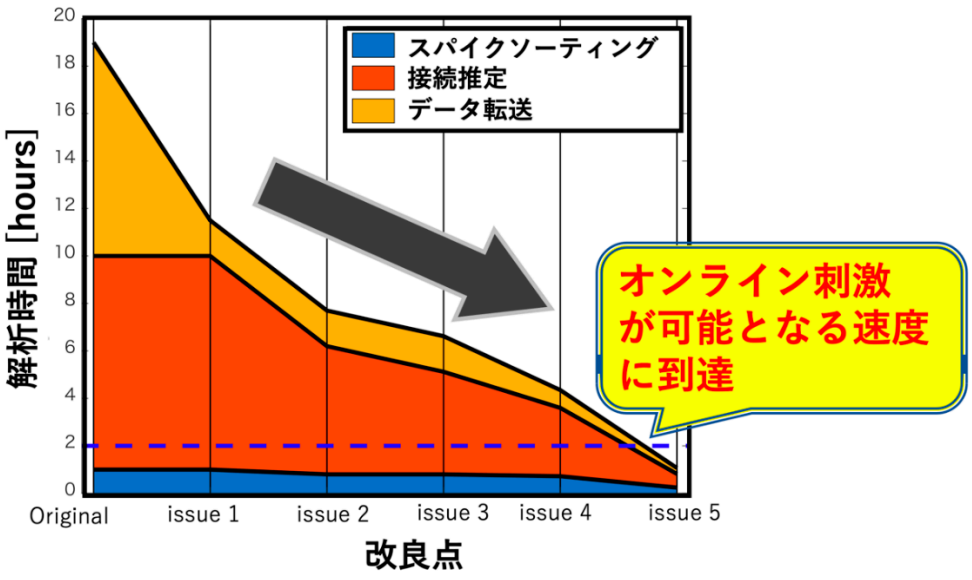
82　多神経細胞間での情報流ネットワークの制御	下野　昌宣

【目的】脳は、極めて非均一に分布した細胞群により構成されている。そのため、一つ一つの細胞のシステム全体への寄与度は極めて異なっている。この様な系を刺激するならば、とりわけ影響力の持つ細胞を選んで刺激することで、刺激の効率を高めることが出来ると期待される。そこで、本研究では、脳－神経系の不均一に分布している超多数細胞（～1,000 個）から計測した高次元時系列から、有望な刺激対象を個々の細胞の“影響度”に基づいて絞り込み、“影響度”の高い細胞群（数個）をターゲットとした刺激や組み合わせの効果を定量評価し、刺激対象自体の最適化を図ろうとしている。刺激対象となる細胞群を選ぶためには、選ぶための事前データを計測し、解析を終わらせた上で、刺激実験を行わなくてはならない。しかし、時間が経つと組織の状態が変わる可能性もあるため、状態把握のための解析後は、出来るだけ早めの刺激が望まれる。そこで、解析時間の短縮が肝要であった。

【方法】解析時間の短縮が乗り越えようとしていたハードルである。本研究では、マウスから摘出した脳スライスから MEA（多電極アレイ）装置を使用してニューロンスパイクを電気計測した。そのデータの解析方法は主に 3 つのステップから構成される。1. 多電極の計測点ごとでの時系列を、細胞ごとの時系列に変換するスパイクソーティングし、2. 細胞の時系列から細胞間の因果的な相互作用ネットワークの接続推定し、3. 推定した相互作用ネットワークのトポロジーを定量化することでの影響力の高い細胞を抽出する、という 3 ステップである。step1、2 は、元々の環境では数時間から半日以上かかる処理であり、step3 でかかる時間は数分であった。step3 の処理は、他のステップと比べると計算時間は現在のところ問題にならなかった。その解析以外に、計測装置から解析サーバーへのデータ転送の時間が必要であったため、step1、step2 の解析時間とデータ転送の時間の短縮が焦点であった。

【結果】解析速度向上の模索：サイエンスとして未知の知見を、今も探求中であるが、本報告書では解析速度向上の現状を報告する。図は、元々かかっていた時間に対する課題一つ一つを解決するごとに、スパイクソーティング（Spike Sorting）、結合推定（Connectivity inference）、データ転送時間（Transmission）のそれぞれが、どの程度に短縮されたかを記している。現時点までの地道な積み重ねにより、目標としたところまでの解析の高速化に成功した。今後、この基盤技術を活かした、ダイナミックなネットワーク制御を通じて、新たな生命現象の発見に向けた研究を進めてゆく。

五段階での課題解決による解析時間の短縮状況



82. 多神経細胞間での情報流ネットワークの制御

下野　昌宣

京都大学 大学院医学研究科 人間健康科学専攻 情報理工医療学講座

Key words：神経細胞，オンライン化，因果性，ネットワーク，制御

緒　言

脳は、極めて非均一に分布した細胞群により構成されている。そのため、一つ一つの細胞のシステム全体への寄与度は極めて異なっている。この様な系を刺激するならば、とりわけ影響力の持つ細胞を選んで刺激することで、刺激の効率を高めることが出来ると期待される。そこで、本研究では、脳－神経系の不均一に分布している超多数細胞（～1,000 個）から計測した高次元時系列から、有望な刺激対象を個々の細胞の“影響度”に基づいて絞り込み、“影響度”の高い細胞群（数個）をターゲットとした刺激や組み合わせの効果を定量評価し、刺激対象自体の最適化を図ろうとしている。刺激対象となる細胞群を選ぶためには、選ぶための事前データを計測し、解析を終わらせた上で、刺激実験を行わなくてはならない。しかし、時間が経つと組織の状態が変わる可能性もあるため、早めの刺激が望まれる。そこで、出来る限り早く解析を終わらせる必要があるのである。上原記念生命科学財団のご支援を受けて、過去一年の中で、必要を満たす解析の高速化が達成されたと共に、細胞間相互作用を興奮性のみではなく抑制性の検出も可能として、さらに “影響度”の高い細胞の抜き出しと生理学的な意味づけに成功したので、ここに報告する。今後も、さらに継続して展開させてゆく予定である。

方　法

特に、計算速度の加速が本プロジェクトにおいて乗り越えようとしていたハードルである。そのため、要旨においては、計算時間を説明する事前知識として、実験からデータ解析の流れを概観する。1. 簡明な実験の説明に続けて、2. データ解析の部分の説明、3. 計算速度の評価の順番で説明する。

1. 準備

本実験は、京都大学医学部動物倫理委員会に承認された。まず、溶液を作製した。500 mL の氷冷 cutting solution 溶液（切削液、pH7.3～7.4）と、1L の aCSF（人工脳髄液、～34℃、pH7.3～7.4）を調製した。cutting solution は 2.5 mM KCl、1.25mM NaH_2PO_4、7 mM $MgCl_2$、15 mM グルコース、25 mM $NaHCO_3$、0.5 mM $CaCl_2$、11.6 mM アスコルビン酸ナトリウム、3.1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 mM コリンコリンクロリドの混合液である。また、aCSF は 127 mM NaCl、2.5 mM KCl、1.25 mM NaH_2PO_4、1 mM $MgCl_2$、15 mM グルコース、25 mM $NaHCO_3$、2 mM $CaCl_2$の混合液である。

2. スライス作製

次に、計測するための脳スライスを準備した。マウス（メス、C57BL/6J、n＝6、3～5 週齢）に 1%～1.5% イソフルランで十分に麻酔をかけてから脳を摘出した。その後、脳を冠状面の中央で切断し、切断した 2 つの脳ブロックを瞬間接着剤で固定した。この脳をペトリ皿に入れた氷冷 cutting solution 溶液に浸し、95%O_2 および 5%CO_2でバブリングしながら、ビブラトームを使って脳のスライスを作製した。この時ビブラトームの切断速度、振動数、振幅のパラメーターは最適化した。スライスをカットしながら、前後座標、半球、その他の条件の情報をフォーマットで記録した。また、残った脳ブロックで 3D スキャンを行うことで、スライスの位置を記録した。

3. 多電極（Multi-electrode array: MEA）計測

先ほど作製した脳スライスから MEA（多電極アレイ）装置を使用して、ニューロンスパイクを電気計測した。脳スライスを予め 4℃に温めておいた aCSF で満たしたビーカーに静かに移し、1 時間インキュベートした。MEA の記録領域は 2×4 mm であり、26,000 個の電極が均一に配置されていた（電極間距離は 15 μ m）。その後、スライスを傷つけないように太いピペットを使ってチップに乗せたスライスを動かし、柔らかい筆でその位置を微調整することで特定の脳領域から適切に記録できるようにした。メイン計測をする前に 30 秒間のプレスキャンを実行し、メイン計測で使用するために強い反応のある 1,020 個のセンサーを選択した。その後、センサーを使用して、自発的な神経活動を 2.5 時間計測した。計測中も aCSF の温度は約 34℃に保ち、バブリングしながら灌流した。

4. データ解析

1）スパイクソーティング

MEA で神経活動を計測した後は、SpyKING CIRCUS ソフトウェアを使用してスパイクソーティングを行った［4］。このソフトウェアに使われるアルゴリズムの主な強みは、テンプレートマッチング手法に基づきスパイクをニューロンに分類するため、低い計算コストでも非常に正確に計算できるところである。多数の電極を使うため、計算コストが低いことは大きな利点となった。まず、スパイクはハイパスフィルタ処理した時系列にバターワースフィルタをかけたものから、標準偏差線の 6 倍を閾値として検出される。フィルタの次数は 3、カットオフ周波数は 500 Hz であった。外部ノイズによって発生した疑似相関を削除するために、スパイクが現れなかった 20 秒のデータを使って白色化した。その後、ランダムに選択したピークポイントの周りの 5 つの時間セクションとして波形を分離した。次に、半径 150 μ m 以内の複数のグループに一度分割された個々の波形グループに対して、クラスタリングを実行した。このステップは、必要な計算メモリを削減するために SpyKING CIRCUS に実装されたものである。最大 10,000 サンプルの波形データが 5 次元の主成分空間に投影された。この次に、密度ベースのクラスタリングを実行した。これは、個々のクラスターの中心に位置する局所的な密度ピークを推定し、ピーク周囲の他のサンプルを集めるものである［2］。また、ノーマライズした距離が標準偏差の 3 倍より小さい異なるクラスターを繰り返しマージした。その後、テンプレートを個々のクラスターの 2 次元描写として推定した。2 つの次元は細胞外波形の平均と分散から構成され、両次元は、いわゆるシュミット分解の意味で最初の成分に直交する。テンプレートと生データの最初の構成成分、つまり波形との類似性に基づいて、同じ推定ニューロンに由来する個々のスパイクを 1 つずつ探した。異なるテンプレートがあまりにも類似している場合（相関係数＞0.975）、2 つのニューロンをマージした。最後に、ノイズの多いサンプルである可能性があるため、発火率が 0.2 Hz 未満のニューロンを削除した。

2）接続推定

計測終了後は、接続推定を行った。シナプス接続を介した因果的影響があるかどうかを評価する方法は非常に重要な問題であるが、理論的定式化と生理学的要求の両方において高度にバランスのとれた優位性が実証されている［3〜5］ため、因果的影響を定量化するために、トランスファーエントロピー（TE）を選択した。TE を利用した過去の研究によって、興奮性細胞における構造と機能間の関係［6, 7］、パッチクランプ実験とハブの存在との一貫したトポロジー［8］、および接続の強さが対数正規分布になることが実証されている［9］。本研究では、はじめて、TE に一工夫加えて SLTE （Sorted Local Transfer Entropy） という指標を合わせて用いた。大まかに言えば、SLTE で接続の興奮性か抑制性かを分類して、その後に、興奮性細胞、抑制性細胞のそれぞれで、TE を用いて接続の有無と、接続強度を算出した。本研究で使用している TE は、次のように表わされる。

$$TE_{J\to I}(d) = \sum_{i_t,\, i_{t-1},\, j_{t-d}} p(i_t, i_{t-1}, j_{t-d}) log\left(\frac{p(i_t|i_{t-1}, j_{t-d})}{p(i_t|i_{t-1})}\right)$$

$$SLTE_{J\to I}(d) = \sum_{i_t, i_{t-1}, j_{t-d}} p(i_t, i_{t-1}, j_{t-d})(-1)^{(i_t - j_{t-d})} log\left(\frac{p(i_t|i_{t-1}, j_{t-d})}{p(i_t|i_{t-1})}\right)$$

ニューロン j のスパイクアクティビティに関する情報を含めると、ニューロン i のアクティビティの予測が、ニューロン i の過去の単独での予測を超えて改善される場合、TE は正の値をとる。この式は、すべてのi_t、j_{t-d}、i_tに対する、$log\left(\frac{p(i_t|i_{t-1},j_{t-d})}{p(i_t|i_{t-1})}\right)$の期待値を定量化する。ニューロン i または j が、時間セクションにおいてアクティブであるか、アクティブでない場合に表現される、t のような時間の指標が与えられた i または j には、スパイクの場合は 1、スパイクのない場合は 0 のラベルが付けられる。対数（log）中の P に括られている分子は、i_{t+1}がj_{t-d}によってどれだけ制約されているかを表しているが、分母は過去のイベントi_tのみのi_{t+1}への制約を表している。これらの違いは、$t-d$の時のニューロン j の過去の状況が、ニューロン i 自身の過去に加えて、時間セクション $t+1$ の時のニューロン i の条件にどれだけ制約を与えるかを表している。SLTE は、$(-1)^{(i_t-j_{t-d})}$ を挟み込んでいることを除いて、TE を同じである。この部分は、i_tとj_{t-d}が同じだと（1）となり、i_tとj_{t-d}が異なると（−1）となる。いわゆる情報量では、起こりにくいイベントでの方が一度の事象の影響が大きい。つまり、発火して 1 になっている時の方が、発火していない 0 の状態よりも稀なために、ニューロン j では発火している状態の影響が大きく、$j_{t-d}=1$を前提として考える。その時、i_tとj_{t-d}が同じ／違うというのは、$i_t=1$（興奮性接続）／$i_t=-1$（抑制性接続）を意味するわけであり、この$(-1)^{(i_t-j_{t-d})}$の符号が、SLTE の合計を興奮性相互作用に対しては正に振り向け、抑制性相互作用に対しては負に振り向け流という“仕分ける”能力を有している。そこで、SLTE で興奮／抑制を分けたのちに（図 2a）、TE を用いて、（興奮細胞／抑制細胞ごとに）接続の有無の判定を行った（図 2b）。具体的には、ニューロン j からニューロン i へのシナプス接続を介した直接の因果的影響が存在するかどうかを判断するには、ヒストグラムのピークがどれだけ強く鋭いかということが不可欠である。そこで、TE のピーク強度値と、TE の遅延時間に依存した広がりのシャープさを評価する指標を表す指標の二次元空間の中で、100 個のジッタリングデータと比較して、“強く鋭い”ピークを検出し、接続の有無を判定した。

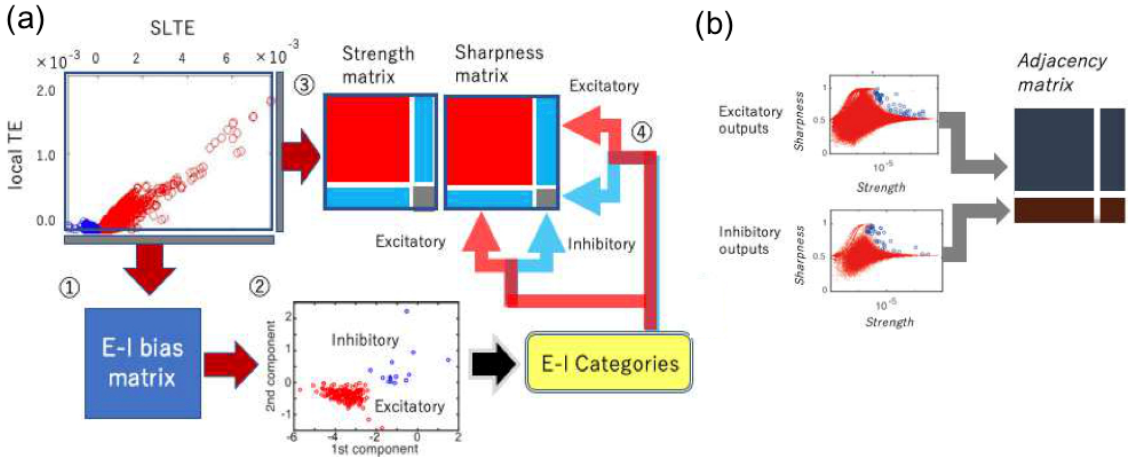


図 1. 新たに開発した接続推定解析の流れ：SLTE に基づく細胞分類（a）と TE に基づく結合性推定（b）の組み合わせ方式

a） 興奮性ニューロンと抑制性ニューロンへの細胞分類の処理：① まず、E-I バイアス（TE がピーク値を示す遅延での SLTE）を計算し、② 1〜5 番目の E-I バイアス値と 6〜10 番目の E-I バイアス値の平均値の 2 次元空間におけるクラスター化分布を観察して、正負の符号を決定。③ TE ヒストグラムから強度とシャープネスを計算し、④ ステップ②の分類に基づいて強度とシャープネスを興奮性と抑制性のグループに分けた。

b） 結合ニューロン対を決定するためにシャッフルデータを、興奮性と抑制性のグループごとに準備した。シャッフルデータと比較して、強いまたは鋭い接続を選んで、興奮性および抑制性ニューロンに対する接続性マトリックスを別々に作製した。

5. 代表的細胞の抽出方法

影響力が大きい細胞を選び出す手法は、サイエンスとして本質的に重要であるが、本研究で推し進めた論点である。本プロジェクトの申請時点では、“ハブ”の選択、と簡単な表現に留めていたが、その定義方針自体も成熟させた。例えば、中心性（細胞間ネットワーク内での位置取りがどのくらい中心的か）、制御性（他細胞を制御する上で重大な位置取りになっているか）を評価するが高いかの観点から評価して、重要な細胞を選出する方法を、解析—刺激システムに組み込んだ。事後評価の準備として染色との比較も極めて大切であるが、解析時間には大きく影響しない。そこで、本概要では、このステップの説明を控え気味にして、解析時間に関する代表図で全体を捉えられる流れで説明する。

結　果

1. 解析速度向上の模索

本報告書では解析速度向上の流れを①から順に報告する。サイエンスとして未知の知見を、今、探求中である。以下は、元々かかっていた時間に対する課題一つ一つを解決するごとに、スパイクソーティング（Spike Sorting）、結合推定（Connectivity inference）、データ転送時間（Transmission）のそれぞれが、どの程度に短縮されたかを記す。

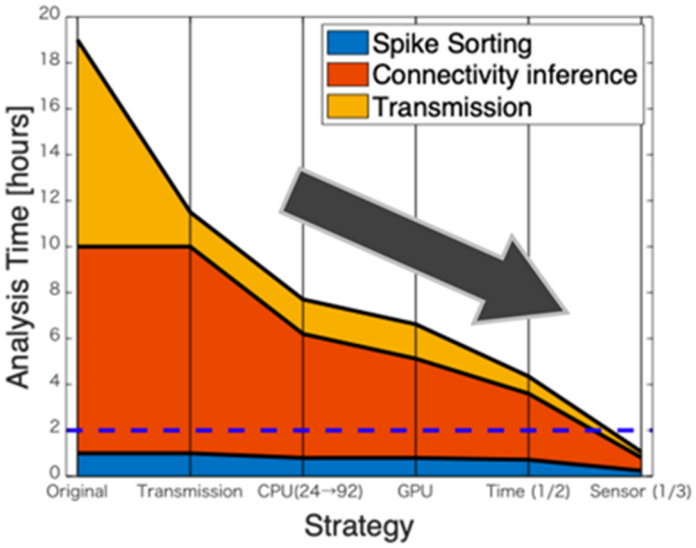


図 2.　課題解決に伴う解析時間の変化
横軸に、オリジナル（左端）から順に、順次、行った対策した内容である。また、
縦軸が計算に要した時間長を、解析の三つのステージごとに分けて表現している。

［課題 1］我々の研究環境で、整理実験室と計算機サーバー室は建物の端と端で隔たれている。例えば、我々の計測データでは 1 時間の計測でのデータ量が 130 GB に至るが、そのデータを計測サーバーへと転送するのに 1 時間以上かかっていた。しかし、理論値よりもはるかに遅かった。

［対策 1］サーバーと計測装置の間で、建物にはわされている配線を一つずつ追いかけて行った。すると、配線の中に、（100 mbps と）低速なケーブルが壁の中に埋め込まれていることが判明し、ケーブルを切り替えることで転送を 10 分程度に抑えた。

［課題 2］次に、直接的に加速する方法として、24 コアの並列マシンを有していたが、それに 92 コアの並列マシンを連携させた。CPU の並列数を高めたことで、解析速度は、元来 4 の 4〜5 倍になると期待していた。しかし、結果は必ずしも、その予想通りに運ばなかった。解析は、スパイクソーティング（（2）-1 参照）と結合推定（（2）-2 参照）から構成されるが、その二つの間で高速化を阻む課題は異なっていた。

［課題 2-1］結合推定のアルゴリズムは、CPU での並列処理が直接的に効くものであった。しかし、用いているソフトウェアである Matlab ライセンスで許容されている最大ワーカー数が 32 に制約されていた。
［対策 2-1-1］そのライセンスの契約状況の更新時期を待ち、40 ワーカーまでは増強した。（もともとはサーバー上での制約から 24 コアに 1： 1 対応させての 24 ワーカーが最大であった）
［対策 2-1-2］極めて並列性の高い部分（計算量の約 10～25%）について、GPU を導入して、接続推定解析の一部を CUDA という言語で記述し直すことで、100 倍程度は高速に計算可能とした。
［課題 2-2］スパイクソーティングのアルゴリズムに、逐次処理（一つが終わってから次を始めるという処理）のアルゴリズムが入りこんでおり、思ったほど速度が伸びなかった。これ以上、時間を縮めるには計測の計測時間もしくはセンサー数を減らすよりない。
［対策 2-2-1］まず計測時間の短縮を図ることとした。何度も検証をしたのだが、計測時間は思うほど効かないことが分かった。スパイクソーティングのアルゴリズムは、センサーを小さなグループに分けて、そのグループごとに逐次的に処理を進める。そのグループ一つ一つに掛かる処理には、最低は数分が必要となり、その上で、計測時間に応じた解析時間が上乗せされる様であった。そこで、用いるセンサー数を減らすことが有効であることが判明した。また、この頃になって、計測－刺激装置において、刺激できるセンサーが、計測に用いたセンサーのみであるという制約がある事が装置を開発した会社から知らされた。
［対策 2-2-2］そこで、センサー数の限定を進める訳だが、（計測領域内であれば、任意の刺激センサーが使える様に）、スキャンで用いるセンサーが計測領域を密に埋め尽くせる様な計測領域に狭めることが、基準となった。そうなると、計測範囲を 2 mm×4 mm から 1 mm×2 mm まで狭めるくらいが妥当であるとの結果が得られた。

考　察

様々な課題を超える対策の積み重ねにより、解析速度が目標値に到達した。今後、このオンライン制御を可能とする計測－解析環境を活かした、医療の発展につながりうる非自明な現象の発見に努めたいと思う。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院化学研究所 バイオインフォマティクスセンターの阿久津達也教授、台湾国立中央大学物理学科複雑科学センターの学生の Felix Goetze 君である。

文　献

1） Kajiwara, M., Nomura, R., Goetze, F., Akutsu, T., & Shimono, M. (2020). Inhibitory neurons are a Central Controlling regulator in the effective cortical microconnectome. bioRxiv. doi: 10.1101/2020.02.18.954016
2） Rodriguez, A., Laio, A. (2014). Machine learning. Clustering by fast search and find of density peaks. Science, 344(6191), 1492-1496. doi: 10.1126/science.1242072, PMID: 24970081
3） Lizier, J. T., Prokopenko, M., & Zomaya, A. Y. (2008). Local information transfer as a spatiotemporal filter for complex systems. Physical Review E, 77(2), 026110. doi: 10.1103/PhysRevE.77.026110, PMID: 18352093
4） Vicente, R., Wibral, M., Lindner, M., & Pipa, G. (2011). Transfer entropy--a model-free measure of effective connectivity for the neurosciences. Journal of computational neuroscience, 30(1), 45-67. doi: 10.1007/s10827-010-0262-3, PMID: 20706781
5） Wibral, M., Pampu, N., Priesemann, V., Siebenhühner, F., & Seiwert, H. (2013). Measuring Information-Transfer Delays. PLoS ONE, 8(2), e55809. doi: 10.1371/journal.pone.0055809 , PMID: 23468850

6) Stetter O, Battaglia D, Soriano J, Geisel T (2012) Model-free reconstruction of excitatory neuronal connectivity from calcium imaging signals. PLOS Computational Biology 8. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002653. PMCID: PMC3426566. PMID: 22927808.

7) Honey CJ, Kotter R, Breakspear M, Sporns O (2007) Network structure of cerebral cortex shapes functional connectivity on multiple time scales. Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 10240–10245. doi: 10.1073/pnas.0701519104, PMID: 17548818.

8) Shimono M, Beggs JM (2014) Functional clusters, hubs and communities in the cortical microconnectome. Cerebral Cortex. doi: 10.1093/cercor/bhu252, PMID: 25336598

9) Nigam S, Shimono M, Ito S, Yeh FC, Timme N, et al. (2016) Rich-club organization in effective connectivity among cortical neurons. Journal of Neuroscience 36: 670–684. doi:10.1103/PhysRevE.86. 016211, PMID: 23005511