

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500331

研究課題名(和文)異種感覚刺激をもちいた時間知覚の脳内機構の解明

研究課題名(英文)Neural mechanisms in duration discrimination of different sensory stimuli

研究代表者

生塩 研一 (OSHIO, Ken-ichi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30296751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：時間の長さは視覚や聴覚などの感覚種に依存しない物理量です。時間情報処理に特化した感覚器は存在しませんが、私たちは1秒と2秒を区別できます。脳の前頭前野は、視覚や聴覚などの感覚情報が集まり、時間情報処理にも関わっていると考えられているものの、具体的な役割は未解明です。本研究では、一つの試行の中で、視覚刺激もしくは、聴覚刺激によって別々に呈示された時間長の長短を弁別させる時間弁別課題をサルが遂行している間にニューロン活動を記録した結果、前頭前野は時間情報だけを抽出して情報処理しているというよりは、与えられる時間長が視覚か聴覚かによって、異なるメカニズムを用いていることが分かりました。

研究成果の概要(英文)：Time duration is the physical quantity that does not depend on sensory modalities such as visual and auditory senses. We can discriminate between one and two seconds, although we have no specialized organ for it. The prefrontal cortex receives visual, auditory, and somatosensory inputs. Also, previous studies have shown that the prefrontal cortex contributes to duration discrimination. Therefore, the prefrontal cortex is expected to play an important role in duration discrimination. I investigated neuronal activity during monkeys conducted a duration discrimination task, in which duration was assigned visual or auditory stimulus. The results suggest that the prefrontal cortex discriminates visual and auditory duration in different ways, rather than measuring duration after extraction of temporal information from different sensory inputs.

研究分野：大脳生理学

キーワード：時間認知 時間知覚 大脳生理学 電気生理学 前頭前野 線条体 霊長類

1. 研究開始当初の背景

「ストップウォッチなしで10秒を計ってください」と言われたら、どうするだろうか。頭の中で「一ーち、にーい、...」と言いながら頭を前後に動かしたり、指でテーブルをタップしたりしながら、10まで数えることで10秒を計ろうとするはずだ。人によっては、少し早い傾向があったり、逆に遅かったりするかも知れない。その違いは、それぞれの人の「1秒」の長さが違うことに起因する。もし、「1秒を計ってください」と言われたら、今度は1秒より短い時間を脳内で作ってそれを数えるようなことはせず、ワンストロークで1秒を計ろうとするだろう。では、その「1秒」はどうやって計って、脳内に符号化するのだろうか？

脳が時間をどのように処理しているかという時間知覚の問題については、心理学の範疇では古くから取り組まれて来た。ところが、全く意外なことに神経生理学者の興味はあまり惹いて来なかった。近年、ヒトを使ったfMRIやPETの脳機能イメージング実験や、ラットなどの小動物を使った薬理学的実験・摘除実験などから、前頭前野、頭頂葉、運動補足野、運動前野、大脳基底核、小脳、海馬などの多くの領野が時間知覚において何らかの形で関与していることが分かってきた。しかし、それら個々の領野でどのような時間情報処理がなされているかについては、ほとんど何も分かっていない。

時間知覚に関わるとされる各脳領野の具体的な役割を明らかにするには、電気生理実験によって個々のニューロンレベルで情報処理機序を解明する必要がある。実験課題も容易ではないので、実験動物としてはサルがもっとも適切である。時間知覚に関するサルの電気生理実験は、Niki & Watanabe (1976)の先駆的な論文以来、頭頂葉LIP野から記録したLeon & Shadlen (2003)と、前頭前野から記録したMita et al. (2009)などの数報があるに過ぎず、世界的にも着手され始めたばかりでほとんど未開拓の挑戦的なテーマである。申請者も時間に関するサルの電気生理実験を開始しており、刺激呈示期間や遅延期間における前頭前野や線条体ニューロンの活動からそれらの機能的役割の一端を明らかにし、4編の原著論文(Oshio et al., 2008; Chiba et al., 2008; Oshio et al., 2006)の他、北米神経科学会やヨーロッパ神経科学会などの国際会議で発表してきた。

視覚や聴覚は、目や耳といった、それぞれの感覚器が刺激を受容して、脳内でそれぞれに特化した感覚野が情報処理を行う。一方、時間は視覚や聴覚などのモーダリティ（感覚種、刺激種）に依存しない物理情報であり、時間情報処理に特化した感覚器は存在しない。時間情報処理の本質を探るために、一つの実験で、複数のモーダリティを使うと重要な知見が得られるに違いない。しかし、申

