

# 多細胞同時記録実験の必要性と方法 - 現状と問題点 -

櫻井芳雄

京都大学霊長類研究所, 岡崎国立共同研究機構生理学研究所,

科学技術振興事業団さきがけ研究 21

## 1. はじめに

脳はその多様で独特な高次機能をどのように実現しているのだろうか？ 一体ここではどのような情報処理方式が採られているのだろうか？ この誰でも思いつきそうな問いは、実際に脳を研究する立場からは意外と意識されていない。現在隆盛の一途をたどる脳の実験的研究は、ある機能にどの伝達物質が関わっているのか (what), あるいは、ある機能にどの部位が関わっているのか (where), に関するものが圧倒的に多い。ある機能がどのように処理され実現されているのか (how) に焦点を当てた実験的研究は、極めて少ない。何よりも、脳内では何が情報処理の基本コードであるのか、つまり情報表現 (符号化) の基本的単位さえもまだ明らかではない。それをまず明らかにし、そこから情報処理方式について解明していくことこそ、ミクロな伝達物質からマクロな機能地図にまたがる、様々なレベルの研究成果を統合していく鍵である。またそれは、脳に関する膨大な実験的データと、急速に進展しつつある脳の理論的研究との協調と統合への道でもある。

## 2. ニューロン活動記録実験の目的

脳機能の中でも特に高次な情報処理の研究となると、脳のどこが関与しているかという、マクロな機能地図の解明がまず先行する。事実、サルの破壊実験やヒトの脳損傷例から、様々な情報処理に関与する特定の脳部位の存在が、次第に明らかになってきた。脳損傷を作る破壊実験は、脳と行動とを対応させる研究の古典的かつ基本的方法であり、最近開発が進んでいる脳活動の非侵襲的計測法の結果と対応させることで、マクロな機能地図に関する多くの知見を、今後も提供してくれるはずである。しかし言うまでもなく、そのような機能地図は、脳のすばらしい情報処理の仕組みについては何も教えてくれない。そこで、特定の脳部位内での情報処理の動態について直接測定し解析する方法となると、微小電極による単一ニューロン活動の記録となる。この技術はすでに 1950 年代に開発されており、これまでの膨大な研究成果から、各ニューロンはそれぞれ個性的であり、その個性も脳の部位毎に異なることがわかっている。ところが、そのような研究で主に用いられるロジックは、「 (部位) には (働き) を持つニューロンが多く存在した。よって は に関与する」というものである。もちろんこのような知見も十分に意義がある。しかし、

せっかく脳というシステムを構成するニューロンの動態をリアルタイムで計測しているながら、破壊実験と同様にマクロな機能地図の作成だけをめざすとしたら何とももったいないし、そのほうなロジックでは、脳の情報処理の仕組みは何も解明されない。また当然のことながら、脳部位の機能はそこでの超複雑な回路網の働きにより実現されている。にも関わらず、ある特性を持つニューロンが多いか少ないかで、その部位の主な機能が決まるとしたら、脳はニューロンという有権者による単なる多数決で、各部位の機能を決めていることになる。ニューロン回路網の中での個性の相互作用や協調自体には、果たして意味がないのであろうか？ ニューロン活動の記録実験にとって今後必要なことは、超複雑な回路網の構成単位を対象としていることを意識しながら、その動態を解析することであり、さらにそこから、脳の情報処理様式の解明へと進むことである。

### 3. 単一ニューロンから動的神経回路へ

ニューロン活動の解析から脳の情報処理様式の解明へと進む際、まずはじめに明らかにしておかねばならない大問題がある。単一ニューロンの活動と複数ニューロン集団の活動のどちらが、情報の基本コードかである。全ての情報や事象はそれぞれに対応した特定のニューロンにより脳内で表現されるというのが、単一ニューロン主義(single neuron doctrine)である。外界刺激の認識に関しては、認識細胞説やお婆さん細胞説などとも言われる。もちろんこの場合の単一とは、ある情報を表現するニューロンが脳内に1つだけあるという意味ではない。その様なニューロンは多数存在するが、情報を表現する単位は個々のニューロンという意味である。

