

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18700378
 研究課題名（和文）サル下部側頭葉の対連合記憶セルアセンブリ：多細胞同時記録とスパイク相関による検証
 研究課題名（英文）cell assembly for associative memory in monkey inferior temporal cortex: multiple single unit recordings and spike correlation analysis
 研究代表者
 平林 敏行 (HIRABAYASHI TOSHIYUKI)
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：60376423

研究成果の概要：

対連合記憶課題を遂行中のマカクザル下部側頭葉において多細胞同時記録を行い、対連合記憶課題に関連した活動を示す複数の神経細胞間で機能的結合が見られることがわかった。また、視覚弁別課題を遂行中のマカクザル下部側頭葉における多細胞同時記録のデータについて、機能的結合が見られた神経細胞対の、周波数領域における機能的結合の性質を調べた結果、ガンマ帯域(40-100 Hz)におけるスパイク間コヒーレンスが、呈示刺激依存的に一過性に現れることを見出した。これらの結果は、高次視覚野における局所神経回路の性質の解明につながるものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	240,000	3,740,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経・筋肉生理学

キーワード：細胞外同時記録・脳高次機能・対連合記憶・下部側頭葉・霊長類

1. 研究開始当初の背景

認知機能に関わる神経回路の性質を明らかにすることを目的として、多細胞同時記録を行い、神経細胞間の機能的結合を調べるのは、有用なアプローチである。そのような提案は、これまでも多くなされてきたが、特に高次の領野においては、局所神経回路内でのどのような計算が行われることによって認

知機構が成立しているかについて、明確な解答を与えた論文はほとんどない。それは、これまでの高次領野における多細胞同時記録による局所神経回路の研究の多くが、対象となる認知事象に関わる単一神経細胞レベルの十分な知見に基づいて、性質が既知である神経細胞間をつなぐ回路を調べる、という組織立てられた研究ではなかったため、対象となる認知事象を表象する局所神経回路の解

析が、はなはだ不完全であったためである。

我々は本研究に先立ち、視覚弁別課題遂行中のマカクザル下部側頭葉において多細胞同時記録を行い、複数の部分図形から成る全体図形の呈示に対する神経細胞群の相関発火が、部分図形の配置に応じて変化することをつきとめ、論文にて報告した (Hirabayashi and Miyashita, *J. Neurosci.*, 2005)。一方、対連合記憶課題を遂行中のマカクザルを用いた下部側頭葉における単一神経細胞の活動については、これまでに当研究室において多くの研究が行われてきた (Sakai and Miyashita, *Nature*, 1991; Tomita et al., *Nature*, 1999; Naya et al., *Science*, 2001; Takeda et al., *Neuron*, 2005)。これらの研究の結果、対連合記憶課題の遂行に関連した活動を示す神経細胞が下部側頭葉に多く存在することが確かめられてきた。これらの神経細胞は、特定の対連合図形ペアの片方にのみ選択的に反応する神経細胞や、特定の対連合図形ペアの両方に選択的に反応する対符号化神経細胞、特定の対連合図形ペアの片方の想起時に選択的に反応する対想起神経細胞など、いくつかの異なるカテゴリーに分類される。これらの神経細胞は、互いに独立に活動しているのではなく、何らかのルールに従った結合パターンからなる神経回路として活動していると考えられるが、これらの異なる性質を示す神経細胞同士が、どのようなルールで結合することによって、神経回路全体としての機能を発現しているかは明らかにされていない。そのような問いに答えるには、これまでに行われてきた単一神経細胞からの記録だけではなく、複数の神経細胞からの同時記録により、神経「回路」としての活動を捉えることが必須である。そこで本研究では、対連合記憶課題を遂行中のマカクザル下部側頭葉より多細胞同時記録を行うことにより、認知記憶課題の遂行に関与する高次の大脳皮質局所回路の機能、及びその計算原理を明らかにすることを目的としている。

