

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25590202

研究課題名(和文) 鳥類・齧歯類を対象とした侵襲性の少ない脳活動の計測技術の確立

研究課題名(英文) Establishing less invasive procedures of neuro-recordings from experimental animals including rodents and birds

研究代表者

岡ノ谷 一夫 (Okanoya, Kazuo)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：30211121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、齧歯類・鳥類等の実験動物において非侵襲的な脳測定技術を確立することが目的である。結果、齧歯類(マウス)を用いて脳幹誘発電位を非侵襲で計測することに成功した。また、鳥類(ジュウシマツ)を用いて侵襲的な神経細胞記録から局所電場電位を記録しミスマッチ電位と相同であることが確認できた。齧歯類についてはこの技術を行動実験と併用することが可能である。鳥類については非侵襲性を高めて応用範囲を広げてゆく予定である。

研究成果の概要(英文)：The study was planned to establish non-invasive brain recording procedures in rodents and birds. As a result, we succeeded in recording brain evoked auditory response from the scalp and using it to estimate auditory sensitivity. As another result, we succeeded in recording local field potentials from bird auditory areas with invasive method. However, we were able to obtain miss match negativity like response from the recordings.

研究分野：生物心理学

キーワード：非侵襲 電場電位 事象関連電位 聴覚 齧歯類 鳥類

1. 研究開始当初の背景

(1) 主に条件付けなど行動学的な手法によって動物の認知機能を探る研究領域である「比較認知科学」は、認知機能の進化についての示唆を与えるデータを供給してきた。この分野は、実験的行動分析で開発されてきた手法にもとづき動物の感覚知覚を測定する「動物精神物理学」に始まり、現在では、意思決定過程やメタ認知、情動等の動物の高次認知機能の測定に挑戦している。私はこの分野では動物から異同概念に対応する行動データを取得することに成功している (Okanoya & Dooling, 1988)。

いっぽう、人間を対象とした認知科学では、脳波をもとにした事象関連電位等、比較的簡単に測定可能な神経生理データを、行動データと並列して取得することで、より訴求力のある知見を得ることに成功している。この場合の神経生理データは、神経情報処理の過程を理解することを必ずしも目的とせず、むしろ認知過程に不随する一指標として、行動データを補強する目的で使用されているため、「認知過程の神経相関 (Neural correlates)」と呼ばれることもある。特に文の意味理解や処理過程、意思決定、視聴覚の高次認知過程等の研究で、こうした方略は多くの成果を挙げている。例をあげれば、私たちの研究室では、事象関連電位と行動法を併用して、音列の分節化過程 (Abla et al, 2008) や音楽演奏過程 (Kamiyama et al, 2010) 規則学習過程 (Sun et al, 2012) の測定に成功している。

比較認知科学では人間と動物の認知過程の差異と相似について関心を持つが、特にメタ認知や意思決定過程などの研究では、条件付けによるデータのみでは訴求力が十分でなく、強化率の最大化による説明が、認知過程による説明よりも妥当性が高くなってしまふ場合がある。こうした問題を解決するため、行動データと同時に認知過程の神経相関が測定できることが望ましい。

<引用文献>

Okanoya, K., & Dooling, R. J. (1988). Obtaining acoustic similarity measures from animals: A method for species comparisons. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 83, 1690-1693.

Abla, D., Katahira, K., & Okanoya, K. (2008). On-line assessment of statistical learning by event-related potentials. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 20, 952-964.

Kamiyama, K., Katahira, K., Abla, D., Hori, K., & Okanoya, K. (2010). Music playing and memory trace: Evidence from event-related potentials. *Neuroscience Research*, 67, 334-340.

Sun, F., Hoshi-Shiba, R., Abla, D., & Okanoya, K. (2012). Neural correlates of

abstract rule learning: An event-related potential study. *Neuropsychologia*, 50, 2617-2624.

