

保湿剤を塗布された四肢による触覚の脳内表象機構の解明

東京大学大学院薬学系研究科

松本 信圭

Sensory information, particularly somatosensation, plays a crucial role in defining the boundary between the body and the external environment. Through somatosensation, animals perceive features such as roughness and temperature from the external world. Brain processing of this information is dynamically modulated by skin conditions and past experiences, a phenomenon realized through somatosensory neuroplasticity. While somatosensory input from peripheral receptors is transmitted to the primary somatosensory cortex (S1), the specific neural representation of tactile features like roughness and how this representation varies with skin conditions remain unclear. This study aims to investigate neural representation of tactile sensation through limbs coated with moisturizer. Traditional methods of neural activity analysis often involve extracting features based on frequency intensities or firing rates, which may overlook important information for decoding somatosensation. S1, representing the body surface, likely encodes tactile features across the entire cortex. To decode somatosensation accurately, it is essential to record neural activity from a broad area of S1 and employ methods to extract bias-free features. This study focuses on deep learning, which can automatically extract relevant features from vast amounts of data without human intervention. We established an experimental system where rats repeatedly experienced smooth and rough surfaces. Based on this system, an algorithm was developed to accurately detect the timing of foot-strikes on the surfaces. We then analyzed a gait of rats, whose limbs were coated with vaseline. Furthermore, we recorded local field potentials in S1 with and without vaseline. We established a deep learning algorithm to predict whether the surface was rough or smooth. We will further analyze the neural representation in S1 when the paw soles were coated with vaseline and explore the relationship between neural representation and neuroplasticity.

1. 緒言

生物は常に五感を通じて外界の情報を収集し、その情報により周辺の環境を分析して適切に反応している。このうち、体性感覚は外界と自身の境界を定義する重要な感覚である。動物は体性感覚を通じて、外界から粗滑度や温度などの特徴を知覚している。これらの情報に対して脳が行う処理は、皮膚環境や過去の経験に応じてダイナミックに変化している。このダイナミックな応答は、体性感覚の神経可塑性によって実現される。申請研究では、皮膚の保湿によって変化する体性感覚を検証することを目指す。

体性感覚は、生物の体表の状態や、環境との相互作用が中枢で処理されることで生じる。末梢の感覚受容器が感知した情報は、最終的に脳の一次体性感覚皮質（以後S1）に伝達される。S1はそれぞれ体の特定の部位に対応した重領域に分けられている。しかし、体の特定の部位で感知されている「粗滑度」のような刺激の詳細な特徴が、脳内でどのように表象され、その表象が皮膚の状態によってどのように区別されるのかは明らかではない。

本研究では、保湿剤を塗布された四肢による触覚の脳内

表象機構の解明を目指す。

従来用いられてきた神経活動の解析手法は、各周波数帯の強度や神経細胞の発火頻度など、神経活動の変化を人間が解釈しやすい形に落とし込むことで、脳の機能の解明に貢献してきた。その反面、この特徴抽出には人間のバイアスがかかっているため、記録された神経活動から体性感覚の解読に重要な情報が捨棄されている可能性がある。さらに、S1は体表面と対応しているため、粗滑のような体性感覚は皮質全体で表現されると考えられる。しかし、従来の数チャネルでしか記録されていない神経活動の解析では不十分であり、体性感覚を高い精度で解読するためには、S1の広範囲から神経活動を記録し、バイアスフリーに必要な特徴量を取り出す手法が必要である。

そこで、本研究では、膨大な情報からバイアスフリーに特徴を抽出することを得意とする深層学習に着目した。深層学習が従来の手法と異なる点は、人の手が加わっていないデータから自動的に特徴や規則性を高次元のまま抽出できることである。

2. 方法

2.1. 実験動物

動物実験は、東京大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

実験には成体雄性Wistarラットを使用し、ラットは、温度（ $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ）および湿度（ $55 \pm 5\%$ ）が管理された環境で個別に飼育した。また、12時間の明暗サイクル（午前7時から午後7時まで照明が消灯）で、自由に食事と水を摂



Neural representation of tactile sensation through limbs coated with moisturizer

Nobuyoshi Matsumoto

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

取できる状態にした。ラットは、馴化期間の開始前に少なくとも2日間は実験者によってハンドリングを受け、その後、摂水制限をおこなった。

2.2. 実験装置

本研究で使用した円盤型ランニングホイールは、直径90cmの自由に回転できる円盤であり、表面には粗い紙やすりを貼った¹⁾。給水ポートは、ラットが胴体を拘束された状態で前方に配置されており、報酬(水)はディスクの回転と同期させた。これにより、ラットは報酬を求めて自発的に運動を開始した。

2.3. 行動試験

ラットは、試験前に12時間の摂水制限を受け、その後、ランニングホイールでの運動と水報酬を関連付けるトレ

ニングを受けた。

訓練期間後、ラットの歩行は、ベースライン時およびワセリン処置時においてモニタリングした。ベースライン時では、ラットの体は独自に作製したのジャケットで拘束されており、ラットは自発的に8~10分間ホイール上を歩いた。その後、ラットの前足と後足にはワセリンを塗布し、再度ホイールに戻して、再び8~10分間歩行した。行動試験時には、ラットの左側からビデオが撮影され、フレームレート60Hzでラットの歩行を録画した。

2.4. 電気生理記録

Open Ephys社製の記録システム(<http://open-ephys.org>)およびIntan社製のRHD32チャンネルヘッドステージを使用し、30kHzのサンプリング周波数で神経活動(局所場電位)を記録した(図1)。その後、2kHzにダウンサン

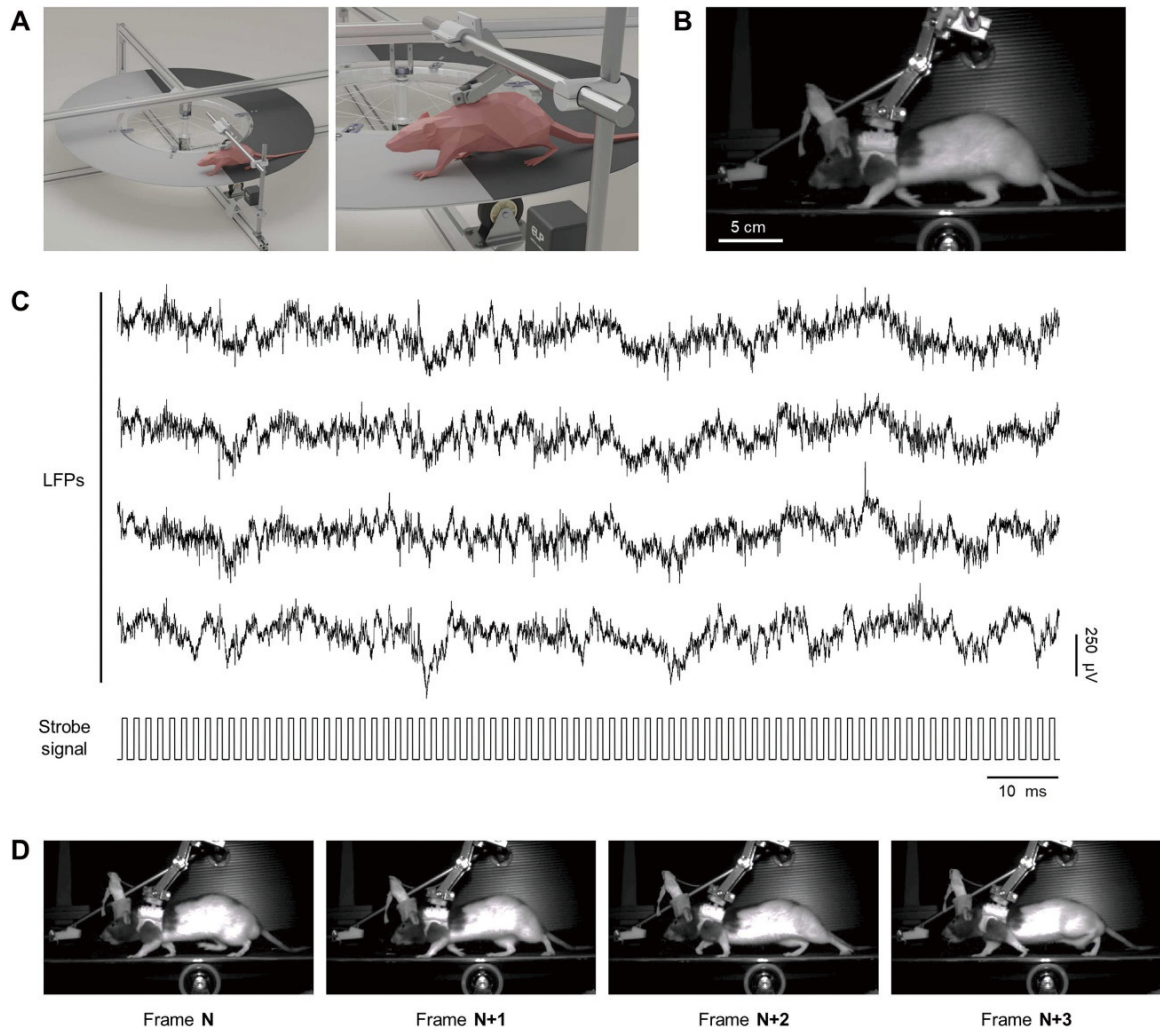


図1 ラットのLFPと運動の同時記録

- 本研究で使用した実験装置の構成を示す。左側のパネルは全体の装置の概要を示し、右側のパネルはラット周辺の具体的な配置を示す。
- 録画されたビデオからの単一フレームのスナップショット。
- S1の代表的な4つのLFPトレース(上)とカメラのストロボ信号(下)。
- 定位置に置かれたカメラで撮影した連続したフレーム。

プリングし、解析に使用した²⁾。同時に、USBカメラモジュールを使用して、各ビデオフレームのストロボ信号を介し、神経記録と動画を同期した。

2.5. データ解析

データは、Python3で作成したカスタムスクリプトを使用してオフラインで解析した。

3. 結果と考察

3.1. 接地タイミングの正確な検出

DeepLabCutと呼ばれる深層学習ベースのマーカーレス姿勢推定法を使用して、ラットの前肢の各ビデオフレームにおける関節座標を追跡した²⁻⁴⁾。モデルは、左前肢の肩、肘、手首を識別できるようにファインチューニングした(図2A、B)。その後、肩の座標を参照して肘と肩の座標を同定し、肘と手首の軌道には3フレームの移動平均フィルターを適用した(図2C)。前肢の足の接地開始を決定するために、肘と手首の座標の軌道を追跡した。まず、足の接地は、肘のxおよびy座標の谷と手首のx座標の谷に先行していた(図2D)。さらに、足の接地時の手首のy座標の速度変化は、二次導関数における谷として観察された(図2E)。これらの基準を用いて、足の接地開始は、肘のxおよびy座標の谷および手首のx座標の谷から5フレーム以内に位置する手首のy座標の二次導関数の谷として定義した。この方法を「座標ベースの方法」と呼び、本研究では9匹のラットから録画された1分間のビデオで接地タイミングを検出した。検出された接地タイミングの大多数は、手動でラベル付けされた接地タイミングから±1フレーム以内のずれであり、±20フレームの範囲で開始が検出されることはほとんどなかった(図2F)。したがって、検出された接地を2フレームの差以内で識別したものを「正しく検出された接地」とし、手動で検出された接地から2フレーム以上離れたものを「誤検出された接地」と分類した。また、手動で検出された接地のうち、自動化された方法で識別されなかったものは「見逃された接地」とラベル付けされた。特に、これらの見逃された接地は検出された接地の12.2%を占め、歩行パターンに似た軌道を生成するグルーミングなどの異常な行動に起因していた(図2G)。ラットがこの行動中にディスク上で静止していたことを考慮すると、「誤検出された接地」の速度は0cm/s付近に集中していた。

次に、DeepEthogramと呼ばれる、連続するビデオフレームを使用して行動の分類を行う方法を用いて、各識別された足の接地フレームに関連する信頼度を向上させた⁵⁾。本研究での実装では、モデルはビデオに「足の接地」と「歩行」の2つのラベルを付けるように訓練した(図3A)。訓練されたモデルは、各ビデオフレームに対して、各行動ラ

ベルの確率を生成した(図3B)。この方法では、足の接地開始は、「足の接地」確率にピークが検出されるフレームとして定義され、同時に「歩行」ラベルの確率が0.5以上であるという条件を満たすフレームとした(図3B)。この方法を「信頼度ベースの方法」と名付けた。信頼度ベースの方法のみで検出された足の接地開始と手動での検出を比較した結果、フレーム差はゼロ付近に集中しているものの、2フレーム以上遅れたフレームの割合が高いことが示された(図3C)。誤検出された接地時の速度分布は、手動でラベル付けされた接地の元の分布の速度分布と似ていた。その結果、誤検出された開始の割合は13.2%に達した(図3D)。開始検出の精度を高めるために、「座標ベースの方法」と「信頼度ベースの方法」の両方の基準で識別されたラベルを組み合わせた。足の接地開始を示す正確なフレームは前肢の関節座標に基づいて決定され、その後、各開始は「足の接地」と「歩行」の信頼度によって閾値処理され、接地タイミングの精度を高めた。結果として、手動でアノテーションした足の接地開始と比較して、98.8%のフレームが1フレーム以内のずれを示した(図3E)。さらに、97.2%のフレームが正しく識別された。見逃されたフレームと誤検出されたフレームの割合はそれぞれ1.6%および1.2%に限られていた(図3F)。

3.2. 四肢へのワセリン塗布による歩容への影響

ここまでで、四肢(特に前肢)の接地タイミングを正確に検出することが可能となった。これまでと同様に、DeepLabCutおよびDeepEthogramを使用して、肩、肘、手首の座標を正確に特定し、肩からの手首と肘の相対座標を計算した。これらの座標を使用して、ラットの状態をstance phaseとswing phaseに分類した。前足が地面に触れている間はstance phase、地面から離れている間はswing phaseとして分類した。左前足が地面に触れる瞬間と離れる瞬間はそれぞれ「着地」と「離陸」と名付けた。ワセリンがラットの歩行に与える影響を定量化するために、各サイクルで手首、肘、肩の角度を計算した。

ワセリン塗布後、サイクルごとの距離が有意に長くなったことが観察された(図4)。特にstance phaseでは、ワセリン処理期間中の距離が有意に短く、swing phaseでは距離が有意に長くなった。サイクルの各段階の長さは、ワセリン処理後に有意に短縮され、stance phaseとswing phaseの両方でラットはワセリン処理時に比べて長い時間をかけていた(図4)。

3.3. 四肢へのワセリン塗布時の神経活動の記録

これらの準備を踏まえ、四肢へのワセリン塗布時の神経活動の記録に移った。

S1の垂領域のニューロンは対応する体表面への触覚刺

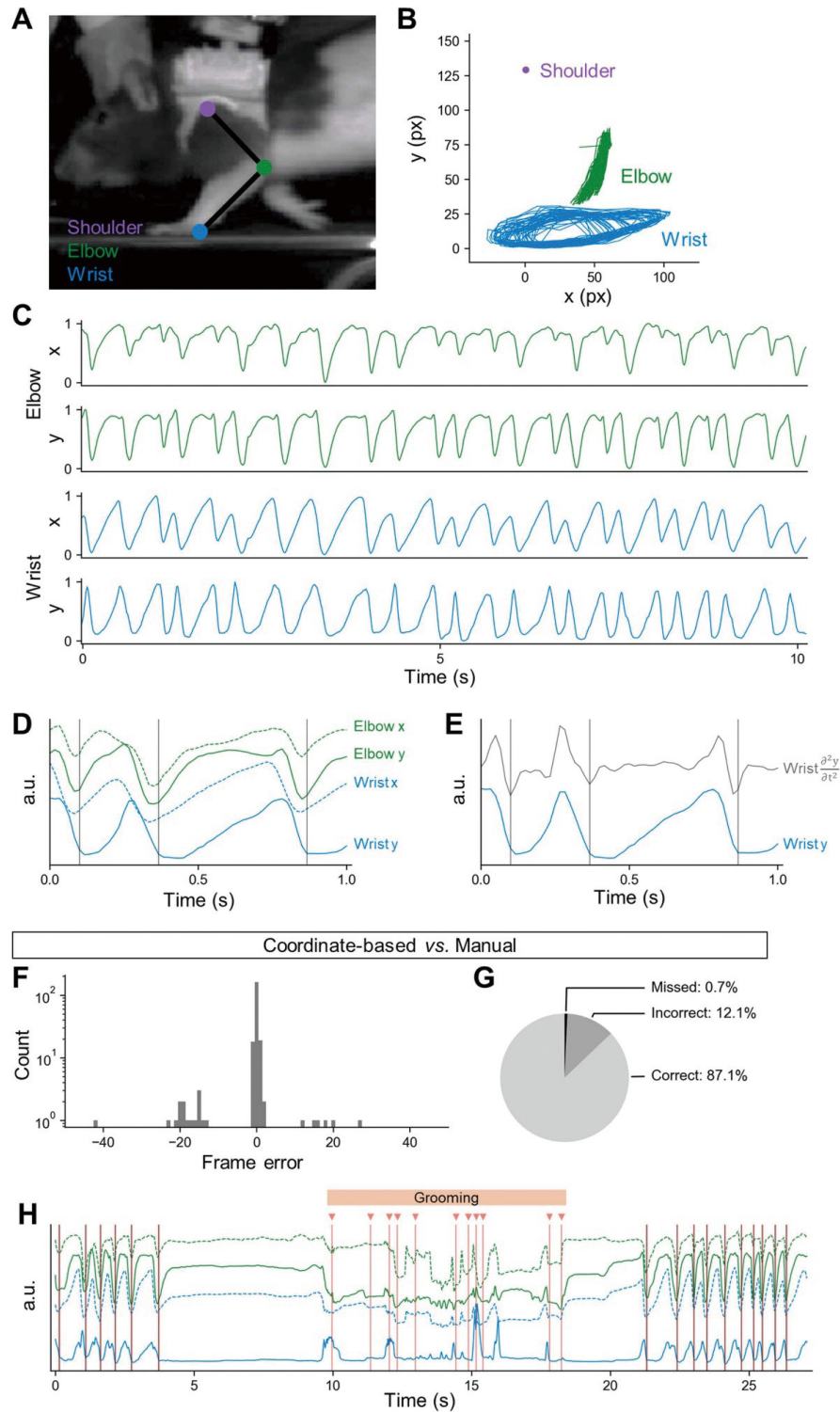


図2 前肢の関節の座標を使用した足の接地タイミングの検出

- A. ラベル付けされた関節の位置 (肩 (紫)、肘 (緑)、手首 (シアン))
- B. 10 秒間の各関節の軌道の例。
- C. 経時的な肘と手首のxおよびy座標の軌道。
- D. 手動でラベル付けされた足の接地と肘および手首のxおよびy座標の整列。灰色の縦線は手動でラベル付けされた接地を示す。
- E. 手動でラベル付けされた足の接地と手首のy座標の二次導関数および元のy座標のアラインメント。灰色の縦線は手動でラベル付けされた接地タイミングを示す。
- F. 座標ベースの接地と手動でラベル付けされた接地とのフレーム差を示すヒストグラム。
- G. 前肢の関節の座標によって検出された接地の割合を示す円グラフ。
- H. 誤検出された接地を含むグルーミング期間の代表的な例。灰色の縦線は手動でラベル付けされた接地を示し、赤い縦線は前肢の関節の座標を使用して検出された接地を示す。赤い三角形は誤検出された接地を示す。

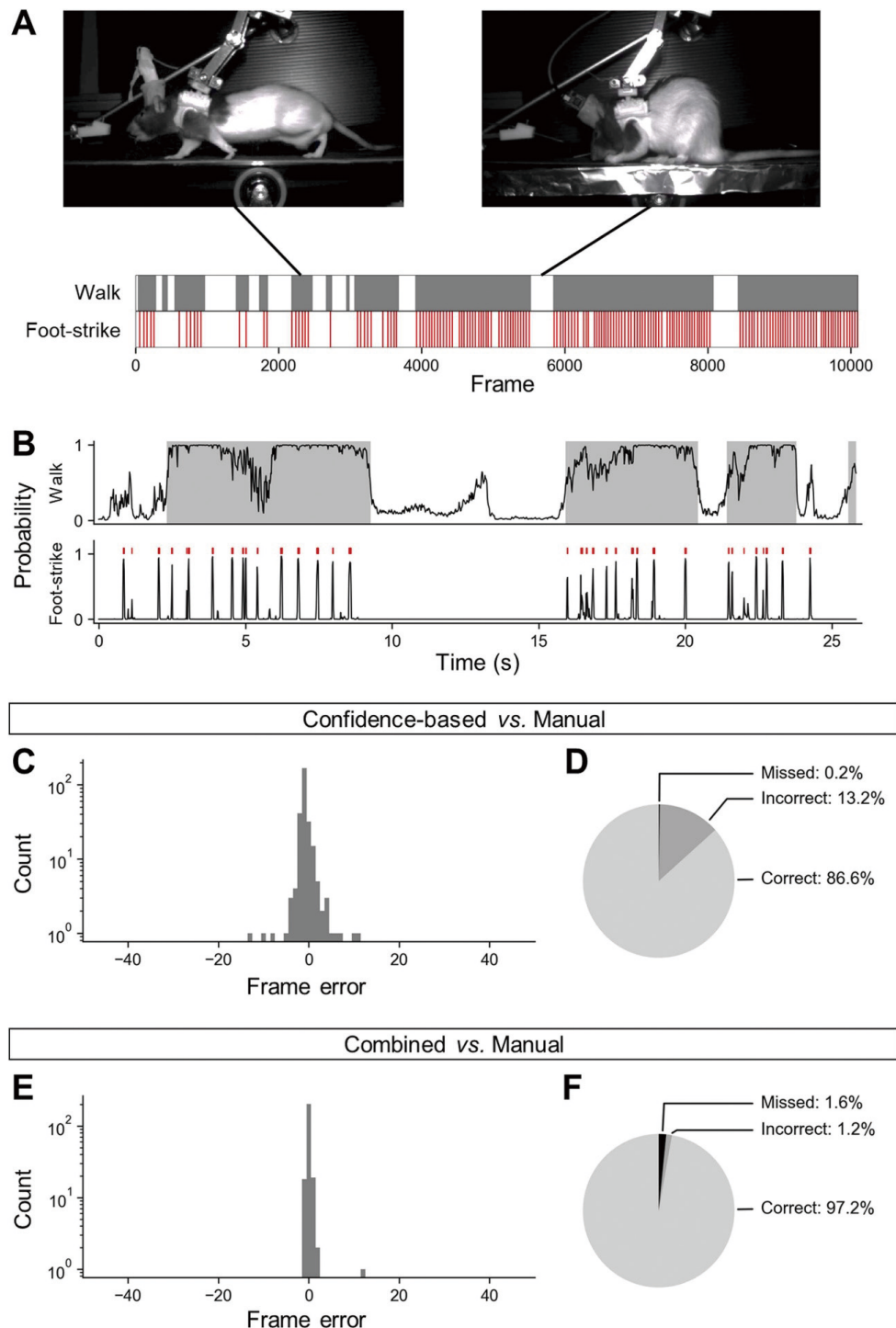


図3 行動の信頼度を使用した足の接地開始の検出

- A. 訓練データとして使用された行動ラベル。上：歩行とグルーミング行動を示す代表的なフレーム。下：灰色のラスタープロットはラットが歩行しているフレームを示し、赤色のラスタープロットは手動でラベル付けされた足の接地開始を示す。
- B. DeepEthogramからの代表的な出力。黒い線は各フレームにおける歩行行動の予測確率を示す。上：歩行行動の確率、灰色の領域は確率から導出された最終的なラベルを示す。下：各フレームにおける足の接地開始の確率、赤色のラスタープロットは検出された開始を示す。
- C. 確率（信頼度）ベースの開始と手動でラベル付けされた開始とのフレーム差を示すヒストグラム。
- D. 信頼度ベースの方法を使用して検出された開始の割合を示す円グラフ。見逃された開始フレーム（黒）、誤検出された開始フレーム（濃灰色）、正しく検出された開始フレーム（灰色）。
- E. 座標ベースの方法と信頼度ベースの方法が組み合わせられたもの。この組み合わせ方法はさらに開始を検出し、これを組み合わせ検出された開始と呼ぶ。ヒストグラムは、組み合わせ検出された開始と手動でラベル付けされた開始とのフレーム差を示す。
- F. Dと同様だが、組み合わせの方法に対するもの。

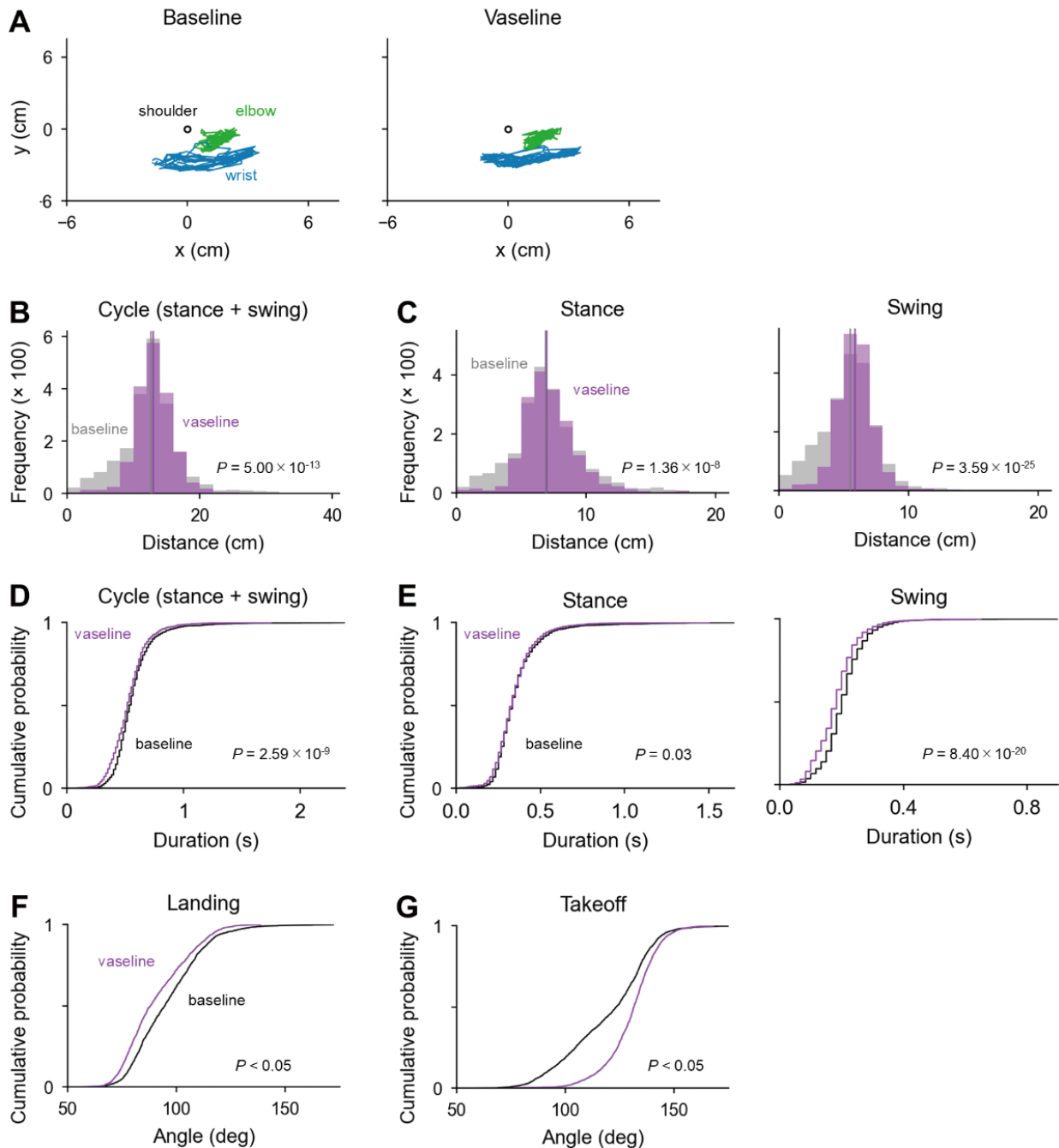


図4 歩容解析のパラメータ

- A. ベースライン（左）およびワセリン処置中（右）中の肘（緑）および手首（青）の代表的な軌道。肩（黒）の位置はx-y座標系の原点に重ねて示されている。
- B. ベースライン（灰色）およびワセリン処置中（紫色）中のサイクルごとの距離のヒストグラム。縦線は中央値を示す。サイクルにはstance phaseとswing phaseの両方が含まれる。
- C. Bと同様だが、stance（左）およびswing（右）フェーズでの距離について。
- D. ベースライン（灰色）およびワセリン処置中（紫色）中のサイクルごとの時間の累積確率曲線。
- E. Dと同様だが、stance（左）およびswing（右）フェーズでの距離について。
- F. Dと同様だが、着地時の角度について。
- G. Dと同様だが、離陸時の角度について。

激に対して安定した反応を示すため、記録されたLFPは検出された接地タイミングを用いてアラインした。まず、手動でラベル付けされた接地タイミングとのアラインメントにより、反対側(すなわち、記録された脳半球とは反対側)の前肢の接地タイミングを基準とした誘発反応が明らかになった(図5A)。この反応は、同側前肢の足の接地開始に整列させたLFPでは観察されず、この反応が運動によって生成されるアーチファクトに依存していないことを示している。S1の前肢に対応する重領域における32チャンネルの広範な電極留置を考慮すると、誘発反応は電極位置によって異なっていた。したがって、最も顕著な反応を示したチャンネルを今回の解析に用いた。9匹のラットについて、LFPは4つの開始検出方法(手動、座標ベース、信頼度ベースの方法、および座標ベースと信頼度ベースの方法の組み合わせ)を使用してアラインおよび平均化した(図5B)。後者の3つの方法で計算された振幅と手動でラベル付けされたフレームとの比較により、組み合わせによる方法が手動でラベル付けされた足の接地開始とほぼ同等の精度を示すことがわかった(図5C)。結果として、座標ベースと信頼度ベースの方法を統合することで、足の接地開始を完全に自動で検出できることが結論された。また、同様の方法でワセリン塗布時の神経活動の記録もおこなった(図6)。あわせて、これまでの研究をもとに^{6,7)} LFPの波形を入力として、滑らかな床と粗い床を歩いている時の神経活動から床面を予測できる深層学習アルゴリズムのプロトタイプを構築した(図7)。

4. 総 括

本研究では、ラットに滑らかな床面と粗い床面を繰り返して経験させる実験系をまず構築した。その実験系をもとに、

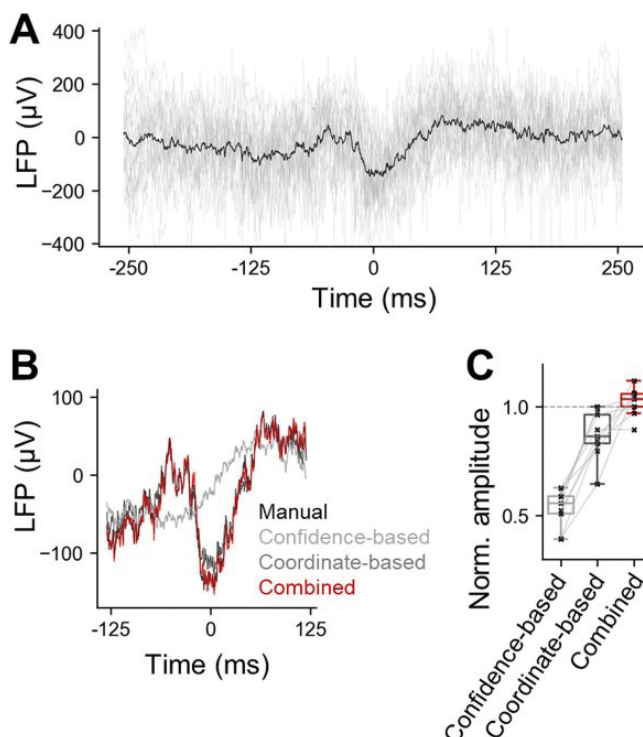


図5 足の接地で揃えたLFPの特性

- 1匹のラットから得られた例として、手動でラベル付けされた接地タイミングで揃えたLFPトレース。灰色の線は各ラベル付けされた接地時点での個々のLFPを示し、黒い線はすべてのLFPの平均を示す。
- 4つの接地検出方法を使用してそろえたLFPの平均トレース。手動(黒: n=25 トレース)、信頼度ベース(灰色: n=62 トレース)、座標ベース(濃灰色: n=29 トレース)、および組み合わせ(赤: n=23 トレース)の方法。
- 信頼度ベース(濃灰色)、座標ベース(黒)、および組み合わせ(赤)の方法による手動でラベル付けされた開始時点に対する正規化されたLFP振幅(n=9匹)。

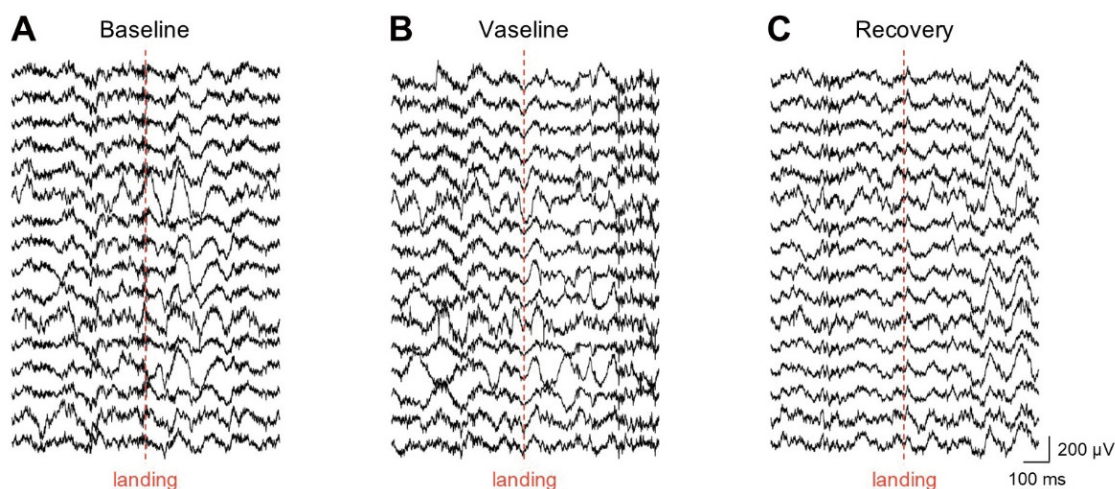


図6 ワセリン塗布時の局所場電位(LFP)

- ワセリンを塗布する前の一次体性感覚皮質前肢領域の16か所からの局所場電位。赤は接地タイミングを表す。
- Aと同じ。ただし、ワセリンを塗布されている時の波形。
- Aと同じ。ただし、塗布されたワセリンを拭きとった後の波形。

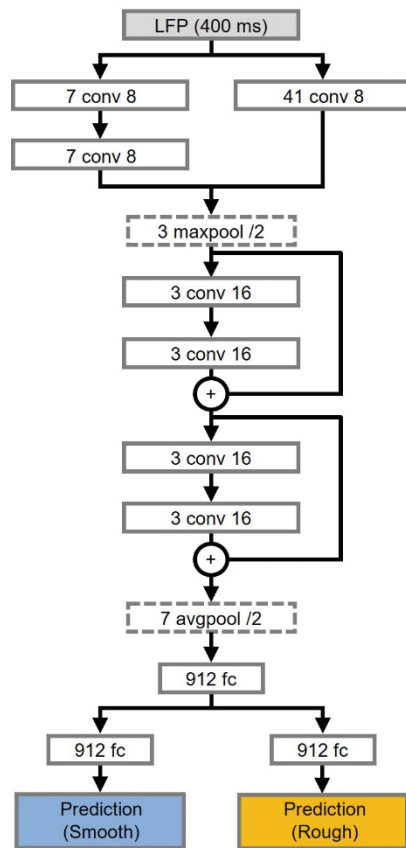


図7 LFPの波形から床面の粗滑度を分類する深層学習アーキテクチャ(プロトタイプ)

床面の接地タイミングを正確に検出するアルゴリズムを構築した。次に、床面を歩いている時の歩容と、ワセリンを四肢に塗布した際の歩容の比較をおこなった。その結果、歩容のいくつかのパラメータにおいて差が見られた。さらに、ワセリンを塗布していない時と塗布した時のS1のLFPを記録した。これらのLFPを入力し、床面が粗いか滑らかかを予測する深層学習アルゴリズムを構築した。今後は、これらの成果をもとにワセリンの塗布によるS1の神経表象について詳細な解析を進め、神経可塑性との関連にも迫っていききたい。

謝 辞

本研究の遂行に多大なるご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Yamashiro K, Ikegaya Y, Matsumoto N. Automatic detection of foot-strike onsets in a rhythmic forelimb movement. *Neurosci. Res.*, **206**, 41-50 (2024).
- 2) Yamashiro K, Aoki M, Matsumoto N, Ikegaya Y. Polyherbal formulation enhancing cerebral slow waves in sleeping rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 1356-1360 (2020).
- 3) Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, Bethge M. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat. Neurosci.*, **21**, 1281-1289 (2018).
- 4) Nath T, Mathis A, Chen AC, Patel A, Bethge M, Mathis MW. Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat. Protoc.*, **14**, 2152-2176 (2019).
- 5) Bohoslav JP, Wimalasena NK, Clausing KJ, Dai YY, Yarmolinsky DA, Cruz T, Kashlan AD, Chiappe ME, Orefice LL, Woolf CJ, Harvey CD. DeepEthogram, a machine learning pipeline for supervised behavior classification from raw pixels. *Elife*, **10**, (2021).
- 6) Yamashiro K, Matsumoto N, Ikegaya Y. Diffusion model-based image generation from rat brain activity. *PLoS One*, **19**, e0309709 (2024).
- 7) Takeuchi Y, Yamashiro K, Noguchi A, Liu J, Mitsui S, Ikegaya Y, Matsumoto N. Machine learning-based segmentation of the rodent hippocampal CA2 area from Nissl-stained sections. *Front. Neuroanat.*, **17**, 1172512 (2023).