霊長類の下部側頭葉において、視覚応答を対象とした多細胞同時記録については、これまでにいくつかの報告がある (Gochin et al., 1991; Tamura et al., 2004; Aggelopoulos et al., 2005; Hirabayashi and Miyashita, 2005)。しかし、上述のように、下部側頭葉は視覚情報処理のみならず、視覚長期記憶の形成・想起にも深く関わる領域であり、この領域における視覚長期記憶課題遂行中の多細胞同時記録は、これまでに一例も報告がない。また、他の領野の過去の研究においても、複数の独立した電極を 300 μm 程度以上の間隔を空けて刺入する方法がほとんどであり、従って、本研究の目的である微小領域内における局所神経回路の研究例は少ない。

2. 研究の目的

本研究は、対連合記憶課題を遂行中のマカクザル下部側頭葉において、課題の遂行に関連した神経細胞群について多細胞同時記録を行い、課題の遂行に関連した神経細胞間の機能的結合を調べることによって、認知記憶課題の遂行に関与する高次の大脳皮質局所回路の機能、及びその計算原理を明らかにすることを目的としている。

複数の神経細胞間の相互作用は、それらの神経細胞から発生したスパイク間の相互相関ヒストグラムを算出することにより推測される。神経細胞間の結合パターンは、細胞間距離に大きく依存し、直径 100 ~ 200 μm 程度の非常に狭小な領域における局所回路は、細胞間距離が 300 μm 以上離れた細胞間の結合パターンとは大きく異なることが、これまでの研究から示唆される。特に、神経細胞間の結合確率は神経細胞間の距離に大きく依存し、距離が離れると急速に結合確率が下がることが知られている。従って、機能的結合の研究には、狭小領域からの同時記録が必須であるが、それは、これまでに多く行われてきたような独立した電極を複数本刺入する方法では困難である。そこで本研究では、直径約 100 μm の 1 本のシャフト内に複数の電極が埋め込まれた、テトロードないしヘプトード等の、電極間距離が数十 μm 程度のマルチチャンネル電極を使用し、課題関連神経細胞群が集まっている狭小領域から多細胞同時記録を行うことにより、局所神経回路の性質を明らかにする。

下部側頭葉の 36 野と TE 野は、互いに隣接する領野であり、共に対連合記憶課題に関連した活動を示す神経細胞が多く存在するが、その性質はいくつかの点で異なることが、当研究室における過去の研究において報告されている (Naya et al., *Science*, 2001; Naya et al., *J. Neurosci.*, 2003)。そこで本研究では、上記の多細胞同時記録を 36 野と TE 野の両方において独立に行うことにより、それぞれの領野における局所神経回路の性質の相違についても明らかにする。

これまでの機能的結合の研究の多くは、2 つの神経細胞の発火タイミングの関係を時間軸上で表すことによって推定される結合関係を扱ってきた。しかし、皮質の局所回路は多くの神経細胞が互いに密接に関連しあい、複雑なふるまいを示す。その例としては、周波数領域における特徴が挙げられる。特に 40 ~ 100 Hz の帯域の信号の増強は、多くの認知機能に関わるシグナルとして、LFP や EEG などで研究されてきたが、単一神経細胞のスパイク列を用いた研究はまだ少ない。本

研究では、このような周波数領域における相互相関解析をスパイク列に応用し、神経細胞間の機能的結合を、時間領域、周波数領域の両面から調べることにより、局所神経回路の複雑なダイナミクスとその機能的意義を捉える。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞対の機能的結合の周波数領域における解析