請者の実験も含めて、これまでの電気生理実験では、視覚・聴覚・触覚のいずれかのモーダリティしか使われてこなかった。

2. 研究の目的

申請者は時間弁別課題をサルに行わせて、脳機能イメージング実験などで時間知覚との関連が示唆されている前頭前野と大脳基底核の線条体からニューロン活動を記録してきた。前頭前野は、attention、タスク遂行、working memoryなどに関わることが知られており、時間知覚においても一定の役割を果たしていることは想像に難くない。また、視覚や聴覚だけでなく、全ての感覚情報が集められ処理されるので、感覚モーダリティに依存しない時間情報処理に重要な役割を果たしていると期待される。しかしながら、これまで、脳の時間情報処理機能を調べる電気生理実験では、視覚・聴覚・触覚のいずれかしか使われて来なかった。つまり、特定の感覚刺激を使ったことによる特異性がデータに現れているかも知れないのである。申請者も視覚刺激しか使って来なかったため、その懸念を抱えていた。

時間は視覚でも聴覚でも同じであり、感覚刺激を受容しながら脳内で時間情報を抽出しているはずである。そこで、これまでの視覚刺激による実験結果を詳しく検討するため、また、脳のより純粋な時間長情報処理過程を調べるため、本研究では、一つの試行の中で、視覚刺激もしくは、聴覚刺激によって別々に呈示された時間長の長短を弁別させる時間弁別課題を考案して、サルがそれを遂行している間の前頭前野のニューロン活動を記録することで、時間情報処理における前頭前野の役割を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、一つの試行の中で視覚刺激と聴覚刺激のいずれかを用いて呈示された2つの時間の長短を弁別する課題を考案し、実験動物がその課題を遂行中に脳のニューロン活動を記録した。ターゲットとする脳領域には、脳表面に近い大脳皮質で、視覚、聴覚、体性感覚、味覚、嗅覚という5つの感覚情報が集まる前頭前野を選んだ。個々のニューロン活動を詳細に記録するため、脳に極細の電極を刺入する侵襲的な手法を採用した。実験動物としては、脳の侵襲的な実験が可能な高等動物で、ヒトに最も近い動物の一つであるニホンザルを使用した。課題の正答率や反応時間と、呈示時間パラメータとの関係などの行動データ解析を行い、サルが時間の長短を弁別するに際してとった戦略を推定することで、ニューロン活動データ解析の参考とした。また、ニューロン活動データからは、刺激呈示時間パラメータと呈示期間・遅延期間・選択期間・刺激種（視覚刺激 or 聴覚刺

激)におけるニューロンの発火の様子との関係を解析して、呈示された視覚刺激の持続時間の計測過程、計測した時間情報のコード過程、コードした時間の比較過程に対する前頭前野と線条体の機能的役割の解明を試みた。

実験には、2頭のニホンザル (*Macaca fuscata*, 体重 8.0~9.2kg) を使った。実験動物の取り扱いについては、日本学会議の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」及び、「近畿大学動物実験規程」に則り適切に行った。実験の基本的な流れとして、まず、サルに時間弁別課題ができるように段階を追ってトレーニングした。そして、その課題が充分にこなせるようになった時点で、ニューロン活動記録実験を開始した。

本研究でサルに与えた時間弁別課題の基本的な構成について説明する(図1)。時間的に変化しない色のついた図形(緑色の四角形)を視覚刺激、スピーカからの2,000Hzの純音を聴覚刺激として用い、それらが呈示されている間の時間をサルが弁別すべき時間長として与えた。視覚刺激と聴覚刺激は、同時に与えることはなく、時間呈示をする際には、そのどちらかの刺激のみを用いた。実験は暗くした防音防電磁波のシールド内で行った。モンキーチェアに座らせたサルの30cm前には、6.5インチ・コンピュータディスプレイと3つのボタン(1つは保持用、2つは選択用)とスピーカが装着されたアクリルパネルを、口のすぐ前には報酬用のステンレスチューブを配置した。サルが保持用のボタンを押すとタスクが開始され、ディスプレイ中央に小さい白色の四角形が固視用の視覚刺激として1秒間表示される。引き続いて、1番目の時間長(視覚刺激か聴覚刺激)を呈示。なお、聴覚刺激の場合、ディスプレイには、固視用の小さい白色の四角形を表示したままとした。続いて、固視用の小さい白色の四角形を表示する1秒間の遅延期間、続いて、2番目の時間長(視覚刺激か聴覚刺激)を呈示。その1秒の遅延期間後に青色と赤色の四角形を左右にならべて同時に表示した。ここで、青色と赤色をそれぞれ1番目と2番目の時間長に意味づけられるようトレーニング期間に教示しておいた。長い方の時間長にあたる色を1.5秒以内にボタン押しで選択すると報酬(フルーツジュース)を与えた。

