



Title	微小コイル磁気刺激法の確立とその脳活動修飾への応用
Author(s)	長内, 尚之
Citation	北海道大学. 博士(情報科学) 甲第13084号
Issue Date	2018-03-22
DOI	10.14943/doctoral.k13084
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/70531">http://hdl.handle.net/2115/70531</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Hisayuki_Osanai.pdf



[Instructions for use](#)

平成29年度 博士論文

微小コイル磁気刺激法の確立とその脳活動修飾  
への応用

Establishment of a method of micro-coil based  
magnetic stimulation and its application to the  
modulation of brain activity

北海道大学 大学院情報科学研究科

生命人間情報科学専攻

神経制御工学研究室

長内 尚之

# 目次

要旨	5
第1章 序論	9
1-1 本論文の概要	9
1-1-1 従来の電磁気刺激法と課題	9
1-1-1-1 脳深部刺激法	9
1-1-1-2 経頭蓋電流刺激法	10
1-1-1-3 経頭蓋磁気刺激法	10
1-1-2 磁気刺激法の電磁気学的原理	12
1-1-3 磁気刺激コイルの設計	13
1-1-4 磁気刺激法の生理学的メカニズム	15
1-1-5 磁気刺激法の臨床・神経科学研究への応用	21
1-1-5-1 磁気刺激法の臨床応用	21
1-1-5-2 磁気刺激法の神経科学研究への応用	22
1-1-6 本論文の目的	25
1-2 本論文の構成	26
第2章 低侵襲微小コイル磁気刺激法の確立	27
2-1 背景と目的	27
2-1-1 微小コイルを用いた磁気刺激法	27
2-1-2 弱磁場による磁気刺激	30
2-1-3 本研究の目的	31
2-2 実験方法	32
2-2-1 微小コイルを用いた磁気刺激デバイスの作製	32
2-2-2 オープンスカル手術	35
2-2-3 フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによる聴覚皮質領域の同定	36
2-2-4 磁気刺激誘発活動の電気生理学的計測	39
2-3 結果	41
2-3-1 低侵襲微小コイル磁気刺激による皮質神経活動の誘発	41
2-3-2 コイル由来のノイズ音および熱の測定	43
2-3-3 電氣的アーティファクトの計測	45
2-3-4 微小コイル磁気刺激法の空間分解能	48
2-4 考察	51
2-4-1 従来の電磁気刺激法との比較	51
2-4-2 磁気刺激誘発活動の計測	51
2-4-3 微小コイル磁気刺激法の空間分解能	52

2-4-4	将来展望	53
2-5	本研究のまとめ	54
3章	微小コイル磁気刺激法の生体脳神経回路活動修飾への応用	55
3-1	背景と目的	55
3-1-1	磁気刺激による神経修飾	55
3-1-2	大脳皮質神経回路の構造	55
3-1-3	本研究の目的	58
3-2	実験方法	59
3-2-1	磁気刺激誘発活動の電気生理学的計測	59
3-2-2	誘導電場・磁場の数値計算	60
3-2-3	解析方法	66
3-3	結果	67
3-3-1	磁気刺激および音刺激の誘発活動の計測	67
3-3-2	磁気刺激誘発活動の空間分布	69
3-3-3	磁気刺激誘発活動の時間変化	73
3-3-4	コイルの向きと神経誘発活動の関係	79
3-3-5	誘導電場ベクトルの数値計算	81
3-3-6	不均一な誘導電場の膜電位への影響	94
3-4	考察	97
3-4-1	磁気刺激の時空間特性と大脳皮質層構造モデル	97
3-4-1-1	従来の電磁気刺激法との比較	97
3-4-1-2	皮質誘発活動の局所神経回路モデル	98
3-4-2	誘導電場ベクトルと皮質誘発活動	100
3-4-2-1	皮質誘発活動の微小コイルの向き依存性	100
3-4-2-2	皮質誘発活動の発生機序	100
3-5	本研究のまとめ	102
第4章	大脳皮質神経回路における自発・音刺激誘発活動への麻酔薬の影響	103
1-1	背景と目的	103
4-1-1	動物実験における麻酔薬	103
4-1-2	ケタミン麻酔薬と3種混合麻酔薬	103
4-1-3	本研究の目的	105
4-2	実験方法	106
4-2-1	手術および麻酔の維持	106
4-2-2	音刺激	107
4-2-2	フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによる聴覚皮質領域の同定	108
4-2-3	電気生理学的計測	109

4-2-4	解析方法	109
4-3	結果	112
4-3-1	一次聴覚野および層構造の同定	112
4-3-2	自発的活動	115
4-3-3	特徴周波数、最小閾値、帯域幅	119
4-3-4	時間周波数受容野(STRF)	123
4-4	考察	128
4-4-1	フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを用いた脳領域同定	129
4-4-2	麻酔薬の自発的活動への影響	130
4-4-3	麻酔薬の音刺激誘発活動への影響	131
4-4-3-1	特徴周波数、最小閾値への影響	131
4-4-3-2	時間周波数受容野(STRF)への影響	132
4-4-4	うつ病研究に対する示唆	133
4-5	本研究のまとめ	135
第5章	本論文の結論と今後の展望	136
5-1	本論文の結論	136
5-2	今後の展望	137
	参考文献	140
	各実験における動物使用数	155
	略語	156
	謝辞	157
	引用許諾	157
	研究業績	158

## 要旨

本論文では、磁気刺激装置の小型化における微小コイル刺激印加システムの一構成法、および、磁気刺激の脳活動への影響について動物モデルに対する実験結果を基に論じた。

脳磁気刺激法は、電磁誘導によって脳内に渦電流を誘導し、中枢神経系を刺激する手法である。特に、経頭蓋磁気刺激法は耳鳴りなどの神経疾患の治療法として広く注目されている。しかし、経頭蓋磁気刺激法に用いる装置は大型であり、一回の治療効果は短時間しか継続しないことが知られている。したがって、医療機関に通院する負担を軽減するために、磁気刺激に用いるコイルを小型化し、携帯可能な磁気刺激治療装置を実現すれば、治療の負担を大幅に軽減し、日常生活の質の向上が期待できる。

近年、直径 0.5 mm の微小コイルがコイル近傍(約 100  $\mu\text{m}$ )において神経細胞の細胞体や軸索に活動電位を誘発できることが明らかになった。しかし、コイルが作る磁場・電場の強さはコイルからの距離に応じ反比例的に減衰するため、脳を傷つけずに脳表から磁気刺激を与える場合には、活動電位を誘発するのに十分な強さの電場を誘導できないと予想される。一方で、近年ではマウス脳スライスを用いた研究から、活動電位を発生しない強度の反復磁気刺激が神経細胞の興奮性を変化させることが明らかになった。これらの背景から筆者は、微小コイルの近傍でなくとも神経活動の誘発が可能であり、脳表に磁気刺激を与えることで脳を傷つけずに皮質神経活動を誘発できる可能性があるという着想に至った。

また、これまで、磁気刺激が神経細胞の興奮性を変化させることは報告されているが、皮質神経回路レベルにおける磁気刺激誘発応答の生成機序は明らかではない。皮質神経回路は感覚信号の情報処理にも深く関わっていることから、

磁気刺激が皮質神経回路に与える影響を解明することは、磁気刺激の神経疾患治療メカニズムを解明する上でも重要である。

本論文では、微小コイルを用いた低侵襲磁気刺激法を提案し、具体的に刺激システムの一構成法を示した。特に、磁気刺激誘発活動の皮質内における空間局所性、コイルの向きと神経誘発活動の関係、微小コイルを用いた磁気刺激のどの物理特性が最も神経活動に影響するかについて、実験と数値計算による解析に基づき検討した。また、そのシステムを用いて、生体脳への影響を皮質神経回路レベルで明らかにした。さらに、皮質神経回路動態の理解のための基礎的知見として、麻酔薬が皮質神経回路活動に及ぼす影響を検討した。

学位論文は全 5 章で構成されている。第 1 章では、本研究の背景と目的を示すとともに、本論文の構成について記述した。

第 2 章では、微小コイルを用いた低侵襲磁気刺激法の確立について記述した。まず、微小コイルを用いて磁気刺激装置を作製し、磁気刺激システムを構築した。そして、構築した磁気刺激システムを用いて、麻酔下のマウス聴覚皮質の脳表に磁気刺激を与え、多点電極アレイを用いて磁気刺激誘発活動の電気生理学的計測を行った。また、死後脳を用いて磁気刺激由来の電氣的アーティファクトの周波数成分を同定することで、電氣的アーティファクトと神経活動とを分離した。加えて、微小コイル磁気刺激法の空間分解能を調べるために、多点脳表電極を用いて磁気刺激誘発活動の皮質側方方向の伝搬を計測した。その結果、微小コイル磁気刺激法は脳を傷つけずに皮質神経活動を誘発することができ、ミリメートルオーダーの空間分解能を持つことが示された。

第 3 章では、磁気刺激の生体脳への影響について記述した。皮質神経回路は緻密な配線構造を持つことから、磁気刺激によって誘発される活動は皮質神経回路の構造の制約を受けると予想される。そこで、この仮説を検証するために、

多点電極アレイを用いてマウス聴覚皮質の層構造横断的に神経活動計測を行い、微小コイルによる磁気刺激応答活動と感覚刺激(音刺激)応答活動の動態を時空間的に比較した。その結果、磁気刺激応答活動と感覚刺激応答活動の時空間特性は類似しており、磁気刺激と感覚刺激は類似の神経回路の活動を誘発することが示唆された。また、誘導電場の向きが神経誘発活動に影響すると予測されていることから、コイルを配置する向きが皮質誘発応答に影響を及ぼす可能性がある。そこで、コイルの向きと神経誘発活動の関係を調べるために、コイルの配置が皮質表面に対して水平の場合と特定の角度をつけた場合とで磁気刺激誘発活動を比較した。加えて、脳内に発生する誘導電場の数値計算を行うことで、誘導電場の不均一性が磁気刺激誘発活動に大きく影響することを見出した。

第4章では、皮質神経回路の活動計測における麻酔薬の影響について記述した。実験に用いる麻酔薬は神経活動に影響を及ぼすことから、神経回路活動計測の実験結果を解釈するうえで麻酔薬の影響を考慮する必要がある。しかし、使用される麻酔薬の種類は研究者によって異なるにもかかわらず、麻酔薬の種類が脳の局所神経回路活動にどのように影響するのかについて、詳細な知見はほとんど報告されていない。そこで、本章ではケタミン麻酔下および三種混合麻酔下のラットを用いて聴覚皮質神経活動を層構造横断的に計測し比較した。それぞれの麻酔下のラットにおいて、自発活動および音刺激誘発活動を計測した結果、2種類の麻酔薬の影響は皮質層構造依存的に異なり、皮質神経回路の動態を議論するうえで麻酔薬の種類を考慮する必要があることが示された。

第5章では、本研究で得られた結果をまとめるとともに、将来展望について記述した。

本研究では、微小コイルを用いた低侵襲磁気刺激法を考案した。この方法は磁気刺激装置の小型化だけでなく、磁気刺激の空間局所性の向上にも大きく寄



与する。また、皮質局所神経回路における磁気刺激応答活動の *in vivo* 電気生理学的計測は本研究が初の試みであり、磁気刺激の神経疾患治療メカニズムを理解する上で基礎的な知見となる。さらに、麻酔薬の種類によって神経活動が皮質層構造依存的な影響を受けることを明らかにした点は、局所神経回路の動態を議論する上で今後の重要な知見となる。

微小コイル磁気刺激法の確立は、小型・携帯可能な磁気刺激装置の開発に重要であり、慢性的な神経疾患に対する新規治療法の開発に繋がると期待される。今後、微小コイル磁気刺激法が神経疾患治療に応用できるかを検証するためには、神経疾患モデル動物への磁気刺激の影響の解析や、可塑的变化を誘発する磁気刺激パラメータの探索が必要である。また、マルチコイルアレイを用いた小型磁気刺激装置の開発は、より大きい強度の誘導電場を生成可能にし、磁気刺激を経頭蓋的に施すことで将来的にはヒトに応用可能な低侵襲で小型・携帯可能な神経疾患治療装置の開発に繋がると考えられる。

# 第1章 序論

## 1-1 本論文の概要

### 1-1-1 従来の電磁気刺激法と課題

電磁気刺激法は電磁氣的に脳を刺激する手法であり、近年では耳鳴りやうつ病の治療に幅広く応用されている。これまで様々な電磁気刺激法が開発されており、中でも脳深部刺激法(deep brain stimulation, DBS)、経頭蓋電流刺激法(transcranial direct current stimulation, tDCS)、経頭蓋磁気刺激法(transcranial magnetic stimulation, TMS)は代表的な電磁気刺激法として知られている。しかし、下に記述したようにそれぞれの刺激法には固有の欠点があり、慢性的な神経疾患の抑制に対して効果的な電磁気刺激法を確立するには課題が存在する。さらに、電磁気刺激が脳に与える影響については、細胞レベルの研究は広く行われているものの神経回路レベルの研究は限られており、電磁気刺激の脳への作用機序は未だに明らかになっていない。

#### 1-1-1-1 脳深部刺激法

脳深部刺激法は、視床など脳深部に埋め込んだ電極を用いて脳内の神経細胞に電気刺激を与える手法である。この手法はパーキンソン病やジストニアなどの神経疾患の治療に応用されており(Perlmutter and Mink, 2006)、他の刺激法に比べて刺激局所性が高くミリメートルオーダーの空間分解能をもつ(Martens et al., 2011)。しかし、この手法は、脳に長期的に電極を埋め込む必要があるため侵襲性の問題があり、長期間埋め込んだ電極により炎症や電極の腐食が発生し、脳損傷が引き起こされる恐れがある(Merrill et al., 2005)。加えて、電極を長期間埋め込むと電極周囲にグリア細胞が集合して電極-組織間のインピーダンス

スが増加し、長期に渡る電気刺激の効果を減少させてしまう (Polikov et al., 2005)。

#### 1-1-1-2 経頭蓋電流刺激法

経頭蓋電流刺激法は、経頭蓋的に数ミリアンペアの弱い電流刺激を与える非侵襲的な脳刺激法である (Nitsche et al., 2002; Ozen et al., 2010)。経頭蓋電流刺激法では Anodal 電極と Cathodal 電極の 2 つの電極が頭部に配置され、Cathodal 電極近傍の細胞は静止膜電位が低下し過分極状態になり、Anodal 電極近傍の細胞は静止膜電位の増加により脱分極が生じ刺激部位付近の神経活動を促進する (Nitsche et al., 2002)。しかし、経頭蓋電流刺激法は非侵襲的な利便性をもつものの、神経疾患の治療効果は個人差が大きいという問題があり、この原因は頭蓋骨・脳回や脳溝の構造の個人差に由来する可能性が指摘されている (Kim et al., 2014)。また、経頭蓋電流刺激法は頭蓋骨越しに電流刺激を与えるために他の刺激法よりも空間分解能が悪く、刺激する標的脳領域以外の広い領域にも電気刺激を与えてしまう (Woods et al., 2016; Bestmann and Walsh, 2017)。さらに、頭皮に電極を配置するため、副作用として紅斑、痛みやかゆみ、火傷を生じるという欠点も存在する (Liu et al., 2017)。

#### 1-1-1-3 経頭蓋磁気刺激法

経頭蓋磁気刺激法(図 1-1)は、電磁誘導によって脳内に渦電流を誘導し中枢神経系を刺激する非侵襲的な脳刺激法であり、近年では耳鳴りやうつ病やなどの神経疾患の治療法として広く注目されている (De Ridder et al., 2004; Hallett, 2007; O'Reardon et al., 2007; Rossini et al., 2015)。しかし、従来の磁気刺激法は装置が大型であるという欠点を持つ。特に、磁気刺激に用いるコイルは直径が 5-10 cm であり (Deng et al., 2013)、磁気刺激コイルを長期間頭部に配置する

ことはできないため、慢性的な脳刺激への応用は困難である。さらに、一回の治療では疾患の抑制期間は数週間程度しか継続しない(Zhang, 2013)。そのため、耳鳴りなどの日常的に発生する神経疾患の患者は、治療を受けるため頻繁に医療機関に通院する負担を強いられている。磁気刺激コイルが小型化し、携帯可能な治療装置が実現できれば、患者は家庭や外出先でも望むときに直ちに治療を受けられ、通院の負担が大幅に軽減し生活の質が向上する。

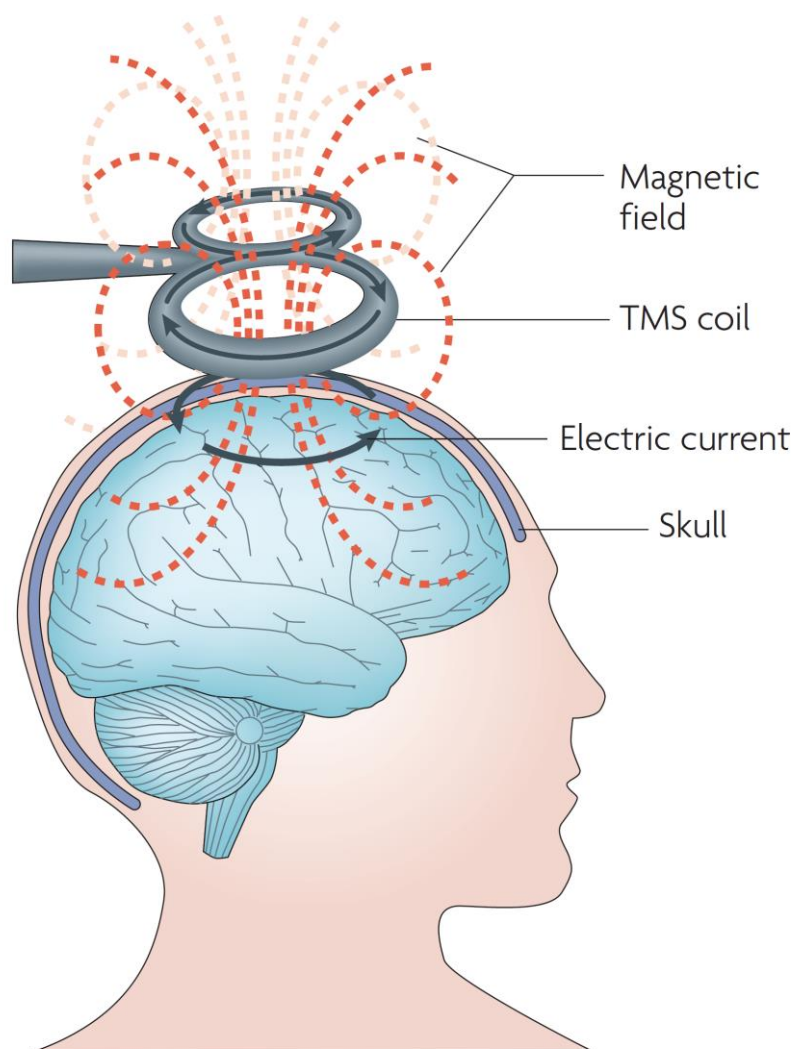


図 1-1 磁気刺激による誘導電場の生成

Reprinted with permission from Nature (Ridding and Rothwell, 2007)

## 1-1-2 磁気刺激法の電磁気学的原理

磁気刺激法では、刺激コイルに時間的に変動する電流が流れたとき、電磁誘導によって脳内に誘導電場を生じ、渦電流が生成される。このとき、誘導電場  $\mathbf{E}$  は次の式で表される(Krieg and Mogul, 2013)。

$$\mathbf{E} = \frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t} - \nabla \phi \quad (1)$$

ここで、式(1)の  $\mathbf{A}$  はベクトルポテンシャル、 $\phi$  はスカラーポテンシャルである。ベクトルポテンシャル  $\mathbf{A}$  は、変動電流  $I(t)$  を用いて次の式で表される。

$$\mathbf{A} = \frac{\mu_0 N I(t)}{4\pi} \int \frac{d\mathbf{l}}{R} \quad (2)$$

ここで、式(2)の  $\mu_0$  は真空の透磁率、 $N$  はコイルの巻き数、 $d\mathbf{l}$  はコイル導線の微小要素、 $R$  は誘導電場の導出点・コイル導線の微小要素の間の距離である。また、式(1)の  $\phi$  は脳組織の境界条件によって決定し、組織の外側が空気の場合は、次式を解くことで得られる。

$$\begin{aligned} \nabla^2 \phi &= 0 \\ \frac{\partial \phi}{\partial n} &= \mathbf{n} \cdot \frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t} \end{aligned} \quad (3)$$

ここで、式(3)の  $\mathbf{n}$  は境界面における単位法線ベクトルである。以上の式を解くことで磁気刺激によって脳内に発生する誘導電場を導出することが可能であり、誘導電場の分布はコイルの巻線形状を投射した形になる(図 1-1)。

### 1-1-3 磁気刺激コイルの設計

脳磁気刺激法に用いる刺激コイルは、刺激の局所性や深部性を向上するため、様々な形状が考案されている。円型コイル(図 1-2)は最も初期の磁気刺激法で用いられていたコイルであるが、脳内に誘導される電場の分布はコイルの巻線形状を投射した形になることから、大きな円型コイルでは脳の標的部位を選択的に刺激することはできなかった。この問題に対し、1988年に Ueno らによって 8 字型コイル(図 1-2)が提案され、2 つの円形コイルの間に局所的に大きい電場を誘導することで、大脳皮質をセンチメートルオーダーの分解能で刺激することが可能になった(Ueno et al., 1988)。近年では、数値計算を用いた誘導電流の推定に基づき、様々な形状の刺激コイルが提案されている(図 1-2)。しかし、従来の磁気コイルは直径が 5 ~ 10 cm と大型であり(Deng et al., 2013)、加えて脳深部刺激法と同等のミリメートルオーダーの空間分解能を達成する磁気刺激コイルは未だに実現されていない。

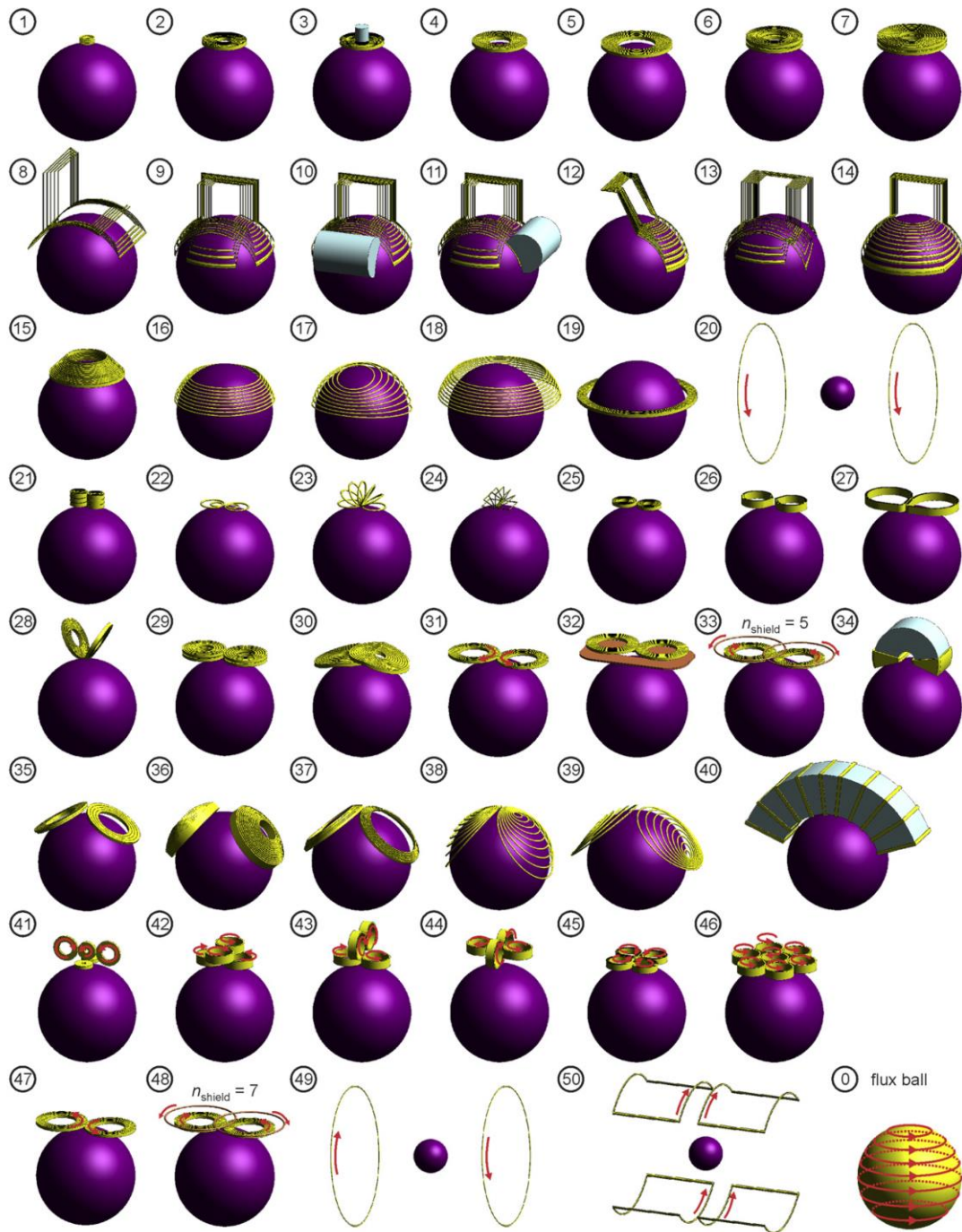


図 1-2 大きさ・形状の異なる磁気刺激コイルの設計

①-⑦、②⑤-②⑦は典型的な円形コイルおよび8字コイルを示している。

Reprinted with permission from Elsevier (Deng et al., 2013)

#### 1-1-4 磁気刺激法の生理学的メカニズム

磁気刺激によって脳内に発生する誘導電場は、脳内の神経細胞の膜電位を変化させ、個々の神経細胞の興奮性に影響する(Hallett, 2007)。神経細胞に脱分極を引き起こすためには細胞膜に電荷が流れる必要があり、脱分極の大きさは誘導電場の強さや、神経細胞の形態に対する誘導電場の方向に依存する。具体的には、細胞膜に脱分極を誘導するには、神経細胞の膜上に電荷の勾配を生成する分布をもつ誘導電場が必要であり、このことは神経細胞の古典的な受動的ケーブルモデルによって示されている(図 1-3)。

古典的な受動的ケーブルモデルでは、誘導電場に対する膜電位変化を計算するうえで次の3つの条件を仮定している:(1) 神経細胞内の電氣的抵抗は均一である;(2) 細胞内の電位差は、細胞内の距離  $x$  の関数  $f(x)$  で記述される;(3) 神経細胞自身の活動による細胞外電位の変化は無視できる(Roth and Bassar, 1990; Bassar, 1994)。神経細胞内の単位長さあたりの抵抗を  $r_i$ 、細胞内に流れる電流を  $I_i$ 、膜内外の電位差を  $V$  としたとき、オームの法則より次の式が成り立つ。

$$r_i I_i = -\frac{\partial V}{\partial x} \quad (4)$$

また、電流の保存則より膜電流  $i_m$  は次の式で表される。

$$i_m = -\frac{\partial I_i}{\partial x} \quad (5)$$

細胞膜に能動的な性質がないとき、細胞膜は単位長さあたり抵抗  $r_m$ 、キャパシタンス  $c_m$  をもつ等価回路と考えることができる(図 1-3)。このとき、膜電流は次の式で表される。

$$i_m = c_m \frac{\partial V}{\partial t} + \frac{V}{r_m} \quad (6)$$

式(4)–(6)より、次のケーブル方程式が導出される。



$$\lambda^2 \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} - V = \tau \frac{\partial V}{\partial t} \quad (7)$$

ただし $\lambda$ は長さ定数 $\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_i}}$ 、 $\tau$ は時定数 $\tau = c_m r_m$ である。また、細胞内に電場 $e_i$ は次の式で表される。

$$e_i = -\frac{\partial V}{\partial x} \quad (8)$$

ここで、電磁誘導による誘導電場 $E(x, t)$ が与えられると、細胞内の電場の式(8)は誘導電場の項が加えられ次の式で表される。

$$e_i = -\frac{\partial V}{\partial x} + E(x, t) \quad (9)$$

同様に、式(5)は次の式に変換される。

$$r_i I_i = -\frac{\partial V}{\partial x} + E(x, t) \quad (10)$$

以上より、式(5), (6), (10)から誘導電場  $E(x, t)$ の存在下でのケーブル方程式は次の式で表される。

$$\lambda^2 \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} - V = \tau \frac{\partial V}{\partial t} + \lambda^2 \frac{\partial E(x, t)}{\partial x} \quad (11)$$

すなわち、受動的ケーブルモデルでは膜電位は誘導電場そのものではなく、誘導電場の空間微分成分によって決定する。そのため、誘導電場の空間微分成分は活性化関数(activation function)と呼ばれる。

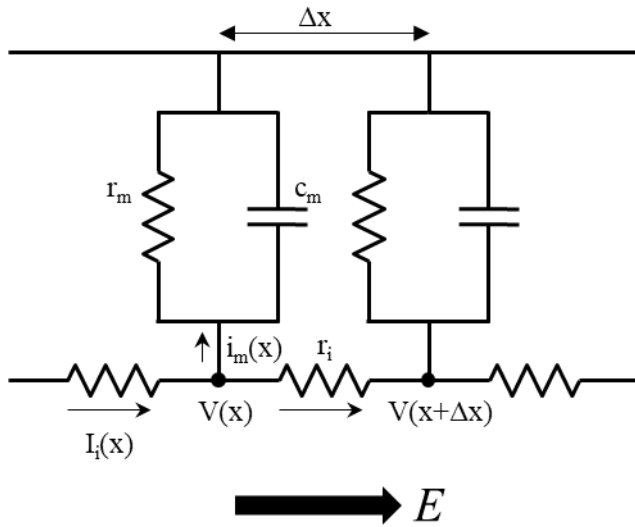


図 1-3 神経細胞の等価回路モデル。

$r_m$  : 単位長さあたりの膜抵抗、 $c_m$  : 単位長さあたりの膜のキャパシタンス、 $r_i$  : 単位長さあたりの神経細胞内の抵抗。

以上の受動的ケーブルモデルより、無限遠に伸びる神経線維(軸索や樹状突起)に平行に均一な誘導電場が印可される場合には、膜電位の変化は生じない(図 1-4A)。一方、誘導電場に勾配がある場合には神経線維上に膜電位の変化が生じる(図 1-4B) (Ilmoniemi et al., 1999)。また、神経線維が折れ曲がった形状をする場合、局所的に神経線維に沿った電場勾配が大きくなるため分極が生じる(図 1-4C) (Roth, 1994; Bestmann and Walsh, 2017)。さらに、神経線維に直交する誘導電場も分極を生じる。神経線維の直径が  $a$  のとき、神経線維に直交する誘導電場  $E$  による膜電位の変化は  $2Ea$  で表される。しかし、神経線維に平行な電場の膜電位への影響は神経線維に直交する向きの電場と比較して小さいことが知られている(図 1-4D) (Roth, 1994)。加えて、神経線維の末端では膜電位の変化が誘導電場の強度と神経線維の長さに比例して発生することが知られている

(図 1-4E) (Rahman et al., 2013)。以上のように、磁気刺激が神経細胞の興奮性に影響を与えることは知られている。しかし、大脳皮質神経回路レベルにおける磁気刺激の機序は明らかになっていない。

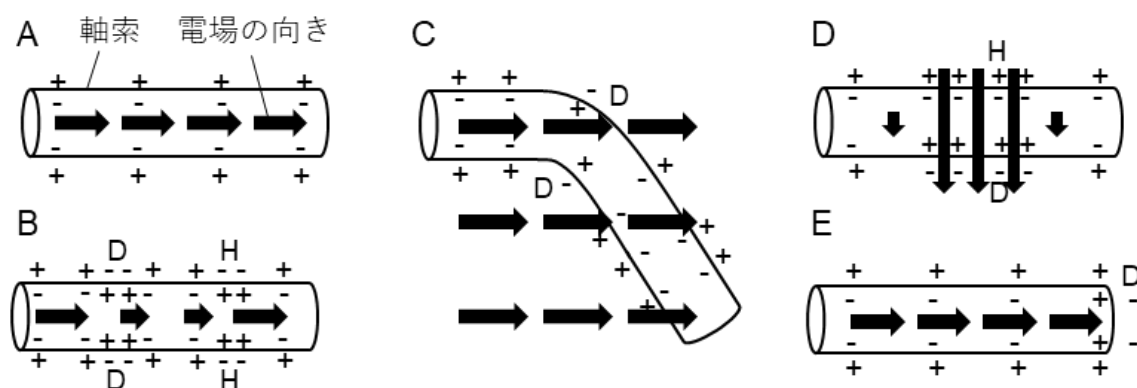


図 1-4 磁気刺激による神経活動生成のメカニズム

A, 無限遠に伸びる軸索に平行に均一な電場が印加される場合は、軸索に沿った電場勾配は存在しないため膜電位の変化は生じない。

B, 軸索に平行に不均一な電場が印加される場合は、部分的に膜電位の変化が生じる。

C, 均一な電場が折れ曲がった形状の軸索に印加された場合は、構造の変化がある場所で大きい膜電位変化が生じる。

D, 軸索に垂直に電場が印加されると膜電位変化が生じる。

E, 軸索末端で膜電位変化が生じる。

D は脱分極(depolarization)、H は過分極(hyperpolarization)を示す。

磁気刺激が皮質神経回路に与える影響は、ヒトにおいて経頭蓋磁気刺激法に対する運動誘発電位 (motor evoked potential, MEP) 計測や脳波計測 (electroencephalography, EEG) の結果から考察されてきた (Rossini et al., 2015)。磁気刺激によって誘発される脳波は、潜時の異なる複数の波を持ち、この波は大きく 2 種類に分類される。1 つは、磁気刺激後 7 ms 以内に発生する direct wave (D-wave) と呼ばれる波形であり、皮質興奮性細胞 (錐体細胞) が直接刺激されることにより発生する活動電位に由来すると考えられている。2 つ目は 18 ms 以上の潜時を持ち、1.5~2.0 ms 間隔の振動成分を持つ indirect wave (I-wave) と呼ばれる波形であり、錐体細胞にシナプス結合を持つ抑制性神経細胞の活動に由来すると考えられている (Ferreri et al., 2011; Rossini et al., 2015)。また、I-wave は興奮性細胞の層と抑制性細胞の層によって構成される皮質神経回路モデルによって再現されることが報告されている (図 1-5) (Esser et al., 2005; Di Lazzaro et al., 2012; Di Lazzaro et al., 2013)。このことは、磁気刺激によって誘発される神経活動は、皮質神経回路が元々持っている構造の制約を受けることを示唆している。しかし、これまで皮質の異なる層で磁気刺激誘発活動を直接記録した報告は存在せず、磁気刺激の神経回路レベルでの機序の理解の妨げとなっている。

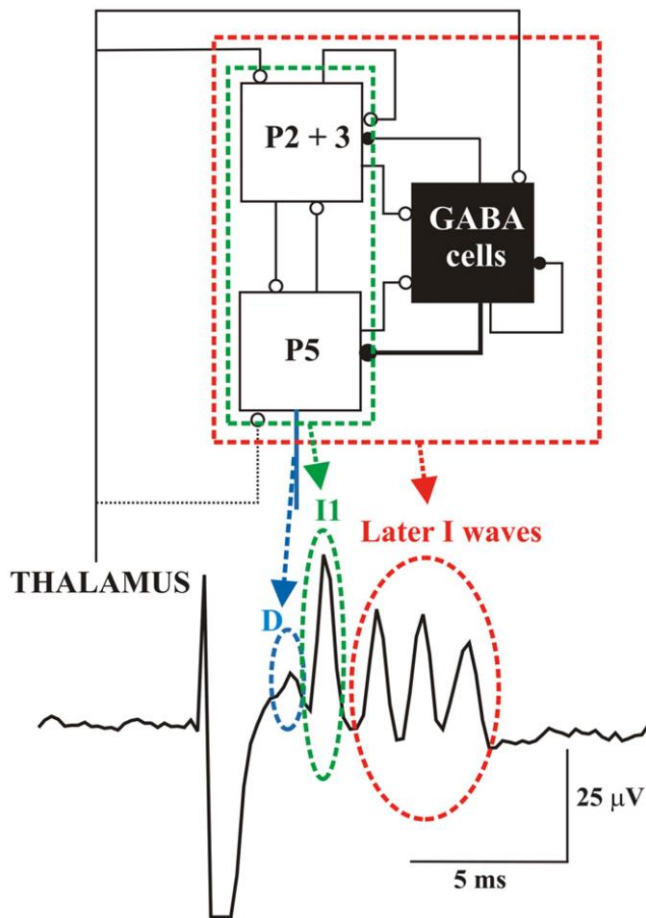


図 1-5 大脳皮質神経回路モデルと磁気刺激誘発神経活動

神経回路モデルは 2 層の興奮性細胞と 1 層の抑制性細胞によって構成されている。下の波形は磁気刺激に応答する脳波の計測例を示している。最初に TMS による神経活動の直接誘発に由来する波形(D-wave)が発生し、その後皮質神経回路によって振動波形(I-wave)が生成される。

Reprinted with permission from Elsevier (Di Lazzaro et al., 2012)

## 1-1-5 磁気刺激法の臨床・神経科学研究への応用

### 1-1-5-1 磁気刺激法の臨床応用

1985年にBarkerらによって、ヒトに経頭蓋的に磁気刺激を与えることで手の誘発筋電位を記録することに成功して以来(Barker et al., 1985)、磁気刺激法は臨床の現場や神経科学研究に幅広く応用されている。例えば、経頭蓋磁気刺激法による誘発筋電図検査(運動誘発電位計測)は、運動誘発電位の大きさや潜伏時、2連磁気刺激パルスを与えたときの静止期を調べることにより、脳卒中後の運動機能の客観的評価指標として用いられている(Cortes et al., 2012)。1990年代に入ると磁気刺激パルスを連続して繰り返し与える反復経頭蓋磁気刺激法(rTMS, repetitive transcranial magnetic stimulation)が開発され(Pascual-Leone et al., 1994)、中枢神経系の興奮性変化を長期間誘導できるようになった。反復経頭蓋磁気刺激法の効果は磁気刺激パルスを与える頻度によって異なり、1 Hz以下の低頻度反復磁気刺激では興奮性の低下を、5 Hz以上の高頻度反復磁気刺激では興奮性の増加が誘導される(Valero-Cabre et al., 2017)。反復経頭蓋磁気刺激法の開発により、磁気刺激法は臨床検査法だけでなく神経疾患の治療法として応用されるようになり、耳鳴り(De Ridder et al., 2004; Zhang, 2013)、脳卒中(Hoffman et al., 2000)、てんかん(Fregni et al., 2006)、うつ病(O'Reardon et al., 2007)、統合失調症(Hoffman et al., 2000)、慢性疼痛(Pridmore et al., 2005)など様々な神経疾患の治療に応用されている。磁気刺激法の疾患治療への有用性は広く認められており、2017年9月には日本において経頭蓋磁気刺激装置が医療機器として薬事承認されるに至った(平成29年9月29日 薬生監麻発0929第1号)。一方で、磁気刺激法による疾患治療効果は個人差が大きく、疾患抑制期間は短いことが知られている(Ridding and Rothwell, 2007; Zhang, 2013)。例えば、耳鳴り疾患の治療では、疾患抑制効果が6か月続

いたという報告も存在するものの(Kleinjung et al., 2005)、多くの報告では疾患抑制期間は一回の治療では数日～数週間程度であり(Folmer et al., 2006; Londero et al., 2006; Minami et al., 2011)、数秒しか疾患が抑制されなかったという報告も存在する(De Ridder et al., 2005)。このような疾患抑制期間の短さは、神経疾患の患者に頻繁に医療機関に通院する負担を強いており、医療機関以外でも患者が治療を受けられる小型・携帯可能な磁気刺激装置の開発が必要とされている。また、磁気刺激による治療効果の個人差を生む原因は疾患の発症期間(De Ridder et al., 2005)や、患者の年齢や性別、頭蓋骨から皮質までの距離、皮質の興奮性、異なる脳領域間の結合の強さや、神経可塑性に関わる遺伝子発現の個人差が考えられている(Valero-Cabre et al., 2017)。しかし、これらの個人差に対応する磁気刺激法は開発されておらず、疾患抑制に効果的な刺激法を開発するためには、神経疾患モデル動物を用いた磁気刺激の強度や刺激位置、刺激回数などの疾患を抑制する最適な刺激パラメータの探索や、磁気刺激の作用機序の解明といった基礎研究が必要である。

#### 1-1-5-2 磁気刺激法の神経科学研究への応用

磁気刺激はヒトにおける認知神経科学研究や精神・神経疾患の機序解明などの基礎神経科学分野にも広く応用されている。例えば、低頻度反復磁気刺激を用いて大脳皮質の背外側前頭前野領域の活動を抑制すると、被験者は不公平な提案を受け入れるようになることが観察され、この実験により背外側前頭前野領域は公平な意思決定行動を実施する役割をもつことが示唆された(Knoch et al., 2006)。また、磁気刺激法とポジトロン断層法 (PET, positron emission tomography)を組み合わせることで、前頭前野や島皮質への磁気刺激がドーパミン放出を増加させることが観察されている(Malik et al., 2017)。ドーパミン神経

回路は脳の報酬系としても知られており、磁気刺激による報酬系神経回路の修飾は精神・神経疾患治療だけでなく薬物依存症の治療への応用も期待されている(Diana et al., 2017)。しかし、ヒトを対象とした磁気刺激法の基礎研究は、実験の困難さや倫理的な問題から十分な実験を行うことは困難である。

この問題に対し、近年では霊長類を用いた磁気刺激実験による精神・神経疾患の機序解明が試みられつつある。最近では筒井らの実験により、内側前頭皮質領域の活動がうつ病に関係しているという仮説のもとで、マカクザルの内側前頭皮質領域に低頻度磁気刺激を与えたところ、磁気刺激後のサルはうつ病様の行動を示し、内側前頭皮質領域の活動が情動や気分の調節に関わることが強く示唆された(Tsutsui and Nakamura, 2017)。また、近年は遺伝子改変技術が霊長類に応用されるようになり(Sasaki et al., 2009; Okano and Kishi, 2017)、自閉症のカニクイザルモデル(Liu et al., 2016)や神経変性疾患マーマセットモデル(Tomioka et al., 2017)が作成されている。現時点では磁気刺激法をこれらのサルモデルに応用した報告は存在しないものの、疾患サルモデルにおける磁気刺激法の応用は、疾患治療に最適な磁気刺激パラメータの探索や、磁気刺激法の機序解明に貢献すると期待されている。

一方、サルを用いた実験は多大な手間やコストがかかるという問題が存在する。ラットやマウスをはじめとする齧歯類は、神経科学研究に用いられる実験動物のうち最も一般的な動物であり、霊長類と比べてコストが安い、サイズが小さい、遺伝的な統制がとれている系統が存在する、遺伝子改変技術による様々な疾患モデルマウスが既に存在するといった利点がある。これまで、齧歯類を用いた磁気刺激実験(Luft et al., 2001)により、反復磁気刺激による可塑性誘導の神経基盤の解明(Mix et al., 2014; Muller et al., 2014; Sykes et al., 2016)、神経細胞レベルの磁気刺激の作用機序の解明(Murphy et al., 2016)や、新たな磁気



刺激法の開発(Rotem et al., 2014)が試みられてきた。しかし、既存の磁気刺激コイルは齧歯類の脳に対して巨大で(Rodger and Sherrard, 2015)、脳全体に誘導電場を発生してしまうという問題が存在する(Crowther et al., 2014)。近年は齧歯類への使用を目的とした直径 8 mm の磁気刺激コイルも開発され、これにより空間分解能は従来の刺激コイルのセンチメートルオーダーの大きさから半値全幅で 7 mm 程度に向上した(Mulders et al., 2016; Tang et al., 2016b)。しかし、マウス聴覚皮質領域の大きさは直径約 2 mm 程度であり(Tsukano et al., 2016)、聴覚皮質などの特定の脳領域を選択的に刺激するには空間分解能が不足している。複数の脳領域に同時に刺激が与えられると、異なる脳領域間にわたって神経活動が伝搬することで(Lakatos et al., 2007; Wylie et al., 2015)、特定の脳領域のみに刺激を与えた場合とは脳活動に異なる影響が現れる可能性がある。

### 1-1-6 本論文の目的

磁気刺激法は非侵襲的な脳刺激方法として広く応用されているが、刺激に用いるコイルは大型のため、慢性的に脳に刺激を与え続けるには患者に通院の負担を強いている。さらに、大型のコイルは空間分解能の向上を阻害する要因となっている。加えて、磁気刺激が脳に与える影響は細胞レベルでは広く研究されているものの神経回路レベルでの機序は明らかになっていない。本研究では、将来的に臨床応用が可能な小型・携帯可能な磁気刺激装置の開発を目指し、微小コイルを用いた脳磁気刺激法の確立と、皮質神経回路レベルにおける磁気刺激の影響の解明を目的とした。

