

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890002

研究課題名(和文)異種感覚統合における神経活動正規化機構の神経メカニズムの解明

研究課題名(英文) Neural basis of the divisive normalization mechanism in the multisensory integration

研究代表者

大城 朝一 (Ohshiro, Tomokazu)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40311568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳におけるゆっくりとした神経活動の律動(infra-slow oscillation, 周期0.1Hz以下)についてその起源と性質についてはまだ良く分かっていない。今回、私はラットの脳表面から内在性信号を検出する技術を用いて、その律動に相当する大脳活動を光学的に観察することに成功した。その振動は波を随っており脳表の前後軸方向をゆっくり(4mm/秒)と伝播していた。重要なことに、視覚と体性感覚の両方の刺激をラットに与えるとarea RLと呼ばれる感覚連合野で内在性信号の増加を認めることが出来た。これらの事から内在性信号の観察は脳における異種感覚統合と律動を調べる上で大変有用である事が示された。

研究成果の概要(英文)：Among the various rhythmic oscillations of the brain activity, the nature and origin of the infra-slow oscillation (0.1Hz) is not well characterized. We detected an oscillation at that slow range in the anesthetized rat's brain using the intrinsic signal imaging technique, and observed that the oscillation propagated like a wave over the cortex. The wave has a spatial pattern with 1 - 2 peak(s) over the cortex and ran along the rostral-caudal direction at 4mm/s. Consistent with the idea that the signal reflects the local neural activity, high-frequency whisker stimulation caused a phase-locked increase of the signal over the somatosensory brain area. Importantly, simultaneous stimulation of the visual and the somatosensory system caused an increase of the signal over the area RL, a multisensory association brain area. Our results demonstrated usefulness of the intrinsic signal detection technique to study the multisensory integration and the oscillations of the brain activity.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳生理学 光イメージング 異種感覚統合 脳波

### 1. 研究開始当初の背景

本研究代表者である大城は、視覚、聴覚、体性感覚など異なる感覚刺激に同時に反応する異種感覚統合神経細胞 (multisensory neuron) の神経活動現象を調べ、そのほとんどが神経活動正規化機構 (Heeger Vis. Neurosci. 1992) を拡張した異種感覚統合モデルによって説明できることを初めて示した (Ohshiro et al., Nat. Neurosci. 2011)。さらに大城らは麻酔下ラットの大脳皮質神経活動の徐波律動 (slow-oscillation) を光遺伝学的手法によって操作する事が可能である事を初めて示した (Kuki, Ohshiro et al., Neurosci. Res. 2013)。最近の総説 (Atteveldt et al., Neuron 2014) で指摘されているように、異種感覚統合領域を含め脳の多くの部位で神経系の律動現象と神経活動正規化機構が共通して見られる。しかしながら両者を統一的に理解しようとする研究はそれまでに例がなく、その生物学的基盤についてもほとんど分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

異種感覚統合領域を含め脳の多くの部位で神経系の律動現象と神経活動正規化機構が共通して見られる。両者を統一的に説明する生物学的基盤 (神経回路) を明らかにするため麻酔下のラットを用いて、大脳皮質神経活動の律動、単一刺激に対する神経活動応答、そして異種感覚刺激に対する神経活動応答、を調べた。神経活動を測定する手法として実体顕微鏡と CMOS デジタルカメラを用いた光学的観察を主に用いた。

### 3. 研究の方法

(1) ラットの手術: ラット (Wistar 及び Long-Evance ラット、計 12 匹) はケタミン・キシラジン混合麻酔液を腹腔注射後、人工呼吸器 (Somnosuite, Kent Scientific 社) につなぎイソフルレンによるガス麻酔 (濃度 1 ~ 3%) に切り替える。心拍数及び体温は常にモニターし、ガス濃度を調節しながら適切な麻酔状態を維持する。頭皮は前後軸方向に切開し、大脳皮質上の血管系が見えるまで頭骨をドリルで薄く削る (thinned-skull preparation 法)。

(2) 電気生理学的記録: 直径 1 mm の穴を合計 4 箇所、大脳皮質視覚野、体性感覚野 (Whisker, Barrel 領域) を中心に薄く削った頭骨上に開け、硬膜は突ききらないように気をつけながらネジ型電極を挿入する。ネジ型電極は直径 50  $\mu$ m の銀ワイヤーを通じてヘッドアンプ増幅器につなぎ、神経活動 (局所電位) を増幅して記録した (Omniplex, Plexon 社)。