時間といっても、秒・分・時・日・年などいろいろな長さはあるが、実験で調べたのは、認知過程とも関係が深い、数百ミリ秒から数秒の時間長を選んだ。具体的には、(0.2秒、1.0秒)(0.6秒、1.0秒)(0.6秒、1.0秒)(0.6秒、1.4秒)(0.6秒、1.8秒)(1.0秒、1.4秒)(1.0秒、1.8秒)の組を予め用意しておいて、その中からランダムに選んで呈示した。特定の時間長が、必ず長いとか短いようになってしまうと、1番目の時間長を呈示した段階で答えが分かっしまい、弁別の意味がないので、同じ時間長でも、試行によって短い場合と長い場合があるように工夫し

た。例えば、1.0秒は、(1.0秒、1.8秒)では「短い」が、(0.2秒、1.0秒)では「長い」ことになる。呈示時間の長短の順序、視覚刺激と聴覚刺激の呈示順序、選択時の赤青の左右はランダムに与えた。

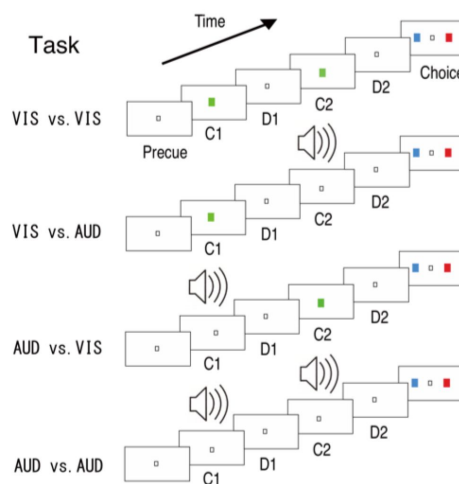


図1. 実験動物に与えた課題の流れ
緑色の四角形は視覚刺激を、スピーカマークは聴覚刺激を意味する。

視覚刺激呈示時間や反応時間などのイベントデータとスパイクデータの取り込み、それから、トレーニングやニューロン活動記録は、全て、実験制御ソフトである TEMPO SYSTEM (Reflective Computing, St. Louis, MO, USA) をインストールしたコンピュータによる制御のもとで行った。また、実験中のサルの行動は CCD カメラによりシールド外からリモートで常時観察した。

トレーニング期間は、サルの個体差にもよるが、おおよそ約半年から1年を要した。トレーニングが完了した時点で、ニューロン活動記録実験に入った。まず、ニューロン活動記録実験の準備として、頭部固定具を頭部の前と後ろの2カ所と、記録用ステンレスチューブを記録部位である前頭前野がカバーできる位置に装着した。ニューロン活動記録実験では、頭部を固定具で固定し、時間弁別課題遂行中に硬膜上からエポキシ被覆タングステン電極 (FHC, USA) を刺入して細胞外記録法によりニューロン活動を記録した。電極は一次元油圧マイクロマニピュレータ (Narishige, JAPAN) で進めた。電極からの信号はアンプで増幅して、150-3000Hz のバンドパスフィルタを施した。それから、マルチスパイクディテクタ (MSD; Alpha Omega Engineering, Nazareth, Israel) で8点プレートマッチング法により単一ニューロン活動を分離してスパイク検出し、TEMPO SYSTEM でスパイクデータをオフライン解析のため保存した。なお、MSD は1本の電極から3つのニューロンまで分離可能である。

