

博 士 論 文

題 目

脳の記憶・学習メカニズム解明のための  
膜電位光学計測システムに関する研究

指導教授

安西 祐一郎 教授

平成 16 年度

慶應義塾大学大学院

理工学研究科 開放環境科学専攻

宮崎 崇史 (            )

# 目次

|       |                        |    |
|-------|------------------------|----|
| 第 1 章 | 序論                     | 1  |
| 第 2 章 | 研究背景                   | 5  |
| 2.1   | 神経活動の光計測法 . . . . .    | 5  |
| 2.2   | 大脳皮質聴覚野 . . . . .      | 11 |
| 第 3 章 | 実験システム                 | 16 |
| 3.1   | 実験システムの構成 . . . . .    | 16 |
| 3.2   | 刺激・計測コントローラ . . . . .  | 21 |
| 3.3   | 解析ソフトウェア . . . . .     | 26 |
| 第 4 章 | 海馬刺激による大脳皮質聴覚野応答変化の光計測 | 32 |
| 4.1   | 実験目的 . . . . .         | 32 |
| 4.2   | 関連研究 . . . . .         | 33 |
| 4.3   | 実験方法 . . . . .         | 35 |
| 4.4   | 実験結果 . . . . .         | 37 |
| 4.5   | 考察 . . . . .           | 42 |
| 第 5 章 | 大脳皮質聴覚野可塑性の光計測         | 45 |
| 5.1   | 実験目的 . . . . .         | 45 |
| 5.2   | 関連研究 . . . . .         | 46 |
| 5.3   | 実験方法 . . . . .         | 56 |
| 5.4   | 実験結果 . . . . .         | 60 |
| 5.5   | 考察 . . . . .           | 68 |
| 第 6 章 | 結論                     | 71 |

|      |    |
|------|----|
| 目次   | ii |
| 謝辭   | 74 |
| 參考文獻 | 76 |
| 業績目錄 | 84 |

# 目次

|     |                                         |    |
|-----|-----------------------------------------|----|
| 1.1 | 脳科学と計算機科学の相互発展 . . . . .                | 2  |
| 2.1 | 代表的な膜電位感受性色素の分子構造 . . . . .             | 6  |
| 2.2 | 膜電位変化に対する光学的変化の直線性 . . . . .            | 7  |
| 2.3 | <i>in vivo</i> ラット体性感覚野の膜電位計測 . . . . . | 9  |
| 2.4 | 聴覚経路 . . . . .                          | 12 |
| 2.5 | モルモットの大脳皮質聴覚野 . . . . .                 | 13 |
| 2.6 | モルモット大脳皮質聴覚野に拮抗薬を投与したときの応答変化 . . . . .  | 15 |
| 3.1 | 膜電位光学計測用実験システム . . . . .                | 17 |
| 3.2 | 実験システムのタイミング・チャート . . . . .             | 19 |
| 3.3 | 光学系 . . . . .                           | 20 |
| 3.4 | 計測と計測試行 . . . . .                       | 22 |
| 3.5 | 計測セッションの定義 . . . . .                    | 22 |
| 3.6 | 制御ソフトウェアの実行例 . . . . .                  | 25 |
| 3.7 | 効率的なデータ解析のためのソフトウェア開発手順 . . . . .       | 26 |
| 3.8 | 解析ソフトウェアのクラス階層 . . . . .                | 29 |
| 3.9 | 解析ソフトウェアの実行例 . . . . .                  | 31 |
| 4.1 | 海馬と大脳皮質間の解剖学的な経路 . . . . .              | 34 |
| 4.2 | 海馬 CA1 を刺激したときの大脳皮質前頭前野の応答 . . . . .    | 35 |
| 4.3 | 海馬と前頭前野の活動相関 . . . . .                  | 36 |
| 4.4 | 海馬刺激を行なった時の聴覚野応答の光計測画像 . . . . .        | 39 |
| 4.5 | 聴覚野応答の時間推移波形 . . . . .                  | 40 |
| 4.6 | 海馬刺激の聴覚野応答への効果 . . . . .                | 41 |

|      |                                  |    |
|------|----------------------------------|----|
| 5.1  | 大脳皮質聴覚野の受容野可塑性 . . . . .         | 47 |
| 5.2  | 大脳皮質聴覚野受容野可塑性の神経基盤のモデル . . . . . | 48 |
| 5.3  | 大脳皮質聴覚野の周波数地図の再構成 . . . . .      | 49 |
| 5.4  | 扁桃体を中心とした恐怖反応条件付けの神経基盤 . . . . . | 53 |
| 5.5  | 予備実験における心拍解析区間 . . . . .         | 57 |
| 5.6  | 条件付けパラダイム . . . . .              | 58 |
| 5.7  | 心拍変動による条件付けの確認 . . . . .         | 61 |
| 5.8  | 周波数マップと応答波形 . . . . .            | 62 |
| 5.9  | 条件付け群の聴覚野応答 . . . . .            | 63 |
| 5.10 | 条件付け群の応答波形 . . . . .             | 63 |
| 5.11 | 条件付けによる CS 音応答領域の拡大 . . . . .    | 64 |
| 5.12 | 疑似条件付け群の聴覚野応答画像 . . . . .        | 65 |
| 5.13 | 疑似条件付け群の応答波形 . . . . .           | 65 |
| 5.14 | 条件付け前後の応答面積比較 . . . . .          | 66 |
| 5.15 | 応答面積変化率の比較 . . . . .             | 67 |

# 表目次

|     |                                                |    |
|-----|------------------------------------------------|----|
| 3.1 | 撮像システムの比較 . . . . .                            | 19 |
| 3.2 | DA 変換ボード (PCI-3337, Interface) の主な仕様 . . . . . | 23 |
| 3.3 | 使用した PC の仕様 . . . . .                          | 24 |

# 第 1 章

## 序論

脳が人工的に設計された計算機と大きく異なる点は，フォン・ノイマン型の計算機があらかじめプログラムされた処理しか行なえないのに対し，脳は学習によってアルゴリズムを獲得できることである．このアルゴリズムの獲得能力は，脳に特有な記憶・学習の仕組みに依っていると考えられる．脳の記憶・学習メカニズムの解明は脳科学における中心的な課題のひとつであり精力的に研究されているが，同時に新たな情報処理手法の開発の契機となる可能性を持っており，計算機科学においても意義のある研究対象である．そこで，本研究では図 1.1 のような，脳科学と計算機科学が相互発展していくような学際的な研究モデルが重要であると考え．すなわち，計算機科学から脳科学への寄与としては，計測制御システムやデータ解析技術を通じた生理実験の支援を行なう．また，脳科学から計算機科学への寄与としては，前述のように記憶・学習メカニズムの解明を通じた新しい情報処理形態の示唆を目標とする．

脳科学では生理実験や心理実験を中心的な実験的方法論としているが，これらにおいては特に計測技術が重要な要素となっている．近年，脳神経活動の計測技術に関しては多くの進展があり，ヒトにも適用可能な非侵襲イメージング手法である機能的磁気共鳴画像 (fMRI) や，陽電子放射断層撮影 (PET) などが実用化され，脳の高次機能の解明を目指した研究において成果をあげてきた．しかしこれらの手法では，時間分解能や空間分解能があまり高くないことや，計測している信号が脳の各部位の代謝変化に関連したものであり，神経細胞の活動との直接の対応関係を議論することが難しいという問題がある．一方で，神経生理学の分野では微小電極法が幅広く用いられてきた．微小電極法では神経細胞の電氣的な活動を高い時間分解能で計測することが可能である．近年では多数の神経細胞の挙動を解析する必要性が認識されてきており，多点電極を用いた計測技術が進展している．しかし，物理的侵襲を伴う微小電極では総電極数や電極密度などの点で限界が存在

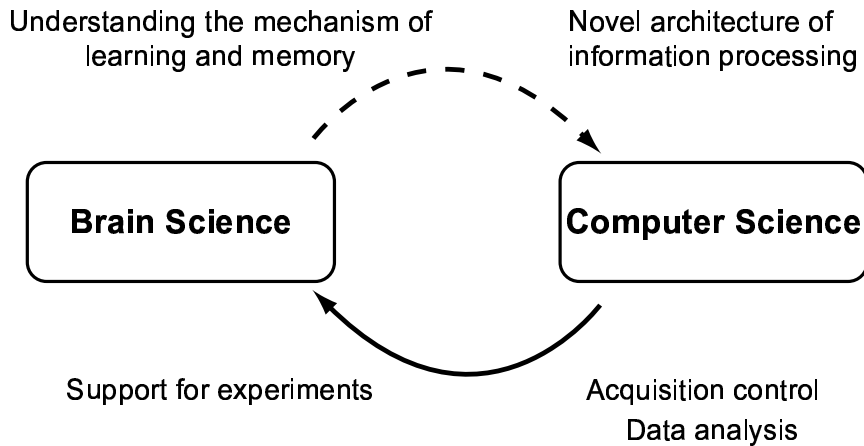


図 1.1 脳科学と計算機科学の相互発展

する．神経活動の光学計測法はこのような非侵襲のイメージング手法と微小電極法の間  
に位置づけられる計測手法である．特に，神経活動の光学計測手法のなかでも膜電位感受  
性色素を用いた光学計測法では，神経細胞の最も基本的な活動である膜電位変化を高い時  
空間分解能で記録することが可能である．

膜電位光学計測法では，脳スライス標本や培養標本などのいわゆる *in vitro* の対象から  
も，また麻酔下あるいは無麻酔下の動物における *in vivo* の脳組織からも計測を行なうこ  
とができる．しかし，*in vivo* の実験では呼吸や心拍の影響を避けるために実験系には工  
夫が必要であり，刺激計測の制御も制約を受ける．*in vivo* で学習や記憶に関連した実験  
を行なう場合には複雑な実験手順を必要とすることもあり，上述の制約を満たしつつ柔軟  
な制御が求められる．また，膜電位光学計測法のデータ解析では必ずしも定型化された解  
析が行なわれているわけではない．学習や記憶に関連した実験では，実験プロトコルに依  
存した解析手順が必要となることも多い．そこで本研究では，この膜電位感受性色素によ  
る光学計測法を用いた脳の記憶・学習メカニズムの解明のための実験に有効な，刺激制御  
システムとデータ解析ソフトウェアを設計・実装した．そして，これらが実際の生理実験  
において有効であることを確認するため，脳の記憶・学習メカニズムに関連した二種類の  
生理実験を行なった．

ひとつは，宣言的記憶と呼ばれる記憶において重要であると考えられる海馬—大脳皮質  
系に関する実験である．海馬と大脳皮質の宣言的記憶における重要性は臨床医学的，解剖  
学的，生理学的，理論的な多くの知見によって支持されている．しかし，海馬と大脳皮質  
の間の投射経路に関する生理学的な特徴や，海馬と大脳皮質の神経活動の関係などはこれ

まであまり研究されてこなかった．この理由のひとつとして，海馬から大脳皮質への主要な投射経路が嗅内野を介した分散性の投射であり，海馬の神経活動の影響が大脳皮質に空間的に広がって検出が難しいことが挙げられる．そこで，本研究では大脳皮質の神経活動を膜電位光学計測によって記録し，海馬活動による修飾作用を空間的に検討した．実験では麻酔したモルモットを用い，大脳皮質聴覚野の音に対する応答を膜電位光学計測により記録した．そして，音の提示と同時に海馬 CA1 に電気刺激を行ない，異なる刺激強度での海馬刺激が聴覚野の応答に与える影響を解析した．さらに，海馬 CA1 への電気刺激の強度を変化させて海馬の活動規模と大脳皮質聴覚野への修飾作用の関係を調べた．膜電位光学計測法を用いることにより，海馬刺激の聴覚野への影響を時空間的に高い分解能で検討することが可能となった．

もうひとつは，古典的条件付けによる大脳皮質の可塑性に関する実験である．音と電気刺激を用いた恐怖反応条件付けと呼ばれる古典的条件付けを行うと，大脳皮質聴覚野にある細胞の受容野に大きな可塑的变化が生じ，条件付けに用いた周波数の音に対する同調が高まることが知られている．さらに，このような変化は 5 回程度の条件付け試行により，数十分程度でも生じることが報告されている．また，数週間から数ヶ月に渡って音の弁別を訓練すると，訓練周波数に対応する大脳皮質聴覚野の応答領域が拡大することが示されている．そして，このような応答領域の拡大時には各細胞で訓練周波数への同調が強まっている．しかし，大脳皮質聴覚野の応答面積の増加が，各細胞の受容野変化が生じるような短時間で生じるかどうかは知られていない．この理由として，微小電極を用いて大脳皮質聴覚野の周波数地図を決定することが難しいことが挙げられる．そこで，本研究では音と電気刺激による恐怖反応条件付けを行ない，その前後で大脳皮質聴覚野の周波数地図を膜電位光学計測法によって計測した．条件付けは麻酔下で行ない条件付け試行 70 回で約 2 時間であり，短時間での周波数地図の変化を検討することが可能になる．また，音と電気刺激を対提示しない疑似条件付け群との比較も行なった．

これらの実験から，膜電位光学計測法が持つ時間および空間分解能の高さや，神経活動の基本量である膜電位を観測できるという特性が，脳の記憶・学習メカニズム解明のための生理実験において有効であることが示された．また，今回設計および実装した刺激制御システムやデータ解析ソフトウェアをこれらの実験において使用し，その有用性を確認した．

本論文の残りの章の構成は以下の通りである．2 章では本研究で行なった二種類の実験に共通する研究背景として，光計測法および大脳皮質聴覚野について述べる．3 章では本実験で用いた実験システムの構成と，本研究で作成した刺激・計測コントローラおよび解析ソフトウェアについて説明する．4 章では海馬—大脳皮質系の記憶メカニズムに関する

実験について述べる．5 章では古典的条件付けによる大脳皮質可塑性を光学計測法を用いて検討した実験について記述する．最後に，6 章で本研究の結論を述べる．

## 第 2 章

# 研究背景

この章では，まず本研究でとりあげる神経活動の計測手法である光計測法について，原理と生理実験の例を紹介する．さらに，4 章と 5 章の生理実験で共通の計測対象となる大脳皮質聴覚野に関する過去の知見を紹介する．

### 2.1 神経活動の光計測法

#### 2.1.1 光計測法の概要

神経活動によって変化する光学的信号を通じて計測する手法を総称して神経活動の光計測法と呼ぶ．光計測法により記録される信号は，神経活動に伴う光散乱などの変化を無染色の標本からとりだす内因性信号と，外部からの色素投与などによって神経活動を光学的変化に変換する外因性信号とに大別される．内因性信号は Cohen ら [1] によって，また外因性信号は Tasaki ら [2] によって，いずれも 1968 年に発見された．

外因性信号計測で用いられる色素は膜電位感受性色素と呼ばれる有機化合物で，1970 年代に Cohen らのグループによって大量にスクリーニングされた [3]．膜電位感受性色素は細胞膜に結合し，細胞の膜電位変化に応じて吸光や蛍光，複屈折性などを変化させる．膜電位感受性色素は応答速度によって fast dye と slow dye に分類され，fast dye は  $\mu\text{s}$  で応答が変化するのに対し slow dye は数秒程度の遅い応答時定数を持つ [4]．活動電位を含めた多くの神経活動の計測には ms の時間分解能が必要なため，fast dye が用いられるが，fast dye が生じる光学的変化は slow dye よりもかなり小さい．

膜電位感受性色素における膜電位から光学変化への変換機構は完全には理解されていないが，fast dye と slow dye の応答速度や応答変化量の違いは次のように理解されている．

一般に fast dye は細胞膜に対し非透過であり，膜電位によって色素内部の電荷分布が変化し，これが蛍光スペクトラムなどの光学的特性の変化をもたらす．一方，slow dye は細胞膜透過性であり静止状態で細胞内外に平衡分布しているが，膜電位が変化すると細胞内外に再配置し，これによって分子の集合状態が大きく変化するために光学的特性も変化する．slow dye では色素分子が空間的に移動するために，応答速度が遅く光学的変化が大きいと考えられている．

生理学的に重要な細胞の静止電位の  $\pm 100$  mV の範囲で，膜電位と光学信号の間に近似的な直線関係が成り立つことが，多くの膜電位感受性色素で確かめられている [5]．図 2.2 には Dye XVII の膜電位変化と吸光変化の関係を示した．この直線関係が膜電位光学計測の定量性の基礎を与えている．なお膜電流と光学変化の間には対応はなく，膜のコンダクタンス変化とは関係がないことが分かっている [3]．

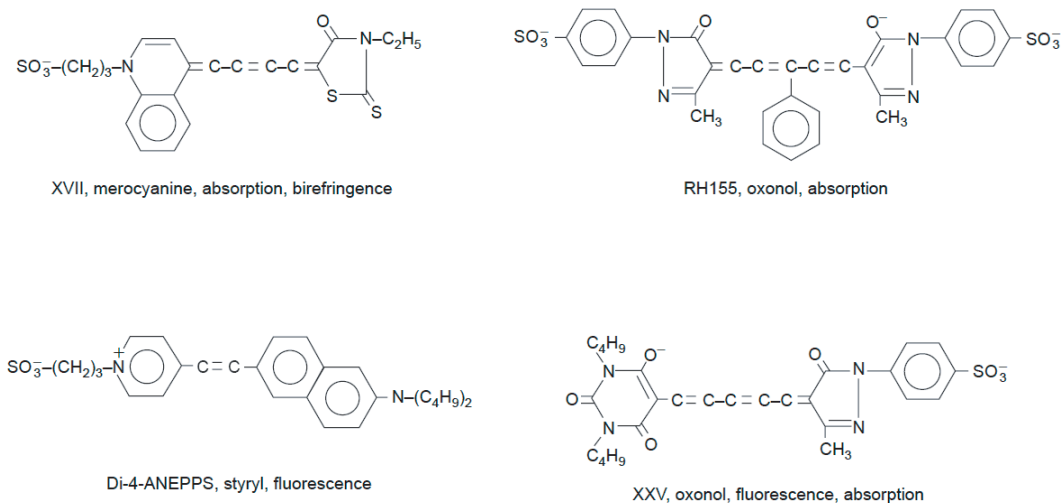


図 2.1 代表的な膜電位感受性色素の分子構造 [6]．

膜電位感受性色素は基となった有機化合物の構造からメロシアニン (merocyanine) 系，メロシアニン・オキサゾロン系 (merocyanine-oxazolone)，メロシアニン・ローダニン (merocyanine-rhodanine) 系，オキソノール (oxonol) 系，スタイリル (styryl) 系などに分類される．merocyanine 系では吸光や複屈折，oxonol 系では吸光および蛍光，styryl 系では蛍光の変化が用いられる．図 2.1 に代表的な膜電位感受性色素の分子構造を示す．膜電位感受性色素の化学構造において色素の特性に大きく反映する要素の一つとしてメチル基の長さがあり，メチル基が長くなるほど長波長域に吸収波長帯を持つようになる．また，メチル基が長いほど細胞膜に結合しやすくなり，吸光，蛍光の変化量が大きくなるが，

逆に親水性が減少するため水溶液中でミセルを形成しやすくなる他，安定性が低下して褪色が速くなる傾向があり，合成も難しくなる [7] .

#### 膜電位色素の副次的作用

光計測法は，物理的に組織を破壊して刺入しなければならない微小電極法と比べると侵襲性が低い計測手法と言えるが，光計測法に特有な副次的作用も存在する．特に膜電位感受性色素を用いた場合，色素が蛍光能を徐々に失なう褪色が生じる．褪色の速さは色素によって大きく異なり，照射光の強度や照射時間にも大きく依存する．また，膜電位感受性色素は細胞に対する内在性の毒性を持つ場合がある．これは膜電位感受性色素が細胞膜に結合することによって，細胞機能に必要な反応が阻害されるためではないかと考えられている．これ以外に，光照射によって組織内部の溶存酸素が励起されて活性酸素を生じ，色素や細胞に影響を与える光損傷 (photodynamic damage) と呼ばれる現象がある．このような影響は色素の種類や測定対象，実験条件に大きく依存する．このため個々の実験においてこれらの影響を調査し対策を行う必要がある．一般的には，照射光強度をなるべく弱くかつ照射時間を短くすることが有効な場合が多い．

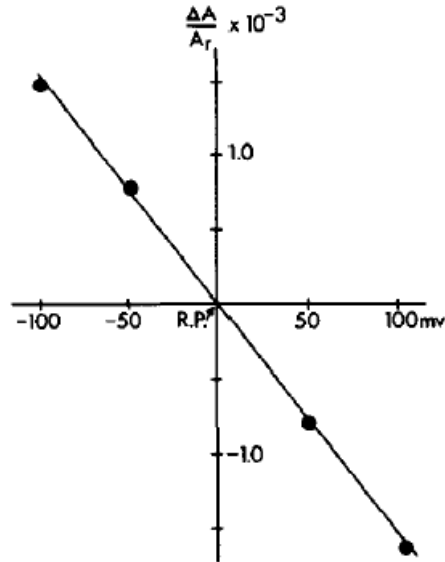


図 2.2 膜電位変化に対する光学的変化の直線性 [4].

Dye XVII で染色したイカの軸索の膜電位変化と吸光変化の関係

### 信号対雑音比

一般に膜電位感受性色素の光学変化は非常に小さいため、信号対雑音比の問題は重要である。現実の光学計測で問題となる雑音には、ショット雑音、受光素子の暗電流雑音、光源の光量変動による雑音、周辺光による雑音、測定対象の微小な動きによる雑音などが挙げられる。このなかで、ショット雑音は光電子発生の確率的な性質に由来しており、原理的に取り除くことはできない。

受光素子で受ける透過光あるいは蛍光のシグナルとショット雑音の比、 $(S/N)_T$ 、 $(S/N)_F$  は以下のように表わされる [8]。

$$(S/N)_T = (\Delta I/I)(2\gamma q)^{1/2} I^{1/2}$$

$$(S/N)_F = (\Delta F/F)(2\gamma q)^{1/2} (gF)^{1/2}$$

ここで、 $\gamma = (1/4)\Delta f$  で、 $\Delta f$  は帯域幅、 $I$  および  $F$  はそれぞれ受光素子が受ける透過光もしくは蛍光の強度、 $q$  は受光素子の量子収率、 $g$  は受光領域に関係する装置定数を表す。

$\Delta I/I$  や  $\Delta F/F$  は一つの色素および実験系では一定と考えられる。したがって  $S/N = kI^{1/2}$  と表され、実際の実験において得られたシグナルとノイズの比を背景光強度の平方根に対してプロットすることにより、雑音がショット雑音近くまで抑えられているかどうかを確認することができる。

#### 2.1.2 *in vivo* での光学計測

*in vivo*(生体) 動物からの膜電位光学計測は Cohen らのグループによって、サンショウウオの嗅球 [9] およびラットの体性感覚野と視覚野 [10] から記録された例が最初である(図 2.3)。以降、サル、ネコ、モルモットなど多くの動物種で、大脳皮質を中心に様々な部位からの *in vivo* 膜電位光学計測が行なわれるようになった。

*in vivo* 動物からの光学計測では、スライス標本や培養組織からの記録とは異なる点が存在する。まず、神経組織は光学的に強散乱物体であるため、スライス標本など極めて薄い組織でなければ光が透過せず、透過光測定を実施することはできない。このため膜電位計測では吸光の色素は用いられず、ほとんどの場合蛍光型の膜電位感受性色素が用いられる。また、神経組織の深部まで色素を浸透させることが難しいため、脂溶性の高い色素は適さない。

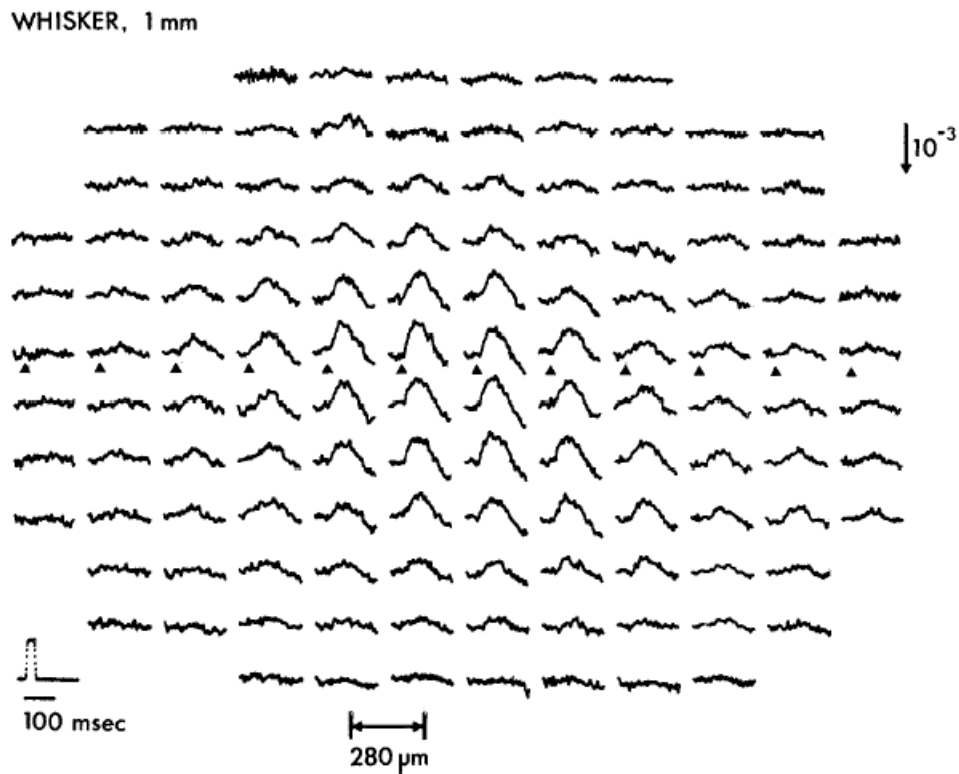


図 2.3 *in vivo* ラット体性感覚野の膜電位計測 [10] .

ラットのヒゲを動かした時の RH414 染色された体性感覚野に生じる活動を 124 チャネルのフォトダイオードアレイで観測した結果を時系列波形の分布として示している .

