

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

日本大学総合基礎科学研究科

相関理化学専攻

斎藤研究室

担当指導教員 斎藤 稔教授

6211D01 濱崎 雄太

第1章 序論	1
1.1 研究の背景	1
1.2 電気生理学的測定	3
1.3 ウェーブレット解析	4
1.4 膜電位イメージング	6
1.5 実験動物としてのチャコウラナメクジ	7
1.6 本研究の目的	9
第2章 実験方法	10
2.1 ナメクジの飼育方法	10
2.2 ナメクジの解剖方法	10
2.3 電気生理実験	12
2.3.1 実験標本作製	12
2.3.2 実験手法	12
2.4 膜電位イメージング実験	14
2.4.1 実験標本作製	14
2.4.2 実験手法	15
2.4.3 神経活動の可視化	17
第3章 匂い刺激に対する前脳葉の局所場電位 (LFP) 波形の変化	22
3.1 本実験の目的	22
3.2 実験方法	22
3.3 実験結果	22
3.4 解析結果	25
3.6 考察	37
第4章 匂い刺激に対する前脳葉の神経活動変化のイメージング	38
4.1 本実験の目的	38
4.2 実験方法	38
4.3 実験結果	39
4.4 解析結果	44

4.6 考察.....	50
第5章 局所場電位 (LFP) 波形に含まれる空間情報の推定	51
5.1 本解析の目的	51
5.2 解析方法.....	51
5.3 解析結果.....	52
5.4 考察.....	55
第6章 総括	56
第7章 参考文献	59
第8章 謝辞	64

第 1 章 序論

1.1 研究の背景

神経系は、生物が神経細胞の働きによって行動、記憶、学習などを行う器官である。神経系には中枢神経系と末梢神経系があり、それらすべてはシナプスを介して繋がっている。中枢神経系とは、神経細胞が密集している領域を指す。哺乳類の中枢神経系は脳と脊髄である。そこには、多くの神経細胞が存在しており、その一つ一つが情報を交換し複雑な神経回路を構成している。この複雑な神経回路によって哺乳類は、記憶や学習などを行うことができる。そのため、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。軟体動物は動物界・軟体動物門に分類される生物の総称で、中枢神経系をもつ生物である。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。そして、神経節を構成している神経細胞の数が哺乳類よりも少ない。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、筋肉をつな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。また、神経節の神経活動が生理食塩水中で長時間持続することも、実験を行う上での利点として挙げられる。

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繋がってくる。本研究では、陸棲の軟体動物であるチャコウラナメクジ (図 1) の嗅覚中枢に着目し、匂い刺激前後の神経活動を電気生理的手法によって測定した。測定した神経活動に対して数理解析を行い、匂い刺激によって生じる神経活動の周波数特性の変化を調べた。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ナメク

ジの嗅覚中枢の神経活動を測定し、匂い刺激によって生じる空間的な神経活動の変化について調べた。



図1 チャコウラナメクジ

1.2 電気生理学的測定

神経細胞間の情報伝達はシナプスを介して行われている。シナプスにおける情報伝達には電氣的伝達による電気シナプスと化学的伝達による化学シナプスとがある。上流に存在する神経細胞とのシナプス、あるいは外界からの信号を受けた神経細胞では、信号の種類に応じた膜電位変化を起こす。生じた膜電位変化が閾値を越えて脱分極に達した場合に、活動電位が発生する。活動電位が発生すると、下流に位置する神経細胞との間のシナプスで情報の伝達が行われる。

このように個々の神経細胞では、情報の受け取り、受け取った情報の統合、統合された情報の出力といった各過程において膜電位の変動が見られるため、神経細胞の活動は電氣的活動から捉えることができる。そのため、神経科学の発展において電気生理学的手法はなくてはならない手法の一つである。電気生理学的手法には、単一チャンネルの働きを捉えるパッチクランプ法、単一細胞に電極を刺入する細胞内電位記録や、細胞外の電位変化を捉える細胞外電位記録等がある。本研究では細胞外電位記録を用いた。細胞外電位記録には、測定位置や電極の形状によって単一ユニット記録、マルチユニット記録、局所場電位記録、皮質脳波、脳波等がある。本研究ではナメクジの嗅覚神経系の同期活動に着目し、ガラス電極による局所場電位（**Local Field Potential; LFP**）測定を行った。この測定で得られた **LFP** 振動は、神経細胞におけるシナプス電位等の細胞膜でのイオンの流入出を伴う活動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^{1,2)}（図2）。

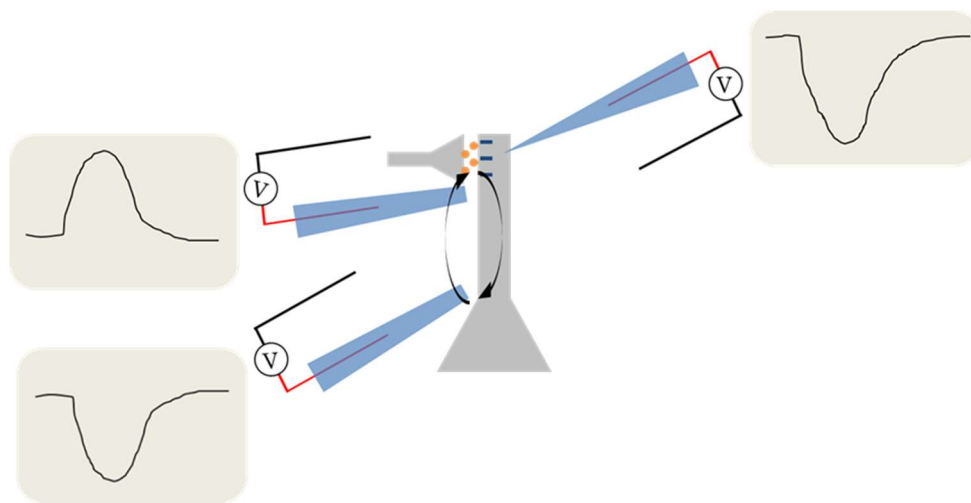


図2 細胞外電位記録方法の概念図

1.3 ウェーブレット解析

信号解析において信号の周波数成分は重要な情報である。信号の周波数解析手法の代表例としてフーリエ解析があげられる。フーリエ解析は、信号を無限に続く正弦波の組み合わせとして表現し、信号全体での周波数成分を解析する手法である。そのため定常な信号に対してフーリエ解析は重要な解析手法である。しかし、生物由来の信号は多くの場合、定常的ではなく常に時間的な変化を伴っている。そのような生物由来の信号に対して周波数解析を行う際には、時々刻々と変化している周波数の変化を調べることになる。そのような信号の周波数成分を解析する際には、時間情報が失われてしまうフーリエ解析は不向きである。信号の周波数成分の時間変化を調べる手法としては短時間フーリエ解析や本研究で用いたウェーブレット解析などがあげられる³⁾ (図 3)。

短時間フーリエ解析は、信号の区間を窓関数によって区切り、窓ごとにフーリエ解析を行い、時間ごとの周波数成分を解析するものである。この時の時間分解能と周波数分解能は窓のサイズに依存する。そして、窓のサイズを大きくすることで周波数分解能は向上するが、時間分解能は低下する。逆に、窓のサイズを小さくすると時間分解能は向上するが、周波数分解能は低下する。そして、短時間フーリエ解析の場合、窓のサイズは常に一定のものとなる。しかし多くの信号に対しては、時間と周波数のどちらかをより正確に決定するために、窓の大きさを可変にできるようなより柔軟な手法が有効になる。

ウェーブレット解析は、信号をスケール変化とシフト変化という二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。各スケールのマザー・ウェーブレットをフーリエ変換することでそれぞれの周波数成分が分かるため、時間-周波数解析として用いることができる。ウェーブレット解析では窓のサイズは一定ではなく、スケールに応じて窓幅が変化する。そのため、周波数成分の変化などの時間情報も正確に取り出すことができる。

本研究では、測定したナメクジ嗅覚神経系の LFP 振動の周波数分布の時間変化を解析するために、測定した LFP 振動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。

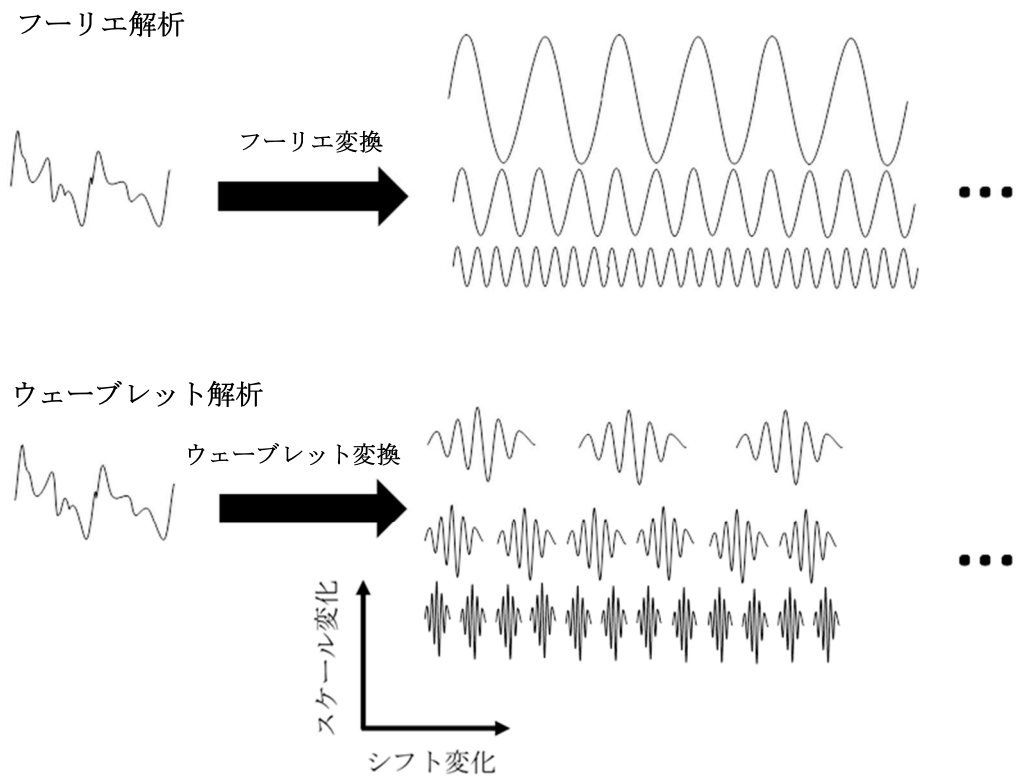


図3 フーリエ解析とウェーブレット解析の比較

1.4 膜電位イメージング

電気生理的手法は時間分解能が優れていること、また長時間測定を行うことができることから単一細胞や狭い範囲を標的にした測定には大変有効な手法であるが、神経節全体や神経回路網の活動等の空間的活動を測定するためには、電極の数や電極の配置密度等の問題があり電気生理的手法を用いることは困難である。そこで近年では、空間的な神経活動を測定するために、蛍光イメージング手法を用いた研究が盛んに行われている。蛍光イメージング手法は、特定の波長の光によって励起され、蛍光を発する蛍光色素で観察対象を染色し、その蛍光強度を画像としてコンピュータに取り込み、解析するものである。蛍光色素の種類によって蛍光強度変化が示す現象は異なる。蛍光色素の種類としては、カルシウム感受性色素や膜電位感受性色素が存在し、それぞれ細胞内へのカルシウムイオン流入と膜電位変化を観察できる。

カルシウム感受性色素は、そのままの状態では細胞膜を透過することができないため、通常アセトキシメチル化 (AM 化) して細胞内に浸透させ、細胞内の酵素によって AM 基を分解させることで細胞内にとどまらせる^{4,7)}。しかしながら軟体動物では、AM 基分解酵素の酵素活性が弱いことから、カルシウム感受性色素を導入することは困難である。カルシウムイメージング法が色素を細胞内部に注入する必要があるのに対し、膜電位感受性色素は細胞膜内で作用するため、AM 化する必要がなく、軟体動物における測定にも使用することができる。

膜電位感受性色素は反応速度の違いから **fast response dye** と **slow response dye** に分けられる⁸⁾。本研究では、応答の速さを重視した結果、**fast response dye** の 1 種で styry 系の化合物である **Di-4-ANEPPS** を使用した⁹⁾。

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⁹⁾。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 **0.1~1%** 程度の蛍光強度変化はカルシウム感受性色素などの他の蛍光色素と比べて非常に低い蛍光強度変化であるため、明るい光学系と感度に優れた受光器が必要になる。本研究では、光学系に開口数の大きい対物レンズと輝度揺らぎが少ない **LED** 光源を使用し、受光器として **EM-CCD** カメラあるいは **sCMOS** カメラを用いた。

1.5 実験動物としてのチャコウラナメクジ

本研究で用いたナメクジはチャコウラナメクジ (学名: *Limax Valentianus*) と呼ばれる種類である。体長 50 mm、体幅 10 mm、体高 10 mm 程で軟体部は黄褐色から茶褐色で、背面や側面には茶褐色の細かい斑模様があり、外套膜の後方の両側に 2 本の黒褐色帯がある。チャコウラナメクジは他のナメクジと同様に嗅覚-味覚連合学習をすることが知られている¹⁾。これは、条件刺激としてニンジンやキュウリなどのチャコウラナメクジが好む匂いを与え、次に無条件刺激としてキニジンなどの苦味物質を与えることで条件付けが成立し、条件刺激に使用した匂いに対して逃避行動をとるようになる現象である¹⁰⁾。この学習は匂い嫌悪学習と呼ばれている。この連合学習の型は興味深いことに、ラットのような高等哺乳動物の示す連合学習の型と同じである。この結果は、連合学習のメカニズムが軟体動物から哺乳動物まで共通であることを予測させるものである¹¹⁾。

チャコウラナメクジの嗅覚感覚器は大触角、小触角の先端にある嗅上皮と呼ばれる器官である¹²⁾。大・小触角には触覚神経節も存在しており、触覚神経節の神経細胞は自発的な振動活動を行っている¹³⁾。中枢神経系である神経節は直径 1 mm 程度の大きさで食道の周囲に位置しており、前脳葉、中脳葉、後脳葉、側神経節、外套神経節、内臓神経節、腹足神経節から構成されている (図 4)。

匂い物質は大触角、小触角の嗅上皮に存在する匂い受容細胞の活動に変換される。匂い受容細胞ごとに投射先は異なっており、直接中枢神経系内の中・後脳葉に投射される経路と触覚神経節内の介在ニューロンに投射された後に多くが中枢神経系内の前脳葉に投射され、一部が中・後脳葉に投射される経路が存在する¹⁴⁾。以下、前脳葉について説明する。

前脳葉はナメクジの二次嗅覚中枢で、上述した嗅覚-味覚嫌悪学習の記憶もここに貯蔵されている^{11, 15-16)}。前脳葉には、直径 6-8 μm の軟体動物の中枢としては小さい細胞が 10^5 個のオーダーで密集しており、内層、終末層、細胞体層の三層に分かれている¹⁷⁻¹⁹⁾。前脳葉には 2 種類の神経細胞が存在している。周期的にバースト状の発火を見せるバースト型ニューロンと、発火頻度が低くバースト状の発火を生じない非バースト型ニューロンである。両者ともに細胞体は細胞体層の全体にわたって存在している。まず、バースト型ニューロンについて説明する。バースト型ニューロンは前脳葉を構成する神経細胞数の 10% 以下と数が少なく、卵形の細胞体を持ち、細胞体層表面にはほぼ平行に神経突起を伸ばしている。そして非バースト型ニューロンと細胞体層内で接続しており、バースト型ニューロンは非バースト型ニューロンに抑制性入力を与えている²⁰⁻²²⁾。次に非バースト型ニューロンについて説明する。非バースト型ニューロンは円

形の細胞体を持ち、細胞体層に対して垂直に終末層、内層へ神経突起を伸ばしている。非バースト型ニューロンは終末層に触覚神経節からの軸索投射があり、内層で中・後脳葉と接続している^{20, 21, 23}。

前脳葉では構成する神経細胞の同期活動が生じているため、個々の神経活動の結果、同期の取れた膜電位振動が生じている^{17, 24-26}。この膜電位振動は、細胞外電位記録で測定することができる。測定されたLFP振動には振動数が0.5-1 Hz、振幅が数10 μV の周期的な振動が発生している。また、前脳葉の先端部と基部ではLFP振動に位相差が存在していることが知られている^{17, 24-26}。また、嗅覚-味覚連合学習時に無条件刺激の種類ごとに前脳葉の特定の神経細胞の活動が活性化することが報告されている。このことから、嗅覚情報が前脳葉の神経活動の時空間パターンにコーディングされていると考えられている。

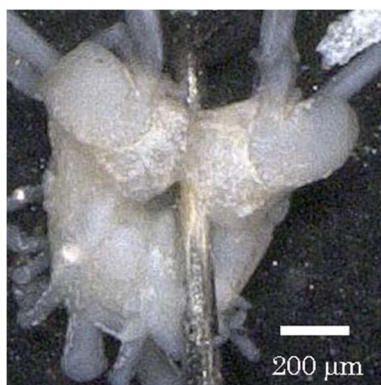


図4 チャコウラナメクジの神経節

1.6 本研究の目的

本研究では、匂い刺激に対するナメクジ前脳葉の神経活動の変化を調べることを目的として、ナメクジ嗅上皮に匂い刺激を行い、前脳葉の LFP 振動の変化を細胞外電位記録で測定した。測定した LFP 振動に対してウェーブレット解析を行った。その結果、忌避性の匂い刺激によって LFP 振動の各周波数帯のエネルギー分布の変化とエントロピーの減少が見られた。エントロピーの減少は空間的秩序性の増加を予想させる。そこで、ナメクジの前脳葉に対して空間的な測定を行うことを検討した。しかしながら、電気生理的手法は時間分解能が優れていること、また長時間測定を行うことができることから単一細胞や狭い範囲を標的にした測定には大変有効な手法であるが、神経節全体や神経回路網の活動を調べる等の空間的活動を測定するためには、電極の数や電極の配置密度等の問題があり電気生理的手法を用いることは困難である。そこで、電位感受性色素 Di-4-ANEPPS を用いた膜電位イメージング測定を行い、匂い刺激による時空間神経活動パターンの変化について調べた。その際に、高速撮影が可能なシステムと明るい光学系を用いることによって、時間分解能と S/N 比が向上した測定系の構築を行った。

しかし、時空間神経活動パターンを取得することが可能な膜電位イメージング手法は、時間分解能では細胞外電位記録に劣る。また、長時間の測定においても蛍光色素の退色のために細胞外電位記録には及ばない。そこで、細胞外電位記録から空間情報を引き出すことを試みた。細胞外電位記録によって得られた LFP 振動に反映された前脳葉の空間範囲を調べる事を目的に、細胞外電位記録と同時に膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS を用いた膜電位イメージング測定を行い、細胞外電位記録に対応した蛍光強度変化（神経細胞の膜電位変化）を調べた。そして得られた蛍光強度の時系列データに対して波形解析を行い、LFP 振動との比較を行った。

本論文の第 2 章では、ナメクジの解剖方法、測定方法、解析方法など本研究で用いた実験方法について述べた。第 3 章では、匂い物質に対する前脳葉の LFP 振動の変化を電気生理的手法で調べた結果について述べた。第 4 章では、膜電位イメージング測定を行い、匂い刺激による前脳葉の時空間神経活動パターン変化を調べた結果について述べた。第 5 章では、細胞外電位記録と同時に膜電位イメージング測定を行い、細胞外電位記録で得られた LFP 波形に含まれる空間情報の推定を行った。第 6 章では第 3 章、第 4 章、第 5 章の結果を総括した。

第 2 章 実験方法

2.1 ナメクジの飼育方法

本研究で用いたチャコウラナメクジは、体重 1 g 前後に成長したものを使用した。プラスチックケースの飼育箱内には、濾過水を染み込ませた濾紙を置き、乾燥を防いだ。餌にはマウス・ハムスター飼育飼料(オリエンタル酵母工業(株))、小麦デンプン(和光純薬工業(株))、混合ビタミン(オリエンタル酵母工業(株))を 25:24:1 の割合で混合した混合粉末飼料を用いた。飼育箱の掃除は、汚れや餌に生えるカビを防ぐために 1 週間に 2 回行い、その際ナメクジに少量の餌を与えた。ナメクジが入った飼育箱は恒温 (20°C) で、12 時間/12 時間の明暗周期に設定したインキュベータ (A5501, 生田産業(株)) 内で保管した。

2.2 ナメクジの解剖方法

本研究でバッファに使用した試薬は、HEPES (同仁化学研究所(株)) を除いて和光純薬工業(株)の製品を使用した。

本研究では大・小触角・神経節 (前脳葉を含む) をナメクジから取り出して標本とした。ナメクジに麻酔用バッファ (57.6 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM HEPES, 5 mM Glucose) 1 ml を注射器で、ナメクジの体の中ほどに刺し込み麻酔液を注入し、その後、動かなくなるまで待った。ナメクジの外套膜の根元付近を鋏で半分に切断し、上半身を解剖用バッファ (35 mM NaCl, 2 mM KCl, 4.9 mM CaCl₂, 28 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM HEPES, 5 mM Glucose, pH 7.6) で満たしたゴム敷きシャーレの上にのせた。ゴム敷きシャーレを実体顕微鏡の上にのせて、そのゴム敷きシャーレにライトを当てて解剖を行った。

まず初めに、体の中心に走る線に沿って頭の先端と外套膜にピンを刺してナメクジを固定し、外套膜を取り除いた (図 5a)。次に、外套膜に隠れていた体の中心の線に沿って皮膚を切り、神経節や内臓が見えるように皮膚を広げ、四隅を虫ピンで固定した (図 5b)。固定後、神経節、大・小触角以外の内臓を切除した。また、内臓を切除する際には内容物が出ないように末端で切断することを心がけた。除去後は、大・小触角・神経節を皮膚からはがして虫ピンで固定した。さらに、触角先端の皮を嗅上皮が露出するまで切り、匂い物質の嗅上皮への到達を容易にした (図 5c, d)。このようにして測定に用いる大・小触角・神経節の繋がった標本作製した (図 5e)。

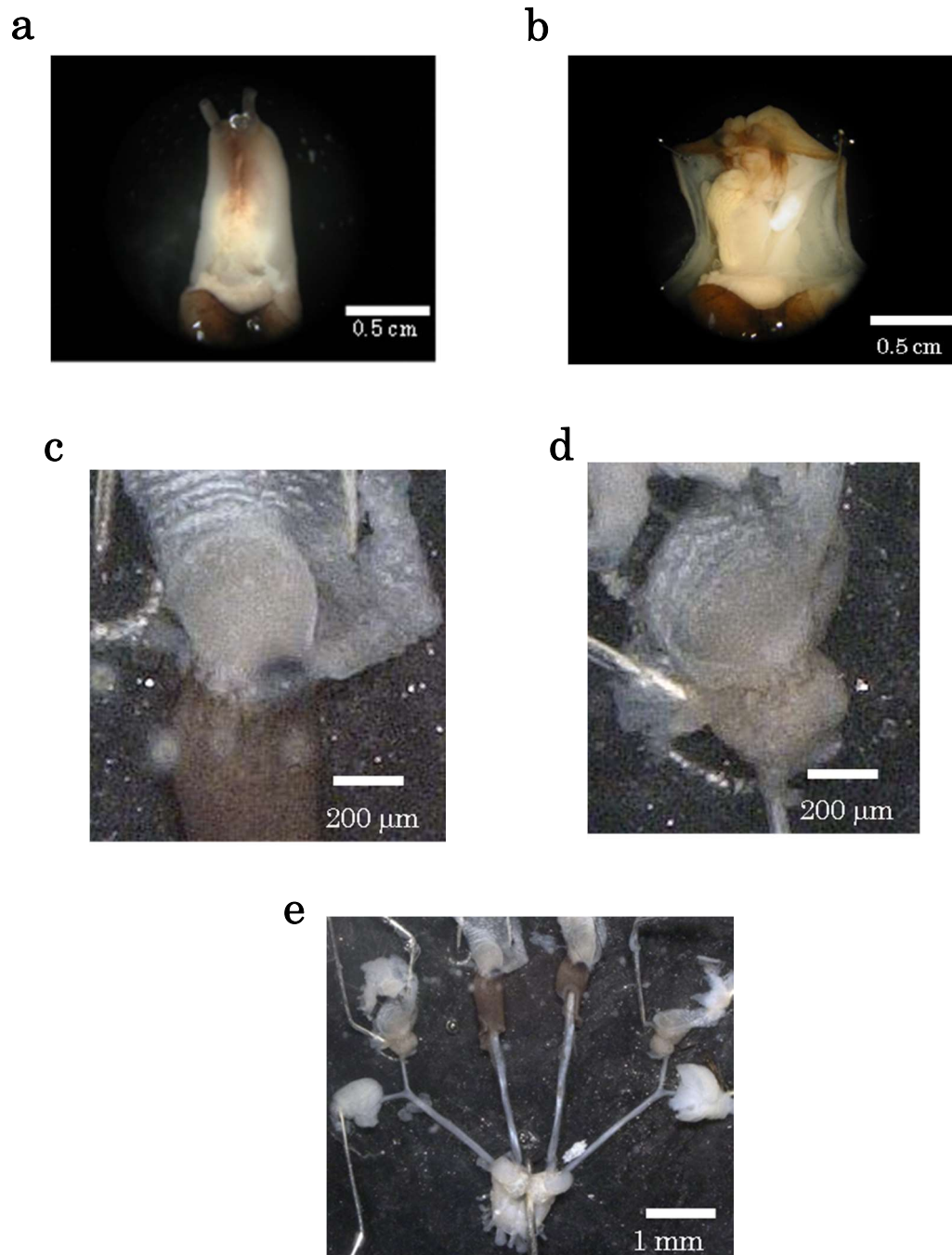


図5 ナメクジの解剖方法

- a: 固定したナメクジ上半身 b: 内臓を露出させたナメクジ上半身
 c: 嗅上皮を露出させた大触角 d: 嗅上皮を露出させた小触角
 e: 作製した大・小触角-神経節標本

2.3 電気生理実験

2.3.1 実験標本作製

作製した大・小触角・神経節標本を測定用バッファ（70 mM NaCl, 2 mM KCl, 4.9 mM CaCl₂, 4.7 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM HEPES, 5 mM Glucose, pH 7.6）で満たされた測定用チャンバに移した。測定用チャンバには大・小触角を空气中に曝すために仕切り板によって2つの部分に区切られたものを用いた（図 6）。大・小触角を仕切り板中央に開いている穴から通し、大・小触角と神経節を分離し、大・小触角側の測定用バッファを吸い出した。なお、液漏れが起きないように穴の部分にはシリコングリス（HIVAC-G, 信越シリコン(株)）を塗布した（図 7）。また、触角の乾燥を防ぐために、大・小触角の下に測定用バッファをしみ込ませた濾紙を敷いた。

2.3.2 実験手法

測定はアングル鋼と銅網を用いて自作したファラデーケージの中で行った。本研究で用いた測定系の概略図を図 8 に示す。測定にはガラス電極を使用した。ガラス電極には、プラー装置（P-97, SUTTER INSTRUMENT）でガラスキャピラリー（GC120T-7.5, HARVARD APPARATUS）を引いた後、マイクロフォーシ（MF900, NARISHIGE）で切断して先端を直径 80 μm 前後に加工したものをを用いた。その中には測定電極として銀線を通し、外側には基準電極として別の銀線を巻いた。ガラス管内にバッファを満たすことで電氣的に外部とつながるようになり、電気回路として成り立つ。ガラス電極には陰圧をかけることが可能となっており、目標神経節（前脳葉）表面に吸着させて測定を行った。測定電極と基準電極間の電位差はプレアンプとアンプ（ER-1, Cygnus Technology）によって 20,000 倍に増幅し、ハイパスフィルタ、ローパスフィルタにより 0.1 Hz 以上、100 Hz 以下の周波数成分のみにした。そして、A/D コンバータ（POWER LAB/4SP, ADInstruments）で 1 kHz のサンプリングレートでデジタル信号に変換し、測定ソフト（Chart5, ADInstruments）で 0.5 Hz から 30 Hz の周波数成分のみをコンピュータに記録した。このようにして測定した電位は、前脳葉の個々の神経細胞の細胞膜上での膜電流によって生じる、ガラス電極先端の細胞外電位の変化である。この細胞外電位が LFP である。測定用チャンバは正立顕微鏡（E-FN1, Nikon あるいは E600FN, Nikon）のステージに固定し、顕微鏡下で前脳葉に測定用バッファを含んだガラス電極を吸着させた。測定する電位のベースラインが安定していることを確認し、測定を開始した。

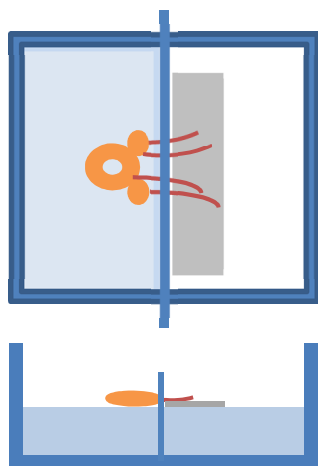


図 6 測定用チャンバの概略図

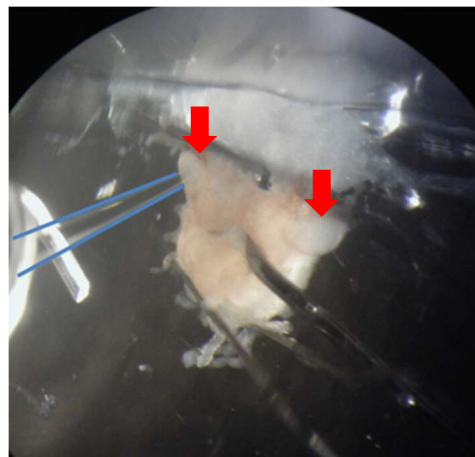


図 7 電気生理測定時の神経節の様子
青い線はガラス電極を示している。
赤い矢印は前脳葉を示している。

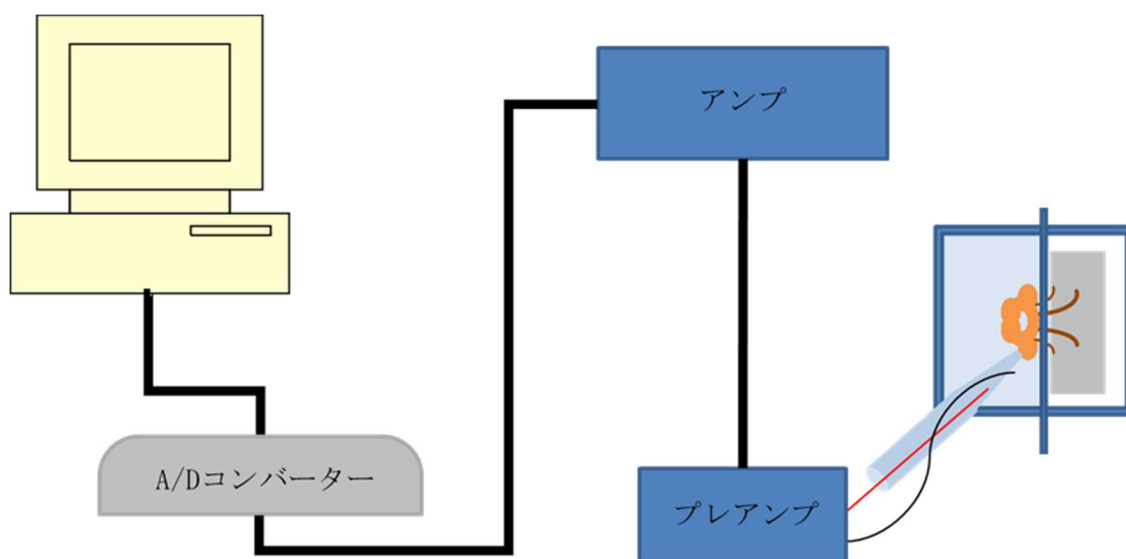


図 8 電気生理測定装置の概略図

2.4 膜電位イメージング実験

2.4.1 実験標本作製

膜電位イメージング実験では、電気生理実験で用いた標本と同様に、大・小触角-神経節の繋がった標本を作製した。作製した標本を解剖用バッファで満たされた測定用チャンバに固定した。測定用チャンバには、電気生理実験に使用したものと同様に、仕切り板によって触角と神経節が分かれる構造の物を使用した。ただし、後述する対物レンズとの接触を避けるために仕切り板を斜めに配置している（図9）。また、イメージング測定において測定対象の移動は、大きな障害である。この実験では、匂い刺激によって誘発される触角等の筋肉の収縮が、測定対象の移動を引き起こす主な原因である。そこで、刺激時の筋肉の収縮や、収縮に伴う神経節の移動を防ぐために触角筋肉の除去や、パラフィルム・微小針を用いた固定を行った（図10）。その後、解剖用バッファと後述する染色液を入れ替えて、50分間浸けて染色を行った。染色液は色素ストック溶液（6.9 mM Di-4-ANEPPS（和光純薬工業(株)）、45%エタノール（和光純薬工業(株)）、5% CremophorEL（Sigma-Aldrich））を解剖用バッファで80倍希釈し調整した。この時点での色素濃度は86 μM である。染色後に解剖用バッファで洗浄し、細胞膜に付着しなかった染色液を洗い流した。最後に解剖用バッファと測定用バッファを入れ替えた。

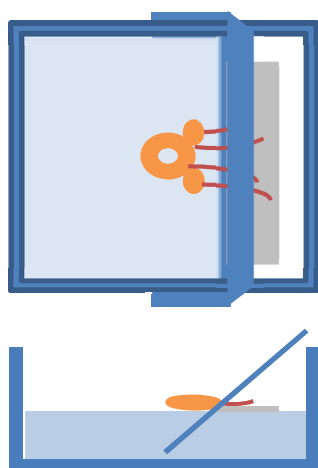


図9 イメージング測定用チャンバの概略図



図10 神経節の固定方法

2.4.2 実験手法

膜電位イメージングに使用する蛍光分子は特定の波長の光を吸収することで励起され、励起光よりも長波長の蛍光を発する。光源からの光は励起フィルタにより必要な波長の光が選択され、これが励起光となる。励起光は、45°に傾いたダイクロイックミラーに到達する。ダイクロイックミラーは特定の波長以上の光は透過し、それ以下の波長の光は反射する特性をもつ。ダイクロイックミラーに到達した励起光は反射され、蛍光測定用の対物レンズを通り、試料に照射される。励起光が照射された試料からは蛍光が発せられ、この蛍光は蛍光測定用の対物レンズを通り、ダイクロイックミラーを透過し、蛍光フィルタにより蛍光のみが選択される。この蛍光を受光器で測定する。

本研究で用いた測定系の概略を図 11 に示す。本研究で用いた測定系は、LED 光源 (LEX2-G, BrainVision)、励起フィルタ (EX510-560, Nikon)、ダイクロイックミラー (DM575, Nikon)、蛍光フィルタ (BA590, Nikon)、10 倍対物レンズ (Plan Apo, 0.45 NA, Nikon)、正立顕微鏡 (E-FN1, Nikon あるいは E600FN, Nikon)、受光器 (EM-CCD カメラ (iXon3, Andor) あるいは sCMOS カメラ (Zyla, Andor))、コンピュータ (Precision T3500, DELL あるいは Precision T5600, DELL) である。LED 光源には中心波長 530 nm のもの、励起フィルタには波長 511 nm~551 nm の光のみを透過させるもの、ダイクロイックミラーには波長 520 nm~575 nm の光を反射し、575 nm 以上を透過させるもの、蛍光フィルタには波長 590 nm 以上の光を透過するものをそれぞれ使用した。第 1 章の「1.4 膜電位イメージングについて」で述べたように膜電位イメージングを行うためには、明るい光学系が必要不可欠である。光学系の明るさは、主に対物レンズの開口数 (NA) によって決まってくる。同じ倍率の対物レンズの場合、開口数が高いほど得られる像が明るくなる。そこで対物レンズには、観察対象である前脳葉全体を観察でき、開口数のできるだけ大きいものを使用した。また、本研究で用いた対物レンズは作動距離が 4.0 mm であるため、匂い刺激のための仕切り板や、ガラス電極の角度を浅くすることで、匂い刺激や、細胞外電位記録との同時測定を可能とした。本研究で使用した受光器の特性については、EM-CCD は sCMOS カメラと比べてサンプリングレートと画素密度で劣るが、受光素子が取得した微弱な光を倍増するため感度が高い。そして、取得した蛍光画像のデータ量が少なく、解析時の処理も高速に行うことができる。一方、sCMOS カメラは EM-CCD カメラと比べて感度が低い。そして測定した蛍光画像のデータ量が多く、解析時の処理にも時間がかかるが、高速かつ画素密度が高い。したがって、解析手法の検討や長時間の測定時には EM-CCD カメラを使用し、短時間かつサンプリングレートが高い測定には sCMOS カメラを使

用した。

次に、蛍光画像の取得方法について述べる。顕微鏡のステージ上に測定用チャンバを固定し、観察対象がカメラの視野の中心になるようセットした。LED光源の光量を75%~100%の連続照射に設定した。EM-CCDカメラの制御には、カメラ制御・解析用ソフト（SOLIS, Andor）を用いた。また、sCMOSカメラの制御には、カメラ制御・解析用ソフト（SOLIS Zyla, Andor）を用いた。

EM-CCDカメラによる測定は以下の設定で行った。測定画素数は512 pixel × 512 pixelとした。10倍対物レンズを用いた場合64 pixelが約100 μmとなる。受光素子からの読み出しレートは10 MHz、受光素子からの読み出し方式はイメージモードを使用した。受光素子からのアナログ信号は14 bitのデジタルデータに変換され記録される。露光時間は15~25 msとし、5000フレーム撮影した。サンプリングレートは露光時間に読み出し時間を足したものとなる。

sCMOSカメラによる測定は以下の設定で行った。測定画素数は1024 pixel × 1024 pixelとした。10倍対物レンズを用いた場合156 pixelが100 μmとなる。受光素子からの読み出しレートは560 MHz、受光素子からの読み出し方式はローリングシャッターモードを使用した。受光素子からのアナログ信号は16 bitのデジタルデータに変換され記録される。露光時間は10 msとし、5000フレーム撮影した。読み出された受光素子から随時受光素子への露光が開始されるため、サンプリングレートも10 msとなる。

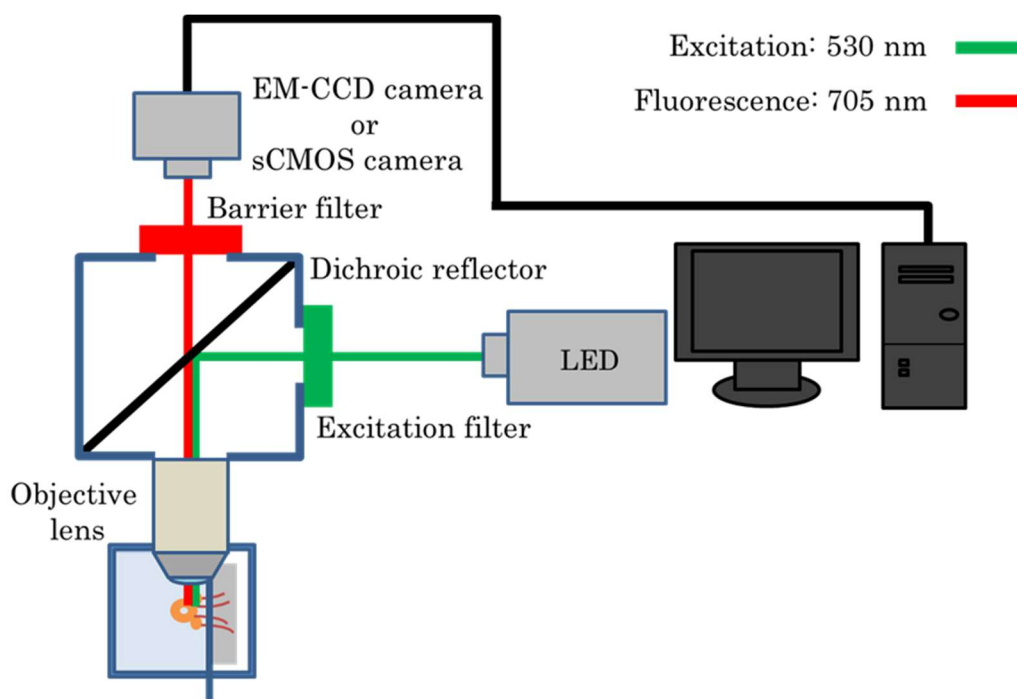


図 11 膜電位イメージング測定装置の概略図

2.4.3 神経活動の可視化

膜電位イメージング手法で得られるデータは、露光時間ごとにカメラの 1 pixel に相当する各受光素子からのアナログ信号を 14 bit あるいは 16 bit のデジタル信号に変換したものである。しかしながら 1 pixel が受光した蛍光強度の時系列データは S/N 比が低く (図 12)、このままでは前脳葉の神経活動を可視化するのは困難である。また、神経活動を可視化する際のデータ量も膨大なものとなる。そこで本研究では、以下に記した手順によって、S/N 比の向上とデータ量の圧縮を図り、擬似カラーによる神経活動の可視化を行った。

まず、画像解析ソフト (ImageJ, HIM) を用いて前脳葉の長軸が水平になるように画像を回転させた。この時、回転後の画像はバイリニア補間によって求めた。その後、sCMOS カメラを用いた場合には、1024 pixel × 1024 pixel の撮影範囲を 16 pixel × 16 pixel ごとの領域 (Region of Interest: ROI) に区切り、露光時間ごとに ROI 内でのデータの平均値を得た。16 pixel × 16 pixel の範囲から算出し平均値の時系列データを図 13 に示す。このため全測定データは 4096 個の時系列データとなる (図 14)。なお、EM-CCD カメラを用いた場合には 512 pixel × 512 pixel の撮影範囲を 8 pixel × 8 pixel の ROI に区切り、露光時間ごとに領域内でのデータの平均値を得た。

次に測定したデータに対して移動平均法によるフィルタリングを行った。入力信号を n 個の離散値

$$x(i) \quad (i = 1, 2, \dots, n)$$

とし、 N 個の離散点からなる重み関数を

$$\omega(j) \quad (j = -m, \dots, -1, 0, 1, \dots, m), \quad N = 2m + 1$$

としたとき平滑値 $y(i)$ は次式で表される。

$$y(i) = \frac{1}{W} \sum_{j=-m}^m \omega(j) \cdot x(i+j) \quad (i = m+1, m+2, \dots, n-m)$$

$$W = \sum_{j=-m}^m \omega(j)$$

重み関数の違いによって単純移動平均や多項式適合法と分類される。

膜電位イメージング手法で得られたデータには、蛍光色素の退色による緩やかな変化が見られる。そこで、各 ROI の時系列データに対して単純移動平均法を用いてフレーム i における蛍光強度を $F(i)$ としたときのベースライン $F_{\text{base}}(i)$ を求め、蛍光強度変化 $\Delta F(i)$ を求めた (図 15)。

単純移動平均法の場合、重み関数は全ての範囲で1となる。そのため $\Delta F(i)$ は次の式で表される。

$$F_{\text{base}}(i) = \frac{1}{N} \sum_{j=-m}^m F(i+j) \quad i = m+1, \dots, n-m$$

N は単移動平均を行う範囲のフレーム数となる。本実験においては、201 フレームで統一した。この計算により、フレームの101枚目から4800枚目までのデータが残ることになる。この時の時系列データには依然として高周波ノイズが残っている。そこで、Savitzky-Golayの係数表による多項式適合法によるスムージングを行った(図16)。この方法は、重み関数 $\omega(j)$ にSavitzky-Golayによって算出された2次・3次多項式適合による平滑化重み係数表(表1)の値を用いたものである²⁷⁾。しかし、スムージング対象のデータは下に凸のピークを持つ波形であるため、重み関数 $\omega(j)$ に-1を乗算したものをを用いた。

$$\Delta F(i) = \frac{1}{W} \sum_{j=-m}^m \omega(j) \cdot \frac{F(i+j) - F_{\text{base}}(i+j)}{F_{\text{base}}(i+j)}$$

$$i = m+1, m+2, \dots, n-m$$

本実験にこの計算を適用することでフレームの $101+m$ 枚目から $4800-m$ 枚のデータが残ることになる。以上の操作をすべてのROIに対して行った。

以下の処理は蛍光画像全体で4096個のROIの内、前脳葉を含んでいるS/N比が高いROIに対して行った。そのROIは蛍光強度変化のピーク数で判別した。ROIごとに蛍光強度変化の時系列データの最小値と最大値で規格化を行い、0から1の数値に変換した。以上の処理には表計算ソフト(Excel, Microsoft)と自作した表計算ソフト上で作動するマクロプログラムを使用して行った。この数値を赤色から緑色を経て青色に変化するカラーチャートとしてグラフ描画ソフト(gnuplot)で出力した。

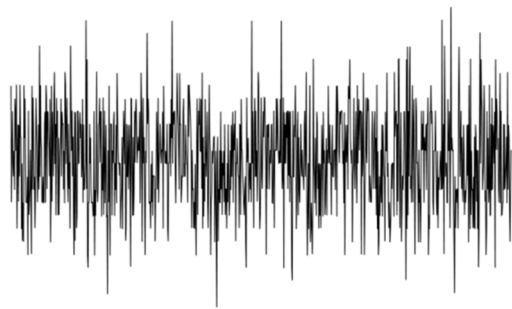


図 12 1 pixel の蛍光強度の時系列データ
(sCMOS カメラによって測定)

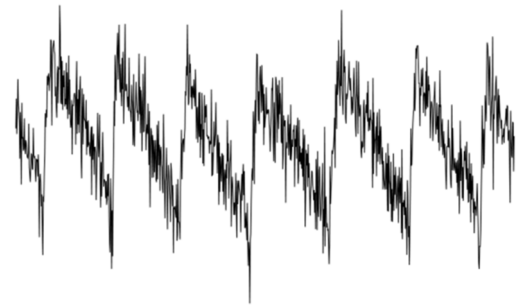


図 13 16 pixel × 16 pixel の蛍光強度の時系列データ
(sCMOS カメラによって測定)

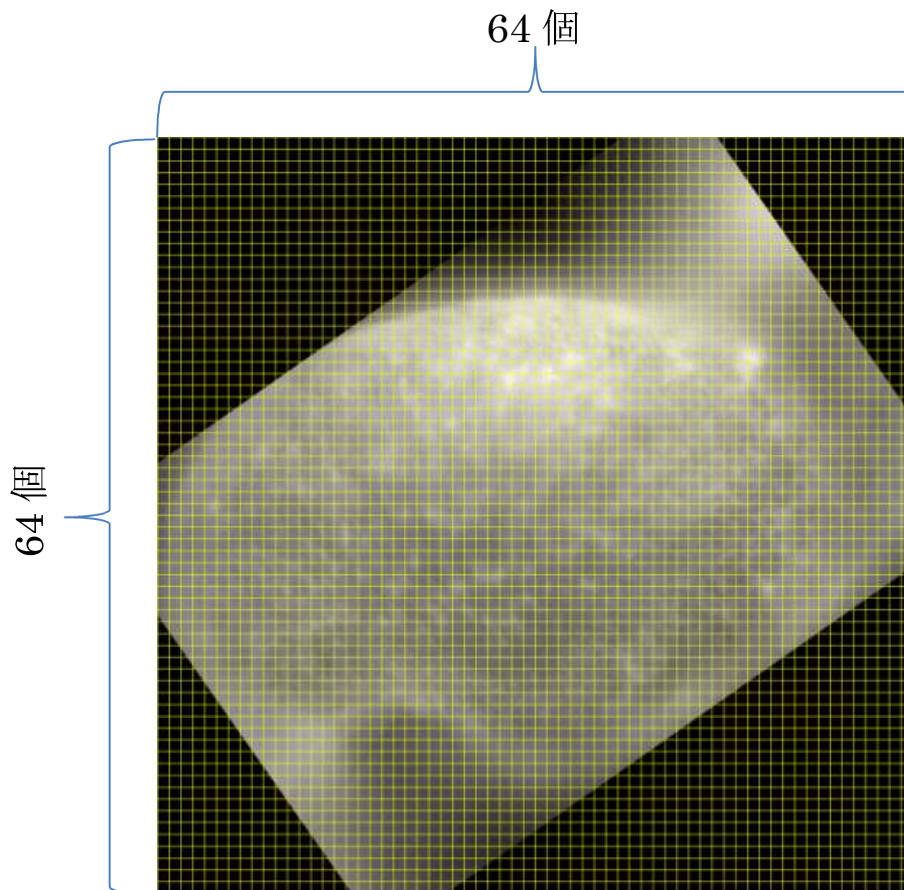


図 14 4096 個の領域に分けられた蛍光画像
(sCMOS カメラによって測定)

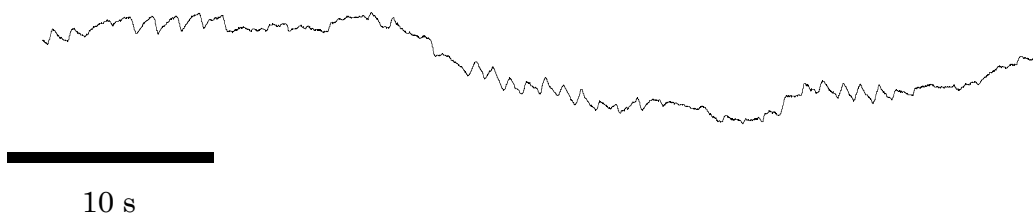
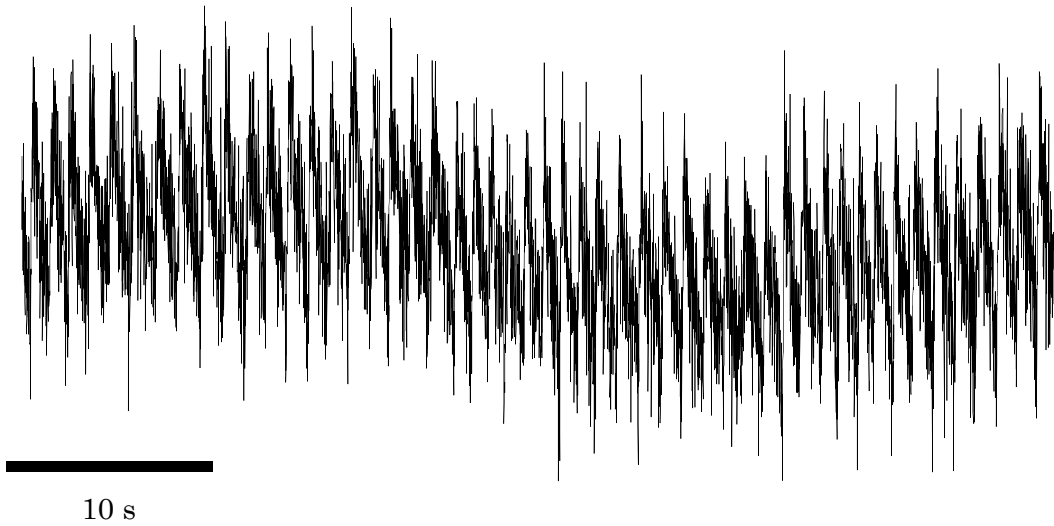


図 15 蛍光強度の時系列データと算出したベースライン
(sCMOS カメラによって測定)

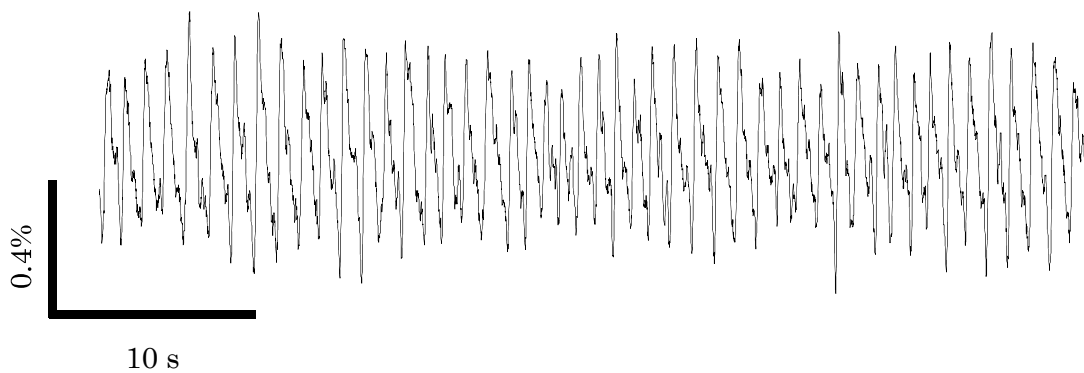


図 16 スムージング処理を施した蛍光強度変化の時系列データ
(sCMOS カメラによって測定)

表 1 Savitzky–Golay による 2 次・3 次多項式適合による平滑化重み係数

$m \backslash j$	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
-12	-253										
-11	-138	-42									
-10	-33	-21	-171								
-9	62	-2	-76	-136							
-8	147	15	9	-51	-21						
-7	222	30	84	24	-6	-78					
-6	287	43	149	89	7	-13	-11				
-5	342	54	204	144	18	42	0	-36			
-4	387	63	249	189	27	87	9	9	-21		
-3	422	70	284	224	34	122	16	44	14	-2	
-2	447	75	309	249	39	147	21	69	39	3	-3
-1	462	78	324	264	42	162	24	84	54	6	12
0	467	79	329	269	43	167	25	89	59	7	17
1	462	78	324	264	42	162	24	84	54	6	12
2	447	75	309	249	39	147	21	69	39	3	-3
3	422	70	284	224	34	122	16	44	14	-2	
4	387	63	249	189	27	87	9	9	-21		
5	342	54	204	144	18	42	0	-36			
6	287	43	149	89	7	-13	-11				
7	222	30	84	24	-6	-78					
8	147	15	9	-51	-21						
9	62	-2	-76	-136							
10	-33	-21	-171								
11	-138	-42									
12	-253										

第3章 匂い刺激に対する前脳葉の局所場電位(LFP)波形の変化

3.1 本実験の目的

本実験では、ナメクジの前脳葉において匂い刺激による LFP 振動の変化を調べることを目的とした。空気中に曝した状態のナメクジ嗅上皮の付近に、忌避反応を示す匂い物質で刺激を行い、LFP 振動変化を電気生理学的手法で測定し、数理解析を行った。

3.2 実験方法

本実験にはナメクジの大・小触角-神経節標本を用いた。標本の作製は、第2章の「2.3.1 標本作製方法」に述べた通りである。匂い刺激による LFP 振動の変化を以下のように測定した。まず、刺激をしていない状態の LFP 振動を測定した。そして測定開始から 10 分後に、大・小触角から約 4.5 cm 離れた場所に匂い物質 500 μ l をしみ込ませた濾紙を静かに置き、10 分間匂い刺激を行った。匂い刺激から 10 分後に匂い物質をしみ込ませた濾紙を静かに取り除き、さらに 10 分間 LFP 振動を測定した。なお、この測定は他の匂いを極力避けるためのカバー内で行った。ナメクジが強い忌避反応を示す isoamyl acetate (東京化成工業(株)) (以下、酢酸イソアミルと表記する) と 1,8-cineol (東京化成工業(株)) (以下、シネオールと表記する) を忌避性の刺激として使用した。匂い物質の忌避性は、行動実験を行い決定した。また、コントロール刺激として測定用バッファを用いて刺激を行った。LFP 振動の測定方法は第2章の「2.3.2 電気生理実験手法」に述べた通りである。

3.3 実験結果

まず、各匂い刺激における LFP 振動の典型例を図 17 に示す。矢印で示した時刻に匂い刺激を開始した。匂い刺激前は振動数 0.5-1 Hz の LFP 振動が見られた。

酢酸イソアミル刺激、シネオール刺激によってピーク間隔から求めた振動数に若干の増加が見られたが大きな変化は見られなかった。振動数の変化は、刺激直後に顕著に見られ、次第に元の波形に戻っていった。一方、これらの忌避性の匂い刺激に対して LFP 振動には大きな変化が見られた。酢酸イソアミル刺激前後の LFP 波形の拡大図を図 18 に示す。細い線が刺激前、太い線が酢酸イソアミル刺激後の LFP 波形を示している。刺激前の LFP 波形にはショルダー型の形状が存在し、緩やかに上昇し緩やかに下降していた。また、複数のピークに分裂しているものも見られた。酢酸イソアミル刺激、シネオール刺激後の LFP

波形には、ショルダーはほとんど見られず鋭くなっている。このような LFP 波形の形状について定量的に解析を行うために、刺激前後の LFP 波形の半値幅を調べた。また、LFP 振動の一時的な周波数変化を調べるために時間一周波数解析手法としてウェーブレット解析を行い、ウェーブレットエネルギーとウェーブレットエントロピーを算出した。ウェーブレット解析については本章の「3.4 解析結果」で詳しく説明する。

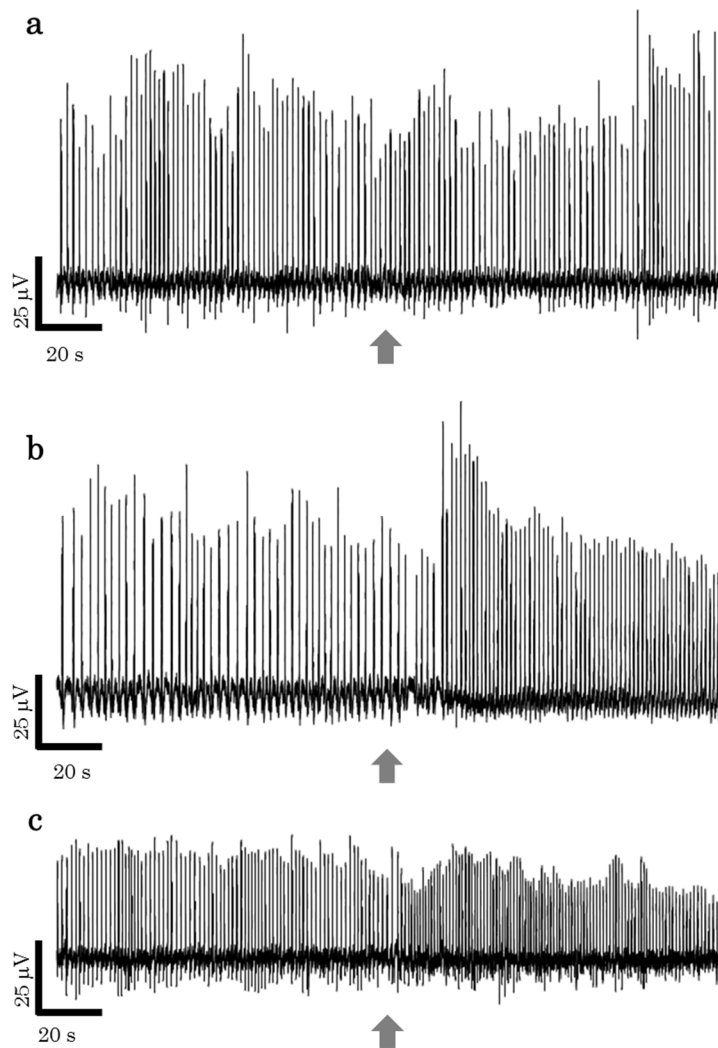


図 17 匂い刺激前後の LFP 振動

a: コントロール, b: 酢酸イソアミル, c: シネオール。矢印の時刻に刺激を開始した。

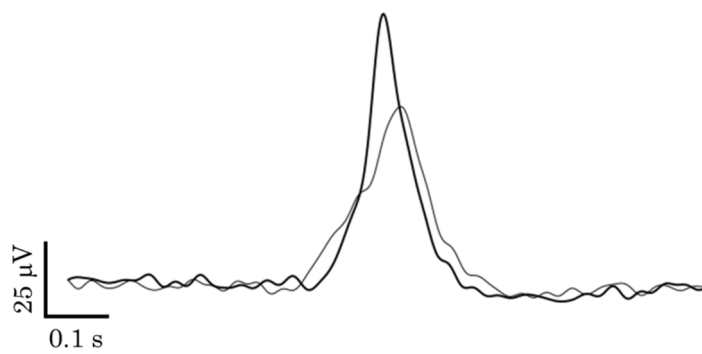


図 18 匂い刺激前後の LFP 波形

細線が刺激前、太線がイソアミル刺激後の LFP 波形を示している。

3.4 解析結果

本実験では、まず LFP 振動を非線形力学系の観点から解析することを試みた。細胞外電位記録によって測定された LFP 振動は、多数の神経細胞間の複雑な非線形相互作用が変化することにより引き起こされる。これは、確率論的なものではなく決定論的な現象であり、神経細胞間の相互作用を非線形力学系として捉えて解析を行うことが可能である。神経活動の時系列データを非線形力学系の観点から解析しようとする場合、位相空間上にアトラクタを再構成する必要がある。アトラクタとは非線形力学系の安定な定常状態であり、時間的に力学変数が変化しない状態に対応する固定点、力学変数が周期的に変化する状態に対応するリミットサイクル、力学変数が不規則だが決定論的に変化する状態（カオス）に対応するストレンジアトラクタに分類される。時系列データから位相空間上にアトラクタを再構成する必要がある。

再構成の方法として最も多く用いられる方法としては、時間遅れ座標系への変換がある（図 19）。電気生理実験から得られた LFP の時系列データから、以下のように Takens の埋込み定理に基づいて時間遅れ座標系へのアトラクタを再構成した。まず、LFP 時系列データ $V(1)$, $V(2)$, $V(3)$, \dots から 3 次元ベクトル

$$\begin{aligned} X_1 &= (V(1), V(1 + \tau), V(1 + 2\tau)) \\ X_2 &= (V(2), V(2 + \tau), V(2 + 2\tau)) \\ &\vdots \\ X_t &= (V(t), V(t + \tau), V(t + 2\tau)) \\ &\vdots \end{aligned}$$

を作製した。ここで、 τ は遅れ時間と呼ばれ、最適な遅れ時間は観測された時系列データの主要な周期の数分の 1 や、時系列データの自己相関関数が最初に 0 となる時刻などの方法により決定される。次に、作製した 3 次元ベクトルを 3 次元位相空間に次々にプロットする。これにより得られた軌道は、その時系列データを発生させる非線形力学系のアトラクタの構造を保存している（これを「時系列データから再構成状態空間への変換が埋込みである」と言う）ことが Takens により示されている²⁸⁾。

刺激前後 15 秒間の LFP 時系列データから 3 次元ベクトルを作製し、その 3 次元ベクトルから再構成した軌道を図示する。コントロール刺激前後の LFP から再構成した軌道を図 20 に、酢酸イソアミル刺激前後の LFP から再構成した軌道を図 21 に、シネオール刺激前後の LFP から再構成した軌道を図 22 にそれぞれ示す。なお遅れ時間 τ は 15 ms とした。

図 20-22 より、刺激前の LFP から再構成した軌道が規則だった構造であることが確認できた。コントロール刺激後には顕著な軌道の変化は見られない。酢酸イソアミル、シネオールによる匂い刺激開始直後には一度乱れた軌道が徐々に元の軌道に遷移していた。このことは 15 秒間という短い時間の中で力学系の軌道が変化していることを示している。

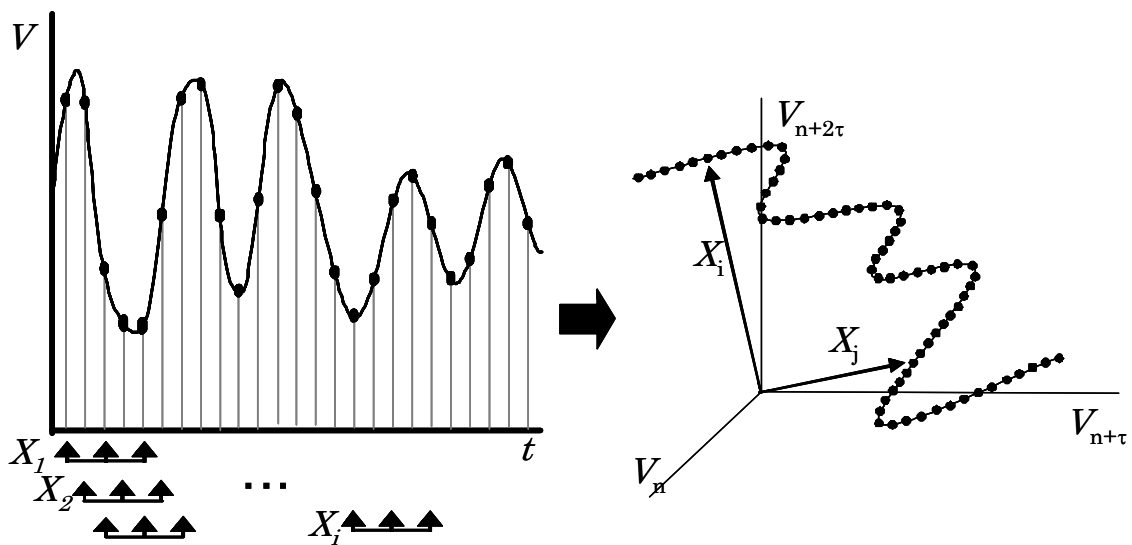


図 19 3次元ベクトルの作製と時間遅れ座標系への埋込み

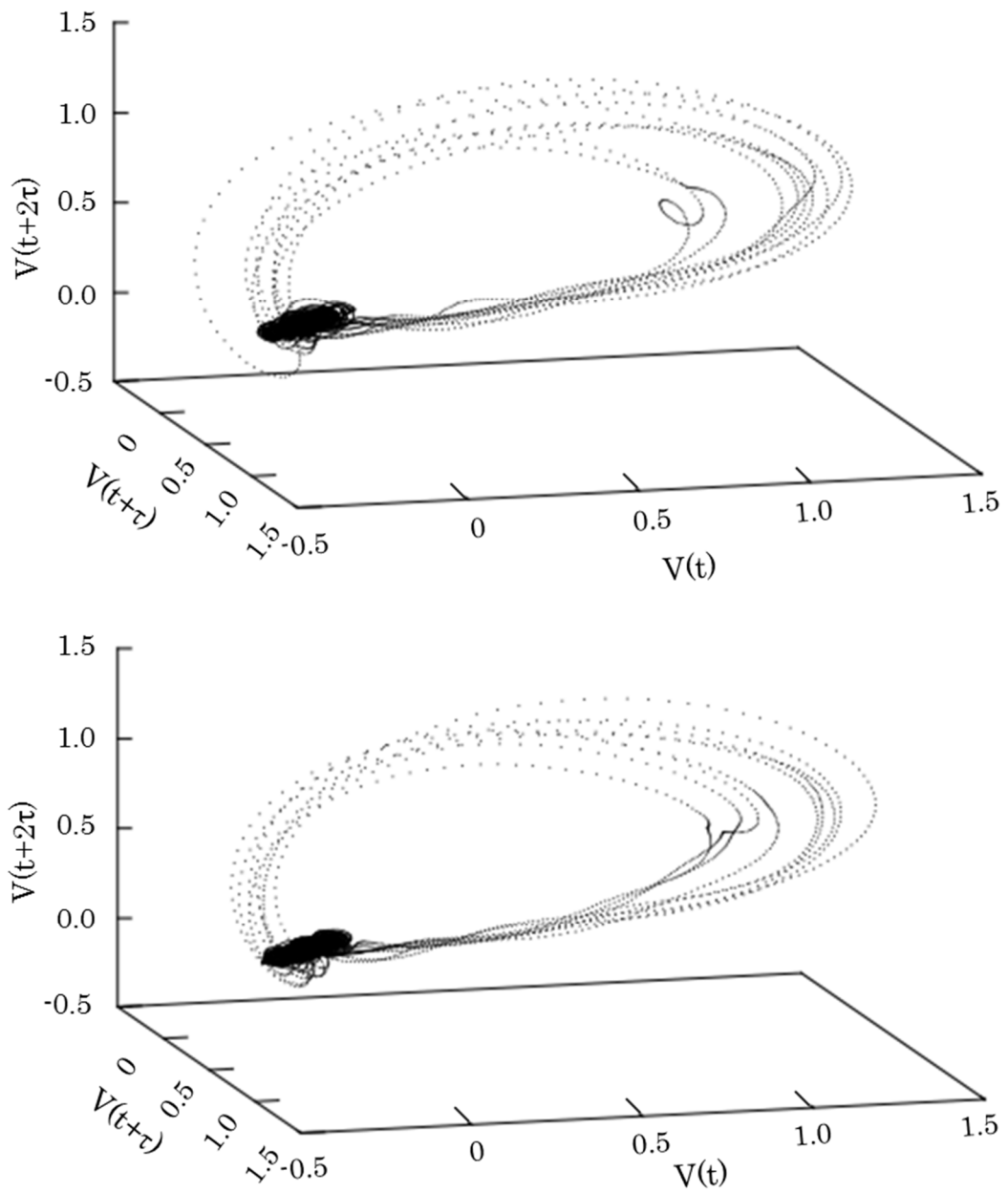


図 20 コントロール刺激前後の LFP 時系列データから再構成した軌道
 上: 刺激前の LFP 時系列データから再構成した軌道 下: コントロール刺激
 直後の LFP 時系列データから再構成した軌道

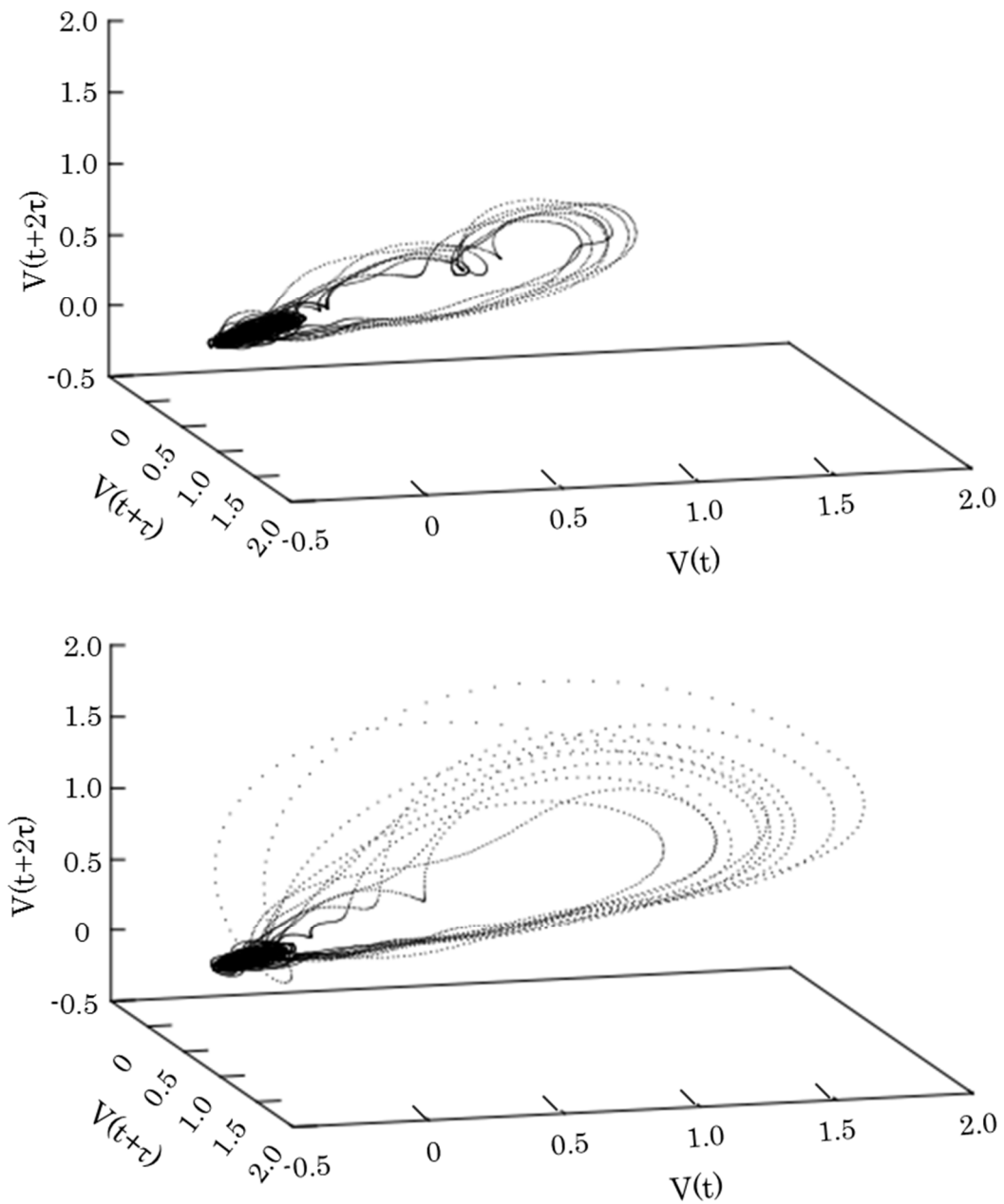


図 21 酢酸イソアミル刺激前後の LFP 時系列データから再構成した軌道
 上：刺激前の LFP 時系列データから再構成した軌道 下：酢酸イソアミル
 刺激直後の LFP 時系列データから再構成した軌道

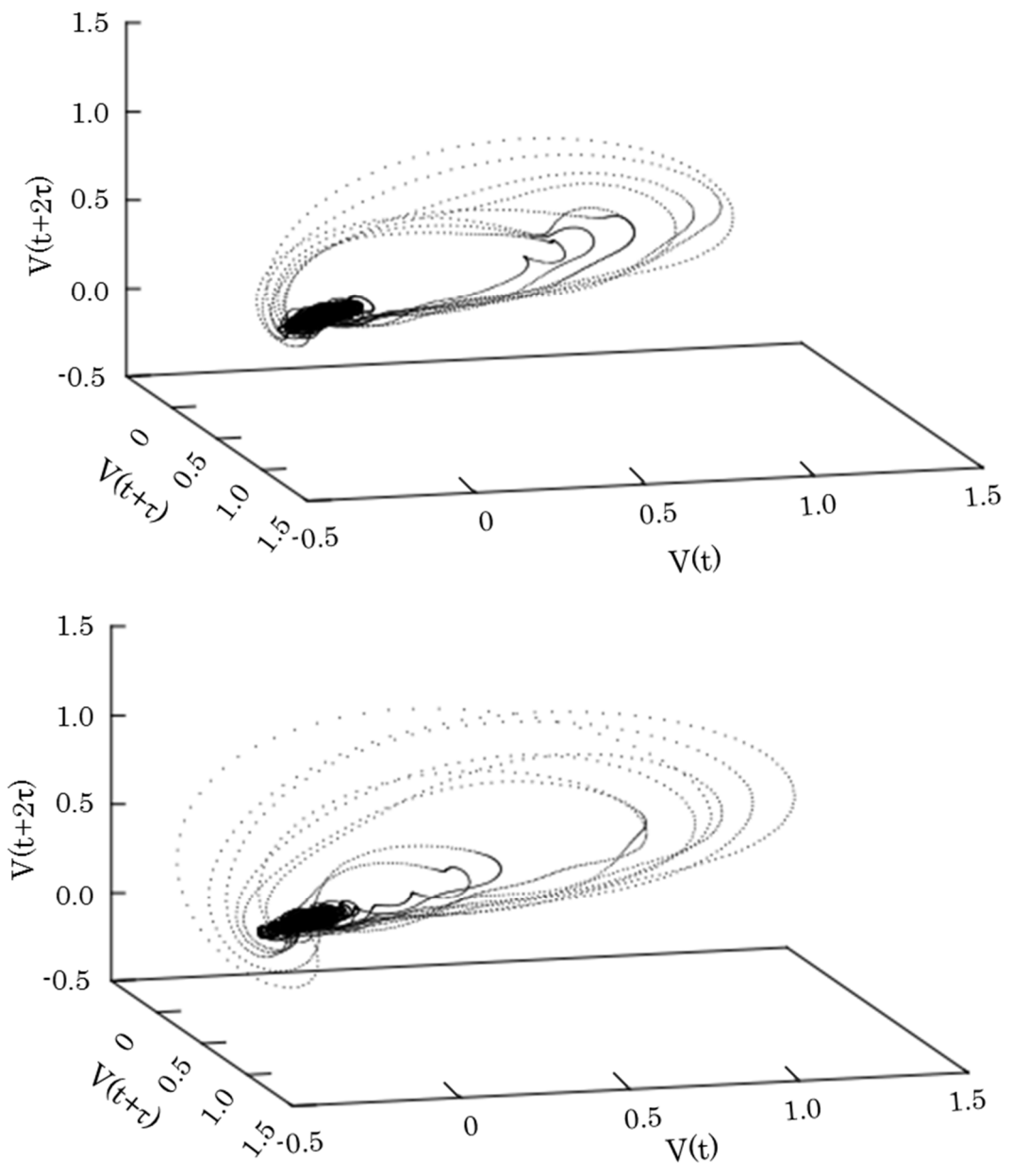


図 22 シネオール刺激前後の LFP 時系列データから再構成した軌道
 上：刺激前の LFP 時系列データから再構成した軌道 下：シネオール
 刺激直後の LFP 時系列データから再構成した軌道

次に、LFP 波形の形状について解析を行った。その理由は、本実験で使用したガラス電極の先端の直径 ($80\ \mu\text{m}$) は多数の神経細胞が収まる範囲であり、前脳葉の先端部と基部に位相差が存在することが知られていることから^{17, 24-26}、測定範囲内の神経活動の位相差などの空間情報が LFP 波形の形状に反映されていると考えたためである。そのため、刺激前後の LFP 波形の半値幅を調べた。半値幅はピークの最大値から最小値を引いたものを振幅とし、その振幅の半分の値を越えた時間とした。そして非線形解析の結果から 15 秒という短い時間で力学系の軌道が変化していることから、刺激前の 4 回の波形の半値幅を刺激前のデータとし、各匂い刺激直後の 4 回の波形の半値幅を各匂い刺激後のデータとした。各データの外れ値をスミルノフ・グラブス検定で除いた。その後、それぞれの項目ごとに平均値を求めた。結果は平均値 \pm SEM として表記した。また、n は波形のデータ数である。本解析には表計算ソフト (Excel, Microsoft) と自作した表計算ソフト上で動作するマクロプログラムを使用した。

図 23 に LFP 波形の半値幅の解析結果を示す。刺激前の半値幅は、 $0.106\pm 0.003\ \text{s}$ (n=188) であった。コントロール刺激後には $0.106\pm 0.006\ \text{s}$ (n=64)、酢酸イソアミル刺激後には $0.093\pm 0.004\ \text{s}$ (n=68)、シネオール刺激後には $0.093\pm 0.004\ \text{s}$ (n=52) となった。この結果から、酢酸イソアミル刺激とシネオール刺激によって LFP 波形が鋭い波形に変化していることが分かった。

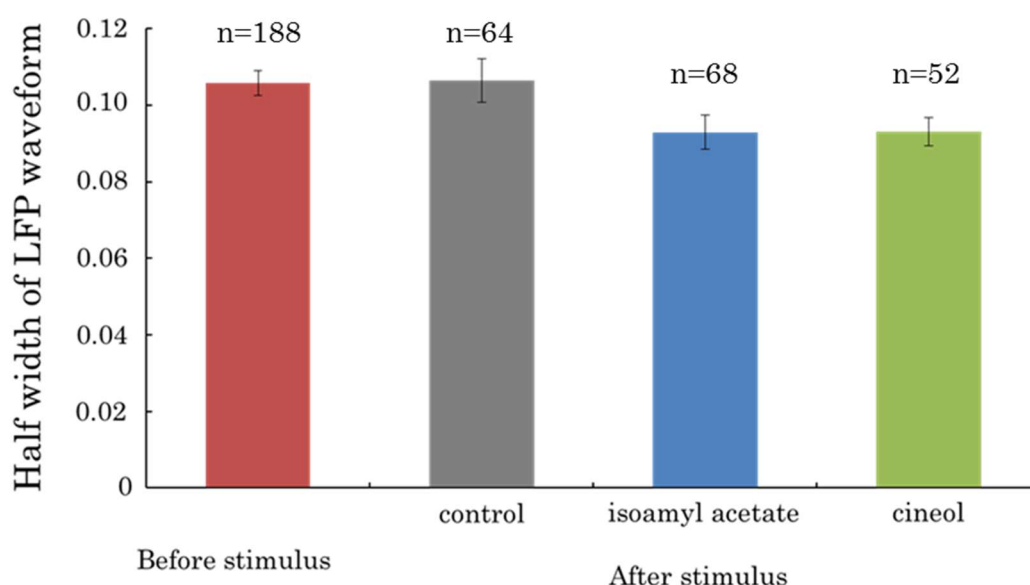


図 23 匂い刺激前後の LFP 波形の半値幅

忌避性の匂い刺激である酢酸イソアミル、シネオール刺激後に半値幅が減少している。結果は平均値 \pm SEM で示した。n は波形のデータ数である。

また、測定した LFP 振動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では、LFP 時系列データにウェーブレット変換を行い、マザー・ウェーブレットと時系列データの適合度を意味するウェーブレット係数 $C(j, k)$ を求める³⁾。ウェーブレット変換は以下の式で表される。

$$V(t) = \sum_{j=1}^N \sum_k C(j, k) \psi_{j,k}(t), \quad C(j, k) = \int_{\mathbb{R}} V(t) \psi_{j,k}(t) dt,$$

$$\psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{2^j}} \psi(2^{-j}t - k).$$

ここで、 ψ はマザー・ウェーブレット、 j はマザー・ウェーブレットのスケール、 k は時間係数を表す。

本実験では、マザー・ウェーブレットに *Daubechies* のオーダー12 を使用し、12 段階のスケールについて $C(j, k)$ を求めた²⁹⁾。12 段階のスケール j はそれぞれ 0-0.225 Hz, 0.225-0.45 Hz, 0.45-0.90 Hz, 0.90-2.40 Hz, 2.40-5.00 Hz, 5.00-9.35 Hz, 9.35-15.30 Hz, 15.30-27.55 Hz, 27.55-54.00 Hz, 54.00-106.30 Hz, 106.30-220.70 Hz, 220.70-300.00 Hz の各周波数帯に対応する。

次に、LFP 振動の周波数分布の時間変化を解析するために、時間ごとの各スケールのエネルギーとそのエネルギー分布からエントロピーを求めた。エネルギーとエントロピーの求め方を以下に説明する³⁰⁻³³⁾。

得られたスケール j のウェーブレット係数 $C(j, k)$ の絶対値の二乗をウェーブレットエネルギーとし、次式から時間窓 i の各スケールのウェーブレットエネルギーの平均を求めた。

$$E_j^{(i)} = \frac{1}{N_j} \sum_{k'} |C(j, k')|^2$$

$|C(j, k')|$ は時間窓 i 内の時間係数 k' の範囲について加算した。 N_j は時間窓に含まれるスケール j のウェーブレット係数の数である。時間窓幅は 4.096 秒とした。

次式により時間窓 i のエネルギーの合計を求め、時間窓 i におけるエネルギー分布の相対値を求めた。

$$P_j^{(i)} = E_j^{(i)} / E_{\text{tot}}^{(i)}, \quad E_{\text{tot}}^{(i)} = \sum_j E_j^{(i)}.$$

求めたエネルギーの相対値から次式により、ウェーブレットエントロピーを求めた。

$$S^{(i)} = - \sum_{j=1}^N P_j^{(i)} \ln P_j^{(i)}$$

求めたエントロピー $S^{(i)}$ は最大エントロピー S_{\max} で規格化した。ウェーブレットエントロピーはウェーブレットエネルギーの分散の度合いを示すものである。また、本解析では12段階のスケールについて解析を行ったため、 $S_{\max} = \ln 12$ である。ウェーブレットエネルギーとウェーブレットエントロピーは実験ごとに刺激前、刺激後それぞれ15個の窓(61.44秒)の値から平均値を求め、実験値とした。各匂い刺激ごとに実験値の平均値を求め、平均値 \pm SEMとして表記した。また、 n は実験値のデータ数である。

ウェーブレット解析の結果を図24から図29に示す。なお、図24から図29では、エネルギーの占める割合が大きい5つの周波数帯(0.225-0.45 Hz, 0.45-0.90 Hz, 0.90-2.40 Hz, 2.40-5.00 Hz, 5.00-9.35 Hz)のエネルギーのみ記載している。

コントロール刺激前後の各周波数帯のエネルギーとエントロピーの時間変化の典型例を図24に示す。コントロール刺激では刺激前後ともエネルギーは、3つの周波数帯(0.45-0.90 Hz, 0.90-2.40 Hz, 2.40-5.00 Hz)に広く分布していた。この3つの周波数帯におけるエネルギーの割合は時々刻々と変化しているが、全体を通して大きな変化は見られなかった。また、エントロピーもほぼ一定で大きな変化は見られなかった。コントロール刺激前後61.44秒間のエネルギー分布とエントロピーの変化を図25に示す。コントロール刺激前後61.44秒間の各周波数帯のエネルギーは以下の通りである(平均値 \pm SEM)：0.225-0.45 Hz; 刺激前 0.063 ± 0.012 ($n=15$), 刺激後 0.064 ± 0.009 ($n=15$), 0.45-0.90 Hz; 刺激前 0.276 ± 0.018 ($n=15$), 刺激後 0.264 ± 0.020 ($n=15$), 0.90-2.40 Hz; 刺激前 0.338 ± 0.013 ($n=15$), 刺激後 0.341 ± 0.013 ($n=15$), 2.40-5.00 Hz; 刺激前 0.221 ± 0.010 ($n=15$), 刺激後 0.214 ± 0.011 ($n=15$), 5.00-9.35 Hz; 刺激前 0.075 ± 0.008 ($n=15$), 刺激後 0.077 ± 0.009 ($n=15$)。また、コントロール刺激前後61.44秒のエントロピーは以下の通りである(平均値 \pm SEM)：刺激前 0.569 ± 0.009 ($n=15$), 刺激後 0.579 ± 0.010 ($n=15$)。

酢酸イソアミル刺激前後の各周波数帯のエネルギーとエントロピーの時間変化の典型例を図26に示す。刺激前は3つの周波数帯に広く分布していたが、酢酸イソアミル刺激後、一時的に周波数帯0.45-0.90 Hzの割合が大きく上昇し、周波数帯2.40-5.00 Hzのエネルギーは大きく減少した。また、それに伴ってエントロピーも減少した。この変化は、匂い刺激は継続しているにもかかわらず3分程度で収まり、その後は、刺激前と同様の状態に戻った。酢酸イソアミル刺激前後61.44秒間の各周波数帯のエネルギーとエントロピーの変化を図27に示

す。酢酸イソアミル刺激前後 61.44 秒間の各周波数帯のエネルギーは以下の通りである (平均値 \pm SEM) : 0.225-0.45 Hz; 刺激前 0.058 \pm 0.007 (n=17), 刺激後 0.031 \pm 0.007 (n=17), 0.45-0.90 Hz; 刺激前 0.310 \pm 0.016 (n=17), 刺激後 0.430 \pm 0.026 (n=17), 0.90-2.40 Hz; 刺激前 0.351 \pm 0.012 (n=17), 刺激後 0.359 \pm 0.015 (n=17), 2.40-5.00 Hz; 刺激前 0.198 \pm 0.009 (n=17), 刺激後 0.131 \pm 0.013 (n=17), 5.00-9.35 Hz; 刺激前 0.056 \pm 0.007 (n=17), 刺激後 0.034 \pm 0.005 (n=17)。また、酢酸イソアミル刺激前後 61.44 秒のエントロピーは以下の通りである (平均値 \pm SEM) : 刺激前 0.569 \pm 0.009 (n=17), 刺激後 0.579 \pm 0.010 (n=17)。

シネオール刺激前後のエネルギーとエントロピーの時間変化の典型例を図 28 に示す。刺激前は 3 つの周波数帯に広く分布していたが、シネオール刺激後、一時的に周波数帯 0.45-0.90 Hz のエネルギーは大きく上昇し、周波数帯 2.40-5.00 Hz のエネルギーは大きく減少した。また、それに伴ってエントロピーも減少した。この変化は、匂い刺激は継続しているにもかかわらず 3 分程度で収まり、その後は、刺激前と同様の状態に戻った。シネオール刺激前後 61.44 秒間の各周波数帯のエネルギーとエントロピーの変化を図 29 に示す。以上の結果は、酢酸イソアミル刺激の場合と同様であった。シネオール刺激前後 61.44 秒間の各周波数帯のエネルギーは以下の通りである (平均値 \pm SEM) : 0.225-0.45 Hz; 刺激前 0.048 \pm 0.009 (n=15), 刺激後 0.043 \pm 0.007 (n=15), 0.45-0.90 Hz; 刺激前 0.274 \pm 0.017 (n=15), 刺激後 0.353 \pm 0.014 (n=15), 0.90-2.40 Hz; 刺激前 0.368 \pm 0.018 (n=15), 刺激後 0.366 \pm 0.011 (n=15), 2.40-5.00 Hz; 刺激前 0.216 \pm 0.013 (n=15), 刺激後 0.161 \pm 0.009 (n=15), 5.00-9.35 Hz; 刺激前 0.064 \pm 0.005 (n=15), 刺激後 0.038 \pm 0.007 (n=15)。また、シネオール刺激前後 61.44 秒のエントロピーは以下の通りである (平均値 \pm SEM) : 刺激前 0.534 \pm 0.022 (n=15), 刺激後 0.482 \pm 0.023 (n=15)。

なお、記載していないエネルギーはどの周波数帯においてもその割合、変化量ともに微小であった。

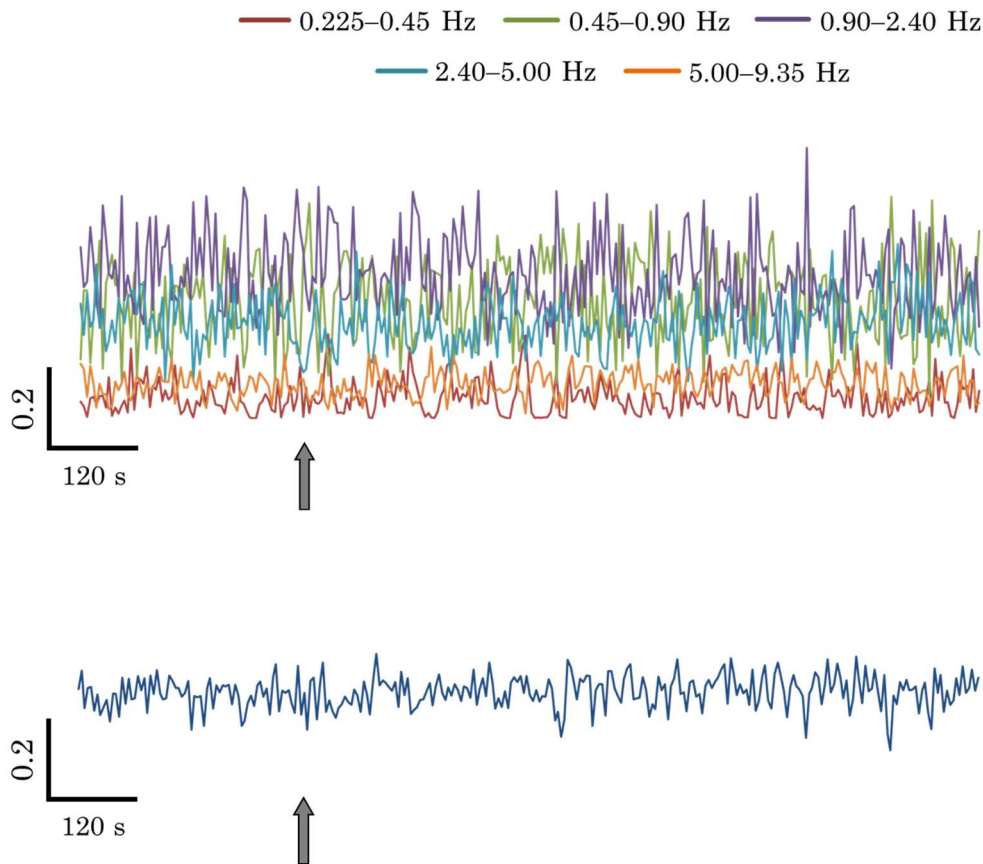


図 24 コントロール刺激前後の各周波数帯のエネルギー(上)とエントロピーの時間変化(下) 矢印の時刻で刺激を開始した。刺激前後でエネルギーとエントロピーに変化は見られなかった。

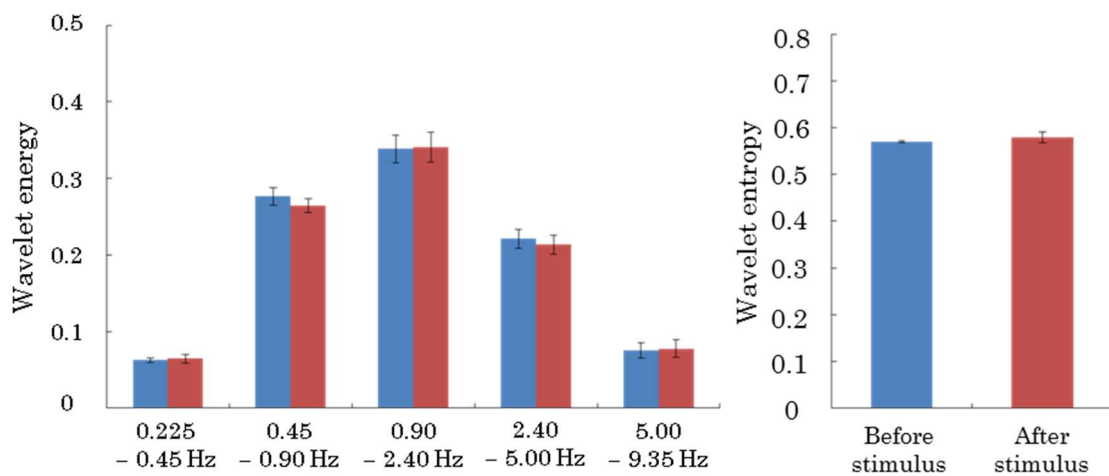


図 25 コントロール刺激前後のエネルギー分布(左)とエントロピー(右) (n=15) 結果は平均値±SEM で示した。n は実験値のデータ数である。

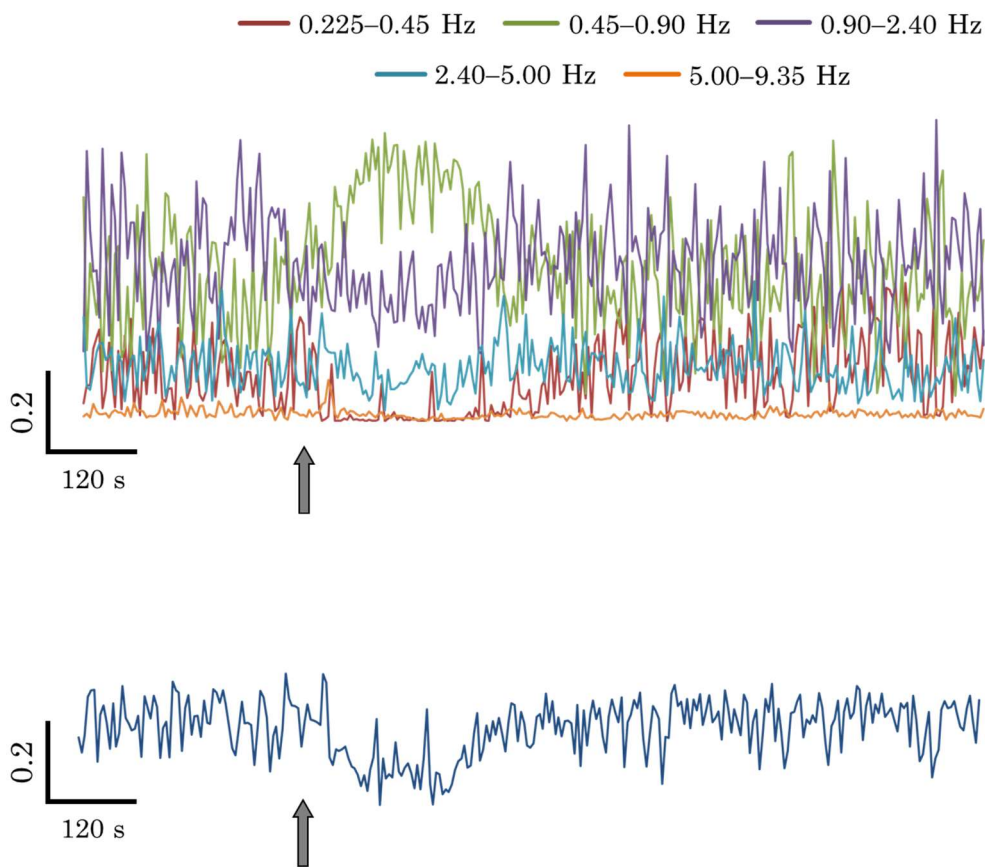


図 26 酢酸イソアミル刺激前後の各周波数帯のエネルギー(上)とエントロピーの時間変化(下) 矢印の時刻で刺激を開始した。刺激後にエネルギーの割合が変化し、エントロピーが減少した。

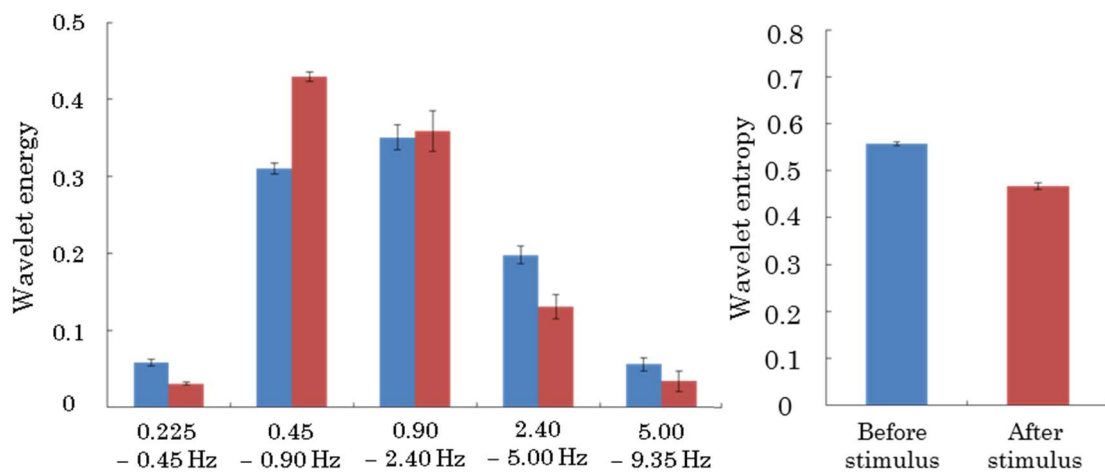


図 27 酢酸イソアミル刺激前後のエネルギー分布 (左) とエントロピー (右) (n=17) 結果は平均値±SEM で示した。n は実験値のデータ数である。

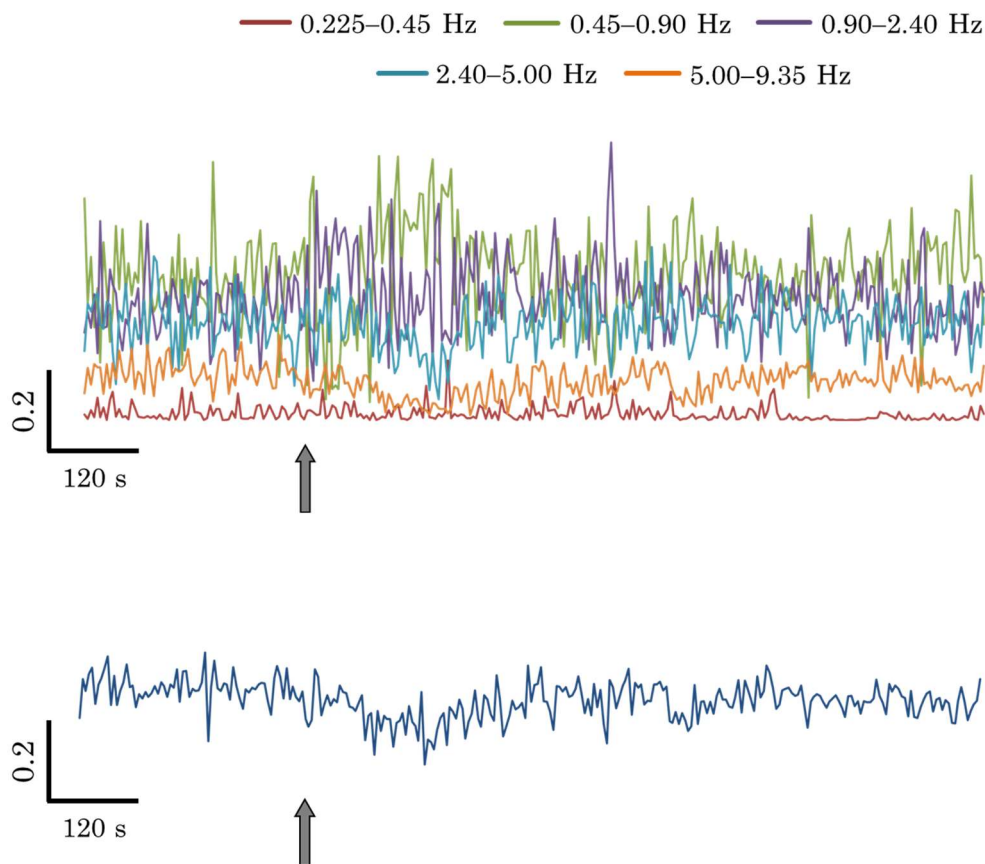


図 28 シネオール刺激前後の各周波数帯のエネルギー(上)とエントロピーの時間変化(下) 矢印の時刻で刺激を開始した。刺激後にエネルギーの割合が変化し、エントロピーが減少した。

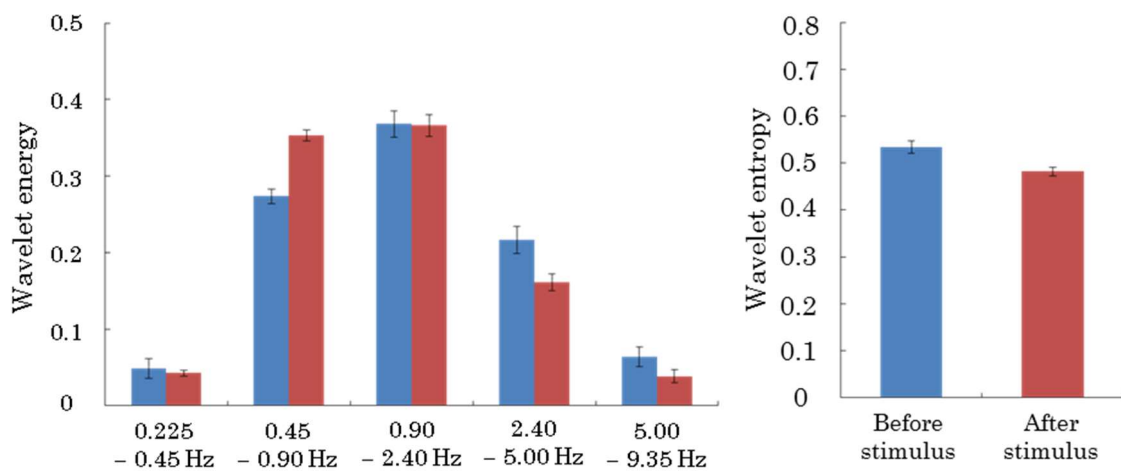


図 29 シネオール刺激前後のエネルギー分布 (左) とエントロピー (右) (n=15) 結果は平均値±SEM で示した。n は実験値のデータ数である。

3.6 考察

測定した LFP 時系列データから刺激前後 15 秒間のアトラクタを再構成したところ酢酸イソアミル、シネオールによる匂い刺激直後には一度乱れた軌道が徐々に元の軌道に遷移している様子が見られた。このことから LFP 波形の形状が 15 秒間という短い時間の中で変化していることがわかる。

刺激前の LFP 波形にはショルダertypeの形状が存在し、緩やかに上昇し緩やかに下降した。酢酸イソアミル刺激、シネオール刺激の直後には LFP 振動に若干の振動数の増加と半値幅の減少が見られた。半値幅の減少は、酢酸イソアミル刺激、シネオール刺激によって LFP 波形が鋭い形状に変化したことを示している。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。前脳葉の先端部と基部に位相差が存在することが知られていることから^{18, 25-27}、LFP 波形の形状はガラス電極の測定範囲内の多数の神経細胞の活動の位相差を反映すると考えられる。したがって、LFP 波形が鋭い形状に変化したことは、測定範囲の神経活動の位相差が減少したためと考えられる。このように LFP 波形の形状の変化は、前脳葉の空間的な神経活動を反映したものだと考えられるが、このことは細胞外電位記録のみで確かめることは困難である。

また、ウェーブレット解析によって LFP 時系列データの周波数特性を調べたところ、刺激前のエネルギーは 0.45-0.90 Hz, 0.90-2.40 Hz, 2.40-5.00 Hz の周波数帯に広く分布していた。LFP 振動のピーク間隔から求めた LFP 振動の周波数は 0.5-1 Hz であるが、LFP 振動のピーク間隔に関係しない 2.40-5.00 Hz の周波数帯が存在している。このことから、LFP 振動のピーク間隔に関係しない周波数帯は、ショルダertypeの LFP 波形の細かい形状を反映したものだと考えられる。一方、酢酸イソアミル刺激、シネオール刺激後には、エネルギーが 0.45-0.90 Hz, 0.90-2.45 Hz の 2 つの周波数成分に集中した。一方、2.40-5.00 Hz の周波数成分は減少した。このエネルギーの変化によってエントロピーが減少した。エントロピーは乱雑さの程度を示しており、エントロピーの減少は秩序性の増加を示している³⁴。上記のように LFP 振動に空間的な位相差の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を示唆している。

このことを確かめるために、次に膜電位イメージング測定を行い、匂い刺激による前脳葉の空間的な神経活動を調べた。

第4章 匂い刺激に対する前脳葉の神経活動変化のイメージング

4.1 本実験の目的

第3章での実験結果から、LFP波形の形状変化、LFP振動に対するウェーブレット解析を行い、それによって求められたエントロピー変化から匂い刺激による前脳葉の空間的秩序性の変化を評価できる可能性が示唆された。そこで、匂い刺激に対する前脳葉の空間的な神経活動の変化を直接的に調べることを目的に、電位感受性色素 Di-4-ANEPPS を用いた膜電位イメージング測定を行った。忌避性の匂い刺激によって LFP 振動が変化していることから、神経活動の伝播の様子も変化していることが予想される。そこで神経活動の伝播の様子を詳細に観察するために、得られた蛍光強度画像を擬似カラーに変換することを試みた。また、神経活動の伝播の様子を定量的に解析するために、前脳葉の先端部と基部での蛍光強度変化のピーク間の時間差を調べた。

4.2 実験方法

実験方法は以下の通りである。実験にはチャコウラナメクジの大・小触角-神経節標本を用いた。標本の作製は第2章の「2.4.1 標本作製方法」に述べた通りである。本実験では、EM-CCD カメラあるいは sCMOS カメラを使用した。匂い刺激による蛍光強度の変化を以下のように測定した。sCMOS カメラを用いた一部の測定に関しては、膜電位イメージング測定と同時に細胞外電位測定も行った。その際、刺激開始 30 秒前に細胞外電位測定を、刺激開始 20 秒前に膜電位イメージング測定をそれぞれ開始した。匂い刺激はエアフローによって行った。まず、ろ紙に匂い物質を滴下し、ピペットのチップ内に挿入した。ピペットのチップは刺激装置の先端に装着した。刺激装置は、ポンプ (Nα1500, ニッソー(株))、流量計 (KG-30, 草野科学(株))、2 個の小瓶をシリコンチューブでつないだものである。なお、2 個の小瓶にはそれぞれ活性炭とミリ Q 水を入れた。ポンプによって取り込まれた空気は、活性炭により浄化された後、流量計を通り、ミリ Q 水によって加湿され、上述した匂い物質を含んだろ紙を挿入したチップを通過し、匂いを含んだ空気が放出される。この匂いを含んだ空気を嗅上皮に近づけることで匂い刺激とした。流量は 0.25 ml/s とした。匂い物質は、忌避性の匂い刺激として酢酸イソアミル、シネオールを使用し、誘引性の匂い刺激として terpinolene (東京化成工業(株)) (以下、テルピノーレンと表記する) を使用した。テルピノーレンはニンジンに含まれる匂い物質の一種である。ニンジンはナメクジの好物として知られている。刺激開始から 30 秒間匂い刺激を継続した。匂い物質の特性と刺激時の空気の流量は、行動実験を行い決定した。

また、コントロール刺激としてミリ Q 水を使用した。測定の合間には、測定用チャンバの触角側に測定用バッファを注ぎ、乾燥を防止した。また励起光の光路のシャッタを閉じておくことで退色を防止した。本実験では、匂い刺激時の前脳葉での神経活動変化を調べるために、擬似カラーによる前脳葉の神経活動の可視化を行い、匂い刺激時の神経活動の空間的な変化を観察した。測定手法は第 2 章の「2.4.2 膜電位イメージング手法」および「2.4.3 神経活動の可視化」に述べた通りである。細胞外電位測定方法は第 2 章の「2.3.2 電気生理実験手法」に述べた通りである。

4.3 実験結果

コントロール刺激による蛍光強度変化の典型例を図 30 に示す。刺激前、刺激後ともに 0.1 秒間隔の画像を示している。左上に蛍光画像を示した。それ以外の画像は細胞が静止膜電位の部分を青色、脱分極している部分を赤色で擬似カラー表示したものである。なお、刺激時刻を 0 秒とした。脱分極は先端部から徐々に始まり、その領域が先端部から基部へ徐々に移動している。脱分極した帯状の領域が基部へ移動するのに合わせて先端部から再分極し過分極が起こり、基部に移動している。コントロール刺激後も膜電位の伝播の様子に違いは見られなかった。酢酸イソアミル刺激による蛍光強度変化の典型例を図 31 に示す。なお、刺激前は 0.1 秒間隔の画像を示し、刺激後は素早い変化が生じたため 0.05 秒間隔の画像を示した。刺激前はコントロール刺激の場合と同様に脱分極した領域が先端部から基部へ徐々に移動していたが、刺激後は前脳葉のほぼ全域に渡って脱分極が始まり、前脳葉のほぼ全域が脱分極すると先端部から再分極が始まる。また先端部から中ほどまでと比較して中ほどから基部まではゆっくりと伝播している。シネオール刺激による蛍光強度変化の典型例を図 32 に示す。なお刺激前は 0.1 秒間隔の画像を示し、刺激後は素早い変化が生じたため 0.05 秒間隔の画像を示した。酢酸イソアミル刺激とシネオール刺激でよく似た蛍光強度変化が生じている。テルピノーレン刺激による蛍光強度変化の典型例を図 33 に示す。刺激前、刺激後ともに 0.1 秒間隔の画像を示している。テルピノーレン刺激では、コントロール刺激と同様に刺激前後で大きな変化は見られなかった。匂い刺激による前脳葉での神経活動の伝播の様子を調べるために、前脳葉の先端部から基部へ神経活動が伝播するまでの時間を調べた。本章の「4.4 解析結果」で解析方法について詳しく説明する。

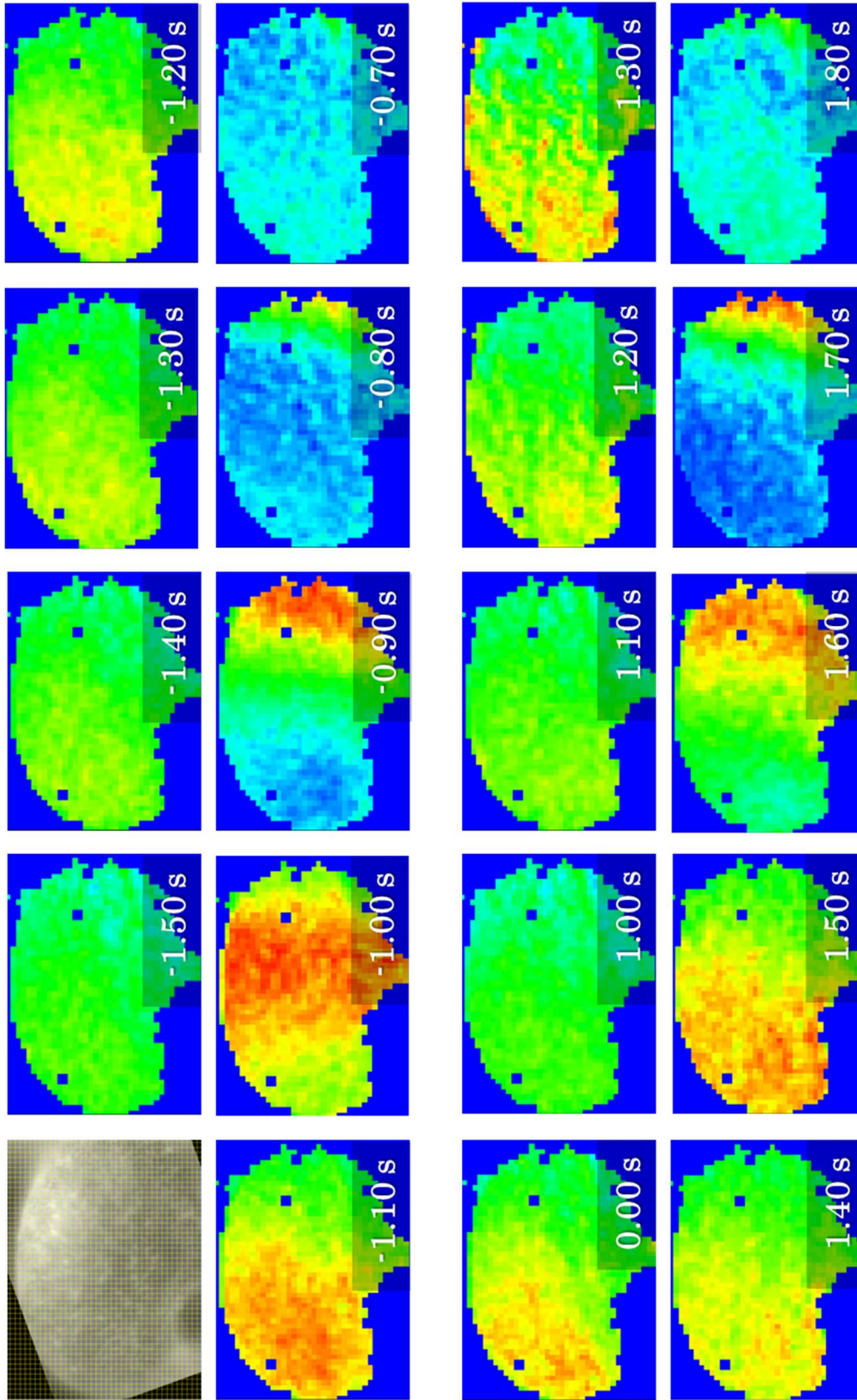


図 30 コントロール刺激前後の前脳葉での膜電位伝播の疑似カラー表示 (sCMOS カメラによって測定) 刺激開始時刻を 0 秒とした。上段 2 列が刺激前、下段 2 列が刺激後の膜電位の変化である。

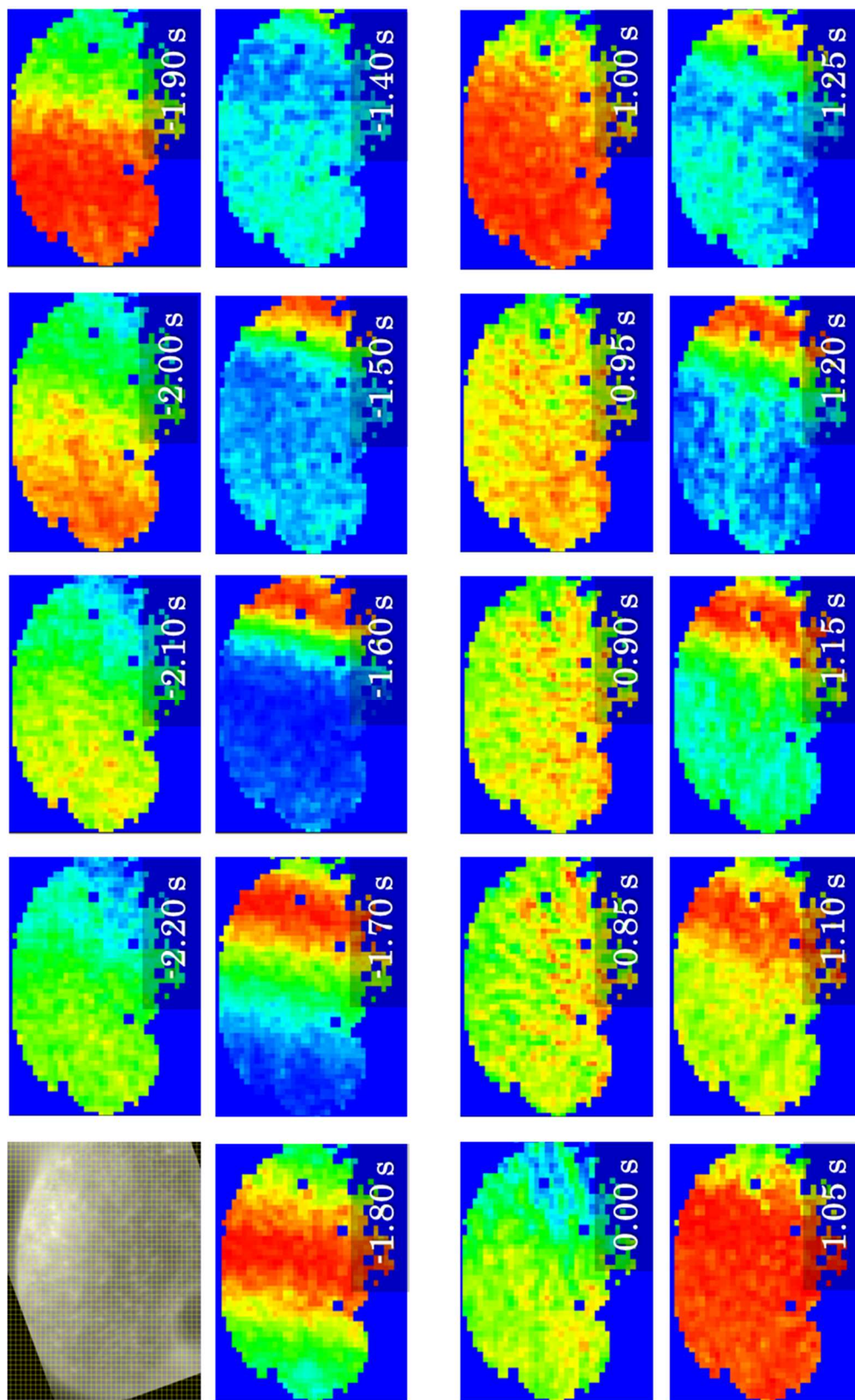


図 31 酢酸イソアミル刺激前後の前脳葉での膜電位伝播の疑似カラー表示 (sCMOS カメラによって測定) 刺激開始時刻を 0 秒とした。上段 2 列が刺激前、下段 2 列が刺激後の膜電位の変化である。

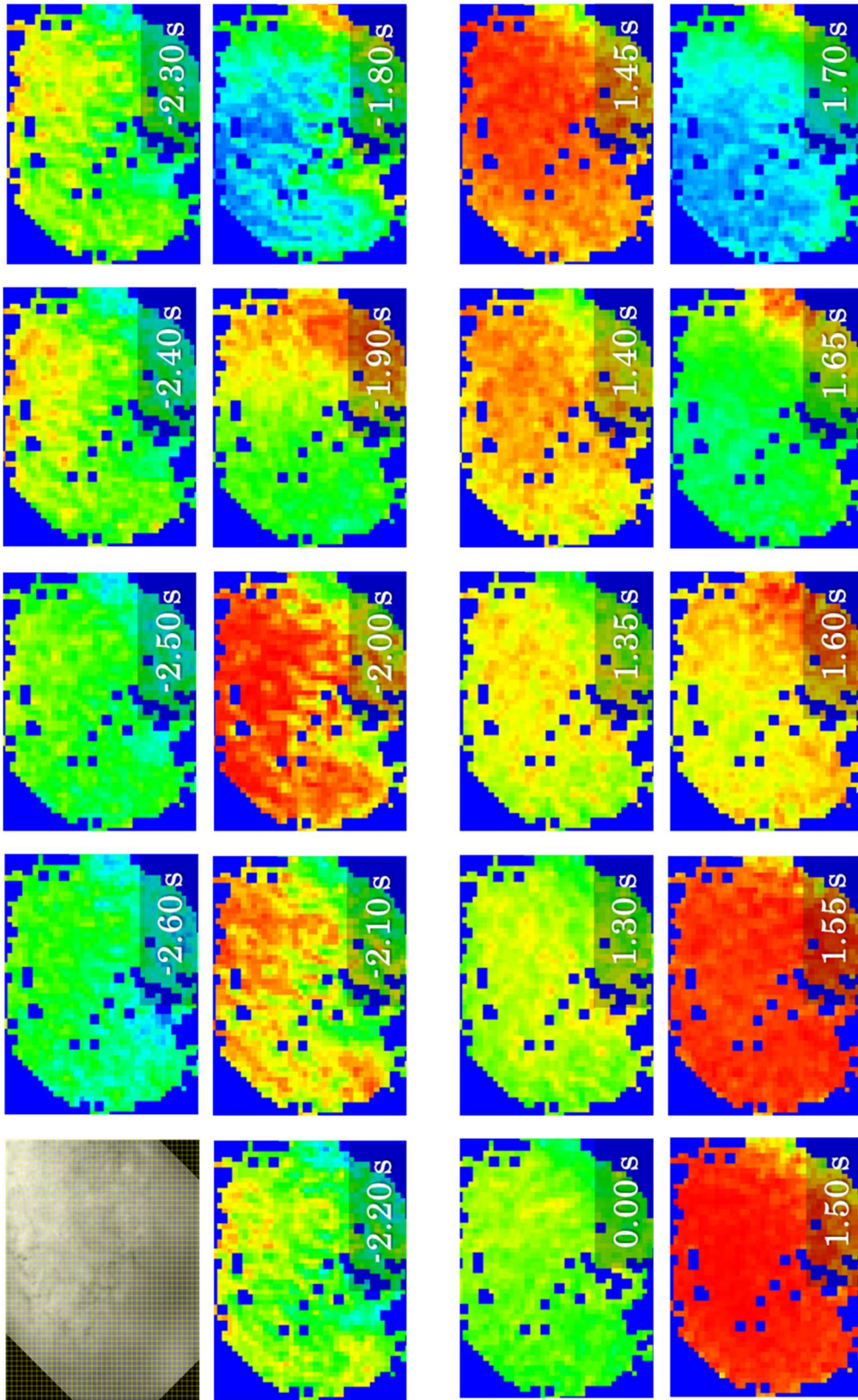


図 32 シネオール刺激前後の前脳葉での膜電位伝播の疑似カラー表示 (sCMOS カメラによって測定) 刺激開始時刻を 0 秒とした。上段 2 列が刺激前、下段 2 列が刺激後の膜電位の変化である。

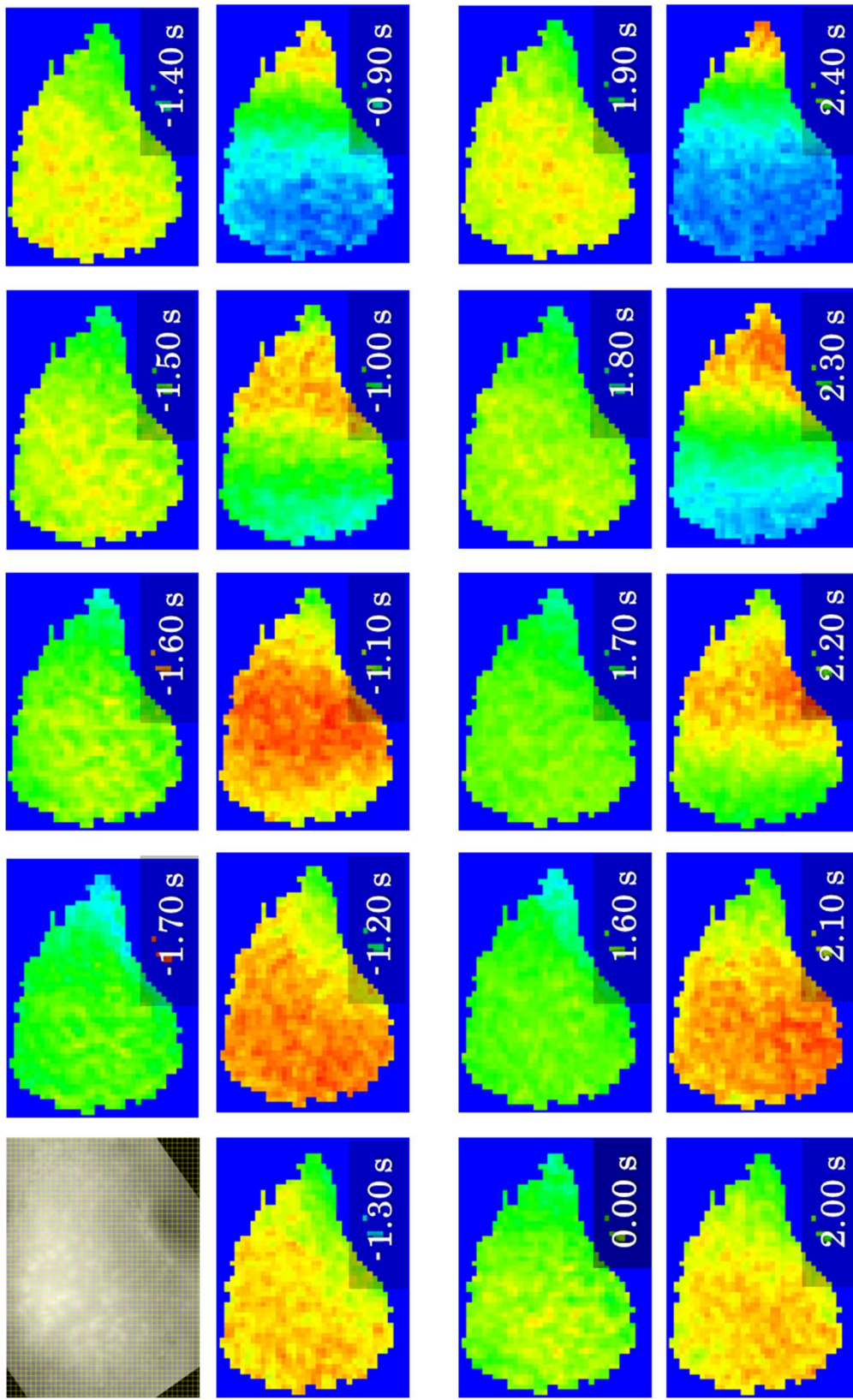


図 33 テルピノーレン刺激前後の前脳葉での膜電位伝播の疑似カラー表示 (sCMOS カメラによって測定) 刺激開始時刻を 0 秒とした。上段 2 列が刺激前、下段 2 列が刺激後の膜電位の変化である。

4.4 解析結果

神経活動の伝播について定量的に調べるために、本研究では以下に記した方法によって前脳葉の先端部と基部の蛍光強度変化の時間差の解析を行った。sCMOS カメラによる測定では前脳葉の先端部と基部に 64 pixel × 64 pixel (約 40 μm × 40 μm) の ROI を 1 個ずつ設置し、フレームごとに ROI 内のデータの平均値を得た。この先端部と基部の時系列データをそれぞれ第 2 章の「2.4.3 神経活動の可視化」で述べたフィルタ処理方法で蛍光強度変化に変換しノイズを除去した。なお、EM-CCD カメラによる測定では、25 pixel × 25 pixel (約 40 μm × 40 μm) の ROI 内の平均値を使用した。また、ノイズの除去は sCMOS カメラによる測定の場合と同様に行った。

ノイズを除去した蛍光強度変化の時系列データからピークの検出を行った。Di-4-ANEPPS は膜電位の脱分極に伴って蛍光強度が低下するため、検出するピークは下に凸のピークである。ピークの条件は蛍光強度変化の振幅とピーク間隔を考慮し決定した。具体的には、フレーム i での蛍光強度変化を $\Delta F(i)$ としたとき、フレーム i を中心とする範囲を設定し、その範囲内の蛍光強度変化の最小値と最大値をそれぞれ求めた。そして、 $\Delta F(i)$ が最小値であり、かつ最大値と最小値の差が閾値を越えていた場合にフレーム i をピークの時刻とした。なお、フレーム i は 1 フレームずつ移動させた。上記の方法で前脳葉の先端部と基部それぞれのピーク時刻を求め、基部のピーク時刻から先端部のピーク時刻の差を取り、先端部と基部のピークの時間差とした。

コントロール刺激による蛍光強度変化の解析結果を図 34 に示す。前脳葉の蛍光画像を図 34a に、刺激前後の LFP 振動と図 34a に示した各 ROI の蛍光強度変化を図 34b に、ROI1 と ROI4 のピークの時間差を図 34c に示す。図 34a の赤い枠は各 ROI の位置、青い線はガラス電極の位置をそれぞれ示している。匂い刺激の開始時刻は図 30b, c の矢印で示した。蛍光強度変化と LFP 振動に対応が見られた。そして、コントロール刺激前後で LFP 振動と各 ROI の蛍光強度変化に大きな変化は見られなかった。また、ROI1 と ROI4 のピークの時間差にも刺激前後に大きな変化は見られなかった。

酢酸イソアミル刺激による蛍光強度変化の解析結果を図 35 に示す。前脳葉の蛍光画像を図 35a に、刺激前後の LFP 振動と図 35a に示した各 ROI の蛍光強度変化を図 35b に、ROI1 と ROI4 のピークの時間差を図 35c に示す。図 35a の赤い枠は各 ROI の位置、青い線はガラス電極の位置をそれぞれ示している。匂い刺激の開始時刻は図 35b, c の矢印で示した。酢酸イソアミル刺激直後に LFP 振動と各 ROI の蛍光強度変化のピーク間隔が狭まった。また、刺激直後に先端部と基部の位相差が減少した。また、シネオール刺激による蛍光強度変化

の解析結果は、酢酸イソアミル刺激の解析結果と同様な結果であった。

テルピノーレン刺激による蛍光強度変化の解析結果を図 36 に示す。前脳葉の蛍光画像を図 36a に、刺激前後の LFP 振動と図 36a に示した各 ROI の蛍光強度変化を図 36b に、ROI1 と ROI4 のピークの時間差を図 36c に示す。図 36a の赤い枠は各 ROI の位置、青い線はガラス電極の位置をそれぞれ示している。匂い刺激の開始時刻は図 36b, c の矢印で示した。テルピノーレン刺激前後で LFP 振動と各 ROI の蛍光強度変化に大きな変化は見られなかった。また、ROI1 と ROI4 のピークの時間差にも刺激前後に大きな変化は見られなかった。

各刺激前後の前脳葉の先端部と基部のピーク間の時間差を図 37 に示す。刺激の 10 秒前から 3 回のピークの先端部と基部の時間差を刺激前のデータとし、各匂い刺激直後の 3 回のピークの先端部と基部の時間差を各匂い刺激後のデータとした。各データの外れ値をスミルノフ・グラブス検定で除き、平均値を求めた。結果は平均値 \pm SEM として表記した。また、n はピークのデータ数である。

前脳葉の先端部と基部のピーク間の時間差は刺激前が 0.24 ± 0.01 s (n=125) であった。コントロール刺激後には、 0.23 ± 0.03 s (n=24)、酢酸イソアミル刺激後には 0.13 ± 0.02 s (n=42)、シネオール刺激後には 0.20 ± 0.02 s (n=24)、テルピノーレン刺激後には 0.24 ± 0.02 s (n=33) であった。

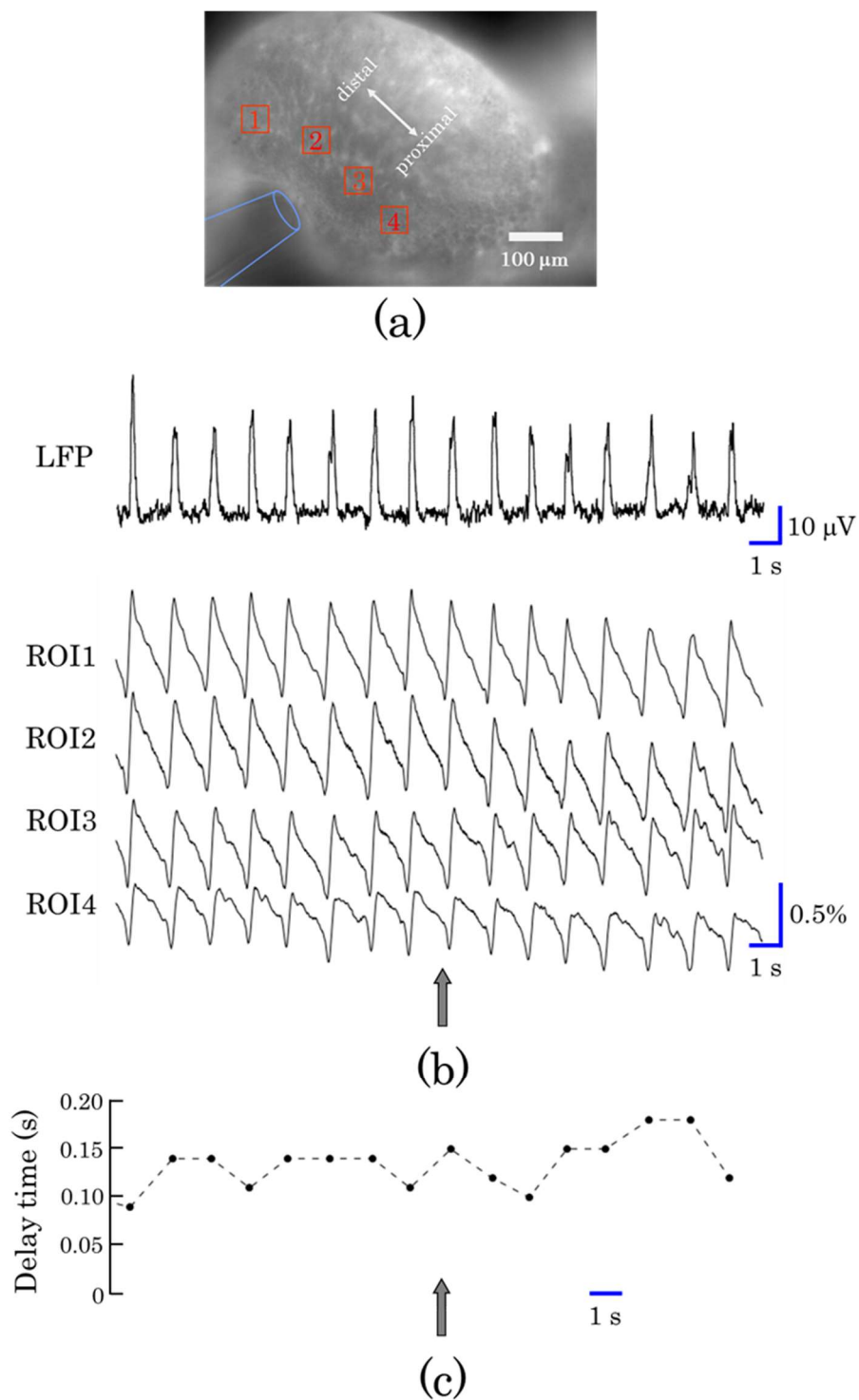
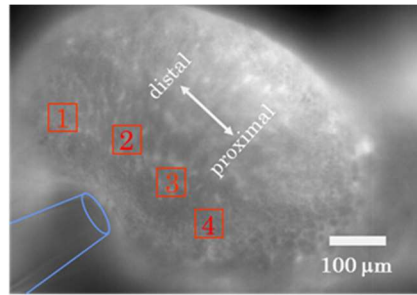
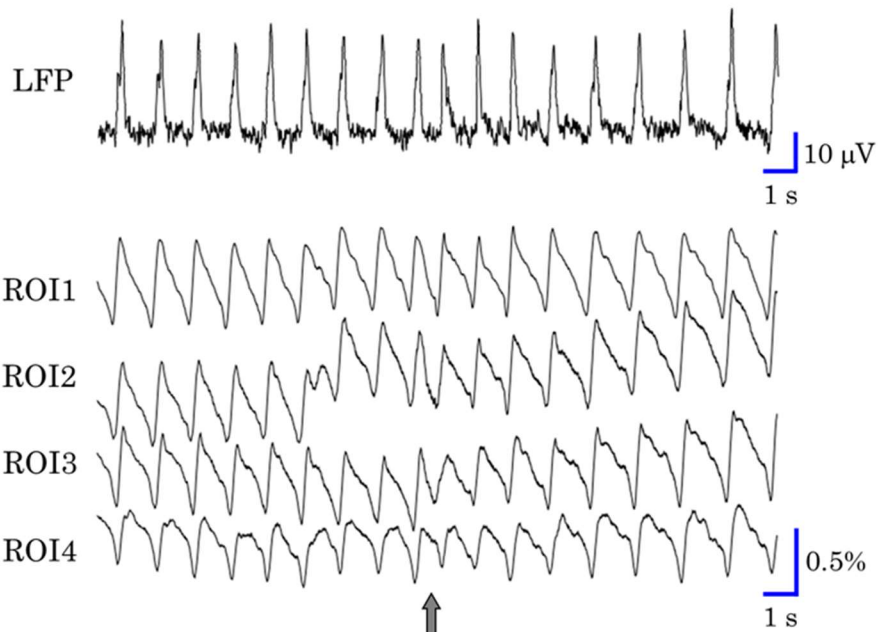


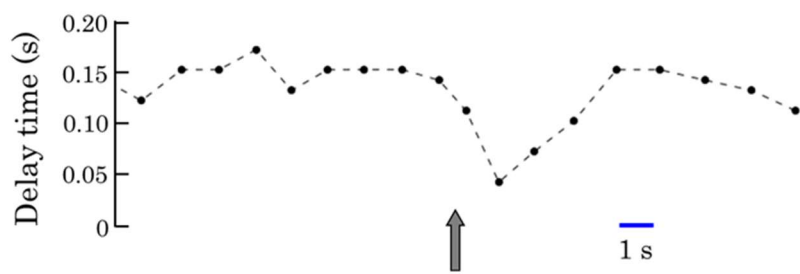
図 34 コントロール刺激前後の LFP 振動と蛍光強度変化 (sCMOS カメラによって測定)
 a: 前脳葉の蛍光画像 b: LFP 振動と各 ROI の蛍光強度変化 c: ROI1 と ROI4 における
 蛍光強度変化のピーク間の時間差。矢印の時刻にコントロール刺激を開始した。a の赤い
 枠は ROI を、青い線はガラス電極を示している。



(a)



(b)



(c)

図 35 酢酸イソアミル刺激前後の LFP 振動と蛍光強度変化(sCMOS カメラによって測定)
 a: 前脳葉の蛍光画像 b: LFP 振動と各 ROI の蛍光強度変化 c: ROI1 と ROI4 における蛍光強度変化のピーク間の時間差。矢印の時刻に酢酸イソアミル刺激を開始した。a の赤い枠は ROI を、青い線はガラス電極を示している。

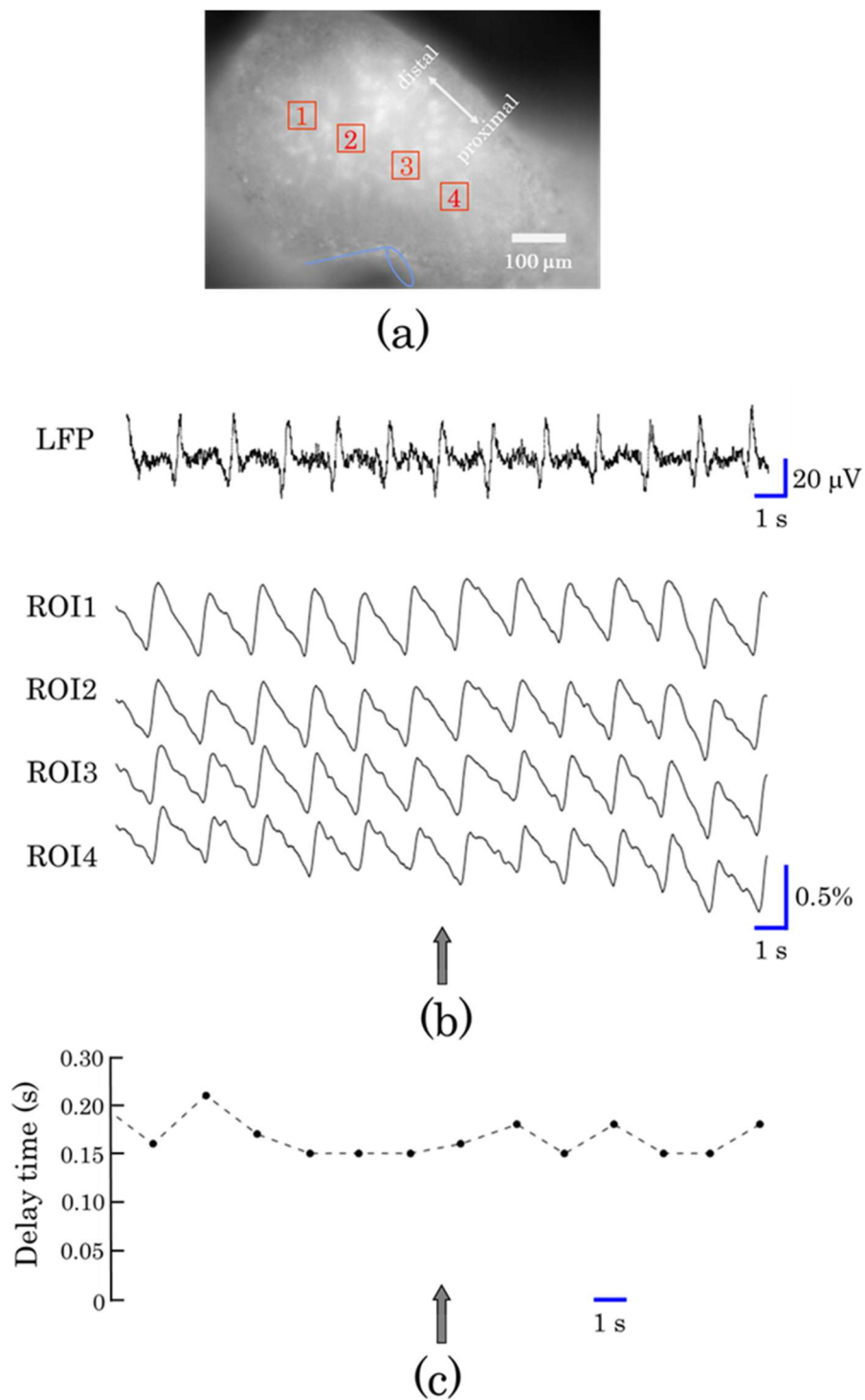


図 36 テルピノーレン刺激前後の LFP 振動と蛍光強度変化 (sCMOS カメラによって測定)
 a: 前脳葉の蛍光画像 b: LFP 振動と各 ROI の蛍光強度変化 c: ROI1 と ROI4 における
 蛍光強度変化のピーク間の時間差。矢印の時刻にシネオール刺激を開始した。a の赤い枠
 は ROI を、青い線はガラス電極を示している。

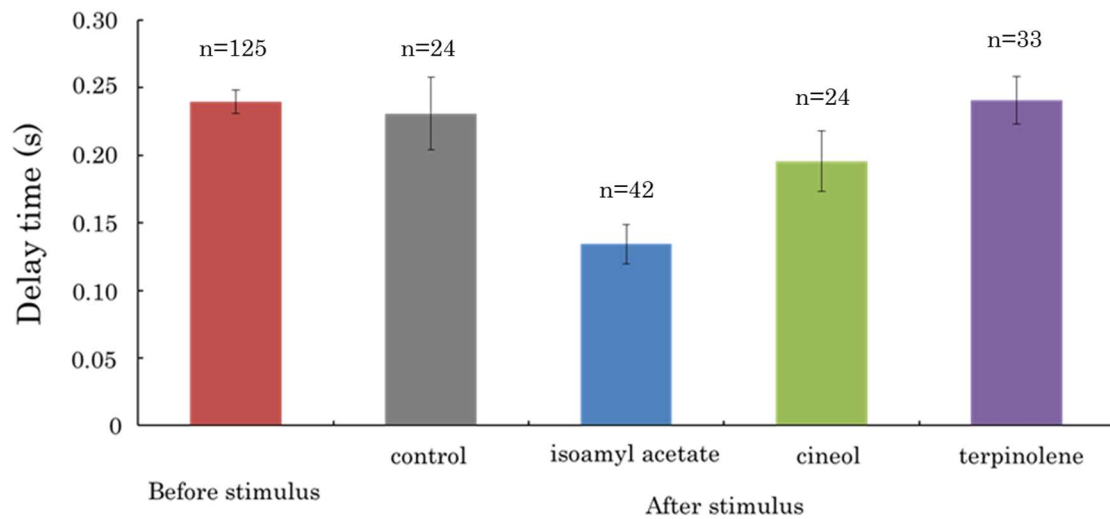


図 37 刺激前後の前脳葉先端部と基部の蛍光強度変化のピーク間の時間差
EM-CCD カメラおよび sCMOS カメラによって測定したデータをまとめて
使用した。結果は平均値 \pm SEM で示した。n は波形のデータ数である。

4.6 考察

明るい光学系への改善、高速かつ高感度の受光器（EM-CCD カメラ、sCMOS カメラ）の使用により、ノイズの少ない膜電位イメージング測定を行うことができた。さらに、ROI ごとにフィルタ処理を行った後に擬似カラー画像を再構成することで、S/N 比が高い膜電位イメージングが可能となり、空間的な神経活動の様子を観察することができた。

また、前脳葉の先端部と基部に存在した位相差が忌避性の匂い刺激によって減少した。そして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した。第 2 章では、LFP 波形の鋭い形状への変化は神経活動の位相差の変化によるものと推測したが、このことが本実験で確認された。また、第 2 章で得られたエントロピーの減少がこのような前脳葉における空間的秩序性を反映したものであることが分かった。したがって膜電位イメージング手法を用いなくても、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的秩序性に関してある程度の評価が可能であるという事が示唆された。

一方、誘引性の匂い刺激（テルピノーレン）によって前脳葉の先端部と基部の位相差に、大きな変化は見られなかった。このことから、匂い刺激による前脳葉の神経活動の位相差の減少は、忌避性の匂い刺激特有のものであると示唆された。そして第 2 章で論じた半値幅の減少と周波数帯の変化に伴ったエントロピーの減少が忌避性の匂い刺激特有のものであることが示唆された。

第5章 局所場電位 (LFP) 波形に含まれる空間情報の推定

5.1 本解析の目的

細胞外電位記録はその手軽さから神経活動を測定するための一般的な手法である。また、第3章、第4章の結果から細胞外電位記録によって得られた LFP 振動が空間的な神経活動を反映していることが確認できた。しかし、その明確な空間的な測定範囲については、明らかではなかった。

一方、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³⁵⁾。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、膜電位変化を反映した蛍光強度変化に対して時間差分を行い、LFP 振動との比較を行った。そして LFP 振動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を行った。

5.2 解析方法

本解析は第4章で得られた膜電位イメージングの結果のうち、同時に細胞外電位測定を行ったデータに対して行ったものである。また、本解析では sCMOS カメラを用いた測定結果のみを使用した。測定した膜電位イメージングデータは、第2章「2.4.3 神経活動の可視化」に記した方法と同様のフィルタ処理を行った後、蛍光画像全体で 4096 個の ROI の内、前脳葉を含んでいる S/N 比が高い ROI に対して ΔF の時間差分 $\Delta F/\Delta t$ を算出した。 $\Delta F/\Delta t$ 時系列データは各 ROI が示す範囲の局所的な膜電流を反映している。そこで算出した各 ROI の $\Delta F/\Delta t$ 時系列データに対して第2章「2.4.3 神経活動の可視化」に記した Savitzky-Golay 法によるノイズ除去を行った。そして、膜電位変化が前脳葉の短軸方向では同期していることから、前脳葉上のガラス電極を中心として短軸方向と平行な帯状の範囲を設定し、その範囲で積算した。 $\Delta F/\Delta t$ 時系列データは、積算した範囲の膜電流を反映している。そこで、細胞外電位記録で得られた LFP 波形との比較を行った。この時、積算する範囲を前脳葉の長軸方向に変化させることで LFP 波形に反映されている神経活動の範囲を推測した。

また、前脳葉での空間的な膜電流の変化を観察するために擬似カラー画像を作成した。まず、ROI ごとに $\Delta F/\Delta t$ 時系列データの最小値と最大値で規格化を行い 0 から 1 の数値に変換した。 $\Delta F/\Delta t$ 時系列データの作成とそのフィルタ処理については JAVA 言語によるオリジナルプログラムを用いて行った。LFP 振動との比較と擬似カラー画像の作成には表計算ソフト (Excel, Microsoft) と自作した表計算ソフト上で動作するマクロプログラムを使用して行った。この数値を赤色から緑色を経て青色に変化するカラーチャートとしてグラフ描画ソフト

(gnuplot) で出力した。

5.3 解析結果

算出した $\Delta F/\Delta t$ 時系列データを積算する範囲を変化させ、膜電位イメージングと同時に測定した細胞外電位記録の LFP 波形を比較した。その結果を図 38 に示す。まず、図 38a は、ガラス電極の断面より狭い 16 pixel 幅の ROI の 3 列分 (約 30 μm) の範囲を設定した場合である。この範囲は赤い枠で示した。積算した $\Delta F/\Delta t$ 波形と LFP 波形を比較すると、積算した $\Delta F/\Delta t$ 波形には LFP 波形に含まれているショルダーが存在していないことから LFP 波形に反映されている空間情報とは異なっていると考えられる。次に、図 38c は、前脳葉のほぼ全域である ROI の 44 列分 (約 440 μm) の範囲を設定した場合である。この範囲は赤い枠で示した。積算した $\Delta F/\Delta t$ 波形と LFP 波形を比較すると、積算した $\Delta F/\Delta t$ 波形がブロードな形状となっているため、この範囲は LFP 波形に反映されている空間情報よりも広い範囲であると考えられる。最後に、図 38b は、ROI の 32 列分 (約 320 μm) の範囲を設定した場合である。この範囲は赤い枠で示した。この範囲から積算した $\Delta F/\Delta t$ 波形と LFP 波形を比較すると、ほぼ一致しているため、LFP 波形に反映されている空間情報とほぼ一致していると考えられる。この結果から LFP 波形に反映されている空間情報の範囲が、300-350 μm 程度の範囲だと推測できた。

また、ROI ごとの $\Delta F/\Delta t$ 時系列データから擬似カラー画像を再構成した。酢酸イソアミル刺激時の ROI ごとの $\Delta F/\Delta t$ 時系列データから再構成した擬似カラー画像を図 39 に示す。酢酸イソアミル刺激時間を 0 秒として各画像に時間を標記した。この際に赤色の部位が $\Delta F/\Delta t$ 時系列データのピークを示している。

このように $\Delta F/\Delta t$ 時系列データから再構成した擬似カラー画像から前脳葉の各部位の膜電流を推測することができた。

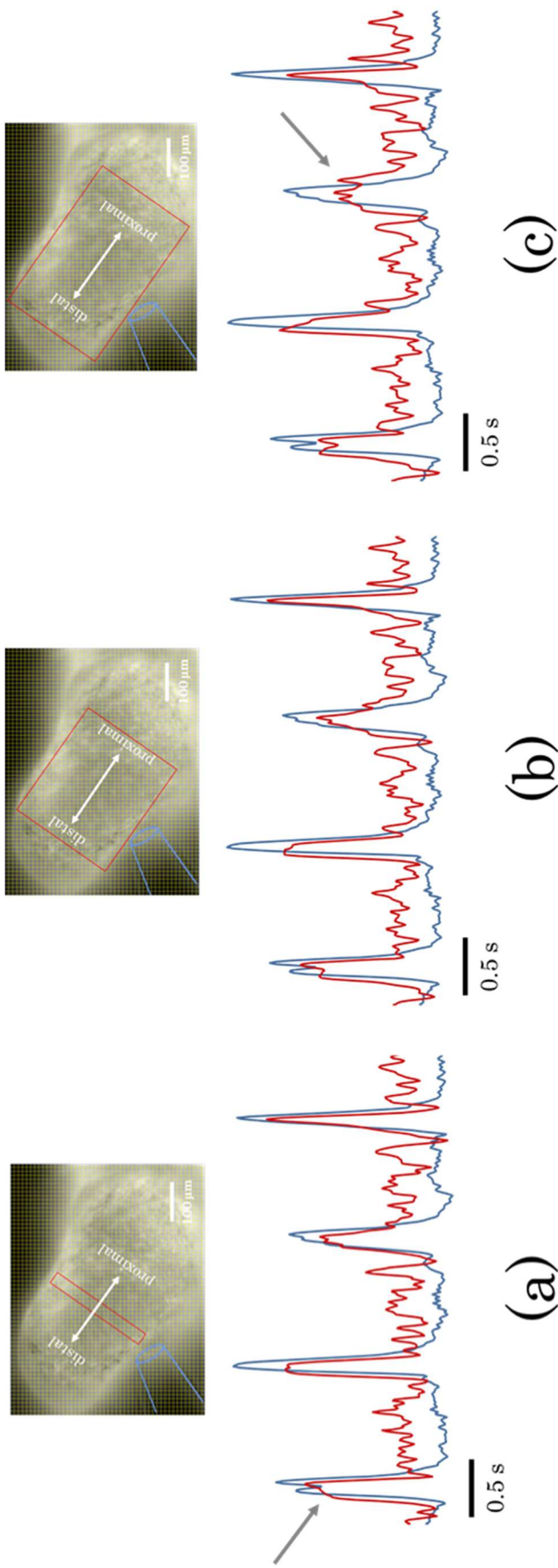


図 38 各種算範囲の $\Delta F/\Delta t$ 波形と LFP 波形の比較

赤い枠で囲った範囲の $\Delta F/\Delta t$ 波形を赤線、LFP 波形を青線で示している。

a: ROI の 3 列分 (約 30 μm) の範囲から作製した $\Delta F/\Delta t$ 波形

b: ROI の 32 列分 (約 320 μm) の範囲から作製した $\Delta F/\Delta t$ 波形

c: ROI の 41 列分 (約 440 μm) の範囲から作製した $\Delta F/\Delta t$ 波形

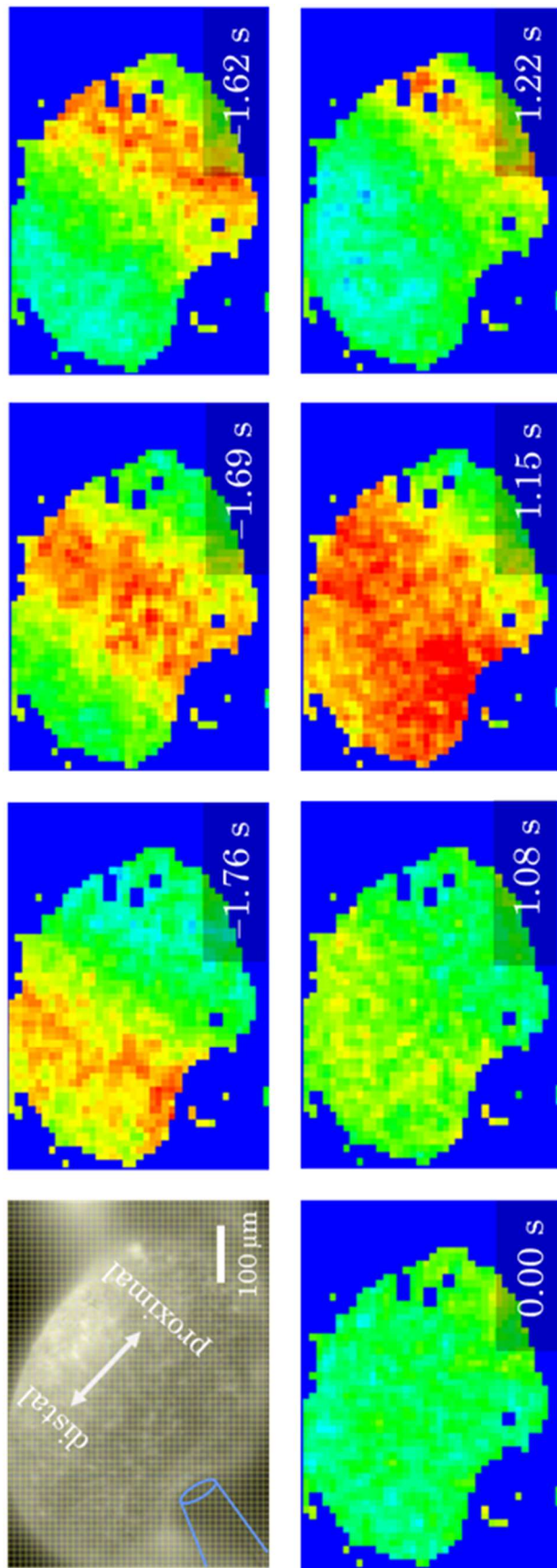


図 39 $\Delta F/\Delta t$ 時系列データから作製した擬似カラー画像

5.4 考察

本解析によって第3章、第4章で行った先端直径 $80\ \mu\text{m}$ のガラス電極による細胞外電位記録が $300\text{-}350\ \mu\text{m}$ 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。このことから、第3章、第4章で LFP 時系列データとウェーブレット解析から前脳葉の空間秩序性の変化について評価できることが示唆されたが、その範囲が $300\text{-}350\ \mu\text{m}$ 程度の範囲であることが推測できた。

第6章 総括

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。

第1章では、本研究の背景として軟体動物を使用した過去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系、研究の目的について述べた。

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。また、本研究で構築した膜電位イメージング測定系について述べた。本研究で構築した膜電位イメージング測定系は受光器にEM-CCDカメラあるいはsCMOSカメラを使用し、対物レンズに開口数0.45のPlan Apo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S/N比が高い膜電位イメージング測定を行うことを可能とした。また、測定した蛍光強度画像を擬似カラーに変換する方法についても述べた。この方法は得られた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思われるノイズを軽減することができた。その結果、第4章に示したように前脳葉の空間的な神経活動変化の様子を詳細に観察することができた。

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局所場電位 (Local Field Potential; LFP) を測定した。測定したLFPは振動数約0.8 Hzで振動していたことを確認した。測定したLFP振動に非線形解析を行い、LFP波形の形状に着目して半値幅を調べた。その結果、忌避性の匂い刺激によってLFP波形の形状が、ショルダー等の細かい形状を含む緩やかな形状から鋭い形状に変化していることが分かった。そして、LFP波形の形状が鋭い形状に変化することは、前脳葉の先端部と基部の神経活動の位相差が減少したために生じたと考えた。また、測定したLFP時系列データの時間-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。したがって、LFP 波形に空間的な神経活動の位相差の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た。

そこで第 4 章では、匂い刺激に対する前脳葉の空間的な神経活動の変化を直接的に調べることを目的として膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS による膜電位イメージング測定を行った。蛍光強度変化を擬似カラー画像に変換することで前脳葉の空間的な神経活動の様子を詳細に観察することができた。また、前脳葉の先端部と基部に存在した位相差が忌避性の匂い刺激によって減少した。そして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した。このことから、第 2 章で考察した LFP 波形の鋭い形状への変化が神経活動の位相差の変化によるものだということが、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、誘引性の匂い刺激によって前脳葉の先端部と基部の位相差に大きな変化は見られなかった。このことから、匂い刺激による前脳葉の神経活動の位相差の減少は、忌避性の匂い刺激特有のものであることが示唆された。そして、第 3 章で論じた半値幅の減少と各周波数帯のエネルギー分布の変化に伴ったエントロピーの減少も忌避性の匂い刺激特有のものであることが示唆された。

第 5 章では、膜電位を反映する蛍光強度変化に対して時間差分を行い、LFP 波形との比較を行い、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の検討を行った。その結果、第 3 章、第 4 章で行った先端直径 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と推測できた。したがって、第 4 章で LFP 波形の形状とウェーブレット解析によるエントロピーの減少から前脳葉の空間秩序性の変化について評価が可能であることが確認されたが、その範囲は 300-350 μm 程度であることが推測できた。

最後に本研究における成果をまとめる。

まず、ナメクジの嗅覚中枢である前脳葉の神経活動の空間的秩序性が忌避性の匂い刺激によって増加することが明らかになった。そして、この空間的秩序性の増加は誘引性の匂い刺激では見られなかった。この知見は、今後の生物の感覚情報処理機構の解明に寄与するものである。

次に従来、細胞外電位記録で測定した LFP 波形には空間情報があまり含まれていないとされていたが、LFP 波形に 300 μm 程度の空間情報が反映されていることが明らかになった。そして、その範囲の空間的秩序性を数理解析によっ

て評価ができることが示唆された。この知見は、技術的に難しい膜電位イメージングを行うことなく細胞外電位記録から得られた **LFP** 波形からある程度の空間情報を引き出すことができることを示しており、今後の神経生理学実験手法の発展に寄与するものである。

第 7 章 参考文献

- 1) W. Rall, "Electrophysiology of a dendritic neuron model." *Biophysical Journal*, **2** (1962) 145-167.
- 2) W. Rall, G. M. Shepherd, "Theoretical reconstruction of Field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb." *Journal of Neurophysiology*, **31** (1968) 884-915.
- 3) I. Daubechies, "Ten lectures on wavelets." *Society for Industrial and Applied Mathematics*, (1992).
- 4) N. Takahashi, S. Oba, N. Yukinawa, N. Ujita, M. Mizunuma, N. Matsuki, S. Ishii, Y. Ikegaya, "High-speed multineuron calcium imaging using Nipkow-type confocal microscopy." *Current Protocols in Neuroscience*, **57** (2011) 2.14.1-2.14.10.
- 5) Y. Kudo, T. Nakamura, E. Ito, "A 'macro' image analysis of fura-2 fluorescence to visualize the distribution of functional glutamate receptor subtypes in hippocampal slices." *Neuroscience Research*, **12** (1991) 412-420.
- 6) S. Sato, H. Osanai, T. Monma, T. Harada, A. Hirano, M. Saito, S. Kawato, "Acute effect of corticosterone on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca^{2+} elevation in mouse hippocampal slices." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **321** (2004) 510-513.
- 7) H. Osanai, A. Suzuki, Y. Komatsuzaki, H. Mukai, S. Kawato, M. Saito, "The binding site for acute corticosterone effects on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca^{2+} signals in mouse hippocampal slices." *Journal of Biophysical Chemistry*, **2** (2011) 430-433.
- 8) L. B. Cohen, B. M. Salzberg, A. Grinvald, "Optical methods for monitoring neuron activity." *Annual Review of Neuroscience*, **1** (1978) 171-182.

- 9) E. Fluhler, V. G. Burnham, L. M. Loew, "Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes." *Biochemistry*, **24** (1985) 5749-5755.
- 10) C. Sahley, A. Gelperin, J. W. Rudy, "One-trial associative learning modifies food odor preferences of a terrestrial mollusk." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78** (1981) 640-642.
- 11) Y. Kasai, S. Watanabe, Y. Kirino, "The procerebrum is necessary for odor-aversion learning in the terrestrial slug *limax valentianus*." *Learning & Memory*, **13** (2006) 482-488.
- 12) A. Gelperin, "Olfactory Basis of Homing Behavior in the Giant Garden Slug, *Limax maximus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71** (1974) 966-970.
- 13) I. Ito, S. Watanabe, Y. Kirino, "Air movement evokes electro-olfactogram oscillations in the olfactory epithelium and modulates olfactory processing in a slug." *Journal of Neurophysiology*, **96** (2006) 1939-1948
- 14) H. Suzuki, T. Kimura, T. Sekiguchi, A. Mizukami, "FMRF amide-like-immunoreactive primary sensory neurons in the olfactory system of the terrestrial mollusc, *Limax marginatus*." *Cell and Tissue Research*, **289** (1997) 339-345.
- 15) T. Teyke, A. Gelperin, "Olfactory oscillation augment odor discrimination not odor identification by *Limax* CNS." *Neuroreport*, **10** (1999) 1061-1068.
- 16) T. Kimura, H. Suzuki, E. Kono, T. Sekiguchi, "Mapping of interneurons that contribute to food aversive conditioning in the slug brain." *Learning & Memory*, **4** (1998) 376-388.

- 17) D. Kleinfeld, K. R. Delaney, M. S. Fee, J. A. Flores, D. W. Tank, A. Gelperin, "Dynamics of propagating waves in the olfactory network of a terrestrial mollusk: an electrical and optical study." *Journal of Neurophysiology*, **72** (1994) 1402-1419.
- 18) R. Chase, B. Tolloczko, "Tracing neural pathways in snail olfaction: from the tip of the tentacles to the brain and beyond." *Microscopy Research and Technique*, **24** (1993) 214-230.
- 19) Z. S. Nagy, D. A. Sakharov, "The fine structure of the procerebrum of pulmonate molluscs, *Helix* and *Limax*." *Tissue & Cell*, **2** (1970) 399-411.
- 20) S. Watanabe, A. Kawahara, Y. Kirino, "Morphological characterization of the bursting and nonbursting neurones in the olfactory centre of the terrestrial slug *Limax marginatus*." *The Journal of Experimental Biology*, **201** (1998) 925-930.
- 21) S. Watanabe, Y. Kirino, "Selective calcium imaging of olfactory interneurons in a land mollusk." *Neuroscience Letters*, **417** (2007) 246-249.
- 22) T. Inoue, S. Watanabe, S. Kawahara, Y. Kirino, "Phase-dependent filtering of sensory information in the oscillatory olfactory center of a terrestrial mollusk." *Journal of Neurophysiology*, **84** (2000) 1112-1115.
- 23) S. Kawahara, S. Toda, Y. Suzuki, S. Watanabe, Y. Kirino, "Comparative study on neural oscillation in the procerebrum of the terrestrial slugs *Incilaria bilineata* and *limax marginatus*." *The Journal of Experimental Biology*, **200** (1997) 1851-1861.
- 24) A. Gelperin, D. W. Tank, "Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk." *Nature*, **345** (1990) 437-440.

- 25) K. R. Delaney, A. Gelperin, M. S. Fee, J. A. Flores, R. Gervais, D. W. Tank, D. Kleinfeld, "Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91** (1994)669-673.
- 26) S. Inoue, S. Kawahara, S. Toda, S. Watanabe, Y. Kirino, "Selective optical recording of the neural activity in the olfactory center of the land slug using a calcium indicator dye." *Bioimages*, **6** (1998) 59-67.
- 27) A. Savitzky, M. J. E. Golay, "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures." *Analytical Chemistry*, **36** (1964) 1627-1639.
- 28) F. Takens, "Detecting strange attractors in turbulence." *Dynamical Systems and Turbulence, Lecture Notes in Mathematics*, **898** (1981) 366-381.
- 29) I. Daubechies, "Orthonormal bases of compactly supported wavelets." *Communications on Pure and Applied Mathematics*, **41** (1988) 909-996.
- 30) A. Schütt, I. Ito, A. Rosso, A. Figliola, "Wavelet analysis can sensitively describe dynamics of ethanol evoked local field potentials of the slug (*Limax marginatus*) brain." *Journal of Neuroscience*, **129** (2003) 135-150.
- 31) R. Q. Quiroga, O. A. Rosso, E. Başar, M. Schürmann, "Wavelet entropy in event-related potentials: a new method shows ordering of EEG oscillations." *Biological Cybernetics*, **84** (2001) 291-299.
- 32) O. A. Rosso, S. Blanco, J. Yordanova, V. Kolev, A. Figlio, M. Schürmann, E. Başar, "Wavelet entropy: a new tool for analysis of short duration electrical signals." *Journal of Neuroscience Methods*, **105** (2001) 65-75.
- 33) A. Schütt, O. A. Rosso, A. Figliola, "A discovery of new features of gastropod local field potentials by application of wavelet tools." *Journal of Neuroscience Methods*, **119** (2002) 89-104.

- 34) C. E. Shannon, "A mathematical theory of communication bell system." *Bell System Technical Journal*, **27** (1948) 379-423, 623-656.
- 35) D. A. Henze, Z. Borhegyi, J. Csicsvari, A. Mamiya, K. D. Harris, G. Buzsáki. "Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus in vivo." *Journal of Neurophysiology*, **84** (2000) 390-400.

第 8 章 謝辞

本研究を行うにあたり研究の機会を与えてくださり、研究に対する姿勢、研究の方向性や実験技術など、多岐に渡り暖かくご指導してくださいました日本大学大学院総合基礎科学研究科教授 斎藤稔先生に心より厚く御礼申し上げます。

本論文作成にあたり、多くの有益な助言をくださいました日本大学大学院総合基礎科学研究科教授 村山和郎先生、菅原正雄先生に厚く御礼申し上げます。

ナメクジの神経系やデータの解析についてご指導していただきました東京大学大学院医学系研究科疾患生命センター助教 渡邊恵先生に心より厚く御礼申し上げます。研究を行うにあたり研究の進め方や測定方法の改良等、研究の多岐にわたり有益な助言をくださいました明治大学理工学部専任講師 向井秀夫先生に心より厚く御礼申し上げます。ナメクジの神経系や飼育方法、実験の基礎についてご指導していただきました日本大学理工学部物理学科助教 小松崎良将先生に心より厚く御礼申し上げます。実験の結果や解析手法について有益な討論や助言をいただきました東京都立産業技術高等専門学校電気電子工学コース教授 山本哲也先生に心より厚く御礼申し上げます。蛍光強度変化の解析を行う際のアルゴリズムについて有益な討論や助言をいただいただけでなく、**JAVA** 言語による解析プログラムを作成していただきました日本大学文理学部自然科学研究所研究員 増本秀文さんに心より厚く御礼申し上げます。

共同研究者である、渡辺哲士先輩、熊井優君、飯室壮史君、細井誠君、中川聡君、古澤貴裕君、敦賀圭祐君、下川智也君、石田康平君には深夜に亘ることも多い実験の中、様々な面で助けていただきました。心より厚く御礼申し上げます。特に仲田正吾君には有益な討論や助言をいただき解析や発表準備等に深夜まで付き合っていたいただいたのは大変励みになりました。心より厚く御礼申し上げます。

研究室の小山内裕美助手を始めとする先輩および後輩の方々には大変お世話になりました。特に畑野裕一先輩、和泉翔大君には有益な討論や助言をいただきました。心より厚く御礼申し上げます。