前頭前野ニューロンの活動を記録し、刺激呈示期間・遅延期間・選択期間などでのニューロンの発火頻度の変化や刺激呈示時間とのパラメトリックな関係性をオフライン解析した。これまで、視覚刺激のみを用いた場合のデータ解析を進めてきた(Oshio et al., 2006, Oshio et al., 2008)ので、その知見に基づいて、ニューロン活動記録実験によって得られた前頭前野ニューロン活動データについて、刺激呈示期間・遅延期間・選択期間などでのニューロン活動の変化や刺激呈示時間とのパラメトリックな関係性をオフライン解析し、視覚刺激と聴覚刺激を使った場合の時間知覚における前頭前野の機能的役割を検討した。

また、何らかの事情で、ニューロン活動データの取得が困難な場合は、これまでに得られているデータの解析をして、論文にまとめることとした。

4. 研究成果

まず、課題を行ったサル の行動データについて述べる。課題では、2つ続けて呈示される時間の長短を弁別してもらうが、各試行で時間長が異なるため、その難易度も変わる。最も難しいのは時間差があまりない(1.0秒、1.4秒)で、最も簡単なのは(0.2秒、1.0秒)だった。トレーニングが終了して、ニューロン活動記録実験に進んだ段階では、全ての組み合わせを含めても9割近い正答率を得た。時間呈示は視覚刺激(VIS)と聴覚刺激(AUD)のいずれかで与えているため、同一試行内での刺激種の組み合わせとしては、1番目、2番目の順に、(VIS, VIS)、(VIS, AUD)、(AUD, VIS)、(AUD, AUD)の4つのパターンがあるが、(AUD, AUD)、つまり、聴覚刺激だけのパターンでやや正答率が低いものの、他は同程度によく正解できた。

次に、その時間弁別課題を遂行中の前頭前野ニューロンの活動について述べる。ニューロン活動は、課題に関連しているか否かによらず、単一ニューロンからの活動を示す信号であると同等されれば記録するようにした。2頭のサルから記録した860個のニューロンのうち、1番目の時間呈示期間(C1)で発火頻度が高くなったのは、64個、1番目の遅延期間(D1)は35個、2番目の時間呈示期間(C2)は139個、2番目の遅延期間(D2)は192個だった。C2とD2で応答するニューロンが多かったことになる。また、C1とC2のそれぞれの期間で、視覚刺激と聴覚刺激に対する応答性を解析したところ、C1では、73.5%のニューロンが視覚刺激だけに応答し、聴覚刺激だけは12.5%、両方ともは14.0%と少なかった。C2では、51.7%のニューロンが視覚刺激だけに応答し、聴覚刺激だけは22.3%、両方ともは26.0%だった。前頭前野は、視覚と聴覚の両方の情報を処理することが知られているが、今回の結果からは、

時間呈示期間、つまり時間の長さを計る期間では、前頭前野は「視覚刺激に優位」な情報処理をしているということが示唆された。また、これらの時間呈示期間に応答したニューロンの活動性を詳細に解析したところ、C1では、視覚刺激に対して刺激開始から0.3秒辺りで最も発火頻度が高くなり、聴覚刺激では0.7秒くらいだった。C2では、視覚刺激と聴覚刺激ともに刺激開始から0.3秒くらいで発火頻度が最も高くなった(図3.C)

