

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00216

研究課題名(和文)脳内ストップウォッチにおける前頭葉の機能的役割

研究課題名(英文)Functional role of the frontal lobe with "brain timer"

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは目を閉じてストップウォッチを5秒や10秒でだいたい止めることができる。これは脳にいわば「脳内ストップウォッチ」があることを示唆する。申請者はサルに時間の長さを区別する課題をトレーニングし、その課題をしている間に前頭葉のニューロンの活動を単一ニューロンレベルで記録する実験を行った。その結果、前頭葉の運動前野や前頭前野という脳領域で、一定の時間が経過した後に一時的に活動が強くなるニューロンや、時間の呈示が終わった後に時間の長さを符号化するような活動を示すニューロンなど、時間を区別する課題に関連した多様な活動パターンのニューロンを発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時間は身の回りに溢れる基本的な物理量であるにもかかわらず、脳が具体的にどうやって時間の長さを計っているのかということは未だほとんど分かっていない。うつ病、ADHD、統合失調症といった患者に時間感覚の歪みが見られることも分かってきており、脳内ストップウォッチの解明は、脳の機能を理解するにとどまらず、精神疾患の理解や、精神状態や気分の客観的指標への応用にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We can stop a stopwatch in ten seconds with eyes closed. This suggests that our brain have timing function such as a "stopwatch". Nonetheless, it is unclear how physical time is transformed into brain time. Temporal interval is a modality-independent physical attribute which can be perceived whether it is assigned to a visual, auditory or somatic stimulus. The frontal lobe receives inputs from multiple sensory systems and plays a role in integrating sensory information. It is therefore natural to speculate that the frontal lobe would participate in time perception and represent temporal attributes in some way. Monkeys were trained to discriminate between temporal durations associated with visual or auditory stimuli. Neuronal activity was recorded while the subjects were performing the task. We found various types neurons exhibiting phasic activity and sustained activity, and so on, which were associated with temporal processing from the prefrontal cortex and the premotor cortex.

研究分野：大脳生理学

キーワード：時間知覚 大脳生理学 電気生理学 前頭葉

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 視覚情報である光や聴覚情報の音は、それぞれ目や耳といった特殊感覚器が刺激を受容して、脳内でそれぞれの感覚野が情報処理を行う。一方、時間は光で与えられても、音で与えられても変わらない普遍的な物理量であり、時間情報処理に特化した感覚器は存在しない。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域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ている。しかし、それら個々の領域が時間情報処理において、どのような役割を担っているのか、ほとんど分かっていないのが現状である。時間知覚に関わるとされる各脳領域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単一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している。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 **Sakurai et al. (2004)** などをはじめ、限られた数の報告しかなく、世界的にもまだ着手され始めたばかりと言ってもよいほど未開拓の挑戦的なテーマである。

