

ニホンザル外側膝状体における  
青色応答細胞の K 層局在を明らかにするための装置  
および記録部位特定手法の開発  
Development of methods to reveal K-layer localization of  
blue-on cells in lateral geniculate nucleus of the macaque  
monkey

2024 年 7 月

博士（工学）

及川 達也

豊橋技術科学大学

2024年 7月 8日

情報・知能工学専攻	学籍番号	第 173310 号	指導教員	鯉田 孝和
氏名	及川 達也			中内 茂樹

## 論文内容の要旨 (博士)

博士学位論文名	ニホンザル外側膝状体における青色応答細胞の K 層局在を明らかにするための装置および記録部位特定手法の開発
---------	---

(要旨 1,200 字程度)

<p>ヒトの色覚系を理解するためには、色情報処理する神経系について構造と機能の両面からの理解が必要である。近年大脳皮質における色情報処理の理解が進んでいるのに対して、皮質下の視覚中枢である外側膝状体、特にK細胞層における色情報処理に関しては、実験手法の制約から理解が進んでおらず、構造と機能の理解に分断が生じていた。本論文は、この実験手法の制約を解決するために実験システムおよび高精細なマーキング手法を開発し、ニホンザル外側膝状体K層からの細胞記録位置証明に用いることで、青色応答細胞がK層に局在することを示す。併せて本手法が今後の脳研究に有用であることを示すものである。</p> <p>本論文ではまず、神経生理実験で用いるための新たな計測システムを開発し、時間精度を評価した。本システムでは、従来のシステムにおける2台のPCおよびデータ収録装置をそれぞれ1台に集約し、開発言語はMatlabとした。これによりシステムの導入運用コストが従来よりも低くできた。また本システムの性能は、ハードウェア間の信号同期を1 ms未満、刺激描画を正確に1フレーム遅れで実施できたことから、従来システムと同等の時間性能をもつことが示された。以上より、本システムは神経生理実験に有用であることが示された。</p> <p>次に、タングステン微小電極を用いた、高精細・低侵襲な記録位置証明 (マーキング) 手法を開発した。従来のマーキング手法では、分解能や組織への侵襲性に問題があり、脳の微細構造へ適用するには性能が不十分であった。そこでタングステン微小電極を用いて、記録部位に双極パルス電流を印加することで、電極先端に酸化物を発生させマーキングとする手法を開発した。マウスを対象とした適用実験では、周辺細胞へのダメージを抑えつつ、直径20 <math>\mu\text{m}</math>を下回る高精細なマーキングに成功した。適用した電流パラメータは電気刺激実験に用いられる条件と類似していたことから、過去に電気刺激を行ったサル脳スライスを再解析した。その結果マーキングは見つかり、マーキングは2年以上生きたサルの個体で、周辺組織を侵襲することなく残存することが明らかになった。以上より、タングステン電極を用いた本マーキング手法は霊長類を対象とした長期間の慢性実験に有用であることが示された。</p> <p>最後に、本論文で開発した実験システムとマーキング手法を用いて、ニホンザル外側膝状体の細胞から青色応答を記録すると同時に、位置を特定した。記録部位を示すマーキングはすべてK層に位置しており、これによって青色に応答する細胞がK層に局在することが示された。</p> <p>以上より、本論文は霊長類脳深部を対象とした新たな実験手法を示すとともに、色覚を構成する脳深部組織である外側膝状体K層の構造と機能にさらなる理解を与えるものである。本論文の成果によって、外側膝状体を中心とした初期視覚系の構造と機能の理解の分断が埋められ、未だに不明瞭な部分が多い脳深部の微細な組織への理解が進むものと考えられる。</p>
--

Date of Submission (month day, year) : July 8, 2024

Department of Computer Science and Engineering	Student ID Number D173310	Supervisors Kowa Koida Shigeki Nakauchi
Applicant's name Tatsuya Oikawa		

## Abstract (Doctor)

Title of Thesis	Development of methods to reveal K-layer localization of blue-on cells in lateral geniculate nucleus of the macaque monkey
-----------------	--

Approx. 800 words

To understand human color vision, it is necessary to understand the structure and function of the nervous system that processes color information. In contrast to the understanding of the cerebral cortex, color information processing in the lateral geniculate nucleus (LGN), especially in the K cell layer, has not been well understood due to limitations in experimental techniques, preventing full understanding of structure and function. Although progress has been made in understanding the K layer mainly through studies using marmosets, marmosets differ from humans in brain structure and color vision. Therefore, to understand human color vision, it is necessary to study the K layer in macaque monkeys, a primate more closely related to humans. Based on anatomical studies, cells in the K layer are thought to respond to blue visual stimuli. However, no studies have directly shown that cells in the K layer respond to blue in macaque monkeys. In this paper, I developed an experimental system and a fine-scale marking method to prove the recording site of the K layer of the Macaque, providing direct evidence that blue-responsive cells are localized in the K-layer.

At first, I developed a novel visual neurophysiology experimental system, utilizing a single computer and one data acquisition system (DAQ), and evaluated its temporal accuracy. In this system, two PCs and DAQs in the previous system were integrated into one PC and DAQ. Matlab-PsychToolbox manages visual stimulation and behavioral control, while the DAQ (TDT) handles neural recording and real-time analysis. Additional analysis, such as calculating the peri-stimulus time histogram, is conducted in a second instance of Matlab. The development language of the system is solely Matlab. Thus, the cost from system installation to operation is lower than conventional systems, and even researchers unfamiliar with system development can develop the system on their own. The system can synchronize signals between hardware in less than 1 ms and draw stimuli with one frame delay, indicating that it has the same time performance as conventional systems. The parallel execution of two Matlabs allows for precise real-time control and simultaneous resource-consuming analysis. The system exhibited adequate temporal performance for visual neurophysiology experiments, and operated stably for over 2000 hours in experiments involving awake macaque monkeys. These results indicate that this system is useful for neurophysiological experiments.

Next, I developed a fine-scale and minimally invasive marking method using tungsten microelectrodes. Conventional marking methods have problems in resolution and invasiveness to tissues and are insufficient for application to microstructures in the deep brain. Therefore, I developed a novel marking method of simple, fine scale, and low invasiveness for use with tungsten electrodes. Tungsten needles are often processed by electrolytic polishing with alternating current, and small fragments of tungsten oxide appear and deposit around the tip. This tungsten oxide could be a mark if the electrolytic polishing is processed in vivo. The marking was clearly visible as a bright red in dark-field microscopy, probably due to the specular reflection of the tungsten oxide. Thus, even tiny fragments of tungsten oxide smaller than cellular size were visible in low magnification image, contributing prompt detections of the marking. Experiment on mice in vivo, I observed fine-scale markings with a size of less than 20  $\mu\text{m}$  while minimizing damage to the surrounding cells. Furthermore, re-analysis of monkey brain slices that participated in the electrical stimulation experiment revealed that the markings persisted without invading the surrounding tissue and lasted for at least two years in vivo. These results indicate that this marking technique using tungsten electrodes is useful for long-term chronic experiments on primates.

Finally, the experimental system and marking technique developed in this paper were used to record color responses in the LGN of Macaque monkeys and provide fine-scale evidence of the location of cells responding to blue color. In the experiment, a total of 330 color response units were recorded from two monkeys, 26 of which responded to blue, and marking was performed at each recording site. The results showed that all identified markings were located in the K layer. This strongly suggested that the cells responding to blue were localized in the K layer.

In summary, this paper demonstrates a new experimental technique for deep brain regions and provides further insight into the structure and function of the K layer of the LGN, a deep brain area that constitutes color vision. Although unit recording using metallic microelectrodes is classic, the combination of single unit recording and my marking technique could be most effective methods available today for recording neural activity in the deep brain microstructure. I believe that the results of this paper will bridge the divide in our understanding of the structure and function of the early visual system and advance our understanding of the fine organization of the deep brain, which is still largely obscure.

# 謝辞

本論文の執筆にあたり、非常に多くの方々のご指導とご協力を賜りました。

はじめに、私へ博士課程への進学を薦めてくださり、学部から博士後期課程までの6年半の長きにわたって温かくご指導くださった鯉田孝和先生に心から感謝いたします。

本学知能・情報工学系の中内茂樹先生、電気・電子情報工学系の河野剛士先生には、本論文を審査いただき、貴重なご意見を頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

京都大学ヒト行動進化研究センターの高畑亨先生、本学次世代半導体・センサ科学研究所の野田俊彦先生、株式会社ニデック研究開発本部研究開発センターの寺澤靖雄博士には、本学リーディングプログラムの指導教員として、研究をご指導いただきました。ここに深く感謝申し上げます。

第3章で述べた TDT-MatlabPTB システムの開発は、多くの方にご協力を頂きました。特に本研究室 OB の田中孝治さん、本学 OB の山際翔太氏、筑波大学の山田洋先生、(株)日本バイオリサーチセンターの枝村光浩氏には、初期の開発において多大な技術支援をいただきました。また、京都大学ヒト行動進化研究センターの松本正幸先生には、システムのコアとなる画期的なアイデアについて助言いただきました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

第4章で述べたタングステンマーキングの開発は、本研究室の OB である野村健人さん、原利充さんの仕事抜きにはなし得ませんでした。原さんはタングステンマーキングの原理を発見し、野村さんにはタングステンマーキングがニホンザルへ適用可能である可能性を示唆する重要な解析をしていただきました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。また、本マーキングの開発に際して、実験動物の飼育管理および提供にご協力いただいた本学次世代半導体・センサ科学研究所の沼野利佳先生、山下幸司氏、電極の微細構造の撮影の際に走査型電子顕微鏡をお貸しいただいた本学教育研究基盤センターの先生方、スタッフの皆様方に深く感謝申し上げます。

玉川大学脳科学研究所の小松英彦先生には、タングステンマーキングの投稿前の論文を読んでいただき、論文の構成に関してご助言いただきました。加えて、マーキング論文で用いたサル脳スライスは、当時鯉田先生が生理学研究所の小松先生の部門に所属していたころの研究によるものであり、この脳スライスの再解析がマーキングの生体適用についての議論に多大な貢献をいたしました。ここに深く感謝申し上げます。

第5章で述べたニホンザル LGN 記録実験の遂行にあたり、生理学研究所の磯田昌岐先生、福永雅喜先生、郷田直一先生、横井功博士には、ニホンザル脳の構造 MRI 撮影にご協力いただきました。ここに深く感謝申し上げます。

生理学研究所（当時）生体システム研究部門の南部篤先生、知見聡美先生には、ま

だサル実験の経験がほとんどなかった学部生の私を実務訓練（長期インターンシップ）にて受け入れていただき、サルを対象とした単一細胞記録のいろはを教えてくださいました。また、本論文第 5 章のサル実験で用いた実験手続きの一部は、南部研究室のプロトコルを参考にいたしました。おかげさまで、サルのケアやヒストロジー作業を大幅に最適化できました。ここに深く感謝申し上げます。

本研究の一部は、本学博士課程教育リーディングプログラムのご支援を賜りました。本プログラムの修了は叶いませんでしたが、本プログラムを通じた活動は、研究活動における困難を乗り越えるための力となりました。本プログラム推進室（当時）の石井仁先生、塚田元先生、岩瀬千春氏、田中由利氏、本プログラム同期の高橋遼さん、田中哉太さん、本保雄太さんをはじめ、関わっていただいた履修生の皆様に心から感謝申し上げます。

リンナイ奨学財団には、博士後期課程の 3 年間にわたって、経済面のご支援を頂きました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

豊橋総合動植物公園（のんほいパーク）の園長である高見一利先生には、本研究室で飼育しているサルの非常勤獣医を引き受けていただいております。サルの健康管理や非常時の対応に貢献いただいております。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、6 年半という長い期間のなかでともに過ごしてきた鯉田研究室のメンバーとスタッフの皆様には感謝申し上げます。本研究室 OB の大原正和さん、同じく OB であり現在九州大学の兼松圭先生には、博士後期課程の先輩として多くの助言を頂きました。大竹明氏には、サルの飼育管理に携わっていただき、サルごとの細かい管理や対応について助言いただきました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

最後に、恐縮ながらここにお名前を挙げきれなかった多くの方々へ、そして長きにわたる学生生活を支えてくれた家族へ感謝いたします。

# 目次

第 1 章 序論.....	1
1.1. 研究背景 .....	1
1.2. 本研究の目的 .....	2
1.3. 本論文の構成 .....	3
第 2 章 霊長類における初期の視覚神経系 .....	5
2.1. はじめに .....	5
2.2. 網膜以前の眼球組織（光学系） .....	6
2.3. 網膜.....	6
2.4. 外側膝状体.....	10
2.5. 外側膝状体の生理学的特性、K 層の特異性 .....	13
2.6. 外側膝状体のサル種による違い、および K 層記録における問題点.....	16
2.7. 本章の総括.....	17
第 3 章 神経生理実験システムの開発 および評価.....	18
3.1. はじめに .....	18
3.2. システム概要 .....	19
3.3. システムの時間精度の評価 .....	21
3.4. 脳活動計測実験 .....	24
3.5. 考察.....	26
3.6. 本章の総括.....	28
第 4 章 タングステン微小電極を用いた 高精細・低侵襲マーキング手法の開発と 生体への適用 .....	29
4.1. はじめに .....	29
4.2. 実験方法 .....	33
4.3. 結果.....	35
4.4. 考察.....	39
4.5. 本章の総括.....	45
第 5 章 外側膝状体の色応答記録および青色応答細胞の位置特	

定	47
5.1.	はじめに ..... 47
5.2.	実験方法 ..... 47
5.3.	結果と考察 ..... 56
5.4.	本章の総括 ..... 69
第 6 章	結論 ..... 70
6.1.	総合考察 ..... 70
6.2.	展望 ..... 72
引用文献	..... 73
研究業績	..... 84

# 第1章 序論

## 1.1. 研究背景

科学において、脳は宇宙とともに「最後のフロンティア」といわれている。なぜならば、脳は現代においても未解明な部分が多いからである。脳はたちの思考や行動を司ると考えられており、古代より魂や心の所在として研究されてきた。現代では、脳は主に神経科学の研究対象である。神経科学は、脳および神経系を対象とした研究分野である。同時に、神経科学は生理学、解剖学、生化学、計算科学など多様な学問分野から研究される分野横断的な領域である。

### 1.1.1. 脳の構造と機能の理解

神経科学において、脳は大きく分けて2つの側面で研究される。ひとつは脳の構造（解剖学）、もうひとつは脳の機能（生理学）である。解剖学は脳の構造の理解を目的とし、生理学は脳の機能の理解を目的としている。この両側面の研究はそれぞれが独立に発達する部分もあるが、特に生理学においては、明らかにした脳機能と、既知の脳構造とを結びつけて考察することが多い。この結びつけにあたって、その拠り所とする仮説が脳機能局在論である。これは脳が部分ごとに異なる機能を担うとする仮説であり、現代では広く受け容れられている。脳機能局在に関する最初期の理解は、ヒト脳損傷患者の損傷部位と機能障害との関連付けである。次いで Brodmann による脳地図が発表され(Brodmann, 1909)、彼による脳の区分をもとに機能との対応付けが研究されてきた。現代では解剖学的研究手法の発達により、これまで理解されてきた脳構造より更に細かなスケールの脳構造が明らかになってきている。生理学においても、脳活動の記録手法の発達により、より広い範囲、かつより高い分解能で脳機能を理解できるようになった。

脳機能の局在を理解することは、学術的・臨床的な貢献をもたらしている。これまで広範囲・高分解能で脳機能の理解が進んできたことで、脳機能局在論の裏付けと、機能局在のさらなる理解が進められてきた。学術的な貢献としては、脳を組織ごとの機能モジュールとして扱うことで、脳による情報処理のモデルを立てやすくなり、それが脳のさらなる理解に貢献することが挙げられる。また、機能局在は脳の発達の研究において、細胞の機能分化と組織化の点において重要な手がかりとなる。臨床的な貢献としては、症例から脳機能の局所的な障害が推定できることで、より適した治療方法を判断する材料となることが挙げられる。以上より、脳の機能局在をさらに理解していくことは、現在の脳科学における重要な課題である。

解剖学も生理学も理解の解像度が高まっているが、現代において生理学の理解は、

解剖学の理解のスケールに追いついていない。特に生体内からの記録において脳深部の微細な構造と機能の対応付けは不十分である。既存の実験手法では、脳深部において神経活動は高々100  $\mu\text{m}$  の分解能でとらえることしかできず、これは既知の微細な解剖構造に比べて精度が粗い。したがって、脳深部組織を理解するためには、高い空間分解能で、脳活動を記録し、かつその記録位置を証明する実験手法の開発が必要である。

### 1.1.2. 霊長類の視覚情報処理

初期視覚情報は、眼の網膜と視床の外側膝状体で主に処理されており、色情報は初期視覚での処理が重要である。ヒトの視覚系において色信号は3種の光受容細胞（錐体）の応答比で得られ、網膜神経節細胞を経て、脳深部の神経組織である外側膝状体に送られる。霊長類の外側膝状体は厚さ数百  $\mu\text{m}$  の層が複数重なった構造をしており、それぞれの層は網膜の異なる色信号を受け取っている。内側の大細胞層（Magnocellular layer; M層）は白黒情報を受け取り、外側の小細胞層（Parvocellular layer; P層）は色情報を受け取っている。このように解剖構造が、色情報の違いという機能と明瞭に対応がつくことから、視覚科学において白黒に関係して運動を分析する経路をM経路、色に関係して形態を分析する経路をP経路と呼ぶことも多い。外側膝状体は視覚研究者にとって最も広く知られている解剖構造の一つであり、視覚機能の理解においても重要である。

色情報には赤緑と青黄の2軸がある。二種類の色情報が外側膝状体でどのように分布しているかは十分に理解されていない。赤緑信号はParvoに選択的に投射しており、青黄色信号は層の隙間に相当する顆粒細胞層(Koniocellular layer; K層)に関連していることが示唆されているが（詳細は2章で述べる）、各層の細胞が何色に反応するのかは実験的に示されていない。これには技術的な問題が背景にある。細胞層の厚さはおおよそ数百  $\mu\text{m}$  であり、特にK層の厚さは高々100  $\mu\text{m}$  であるため、現在の記録位置の同定手法では分解能が足りないからである。初期視覚系における色情報の機能局在を理解するためには、外側膝状体の神経活動を記録し、その記録位置を細胞層の厚さよりも小さなスケールで証明するための技術的なブレイクスルーが求められている。

## 1.2. 本研究の目的

本研究の目的は、脳深部の微細組織から長期間にわたって記録を行うための新たな方法を提案し、色覚に関わる脳深部の微細組織を、その構造・機能の両面で同時に明らかにすることである。従来の研究手法では、脳深部からの単一細胞記録と記録位置の精密な同定が行えないため、外側膝状体の細胞層の高精細な理解が進んでいない。そ

ここで本研究は、金属微小電極を用いた神経活動記録実験で適用可能な、新しい記録位置同定手法を提案する。この新たな手法では、単一神経細胞から活動を記録した後に、その位置を数十  $\mu\text{m}$  の精度で同定することができる。

加えて、神経活動記録実験に用いる新たなシステムを提案する。神経活動を記録する実験では、記録したデータの処理および保存に PC を用いる。従来のシステムでは、かつて PC の処理能力が低かったことから、データの処理と保存をそれぞれ別の PC で行っていた。しかしながら、PC の処理能力が上がった現代においても、この 2 台の PC を用いた構成は変わっていない。そこで本研究では、1 台の PC から構成される新たなシステムを開発した。本システムは、従来のシステムと同等の時間精度を保ちつつ、システムの構成が大幅に単純化されている。同時に、システムの開発コストを下げることによって、ハードウェア・ソフトウェア開発に不慣れな生命科学系の学生や研究者でも独力でシステムの開発が可能である。

さらに上記で開発した記録位置証明手法および実験システムを用いて、ニホンザルの外側膝状体から青色に応答する細胞を記録し、記録された部位が K 層に局在しているかどうかを明らかにする。本研究は、脳深部の構造と機能の理解を橋渡しするものであり、今後の脳深部を対象とした神経活動記録実験における新たな標準手法たり得るものである。

### 1.3. 本論文の構成

本論文の構成を図 1.1 に示す。本章に次いで、2 章ではヒトおよび霊長類の色覚を構成する神経系のうち、本論文で着目する初期視覚系に関する先行研究を述べる。3 章では、単一の汎用 PC で構成される新たな視覚神経生理実験システムの開発およびその性能評価について述べる。4 章では、タングステン微小電極を用いた、高精細・低侵襲な記録位置証明手法の開発および生体への適用実験について述べる。5 章では、3 章および 4 章で開発した実験システムおよび手法を用いた、ニホンザル外側膝状体 K 層を対象とした色応答の記録およびその記録位置の証明実験について述べる。そして、6 章で以上を総括する。

## 第1章 序論

### 第2章 霊長類における初期の視覚神経系

- 脳深部の構造と機能の理解を対応付けることは重要である
- 従来手法では脳深部の微細な構造を理解するのに不十分である
- 外側膝状体 K 層の視覚応答について、明確な証明がされていない
- ニホンザルを用いた研究が、ヒト視覚の理解のために必要である

### 第3章 神経生理実験システムの開発および評価

- コンパクトで簡単なシステム
- 従来システムと同等の時間精度
- 導入・開発コストが低い

### 第4章 タングステン微小電極を用いた高精細・低侵襲マーキング手法の開発と生体への適用

- 高精細・低侵襲で、微細構造に有用
- 長期間の慢性実験に有用
- 特殊な処理なく明瞭に観察できる

### 第5章 外側膝状体 K 層の色応答記録および青色応答細胞の位置特定

- ニホンザル外側膝状体から青色応答細胞を記録、マーキング
- マーキングはすべて K 層に位置していた
- 外側膝状体の青色応答細胞が K 層に局在する強い証拠を示した

## 第6章 結論

- ニホンザル外側膝状体 K 層における機能と構造の理解を対応付けることで、初期視覚系の並列性を示すミッシングピースが埋められた
- 本研究で開発し、用いた実験手法は、脳深部の微細構造を理解するための最適な手法である

図 1.1 本論文の構成

## 第2章 霊長類における初期の視覚神経系

本章は、霊長類における網膜から外側膝状体までの解剖と機能、視覚情報表現について述べ、本研究で注目する外側膝状体における課題を述べる。

### 2.1. はじめに

色覚研究において、非ヒト霊長類、特にマカクザルは優れたモデル動物である。これは他の一般的な実験動物である齧歯類と比較することでわかる。げっ歯類の中でもマウスは入手と飼育のコストが低く、倫理的制約が緩く、遺伝子改変動物など豊富な研究ツールがあるなどの利点がある。そのため、マウスは研究目的に対する科学的な妥当性よりも実用的な制約から選ばれることすらある(Walker et al., 2022)。マウスをモデル動物に選ぶことの問題点は、視覚機能がヒトと大きく異なる点である。マウスには網膜に中心窩が無く高分解能の視力を持たない。マウスは夜行性であるため暗所視に適した桿体が多く、錐体の数が少ない。さらに、マウスにはL錐体が無く2色型の色覚であり、3色型色覚であるヒトや霊長類とは異なる。脳の構造も異なり、マウスはヒトに対して大脳皮質の発達が乏しく、特に高次領野の対応は困難である。皮質下においても、マウス外側膝状体はCoreおよびShellと呼ばれる2つの組織で構成されており、ヒトの外側膝状体の6層構造とは構造が大きく異なる。よって、げっ歯類は色覚のモデルとして有用ではない。

また近年、非ヒト霊長類のモデル動物としてコモンマーモセットが用いられるようになってきているが、色覚研究に用いるには問題がある。まずマーモセットの色覚には性差があり、オスはすべて二色覚であり、メスは二色覚と三色覚が混在する。さらにオス、メスともにLM錐体オプシンに3つのサブタイプが存在する(Tovée et al., 1992; Williams et al., 1992)。三色覚をもつメスであっても明確な個体差がある。この多様性は遺伝子多型によるものであるため頻度が高く、ヒトのL/Mオプシン遺伝子の変異による異常三色覚とは仕組みが異なる。以上より、ヒトの三色覚とマーモセットの三色覚は異なるため、色覚研究にマーモセットを用いる際は制限がある。

一方でマカクザルには上記の問題が無く、視覚研究に適したモデル動物である。マカクザルはヒトと同じ3種類の視物質を有しており、外側膝状体の構造もヒトと同様の6層構造であり、大脳皮質も発達しているため、色覚や高次の視覚認知機能を調べる研究でも広く用いられる。以上から本研究ではマカクザルに属するニホンザル(*Macaca fuscata*)を用いることとした。

本章で述べる視覚神経系の構造と機能は、断りのない限りヒトを含む三色覚をもつ霊長類のものである。

## 2.2. 網膜以前の眼球組織（光学系）

視覚の分光感度は眼光学系によって大きく影響される。外界の光は、眼球組織の角膜→房水→水晶体→硝子体の順にフィルタリングされて網膜に到達する（図 2.1A）。360 nm 未満の紫外線は眼球組織に 99%以上吸収されるため、網膜にほとんど到達しない。800 nm 以上の近赤外線は眼球組織にほとんど吸収されずに網膜まで到達する。1300 nm 以上の遠赤外線は房水や硝子体液といった眼球組織中の水分にほとんど吸収される。更に、中心視野周辺では黄斑色素によって短波長光が吸収される。

## 2.3. 網膜

網膜は、眼球の後ろ側の内壁を覆うシート状の組織であり、光から始まる視覚情報を処理する神経細胞が規則的に配置された構造をしている。眼球の光学系を通った光は網膜最奥の視細胞（錐体細胞、桿体細胞）に受容され、神経信号に変換される。その信号は水平細胞やアマクリン細胞による修飾を受けたのち、網膜表面の網膜神経節細胞へ伝達され、視神経を経て脳へ送られる（図 2.1B）。

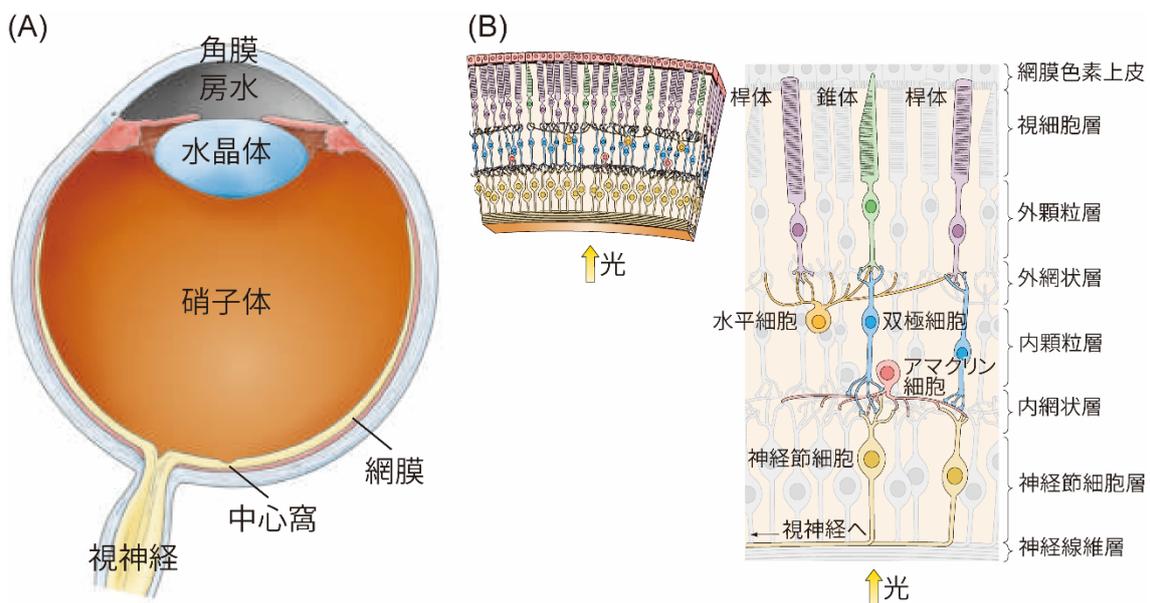


図 2.1 (A)眼球の光学系および (B)網膜の構造。(Purves et al., 2004)を加工。

網膜の細胞密度や構造はその位置によって異なる。網膜中心には黄斑と呼ばれる黄色の色素に富む領域がある。したがって黄斑領域では短波長光（青色）が吸収されるが、これは軸上色収差（波長により屈折率が異なる）による網膜上の結像のぼけをなくすためだと考えられている。黄斑領域は視細胞が密に存在し、視野中心部の視覚情

報を担う。黄斑領域の更に中心部は中心窩と呼ばれ、錐体細胞が最も密に存在し、かつその出力がほとんど占有の回路によって眼球外まで伝わる。よって中心窩は最も空間解像度が高く、高精細な視覚情報処理に重要である。さらに中心部は錐体細胞のみが存在する領域があり、中心小窩と呼ばれる。中心窩の錐体細胞以降の神経細胞は、周辺部に追いやられている。哺乳類において中心窩をもつのは霊長類のみである。

次節より、網膜の構造と機能について、視覚情報処理の順に追って述べる。

### 2.3.1. 視細胞

網膜において主に光を受容するのは L、M、S の三種類の錐体細胞 (Cone cell) と、桿体細胞 (Rod cell) である。錐体・桿体はそれぞれ異なる視物質を発現し、波長感度特性と光への感度が異なる。錐体はそれぞれ 560、530、420 nm に吸光波長感度ピークをもつ L、M、S オプシンを発現する (図 2.2 A)。以降、それぞれ L、M、S 錐体と呼ぶ)。また、L オプシンの吸光波長感度には遺伝子の違いによる数 nm のばらつきがある (図 2.2A)。また、網膜錐体細胞の感度特性を心理実験のデータから定義した Cone fundamental と呼ばれる関数が用意されている (Stockman & Sharpe, 2000、図 2.2B)。桿体はおよそ 500 nm に吸光波長感度ピークをもつロドプシンを発現する。錐体・桿体は環境中の光量によって使い分けられている。錐体は光への感度が桿体に比べて低く、明るい場所では応答するが暗い場所では応答しない。対して桿体細胞は光への感度が高く、暗い場所で応答できる。

錐体細胞の密度は中心窩で最も高く、中心小窩ではおよそ 20 万個/1 mm<sup>2</sup>に達する (Sawides et al., 2017、図 2.2C)。錐体細胞の網膜上の配置は、L/M 錐体はモザイク状にランダムな配置を示し、対して S 錐体は規則的なばらつきをもって配置されている (Hofer et al., 2005、図 2.2D)。

網膜錐体細胞の存在比率には偏りがある。正常な三色覚と診断されたヒトにおいて、S 錐体は全体の 5.7%(4.6~6.6 %、Hofer et al., 2005)で、残りは L 錐体と M 錐体である。ヒトにおいて L/M 錐体の存在比率は平均して L:M = 2.5:1 (L 錐体が 70%程度) であるが、正常三色覚とされたヒトでも大きな個人差がある (Hofer et al., 2005、図 2.2D)。マカクザルでは、S 錐体の存在比率がヒトよりも 2-3 倍大きく (Martin & Grünert, 1999)、L/M 錐体の存在比率はほぼ 1:1 で個体差は小さいと考えられている (Mollon & Bowmaker, 1992)。また錐体細胞の存在比率は網膜部位によっても異なり、中心窩の直径 0.3-0.4° の範囲には S 錐体細胞が存在しない。

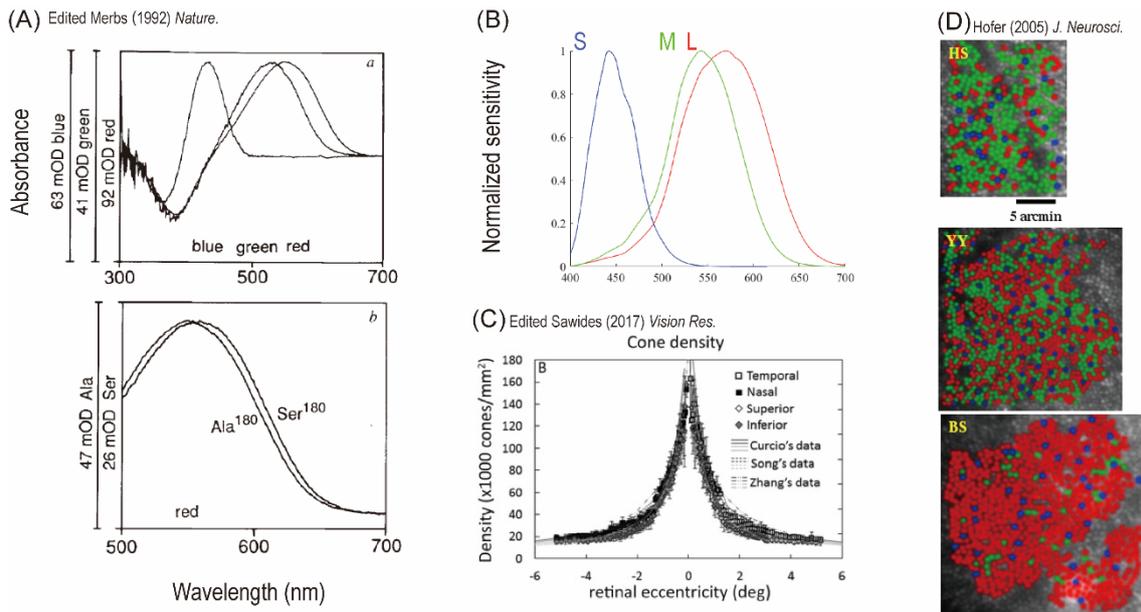


図 2.2 ヒト網膜錐体細胞の諸特性。(A)ヒト錐体オプシンの吸光波長特性(上)、および赤(L)オプシンのサブタイプによる波長ピークのズレ(下) (Merbs & Nathans, 1992)。(B) ヒト錐体の感度特性(Stockman & Sharpe, 2000)。(C) ヒト錐体の、網膜中心からの離心度に対する密度分布(Sawides et al., 2017)。(D) ヒト L/M/S 錐体の分布。L 錐体を赤、M 錐体を緑、S 錐体を青に画像処理で着色している(Hofer et al., 2005)。

### 2.3.2. 網膜の介在神経細胞

水平細胞は錐体細胞とその出力先である双極細胞の間に介在する細胞である。水平細胞は隣接する数個の錐体細胞とシナプス結合をもち、視細胞と双極細胞の間の信号伝達を修飾する。具体的には、水平細胞は周辺の錐体細胞の信号を加算し、錐体細胞へ抑制性のフィードバックを送っている。水平細胞は隣接する水平細胞と電気的結合をもつことから、水平細胞の信号は周辺の水平細胞の信号も加算され、結果として多数の錐体細胞の信号が加算されたものとなる。したがって、水平細胞は、周辺の L/M/S 錐体の存在比に対応した信号 (実質的に L+M) をもつことになる。錐体細胞はこの信号によるフィードバック抑制を受け、受容野周辺部の光刺激に対して応答が抑制される。つまり、水平細胞によって、L 錐体は  $L-(L+M)$ 、M 錐体は  $M-(L+M)$ 、そして S 錐体は  $S-(L+M)$  という錐体反対色応答が形成される (図 2.3)。

