

論文の内容の要旨

論文題名：

**Localization of the electrophysiological recording sites
within the monkey cerebral cortex using high-resolution MRI.**

高解像度 MRI を用いたサル大脳皮質における神経活動記録部位の定位

指導教員： 宮下 保司 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名： 小谷野 賢治

微小電極による単一神経細胞活動記録は、各領野に特有な個々の神経細胞の活動を記録することで、大脳皮質の機能に関する詳細な知見をもたらしてきた。厚さ 2-3 mm の霊長類の大脳皮質は、異なる性質を持つ神経細胞集団が分かれて層構造を形成し、それぞれの層が特徴的な入出力を持ち相互に連絡して情報処理を行っている。そのため、記録された神経活動を皮質層構造に関連付けて解析することで大脳皮質における情報処理機構が解明されることが期待されてきた。過去、麻酔下のサルを用いた急性実験により、低次の感覚野において大脳皮質の各層が異なる働きをし入力された感覚情報を処

理していることが明らかにされている(Hubel & Wiesel, 1968; Gilbert, 1977)。このような神経活動と皮質層構造の研究には、急性実験後に神経活動記録部位を電氣的傷害により標識し、動物の死後組織学的に解析することで顕微鏡下にて記録部位を同定する手法が用いられてきた。しかしながら、このような手法は侵襲的な上に標識が残る時間も限られるため、1 個体あたり同定できる記録部位の数に限界がある。そのため、霊長類の高次認知機能を調べるために必要な、長期間にわたり数百にもおよぶ神経活動記録を行う慢性実験に適用することはできなかった。慢性実験において大脳皮質層構造の機能分化を調べるには、生きた動物から毎回の電極刺入ごとに記録部位を同定する手法が不可欠であると思われる。そこで私は近年発展の著しい高磁場 MRI を用いることでこの問題を克服することを試みた (図 1)。

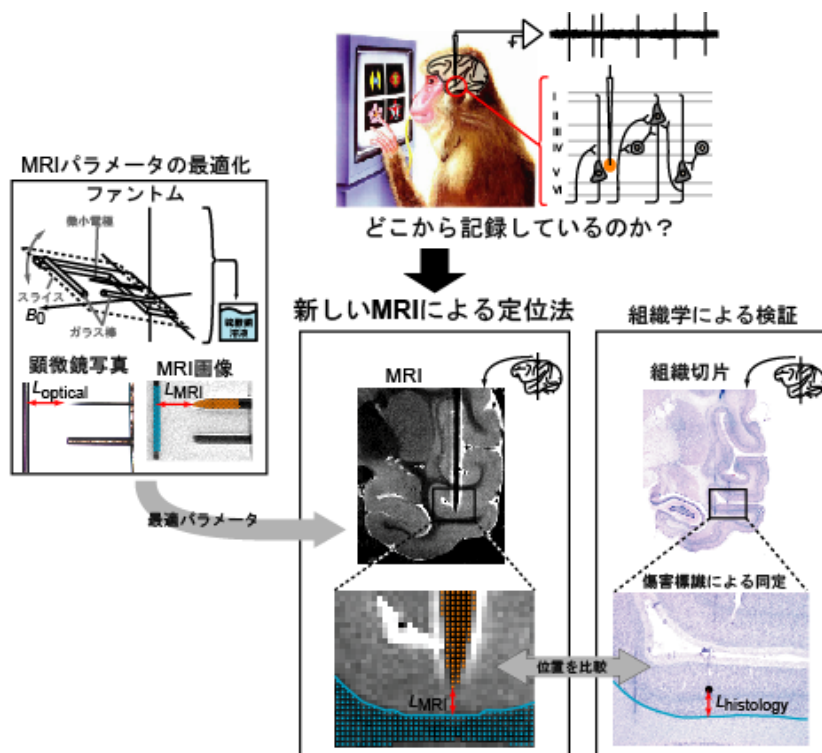


図 1 MRI を用いた定位法の構想と開発

覚醒行動下のサルにおける電気生理的記録部位を同定するため(上)、まずファントムを用いた *in vitro* 条件下でパラメータの最適化を行った(左)。次いで、最適化されたパラメータを用い *in vivo* 条件下でサルにおける記録部位同定を行い、組織切片と比較することで定位の誤差を評価した(下)。定量には電極先端部位と皮質境界面までの距離を計測した (*Loptical/LMRI/Lhistology*)。

まず、微小電極の記録部位である電極先端を正確に同定するための MRI の撮像条件を *in vitro* 条件下において検討した。MRI 撮像には 4.7 T MRI とボリュームラジ

オ周波数(RF)コイルを用い、ファストスピンエコー法(FSE)によりタングステン微小電極を硫酸銅溶液中に沈めたファントムを撮像した。空間解像度 $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ において撮像の諸条件を検討した結果、撮像時の電極と静磁場との角度、および周波数エンコード方向が電極先端の正確な定位に重要であることが分かった。電極と静磁場との角度が大きくなるほど MRI 画像における電極は太く強調され、周波数エンコード方向を電極に対し垂直に設定することで電極の先端がより明瞭に描出された。MRI 画像上における微小電極先端の位置を写真と比較しその誤差を定量的に評価したところ、電極と静磁場の角度が 60° 以上で、かつ周波数エンコード方向を電極に対し垂直に設定した条件では微小電極の先端を ± 1 ボクセル以下の精度で同定できた ($n = 10$, 同等性検定, $P < 0.05$)。さらに、この条件下における電極先端定位の精度をより高い空間解像度においても同様に調べたところ、空間解像度 $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ の MRI 画像における誤差は $4.8 \pm 38.7 \mu\text{m}$ と小さく、やはり ± 1 ボクセル以下の精度であった($n = 10$, 同等性検定, $P < 0.05$)。また、RF パルスのタイミングに関係したパラメータ、すなわち繰り返し時間(TR)、エコー時間(TE)、エコートレイン長(ETL)の影響を検討したところ、これらのパラメータは電極先端定位の精度には影響を及ぼさず(条件あたり $n = 10$, two-way / one-way ANOVA, $P > 0.07$)、必要なコントラストを得るために広範な RF パルスシーケンスを選択可能であることが示された。

次に、上記の *in vitro* 実験により最適化した撮像条件を用い、麻酔下のサル脳内へ電極を刺入しその先端の同定を *in vivo* で行った。サル頭蓋にはあらかじめ MRI 対応の頭部固定具と記録用チェンバーを設置し実験に用いた。MRI 対応のプラスチック製グリッド(ナリシゲ)を用い、タングステン微小電極を麻酔下で上側頭溝へと刺入した。MRI 撮像前にプラスチック製ホルダーで電極を固定し、金属製のマニピュレータを取り外した。撮像時には静磁場との角度を垂直に近づけるため顔を前に向かせて頭部固定し、いわゆる“スフィンクス体勢”をとらせた。麻酔下のサルからクアドラチャ表面 RF コ

イル、およびボリウム RF コイルを用い、反復回転(IR) FSE にて $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ の構造画像を撮像した。後の組織学的解析のため、MRI 撮像後には脳組織を電氣的に凝固傷害して(5-10 μA , 5-30 秒) 電極先端位置を標識した。得られた MRI 画像には、明瞭な電極先端が上側頭溝腹側に良好なコントラストの皮質構造とともに観察された(図 2 左)。ニッスル染色切片上の電氣的傷害標識も上側頭溝腹側の皮質中部に観察され、その位置は MRI 画像上の電極先端位置とよく対応していた (図 2 右)。微小電極先端部位から腹側の皮質境界までの距離を計測し、この距離を MRI と組織切片の間で比較して MRI による定位方法の誤差を評価したところ、in vivo 条件下の MRI による電極先端位置同定の誤差は 0.13 ± 0.97 ボクセルであり、 ± 1 ボクセル以下の精度を持つことが示された (同等性検定、 $P < 0.005$ 、図 3)。

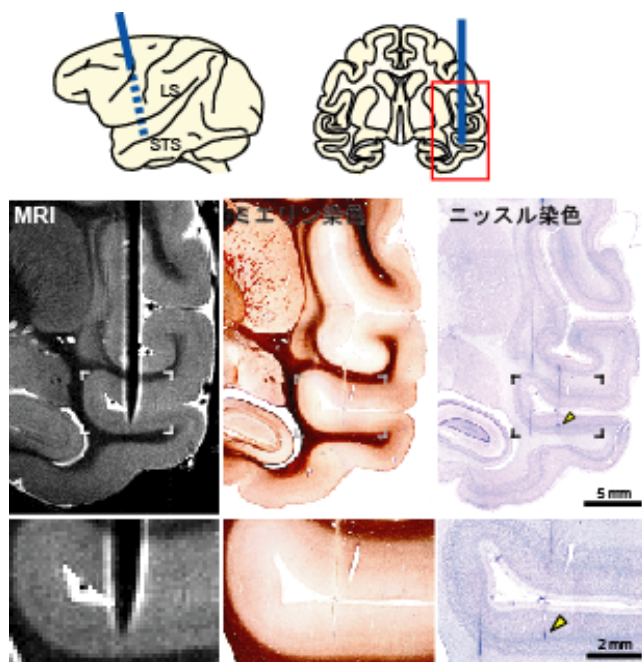


図 2 サル大脳皮質における電極先端の同定
MRI (左)、ミエリン染色切片 (中央)、ニッスル染色切片 (右)。矢頭、電氣的傷害標識。

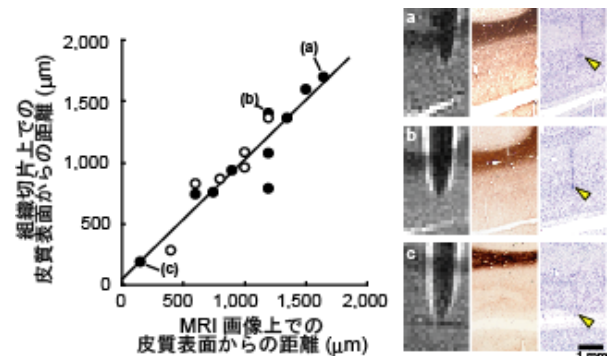


図 3 大脳皮質における電極先端の同定精度
MRI (横軸) および組織切片 (縦軸) により同定された電極先端位置 ($n = 16$)。MRI の解像度は 150 (●) もしくは 200 (○) μm 。a-c のデータは右側の画像に対応。

さらに、このように開発した手法を課題遂行中のサルへと実際に用いるため、高磁場 MRI と単一神経細胞活動記録を両立させることのできる MRI 対応の非磁性超小型記録電極マニピュレータの開発を行った。高磁場でも使用可能な非磁性ジュラコン樹

脂を材料とし、MRI 装置内部の限られた空間でも使用可能なように小型のマニピュレータを開発した。この非磁性小型マニピュレータを用いて実際にサル側頭葉へ記録電極を2日間にわたって留置し、表面 RF コイルを用いて得た $150 \times 150 \mu\text{m}^2 \sim 200 \times 200 \mu\text{m}^2$ の解像度の MRI 画像から電極位置の保持性能を調べた。その結果、2 日間の留置における電極先端の位置の差は 0.00 ± 0.94 ボクセルと小さく、1 ボクセル以下であった(同等性検定、 $P < 0.005$)。飼育ケージでの覚醒状態を経ているにもかかわらず複数日にわたり安定した保持性能は、覚醒下で課題遂行中のサルからの神経細胞活動記録と麻酔下での超高分解度 MRI 構造画像の取得を異なる日に行うことをも可能とする。

この電極先端定位の方法にはさまざまな撮像パラメータを用いることができ、IR FSE 法以外にも、プロトン密度画像のようにコントラストを犠牲として信号雑音比を上げる撮像方法により、現実的な撮像時間の制限の中においても高い空間解像度を実現することが可能である。その場合、犠牲となる低いコントラストに関しては、大脳皮質の細胞構築に関する情報を高コントラストの MRI 画像や組織切片から外挿することで補うことができる。異なるコントラストの MRI 間、および MRI と組織切片の間で画像を重ね合わせるためには、異なる MRI シークエンスおよび MRI と組織切片の双方で検出可能な標識が有用であると考え、MRI においても検出可能な金属沈着標識を利用するための実験をおこなった。過去の研究において、ラット脳内に挿入したステンレス電極の電気分解により、MRI で検出可能な標識が生成されることが報告されている (Fung *et al.*, 1998)。本研究では、この方法をサルにおいても用いるため、より電気生理学的な記録性能が良くサルの実験にもしばしば用いられるエルジロイ電極を用いて金属沈着標識を生成し、その大きさと沈着時の電流の関係および標識の持続性について調べた。

エルジロイ電極をラットの脳内に挿入して陽極電流を流したところ、プロトン密度強調 MRI 画像上で低シグナルのスポットが検出された。タングステン電極を用いて同様の電流を流したところ、このようなスポットは確認されなかった。組織化学切片

上においては、MRI 画像上のスポットに対応する位置にエルジロイ由来の鉄成分がプルシア青反応により確認された。このことから、エルジロイ電極由来の金属沈着が MRI 画像上で検出されたと結論した。次いで、金属沈着時の電気分解パラメータを 60～3600 μ C の範囲で変え沈着標識の大きさを調べたところ、電気分解に用いた総電荷量とよく相関し($R=0.866$, $P<0.0001$)、検出された最も小さな標識は画像解像度と同程度の 150～200 μ m であった。長期間にわたる慢性実験でも使用かどうかを調べるため、標識から数ヶ月後に MRI を撮像したところ、エルジロイ沈着標識は少なくともその生成から7ヶ月間は MRI 上で検出できることがわかった。このエルジロイ沈着標識を用いることで、組織コントラストの情報を IR FSE 法や組織切片から重ね合わせることが可能となり、より信号雑音比の高いプロトン密度強調画像法を電極先端定位に用いることができるようになると思われる。

今後、この MRI を用いた神経活動記録部位の定位法により高次認知機能に関わる大脳皮質各層の機能分化、ひいてはその情報処理過程が明らかになることが期待される。