多層ニューラルネットワークによる 生体神経回路網における神経活動パターン特徴抽出の試み

An attempt of feature extraction of neuronal activity patterns in living neuronal network, by multi-layered artificial neuronal network

> 作田 尋路 工 Hiromichi Sakuta Sug

工藤 卓 ^{CA} Suguru N. Kudoh

関西学院大学 理工学部 人間システム工学科 Human System Interaction, School of Sci and Tech, Kwansei Gakuin University

To elucidate the brain function, it is important to understand dynamics of nonlinear neuronal activity patterns. In this study, we attempted to extract features of activity patterns including evoked responses in the cultured rat neuronal network. Thus, we employed the multi-layered artificial neural network (ml-ANN) as the Deep-Learning method with stacked-autoencoder as the pre-training method to classify the network activity. As the result, activity pattern 2 seconds after the electrical stimulation was barely classified, however, discrimination ability of ml-ANN against the activity pattern of later time domain after the stimulation was not enough to classify the patterns of evoked responses, because of the insufficient amount of learning-data, which is difficult to be gathered in large quantities. This indicates a huge number of pre-learning data is absolutely necessary to improve the discrimination accuracy in order to identify patterns by the Deep-Learning method for large phenomena with "fluctuation" such as neural activity.

1. はじめに

脳の情報処理機序の解明には、生体神経回路網における非 線形な神経電気活動パターンを解析し、そのダイナミクスを理 解することが重要である.また、このように電気生理学的アプ ローチで脳の情報処理について研究することは、より高度な脳 型情報処理システムを構築する上での基礎となる可能性を秘 めている.そこで、近年培養神経回路網における電気活動の時 系列パターンを、リカレントニューラルネットワーク(RNN) により抽出する等の研究が行われている[安江 2016].神経電 気活動の特性上、生波形データを単純に入力するだけでは学習 がうまくいかないことが予想される.

このような背景から、本研究では脳の機能を本質的に保持 した小規模モデルとしてラット海馬分散培養系を用いて、生体 神経回路網において電気刺激印加に伴う誘発応答を含む神経電 気活動パターンの解析を行った.近年、Deep Learning (DL) が高い性能を発揮している.特に、畳み込みニューラルネット ワーク (CNN) であれば畳み込み層とプーリング層を積み重ね て特徴抽出を行う等、動物の視覚情報処理とよく似た処理で あるため、画像認識に特に親和性が高い.ただし、DL は大規 模なデータで学習することが前提である.本研究では、時空間 情報の連続性をうまく保持するよう入力画像データを作成し、 積層オートエンコーダを事前学習手法として利用し、特徴抽出 を試みた.大量のデータを用いるのが困難である in vitro 生 体データに対しても DL 手法が有効であるか検討した.

2. 実験・解析手法

2.1 ラット海馬分散培養系

胚齢 18 日齢(E18)のウィスターラット(Jcl:Wistar,日本クレア)の胎児大脳海馬領域を摘出し,分散培養を行った. 底面に微小電極が配置された特殊な培養皿である MED プローブ(α-Med サイエンティフィック)において,10 分間のトリ プシン処理により十分に解離分散された神経細胞を中央の電極 上に播種した. これを 37 ℃・5 % CO₂ のインキュベータ内 で培養し,神経回路網を再構築させた.本研究において行った 動物実験は,全て「関西学院大学動物実験管理規定」に則り, 動物実験委員会の承認を得た上で行った.

2.2 細胞外電位計測システム(MED64 システム)

生体神経回路網における神経電気活動の計測には、細胞外 電位多点計測システム (MED64 システム, α-Med サイエン ティフィック)を使用した.本研究で用いた多点電極培養皿で ある MED プローブには、底面の中央部分に 64 個の平面微小 電極が8×8の格子状に配置され、その外側に4個の参照電 極が配置されており、これらの電位差を計測することによって、 神経電気活動を細胞外電位として 64 点から非侵襲で長期間同 時計測することが可能で、神経ネットワークにおける電気活動 の時空間的特性を解析することができる.本研究では、神経細 胞近傍の細胞外を計測し、これをサンプリング周波数 10 kHz, 量子数 12 bit でデジタル化して、コンピュータのハードディ スクに保存した.また本システムは、参照電極と64個の電極 から任意に選んだ電極との間に電圧を加えて、最大2点まで 細胞に定電流刺激を行うことが可能である. 電気刺激には同形 の方形波パルスを双極で適用した. 計測の際には、培養液を細 胞外記録溶液(Rec.Sol.)に液置換した.

