

大脳視覚連合野の神経活動と視覚刺激選択意思の相関

長谷川 功* 戸田 春男**

Neural Correlates of Visual Choices in the Rat Visual Association Cortex

Isao HASEGAWA* and Haruo TODA**

A distributed cortical network among the visual association areas is implicated in imagery as well as perception of visual objects. In macaque monkeys, single neurons in the visual association cortex can represent visual long-term memory acquired through associative learning. The coded representation of memory can be reactivated along bottom-up and top-down visual pathways. Here we tried to construct rodent animal models to read out visual images generated in the distributed network. First, we developed a new behavioral paradigm to test Long-Evans rats in visual discrimination task. Second, we tested chronic multi-channel recording of local field potentials, and directly compared them with conventional single-unit recording techniques in the same animal. Our results showed feasibility of rodent animal models for both behavioral and electrophysiological investigation of complex visual cognition.

1. 目 的

大脳高次視覚野においては複雑な形態の視覚刺激の知覚に特異的な神経活動が観測される¹⁾²⁾. 筆者らは、個体が「次にどの視覚刺激を選びたいか」という意思と、大脳視覚連合野の神経活動の相関を電気生理学的多点計測にもとづいて解明することを目標としている。このため、視覚イメージ想起の脳内機構に関する筆者らのサル慢性実験^{3)~6)}の知見を拡張し、『視覚刺激を選ぶ意思判断は、視覚連合野を活性化する広範囲の大脳ネットワークの活動に分散表現されている』という作業仮説を立てた。仮説を検証するためには、二つの問題を解決する必要がある。

第一に、大脳の情報処理の特徴の一つは、広範囲の脳領野にわたって階層的/並列分散的に行われることであり、仮説検証のためには広範囲の大脳ネットワークにおける神経活動をミリ秒単位の高い時間分解能で同時計測することが必要である。しかし、これは決して容易でない。この問題を打開するための一つの方法として、広範囲の脳表からの局所フィールドポテンシャル (local field potential: LFP) 多点計測が有効と考えられる。例えば、ヒトの機能的脳外科でも利用される皮質脳波 (electrocorticogram: ECoG) の手法は、脳波と比べると頭蓋骨・脳脊髄液を介さずに記録する分、信号記録特性

が時間分解能・空間分解能とも格段に優れる。また脳に直接刺入する微小電極法に比べると比較的侵襲性が低い点、マカクザル等における基礎研究からヒトにおける臨床応用まで幅広い用途が考えられる。ECoGによる記録は、LFPを脳の広範囲にわたりミリ秒単位で取得でき、MUA計測では捉えきれなかった閾値以下の神経活動をも検出できるという利点が考えられる反面、微小電極法による多細胞活動 (Multi-unit activity: MUA) 記録に比べて個々の細胞の応答特性が鋭敏に検出できないという欠点がある。LFPに視覚情報がどれだけきめ細かく符号化されているかは必ずしも明らかでなく、この手法の技術的フィジビリティを、従来からのMUA記録ないし単一細胞活動記録 (Single-unit activity recording: SUA) による侵襲的な方法と比較対照しながら、できれば同一の個体で確かめる手続きが必要である。

第二に、上記の同一個体での検証にはラットの動物モデルが最適であるが、げっ歯類で視覚像を選ぶための認知パラダイムは確立されてこなかった。一つの理由は、げっ歯類は視覚の発達極めて弱いと信じられていたためである。しかし、近年、視覚系の発達したラット種 (ロングエヴァンス) を用いた視覚実験の報告が散見される。そこで、本研究ではこのロングエヴァンスラットを用いて筆者らのサル慢性実験の手法を適応し、視覚認知課題の実験パラダイムの構築を試みた。

本研究では次の二つの下位目標を立てた。

1. 視覚刺激を選択する意思の脳内メカニズムを調べ

2009年2月10日 受理

* 豊田理化学研究所研究嘱託
(新潟大学医学部生理学教室)

** 新潟大学医学部生理学教室

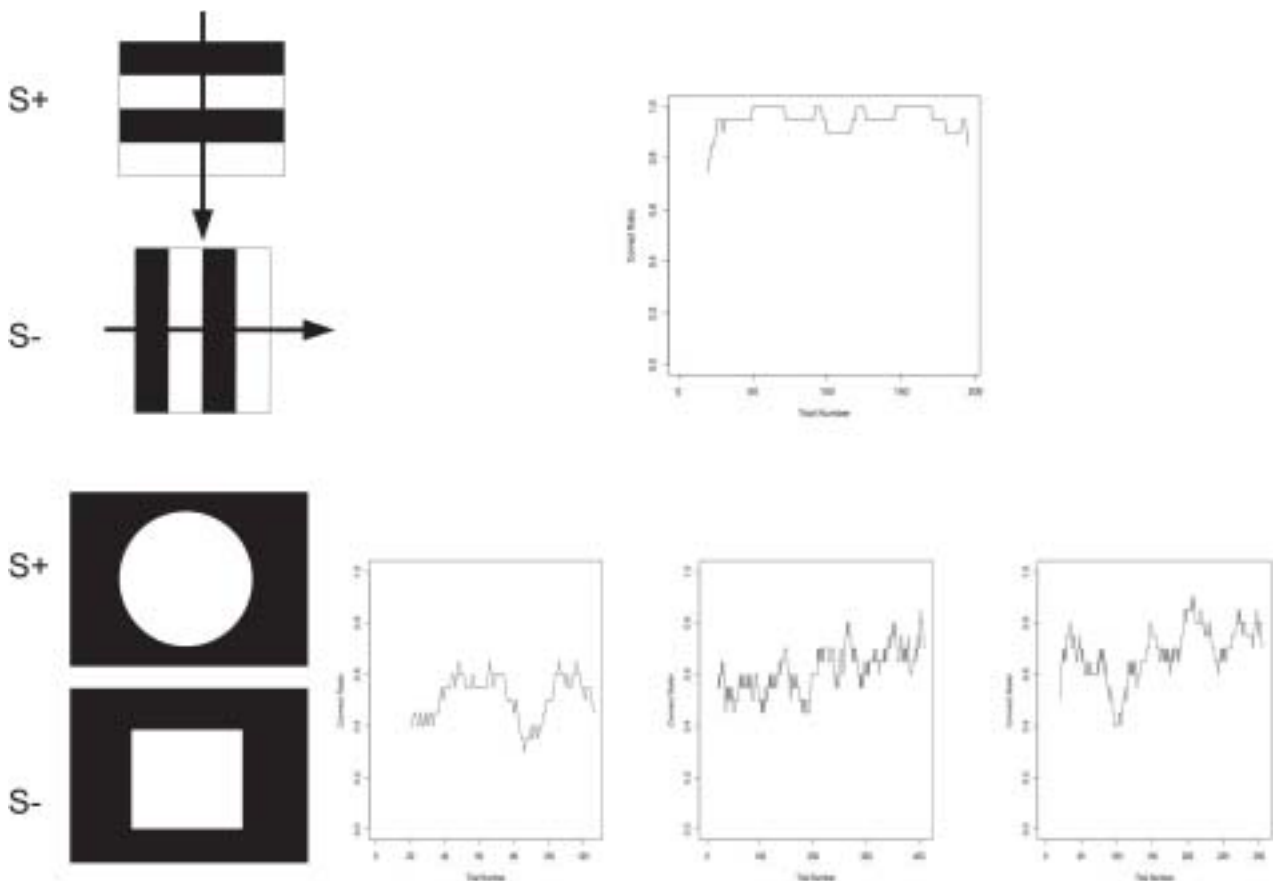


図 1

左: 視覚認知実験に使用した視覚刺激

上から順に, 報酬価値のある (S+) 下向きに動く黒白の横縞 (square grating) 刺激, 報酬価値のない (S-) 右向きに動く黒白の縦縞 (square grating) 刺激, 報酬価値のある (S+) 黒地に白い丸の刺激, 報酬価値のない黒地に白い四角の刺激 (図下).

右: ラットの行動学習の成績

上段: 縦縞と横縞の二つの刺激のうちラットが横縞を選んだ確率の 1 訓練セッション内での経過.

下段: 丸と四角のうち, ラットが丸刺激を選んだ確率の 1 訓練セッション内での経過. 訓練 1 日目を左, 2 日目を右, 3 日目を右に示す.

るためのラット動物実験モデルの構築

2. 同一の個体で SUA 記録法と対照しながら慢性 LFP 多点記録法の時間的安定性を検証

2. 方 法

2.1. 視覚認知課題におけるラットの訓練

実験には 12-20 週令のオスのロングエヴァンスラットを用いた.

行動実験は, Y 字型迷路を改変して製作したラット用オペラント視覚実験箱 (小原医科産業製) を開発して行った. 実験箱は, 開始領域と選択領域からなり, 両者はガラス製の左右 2 枚の仕切り板で仕切られている. 選択領域は仕切り板の直前方から緩やかな勾配で 10 cm の高さを降下し, 平らになったその先に 20 インチ液晶モニターとエサのペレットディスペンサーを配した. 実験では, ラットが穴に鼻を突っ込む習性 (ノーズポッキング反応) を利用するため, 開始領域の背面壁, 左右の仕切り板の

中央, モニターの下二箇所にノーズポッキング用の穴と, それを検知するための赤外線センサーが設置してある. まず, 3 匹のロングエヴァンスラットにこの実験システムへの馴化を数日間かけておこなわせた後, シェイピングと視覚弁別課題の訓練をおこなった.

この課題は, ラットが開始領域の背面壁にある穴にノーズポッキングしたのを検知した瞬間に左右のガラス仕切り板が閉じることで開始される. 次に, ラットは左右のガラス板の真ん中にできた隙間の穴に 1 秒間ノーズポークしなければならない. この間, モニター上には, 左右二つの視覚刺激を提示する. 1 秒間経つと, 仕切り板が左右に観音開きで開く. ラットは, 選択領域に移動し, 二つの視覚刺激のうち正しい一方の真下にある反応穴にノーズポークすることが要求される. 正しい刺激を選ぶと, 報酬として餌のペレット (1 回当たり 25 mg 粒) が得られる. 誤ったものを選んだり, 2 秒以上躊躇していると反応穴はシャッターで閉じられてしまう. このように餌を強

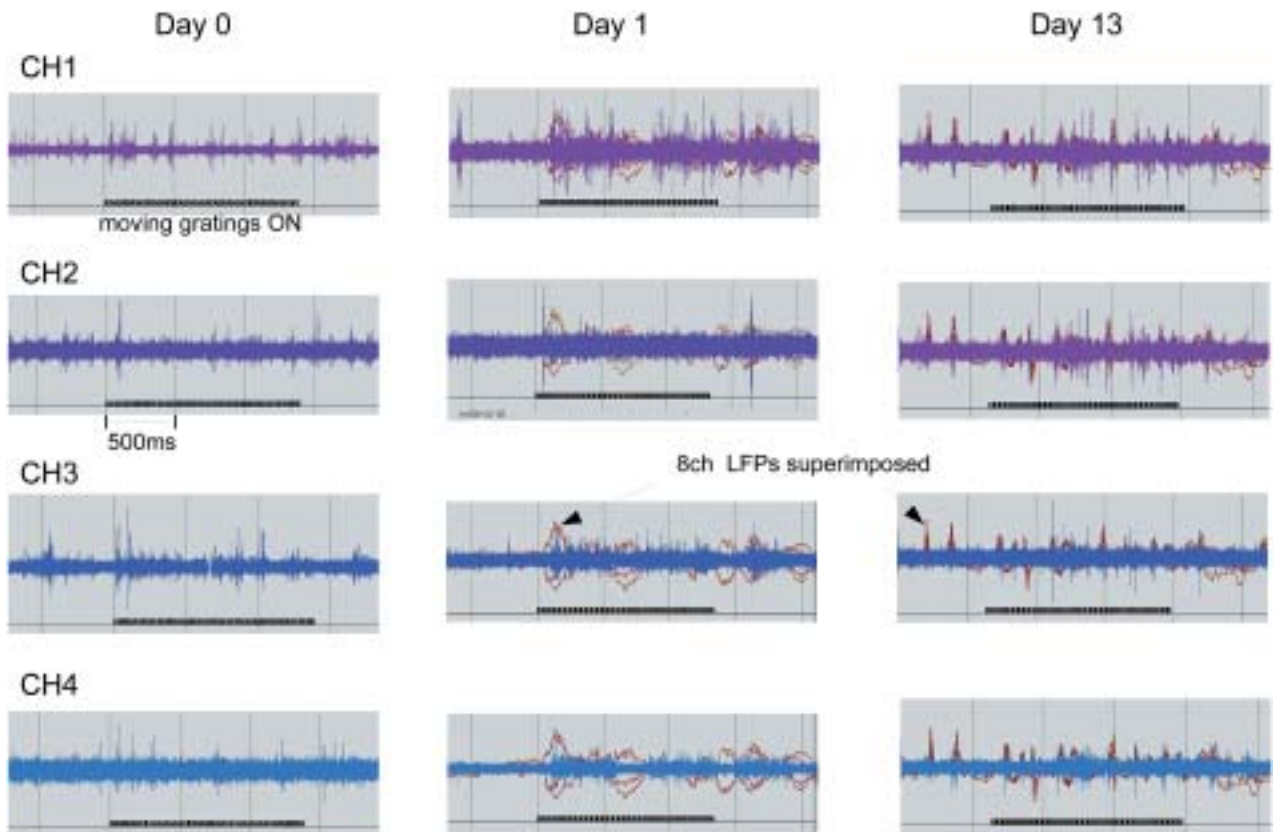


図 2. 慢性埋め込み多点電極で記録された多細胞活動と局所フィールド電位

各段は 8 チャンネルの多点電極のうち、チャンネル 1-4 の電極から記録されたデータに、左列、中央列、右列は、慢性埋め込み手術直後、術後 1 日目、術後 13 日目でのデータに対応する。各チャンネルの多細胞活動を紫線で、チャンネル 8 で記録された局所フィールド電位を赤線で表す。動く縞刺激の呈示期間を黒線で示す。

化因子としたオペラント学習を行う。課題のイベントの制御および視覚刺激の生成・提示には米国 National Instrument 社製の DIO ボード PCI-6503 と、同社の LabVIEW 開発環境で作成した自作ソフトウェアを利用した。視覚刺激としては、照度を合致させた縦縞と横縞がそれぞれ垂直方向に動く square grating の刺激対 (図 1 左上)、または黒地に白色の丸または四角の静的な刺激対 (図 1 左下) を用いた。

2.2. 多チャンネル LFP, SUA の電気生理記録

慢性電気生理記録は筆者らのマカクザルにおける手法³⁰⁾を踏襲したが、多チャンネル記録に特異的な方法は以下の通りである。

まず、電極には直径 50 μm のテフロン被膜ステンレス線を 500 μm 間隔で 3 \times 3 に配列した微小電線アレイを米国オムニテクス社の 0.025 インチピッチのマイクロコネクタに繋いだもの (米国マイクロプローブズ社製) を用いた。このうち、中央の一本を基準電極として用いた。この多点電極を上記 2.1. とは別の一匹の動物個体の大脳後頭葉表面に頭蓋骨・硬膜を剥がして留置し、歯科用セメント (スーパーボンド, サンメディカル社製) で固めた。

手術直後、1 日後、13 日後にこの電極アレイから LFP および MUA の 8 チャンネル記録をネブタール麻酔下 (60 mg/kg i.p.) でおこない、視覚応答を調べた。多チャンネル神経データは高インピーダンス入力対応型のヘッドアンプを経て前置増幅器 (米国プレクソン社製) で増幅後、0.7 Hz-10 kHz の広帯域周波数フィルターを経て LabVIEW の AD 変換ボード (PCI-6259) で記録した。多チャンネルデータのオンライン収録・表示には特注ソフトウェア (NS コンピュータサービス社製) を用いた。

なお、実験動物の飼育・管理・実験はすべて新潟大学動物実験委員会の承認を得て、NIH のガイドラインを遵守しておこなった。

3. 結 果

3.1. 視覚刺激選択のラット動物行動実験モデル

2 匹のロングエヴァンスラットは、オペラント訓練により縦縞と横縞の動く square grating 刺激を正しく識別することができるようになった。行動課題の成績のチャンスレベルは 50% であるのに対して、図 1 の右上に示した訓練後のラットではこれより有意に高く、1 日の訓練セッションの平均で 90% 以上の成績で、正しく弁別し

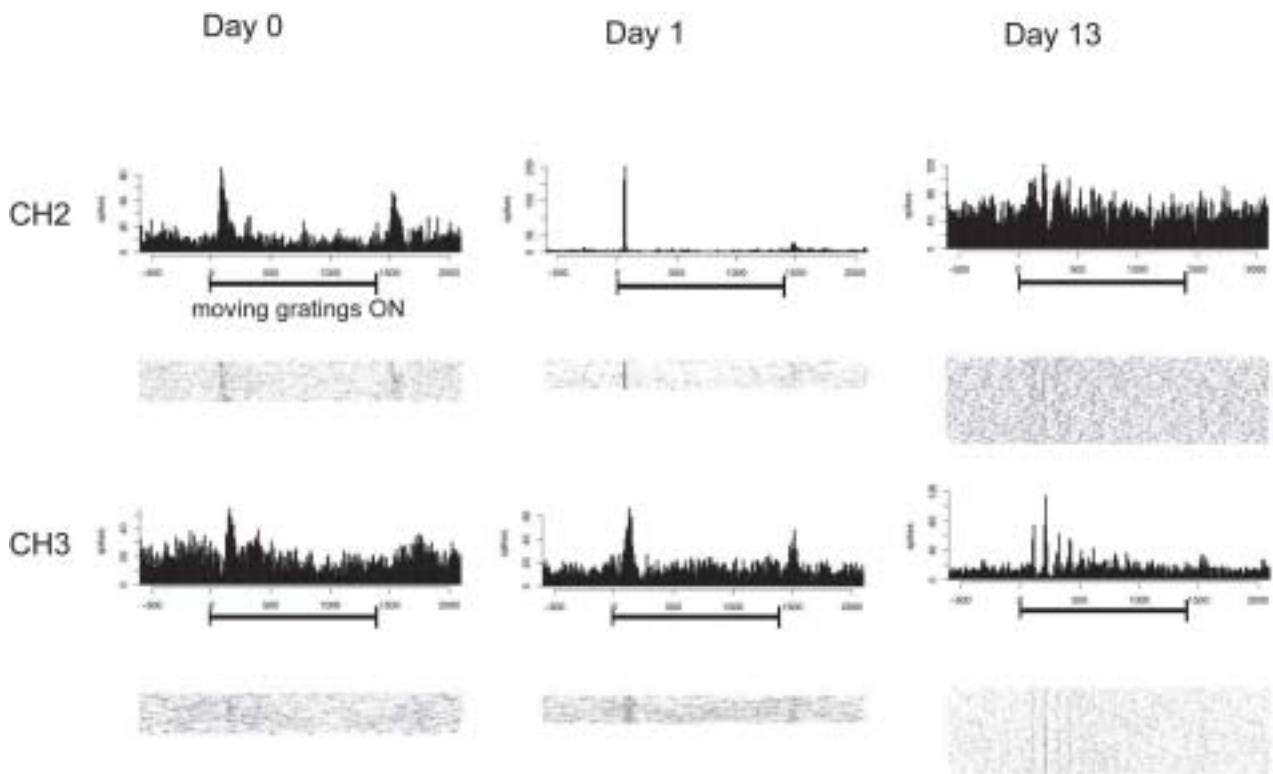


図3. 慢性埋め込み多点電極で記録された単一細胞活動

上段・下段は8チャンネルの多点電極のうち、チャンネル2と3からの記録を、また左列・中央列・右列はそれぞれ慢性埋め込み手術直後・術後1日目・術後13日目での記録を表す。各欄はさらにスパイク発火頻度ヒストグラム(上)と試行毎のスパイク経過のラスターグラム(下)からなる

ている。

さらに、1匹の別のラットで、丸と四角の形態の弁別もできるようになった。図1右下は、左から順に、この動物の訓練1日目、2日目、3日目の成績を表す。1日目の初めにチャンスレベル(50%)から始まった成績が次第に上昇して、3日目の後半には70%台まで上昇し、学習が進む様子がわかる。

3.2. 多チャンネル電気記録

慢性多点電極の埋め込み手術直後、8チャンネルの電極のうち4チャンネルの電極からの電気記録が有効に行えた。この4つの電極からの記録は、1日後、13日後においても有効に行えた。図2に、チャンネル1-4の電極の、最適方向に動く縞模様刺激に対する視覚応答を示す。1日後、13日後では、high pass filter後の多細胞活動記録(MUA)波形の上に、8チャンネルのLFP波形が重なっている。この実験の結果、慢性埋め込み後13日目までは、適刺激に対する応答が安定に維持されることがわかった。

図3は、図2のチャンネル2とチャンネル3のデータから単離した単一細胞活動記録(SUA)の結果を表している。表示には、一試行ずつ活動電位(スパイク)の生じた時刻を小さな縦線で表示したラスター表示(spike rastergram)と、視覚刺激の提示時刻で揃えてスパイク生起頻度の度数分布を試行間で平均した、事象関連平均

発火頻度分布図(peri-stimulus time histogram)を示す。

この手法により、刺激提示をする前のbaseline期間の活動には増減があるものの、少なくとも視覚刺激が提示された直後約80msの潜時でみられるスパイクのピークについては、手術後13日目までは安定的に保たれていることが分かった。

4. 結 論

本研究により、二つの結論が得られた。

第一に、複雑な視覚刺激を選択する意思の脳内メカニズムを調べるための、ロングエヴァンスラット行動実験モデルを構築することができた。

第二に、慢性多点電極埋め込みにより、少なくとも2週間の期間、LFPとスパイクが安定的に記録できることがわかった。現在は、チャンネル数を32チャンネルまで拡張し、同様の実験により、視覚連合野の広範囲からの同時記録を行う試みを続けている。

さらに、筆者らは32チャンネル多点ECoG電極の試作をおこなっている。

近い将来、このECoG電極と多点微小電極アレイの併用により、LFPによる複雑な形の情報表現をMUA法と比べることが可能となるはずである。新しく開発した視

覚認知行動実験パラダイムと組み合わせることで、『視覚刺激を選ぶ意思判断は、視覚連合野を活性化する広範囲の大脳ネットワークの活動に分散表現されている』という作業仮説検証の第二段階に進みたい。

謝辞 本研究は豊田理化学研究所研究嘱託による助成を得て行われた。

文 献

- 1) Hasegawa & Miyashita, *Nat Neurosci* **5**, (2002), 90-91.
- 2) Hasegawa, *Rev Neurosci* **11**, (2000), 113-125.
- 3) Tomita, *et al. Nature* **401**, (1999), 699-703.
- 4) Hasegawa, *et al. Science* **281**, (1998), 814-818.
- 5) Fukushima, Hasegawa, Miyashita, *J Neurophysiol* **91**, (2004), 1367-80.
- 6) M. Koyama*, Hasegawa*, *et al. Neuron* **41**, (2004), 795-807. *co-authors