

was selected from three sources (on-mesh, skull screw and neck). Following amplification, signals from different sources were simultaneously acquired with two digital-to-analogue converting boards running on the LabVIEW system (PCI-6259 and PCI-6225; National Instruments, TX, USA) driven by the same clock source for synchronization of samplings, with the use of a custom-made multichannel data acquisition/display software (NS Computer Systems, Nagaoka, Japan). The sampling frequency was 20 kHz for depth and silver-ball recordings and 1 kHz for multichannel surface electrode-mesh recording. Single- or multi-unit spike activities were isolated from the high-passed signal using software slicers. For each unit activity, a peristimulus time histogram (PSTH) was plotted (bin width = 10 ms, spike counts within any bin were summed across trials). The mean and the standard deviation (SD) of the baseline period activity was calculated for the 500-ms period prior to the stimulus onset. The unit activity was defined as visually responsive if at least a bin during the 50- to 200-ms post-stimulus period exceeded mean + 3SD of the baseline activity. The iCLFPs and silver-ball ECoGs were obtained by low-pass filtering (cutoff frequency: 300 Hz) and resampling (20 kHz to 1 kHz) of the wide-band-filtered signals. The latency was defined as the time between stimulus onset and the time point where the signal exceeded  $\pm 3$ SD of the baseline activity. The offline data analysis was performed with custom-made software written in FreePascal/Lazarus and GNU R on Macintosh computers.

#### Ocular dominance index

Ocular dominance index of neuronal spike activity (neuronal ODI) was calculated as:

$$\left( F_{\text{contra}} - F_{\text{ipsi}} \right) / \left( F_{\text{contra}} + F_{\text{ipsi}} \right)$$

where  $F_{\text{contra}}$  = spike frequency recorded in Contra condition, and  $F_{\text{ipsi}}$  = spike frequency recorded in Ipsi condition. If visual responses were detected only in Contra condition, neuronal ODI should be 1. If visual responses were detected only in Ipsi condition, neuronal ODI should be -1. ECoG ODI was defined for each ECoG channel as:

$$\left( \text{Slope}_{\text{contra}} - \text{Slope}_{\text{ipsi}} \right) / \left( \text{Slope}_{\text{contra}} + \text{Slope}_{\text{ipsi}} \right)$$

where  $\text{Slope}_{\text{contra}}$  = peak slope of averaged visually evoked potentials (VEPs) in Contra condition,  $\text{Slope}_{\text{ipsi}}$  = peak slope of averaged VEP in Ipsi condition. If multiple peaks were observed in time course, the first peak was used. Correlation between neuronal ODI and ECoG ODI was evaluated by regression analysis using the "robustly fitted line" recommended in exploratory data analysis (Tukey, 1977). In anatomically defined V1, the locations of binocular and monocular tracts were chosen at the nearest mesh-hole in the vicinity of the most typical bilateral and Contra-dominant ECoG response channels, respectively. Because the tungsten microelectrode was inserted into the cortex through the holes between the mesh, an ECoG ODI for each penetration

site was estimated by interpolation. Each 32-channel ECoG map was interpolated into a  $72 \times 72$  matrix using Akima's (1970, 1991) method.

#### Across-trial response variabilities

To evaluate a trial-wise variability of ECoG or LFP signals, we calculated a trial-to-trial standard deviation at each sampling time. Then, standard deviations during a period of 250 ms following the stimulus onset were averaged (across-trial SD).

#### Decoding analysis

We used ECoG signals during a period from -25 ms to 325 ms relative to the stimulus onset in each trial. The amplitudes at each channel were sampled by a 50-ms time window shifted by 50 ms, and 25 the power spectrum in each time window was calculated. The powers of each frequency, time window and channel were used as input features (a feature vector) for classification analysis (7 time windows  $\times$  5 frequency bands  $\times$  32 channels; total of 1120 features in each data sample for the electrode-mesh). The feature vector obtained from each trial was labeled by the stimulated eye (left eye or right eye). The dimensionality of feature vectors was reduced by selecting informative features based on a univariate analysis (*t*-statistics) applied to a training data set. We ranked the features by the *t*-value that indicated the differential responses of the two stimulus conditions (left eye or right eye) and selected top *N* features ( $n = 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150$  and 200). The *N*-dimensional feature vectors served as inputs to the decoding model. We constructed a linear classifier (decoder) to predict the stimulated eye from the ECoG signals measured in each trial. The decoder calculated the linearly weighted sum of the ECoG features plus bias for each class (left eye or right eye), and the class with a higher value was chosen as the predicted class. Individual weights and biases were determined using a linear support vector machine (SVM) applied to a training data set (Vapnik, 1998). The SVM algorithm was implemented using MATLAB (Kamitani and Tong, 2005).

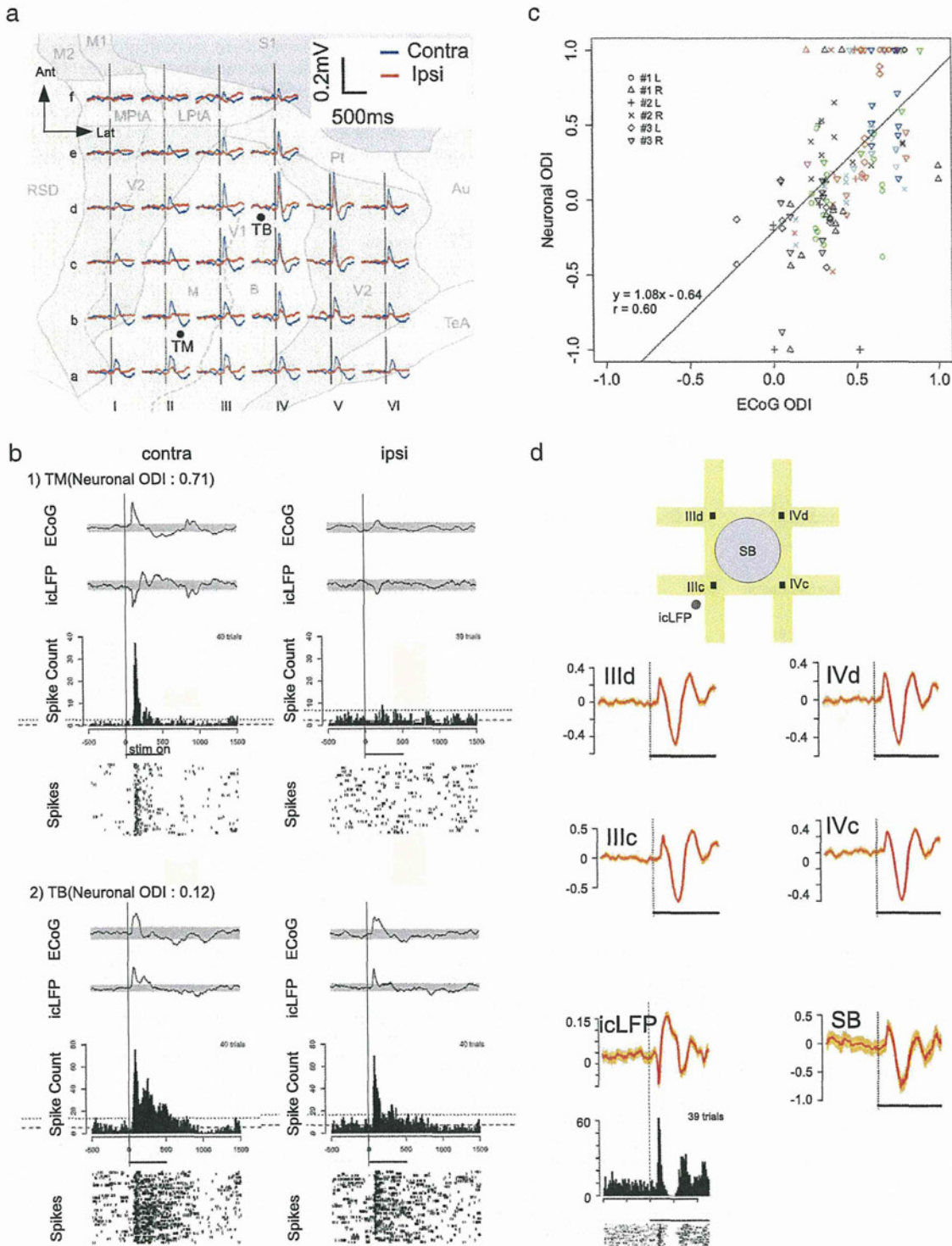
Decoding performance was evaluated by two types of analysis. First, to evaluate the overall performance of each rat/hemisphere avoiding the circularity that can arise from data selection (Kriegeskorte et al., 2009), we performed a cross-validation analysis using the entire data set. We divided the data into 10 subgroups, and 9 of them were used to train a classifier, and the remaining subgroup was used for evaluating the trained classifier. This procedure was repeated until the samples from all 10 subgroups were tested (10-fold cross-validation) and the percentage of correct classification was calculated. Second, to evaluate the stability of decoding with multichannel ECoG responses, we selected top-100 features and trained a classifier using the data measured during the first hour of the experiment and tested on the blocks of data measured in the following 1–6 hours (1 hour in 1 hemisphere, 3 hours in 3 hemispheres, 4 hours for 1 hemisphere and 6 hours for 1 hemisphere). We calculated the cross-

**Fig. 2.** Visually evoked ECoG signals from an electrode-mesh. (a) Multichannel ECoG responses to Contra (blue traces) and Ipsi (red traces) stimulation superimposed on the cortical map reconstructed from Paxinos Atlas. Vertical black line in each panel indicates the stimulus onset. Numbers of averaged trials were 40 and 39 for the Contra and Ipsi conditions, respectively. 'TM' and 'TB' indicate the positions of penetration tracts in the monocular and binocular visual cortex, respectively, defined by mesh ECoG responses (see Methods for electrode coordinate nomenclature). Ant: anterior (rostral), Lat: lateral, V1: primary visual cortex (V1B: binocular V1, V1M: monocular V1), V2: secondary visual cortex, S1: primary somatosensory cortex, Au: auditory cortex, TeA: temporal association cortex, M1: primary motor cortex, M2: secondary motor cortex, Pt: parietal cortex, LPtA: lateral parietal association cortex, MPtA: medial parietal association cortex, RSD: retrosplenial dysgranular cortex. (b-1) Simultaneously recorded ECoG, iCLFP, PSTH and rastergrams in Contra and Ipsi conditions at TM. ECoG was from the nearest electrode-mesh channel. Shaded areas in ECoG and iCLFP indicate mean  $\pm$  3SD of the baseline. Dashed and dotted lines in PSTH indicate mean and mean + 3SD levels of baseline spike counts. ECoG, iCLFP and spike activity was consistently Contra-dominant at this recording site. (b-2) ECoG, iCLFP, PSTH and rastergram at TB. Bilateral ECoG, iCLFP and spike activity was observed at this recording site. Presumably, difference in VEP polarity between TM and TB iCLFPs was due to different recording depths (TM: 588  $\mu$ m, TB: 226  $\mu$ m from dura, by manipulator readout). (c) Scatterplot of simultaneously recorded neuronal ODI versus mesh ECoG ODI, showing a significant positive correlation. Different symbols/colors indicate different hemisphere/penetrations. Each symbol represents an individual neuron. Solid line indicates the robustly fitted line (Tukey, 1977) (see Methods). (d) Simultaneously recorded visually evoked responses from 4 channels ('Illa', 'Illd', 'IVc' and 'IVd') of the electrode-mesh and from the silver-ball ECoG electrode (SB) at the center of 4 electrode-mesh channels as well as iCLFP and spikes at the penetration tract. Data were obtained from a left hemisphere under the Contra condition in a control experiment. In each iCLFP or ECoG trace, a red line and orange shadow represent mean  $\pm$  SEM. Vertical dotted lines indicate stimulation onset. Horizontal bars: stimulation duration (500 ms). Number of averaged trials was 39.

validation classification accuracy for the first hour and the generalization accuracies for each of the following hours. We used the binomial test to examine whether the frequency of correct classification exceeded the chance level.

Statistics

Results are expressed as means ± standard error of mean (SEM) unless otherwise mentioned. Differences were tested using two-tailed



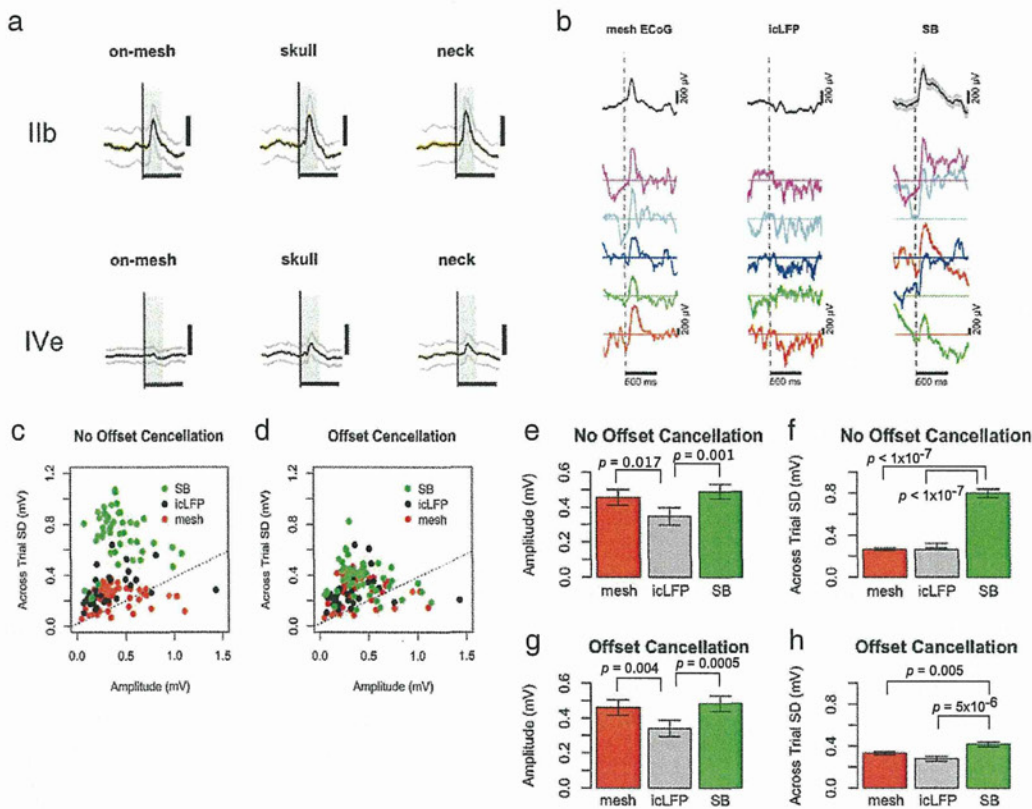
Student's *t*-test. In all pair-wise tests, results from the same hemisphere were paired unless otherwise mentioned. All statistical calculations were performed using GNU R.

## Results

### MEMS fabrication of a flexible electrode-mesh

To record surface LFPs systematically across broad cortical regions and simultaneously with reference to intracortical neuronal sources, we intended to develop a multichannel electrophysiological probe that enabled three operations: (1) the probe should flexibly fit to the curved surface of the brain; (2) the probe would be prevented from disturbing an exchange of physiological materials; and (3) the microelectrodes could be penetrated into the cortex through the probe. To meet these requirements, we specifically devised an

"electrode-mesh", a flexible ECoG electrode array of mesh-form structure (Fig. 1a) with interelectrode space open as fenestrae (square holes). For fabrication with MEMS technology (Fig. 1b, also see Method), a flexible base substrate of Parylene-C was used. An electrode-mesh in the present study contained 32 recording electrodes spatially extending 6×6 mm, wide enough to cover approximately half of the entire dorsal surface of the rat brain. The interelectrode distance was 1 mm (Fig. 1c), which enabled much finer-resolution functional mapping compared with 10- or 5-mm-interspaced standard clinical-use ECoG array. The total thickness of the electrode-mesh was only 20 μm, much thinner than conventional probes of millimeter thick. Electrodes had impedance of  $603 \pm 16$  kΩ and  $103 \pm 5$  kΩ (mean ± SEM for 216 electrode at 1 kHz), before and after platinum black coating (Fig. 1d), respectively. The feasibility of the electrode-mesh for simultaneous ECoG and spike recordings was tested in the visual cortex of anesthetized Long-Evans rats (Fig. 1e).



**Fig. 3.** Recording quality of the electrode-mesh compared with conventional probes. (a) Comparison of VEP amplitudes and trial-to-trial variability at the same channel. Upper: averaged VEPs recorded at the electrode IIb with different references, on-mesh, skull screw and neck (from left to right, respectively). Vertical lines indicate stimulation onset. Horizontal bars: stimulation duration (500 ms). Scales: 0.2 mV. Number of averaged trials was 100, 98 and 99 for on-mesh, skull screw and neck, respectively. Orange bands and grey line indicate ±SEM and ±SD, respectively. Across-trial SDs were SDs averaged through 0- to 250-ms period after stimulation onset (green shadow). Amplitudes of VEP (0.197 mV, 0.214 mV and 0.232 mV, respectively) and across-trial SDs (0.116 mV, 0.111 mV and 0.107 mV, respectively) were comparable among three reference conditions. Recorded under Contra condition in a chronic implantation experiment. Lower: the similar comparison was made in the same recording session at the channel IVE, adjacent to the on-mesh reference electrodes. In this case, the amplitude was smaller in on-mesh condition than other reference conditions, presumably due to effects of closer signal reference. Amplitudes were 0.04 mV, 0.08 mV and 0.08 mV, respectively. Across-trial SDs were 0.05 mV, 0.06 mV and 0.07 mV, respectively. (b) Visually evoked responses simultaneously recorded from three types of electrodes, electrode-mesh (mesh ECoG), depth electrode (icLFP) and silver-ball ECoG electrode (SB) with a common signal reference at neck for all electrodes. In each column, the top trace represents averaged VEPs recorded in five consecutive trials, arranged from top to bottom. The order of each trace in the five trials was indicated by color. Horizontal colored lines indicate 0 volts for corresponding traces. Vertical dotted line indicates the stimulation onset and horizontal black bar indicates stimulation duration (500 ms). Scale bar = 0.2 mV. For mesh ECoG plot, the channel nearest to the depth electrode and silver-ball ECoG electrode was selected. DC fluctuations were evident in SB traces. (c) Across-trial SDs (see Methods) versus peak-to-trough amplitudes of averaged VEP responses recorded in control experiments. Different colors indicate different types of electrodes. The dotted line represents the mesh ECoG regression line obtained from the main experiments (Fig. 6c). (d) Across-trial SDs were plotted against peak-to-trough amplitudes of averaged VEP responses in the same way as (c), except that DC fluctuations were eliminated by subtracting prestimulus (−20 to −1 ms) mean voltage from each trial's data. Across-trial SDs of SB decreased obviously. (e, f) Comparisons of peak-to-trough amplitudes of averaged VEP responses (e) and across-trial SDs (f) among different probes. (g, h) Comparisons similar to (e) and (f) were made using DC fluctuation-eliminated data. The *p*-values were post hoc Tukey honest significance differences (The family-wise confidence level = 0.95, *n* = 31. Only significant (*p* < 0.05) values are shown).

As intended, our electrode-mesh softly fit onto the moderately convex surface of the rat occipital cortex (Figs. 1f, S1), covering V1 and V2. This was in sharp contrast with a “meshless” sheet type electrode array made from the same material, which failed to fit to the curved surface of the cortex (Fig. S1). Since the electrode-mesh was safely attached to and detached from the epidural/subdural surface of the brain, a single probe was able to be repeatedly and durably re-used for 5 different hemispheres in acute experiments.

#### Reliable ECoG signals from the electrode-mesh

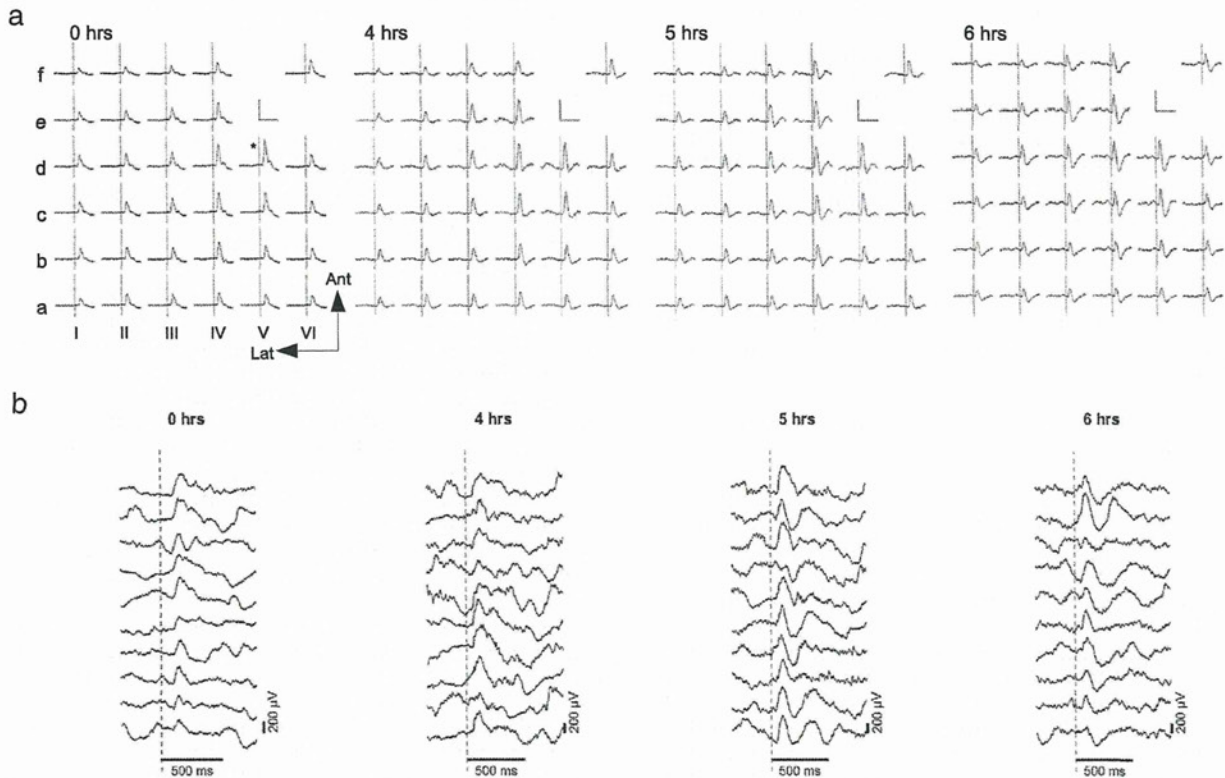
In Contra (contralateral-eye-stimulation) condition, VEPs were consistently recorded from most electrodes assigned to V1 and V2 based on Paxinos and Watson’s Atlas (blue traces in Fig. 2a). On the other hand, the response was small and localized around the binocular V1 (V1B) and the anterolateral area of V2 (AL) in Ipsi (ipsilateral-eye-stimulation) condition (red traces). The VEP amplitude at the peak channel in Ipsi condition was  $0.15 \pm 0.06$  mV, approximately half of Contra condition ( $0.31 \pm 0.07$  mV,  $p < 0.001$ , paired- $t$ ,  $n = 6$  hemispheres). The peak VEP slopes were  $5.3 \pm 2.1$  mV/s and  $13.2 \pm 4.6$  mV/s in Ipsi and Contra conditions, respectively ( $p < 0.001$ , paired- $t$ ,  $n = 6$  hemispheres).

Next, we conducted simultaneous recording by penetrating the tungsten microelectrode through a hole of the electrode-mesh (Fig. 1f). At a monocular penetration tract (TM in Fig. 2a) where ECoG responses were predominantly elicited in Contra condition, Contra-dominant spikes and intracortical LFPs (icLFPs) were typically observed (Fig. 2b-1). In contrast, at a binocular tract (TB) where bilateral ECoG responses were recorded, bilateral spike/icLFP responses were found (Fig. 2b-2). We quantified Contra/Ipsi

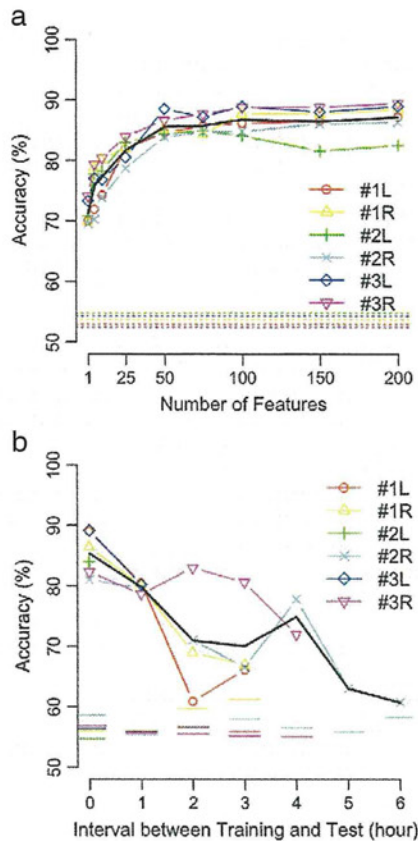
selectivity of neural responses in terms of the ocular dominance index (ODI; see Methods). Neuronal ODI and ECoG ODI were significantly correlated for a population of 154 visually responsive neurons isolated from 18 tracts (Fig. 2c), presumably because of the regional difference of ODI between binocular and monocular regions.

We further conducted two experiments to examine reliability of signals from the electrode-mesh. First, we compared across-trial variability of VEP signals recorded from the electrode-mesh (mesh ECoG) with those from conventional probes (Fig. 2d). Relative response variability normalized with VEP amplitude (orange shadows in Fig. 2d) appeared smaller for mesh ECoG than for icLFP or silver-ball ECoG signals. The difference may not be attributable to artifacts from the reference electrode, since a control experiment confirmed that across-trial SDs of mesh ECoG during the response period (green shadows) were very small regardless of where the reference electrode was connected (one of the electrode on-mesh, skull screw or neck muscle) (orange shadows in Fig. 3a). A separate analysis of VEP amplitudes and across-trial SDs indicated that DC fluctuation was a major factor increasing across-trial variability of silver-ball ECoG (Figs. 3b–d). In contrast, the apparent instability of icLFP (Fig. 2d) was not due to difference in SD ( $p = 0.557$ , post hoc Tukey honest significant differences after Friedman’s test), but to smaller mean VEP amplitudes than mesh ECoG (Figs. 3e–h), presumably because the icLFP size would depend on the depth of the microelectrode tip that was optimized for spike recording in each session.

Second, we examined across-session and within-session reliability of multichannel ECoG signals from the electrode-mesh. As exemplified in Fig. 4, recordings were reliably maintained for 6 hours.



**Fig. 4.** Across- and within-session stabilities of multichannel ECoG signals from the electrode-mesh. (a) Data recorded 4, 5 and 6 hours following the initial session (0 hours). The inset indicates the simultaneously recorded icLFP for reference. Scale bars: 0.2 mV and 500 ms. Recordings were reliably maintained for 6 hours, although slight variations in waveforms were similarly found in simultaneously recorded ECoGs and icLFPs. Ant: anterior (rostral), Lat: lateral. (b) Visually evoked responses in consecutive ten trials were shown from top to bottom in each column. Signals were recorded at the electrode Vd (marked by asterisk) in the same sessions as (a).



**Fig. 5.** Single-trial decoding accuracy by ECoG signals from the electrode-mesh. (a) Decoding accuracies on single-trial mesh ECoG signals plotted against the number of features used in the analysis. Different colors/symbols represent different hemispheres. Colored dotted lines indicate 1% significance levels for each hemisphere of the same color. Accuracy increased with the number of features, approaching 90% at 50–100 features. (b) Generalization accuracy of the classifier for hourly repeated recording sessions with top-100 features from the mesh ECoG signals. The abscissa indicates time after the initial session wherein the classifier had been trained. The performance was above the 1% significance level (solid line of the same color) for any given session and hemisphere.

Although slight variations were observed over times, waveforms were significantly correlated in simultaneously recorded ECoGs and iLFPs (Fig. S2).

#### Single-trial decoding of stimulus condition with signals from the electrode-mesh

Our electrode-mesh might be applied not only for electrophysiological recordings, but also for building brain–machine interface systems using single-trial-based decoding. To test this possibility, we examined whether the stimulation condition (*i.e.*, left eye or right eye) could be reliably decoded from single-trial ECoG signals by a statistical classifier (linear support vector machine, SVM).

Correct classification rate was around seventy percent with top-ranked features derived from the ECoG signals (see Methods), and increased with the number of features, approaching ninety percent at 50–100 features (Fig. 5a). Consistent with across-session stability of the mesh ECoG signals (Fig. 4), generalization accuracies of the classifier across sessions (training the decoder on the first session, and testing it on the subsequent sessions) were above the significance level for 6 hours through the test period (Fig. 5b). Though interleaved presentation of monocular- and binocular trials within a block was

more appropriate, Contra- and Ipsi responses were distinctively recorded (Fig. 2a) and decoded over times (Fig. 5) in the present block-design experiments.

Stimulus-locked topographical weight maps (Fig. S3) show spatiotemporal profiles of effective information used in the decoding-based analysis. Channels with high weight values were mainly found 75–175 ms following stimulation onset, and tended to form a few clusters.

#### Feasibility of the electrode-mesh in chronic recording

One possible problem with the type of electrode like ours may be deterioration in impedance and S/N ratio of the electrode due to growth of some tissues between the electrode surface and dura or pia with time in a chronic application. The small surface area of each electrode in our electrode-mesh might enhance this problem. We therefore examined the feasibility of our electrode-mesh in chronic subdural/epidural implantation for 2 weeks. No gross trends in electrode impedance change were observed through 2 weeks (Fig. 6a,  $V=4270$ ,  $p=0.8564$ , Wilcoxon signed rank test with continuity correction).

The recording experiments showed reliable mesh ECoG responses even after 2 weeks (Fig. 6b). Although VEP amplitude tended to be smaller in the chronic condition, across-trial SD was also reduced correspondingly. Consequently, plots of VEP amplitude and SD in the chronic experiments (colored symbols in Fig. 6c) aligned closely around the regression line calculated from the acute main experiments (dotted line in Fig. 6c). These results indicate that across-trial stabilities of the mesh ECoG signals in the chronic preparation were comparable to those in the acute preparation. Here again the reference issue was not likely a major factor affecting S/N ratio of the electrode-mesh. Notably, no clear difference of impedance or S/N ratio was observed between subdural and epidural implantation for rats, probably because the dura is relatively thin in rat than larger animals.

#### Discussion

In the present study, we produced a flexible electrode-mesh and developed an electrophysiological technique for simultaneous multi-channel ECoG and intracortical spike/LFP recordings within the same region. We applied this method to the rodent visual cortex and obtained reliable spatiotemporal profiles of multichannel ECoG activations through individual eye stimulation up to 2 weeks. The combined ECoG and microelectrode recording revealed close correlation of ocular dominance between surface ECoG and depth spike signals. Close examination of the VEP amplitudes and across-trial SDs showed that mesh ECoG signals exhibited comparable or better signal variability than conventional ECoG or LFP recording methods, which could not be attributable to reference artifacts. In the present study, the microelectrode tip was positioned at different depth positions where single-unit activity was optimally isolated from session to session. If the microelectrode was optimally placed for iLFP recording, the mean amplitude of iLFP signal (Figs. 3e and g) would increase. Nevertheless, our findings demonstrate the potential advantage of our flexible ECoG approach for characterizing trial-wise brain dynamics with minimal invasiveness.

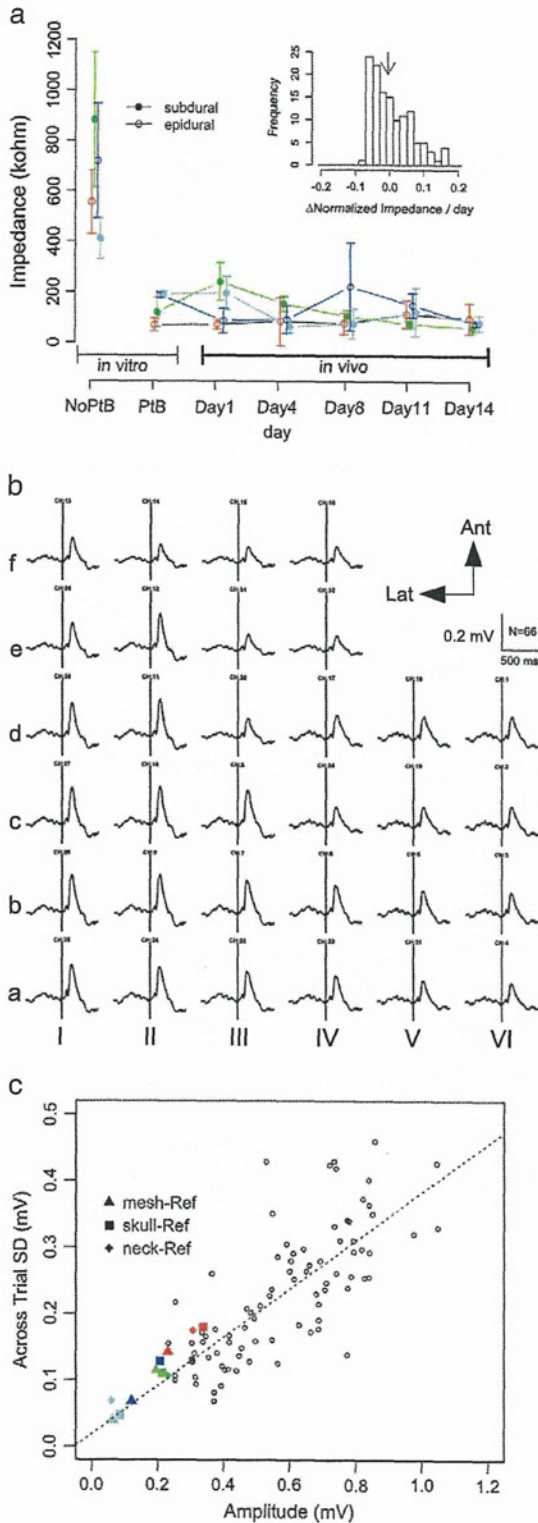
Our electrode-mesh is a type of ECoG electrode array on a flexible sheet fabricated with MEMS technology. The base substrate, Parylene-C, is a flexible, biostable and biocompatible material (Takeuchi et al., 2005). Signal quality recorded from the electrode-mesh was comparable or better than conventional methods (Figs. 2d and 3). Recently, several other groups also developed or used flexible ECoG arrays based on different substrates (Chao et al., 2010; Hollenberg et al., 2006; Rubehn et al., 2009; Yeager et al., 2008). For example, Chao et al. reported long-term decoding of motor signals in monkeys by customizing clinical-use silicone ECoG sheet (Unique Medical, Japan)

to contain array of 2.1-mm-diameter platinum electrodes with an inter-electrode distances of 3.5 mm. Ruben et al. developed a 252-channel electrode array on a polyimide sheet. Their platinum electrodes had a diameter of 1 mm with electrode pitches of 2 mm, 2.5 mm and 3 mm,

respectively. Compared to these examples, our probe has a finer interelectrode distance suitable for spatially resolved, systematic mapping of ECoG with reference to intracortical neural activity. Moreover, the mesh structure would help to stabilize mechanical contact on the cortical curvature (Figs. 1f and S1). Air/fluid drainage through the holes might also contribute to the stability. The holes would further allow simultaneous penetration of various sorts of biological probes such as stimulation/recording microelectrodes, injection/microdialysis cannulas or optrodes (Deisseroth et al., 2006). It would be possible to estimate the horizontal or vertical source of ECoG using the flexible electrode-mesh in combination with needle electrode arrays or depth multichannel microelectrodes. It should also be interesting to explore the relationship of specific band powers of ECoG signals to those of intracortical spike/LFP activities.

The number of channels, interelectrode distance, thickness and the pattern of the electrode-mesh in the present study were optimized for covering both V1M and V1B of rat. These spatial parameters can be easily modified with MEMS technology. It would be interesting to further examine whether finer-density ECoG array can resolve neural activity from an individual cortical column extending several hundred micrometers. Though the largest size of a single mesh is limited by the size of a silicon wafer which can be handled using the process equipments (in the present study it was 5 inches), it may be effectively scaled up to any desired size since multiple meshes can be flexibly composed with each other using our technique. Therefore, optimization of the probe for different resolution of experiments including monkey or cat animal models (Buschman and Miller, 2007; Hasegawa et al., 1998; Koyama et al., 2004; Ohki et al., 2005; Toda et al., 2006) and human patients (Leuthardt et al., 2006; Liu et al., 2009) would be basically possible. In these cases, however, the electrode should be placed subdurally, not epidurally.

We found that single-trial ECoG data carried information reliably signifying the stimulated eye with an accuracy approaching 90%. Such high single-trial decoding performance complements the results of other analyses based on averaged and channel-by-channel data and provide evidence for the feasibility of our electrode-mesh as a signal input device to BMI systems. In our preparation, we just placed the electrode-mesh on the surface of an anesthetized rat's brain, and still the decoding classifier was significantly generalized across sessions for 6 hours. Since we used only time window, frequency and channel information for decoding, adding other precise time-relevant signal features, e.g. phase components, would improve decoding performance because VEPs were time locked to the stimulus onset. Also chronic awake experiments with appropriate behavioral control and trainings might increase long-term recording stability and decoding durability. Consistent with this view, long-term decoding stability for months was reported with motor ECoG signals in monkeys (Chao et al., 2010). In addition, our mesh-film probe of 20- $\mu$ m-thick is less invasive than the conventional clinical ECoG sheet of approximately 1-mm-thick that might cause mass effects when multiply inserted in



**Fig. 6.** Electrode impedance and recording performance after 2-week chronic implantation. (a) Time courses of impedance of electrode-meshes through 2-week implantation. Data are represented by mean  $\pm$  SD. Different colors indicate different animals. NoPtB and PtB indicate *in vitro* measurements before and after platinum black coating. The day of implantation is denoted as day1. Inset: distribution of rate of change in normalized impedance (impedance in day1 = 1). The arrow indicates the mean (0.0055). (b) Visually evoked responses recorded under Contra condition from an electrode-mesh implanted subdurally for 2 weeks. The skull screw was used as the reference electrode. Ant: anterior (rostral), Lat: lateral. (c) Across-trial SDs (see Methods) versus peak-to-trough amplitudes of averaged VEP responses recorded from electrode-meshes implanted subdurally ( $n=2$ ) or epidurally ( $n=2$ ) for 2 weeks. Triangles, squares and diamonds indicate the electrode references used in chronic recording experiments; on-mesh reference, skull screw and neck, respectively. Colors indicate animals in the same way as (a). Small open circles and dotted line represent mesh ECoG data obtained from the combined recording sessions in acute main experiments and their regression line. Results from chronic experiments fitted well on the regression line obtained from acute experiments.

the cranium. Although further clinical tests are needed to establish long-term stability for months and years, the animal experiments suggest that our probe is safely and repeatedly attached to and detached from cortical surfaces during neurosurgery. These findings support the view that the electrode-mesh is one of the promising candidates for the next-generation input devices for BMI (Lebedev and Nicolelis, 2006; Leuthardt et al., 2006).

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.neuroimage.2010.08.003.

### Acknowledgments

We thank T. Isa and Y. Sakurai for comments on the manuscript. We also thank A. Iijima, R. Fukuma and H. Watanabe for technical collaborations. This work was supported by VLSI Design and Education Center (VDEC) of The University of Tokyo. This work was financially supported by Strategic Research Program for Brain Science from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (I.H., T.S., Y.K.), 2008 Specified Research grant from Takeda Science Foundation, Grant (A) from Hayao Nakayama Foundation for Science and Technology and Culture (I.H.), Research for Promoting Technological Seeds (H.T.) and ASTEP (I.H.) from Japan Science and Technology Agency, Grant for Promotion of Niigata University Research Project (I.H.), grants from Brain Science Foundation (I.H.), Yujin Memorial Grant of Niigata University (I.H.), Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (I.H.), Toray Science and Technology Grant of Toray Science Foundation (I.H.), Toyota Physical and Chemical Research Institute (I.H.), and Innovation Promotion Program of New Energy and Industrial Technology Development Organization (I.H.).

### References

- Akima, H., 1970. A New Method of Interpolation and Smooth Curve Fitting Based on Local Procedures. *J. ACM* 17, 589–602.
- Akima, H., 1991. A Method of Univariate Interpolation that Has the Accuracy of a 3rd-degree Polynomial. *ACM Transactions on Mathematical Software* 17, 341–366.
- Buschman, T.J., Miller, E.K., 2007. Top-down versus bottom-up control of attention in the prefrontal and posterior parietal cortices. *Science* 315, 1860–1862.
- Chao, Z.C., Nagasaka, Y., Fujii, N., 2010. Long-term asynchronous decoding of arm motion using electrocorticographic signals in monkey. *Front. Neuroeng.* 3 (3). doi: 10.3389/fneng.2010.00003.
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A.K., Miesenbock, G., Ting, A., Schnitzer, M.J., 2006. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.* 26, 10380–10386.
- Fries, P., 2009. Neuronal gamma-band synchronization as a fundamental process in cortical computation. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 209–224.
- Gaillard, R., Dehaene, S., Adam, C., Clemenceau, S., Hasboun, D., Baulac, M., Cohen, L., Naccache, L., 2009. Converging intracranial markers of conscious access. *PLoS Biol.* 7, e61.
- Girman, S.V., Sauve, Y., Lund, R.D., 1999. Receptive field properties of single neurons in rat primary visual cortex. *J. Neurophysiol.* 82, 301–311.
- Hasegawa, I., Fukushima, T., Ihara, T., Miyashita, Y., 1998. Callosal window between prefrontal cortices: cognitive interaction to retrieve long-term memory. *Science* 281, 814–818.
- Hollenberg, B.A., Richards, C.D., Richards, R., Bahr, D.F., Rector, D.M., 2006. A MEMS fabricated flexible electrode array for recording surface field potentials. *J. Neurosci. Methods* 153, 147–153.
- Kamitani, Y., Tong, F., 2005. Decoding the visual and subjective contents of the human brain. *Nat. Neurosci.* 8, 679–685.
- Katzner, S., Nauhaus, I., Benucci, A., Bonin, V., Ringach, D.L., Carandini, M., 2009. Local origin of field potentials in visual cortex. *Neuron* 61, 35–41.
- Koyama, M., Hasegawa, I., Osada, T., Adachi, Y., Nakahara, K., Miyashita, Y., 2004. Functional magnetic resonance imaging of macaque monkeys performing visually guided saccade tasks: comparison of cortical eye fields with humans. *Neuron* 41, 795–807.
- Kriegeskorte, N., Simmons, W.K., Bellgowan, P.S., Baker, C.I., 2009. Circular analysis in systems neuroscience: the dangers of double dipping. *Nat. Neurosci.* 12, 535–540.
- Lebedev, M.A., Nicolelis, M.A., 2006. Brain-machine interfaces: past, present and future. *Trends Neurosci.* 29, 536–546.
- Leuthardt, E.C., Schalk, G., Moran, D., Ojemann, J.G., 2006. The emerging world of motor neuroprosthetics: a neurosurgical perspective. *Neurosurgery* 59, 1–14 (discussion 11–14).
- Liu, H., Agam, Y., Madsen, J.R., Kreiman, G., 2009. Timing, timing, timing: fast decoding of object information from intracranial field potentials in human visual cortex. *Neuron* 62, 281–290.
- Logothetis, N.K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T., Oeltermann, A., 2001. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412, 150–157.
- 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.
- Ohki, K., Chung, S., Ch'ng, Y.H., Kara, P., Reid, R.C., 2005. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* 433, 597–603.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. Academic Press, London.
- Rubehn, B., Bosman, C., Oostenveld, R., Fries, P., Stieglitz, T., 2009. A MEMS-based flexible multichannel ECoG-electrode array. *J. Neural Eng.* 6, 036003.
- Schwartz, A.B., Cui, X.T., Weber, D.J., Moran, D.W., 2006. Brain-controlled interfaces: movement restoration with neural prosthetics. *Neuron* 52, 205–220.
- Slutzky, M.W., Jordan, L.R., Krieg, T., Chen, M., Mogul, D.J., Miller, L.E., 2010. Optimal spacing of surface electrode arrays for brain-machine interface applications. *J. Neural Eng.* 7, 26004.
- Takeuchi, S., Ziegler, D., Yoshida, Y., Mabuchi, K., Suzuki, T., 2005. Parylene flexible neural probes integrated with microfluidic channels. *Lab Chip* 7, 519–523.
- Toda, H., Tanimoto, N., Takagi, M., Abe, H., Bando, T., 2006. Visual cortical contribution to open-loop and feed-back control of convergence eye movements in the cat. *Neurosci. Res.* 54, 302–312.
- Tukey, J.W., 1977. *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley.
- Vapnik, V.N., 1998. *Statistical Learning Theory*. John Wiley & Sons, New York.
- Whittingstall, K., Logothetis, N.K., 2009. Frequency-band coupling in surface EEG reflects spiking activity in monkey visual cortex. *Neuron* 64, 281–289.
- Yeager, J.D., Phillips, D.J., Rector, D.M., Bahr, D.F., 2008. Characterization of flexible ECoG electrode arrays for chronic recording in awake rats. *J. Neurosci. Methods* 173, 279–285.

## DTI-based tractography による白質マッピングの脳神経外科手術への応用

鎌田 恭輔

## White Matter Mapping by DTI-based Tractography for Neurosurgery

by

Kyouusuke Kamada, M.D.

from

Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

To validate the corticospinal tract (CST) and arcuate fasciculus (AF) illustrated by diffusion tensor imaging (DTI), we used CST- and AF-tractography integrated neuronavigation and monopolar and bipolar direct fiber stimulation. **Methods:** Forty seven patients with brain lesions adjacent to the CST and AF were studied. During lesion resection, direct fiber stimulation was applied to the CST and AF to elicit motor responses (fiber-MEP) and the impairment of language-related functions to identify the CST and AF. The minimum distance between the resection border and illustrated CST was measured on postoperative images. **Results:** Direct fiber stimulation demonstrated that CST- and AF-tractography accurately reflected anatomical CST functioning. The cortical stimulation to the gyrus, including the language-fMRI activation, evoked speech arrest, while the subcortical stimulation close to the AF reproducibly caused "paranoia" without speech arrest. There were strong correlations between stimulus intensity for the fiber-MEP and the distance between eloquent fibers and the stimulus points. The convergent calculation formulated 1.8 mA as the electrical threshold of CST for the fiber-MEP, which was much smaller than that of the hand motor area. Validated tractography demonstrated the mean distance and intersection angle between CST and AF were 5 mm and 107°, respectively. In addition, the anisotropic diffusion-weighted image (ADWI) and CST-tractography clearly indicated the locations of the primary motor area (PMA) and the central sulcus and well reflected the anatomical characteristics of the corticospinal tract in the human brain. **Discussion:** DTI-based tractography is a reliable way to map the white matter connections in the entire brain in clinical and basic neuroscience. By combining these techniques, investigating the cortico-subcortical connections in the human central nervous system could contribute to elucidating the neural networks of the human brain and shed light on higher brain functions.

(Received July 7, 2009; accepted July 13, 2009)

**Key words:** arcuate fascicles, corticospinal tract, diffusion tensor imaging, subcortical stimulation

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 18 : 792-799, 2009

## はじめに

脳腫瘍をはじめとする頭蓋内疾患の外科的治療に際し、最も効果的な治療は病巣の最大限の切除を可能にす

ることである。その一方で、術後の麻痺、失語などの神経脱落症状を回避するために、術前、または術中に運動、言語機能局在を同定することがきわめて重要である。従来われわれは、先人たちの尽力により培われた微小解剖

東京大学大学院医学系研究科脳神経外科 / 〒113-8655 文京区本郷 7-3-1 (連絡先: 鎌田恭輔)

Address reprint requests to: Kyouusuke Kamada, M.D., Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan



と脳機能分布地図を基にして頭蓋内病巣切除を行ってきた。

近年の目覚ましい画像技術の進歩は、従来の微小解剖学とは一線を画した“invisible”な構造を可視化することができるようになった。MRI 撮像方法の一つである拡散強調画像 (diffusion-weighted imaging; DWI) は、“組織内プロトンの拡散の速度情報”を画像のコントラストに付加している。中枢神経組織では動きを制限された拡散 (restricted diffusion) が観察されることが知られている<sup>1)</sup>。中枢神経内の水分子の“diffusion”は、強い不等方向性 (anisotropy) があり、それらは経験的に皮質下線維方向を反映していると解釈されている。より詳細に白質神経路の走行を知るためには、ピクセルごとに最低 6 方向の拡散強調磁場パルス (mpg) を印加して拡散係数の計測を行い、求めた拡散テンソルが皮質下組織の各ピクセル内主軸方向を表しているとされている<sup>1)9)</sup>。テンソル算出に関する詳細の説明は他書に譲るが、算出された結果は 3 つの固有値 (eigenvalue:  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ ) とそれに対応する固有ベクトル (eigenvector:  $e_1, e_2, e_3$ ) で表される。 $\lambda_1$  は神経線維に沿った方向の拡散係数で、 $\lambda_2, \lambda_3$  は神経線維に直交した方向の係数となる。この拡散テンソル画像 (diffusion tensor imaging; DTI) の主軸方向を追跡 (fiber tracking) することにより、連続した白質線維の画像化 (拡散テンソルトラクトグラフィ: tractography) が可能になった<sup>9)11)</sup>。Tractography を描く際のパラメータとして、スライス厚、ピクセルサイズ、mpg の強さ ( $b$  値)、および使用する tracking 開始、終了点、fractional anisotropy (FA) と tracking angle などがあるが、その条件設定により結果が大きく異なってくる。

本稿では tractography による従来 invisible structure であった白質の画像化の実際と脳神経外科手術における白質解剖について述べる。

## 対象と方法

### 1) 対象

皮質脊髄路 (corticospinal tract; CST) 近傍病変 40 例と弓状束 (arcuate fasciculus; AF) 近傍病変 7 例、および頭蓋内疾患のない健常な 15 症例を対象とした。

### 2) 画像撮像法

#### 1) DTI データ取得

MRI データは、echo planer imaging (EPI) シーケンス撮像可能な臨床用 1.5、または 3T 装置で取得した。撮像条件は SE-EPI によりエコー時間 67~80 msec、繰り返し

し時間 13,000 msec、スライス数 55 枚、スライス厚 3 mm、空間解像度は 1.875 mm とした。 $b$  値は 1,000 s/mm<sup>2</sup> の mpg 15 軸 (1.5T)、30 軸 (3T) を印加した DTI データと、 $b$  値が 0 s/mm<sup>2</sup> である T2 強調画像を取得した。取得データは T2 強調画像に合わせて歪み補正を行った。得られた DTI データは、当大学放射線科で開発した VOLUME-ONE と dTV (<http://volume-one.org>) を用いてテンソル計算を行った。

#### 2) CST-tractography の作製

運動性下行線維である CST は、中脳では大脳脚内のみを走行している。中脳では CST 背側は黒質が存在しており、その背側には上行性感覚線維で構成される内側毛帯が位置している。内包では下行性、上行性線維が近接しているため、解剖学的に上・下行線維それぞれが分離している大脳脚が seed に適していると考えた (one-ROI 法)。特に中脳と一次運動野の間の CST のみを抽出する時は、追跡終了点 (target) を一次運動野に指定する (two-ROI 法)。正常 CST の FA 平均値は 0.6 前後と報告されている<sup>5)</sup>。われわれは CST-tractography の FA を 0.18 と設定した。また、tracking angle は通常 30° に設定した。

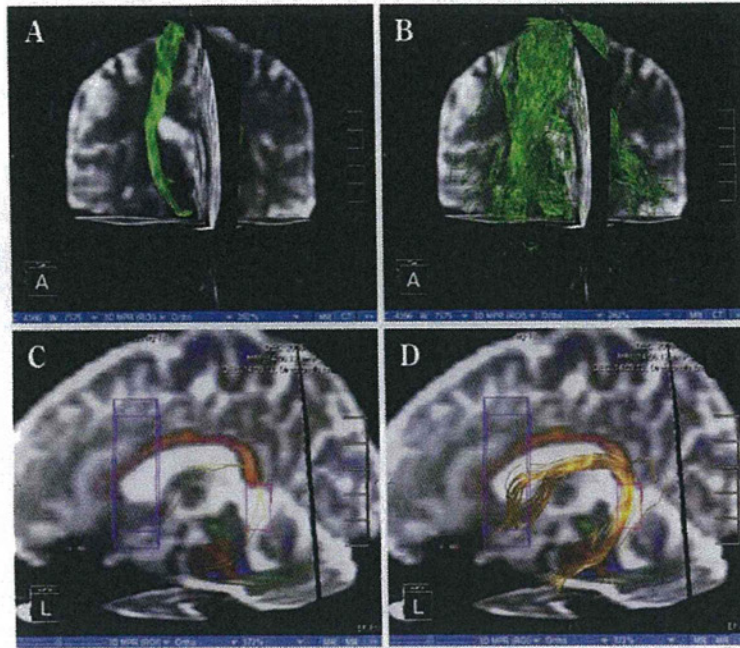
#### 3) AF-tractography の作製

前頭葉、側頭葉内言語野を結ぶ AF は CST と異なり、解剖学的に追跡開始点を指定することが困難である。脳梁上部正中側を前後に走行している上縦束の外側に前後に走行している線維に seed を設定、または下前頭回と上側頭回に seed と target を設定することで AF の描出が可能である。われわれの施設では、この言語野の同定のために、言語関連課題による機能 MRI、または脳磁図計測結果を用いているが、本稿では省略する。AF 描出のための FA 値は 0.18 であり、tracking angle は 50~60° が適していた。

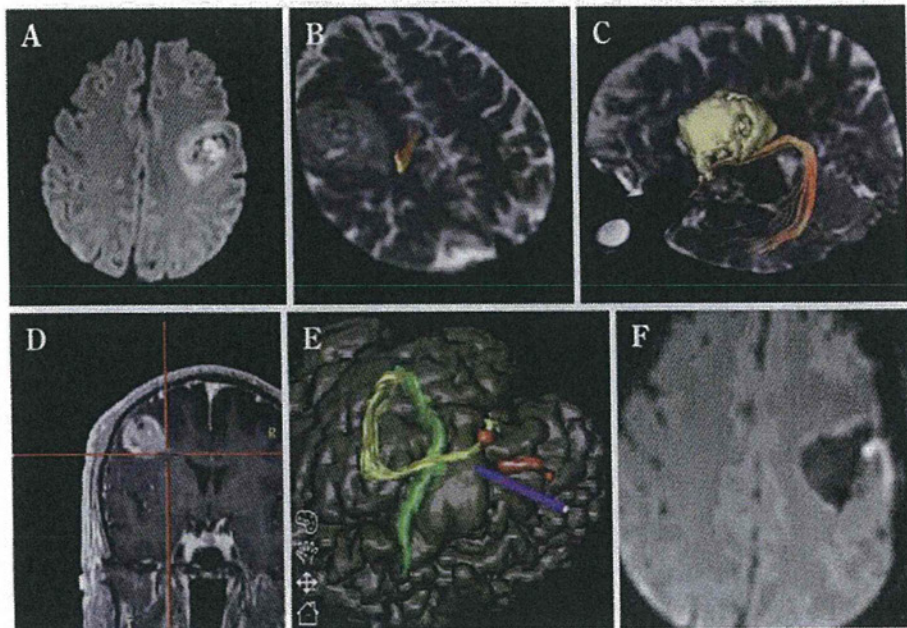
#### 4) Tractography 融合 functional neuronavigation

病巣切除を進めて脳深部に達した際には、白質内 CST、AF を顕微鏡下であっても同定することは不可能である。このため、切除範囲、電気刺激部位などを決定するためにも tractography を表示可能としたニューロナビゲーションが有用である。

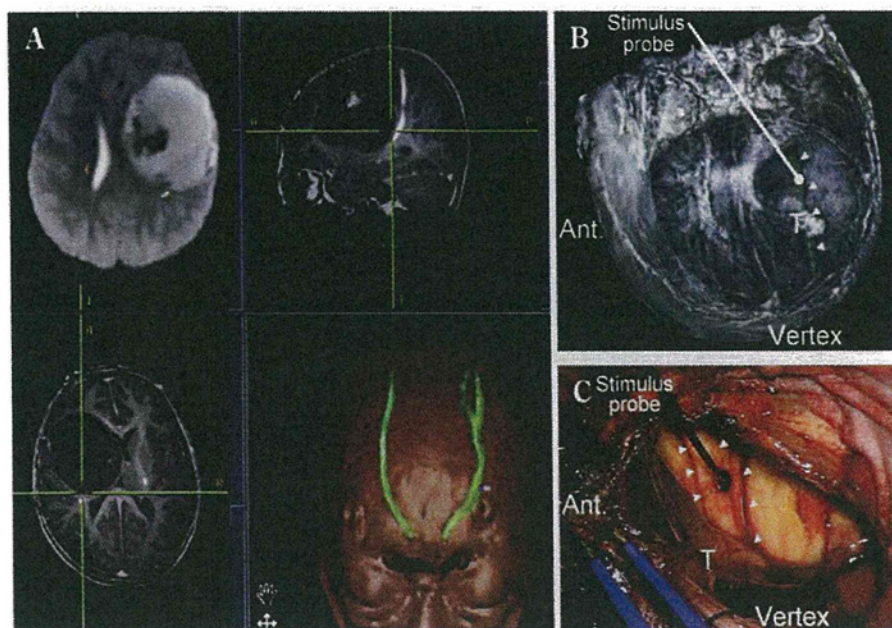
Tractography 用の DTI と解剖学的 3D-MRI データは異なる座標系を有しているため、各画像間の座標変換によるレジストレーションが必要となる。われわれの施設では、Mutual information 法を用いて画像座標変換を行っている<sup>2)8)</sup>。その後、tractography を 3D-MRI と重畳した後、digital imaging and communication medicine (DICOM) 形式の MRI スライスに変換し、ナビゲーション装置上で各機能情報の抽出と 3 次元再構成を行う。



**Fig. 1** Different profiles of CST- and AF-tractography  
**A** : CST-tractography illustrated with a 30° tracking angle.  
**B** : CST with a 120° tracking angle.  
**C** : AF-tractography illustrated with a 30° tracking angle.  
**D** : AF with a 90° tracking angle.



**Fig. 2** Left frontal glioma, which compressed corticospinal the tract (CST) and arcuate fascicles (AF).  
**A** : Isotropic diffusion-weighted image (DWI) showing a hyperintense lesion in the left frontal lobe.  
**B** : CST-tractography demonstrating that the tumor was located near CST.  
**C** : AF-tractography revealing that the anterior part of AF was shifted inferiorly by the tumor.  
**D, E** : Two-dimensional (2D) and 3D-reconstructed neuronavigation images with CST and AF.  
**F** : Postoperative DWI showing that the tumor was mostly removed with no neurological deterioration.



**Fig. 3** A : Tractography integrated neuronavigation showing that the tumor resection (green cross) reached the CST (white areas), which was markedly compressed by the cyst. Direct fiber stimulation with a 1.86 mA stimulus intensity evoked the fiber-MEP in the upper and lower extremities.  
 B : Three-dimensionally reconstructed MRI revealing the spatial relationship among the tumor (T), CST (arrowheads) and the stimulator.  
 C : Intraoperative view showing the spatial relationship among the tumor (T), CST and the stimulator. Note that direct fiber stimulation only to a groove on the CST (arrowheads) evoked the fiber-MEP and functionally demonstrated the CST profile.

#### 5) 術中モニタリングと白質電気刺激

運動野皮質刺激と切除腔内の CST 近傍部の白質電気刺激 (direct fiber stimulation) により上下肢の筋肉に留置した針電極より筋電図 (MEP) を検出する。CST 刺激はモノポーラ刺激とし、0.2 msec 幅の矩形波を 5 連発電気刺激で行った。AF の電気刺激には覚醒下手術中に自発言語、物品名称課題を行いながら、電極幅 5 mm のバイポーラ型刺激電極を用いて 1 msec 幅の矩形波 50 Hz の電気刺激を 4~5 秒間行い、発語停止、呼称困難などの症状を観察した。

術後に DTI を取得して、切除腔と CST、AF との最短距離を計測した。

### 結果

CST を解析した 40 症例で、0.18 の FA と 30° の tracking angle を用いることで、大脳脚から一次運動野までの CST を描出することができた。側脳室体部よりも皮質側の CST は、解剖学的に上下肢、cortico-bulbar tract などへ分岐することが知られているが、横方向への fiber

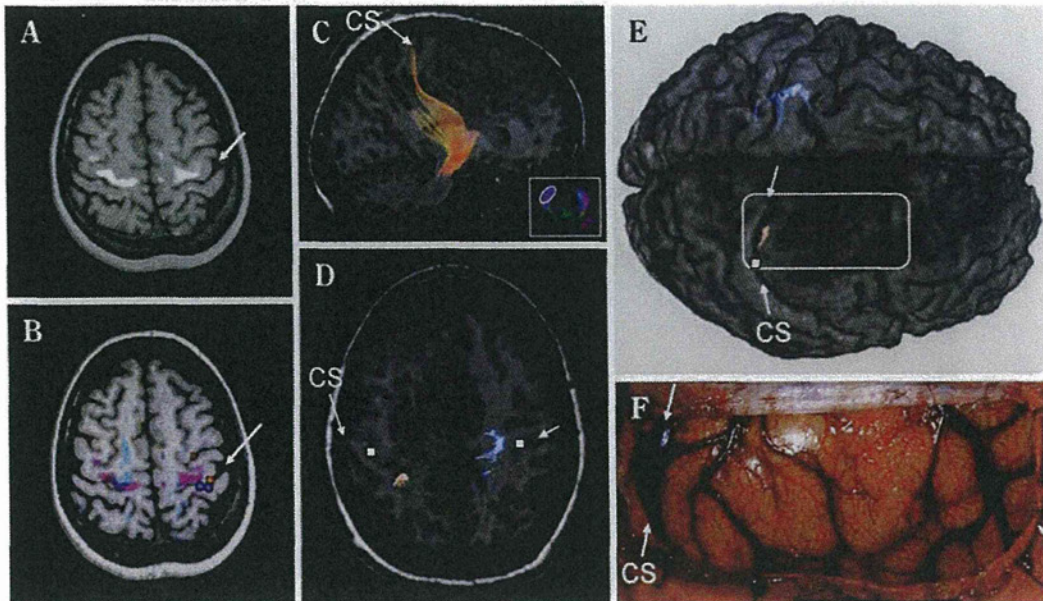
tracking は困難であった。Tracking angle を 30~12° と変更しても、上縦束のピクセル数が増すのみで、横方向への fiber の描出は不可能であった (Fig. 1A)。このため、病変部と CST との分離に関しては、脳室体部よりも中枢側に関して着目した。

AF は 30° よりも 60° の tracking angle で安定した弓状の線維束を描出することが可能であった (Fig. 1B)。

CST-、または AF-tractography をナビゲーション装置に融合することで、術中に白質電気刺激の位置、刺激タイミングなどを迅速に決定することができた (Fig. 2)。

### CST-tractography とモノポーラ電気刺激 (direct fiber stimulation)

白質電気刺激により MEP が誘発された症例は 17 例あり、43% で CST の白質マッピングを行うことができた。皮質刺激 MEP の平均刺激強度は 15.6 mA であったのに対し、白質刺激 MEP が出現した症例の平均刺激強度は 9.4 mA であった。皮質と白質刺激閾値には Student *t*-test により明らかな有意差があった ( $p < 0.01$ )。これ



**Fig. 4** A, B: Anisotropic DWI (A) and three-dimensional anisotropic contrast (3D-AC) (B) superimposed on an anatomical MRI indicating the primary motor area (PMA) as hyperintense and purple areas, respectively.  
 C, D: CST-tractography showing the location of PMA in case with right frontal glioma.  
 D: 3D-reconstructed brain surface image demonstrating craniotomy (white square), the central sulcus (arrow) and PMA with CST-tractography.

より皮質より白質 CST が電気刺激に対する閾値が低いと考えられた。

白質刺激部位と CST-tractography との平均距離は 8.4 mm であった。切除に伴う白質刺激部位が 10 mm 以内に近づいた時には、白質電気刺激による機能マッピングが可能になるものと考えられる。一方、白質電気刺激による MEP が誘発されなかった症例では、刺激部位と CST-tractography との距離が 26.8 mm と離れていた。白質電気刺激により MEP を誘発する重要な因子としては、刺激部位と CST までの距離が重要であると考えられる。

**Fig. 3** は再発腫瘍の嚢胞腔内出血のため片麻痺で発症した症例である。この症例では嚢胞腔が CST を直接圧迫していたため、白質刺激で CST-tractography の直上を刺激することが可能であった。本症例の刺激部位と CST-tractography との距離は 2 mm 以内であり、白質刺激 MEP 閾値は 1.8 mA であった。また、嚢胞壁の溝に沿った CST は全体が 2 mA 以下の刺激で MEP が誘発された。刺激位置が CST-tractography から外れると、同一刺激強度では MEP は誘発されなくなった。本症例では皮質 MEP の刺激閾値 16 mA であり、白質刺激閾値はその 1/5 以下であった。

これらの検討より、CST-tractography はきわめて信頼

性が高く、CST を反映していることが証明された。また、皮質に比して白質の電気刺激閾値が低いことも明らかになった。

### CST-tractography による 一次運動野の同定

不等方向性拡散強調画像 (anisotropic DWI ; ADWI), CST-tractography を用いて一次運動野 (primary motor area ; PMA) から主に投射している CST を描画、追跡した。中心溝、PMA は、術中に皮質 SEP の位相反転を観察することで同定した。ADWI では 12 例で、PMA が高信号域となるため同定が可能であった。脳浮腫の強い 5 例では 3D-AC, tractography による等方向成分を除去・無視することで CST を追跡し、PMA を同定することができた (Fig. 4)。さらに、DWI 原理で追跡した CST は、PMA 近傍部では運動野後半部、中心溝後壁に主に投射していた。機能 MRI 活動なども中心溝後壁に集積することを考慮すると、運動神経細胞の集まり、CST の投射分布などが中心溝後壁に集中していることが描出された。



**Fig. 5 White matter structures by tractography**  
Tractography demonstrating that distances between the CST and AF (①), the CST and the lateral ventricle (②) and the intersection angle of the CST and AF (③).

### AF-tractography とバイポーラ電気刺激

覚醒下手術を行った7症例では、6~10 mA ほどの強度で下前頭回を刺激したところ、全症例で発語停止が誘発された。深部へ切除を進め、ナビゲーション上の AF に近接したところで自発言語は保たれていたが、4症例で図形の呼称困難が現れた。症状の現れた症例の切除腔と AF の平均距離は  $2.2 \pm 1.3$  mm であった。一方、言語関連症状の出現しなかった平均距離は  $12.4 \pm 3.4$  mm であり、バイポーラ刺激による白質マッピングも刺激部位と AF までの距離が重要な因子であった。

### Tractography 上の CST と AF との空間的位置関係

上述したように電気生理学的手法により tractography の信頼性を検証することができた。脳深部病変摘出を行う時には脳室体部外側に CST と AF が近接しているが、Fig. 5 では、①CST-AF、②CST-脳室との平均距離、および③CST と AF の交差角度を健常例 15 例で計測した。その結果、①の平均は 4.91 mm、②は 2.3 mm、③は  $107.6^\circ$  であった。このように従来の微小解剖では計測が不可能であった eloquent fiber の脳内の走行、位置関係について計測することが可能となった。

### 考 察

CST-, AF-tractography を重畳したニューロナビゲーション装置上で、脳深部術野で近接している CST、また

は AF の損傷に留意しながら切除を進めることが可能になった。皮質電気刺激と同様の条件により切除内腔から白質線維を刺激することで、白質電気刺激 MEP、または言語関連脳機能障害が誘発される。この方法により、① CST-tractography で表示された CST の検証、② AF-tractography 上 AF の検証、③電気刺激による白質マッピングの有効性、④脳深部手術時の CST、AF の温存に留意した最大限の病巣切除が可能となった。

近年は tractography を用いて、脳卒中患者において病変部と CST との位置、神経機能予後との関係に関する報告が散見される<sup>7)8)</sup>。これにより間接的に tractography 上の線維と実際の解剖学的な情報と合致していることも推察されていた。白質電気刺激による白質マッピングも最近では広く普及するようになり、tractography と白質電気刺激による検証も進みつつある<sup>3)6)10)</sup>。

大脳皮質の神経細胞のうち、80%ほどが錐体細胞であり、平均的には皮質 1 mm<sup>2</sup>あたりヒトでおよそ 1 万の錐体細胞が存在する。ヒトの錐体細胞の細胞体は典型的には 10 μm から 50 μm ほどであるが、ベッツ細胞とも呼ばれる一次運動野の V 層の錐体細胞は特に大きく、ヒトでは細胞体が 100 μm になる。また運動野の皮質の厚さは 1.5~4.5 mm ほどあり、脳回の縁の部分で最も厚く、脳溝の底で最も薄い。Brodmann の地図にもあるように、この大型細胞は PMA の後半部に多く集まっているため、CST は PMA 後半部から優位に下方へ投射している。ADWI、CST-tractography ではこの解剖学的特徴を鋭敏に検出しているため、PMA 後半部の ADWI の高信号、同部位まで CST-tractography が連続することで PMA を同定することが可能であった。

また、電気生理学的に検証した CST, AF の空間的な位置関係についても解析を行った。この結果、脳室体部近傍部では CST と AF が最も近接していることが明らかにすることができた。これらの eloquent fiber の距離は約 5 mm, 交差角度は 107°であり、CST と脳室壁との距離は 2.5 mm であった。このような白質の走行の位置の計測は、生体脳を用いた DTI のみ行える解剖学的検討である。さらに本報告では、電気生理学的検証を行っていることが画像上の検討の信頼性を高めている。

その一方で脳波、誘発電位、および脳磁図などではスパイク以外の電氣的脳活動を認めず、臨床的にも片側脳機能が廃絶している症例の患側大脳半球においても、tractography では CST が描出される例も経験している。本症例では経頭蓋磁気刺激でも運動機能は同側支配であることが証明されているため、機能していない CST も tractography では描出されていた。しかし、この FA に着目すると患側 CST の FA は 0.22 であり、健側の 0.54 に比して半分以下に低下していた。今後は FA 値から CST の機能状態を非侵襲的に診断することも可能になるものと期待される。機能画像と臨床上の症候、電気刺激による機能マッピング結果を考慮したうえで、外科治療戦略を立てることも重要である。

## おわりに

近年さらなる高速撮像法 (SENSE など)<sup>4)</sup>、および安定した信号の取得法の確立 (PROPELLER, SPLICE など)、高磁場装置の導入により、DWI の信号強度、画質は飛躍的に向上している。また、crossing fiber に対する分離アルゴリズムも開発されつつある。これらの進歩により、より詳細な CST の描出に加え、AF、脳弓、脳神経などの複雑、詳細な中枢神経構造物の画像化が行えるようになることが期待される。

## 謝辞

本研究は、科学研究費補助金 (21390406)、特定領域研究 (統合脳: 20020008)、新学術領域 (顔認知: 21119508)、および JST さ

きがけ (脳の解読と制御) による援助を受けた。

## 文献

- 1) Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D: MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J* **66**: 259-267, 1994.
- 2) Chen HM, Varshney PK: Mutual information-based CT-MR brain image registration using generalized partial volume joint histogram estimation. *IEEE Trans Med Imaging* **22**: 1111-1119, 2003.
- 3) Duffau H, Peggy Gatignol ST, Mandonnet E, Capelle L, Taillandier L: Intraoperative subcortical stimulation mapping of language pathways in a consecutive series of 115 patients with Grade II glioma in the left dominant hemisphere. *J Neurosurg* **109**: 461-471, 2008.
- 4) Jaermann T, Crelier G, Pruessmann KP, Golay X, Netsch T, van Muiswinkel AM, Mori S, van Zijl PC, Valavanis A, Kollias S, Boesiger P: SENSE-DTI at 3T. *Magn Reson Med* **51**: 230-236, 2004.
- 5) Kamada K, Sawamura Y, Takeuchi F, Kawaguchi H, Kuriki S, Todo T, Morita A, Masutani Y, Aoki S, Kirino T: Functional identification of the primary motor area by corticospinal tractography. *Neurosurgery* **56**: 98-109; discussion 198-109, 2005.
- 6) Kamada K, Todo T, Masutani Y, Aoki S, Ino K, Takano T, Kirino T, Kawahara N, Morita A: Combined use of tractography-integrated functional neuronavigation and direct fiber stimulation. *J Neurosurg* **102**: 664-672, 2005.
- 7) Konishi J, Yamada K, Kizu O, Ito H, Sugimura K, Yoshikawa K, Nakagawa M, Nishimura T: MR tractography for the evaluation of functional recovery from lenticulostriate infarcts. *Neurology* **64**: 108-113, 2005.
- 8) Kunimatsu A, Aoki S, Masutani Y, Abe O, Mori H, Ohtomo K: Three-dimensional white matter tractography by diffusion tensor imaging in ischaemic stroke involving the corticospinal tract. *Neuroradiology* **45**: 532-535, 2003.
- 9) Masutani Y, Aoki S, Abe O, Hayashi N, Ohtomo K: MR diffusion tensor imaging: Recent advance and new techniques for diffusion tensor visualization. *Eur J Radiol* **46**: 53-66, 2003.
- 10) Mikuni N, Okada T, Enatsu R, Miki Y, Hanakawa T, Urayama S, Kikuta K, Takahashi JA, Nozaki K, Fukuyama H, Hashimoto N: Clinical impact of integrated functional neuronavigation and subcortical electrical stimulation to preserve motor function during resection of brain tumors. *J Neurosurg* **106**: 593-598, 2007.
- 11) Mori S, van Zijl PC: Fiber tracking: Principles and strategies: A technical review. *NMR Biomed* **15**: 468-480, 2002.

要 旨

DTI-based tractography による白質マッピングの脳神経外科手術への応用

鎌田 恭輔

拡散テンソル MRI による tractography は、従来 invisible な白質内構造を画像化し, eloquent fiber の同定に応用できる. Tractography による白質マッピングの現状とその有用性を報告する. 各 fiber の至適作製条件を設定後, 皮質脊髄路 (CST) と弓状束 (AF) を作製した. 白質電気刺激では距離と刺激強度に非線形相関があった. 白質刺激 MEP 閾値は 2 mA 程度であり, 皮質刺激 MEP の 1/10 程度であった. 刺激部位が AF の 5 mm 以内の時は錯語を呈した. CST と AF の交差部は運動, 言語機能マッピングが必要であり, 外科解剖としてきわめて重要な部位と考える.

脳外誌 18 : 792-799, 2009

脳神経外科ジャーナル

次号予告

第 18 巻 第 12 号 2009 年 12 月

特集「他科のエキスパートに学ぶ」担当/飯原弘二, 永廣信治

- ここまでできる ultramicrosurgery .....岡山大学 木股敬裕, 他
- 経皮的内視鏡椎間板ヘルニア摘出の現状.....帝京大学医学部附属溝口病院 出沢 明, 他
- 心臓血管外科分野での血行再建のテクニック .....国立循環器病センター 荻野 均
- 耳鼻科医は内視鏡をこう役立てている—内視鏡下鼻内副鼻腔手術の適応と応用— .....岡山大学 岡野光博

温故創新

- 脳神経外科医魂 .....山梨大学 貫井英明

原著

高齢者の腰部脊柱管狭窄症に対する片側進入顕微鏡下開窓術の手術成績:

- 前期および後期高齢者間での比較 .....順天堂東京江東高齢者医療センター 屋田 修, 他

手術手技・周術期管理

Gravity assisted device を用いた hybrid な shunt system による

- 特発性正常圧水頭症の治療経験 .....越谷市立病院 角田 朗, 他

症例報告

Gadolinium-enhanced 3D MR angiography による

- 脳動脈瘤コイル塞栓術後の評価 .....三重中央医療センター 三浦洋一, 他

編集の都合上内容が若干異なる場合がありますのでご了承ください.

### 3) 脳腫瘍手術における functional neuronavigation

旭川医科大学医学部脳神経外科教授 鎌田恭輔

**key words** diffusion tensor imaging, eloquent fiber, functional neuronavigation, subcortical stimulation, tractography

#### 要 旨

脳神経画像誘導装置は1986年に日本で開発されニューロナビゲーションと命名された。本装置により脳神経外科手術において正確な病巣切除が多く、多くの脳神経外科医が安定して行うことができるようになった。最近では従来の解剖学的情報に加えて機能MRI、脳白質画像<sup>1)</sup>、および核医学画像などの脳機能画像を融合することで、機能情報を融合したニューロナビゲーションが盛んに報告されるようになった。これにより従来invisibleであった脳構造物をニューロナビゲーション下に同定し、よりの確に病巣に到達することが可能となった。また、脳神経外科手術中に脳組織などの構造物が偏位するbrain shiftの補正に対応するために、手術室に設置したCT、MRI、または脳血管撮影装置による術中画像とニューロナビゲーションを融合することで、新たな術中画像をアップデートする試みも報告されている。機能画像と術中画像装置の導入に発展しているニューロナビゲーションの最近の知見について述べる。

#### 動 向

脳腫瘍をはじめとする頭蓋内疾患の外科的治療に際し、もっとも効果的な治療は病巣の最大限の

切除を可能にすることである。従来は神経脱落症状の出現を回避するために、先人達の尽力により培われた微小解剖と脳機能分布地図をもとにして病巣切除を行ってきた。しかし、病変部が脳深部に及んでいる際は切除部位の正確な位置と脳機能局在を把握することが必要であった。この目的のために脳神経外科手術ナビゲーション（ニューロナビゲーション）が1987年に日本で開発された<sup>2)</sup>。当初はアームの各々に取り付けられたセンサー（ポテンシオメーター、エンコーダーなど）で距離を計測し、基準位置に対するプローブの相対位置を算出していた。しかし、アームによる拘束はプローブ操作の制限と術者の慣れを要するため、光学式アプローチが主流となった。使用する画像は薄いスライス厚(1mm程度)かつスライスギャップのない三次元CT、またはMRIのT<sub>1</sub>強調画像上で頭皮に貼り付けた4個以上のマーカーを用いて画像と頭部位置情報の登録を行う。トラッキング装置とポインターは約20Hz以上の高周波サンプリングを行っているため、ほぼリアルタイムに脳内位置を知ることができる。さらに詳細な脳内組織、病変構造情報が必要なときには、T<sub>2</sub>強調、Fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) 画像、核医学画像などを自動位置合わせプログラ



ムにより重ねることも可能となった。現在では本システムは脳神経外科領域で必要な手術支援装置となり、2008年の診療報酬改定で「画像等手術支援加算（ナビゲーション）として2,000点の点数加算も認められた。

ただし従来のニューロナビゲーションでは上述した位置的正確さに重きをおいた手術であった。最近では従来可視化不可能であった脳の機能情報を検出できる機能MRI (fMRI)、白質画像 (tractography)、PET、脳磁図などが可能になり、この機能情報をナビゲーション画像に重畳することで機能的画像誘導手術に関する報告が増えてきている<sup>3,4)</sup>。このような機能画像融合型ニューロナビゲーションは functional neuronavigation として注目されている。

また、MRI、CT、血管撮影装置を手術室に設置して術中画像をニューロナビゲーション装置に転送することで、常に最新の脳内構造、病変の状態をアップデートすることで正確、かつ確実な手術を目指して開発が進められている。

本稿では最近のニューロナビゲーションの現状と今後の展望について述べる。

## A. Functional neuronavigation

### 1. 機能MRI (fMRI)

臨床用1.5T装置で行うことができるfMRIは、比較的簡便に、かつ高い信号・雑音比を有する信号を得ることができる。これにより単純な運動、視覚等の一次脳機能に加え、言語などの高次脳機能の局在に応用されるようになった。しかし、fMRIは主に脳組織内血流の変化に伴う酸化ヘモグロビン/還元型ヘモグロビン比 blood oxygenation level dependent (BOLD) を捉えているため、直接電気的な脳活動を反映しているわけではない。特に1.5T程度のMRI装置では脳組織内のBOLD効果よりは、血管由来の in flow 効果を主に反映しており、その厳密な機能局在に関しては今後さらなる検討が必要である。このfMRI解析結果を非侵襲的な脳皮質機能マッピングに用いて

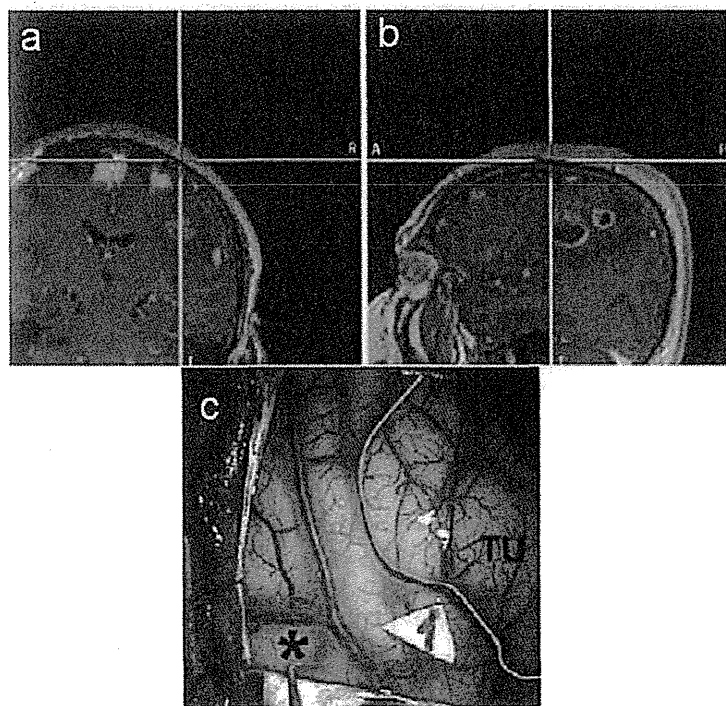


図1 fMRI活動を融合した functional neuronavigation<sup>5)</sup>

(a) finger tapping課題による運動課題関連fMRI活動を示した冠状断 functional neuronavigation画像、(b) 同 矢状断、(c) 術中所見。Functional neuronavigationで示された運動野(\*)と脳皮質電気刺激により同定された運動野(I)。TUは腫瘍である。Functional neuronavigationと皮質電気刺激マッピングとの局在が一致しなかった。

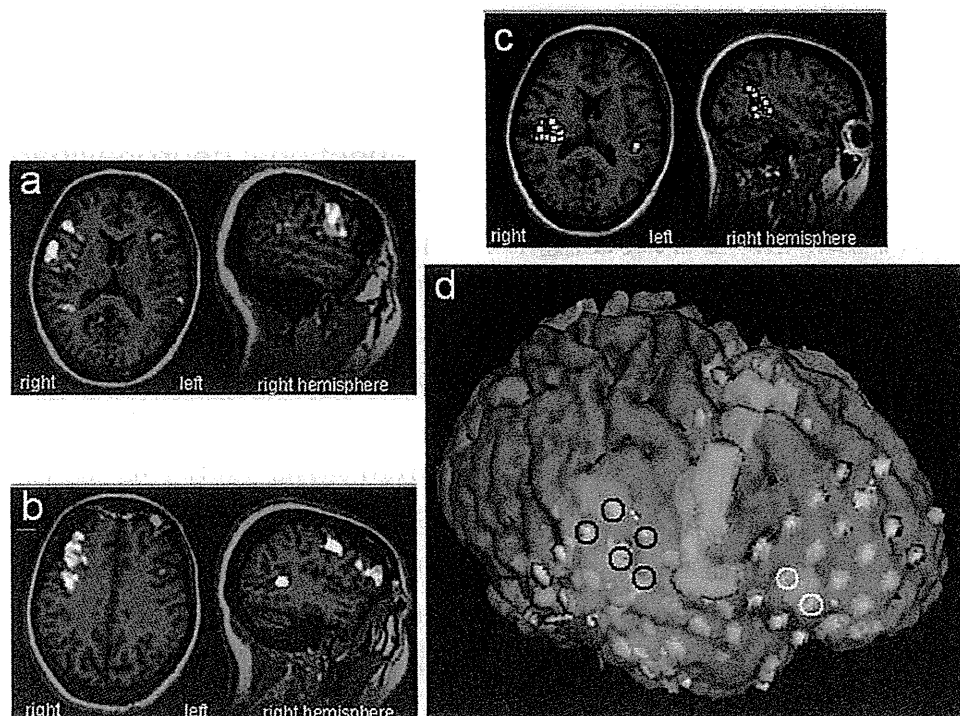


図2 言語関連課題fMRIと脳磁図と慢性硬膜下電極による脳皮質電気刺激マッピング結果  
 (a) 文字読み課題fMRI. 活動が右前頭葉優位に認められるため右が言語優位半球と判断できる。(b) 動詞想起課題fMRI. 右半球に優位に活動を認める。(c) 文字読み課題脳磁図. 右上側頭葉周辺部に信号源が集中している。(d) 言語関連活動functional neuronavigationと留置した慢性硬膜下電極. 動詞想起課題fMRI活動上の電極(白円)による脳表電気刺激でspeech arrestを誘発した。

functional neuronavigationとして応用した報告が認められる。

一次運動野に関しては2009年にBartosらは18例の患者においてfinger tapping課題fMRIで同定した運動野とhand motor areaに関して脳皮質電気刺激法により機能マッピングを行い検証している<sup>5)</sup>。その結果83%では2つの検査結果に1cm以内の誤差範囲であったが、17%では一致していなかった(図1)。この原因は脳血流を反映しているfMRIでは脳血管反応性が低下している病的状態脳のマッピングを正確に行えないことを証明している。過去のfMRI活動の局在の検討においても脳浮腫近傍部ではその運動関連活動領域の信頼性が有意に低下するとの報告もある<sup>6)</sup>。一方、言語機能はRuttenらが頭頂-側頭部の言語野機能の局在を覚醒下手術とfunctional neuro-

navigationを融合して検討している。ここでもfMRIのsensitivityとspecificityはそれぞれ90%と88%程度であり、電気刺激マッピングの結果と100%一致するわけでないことを報告している<sup>7)</sup>。その後新たなfMRI撮像シーケンス、比較検討、解析法の開発によりfMRIの活動局在と脳皮質電気刺激結果の完全な一致には至っていない。

この結果よりfMRIによるfunctional neuronavigationは脳神経外科手術に際しての刺激・切除部位の決定の参考にはなるが、従来法である術中モニタリングを完全にスキップするまでには至っていないのが現状である(図2)。

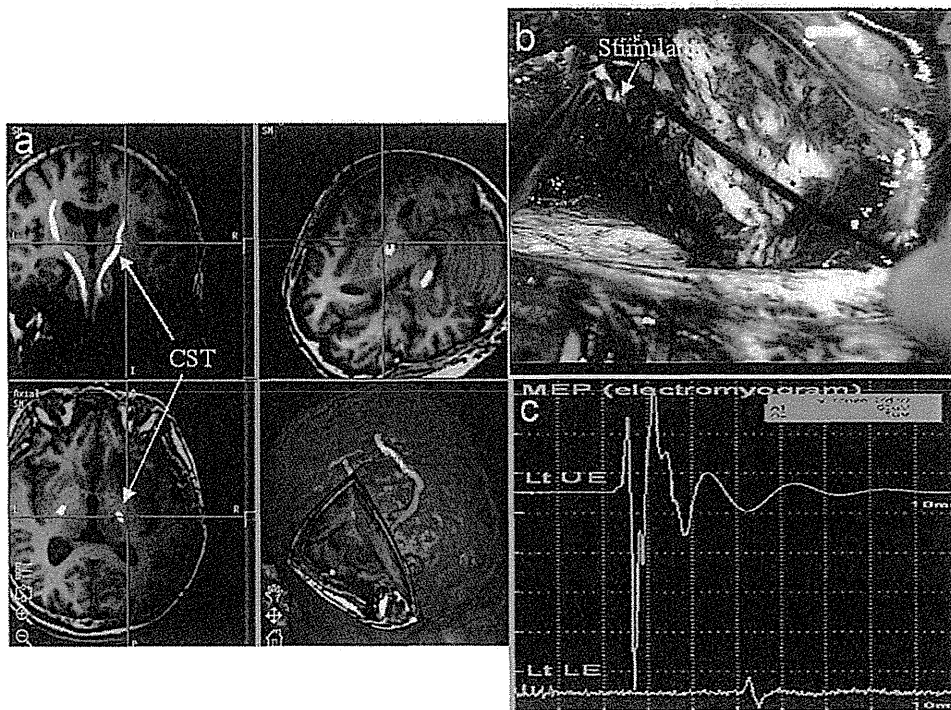
## 2. 白質画像 (tractography)

Anisotropic DWI (ADWI) はx-, y-, z-のそれぞれ3軸に拡散強調傾斜磁場 (motion proving

gradient; mpg) をかけることにより、簡便に軸索の走行の方向を3次的に捉えることができる。“Diffusion”の計測精度は、純粋なプロトンの拡散現象のみならず、毛細血管の灌流などの、拡散の範疇でとらえることのできるすべての微視的並進運動が加味されることから“みかけの拡散係数 apparent diffusion coefficient (ADC)”とその係数が求められる。正確な白質神経路の走行方向を知るためにはピクセル毎に最低6回のmpg方向の異なるADCの計測が必要であり、求めた拡散テンソルが皮質下組織の各ピクセル内主軸方向を表しているとされている。テンソル算出に関する説明は他書に譲るが、算出された結果は三つの根によって決定される三つの固有値 (eigenvalue:  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$ ) とそれに対応する固有ベクトル (eigenvector:  $e1$ ,  $e2$ ,  $e3$ ) で表

される。 $\lambda 1$ は神経線維に沿った方向のADCで、 $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$ は神経線維に直交した方向のADCとなる。通常は $\lambda 1 \gg \lambda 2 > \lambda 3$ であり、それに対応する $e1$ ,  $e2$ ,  $e3$ もボクセル毎の方向、とくに最大値を持つ $e1$ はボクセル内の拡散方向の主軸を反映している。この拡散テンソル画像より、各ボクセルの主軸方向を追跡することにより連続した白質線維の画像化 (tractography) が可能である<sup>8)</sup>。

皮質脊髄路tractography融合functional neuronavigationは、脳深部の術野において近接している皮質脊髄路の損傷に留意した切除を進めることが可能になった<sup>9,10)</sup> (図3)。一次運動野を持続的に電気刺激することでtractographyと皮質刺激による運動誘発筋電図持続モニタリングにより皮質脊髄路機能を温存しながら安全に切除を行うことができる。さらに皮質刺激と同様のモノポー



**図3 皮質脊髄路tractography融合functional neuronavigation**  
 (a) 切除部分を示したfunctional neuronavigation. 切除部は皮質脊髄路に近接している。CSTは皮質脊髄路。(b) 術中所見。刺激装置で切除腔内を電気刺激(白質電気刺激)。(c) 白質電気刺激誘発筋電図。皮質脊髄路への電気刺激で上肢(UE)と下肢(LE)に筋収縮は誘発された。

ラ刺激により切除内腔より白質線維を直接刺激することで、白質刺激運動誘発筋電図が検出されることも確認された。白質刺激部位がtractography

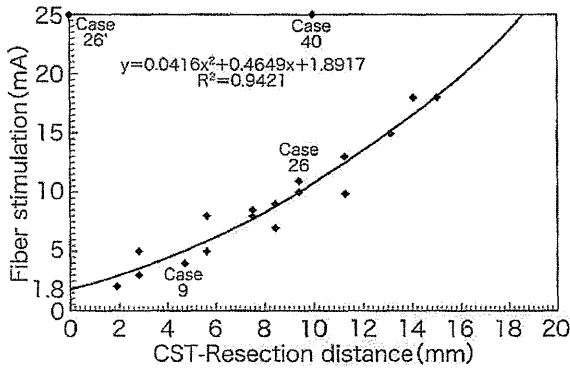


図4 皮質脊髓路と刺激部位との距離と白質電気刺激強度との関係  
両者に強い相関関係のあることがfunctional neuronavigationを用いたことで明らかになった。

上の皮質脊髓路に5mm以内に近接している時は比較的低い電流値(5mA程度)で運動誘発筋電図が誘発された(図4)<sup>11)</sup>。この方法により現在では、1) tractographyで表示された皮質脊髓路の検証、2) 直接白質刺激による白質機能マッピングの可能性、3) 脳深部手術時の皮質脊髓路の温存に留意した最大限の病巣切除が可能となった。

視放線に関しては、全身麻酔下にゴーグル型発光ダイオードによる1Hz程度の閃光視覚刺激により後頭極皮質に直接留置した電極より視覚誘発電位(VEP)を導出する。皮質VEPは10回程度の加算で100msecの潜時の陰性波(N100)を導出することが可能である。本手法は皮質MEP同

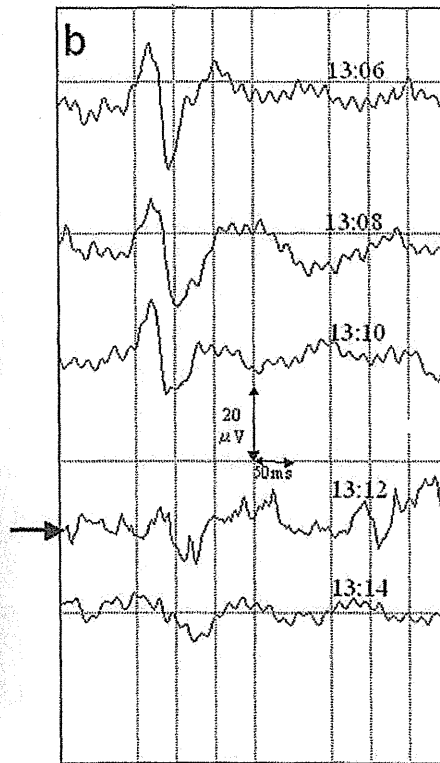
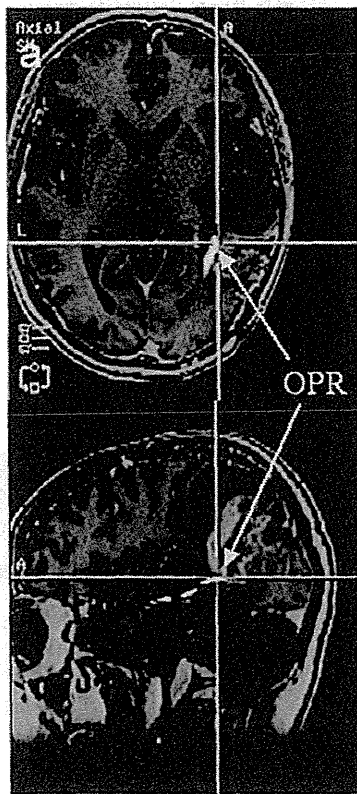


図5 視放線tractographyを融合したfunctional neuronavigation  
(a) 切除部分を示したfunctional neuronavigation. OPRは視放線。(b) 皮質より導出した視覚誘発電位。光刺激後100msecに陰性波(N100)を認める。13時12分functional neuronavigation上OPRに切除が達した際にN100は消失した。