2.3 電気刺激に伴う誘発応答を含む神経電気活動の計測

胚齢 18 日,培養日数 29-65 日(E18DIV29-65)の神経回 路網において,電気刺激印加による誘発応答を含む電気活動 を MED64 システムを用いて 10 分間計測した.計測には,当 研究室でプログラミング言語 LabVIEW を用いて独自開発し た計測用プログラムである Spike_Recoder(SPR)プログラ ムを用いた.実験するにあたって,まず MED プローブ上の 8 × 8 の 64 電極のうち 2 点 A, B を選択し,計測開始から 30 s 毎に「電気刺激なし・電極 A に刺激・電極 B に刺激」と いう 3 種類の刺激パターンを 10 s 間隔毎にランダムに切り替 え,個別の神経回路網に対して計測時間が終了するまで電気刺 激と電位計測を繰り返した(図 1).このとき選択した刺激電 極番号と実際の刺激順序を同時に記録した.

連絡先: 工藤卓, 関西学院大学 理工学部 人間システム工学科, 神経知能工学研究室 (NIE-Lab), 兵庫県三田市学園 2 丁 目 1 番地, 079-565-7244, snkudoh@kwansei.ac.jp



図 1: 電気刺激実験スキーム.

計測した波形データから,当研究室で独自開発した SPike_Counter (SPC) プログラムを用いて,神経電気活 動スパイクを検出し,同様に当研究室で独自開発した SPC_analyser プログラムによって,計測時間内におけるタイ ムスタンプデータ (ms)を抽出した.

2.4 時系列情報と空間的位置情報を含む入力画像デー タの作成

計測時間分の10分間のタイムスタンプ系列データを40ms の時間窓幅で区切り、全64 電極分の細胞外電位スパイク数を逐 次求めた.本研究と同じ条件の実験系において,時間窓幅を変 えながら全64 電極分のスパイク数を生体神経回路網による情 報表現としてまとめた.1次元データ集合に対して、X-means 法によるクラスタリングを行った結果、出力されたクラスタ数 が最も多くなり、最も多くのパターンが表現された時間窓幅が 30-40 ms であったという報告があるため、時間窓幅を 40 ms とした [Okada 07]. 算出した時間窓幅 40 ms におけるスパイ ク数を1ピクセルの輝度とし、これを2s分まとめて画像化し たデータを作成した.本研究においては計測時間を10分とし たため、1 画像として 3200 (64 × 50) 次元のデータ 300 個 からなる入力データセットを作成したことになる.1画像を2 s 毎のデータ集合とした理由は、本研究と同じ条件で実験した 際に、直前の刺激入力の履歴が持続する時間、即ち、神経細胞 の内部状態の持続時間が約2sであったと報告されているから である [Ito 16]. 以上の操作により, 作成した入力画像の縦軸 方向には神経活動パターンの時間的関係性、横軸方向に空間的 関係性を保持した入力画像データを作成した.



図 2: 神経活動の時空間パターンの特徴を表現した画像データの作成法の概要.



図 3: 自発性神経活動パターンの画像化データの例 (E18DIV51).

2.5 解析手法

2.5.1 積層オートエンコーダによる活動パターン識別

本研究において用いた積層オートエンコーダ(Stacked Autoencoder, SAE) は、オートエンコーダ (AE) を複数積み重 ね多層化した Deep Learing の学習モデルの一種である.本研 究では4層からなる多層ニューラルネットワーク(mL-ANN) を構成し、SAE によるプレトレーニング(事前学習)とファ インチューニング(微調整)を行った.まず入力データ集合に 対して、教師なし学習として SAE のプレトレーニングを行っ た(図 4). 一般的に DL を行う際は,入力データとして大量 のデータを与え、正則化項を目的関数に踏まえ、更にドロップ アウトの処理を行う等,過学習が起こらないように様々な工夫 を行うことで汎可性を高める.しかし、本研究においては神経 電気活動の実験データ毎に特異的な特徴量を抽出し、強く特徴 を表現することを目的として、むしろ過学習するように学習さ せた. プレトレーニングにおいては, 損失関数には最小二乗誤 差,活性化関数には sigmoid 関数,勾配降下法の最適化アル ゴリズムには Adam を用いた. これは本研究の前段階として AE の有効性を確認した際に用いたものと一致させた.

続いて、多層パーセプトロンの学習手法である Backpropagation (BP) により、刺激の有無、刺激電極の任意の違いに より神経電気活動パターンが識別されるよう、ファインチュー ニングを行った (図 5). プレトレーニングによって得られた 各層の重みやバイアス項を初期値としたネットワークに対し て,出力層として3次元のノードを追加し,更に正解ラベル (分類ラベル)を与えて教師あり学習を行い、ネットワークの 最適化を行った.また出力層の活性化関数には softmax 関数 を用いることで、最上層である3つのノード値をそれぞれ、3 種類の刺激パターンのいずれかという確率として扱った. また テストデータに対して識別を行った結果の正答率を、出力層に おける3つのノードのうち最も確率の高かったものと正解ラ ベルを比較して一致した確率と定め、活動パターンの識別精 度の指標とした.ファインチューニングにおいては、損失関数 には交差エントロピー,隠れ層の活性化関数には ReLU 関数, 勾配降下法の最適化アルゴリズムには Adam を用いた.

