

氏 名 若林 正浩

学位(専攻分野) 博士(医学)

学位記番号 総研大甲第 2018 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Development of stereotaxic recording methods for awake
marmosets

論文審査委員 主 査 教授 磯田 昌岐
教授 南部 篤
教授 川口 泰雄
教授 高田 昌彦 京都大学 霊長類研究所

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

The common marmoset (*Callithrix jacchus*) is a New World monkey species living in the South America. Marmosets are easier to handle than macaque monkeys, because marmosets are small and gentle. Although the marmoset brain is small and the cerebral cortex is lissencephalic, marmosets share common brain structures with the other primates including macaques and humans. Moreover, their breeding efficacy is high, and this advantage has enabled the generation of transgenic marmosets. Owing to these advantages, marmosets have emerged as an alternative to macaque monkeys as a primate model for neuroscience and medical research. However, there are only a few reports in which neuronal activity was recorded in behaving and awake marmosets. Here, I introduced a newly developed stereotaxic system for marmosets and performed neuronal recording in the awake state.

I modified the head-fixation system for macaque monkeys to fit to marmosets: The metal frame held anterior-posterior stereotaxic bars and head-fixation blocks, and the marmoset chair was composed of neck and waist plates, a perch and a waste tray, which are held by four pillars. Under inhalation anesthesia with 1-2% sevoflurane and 25% N₂O, the head of the marmoset was fixed in a stereotaxic frame. The skull was widely exposed and covered with bone adhesive resin. A pair of head-fixation tubes, which were made from polyether ether ketone, were positioned medio-laterally and horizontally to the stereotaxic plane on the skull and fixed using dental resin. Vital signs were monitored with a pulse oximeter.

After full recovery from the first operation, a structural magnetic resonance imaging (MRI) was acquired by a 3T MRI scanner to localize deep brain structures. Under general anesthesia with ketamine and xylazine hydrochlorides, the head of the marmoset was fixed painlessly to the stereotaxic MRI apparatus, which was made from materials compatible with MRI and fitted to the inside the volume coil of the scanner.

In order to access the cerebral cortex and deep brain structures, partial craniotomy was performed. A marmoset was seated in the marmoset chair, and its head was painlessly fixed to the stereotaxic frame. Under the general anesthesia with ketamine hydrochloride, the skull was slowly and carefully exfoliated using an ultrasonic scalpel to minimize surgical damage to the brain. Then, the recording chamber was attached to cover the hole and fixed.

To record neuronal activity, the awake marmoset was seated in the marmoset chair with its head restrained. The homemade glass-coated Elgiloy-alloy microelectrode (0.8–1.5 MΩ at 1 kHz) was inserted into the cortex perpendicularly to the cortical surface through the dura mater with a hydraulic microdrive. Neuronal activity was amplified using a homemade amplifier and continuously monitored with an oscilloscope and a sound monitor. Neuronal responses to somatosensory stimuli were examined. Intracortical microstimulation (ICMS; < 60 μA with a train of 12 cathodal monophasic pulses, 200 μs duration at 333 Hz) was performed, and evoked movements and muscle contractions were observed. ICMS typically induced movement of a single joint in the contralateral forelimb, hindlimb, or muscle twitch in the face area. The area

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

where low current stimulation $< 10 \mu\text{A}$ induced movements was found and considered to be the primary motor cortex (MI). In the medial part of the MI, ICMS evoked movements of the hindlimb. The sites representing the forelimb were widely distributed in the area lateral to the hindlimb representation. In the area anterior to the MI, higher current stimulation of 20-50 μA was needed to evoke movements. The area was considered to be the premotor cortex. The area that required higher current stimulation of 15-30 μA to elicit body movements was found immediately posterior to the MI and was considered as the somatosensory area 3a.

Based on MRI images, the Elgiloy-alloy microelectrode was inserted vertically into the deep brain structures. I successfully recorded in the internal and external segments of the globus pallidus, thalamus, and cerebellar nuclei, which were confirmed by their characteristic firing rates and patterns. I also injected an adeno-associated virus vector carrying the enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgene into the caudate nucleus. The expressed EGFP was clearly observed in the nucleus.

This system is suitable for functional mapping of the brain, since the large recording chamber allows stereotaxically access to arbitrary regions over almost the entire brain. In addition, this system is desirable for neuronal recording during task performance to assess motor skills and cognitive function, as the marmoset sits in the marmoset chair and can freely use its hands. Moreover, this system can be used in combination with cutting-edge techniques, such as two-photon imaging and optogenetic manipulation. This recording system will contribute to boosting neuroscience and medical research using marmosets.

博士論文審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

小型で、おとなしい霊長類動物であるマーモセットは、中型のマカクザルよりも扱いが容易である。また、繁殖能力が高いため、遺伝子改変動物の作製に適している。これらの利点から、マカクザルに代わる霊長類モデル動物として、特に医学・脳科学分野において注目を集めている。一方、マーモセットの脳では、ヒトやマカクザルの脳と共通の基本構造をもつ部位が多いものの、脳全体のサイズが小さいことに加えて、脳溝が発達していないという特徴がある。さらに、覚醒下や行動遂行中の神経活動を安定的に記録できる手法が確立していないため、神経生理学的な研究報告が少ない。今後、マーモセットが優れたモデル動物として普及するには、覚醒下での神経活動を脳定位的に計測できる実験システムの開発が求められる。こうした背景を踏まえて、出願者は以下の研究を行った。

まず、頭部固定装置とマーモセットチェアを一体化させたシステムの作製に着手した。堅牢な金属製フレームに、頭部固定装置として、前後方向に伸びる 2 本の定位バーと頭部固定ブロックを装着した。さらに、首板、腰板、足置き場、糞受けより構成したマーモセットチェアを、4 本の支柱を介して金属製フレームに固定した。動物側の処置としては、全身麻酔下に露出した頭蓋骨を骨接着性レジンで覆い、さらに歯科用レジンを用いて、一對のポリエーテルエーテルケトン (PEEK) 樹脂製の頭部固定用チューブを脳定位座標面に対して水平となるように装着した。これにより、マーモセットの頭部を、覚醒下においても無痛的に定位固定することが可能となった。

続いて大脳皮質の神経活動を計測するため、覚醒下のマーモセットをチェアに座らせて、核磁気共鳴画像に基づいて事前に部分開頭術を施した部位から、記録電極を刺入した。皮質内微小電気刺激 (持続時間 200 μ s、周波数 333 Hz、12 発の陰性単相パルス) を行い、誘発される運動や筋収縮を観察した結果、10 μ A 以下の弱い刺激強度で反対側上下肢の単関節運動や筋収縮が誘発される部位を同定した。この領域は、ヒトやマカクザルの一次運動野 (M1) に相当すると考えられた。M1 の内側部では後肢の運動が誘発され、外側部では前肢の運動が誘発されたことから、マーモセット M1 における体部位再現は、ヒトやマカクザルのそれと一致することが明らかとなった。さらに、M1 より前方及び後方では、運動を誘発するのに強い刺激を必要とする領域が確認され、それぞれ運動前野 (刺激閾値 20-50 μ A) 及び体性感覚野 3a 野 (刺激閾値 15-30 μ A) であると考えられた。

さらに出願者は、核磁気共鳴画像に基づいて記録電極を脳深部に刺入し、淡蒼球内節、淡蒼球外節、視床、小脳核から神経活動を記録した。その結果、それぞれの核の神経細胞は、マカクザルの相同部位と同様の発火頻度及び発火パターンを示すことが明らかとなった。さらに、増強緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を導入したアデノ随伴ウイルスベクターを尾状核内に注入し、EGFP が同部において発現することを確認した。

出願者が開発した実験システムでは、ほぼ全ての脳領域に脳定位的にアクセスすることができるため、網羅的な脳機能マッピングに適している。また、マーモセットはチェアに座った状態で自由に手を動かすことができるため、運動の認知的制御の神経機構を明らかにする実験への応用が期待できる。さらに、二光子顕微鏡を用いたイメージング法や光遺伝学を駆使した最先端研究への応用も可能である。本実験システムは、マーモセットを

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

用いた脳科学研究の標準的手法として普及し、当該領域の発展に多大な貢献をもたらすことが期待される。以上の結果から、本研究は学位論文として十分な内容を有しているものと、審査委員会において全員一致で判断した。