(2) 私たちは、何も見ずにストップウォッチを5秒や10秒で止めることができる。これは私たちが脳で時間を計れる、脳にいけば「脳内ストップウォッチ」があることを示唆する。しかし、時間は身の回りに溢れる基本的な物理量であり、大雑把ながら時間を計れるにもかかわらず、脳が具体的にどうやって時間の長さを計っているのかということは未だほとんど分かっていない。また、臨床的な研究を通して、うつ病、**ADHD**、統合失調症といった患者に時間感覚の歪みが見られることも分かってきた。脳内ストップウォッチの解明は、精神疾患の理解や、精神状態や気分の客観的指標への応用も期待される。申請者は視覚刺激や聴覚刺激を用いて時間を呈示して、サルに時間長を区別させる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のニューロン活動について、原著論文(**Chiba et al. 2015, Oshio 2011, Oshio et al. 2008, Chiba et al. 2008, Oshio et al. 2006**)の他、ヨーロッパ神経科学会などの国際会議で発表した。先述のように、そもそも時間は感覚種に依存しない物理量にもかかわらず、視覚と聴覚の両方を使って、単一ニューロンレベルで時間知覚に携わるニューロン活動を調べた研究はほとんどない。それから、時間を計る機能を調べる際、連続的な時間計測に近付けるため、時間長を長短の2択で判断させる課題よりも、時間長を3択で判断させる、よりアナログ的な計測が必要な課題の採用が必要だと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 申請者の先行研究も含めて、世界中の様々な実験を見渡すと、時間知覚の実験では、対象となる実験動物、実験動物に与える課題の構成、ニューロン活動を記録する脳領域によって、さまざまな傾向のデータが存在する。これらのことから、申請者は時間知覚の脳内機構ではストラテジーの多様性が想像以上に大きいのではないかと考えている。このような研究段階では、まず、データの蓄積が必要となる。従って、研究期間内には、課題構成を入念に検討した上で、前頭葉の複数の脳領域でのニューロン活動のデータを蓄積に努めた。課題構成としては、受動的に時間を計る認知的な課題や、指示された時間長でボタンを押し続ける時間生成課題などが考えられるが、時間生成課題では運動の要素が強いため、本研究課題では認知的な課題を採用した。それから、同じ認知的な課題でも視覚刺激を使うのか、聴覚刺激を使うのかといった違いもある。申請者の「異種感覚刺激を用いた時間弁別課題(研究の方法を参照)」では、認知的な課題で、視覚刺激と聴覚刺激の両方を用いる。同じ実験設定、同じ被験動物で感覚種を変えたことによる違いや、感覚種に依存しないニューロン活動のデータを得られることを期待した。申請者は、視覚と聴覚という異種感覚種を用いた時間弁別課題をサルに行わせて、主に前頭前野から単一ニューロンレベルの活動の記録した実績がある。まだデータが十分に収集できていないが、ある程度の傾向として、前頭前野には視覚情報にตอบสนองするニューロンが多く、聴覚だけ、もしくは、視覚と聴覚の両方にตอบสนองするニューロンは少ないことを示唆する結果が得られていた。また、時間長を呈示した後の遅延期間では、呈示時間長に依存して発火頻度が変わるニューロンも複数見出した。これらの予備的な結果を元に、単一試行内で視覚刺激と聴覚刺激の両方を使って時間を呈示したときに、前頭葉の中の前頭前野や運動前野のニューロンは、どちらの感覚種の時間も同じように処理するのか、もしくは、感覚種によって異なる処理をするのかを明らかにしたいと考えた。また、先行研究では、実験動物に3つの時間カテゴリを生成させた実験はあるが、認知的な3つの時間長カテゴリを使った実験はこれまでになく、よりアナログ的な時間の計測に即したデータが得られるものと考えた。これらの実験データを通して、時間の長さを脳内で表現する際に、前頭葉が具体的にどのような役割を果たしているのかということについて、時間長のパラメータを変えた応答性や、応答の時間特性などを詳しく解析することで明確にすることを目指した。

(2) 本研究の特色・独創的な点は、1) 時間呈示に視覚刺激と聴覚刺激の両方を用い、2) 3つの時間カテゴリを区別する認知的課題を採用し、3) 前頭葉内の複数の脳領域から単一ニューロン活動データを記録することで時間知覚における前頭葉の役割を理解しようとしている点

にある。1)については、物理的な時間の長さは、視覚刺激で与えても聴覚刺激で与えても変わらないにもかかわらず、これまで、時間知覚の脳内機構を調べる動物実験においては、申請者も含めて視覚刺激か聴覚刺激を使った研究しか行われてこなかった(Chiba et al. 2015, Oshio 2011, Oshio et al. 2008, Chiba et al. 2008, Oshio et al. 2006)。異種感覚刺激をもちいて単一ニューロンレベルで時間知覚の脳内機構を調べる試みは世界で論文発表がなされていない独創的なものである。2)について。3つのカテゴリで時間知覚を調べた研究は時間生成しかなく、認知的な課題では実験の実施例がない。3)について。視覚、聴覚、体性感覚、味覚、嗅覚という5感の全ての情報が集まるのが前頭前野で、運動前野は、前頭前野などとループ回路を形成することが分かっている。いずれも、脳機能イメージング実験で時間知覚との関連が強く示唆されるデータが報告されている。本研究課題は、それら相互のシステムの関係性の下に時間知覚における前頭葉の役割を解明しようとする独創的、かつ挑戦的なものである。