2. 研究の目的

人間の頭皮上から記録される事象関連電位は、認知過程と高い相関を持つことが知られており、心理学的な測定のひとつとして利用されている。本研究は、鳥類・齧歯類において行動実験と並立可能な手続きで事象関連電位を記録する方法を確立し、比較認知科学研究の発展に資する技術を創出することを目的とする。これが可能になれば、ヒトにおいて多数報告されている事象関連電位を指標とした認知過程を動物で検証することができ、現在では行動のみよりどころとしている比較認知科学研究に、神経生理学的な指標を与えることになる。特にメタ認知など、強化率の差異により説明がつけられがちな研究に神経相関を加えることで、人間と動物の認知過程の相違について直接議論ができるようになる。

3. 研究の方法

(1) 齧歯類(マウス)における聴性誘発電位の非侵襲的計測

装置：測定は電氣的ノイズの影響を受けないようファラデーケージ内で行った。ファラデーケージの内側には防音材を設置し、ノイズレベルを 40dB 以下にした。誘発電位の測定には TDT システムを使用した。

刺激：脳幹聴性誘発電位の測定においては音の立ち上がりが急峻で周波数特異性の低いクリック音と立ち上がりが急峻ではなく周波数特異性の高いトーン音を用いて測定を行った。トーン音は 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 40 kHz の音声を使用した。

手順：測定の前に動物はソムノペンチルもしくはイソフルラン麻酔下でマウスの頭部を剃毛し、脳波測定用ゲルを頭部と後肢に塗付した。接触部以外をチューブで囲んだ銀電極を頭部に二本、後肢に一本、電極同士や動物と接触しないよう置く。音圧 80dB から記録を始め、5~10dB ステップで音圧を下げていき反応閾値を調べた。マウスの誘発電位は主に 4 波からなると言われており、これらの波形を指標として閾値を求めた。

(2) 鳥類におけるミスマッチ電位の計測

非検体：成鳥 (180 日齢以上) のオスのジュウシマツを 15 羽用いた。被験体は業者から購入した後、実験当日まで理化学研究所および東京大学で飼育された。飼育室は、気温 25~30°C、湿度 60%、明期：暗期 = 14:10 h に保たれた。実験の手順と飼育環境は東京大学の動物実験委員会からの承認を得ている。

刺激：単一音オドボール課題には、被験体が聞いたことのないジュウシマツの歌 8 羽

分から1個ずつ音要素を切り出した(94.1 ± 20.5 ミリ秒)。音圧は歌と同様に調整した。各刺激の時間長の差が聴反応に影響することを防ぐため、標準刺激と逸脱刺激の時間長の差が6ミリ秒以下になる刺激同士を常に対にして呈示した。たとえば、音要素 a (73 ミリ秒) と b (74 ミリ秒)、c (83 ミリ秒) と d (87 ミリ秒) のような刺激対を作成した。刺激対の基本周波数の差が大きいほど逸脱刺激への選択性は大きくなることが知られている。しかし、本研究で用いた刺激は自然な音声であり、その中には基本周波数が特定できないものもあるため、対にした刺激同士の基本周波数の差を求めるのは困難であった。したがって、各刺激について、5 ミリ秒ごとに算出したスペクトルエントロピーの平均値を求めた。

手術：まず、被験体をウレタン(10%カルバミン酸エチル) 0.2 – 0.3 ml の皮下投与により麻酔し、脳定位固定装置(Vernier Stereotaxic Instrument, Leica, Germany) 上の小鳥用アダプター(Model 914, David Kopf Instruments, USA) に固定した。嘴を嘴固定器にかませ、両耳にイヤーパーを挿し込んで頭部を固定し、耳と嘴を結ぶ線が水平から下に45°になるように頭部を傾けた。頭皮に皮膚表面麻酔薬(キシロカインゼリー, アストラゼネカ株式会社, 大阪市北区)を塗布し、頭部を切り開いて頭蓋を露出させた。露出した頭蓋の吻側に三点固定器(特注, 成茂科学器械研究所, 東京都世田谷区)をデンタルセメントで固定した。頭蓋の電極を刺入する位置から離れた位置に参照電極を刺入した。大脳両半球と小脳とが接する分岐点(Y点)の周辺の頭蓋とその下の硬膜を取り除いた後、イヤーパーを抜いて音が聞こえる状態にしてから、電極を脳表面に接した。

