

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500480

研究課題名(和文)睡眠の記憶固定促進効果に関わる神経基盤の解明

研究課題名(英文)Neural mechanisms for the enhancing effects of sleep on memory consolidation.

研究代表者

田村 了以(Tamura, Ryo)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：60227296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：物事を覚えた後に眠ると、眠らない場合と比較して記憶が確りする(記憶固定)。我々はこの記憶固定の神経機構を明かにするため、霊長類(サル)が眠っているときに、記憶形成の首座として知られる海馬から脳波を記録した。その結果、入眠期から眠りが徐々に深くなっていく(ノンレム睡眠)時に、鋭波リップルの名で知られる脳波が海馬の特定の部位で、その構造に従った様式で現れることを明らかにした。また脳波は多数の神経細胞の活動の“総和”であり、その構成要素である個々の神経細胞の振る舞いはわからないので、我々は現在、個々の神経細胞活動を覚醒下と睡眠時に記録し、それらが記憶固定にどのように役立っているのかも調べている。

研究成果の概要(英文)：Sleep subsequent to learning can facilitate memory consolidation. To elucidate neural mechanisms for this facilitating effects of sleep on memory consolidation, we recorded electroencephalogram from the hippocampus, a pivotal brain area for memory formation and storage, of monkeys while they were asleep. As a results we found that sharp-waves and associated ripples (SPW-ripple events) increased in a specific region of the hippocampus during non-REM sleep; a characteristic amplitude profile of SPW-ripple events appeared along the layer structure of this area. Because electroencephalography represents summation of electrical activities from ensemble of many neurons, it is difficult to clarify the contribution of each neural element, i.e., each neuron, to the mechanism of memory consolidation. Therefore, we also try to record single neuron activities both during awake and sleep conditions to determine functional roles of these neurons in memory consolidation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合脳計測科学

キーワード：海馬 サル 睡眠 記憶 脳波 ニューロン活動 場所 霊長類

### 1. 研究開始当初の背景

睡眠には、急速な眼球運動と脳波上の低振幅速波を特徴とするレム睡眠と、脳波上高振幅の徐波(眼球運動はほとんど起こらない)を特徴とするノンレム睡眠があり、このうち特にノンレム睡眠はエピソード記憶(いわゆる思い出)の固定に重要であることが示唆されてきた。海馬は記憶の形成の首座とされるが、げっ歯類動物ではレム睡眠中にはシータ波(4-8 Hzの高振幅の脳波)、ノンレム睡眠中には鋭波・リップルが海馬に出現することが報告されている。またノンレム睡眠中には、海馬に鋭波・リップルに同期して睡眠前に体験したことの再生(リプレー)が時間圧縮した形で起こり、新皮質領域への効率的な“書き出し”が生じている可能性も示唆されている。これらの知見より、レム睡眠中の海馬の活動は記憶の符号化やその整理に、また、ノンレム睡眠中の活動は新皮質への記憶固定に重要な役割を果たすとの仮説が提唱されてきた。しかし近年まで、ヒトを含め霊長類の海馬でこのような活動が生じるかどうかほとんど知られていなかった。われわれは平成20~22年度に行なった基盤研究(C)「霊長類の記憶形成・貯蔵における睡眠の機能的意義」で、サル海馬(歯状回)では、ノンレム睡眠中に皮質類似の高振幅徐波(デルタ帯域)、レム睡眠中には覚醒時類似の低振幅速波が主として出現することを明らかにした。しかし、徐波振動を引き起こす歯状回内回路の特性や歯状回以外の海馬亜領域(例えばCA1領域)での変化に関する研究はほとんど行なっていなかった。また、覚醒時に記憶関連応答を示すサル海馬ニューロンの睡眠時の活動様式も不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、霊長類(サル)を用いて、徐波振動を引き起こす歯状回内回路の特性、海馬内の他の亜領域(CA1領域)での海馬睡眠脳波と解剖学的な層構造との関係や睡眠時の海馬ニューロン活動性の変化、覚醒時に記憶関連応答を示すサル海馬ニューロンの睡眠時の活動様式などを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 被検動物と馴化訓練

