

平成 30 年度
博士論文

チャコウラナメクジの嗅覚中枢神経系における
神経活動と一酸化窒素の時空間動態

日本大学大学院 総合基礎科学研究科
相関理化学専攻
石田康平

第1章	序論	1
1.1	研究の背景	1
1.2	電気生理的手法	2
1.3	蛍光イメージング法	3
1.4	実験動物としてのチャコウラナメクジ	4
1.5	本研究の目的	6
第2章	実験方法	8
2.1	チャコウラナメクジの飼育方法	8
2.2	チャコウラナメクジの解剖方法	8
2.3	電気生理実験	9
2.4	蛍光イメージング実験	11
2.4.1	Di-4-ANEPPS	12
2.4.2	DAR-4M AM	13
2.5	解析方法	14
2.5.1	細胞外電位記録(LFP 振動)	14
2.5.2	膜電位イメージング	15
2.5.3	NO イメージング	22
2.6	統計解析	24
第3章	単離脳標本系における神経活動の時空間動態の測定	25
3.1	本実験の目的	25
3.2	実験方法	25
3.3	実験結果	28
3.4	考察	42
第4章	匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化に対するNOの関与	44
4.1	本研究の目的	44
4.2	実験方法	44
4.3	実験結果	46
4.4	考察	56
第5章	NO感受性色素を用いたNOイメージングの実験系の確立と時空間動態の測定	57
5.1	本実験の目的	57
5.2	実験方法	57

5.3 実験結果.....	59
5.4 考察.....	65
第6章 総括.....	66
参考文献.....	69
謝辞.....	72

第1章 序論

1.1 研究の背景

嗅覚系と記憶についての研究は盛んに行われている。嗅覚系は陸棲動物、水棲動物問わず外部情報を獲得する機能としてとても重要である。匂い情報(匂い分子)は嗅覚受容細胞と反応(あるいは結合)することで脱分極し電気信号が発生する。この電気信号は嗅覚神経を通り脳へと伝わる。嗅覚は他の感覚(視覚、聴覚、味覚、体性感覚)とは異なった経路で脳に情報が入力される。匂いと記憶の関係を明らかにするためには、匂い情報が脳内でどのように処理されているのか、匂いにより神経活動がどのように変化するのかを調べる必要がある。しかしながら、哺乳動物の中枢神経系(脳と脊髄)は複雑な構造をしており、哺乳動物を用いた嗅覚系の研究は容易ではない。そこで、哺乳動物と同様に中枢神経系をもち、記憶や学習といった高次脳機能を有する軟体動物を対象とする研究が行われている。軟体動物とは、動物界・軟体動物門に属する生物である。無脊椎動物である軟体動物の中枢神経系は哺乳動物のものとは異なり、環形動物に近い形状をした頭部神経節(神経節)が中枢神経系である。軟体動物の神経節は、食道を囲うような形で口球の上に位置している。このように軟体動物の神経節は哺乳動物の中枢神経系とは全く異なった形状をしていながら、神経細胞の基本構造、神経細胞間の情報の伝達方法は同じである。さらに、神経細胞の数も哺乳動物に比べ非常に少なく、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事象を高等な生物よりも容易に調べることができる。また、哺乳動物で行われる脳スライス標本を用いた測定とは違い、軟体動物の神経節は神経回路をすべて保持したままの状態での測定することが可能である。さらに、神経節と感覚器を繋げたまま単離することができ、自然に近い状態で感覚器に刺激を行い、その時の神経活動を測定することができる。また、神経節の神経活動が生理食塩水中で長時間測定可能という点も研究対象としての利点である。

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、哺乳動物における神経系の働きを理解することに繋がる。そこで本研究では、軟体動物であるナメクジを実験動物として用い、匂い刺激に対する嗅覚中枢神経系の応答、すなわち神経活動の変化を電気生理学的測定及び蛍光イメージング測定により調べた。

1.2 電気生理学的手法

神経細胞間での情報伝達はシナプスを介して行われる。シナプスには電氣的伝達を行う電気シナプスと化学的伝達を行う化学シナプスが存在する。神経細胞はイオン濃度差により電氣的に分極している。この状態を静止状態といい、細胞の内側は外側に比べ負に分極しており、約 70 mV の電位差がある(静止膜電位)。上流の神経細胞からの入力や外部からの刺激によって神経伝達物質が放出されると、受けた神経細胞に膜電位変化が生じる。生じた膜電位変化が閾値を超えると Na^+ や Ca^{2+} が流入し、細胞内の電位が正に分極する。これを脱分極といい、この瞬間的な電位変化を活動電位という。すなわち、神経活動は神経細胞の膜電位の急激な変化である。活動電位が発生すると、下流の神経細胞との間のシナプスで情報の伝達が行われる。

このような個々の神経細胞間での情報の入力・統合・出力といった各過程において膜電位変化が見られるため、神経細胞の活動は電氣的に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 1 つである。電気生理学的手法には細胞内に電極を刺入し細胞内外の電位差を測定する細胞内電位記録法、細胞外に電極を配置し近傍の電氣的な変化を測定する細胞外電位記録がある。

1.3 蛍光イメージング法

電気生理学的手法は時間分解能が優れているため、単一の細胞の活動電位や局所的な電位変化の測定に用いられている。また、長時間の測定も向いているため、神経科学の分野において長い間用いられてきた測定法である。しかし、電極の数や配置密度の問題で、同時に広範囲の神経活動を測定することには不向きである。そこで、空間的な神経活動の測定を行うため、空間分解能が優れている蛍光イメージング法を用いた研究が盛んに行われている。蛍光イメージング法とは、蛍光プローブで標識した観察対象に対して、特定の波長の光(励起光)を当て蛍光プローブを基底状態から励起状態に励起させ、蛍光プローブが励起状態から基底状態に遷移する際に発する光(蛍光)をカメラを用いて捉える実験手法である(図 1-1)。蛍光の波長は励起光の波長よりも長いのが特徴である。発せられた蛍光をフィルターで選択し、カメラで捉える。

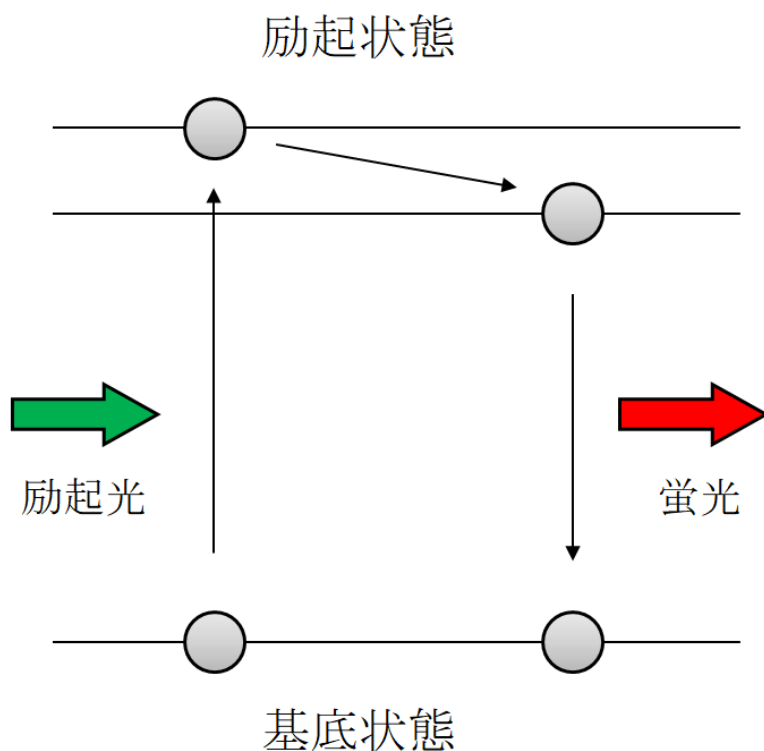


図 1-1 蛍光の概念図

1.4 実験動物としてのチャコウラナメクジ

軟体動物の中樞神経系は多数の神経細胞が集まってできた領域である。中樞神経系は哺乳類においては脳と脊髄に相当し、細胞間で情報を交換しあうことで情報処理を行っている。中樞神経系の構造を理解するにあたり、哺乳類に比べ構造が単純な軟体動物が実験材料として用いられている。本研究では、実験材料として軟体動物門・腹足綱・柄眼目・コウラナメクジ科に属するチャコウラナメクジ (*Limax valentianus*) を用いた (図 1-2)。チャコウラナメクジは嗅覚が優れているため、嗅覚-味覚連合学習等の嗅覚系の研究に用いられている。チャコウラナメクジの中樞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・腹足神経節で構成されている。嗅覚受容器である触角の先端にある嗅上皮 (Kleinfeld et al., 1994) からの匂い情報は、二次嗅覚中枢である前脳葉に投射される (Suzuki et al., 1997)。前脳葉には、直径 6-8 μm の軟体動物の中樞神経系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 (Kleinfeld et al., 1994; Chase et al., 1993)、internal mass (IM)、terminal mass (TM)、cell mass (CM) の三層に分かれている (Nagy et al., 1970)。前脳葉を構成する神経細胞は、周期的にバースト状に発火する Bursting neuron (Bneuron) と、発火頻度が低くバーストが生じない NonBursting neuron (NBneuron) の二種類があり、両者とも細胞体は CM 層に存在している。Bneuron は前脳葉の 10% 以下と数が少なく、両者は前脳葉内で混在している。Bneuron は CM 層表面に対してほぼ平行に神経突起を伸ばしており、NBneuron は CM 層に対して垂直に TM 層、IM 層へ神経突起を伸ばしている (Watanabe et al., 1998) (図 1-3)。嗅上皮から伝達された匂い情報は神経線維と通り、TM 層で NBneuron に伝達され、CM 層で Bneuron に伝達されている (Watanabe et al., 1998)。また、Bneuron は NBneuron に抑制性入力を与えている (Kleinfeld et al., 1994)。前脳葉では構成する神経細胞 (Bneuron、NBneuron) の同期活動が生じているため、個々の神経活動の結果、局所的な電位 (local field potential: LFP) が発生している (Gelperin et al., 1990)。この LFP を測定すると、振幅が 10-100 μV 、0.5-1 Hz の周波数をもった自発的な振動活動が見られる。LFP 振動は匂い情報処理において重要な役割を持ち、解剖後も自発活動を続けている (Gelperin et al., 1990)。また、前脳葉の先端部と基部では LFP 振動に位相差が存在することが報告されている (Delaney et al., 1994; Toda et al., 2000)。また、嗅上皮に匂い刺激を与えることで LFP 振動の周波数に変化が現れる (Toda et al., 2000)。

チャコウラナメクジの神経細胞間での情報伝達は哺乳動物と同じである。そのため、神経伝達物質の働きが深く関わってくる。神経伝達物質の 1 つである一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) は神経細胞で合成され、シナプス可塑性の調整因子として働いていることで知られている。



図 1-2 実験に使用したチャコウラナメクジ (*Limax valentianus*)

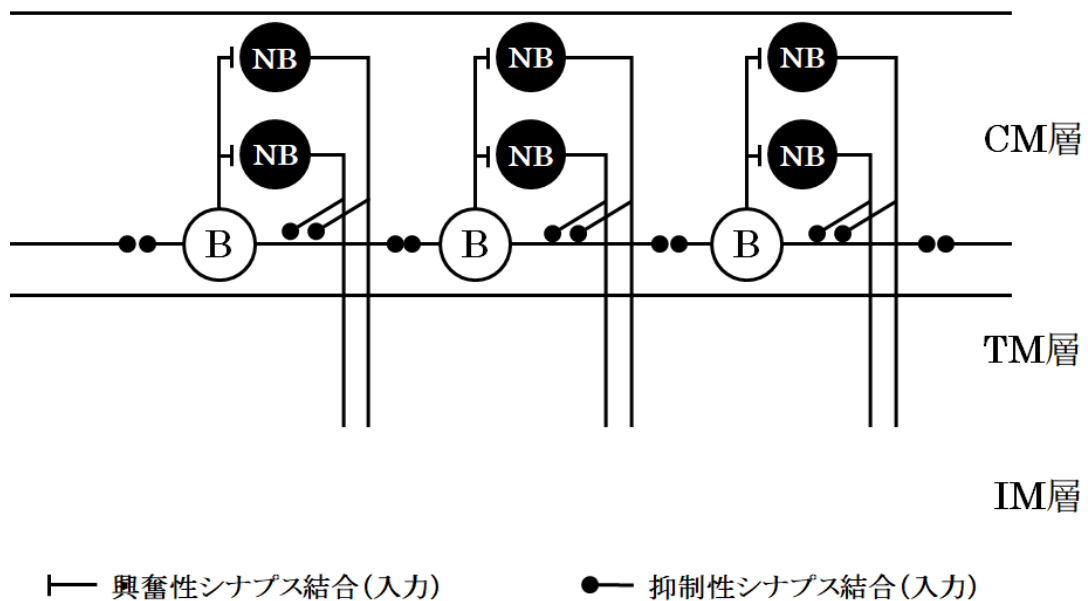


図 1-3 前脳葉内の神経回路の構造の概念図

1.5 本研究の目的

本研究では、チャコウラナメクジの嗅覚中枢神経系(前脳葉)における神経活動、および神経伝達物質の1つである一酸化窒素(Nitric Oxide: NO)の時空間動態について検討することを目的とした。そのため、本研究では主に蛍光イメージング手法を用いた。電気生理的手法を用いた神経活動の測定についてはこれまでに報告されている例は多く、例えばナメクジに忌避性の匂い刺激を与えた場合、前脳葉の局所場電位(local field potential: LFP)振動に変化が生じることが知られている(Toda et al., 2000; Inoue et al., 2006)。一方、蛍光イメージング手法を用いた神経活動の測定についてはあまり行われてこなかった。蛍光イメージング手法を用いることにより、匂い刺激に対する前脳葉の神経活動や NO の時空間動態の変化を調べるのが可能になる。

本研究の実験には単離脳標本系を用いた。ナメクジは匂い嫌悪条件づけを行うことで、誘引性の匂い物質に対する行動が変化する(Gelperin et al., 1975)。誘引性の匂い物質に対する変化は行動だけでなく神経活動においても起きている(Inoue et al., 2006)。しかしながら、従来行われてきた行動実験による条件づけの方法では、同一個体において条件づけ前後の神経活動を比較することは非常に困難である。そこで、単離脳標本系において匂い嫌悪条件づけを行い、同一個体における条件づけ前後の神経活動の匂い応答変化を、膜電位感受性色素を用いた蛍光イメージング(膜電位イメージング)によって調べた。

また、匂い刺激時の神経伝達物質の振舞いについて調べた例は少ない。多くの神経伝達物質の中で NO は生理機能の調節に関わりがあると示唆されている(Gelperin et al., 1994)。NO は記憶や学習などのシナプス可塑性にも関わっており、NO 合成を阻害されたナメクジは学習ができなくなる(Yabumoto et al., 2008)。しかしながら、匂い刺激による NO 放出機構については未だよく知られていない。そこで、NO 合成を阻害した上で、匂い刺激に対する前脳葉の神経活動変化を調べた。また、前脳葉における NO の時空間動態について調べた例は少ない。そこで、NO 感受性色素を用いた蛍光イメージング(NO イメージング)の実験系を確立し、特に忌避性の匂い刺激に対する NO の時空間動態を調べた。これにより、前脳葉における神経活動と NO の時空間動態の関係を明らかにすることができる。さらに、ナメクジにおける匂い情報処理について新たな知見を得ることが期待される。

本論文の第 2 章では、ナメクジの飼育・解剖方法、細胞外電位記録、蛍光イメージングの実験手法について述べる。第 3 章では、電気生理及び膜電位イメージング手

法を用いて単離脳標本系における神経活動の時空間動態を調べた結果を述べる。第 4 章では、第 3 章と同様に電気生理及び膜電位イメージング手法を用いて NO と匂い情報伝達の間を調べた結果を述べる。第 5 章では、NO イメージング手法の確立、および前脳葉における NO の時空間動態について調べた結果を述べる。第 6 章では、第 3 章、第 4 章と第 5 章の結果を総括する。

第2章 実験方法

2.1 チャコウラナメクジの飼育方法

本研究で使用したチャコウラナメクジは 19°Cのインキュベーター内で継代飼育した。インキュベーター内は 12 時間/12 時間の明暗周期に設定した。市販のプラスチックタッパを飼育箱とし、後述する餌とタッパ内の乾燥を防ぐために浄水を浸み込ませた濾紙を内部に置いた。飼育箱は汚れや餌に生えるカビを防ぐために 5 日以内に交換・洗浄を行った。餌はマウス・ハムスター飼育飼料(オリエンタル酵母)の粉末、小麦由来デンプン(和光純薬工業(株))、混合ビタミン(オリエンタル酵母)を 25:24:1 で混合したものを使用し、ナメクジに与えるまで冷蔵庫で保存した。

2.2 チャコウラナメクジの解剖方法

4 ヶ月齢未満の個体(～2 g)を使用した。ナメクジの背の中心部に麻酔用バッファ(57.6 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 mM HEPES, 5 mM Glucose)をシリンジを用いて注入し、麻酔が効いたのち、ナメクジの体を半分切断した(実験に対して不使用の部分)。切断後、解剖用バッファ(35 mM NaCl, 2 mM KCl, 4.9 mM $CaCl_2$, 28 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 mM HEPES, 5 mM Glucose)で満たしたチャンバ内に移した。チャンバ内で実験に不要な口球、食道、胃袋、生殖器などを取り除き、神経節と各触覚(神経と受容器)・味覚受容器の神経を繋げたまま単離した(図 2-1)。

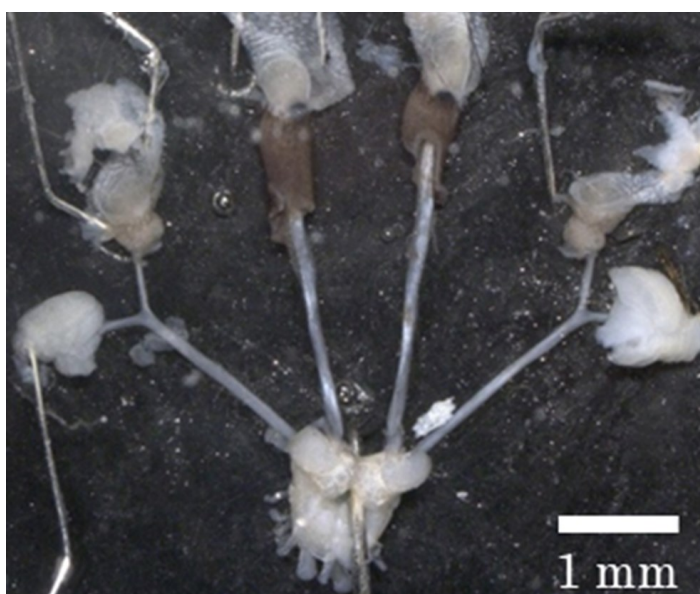


図 2-1 ナメクジから単離した触覚-神経節標本

2.3 電気生理実験

本研究における電気生理実験では、ガラス電極を用いた細胞外電位記録法によってナメクジの前脳葉における LFP 振動を測定した。ガラス電極はプラー装置(P-97, SUTTER INSTRUMENT)でキャピラリーガラス(GC120T-7.5 and GC120T-10, HARVARD APPARATUS)を引き伸ばした後、マイクロフォーシ(MF900, NARISHIGE)で先端の直径が 100 μm 前後に加工したものを使用した(図 2-2)。同様に加工したガラス電極をもう 1 本用意し、1 本を測定用電極、他方を基準電極として使用した。電極内を測定用バッファ(70 mM NaCl, 2 mM KCl, 4.9 mM CaCl₂, 4.7 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM HEPES, 5 mM Glucose)で満たし、銀線を入れた。測定電極を対象であるナメクジの前脳葉に接触させ、基準電極を近くに配置し(図 2-3)、2 本の電極間の電位差を測定した。銀線からプリアンプとアンプ(ER-1, Cygnus Technology Inc.)に接続し信号を 20,000 倍に増幅した。増幅したアナログ信号は A/D コンバーター(POWER LAB/4SP, ADInstruments)に接続し、デジタル信号に変化してから測定用ソフト(Chart5, ADInstruments)でパソコンに取り込んだ(図 2-4)。解析には 0.5 Hz から 30 Hz の周波数成分のみを使用した。このように測定した電位は、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細胞外電位である。この細胞外電位が LFP である。

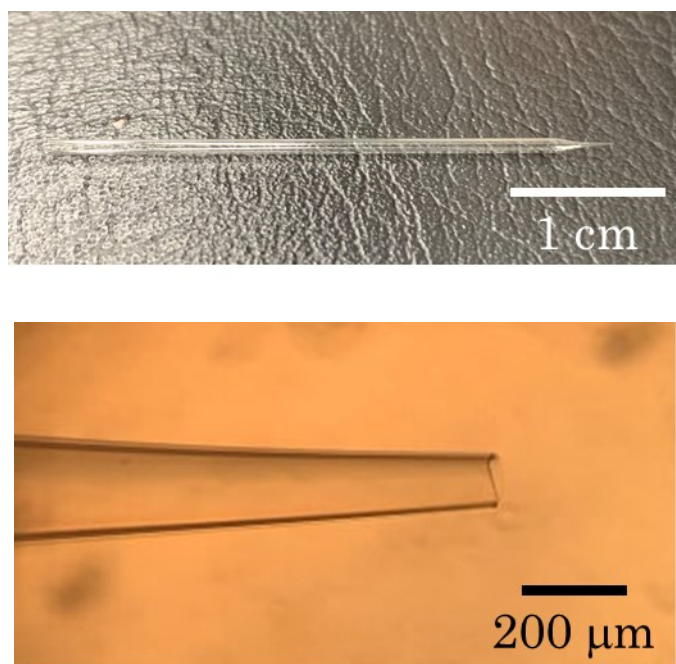


図 2-2 使用したガラス電極

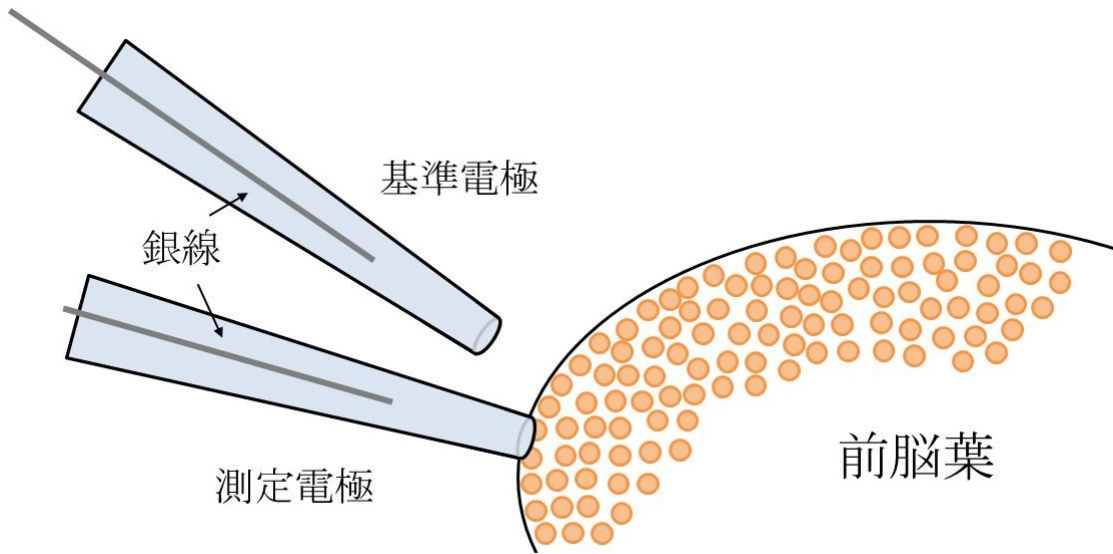


図 2-3 細胞外電位記録法の模式図

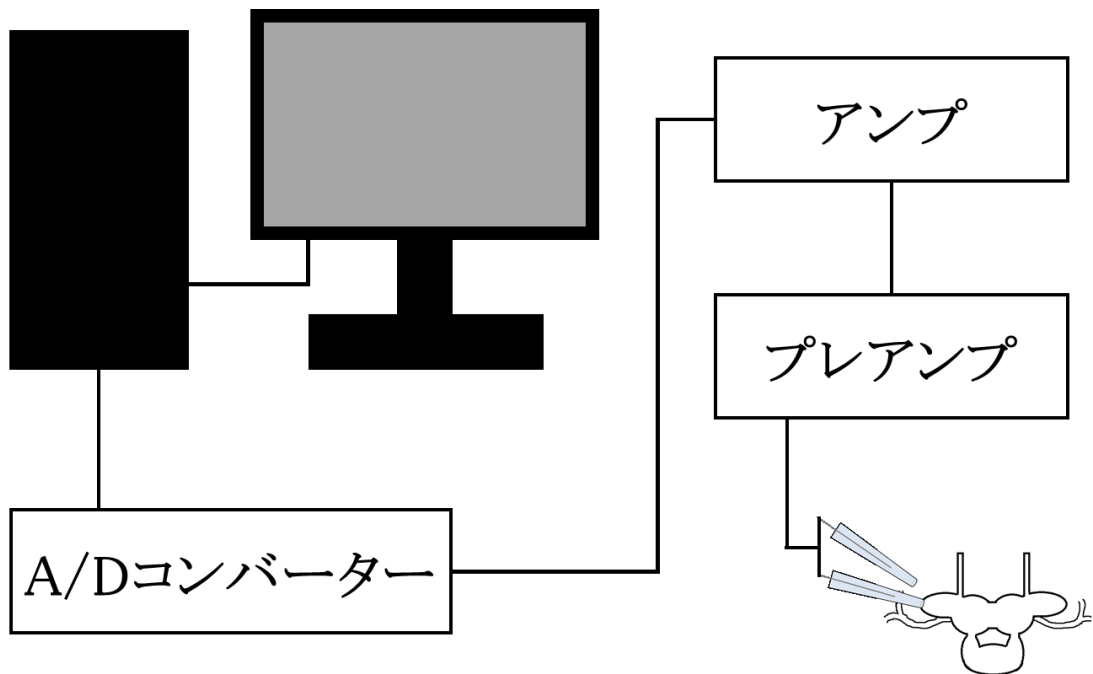


図 2-4 電気生理実験の配線の模式図

2.4 蛍光イメージング実験

神経活動を測定する上で、ガラス電極を用いた電気生理学的測定は重要な測定手法である。しかし電気生理学的測定では、複数の神経細胞の活動を空間的に捉えることは困難である。そこで本研究では、主に蛍光色素を用いて前脳葉の空間的な神経活動を光学的に測定する蛍光イメージング法を用いた。1.3 で述べたように蛍光イメージングを行うには、蛍光プローブ(蛍光タンパクや蛍光色素)とそれにあった励起光の選択が重要である。本研究では、2種類の蛍光色素を使用した。1つは膜電位感受性色素である Di-4-ANEPPS(和光純薬工業(株))であり、もう1つは NO 感受性色素である Diaminorhodamine-4M acetoxymethyl ester(以下 DAR-4M AM と表記する)(五稜化薬(株))である。各色素の特徴については以下で述べる。

蛍光イメージングを行う上で適切な光学系の選択が重要である。本研究では、Di-4-ANEPPS を用いた測定に適した LED 光源(LEX2-G, Brain Vision)、正立型蛍光顕微鏡(E-FN1, Nikon)、励起フィルター(EX510-560, Nikon)、ダイクロイックミラー(DM575, Nikon)、蛍光フィルター(BA590, Nikon)、画像取得用のカメラ(Zyla, Andor)、コンピューター(Dell Precision T5600, Dell, USA)を使用した(図2-5)。また、DAR-4M AM を用いた測定でも同様の測定系を使用し、画像取得時の設定を変更して測定を行った。

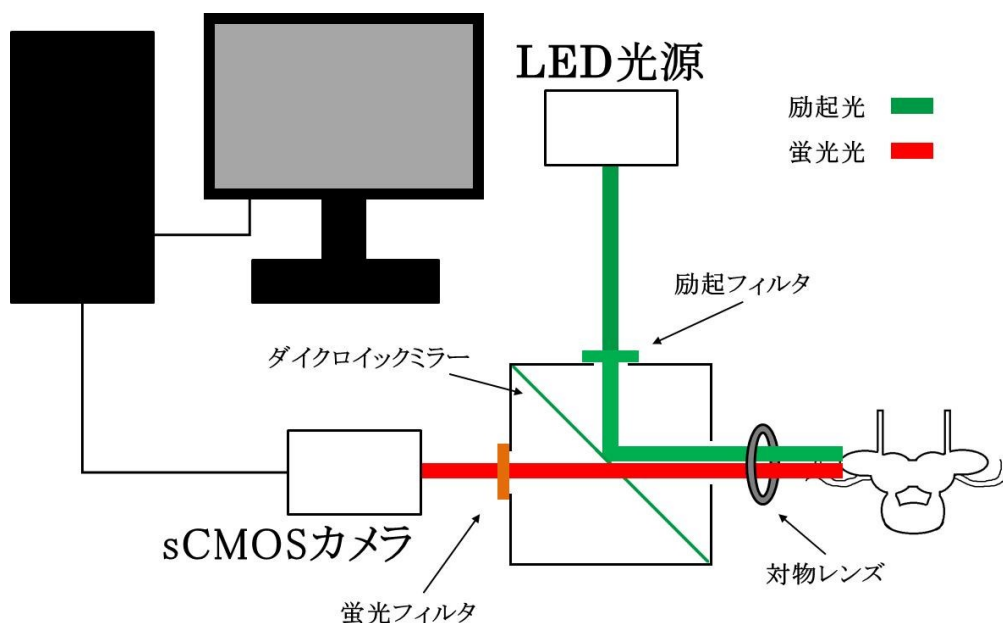


図 2-5 蛍光イメージング実験の模式図

2.4.1 Di-4-ANEPPS

膜電位感受性色素は応答時間が 0.5 マイクロ秒以下の fast-response dye と秒オーダーの slow-response dye の 2 種類に大きく分類される (Cohen et al., 1978)。神経活動は 1-10 ミリ秒オーダーで行われるため、本研究では fast-response dye の 1 種で styryl 系化合物である Di-4-ANEPPS を使用した (Fluhler et al., 1985)。Di-4-ANEPPS は細胞に添加すると膜内に埋もれて存在する。505 nm の波長の光で励起され、励起状態から基底状態に遷移する (図 2-6)。その時に波長 705 nm の光を発する (蛍光)。また、膜電位変化が生じることにより Di-4-ANEPPS の構造が変化し、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。その蛍光強度変化を sCMOS カメラを用いて取得し、コンピューターに取り込んだ (図 2-5)。

本研究では、予め分注したストック染色液 (6.9 mM Di-4-ANEPPS, 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 倍に希釈し、Di-4-ANEPPS の最終色素濃度が 86 μ M の染色溶液を用いて 50 分間染色を行った。

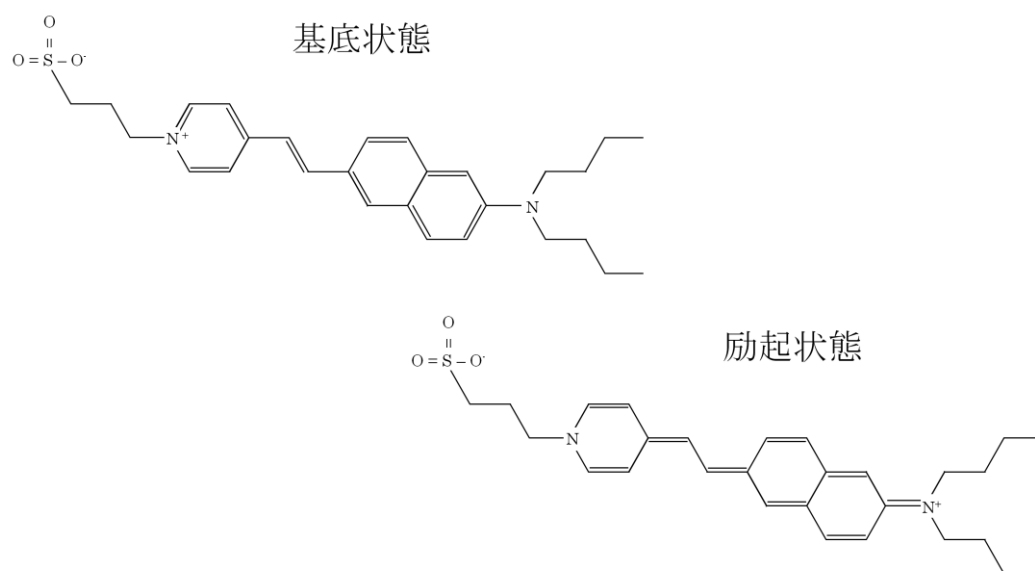


図 2-6 Di-4-ANEPPS の構造式

2.4.2 DAR-4M AM

神経活動が生じることで細胞外への神経伝達物質の放出が生じる。細胞外における神経伝達物質を測定することで神経活動の変化と神経伝達物質の放出の関係を調べる事が可能である。しかしながら、神経伝達物質の種類は非常に多く、LFP 振動や膜電位変化などの神経活動の変化から特定の神経伝達物質の放出の変化を推定することは不可能である。そこで本研究では、生理機能の調整に関係があることで知られている NO に着目し、NO 感受性色素である DAR-4M AM を用いて前脳葉における空間的な NO 分布を調べた。

DAR-4M AM は同じく NO 感受性色素である DAR-4M にアセトキシメチル基 (AM 基) を付加した色素である。AM 基により DAR-4M に細胞膜透過性が付加される。色素が細胞内に入ることによって細胞内の酵素 (エステラーゼ) の働きによって AM 基が切断される。AM 基が取れることで色素が細胞の外側に出なくなる。細胞内に取り込まれた色素は NO と反応し、波長 560 nm の光で励起され波長 575 nm のオレンジ色の光を発する (蛍光) (図 2-7)。DAR-4M AM は Di-4-ANEPPS と異なり、一度 NO と反応すると蛍光強度は変化したままであり、その反応は不可逆である (Joern et al., 2008)。

本研究では、予め分注したストック染色液 (5 mM DAR-4M AM) を解剖用バッファと界面活性剤 (10% pluronic) で 100 倍に希釈し、DAR-4M AM の最終色素濃度が 50 μ M の染色溶液を用いて 50 分間染色を行った。

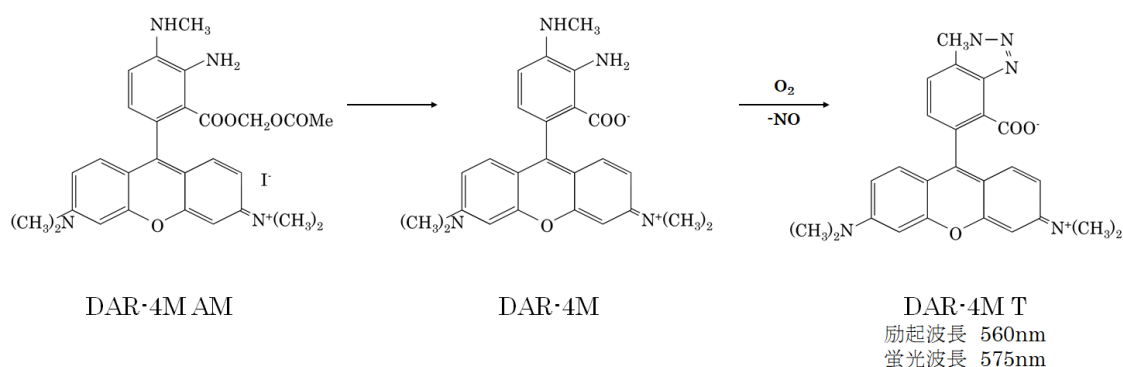


図 2-7 DAR-4M AM の構造式と原理

2.5 解析方法

電気生理的測定や蛍光イメージングによって取得した時系列データから周波数や神経活動の伝搬速度などの物理量を求めた。そのため、プログラミングソフト (MATLAB, MathWorks) で自作したプログラムを使用し以下の処理を行った。

2.5.1 細胞外電位記録 (LFP 振動)

細胞外電位記録により得られた結果から LFP 振動の周波数とその変化率を求めた。匂い刺激前の周波数は、匂い刺激開始前、10 ピークのピーク間隔の逆数の平均である。匂い刺激中の周波数は、匂い刺激を行っている時間内で最も変化が生じた 5 ピークのピーク間隔の逆数の平均である。匂い刺激による LFP 振動の周波数の変化はあまり持続しないため、5 ピークのピーク間隔の逆数の平均から評価した (図 2-8)。

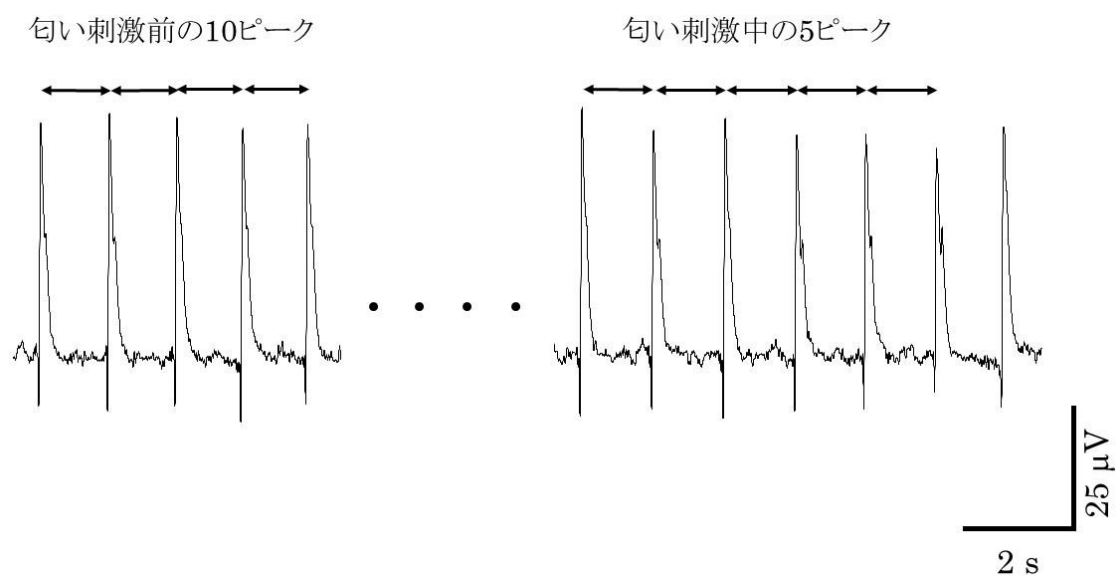


図 2-8 LFP 振動のピーク間隔の選び方の例

2.5.2 膜電位イメージング

膜電位イメージングにより得られる時系列データは、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デジタル信号に変換したものである。しかし、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、前脳葉の膜電位変化を可視化することは困難である。本研究で使用した sCMOS カメラの 1 pixel あたりの大きさは約 $0.4 \times 0.4 \mu\text{m}$ と前脳葉を構成する細胞の大きさに比べ非常に小さい。そこで、取得した蛍光画像に計測ウィンドウ (Region of Interest: ROI) を設定し (図 2-9)、露光時間ごとの ROI 内でのデータの平均値を得た (図 2-10 上)。しかしながら、蛍光強度変化にはノイズが存在する。そこで本研究では、ROI の時系列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。さらに、移動平均法のみでは時系列データに高周波ノイズが残ってしまうため、Savitzky - Golay の係数表 (図 2-11) を用いた多項式適合法によるスムージングを行った。その結果 (図 2-10 下) を用いて、前脳葉全体の神経活動を可視化するため擬似カラー化を行った。また、神経活動の伝搬速度を求めた。

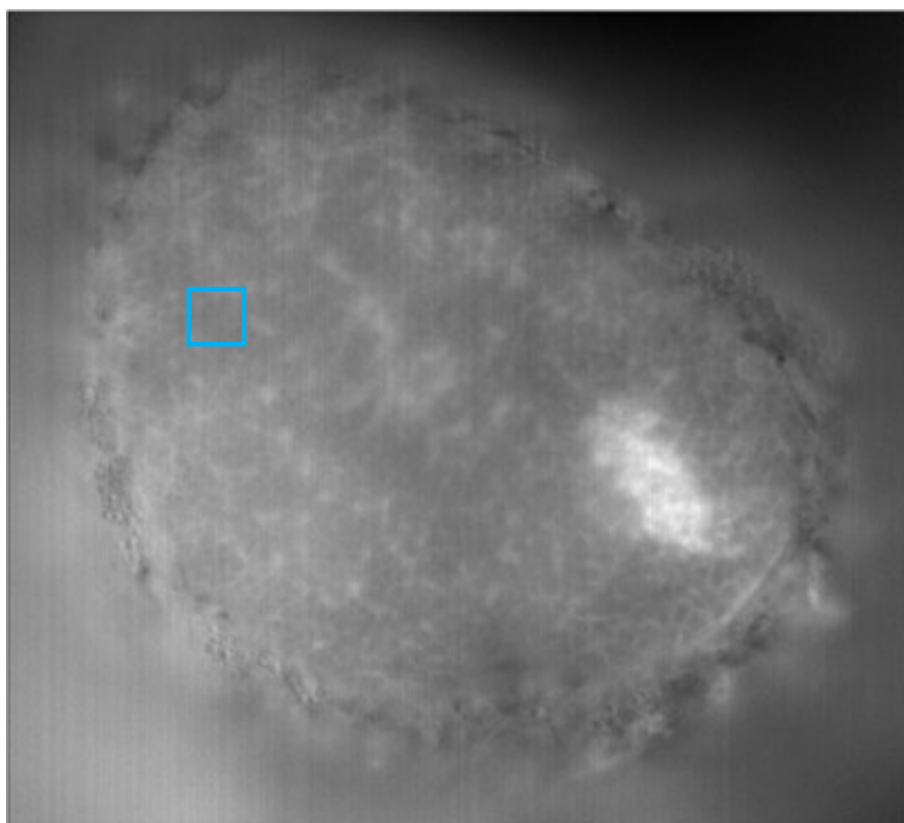


図 2-9 前脳葉の蛍光画像
青い四角は ROI の一例を示す。

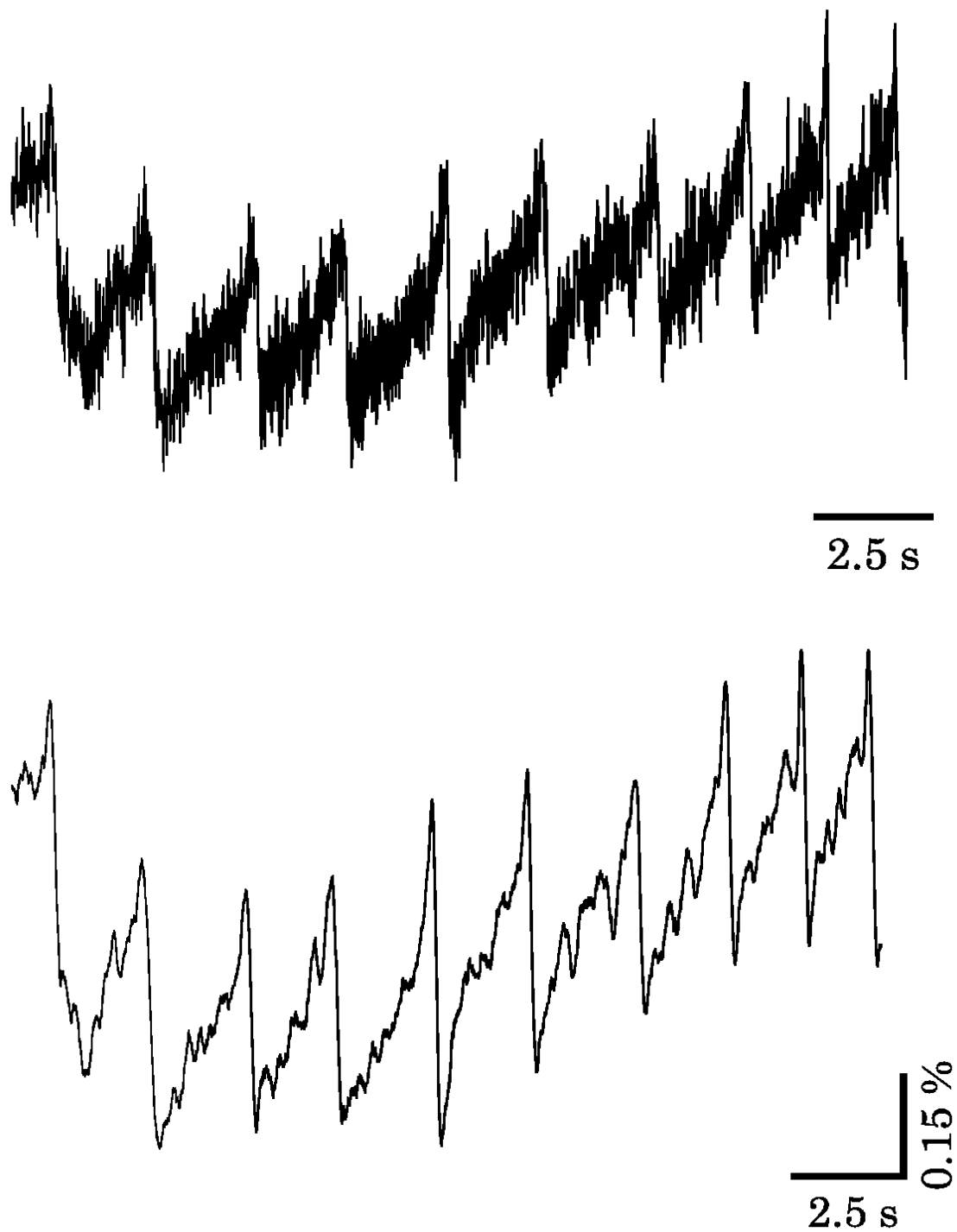


図 2-10 膜電位イメージング実験により得られる蛍光強度の時間変化
上:取得データ、下:スムージングを施した後のデータ

	a0	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12
5	35	17	12	-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	21	7	6	3	-2	-	-	-	-	-	-	-	-
9	231	59	54	39	14	-21	-	-	-	-	-	-	-
11	429	89	84	69	44	9	-36	-	-	-	-	-	-
13	143	25	24	21	16	9	0	-11	-	-	-	-	-
15	1105	167	162	147	122	87	42	-13	-78	-	-	-	-
17	323	43	42	39	34	27	18	7	-6	-21	-	-	-
19	2261	269	264	249	224	189	144	89	24	-51	-136	-	-
21	3059	329	324	309	284	249	204	149	84	9	-76	-171	-
23	805	79	78	75	70	63	54	43	30	15	-2	-21	-42
25	5175	467	462	447	422	387	343	287	222	147	62	-33	-138
													-253

図2-11 Savitzky – Golayの係数表

擬似カラー

取得した蛍光画像を 16×16 pixel ($6.5 \times 6.5 \mu\text{m}$) ごとの領域 (ROI) に区切り (図 2-12)、露光時間ごとの ROI 内での蛍光強度データの平均値を得た。各 ROI の時系列データに対して先に述べたスムージングを行った。また、蛍光色素の特性として褪色が生じる (図 2-13 上)。褪色の影響を除去するためにベースラインを補正する必要がある。まず、得られた時系列データに対して任意の時間間隔を設定し、その時間間隔内での最小値を求めた。同様の処理を時間をずらして行うことで、補正したベースラインを得ることができる (図 2-13 中)。スムージングしたデータと補正したベースラインの差を取り最終的な蛍光強度の時系列データを得た (図 2-13 下)。

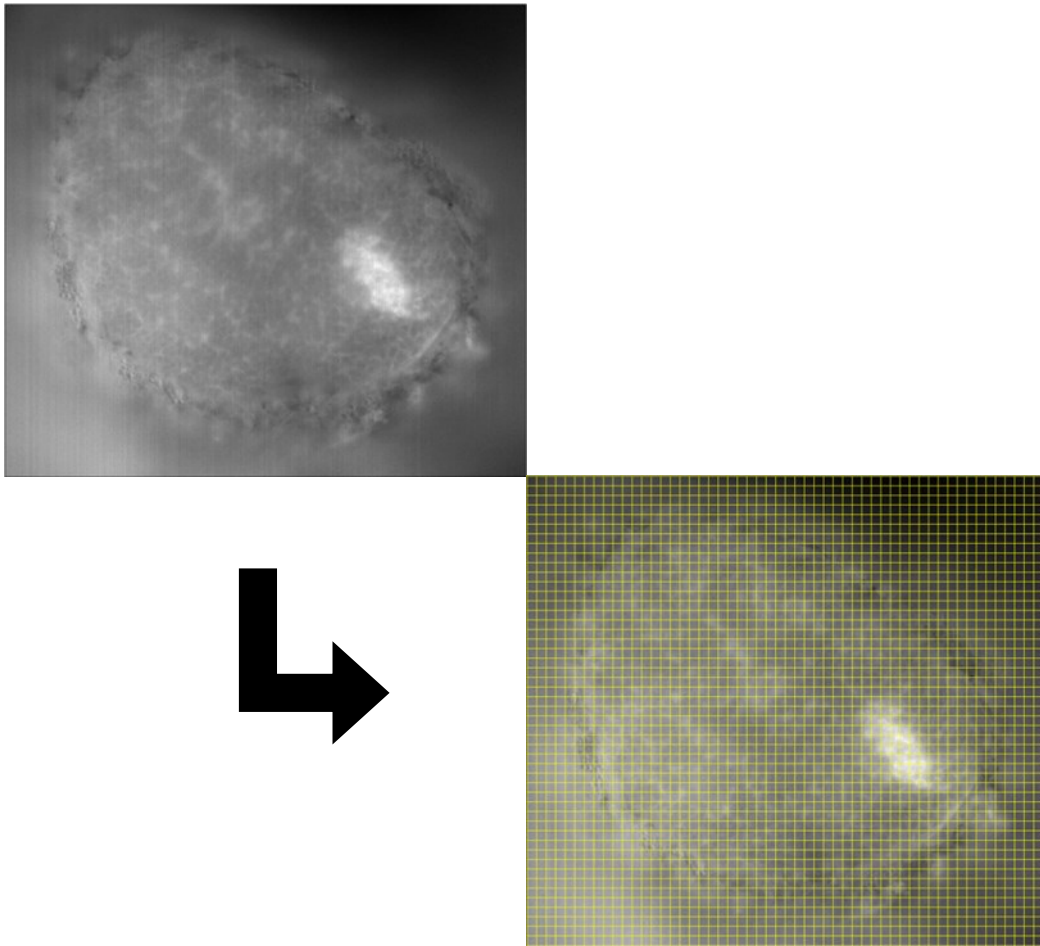


図 2-12 前脳葉の蛍光画像に格子状に設定した ROI

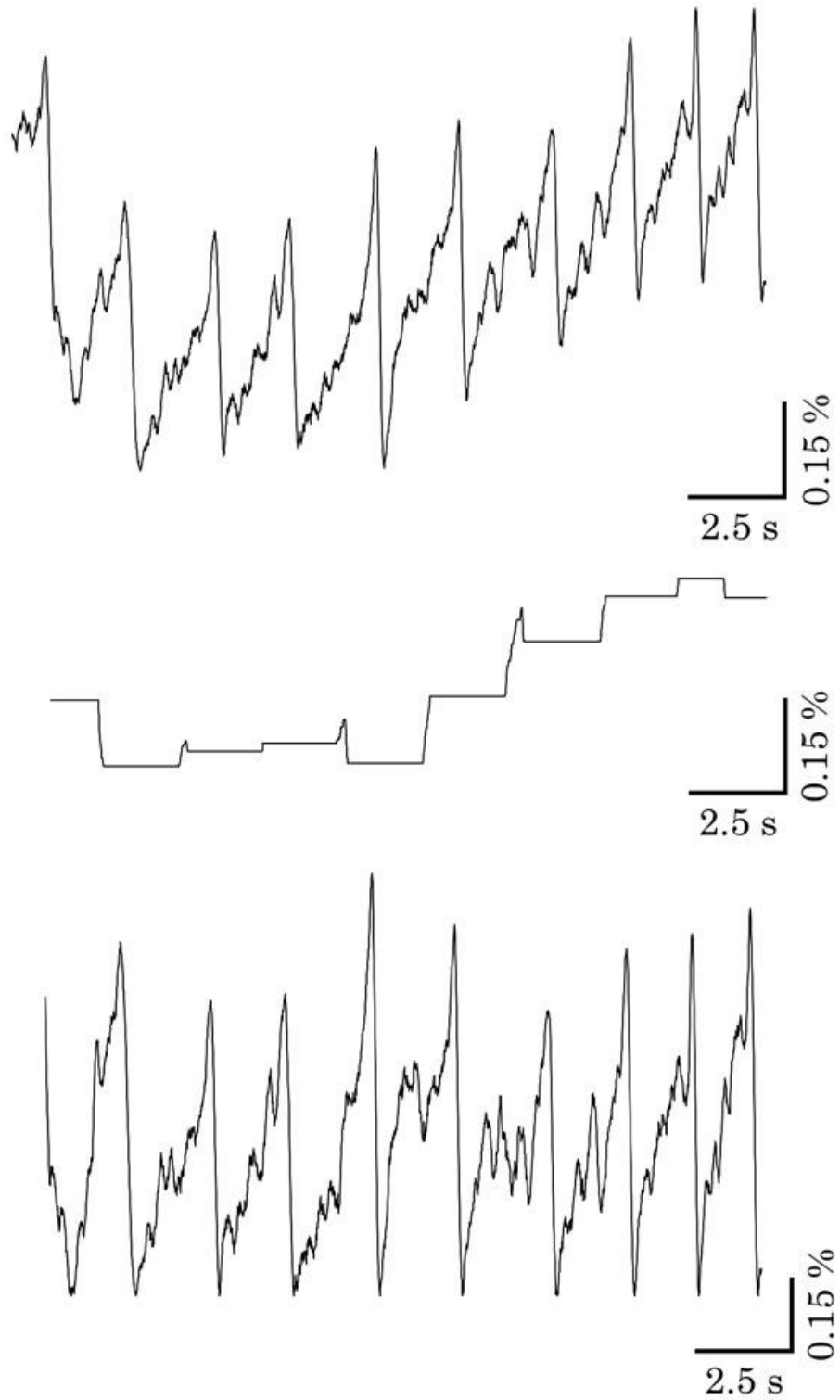


図 2-13 ベースラインを補正して得た蛍光強度の時間変化
 上:補正前の蛍光強度の時間変化、中:補正したベースライン、下:補正後の蛍光強度の時間変化

伝搬速度

得られた蛍光画像に対して 50×50 pixel ($20 \times 20 \mu\text{m}$) の ROI を前脳葉の先端部と基部にそれぞれ 1 つずつ設定し(図 2-14)、各 ROI から蛍光強度変化の時系列データを取得し、先に述べたスムージングを行った(図 2-12)。蛍光強度変化の結果から伝搬速度を求めた。匂い刺激前と匂い刺激中の伝搬速度を求めるための蛍光強度変化のピークの選び方については 2.5.1 と同様の基準で行った。伝搬速度は 2 つの ROI の距離をピークの時間差(図 2-15)で割ったものである。匂い刺激前と匂い刺激中の伝搬速度から変化率を求めた。

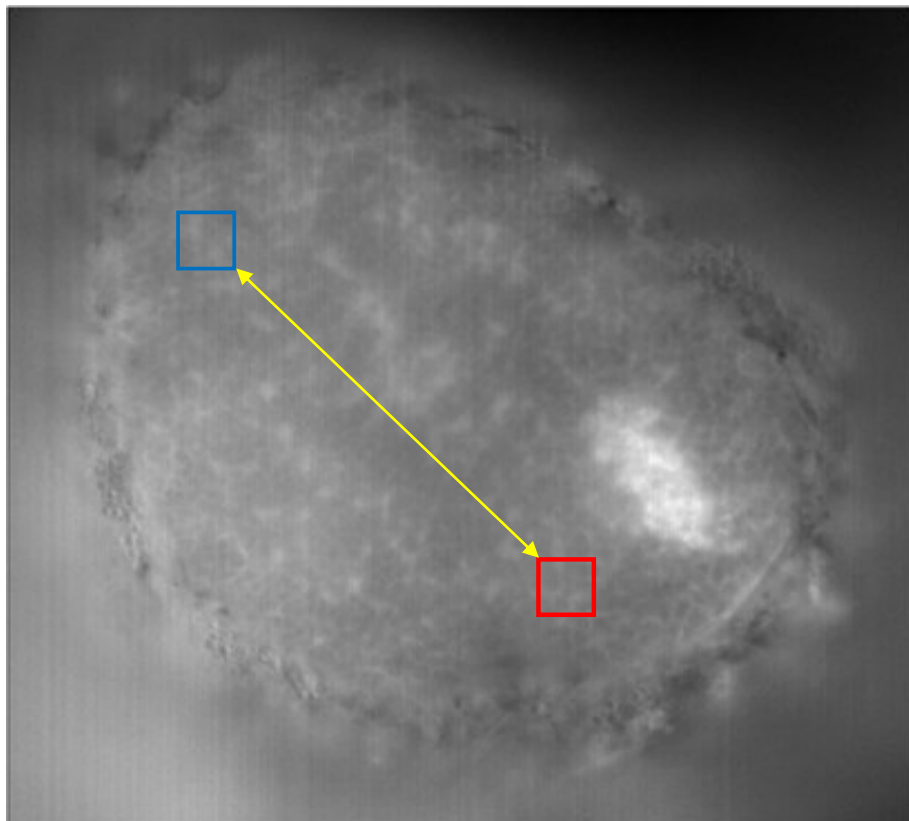


図 2-14 前脳葉の蛍光画像と先端部と基部に設定した ROI
青:先端部、赤:基部

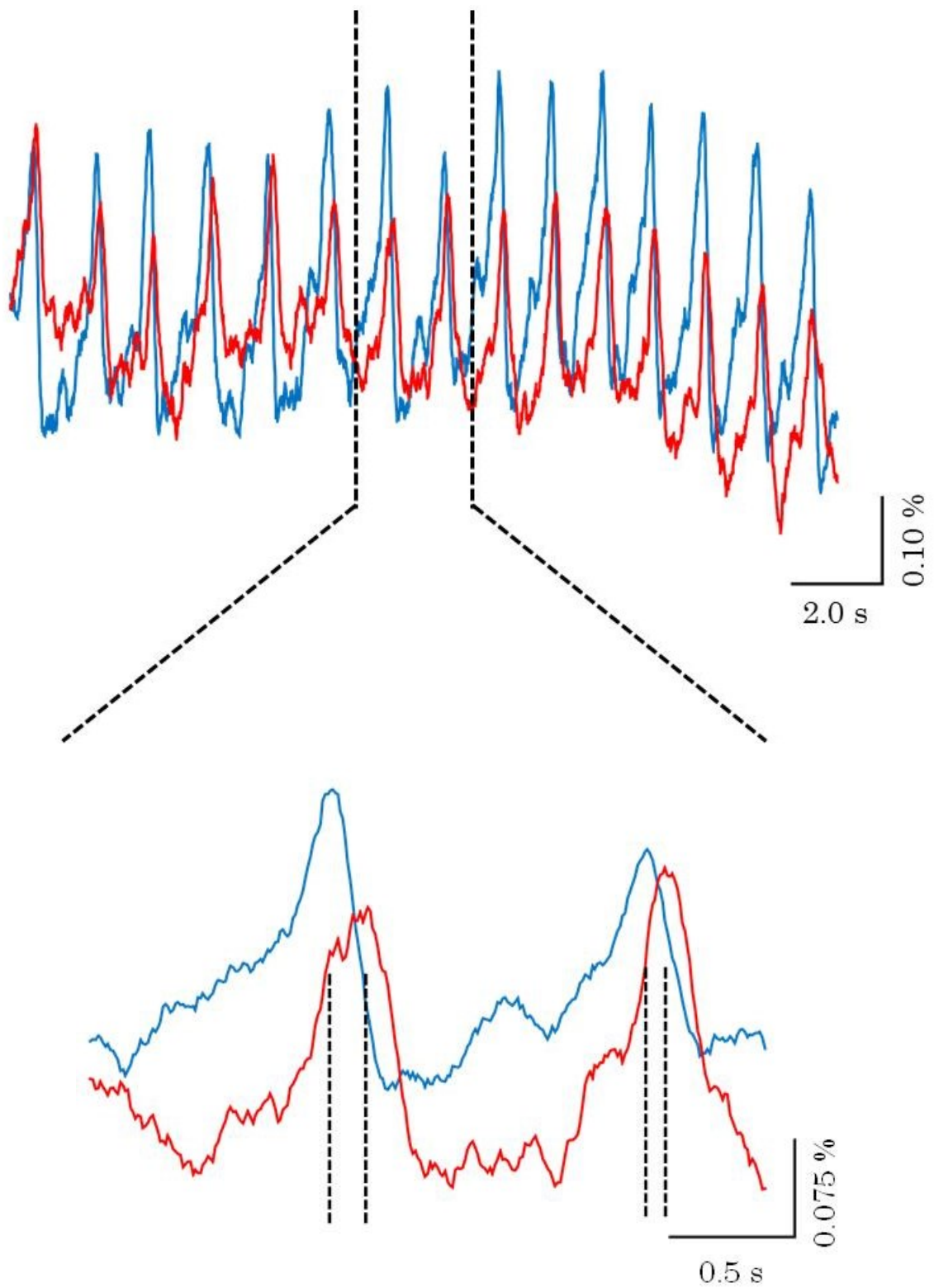


図 2-15 前脳葉の先端部(青線)と基部(赤線)における
 蛍光強度変化とピークの時間差

2.5.3 NO イメージング

2.4.2 でも述べたように、本研究で用いた DAR-4MAM は 1 度 NO と反応すると蛍光を発生し続け、その反応は不可逆である。また、得られる時系列波形に Di-4-ANEPPS で見られるような振動現象は生じないためピークは存在せず、図 2-17 のように蛍光強度が増加していくことになる。したがって、蛍光強度変化の傾きを求め、傾きの変化率から匂い刺激に対する NO の合成速度の変化を評価した。

取得した蛍光画像から前脳葉を囲うように ROI を設定し(図 2-16)、蛍光強度変化の時系列データを取得した。得られたデータからある時刻の前後 5 秒、計 10 秒間における蛍光強度の時間変化の傾きを求めた。同様の処理を時間をずらして行い、蛍光強度変化の傾きの時系列データを得た(図 2-17)。そして、匂い刺激前における蛍光強度変化の傾きの平均値を求めた。平均値からの傾きの変化率を求め、匂い刺激中における傾きの変化率の最大値で NO の合成速度の変化を評価した。また、1-4 でも述べたように前脳葉は 3 層の領域(IM、TM、CM)にも分かれている。また先行研究により、3 層の中で IM 層が最も NO 合成酵素が存在することが示唆されている(Gelperin et al., 2000; Matsuo et al., 2009; Fujie et al., 2002)。そこで、それら 3 層の領域ごとにも ROI を囲うように設定し(図 2-16)、同様の処理を行い、各領域における NO 合成速度の変化を評価した。

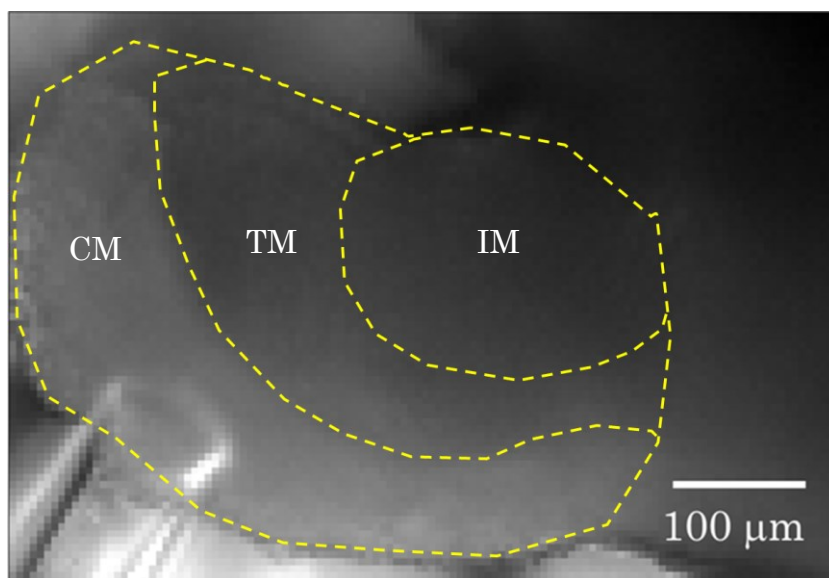


図 2-16 DAR-4MAM で染色した前脳葉標本の蛍光画像
IM: internal mass、TM: terminal mass、CM: cell mass

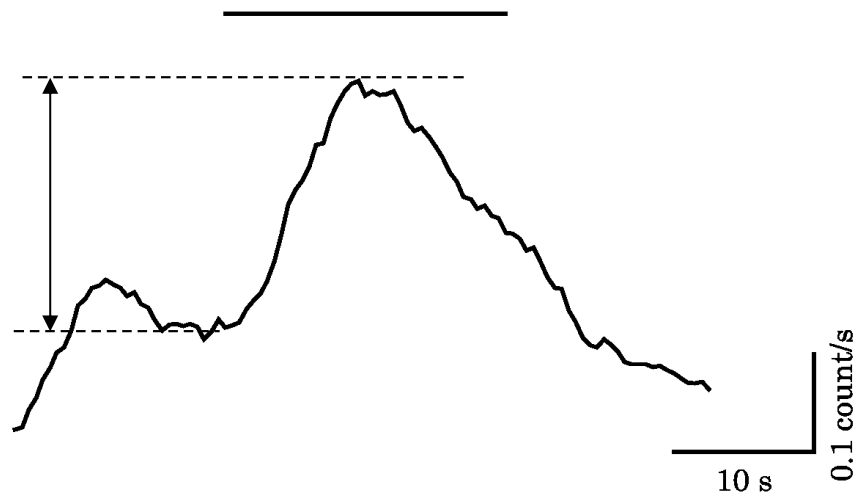
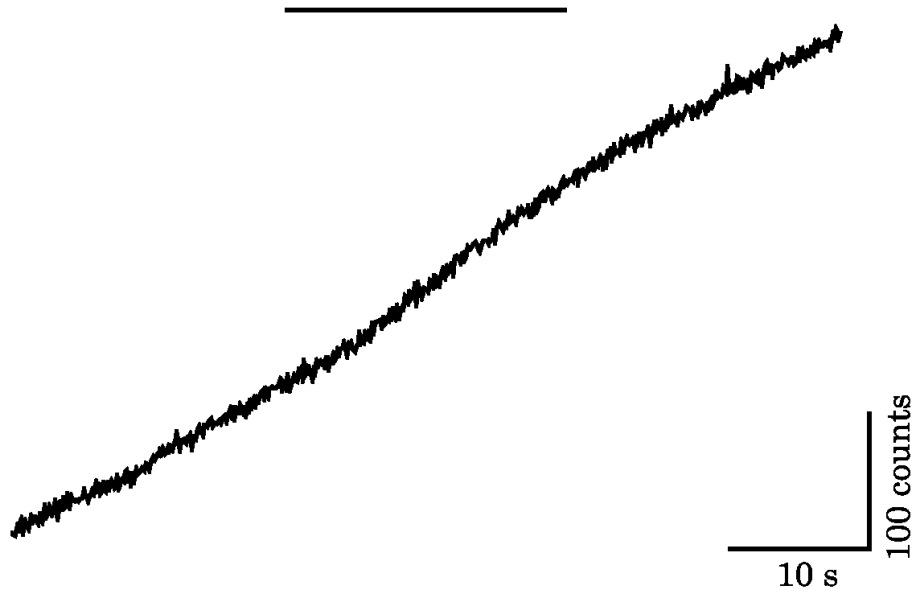


図 2-17 DAR-4M の蛍光強度の時間変化とその傾きの時間変化
 上: 蛍光強度の時間変化、下: 傾きの時間変化
 実線は匂い刺激、点線は匂い刺激前の傾きの平均と匂い刺激中の最大値

2.6 統計解析

各実験で群間の差異を統計解析手法の1つである t 検定 (スチューデント- t) を用いて有意性を求めた。 $p < 0.05$ を有意差とした。結果は平均 \pm 標準誤差で示した。

第3章 単離脳標本系における神経活動の時空間動態の測定

3.1 本実験の目的

本実験では、ナメクジの単離脳標本系における神経活動の時空間動態を測定することを目的とした。ナメクジの行動実験や単離脳標本系における電気生理的手法を用いた神経活動の測定については報告されている例は多い。一方で蛍光イメージング手法による神経活動の測定についてはあまり行われていない。単離脳標本系において蛍光イメージング手法を用いることで、前脳葉における匂い刺激に対する神経活動の時空間動態の変化を調べることが可能になる。さらに、ナメクジの嗅覚系は優れており、記憶・学習機能も有することから、生体(生きた状態)での匂い嫌悪条件づけが行われてきた(Yamada et al., 1992; Kasai et al., 2006; Sahley et al., 1980; Nakaya et al., 2001)。しかしながら、生体での匂い嫌悪条件づけ(行動実験)では同一個体で条件づけ前後の神経活動の変化を比較することは困難である。本実験では、単離脳標本系を用いることにより、同一個体で条件づけ前後の神経活動の変化を比較した。

また、生体での匂い嫌悪条件づけでは無条件刺激として苦味刺激が用いられる。しかしながら、味覚受容器を残したまま単離脳標本を作製するのは容易ではない。そこで、味覚受容器の神経線維に対して電気刺激を与えることによって匂い嫌悪条件づけを行った。電気刺激を用いた条件づけが可能になれば、より簡便な実験条件を得ることができる。

3.2 実験方法

2.2 で述べた通り、ナメクジから触角・神経節を単離し、測定用チャンバに移した。触角がバッファに浸っていると匂い物質が嗅上皮に到達しないため、匂い刺激を行うことができない。そのため、測定用チャンバに神経節と大触覚を固定した後にゴムチューブを半円状に加工したものを触角神経を潰さないように置き、神経節と触角を浸すバッファを隔てられるようにした(図 3-1)。測定中に標本が動かないようにパラフィルムを用いて固定した。固定が完了した後、2.4.1 で述べた通りに Di-4-ANEPPS で染色を行った。染色終了後、測定用バッファで洗浄した。2.3 で述べた測定電極を前脳葉の表面に接触させ、測定用ソフトで細胞外電位をコンピューターに記録した。解析には 0.5 Hz から 30 Hz の周波数成分のみを使用した。また、2.4 で述べた蛍光イメージングの実験系を用いて膜電位イメージングも同時に行った。

忌避性の匂い刺激を行い、LFP 振動の測定と膜電位イメージングを行った。忌避

性の匂い物質には、予め行動実験によって忌避性であることを確認した 1-hexanol (東京化成業(株)) (以下、ヘキサノールと表記する)と玉ねぎを用いた。ヘキサノールは流動パラフィン(和光純薬工業(株))を用いて1000倍に希釈したもの(0.1 v/v%)を使用した。さらに、誘引性の匂い物質であるニンジンとキュウリ(Inoue et al., 2006)を使用し、誘引性の匂い刺激に対する LFP 振動の測定と膜電位イメージングを行った。匂い刺激の方法はエアフローとし、コントロールには水を用いた。匂い刺激の切り替えは刺激装置と電磁弁(EXAK-3, 高砂電気工業(株))を使用した。刺激装置から電磁弁に電圧を加えることで、電磁弁の経路が切り替わり、コントロール刺激から匂い刺激(条件刺激)に切り替わる。刺激開始から 20 秒間は電圧を加え続け、匂い刺激を与え続けた。匂い刺激終了後は再度コントロール刺激を行った。

また、単離脳標本系における匂い嫌悪条件づけを行うためには無条件刺激が必要である。そこで、味覚受容器の神経線維を残したまま単離脳標本を作製し、同様の手順で固定・染色・洗浄を行った。洗浄後、電気刺激を与えるために味覚受容器の神経を予め準備しておいたガラス電極内に引き込んだ。ガラス電極内を測定用バッファで満たし、銀線を入れた。刺激用の基準電極として、ガラス電極内に入れた銀線と同様のものを標本近くに配置した(図 3-1)。電気刺激装置(SEN-7203, NIHON KODEN)とアイソレーター(SS-202J, NIHON KODEN)に銀線を接続した。

誘引性の匂い物質であるニンジン、キュウリで匂い刺激を行った後、ニンジンに対してのみ条件づけを行った。匂い刺激開始 1 秒後に無条件刺激として味覚受容器の神経線維に電気刺激(1 ms, 3 V)を与え、これを 5 分間隔で 3 回行った。条件づけ終了後、1 時間静置した。その後、確認として最初に行った匂い刺激と同様の条件で測定を行った。匂い刺激の方法は、上記の方法と同様に電磁弁を用いたエアフローで行った。

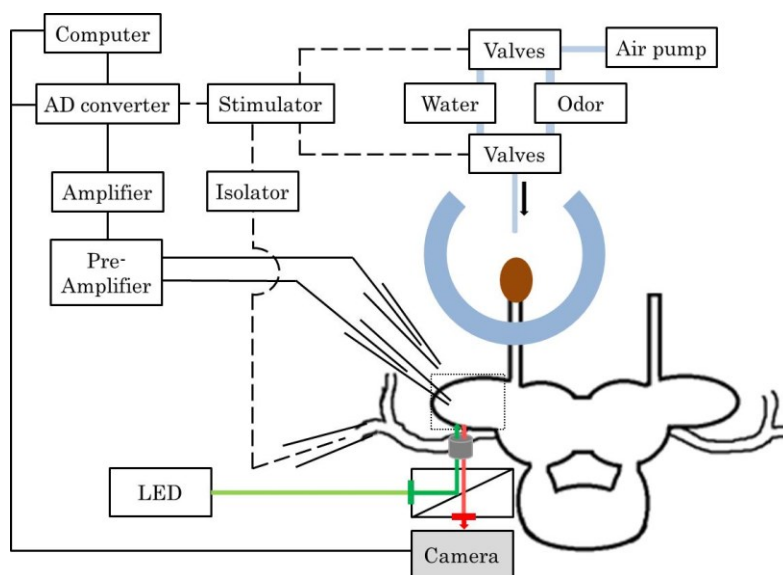


図 3-1 単離脳標本系における匂い嫌悪条件づけの実験系の模式図

3.3 実験結果

忌避性の匂い刺激を行った場合のLFP振動の結果を図3-2に示す。誘引性の匂い物質であるニンジンとキュウリで匂い刺激をした場合のLFP振動の結果を図3-3に示す。ニンジンで匂い嫌悪条件づけを行った後にニンジンとキュウリで匂い刺激をした場合のLFP振動の結果を図3-4に示す。これらの結果から、LFP振動の周波数の変化率を求めた(図3-5)。

匂い刺激は図中の黒実線で示す間与え続けた。忌避性の匂い物質である0.1%ヘキサノールと玉ねぎで匂い刺激をした場合のLFP振動の周波数変化率はそれぞれ $22.31 \pm 2.51\%$ (匂い刺激前; 0.60 ± 0.02 Hz、匂い刺激中; 0.75 ± 0.04 Hz、 $n = 27$)、 $7.34 \pm 3.11\%$ (匂い刺激前; 0.74 ± 0.06 Hz、匂い刺激中; 0.79 ± 0.05 Hz、 $n = 7$)であった。また、誘引性の匂い物質であるニンジンとキュウリで匂い刺激をした場合のLFP振動の周波数変化率はそれぞれ $-1.45 \pm 1.40\%$ (匂い刺激前; 0.67 ± 0.03 Hz、匂い刺激中; 0.66 ± 0.04 Hz、 $n = 21$)、 $-1.62 \pm 1.63\%$ (匂い刺激前; 0.67 ± 0.06 Hz、匂い刺激中; 0.65 ± 0.06 Hz、 $n = 9$)であった。さらに、ニンジンに対して匂い嫌悪条件づけを行った後にニンジンとキュウリで匂い刺激をした場合のLFP振動の周波数変化率はそれぞれ $9.09 \pm 2.28\%$ (匂い刺激前; 0.67 ± 0.03 Hz、匂い刺激中; 0.74 ± 0.03 Hz、 $n = 21$)、 $0.44 \pm 1.10\%$ (匂い刺激前; 0.66 ± 0.05 Hz、匂い刺激中; 0.66 ± 0.06 Hz、 $n = 9$)であった。ニンジンによる匂い刺激を行った場合では条件づけ前後で有意な差が見られた($p < 0.01$)。しかしながら、キュウリによる匂い刺激を行った場合では条件づけ前後で有意な差がなかった(n.s.)。また、条件づけ前に行ったニンジンと忌避性の匂い刺激には有意な差が見られた($p < 0.01$) (図3-5)。

また、膜電位イメージングの結果から神経活動を擬似カラー表示した結果を図3-6に示す。図中の時間は匂い刺激開始時間を0.00 sとし、そこからの時間を示している。また、蛍光強度変化のピークを赤色で示した。先端部から基部に向かって神経活動が伝搬していることが知られている(Delaney et al., 1994; Toda et al., 2000)。そのため、先端部と基部にROIをそれぞれ配置し、蛍光強度変化を求めた。その結果を図3-7、図3-8、図3-9、図3-10、図3-11、図3-12に示す。さらに神経活動の伝搬速度変化率を求めた(図3-13)。忌避性の匂い物質である0.1%ヘキサノールで匂い刺激をした場合の伝搬速度変化率は $72.55 \pm 12.71\%$ (匂い刺激前; 1.87 ± 0.25 mm/s、匂い刺激中; 3.04 ± 0.31 mm/s、 $n = 14$)であった。また、誘引性の匂い物質であるニンジンとキュウリで匂い刺激をした場合の伝搬速度変化率は $4.32 \pm 1.51\%$ (匂い刺激前; 1.30 ± 0.27 mm/s、匂い刺激中; 1.36 ± 0.30 mm/s、 $n = 6$)、 $-8.26 \pm 5.31\%$ (匂

い刺激前; 1.97 ± 0.15 mm/s、匂い刺激中; 1.81 ± 0.22 mm/s、 $n = 4$)であった。さらに、ニンジンに対して匂い嫌悪条件づけを行った後にニンジンとキュウリで匂い刺激をした場合の伝搬速度変化率は 20.75 ± 6.08 % (匂い刺激前; 1.04 ± 0.15 mm/s、匂い刺激中; 1.24 ± 0.16 mm/s、 $n = 6$)、 -4.72 ± 3.87 % (匂い刺激前; 1.19 ± 0.12 mm/s、匂い刺激中; 1.12 ± 0.08 mm/s、 $n = 4$)であった。ニンジンによる匂い刺激を行った場合では条件づけ前後で有意な差が見られた ($p < 0.05$)。しかしながら、キュウリによる匂い刺激を行った場合では条件づけ前後で有意な差がなかった (n.s.)。また、条件づけ前に行ったニンジンと忌避性の匂い刺激 (0.1% ヘキサノール (72.55 ± 12.71 %、匂い刺激前; 1.87 ± 0.25 mm/s、匂い刺激中; 3.04 ± 0.31 mm/s、 $n = 14$))には有意な差が見られた ($p < 0.01$)。

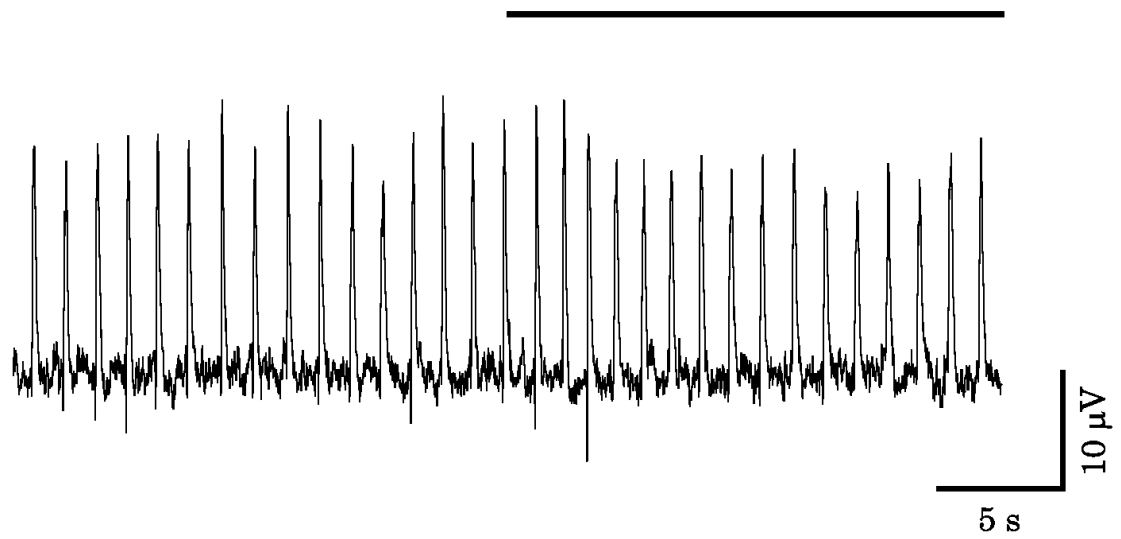
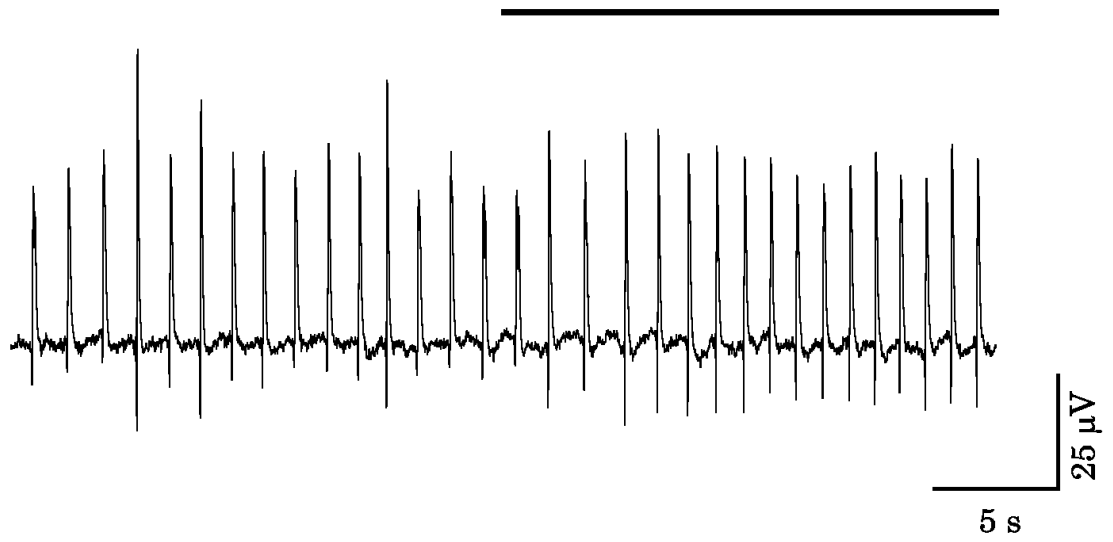


図 3-2 忌避性の匂い刺激に対する前脳葉における LFP 振動の変化
 上:0.1% ヘキサノール、下:玉ねぎ
 上線の間で匂い刺激を行った。

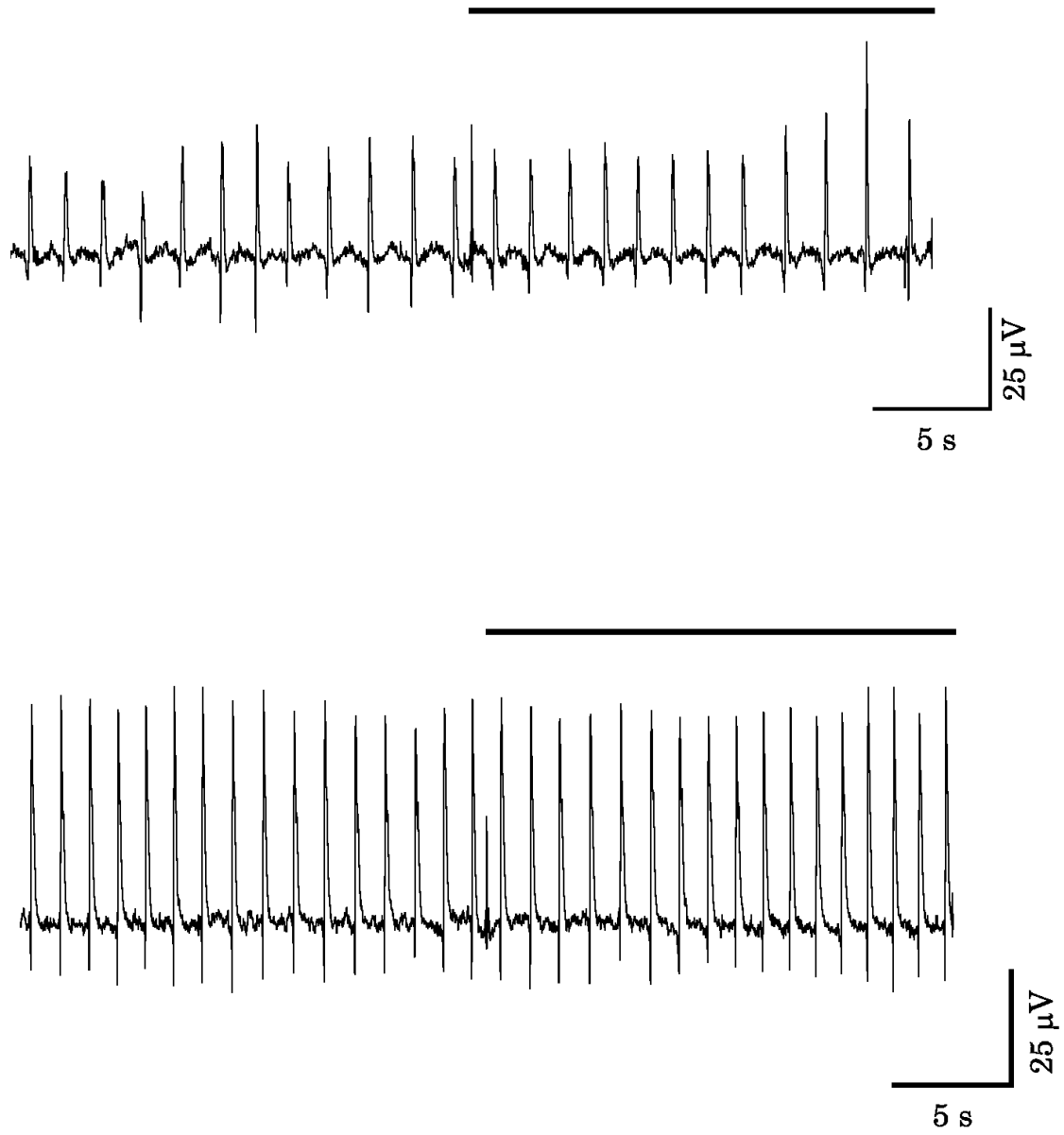


図 3-3 誘引性の匂い刺激に対する LFP 振動の変化
上:エンジン、下:キュウリ
上線の間で匂い刺激を行った。

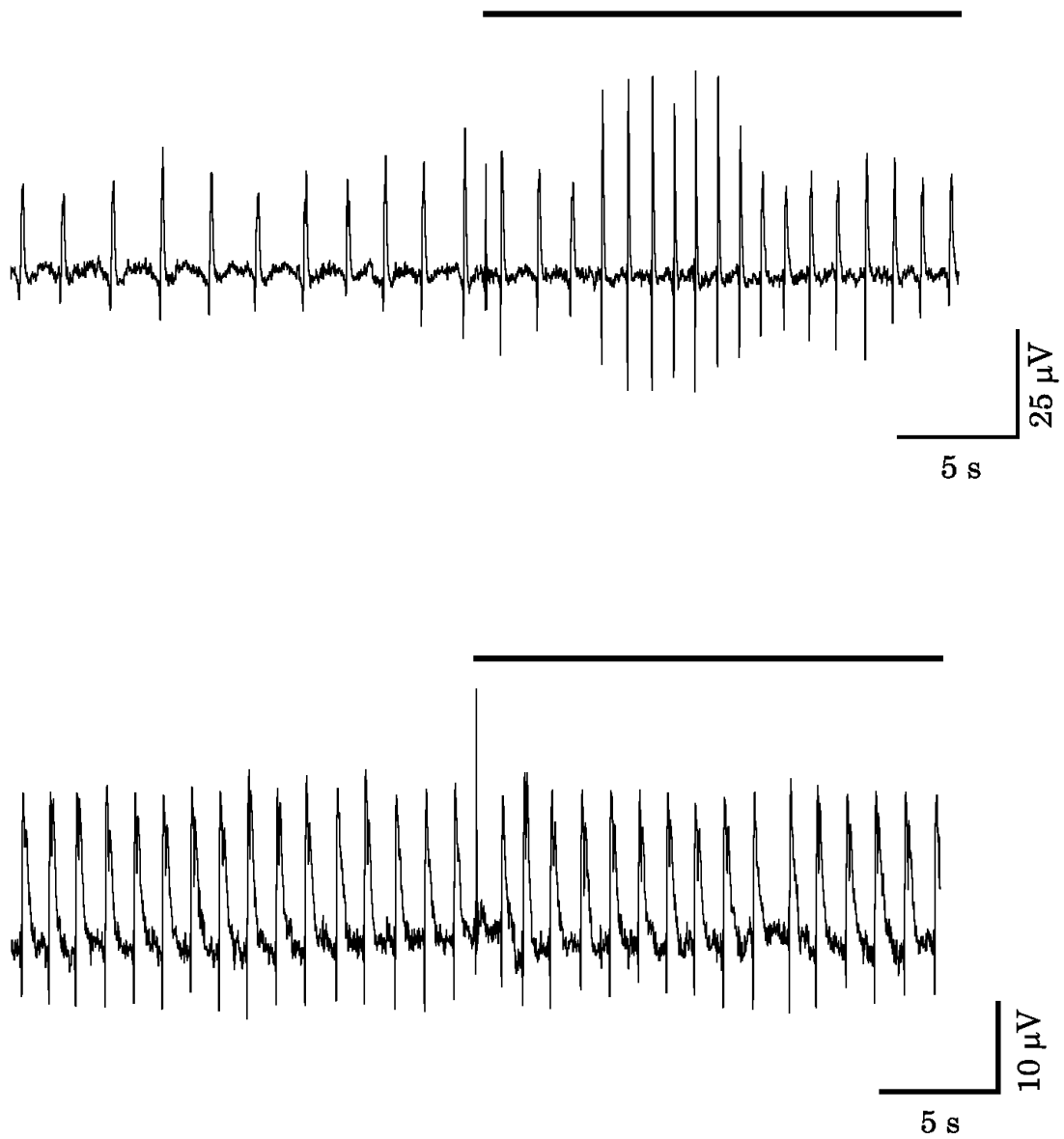
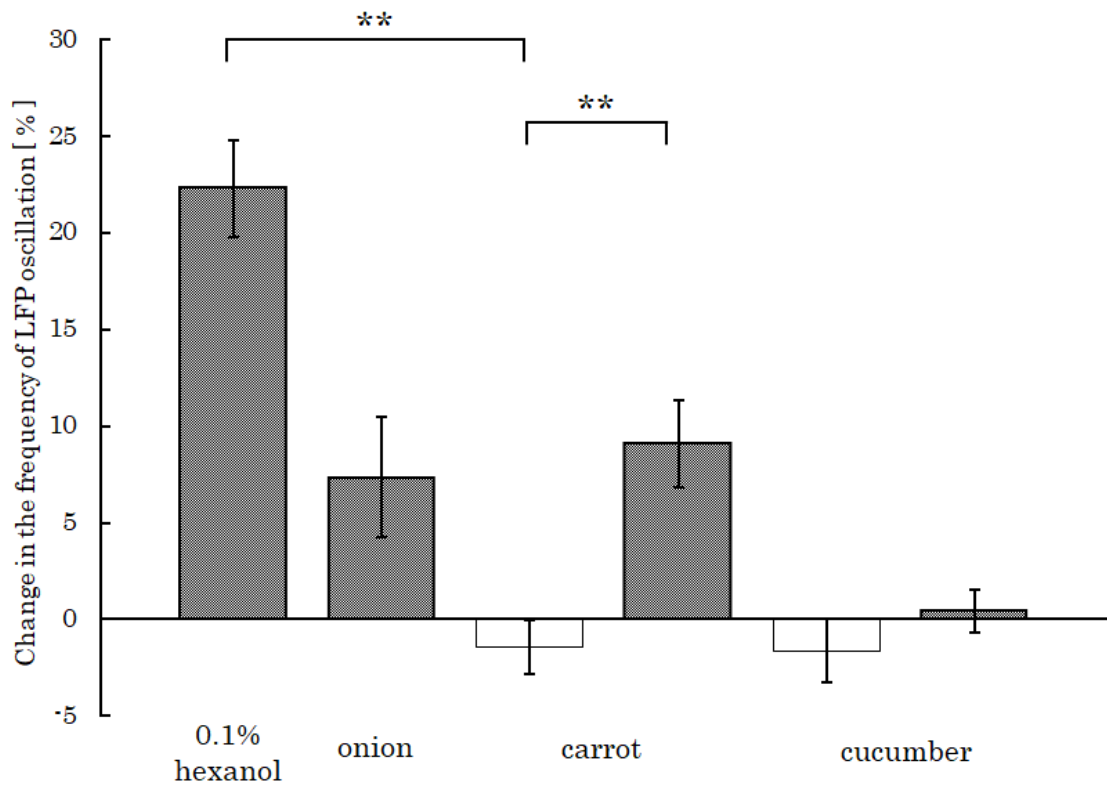


図 3-4 エンジンで条件づけ後の匂い刺激に対する LFP 振動の変化
 上:エンジン、下:キュウリ
 上線の間で匂い刺激を行った。



** $p < 0.01$

図 3-5 各匂い刺激に対する LFP 振動の周波数変化率
 白のバーは匂い嫌悪条件づけ前、グレーのバーは匂い嫌悪条件づけ後の結果を示す。

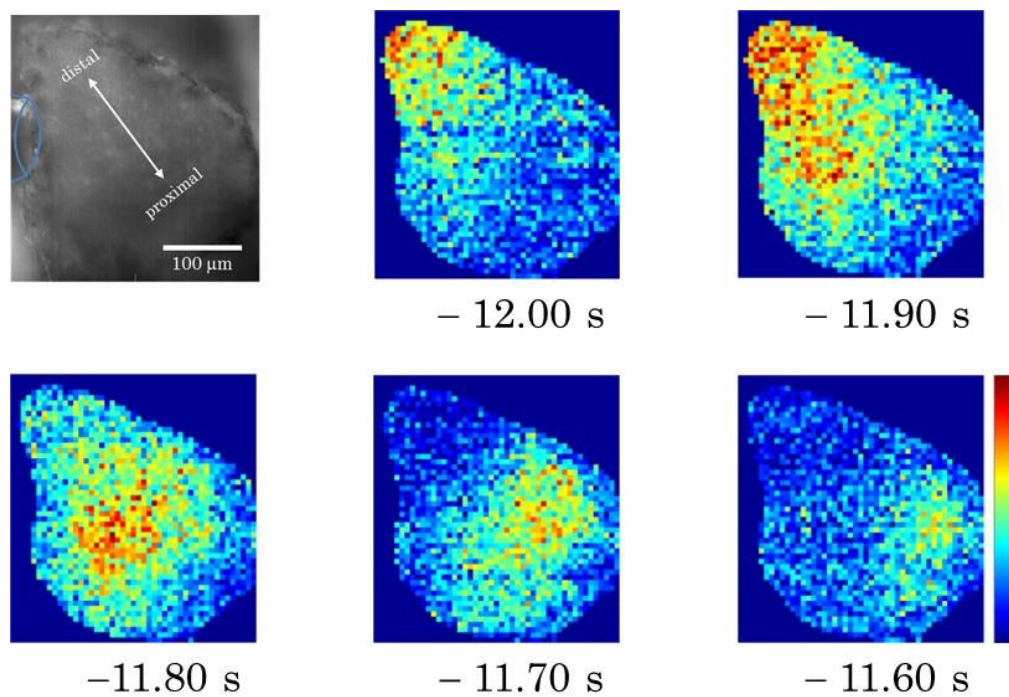


図 3-6 前脳葉における神経活動の伝搬の様子
 図中の時間は匂い刺激開始を 0.00 s で表している。

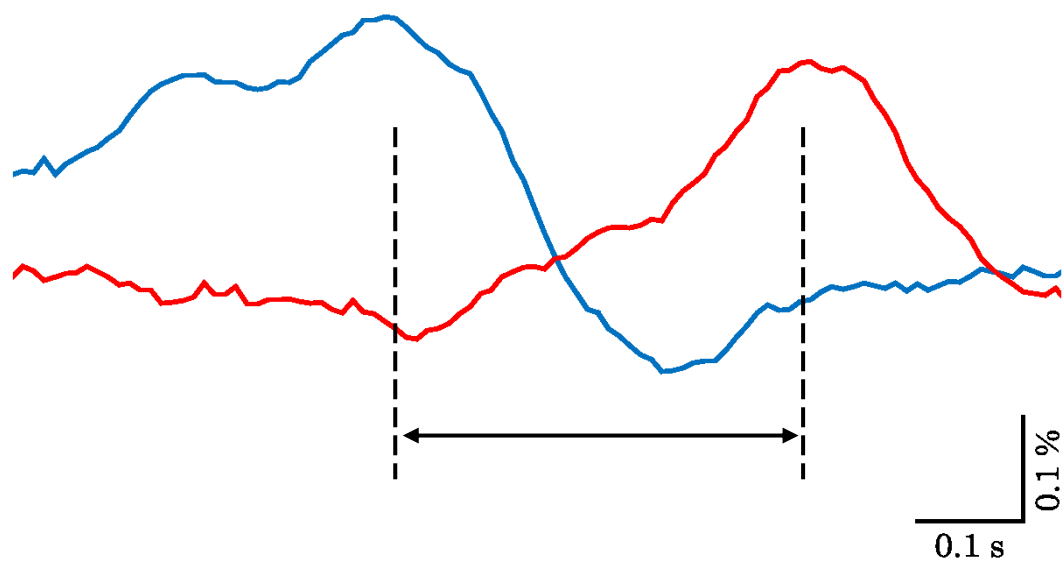


図 3-7 忌避性の匂い刺激(0.1% ヘキサノール)に対する蛍光強度変化
 上:匂い刺激前、下:匂い刺激中
 青:先端部、赤:基部

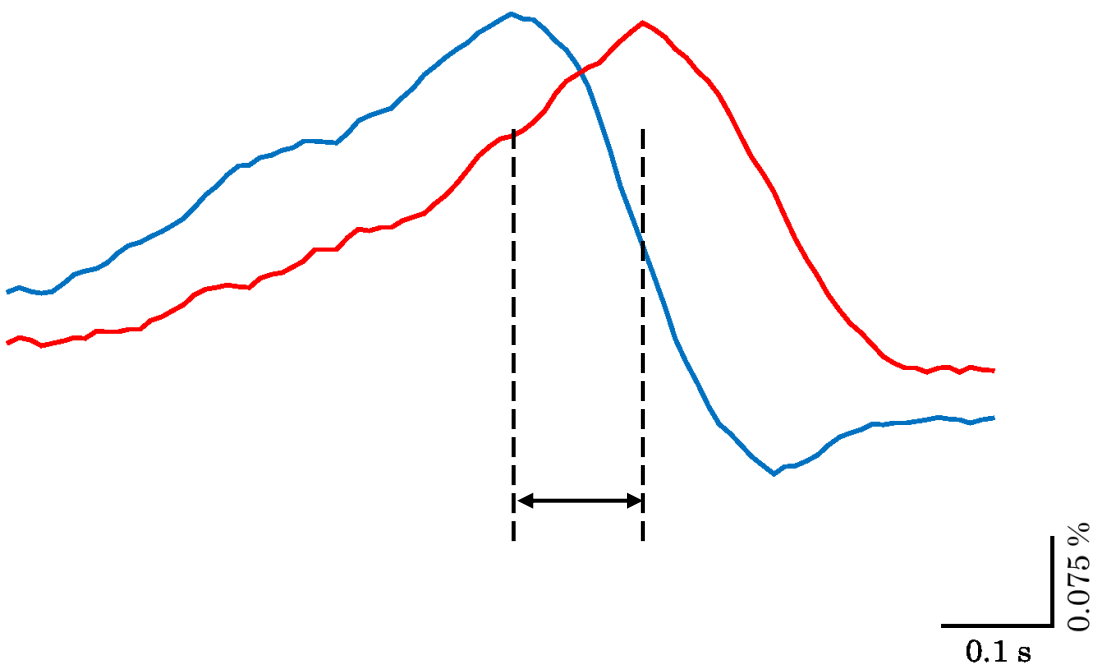
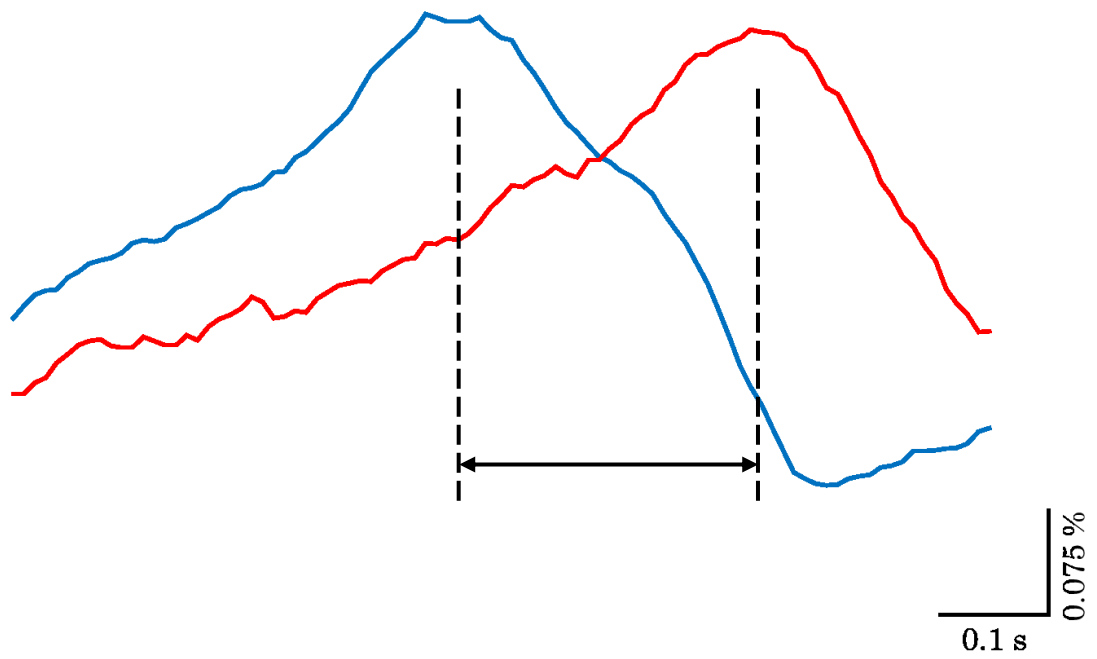


図 3-8 忌避性の匂い刺激(玉ねぎ)に対する蛍光強度変化
 上:匂い刺激前、下:匂い刺激中
 青:先端部、赤:基部

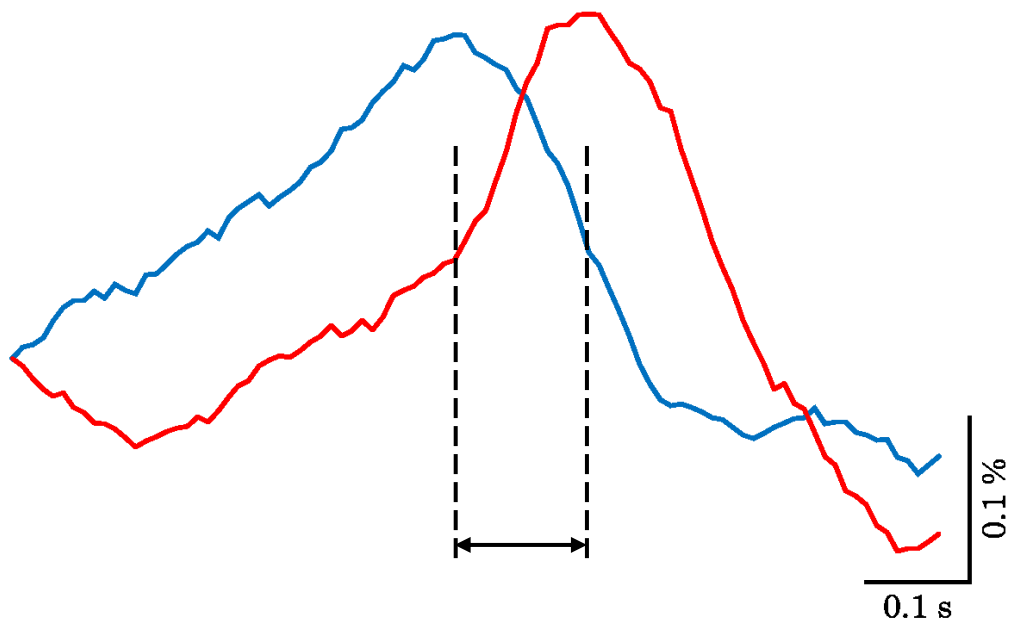
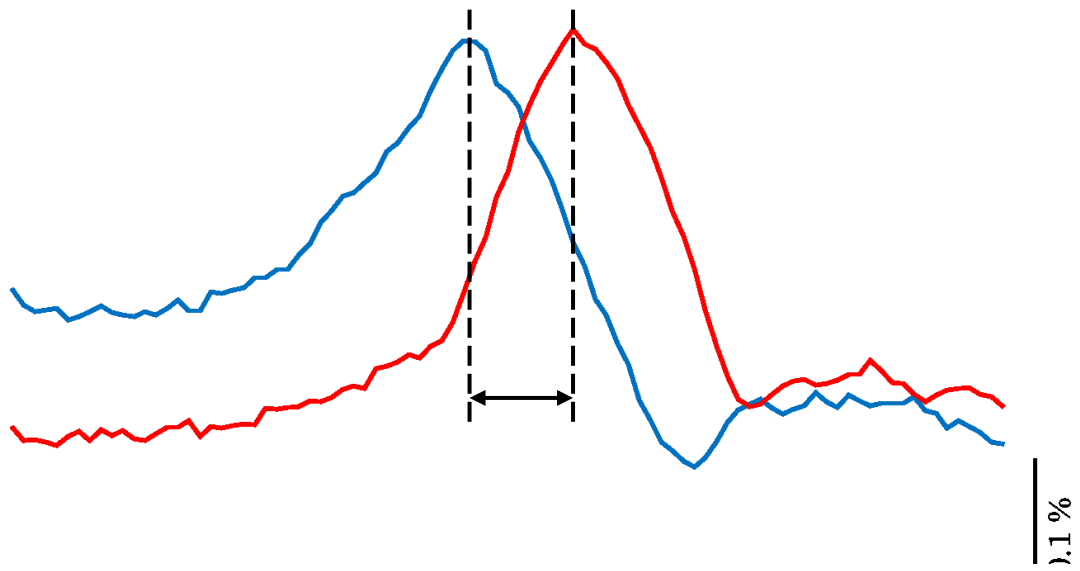


図 3-9 誘引性の匂い刺激(ニンジン)に対する蛍光強度変化
 上:匂い刺激前、下:匂い刺激中
 青:先端部、赤:基部

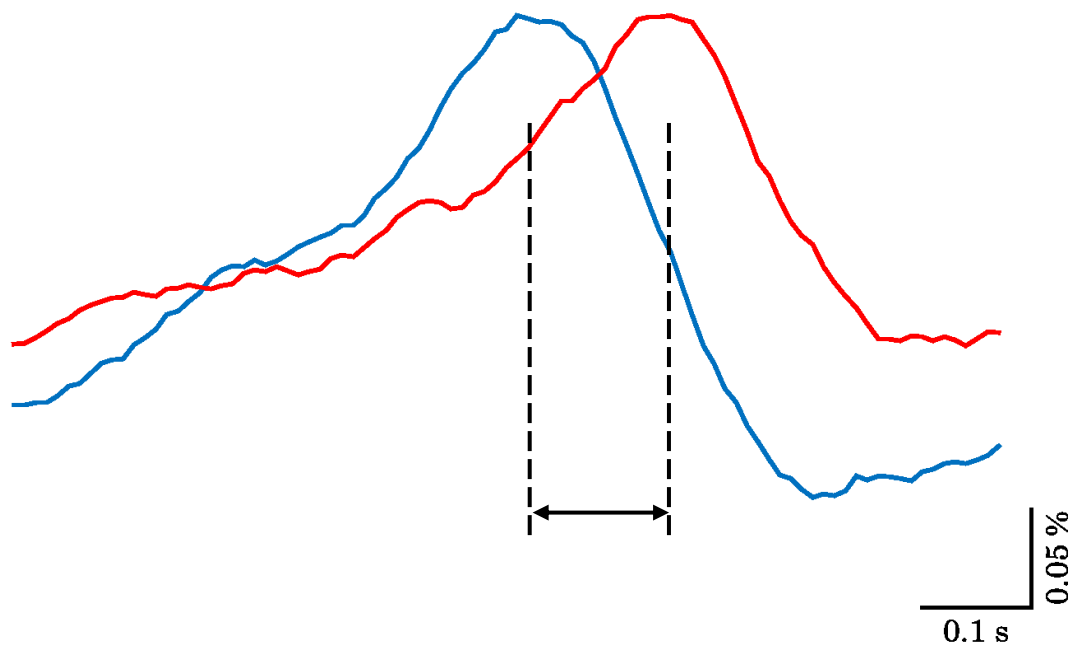
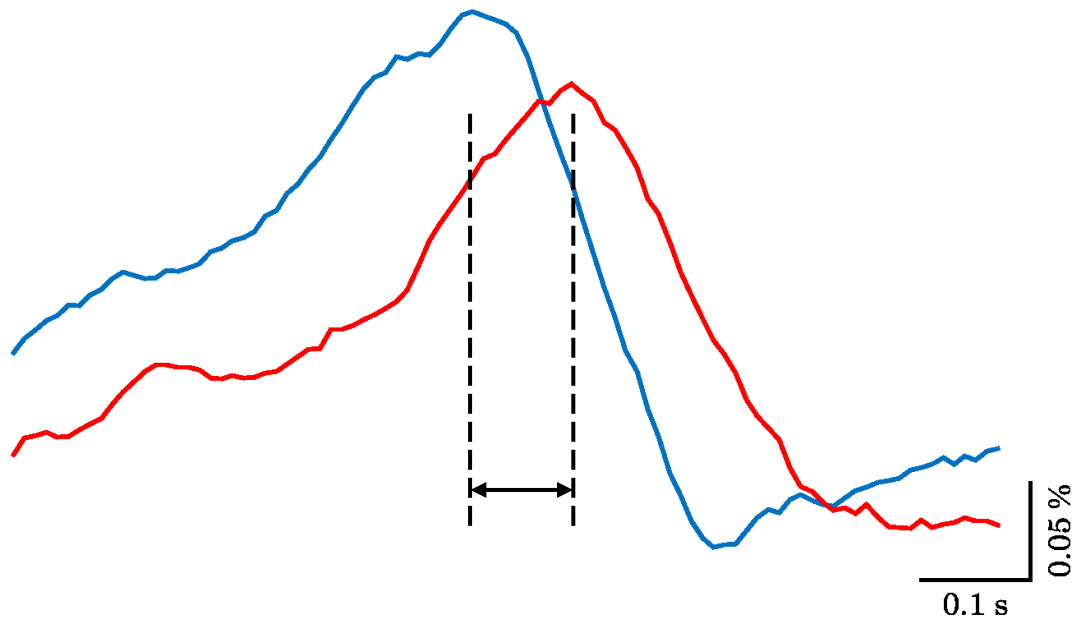


図 3-10 誘引性の匂い刺激(キュウリ)に対する蛍光強度変化
 上:匂い刺激前、下:匂い刺激中
 青:先端部、赤:基部

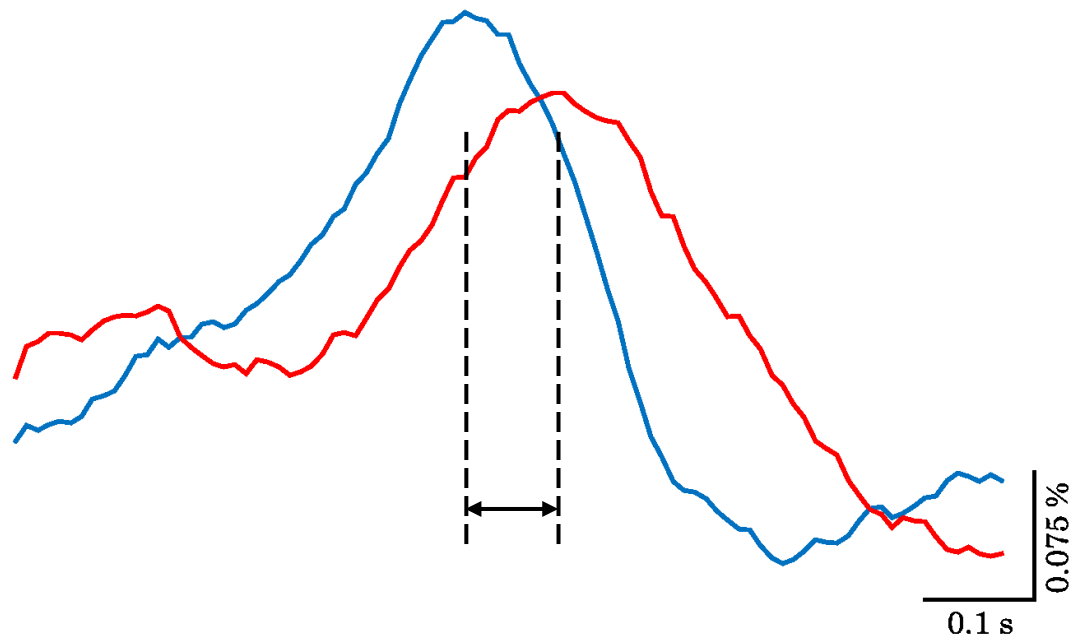
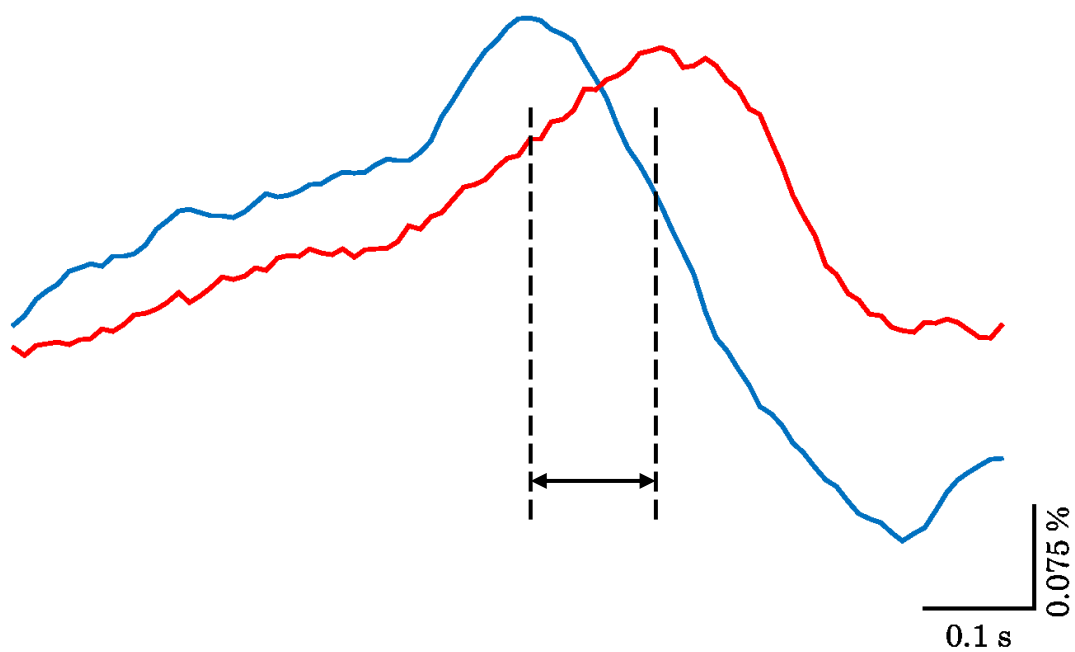


図 3-11 ニンジンで匂い嫌悪条件づけした後の
匂い刺激(ニンジン)に対する蛍光強度変化
上:匂い刺激前、下:匂い刺激中
青:先端部、赤:基部

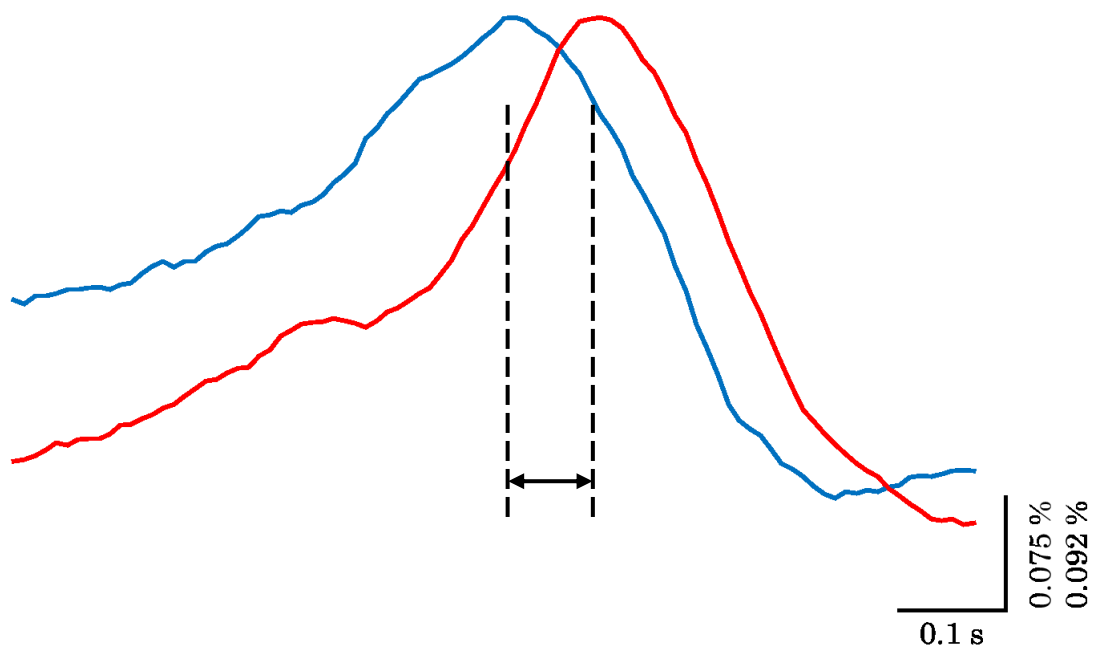
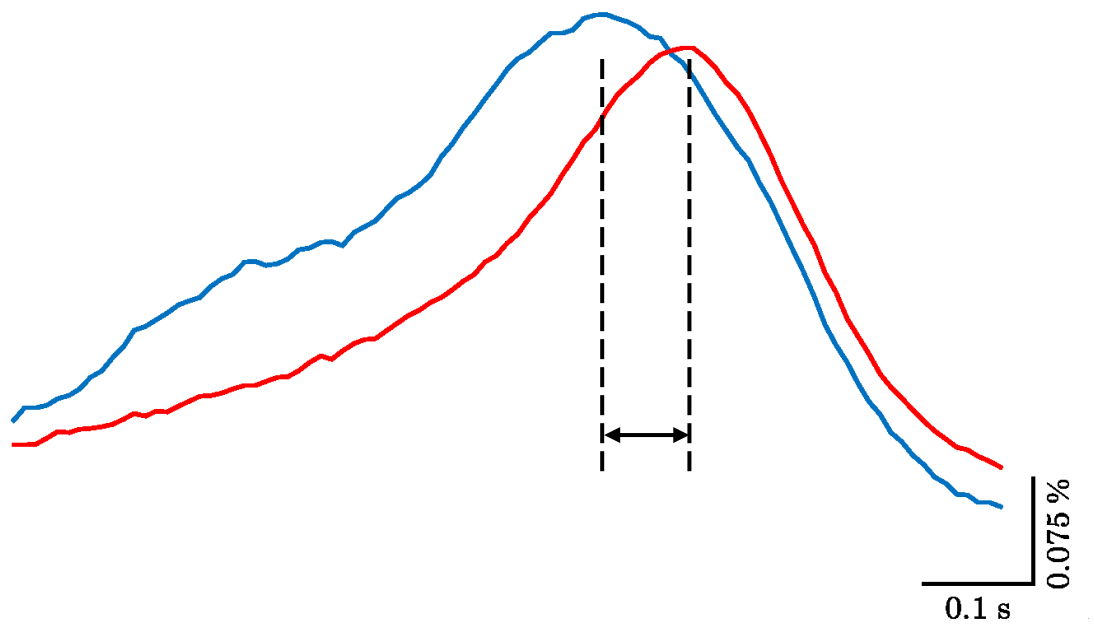
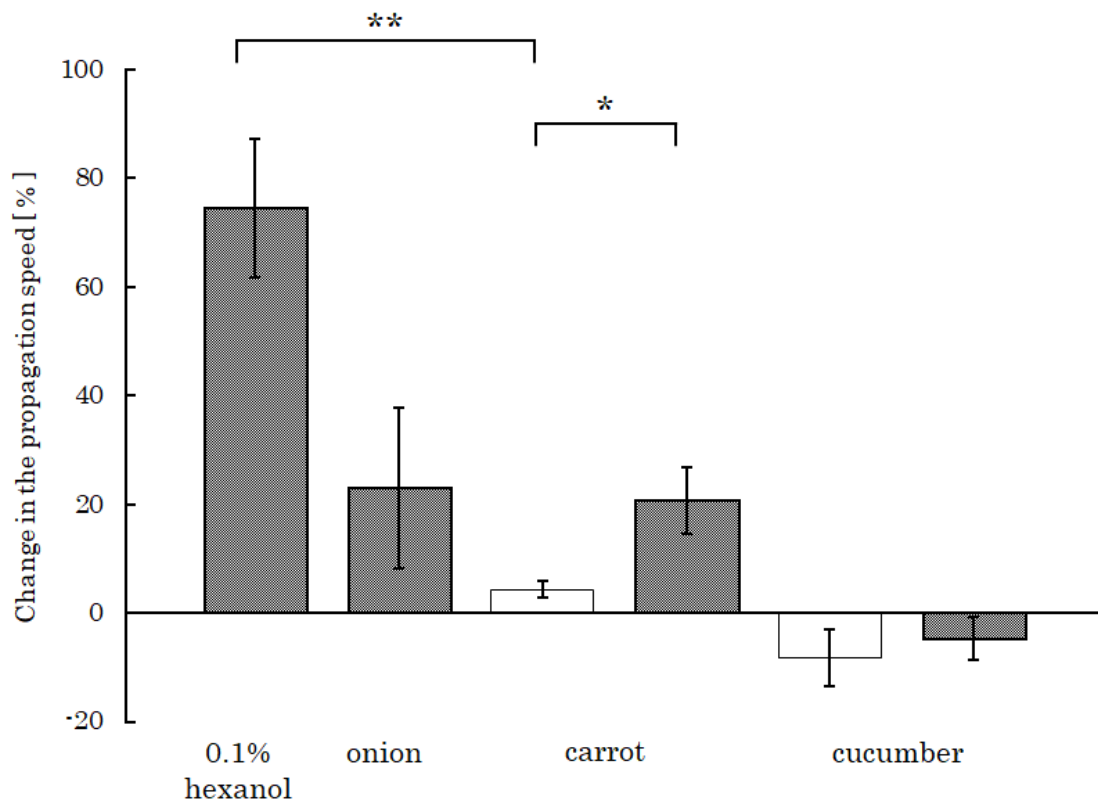


図 3-12 ニンジンで匂い嫌悪条件づけした後の匂い刺激(キュウリ)に対する蛍光強度変化
 上:匂い刺激前、下:匂い刺激中
 青:先端部、赤:基部



** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

図 3-13 各匂い刺激に対する伝搬速度変化率

白のバーは匂い嫌悪条件づけ前、グレーのバーは匂い嫌悪条件づけ後の結果を示す。

3.4 考察

まず、細胞外電位記録の結果について考察する。忌避性の匂い刺激(0.1% ヘキサノールと玉ねぎ)によって LFP 振動の周波数が増加した(図 3-2)。この結果は、過去の研究結果とも一致している(Toda et al., 2000; Inoue et al., 2006)。一方、誘引性の匂い刺激(ニンジンとキュウリ)では LFP 振動の周波数は増加しなかった(図 3-3)。その後、ニンジンに対して単離脳標本系での匂い嫌悪条件づけを行い、再度誘引性の匂い刺激を行った結果、匂い嫌悪条件づけを行ったニンジンに対しては LFP 振動の周波数は増加した(図 3-4)。しかしながら、匂い嫌悪条件づけを行っていないキュウリに対しては LFP 振動の周波数は増加しなかった(図 3-4)。図 3-5 から、匂い嫌悪条件づけした場合、LFP 振動の周波数の変化は忌避性の匂い刺激に対する変化と同じであるということが明らかになった。続いて、膜電位イメージングの結果について考察する。忌避性の匂い刺激(0.1% ヘキサノールと玉ねぎ)によって神経活動の伝搬速度が増加した(図 3-7、図 3-8)。一方、誘引性の匂い刺激(ニンジンとキュウリ)では神経活動の伝搬速度は増加しなかった(図 3-9、図 3-10)。その後、ニンジンに対して単離脳標本系での匂い嫌悪条件づけを行い、再び誘引性の匂い刺激を行った結果、匂い嫌悪条件づけを行ったニンジンに対しては神経活動の伝搬速度は増加した(図 3-11)。しかしながら、匂い嫌悪条件づけを行っていないキュウリに対しては神経活動の伝搬速度は増加しなかった(図 3-12)。図 3-13 から匂い嫌悪条件づけした場合、神経活動の伝搬速度の変化は忌避性の匂い刺激に対する変化と同じであるということが明らかになった。以上のことから、単離脳標本系における匂い嫌悪条件づけが成立し、条件づけされた匂いに対して、行動だけでなく神経活動から変化し、LFP 振動の周波数と神経活動の伝搬速度の増加は忌避行動と関係しているということが明らかになった。

行動実験において忌避性の匂い刺激を行った場合、ナメクジは委縮・逃避などの忌避行動を示す。委縮する場合、外套膜と言われる背側の内臓を覆う体壁に頭部を引き込む。この外套膜に頭部を引き込むための神経細胞(あるいは線維)の神経活動を測定し、他の神経活動との関係を調べることで、神経活動の変化と忌避行動の関係について明らかにすることができる。先行研究では、LFP 振動の周波数と外套膜神経線維の活動の相関について調べており、外套膜神経線維の活動は忌避行動の指標となることを示している(Inoue et al., 2006)。LFP 振動は前脳葉に接触させたガラス電極を介して測定されるので、LFP 振動の周波数の増加は前脳葉で繰り返し発生している神経活動の伝搬速度の増加によるものと考えられる。さらに、神経活動は、

行動とくに忌避行動をとらせるための行動を担う神経細胞(部位)に繰り返し伝搬する必要があり、神経活動の伝搬速度の増加は外套膜神経線維の活動の頻度を増加させなければならない。本論文の結果には記載していないが、忌避性の匂い刺激によって外套膜神経線維の活動の頻度と神経活動の伝搬速度が増加した(図 3-14)。しかしながら、統計解析が行えていないため、更なる実験が必要である。以上の結果から、前脳葉における神経活動の伝搬速度の増加と外套膜神経線維の活動の増加によって先天的及び後天的(匂い嫌悪条件づけ)な忌避性の匂いに対する忌避行動が生じているということが示唆された。

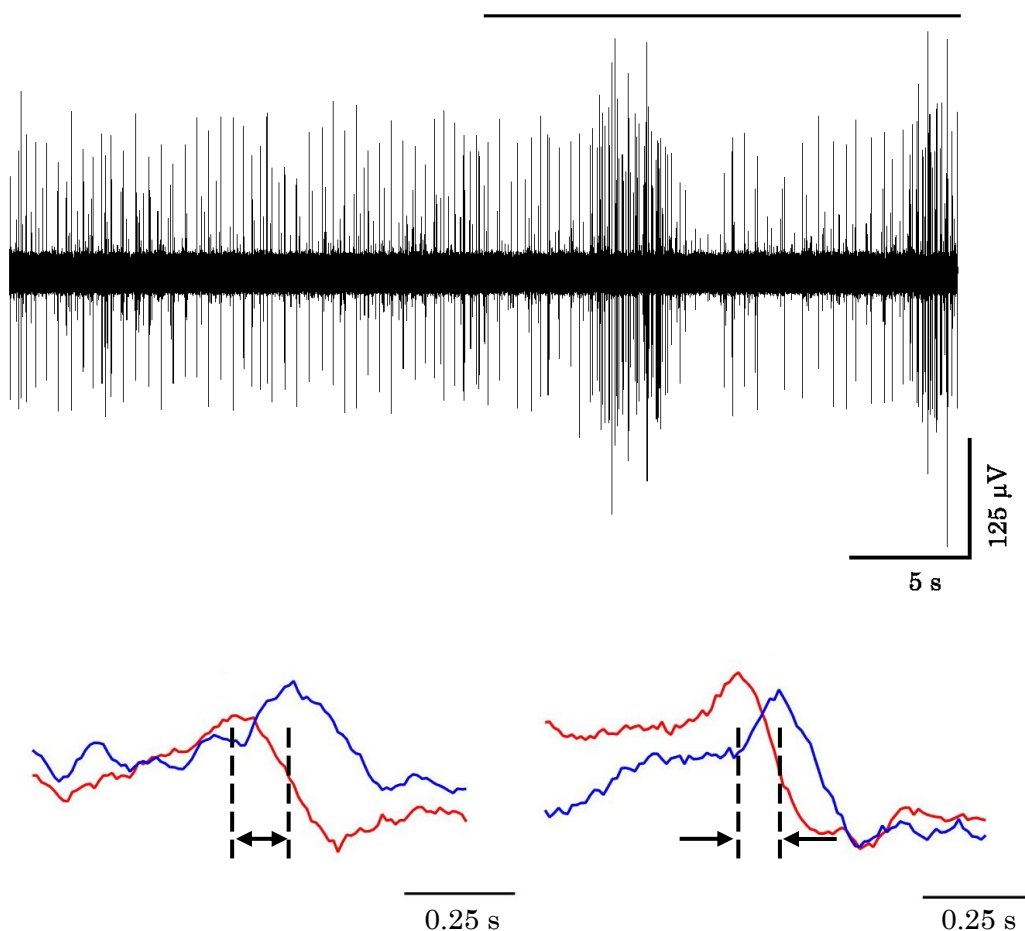


図 3-14 忌避性の匂い刺激(玉ねぎ)に対する神経活動
 上:外套膜神経線維の活動、下:蛍光強度変化(左:匂い刺激前、右:匂い刺激中)
 上線の間で匂い刺激を行った。

第4章 匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化に対する NOの関与

4.1 本実験の目的

本実験では、忌避性の匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化に対する NO の関りについて調べることを目的とした。

忌避性の匂い刺激による前脳葉の神経活動(LFP 振動の周波数)に変化が生じることは知られている(Toda et al., 2000; Inoue et al., 2006)。さらに、第3章の結果から、忌避性の匂い刺激によって前脳葉における神経活動の伝搬は変化することが明らかになった。一方、神経伝達物質の NO の合成を阻害することで行動実験での学習が成立しないことが知られている(Gelperin., 1999)。しかしながら、忌避性の匂い刺激を与えたときの NO 動態については調べられていない。そこで、NO 合成を阻害した上で、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。

4.2 実験方法

3.2 と同様に単離した触角-神経節を測定用チャンバに固定した(図 4-1)。固定が完了した後、2.4.1 で述べたとおりに Di-4-ANEPPS で染色を行った。染色終了後、測定用バッファで洗浄した。匂い刺激方法や測定方法は 3.2 で述べたものと同様の方法を用いた。匂い刺激は 30 秒間行い、匂い物質にはヘキサノールを流動パラフィンで 1000 倍に希釈したもの(0.1 v/v%)を使用した。大触覚にのみ匂い刺激を行い、忌避性の匂い刺激によって LFP 振動の周波数が増加することを確認した後、NO 合成酵素阻害剤である N^{G} -Nitro-L-arginine methyl ester, hydrochloride(和光純薬工業(株))(以下、L-NAME と表記する)あるいは L-NAME の光学異性体である N^{G} -Nitro-D-arginine methyl ester hydrochloride(和光純薬工業(株))(以下、D-NAME と表記する)を測定用バッファで溶かしたもので 90 分間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、再度同様の手順で匂い刺激を行った。L-NAME と D-NAME はそれぞれ 1 mg/ml(3.7 mM)の濃度に調製したものを使用した。

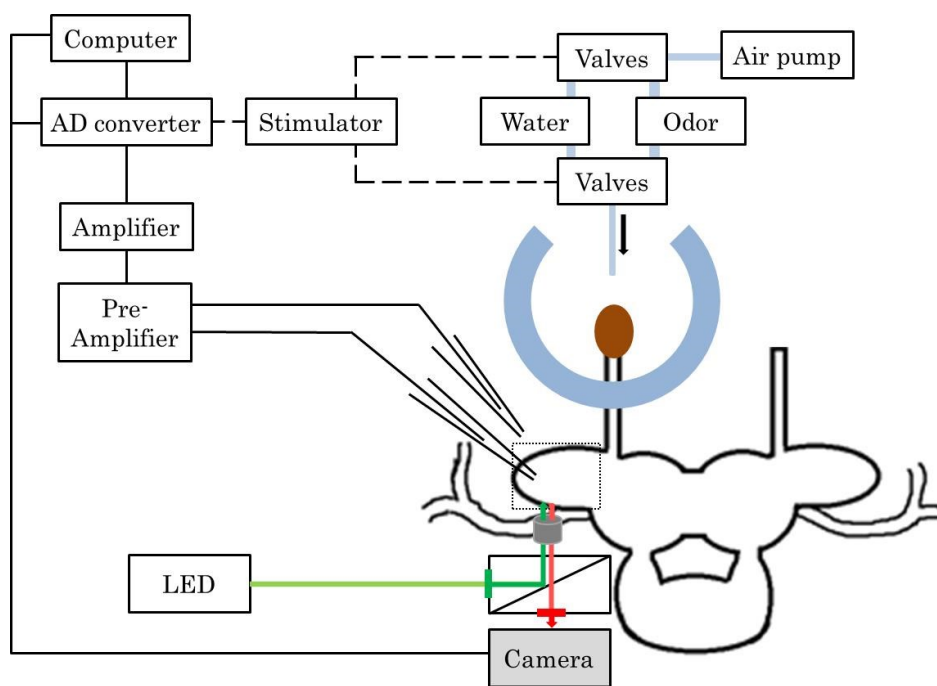


図 4-1 実験系の模式図

4.3 実験結果

細胞外電位記録の結果を図 4-2、図 4-3 に示す。匂い刺激は図中の黒実線で示す間与え続けた。また、LFP 振動の周波数変化率を求めた(図 4-4)。

L-NAME インキュベーション前の LFP 振動の周波数変化率は 21.52 ± 2.42 % (匂い刺激前; 0.57 ± 0.03 Hz、匂い刺激中; 0.69 ± 0.03 Hz、 $n = 12$) であった。L-NAME インキュベーション後の LFP 振動の周波数変化率は 2.34 ± 2.36 % (匂い刺激前; 0.59 ± 0.03 Hz、匂い刺激中; 0.61 ± 0.04 Hz、 $n = 12$) であった。これら 2 つには有意な差が見られた ($p < 0.01$)。また、D-NAME インキュベーション前 (19.96 ± 3.61 %、匂い刺激前; 0.63 ± 0.03 Hz、匂い刺激中; 0.75 ± 0.03 Hz、 $n = 14$) と後 (12.80 ± 2.53 %、匂い刺激前; 0.62 ± 0.02 Hz、匂い刺激中; 0.70 ± 0.02 Hz、 $n = 14$) で LFP 振動の周波数変化率には有意な差はなかった (n.s.)。L-NAME と D-NAME でのインキュベーション前の LFP 振動の周波数変化率には有意な差はなかった (n.s.)。

また、膜電位イメージングの結果から神経活動を擬似カラー表示した結果を図 4-5 から図 4-8 に示す。図中の時間は匂い刺激開始時間を 0.00 s とし、そこからの時間を示している。また、蛍光強度変化のピークを赤色で示した。第 3 章と同様に、先端部と基部に ROI をそれぞれ配置し、蛍光強度変化を求めた。その結果を図 4-9、図 4-10 に示す。さらに、神経活動の伝搬速度変化率を求めた(図 4-11)。L-NAME インキュベーション前の伝搬速度変化率は 118.79 ± 35.65 % (匂い刺激前; 1.13 ± 0.12 mm/s、匂い刺激中; 3.02 ± 0.65 mm/s、 $n = 5$) であった。L-NAME インキュベーション後の伝搬速度変化率は 17.16 ± 6.29 % (匂い刺激前; 1.61 ± 0.17 mm/s、匂い刺激中; 1.87 ± 0.18 mm/s、 $n = 5$) であった。これら 2 つには有意な差が見られた ($p < 0.05$)。また、D-NAME インキュベーション前 (52.54 ± 12.36 % (匂い刺激前; 1.84 ± 0.24 mm/s、匂い刺激中; 2.70 ± 0.29 mm/s、 $n = 9$)) 後 (38.30 ± 8.10 % (匂い刺激前; 1.83 ± 0.24 mm/s、匂い刺激中; 2.68 ± 0.50 mm/s、 $n = 9$)) の伝搬速度変化率には有意な差はなかった (n.s.)。L-NAME と D-NAME でのインキュベーション前の伝搬速度変化率には有意な差はなかった (n.s.)。

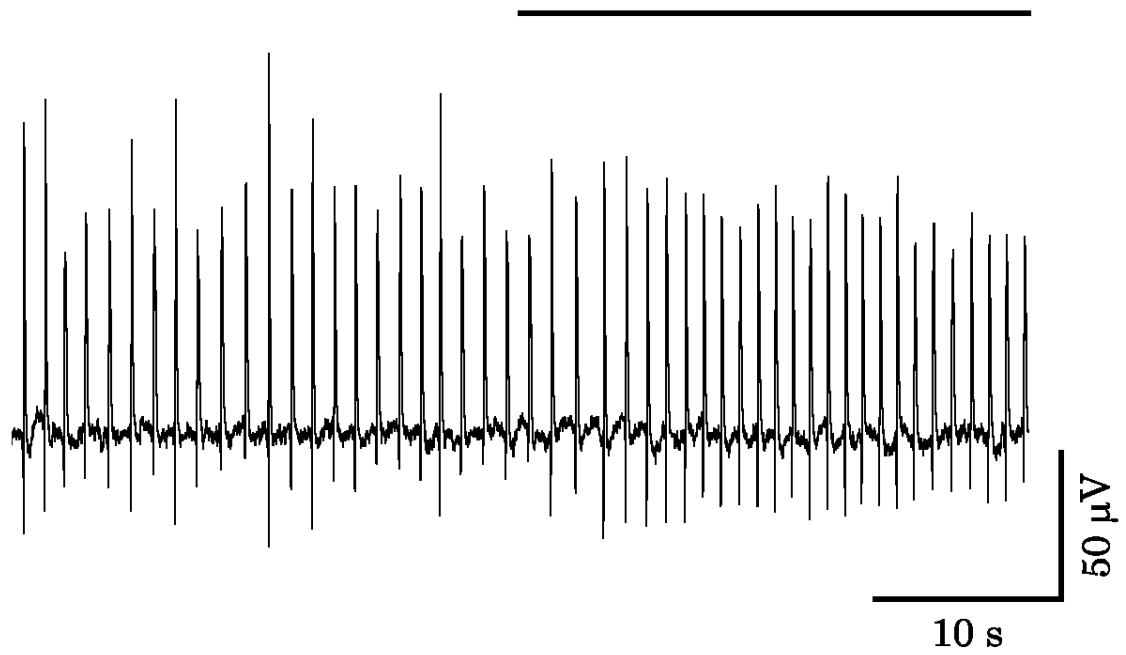


図 4-2 L-NAME 投与前の前脳葉における LFP 振動
上線の間で匂い刺激を行った。

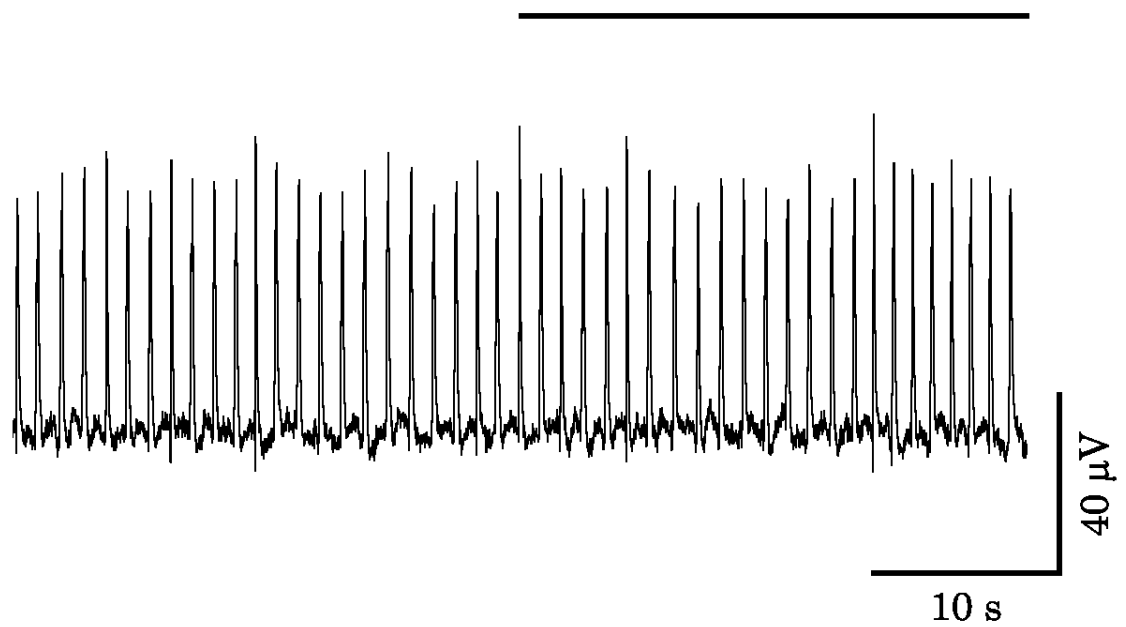
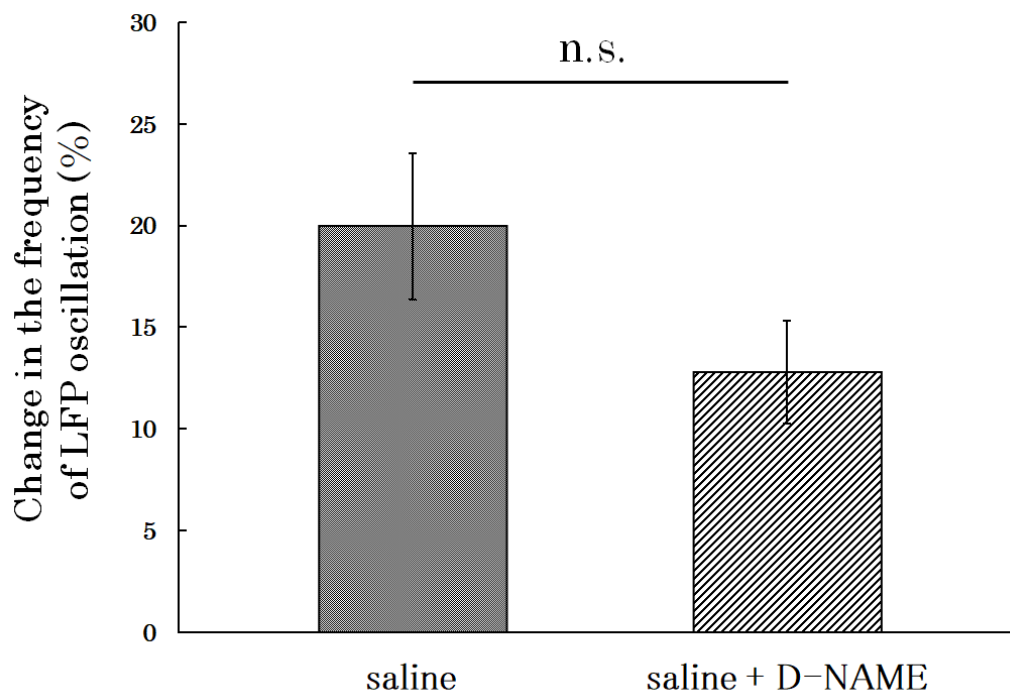
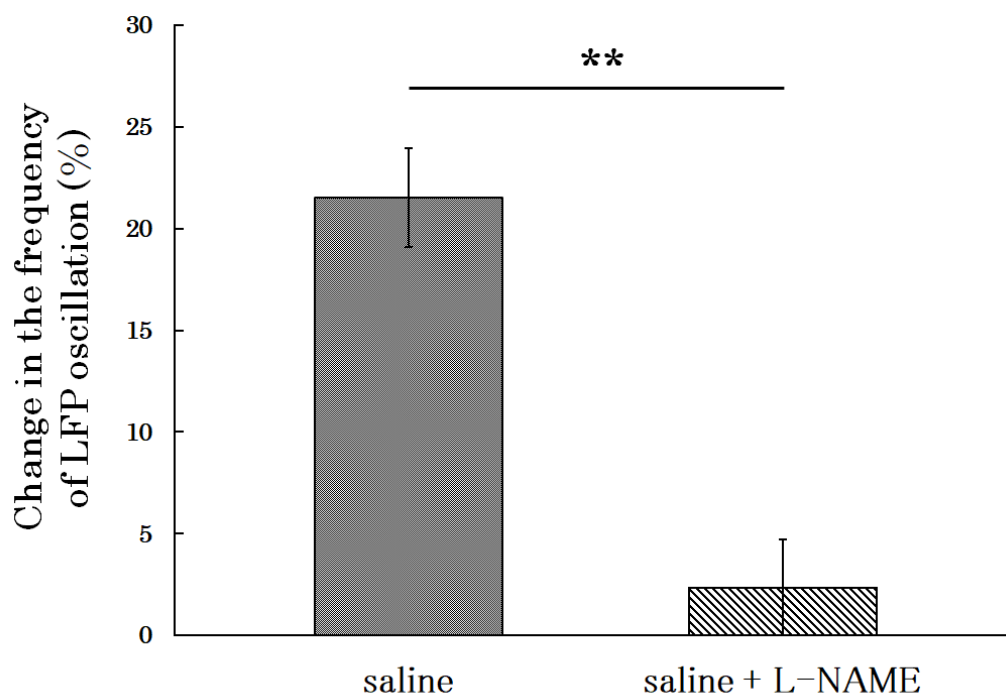


図 4-3 L-NAME 投与後の前脳葉における LFP 振動
上線の間で匂い刺激を行った。



****** $p < 0.01$

図 4-4 忌避性の匂い刺激に対する LFP 振動の周波数変化率
上:L-NAME、下:D-NAME

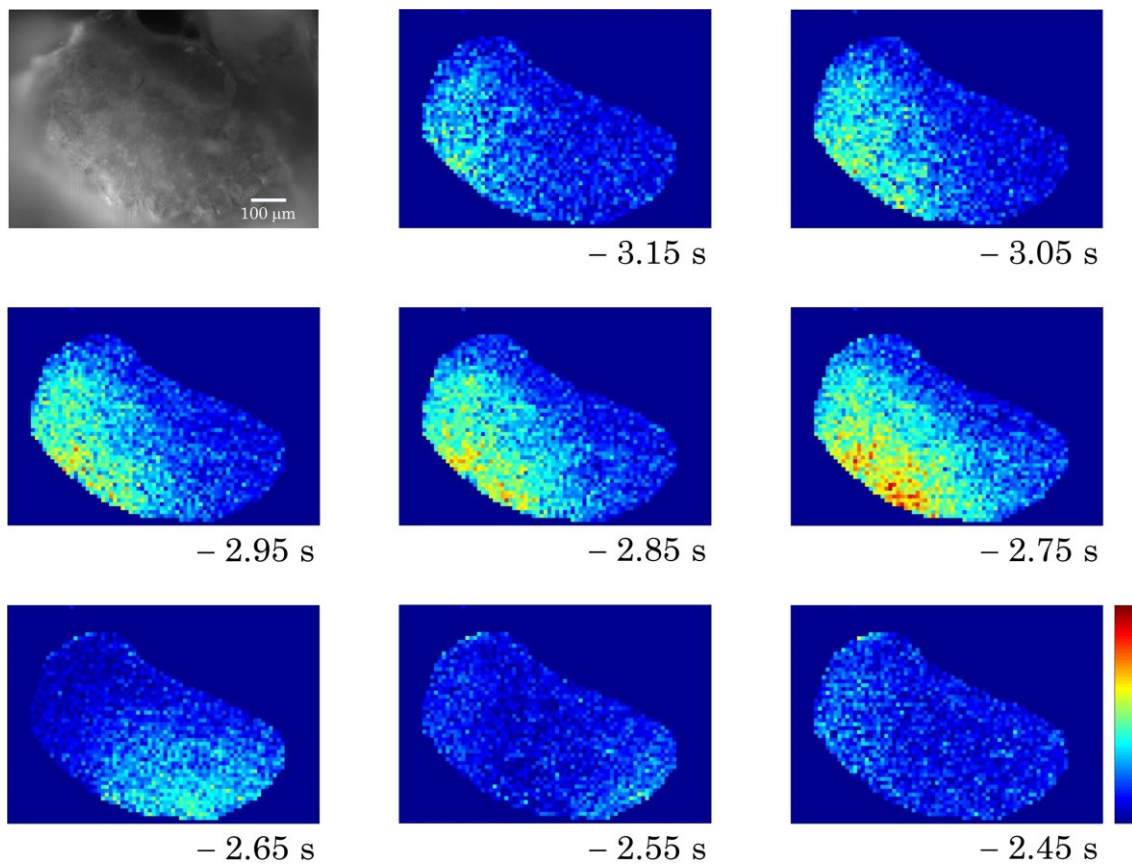


図 4-5 L-NAME インキュベーション前の匂い刺激前の
擬似カラーによる神経活動の伝搬の様子
図中の時間は匂い刺激開始を 0.00 s で表している。

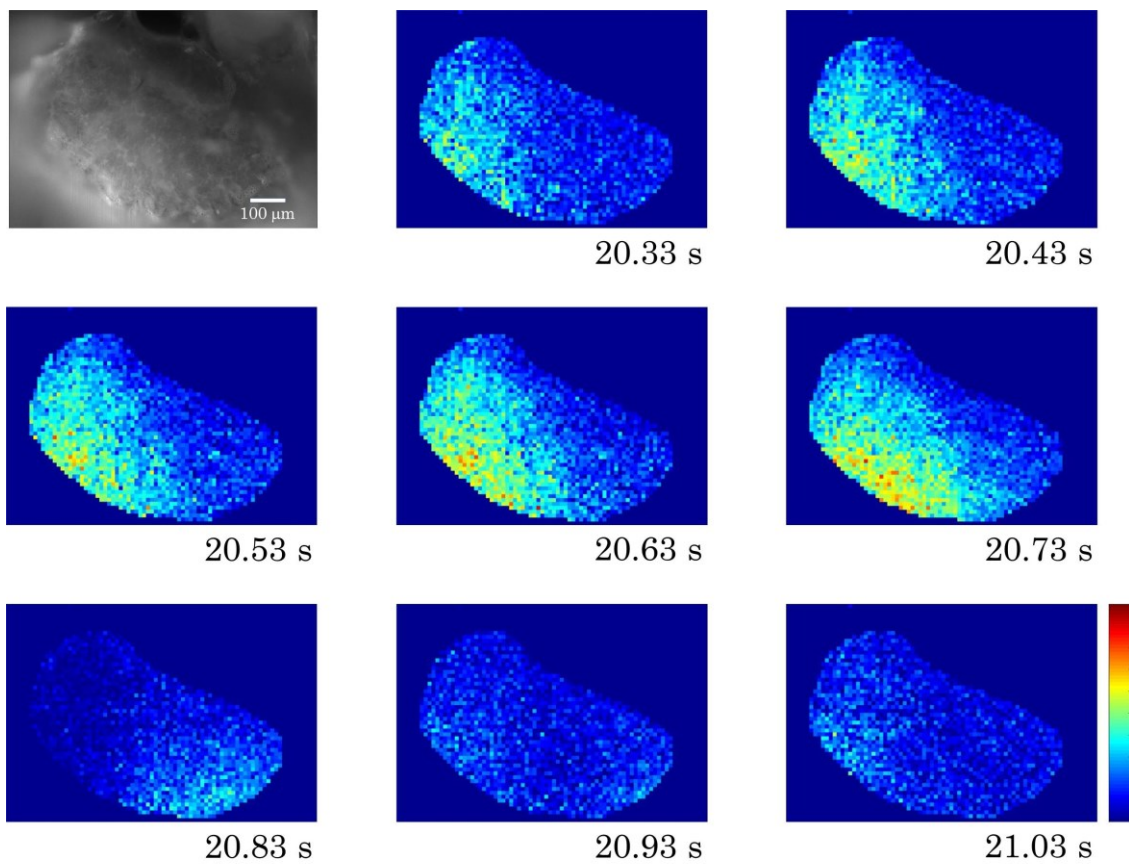


図 4-6 L-NAME インキュベーション前の匂い刺激中の
擬似カラーによる神経活動の伝搬の様子
図中の時間は匂い刺激開始を 0.00 s で表している。

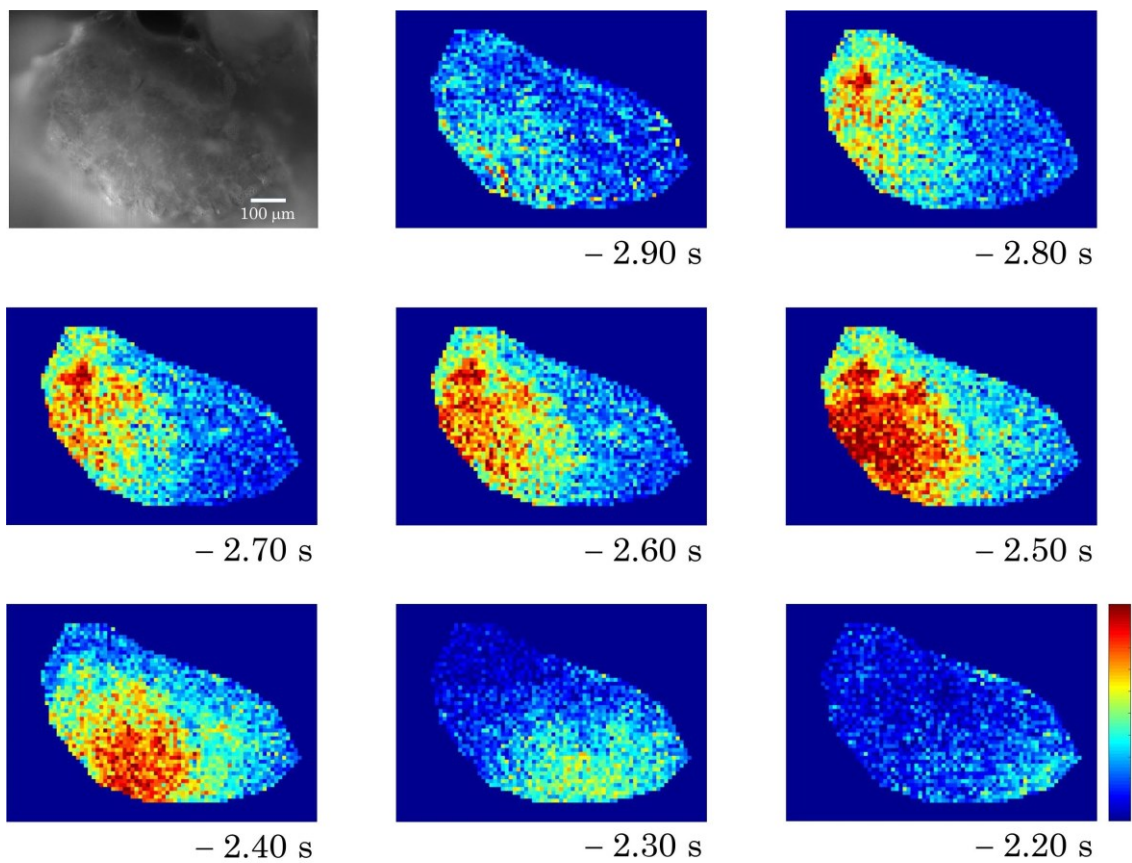


図 4-7 L-NAME インキュベーション後の匂い刺激前の
擬似カラーによる神経活動の伝搬の様子
図中の時間は匂い刺激開始を 0.00 s で表している。

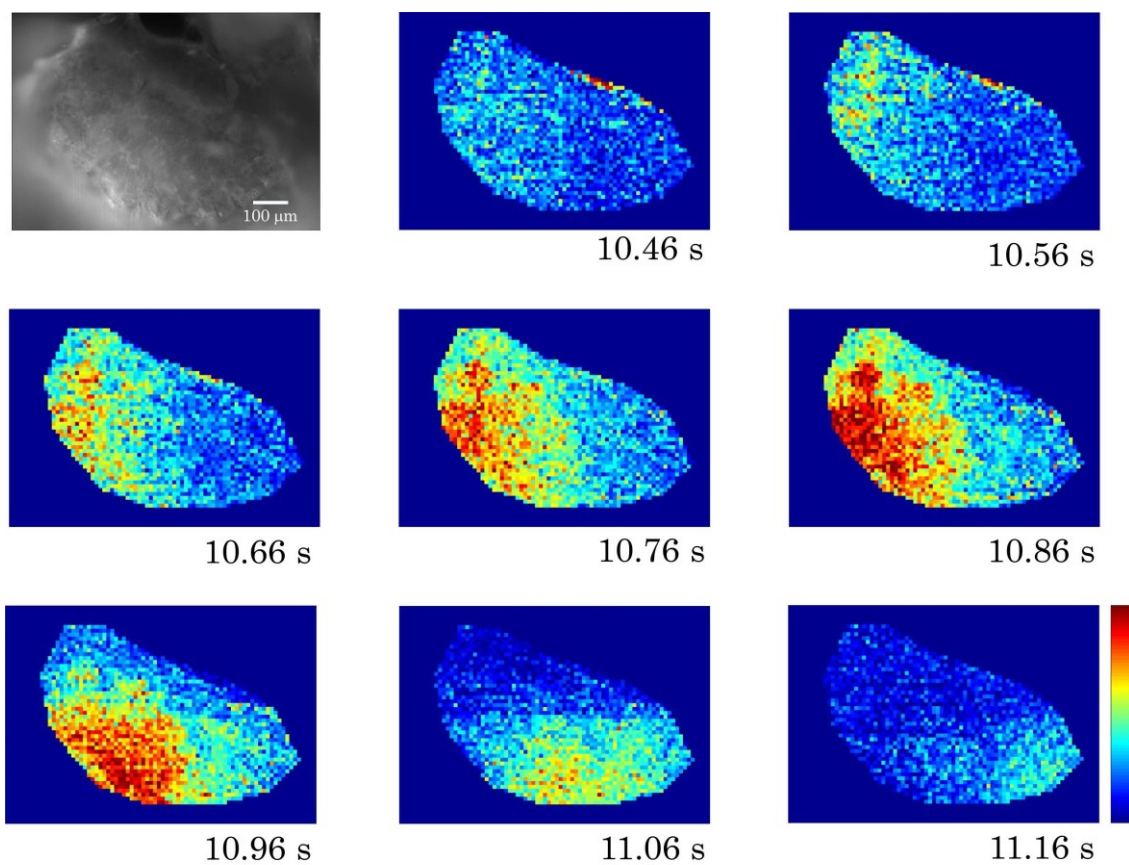


図 4-8 L-NAME インキュベーション後の匂い刺激中の
擬似カラーによる神経活動の伝搬の様子
図中の時間は匂い刺激開始を 0.00 s で表している。

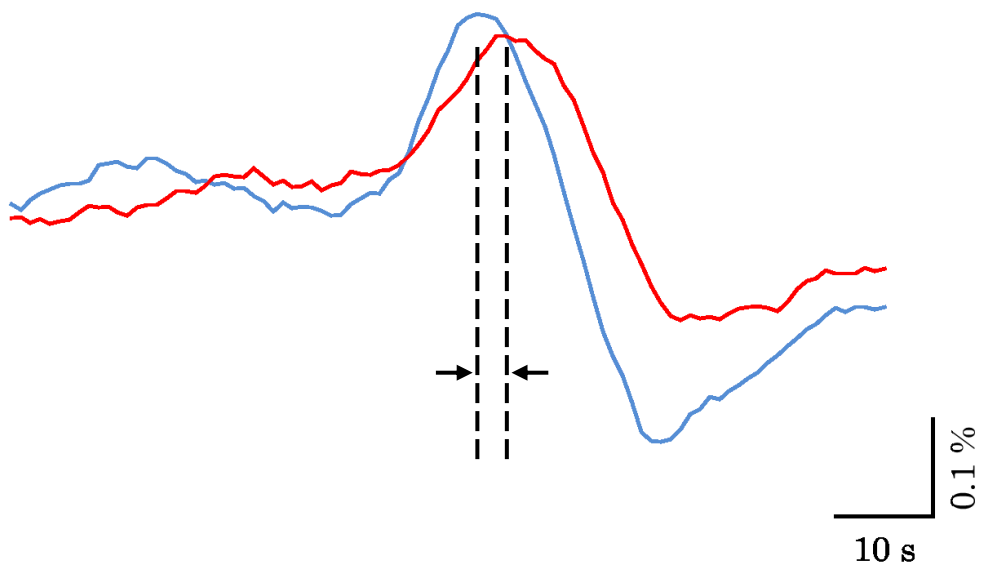
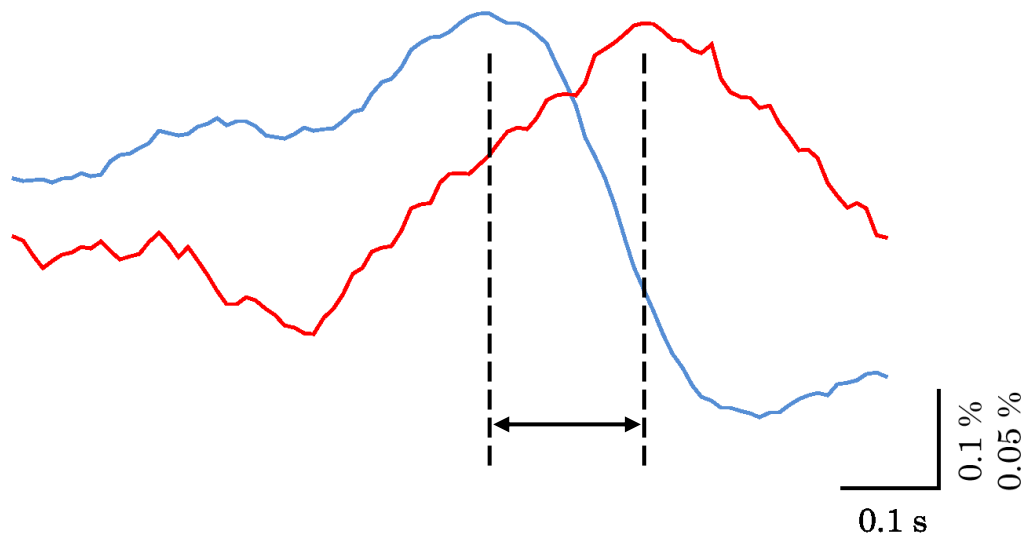


図 4-9 L-NAME 投与前の忌避性の匂い刺激に対する蛍光強度変化
 上:匂い刺激前、下:匂い刺激中
 青:先端部、赤:基部

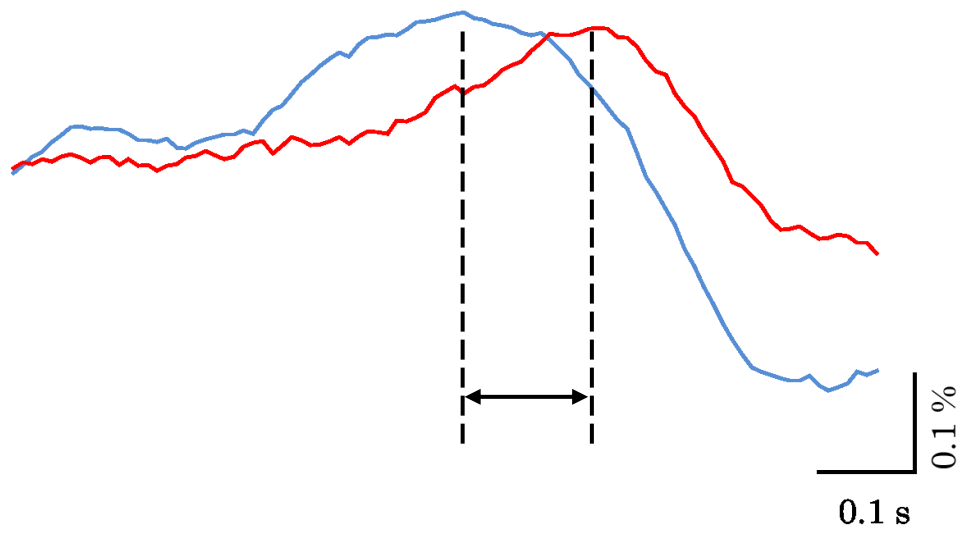
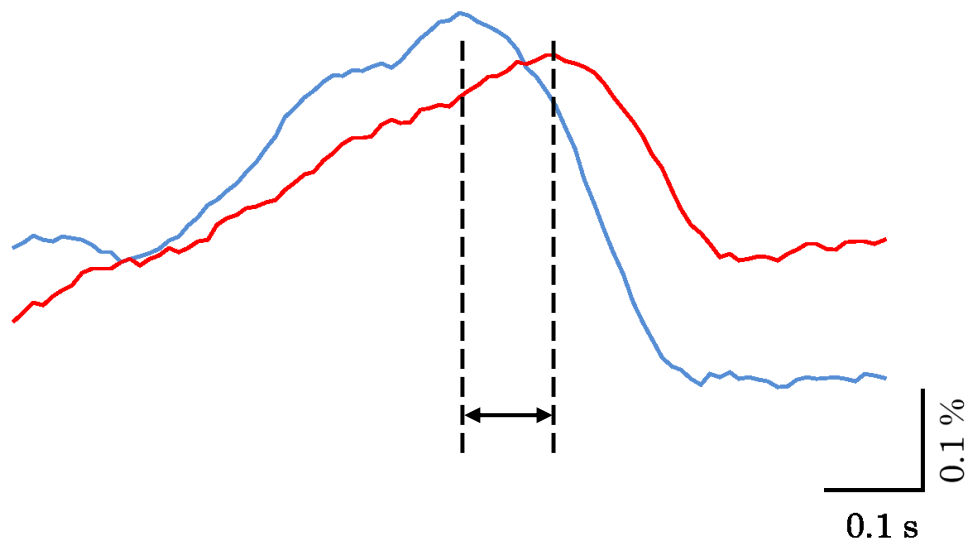
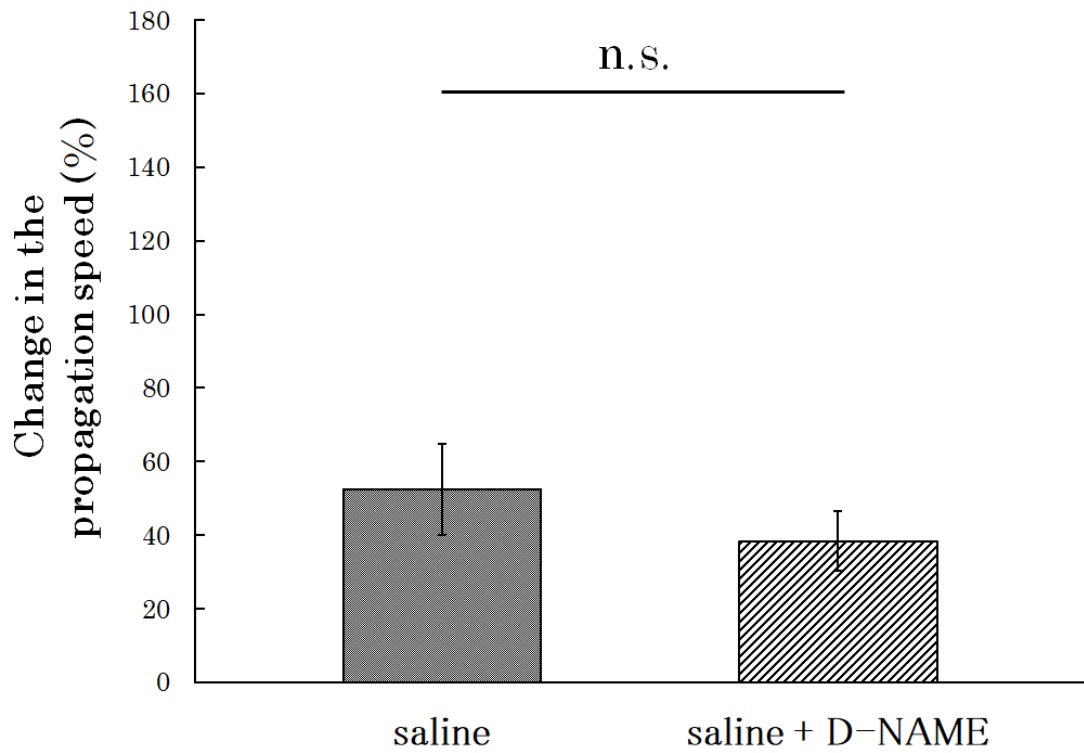
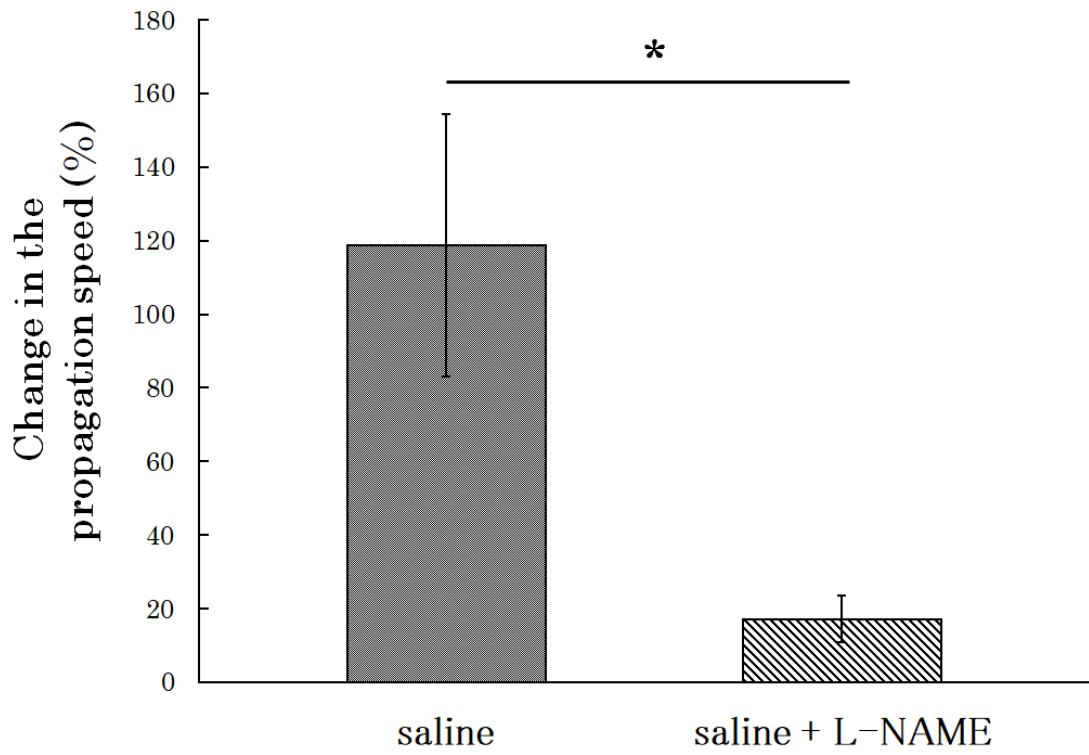


図 4-10 L-NAME 投与後の忌避性の匂い刺激に対する蛍光強度変化
 上:匂い刺激前、下:匂い刺激中
 青:先端部、赤:基部



* $p < 0.05$

図 4-11 忌避性の匂い刺激に対する伝搬速度変化率
上:L-NAME、下:D-NAME

4.4 考察

まず、細胞外電位記録の結果について考察する。忌避性の匂い刺激によって LFP 振動の周波数は増加した(図 4-2)。しかしながら、L-NAME (NO 合成酵素阻害剤) インキュベーション後(図 4-3)は匂い刺激による LFP 振動の周波数の増加は見られなかった(図 4-4)。一方で、D-NAME インキュベーション前後では匂い刺激による LFP 振動の周波数はどちらも増加し、大きな違いはなかった(図 4-4)。以上のことから、NO が忌避性の匂い刺激による LFP 振動の周波数の増加に関係していることが明らかになった。続いて、膜電位イメージングの結果について考察する。忌避性の匂い刺激によって伝搬速度は増加した(図 4-9)。しかしながら、L-NAME インキュベーション後(図 4-10)は匂い刺激による伝搬速度の増加は見られなかった(図 4-11)。一方で、D-NAME インキュベーション前後では匂い刺激による伝搬速度はどちらも増加し、大きな違いはなかった(図 4-11)。以上の結果から、NO が忌避性の匂い刺激による伝搬速度の増加に関係していることが明らかになった。

先行研究によって、20 mM の L-NAME でインキュベーションを行うことで、LFP 振動が消失することは報告されている(Gelperin et al., 1994)。本実験では、より低濃度(3.7 mM)の L-NAME でインキュベーションを行ったが、この濃度では、LFP 振動の発生と神経活動の伝搬自体には影響を与えなかった。しかしながら、忌避性の匂い刺激による LFP 振動の周波数と伝搬速度の増加を妨げた。これらのことから、LFP 振動の発生と匂い刺激による周波数と伝搬速度の増加に NO が関係していることが示唆された。さらに第 3 章の結果より、忌避性の匂い刺激によって LFP 振動の周波数と伝搬速度は増加し、誘引性の匂い刺激ではそのような現象が見られないことから、匂いの弁別に NO が関係していることが示唆された。また、本論文と同量の L-NAME をナメクジの体内に注入し行動実験を行った場合(Yabumoto et al., 2008; Sakura et al., 2004)、体内の L-NAME 濃度が本実験と同じであると仮定すると、LFP 振動は正常であるが、匂い刺激による変化は行動実験においても阻害されると考えられる。この仮定は、L-NAME を体内に注入したナメクジから神経節を単離した直後に測定した LFP 振動は正常であったが、大触角の神経線維に対して電気刺激を与えたことによる LFP 振動の周波数の変化が阻害されていたことによって立証された(Yabumoto et al., 2008)。したがって、NO の調節効果は匂い弁別と嗅覚学習(条件づけ)に重要なメカニズムであると考えられる。

第5章 NO感受性色素を用いたNOイメージングの実験系の 確立とNOの時空間動態の測定

5.1 本実験の目的

第4章の結果から、ナメクジの前脳葉における神経活動の変化にNOが関係していることが明らかになった。しかしながら、第4章の測定手法では、前脳葉の神経活動の変化におけるNOの時空間動態を直接捉えられてはいない。そこで本実験では、ナメクジの前脳葉における神経伝達物質のNOの時空間動態に着目し、NO感受性蛍光色素を用いたNOイメージングの実験系の確立およびそれを用いてNOの時空間動態を測定することを目的とした。

前脳葉におけるNOの振る舞いを調べる手法として、NOセンサーを用いてNO濃度を測定することも可能である(Kitamura et al., 2001; Fujie et al., 2002、)。しかしながら、NOセンサーを用いた測定法では局所領域におけるNO濃度変化を測定することしかできない。NO感受性蛍光色素を用いたNOイメージングの実験系の確立し、ナメクジの前脳葉における忌避性の匂い刺激に対する神経活動の変化とNOの時空間動態について調べることで、嗅覚系とNOについての新たな知見を得ることができる。また、第4章でも使用したL-NAMEを用いてNO合成を阻害した場合の匂い刺激に対するNOの時空間動態の変化を調べた。同時にLFP振動の周波数の変化も測定した。

5.2 実験方法

3.2と同様に単離した触角-神経節を測定用チャンバに固定した(図4-1)。固定が完了した後、2.4.2で述べた通りにDAR-4M AMで染色を行った。染色色素をより細胞内に取り込ませるために、前脳葉の部分のシースと言われる薄膜様構造を前脳葉を傷つけないように取り除いた。染色は、30℃に設定した恒温槽内で行った。染色終了後、測定用バッファで30分間洗浄した。L-NAMEを用いる場合は、3.7 mMになるように染色溶液や測定用バッファで溶かした。匂い刺激方法や測定方法は3.2で述べたものと同様の方法を用いた。匂い刺激は測定開始後20秒後に20秒間行い、匂い物質には流動パラフィンを用いて1000倍に希釈したヘキサノール(0.1 v/v%)を使用した。

また、本実験で用いた光学系はDi-4-ANEPPSに適したものを使用した。そのため、膜電位イメージングと同様の設定ではDAR-4M AMの蛍光画像を取得することは困難である。そこで、パソコンで画像を取得する段階でビニング(1 pixel×1 pixelを8

pixel×8 pixel)を行った。

5.3 実験結果

細胞外電位記録の結果を図 5-1 に示す。匂い刺激は図中の黒実線で示す間与え続けた。また、LFP 振動の周波数の変化率を求めた(図 5-2)。コントロール(流動パラフィン→流動パラフィン)の場合の LFP 振動の周波数変化率は $0.69 \pm 1.40 \%$ (匂い刺激前; 0.62 ± 0.03 Hz、匂い刺激中; 0.63 ± 0.03 Hz、 $n = 15$)であった。忌避性の匂い物質(0.1% ヘキサノール)で匂い刺激を行った場合の LFP 振動の周波数変化率は $4.70 \pm 1.98 \%$ (匂い刺激前; 0.55 ± 0.03 Hz、匂い刺激中; 0.58 ± 0.03 Hz、 $n = 15$)であった。これら 2 つには有意な差がなかった(n.s.)。また、L-NAME で 90 分間インキュベーションを行い、忌避性の匂い物質(0.1% ヘキサノール)で匂い刺激を行った場合の LFP 振動の周波数変化率は $1.35 \pm 1.60 \%$ (匂い刺激前; 0.55 ± 0.03 Hz、匂い刺激中; 0.56 ± 0.04 Hz、 $n = 4$)であった。L-NAME の有無では有意な差がなかった(n.s.)。

また、NO イメージングの結果を図 5-3 に示す。NO イメージングにおける蛍光強度変化の傾き(図 5-3)からその変化率の最大値を求めた(図 5-4)。コントロール(流動パラフィン→流動パラフィン)の場合の傾きの変化率の最大値は $21.16 \pm 5.50 \%$ (匂い刺激前; 0.82 ± 0.12 count/s、匂い刺激中; 0.95 ± 0.12 count/s、 $n = 10$)であった。忌避性の匂い物質(0.1% ヘキサノール)で匂い刺激を行った場合の傾きの変化率の最大値は $139.93 \pm 25.22 \%$ (匂い刺激前; 0.27 ± 0.05 count/s、匂い刺激中; 0.55 ± 0.06 count/s、 $n = 15$)であった。これら 2 つには有意な差が見られた($p < 0.01$)。また、L-NAME で 90 分間インキュベーションを行い、忌避性の匂い物質(0.1% ヘキサノール)で匂い刺激を行った場合の傾きの変化率の最大値は $34.82 \pm 8.85 \%$ (匂い刺激前; 0.34 ± 0.05 count/s、匂い刺激中; 0.45 ± 0.06 count/s、 $n = 7$)であった。忌避性の匂い刺激をした場合とコントロール、L-NAME でインキュベーションした場合とでは有意な差が見られた($p < 0.05$)。さらに、前脳葉内の各層(IM、TM+CM)における蛍光強度変化から匂い刺激中における傾きの変化率の最大値を求めた(図 5-5)。IM 層における傾きの変化率の最大値は $115.48 \pm 17.59 \%$ (匂い刺激前; 0.29 ± 0.05 count/s、匂い刺激中; 0.60 ± 0.08 count/s、 $n = 8$)であった。TM+CM 層における傾きの変化率の最大値は $67.34 \pm 11.90 \%$ (匂い刺激前; 0.41 ± 0.07 count/s、匂い刺激中; 0.66 ± 0.10 count/s、 $n = 8$)であった。これら 2 つには有意な差がなかった(n.s.)。L-NAME で 90 分間インキュベーションを行った場合の IM 層における傾きの変化率の最大値は $37.57 \pm 9.46 \%$ (匂い刺激前; 0.36 ± 0.05 count/s、匂い刺激中; 0.48 ± 0.06 count/s、 $n = 6$)であった。IM 層において L-NAME の有無にお

ける傾きの変化率には有意な差が見られた($p < 0.01$)。L-NAME で 90 分間インキュベーションを行った場合の TM+CM 層における傾きの変化率の平均値は $36.74 \pm 9.57 \%$ (匂い刺激前; 0.41 ± 0.05 count/s、匂い刺激中; 0.55 ± 0.06 count/s、 $n = 6$)であった。TM+CM 層における L-NAME の有無では有意な差がなかった(n.s.)。

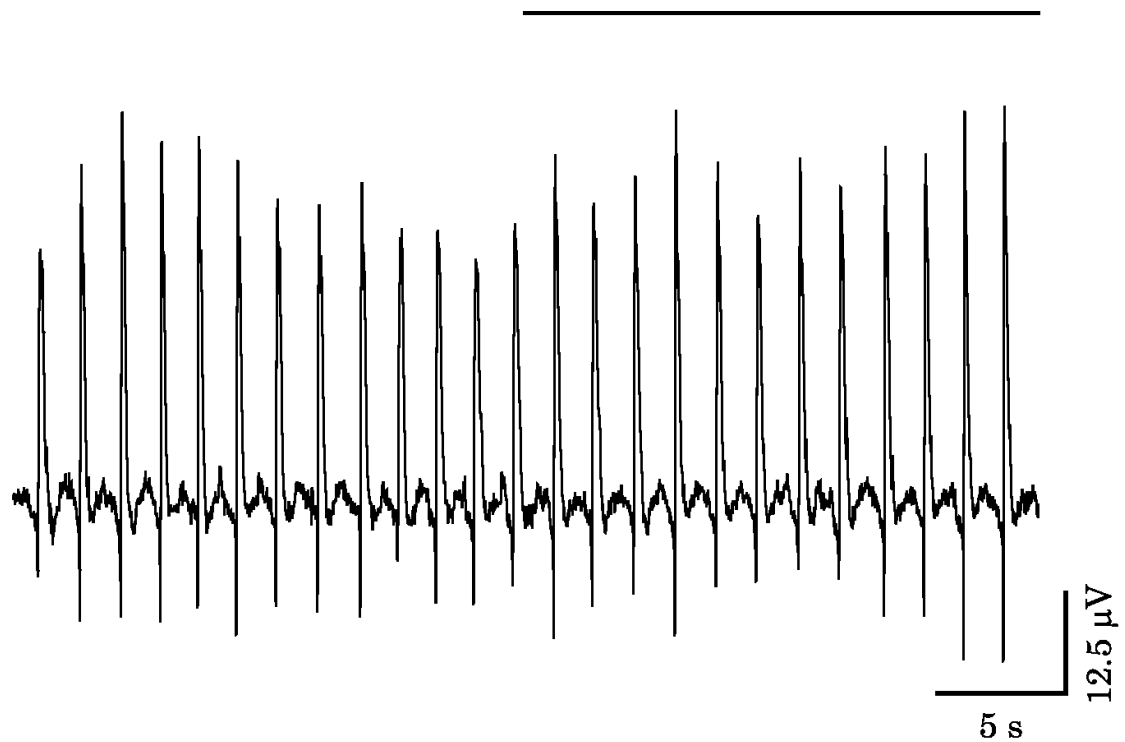


図 5-1 忌避性の匂い刺激(0.1% ヘキサノール)に対する前脳葉における LFP 振動
上線の間で匂い刺激を行った。

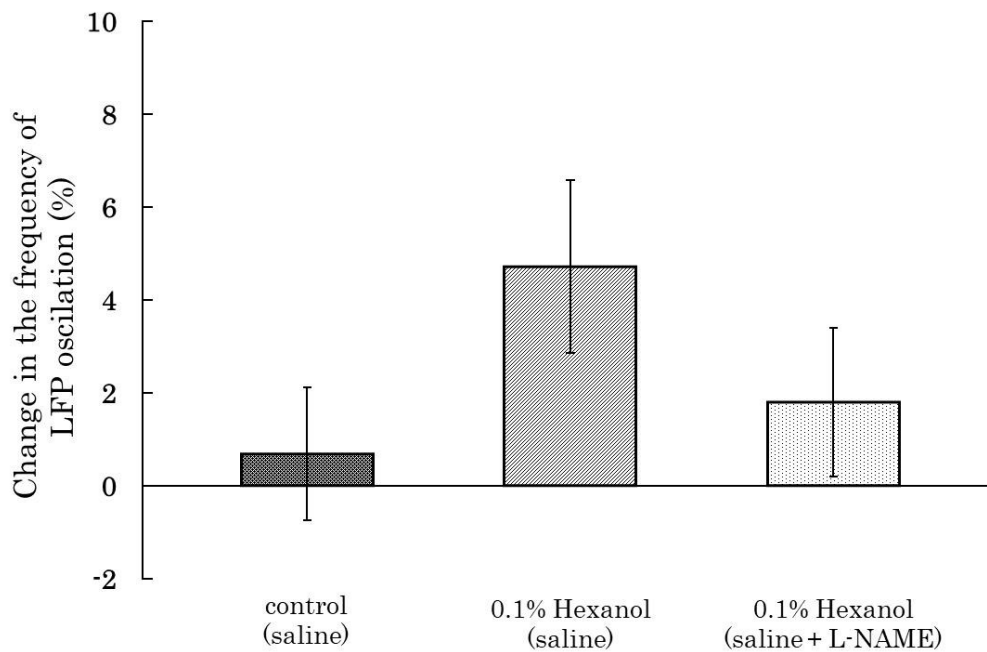


図 5-2 各条件における匂い刺激に対する LFP 振動の周波数変化率

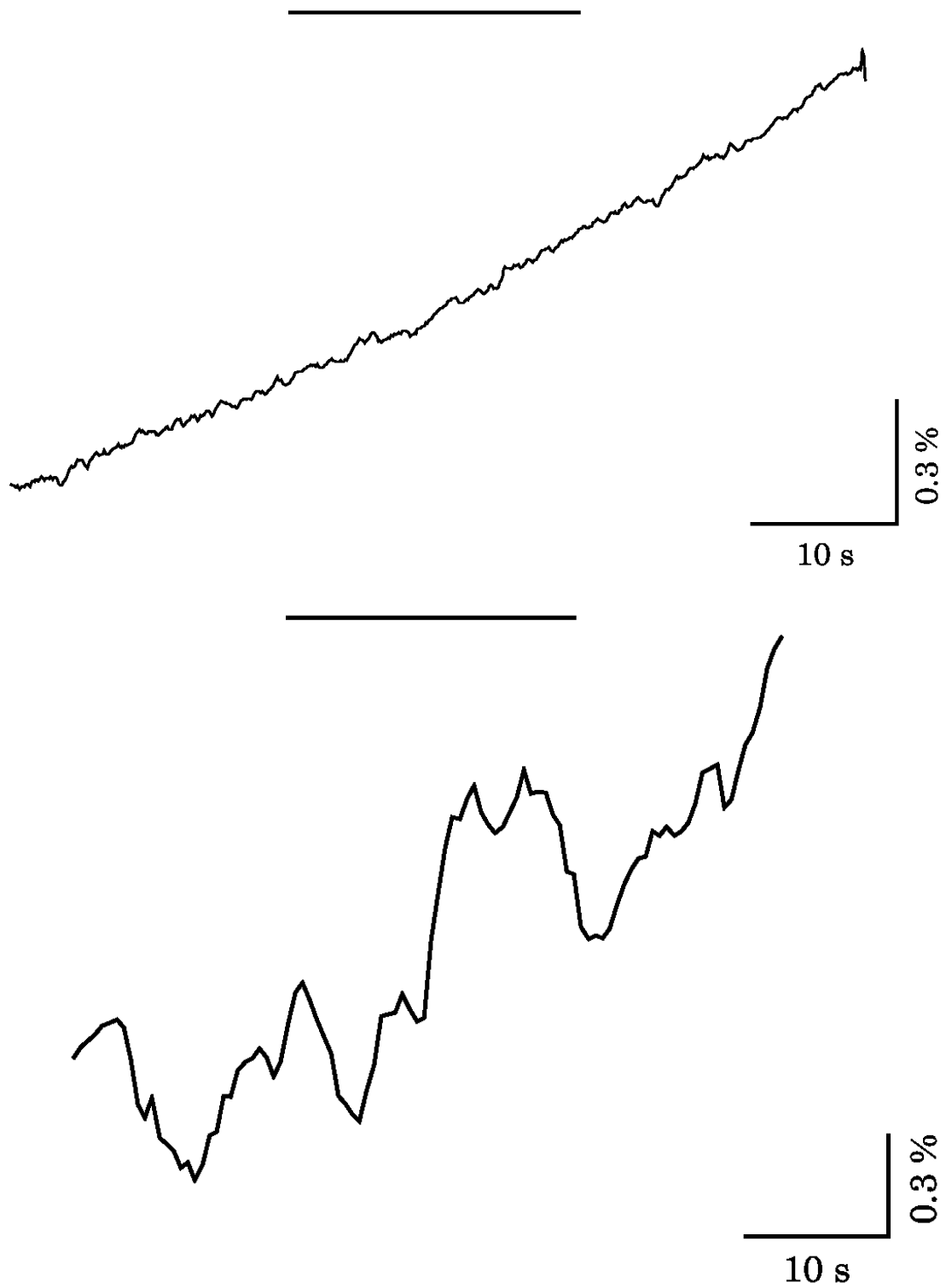
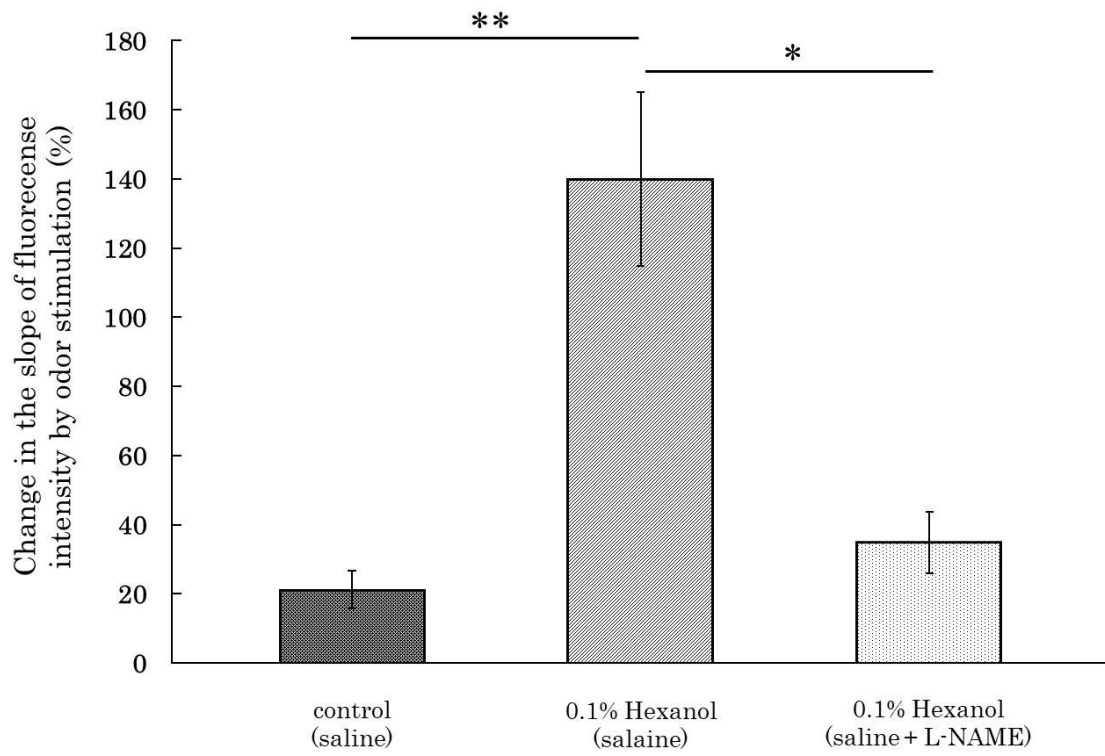


図 5-3 蛍光強度の時間変化と求めた傾きの時間変化
 上: 蛍光強度の時間変化、下: 蛍光強度の時間変化から求めた傾きの時間変化
 上線の間で匂い刺激を行った。



**** $p < 0.01$, * $p < 0.05$**

図 5-4 各条件における匂い刺激に対する蛍光強度変化の傾きの変化率の最大値

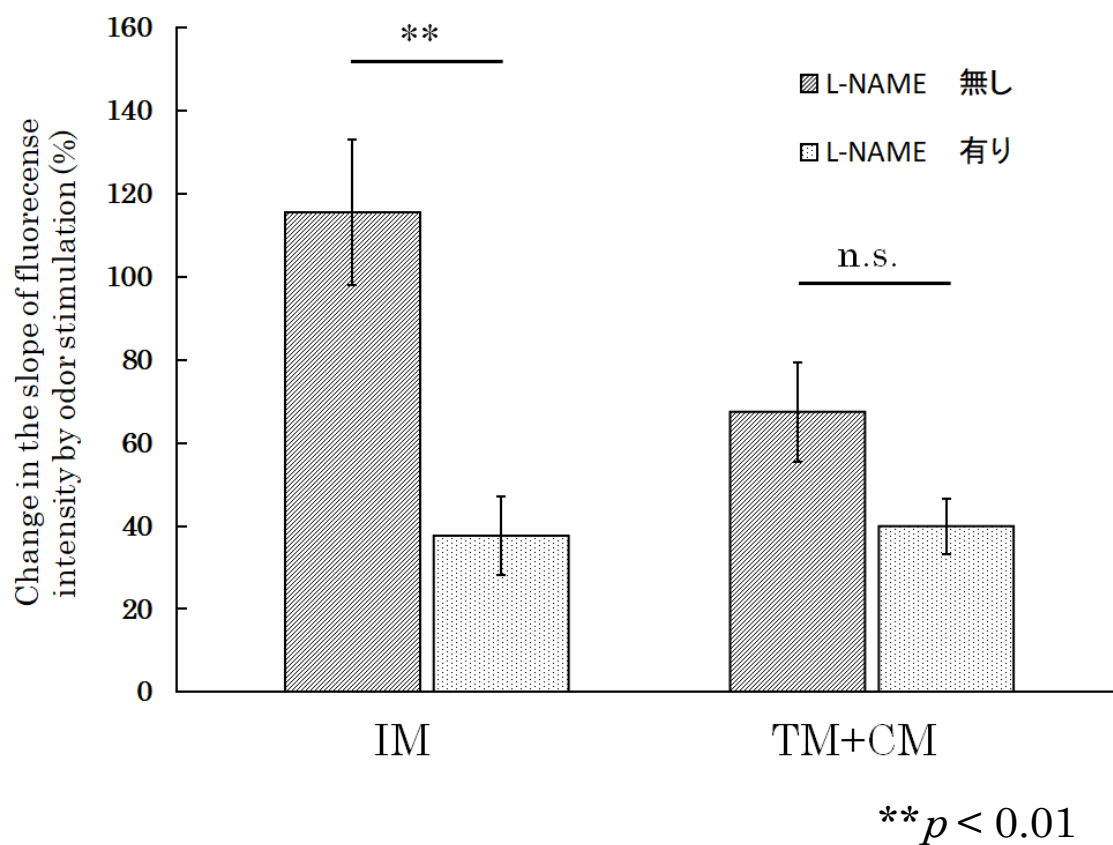


図 5-5 各層における匂い刺激に対する蛍光強度変化の傾きの変化率の最大値

5.4 考察

まず、NO イメージングの結果について考察する。DAR-4M AM でナメクジ前脳葉を染色した結果、画像取得時のパソコンの設定を変更することで Di-4-ANEPPS に適した光学系でも蛍光画像を取得することが可能になった。さらに、蛍光強度の時間変化を取得した。このことから、前脳葉における NO イメージングの実験系の確立できたといえる。さらに、忌避性の匂い刺激によって前脳葉における蛍光強度の時間変化の傾きが増加した(図 5-3、図 5-4)。この結果から、忌避性の匂い刺激によって NO の合成速度が増加することが明らかになった。また、前脳葉を構成する 3 層において、忌避性の匂い刺激による蛍光強度の時間変化の傾きの変化率は IM 層が他の 2 層と比べて高かった(図 5-5)。さらに L-NAME を用いた結果、L-NAME の影響は IM 層において顕著に現れることを明らかにした(図 5-5)。一方、他の 2 層(TM 層、CM 層)では L-NAME の有無で蛍光強度の時間変化の傾きの変化には有意な差は見られなかった(図 5-5)。このことから、前脳葉内の 3 層において主に IM 層が忌避性の匂い刺激によって NO の合成速度が増加することが示唆された。

忌避性の匂い刺激した場合は LFP 振動の周波数は増加した。さらに、L-NAME でインキュベーションした場合は忌避性の匂い刺激を行っても LFP 振動の周波数は増加しなかった。本実験の結果からは、LFP 振動の周波数変化率には有意差は見られなかった(図 5-2)。この結果は第 4 章の結果とは異なってしまふ。しかしながら、これはシースを取り除いたことによる影響であると考えられる。

本実験で得られた結果は、使用した DAR-4M AM には本来適していない光学系を用いて得られたものである。今後の課題として、DAR-4M AM に適した光学系を用いて実験を行い、匂い刺激による前脳葉の NO の時空間動態をより詳細に捉えることが必要である。さらに、行動実験や第 3 章で行った匂い嫌悪条件づけと組み合わせて行うことで、誘引性の匂い刺激に対する NO の時空間動態や条件づけ中の NO の時空間動態などを調べることも可能になる。

第6章 総括

第3章では、ナメクジの単離脳標本系における神経活動の時空間動態の測定および匂い刺激によるその変化について述べた。膜電位イメージングの結果から、前脳葉の先端部から基部に向かって神経活動が伝搬している様子を捉えることが可能になった(図3-6)。忌避性の匂い刺激(0.1% ヘキサノール、玉ねぎ)を行った結果、LFP振動の周波数と神経活動の伝搬速度が増加した(図3-5、図3-13)。このLFP振動結果は、過去の研究とも一致した(Toda et al., 2000; Inoue et al., 2006)。一方で、誘引性の匂い刺激を行った場合、LFP振動の周波数と神経活動の伝搬速度は増加しなかった(図3-5、図3-13)。単離脳標本系で匂い嫌悪条件づけを行った結果、条件づけを行った匂い刺激に対する神経活動(LFP振動と伝搬速度)の変化は忌避性の匂い刺激を行った場合と同様の応答であった(図3-5、図3-13)。しかし、匂い嫌悪条件づけを行っていない匂い刺激に対しては神経活動の変化は増加しなかった(図3-5、図3-13)。このことから、単離脳標本系における匂い嫌悪条件づけが成立し、条件づけされた匂いに対して行動だけではなく、神経活動も変化しており、LFP振動の周波数と神経活動の伝搬速度の増加は忌避行動に関係しているということが明らかになった。

第4章では、忌避性の匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化に対するNOの関与について調べた結果について述べた。忌避性の匂い刺激(0.1% ヘキサノール)を行った結果、LFP振動の周波数と神経活動の伝搬速度が増加した(図4-4、図4-11)。その個体に対して、3.7 mMのL-NAMEでインキュベーションすると同じ忌避性の匂い刺激に対するLFP振動の周波数と神経活動の伝搬速度の増加は見られなかった(図4-4、図4-11)。擬似カラー表示した結果を見ても、L-NAMEでインキュベーションすることで忌避性の匂い刺激による神経活動の伝搬速度の増加は見られなくなった(図4-5～図4-8)。以上のことから、匂い刺激に対するLFP振動の周波数と神経活動の伝搬速度の変化にNOが関係していることは明らかになり、匂いの弁別にNOが関係していることが示唆された。

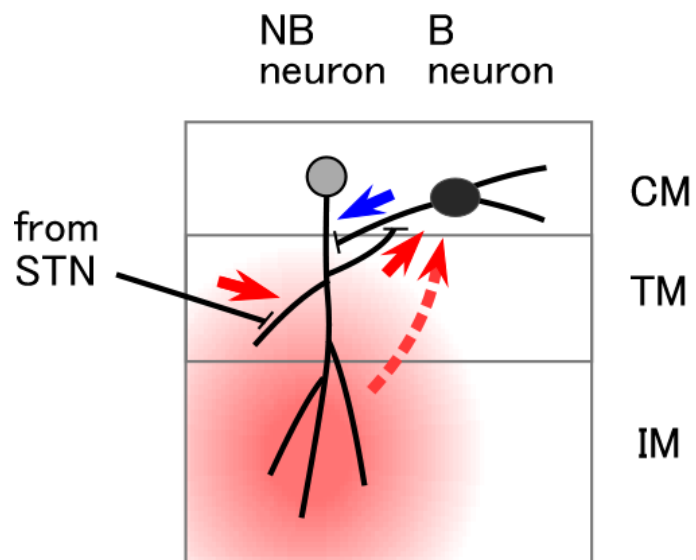
第5章では、NO感受性色素を用いたNOイメージング実験系の確立および前脳葉のNOの時空間動態の測定を行った結果について述べた。NO感受性色素で染色し、第3章および第4章と同様の実験系を用いた。画像取得時のパソコンの設定を変更することで、蛍光画像を取得することができ、蛍光強度の時間変化を測定することができた(図5-3)。さらに、忌避性の匂い刺激(0.1% ヘキサノール)によって蛍光強度の時間変化の傾きが増加することを明らかにした(図5-4)。この結果から、忌避性の匂

い刺激によって NO の合成速度が増加することが明らかになった。また、前脳葉を構成する 3 (IM、TM、CM) 層において、忌避性の匂い刺激による蛍光強度の時間変化の傾きの最大変化率は IM 層が他の 2 層と比べて高かった (図 5-5)。さらに L-NAME でインキュベーションした結果、IM 層において L-NAME の影響が顕著に見られた (図 5-5)。以上のことから、主に IM 層が忌避性の匂い刺激によって NO の合成速度が増加することが示唆された。

本研究結果から、以下のことが明らかになった。

- 1) 忌避性の匂い刺激によって前脳葉の神経活動 (LFP 振動の周波数と伝搬速度) は変化する。
- 2) 誘引性の匂い刺激によって前脳葉の神経活動は変化しない。
- 3) 単離脳標本系における匂い嫌悪条件づけは成立し、条件づけを行った匂い刺激に対して前脳葉の神経活動の変化は忌避性の匂い刺激と同様の応答を示す。
- 4) 匂い刺激による前脳葉の神経活動の変化に NO が関係している。
- 5) 忌避性の匂い刺激によって前脳葉における NO 合成速度が増加する。
- 6) IM 層が忌避性の匂い刺激によって NO の合成速度が増加する。

忌避性の匂い刺激によって前脳葉における LFP 振動の周波数と伝搬速度は増加する。その神経活動の変化は、忌避性の匂い刺激による前脳葉内の NO 合成速度が増加することによって生じる現象であり、主に IM 層において NO の合成速度が増加しているということが示唆された。また、このような一連の神経活動の変化がナメクジの忌避行動と関係していることが示唆された。しかし、LFP 振動や神経活動の伝搬を生じさせている 2 種類の神経細胞の細胞体は両者 (Bneuron、NBneuron) とも CM 層に存在している。すなわち、IM 層で合成された NO が放出され、CM 層の Bneuron が NO によって脱分極し、NBneuron に対して抑制性の入力を与えることによって LFP 振動や神経活動の伝搬の増加が生じていると示唆された (図 6)。



- ➔ Fast transmission (excitatory)
- ➔ Fast transmission (inhibitory)
- - ➔ NO-mediated modulation

図 6 前脳葉における嗅覚情報伝達の模式図

参考文献

Chase, R., Tolloczko, B., “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

Cohen, L. B., Salzberg, B. M., Grinvald, A., “Optical methods for monitoring neuron activity. ” *Annu Rev Neurosci.*, 1 (1978) 171-82.

Delaney, KR., Gelperin, A., Fee, MS., Flores, JA., Gervais, R., Tank, DW., Kleinfeld, D., “Waves and Stimulus-Modulated Dynamics in an Oscillating Olfactory Network” *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 91, (1994) 669-673

Fluhler, E., Burnham, VG., Loew, LM., “Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes.” *Biochemistry*, 24 (1985) 5749-5755

Fujie, S., Aonuma, H., Ito, I., Gelperin, A., Ito, E., “The Nitric Oxide/Cyclic GMP Pathway in the Olfactory Processing System of the Terrestrial Slug *Limax marginatus*” *Zoological Science*, 19 (1) (2002) 15-26

Gelperin, A., Tank, DW., “Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk” *Nature*, 345 (1990) 437-440

Gelperin, A., “OSCILLATORY DYNAMICS AND INFORMATION ROCESSING IN OLFACTORY SYSTEMS” *The Journal of Experimental Biology*, 202, (1999) 1855-1864

Gelperin, A., “Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk” *Nature*, 369 (1994) 61-63

Gelperin, A., Flores, J., Raccuia-Behling, F., Cooke, IRC., “Nitric oxide and carbon monoxide modulate oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk” *J Neurophysiol*, 83 (2000) 116–127

Inoue, T., Murakami, M., Watanabe, S., Inokuma, Y., "In Vitro Odor-aversion Conditioning in a Terrestrial Mollusk" *Journal of Neurophysiology*, 95 (2006) 3898-3903

Kasai, Y., Watanabe, S., Kirino, Y., Matsuo, R., "The procerebrum is necessary for odor-aversion learning in the terrestrial slug *Limax valentianus*" *Learning & Memory*, 13 (2006) 482-488

Kitamura, Y., Naganoma, Y., Horita, H., Ogawa, H., Oka, K., "Serotonin-induced nitric oxide production in the ventral nerve cord of the earthworm, *Eisenia fetida*" *Neurosci Res*, 41 (2001) 129-134

Kleinfeld, D., Delaney, KR., Fee, MS., Flores, JA., Tank, DW., Gelperin, A., "Dynamics of propagating waves in the olfactory network of a terrestrial mollusk: an electrical and optical study" *Journal of Neurophysiology*, 72 (1994) 1402-1419

Matsuo, R., Ito, E., "A novel nitric oxide synthase expressed specifically in the olfactory center" *Biochem Biophys Res Commun. Elsevier Inc.*, 386 (2009) 724-728

Nagy, Zs., Sakharov, D. A., "The fine structure of the procerebrum of pulmonate molluscs, *Helix* and *Limax*" *Tissue & Cell*, 2 (1970) 399-411

Nakaya, T., Kawahara, S., Watanabe, S., Lee, D., Suzuki, T., Kirino, Y., "Identification and expression of a novel gene in odour-taste associative learning in the terrestrial slug." *Genes to Cells*, 6 (2001) 43-45

Sahley, C., Gelperin, A., Rudy, A. W., "One-trial associative learning modifies food odor preferences of a terrestrial mollusc" *Proc Natl Acad Sci U S A. Jan*, 78 (1981) 640-642

Sakura, M., Kabetani, M., Watanabe, S., Kirino, Y., "Impairment of olfactory discrimination by blockade of nitric oxide activity in the terrestrial slug *Limax valentianus*" *Neurosci Lett.*, 370 (2004) 257-61

Steinert, Joern R., Kopp-Scheinpflug, C., Claire, B., Challiss, J., Mistry, R., Haustein, Martin D., Griffin, Sarah J., Tong, H., Graham, Bruce P., Forsythe, Ian D., “Nitric Oxide Is Volume Transmitter Regulating Postsynaptic Excitability at a Glutamatergic Synapse” *Neuron*, 60 (4) (2008) 642-56

Suzuki, H., Kimura, T., Sekiguchi, T., Mizukami, A., “FMRF amide-like-immunoreactive primary sensory neurons in the olfactory system of the terrestrial mollusc, *Limax marginatus*” *Cell Tissue Research*, 289 (1997) 339-345

Toda, S., Kawahara, S., Kirino, Y., “IMAGE ANALYSIS OF OLFACTORY RESPONSES IN THE PROCEREBRUM OF THE TERRESTRIAL SLUG LIMAX MARGINATUS” *The Journal of Experimental Biology*, 203, (2000) 2895-2905

Yabumoto, T., Takanashi, F., Kirino, Y., Watanabe, S., “Nitric oxide is involved in appetitive but not aversive olfactory learning in the land mollusk *Limax valentianus*” *Learn Mem.*, 15 (4) (2008) 229-32

Yamada, A., Sekiguchi, T., Suzuki, H., Mizukami, A., “Behavioral Analysis of Internal Memory States Using Cooling-induced Retrograde Amnesia in *Limax flavus*” *The Journal of Neuroscience* (1992) 729-735

謝辞

本研究をおこなうにあたり、研究の機会を与えてくださり、研究に対する姿勢や方向性、実験技術など、多岐にわた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の斎藤稔教授に心より厚く御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、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の澤田博司教授、間瀬啓介教授に心より厚く御礼申し上げます。

実験を行うにあたり、実験技術をご指導くださり、またデータ解析などについて多くの有益な助言をくださいました独立行政法人国立精神神経医療研究センター神経研究所微細構造研究部の渡邊恵先生に心より厚く御礼申し上げます。

長きにわたり研究に対する姿勢や進め方等、研究の多岐にわたりご指導くださいました日本大学文理学部生命科学科の濱崎雄太助教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など、多くの有益な助言をくださいました日本大学工学部物理学科の小松崎良将准教授に心より厚く御礼申し上げます。

また、斎藤研究室の皆様、その他大勢の皆様には感謝いたします。

最後に、研究を温かく見守り、支えてくれた両親に感謝いたします。