(3) 光学的記録: 電極を埋め込んだラットは実体顕微鏡 (MZFLIII, Leica) 下に静置

する。波長が 530nm の光 (緑色) を側面から照射し、薄く削った頭骨越しに反射した反射光を CMOS カメラ (ORCA FLASH ver.4.0. Hamamatsu photonics) にて記録する。記録したデータから反射光の変化率 ( $\Delta I / I_0$ ) を独自に作成した off-line 解析プログラムにて計算する (MATLAB、Mathworks 社)。この時得られる反射光の変化率は内在性信号 (intrinsic signal) と呼ばれ、大脳皮質の局所的な血流を反映していると考えられる。つまり、大脳皮質のある領域の神経活動が活発になると局所的な血流が上昇し赤血球による 530nm の光の吸収が上昇し、反射光の強度が減少する (暗く見える)。

(4) 感覚刺激の提示: 自作した LED 光源 (530nm) 及び whisker 振動刺激装置 (20 Hz の電動モーター) を、刺激提示コントロール用の digital I/O ボード (Measurement Computing) につなぎ、Visual C++ (Microsoft) で書かれた自作プログラムにて 1ms の時間解像度で刺激提示のコントロールを行った。LED 光源はラットの目に近づけ、周りに光が漏れないようにアルミ箔で覆う。whisker 振動刺激装置はラットの顔面、ヒゲ部位に押し当てた。

(5) データ解析: 電気生理学的記録と光学的記録は MATLAB で記述した解析プログラムで off-line 解析を行った。電気生理学的記録には TTL 同期信号、光学的記録には LED 同期信号を組み込んでおき、時間的に同期した解析ができるようにしておいた。

### 4. 研究成果

1) 非常にゆっくりとした (0.1Hz 以下) 神経活動が波状に大脳皮質上を伝播する: 感覚刺激を一切提示しない状態で内在光学信号を観察してみると、その信号は自発的に律動し、かつ大脳皮質上を波状に伝播することが明らかになった (図 1)。この律動の周波数は約 0.1Hz 前後で、これまで脳波研究で知られていた infra-slow oscillation と呼ばれるものに一致していた (Girton et al., Clin. Neurophysiol. 1973)。

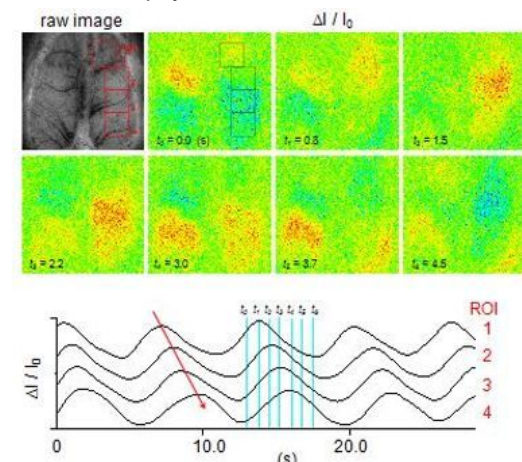
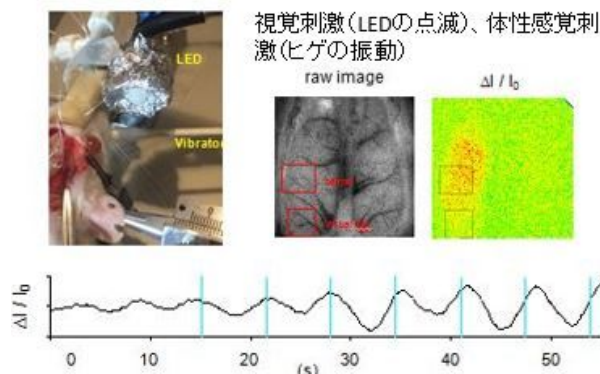


図1 波状に伝播する内在性信号。反射光の時間変化(0.5秒毎)をカラーで表示。(上図)。4箇所ROIにおける内在信号の時間変化(下図)より信号は波状に伝播することが分かる。