2頭のニホンザルを用いた。神経活動記録用実験室に近赤外線 CCD カメラを取り付けたケージを設置し、サルを首輪とロープを装着した状態で週に2日、20時から翌朝9時まで夜間の睡眠訓練を行った。

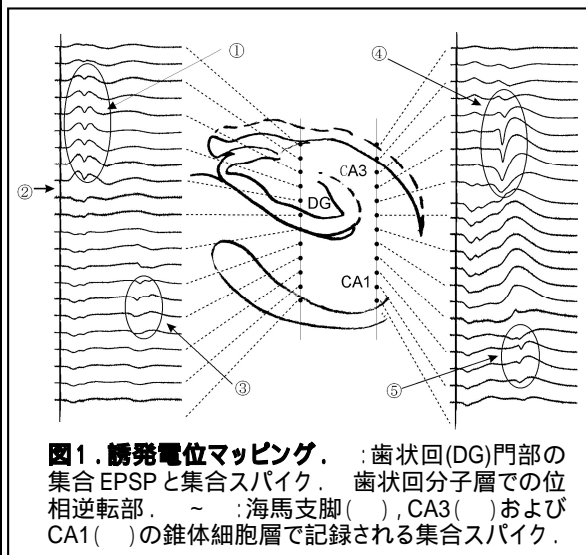
#### (2) ヘッドホルダーの取り付けと海馬亜領域の同定(誘発電位マッピング)

上記の馴化訓練終了後、ペントバルビタール麻酔下でサルの頭蓋骨にヘッドホルダーを取り付けた。その際、表在脳波の記録のために、前頭骨にステンレス製ビスを2本埋め込んだ(F7とF8)。また、眼電図(EOG)記

録用にテフロン被覆ステンレスワイヤーを左右外眼角上方約5mmの部位の皮下に先端が位置するように埋め込んだ。さらにEOGと同様のステンレスワイヤーを筋電図(EMG)記録用に脊柱起立筋に埋め込んだ。

この手術から最低2週間の回復期間をあげ、ケタミン・メドミジン麻酔下で脳地図上、海馬直上と推定される部位にマーカー用のタングステンロッドを刺入・固定後、MRIの撮像を行った。

その約2週間後、まず、MRI上のタングステンロッド先端座標から、刺激電極および誘発電位記録用電極の刺入座標を決定した。次にサルをペントバルビタールで麻酔後、刺激電極は貫通路に、記録電極は歯状回に向けて刺入し、記録電極を200μmステップで深部方向へ移動しながら誘発電位を記録した。この操作を冠状面内で数トラック繰り返すことにより、海馬の亜領域の脳定座標を正確に求めた(図1)。



#### (3) 対パルステスト

上記の誘発電位マッピングにより海馬の各亜領域の脳定座標を決定した後、記録電極を歯状回門部に刺入し、この位置で記録電極と刺激電極とを歯科用セメントによりヘッドキャップに固定した。この電極埋め込みから1週間の回復期間をおき、対パルステストセッションを開始した。セッション開始初日には、その後用いる刺激強度を決定するため、刺激強度を徐々に変えながら誘発電位を記録し、刺激強度-反応曲線を作製した。この刺激強度-反応曲線より、集合スパイク電位(PS)が最大振幅の80%となる刺激強度を求め、以降の実験セッションで用いる刺激強度とした。対パルス刺激は持続が0.3msの矩形波を、10、20、30、50、70、100、200、500、1000または2000msの間隔(IPI)で与え、2発目のパルスに対する反応と1発目のパルスに対する反応の比をPSの振幅に関して算出した。

#### (4) CA1睡眠脳波と層分布

上記の対パルステストが全て終了した後、

海馬 CA1 領域（以下 CA1 と記載）の睡眠脳波に関する実験を行なった。この実験では、睡眠脳波の層分布を調べるため、外径が 0.1 mm のエナメル被覆ステンレスワイヤーの先端を 0.2 mm ずつ離して 7 本束ねた多連電極を CA1 に埋め込んだ。その際、誘発電位波形より、最先端および最尾端に位置するワイヤーが錐体細胞層より、それぞれ、深層および浅層に位置するように調整した。