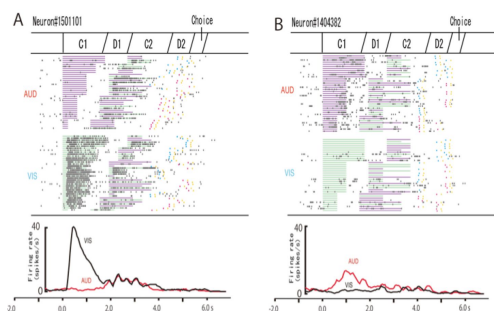


図2. C1期間で応答したニューロンの例 (A)視覚刺激のみ。(B)聴覚刺激のみ。紫の線と緑の線は、それぞれ聴覚刺激と視覚刺激を呈示した期間を示す。

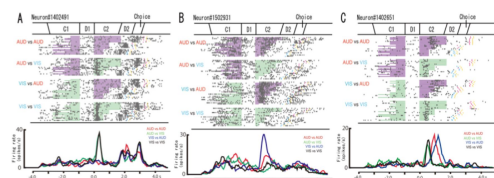


図3. C2期間で視覚刺激のみに応答したニューロンの例(A)と、聴覚刺激のみの例(B)と、視覚と聴覚の両方に応答した例(C)。

我々が2008年に発表した論文(Oshio et al., 2008)では、前頭前野が1番目の刺激呈示時間を長短の2つのカテゴリーに分ける、つまりフィルタリングする役割があることを示した。C1で刺激呈示開始から一定の遅延後、バースト的な発火を示すニューロンが前頭前野で多数見付かったのである。そして、その遅延時間が刺激呈示時間の平均値に近いことから、前頭前野はまず、1番目の刺激呈示時間を長短の2つのカテゴリーに大まかに分類する処理をしており、それらのニューロンはそのフィルタリングをする際の基準時間を示していると考えた。今回の実験で、C1において、聴覚刺激に対する活動が刺激開始から0.8秒と遅かったのは、そのフィルタリング機能を担っていた可能性がある。ただ、これが聴覚刺激のみに見られたこと、それから、視覚刺激と聴覚刺激の両方に応答したニューロンでも、聴覚刺激では発火頻度が最も高くなるタイミングが視覚刺激よりも

遅かったことから、視覚と聴覚の両方を時間呈示に使った場合は、視覚だけを時間呈示に使った場合と時間情報処理のメカニズムが異なることが示唆される。また、視覚と聴覚の両方の情報が前頭前野に集まってはいるが、それぞれの感覚刺激に乗せられた時間情報は、刺激呈示期間においては前頭前野では別々に処理されている可能性が高い。

C1 直後の遅延期間である D1 では、視覚刺激と聴覚刺激の両方ともに応答したニューロンが 86% (30/35) だった。さらに、C1 の時間長に依存して発火頻度が変わるものが聴覚に対しては 69% (21/35)、視覚では 79% (27/35) と多くを占めたことから、前頭前野は刺激種に依存せず、C1 の時間長を符号化していると考えられる。

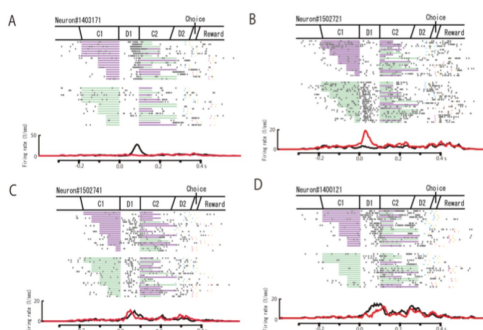


図 4 . D1 期間で応答したニューロンの例 (A) 聴覚刺激の後だけ、(B) 視覚刺激の後だけ、(C) 視覚刺激と聴覚刺激の両方後、(D) 聴覚刺激の後だけ、かつ、C1 の長さ依存して発火頻度変化。

最も多く応答性ニューロンが見出された D2 では、1 番目の時間長が長いときに応答したニューロンが 44% (85/192)、2 番目が長いときに応答したものが 30% (57/192) と、どちらが長かったかという、弁別の結果を符号化したニューロンが多かった。

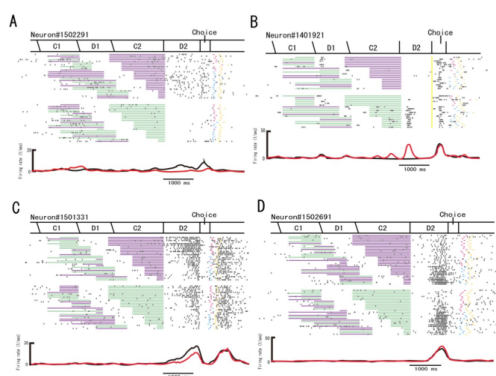


図 5 . D2 期間で応答したニューロンの例 (A) C2 が聴覚刺激の後だけ、(B) 視覚刺激の後だけ、(C) 視覚刺激と聴覚刺激の両方で、C2 が長いほど発火頻度が高い、(D) 視覚刺激と聴覚刺激の両方で、C2 が短いほど発火頻度が高い。

これは、我々の先行研究で視覚刺激だけを使った実験で、遅延期間でどちらが長かったかを符号化するニューロンが前頭前野で見出された結果と合致する (Oshio et al., 2006)。視覚刺激と聴覚刺激での違いについては、C2 が聴覚刺激のときに強い応答を示したニューロンが 25% (47/192)、視覚刺激で強かったのが 17% (33/192) という結果で、刺激特異性をもつニューロンも一定の割合であるが、多くは刺激種に依存しないことが分かった。また、D2 では、1 番目と 2 番目のどちらが長かったかという情報と同時に、特定の刺激種で C2 の時間長に応じて発火頻度が変わるニューロンも少なからず見出され、この課題での前頭前野の情報処理過程の複雑さを垣間見る結果となった。