2頭のマカクザルに120種類の顔の部分図形(目、鼻、口、各40種類)を用いた遅延見本合わせ課題を訓練した。次に、これらの部分図形を組み合わせることで、計64,000種類の顔刺激と、部分図形をランダムに並べた非顔刺激を用意した。上記の課題の十分な訓練の後、これらの刺激を用いて、顔・非顔刺激識別課題の訓練を行った。この課題では、サルがレバーを引くと、画面中央に固視点が現れ、0.8秒後に固視点上に顔または非顔刺激が1秒間呈示され、0.5秒間の遅延期間の後、画面の左右に2つの白丸が呈示された。これに対して、呈示された刺激が顔刺激であれば右、非顔刺激であれば左のボタンをサルが押せば正解とし、報酬が与えられた。サルはこの課題を遂行中、固視点から1~1.4°の範囲を固視することが要求された。この課題の十分な訓練の後、下部側頭葉36野およびTE野において単一神経細胞の活動を記録し、顔の部分図形に反応する神経細胞が多く存在する領域を同定した。次に、これらの領域において、4本の近接した電極が1本にまとめられたテトロード電極(図1)を刺入し、多チャンネル増幅器を用いて細胞外電位記録を行うことにより、隣接した複数の神経細胞の活動を同時に記録した。記録中は、2つの単一神経細胞の活動を同時に分離・観測し、記録中の神経細胞対に対する最適刺激を決定した。神経活動は、波形情報を含む形で保存し、記録終了後に、波形情報を用いて、複数の単一神経細胞の活動に分離した。記録中の神経細胞対の最適顔刺激・非顔刺激は、共に同一の部分図形の組み合わせが、互いに異なる空間配置で並べられたものとし、それらの部分図形は、記録中の神経細胞対が、顔刺激・非顔刺激に対して、共にできるだけ強い反応を示すように決定した。全ての動物実験は、動物実験に関する国際基準及び東京大学医学部が定める基準に従って行われた。

神経細胞間の機能的結合は、まずスパイク列間の相互相関を算出することによって評価した。記録された神経細胞対が、共に最適顔刺激・非顔刺激の両方に対して有意に反応し、神経細胞あたりのスパイク数がどちらの

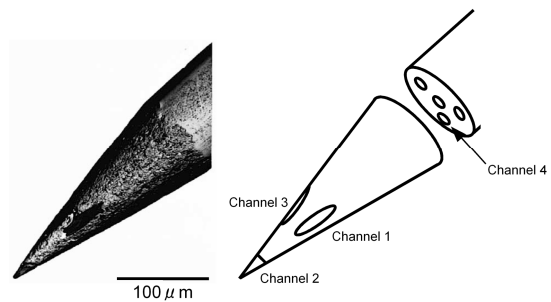


図1 テトロード電極

刺激に対しても共に600以上で、かつ、神経細胞対で合計1,600以上であった場合のみ、相互相関解析を行った。刺激呈示開始後80~1080msの期間におけるスパイク列を用いて相互相関ヒストグラムを算出し、片方の神経細胞のスパイク列を1試行分ずらして計算したshift predictorを差し引くことにより、刺激呈示に対して類似した潜時で共通に反応することによる相互相関の成分を取り除いた。

上記の解析で顔または非顔刺激に対して有意な相関発火を示した神経細胞対について、その機能的結合の周波数領域における性質を調べた。刺激呈示期間およびその直前の期間におけるスパイク列のパワースペクトルとスパイク列間のコヒーレンス、及びそのフェイズを計算した。コヒーレンスは、相互相関のフーリエ変換を、2つのスパイク列のパワースペクトルを用いて規格化した量であり、各周波数における相互相関の強さを表す。スパイク列の周波数領域の信号の計算には、Multi-taper法を用いることで、バイアスやノイズを最小化した(Chronux)。

(2) 対連合記憶課題に関連した活動を示す下部側頭葉神経細胞間の機能的結合の同定

2頭のマカクザルについて、固視条件下にて5ないし6ペアの対連合記憶課題が遂行できるように訓練した。この課題では、サルがレバーを引くと画面中央に固視点が現れ、0.8秒後に固視点上に手がかり図形が1秒間呈示され、2.2秒間の遅延期間の後、画面に2つの選択図形が呈示された。2つの図形のうちの1つが、手がかり図形に対する対連合図形であり、選択図形呈示開始から1.5秒以内にサルがこれに触れば、正解として報酬が与えられた。サルはこの課題を遂行中、固視点から2°の範囲を固視することが要求された。この課題を十分に訓練した後、下部側頭葉36野及びTE野において単一神経細胞の活動を記録し、同課題に関連した活動を示す神