学習率の大きさと識別精度との関係性と,重み及びバイア ス項の更新を固定する層の違いによる活動パターンの識別精度 を比較した.また,全部で 300 個ある入力データを全て,プ レトレーニングに用いる学習データ及びファインチューニング に用いるテストデータとして用いた.これは,本研究の目的は 未知データに対する識別より,識別に有効な特徴量を抽出する ことであるため過学習が起こる方が都合が良いと考えたためで ある.



図 4: SAE におけるプレトレーニングの概要.



図 5: mL-ANN におけるファインチューニングの概要.

以上の解析を行うプログラムは全て, Tensorflow ライブラ リを用いて Python3 で独自に作成した.

2.5.2 刺激直後2sの入力画像データに対するパターン識別

「電気刺激なし・電極 A に刺激・電極 B に刺激」という 3 つの刺激パターンそれぞれの刺激直後 2 s の神経電気活動を入 力データとして解析した.これにより,電気刺激の影響が最も 強く表われているであろう神経電気活動データのみを入力デー タとして用いたことになる.刺激直後のより誘発応答に着目 することになり,活動パターンが精度良く識別されると予想し た.作成した画像データを入力として,事前学習として SAE による特徴抽出を行った後,多層パーセプトロンによるパター ン識別を行った.

また、この刺激直後2sのデータを入力として、SAEにおける エンコードを畳み込み層とプーリング層によって行い、デコーダ としてアップサンプリングと逆畳み込みの処理をする積層畳み 込みオートエンコーダ (Stacked Convolutional Autoencoder, SCAE) による解析も行った.入力データを画像データとして 作成したため、データに空間的な特徴が含まれる場合に、より 精度良く識別できると考えた.畳み込み層においては3×3 のフィルターにかけて畳み込み処理を行い、プーリング層にお いては、画像化データの縦軸・横軸ともに画像の解像度が半分 になるよう、特徴マップを作成した.この得られた特徴マップ に対して逆畳み込みの処理を行い、入力データを再構成した.

3. 実験結果·考察

前処理として入力データに対して標準化を行い,スパース性 に対して精度良く適用される線形主成分分析(線形 PCA)に より,累積寄与率がほぼ1になるように予め次元削減した.こ れは本研究の前段階として,神経電気活動データに対する AE の有効性を確認した際に,予め線形 PCA によって入力データ の冗長性を省くことで,制限を設けることで AE と等価とな る線形 PCA と比しても精度良く次元削減されたためである.

電気刺激印加による誘発応答を含む 10 s の神経活動から生 成した画像データを入力として、 プレトレーニング時の学習率 0.1, ファインチューニング時の学習率 0.01 とした際に,パラ メータの更新が固定される層の違いによって活動パターンの識 別精度を比較した結果、「第1層・最上層の重みを固定」した 場合に 36.0 ± 0.61 % (平均±標準誤差),「第1層の重みだけ 固定 | した場合に 33.9 ± 0.24 % (平均±標準誤差),「全ての 層の重みが可変」である場合に 33.8 ± 0.11 % (平均±標準誤 差),「最上層の重み以外固定」した場合に 34.9 ± 0.56 % (平 均±標準誤差)となり、「第1層・最上層の重みを固定」、「第1 層の重みだけ固定」,「全ての層の重みが可変」,「最上層の重み 以外固定」の順に僅かながら識別精度が高く,「第1層・最上 層の重みを固定」と「第1層の重みだけ固定」,「第1層・最上 層の重みを固定」と「全ての層の重みが可変」の間に有意差が あった (p<0.01). いずれも識別精度の平均値が 40 %に満た ず識別できなかったが、ファインチューニング時に少なくとも 第1層の重み更新を行わないように設定することで精度が上 がる可能性が示唆された(図6).



図 6: 重み固定される層の違いによる比較, (N = 25, E18DIV29-65, ウィルコクソンの符号付順位検定:*p<0.01).

プレトレーニング時及びファインチューニング時の学習率設 定の違いによる識別精度を比較した結果、プレトレーニング 時の学習率 0.1、ファインチューニング時の学習率 0.01 とし た際には 36.0 ± 0.61 %(平均±標準誤差)、プレトレーニン グ時の学習率 0.001、ファインチューニング時の学習率 0.1 と した際には 33.7 ± 0.22 %(平均±標準誤差)となり、プレト レーニング時の学習率が大きい方が識別精度が若干高くなり、 有意差が見られた(p<0.01、図 7).しかし、プレトレーニン グ時及びファインチューニング時の学習率を反転させても、依 然として識別精度は 40 %に満たなかった.この原因としては、 電気刺激を印加したことによる誘発応答を含んだ神経電気活動 パターンは、刺激を印加した直後は活動パターンの特異性が強 いが、次の刺激を印加するまでの後半部分のデータにおいては 前の刺激に対する履歴より自発的活動の影響の方が強く、1つ の刺激に対するパターンのゆらぎが大きいことが考えられる.