この電極の埋め込み・固定の手術的操作から回復期間（約 1 週間）をおき、サルを馴化訓練時と同じ実験室のケージに入れた。CCD カメラでサルの状態（覚醒-睡眠）と行動をモニターし、同時に表在および海馬の脳波、EOG および EMG を記録した。これら電気生理学的データは AD 変換後、コンピュータのハードディスク内に 32.768 秒（1 セグメント）ごとに記録した。Rechtschaffen と Kales の基準に準拠して、CCD カメラの画像、EOG、EMG および表在脳波のデータから記録した各セグメントを覚醒時、睡眠ステージ I-II、睡眠ステージ III-IV、REM 睡眠期に分類した。海馬脳波と表在脳波は各セグメント単位で高速フーリエ変換を行い周波数成分のスペクトル振幅と睡眠時期との関連性を検討した。海馬の興奮性を意味する高周波振動（リップル）の検出は、記録波形から、まず 100 Hz のハイパスフィルタにより高周波成分だけを抽出し、その波形を整流後に 20 Hz のローパスフィルタを用いてエンベロープを抽出した。次に設定閾値を越えるエンベロープをリップル事象とし、各睡眠ステージにおけるリップル事象率（リップル事象数/セグメント時間）を計算した。

#### （ 5 ） CA1 ニューロン活動記録

CA1 睡眠脳波の層分布に関する実験が全て終了した後、まず、サルに同一対象（サルおよびヒト）の「顔」および物体や風景を数方向から撮影した画像をディスプレイ上に呈示し、弁別（Go/No-go）課題を訓練した。サルがこの課題を十分に学習した後、ニューロン活動記録用の可動式テトロードを CA1 直上に埋め込んだ。1 日に 0.2 mm ずつテトロードを CA1 の中へと進めていき、オシロスコープ上で記録信号をモニターした。ニューロン活動が観察された場合、約 2 時間の安定化期間後にサルに上記の弁別課題を行なわせ、ニューロン活動を記録・解析した。

また 1 頭のサルには直線走路の往復移動課題を訓練した。この課題では、幅 0.8 m、全長 5 m で両端にペレットディスペンサを設置してある直線走路にサルを入れ、左右のディスペンサから出される報酬（エサの小片）を往復移動することにより交互に獲得することを学習させた。サルがこの課題を十分に学習した後に上記と同様の方法で CA1 からニューロン活動を記録・解析した。

### 4 . 研究成果

#### （ 1 ） 対パルステスト

対パルス法はシナプスの短期可塑性を調べる手法であり、対パルス促進や対パルス抑圧が現れる。本研究で行なっているような（単発刺激では）PS が誘発される比較的強い刺激を用いた場合、シナプス後細胞の発火の結果生じる反回性の興奮や抑制の影響、すなわち局所神経回路特性に関する知見を得ることができる。

サルで貫通路を対パルス刺激し、歯状回で誘発反応を記録すると、IPI が 10 ~ 100 ms の間は強い対パルス抑制が生じ 2 発目のパルスによる PS は完全に抑制された。IPI が 200 ms でも 2 発目のパルスによる PS 振幅は約 50% 抑制されたが、IPI が 200 ms より長くなるとほぼ 1 発目のパルスによる PS と同じ振幅に回復した（図 2）。

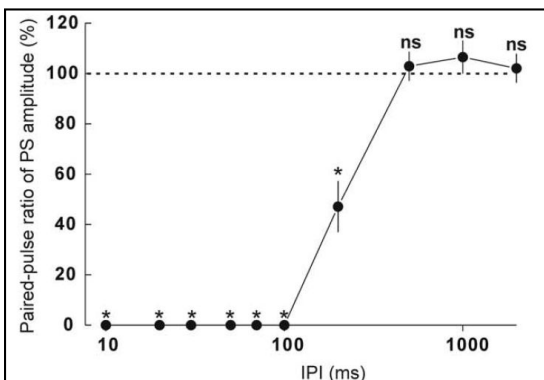


図 2. サル歯状回における対パルス抑制。横軸、パルス間隔 (inter-pulse interval: IPI) ; 縦軸は 1 発目のパルスと 2 発目のパルスで誘発された集合スパイク電位 (PS) の振幅比の % 表示。