神経細胞の密集領域を同定した。次に、それらの領域に、テトロード電極を刺入し、多チャンネル増幅器を用いて、同課題に関連した活動を示す 2~7 個の神経細胞から同時記録を行った。記録中は、少なくとも 2 つの単一神経細胞の活動を同時に観測し、手がかり図呈示期間および遅延期間中における活動を調べ、少なくとも 1 つの手がかり図形に共通に反応する神経細胞が少なくとも 2 つ含まれる条件下で複数神経細胞の活動の同時記録及び保存を行った。全ての動物実験は、動物実験に関する国際基準及び東京大学医学部が定める基準に従って行われた。記録後、波形情報を用いたスパイク単離アルゴリズムにより、記録された神経活動を複数の単一神経細胞の活動に分離し、手がかり図形呈示期間、および遅延期間中における各単一神経細胞の反応を調べ、さらに相関発火解析により、それらの課題に関連した神経細胞間の機能的結合を調べた。

4. 研究成果

(1) 神経細胞対の機能的結合の周波数領域における解析

顔・非顔刺激弁別課題を遂行中のマカクザル下部側頭葉において、多細胞同時記録を行い、複数神経細胞間の相関発火の強さが呈示刺激によって変化することを報告した (Hirabayashi and Miyashita, 2005.)。本研究では、このデータベースにおいて、有意な相関発火が見られた神経細胞対について、その相関発火の周波数領域における性質を調べた。

2 頭のマカクザルから、顔・非顔刺激弁別課題を遂行中に記録された神経細胞対のうち、有意な相関発火を示した計 28 ペアの神経細胞対 (サル KU: 13 ペア、サル TK: 15 ペア) について、顔および非顔刺激呈示期間中と刺激呈示前の期間におけるスパイク間コヒーレンスを計算した (図 2)。

その結果、刺激呈示期間中のスパイク列は、スパイク列を 1 試行分ずらした場合に比べて、顔・非顔刺激ともに 40~100 Hz の帯域において有意に強いスパイク間コヒーレンスを示した ($P < 0.001$)。一方、刺激呈示前の期間におけるコヒーレンスの強さは、刺激呈示期間中に比べて有意に低かった ($P < 0.001$)。さらに、顔刺激は、非顔刺激に比べて有意に強いコヒーレンスを示した ($P < 0.02$)。この結果は、相関発火の強さを比較した場合と同様であった。このことから、相関発火の強さは、周波数領域においては、コヒーレンスの強さとして現れることが示唆された。一方、同じ神経細胞群の発火頻度の強さは、顔刺激と非顔刺激の間で有意差が見られな

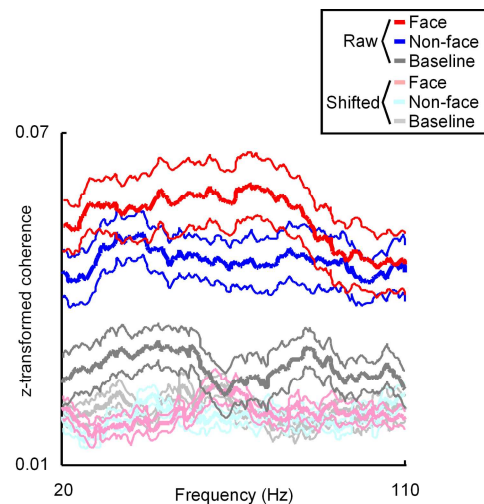


図 2. 下部側頭葉神経細胞対のスパイク間コヒーレンス ($n = 28$). 赤、青は、それぞれ、顔刺激、非顔刺激の呈示期間におけるコヒーレンス、ダークグレーは刺激呈示前の期間におけるコヒーレンスをそれぞれ表す。マゼンタ、シアン、ライトグレーは、それぞれ、顔刺激、非顔刺激、及び刺激呈示前の片方の神経細胞のスパイク列を 1 試行分ずらして計算したもの。

った ($P > 0.5$)。このことから、上記の顔優位性のコヒーレンスは、顔刺激と非顔刺激に対する発火頻度の差によるものではなく、機能的結合の強さを反映したものであることが示唆された。

次に、刺激呈示によるコヒーレンスの経時変化を調べた (図 3)。その結果、顔刺激優位性のコヒーレンスは、刺激呈示後すみやかに、一過性に現れることが示された。顔刺激に対するコヒーレンスは、同じ神経細胞群の発火頻度が最大になるよりも有意に早く最大値に達した ($P < 0.002$)。このことから、コヒーレンスの強さが発火頻度の上昇のみに依存するものではないことが示唆された。また、コヒーレンスの顔優位性は、刺激呈示期間の前半 500 ms においてのみ有意で、刺激呈示期間の後半 500 ms においては、顔刺激と非顔刺激の間でコヒーレンスの強さに有意差は見られなかった。このことから、呈示刺激依存性のコヒーレンスは刺激呈示後すみやかに現れ、数 100 ms の短いダイナミクスを示すことが示唆された。

さらに、神経細胞間の機能的結合の種類によるスパイク間コヒーレンスの差異を調べる為に、相互相関ヒストグラム上で同期発火を示した神経細胞対と、数 ms ずれた連続発火を示した神経細胞対の 2 つのグループに分

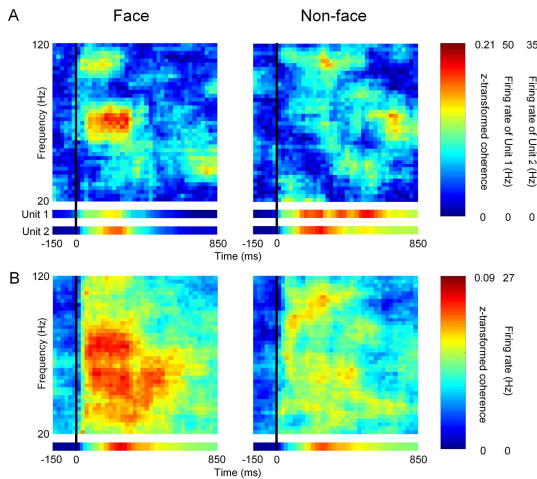


図 3. コヒーレンスと発火頻度の経時変化。(A) 代表的な神経細胞対の例。上はコヒーレンス、下は各神経細胞の発火頻度をそれぞれ表す。横軸は、刺激呈示開始からの時間、縦軸は周波数、カラーコードはコヒーレンスの強さ(上)と発火頻度(下)をそれぞれ表す。(B) 28 ペアの population data.

けて解析を行った。同期発火は2つの神経細胞に対する共通入力または双方向結合を、連続発火は一方の神経細胞からもう一方への一方向性の結合を、それぞれ示唆している。コヒーレンスの位相解析の結果、連続発火を示した神経細胞対は、同期発火を示した神経細胞対に比べて、有意に大きな位相のコヒーレンスを示した ($P < 0.05$)。このことから、コヒーレンスの位相が、神経細胞間の結合のパターンを反映することが示唆された。また、それぞれの神経細胞群のコヒーレンスを調べたところ、同期発火を示した神経細胞対に対して、連続発火を示した神経細胞対の方が有意に高い周波数領域において顔優位性のコヒーレンスを示した ($P < 0.02$)。次に、刺激呈示前と刺激呈示中のコヒーレンスの位相を、両群の神経細胞対について比較した。その結果、同期発火を示した神経細胞対のコヒーレンスの位相は、刺激呈示に伴った変化を示さなかったのに対して、連続発火を示した神経細胞対のコヒーレンスの位相は、刺激呈示開始と共に有意に大きくなることがわかった ($P < 0.04$)。このことから、連続発火を示す神経細胞対は、刺激呈示期間中とその前とでは機能的結合の強さが変化するだけでなく、そのパターンも変化することが示唆された。