例えば、動物に様々な刺激を見せながらニューロン活動を記録したとする。その時、刺激Aに対してより発火を増大させたニューロンがあったとしたら、それは脳内でAを表現するとニューロンと解釈される。普通このような実験では、同じ刺激を数回から数十回繰り返し提示し、その都度の活動を全て足しあわせた加算平均ヒストグラムによりニューロン活動を表す。しかしその動物や我々がAを認識するには、よほど注意散漫でない限り、繰り返し加算は必要ないのである。つまり、このような不安定なニューロンが単独でAを表現しきれるとは、とても考えられない。ほとんどのニューロンは常に不規則な自発発火を繰り返しており、発火間隔の変動を表すその標準偏差は、平均値とほぼ同じで極めて大きい。たしかに切片標本を用いた最近の研究は、ニューロン自体には正確なタイミングで発火する能力があることを示している。しかし膨大な数のニューロンが回路網を作る実際の脳では、1つのニューロンが他のニューロンからのシナプスを数千から1万も持っている。となると、個々のシナプス入力のみで、それによる個々の膜電位変化が小さくとも、これだけ膨大な数のシナプスから入力を受け取っていると、細胞全体の膜電位には常に脳波のようなランダムな変化が生じてしまう。そしてそれが不規則に閾値を超

えることで、ランダムな自発発火を繰り返す。それでも、特定の事象に対する時のみ極めて高頻度に発火すれば、SN比（信号雑音比）は良くなり得る。しかし、そのような発火を受けると次のニューロンのシナプス後膜の応答性は鈍く、15ヘルツ以上の発火はそこでゆがんでしまい、あまり意味をなさないという。結局、単一のニューロンはどれもSN比の悪い不安定なしるものであり、情報を十分に表現する単位にはなり得ない。

さらに単一ニューロン主義については、次の問題点もよく指摘される。1) 単一ニューロンの発火は、次のニューロンの細胞膜に極めて小さい変化しか起こし得ず、単独ではほとんど無力である。2) 実験場面で恣意的に選んだ事象の中でさえ、一つのニューロンがそれらのうちの複数に応答することも多い。3) ある特定の機能に関わる脳領域が壊れた際、他の部位がその機能を代行することがある（ニューロンの機能変化による代償）。また実験事実に基づかなくとも、以下の問題点は容易に思いつく。1) 事象の組合せは新たな事象を生み（お婆さん 帽子をかぶったお婆さん 帽子をかぶって自転車に乗っているお婆さん）、それは無数に作れるが、有限な個々のニューロンでこのほぼ無限な事象に対応できるか（組み合わせ爆発の問題）。2) 情報間の連合、分離、類似度、構造化等を、個々のニューロンで十分に表現できるか。3) 多数のニューロンが毎日死滅しているにも関わらず、脳内の情報が次々死滅していかないのはなぜか。

これらのことから、何らかのニューロン集団が協調的に働くことにより情報を表現するという、集団的・協調的符号化（population ensemble coding）をどうしても考えざるを得ない。ただしここでの集団という言葉は、個々のニューロンが無個性で均質であり集団となって始めて意味を持つ、ということではない。ニューロンが個性的であることはすでにわかっている。それら個性の協調が情報を表現するということである。つまり、単一ニューロンの個性を生かしながら、少数の局所集団から膨大な大集団までのどこをも含み得る、連続性のある動的な回路を、脳内情報を表現する基本的単位と考えるべきであろう。

#### 4. 動的神経回路としてのセル・アセンブリ

情報を担い得る連続性のある動的な回路は何かとなると、かつて心理学者D.O.Hebb が唱えたセルアセンブリ（cell assembly 細胞集成体）をまず思いつく。セルアセンブリとは、協調的ニューロン集団により随時形成される機能的回路である。個々のニューロンが機能の異なる複数の回路に重複して結合し、なおかつ必要な情報処理に応じて回路内や回路間の結合を変化させ、大小の閉回路を随時形成する。複数の情報処理の同時進行が可能なので、まさしく脳独特の並列分散処理の実現である。同じ性質のニューロンが単に集まるだけの量作用説（mass action）とは異なり、回路内の個々のニューロンもある程度の個性を持っている。回路を構成

するニューロンを結合するシナプス強度の増減は、Hebb 則、つまりシナプス前ニューロンと後ニューロンの活動相関により制御される。セルアセンブリの主な特徴は2つあり、一つは異なる回路間でのニューロンの重複 (neurons overlapping)、もう一つは機能的シナプス結合の変化による回路自体の動的な変化 (connection dynamics) である。これがそれを実験的に検出する際のカギになる (櫻井, 1998a; Sakurai, 1996a; 1998ab, 1999)。

## 5. 多細胞同時記録実験の方法

セル・アセンブリという動的で機能的な回路を直接測定するための新技術は、光学的測定法などを中心として次第に開発されつつあるが、決して容易ではない。そこで、従来のニューロン活動記録する技術を応用し改善することにより、回路の部分的な活動を検出し、その背景にある回路網全体の働きを明らかにしようとする方法が、多細胞同時記録であり、マルチニューロン活動の同時記録、マルチユニットの記録 (multiunit recording)、多点同時記録 (multichannel neuronal recording) などとも呼ばれる。

個々のニューロン活動を、多数しかも同時に測定するためには、三つの基本的技術が必要である。すなわち、記録電極の作製と選定、電極の配列と操作、データの取り込み、である。以下、その順に簡単に解説する。なお、ニューロン活動の記録に関する基本的な解説として櫻井(1998bc)が、また、多細胞同時記録から解析に至る最近の優れた解説として伊藤(1998)がある。さらに、この技術による研究の隆盛を示すものとして、より詳しい単行本も最近は相次いで出版されている (Eichenbaum & Davis, 1998; Nicolelis, 1998)。

### 5 - 1. 記録電極の作製と選定

従来の微小電極を単に並べるだけでは、電極間の距離がどうしてもある一定以上離れてしまい、回路を構成しているはずの近傍の多数ニューロンから同時記録することは難しい。そこで、個々の電極の先端を工夫することで、狭い範囲に存在するほぼ全てのニューロンの活動を同時に検出する特殊電極が、いくつか考えられてる。いずれも一本の電極に多数の記録点を設けたものであり、多点電極などと呼ばれる。例えば、マルチファイバー電極は Thomas 社から市販されており、シリコンプローブ電極はミシガン大学の Center for Neural Communication Technology から供給されている。またそのような電極自体に、増幅回路やマルチプレクサ回路等を焼き付けたものもあり、例えば 32 点の記録点からの信号を増幅し同時測定することが可能な電極もある。ステレオトロードやテトロードと呼ばれる電極は自作されることが多い。

## 5 - 2. 電極の配列と操作

より多数の電極を刺入したい場合は、市販のワイヤー電極（Californica Fine Wire 社や AM-Systems 社など）を多数配列して慢性的に埋め込む方法が適している。例えば何十本ものニクロムワイヤーをポリエチレングリコール（#4000）で一時的に固め、脳内に埋め込むことが可能である。ポリエチレングリコールは体温で溶けて代謝吸収されるため、ワイヤー電極のみが脳内に残り、その柔らかさのために脳の動きと連動することから、極めて安定した長期間記録が可能となる（Floating 電極）。しかし、電極の本数を少なくしてでもそれを脳内で動かせる可動電極が、ニューロン活動の検出にはより効率的な場合も多い。ラットの場合は、マイクロドライブと呼ばれる装置を頭蓋骨上に固定し、その可動部分に電極を複数配列し、可動部分を操作することで電極列を随時脳内へ刺入していく（Sakurai, 1993; 1994; 1996b）。ラットは自由行動の状態で行う実験が多いため、マイクロドライブはまず軽量であることが必要であり、接続用ソケットも頭蓋上にしっかり固定し、ラットの後肢によるひっかきから守るためのガードも装着しなければならない。この方法をさらに拡張して電極の本数を増やし、個々の電極も個別に操作できるようにしたものが、最近市販されているハイパードライブ（Kopf 社）である。これらマイクロドライブやハイパードライブをより小型化すれば、マウスへの使用も可能である。

サルを用いる場合は、頭部を固定する場合はほとんどであるため、複数電極の操作が可能なマニピュレータと操作システムを記録時に頭部に装着し、課題遂行中に電極を個別に動かすことが可能である。また、課題遂行中に電極を動かす必要がなく、比較的長時間の記録を必要とする場合は、上記のラット用マイクロドライブを改作してサルに使うことも可能である。これらのマニピュレータ方式とマイクロドライブ方式には、それぞれにいくつもの長所と短所があるため、実験目的に合わせ使い分ける必要がある。

## 5 - 3. データの取り込み

検出したマルチニューロン活動をデータとして取り込む場合、まず個々のニューロンの活動に分離しなければならない（スパイク・アイソレーション）。マルチニューロン活動の記録のほとんどは細胞外記録であるが、その場合、同じニューロンからのスパイクでも、電極とニューロンとの距離により、その波形はかなり変動こともある。特に海馬にある錐体細胞のように、スパイクがバースト状に短時間に続けて出るときには、波形の変形も大きくなる。このようなことから、スパイクの全体的な波形に基づき個々のニューロン活動に分離する方法、すなわち、テンプレート・マッチング（template matching）やウエーブフォーム・マッチング（waveform matching）と呼ばれる方法は、適切でない場合もある。そこでスパイクを、その波形がもつ様々なパラメータ毎に分類し（スパイクの高さ、時間幅、電位変化の時間、他）、それらパラメータの変動を相対的に比較することで、個々のニューロン活動に

分離するという方法が採られることも多い。これをクラスター・カッティング (cluster cutting) と呼ぶ。この方法を用いれば、たとえスパイク波形のあるパラメータが変動しても、それが連続的に一定の範囲 (cluster) 内に収まっており、さらに他のパラメータと一定の関係を保っていれば、同じニューロンからのスパイクであると判定することができる。この方法は、異なる電極で記録されたスパイク間に見られるパラメータの変動をも比較することで、アイソレーションの精度をより上げることができるため、先に紹介した様々な多点電極と共に用いられることが多い。特にステレオトロード電極やテトロード電極と共に用いると、より有効である。ただし、テトロード電極はステレオトロード電極の倍数の電極を用いるが、検出できるニューロン数も倍となるわけではない。またこれらの電極を用いる際のクラスター・カッティングは、かなりの時間を要するため、オンラインでデータ収集と解析を済ませようとする実験には適さないことも多い。

テンプレート・マッチングやウエーブフォーム・マッチングは、専用のソフトも市販されているが (Signal Processing 社など)、そのためのシステムをある程度自作することも可能である。クラスター・カッティングのような複雑な処理となると、専用のソフトを搭載した市販のシステム (Data Wave 社など) を用いることも多い。しかしその場合、どうしても個々の実験にとって不都合が箇所が出てくるため、最近では独自のソフトとシステムを作成するラボも増えている。