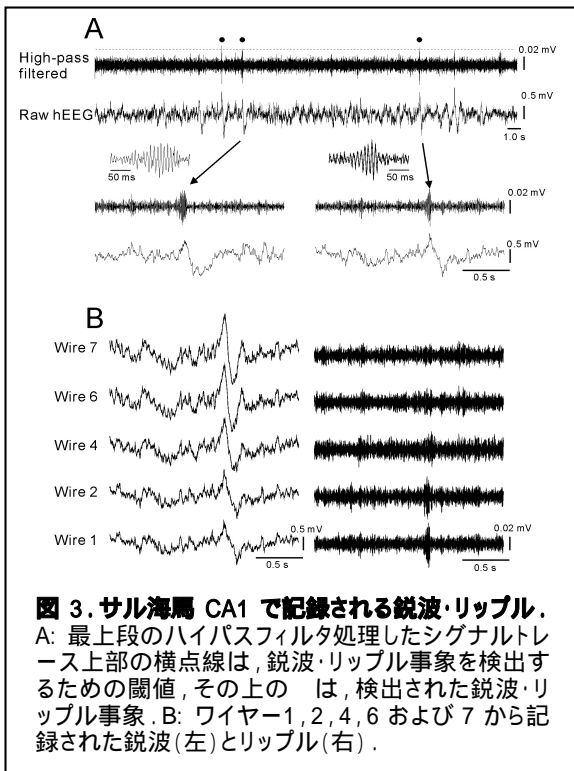
これらの知見より、サルでは貫通路を刺激すると少なくとも 200 ms は持続する反回性の抑制が生じていると思われる。過去の研究から、ラットの歯状回では、同様の対パルス抑制は 50 ~ 100 ms 程度しか持続しないことが知られており、従って霊長類の海馬は抑制系の持続時間がげっ歯類よりもかなり長いと考えられる。げっ歯類の海馬では、動物の探索行動中やレム睡眠中に高振幅で規則的なシータ波 (4-10 Hz) が持続的に出現するが、これは海馬に内在する興奮 - 抑制局所回路の規則的な活動で、その振動周波数が対パルス抑制の持続時間と相聞することが知られている。従って本研究知見より、もしサル海馬にもげっ歯類のシータ波に相当する周期性徐波が存在するならば、その振動周波数はシータ帯域ではデルタ帯域にあることが予想される。

#### （ 2 ） CA1 睡眠脳波と層分布

サルでもヒトと同様に睡眠は、ノンレム睡眠（ステージ I-IV）と REM 睡眠に大別でき、各が占める平均の割合は睡眠ステージ I-II が 68.2%、睡眠ステージ III-IV が 11.4%、REM 睡眠期が 20.4%であった。

CA1 睡眠脳波は、サル歯状回に関するわれ

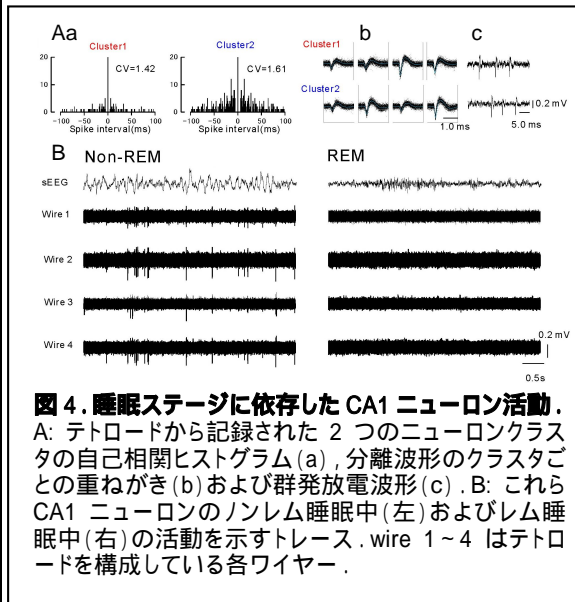
われの先行研究と類似して、覚醒時には低振幅の速波が主体であるが、ノンレム睡眠に入ると徐波が出現しはじめ、ノンレム睡眠が深くなるにつれて徐波が明瞭になった。またノンレム睡眠に入ると鋭波リップル事象も出現し始め、ノンレム睡眠が深くなるにつれてその発生頻度も増加した。逆にレム睡眠中には海馬脳波が覚醒時に似た低振幅速波となり、鋭波リップル事象もほとんど見られなくなった。図3には深いノンレム睡眠中に観察された高振幅徐波と鋭波リップル事象の典型例を示してある。図3AはCA1睡眠脳波のトレースを示してあるが、このセグメントでは比較的高振幅の徐波の中に3回の鋭波リップル事象が検出されている。また、高速掃引トレースからわかるように高周波(約90-150 Hz)のリップルが鋭波の上昇相に一致して見られる。図3Bには鋭波リップル事象のCA1内の層分布様式を示してある。鋭波はCA1の浅層(Wire6と7)で最大振幅を示したのに対してリップルは深層(Wire1と2)で最大振幅となった。これは、鋭波がCA1の縫線層への興奮性入力によるEPSP、リップルが錐体細胞および局所介在細胞の小集団の活動を反映する電位変化であるというげっ歯類での知見とよく一致している。従ってサルでも、ノンレム睡眠時に鋭波・リップルに同期して海馬内に蓄えられていた情報が新皮質へ効率的に書き出されているのかもしれない。