## 1-2 本論文の構成

第 1 章では、本研究の背景、目的について記述した。第 2 章では、サブミリメートルサイズの微小コイルを用い、生きたマウスに応用し、低侵襲脳磁気刺激法の確立について述べる。第 3 章では、微小コイル磁気刺激法を生きたマウスに応用し、聴覚皮質神経回路の動態を計測することで、磁気刺激の機序を明らかにする。第 4 章では、第 3 章で得られた実験結果を比較・解釈するための基礎的知見として、麻酔薬の種類が神経活動に及ぼす影響を明らかにする。

## 第2章 低侵襲微小コイル磁気刺激法の確立

### 2-1 背景と目的

#### 2-1-1 微小コイルを用いた磁気刺激法

これまで、磁気刺激に用いられる刺激コイルは十分な刺激強度を達成するために直径5~10 cmの大型のコイルが用いられてきた(Deng et al., 2013)。一方、近年では Bonmassar らによって、サブミリサイズの微小コイルであってもコイル近傍では神経活動の誘発に十分な刺激強度が得られることが示された(図 2-1)。さらに、脳スライスを用いた実験から実際に微小コイル磁気刺激によって神経活動を誘発することが可能であると報告された(図 2-2) (Bonmassar et al., 2012)。加えて、その翌年には Park らによって、脳の一部を手術で除去し微小コイルを脳内の軸索に 100–300  $\mu\text{m}$  まで近づけることで、侵襲性の大きい手法を用いれば in vivo でも微小コイル磁気刺激によって神経活動を誘発できることが示された(Park et al., 2013)。しかし、臨床に用いるためには低侵襲的な手法が望ましいが、コイルが作る磁場・電場の強さはコイルからの距離に応じて反比例的に減衰するため(図 2-1)、脳を傷つけずに脳表から磁気刺激を与える場合では、活動電位の誘発には十分な強さの電場を誘導できないと予想される。

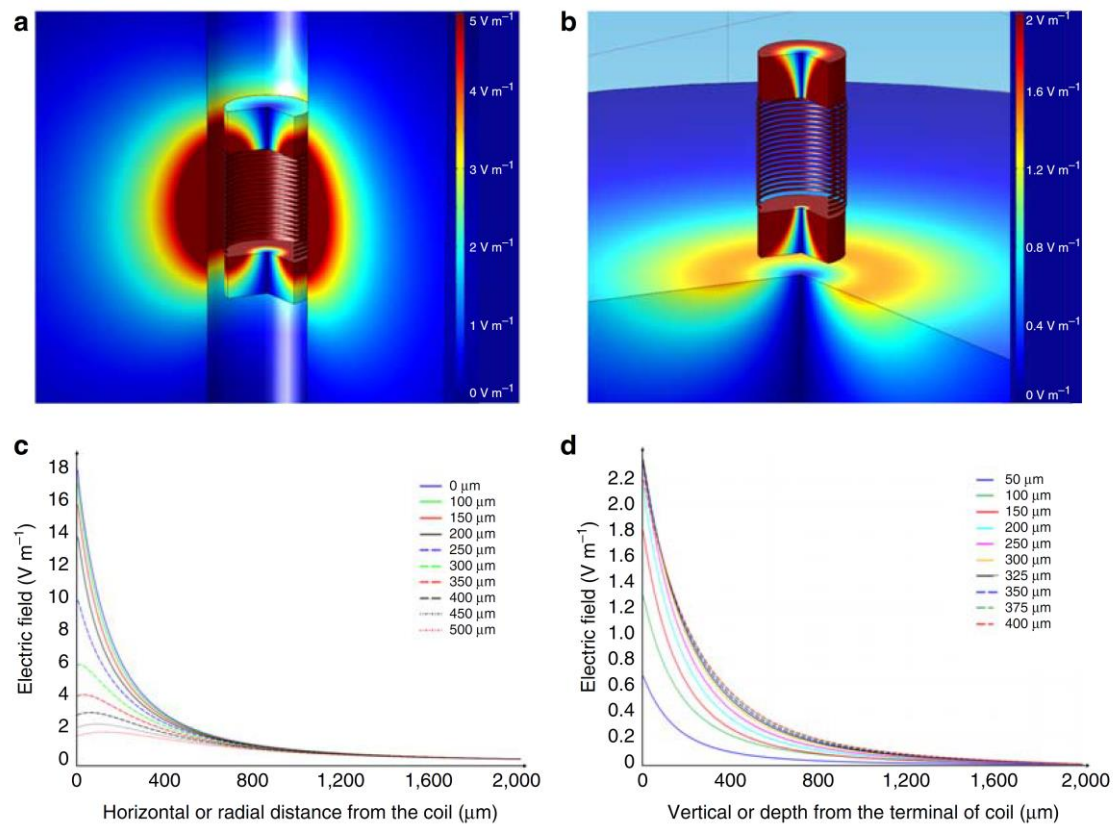


図 2-1 サブミリサイズの微小コイルが発生する誘導電場

A, B, 誘導電場の 3 次元分布。

C, コイルに対して放射方向の電場分布。コイル直近では電場強度が  $10 \text{ V/m}$  を超えており、活動電位の生成に十分な誘導電場が発生する。

D, コイルに対して軸方向の電場分布。

Reprinted with permission from Nature (Bonmassar et al., 2012)

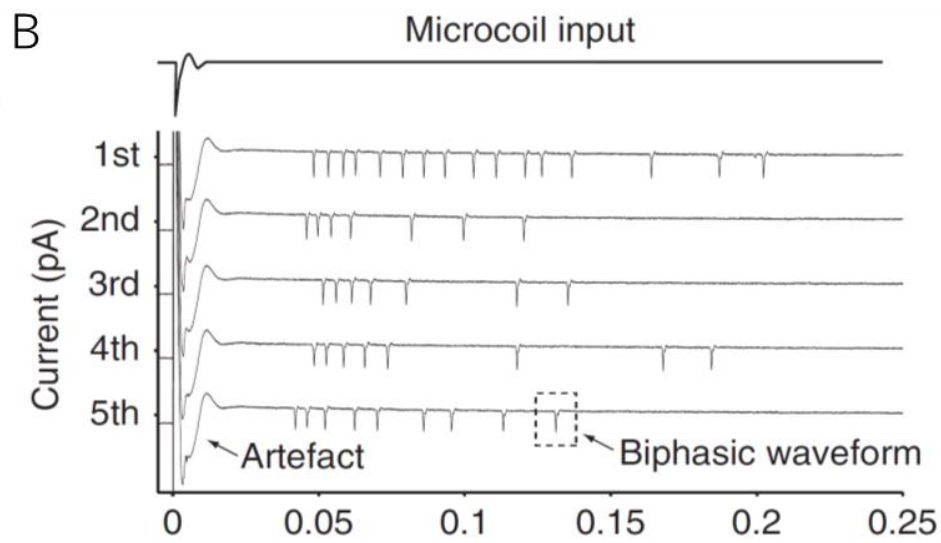
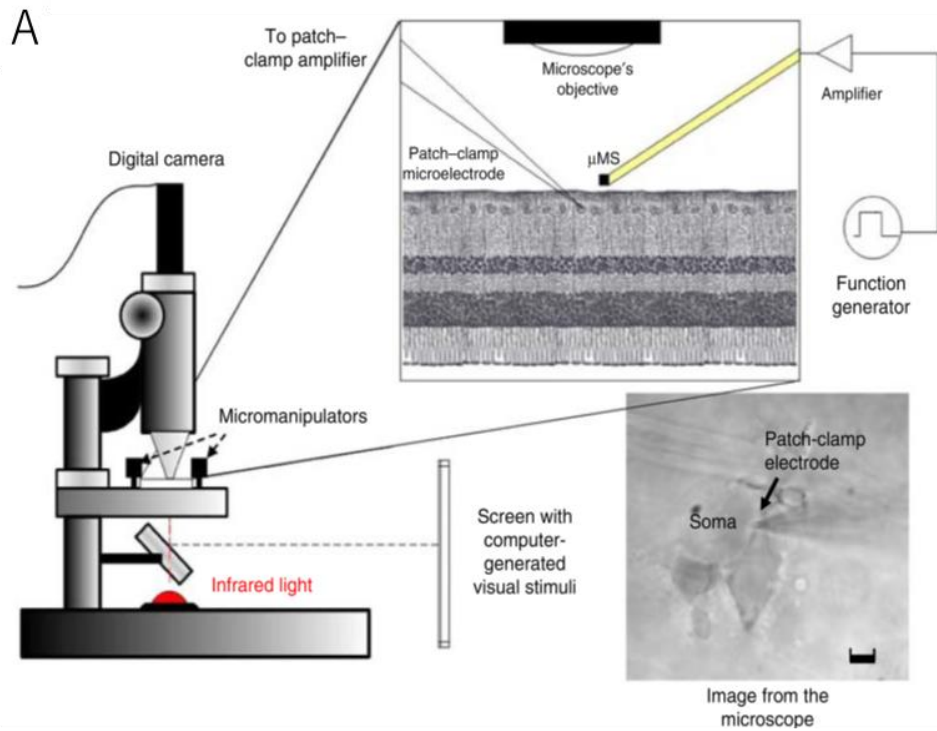


図 2-2 微小コイル磁気刺激による神経活動誘発の in vitro 実験

A, 実験構成。脳スライスと微小コイルは 300  $\mu$ m 離れている。

B, 活動電位の誘発時の神経活動波形。

Reprinted with permission from Nature (Bonmassar et al., 2012)

## 2-1-2 弱磁場による磁気刺激

磁気刺激法では、頭蓋骨越しに脳内に渦電流を発生させるために、一般的には 1 テスラ (T) 以上の強い磁場を用いた磁気刺激が利用されている(Ridding and Rothwell, 2007; Zhang, 2013)。一方で、近年では直接活動電位を誘発しない数ミリ～数十ミリテスラ程度の弱磁場を用いた磁気刺激でも、神経細胞の興奮性に影響を与え(図 2-3) (Tang et al., 2016a)、ヒトの脳活動を修飾可能であることが判明した(Di Lazzaro et al., 2013)。これらの背景から、筆者は微小コイルの近傍でなくとも弱い強度の磁気刺激によって神経活動の誘発が可能であり、微小コイル用いて脳を傷つけずに脳表から磁気刺激を与えることで、脳を損傷しない低侵襲小型磁気刺激法を確立できるという着想に至った。

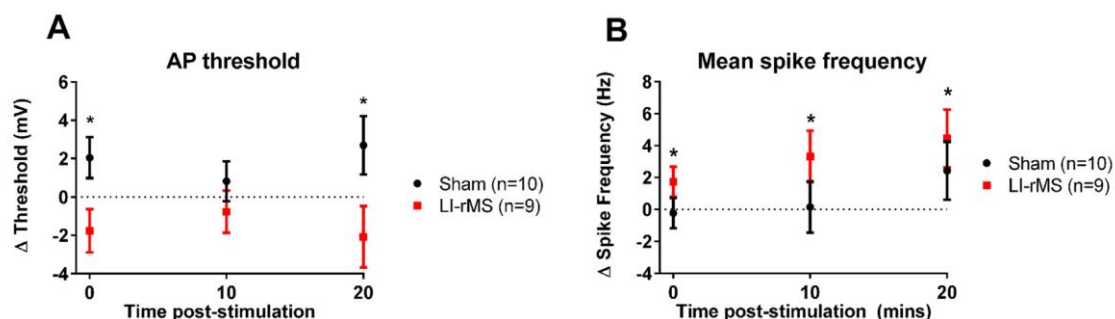


図 2-3 弱磁場刺激による海馬神経細胞の興奮性の変化

A, 反復弱磁場刺激 (LI-rMS; 85.4 mT)による活動電位発生閾値の低下。

B, 反復弱磁場刺激による自発的発火頻度の増加。

Reprinted with permission from Elsevier (Tang et al., 2016a)

### 2-1-3 本研究の目的

本研究では、微小コイルを用いた低侵襲磁気刺激法の確立を目的とした。ここで、低侵襲磁気刺激法の確立については、微小コイルを脳に刺入せずに皮質神経活動を誘発することを目標とする。まず、微小コイルを用いた磁気刺激システムを構築した。さらに神経活動を誘発可能か調べるために、構築した磁気刺激システムを用いて麻酔下のマウス聴覚皮質の脳表に磁気刺激を与え、多点電極アレイを用いて磁気刺激誘発活動の電気生理学的計測を行った。また、死後脳を用いて磁気刺激由来の電氣的アーティファクトの周波数成分を同定することで、電氣的アーティファクトと神経活動とを分離した。加えて、微小コイル磁気刺激法の空間分解能を調べるために、多点脳表電極を用いて磁気刺激誘発活動の皮質側方方向の伝搬を計測した。その結果、脳を傷つけずに皮質神経活動を誘発することが可能な低侵襲微小コイル磁気刺激法が確立し、さらに微小コイル磁気刺激法はミリメートルオーダーの空間分解能を達成することが示された。



## 2-2 実験方法

### 2-2-1 微小コイルを用いた磁気刺激デバイスの作製

微小コイルを用いた磁気刺激システムを構築するため、磁気刺激に用いる刺激コイルは商用の微小コイル(ELJ-RFR10JFB; Panasonic Electronic Devices Corporation of America, Knoxville, TN, USA;  $0.5 \times 0.5 \times 1.0$  mm)を用いた(図 2-4A) (Bonmassar et al., 2012)。微小コイルを脳表から離れた位置で保持するため、微小コイルはプリント基板 (0.1-mm flame retardant type 4 circuit board (FR-4)) に固定した (図 2-4B)。そして、導線部をはんだ付けした後、絶縁コーティングのために  $15 \mu\text{m}$  厚の生体適合性素材 Parylene-C (DPX-C, Speedline Technology) を蒸着装置 (LABCOATERPDS2010, Specialty Coating Systems, Indianapolis, IN, USA) を用いてコーティングした。

微小コイルから変動磁場を発生させるために、コイルに電圧パルスを印加する磁気刺激システムを構築した(図 2-5)。電圧パルスの生成は D/A コンバータ (40 sample points、800-kHz sampling rate; NI USB-6341; National Instruments, Austin, USA) を使い、矩形波で異なる大きさの電圧パルス (パルス幅:  $50 \mu\text{s}$ 、入力電圧:  $V_{\text{in}} = 0\text{--}5 \text{ V}$  ( $0.5 \text{ V}$  もしくは  $1 \text{ V}$  ステップ)) を生成した。 $V_{\text{in}} = 6 \text{ V}$  以上では微小コイルが破損するため、 $6 \text{ V}$  以上の電圧は印加しなかった。D/A コンバータで生成した電圧パルスはアンプによって増幅し( $3\times$ ; PB717, Pyramid Inc., Brooklyn, NY, USA)、増幅後の両極性出力波形をコイルに印加した。各トライアルにおいて、磁気刺激は  $1.0\text{--}1.5$  秒のランダムな刺激間隔で 50 回提示した。実験では、インピーダンスが  $3.5\text{--}4.5\Omega$  のコイル( $1 \text{ V}$ ,  $1 \text{ kHz}$  で LCR メーターを用いて測定; ZM2371; NF Corporation, Yokohama, Japan)のみを使用した。また、Parylene-C コーティングのインピーダンス低下(Xie et al., 2013)

に伴うリーク電流の影響を避けるため、各実験の開始前・終了直後でコイルの絶縁インピーダンスを LCR メータ (1 V, 1 kHz) を用いて測定し、絶縁インピーダンスが  $7\text{ M}\Omega$  を超えることを確認した。

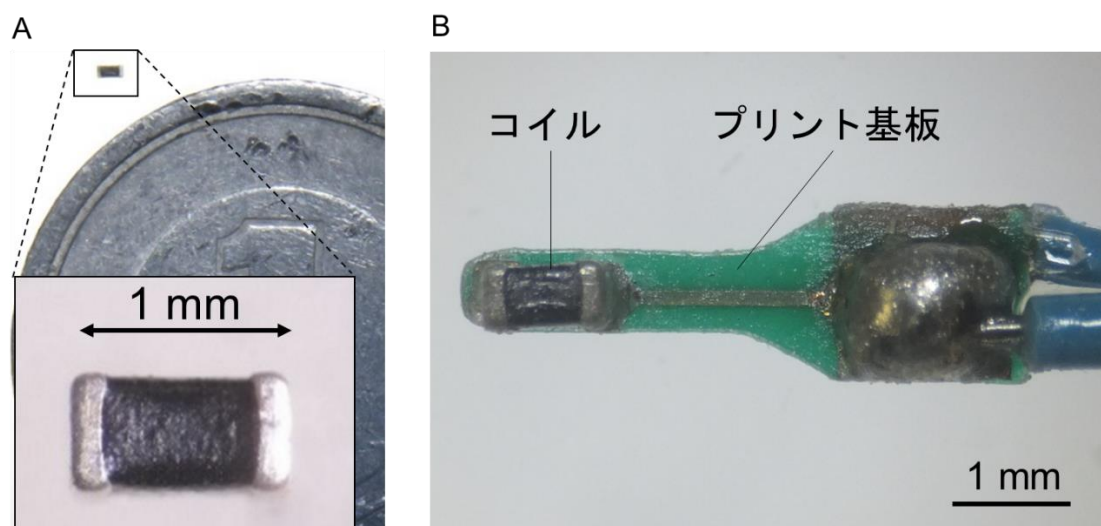


図 2-4 微小コイル磁気刺激インターフェース

A, 磁気刺激に用いる微小コイル

B, プリント基板に固定後の磁気刺激インターフェース

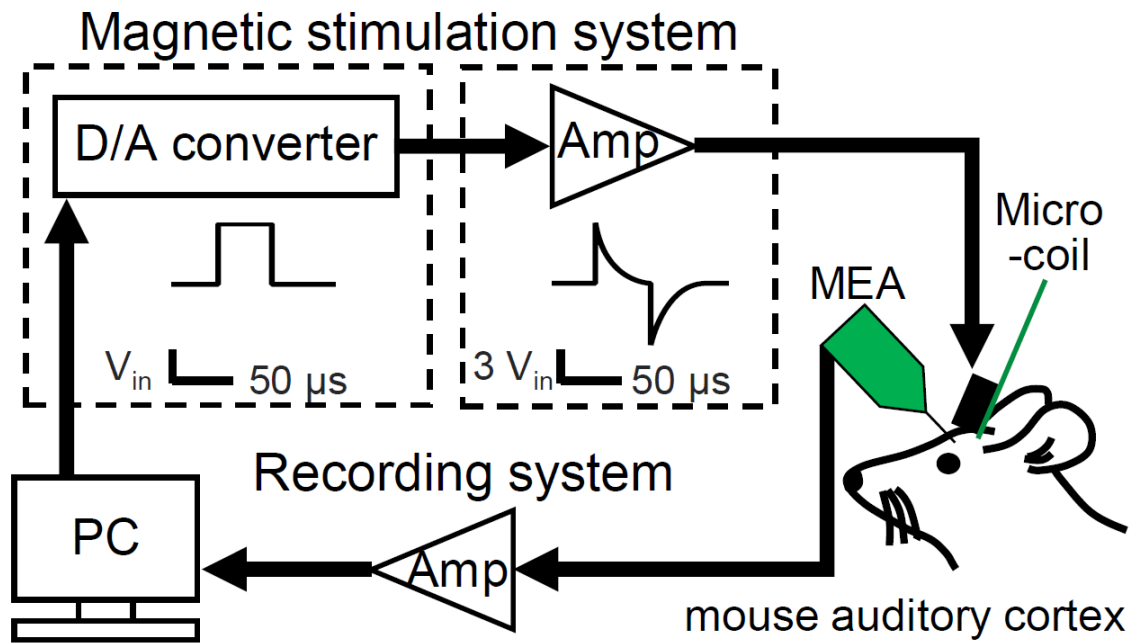


図 2-5 磁気刺激システムおよび電気生理学的計測システム

## 2-2-2 オープンスカル手術

本研究において動物実験を遂行するにあたり、北海道大学における動物実験に関する教育訓練を受け、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に定められた指針に従い実験を行った。

微小コイル磁気刺激による誘発活動を計測するため、6-10週齢のC57BL/6J マウス (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) を 15 個体使用した（「各実験における動物使用数」参照）。オープンスカル手術を施す 3-7 日前に、マウスを 3 種混合麻酔（ミダゾラム：2 mg/kg, Astellas Pharma, Tokyo, Japan; メドトミジン：0.15 mg/kg; Kobayashi Kako, Awara, Japan; ブトルファノール：2.5 mg/kg, Meiji SeikaPharma Co., Ltd., Tokyo, Japan）(Kawai et al., 2011)を用い腹腔内投与によって麻酔を施し（第 4 章参照）、手術中にマウス頭部を固定するために自作の固定具をマウス頭部にデンタルセメントを用いて装着した。そして、磁気刺激実験を実施する日に、マウスに対しアトロピン(0.04 mg/kg, Mitsubishi Tanabe Pharma, Osaka, Japan)を投与し、ウレタン(1.3 g/kg, Wako, Osaka, Japan)を腹腔内投与して麻酔を施した。さらに、脳浮腫の発生を防ぐためにデキサメタゾン(0.5 mg/kg, Kobayashi Kako) の筋肉注射を行った。オープンスカル手術を行うにあたり、開頭位置を決定するためにフラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを経頭蓋で行い、聴覚野の位置を同定した(詳細は 2-2-3 に記述)。そして、歯科用ドリルを用いて頭蓋骨および硬膜を除去し、左脳の聴覚皮質を露出させた。オープンスカル後は、脳表の乾燥を防ぐために人工脳脊髄液 (ACSF, artificial cerebrospinal fluid ) (in mM, 119 NaCl, 26.2 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 1.0 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 11.0 D-glucose (pH = 7.4) )を脳表に滴下した。麻酔の深度は後肢刺激に対する反射の大きさによって判断し、マウス直腸温を温度計(RT-30S; ESPEC, Osaka, Japan)で測定して温度が

36 °C に保たれるように使い捨てカイロを用いてマウスの体温維持を行った。

### 2-2-3 フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによる聴覚皮質領域の同定

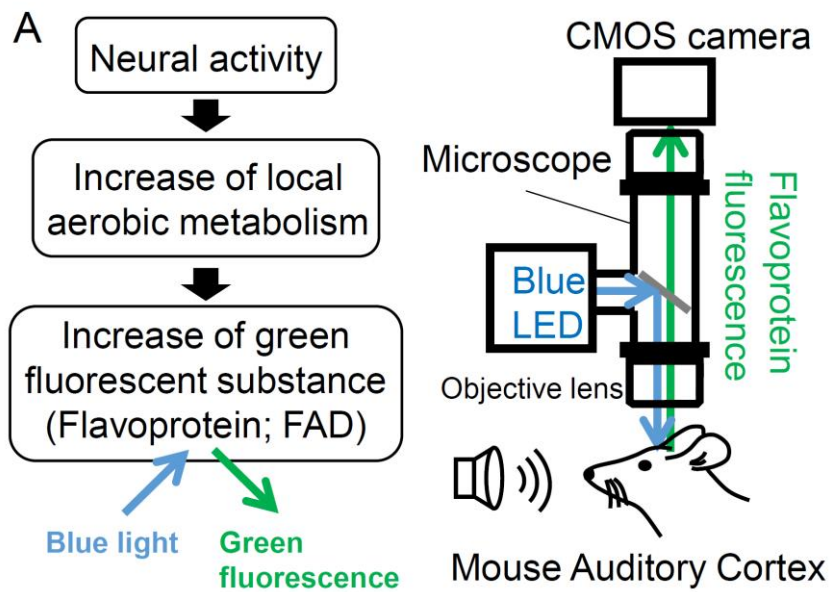
聴覚皮質領域の同定のために、フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを用いた。この手法は電気生理学的計測実験に必要な時間を短縮する。聴覚皮質領域の同定の詳細については第 4 章に記述した。

フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングは内因性の蛍光を用いて神経活動を計測する手法である(Shibuki et al., 2003; Shibuki et al., 2006; Tsukano et al., 2015)。フラビンタンパク質はミトコンドリアの電子伝達系にかかわるタンパク質であり、好気呼吸における ATP 合成の過程で還元型(FMNH<sub>2</sub>)から酸化型(FMN)へと変化する。酸化型フラビンタンパク質は青色光の照射に伴い緑色の自家蛍光を発するという性質があり、フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングではこの性質を利用する。感覚刺激等によって神経活動が誘発されると、それに伴いミトコンドリア活動が亢進し、酸化型フラビンタンパク質が増加し緑色蛍光が増加する(図 2-6Aa)。この蛍光変化を観察することにより、脳を染色せずに間接的に脳内の神経活動をイメージングすることができる(図 2-6Ab)。

聴覚皮質のサブ領域である一次聴覚野(primary auditory cortex, A1)および前聴覚野(anterior auditory field, AAF)を同定するために、正立顕微鏡(THT, BrainVision, Tokyo, Japan)を用い、CMOS カメラシステム(MiCAM02; BrainVision) および 1 倍対物レンズ (PLAN APO 1x, Leica Microsystems, Tokyo, Japan) を使用してフラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを実施した。励起光照射には青色 LED (LEX2-B; BrainVision)を用い、バンドパスフ

フィルター ( $466 \pm 20$  nm)を通して皮質に青色光を照射した。フラビン蛍光の取得には、ダイクロイックミラー(509 nm)およびバンドパスフィルター ( $525 \pm 22.5$  nm)を通し、CMOS カメラシステムで緑色蛍光を取得した。顕微鏡観察は 20 フレーム/秒で行い、純音刺激 (60-dB SPL, 100-ms 継続時間 with 5-ms linear rise and fall time)の 1 秒前から 5 秒後までの蛍光変化を記録した。音刺激は 6–8 秒の擬似ランダム間隔で 10 回提示され、各試行の蛍光画像は BV\_ANA ソフトウェア(BrainVision)を用いて平均化された。得られた蛍光画像から、聴覚皮質のトノトピー構造の特徴に基づき A1 および AAF 領域を同定した(図 2-6B)。

音刺激波形は Python によって書かれたプログラムと D/A コンバータ (NI USB-6341) によって 800 kHz のサンプリングレートで生成され、2 Hz-100 kHz のバンドパスフィルター(Multifunction Filter 3611; NF Electronic Instruments, Yokohama, Japan) およびパワーアンプ(SA1; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA)を通し、スピーカー(MF1; Tucker-Davis Technologies)から音刺激が提示された。音刺激の音圧校正には音量計 (Type 2636, Brüel and Kjaer, Naerum, Denmark) およびマイクロホン (Type 4939-L-002; Brüel and Kjaer) を使用した。



## B Cortical subfield-identification

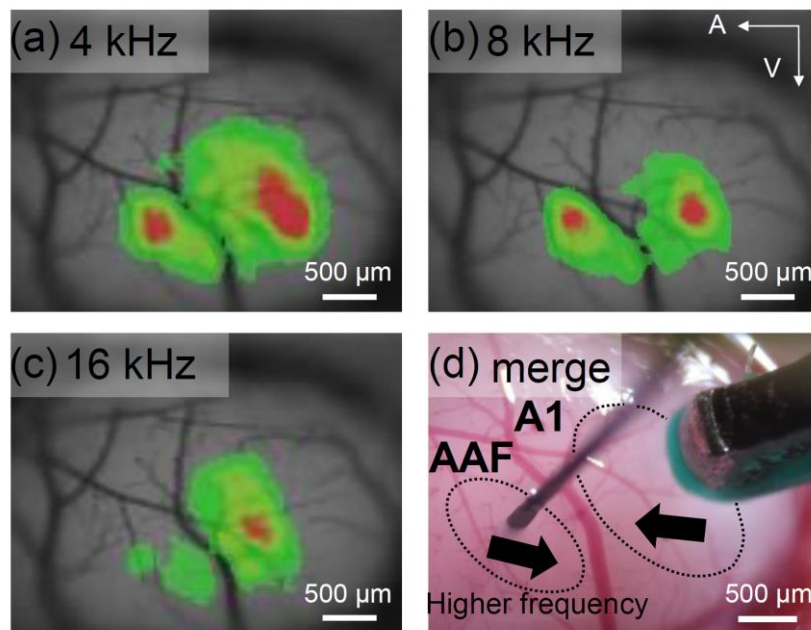


図 2-6 フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによる聴覚皮質領域の同定

A, フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングの概要。Aa, フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングの原理、Ab, 実験装置の構成。

B, 聴覚皮質領域の同定。Ba-c, 純音刺激(4, 8, 16 kHz)に対する応答。Bd, 聴覚皮質領域の同定と磁気刺激・電気生理学的計測の記録位置。

#### 2-2-4 磁気刺激誘発活動の電気生理学的計測

聴覚皮質領域の同定後、マイクロマニピュレーター(Narishige; Tokyo, Japan)を用い、聴覚皮質 A1 領域上の脳表から 50-100  $\mu\text{m}$  離れた場所に微小コイルを配置した。次に、電気生理学的計測を行うために、刺入型多点電極アレイを AAF 領域に微小コイルから 0.7-1.5 mm 離して刺入し(図 2-6 Bd)、もしくは、多点脳表電極(electrococchleography, ECoG)を AAF と A1 の全体の領域を覆うように配置した(図 2-12 参照)。

電気生理学的計測を行うにあたり、刺入型多点電極アレイは電極間隔 50  $\mu\text{m}$ 、1 シャンク、16 チャネルの電極 (A1 $\times$ 16-5mm-50-177-A16; NeuroNexus, Ann Arbor, MI)を使用し、多点脳表電極は電極間隔 300  $\mu\text{m}$ 、32 チャネルの ECoG 電極(E32-300-20-50-HC32; NeuroNexus)を使用した。スパイク活動および局所電場電位(local field potential, LFP)は計測ソフト(OmniPlex; Plexon Inc, Dallas, TX, USA)の設定上で 250 倍に増幅し、それぞれバンドパスフィルター(300-8,000 Hz)もしくはローパスフィルター(0.1-600 Hz)を用い、40 kHz もしくは 1 kHz のサンプリング周波数で計測した。音刺激誘発活動は、0.3–0.4 秒のランダム間隔で 100 回提示したクリック音(80 dB SPL)に対する応答を記録した。刺入型多点電極により皮質のどの層からの記録が得られたのか確認するために、電流源密度(current-source density, CSD)を、LFP の深さ方向の空間 2 階微分の計算により解析した(Muller-Preuss and Mitzdorf, 1984; Kaur et al., 2005)。そして、CSD 解析結果における source-sink-source のトリプレットパターンから 4 層の位置を決定した(Kaur et al., 2005; Sakata and Harris, 2009)。この結果は、皮質各層の厚み(DeFelipe et al., 2002)と電極の刺入深さとの関係性と矛盾しなかった。スパイク活動は Offline Sorter (Plexon Inc.) を用い、活動波形の 3 倍の標準偏差(SD)を閾値にした主成分分析によって、シングルユニ



ットの活動にソーティングされた。

磁気刺激の提示は、電極を脳に刺入後、音刺激活動(スパイク応答、LFP 応答)が安定してから行った。また、磁気刺激応答活動の記録は、に初めて磁気刺激を提示してから 30 分以内でのみ行った。全ての動物は実験終了時に麻酔の過剰投与により安楽死させ、エンドポイントは心拍および呼吸の有無で評価した。また、電氣的アーティファクトの周波数成分を調べるために、エンドポイントを確認してから 30 分後に磁気刺激応答波形を記録した。加えて、ナトリウムチャンネル阻害剤であるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX, 20  $\mu$ M; Wako)を脳表に滴下し、活動電位の発生を阻害した状態でも電氣的アーティファクトの計測を行った。TTX 処理後の電気生理記録は、TTX 投与の 1 時間後に音刺激誘発活動の消失を確認してから行った。

磁気刺激・音刺激誘発活動の有無は LFP の z-score によって計算した。刺激後のある時間における LFP の電位(V)の z-score は、刺激前 10–50 ms 間の電位の平均( $\bar{V}$ )とその標準偏差( $\sigma$ )によって計算され( $z = \frac{V-\bar{V}}{\sigma}$ )、刺激後 100 ms 以内に z-score が 6 を超える場合に応答性の活動を示したと判断した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 低侵襲微小コイル磁気刺激による皮質神経活動の誘発

微小コイルによる脳表磁気刺激によって皮質活動を誘発できるかを検証するために、多点電極アレイ(n = 9)および多点脳表電極(n = 8)を用いて磁気刺激応答活動の電気生理学的計測を行った。微小コイルは脳表から 50-100  $\mu\text{m}$  離し、脳表に対して 60° の角度で配置された(図 2-7A)。図 2-7B は磁気刺激後 1 秒間の LFP とスパイク活動の例を示しており、磁気刺激パルス後に LFP の変化やスパイク発火頻度の顕著な増加が現れた。磁気刺激前後(刺激前 < 200 ms および刺激後 < 50 ms)のスパイク波形は同じ時間変化パターンを示し(図 2-7C)、図 2-7Bb で示された磁気刺激後のスパイク数の増加は電氣的アーティファクトに由来するものではないことを示している。LFP 応答およびスパイク活動の増加は異なる電極位置においても観察され (図 2-7D)、微小コイルを用いた脳表の磁気刺激によって皮質の層構造全体に神経活動が誘発されることが示された。

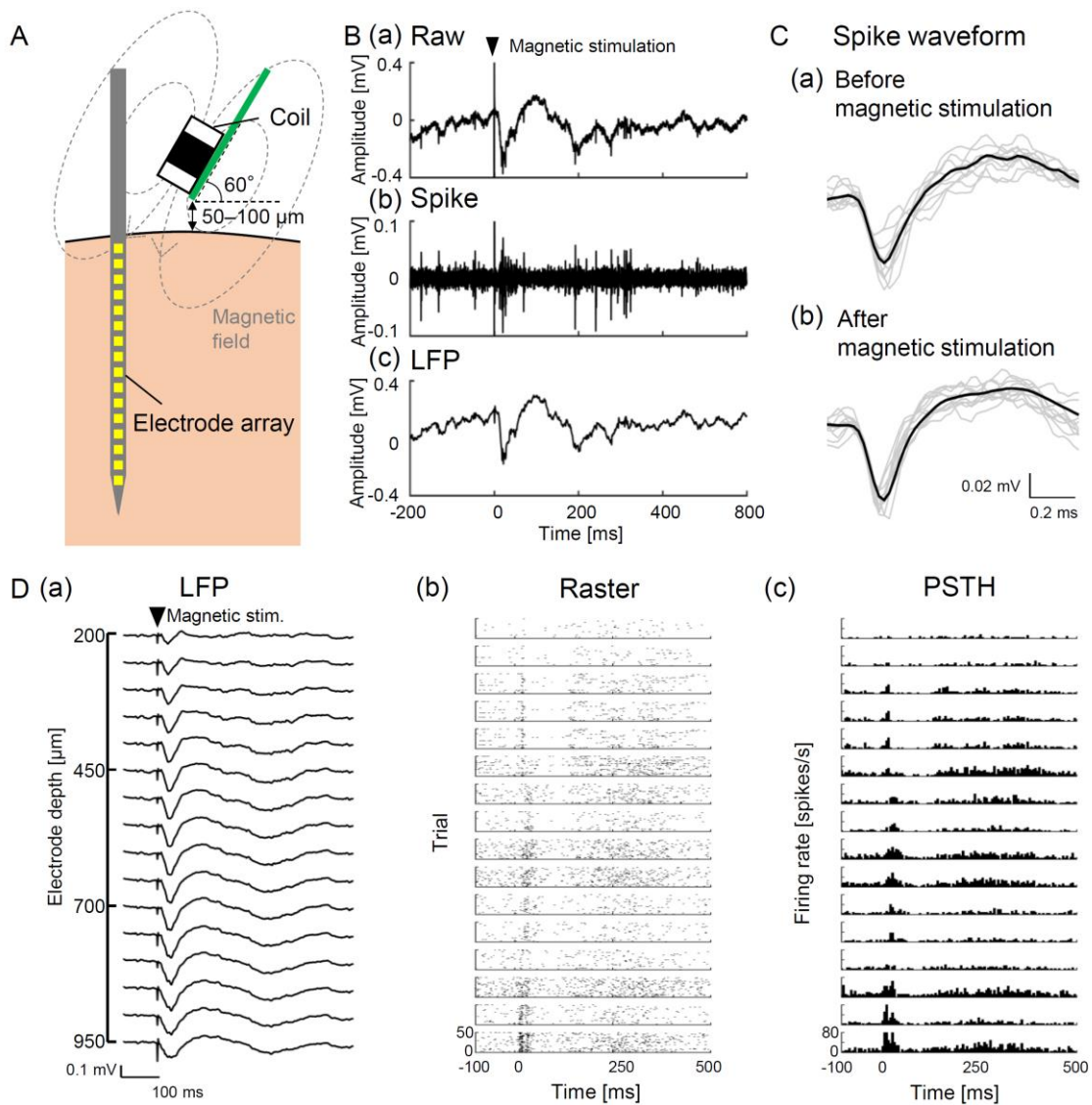


図 2-7 微小コイル磁気刺激誘発活動の電気生理学的計測

A, 16 ch 多点電極アレイを用いた実験の概略図。

B, 微小コイル磁気刺激の誘発活動の例(電極位置: 8 ch)。Ba, フィルター前の神経活動波形。Bb, スパイク活動。Bc, 局所電場電位(LFP)活動。

C, 磁気刺激前(-200-0 ms, Ca)および磁気刺激後(0-50 ms, Cb)のスパイク波形

D, 微小コイル磁気刺激の誘発活動の多点電極記録。Da, LFP, Db, スパイク活動のラスタープロット, Dc, スパイク活動の PSTH (Post-stimulus time histogram)。ビン幅: 0.5 ms。

## 2-3-2 コイル由来のノイズ音および熱の測定

2-3-1 節で観察された誘発活動が、コイルが発する音や熱に由来するものではないことを確認するために、磁気刺激の際にコイルに発生する熱と音圧を測定した。まず、コイルが発するノイズ音の音圧を測定するために、微小コイルに  $V_{in} = 5 \text{ V}$ 、パルス幅  $50 \mu\text{s}$  の入力電圧を印加し、コイルから  $1 \text{ cm}$  離れた位置に配置したマイクによって音圧変化を収録した(図 2-8A)。得られた音圧変化の時間周波数解析を行ったところ、磁気刺激によって  $2\text{-}4 \text{ kHz}$  において約  $40 \text{ dB SPL}$  の短い音を発することが観察された(図 2-8B)。しかし、磁気刺激応答が観察されたマウスを用い、脳表から微小コイルを  $3 \text{ cm}$  離してコイルに電圧パルス ( $V_{in} = 5 \text{ V}$ )を印加したところ、磁気刺激に応答した LFP 変化やスパイク数の増加は観察されなかった ( $n = 3$ )。この結果より、磁気刺激によってコイルからノイズ音は発生するものの、2-3-1 節で観察された誘発神経活動は音に由来するものではないことが示された。

次に、コイルが発する熱の測定を行った。空気中で微小コイルにパラフィルムを挟んで熱電対を接触させ(図 2-9A)、コイルに  $V_{in} = 5 \text{ V}$ 、パルス幅  $50 \mu\text{s}$  の入力電圧を  $1 \text{ 秒間隔}$  で印加したところ、温度は印加開始後に  $1 \text{ 分間}$  で約  $1.2^\circ\text{C}$  上昇し、その後は安定していた(図 2-9B)。熱による神経活動の誘発は  $10^\circ\text{C}$  以上の温度変化を必要とするため(Chen et al., 2015)、2-3-1 節で観察された誘発活動は熱に由来するものではないことが判明した。

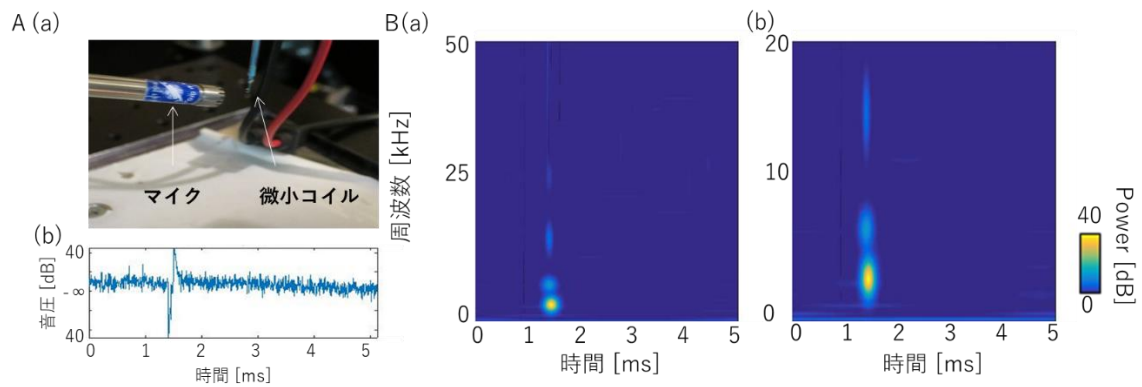


図 2-8 コイル由来のノイズ音の測定

A, コイル由来ノイズの測定。Aa, コイルとマイクの配置。Ab, コイル由来ノイズの計測例

B, コイル由来ノイズ(Ab)の時間周波数解析。Ba, 0-50 kHz。 Bb, Ba の拡大図。0-20 kHz の範囲を表示。

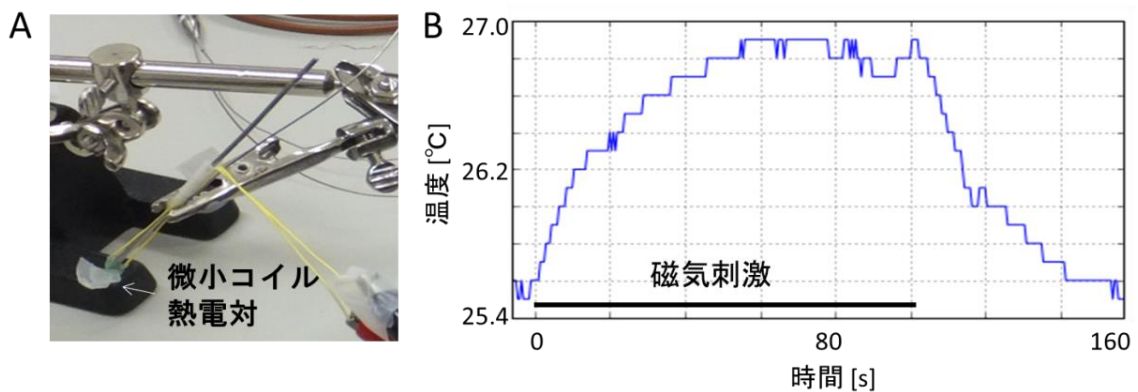


図 2-9 微小コイルの温度測定

A, 微小コイルと熱電対の配置

B, コイルの温度変化。コイルには  $V_{in} = 5 \text{ V}$ , パルス幅  $50 \mu\text{s}$ , 刺激間隔  $1 \text{ s}$  の入力を 100 回印加した。

### 2-3-3 電氣的アーティファクトの計測

次に、磁気刺激による電氣的アーティファクトの影響を調べるために、死後脳(図 2-10 A, B)や TTX 投与後の脳(図 2-10C-E)における LFP 波形の時間周波数解析を行うことでアーティファクトの周波数成分を調べた。マウスに安楽死を施す前は、LFP は磁気刺激に応答して負の方向に大きく遅い変化(peak after  $\mu$ MS: 30–50 ms)する成分と、早い振動成分(inter peak interval:  $\sim$ 20 ms) が足し合わされた波形を示していた(図 2-10Aa)。一方で、麻酔の過剰投与により動物に安楽死を施した後は、大きく遅い LFP の変化が消え、早い振動成分のみが残った (図 2-10Ab)。マッチング追跡法(Chandran Ks et al., 2016)を用いて時間周波数解析を行ったところ、死後脳における LFP 波形には 40 Hz 以上の周波数成分が見られ(図 2-10 B)、TTX 投与後の脳でも同様の結果が得られた(図 2-10C-E)。そこで、0.5-35 Hz のバンドパスフィルターを使用することで、電氣的アーティファクトを分離し、明瞭な磁気刺激の誘発活動波形を得た (図 2-10Ac, Ca)。さらに、スパイク活動測定に使われる高い周波数帯(0.3–8 kHz)における電氣的アーティファクトの周波数成分を調べた (図 2-11)。広周波数帯域で時間周波数解析を行ったところ、スパイク活動に伴って高い周波数成分(1–6 kHz)の増加は見られたが(図 2-11b)、TTX 投与後の脳では、このような高い周波数成分の増加は見られなかった (図 2-11d)。以上の結果より、従来の磁気刺激実験では電氣的アーティファクトのために磁気刺激の誘発活動の電気生理学的計測は困難だった状況に対し、本研究ではアーティファクトを周波数フィルターで分離することで明瞭な磁気刺激の誘発活動の取得に成功した。この結果により、2-3-1 節で観察された磁気刺激誘発活動はアーティファクトではなく、神経活動であることが示された。