#### 5 - 4. データ解析の前提

以上の技術を駆使して集めたマルチニューロンのスパイク列を、従来のニューロン活動の記録実験のように、そのままヒストグラムやラスター・プロットで表示しただけでは、それが回路網のどのような働きを表しているのか、当然のことながら全くわからない。そのようなスパイク列から一定の意味を抽出する方法こそが、データ解析法である。しかし、マルチニューロンの活動をまとめて解析し、回路網の働きを一気に表示し得る一般的な解析法はない。推計学的あるいは統計学的な観点から見て、3つ以上の変数 (ニューロン活動) 間の相互関係と個々の変数の変動をまとめて可視化する方法など、まず不可能である。そこで、まず回路網の働きに関する何らかの仮説を構築し、その仮説から当然導き出されるであろう局所的な現象を順次検証していくということが必要になる。つまり何らかの仮説演繹法こそ、マルチニューロン活動の解析の大前提であろう。

#### 6. 技術以前に考えるべきこと

より多数のニューロン活動を記録するためのハードウェアの技術は、現在進行形で急速に進んでいる。特に最近では、生理学的研究者と電子工学研究者の共同研究により、電極からの接続ケーブルさせ使わない完全無拘束の動物から、多数のニュー

ロン活動を同時記録するシステムなども開発されており（山本他，1999），多細胞活動の同時記録実験は，今後ますます増大し進展するはずである。つまり，電極の選定 電極の配列と操作 データの取り込み，については，技術的な困難さはまだあるものの，それを克服しつつ進展し，膨大なデータが蓄積されていくことは間違いない。しかし多細胞同時記録実験が，その目的，つまり神経回路網の動態の解明に到達するか否かは，その後にくるデータ解析にかかっている。そのためには，先に述べたように，回路網の働きに関する有効な仮説の構築からまず出発しなければならない。結局，この方法による研究の真価を決めるものは，実験のハードウェアに関する技術というよりも，それを活かすための，脳の情報処理に関する理論的枠組みとモデルの構築なのである。

### 参考文献（本文中に示したもの）

- \* Eichenbaum, H. and Davis, J. L. (Eds.) : *Neuronal ensembles: strategies for recording and decoding*. Welly-Liss, New York, 1998.
- \* 伊藤浩之 : 多細胞活動同時測定法. *医学のあゆみ*, 184:599-605, 1998.
- \* Nicolelis, M. A. L. (Ed.) : *Methods for neural ensemble recordings*. CRC Press, New York, 1998.
- \* 櫻井芳雄 : ニューロンから心をさぐる. 岩波書店, 東京, 1998a.
- \* 櫻井芳雄 : 脳神経科学の研究法 電気的活動記録法. *新生理心理学* (宮田洋監修), pp.62-65, 北大路書房, 京都, 1998b.
- \* 櫻井芳雄 : 多数ニューロン活動の同時記録法. *脳の科学*, 20:1233-1237, 1998c.
- \* Sakurai, Y. : Dependence of functional synaptic connections of hippocampal and neocortical neurons on types of memory. *Neurosci. Lett.*, 158:181-184, 1993.
- \* Sakurai, Y. : Involvement of auditory cortical and hippocampal neurons in auditory working memory and reference memory in the rat. *J. Neurosci.*, 14:2606-2623, 1994.
- \* Sakurai, Y. : Population coding by cell assemblies - what it really is in the brain. *Neurosci. Res.* 26:1-16, 1996a.
- \* Sakurai, Y. : Hippocampal and neocortical cell assemblies encode memory processes for different types of stimuli in the rat. *J. Neurosci.*, 16:2809-2819, 1996b.
- \* Sakurai, Y. : The search for cell assemblies in the working brain. *Behav. Brain Res.*, 91 :1-13, 1998a.
- \* Sakurai, Y. : Cell-assembly coding in several memory processes. *Neurobiol. Learning & Memory*, 70:212-225, 1998b.
- \* Sakurai, Y. : How do cell assemblies encode information in the brain ? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1999 (In press).

- \* 山本純, 高橋宗良, 塚田稔, 安西祐一郎 : Analog FPAA と組込用 MCU を用いた完全無拘束動物実験のための多点ニューロン同時計測システムの開発 . 日本神経回路学会誌, 6: 3-10, 1999.