(2) 内在光学信号は単一感覚刺激に応じて変化する：

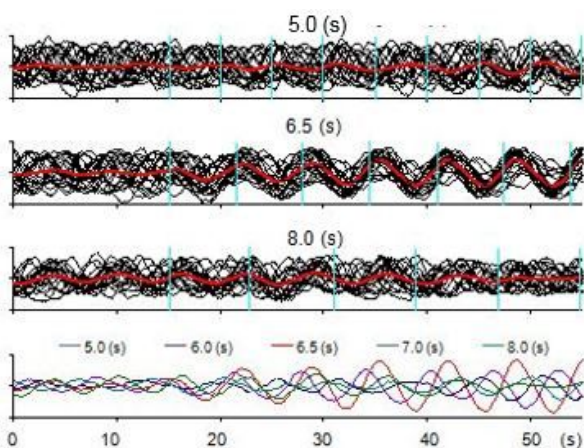
光学的に観察された infra-slow oscillation が神経活動を反映している事を確かめるために、体性感覚刺激（ヒゲ刺激）を提示している時の内在光学信号を調べた（図2）。予想通りヒゲ刺激に同期して大脳皮質体性感覚野（パレル領域）において内在信号の律動を惹起する事ができた。



(図2)ヒゲ刺激にตอบสนองして体性感覚野に内在性信号が現れる(右上)。内在信号はヒゲ刺激のタイミング(下図、青い縦線)に同期して律動を始める。

(3) 内在信号は特定の頻度で提示された感覚刺激に対して同期する：

内在信号は感覚刺激に同期して律動することがわかったが、感覚刺激の提示頻度を変化させても同期が保たれるのかを調べた。ヒゲ刺激（0.5秒）の間隔を5.0、6.0、6.5、7.0、8.0秒として提示し、大脳皮質体性感覚野における内在信号を調べた（図3）。間隔が6.5秒の時に刺激に対する同期が強くみられた。つまり、内在信号は特定の頻度の外部刺激に共鳴することが分かった。

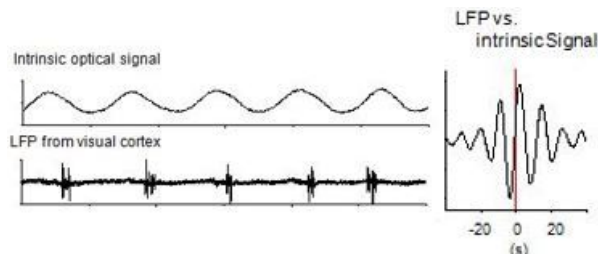


(図3)内在性信号は6.5秒間隔のヒゲ刺激に強く同期する。刺激の間隔は短すぎても長すぎても内在性信号を効率よく同期させる事ができない。

(4) 内在信号は電気的な神経活動と同期する

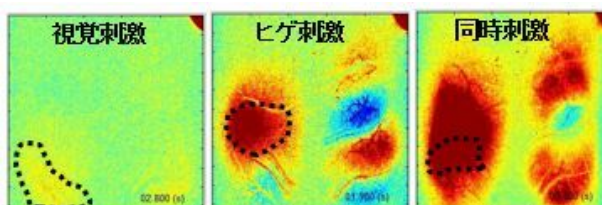
光学的に観察された内在信号が真に神経活動を反映している事を確かめるために、ピス電極をもちいた局所電位記録と内在信号の

光学的記録を同時に行った（図4）。感覚刺激を一切提示しない状態で内在信号の律動に同期して局所電位の変化が見られた。興味深い事に局所電位の変化が内在信号よりも早く位相が進んでいる事がわかった。よって、神経活動がトリガーとなり内在信号の変化が惹起されていることが示唆された。



(図4)内在性信号の律動は神経活動(LFP: 局所電位)に同期して現れる(左)。両者の相互相関図(右)より、局所電位のタイミング(赤縦線)より少し遅れて内在性信号のピークが現れる事が分かる。

(5) 異種感覚刺激に対する内在信号の変化  
体性感覚刺激（ヒゲ刺激）に同期して体性感覚野での内在信号の変化が見る一方、視覚刺激（LED 点滅：0.5秒間）に同期して視覚野での内在信号の変化が見られた。重要な事に、体性感覚刺激と視覚刺激を同時に提示すると、感覚連合野（area RL）での内在信号の同期が見られた（図5）。area RLは視覚刺激と体性感覚刺激の両方から入力を受け、情報を統合する場であると考えられるのでこの観察事実は非常に理にかなったものである。



(図5)視覚刺激単独、ヒゲ刺激単独、そして両方の刺激同時提示における内在信号。それぞれ視覚野、体性感覚野、そして感覚連合野を含む領域(破線)で強い信号が現れる。

(6) 考察

infra-slow oscillationはヒト脳波の研究において見出された律動であるが、その発生機序については不明である。本研究において初めて、infra-slow oscillationの周波数と一致する内在信号を麻酔下のラットの大脳皮質上で観察した。この内在信号は大脳皮質上を4mm/sの速度で波状に伝播しており、これは重要な発見である。内在信号の由来についてであるが、大脳の血管の太さがゆっくり変化する vasomotion という現象が知られており、もしかするとこの vasomotion に起因する血流の変化を反映したのもかもしれない(Mayhew et al., Neuroimage 1996)。昨年、脳実質内にリンパ系が存在することが初めて報告された(Louveau et al., Nature

2015)。この中枢リンパ系は脳実質内の毛細血管から染み出た間質液を吸収・回収するシステムと考えられる。内在信号は非常にゆっくりと大脳皮質上を波状に伝播していくことから、この間質液の動態を反映している可能性もある。さらに中枢での主要なグリア細胞であるアストロサイトがその間質液の輸送、吸収に大きく関わっていることが示唆されている (Glymphatic system: Maiken Nedergaard Univ. of Rochester, U.S.A.)。今回の観察をヒントにして、infra-slow oscillation の発生機序を今後の研究で明らかにしていきたい。

比較的遅い脳神経活動の律動については、infra-slow oscillation よりも周期の短い slow-oscillation (約 1Hz) が知られている。我々は光遺伝学的手法を用いて slow-oscillation を外部の光刺激に同期させることに成功した (Kuki, Ohshiro et al., Neurosci. Res, 2013)。興味深いことに、今回の infra-slow oscillation は slow oscillation と同様に任意の外部刺激にตอบสนองするのではなく、特定の周期の刺激に強く引き込まれる (entrainment) が起こることがわかった。これは神経細胞回路網のダイナミクスを外部刺激に共鳴させることが可能であることを示しており、神経活動の同期現象を明らかにする上で非常に重要な知見であると考えられる。

今回、大脳皮質感覚連合野において異種感覚刺激に同期した内在信号を初めて観察した。神経活動正規化モデルによると異種感覚統合における神経活動は単純な和にはならず、平均化することが予想されている。この予想が内在信号においても常に成り立つのかどうかは今後の研究で明らかにしていくことになるが、本研究のように頭骨を薄く削り内在信号をデジタルカメラで観察するという極めて簡単な方法で異種感覚統合時の脳の活動を可視化できることを示せた事は、今後の研究の方針を決める上で非常に重要なブレイクスルーとなった。

#### <引用文献>

Heeger “Divisive normalization of cell responses in cat striate cortex” Vis. Neuro. 9, 181-197 (1992)

Ohshiro et al., “A normalization model of multisensory integration” Nat. Neurosci. 14, 775-782 (2011)

Kuki, Ohshiro et al., “Frequency-dependent entrainment of neocortical slow oscillation to repeated optogenetic stimulation in the

anesthetized rat” Neurosci. Res. 75, 35-45 (2013).

Mayhew et al., “Cerebral Vasomotion: A 0.1-Hz Oscillation in Reflected Light Imaging of Neural Activity” Neuroimage 4, 183-193 (1996)

Louveau et al., “Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels” Nature 523, 337-341 (2015)

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計5件)

Tomokazu Ohshiro, Hajime Mushiake “Wave-like propagation of the infra-slow oscillation (near 0.1Hz) over the rat cortex revealed by the intrinsic signal imaging” 第93回日本生理学会大会 札幌コンベンションセンター 札幌 2016年3月23日  
Tomokazu Ohshiro “A key prediction of divisive normalization model of multisensory integration demonstrated in macaque area MSTd” NTNU-Tohoku Univ. Brain science meeting “Joy of Brain Research” 東北大学 仙台 2015年11月26日

Tomokazu Ohshiro, Gregory C. DeAngelis “Divisive normalization during multisensory integration by neurons in macaque area MSTd” 第38回日本神経科学会年会 神戸国際会議場 神戸 2015年7月30日

Tomokazu Ohshiro, Gregory C. DeAngelis “Divisive normalization during multisensory integration by neurons in macaque area MSTd” 第92回日本生理学会大会 神戸国際会議場 神戸 2015年3月23日

大城朝一 “異種感覚統合における神経活動正規化機構” 第46回 東北生理談話会 コラッセ福島 福島 2014年10月25日

〔その他〕 ホームページ等

<http://www.neurophysiology.med.tohoku.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大城朝一 (OHSHIRO, Tomokazu)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 40311568

##### (2) 連携研究者

虫明元 (MUSHIAKE, Hajime)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 80219849