本研究は、一つの試行で複数の異なる感覚種の刺激を用いて時間長の長短を弁別させ、その課題遂行中に単一ニューロンレベルでニューロン活動を記録した。実は、このアプローチ自体が世界初である。実験結果から、高次情報処理を担う前頭前野においてもなお、時間を感覚種に依存しない抽象的な量として処理しているのではなく、視覚刺激と聴覚刺激を別々に処理されていることが示唆された。研究成果を日本生理学会大会で日本神経科学学会大会において発表した他、これまで得られていた視覚刺激のみの場合のデータを整理して原著論文として発表した。

<引用文献>

Oshio K (2011) "Possible functions of prefrontal cortical neurons in duration discrimination" *Front Integr Neurosci* 5: 25.

Oshio K, Chiba A, Inase M, "Temporal filtering by prefrontal neurons in duration discrimination", *Eur J Neurosci* 28(11): 2333-43 (2008).

Chiba A, Oshio K, Inase M, "Striatal neurons encoded temporal information in duration discrimination task", *Exp Brain Res* 186: 671-676 (2008).

Oshio K, Chiba A, Inase M, "Delay period activity of monkey prefrontal neurons during duration-discrimination task" *Eur J Neurosci* 23: 2779-2790 (2006).

Niki H & Watanabe M, "Prefrontal and cingulate unit activity during timing behavior in the monkey" *Brain Res* 171: 213-224 (1976)

Leon MI & Shadlen MN, "Representation

of time by neurons in the posterior parietal cortex of the macaque” Neuron 38: 317-327.(2003)

Mita A, et al., “Interval time coding by neurons in the pre- supplementary and supplementary motor areas” Nat Neurosci 12(4): 502-507 (2009)

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)

Chiba A, Oshio K, Inase M, “Neuronal representation of duration discrimination in the monkey striatum”, Physiol Rep: 3(2) e12283 (2015), doi: 10.14814/phy2.12283. 査読有.

Chiba A, Oshio K, Inase M, “Neuronal activity in monkey prefrontal cortex during a temporal classification task”, J Physiol Sci 65: S260 (2015). 査読無.

Chiba A, Oshio K, Inase M, “Temporal information processing of visual and auditory cues in monkey prefrontal cortex during a duration discrimination task”, J Physiol Sci 64: S250 (2014). 査読無.

Chiba A, Oshio K, Inase M, “Timing representation in cue and delay activity of monkey striatal neurons during duration discrimination”, J Physiol Sci 63: S165 (2013). 査読無.

Chiba A, Oshio K, Inase M, “Neuronal activity in monkey prefrontal cortex during a duration discrimination task with visual and auditory cues”, J Physiol Sci 62: S231 (2012). 査読無.

[学会発表](計6件)

千葉惇、時間三分類課題におけるサル前頭前野の神経細胞活動、第92回日本生理学大会、2015年3月21日、神戸コンベンションセンター、神戸市。

千葉惇、異なる感覚刺激の時間弁別におけるサル前頭前野での情報処理、第37回日本神経科学大会、2014年9月11日、パシフィコ横浜、横浜市。

千葉惇、サル前頭前野における時間弁別

課題中の視覚性と聴覚性刺激の時間情報処理、第91回日本生理学大会、2014年3月16日、鹿児島大学都元キャンパス、鹿児島市。

千葉惇、視覚性及び聴覚性刺激を用いた時間弁別課題におけるサル前頭前野ニューロンの遅延期応答、第36回日本神経科学大会、2013年6月20日、国立京都国際会館、京都市。

千葉惇、時間弁別に関わるサル線条体神経細胞活動の時間呈示期と遅延期における時間情報表現、第90回日本生理学大会、2013年3月27日、タワーホール船堀、東京都。

千葉惇、視覚刺激と聴覚刺激の時間弁別におけるサル前頭前野の神経細胞活動、第35回日本神経科学大会、2012年9月20日、名古屋国際会議場、名古屋市。

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
生塩 研一 (OSHIO, Ken-ichi)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：30296751

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし