

論文の内容の要旨

氏名：瀨崎 雄太

博士の専攻分野の名称：博士（理学）

論文題名：チャコウラナメクジの嗅覚神経系における時空間神経活動パターンとその数理解析

はじめに

記憶や学習のメカニズムを理解するためには、その機能を実現する神経回路に対する研究が必要不可欠である。哺乳類を対象とした研究としては、単一の神経細胞の機構や、特定の処理を行う脳機能部位の特定などの研究がよく知られているが、その中枢神経系の神経細胞は小さく、数が多いため大規模な神経回路の測定を行うことは困難である。そこで、哺乳類と同じく学習や記憶などができる中枢神経系をもつ軟体動物を使用した研究が行われている。無脊椎動物である軟体動物では頭部神経節が中枢神経系である。以後、頭部神経節を単に神経節と表記する。神経節の構造は哺乳類の脳とは異なるが、神経細胞の基本構造、神経細胞間の情報伝達方法は共通している。また、一つの機能を担っている神経細胞の数も少数で、神経回路も比較的単純である。そのため、神経細胞間で起きた変化を高等な生物よりも簡単に調べることができる。また、哺乳類でよく用いられるスライス標本とは異なり、神経回路をすべて保持した状態で測定できる。さらに、神経節と感覚器、筋肉を繋げたまま単離することができるため、神経節への入力も感覚器を通した自然に近い方法で行うことができる。

これらの特徴から、軟体動物の神経節は哺乳動物の神経回路のモデル実験系として利用されてきた。軟体動物の神経節の働きを明らかにすることは、哺乳類の中枢神経系を理解することにつながってくる。本研究では、陸棲の軟体動物であるチャコウラナメクジの嗅覚神経系に着目した。ナメクジは、嗅覚-味覚連合学習を行うことができるなど嗅覚が発達している。本研究では、ナメクジの嗅覚中枢である前脳葉に着目し、匂い刺激に対する前脳葉の神経活動の変化を調べることを目的として、その神経活動を電気生理的手法によって測定し、測定した神経活動に対して数理解析を行った。また、ナメクジの嗅覚中枢では時空間神経活動パターンを用いて情報処理がなされていることが示唆されていることから、膜電位イメージング手法を用いて匂い刺激によって生じる前脳葉の空間的な神経活動の変化について調べた。

本論文の各章の概要は以下の通りである。

第1章

第1章では、本研究の背景として軟体動物を使用した従来の研究と、本研究で使用した測定手法の原理、チャコウラナメクジの嗅覚神経系、研究の目的について述べた。

第2章

第2章では、本研究で共通する標本の作製方法と電気生理実験方法、膜電位イメージング実験方法について述べた。標本は大・小触角・神経節の繋がったものを用いた。電気生理実験では、ガラス電極によって局所場電位（Local Field Potential; LFP）の測定を行った。得られたLFPは、神経細胞の細胞膜でのイオンの流入出によって発生した膜電流によって生ずる、ガラス電極先端部の細胞外電位の変化である。また、膜電位イメージング実験では膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS を用いた高速な測

定系を構築した。Di-4-ANEPPS は細胞に添加されると細胞膜内に埋もれて存在し、波長 505 nm の光によって励起され、波長 705 nm の蛍光を発する。細胞膜内の Di-4-ANEPPS は膜電位変化によって構造が変化し、神経細胞の膜電位変化に対して 0.1~1% 程度の蛍光強度変化が現れる。この蛍光強度画像を受光器で取得する。受光器には EM-CCD カメラあるいは sCMOS カメラを使用し、開口数の高い対物レンズを使用することでサンプリングレートが 15~25 ms あるいは 10 ms という高速で、かつ S/N 比が高い膜電位イメージング測定を可能とした。また、得られた蛍光強度画像は擬似カラーに変換した (図 1)。この方法は得られた画像データに時間軸方向のフィルタをかけることに最大の特徴があり、蛍光色素の退色や受光素子由来と考えられるノイズを軽減することができた。

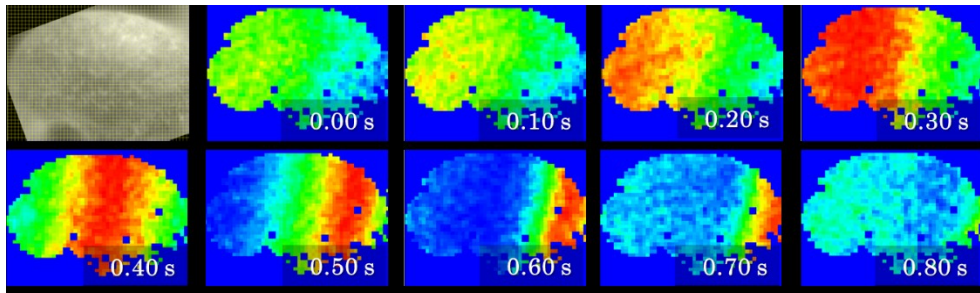


図 1 前脳葉における神経活動伝播の擬似カラー表示

左上が擬似カラー画像のもとになった蛍光画像、それ以外は測定開始から 0.1 秒間隔の擬似カラーを表示した。

第 3 章

第 3 章では、ガラス電極による細胞外電位記録を行い、忌避性の匂い刺激前後の LFP を測定した結果を述べた。測定した LFP は振動数約 0.8 Hz で振動していた。また、前脳葉の神経活動には先端部と基部で位相差が存在していることが知られており、この位相差によって LFP 波形が変化しているのではないかと考え、その形状の変化を調べた。その結果、忌避性の匂い刺激によって LFP 波形の形状がいくつかのショルダーやピークをもつ幅広い形状から鋭い形状に変化していることが分かった。本実験に用いたガラス電極の先端の直径 (80 μm) は、多数の神経細胞が収まる範囲である。上記の通り、前脳葉の神経活動には位相差が存在することが知られていることから、LFP 波形形状の変化はガラス電極の測定範囲内における多数の神経細胞の活動の位相差変化を反映するものと考えられる。そして LFP 波形が鋭い形状に変化したことは、その測定範囲における神経活動の位相差が減少したことを示唆する。この考えが正しいならば、LFP 波形には空間情報が含まれていることを意味している。

次に、LFP 時系列データの時間一周波数解析を目的としてウェーブレット解析を行った。ウェーブレット解析は、スケール変化とシフト変化という 2 つの変化を行ったマザー・ウェーブレットと呼ばれる小波状の関数の組み合わせとして信号を表現する。スケール変化はマザー・ウェーブレットの伸縮操作で、シフト変化はマザー・ウェーブレットの時間軸上の位置の移動にあたる操作である。このスケール変化とシフト変化によって、ウェーブレット解析の結果は時間ごとのスケール成分として表される。ウェーブレット解析では時間窓のサイズは一定ではなく、スケールに応じて窓のサイズが変化する。そのため、周波数成分の変化などの時間情報もフーリエ解析に比べ正確に取り出すことができる。本研究では、LFP 波形の周波数分布の時間変化を解析するために、LFP 時系列データに対してウェーブレット解析を行い、時間ごとの周波数分布とその周波数分布からエントロピーを求めた。ウェーブレット解析の結果、エネルギー分布は刺激前に 0.45-0.90 Hz, 0.90-2.40 Hz, 2.40-5.00 Hz の 3 つの周波数帯に広く分布していたが、忌避性の匂い刺激 (酢酸イソアミル、シネオール) によって

0.45-0.90 Hz, 0.90-2.45 Hz の 2 つの周波数成分に集中し、それに伴ってエントロピーが減少した (図 2)。したがって、LFP 波形に神経活動の空間的な情報が含まれているのであれば、エントロピーの減少によって前脳葉の空間的秩序性について評価が可能であることが示唆される。

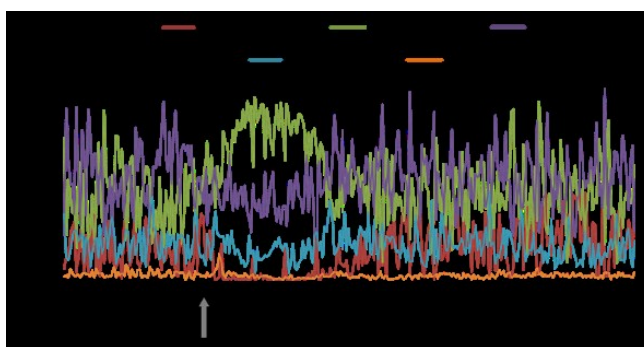


図 2 忌避性の匂い刺激 (酢酸イソアミル) 刺激前後の各周波数帯のウェーブレットエネルギー分布

0.45-0.90 Hz, 0.90-2.45 Hz, 2.40-5.00 Hz に分散していたエネルギーが、酢酸イソアミル刺激によって 0.45-0.90 Hz, 0.90-2.45 Hz の 2 つの周波数成分に集中した。

第 4 章

第 4 章では、膜電位イメージング測定を用い、匂い刺激に対する前脳葉の空間的な神経活動の変化を詳細に調べた結果を述べた。測定した蛍光強度変化は擬似カラー画像に変換し、前脳葉の空間的な膜電位変化の様子を観察した。その結果、前脳葉の先端部と基部に存在した神経活動の位相差が忌避性の匂い刺激 (酢酸イソアミル、シネオール) によって減少し (図 3)、位相差が減少した際には、同時に測定した LFP 波形が鋭い形状に変化することが分かった。このことから、第 3 章で述べた LFP 波形の鋭い形状への変化が神経活動の位相差の減少によるものだという事、エントロピーの減少がこのような前脳葉における空間秩序性を反映したものであることが確かめられた。したがって、膜電位イメージング手法を用いなくとも、細胞外電位記録を用いた LFP 波形の形状とウェーブレット解析による周波数解析によって、前脳葉における空間秩序性に関してある程度の評価が可能であるということが示唆された。一方、誘引性の匂い刺激 (テルピノーレン) によって前脳葉の神経活動の位相差に大きな変化は見られなかった (図 3)。このことから、匂い刺激による位相差の減少は、忌避性の匂い刺激特有のものであると示唆された。

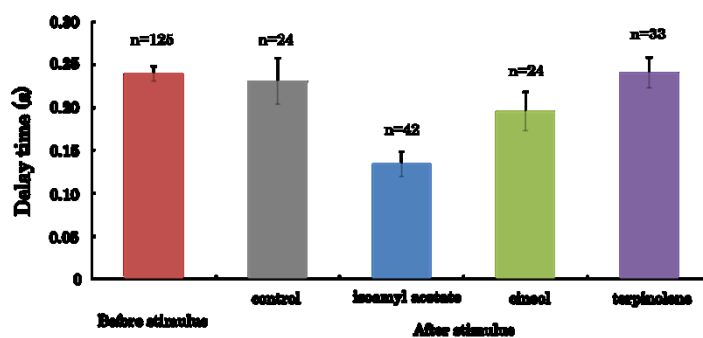


図 3 匂い刺激前後における前脳葉の先端部と基部の蛍光強度変化の時間差

結果は平均値±SEM で示した。n は波形のデータ数である。忌避性の匂い刺激により先端部と基部の蛍光強度変化のピーク間の時間差が減少した。(isoamyl acetate; 酢酸イソアミル, cineol; シネオール, terpinolene; テルピノーレン)

第5章

第5章では、LFP波形に反映された前脳葉の神経活動の空間的な測定範囲について検討した。膜電位の時間差分が細胞外電位測定と類似した波形になることが経験的に知られている。これは膜電流の容量成分によるものである。そこで膜電位イメージング測定と細胞外電位記録を同時に行い、膜電位を反映した蛍光強度変化に対して時間差分を行い、その積算した波形をLFP波形と比較することにより、LFP波形に反映される神経活動の空間的な測定範囲を推測した。その結果、先端直径80 μm のガラス電極による細胞外電位記録が300-350 μm 程度の範囲の神経活動を反映していることが推測できた(図4)。

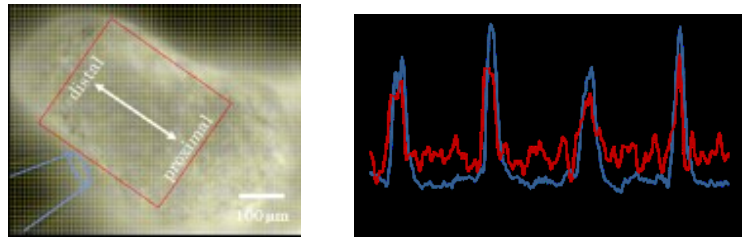


図4 蛍光強度変化の時間差分とLFP波形の比較

左図の赤い枠で囲った範囲の蛍光強度変化の時間差分の積算を右図では赤線で示している。また、LFP波形を青線で示している。蛍光強度変化の時間差分はLFP波形の形状をよく再現している。

第6章

第6章では、本研究の結果を総括した。本研究では以下のことが明らかになった。(1) ガラス電極を用いた電気生理測定によって測定したLFP波形の形状が、忌避性の匂い刺激によって鋭い形状に変化した。(2) ウェーブレット解析で求めたエネルギーの周波数分布が忌避性の匂い刺激によって狭い分布に変化し、それに伴ってエントロピーが減少した。(1)と(2)の結果から、忌避性の匂い刺激によって前脳葉の神経活動の位相差が減少したのではないかと考えた。(3) 本研究で構築した膜電位イメージング測定系と擬似カラー画像作成法によって、前脳葉における神経活動を高速かつ詳細に可視化することに成功した。(4) これにより、忌避性の匂い刺激によって、確かに前脳葉の神経活動の位相差が減少することが確認された。(5) 電気生理測定の結果と膜電位イメージング測定の結果を比較することで、ガラス電極によって測定したLFP波形に前脳葉の神経活動の空間的な情報が含まれていることが分かった。(6) 膜電位イメージング手法と比較して容易に測定できるLFP波形とウェーブレット解析から、前脳葉の空間的秩序性の変化についての評価が可能であることが示唆された。(7) LFP波形に含まれている前脳葉の神経活動の範囲が300-350 μm 程度の範囲であることが推測できた。(8) 前脳葉の神経活動の位相差の減少が忌避性の匂い刺激特有のものだということが示唆された。