図 7: 学習率の違いによる識別精度の比較, (エラーバーは標準 誤差, N = 25, E18DIV29-65, ウィルコクソンの符号付順位 検定:*p<0.01).

以上のように、電気刺激を印加してから 10 s 間の実験デー タを入力として用いた場合には、神経の活動パターンを精度良 く識別することは難しかった.これは刺激印加から時間が経つ につれて、刺激に対する誘発応答を含む神経電気活動パターン がこの手法で識別され得る形で発現していないということで、 履歴性をうまく抽出できなかった可能性が考えられる.

以上の結果から,次の刺激を印加するまでの後半部分のデー タに前の刺激に対する履歴の影響が小さく、本手法では検出で きない可能性が高いため、刺激を印加した直後の2s間のデー タ以外を省いた入力画像データセットを作成して解析した.全 データを用いたときと同様、まず標準化した上で、線形 PCA による次元削減を累積寄与率がほぼ1になるように行った.こ の結果,ファインチューニング後の活動パターンの識別精度が 63.1 ± 2.24 % (平均値±標準誤差)となり、全データを用い たときと比較して約2倍精度良く識別でき、有意差があった (p<0.01,図8). 培養サンプルによっては80-90%の精度で 識別可能な神経回路網も存在した. これは入力として用いる刺 激後のデータを刺激直後のパターンに限定することで、入力 データの次元が少なくなったことにより、データのばらつきが 小さくなり識別されやすくなったことと、刺激による直接的な 誘発応答パターンのみ識別対象としたため再現性が高くなった ことが考えられる.



図 8: 入力データの違いによる活動パターン識別精度の比較, (エラーバーは標準誤差, N = 25, E18DIV29-65, ウィルコク ソンの符号付順位検定:*p<0.01).

さらに,エンコード部分で畳み込み処理を行う SCAE を用 いることで,入力データの局所的な特徴により着目し特徴抽出 を行うことができると考え,プレトレーニングに SCAE を用 いて識別精度を求めた.しかし,各識別精度は,プレトレーニ ングを SAE を用いた場合に 63.1 ± 2.24 % (平均値±標準誤 差), SCAE を用いた場合には 39.7 ± 1.94 % (平均値±標準 誤差)であった(図 9).ウィルコクソンの符号付順位検定を 行った結果,有意差が見られた(p<0.01).SCAE によって 識別精度が得られなかった原因としては,元々の入力データの 次元数が少ないところに畳み込み処理をすることにより識別の 空間解像度が低くなりすぎたことが考えられる.



図 9: プレトレーニングを SAE と SCAE による活動パターン 識別精度の比較, (エラーバーは標準誤差, N = 25, E18DIV29-65, ウィルコクソンの符号付順位検定:*p<0.01).

4. 結論

本研究では、ラット海馬から調製した生体神経回路網に対し て, 電気刺激印加することで誘発される応答活動電位を含む神 経電気活動を DL 手法で解析した. 計測した生波形データから 時空間的関係性が保持されるように入力画像データを作成し, 事前学習として SAE を用いてパラメータを決定し、多層パー セプトロンとして BP によって神経電気活動のパターン識別を 行った. 電気刺激印加後 10 s 間の電気活動から作成したデー タを入力として用いた場合,神経電気活動パターンを識別する ことは難しかった.一方,刺激直後2s間分の電気活動データ のみを入力とした場合は識別精度が上がり、刺激直後のパター ンに限定することである程度精度が向上することが示唆され た. 以上のことから、一定の分類基準に対して「ゆらぎ」の大 きい現象について DL の手法によってパターン識別を行い、識 別精度を向上させるには、事前学習データ及びファインチュー ニングを行う入力データとして、相当膨大な数の入力データを 確保する必要があることが示唆された.

参考文献

- [安江 2016] 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」, 電気学会研究会資料 医用・生体工学研究会 MBE-16-022 048: pp.17-22, 2016.
- [Okada 07] T. Okada, W. Minoshima, H. Ito, S. N. Kudoh, "Analysis of transition of spontaneous electrical activity patterns in cultured neuronal networks", Proceedings of Life Engineering Symposium 2016 (LE2016), pp. 102-105, 2016.
- [Ito 16] Hidekatsu Ito, Wataru Minoshima, Suguru N. Kudoh, Relationships between stimulus interval and changes of firing properties, Proc. Soft Computing and Intelligent Systems (SCIS) 2016 and 17th International Symposium on Advanced Intelligent Systems(ISIS), pp. 722-723.