双極細胞は錐体細胞から入力を受け、網膜神経節細胞およびアマクリン細胞へ出力する細胞である。双極細胞には少なくとも 12 種類のサブタイプが存在すると考えられている(Tsakamoto & Omi, 2016)。このうち色覚に関わるのは、ミジェット双極細胞と S 錐体双極細胞の 2 つである。双極細胞には ON 型と OFF 型が存在する。ON 型は光刺激の増加に対して、OFF 型は光刺激の減少に対して応答する。したがって双極

細胞は、例えば ON 型の S 錐体双極細胞では受容野中心部の S 錐体色刺激の増加に興奮応答、かつ周辺部の L/M 錐体色刺激の増加に抑制応答する(S-ON 中心、LM-OFF 周辺)。更に、OFF ミジェット細胞は S 錐体細胞と結合をもち、S-OFF 信号を網膜神経節細胞に出力する。

アマクリン細胞は双極細胞と網膜神経節細胞の間に介在する細胞である。アマクリン細胞は水平細胞と同様に周辺のアマクリン細胞と結合をもつため、水平細胞や双極細胞よりも更に広い範囲の光刺激の信号を加算し、網膜神経節細胞の応答を修飾していると考えられる。しかし、アマクリン細胞は形態学的に 30 種類以上の分類が存在し、視覚的な運動への方向選択的な応答を示すスターバースト細胞(Y. J. Kim et al., 2022; Patterson et al., 2022; Rodieck, 1989; A. Y. M. Wang et al., 2023)や桿体細胞由来の入力を受ける AII 細胞などを除いて、その詳細な機能は明らかになっていない。

### 2.3.3. 網膜神経節細胞

網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell、RGC) は網膜から脳へ出力する細胞である。霊長類 RGC は形態学的、解剖学的に多様であり、RGC タイプごとの存在比率は最近になって明らかになった(Y. J. Kim et al., 2022)。RGC のうち 8 割を占めるのが、錐体細胞から入力を受けるミジェット (Midget)、パラソル (Parasol)、小型二層性 (Small bistratified) 神経節細胞である。このうち色覚に関わるのはミジェット神経節細胞と小型二層性神経節細胞である。ミジェット神経節細胞はミジェット双極細胞から入力を受ける細胞で、応答は入力細胞と同様に、受容野中心部の L-ON、M-ON、L-OFF、M-OFF 光刺激に興奮応答し、受容野周辺部の L+M 刺激にはその反対の応答を示すという構造をもつ。この応答によって、ミジェット神経節細胞では L 錐体細胞と M 錐体細胞の差分の情報、つまり赤-緑の反対色として色情報が表現される。ミジェット神経節細胞は外側膝状体小細胞層 (Parvocellular layer、P 層) へ接続する。小型二層性細胞は樹状突起が二層に分かれており、双極細胞の ON 接続層 (内網状層外側) と OFF 接続層 (内網状層内側) の両方で入力を受ける。ON 接続層では S 錐体双極細胞から入力を受け、OFF 接続層では L/M 錐体からの OFF 情報をディフューズ双極細胞を介して受け取っている(Calkins et al., 1998; Crook et al., 2009; Dacey & Lee, 1994)。応答は入力細胞と同様に S-ON 中心、(L+M)-OFF 周辺という構造をもつ。つまり、小型二層性細胞は青-黄の反対色表現をもつ。小型二層性細胞は外側膝状体顆粒細胞層 (Koniocellular layer、K 層) へ接続する。これら神経節細胞がもつ赤緑、青黄という色軸は心理物理実験の結果とよく対応しており、この二軸は Cardinal 軸と呼ばれている。

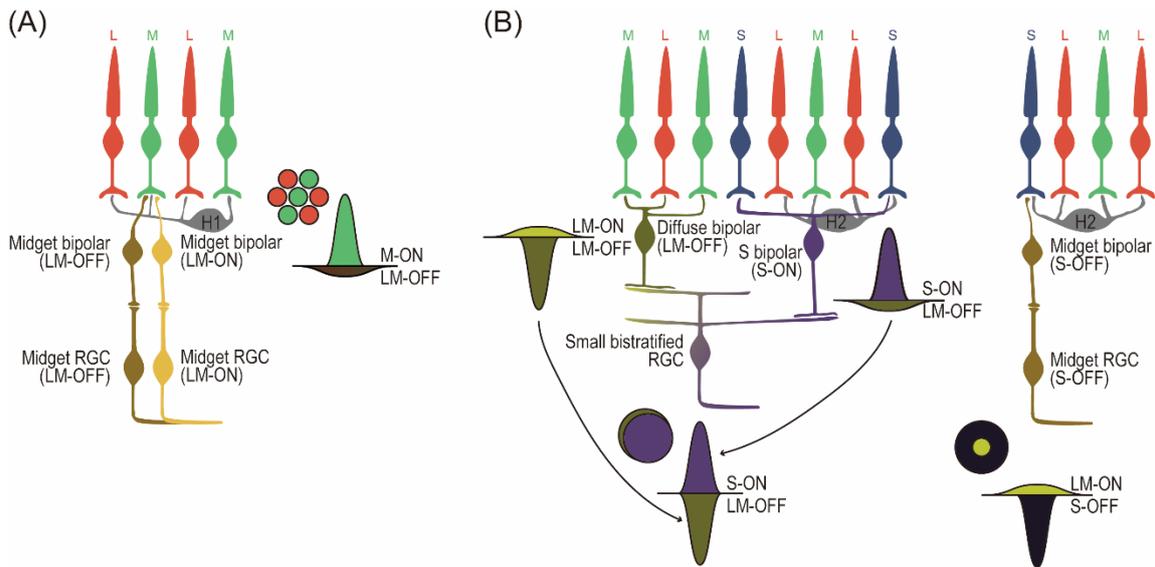


図 2.3 網膜錐体細胞から網膜神経節細胞までの接続と錐体反対色表現の形成。(A)L/M 錐体反対色。(B) S 錐体反対色。図は(Crook et al., 2009) をもとに作成した。

## 2.4. 外側膝状体

### 2.4.1. 視覚に関わる皮質下神経核

網膜が受けた視覚情報は皮質下の神経核を介して大脳に伝えられる。したがって大脳皮質における視覚情報処理を理解するためには、皮質下神経核による情報の修飾を考慮する必要がある。視覚の主な皮質下神経核は、外側膝状体 (Lateral Geniculate Nucleus; 外側膝状体)、上丘 (Superior Colliculus; SC)、視床枕 (Pulvinar) の3つである。これらはすべて網膜神経節細胞の投射を受けるが(Kwan et al., 2019)、このうち最も多くの投射を受けるのは外側膝状体である。網膜神経節細胞の 8 割以上が外側膝状体へ投射する。

次節から、視覚経路における網膜-皮質投射の主要な神経核である外側膝状体について先行研究を述べる。

### 2.4.2. 解剖学的特性

外側膝状体は視覚に関わる神経核(神経細胞の塊状組織)であり、霊長類においては脳のほぼ中心に位置する。外側膝状体の構造は、脳を中心に冠状断にスライスしたとき、海馬の内背側をみるとよくわかる (図 2.4A、B)。外側膝状体は霊長類において層構造であり、例えばニホンザルの外側膝状体細胞は厚さ 100  $\mu\text{m}$  程度の折れ曲がった層をつくり、それが数十  $\mu\text{m}$  程度の間隙を挟みながら数層重なっている (図 2.4C)。

この層の数はコモンマーモセットで4層、マカクザルで6層あり、種によって異なるが、いずれもその解剖学的・生理学的特徴からまず2種類の層に分類できる。図2.4Eに、外側膝状体の層構造および神経接続を示す。背側の層は小細胞層 (Parvocellular layer; P層) と呼ばれ、外側膝状体細胞全体の8割を占める。P層細胞はRGCのMidget細胞から入力を受け、V1のIVc $\alpha$ 層に出力する。内側の層は大細胞層 (Magnocellular layer; M層) と呼ばれ、外側膝状体細胞全体の1割を占める。M層細胞はRGCのParasol細胞から入力を受け、V1のIVc $\beta$ 層に出力する。加えて、層の間隙にも小さな細胞がまばらに存在する。これらは顆粒細胞層 (Koniocellular layer, K層) と呼ばれ、外側膝状体細胞全体の残りの1割である (図2.4D)。K層細胞はRGCのSmall bistratified細胞から入力を受け、主にV1のI層、II/III層ブロッブへ投射するほか、MT野(Sincich et al., 2004)、V2およびV4野への直接投射も報告されている (Benevento & Yoshida, 1981; Bullier & Kennedy, 1983; Yoshida & Benevento, 1981; Yuki & Iwai, 1981)。更に、また、K層細胞は他の層とは異なりリン酸化酵素の一つCaMKIIを発現しており抗体により選択的に染まる (Hendry & Yoshioka, 1994; Sincich et al., 2004)。また、K層の一部で、K層同士がP層をまたぐ「ブリッジ」のように繋がっていたり、P層へ枝を伸ばすような構造を持つという報告がある (Hendry & Yoshioka, 1994; Roy et al., 2009)。このように、外側膝状体の細胞層は解剖学的に上述の3種類に分類される。

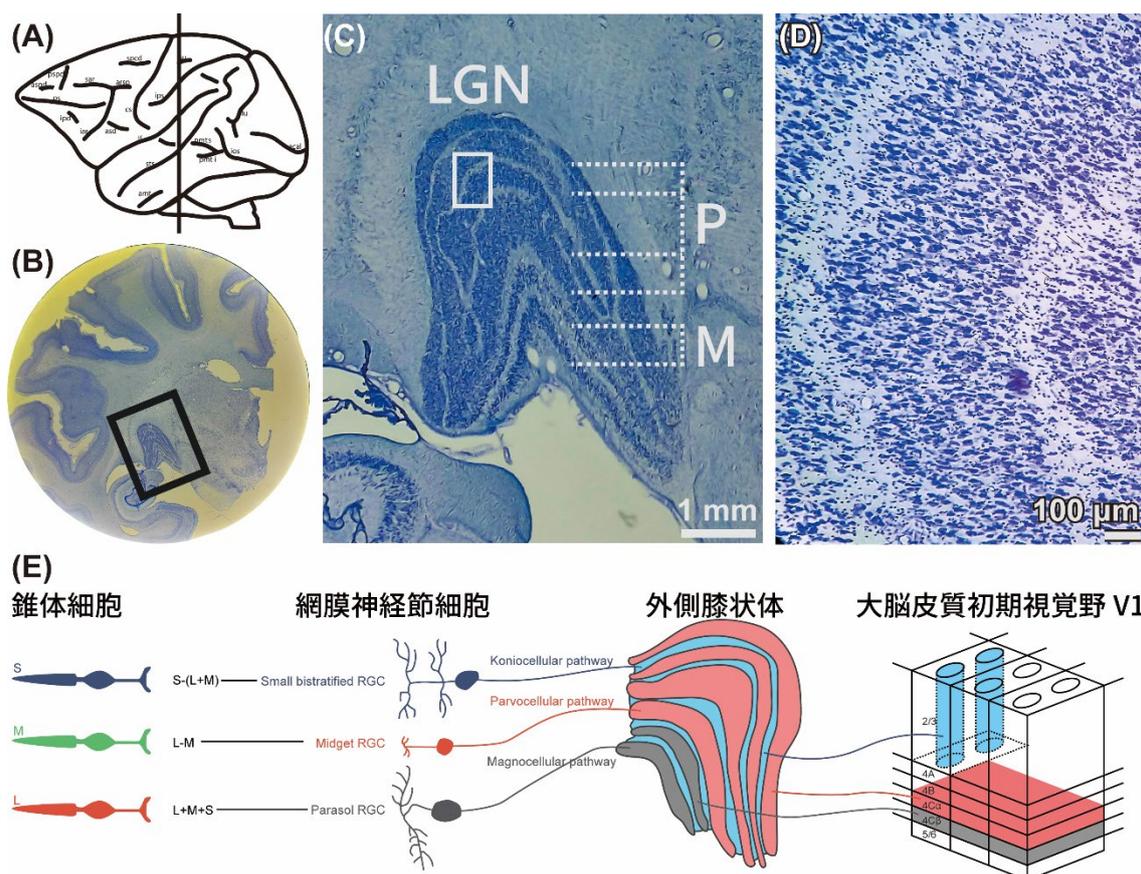


図 2.4 外側膝状体。(A) マカクザル全脳模式図および(B)以降のスライス位置。(B) (A)の切断面における、脳スライスのニスル染色。(C) (B)の枠内拡大図。(D) (C)の枠内拡大図。細胞層の間隙にも小さな細胞が疎に分布している (K 層)。(E) 外側膝状体の層構造、および網膜・大脳皮質視覚野との神経接続。図は(Kim et al., 2021; Nassi & Callaway, 2009)をもとに作成した。

外側膝状体が受ける網膜入力には主に単眼性であり、各層ごとに入力を受ける眼が異なる。マカクザル外側膝状体の P 層では背側から順番に対側、同側、対側、同側、M 層では背側から順番に同側、対側の眼球網膜から入力を受ける。

外側膝状体細胞は網膜からの求心性入力に加えて、複数の組織からの調整的な入力を受ける。まず V1 の VI 層からのフィードバック投射は外側膝状体への入力の 3 割、次に TRN からの抑制性入力もまた外側膝状体への入力の 3 割を占める (Sherman & Guillery, 2006)。更に、V4 から K 層への入力も報告されている (Gattass et al., 2014)。加えて脳幹の脚橋被蓋核 (Pedunculopontine tegmentum nucleus) や二丘傍核 (Parabrachial nucleus) からも非視野依存的なコリン作動性投射を受けており、睡眠・覚醒機能との関連が示唆される (Bickford et al., 2000)。

近年、外側膝状体は視床枕や上丘と複雑な回路を形成していることが明らかになっている。Kwan らはマーモセットの神経トレーシングによって、外側膝状体の P 層か

ら視床枕へ、上丘から外側膝状体の K 層への投射があることを示した(Kwan et al., 2019)。これは視覚情報が脳-視床間の相互投射による伝達・修飾のみならず、視床を含む皮質下の神経核内の回路による寄与も受けていることを示唆するが、その機能的な役割はまだわかっていない。

以上のように外側膝状体細胞は網膜由来の駆動型入力よりも、皮質や周辺神経核からの入力が多く多様な調整を受けているため、視覚情報にも影響を与えている可能性が高い。

## 2.5. 外側膝状体の生理学的特性、K 層の特異性

外側膝状体はかつて網膜から大脳皮質初期視覚野への神経路に介在するリレーであると考えられており、その情報処理についての知見は少なかった。しかし近年の研究によって、外側膝状体が担う情報処理の特徴が明らかになっている。

外側膝状体の細胞は RGC と同様に円形の中心-周辺拮抗型受容野を持ち、その多くは中心-周辺拮抗型である。外側膝状体は層ごとに半視野の明確な受容野マップを形成している。大まかには、外側膝状体は前側から後側にかけて視野の周辺-中心、背側から内側にかけて視野の下側-上側を担う (図 2.5)。

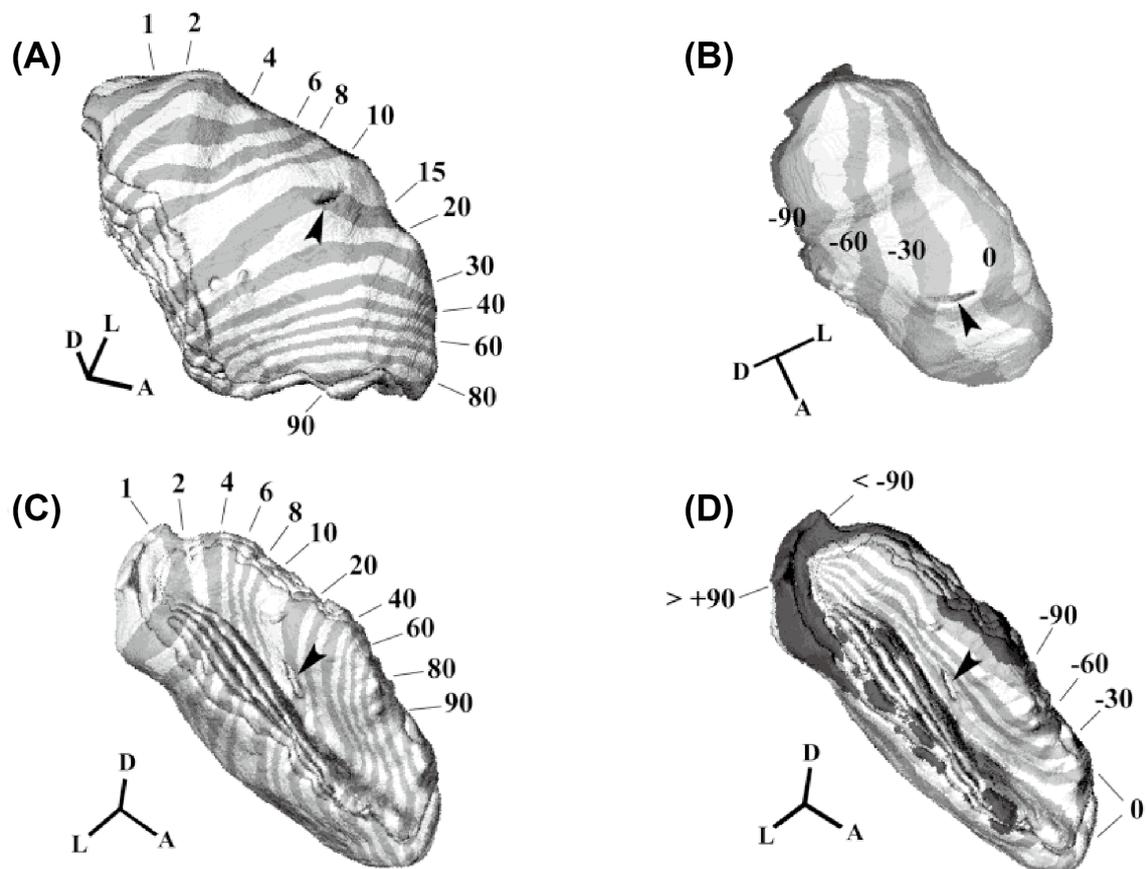


図 2.5 マカクザル外側膝状体の受容野マップ (レチノトピー)。A・C は視野中心からの

偏心性、B・Dは水平線を基準とした偏角(正が上半視野、負が下半視野)。Dの暗いグレイ部分は同側眼入力を受ける層を示す。図中D、L、Aはそれぞれ背側、外側、前側の座標軸を示す。図は(Erwin et al., 1999)から引用した。

外側膝状体の視覚応答の時空間特性は、入力のRGCの時空間特性とよく対応する。Parasol細胞から入力を受けるM層細胞は比較的低い空間周波数、かつ高い時間周波数の視覚刺激に応答し、視覚刺激に対して一過性の発火パターンをみせる。Midget細胞から入力を受けるP層細胞は比較的高い空間周波数、かつ低い時間周波数の視覚刺激に応答し、視覚刺激に対して持続的な発火パターンをみせる。加えて、P層はL/M錐体細胞由来の色情報に選択的に応答する。

外側膝状体細胞の色応答はDe Valoisらによってはじめて調べられた。彼らはマカクザル外側膝状体のスペクトル光応答を調べ、外側膝状体に錐体反対色応答を示す細胞が存在することを示した(De Valois et al., 1966)。Wieselらも同時期にマカクザル外側膝状体の背側の層(P層)の8割程度の細胞が錐体反対色応答を示したことを報告している(Wiesel & Hubel, 1966)。その後Derringtonらも同様にマカクザル外側膝状体の色応答を記録し、この応答特性を説明する新たな色表現モデルを提唱した(Derrington et al., 1984)。現在このモデルはDKL色空間として整備され、視覚心理物理学で広く使われている(図2.6A、Brainard, 1982)。

DKL色空間は順応色(環境光、モニタの背景色など)を原点に置き、原点に対する等輝度の錐体反対色軸(Cardinal軸:L-M軸、S-(L+M)軸)と輝度軸の強度の比として表現される空間である。Cardinal軸は、Heringによって反対色の軸として定義されたユニーク色と対応づけるように、赤緑軸、青黄軸と呼ばれることもあるが、実際の色相の見えはL-M軸が赤-シアン、S-(L+M)軸がおよそラベンダー色-ライム色とも呼ぶべき色であり、ユニーク色である赤緑青黄とは一致していない(図2.6B、Wuerger et al., 2005)。つまり、初期視覚で表現されている錐体反対色は、主観的な反対色とは異なる色表現であり、色の見えを計算するための中間表現と考えられる。外側膝状体の錐体反対色は、V1の局所回路によって主観的な反対色に変換されるようである(Li et al., 2022)。

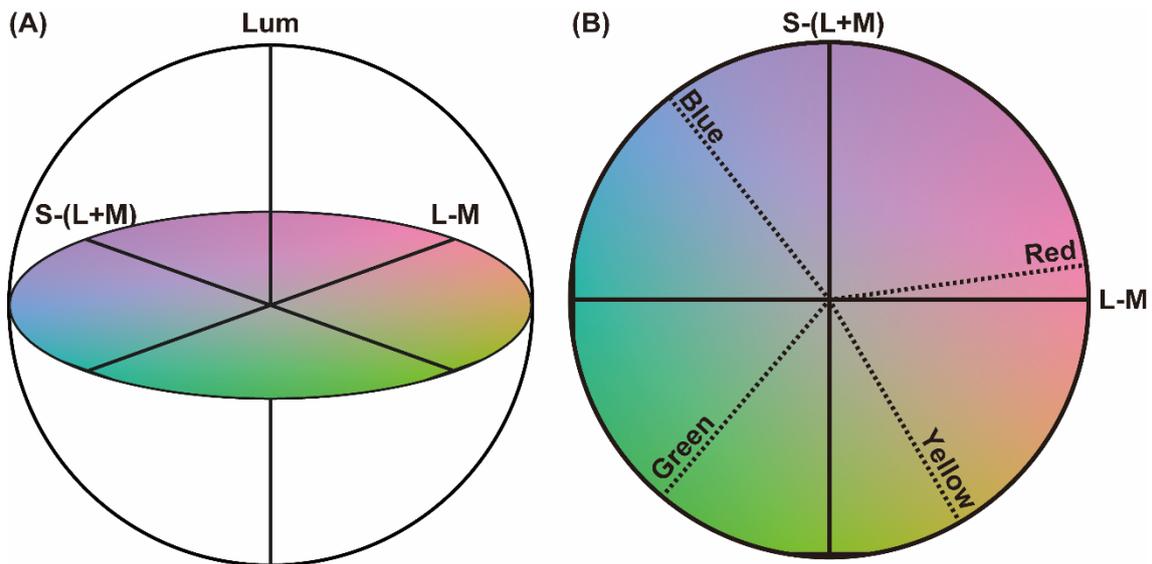


図 2.6 (A)DKL 色空間。(B)DKL 色空間の等輝度平面、およびユニーク色相(点線)。図は (Gegenfurtner & Kiper, 2003)をもとに作成した。

K 層の空間応答特性は P 層、M 層の中間程度の空間周波数の視覚刺激に応答する。M 層や P 層の細胞の視覚応答は、ほとんどの細胞で単眼性である。ただし、両眼への視覚入力によって、外側膝状体細胞の単眼応答が抑制されるという報告がある。この両眼入力による外側膝状体の応答の調整は、はじめネコで観察されたが、マカクザルでもよく調べられている (Dougherty et al., 2021)。ただしこの抑制は入力眼の刺激が低コントラスト、非入力眼の刺激が高コントラストのときにのみ現れたため、外側膝状体における両眼入力の相互作用は限定的であると考えられる。

K 層細胞の生理学応答については、マーモセットを用いてよく調べられている。K 層細胞への網膜入力は両眼性の視覚応答を示す細胞が多く確認されており (Zeater et al., 2015)、これは網膜からの入力が他の層に比べて両眼分離的でない (Kaas et al., 1978)、K 層へ入力する上丘細胞の応答が両眼性である (Tailby et al., 2012)、などの理由が考えられる。マーモセットでは更に、K 層細胞の一部が V1 細胞のような方位選択的応答を示すという報告もある (Cheong et al., 2013)。また K 層細胞は、皮質脳波との関係も研究されている。麻酔下において、V1 皮質 LFP の非同期状態 ( $\delta$  波のパワー低下) が、K 層細胞のスパイクレート上昇に数秒先行して現れたという報告がある (Pietersen et al., 2017)。この性質は P 層や M 層にはみられなかった。これは皮質活動の状態、つまり覚醒状態が K 層細胞の活動に影響を与えていることを示唆する。K 層細胞の自発活動は「分」スケールのリズムで振動している (Cheong et al., 2011)。更にこの自発活動のゆらぎはフラクタル構造をもち、変動の大きさが M 層や P 層に比べて大きいことがわかっている (Munn et al., 2020)。自発活動のフラクタル変動の大きさは大脳視覚領野において高次の領野であるほど大きいいため、K 層は M 層や P 層と比べて高次の視

覚機能と関連性が高いことが示唆される。

K 層の特性は遺伝学的にも調べられている。ヒト・サル・マウスを対象とした外側膝状体を含む視覚系組織のシングルセル RNA シーケンシングでは、サル外側膝状体の K 層において、プロエンケファリン (PENK) 遺伝子の発現量によって 2 種類のサブタイプが同定され、更に外側膝状体で PENK 発現細胞を特異的に染色すると、PENK 発現した K 層細胞は K 層内の局所にクラスターをもつことがわかった (Bakken et al., 2021)。この研究は、K 層細胞が少なくとも 2 種類に解剖学的あるいは生理学的分化をしていることを示唆する。マーモセットを対象とした免疫染色では、Calbindin を発現する細胞が、外側膝状体では K 層に限局すると同時に、隣接する視床枕下側部まで連続的に分布していることを報告した (Huo et al., 2019)。これは K 層が視床枕と類似した機能をもつことを示唆する。

K 層は S 錐体由来の色情報に選択的に応答すると考えられている。Dacey らは、マカクザル網膜の Small-bistratified 細胞が S 錐体応答に最適化した刺激、つまり青刺激に選択的に応答すると報告した (Dacey & Lee, 1994)。この時点で Small-bistratified 細胞の投射先が K 層であることと K 層の青色応答についてはまだ明らかでなかったが、続くマーモセットおよびマカクザル外側膝状体からの色応答記録 (Martin et al., 1997; Roy et al., 2009)、外側膝状体から網膜への逆行性神経トレーシング (Szmajda et al., 2008) によって、K 層が Small-bistratified 細胞の投射を受け、K 層が青色に応答するという考えが広く受け入れられた。つまり、Dacey らの研究に先立って De Valois ら、Derrington らが報告した外側膝状体細胞の青-黄反対色応答は、K 層細胞によるものであったと考えられる。しかしながら、これまで外側膝状体 K 層から青応答を記録した研究には、次節で述べる問題がある。

## 2.6. 外側膝状体のサル種による違い、および K 層記録における問題点

K 層の視覚応答特性はマーモセットでよく調べられている。その理由は、マーモセットの K 層がマカクザルの K 層と比べて厚く、記録および記録位置の推定が容易であるからである。加えてマーモセットは遺伝子改変による動物モデルの作成に成功しているため、神経科学の分野では近年盛んに利用されている。しかしマーモセットはマカクザルよりもヒトから遠い種であるため、種間の比較研究には有用だが、マーモセットの研究成果をそのままヒトに適用することは難しいと考えられる。外側膝状体の構造はヒトやマカクザルと異なり層が少なく、2つの M 層と 2つの P 層で構成される。このことから、ヒト視覚モデルとしての有用性はマカクザルに劣る。色覚において

も、マーモセットは性差やサブタイプの存在によりヒトと異なる。

マカクザル K 層の生理学的研究が難しい理由は、その構造的の細かさにあると考えられる。マカクザル K 層は各層が 100  $\mu\text{m}$  程度の厚さであるため、fMRI による応答の記録および同定はできず、電気生理実験によって個々の細胞から特徴的な応答特性が得られたとしても記録部位の特定が困難である。実際、これまでマカクザル外側膝状体から青色応答を記録した実験では、記録位置の同定は複数の粗いマーキング間の補間で推定した間接的なものであるため(Martin et al., 1997; Roy et al., 2009)、記録位置が K 層上であると証明するには精度が不十分である。また脳の深部にあるため Ca イメージング等のモダンな手法を用いることも困難である。以上より、マカクザル K 層からの記録とその記録位置の高精細な同定は、ヒト視覚系を理解するうえで重要な課題である。

## 2.7. 本章の総括

外側膝状体 K 層は外側膝状体において解剖学的、生理学的、そして遺伝学的にも P・M 層と比べて性質が異なっており、特別な理解が必要である。その中でも K 層細胞のみが青色に応答することを示すことは、色覚情報経路の並列性を示すために重要であり、色覚研究のミッシングピースであると言える。これまで K 層はマーモセットでよく調べられてきたが、マーモセットはマカクザルに比べてヒトと遠い動物種であり、脳の構造もまたヒトと異なるため、ヒト視覚の理解のためにはマカクザルを用いた研究が必要である。

# 第3章 神経生理実験システムの開発 および評価

## 3.1. はじめに

覚醒下の動物から脳活動を測るシステム神経科学実験では、感覚刺激の呈示と、行動・神経活動の記録を高い時間精度で同期させる必要がある。これまで様々な実験システムが開発されてきたが、その多くは専用の環境と低レベルのプログラム言語による開発を要するものや(Hays Jr et al., 1982)、複数の PC やハードウェアを統合した大規模かつ複雑なもの(Asaad et al., 2013; Asaad & Eskandar, 2008; Hwang et al., 2019; B. Kim et al., 2019; Meyer & Constantinidis, 2005)であった。そのため、システムの開発者や利用者はハードウェア、ソフトウェアの両方に精通する必要があり、研究者（たいいてい生物学・医学の学生）にとって学習コストが高いという問題がある。

その対策として近年普及しているのが神経科学用の統合計測制御システムである。一般に、計測システムを維持管理するにあたって問題となるのは、装置の持続性と互換性である。同じ装置を複製しようとしても特定のパーツが販売終了し入手困難となったり、制御 PC の OS アップデートに伴って互換性が失われたりすることがある。数年にわたって同じ実験を繰り返す慢性神経科学実験では持続性は何よりも重要である。このため、各自が入出力ボード等を組み合わせてシステムを作り上げるよりも、入出力が一体となった装置を導入する方が持続性や互換性は高いことから、近年統合システムが普及するようになった。

TDT (Tucker-Davis Technologies, US) とは統合システムを製造するメーカーの一つで、その統合システムにはプログラミング可能なリアルタイムマイクロプロセッサが搭載されている点に特徴がある。このため多チャンネルでの神経活動の記録、デジタル・アナログ入出力に加えて、簡単な信号処理を制御パソコンに負荷をかけずに行うことができる。ただし、情報処理機能は十分ではない。例えばシステム神経科学実験では、記録された電極電位からリアルタイムで単一スパイクを検出し、刺激や行動にどう関連しているのかを解析することが求められている。また画像刺激を固視中などの適切なタイミングで表示し、動物の応答に応じて画像や音声やジュース報酬をフィードバックする必要もある。これらの解析や制御のためには TDT とは別の制御システムを用意する必要があるが、完全に独立にしてしまうと実験データの保存ファイルが分離する、状態変数が共通化できないためオンライン解析ができない、という問題が生じる。そのため既存のシステムではソフトウェア間の通信を行いタイミングやパラメータを同期させている。しかし、この同期の制御には多くの開発の困難さが

ある。

様々なソフトウェア開発言語があるなかで、現在システム神経科学分野で広く用いられている開発言語として Matlab (Mathworks, USA) がある。Matlab は、データ解析だけでなく、Psychtoolbox (Brainard, 1997; Kleiner et al., 2007; Pelli, 1997)を導入することで視覚刺激の呈示や応答のリアルタイム制御が容易となる。このため、視覚刺激を用いる心理実験で広く用いられている。このような普及率の高い言語を用いて神経生理実験制御システムの開発ができれば、導入コストが低くなると期待できる。近年提案された制御システムの例(Asaad et al., 2013; Asaad & Eskandar, 2008; Hwang et al., 2019; B. Kim et al., 2019; Meyer & Constantinidis, 2005)でも Matlab が使われている。システム神経科学実験に使われてきたシステムでは伝統的に、実験制御、感覚刺激呈示に用いる PC と、神経応答の収録、解析、保存に用いる PC とは分けられていた(Asaad et al., 2013; Asaad & Eskandar, 2008; Hays Jr et al., 1982; Hwang et al., 2019; B. Kim et al., 2019; Meyer & Constantinidis, 2005)。これは時間性能を優先するリアルタイム処理系と、計算性能を優先する処理系で OS や PC を分ける必要があったためである。その背景には両者を単一の PC で同時に処理するには PC の性能が不十分であったことも理由に挙げられる。しかし、近代の PC の性能に加えて TDT のリアルタイムプロセッサを併用すれば、これらを単一の PC で処理することが可能かもしれない。

そこで、神経科学用計測制御システム TDT を用いて、1台の PC 上で TDT と Matlab をオンライン同期して稼働させ、視覚刺激と行動の制御を行うシステムを開発した (TDT-MatlabPTB と呼ぶ)。オンライン解析を行う場合は、制御用の Matlab とは別に2つめの Matlab を起動し、制御系に負担を掛けずにリアルタイムに神経活動等を解析できる。このような制御システムは、すでに複数の研究機関 (豊橋技科大、筑波大) でサルを対象とした実験に利用されており、一定の信頼性が得られている (Imaizumi et al., 2022; Y. Wang et al., 2021)。本論文では、このシステムを報告するとともに、一般に求められる時間性能について評価したのち、本システムを用いて覚醒マカクザルを対象とした視覚神経応答記録実験を行い、システムが実際の実験に利用可能であることを実証した。ここで求められる性能とは、神経スパイクの時間を解析するタイミングの精度として変数同期時間が 1 ms(Asaad et al., 2013; Asaad & Eskandar, 2008; Hwang et al., 2019; B. Kim et al., 2019; Meyer & Constantinidis, 2005)、視覚刺激の制御としてフレームレート (60 Hz, 17 ms) である。