神経記録：記録は、左右両半球から行った。先にどちらか一方の半球に電極を刺入して記録した後、記録点確認のための微小損傷を行い(のちの組織学の部分を参照)もう一方の半球の記録に移った。どちらの半球から先に記録するかは、被験体ごとにカウンターバランスをとった。電極には、4点の縦に並んだ記録点を持つ電極が8本横に並んだ32点シリコンプローブ(NeuroNexus, USA)を用いた。電極を刺入する座標は、次のように決定した。まず、NCMは、大脳の尾側末端にある。また、NCMでは大脳の中心から外側約0.2 – 0.6 μmの範囲でよく馴化・脱馴化することが知られている)。したがって、座標は決めず、できるだけ大脳の内側・尾側の矢状面方向に電極を接するよう心がけた。

電極を脳表面に接した後、脳定位固定装置を防音箱(内寸57W×46D×54H cm, ミュージックキャビンSC-2, 高橋建設株式会社, 神奈川県川崎市)に入れ、防音箱内のスピーカー(SRS-Z1, ソニー株式会社, 東京都港区)から1.4秒の白色雑音、被験体自身の歌(BOS)、実際の実験では使用しないジュー

シマツ他個体の歌(CON)を無作為な順に4秒間隔で再生しながらマイクロポジショナー(Model 640, David Kopf Instruments, USA)を用いて電極を少しずつ深部に進めていき、聴反応を確認できる位置を探した。

32点の記録点における電位と参照電極の電位から電位差信号を計測し、前置増幅器(HST/32V-G20, Plexon, USA)で20倍に増幅した。主増幅器(PBX2, Plexon, USA)で50倍に増幅し、遮断周波数100 Hzの高域通過フィルタと8 kHzの低域通過フィルタをかけた。増幅された信号をアナログ/デジタル変換器(MAP/32, Plexon, USA)を用いてサンプリング周波数40 kHzでコンピュータに保存するとともに50 Hz帯域阻止フィルタをかけ、ソフトウェア(Sort Client, Plexon, USA)上のウィンドウディスクリミネータで活動電位を確認した。また、オシロスコープ(HM507, HAMEG Instruments, Germany)と防音箱外のスピーカー(Model 3300 Audio Monitor, A-M Systems, USA)にも信号を送り、目と耳で閾値を超えた電位変化を確認できるようにした。刺激再生のタイミングと電位の記録のタイミングが合っていることを確かめるため、防音箱内の音声をマイクロフォン(ECM-MS907, ソニー株式会社, 東京都港区)で録音し、活動電位の記録と同様のデジタル信号として記録した。

白色雑音、BOS、CONを再生しながら電極を深部に進めていき、音声の再生に対応した活動電位(聴反応)が多数見られた位置で電極の刺入を止め、実験用の刺激呈示を開始した。

記録終了後、解析ソフトウェア(Offline Sorter, Plexon, USA)を用いて、Valley-Seeking法によって閾値を超えた波形の集合から単一細胞の活動を分離した。分類されたシングルユニットの波形を見て、明らかにノイズであると実験者が判断したものを除外した。

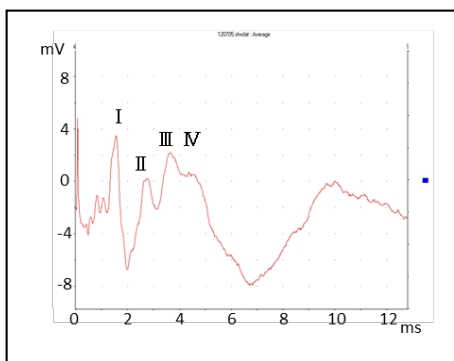
手順：1秒に1度の割合で刺激を提示した。標準音と逸脱音との比は9:1とした。得られた局所電場電位を標準音・逸脱音それぞれ240回分加算平均し、150から300ミリ秒の間10ミリ秒ごとに対応のあるt検定を行った。

4. 研究成果

(1) げっ歯類(マウス)

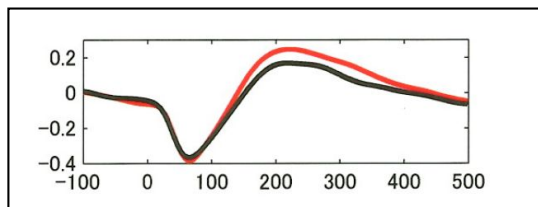
感覚受容器、神経系に対する生理的または非生理的刺激により誘発され、しかもその刺激と時間的関連(time-locked)ないし事象的関連(event-related)のある電気反応または波形のことを誘発電位という。1970年にJewettらが聴覚刺激の呈示によりネコ、ヒトから脳幹聴覚路由来の短潜時の誘発電位(脳幹聴性誘発電位)を発見し、それ以降多くの臨床場面において難聴や脳幹障害の診断などに利用されてきた。

本実験は現在までにマウスにおいて非侵襲的な脳幹聴性誘発電位の測定法を確立し、クリック音とトーン音提示時の脳幹聴性誘発電位の測定に成功した。本手法は剃髪のみで済み、頭皮や頭蓋に侵襲的措置を施す必要がなく、当初目標に合致した方法である。



(2) 鳥類 (ジュウシマツ)

結果：一次聴覚野である Field L においては刺激提示後 150-300 ミリ秒において標準音と逸脱音で誘発された局所電場電位の電圧に有意差があった。しかし、高次聴覚野である NCM においては、有意差は見られなかった。以下に結果の一例として Field L において記録された局所電場電位を示す。縦軸はミリボルト、横軸はミリ秒で、赤が逸脱音、黒が標準音に対する電場電位である。時刻 0 において刺激が提示され、150-300 ミリ秒の間で電位の差が見られている。



考察：鳥類の聴覚系においても局所電場電位からヒトにおけるミスマッチ陰性電位に対応する記録が得られた。ただし、鳥類では陽性電位であるが、これは参照電極の取り方でどちらにも変わり得るであろう。ジュウシマツとヒトという、系統的にも脳のサイズにおいても大きな違いがある種において、聴覚刺激について機能的に相同であるミスマッチ電位が得られたこと、しかもほぼ同様な潜時で得られたことは、非常に興味深い。現状では手続きは侵襲的であるが、信号源としてはミスマッチ電位が得られたことは大きな収穫であり、マウスで用いた手法を参考に、さらに手法を洗練させてゆくことで、実験動物における非侵襲脳機能計測を可能にしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

Ono, S., Okanoya, K., Seki, Y. (2014). An oddball response to the deviant sequence in songbird auditory forebrain. The 19th Auditory Research Forum, 同志社びわこリトリートセンター(滋賀県大津市), 12/13-14.

Ono, S., Okanoya, K., & Seki, Y. (2014). An Oddball task of sound sequence discrimination in songbird auditory forebrain. The International Congress of Neuroethology, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014/7/28-8/2.

Ono, S., Okanoya, K., & Seki, Y. (2013). Variability of auditory response to the bird's own song in neurons of the songbird auditory forebrain area. The 18th Auditory Research Forum, 同志社びわこリトリートセンター(滋賀県大津市), 12/14-15.

Ono, S., Okanoya, K., & Seki, Y. (2013). Variability of auditory response to bird's own songs in NCM neurons of Bengalese finches. Neuroscience 2013 (43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience), San Diego, California, USA, 11/9-13.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡ノ谷 一夫 (Okanoya Kazuo)
 東京大学・大学院総合文化研究科・教授
 研究者番号：30211121

(2) 研究分担者

一方井 祐子 (Ikkatai Yuko)
 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
 研究者番号：00709214
 (平成26年5月23日より研究分担者)

(3) 研究協力者

松本 結 (Matsumoto Yui)
 東京大学・大学院総合文化研究科・博士課程2年在学中(当時)
 小野聡子 (Ono Satoko)
 東京大学・大学院総合文化研究科・修士課程在2年在学中(当時)