### (3) 睡眠時の CA1 ニューロン活動

まず、睡眠ステージと CA1 ニューロン活動との関連性を調べた。記録した CA1 ニューロンの多くは、上記の鋭波リップル事象と同様に、ノンレム睡眠が深くなるにつれて放電数が有意に増加したが、レム睡眠時には逆に放

電数が顕著に減少した。図4には、睡眠ステージに関連した CA1 ニューロン活動変化の典型例を示してある。この記録セグメントでは、テトロード記録により2個のニューロン活動クラスター(2個の単一ニューロンに由来する活動)が分離された。これらニューロンは複雑スパイクの波形を示す群発放電が見られ(図4A 上部の自己相関ヒストグラムと波形トレース)、CA1 錐体細胞からの記録であると思われる。図4Bに示すとおり、これらニューロンはノンレム睡眠中に盛んに活動したが、レム睡眠中はほとんど活動しなかった。



つぎに覚醒時に記憶関連応答を示すニューロンの睡眠時の活動変化に関する研究に着手した。当初、記憶関連応答を示すニューロンが記録できることを期待して、同一対象(サルおよびヒト)の「顔」および物体や風景を用いた Go/No-go 課題を訓練し、サルがこの課題を遂行しているときに海馬ニューロン活動を記録した。しかし、総数 52 個のニューロンから活動を記録したが、予想に反して目的とした記憶関連応答を示すニューロンは見つからなかった。そのため行動課題を直線走路の往復移動課題に変更した(ヒトを含め動物の海馬には居場所に依存した応答を示す「場所細胞」が存在することが知られている)。すでに、この行動課題システムのセットアップおよび動物の行動訓練は終了し、現在ニューロン活動記録をしているところである。

### 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 5件)

- 1) Nakata R, Eifuku S, Tamura R. Effects of tilted orientations and face-like configurations on visual search

asymmetry in macaques. Anim Cogn, 査読有, 17: 67-76, 2014.

- 2) Tamura R, Nishida H, Eifuku S, Nagao K, Fushiki H, Watanabe Y, Uchiyama K. Sleep-stage correlates of hippocampal electroencephalogram in primates. PLoS One, 査読有, 8: e82994, 2013.
- 3) Tamura R, Nishida H, Eifuku S, Nagao K, Fushiki H, Watanabe Y, Ono T. Short-term synaptic plasticity in the dentate gyrus of monkeys. PLoS ONE, 査読有, 6: e20006, 2011.
- 4) Tamura R, Eifuku S, Uwano T, Sugimori M, Uchiyama K, Ono T. A method for recording evoked local field potentials in the primate dentate gyrus in vivo. Hippocampus, 査読有, 21: 565-574, 2011.
- 5) Eifuku S, De Souza WC, Nakata R, Ono T, Tamura R. Neural representations of personally familiar and unfamiliar faces in the anterior inferior temporal cortex of monkeys. PLoS ONE, 査読有, 6: e18913, 2011.