実験にあたっては、光学測定系が一般に振動に弱いため、動物は麻酔を施した上で測定部位を確実に固定する。内因性光学計測では、赤外光を用いることで非常に薄く削った頭蓋を通して計測を行なう *thinned skull* という手法も存在するが [11]、膜電位感受性色素を用いる場合は染色のため頭蓋を部分的に除去し、硬膜も剥離する必要がある。この状態では、硬膜が剥離された領域で脳圧が開放されているため、呼吸に伴って脳の上下動が生じる。この呼吸によるノイズはパルセーション・ノイズと呼ばれる。このパルセーション・ノイズを抑圧するために、人工呼吸を導入し測定中のみ呼吸を停止する方法 [10, 12] や、測定領域の周囲にチャンバーを設け、チャンバーをシリコンオイルやアガロースで満たし上部を透明な素材で密閉する方法 [13–15] などが行なわれている。

もう一つの大きなノイズ源は心拍由来のノイズである。親水性かつ低毒性であるため *in vivo* の光学計測でよく用いられる styryl 系の蛍光型膜電位感受性色素 RH795 は、そ

の励起波長が血液中のヘモグロビンの吸収波長と重なっている [16]。このため、心拍による血流量の変化に合わせて血液中のヘモグロビン量に変化し、それが光学信号に重畳しノイズとなる。このノイズを低減するために用いられる方法の一つは、通常神経活動の計測が刺激に対する応答を記録することを利用する。この方法では、心拍から一定のタイミングで同期して神経活動の記録を行なうようにし、刺激時の記録から無刺激時の記録を測定後に減算して、心拍由来の成分を除去する。この方法は刺激に対する応答がほぼ一定で再現性があることを仮定しているが、光学計測では  $S/N$  が小さいことから、加算平均を行なえるように再現性のある事象を記録する例が多いため、強い制約ではない。また、心室にカニューレを挿入して血液を人工の Ringer 液で灌流する方法も試みられており、カエルの視蓋からの記録が約 3 時間可能であったことが報告されている [7]。

近年では RH795 と異なり、ヘモグロビンの吸収波長よりも長波長域に励起波長を持つ oxonol 系の蛍光型膜電位感受性色素 RH1691, RH1692, RH1838 が開発されている [16]。これらの膜電位感受性色素では、心拍由来のノイズが非常に低いことに加え  $S/N$  も高く毒性も低いと報告されている。しかし、膜電位感受性色素は対象となる神経組織によって必ずしも十分染色できるとは限らず、しかも種や部位ごとの依存性が大きい [5]。実際、これまでに報告されているのはネコの視覚野 [16] とラットの体性感覚野 [17–19]、サルの視覚野 ( $V1$ ,  $V2$ ) [15] などに限られており、RH795 ほど多くの対象に適用できないことが課題である。

ここまで述べたように *in vivo* での光学計測には制約も多いが、生きた動物の脳が実際に情報処理をしている過程を高い時間および空間分解能で計測可能な神経活動計測手法として、今後も重要性が増していくと考えられる。

## 2.2 大脳皮質聴覚野

### 2.2.1 聴覚経路

ここでは、大脳皮質聴覚野の聴覚系における位置付けの理解に必要な、大脳皮質聴覚野に至るまでの聴覚経路について説明する。図 2.4 に霊長類の聴覚経路の概略を示した。哺乳類の多くはこれに近い聴覚経路を持っていると考えられている。

外界の音は耳介で集められ外耳道を通り鼓膜を振動させる。鼓膜振動は中耳にある槌骨、砧骨、鐙骨を伝わり、蝸牛に伝えられる。この三つの骨は外耳道に対して高いインピーダンスを持つ蝸牛内液のインピーダンスと整合させる役割りを果たす。蝸牛には音の周波数分解を行なう精緻な機構が存在し、狭い範囲の周波数に同調した有毛細胞が、その周波数の音の強さに応じて脱分極する。この脱分極は蝸牛内のらせん神経節から聴神経を伝わり、蝸牛神経核 (cochlear nucleus) に入り、上オリーブ核 (superior olive)、外側毛帯核 (nucleus of lateral lemniscus)、下丘 (inferior colliculus)、内側膝状体 (medial geniculate complex) を経由して大脳皮質聴覚野へ到達する。

### 2.2.2 大脳皮質聴覚野と周波数局在性

大脳新皮質のなかで聴覚刺激に強く応答する領域は大脳皮質聴覚野と呼ばれているが、厳密に定義されているわけではなく生理学的、細胞構築学的、組織化学的など多角的な見地から判断されている [21]。このなかで、内側膝状体から直接投射を受けている領域が一次聴覚野 (AI) と呼ばれる [22]。有袋類の大脳皮質聴覚野は一次聴覚野のみしか確認されていないが、他の哺乳類では一次聴覚野以外に 3~8 個程度の聴覚領域が存在する場合が多い。一次聴覚野では、皮質下の聴覚関連部位と同様に、細胞は最も強くする周波数の高低順に規則的に配置した周波数局在性と呼ばれる構造が存在している。一次聴覚野の周波数局在性はヒト [23]、ネコ [24, 25]、ラット [26] など非常に多くの哺乳類で局所電位や単一細胞記録により明瞭に観察されている。大脳皮質聴覚野の周波数局在では各周波数に対応する領域は細長く帯状に伸びており、等周波数帯と呼ばれる。

大脳皮質聴覚野の細胞の応答パターンは聴覚経路の皮質下の部位の細胞に比べて多様であることが知られている。バルビツール麻酔したネコの AI の細胞には、鋭い同調曲線を示すものから複峰性のものまでが存在していることが報告されている。また、AI の細胞の多くは両耳性の応答を示し、両耳間の位相差や強度差に感受性を持つ。これ以外に、AI では周波数変調音に選択的な応答を示す細胞が存在することも知られている。

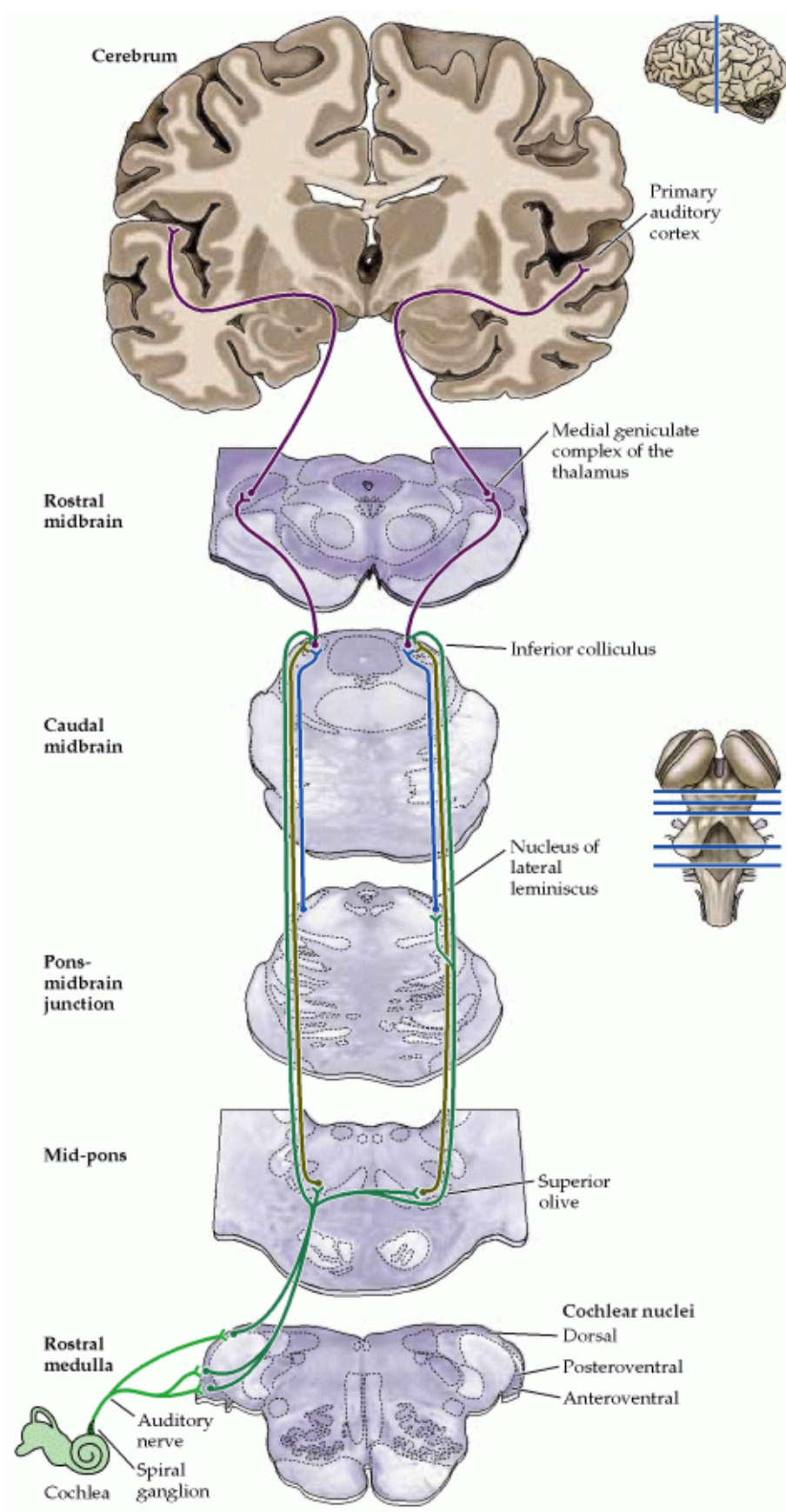


图 2.4 聴覚経路 [20]

次に本研究で使用しているモルモットの大脳皮質聴覚野に関する代表的な知見を述べる．モルモットの大脳皮質聴覚野によって電気生理学的手法 [27, 28] や組織化学的手法 [29]，光計測法 [30] による領野分類が行なわれている．研究報告によって領野の区分や呼称が異なるが，ここでは文献 [29] を基に，他の研究報告の結果も補足しながら説明する．文献 [29] ではモルモットの聴覚野を図 2.5 のように分類しており，AI, DC と呼ばれる主要な領野の周囲を VRB, DRB, VCB, DCB などのベルト領野が囲んでいる．モルモットの聴覚野では AI, DC, S の領野に周波数局在性が存在する．

図 2.5 のように AI は吻側から背側に向かって応答周波数が高くなるが，DC では逆に低くなるように並んでおり，鏡像対称の周波数局在性を有している．また図 2.5 には示されていないが，S は AI と同じ並びの周波数局在を持つ [28]．応答潜時でみると周波数局在性を持つ AI, DC, S は短く，ベルト領野のなかでも DRB は AI などに近いが，他のベルト領野は長い潜時を持つ．ベルト領野のなかで，DCB と VCB はホワイトノイズに強く応答する傾向がある．

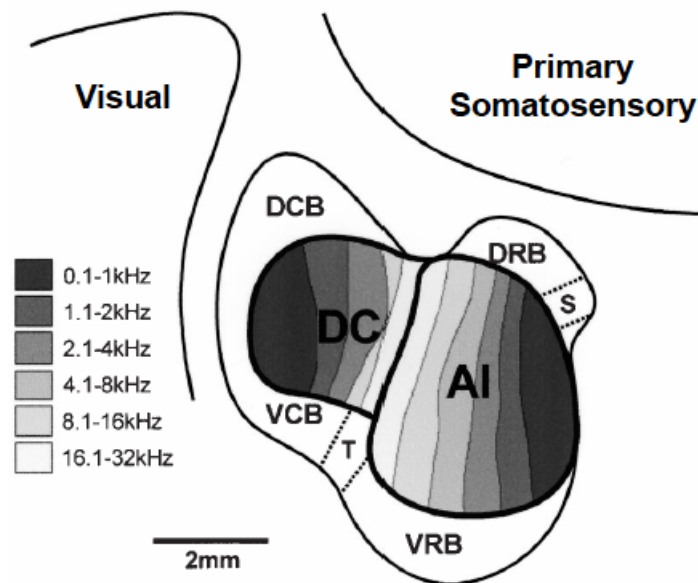


図 2.5 モルモットの大脳皮質聴覚野 [29]．右の大脳皮質を示しており上が背側右が吻側方向．

### 2.2.3 光計測法を用いたこれまでの大脳皮質聴覚野に関する研究

膜電位光学計測で大脳皮質聴覚野から記録される応答は、II, III 層の細胞樹状突起電位を主に反映していると考えられる [31]。Horikawa らは様々な受容体の拮抗薬を大脳皮質聴覚野に投与して、聴覚応答の変化を検討している [32]。一般に大脳皮質では興奮性の神経伝達物質としてグルタミン酸が、また抑制性の伝達物質として GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid) が用いられている。この実験では NMDA(N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体の拮抗薬 APV(2-amino-5-phosphonopentanoic acid) と非 NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬 CNQX(6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬 BMI(bicuculline methiodide) を用いている。

図 2.6 のように、CNQX を投与すると興奮性の速い成分が消失し、遅い興奮性成分が見られる。さらに CNQX と BMI を混合して投与すると、抑制性成分が消失し遅い興奮性成分の振幅が増大する。最後に CNQX, BMI に加え APV も含めて投与すると、応答は完全に消失する。この結果は、大脳皮質聴覚野の純音誘起応答が速い非 NMDA 型と遅い NMDA 型の興奮性成分からなり、GABA<sub>A</sub> による抑制は NMDA 型の興奮性成分に対して作用することを意味している。

また、拮抗薬投与の効果を空間的に検討すると、拮抗薬を投与しない状態では AI と DC の各領野に等周波数帯に沿った帯状の興奮領域が観察されたが、BMI 投与により興奮性領域が AI, DC の両野を含む聴覚野の広範囲に及び、帯状の興奮領域は覆い隠された。しかし、BMI と APV を混合して投与すると広範囲に及ぶ興奮性応答は消失し、等周波数帯に沿った帯状の興奮領域が再び観察されるようになる。これは、等周波数帯に沿った活動が非 NMDA 型受容体を介した活動であること、等周波数帯を越えた活動は NMDA 型であり、通常は GABA 型受容体の活動によって抑制されていることを示している。この GABA 型受容体を介した等周波数帯間の抑制によって、周波数弁別の精度を上げる側抑制のメカニズムが働いていると考えられる。また、NMDA 型受容体はシナプス可塑性に重要な役割を果たしていると考えられており、この等周波数帯を越える NMDA 型の興奮性活動が大脳皮質聴覚野の周波数地図の可塑的变化の基礎である可能性がある。

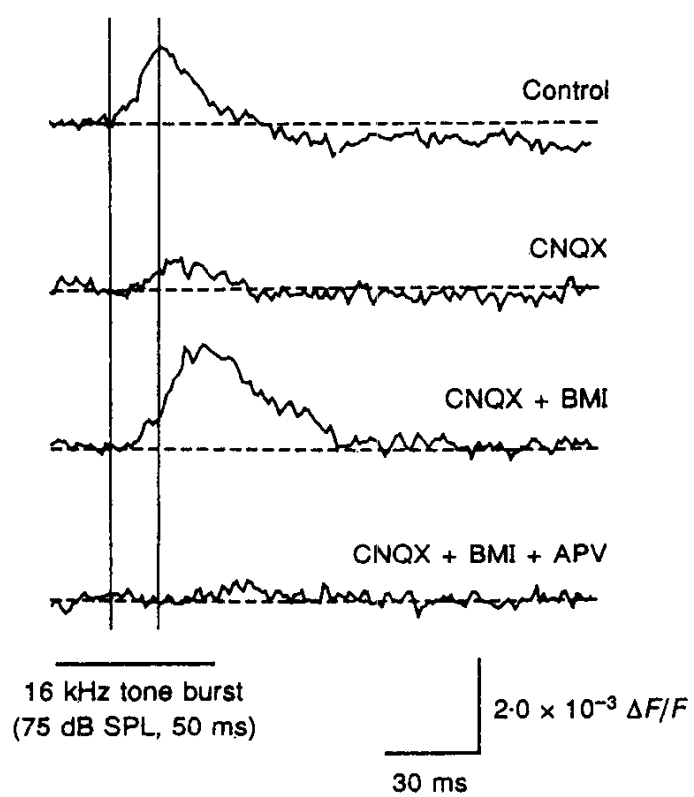


図 2.6 モルモット大脳皮質聴覚野に拮抗薬を投与したときの応答変化 [32] .

## 第 3 章

# 実験システム

本章では，まず実験システムの構成を計測制御系と光学系に分けて説明する．次に，本研究で作成した刺激・計測コントローラの設計および実装について説明する．最後に，やはり本研究で作成した解析ソフトウェアの設計および実装の詳細を述べる．

### 3.1 実験システムの構成

#### 3.1.1 計測制御系

図 3.1 に，4 章と 5 章で共通に用いる膜電位光学実験システムの，計測制御系を中心とした構成を示す．刺激・計測コントローラは本研究で作成した制御システムで，3.2 節で詳しく説明する．刺激・計測コントローラは，計測開始のトリガ信号を受けて刺激および計測用の機器を適切なタイミングで動作させる機能を持つ．今回の実験システムでは，タイミング制御回路から計測試行の開始トリガを受け，露光制御用シャッタ，光学計測用カメラのコントローラ，音出力のためのスピーカを駆動するアンプ，心電記録用 PC，電気刺激装置の各機器を制御する役割を果たしている．露光制御用シャッタは，計測時以外に励起光が計測対象に照射されないようにする．2.1.1 節でも述べたが，励起光は輝度が高く膜電位感受性色素の褪色や細胞へのダメージを生じるため，シャッタ制御を行なって計測時のみ励起光が計測対象に照射されるように制御している．電気刺激装置は，4 章の実験では海馬に電気刺激を行なうために，また 5 章の実験では条件付け時に動物の足に電流刺激を行なうために使用している．

2.1.2 節で述べたように，*in vivo* の光学計測では呼吸によるパルセーションノイズと，心拍による血流ノイズの二種類のノイズへの対処が必要となる．本研究ではパルセーショ

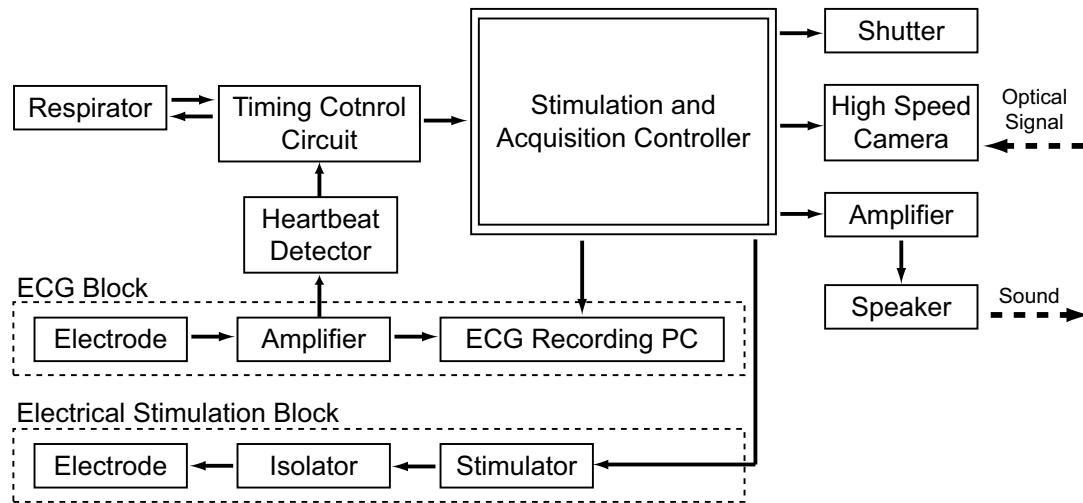


図 3.1 膜電位光学計測用実験システム

ンノイズに対しては人工呼吸器 (SN-480-7, シナノ製作所) の短時間の停止により, また血流ノイズに対しては心拍同期記録後オフラインで減算を行なって, ノイズを低減している. このため, 計測では人工呼吸器の制御および心拍の監視が必要である. 人工呼吸器にはフォトインタラプタ (TLP507A) を取り付け人工呼吸器のサイクルを検知するようになり, また電源を制御して任意の時点で停止および始動が可能となっている. また, 動物の両前足および左耳朶に皿電極を設置し, 生体アンプを通じて計測された心電波形の R 波を心拍検出回路によって心拍のトリガ信号に変換した. 心拍検出回路ではコンパレータによって閾値を越えた電位変化を検出し, 単安定マルチバイブレータ (74HC123) を用いて一定幅のパルスを出力した.

心電計測部 (ECG block) では, 計測電極に銀皿電極 (日本光電) を使用し, 生体用増幅器 (日本光電) で差動増幅およびフィルタリングを行なった. この信号は分岐され一つは心拍検出回路に入力され, もう一つは心電記録用 PC (AMD K6 233 MHz, 32 MB Memory, Compaq PRESARIO) に入力される. この心電記録用 PC には AD 変換ボード (PCI-6034E, National Instruments) を設置し, 自作のプログラムで心電図の監視と波形データのファイルへの記録が行なえるようにした. 心電記録用 PC は 5 章で条件付け中の心拍変動を記録するために使用している.

電気刺激部 (electrical stimulation block) では, 刺激波形を電気刺激装置 (SEN-7293, 日本光電) で生成し, アイソレータ (SS-202J, 日本光電) を通じて出力した.

図 3.2 にはこの人工呼吸器制御と心拍同期のための各機器の動作タイミングを示した. 図中の各記号は,  $N_r$  が計測から次の計測までの人工呼吸の回数 (図の例では  $N_r = 2$ ),

$N_e$  が人工呼吸器を停止してから計測開始までの心拍数 (図の例では  $N_e = 2$ ) ,  $T_r$  が光学計測の記録区間 ,  $T_s$  が記録開始からシャッタを閉じるまでの時間を表わしている . 実験が開始されると , タイミング制御回路が人工呼吸器のサイクルを  $N_r$  回数え , その次のサイクルで人工呼吸器を停止すると同時に , 露光制御用シャッタを開く . ここから心拍パルス数を数える状態に入り ,  $N_e$  個の心拍パルス数を数えると計測開始トリガを刺激・計測コントローラに送る . 通常刺激・計測コントローラは直ちに光学計測用カメラのコントローラに信号を送り計測を開始させる . 計測カメラのコントローラは , 取得画像枚数を  $N_f$  , 画像のサンプリングレートを  $R_f$  としたとき  $T_r = N_f \times R_f$  の時間だけ光学計測を行ない , 終了後に PC にデータ転送を行う . また , タイミング制御回路は刺激・計測コントローラに計測開始トリガが送られた時刻から  $T_s$  だけ経過するとシャッタを閉じ , 人工呼吸器のサイクルを開始する . そして , 再び人工呼吸器のサイクルを監視し ,  $N_r$  回のサイクルを待つ状態となる .

### 3.1.2 光学系および撮像システム

光学系の概要を図 3.3 に示す . 光学系の配置は通常の落射蛍光光学系になっており , 本研究で用いる膜電位感受性色素 RH795 の励起・蛍光スペクトラムに合わせて光学フィルタの波長特性を決定した . 光源には 150 W のハロゲン・タングステンランプを用い ,  $540 \pm 30$  nm の干渉フィルタを通して励起波長の光を取り出した . この励起光は 580 nm 以下の波長に対して反射特性を持つダイクロイック・ミラーによって反射され , 計測領域となる大脳皮質表面に落射される . 染色された大脳皮質からの蛍光は 1 倍もしくは 2 倍の対物レンズ (NA 0.26) によって集光され , ダイクロイック・ミラーおよび 600 nm 以下の波長を吸収する吸光フィルタを通過する . そして , 顕微鏡にマウントされた撮像カメラに入射し , 画像データとして記録される . 撮像システムは , 4 章の実験では  $128 \times 128$  チャンネルの MOS 型撮像センサを用いた光学計測システム (Deltaron 1700, FUJIX) を , 5 章の実験では  $100 \times 100$  チャンネルの MOS 型撮像センサを用いた光学計測システム (MiCAM ULTIMA, BrainVision) を用いた . 各システムのサンプリング速度とセンササイズの仕様を表 3.1 に示す .

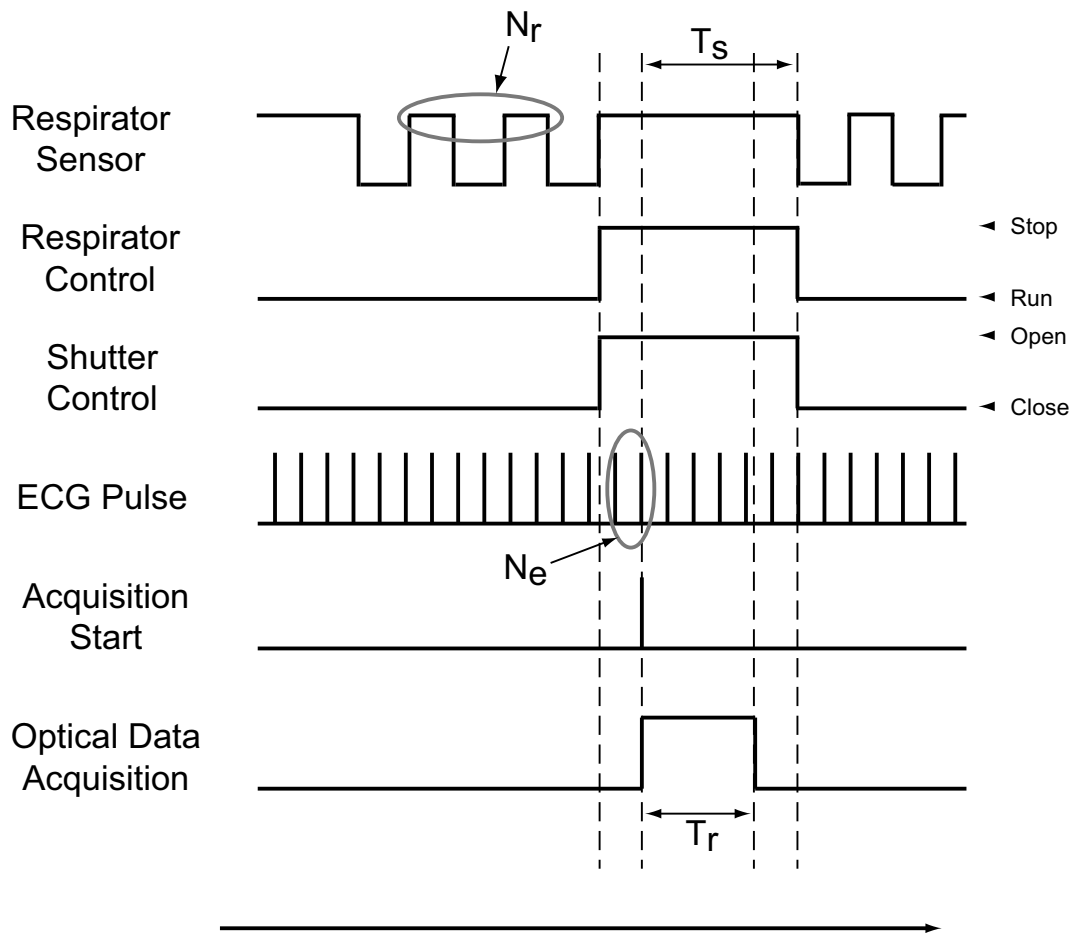


図 3.2 実験システムのタイミング・チャート

表 3.1 撮像システムの比較

|                       | Deltaron 1700 | MiCAM ULTIMA                   |
|-----------------------|---------------|--------------------------------|
| Sensor Type           | MOS           | MOS                            |
| Maximum Sampling Rate | 1.7 kHz       | 10 kHz                         |
| Number of Pixels      | 128 × 128     | 100 × 100                      |
| Sensor Size           | 10 mm × 10 mm | 10 mm × 10 mm                  |
| Pixel Size            | 70 μm × 70 μm | 100 μm × 100 μm                |
| Quantum Efficiency    | N/A           | 63 % (550 nm)<br>45 % (700 nm) |

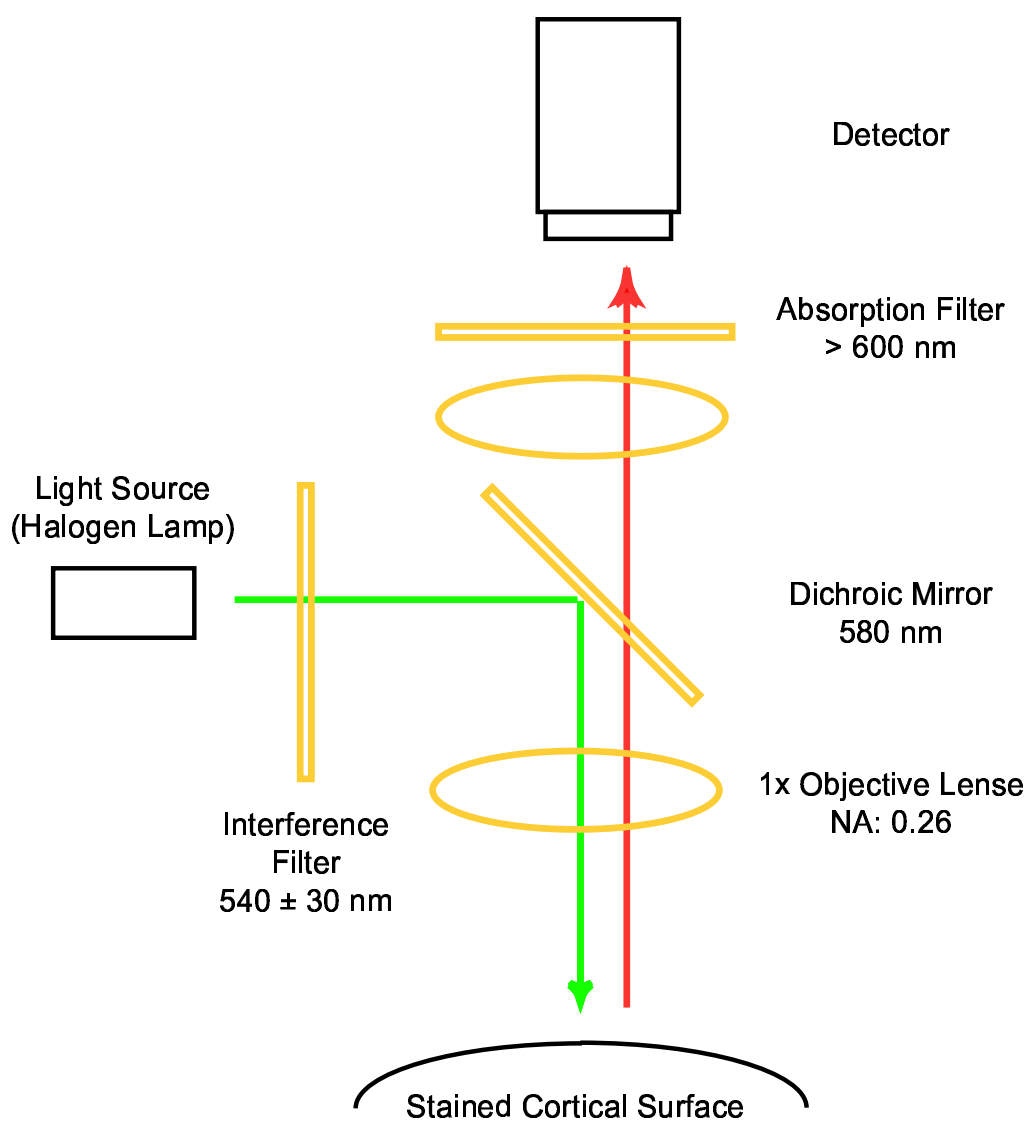


図 3.3 光学系

## 3.2 刺激・計測コントローラ

### 3.2.1 刺激・計測コントローラの必要性

本研究では、*in vivo* の膜電位光学計測における使用を目的とした刺激・計測コントローラ の設計、実装を行なった。神経生理学の実験では、通常刺激や計測のタイミングは ms オーダの精度があれば十分である。また多くの場合、刺激パターンは固定化されており、計測タイミングも刺激との単純な関係で決まる。しかし、3.1 節で述べたように、*in vivo* の膜電位光学計測では計測を呼吸や心拍に基づいて決定する必要があり、刺激や計測のタイミングはいくつかの制約を満たす必要がある。このような制約を満たしつつ複雑な実験手順を実施するためには、実験条件の設定が容易であることや、実験中の設定切替えが迅速にかつ人為ミスを起こしにくいようなシステムが望ましい。

そこで、本研究では *in vivo* の膜電位光学計測であることを前提にすることで問題を単純化し、この前提のもとで設定の柔軟性と操作の効率性が両立できるような刺激・計測コントローラの設計および実装を行なった。

### 3.2.2 設計

まず設計の条件を検討するため、刺激・計測コントローラの膜電位光学計測実験中での役割をモデル化する。3.1 節で述べたように、刺激・計測コントローラはタイミング制御回路からのトリガ入力を受けて、刺激波形の生成や他の機器の制御を行なう。そこで、図 3.4 のように一回のトリガ入力に対して一連の出力チャネルから刺激波形や制御信号を出力する過程を計測試行 (trial) と定義し、実験における計測はこの計測試行の繰返しと考える。

さらに、計測データを記録するための一連の計測試行の集まりを、計測シーケンス (sequence) と呼ぶことにする。膜電位光学計測では同じ計測を複数回行なってデータを加算平均することが多いため、計測シーケンスを指定回数繰返すことができるようにし、この計測シーケンスの繰返しによって一回の計測セッション (session) を構成する。図 3.5 はこのセッションの構成の例を示した。

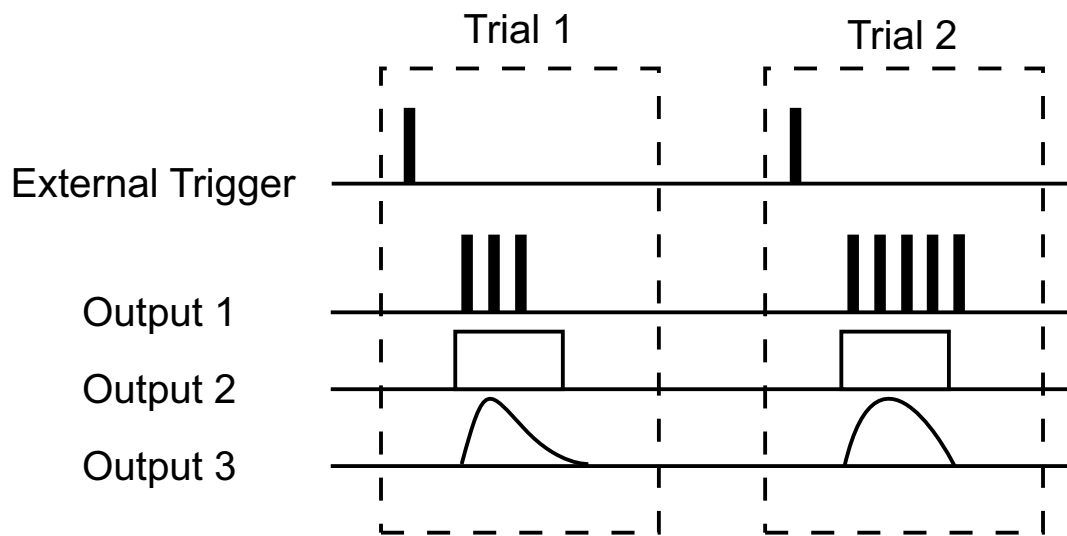


図 3.4 計測と計測試行 .

External Trigger は刺激・計測コントローラに入力される計測開始トリガを，Output は刺激波形や機器制御信号などの刺激・計測コントローラの出力を示す．

## Session

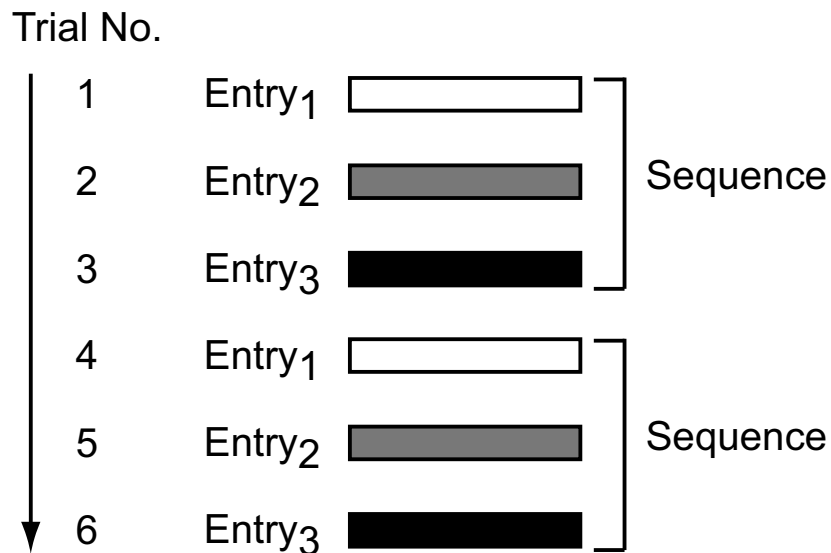


図 3.5 計測セッションの例 .

3 回の計測試行からなる 2 回のシーケンスで構成される場合を示している .

### 3.2.3 実装

#### ハードウェア

刺激・計測コントローラを実装するにあたってもっとも重要な条件は、入出力タイミングの精度である。刺激・計測コントローラは人工呼吸器からのトリガを受けて、計測装置や刺激装置に信号を送る必要があるが、光計測における画像のサンプリングレートが1~2 ms 程度のため、少なくとも1 ms 以下の精度が保証されなければならない。この精度は電子回路で実現すれば容易に達成できるが、様々な実験を行なうためには制御を柔軟に変更可能であることが必要である。また特に本研究の用途においては多様な音刺激列を出力可能である必要がある。これらのためには、何らかのプログラマブルなプロセッサを用いる方法が適しており、十分な精度を持つ入出力ボードを登載したPCを使用することなどが考えられる。

そこで、本研究ではPCに市販のDA変換ボードを登載する構成を選択した。PCベースであるため、プログラムの作成や機能追加が容易であり、またGUI(graphical user interface)を用いて操作性を向上することが可能である。このボードの主な使用を表3.2に示す。このDA変換ボードは4つのアナログ出力チャンネルの各チャンネルに対して、512 k サンプルのメモリを持ち、メモリにあらかじめ転送しておいたデータはCPUを介さずトリガ入力に対しハードウェアタイミングで出力することが可能である。512 k サンプルのメモリを全て使った場合、このボードの最高出力レートは200 kHzにおいても $512(\text{kSamples}) \times 200(\text{kHz}) = 2.56(\text{s})$ の間の連続データ出力が可能である。膜電位光学計測が可能なのは人工呼吸器を停止している間のみのため、約2.5 sの連続データ出力はほぼ十分な時間である。PCの仕様は表3.3の通りとした。

表 3.2 DA 変換ボード (PCI-3337, Interface) の主な仕様

|                 |                        |
|-----------------|------------------------|
| Analog Output   | 4 Channels             |
| Conversion Rate | 200 kHz                |
| Resolution      | 16 bit                 |
| Memory          | 512 kSamples / Channel |

表 3.3 使用した PC の仕様

|        |                   |
|--------|-------------------|
| CPU    | AMD Duron 1.2 GHz |
| Memory | DDR SDRAM 256MB   |
| OS     | Windows 2000SP4   |

### ソフトウェア

図 3.6 に制御ソフトウェアの実行画面例を示す．制御用ソフトウェアの実装には Visual C++ 6.0 (Microsoft) を用いた．Windows の機能へのアクセスには Win32 API を用いた．図 3.5 で定義される各構成要素を C++ のクラスとして表現した．SequenceEntry クラスは，計測試行時の各出力チャンネルからの出力データを含んでいる．Sequence クラスは SequenceEntry クラスのインスタンスを配列要素として持ち，計測シーケンスにおける計測試行の実施順序を定めている．Sequence クラスの内容は Sequence ファイルとしてあらかじめ記述しておき，読み込んで使用する．

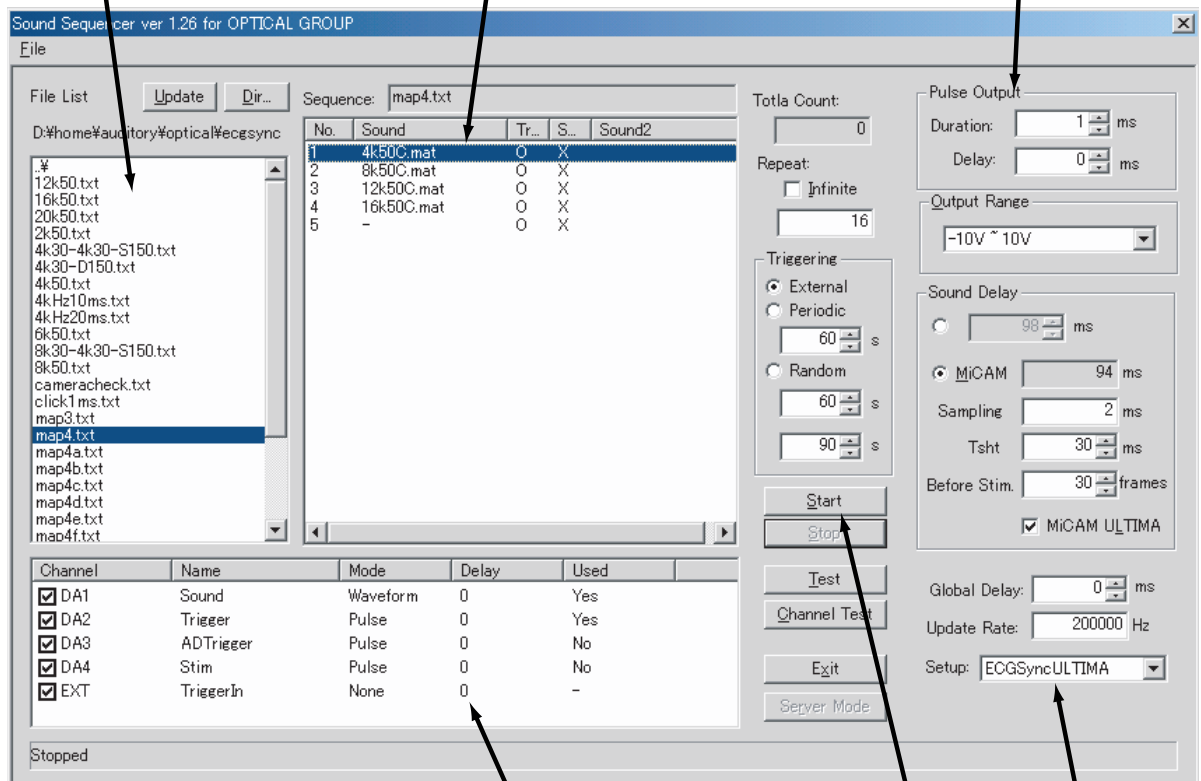
Setup クラスは，計測制御全体のパラメータを保持している．これには，全出力チャンネルに適用されるディレイ時間，トリガ条件，論理パルスを出力するときの電圧範囲設定などが含まれる．Setup クラスが保持する内容は Setup ファイルとして随時保存や読み出しが可能で，アプリケーションではこれを利用して計測制御の設定の切り替えを行なう．

Session クラスは計測セッションの開始毎にインスタンスが作成される．このクラスは Setup クラスのインスタンスおよび Sequence クラスのインスタンス，現在実行中の計測試行を示す制御情報をメンバに持ち，これによって計測セッションの実行に必要な全ての情報を保持している．Session クラスはメンバ関数に Process() を持っており，この関数は現在の計測試行の実行が終了したこと検知すると，次の計測試行を準備するようになっている．この制御用ソフトウェアでは Win32 API のアイドルイベントを受ける度にこの Process() を呼ぶことで，計測セッションが進行する．アイドルイベントは OS によってこのソフトウェアに実行時間が割当てられたときしか実行されないが，Process() は DA 変換ボード上のメモリへのデータ転送とトリガ待機を指示し，以降の過程は DA 変換ボードによってハードウェアタイミングで行なわれるため，十分な時間精度を保つことができる．

Sequence file selection  
(as a file list)

Entries in the current sequence

Pulse output parameters



Acquisition start button

Setup file selection

Channel settings

図 3.6 制御ソフトウェアの実行例

### 3.3 解析ソフトウェア

#### 3.3.1 解析ソフトウェアの必要性

本研究では，膜電位光学計測によって得られた時系列画像データの解析用ソフトウェアの開発を行なった．膜電位光学計測ではデータが時系列画像という形で得られるが，このような多次元のデータを解析するには，様々な方法でデータの次元を落として解析する必要がある．膜電位光学計測のデータでは，個々の画像を取り出して解析を行なったり，画像の特定の位置に着目してその位置で記録された波形の解析を行なう場合が多いが，単に特定の画像や波形を抽出するのではなく，平均やフィルタリング，ピーク抽出などの演算処理の結果が必要になる場合も多い．

このような解析のために，MATLAB, Igor などの数値計算，解析言語が用いられることも多いが，これらの言語では画像計測で得られるような大量のデータを処理しようとすると実行速度や要求メモリの点で不利である．そこで，本研究では図 3.7 のように，データ解析のアルゴリズム開発には数値計算用言語を用い，データ解析の手法がある程度決定されアルゴリズムの妥当性も検証された段階で，C 言語により記述された専用解析アプリケーションに実装し，多数のデータにこの解析アルゴリズムを高速に適用できるようにするようなソフトウェアの開発サイクルが有効であると考えた．そして，数値計算用言語で開発したアルゴリズムを効率的に実装できるような専用解析アプリケーションの設計と実装を行なった．

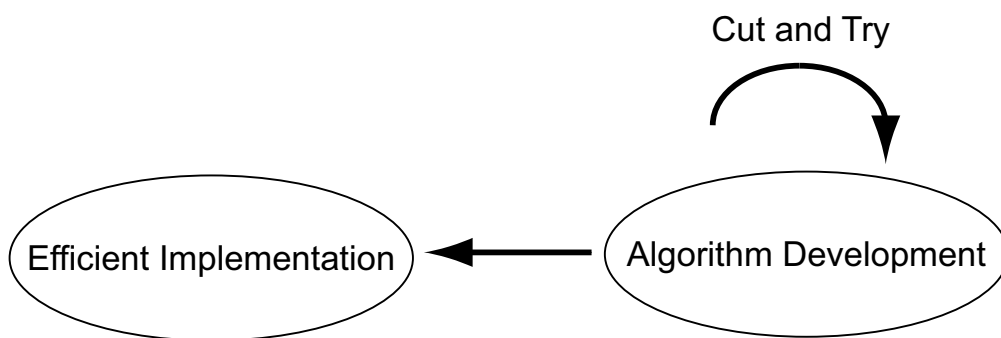


図 3.7 効率的なデータ解析のためのソフトウェア開発手順

解析ソフトウェアは，解析アルゴリズムおよびデータファイルの入出力を処理するためのライブラリ部と，アプリケーションとして必要な GUI 部に分割した．これによって，イ

インタフェースと論理が分離されプログラムの保守性および移植性が高まる．またグラフィカルなインタフェースの必要性が無い処理は，直接ライブラリを呼ぶことによってバッチ処理の記述を容易に行なうことができる．

### 3.3.2 ライブラリ部の設計および実装

移植性と実行速度を両立するため，ライブラリ部の記述には C 言語を用いた．現在の C コンパイラは豊富な最適化機能を持つものも多く，高速な数値演算コードの生成が期待できる．また，gcc を代表として非常に多くの環境で ANSI/ISO 規格準拠の C コンパイラが利用できるため，機種依存性の高い記述を避けることで高い移植性を確保することができる．

#### 複数の基本データ型のサポート

本ソフトウェアでは時系列画像データを扱うことを基本としているが，このデータをプログラム中で扱う際に一つの画素をどのようなデータ型で表現するかは重要な要素である．これは，このデータ型の選択によって演算精度，演算時間，要求メモリ量などが大きな影響を受けるためである．そこで本ソフトウェアでは，画素を表現するデータ型として，符号無し 8 bit 整数，符号付き 16 bit 整数，32 bit 浮動小数点数の 3 種類を用いることができるように実装した．この 3 種類のデータ型を選んだ理由は以下の通りである．まず，符号無し 8 bit 整数は科学計測で使われる強度画像で一般的に使用される．また，光学計測では背景光強度との差分である  $\Delta F$  や  $\Delta I$  が用いられ，符号が必要であること，また AD 変換器の性能などの事情から多くの光学計測システムの出力が 8 bit~16 bit の範囲であることなどから，デフォルトのデータ型として符号付き 16 bit 整数を使用する．さらに，高精度の計算や  $\Delta F/F$  の算出などでは浮動小数点演算が必要であり，これらを想定して 32 bit 浮動小数点数も実装している．これらのデータ型は，任意の時点で `see_fs_convert()` 関数を用いて相互に変換できるため，処理に応じて最も適したデータ型で演算処理を行なわせることが可能である．

ただし，データ型を増やすと，解析アルゴリズムを全てのデータ型について記述しなければならない，実装や保守時の作業量を増加させてしまうという問題が生じる．そこで，本研究ではこの問題を解決するため，Perl を用いて簡単なプリプロセッサを記述した．このプリプロセッサの動作を説明するために，時系列画像データの符号を反転する `see_fs_invert()` 関数のソースコードをリストに示す．説明のため，このコードではエラー処理などの記述は省略している．

```
#include "see.h"
#include "see-int.h"

@implement uint8, int16, float

@{
static int
see_fs_invert_@type@(see_frameset *fs)
{
    int i, n;
    see_value_@type@ u;

    n = SEE_FS_PIXEL_COUNT(fs);
    for (i = 0; i < n; i++) {
        u = SEE_FS_PIXEL_DIRECT_@TYPE@(fs, i);
        SEE_FS_SET_PIXEL_DIRECT_@TYPE@(fs, i, -u);
    }

    return SEE_OK;
}
@}

int see_fs_invert(see_frameset *fs)
{
    switch (SEE_FS_DATATYPE(fs)) {
    @{
    case SEE_@TYPE@:
        return see_fs_invert_@type@(fs);

    @}
    default:
        return SEE_ER_DATATYPE;
    }
}
```

@implement によって生成すべき対象となるデータ型を指定する .uint8, int16, float はそれぞれ符号無し 8 bit 整数, 符号付き 16 bit 整数, 32 bit 浮動小数点数を表す. @{と@}で囲まれた領域は@implement で指定されたデータ型の個数だけ反復される. この時, @{と@}の内部に含まれる@type@および@TYPE@は, それぞれ@implement で指定された各

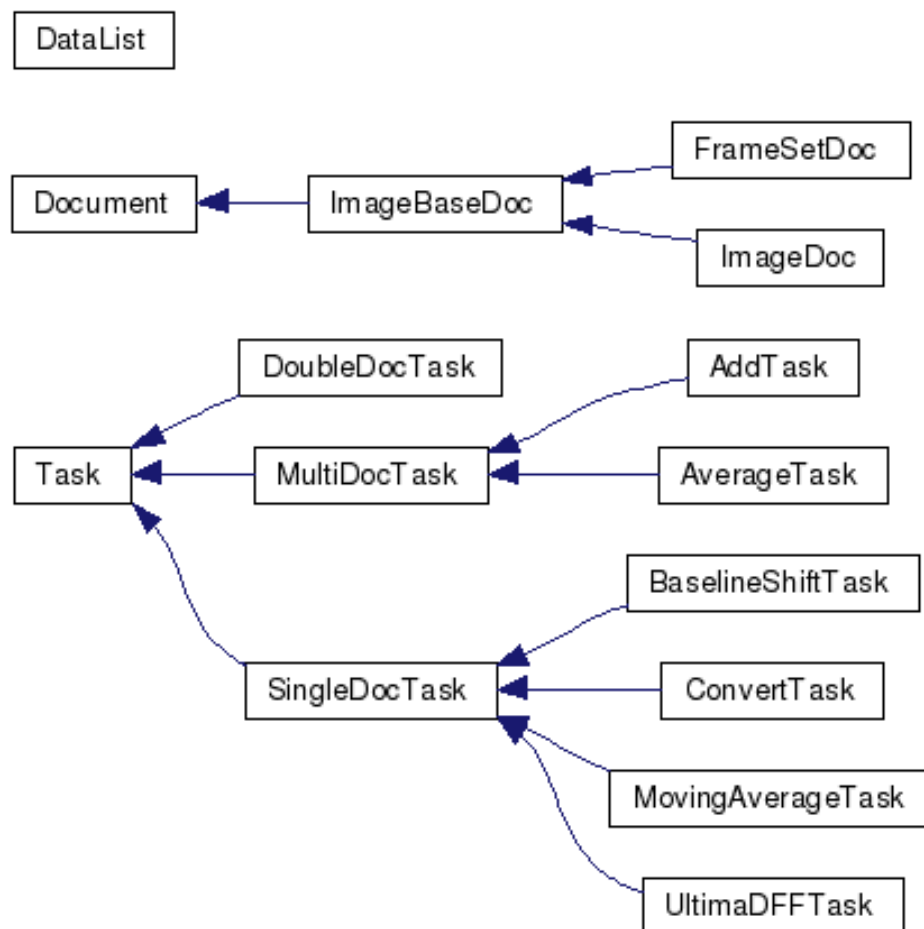


図 3.8 解析ソフトウェアのクラス階層

データ型の名前およびその大文字化された文字列に展開される。

このような仕組みを用いることで、単一のアルゴリズム記述から複数のデータ型のためのプログラムを生成することができ、プログラムの保守性が高まると同時に新しいデータ型を追加することも容易となる。

### 3.3.3 GUI アプリケーションの設計および実装

3.3.1 節で述べたように、本解析ソフトウェアではデータ入出力やデータ解析を行なうライブラリ部分と GUI 部を分離したため、GUI アプリケーションはほぼ独立に設計できる。

本研究では Microsoft 社の Windows 2000 以降の OS を対象とした。これは、光学計

測システムの制御プログラムが Microsoft Windows を OS とした PC 上で実行されるため、計測の場面で解析プログラムを同時に起動し、計測データを確認できると極めて利便性が高いという理由による。

本ソフトウェアは C++ 言語を用いて記述した。Windows の機能へのアクセスには Win32 API を直接用いた。また複数のデータの管理を簡潔に記述するため STL(Standard Template Library) を使用した。

本アプリケーションのクラス階層を図 3.8 に示す。本アプリケーションでは同時に複数のデータを扱うことができるようになり、各データはドキュメントとして扱われる。このドキュメントは Document クラスのサブクラスの ImageBaseDoc クラスのさらにサブクラスにあたる FrameSetDoc クラスと ImageDoc クラスによって扱われる。FrameSetDoc クラスは時系列画像を扱い、ImageDoc クラスは(一枚の)静止画像を扱う。ImageBaseDoc クラスは FrameSetDoc クラスと ImageDoc クラスに継承できる共通のコードを保持している。Document クラスと ImageBaseDoc クラスは抽象クラスである。

DataList クラスはアプリケーションが開いている全てのドキュメントのリストを保持しており、全てのドキュメント、あるいは選択されたドキュメントに対する処理を行なうために用いられる。このクラスは画面上に表われる datalist ウィンドウとのインタフェースを兼ねる。

Task クラスは解析処理を実行するための抽象クラスで、純粹仮想メンバ関数 process() を持っており、Task クラスのサブクラスではこの仮想関数をオーバーライドする。Task クラスのサブクラスには SingleDocTask クラス、DoubleDocTask クラス、MultiDocTask クラスが存在している。これらはそれぞれ、一個のドキュメント、二個のドキュメント、二個以上の多数のドキュメントに作用する解析処理を実装するための抽象クラスである。これらのクラスではそれぞれ一個のドキュメント、二個のドキュメント、ドキュメントのリストを引数としてとる仮想メンバ関数 apply() が定義されており、Task クラスからオーバーライドした process() はこの apply() を使って処理を行なうように実装されている。このような構成をとることによって、エラーチェックや、複数のドキュメントに解析処理を適用するためのループ記述が共有され、コードの保守が容易になっている。

最後に、解析ソフトウェアの実行画面の例を図 3.9 に示した。光計測画像データを開くと、一つのデータに対応して一つの data window が生成され、画像が表示される。画像を表示させる際のパレットの選択やパレット範囲の指定、閾値指定などは view control から行なうことができる。また、data window に表示されている画像から任意の位置を選んで、その位置での応答波形を time course window に表示することができる。data list

window には現在開かれている全てのデータの一覧が表示されており，その中から任意個数のデータを選択してそのデータに対し同一の解析処理を実施することが可能となっている．

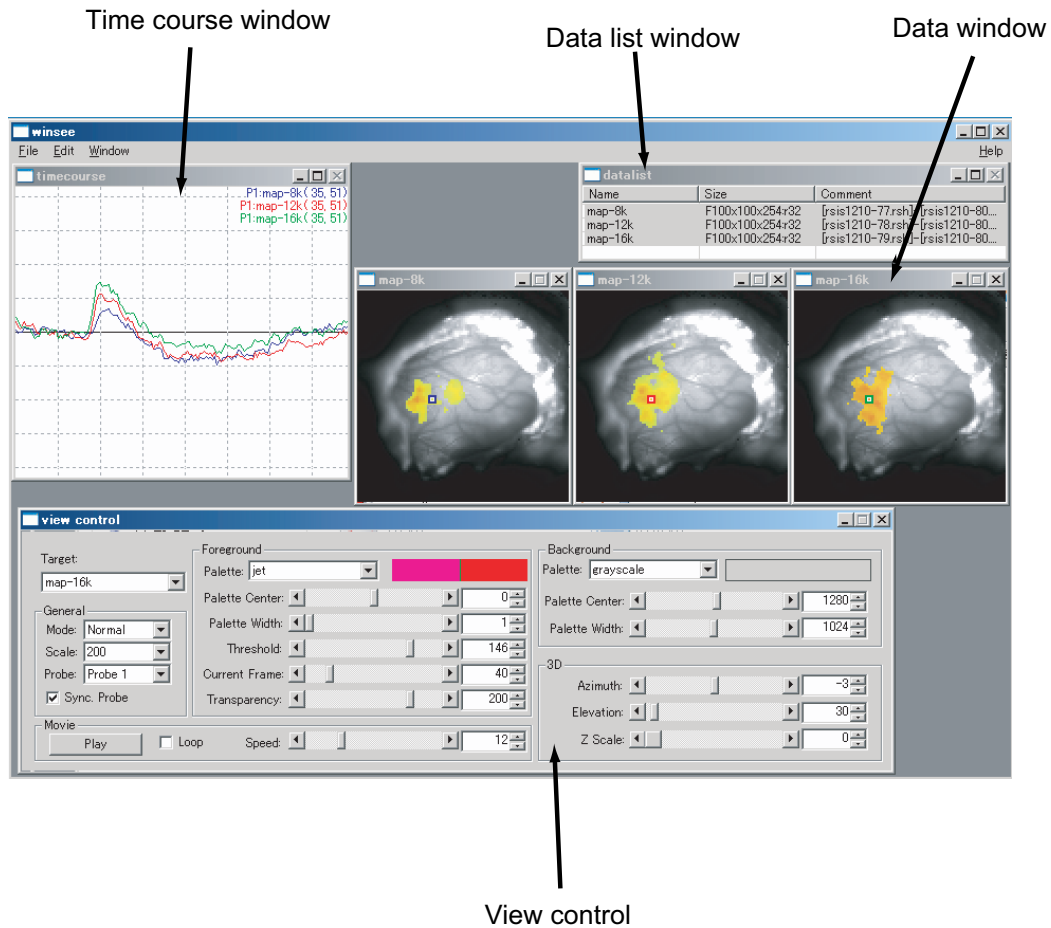


図 3.9 解析ソフトウェアの実行例

## 第 4 章

# 海馬刺激による大脳皮質聴覚野応答 変化の光計測

本章では、まず海馬刺激による大脳皮質聴覚野の応答変化を光計測法により調べる目的について述べる．次に、海馬と大脳皮質の投射関係と、これまでに知見が数多く報告されている海馬 CA1 から大脳皮質前頭前野への経路に関する研究をまとめる．ついで、今回の実験の方法および結果を述べる．最後に、本実験の結果から海馬—大脳皮質の経路が記憶にどのような役割りを果たしているかについて考察する．

### 4.1 実験目的

海馬と大脳新皮質が脳の宣言的記憶に重要な役割を担っていることが、これまでの多くの臨床的 [33]、解剖学的 [34, 35]、生理学的 [36]、理論的 [37–39] 知見によって指摘されている．霊長類やげっ歯類では大脳新皮質のほとんどの領野から海馬に対して嗅内野を介した投射があり、海馬内のトリシナプティック回路を経た出力は再び嗅内野を介して大脳新皮質へと投射する [40]．このような回路構造によって、記憶の固定が行なわれているとする仮説が有力である [34]．この仮説では、大脳新皮質で処理された情報は海馬で統合され、再び大脳新皮質に戻って長期的な記憶として定着すると考える．

脳が実際にこのような形で記憶処理を行なっているかどうかを検証するには、海馬と大脳新皮質の活動の連関を調べる必要がある．海馬の CA1 領域から新皮質の前頭前野や下側頭皮質に対しては単シナプスの投射が存在し [41, 42]、生理学的な知見が報告されてきた [43–46]．しかし、嗅内野を介した経路しか持たない新皮質の他の領野に関して、海馬との関係を調べた報告は少ない [47]．

山本らは膜電位光計測法を用い、音刺激による大脳新皮質聴覚野の活動が海馬に対する電流刺激によって抑制されることを報告し [48]、海馬活動が聴覚野の活動に影響を与え得ることを示した。聴覚野にも他の領野と同様に、嗅内野への収斂性の投射と嗅内野からの分散性のフィードバック投射が存在することが報告されており [49]、このような実験パラダイムによって嗅内野を介した海馬と大脳皮質間の機能的な関係を調べることができる。

また、膜電位光計測法を用いることによって聴覚野内の神経活動の変化を細かい分解能で時空間的に解析することが可能である。

そこで本実験ではこの実験パラダイムを発展させ、異なる強度の電流刺激を行ない、海馬内に生じる神経活動の違いによって聴覚野応答にどのように修飾されるかを検討する。これにより海馬と大脳新皮質聴覚野の経路に関する知見が深まり、海馬と大脳新皮質に基いた記憶情報処理のメカニズムの理解へとつながると考えられる。

## 4.2 関連研究

図 4.1 のように、霊長類やげっ歯類では、海馬は海馬傍領域 (parahippocampal region) を介して大脳皮質の広範な領域との双方向の投射を持っている [40]。海馬傍領域の中でも嗅内野 (entorhinal region) と呼ばれる領域は、内側前頭前野、体性感覚野、聴覚野、運動野に投射を送っていることが逆行性トレーサを用いた実験で報告されている [49]。

このように大脳皮質は基本的に海馬傍領域を介して海馬と接続しているが、大脳皮質の前頭前野 [41, 50] や下側頭野 (TE 野) [42, 51] などいくつかの領域に対しては、海馬 CA1 からの単シナプス性の投射が知られている。中でも海馬 CA1 から前頭前野への経路については多くの解剖学的、生理学的な知見が報告されている。

海馬から前頭前野への入力 CA1 と海馬台からのみであり、CA2, CA3, 歯状回からの投射は存在しないことが知られている [52]。そして、海馬 CA1 に電気刺激を行ない前頭前野で細胞外記録を行なうと、89 % の細胞はシングルパルス刺激に対し EPSP と IPSP の複合した応答を示す [44](図 4.2)。この海馬から前頭前野への興奮性伝達は、薬理学的な実験によりグルタミン酸受容体である AMPA 型受容体および NMDA 型受容体を介していることが分かっている [53]。

NMDA 受容体を介した伝達が存在することから、NMDA 受容体依存性の LTP が生じる可能性が考えられるが、実際に、麻酔下のラットで Laroche らは海馬の CA1 をテタヌス刺激することによって、前頭前野に LTP が起きること [54]、海馬—前頭前野間の経路の LTP の誘導には NMDA 受容体の活性化が必要であること [55] を報告している。このように海馬—前頭前野間で NMDA 受容体を介した LTP によるシナプス可塑性は、この

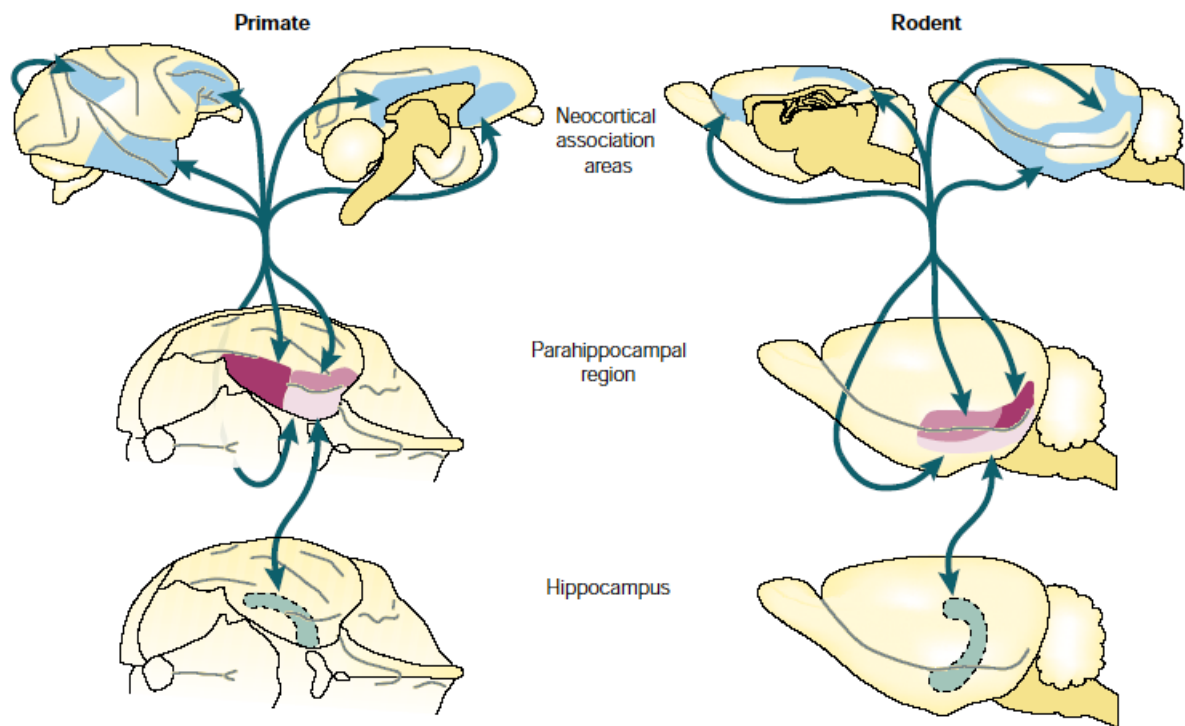


図 4.1 海馬と大脳皮質間の解剖学的な経路 [40] .

霊長類とげっ歯類のどちらも、大脳皮質と海馬は海馬傍領域を介して双方向の結合を有している .

経路が関与する記憶処理の基礎的なメカニズムを与えている可能性が考えられる .

最後に、実際の記憶過程におけるこのような海馬—前頭前野間の経路の役割を示唆する実験として、Siapas らの研究を取り上げる [46] . ラットの徐波睡眠中に局所電位を観測すると、海馬ではリプルと呼ばれる速い振動が記録される . 一方、大脳皮質前頭前野では 7-14 Hz の紡錘波と呼ばれるゆっくりとした振動が記録される (図 4.3) そして、このリプルと紡錘波の発生時刻には高い相関が見られた . この高い相関は、前述した海馬から前頭前野への単シナプス性の直接投射が基礎にあると考えられる . また、この活動相関は睡眠中に海馬から大脳皮質へ記憶が長期固定するための仕組みとして機能していると想定される .

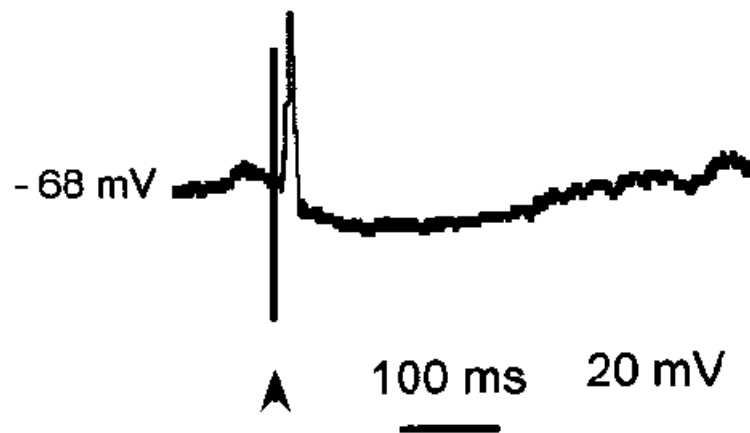


図 4.2 海馬 CA1 を刺激したときの大脳皮質前頭前野の応答 [44]

## 4.3 実験方法

### 4.3.1 外科手術

実験には 4~6 週齢のメスのモルモット (250 - 400 g,  $n = 3$ ) を用いた。実験動物の取扱いは、慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインおよび玉川大学の「動物実験に関する指針」に従った。外科手術では、まずアトロピン (0.2 ml/kg, 皮下注射) を麻酔の 30 分前に投与した。次に、混合麻酔 (ケタミン: 20 mg/kg, キシラジン: 10 mg/kg, 筋肉注射, 1 時間毎) を両後足から初回のみ 2 倍量投与した。さらに、人工呼吸を行なうために気管切開を施し、カニューレを挿入した。そして筋弛緩剤臭化パンクロニウム (0.2 mg/kg, 筋肉注射, 3 時間毎) を投与して自発呼吸を停止し、人工呼吸に移行した。

測定領域の中心を大脳皮質一次聴覚野とするため、次のようにその位置を決定した。Bregma を左側に下がった縫合線の分岐点から、正中線に平行に尾側に 5 mm, 正中線に垂直に 5 mm 下がり、その点を中心とした 5 mm 角の正方領域を観測領域とした。また、Bregma から正中線に沿って尾側に 4.5 mm 進み、そこから正中線に対し左側頭方向に垂直に 5 mm 下がった位置に孔を開け、海馬刺激用電極を刺入した。刺激電極には直径 80  $\mu\text{m}$  のタングステン線の双極電極を用いた。電極の深さは約 2.0 mm ~ 2.5 mm とし、刺激電極から記録される局所電位を参考に深さを決定した。

露出した左聴覚野を、生理食塩水に溶かした濃度 0.125 mg/ml の膜電位感受性色素 RH795 (Molecular Probes, Inc.) で約 1 時間染色した。その後色素を取り除き、計測を行

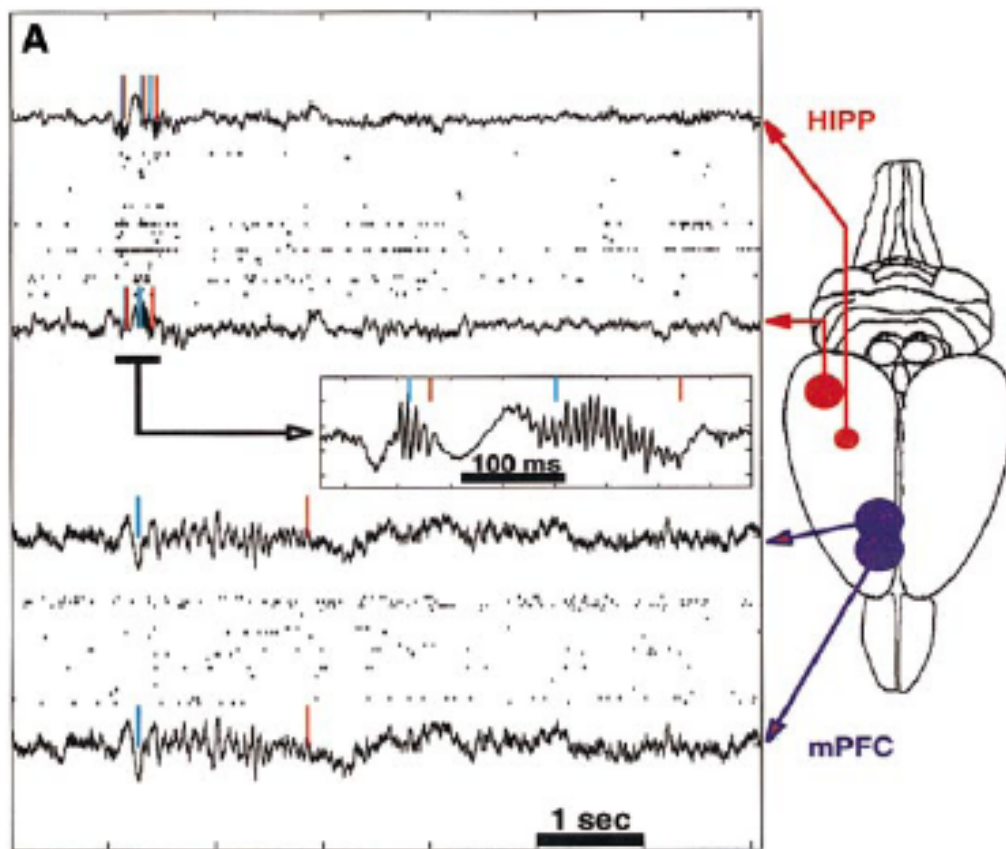


図 4.3 海馬と前頭前野の活動相関 [46]

なった．計測中は脳表面が乾燥しないように生理食塩水を必要に応じて滴下した．

#### 4.3.2 計測

実験システムの構成や使用機器については 3.1 節で説明しているので，ここでは本実験に特有の事項を中心に簡略化して述べる．光学計測には 2 倍の対物レンズを使用し，Deltaron 1700 (FUJIX) を用いて光学画像を記録した．サンプリングは 1.2 ms おきに行ない，S/N を向上するため 32 回の計測データの加算平均を行なった．

音刺激には 8 kHz の純音 (持続時間 10 ms，音圧 60dB SPL) を用いた．音刺激は TDT System II (Tucker Davis Technologies) を用いて生成，出力し，スピーカを通じて右耳に提示した．

海馬への刺激は 200  $\mu$ s のシングルパルスで，刺激は音刺激の出力タイミングに同期さ

せた。実験は海馬刺激なしの場合の 32 回の計測をまず行ない、以降海馬刺激強度が 0.19 mA, 0.38 mA, 0.57 mA, 0.76 mA の順番で各 32 回の計測を行なった。計測と計測の間隔は海馬刺激により海馬内に可塑的变化が生じないように 20 s とした [56, 57]。

測定終了後、刺激電極に 5 ～ 10 s 程度 10 mA の電流を流して電極の刺入位置に痕跡を作った。さらに、脳を摘出しスライス切片を作成して電極先端が海馬 CA1 領域に位置していたことを確認した。

## 4.4 実験結果

本研究では、麻酔下のモルモットから、音刺激を提示したときの大脳皮質聴覚野の活動を光計測法により記録した。このとき、音刺激提示と同時のタイミングで海馬 CA1 領域に電気刺激を行ない、海馬の刺激強度と聴覚野活動の変化の関係を調べた。

図 4.4 は 8 kHz の純音を提示し、それと同時に海馬に電気刺激を行なったときの大脳皮質聴覚野の神経活動を光計測した結果の時系列画像である。図中のスケールバーは 1 mm を示し、画像の上が背側、左が吻側である。画像の各点には蛍光強度変化に対して疑似カラーを割当てており、対応関係をカラーバーに示した。蛍光強度変化は膜電位変化に比例するため、赤の部分は神経活動が強いことを表わす。海馬刺激を与えない場合の画像に代表されるように、神経活動は聴覚野の背側部から始まりその後活動が全体に広がっていくような時間経過をたどる。

0.19 mA の電流刺激を海馬に与えた場合、すでに報告 [48] されているように、刺激なしの場合に比べ聴覚野の応答は抑制された。この電流刺激をさらに強くしていくと聴覚野の応答抑制は小さくなり、0.76 mA でははっきりと刺激なしの場合よりも強い応答を示した。海馬刺激の影響を空間分布でみると、背側では強い影響があるが、腹側では影響が小さい。

また、聴覚野応答の時間的変化を調べるため計測画像中から 3 点 A(68, 34), B(109, 28), C(78, 82) を選んで応答の時間推移を示した (図 4.5)。グラフの横軸は音刺激提示時刻を基準として経過時間、縦軸は膜電位変化に比例した蛍光強度変化を表している。海馬刺激の有無にかかわらず、音刺激提示後約 20 ms 後から応答が始まり 30 ms 後から 40 ms 後までの間にピークに達する。海馬刺激を行なった場合の聴覚野応答への影響は応答のピーク時点ですでに表われているが、ピーク後の応答経過で差がより大きく表れた。

このように海馬刺激の影響は背側と腹側、ピークとピーク後で違いが見られる。ここで、ピーク潜時に関してヒストグラムを描くと二峰性となり (図 4.6A)、速い山が背側、遅い山が腹側に対応していることが分かった。図 4.6A は海馬刺激なしの場合のヒストグ

ラムで、横軸はピーク時刻、縦軸はピクセル数を表わしている。このような分布は刺激条件によらずほぼ一定であることから、ピーク潜時の分布をもとに各点を背側と腹側に分類することとした。そして、海馬刺激の効果を定量化するため、各点の時間推移をもとに聴覚野応答のピーク値とピーク後の一定区間の応答の平均値を使ってグラフに示したものが、それぞれ図 4.6C と D である。ピーク値は音刺激提示後から 57 ms までの範囲の最大値、ピーク後の応答は音刺激提示後 57 ms から 81 ms までの 20 個のデータの平均値を用いて計算した (図 4.6B)。また、海馬刺激の効果をみるため海馬刺激なしの場合を 100 % として正規化し、背側および腹側のそれぞれについて集計して平均値  $\pm$  標準誤差として図 4.6C, D に表示した。グラフの見易さのため図 4.6D において 0.57 mA と 0.76 mA のエラーバーの向きを入れ替えた。

図 4.6C, D からは、海馬刺激が 0.19 mA, 0.38 mA では抑制性に働き 0.57 mA および 0.76 mA では興奮性に働いていること、海馬刺激の効果は背側よりは腹側、ピークよりはピーク後で強いことが分かる。同様の結果が他の個体からも確認された。

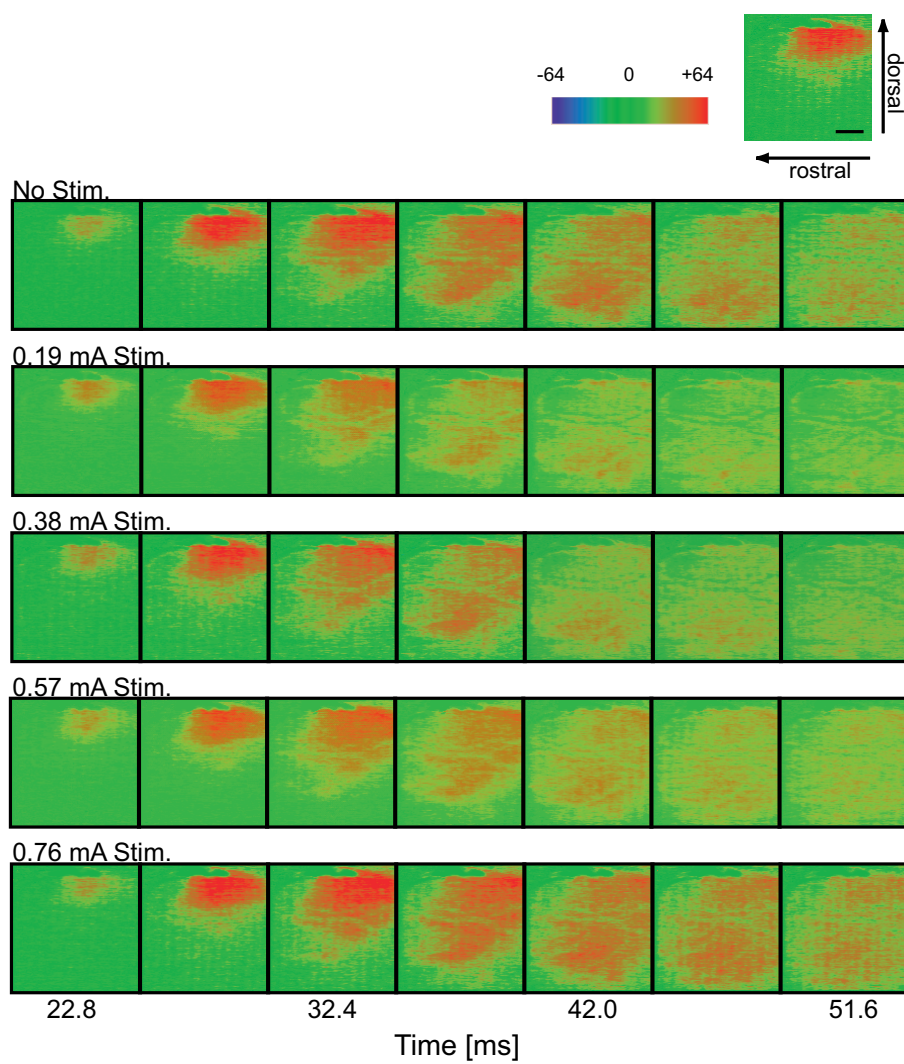


図 4.4 海馬刺激を行なった時の聴覚野応答の光計測画像

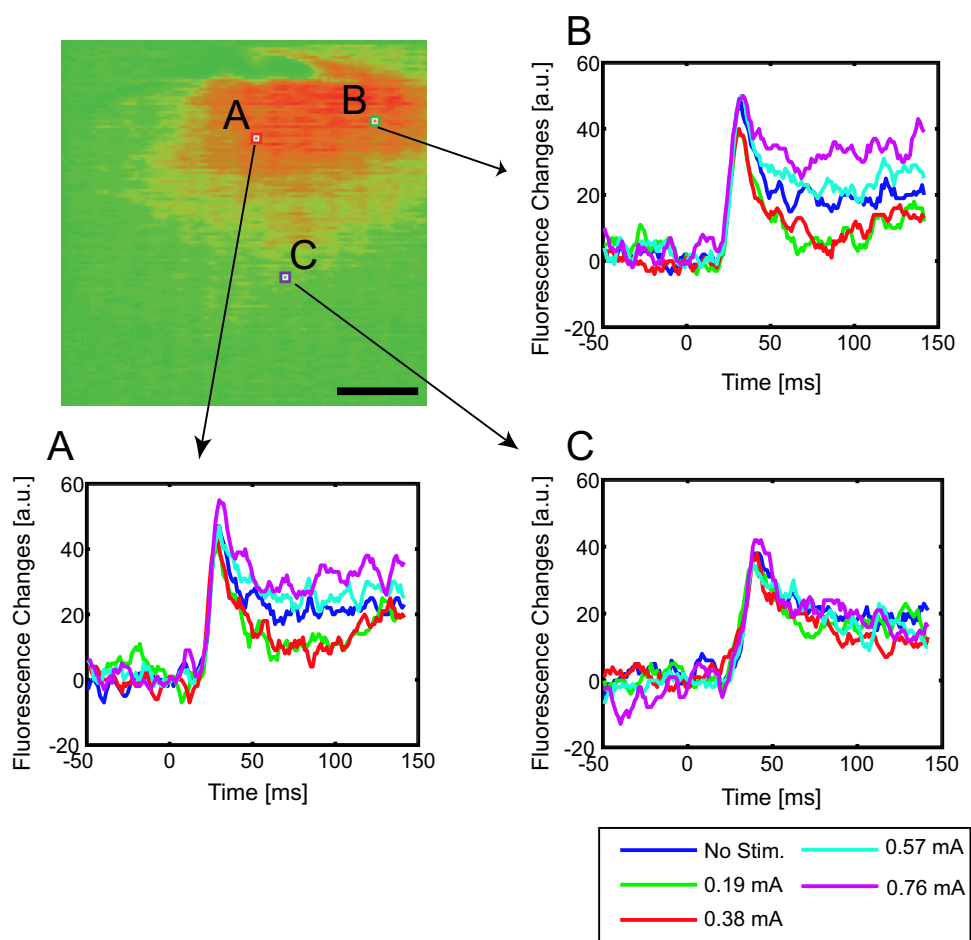


図 4.5 聴覚野応答の時間推移波形

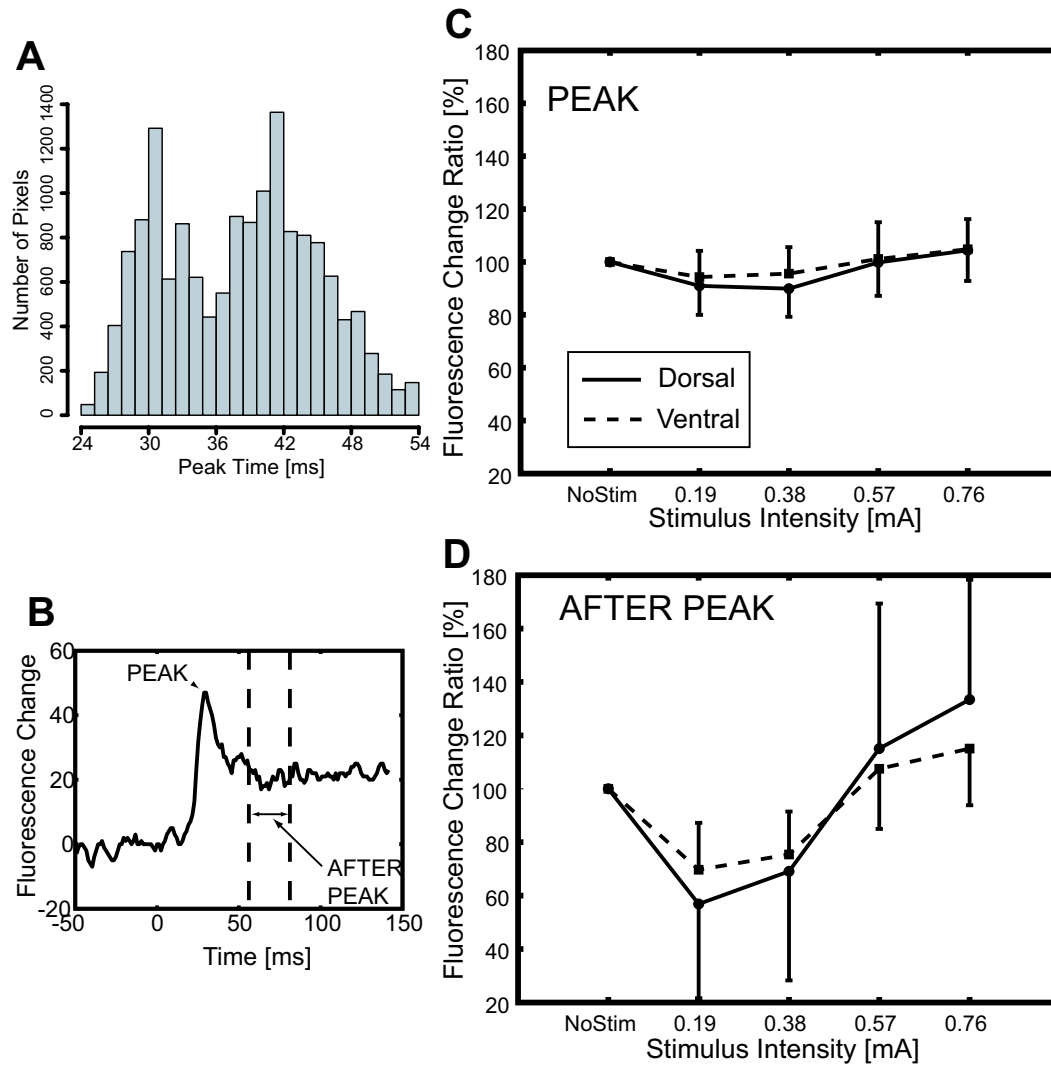


図 4.6 海馬刺激の聴覚野応答への効果

## 4.5 考察

本実験では、海馬刺激強度を変化させた時の音刺激に対する大脳新皮質聴覚野の応答を光計測法により調べた。結果で述べたように、海馬刺激を行なわなかった場合に比べ海馬刺激の電流値が 0.19 mA から 0.38 mA の範囲では聴覚野の応答に対し抑制的に働き、それよりも大きい場合には逆に興奮性に働くことが分かった。

ここではまず、膜電位感受性色素による光計測シグナルの解釈について議論する。次に、今回の結果の記憶処理における意義を考察する。最後に、解剖学的な知見などをもとに、今回の結果がどのような神経基盤によって生じた可能性があるかを検討する。

### 4.5.1 シグナルの起源

まず、光計測シグナルに含まれる神経活動の起源について考える。大脳皮質表面を上から見たときの膜面積のほとんどを樹状突起が占めるため、光計測シグナルは興奮性や抑制性の後シナプス電位成分が主であるという解釈 [58] が一般的であり、同時に局所電位記録や細胞内記録を行なったときの比較もこの解釈を支持している。活動電位も計測シグナル中に含まれると考えられるが、シナプス電位の成分が支配的であることに加え、データの加算平均、神経組織による光散乱、非焦点面からの光の混入などの複合的な理由により、特に *in vivo* では分離は極めて困難である。

また一般に大脳新皮質は細胞の分布によって垂直方向に 6 層 (I 層 ~ VI 層) に分類されており [59]、聴覚野も同様である。光計測シグナルがどの層の活動を反映しているかについては、色素の染色深度や顕微鏡の焦点を変化させたときの応答 [32]、スライスでの活動伝播の様子 [31] から、モルモット聴覚野ではほぼ 200 ~ 300  $\mu\text{m}$  の深度、II 層から III 層上部までに含まれる神経細胞の活動を最も強く反映していると推測される。

### 4.5.2 記憶過程における役割

次に、今回の結果分かった海馬 CA1 領野と大脳皮質聴覚野が持つ機能的連関の記憶過程における意義について考える。海馬から大脳皮質への投射経路の役割についての有力な仮説のひとつは、短期記憶から長期記憶への記憶の固定に関与している [34] というものである。最近ではシナプスの長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) が大脳皮質の可塑性の基礎になっていることを示唆する結果 [60, 61] が報告されており、いわゆる長期記憶が大脳皮質内にこうした形で保持されている可能性が高い。今回海馬 CA1 領野への刺激の違い

が、大脳皮質聴覚野に見られる応答に対して抑制性にも興奮性にも働くことが分かったが、これは海馬からの入力によって大脳皮質聴覚野に LTP や LTD などのシナプス可塑性を起こしやすくしている可能性がある。また、海馬刺激の強度は同時に賦活される神経細胞の数に対応すると考えられるため、海馬刺激を強くしていったときに聴覚野への影響が抑制性から興奮性へと変化したことは、海馬内の神経活動の大きさが大脳皮質に記憶が固定される時の情報に対する重要度を表現している可能性がある。

#### 4.5.3 神経基盤

最後に、解剖学的な知見をもとに海馬刺激が聴覚野応答を変化させる神経基盤を考える。海馬 CA1 領野から大脳皮質聴覚野への同定されている経路は、CA1 から嗅内野を経た投射で、嗅内野に対する順行性トレーサ PHA-L の注入によって聴覚野の I 層深部、II～III 層および VI 層が染まることが報告されている [49]。この報告からは、結合が興奮性であるか抑制性であるかや細胞の種類などは分からないが、光計測で主に記録されていると思われる皮質の II, III 層への投射が存在することから、海馬 CA1 の活動が嗅内野動を経て聴覚野の II, III 層の細胞に抑制性や興奮性の作用を与えたと推測できる。

このように、海馬刺激が強度に応じて聴覚野応答に対し抑制性にも興奮性にも働く機序について、以下のような可能性が考えられる。(1) 嗅内野から聴覚野への投射は興奮性と抑制性それぞれが存在すると考える。海馬刺激強度が小さいときは抑制性シナプス伝達主体で聴覚野応答は抑制され、刺激強度が増すにつれ興奮性の寄与が抑制を上回るようになった。(2) 嗅内野から聴覚野の抑制性細胞およびそれらをさらに抑制する細胞に対して興奮性投射が存在すると考える。刺激強度が小さいときは抑制性細胞のみが刺激され聴覚野の応答が抑制されるが、刺激強度が増すにつれそれらを抑制する細胞への刺激が強まり、脱抑制によって応答が強まった。通常音刺激に対して聴覚野が応答する場合抑制系も活動しており [32]、海馬刺激なしの場合より応答が強くなる場合があることとも矛盾しない。(3) 皮質錐体細胞に存在する GABA<sub>A</sub> 受容体は興奮性に働く場合があり [62–64]、嗅内野からの投射先の抑制性細胞が錐体細胞に対して作っているシナプスが刺激強度が上がるにつれて抑制性から興奮性に変化したと考える。これらの可能性のいずれが正しいのか、あるいは複合的な結果であるのかは今回の結果から断定するのは難しく、これらの仮説の特徴を踏まえた検証実験が必要である。

またこれ以外に、海馬刺激によって聴覚経路中の大脳皮質より下位の部位が影響を受けた可能性も考えられる。音刺激は内耳の蝸牛で神経活動に変換され、蝸牛神経核、上オリブ核、外側毛帯核、下丘、内側膝状体を経て大脳新皮質聴覚野に到達することが知ら

れている。しかし、海馬からこれら皮質下の各部位への直接投射は知られていないことから、大脳皮質より下位の部位への海馬刺激の影響が今回の現象の原因である可能性は低いと考える。

なお、今回の結果では観測領域の腹側より背側に海馬刺激の効果が強く表れた。この理由として、腹側には一次聴覚野 (AI) の腹側にあるとされる VRB 領域 [29] からの応答が含まれていた可能性が挙げられる。海馬 CA1 や嗅内野から VRB への投射は特に知られていないため、VRB では海馬刺激の影響が小さく、結果として観測領域腹側における海馬刺激の効果を弱めたという仮説が成り立つ。Wallace らは AI に比べ VRB では潜時が約 10 ms 遅れるということを報告 [29] しており、これも図 4.6A の潜時分布と一致する。しかし、AI は今回定義した背側領域よりもかなり広いことや、Wallace らがスパイクによって潜時を計算しているのに対し光計測では EPSP の潜時であり結果が一致するとは限らないことから、背側も腹側も AI であり AI 内部に 2 種類の EPSP 潜時の分布が存在した可能性もある。その場合は海馬からの投射が腹側よりも背側でより強く結合していると考えられる。

今回の結果により、海馬から嗅内野を介した大脳皮質への経路の性質の一部が明らかになり、この系が記憶の長期的な固定に実際に関与していることが示唆された。ただし、今回の現象の神経生理学的基盤の同定や、実際に海馬の活動によって皮質内に LTP, LTD などのシナプス可塑性が生じるかどうかの検証は今後の課題である。

## 第 5 章

# 大脳皮質聴覚野可塑性の光計測

本章では、まず大脳皮質聴覚野の可塑性を膜電位光学計測法によって調べる目的を述べる。次に、大脳皮質の可塑性と、本実験で可塑性を誘導するために使用した古典的恐怖反応条件付けに関するこれまでの研究についてまとめる。そして、実験方法および実験結果を説明し、最後に本実験の結果から示唆される大脳皮質可塑性の性質について考察する。

### 5.1 実験目的

大脳皮質感覚野では末梢感覚器からの情報が空間的に表現されている。特に、2.2 節に述べたように大脳皮質聴覚野の空間表現は周波数局在として存在していることが多くの動物種で確かめられている。

Recanzone らはサルに周波数弁別課題を行なわせると大脳皮質一次聴覚野の訓練周波数に対応する領域が拡大することを示している [65]。この実験では数ヶ月に渡って訓練を行なっているが、Weinberger らは音と電気刺激による古典的条件付けを行なうと、数十分から数時間で大脳皮質聴覚野細胞の受容野が大きく変化することを示した。このような受容野変化が短時間のうちに大脳皮質聴覚野の多くの細胞に生じた場合、空間的な周波数局在の変化として検出されると考えられる。しかし、一般に微小電極を用いた大脳皮質聴覚野で周波数局在を短時間で決定するのは困難であり、古典的条件付けによって短時間に周波数局在が変化するかどうかは知られていない [66]。

そこで本研究では、光計測法は一定領域内の多数の細胞の活動を同時に記録することができる、膜電位感受性色素を用いた光計測法によって、大脳皮質の可塑性の性質やメカニズムを調べることを目的とした。

光計測法では振動が大きな雑音源となるため、計測および条件付けを麻酔下で実施する

必要がある．麻酔下で条件付けに関しては，Edeline らがケタミン麻酔下で音と電気刺激による恐怖反応条件付けが生じることを示しており [67]，そこで本実験でも同様の条件付けプロトコルを採用した．そして，条件付けを行なう前後で大脳皮質聴覚野の応答を膜電位光学計測法で記録し，条件付けによる聴覚野の可塑的变化を検討した．

## 5.2 関連研究

### 5.2.1 大脳皮質聴覚野の可塑性

大脳皮質が個体の発達期に大きな可塑性を生じることが古くから知られていたが，成熟個体になってからも大きな可塑性を生じうることで様々な手法を用いて明らかになっている．ここでは，成体動物の大脳皮質聴覚野における可塑性についての代表的な研究のうち，本実験と関連の深い研究を中心に説明する．

#### 訓練による周波数局在の変化

Recanzone らはヨザル (owl monkey) を使い接近した 2 種類の周波数の音に対する弁別課題を数週間に渡って訓練し，訓練後に 70-258 箇所から微小電極によりスパイクを記録して一次聴覚野を決定した [65]．訓練周波数の皮質応答領域，同調の強さ，応答潜時を訓練個体と非訓練個体で比較した結果，訓練個体の方がいずれも増加した．また，これらのなかで皮質応答領域のみに課題成績との相関が見られた．これは課題訓練を行なうことで霊長類の成熟個体の一次聴覚野の周波数局在が変化し，訓練された周波数に対する認知が鋭敏になることを示唆している．

#### 古典的条件付けによる受容野可塑性

Weinberger らは音と電気刺激による古典的条件付けを行ない，条件付け前後の大脳皮質聴覚野の単一細胞の受容野解析を行なった [68]．その結果，条件付けによって細胞受容野が大幅に変化し，細胞の最適周波数 (BF) が条件付け周波数へと移動する場合もあることを示した (図 5.1)．この受容野変化は連合性で，音と電気刺激をペアリングせずに与えても受容野変化は生じず，この場合には全ての周波数に対して一般的な応答増加が生じる [69]．さらに，この受容野変化はわずか 5 回の条件付け試行でも生じ [70]，最長で 8 週間持続することが報告されている [71]．

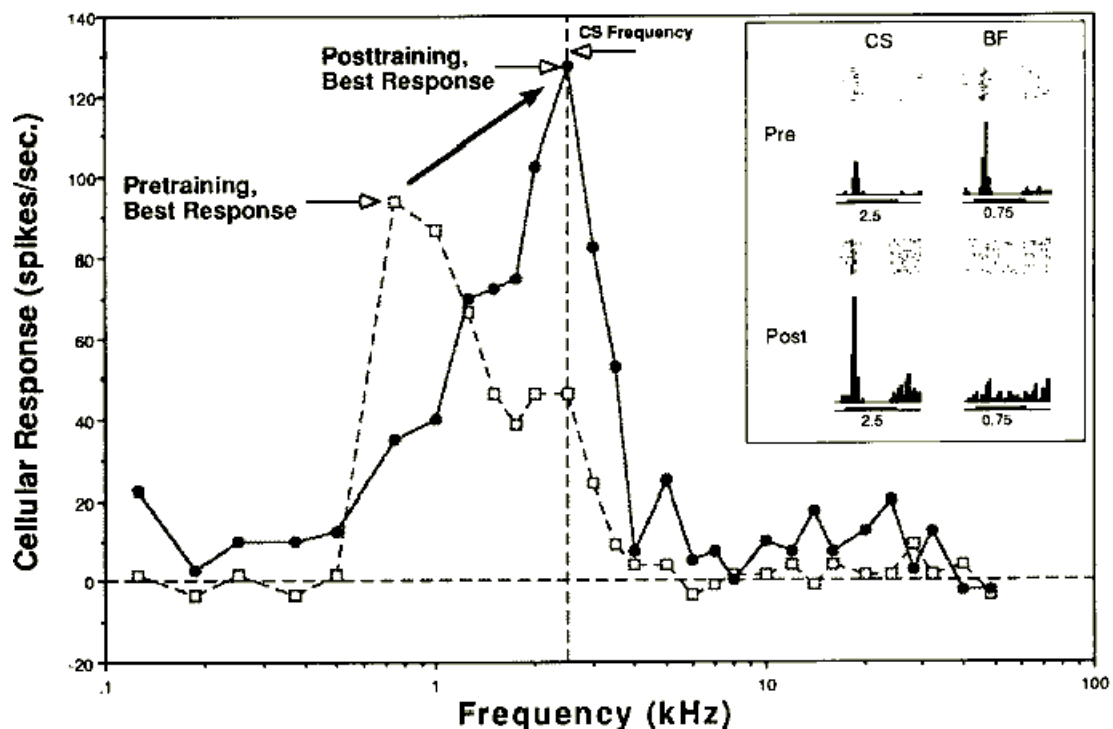


図 5.1 大脳皮質聴覚野の受容野可塑性 [72]

#### 古典的条件付けによる受容野可塑性の神経基盤

Weinberger らは、このような大脳皮質聴覚野の可塑性が起きる神経基盤として図 5.2 のようなモデルを提唱している [73]。このモデルには聴覚網様経路，聴覚非網様経路，コリン作動性神経修飾系の三種類の皮質下の系が含まれている。聴覚網様経路にある内側膝状体腹側部 (MGv) は大脳皮質一次聴覚野の IV 層に直接投射を送っている。蝸牛からの周波数局在構造を維持し，地理的対応を保ったまま一次聴覚野へ投射しているため，一次聴覚野の周波数局在の基礎を与えている。この MGv では受容野可塑性はほとんど生じないか，生じても 1 時間以下しか持続しない過渡的な可塑性である [74]。このため，大脳皮質聴覚野における長期の受容野可塑性への関与は小さいと考えられる。聴覚非網様経路の内側膝状体大細胞部 (MGm) では明瞭な周波数局在はなく，大脳皮質一次聴覚野および周囲の大脳皮質聴覚領域へ広範に投射を送っており，層別の分布では I, II, VI 層への投射が多い。MGm は聴覚と体性感覚の両方の刺激に応答する。また条件付けによって条件刺激に用いた音に特異性のある受容野可塑性を生じ，また長期間持続する [75]。コリン作動性神経修飾系である大脳基底核は，大脳皮質に対しアセチルコリン性の投射があり，学習に

おける重要性が示唆されている。実際に、音と大脳基底核への30回の刺激を行なうと受容野可塑性が生じ [76]，24時間以上持続する [77]。

なお，図 5.2 にも含まれている扁桃体 は音と電気刺激による条件付け学習における記憶の座と考えられているが，これについては 5.2.2 節で述べる。

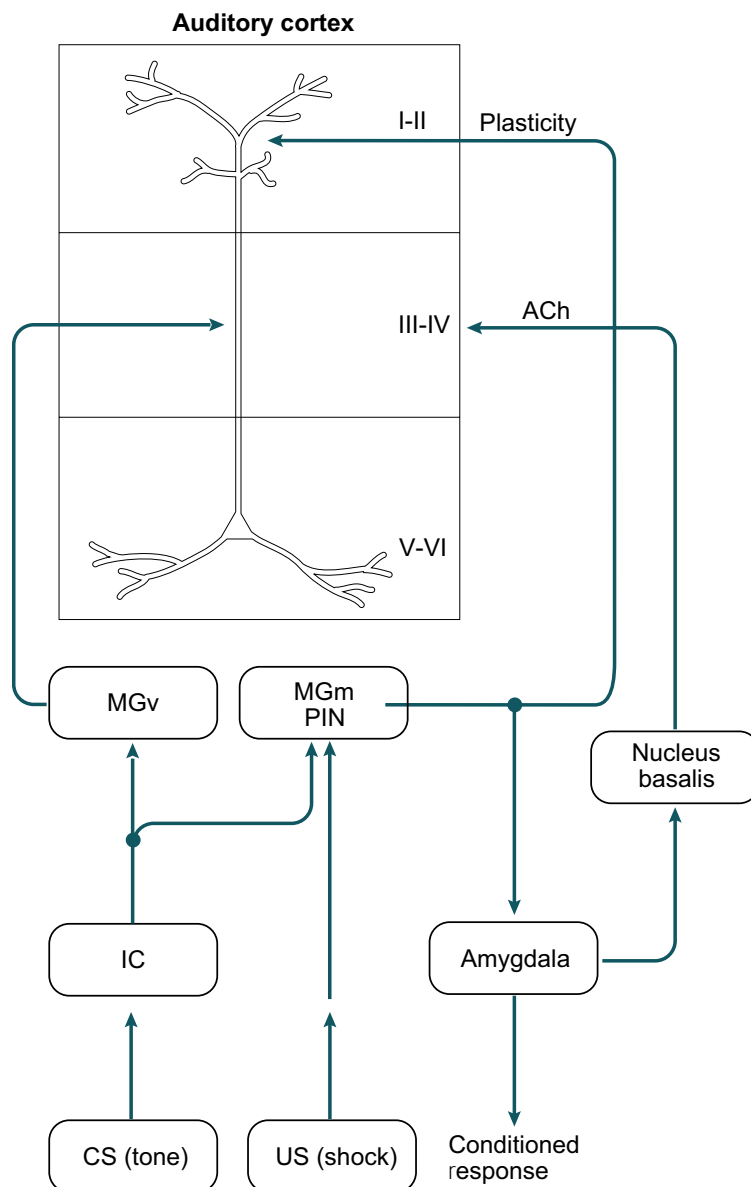


図 5.2 大脳皮質聴覚野受容野可塑性の神経基盤のモデル [66]

## 周波数局在の可塑的变化

Kilgard らはラットに対して音と大脳基底核電気刺激のペアリングを 20~25 日間に渡って毎日 300~500 回行なった [78]。ペアリング後、大脳皮質一次聴覚野の 70~100 地点に電極を刺入し、各地点で 15 種類の音圧と 45 種類の純音周波数を用いて同調曲線を同定した。図 5.3 のように、ペアリング周波数 (9 kHz) に対応する領域がペアリングによって拡大した。さらに、192 免疫グロブリン G-サポリンを注入して大脳基底核を破壊すると、ペアリングによる周波数表現の変化は生じなかった。

なお、同様の周波数地図の変化が報酬系の刺激によって生じることも報告されている。Bao らは音と腹側被蓋野への電気刺激のペアリングをラットに 20 日間に渡って行なった [79]。ペアリングを行わない群に比べ、ペアリングを行なった群の大脳皮質聴覚野の領域が統計的に有意に大きかった。特に、ペアリング周波数に対応する領域が大きくなり、逆にペアリング周波数に近い他の周波数の領域は小さかった。腹側被蓋野から大脳皮質へはドーパミン性の投射が知られている。この実験ではドーパミン  $D_1$  受容体の拮抗薬である SCH-23390 とドーパミン  $D_2$  受容体拮抗薬 eticlopride をペアリング 30 分前に投与した。

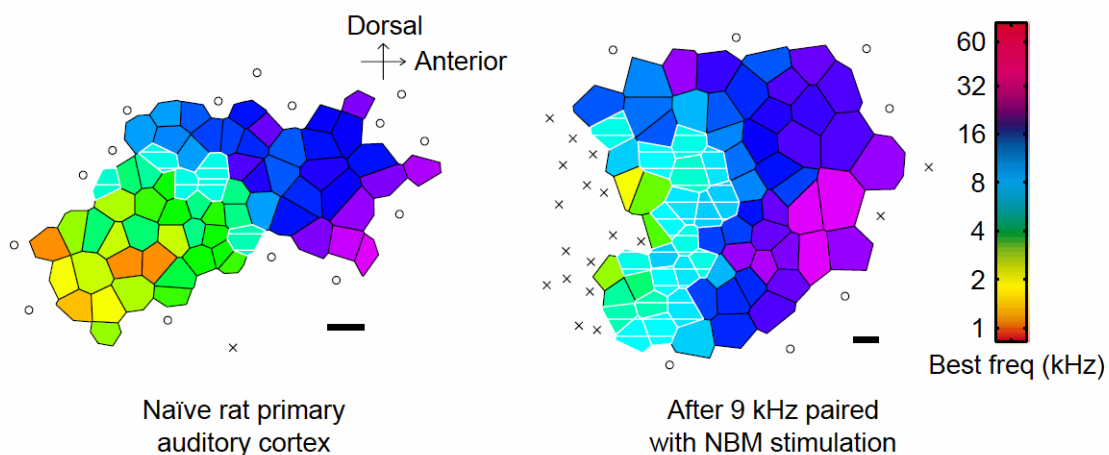


図 5.3 大脳皮質聴覚野の周波数地図の再構成 [78]

このように聴覚野を含め、視覚野、体性感覚野などの大脳皮質領域において、成熟個体になってからも可塑的变化が生じることが報告されている。この大脳皮質の可塑的变化の細胞レベルでの機序として、シナプス可塑性が有力視されている [60]。大脳皮質のスライ

ス標本ではテタヌス刺激やシータバースト刺激などのプロトコル LTP や LTD が生じることが報告されている。

### 5.2.2 音と電気刺激による古典的恐怖反応条件付け

#### 古典的恐怖反応条件付けの特徴

古典的恐怖反応条件付けは，恐怖反応を無条件反応 (unconditioned response ; UR) を反射的に引き起こす無条件刺激 (unconditioned stimulus ; US) を条件刺激 (conditioned stimulus ; CS) を同時に提示することで恐怖に関連した様々な条件反応 (conditioned response ; CR) を生じる，古典的条件付けの一種である．

恐怖反応条件付けのなかでも，音と電気刺激を組合せた恐怖反応条件付けは情動学習の実験モデルとして詳しく研究されてきた．恐怖反応条件付けには，数回から数十回の少ない回数の試行で短時間に成立し，長時間持続するという特徴があり，実験上の様々な操作を加え易いという利点がある．また，音と電気刺激による古典的条件付けではすくみ行動 (freezing)，跳ね上がり反射 (startle reflex)，飲水量などの行動変化や，心拍，血圧，呼吸回数などの自律神経系の変化など多様な条件反応を生じるが，これらを定量化する方法も確立されている．

#### 音と電気刺激による恐怖反応条件付けの学習の座としての扁桃体

大脳辺縁系の一部である扁桃体は，古くから情動に関与する部位であることが示唆されていたが，近年の様々な実験結果は，扁桃体が音と電気刺激による恐怖反応条件付けにおける学習の場であることを強く支持している．

扁桃体は多くの核で構成されているが，恐怖反応条件付けにおける機能から二種類に分類することができる [80]．ひとつは外側核 (lateral nucleus ; LA)，基底外側核 (basolateral nucleus ; BL)，基底内側核からなる基底外側部 (basolateral complex ; BLA) である．基底外側核は基底核 (basal nucleus)，基底内側核は副基底核 (accessory basal nucleus) とも呼ばれる．基底外側部は扁桃体の感覚情報入力を担当する部位と考えられており，実際，LA は聴覚経路の内側膝状体内側部 (MGm) と [81] と大脳皮質聴覚野から投射を受けている [82]．また，基底内側核は聴覚の入力は受けていないが，海馬から入力を受けており後ほど述べる状況恐怖条件付けに関与している [82]．BLA の選択的破壊によって恐怖反応条件付けの獲得と発現の両方が阻害され，刺激の感覚種に依存しないことが知られている [83]．BLA の中でも LA は恐怖反応条件付けに必須と考えられている [84]．

もうひとつは中心核 (CE) で，これは恐怖反応を出力するための部位であると考えられている．この中心核の切除で様々な恐怖反応条件付けが減弱もしくは消失することが確認

されている。ラットを用いた実験によると、血圧や跳ね上がり反射、超音波有声音、すくみ行動の条件反応の獲得と発現が扁桃体切除によって阻害される。また、CE から投射されている各部位は、異なる条件反応の発現に関与している。LeDoux らはラットの扁桃体の CE から投射を受けている視床下部 (LH) や中脳灰白質 (CG) を電気的あるいはイボテン酸の注入によって破壊し、音と電気刺激による条件付けにおける破壊の効果を、すくみ行動と血圧変化を指標として検討した [85]。それによると、LH の破壊は血圧の条件反応を阻害したがすくみ行動には影響しなかった。逆に、CG の破壊は血圧には影響しなかったが、すくみ行動の条件反応を阻害した。なお、能動的な逃避行動では扁桃体中心核ではなく扁桃体基底核が必須であると報告されている [84]。これまでの知見をもとに、恐怖反応条件付けにおける扁桃体の位置付けを中心とした情報伝達の経路を図 5.4 に示した。

多くの証拠から、音と電気刺激による恐怖反応条件付けにおいて扁桃体は必須の部位であると考えられているが、全ての恐怖反応の条件付けに扁桃体が必要というわけではないことも報告されている。例えば、音ではなく動物が置かれた環境と電気刺激の間で条件付けを行なう場合、扁桃体基底外側部を破壊しても条件付けが成立し [86]、海馬の重要性が指摘されている [87]。このことは、恐怖反応条件付けが多くの部位の関与する複雑な現象であり、さらに、条件付けの手法の違いによってこれらの部位の役割が変化することを示している。

#### 恐怖反応条件付けへの海馬の関与

音と電気刺激による条件付けを行なった際に、同時に動物が置かれた環境に関しても条件付けが成立していることが知られており、状況恐怖条件付け (contextual fear conditioning) と呼ばれる。この状況恐怖による条件付けには海馬が関与している可能性が指摘されている。

ラットで状況恐怖条件付けを行ない 1 日後に海馬を破壊すると状況恐怖の条件付けが消去されるが、音に対する恐怖条件付けには海馬破壊は影響しない [87]。条件付け後 28 日経過して海馬破壊をしても状況恐怖の条件付けは影響を受けることから、海馬に一時的に状況恐怖の記憶が貯蔵されていると考えられる。また、条件付け前に海馬を切除すると状況恐怖の条件付けは選択的に阻害されるが、音に対する恐怖条件付けは影響を受けない。

状況恐怖の条件付け以外に、音の条件付けにおいて CS と US の間に時間差を入れる経時的恐怖条件付け (trace fear conditioning) においても海馬の関与が示唆されている。ラットのすくみ行動 [88] やウサギの心拍数 [89] を指標として経時的恐怖条件付けを行なうと、これらが海馬の破壊によって阻害されることが報告されている。さらに、ウサギの経時的条件付けでは、条件付けが成立すると CS 音単独で提示した際にも US 音が提示さ

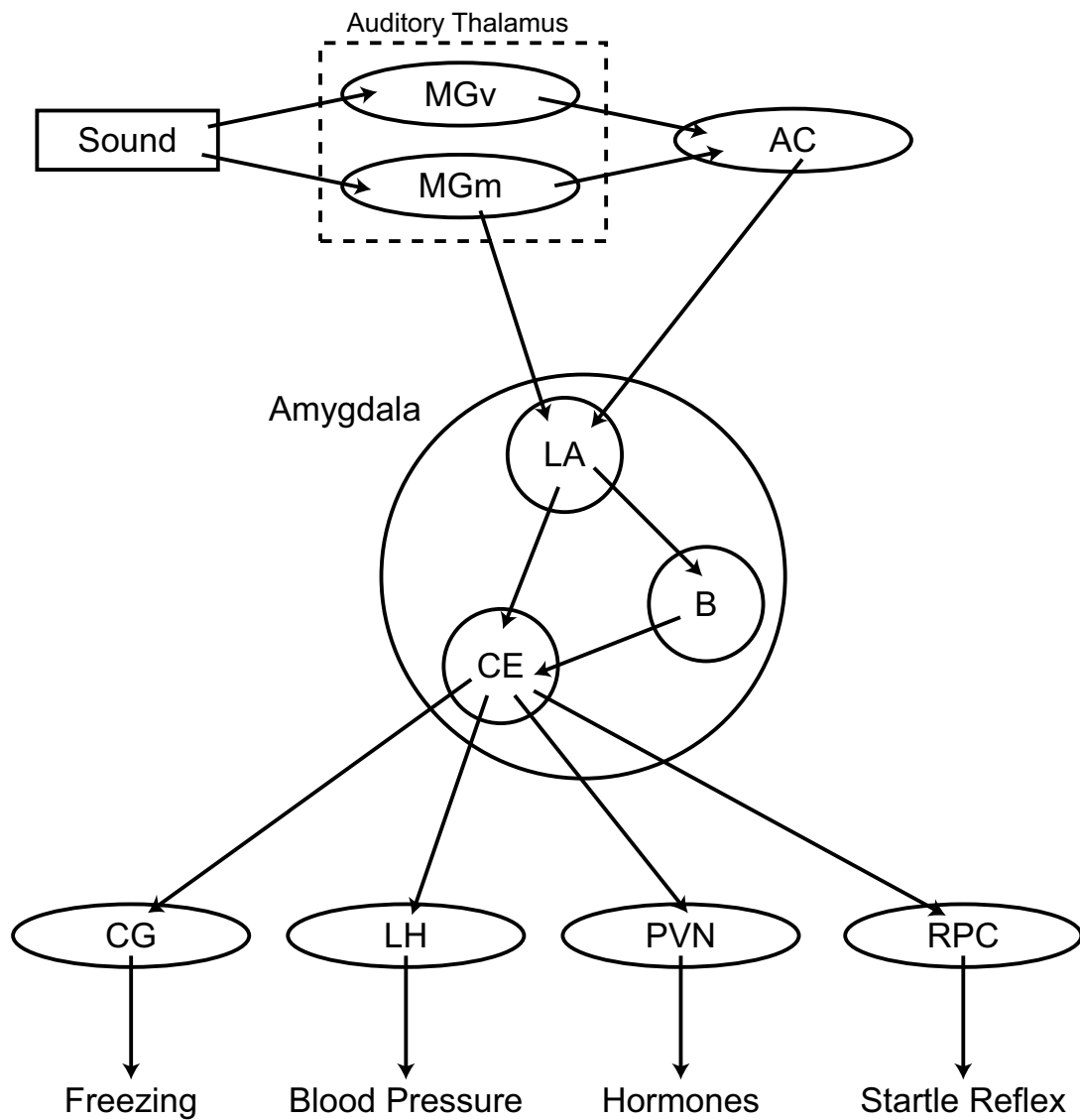


図 5.4 扁桃体を中心とした恐怖反応条件付けの神経基盤。

MGv: 内側膝状体腹側部, MGm: 内側膝状体内側部, AC: 大脳皮質聴覚野, LA: 扁桃体外側核, B: 扁桃体基底核, CE: 扁桃体中心核, CG: 中心灰白質, LH: 視床下部外側部, PVN: 視床下部室傍核, RPC: 橋毛様体尾部

れていた時刻に海馬 CA1 の細胞の活動が高まることが示されている [90] .

### 大脳皮質聴覚野の役割

5.2.1 節で述べたように、音と電気刺激による古典的恐怖反応条件付けを行なうことによって、大脳皮質聴覚野の細胞には大きな受容野可塑性が生じる。しかし既に述べたように、この恐怖反応条件付けの学習の座が大脳皮質聴覚野ではなく扁桃体であることが多くの研究によって指摘されている。実際、大脳皮質聴覚野が無くても恐怖反応条件付けが成立することが報告されている。LeDoux らは、ラットの大脳皮質聴覚野、内側膝状体のいずれかを電気破壊し、その後音と電気刺激による恐怖反応条件付けを行なった [81]。そして、電気刺激を伴わないテスト刺激を用いて血圧、心拍、すくみ行動、飲水抑制の各条件応答を評価すると、大脳皮質聴覚野を破壊したラットではこれらのいずれの条件応答も影響を受けなかった。一方、内側膝状体を破壊したラットではこれらの条件応答は失われたが、無条件刺激である電気刺激を行なった時の無条件恐怖反応は生じず、大脳皮質聴覚野が存在しなくても、条件付けが成り立つことが分かる。

ただし、これは大脳皮質聴覚野が恐怖反応条件付けに全く関与していないことを意味しているわけではない。Romanski らは視床—大脳皮質聴覚野—扁桃体の経路と視床—扁桃体の経路のいずれかが存在すれば、恐怖反応条件付けが成り立つことを報告している [91]。

また、音の弁別が必要な場合には大脳皮質聴覚野が必要であるという報告もある。Jarrell らはウサギに電気刺激と対で提示する音 (CS+) と単独で与える音 (CS-) を用いて条件付けする differential conditioning を行なった [92]。そして、条件付け後に内側膝状体腹側部 (MGv)、内側膝状体内側部 (MGm)、大脳皮質聴覚野のいずれかを破壊し、その影響を心拍変動を条件反応として調べている。その結果、MGv を破壊したウサギでは条件付けが生じたが、MGm と大脳皮質聴覚野を破壊したウサギでは条件付けが阻害された。これは既に紹介した Recanzone らの研究 [65] と整合性がある結果と言える。

しかし、Armony らは大脳皮質聴覚野が無くても、恐怖反応条件付けにおける音の弁別能は影響を受けないという結果を報告している [93]。Armony らは大脳皮質聴覚野、扁桃体、MGv、MGm を含んだニューラルネットワークモデルを用いてシミュレーションを行ない、大脳皮質聴覚野をモデルから取り除いても条件反応の CS 音周波数に対する特異性が残ることを示している。この研究ではさらに、大脳皮質聴覚野を破壊したラットを用いて同様に条件反応の周波数依存性を調べ、CS 音周波数に対する特異性が残っていることも報告している。このように Armony らと Jarrell らでは結果に相違があるが、動物種の違いや実験手法の違いなどがあり単純に比較はできない結果である。大脳皮質聴覚野が音の弁別に関わっている可能性は高いが、音の弁別を必要とする恐怖条件付け時に必須であ

るかどうかは，さらなる検証が必要と考えられる．

また，大脳皮質聴覚野は恐怖反応条件付けの消去 (extinction) に関与しているという報告もある．Teich らは音と眼窩電気刺激による恐怖反応条件付けを用い，大脳皮質聴覚野を破壊したウサギと大脳皮質視覚野を破壊したウサギで心拍変動による条件反応の消去過程を観察した [94]．すると，大脳皮質視覚野を破壊したウサギでは条件反応は一週間で消失したが，大脳皮質聴覚野を破壊したウサギでは条件反応が減弱してはいくものの，消失はしなかった．これは大脳皮質聴覚野が恐怖反応条件付けの消去に必要であることを示している．

ここまで述べたように，大脳皮質聴覚野は音による恐怖反応条件付けに必須ではないものの一定の役割を果たしており，特に音の弁別や条件付けの消去にはより重要な働きを行なっているものと考えられる．

### 5.3 実験方法

ここでは，外科手術，条件付け学習，光計測，データ解析の方法について述べる．実験システムについては，3 章で説明している部分は省略した．また外科手術についても，5 章と重複する部分の記述は省略した．

#### 5.3.1 予備実験

本実験の条件付け手順によって条件付けが成立するかどうかを確認するため，事前に予備実験を行なった．予備実験では，ケタミン麻酔下において音と電気刺激を行ない，その時の心電図を記録した．音刺激とその直後の電気刺激を 1 回の条件付け試行とし，これを 90 ～120 s の間でランダムな時間間隔をおいて 70 回行なった．音刺激には 4 kHz の純音 (音圧: 65 dB SPL, 持続時間: 5 s) を用いた．また，電気刺激は両後足から幅 5 ms のパルスを 60 Hz の繰返し周波数で 0.5 s 与えた．電流強度は最初の 30 回は 0.5 mA とし，残りの 40 回は 1.5 mA とした．条件付け終了後，動物が麻酔から回復したことを確認して飼育用ケージに戻した．翌日テスト条件として，条件付け時に用いたのと同じ音を単独で，90 ～120 s の間のランダムな時間間隔をおいて 10 回提示し，この時の心電図を記録した．

記録された心電図の解析は次のように行なった．まず，各記録ごとに閾値を設定して R 波のピークを検出した．次に，図 5.5 のようにコントロール区間 (Control, 5 s)，音区間 (Sound, 5 s)，電気刺激後区間 (After Shock, 5 s) の 3 つの区間を定義し，各区間内で，心拍間隔 (inter beat interval ; IBI) を算出した．さらに，条件付け試行 10 回を 1 ブロックと定義し各区間の IBI をブロック毎に計算した．IBI の変動を確認するため， $n$  回目のブロックにおけるコントロール区間の平均 IBI を  $C_n$ ，音刺激区間の平均 IBI を  $S_n$ ，電気刺激後区間の平均 IBI を  $E_n$  とし，音刺激区間の IBI 変動  $\Delta S_n$  と電気刺激後区間の IBI 変動  $\Delta E_n$  を  $\Delta S_n = S_n - C_n$ ,  $\Delta E_n = E_n - C_n$  とし算出した．

#### 5.3.2 外科手術

実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインおよび玉川大学の「動物実験に関する指針」に則って行なった．実験対象には 6 匹のメスのモルモット (Hartley, 3～4 週齢) を使用した．実験中は動物用ブランケットシステム (MK-900, 室町器械) を用いて，動物の体温を 37℃ に維持した．手術中はケタミン (20 mg/kg) とキシラジン (10 mg/kg) の混

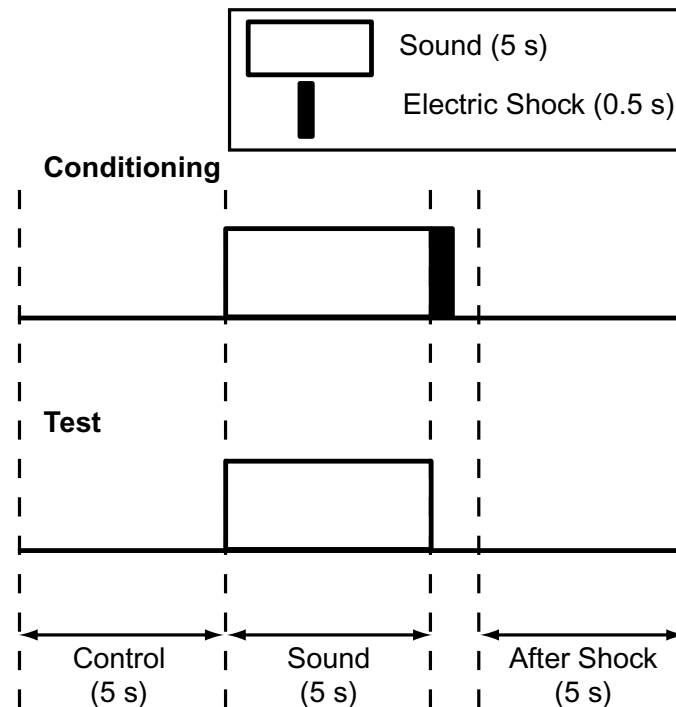


図 5.5 予備実験における心拍解析区間

合麻酔（初回のみ 2 倍量，1 時間毎）を筋肉注射により投与した。

気管切開および大脳皮質聴覚野の染色は 4.3 節で述べた手順と同様に行なった。

そして，まず条件付け前の純音に対する聴覚野応答を光計測により記録した．その後，音と電気刺激による条件付けを行ない，再び条件付け後に聴覚野応答の光計測を行なった．計測および条件付け中はケタミン (30 mg/kg) を 40 分ごとに腹腔に投与した．計測終了後は動物にペントバルビタールを大量投与し，心停止を確認した．

### 5.3.3 条件付け学習

本研究では条件付け刺激 (CS) に音，無条件刺激 (US) に電気刺激を用いる恐怖反応条件付けを行なった．実験には，条件付け群 (pair-conditioned group,  $n = 3$ ) 以外に，音と電気刺激の回数が同一で条件付けが成立しない対照群である疑似条件付け群 (pseudoconditioned group,  $n = 3$ ) を用意した．CS は持続時間 5 s で周波数が 12 kHz の純音とし，US である後ろ足への電気刺激は持続時間 0.5 s で電流強度を 0.5 ~ 1.5 mA とした (図 5.6)．条件付け群では音の直後に電気刺激を行ない，これを 1 試行として合計 70 試行を行なった．試行と試行の間隔は 60 s ~ 120 s の間でランダムとした．疑似条件付

け群では，条件付けが成立しないようにするため，条件付け群とは逆の電気刺激の後に音という順序にし，電気刺激と音の間隔，音と電気刺激の間隔は全て 30 s~60 s でランダムとした．音と電気刺激の提示回数は条件付け群と同様にそれぞれ 70 回とし，また全試行にかかる時間も条件付け群の約 2 時間とほぼ同じになるようにした．

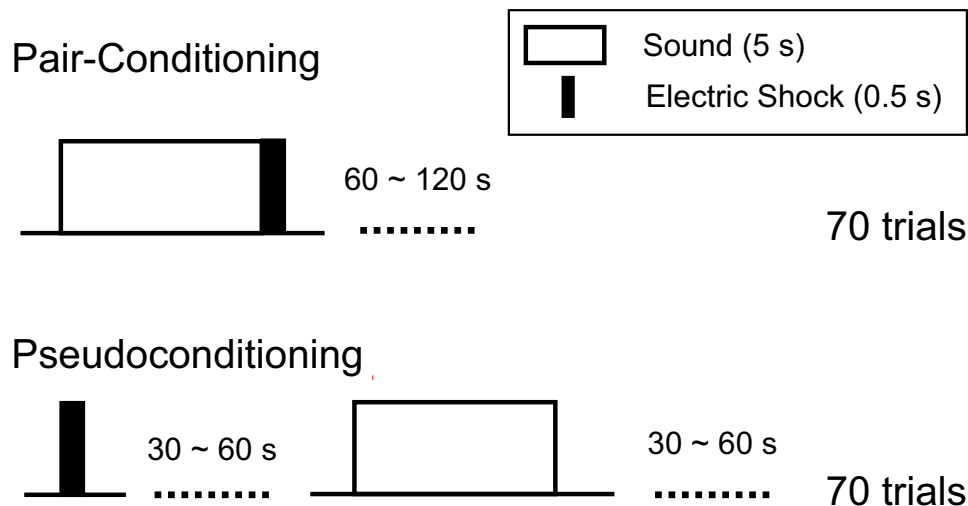


図 5.6 条件付けパラダイム

音刺激波形は MATLAB (Version 6.5, Mathworks) により生成した．生成した波形データは PC に装着した DA 変換ボード (PCI-3337, Interface) を通じてアナログ信号として出力した．この信号を，アッテネータを (PA5, Tucker-Davis Technologies) を通じて高周波用スピーカ (ED1, ES1:1041, Tucker-Davis Technologies) から出力し，動物の右耳に提示した．

刺激電極は銀皿電極に導電性ペーストを塗り両後ろ足に取り付けた．電気刺激は電気刺激装置 (SEN-7203, 日本光電) を用いて 5 ms 幅のパルスを 60 Hz で 0.5 s の長さで生成し，アイソレータ (SS-202J, 日本光電) を通じて電流刺激として行なった．電流強度は，0.5~1.5 mA の範囲で電気刺激時に動物が足を動かす最低限度の強さとした．

実験中は心電図によって動物の状態を監視した．また，条件付け中は心電図を記録し，電気刺激が適切に行なわれていることを心拍変動においても確認した．

### 5.3.4 光計測

光計測は条件付けの前に行なった．周波数が 8 kHz, 12 kHz, 16 kHz の純音 (持続時間 30 ms, 音圧 65dB SPL) を使用し，聴覚野からの応答を記録した．

脳表面からの蛍光シグナルは、100 x 100 チャンネルの MOS 型撮像デバイスを使用した光計測システム (MiCAM ULTIMA, BrainVision) で記録した。

光計測は各画像のサンプリングを 2 ms 間隔で行ない、十分な S/N を得るため 16 回の加算平均を行なった。

### 5.3.5 データ解析

記録された光計測データに対して、次のような処理を行なった。まず、背景蛍光強度の違いを補正するため蛍光強度変化  $\Delta F/F$  を計算した。次に、心拍同期成分を除くため各音刺激に対するデータから無音時のデータを減算した。最後に、ショットノイズ等を除去するため、 $3 \times 3$  の空間メディアンフィルタを使用した。

本研究では条件付けの効果を応答面積で比較したが、その面積の算出は次の手順で行なった。まず、音刺激によって応答潜時が異なるため、各データごとに応答のピーク時刻を求め、もっとも多くの点がピークとなった時刻の画像、そのデータを代表する画像とした。次に、主に音刺激の種類による応答の違いを補正するため、半値幅の意味で代表画像内での最大値の 50 % を閾値とし、この閾値を越えた画像領域の面積を、このデータの応答面積とした [95]。

音と電気刺激による条件付けによって聴覚野の応答面積に有意な変化が生じたかどうかを確かめるため、次の手順で統計的検定を行なった。まず、測定領域や染色の程度などの原因によって個体間での応答面積の違いが非常に大きいことから、各個体、各音刺激ごとに条件付け後の応答面積を条件付け前の応答面積で割り、面積変化率を算出した。次に、条件付け群と疑似条件付け群および音刺激を CS(12 kHz) と NonCS(8 kHz, 16 kHz) の 4 通りの組合せを一つの要因とし、個体をもう一つの要因として繰り返しのない Two-way ANOVA を行なった。多重比較は有意水準を 95 % として Tukey の HSD を行なった。統計解析には R [96] を用いた。

## 5.4 実験結果

### 5.4.1 条件付けの確認

今回用いた条件付け方法により条件付けが生じることを確認するため、5.3.1 に述べた手順で予備実験を行なった。各ブロックでの IBI 変動を条件付け時 (白抜きの記号) とテスト時 (黒塗りの記号) について示したのが図 5.7 である。四角は  $\Delta S_n$ 、三角は  $\Delta E_n$  を表しており、IBI 変動が正の時はコントロール区間に比べて心拍が遅くなったことを、負の時は速くなったことを示している。まず条件付け時では、 $\Delta S_n$  の変動は 0 の周りで小さく音を提示している際に心拍変動がほとんどないことを意味している。しかし、 $\Delta E_n$  は負の値になっており、電気刺激によって心拍が速くなったことを示している。この心拍増加はブロックが進むと徐々に小さくなり、慣れが生じていると考えられる。30 回目の条件付け試行において電気刺激強度を 0.5 mA から 1.0 mA に上げると再び心拍が速くなり、その後また徐々に心拍変動が小さくなっていく。

テスト時では、 $\Delta S_n$  はやはり小さいが、電気刺激を行なっていないにもかかわらず  $\Delta E_n$  は正の大きな値を持ち、心拍が遅くなっていることが分かる。これは、音の後に電気刺激が与えられることを動物が学習したためであると考えられる。心拍が速くならずに遅くなる理由は、慣れの作用が電気刺激によって生じる心拍増加を抑えるように働いており、電気刺激が実際には与えられなかったために心拍を遅くしていると解釈できる。この結果から、本実験の条件付け手順によって条件付けが生じることが分かった。

### 5.4.2 周波数局在性

まず、モルモットの大脳皮質聴覚野の周波数局在を確認するため、8 kHz, 12 kHz, 16 kHz の各純音に対する聴覚野の神経活動を光計測法で観測した。図 5.8 上の 3 枚の画像は、各周波数ごとの応答を実験方法で述べた代表画像で示したものである。周波数局在を明瞭にするため閾値を最大応答の 60 % とし、閾値を越えた部分は蛍光変化率をカラーバーに示される疑似カラーに変換して表示した。また、閾値を越えなかった部分は背景光強度をグレースケールで表示した。左聴覚野を計測しているため、図の左側が吻側、上側が背側となる。図中の白線の長さは 2 mm を、各画像の下括弧内の数字は音刺激提示からの経過時刻を表す (図 5.9, 5.12 も同様)。図 5.8 下のグラフは応答波形の例で、8 kHz の画像中に黒矢印で波形の記録された位置を示した。

モルモットの大脳皮質聴覚野では吻側に A 野、尾側に DC 野という周波数局在領域が

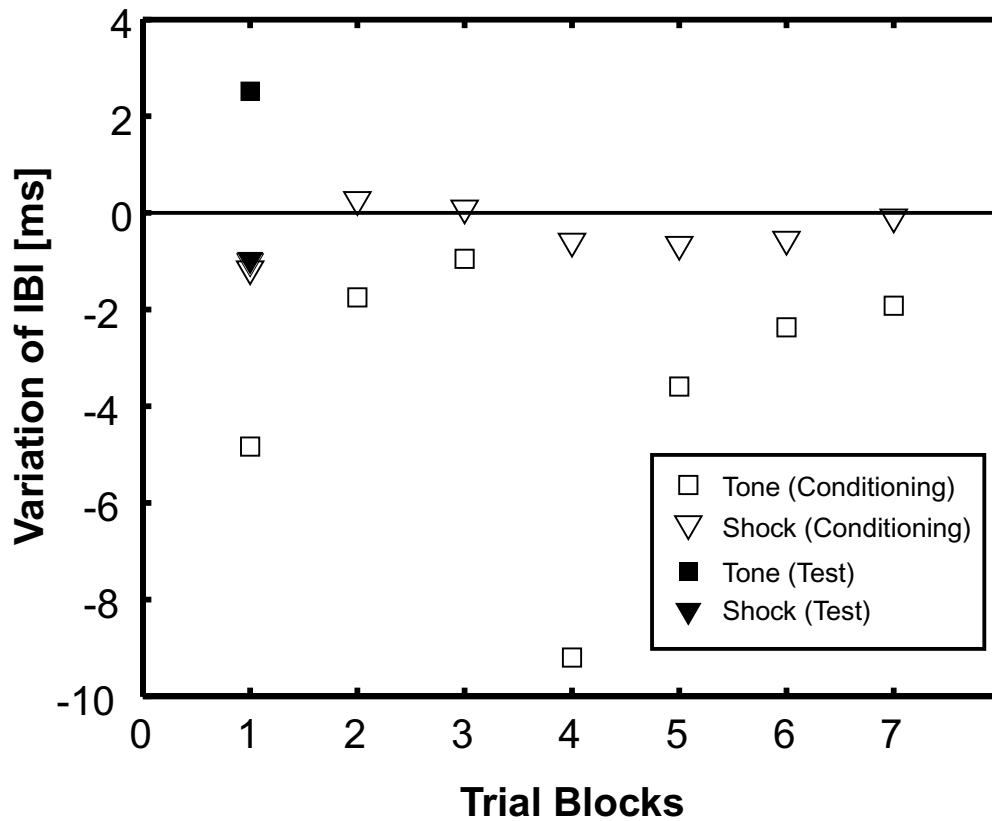


図 5.7 心拍変動による条件付けの確認

存在することが微小電極法によって調べられている [28, 29]。これらの領野の周波数局在は、吻側から尾側に向かって、A 野では低周波から高周波に強く応答する細胞が並び、逆に DC 野では高周波から低周波に対応する細胞が配列するという形で存在している。図 5.8 の結果はこのような A 野と DC 野の鏡像対称の周波数局在を示しており、過去の微小電極法による結果 [28, 29] および光計測法による結果 [30] とほぼ一致している。また図 5.8 に示した応答波形は 16 kHz に対応する領域付近のものであるため、16 kHz に対する応答が最も強く、周波数が 16 kHz から離れるにしたがって応答が弱くなっている。

### 5.4.3 条件付け群

本実験では条件付けによる聴覚野応答の変化を調べるため、条件付けの前後において 8 kHz, 12 kHz, 16 kHz の音に対する聴覚野応答を光計測法により記録した。図 5.9 は、条件付け群のある個体における条件付け前後の各純音に対する聴覚野応答を、実験方法に述

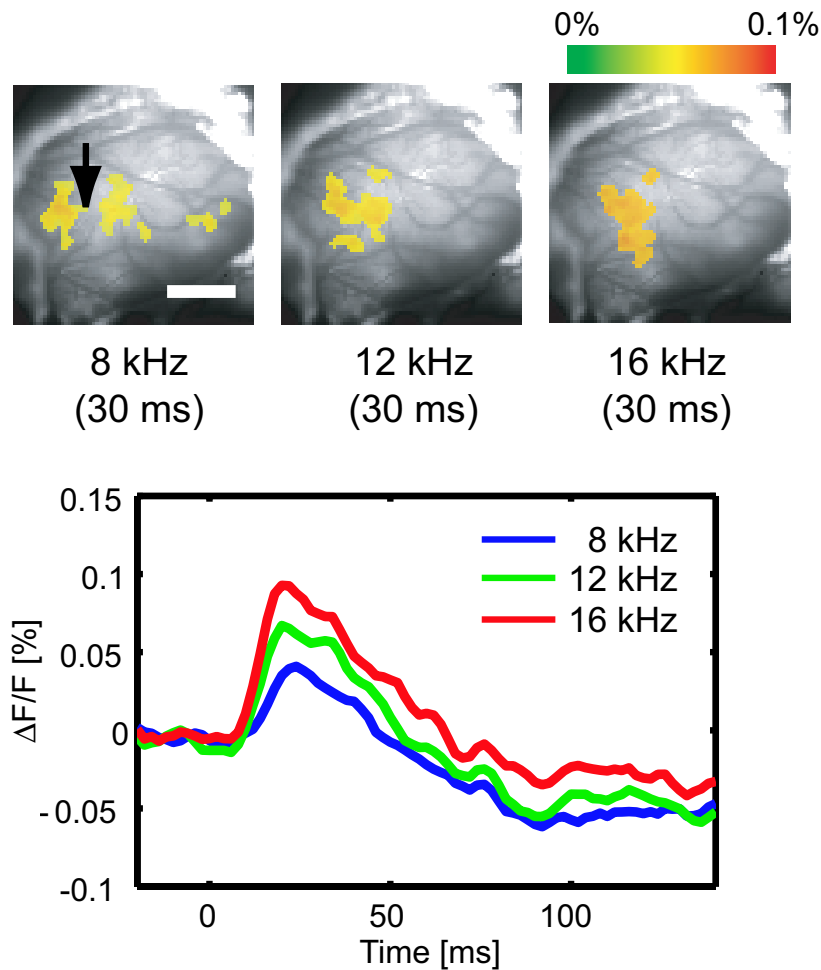


図 5.8 周波数マップと応答波形

べた代表画像について、閾値は最大応答の 50 % に設定して示したものである。条件付け前後の応答を比較すると、CS 音に使用した 12 kHz では応答領域が増加しているが、8 kHz および 16 kHz では応答領域は減少している。CS 音応答における増加領域を確認するため、図 5.9 における CS 音 (12 kHz) の条件付け後の画像の閾値を越えた応答領域を赤とし、その上に条件付け前の閾値を越えた応答領域をオレンジ色で重ねて描いたものが図 5.11 である。この図からは、条件付け前の応答領域の境界部分が、条件付け後にはほぼ一様に周囲へ拡張する傾向が見られる。図 5.10 には図 5.9 の画像中に黒矢印で示した点での応答波形を示した。CS である 12 kHz の応答波形は条件付け後に波形のピークおよびそれ以降で応答が増加しているが、8 kHz や 16 kHz の応答波形ではそのような傾向は見られない。このように条件付け群では、条件付け後の大脳皮質聴覚野では CS 周波数

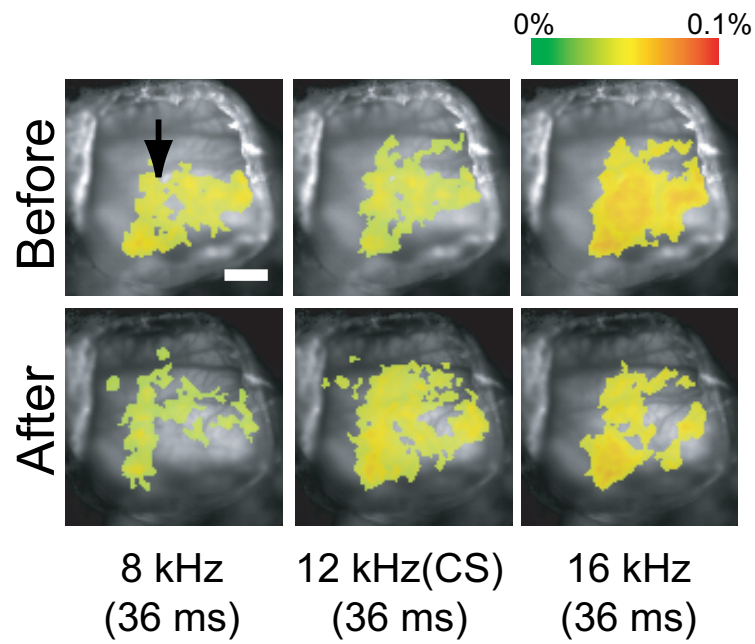


図 5.9 条件付け群の聴覚野応答

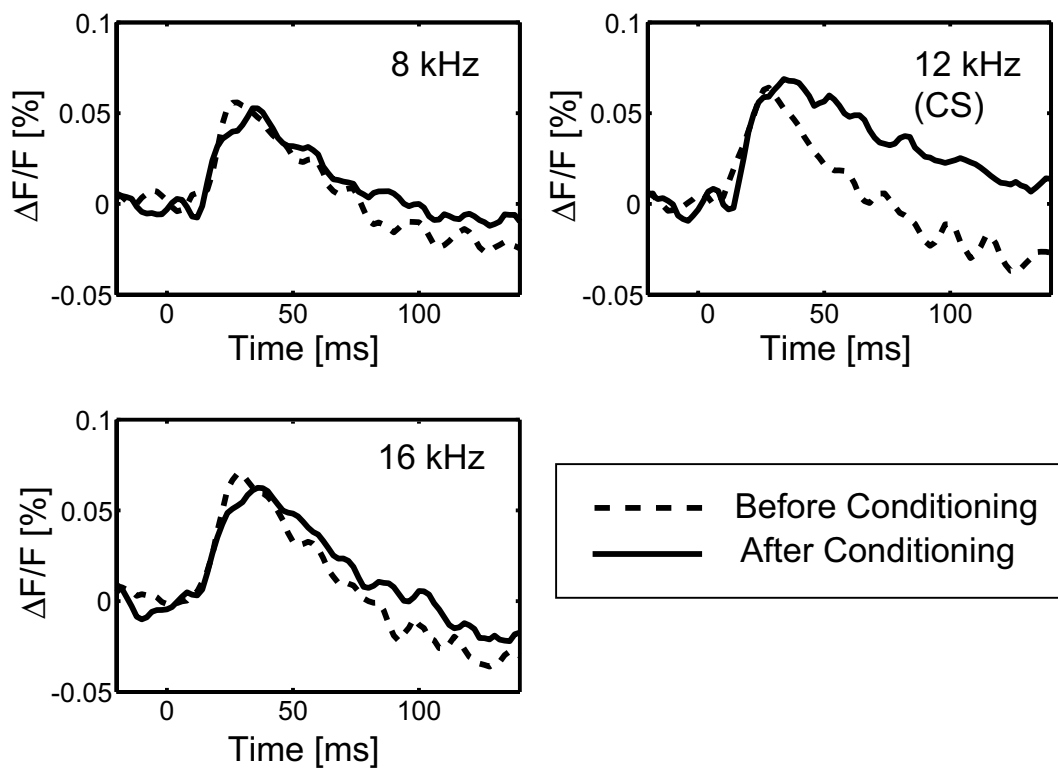


図 5.10 条件付け群の応答波形

特異的な応答領域の増加とピーク以降の応答波形の上昇が見られる。

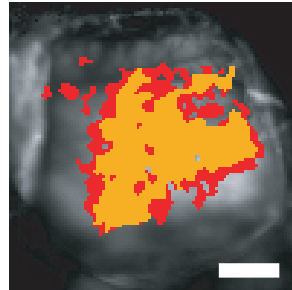


図 5.11 条件付けによる CS 音応答領域の拡大

#### 5.4.4 疑似条件付け群

ただし，条件付け群では 8 kHz や 16 kHz の音は条件付け前後の光計測の際にのみ聞かせているのに対し，CS である 12 kHz の音は条件付け中にもさらに 70 回提示されている．したがって，条件付けによる効果ではなく，単に非常に多く音を提示されたことによって 12 kHz の音に対する応答面積の増加が起きた可能性も排除できない．そこで，70 回多く音を提示するだけでは応答面積が増加しないことを確認するため，本実験では，音刺激や電気刺激の回数は一致するが刺激タイミングによって条件付けが生じない疑似条件付け群を用意した．この疑似条件付け群のある個体における，疑似条件付け前後の聴覚野応答の光計測代表画像を示したものが図 5.12 である．この結果では全ての周波数において条件付け後に応答領域が減少している．図 5.13 には図 5.12 の画像中に黒矢印で示した点での応答波形を示した．全ての周波数において，疑似条件付け後の応答波形は応答開始時直後から振幅が減少している．この応答波形の変化に CS 音と非 CS 音で大きな違いがみられないことから，色素の褪色や毒性による細胞活動の低下などによる可能性が考えられる．同様の応答減少は条件付け群の個体にもみられる．

#### 5.4.5 条件付け群と条件付け群の比較

実験を行なった各個体での応答面積の変化の様子を図 5.14 に示した．線の色および端点の形状は各動物個体を表している．この図からは，条件付け群の CS 音に対する応答面積が条件付け後に増加し，他の場合では減少するという一貫した傾向が見られる．

最後に，条件付け後の聴覚野の応答面積増加の統計的有意性の検討を行なった．そのために，条件付け群と疑似条件付け群のそれぞれに対し，CS 音への応答と CS 以外の音へ

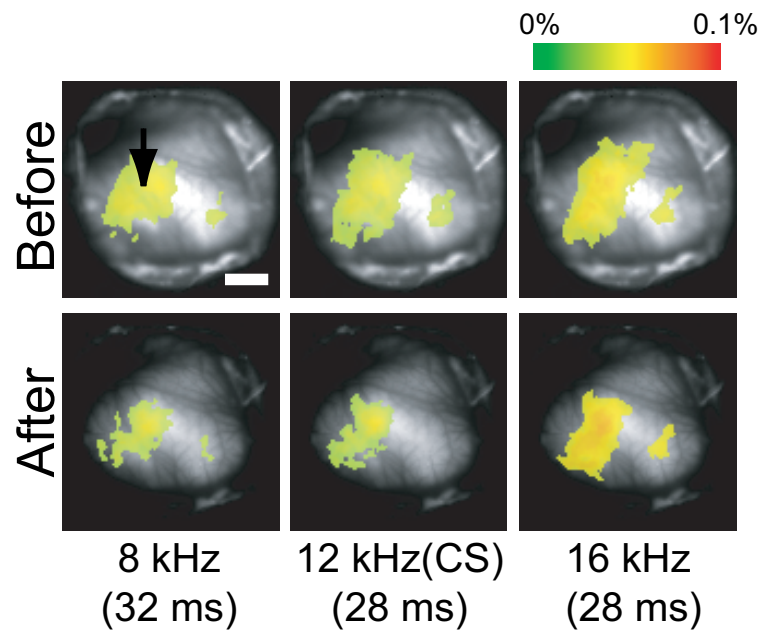


図 5.12 疑似条件付け群の聴覚野応答画像

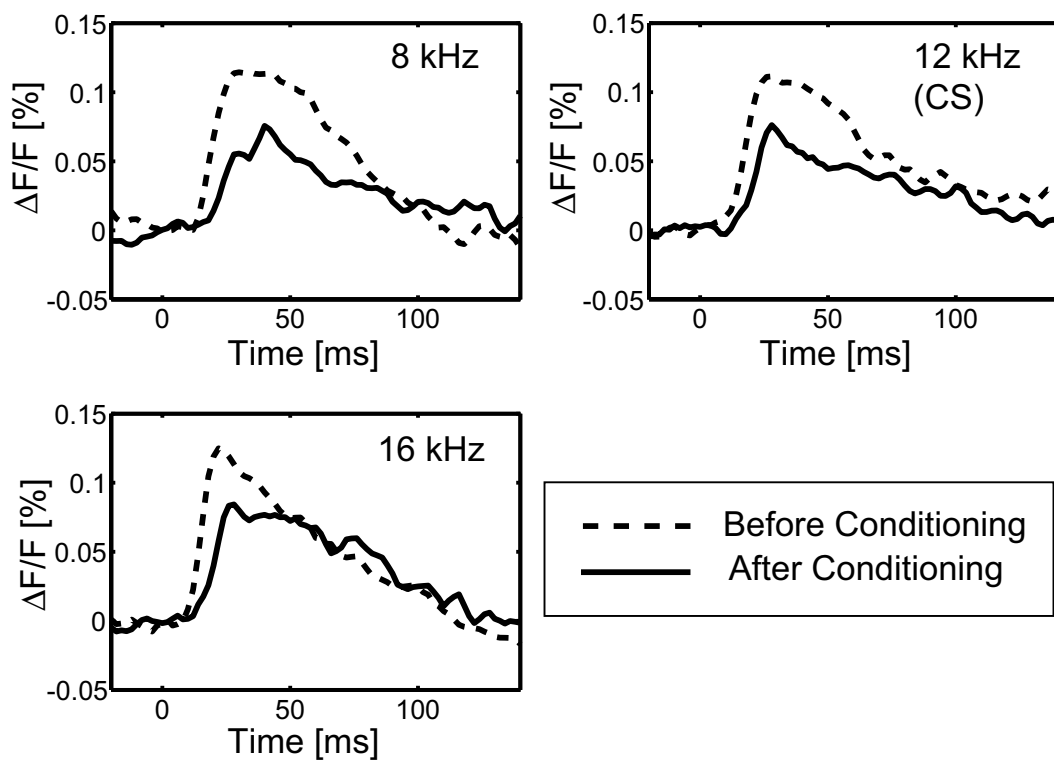


図 5.13 疑似条件付け群の応答波形

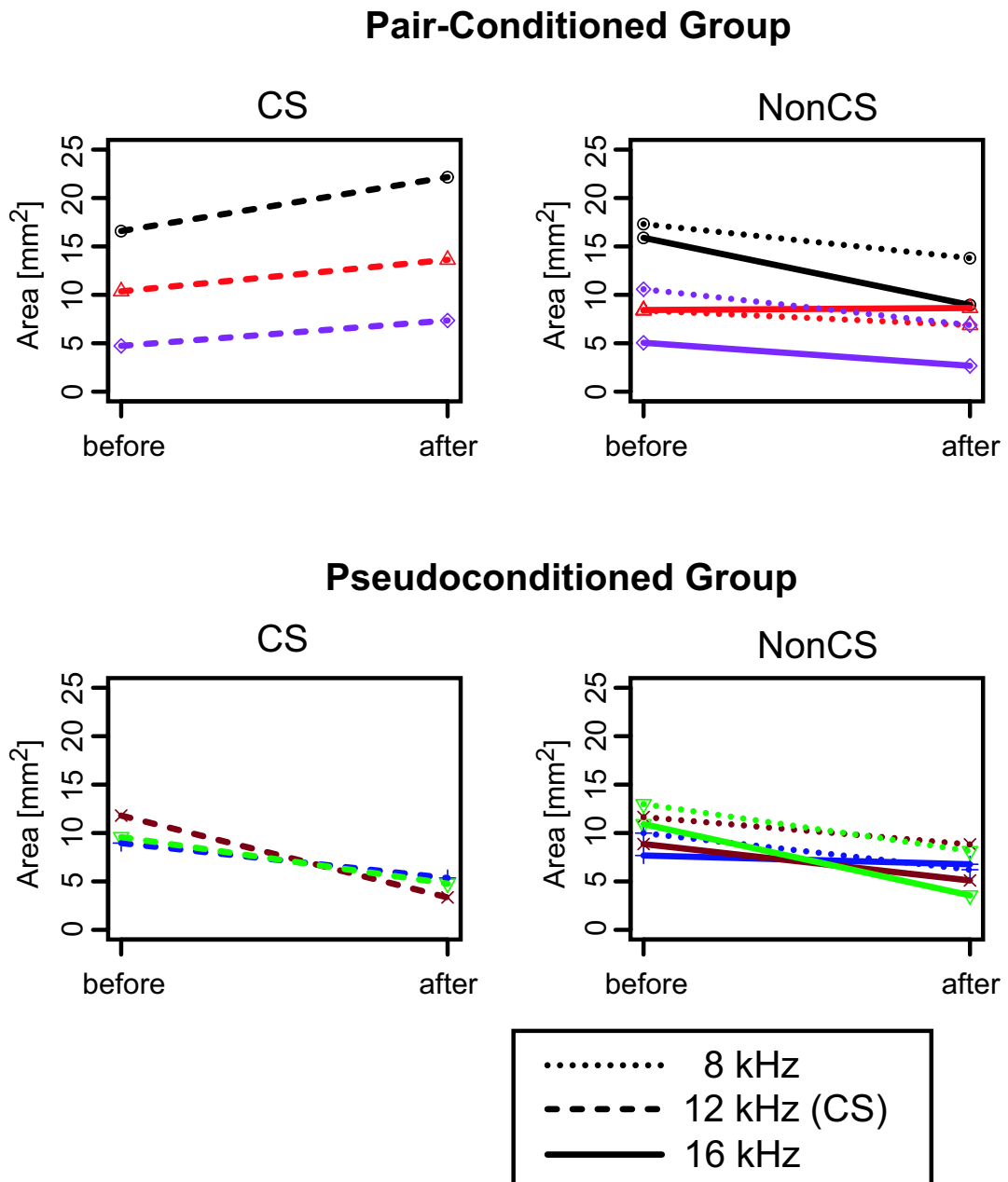


図 5.14 条件付け前後の応答面積比較

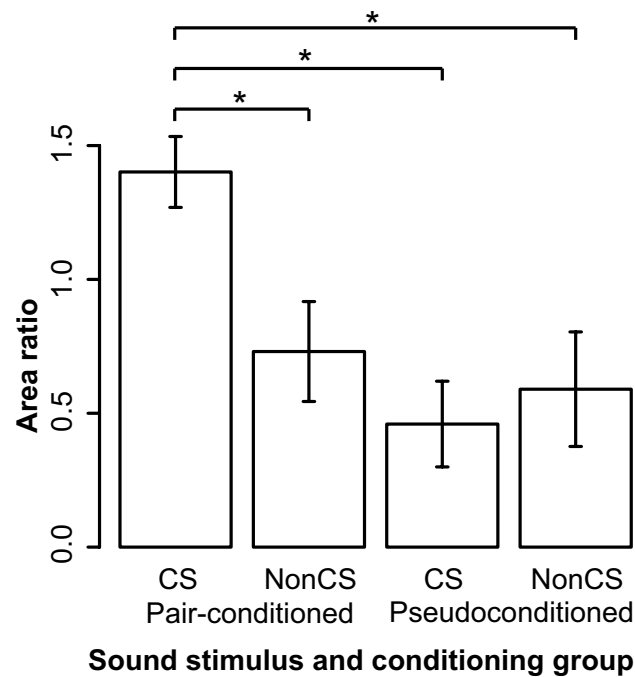


図 5.15 応答面積変化率の比較

の応答の合計 4 種類の組合せを考えた．そして，この各組合せについて，条件付け後の応答面積を条件付け前の応答面積で割った面積変化率を計算した．その平均値  $\pm$  標準偏差を示したのが図 5.15 である．さらに，3(個体)  $\times$  4(音の種類と条件付け群の組合せ) の Two-way ANOVA を行なった結果，それぞれの要因で統計的に有意と判定された (個体間  $p < 0.05$ ; 音と条件付け群  $p < 0.001$ )．そこで，音と条件付け群の組合せに関し有意水準 95 % で多重比較検定 (Tukey の HSD) を行なった．その結果，条件付け群の CS 音の応答面積変化率のみが他の組合せと比べて有意 (図 5.15 中に \* で表示) と判定された．これ以外の組合せでは統計的に有意とはならなかった．したがって，条件付け群に CS 音を聴かせた場合のみ統計的に有意な応答面積の増加が認められた．

## 5.5 考察

### 5.5.1 短時間での周波数局在変化

長期間の訓練後に大脳皮質聴覚野の周波数局在に大きな変化が生じることはこれまでも報告されていたが [65]，条件付け後短時間でこのような変化が生じるかどうかは知られていなかった．本実験の結果，条件付け開始後数時間で聴覚野の周波数局在に変化が生じ，CS 音に強く応答する面積が増加することが確かめられた．単一細胞レベルでの周波数受容野変化と周波数局在の変化は密接に関連した現象であると予想され，実際に Kilgard らが音と大脳基底核への電気刺激を 20~25 日間行なった実験もその予想を裏付けている [78]．今回の実験では，Weinberger らが短時間での受容野可塑性を報告した実験 [71] に近い実験手法によって周波数局在の変化が観測された．これは，条件付け後数時間のうちにも受容野変化と周波数局在の変化の両方がほぼ同時に生じていることを示している．

### 5.5.2 空間的な変化

さらに，今回の実験では Kilgard らの実験と異なり同一個体における変化の様子を空間的に比較可能である．図 5.11 に見られるように，条件付け後には条件付け前の応答領域の境界部分からほぼ一定の幅で周辺部へ拡大している．今回の計測では主に大脳皮質 II, III 層からの応答が記録されていると考えられるため [32]，大脳皮質運動野において II, III 層に存在する水平結合に長期増強 (LTP) が生じるという報告 [97] などを含わせて考えると，一つの説明として II, III 層の水平結合を通じて徐々に周囲の細胞との結合強度が増すことによって応答領域が増加した可能性が考えられる．

また 2.2.3 節で述べたように，NMDA 受容体を介した興奮性活動が等周波数帯を越える形で存在することが示されている．これは，II, III 層における NMDA 受容体依存性の LTP が応答領域増加の機序であることを示唆している．

### 5.5.3 応答波形の変化

図 5.10 からは，CS 音応答に限って条件付け後にピーク以降の応答の顕著な増大が見られる．2.2.3 節で述べたように，過去の *in vivo* の薬理実験では，聴覚野の音に対する応答は速い非 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体依存性の興奮性シナプス後電位 (EPSP)

と、遅い NMDA 受容体依存性の EPSP および GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid) 受容体依存性の抑制性シナプス後電位 (IPSP) が主要な成分であると報告されている。潜時の観点からは、今回のピーク以降の応答増加は NMDA 受容体依存性の EPSP の増加もしくは GABA 受容体依存性の IPSP の減少に相当するものと考えられる。聴覚野における応答変化が EPSP の増加と IPSP の減少のどちらによるものであるのか、あるいは両方が複合的に作用しているのかを今回の実験結果のみから結論することは難しい。しかし、音と電気刺激による条件付け時に大脳基底核から放出されるアセチルコリンが大脳皮質聴覚野に可塑性を誘導している可能性が、多くの研究によって指摘されている [73, 98]。このアセチルコリンは NMDA 受容体に作用して大脳皮質聴覚野の可塑的变化を促進していると想定されており [99–101]、今回の実験においても少なくとも NMDA 受容体依存性の EPSP の増加が生じていた可能性は高いと考えられる。これは前述の II, III 層に存在する水平結合の結合強度増加の可能性とも整合性がある。

#### 5.5.4 変化の持続時間

また、今回の条件付け群 3 個体のうち 2 個体については条件付けの終了後から 30 分以上経過したデータにおいても領域増加が見られた。Weinberger らは音と電気刺激による恐怖反応条件付けによって生じた受容野可塑性は 8 週間持続することもあると報告しているが [71]、受容野可塑性や今回の応答領域の増加がシナプス可塑性によって生じているとすれば、単なるファシリテーションではなく LTP が生じていた可能性が高い。

#### 5.5.5 ケタミンの NMDA 受容体に対する拮抗作用

今回の実験の条件付け手順は、Edeline らがケタミン麻酔下での恐怖反応条件付けが成り立つことをレバー押し課題を用いて確認しているため [67]、ほぼ同一の手順を採用した。ケタミンの薬理作用は多様であり、ムスカリン性アセチルコリン受容体、セロトニン受容体、オピエイト受容体への影響などが知られているが、これ以外に NMDA 型グルタミン酸受容体への拮抗作用が存在することが知られている [102]。また、大脳皮質では層ごとに LTP の機序が異なり、II, III 層が NMDA 受容体依存性、V 層が NMDA 受容体および代謝型グルタミン酸受容体依存性、VI 層が代謝型グルタミン酸依存性で NMDA 受容体非依存性であることが、スライス標本を用いた実験で示されている。さらに、大脳皮質視覚野のスライス標本を用いた実験では、II, III 層で生じる LTP はケタミンによって消失するとの報告もある [103]。しかし、スライス標本にケタミンが直接適用された場

合に比べ，今回の *in vivo* での注射投与ではケタミンの脳内での濃度はかなり低くなるため，NMDA 受容体への拮抗作用は部分的であったと考えられる．

#### 5.5.6 色素の褪色等の効果

2.1.1 節で述べたように，一般に膜電位感受性色素を用いた光計測法では，色素の褪色や毒性などの効果を考慮する必要がある．実際に，図 5.13 のように条件付け後に応答が小さく観測される場合には，これらの影響が大きかったと思われる．しかし，これらの効果は条件付け後の応答面積を減少させる方向に働くため，CS 音における応答面積の増加という結論には影響を与えないと考えられる．

## 第6章

# 結論

脳の記憶・学習メカニズムの解明は、脳科学における中心的な課題であると同時に、計算機科学に対しても重要な示唆を与え得る研究対象である。脳は人工的な計算機とは非常に大きく異っており、フォン・ノイマン型の計算機があらかじめプログラムされた処理しか行なえないのに対し、脳は学習によってアルゴリズムを獲得することが可能である。このような脳が持つ自律的なアルゴリズム獲得能力や柔軟な記憶・学習のメカニズムに関しては現在では未だ限定的にしか理解されていないが、これらの研究を通して新たな情報処理手法が開発される契機となる可能性を秘めており、計算機科学においても意義の深い研究である。

脳研究は近年急速に発展しているが、新しい神経活動計測技術の開発がこの発展を支えている。特に、ヒトにも適用可能な非侵襲の画像計測手法である機能的磁気共鳴画像 (fMRI) や、陽電子放射断層撮影 (PET) などが実用化され、脳の高次機能の解明において成果をあげてきた。しかし、これらの計測技術は時間分解能や空間分解能が比較的低く、また神経活動としては最も基本的である電気的な活動を記録することができない。逆に、神経生理学の中心的な計測手法である微小電極記録では、神経細胞の電気的な活動を高い時間分解能および空間分解能で記録することができるが、多数の神経細胞の活動を記録することが困難である。膜電位感受性色素を用いた光学計測はこれらの計測手法の中間に位置付けられる新しい神経活動計測手法である。膜電位光学計測法では、神経細胞の最も基本的な活動である膜電位変化を高い時空間分解能で記録することが可能であり、また同時に非常に多くの神経細胞から記録することができる。

しかし、麻酔下動物からの膜電位光学計測には技術的な制約が多く、記憶・学習に関連するような複雑な実験課題にはあまり用いられてこなかった。本研究では、この膜電位感受性色素による光学計測法を用いた脳の記憶・学習メカニズムの解明のための実験に特化

した，刺激制御システムとデータ解析ソフトウェアを設計・実装した．そして，これらのシステムの有効性を確認するため二種類の生理実験を行なった．

一つ目の実験は，宣言的記憶において重要と考えられている海馬—大脳皮質系に関する実験である．この実験では麻酔下モルモットの大脳皮質聴覚野から音を聞かせた時の応答を膜電位光学計測により記録した．そして，音の提示と同時に海馬 CA1 に電気刺激を行ない，異なる刺激強度の海馬刺激が聴覚野の応答に与える影響を解析した．この結果，海馬 CA1 への刺激強度に依存して大脳皮質聴覚野の応答は興奮性にも抑制性にも修飾されることが分かった．また，この修飾は時間的および空間的に非一様であり，空間的には大脳皮質聴覚野の腹側部より背側部で修飾作用が大きく，時間的には興奮性応答のピークよりもピーク後の抑制性成分に大きな修飾が見られた．このように，海馬 CA1 の活動が大脳皮質聴覚野の活動を興奮性にも抑制性にも修飾し得ること，またその修飾作用が時間的にも空間的にも一様でないことは，海馬が大脳皮質聴覚野の活動を細かく制御できる可能性を示しており，海馬から大脳皮質へ記憶が固定される際に役立っていることが考えられる．

二つ目の実験は，古典的条件付けによる大脳皮質聴覚野の可塑性を調べる実験である．音と電気刺激を用いた恐怖反応条件付けと呼ばれる古典的条件付けを行なうと，大脳皮質聴覚野細胞の受容野が大きな可塑的变化を起こすことが，数多くの研究によって報告されている．また，数週間の条件付けを起こなうと，細胞集団としての空間的な周波数地図にも変化が生じることも微小電極法によって示されていた．しかし，細胞受容野の変化が生じるような短時間で生じるため，空間的な周波数地図にも変化が生じるかどうかはこれまで知られていなかった．そこで，本研究では音と電気刺激による条件付けを行ない，その前後で大脳皮質聴覚野の音刺激に対する応答を膜電位光学計測法によって記録した．この結果，条件付け前後の応答面積を比較すると，条件付け周波数の音では応答面積が増加したが，それ以外の音では減少した．また，音と電気刺激を予測できない時間間隔で提示し，条件付けが成立しないようにした疑似条件付け群では，疑似条件付け後の応答面積は全て減少した．これは，大脳皮質聴覚野の多数の神経細胞において短時間のうちに条件付け周波数の音に対して特異的に同調が生じたことを示している．

これらの実験から，膜電位光学計測法が持つ時空間分解能の高さや神経活動の基本量である膜電位を観測できるという特長が，これまであまり用いられてこなかった，脳の記憶・学習メカニズム解明のための生理実験において有効であることが示された．また，序論で述べたように，本研究では脳科学と計算機科学が相互発展していく研究モデルを研究方針として採用した．そして，計算機科学から脳科学への寄与として，計測制御システムやデータ解析技術を通した生理実験の支援を考え，刺激・計測コントローラと解析ソフト

ウェアの設計および実装を行なった．さらに，実際の生理実験においてこれらの刺激・計測コントローラや解析ソフトウェアを使用し，その有用性を確認した．

このように，図 1.1 の実線矢印で示されている計算機科学から脳科学への寄与に関しては，本研究においても達成されていると考えられる．しかし，破線矢印で示されている脳科学から計算機科学へ寄与する内容を本研究において含めることはできなかったが，現状ではこのような研究自体が少なく成果も限定的である．これは，脳の記憶・学習のメカニズムに十分理解されていない側面が非常に多いことが一つの要因であると思われる．しかし，近年の脳研究の進展は断片的な記憶・学習メカニズムに関する理解を徐々に統合しつつあり，脳研究の成果を計算機科学に取り入れて新しい情報処理形式の開発を目指す研究の必要性も増して行くと考えられる．

## 謝辞

本研究の遂行にあたっては、非常に多くの方にお世話になりました。指導教官である安西祐一郎教授には、他大学での長期の共同研究を快諾して頂きました。また、お忙しい立場であるにも関わらず、丁寧で的確な御指導を頂きました。このような研究の機会を与えて頂いたことに深く感謝申し上げます。

そして、本研究は玉川大学工学部の塚田稔教授の研究室との共同研究として行なわれました。塚田教授には実験設備を自由に使わせて頂き、あらゆる面で惜しみない支援をして頂きました。また、研究の内容について何度も議論をさせて頂きました。深くお礼を申し上げます。玉川大学工学部の相原威教授、水野真助教授、玉川大学学術研究所の小島比呂志客員教授には実験や研究に関する有益な意見を頂き、大変感謝しております。

本研究で取り上げた二つ目の生理実験である、古典的条件付けに関する実験は、ルイ・パスツール大学医学部の Guy Sandner 教授との共同研究で行なわれました。Sandner 教授には直接実験を指導して頂いた他、ストラスブールにある Sandner 教授の研究室への滞在する機会を与えて頂きました。本当に得難い貴重な経験をさせて頂いたことに、心より感謝の意を申し上げます。

安西祐一郎教授、塚田稔教授、寺岡文男教授、岡浩太郎助教授、今井倫太講師には御多忙な中、本論文を精査して多くの有益な意見を頂きました。誠に有り難うございます。

安西研究室ブレイングループの先輩である、山本純博士（現理化学研究所）、高橋宗良氏、高橋晋博士（現京都大学文学部）には生理実験の基礎から研究の進め方まで多くの事柄を学ばせて頂きました。心よりお礼を申し上げます。

玉川大学学術研究所の佐々木寛博士には、投稿論文の共著者として論文の内容の吟味を討論して頂き、より良い論文を投稿することができました。大変有り難うございました。

玉川大学工学部出身で、現玉川大学学術研究所の松田哲也博士および現鹿児島大学大野裕史博士には、投稿論文執筆の際に何度も相談にのって頂き、大変感謝しております。

理化学研究所 脳科学研究センターの本間良太博士には膜電位感受性色素による光学計

測の実験技術について示唆に富む助言をいくつも頂き、心よりお礼申し上げます。

安西研究室のメンバーには本当にお世話になりました。特に、博士課程の同期である大村廉博士(現 ATR)、川島英之氏、梅沢猛氏、そして秘書の永坂弘子氏には、様々な面でお世話になりました。

玉川大学工学部の塚田研究室のメンバーには、いつも親切にして頂きました。特に、井出吉紀博士、大神田瑞樹氏、武田湖太郎氏、岡崎俊太郎氏、碓井祐介氏、鈴木理恵氏、高浦加奈氏を始め、聴覚班のメンバーには大変感謝しております。また、渡辺秀典博士、山崎吉之博士、福島康弘博士、藤原浩樹氏には研究から日常的なことまで大変お世話になりました。

最後に、ここに名前を記すことができなかった方々も含めて非常に多くの方々のおかげでこの論文を執筆することができました。本当にありがとうございました。

平成 17 年 2 月

## 参考文献

- [1] L. B. Cohen, B. Hille, and R. D. Keynes. Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature*, Vol. 218, pp. 438–441, 1968.
- [2] I. Tasaki, A. Watanabe, R. Sandlin, and L. Carnay. Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 61, pp. 883–888, 1968.
- [3] W. N. Ross, B. M. Salzberg, L. B. Cohen, A. Grinvald, H. V. Davila, A. S. Waggoner, and C. H. Wang. Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and birefringence in stained giant axons: Optical measurement of membrane potential. *J. Membr. Biol.*, Vol. 33, pp. 141–183, 1977.
- [4] L. B. Cohen, B. M. Salzberg, and A. Grinvald. Optical methods for monitoring neuron activity. *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol. 1, pp. 171–182, 1978.
- [5] W. N. Ross and L. F. Reichardt. Species-specific effects on the optical signals of voltage-sensitive dyes. *J. Membr. Biol.*, Vol. 48, pp. 343–356, 1979.
- [6] J.-Y. Wu, Y.-W. Lam, C. X. Falk, L. B. Cohen, L. L. Jing Fang, J. C. Prechtel, D. Kleinfeld, and Y. Tsau. Voltage-sensitive dyes for monitoring multineuronal activity in the intact central nervous system. *Histochemical Journal*, Vol. 30, pp. 169–187, 1998.
- [7] 神野, 佐藤, 佐藤, 持田. 膜電位感受性色素をもちいた計測と解析法. *日本生理学雑誌*, Vol. 61, No. 4, pp. 95–134, 1999.
- [8] A. Grinvald, R. D. Frostig, E. Lieke, and R. Hildesheim. Optical imaging of neuronal activity. *Physiol. Rev.*, Vol. 68, No. 4, pp. 1285–1366, 1988.
- [9] H. S. Orbach and L. B. Cohen. Optical monitoring of activity from many areas of the in vitro and in vivo salamander olfactory bulb: A new method for studying functional organization in the vertebrate central nervous system. *J. Neurosci.*, Vol. 3, pp. 2251–2262, 1983.
- [10] H. S. Orbach, L. B. Cohen, and A. Grinvald. Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. *J. Neurosci.*, Vol. 5, No. 7, pp. 1886–1895, 1985.
- [11] S. A. Masino, M. C. Known, Y. Dory, and R. D. Frostig. Characterization of functional organization within rat barrel cortex using intrinsic signal optical imaging through a thinned skull. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 90, pp. 9998–10002, 1993.
- [12] J. young Wu, L. Guan, and Y. Tsau. Propagating activation during oscillations and

- evoked responses in neocortical slices. *J. Neurosci.*, Vol. 19, No. 12, pp. 5005–5015, 1999.
- [13] G. G. Blasdel and G. Salama. Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex. *Nature*, Vol. 321, No. 6070, pp. 579–585, 1986.
- [14] A. Arieli, A. Grinvald, and H. Slovin. Dural substitute for long-term imaging of cortical activity in behaving monkeys and its clinical implications. *J. Neurosci. Methods*, Vol. 114, pp. 119–133, 2002.
- [15] H. Slovin, A. Arieli, R. Hildesheim, and A. Grinvald. Long-term voltage-sensitive dye imaging reveals cortical dynamics in behaving monkeys. *J. Neurophysiol.*, Vol. 88, pp. 3421–3438, 2002.
- [16] D. Shoham, D. E. Glaser, A. Arieli, T. Kenet, C. Wijnbergen, Y. Toledo, R. Hildesheim, and A. Grinvald. Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes. *Neuron*, Vol. 24, pp. 791–802, 1999.
- [17] C. C. H. Petersen and B. Sakmann. Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging. *J. Neurosci.*, Vol. 21, No. 21, pp. 8435–8446, 2001.
- [18] C. C. H. Petersen, T. T. G. Hahn, M. Mehta, A. Grinvald, and B. Sakmann. Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 100, No. 23, pp. 13638–13643, 2003.
- [19] C. C. H. Petersen, A. Grinvald, and B. Sakmann. Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *J. Neurosci.*, Vol. 23, No. 4, pp. 1298–1309, 2003.
- [20] In D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A.-S. LaMantia, J. O. McNamara, and S. M. Williams, editors. *Neuroscience*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, U.S.A., 2 edition, 2001.
- [21] H. L. Read, J. A. Winer, and C. E. Schreiner. Functional architecture of auditory cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, Vol. 12, pp. 433–440, 2002.
- [22] G. Ehret. The auditory cortex. *J. Comp. Physiol. A.*, Vol. 181, pp. 547–557, 1997.
- [23] G. L. Romani and S. J. Williamson. Tonotopic organization of the human auditory cortex. *Science*, Vol. 216, No. 4552, pp. 1339–1340, 1982.
- [24] M. Abeles and J. Moise H. Goldstein. Functional architecture in cat primary auditory cortex: columnar organization and organization according to depth. *J. Neurophysiol.*, Vol. 33, pp. 172–187, 1970.
- [25] M. M. Merzenich, P. L. Knight, and G. L. Roth. Representation of cochlea within primary auditory cortex. *J. Neurophysiol.*, Vol. 38, pp. 231–249, 1975.
- [26] S. L. Sally and J. B. Kelly. Organization of auditory cortex in the albino rat: sound frequency. *J. Neurophysiol.*, Vol. 59, pp. 1627–1638, 1988.
- [27] F. L. Hellweg, R. Koch, and M. Vollrath. Representation of the cochlea in the neocortex of guinea pigs. *Exp. Brain Res.*, Vol. 29, pp. 467–474, 1977.

- [28] H. Redies, U. Sieben, and O. D. Creutzfeldt. Functional subdivisions in the auditory cortex of the guinea pig. *J. Comp. Neurol.*, Vol. 282, pp. 473–488, 1989.
- [29] M. N. Wallace, R. G. Rutkowski, and A. R. Palmer. Identification and localisation of auditory areas in guinea pig cortex. *Exp. Brain Res.*, Vol. 132, pp. 445–456, 2000.
- [30] J. Horikawa, A. Hess, M. Nasu, Y. Hosokawa, H. Scheich, and I. Taniguchi. Optical imaging of neural activity in multiple auditory cortical fields of guinea pigs. *NeuroReport*, Vol. 12, No. 15, pp. 3335–3339, 2001.
- [31] M. Kubota, S. Sugimoto, J. Horikawa, M. Nasu, and I. Taniguchi. Optical imaging of dynamic horizontal spread of excitation in rat auditory cortex slices. *Neurosci. Lett.*, Vol. 237, pp. 77–80, 1997.
- [32] J. Horikawa, Y. Hosokawa, M. Kubota, M. Nasu, and I. Taniguchi. Optical imaging of spatiotemporal patterns of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition in the guinea-pig. *J. Physiol.*, Vol. 497, No. 3, pp. 629–638, 1996.
- [33] L. R. Squire, B. Knowlton, and G. Musen. The structure and organization of memory. *Annu. Rev. Psychol.*, Vol. 44, pp. 453–495, 1993.
- [34] P. Lavenex and D. G. Amaral. Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity. *Hippocampus*, Vol. 10, pp. 420–430, 2000.
- [35] M. P. Witter, P. A. Naber, T. van Haeften, W. C. M. Machielsen, S. A. R. B. Rombouts, F. Barkhof, P. Scheltens, and F. H. L. da Silva. Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus*, Vol. 10, pp. 398–410, 2000.
- [36] G. Buzsáki. The hippocampo–neocortical dialogue. *Cereb. Cortex*, Vol. 6, pp. 81–92, 1996.
- [37] E. T. Rolls. *Functions of Neuronal Networks in the Hippocampus and Neocortex in Memory*, chapter 13, pp. 240–265. Academic Press, San Diego, CA, 1989.
- [38] E. T. Rolls. Hippocampo-cortical and cortico-cortical backprojections. *Hippocampus*, Vol. 10, No. 4, pp. 389–397, 2000.
- [39] R. C. O'Reilly and J. W. Rudy. Computational principles of learning in the neocortex and hippocampus. *Hippocampus*, Vol. 10, pp. 389–397, 2000.
- [40] H. Eichenbaum. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, Vol. 1, pp. 41–50, 2000.
- [41] F. Ferino, A. M. Thierry, and J. Glowinski. Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat. *Exp. Brain Res.*, Vol. 65, pp. 421–426, 1987.
- [42] Y.-M. Zhong and K. S. Rockland. Connections between the anterior inferotemporal cortex (area TE) and CA1 of the hippocampus in monkey. *Exp. Brain Res.*, Vol. 155, pp. 311–319, 2004.
- [43] Y.-L. Qin, B. L. McNaughton, W. E. Skaggs, and C. A. Barnes. Memory reprocessing in corticocortical and hippocampocortical neuronal ensembles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, Vol. 352, pp. 1525–1533, 1997.

- [44] A.-M. Thierry, Y. Gioanni, E. Dégénétais, and J. Glowinski. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*, Vol. 10, pp. 411–419, 2000.
- [45] S. Laroche, S. Davis, and T. M. Jay. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: Dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus*, Vol. 10, pp. 438–446, 2000.
- [46] A. G. Siapas and M. A. Wilson. Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron*, Vol. 21, pp. 1123–1128, 1998.
- [47] T. L. Ivanco and R. J. Racine. Long-term potentiation in the reciprocal corticohippocampal and corticocortical pathways in the chronically implanted, freely moving rat. *Hippocampus*, Vol. 10, pp. 143–152, 2000.
- [48] 山本, 門司, 大神田, 塚田, 佐々木, 福西, 安西. 音と海馬の複合刺激によってモルモット聴覚皮質に誘起されるダイナミックな相互作用. 日本神経回路学会誌, Vol. 6, No. 1, pp. 11–16, 1999.
- [49] L. W. Swanson and C. Köhler. Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *J. Neurosci.*, Vol. 6, No. 10, pp. 3010–3023, 1986.
- [50] L. W. Swanson. A direct projection from Ammon’s horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.*, Vol. 217, pp. 150–154, 1981.
- [51] E. Iwai and M. Yukiie. A direct projection from hippocampal field ca1 to ventral area TE of inferotemporal cortex in the monkey. *Brain Res.*, Vol. 444, No. 2, pp. 397–401, 1988.
- [52] T. M. Jay and M. P. Witter. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.*, Vol. 313, pp. 574–586, 1991.
- [53] T. M. Jay, A. M. Thierry, L. Wiklund, and J. Glowinski. Excitatory amino acid pathway from the hippocampus to the prefrontal cortex. *Eur. J. Neurosci.*, Vol. 4, pp. 1285–1295, 1992.
- [54] S. Laroche, T. M. Jay, and A.-M. Thierry. Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. *Neurosci. Lett.*, Vol. 114, pp. 184–190, 1990.
- [55] T. M. Jay, F. Burette, and S. Laroche. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to prefrontal cortex in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, Vol. 90, No. 7, pp. 247–250, 1995.
- [56] M. P. O’Boyle, V. Do, B. E. Derrick, and B. J. Claiborne. In vivo recordings of long-term potentiation and long-term depression in the dentate gyrus of the neonatal rat. *J. Neurophysiol.*, Vol. 91, pp. 613–622, 2003.
- [57] R. W. Skelton, J. J. Miller, and A. G. Phillips. Low-frequency stimulation of the perforant path produces long-term potentiation in the dentate gyrus of unanesthetized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Vol. 61, pp. 1156–1161, 1983.

- [58] A. Grinvald, E. E. Lieke, R. D. Frostig, and R. Hildesheim. Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by real-time optical imaging of macaque monkey primary visual cortex. *J. Neurosci.*, Vol. 14, No. 5, pp. 2545–2568, 1994.
- [59] M. Abeles. *Corticonics: Neural Circuits of the Cerebral Cortex*. Cambridge University Press, 1991.
- [60] D. V. Buonomano and M. M. Merzenich. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol. 21, pp. 149–186, 1998.
- [61] C. B. Allen, T. Celikel, and D. E. Feldman. Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity *in vivo*. *Nat. Neurosci.*, Vol. 6, No. 3, pp. 291–299, 2003.
- [62] K. J. Staley, B. L. Soldo, and W. R. Proctor. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA<sub>A</sub> receptors. *Science*, Vol. 269, pp. 977–981, 1995.
- [63] A. T. Gullledge and G. J. Stuart. Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron*, Vol. 37, pp. 299–309, 2003.
- [64] H. Fujii, K. Aihara, and I. Tsuda. Functional relevance of 'excitatory' GABA actions in cortical interneurons: A dynamical systems approach. *J. Integr. Neurosci.*, Vol. 3, No. 2, pp. 183–205, 2004.
- [65] G. H. Recanzone, C. E. Schreiner, and M. M. Merzenich. Plasticity in the frequency representation of primary auditory cortex following discrimination training in adult owl monkeys. *J. Neurosci.*, Vol. 13, No. 1, pp. 87–103, 1993.
- [66] N. M. Weinberger. Specific long-term memory traces in primary auditory cortex. *Nat. Rev. Neurosci.*, Vol. 5, pp. 279–290, 2004.
- [67] J.-M. Edeline and N. N.-E. Massiou. Retention of CS-US association learned under ketamine anesthesia. *Brain Res.*, Vol. 457, pp. 274–280, 1988.
- [68] J. S. Bakin and N. M. Weinberger. Classical conditioning induces CS-specific receptive field plasticity in the auditory cortex of the guinea pig. *Brain Res.*, Vol. 536, No. 1–2, pp. 271–286, 1990.
- [69] J. S. Bakin, B. Lapan, and N. M. Weinberger. Sensitization induced receptive field plasticity in the auditory cortex is independent of CS-modality. *Brain Res.*, Vol. 577, No. 2, pp. 226–235, 1992.
- [70] J.-M. Edeline and N. M. Weinberger. Receptive field plasticity in the auditory cortex during frequency discrimination training: Selective retuning independent of task difficulty. *Behav. Neurosci.*, Vol. 107, No. 1, pp. 82–103, 1993.
- [71] N. M. Weinberger, R. Javid, and B. Lapan. Long-term retention of learning-induced receptive-field plasticity in the auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 90, pp. 2394–2398, 1993.
- [72] N. M. Weinberger. Physiological memory in primary auditory cortex: Characteristics and mechanisms. *Neurobiol. Learn. Mem.*, Vol. 70, pp. 226–251, 1998.
- [73] N. M. Weinberger and J. S. Bakin. Learning-induced physiological memory in adult

- primary auditory cortex: Receptive field plasticity, model, and mechanisms. *Audiology & Neuro-Otology*, Vol. 3, pp. 145–167, 1998.
- [74] J.-M. Edeline. Thalamic short-term plasticity in the auditory system: Associative retuning of receptive fields in the ventral medial geniculate body. *Behav. Neurosci.*, Vol. 105, No. 5, pp. 618–639, 1991.
- [75] J.-M. Edeline and N. M. Weinberger. Associative retuning in the thalamic source of input to the amygdala and auditory cortex: Receptive field plasticity in the medial division of the medial geniculate body. *Behav. Neurosci.*, Vol. 106, No. 1, pp. 81–105, 1992.
- [76] J. S. Bakin and N. M. Weinberger. Induction of a physiological memory in the cerebral cortex by stimulation of the nucleus basalis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 93, pp. 11219–11224, 1996.
- [77] T. S. Bjordahl, M. A. Dimyan, and N. M. Weinberger. Induction of long-term receptive field plasticity in the auditory cortex of the waking guinea pig by stimulation of the nucleus basalis. *Behav. Neurosci.*, Vol. 112, pp. 467–479, 1998.
- [78] M. P. Kilgard and M. M. Merzenich. Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science*, Vol. 279, pp. 1714–1718, 1998.
- [79] S. Bao, V. T. Chan, and M. M. Merzenich. Cortical remodelling induced by activity of ventral tegmental dopamine neurons. *Nature*, Vol. 412, pp. 79–83, 2001.
- [80] S. Maren. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol. 24, pp. 897–931, 2001.
- [81] J. E. LeDoux, A. Sakaguchi, and D. J. Reis. Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *J. Neurosci.*, Vol. 4, No. 3, pp. 683–698, 1984.
- [82] J. E. LeDoux. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol. 23, pp. 155–184, 2000.
- [83] S. Campeau and M. Davis. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J. Neurosci.*, Vol. 15, pp. 2301–2311, 1995.
- [84] P. Amorapanth, J. E. LeDoux, and K. Nader. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat. Neurosci.*, Vol. 3, No. 1, pp. 74–79, 2000.
- [85] J. E. LeDoux, J. Iwata, P. Cicchetti, and D. J. Reis. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.*, Vol. 8, No. 7, pp. 2517–2529, 1988.
- [86] L. Cahill, A. Vazdarjanova, and B. Setlow. The basolateral amygdala complex is involved with, but is not necessary for, rapid acquisition of Pavlovian ‘fear conditioning’. *Eur. J. Neurosci.*, Vol. 12, pp. 3044–3050, 2000.
- [87] J. J. Kim and M. S. Fanselow. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*,

- Vol. 256, pp. 675–677, 1992.
- [88] M. D. McEchron, H. Bouwmeester, W. Tseng, C. Weiss, and J. F. Disterhoft. Hippocampectomy disrupts auditory trace fear conditioning and contextual fear conditioning in the rat. *Hippocampus*, Vol. 8, No. 6, pp. 638–646, 1998.
- [89] M. D. McEchron, W. Tseng, and J. F. Disterhoft. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus disrupt auditory-cued trace heart rate (fear) conditioning in rabbits. *Hippocampus*, Vol. 10, pp. 739–751, 2000.
- [90] M. D. McEchron, W. Tseng, and J. F. Disterhoft. Single neurons in CA1 hippocampus encode trace interval duration during trace heart rate (fear) conditioning in rabbit. *J. Neurosci.*, Vol. 23, No. 4, pp. 1535–1547, 2003.
- [91] L. M. Romanski and J. E. LeDoux. Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J. Neurosci.*, Vol. 12, pp. 4501–4509, 1992.
- [92] T. W. Jarrell, C. G. Gentile, L. M. Romanski, P. M. McCabe, and N. Schneiderman. Involvement of cortical and thalamic auditory regions in retention of differential bradycardiac conditioning to acoustic conditioned stimuli in rabbits. *Brain Res.*, Vol. 412, pp. 285–294, 1987.
- [93] J. L. Armony, D. Servan-Schreiber, L. M. Romanski, J. D. Cohen, and J. E. LeDoux. Stimulus generalization of fear responses: Effects of auditory cortex lesions in a computational model and in rats. *Cereb. Cortex*, Vol. 7, pp. 157–165, 1997.
- [94] A. H. Teich, P. M. McCabe, C. C. Gentile, L. S. Schneiderman, R. W. Winters, D. R. Liskowsky, and N. Schneiderman. Auditory cortex lesions prevent the extinction of Pavlovian differential heart rate conditioning to tonal stimuli in rabbits. *Brain Res.*, Vol. 480, pp. 210–218, 1989.
- [95] C. H. Chen-Bee, M. C. Kwon, S. A. Masino, and R. D. Frostig. Areal extent quantification of functional representations using intrinsic signal optical imaging. *J. Neurosci. Methods*, Vol. 68, pp. 27–37, 1996.
- [96] R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2004. ISBN 3-900051-07-0.
- [97] G. Hess, C. D. Aizenman, and J. P. Donoghue. Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J. Neurophysiol.*, Vol. 75, No. 5, pp. 1765–1778, 1996.
- [98] J.-M. Edeline. Learning-induced physiological plasticity in the thalamo-cortical sensory systems: a critical evaluation of receptive field plasticity, map changes and their potential mechanisms. *Prog. Neurobiol.*, Vol. 57, pp. 165–224, 1999.
- [99] D. D. Rasmusson. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behav. Brain Res.*, Vol. 115, pp. 205–218, 2000.
- [100] R. Metharate and C. Y. Hsieh. Regulation of glutamate synapses by nicotinic acetylcholine receptors in auditory cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.*, Vol. 80, pp. 285–290, 2003.

- 
- [101] A. E. Bandrowski, S. L. Moore, and J. H. Ashe. Cholinergic synaptic potentials in the supragranular layers of auditory cortex. *Synapse*, Vol. 41, pp. 118–130, 2001.
- [102] D. X. Zhang and W. B. Levy. Ketamine blocks the induction of LTP at the lateral entorhinal cortex-dentate gyrus synapses. *Brain Res.*, Vol. 593, No. 1, pp. 124–127, 1992.
- [103] M. Salami, Y. Fathollahi, H. Esteky, F. Motamedi, and N. Atapour. Effects of ketamine on synaptic transmission and long-term potentiation in layer II/III of rat visual cortex in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 390, pp. 287–293, 2000.

# 業績目録

## 学術論文

- 宮崎崇史，大神田瑞樹，山本純，佐々木寛，塚田稔，安西祐一郎，大脳皮質聴覚野における海馬刺激強度依存的な応答変化の光計測，日本神経回路学会誌（印刷中）
- 宮崎崇史，鈴木理恵，Guy Sandner，塚田稔，安西祐一郎，古典的条件付けにより生じる大脳皮質聴覚野の可塑的变化の光計測，日本神経回路学会誌（印刷中）

## 国際会議発表

- T. Miyazaki, K. Takeda, S. Okazaki, R. Suzuki, M. Tsukada, Y. Anzai, “Optical imaging of the response to two-tone sequences in the guinea pig auditory cortex”, Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, 2003
- T. Miyazaki, K. Takeda, S. Okazaki, R. Suzuki, Y. Usui, H. Sasaki, M. Mizuno, M. Tsukada, Y. Anzai, “Inhibition and facilitation of the response to two tone sequences in the guinea pig auditory cortex using optical imaging method”, Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, 2002
- T. Miyazaki, J. Yamamoto, H. Sasaki, Y. Anzai, M. Tsukada, “Dynamic interaction of the auditory cortex and the hippocampus revealed by optical imaging method”, The 6th Tamagawa Dynamic Brain Forum, 2001
- T. Miyazaki, M. Okanda, J. Yamamoto, E. Hida, M. Tsukada, Y. Anzai, “Frequency dependent depression in the auditory cortex, by a specific interaction between sensory and hippocampal information”, Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, 2000
- S. Okazaki, K. Takeda, T. Miyazaki, T. Matsuda, Y. Kitamura, M. Tsukada,

- K.Oka, “Late response properties in primary auditory cortex cells of the anesthetized guinea pig”, Auditory Cortex Meeting, 2003
- S. Okazaki, K. Takeda, T. Miyazaki, T. Matsuda, Y. Kitamura, M. Tsukada, K. Oka, “Neuronal mechanisms of late response in primary auditory cortex of the anesthetized guinea pig”, Society for Neuroscience, 2003
  - K. Takeda, S. Okazaki, J. Ushiba, T. Miyazaki, H. Sasaki, M. Tsukada, Y. Tomita, “The Change of Neuronal Response in Guinea-pig Auditory Cortex by Hippocampal Modulation —Application of Bootstrap Method—”, The Society of Instrument and Control Engineers (SICE) Annual Conference, 2002
  - S. Okazaki, K. Takeda, T. Miyazaki, H. Sasaki, M. Tsukada, “Cross correlation of neuronal activity in the auditory cortex of guinea pig —Reconstruction of cross-correlogram method application—”, The Society of Instrument and Control Engineers (SICE) Annual Conference 2002

## 国内会議発表

- 宮崎崇史, 武田湖太郎, 山本純, 佐々木寛, 塚田稔, 安西祐一郎, 海馬刺激が聴覚野におよぼす影響の部位依存性, 日本神経回路学会第 11 回全国大会, 2001
- 宮崎崇史, 遠藤豊, 原沢崇文, 大神田瑞樹, 山本純, 水野真, 塚田稔, 安西祐一郎, モルモットにおける聴覚野の純音応答への海馬刺激の影響, 日本神経科学大会-日本神経回路学会大会合同大会, 2000
- 宮崎崇史, 山本純, 大神田瑞樹, 高橋晋, 安西祐一郎, 塚田稔, モルモット聴覚皮質における誘発応答と興奮パターンの同期解析, 日本神経回路学会第 9 回全国大会, 1999
- 鈴木理恵, 宮崎崇史, 岡崎俊太郎, 碓井祐介, 藤田毅弘, 松田拓也, 水野真, 塚田稔, 二音系列刺激に対する聴覚野応答の光計測, ニューロコンピューティング研究会, 2003
- 岡崎俊太郎, 碓井祐介, 武田湖太郎, 宮崎崇史, 塚田稔, ブートストラップ法を用いた聴覚皮質応答 PSTH の統計解析とその検証, 日本神経回路学会第 12 回全国大会, 2002
- 武田湖太郎, 岡崎俊太郎, 宮崎崇史, 松田哲也, 佐々木寛, 水野真, 塚田稔, 富田豊, モルモット聴覚野における神経活動の海馬刺激における動的変化, 日本神経回

路学会第 11 回全国大会，2001

- 岡崎俊太郎，武田湖太郎，宮崎崇史，松田哲也，佐々木寛，水野真，塚田稔，富田豊，モルモット聴覚野皮質層構造と周波数選択性-受容野解析による一考察-，日本神経回路学会第 11 回全国大会，2001