

自由行動下ラット視床外側膝状体単一神経細胞の 慢性記録実験

平成 27 年 4 月 23 日受付

赤 崎 孝 文*

要 旨

視野情報を大脳一次視覚野に送っている視床外側膝状体 (LGN) の神経活動は、網膜細胞からの入力により惹起されており、LGN の活動は視覚入力の強さを表していると考えられる。視覚入力を遮断すると LGN の活動は減少し、幼少期の動物において、視覚経験依存的な大脳皮質神経回路の可塑性を誘発する。しかし、覚醒状態での LGN の神経活動量が、視覚入力の強さを忠実に反映しているのかどうかは明らかになっていない。

この仮説を覚醒・行動中の動物で検証するため、ラットの視床にワイヤー電極を慢性的に埋め込み、行動中の視床神経活動の観察を行った。実験の結果、フラッシュ光は有意な LGN 細胞の視覚反応を誘起した。暗環境と明環境における平均的発火頻度には、予想に反して明確な差が見られないことを見出した。また、ラットの髭探索時に伴って短時間での急激な反応性の増加が見られた。これらの結果は、覚醒行動ラットの LGN 反応性は、網膜入力の強さを単純に反映していないことを示唆する。

キーワード：慢性神経活動記録, 外側膝状体 (LGN), 単一神経活動, 自由行動ラット, ブレインマシンインターフェイス

1. 研究の背景と目的

事故や怪我, 疾病などにより身体機能を失った患者のために, 機能再建を目指して様々な方法で研究がなされている。近年, 工学的手法により, 電気的に神経細胞を刺激して喪失機能を再構築する試みが, ブレインマシンインターフェース技術として注目を浴びている。ブレインマシンインターフェース技術を応用した視覚再建法として, 網膜内に薄い刺激電極を埋め込む方法や, 大脳皮質に電極を埋め込む方法などが臨床研究中であるが, 現在のところ, 安全性の検証が行われているステージである。

そこで本研究では, すでに臨床応用されている深部脳組織刺激療法 (Deep Brain Stimulation) の手法を応用し, 視覚中継核である視床外側膝状体を刺激して視覚機能を再建することを目指し, 神経細胞の刺激と神経活動を記録できる電極の作成と, 長期安定性について検討した。

* 京都産業大学コンピュータ理工学部

2. 実験方法

本研究の動物実験は、京都産業大学動物実験規定に基づき、大学の動物実験委員会の承認を受けて実施した。

2.1 慢性埋め込み電極の作成

ラット外側膝状体に長期間にわたり埋め込みを行う電極は、テフロンコートされたタングステンワイヤー電極（直径 25 マイクロメートル，A-M systems, #795500）を使用した。このワイヤーを 30G の座屈防止用のステンレス管に内挿し，ステンレス管から約 0.5mm - 1.0mm ほどタングステンワイヤー先端を露出させた。頭蓋骨上に設置したステンレスビスを基準電極，ステンレス管を参照電極，そしてタングステンワイヤー電極を記録電極とする電極を作成した（図 1）。

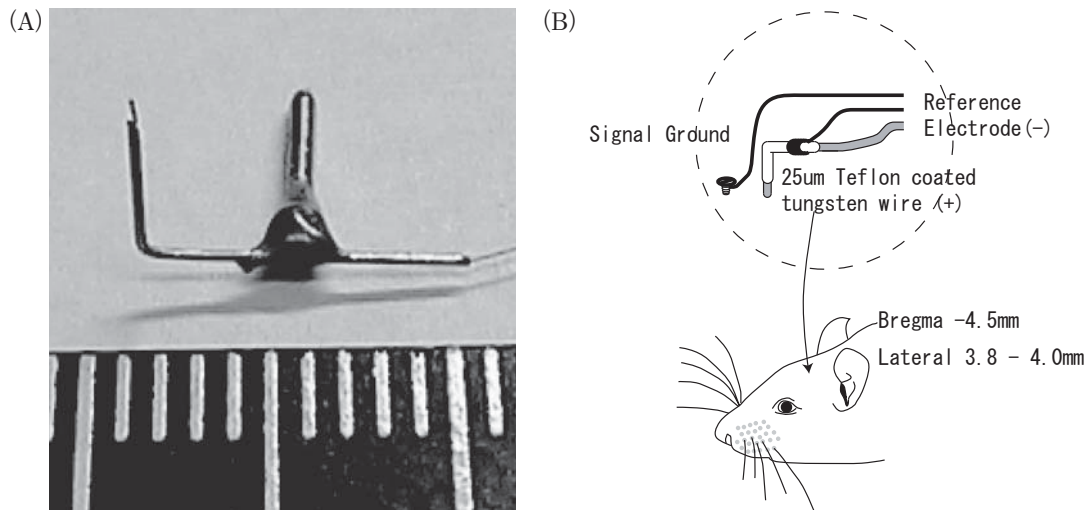


図1 慢性埋め込み電極と電極のインプラント方法

(A) 電極の支持部を含めた大きさは約 10mm。 (B) 神経活動を記録するための基準電極（グラウンド）と参照電極を設置し，神経活動を差動計測した。

2.2 実験動物の作成

成熟したオスラット（Long Evans, 生後 100 日以上）に電極を埋設する手術を記録実験前に行った。バルビツール系鎮静麻醉薬で麻醉を行い，呼吸に異常が見られない状態で頭骨固定装置にラット頭部を固定し，脳定位手術によりブレグマから 4.5mm 後方，矢状縫合より外側へ 4mm の位置に直径 2mm の頭蓋骨穿孔を行い，およそその電極の刺入位置とした。ワイヤー電極の先端を鉛直方向に向けて精密マニピュレータに取り付け，頭骨固定状態のラットの頭蓋骨穿孔部から脳組織へと刺入した。電極の埋設深さを設定する際，ラットの眼前にフラッシュ光を提示し，外側膝状体特有の光反応が見られる深さまで 10 マイクロメータ単位で電極を深部刺入した。その後，デンタルセメントで頭蓋骨に電

極を固定し、電極を外部接続するコネクタを露出させた状態で頭部の皮膚を縫合した。電極を慢性留置した動物を5セット作成した（図1）。

2.3 神経活動の記録方法

覚醒行動中の神経活動を、次の条件で記録した。

- 1) フラッシュ光による視覚刺激（発光タイミングをコンピュータで制御）
- 2) 暗環境中と明環境中で自由行動した時の比較

神経活動はアナログ電圧信号として導出し、前段アンプで100倍に増幅したのちに500Hz~5KHzのバンドパスフィルタを通し、後段アンプでさらに100倍の増幅を行った。記録信号の背景ノイズ振幅の ± 2 S.D.を閾値として、アナログ信号の変位が閾値を超えた時の時間と、閾値を超えた前後の電位変化を神経活動イベントとして保存した。

2.4 解析方法

神経活動イベントは振幅の大きさや変化の時間幅で分類し、それぞれを個別の外側膝状体神経細胞由来の神経活動としてラベリングし、分類した。この神経細胞の反応の平均発火頻度と、発火タイミングの自己相関関数について調べ、偶発的な発火やノイズではないことを確認し、単一神経細胞の活動として分類したものを解析対象とした。

3. 実験結果

電極を埋め込んだ5匹のラットのうち、2匹のラット（ID: 0524i, 0531i）が埋め込み手術後1週間以上安定して記録可能であったため、この2例を解析対象とした。記録実験終了後、埋め込んだ電極が脳組織に与えた侵襲度を調べるため、動物を深麻酔処理し、ニッスル染色法により脳組織切片標本を作成した（図2）。電極先端が視床外側膝状体の上部にとどまっていることが確認できた。記録対象部位の高倍観察像において、記録電極先端付近の神経細胞は損傷を受けていなかった。

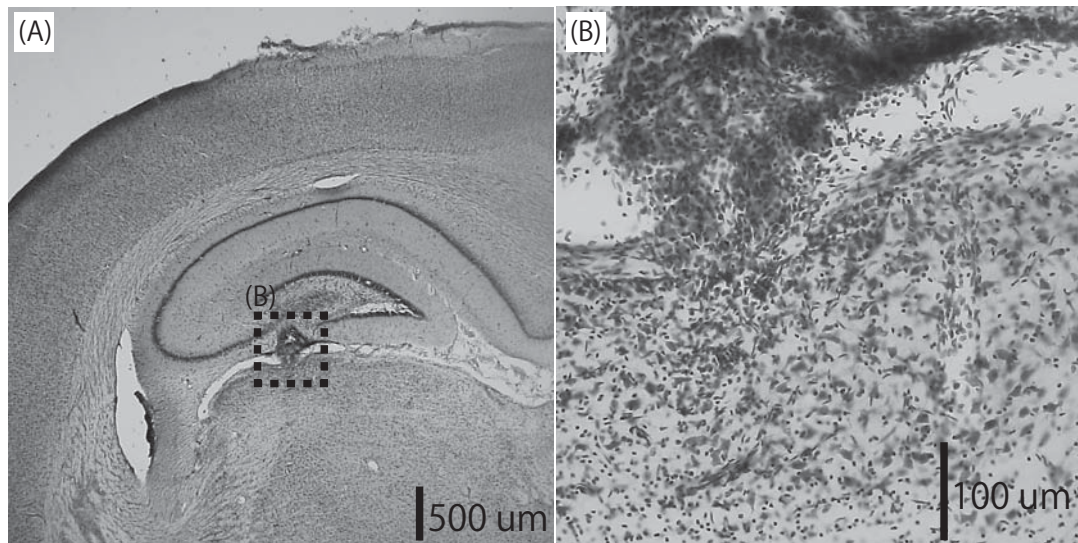


図2 埋め込み電極付近のラット脳組織切片標本

視床外側膝状体を含む脳組織切片をニッスル染色し、埋め込み電極が神経細胞に与える影響を観察した。(A) 低倍率像、点線で囲った部分が視床外側膝状体上端を示しており、(B) は拡大観察像を示したものである。長期にわたり記録ができた動物の場合、大きな組織損傷は認められなかった。

3.1 フラッシュ光に対する反応性の評価

覚醒行動中のラットにフラッシュ光を提示した時の神経活動の例を図3に示す。フラッシュ光提示時間を基準とした神経活動イベントの発生時刻を横軸とし、フラッシュ光を提示した29回試行の神経活動イベントを縦方向に並べている。この例では、神経活動イベントの振幅と反応の時間幅の違いから、3個の神経細胞 (Unit 1 ~ 3) の反応を分類した。一つの試行トレース上に、Unit 1 (赤)、Unit 2 (青)、Unit 3 (緑) の発生タイミングを示している。これらの神経活動イベントは、単一神経細胞の活動に不応期があることに着目し、不応期に相当する時間間隔以下のタイミングで連続して神経活動が見られないことから、単一神経細胞の反応であると言える。それぞれの神経活動イベント毎の発火頻度を定量解析するために、フラッシュ光提示時間を基準とした刺激周辺の神経活動イベントヒストグラム (Peri-Stim Time Histogram, 以下 PSTH) として表した (図3)。3つの細胞で異なる反応性の PSTH が得られた。全ての試行で、フラッシュ光提示から潜時 50mms 以内に光反応性の反応が観察されたことから、自発的な発火ではなく、視覚刺激由来の反応であることがわかる。

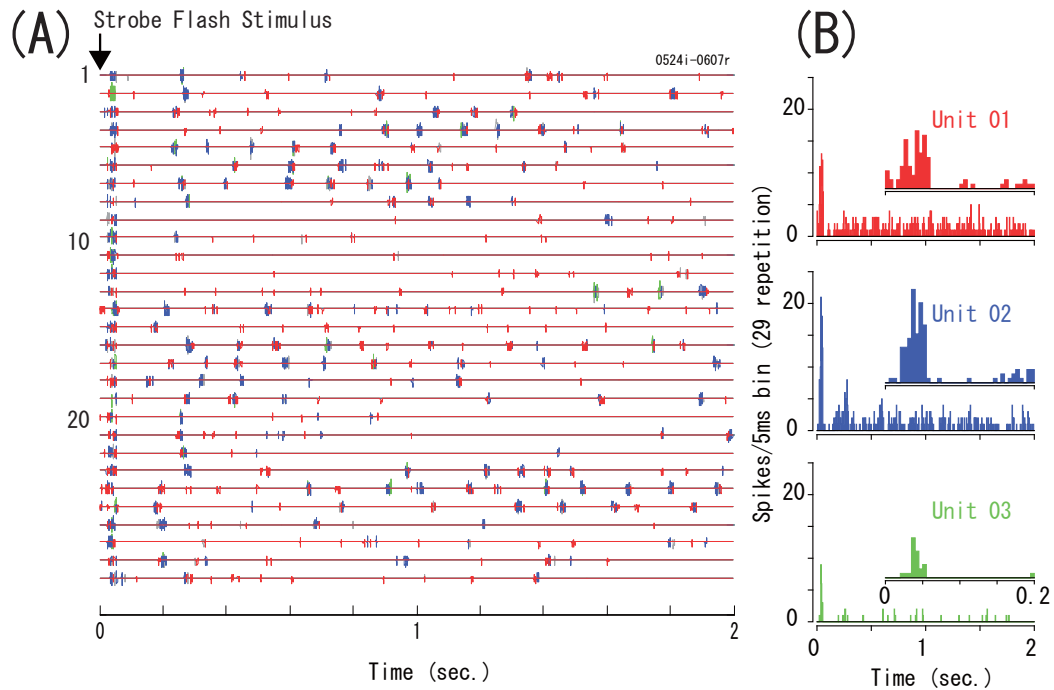


図3 フラッシュ光に対する外側膝状体神経細胞の活動

電極埋め込み後、2週間経過後のフラッシュ光反応記録実験例を示す。(A) フラッシュ光の提示を29試行行い、フラッシュ光提示タイミングを基準（刺激タイミングを矢印で示す）として刺激提示から2秒間の神経活動イベント発生時間を表示している。観察された神経活動イベントを反応振幅、反応の時間幅で分類した結果、3つの神経細胞が活動していることが確認できた。(B) 分類した神経細胞毎の反応をPSTHで表示した。大きいグラフは刺激後2秒間の反応性を示しており、小さいPSTHは、光提示後200ミリ秒の光刺激に対する初期反応を拡大表示したものである。

3.2 明環境と暗環境における反応性

覚醒自由行動中の動物を明環境（室内蛍光灯環境）および暗環境（外光を遮光した、準暗環境）に置き、明／暗それぞれの明るさの環境下で1分間・5試行の神経活動を記録した。反応の振幅と時間幅で分類した細胞毎に、60秒間の神経活動イベント数（平均発火頻度）を計算し、暗環境と明環境で比較した（図4）。暗環境と明環境の平均発火頻度ベースの反応性に、比較的大きな差が見られる細胞（Unit 1）や、明確な反応性の違いが少ない細胞（Unit 2）、反応性の差がない細胞（Unit 3）などがあることがわかった。実験前の仮説では、網膜からの入力がない暗環境では、入力の減少に起因して平均発火頻度ベースの反応性は低く、明るい環境では豊富な光刺激により入力が増大し、平均発火頻度ベースの反応性が高くなると予想していたが、この予想に反した特性を持つ細胞が観察された。予備実験として行った麻酔環境下のネコの視覚実験では、視覚入力が全くない状況でのLGNの反応性は弱かった（データは本報告では示していない）。これらの結果から、麻酔環境下と覚醒行動中の視床外側膝状体の神経細胞は異なる反応特性を持つことが示唆される。

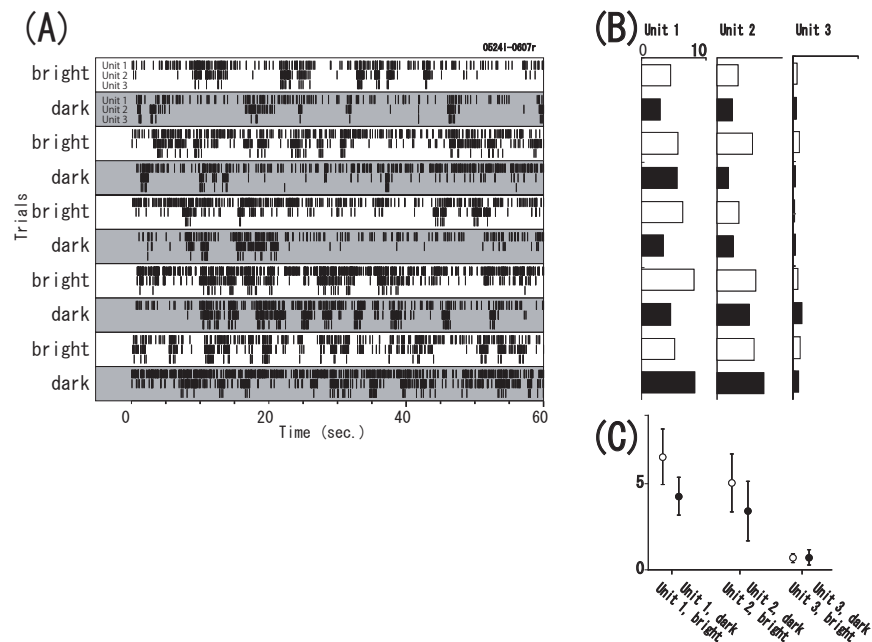


図4 明環境と暗環境における反応性の比較実験

(A) 神経活動イベントを3個の単一神経活動(ユニット)に分類し、明環境と暗環境下の反応をそれぞれ60秒間記録した。明—暗環境の記録を1セットとして、5セット繰り返して記録した。(B) ユニット毎の平均発火頻度を計算した。(C) ユニット毎、明—暗環境の平均発火頻度を比較した。

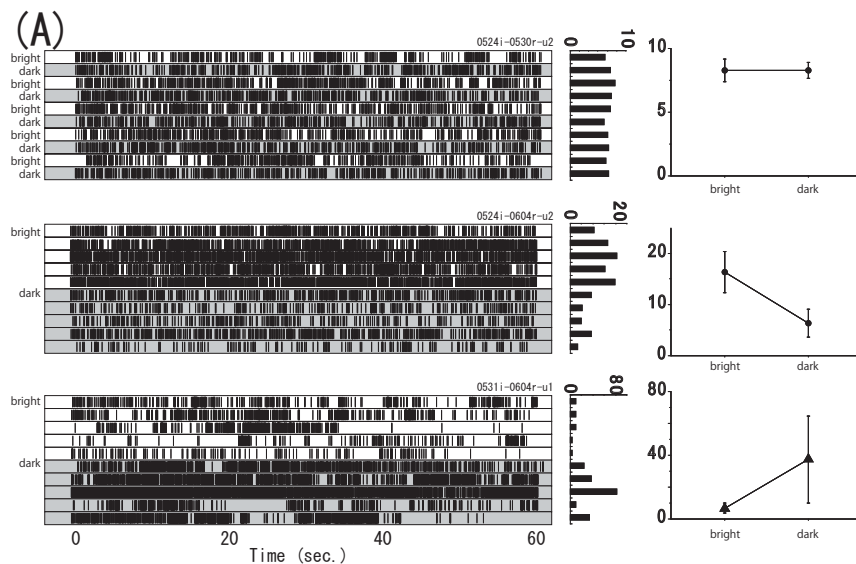


図5 明暗環境に対する反応性の順応に対する検討実験

(上段) 明環境と暗環境の記録実験を交互に行い、神経活動イベントの平均発火頻度を比較した。(中・下段) 実験セットの最初に明環境で連続記録して順応が起こりやすいような条件で記録実験を行い、神経活動イベントの平均発火頻度を比較した。

視覚機能における神経細胞の反応は、環境に順応して反応性が変化することが知られており、環境の暴露順により反応性が増減する可能性もあるため、明環境と暗環境の順番を変えて実験を行い、それぞれの環境の反応性の違いを比較した実験を行った（図5）。安定して記録できた19個の神経ペアについて、暗環境と明環境の反応性の違いを調べた結果、暗環境中の平均発火頻度が明環境中の平均発火頻度を上回る細胞も存在することがわかった（図6、右肩上がりのペア）。

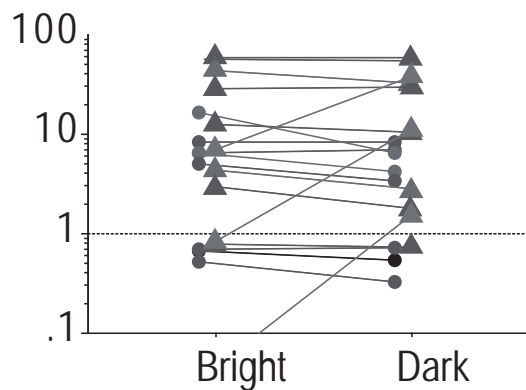


図6 明環境と暗環境における平均発火頻度の違い

19個の単一神経細胞の反応性の違いを平均発火頻度で比較した。縦軸は平均発火頻度 (spikes/sec.)、横軸は明度環境の違いを示す。

4. まとめ

本課題で開発を行う電極は、埋め込み対象となる生体組織に損傷を与えず、また生存期間中に機能を損なうことのない、大脳皮質埋め込み型のロングライフ電極である点に特色がある。ロングライフ電極を埋め込んだモデル動物を作成し、神経活動の出力をモニタリングしながら入力強度やパターンを変化させ、脳刺激型デバイスの新しい方向性を見いだすことを目指して実験を実施した。

実験の結果、深部脳刺激タイプの電極で、これまでの急性記録実験と比較して比較的長時間の安定記録が可能となった。この電極を用いて、日常環境で自由行動している動物の脳神経活動を記録し、これまでの麻酔環境の中枢神経系の神経活動とは異なった反応性を有することが分かった。

本研究を推進することで入力信号の強度や入力頻度などのパラメータ推定ができると予想されるが、人工的な電気刺激による中枢神経系の反応はまだ未解明な点が多い。その一つとして、脳は刺激によりその反応性が変化する「可塑性」がある。この性質が脳という生体システムの最もおもしろい点でもあるが、解析を困難にしている点でもある。この研究を発展させれば、脳への感覚入力を制御しつつ中枢神経の活動をモニタリングすることにより、より詳細な脳の可塑的变化を調べることができると考えられる。

また、本研究課題が関係するブレインマシンインターフェースの研究では、脳神経活動を読み取り解析することにより、運動機能（出力系）に利用できる段階に至っている。一方、脳神経系への入力

としてのブレインマシンインターフェイスの研究は発展途上段階にあるが、本研究課題を含む脳神経細胞への情報入力ができるようになり、脳への入出力が出そうにより、脳機能の解明に貢献できる。

Chronic recording of single lateral geniculate neuron activity in behaving rat

Takafumi AKASAKI

Abstract

The lateral geniculate nucleus (LGN) of the thalamus conveys visual information to the primary visual cortex. Because activity of LGN neurons is elicited by retinal inputs, amount of LGN activity are expected to represent strength of visual inputs. Also, visual deprivation is assumed to decrease the LGN activity and leads to experience-driven cortical plasticity in young animals. However, it is not clear whether neural activity of LGN faithfully represents the input strength in awake condition. In order to test this hypothesis in behaving animals, we implanted a wire electrode to the LGN of rat chronically and recorded neural activity in behaving condition. Strobe flash stimuli effectively elicited visual responses of LGN neurons. Unexpectedly, however, we found no quantitative difference in mean firing rate of ongoing activity between the light and dark environment. In addition, abrupt increase of activity of short duration was accompanied by exploratory whisking of rats. These results suggest that neural activity of LGN does not simply represent the quantity of visual inputs in behaving rats.

Keywords : chronic neural activity recording, lateral geniculate nucleus (LGN), single neuron activity, behaving rat, brain machine interface