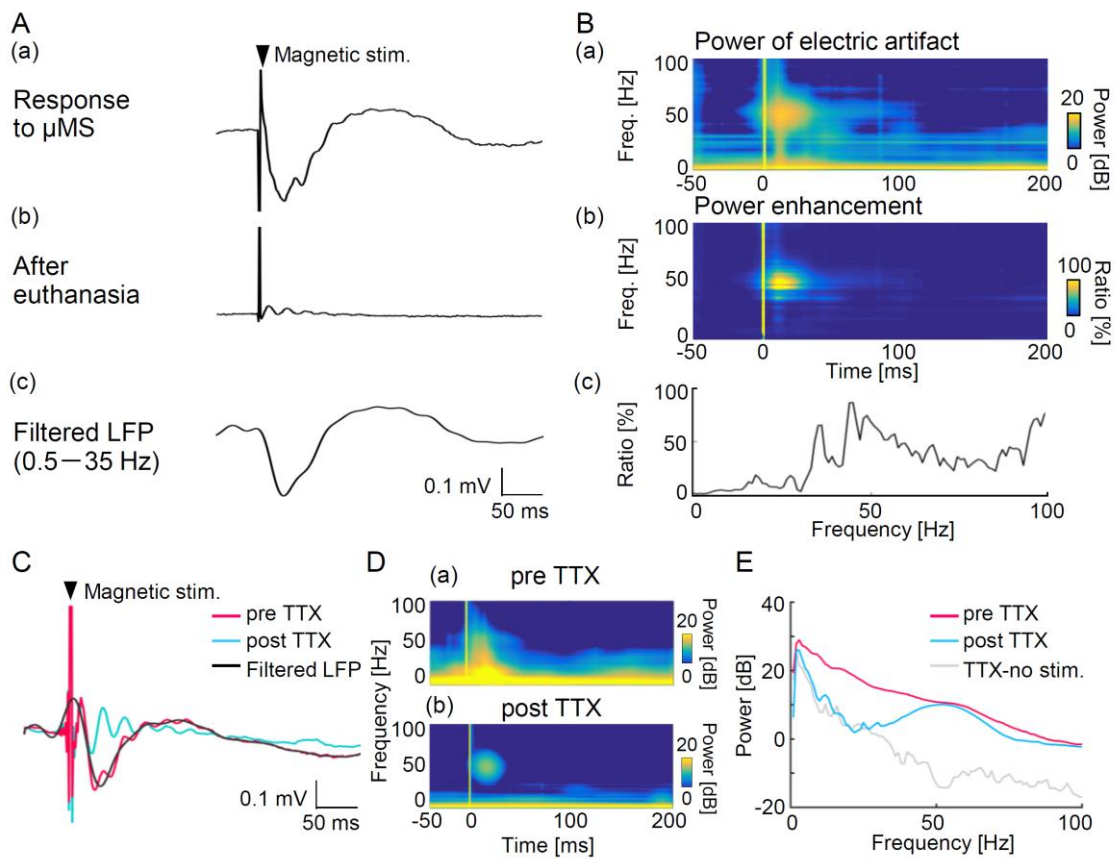


図 2-10 電氣的アーティファクトと神経活動の分離

A, 安樂死前後の磁氣刺激の応答波形(Aa, Ab)および電氣的アーティファクトの分離(Ac)。

B, 電氣的アーティファクトの周波数成分の時間周波数解析(Ba)および電氣的アーティファクトの周波数成分の増加率(Bb, Bc)。

C-E, TTX 投与前後の磁氣刺激応答波形および電氣的アーティファクトの分離。

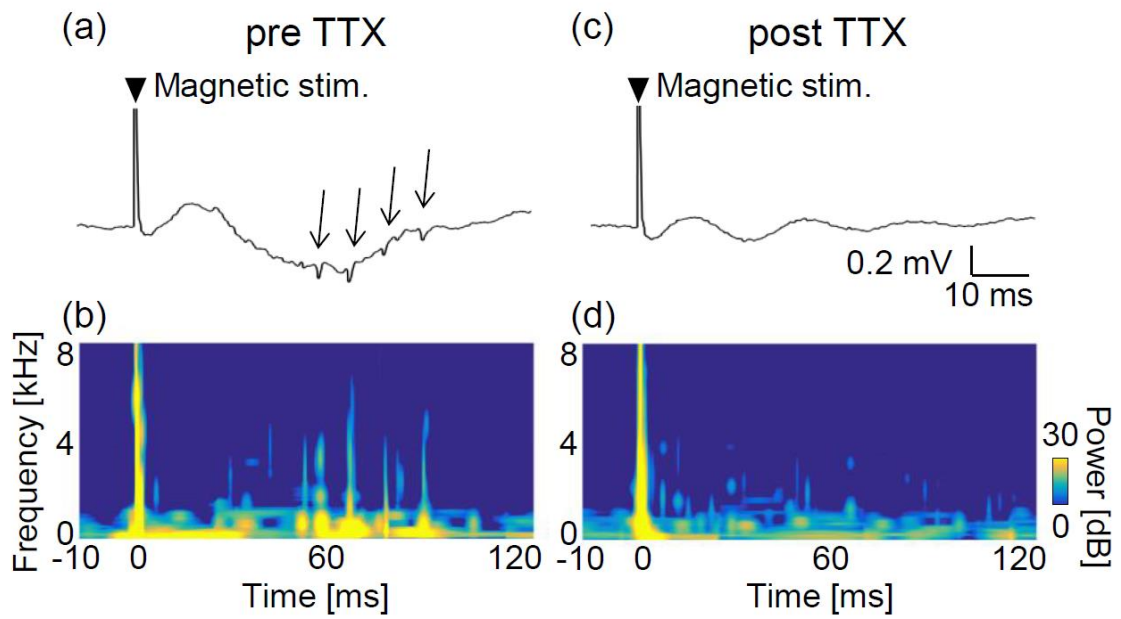


図 2-11 スパイク活動と電気的アーティファクトの周波数成分

a, b, TTX 投与前の広帯域神経活動の磁気刺激応答波形(a)および周波数成分(b)。

矢印：スパイク活動。

c, d, TTX 投与後の広帯域神経活動の磁気刺激応答波形(a)および周波数成分(b)。



#### 2-3-4 微小コイル磁気刺激法の空間分解能

磁気刺激の空間分解能は磁気刺激コイルの大きさに依存するため (Deng et al., 2013)、微小コイル磁気刺激法では従来の磁気刺激法と比べて空間分解能の向上が期待される。そこで、皮質水平方向に対する空間分解能を評価するため、多点脳表電極を用いて磁気刺激誘発活動の皮質水平方向の伝搬について測定を行った。微小コイル磁気刺激は図 2-7A と同様に脳表の上に配置し、入力電圧  $V_{in} = 5V$  を印加した。磁気刺激誘発活動は、32 チャンネルの多点脳表電極を聴覚皮質上に微小コイルから  $150 \pm 54 \mu m$  離して配置し計測した(図 2-12 A)。音刺激(80 dB SPL click sound) を与えたとき、音刺激誘発活動は聴覚皮質全体に表れた(A1、AAF の両方、図 2-12 Ba, Ca)。次に、音刺激誘発活動の分布を調べるために各電極で計測された LFP を電極全体の最大のピーク時振幅で正規化した(normalized peak amplitude)。その結果、音刺激誘発活動のピーク時振幅は、最大の応答を示した場所から離れるに従って減少し、1.2–1.5 mm 離れた領域ではピーク時振幅は半分以下(正規化後のピーク時振幅:  $0.27 \pm 0.08$ )にまで減少した(図 2-13A;  $p = 0.001$ , Tukey-Kramer test)。一方、微小コイル磁気刺激の誘発活動は 6 個体中 5 個体でコイル近傍で最大の応答を示し(図 2-12Bb, Cb)、ピーク時振幅はコイルから離れるに従い単調に減少して、コイルから 1.2–1.5 mm 離れた場所ではピーク時振幅は半分(正規化後のピーク時振幅:  $0.50 \pm 0.02$ )にまで減少した (図 2-13 B;  $p = 0.001$ , Tukey-Kramer test)。以上により、微小コイル磁気刺激法の空間分解能はミリメートルオーダーで、従来の脳磁気刺激法がもつセンチメートルオーダーの空間分解能 (Deng et al., 2013)と比較して、大幅に向上したことが示された。一方で、微小コイル磁気刺激法の空間分解能は音刺激応答 (80 dB SPL)が示した活動領域よりも大きく、聴覚皮質のサブ領域を選択的に刺激するには空間分解能がより高い刺激法を開発する必要がある。

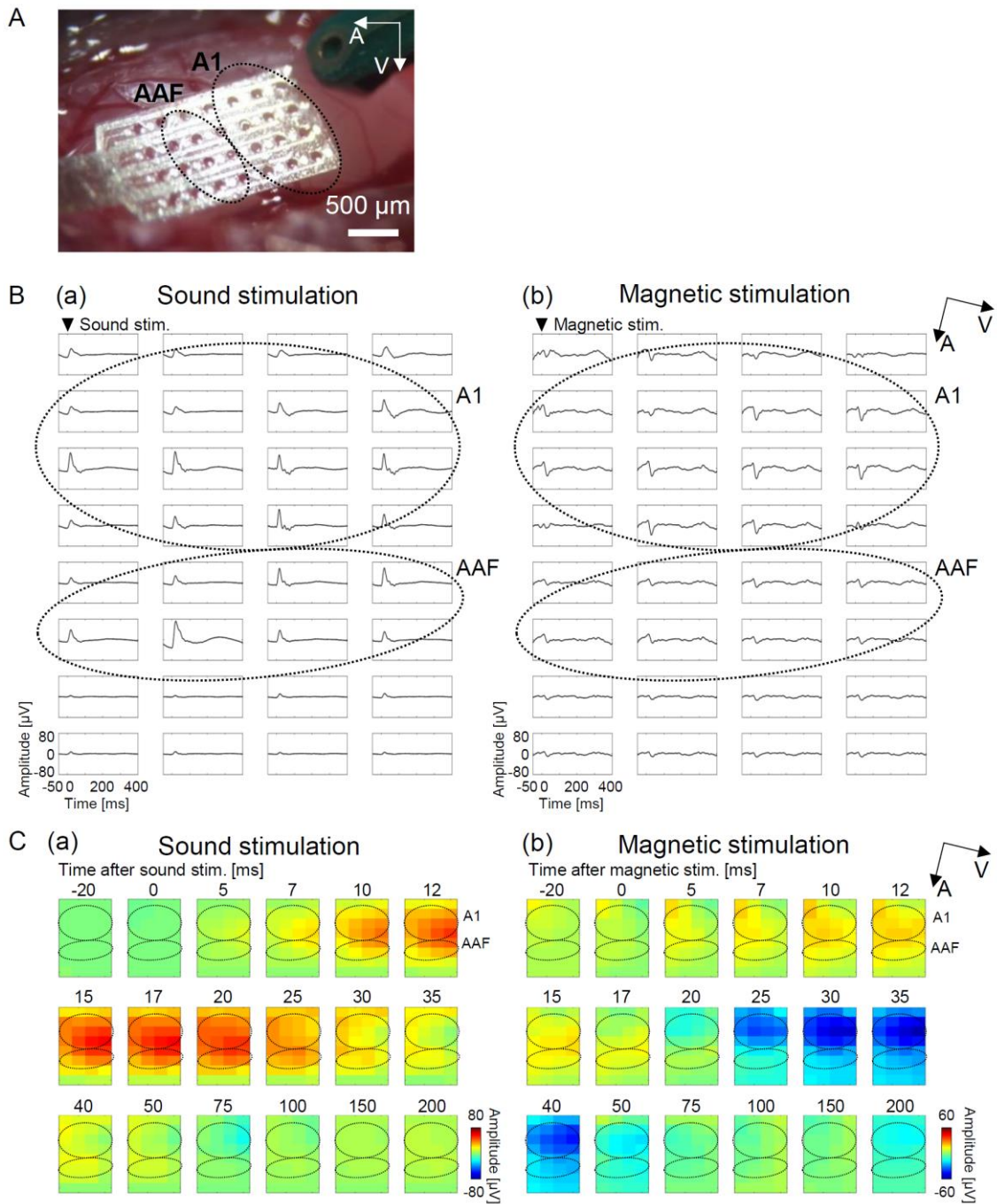


図 2-12 微小コイル磁気刺激誘発活動の多点脳表電極計測

A, 脳表電極と磁気刺激インターフェースの位置関係。

B, 微小コイル磁気刺激誘発活動および音刺激誘発活動の多点脳表電極計測の応答波形。

C, 磁気刺激・音刺激誘発活動(Ba, Bb)の時間変化。

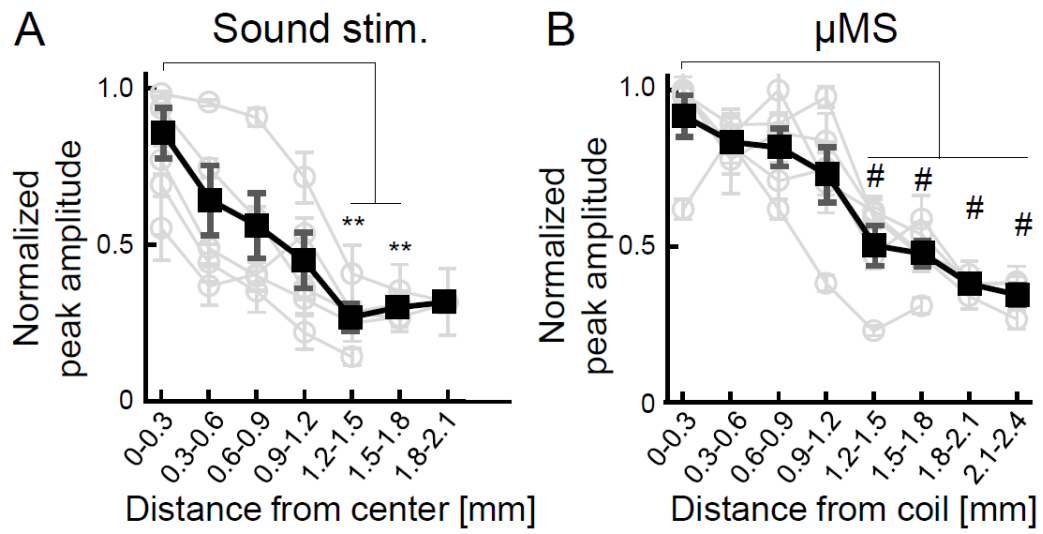


図 2-13 音刺激と微小コイル磁気刺激の応答(正規化後のピーク時振幅)と微小コイルからの距離との関係

A, 微小コイルからの距離と音刺激の誘発活動の関係。

B, 微小コイルからの距離と磁気刺激の誘発活動の関係。

\*\*  $p < 0.01$ , #  $p < 0.001$

## 2-4 考察

### 2-4-1 従来の電磁気刺激法との比較

本研究では、脳表から離れた微小コイルによって、低侵襲的に皮質神経活動を誘発できることを示した。この低侵襲性微小コイル磁気刺激法は従来の電磁気刺激法と比較し多くの利点がある。

経頭蓋電流刺激法は非侵襲に神経活動を修飾できる(Ozen et al., 2010)が、頭皮・脳組織間の距離や頭蓋骨の形状などの要因により、局所的な刺激は困難である。脳深部刺激法はミリメートルオーダーの空間分解能を持つものの(Merrill et al., 2005; Deliano et al., 2009)、電極の腐食や電極周囲でのグリア細胞の集合により、侵襲性や長期刺激において課題が残る(Polikov et al., 2005)。近年、Leeらによってシャंक幅 100  $\mu\text{m}$  の刺入型磁気刺激プローブが開発された(Lee et al., 2016)。この技術は脳深部刺激法で使われる刺入電極の代替となる可能性がある。しかし、磁気刺激プローブが損傷したときに脳に大きいダメージを与える可能性があり、行動中の動物やヒトへの臨床応用において問題となる恐れがある。本研究で提案した低侵襲性微小コイル磁気刺激法は、上記の問題を解決する新たな神経活動の修飾法である。

### 2-4-2 磁気刺激誘発活動の計測

2-3-2 節ではコイルが発する音や熱の影響について検討した。これら以外の非磁気要素、たとえば音振動による皮質への機械的な刺激については、神経活動の誘発にはメガパスカルオーダー(> 230 dB SPL)の圧力が必要である(Tyler et al., 2008)ため、本実験のコイルではほとんど影響しない。このことは、微小コイル磁気刺激法は微小コイルが生成する磁場・誘導電場によって神経活動を修飾していることを示唆している。

また、2-3-3 節では神経活動と電氣的アーティファクト成分の分離を試みた。

一般的に、磁気刺激は大きく長時間継続する電氣的アーティファクトを生成するため(Ilmoniemi and Kikić, 2009; Casula et al., 2017)、磁気刺激を与えた領域での電気生理学的計測を行うには特殊な装置構成や技術が必要があり(Mueller et al., 2014; Pashut et al., 2014)、電気生理学的計測は避けられる場合が多かった(Kozyrev et al., 2014)。そのため、大脳皮質の層構造横断的に電気生理学的計測を行った報告は本研究が初の試みであり、この技術により第 3 章で述べる磁気刺激の皮質神経回路への影響を調査することが可能となった。

### 2-4-3 微小コイル磁気刺激法の空間分解能

2-3-4 節において、脳表電極を用いて磁気刺激誘発活動が伝搬する領域を計測したところ、微小コイル磁気刺激法はミリメートルオーダー (半径 1.2–1.5 mm) の空間分解能を達成することが判明した。この分解能は刺入電極による局所電気刺激と同等(分解能：半径~1.2 mm)であり(Deliano et al., 2009)、これまで報告されている磁気刺激法の中で最小の空間分解能が達成された。

従来の磁気刺激法の欠点の一つは空間分解能がセンチメートルオーダー(1-2 cm)と高くなかったことが挙げられる(Deng et al., 2013)。そのため、従来の磁気刺激法ではマウスの脳全体に誘導電場を発生してしまい(Crowther et al., 2014)、齧歯類を用いて磁気刺激の機序解明の研究を行う上で、標的部位以外へも広く磁気刺激を与えてしまう。そのため、異なる機能を持った脳領域に広く刺激を与えてしまい、異なる脳領域間で神経活動が伝搬することで(Lakatos et al., 2007; Wylie et al., 2015)特定の脳領域を刺激した場合とは異なる様相の脳活動が観察されてしまう恐れがある。微小コイル磁気刺激法は高い空間分解能を達成するため、この問題を解決し微小脳領域における磁気刺激の影響を調べるのに適した刺激法である。

#### 2-4-4 将来展望

本研究により、サブミリメートルの微小コイルが低侵襲的に皮質神経活動を誘発できることが明らかになった。しかし、コイルが生成する誘導電場の大きさはコイルの距離に反比例して減衰するので、より侵襲性の低い経頭蓋磁気刺激では皮質活動を誘発できないと予想される。また、微小コイル磁気刺激法の空間分解能は従来の磁気刺激法と比べ大幅に向上しているものの、マウスにおいて聴覚皮質のサブ領域を選択的に刺激するには十分ではない(Tsukano et al., 2016)。これらの課題を解決するため、今後、マルチコイルアレイ(Ruohonen et al., 1999)を用いた小型磁気刺激装置を開発することで、磁気刺激強度や刺激局所性の向上を狙える。

また、本研究では皮質神経活動の誘発を確認したものの、神経疾患治療に応用するためには、今後微小コイル磁気刺激の神経疾患治療への効果について検証する必要がある。具体的には、微小コイル磁気刺激によって脳に可塑的な変化を誘導する刺激パラメータの探索や、耳鳴りモデルマウスなどの神経疾患モデル動物に対する微小コイル磁気刺激の影響の調査は今後の課題として残されている。

## 2-5 本研究のまとめ

本研究では低侵襲性の微小コイル磁気刺激法を提案し、皮質神経活動を誘発できることを示した。さらに、皮質神経活動の誘発において熱や音などの非磁気要素の影響は小さく、電氣的アーティファクトの周波数帯域をバンドパスフィルターで除去することで神経活動成分を分離できることを示した。また、微小コイル磁気刺激法の空間分解能においてはミリメートルオーダーを達成し、従来の磁気刺激法と比較し空間分解能が大きく向上した。これらの結果は、微小コイル磁気刺激法の確立が小型・携帯可能な磁気刺激装置の開発に繋がるということだけでなく、微小コイル磁気刺激法は脳の微小領域に対する磁気刺激効果を調べる上でも有用なツールとなることを示唆している。

## 3 章 微小コイル磁気刺激法の生体脳神経回路活動修飾への応用

### 3-1 背景と目的

#### 3-1-1 磁気刺激による神経修飾

電磁気刺激法は神経活動の修飾に用いられており、中でも磁気刺激法は神経科学研究(Rossini et al., 2015)から耳鳴り神経疾患治療などの臨床目的(De Ridder et al., 2004; O'Reardon et al., 2007)まで幅広く使用されている。脳に磁気刺激を与えると磁気刺激コイル直下の皮質活動は興奮または抑制されることが知られている(Hallett, 2007)。一方、磁気刺激の作用機序は明らかになっていない点が多く、これまで細胞集団レベル(Allen et al., 2007; Thut et al., 2011)、単一神経細胞レベル(Pashut et al., 2011; Pashut et al., 2014)、神経細胞の微小構造レベル(Murphy et al., 2016)で磁気刺激の作用機序の解明が試みられてきた。しかし、皮質の層構造内や層構造間における局所神経回路に磁気刺激がどのように作用するのかは明らかではない。

#### 3-1-2 大脳皮質神経回路の構造

大脳皮質は6層構造を持ち、多数の神経細胞が緻密な配線構造を形成している(図3-1)。皮質の各層は神経細胞の密度や投射様式によって解剖学的に定義され、それぞれの層は異なる機能を有すると考えられている(Allene et al., 2015)。一般的に、聴覚皮質などの感覚皮質では、末梢から送られてくる感覚信号は視床を通り、主に皮質第4層に入力され、第4層から皮質における感覚情報処理は開始される。次に、第4層の活動は第2/3層の神経細胞に伝搬し、さらに第



2/3層の活動は第5層・第6層の神経細胞に伝搬し、5層・6層から他の皮質領域に活動が出力される。感覚皮質では皮質神経回路で神経活動が伝搬する過程で感覚信号の情報処理が行われている。例えば、聴覚皮質では音の周波数情報の抽出などの情報処理が行われていると考えられている(Haeusler and Maass, 2007; O'Connell et al., 2014)。また、耳鳴りモデル動物の聴覚皮質では第1層へのシナプス入力活動が増加することが示唆されており(Stolzberg et al., 2012)、皮質神経回路における情報処理は神経疾患にも深い関りがある。そのため、磁気刺激が皮質神経回路に与える影響を解明することは磁気刺激の神経疾患治療メカニズムを解明する上でも重要である。しかし、皮質神経回路において磁気刺激誘発活動を直接計測した報告は存在せず、磁気刺激が皮質神経回路活動に与える影響は明らかになっていない。

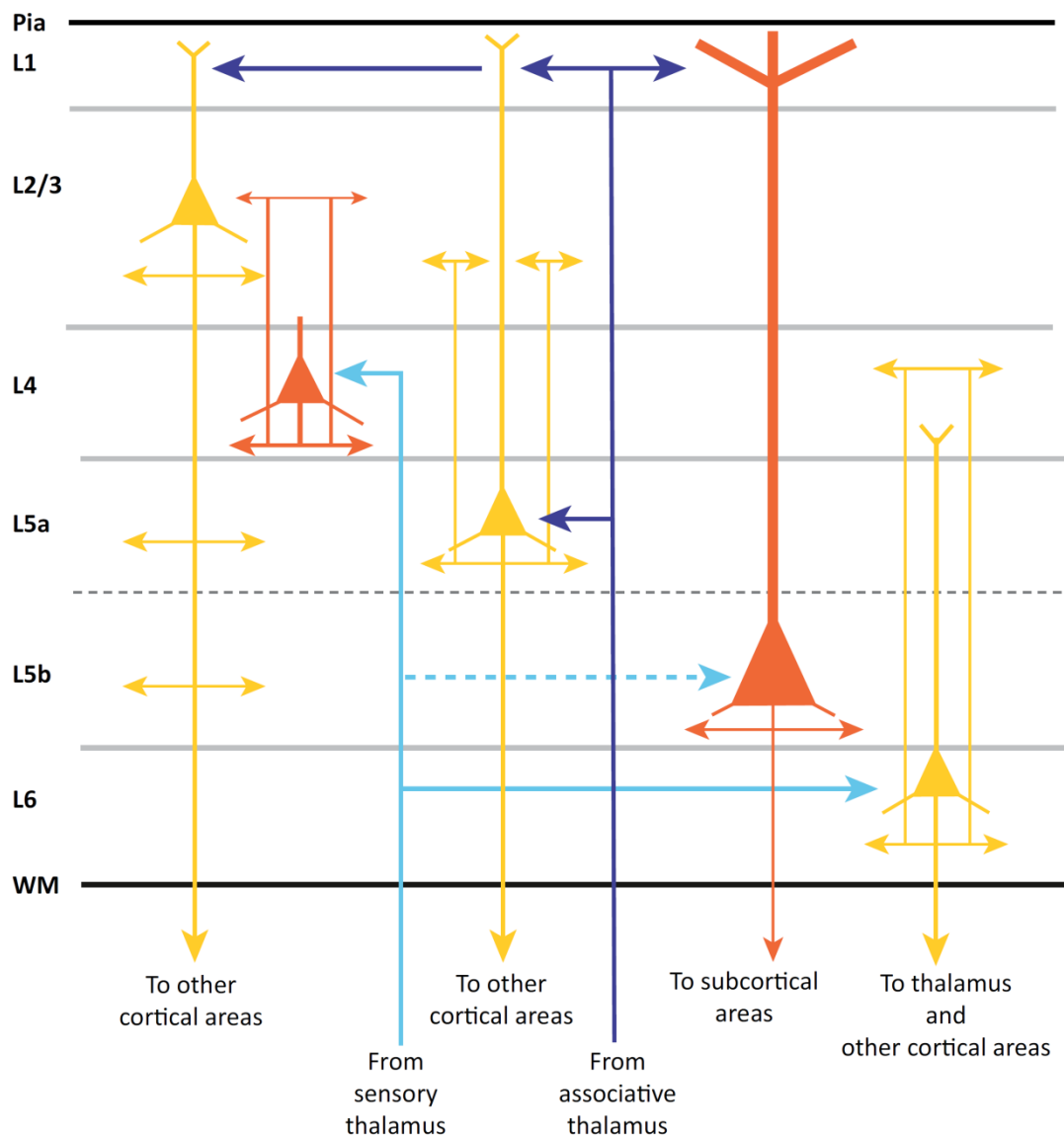


図 3-1 聴覚皮質神経回路の 6 層構造と投射様式

視床からの感覚信号は主に第 4 層に入力され、付随的に第 5 層・第 6 層にも入力される(水色)。また、異なる種類の感覚信号(視覚など)は第 1 層や第 5 層に入力する。オレンジ色の細胞(第 4 層、第 5b 層)は主に同じ皮質内(聴覚皮質内)の細胞に投射し、黄色の細胞(第 2/3 層、第 5a 層、第 6 層)は主に他の皮質領域に投射する。

Reprinted with permission from Elsevier (Allene et al., 2015)

### 3-1-3 本研究の目的

磁気刺激は電氣的アーティファクトを生じるため、磁気刺激を与えた領域での電氣生理学的計測はこれまで避けられる場合が多かった。一方、第 2 章に記述した通り、微小コイル磁気刺激法では深刻な電氣的アーティファクトを生じず、磁気刺激誘発活動の電氣生理学的計測ではバンドパスフィルターによって神経活動とアーティファクト成分とを分離することが可能である。そこで、本研究では磁気刺激の局所神経回路レベルでの作用機序の解明を目指した。ここで、磁気刺激の作用機序の解明については、感覚刺激と磁気刺激によって誘発される活動の時空間特性の類似性もしくは差異を評価することを目的とする。特に(1)磁気刺激誘発活動の層方向の伝搬様式、(2)コイル配置の磁気刺激誘発活動への影響、(3)皮質神経活動を誘発する物理パラメータの 3 つについて検証するために、磁気刺激誘発活動の電氣生理学的計測を 6 層構造全体で行った。さらに、磁気刺激の誘発活動に重要な物理パラメータを探索するために、脳内に生成される誘導電場の数値計算を行った。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 磁気刺激誘発活動の電気生理学的計測

本研究において動物実験を遂行するにあたり、北海道大学における動物実験に関する教育訓練を受け、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に定められた指針に従い実験を行った。

微小コイル磁気刺激の皮質神経回路への影響を調べるため、生後 6-10 週齢の C57BL/6J マウス (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) を 15 個体使用した(「各実験における動物使用数」参照)。微小コイルは第 2 章で使用した刺激コイルと同一のものをを用い、磁気刺激方法・フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによる聴覚皮質領域の同定方法および音刺激生成方法・電気生理学的計測方法も第 2 章 2-2 節 実験方法に記載された内容と同一の方法を用いて実験を行った。得られた電気生理学的計測データを解析するにあたり、電気的アーティファクトの除去のために 0.5-35 Hz のバンドパスフィルターを使用した(第 2 章 2-3-2 節 参照)。さらに、コイルの配置と磁気刺激誘発活動の関係性を調べるため、微小コイルの配置が異なる 2 種類の刺激コイルを作製した(Type-A coil vs. Type-B coil、図 3-2)。

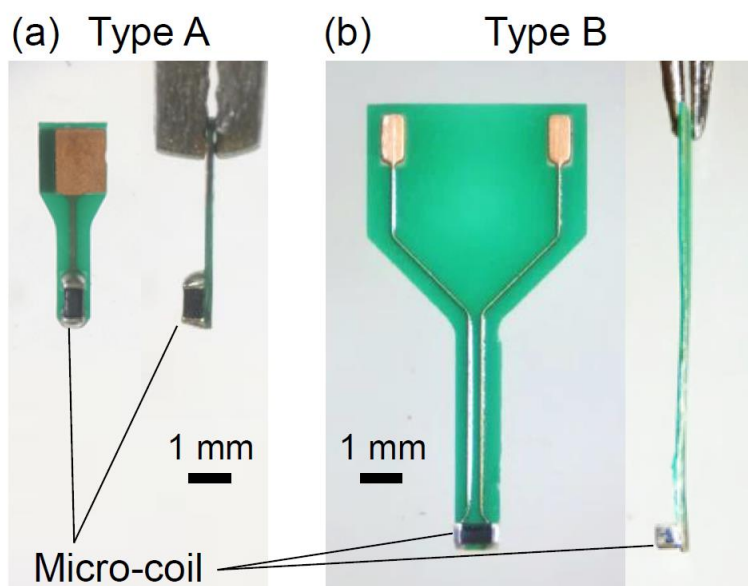


図 3-2 2 種類の刺激コイル

a, Type A coil

b, Type B coil

### 3-2-2 誘導電場・磁場の数値計算

脳内に生成される誘導電場を計算するにあたり、Python 3.4 を用いて数値計算プログラムを作成した。数値計算を行う上で、マウス脳に比較して磁気刺激に用いた微小コイルは十分に小さいため、単純化してマウスの脳平面が平坦な構造であると仮定して数値計算を行った(Tofts, 1990)。微小コイルは脳表面から 50  $\mu\text{m}$  離れた位置に配置し、コイルは ACSF の中に存在すると仮定し、脳と ACSF 間の境界条件を考慮して計算を行った。この条件において、誘導電場は次の式のように 1 次電場  $\vec{E}_p$  と 2 次電場  $\vec{E}_s$  の合計によって計算される。

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_p(\vec{r}, t) + \vec{E}_s(\vec{r}, t), \quad (12)$$

ここで、 $\vec{r}$  は座標空間における位置であり  $t$  は時間を示している。また、1次電場  $\vec{E}_p(\vec{r}, t)$  はコイルに流れる電流から直接計算され、2次電場  $\vec{E}_s(\vec{r}, t)$  は脳表面と ACSF の境界に発生する電荷分布から計算される(図 3-3) (Krieg and Mogul, 2013)。

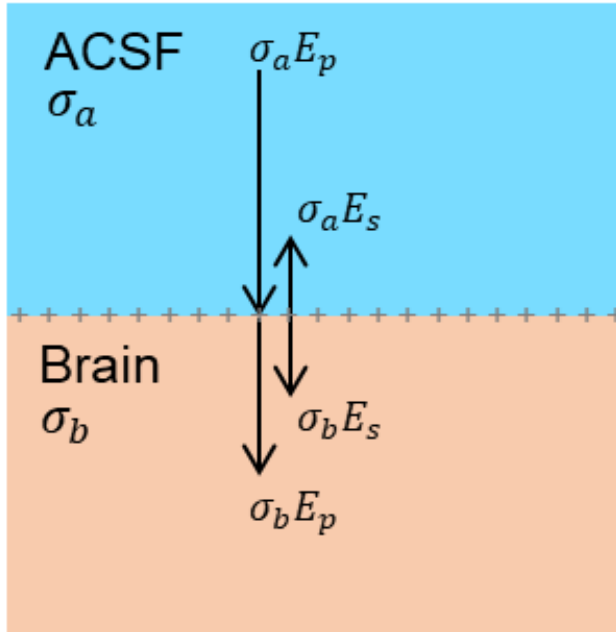


図 3-3 誘導電場の計算方法

脳表における 1次電場( $E_p$ )の分布から、境界面に発生する電荷と 2次電場( $E_s$ )の分布が決定する。

1次電場は、次の式のようにコイルが生成するベクトルポテンシャル $\vec{A}$  から計算される。

$$\vec{E}_p(\vec{r}, t) = -\frac{\partial \vec{A}(\vec{r}, t)}{\partial t}. \quad (13)$$

ベクトルポテンシャルの計算のため、まずコイルに印加した電圧 $v(t)$ からコイルに流れる電流 $i(t)$ を計算した(図 3-4)。電圧 $v(t)$ はアンプによる増幅後、オシロスコープ (GDS1062A, NF Corporation)を用いて測定した。コイル電流の計算では

単純化のために磁気刺激システムは RLC 回路と等価であると考えて計算した。コイル電流はキルヒホッフの法則から導出される 2 階微分方程式,  $R_s i(t) + L_s \frac{di(t)}{dt} + \frac{1}{C_s} \int i(t) = v(t)$ , に 2 次のルンゲ・クッタ法を用いることで計算した(図 3-4)。ここで、 $R_s = 4.2$  [ $\Omega$ , impedance],  $L_s = 3.1$  [ $\mu\text{H}$ , inductance], and  $C_s = 7.6$  [ $\text{mF}$ , capacitance]であり、この値は実験に使用した磁気刺激システムにおいて LCR メーター (ZM2371, NF Corporation)を用いて 1 V、1 kHz で測定した結果である。

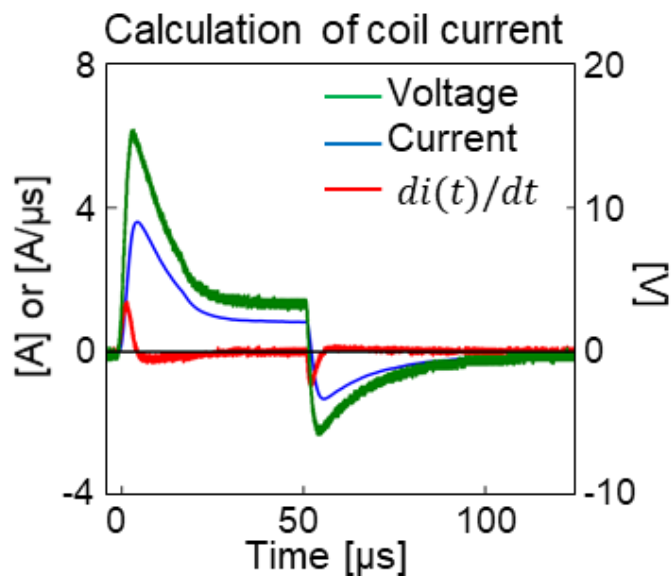


図 3-4 微小コイルに流れる電流の計算

緑：コイルに印可される電圧。青：コイルに流れる電流。赤：コイルに流れる電流の時間微分成分。

次に、準定常状態を仮定し、ビオ・サバルの法則からベクトルポテンシャルの計算を行った。ここで、単純化のために、刺激に用いた微小コイルは長さ  $l$ , 巻き数  $N$ , 半径  $a$  の有限長理想コイルとした。計算では円柱座標を考え、円柱座標

中の点 $(\rho, z)$ におけるベクトルポテンシャル $\vec{A}$  は次の式により計算される。

$$\vec{A}(\vec{r}) = \frac{\mu Ni(t)}{2\pi l} \int_0^\infty dk \frac{1}{k} J_1(k\rho) J_1(ka) f(k; z), \quad (14)$$

ここで、 $\mu$ は真空の透磁率、 $J_1$ は1次の第1種ベッセル関数であり、円柱座標でコイルの一端を $z = 0$ 、もう一端を $z = l$ に設定した時、 $f(k; z) = |e^{-k(z-l)} - e^{-kz}|$  ( $z \geq l, z < 0$ ) もしくは  $f(k; z) = 2 - e^{-k(z-l)} - e^{-kz}$  ( $0 \leq z < l$ ) である (Labinac et al., 2006)。そして、式(13)の通り、1次電場は式(14)の時間微分によって計算される。

2次電場は境界面の電荷分布から計算され、電荷分布は1次電場と脳組織-ACSF境界条件によって決定する (Krieg and Mogul, 2013)。まず、境界面における2次電場の $\nabla\varphi$ の計算を行う。ACSFと脳の導電率をそれぞれ $\sigma_b$ と $\sigma_a$ としたとき、境界条件を満たすために次の式が成立する (図 3-3):

$$\sigma_b (\vec{E}_p + \nabla\varphi) \cdot \vec{n} = \sigma_a (\vec{E}_p - \nabla\varphi) \cdot \vec{n} \quad (15)$$

ここで $\sigma_a > \sigma_b$ であり、 $\vec{n}$ は境界面に対する単位法線ベクトルである。式(13)から、この式は次のように変形できる:  $\nabla\varphi \cdot \vec{n} = \left( \frac{\sigma_a - \sigma_b}{\sigma_a + \sigma_b} \right) \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \cdot \vec{n}$  (Miranda et al., 2003)。

次に、脳内の任意の場所で2次電場を計算するため、境界面における電荷分布を計算する (Tofts, 1990)。ガウスの法則より、微小面積における電荷 $\Sigma$ は、 $\Sigma = \varepsilon_a \nabla\varphi \cdot \vec{n} dS + \varepsilon_b \nabla\varphi \cdot \vec{n} dS$ によって記述できる。ここで、 $\varepsilon_a$ と $\varepsilon_b$ はそれぞれACSFと脳の誘電率で、 $dS$ は境界面の微小面積要素である。この式を変形すると、境界面の電荷分布は $\Sigma = (\varepsilon_a + \varepsilon_b) \left( \frac{\sigma_a - \sigma_b}{\sigma_a + \sigma_b} \right) \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \cdot \vec{n}$ で表される。よって、クーロンの法則より2次電場は次の式で表現される。

$$\vec{E}_s(\vec{r}, t) = \int \frac{\Sigma dS \vec{d}}{4\pi \varepsilon d^3} = \int (\varepsilon_a + \varepsilon_b) \left( \frac{\sigma_a - \sigma_b}{\sigma_a + \sigma_b} \right) \frac{\partial A_n}{\partial t} \frac{dS \vec{d}}{4\pi \varepsilon d^3} \quad (16)$$

ここで $d$ は微小面積要素 $dS$ から座標 $\vec{r}$ までの距離である。



以上より、式(12)の通り、脳内の電場は  $\vec{E}_p$  (式 (13)) と  $\vec{E}_s$  (式 (16)) の和によって計算される(図 3-5、図 3-6)。計算に使用するパラメータは次の通りである： $\mu = 4\pi \times 10^{-7}$  [H/m]， $a = 0.2235$  [mm]， $l = 0.6$  [mm]， $N = 21$  turns (Bonmassar et al., 2012)， $\sigma_a = 1.5$   $\left[\frac{S}{m}\right]$  および  $\sigma_b = 0.3$  [S/m] (Miceli et al., 2017)， $\varepsilon_a = 83$  および  $\varepsilon_b = 74$  (Voigt et al., 2011; Michel et al., 2017)。また、1次電場はコイル周囲に電流と同じ向きで生成されるため、誘導電場の水平方向の曲率は1次電場ベクトル(円方向)を脳表面に投射した形(楕円)の曲率によって計算した。加えて、コイルが生成する磁場  $\vec{B}$  はビオ・サバルの法則より次の式で計算された： $|\vec{B}| = \left| \int \frac{\mu i(t) ds \times (\vec{r} - \vec{r}_0)}{4\pi |\vec{r} - \vec{r}_0|^3} \right|$ 、ただし  $ds$  コイルの長さの微小要素である (Minusa et al., 2017)。

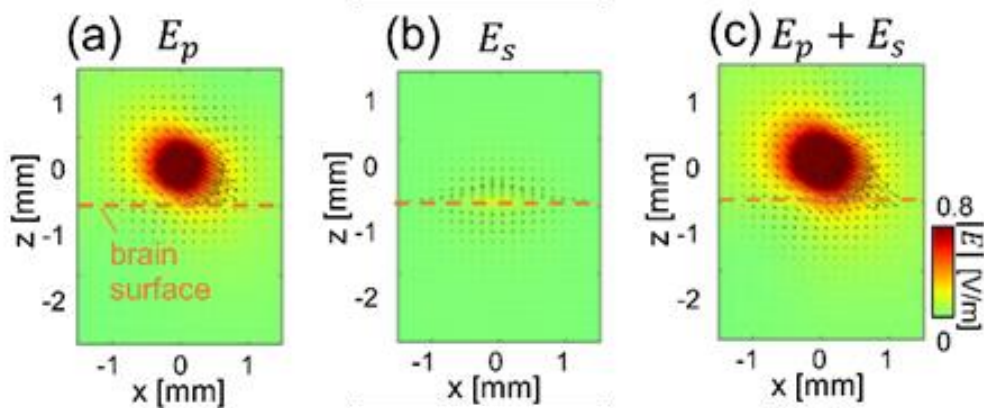


図 3-5 1次電場( $E_p$ )・2次電場( $E_s$ )とその和の  $xz$  平面における分布  
コイル中心から  $y$  軸方向に  $200 \mu\text{m}$  における電場分布を表示した。

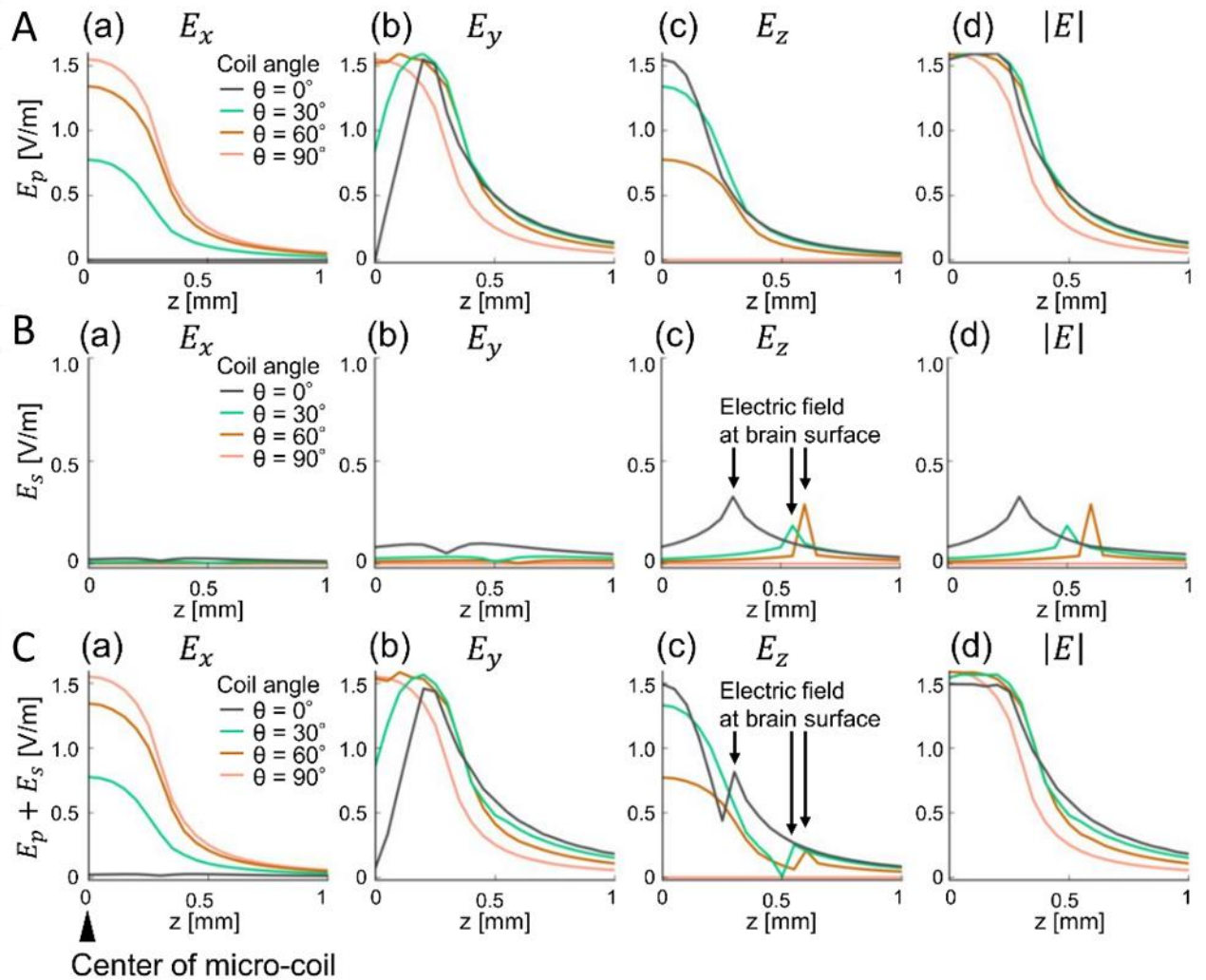


図 3-6 脳内の各深さ(z)における 1 次電場( $E_p$ )・2 次電場( $E_s$ )とその和の  $x$ ,  $y$ ,  $z$  成分の最大値

A, 脳内の各深さ(z)における 1 次電場( $E_p$ )の各成分の最大値。

B, 脳内の各深さ(z)における 2 次電場( $E_s$ )の各成分の最大値。

C, 脳内の各深さ(z)における 1 次電場と 2 次電場の和の各成分の最大値。

### 3-2-3 解析方法

磁気刺激の誘発活動の特徴を捉えるために、LFP の 3 つのパラメータ、すなわちピーク時振幅(peak amplitude), 潜時(latency), 継続時間(duration)の解析を行った。ピーク時振幅は、音刺激または磁気刺激後の 0–100ms 間の LFP の最大振幅によって決定した。潜時は LFP が音または磁気刺激後 0–200ms 以内に最大振幅を示す時間として決定した。継続時間は、LFP 波形の半値全幅により決定した。さらに、LFP の層方向の分布を調べるために、ピーク時振幅を各電極で得られた最大の値により正規化した。

電場計算以外の全ての解析は MATLAB(2016a, MathWorks, USA)を用いた。p < 0.05 を有意水準とし、すべてのデータは、平均±標準誤差で表した。統計的な有意性は、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、# p < 0.001 として表した。

## 3-3 結果

### 3-3-1 磁気刺激および音刺激の誘発活動の計測

微小コイル磁気刺激が誘発する神経活動の特徴について検証するために、微小コイルを、第2章2-3-1節に記述した方法と同様に配置し、脳表から50-100  $\mu\text{m}$  離して刺激した(図2-7A)。皮質の各層における誘発活動の特徴を捉えるために、刺入型多点電極アレイを用いて聴覚皮質 AAF 領域の音刺激誘発活動 (80 dB SPL のクリック音; 図3-7 A) および磁気刺激の応答活動 (図3-7 B) を層横断的に計測した( $n = 6$  個体)。コイルへの入力電圧が小さいとき( $V_{\text{in}} = 1 \text{ V}$ ) は磁気刺激の誘発活動は観察されなかったが(図3-7Ba)、どの個体でも十分な強度の電圧を入力すると磁気刺激の誘発活動が観察された ( $V_{\text{in}} \geq 2 \text{ V}$ ; 図3-7Bb, c)。音刺激・磁気刺激誘 LFP に対し CSD 解析を行ったところ、音刺激・磁気刺激ともに第2/3層、第4層、第5層に類似した sink-source パターンが表れ、音刺激を用いた先行研究と同様の CSD パターン(Kaur et al., 2005; Sakata and Harris, 2009)が得られた。図3-7 C は誘発活動の CSD パターンの一例を示しており、音刺激および磁気刺激の CSD パターンの類似性を示している。次に、誘発応答活動の時空間的特徴を解析するために、LFP 波形の3つのパラメータ(ピーク時振幅、潜時、継続時間)に注目して解析を行った (図3-8)。

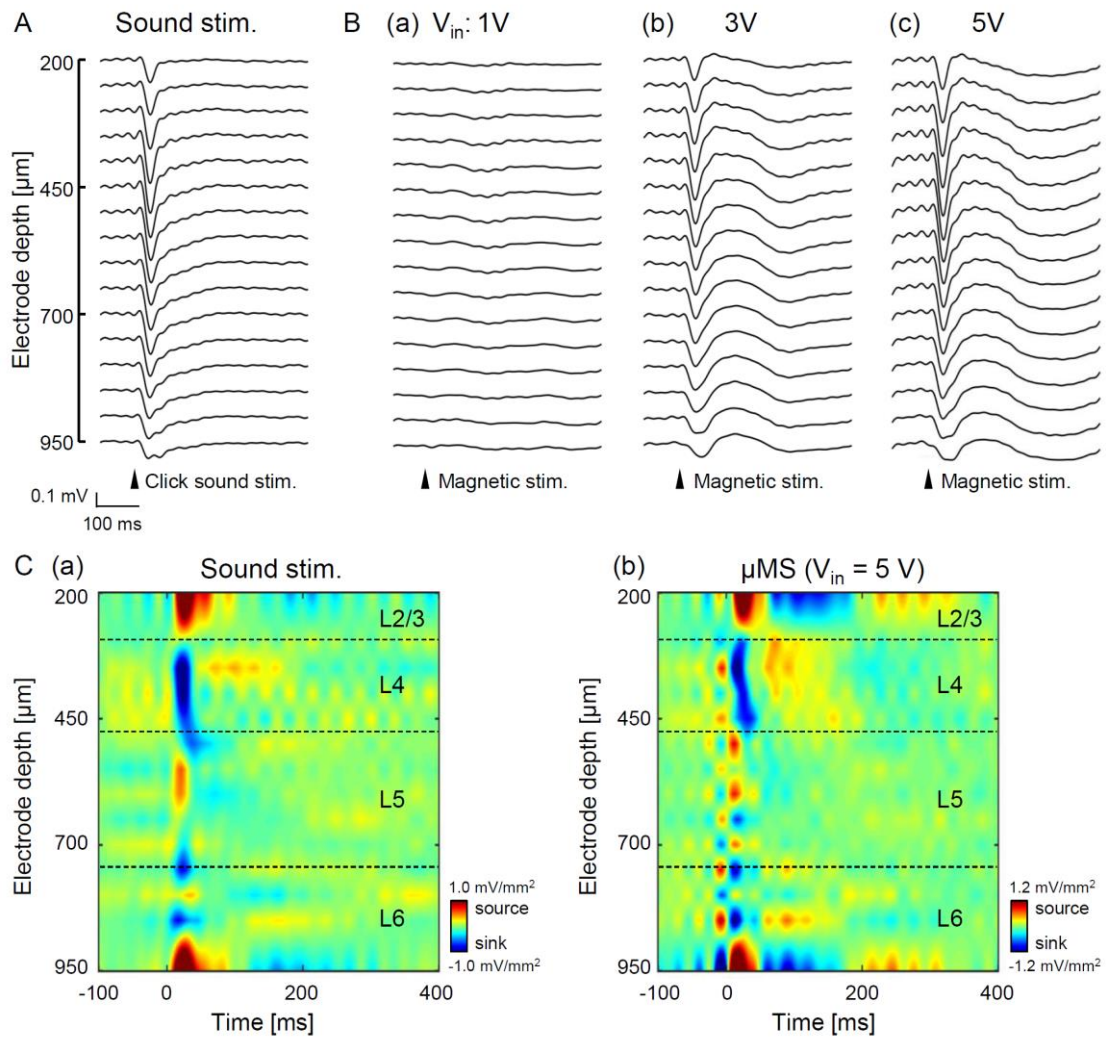


図 3-7 音刺激・微小コイル磁気刺激誘発活動の皮質 6 層からの計測

A, 音刺激誘発活動の計測。

B, 磁気刺激誘発活動の計測。Ba, Bb, Bc は入力電圧が各々 1, 3, 5 V に対応。

C, 音刺激の誘発活動(Ca)および磁気刺激の誘発活動(Cb;  $V_{in} = 5V$ )に対する CSD 解析。

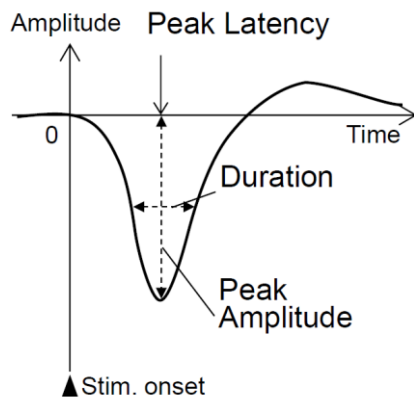


図 3-8 解析した LFP の 3 つのパラメータ : (i)ピーク時振幅, (ii) ピーク潜時, (iii) 継続時間。

### 3-3-2 磁気刺激誘発活動の空間分布

まず、磁気刺激応答活動が刺激強度によってどのような影響を受けるかについて調べた。異なる刺激強度に対する磁気刺激誘発活動を計測したところ、6 個体中 5 個体の動物で磁気刺激誘発活動の刺激強度依存性が見られた(図 3-9 A;  $p < 0.05$ , one-way ANOVA を用いて同一の電極における異なる入力電圧のデータ間で検定)。より詳細には、磁気刺激強度を大きくすると、3 個体の動物ではピーク時振幅が単調に増加し(Mouse #1, #2, #5; 図 3-9 Aa, b, e)、他の 3 個体では非単調的に増加もしくは刺激強度に依存しなかった (Mouse #3, #4, and #6; 図 3-9 Ac, d, f)。各動物の結果を平均すると、磁気刺激強度の増加に従ってより大きい LFP 応答を示す傾向が観察された(図 3-9 B;  $p = 0.044$ ,  $p = 0.047$ ,  $p = 0.0049$ ,  $p = 0.0034$ , それぞれ  $V_{in} = 2-2.5 \text{ V vs. } 4-4.5 \text{ V}$ ,  $2-2.5 \text{ V vs. } 5 \text{ V}$ ,  $3-3.5 \text{ V vs. } 4-4.5 \text{ V}$ , and  $3-3.5 \text{ V vs. } 5 \text{ V}$  に対応、, one-way ANOVA 後に Tukey-Kramer 補正を使った t-test)。

次に、磁気刺激応答活動が皮質各層でどのように異なるかを調べるため、ピーク時振幅を各電極における最大の値を用いて正規化し、正規化後のピーク時

振幅の層方向の分布に注目した(図 3-9 C, D)。磁気刺激誘発活動の正規化後のピーク時振幅の分布は、磁気刺激強度に関わらず音刺激と類似しており、どちらの刺激でも全ての個体で第 4 層もしくは第 5 層で最大のピーク時振幅を示した(図 3-9 C, 表 3-1;  $p < 0.05$ , one-way ANOVA)。また、磁気刺激と音刺激の誘発活動の分布は、1 個体(Mouse #3)を除いて各個体で強い相関関係を示した(図 3-9 C;  $r > 0.78$ ,  $p < 0.001$ , Pearson's correlation coefficients and test)。全ての個体の平均では、音刺激誘発活動のピーク時振幅は第 2/3 層・第 6 層よりも第 4 層・第 5 層の方が大きかった (図 3-9D; 正規化後のピーク時振幅:  $0.33 \pm 0.08$  (第 2/3 層),  $0.82 \pm 0.04$  (第 4 層),  $0.77 \pm 0.05$  (第 5 層),  $0.52 \pm 0.05$  (第 6 層); 第 2/3 層 vs. 第 4 層:  $p = 0.0001$ , 第 2/3 層 vs. 第 5 層:  $p = 0.0004$ , 第 4 層 vs. 第 6 層:  $p = 0.0268$ , Tukey-Kramer test)。磁気刺激においても同様に、誘発活動のピーク時振幅は第 2/3 層・第 6 層よりも第 4 層・第 5 層の方が大きかった(図 3-9 D; 正規化後のピーク時振幅:  $0.37 \pm 0.08$  (第 2/3 層),  $0.84 \pm 0.04$  (第 4 層),  $0.69 \pm 0.08$  (第 5 層), and  $0.46 \pm 0.09$  (第 6 層); 第 2/3 層 vs. 第 4 層:  $p = 0.0019$ , 第 2/3 層 vs. 第 5 層:  $p = 0.0377$ , 第 4 層 vs. 第 6 層:  $p = 0.0236$ , Tukey-Kramer test)。以上の結果より、磁気刺激の誘発活動の大きさは刺激強度に依存するものの、誘発活動の分布様式は刺激強度に関わらず音刺激の誘発活動の分布様式に類似していた。

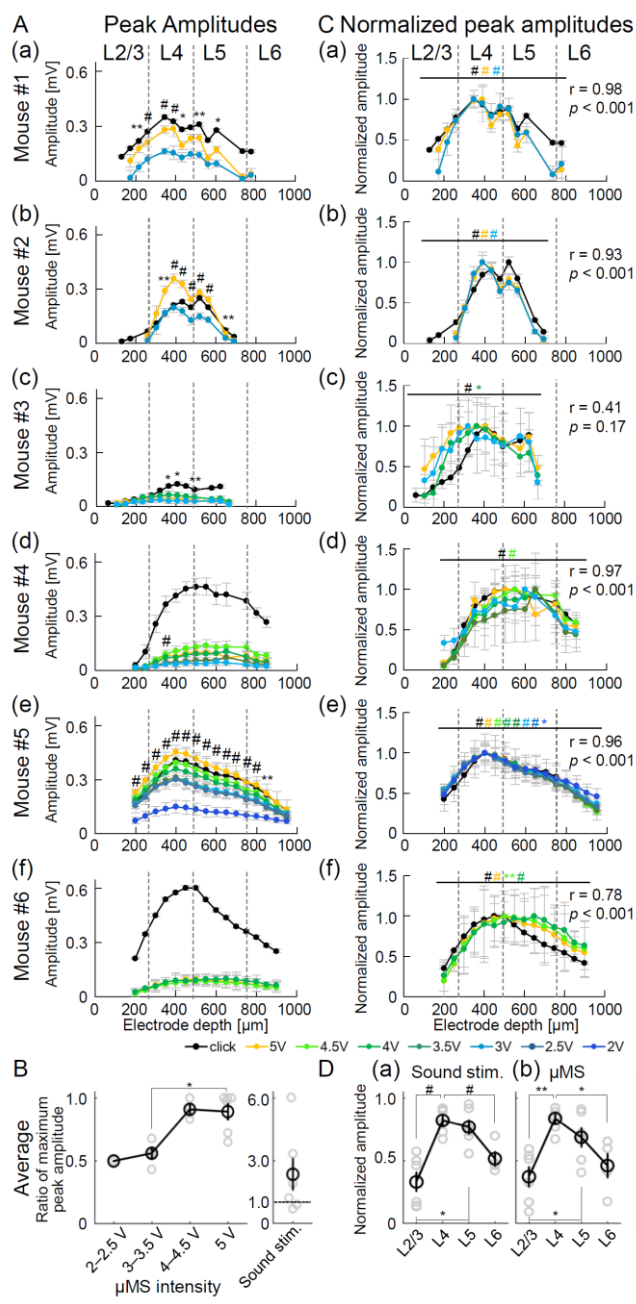


図 3-9 磁気刺激誘発活動の空間分布

A, peak amplitude の分布。

B, 誘発活動の大きさの磁気刺激強度依存性。

C, 正規化後の peak amplitude の分布。

D, 音刺激および磁気刺激の誘発活動の空間分布の類似性。

\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , #  $p < 0.001$



表 3-1 図 3-5 C の ANOVA 検定結果

Stimulation type		$\mu$ MS									Sound stim.
Intensity in V/dB SPL		$V_{in} = 1$	$V_{in} = 1.5$	$V_{in} = 2$	$V_{in} = 2.5$	$V_{in} = 3$	$V_{in} = 3.5$	$V_{in} = 4$	$V_{in} = 4.5$	$V_{in} = 5$	80
Mouse #1	df					11				11	12
	F	NR	n/a	n/a	n/a	5.19	n/a	n/a	n/a	21.12	37.34
	<i>p</i>					<0.001				<0.001	<0.001
Mouse #2	df					9				9	11
	F	NR	n/a	n/a	n/a	33.82	n/a	n/a	n/a	68.6	61.15
	<i>p</i>					<0.001				<0.001	<0.001
Mouse #3	df					12		12		12	13
	F	NR	n/a	NR	n/a	0.25	n/a	2.11	n/a	1.71	42.07
	<i>p</i>					0.99		0.016		0.063	<0.001
Mouse #4	df					12	12	12	12	12	12
	F	NR	NR	NR	NR	0.36	0.43	0.93	2.83	1.31	9.91
	<i>p</i>					0.978	0.954	0.519	<0.001	0.208	<0.001
Mouse #5	df			15	15	15	15	15	15	15	15
	F	NR	NR	1.88	11.39	8.22	8.58	11.34	18.28	16.87	6.62
	<i>p</i>			0.022	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Mouse #6	df							15	15	15	15
	F	NR	NR	NR	NR	NR	NR	2.69	2.41	4.07	175.49
	<i>p</i>							<0.001	0.002	<0.001	<0.001

NR : no responsive activity

### 3-3-3 磁気刺激誘発活動の時間変化

次に、磁気刺激誘発活動波形の時間的特徴を捉えるため、LFP 波形の潜時および継続時間を解析した(図 3-10)。異なる磁気刺激強度に対する誘発活動について調べたところ、刺激強度と潜時・継続時間の間に一定の傾向は見られなかった。具体的には、Mouse #5 の場合では皮質各層で潜時に刺激強度依存性が観察されたが、他の 5 個体の動物には刺激強度依存性は見られなかった (図 3-10)。動物全体での潜時の平均は、第 2/3 層で  $31.9 \pm 2.6$  ms、第 4 層で  $31.8 \pm 2.3$  ms、第 5 層で  $31.9 \pm 0.8$  ms、第 6 層で  $31.4 \pm 1.0$  ms であった(図 3-10A)。また、継続時間の平均は第 2/3 層で  $34.5 \pm 4.2$  ms、第 4 層で  $41.5 \pm 5.1$  ms、第 5 層で  $42.0 \pm 5.7$  ms、第 6 層で  $42.2 \pm 8.8$  ms であり(図 3-10C)、各動物個体の潜時と継続時間の平均値に刺激強度依存性は見られなかった(図 3-10B, D; 潜時:  $p = 0.957$ ,  $df = 3$ ,  $F = 0.1$ , one-way ANOVA; 継続時間:  $p = 0.714$ ,  $df = 3$ ,  $F = 0.46$ , one-way ANOVA)。

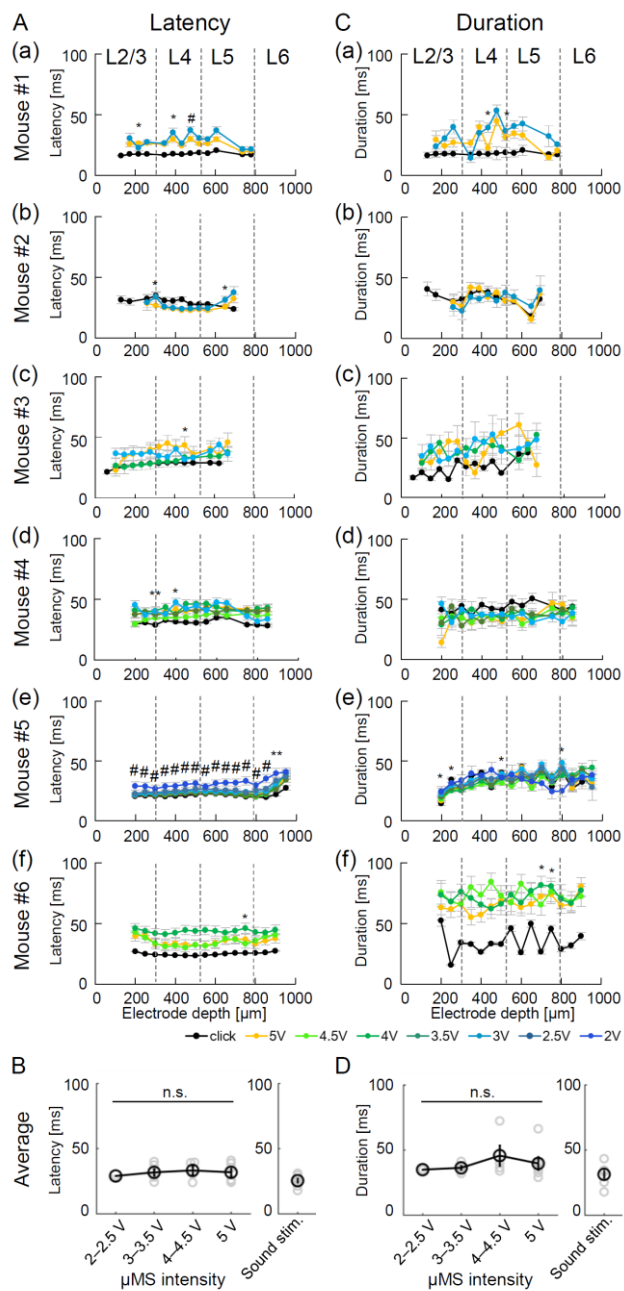


図 3-10 磁気刺激誘発活動の時間的特性

A, 磁気刺激誘発活動の潜時の分布

B, 潜時の磁気刺激強度依存性。

C, 磁気刺激誘発活動の継続時間の分布

D, 継続時間の磁気刺激強度依存性。

\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , #  $p < 0.001$

次に、磁気刺激の誘発活動の時間的特性を捉えるため、磁気刺激と音刺激の誘発活動の時間変化を比較した。磁気刺激および音刺激の誘発活動を共に同一の電極を用いて記録したところ、皮質各層でそれぞれの刺激後 50 ms 間の誘発活動は類似していた (図 3-11A)。さらに、磁気刺激・音刺激誘発活動の相互相関は刺激前後 50 ms で最も高い値を示し、1 個体(Mouse #3)を除いて皮質第 4 層から第 6 層までの相互相関値は第 2/3 層よりも高い値を示した(図 3-10B)ものの、統計的には有意な差は見られなかった (図 3-11C, D; maximum correlations =  $0.42 \pm 0.04$  (第 2/3 層),  $0.66 \pm 0.07$  (第 4 層),  $0.61 \pm 0.08$  (第 5 層),  $0.70 \pm 0.11$  (第 6 層);  $p = 0.054$ ,  $df = 3$ ,  $F = 3.06$ , one-way ANOVA)。これらの解析により、磁気刺激と音刺激誘発活動の時間変化は類似することが判明した。

## Correlation between sound-stim. and $\mu$ MS

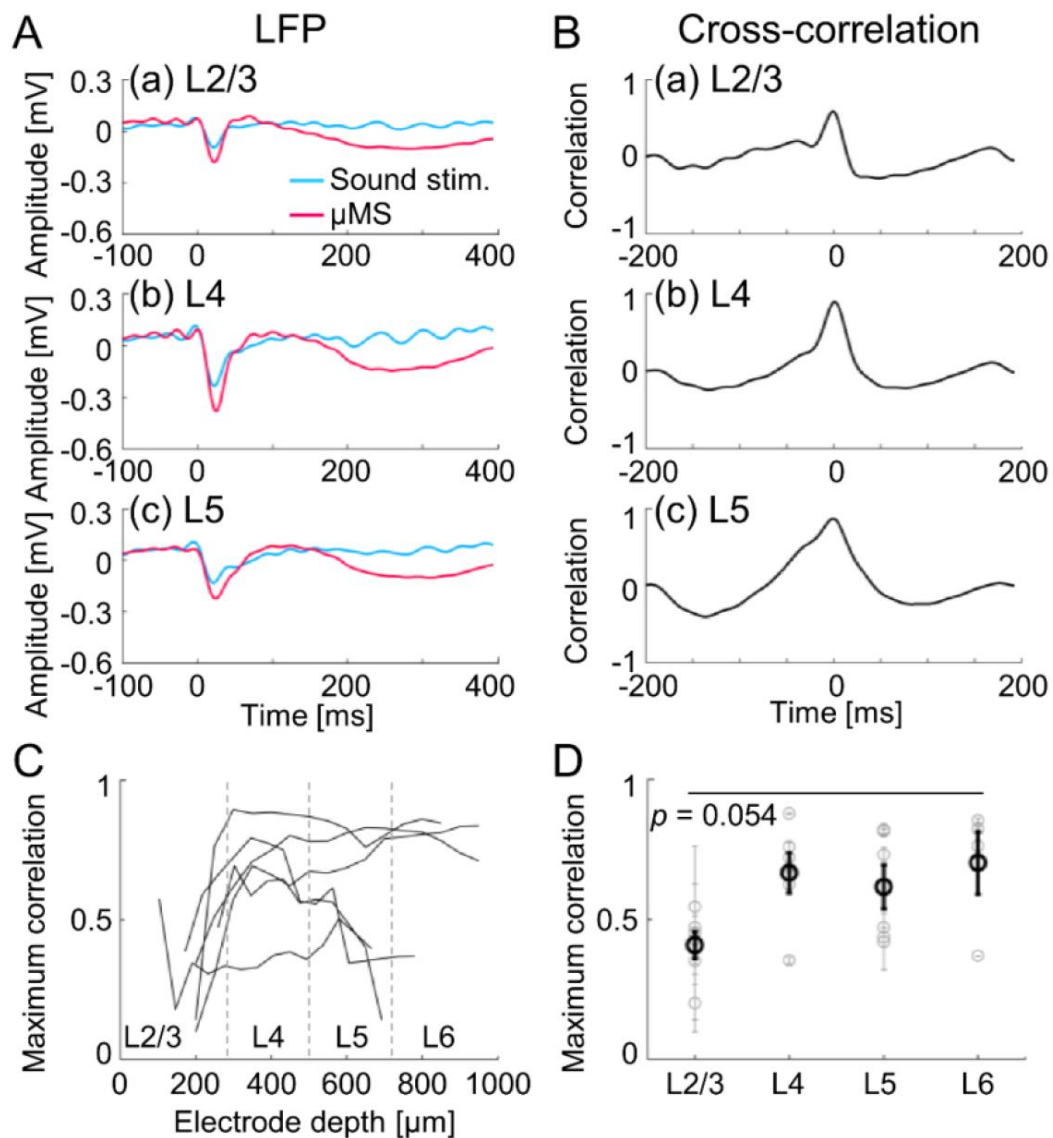


図 3-11 音刺激および磁気刺激の誘発活動の相互相関関係

A, 音刺激および磁気刺激の誘発活動の例。

B, 音刺激および磁気刺激の誘発活動の相互相関解析の例。

C, 各動物個体の音刺激・磁気刺激の誘発活動の最大相互相関の分布。

D, 皮質各層の音刺激・磁気刺激の誘発活動の最大相互相関。グレー：各個体における最大相互相関、黒：各個体の平均値

また、音刺激と磁気刺激の誘発活動の空間分布についての類似性を評価するために、各層間における誘発活動の時間的特性の相関パターンを調べた。図 3-12A は、誘発活動の各層間の相関パターンを表しており、磁気刺激・音刺激が類似した相関パターンをもつことを示している。さらに、それぞれの刺激において、各層間の最大相互相関値は似た値を示していた(図 3-12; correlations > 0.69,  $p > 0.30$ , t-test (磁気刺激-音刺激))。これらの結果は、音刺激と磁気刺激の誘発活動の空間分布は類似することを示している。

以上の結果から、磁気刺激と音刺激の誘発活動の時間特性は、特に皮質深層(第 4-第 6 層)で類似することが判明した。すなわち、磁気刺激強度は誘発活動の大きさに影響するものの時間特性には影響せず、音刺激・磁気刺激誘発活動の時間特性は特に皮質深層で類似することが判明した。

## Correlation between cortical layers

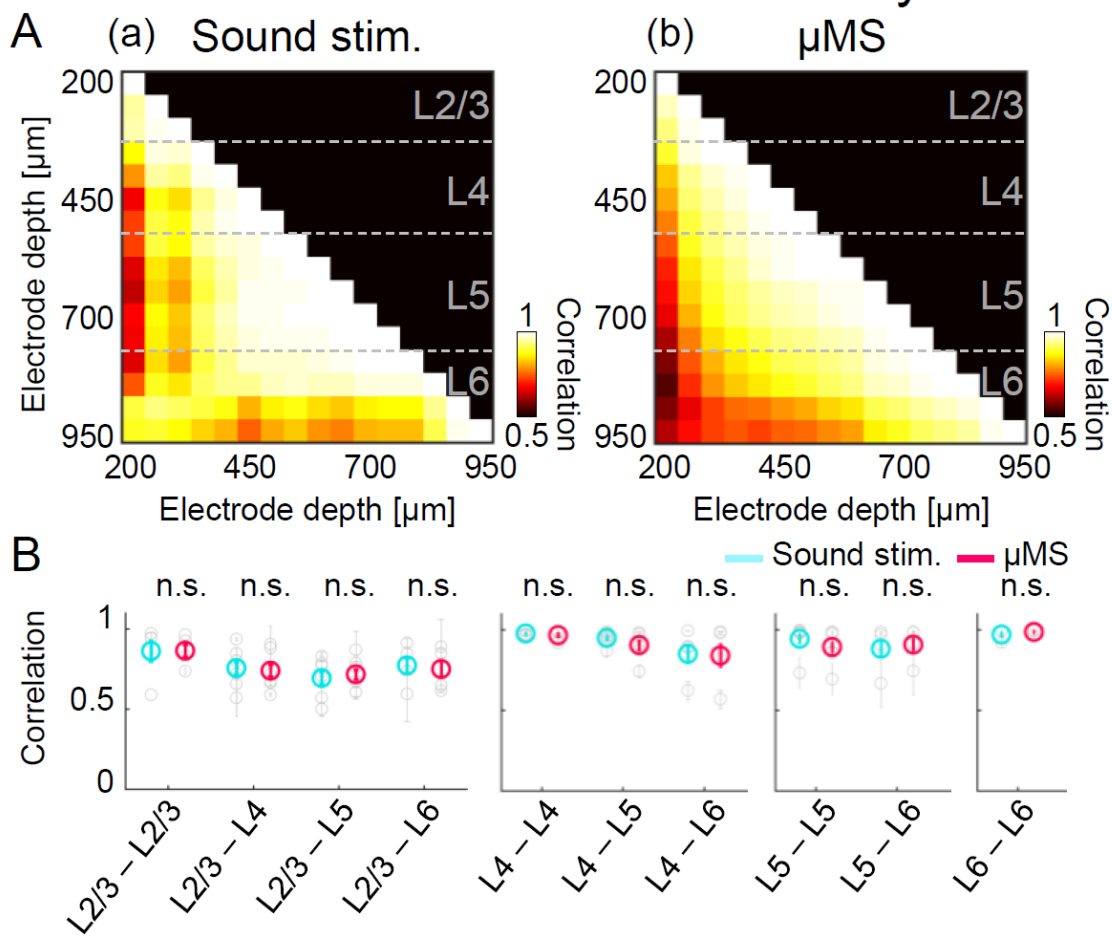


図 3-12 音刺激および磁気刺激の誘発活動の各層間の相関パターン

A, 誘発活動の各層間の相関パターン。Aa, 音刺激、Ab, 磁気刺激。

B, 音刺激および磁気刺激誘発活動における各層間の相互相関係数。 青：音刺激、赤：磁気刺激。

### 3-3-4 コイルの向きと神経誘発活動の関係

磁気刺激において、誘導電場のベクトルは神経活動の誘発に大きく影響することが示唆されている (Bonmassar et al., 2012; Lee and Fried, 2015; Lee and Fried, 2016)。そこで、微小コイルの向きと誘発活動の関係を調べるため、2種類の刺激コイルを作製した。1つは3-3-3節まで記述したコイルと同様に微小コイルをプリント基板のシャンクの長軸方向に対して平行に縦に固定したコイル (Type A coil) であり (図 3-2A)、もう1つは垂直方向にコイルを配置したコイル (Type B coil) である (図 3-2B)。

この2種類のコイルを用い、コイルの向きと神経誘発活動の関係について調べた。Type A coil は微小コイルが脳表に対して60度の向きになるように配置し (図 3-13Aa)、Type B coil は微小コイルが脳表に対して水平の向きになるように配置した (図 3-13Ba)。これまで、大脳皮質のカラムの向きの誘導電場が神経活動誘発に大きい影響を及ぼすと考えられていたことから (Amassian et al., 1992; Bikson et al., 2004; Fox et al., 2004; Rahman et al., 2013; Krieg et al., 2015)、コイルを脳表に対して水平の向きに配置したほうが誘発活動に大きく影響すると考えられる。しかし、異なるコイルの向きで磁気刺激を与えたところ、予想に反し、脳表に対して角度をつけてコイルを配置した場合には11個体中10個体で誘発活動が見られたものの (図 3-13Ab, 表 3-2)、水平方向に配置した場合には5個体中1個体も誘発活動が観察されなかった ( $p = 0.0037$ , Fisher's 2×2 exact test) (図 3-13Bb, 表 3-2)。この結果は微小コイル磁気刺激の先行研究において、コイル電流が神経細胞の axo-dendritic axis の平行に流れるときに誘発活動が最も大きく観察されたという結果に反している (Bonmassar et al., 2012; Lee and Fried, 2015; Lee and Fried, 2016)。この原因について考察を行うため、次に脳内に発生する誘導電場ベクトルの数値計算を行った。



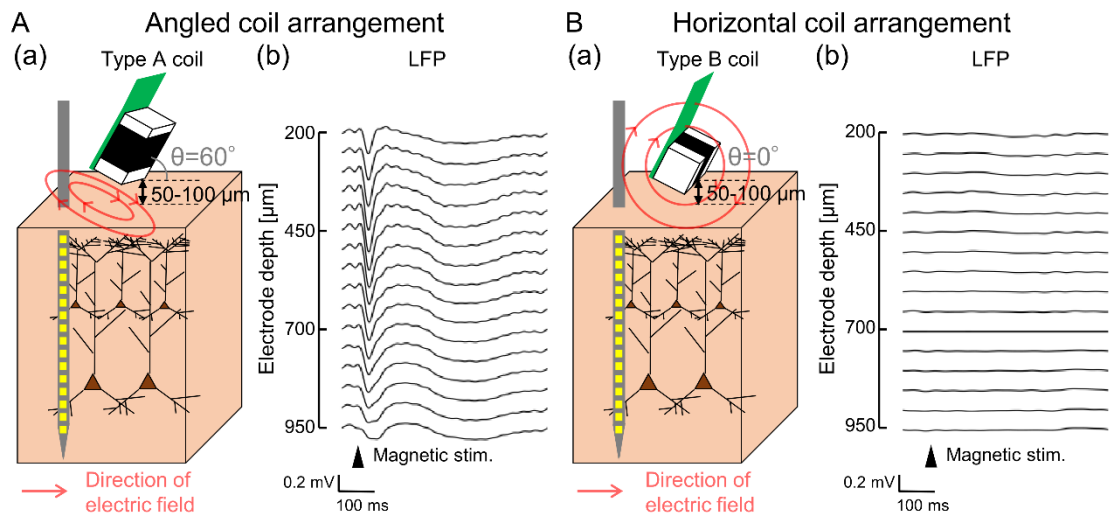


図 3-13 コイルの向きと神経誘発活動の関係

A, 脳表に対して微小コイルを  $60^\circ$  の傾きで配置した場合 (Type A coil)

B, 脳表に対して微小コイルを水平方向に配置した場合 (Type B coil)

表 3-2 コイルの向きと神経活誘発の成功率

Coil orientation in degree	Number of animals	$Z_{\max}$	Success rate in %
60	10/11	$28.8 \pm 7.8$	90.9
0	0/5	$4.2 \pm 0.3$	0

$Z_{\max}$ : 磁気刺激後 100 ms 以内における LFP の z-score の最大値 (2-2-4 節 参照)

### 3-3-5 誘導電場ベクトルの数値計算

細胞外の電場が皮質神経活動を誘発することは古くから知られていた (Roth, 1994)。皮質神経活動の誘発は電場によって膜電位の変化が引き起こされると考えられており、神経細胞に対する電場の向きが膜電位の変化に影響すると考えられている。特に、(i)神経細胞に沿った電場の空間微分成分、(ii) 神経細胞の末端や細胞体と軸索の間などのインピーダンスミスマッチが発生する場所における電場成分 (Roth and Basser, 1990; Nagarajan et al., 1993; Silva et al., 2008)、(iii)磁場成分(Lu et al., 2015) の3つの要素が皮質の興奮性に影響すると考えられている。

3-3-4 節で磁気刺激誘発活動が微小コイルの向きに依存することを観察したことから、角度をつけた配置は水平方向の配置よりも物理的な利点があると考えた。この仮説を検証するために、磁場  $B$ 、電場  $E$ 、電場の空間微分の3つの要素の数値計算を行った。電場の方向、具体的には脳表面に水平( $E_x$ 、 $E_y$ )および垂直( $E_z$ )の電場成分およびそれらの空間微分成分は、電場のノルムよりも重要であると考えられている。誘導電場の数値計算には、脳の表面から 50  $\mu\text{m}$  離れた位置で ACSF 中に配置された円柱形の微小コイルのモデルを用いた(図 3-14A)。コイルに提示される電流から時間変化する磁場および電場が計算されるが、単純化のために、最大の強度を示す時間における電場・磁場分布を解析した。

まず、微小コイルが作る磁場分布について計算したところ(Minusa et al., 2017)、コイルを水平に配置した場合の方が角度をつけて配置した場合よりも強い磁場強度が表れた(表 3-3)。角度をつけてコイルを配置した場合は水平方向の配置よりも磁場強度は小さいため、磁場強度では3-3-4 節で見られたコイルの向きの依存性を説明できないことになる。

同様に、 $x$  軸、 $y$  軸、 $z$  軸方向の電場( $E_x$ 、 $E_y$ 、 $E_z$ )および電場ノルム( $|E|$ )の皮質表層から  $200 \mu\text{m}$  における数値計算結果を図 3-14B, C および図 3-15、図 3-16、図 3-17、図 3-18 に図示した。微小コイルを皮質に対して水平方向( $\theta = 0^\circ$ )に配置すると、 $y$  軸及び $z$  軸の方向に大きい電場成分( $E_y$ 、 $E_z$ )が観察された。また、 $x$  軸に沿った電場( $E_x$ )は、 $E_y$  および  $E_z$  より小さく、電場の方向は  $y$  軸に沿って直線的であり曲率は小さい(図 3-14B、表 3-3)。一方で、微小コイルを角度をつけて配置したとき( $\theta = 60^\circ$ )、 $E_y$  および  $E_z$  は、水平方向にコイルを配置したときよりも小さかった。さらに、 $E_x$  は水平方向のコイル配置よりも大きい値が表れ、水平方向の電場成分は回転する向きを示した(図 3-14C)。

表 3-3 誘導電場の数値計算結果 ( $z = -200 \mu\text{m}$ )

Coil angle ( $\theta$ )	$B$	$E_x$	$E_y$	$E_z$	$ E $	$\partial E_x / \partial x$	$\partial E_y / \partial y$	$\partial E_z / \partial z$	Gradient norm	Curvature
Unit	mT	V/m	V/m	V/m	V/m	$\text{V/m}^2$	$\text{V/m}^2$	$\text{V/m}^2$	$\text{V/m}^2$	/mm
$0^\circ$ (Horizontal)	11.08	0.02	0.59	0.31	0.59	5.07	59.32	56.73	63.40	0.00
$30^\circ$	4.38	0.06	0.29	0.15	0.29	2.87	17.38	17.76	20.03	1.03
$60^\circ$ (Angled)	5.48	0.08	0.16	0.07	0.16	3.06	7.98	7.71	9.08	1.74
$90^\circ$	8.83	0.10	0.10	0.00	0.10	5.28	5.28	0.00	6.05	2.65

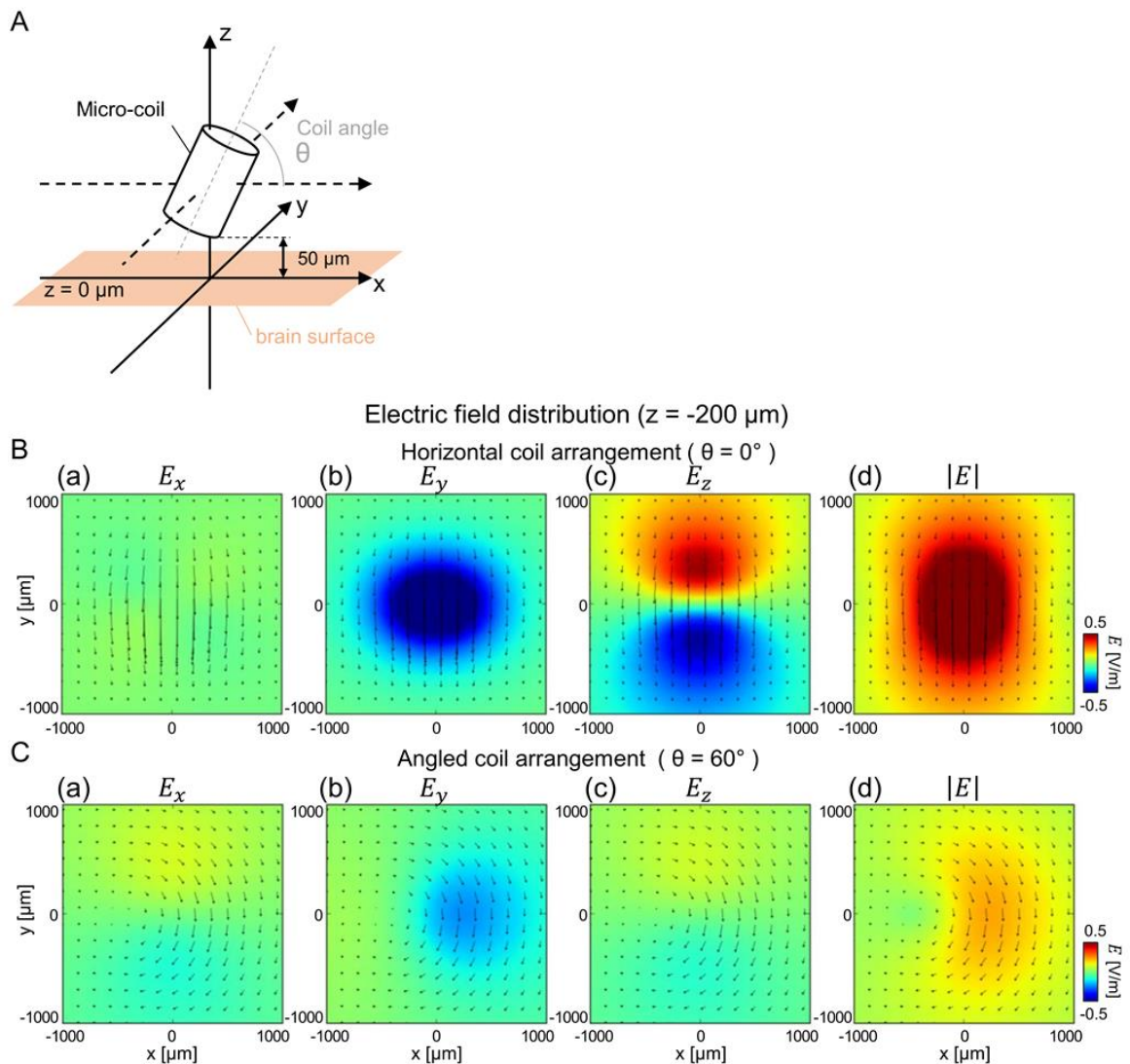


図 3-14 脳内に生成される誘導電場の数値計算

A, 微小コイルの配置。 $\theta = 0^\circ$ の場合は  $x$  軸方向(脳表に対し水平方向)、 $\theta = 90^\circ$ の場合は  $z$  軸に沿ってコイルが配置される。

B, 水平方向のコイル配置における誘導電場分布 (図 3-13B)。

C, 角度のあるコイル配置における誘導電場分布 (図 3-13A)。

B, C は脳表から  $200 \mu\text{m}$  ( $z = -200 \mu\text{m}$ )における誘導電場分布を示している。a,  $E_x$ , b,  $E_y$ , c,  $E_z$ , d,  $|E|$ 。矢印は誘導電場の  $xy$  方向の向きを示す。

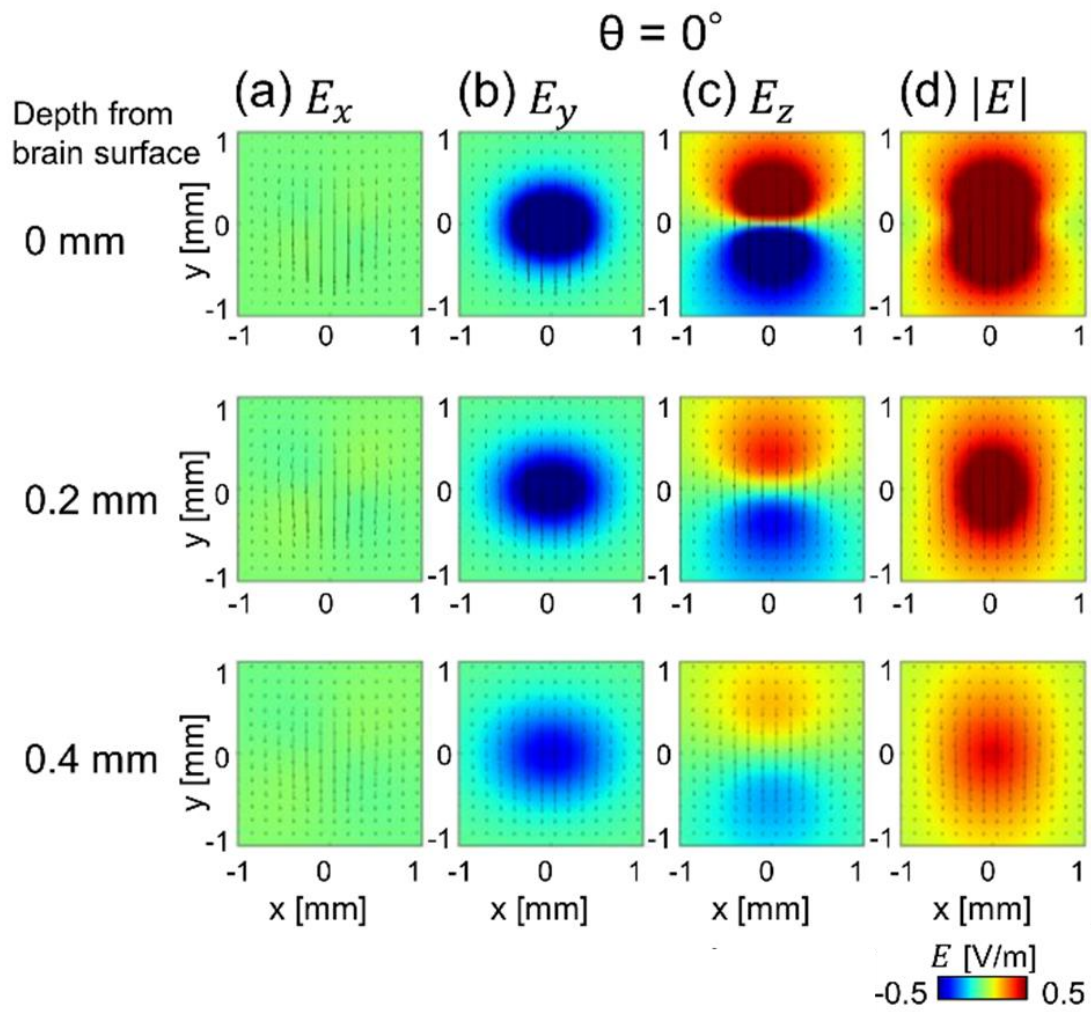


図 3-15 コイルの角度が  $\theta = 0^\circ$  (図 3-14A) のときの脳内の各深さにおける誘導電場の空間分布

a,  $E_x$ , b,  $E_y$ , c,  $E_z$ , d,  $|E|$ 。矢印は誘導電場の xy 方向の向きを示す。

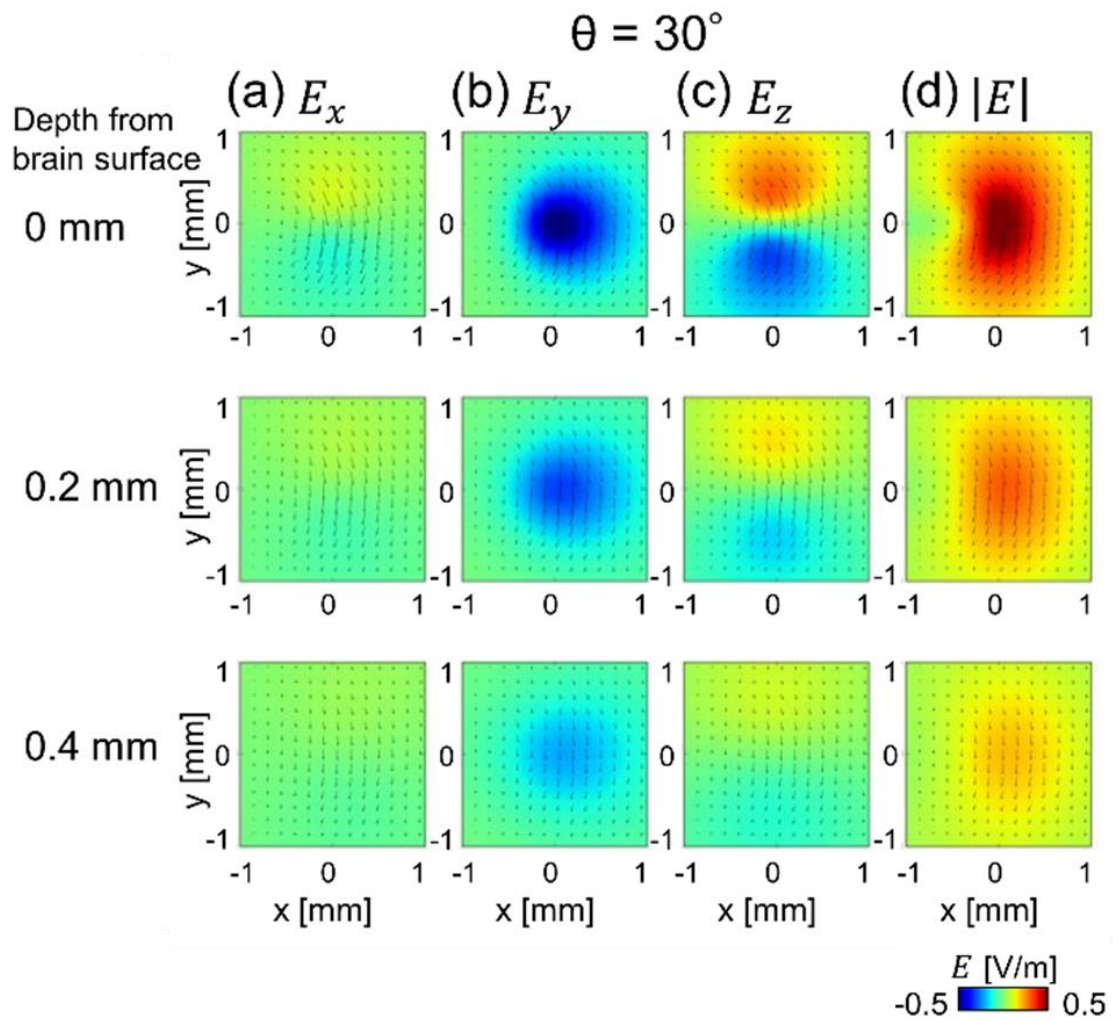


図 3-16 コイルの角度が  $\theta = 30^\circ$  (図 3-14A)のときの脳内の各深さにおける誘導電場の空間分布

a,  $E_x$ , b,  $E_y$ , c,  $E_z$ , d,  $|E|$ 。矢印は誘導電場の xy 方向の向きを示す。

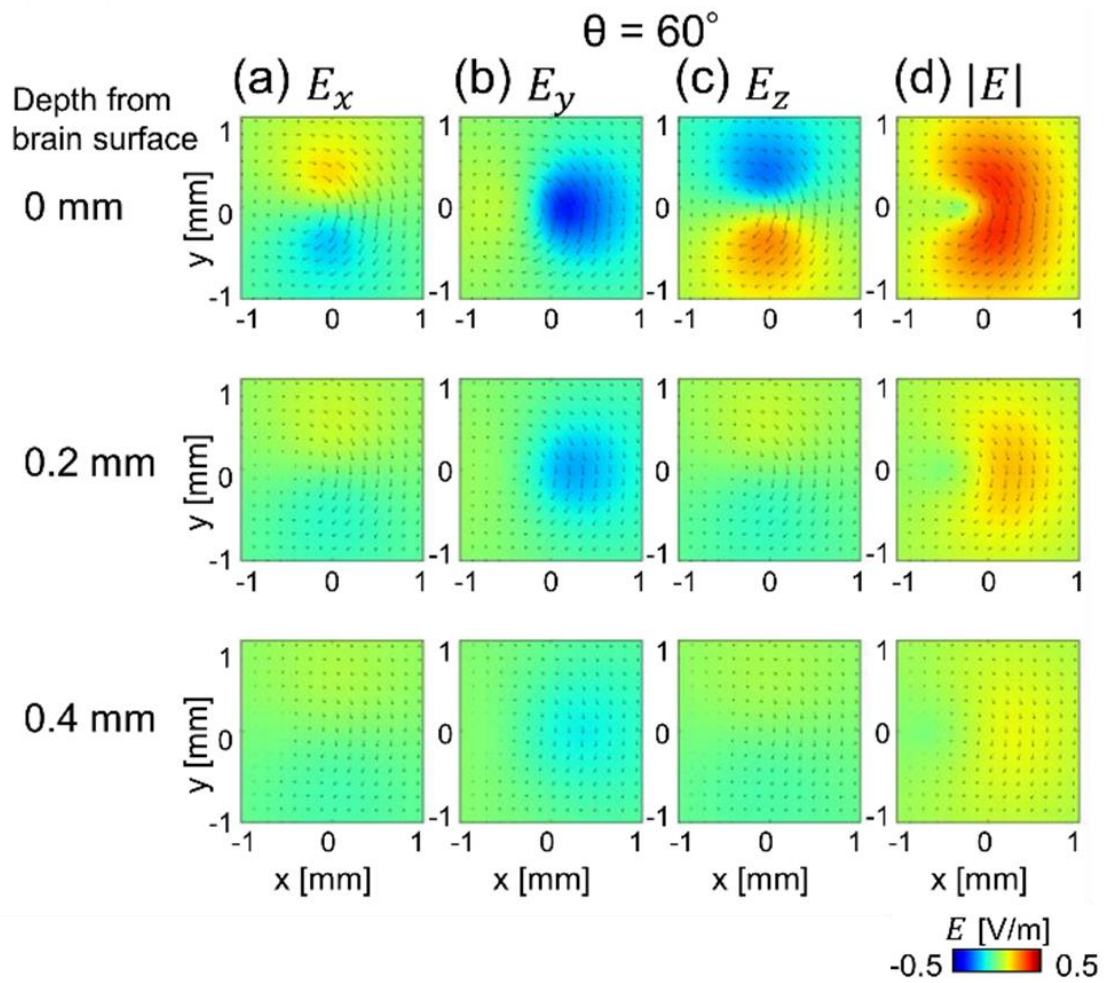


図 3-17 コイルの角度が  $\theta = 60^\circ$  (図 3-14A)のときの脳内の各深さにおける誘導電場の空間分布

a,  $E_x$ , b,  $E_y$ , c,  $E_z$ , d,  $|E|$ 。矢印は誘導電場の xy 方向の向きを示す。

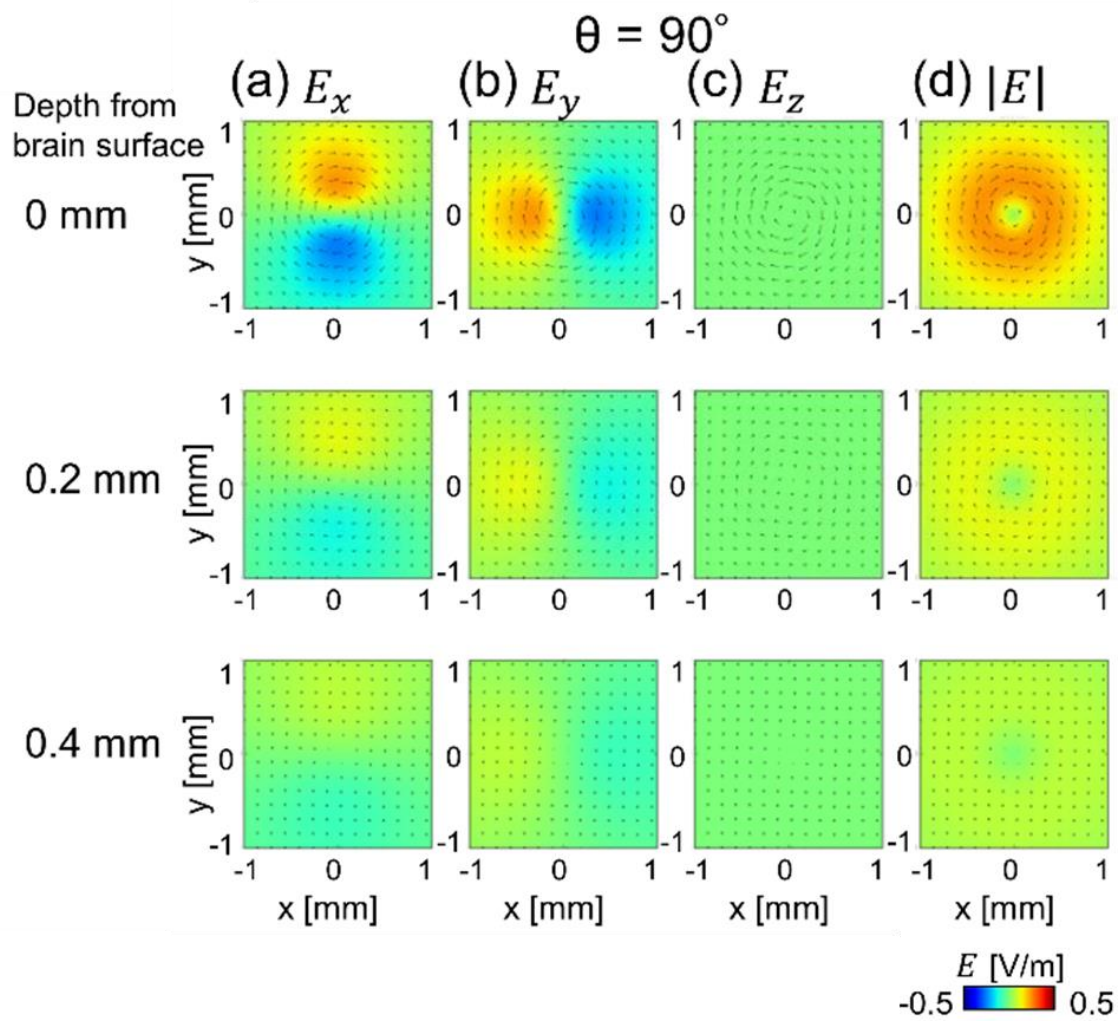


図 3-18 コイルの角度が  $\theta = 90^\circ$  (図 3-14A) のときの脳内の各深さにおける誘導電場の空間分布

a,  $E_x$ , b,  $E_y$ , c,  $E_z$ , d,  $|E|$ 。矢印は誘導電場の  $xy$  方向の向きを示す。



皮質の各深さにおける電場成分の最大値は、コイル配置に角度がある場合 ( $\theta > 0^\circ$ ) は、水平方向の配置 ( $\theta = 0^\circ$ ) における電場成分のよりも小さいため ( $E_y$ ,  $E_z$ ; 図 3-19、表 3)、電場の大きさでも磁場の数値計算結果と同様に、3-3-4 節で皮質誘発活動の見られたコイルの向きの依存性を説明できないことになる。

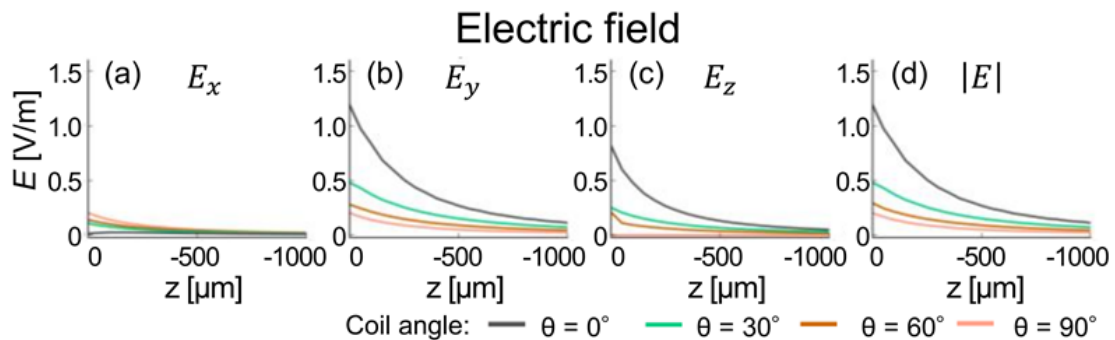


図 3-19 皮質各深さにおける最大の誘導電場強度

a,  $E_x$ , b,  $E_y$ , c,  $E_z$ , d,  $|E|$ 。

次に、電場の空間微分成分を計算し、皮質各深さにおける最大値を比較した (図 3-20)、コイルの角度が  $\theta > 0^\circ$  のときは水平方向の配置 ( $\theta = 0^\circ$ ) よりも空間微分成分は小さかった ( $\partial E_y / \partial y$ ,  $\partial E_z / \partial z$ ; 図 3-21、表 3-3)。従って、電場の空間微分成分も同様に 3-3-4 節における皮質誘発活動のコイルの向き依存性を説明できないことになる。

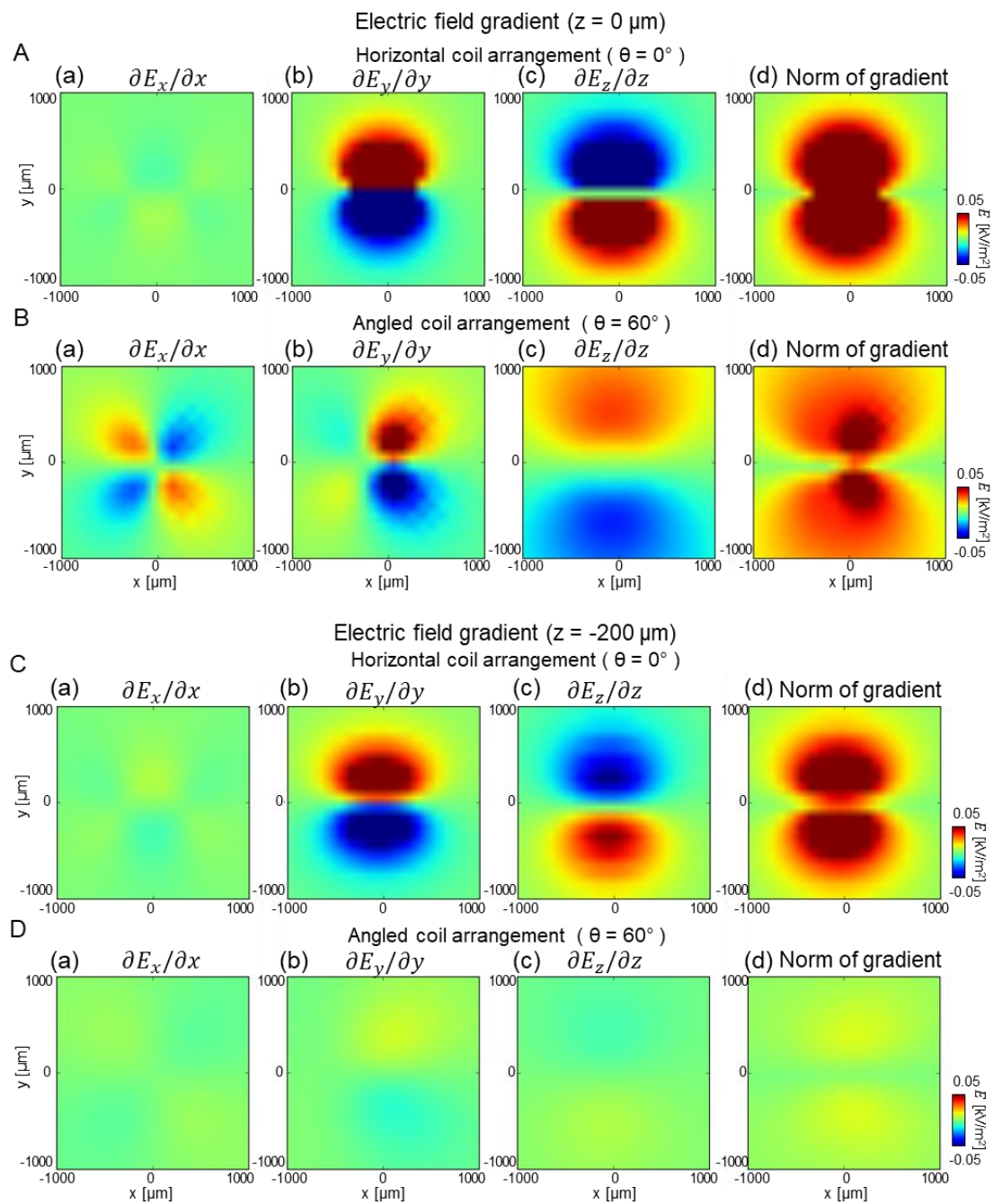


図 3-20 誘導電場の空間微分成分の分布

- A, 皮質表層( $z = 0 \mu\text{m}$ ) における誘導電場の空間微分成分 (コイルの角度:  $0^\circ$ )。
- B, 皮質表層( $z = 0 \mu\text{m}$ ) における誘導電場の空間微分成分 (コイルの角度:  $60^\circ$ )。
- C, 皮質表層から  $200 \mu\text{m}$  における誘導電場の空間微分成分 (コイルの角度:  $0^\circ$ )。
- D, 皮質表層から  $200 \mu\text{m}$  における誘導電場の空間微分成分 (コイルの角度:  $60^\circ$ )。

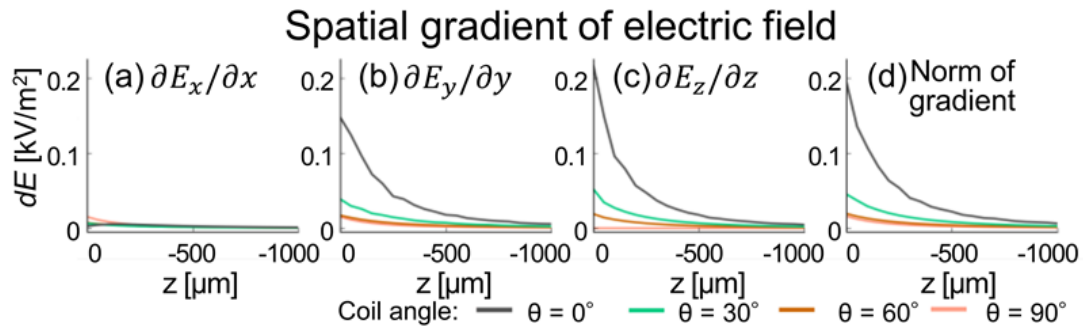


図 3-21 皮質各深さにおける誘導電場の最大の空間微分成分

a,  $E_x$ , b,  $E_y$ , c,  $E_z$ , d,  $|E|$ 。

さらに、それぞれのコイル配置における誘導電場の方向に注目した。 $\theta > 0^\circ$ のコイル配置は、水平方向に回転する方向の電場(図 3-14 B、C)を生じ、水平方向の配置( $\theta = 0^\circ$ )と比べ、より不均一な電場分布を生じる。誘導電場の水平方向成分の発散および回転は、どちらも水平方向のコイル配置( $\theta = 0^\circ$ )の方が大きかった(図 3-22)。また、脳表から  $200 \mu\text{m}$  の深さにおいて、水平方向のコイル配置( $\theta = 0^\circ$ )における誘導電場は主に  $y$  軸方向である(図 3-23Aa)。一方で、コイルの角度が  $\theta > 0^\circ$  のときは誘導電場は様々な方向を示した(図 3-23Ab)。さらに、皮質各深さにおいて電場の最大強度示した場所における水平方向の電場ベクトルの曲率は、コイルの角度が  $\theta > 0^\circ$  の時の方が大きく、水平方向のコイル配置( $\theta = 0^\circ$ )の時は曲率は  $0$  であった(図 3-23B、図 3-24、表 3-3)。以上により、脳表に対して角度をつけたコイル配置の物理的利点の一つは、水平方向に不均一な(湾曲した)電場を生成できることである。

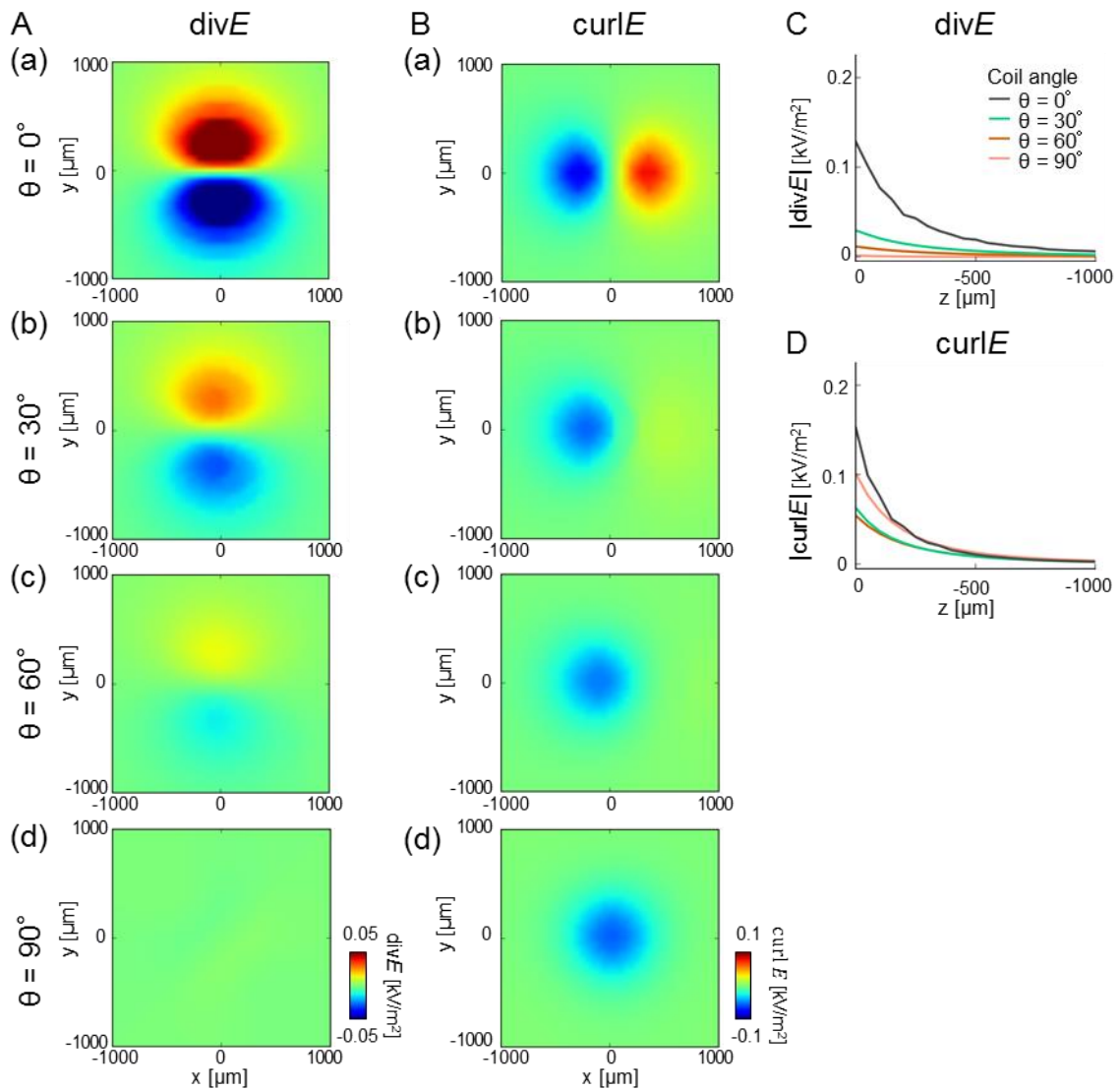


図 3-22 誘導電場の発散および回転

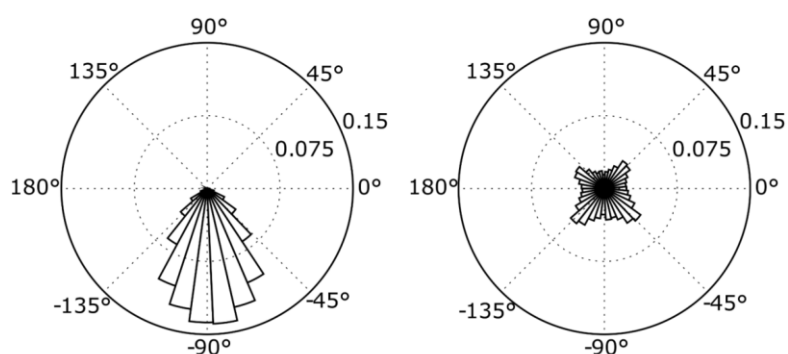
A, 誘導電場の水平方向成分の発散 ( $z = -200 \mu\text{m}$ )。Aa,  $\theta = 0^\circ$ , Ab,  $\theta = 30^\circ$ , Ac,  $\theta = 60^\circ$ , Ad,  $\theta = 90^\circ$ 。

B, 誘導電場の水平方向成分の回転 ( $z = -200 \mu\text{m}$ )。Ba,  $\theta = 0^\circ$ , Bb,  $\theta = 30^\circ$ , Bc,  $\theta = 60^\circ$ , Bd,  $\theta = 90^\circ$ 。

C, 皮質各深さにおける誘導電場の水平方向成分の最大の発散。

D, 皮質各深さにおける誘導電場の水平方向成分の最大の回転。

**A** Horizontal electric field components  
 (a) Horizontal coil ( $\theta = 0^\circ$ ) (b) Angled coil ( $\theta = 60^\circ$ )



**B** Horizontal field curvature

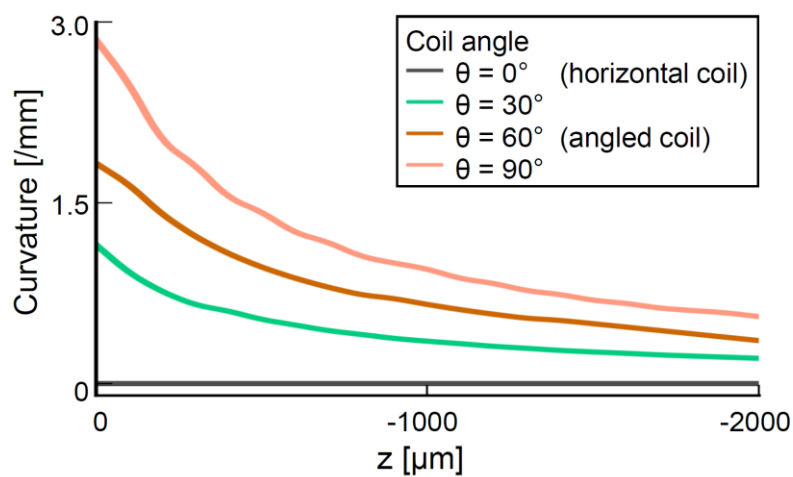


図 3-23 誘導電場の不均一性

A, 2 種類のコイル配置(Type A coil vs. Type B coil; 図 3-13)が作る誘導電場の向き  
 の円形ヒストグラム。

B, 各皮質深さで誘導電場強度が最大を示した位置における誘導電場の水平方  
 向成分の最大の曲率。

## Horizontal field curvature

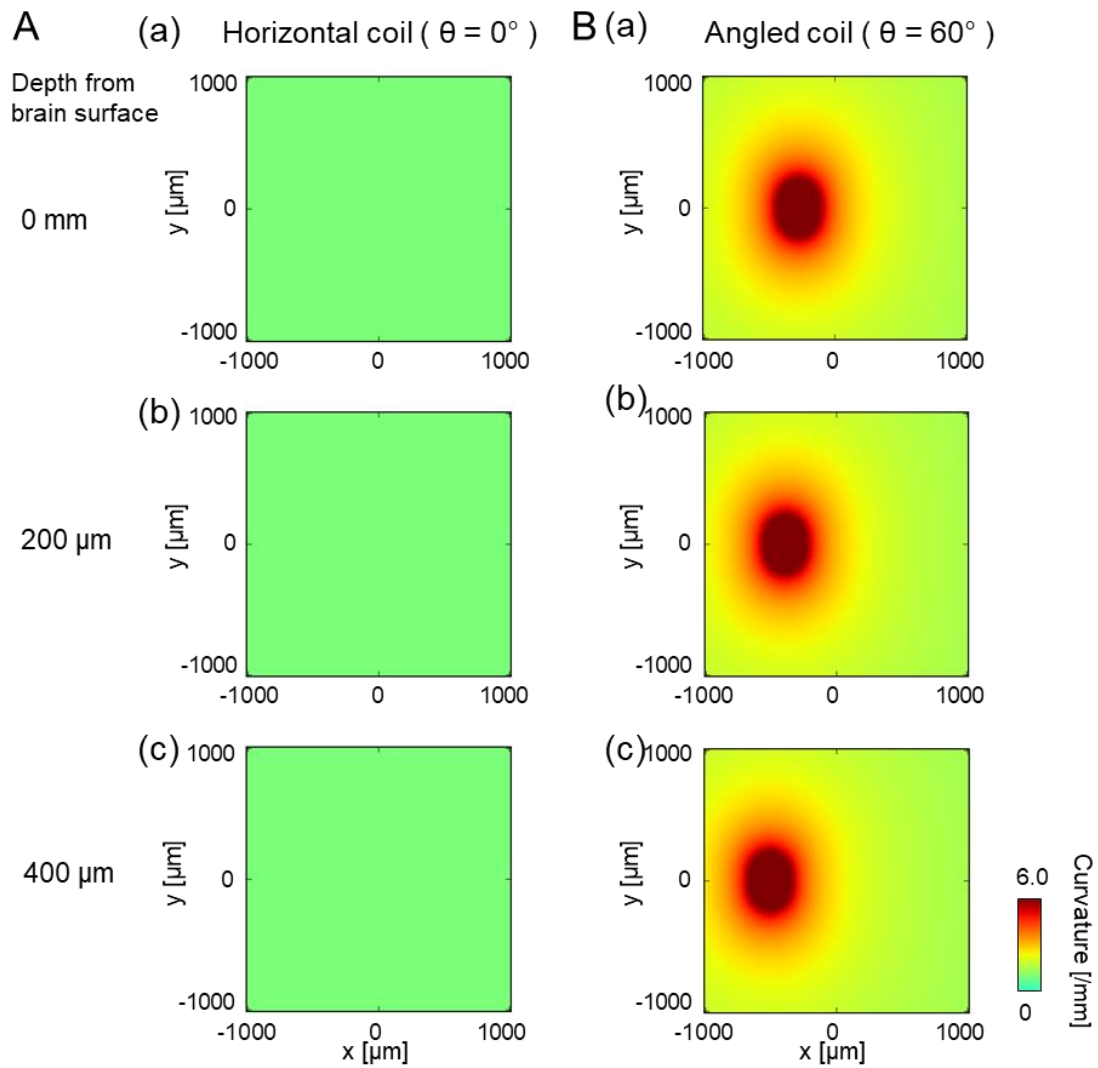


図 3-24 誘導電場の水平方向成分の曲率の分布

A, コイルの角度が  $\theta = 0^\circ$  のときの誘導電場の曲率。

B, コイルの角度が  $\theta = 60^\circ$  のときの誘導電場の曲率。

a, 皮質表層 ( $z = 0 \mu\text{m}$ ), b,  $z = -200 \mu\text{m}$ , c,  $z = -400 \mu\text{m}$ 。

### 3-3-6 不均一な誘導電場の膜電位への影響

誘導電場による神経細胞の興奮性への影響は、これまでは均一な電場の仮定の下で調べられることが多く (1-1-4 節 参照)、電場の不均一性の影響は明らかになっていない。近年、空間的に不均一な電場は、神経細胞に沿って局所的な電流源(sink/source)を生成し、均一な(直線的な)電場よりも個々の神経細胞の空間的な膜電位分布に大きな影響を及ぼすことが示唆された(Anastassiou et al., 2010)。そこで本研究では、湾曲した電場が神経細胞の興奮性に与える影響を明らかにするため、受動的ケーブルモデルを用いて湾曲した電場による膜電位への影響を調べた。

従来の受動的ケーブルモデルでは、神経細胞の膜電位の変化は神経細胞の向きに沿った誘導電場の空間微分成分によって決定する(1-1-4 節 参照)。誘導電場の空間微分成分は活性化関数(activation function)と呼ばれ、神経線維が  $x$  軸に平行して走行する場合は活性化関数は  $\frac{\partial E}{\partial x}$  で表される(図 3-25A)。そのため、空間的に均一な電場では  $\frac{\partial E}{\partial x} = 0$  となり、神経線維上に膜電位変化は誘導されない。一方、神経線維が  $\vec{r} = r(s)$  に表現される湾曲した形状をもつとき、活性化関数は次の関数に置き換えられる。

$$\frac{\partial}{\partial s} (E(r(s)) \cdot \vec{\tau}(s)) \quad (17)$$

ここで  $\vec{\tau}(s)$  は点  $s$  における神経線維の接線方向の単位ベクトルである。よって、均一な電場(電場強度:  $|E|$ )の下で神経線維が曲率半径  $r$  で円形に湾曲するとき、点  $(r, \theta)$  における活性化関数は次の式で表される(図 3-25B) (Roth and Basser, 1990)。

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \theta_r} (|E| \cos \theta_r) = -\frac{|E|}{r} \sin \theta_r \quad (18)$$

また、曲率半径  $R$  の電場(電場強度:  $|E|$ )のもとで神経線維が  $x$  軸に平行して走行するとき、点( $x, 0$ )における活性化関数は次の式で表される(図 3-25C)

$$\frac{\partial}{\partial x} (|E|\cos\theta_R) = \frac{\partial}{\partial x} \left( |E| \frac{x}{R} \right) = \frac{|E|}{R} \quad (19)$$

さらに、曲率半径  $R$  の電場(電場強度:  $|E|$ )のもとで神経線維が曲率半径  $r$  で円形に湾曲するとき、点( $r, \theta$ )における活性化関数は次の式で表される(図 3-25D)

$$\begin{aligned} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \theta_r} (|E|\cos\theta_R) &= \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \theta_r} \left( |E| \frac{x}{R} \right) = \frac{1}{rR} \frac{\partial}{\partial \theta_r} (|E|\cos\theta_r) \\ &= -\frac{|E|}{rR} \sin\theta_r \end{aligned} \quad (20)$$

式(19)、式(20)により、湾曲した電場における活性化関数は曲率( $1/R$ )に比例して増加するため、強度が一定の誘導電場のもとでは空間的に不均一な電場は均一な電場よりも神経細胞の膜電位に大きな影響を及ぼす。以上より、微小コイル磁気刺激において誘導電場の不均一性が磁気刺激の誘発応答に影響した可能性が示された。

また、樹状突起の能動性が不均一な電場による膜電位変化に影響を及ぼす可能性も考えられる。HCN (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated)チャネルは過分極状態で活性化するチャネルで、神経細胞の興奮性を調整する機能を持つ(Wahl-Schott and Biel, 2009)。HCN チャネルは、皮質錐体細胞では特に Tuft (第 1 層)に高密度に分布することが知られている(Berger et al., 2001; Harnett et al., 2015)。また、HCN チャネルの動態は時定数が 25–300 ms と遅く(Wahl-Schott and Biel, 2009)、過分極による HCN チャネルの活性化は神経細胞の興奮性を長期間上昇する(Grenier et al., 1998; Surges et al., 2006)。湾曲した電場は、個々の神経細胞上に局所的に過分極と脱分極を同時に引き起こす。そのため、湾曲した電場は神経細胞上に部分的に過分極が誘導することで、均一な電場よりも神経細胞の興奮性を上昇させる可能性が考えられる。このことを検証



するには、従来の受動的ケーブルモデルだけでなく、樹状突起上のチャネル特性も考慮に入れた能動的な樹状突起モデルが必要である。

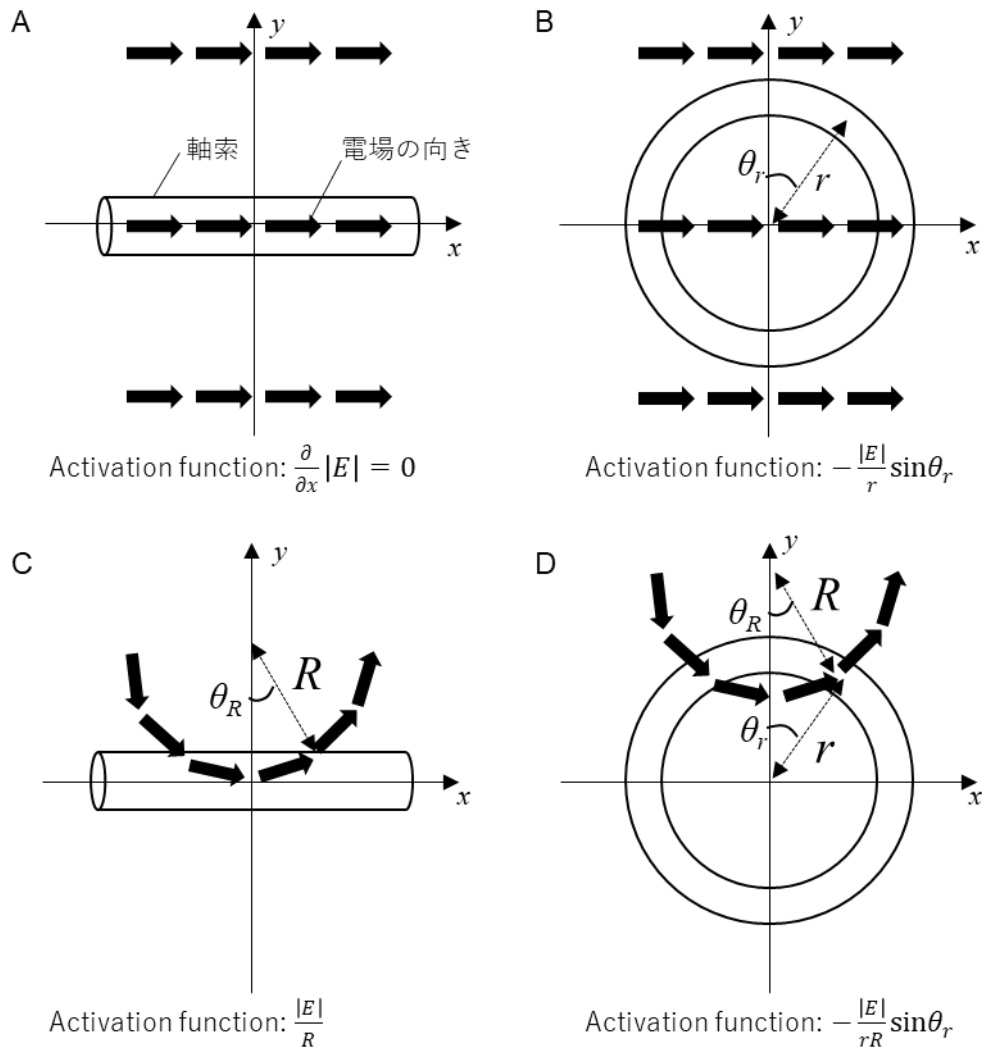


図 3-25 均一な電場と湾曲した電場による膜電位変化への影響

A, 均一な電場における直線的な神経線維上の活性化関数。

B, 均一な電場における湾曲した神経線維上の活性化関数。

C, 曲率半径  $R$  で湾曲した電場における直線的な神経線維上の活性化関数。

D, 曲率半径  $R$  で湾曲した電場における湾曲した神経線維上の活性化関数。

電場強度  $|E|$  は一定と仮定した。

### 3-4 考察

近年、低磁場を用いた磁気刺激は神経活動に影響を及ぼすことが次第に明らかになりつつある。例えば、低磁場を用いた磁気刺激によって、サイン波のような周期性のある磁場変化を脳に与えた場合は、ヒトの脳において刺激した周波数に対応する神経活動を増加させることが分かった(> 0.1 mT; Di Lazzaro et al., 2013)。また、マウスを用いた *in vivo* 実験により、低磁場を用いた反復磁気刺激は脳内の神経回路の投射様式に影響を与え、脳由来神経栄養因子 (BDNF, brain derived neurotrophic factor) の産生を増やすことも発見された (12 mT; Makowiecki et al., 2014)。さらに、マウス脳スライスを用いた *in vitro* 実験により、低磁場を用いた反復磁気刺激実験は個々の神経細胞の興奮性を変化させることが示された (85.4 mT; Tang et al., 2016a)。これらの結果に加え、弱い電場刺激(> 0.2 V/m)も神経活動を修飾することが示されている(Francis et al., 2003; Reato et al., 2010, 2013)。しかし、これまで低強度の磁気刺激パルスに対する誘発活動を直接記録した報告は存在しない。加えて、磁気刺激が脳活動にどのような影響を及ぼすかについて皮質神経回路レベルで調べた報告は本研究が初の試みであり、磁気刺激の神経回路レベルでの機序を理解するうえで重要な知見となる。

#### 3-4-1 磁気刺激の時空間特性と大脳皮質層構造モデル

##### 3-4-1-1 従来の電磁気刺激法との比較

微小コイル磁気刺激の誘発活動は、層構造全体で音誘発活動と同様の LFP および CSD パターンを示すという特徴を持つ(図 3-4)。LFP の大きさは組織の導電率などにも影響を受けるため、LFP パターンの機能的意義を直接解釈することは困難である(Herreras, 2016)が、皮質微小電気刺激などの他の刺激法における誘発活動の分布様式と比較することは可能である。本研究において、微小コ

イル磁気刺激による誘発活動は音刺激誘発活動に対して0.4-0.7の相互相関値を示し、LFPの大きさは皮質第4層が最大であった。一方、聴覚皮質における微小電気刺激は、電気刺激した層と同じ層で最大のLFP応答を示し、音刺激誘発活動との相互相関係数の値も低い( $< 0.3$ ) (Voigt et al., 2017)。また、本研究におけるCSD解析結果では、磁気刺激と音刺激ともに、第4層に明瞭なsinkが観察された。感覚信号入力がない状態における第4層のsinkは、第2-6層から4層神経細胞への皮質内投射(Kratz and Manis, 2015)によって説明することができる。一方、電気刺激法では本研究の結果とは異なり、in vitroで第2/3層に電気刺激を与えた場合は、第2/3層および第4層のsink/sourceが生成された(Yamamura et al., 2017)。さらに、微小コイル磁気刺激誘発活動は、潜時が従来のTMS研究で報告されたもの(0.2~0.5 ms, 1.3-1.5 T, 2.4-8 V/m; Mueller et al., 2014; Pashut et al., 2014)よりも長いという特徴を持つ(約32 ms; 図3-6)。本研究で観察された潜時は、先行研究において海馬スライスで弱電場刺激(約0.3 V/m)を与えた場合に、単一神経細胞の発火頻度が刺激後の数十ミリ秒後に最大を示したという結果と一致している(Francis, et al., 2003)。したがって、弱い磁気刺激は、強力な電磁気刺激と異なる作用を皮質神経回路に及ぼすことが示唆された。

#### 3-4-1-2 皮質誘発活動の局所神経回路モデル

皮質回路に対するTMSの影響は、運動誘発電位(motor evoked potential, MEP)およびEEG (electroencephalography)による脳波計測によって調べられている(Rossini et al., 2015)。これらの計測では、単一のTMSパルスに応答して連続的な神経活動の波が観測される。最も初期に現れる波はD-waveと呼ばれ、錐体細胞の直接的な活性化に由来し、約7 msの潜時を有する。D-waveの

後には I-wave と呼ばれる波が発生し、この波は 18 ms 以上の潜時をもちシナプスを介した GABA<sub>A</sub> 受容体の活動活性に由来する (Ferreri et al., 2011; Rossini et al., 2015)。I-wave は、錐体細胞層と抑制性細胞層からなる皮質微細回路モデルによって再現され、I-wave は皮質神経回路がもつ構造によって生成されることを示唆している (Esser et al., 2005; Di Lazzaro et al., 2012; Di Lazzaro et al., 2013)。本研究では、磁気刺激の誘発活動の潜時は刺激後 30~60 ms であり、ヒトにおける TMS 実験で観察された脳波の I-wave の潜時と一致する (Ferreri et al., 2011; Premoli et al., 2014)。さらに、発火活動を誘発するための刺激閾値は、電場で 57 V/m (Radman et al., 2009)、電場の空間微分成分で 11 kV/m<sup>2</sup> と報告されており (Maccabee et al., 1993)、本研究における磁気刺激よりも 2 桁大きい。このことは、微小コイル磁気刺激は皮質活動を直接誘発するのではなく、活動電位が発生しない閾値下の興奮性変調を細胞に与えることで、間接的に皮質活動を誘発することを示唆している。また、本研究で見られた磁気刺激と音刺激の誘発活動の LFP パターンの類似性は、同様の皮質神経回路の活動が誘発されたことを示唆している。したがって本研究における磁気刺激が誘発する活動の時空間特性の解析結果は、上述したモデル研究が示す通り、微小コイル磁気刺激による閾値下の興奮性活動の変化によって皮質神経回路の活動が誘発されたことを示唆している。また、先行研究において、感覚皮質では自発的活動と感覚刺激の誘発活動が同様の時間的構造を示し、皮質活動は皮質が持つ神経回路構造による制約を受けることが示唆されている (Luczak et al., 2015)。この報告と同様に、本研究の結果は、磁気刺激誘発活動は皮質神経回路の構造の制限を受けるために、感覚刺激応答活動と同様の時空間構造を持つことを示唆している。

## 3-4-2 誘導電場ベクトルと皮質誘発活動

### 3-4-2-1 皮質誘発活動の微小コイルの向き依存性

誘導電場の方向は刺激コイルの向きに依存し、TMS 研究においては皮質活動の誘発に適切なコイルの配置が調べられている(Richter et al., 2013)。本研究では微小コイルが脳表に対して角度をつけて配置されたときは磁気刺激誘発活動が見られたが、一方で脳表に水平の向きに配置した場合は誘発活動は観察されなかった。本研究では、異なる 2 つのコイルの向きのみで磁気誘発活動への影響を比較しており、微小コイル配置の条件をより細かく変えることで、神経活動の誘発により適切な位置の条件を見つけることが出来る。

### 3-4-2-2 皮質誘発活動の発生機序

磁気刺激の誘発活動がコイルの向きに依存していたことから、神経活動の誘発に影響のある物理パラメータを探索するために脳内に発生する誘導電場の数値計算を行った。従来、皮質のカラムの方向に発生する誘導電場が皮質活動の誘発に不可欠であると考えられてきた(Fox et al., 2004)。これに対し、本研究の実験および数値計算の結果は、カラム方向の電場ではなく水平方向の電場の不均一性が皮質活動に影響することを示唆している(図 3-13)。水平方向の電場は錐体細胞の分極に大きく影響しないが、脳表面に平行して走行する神経細胞は強く分極する(Rahman et al., 2013)。特に、磁気刺激ではコイル近傍の方が誘導電場強度は強くなるため、皮質上層(第 1 層や第 2 層)の方が皮質深層よりも磁気刺激による誘起電場の影響をより大きく受ける可能性がある。したがって、本研究の微小コイル磁気刺激法は、皮質上層で水平方向に走行する神経細胞(第 1/2 層の軸索や樹状突起(Winer and Prieto, 2001; Palmer et al., 2014)、介在神経細胞(Letzkus et al., 2011; Jiang et al., 2013))を刺激の標的にしていると推測される。特

に、第 1 層は従来の磁気刺激研究では刺激の標的と考えられていなかったが、近年の TMS 動物実験では、TMS によりまず第 1 層の介在神経細胞が影響を受け、その結果として第 5 層錐体細胞の活動が調節されると示唆している(Murphy et al., 2016)。したがって、本研究の微小コイル磁気刺激法では、まず水平方向の誘導電場によって皮質上層の神経細胞が影響を受け、その結果、元々生体が保有する神経回路構造に制約された活動が誘発されたと推測できる。しかし、水平方向の電場の不均質について、正確な効果を検証するためには、細胞の形態も考慮した詳細な回路網のモデリングを行う必要がある。

### 3-5 本研究のまとめ

本研究では皮質神経回路において微小コイルによる磁気刺激の応答活動の電気生理学的計測を行うことで、弱い磁気刺激がどのように皮質神経回路を駆動するのかを調査した。その結果、感覚刺激と磁気刺激によって発生する神経活動パターンは類似しており、磁気刺激によって誘発される神経活動は皮質神経回路の構造の制限を受けることが示唆された。さらに、コイルの向きと誘発活動の関係性や誘導電場の数値計算の結果から、これまで注目されてこなかった誘導電場の不均一性が、皮質活動を誘発する物理パラメータの一つとなる可能性が示された。磁気刺激の作用を神経回路レベルで観察した研究は本研究が初の試みであり、本研究の結果は、今後磁気刺激による神経疾患治療の機序解明に迫るうえで基礎的な知見になる。

## 第4章 大脳皮質神経回路における自発・音刺激誘発活動への麻酔薬の影響

### 1-1 背景と目的

#### 4-1-1 動物実験における麻酔薬

麻酔は脳の情報処理に影響を及ぼすことが知られている。しかし、実験における利便性の都合上、麻酔下の動物は未だに脳の情報処理機構の研究に広く用いられている(Alkire et al., 2008; Devonshire et al., 2010; Sellers et al., 2015)。特に、麻酔薬は聴覚皮質における周波数チューニング特性や音刺激誘発活動の発火頻度を変化させ、音刺激に対するオンセット・オフセット反応にも影響することが知られている(Astl et al., 1996; Thornton and Sharpe, 1998; Gaese and Ostwald, 2001; Qin et al., 2007; Noda and Takahashi, 2015)。そのため、聴覚皮質における情報処理を理解するためには、麻酔薬が神経活動に及ぼす影響を考慮することが必須である。しかし、使用する麻酔薬は研究者によって異なるにもかかわらず、麻酔薬の選択が聴覚皮質における音信号の情報処理にどのように影響を及ぼすのかは明らかになっていない。

#### 4-1-2 ケタミン麻酔薬と3種混合麻酔薬

ケタミンは動物実験で使用される麻酔薬の中でも最も一般的な麻酔薬の一つであり、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の阻害剤として働くことが知られている (MacDonald et al., 1987; Franks and Lieb, 1994)。ケタミンを麻酔薬として投与する場合は、通常、麻酔効果を高めるためにキシラジンやメデトミジンなどの alpha-2 adrenoceptor 促進剤と共に投与される(Meyer and Fish, 2011)。



また、ケタミンは急速な抗うつ作用を示すことから、近年ではうつ病治療薬としても注目されている (Li et al., 2010; Newport et al., 2015)。しかし、ケタミンは幻覚や依存性といった副作用を持ち、ケタミンの乱用は社会問題となっている (Newport et al., 2015)。

近年、ケタミンの中毒性を避けるため、ケタミンの代替麻酔薬としてミダゾラム・メドトミジン・ブトルファノールの混合麻酔薬である 3 種混合麻酔が齧歯類に対して使用され始めている (Kawai et al., 2011; Kirihara et al., 2016)。ミダゾラムは水溶性のベンゾジアゼピンであり、 $\gamma$ -aminobutyric acid type A ( $GABA_A$ ) 受容体活動を促進して神経活動を抑制する作用を持つ (Kohno et al., 2000; Saari et al., 2011)。また、ブトルファノールはオピオイド受容体に対する作用拮抗薬としての作用を持つ (Commiskey et al., 2005)。そのため、3 種混合麻酔はケタミンのように NMDA 受容体の阻害剤として作用しない。日本では特に、2007 年にケタミンが麻薬指定され、取り扱いが困難になったことから (Kawai et al., 2011)、ケタミンの代わりに 3 種混合麻酔薬が用いられる機会が多くなった。しかし、これまで 3 種混合麻酔下の動物で神経活動計測を行った報告は存在せず、ケタミンや他の麻酔と比較し 3 種混合麻酔が神経活動にどのような影響を及ぼすのかは明らかになっていない。

これまで、異なる麻酔薬は神経活動に異なる影響を及ぼすことが報告されてきた。ケタミンと作用機序が異なる麻酔薬、例えば  $GABA_A$  受容体の促進剤として働くペントバルビタールは、聴覚皮質における自発的活動や音刺激誘発活動にケタミンとは異なる影響を及ぼすことが知られている (Zurita et al., 1994)。このことから、ケタミンとは作用機序の異なる 3 種混合麻酔は、聴覚皮質神経活動にケタミンとは異なる影響を与えると予想される。

### 4-1-3 本研究の目的

本研究では、3種混合麻酔薬とケタミン麻酔薬の聴覚皮質神経活動への影響について比較した。具体的には、各麻酔下のラットにおける自発的活動・音刺激誘発活動の電気生理学的計測を行い、それらの特性を比較した。特に、音刺激誘発活動の比較では、特徴周波数(characteristic function, CF)、帯域幅(bandwidth, BW)、最小閾値(Minimum threshold, MT)に注目して聴覚応答特性を評価した。聴覚皮質は複数のサブ領域によって構成され、それぞれの領域は聴覚情報処理に異なる機能を有していると考えられている。中でも一次聴覚野(A1)は聴覚皮質において初期の情報処理を担う領域の一つである。本研究では一次聴覚野における麻酔薬の影響を調べるため、内因性蛍光イメージングを用いて一次聴覚野を同定した。さらに、第3章の背景に記述したように皮質層構造は感覚信号の情報処理に関わるものの、皮質の各層を区別して麻酔薬の選択の影響を調査した例はこれまで存在しない。本研究では、皮質層構造に注目しながら各麻酔条件における神経活動特性の比較を行った。

## 4-2 実験方法

### 4-2-1 手術および麻酔の維持

実験には 8–16 週齢のオスの Wistar/ST ラット (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) を 7 個体用いた。ケタミン (80 mg/kg; Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan) とキシラジン (8 mg/kg; Bayer Japan, Tokyo, Japan) の混合液、もしくはミダゾラム (2 mg/kg; Astellas Pharma, Tokyo, Japan)、メドトミジン (0.15 mg/kg; Kobayashi Kako, Fukui, Japan)、ブトルファノール (2.5 mg/kg; Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan) の混合液を腹腔内投与により麻酔を施した (Kirihara et al., 2016)。麻酔の深度は後肢反射の有無によって確認し、後肢反射が観察された場合はその度に初回麻酔投与の 4 分の 1 量の麻酔薬を投与した。

電気生理学的計測を行うために、第 2 章で述べた方法と同様の方法でラットに Open-skull 法を施した。ラットに視覚刺激が入ることを避けるため、実験中は接着剤によってラットのまぶたを閉じた状態を維持した。実験中にラット頭部を固定するため、デンタルセメントを用いてラット頭蓋骨に固定具を装着した。そして、脳浮腫を避けるためにデキサメタゾン (0.5 mg/kg; Kobayashi Kako) を筋肉注射した後、歯科用ドリルを用いて頭蓋骨と硬膜を取り除いた。頭蓋骨の除去後は実験中に脳表が乾燥することを防ぐために、脳表面を生理食塩水でカバーした。また、神経活動計測は動物の体温を平熱よりも低い温度に維持した方が安定的な計測を行えることから (Song et al., 2006; Noto et al., 2016)、実験中は温度計 (RT-30S; ESPEC, Aichi, Japan) を用いてラット直腸温を計測し、カイロを用いて体温を  $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$  に維持した。この軽い低体温状態は、出血性のショック状態に対する耐性が高くなるという利点も存在する (Iwamoto et al., 2010)。

動物の個体差の影響を低減するために、異なる麻酔下の神経活動を同一のラ

ットで計測した。具体的には、ケタミン-キシラジン麻酔 (KX)で電気生理学的計測を行った後、動物が麻酔から覚め、後肢反射が観察された時間に 3 種混合麻酔(KX-MMB)を投与し電気生理学的計測を行い、その後さらに後肢反射が観察された時間にケタミン-キシラジン麻酔を投与し (KX-MMB-KX)電気生理学的計測を行った (n = 3 個体)。同様に、まず 3 種混合麻酔(MMB)を投与し電気生理学的計測を行い、その後ケタミン-キシラジン麻酔下の条件 (MMB-KX)で電気生理学的計測を行った後、3 種混合麻酔(MMB-KX-MMB)を投与し電気生理学的計測を行った。ケタミン-キシラジン麻酔 (KX)から 3 種混合麻酔(MMB)へ、もしくは MMB から KX に麻酔を変更するときは、後肢反射が観察された場合のみ、もう一方の麻酔を上述した麻酔投与量の 4 分の 1 量で投与した。麻酔を交換する前の麻酔の影響を減らすため、新たな麻酔を投与後に 2 時間以上経過してから神経活動の電気生理学的計測を行った(図 4-1)。

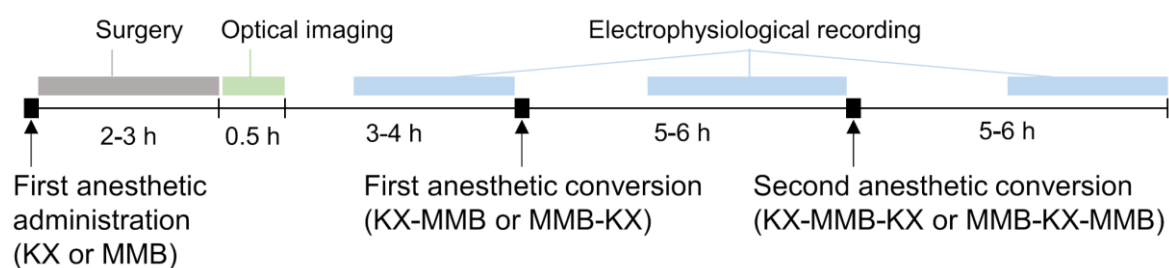


図 4-1 麻酔交換実験の流れ。

#### 4-2-2 音刺激

D/A コンバータ(NI USB-6341; National Instruments, Austin, TX, USA) を用いてサンプリング周波数 800 kHz で音刺激波形を生成し、2 Hz–100 kHz のバンドパ

スフィルター(Multifunction Filter 3611; NF Electronic Instruments, Yokohama, Japan)を通したのち、パワーアンプ (SA1; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA)を介してスピーカーに音刺激信号を送った。スピーカーは低周波用(0.5-2 kHz; MF1, Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA)・高周波用(2-64 kHz; T250D, Fostex, Chesterfield, MO, USA)の 2 種類を使用した。音刺激の音圧校正は各実験開始時に毎回行い、音圧計(Type 2636; Brüel and Kjaer, Naerum, Denmark)およびマイクロホン(Type 4939-L-002; Brüel and Kjaer)を使って校正した。それぞれの麻酔条件下における周波数応答領域(FRA, frequency response area) や時間周波数応答領域(STRF, spatiotemporal receptive field)を調べるため、音刺激は周波数が 0.5-64 kHz、8 分の 1 オクターブステップの複数の純音をランダムに出力した(音刺激継続時間: 30 ms、立ち上がり・立下り時間: 5 ms)。音刺激の音圧は 0-80 dB SPL もしくは 20-80 dB SPL で 10 dB 刻みでランダムに出力した。また、音刺激は 0.25-0.5 s のランダムな刺激間隔で出力し、それぞれの音刺激を 10 回ずつ提示した。音刺激の周波数・音圧の組み合わせは 406 種類 (音圧: 20-80 dB SPL のとき)もしくは 522 種類 (音圧: 0-80 dB SPL のとき)あり、各音刺激に対する神経応答活動の電気生理学的計測を行った。また、聴覚皮質の層構造の同定のために、クリック音を 0.3-0.45 s のランダム間隔で 100 回提示し、得られた LFP 波形から CSD 解析を行った(4-2-4 節 参照)。

#### 4-2-2 フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによる聴覚皮質領域の同定

聴覚皮質 A1 領域の場所を同定するため、第 2 章に記述した内容と同様の方法を用いてフラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを行った。異なる周波数

の純音刺激(2, 4, 8, 16, 32 kHz; 継続時間: 100 ms; 音圧: 60 dB SPL)を 5-10 s のランダムな間隔で 8 回提示し、BV\_Ana ソフトウェア(BrainVision)を用いて平均画像を取得した。取得した蛍光画像から得られた聴覚皮質のトノトピー構造や、脳表の血管走行位置を指標に聴覚皮質 A1 領域を同定した (4-3-1 節 参照)。

### 4-2-3 電気生理学的計測

電気生理学的計測は第 2 章に記述した内容と同様の方法で行った。16 チャンネル、電極間隔 50  $\mu\text{m}$  の刺入型多点電極(0.98–2.03  $\text{M}\Omega$  at 1 kHz; A1x16-5mm-50-177-A16; NeuroNexus, Ann Arbor, MI, USA)を用い、フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングの観察結果により同定した聴覚皮質 A1 領域にマイクロマニピュレーター (Narishige, Tokyo, Japan)を用いて電極を刺入した。神経活動計測には計測ソフトウェア(OmniPlex; Plexon Inc, Dallas, TX, USA)の設定で 250 倍に増幅し、300–8,000 Hz のバンドパスフィルターを通してマルチユニット活動(スパイク活動)を記録した。また、LFP は 0.1-300 Hz のバンドフィルターを通して取得した。計測時には、電源ノイズを除去するために 50 Hz のノッチフィルタを使用した。マルチユニット活動データからシングルユニットを分離するために、マルチユニット活動データにおける電位変化の標準偏差の 3 倍の電位を閾値に設定し、主成分分析を用いてスパイクソーティング(Offline Sorter; Plexon Inc.)を行った。安定した神経活動データを取得するために、刺入電極の位置を変えた場合は、電極の位置を変えた後 30 分以上経過してから神経活動を記録した。

### 4-2-4 解析方法

シングルユニット活動から FRA および STRF を導出するために、自発活動を

ベースにした z-score を用いて音刺激応答活動の特性を評価した。FRA の計算では各音刺激後 100 ms 間のスパイク数( $s$ )をカウントし、音刺激開始前の 100 ms 間のスパイク数の平均( $\bar{s}$ )と標準偏差( $\sigma$ )から z-score を算出した( $z = \frac{s-\bar{s}}{\sigma}$ )。そして、各周波数・音圧の音刺激による誘発活動の z-score を計算することで FRA を導出した。次に、特徴周波数 (CF)や最小閾値 (MT)を調べるために、求めた FRA を用いて各音圧で最大の z-score を生じる周波数を特定した。z-score が 2 以上の応答を音刺激による誘発活動とし、最小閾値は音刺激誘発活動が生じる最小の音圧として定義した。また、特徴周波数は最小閾値の音圧の音刺激を提示した時に最も大きい z-score を示す音刺激周波数として定義した。FRA の境界は、最小閾値における特徴周波数を提示したときの z-score を用いて等高線を描くことで決定した。また、帯域幅 (BW)は最小閾値より 10 dB または 30 dB 高い音圧における FRA の周波数方向の幅とし、それぞれ BW10 および BW30 として定義した。さらに、FRA の尖度は  $BW30 / BW10$  により評価した (Rutkowski et al., 2003; Noda and Takahashi, 2015)。これらの解析に加えて、音刺激の音圧と発火頻度 (z-score) の関係の単調性を評価する発火頻度-音圧レベル関数(RLF, rate-level function) (Polley et al., 2007)の解析を行った。非単調な RLF の定義は、80 dB の音刺激よりも 0-70 dB の音刺激誘発活動でより大きい z-score を示し、各音圧の音刺激のいずれかに最大 z-score よりも 20%以上の大きさの谷が RLF に表れるものとした。そして、非単調な RLF として分類されない場合は単調な RLF として分類した。

STRF の導出は、各音圧・周波数の音刺激に対する peri-stimulus histogram (PSTH)を描くことで行なった(Pienkowski and Eggermont, 2009)。PSTH の bin 幅は 2.5 ms で計算し、音刺激開始前の 50 ms 間のスパイク活動を基に z-score を計算した。STRF の境界は、最大応答の 30%の等高線を取ることで決定した。

次に、STRF の特性を評価するため応答開始潜時、ピーク潜時、継続時間を評価した。応答開始潜時、ピーク潜時、継続時間は、それぞれ z-score が最大応答の 30% を初めて超えた時間、音刺激後に最大発火頻度を示した時間、および最大発火頻度を示した周波数における STRF の時間軸方向の幅として定義した。また、音刺激誘発活動の発火頻度は STRF 中の最大発火頻度で評価した。平滑化のため、STRF および FRA には 3×3 ピクセルの空間フィルターを適用した。

また、CSD 解析を行うことで電極が皮質 6 層構造のどの深さに存在するかを推定した。CSD 解析にはクリック音の音刺激に誘発された LFP 活動波形を用い、LFP の電圧波形を電極深さ方向に空間 2 階微分を取ることで CSD パターンを計算した(Muller-Preuss and Mitzdorf, 1984; Kaur et al., 2005)。層構造の同定には sink-scoure の対のうち sink を示した位置を第 4 層の位置とした(DeFelipe et al., 2002) (図 3-1Bb)。

本研究では、7 匹のラットから 663 個のシングルユニットの神経データを分析した。シングルユニットは、KX-MMB-KX 条件では 3 匹のラットから 336 個、MMB-KX-MMB 条件では 4 匹のラットから 327 個得た。データは、平均±標準誤差(SEM)で表し、統計検定は R ソフトウェア(<http://www.r-project.org/>)を用いて one-way repeated-measures ANOVA または paired t-test を使用した。 $p < 0.05$  を統計的に有意であるとした。



## 4-3 結果

### 4-3-1 一次聴覚野および層構造の同定

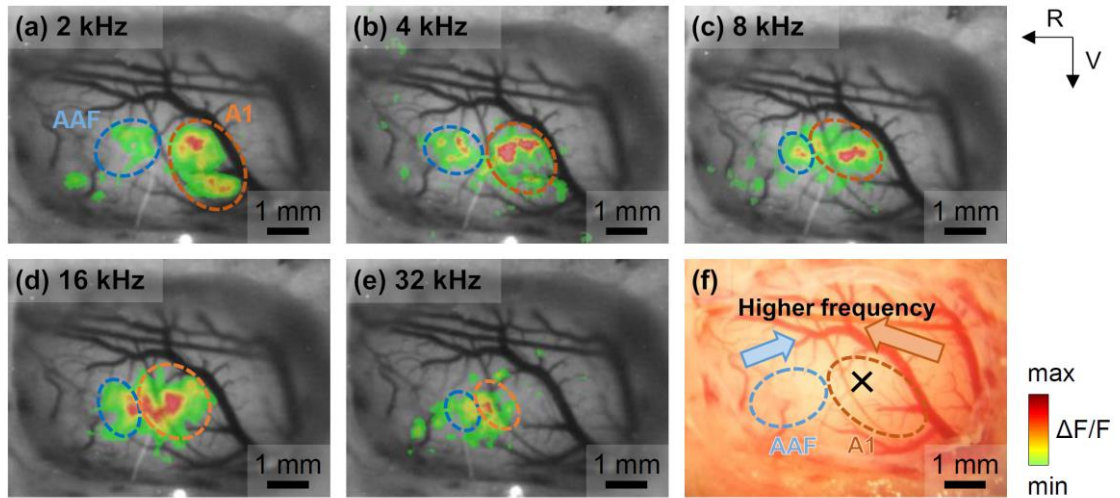
一次聴覚野における神経活動への麻酔薬の影響を調べるためには、聴覚皮質における一次聴覚野の場所を同定する必要がある。そこで、各実験で電気生理学的計測を行う前に、フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを用いて、聴覚皮質領域における純音刺激誘発活動を計測した(図 4-2A)。トノトピー構造を観察するために、異なる周波数の音刺激(2, 4, 8, 16, 32 kHz)に応答した領域のうち、蛍光変化が最大蛍光変化率の 60%以上を示した領域に注目した(図 4-2Aa-e)。低い周波数の音刺激(2, 4, 8 kHz)では、音刺激に応答する領域が 2 つ観察され(図 4-2Aa-c)、音刺激の周波数が高くなるにつれ 2 つの音刺激応答領域が近づく様子が観察された。図 4-2Af は音刺激応答領域の周波数依存性を示している。A1 領域および前聴覚野(AAF, anterior auditory field) 領域は、空間的に対称的なトノトピー構造を持つことが知られている(図 4-2Af; Noto et al., 2016)。また、A1 および AAF 領域において、各周波数の音刺激応答領域は背側-腹側方向に帯状に配置されている。さらに、A1 領域では低い周波数に応答する領域は尾側に、高い周波数に応答する領域は吻側に現れるという特徴をもつ。本研究では、音刺激による誘発神経活動の蛍光変化画像から、これらの特徴を示す領域を A1 領域として同定した。以上の方法により、本研究ではフラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを用いて、膜電位感受性色素や他の指示薬を使用せずに聴覚皮質 A1 領域を同定した。

次に、多点電極アレイを用い、ケタミン麻酔下および 3 種混合麻酔下のマウスで A1 領域における神経活動を皮質層構造全体で計測した(図 4-2B)。電極の刺

入位置は、フラビンタンパク質内因性蛍光イメージング実験で 8-16 kHz の音刺激に対する応答が観察された領域に決定した(図 4-2A)。

次に、皮質の層構造と電極の位置関係を同定するために、第 4 層の位置をクリック音に対する LFP 応答の CSD 解析により判断した(図 4-2B)。CSD 解析における sink 活動は興奮性活動(軸索の脱分極やシナプス活動)の表れと解釈されており(Mitzdorf, 1985)、聴覚皮質における音刺激誘発活動では第 4 層に sink が現れる。図 4-2B は音刺激誘発活動の CSD パターンの代表例を示しており、皮質表面から 600-750  $\mu\text{m}$  の位置において音刺激の 20-25 ms 後に明瞭な sink 活動が表れている。この特徴は、先行研究においてラット A1 で観察された CSD パターンの特徴と一致していた (Kaur et al., 2005; Sakata and Harris, 2009; Szymanski et al., 2011)。そこで、解剖学的な知見(DeFelipe et al., 2002)から、sink-source の境界が観察された深さから脳表側に 150  $\mu\text{m}$  までを第 4 層の位置とし、第 4 層よりも浅い領域を第 2/3 層、第 4 層よりも深い領域を第 5 層とした (図 4-2 B)。各麻酔条件で同じ位置における神経活動を比較するために、電極の位置を一度決定した後は実験中に電極の移動は行わなかった。

A



B

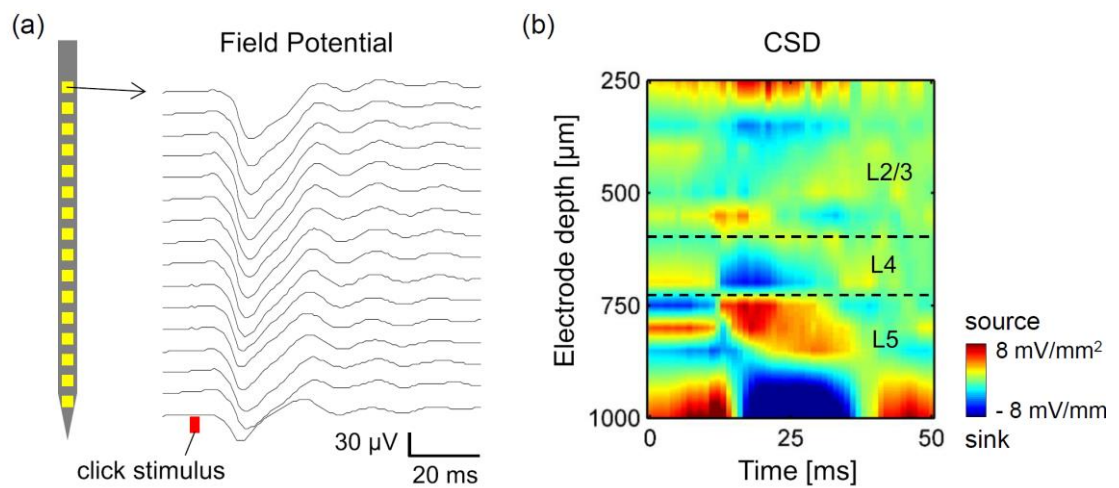


図 4-2 実験の概要。

A, フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによる聴覚皮質領域の同定。B, 聴覚皮質領域の同定。Aa-e, 純音刺激(2, 4, 8, 16, 32 kHz)に対する応答。Ad, 聴覚皮質領域の同定。×: 電気生理学的計測の記録位置。

B, 神経活動の多点電極記録(Ba)と CSD 解析による層の同定(Bb)。

#### 4-3-2 自発的活動

麻酔薬の神経活動の影響を調べるうえで、動物の個体差の影響を減らすため、電気生理学的計測は、各実験で同一のラットを用いて異なる麻酔条件における神経活動を計測した。実験では、ラットにケタミン麻酔-3種混合麻酔-ケタミン麻酔(KX-MMB-KX)の順番、または3種混合麻酔-ケタミン麻酔-3種混合麻酔(MMB-KX-MMB)の順番で麻酔を投与した(図 4-1)。

各麻酔条件における聴覚応答特性を比較する前に、まず自発的発火頻度の比較を行った。同一のラットでケタミン麻酔下・3種混合麻酔下の自発発火を計測したところ、KX-MMB-KX と MMB-KX-MMB のどちらの投与順序でも、3種混合麻酔下の条件よりもケタミン麻酔下の条件で自発発火頻度が高くなる傾向が見られた(図 4-3)。4 個体のラットで MMB-KX-MMB の投与順序で各麻酔条件下の自発的発火頻度を計測したところ、皮質第 5 層では麻酔薬を 3 種混合麻酔からケタミン麻酔に変更した時に発火頻度が有意に増加し、再び 3 種混合麻酔を投与すると発火頻度が減少した(図 4-4 Ac, MMB:  $4.8 \pm 0.3$  Hz; MMB-KX:  $7.3 \pm 0.5$  Hz; MMB-KX-MMB:  $4.3 \pm 0.6$  Hz,  $p < 0.01$ )。同様に、3 個体のラットで KX-MMB-KX の投与順序で各麻酔条件下の自発的発火頻度を計測したところ、皮質第 5 層では、ケタミン麻酔から 3 種混合麻酔に変更し、再びケタミン麻酔に戻した場合にも自発発火頻度にわずかな変化が現れる傾向が見られた(図 4-4 Bc, KX:  $7.8 \pm 0.5$  Hz; KX-MMB:  $4.8 \pm 0.7$  Hz; KX-MMB-KX:  $6.3 \pm 0.8$ ,  $p = 0.06$ )。一方で、皮質第 2/3 層や第 4 層では、KX-MMB-KX の投与順序、MMB-KX-MMB の投与順序どちらの場合でも、各麻酔条件において自発的発火頻度に明確な差は観察されなかった。第 2/3 層の自発的発火頻度は、KX-MMB-KX の投与順序では KX:  $2.3 \pm 0.4$  Hz; KX-MMB:  $2.4 \pm 0.5$  Hz; KX-MMB-KX:  $3.2 \pm 0.3$  Hz であり(図 4-4 Aa;  $p > 0.05$ )、MMB-KX-MMB の投

与順序では MMB:  $1.6 \pm 0.3$  Hz; MMB-KX:  $0.7 \pm 0.2$  Hz; MMB-KX-MMB:  $1.0 \pm 0.3$  Hz;  $p > 0.05$  であった(図 4-4 Ba;  $p > 0.05$ )。また、第 4 層の自発的発火頻度は、KX-MMB-KX の投与順序では KX:  $6.5 \pm 1.0$  Hz; KX-MMB:  $5.2 \pm 0.7$  Hz; KX-MMB-KX:  $4.7 \pm 1.0$  Hz であり(図 4-4 Ab;  $p > 0.05$ )、MMB-KX-MMB の投与順序では MMB:  $2.1 \pm 0.7$  Hz; MMB-KX:  $2.1 \pm 0.6$  Hz; MMB-KX-MMB:  $1.6 \pm 0.0$  Hz であった(図 4-4 Bb;  $p > 0.05$ )。この結果は、ケタミン麻酔と 3 種混合麻酔の選択は 2/3 層と 4 層では影響しないが、5 層では大きく影響することを示している。

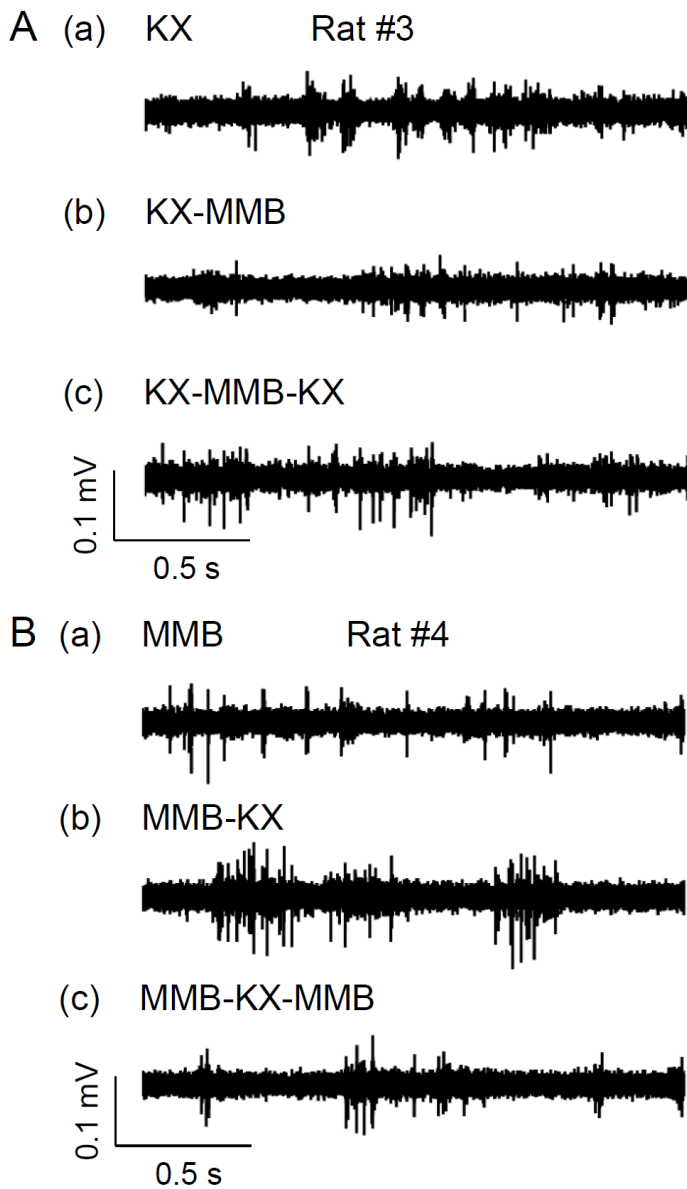


図 4-3 自発的活動の計測

A, KX-MMB-KX の順で麻酔を投与した場合の自発的活動例。Aa, ケタミン麻酔下(KX)、Ab, 3 種混合麻酔下(KX-MMB)、Ac, ケタミン麻酔下(KX-MMB-KX)の自発的活動例。

B, MMB-KX-MMB の順で麻酔を投与した場合の自発的活動例。Aa, 3 種混合麻酔下(MMB)、Ab, ケタミン麻酔下(MMB-KX)、Ac, 3 種混合麻酔下(MMB-KX-MMB)の自発的活動例。

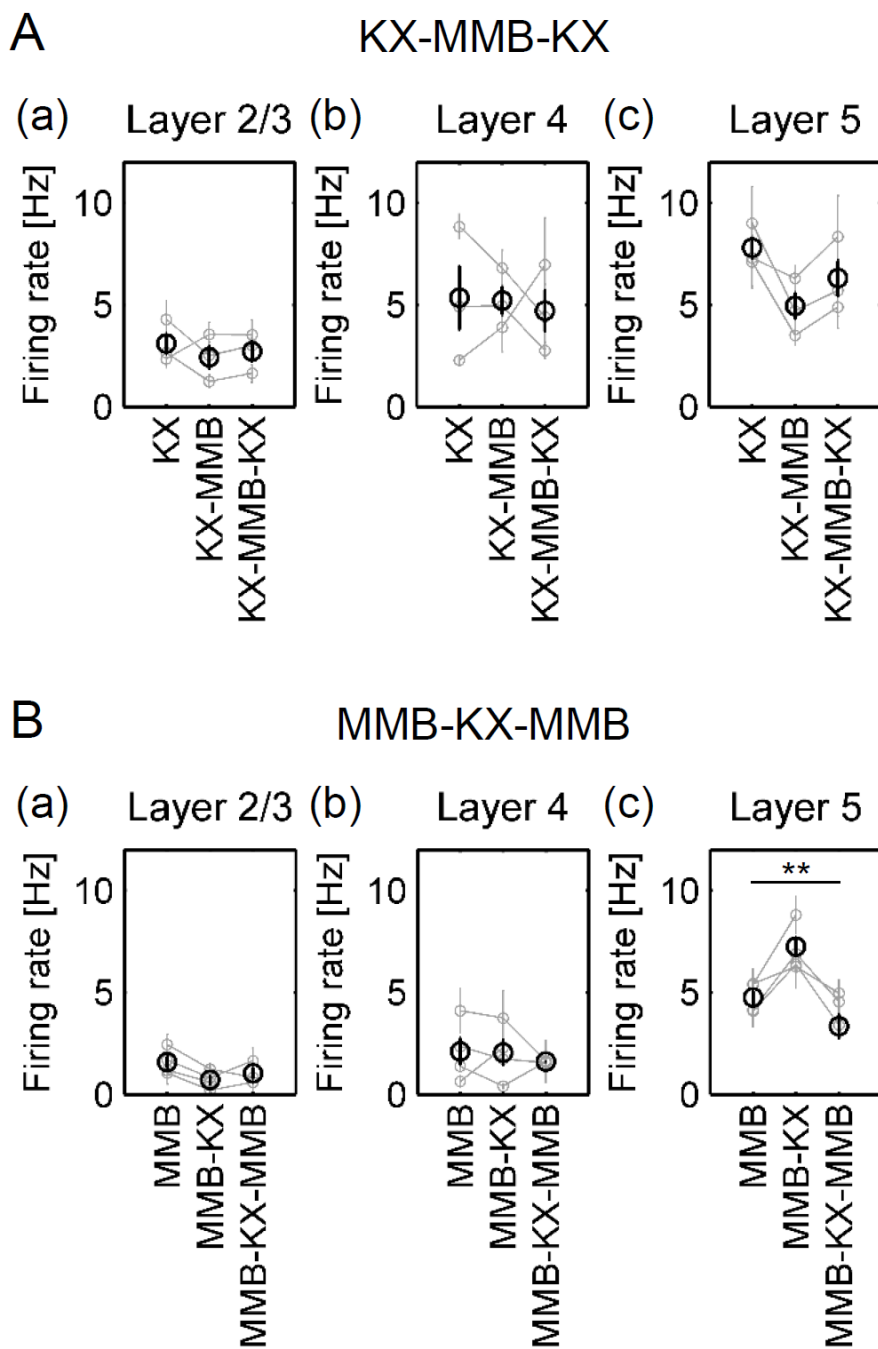


図 4-4 各麻酔条件における自発的発火頻度

A, KX-MMB-KX の順で麻酔を投与した場合の自発的発火頻度。

B, MMB-KX-MMB の順で麻酔を投与した場合の自発的発火頻度。

a, 第 2/3 層、b, 第 4 層、c, 第 5 層。グレー：各動物個体、黒：各個体の平均値。

\*\*  $p < 0.01$

### 4-3-3 特徴周波数、最小閾値、帯域幅

次に、麻酔薬の選択が周波数チューニング特性に与える影響を調べるために、FRA を用いて特徴周波数、最小閾値、帯域幅を解析した。図 4-5 は各麻酔条件下における FRA の代表例を示しており、それぞれの FRA を用いて特徴周波数、最小閾値、帯域幅を解析した。特徴周波数は、KX-MMB-KX、MMB-KX-MMB の投与順序どちらの場合でも、投与する麻酔薬を変更した時に変化を示さなかった (図 4-6)。また、KX-MMB-KX における第 2/3 層の計測結果を除いて、最小閾値は各麻酔条件の間で有意な差を示さなかった (図 4-7)。さらに、最小閾値よりも 10 dB および 30 dB 大きい音圧における帯域幅 (BW10 および BW30) を解析したところ、各麻酔条件の間で帯域幅に有意な差は見られなかった (表 4-1)。また、FRA の尖度を BW30 と BW10 の比率 (BW30/BW10) により調べたところ、有意な差は見られなかった (表 4-1)。したがって、異なる麻酔条件間で特徴周波数と帯域幅は差は見られず、最小閾値も一定の傾向を示さなかった。

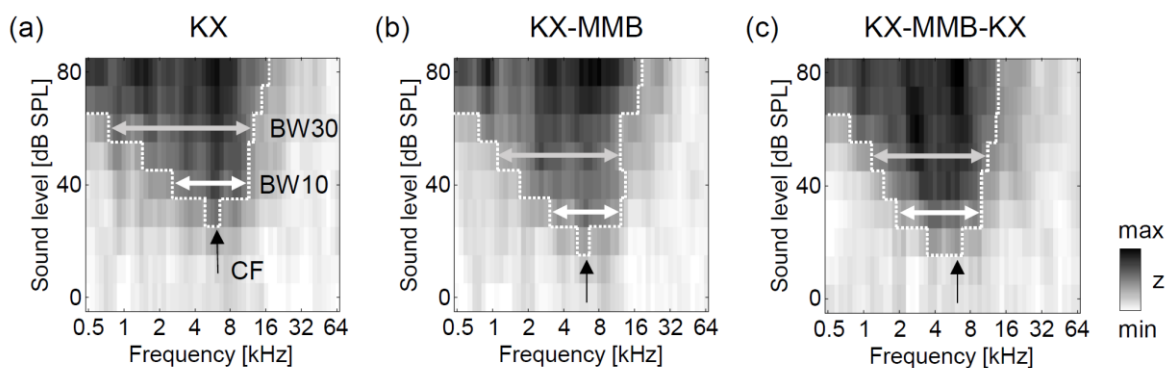


図 4-5 各麻酔条件における FRA の典型例

a, KX, b, KX-MMB, c, KX-MMB-KX の場合の FRA。



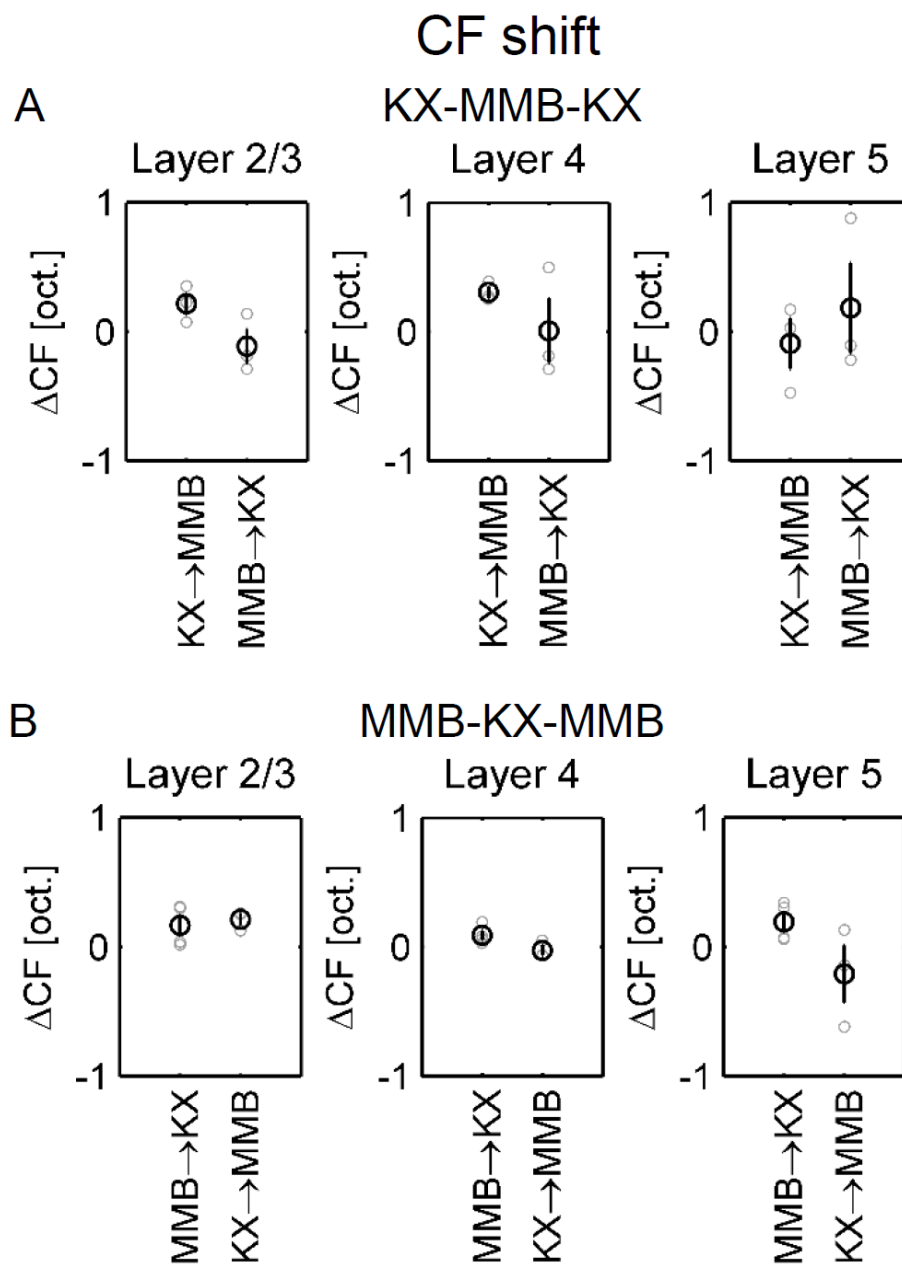


図 4-6 第 2/3 層、第 4 層、第 5 層での各麻醉条件における特徴周波数の変化

A, KX-MMB-KX の投与順序における特徴周波数。

B, MMB-KX-MMB の投与順序における特徴周波数。

a, 第 2/3 層、b, 第 4 層、c, 第 5 層。グレー：各動物個体、黒：各個体の平均値。

## Minimum Threshold

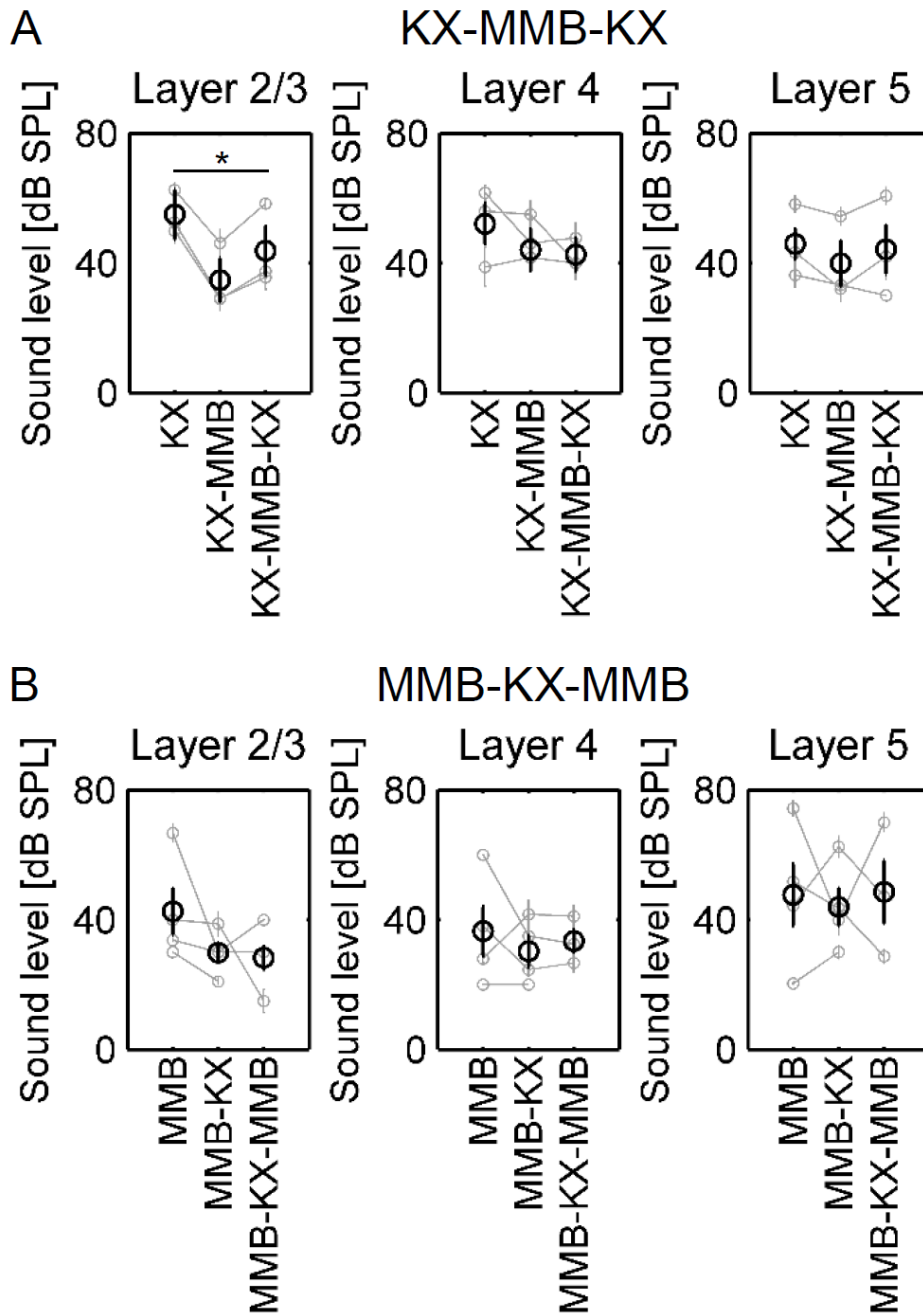


図 4-7 第 2/3 層、第 4 層、第 5 層での各麻酔条件における最小閾値の変化

A, KX-MMB-KX の投与順序における最小閾値。

B, MMB-KX-MMB の投与順序における最小閾値。

a, 第 2/3 層、b, 第 4 層、c, 第 5 層。グレー：各動物個体、黒：各個体の平均値。

\*  $p < 0.05$

表 4-1 各麻酔下における帯域幅

	Layer	Anesthetics		
		KX	KX-MMB	KX-MMB-KX
BW10 [oct.]	L2/3	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.2
	L4	2.3 ± 0.5	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.3
	L5	2.2 ± 0.3	1.5 ± 0.2	2.3 ± 0.2
BW30 [oct.]	L2/3	2.8 ± 0.3	2.9 ± 0.8	3.2 ± 0.7
	L4	3.5 ± 0.4	3.0 ± 0.4	2.9 ± 0.5
	L5	3.2 ± 0.0	3.1 ± 0.1	3.3 ± 0.3
BW30/BW10	L2/3	3.1 ± 0.5	3.0 ± 0.5	2.9 ± 0.6
	L4	2.4 ± 0.3	4.2 ± 1.6	3.1 ± 1.1
	L5	3.1 ± 2.4	2.9 ± 0.4	3.0 ± 1.5

	Layer	Anesthetics		
		MMB	MMB-KX	MMB-KX-MMB
BW10 [oct.]	L2/3	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.4
	L4	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.7 ± 0.4
	L5	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.5	1.4 ± 0.3
BW30 [oct.]	L2/3	2.8 ± 1.0	2.7 ± 0.7	3.6 ± 0.6
	L4	2.6 ± 0.4	2.8 ± 0.9	3.0 ± 0.6
	L5	3.0 ± 0.5	2.7 ± 0.5	2.8 ± 0.5
BW30/BW10	L2/3	3.5 ± 1.1	4.2 ± 1.1	3.0 ± 1.0
	L4	3.9 ± 1.0	3.8 ± 0.5	1.9 ± 0.1
	L5	3.0 ± 0.2	3.5 ± 0.5	2.4 ± 0.6

さらに、FRA における発火頻度-音圧レベル関数 (RLF) の単調性について調査した。その結果、非単調性を示した細胞は全体の 8.8%–16.9% のみで、この割合はケタミン麻酔と 3 種混合麻酔の間に差は見られなかった (KX vs. MMB, 第 2/3 層:  $8.8 \pm 0.9\%$  vs.  $11.4\% \pm 2.5\%$ ; 第 4 層:  $10.1 \pm 1.2\%$  vs.  $15.1 \pm 1.1\%$ ; 第 5 層:  $14.3 \pm 1.4\%$  vs.  $16.9 \pm 1.0\%$ ;  $p > 0.05$ , paired t-test)。また、3 種混合麻酔下の第 5 層において非単調な RLF を示す細胞の割合は、ラットにおいてペントバルビタール麻酔を用いた先行研究(細胞全体の 17% が非単調 RLF を示す)の結果と一致していた(Polley et al., 2007)。

#### 4-3-4 時間周波数受容野(STRF)

次に、個々の神経細胞の時間周波数受容野(Spectro-temporal receptive field, STRF)に注目することで、麻酔薬の選択が神経活動の時間的特徴に与える影響を調べた。図 4-8A は各音圧における STRF の代表例を示している (図 4-8A; 20, 40, 60, and 80 dB SPL)。STRF の音圧依存性について調べたところ、先行研究 (Heil and Irvine, 1997)と同様に音圧が大きくなると潜時が短くなる傾向が観察された(図 4-8B, C)。また、音圧が大きくなると受容野は周波数方向に大きくなる傾向が得られた (図 4-8A)。一方、各麻酔条件の間で神経活動の応答開始潜時、ピーク潜時、継続時間を比較したところ、どのパラメータも異なる麻酔条件間で一定の傾向は見られなかった (図 4-8B-D)。具体的には、第 2/3 層における MMB-KX-MMB の投与順序の場合の応答開始潜時とピーク潜時を除いて、ケタミン麻酔下と 3 種混合麻酔下の条件で潜時、ピーク潜時、継続時間に差は見られなかった。さらに、第 2/3 層における KX-MMB-KX の投与順序では応答開始潜時とピーク潜時に異なる麻酔条件間で有意な差は観察されなかった。

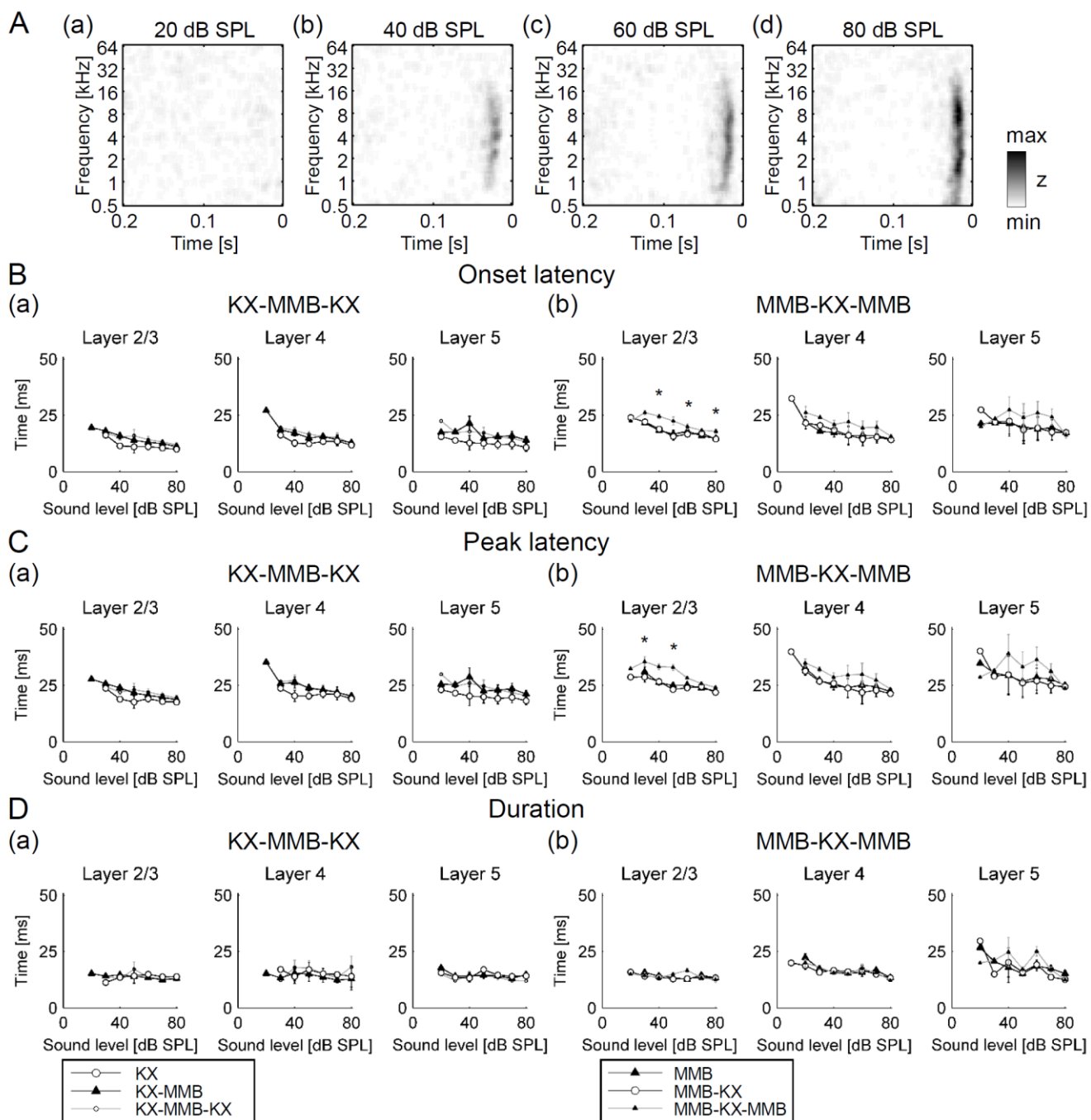


図 4-8 各麻酔下における神経活動の時間周波数特性

A, 各音圧(20, 40, 60, 80 dB SPL)における STRF の典型例。

B, 各麻酔条件下における応答開始潜時。

C, 各麻酔条件下におけるピーク潜時。

D, 各麻酔条件下における継続時間。

a, KX-MMB-KX、b, MMB-KX-MMB の投与順序。\*  $p < 0.05$

一方で、音刺激誘発応答の最大発火頻度に注目したところ、第 5 層でのみ、40 dB SPL 以上の音圧が提示されるとケタミン麻酔下の方が 3 種混合麻酔下よりも高い発火頻度を示した( $p < 0.05$ , 図 4-9)。一方で、第 2/3 層と第 4 層においては、各麻酔条件の間で最大発火頻度に差は見られなかった(図 4-9)。

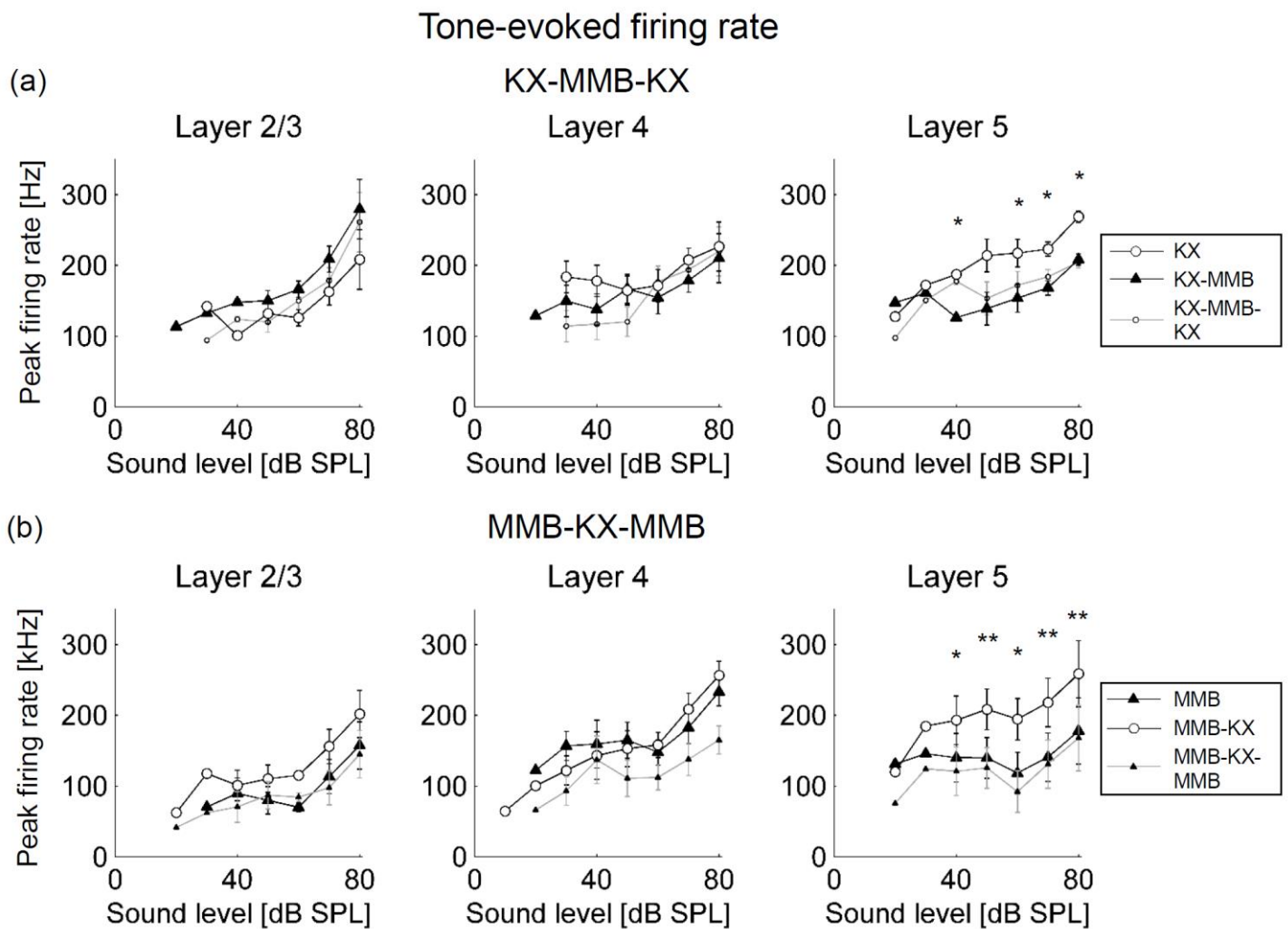


図 4-9 各麻酔下における音刺激による誘発活動の発火頻度

a, KX-MMB-KX 条件での音刺激による誘発活動の発火頻度

b, MMB-KX-MMB 条件での音刺激による誘発活動の発火頻度

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

さらに、麻酔薬の選択が音刺激に誘発される神経活動の時間変化パターンに与える影響について注目した。STRF のパターンを、神経活動の時間変化に注目して、(1) 一峰型(onset type、音刺激に対して 15-40 ms 後にのみピークを持つ)と、(2) 二峰型(two-peak type、音刺激に対して 50 ms 後に z-score > 2 となる 2 回目のピークを持つ)の二つに分類した(図 4-10A)。その結果、第 2/3 層や第 4 層ではケタミン・3 種混合麻酔のどちらもほぼ全ての細胞が onset type であり、この割合は異なる麻酔条件間で差は見られなかった(第 2/3 層、一峰型/二峰型:  $99.2 \pm 0.8\%/0.8 \pm 0.8\%$  (KX),  $93.9 \pm 2.5\%/6.1 \pm 2.5\%$  (MMB); 第 4 層:  $97.7 \pm 2.2\%/2.3 \pm 2.2\%$  (KX),  $88.4 \pm 3.9\%/11.6 \pm 3.9\%$  (MMB))。対称的に、第 5 層では 3 種混合麻酔下では一峰型の細胞は全体の半分以下であったのに対し、ケタミン麻酔下では 8 割以上の細胞が一峰型を示した(第 5 層、一峰型/二峰型:  $80.7 \pm 4.5\%/19.3 \pm 4.5\%$  (KX),  $33.4 \pm 7.3\%/66.6 \pm 7.3\%$  (MMB)) (図 4-10B)。したがって、神経活動の時間変化パターンはケタミン麻酔と 3 種混合麻酔の条件で層依存的に大きく異なっていた。

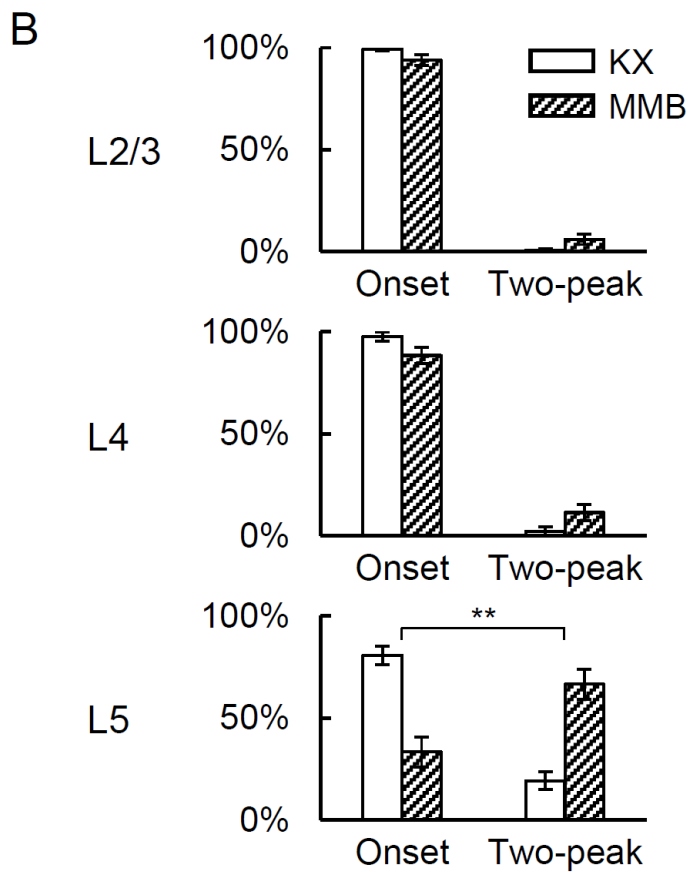
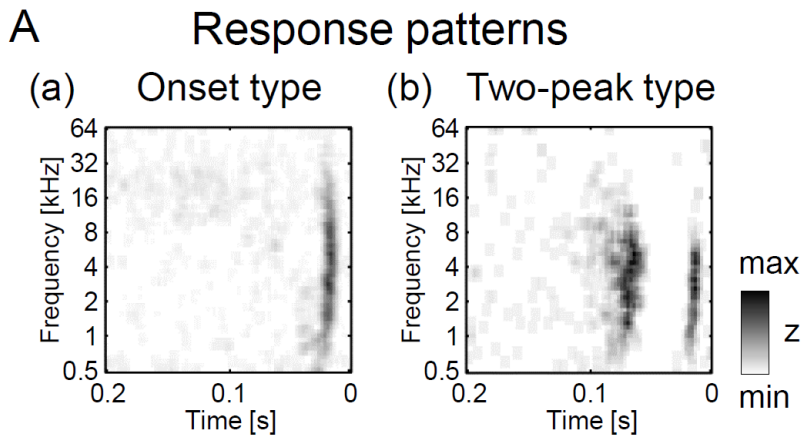


図 4-10 各麻酔下における神経活動の発火パターン

A, 各発火パターンの代表例。Aa, 一峰型(onset type), Ab, 二峰型(two-peak type)

B, 各麻酔下・各層における一峰型/二峰型の発火パターンを示す細胞の割合

\*\*  $p < 0.01$



#### 4-4 考察

麻酔は聴覚システムに影響を与えることが知られている(Gaese and Ostwald, 2001; Rennaker et al., 2007)。近年は聴覚研究において覚醒下の動物を用いた実験が行われるようになってきたものの、実験における利便性の都合上、麻酔を使った動物実験は現在も広く行われている。一方で、使用する麻酔薬は研究者によって異なるが、麻酔薬の選択が聴覚皮質の神経活動が麻酔によって変化すると報告されている (Zurita et al., 1994; Cheung et al., 2001; Huang et al., 2013)。しかし、3 種混合麻酔が他の麻酔と比ベドのように聴覚皮質活動に異なる影響を及ぼすのかということや、麻酔薬の選択が聴覚皮質の局所神経回路に及ぼす影響は明らかになっていない。

ケタミンは迅速な麻酔効果を持ち、全身麻酔の導入や麻酔の維持に広く用いられている。ケタミンは NMDA 受容体の阻害剤であり、異なる脳領域間の結合を遮断し麻酔状態を生成する(Franks, 2008)。また、ケタミンはニコチン性アセチルコリン受容体も阻害することが知られている (Franks and Lieb, 1994; Sleight et al., 2014)。脳波計測の研究から、ケタミンはバルビツール系の麻酔と比較して、視床-皮質間の結合の抑制の程度は大きくないことが示唆されている (Miyasaka and Domino, 1968)。このことは、バルビツール系麻酔薬と比較して、ケタミンは視床から皮質への主要な入力を受ける皮質第 4 層(Smith et al., 2012)の神経活動に大きく影響しないことを示唆している。

本研究では、ケタミン麻酔とミダゾラム・メデトミジン・ブトルファノールの混合麻酔である 3 種混合麻酔が聴覚皮質神経活動に与える影響を比較した。ミダゾラムは、動物において顕著な鎮静作用を生じる水溶性ベンゾジアゼピンとして知られている(Meyer and Fish, 2011)。しかし、ミダゾラム単体の投与では鎮痛効果や麻酔の効果がないため、ミダゾラムは他の薬剤と組み合わせること

で麻酔薬として使用されている (Kawai et al., 2011; Meyer and Fish, 2011; Kirihara et al., 2013)。メデトミジンは、キシラジンよりも  $\alpha$ -2 アドレナリン受容体に対し高い選択性の促進作用を持ち(Scheinin et al., 1989)、ミダゾラムとメデトミジンの組み合わせはイヌ(Hayashi et al., 1994)や他の動物(Raekallio et al., 1998; Shilo et al., 2010)に鎮静作用を与えることが知られている。また、オピオイド受容体の促進・阻害剤であるブトルファノールは、獣医学において鎮痛薬として使用されている(Commiskey et al., 2005)。3 種混合麻酔はミダゾラム・メデトミジン・ブトルファノールの組み合わせを用いており、齧歯類 (Kirihara et al., 2013; Kirihara et al., 2016)や他の大型の動物 (Spelman, 2004; Ochi et al., 2014)に対して実績のある麻酔薬である。しかし、これまでの 3 種混合麻酔を聴覚神経科学の研究に使用した研究は報告されていない。本研究の目的の一つは、聴覚研究において 3 種混合麻酔をケタミン代替麻酔として使用するにあたり、麻酔薬の選択が齧歯類(ラット)の聴覚皮質神経活動に与える影響を明らかにすることにある。

#### 4-4-1 フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを用いた脳領域同定

聴覚皮質における神経応答特性を理解するためには、聴覚皮質サブ領域の正確な同定が必須である。本研究では第 2 章・第 3 章と同様にフラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによって、聴覚皮質のトノトピー構造に基づいて 2 つのコア領域(A1 および AAF)を同定した。本研究でフラビンタンパク質内因性蛍光イメージングによって観察されたトノトピー構造の特徴 (図 4-2)は、先行研究における電気生理学計測の結果(Guo et al., 2012) や、膜電位感受性色素を用いた光学イメージングの結果 (Kalatsky et al., 2005; Noto et al., 2016)と一致する。

本研究は、フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを電気生理学的計測における電極刺入位置の決定に利用した最初の研究である。一般的に、計測位置決定のために電極を複数の部位に挿入し皮質領域を同定するには多大な時間と労力がかかり、加えて長時間の記録は組織の損傷を引き起こす(Johnson et al., 2007)。また、電位感受性色素を利用するイメージング技術は、色素の毒性のために長時間の神経活動の記録には必ずしも適していない。一方、フラビンタンパク質内因性蛍光イメージングは自家蛍光を利用するために毒性はなく、イメージングにかかる時間は準備も含め 30 分未満で済む。したがって、本研究で用いたフラビンタンパク質内因性蛍光イメージングを電気生理学的計測における電極刺入の決定に利用する方法は、A1 や他のサブ領域の効率的な同定を可能にする。

#### 4-4-2 麻酔薬の自発的活動への影響

本研究では皮質第 2 層から第 5 層にわたって神経細胞の自発的活動を計測し、麻酔薬の選択によって第 5 層の自発的発火頻度が異なることが示された。本研究で観察されたケタミン麻酔下における第 5 層の発火頻度は、先行研究の報告と同程度である( $6.7 \pm 0.7$  Hz; Turner et al., 2005)。また、ケタミン麻酔下の発火頻度が 3 種混合麻酔より高いという結果は、3 種混合麻酔と同様に GABA 受容体活動を増加させるペントバルビタールがケタミンよりも発火頻度を大きく低下させるという報告と矛盾しない(Zurita et al., 1994; Muroi et al., 2009)。加えて、ケタミン麻酔下の自発的発火頻度は、NMDA 受容体や GABA<sub>A</sub> 受容体など様々な神経伝達物質受容体に影響を及ぼすウレタン麻酔下の状態と比較すると低いことが報告されている (Huang et al., 2013)。これらの報告は、麻酔薬の作用機序の違いにより自発的発火頻度に差を生じる可能性を示唆している。

一次視覚野(V1)における先行研究では、覚醒下とイソフルラン麻酔下の自発的活動の計測により、イソフルラン麻酔は自発的活動に層構造依存的な影響を与えることが報告されている(Sellers et al., 2013)。この研究では、他の脳領域領域や層からフィードフォワード抑制を受ける V1 の第 4 層において、覚醒下よりもイソフルラン麻酔下で発火頻度が低かったことを示している。一方で、本研究ではケタミン麻酔と 3 種混合麻酔で第 5 層のみ自発発火頻度が異なり、第 2/3 や第 4 層には差が見られなかった。このことは麻酔薬の種類によって大脳皮質の各層に与える影響が異なることを示唆しており、麻酔薬の選択が神経活動に層構造依存的な影響を与えることを示した報告は本研究が初である。

#### 4-4-3 麻酔薬の音刺激誘発活動への影響

##### 4-4-3-1 特徴周波数、最小閾値への影響

本研究では、異なる麻酔間で特徴周波数に差は見られなかった。この結果は、特徴周波数は麻酔薬の種類の影響を受けず安定していることを示唆している。また、最小閾値に関して、先行研究ではケタミンによる聴性脳幹反応の閾値は、ペントバルビタールやイソフルランよりも低いと報告されている(Cohen and Britt, 1982; Cederholm et al., 2012; Ruebhausen et al., 2012)。ミダゾラムはペントバルビタールおよびイソフルランと同様に GABA 受容体活動を促進する(Kohno et al., 2000; Wang et al., 2003; Saari et al., 2011)ことから、ケタミン麻酔と 3 種混合麻酔の間で最小閾値は差があると予想されたが、本研究の結果では最小閾値に一貫した差は見られなかった。この原因は、ミダゾラムの GABA 受容体活動の促進に対する薬理的な機序はペントバルビタールやイソフルランとは異なることに起因している可能性がある(Yu et al., 1988)。

#### 4-4-3-2 時間周波数受容野(STRF)への影響

覚醒状態とケタミン麻酔状態の帯域幅・潜時は異なることが報告されており (Talwar and Gerstein, 2001; Rennaker et al., 2007)、ケタミン麻酔は帯域幅や潜時に影響を及ぼすことが示されている。一方、本研究では帯域幅や潜時についてケタミンと3種混合麻酔間で差は見られなかった。この結果は、3種混合麻酔は帯域幅や潜時に対してケタミン麻酔と同様の影響を及ぼす可能性を示唆している。

また、本研究で観察された音刺激誘発活動の発火頻度や時間変化パターンは、ケタミン麻酔と3種混合麻酔の間で異なる傾向にあった。さらに、この差は第2/3層および第4層と比較して、第5層に顕著に観察されることが示された。聴覚皮質A1領域では、音刺激誘発活動は視床から皮質第4層に入力する。皮質第4層の活動は第2/3層に伝搬し、第2/3層の活動は第5層に伝搬する。このことから、本研究でみられた発火頻度や時間変化パターンの差の層依存性が生じる理由は次のような仮説によって説明することができる。まず、ケタミン麻酔によってNMDA受容体が阻害されると、興奮性シナプス入力が低下した結果、第4層から抑制性神経細胞が多く分布する第2/3層への出力が低下する。次に、第2/3層の抑制性神経細胞の活動は低下し、第2/3層から第5層抑制性細胞への抑制性入力が低下する。それにより、第5層抑制性細胞の活動が促進され、この結果ケタミン麻酔下では大部分の細胞が一峰方の発火パターンを示し、音刺激誘発活動の発火頻度も高くなる。一方、3種混合麻酔はGABA<sub>A</sub>受容体活動を高め、皮質神経活動を全体的に抑制するため、ケタミンとは異なり二峰型の発火パターンを持つ細胞が多く存在できる。さらに、GABA<sub>A</sub>受容体活動の促進は音刺激誘発活動の発火頻度の低下にもつながる。

#### 4-4-4 うつ病研究に対する示唆

ケタミンに代表される NMDA 阻害剤は、麻酔薬以外にも急速な抗うつ作用を示すうつ病治療薬として注目されている (Li et al., 2010; Newport et al., 2015)。ケタミンの急速な抗うつ効果は mTOR (mammalian target of rapamycin) を介したシグナル経路を阻害すると消失することから (Li et al., 2010)、mTOR シグナル経路を介したグルタミン酸受容体の増加やシナプス形成がケタミンの抗うつ効果の背後にあると考えられている (Browne and Lucki, 2013)。一方で、ケタミンが皮質神経回路活動にどのように影響することで抗うつ作用を示すのかは明らかになっていない。本研究では、ケタミン麻酔と、ケタミンとは作用機序の異なる 3 種混合麻酔が聴覚皮質神経回路の活動に与える影響を比較した。この比較は、ケタミンなどの NMDA 受容体阻害剤に特徴的な神経回路活動への作用を見出すことに貢献できる。

うつ病患者の脳では、前頭前野や辺縁系における神経活動の変化や神経変性が発生していることが報告されている (Shrestha et al., 2015)。また、うつ病では情動や認知機能だけでなく、幻覚や幻聴に代表される感覚情報処理の異常が起きることも知られており、感覚刺激に対する神経応答活動も変化することが報告されている (Linka et al., 2004)。また、最近では、うつ病患者脳では聴覚皮質の抑制性細胞が減少していることも報告された (Smiley et al., 2016)。この報告では抑制性細胞の減少率に層構造依存性は観察されなかった。しかし、抑制性細胞は第 4 層や第 5 層よりも第 2/3 層に高い密度で分布するため (Smiley et al., 2016)、うつ病患者における抑制性細胞の減少は皮質深層よりも表層の神経活動に顕著に影響し、第 2/3 層の興奮性を高めると予想される。一方、ケタミン麻酔下の感覚皮質における自発発火活動は、覚醒下の状態と比較して低下することが知られている (Patel and Chapin, 1990; Gaese and Ostwald, 2001)。特に本研

究では、3種混合麻酔と比較しケタミン麻酔では第2/3層の神経活動頻度は差がなく、第5層の神経活動頻度は高いという結果が得られた。この結果は、ケタミン麻酔は第2/3層の活動を低下させる一方で5層の神経活動には大きな影響を及ぼさない可能性を示唆している。さらに、このケタミン麻酔の層依存的な作用は、ケタミンはうつ病患者脳における聴覚皮質第2/3層の興奮性の高まりを層構造選択的に抑え、うつ病患者脳の抑制性神経細胞の減少による興奮性の変化を補償する作用を持つという可能性を示唆している。今後、この仮説について検証するには、聴覚皮質の各層の活動を覚醒下とケタミン麻酔下の状態で比較することや、うつ病モデル動物を用いてケタミンの投与によって層構造依存的な神経活動の変化が誘導されるかを観察することが必要である。

#### 4-5 本研究のまとめ

本研究では、一次聴覚皮質領域において、ケタミン麻酔薬と 3 種混合麻酔薬の神経活動への影響を比較した。2 つの麻酔間で周波数チューニング(特徴周波数、最小閾値、帯域幅)への影響に差は見られなかったものの、自発・音刺激誘発活動の発火頻度には差が見られ、3 種混合麻酔下の聴覚皮質ではケタミン麻酔と比較し興奮性が抑えられていることが判明した。さらに、麻酔薬の種類によって音刺激応答活動の時間変化パターンに皮質層構造依存的な差が生じることを見出した。本研究の結果は、皮質神経回路の特性を明らかにするうえで、実験に使用する麻酔薬の種類の影響を十分に考慮する必要があることを示している。



## 第5章 本論文の結論と今後の展望

### 5-1 本論文の結論

本論文では、微小コイルを用いた低侵襲磁気刺激法を提案し、刺激システムの一構成法を示した。特に、磁気刺激誘発活動の皮質内における空間局所性、コイルの向きと誘発活動の関係、磁気刺激における物理特性が最も神経活動に影響するかについて、実験と数値計算による解析に基づき検討した。また、構築した磁気刺激システムを用いて、磁気刺激の生体脳への作用を皮質神経回路レベルで明らかにした。さらに、皮質神経回路動態の理解のための基礎的知見として、麻酔薬が皮質神経回路活動に及ぼす影響を検討した。

第2章では、微小コイルを用いた低侵襲磁気刺激法の確立について記述した。まず、微小コイルを用いた磁気刺激インターフェースを作製し、磁気刺激システムを構築した。そして、構築した磁気刺激システムを用いて、麻酔下のマウス聴覚皮質の脳表に磁気刺激を与え、刺入型電極を用いて磁気刺激による誘発活動の電気生理学的計測を行った。さらに、死後脳を用いて磁気刺激由来の電気的アーティファクトの周波数成分を同定することで、電気的アーティファクトと神経活動とを分離した。その結果、微小コイルを用いた磁気刺激は脳を傷つけずに皮質神経活動を誘発することができることが実証された。さらに、微小コイル磁気刺激法の空間分解能を調べるために、多点脳表電極を用いて磁気刺激による誘発活動を、皮質側方方向に広範囲にわたって計測した。その結果、微小コイル磁気刺激法はミリメートルオーダーの空間分解能を持つことが示された。

第3章では、磁気刺激の生体脳への影響について記述した。皮質神経回路は緻密な配線構造を持つことから、磁気刺激によって誘発される活動は皮質神経回路の構造の制約を受けると予想される。そこで、この仮説を検証するために、刺入型の多点電極アレイを用いてマウス聴覚皮質の層構造横断的に神経活動計測を行い、微小コイルによる磁気刺激応答と感覚刺激(音刺激)応答の動態を時空間的に比較した。その結果、磁気刺激と感覚刺激の活動の時空間特性は類似しており、磁気刺激と感覚刺激は類似の神経回路の活動を誘発することが示唆さ

れた。また、誘導電場の向きが神経誘発活動に影響すると予測されていることから、コイルを配置する向きが皮質誘発応答に影響を及ぼす可能性がある。そこで、コイルの向きと神経誘発活動の関係を調べるために、コイルの配置が皮質表面に対して水平の場合と特定の角度をつけた場合とで磁気刺激誘発活動を比較した。加えて、脳内に発生する誘導電場の数値計算を行うことで、誘導電場の不均一性が磁気刺激誘発活動に大きく影響することを見出した。

第4章では、皮質神経回路の活動計測における麻酔薬の影響について記述した。実験に用いる麻酔薬は神経活動に影響を及ぼすことから、神経回路活動の計測の実験結果を解釈するうえで麻酔薬の影響を考慮する必要がある。しかし、使用される麻酔薬の種類は研究者によって異なるにもかかわらず、麻酔薬の種類が脳の局所神経回路活動にどのように影響するのかについて、詳細な知見はほとんど報告されていない。そこで、本章ではケタミン麻酔下および3種混合麻酔下のラットを用いて聴覚皮質神経活動を層構造横断的に計測し比較した。それぞれの麻酔下のラットにおいて、自発的活動や音刺激誘発活動を計測した結果、2種類の麻酔薬の影響は皮質層構造依存的に異なり、皮質神経回路の動態を議論するうえで麻酔薬の種類を考慮する必要があることが示された。

本研究では、微小コイルにより脳を傷つけずに神経活動を誘発できることを実証し、低侵襲微小コイル磁気刺激法は神経活動修飾に応用できることを示した。この方法は磁気刺激装置の小型化だけでなく、磁気刺激の空間局所性の向上にも大きく寄与する。また、皮質局所神経回路における磁気刺激誘発活動の *in vivo* 電気生理学的計測は本研究が初の試みであり、磁気刺激の神経疾患治療メカニズムを理解する上で基礎的な知見となる。さらに、麻酔薬の選択によって神経活動が皮質層構造依存的な影響を受けることを明らかにした点は、今後の局所神経回路の動態についての議論の上で重要な知見となる。

## 5-2 今後の展望

微小コイル磁気刺激法の確立は、小型・携帯可能な磁気刺激装置の開発に重要であり、慢性的な神経疾患に対する新規治療法の開発に繋がると期待される。

今後、微小コイル磁気刺激法が神経疾患治療に応用できるかを検証するためには、神経疾患モデル動物への磁気刺激の影響の解析や、可塑的变化を誘発する磁気刺激パラメータの探索が必要である。また、マルチコイルアレイを用いた小型磁気刺激装置の開発は、より大きい強度の誘導電場を生成可能にし、磁気刺激を経頭蓋的に施すことで将来的にはヒトに応用可能な低侵襲で小型・携帯可能な神経疾患治療装置の開発に繋がると考えられる。

耳鳴り研究における動物実験は、耳鳴り誘発剤であるサリチル酸の投与 (Stolzberg et al., 2012) や大音量(約 120 dB SPL) のノイズ音曝露 (Longenecker and Galazyuk, 2011) による神経疾患モデル動物を用いて行われている。これまで、磁気刺激を耳鳴り患者の聴覚皮質に与えると疾患が抑制されることは広く知られてきた (Kleinjung et al., 2005)。近年では、耳鳴りモデルラットを用いた実験により、85 mT 程度の弱磁場を用いた反復磁気刺激において耳鳴り様の動物行動が抑えられ、耳鳴りに関連する自発活動の増加も抑制されたと報告された (Mulders et al., 2016)。これらの報告は、本研究で用いた微小コイルによる弱い磁気刺激でも耳鳴り疾患を抑制できる可能性を示唆している。

磁気刺激による可塑性の誘導は、単一の磁気刺激治療では短期間しかない治療効果を長期間継続させるために必須である。反復磁気刺激はシナプス可塑性を誘導し、その刺激頻度によって運動誘発電位を増強または抑制することが知られている (Huerta and Volpe, 2009)。近年では、12 mT 程度の弱磁場を用いた反復磁気刺激により運動誘発電位を可塑的に増強できることが明らかになった。 (Tang et al., 2016b)。しかし、神経活動に可塑的变化を誘導する最適な刺激パラメータは報告されておらず、磁気刺激が可塑的变化を引き起こす神経回路レベルでの機序も明らかになっていない。微小コイルを用いた反復磁気刺激によって可塑的变化を誘導する最適な刺激パラメータ、例えば刺激の反復回数や刺激頻度、刺激強度を探索することは、耳鳴りなどの神経疾患治療への応用につながる。さらに、磁気刺激に可塑的变化誘導の神経回路レベルでの機序を明らかにすることは、神経疾患が治療される機序の解明に繋がる。

本研究で用いた微小コイルは、大電圧を印可すると破壊されてしまうため刺

激強度には限界がある。したがって、経頭蓋刺激の場合は、コイルと脳までの距離が長くなるので、刺激強度が弱くなり神経活動に影響を与えにくくなる恐れがある。さらに、微小コイル磁気刺激法による空間分解能の向上は、刺激標的的部位である疾患関連の脳領域を正確に同定しなければ、その脳領域を刺激することが困難になるという問題も生じる。マルチコイルアレイ(Ruohonen and Ilmoniemi, 1998; Ruohonen et al., 1999)を用いた小型磁気刺激装置の開発は、より強い強度の磁気刺激を生じるだけでなく、任意の誘導電場分布を生成可能にする。そのため、小型マルチコイルアレイを用いた磁気刺激装置が開発されれば、疾患を効果的に抑制する刺激位置を探索することが容易になり、個々の患者に適した磁気刺激を経頭蓋的に施すことができるようになる可能性がある。したがって、小型マルチコイルアレイ磁気刺激装置の開発は、臨床応用に適した非侵襲で小型・携帯可能な神経疾患治療装置の開発に繋がる。

## 参考文献

- Alkire MT, Hudetz AG, Tononi G (2008) Consciousness and anesthesia. *Science* 322:876-880.
- Allen EA, Pasley BN, Duong T, Freeman RD (2007) Transcranial magnetic stimulation elicits coupled neural and hemodynamic consequences. *Science* 317:1918-1921.
- Allene C, Lourenco J, Bacci A (2015) The neuronal identity bias behind neocortical GABAergic plasticity. *Trends Neurosci* 38:524-534.
- Amassian VE, Eberle L, Maccabee PJ, Cracco RQ (1992) Modelling magnetic coil excitation of human cerebral cortex with a peripheral nerve immersed in a brain-shaped volume conductor: the significance of fiber bending in excitation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 85:291-301.
- Anastassiou CA, Montgomery SM, Barahona M, Buzsaki G, Koch C (2010) The effect of spatially inhomogeneous extracellular electric fields on neurons. *J Neurosci* 30:1925-1936.
- Astl J, Popelar J, Kvasnak E, Syka J (1996) Comparison of response properties of neurons in the inferior colliculus of guinea pigs under different anesthetics. *Audiology* 35:335-345.
- Barker AT, Jalinous R, Freeston IL (1985) Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. In: *Lancet*, pp 1106-1107. England.
- Basser PJ (1994) Focal magnetic stimulation of an axon. *IEEE Trans Biomed Eng* 41:601-606.
- Berger T, Larkum ME, Luscher HR (2001) High I(h) channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs. *J Neurophysiol* 85:855-868.
- Bestmann S, Walsh V (2017) Transcranial electrical stimulation. *Current Biology* 27:R1258-R1262.
- Bikson M, Inoue M, Akiyama H, Deans JK, Fox JE, Miyakawa H, Jefferys JG (2004) Effects of uniform extracellular DC electric fields on excitability in rat hippocampal slices in vitro. *J Physiol* 557:175-190.
- Bonmassar G, Lee SW, Freeman DK, Polasek M, Fried SI, Gale JT (2012) Microscopic magnetic stimulation of neural tissue. *Nat Commun* 3:921.
- Browne CA, Lucki I (2013) Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. *Front Pharmacol* 4:161.
- Casula EP, Bertoldo A, Tarantino V, Maiella M, Koch G, Rothwell JC, Toffolo GM, Bisiacchi PS (2017) TMS-evoked long-lasting artefacts: A new adaptive algorithm for EEG signal correction. *Clinical Neurophysiology* 128:1563-1574.