## 3.2. システム概要

本システムのハードウェア構成を図 3.1A に示す。データ収集 (DAQ) システムであ

る TDT-RZ シリーズは、デジタルシグナルプロセッサを複数搭載し、多チャンネル電極の神経信号を増幅、デジタル化、周波数フィルタ、単一神経活動のスパイク検出までをリアルタイムに行うことができる。これらに加え、デジタル、アナログ入出力を持つため、アイカメラで得られる視線位置データやボタン押しの入力、報酬の出力が可能である。本研究で用いた TDT-RZ2 の仕様を表 3.1 に示す。本システムは、従来の複数システム (図 3.1B) に比べ、PC が 1 台で構成されているため、設置面積が小さく配線も最小で、データの一貫性や保守性に優れる。

本システムのソフトウェア構造を図 3.2 に示す。OpenEx (TDT) は、TDT-RZ シリーズを制御する Windows 用 GUI プラットフォームである。GUI 上に変数の表示と入力、入出力データの時系列表示、スパイク波形の切り出しなどがリアルタイムに行える。Matlab-Psychtoolbox (Matlab(1))は、タスクシーケンスおよび視覚刺激の制御を行う。OpenEx と Matlab は、ActiveX (Microsoft, US)をベースとした通信メソッドのパッケージである TDevAcc (TDT) によって変数が同期されている。実験中にユーザーが行う変数管理や制御はすべて OpenEx の GUI 上で行われ、Matlab はバックグラウンドで稼働する。Matlab(2)は複雑な解析 (例えば刺激ごとのヒストグラム表示) や OpenEx で表示できないデータ解析 (例えば視線位置の xy 表示) が必要な場合、2 台目の Matlab として起動され、Matlab(1)とは独立に稼働する。Windows OS での制御のリアルタイム性を確保するため、Matlab(1)はプロセス優先度を高く、Matlab(2)は低くすることが好ましい。

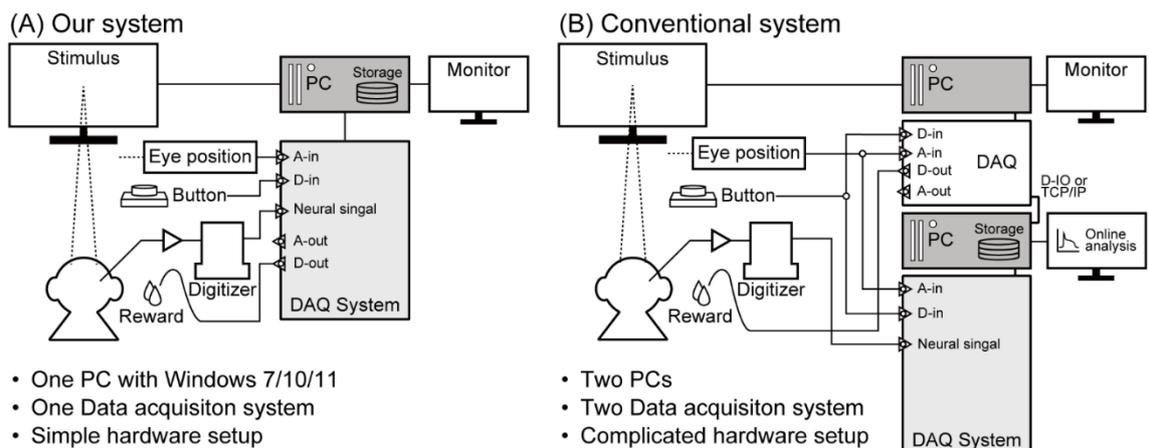


図 3.1 (A) TDT-MatlabPTB システムのハードウェア構成。(B) 従来型実験システムのハードウェア構成。

表 3.1 TDT-RZ2 の仕様

Num. of DSPs	8
Standard DSP	400MHz DSP, 2.4GFLOPS, 64MB RAM
Sampling rate	~50 kHz
D/A ports	8 ch, 16-bit PCM

A/D ports	8 ch, 16-bit PCM
Digital I/O	24 bit
Optical port	One 256 ch input
Legacy port	Two 16 ch inputs
Size	483 x 133 x 305 mm

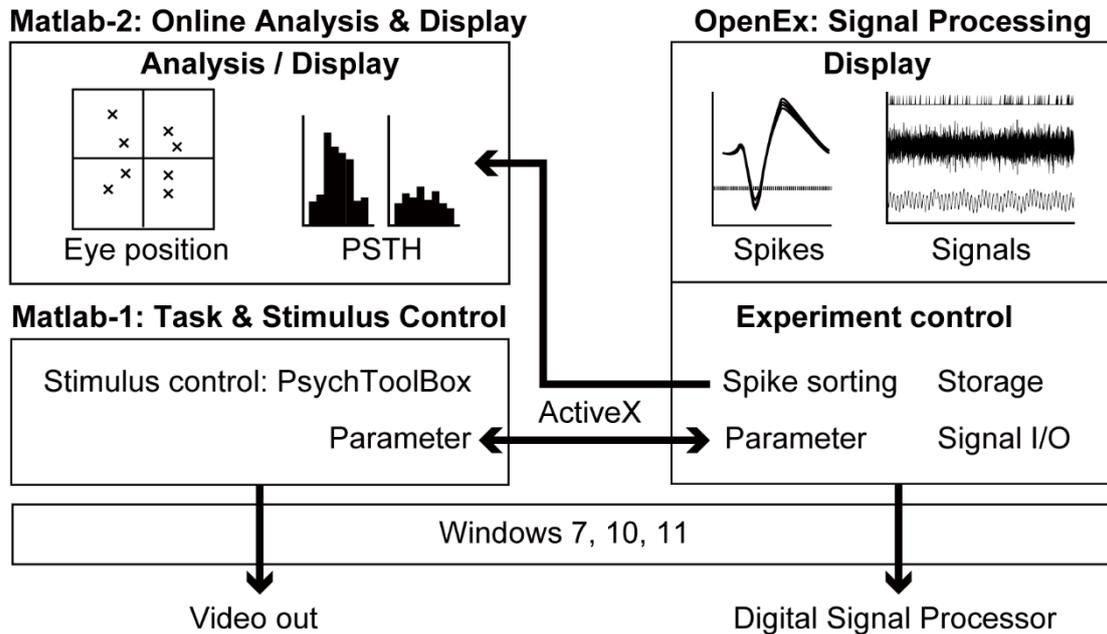


図 3.2 TDT-MatlabPTB システムのソフトウェア構成。TDT のソフトウェア OpenEx と、2 台の Matlab がそれぞれ変数をリアルタイム同期しながら稼働する。

### 3.3. システムの時間精度の評価

評価に用いた神経生理実験用プロセッサ TDT RZ2 (Tucker-Davis Technologies, USA、表 1) は、制御用 PC (HP Z400 Workstation (HP Inc, US, Intel Xeon CPU W3565 3.20 GHz, ATI FirePro V3800 512MB, 4GB RAM, 1TB HDD, Windows 7 pro 64bit version 6.1 SP1)に接続されている。実験者用ディスプレイには、23.6 インチ iiyama ProLite B2409HDS 液晶モニタ (解像度 1920 × 1080、60 Hz) を 2 台使用した。刺激呈示用ディスプレイには、40 インチ NEC MultiSync LCD-V404 液晶モニタ (解像度 1920 × 1080、60Hz) を使用した。視覚刺激の提示タイミングを計測するために、刺激呈示画面の左上隅にフォトセンサを取り付け、計測値は TDT のアナログ入力で記録された。OpenEx のバージョンは 2.18.0、Matlab は R2012b であった。Matlab(1)のプロセス優先度は最も高く (realtime) 設定された。

まず、OpenEx と Matlab の変数同期の時間精度を評価するために、変数変化の往復時間を計測した。往復時間は以下の手続きで定義した。まず Matlab 上で変数 A の数値を変え TDT に同期する。次に TDT で変数変化を検出したら結果を変数 B に入力

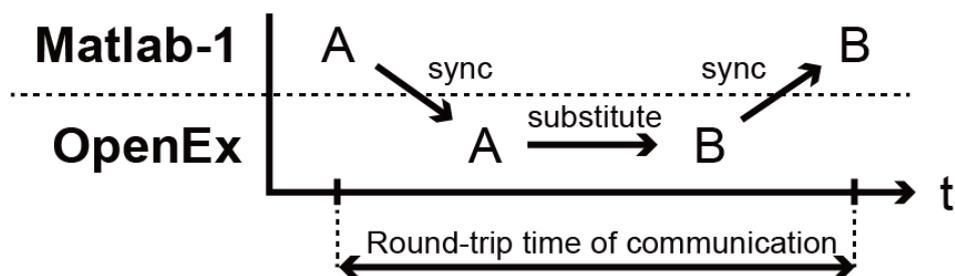
する。変数 B の変化は Matlab に同期され、変数変化を検出したら完了とする。往復時間はこの一連の処理にかかる時間長である (図 3.3A)。

次に、刺激呈示の時間制御性を評価するために、Matlab(1)の描画命令からディスプレイへの呈示までの時間遅れを測った。描画命令のタイミングは、Matlab から描画命令の直後に変数変化として OpenEx に送られ記録される。画面呈示のタイミングは、画像を黒から白へ変化させたときに画面左上にとりつけたフォトダイオードの計測信号の立ち上がりとして検出した。時間遅れは、描画命令と呈示タイミングとの差で評価した (図 3.4A)。この遅れは必ず生じるが、常に一定の遅れであれば補正は容易であるため計測上問題は無い。遅れ時間にばらつきが生じるかどうかで評価を行う。

### 3.3.1. 変数同期精度の評価

Matlab と TDT の変数同期時間 (往復時間) は 0.20~0.50 ms であった (図 3.3B)。測定を 90000 回繰り返したところ、中央値は 0.252 ms、99.8%が 1.0 ms 未満であった。また、最悪のケースであっても往復時間は 2 ms 未満であった。

(A)



(B)

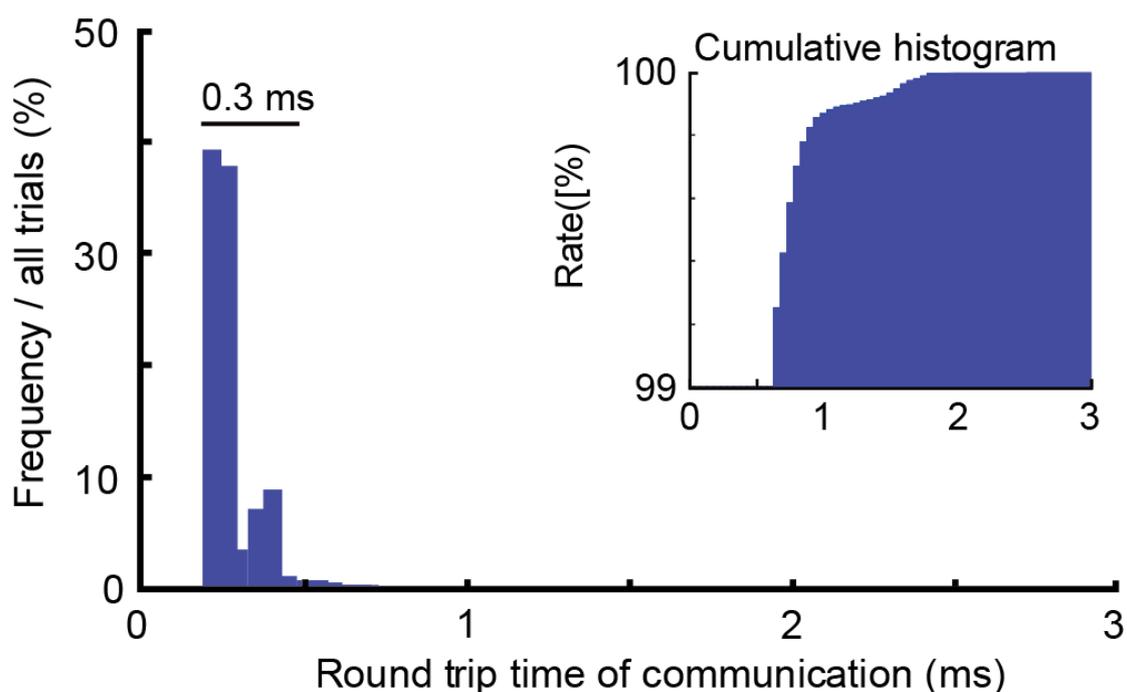


図 3.3 Matlab と TDT の変数同期の往復時間。(A)往復時間の定義。(B)サンプルの時間長さのヒストグラム、および累積ヒストグラム。

### 3.3.2. 刺激描画遅れの評価

Matlab の視覚刺激描画命令の時間を 0 とし、実際のディスプレイ描画までの遅れを計測した。測定を 2481 回繰り返した結果、ディスプレイ描画の遅れは 16.7~20.8 ms に分布していた (図 3.4B)。60 Hz のリフレッシュレートに対して完全に同期して表示が行われていたと言える。

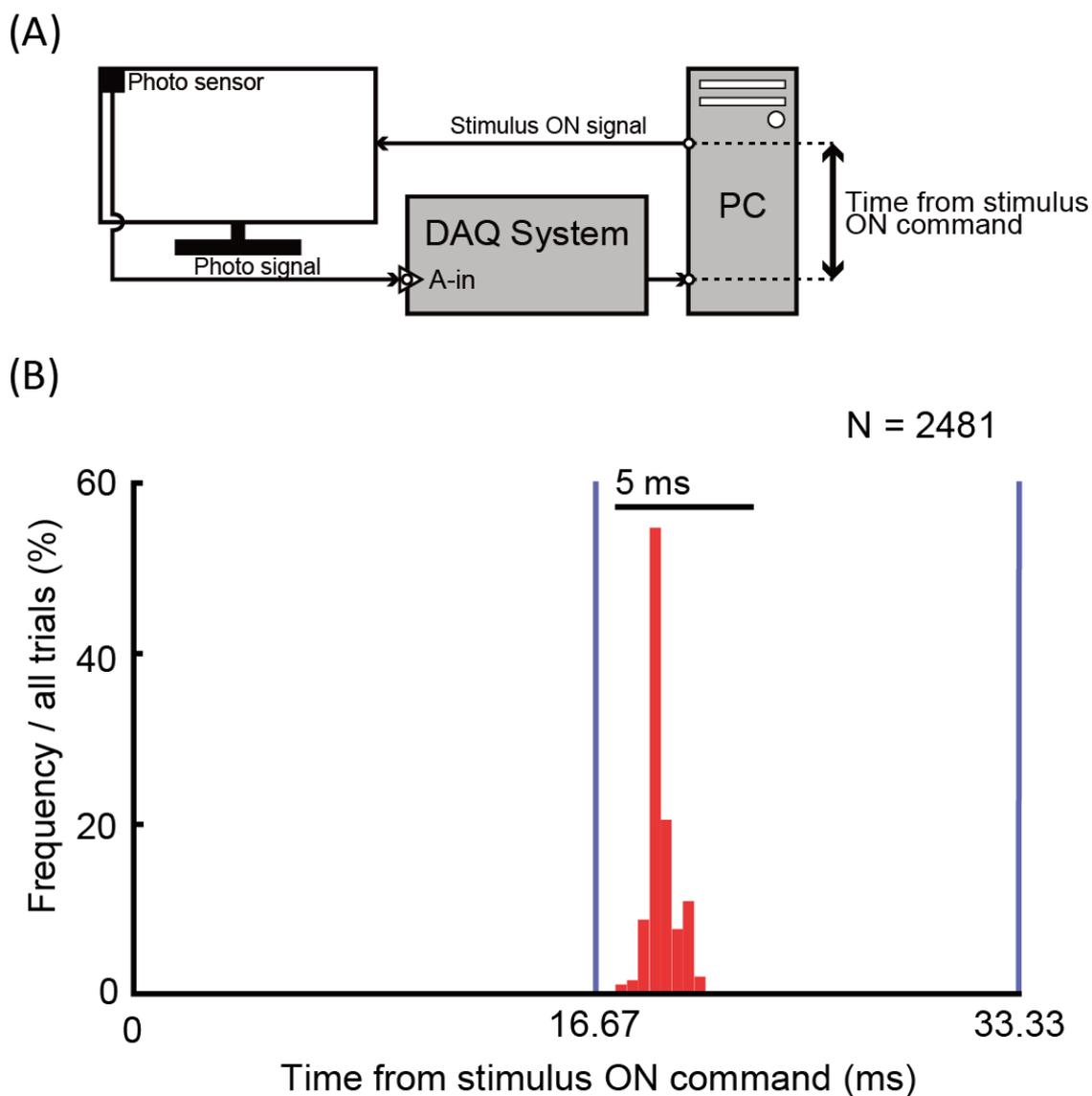


図 3.4 (A)画面描画遅れの定義。(B)Matlab の刺激描画コマンドから画面描画までの遅れのヒストグラム。ディスプレイのリフレッシュレートである 60Hz の時間を縦線で示す。

### 3.4. 脳活動計測実験

最後に、本システムを用いて覚醒マカクザルを対象とした視覚神経応答記録実験を実施し、本システムが実際の脳活動記録実験に利用可能であることを実証した。本実験で利用したシステムのハードウェア・ソフトウェアは前章と同じであった。実験課題は数秒程度のトライアル単位で構成され、各トライアルは以下の順で進む。固視点が呈示され、サルが目を向ける。固視が継続している間に視覚刺激が提示される。認知応答をとる場合は、その後選択肢となる複数の刺激が提示され、動物はどちらかに目を向ける。課題を完遂すると、ジュースの報酬が与えられる。この間に固視が途中

で外れた場合は、トライアルは未遂となり、最初に戻る。一定の休止時間を挟んで次のトライアルへ移る。

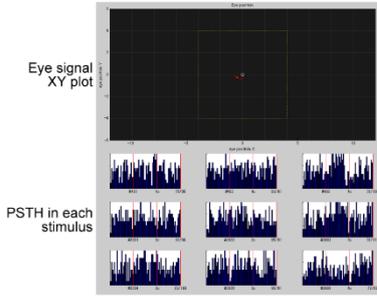
以上の実験を実験者が制御するにあたって、以下の情報を動的に監視する必要がある。視線位置と各種視覚刺激に対するニューロン活動の解析データ (図 3.5A)。記録電位の時間トレース表示(図 3.5B)。トリガで検出されたスパイクの波形表示、トリガレベルのユーザー設定(図 3.5C)。各種パラメータとして、固視を判定するウインドウサイズの設定、視覚刺激セットの選択と現在のトライアルで表示される刺激 (ランダムな順に表示されることが多い) の情報あるいは実験者による動的な選択、認知タスクの正解と動物の応答、報酬のタイミングと量、動物のやる気を示す平均完遂率、実験開始、休止、再開、解析データのクリア、データのストレージ格納開始と休止、さらにファイルの切り分け等の制御コントロールなどのユーザーインタフェースがある (以上、図 3.5C)。本システムでは以上の情報の監視と制御を Full-HD 解像度のディスプレイ 2 台で行っているが、1 台でも支障はない。

OpenEx と Matlab は変数がリアルタイムに共有されているために、ユーザーからは複数のアプリケーションが一体となって稼働しているように見える。刺激表示ならびにタスクの制御をおこなう Matlab(1)は、状態確認とユーザー操作が OpenEx を介して行われている。このため起動時以外に触る必要がなくウインドウの裏に隠れている。

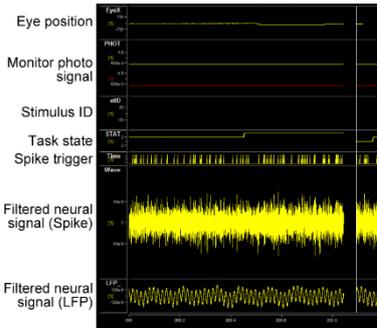
神経活動データをオンライン解析する Matlab(2)とも変数がリアルタイムに共有されている。ただし、検出されたスパイクのタイミング情報のみ、トライアル終了時に配列変数として転送される。配列変数のバッファは 1 トライアル分のスパイク発生時刻を保存するのに十分な長さがあり、バッファデータはトライアル開始時にクリアされる。Matlab(2)は受け取ったスパイク発生時刻のデータ列ならびに視覚刺激の呈示時刻を、過去の同一刺激のデータと統合して時間応答ヒストグラムを計算し、描画する。

実環境におけるシステムの時間精度を評価するため、実験動物から神経活動を記録し、実験者がデータ解析している際の視覚刺激の呈示長さをフォトセンサで計測した。課題を完遂した 220 トライアルについて集計した結果、刺激の呈示長さに誤差は生じなかった。計測中は常に視覚刺激の描画、神経データの解析および図示の負荷が生じているが、時間制御性能を維持していると言える。以上のシステムで安定して少なくとも 4 年間、通算 2400 時間以上の計測に成功した。以上の動物実験は国立大学法人豊橋技術科学大学動物実験規程に基づき、承認された研究計画 (研究責任者：鯉田孝和) に沿って実施された。

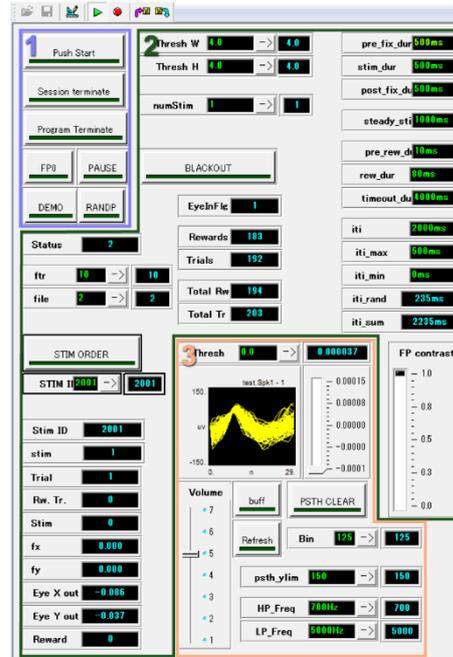
(A) Matlab-2 Online display



(B) OpenEx Time trace display



(C) OpenEx Experiment control panel



1. Task start/stop control  
Holds buttons for toggling task start/finish, pause, demo mode, etc.
2. Task control  
Changing task conditions: Stimulus set, duration and timing, fixation duration, etc.
3. Online analysis control  
Changing trigger, frequencies of filters, bin and y-axis range of psth, etc.

図 3.5 シングルユニット計測中のシステム画面。(A) Matlab (2) による視線データプロットと応答ヒストグラムのオンライン表示。(B) 各種計測信号のトレース表示とデータ保存ボタン。(C) OpenEx による実験パラメータの動的表示と制御。

## 3.5. 考察

性能評価実験の結果、TDT-MatlabPTB システムは、システム神経科学実験に十分な時間制御性能を持つことが示された。TDT-Matlab 間での変数同期は 99.8%が 1.0 ms 未満であるため、スパイク発生時刻とタスクの状態変化を十分な時間精度で比較できる。視覚刺激の呈示遅れが正確に 1 フレーム以内であったことから、感覚刺激の時間分解能がモニタのリフレッシュレートにのみ依存し、内部変数によるタイミング管理だけで十分であると言える。ディスプレイに取り付けたフォトセンサによるタイミングの校正が不要となるため、装置も解析も簡素化できる。

TDT-MatlabPTB システムは、普及した開発言語である Matlab のみを用いたため、導入や修正、維持管理のコストが低い。実験の目的に応じた刺激や認知課題を開発し、オンライン、オフライン解析までを同じ言語で行えるのはメリットが大きい。OpenEx の GUI 設定は独自のグラフィック言語で記述されているが、本プログラムを修正する程度の変更であれば学習は容易である。

Matlab を 2 台起動する手法は本システムの最も重要な知見である。ソフトウェアにおいて時間性能を優先する系と解析を優先する系を両立させるためには、一般的にはプログラム内部をマルチスレッドとして並列化し、それぞれの CPU 優先度を変える

という解決策がとられる。しかしながら Matlab にはそのような機能はない。そこで本システムでは、2 台の Matlab を起動してそれぞれ並列に実行し、それぞれプロセス優先度を変える方法を示した。これは極めて簡単に並列化と優先度制御が可能な手法であり、導入コストを下げるという本研究の目的に対して重要な貢献を果たしている。

TDT-MatlabPTB システムをいくつかの既存のシステムと比較する。Spike2 (CED Inc.) はマルチチャンネルのデータ収集・解析パッケージであり、データ収集だけでなく、実験・刺激制御、オンラインのスパイク解析が可能である。Spike2 の欠点は、システムの構築に専用のスクリプト言語の習得が必要なことである。対して TDT-MatlabPTB はシステム神経科学分野で広く用いられている言語である Matlab の習得だけでよいという点で優れている。Wake-Forest Visual Experimentation (WaVe) は Matlab 上で動作する視覚心理実験用のソフトウェアである (Meyer & Constantinidis, 2005)。WaVe は Matlab のグラフウィンドウによって、視線や実験データの表示、GUI による実験条件の入力が行える。視覚刺激は PTB を用いてプログラミングによって作成する。DAQ システムとは TCP/IP 通信で神経生理データを送受信する。MonkeyLogic は米国 NIH の研究グループによって開発された Matlab による制御システムである (Asaad et al., 2013; Asaad & Eskandar, 2008; Hwang et al., 2019)。開発言語が普及している Matlab であることに加え、GUI ベースでプログラムを作成できることに特徴がある。REC-GUI は、ウィスコンシン大学で開発された神経科学実験用のフレームワークである (B. Kim et al., 2019)。これは感覚刺激の制御 (Matlab-PTB) と実験シーケンス制御 (Python) とで PC を分け、UDP、TCP を用いたネットワーク通信を介してシステム内の状態を共有するものである。オープンソースで汎用性があるが、研究者は Matlab と Python の習得が必要である。WaVe、MonkeyLogic、REC-GUI のいずれにおいても、神経活動の記録は制御用 PC から独立した DAQ と PC を用いることを前提としている (図 3.1B)。このため複数の PC を並列する必要がある、また各種信号や制御データの通信を構築する必要がある。上記のシステムと比較して TDT-MatlabPTB は開発言語が Matlab ならびに OpenEx の GUI コントロールだけであり言語の障壁が小さい。また、制御するパソコンは 1 台であるため、設置面積のコンパクトさ、配線のシンプルさ、データの同期性において優れている。

本システムの制限は、DAQ として TDT が必須であることと、制御性能が Windows に依存していることである。TDT 以外の DAQ を利用できる MonkeyLogic や REC-GUI では、TDT のような DSP 計算機能が利用できないため、記録データのオンライン解析に CPU リソースを必要とする。これは制御系ソフトの性能に干渉するため、単一 PC での制御に問題となる可能性が高い。このため既存のシステムでは複数の PC を使うことが求められたと言える。Windows の制限は利便性とのトレードオフである。リアルタイム OS を用いたシステム (Hays Jr et al., 1982) では優れた時間

制御性能を示すが、開発や導入、維持は手間である。

本研究で紹介したシステムは Windows 7 で稼働しているが、Windows 10 でも利用可能である。Windows 10 において本システムを評価したところ、刺激画面の描画の性能にわずかな機能低下がみられた。具体的には描画のフレーム遅れが 1%程度の頻度で発生した。これは Psychtoolbox の開発者によって警告されている知られた問題であり、Windows10 を使う以上回避できない。しかしながら、3.2 節のように刺激描画のタイミングをフォトセンサで検知すれば、システムの描画遅れによらず正確な描画タイミングを得られるため、本システムは Windows10 以降の OS でも利用できると考えられる。

本システムは従来のシステムと同等の時間精度を保ちつつ、従来よりも単純なシステムを構築することを目的としたものであり、性能面では従来と比べて優位性を示すものではない。特殊な計算機環境やハードウェアを用いれば、より高性能なシステムを構築することは可能であるが、システムの汎用性が下がり、学習・導入コストが損なわれる可能性が高い。したがって、より厳密な時間制御、高いフレームレートによる画像表示などのシステムの高性能化は今後の課題である。

## 3.6. 本章の総括

本章は、システム神経科学実験のためのシステム TDT-MatlabPTB を開発し、その性能評価を行ったことについて述べた。TDT-MatlabPTB は、研究者の開発コストとシステムのシンプルさにメリットがある。制御系・解析系である Matlab とデータ収集系である TDT の間で、リアルタイムで変数・状態が同期されているため、ユーザーは一つのアプリケーションを利用しているように感じられる。視覚刺激のタイミング制御は Windows の性能に依存するものの、十分な時間精度を持っていた。以上から、本システムは視覚刺激を用いたシステム神経科学実験に有用である。

# 第4章 タングステン微小電極を用いた 高精細・低侵襲マーキング手法の開発と 生体への適用

## 4.1. はじめに

神経細胞の活動を解剖学的構造にマッピングすることは、神経科学の分野では基本的な課題である。50年以上にわたって、微小電極を用いた *in vivo* 細胞外記録は、単一ニューロンレベルでの生理的活動と機能的構造を理解するために利用されてきた。現代のイメージング技術は大きな進歩を遂げたが、時空間分解能(N K Logothetis et al., 2001; Nikos K Logothetis, 2008; Ogawa, Lee, Kay, et al., 1990; Ogawa, Lee, Nayak, et al., 1990)やイメージング可能な深さ(Horton et al., 2013; Kobat et al., 2009; Takasaki et al., 2020; Yildirim et al., 2019)の点で限界がある。従って、電気生理学的手法は、特に大型動物において、脳深部構造の活動を記録するために依然として重要である。マルチ電極アレイは、脳深部で複数のニューロンを同時に記録できる(Glimcher et al., 2001; Hansen et al., 2011; Jun et al., 2017; O’Keefe & Recce, 1993; Recce & O’Keefe, 1989; Steinmetz et al., 2021; Wilson & McNaughton, 1993)。しかし、電極のサイズが大きいため、脳に大きな損傷を与える可能性がある。加えて、マルチ電極アレイやその周辺機器は高価である。対して、シングル電極は一般に直径が小さいため、脳深部領域からの単一ユニット活動を、より小さい損傷とコストで記録することができる(Szarowski et al., 2003)。以上より、従来のシングル電極を用いた単一ユニット記録は、脳深部の神経機能を調べるのに依然として有用である。

生理学的応答と解剖学的構造との相関を調べるためには、記録部位を正確に特定する必要がある。単一ユニット記録では、記録したい位置に電極を到達させるために、脳定位座標を用いて電極先端の位置を推定する(Asahi et al., 2003; Horsley & Clarke, 1908; Saunders et al., 1990)。理想的には、この方法で電極先端の正確な位置が得られるが、実際には、電極や脳組織の変形により、記録部位を正確に推定することは困難である。この推定誤差は、脳深部からの記録では特に顕著である。この問題に対処するため、超音波エコー、X線、コンピュータ断層撮影(CT)など、いくつかの補助的な可視化方法が開発されてきた。(Collier et al., 1980; Glimcher et al., 2001; Tokuno et al., 2000)X線およびコンピュータ断層撮影(CT)(Aggleton & Passingham, 1981; Cox et al., 2008; Nahm et al., 1994)磁気共鳴画像法(MRI)(Jog et al., 2002; Martínez Santiesteban et al., 2006; Matsui et al., 2007; Tammer et al., 2006)などが開発されてき

た。しかし、これらの方法は、サブミリメートル程度の空間分解能しか持たず、また取得された画像のコントラストが低いという点で制約がある。そのため、これらの手法で電極の到達部位を解剖学的にマッピングすることには限界がある。

死後脳から組織学的に記録部位を正確に特定するために、さまざまな「マーキング」手法が開発されてきた。これらの方法の中で、リージョンマーキング(Hubel & Wiesel, 1962)は、60 年以上にわたって最も広く使われてきた手法である。この手法では、電極の先端から直流電流を印加することで生じた組織損傷とグリオーシスを観察する。また、電極を蛍光色素でコーティングし、電極の刺入経路を蛍光で観察する方法もよく使われる(DiCarlo et al., 1996; Naselaris et al., 2005; Snodderly & Gur, 1995)。この手法は簡単に適用でき、かつ脳組織にダメージを与えない。ステンレスやエルジロイ製の電極は、陽極電流を流して鉄イオンを析出させることでマーキングでき、プルシアンブルー染色で可視化できる。(Adrian & Moruzzi, 1939; Brown & Tasaki, 1961; Hess, 1939; Marshall, 1940; Suzuki & Azuma, 1987)。非金属電極を利用する方法もいくつかある。例えば、ガラス管電極を用いた細胞内記録では、色素を注入することでマーキングが可能である(Lee et al., 1969; Stretton & Kravitz, 1968; Thomas & Wilson, 1965)。また、細胞膜にガラス管電極を押し付けて記録するジャクスタセルラー記録では、記録後に細胞内へ色素注入することでマーキングできる。(Pinault, 1996)。

上記の方法はいずれも、空間分解能が低い、組織の損傷が大きい、マーキングの残存時間が短いなど、一定の限界がある。既存手法のマーキングの大きさは通常  $100\ \mu\text{m}$  程度であり、小さな神経核のサブ組織など、 $100\ \mu\text{m}$  より小さな部位を正確に局在化するには不十分である。リージョンマーキングや鉄イオンマーキングは、電流を小さくすることでサイズを小さくすることができるが、時間の経過とともにマーキングが拡散したり消失したりする可能性があるほか、直流電流が組織に損傷を与え、解剖学的構造を不明瞭にする可能性がある。この損傷はまた、マーキング近傍でのさらなる記録を制限する。鉄イオンのマーキングの際に、直流電流の代わりに二相電流を利用することで、損傷を軽減することができるが、それでもマーキングの持続性とその大きさの間にはトレードオフの関係がある。(Fung et al., 1998)。細胞内色素注入自体は損傷を引き起こさないが、この技術で使用される太いガラス管電極は、刺入時に組織に大きな損傷を与える可能性がある。さらに、ジャクスタセルラー記録で用いられるニューロビオチン色素による記録細胞の可視化は、残存期間が高々48 時間程度しかない。このことは、長期にわたる慢性的な実験、特に数ヵ月から数年にわたる大型動物での実験には大きな制約となる。

既存のマーキング手法はいずれも、空間分解能、組織損傷、残存時間の要件を同時に満たしていない。これらの要件は、皮質下神経核のような  $100\ \mu\text{m}$  オーダーの部分構造を持つ、脳深部の小さな構造に対して単一ユニット活動をマッピングする上で特

に重要である。(Kwan et al., 2019; Turner et al., 2020).

本研究は、従来のタングステン電極に二相パルス電流を印加して酸化タングステンを生成する新たなマーキング手法を述べる。酸化タングステンでマーキングする手法は、以前に Pabst(Pabst, 1973)が開発している。しかし、Pabst の方法には 3 つの問題があった。第一に、直流電流の印加により電極先端が酸化物の膜で覆われると陽極反応が停止する。酸化物の膜がそれ以上の反応を妨げ、酸化タングステンの生成量が不足するため、マーキングが不確実になる。第二に、直流電流はリージョンマーキングと同様に組織に損傷を与える。第三に、堆積した酸化タングステンは、強酸による染色を追加しなければ、アーティファクトと区別できない。この還元処理により、溶液の pH に敏感な既存の細胞染色技術と並行して行うことが困難になる。

本研究の手法は Pabst の問題に対処するため、直流ではなく二相電流を採用した。二相電流は酸化膜に阻害されにくく、直流電流よりも組織に対して安全であると考えられている。(Clark et al., 2011; Cohen & Newsome, 2004; Salzman et al., 1992; Tehovnik, 1996)。この方法の模式図を図 4.1A に示す。二相パルスを印加すると、陽極反応によって不溶性の酸化皮膜が生成し、陰極反応によって生じた気泡を通して酸化物が電極から剥離する。(Robblee & Sweeney, 1996)。このような反応を数分間繰り返すことで、一定量の酸化物が生成し(図 4.1B)、電極先端の周辺に拡散する(この画像では、一部の酸化物が電極先端に付着している)。

さらに、本手法が生体に適用できることを実証するため、*in vivo* 実験を行った。図 1C は実験デザインを示しており、動物の脳深部構造のシングルユニット記録を行い、二相電流印加を用いて記録部位にマーキングを行った。その結果、本手法は、組織の損傷を最小限に抑えながら、数十マイクロメートルのマーキングが可能であることが明らかになった。加えて、本マーキングの探索に暗視野観察を導入することで、非常に小さなマーキングを組織から明瞭に検出することができた。更に、ニホンザルの脳においてもマーキングは成功し、生きた動物で 2 年以上持続することが確認できた。

加えて、本マーキングは暗視野観察(図 4.2)を用いることで、組織やアーティファクトから明瞭に区別できた。暗視野観察では、照明は周辺部から照射され、試料からの散乱光が像を形成する。その結果、マーキングはニスル染色を施した組織上で赤く光る塊として観察された。本マーキングが神経細胞の標準的な染色であるニスル染色上で明瞭に観察できることは、マーキングの脳構造上の位置を明確に知ることができ、かつ Pabst のマーキングのような追加の染色法が要らないという点で優れている。

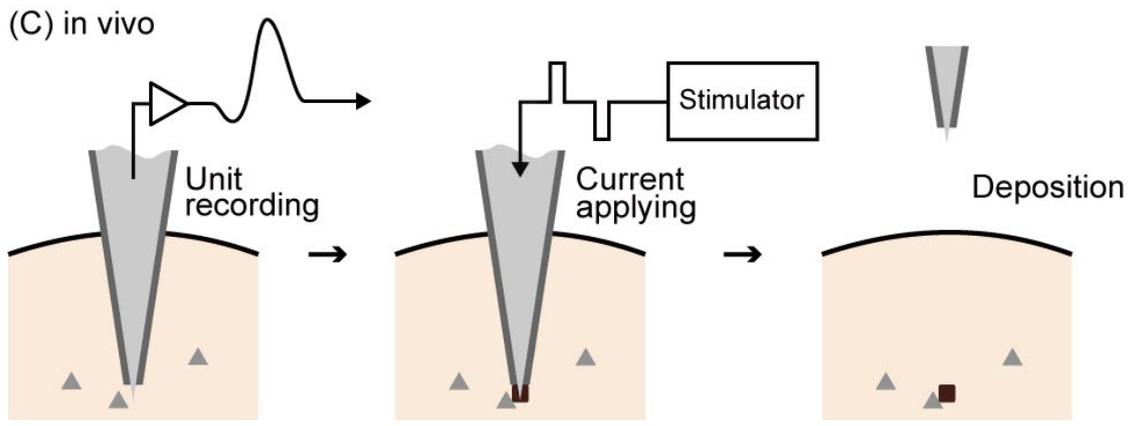
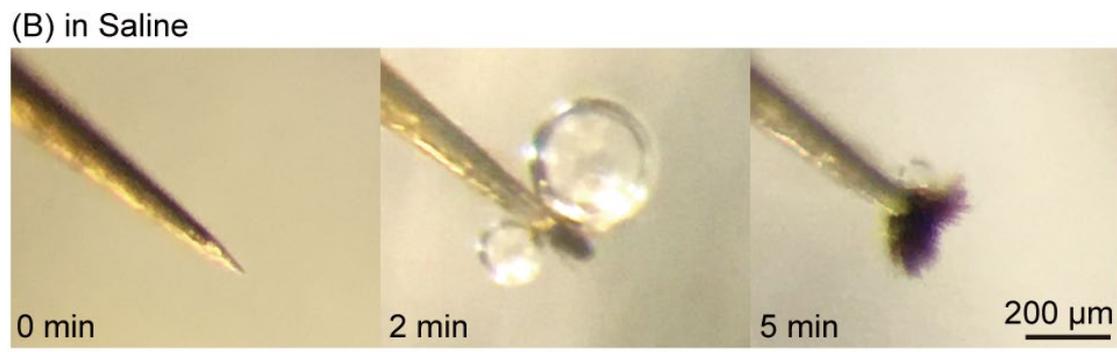
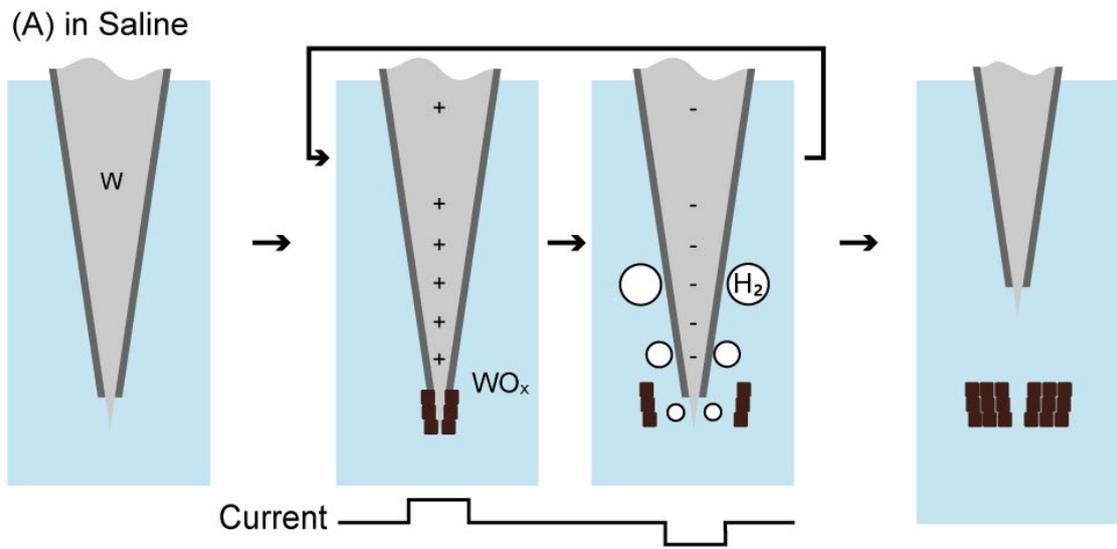


図 4.1 マーキング法。(A) 酸化タングステンの生成の概略図。生理食塩水中でタングステン電極 (W) に二相電流を流すと、陽極反応で酸化タングステン ( $WO_x$ ) が生成され、陰極反応で水素の泡 ( $H_2$ ) が生成される。これらの反応は、先端部の周囲に十分な量の酸化タングステンが析出するまで、一定の時間繰り返される。(B) 双極電流を流したときの電極先端の様子を示す写真。(C) マーキング技術を *in vivo* で実施するための実験プロトコル。

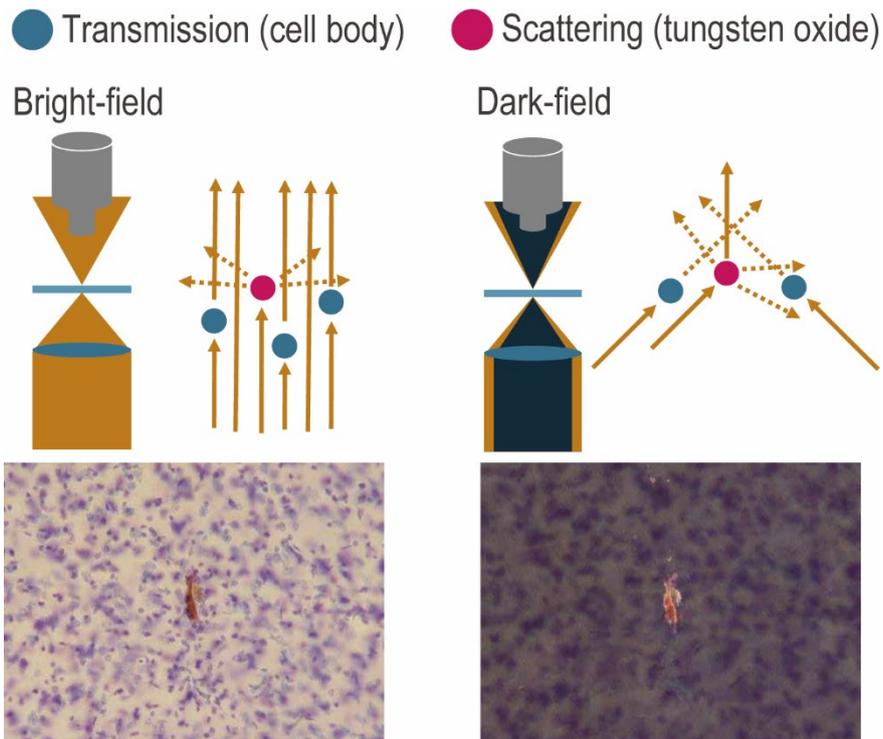


図 4.2 暗視野観察の原理。図の下部はそれぞれ明視野、暗視野像で観察されたマーキング。

## 4.2. 実験方法

### 4.2.1. 実験動物

マウスを用いた実験はすべて豊橋技術科学大学の動物実験委員会の承認を得ており、動物の飼育はすべて「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に従った。10 週齢以上の野生型マウス (C57BL/6J、体重 22.6-26.4g) を計 3 匹用いた。マウスは室温 (20°C~24°C) および 12 時間の明暗サイクルで管理されたケージに収容された。

ニホンザルを用いた実験手順は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) に従い、生理学研究所動物実験委員会の承認を得て実施した。実験にはニホンザル (*Macaca fuscata*、雄、体重 7.0kg) 1 頭を用いた。ニホンザルは室温 (20°C~24°C)、12 時間の明暗サイクルで管理されたケージ内で飼育された。

### 4.2.2. 電気生理学 (マウス)

マウスはメドトミジン (0.75 mg/kg)、ミダゾラム (4 mg/kg)、ブトルファノール (5 mg/kg) の混合物を腹腔内注射することで麻酔された。記録とマーキングの間、マウスは脳定位固定装置 (Narishige, Japan) で固定された。電極刺入に先立って、電極の

先端を蛍光色素 (DiI, Sigma-Aldrich(DiCarlo et al., 1996))に浸けてコーティングした。タングステン電極 (3.0-4.0 M $\Omega$ 、UEWLEGLMFNNH、FHC ; 1.2-1.4 M $\Omega$ 、UEWLEGLM、FHC) は、頭蓋骨に開けた開口部 (bregma から尾側 1-3 mm、外側 1-3 mm) を介して脳の右半球に垂直に刺入した。電極は、よく分離された単一ユニットが得られるまで、視床の深さまで挿入した。参照電極として、ステンレス製のスクリーン電極を左半球の頭蓋骨に挿入した。

記録は、フィルタ (0.35Hz のローカットオフ、および 7.5kHz のハイカットオフ) を備えたヘッドステージ (SH16、Tucker-Davis Technologies (TDT), US) を用いて行った。信号はプリアンプ/デジタイザー (PZ2、TDT) に送られ、デジタル信号処理モジュール (RZ2、TDT) で取得された。デジタルデータはサンプリング周波数 25kHz で PC に保存された。スパイクは、フィルタリングされた信号 (0.5-3kHz、2次バターワースフィルタ) から、Matlab (Mathworks) で閾値処理することにより、オフラインで検出された。単一ユニットを分離するために、トリガ信号をウィンドウディスタクリミネータで処理した。

マーキングは刺激発生装置 (SEN-3401、日本光電) で発生させた電流をアイソレーター (SS-203J、日本光電) で制御しながら印加することで行った。二相電流パルス (40  $\mu$ A、200Hz、陽極先行、パルス幅=0.5ms、パルス間隔=0ms) を、電極を介して 180 秒間印加した。

### 4.2.3. 組織学 (マウス)

記録から一週間後、マウスはウレタン (1 g/kg) の腹腔内注射により深麻酔された。その後、マウスは 0.1M リン酸緩衝液、次いで 4% パラホルムアルデヒド・0.1 M リン酸緩衝液によって心臓から灌流固定された。その後脳を 4%PFA に脳を浸漬し、4°C の環境で一晩保管した。固定後の脳はスライスに先立ち、スクロースを 10%、20%、30%と濃度を上げた PB 溶液に沈むまで入れられた。その後、クライオスタットで冠状断方向に 100  $\mu$ m の厚さにスライスされ、クレシルバイオレットで染色された。染色後のスライスは光学顕微鏡 (CX21、オリンパス、日本) で観察され、自家製のパッチを用いて明視野顕微鏡と暗視野顕微鏡を切り替えた。

### 4.2.4. 電気生理学 (サル)

サルの手術方法は、以前に報告した実験手順の通りである (Koida & Komatsu, 2023; Matsumora et al., 2008)。簡単に述べると、サルの頭をヘッドホルダーで固定し、ビデオベースのモニタリングシステム (120Hz、ISCAN) を用いて眼球の位置を記録した。記録チェンバーは頭蓋骨上に設置され、電極は下側頭皮質 (IT) の腹側表面にある関心領域に向けて、垂直に刺入された。電極の刺入および手術に先立ち、サル脳の MRI

を撮影し、チェンバー設置および電極刺入の目印を作成した。記録位置は、各刺入時のニューロン活動のデプスプロファイルと MRI 画像と比較し、また X 線写真で確認された電極の先端と比較して決定された。

神経活動記録と微小刺激は、IT の腹側表面の広い範囲に 1 mm 間隔で等間隔に穴をあけたグリッドに電極を刺入して行った (Crist et al., 1988)。記録は、電極を皮質深層への到達から更に 200  $\mu\text{m}$  以上深く刺入させてから開始した。ユニット記録の後、同じ電極でマーキング (微小刺激) を行った。

微小刺激は電子刺激装置 (SEN-7203、日本光電) を用いて電流をし、アイソレーター (SS-203J、日本光電) で電流を制御して行った。刺激は記録電極を介して、二相電流パルス (20  $\mu\text{A}$  または 50  $\mu\text{A}$ 、200Hz、アノード先行、パルス幅=0.2ms、パルス間隔=0ms) を合計 300 秒間断続的に印加した。

#### 4.2.5. 組織学 (サル)

2 年間の記録実験後、サルはペントバルビタールナトリウム (80 mg/kg) の静脈内注射によって深く麻酔されたのち、マウス実験と同じ手続きで灌流固定された。組織学的プロトコルおよび顕微鏡を用いた解析は、マウス実験で用いたものと同じであった。

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. マウス実験

蛍光色素 (DiI) でコーティングしたタンゲステン電極をマウスの脳に垂直に挿入した (図 4.3A)。視床から電気生理学的記録を取り (図 4.3C)、続いてマーキング目的で二相微小電流 (40  $\mu\text{A}$  二相パルス、180 秒、図 4.3D) を印加した。3 つの電極を貫通させ、各電極は横方向に 500  $\mu\text{m}$  の距離を隔てた。電流印加後に電極を脳内から引き抜き、電極先端を顕微鏡で観察すると、電極先端はわずかに丸くなっており、電極インピーダンスは低下していた。マーキングから 2 週間後、マウスの灌流固定を行い、続いて脳の冠状断スライスを行った。

染色前、スライスの蛍光画像から、約 500  $\mu\text{m}$  間隔で 3 本の平行な軌跡が認められた (図 4.3A)。最も外側を除く各トラックの最深部には、強い蛍光スポット (#1 と #2 で示す) が現れ、これは脳表面から約 3,000  $\mu\text{m}$  下に位置し、記録およびマーキングのデプスプロファイルと一致していた。したがって、蛍光スポットはパルス電流によって、電極から DiI の拡散が誘発された結果であると考えられる (DiCarlo et al., 1996)。最も外側の蛍光トラックは、内側の 2 つのトラックよりも約 1,000  $\mu\text{m}$  深かった。これは、マニピュレーター上での電極刺入深さが内側の 2 つのトラックよりも

1,000  $\mu\text{m}$  深かったことと一致する。このトラックでは、最深部に強い蛍光スポットは見られなかった。

軌跡の最深部にある2つの蛍光スポットで、酸化タングステンのマーキングが検出された(図 4.3B)。これらのマーキングは連続する2つのスライスで確認された。最も外側のトラックではマーキングは検出されなかった。明視野観察では、マーキングは染色していないスライス内に黒い粒子として現れた(図 4.3F, J)。その後のニスル染色では、マーキングは茶色の粒子として現れた(図 4.3G, K)。マーキング#1は複数の細長い粒子からなり、その大きさは $54 \times 174 \mu\text{m}$ であった(図 4.3F-H)。マーキング#2は細長い粒子1個からなり、その大きさは $21 \times 53 \mu\text{m}$ であった。

マーキングによる組織へのダメージは、細胞染色後のスライスを明視野観察することで評価できた。結果、マーキング#1はわずかなリージョンを伴っていた(図 4.3G)のに対して、マーキング#2の周囲にはリージョンは観察されなかった(図 4.3K)。

暗視野顕微鏡(図 4.3B, H, L)では、明るい赤色のマーキングが目立って現れた。このような見え方は、マーキング部位でのみ検出され、切片に時々見られる黒い未確認の粒には見られなかった。したがって、明るい赤色のマーキングは、酸化タングステンの表面からの反射光によるものと考えられる。明視野顕微鏡と暗視野顕微鏡の画像を比較することで、埃などのアーティファクトとマーキングを区別することができた。さらに、暗視野顕微鏡では、低倍率で視野が広い状態でも容易にマーキングを見つけることができた(図 4.3B)。

マーキングの位置が正確であることは、蛍光スポットとマーキングがよく重なることで確認された。電極は電気刺激部位の深さを超えて進めなかったため、蛍光スポットはマーキングした電極刺入経路の最深点を示していた。さらに、マーキングの位置は、マーキング#1の電気パルスによって生じたと思われるリージョンの部位と一致していた。これらの一致は、マーキング位置と電気刺激の印加位置が一致していることを示唆している。同じ実験を他の2匹のマウスでも行い、最初の実験を含めて合計9個のマーキングを行った。このうち、6つのマーキング(66%)の同定に成功した。マーキングの大きさは、長辺が $12 \sim 194 \mu\text{m}$ 、短辺が $10 \sim 54 \mu\text{m}$ であった。したがって、提案するマーキング技術は生体内で実施可能であり、マーキングの位置精度は高いことが示された。

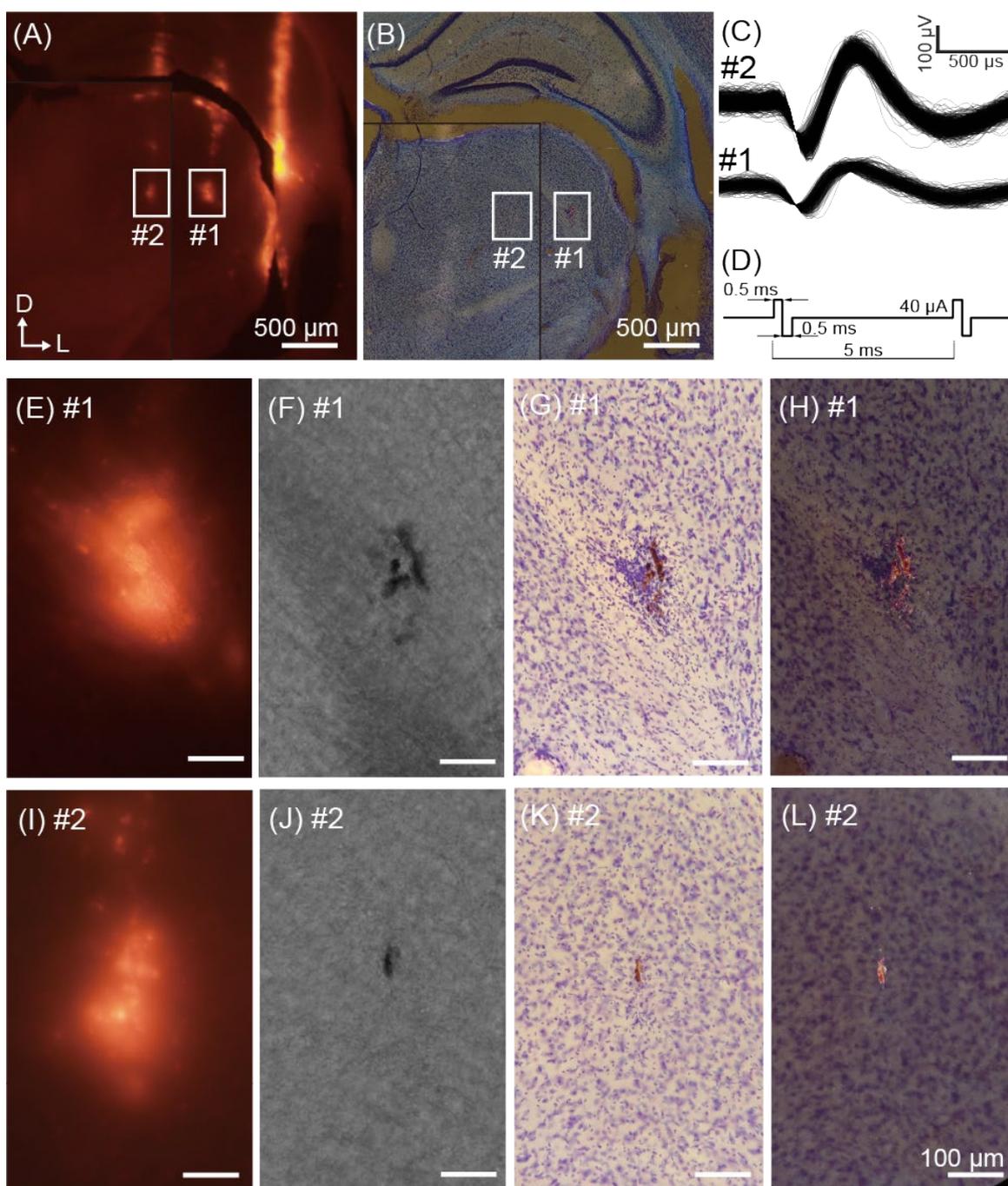


図 4.3 マウスでのマーキング実験。(A) マウス脳の冠状スライスの蛍光画像。蛍光は3つの電極の刺入軌跡として観察できる。連続する2つのスライスを統合し、黒線の境界で分離した。(B) Aの暗視野象。(C) Aで示したマーキング部位で記録したスパイク波形。(E-H) ボックス#1に示したマーキングの拡大図。(E) 蛍光画像。(F) 明視野像(未染色)。(G) 明視野像(ニスル染色)。(H) 暗視野像(ニスル染色)。(I-L) ボックス#2に示したマーキングの拡大図。各図で採用した撮像方法はE-Hと同じ。E-Lのスケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。

### 4.3.2. ニホンザル実験

一般に微小刺激として知られる二相パルスの印加は、行動の変化を調べるために神経細胞を刺激する実験で広く使用されている。(Cicmil & Krug, 2015; Clark et al., 2011; Cohen & Newsome, 2004; Lilly et al., 1955; Murasugi et al., 1993; Murphey & Maunsell, 2007; Tehovnik, 1996).これらの刺激実験で用いられた電流 ( $10\sim 50\mu\text{A}$ ) は、本章で用いているマーキング手法で用いられた電流 ( $40\mu\text{A}$ ) と同等であった。したがって、微小刺激が加えられた脳内には酸化タングステンが残存しているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、神経活動を調節する目的で微小刺激を加えたマカクザルの脳を調査した(Koida & Komatsu, 2023)。

タングステン電極をマカクザルの下側頭皮質に垂直に挿入し、その後、微小刺激(二相性、 $20\mu\text{A}$  または  $50\mu\text{A}$ ) を印加した。微小刺激から少なくとも 2 年後に、灌流固定とスライス作製を行った。これらのスライスの解析は、灌流から 10 年経過後に行った。顕微鏡による観察の結果、これらのスライスには酸化タングステンのマーキングがあった(図 4.4)。明視野像(図 4.4B)では暗色の矢印状の粒として、暗視野像(図 4.4C)では明赤色の粒として観察された。マーキングの大きさは  $89\times 38\mu\text{m}$  であった(図 4.4D, E)。マーキングの周囲の細胞は、若干の損傷はみられたもの、おおよそ健全に見えた。また、マーキングを通る垂直の直線に沿って、明るい赤色の粉が分布しているのが観察された(図 4.4C)。これらのマーキングは、微小刺激によって生じたと考えられるが、粉状の線は微小刺激後の電極の移動によって酸化タングステンが散乱した結果であると考えられる。このことは、微小刺激の後にさらに  $1,500\mu\text{m}$  深く刺入したという電極刺入のデプスプロファイルによって確認された。

片半球の 22 部位に、異なる電極を介して  $50\mu\text{A}$  の微小刺激を行った。これらの微小刺激のうち、ほぼ対応する部位に 14 個のマーキングが認められた。マーキングの大きさは、粉状の線を除いて、長辺が  $25\sim 149\mu\text{m}$ 、短辺が  $16\sim 59\mu\text{m}$  であった。検出割合が 64%と低かったのは、連続した 2 枚のスライスのうち 1 枚しか保存されていなかったためと考えられる。対照的に、もう一方の半球で適用した  $20\mu\text{A}$  の微小刺激では、微小な粉末状の塊のみみられ、刺激部位の周囲にマーキングはほとんど観察されなかった。したがって、酸化タングステンによるマーキング手法は、適度な電流を設定すればサル脳にも適用可能であり、マーキングは生きた個体内で 2 年以上保存されることが明らかになった。

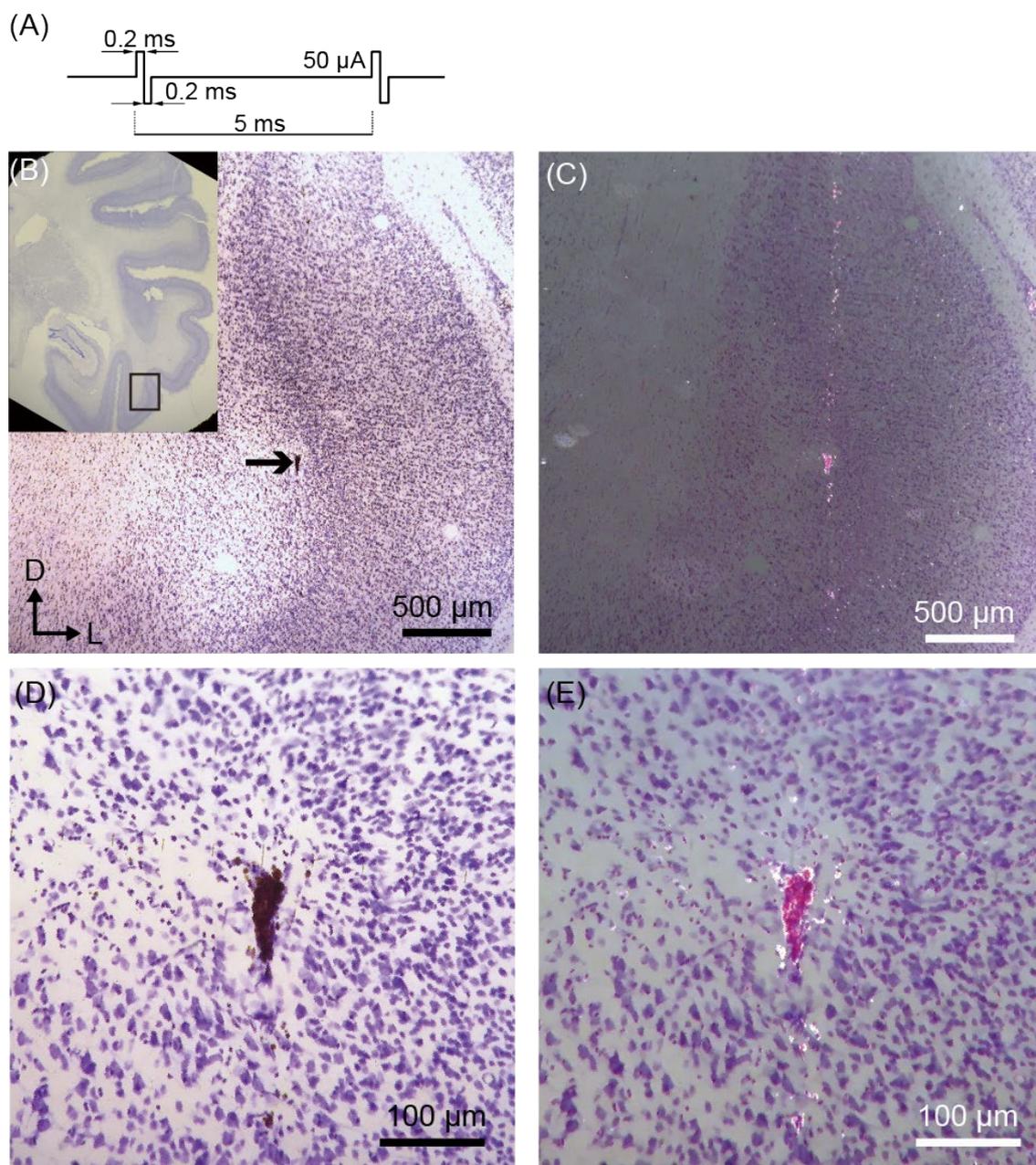


図 4.4 マカクザルのマーキング。ニスル染色した冠状断面を示す。(A) 印加電流の時間波形。(B) 下側頭皮質で観察された酸化タングステン (矢印)。挿入図はスライスの低倍率図。正方形はマーキングのあった領域を示す。(C) A の暗視野像。(D) A の拡大図。(E) B の拡大図。

## 4.4. 考察

私は、従来のタングステン電極を介して二相パルス電流を印加する新しいマーキング手法を開発した。電流の印加は電極の腐食をもたらし、これは一般に電解研磨と呼ばれる (Hubel, 1957; Levick, 1972; Sugiyama et al., 1994; Szostak et al., 2017)。電解研磨

の副産物である酸化タングステンは、電極先端の周囲に堆積し、マーキングを形成する。この技術はマウスとマカクザルの両方で検証され、高い空間精度、低い侵襲性、生きた個体内における 2 年以上の持続性が実証された。これらの結果は、局在性、識別可能性、侵襲性、持続性、費用対効果という点で、既存のマーキング技術を凌ぐものである。

マーキングの平均サイズは、従来のマーキング手法よりも小さかった。平均すると、マウスの実験ではマーキングの大きさは短辺で  $32\mu\text{m}$ 、長辺で  $116\mu\text{m}$ 、サルの実験ではそれぞれ  $30\mu\text{m}$ 、 $73\mu\text{m}$  であった。最小のマーキングは  $20\mu\text{m}$  未満で、これは神経細胞の細胞体の大きさに相当する (図 4.5)。インピーダンスが  $1\text{M}\Omega$  のタングステン電極の開口部の長さは約  $10\sim 20\mu\text{m}$  であることから (Hubel, 1957; Levick, 1972; Sugiyama et al., 1994)、この最小マーキングサイズは、細胞外記録法の記録部位を特定するのに十分である。また、マーキング後にマーキング位置がずれることはほとんどなかった。このことは、蛍光色素による電極刺入経路および蛍光スポットとの一致 (図 4.3)、およびリージョンのとの一致 (図 4.4) から明らかである。

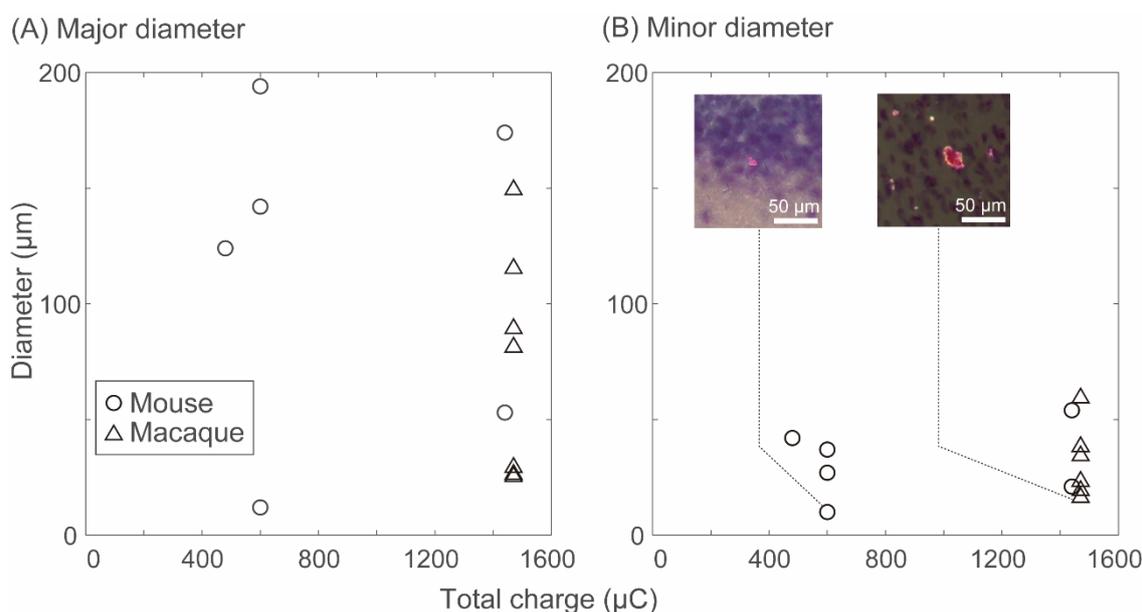


図 4.5 マーキング点の大きさ (縦軸) と電極に加えられた総電荷量 (横軸) の関係。プロットはマーキングの長辺 (A) と短辺 (B) で分けられている。なお、この分析では、粉状の線のマーキングは除外している。

マーキングの識別は、ニスル染色後の暗視野観察によって行った。マーキングが非常に明るく、低倍率の画像でも検出が容易であったことは、高倍率でしか識別できない小さなマーキングで特に重要である。暗視野観察における強い反射光により、低倍率で広い視野での検出が可能となり、マーキングの探索に要する時間が短縮された。

検出のしやすさに加えて、マーキングと他のアーティファクトを区別することが極めて重要である。例えば、混入したゴミの粒子は明視野観察では暗いドットとして観察されることが多く、明視野観察ではアーティファクトもマーキングも暗いドットとして見えるため、マーキングとアーティファクトを区別することが難しくなる。暗視野観察では、アーティファクトも暗いドットに見えるが、マーキングでは明るい赤色に見えるため、両者を明確に区別することができる。脳組織の明視野・暗視野観察の双方でアーティファクトの見え方に変化はなく、本マーキング手法のマーキングは検出性が高いことを示している。

本マーキング手法における組織損傷は最小限であった。リージョンマーキングにおける直流電流の印加は組織損傷が大きいが、これは  $5\mu\text{A}$  を 5 秒間印加すると直径  $100\text{--}200\mu\text{m}$  の領域ができることから明らかである (Hubel, 1959; Koyano et al., 2011)。対照的に、交流電流は損傷が小さいと考えられている (Cicmil & Krug, 2015; Clark et al., 2011; Cohen & Newsome, 2004; Fung et al., 1998; Lilly et al., 1955; Murasugi et al., 1993; Murphey & Maunsell, 2007; Tehovnik, 1996)。例えば、電気刺激実験において二相パルスは侵襲性が低いと考えられており、二相パルスによる微小刺激は神経活動を調節するために一般的に用いられている (Cicmil & Krug, 2015; Clark et al., 2011; Cohen & Newsome, 2004; Fung et al., 1998; Lilly et al., 1955; Murasugi et al., 1993; Salzman et al., 1990, 1992; Tehovnik, 1996)。本マーキング手法で使用した電流 ( $40\text{--}50\mu\text{A}$ ) は、他の電気刺激研究で使用された電流 ( $10\text{--}100\mu\text{A}$ ) と一致しており、低侵襲であると考えられる。低侵襲性は 2 つの理由から非常に重要である。第一に、組織を保存することにより、記録部位と解剖学的構造との相関をとることができる。第二に、マーキング後もその近傍からの記録が可能であり、長期間にわたって同じ部位から繰り返し神経細胞活動を測定する必要がある慢性実験において非常に有益である。

マーキングは少なくとも 2 年間は生きて個体内に残った。この結果は、この新しいマーキングの毒性が長期的に低いことを示している。マーキングが経時的にどのように変化するかは不明だが、少なくとも 2 年間は十分な性能を維持できることは有望である。この長期的な安定性は、慢性的な実験において特に有益であると考えられる。

この新しいマーキング手法は、導入コストの低さという点で大きな利点がある。タングステン電極は、そのコストパフォーマンスの高さから広く使用されている。酸化タングステン電極は、タングステン電極に二相電流を印加することで生成でき、その電気的条件は一般的な微小刺激実験に使用されるものと同様である。したがって、本マーキングを適用する際は電気生理学実験によく使われる電気刺激装置を利用することができる。またクレシルバイオレットによるニスル染色法は広く用いられており、このマーキングのために追加の染色を必要としない。さらに、得られたマーキングは、従

来の光学顕微鏡を用いて明視野または暗視野で観察することができる。以上に述べた電極、刺激装置、染色法、観察法はすべて容易に実施可能であるため、非常に低コストであるといえる。

#### 4.4.1. 本マーキング手法の制限

本実験では、35%の割合で酸化タングステンが電極から分離しなかったが、これは死後のスライス観察によってのみ判断できた。成功率を上げるためには、刺激のパラメータを考慮しなければならない。まず、電気化学反応には一般的に閾値電圧があるため、十分な電圧を印加しなければならない(Ibe et al., 1990)。本研究で使用した電流値 ( $40\mu\text{A}$ ) は、約  $1\text{M}\Omega$  のインピーダンスを持つ電極では数十ボルトに相当し、実際の測定ではパルス期間中に最大約  $17\text{V}$  が観察された。これは反応には十分に高い電圧である。第二に、電流を印加する時間を長くすることで、印加する電荷の総量を増やすことができる。本研究ではマーキングの直径と総印加電荷量に相関は見られなかったが(図 4.5)、印加電荷量は酸化タングステンの生成量に対応すると考えられる。従って、電荷量を増加させれば酸化タングステン量が増加し、マーキングが成功しやすくなると予想される。しかし、電荷量が多すぎるとマーキングが大きくなるほか、生体組織に損傷を与える可能性がある。このように、マーキングの成功確率と精度はトレードオフの関係にある。したがって、研究目的に応じて適切なパラメータを選択する必要がある。

成功したケースでも、マーキングの大きさや形にはばらつきがあった。マウス実験でみられたように、同じ微小刺激を印加しても、マーキングの大きさはばらついた(図 4.5)。マーキングの大きさのばらつきは、以下の原因によると考えられる。第一に、電極先端の形状や微細構造のばらつきである。これを調べるため、走査型電子顕微鏡を用いて、同じロットの未使用電極2本を調べた(図 4.6)。結果、電極先端の表面は  $1\mu\text{m}$  単位で凹凸があり、電極ごとに異なるパターンを示すことがわかった。電極表面の形状は、析出する酸化物の形状や電極からの剥離に影響を与える可能性がある。第二に、絶縁被覆の先端開口部の形状である。タングステン電極は、絶縁被覆を施したタングステンワイヤーを用い、先端で絶縁被覆を剥離することで製造される(Hubel, 1957; Sugiyama et al., 1994)。電極先端の開口部の大きさは電極のインピーダンス測定で推定できるが、開口部の形状は様々であり観察するまでわからない。今後、電極と開口部の形状から酸化タングステンの発生状況を予測できるようになれば、マーキングに適した電極を選択することで成功率を高めることができるかもしれない。

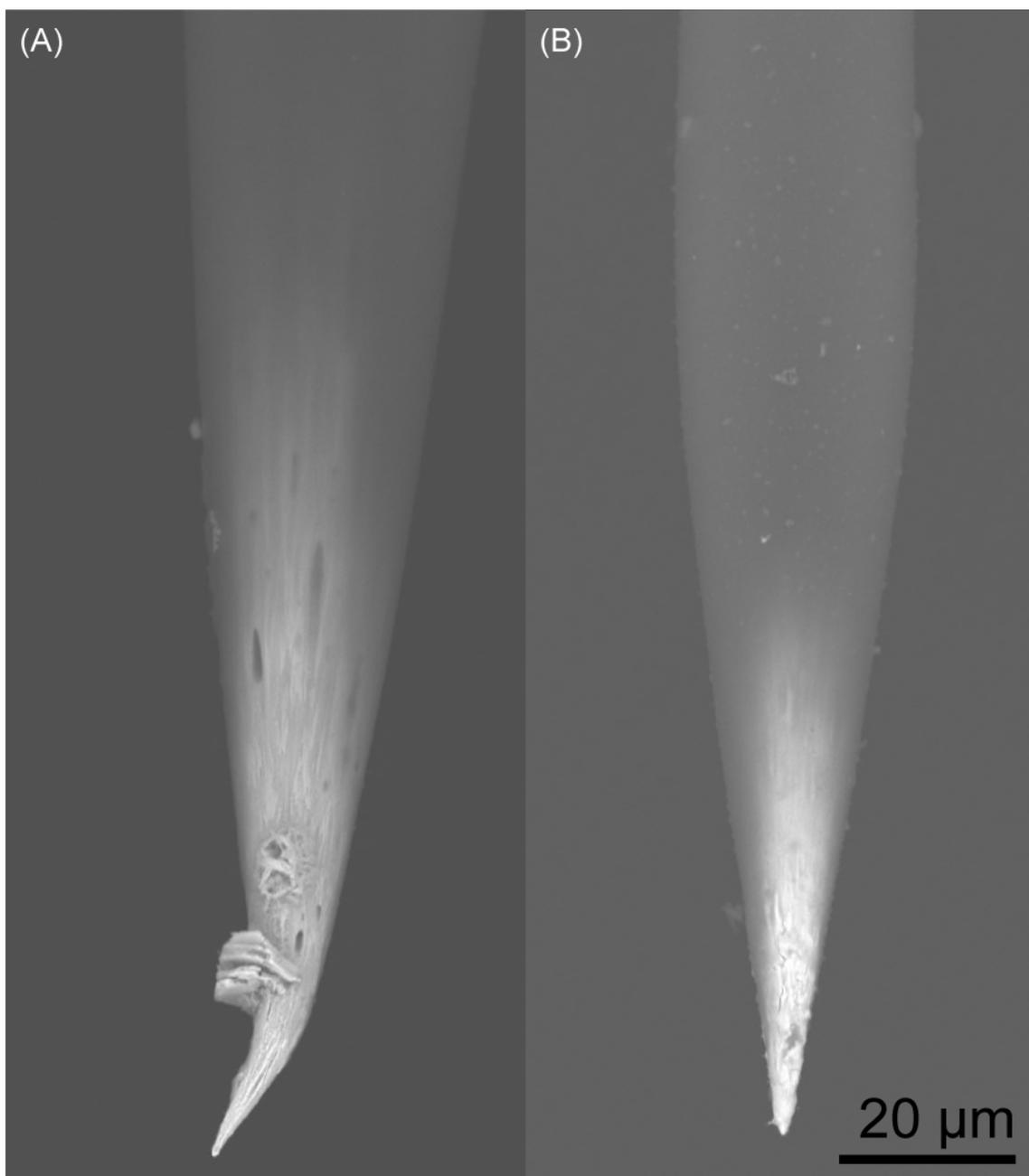


図 4.6 走査型電子顕微鏡（Miniscope TM1000、日立）を用いて観察した代表的な 2 本のタンゲステン微小電極の先端部。(A)と(B)は同じロットの未使用電極。

電極は、使用する総電荷量に応じて何度か再利用できる。マーキング技術は酸化反応を利用しており、先端部の腐食と電極の損傷を引き起こす。これは、マーキング後に先端がわずかに丸くなり、インピーダンスが低下することで示された。また、マーキング後にシングルユニット記録のアイソレーション性能が低下することもわかった。しかし、マルチユニット記録は実行可能であり、マーキングは少なくとも 3 回まで繰り返し可能であった。

酸化タングステンは固体粒子であるため、位置精度を悪化させる可能性が 2 つ考えられる。第一に、マーキング後に電極表面に付着した酸化タングステンが、電極の移動によってトラック上にこぼれることがある。これはノイズをもたらし、マーキングの位置精度を低下させる。第二に、脳スライス作製中に、酸化タングステンがブレードによってずれて周囲の組織に拡散したり、スライス操作中にマーキング自体が組織から脱落したりすることがある。この問題を軽減するために、脳スライスの厚みを増すことは、刃がマーキングに当たる確率を減少させ、マーキングが組織内に残る可能性を増加させるため有益である。

電気刺激を印加しない場合でも、タングステン電極の刺入経路上に酸化タングステンが観察されたが、これは電極表面の自然酸化に起因すると思われる。サル脳スライスをを用いた実験では、このような意図しない酸化タングステンが、電気刺激が加えられていない脳表面に多く見られた。これは、脳表の組織貫通によって電極にストレスがかかり、酸化物が剥離したためと考えられる。意図しない酸化タングステンは、マーキングにノイズをもたらす可能性があり、脳表の近くにマーキングしたい場合には特に問題となる。この問題の潜在的な解決策は、電極刺入前に先端を機械的に研磨するか、あらかじめ陰極パルス印加して電極界面の酸化物を除去することである。

本マーキング方法は、タングステン電極にのみ適用可能である。金属電極によく使われる材料は他にもいくつかある。例えば、鉄を含む合金の場合、二相電流を流すと金属イオンが析出する (Fung et al., 1998)。白金電極の場合、電流を流しても金属の酸化反応は起こらない (Robblee & Sweeney, 1996)。したがって、現代のマルチチャンネル電極が白金合金製であることを考慮すると、本マーキング方法はこれらの最新電極に直接適用することはできない。

#### 4.4.2. マーキング物質

マーキングによって堆積した物質は、酸化タングステンと考えられている (Ibe et al., 1990)。ニスル染色前のマーキングの色は黒または赤褐色であった (図 4.1B)。この色は物質の化学組成に関係している。酸化タングステンは負に帯電したイオンで、ナトリウムや水素と結合する。ナトリウムと水素の比率は見かけの色に大きく影響することが知られており (Tegg et al., 2017)、赤褐色は、ナトリウムタングステンブロンズ  $\text{Na}_x\text{WO}_3$  ( $x = 0.75$ ) に対応する。マーキングは明視野観察では茶色に見えたが (図 4.3G, K, 4.4D)、ニスル染色後の暗視野観察では赤みがあったピンク色に見えた (図 4.3H, L, 4.4E)。この赤ピンク色は酸化タングステンの色ではなく、クレシルバイオレットの色に似ている。クレシルバイオレットは塩基性染料であり (Carter & Shieh, 2015)、負に帯電した酸化タングステンを標識している可能性がある ( $\text{WO}_3^-$ )。したが

って、マーキングは、クレシルバイオレットが付着した酸化タングステンであると推測できる。

Pabst は、酸化タングステンをオスmium酸で還元することによって、「タングステンブルー」(おそらく  $H_xWO_3$ ;  $x = 0.1-0.5$ ) を観察した(Pabst, 1973)。この方法は、酸化タングステンの色が pH によって大きく変化するという事実に基づいていた。しかしながら、酸化タングステンと細胞の両方を同時に染色することは、pH 依存性のために困難である。ニスル染色を含む多くの染色法は中性溶液 (pH ~7) で行われるため、細胞染色と同時にタングステンブルー染色を行うことは困難である。一方、ニスル染色を用いた観察手法では、酸化タングステンと細胞の両方を可視化することができる。したがって、提案手法は Pabst のタングステンブルー染色法よりも優れている。

#### 4.4.3. 今後の展望

タングステン針の電解研磨は、電気生理学実験用の電極を製造するために広く使用されている。電解研磨は針の製造の文脈ではよく知られているが、電解研磨中に生成される酸化物にはほとんど注意が払われていない。例えば、Histed らは、タングステン電極を用いた電気刺激によるタングステニオンの沈着を報告した(Histed et al., 2009)。同様に、タングステン電極を用いた電気刺激に関する多くの研究があるにもかかわらず、一部の研究者は、タングステン電極を用いた電気刺激によるタングステニオンの析出に気づいていなかった可能性がある(Cicmil & Krug, 2015; Murasugi et al., 1993; Salzman et al., 1992)。刺激部位のスライスを観察していれば、この析出に気づいた研究者もいたかもしれない。しかし、私の知る限り、このような析出がマーキングとして利用できることを示した研究はない。もし電気刺激を与えた組織が保存されていれば、そのマーキングを使って電気刺激部位を正確に示すことができるだろう。Pabst の方法は、おそらく侵襲性と識別可能性に関する問題のため、広く採用されることはなかった。しかし、本研究で述べた方法は、これらの課題を克服し、安価で簡単に脳機能を解剖学的構造にマッピングすることを可能にした。

### 4.5. 本章の総括

本章は、タングステン微小電極を用いたシングルユニット記録に有用な、高精細かつ低侵襲な新規マーキング手法の開発と、その生体への適用について述べた。本マーキング手法は周辺組織を損傷させることなく、100  $\mu\text{m}$  以下の大きさに記録位置を可視化できる。したがって本マーキングは、脳深部の微小構造を対象とした神経活動記録とその位置の可視化に有用であると考えられる。次章では、3章で述べた実験システム、

および本章で述べたマーキングを用いた、ニホンザル外側膝状体からの記録について述べる。

# 第5章 外側膝状体の色応答記録および 青色応答細胞の位置特定

## 5.1. はじめに

第3章、第4章では、神経活動記録に用いる新たな実験システムおよびマーキング手法について述べた。本章は、新たな記録位置証明手法および実験システムを用いたニホンザルの外側膝状体（以降 LGN と略して呼ぶ）青色応答細胞の神経活動記録と、新規マーキング手法を用いた記録位置の証明について述べる。

ニホンザル LGN は6層構造をしており、処理している視覚情報に応じて分類することができる。その中でも K 層は6つの層の間隙にある細胞層で、S 錐体細胞（青色応答）由来の投射を受ける。このことから K 層の細胞は青色応答を示すことが期待されるが、青色応答細胞の位置を調べた先行研究では記録位置特定の精度が不十分であった。先行研究での位置特定は、刺入開始位置を基準とした刺入深さによる推定や、組織損傷を伴う従来マーキング手法による推定であった(Martin et al., 1997; Roy et al., 2009)。これらの位置特定手法は数 100  $\mu\text{m}$  程度の位置誤差が生じる恐れがある。これに対してニホンザル K 層は薄く ( $\sim 100 \mu\text{m}$ )、先行研究による位置推定では十分に証明ができていないと言える。

そこで本章では、これまで開発してきた高精細かつ低侵襲な新規マーキング手法をニホンザル外側膝状体の単一ユニット記録と組み合わせることで、青色応答細胞の局在を調べることにした。実験では外側膝状体の単一神経細胞から色選択的応答を測定し、青色 (S+) 応答を示した場合にマーキングを行う。もし青色応答細胞が K 層に局在するならば、マーキングも K 層に局在することが期待される。逆にもし K 層に局在していない場合、外側膝状体全体にランダムに分布する、もしくは K 層以外の層に局在することが予想される。実験の結果、検出されたマーキングはすべて K 層に位置していた。この結果は、ニホンザル外側膝状体において青色応答細胞は K 層に局在することを強く示唆する。

## 5.2. 実験方法

### 5.2.1. 動物

実験には2頭のニホンザル (*Macaca fuscata*) が参加した (サル A: 雌、体重 6.0kg、サル B: 雌、体重 6.0kg)。本実験に先立ち、サル A は 2019 年に、サル B は 2022 年にサ

ル頭部へ頭の固定および記録のための手術が施された。サル A はペントバルビタール (25 mg/25 min、静注)、サル B はイソフルラン (1.0–1.2 %濃度、ガス) による全身麻酔下で行われた。まず頭蓋骨頭頂部にヘッドホルダが取り付けられた。次に記録チェンバーが脳定位固定装置のイヤバーを原点として、サル A は前方 7 mm、サル B は前方 8 mm の冠状断面で、頭頂から側頭に 52 deg.の角度で、各半球の外側膝状体を狙ってそれぞれ頭蓋骨上に設置された。外側膝状体の位置は手術前に撮影した MRI 構造画像 (生理学研究所の共同利用) から推定した。ヘッドホルダおよびチェンバーには MRI が利用可能な材料を使い、ヘッドホルダはサル A、B ともに PEEK 樹脂製、チェンバーは、サル A はポリオキシメチレン (POM) 樹脂製、サル B は耐水性の高いフィラメント材料による 3D プリンタ造形で製作されたものを用いた。手術後、サルには抗生物質のセファメジン (1.0 mL/day) が 1 週間投与された。

ニホンザルを対象とした実験は、「国立大学法人豊橋技術科学大学動物実験規程」(url: <http://www.tut.ac.jp/gakusoku/rule/302.html>) に基づき、承認された研究計画 (研究責任者：鯉田孝和) に従って実施された。

## 5.2.2. 実験環境

実験環境の概略図を図 5.1 に示す。視覚刺激の呈示、動物の行動モニタリングおよび神経活動の記録は、第 4 章で示した TDT-MatlabPTB システムによって行われた。実験は全てシールドルーム内で行われた。実験中のシールドルーム内は、照明がすべて切られたか、部屋内とディスプレイとの輝度差による視覚応答を避けるため、モニタとの輝度差がないよう任意の明るさで照明がつけられた。視距離は LCD ディスプレイから 90 cm であった。

サルの視線は全て赤外線カメラ ETL-200 (ISCAN、US) によって計測された。視線データは PC を介してマルチチャンネルプロセッサ TDT-RZ2 に送られた。別の PC では Matlab 及び PsychToolBox によるタスク制御及び刺激呈示と、OpenEx による、RZ2 を介した視線データとタスクの同期が行われた。また、RZ2 ではタスクに同期した報酬の制御も行われた。

呈示刺激は、LCD ディスプレイ LCD-V404 (NEC、日本) に呈示された。ディスプレイのリフレッシュレートは 60 Hz、ディスプレイ表示サイズは 88.6 cm x 49.8 cm、解像度は 1920 x 1080 pixel であり、サルの眼球位置における呈示視野角は横 50.2 deg.、縦 29.5 deg. であった。ディスプレイは色彩輝度系 CS-200 (Konica-Minolta、日本) を用いて較正された。ディスプレイの RGB 値をそれぞれ最大にした際の色度と輝度 (x,y,Y) は、R: (0.641, 0.328, 103.7)、G: (0.292, 0.633, 343.6)、B: (0.158, 0.046, 30.0) であった。ディスプレイの輝度は、黒 (R, G, B) = (0, 0, 0) で 0.22 cd/m<sup>2</sup>、白 (255,

255, 255) で  $488.1 \text{ cd/m}^2$  であった。加えて、分光放射照度計 CL-500A (Konica-Minolta、日本) を使用して、ディスプレイの RGB それぞれの分光分布を測った。本実験で用いた LCD ディスプレイについて、CS-200 で得た、入力値と RGB 単色光の輝度の関係 (ガンマカーブ)、及び CL-500A で得た、RGB 単色光の分光分布を図 5.2 に示す。

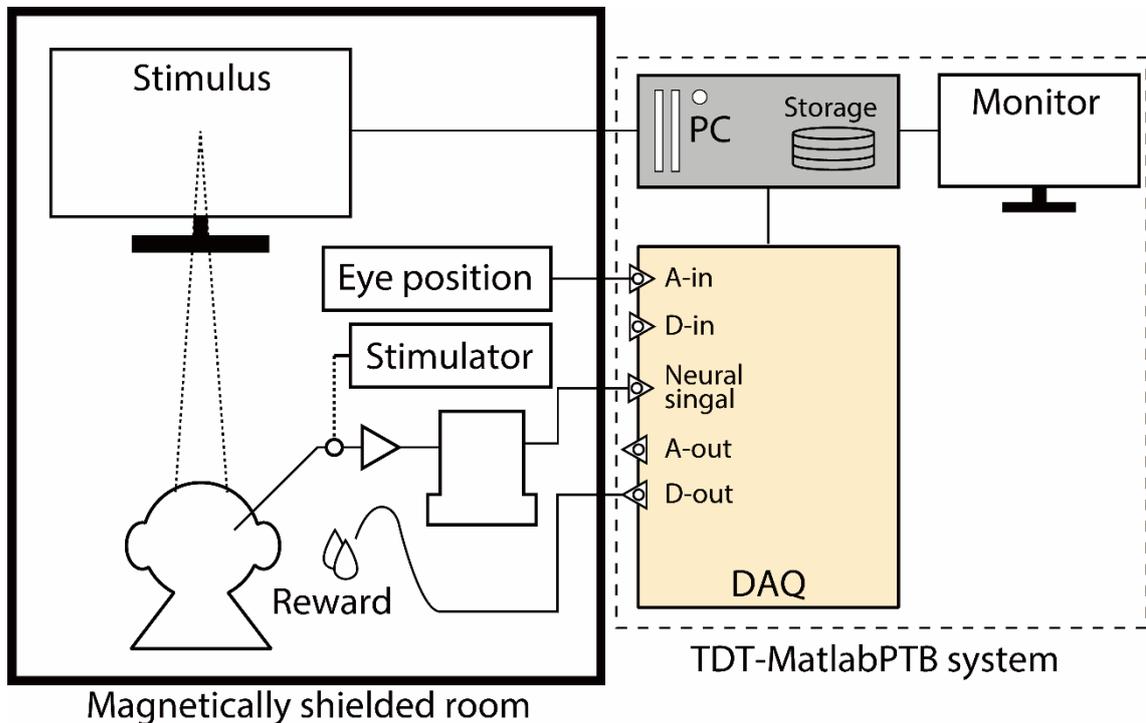


図 5.1 実験環境の概略図。

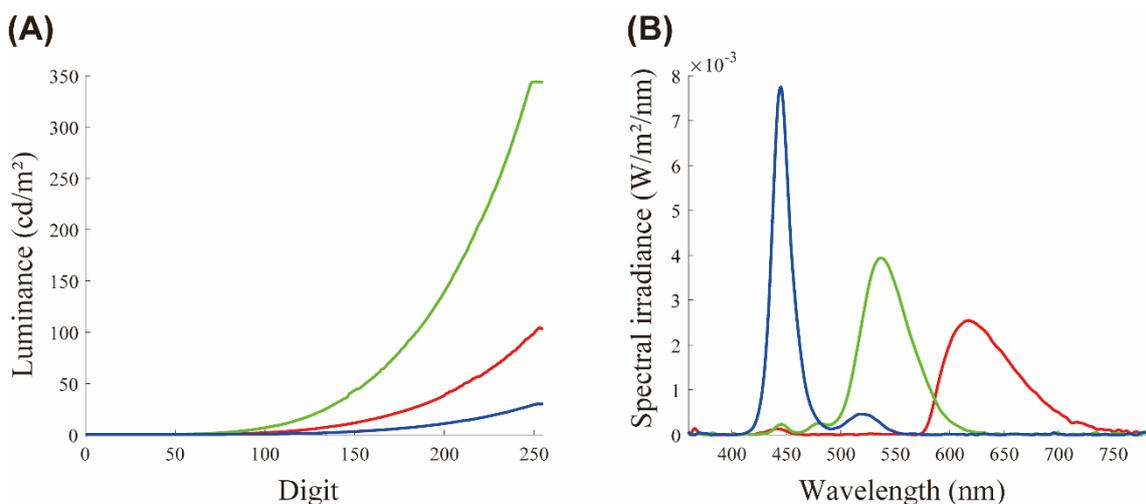


図 5.2 (A) LCD ディスプレイのガンマカーブ。(B) LCD ディスプレイの RGB それぞれの分光分布。

### 5.2.3. 視覚刺激と色空間

刺激は全画面の一様刺激とドリフトグレーティングを用いた。グレーティングの時空間解像度は 0.2 cycle/deg.、2 cycles/s で、上から下への運動方向でドリフトした。ドリフトグレーティング刺激は、主に記録実験中にユニットの視覚応答を見つけやすくする目的で使用された。

刺激の色は、Stockman & Sharpe の錐体応答感度(Stockman & Sharpe, 2000) で定義した図 5.3A に示す DKL 色空間 (Derrington et al., 1984) の各軸上と、その中間色相の色を用いた。DKL 色空間の原点は、輝度がディスプレイの最大輝度の半分である  $244 \text{ cd/m}^2$  で  $(x, y) = (0.333, 0.333)$  の等エネルギー白色とした。DKL 色空間の各軸は、ディスプレイの色域に基づいて正規化した。ディスプレイの色域と併せて、本実験で用いた色刺激の色域を図 5.3B に示す。

一様刺激の色は、図 5.3A の等輝度 cardinal 軸上の最大コントラストの 4 色 (“LM+”、“LM-”、“S+”、“S-”) に加えて、輝度軸の最大コントラストの 2 色 (“Lum+” :  $371.6 \text{ cd/m}^2$ 、“Lum-” :  $0.66 \text{ cd/m}^2$ ) を使用した。ドリフトグレーティング刺激の縞の色は、一様刺激で用いた色の、軸ごとの組み合わせを用いた (“LM grating”、“S grating”、“Lum grating”)。したがって、グレーティングの反対色どうしで色コントラストは異なり、足し合わせてもグレーにはならない。以上より、使用した視覚刺激の数は、一様刺激 6 個とドリフトグレーティング刺激 3 個を合わせた 9 個であった。

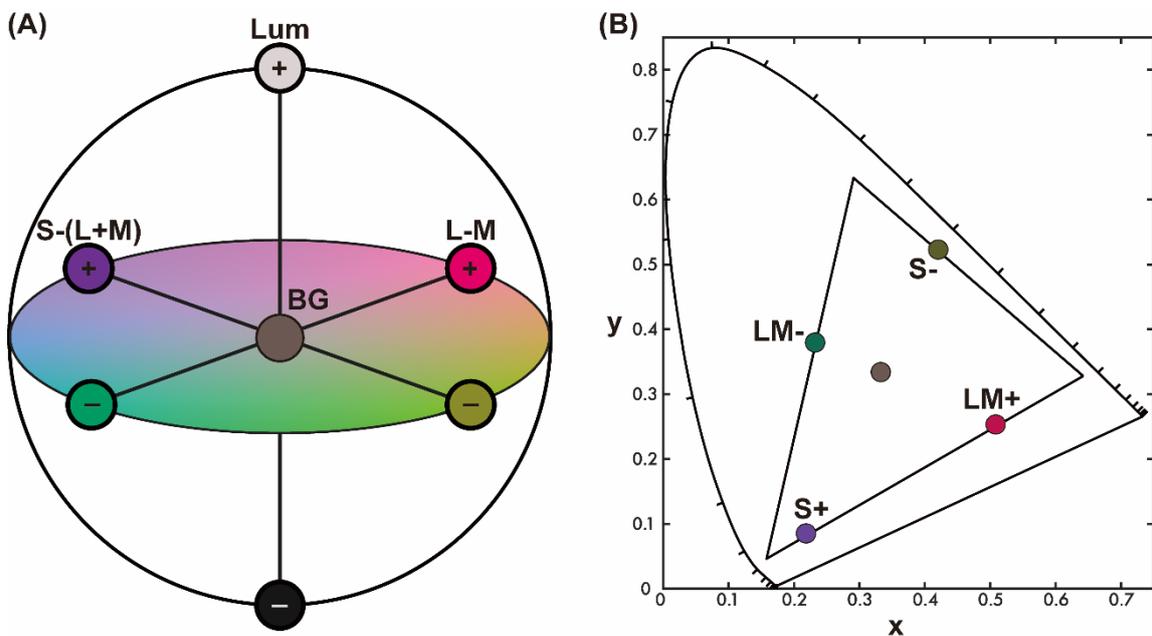


図 5.3 本実験で用いた刺激の色域。(A)DKL 色空間の刺激色の定義。○印の中の“+”“-”

は軸の正負を表す。(B)<sub>xy</sub>色度図における刺激の色域。

十分な選択的応答が得られた場合は、最適刺激を用いて眼優位性および受容野マッピングを行った。眼優位性はサル目の前に目隠しを配置し、片眼ずつ刺激を行うことで記録した。目隠しは赤外線のみを通すコールドミラーを用いることで、眼球位置計測装置を問題なく行うことができる。受容野マッピングは、視野の中心周辺を見分ける同心円刺激5段階と、上下左右を見分けるウェッジ状の4つの刺激の合計9つを用いた。

#### 5.2.4. 行動タスク

動物は固視課題を行った。トライアルの流れを図 5.4 に示す。ディスプレイの背景として  $244 \text{ cd/m}^2$  で  $(x, y) = (0.333, 0.333)$  の等エネルギー白色が表示されており、トライアル開始時にディスプレイ中心に固視点が表示される。固視点は黒いドットに白い輪郭がつけられている。サルが固視点を 500 ms 注視すると、視覚刺激が 500 ms 呈示された。視覚刺激は 9 つの刺激のうちのどれかがランダムで選ばれた。刺激呈示終了後さらに 500 ms 後までサルが固視点を注視すると、水またはジュースによる報酬が与えられた。この間サルは中央の固視点を注視しつづけるように訓練され、途中で固視点が外れたときはトライアル終了となり、同じ刺激はランダム順のリストに戻された。インターバルとして一定時間 (2000 ms) に変動時間 (0-1000 ms) が加えられた時間が経過したのち、次のトライアルへと進んだ。

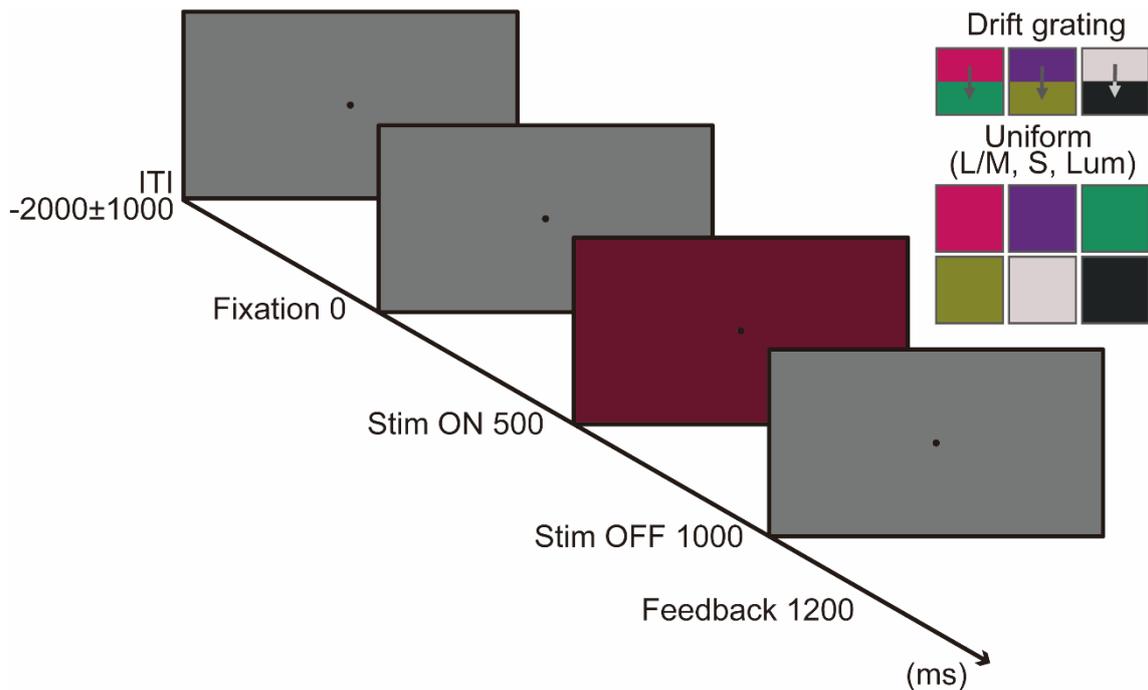


図 5.4 トライアル開始の時刻を 0 とした、トライアルの流れ。右上に、用いた刺激の種類を示す。

## 5.2.5. 電気生理実験

電極はタングステン電極 (FHC、US) を使用した。電極のインピーダンスはおよそ 1 MΩ だった。電極はチェンバーに取り付けた 1 mm 間隔のグリッド (Crist et al., 1988) にガイドチューブを介して挿入された。ガイドチューブによって脳の硬膜は突き破られ、電極の先端は保護されたまま脳内に刺入される。電極の挿入深さはマイクロマニピュレータおよびダイヤル (MO-97、NARISHIGE、日本) で制御された。

実験中、ユニットの色応答を確かめるためにオンラインでスパイクソートが行われ、刺激種ごとに PSTH がモニタリングされた。S+ の一様刺激に応答を示すユニットが記録された位置では、ユニットの記録後にタングステン酸化物によるマーキングが実施された。マーキングには電気刺激装置 (SEN-3401、日本光電) とアイソレーター (SS-203J、日本光電) を使い、二相電流パルス (40 μA、200Hz、陽極先行、パルス幅 = 0.5ms、パルス間隔 = 0ms) を 180 秒間印加した。

マーキングの対象としたユニットは必ずしも単一ユニットが明瞭にアイソレーションされたものではなかった。具体的には、S+ 刺激への興奮性応答と同時に、他の色刺激への興奮性応答もみられたユニットである。この場合は、S+ 刺激への応答が他色刺激への応答よりも強いかどうかによって、マーキングを実施するか判断した。

サル B の左半球については、複数回行われるタングステンマーキングを見分けるた

めにリージョンマークによるタグ付けを行った。リージョンマーキングは外側膝状体よりも少なくとも 1.97 mm 浅い位置で図 5.5 に示すように多重に行う。刺入軸に沿って 2000  $\mu\text{m}$  の間に 5 か所でマーキングの可能性があり、最も深い部位と浅い部位の 2 箇所では必ずマーキングを行い、間の 3 か所において、500  $\mu\text{m}$  間隔で 0~3 回マーキングする。この 3 箇所のマーキングの有無によって、計 8 パターンのマーキング列が区別可能になる。リージョンマーキングのパターンは、タングステン酸化物によるマーキングを実施した順番に、#0 から実施された。

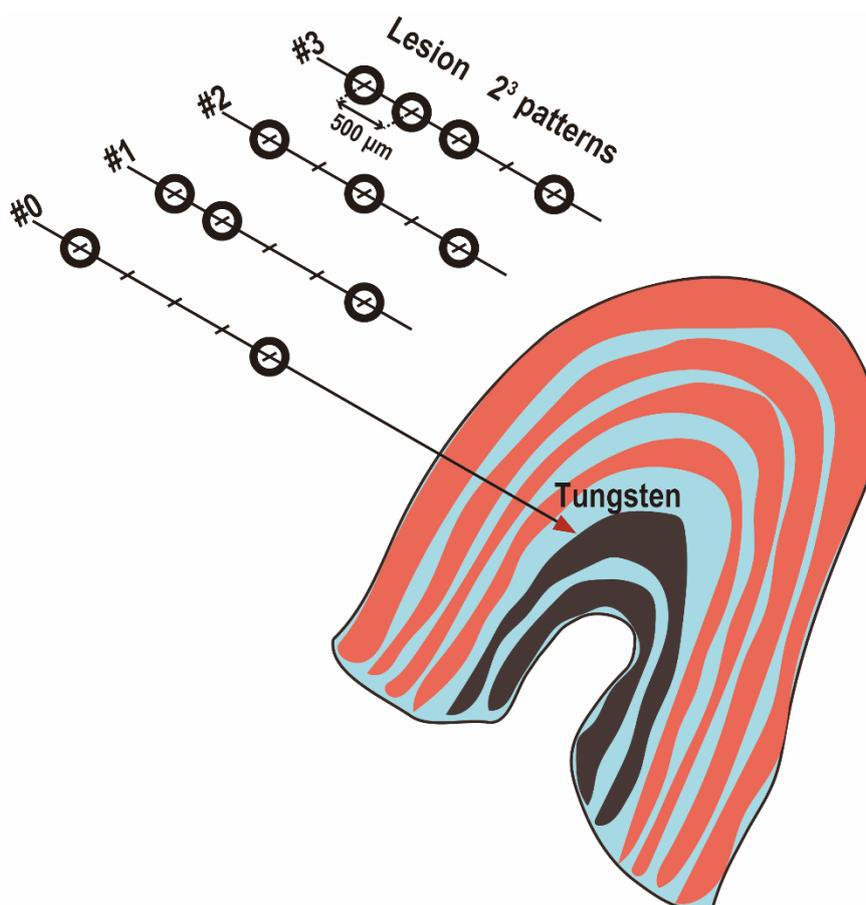


図 5.5 サル B 左半球で実施したリージョンマーキングの概略図。外側膝状体内でタングステンマーキングしたのち、電極を戻しながら右側に示す 8 パターンのリージョンマーキングから 1 パターンだけ実施する。リージョンマーキングのパターンは #0 から順番に使う。

半球について記録を完了したのち、サル A 両半球とサル B 右半球では最後にユニット記録をしたグリッド位置を囲う範囲で電極を刺入し、外側膝状体よりも浅い位置でリージョンマーキングが実施された。このリージョンマーキングは、脳スライス上で記録範囲を推定するために用いた。

## 5.2.6. デプスプロファイル

記録部位は電極刺入深さに応じた神経応答の有無によっておおまかに推定された。実験に用いたサルは、チェンバーを取り付ける前に脳を MRI で撮影された。その後サルは記録実験中の任意のタイミングで、電極を脳に刺入した状態で頭蓋骨を X 線撮影された。その後 MRI 画像と X 線撮影画像は頭蓋骨を目印に重ね合わせられ、電極刺入の開始位置と深さの基準位置が特定された(図 5.6)。図および刺入深さのスケールは、X 線撮影画像中のグリッドの穴を基準に調整された。

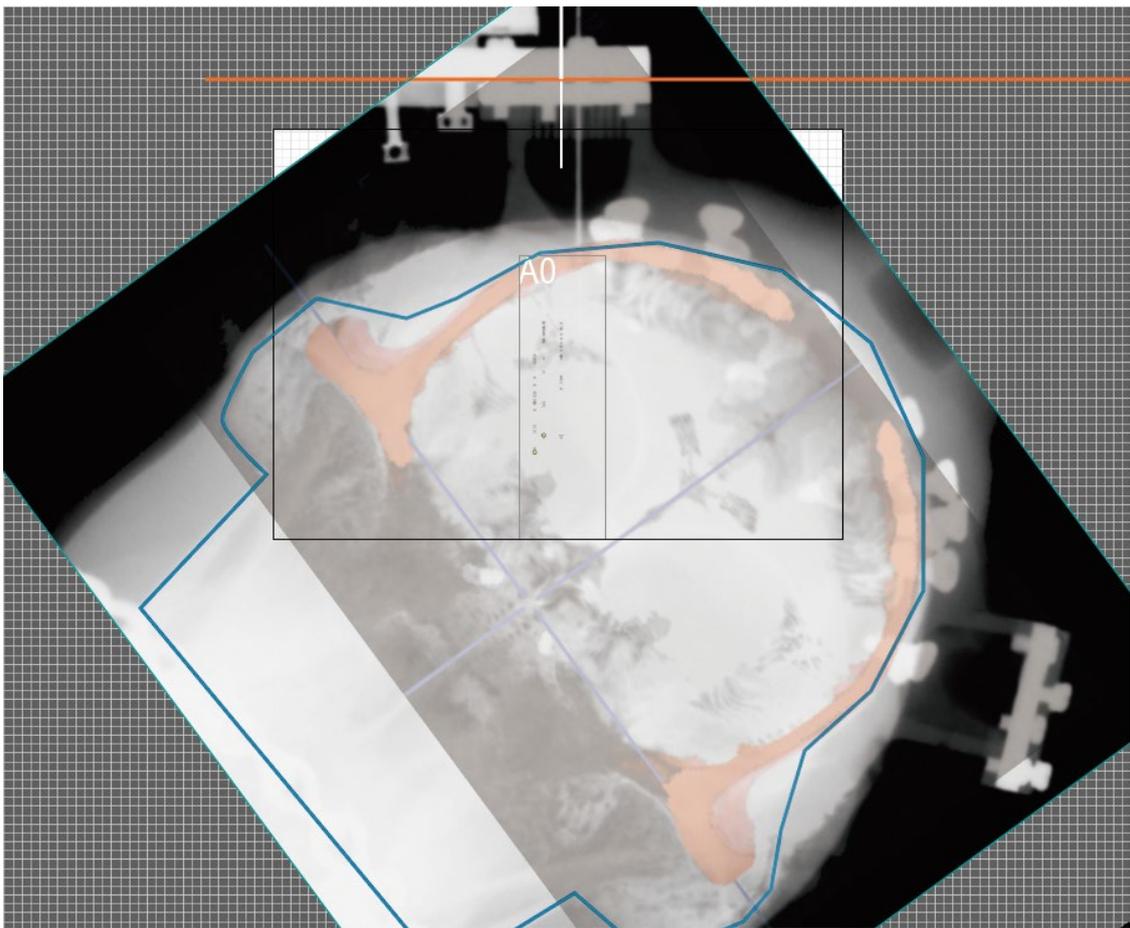


図 5.6 サル MRI 画像と X 線撮影画像の重ね合わせ。図中オレンジの領域は MRI 画像から推定した頭蓋骨、水色線は MRI 画像から推定した頭蓋骨の形、図上部のオレンジの線は推定した電極刺入深さの基準位置を示す。

## 5.2.7. 神経活動の解析

記録された神経活動はすべて MATLAB を用いて解析された。まず、神経活動の時系列データに、任意の電圧レベルでのトリガとウインドウを設定することで、スパイク

の発生時刻を抽出した。その後、スパイク発生時刻の時系列データから、タスクが完遂されたトライアル、かつその中で視覚刺激の ON 時刻を 0 として -500~2000 ms の範囲が抽出された。次に、抽出されたスパイク発生時刻のデータを刺激の種類ごとに分け、視覚刺激の ON 時刻を 0 とした時刻としてヒストグラム (Peri-Stimulus Time Histogram; PSTH) を作成した。

一様刺激への応答は、刺激 ON 区間 (0~500 ms)、OFF 区間(-500~0、500~2000) それぞれのスパイク発生頻度から平均発火頻度を計算した。

ドリフトグレーティングへの応答は以下のように解析した。グレーティングに対する典型的な応答は、受容野に最適刺激が入るときに興奮性応答が生じ、非最適刺激が入るときに応答が弱まるか抑制応答が生じるものである。これらの興奮と抑制応答の差分を取る。応答遅れを考慮した刺激 ON 区間 (50~550 ms) の PSTH と、2 Hz、振幅 1 の矩形波ウェーブレットとの相互相関を計算し、相関係数の最大値をもとに波形のマッチングを行った。その後 PSTH と矩形波ウェーブレットの同じ時刻の要素同士をかけたベクトルを作り、その要素の平均値をとった。

## 5.2.8. 組織学的解析

すべての記録およびマーキングが終了したのち、最後の記録実験から少なくとも 1 週間後に動物の灌流固定を行った。サルはペントバルビタール (200 mg, IV) もしくはチオペンタール (150 mg, IV) による深麻酔のあと開胸され、左心室にヘパリン 1 mL、次いでペントバルビタール 200 mg もしくはチオペンタール 300 mg が投与された直後に、4% パラホルムアルデヒド・0.1 M リン酸緩衝液によって心臓から灌流された。脳は頭蓋骨から取り出された後、少なくとも 1 日以上 4% パラホルムアルデヒド・0.1 M リン酸緩衝液によって後固定された。

脳はスライスに先立ち、グリッドを介して蛍光塗料 DiI を塗布したガイドチューブが複数回刺入されることで、冠状断面の目印がつけられた。脳はその後、線状の傷の深さ方向を切断面とし、記録部位とその周辺の大脳皮質の部分のみを含むブロックに切断された。そして、この脳ブロックは 10%→20%→30%スクロース液 (300 g / L) にそれぞれ少なくとも 1 日以上、脳ブロックがスクロース液に完全に沈み込むまで漬け込まれることで、凍結保護 (クライオプロテクション) された。その後、脳ブロックはマイクローム (REM-710、大和光機) によって 100  $\mu$ m 厚にスライスされた。スライスと電極刺入軌跡との平行がとれていることは、スライスの脳ブロック上で蛍光塗料の軌跡を観察することで確認した (図 5.7)。作成された脳スライスは 5%界面活性剤 TritonX-100 中で少なくとも 1 時間攪拌されたのち、ゼラチンコートされたスライドガラスにマウントされた。次いで脳スライスは、まずエタノール上昇系列 (70%

→95%→100%→100%、各 3 分) およびキシレン (少なくとも 10 時間) で脱脂され、その後アルコール下降系列 (100%→100%→95%→70%→50%、各 3 分) および DW で rehydrate された。次に脳スライスはクレシルバイオレット 3 分、のち酢酸 (1.5 mL / L) で染色された。そしてスライスは上記と同様の脱脂処理の後、カバースリッピングされた。染色サンプルは十分に乾燥されたのち、光学顕微鏡で明視野および暗視野観察が行われた。

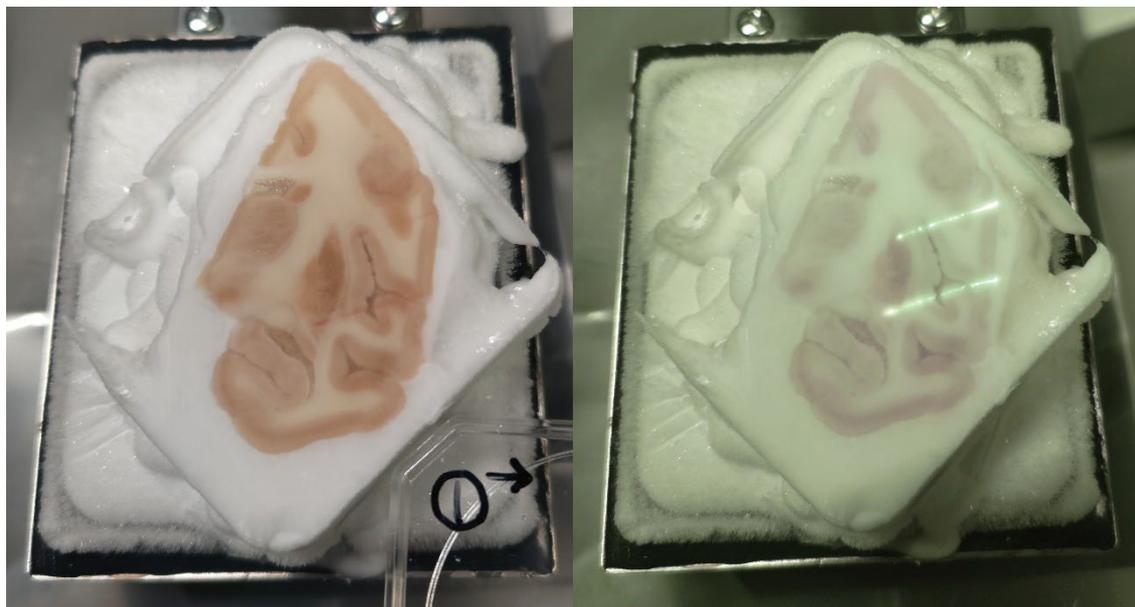


図 5.7 スライス直前のサル B 右半球脳ブロック(左: 通常照明下の観察、右: 蛍光観察)。緑色の軌跡は、蛍光塗料を塗布されたガイドチューブの刺入軌跡を示す。

## 5.3. 結果と考察

### 5.3.1. 記録ユニット

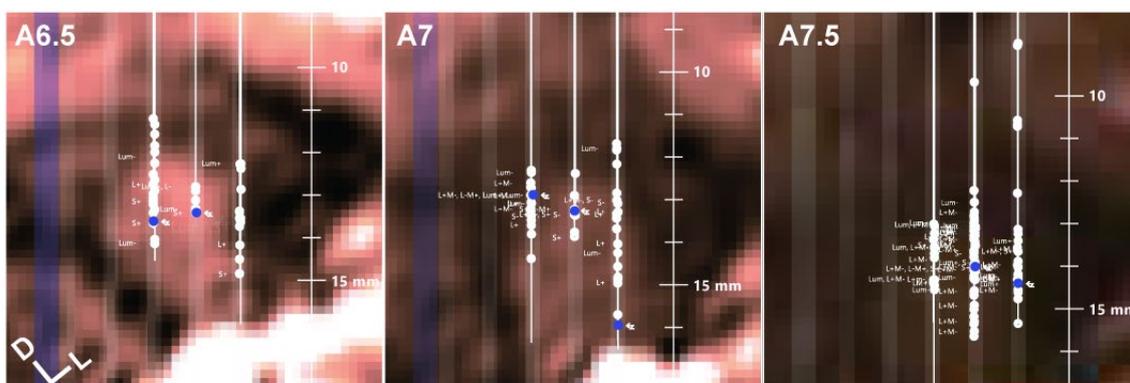
本実験では、サル A 両半球から 179 ユニット、サル B 両半球から 151 ユニートを記録した。そのうち青色に応答し、かつマーキングを実施したユニットは、サル A で 14 ユニット、サル B で 12 ユニットであった。

電極を刺入すると外側膝状体に到達する前、比較的浅い位置では聴覚野と思われる聴覚応答がみられた。次に、神経信号のない区間、および視床網様核と思われる高頻度の自発活動がみられる区間を経たのち、外側膝状体と思われる顕著な視覚応答がみられる領域に到達した。外側膝状体と思われる区間のユニットには、錐体反対色空間で定義した一様色刺激に対する選択的応答がみられた。電極刺入の深さ記録をサルの MRI 構造画像と重ね合わせた結果、色応答ユニットは、被殻よりも内側で、かつ海馬

の背側に位置していた。したがって、本実験で記録された色ユニットは外側膝状体のものと考えられる (図 5.8、図 5.9)。

## Monkey A

### RH



### LH

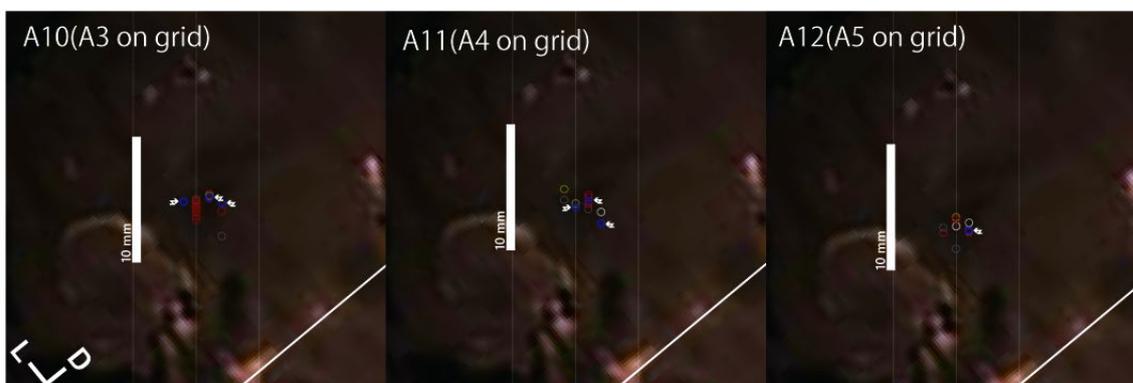
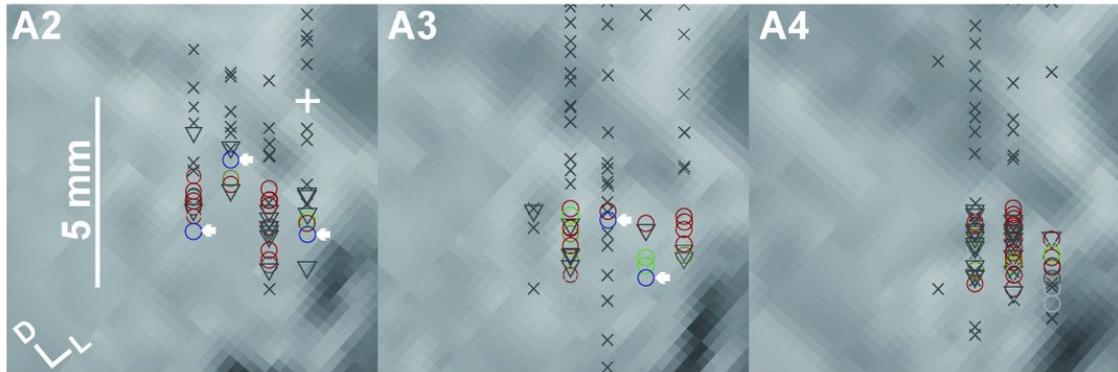


図 5.8 サル A の電極刺入、および色応答ユニットの位置記録と MRI 構造画像の重ね合わせ。矢印はタングステンマーキングを実施した場所を示す。左図の左下に、MRI 画像の座標軸を示す。D=背側、L=外側。(RH) 右半球。白丸は S+ ON 応答以外のユニット。応答した色等は丸の横に文字で示す。青縦線は LM(外側-内側方向)のゼロ座標を示す。A6.5~7.5 は MRI 断面のグリッド上の AP(前後方向)座標を示す。各図右側の 10~15 mm ルーラは脳内に貫通させたガイドチューブ先端からの刺入深さを示す。(LH) 左半球。ユニットの色応答は丸の色で示す。A10~A12 はイヤーパーを原点とした AP 座標、A3~A5 on grid はグリッド座標中の AP 座標を示す。各図右下の斜め白線は正中を示す。

## Monkey B RH



## LH

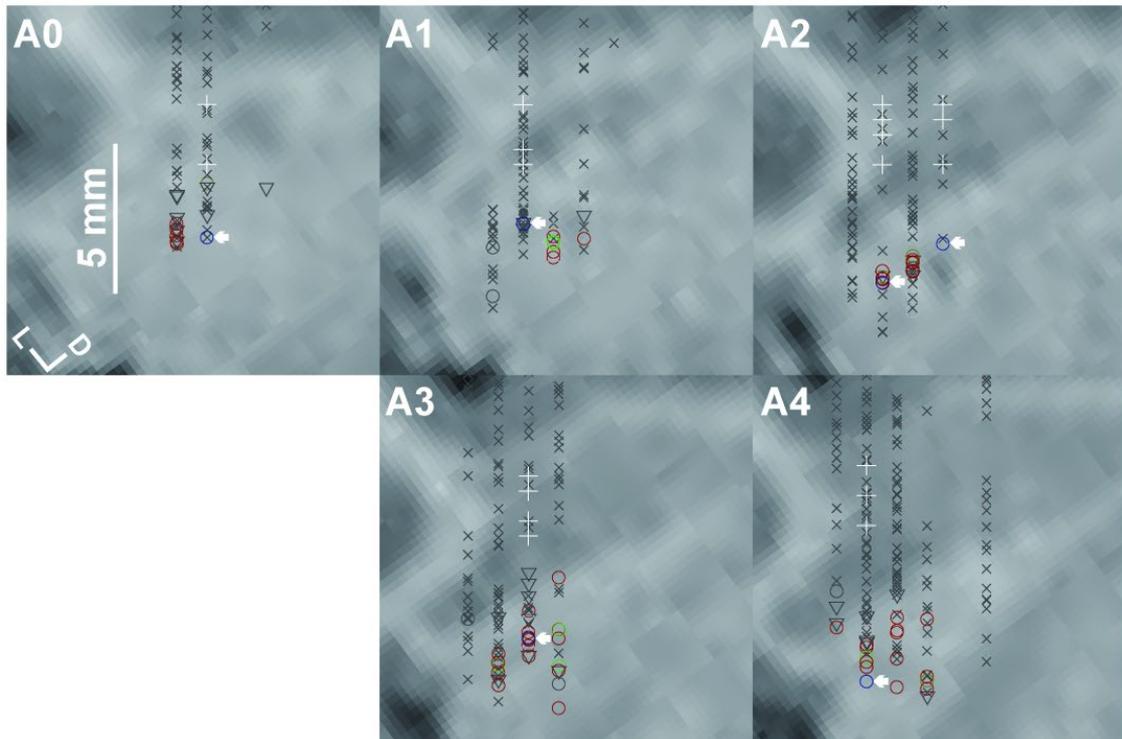


図 5.9 サル B の電極刺入、および色応答ユニットの位置記録と MRI 構造画像の重ね合わせ。矢印はタングステンマーキングを実施した場所、十字はリージョンマーキングを実施した場所を示す。丸印は色応答のあったユニット、三角印は色応答を分離できなかったが、視覚応答のあったユニット、バツ印は視覚応答がみられなかったユニット。各図 A0~A4 はグリッドの AP 座標を示す。各半球の左図に MRI 画像の座標軸を示す。D=背側、L=外側。

よくアイソレーションされた色応答ユニットの例を図 5.10、図 5.11、図 5.12 に示す。図 5.10 は記録された S+ユニットの例である。このユニットは S+一様刺激に

対して興奮性の応答を示し、LM+、S-、Lum-一様刺激では抑制性の応答を示した(図 5.10 B-C)。眼優位性は両眼性であり、対側、同側どちらの眼の S+一様刺激に対しても興奮性の応答を示した(図 5.10 D)。刺激の視野位置ごとの応答では、偏心度 2-10 deg.、かつ左/下半視野への呈示でより強く応答した(図 5.10 E、検定なし)。また、S 軸ドリフトグレーティング刺激では縞のドリフトに対応しているとみられる、2 Hz で興奮と抑制を繰り返す応答がみられた (図 5.10F)。

図 5.11、図 5.12 はそれぞれ LM+および Lum+応答ユニットの例である。これらのユニットは、LM+、Lum+一様刺激への明瞭な興奮性応答がみられ、LM+応答ユニットでは反対色の LM-一様刺激への抑制性応答もみられた。

以上のように、記録された色応答ユニットは、ドリフトグレーティング刺激では 2 Hz の興奮・抑制応答がみられ、一様刺激では反対色でそれぞれ興奮・抑制応答がみられた。

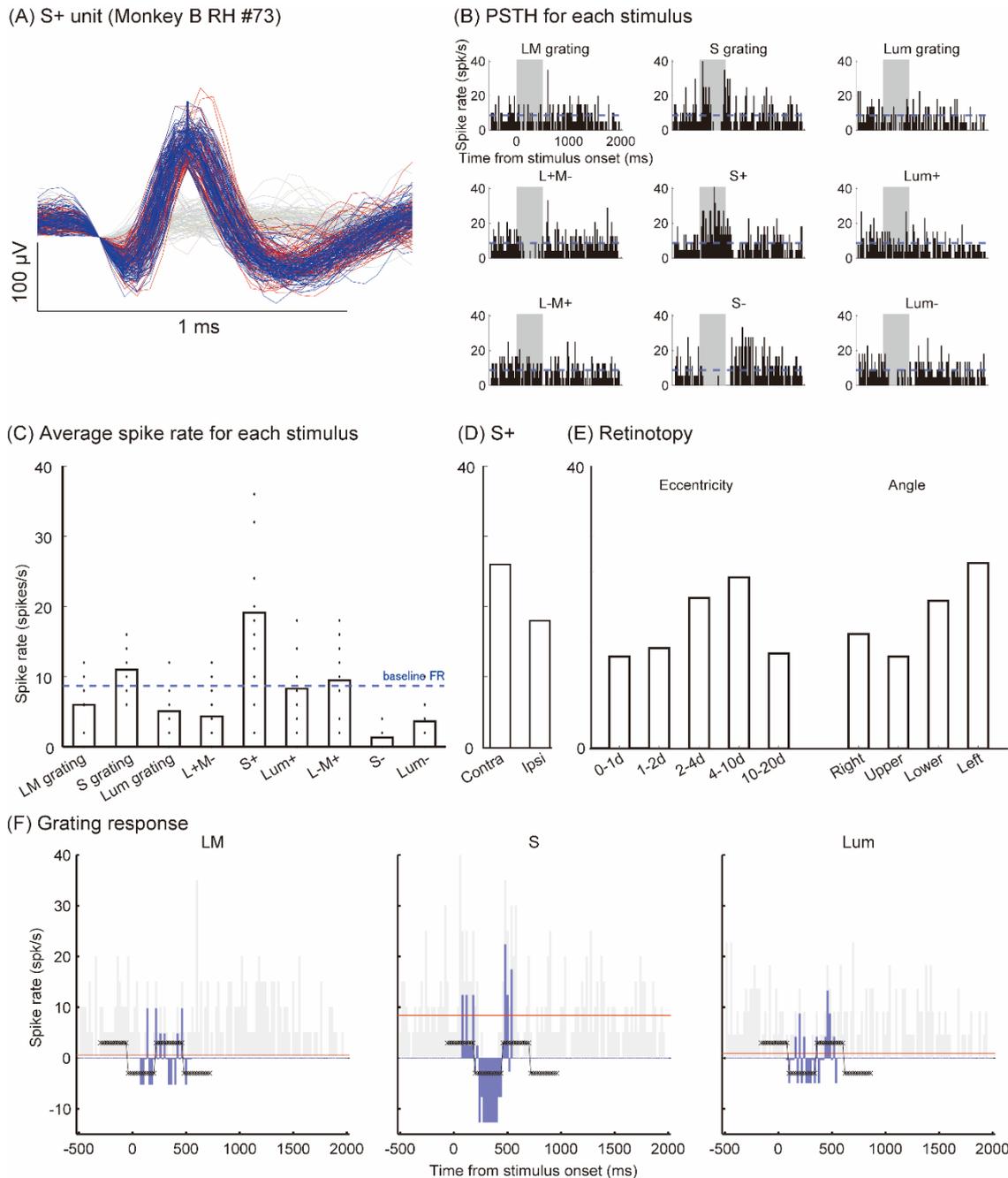


図 5.10 記録された S+応答ユニットの例。(A)ソートされたスパイク。青波形は最初の 100 ユニット、赤波形は最後の 100 ユニットの例を示す。(B) 刺激種ごとの、刺激 ON 周辺の発火頻度ヒストグラム(PSTH)。刺激オンセットの時刻が 0 である。刺激 ON 区間は灰色背景で示す。(C) 刺激種ごとの平均発火頻度。(D) S+刺激の、対側眼(contra)、同側眼(ipsi)入力に対する平均発火頻度。(E) S+刺激の、視野位置ごとの平均発火頻度。視野中心からの偏心性(Eccentricity)と、上下左右の半視野(Angle)。(F) グレーティング応答の抽出。青バーは解析区間(50~550 ms)の PSTH、黒線は 2 Hz 矩形波、赤線は計算されたグレーティングの 2 Hz 応答 (spk/s) を示す。

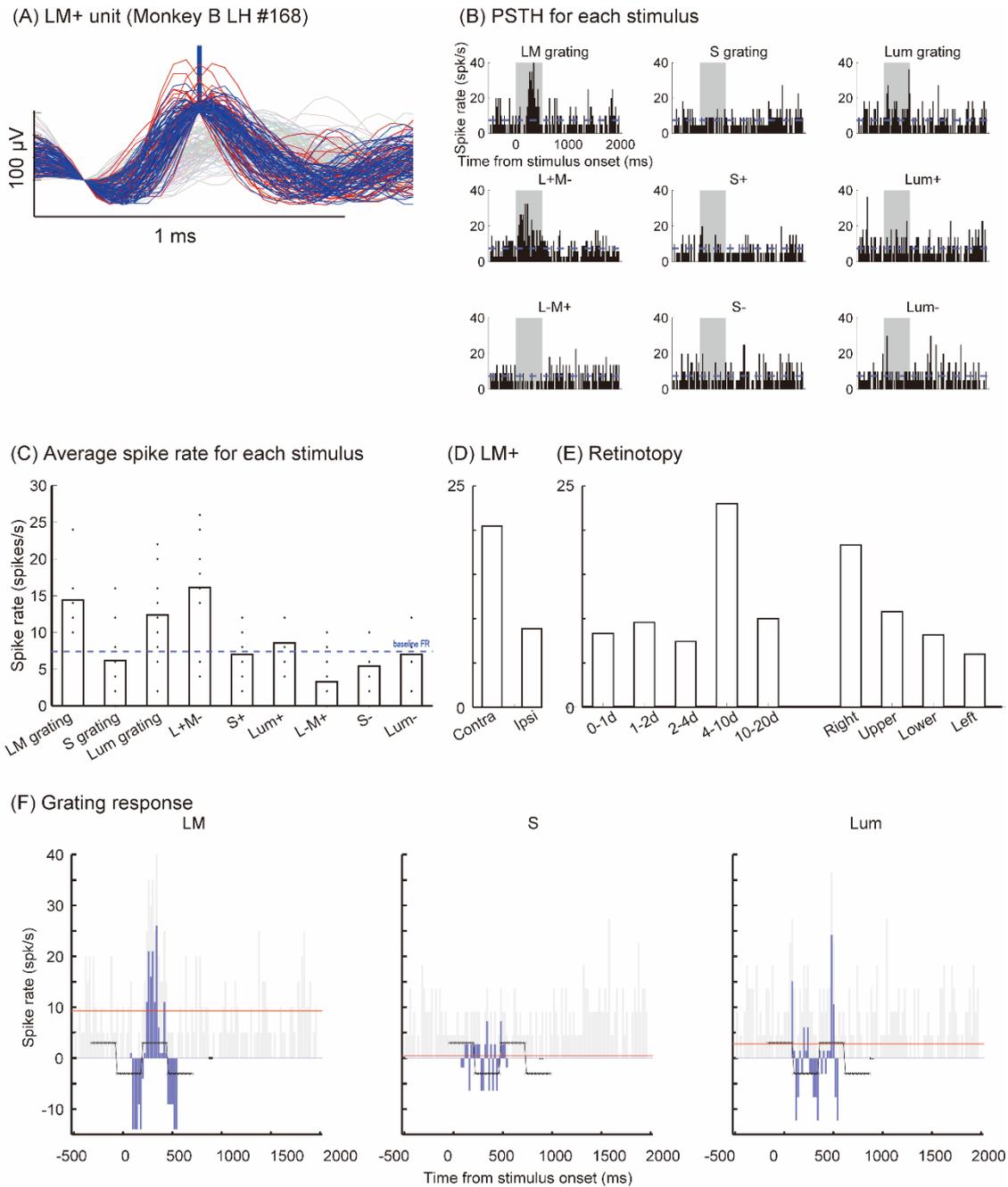


図 5.11 記録された LM+ユニットの例。各図の見方は S+ 応答ユニットと同じ。

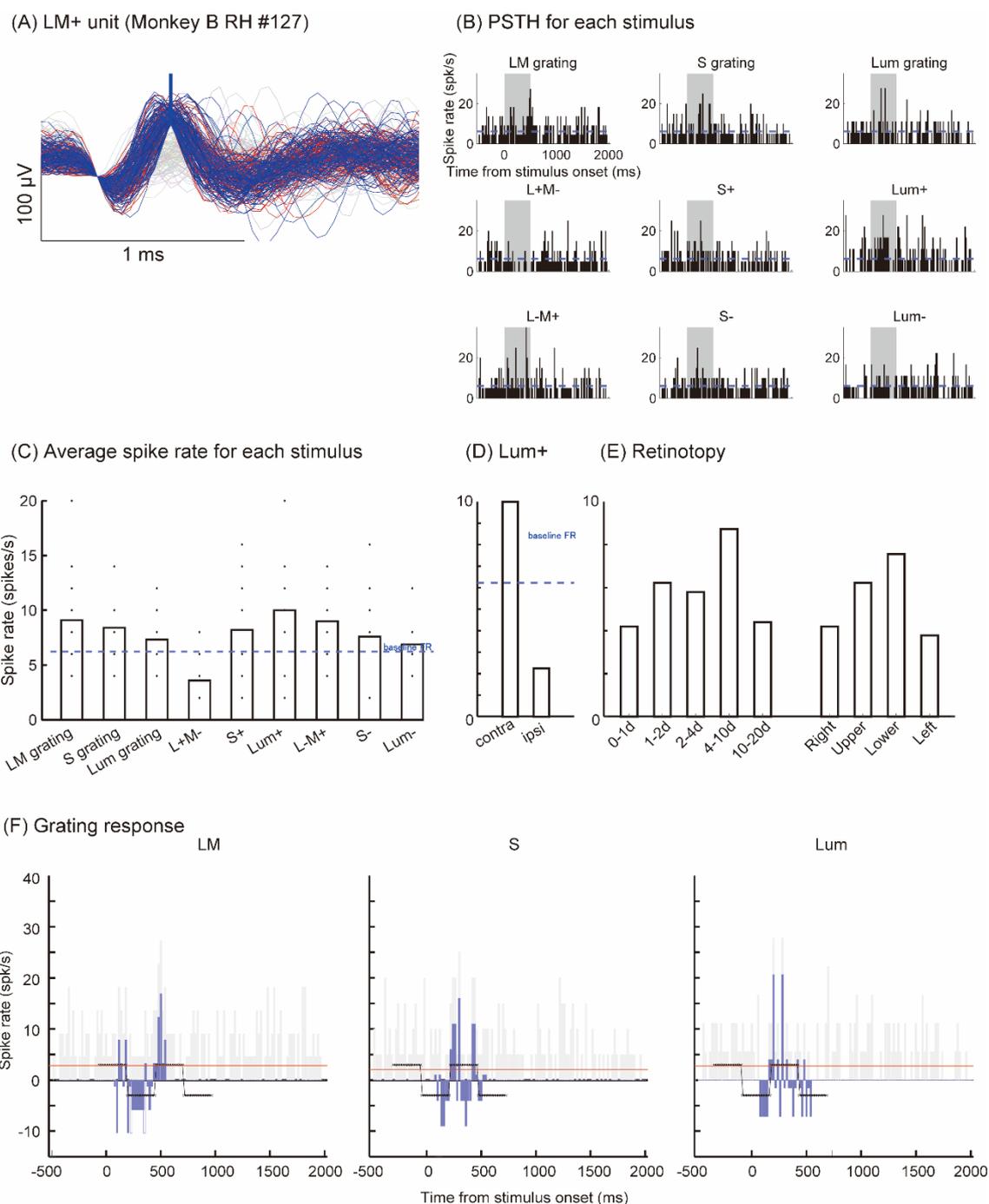


図 5.12 記録された Lum+ユニットの例。各図の見方は S+応答ユニットと同じ。

次に記録された色ニューロン全体の色選択性を示す。各サルの半球ごとに記録された一様色刺激への応答から、DKL 色空間の各 cardinal 軸で平均発火頻度の差を計算して示した (図 5.13)。マーキングを実施した S+応答ユニット、およびアイソレーションの良い他色応答ユニットを色分けして表示する。マーキングを行った細胞は明らかに S+刺激に興奮性応答を示しており、L-M では顕著な応答がないか、わずかに抑制性

(L に抑制性もしくは M に興奮性) 応答を示す傾向が見られた。この傾向を統計的に確かめるため、各色軸群の母平均が等しいという帰無仮説を立て、有意水準 5% で一元配置分散分析を実施した結果、帰無仮説は棄却された (サル A 左半球:  $p=0.0236$ 、サル A 右半球:  $p=0.046$ 、サル B 左半球:  $p=0.0323$ 、サル B 右半球:  $p=0.0007$ )。さらに、各サル、各半球で多重比較としてダネットの検定 (対象群とその他群との間の母平均の検定) を行った結果、サル A 各半球の S 群対 LM 群、サル B 各半球の S 群対 LM 群、S 群対 Lum 群それぞれの比較について有意水準 5% で有意に差があった (サル A 左半球:  $p=0.0144$  (S vs LM)、サル A 右半球:  $p=0.0437$  (S vs LM)、 $0.0715$  (S vs Lum)、サル B 右半球:  $p=0.0004$  (S vs LM)、 $0.0349$  (S vs Lum))。したがって、マーキングを実施したユニットは概して S+刺激への選択的な応答があったといえる。

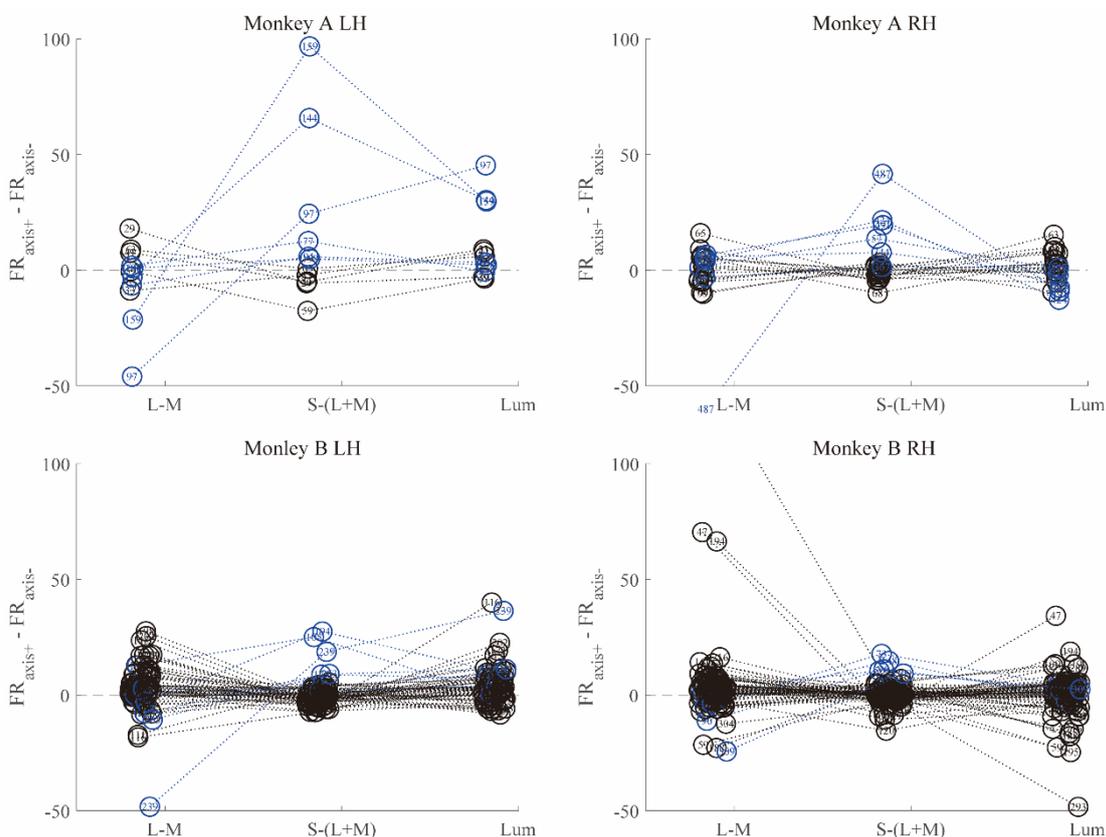


図 5.13 サル A、B の各半球における、マーキングを実施した S+応答ユニットおよび他色応答ユニットの応答。横軸は刺激の色軸 (DKL 色空間の cardinal 軸)、縦軸は色軸ごとの刺激応答の差分を示す。マーキングを実施したユニットのプロットは青色で示す。

### 5.3.2. マーキング

S+応答が計測されたのちに行われたマーキングの回数は、サル A 各半球 7 回、サル B

右半球 5 回、左半球 7 回で合計 26 回であった。作成した脳スライスからマーキングを探索した結果、複数のマーキングが見つかった。マーキング点が局在していたケースは、サル A では 6 個、サル B では 4 個であった。

サル A から見つかったマーキングのうち最も顕著な結果をケース A1 として図 5.14 に示す。ケース A1 でマーキングは、K5 層に位置していた。マーキングは長軸 200  $\mu\text{m}$  の錐状形状の分布をしており、分布の長軸方向は電極の刺入角度と一致していた。マーキングは概して K5 層の中央に分布していたが、わずかに隣接する P4 層にも見られた。サル A で見つかった他のマーキング (ケース A2~A6) も、すべて K 層に位置していた (図 5.15)。以上から、記録された S+ユニットはすべて K 層に存在したことが強く示唆される。

サル B で観察されたマーキング点は左右脳で異なっていた。左半球のケース B1 は parvo 6 層に位置し、ケース B2、B3、B4 は Parvo6 層と K6 層の境界に位置していた (図 5.16C)。また、サル B のタングステンマーキングと同じ刺入軌跡上に、タングステンマーキングのパターンを見つけることができた (図 5.16B)。右半球で観察されたマーキングは局在しておらず、ほとんどが電極刺入軌跡に沿って線状に分散していた (図 5.17)。このため、個別のマーキングを分離同定することが困難であった。サル B 右半球のマーキングは S+応答ユニットの位置推定ならびにマーキングの成功確率の判定には適さないと判断し、以降の解析からは除外した。

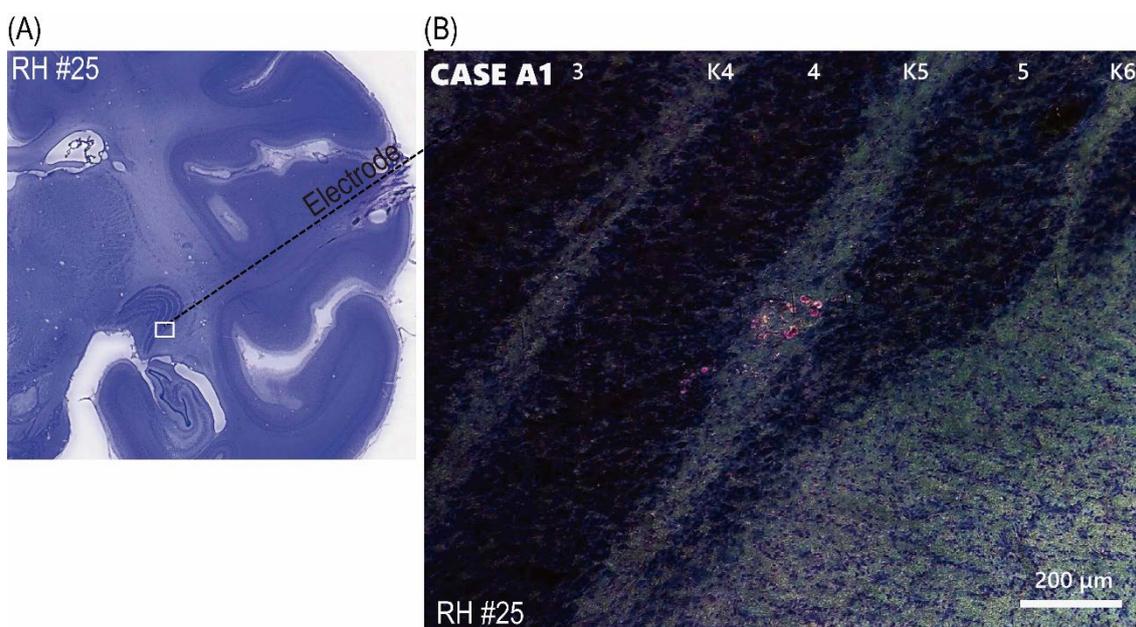


図 5.14 サル A で同定したタングステンマーキングの例。(A) マーキングのあったスライスの俯瞰図、および電極刺入の推定軌跡。(B) (A)の白枠領域を拡大した暗視野像。

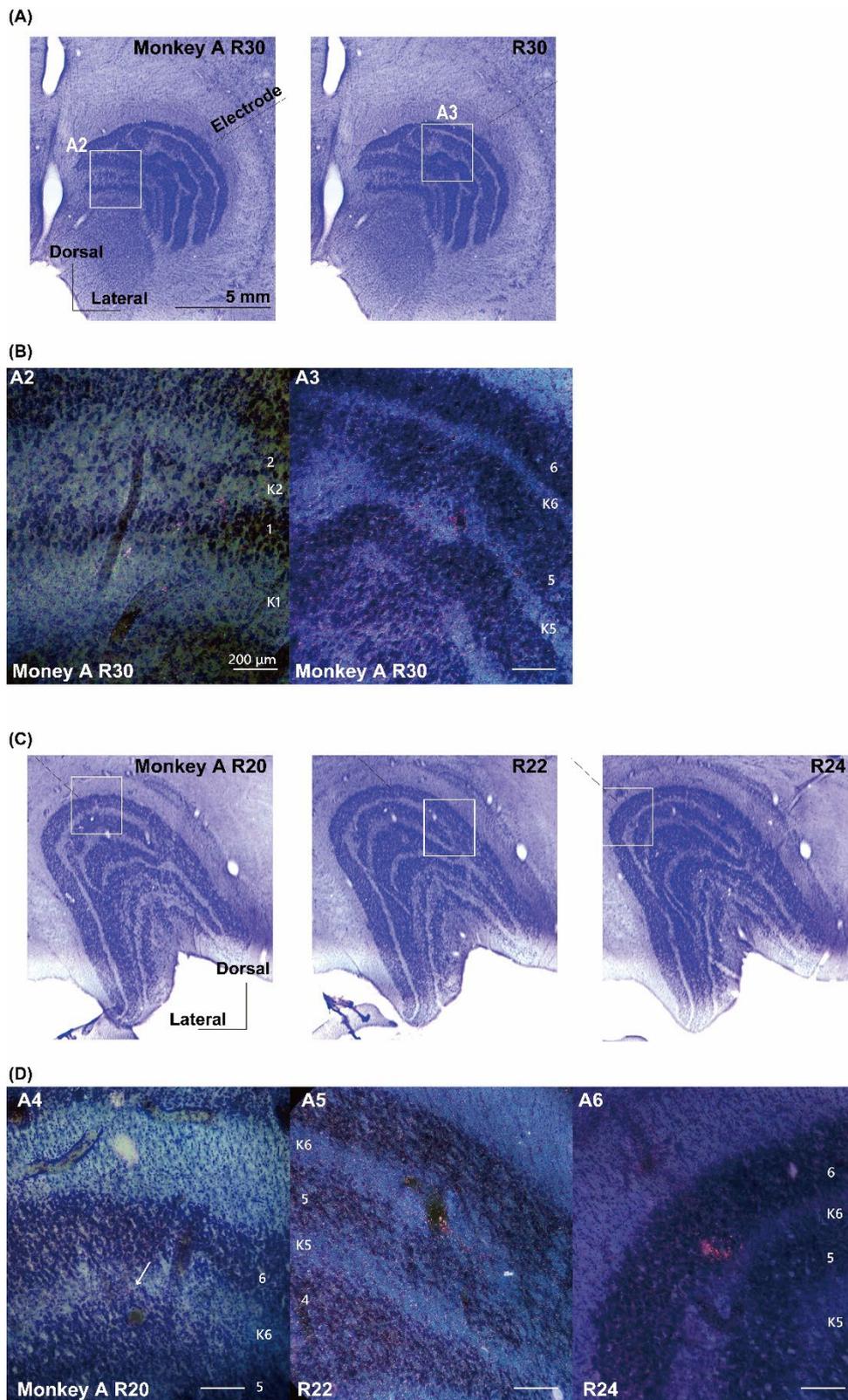


図 5.15 サル A で同定した他のマーキング。(A)サル A 右半球スライス俯瞰図。暗視野像の範囲(白枠)、電極刺入の推定軌跡(点線)を示す。(B)サル A 右半球マーキング拡大図。(C)(D) サル A 左半球の俯瞰図およびマーキング拡大図。

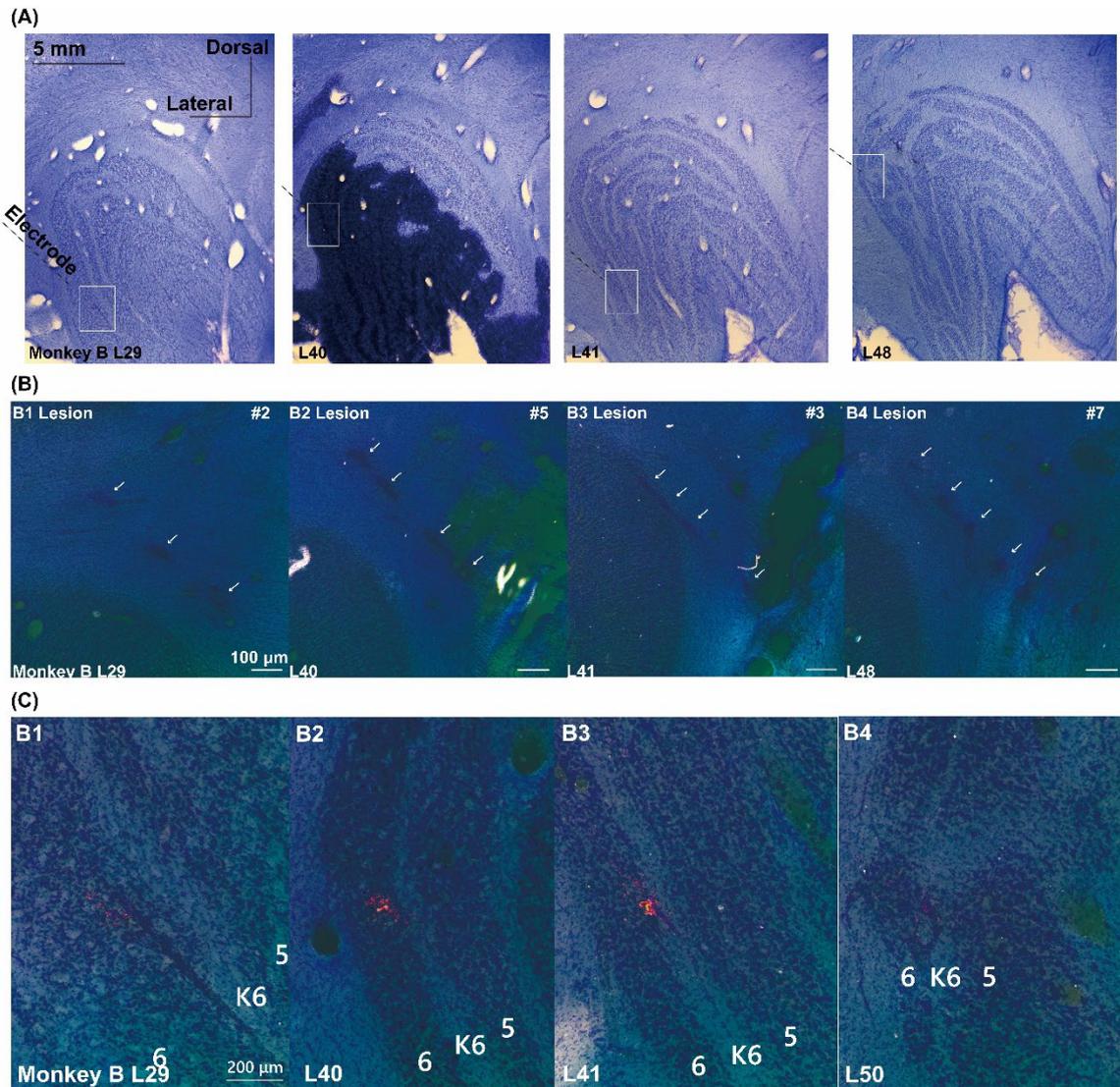


図 5.16 サル B 左半球で同定したマーキング。(A)サル B 左半球スライス俯瞰図。暗視野像の範囲(白枠)、電極刺入の推定軌跡(点線)を示す。(B) サル B 左半球で実施したタングステンマーキングのパターン。(C)サル B マーキング拡大図。

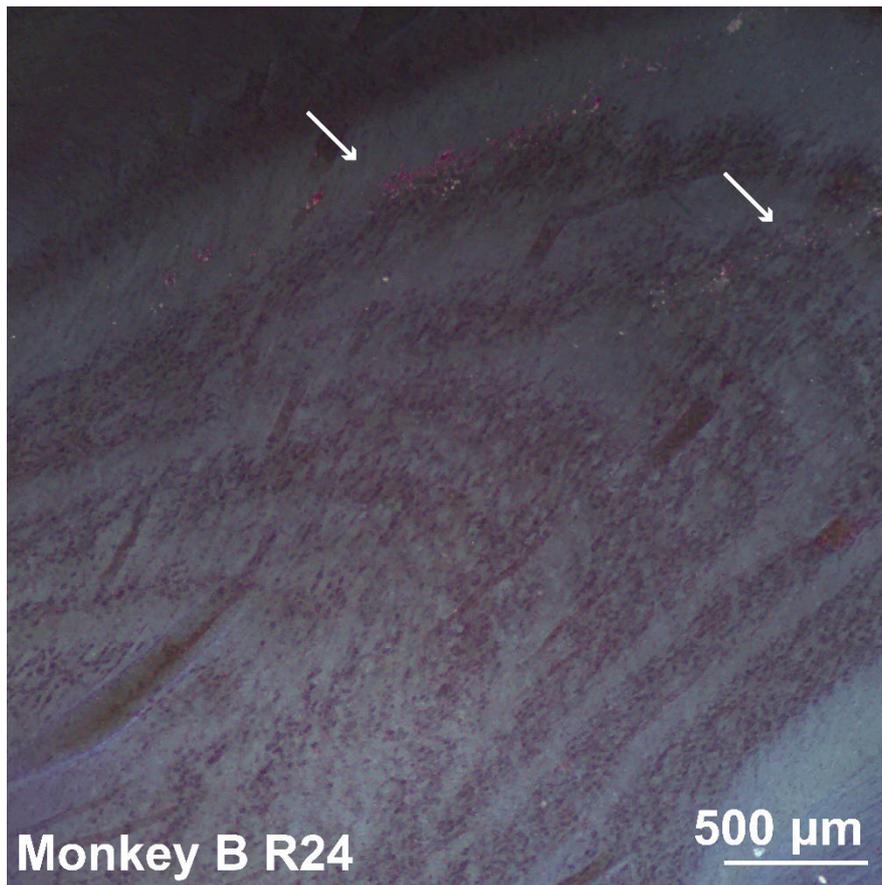


図 5.17 サル B 右半球で見つかったマーキングの例。矢印はマーキングの位置を示す。

次に、スライスから見つかったマーキング点の全体の分布を図 5.18 に示す。LGN の層に対するマーキング点の全体の傾向を示すために、スライスから LGN の各層を目視により特定し、各層に対するマーキング点の相対的な位置を集計する。マーキング点は複数の隣接したスライスに渡って分布していることがあるため、スライス間の分布を確かめる必要がある。そこでスライス番号を横軸に、LGN の各層に対するマーキングの相対位置を縦軸に取ったグラフに結果を集計した。この際に、同一スライス上でのマーキングの位置は集約した。また、マーキング点には様々な形状があり、小さな点分布 (A3, A4 など)、錐体状 (A5, A6 など)、線状に長く分布 (サル B の右半球) などがあつた。これらをシンボルの違いに分けてプロットした。

全体の分布から、多くのマーキング点はスライス番号で隣接しておらず、隣接しているケースであっても (A4, A5, A6 や B2, B3) スライス断面上で 1 mm 以上離れており、明らかに別の電極刺入経路による異なるマーキングの結果であると言える。一方でサル B の右半球のマーキングは概して長く線状に分布するのみならず、隣接したスライスに渡って分布が見られ、個別の刺入経路を特定することが困難であることが分かる。

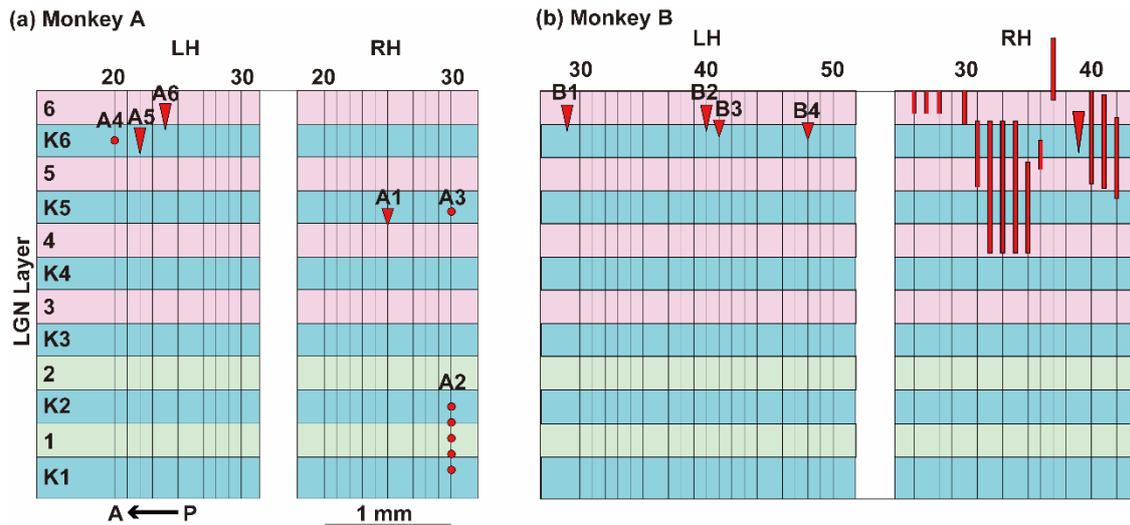


図 5.18 サル半球ごとのマーキングの分布。(a) Monkey A、(b) Monkey B。各図上側の番号は脳スライスの番号を示す。赤い図形はタングステンマーキングを示し、小さな粒上のマーキングは小さい丸、錐状または柱状のマーキングは三角形、長い棒状のマーキングは棒で示す。タングステンマーキングの上の番号 A1~B4 は、同定されたマーキングに割り振ったケース番号を示す。

### 5.3.3. マーキングに関する考察

マーキング点の多くは K5, 6 層および Parvo6 層に分布していた。これら LGN の外側の層で多く見つかったことは、サンプリングのバイアスを反映している可能性がある。細胞のサンプリングは、電極を LGN の外側から刺入し、S+応答ユニットが見つかったらマーキングし、それ以降に深く刺入は行わないという手続きで行われた。つまり LGN の外側で多くの記録が行われており、必然的に S+応答も多く見付き、マーキングが多く行われた可能性がある。ただし、S+応答ユニットが外側の K 層に多く局在することを否定してはいない。したがって、本実験の結果からマーキングの K 層の位置によるユニット応答の違いは議論できない。

マーキングは、2 頭両半球で合計 21 回実施のうち、10 個 (48%) 見つかった。この成功割合は、4 章で述べたマーキングの適用実験から期待される値 (約 60%) よりも低かった。この原因としては、電極刺入が適用実験よりも深かったことと、マーキングに用いた電極が必ずしも未使用のものでなかったことが挙げられる。深い電極刺入と電極の繰り返し利用は、電極先端および絶縁被膜を摩耗させることで、電極のインピーダンスを下げる。電極のインピーダンスが下がると、同じ印加電流値でも電圧が低下する。これによって、電解反応がより抑制されたかもしれない。また、電極の繰り返し利用が電極開口部のミクロな構造に変化を与え、マーキングが剥がれにくく

なった可能性がある。

見つからなかったマーキングが多いことは、マーキングによる S+ユニットの局在証明に不確実性を与える。つまり、見つからなかったマーキングは、電気刺激が P 層や M 層で実施された可能性がある。しかし、見つかった 10 個のマーキングがすべて K 層に位置していたことから、S+ユニットが K 層に局在していない、とは考えにくい。

## 5.4. 本章の総括

本章ではニホンザルの外側膝状体を対象に、タングステン電極を用いたシングルユニット記録を実施し、青色応答したユニットの記録位置にタングステン酸化物によるマーキングを実施した。2 頭のニホンザル両半球から、視覚応答するユニットは合計 330 個記録され、うち 21 個が青色応答ユニットであった。組織学的解析により、マーキングはサル A で 6 個、サル B で 4 個みつき、そのすべてが K 層に位置していた。この結果は、ニホンザル外側膝状体において、青色応答する細胞が K 層に局在する強い証拠を示す。また、マーキングの分布から、青色応答するユニットは複数の K 層にまたがって存在することが示された。

## 第6章 結論

### 6.1. 総合考察

色は、網膜で受けた光の情報を中枢神経系で処理した結果知覚されるものである。したがって、色の知覚を理解するためには、色情報を処理する神経系の構造と機能の理解が必要である。近年大脳皮質における色情報の処理が進んでいることに対して、外側膝状体、特に K 細胞層における色情報処理に関しては、実験手法の制約から理解が進んでいなかった。本論文では、新たに開発した実験システムおよび高精細なマーキング手法をニホンザル外側膝状体 K 層の記録位置証明に用いることで、K 層が青色応答細胞の局在する組織である直接的な証拠を示した。

3 章では、単一 PC で構成される、単純かつ低コストの神経生理実験システムを開発し、その時間性能を評価した。本システムは、従来のシステムにおける 2 台の PC および DAQ を、それぞれ 1 台の PC と DAQ に集約した。また、システムの開発言語は Matlab のみとした。このため、システムの導入から運用までのコストが従来よりも低く、システム開発に不慣れなことが多い生物学・医学系の学生でも独力で開発できると考える。また本システムはハードウェア間の信号同期を 1 ms 未満、刺激描画を正確に 1 フレーム遅れで実施できることから、従来システムと同等の時間性能をもつことが示された。以上より、本システムは神経生理実験に有用である。

4 章では、従来のマーキング手法がもつ制約を示したのち、新たに開発したマーキング手法がそれらの制約をすべて克服することを示した。生きた動物を対象とした適用実験において、新しいマーキングの大きさは最小で 20  $\mu\text{m}$  を下回った。これは、本マーキングが単一神経細胞の大きさと同等の分解能で記録位置を証明できることを示す。また、本マーキングは神経細胞にダメージを与えなかった。これはマーキング本体の大きさと同様に、マーキングの位置証明の分解能を小さくすると同時に、生きた個体から記録できる細胞の個数を長期間にわたって保つことに寄与する。更に、本マーキングは生きた霊長類の個体で 2 年以上の残存が確認された。これは本マーキングが長期間の慢性実験にも利用可能であることを示す。加えて、本マーキングは、クレシルバイオレットで染色した脳スライスで暗視野観察したとき、赤く光って見えた。これは非常に微小である本マーキングを脳スライス上で簡単に探索できることを示している。以上より、本マーキングは霊長類を対象とした長期間の慢性実験に有用である。

5 章では、3 および 4 章で開発した実験システムとマーキングを用いて、ニホンザル外側膝状体の細胞から色応答を記録すると同時に、青色に応答する細胞の位置を高精細に証明した。マーキングはすべて K 層に位置しており、これは青色に応答する細胞

が K 層に局在する直接的な証拠となる。本実験によって、霊長類の外側膝状体の微細な層構造に関して、その構造と機能をつなぐさらなる理解が得られ、色情報の機能的構造についてのミッシングピースが埋められた。

以上より、本研究は霊長類脳深部を対象とした新たな実験手法を示すとともに、色覚を構成する脳深部組織である外側膝状体 K 層の構造と機能にさらなる理解を与えるものである。

本研究で用いた、金属微小電極を用いた単一細胞記録とマーキング、という実験手法そのものは 60 年以上にわたって使われてきている。そして、現代では fMRI やカルシウムイメージング、多点電極アレイなど神経活動を記録する新たな技術が開発され、より広範囲の脳部位から記録することが可能になっている。しかし、fMRI は単一細胞からの記録ができず、カルシウムイメージングは脳深部からの記録ができない。このため、脳深部からの記録は、現在では多点電極アレイを挿入して行うことが多い。多点電極アレイを用いた記録の際、その記録位置の証明として、電極に蛍光塗料を塗布して、電極刺入による蛍光を観察することが多い。しかし、蛍光は電極を刺入したトラック全体に観察されるため、刺入深さ方向の記録位置証明が難しい。これに対して、本研究で新たに開発したマーキングは、単一細胞記録に限定されるが、深さ方向にも高い位置精度で記録位置を証明できる。これは、最も古典的である単一細胞記録が、脳深部においては現代でも有効な手法であることを示している。

本マーキングを用いた単一細胞記録は、外側膝状体のみならず、あらゆる脳深部記録に用いることができる。脳深部は、その構造の微細さから構造・機能の両面で理解が進んでいない。視覚に関わる主要な脳深部組織として、外側膝状体のほかに視床枕と上丘がある。視床枕は視床の後側に位置し、大脳皮質視覚野および連合野と相互に神経接続している。視床枕は投射先を共有する複数のサブ組織から構成されるとみなされており、それぞれについて電極を用いた視覚応答の記録が行われている。しかしながら、視床枕から得られる視覚応答は多様であるため、視床枕がもつ視覚的機能はいまだに不明である。また、この「サブ組織」は組織学的には不明瞭であるため、研究者によってその区分が異なることがある。上丘は中脳を構成する神経核のひとつであり、網膜からの求心性入力のほか、多くの皮質視覚領野、特に初期視覚野から視覚的運動の処理を担う MT 野までの背側経路からの入力を受けている。霊長類において上丘は明瞭な 7 層構造をしており、背側に位置する浅層は視覚的機能、中間層は視覚-運動連関、特に眼球・頭部運動の出力に関わっていると考えられている。これらの層はいずれも厚さが数百  $\mu\text{m}$  であり、かつ各層がもつ機能は完全には理解されていない。外側膝状体を含めたこれらの脳深部組織は、それぞれが互いに神経接続をもつと同時に、広範囲の皮質視覚領野と相互接続しているため、脳における視覚情報処理全般に何らかの介入をしていると考えられる。そして、これらの組織からの記録は、その構

造の不明瞭さと微細さから、本マーキングを用いた単一細胞記録が役立つと考えられる。

以上より、本研究で用いた手法は、脳深部のさらなる理解のために、現代において最も有効な手法のひとつである。

## 6.2. 展望

本研究は、新たなマーキング手法と、外側膝状体 K 層への青色応答細胞の局在を示すものである。ここでは、本研究の展望を、マーキング手法、外側膝状体からの記録それぞれについて述べる。

本マーキング手法の制約として、マーキングの成功率が高々6-7割にとどまることと、そのサイズのばらつきが大きいことが挙げられる。これは生体中における電気分解反応の大きさや、金属酸化物の留置について制御しきれていないことが原因であると考えられる。マーキングの大きさについては、電極先端に予めめっきを施してからマーキングをすることで、めっきが金属酸化物の拡散を抑える外殻としてはたらき、マーキング径を小さくできる可能性がある。マーキングの成功率については、マーキング中に電極の電気的パラメータをモニタリングすることで、生体中のマーキングの発生を予測することができるかもしれない。

外側膝状体 K 層からの記録において、マーキングは主に背側の K 層に分布した。これは、本研究において、電極を外側膝状体の背側から刺入しており、かつ全ての電極刺入が必ずしも外側膝状体の最深部に到達していないために、記録細胞が背側に偏ったことが原因であると考えられる。2章で述べたとおり、外側膝状体 K 層もまた層特異的な投射や部位特異的な遺伝子発現が確認されているため、K 層は層ごとに異なる視覚特性をもつことが予想される。次の研究として、神経活動の記録対象を青色応答細胞のみに絞ったうえで、細胞の時空間応答特性、視覚応答、および自発活動のダイナミクスなどを計測し、これらに層間の違いがあるのかを調べることが挙げられる。

## 引用文献

- Adrian, E. D., & Moruzzi, G. (1939). Impulses in the pyramidal tract. *The Journal of Physiology*, *97*(2), 153–199. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1939.sp003798>
- Aggleton, J. P., & Passingham, R. E. (1981). Stereotaxic surgery under X-ray guidance in the rhesus monkey, with special reference to the amygdala. *Experimental Brain Research*, *44*(3), 271–276. <https://doi.org/10.1007/BF00236564>
- Asaad, W. F., & Eskandar, E. N. (2008). Achieving behavioral control with millisecond resolution in a high-level programming environment. *Journal of Neuroscience Methods*, *173*(2), 235–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.06.003>
- Asaad, W. F., Santhanam, N., McClellan, S., & Freedman, D. J. (2013). High-performance execution of psychophysical tasks with complex visual stimuli in MATLAB. *Journal of Neurophysiology*, *109*(1), 249–260. <https://doi.org/10.1152/jn.00527.2012>
- Asahi, T., Tamura, R., Eifuku, S., Hayashi, N., Endo, S., Nishijo, H., & Ono, T. (2003). A method for accurate determination of stereotaxic coordinates in single-unit recording studies in monkeys by high-resolution three-dimensional magnetic resonance imaging. *Neuroscience Research*, *47*(2), 255–260. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(03\)00202-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-0102(03)00202-5)
- Bakken, T. E., van Velthoven, C. T., Menon, V., Hodge, R. D., Yao, Z., Nguyen, T. N., Graybiel, L. T., Horwitz, G. D., Bertagnolli, D., Goldy, J., Yanny, A. M., Garren, E., Parry, S., Casper, T., Shehata, S. I., Barkan, E. R., Szafer, A., Levi, B. P., Dee, N., ... Tasic, B. (2021). Single-cell and single-nucleus RNA-seq uncovers shared and distinct axes of variation in dorsal LGN neurons in mice, non-human primates, and humans. *ELife*, *10*, e64875. <https://doi.org/10.7554/eLife.64875>
- Benevento, L. A., & Yoshida, K. (1981). The afferent and efferent organization of the lateral geniculo-prestriate pathways in the macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, *203*(3), 455–474. <https://doi.org/10.1002/cne.902030309>
- Bickford, M. E., Ramcharan, E., Godwin, D. W., Erişir, A., Gnadt, J., & Sherman, S. M. (2000). Neurotransmitters contained in the subcortical extraretinal inputs to the monkey lateral geniculate nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, *424*(4), 701–717. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000904\)424:4<701::AID-CNE11>3.0.CO;2-B](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000904)424:4<701::AID-CNE11>3.0.CO;2-B)
- Brainard, D. H. (1982). *PART IV: CONE CONTRAST AND OPPONENT MODULATION COLOR SPACES* (pp. 563–579).
- Brainard, D. H. (1997). The Psychophysics Toolbox. *Spatial Vision*, *10*(4), 433–436.
- Brodmann, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues von Dr. K. Brodmann ...* J.A. Barth.

- Brown, K. T., & Tasaki, K. (1961). Localization of electrical activity in the cat retina by an electrode marking method. *The Journal of Physiology*, *158*(2), 281–295. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1961.sp006769>
- Bullier, J., & Kennedy, H. (1983). Projection of the lateral geniculate nucleus onto cortical area V2 in the macaque monkey. *Experimental Brain Research*, *53*(1), 168–172. <https://doi.org/10.1007/BF00239409>
- Calkins, D. J., Tsukamoto, Y., & Sterling, P. (1998). Microcircuitry and mosaic of a blue-yellow ganglion cell in the primate retina. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(9), 3373–3385. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03373.1998>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). Visualizing neural structure. In M. Carter & J. B. T.-G. to R. T. in N. (Second E. Shieh (Eds.), *guide to research techniques in neuroscience* (Second Edi, pp. 145–166). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800511-8.00006-X>
- Cheong, S. K., Tailby, C., Martin, P. R., Levitt, J. B., & Solomon, S. G. (2011). Slow intrinsic rhythm in the koniocellular visual pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(35), 14659–14663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108004108>
- Cheong, S. K., Tailby, C., Solomon, S. G., & Martin, P. R. (2013). Cortical-like receptive fields in the lateral geniculate nucleus of marmoset monkeys. *The Journal of Neuroscience*, *33*(16), 6864–6876. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5208-12.2013>
- Cicmil, N., & Krug, K. (2015). Playing the electric light orchestra--how electrical stimulation of visual cortex elucidates the neural basis of perception. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *370*(1677), 20140206. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0206>
- Clark, K. L., Armstrong, K. M., & Moore, T. (2011). Probing neural circuitry and function with electrical microstimulation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1709), 1121–1130. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2211>
- Cohen, M. R., & Newsome, W. T. (2004). What electrical microstimulation has revealed about the neural basis of cognition. *Current Opinion in Neurobiology*, *14*(2), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.03.016>
- Collier, B. D., Seltzer, S. E., Kido, D. K., & Utsunomiya, R. (1980). Ultrasound directed placement of needles into brains of rhesus monkeys. *Neuroradiology*, *19*(4), 201–205. <https://doi.org/10.1007/BF00376708>
- Cox, D. D., Papanastassiou, A. M., Oreper, D., Andken, B. B., & DiCarlo, J. J. (2008). High-resolution three-dimensional microelectrode brain mapping using stereo microfocal X-ray imaging. *Journal of Neurophysiology*, *100*(5), 2966–2976. <https://doi.org/10.1152/jn.90672.2008>
- Crist, C. F., Yamasaki, D. S. G., Komatsu, H., & Wurtz, R. H. (1988). A grid system and a microsyringe for single cell recording. *Journal of Neuroscience Methods*, *26*(2), 117–122. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-0270\(88\)90160-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-0270(88)90160-4)

- Crook, J. D., Davenport, C. M., Peterson, B. B., Packer, O. S., Detwiler, P. B., & Dacey, D. M. (2009). Parallel ON and OFF Cone Bipolar Inputs Establish Spatially Coextensive Receptive Field Structure of Blue-Yellow Ganglion Cells in Primate Retina. *The Journal of Neuroscience*, *29*(26), 8372 LP – 8387. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1218-09.2009>
- Dacey, D. M., & Lee, B. B. (1994). The “blue-on” opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature*, *367*(6465), 731–735. <https://doi.org/10.1038/367731a0>
- De Valois, R. L., Abramov, I., & Jacobs, G. H. (1966). Analysis of response patterns of LGN cells. *Journal of the Optical Society of America*, *56*(7), 966–977. <https://doi.org/10.1364/josa.56.000966>
- Derrington, A. M., Krauskopf, J., & Lennie, P. (1984). Chromatic mechanisms in lateral geniculate nucleus of macaque. *The Journal of Physiology*, *357*(1), 241–265. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015499>
- DiCarlo, J. J., Lane, J. W., Hsiao, S. S., & Johnson, K. O. (1996). Marking microelectrode penetrations with fluorescent dyes. *Journal of Neuroscience Methods*, *64*(1), 75–81. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00113-1](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00113-1)
- Dougherty, K., Carlson, B. M., Cox, M. A., Westerberg, J. A., Zinke, W., Schmid, M. C., Martin, P. R., & Maier, A. (2021). Binocular suppression in the macaque lateral geniculate nucleus reveals early competitive interactions between the eyes. *ENeuro*, ENEURO.0364-20.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0364-20.2020>
- Erwin, E., Baker, F. H., Busen, W. F., & Malpeli, J. G. (1999). Relationship between laminar topology and retinotopy in the rhesus lateral geniculate nucleus: results from a functional atlas. *The Journal of Comparative Neurology*, *407*(1), 92–102.
- Fung, S. H., Burstein, D., & Born, R. T. (1998). In vivo microelectrode track reconstruction using magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience Methods*, *80*(2), 215–224. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(98\)00003-x](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(98)00003-x)
- Gattass, R., Galkin, T. W., Desimone, R., & Ungerleider, L. G. (2014). Subcortical connections of area V4 in the macaque. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(8), 1941–1965. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.23513>
- Gegenfurtner, K. R., & Kiper, D. C. (2003). Color vision. *Annual Review of Neuroscience*, *26*, 181–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131116>
- Glimcher, P. W., Ciaramitaro, V. M., Platt, M. L., Bayer, H. M., Brown, M. A., & Handel, A. (2001). Application of neurosonography to experimental physiology. *Journal of Neuroscience Methods*, *108*(2), 131–144. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(01\)00365-x](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(01)00365-x)
- Hansen, B. J., Eagleman, S., & Dragoi, V. (2011). Examining local network processing using multi-contact laminar electrode recording. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *55*. <https://doi.org/10.3791/2806>

- Hays Jr, A. V., Richmond, B. J., & Optican, L. M. (1982). *Unix-based multiple-process system, for real-time data acquisition and control*. Electron Conventions, El Segundo, CA.
- Hendry, S. H., & Yoshioka, T. (1994). A neurochemically distinct third channel in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *Science (New York, N.Y.)*, *264*(5158), 575–577. <https://doi.org/10.1126/science.8160015>
- Hess, W. (1939). Beiträge zur Physiologie des Hirnstammes. *Journal of the American Medical Association*, *112*(3), 267. <https://doi.org/10.1001/jama.1939.02800030077032>
- Histed, M. H., Bonin, V., & Reid, R. C. (2009). Direct activation of sparse, distributed populations of cortical neurons by electrical microstimulation. *Neuron*, *63*(4), 508–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.07.016>
- Hofer, H., Carroll, J., Neitz, J., Neitz, M., & Williams, D. R. (2005). Organization of the human trichromatic cone mosaic. *Journal of Neuroscience*, *25*(42), 9669–9679. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2414-05.2005>
- Horsley, V., & Clarke, R. H. (1908). The Structure and functions of the cerebellum examined by a new method. *Brain*, *31*(1), 45–124. <https://doi.org/10.1093/brain/31.1.45>
- Horton, N. G., Wang, K., Kobat, D., Clark, C. G., Wise, F. W., Schaffer, C. B., & Xu, C. (2013). In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature Photonics*, *7*(3), 205–209. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.336>
- Hubel, D. H. (1957). Tungsten Microelectrode for Recording from Single Units. *Science (New York, N.Y.)*, *125*(3247), 549–550. <https://doi.org/10.1126/science.125.3247.549>
- Hubel, D. H. (1959). Single unit activity in striate cortex of unrestrained cats. *The Journal of Physiology*, *147*(2), 226–238. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006238>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of Physiology*, *160*(1), 106–154. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006837>
- Huo, B. X., Zeater, N., Lin, M. K., Takahashi, Y. S., Hanada, M., Nagashima, J., Lee, B. C., Hata, J., Zaheer, A., Grünert, U., Miller, M. I., Rosa, M. G. P. P., Okano, H., Martin, P. R., & Mitra, P. P. (2019). Relation of koniocellular layers of dorsal lateral geniculate to inferior pulvinar nuclei in common marmosets. *European Journal of Neuroscience*, *50*(July 2018), 1–14. <https://doi.org/10.1111/ejn.14529>
- Hwang, J., Mitz, A. R., & Murray, E. A. (2019). NIMH MonkeyLogic: Behavioral control and data acquisition in MATLAB. *Journal of Neuroscience Methods*, *323*, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.05.002>
- Ibe, J. P., Bey, P. P., Brandow, S. L., Brizzolara, R. A., Burnham, N. A., DiLella, D. P., Lee, K. P., Marrian, C. R. K., & Colton, R. J. (1990). On the electrochemical etching of tips for scanning tunneling microscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, *8*(4), 3570–3575. <https://doi.org/10.1116/1.576509>
- Imaizumi, Y., Tymula, A., Tsubo, Y., Matsumoto, M., & Yamada, H. (2022). A neuronal prospect theory model in the brain reward circuitry. *Nature Communications*, *13*(1), 5855.

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-33579-0>

- Jog, M. S., Connolly, C. I., Kubota, Y., Iyengar, D. R., Garrido, L., Harlan, R., & Graybiel, A. M. (2002). Tetrode technology: advances in implantable hardware, neuroimaging, and data analysis techniques. *Journal of Neuroscience Methods*, *117*(2), 141–152. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(02\)00092-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(02)00092-4)
- Jun, J. J., Steinmetz, N. A., Siegle, J. H., Denman, D. J., Bauza, M., Barbarits, B., Lee, A. K., Anastassiou, C. A., Andrei, A., Aydın, Ç., Barbic, M., Blanche, T. J., Bonin, V., Couto, J., Dutta, B., Gratiy, S. L., Gutnisky, D. A., Häusser, M., Karsh, B., ... Harris, T. D. (2017). Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature*, *551*(7679), 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature24636>
- Kaas, J. H., Huerta, M. F., Weber, J. T., & Harting, J. K. (1978). Patterns of retinal terminations and laminar organization of the lateral geniculate nucleus of primates. *Journal of Comparative Neurology*, *182*(3), 517–553. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.901820308>
- Kim, B., Kenchappa, S. C., Sunkara, A., Chang, T.-Y., Thompson, L., Doudlah, R., & Rosenberg, A. (2019). Real-time experimental control using network-based parallel processing. *ELife*, *8*, e40231. <https://doi.org/10.7554/eLife.40231>
- Kim, U. S., Mahroo, O. A., Mollon, J. D., & Yu-Wai-Man, P. (2021). Retinal Ganglion Cells-Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. *Frontiers in Neurology*, *12*, 661938. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.661938>
- Kim, Y. J., Peterson, B. B., Crook, J. D., Joo, H. R., Wu, J., Puller, C., Robinson, F. R., Gamlin, P. D., Yau, K.-W., Viana, F., Troy, J. B., Smith, R. G., Packer, O. S., Detwiler, P. B., & Dacey, D. M. (2022). Origins of direction selectivity in the primate retina. *Nature Communications*, *13*(1), 2862. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30405-5>
- Kleiner, M., Brainard, D. H., & Pelli, D. (2007). What's new in Psychtoolbox-3? *Perception*, *36*, 1–16.
- Kobat, D., Durst, M. E., Nishimura, N., Wong, A. W., Schaffer, C. B., & Xu, C. (2009). Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Optics Express*, *17*(16), 13354–13364. <https://doi.org/10.1364/OE.17.013354>
- Koida, K., & Komatsu, H. (2023). Effect of microstimulation of the inferior temporal cortex on color judgment behavior. *BioRxiv*, 2023.03.31.535032. <https://doi.org/10.1101/2023.03.31.535032>
- Koyano, K. W., Machino, A., Takeda, M., Matsui, T., Fujimichi, R., Ohashi, Y., & Miyashita, Y. (2011). In vivo visualization of single-unit recording sites using MRI-detectable elgiloy deposit marking. *Journal of Neurophysiology*, *105*(3), 1380–1392. <https://doi.org/10.1152/jn.00358.2010>
- Kwan, W. C., Mundinano, I. C., de Souza, M. J., Lee, S. C. S., Martin, P. R., Grünert, U., & Bourne, J. A. (2019). Unravelling the subcortical and retinal circuitry of the primate inferior pulvinar. *Journal of Comparative Neurology*, *527*(3), 558–576.

<https://doi.org/10.1002/cne.24387>

- Lee, B. B., Mandl, G., & Stean, J. P. (1969). Micro-electrode tip position marking in nervous tissue: a new dye method. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *27*(6), 610–613. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(69\)90075-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(69)90075-3)
- Levick, W. R. (1972). Another tungsten microelectrode. *Medical & Biological Engineering*, *10*(4), 510–515. <https://doi.org/10.1007/BF02474199>
- Li, P., Garg, A. K., Zhang, L. A., Rashid, M. S., & Callaway, E. M. (2022). Cone opponent functional domains in primary visual cortex combine signals for color appearance mechanisms. *Nature Communications*, *13*(1), 6344. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34020-2>
- Lilly, J. C., Hughes, J. R., Alvord, E. C., & Galkin, T. W. (1955). Brief, noninjurious electric waveform for stimulation of the brain. *Science*, *121*(3144), 468 LP – 469. <https://doi.org/10.1126/science.121.3144.468>
- Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T., & Oeltermann, A. (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature*, *412*(6843), 150–157. <https://doi.org/10.1038/35084005>
- Logothetis, Nikos K. (2008). What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*, *453*(7197), 869–878. <https://doi.org/10.1038/nature06976>
- Marshall, W. H. (1940). An application of the frozen sectioning technic for cutting serial sections thru the brain. *Stain Technology*, *15*(4), 133–138. <https://doi.org/10.3109/10520294009110338>
- Martin, P. R., & Grünert, U. (1999). Analysis of the short wavelength-sensitive (“blue”) cone mosaic in the primate retina: Comparison of New World and Old World monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, *406*(1), 1–14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990329\)406:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990329)406:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-1)
- Martin, P. R., White, A. J. R. R., Goodchild, A. K., Wilder, H. D., & Sefton, A. E. (1997). Evidence that blue-on cells are part of the third geniculocortical pathway in primates. *European Journal of Neuroscience*, *9*(7), 1536–1541. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01509.x>
- Martínez Santiesteban, F. M., Swanson, S. D., Noll, D. C., & Anderson, D. J. (2006). Magnetic resonance compatibility of multichannel silicon microelectrode systems for neural recording and stimulation: design criteria, tests, and recommendations. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, *53*(3), 547–558. <https://doi.org/10.1109/TBME.2005.864497>
- Matsui, T., Koyano, K. W., Koyama, M., Nakahara, K., Takeda, M., Ohashi, Y., Naya, Y., & Miyashita, Y. (2007). MRI-based localization of electrophysiological recording sites within the cerebral cortex at single-voxel accuracy. *Nature Methods*, *4*(2), 161–168. <https://doi.org/10.1038/nmeth987>

- Matsumora, T., Koida, K., & Komatsu, H. (2008). Relationship between color discrimination and neural responses in the inferior temporal cortex of the monkey. *Journal of Neurophysiology*, *100*(6), 3361–3374. <https://doi.org/10.1152/jn.90551.2008>
- Merbs, S. L., & Nathans, J. (1992). Absorption spectra of human cone pigments. *Nature*, *356*(6368), 433–435. <https://doi.org/10.1038/356433a0>
- Meyer, T., & Constantinidis, C. (2005). A software solution for the control of visual behavioral experimentation. *Journal of Neuroscience Methods*, *142*(1), 27–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.07.009>
- Mollon, J. D., & Bowmaker, J. K. (1992). The spatial arrangement of cones in the primate fovea. *Nature*, *360*(6405), 677–679. <https://doi.org/10.1038/360677a0>
- Munn, B., Zeater, N., Pietersen, A. N., Solomon, S. G., Cheong, S. K., Martin, P. R., & Gong, P. (2020). Fractal spike dynamics and neuronal coupling in the primate visual system. *The Journal of Physiology*, *0*(n/a), 1–21. <https://doi.org/10.1113/jp278935>
- Murasugi, C. M., Salzman, C. D., & Newsome, W. T. (1993). Microstimulation in visual area MT: Effects of varying pulse amplitude and frequency. *Journal of Neuroscience*, *13*(4), 1719–1729. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-04-01719.1993>
- Murphey, D. K., & Maunsell, J. H. R. (2007). Behavioral detection of electrical microstimulation in different cortical visual areas. *Current Biology*, *17*(10), 862–867. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.066>
- Nahm, F. K., Dale, A. M., Albright, T. D., & Amaral, D. G. (1994). In vivo microelectrode localization in the brain of the alert monkey: a combined radiographic and magnetic resonance imaging approach. *Experimental Brain Research*, *98*(3), 401–411. <https://doi.org/10.1007/BF00233978>
- Naselaris, T., Merchant, H., Amirikian, B., & Georgopoulos, A. P. (2005). Spatial Reconstruction of Trajectories of an Array of Recording Microelectrodes. *Journal of Neurophysiology*, *93*(4), 2318–2330. <https://doi.org/10.1152/jn.00581.2004>
- Nassi, J. J., & Callaway, E. M. (2009). Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(5), 360–372. <https://doi.org/10.1038/nrn2619>
- O’Keefe, J., & Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, *3*(3), 317–330. <https://doi.org/10.1002/hipo.450030307>
- Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R., & Tank, D. W. (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(24), 9868–9872. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9868>
- Ogawa, S., Lee, T. M., Nayak, A. S., & Glynn, P. (1990). Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magnetic Resonance in Medicine*, *14*(1), 68–78. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910140108>
- Pabst, A. (1973). A simple method for use with tungsten microelectrodes for the localization of recording sites. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *339*(4), 355–358.

<https://doi.org/10.1007/BF00594170>

- Patterson, S. S., Bembry, B. N., Mazzaferri, M. A., Neitz, M., Rieke, F., Soetedjo, R., & Neitz, J. (2022). Conserved circuits for direction selectivity in the primate retina. *Current Biology*, *32*(11), 2529-2538.e4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.056>
- Pelli, D. G. (1997). The VideoToolbox software for visual psychophysics: Transforming numbers into movies. *Spatial Vision*, *10*(4), 437-442. <https://doi.org/10.1163/156856897X00366>
- Pietersen, A. N. J., Cheong, S. K., Munn, B., Gong, P., Martin, P. R., & Solomon, S. G. (2017). Relationship between cortical state and spiking activity in the lateral geniculate nucleus of marmosets. *Journal of Physiology*, *595*(13), 4475-4492. <https://doi.org/10.1113/JP273569>
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *Journal of Neuroscience Methods*, *65*(2), 113-136. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00144-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00144-1)
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (Eds.). (2004). Neuroscience, 3rd ed. In *Neuroscience*, 3rd ed. (pp. xix, 773-xix, 773). Sinauer Associates.
- Recce, M., & O'Keefe, J. (1989). The tetrode: a new technique for multi-unit extracellular recording. *Soc. Neurosci. Abstr.*, *15*, 1250. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573668926034236800>
- Robblee, L., & Sweeney, J. (1996). Bioelectrodes. In B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. (p. 26). Academic Press.
- Rodieck, R. W. (1989). Starburst amacrine cells of the primate retina. *Journal of Comparative Neurology*, *285*(1), 18-37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.902850104>
- Roy, S., Jayakumar, J., Martin, P. R., Dreher, B., Saalman, Y. B., Hu, D., & Vidyasagar, T. R. (2009). Segregation of short-wavelength-sensitive (S) cone signals in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *European Journal of Neuroscience*, *30*(8), 1517-1526. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06939.x>
- Salzman, C. D., Britten, K. H., & Newsome, W. T. (1990). Cortical microstimulation influences perceptual judgements of motion direction. *Nature*, *346*(6280), 174-177. <https://doi.org/10.1038/346174a0>
- Salzman, C. D., Murasugi, C. M., Britten, K. H., & Newsome, W. T. (1992). Microstimulation in visual area MT: effects on direction discrimination performance. *Journal of Neuroscience*, *12*(6), 2331-2355. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-06-02331.1992>
- Saunders, R. C., Aigner, T. G., & Frank, J. A. (1990). Magnetic resonance imaging of the rhesus monkey brain: use for stereotactic neurosurgery. *Experimental Brain Research*, *81*(2), 443-446. <https://doi.org/10.1007/BF00228139>
- Sawides, L., de Castro, A., & Burns, S. A. (2017). The organization of the cone photoreceptor mosaic measured in the living human retina. *Vision Research*, *132*, 34-44.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.visres.2016.06.006>
- Sherman, S. M., & Guillery, R. W. (2006). *Exploring the thalamus and its role in cortical function*. MIT press.
- Sincich, L. C., Park, K. F., Wohlgenuth, M. J., & Horton, J. C. (2004). Bypassing V1: a direct geniculate input to area MT. *Nature Neuroscience*, *7*(10), 1123–1128. <https://doi.org/10.1038/nn1318>
- Snodderly, D. M., & Gur, M. (1995). Organization of striate cortex of alert, trained monkeys (*Macaca fascicularis*): Ongoing activity, stimulus selectivity, and widths of receptive field activating regions. *Journal of Neurophysiology*, *74*(5), 2100–2125. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.5.2100>
- Steinmetz, N. A., Aydin, C., Lebedeva, A., Okun, M., Pachitariu, M., Bauza, M., Beau, M., Bhagat, J., Böhm, C., Broux, M., Chen, S., Colonell, J., Gardner, R. J., Karsh, B., Kloosterman, F., Kostadinov, D., Mora-Lopez, C., O’Callaghan, J., Park, J., ... Harris, T. D. (2021). Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings. *Science*, *372*(6539), eabf4588. <https://doi.org/10.1126/science.abf4588>
- Stockman, A., & Sharpe, L. T. (2000). The spectral sensitivities of the middle- and long-wavelength-sensitive cones derived from measurements in observers of known genotype. *Vision Research*, *40*(13), 1711–1737. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(00\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(00)00021-3)
- Stretton, A. O. W. W., & Kravitz, E. A. (1968). Neuronal geometry: determination with a technique of intracellular dye injection. *Science*, *162*(3849), 132–134. <https://doi.org/10.1126/science.162.3849.132>
- Sugiyama, K., Dong, W. K., & Chudler, E. H. (1994). A simplified method for manufacturing glass-insulated metal microelectrodes. *Journal of Neuroscience Methods*, *53*(1), 73–80. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90146-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90146-5)
- Suzuki, H., & Azuma, M. (1987). A reliable marking technique for identification of recording and stimulating sites in the brain. *Journal of Electrophysiological Techniques*, *14*(2), 121–124.
- Szarowski, D. H., Andersen, M. D., Retterer, S., Spence, A. J., Isaacson, M., Craighead, H. G., Turner, J. N., & Shain, W. (2003). Brain responses to micro-machined silicon devices. *Brain Research*, *983*(1), 23–35. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03023-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03023-3)
- Szmajda, B. Ar. ganglion cell inputs to the koniocellular pathway., Grünert, U., & Martin, P. R. (2008). Retinal ganglion cell inputs to the koniocellular pathway. *The Journal of Comparative Neurology*, *510*(3), 251–268. <https://doi.org/10.1002/cne.21783>
- Szostak, K. M., Grand, L., & Constantinou, T. G. (2017). Neural interfaces for intracortical recording: requirements, fabrication methods, and characteristics. *Frontiers in Neuroscience*, *11*, 665. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2017.00665>
- Tailby, C., Cheong, S. K., Pietersen, A. N., Solomon, S. G., & Martin, P. R. (2012). Colour and pattern selectivity of receptive fields in superior colliculus of marmoset monkeys. *The*

- Journal of Physiology*, 590(16), 4061–4077. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230409>
- Takasaki, K., Abbasi-Asl, R., & Waters, J. (2020). Superficial bound of the depth limit of two-photon imaging in mouse brain. *ENeuro*, 7(1). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0255-19.2019>
- Tammer, R., Ehrenreich, L., Boretius, S., Watanabe, T., Frahm, J., & Michaelis, T. (2006). Compatibility of glass-guided recording microelectrodes in the brain stem of squirrel monkeys with high-resolution 3D MRI. *Journal of Neuroscience Methods*, 153(2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.10.018>
- Tegg, L., Cuskelly, D., & Keast, V. J. (2017). The sodium tungsten bronzes as plasmonic materials: fabrication, calculation and characterization. *Materials Research Express*, 4(6), aa6c40. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa6c40>
- Tehovnik, E. J. (1996). Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. *Journal of Neuroscience Methods*, 65(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00131-x](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00131-x)
- Thomas, R. C., & Wilson, V. J. (1965). Precise localization of Renshaw cells with a new marking technique. *Nature*, 206(980), 211–213. <https://doi.org/10.1038/206211b0>
- Tokuno, H., Hatanaka, N., Takada, M., & Nambu, A. (2000). B-mode and color Doppler ultrasound imaging for localization of microelectrode in monkey brain. *Neuroscience Research*, 36(4), 335–338. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(99\)00133-9](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(99)00133-9)
- Tovée, M. J., Bowmaker, J. K., & Mollon, J. D. (1992). The relationship between cone pigments and behavioural sensitivity in a new world monkey (*Callithrix jacchus jacchus*). *Vision Research*, 32(5), 867–878. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-6989\(92\)90029-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-6989(92)90029-I)
- Tsukamoto, Y., & Omi, N. (2016). ON Bipolar Cells in Macaque Retina: Type-Specific Synaptic Connectivity with Special Reference to OFF Counterparts. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10. <https://www.frontiersin.org/journals/neuroanatomy/articles/10.3389/fnana.2016.00104>
- Turner, E. C., Gabi, M., Liao, C.-C. C., & Kaas, J. H. (2020). The postnatal development of MT, V1, LGN, pulvinar and SC in prosimian galagos (*Otolemur garnettii*). *Journal of Comparative Neurology*, 528(17), 3075–3094. <https://doi.org/10.1002/cne.24885>
- Walker, R. L., Saylor, K. W., Waltz, M., & Fisher, J. A. (2022). Translational science: a survey of US biomedical researchers' perspectives and practices. *Lab Animal*, 51(1), 22–35. <https://doi.org/10.1038/s41684-021-00890-0>
- Wang, A. Y. M., Kulkarni, M. M., McLaughlin, A. J., Gayet, J., Smith, B. E., Hauptschein, M., McHugh, C. F., Yao, Y. Y., & Puthussery, T. (2023). An ON-type direction-selective ganglion cell in primate retina. *Nature*, 623(7986), 381–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06659-4>
- Wang, Y., Toyoshima, O., Kunitatsu, J., Yamada, H., & Matsumoto, M. (2021). Tonic firing mode of midbrain dopamine neurons continuously tracks reward values changing moment-by-moment. *ELife*, 10, e63166. <https://doi.org/10.7554/eLife.63166>
- Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1966). Spatial and chromatic interactions in the lateral geniculate

- body of the rhesus monkey. *Journal of Neurophysiology*, 29(6), 1115–1156. <https://doi.org/10.1152/jn.1966.29.6.1115>
- Williams, A. J., Hunt, D. M., Bowmaker, J. K., & Mollon, J. D. (1992). The polymorphic photopigments of the marmoset: spectral tuning and genetic basis. *The EMBO Journal*, 11(6), 2039–2045. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05261.x>
- Wilson, M. A., & McNaughton, B. L. (1993). Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5124), 1055–1058. <https://doi.org/10.1126/science.8351520>
- Wuerger, S. M., Atkinson, P., & Cropper, S. (2005). The cone inputs to the unique-hue mechanisms. *Vision Research*, 45(25), 3210–3223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.visres.2005.06.016>
- Yildirim, M., Sugihara, H., So, P. T. C., & Sur, M. (2019). Functional imaging of visual cortical layers and subplate in awake mice with optimized three-photon microscopy. *Nature Communications*, 10(1), 177. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08179-6>
- Yoshida, K., & Benevento, L. A. (1981). The projection from the dorsal lateral geniculate nucleus of the thalamus to extrastriate visual association cortex in the macaque monkey. *Neuroscience Letters*, 22(2), 103–108. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(81\)90071-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(81)90071-9)
- Yukie, M., & Iwai, E. (1981). Direct projection from the dorsal lateral geniculate nucleus to the prestriate cortex in macaque monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*, 201(1), 81–97. <https://doi.org/10.1002/cne.902010107>
- Zeater, N., Cheong, S. K., Solomon, S. G., Dreher, B., & Martin, P. R. (2015). Binocular Visual Responses in the Primate Lateral Geniculate Nucleus. *Current Biology*, 25(24), 3190–3195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.033>

# 研究業績

## 原著論文

1. T. Oikawa, K. Nomura, T. Hara, K. Koida, "A fine-scale and minimally invasive marking method for use with conventional tungsten microelectrodes", eNeuro, ENEURO.0141-23.2023, September 2023.
2. T. Oikawa, K. Koida, "Integrated recording system for visual neurophysiology using a single personal computer", International Journal of Affective Engineering, [accepted, September 2024].

## 国際学会発表

1. T. Oikawa, K. Nomura, T. Hara, K. Koida, "A fine scale and low invasive marking method for use with conventional tungsten microelectrodes", Neuroscience 2022, San Diego, US, November 2022, Poster.
2. T. Oikawa & K. Koida, "Color naming is more reliable than position detection in peripheral visual field", the 15th Asia-Pacific Conference on Vision (APCV 2019), Osaka, Japan, August 2019, Poster.

## 国内学会、研究会等発表

1. 及川達也, 鯉田孝和, "タングステン電極マーキング手法を用いたニホンザル外側膝状体青色応答細胞の位置同定", 第5回サル脳新技術研究会, 京都, 2024年3月, ポスター.
2. 及川達也, 鯉田孝和, "TDT-MatlabPTB: 単一 PC による視覚神経生理学実験システムの構築", 生体医工学シンポジウム 2023, 熊本, 2023年9月, ポスター.
3. 及川達也, 鯉田孝和, "Blue-on cells are localized in the K layers of lateral geniculate nucleus of Macaque monkey", 第46回日本神経科学大会, 仙台, 2023年8月, ポスター.
4. 及川達也, 鯉田孝和, "ニホンザル外側膝状体における青色応答細胞の K 層局在", 第25回視覚科学フォーラム 2022 研究会 (生理研研究会 「機能と構造の視覚科

学研究会」), 岡崎, 2022 年 9 月, 口頭&ポスター.

5. 及川達也, 野村健人, 原利充, 河野剛士, 沼野利佳, 鯉田孝和, “双極性電流によるタングステン微小電極の位置マーキング手法”, 電気情報通信学会 ME とバイオサイバネティックス研究会, オンライン開催, 2021 年 3 月, 口頭.
6. 及川達也, 野村健人, 原利充, 河野剛士, 沼野利佳, 鯉田孝和, “ A fine scale and low invasive marking method for use with Tungsten microelectrodes”, 第 43 回日本神経科学大会, オンライン開催, 2020 年 7 月, ポスター.

#### 受賞等

1. 及川達也, 最優秀特別研究発表賞, 豊橋技術科学大学 情報・知能工学系, 2021 年 2 月
2. Tatsuya Oikawa, Student Travel Award, the 15th Asia-Pacific Conference on Vision (APCV 2019), August 2019
3. 及川達也, 最優秀卒業研究発表賞, 豊橋技術科学大学 情報・知能工学系, 2018 年 12 月
4. 及川達也, 同窓会会長賞, 豊橋技術科学大学同窓会, 2019 年 3 月