以上の結果から、機能的結合を示す下部側頭葉神経細胞対は、刺激呈示期間において、呈示刺激依存的に一過性のコヒーレンスを示し、その位相と周波数は、機能的結合の

タイプによって異なることが示された。これらの知見は、時間領域においてのみ調べられてきた局所神経回路の機能的結合の性質に、新たに周波数領域の性質を加えるものであり、複雑なダイナミクスを示す局所神経回路の性質のさらなる解明につながるものである。

(2) 対連合記憶課題に関連した活動を示す下部側頭葉神経細胞間の機能的結合の同定

2頭のマカクザルについて、固視条件下にて対連合記憶課題を遂行させ、下部側頭葉36野及びTE野において計107(サルTY: 66, サルME: 41)の記録部位においてテトロード電極を用いて多細胞同時記録を行った。記録後、スパイク単離アルゴリズムにより、記録された神経活動を複数の単一神経細胞の活動に分離し、相関発火解析により、それらの神経細胞間の機能的結合を調べた。まず、手がかり図形呈示期間においては、特定の共通した刺激に反応する神経細胞対間で、機能的結合を示唆する相関発火が見られた。また、特定の対連合図形ペアについて、その一方に反応する神経細胞と両方の刺激に反応する神経細胞との間で、機能的結合を示唆する相関発火が見られた。また、特定の刺激に反応する神経細胞と、同じ刺激に反応し、かつその刺激が選択図形として呈示される直前の遅延期間中に活動する神経細胞との間でも機能的結合が見られた。これらの機能的結合から、対連合記憶課題の遂行に関わる神経細胞群は、特定の規則に従って局所神経回路を形成し、機能していることが示唆された。

一方、手がかり図形呈示後の遅延期間中も、機能的結合が見られた。特定の手がかり図形に反応し、その後の遅延期間中も反応が持続する神経細胞対や、特定の図形が選択図形として呈示される直前の遅延期間中に共通して活動する神経細胞対において、遅延期間中に機能的結合が見られた。下部側頭葉において、視覚刺激についての情報を、刺激呈示後の遅延期間においても保持する単一神経細胞の活動は、これまでに多くの報告があるが、そのような神経細胞間の機能的結合についての報告はこれまでになかった。本研究において見られた上記の遅延期間中における機能的結合から、下部側頭葉では、視覚刺激についての情報が、遅延期間において複数の神経細胞からなるセルアセンブリによって保持されていることが示唆される。

これまでに、神経細胞間の機能的結合の報告は多くあるが、認知課題の遂行に関わる神経細胞がどのような規則に基づいた機能的結合を介して局所神経回路を形成されているかについて示唆を与える報告は、これまで

になかった。本研究で見られた上記の機能的結合から、下部側頭葉において、対連合記憶のコードに関わる様々な種類の神経細胞が、特定の規則に従って相互作用することによって、対連合記憶課題を解くための局所神経回路が形成されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

平林敏行、竹内大吾、笠原洋紀、田村啓太、宮下保司. Dynamic modulation of spike-spike coherence between macaque inferotemporal neurons. *Neuroscience Research* 61, Supplement 1, S52, 2008. 査読: 無

[学会発表](計2件)

平林敏行、竹内大吾、笠原洋紀、田村啓太、宮下保司. Cross-correlation and spectral analyses of spike trains in macaque inferotemporal cortex for different parts configurations within a whole object. Asia-Pacific conference on vision, 2008年7月21日, Brisbane, Australia.

平林敏行、竹内大吾、笠原洋紀、田村啓太、宮下保司. マカクザル下部側頭葉ニューロンにおけるスパイク間コヒーレンスの動的変化. 第31回 日本神経科学大会, 2008年7月10日, 東京国際フォーラム.

6. 研究組織

(1)研究代表者

平林 敏行 (HIRABAYASHI TOSHIYUKI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60376423

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし