神経回路網の形成制御に関する研究（第1報）*

—— 神経細胞培養のための細胞の初期分布密度について ——

菊池 誠** 白石 昌武***

A Study on Forming Control of a Nerve Circuit Network (1st Report)
— The Initial Distribution Density of a Cell for Nerve-Cell Cultivation —

Makoto KIKUCHI and Masatake SHIRAISHI

This study focuses on the construction of an information processing and control system using an actual cell. The emphasis is placed on both the initial location of a cell and the cellular distribution density when a nerve cell is cultivated. On the basis of physiological knowledge, a calculation program was made which simulated the activity of a nerve cell. Then, the excitation transmission from a cell was observed in the simulation by randomly changing the initial cell location. The transmission performance of the excitation was evaluated by using the transmission ability function defined in this study. It is found from simulation results that a nerve circuit network forms a closed circuit when the distribution density of a cell becomes large, although it is a barrier in transmitting the excitation. Further, the cellular distribution density shows its optimal value when a cell condition is adequately arranged. As a result, there is the possibility of controlling the performance of a nerve circuit network by changing the initial cell location.

Key words: cell cultivation, nerve circuit network, cell distribution density, information processing

1. 緒 言

生体機能を情報処理や制御工学に応用する研究が活発に行われている¹⁾。最近では生物の神経細胞を培養して情報処理装置として最適化する試みもなされている²⁾³⁾。神経細胞を平面状に配置し、細胞が生き続けるために表面にブドウ糖溶液の膜を作り、その溶液を常に新鮮に保てば神経細胞は数週間活動し続ける。現在、このような実験で実際の神経細胞の活動を観察し、刺激に対してどのような電気信号が発生するかの研究が着手され始めている。この分野の研究がさらに進展すれば、次の段階として神経回路網の形成を制御することが考えられるが、それに関するシミュレーション報告はまだない。培養実験では細胞の初期配置の決定は不可欠であり、特に細胞分布密度は、細胞を整列またはランダムに配置する場合でも決定しておく必要がある。この場合細胞分布密度が細胞培養時の回路網形成に影響を与えるとすると、その分布密度は注意深く決定されなければならない。しかしながら神経細胞培養時の細胞分布密度と、培養後の回路網の形成状態とを関連付けて考察した報告例はこれまでにない。

このような背景を踏まえ、本報告は神経回路網の形成制御に関して、神経細胞の平面的分布密度が成長後の神経回路網に与える影響についてシミュレーションにより考察したものである。具体的にはまず神経生理学の知見を基礎として、神経細胞が成長する過程を定性的に調べるためのシミュレータを計算機内に作成した。これを作成することで、従来の培養実験では得られなかった神経回路網形成過程の再現性が得られた。次に細胞分布密度を固定し、初期配置を乱数的に変化させた場合の培養シミュレーションを繰り返し、それによって回路網の情報伝達能

力の変化を求めた。これらについて細胞分布密度を変化させてシミュレーションによる考察を行った。その結果、神経回路網の形成制御に関するいくつかの知見が得られた。

2. 神経細胞の生理モデル

神経活動の正確なモデル化は困難である。そこで神経生理学で得られている知見³⁾⁵⁾を利用して単純化した数学モデルを作成し、それを基に神経細胞（以下、細胞と記す）を二次元的に配置したシミュレーションを行う。

2.1 神経細胞の生理学的特徴

細胞の性質は数多く知られているが、本研究ではその性質の中から関連する次の特徴を考察の対象とした^{4)~6)}。

- 1) 細胞は内部の神経成長因子 NGF (Nerve Growth Factor) 量の増加により、細胞探索用の軸索を段階的に伸ばす（以下、この現象を発芽と記す）。
- 2) 細胞には発芽可能な軸索数に上限があり、これに達すると NGF 量が増加しても発芽は起こらない。
- 3) 軸索は神経細胞を支持し、栄養を供給する細胞の間を NGF 濃度の高い方向に成長する（NGF に対して走行性を示す）。
- 4) 細胞が興奮した場合、シナプス前膜部から神経伝達物質が放出され、さらにシナプス後膜部からは NGF が放出される。この NGF はシナプス前膜部から探索細胞内に取り込まれ、軸索内部を通過して細胞中心部へ逆行輸送される。
- 5) 一つの細胞と結合できるシナプス数には上限がある（シミュレーションでは、シナプス数が上限に達した場合はその細胞を探索対象から除外する）。

2.2 NGF ガウス型分布モデル

NGF の拡散問題の簡略化を図るため、以下の NGF ガウス型分布モデルを提案する。まず NGF の拡散は中性子の拡散あるいは熱の拡散と同じ関係にあることを根拠に、ある細胞が放出

* 原稿受付 平成 10 年 4 月 7 日

** 学生会員 茨城大学大学院（日立市中成沢町 4-12-1）

*** 正 会 員 茨城大学工学部

する NGF は、細胞中心から離れるにつれて 2 次元ガウス型分布に従い拡散するものとする。次にその細胞が含んでいる NGF の総量は時間とともに変化すると仮定する。これらの仮定に基づくと、ある領域に N 個の細胞が存在している場合、任意の点 (x, y) における時刻 t での NGF 濃度は式(1)で求められる。

$$\phi(x, y, t) = \sum_{i=1}^N \frac{M_i(t)}{\pi a_0^2} e^{-\left(\frac{(x-p_{xi})^2 + (y-p_{yi})^2}{a_0^2}\right)} \quad (1)$$

ここで、 i 番の細胞中心座標を (p_{xi}, p_{yi}) 、中心での NGF 濃度を $M_i(t)$ 、 i 番の細胞の濃度が最大値の $1/e$ (約 37%) になる距離を a_0 とする。

このガウス型分布モデルに従うと、NGF 走行性により標的細胞を探索する探索力 F は式(2)となる。

$$F = \frac{\partial \phi(x, y, t)}{\partial x} \mathbf{i} + \frac{\partial \phi(x, y, t)}{\partial y} \mathbf{j} \quad (2)$$

ここで、 $\mathbf{i}, \mathbf{j}$ は x, y 方向の単位ベクトルを表す。式(1)を用いて式(2)を書き換えると、

$$F = \sum_{k=1}^N \left[\frac{2M_k(t)}{\pi a_0^4} \left\{ (x-p_{xk})\mathbf{i} + (y-p_{yk})\mathbf{j} \right\} e^{-\left(\frac{(x-p_{xk})^2 + (y-p_{yk})^2}{a_0^2}\right)} \right] \quad (3)$$

となる。

2.3 標的細胞探索モデル

前述の特徴 1)~5)に従い、細胞が軸索を伸ばし標的細胞を探索する過程を図 1 のようにモデル化した。この基本的考え方は、細胞 A の軸索が成長する場合、軸索は末端の NGF 濃度勾配を調べ、濃度が高くなる方向に末端を伸ばすというものである。図で、まず細胞 A の軸索は探索力に影響されて細胞 D を標的にし、次に軸索は細胞 D が結合しているシナプス数を調べる。細胞 D のシナプス数が上限に達している場合は、それを探索対象から除外する。再度式(1)により NGF 濃度分布を計算し、軸索は細胞 D を探索した時と同様に探索力が大きい細胞 B に向かって成長する。この作業を計算時間ごとに繰り返す。そして探索途中で標的細胞のシナプス結合が満たされると、軸索は新たな標的細胞を探索する。これが本モデルによる探索方法である。

Fig.1 Axon growth process model

2.4 興奮伝達モデル

一般に神経細胞が興奮すると軸索をインパルス信号が移動する。それがシナプス前終末 (図 2 ①) を経てシナプス終末ボタン (図 2 ②) の中にあるシナプス小胞 (図 2 ③) を刺激し、その際小胞内の伝達物質 TRS (Transmitter Substance) が約 10~50 nm のシナプス間隙に放出されて、シナプス下膜 (図 2 ④) の興奮や抑制を誘発する。この時、シナプス下膜とその周辺からは NGF が放出され、それがシナプス前終末で吸収されて軸索内部を通過し、興奮元の細胞内まで逆行輸送される。このよ

Fig.2 Model of the excitation transmission from No.(i) cell to No.(j) cell

うな神経細胞の興奮は細胞膜電位の変化として観察できる。その代表的な生理学的数学モデルは、Hodgkin-Huxley モデルである。これは生理学的知見と良く一致するが、全細胞について適用すると計算手順が煩雑になる。またこれまでのところシナプス伝達に関する適切なモデルは提案されていない。そこで本研究では、細胞内を伝達する興奮を連続するインパルス信号列と仮定して一つの興奮単位とみなし、この興奮が細胞間でシナプス伝達するモデルを図 2 のように表した。以下このモデルに従って考察する。

i 番の興奮細胞の軸索が j 番の細胞にシナプス結合した場合、 i 番の細胞から TRS を放出する度合いを表す係数 (以下、TRS 交換係数と記す) $K_t(i)$ を式(4)と定義する。

$$K_t(i) = K_{tm} \frac{1 - u_i}{1 + u_i} \quad (4)$$

ここで、 $u_i = \exp(-\lambda_i \cdot ex(i))$ 、 λ_i 、 K_{tm} は定数である。同様に j 番の細胞からの NGF 放出に関する係数 (以下、NGF 交換係数と記す) $K_n(j)$ を式(5)と定義する。

$$K_n(j) = K_{nm} \frac{1 - u_n}{1 + u_n} \quad (5)$$

ここで、 $u_n = \exp(-\lambda_n \cdot ex(j))$ 、 λ_n 、 K_{nm} は定数である。なお式(4)、(5)は神経細胞の興奮伝達特性として知られるシグモイド関数⁴⁾を基に定義した。これらの式は以下の式(8)の計算過程で $K_m(j)$ を構成する要素として用いられる。次に j 番の細胞が k 番の細胞から受け取る TRS 量を $M_t(j, k)$ とすると、 j 番の細胞内の TRS の総量 $M_{ta}(j)$ は、

$$M_{ta}(j) = \sum_{k=1}^{j-1} M_t(j, k) + \sum_{k=j+1}^N M_t(j, k) \quad (6)$$

となる。NGF に関しても同様に、 i 番の細胞が k 番の細胞から受け取る NGF 量を $M_n(i, k)$ とすると、 i 番の細胞内の NGF の総量 $M_{na}(i)$ は、

$$M_{na}(i) = \sum_{k=1}^{i-1} M_n(i, k) + \sum_{k=i+1}^N M_n(i, k) \quad (7)$$

となる。ここで TRS 量と NGF 量の時間的変化は式(8)に従うものとする。

$$\frac{d}{dt} \mathbf{X}_m(i, k) = \mathbf{K}_m(i), \quad \frac{d}{dt} \mathbf{X}_m(j, k) = -\mathbf{K}_m(j) \quad (8)$$

$$\mathbf{X}_m(i, k) = [M_n(i, k), M_t(i, k)]^T, \quad \mathbf{K}_m(j) = [K_n(j), -K_t(j)]^T$$

また、 j 番の細胞の興奮を式(9)で求める。

$$ex(j) = \frac{ex_m(j)}{1 + \exp(-\lambda_m(M_{ta}(j) - M_{th}))} \quad (9)$$

ここで、 $ex_m(j)$ は j 番の興奮の最大値、 M_{th} は細胞が発火する

しきい値を表す。

なおシナプス結合が進行すると各細胞内の TRS 量が変化し、さらにしきい値を超えると細胞は発火（興奮）して、出力としてその細胞のインパルス発射頻度が高くなると仮定した。この仮定はシナプスの可塑性、特にシナプス長期増強 LTP (Long Term Potentiation) という性質を根拠にしたものである。

3. 成長シミュレーション

式(1)~(9)及び拘束条件 1~5)に基づき、計算時間単位ごとに細胞の状態変数を更新する関数プログラムを作成した。計算ではプログラムの細胞番号を変え、単位平面内の細胞の状態を逐次求めて、細胞群全体の挙動を把握するようにした。プログラム言語は Turbo C++5.0 を使用した。図 3 にシミュレータのメイン関数部分の流れ図を示す。

Fig.3 Flow chart of the main function of growth process simulation

以下にシミュレーション結果を示す。細胞数 N は 30 個、1 細胞当たり形成できるシナプス数の上限（以下、シナプス受容限界と記す） p は 5 個、1 細胞当たりの軸索発芽数の上限（以下、軸索発芽限界と記す） q は 7 本とした。図 4(e) のような単位平面内で乱数的に細胞を配置し、細胞 A（図 4(e) 左上）だけを興奮させた。なお細胞の発芽を促進させるため、すべての細胞に対して NGF をわずかに与えるようにした。計算間隔は 1s とし、300s まで状態を更新させた。

図 4(a)~(e) はシミュレーション開始後 50~300s 間の神経回路網の成長過程を示す。図 4(e) において○印はシナプス、●印は細胞位置、⊗印は細胞が持続的興奮状態であることを示す。また、●印または⊗印間の折れ線部分（図 4(e) Axon）は軸索末端が標的細胞を探索した過程を、末端に○印が無い折れ線部分（図 4(e) ①）は探索途中、もしくは標的細胞を失った軸索を示す。なお図 4(f) は神経回路網が情報処理を行う上で影響を与える閉回路形成の例を示したものである。図 4(f) ②、③の回路網を観察すると回路網内部に入る軸索はあるが、外部へ出る軸索は存在しないことが目視により確認できる。

図 5 に 300s 後の NGF 濃度分布を示す。投与された NGF はシナプス結合の進行に伴い逆行輸送され、全体的とは言えない

Fig.4 Examples of the simulation results with the change of calculation time

Fig.5 Concentration distribution of NGF at calculation time of 300 s

までも各細胞に拡散しているのが確かめられる。

これらのシミュレーション結果は、従来から神経細胞の性質として知られる“軸索の NGF 走行性”を良く表現している⁴⁾。図 4(a)~(e) のシミュレーション結果では、閉回路は形成されず、単に興奮が細胞 A から B まで計算時間内に伝達していることがわかる。この場合閉回路が形成されるとすると、それは外部からのシナプス結合を受け入れはするが軸索を形成しない系となり、その結果情報を内部に閉じ込めて情報伝達側から見て情報

遮断壁のようにふるまうようになる。つまり情報伝達の低下となる。従って閉回路形成について考察することは情報学的な視点からも意義深い。このように作成したシミュレータにより、細胞の初期配置が培養後の閉回路の形成にどのような影響を与えるかを定性的に調べることが可能である⁷⁾⁸⁾。

4. 細胞分布密度と信号伝達能率の変化

細胞の分布密度が変化した場合、回路網内の信号伝達の様子がどのように変化するかをシミュレーションによって調べる。いま単位平面内に 22 個の細胞を乱数的に配置し、ある細胞 A から B まで興奮が伝達する状態を考える。2 個の細胞 A, B は平面内での位置が固定されており、残りの 20 個の細胞が配置を変えるものとする。この場合細胞 A, B 間の空間に閉回路が形成されると、閉回路は興奮伝達に対して一種の遮断壁となり、情報伝達上の抵抗となる。そこでこの抵抗を求める方法として次の伝達率 J を定義した。

$$J = 1 - \frac{T_c}{T_s} \quad (10)$$

T_s はシミュレーションの上限時間、 T_c は計算開始から細胞 B が興奮するまでの時間（伝達時間）である。式(10)において、 J は 0~1 までの値をとり、シミュレーション開始後直ちに伝達に成功した場合は 1、伝達に失敗した場合は 0 となる。

シミュレーションでは最初に配置細胞数 N を与え、配置番号 m を 1 として乱数的に配置パターンを決定し、シミュレーションの実行後伝達率 J を求めた。同様に配置番号 m を 10 まで変化させ、細胞数 N における平均伝達率 M_J と標準偏差 σ_J を求めた。つまり平均伝達率 M_J は閉回路形成についての指標を与えるものと考えられる。また標準偏差 σ_J と細胞数 N の比として伝達偏差率 R_J を式(11)のように定義した。

$$R_J = \frac{\sigma_J}{N} \quad (11)$$

伝達偏差率は 1 細胞当たりの標準偏差であり、細胞数 N の増加にともなう標準偏差の増加を考慮したものである。シミュレーションの流れ図を図 6 に、またその結果を図 7~図 10 に示す。なおこれらのシミュレーションでは、全体的な傾向を調べるため、シナプス受容限界 p と軸索発芽限界 q を変化させた。

図 7 は軸索発芽限界 q と細胞数 N を変えた場合の平均伝達率 M_J の変化を示す。全体の傾向として平均伝達率は $N=5 \sim 6$ で最大値を示し、細胞数 N が増加すると緩やかに減少している。このことは、情報を伝達する回路網には最適な細胞数が存在することを示唆している。単位面積当たりの細胞数という点を強調すれば、細胞分布密度についても同様のことが言える。また、図で軸索発芽限界が多くかつ細胞数が 10~15 個付近では、細胞数 1 個の変化に対して平均伝達率が大きく変化する（例えば、軸索発芽限界 $q=20$ の場合の 11~12 個付近、 $q=15$ の場合の 14~15 個付近、 $q=10$ の場合の 11~15 個付近）。なお $q=5$ では変化が比較的小さい。ここでは平均的な伝達率を対象としているため、このような急激な変化について究明することは困難であるが、一因として、何らかの非線形的な要因が閉回路の形成に複合的に作用してこのような変化が生じたものと考えられる。

図 8 はシナプス受容限界 p と細胞数 N を変えた場合の平均伝達率 M_J の変化を示す。全体の傾向はシナプス受容限界が 5 個の場合を除いて図 7 の結果と類似している。しかしシナプス受容限界の大小を比較すると、それが大きい場合は細胞数の増加

にともなう変化が小さい。細胞数が少ない場合、シナプス受容限界が 10 個を超えると、0.3 以上の平均伝達率を確保できる。言い換えるとシナプス受容限界がある値を超えないと、細胞数が変化しても平均伝達率は確保できない。また細胞数が 5 個付近では、シナプス受容限界が 10 個以上であれば平均伝達率はほとんど変化しない。

Fig. 6 Flow chart of transmission simulation

Fig. 7 Relation between the average transmission rate and the number of neurons

Fig. 8 Relation between the average transmission rate and the number of neurons

Fig.9 Relation between the transmission deviation rate and the number of neurons

5. 初期配置変動と信号伝達能率の変化

次に細胞の初期配置の乱数的な変化が平均伝達率に及ぼす影響を調べる。平均伝達率は初期配置だけが異なるシミュレーションを10回行った場合の伝達率の平均であり、伝達偏差率は伝達率の分散の程度を細胞1個あたりに換算した値である。従って伝達偏差率は、初期配置の分散が伝達率の分散に反映される度合いを意味する。初期配置が乱数的に決定されて毎回異なる場合、分散は大きいと判断できる。仮に初期配置が伝達率に影響を与えないとすると、伝達率は常に一定となって分散が0となるから、たとえ初期配置が分散しても伝達偏差率の値は細胞数によって変化しない。つまり伝達偏差率が細胞数に依存するならば、それは初期配置に影響される度合いを細胞数に対して表現しているものと考えられる。従って伝達偏差率は、初期配置が興奮伝達に及ぼす影響を考察するうえで重要となる。例えば伝達偏差率が大きい場合には、乱数的に変化する初期配置に影響されて回路網の情報伝達能力が変化する。このことは、初期配置が神経回路網の発達後の情報伝達能力に対し、何らかの制御因子となり得ることを示唆している。

図9は軸索発芽限界 q と細胞数 N を変えた場合の伝達偏差率 R_j の変化を示す。全体の傾向として細胞数が5個付近で最大値を示し、細胞数が増加すると緩やかに減少している。このことは、初期配置の乱数的な変動の影響を受けやすい細胞数が存在することを意味している。図9の場合、伝達偏差率が最大になる条件は、細胞数4個、軸索発芽限界20本、シナプス受容限界20個の場合で、伝達偏差率は約1.15、平均伝達率は約0.58である。軸索発芽限界が5個の場合を除けば、その限界の増加と共に伝達偏差率も高くなる。細胞数が増えた場合に伝達偏差率が減少する原因として、閉回路の形成が局部的に生じ、興奮の伝達を妨害したためと考えられる。また、細胞数が極端に少ない場合に伝達偏差率が減少する原因としては、探索細胞数の減少により結合パターンが限定されたことが挙げられる。

図10はシナプス受容限界 p と細胞数 N を変えた場合の伝達偏差率 R_j の変化を示す。シナプス受容限界が5個の場合を除けば、全体の傾向は図9の場合と同様であるが、軸索発芽限界の変化に比べてシナプス受容限界の変化は伝達偏差率に大きな影響を与えない。シナプス受容限界が5個の場合に伝達偏差率が極めて小さくなる原因としては、配置番号の最大値が10と少ないこと、及び平均伝達率の値が極端に小さく変化が少ないことが考えられる。一般にシナプス受容限界が小さくなると、結

Fig.10 Relation between the transmission deviation rate and the number of neurons

合が飽和して閉回路が形成されやすい。特に細胞が多い場合はその傾向が強くなる。

6. 結 言

本シミュレーション考察により以下の結果が得られた。

- (1) 細胞数が増加すると平均伝達率が低下することから、閉回路が形成されやすくなる。
- (2) 伝達時間で興奮伝達能力を評価した場合、平均伝達率が減少することから、閉回路は興奮伝達時の障害となる。
- (3) 細胞の軸索発芽限界やシナプス受容限界の能力から細胞密度には最適値がある。
- (4) ある条件下では、神経回路網の初期配置は興奮の伝達状態に影響を与えることができ、従って制御変数となり得る。

今後の課題として、入力細胞が増えた場合、閉回路の形成が入出力パターンとの関連においていかなる作用をするかを、細胞モデルを改良して調べる必要がある。

参 考 文 献

- 1) たとえば, M.Shiraishi: A Possibility of 1/f Evaluation on Surface Finishes Based on Fluctuation Behavior, Trans. ASME, J.Eng. Ind., 114, 2 (1992) 207.
- 2) 神保泰彦: 大脳皮質培養切片におけるてんかん様電気活動の観察, 第11回生体・生理工学シンポジウム論文集, (1996) 261.
- 3) 川口英夫, 福西宏有: 培養神経回路特性の光学的計測法を用いた観察, 第11回生体・生理工学シンポジウム論文集, (1996) 265.
- 4) 甘利俊一, 酒田英夫: 脳とニューラルネット, 朝倉書店, (1994) 186~202.
- 5) R.F.Schmidt 編 (内蘭耕二ら訳): 神経生理学, 金芳堂, (1992) 1~97.
- 6) 畠中 寛: 神経成長因子ものがたり, 羊土社, (1994) 41.
- 7) 菊池 誠: 神経軸索末端の探索モデルについて, 第14回シミュレーション・テクノロジー・コンファレンス発表論文集, (1995) 151.
- 8) 菊池 誠: 神経細胞の初期配置と閉回路網の形成, 第10回生体・生理工学シンポジウム論文集, (1995) 456.