- Cederholm JM, Froud KE, Wong AC, Ko M, Ryan AF, Housley GD (2012) Differential actions of isoflurane and ketamine-based anaesthetics on cochlear function in the mouse. *Hear Res* 292:71-79.
- Chandran Ks S, Mishra A, Shirhatti V, Ray S (2016) Comparison of Matching Pursuit Algorithm with Other Signal Processing Techniques for Computation of the Time-Frequency Power Spectrum of Brain Signals. *J Neurosci* 36:3399-3408.
- Chen R, Romero G, Christiansen MG, Mohr A, Anikeeva P (2015) Wireless magnetothermal deep brain stimulation. *Science* 347:1477-1480.
- Cheung SW, Nagarajan SS, Bedenbaugh PH, Schreiner CE, Wang X, Wong A (2001) Auditory cortical neuron response differences under isoflurane versus pentobarbital anesthesia. *Hear Res* 156:115-127.
- Cohen MS, Britt RH (1982) Effects of sodium pentobarbital, ketamine, halothane, and chloralose on brainstem auditory evoked responses. *Anesth Analg* 61:338-343.
- Commiskey S, Fan LW, Ho IK, Rockhold RW (2005) Butorphanol: effects of a prototypical agonist-antagonist analgesic on kappa-opioid receptors. *J Pharmacol Sci* 98:109-116.
- Cortes M, Black-Schaffer RM, Edwards DJ (2012) Transcranial magnetic stimulation as an investigative tool for motor dysfunction and recovery in stroke: an overview for neurorehabilitation clinicians. *Neuromodulation* 15:316-325.
- Crowther LJ, Hadimani RL, Kanthasamy AG, Jiles DC (2014) Transcranial magnetic stimulation of mouse brain using high-resolution anatomical models. *Journal of Applied Physics* 115-7:17B303.
- De Ridder D, De Mulder G, Walsh V, Muggleton N, Sunaert S, Møller A (2004) Magnetic and electrical stimulation of the auditory cortex for intractable tinnitus: case report. *Journal of neurosurgery* 100:560-564.
- De Ridder D, Verstraeten E, Van der Kelen K, De Mulder G, Sunaert S, Verlooy J, Van de Heyning P, Moller A (2005) Transcranial magnetic stimulation for tinnitus: influence of tinnitus duration on stimulation parameter choice and maximal tinnitus suppression. *Otol Neurotol* 26:616-619.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI (2002) Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* 31:299-316.
- Deliano M, Scheich H, Ohl FW (2009) Auditory cortical activity after intracortical microstimulation and its role for sensory processing and learning. *J Neurosci* 29:15898-15909.
- Deng ZD, Lisanby SH, Peterchev AV (2013) Electric field depth–focality tradeoff in transcranial magnetic stimulation: simulation comparison of 50 coil designs.

- Brain Stimul 6:1-13.
- Devonshire IM, Grandy TH, Dommett EJ, Greenfield SA (2010) Effects of urethane anaesthesia on sensory processing in the rat barrel cortex revealed by combined optical imaging and electrophysiology. *Eur J Neurosci* 32:786-797.
- Di Lazzaro V, Profice P, Ranieri F, Capone F, Dileone M, Oliviero A, Pilato F (2012) I-wave origin and modulation. *Brain Stimul* 5:512-525.
- Di Lazzaro V, Capone F, Apollonio F, Borea PA, Cadossi R, Fassina L, Grassi C, Liberti M, Paffi A, Parazzini M, Varani K, Ravazzani P (2013) A consensus panel review of central nervous system effects of the exposure to low-intensity extremely low-frequency magnetic fields. *Brain Stimul* 6:469-476.
- Diana M, Raj T, Melis M, Nummenmaa A, Leggio L, Bonci A (2017) Rehabilitating the addicted brain with transcranial magnetic stimulation. *Nat Rev Neurosci* 18:685-693.
- Esser SK, Hill SL, Tononi G (2005) Modeling the effects of transcranial magnetic stimulation on cortical circuits. *J Neurophysiol* 94:622-639.
- Ferreri F, Pasqualetti P, Maatta S, Ponzo D, Ferrarelli F, Tononi G, Mervaala E, Miniussi C, Rossini PM (2011) Human brain connectivity during single and paired pulse transcranial magnetic stimulation. *Neuroimage* 54:90-102.
- Folmer RL, Carroll JR, Rahim A, Shi Y, Hal Martin W (2006) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on chronic tinnitus. *Acta Otolaryngol Suppl*:96-101.
- Fox PT, Narayana S, Tandon N, Sandoval H, Fox SP, Kochunov P, Lancaster JL (2004) Column-based model of electric field excitation of cerebral cortex. *Hum Brain Mapp* 22:1-14.
- Francis JT, Gluckman BJ, Schiff SJ (2003) Sensitivity of neurons to weak electric fields. *J Neurosci* 23:7255-7261.
- Franks NP (2008) General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9:370-386.
- Franks NP, Lieb WR (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367:607-614.
- Fregni F, Otachi PT, Do Valle A, Boggio PS, Thut G, Rigonatti SP, Pascual-Leone A, Valente KD (2006) A randomized clinical trial of repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with refractory epilepsy. *Ann Neurol* 60:447-455.
- Gaese BH, Ostwald J (2001) Anesthesia changes frequency tuning of neurons in the rat primary auditory cortex. *J Neurophysiol* 86:1062-1066.

- Grenier F, Timofeev I, Steriade M (1998) Leading role of thalamic over cortical neurons during postinhibitory rebound excitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13929-13934.
- Guo W, Chambers AR, Darrow KN, Hancock KE, Shinn-Cunningham BG, Polley DB (2012) Robustness of cortical topography across fields, laminae, anesthetic states, and neurophysiological signal types. *J Neurosci* 32:9159-9172.
- Haeusler S, Maass W (2007) A statistical analysis of information-processing properties of lamina-specific cortical microcircuit models. *Cereb Cortex* 17:149-162.
- Hallett M (2007) Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron* 55:187-199.
- Harnett MT, Magee JC, Williams SR (2015) Distribution and function of HCN channels in the apical dendritic tuft of neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 35:1024-1037.
- Hayashi K, Nishimura R, Yamaki A, Kim H, Matsunaga S, Sasaki N, Takeuchi A (1994) Comparison of sedative effects induced by medetomidine, medetomidine-midazolam and medetomidine-butorphanol in dogs. *J Vet Med Sci* 56:951-956.
- Herreras O (2016) Local Field Potentials: Myths and Misunderstandings. *Front Neural Circuits* 10:101.
- Hoffman RE, Boutros NN, Hu S, Berman RM, Krystal JH, Charney DS (2000) Transcranial magnetic stimulation and auditory hallucinations in schizophrenia. In: *Lancet*, pp 1073-1075. England.
- Huang L, Bai L, Zhao Y, Xiao Z (2013) Comparison of tonal response properties of primary auditory cortex neurons of adult rats under urethane and ketamine anesthesia. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33:785-793.
- Huerta PT, Volpe BT (2009) Transcranial magnetic stimulation, synaptic plasticity and network oscillations. *J Neuroeng Rehabil* 6:7.
- Ilmoniemi RJ, Kičić D (2009) Methodology for Combined TMS and EEG. *Brain Topography* 22:233.
- Ilmoniemi RJ, Ruohonen J, Karhu J (1999) Transcranial magnetic stimulation--a new tool for functional imaging of the brain. *Crit Rev Biomed Eng* 27:241-284.
- Iwamoto S, Takasu A, Sakamoto T (2010) Therapeutic mild hypothermia: effects on coagulopathy and survival in a rat hemorrhagic shock model. *J Trauma* 68:669-675.
- Jiang X, Wang G, Lee AJ, Stornetta RL, Zhu JJ (2013) The organization of two new cortical interneuronal circuits. *Nature neuroscience* 16:210-218.
- Johnson MD, Kao OE, Kipke DR (2007) Spatiotemporal pH dynamics following



- insertion of neural microelectrode arrays. *J Neurosci Methods* 160:276-287.
- Kalatsky VA, Polley DB, Merzenich MM, Schreiner CE, Stryker MP (2005) Fine functional organization of auditory cortex revealed by Fourier optical imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13325-13330.
- Kaur S, Rose HJ, Lazar R, Liang K, Metherate R (2005) Spectral integration in primary auditory cortex: laminar processing of afferent input, in vivo and in vitro. *Neuroscience* 134:1033-1045.
- Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T (2011) Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim* 60:481-487.
- Kim JH, Kim DW, Chang WH, Kim YH, Kim K, Im CH (2014) Inconsistent outcomes of transcranial direct current stimulation may originate from anatomical differences among individuals: electric field simulation using individual MRI data. *Neurosci Lett* 564:6-10.
- Kirihara Y, Takechi M, Kurosaki K, Kobayashi Y, Kurosawa T (2013) Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. *Exp Anim* 62:173-180.
- Kirihara Y, Takechi M, Kurosaki K, Kobayashi Y, Saito Y, Takeuchi T (2016) Effects of an anesthetic mixture of medetomidine, midazolam, and butorphanol in rats-strain difference and antagonism by atipamezole. *Exp Anim* 65:27-36.
- Kleijnung T, Eichhammer P, Langguth B, Jacob P, Marienhagen J, Hajak G, Wolf SR, Strutz J (2005) Long-term effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in patients with chronic tinnitus. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132:566-569.
- Knoch D, Pascual-Leone A, Meyer K, Treyer V, Fehr E (2006) Diminishing reciprocal fairness by disrupting the right prefrontal cortex. *Science* 314:829-832.
- Kohno T, Kumamoto E, Baba H, Ataka T, Okamoto M, Shimoji K, Yoshimura M (2000) Actions of midazolam on GABAergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *Anesthesiology* 92:507-515.
- Kozyrev V, Eysel UT, Jancke D (2014) Voltage-sensitive dye imaging of transcranial magnetic stimulation-induced intracortical dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:13553-13558.
- Kratz MB, Manis PB (2015) Spatial organization of excitatory synaptic inputs to layer 4 neurons in mouse primary auditory cortex. *Front Neural Circuits* 9:17.
- Krieg T, Mogul DJ (2013) Transcranial Magnetic Stimulation. In: *Neural Engineering* (He B, ed), pp 405-453. Boston, MA: Springer US.
- Krieg TD, Salinas FS, Narayana S, Fox PT, Mogul DJ (2015) Computational and

- experimental analysis of TMS-induced electric field vectors critical to neuronal activation. *J Neural Eng* 12:046014.
- Labinac V, Erceg N, Kotnik-Karuza D (2006) Magnetic field of a cylindrical coil. *American journal of physics* 74:621-627.
- Lakatos P, Chen CM, O'Connell MN, Mills A, Schroeder CE (2007) Neuronal oscillations and multisensory interaction in primary auditory cortex. *Neuron* 53:279-292.
- Lee SW, Fried SI (2015) Suppression of subthalamic nucleus activity by micromagnetic stimulation. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 23:116-127.
- Lee SW, Fried S (2016) Enhanced control of cortical pyramidal neurons with micro-magnetic stimulation. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*.
- Lee SW, Fallegger F, Casse BDF, Fried SI (2016) Implantable microcoils for intracortical magnetic stimulation. *Sci Adv* 2.
- Letzkus JJ, Wolff SB, Meyer EM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Luthi A (2011) A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* 480:331-335.
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2010) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329:959-964.
- Linka T, Muller BW, Bender S, Sartory G (2004) The intensity dependence of the auditory evoked N1 component as a predictor of response to Citalopram treatment in patients with major depression. *Neurosci Lett* 367:375-378.
- Liu S, Sheng J, Li B, Zhang X (2017) Recent Advances in Non-invasive Brain Stimulation for Major Depressive Disorder. *Front Hum Neurosci* 11:526.
- Liu Z et al. (2016) Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature* 530:98-102.
- Londero A, Langguth B, De Ridder D, Bonfils P, Lefaucheur JP (2006) Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): a new therapeutic approach in subjective tinnitus? *Neurophysiol Clin* 36:145-155.
- Longenecker RJ, Galazyuk AV (2011) Development of tinnitus in CBA/CaJ mice following sound exposure. *J Assoc Res Otolaryngol* 12:647-658.
- Lu XW, Du L, Kou L, Song N, Zhang YJ, Wu MK, Shen JF (2015) Effects of moderate static magnetic fields on the voltage-gated sodium and calcium channel currents in trigeminal ganglion neurons. *Electromagn Biol Med* 34:285-292.
- Luczak A, McNaughton BL, Harris KD (2015) Packet-based communication in the cortex. *Nat Rev Neurosci* 16:745-755.
- Luft AR, Kaelin-Lang A, Hauser TK, Cohen LG, Thakor NV, Hanley DF (2001)

- Transcranial magnetic stimulation in the rat. *Exp Brain Res* 140:112-121.
- Maccabee PJ, Amassian VE, Eberle LP, Cracco RQ (1993) Magnetic coil stimulation of straight and bent amphibian and mammalian peripheral nerve in vitro: locus of excitation. *The Journal of Physiology* 460:201-219.
- MacDonald JF, Miljkovic Z, Pennefather P (1987) Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *J Neurophysiol* 58:251-266.
- Makowiecki K, Harvey AR, Sherrard RM, Rodger J (2014) Low-intensity repetitive transcranial magnetic stimulation improves abnormal visual cortical circuit topography and upregulates BDNF in mice. *J Neurosci* 34:10780-10792.
- Malik S, Jacobs M, Cho S-S, Boileau I, Blumberger D, Heilig M, Wilson A, Daskalakis ZJ, Strafella AP, Zangen A, Le Foll B (2017) Deep TMS of the insula using the H-coil modulates dopamine release: a crossover [11C] PHNO-PET pilot trial in healthy humans. *Brain Imaging and Behavior*.
- Martens HC, Toader E, Decre MM, Anderson DJ, Vetter R, Kipke DR, Baker KB, Johnson MD, Vitek JL (2011) Spatial steering of deep brain stimulation volumes using a novel lead design. *Clin Neurophysiol* 122:558-566.
- Merrill DR, Bikson M, Jefferys JG (2005) Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *J Neurosci Methods* 141:171-198.
- Meyer RE, Fish RE (2011) Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*:27-82.
- Miceli S, Ness TV, Einevoll GT, Schubert D (2017) Impedance Spectrum in Cortical Tissue: Implications for Propagation of LFP Signals on the Microscopic Level. *eNeuro* 4.
- Michel E, Hernandez D, Lee SY (2017) Electrical conductivity and permittivity maps of brain tissues derived from water content based on T1 - weighted acquisition. *Magnetic resonance in medicine* 77:1094-1103.
- Minami SB, Shinden S, Okamoto Y, Watada Y, Watabe T, Oishi N, Kanzaki S, Saito H, Inoue Y, Ogawa K (2011) Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for treatment of chronic tinnitus. *Auris Nasus Larynx* 38:301-306.
- Minusa S, Osanai H, Tateno T (2017) Micromagnetic Stimulation of the Mouse Auditory Cortex In Vivo Using an Implantable Solenoid System. *IEEE Trans Biomed Eng*.
- Miranda PC, Hallett M, Basser PJ (2003) The electric field induced in the brain by magnetic stimulation: a 3-D finite-element analysis of the effect of tissue heterogeneity and anisotropy. *IEEE Trans Biomed Eng* 50:1074-1085.
- Mitzdorf U (1985) Current source-density method and application in cat cerebral cortex:

- investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiol Rev* 65:37-100.
- Mix A, Benali A, Funke K (2014) Strain differences in the effect of rTMS on cortical expression of calcium-binding proteins in rats. *Exp Brain Res* 232:435-442.
- Miyasaka M, Domino EF (1968) Neural mechanisms of ketamine-induced anesthesia. *Int J Neuropharmacol* 7:557-573.
- Mueller JK, Grigsby EM, Prevosto V, Petraglia FW, 3rd, Rao H, Deng ZD, Peterchev AV, Sommer MA, Egner T, Platt ML, Grill WM (2014) Simultaneous transcranial magnetic stimulation and single-neuron recording in alert non-human primates. *Nat Neurosci* 17:1130-1136.
- Mulders WH, Vooy's V, Makowiecki K, Tang AD, Rodger J (2016) The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in an animal model of tinnitus. *Sci Rep* 6:38234.
- Muller PA, Dhamne SC, Vahabzadeh-Hagh AM, Pascual-Leone A, Jensen FE, Rotenberg A (2014) Suppression of motor cortical excitability in anesthetized rats by low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. *PLoS One* 9:e91065.
- Muller-Preuss P, Mitzdorf U (1984) Functional anatomy of the inferior colliculus and the auditory cortex: current source density analyses of click-evoked potentials. *Hear Res* 16:133-142.
- Muroi Y, Theusch CM, Czajkowski C, Jackson MB (2009) Distinct structural changes in the GABAA receptor elicited by pentobarbital and GABA. *Biophys J* 96:499-509.
- Murphy SC, Palmer LM, Nyffeler T, Muri RM, Larkum ME (2016) Transcranial magnetic stimulation (TMS) inhibits cortical dendrites. *Elife* 5.
- Nagarajan SS, Durand DM, Warman EN (1993) Effects of induced electric fields on finite neuronal structures: a simulation study. *IEEE Trans Biomed Eng* 40:1175-1188.
- Newport DJ, Carpenter LL, McDonald WM, Potash JB, Tohen M, Nemeroff CB (2015) Ketamine and Other NMDA Antagonists: Early Clinical Trials and Possible Mechanisms in Depression. *Am J Psychiatry* 172:950-966.
- Nitsche MA, Liebetanz D, Tergau F, Paulus W (2002) Modulation of cortical excitability by transcranial direct current stimulation. *Nervenarzt* 73:332-335.
- Noda T, Takahashi H (2015) Anesthetic effects of isoflurane on the tonotopic map and neuronal population activity in the rat auditory cortex. *European Journal of Neuroscience* 42:2298-2311.
- Noto M, Nishikawa J, Tateno T (2016) An analysis of nonlinear dynamics underlying neural activity related to auditory induction in the rat auditory cortex.

- Neuroscience 318:58-83.
- O'Connell MN, Barczak A, Schroeder CE, Lakatos P (2014) Layer specific sharpening of frequency tuning by selective attention in primary auditory cortex. *J Neurosci* 34:16496-16508.
- O'Reardon JP, Solvason HB, Janicak PG, Sampson S, Isenberg KE, Nahas Z, McDonald WM, Avery D, Fitzgerald PB, Loo C, Demitrack MA, George MS, Sackeim HA (2007) Efficacy and safety of transcranial magnetic stimulation in the acute treatment of major depression: a multisite randomized controlled trial. *Biol Psychiatry* 62:1208-1216.
- Ochi T, Nishiura I, Tatsumi M, Hirano Y, Yahagi K, Sakurai Y, Matsuyama-Fujiwara K, Sudo Y, Nishina N, Koyama H (2014) Anesthetic effect of a combination of medetomidine-midazolam-butorphanol in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci* 76:917-921.
- Okano H, Kishi N (2017) Investigation of brain science and neurological/psychiatric disorders using genetically modified non-human primates. *Curr Opin Neurobiol* 50:1-6.
- Ozen S, Sirota A, Belluscio MA, Anastassiou CA, Stark E, Koch C, Buzsáki G (2010) Transcranial electric stimulation entrains cortical neuronal populations in rats. *J Neurosci* 30:11476-11485.
- Palmer LM, Shai AS, Reeve JE, Anderson HL, Paulsen O, Larkum ME (2014) NMDA spikes enhance action potential generation during sensory input. *Nature neuroscience* 17:383-390.
- Park HJ, Bonmassar G, Kaltenbach JA, Machado AG, Manzoor NF, Gale JT (2013) Activation of the central nervous system induced by micro-magnetic stimulation. *Nat Commun* 4:2463.
- Pascual-Leone A, Valls-Sole J, Wassermann EM, Hallett M (1994) Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain* 117 ( Pt 4):847-858.
- Pashut T, Wolfus S, Friedman A, Lavidor M, Bar-Gad I, Yeshurun Y, Korngreen A (2011) Mechanisms of magnetic stimulation of central nervous system neurons. *PLoS Comput Biol* 7:e1002022.
- Pashut T, Magidov D, Ben-Porat H, Wolfus S, Friedman A, Perel E, Lavidor M, Bar-Gad I, Yeshurun Y, Korngreen A (2014) Patch-clamp recordings of rat neurons from acute brain slices of the somatosensory cortex during magnetic stimulation. *Front Cell Neurosci* 8:145.
- Patel IM, Chapin JK (1990) Ketamine effects on somatosensory cortical single neurons

- and on behavior in rats. *Anesth Analg* 70:635-644.
- Perlmutter JS, Mink JW (2006) Deep brain stimulation. *Annu Rev Neurosci* 29:229-257.
- Pienkowski M, Eggermont JJ (2009) Long-term, partially-reversible reorganization of frequency tuning in mature cat primary auditory cortex can be induced by passive exposure to moderate-level sounds. *Hear Res* 257:24-40.
- Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM (2005) Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J Neurosci Methods* 148:1-18.
- Polley DB, Read HL, Storace DA, Merzenich MM (2007) Multiparametric auditory receptive field organization across five cortical fields in the albino rat. *J Neurophysiol* 97:3621-3638.
- Premoli I, Castellanos N, Rivolta D, Belardinelli P, Bajo R, Zipser C, Espenhahn S, Heidegger T, Muller-Dahlhaus F, Ziemann U (2014) TMS-EEG signatures of GABAergic neurotransmission in the human cortex. *J Neurosci* 34:5603-5612.
- Pridmore S, Oberoi G, Marcolin M, George M (2005) Transcranial magnetic stimulation and chronic pain: current status. *Australas Psychiatry* 13:258-265.
- Qin L, Chimoto S, Sakai M, Wang J, Sato Y (2007) Comparison between offset and onset responses of primary auditory cortex ON-OFF neurons in awake cats. *J Neurophysiol* 97:3421-3431.
- Radman T, Ramos RL, Brumberg JC, Bikson M (2009) Role of Cortical Cell Type and Morphology in Sub- and Suprathreshold Uniform Electric Field Stimulation. *Brain Stimul* 2:215-228.
- Raekallio M, Tulamo RM, Valtamo T (1998) Medetomidine-midazolam sedation in sheep. *Acta Vet Scand* 39:127-134.
- Rahman A, Reato D, Arlotti M, Gasca F, Datta A, Parra LC, Bikson M (2013) Cellular effects of acute direct current stimulation: somatic and synaptic terminal effects. *J Physiol* 591:2563-2578.
- Reato D, Rahman A, Bikson M, Parra LC (2010) Low-intensity electrical stimulation affects network dynamics by modulating population rate and spike timing. *J Neurosci* 30:15067-15079.
- Reato D, Rahman A, Bikson M, Parra LC (2013) Effects of weak transcranial alternating current stimulation on brain activity-a review of known mechanisms from animal studies. *Front Hum Neurosci* 7:687.
- Rennaker RL, Carey HL, Anderson SE, Sloan AM, Kilgard MP (2007) Anesthesia suppresses nonsynchronous responses to repetitive broadband stimuli. *Neuroscience* 145:357-369.
- Richter L, Neumann G, Oung S, Schweikard A, Trillenber P (2013) Optimal coil

- orientation for transcranial magnetic stimulation. *PLoS One* 8:e60358.
- Ridding MC, Rothwell JC (2007) Is there a future for therapeutic use of transcranial magnetic stimulation? *Nat Rev Neurosci* 8:559-567.
- Rodger J, Sherrard RM (2015) Optimising repetitive transcranial magnetic stimulation for neural circuit repair following traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 10:357-359.
- Rossini PM et al. (2015) Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an I.F.C.N. Committee. *Clin Neurophysiol* 126:1071-1107.
- Rotem A, Neef A, Neef NE, Agudelo-Toro A, Rakhmilevitch D, Paulus W, Moses E (2014) Solving the orientation specific constraints in transcranial magnetic stimulation by rotating fields. *PLoS One* 9:e86794.
- Roth BJ (1994) Mechanisms for electrical stimulation of excitable tissue. *Crit Rev Biomed Eng* 22:253-305.
- Roth BJ, Basser PJ (1990) A model of the stimulation of a nerve fiber by electromagnetic induction. *IEEE Trans Biomed Eng* 37:588-597.
- Ruebhausen MR, Brozoski TJ, Bauer CA (2012) A comparison of the effects of isoflurane and ketamine anesthesia on auditory brainstem response (ABR) thresholds in rats. *Hear Res* 287:25-29.
- Ruohonen J, Ilmoniemi RJ (1998) Focusing and targeting of magnetic brain stimulation using multiple coils. *Med Biol Eng Comput* 36:297-301.
- Ruohonen J, Ravazzani P, Grandori F, Ilmoniemi RJ (1999) Theory of multichannel magnetic stimulation: toward functional neuromuscular rehabilitation. *IEEE Trans Biomed Eng* 46:646-651.
- Rutkowski RG, Miasnikov AA, Weinberger NM (2003) Characterisation of multiple physiological fields within the anatomical core of rat auditory cortex. *Hear Res* 181:116-130.
- Saari TI, Uusi-Oukari M, Ahonen J, Olkkola KT (2011) Enhancement of GABAergic activity: neuropharmacological effects of benzodiazepines and therapeutic use in anesthesiology. *Pharmacol Rev* 63:243-267.
- Sakata S, Harris KD (2009) Laminar structure of spontaneous and sensory-evoked population activity in auditory cortex. *Neuron* 64:404-418.
- Sasaki E et al. (2009) Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* 459:523-527.
- Scheinin H, Virtanen R, MacDonald E, Lammintausta R, Scheinin M (1989)

- Medetomidine--a novel alpha 2-adrenoceptor agonist: a review of its pharmacodynamic effects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 13:635-651.
- Sellers KK, Bennett DV, Hutt A, Frohlich F (2013) Anesthesia differentially modulates spontaneous network dynamics by cortical area and layer. *J Neurophysiol* 110:2739-2751.
- Sellers KK, Bennett DV, Hutt A, Williams JH, Frohlich F (2015) Awake vs. anesthetized: layer-specific sensory processing in visual cortex and functional connectivity between cortical areas. *J Neurophysiol* 113:3798-3815.
- Shibuki K, Ono K, Hishida R, Kudoh M (2006) Endogenous fluorescence imaging of somatosensory cortical activities after discrimination learning in rats. *Neuroimage* 30:735-744.
- Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T, Tanaka R (2003) Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol* 549:919-927.
- Shilo Y, Lapid R, King R, Bdolah-Abram T, Epstein A (2010) Immobilization of red fox (*Vulpes vulpes*) with medetomidine-ketamine or medetomidine-midazolam and antagonism with atipamezole. *J Zoo Wildl Med* 41:28-34.
- Shrestha P, Mousa A, Heintz N (2015) Layer 2/3 pyramidal cells in the medial prefrontal cortex moderate stress induced depressive behaviors. *Elife* 4.
- Silva S, Basser P, Miranda P (2008) Elucidating the mechanisms and loci of neuronal excitation by Transcranial Magnetic Stimulation using a finite element model of a cortical sulcus. *Clin Neurophysiol* 119:2405-2413.
- Sleight J, Harvey M, Vossa L, Denny B (2014) Ketamine – More mechanisms of action than just NMDA blockade. *Trends in Anaesthesia and Critical Care* 4:76–81.
- Smiley JF, Hackett TA, Bleiwas C, Petkova E, Stankov A, Mann JJ, Rosoklija G, Dwork AJ (2016) Reduced GABA neuron density in auditory cerebral cortex of subjects with major depressive disorder. *J Chem Neuroanat* 76:108-121.
- Smith PH, Uhrich DJ, Manning KA, Banks MI (2012) Thalamocortical projections to rat auditory cortex from the ventral and dorsal divisions of the medial geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 520:34-51.
- Song WJ, Kawaguchi H, Totoki S, Inoue Y, Katura T, Maeda S, Inagaki S, Shirasawa H, Nishimura M (2006) Cortical intrinsic circuits can support activity propagation through an isofrequency strip of the guinea pig primary auditory cortex. *Cereb Cortex* 16:718-729.
- Spelman LH (2004) Reversible anesthesia of captive California sea lions (*Zalophus*



- californianus) with medetomidine, midazolam, butorphanol, and isoflurane. *J Zoo Wildl Med* 35:65-69.
- Stolzberg D, Chrostowski M, Salvi RJ, Allman BL (2012) Intracortical circuits amplify sound-evoked activity in primary auditory cortex following systemic injection of salicylate in the rat. *J Neurophysiol* 108:200-214.
- Surges R, Sarvari M, Steffens M, Els T (2006) Characterization of rebound depolarization in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 348:1343-1349.
- Sykes M, Matheson NA, Brownjohn PW, Tang AD, Rodger J, Shemmell JB, Reynolds JN (2016) Differences in Motor Evoked Potentials Induced in Rats by Transcranial Magnetic Stimulation under Two Separate Anesthetics: Implications for Plasticity Studies. *Front Neural Circuits* 10:80.
- Szymanski FD, Rabinowitz NC, Magri C, Panzeri S, Schnupp JW (2011) The laminar and temporal structure of stimulus information in the phase of field potentials of auditory cortex. *J Neurosci* 31:15787-15801.
- Talwar SK, Gerstein GL (2001) Reorganization in awake rat auditory cortex by local microstimulation and its effect on frequency-discrimination behavior. *J Neurophysiol* 86:1555-1572.
- Tang AD, Hong I, Boddington LJ, Garrett AR, Etherington S, Reynolds JN, Rodger J (2016a) Low-intensity repetitive magnetic stimulation lowers action potential threshold and increases spike firing in layer 5 pyramidal neurons in vitro. *Neuroscience* 335:64-71.
- Tang AD, Lowe AS, Garrett AR, Woodward R, Bennett W, Canty AJ, Garry MI, Hinder MR, Summers JJ, Gersner R, Rotenberg A, Thickbroom G, Walton J, Rodger J (2016b) Construction and Evaluation of Rodent-Specific rTMS Coils. *Front Neural Circuits* 10:47.
- Thornton C, Sharpe RM (1998) Evoked responses in anaesthesia. *Br J Anaesth* 81:771-781.
- Thut G, Veniero D, Romei V, Miniussi C, Schyns P, Gross J (2011) Rhythmic TMS causes local entrainment of natural oscillatory signatures. *Curr Biol* 21:1176-1185.
- Tofts PS (1990) The distribution of induced currents in magnetic stimulation of the nervous system. *Phys Med Biol* 35:1119-1128.
- Tomioka I et al. (2017) Transgenic Monkey Model of the Polyglutamine Diseases Recapitulating Progressive Neurological Symptoms. *eNeuro* 4.
- Tsukano H, Horie M, Hishida R, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K (2016) Quantitative map of multiple auditory cortical regions with a stereotaxic

- fine-scale atlas of the mouse brain. *Sci Rep* 6:22315.
- Tsukano H, Horie M, Bo T, Uchimura A, Hishida R, Kudoh M, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K (2015) Delineation of a frequency-organized region isolated from the mouse primary auditory cortex. *J Neurophysiol* 113:2900-2920.
- Tsutsui K, Nakamura S (2017) The Role of Monkey Medial Frontal Cortex in the Regulation of Affect and Mood Examined by Repetitive Trans-cranial Magnetic Stimulation (rTMS). *Japanese Journal of Psychosomatic Medicine* 57:916-921.
- Turner JG, Hughes LF, Caspary DM (2005) Affects of aging on receptive fields in rat primary auditory cortex layer V neurons. *J Neurophysiol* 94:2738-2747.
- Tyler WJ, Tufail Y, Finsterwald M, Tauchmann ML, Olson EJ, Majestic C (2008) Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound. *PLoS One* 3:e3511.
- Ueno S, Tashiro T, Harada K (1988) Localized stimulation of neural tissues in the brain by means of a paired configuration of time - varying magnetic fields. *Journal of Applied Physics* 64:5862-5864.
- Valero-Cabre A, Amengual JL, Stengel C, Pascual-Leone A, Coubard OA (2017) Transcranial magnetic stimulation in basic and clinical neuroscience: A comprehensive review of fundamental principles and novel insights. *Neurosci Biobehav Rev* 83:381-404.
- Voigt MB, Hubka P, Kral A (2017) Intracortical microstimulation differentially activates cortical layers based on stimulation depth. *Brain Stimul* 10:684-694.
- Voigt T, Katscher U, Doessel O (2011) Quantitative conductivity and permittivity imaging of the human brain using electric properties tomography. *Magn Reson Med* 66:456-466.
- Wahl-Schott C, Biel M (2009) HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 66:470-494.
- Wang DS, Lu SY, Hong Z, Zhu HL (2003) Biphasic action of midazolam on GABAA receptor-mediated responses in rat sacral dorsal commissural neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 309:893-899.
- Winer JA, Prieto JJ (2001) Layer V in cat primary auditory cortex (AI): cellular architecture and identification of projection neurons. *J Comp Neurol* 434:379-412.
- Woods AJ, Antal A, Bikson M, Boggio PS, Brunoni AR, Celnik P, Cohen LG, Fregni F, Herrmann CS, Kappenman ES, Knotkova H, Liebetanz D, Miniussi C, Miranda PC, Paulus W, Priori A, Reato D, Stagg C, Wenderoth N, Nitsche MA (2016) A technical guide to tDCS, and related non-invasive brain stimulation tools. *Clin*

- Neurophysiol 127:1031-1048.
- Wylie KP, Kronberg E, Maharajh K, Smucny J, Cornier MA, Tregellas JR (2015) Between-network connectivity occurs in brain regions lacking layer IV input. *Neuroimage* 116:50-58.
- Xie X, Rieth L, Caldwell R, Diwekar M, Tathireddy P, Sharma R, Solzbacher F (2013) Long-term bilayer encapsulation performance of atomic layer deposited Al(2)O(3) and Parylene C for biomedical implantable devices. *IEEE Trans Biomed Eng* 60:2943-2951.
- Yamamura D, Sano A, Tateno T (2017) An analysis of current source density profiles activated by local stimulation in the mouse auditory cortex in vitro. *Brain Res* 1659:96-112.
- Yu OF, Chiu TH, Rosenberg HC (1988) A comparison of the effects of midazolam and pentobarbital on the dose-response of GABA-gated Cl<sup>-</sup> influx in rat brain microsacs. *Brain Res* 451:376-380.
- Zhang J (2013) Auditory cortex stimulation to suppress tinnitus: mechanisms and strategies. *Hear Res* 295:38-57.
- Zurita P, Villa AE, de Ribaupierre Y, de Ribaupierre F, Rouiller EM (1994) Changes of single unit activity in the cat's auditory thalamus and cortex associated to different anesthetic conditions. *Neurosci Res* 19:303-316.

## 各実験における動物使用数

第2・第3章					動物使用数
コイルの向き	60°		0°		
計測電極	刺入型電極	脳表電極	刺入型電極	脳表電極	計
マウス使用数	6* **	6*	3**	2	15

第4章			動物使用数
麻酔投与順序	KX-MMB-KX	MMB-KX-MMB	計
ラット使用数	3	4	7

\* 1 個体、同一個体で刺入型電極と脳表電極の両方で記録

\*\* 1 個体、コイルの向き(3-3-4 節 参照)が 0° と 60° の場合の両方で記録

## 略語

A1	primary auditory cortex; 一次聴覚野
AAF	anterior auditory field; 前聴覚野
ACSF	artificial cerebrospinal fluid; 人工脳脊髄液
BW	bandwidth; 帯域幅
CF	characteristic frequency; 特徴周波数
CSD	current-source density; 電流源密度
ECoG	electrocochleography; 脳波(脳表電極記録)
EEG	electroencephalography; 脳波(頭皮電極記録)
FRA	frequency-intensity response area; 周波数-音圧受容野
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid; $\gamma$ -アミノ酪酸
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated; 過分極活性化陽イオンチャンネル
KX	the mixture of ketamine and xylazine; ケタミン-キシラジン麻酔薬
LFP	local field potential; 局所電場電位
MEA	multielectrode array; 多点電極
MMB	the mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol; 3種混合麻酔薬
MT	minimum threshold; 最小閾値
NMDA	N-methyl-D-aspartate; N-メチル-D-アスパラギン酸
PSTH	peri-stimulus time histogram; 刺激前後のヒストグラム
RLF	rate-level function; 発火頻度-音圧関数
SD	standard deviation; 標準偏差
STRF	spectrotemporal receptive field; 時間周波数受容野
TMS	transcranial magnetic stimulation; 経頭蓋磁気刺激
TTX	tetrodotoxin; テトロドトキシン
$\mu$ MS	micro-magnetic stimulation / magnetic stimulation using a micro-coil; 微小コイル磁気刺激

## 謝辞

本研究は 2015 年 4 月より 2018 年 3 月にかけて、北海道大学大学院情報科学研究科で行われました。本研究を遂行するにあたり、数多くのご指導、ご助言を承りました舘野高教授に深く感謝申し上げます。また、本研究においてフライング蛍光イメージングの実験系を立ち上げるにあたり、計測の手技・手法についてご助言を頂きました新潟大学医学部の澁木克栄教授に深く感謝申し上げます。最後に、神経制御工学研究室の皆様方には様々な面でご助言やご助力を頂きましたことを、この場を借りて感謝の意を述べさせていただきます。

## 引用許諾

図 2-4-2-7、図 2-10-2-7、図 3-2、図 3-5、図 3-2-3-19、図 3-23、表 3-1-3-3、図 4-1-4-10、表 4-1 は、著者が Elsevier 社の学術雑誌(Hearing Research および Neuroscience)に筆頭著者として投稿したものを引用した。Elsevier 社の方針により、投稿論文の著者が非営利目的の学位論文に図を引用する際には引用許諾を必要としない。

図 1-1 は Nature Publishing Group 社の引用許諾(License Number: 4242321338719)、図 1-2 および図 1-5 は Elsevier 社の引用許諾(License Number: 4250640572363; 4227640014163)、図 2-1-2-2 は Springer Nature 社の引用許諾(License Number: 4250621032799)、図 2-3 は Elsevier 社の引用許諾(License Number: 4250640976357)、図 3-1 は Elsevier 社の引用許諾(License Number: 4224720575881)のもとで図を引用した。

## 研究業績

### 1. 主要学術論文

[1] Hisayuki Osanai and Takashi Tateno,

"Neural response differences in the rat primary auditory cortex under anesthesia with ketamine versus the mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol", *Hearing Research*, Vol. 339, pp. 69–79 (2016) doi: 10.1016/j.heares.2016.06.012

[2] Hisayuki Osanai, Shunsuke Minusa and Takashi Tateno,

"Micro-coil-induced inhomogeneous electric field produces sound-driven-like neural responses in microcircuits of the mouse auditory cortex in vivo", *Neuroscience* (published online 2017) doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.12.008)

### 2. 査読付国際会議プロシーディング

[1] Hisayuki Osanai and Takashi Tateno,

"Differential Effect of Two Types of Anesthesia on Sound-Driven Oscillations in the Rat Primary Auditory Cortex", *Neural Information Processing, Lecture Notes in Computer Science*, Springer, Vol. 9948, pp. 363–371 (2016) doi: 10.1007/978-3-319-46672-9\_41

### 3. 講演(学位論文関係)

[1] Hisayuki Osanai, Sota Takahashi, Ryo Iwaki and Takashi Tateno, "A Frequency-Selective CMOS IC-Based Pulse Generator for Recording and Imaging in the Auditory Cortex In Vivo", MEA meeting 2016, 9.01, Reutlingen, Germany (2016年6月)

[2] Hisayuki Osanai and Takashi Tateno, “Differential Effect of Two Types of Anesthesia on Sound-Driven Oscillations in the Rat Primary Auditory Cortex”, 23rd International Conference on Neural Information Processing (ICONIP2016), Kyoto, Japan (2016 年 10 月)

[3] Hisayuki Osanai and Takashi Tateno, “Neural response differences in the rat primary auditory cortex under anesthesia with ketamine versus the mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol”, Annual meeting of Society for Neuroscience (SfN2016), 51.04, San Diego, California, USA (2016 年 11 月)

[4] Hisayuki Osanai and Takashi Tateno, “Microcoil-driven responses induced by magnetic stimulation spatially restricted to the local surface of the mouse auditory cortex in vivo”, Annual meeting of Society for Neuroscience (SfN2017), 51.04, Washington, DC, USA (2017 年 11 月)