain Research*, Vol. 915, pp. 79-87, 2001.
- (5) S N Kudoh and T Taguchi. Operation of spatiotemporal patterns stored in living neuronal networks cultured on a microelectrode array. *J Adv Computational Intelligence and Intelligent Informatics*, Vol. 8, pp. 100-107, 2003.
- (6) H Oka, K Shimono, R Ogawa, H Sugihara, and M Taketani. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J Neurosci Methods*, Vol. 93, pp. 61-67, 1999.
- (7) 工藤 卓、田口 隆久、外界と相互作用する生体神経回路網、計測自動制御学会論文集、第 42 巻 4 号 pp.351-358、2006
- (8) Albert-La'szlo' Baraba'si and Reka Albert. Emergence of scaling in random networks. *Science*, Vol. 286, pp. 509-512, 1999.

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究補助金特定領域「マルチスケール操作によるシステム細胞工学」(18048043)、科学研究費補助金基盤研究(C) (18500181)の助成を得た。