〔学会発表〕(計 16件)

【国際学会】

- 1) Nakata R, Tamura R, Eifuku S. What facial information is important for rapid detection of the face? Comparative cognitive studies between humans and monkeys. The 35th European Conference on Visual Perception, 9/2-6, 2012, Alghero, Italy.
- 2) Eifuku S, Nakata R, Daimon Y, Tamura R. Neural representations of perceptual and semantic identities of individuals in the ventral anterior inferior temporal cortex of monkeys. The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 10/13-17, 2012, New Orleans, USA.
- 3) Nakata R, Tamura R, Eifuku S. What facial information is important for rapid detection of the face? Comparative cognitive studies between humans and monkeys. The 43rd NIPS International Symposium, Face Perception and Recognition, 10/31-11/03, 2012, Okazaki, Japan.
- 4) Tamura R, Eifuku S. Representation of target identity in the monkey hippocampus. The 43rd NIPS

International Symposium, Face Perception and Recognition, 10/31-11/03, 2012, Okazaki, Japan.

- 5) Kitazono J, Nagata K, Eifuku S, Tamura R, Okada M. Sparse modeling for face identification in monkey anterior temporal cortical areas. The 43rd NIPS International Symposium, Face Perception and Recognition, 10/31-11/03, 2012, Okazaki, Japan.
- 6) Eifuku S, Nakata R, Ono T, Tamura R. Neural basis for associative face memory in the monkey anterior inferior temporal cortex. The 34th European Conference on Visual Perception, 6/9-12, 2011, Kyoto, Japan.
- 7) Nakata R, Tamura R, Eifuku S. Inner features of the face are important for pop-out? Face pop-out effect in humans and monkeys. The 34th European Conference on Visual Perception, 8/28-9/1, 2011, Toulouse, France.
- 8) Eifuku S, De Souza WC, Nakata R, Ono T, Tamura R. Neural representations of personally familiar and unfamiliar faces in the anterior inferior cortex of monkeys. The 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 11/12-16, 2011, Washington DC, USA.

【国内学会】

- 1) 中田龍三郎, 田村了以, 永福智志. ニホンザルにおける顔の視覚探索課題 - サルは顔を瞬時に検出するか? - 第 90 回日本生理学会大会 3/27-29, 2013, 東京.
- 2) 永福智志, 田村了以, 中田龍三郎. サル腹側前部側頭皮質における知覚的および意味的アイデンティティのニューロン表現. 第 36 回日本神経科学大会, 6/20-23, 2013, 京都.
- 3) 中田龍三郎, 永福智志, 田村了以. ニホンザルによる視覚探索課題における線分と顔刺激の影響. 日本動物心理学会第 73 回大会, 9/14-16, 2013, 筑波.
- 4) 田村了以, 西田悠, 永福智志. サル海馬神経活動の睡眠ステージ相関. 第 35 回日本神経科学大会, 9/18-21, 2012, 名古屋.
- 5) 中田龍三郎, 田村了以, 永福智志. 自首顔のどのような情報が速やかな顔検出

に重要なのか？ヒトとニホンザルの比較認知研究. 第35回日本神経科学大会, 9/18-21, 2012, 名古屋.

- 6) 田村了以, 西田悠, 永福智志, 永尾薫, 伏木宏彰, 渡邊行雄. 霊長類の海馬歯状回における短期シナプス可塑性. 第34回日本神経科学大会, 9/14-17, 2011, 横浜.
- 7) 永福智志, De Souza WC, 中田龍三郎, 小野武年, 田村了以. サル前部下側頭皮質における個人的親近性のニューロン表現. 第34回日本神経科学大会, 9/14-17, 2011, 横浜.
- 8) 西田悠, 永福智志, 永尾薫, 伏木宏彰, 渡邊行雄, 田村了以. サル海馬神経活動の睡眠ステージ相関. 第20回「海馬と高次脳機能」学会, 10/8-9, 2011, 金沢.

〔図書〕(計 3件)

- 1) 筒井健一郎, 田村了以. 14-11 学習. 「誠心 心理学辞典」下山晴彦編集代表. 東京: 誠心書房, 掲載予定.
- 2) 田村了以. 14-12 記憶. 「誠心 心理学辞典」下山晴彦編集代表. 東京: 誠心書房, 掲載予定.
- 3) 田村了以. 睡眠と記憶固定 - 海馬と皮質のダイアログ -. 心理学評論, 56: 216-236, 2013.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/ins/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 了以 (Tamura, Ryoji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 60227296