

博士論文（要約）

分散培養系で神経集団が創発する  
時空間ダイナミクス

矢田祐一郎



## 概要

脳は生物が進化の過程で獲得した情報処理システムである。しばしば脳は最も優れた情報処理システムと考えられ、これまでに脳の情報処理機能を理解し、人工的に実装しようと数多くの取り組みがなされてきた。脳の神経回路が持つ顕著な特徴として、自発活動が挙げられる。脳の神経活動は止まらない。睡眠中や麻酔下であっても脳は休まずに活動を続けている。脳を情報処理システムと考えた時、エネルギー効率の観点では、入力あり、出力が求められる時のみ動作する方が効率的であろう。それにも関わらず脳が持続的に活動し続けることは、そこに何らかの物理的制約と機能的要求があるからと考えるのが自然である。

脳の神経回路は自発活動で再現性と多様性のある時空間パターンを再生し、さらに自発活動の時空間パターンは外部入力に対する応答パターンと類似することが知られている。そのため、神経回路は自発活動で記憶を表現していると考えられる。再現性と多様性のある時空間パターンは、外部入力を受けること無く神経細胞が自己組織的に構成した分散培養神経回路でも見られることから、神経回路の記憶は必ずしも外部入力を学習して作り出されるのではない可能性がある。本研究では、自発活動が備える再現性と多様性のある時空間パターンが自律的に生まれるものと仮定し、分散培養神経回路で、どのような自己組織化過程を経て創発されるのか、神経回路が獲得するどのような特性から実現されるのかを明らかにすることを目的とした。さらに、自発活動が分散培養神経回路でも外部入力応答との類似性を保持し、記憶の座として機能するのかを調べた。近年開発の進む高密度 CMOS 電極アレイを用いて、ラット胎児大脳皮質由来の分散培養神経回路の神経活動を計測し、以下の知見を得た。

適度な多様性を持つ神経活動の指標である、べき乗則に従う神経雪崩現象が神経回路に生じる発達過程を明らかにするため、幼弱な時期から経時的に分散培養神経回路の活動を観測した。その結果、神経回路の活動はランダムな発火をする最初期から、一様な時空間パターンを持つ特徴的な大規模同期を出力する時期を経て、最終的に多様な規模、時空間パターンを出力する状態になることが観測された。この結果は、神経回路の自発活動が持つ多様性が、神経回路の機能的な統合と断片化という 2 段階の発達プロセスを経て創発することを示唆する。

神経回路が自発活動で時空間パターンの再現性と多様性を両立するメカニズムとして、神経回路に機能的な部分神経集団が存在し、部分神経集団単位で活動伝達することで安定性を確保し、かつ内部状態依存で部分神経集団間の関係が変化することで複数パターンを出力するという仮説を立て、その検証を行った。次元削減法で部分神経集団の活動を抽出すると、異なる時空間パターン間で部分神経集団の活性化順序が部分的に類似し、共通の逐次伝達構造を用いて複数の時空間パターンを再生することが示唆された。さらに、類似した時空間パターンは連続して再生されやすく、連続的な内部状態依存で時空間パターンが出力される可能性を示した。

分散培養神経回路が自己組織的に自発活動に創りだす時空間パターンが記憶の座としての役割を持つから明らかにするため、分散培養神経回路に電気刺激を加えて同期発火を誘発し、自発同期活動パターンとの類似性を調べた。神経回路は自発活動で幾つかの再現性ある時空間パターンを出力し、誘発された同期活動の時空間パターンはその一つと類似した。すなわち、分

散培養神経回路でも自発活動の時空間パターンが記憶の座としての役割を果たす可能性が示された。分散培養神経回路は予め自己組織的に創りだした内部状態に対して、外部入力を投射して表現するとも言える。

以上から、神経回路は学習を経ずとも自己組織的に記憶の座に相当する再現性と多様性を持つ時空間パターンを創りだし、外部入力を予め存在する記憶の座に割り当てて処理する可能性が示唆される。発達による自己組織化を通して、神経回路は初めに一度単調な活動状態を作り出してから、適度な多様性を持つ神経活動を導くことが示された。さらに、自己組織化の結果として、神経回路は機能的な部分神経集団と逐次的活性化構造、さらに自律遷移する内部状態を生み出し、再現性と多様性ある時空間パターンが備わることが示唆された。このような自己組織化特性は、生物が入力に依存せずあらゆる状況下で常にある程度優れた情報処理をするための解であるかもしれない。

# 目次

第 1 章	序論	1
1.1	情報処理システムとしての神経回路	1
1.2	神経回路の自発活動	4
1.3	分散培養神経回路	12
1.4	本研究の目的	13
1.5	本論文の構成	15
第 2 章	高密度 CMOS 電極アレイを用いた分散培養神経回路の電気生理実験系	16
第 3 章	発達を通じた多様性の創発: 統合と断片化のプロセス	17
3.1	背景と目的	17
3.2	手法	19
3.3	結果	24
3.4	考察	34
3.5	結論	37
第 4 章	再現性と多様性の両立メカニズム: 細胞集団伝達と自律状態遷移	39
4.1	背景と目的	39
4.2	手法	40
4.3	結果	46
4.4	考察	54
4.5	結論	62
第 5 章	自発誘発類似性の機能的意義: 刺激入力による内部状態への投射	63
第 6 章	総論	64
第 7 章	結論	65
	参考文献	67
	業績リスト	80

謝辭

85

# 目次

1.1	Schematic illustrations of artificial neural network models. . . . .	3
1.2	Schematic illustration of the synfire chain model and the branching process model. . . . .	8
1.3	Schematic illustration of the sampling-based representation hypothesis. . .	11
3.1	Schematic illustration of possible developmental variation models. . . . .	20
3.2	Spontaneous activity of dissociated cortical cultures at different developmental stages. . . . .	25
3.3	Avalanche size distributions obtained from a culture . . . . .	27
3.4	Avalanche size distributions in different configurations. . . . .	28
3.5	The developmental variation of avalanche distribution features over time. .	30
3.6	Poisson-like spiking activity in cortical cultures with synaptic blockers. . . .	32
3.7	The changing proportion of avalanche distribution over time. . . . .	33
3.8	Developmental variations in spatiotemporal pattern. . . . .	35
4.1	Spontaneous spiking activities of cultured cortical neurons recorded on CMOS MEAs and distributions of burst peak amplitude. . . . .	47
4.2	Decomposition of high-dimensional neuronal activity and classification of synchronized burst patterns. . . . .	49
4.3	Similarity in partial sequence of sub-population activation between synchronized burst classes. . . . .	52
4.4	Evaluation of consecutiveness in appearance of burst spatiotemporal patterns classes. . . . .	53
4.5	Consecutive and periodic appearance of similar spatiotemporal patterns of bursts. . . . .	55
4.6	Variation of spatiotemporal patterns during a period of the same class burst. .	56
4.7	Schematic illustration of the hypothesis. . . . .	58
4.8	Dimension-reduced activity of cultured neuronal networks represented by 20 sub-populations. . . . .	60

# 表目次



# 第 1 章

## 序論

### 1.1 情報処理システムとしての神経回路

脳は生物が進化の過程で獲得した情報処理システムである。脳では神経細胞が構成するネットワーク（神経回路）が電気信号または化学物質を介して情報を伝達しており、神経回路の活動が脳の情報処理機能を生み出している。しばしば脳は最も優れた情報処理システムと考えられ、その動作原理を理解することは人類の夢の一つと言える。

これまでに脳の情報処理機能を数理的・物理的に模擬しようと多くの試みがなされてきた。1943年にMcCullochとPittzが神経細胞の入出力特性を単純な数式で表現したMcCulloch-Pittzモデルを考案した(McCulloch and Pitts, 1943)。Rosenblattはそれを元に1957年に3層のフィードフォワード構造からなるパーセプトロン(Perceptron)を考案し、入力パターンを識別できることを示した(Rosenblatt, 1958)。神経回路(Neuronal network)をモデル化し、計算機上で実行できるようにしたものは一般にニューラルネットワーク(Neural network)と呼ばれる。以降興隆期と停滞期を繰り返しながら、これまでに多くのニューラルネットワークが考案されてきた。これらの試みは、脳に匹敵する優れたコンピュータを造る、という社会的要求を実現することを目的としただけでなく、脳を（情報学的観点から）理解したい、という科学的探究心にも牽引されてきたのであろう。

近年はディープラーニングと呼ばれる技術の登場により、ニューラルネットワークが再度注目を集めている。2016年にディープラーニング技術を駆使して作られたDeepMind社のAlphaGo(Silver et al., 2016)が世界屈指の囲碁棋士イ・セドルに勝利したことは我々に大きなインパクトを与えた。ディープラーニングの革新的な点は、それまで学習を収束させることが困難と考えられていた3層以上の多層パーセプトロンが学習可能であることが示された点である(Hinton et al., 2006)。その下地となったのは、学習データの増加及び計算機の性能向上と考えられている。

パーセプトロンを初めとして、現状一般的なニューラルネットワークはフィードフォワード型(Fig. 1.1A)のものが多い。フィードフォワードニューラルネットワーク(Feed-forward neural network: FFNN)とは、神経細胞が層状に配置されており、入力情報が逐次的に各層で処理されて出力されるネットワークで、大脳皮質感覚野の6層構造を模擬したものとも言わ

れる。ニューラルネットワークの学習は、バックプロパゲーション（誤差逆伝播法とも）と呼ばれるアルゴリズムで実行される。バックプロパゲーションでは、与えられた正解データと出力データの誤差に対して、出力に最も近い出力層から順に、層を逆上って重みを更新するアルゴリズムである。この時、層を逆上るに従って更新速度が低下する勾配消失問題が生じることが知られていた。

FFNN は画像など時間的な情報を持たない入力の識別には向くものの、音声や動画など、入力の時間的な連続性を考慮する必要がある入力には適さない。これは、FFNN が（学習の結果重みが更新されない限り）状態が常に固定された静的な識別器だからである。再帰的な結合構造を持つニューラルネットワーク、リカレントニューラルネットワーク (Recurrent neural network: RNN; Fig. 1.1B) は時間的に連続な入力を扱える。RNN では神経細胞の出力が他の細胞を介してリカレント（再帰的）に入力となるため、前時刻の入力情報を間接的に保持し、前時刻までの入力に依存して現時刻の入力処理結果が変わるからである。すなわち、ネットワークに内部状態が存在し、外部入力に駆動されるダイナミクスを持つ、動的ニューラルネットワークと言える。

このように動的情報処理をニューラルネットワークで行うためにはリカレントな構造が必要だが、RNN は依然として勾配消失問題が問題となる。そこで、RNN の機能を計算的に安定な構造で実装した Long short-term memory (LSTM) (Hochreiter and Schmidhuber, 1997) と呼ばれる擬似的なモデルがニューラルネットワークで動的情報処理をするための一般的な手法になっている。RNN を用いた別の枠組みとして、リザーバーコンピューティング (Reservoir computing) とよばれる手法がある (Maass et al., 2002; Sussillo and Abbott, 2009)。リザーバーコンピューティングではランダムな結合構造を持つ RNN に対して、特定の神経細胞群に入力信号が入力される。出力信号は神経細胞の活動の線形和であり、線形和の重みを最適化することで入力信号に対して任意の出力信号を学習して出力できる。学習するのは線形和の重みだけなので容易であり、RNN の実用的なモデルとして着目されている。

ディープラーニングの登場により、ニューラルネットワークはヒトの脳機能を越える性能を示しつつある。しかし、その性能を示すことができる応用先は一部に限られている。現状のニューラルネットワークは、学習に膨大なデータ量と学習時間を必要とする。そのため、十分に学習データが準備できない対象に対しては、その性能を発揮することができない。実世界では、必ずしも十分な学習データが用意されない可能性がある。また、学習に十分な時間を取れるとも限らない。さらに、手に入るデータが質の良いものかもわからない。そのような場合でも、脳はリアルタイムに安定して動作する必要がある。学習が完了していなくとも、常にある程度妥当な出力をする必要がある。脳の神経回路にはこのような機能が要求される。そのためには、必ずしも入力データの学習という形に依存しないシステムの構成方法が必要と考えられる。

脳の神経回路と一般的な情報処理システムとの最たる相違点は、その自発活動の有無にあるかもしれない。情報処理システムとは、入力を受けて出力を返すシステムと定義できるだろう。しかし、脳の神経活動は止まらない。睡眠中や麻酔下であっても脳は休まずに活動を続けている。つまり、入力が無くとも常に出力をする。そのため、単に入出力関係からではその動

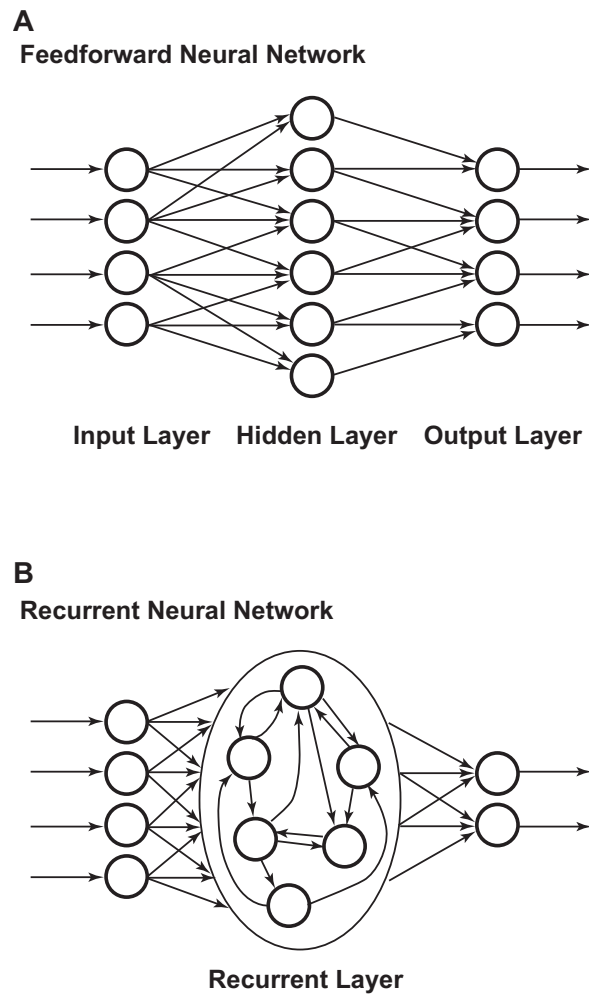


Fig.1.1. Schematic illustrations of artificial neural network models. **(A)** A typical structure of feed-forward neural network (FFNN). **(B)** A typical neural network structure for the reservoir computing, where a recurrent neural network plays a principal role.

作原理を理解することは難しいと考えられる。脳を情報処理システムと考えた時、エネルギー効率の観点では、入力があり、出力が求められる時にのみ動作する方が効率的であろう。それにも関わらず脳が持続的に活動し続けることは、そこに何らかの物理的制約か機能的要求があるからと考えるのが自然である。

脳の神経回路は再帰的な結合を持ち、自発的に活動しながら動的に情報処理を行う。FFNNが静的ニューラルネットワーク、RNNが動的ニューラルネットワークであるのに対し、神経回路は自律的なダイナミクスを持つ内部状態が存在する、自律動的ニューラルネットワークと言えるだろう。この自律動的な特性が、学習が不十分な状況でも脳が安定して動作する理由かもしれない。脳に匹敵する情報処理システムを創り出すためには、自発活動の意義を理解する必要があると考えられる。

## 1.2 神経回路の自発活動

本節では、これまでに報告されている脳の自発活動に関する知見をまとめる。

### 1.2.1 自発活動の同期現象と時空間パターン再生

睡眠下、麻酔下など、外部からの入力がない、または少ない状態では、神経回路の自発活動は神経細胞の同期発火に特徴づけられる。同期発火現象は大脳皮質や海馬などで一般に観測される。同期発火中の神経細胞は、単に一斉に発火するのではなく、再現性のある時空間パターンに従って活動する。すなわち、各細胞が同期中に活動する順序、タイミングがおおよそ決まっているのである。このような秩序だった時空間パターンを有することから、神経回路は神経細胞の同期発火に情報を表現している、または同期発火で情報を伝播しているのではないかと考えられている。

同期発火が最も詳しく調べられているのは海馬である。in vivo 実験では海馬のCA1の錐体細胞が覚醒下に経験した発火パターンを睡眠下でも繰り返す(“Replay”現象)ことが知られている(Lee and Wilson, 2002; Wilson and McNaughton, 1994)。覚醒下で皮質から海馬に送られた情報を貯蓄しておき、睡眠下、特にNREM(Non rapid eye movement)状態で、海馬が情報を再生して皮質に送ることで記憶が定着する(Memory consolidation)メカニズム(Diekelmann and Born, 2010)が考えられている。さらに、海馬では、覚醒下で経験した発火パターンの順序を真逆にしたような発火パターンが睡眠下で現れる(“Reverse replay”)現象(Foster and Wilson, 2006)や、更には覚醒下で経験する発火パターンが事前の睡眠中に生じる(“Preplay”)現象(Dragoi and Tonegawa, 2011, 2013)も観測されている。海馬での研究報告が多い一つの理由は、CA1の錐体細胞に場所細胞(Place cell)(O’Keefe and Dostrovsky, 1971; O’Keefe and Nadel, 1978)として機能する細胞があり、実験体に特定の経路を通らせることで発火パターンを誘起しやすいからであろう。

また、海馬の同期発火は覚醒化静止時にも観測される(Carr et al., 2011; Grosmark and Buzsáki, 2016; Karlsson and Frank, 2009; Kudrimoti et al., 1999; Takahashi, 2015; Villette

et al., 2015) . マウスに迷路課題を解かせると、分岐点で静止する間に、これから通る経路に対応する場所細胞発火パターンを事前に再生する (Takahashi, 2015) . これは未来の行動を予測していると捉えられ、メンタルタイムトラベル (Tulving, 1985) の原理とも考えられている .

自発的な同期発火とそれに伴う時空間パターンの再生は大脳皮質でも観測される . Ji と Wilson は、海馬で睡眠下に Replay が生じるとき、大脳皮質の視覚野 V1 でも直前の覚醒下で経験した時空間パターンが再生されることを報告している (Ji and Wilson, 2007) . 海馬で Replay が生じるときに伴う Sharp-wave ripple と同期して、大脳皮質前頭前野 (Prefrontal cortex: PFC) でも replay が生じることが報告されている (Jadhav et al., 2016; Peyrache et al., 2009) . また、麻酔下の大脳皮質感覚野では、上記のような Replay 現象とは独立に、自発活動で安定した時空間パターンが生じることが示されている (Luczak et al., 2007) . 覚醒行動下では神経回路は睡眠下、麻酔下と比べて非同期的な活動を示すことが知られているが、神経細胞の発火順序や入力に対する反応などの活動パターンは保存されている (Luczak et al., 2013; Noda and Takahashi, 2015) .

### 1.2.2 神経雪崩現象

神経回路は自発的に多様な活動を生じる . Beggs と Plenz は大脳皮質スライスを多点電極アレイ上で培養し、自発活動での局所電場電位 (LFP: Local field potential) を観測したところ、同期の規模がべき乗則に従うことを見出した (Beggs and Plenz, 2003) . ここで、同期の規模とは同期中に観測された LFP が閾値を超えた回数、同期中に閾値を超えた LFP を観測した電極の数、同期の持続時間などで定義される . これらの定義で同期規模の分布はべき分布に従い、分布が両対数グラフ上で負の傾きを持つ直線となる . これは、小規模な同期が大多数を占める一方で、稀に極めて大規模な同期も生じ得ることを意味する . また、時間、空間スケールに依存せずこれらの性質が成り立つことを意味する (スケールフリー性) . 雪崩が生じる際の雪球の大きさにもこの法則が成り立ち、神経細胞が同期活動する様子が雪崩が生じる様子に似ていることから、この文脈での同期現象は神経雪崩現象 (Neuronal avalanche) と呼ばれる (Plenz and Thiagarajan, 2007) . また、べき乗則に従う神経雪崩現象が生じるとき、神経回路は活動が適度な複雑性を持つ状態、Self-organized criticality (SoC) にあると言われる .

Beggs と Plenz は神経雪崩現象がべき乗則に従うとき、すなわち SoC で、神経回路では多様な時空間パターンが生じていることを示した (Beggs and Plenz, 2004) . さらに、大脳皮質スライスでの実験及びシミュレーションの結果から SoC にある神経回路では出現する時空間パターンの種類が最大化されることが報告されている (Chen et al., 2010; Haldeman and Beggs, 2005) . さらに、神経回路が記憶可能な情報量や (Shew et al., 2011)、処理できる外部入力の種類 (Shew et al., 2009) も最大化される . すなわち、SoC は神経回路が情報処理システムとして最適な状態にあることを示唆しているのかもしれない .

SoC と神経雪崩現象は初めに大脳皮質スライスで発見された (Beggs and Plenz, 2003) が、皮質スライス (Friedman et al., 2012; Haldeman and Beggs, 2005; Stewart and Plenz, 2008) だけではなく、腹側被蓋野を皮質と合わせて切り出したスライス共培養系 (Petermann et al.,

2009; Shew et al., 2009, 2011; Yang et al., 2012), in vivo 麻酔下の大脳皮質 (Gireesh and Plenz, 2008), 覚醒化の大脳皮質 (Petermann et al., 2009), 海馬 (Priesemann et al., 2014) などでも観測されており, 神経回路の普遍的な特性の一つと考えられている. SoC を生み出す上で, 神経回路での興奮性細胞と抑制性細胞の割合が重要な要素だと考えられている. (Massobrio et al., 2015; Shin and Kim, 2006)

### 1.2.3 神経活動の自律状態変動

自発的な同期発火が生じるとき, 神経回路はしばしば”Up state”にあると言われる. これは, 神経回路で同期発火が生じる際には, 各神経細胞の膜電位が平常時よりも持続して上昇した状態になるからである (Anderson et al., 2000; Cossart et al., 2003; Maclean et al., 2005; Petersen et al., 2003; Sanchez-Vives and McCormick, 2000). これにより, 神経細胞の発火閾値までの電位差が少なくなり, 神経細胞は入力を受けた際に平常時より発火しやすい状態になる. 神経細胞の同期現象は膜電位レベルの状態変化も表現している可能性が高い.

また, 同じ刺激入力を繰り返し与えた時に, 神経回路の応答は試行ごとに大きなばらつきを見せる. このばらつきは Trial to trial variability と呼ばれる. Arieli らは, 移動する縞模様を見せた時にネコの視覚野で誘発される LFP を電位感受性色素 (Voltage sensitive dye) イメージングで観測した. この時生じた Trial to trial variability は自発活動に由来するものと考えられ, 刺激に誘発される LFP のパターンが再現性のある誘発応答成分とその時の自発活動との和として表せるというモデルを提案した (Arieli et al., 1996). 神経回路は動的特性を持ち, 外部入力に対する応答パターンは自律的に変動する自発活動に依存して生じると考えられる.

このような自律的な自発活動の変動は, 単なるノイズではないと考えられる. 非同期的な発火を生じるときの自発活動を隠れマルコフモデルで解析すると, 神経回路に複数の状態が存在し, それらを自律的に巡回することが示される (Mazzucato et al., 2015). そして, 外部刺激を加えると遷移する状態数が減少する (Mazzucato et al., 2015). 外部刺激が高次元自発活動の次元を圧縮する作用を持つとも言え (Mazzucato et al., 2016), 神経回路がアトラクターネットワークとして働くことを示すかもしれない.

### 1.2.4 自発活動と刺激応答の類似性

自発活動の大きな特徴として, 時空間パターンが外部から回路に入力が加わった時に誘発される応答の時空間パターンと類似することが知られている. ネコ視覚野の電位感受性色素イメージングから, 自発活動の空間パターンと誘発応答の空間パターンは似ており, 誘発反応時の活動から自発活動時の単一神経細胞の発火パターンを再現できることを示した (Tsodyks et al., 1999). また観測された自発活動の空間パターンは持続的に変動し, その変化は連続的に角度変化する縞模様を掲示したときの空間パターン変化に類似することも示されている (Kenet et al., 2003). 皮質視床の脳スライスでも, 視床に電気刺激を加えた時の皮質神経細胞の活動を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法で観測すると, その空間活動パターンは自発活動の空間パター

ンに類似する (Maclean et al., 2005) .

さらに, Luczak らは多点電極を配備したシリコンプローブを使用して高い時間解像度で活動計測を行い, 聴覚野及び体性感覚野で自発活動と刺激誘発反応が時空間発火パターンとしても類似することを示した (Luczak et al., 2009) . また, 聴覚野で, 異なる種類の刺激 (トーン刺激と自然音刺激) を与えた時の誘発応答, そして自発活動はどれも類似した時空間発火パターンを示す . (Luczak et al., 2009, 2013) . 自発活動のばらつきは異なる刺激への誘発応答それぞれのばらつきを包含し, さらに自発活動の発火パターンをシャッフルして得られた発火パターンは, 自発活動パターンを包含したより多様なパターンを示した . この結果を元に, 自発活動は神経回路が出力できる活動パターンの領域を示しており, 外部からの入力はこの領域に含まれる活動パターンの一つで表現される, という仮説が提案されている (Luczak et al., 2009, 2015) .

### 1.2.5 同期現象での活動パターン生成モデル

神経細胞の集団同期発火の概念は Hebb のセル・アセンブリ (Cell assembly) 仮説 (Hebb, 1949) にまで遡れるだろう . Hebb は神経細胞が同期して活動すると, それらの細胞間の結合が強まると考えた . この法則を Hebb 則, この法則に従って変化する細胞間結合は Hebbian シナプスと呼ばれる . この法則から脳の神経回路には同期して発火し, 強い結合で結びついた神経細胞集団が生まれるはずである . このような同期神経細胞集団がセル・アセンブリと呼ばれる . セル・アセンブリは特定の知覚や記憶と結びつき, セル・アセンブリの活動が脳の知覚の認識や記憶の想起を起こすと考えた . セル・アセンブリ仮説は生理学的な実験からでなく, 心理学者である Hebb の推察から生まれたものであるが, その後長い時を経て実験的にも支持され, 広く受け入れられている (Mao et al., 2001) .

このような同期する神経細胞集団は特定の同期発火パターンを生み出すはずである (Abeles and Gerstein, 1988) . 同期発火による時空間パターン生成モデルとして, Abeles は Synfire chain 仮説 (Abeles, 1991) を提案した . 同期細胞集団の中で機能的な多層フィードフォワード伝達構造 (Fig. 1.2A) が作られており, ある層で特定の発火パターンが生じた時のみ安定して次の層へと伝達される . これにより, 回路全体で特定の時空間発火パターンのみが安定して生じる (Fig. 1.2B) . ひとつひとつの神経細胞同士の伝達は確率的で不安定であっても, 層から層へ, 部分的な集団間で伝達することで安定したパターン生成が可能と考えられる (Diesmann et al., 1999; Ikegaya et al., 2004) .

Synfire chain 仮説は神経回路の安定した時空間発火パターンによって実験的に検証され (Ikegaya et al., 2004; Reyes, 2003; Zandvakili and Kohn, 2015), 有力な仮説となっている . ただし, これらの観測された”安定して再生される発火パターン”は実は確率的にランダムに生成されたものとして説明でき, 有意なパターンとは言えない, という批判も存在する (Baker and Lemon, 2000; Long et al., 2010; Mokeichev et al., 2007; Oram et al., 1999) . また, Synfire chain 仮説は安定した時空間発火パターンの生成メカニズムを説明するものの, 神経回路に多様な出力パターンが生まれることは必ずしも説明しない .

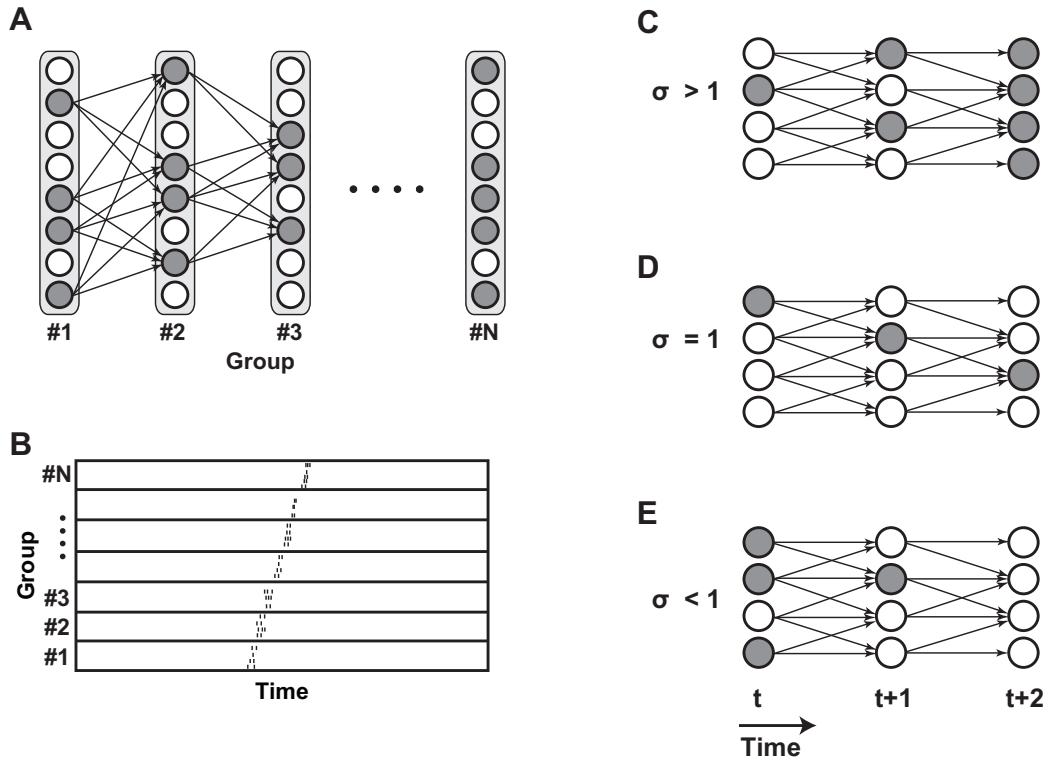


Fig.1.2. Schematic illustration of the synfire chain model and the branching process model. **(A–B)** Schematic illustration of the synfire chain model. The neurons form functional feedforward structure in a network. A specific synchronous activity in the group #1 excite particular neurons in the group #2 **(A)**. The activity pattern in the group #2 ignite neurons in the group #3 likewise, and a spatiotemporal firing pattern propagates as a synchronous firing chain **(B)**. **(C–E)** Schematic illustration of the theoretical branching process model. The model parameter  $\sigma$  defines the expected number of neurons ignited by firing of a neuron. **(C)** If  $\sigma > 1$ , the network activity easily diverges. **(D)** If  $\sigma = 1$ , the network operates in a stable mode. **(E)** If  $\sigma < 1$ , the network activity disappears rapidly.



神経回路が SoC でべき乗則に従う神経雪崩現象を生み出すメカニズムとして、神経細胞間の伝達が Critical branching process (Harris, 1989) に従うモデルが考えられている (Beggs and Plenz, 2003) . フィードフォワード構造の神経回路を考えた時に、ある神経細胞の発火が次の層で発火させる神経細胞の数は確率的に決まると仮定し、その期待値を  $\sigma$  とする . 一つ一つの層が各時刻を表すと考えれば、リカレントな神経回路も便宜的にこのフィードフォワード構造で表せる .  $\sigma > 1$  のとき、層 (時間) が進むごとに発火する細胞が増えていき、神経回路の活動は発散してしまう (Fig. 1.2C) . 反対に  $\sigma < 1$  のとき、層 (時間) が進むに連れて発火する細胞は減少し、最終的に神経回路の活動は止まる (Fig. 1.2E) .  $\sigma = 1$  であるとき、神経回路が持続的に活動を続けることができる (Fig. 1.2D) . この状態が Criticality であるとするのが Critical branching process である .  $\sigma = 1$  となるときの Branching process から観測される神経雪崩はべき乗則に従う . また、このとき神経雪崩規模分布は両対数グラフ上での傾きが  $\alpha = -1.5$  となる . この値は実験的に観測された神経雪崩規模分布の両対数軸グラフ上での傾き (Beggs and Plenz, 2003; Gireesh and Plenz, 2008) に近く、Critical branching process が神経雪崩現象モデルとして確からしい根拠となっている . ただし、Branching process モデルでは、活動パターンはランダムに生じる . 活動パターンの多様性は保証されるものの、類似した時空間パターンが繰り返し生じる、時空間パターンの再現性は必ずしも保証されない .

神経回路の同期発火時空間パターンは、同期の開始直後は ms 単位で極めて正確なものの、同期期間の後半になると開始直後ほど正確ではなくなる (Luczak et al., 2007) . また、神経細胞が受容野 (神経細胞が感受性を持つ刺激入力範囲) に相当する刺激入力を受けた時に特異的に出力する応答が、同期発火の後半に現れることが報告されている (Barthó et al., 2009; Wang et al., 2005) . Luczak らは時空間パターン生成のメカニズムとして Packet-based communication 仮説 (Luczak et al., 2015) を提案している . ここでの Packet とは神経細胞集団が出力できる特定の時空間発火パターンを指す . この Packet は異なる入力に対する応答や自発活動の間で共通し、自発活動と誘発応答の類似性を説明する . 入力の情報は主に Packet の後半に表現され、同期開始直後に使用する Packet は異なる入力間で共通している . また、麻酔下や睡眠下に比べて覚醒下では非同期的な発火をするが、これは複数の Packet が重複した時間に生じているからであるとしている . Packet-based communication 仮説は神経回路の時空間パターン生成に関わる様々な実験結果を説明し、現段階で有力な仮説と言える .

### 1.2.6 自発活動の機能的意義

神経回路の自発活動の機能的意義については、これまでにいくつかの仮説が考えられている . 一つは Luczak らの説明したように、自発活動が神経回路が外部入力に対する応答として出力できるパターンのレパートリーを保持しているというものである (Luczak and Maclean, 2012; Luczak et al., 2009, 2015) .

生き物が生存するためには、外部環境を把握することが必要である . 外部から入力される情報を予測できるように、脳は内部に外部環境のモデルを保持すると考えられている (Predictive coding) . ベイズ推定の枠組みでは、これは外部環境からの入力の分布を推定して神経回路に

保持することを意味する．近年の研究では，自発活動はこのような分布を神経回路が表現する役割を持つのではないかと考えられている (Buesing et al., 2011; Fiser et al., 2010)．すなわち，自発活動での活動パターンは，神経回路が保持する分布からサンプリングされたものであり，活動パターンがばらつくことで分布を表現できる．Berkes らは，特定の刺激が入力される環境下でマウスを成長させると，成長段階で入力された刺激に対する応答パターンと自発活動は類似するが，成長段階で与えられなかった刺激への応答パターンと自発活動のパターンは異なることを示し (Berkes et al., 2011)．この結果は，自発活動が外部環境から入力される刺激を予測する内部モデルを表すという仮説を支持する．応答パターンのばらつきは，自発活動のばらつきを事前分布として，入力情報と事前分布から推定された事後分布を表したものと考えられる (Berkes et al., 2011; Orbán et al., 2016)．つまり，誘発応答は自発活動が保持する事前分布から決まるため，自発活動と誘発応答の類似性を説明できる (Fig. 1.3)．

但し，これらの研究では，神経回路の出力が各細胞の発火量，すなわち，神経活動の空間パターンで表現される，と定義して分布を求めており，時空間パターンが出力を表すとする Luczak らの仮説とは必ずしも一致しない．実際は Luczak らの報告 (Luczak et al., 2009) でも，刺激誘発応答パターンが自発活動のパターンの一部となることは，上記の報告同様，各細胞の発火数の分布から推測しており，仮説が時空間パターンでも成立するかは立証されていない．

他にも，神経細胞からの出力は微弱であり，ノイズが加わった方が他の細胞を発火させやすい，という確率共鳴 (Stochastic resonance) 現象 (Douglass et al., 1993) が知られており，神経回路は自発活動で適切なノイズレベルを担保する機能を持つのではないかと考えられている．

### 1.2.7 まとめと考察

以上から，神経回路の自発活動は，多様な時空間パターンを安定して再生し，再現性と多様性を備える．これは，自発活動が情報量を持つことを意味する．そして，自発活動は外部入力に対する誘発応答パターンとの類似性を持つ．つまり，自発活動の持つ情報は外部からアクセス可能である．自発活動は神経回路の記憶として捉える事ができると考えられる．自発活動と誘発応答の類似性は，一時的な記憶の貯蔵庫と考えられている海馬だけでなく，大脳皮質感覚野でも観測される．そのため，この場合の記憶とは特定の入力に対して想起される感覚なども含めた広義の記憶に該当する．

自発同期活動パターンと誘発応答パターンが類似することは，2つの可能性を示唆する．神経回路を一般的な情報処理システムと考えれば，外部入力とそれに対応する出力，すなわち神経活動パターンを与えられ，その関係を学習する．その結果生まれた活動パターンが記憶として自発活動に埋め込まれれば，類似性が生じると考えられる．この時，自発活動にパターンが生じるためには学習を経る必要がある．しかし，もうひとつの可能性として，仮に入力が無くとも，記憶の座に相当する活動パターンを神経回路が自律的に自発活動に作り出し，外部入力は後からそこに紐付けられる，という仮説が考えられる．後者の仮説が成り立つ場合，自発活

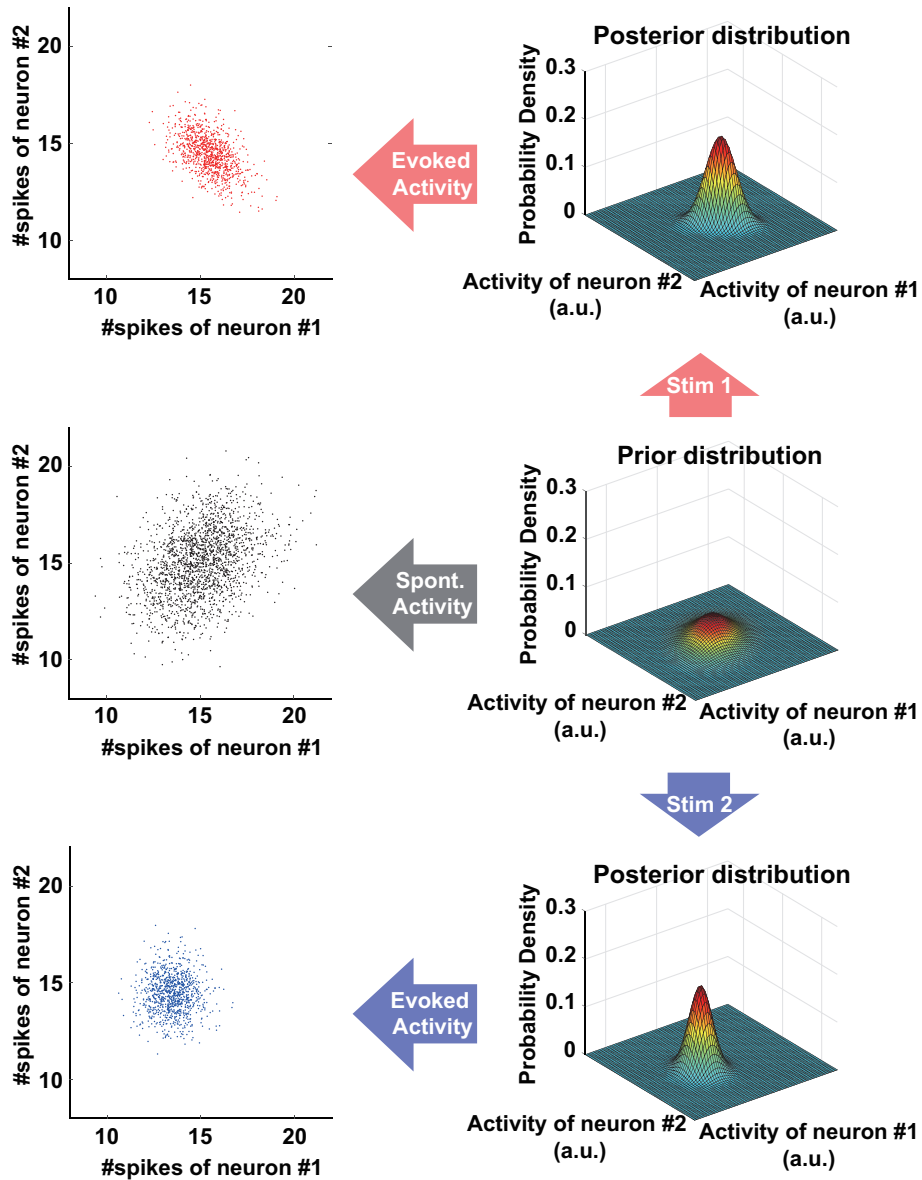


Fig.1.3. Schematic illustration of the sampling-based representation hypothesis.

動が誘発応答を規定することは、神経活動がとり得る空間が、予め存在する自発活動に制約を与えられていることを意味する。神経活動は何も情報を持たない初期状態から与えられた入力に対して定められた出力を学習するのではなく、入力に対して予め持つ出力パターンから適したものを出力する、または予め持つ出力パターンを元に改変して出力するのかもしれない。そうであれば、十分に学習できない時でも、限られた出力の中からそれなりに妥当な出力を選択し、安定した動作が可能と考えられる。

### 1.3 分散培養神経回路

分散培養神経回路は、一般にラット胎児または乳児から脳組織を取り出し、酵素を用いて神経細胞を単離した上で培養皿上に播種し、培養することで組み立てられる。播種された神経細胞は、初めは単離しているものの、徐々に神経突起を伸ばし、培養開始後1週間程度でシナプスを形成する (Ichikawa et al., 1993; Muramoto et al., 1993)。神経細胞を得る際に元の神経回路構造は失われ、また神経回路は2次元平面上に組み立てられるので、その回路構造は脳内の神経回路構造とは異なる。しかし、このような分散培養神経回路でも多くの神経回路の活動特性や機能が保存されている。

初めに、分散培養神経回路でも自発的に神経活動が生じ、さらに同期発火をする (Jimbo et al., 1998; Kamioka et al., 1996)。分散培養神経回路での同期発火はしばしば同期バースト (Synchronized burst; Population burst, Network burst とも) と呼ばれる。同期バーストは時空間パターンを安定して繰り返し再生する (Eytan and Marom, 2006; van Pelt et al., 2004) ことが知られており、複数の時空間パターンを生じる (Madhavan et al., 2007; Segev et al., 2004)。また、分散培養神経回路でも神経雪崩現象は観測される (Massobrio et al., 2015; Mazzoni et al., 2007; Pasquale et al., 2008; Tetzlaff et al., 2010)。自発活動と外部入力による誘発応答のパターンが類似するかは明らかにされていないものの、自発活動時と刺激反応時の神経回路の機能的結合構造が類似することは報告されている (Pirino et al., 2015)。

加えて、長期間刺激入力を与え続けたときに生じる神経回路レベルでの長期増強 (Long-term potentiation: LTP) および長期抑制 (Long-term depression: LTD) (Jimbo et al., 1999; le Feber et al., 2010; Ruaro et al., 2005; Shahaf and Marom, 2001)、入力頻度に応じて誘発反応の強さが変化する刺激特異的適応 (Stimulus specific adaptation: SSA) (Eytan et al., 2003)、短期記憶 (Draniias et al., 2013, 2015; Ju et al., 2015) など、神経回路の典型的な学習機能を保持することも報告されている。

#### 1.3.1 自己組織化現象

このように、分散培養神経回路は、恐らく脳内神経回路と異なる構造を持ちながらも、多くの特性を保存している。これは神経回路の特性が神経細胞集団の自己組織化現象 (Self-organization) (Kauffman, 1993) で創発されるものであることを示すかもしれない。自己組織化とは、事前に与えられた設計図がなくとも、集団が環境に応じて自律的に秩序を生み出す現

象である。

神経回路の学習は自己組織化現象の一つとして捉えることができるかもしれない。学習では、神経回路は外部入力と望ましい出力が与えられた環境下で、神経細胞間のシナプス可塑性による伝達効率変化でその環境に適した神経活動を生み出す。

しかし、神経回路の自己組織化は学習だけではない。発達も神経回路の自己組織化の一つと言える。発達は神経回路の構造形成であり、時間スケールが長期で不可逆な自己組織化と考えられる。神経回路の自己組織的発達モデルとしては、Dawkins や Edelman が提唱した Neural Darwinism 仮説が知られている (Dawkins, 1971; Edelman, 1993)。Neural Darwinism は二つの多様化・選別プログラムからなる。初めに脳には多量の神経細胞があるが、必要な細胞のみが残り不必要な細胞は死に至る。次に神経細胞は結合を作りネットワークができるが、必要な結合のみが強化され不要な結合は除去される。前者はアポトーシス (Apoptosis) (Meier et al., 2000)、後者はシナプス刈り込み (Synaptic pruning) 現象または軸索刈り込み (Axon pruning) 現象 (Cowan et al., 1984; Luo and O'Leary, 2005; Purves and Lichtman, 1980) として実装されていると考えられる。

また、神経回路に自発活動が生じるとき、学習という枠組みとは異なる、シナプス可塑性に基づく自己組織化が起きるかもしれない。神経回路が自発的に活動することは、神経回路が自身の状態を自身にフィードバックしていると捉えることができるかもしれない。Hebb 則では、同期して活動した神経細胞間の結合、つまり神経活動が生成されるときに使用された結合が強まる。この時、自発的に活動パターンが生じると、よりそのパターンが出やすくなるように神経細胞間の結合が強化されるはずである。すなわち、自発活動は、神経回路を現在の状態に安定化するように調整する機能を持つ可能性もある。

本節で見たように、分散培養神経回路は、言わば無秩序な神経細胞集団が自己組織的に創りだす有機ニューラルネットワークである。分散培養神経回路の自発活動にも再現性と多様性が備わることは、これら記憶の基盤となる神経活動が、必ずしも学習で獲得されるのではなく、自己組織化が創りだすものだという仮説を支持する。しかし、その創発過程やどのような自己組織特性で実現されるかはわかっていない。

## 1.4 本研究の目的

本章で論じてきたように、脳の神経回路は一般的な情報処理システムとは異なり、何も入力がなくとも自発活動を生じる自律動的ニューラルネットワークと考えられる。自発同期活動の時空間パターンは再現性と多様性を備え、外部入力による誘発応答との類似性を示す。このことから、自発同期活動の時空間パターンは神経回路の記憶を表現していると考えられる。神経細胞集団が自己組織的に形成した、分散培養神経回路の自発同期活動にも再現性と多様性が見られることから、これらは自己組織化で生み出されるものと考えられる。神経回路が学習せずとも予め記憶に相当する活動を作り出し、それ利用した情報処理をするのであれば、学習が不十分な状況下でも安定した動作をする仕組みであるかもしれない。しかし、神経回路がどのような自己組織化過程を経て、どのような特性を獲得することで、自発活動に再現性と多様性が

創発するかは詳しくわかっていない。また、分散培養神経回路でも外部入力応答の時空間パターンが自発同期活動の時空間パターンと類似性が生じるかも明らかになっていない。

そこで、本研究では、分散培養神経回路を研究対象として用いて、自発活動の自己組織化過程と再現性と多様性が生じるメカニズムを明らかにし、また分散培養神経回路でも自発活動と外部入力による誘発応答が類似することを示す。分散培養神経回路の神経活動は、次章で説明する高密度 CMOS 電極アレイを活用して観測する。具体的な研究目的として、以下の 3 つを設定する。

#### 1.4.1 発達を通じた多様性の創発過程

神経雪崩現象に代表されるように、神経回路は自発活動で多様な出力を生じる。神経活動が適度な多様性を持つ状態を示す SoC は、分散培養神経回路にも見られることから、神経細胞集団の自己組織化、特に自己組織的発達プログラムが生み出すと考えられる。しかし、これまでの観測系は古典的な多点電極アレイ (Microelectrode array: MEA) を用いたために、幼弱な時期の神経回路活動を十分にサンプリングできず、SoC の発生を捉えることができたとは言いがたい。そこで、高密度 CMOS 電極アレイで分散培養神経回路の神経活動を幼若期から追跡し、発達を通じて神経回路に SoC が創発する過程を明らかにする。

#### 1.4.2 再現性と多様性の両立メカニズム

神経回路は自発同期現象を生じ、時空間パターンを再生する。複数の時空間パターンを安定して再生することは、自発活動が神経回路の記憶を表現するために必須の機能であろう。しかし、自発活動でそれらが実現されるメカニズムはわかっていない。そこで、Synfire chain 様に神経回路で逐次的な細胞集団間の伝達が生じ、かつ集団間関係が自律遷移する内部状態依存で変化することで、安定して複数のパターンを再生する、という仮説を立てる。高密度 CMOS 電極アレイで分散培養神経回路の神経活動を観測し、この仮説を検証する。

#### 1.4.3 分散培養神経回路での自発活動と刺激誘発応答の類似性

脳の神経回路では、自発活動の時空間パターンが外部入力による誘発応答の時空間パターンと類似することが知られており、自発活動が誘発応答のとり得る範囲を規定するという仮説が提案されている。しかし、外部入力を受けずに育った分散培養神経回路でこの関係が成立するかは明らかでなく、また時空間パターンレベルでは、自発活動が誘発応答を内包することは実証されていない。そこで、分散培養神経回路に高密度 CMOS 電極アレイから同期バーストを誘発する電気刺激を与え、自発同期バーストが再生する時空間パターンと誘発応答の時空間パターンを比較する。そして、自発活動と誘発応答が時空間パターンレベルでの類似性を示すか検証する。

## 1.5 本論文の構成

本論文は全 7 章から構成される。第 1 章「序論」では、本研究の背景、動機、及び目的を説明した。第 2 章「高密度 CMOS 電極アレイを用いた分散培養神経回路の電気生理実験系」では、本研究で用いた分散培養神経回路及び高密度 CMOS 電極アレイを用いた電気生理実験系について述べる。第 3 章「発達を通じた多様性の創発過程: 統合と断片化のプロセス」では、分散培養神経回路が発達を通して多様性を獲得する過程を観測し、明らかにする。第 4 章「再現性と多様性の両立メカニズム: 細胞集団伝達と自律状態遷移」では、分散培養神経回路に安定した部分細胞集団の逐次伝達構造と自律的に変動する内部状態が存在し、再現性と多様性を両立している可能性を示す。第 5 章「分散培養神経回路での自発活動と刺激誘発応答の類似性: 外部入力の内状態への投射」では、分散培養神経回路で自発活動と刺激応答が時空間パターンレベルで類似することを示し、その機能的意義を考察する。第 6 章「総論」では、第 4–6 章の結果を総括し、各章で得られた結果の関連性、本研究結果の意義と限界、そして今後の展望を述べる。最後に第 7 章では、本研究の結論を述べる。

## 第 2 章

# 高密度 CMOS 電極アレイを用いた分散培養神経回路の電気生理実験系

本章は、未だ出版契約に至らないものの、今後刊行を予定する内容を含むため、5年間非公開とする。



## 第 3 章

# 発達を通じた多様性の創発: 統合と断片化のプロセス

本章では、神経回路の Self-organized criticality (SoC) と呼ばれる特徴に着目し、神経回路における多様性の創発過程を観測する。

### 3.1 背景と目的

Self-organized criticality (SoC) とは、システムのダイナミクスが適度な複雑性を持つ状態であり、様々な神経回路で普遍的に生じる (Beggs and Plenz, 2003; Friedman et al., 2012; Mazzoni et al., 2007; Pasquale et al., 2008; Petermann et al., 2009)。SoC における神経回路は雪崩状の自発活動 (すなわち、神経雪崩現象) で特徴づけられる。この時、神経雪崩現象は規模がべき乗則に従い (Beggs and Plenz, 2003)、また豊富な時空間パターンのレパートリーを持つ (Beggs and Plenz, 2004)。SoC は神経細胞間の興奮性伝達と抑制性伝達の適切なバランスによって保たれている (Massobrio et al., 2015)。SoC は神経回路がいくつかの情報処理機能を実現するのに貢献していると考えられる。例えば、SoC での神経回路は、情報伝達量 (Beggs and Plenz, 2003)、出現する時空間パターンの種類 (Chen et al., 2010; Haldeman and Beggs, 2005)、記憶できる情報量 (Shew et al., 2011)、処理可能な外部入力の種類 (Shew et al., 2009) を最大化することが報告されている。このように、SoC は情報処理に多くの利点を持つため、これまでその創発メカニズム、特に、シナプス可塑性 (Levina et al., 2007; Millman et al., 2010; Shew et al., 2015) や神経回路の発達 (Pasquale et al., 2008; Stewart and Plenz, 2008) がどのように SoC を導くのか、について研究が進められてきた。

神経回路の発達を通じた SoC の創発と関係すると考えられるのが、神経回路の成長段階におけるシナプスの形成および再形成のメカニズムである。発達初期段階で、神経細胞はまず軸索を他の細胞群に向けて伸長し、シナプスを形成する。その後、不要なシナプスと軸索を除去する (刈り込み現象) ことで適切なネットワーク構造を生み出すことが知られている。また、未熟な神経回路では、GABA を神経伝達物質として放出する抑制性神経細胞からの入力、興奮性入力として作用することが知られている (Bourgeois and Rakic, 1993; Chechik et al., 1998;

Wu et al., 2012). 幼弱な神経細胞は細胞内の  $\text{Cl}^-$  イオン濃度が細胞外よりも高い。そのため、GABA を受け取り  $\text{Cl}^-$  イオンチャネルが開くと、細胞内から細胞外への  $\text{Cl}^-$  イオンの流出が生じ、脱分極する。発達につれて細胞内  $\text{Cl}^-$  イオン濃度が細胞外よりも低くなり、GABA 伝達が抑制性として作用するようになる。このような発達過程で生じるネットワーク構造と細胞間作用の変化は、神経雪崩の規模分布の変化に関わるはずである。Tetzlaff らは神経回路のシナプス形成と刈込、及び GABA の作用変化をシミュレーションし、発達に伴う神経雪崩の規模分布変化を調べた (Tetzlaff et al., 2010)。そして、類似した分布変化が分散培養神経回路の発達を通じて観測されることを示している。

しかし、先行研究は神経回路での発達を通じた SoC の創発を十分に捉えたとは言い難い。神経回路構造と伝達作用の変化は、神経雪崩の規模だけでなくその時空間パターンの豊富さにも影響するはずであるが、規模分布の変化と時空間パターンの変化の関係は調べられていない。さらに、分散培養神経回路は培養開始後 1 週間程度で同期発火を生じることが知られており (Kamioka et al., 1996)、この頃までにはシナプス形成がされているはずであるが、これまでの報告では培養 2 週目以降のみ活動からしか対象にしてこなかった (Pasquale et al., 2008; Tetzlaff et al., 2010)。これは、先行研究で使用されてきた古典的な多点電極アレイ (MEA) の空間解像度が不十分であり、発達初期の微弱でまばらな神経活動を十分にサンプリングできず、神経雪崩の規模分布を捉えることが困難なことが原因である (Tetzlaff et al., 2010)。

この問題は高密度 CMOS 電極アレイ (Berdondini et al., 2009; Frey et al., 2010; Müller et al., 2015) を使うことで解決できると考えられる。高密度 CMOS 電極アレイは神経細胞と同程度 (20  $\mu\text{m}$ ) の空間解像度を持つので、旧来の MEA では電極の間に位置して計測できなかった細胞からも活動を計測することができるだろう。さらに、このような高空間解像度に加えて、電氣的な計測による高い時間解像度を合わせ持つ。そのため、神経回路の詳細なダイナミクスを幼弱な神経回路が成熟するまで経時的に追えると期待され、SoC の創発過程を調べる上で有用と考えられる。

本研究の目的は、高密度 CMOS 電極アレイを使用して皮質の分散培養神経回路を計測し、神経雪崩現象の発達変化を発達初期の段階から調べることである。神経回路の SoC はどのような過程を経て生まれてくると推測されるだろうか。まず最初期の段階では、神経細胞はほとんど他の神経細胞と結合を持たないため、神経細胞同士の活動は互いに独立であり、神経雪崩の規模分布は指数分布で表されるはずである。また、最終的には適切な興奮性-抑制性のバランスを持つ適度に複雑な神経回路構造が出来上がり、べき乗則に従う規模分布 (べき分布) を持つ神経雪崩現象、すなわち SoC が生じるであろう。発達を通じて生じるシナプスの形成と刈り込み、そして GABA 作動性神経細胞の作用変化を考慮すると、この最初期と SoC の間の中間段階として、興奮性の入力のみが存在し、結合は弱いものの密な回路構造を持つ神経回路状態を仮定することができるかもしれない。このとき、神経回路はおそらく散発的な神経細胞の活動と特徴的な回路レベルの同期を示すと推測される。このような神経回路の発達モデルを integration-then-fragmentation model と呼ぶことにする。他の可能性として、最初期の神経回路状態から SoC の状態へ徐々に近づいていく発達モデル (gradual-expansion model と呼ぶ) が考えられる。Integration-then-fragmentation model に従うならば、ある時期に他の神

経雪崩規模から逸脱した大きな神経雪崩の出現が観測されるだろう。この大きな神経雪崩は互いに類似した時空間パターンを持つと考えられる。一方で、gradual-expansion model に従う場合は、神経雪崩規模分布は指数分布が徐々に変形し、べき分布が生まれるはずである。SoC の創発に伴ってこれらの変化が生じるかを検証するため、分散培養神経回路で発達を通じた神経雪崩現象の規模分布変化と時空間パターンのレパートリー変化を観測する。

## 3.2 手法

### 3.2.1 細胞培養

細胞培養手法は第 2.2 節に述べた手法に従った。高密度 CMOS 電極アレイとして、HiDens (BEL ETH Switzerland)(Frey et al., 2010) を使用した。胎児ラット (胎齢 18 日目) の大脳皮質から得た細胞を、高密度 CMOS 電極アレイ上に細胞数が 30,000–50,000 個になるように播種した。細胞は 36.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> 環境の細胞培養インキュベータ内に保管した。

### 3.2.2 電気生理計測

本実験では高密度 CMOS 電極アレイ (HiDens) で分散培養神経回路 (N=9) の 4–30 DIV に渡る活動変化を観測した。HiDens での計測系に関する詳細は第 2.3.1 節に示した通りである。各活動計測試行の前に、11,011 個の電極から 126 個の計測電極を選ぶため、逐次的に全電極で 1 分間ずつ、分散培養神経回路の自発活動で生じる細胞外電位を計測した。計測した細胞外電位からスパイクを検出し、各電極で振幅がピーク時の平均細胞外電位を求めた。次に、電極間の値を空間的に補間し、活動電位由来の細胞外電位分布図を得た。この分布図をガウシアンカーネルで空間的に滑らかにした上で、負方向の振幅極大点を大きい順に  $\leq 126$  点選択した。この  $\leq 126$  点それぞれに最も近い電極  $\leq 126$  個を計測チャンネルに接続する計測電極として指定した。このようにして決定した計測電極から分散培養神経回路の自発活動を 30 分間記録し、神経雪崩現象の規模分布を捉えた。

計測試行は全回路で延べ 77 回行った。信号の計測や記録は MEAbench (Wagenaar et al., 2005) を独自に改良したソフトウェアを使って管理した。スパイク検出には LimAda アルゴリズム (Wagenaar et al., 2005) を使用した (閾値: 5.0)。本実験ではスパイクソーティング処理はしていない。全ての計測試行は細胞培養インキュベータの中で実施した。

### 3.2.3 神経雪崩現象の定義

神経雪崩の定義及びその検出方法は Tezloff (Tetzloff et al., 2010) らの方法に従った。具体的には、まず電極アレイの全チャンネルで検出されたスパイクの発生時刻を一つの時系列データにまとめて、全チャンネルスパイク系列として定義した。全チャンネルスパイク系列中で、もし隣接するスパイク間の時間間隔が  $\Delta t$  以下であれば、それらのスパイクは同一の神経雪崩に属するとした。あるスパイクの発生時刻が隣接するスパイクの発生時刻から  $\Delta t$  よりも離れている

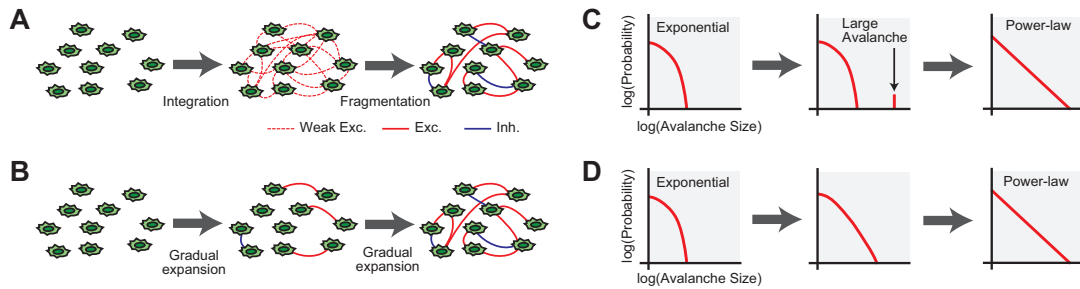


Fig. 3.1. Schematic illustration of possible developmental variation models. **(A–B)**: network structures. **(C–D)**: avalanche size distributions corresponding to **A** and **B**, respectively. Each neuron initially has few connections with others and exhibits mutually independent activity; therefore, the avalanche size should be described by an exponential distribution. As the complex neural circuit structure develops, including fine excitatory-inhibitory balance, the critical state may emerge. Such a state is characterized by an avalanche size distributed according to the power-law distribution. Between these states, there could be a hypothetical state that would feature weak but dense excitatory connections, produces characteristic large-scale synchronization, and whose connections would then be fragmented during development (Le Magueresse and Monyer, 2013; Tetzlaff et al., 2010) (**A**: integration-then-fragmentation); alternatively, neurons could gradually expand their connections during development of the SoC (**B**: gradual expansion). In the integration-then-fragmentation model, the avalanche size distribution could capture the characteristic large-scale synchronization as specific, large avalanches that are significantly larger than the typical avalanche sizes (**C**). In the gradual-expansion model, on the other hand, the avalanche size distribution would exhibit gradual transformation from the exponential distribution to the power-law distribution (**D**). Adopted from (Yada et al., 2017).

場合は、そのスパイクは便宜上「規模 1」の神経雪崩として定義した。神経雪崩の時間スケール  $\Delta t$  はそれぞれの分散培養神経回路の時間スケールに応じて決定した。すなわち、各計測試行で、全チャンネルスパイク系列の平均スパイク間隔 (mean inter-spike interval: mISI) を  $\Delta t$  とした (Pasquale et al., 2008; Tetzlaff et al., 2010)。

### 3.2.4 神経雪崩現象の特徴量

分散培養神経回路の発達に伴う神経雪崩の変化を定量化するため、神経雪崩の規模分布に関していくつかの特徴量を定義した。神経雪崩の規模は神経雪崩に含まれる全チャンネルスパイクの総数として定義した (Tetzlaff et al., 2010)。まず、神経雪崩の規模分布が、べき分布または指数分布で表される尤もらしさを特徴量とした。計測した実験データから得られた規模分布と、実験データに対して最尤推定法で理論的な確率分布モデルをフィッティングした分布との間で Kolmogorov-Smirnov (KS) test を行い、実験的に得た規模分布が理論的な確率分布で特徴づけられるかを示す統計量を求めた (Clauset et al., 2009; Klaus et al., 2011)。

べき分布を、

$$P_\alpha(s) = \begin{cases} cs^\alpha & (s_{\min} \leq s \leq s_{\max}) \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (3.1)$$

として定義した。ここで、 $s$  は神経雪崩の規模であり、 $c$  は正規化定数で、

$$\sum_{s=s_{\min}}^{s_{\max}} P_\alpha(s) = 1 \quad (3.2)$$

を満たす。べき分布は両対数軸上で線形となる特徴を持つ。式 3.1 での指数関数の係数  $\alpha$  は、両対数軸上でのべき分布の傾きを示すパラメータである。同様に、指数分布を、

$$P_\lambda(s) = \begin{cases} ce^{-\lambda s} & (s_{\min} \leq s \leq s_{\max}) \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (3.3)$$

として定義した。ここで、 $\lambda$  は分布の形状パラメータ、 $c$  は正規化定数で

$$\sum_{s=s_{\min}}^{s_{\max}} P_\lambda(s) = 1 \quad (3.4)$$

を満たす。式 3.1 及び式 3.3 で分布の範囲を示すパラメータ  $\{s_{\min}, s_{\max}\}$  は、それぞれ  $s_{\min} = 1$ 、 $s_{\max} = \langle \text{計測電極数} (\leq 126) \rangle$  として定義した。式 3.1 及び式 3.3 での分布のパラメータ  $\alpha$  及び  $\lambda$  は、それぞれ最尤推定法で求めた。式 3.1 で表される、べき分布の対数尤度関数は、

$$\log L_\alpha(\alpha|\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^n \log P_\alpha(x_i) \quad (3.5)$$

と表される。ここで、 $\mathbf{x} = [x_1, x_2, \dots, x_n]$  は  $n$  回の計測で得られた神経雪崩の規模である。式 3.5 の対数尤度関数を最大化する  $\hat{\alpha}$  を求めた。同様に、式 3.3 で表される指数分布の対数尤度関数は、

$$\log L_\lambda(\lambda|\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^n \log P_\lambda(x_i) \quad (3.6)$$

と表わせ、これを最大化する  $\hat{\lambda}$  を求めた。このとき、べき分布、指数分布それぞれについて、最尤推定法で得られた対数尤度の比、

$$LLR = \log L_{\alpha}(\hat{\alpha}|\mathbf{x}) - \log L_{\alpha}(\hat{\lambda}|\mathbf{x}) \quad (3.7)$$

を対数尤度比 (LLR: Log-likelihood ratio) と定義した。LLR は実験で観測された神経雪崩の分布がべき分布と指数分布のどちらに近いかを相対的に示す値である。LLR が正であればべき分布が実験データをより適切に表し、負であれば指数分布がより適切に表す。

KS 統計量は実験で観測された分布が、推定された分布で表される信頼性を示す統計量である。KS 統計量は、実験で得られた分布と推定された分布それぞれの累積分布の最大誤差として定義される。すなわち、べき分布に対する KS 統計量は、

$$KSstat_{\text{power}}(\mathbf{x}|\alpha) = \max_s |C_{\text{emp}}(s) - C_{\alpha}(s)|. \quad (3.8)$$

ここで、 $C_{\text{emp}}(s)$  は実験から得られた累積分布、 $C_{\alpha}(s)$  は推定されたべき分布から得られた累積分布である。実際には、実験で観測される分布では、しばしば小さい規模でべき分布から逸脱することが知られている (Clauset et al., 2009)。そこで、実験で観測された神経雪崩規模分布のべき分布への適合度は、規模 1 の神経雪崩を除いて計算した KS 統計量

$$KSstat_{\text{power}^*}(\mathbf{x}|\alpha) = \max_{s \geq 2} |C_{\text{emp}}(s) - C_{\alpha}(s)|. \quad (3.9)$$

で評価した。同様に、実験で観測された分布に対する、推定された指数分布の KS 統計量は

$$KSstat_{\text{exponential}}(\mathbf{x}|\lambda) = \max_s |C_{\text{emp}}(s) - C_{\lambda}(s)|. \quad (3.10)$$

となる。ここで、 $C_{\lambda}$  は推定された指数分布から得られた累積分布である。

実験で観測される神経雪崩の規模分布は必ずしも連続的になるとは限らない。小規模な神経雪崩と大規模な神経雪崩の間に、該当する神経雪崩が観測されない非連続区間があることがある。このような非連続区間の中で最大のものを  $G$  と定義した。神経雪崩の規模分布が大きな  $G$  を持つとき、分布は二峰性となるはずである。このとき神経回路では、小規模な神経雪崩を生み出しているメカニズムとは異なる機序を持つ、特異的な大規模の神経雪崩が生じていると考えられる。

以上で定義された特徴量から、神経雪崩規模分布を 3 つのタイプに分類した。はじめに、もし分布が閾値よりも大きな  $G$  を持つ場合、その分布は二峰性分布に従うとした。ここで閾値は全観測データから得られた  $G$  の第三四分位とした。次に、 $G$  の値が閾値よりも小さい場合、分布がべき分布か指数分布に従うかを評価した。LLR が正で、かつ  $KSstat_{\text{power}^*}$  が有意に小さい ( $<0.05$ ) とき、分布はべき分布に従うとした。また、LLR が負で、かつ  $KSstat_{\text{exponential}}$  が有意に小さい ( $<0.05$ ) とき、分布は指数分布に従うとした。

確認のため、最尤推定法だけでなく、線形回帰法でも分布への適合度を評価した。べき分布は両対数グラフで線形となり、指数分布は片対数グラフで線形となる。実験で観測された神経雪崩規模分布に対して、両対数グラフ上、片対数グラフ上でそれぞれ最小二乗法で線形回帰を行い直線をフィッティングした。このとき、それぞれに対する決定係数を  $powerR^2$ 、 $expR^2$

と定義した。実験で観測された分布に非連続区間がある場合は、回帰直線が特異的な大規模の神経雪崩の影響を受けないよう、非連続区間よりも小さい神経雪崩のデータのみから回帰直線を算出した。 $powerR^2$ ,  $expR^2$  は、実験的に観測された神経雪崩規模分布のそれぞれべき分布、指数分布への当てはまりの良さを示す量であり、値が大きいほど適合度が高いことを意味する。

### 3.2.5 薬剤処理

培養初期は神経細胞間の結合が十分にできていないため、神経細胞同士は独立した活動を示すと考えられる。この仮説を検証するため、培養初期の分散培養神経回路の活動を、シナプス阻害剤を加えて神経細胞間の伝達を遮断した分散培養神経回路の活動と比較した。3つの分散培養神経回路 (44, 54, 69 DIV) に対して、DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5; Sigma-Aldrich), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; Sigma-Aldrich), bicuculline (Sigma-Aldrich) を加えた。AP5, CNQX, bicuculline は、それぞれ NMDA 受容体, AMPA 受容体, GABA<sub>A</sub> 受容体を阻害する。具体的には、培地の半量をシナプス阻害剤を含んだ細胞培養用培地と交換し、交換後の培地が 30  $\mu$ M の AP5, 10  $\mu$ M の CNQX, 30  $\mu$ M の bicuculline を含むようにした (Beggs and Plenz, 2004; Jiang and North, 1991)。

### 3.2.6 Fano Factor

神経細胞間で伝達が起きず、互いに独立に活動するとき、神経回路のスパイク発生は Poisson 過程に従うと考えられる。分散培養神経回路のスパイク発生過程が Poisson 過程で近似可能か評価する指標として、Fano Factor を用いた。全チャンネルスパイク時系列を mISI の幅を持つ時間窓で区切り、mISI あたりのスパイク数の分布を求めた。スパイク発生過程が Poisson 過程に従う場合、このスパイク数分布が Poisson 分布で表されるはずである。Fano Factor は確率分布のばらつきの指標であり、

$$F = \frac{\sigma^2}{\mu} \quad (3.11)$$

で表される。ここで、 $\mu$  は分布の平均、 $\sigma^2$  は分布の分散である。スパイク発生分布が Poisson 分布で表されるとき、 $F = 1$  を満たす。

### 3.2.7 時空間パターン解析

神経回路の発達を通じた神経雪崩規模分布の変化と、神経活動の時空間パターンとの関係を調べるため、分散培養神経回路の時空間パターンを解析した。ここでは、同期バーストと呼ばれる大規模な神経雪崩に着目して時空間パターンを解析した。同期バーストは安定した時空間パターンのレパートリーを持つことが知られている (Segev et al., 2004)。検出された神経雪崩のうち、スパイクを 252 個 (最大計測電極数の 2 倍) 以上含むものを同期バーストと定義した。各同期バーストのスパイク時系列をチャンネルごとに mISI の幅を持つ時間窓で区切った。

両隣の時間窓と合わせて時間窓3つ分のスパイクを平均し、各チャンネル各時刻での神経活動を求めた。このとき、同期バーストの時空間パターンは、 $\langle \text{計測チャンネル数} \rangle \times \langle [\text{同期バーストの時間幅}/\text{mISI}] \rangle$  の行列で表現される。同期バーストの時間幅は同期バーストによって異なるので、同期バースト間の相関は、時空間パターン行列同士の相互相関関数を求めたときの最大値として定義した。このようにして得た相関値を1から引いたものを同期バースト間距離として定義して階層的クラスタリングを行い (Beggs and Plenz, 2004; Madhavan et al., 2007), 同期バースト群の時空間パターン構造を明示化した。階層化クラスタリングでは、各クラスターに属する同期バースト間の平均距離をクラスター間の距離とした。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 発達を通じた分散培養神経回路の神経活動

$N=9$  個の胎児ラット大脳皮質由来分散培養神経回路を培養し、その自発活動を延べ77回計測した。全電極で計測した活動電位から細胞外電位分布図を作成し、計測チャンネルに接続する計測電極を選択した後、自発活動を30分間記録した。Fig. 3.2 に高密度 CMOS 電極アレイで得られた細胞外電位分布図の例を示す。Fig. 3.2A は4 DIV の分布図、Fig. 3.2B,C は同じ分散培養神経回路のそれぞれ7 DIV, 16 DIV の分布図である。4, 7, 16 DIV で検出されたスパイク波形の例と平均波形を Fig. 3.2D-F に示す。Fig. 3.2G-I に、Fig. 3.2A, B と同じ神経回路から計測した自発活動のラスタプロットを示す。高密度 CMOS 電極アレイの高い空間解像度により、4 DIV (Fig. 3.2A) のような神経活動を計測できる地点が限られた幼若な神経回路からも、安定してスパイクを計測することができた。4 DIV の段階ではチャンネル間でスパイクが同期している様子は見られず、各チャンネルで独立にランダムな発火が見られた。7 DIV になると大規模な同期バーストが見られ、最終的には複雑な同期バーストを含む神経活動へと移行変わった (Kamioka et al., 1996)。

#### 3.3.2 神経雪崩規模分布の変化

計測した自発活動から全チャンネルスパイク時系列を求め、神経雪崩を検出した。Fig. 3.3A-C は Fig. 3.2 で示したのと同じ神経回路から計測した神経雪崩の規模分布を両対数グラフ上に表したものである。Fig. 3.2C-E に示したのと同じ DIV (それぞれ、4, 7, 16 DIV) のデータから得た神経雪崩の規模分布を、それぞれ Fig. 3.3A-C に示す。検出された神経雪崩の規模分布に対して、最尤推定法で理論的な確率分布をフィッティングした。Fig. 3.3 中の赤線、青線は、それぞれ最尤推定されたべき分布、指数分布を表す。Fig. 3.3A に示した最初期 (4 DIV) の神経回路で観測された神経雪崩の規模分布は指数分布で表された ( $KSstat_{\text{exponential}} = 0.024 < 0.05$ : significance level)。その後、DIV 7 では神経回路は二峰性の神経雪崩規模分布を示した (Fig. 3.3)。すなわち、大多数の小規模な神経雪崩と、それらとは規模が大きく異なる特異的な大規模の神経雪崩が観測され、規模分布は不連続となり大きな  $G (= 0.53)$  を示した。そして、Fig. 3.3C に示されるように、最終的に神経雪崩はべき分布で表される規模分布を示した



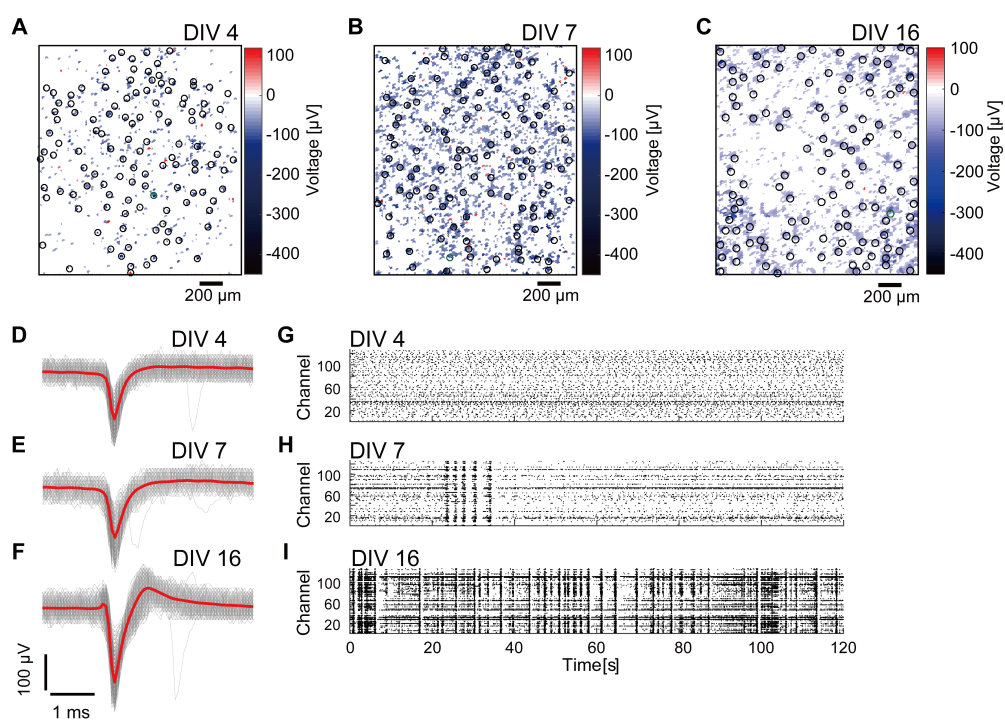


Fig.3.2. Spontaneous activity of dissociated cortical cultures at different developmental stages. (A–C) Spatial maps of action potential amplitude obtained using high-density complementary metal-oxide semiconductor microelectrode arrays (CMOS MEAs). CMOS MEAs from the same culture at 4 days in vitro (DIV) (A), 7 DIV (B), and 16 DIV (C). Black (and green) circles indicate designated recording sites. (D–F) show examples of mean spike waveforms detected at the green circles in A–C, respectively. (G–I) Raster plots of 120 s of spontaneous spiking activity out of 30 min of recorded data. Activities were recorded from the same dissociated cortical culture shown in A–C, at 4 DIV (G), 7 DIV (H), and 16 DIV (I). Adopted from (Yada et al., 2017).

( $KSstat_{power*} = 0.021 < 0.05$ : significance level) .

### 3.3.3 べき乗則に従う神経雪崩規模分布の空間・時間解像度による変化

SoCにある神経回路は空間的, 時間的なスケールに依存せずべき乗則に従う神経雪崩現象を示す. これを検証するため, 異なる空間的, 時間的条件下で神経雪崩規模分布を求めた場合と比較した. Fig. 3.4Aに, Fig. 3.3Cと同じデータから, 計測電極数を減らして(最大計測電極数の半分=63個, または3分の1=42個)神経雪崩を検出した場合に得られた規模分布を示す. この時, 負方向に大きな活動電位を示した計測電極を, 大きい方からそれぞれ63個, 42個残した. Fig. 3.4Bは, 神経雪崩検出の時間幅 $\Delta t$ をmISIの2倍, または1/2倍にした場合に得られた神経雪崩の規模分布を示す. Fig. 3.4からわかる通り, 神経雪崩規模分布は, べき分布に従うとき空間的, 時間的な解像度を変更してもべき分布を示した (Beggs and Plenz, 2003; Petermann et al., 2009; Tetzlaff et al., 2010) .

### 3.3.4 発達を通じた神経雪崩規模分布の特徴量の変化

9つ全ての分散培養神経回路の発達過程で示された神経雪崩規模分布の特徴量を Fig. 3.5にまとめる. Fig. 3.5A-Eは, それぞれ全チャンネルスパイクの発火率, 観測した規模分布と最尤推定したべき分布とのKS統計量 $KSstat_{power*}$ , 最尤推定した指数分布とのKS統計量 $KSstat_{exponential}$ , 観測した規模分布の最大不連続区間幅 $G$ , 片対数グラフ上で線形回帰直線を求めて得た決定係数 $expR^2$ と両対数グラフ上で線形回帰直線を求めて得た決定係数 $powerR^2$ の比 $expR^2/powerR^2$ を示す. ただし, 全チャンネルスパイクの発火率は, 1秒あたりに生じた全チャンネルスパイクの平均とした. 全チャンネルスパイクの発火率は, 培養期間を通して概して増加したが, 20 DIV頃からばらつきが大きくなった (Fig. 3.5A) .

最尤推定法で得た $KSstat_{power*}$ は4-6 DIVで比較的大きく, その後11 DIV以降では0.05未満まで低下した (Fig. 3.5B and H, Kruskal-Wallis test,  $p = 0.0057 < 0.01$ ; followed by Mann-Whitney U-tests, 4-6 DIV vs. 11-30 DIV,  $p = 0.0016 < 0.01$ ) . 一方で $KSstat_{exponential}$ は4-6 DIVで7-10 DIV及び11-30 DIVと比較して有意に小さい値を示した (Fig. 3.5C and I, Kruskal-Wallis test,  $p = 0.0037 < 0.01$ ; followed by Mann-Whitney U-tests, 4-6 DIV vs. 7-10 DIV,  $p = 0.028 < 0.05$ ; 4-6 DIV vs. 11-30 DIV,  $p = 4.5 \times 10^{-4} < 0.001$ ) . これらの結果から, 神経雪崩の規模分布は培養神経回路が幼弱な期間は指数分布に従い, 成熟するに連れてべき分布に従うようになることが示された. この傾向は線形回帰で得た $expR^2$ と $powerR^2$ の比の結果に支持される. 5つの分散培養神経回路から4-10 DIVで1より大きい $expR^2/powerR^2$ が観測され, 11 DIV以降では1未満の値に落ち着いた (Fig. 3.5) . 11 DIVの神経回路で観測された $expR^2/powerR^2$ に対して, 各神経回路の最初の計測日 (< 10 DIV, mean $\pm$ SD: 6.0 $\pm$ 1.7) で観測された $expR^2/powerR^2$ は有意に高い値を示した (median: 0.92 vs. 0.86;  $p = 0.0043 < 0.01$ , Mann-Whitney U-test) .

そして, 7-10 DIVで7つの神経回路が閾値(全データの第三四分位点 = 0.13)よりも大き

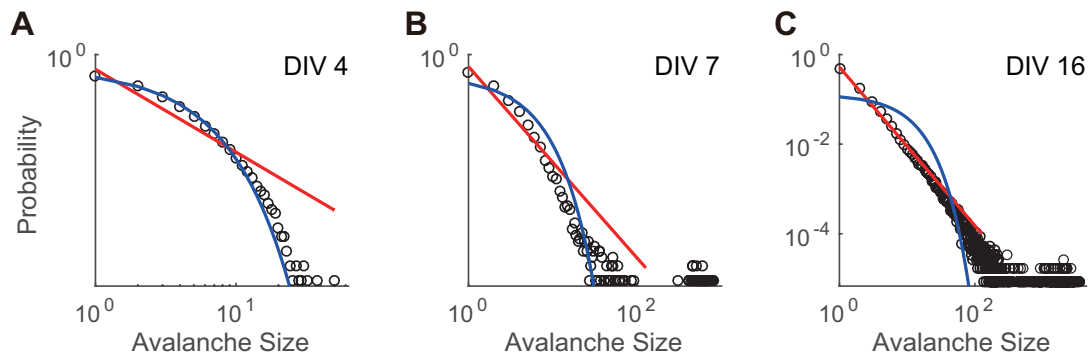


Fig. 3.3. Avalanche size distributions obtained from a culture. This figure shows data from 4 days in vitro (DIV) (A), 7 DIV (B), and 16 DIV (C), respectively. The red lines represent power-law distribution fitted to the empirical distributions, where the parameters were estimated by maximum likelihood estimation (MLE). The blue lines are fitted exponential distribution estimated by MLE. Adopted from (Yada et al., 2017).

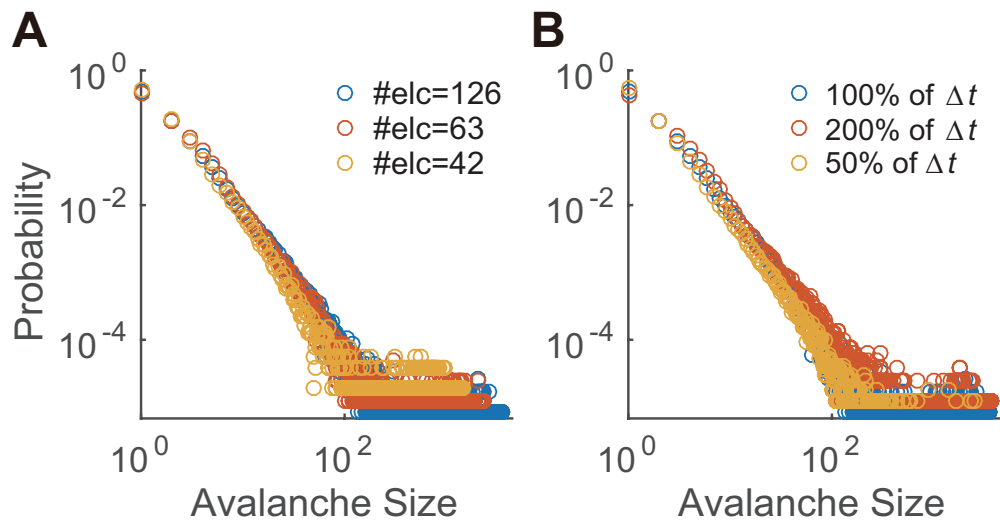


Fig.3.4. Avalanche size distributions in different configurations. **(A)** shows avalanche size distributions from the same culture at the same DIV (i.e., 16 DIV) shown in Fig. 3.3C for different number of electrodes, and **(B)** shows the avalanche size distributions for different sizes of the time bin. Adopted from (Yada et al., 2017).

い  $G$  (median:0.53) を示した。全神経回路を見ても、この期間 (7–10 DIV) の神経回路は 4–6 DIV, 11–30 DIV の神経回路と比較して、有意に大きい  $G$  を示した (Fig. 3.5J, Kruskal-Wallis test,  $p = 3.2 \times 10^{-6} < 0.001$ ; followed by Mann-Whitney U-tests, 7–10 DIV vs. 4–6 DIV,  $p = 0.0012 < 0.01$ ; 7–10 DIV vs. 11–30 DIV,  $p = 3.6 \times 10^{-6} < 0.001$ )。すなわち、分散培養神経回路は 7–10 DIV で二峰性の神経雪崩分布を持つことが示された。Fig. 3.5F は最大神経雪崩規模を、 $y$  軸を対数とした片対数グラフに示したものである。グラフ上で最大神経雪崩規模は 10 DIV 頃までは上昇したが、以降およそ  $2.5 \times 10^3$  ( $\pm 1.6 \times 10^3$  SD;  $> 10$  DIV) で落ち着いた。この時期 (10 DIV) は神経回路が大きい  $G$  を示した時期が終わり、減少した時期と重なる。

$\geq 28$  DIV でべき乗則に従った神経回路で、神経雪崩規模分布をべき分布で表した時の  $\alpha$  は  $-1.83 \pm 0.45$  (mean  $\pm$  SD) であった (Fig. 3.5)。この値は先行研究で示されている典型的な値 ( $= 1.5$ ) よりはやや高い値である (Beggs and Plenz, 2003)。

本実験では、3.2 節で説明したように、各計測試行の度に細胞外電位分布図を取得し、異なる計測電極で計測した。計測電極の配置分布は計測の空間解像度を規定していると言える。そのため、得られた結果は、電極配置が発達時期に依存しており、異なる発達時期では異なる空間解像度で計測していたことが原因である可能性がある。計測の空間解像度が発達時期に依存しないことを確認するため、各計測試行で使用した計測電極の平均電極間距離を求めた。その結果、4–6 DIV, 7–10 DIV, 11–30 DIV での平均電極間距離に有意な差は見られなかった (Kruskal-Wallis test,  $p = 0.38 > 0.05$ )。故に、計測空間解像度は異なる発達時期でも同程度であることが示された。

### 3.3.5 シナプス阻害剤を投与した神経回路との比較

4–6 DIV の分散培養神経回路が示した指数分布状の神経雪崩規模分布は、神経回路が未熟で十分な結合を形成しておらず、神経細胞同士が独立に活動したことを示すかもしれない。これを確認するため、十分に成熟した分散培養神経回路 (43–69 DIV) に対してシナプス阻害剤 (CNQX, AP5, bicuculline) を投与した時の神経活動を比較した。Fig. 3.6A はシナプス阻害剤を投与された神経回路の自発活動の例を示す。同期バーストは生じず、個々のチャンネルで独立したスパイクが見られる。神経雪崩を検出し、その規模分布を求めると、Fig. 3.6 に示すように指数分布に従った。これは、幼弱な分散培養神経回路が 4–6 DIV で示した神経雪崩の規模分布と類似する。シナプス阻害剤を投与した神経回路と投与していない 4–6 DIV の神経回路で  $KSstat_{\text{exponential}}$  を比較すると、有意な差は見られなかった (Mann-Whitney U-test,  $p = 0.067$ )。すなわち、4–6 DIV での神経雪崩規模分布は、シナプス阻害剤を加えた神経回路の神経雪崩規模分布と同程度に指数分布で特徴づけられると言える。一方で、シナプス阻害剤を投与していない  $> 6$  DIV の神経回路は、4–6 DIV の神経回路に対しても、シナプス阻害剤を投与した神経回路に対しても有意に大きな  $KSstat_{\text{exponential}}$  を示した (Mann-Whitney U-test;  $> 6$  DIV vs. 4–6 DIV,  $p = 0.0040 < 0.01$ ;  $> 6$  DIV vs. w/blocker,  $p = 0.0010 < 0.01$ )。

次に、スパイク発生過程が Poisson 過程に従うか、すなわち個々のスパイクが独立に生じているかを評価するため、Fano factor を求めた。4–6 DIV の幼弱な神経回路と、シナプス

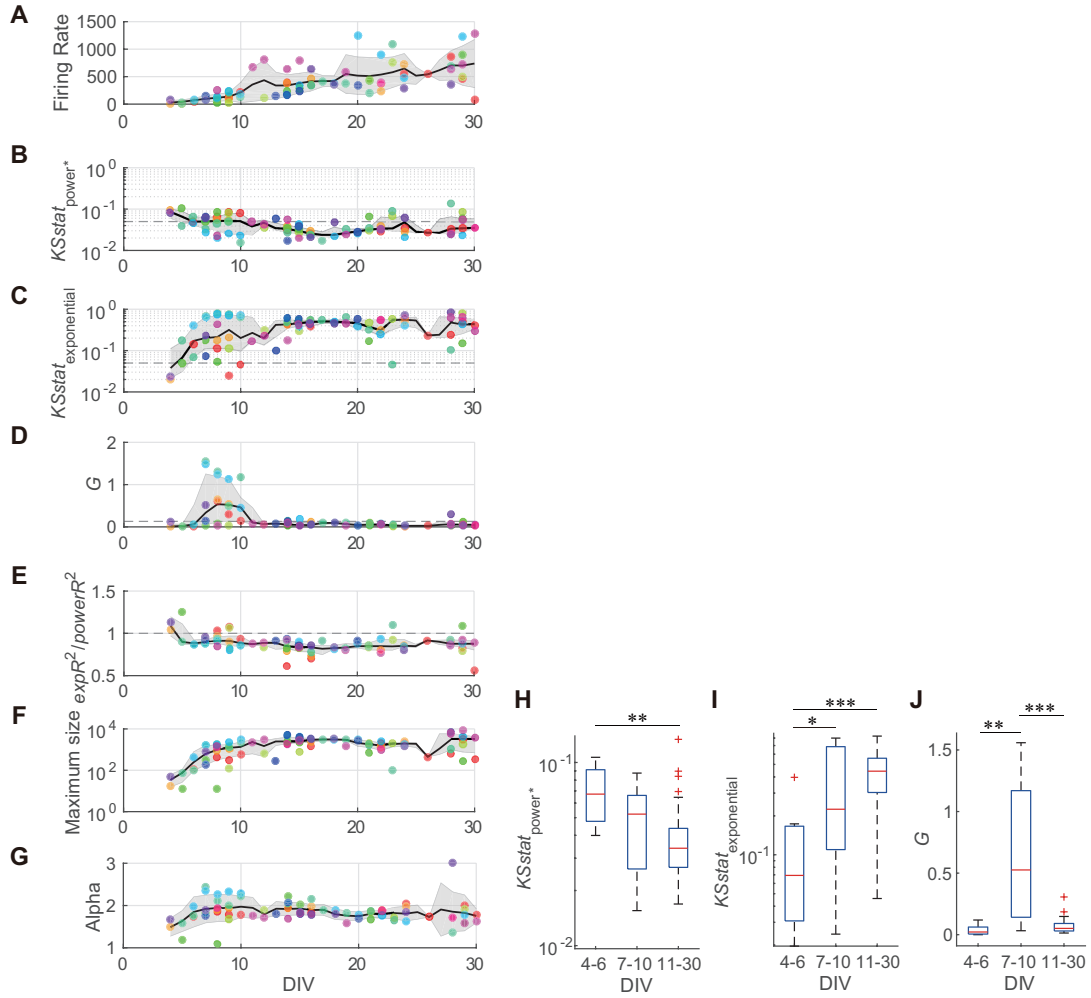


Fig. 3.5. The developmental variation of avalanche distribution features over time. (A–G) illustrates the developmental variation of array-wide firing rates (A), the Kolmogorov-Smirnov (KS) statistic for power-law distribution where size 1 avalanches were excluded (B), the KS statistic for exponential distribution (C),  $G$  values (D), the ratio of  $expR_2$  to  $powerR_2$  (E), the maximum avalanche sizes (F), and the alpha exponent (G), respectively. Plotted points of the same color indicate features from the same culture on a different DIV. Black lines indicate a moving average (A, G: mean; B, C, D, E, F: median) and gray shades indicate errors (A, G: SD; B, C, D, E, F: first and third quartiles) for each feature, including the day before and after. (H–J) show comparison of avalanche distribution features (for B–D, respectively) between developmental periods (4-6 DIV, 7-10 DIV and 11-30 DIV). Adopted from (Yada et al., 2017).

阻害剤を投与した神経回路は比較的小さい, 1に近い値を示した. Poisson過程に従ってスパイクが生じるとき, Fano factor は1になる. 4-6 DIVの神経回路とシナプス阻害剤を投与した神経回路で Fano factor を比較すると, 有意な差は見られなかった (Mann-Whitney U-test,  $p = 0.83$ ). それらに対して, > 6 DIVの神経回路での Fano factor は有意に大きい値を示した (Mann-Whitney U-test; > 6 DIV vs. 4-6 DIV,  $p = 2.7 \times 10^{-4} < 0.001$ ; > 6 DIV vs. w/blocker,  $p = 7.3 \times 10^{-3} < 0.01$ ).

### 3.3.6 神経雪崩規模分布クラスの推移

3.3.4節で得た特徴量を元に, 神経雪崩規模分布を指数分布, 二峰性分布, べき分布, その他の分布に分類した. 分類方法は3.2節に示した通りである. Fig. 3.7は発達時期ごとに各分布クラスの占める割合を示す. 各DIVで, 前後日の分布を含めて割合を算出した. 分散培養神経回路が, 最初期( $\approx 4$  DIV)には指数分布, 次に二峰性分布( $\approx 7-10$  DIV), そして最終的(> 10 DIV)にはべき分布に従うようになることがわかる.

### 3.3.7 発達に伴う時空間パターンの変化

発達に伴う神経雪崩の規模分布変化は, 時空間パターンの多様化と関連が見られた. Fig. 3.8A-Cは発達に伴う神経活動時空間パターンの相関構造変化を示す. 時空間パターンは, 同期バーストに着目して解析した. ここでは, 252個以上のスパイクを含む神経雪崩を同期バーストとしている. 同期バーストの時空間パターンを行列で表し, 階層的クラスタリング法で逐次的に距離の近い同期バーストが隣合うように並び替えた (Beggs and Plenz, 2004). Fig. 3.8Aは7 DIVの神経回路から得られた同期バーストの相関行列を示す. この時期は, 神経回路が大きな $G$ で特徴づけられる二峰性の神経雪崩分布を示していた時期である. 相関行列を見ると, 一様に大多数の要素が高い相関値を示しており, 最も相関が小さい同期バーストの組み合わせでも相関値は0.464だった. 一方で, Fig. 3.8Aと同じ神経回路の16 DIV (Fig. 3.8B), 23 DIV (Fig. 3.8C)での神経活動は, 非一様な同期バーストの相関行列を示した. 相関値の高い同期バーストの集団がある一方で, 相関の低い組み合わせも見られ, 最も相関が小さい組み合わせはそれぞれ0.053 (16 DIV), 0.010 (23 DIV)だった. これは, 同期バーストのレパートリーに複数の時空間パターンが生まれてきたことを意味する.

時空間パターンの多様性を評価するため, 神経回路を同期バースト間, すなわち大規模な神経雪崩間の, 相関値の平均及び標準偏差で特徴づけた. Fig. 3.8Dは, 特徴的な大きな $G$  ( $> 0.39 = 0.13 \times 3$ )を持つ神経雪崩規模分布を示した神経回路 ( $N=5$ )の相関値の平均と標準偏差を発達時期ごとに示す. 7-8 DIVでは, 同期バーストの時空間パターン相関は高い平均値と小さい標準偏差を示した. 一方で, 15-16 DIV及び21-24 DIVでは, 反対に比較的低い平均値と大きい標準偏差を示した. これらの結果は, 7-8 DIVの神経回路が示す特徴的な大規模神経雪崩は一様に類似した時空間パターンを示し, 一方でさらに成熟した神経回路 (> 14 DIV)はべき分布に従う神経雪崩規模分布とともに, 中規模な神経雪崩を含んだ多様な時空間パター

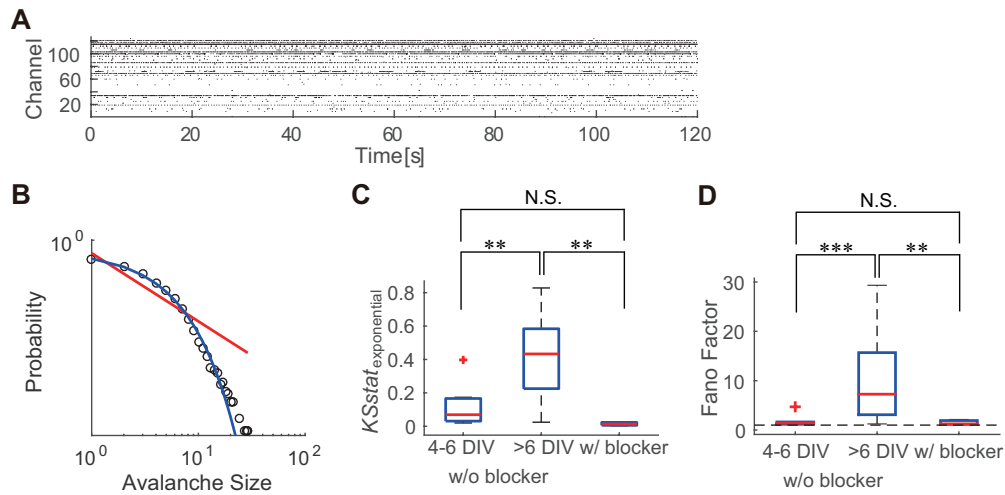


Fig. 3.6. Poisson-like spiking activity in cortical cultures with synaptic blockers. **(A)** A raster plot of spontaneous activity in a culture supplemented with CNQX/AP5 and bicuculline. **(B)** The avalanche size distribution of a culture supplemented with synaptic blockers. **(C–D)** The KS statistics for exponential distribution **(C)** and Fano factors **(D)** from cultures at 4–6 days in vitro (DIV), cultures older than 6 DIV, and from cultures supplemented with synaptic blockers. The horizontal dashed line in **D** indicates a point where the Fano factor equals one. Adopted from (Yada et al., 2017).



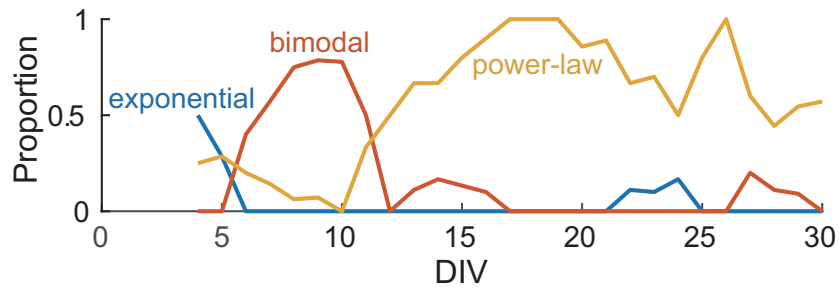


Fig.3.7. The changing proportion of avalanche distribution over time. This figure displays the proportion of each avalanche distribution type occurring at a specific time point. The details for distribution type classification are described in the Experimental Procedures. The proportions of each day include the day before and after. Adopted from (Yada et al., 2017).

ンを示すことを示唆する。

### 3.4 考察

本研究では、神経回路にべき乗則に従う神経雪崩が生じる状態、すなわち SoC が創発するまでの、幼若期の発達過程を明らかにすることを目的とした。SoC が生じるまでの 4–30 DIV の間、高密度 CMOS 電極アレイで皮質分散培養神経回路の自発活動を計測した。その結果、幼若期の発達過程で、初めは指数分布に従う神経雪崩規模分布が生じ (4–6 DIV)、次に規模分布は二峰性となり (7–10 DIV)、最終的には SoC の特徴であるべき分布に従った (>10 DIV)。神経回路が二峰性の神経雪崩規模分布を示すとき、大規模な神経雪崩が一様な時空間パターンを示し、一方でべき分布を示すようになると規模の大きい神経雪崩にも多様な時空間パターンが生まれた。

#### 3.4.1 高密度 CMOS 電極アレイの貢献

著者の知る限り、培養神経回路でスパイクが生じ始める頃の幼弱な時期から SoC が生じるまでの神経雪崩分布変化過程は、これまでに報告されていない。本研究でこの過程を観測することができたのは、高密度 CMOS 電極アレイの貢献が大きいと考えられる。本研究で使用した高密度 CMOS 電極アレイ (Frey et al., 2010) は電極中心間の距離が最短で 18  $\mu\text{m}$  の解像度を持つ。そのため、神経回路内で分散して存在している任意の神経細胞から、細胞より細かい部位レベルで選択的に神経信号を計測することができる (Bakkum et al., 2013a)。このような解像度での計測は旧来の MEA に対して大きな優位性を持つ。一般的な MEA の電極間距離は 100  $\mu\text{m}$  かそれ以上であり、電極間の電極から離れた位置にある少なくない神経細胞の活動を計測できない可能性がある (Tetzlaff et al., 2010)。特に、培養初期の幼弱な時期は、神経細胞の出力する活動電位も小さく、まだ未熟であり、旧来の MEA で適切に活動を捉えることができない場合があった (Tetzlaff et al., 2010)。

加えて、発達の過程で神経回路は継続的に回路構造や組成を変化させる。例えば、神経細胞位置を移動したり (Lledo et al., 2006; Segev et al., 2003)、軸索を伸長したり、活動電位の発生源である Axonal initial segment (AIS) の位置を調整したり (Grubb and Burrone, 2010; Grubb et al., 2011) する。これらの変化は、旧来の MEA のような目の粗い固定された電極配置で経時的に計測する場合、深刻な影響を及ぼしうる。そのため、発達を通して安定して神経回路の活動を追うためには、高解像度の計測が必要である。

#### 3.4.2 べき分布のパラメータ $\alpha$

本研究では、両対数グラフでのべき分布の傾きは、 $\alpha = -1.83 \pm 0.45$  (mean  $\pm$  SD;  $\geq 28$  DIV) になった。初めて神経回路での SoC を示した Beggs と Plenz は、皮質培養スライスを使用し、 $\alpha = -1.5$  となることを報告している (Beggs and Plenz, 2003)。この値は、神経雪崩が理論的な branching process に従うと仮定した時に生じる値と合致する。他のいくつかの先行研究で

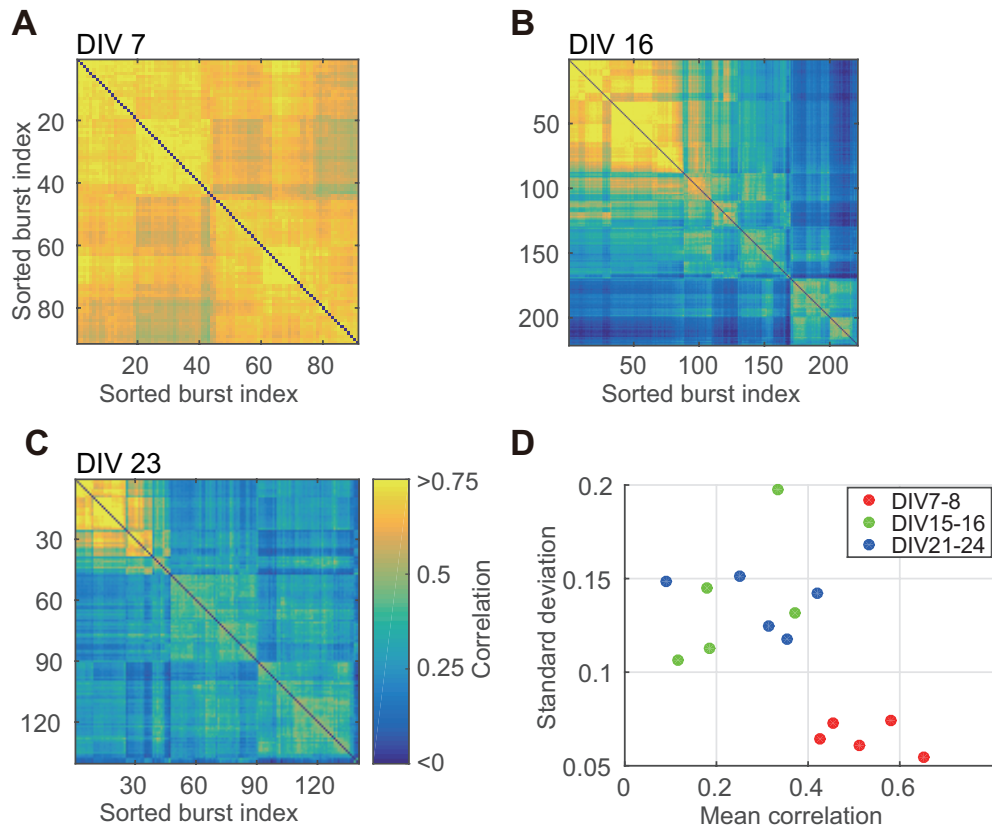


Fig.3.8. Developmental variations in spatiotemporal pattern. (A–C) displays the correlation matrices for spatiotemporal patterns in large avalanches, i.e., synchronized bursts. Each matrix was obtained from a culture at 7 days in vitro (DIV) (A), 16 DIV (B), and 23 DIV (C), respectively. (D) illustrates the mean correlation and standard deviation of spatiotemporal pattern correlations calculated from five cultures that exhibited high value (in C) during 7–8 DIV. Adopted from (Yada et al., 2017).

もこの値は支持されている (Gireesh and Plenz, 2008; Mazzoni et al., 2007; Pasquale et al., 2008). ただし, 分散培養神経回路では  $\alpha$  は必ずしもこの特徴的な値と一致しないかもしれない (Massobrio et al., 2015; Pu et al., 2013; Tetzlaff et al., 2010). また, 神経雪崩の時間解像度, すなわち  $\Delta t$  に依存して  $\alpha$  は変動する (Beggs and Plenz, 2003). 本研究では, 時間解像度は全チャネルスパイク系列の mISI としており, 同じ手法で適応的に決定した先行研究でも  $\alpha = -1.5$  よりやや急な傾きを報告している (Tetzlaff et al., 2010). Fig. 3.4 からも見取れるように,  $\Delta t$  が大きくなるほど両対数グラフでの傾きは緩くなる. さらに, もし本研究で見られたように, ある時期以降神経雪崩の最大規模があまり変わらないとすると, 小さな神経雪崩の発生回数が減少し, それに伴って中規模な神経雪崩が増加することでべき分布の傾きが緩やかになるかもしれない.

### 3.4.3 シナプス形成と独立した神経活動の統合

7 DIV より前の神経回路の活動は, シナプス阻害剤を加えた神経回路と同様に 1 に近い Fano factor を示し, これは個々の神経細胞の独立したランダムな神経活動を示唆する. 先行研究によると, 電子顕微鏡で調べると, 分散培養神経回路では, 3 DIV でシナプスの形成を確認できないが, 7 DIV では確かにシナプス形成が確認できる (Ichikawa et al., 1993; Muramoto et al., 1993). これによると, 分散培養神経回路でのシナプス形成は 4–6 DIV の時期に起きると考えられ, 本研究の結果と一致する. ただし, 第2章で示したように, 本研究で用いた分散培養神経回路では 3 DIV でもシナプス小胞の形成は見られたため, シナプス形成時期は培養方法にも依存して前後するかもしれない. 軸索の伸長, 及びシナプスの形成が神経回路の同期活動のトリガーとなり, 神経雪崩の最大規模を増加させる. このような神経活動は, 独立に分散していた神経細胞がひとつの回路として統合されることを意味する.

### 3.4.4 抑制性神経活動と神経雪崩の二峰性規模分布

7–10 DIV の神経回路では, 一般に特徴的な大規模の神経雪崩が観測され, 二峰性の神経雪崩規模分布が生じた. 神経雪崩と SoC を調べた既存の研究では, シナプスでの GABA による伝達を阻害した場合に二峰性の神経雪崩規模分布が観測されている (Mazzoni et al., 2007; Pasquale et al., 2008). これらを踏まえると, 二峰性の神経雪崩規模分布は, 恐らく GABA による抑制性伝達に何らかの変化が生じたことによる, 興奮性伝達のみで動作する神経回路の活動が生み出すのかもしれない. この考えを支持する現象として, 未熟な神経細胞では  $\text{Cl}^-$  イオンの逆転電位が成熟後と比べて比較的高く, GABA によるシナプス伝達は一般的に脱分極を生じる (Ben-Ari, 2001, 2002; Bourgeois and Rakic, 1993; Chechik et al., 1998; Le Magueresse and Monyer, 2013; Wu et al., 2012). ラット海馬の分散培養神経回路での先行研究では, 4–6 DIV では全ての神経細胞で GABA 由来の脱分極が観測されたが, 多くの場合, その後 13 DIV 以降では GABA 由来の脱分極を観測できなくなったことを報告している (Ganguly et al., 2001). GABA によるシナプス伝達作用の興奮性から抑制性への変化は, 本研究で観測した指

数分布から二峰性分布へ，そして二峰性分布から最終的にべき分布へという神経雪崩規模分布の遷移と矛盾しない。

さらに，本研究で得られた結果は GABA 作動性神経細胞の活動が最大神経雪崩規模の変化に影響を与えることを支持する。最大神経雪崩規模は，神経回路が二峰性の規模分布を示した時期 (7–10 DIV) を経た後， $\approx 10$  DIV 以降安定した。神経細胞の発達初期では，GABA 由来のシナプス入力が必要な脱分極 (giant depolarizing potentials: GDP) を生じ，未熟な神経回路の結合形成を促進することが知られている (Le Magueresse and Monyer, 2013; Sipila, 2005)。 $\approx 10$  DIV で最大神経雪崩規模の飽和が生じたのは，培養系に存在する十分な数の神経細胞が神経回路に取り込まれ，回路形成期間からシナプスの刈り込み期間へと移り変わったことを示唆する。シナプスの刈り込みでも GABA は重要な役割を果たすことが知られている (Baho and Di Cristo, 2012; Le Magueresse and Monyer, 2013)。

#### 3.4.5 抑制性神経活動と時空間パターンの多様化

神経回路の変容に GABA が重要な役割を果たすことは，時空間パターンの多様化からも支持される。7–8 DIV で観測された，特定の時空間パターンで特徴づけられる大規模な神経雪崩は，もし神経細胞が一様な結合構造を持ち，興奮性入力が支配的な神経回路であれば生み出され得るだろう。そこで，7–8 DIV の一様な時空間パターンに引き続いて観測された神経雪崩の時空間パターン多様化は，GABA 作動性シナプスの興奮性伝達から抑制性伝達へのシフトにより，以下の2つのメカニズムのどちらかによって引き起こされるかもしれない。ひとつ目は，興奮性結合の神経回路が駆動する特定の時空間パターンが，GABA 作動性神経細胞の抑制性伝達で中断されることで多様化が生じる可能性がある。もうひとつは，GABA 作動性神経細胞の抑制性伝達が神経回路にシナプスの刈り込みを引き起こし，非一様で複雑な神経回路構造を生み出し，その結果として多様な時空間パターンが生まれる可能性もある。GABA<sub>A</sub> 受容体の阻害が二峰性の神経雪崩分布を導くことは，前者の可能性を支持するように思える。しかし，恐らくは前者と後者の相互作用，すなわち機能的かつ構造的な神経回路の断片化が SoC を誘導するのかもしれない。

### 3.5 結論

本研究では，高密度 CMOS 電極アレイを利用して皮質分散培養神経回路で発達に伴う神経雪崩の変化を調べた。神経活動は 4 DIV 頃から計測可能であり，神経雪崩の規模分布は指数分布に従った。そのため，この時期の神経細胞は互いに独立でランダムに活動をすると考えられる。それに続いて，神経雪崩規模分布は指数分布から二峰性分布へと変化し ( $\approx 7$ –10 DIV)，最終的にべき分布を示した。分布が変化するだけでなく，それに伴って時空間パターンも多様性も変化した。明らかな二峰性の神経雪崩分布を示す神経回路は特徴的な特定の時空間パターンを再生する一方で，2–3 週間培養し，べき分布状の神経雪崩規模を伴う神経回路は多様な時空間パターンを示した。これらの結果は，神経回路の SoC は二段階のプロセスを経て創発す

ることを示している。すなわち、神経回路の発達プログラムとして、初めに統合プロセスが特徴的な大規模神経雪崩を生み出し、それに引き続く神経回路の断片化プロセスが多様な時空間パターンを持つ神経雪崩を生み出すことが示唆される。

## 第4章

# 再現性と多様性の両立メカニズム：細胞集団伝達と自律状態遷移

神経回路は、自発活動に活動パターンの再現性（秩序）と多様性を両立している。これは神経回路が記憶に相当する情報を保持し、表現する上で欠かすことのできない機能である。本章では、自己組織的に作られた神経回路が再現性と多様性を両立するメカニズムを論ずる。

### 4.1 背景と目的

神経回路は自発的に同期活動を示し、そこで安定して時空間パターンを再生する。この現象は *in vivo* (Ji and Wilson, 2007; Lee and Wilson, 2002; Luczak et al., 2007; Villette et al., 2015), *in vitro* のスライス (Beggs and Plenz, 2003, 2004; Ikegaya et al., 2004), そして分散培養神経回路 (Eytan and Marom, 2006; Madhavan et al., 2007; Rolston et al., 2007; Schroeter et al., 2015; Segev et al., 2004; van Pelt et al., 2004) で観測されている。このような時空間パターンのレパートリーは、神経回路の記憶や一時的な情報の貯蓄（すなわち、リザーバー）(Maass et al., 2002; Sussillo and Abbott, 2009) としての役割を持つことができる。さらに、時空間パターンの多様性は神経回路の記憶容量 (Shew et al., 2011) を表しているかもしれない。加えて、自発活動の時空間パターンはしばしば感覚入力などの外部入力に誘発される神経活動の時空間パターンに似ていることが報告されており (Arieli et al., 1996; Kenet et al., 2003; Luczak et al., 2009; Tsodyks et al., 1999), 自発活動の多様性が外部入力の処理性能を規定している可能性が示唆される (Luczak et al., 2009; Villette et al., 2015)。このように、自発活動の時空間パターンは神経回路の性能に重要な意義を持つため、神経回路がどのようなメカニズムで安定した時空間パターンのレパートリーを生み出しているのかを明らかにする必要がある。

理論的研究と実験的研究の両方面で、神経回路の安定した時空間パターン再生メカニズムは研究されてきた。単一神経細胞間のシナプス伝達は非常に不安定なため、神経集団内で複数の神経細胞が機能的な部分集団を構成しており、部分集団が他の部分集団を逐次的に活性化させていくことで安定した時空間パターンが生じるモデルが有力な仮説として考えられて

いる (Abeles, 1991; Aertsen et al., 1996; Diesmann et al., 1999; Ikegaya et al., 2004) . しかし, このような部分的な細胞集団の逐次活性化構造から複数の時空間パターンが生まれるメカニズムは明らかになっていない .

この問題に対して, 神経回路の状態依存的な活動特性 (Buonomano and Maass, 2009) は複数の時空間パターンを実現する神経基盤として有力な候補と考えられる . 近年, 皮質の自発活動が複数の準安定状態 (metastable state) を持ち, それらの状態を活動依存的に遷移することが報告されている (Mazzucato et al., 2015) . このような神経回路の状態は, 神経活動が見られない時にも, すなわちスパイクが発生しない時にも連続的に持続するはずである (Dranias et al., 2013; Ju et al., 2015) . なぜなら, 神経細胞の細胞膜特性変化やシナプスの短期可塑性などが保持する神経回路状態 (“hidden states” (Buonomano and Maass, 2009)) は, スパイク発生しない期間にも持続しているからである . これらを元に, 本研究では, 神経回路が安定した情報伝達と複数の時空間パターンを両立するメカニズムとして, (i) 神経細胞の部分集団が逐次的に活性化して安定した時空間パターンを再生することができ, (ii) 神経回路にある期間で連続的に持続する複数の状態があり, 状態依存的に部分集団の活性化構造が変化することで複数のパターンを出力できる, というモデルを仮定する .

本研究では, この仮説を分散培養神経回路で検証する . これまでに, 培養系の神経活動の計測には多点電極アレイ (MEA) が用いられてきた (Beggs and Plenz, 2003; Eytan and Marom, 2006; Madhavan et al., 2007) . しかし, 旧来の MEA の空間解像度は, 神経回路全体の活動をサンプリングするには不十分であり, 神経集団の活動特性を正しく推定できない可能性がある (Gerhard et al., 2011; Ribeiro et al., 2014) . この技術的な問題点を解決するため, 本研究では近年開発が進められつつある高密度 CMOS 電極アレイを利用した (Berdondini et al., 2009; Frey et al., 2010; Müller et al., 2015; Obien et al., 2014) . 高密度 CMOS 電極アレイは *in vitro* の神経回路から活動を計測する上で十分な, 優れた時空間解像度を持つ . 本研究で使用した高密度 CMOS 電極アレイ BioChip 4096S は, 2.67 mm × 2.67 mm の区画にある 4096 点の電極から, 7 kHz のサンプリング周波数で同時計測ができる . 計測した神経活動の高次元な時空間パターンは非負値行列因子分解 (Non-negative matrix factorization: NMF) で次元削減した (Lee and Seung, 1999; Leonard et al., 2015; Wei et al., 2015) 上で特徴づけられ, 状態依存的に神経部分集団の逐次活性化が生じるかどうか, そして, 生じるとしたらどのように生じているのかを明らかにする .

## 4.2 手法

### 4.2.1 細胞培養

細胞培養方法は第 2.2 節に示した手法に従った . 胎齢 18 日目の Wistar ラットから大脳皮質を摘出し, 細胞を単離した上で, 高密度 CMOS 電極アレイ上に 30,000–40,000 個を含むように調整した細胞播種用培地を滴下した . 神経細胞は 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> の湿潤した環境に保たれた, 細胞培養インキュベータの中で培養した . 1 週間に 2 度の割合で培地の半量を新しい細



胞培養用培地と交換した。

#### 4.2.2 高密度 CMOS 電極アレイによる計測

ここでは、高密度 CMOS 電極アレイ BioChip 4096S と計測インターフェース BioCAM からなる計測システム (3Brain) を使用し、分散培養神経回路から細胞外電位を計測した。21 DIV 前後の 5 つの分散培養神経回路から 10 分間の自発活動を計測した。比較のため、それらの神経回路が 10 DIV 前後の頃の自発活動も同様に 10 分間計測しておいた。計測システム、計測環境の詳細については第 2.3.2 節に示す。

#### 4.2.3 スパイク検出

記録された細胞外電位から、BrainWave に組み込まれた Precise spike timing detection (PSTD) アルゴリズム (Maccione et al., 2009) でスパイクを検出した。PSTD アルゴリズムのパラメータは、標準偏差係数を 10.0、スパイク持続期間を 2.0 ms、不応期を 1.0 ms と設定した。スパイクの発生時刻は、スパイク波形の振幅が負方向に最大となる時刻として定義した。各電極で検出されたスパイクの最大振幅値の中央値を求め、閾値よりも低い場合は以降の解析からは除外した。閾値は全電極で得られたスパイク最大振幅値の中央値の、第三四分位点と設定した。本実験ではスパイクソーティングは実施していない。

#### 4.2.4 同期バースト検出

分散培養神経回路では、自発的な同期活動は同期バーストとして生じる (Kamioka et al., 1996)。先行研究で提案されている適応的な同期バースト検出法 (Bakkum et al., 2013b) を部分的に改変し、計測した自発活動から同期バーストを検出した。具体的には、 $T$  ms 以内に全電極合計で  $N_{spike}$  個以上のスパイクが生じたら、それらのスパイクが生じた期間を同期バースト期間として定義した。検出された同期バースト期間が時間的に重複していたら、それらの期間は一つながりの同期バーストを検出しているものとして統合した。時間パラメータ  $T$  は神経回路が示す、全電極で観測されたスパイク間隔 (Inter-spike interval: ISI) から適応的に決定される。分散培養神経回路から ISI の分布を求めると、典型的には二峰性分布を示す。この二峰性分布で、2 つのピーク間の谷底に当たるスパイク間隔が時間パラメータ  $T$  として選択される。ここでは、スパイク数のパラメータ  $N_{spike}$  は 200 と設定した。この値は先行研究で設定された値 (= 10) と比べると大きいですが、本研究の実験系 (計測チャンネル数: 4096) では先行研究 (計測チャンネル数: 126) と比べて計測チャンネル数が多いため、 $N_{spike}$  も大きな値に設定した。さらに、上記のバースト検出法を適用後に、同期バーストの断片化を防ぐために追加の処理を行った。先行研究は小規模な同期バーストの検出感度を上げることを主眼としており、大規模な同期バーストが複数の小さな同期バーストとして検出されてしまうことがあった。そのため、もし隣接する同期バースト期間の間隔が 100 ms 未満であれば、それらの区間は一つの同期バーストを示すものとして統合した。

#### 4.2.5 同期バースト規模の分布

全電極で計測されるスパイクを一つの時系列として統合したものを全電極スパイク時系列と定義する．ある同期バースト期間中で，10 ms の間に生じる最大全電極スパイク数を，その同期バーストの振幅と定義する．自発同期バーストの振幅の分布を求め，活動の多様性の指標とした．分布の尖度が高ければ，ある特定の振幅の同期バーストが集中しており，単調なバーストが生じているはずである．逆に尖度が低ければ，多様な同期バーストが生じているだろう．分布の尖度は

$$k = \frac{E[x - E[x]]^4}{E[(x - E[x])^2]^2} - 3 \quad (4.1)$$

と定義した．ただし， $x$  は分布に従う変数で， $E[x]$  はその期待値である．

先行研究で，十分な密度で培養した分散培養神経回路は，10 DIV 頃には，決まった大きさの同期バーストか，“super burst” と呼ばれる複数のバーストが連結した大規模なバーストを生じ，20 DIV 頃には二峰性の大きさを持つバーストか，長期間持続する”long-tailed” バーストが生じることを報告している (Wagenaar et al., 2006b)．この場合，10 DIV 頃はバースト振幅分布の尖度は高く，20 DIV 頃には低くなるだろう．

また， $\chi^2$  適合度検定でバースト振幅分布が正規分布，すなわち単峰の分布で表現できるかを検定し，同期バーストの多様性を評価した．

#### 4.2.6 非負値行列因子分解による神経部分集団の抽出

高密度 CMOS 電極アレイの各電極 (= 4096 電極) でスパイクを検出した．各電極のスパイク時系列を 10 ms の時間窓で区切り，時間窓内で生じたスパイク数を要素として持つ  $4096 \times 60000$  次元の行列を得た．この行列を観測行列  $Y$  と定義する．時間窓の時間幅は，同期バーストに複数の時空間パターンが再生されることを観測した先行研究に基づく (Madhavan et al., 2007)．

ここで，設定した時間窓の時間スケールで，神経回路のいくつかの神経細胞が同期して活動する部分神経集団を構成すると仮定する．この時，このような部分神経集団が逐次的に活性化されることで，安定して神経回路の時空間パターンが再生され，それが同期バーストとして観測される．このモデルでは，部分神経集団の活動は神経回路の再現性のある空間的活動パターンとして観測されるはずである．このような再現性のある空間的活動パターンを部分神経集団パターン (SPP: Sub-population pattern) と定義する．

この時，観測行列の各要素， $y_{i,t}$  ( $i = 1, 2, \dots, 4096; t = 1, 2, \dots, 60000$ ) がパラメータ  $s_{i,t}$  の Poisson 過程からサンプリングされたと仮定する． $s_{i,t}$  は各時間窓での瞬時的なスパイク発火率と考えることができ，

$$P(y_{i,t}) = \text{Poisson}(y_{i,t} | s_{i,t}) \quad (4.2)$$

と表せる．さらに，4096 電極それぞれの各時刻の瞬時発火率が， $D$  個の SPP の線形な重ね合わせで表せると仮定する． $D$  は神経回路の活動の次元を表す．すなわち，瞬時発火率行列  $S$  ( $4096 \times 60000$ ) が，各列に各 SPP を表現する SPP 行列  $H$  ( $4096 \times D$ ) と，線型結合の重み，すなわち各部分神経集団の活性化度を表す SPAW(Sub-population activation weight) 行列  $W$  ( $D \times 60000$ ) の積で表現される．

$$S = H \times W \quad (4.3)$$

このモデルでは，SPP が表す空間的活動パターンは重なることも起き得る．すなわち，同じ電極が複数の SPP に含まれることもある．観測行列  $Y$  の各要素はスパイク数を表すので，非負値である．そこで，SPP 行列  $H$ ，SPAW 行列  $W$  それぞれの要素も非負値であると仮定する．この仮定の下で，SPP 行列  $H$ ，SPAW 行列  $W$  は非負値行列因子分解 (NMF) (Lee and Seung, 2001) で求めることができる．NMF は一般化 Kullback-Leibler ダイバージェンスを損失関数とすると，本研究で仮定したような Poisson 生成モデルを前提とした行列因子分解を行う．すなわち，下記のような最適化を行い，SPP 行列  $H$ ，SPAW 行列  $W$  を求めた．

$$\text{minimize } D_{KL}(Y|HW) \quad (4.4)$$

$$\text{s.t. } \forall i, \forall d, h_{i,d} \geq 0; \forall d, \forall t, w_{d,t} \geq 0 \quad (4.5)$$

ただし，行列間の一般化 Kullback-Leibler ダイバージェンス  $D_{KL}$  を

$$D_{KL}(A|B) = \sum_{m,n} \left( A_{m,n} \log \frac{B_{m,n}}{A_{m,n}} - A_{m,n} + B_{m,n} \right) \quad (4.6)$$

と定義した．この最適化問題は Lee と Seung によるアルゴリズムで解いた．最適化は MATLAB で行い，プログラムの一部にはオープンソースのライブラリを利用した．SPP の数  $D$  は実験的に決定し， $D = 10$  とした．最適化の際，行列要素の初期値はランダムに設定し，反復計算は 500 回実施した．最適化は独立に 10 回実施し，全ての試行の中で損失関数が最小だった解を以降の解析で用いた．

#### 4.2.7 同期バーストパターンのクラスタリング

同期バーストで複数の時空間パターンが再生されていることを確認するため，同期バーストパターンをクラスタリングした．同期バースト期間中の SPAW を切り出し，同期バーストを特徴づける行列 (Burst feature matrix: BFM) と定義した．検出された同期バーストはそれぞれ異なる長さを持つので，初めに，バースト期間の長さを調整して揃えた．同期バーストの開始時刻を，各バースト期間で初めに全電極から計測されるスパイク数の合計が 10 個以上となる時刻 (時間窓) と定義した．各同期バーストの開始時刻より前の期間をバースト開始前期間とした．直前のバーストを含めないために，バースト開始前期間の長さは 100 ms と設定した．バースト開始時刻以後の長さ (バースト開始後期間) は，検出された同期バーストの中で，最もバースト開始後期間の長さが長い同期バーストに合わせた．BFM はバースト開始前

期間とバースト開始後期間を合わせて切り出し、すなわち全ての BFM は同じ時間方向の長さを持つ。

次に、BFM を階層的クラスタリング法でクラスタリングした (Beggs and Plenz, 2003)。BFM 同士の相互相関関数を計算し、その最大値を BFM の類似度と定義した。相互相関を取ることで、BFM の切り出し位置がずれていても適切に BFM 同士の類似度を計算することができる。このとき、類似度を以下の式で定義する。

$$Corr(A, A) = \sum_{l=1}^L \sum_{d=1}^D A_{d,l} A_{d,l} \quad (4.7)$$

$$Similarity(A, B) = \max_k \sum_{l=1}^L \sum_{d=1}^D \frac{A_{d,l}}{Corr(A, A)^{1/2}} \frac{B_{d,l-k}}{Corr(B, B)^{1/2}} \quad (4.8)$$

$$(k = -L, -L+1, \dots, 0, \dots, L-1, L) \quad (4.9)$$

ただし、 $L$  は BFM の時間方向の長さを表す。 $l-k < 0$ 、または  $l-k > L$  の場合は、BFM の該当範囲に 0 を代入した行列を作り、類似度を計算した。BFM A と BFM B が同じ時、 $Similarity(A, B) = 1$  となる。全ての BFM のペア間で類似度を計算し、最も類似度が高いペアを一つのグループとした。グループとなった BFM の平均値を求め、その行列をグループを代表する BFM とした。この処理を全ての BFM が一つのグループに統合されるまで繰り返した。

続いて、同期バーストのクラス数を決定した。コントラスト関数 (Beggs and Plenz, 2004) を最大化する値を最適なクラス数と設定した。コントラスト関数はクラス間の同期バースト類似度に対するクラス内の同期バースト類似度の大きさから定義される関数である。ただし、もし最適なクラス数で分類した結果、一つのクラスが全同期バーストの 90% 以上を占める場合は、次にコントラスト関数を最大化するクラス数を選択した。これは、同期バースト検出の際に誤ってバーストとして検出された少数のノイズが、一つの同期バーストクラスとして認識されてしまう場合の影響を低減するためである。

#### 4.2.8 部分集団活性化順序の解析

異なる同期バーストのクラス間で部分神経集団の活性化順序を比較した。もし部分神経集団間の逐次的な伝達構造が安定しているのであれば、活性化順序は異なるクラスの同期バーストでも部分的には不変だと推測される。

初めに、全同期バーストの平均 BFM を求め、 $D = 10$  個の部分神経集団のうち、平均 BFM に大きなピークを持つ部分神経集団をピーク値が大きい方から 5 つ選択した。残りの 5 つの部分神経集団は、同期バーストに関わらない、または、あまり大きな貢献のない部分神経集団として以降の解析からは除外した。そして、同期バーストの時空間パターンは、部分神経集団が同期バースト期間内でピーク値を示したタイミングの順序（活性化順序）として表された。同期バーストクラスのうち、各クラスの平均 BFM で最も SPAW の総和が大きい同期バーストク

ラスをテンプレートクラスとした。さらに、テンプレートクラスの平均 BFM から得た活性化順序を、テンプレート順序と定義した。

上記のように定義したテンプレート順序に対する、(i) テンプレートクラスに含まれる同期バーストでの部分神経集団の活性化順序、(ii) 非テンプレートクラスに含まれる同期バーストでの部分神経集団の活性化順序、(iii) ランダムに生成した部分神経集団の活性化順序（ランダム順序）、の部分的な類似度を比較した。部分的な類似度は、海馬で覚醒下で生じた神経活動が睡眠中に再生する現象を調べた先行研究に基づき、2つの基準で評価した (Lee and Wilson, 2002)。ひとつ目は、対象となる活性化順序をテンプレート順序と合致させるため必要な部分神経集団ペア順序の組み換え回数を求めた。各同期バーストクラスで必要な組み換え回数が  $N$  回以下の活性化順序を示す確率を求め、テンプレート順序に対する各クラスの類似度基準とした。ふたつ目は、活性化順序内での部分神経集団ペアの順序 (duplet)、またはトリオの順序 (triplet) の再現性を基準とした。テンプレート順序を持つ特定の duplet または triplet が、各同期バーストクラスで現れる確率を計算し、類似度基準とした。比較する duplet/triplet は、テンプレート順序を持つ duplet/triplet の中で、全同期バースト中に最も出現頻度が高いものとした。これらの類似度の有意さは、ランダム順序に対する類似度と比較して検定した。ランダム順序は各分散培養神経回路で全同期バースト数と同じだけ（すなわち、テンプレートクラスの同期バースト数と非テンプレートクラスの同期バースト数を合わせた数）生成した。

#### 4.2.9 ランダムな順序の生成

部分神経集団の活性化順序を解析するとき (4.2.8 節)、統計的な有意性を検定するためにランダムな順序を生成した。メルセンヌ・ツイスター法で一様分布から範囲 [0 1] の実数をランダムにサンプリングし、活性化順序の各要素に一つずつ割り当てた。部分神経集団を割り当てられた実数で昇順に並び替え、ランダムに生成された活性化順序とした。バーストクラスの連続性を評価する (4.2.10 節) 際にも、同様の方法でランダムな系列を生成した。

#### 4.2.10 バーストクラスの連続性の評価

分類された各クラスの同期バーストが、ランダムに現れるのか、同じクラスの同期バーストが連続して出やすいのかを調べるため、バーストクラスの出現に連続性があるかを評価した。連続して出現した同期バーストでバーストクラスが変化しない確率を、実際に出現した系列とランダムに生成した系列で比較した。各分散培養神経回路で、実際の出現系列を並べ替えて 100 個のランダム系列を生成した。統計的な有意性は、ランダム系列でバーストクラスが連続する確率の中央値が実際に出現した系列での確率と等しい、という帰無仮説を検定することで評価した。

#### 4.2.11 同期バーストパターンの周期性の評価

同期バーストが再生する時空間パターンに周期性があるかを統計的に評価するため、Fisher の  $g$  統計量を用いた (Wichert et al., 2003). Fisher の  $g$  統計量は

$$g = \frac{\max_i I(\omega_i)}{\sum_{i=1}^{\lfloor N_{\text{sample}}/2 \rfloor} I(\omega_i)} \quad (4.10)$$

と定義される。ここで、 $I(\omega_i)$  は周期性を評価したい信号のピリオドグラムであり、 $N_{\text{sample}}$  は信号の標本点数、そして  $\omega_i$  は離散周波数である。すなわち、 $\omega_i = 2\pi i/N_{\text{sample}}$ 。この時、Fisher の  $g$  統計量の有意性は以下の分布から決まる。

$$P(g > g^*) = \sum_{m=1}^M (-1)^{m-1} \binom{M-1}{m-1} C_m (1 - mg^*)^{(N_{\text{sample}}/2)-1} \quad (4.11)$$

ここで、 $M$  は  $1/g^*$  よりも小さい最大の整数である。同期バーストの時空間パターンが (i) 出現数に依存する周期性、または (ii) 時間的な周期性を持つと仮定し、時空間パターンの平均類似度を (i) 出現順序の差、及び (ii) 出現時刻の差の関数として求め、そこから線形な成分を引いたものを  $I_{\omega_i}$  として定義した。ただし、サンプル数が少ないことに由来する誤りを避けるため、(i) 順序差は 20 組以上のペアがある差のみ、(ii) 時間差は 400 s 以下のみとした。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 高密度 CMOS 電極アレイで観測された神経活動

高密度 CMOS 電極アレイで 5 つの皮質分散培養神経回路から自発活動を計測した。各神経回路の成熟した時期 ( $20.8 \pm 2.2$  DIV, mean  $\pm$  SD) に 10 分間の自発活動計測を行った。比較のため予め幼弱な時期 ( $9.8 \pm 0.8$  DIV, mean  $\pm$  SD) にも 10 分間の自発活動を計測した。各電極でスパイクを検出し、電位変化の最大値が閾値以上の電極、すなわち、十分な大きさの電位を計測できた電極を選別した。選別された電極数は一般に 1000 個程度になった。分散培養神経回路の同期バーストは幼弱な時期から観測され、発達を通して持続した (Kamioka et al., 1996)。適応的なアルゴリズム (Bakkum et al., 2013b) で同期バーストを検出した。10 分間で計測された同期バーストの数は、幼弱な頃は  $88 \pm 54$  (mean  $\pm$  SD) 個、成長後は  $139 \pm 68$  (mean  $\pm$  SD) 個だった。

先行研究と同様に、幼弱な ( $\approx 10$  DIV) 神経回路は決まった大きさの振幅を持つ同期バーストを示した。一方で、成熟した神経回路 ( $\approx 21$  DIV) では、より多様な振幅の同期バーストが出現した。計測された神経回路の代表的な自発活動を、幼弱な時期と成熟した時期のそれぞれについて Fig. 4.1A-D に示す。幼弱な神経回路は一様な振幅、パターンの同期バーストを示し (Fig. 4.1A,B)、それに対して成熟した神経回路は明らかに複数の規模、パターンの同期バーストを示したことがわかる (Fig. 4.1C,D)。同期バーストの振幅、すなわちバースト期間中に全電極で観測された 10 ms 間の最大スパイク数は、幼弱な頃は単峰性の分布を示し (Fig. 4.1E)、成

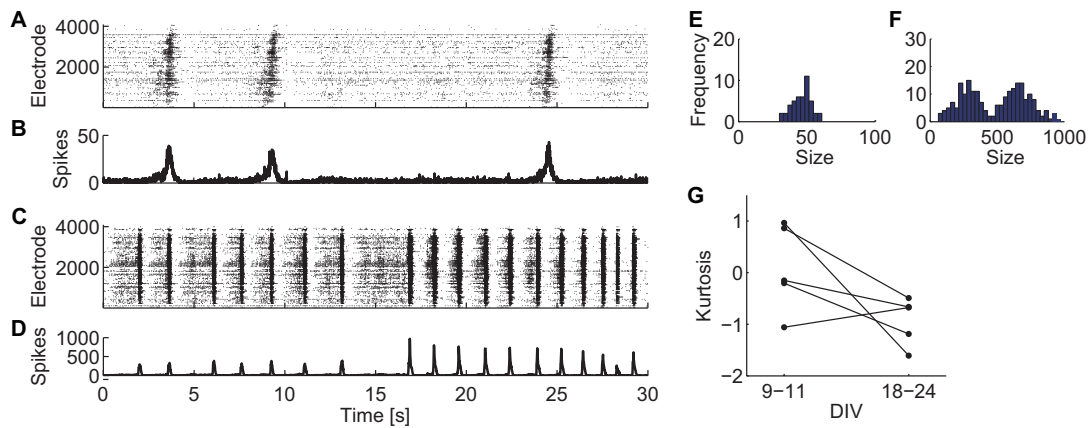


Fig. 4.1. Spontaneous spiking activities of cultured cortical neurons recorded on CMOS MEAs and distributions of burst peak amplitude. (A-B) A representative raster plot (A) and the number of array-wide spikes (B) from 30 s of spontaneous activity recorded from a culture at 10 DIV. (C-D) A raster plot (C) and the number of array-wide spikes (D) from recorded data from a culture at 18 DIV. (E) Histogram of burst peak amplitude (the maximum number of array-wide spikes in 10-ms bins during synchronized bursts) from the same recorded data shown in A and B. (F) Histogram of burst peak amplitude from the same recorded data shown in C-D. (G) Kurtosis of the burst-peak-amplitude distribution from spontaneous activities at 9–11 DIV and those at 18–24 DIV. Adopted from (Yada et al., 2016).

熟すると二峰性の分布を示した (Fig. 4.1F) . Fig. 4.1G はバースト振幅分布の尖度を表しており, Culture #3 を除き, 成熟の結果として分布の尖度は幼弱な時期より低下した. Culture #3 は成熟過程で活動の多様化が生じなかった可能性があるため, 以降の解析からは除外した.

さらに, バースト振幅分布が単峰の正規分布で表現できるかを  $\chi^2$  検定で検定した. その結果, 成熟した神経回路のバースト振幅分布は正規分布で表すことができなかった (Culture #1,  $p = 3.2 \times 10^{-8}$ , mean  $\pm$  SD:  $484.8 \pm 225.1$ ; Culture #2,  $p = 4.7 \times 10^{-10}$ , mean  $\pm$  SD:  $250.7 \pm 176.2$ ; Culture #4,  $p = 0.0054$ , mean  $\pm$  SD:  $198.7 \pm 88.1$ ; Culture #5,  $p = 3.8 \times 10^{-16}$ , mean  $\pm$  SD:  $1437 \pm 631$ ). 一方で, 幼弱な神経回路のバースト振幅分布は正規分布に従った (Culture #1,  $p = 0.77$ , mean  $\pm$  SD:  $46.36 \pm 6.92$ ; Culture #2,  $p = 0.52$ , mean  $\pm$  SD:  $46.64 \pm 7.34$ ; Culture #4,  $p = 0.94$ , mean  $\pm$  SD:  $137.1 \pm 41.5$ ; Culture #5,  $p = 0.096$ , mean  $\pm$  SD:  $91.02 \pm 18.23$ ). すなわち, 成熟した神経回路の同期バーストは, 幼若な神経回路の同期バーストのように一つの特徴的な振幅では表せないことが示された. そこで, 成熟した神経回路が複数の同期バーストパターンを生み出すために, 多様な神経部分集団を利用しているはずだと考え, 時空間パターンの解析を行った.

#### 4.3.2 NMF で推定された部分神経集団の活動

分散培養神経回路 ( $\approx 21$  DIV) の活動を SPP と SPAW に分解して表した. 初めに, 各電極で検出したスパイク系列を 10 ms の時間窓で区切り, 10 ms ごとのスパイク発火頻度を求めた. 次に, NMF (Lee and Seung, 2001) で 4096 次元のスパイク頻度行列を, 繰り返し同期して活動した電極群の空間パターンを表す 10 個の SPP と, 各時刻での SPP の活性化度を示す 10 次元の SPAW に分解した. 各時刻の各電極で, 10 ms ごとの生じたスパイク数はある瞬時的な発火率を表す値をパラメータとする Poisson 過程に従うと仮定した. 一般化 Kullback-Leibler ダイバージェンスを用いる NMF では, この Poisson 過程のパラメータが SPP の線形和で表されることを仮定している.

NMF で次元削減された神経活動でも, 非一様な同期バーストの時空間パターンが再生されることが確認された. Fig. 4.1C に示されている成熟した神経回路の代表的な神経活動を, SPAW の時間的なパターンで表した (Fig. 4.2A). それぞれの SPAW に対応する SPP を Fig. 4.2B に示す. SPP で示される同期して活動した電極の空間分布は必ずしも局所的ではなく, いくつかの部分神経集団は空間的に局在した活動パターンを持ち, 他のものは空間的に分散した活動パターンを示した. 総じて, SPAW から同期バーストの時空間パターンは再現性があることが確認でき, 分散培養神経回路が同期バーストで安定した活動パターンを示すことを報告した先行研究と合致した. しかし, Fig. 4.2A に示した期間の SPAW で, 前半 (15 s 以前) と後半 (15 s 以後) では異なる時空間パターンが生じているように見える. 例えば, SPP #1 は, 後半では同期バーストに参加しているものの, 前半では参加していない. その一方で, 他の SPP は前半と後半で同様に同期バーストに参加しているように見える.

同期バーストの時空間パターンを, バースト期間中の SPAW を表す, BFM の類似度に基づいて階層的にクラスタリングした上で, いくつかのクラスに分類した. 階層的クラスタリング



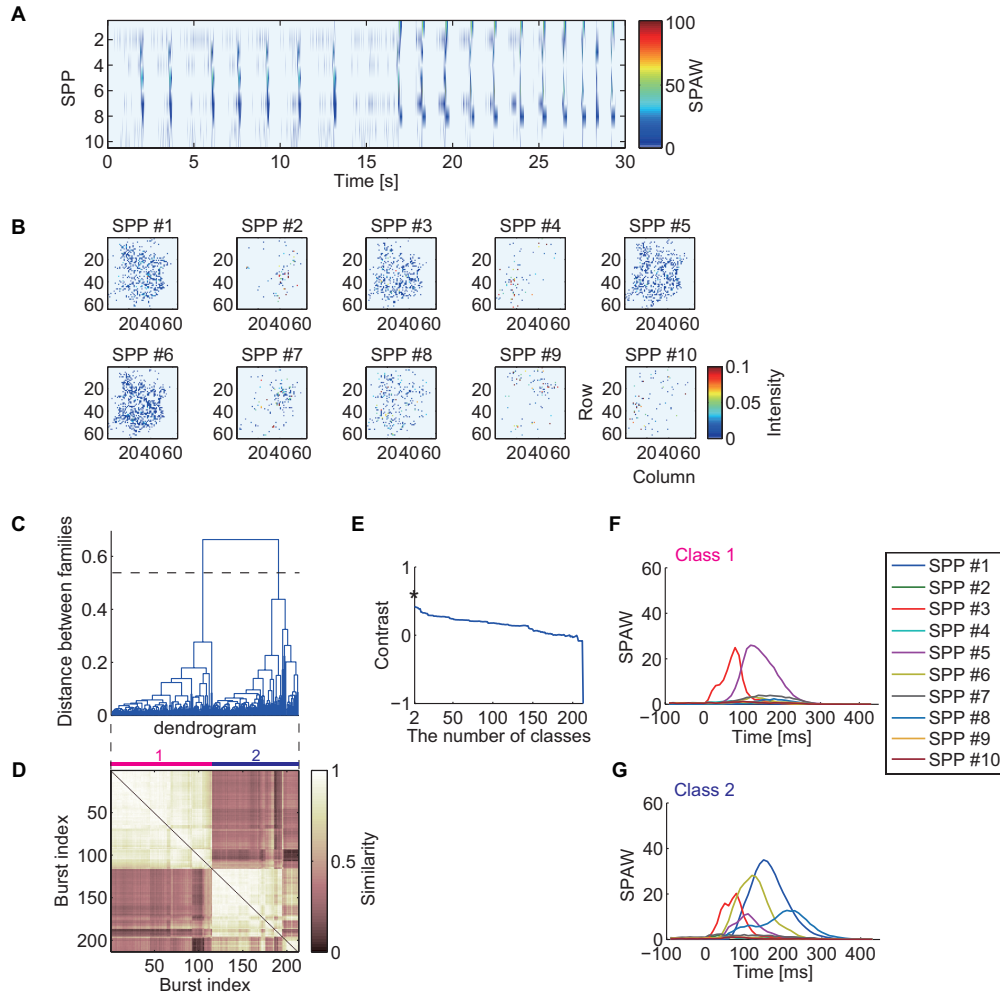


Fig. 4.2. Decomposition of high-dimensional neuronal activity and classification of synchronized burst patterns. **(A)** Low-dimensional activity of the neuronal network represented with sub-population activation weights (SPAWs). The same period of Fig. 4.1C–D is illustrated. **(B)** Sub-population patterns (SPPs) of spontaneous activity of cultured cortical neurons obtained with NMF. The SPPs are shown as corresponding to recording electrodes configuration. **(C)** A dendrogram represents a process of hierarchical grouping of BFMs. The dotted horizontal line indicates a selected level of the grouping. **(D)** A similarity matrix of sub-population activation weights during synchronized bursts. **(E)** A contrast function for the dendrogram shown in C. Asterisk indicates a maximum peak of the function. **(F–G)** Mean SPAWs within classified burst classes. Adopted from (Yada et al., 2016).

の様子を Fig. 4.2C の Dendrogram に示す。Dendrogram で示されたように、類似する同期バーストが隣り合うように順番を並び替えた上で同期バースト間の類似度を示した類似度行列を Fig. 4.2D に示す。明らかに類似する同期バーストの集団が存在し、ここからも部分神経集団の活動パターンの再生が生じたことがわかる。クラスタリングして分類したクラスの数、コントラスト関数 (Beggs and Plenz, 2004) を最大化する値とした。Fig. 4.2C の Dendrogram で点線が引かれている場所がコントラスト関数から決定されたクラス分類の閾値である。

分類された同期バーストクラスそれぞれの平均 SPAW 変化を Fig. 4.2F, G に示す。Class 1 の同期バーストに対して、Class 2 の同期バーストにはより多くの部分神経集団が参加していることがわかる。しかし、注目すべきことに、異なるクラスでも部分神経集団の活動順序は部分的には共通している。Class 1 も Class 2 も初めに SPP #3 が活動し、次に SPP #5 が活動することは共通している。これは、異なるクラスの同期バーストでも共通する、部分神経集団間の伝達方向性があることを示唆する。このような同期バーストでの階層的な伝達は先行研究でも示唆されている (Eytan and Marom, 2006; Ham et al., 2008; Raichman and Ben-Jacob, 2008)。

#### 4.3.3 同期バーストパターン間の部分的な類似性

異なるクラスに分類された同期バーストパターン間の部分的な類似性を評価するため、同期バーストで部分神経集団が活性化した順序を比較した。4.3A に比較方法の概要を図示する。同期バーストに無関係、もしくはあまり関係のない部分神経集団の影響を除くため、10 個の部分神経集団のうち、全ての同期バーストの平均 BFM の中で大きなピークを示した 5 個の部分神経集団を選択した。そして、各同期バーストを選択された部分神経集団の活性化順序で表現した (Fig. 4.3A)。各同期バーストクラスで平均 BFM を計算し、最も SPAW の総和が大きいクラスをテンプレートクラス、テンプレートクラスでの部分神経集団の活性化順序をテンプレート順序とした。

Fig. 4.3B は、部分神経集団ペアの順序組み換え回数を基準として、各クラスの活性化順序がテンプレート順序と部分的に類似した確率を示す。ここでは、2 回以内の組み換え回数でテンプレート順序と一致する活性化順序を、テンプレート順序と部分的に類似する順序とした。自然な結果として、テンプレートクラスの活性化順序は、ランダム順序と比べて有意に高い確率でテンプレート順序と部分的に類似した ( $p = 0.029 < 0.05$ , Mann-Whitney U-test)。しかし、非テンプレートクラスの活性化順序も、その中央値はややテンプレートクラスの活性化順序よりは低いものの、同様にランダム順序と比べて有意に高い確率でテンプレート順序と部分的類似性を示した ( $p = 0.029 < 0.05$ , Mann-Whitney U-test)。

部分神経集団ペア順序組み換え回数を基準として得られた上記の結果と同様の結果が duplet/triplet の比較からも確認された。Fig. 4.3C, D に、各クラスの活性化順序でテンプレート順序と共通した特定の duplet/triplet が再生される確率を示す。どちらの場合も、テンプレートクラスの活性化順序、非テンプレートクラスの活性化順序ともに、ランダム順序よりも高い確率でテンプレート順序と共通の duplet/triplet を含んだ (全ての場合で  $p = 0.029 < 0.05$ ,

Mann-Whitney U-test). このことから, 同期バーストで見られる複数の時空間パターンは, 恐らく部分的には類似する部分神経集団の活性化順序を持つ.

#### 4.3.4 同期バーストクラスの連続性

次に, 時空間パターンが時間的に連続して現れるのかを調べた. もし, 同期バーストの時空間パターンが神経回路の”hidden states” (Buonomano and Maass, 2009) に基づいて表出したものであるならば, 時間的に隣接した同期バーストは類似したパターンを示すはずである. Fig. 4.4A は, 計測を通してそれぞれのクラスの同期バーストが現れたタイミングを示したものであり, 明らかに分散培養神経回路が同じクラスの同期バーストを連続して示したことがわかる. 同じクラスの同期バーストが持続する確率をランダムに生成した同期バーストクラスの順列と比較すると, 解析した全ての分散培養神経回路で有意に高い確率で同じクラスが持続した (Fig. 4.4B, C; Culture #1:  $p = 1.6 \times 10^{-30}$ ; Culture #2:  $p = 9.5 \times 10^{-30}$ ; Culture #4:  $p = 2.2 \times 10^{-22}$ ; Culture #5:  $p = 1.6 \times 10^{-30}$ , One-sample Wilcoxon’s signed rank test). これはすなわち, 神経回路がある一定期間似たような時空間パターンの同期バーストを持続させやすいことを示す.

#### 4.3.5 同期バーストパターンの周期性

同期バーストの時空間パターンの連続性は, Fig. 4.5A に示した, 出現した順番に並べた同期バースト間の類似度行列からも支持される. Fig. 4.5A の類似度行列で対角線上に類似した同期バーストのクラスが見られるが, これは類似した同期バーストが一定期間に続けて出現したことを示している. Fig. 4.5B は同期バースト間の類似度と出現順序の差の関係性を示している. 注目すべきことに, 出現順序が近い同期バースト同士が高い類似度を示しただけでなく, 同期バーストは間隔を置いて周期的に高い類似度を示しているように見える. このことから, 同期バースト間の類似度と出現順序の差の関係性が, 連続性と周期性で説明できると仮定した.

Fig. 4.5B の類似度関数から, 線形回帰で求めた直線を引くことで線形な成分を除いた上で, 自己相関関数を求めると (Fig. 4.5C), 明らかな周期性が確認された. 線形成分を除いた類似度関数のピリオドグラム (Fig. 4.5D) から Fisher の  $g$  統計量を求め, 周期性成分の有意性を検定した (Wichert et al., 2003). Fig. 4.5D は3周期にピークを持ち, これは Fig. 4.5B で見られる類似度関数の変動が3周期を持つことを表している. これは, 64.0回間隔で類似度の高い同期バーストが出現したことを意味する. 全ての分散培養神経回路で, 同期バースト間の類似度と出現順序の差の関数に有意 ( $p < 0.01$ ) な周期性が見られた (Culture #1,  $p = 1.6 \times 10^{-43}$ ; Culture #2,  $p = 1.2 \times 10^{-5}$ ; Culture #4,  $p = 2.3 \times 10^{-3}$ ; Culture #5,  $p = 4.8 \times 10^{-7}$ ). この周期は神経回路によって異なった (Culture #1, 64.0; Culture #2, 27.7; Culture #4, 66.0; Culture #5, 38.6).

同期バースト間の類似度と出現時刻の差の関係性も同様に解析した (Fig. 4.5E-G). 類似度

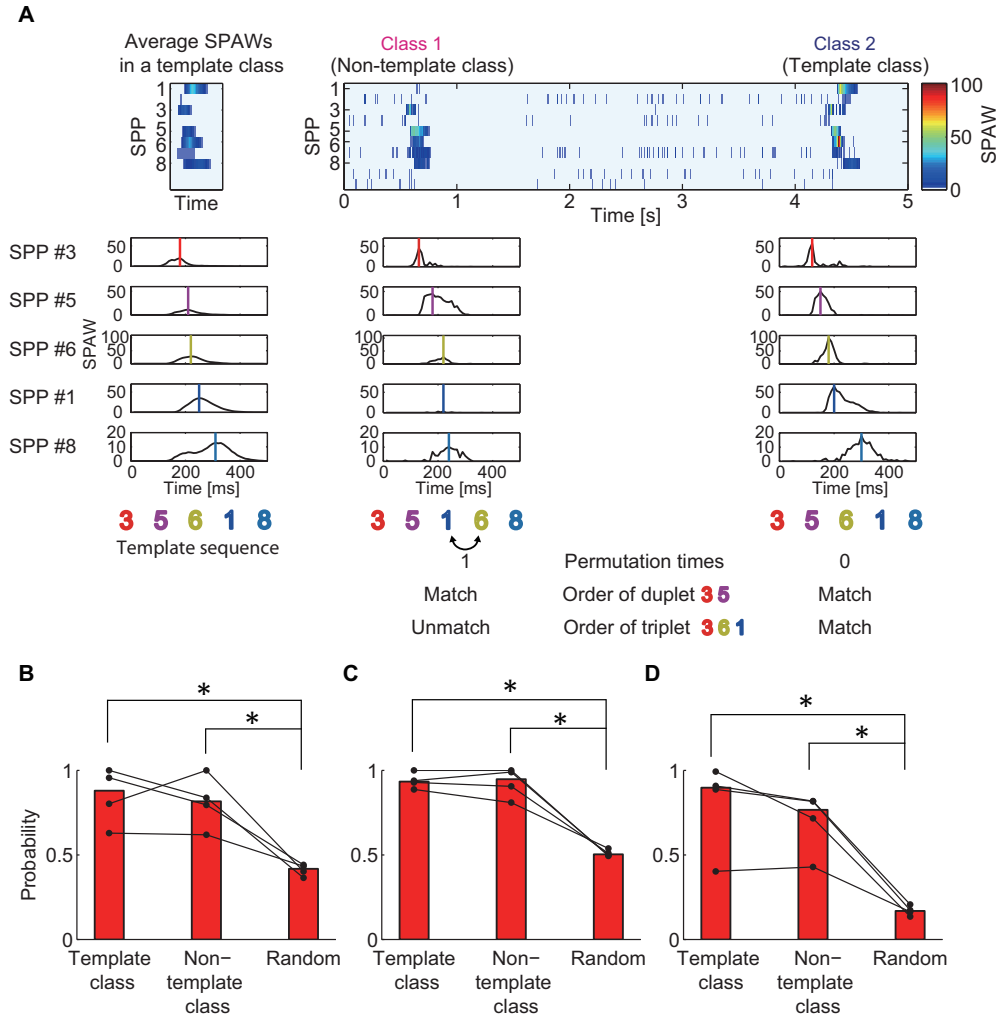


Fig.4.3. Similarity in partial sequence of sub-population activation between synchronized burst classes. **(A)** Illustration of the procedure to evaluate partial similarity between sub-population sequences of bursts. SPAWs during bursts were converted into a sequence of their peaks. Sub-population sequences of bursts were compared with the template sequence. Permutation times for matching refers to the way in which many pair permutations are required to match the template sequence. Duplet/triplet order matching indicates whether the order of two/three sub-populations matches the template sequences. **(B)** Probability that permutation times for matching is two or less. **(C-D)** Probability that the duplet **(C)** or the triplet **(D)** order matched the template. The most reproduced duplet or triplet was selected for analysis. The Mann-Whitney U-test.  $*p < 0.05$ . Adopted from (Yada et al., 2016).

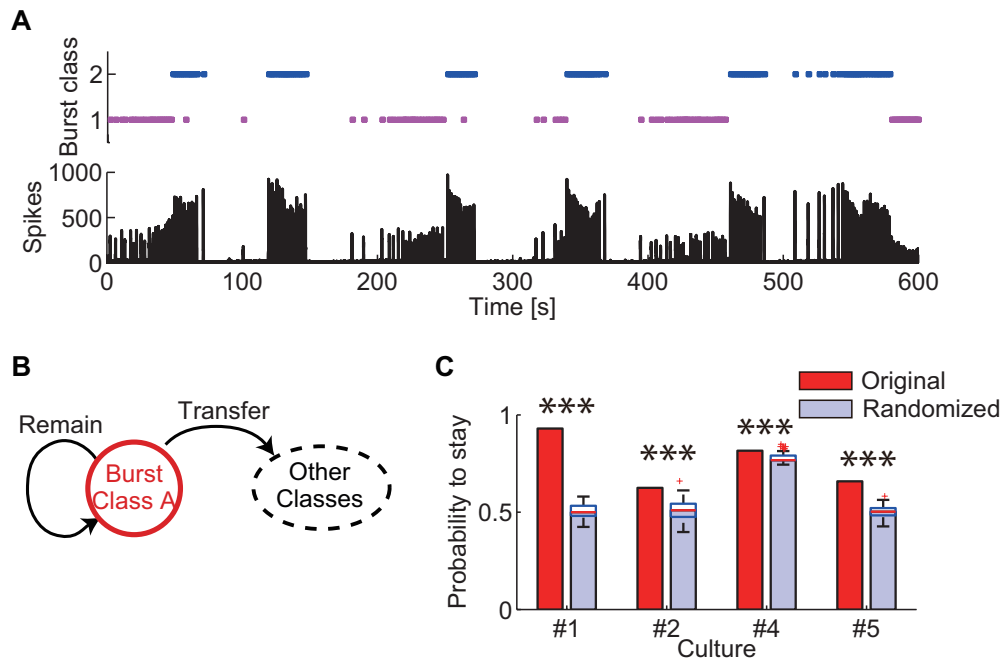


Fig.4.4. Evaluation of consecutiveness in appearance of burst spatiotemporal patterns classes. **(A)** (Top) Periods in which each class of bursts appeared. (Bottom) Number of array-wide spikes through the whole recording. **(B)** Schematic illustration of the transition between multiple burst classes. The probability of “remaining” was evaluated. **(C)** Probability that the same class of bursts appeared in succession. Randomized data was generated by randomly shuffling original data. The red lines in randomized data indicate the median of the probabilities. The blue boxes are ranges from the 25th percentiles to the 75th percentiles. The whiskers are the ranges of the all probabilities excluding outliers (the red crosses). One-sample Wilcoxon signed-rank test.  $***p < 0.001$ . Adopted from (Yada et al., 2016).

の出現順序の差に関する周期として得られた, 64回の同期バーストの平均時間間隔は 195.1 ( $\pm 26.0$ , SD) であり, Fig. 4.5E, F で見られるピークのひとつと一致する. 同期バースト間の類似度と出現時刻の差の関係性では, 一つの神経回路を除いて有意 ( $p < 0.001$ ) な周期性が見られた (Culture #1,  $p = 9.7 \times 10^{-9}$ ; Culture #2,  $p = 1.5 \times 10^{-8}$ ; Culture #4,  $p = 0.13$ ; Culture #5,  $p = 3.5 \times 10^{-8}$ ). この類似度関数の周期は 0.01–0.02 Hz の間となった (Culture #1, 0.01 Hz; Culture #2, 0.0175 Hz; Culture #5, 0.01 Hz).

Fig. 4.5B で示したように類似度が連続的に変化することは, 同じクラスの同期バーストが連続する期間であっても時空間パターンは一定ではないことを意味するかもしれない. この可能性を検証するため, 同じクラスのバーストが持続する期間の中で, 最初の2つの同期バーストのペア (Start-Start), 最初と最後の同期バーストのペア (Start-End), そしてクラスが切り替わる前後の同期バーストのペア (Class A-Class  $\bar{A}$ ) の類似度を比較した. その結果, Fig. 4.6 に示すように, 同じクラスの同期バーストが出る期間の最初同士のペアは, 最初と最後のペアに比べて有意に高い類似度を示した ( $p = 0.003$ , Wilcoxon signed rank test). 一方で, 最初同士のペア, 最初と最後のペアは, とともにクラス間のペアと比べると有意に高い類似度を示した (Start-Start vs. Class A-Class A,  $p = 6.4 \times 10^{-7}$ ; Start-End vs. Class A-Class  $\bar{A}$ ,  $p = 3.9 \times 10^{-6}$ , Wilcoxon signed rank test). そのため, 同じクラスのバーストが出る期間であっても, 時空間パターンは一定ではなく時間とともに変動することが示された. ただし, その変動の大きさは, バーストクラスが切り替わる時の時空間パターン変化と比べるとかなり小さいものである.

すなわち, これらの結果から同期バーストの時空間パターンはレパートリーからランダムに出力されるのではなく, むしろ似たようなパターンを連続的に, また周期的に出力することが示された. これは, 同期バーストの時空間パターン出力が, 神経回路の持つ内部的な隠れ状態 (“hidden states” (Buonomano and Maass, 2009)) に依存し, その内部状態が複数の準安定状態を自発的にかつ再帰的に遷移する (Durstewitz and Deco, 2007; Mazzucato et al., 2015) という仮説を支持する.

#### 4.4 考察

本研究では, 4096チャンネルCMOS電極アレイによる高時空間解像度計測と, NMFによる次元削減を組み合わせ, 培養3週間前後の皮質分散培養神経回路の同期バーストを調べた. その結果, 同期バーストは複数の時空間パターンからなる活動レパートリーを持ち, また複数の時空間パターンに, 共通する部分神経集団の活性化順序が存在することが示された. これは, 同期活動で部分的な神経集団で情報伝達が生じるというモデル (Fig. 4.7; (Abeles, 1991; Eytan and Marom, 2006; Ikegaya et al., 2004)) を支持する. さらに, 類似した時空間パターンの同期バーストが連続的に, かつ周期的に出現しやすく, これは部分神経集団間の伝達が状態依存的に変化することを示唆している. この同期活動の状態依存性は, 先行研究では見落とされていた事実である. このような, 状態依存的特性を持つ階層的な部分神経集団構造は (Fig. 4.7), 神経回路が同期活動で安定した活動レパートリーを出力するための有力な神経基盤

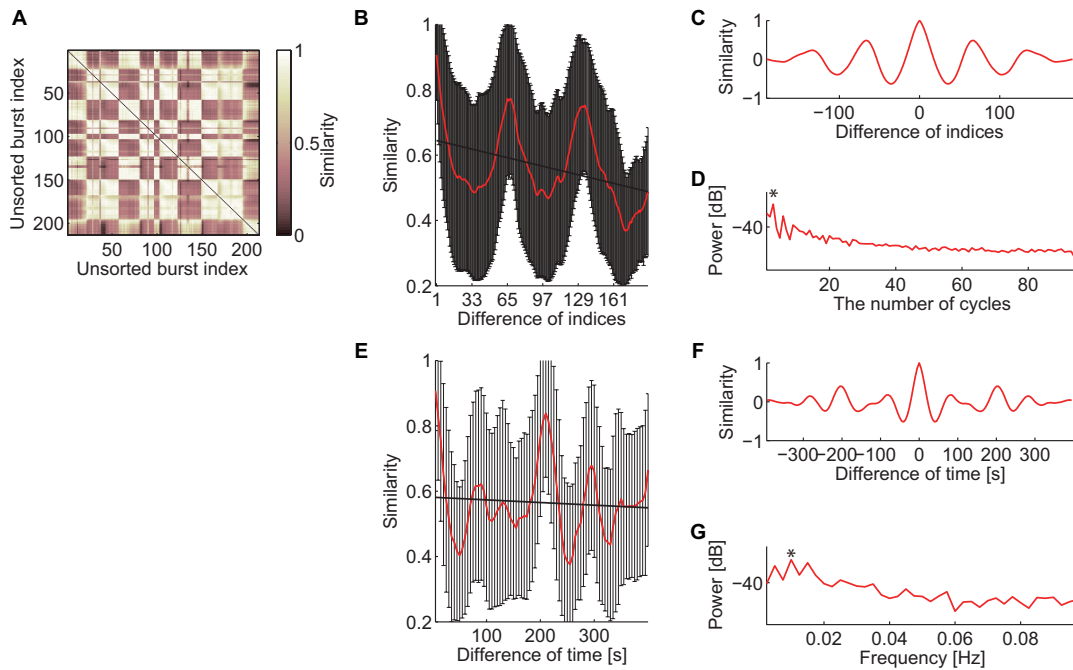


Fig. 4.5. Consecutive and periodic appearance of similar spatiotemporal patterns of bursts. **(A)** Similarity matrix of bursts. Bursts are listed in temporal order. **(B)** Relationship between similarity and the difference of the burst indices in temporal order. The red line indicates mean similarity against the difference of burst indices in temporal order. The error bars are SD. The thick black line is a linear regression line to the mean similarity. **(C)** Autocorrelation of the mean similarity that subtracted the regression line shown in **B**. **(D)** Periodogram of the mean similarity that subtracted the regression line. Asterisk indicates a maximum peak. The significance level of the maximum peak was tested using Fisher's  $g$ -statistic. **(E-G)** The same analysis as shown in **B-D** about relationship between similarity and the difference of burst appearance time. Adopted from (Yada et al., 2016).

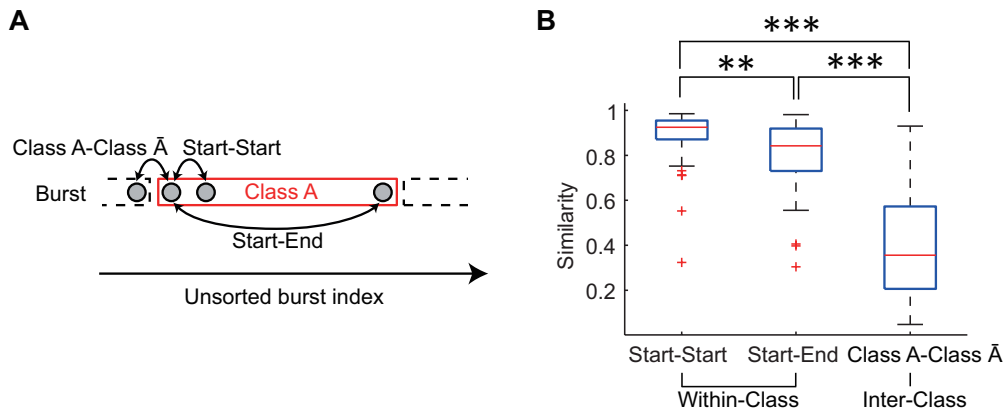


Fig. 4.6. Variation of spatiotemporal patterns during a period of the same class burst. **(A)** Similarity of the first two bursts in a given period (Start–Start pair), that of the burst pair at the start and end of a given period (Start–End pair) and that of the successive burst pair at the transition of the period (Class A–Class  $\tilde{A}$  pair) were evaluated. **(B)** Similarity of Start-Start pair, Start–End pair and Class A–Class  $\tilde{A}$  pair. The red lines indicate the median of the similarities. The blue boxes are ranges from the 25th percentiles to the 75th percentiles. The whiskers are the ranges of the all similarity excluding outliers (the red crosses). Wilcoxon signed-rank test. \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . Adopted from (Yada et al., 2016).



と考えられる。

#### 4.4.1 手法の特色

高密度 CMOS 電極アレイは電気生理的に神経回路の活動を計測するための新たなプラットフォームとして、近年開発が進められている。まるで細胞レベルの空間解像度、単一活動電位以上の時間解像度で作られた映画のように神経活動を捉えることができる (Berdondini et al., 2009)。神経回路の中で、頻繁に活動して回路で重要な役割を果たしていると考えられる神経細胞は限られた割合しかいない (Wohrer et al., 2013)。すなわち、神経細胞の活動は一様ではなく、活動量の多いの細胞を見落としてしまえば、本研究で実施した実験でも結果を誤って解釈してしまふ可能性がある。このような部分的な細胞しか計測されないで生じうるバイアスを避けるため、細胞レベルの空間解像度で計測することが必要である (Panas et al., 2015)。さらに、本研究で対象とした同期バーストの持続期間は典型的には数 100 ms である。そのため、同期バーストの時空間パターンを適切に特徴づけるためには、ms オーダーの時間解像度で計測するべきである。

高密度 CMOS 電極アレイで取得されるデータの次元 (= 4096) は本研究で対象とした機能的な部分神経集団の次元よりは遥かに高いはずである (Baruchi and Ben-Jacob, 2004)。そのため、取得されるデータの次元を適切に削減する手法が必要である。本研究では、NMF を利用して安定して同期する部分神経集団の空間パターンを同定した。元々 NMF はヒトの顔画像から特徴的なパーツ、すなわち、目や、鼻や口などを自動的に抽出できるアルゴリズムとして開発された (Lee and Seung, 1999)。神経のスパイク活動に対して NMF を利用する上でのメリットは、スパイクに対して前処理をすることなく適用できることである。一般に使用される主成分分析 (PCA) では、スパイク列 (離散、非負値) から発火頻度を推定し、さらに正規化した上で適用することが必要である (Lopes-dos Santos et al., 2013; Peyrache et al., 2009)。Kullback-Leibler ダイバージェンスを損失関数とする NMF は、離散、非負値であるスパイク列を自然に扱うことができる。さらに、前処理をしないために抽出される活動パターンが、顔画像から抽出される目や鼻などのように (Lee and Seung, 1999)、直感的に理解しやすいという利点も持つ。

NMF で分解する部分神経集団の数は  $D = 10$  と固定した。本研究で示した結果はこの集団数に依存する可能性もある。Fig. 4.8 に部分神経集団数を  $D = 20$  として解析した場合の結果を示す。Fig. 4.8A に代表例を示す。SPP の順序は、全同期バースト中の SPAW を平均し、最大値を示した時刻順に並び変えたものである。類似した同期バーストが連続して出現していることがわかる。時空間パターンをクラスタリングすると、Fig. 4.8C に示すように、Fig. 4.2D と類似した時空間パターン構造が見られた。同様に 2 つのクラスに分類し、それぞれに属する同期バーストで平均した SPAW を Fig. 4.8C に示す。それぞれのクラスで部分神経集団の活性化順序が類似していることがわかる。異なるクラス間で共通する Triplet の出現確率を全回路で調べた結果を Fig. 4.8D に示す。ただし、同期バースト中での SPAW が大きい方から 10 個の部分神経集団を選択し、Triplet の順序はその中から決定した。やはり、ランダムに活性

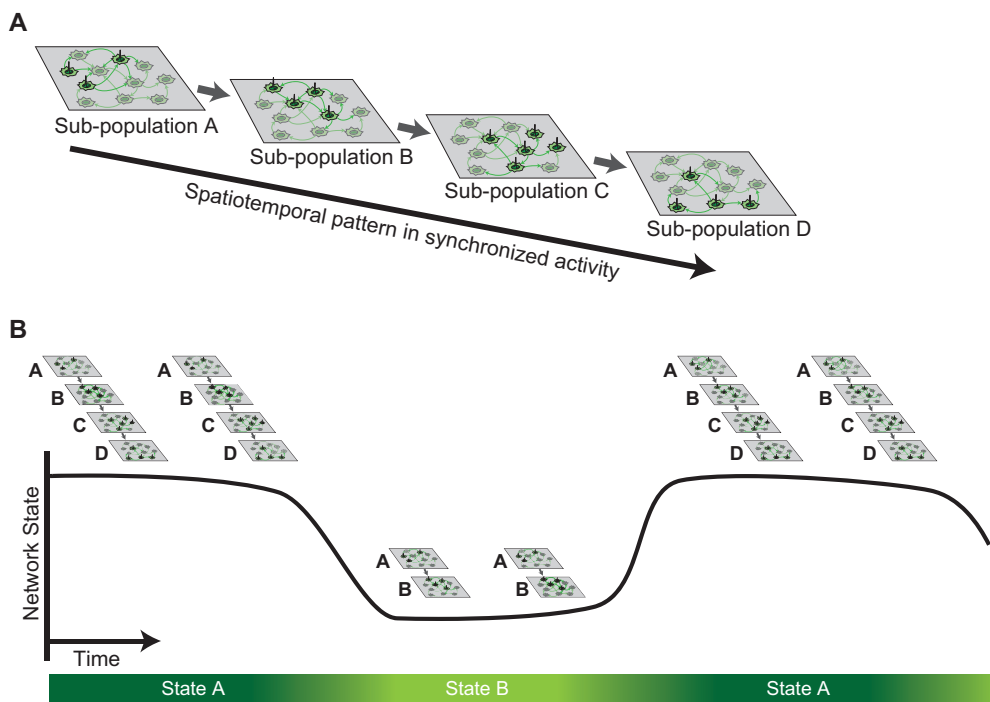


Fig.4.7. Schematic illustration of the hypothesis. **(A)** Stable spatiotemporal patterns observed in synchronized spontaneous activity are generated by sequential activation of neuronal sub-population. **(B)** Such sequential activation of sub-population is state-dependent, whereby multiple metastable states can be defined as a finite continuous period. Adopted from (Yada et al., 2016).

化が生じた場合と比べて、異なるクラス間で共通して有意に高い出現確率を持つ部分神経集団の活性化構造が存在した。このことから、本研究で示した結果が、部分神経集団数に特異的に得られた結果では無いことがわかる。ただし、部分神経集団数によらず普遍的に成立することを示すものではない。実際には、一般に情報量基準や交差検定などを用いて評価される、神経活動を表現するのに最適な部分神経集団数が存在すると考えられる。どのような基準を用いて部分神経集団数を決定すれば良いか評価することは今後の課題である。

#### 4.4.2 自発同期活動での時空間パターンの再生

本研究で得られた結果と同様に、これまでの先行研究でも分散培養神経回路がいくつかの時空間パターンを持つことが報告されている (Madhavan et al., 2007; Rolston et al., 2007; Segev et al., 2004)。本研究で観測した分散培養神経回路では、典型的には二峰性の振幅分布と、二種類の時空間パターンを持つ同期バーストを示した。バーストの振幅分布については、成熟した神経回路 (21 DIV 前後) は二峰性の分布を示す一方で、幼弱な神経回路は単峰の分布を示すことが報告されており (Eytan and Marom, 2006; Madhavan et al., 2007; Wagenaar et al., 2006b)、本研究結果と一致する。さらに、類似度に基づくクラスタリング手法で同期バーストが限られた種類のパターン (Segev et al., 2004)、典型的には小さいバーストと大きなバースト (Madhavan et al., 2007)、に分類できることが報告されている。本研究で得られた結果はこれらの知見をさらに拡張し、大きなバーストと小さなバーストが似たような部分神経集団の活性化順序を共有することを示した。

#### 4.4.3 状態依存性と時空間パターン

本研究で得られた結果は、神経活動が自発的にいくつかの時空間パターンを巡回することを示しており、これは培養皿上の孤立して存在する分散培養神経回路にも、準安定状態 (metastable states) が存在することを示唆している。ある状態にいる間でも連続的な同期バーストパターンの変動が生じていたことから、それぞれの状態は孤立したものではなく、連続的な中間状態を持つのかもかもしれない。似たような準安定状態間の自発的な巡回は、近年 *in vivo* の味覚野でも報告されている (Mazzucato et al., 2015)。また、*in vivo* の大脳皮質の活動も、極端な二つの典型的状態 (同期状態と非同期状態) と連続的な中間状態で特徴づけられる (Harris and Thiele, 2011)。これらの準安定状態の時間スケールは数秒から数分である。そのため、分散培養神経回路では発達を通じて数週間から数ヶ月の時間スケールで、さらに一方向に準安定状態を遷移することが報告されているが (Pu et al., 2013)、これは本研究で着目した準安定状態とは本質的に異なる。

神経回路の安定した活動状態はしばしばアトラクタとして言及されてきた (Cossart et al., 2003; Wagenaar et al., 2006a)。旧来、神経回路のアトラクタは特定の情報 (記憶) そのものとして考えられていた (Hopfield, 1982)。しかし、古典的なアトラクタネットワーク、すなわち、一つのアトラクタが一つの記憶を表すという考え方は、生物が実現するのに現実的

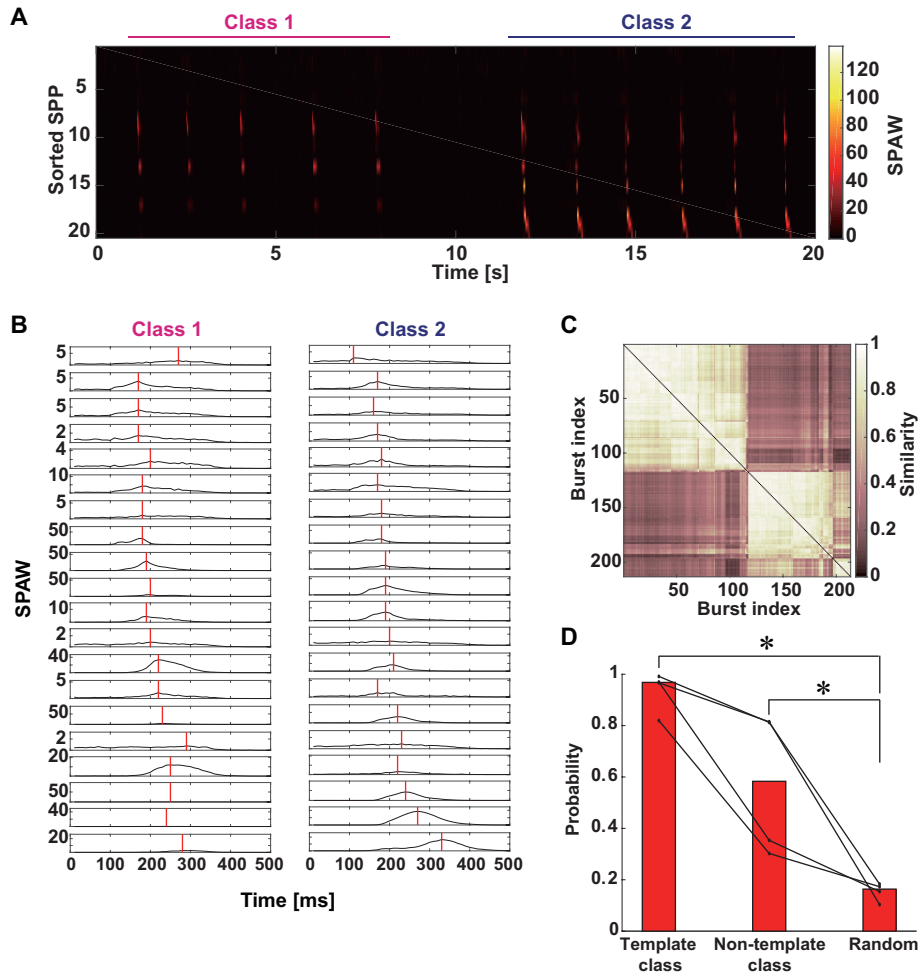


Fig. 4.8. Dimension-reduced activity of cultured neuronal networks represented by 20 sub-populations. **(A)** Representative 20-dimension activity of cultured neurons during 20 seconds. **(B)** Mean 20-dimension SPAWs in each class of synchronized bursts. The red lines indicate the timings of the peaks in SPAWs. **(C)** Similarity matrix of 20-dimension SPAW during synchronized bursts. **(D)** The probability that the triplet order matched with the template. Mann-Whitney U-test.  $*p < 0.05$ .

な方策とは言えない。その理由として、これまでに実験的に得られている知見と比較した時に、要求される記憶容量に対してアトラクタの数は限定的であること (Maass et al., 2002), 記憶を想起するのにアトラクタに収束するまでの時間が必要となること (Maass et al., 2002; Rabinovich et al., 2008), さらに神経回路の自発活動との関係が説明できないこと (Kurikawa and Kaneko, 2015) が挙げられている。そのため、より生物が実現する上で合理的な考え方として、近年の研究では準安定状態の間を遷移することそれ自体が情報を保持し、また表現しているとも考えられている (Durstewitz and Deco, 2007; Rabinovich et al., 2008)。

一般的に、再帰的に生じる時空間パターンは、神経回路の準安定状態が表出したものであると考えられている。特定の時空間パターンが出る間は特定の細胞やシナプスの特性（例えば、短期可塑性や時定数の遅い抑制性のシナプス高電位、NMDA 受容体の特性など）が持続しており、神経回路の隠れ状態 (“hidden states”) を構成していると言われている (Buonomano and Maass, 2009)。このような隠れ状態は、本研究で連続して似たような同期バーストが現れたことを説明できるかもしれない。つまり、同期バーストを表象とする隠れ状態が神経回路の内部記憶を保持している可能性がある。このような内部記憶は、外部入力で一時的に保持される記憶よりも強固であろう。このような一時記憶は簡単に同期バースト、すなわち内部記憶で消去されることが知られている (Draniias et al., 2013; Ju et al., 2015)。隠れ状態から特定の時空間パターンを生み出される上では、抑制性の介在神経細胞持つ役割も大きいだろう (Sasaki et al., 2014)。

さらに、本研究の結果で同期バーストの出現回数に対して時空間パターン周期性が見られたことは、状態遷移に自発的な同期バーストそれ自体が作用しているかもしれないことを示す。つまり、特定の回数同期バーストが生じることで状態遷移が誘起されている可能性がある。

#### 4.4.4 同期活動中の逐次的な活性化構造

本研究で得られた結果は、複数の異なる時空間パターンが共通した神経回路の安定な伝達構造から生み出されることを示している (Raichman and Ben-Jacob, 2008)。隠れ状態に依存した伝達をすることで、このような安定した構造からでも複数のパターンを生み出せるのではないかと考えられる。逐次的な活性化構造という考え方は、分散培養神経回路で報告されている同期バーストの開始時に発火する少数の神経細胞、つまりリーダーニューロン (Eytan and Marom, 2006)、と同期バーストでの神経細胞の階層的構造 (Ham et al., 2008) と矛盾しない。本研究結果は異なる活動状態で同期バーストが類似した時空間パターンを持つという *in vivo* 実験での報告 (Luczak et al., 2013) にも一致する。まとめると、このような状態依存性持つ部分神経集団の逐次活性化構造 (Synfire chain の改良版ともいえる) は、同期活動の安定性 (Eytan and Marom, 2006; Panas et al., 2015) と多様な時空間パターン生成 (Madhavan et al., 2007; Rolston et al., 2007; Segev et al., 2004) の両方を説明できる。

#### 4.4.5 in vivo での自発活動の時空間パターン

自発活動で繰り返し生じる時空間パターンは in vitro (Beggs and Plenz, 2004; Ikegaya et al., 2004) だけでなく, in vivo でも観測されてきた (Luczak et al., 2007). 神経回路が情報を部分的な神経集団の活動パターン単位で伝達しており, それが全体での安定した時空間パターンの再生を実現しているのではないかと, という神経パケット (Neuronal packet) 仮説 (Luczak et al., 2013, 2015) は本研究結果とも合致する. 海馬では睡眠中や覚醒下の静止状態で活動パターン, すなわち記憶のリプレイが生じ, それぞれ記憶定着メカニズム (Lee and Wilson, 2002), 及び記憶想起メカニズム Takahashi (2015); Villette et al. (2015) ではないかとして注目されている. 大脳皮質の感覚野では自発活動と誘発応答の時空間パターンが類似することが報告されており, Luczak らは誘発応答のパターンは自発活動のレパートリーの一部であるという仮説を提唱している (Luczak et al., 2009). また, 大脳皮質をベイズ推定器として捉え, 自発活動が感覚入力の前分布を示しているという仮説も提唱されている (Berkes et al., 2011).

しかし, 本研究で得た結果は, 分散培養神経回路, すなわち外部からの入力を一度も経験していない神経回路にも繰り返し生じる時空間パターンのレパートリーがあり, さらにそれらのパターンが状態依存的に生じることを示している. このような神経回路でも機能的な結合は自発活動と誘発応答で類似するという報告があり (Pirino et al., 2015), 時空間パターンも類似しているのかもしれない. このような自発活動の意義はまだ明らかになっていない.

### 4.5 結論

本研究では, 分散培養神経回路が自発活動で再生する時空間パターンの再現性と多様性の両立メカニズムを調べた. 神経回路に機能的な部分神経集団が存在し, 部分集団単位で活動伝達することで安定性が担保され, また部分集団間の伝達構造が状態依存的に変化することで多様性が生まれるという仮説を立て, 検証した. 分散培養神経回路の活動を NMF で次元削減して部分神経集団の活動に変換すると, 同期バーストは明らかに複数の時空間パターンを示した. 異なる時空間パターンでも部分神経集団の活性化順序は部分的に共通し, 類似した時空間パターンは連続的に, また周期的に出現した. これらの結果は, 神経回路に安定した部分神経集団の逐次伝達構造があること, そして自律ダイナミクスを持つ内部状態依存で時空間パターンが生じることを示唆し, 仮説を支持する.

## 第5章

# 自発誘発類似性の機能的意義：刺激入力による内部状態への投射

本章は、未だ出版契約に至らないものの、今後刊行を予定する内容を含むため、5年間非公開とする。

## 第 6 章

# 総論

本章は、未だ出版契約に至らないものの、今後刊行を予定する内容を含むため、5年間非公開とする。



## 第7章

# 結論

神経回路は自発活動で再現性と多様性のある時空間パターンを出力し、このパターンは外部入力で誘起されるパターンと類似する。このことから、自発活動は神経回路の記憶を表現すると考えられている。本研究では、神経回路の自発活動に備わる再現性と多様性ある時空間パターンが自己組織的に創られるものと仮定し、神経細胞が培養皿上で自己組織的に構成する分散培養神経回路で、どのような過程を経て創発するのか、どのような特性から実現されるのか、そして外部入力で想起可能であるのかを明らかにすることを目的とした。ラット胎児大脳皮質由来の分散培養神経回路と高密度 CMOS 電極アレイを用いた実験から以下の知見を得た。

神経回路に、適度な多様性を持つ神経活動の指標である、べき乗則に従う神経雪崩現象が生じる発達メカニズムを明らかにするため、幼弱な時期から経時的に分散培養神経回路の活動を観測した。その結果、神経回路の活動はランダムな発火をする最初期から、一様な活動パターンを持つ特徴的な大規模同期を出力する時期を経て、最終的に多様な規模、活動パターンを出力する状態になることが示された。この結果から、神経回路の多様な活動パターンは神経回路の機能的な統合と断片化という2段階の発達プロセスを経て創発することが示唆された。

神経回路が自発活動で時空間パターンの再現性と多様性を両立するメカニズムとして、神経回路に部分的な神経集団が存在し、部分集団単位で逐次的に活動伝達することで安定性を確保し、かつ自律的な内部状態依存で部分集団間の変化が変化することで多様性を両立するという仮説を立て、その検証を行った。次元削減法で部分神経集団の活動を抽出すると、分散培養神経回路は共通した部分神経集団を用いて異なる時空間パターンを再生することが示された。さらに、類似したパターンが連続して再生されることから、連続的な内部状態依存で時空間パターンが出力されることを示唆した。

分散培養神経回路が自己組織的に自発活動に創りだす時空間パターンが記憶の座としての役割を持つか明らかにするため、分散培養神経回路に電気刺激を加えて同期発火を誘発し、自発同期活動パターンとの類似性を調べた。神経回路は自発活動で幾つかの再現性ある時空間パターンを出力し、誘発された同期活動の時空間パターンはその一つと類似した。すなわち、分散培養神経回路でも自発活動の時空間パターンが記憶の座としての役割を果たす可能性が示された。分散培養神経回路は予め自己組織的に創りだした内部状態に対して、外部入力を投射して表現するとも言える。

以上から、神経回路は学習を経ずとも自己組織的に記憶の座に相当する、再現性と多様性を持つ時空間パターンを創りだし、外部入力を予め存在する記憶の座に割り当てて処理する可能性が示唆される。発達を通じた自己組織化で、神経細胞は初めに一度単調な状態を作り上げてから適度な多様性を持つ活動を生み出す。自己組織化は神経回路に機能的な部分神経集団と逐次的活性化構造、さらに自律遷移する内部状態を生み出し、再現性と多様性ある時空間パターンが備わる。このような自己組織化特性は、生物があらゆる状況下で常にある程度優れた処理をするための解であるかもしれない。

## 参考文献

- M. Abeles. *Corticonics: Neural Circuits of the Cerebral Cortex*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1991.
- M. Abeles and G. L. Gerstein. Detecting spatiotemporal firing patterns among simultaneously recorded single neurons. *Journal of neurophysiology*, 60(3):909–924, 1988.
- A. Aertsen, M. Diesmann, and M. O. Gewaltig. Propagation of synchronous spiking activity in feedforward neural networks. *Journal of Physiology-Paris*, 90(3-4):243–247, 1996.
- J. S. Anderson, I. Lampl, D. C. Gillespie, and D. Ferster. The contribution of noise to contrast invariance of orientation tuning in cat visual cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5498):1968–1972, 2000.
- A. Arieli, A. Sterkin, A. Grinvald, and A. Aertsen. Dynamics of ongoing activity: explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5283):1868–1871, 1996.
- E. Baho and G. Di Cristo. Neural activity and neurotransmission regulate the maturation of the innervation field of cortical GABAergic interneurons in an age-dependent manner. *Journal of Neuroscience*, 32(3):911–918, 2012.
- S. N. Baker and R. N. Lemon. Precise spatiotemporal repeating patterns in monkey primary and supplementary motor areas occur at chance levels. *Journal of neurophysiology*, 84(4):1770–1780, 2000.
- D. J. Bakkum, U. Frey, M. Radivojevic, T. L. Russell, J. Müller, M. Fiscella, H. Takahashi, and A. Hierlemann. Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites. *Nature communications*, 4:2181, 2013a.
- D. J. Bakkum, M. Radivojevic, U. Frey, F. Franke, A. Hierlemann, and H. Takahashi. Parameters for burst detection. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 7:193, 2013b.

- P. Barthó, C. Curto, A. Luczak, S. L. Marguet, and K. D. Harris. Population coding of tone stimuli in auditory cortex: dynamic rate vector analysis. *European Journal of Neuroscience*, 30(9):1767–1778, 2009.
- I. Baruchi and E. Ben-Jacob. Functional holography of recorded neuronal networks activity. *Neuroinformatics*, 2(3):333–352, 2004.
- J. M. Beggs and D. Plenz. Neuronal avalanches in neocortical circuits. *The Journal of Neuroscience*, 23(35):11167–11177, 2003.
- J. M. Beggs and D. Plenz. Neuronal avalanches are diverse and precise activity patterns that are stable for many hours in cortical slice cultures. *Journal of Neuroscience*, 24(22):5216–5229, 2004.
- Y. Ben-Ari. Developing networks play a similar melody. *Trends in Neurosciences*, 24(6):353–360, 2001.
- Y. Ben-Ari. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9):728–739, 2002.
- L. Berdondini, K. Imfeld, A. Maccione, M. Tedesco, S. Neukom, M. Koudelka-Hep, and S. Martinoia. Active pixel sensor array for high spatio-temporal resolution electrophysiological recordings from single cell to large scale neuronal networks . *Lab on a Chip*, 9(18):2644–2651, 2009.
- P. Berkes, G. Orbán, M. Lengyel, and J. Fiser. Spontaneous cortical activity reveals hallmarks of an optimal internal model of the environment. *Science*, 331(6013):83–87, 2011.
- J. P. Bourgeois and P. Rakic. Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *The Journal of Neuroscience*, 13(7):2801–2820, 1993.
- L. Buesing, J. Bill, B. Nessler, and W. Maass. Neural Dynamics as Sampling: A Model for Stochastic Computation in Recurrent Networks of Spiking Neurons. *PLoS Computational Biology*, 7(11):e1002211, 2011.
- D. V. Buonomano and W. Maass. State-dependent computations: spatiotemporal processing in cortical networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(2):113–125, 2009.
- M. F. Carr, S. P. Jadhav, and L. M. Frank. Hippocampal replay in the awake state: a

- potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nature Neuroscience*, 14(2): 147–153, 2011.
- G. Chechik, I. Meilijson, and E. Ruppin. Synaptic pruning in development: a computational account. *Neural Computation*, 10(7):1759–1777, 1998.
- W. Chen, J. P. Hobbs, A. Tang, and J. M. Beggs. A few strong connections: optimizing information retention in neuronal avalanches. *BMC Neuroscience*, 11(1):3, 2010.
- A. Clauset, C. R. Shalizi, and M. E. J. Newman. Power-law distributions in empirical data. *SIAM Review*, 51(4):661–703, 2009.
- R. Cossart, D. Aronov, and R. Yuste. Attractor dynamics of network UP states in the neo-cortex. *Nature*, 423(6937):283–288, 2003.
- W. M. Cowan, J. W. Fawcett, D. D. O’Leary, and B. B. Stanfield. Regressive events in neurogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 225(4668):1258–1265, 1984.
- R. Dawkins. Selective neurone death as a possible memory mechanism. *Nature*, 229(5280): 118–119, 1971.
- S. Diekelmann and J. Born. The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(2):114–126, 2010.
- M. Diesmann, M. O. Gewaltig, and A. Aertsen. Stable propagation of synchronous spiking in cortical neural networks. *Nature*, 402(6761):529–533, 1999.
- J. K. Douglass, L. Wilkens, E. Pantazelou, and F. Moss. Noise enhancement of information transfer in crayfish mechanoreceptors by stochastic resonance. *Nature*, 365(6444):337–340, 1993.
- G. Dragoi and S. Tonegawa. Preplay of future place cell sequences by hippocampal cellular assemblies. *Nature*, 469(7330):397–401, 2011.
- G. Dragoi and S. Tonegawa. Distinct preplay of multiple novel spatial experiences in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22):9100–9105, 2013.
- M. R. Dranias, H. Ju, E. Rajaram, and A. M. J. VanDongen. Short-Term Memory in Networks of Dissociated Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience*, 33(5):1940–1953, 2013.
- M. R. Dranias, M. B. Westover, S. Cash, and A. M. J. VanDongen. Stimulus information

- stored in lasting active and hidden network states is destroyed by network bursts. *Frontiers in integrative neuroscience*, 9:14, 2015.
- D. Durstewitz and G. Deco. Computational significance of transient dynamics in cortical networks. *European Journal of Neuroscience*, 27(1):217–227, 2007.
- G. M. Edelman. Neural Darwinism: Selection and reentrant signaling in higher brain function. *Neuron*, 10(2):115–125, 1993.
- D. Eytan and S. Marom. Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 26(33):8465–8476, 2006.
- D. Eytan, N. Brenner, and S. Marom. Selective adaptation in networks of cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(28):9349–9356, 2003.
- J. Fiser, P. Berkes, G. Orbán, and M. Lengyel. Statistically optimal perception and learning: from behavior to neural representations. *Trends in cognitive sciences*, 14(3):119–130, 2010.
- D. J. Foster and M. A. Wilson. Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature*, 440(7084):680–683, 2006.
- U. Frey, J. Sedivy, F. Heer, R. Pedron, M. Ballini, J. Mueller, D. Bakkum, S. Hafizovic, F. D. Faraci, F. Greve, K.-U. Kirstein, and A. Hierlemann. Switch-Matrix-Based High-Density Microelectrode Array in CMOS Technology. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 45(2):467–482, 2010.
- N. Friedman, S. Ito, B. A. W. Brinkman, M. Shimono, R. E. L. DeVile, K. A. Dahmen, J. M. Beggs, and T. C. Butler. Universal critical dynamics in high resolution neuronal avalanche data. *Physical Review Letters*, 108(20):208102, 2012.
- K. Ganguly, A. F. Schinder, S. T. Wong, and M. Poo. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, 105(4):521–532, 2001.
- F. Gerhard, G. Pipa, B. Lima, S. Neuenschwander, and W. Gerstner. Extraction of Network Topology From Multi-Electrode Recordings: Is there a Small-World Effect? *Frontiers in Computational Neuroscience*, 5:4, 2011.
- E. D. Gireesh and D. Plenz. Neuronal avalanches organize as nested theta- and

- beta/gamma-oscillations during development of cortical layer 2/3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(21):7576–7581, 2008.
- A. D. Groszmark and G. Buzsáki. Diversity in neural firing dynamics supports both rigid and learned hippocampal sequences. *Science*, 351(6280):1440–1443, 2016.
- M. S. Grubb and J. Burrone. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*, 465(7301):1070–1074, 2010.
- M. S. Grubb, Y. Shu, H. Kuba, M. N. Rasband, V. C. Wimmer, and K. J. Bender. Short- and Long-Term Plasticity at the Axon Initial Segment. *The Journal of Neuroscience*, 31(45):16049–16055, 2011.
- C. Haldeman and J. M. Beggs. Critical Branching Captures Activity in Living Neural Networks and Maximizes the Number of Metastable States. *Physical Review Letters*, 94(5):058101, 2005.
- M. I. Ham, L. M. Bettencourt, F. D. McDaniel, and G. W. Gross. Spontaneous coordinated activity in cultured networks: analysis of multiple ignition sites, primary circuits, and burst phase delay distributions. *Journal of Computational Neuroscience*, 24(3):346–357, 2008.
- K. D. Harris and A. Thiele. Cortical state and attention. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(9):509–523, 2011.
- T. E. Harris. *The theory of branching processes*. Dover Phoenix Editions. Dover Publications, Inc., Mineola, NY, 1989.
- D. O. Hebb. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. Wiley, Newyork, 1949.
- G. E. Hinton, S. Osindero, and Y.-W. Teh. A Fast Learning Algorithm for Deep Belief Nets. *Neural Computation*, 18(7):1527–1554, 2006.
- S. Hochreiter and J. Schmidhuber. Long short-term memory. *Neural Computation*, 9(8):1735–1780, 1997.
- J. J. Hopfield. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(8):2554–2558, 1982.
- M. Ichikawa, K. Muramoto, K. Kobayashi, M. Kawahara, and Y. Kuroda. Formation and

- maturation of synapses in primary cultures of rat cerebral cortical cells: an electron microscopic study. *Neuroscience research*, 16(2):95–103, 1993.
- Y. Ikegaya, G. Aaron, R. Cossart, D. Aronov, I. Lampl, D. Ferster, and R. Yuste. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science*, 304(5670):559–564, 2004.
- S. P. Jadhav, G. Rothschild, D. K. Roumis, and L. M. Frank. Coordinated Excitation and Inhibition of Prefrontal Ensembles during Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripple Events. *Neuron*, 90(1):113–127, 2016.
- D. Ji and M. A. Wilson. Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. *Nature Neuroscience*, 10(1):100–107, 2007.
- Z. G. Jiang and R. A. North. Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *The Journal of physiology*, 443:533–553, 1991.
- Y. Jimbo, H. P. C. Robinson, and A. Kawana. Strengthening of synchronized activity by tetanic stimulation in cortical cultures: application of planar electrode arrays. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 45(11):1297–1304, 1998.
- Y. Jimbo, T. Tateno, and Robinson, H. P. C. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophysical Journal*, 76(2):670–678, 1999.
- H. Ju, M. R. Dranias, G. Banumurthy, and A. M. J. VanDongen. Spatiotemporal Memory Is an Intrinsic Property of Networks of Dissociated Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience*, 35(9):4040–4051, 2015.
- H. Kamioka, E. Maeda, Y. Jimbo, Robinson, H. P. C., and A. Kawana. Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neuroscience letters*, 206(2):109–112, 1996.
- M. P. Karlsson and L. M. Frank. Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 12(7):913–918, 2009.
- S. A. Kauffman. *The Origins of Order*. Self Organization and Selection in Evolution. Oxford University Press, USA, 1993.
- T. Kenet, D. Bibitchkov, M. Tsodyks, A. Grinvald, and A. Arieli. Spontaneously emerging cortical representations of visual attributes. *Nature*, 425(6961):954–956, 2003.



- A. Klaus, S. Yu, and D. Plenz. Statistical analyses support power law distributions found in neuronal avalanches. *PLoS ONE*, 6(5):e19779, 2011.
- H. S. Kudrimoti, C. A. Barnes, and B. L. McNaughton. Reactivation of hippocampal cell assemblies: effects of behavioral state, experience, and EEG dynamics. *Journal of Neuroscience*, 19(10):4090–4101, 1999.
- T. Kurikawa and K. Kaneko. Memories as bifurcations: Realization by collective dynamics of spiking neurons under stochastic inputs. *Neural Networks*, 62:25–31, 2015.
- J. le Feber, J. Stegenga, and W. L. C. Rutten. The Effect of Slow Electrical Stimuli to Achieve Learning in Cultured Networks of Rat Cortical Neurons. *PLoS ONE*, 5(1), 2010.
- C. Le Magueresse and H. Monyer. GABAergic Interneurons Shape the Functional Maturation of the Cortex. *Neuron*, 77(3):388–405, 2013.
- A. K. Lee and M. A. Wilson. Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron*, 36(6):1183–1194, 2002.
- D. D. Lee and H. S. Seung. Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization. *Nature*, 401(6755):788–791, 1999.
- D. D. Lee and H. S. Seung. Algorithms for non-negative matrix factorization. *Advances in neural information processing systems 13*, 2001.
- T. K. Leonard, J. M. Mikkila, E. N. Eskandar, J. L. Gerrard, D. Kaping, S. R. Patel, T. Womelsdorf, and K. L. Hoffman. Sharp Wave Ripples during Visual Exploration in the Primate Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(44):14771–14782, 2015.
- A. Levina, J. M. Herrmann, and T. Geisel. Dynamical synapses causing self-organized criticality in neural networks. *Nature Physics*, 3(12):857–860, 2007.
- P.-M. Lledo, M. Alonso, and M. S. Grubb. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(3):179–193, 2006.
- M. A. Long, D. Z. Jin, and M. S. Fee. Support for a synaptic chain model of neuronal sequence generation. *Nature*, 468(7322):394–399, 2010.
- V. Lopes-dos Santos, S. Ribeiro, and A. B. L. Tort. Detecting cell assemblies in large neuronal populations. *Journal of Neuroscience Methods*, 220(2):149–166, 2013.

- A. Luczak and J. N. Maclean. Default activity patterns at the neocortical microcircuit level. *Frontiers in integrative neuroscience*, 6:30, 2012.
- A. Luczak, P. Barthó, S. L. Marguet, G. Buzsáki, and K. D. Harris. Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1):347–352, 2007.
- A. Luczak, P. Barthó, and K. D. Harris. Spontaneous Events Outline the Realm of Possible Sensory Responses in Neocortical Populations. *Neuron*, 62(3):413–425, 2009.
- A. Luczak, P. Bartho, and K. D. Harris. Gating of Sensory Input by Spontaneous Cortical Activity. *Journal of Neuroscience*, 33(4):1684–1695, 2013.
- A. Luczak, B. L. McNaughton, and K. D. Harris. Packet-based communication in the cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(12):745–755, 2015.
- L. Luo and D. D. M. O’Leary. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci*, 28:127–156, 2005.
- W. Maass, T. Natschläger, and H. Markram. Real-time computing without stable states: a new framework for neural computation based on perturbations. *Neural Computation*, 14(11):2531–2560, 2002.
- A. Maccione, M. Gandolfo, P. Massobrio, A. Novellino, S. Martinoia, and M. Chiappalone. A novel algorithm for precise identification of spikes in extracellularly recorded neuronal signals. *Journal of Neuroscience Methods*, 177(1):241–249, 2009.
- J. N. Maclean, B. O. Watson, G. B. Aaron, and R. Yuste. Internal dynamics determine the cortical response to thalamic stimulation. *Neuron*, 48(5):811–823, 2005.
- R. Madhavan, Z. C. Chao, and S. M. Potter. Plasticity of recurring spatiotemporal activity patterns in cortical networks. *Physical Biology*, 4(3):181–193, 2007.
- B. Q. Mao, F. Hamzei-Sichani, D. Aronov, R. C. Froemke, and R. Yuste. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron*, 32(5):883–898, 2001.
- P. Massobrio, V. Pasquale, and S. Martinoia. Self-organized criticality in cortical assemblies occurs in concurrent scale-free and small-world networks. *Scientific Reports*, 5:10578, 2015.
- A. Mazzoni, F. D. Broccard, E. Garcia-Perez, P. Bonifazi, M. E. Ruaro, and V. Torre. On

- the Dynamics of the Spontaneous Activity in Neuronal Networks. *PLoS ONE*, 2(5):e439, 2007.
- L. Mazzucato, A. Fontanini, and G. La Camera. Dynamics of Multistable States during Ongoing and Evoked Cortical Activity. *Journal of Neuroscience*, 35(21):8214–8231, 2015.
- L. Mazzucato, A. Fontanini, and G. La Camera. Stimuli Reduce the Dimensionality of Cortical Activity. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10(56):65, 2016.
- W. S. McCulloch and W. Pitts. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull. Math. Biophys.*, 5:115–133, 1943.
- P. Meier, A. Finch, and G. Evan. Apoptosis in development. *Nature*, 407(6805):796–801, 2000.
- D. Millman, S. Mihalas, A. Kirkwood, and E. Niebur. Self-organized criticality occurs in non-conservative neuronal networks during ‘up’ states. *Nature Physics*, 6(10):801–805, 2010.
- A. Mokeichev, M. Okun, O. Barak, Y. Katz, O. Ben-Shahar, and I. Lampl. Stochastic Emergence of Repeating Cortical Motifs in Spontaneous Membrane Potential Fluctuations In Vivo. *Neuron*, 53(3):413–425, 2007.
- J. Müller, M. Ballini, P. Livi, Y. Chen, M. Radivojevic, A. Shadmani, V. Viswam, I. L. Jones, M. Fiscella, R. Diggelmann, A. Stettler, U. Frey, D. J. Bakkum, and A. Hierlemann. High-resolution CMOS MEA platform to study neurons at subcellular, cellular, and network levels. *Lab on a Chip*, 15:2767–2780, 2015.
- K. Muramoto, M. Ichikawa, M. Kawahara, K. Kobayashi, and Y. Kuroda. Frequency of synchronous oscillations of neuronal activity increases during development and is correlated to the number of synapses in cultured cortical neuron networks. *Neuroscience letters*, 163(2):163–165, 1993.
- T. Noda and H. Takahashi. Anesthetic effects of isoflurane on the tonotopic map and neuronal population activity in the rat auditory cortex. *European Journal of Neuroscience*, 42(6):2298–2311, 2015.
- M. E. J. Obien, K. Deligkaris, T. Bullmann, D. J. Bakkum, and U. Frey. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in Neuroscience*, 8:423, 2014.

- J. O'Keefe and J. Dostrovsky. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1):171–175, 1971.
- J. O'Keefe and L. Nadel. *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press, USA, 1978.
- M. W. Oram, M. C. Wiener, R. Lestienne, and B. J. Richmond. Stochastic nature of precisely timed spike patterns in visual system neuronal responses. *Journal of neurophysiology*, 81(6):3021–3033, 1999.
- G. Orbán, P. Berkes, J. Fiser, and M. Lengyel. Neural Variability and Sampling-Based Probabilistic Representations in the Visual Cortex. *Neuron*, 92(2):530–543, 2016.
- D. Panas, H. Amin, A. Maccione, O. Muthmann, M. van Rossum, L. Berdondini, and M. H. Hennig. Sloppiness in Spontaneously Active Neuronal Networks. *Journal of Neuroscience*, 35(22):8480–8492, 2015.
- V. Pasquale, P. Massobrio, L. L. Bologna, M. Chiappalone, and S. Martinoia. Self-organization and neuronal avalanches in networks of dissociated cortical neurons. *Neuroscience*, 153(4):1354–1369, 2008.
- T. Petermann, T. C. Thiagarajan, M. A. Lebedev, M. A. L. Nicolelis, D. R. Chialvo, and D. Plenz. Spontaneous cortical activity in awake monkeys composed of neuronal avalanches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37):15921–15926, 2009.
- C. Petersen, T. Hahn, M. Mehta, A. Grinvald, and B. Sakmann. Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23):13638–13643, 2003.
- A. Peyrache, M. Khamassi, K. Benchenane, S. I. Wiener, and F. P. Battaglia. Replay of rule-learning related neural patterns in the prefrontal cortex during sleep. *Nature Neuroscience*, 12(7):919–926, 2009.
- V. Pirino, E. Riccomagno, S. Martinoia, and P. Massobrio. A topological study of repetitive co-activation networks in in vitro cortical assemblies. *Physical Biology*, 12(1):1–15, 2015.
- D. Plenz and T. C. Thiagarajan. The organizing principles of neuronal avalanches: cell assemblies in the cortex? *Trends in Neurosciences*, 30(3):101–110, 2007.
- V. Priesemann, M. Wibral, M. Valderrama, R. Pröpper, M. Le Van Quyen, T. Geisel, J. Tri-

- esch, D. Nikolić, and M. H. J. Munk. Spike avalanches in vivo suggest a driven, slightly subcritical brain state. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8:108, 2014.
- J. Pu, H. Gong, X. Li, and Q. Luo. Developing neuronal networks: self-organized criticality predicts the future. *Scientific Reports*, 3:1081, 2013.
- D. Purves and J. W. Lichtman. Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4466):153–157, 1980.
- M. Rabinovich, R. Huerta, and G. Laurent. Transient dynamics for neural processing. *Science*, 321(5885):48–50, 2008.
- N. Raichman and E. Ben-Jacob. Identifying repeating motifs in the activation of synchronized bursts in cultured neuronal networks. *Journal of Neuroscience Methods*, 170(1):96–110, 2008.
- A. D. Reyes. Synchrony-dependent propagation of firing rate in iteratively constructed networks in vitro. *Nature Neuroscience*, 6(6):593–599, 2003.
- T. L. Ribeiro, S. Ribeiro, H. Belchior, F. Caixeta, and M. Copelli. Undersampled Critical Branching Processes on Small-World and Random Networks Fail to Reproduce the Statistics of Spike Avalanches. *PLoS ONE*, 9(4):e94992, 2014.
- J. D. Rolston, D. A. Wagenaar, and S. M. Potter. Precisely timed spatiotemporal patterns of neural activity in dissociated cortical cultures. *Neuroscience*, 148(1):294–303, 2007.
- F. Rosenblatt. The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological review*, 65(6):386–408, 1958.
- M. E. Ruaro, P. Bonifazi, and V. Torre. Toward the neurocomputer: image processing and pattern recognition with neuronal cultures. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 52(3):371–383, 2005.
- M. V. Sanchez-Vives and D. A. McCormick. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nature Neuroscience*, 3(10):1027–1034, 2000.
- T. Sasaki, N. Matsuki, and Y. Ikegaya. Interneuron firing precedes sequential activation of neuronal ensembles in hippocampal slices. *European Journal of Neuroscience*, 39(12):2027–2036, 2014.
- M. S. Schroeter, P. Charlesworth, M. G. Kitzbichler, O. Paulsen, and E. T. Bullmore. Emer-

- gence of Rich-Club Topology and Coordinated Dynamics in Development of Hippocampal Functional Networks In Vitro. *Journal of Neuroscience*, 35(14):5459–5470, 2015.
- R. Segev, M. Benveniste, Y. Shapira, and E. Ben-Jacob. Formation of electrically active clusterized neural networks. *Physical Review Letters*, 90(16):168101, 2003.
- R. Segev, I. Baruchi, E. Hulata, and E. Ben-Jacob. Hidden Neuronal Correlations in Cultured Networks. *Physical Review Letters*, 92(11):118102, 2004.
- G. Shahaf and S. Marom. Learning in networks of cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 21(22):8782–8788, 2001.
- W. L. Shew, H. Yang, T. Petermann, R. Roy, and D. Plenz. Neuronal Avalanches Imply Maximum Dynamic Range in Cortical Networks at Criticality. *Journal of Neuroscience*, 29(49):15595–15600, 2009.
- W. L. Shew, H. Yang, S. Yu, R. Roy, and D. Plenz. Information Capacity and Transmission Are Maximized in Balanced Cortical Networks with Neuronal Avalanches. *Journal of Neuroscience*, 31(1):55–63, 2011.
- W. L. Shew, W. P. Clawson, J. Pobst, Y. Karimippanah, N. C. Wright, and R. Wessel. Adaptation to sensory input tunes visual cortex to criticality. *Nature Physics*, 11(8):659–663, 2015.
- C.-W. Shin and S. Kim. Self-organized criticality and scale-free properties in emergent functional neural networks. *Physical Review E*, 74(4):045101, 2006.
- D. Silver, A. Huang, C. J. Maddison, A. Guez, L. Sifre, G. van den Driessche, J. Schrittwieser, I. Antonoglou, V. Panneershelvam, M. Lanctot, S. Dieleman, D. Grewe, J. Nham, N. Kalchbrenner, I. Sutskever, T. Lillicrap, M. Leach, K. Kavukcuoglu, T. Graepel, and D. Hassabis. Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. *Nature*, 529(7585):484–489, 2016.
- S. T. Sipila. Depolarizing GABA Acts on Intrinsically Bursting Pyramidal Neurons to Drive Giant Depolarizing Potentials in the Immature Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 25(22):5280–5289, 2005.
- C. V. Stewart and D. Plenz. Homeostasis of neuronal avalanches during postnatal cortex development in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*, 169(2):405–416, 2008.

- D. Sussillo and L. F. Abbott. Generating coherent patterns of activity from chaotic neural networks. *Neuron*, 63(4):544–557, 2009.
- S. Takahashi. Episodic-like memory trace in awake replay of hippocampal place cell activity sequences. *eLife*, 4, 2015.
- C. Tetzlaff, S. Okujeni, U. Egert, F. Wörgötter, and M. Butz. Self-Organized Criticality in Developing Neuronal Networks. *PLoS Computational Biology*, 6(12):e1001013, 2010.
- M. Tsodyks, T. Kenet, A. Grinvald, and A. Arieli. Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5446):1943–1946, 1999.
- E. Tulving. *Elements of Episodic Memory*. OUP Oxford, 1985.
- J. van Pelt, P. S. Wolters, M. A. Corner, W. L. C. Rutten, and G. J. A. Ramakers. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 51(11):2051–2062, 2004.
- V. Villette, A. Malvache, T. Tressard, N. Dupuy, and R. Cossart. Internally Recurring Hippocampal Sequences as a Population Template of Spatiotemporal Information. *Neuron*, 88(2):357–366, 2015.
- D. Wagenaar, T. B. DeMarse, and S. M. Potter. MeaBench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis. In *Neural Engineering, 2005. Conference Proceedings. 2nd International IEEE EMBS Conference on*, pages 518–521. IEEE, 2005.
- D. Wagenaar, Z. Nadasdy, and S. Potter. Persistent dynamic attractors in activity patterns of cultured neuronal networks. *Physical Review E*, 73(5):051907, 2006a.
- D. A. Wagenaar, J. Pine, and S. M. Potter. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neuroscience*, 7:11, 2006b.
- X. Wang, T. Lu, R. K. Snider, and L. Liang. Sustained firing in auditory cortex evoked by preferred stimuli. *Nature*, 435(7040):341–346, 2005.
- J. Wei, W. Bai, T. Liu, and X. Tian. Functional connectivity changes during a working memory task in rat via NMF analysis. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9:2, 2015.
- S. Wichert, K. Fokianos, and K. Strimmer. Identifying periodically expressed transcripts in microarray time series data. *Bioinformatics*, 20(1):5–20, 2003.

- M. A. Wilson and B. L. McNaughton. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5172):676–679, 1994.
- A. Wohrer, M. D. Humphries, and C. K. Machens. State-Dependent Propagation of Neuronal Sub-Population in Spontaneous Synchronized Bursts. *Progress in Neurobiology*, 103(193):156–193, 2013.
- X. Wu, Y. Fu, G. Knott, J. Lu, G. Di Cristo, and Z. J. Huang. GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons. *Journal of Neuroscience*, 32(1):331–343, 2012.
- Y. Yada, R. Kanzaki, and H. Takahashi. State-Dependent Propagation of Neuronal Sub-Population in Spontaneous Synchronized Bursts. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10: 28, 2016.
- Y. Yada, T. Mita, A. Sanada, R. c. Yano, R. Kanzaki, D. J. Bakkum, A. Hierlemann, and H. Takahashi. Development of neural population activity toward self-organized criticality. *Neuroscience*, 343:55–65, 2017.
- H. Yang, W. L. Shew, R. Roy, and D. Plenz. Maximal variability of phase synchrony in cortical networks with neuronal avalanches. *Journal of Neuroscience*, 32(3):1061–1072, 2012.
- A. Zandvakili and A. Kohn. Coordinated Neuronal Activity Enhances Corticocortical Communication. *Neuron*, 87(4):827–839, 2015.



# 業績リスト

## 査読付き論文誌（英文）

- [1]. Yuichiro Yada, Takeshi Mita, Akihiro Sanada, Ryuichi Yano, Ryohei Kanzaki, Douglas J. Bakkum, Andreas Hierlemann and Hirokazu Takahashi. “Development of neural population activity toward self-organized criticality,” *Neuroscience*, 343:55-65, 2017
- [2]. Yuichiro Yada, Ryohei Kanzaki and Hirokazu Takahashi. “State-dependent propagation of neuronal sub-population in spontaneous synchronized bursts,” *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10:28, 2016

## 査読付き論文誌（和文）

- [1]. 矢田祐一郎，神崎亮平，高橋宏知，“状態空間モデルと先導空間活動パターンによる培養神経回路バースト活動の再構成，” 電気学会論文誌 C（電子・情報・システム部門誌），電気学会，153(8):971-978，2015
- [2]. 矢田祐一郎，芳賀達也，宮廻裕樹，高山祐三，深山理，星野隆行，満淵邦彦，“シミュレーションを用いた神経回路網可塑的变化のテタヌス刺激位置依存性の検討，” 電気学会論文誌 C（電子・情報・システム部門誌），電気学会，133(8):1485-1492，2013

## 査読付き国際学会

- [1]. Yuichiro Yada, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, “Dimensionality reduction of massively recorded activity reveals sequential structure and state-dependency in dissociated neurons,” 10th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays (MEA meeting 2016), Reutlingen, Germany, June 2016
- [2]. Hirokazu Takahashi, Shusaku Yasuda, Yuichiro Yada, Ryohei Kanzaki, “Reservoir computing with dissociated neuronal culture,” 10th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays (MEA meeting 2016), Reutlingen, Germany, June 2016
- [3]. Yuichiro Yada, Takeshi Mita, Ryohei Kanzaki, Douglas Bakkum, Hirokazu Taka-

- hashi, " Identification of diverse synchrony pattern in dissociated cortical culture using Bayesian non-negative matrix factorization, " 7th International IEEE EMB Conference on Neural Engineering (NER) , pp. 344-347, Montpellier, France, April 2015
- [4]. Yuchiro Yada, Osamu Fukayama, Takayuki Hoshino, Kunihiro Mabuchi, " Estimating stationary functional connection underlying switching-state network activity, " 9th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays (MEA meeting 2014), Reutlingen, Germany, July 2014
- [5]. Yuichiro Yada, Toru Kurihara, Shigeru Ando, " Lateral and rotational displacement measurement using dual mode reflector and multizeros optical beam, " SICE Annual Conference (SICE) 2012, pp.1934-1938, Akita, Japan, August 2012
- [6]. Toru Kurihara, Yuichiro Yada, Shigeru Ando, Qi Yulan, Emiko Sano, Hajime Nakajima, " Use of retroreflector and multi-zeros optical beam for remote monitoring of lateral deformation, " 2012 Ninth International Conference on Networked Sensing Systems (INSS), pp.1-4, Antwerp, Belgium, June 2012

#### 査読無し国際学会・ワークショップ

- [1]. Yuichiro Yada, Shusaku Yasuda, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " Goal-directed behavior of a cultured neuron robot through reservoir computing, " Neural Coding Workshop 2016, Cologne, Germany, September 2016
- [2]. Yuichiro Yada, Kaori Furuike, Takeshi Mita, Ryohei Kanzaki, Douglas Bakkum, Hirokazu Takahashi, " A switch to readout internal memory in cortical cultures, " 10th FENS Forum of Neuroscience, Copenhagen, Denmark, July 2016
- [3]. Yuichiro Yada, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " Shared sub-sequences in multiple spatiotemporal patterns in living neuronal network, " INCF Japan Node International Workshop 2015, Tokyo, Japan, November 2015
- [4]. Shusaku Yasuda, Yuichiro Yada, Takeshi Mita, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " FORCE learning implemented with a living neuronal network, " INCF Japan Node International Workshop 2015, Tokyo, Japan, November 2015
- [5]. Ryuichi Yano, Takeshi Mita, Yuichiro Yada, Douglas Bakkum, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " Estimation of Neuronal Migration Distance in Dissociated Culture on High Density CMOS Micro-Electrode Array, " INCF Japan Node International Workshop 2015, Tokyo, Japan, November 2015
- [6]. Yuichiro Yada, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " Shared sub-sequences in multiple spatiotemporal patterns in living neuronal network, " INCF Japan Node International Workshop 2015, Tokyo, Japan, November 2015

- [7]. Shusaku Yasuda, Yuichiro Yada, Takeshi Mita, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " FORCE learning implemented with a living neuronal network, " INCF Japan Node International Workshop 2015, Tokyo, Japan, November 2015
- [8]. Ryuichi Yano, Takeshi Mita, Yuichiro Yada, Douglas Bakkum, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " Estimation of Neuronal Migration Distance in Dissociated Culture on High Density CMOS Micro-Electrode Array , " INCF Japan Node International Workshop 2015, Tokyo, Japan, November 2015
- [9]. Yuichiro Yada, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " Coordinated activation of neuronal patterns in synchrony of dissociated cortical neurons, " Society for Neuroscience 2015, Chicago, USA, October 2015
- [10]. Yuichiro Yada, " Characterization of synchrony repertory diversification during maturation of cortical cultures, " 2nd Neuro CMOS Workshop, Kobe, Japan, January 2015
- [11]. Yuichiro Yada, " Reproducible spatial activity pattern in cortical network burst, " Neuro CMOS Workshop, Tokyo, Japan, May 2014
- [12]. Yuichiro Yada, Tatsuya Haga, Osamu Fukayama, Takayuki Hoshino, Kunihiko Mabuchi, " Multiplicative-STDP Learning Rule Shows Pathway Specificity, " 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Osaka, Japan, July 2013

## 国内学会・ワークショップ

- [1]. 安田秀策, 矢田祐一郎, 三田毅, 神崎亮平, 高橋宏知, "神経細胞の分散培養系によるリザバー計算, " 電気学会 医用・生体工学研究会, MBE-16-026, 東京, 3月, 2016
- [2]. 安江秀太, 安田秀策, 矢田祐一郎, 神崎亮平, 高橋宏知, "リザバー計算に基づく培養神経回路の状態制御, " 電気学会 医用・生体工学研究会, MBE-16-024, 東京, 3月, 2016
- [3]. 矢野隆一, 三田毅, 矢田祐一郎, Douglas Bakkum, 神崎亮平, 高橋宏知, "分散培養系における神経細胞の移動, " 電気学会 医用・生体工学研究会, MBE-16-024, 東京, 3月, 2016
- [4]. 古池香里, 矢田祐一郎, 三田毅, Douglas Bakkum, 神崎亮平, 高橋宏知, "培養神経回路の同期バースト発生を担う細胞群の探索, " 電気学会 医用・生体工学研究会, MBE-16-023, 東京, 3月, 2016
- [5]. Yuichiro Yada, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " Independency and predictability in synchronization patterns of cultured cortical networks, " SICE LE2015, 飯塚, 9月, 2015
- [6]. Shuta Yasue, Shusaku Yasuda, Mustapha Tolba, Yuichiro Yada, Takeshi Mita, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, " Embodiment of Neural Network Model with

- Plasticity,” SICE LE2015, 飯塚, 9月, 2015
- [7]. Shusaku Yasuda, Yuichiro Yada, Takeshi Mita, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, “ Complex temporal pattern generation from cultured neurons with FORCE learning,” SICE LE2015, 飯塚, 9月, 2015
- [8]. Ryuichi Yano, Takeshi Mita, Yuichiro Yada, Douglas Bakkum, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, “ Verification of Estimated Neuronal Soma Location and Migration Distance in Dissociated Culture on High Density CMOS Electrode Array,” SICE LE2015, 飯塚, 9月, 2015
- [9]. Kaori Furuike, Yuichiro Yada, Takeshi Mita, Douglas Bakkum, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi, “ Identification of a source of synchronized bursting in cultured neuronal networks,” SICE LE2015, 飯塚, 9月, 2015
- [10]. 矢田祐一郎, 神崎亮平, 高橋宏知, “ Functional sub-network of leader neurons in self-organized dissociated cortical network,” 第38回日本神経科学大会, 神戸, 7月, 2015
- [11]. 矢田祐一郎, 眞田章広, 三田毅, 神崎亮平, Douglas Bakkum, 高橋宏知, “ 培養神経回路における神経雪崩現象と同期パターン相関,” 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋, 5月, 2015
- [12]. 安田秀策, 矢田祐一郎, 三田毅, 神崎亮平, 高橋宏知, “ 培養神経細胞によるFORCE学習を用いたロボット制御,” 電気学会 医用・生体工学研究会, MBE-15-045, 東京, 3月, 2015
- [13]. 眞田章広, 矢田祐一郎, 三田毅, 矢野隆一, 神崎亮平, 高橋宏知, “ 高密度 CMOS アレイ上の培養神経回路の神経雪崩現象の発達過程,” 電気学会 医用・生体工学研究会, MBE-15-037, 東京, 3月, 2015
- [14]. 矢田祐一郎, 三田毅, 神崎亮平, 高橋宏知, “ Age-dependent diversity of spontaneous synchrony in dissociated cortical network,” 脳と心のメカニズム 第15回冬のワークショップ, ルスツ, 1月, 2015
- [15]. 矢田祐一郎, 眞田章広, 神崎亮平, 高橋宏知, “ Reproducible spatial activity pattern in cortical network burst: characterization with non-negative matrix factorization,” 第37回日本神経科学大会, 横浜, 9月, 2014
- [16]. 眞田章広, 矢田祐一郎, 三田毅, 神崎亮平, 高橋宏知, “ 高密度 CMOS アレイ上の培養神経回路の成熟と神経雪崩現象,” 電気学会 電子・情報・システム部門大会, TC4-32, 松江, 9月, 2014
- [17]. 矢田祐一郎, 神崎亮平, 高橋宏知, “ 状態空間モデルと先導空間活動パターンによる培養神経回路バースト活動の再構成,” 電気学会 電子・情報・システム部門大会, TC4-24, 松江, 9月, 2014
- [18]. 矢野隆一, 三田毅, 矢田祐一郎, Douglas Bakkum, 神崎亮平, 高橋宏知, “ 神経細胞の分散培養系におけるシナプス活動依存的な細胞移動,” 電気学会 電子・情報・システム部門大会, 松江, 9月, 2014

- [19]. 安田秀策, 矢田祐一郎, 三田毅, 神崎亮平, 高橋宏知, “ ケージド化合物を用いた光刺激による神経細胞分散培養系の活動制御, ” 電気学会 電子・情報・システム部門大会, 松江, 9月, 2014
- [20]. 矢田祐一郎, 深山理, 星野隆行, 満洲邦彦, “ 高次状態遷移型移動エントロピーを用いた神経システムにおけるバースト伝達構造解析, ” 第 26 回自律分散システム  $\hat{u}$  シンポジウム, 2B2-4, 東京, 1月, 2014
- [21]. 矢田祐一郎, 芳賀達也, 深山理, 星野隆行, 満洲邦彦, “ 電気刺激による皮質培養神経回路 網可塑性の制御に向けて-結合評価手法の改良と結合状態依存刺激の検討-, ” 電気学会 電子・情報・システム部門大会, TC1-10, 北見, 9月, 2013 年
- [22]. 矢田祐一郎, 栗原徹, 安藤繁, 佐野恵美子, 仲嶋一, “ リトロリフレクターと多重零点光ビームによる横変位の分離と遠隔計測, ” 応用物理学関係春期連合講演会, 17p-B9-3, 東京, 3月 2012 年

## 受賞

- [1]. 電気学会 平成 27 年 電子・情報・システム部門誌 論文奨励賞, 2016
- [2]. 電気学会 平成 26 年 電子・情報・システム部門大会 優秀論文発表 A 賞, 2015
- [3]. 電気学会 平成 25 年 電子・情報・システム部門誌 論文奨励賞, 2014
- [4]. SICE Annual Conference 2012 Young Author ' s Award, 2012
- [5]. 国際学生対抗バーチャルリアリティコンテスト IVRC 2011 岐阜 VR 大賞 ( 総合第 3 位 ), ソリッドレイ研究所賞, DCEXPO/ConTEX 賞, 2011

# 謝辞

本学位論文は、筆者が東京大学 大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻に在籍した3年間に実施した研究の成果をまとめたものである。研究の遂行、及び本論文の執筆にあたり、本当に多くの方々にご協力を頂いた。ここに感謝を述べる。

本論文の主査であり、指導教員である東京大学 先端科学技術研究センター 高橋宏知講師には、非常に多岐に渡るご指導、ご協力を頂いた。博士課程から神崎高橋研究室の門を叩いた筆者を指導教員として快く受け入れて頂き、非常にのびのびと自由に、そして楽しく快適に研究を進める環境を提供して下さいました。研究結果が出た時や、論文を書き上げた時には、講師室に籠って何時間にもわたって熱心に議論をし、論文の書き方を懇切丁寧に指導して頂いた。さらに、研究内容そのものだけではなく、研究に対する姿勢や哲学、共同研究の広げ方、研究費の申請方法など、本当に数多くのことを学ばせて頂き、また筆者の研究を紹介する数多くの機会をご提供頂いた。ここに心からの感謝の意を表する。

東京大学 先端科学技術研究センター 神崎亮平教授には、副査として本学位論文の審査をお引き受け頂いただけでなく、博士課程で研究を進めるにあたり、日頃から研究室でのセミナーを通して様々なご助言を頂いた。先端科学技術研究センター長となられてからも、ご多忙にも関わらず何かにつけて気にかけて頂き、労いと激励の言葉を頂いたことは非常に研究の励みとなった。

東京大学 大学院総合文化研究科 池上高志教授には、副査として審査をご担当頂き、解析手法や結果の解釈に関して多くのご指摘、ご助言を頂いた。博士課程を通して、共同セミナーなどで筆者の研究に対して度々鋭いご指摘や新しい視点からの解釈をご提供下さった。

東京大学 大学院情報理工学系研究科 國吉康夫教授には、副査として審査をお引き受け頂き、序論での議論の進め方や各章での研究の関連性など、本論文をまとめるために有意義なご助言を頂いた。

東京大学 大学院工学系研究科 神保泰彦教授には本論文の副査をお引き受け頂いた。神保先生は本論文で扱った分散培養神経回路と多点電極アレイ法の研究の先駆者であり、先生から実験技法の記述や結果の解釈などについて数多くの的確なご指摘を頂いたことは論文をまとめる上で大変重要であった。

以上、大変ご多忙ながらも合間を縫って本論文の副査をお引受け頂き、大変貴重なご助言、

ご指摘を下さった先生方に深い感謝の意を表する。

本研究を進めるのに不可欠であった高密度 CMOS 電極アレイ HiDens は、スイス連邦工科大学チューリヒ校 Andreas Hierlemann 教授からご提供頂いた。HiDens の実験系を運用するにあたっては、同 Urs Frey 博士、Douglas Bakkum 博士の協力無しでは成し得なかった。また、Andreas Hierlemann 教授、及び Douglas Bakkum 博士には、学術雑誌論文の共著者として、何度もアドバイスと添削を頂いた。さらに、本課程中に Andreas Hierlemann 教授の研究室に滞在させて頂き、高密度 CMOS 電極アレイの実験技術について学んだことは、研究を進めるにあたり貴重な経験となった。同研究室の皆様、特に HiDens での電気刺激について技術的な助言を頂いた Jan Muller 博士、Milos Radivojevic 氏、滞在をサポートして頂いた Wei Gong 氏、そして高密度 CMOS 電極アレイの管理を担当して頂いた Alexander Stettler 氏、Albert Martel 氏に感謝を表する。

I would like to show my sincere gratitude to Prof. Andreas Hierlemann, Dr. Urs Frey and Dr. Douglas Bakkum (Bioengineering Laboratory (BEL), ETH) for kindly providing the CMOS MEA system to our laboratory and giving us continuous support. Prof. Andreas Hierlemann and Dr. Douglas Bakkum also patiently helped me when submitting a paper to a journal, as co-authors. I also greatly thank to all the members in BEL, especially to Dr. Jan Muller and Mr. Milos Radivojevic for technical advices about electrical stimulation on CMOS MEAs, to Ms. Wei Gong for kind support during my stay at BEL, and to Mr. Alexander Stettler and Mr. Albert Martel for the daily management of packaging and shipping of the CMOS MEAs.

また、東京大学 先端科学技術研究センター 神崎高橋研究室の皆様からは有形無形の数多くのご協力を頂いた。

特に、博士課程の先輩である三田毅氏には、分散培養神経回路での実験技法から高密度 CMOS 電極アレイの計測系構築まで、実に多くのことを教えて頂いた。実験系にトラブルが生じる度に、一緒に原因を考えて頂いたことは研究を進める上で非常に大きな支えとなった。

研究室で共に分散培養神経回路を対象とした研究を行った、修士課程の眞田章宏氏、安田秀策氏、矢野隆一氏、鹿山敦至氏、藤田裕介氏、安江秀太氏、卒論生の古池香里氏、角田颯飛氏、Mustapha Tolba 氏には、実験の準備や試薬、機材の発注など、様々な場面で協力を頂いた。博士課程院生として彼らの研究を指導したり、彼らと議論する中で自らが学ぶことは多く、また彼らの成長を実感することは筆者の喜びであった。貴重な機会を頂いたことに感謝の意を表する。

白松（磯口）知世博士には、様々な場面でご相談に乗って頂いた。最も身近な博士号取得者として、学位取得までの体験談を伺うことができたことは、博士論文を執筆する上で大きな助けとなった。Lisandro Kaunitz 博士には、著者が学術雑誌に論文を投稿する際に、文章を添削しながら論文の執筆方法を体系だって丁寧に教えて頂いた。博士課程の石津光太郎氏とは、近い時期に博士課程に進学した者同士、切磋琢磨しながら研究を進める事ができた。彼の直向

きで堅実な研究に対する姿勢には感銘を受けた。博士課程の和家尚希氏とは、互いの研究に留まらず、新しい研究構想など日々様々な議論で盛り上がり、彼の闊達さからは多くの刺激を貰った。修士課程の曾我遼氏とは、修了時期が重なったこともあり、研究対象は違うながらも共に行動する事が多く相談を受けることも多かった。修士課程を通しての彼の成長は大いに刺激となった。

また、研究、執筆の合間にささやかな息抜きとして曾我遼氏、鹿山敦至氏、協力研究員の藤原真奈氏らと卓球を楽しむことができたことは、博士課程を最後まで息切れせずに走り抜くための助けとなった。先端科学技術研究センターに卓球場を開設下さった神崎亮平センター長にも御礼を申し上げる。

安藤規泰特任講師、櫻井健志特任講師、光野秀文助教、並木重宏特任講師、加沢知毅特任研究員からは、研究室セミナーを通して多くのご助言を頂いた。加沢知毅特任研究員は研究室セミナー以外でも鋭いご意見やアドバイスを下さり、大変に研究の助けとなった。

博士課程の宮本大輔氏は研究室のサーバー管理をご担当下さった。サーバーやネットワークにトラブルがあった時に、いつも迅速に修正して頂けたことは本当に助けとなった。

研究室秘書の木村立代氏、岩月知香氏には、物品購入や書類手続きなど、研究を円滑に進める上で欠かせない多岐に渡るサポートをして頂いた。特に木村立代氏には、研究費の管理をして頂き、また筆者が海外滞在中に書類提出を代行して頂くなど、本当にお世話になった。技術補佐員の糸井川茜氏、中島裕子氏、土屋純子氏にも実験準備のご協力や、暖かいご支援を頂いた。

ここに以名前を挙ることが出来た方以外にも多くの方々から、研究を進め、本論文を執筆する上で欠かせなかった数多くの優しさをご支援を頂いた。ここに深い感謝の意を表する。

また、筆者は博士課程在学中の3年間に、独立行政法人日本学術振興会に特別研究員として採用して頂き、給与と研究費を支給して頂いた。生活面に不安がなかったからこそ研究に安心して打ち込むことができた。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、この3年間にとどまらず、これまでいつも変わらずに筆者を見守り、そして応援し続けてくれた父・博昭と母・恵美子、妹・恵理奈、そして祖父母に心から感謝する。