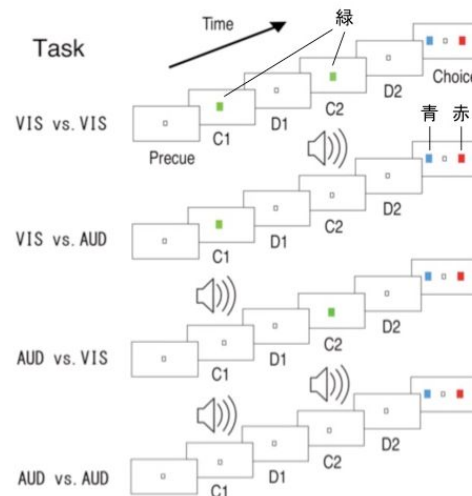
### 3. 研究の方法

(1) 概要：サルに「異種感覚刺激を用いた時間弁別課題」と「時間3分割課題」で数百ミリ秒から5秒程度の時間長を区別するトレーニングし、その課題遂行中に単一ニューロン活動を細胞外ユニットレコーディング法により単一ニューロンレベルで記録した。2つの課題を別の個体に対して与えて同時進行した。予備的な実験はすでに済ませてあった。トレーニング期間を経たのち、前頭前野や運動前野からニューロン活動を記録した。ニューロン活動データを解析することで、感覚刺激種に対する応答、呈示された視覚刺激の持続時間の計測過程、コードした時間の比較過程における前頭前野や他領域の機能的役割を検討した。

(2) サルに課した2つの時間弁別課題は以下通りである。

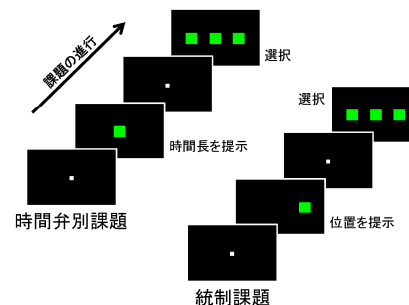
#### 異種感覚刺激を用いた時間弁別課題

この課題では、サルに視覚刺激と聴覚刺激という異なる感覚種で時間長を呈示した。視覚刺激の場合は、時間的に変化しない色のついた図形(緑色の四角形)を、聴覚刺激の場合は、スピーカーからの2,000Hzの純音を用いた。また、それらの両方を同時に用いるのではなく、いずれか一方を使って時間長を呈示した。サルには、2つ続けて呈示された時間長のうち、より長く呈示された時間長を選択させた。課題の流れは、右図の通りである。サルが保持用のボタンを押すと課題が開始され、ディスプレイ中央に小さい白色の四角形が固視用の目印として1秒間表示させる。引き続き、1番目の時間長(C1、視覚刺激か聴覚刺激)を呈示。固視用の小さい白色の四角形を表示される1秒間の遅延期間の後、2番目の時間長(C2、視覚刺激か聴覚刺激)を呈示。時間長を呈示する感覚種の順序パターンは、視覚/視覚、視覚/聴覚、聴覚/視覚、聴覚/聴覚の4つがあり(上図参照)感覚種によらず時間長を区別させた。1秒の遅延期間後に青色と赤色の四角形を左右に並べて同時に表示した。ここで、青色と赤色の四角形は、それぞれを1番目と2番目の時間長に意味づけるようトレーニング期間に教示しておくことで、サルは感覚種に関わらずより長く呈示された時間長を選択できるようになった。



#### 時間3分割課題(3つの時間長カテゴリを区別する時間弁別課題)

これまでに行われてきた時間知覚の実験では、時間長を長短の二者択一させる課題が大半で、時間長を単に長短に分類する情報処理過程が調べられてきた可能性も否定できない。そこで申請者は、3つの時間長を区別する実験課題を構築し、脳内ストップウォッチの解明に挑んだ。この課題では、サルに3つの時間長カテゴリを区別させた。短い時間長カテゴリ: 0.8, 1.0, 1.2秒。中程度の時間長カテゴリ: 1.6, 2.0, 2.4秒。長い時間長カテゴリ: 3.2, 4.0, 4.8秒。時間長の呈示は視覚刺激(緑色の四角形)を用いた。サルが保持用のボタンを押すと課題が開始され、ディスプレイ中央に小さい白色の四角形が固視用の目印として1秒間表示した。引き続き、時間長を視覚刺激で呈示したが、時間長は3つの時間長カテゴリからランダムに選び、さらに当該カテゴリに含まれる3つの時間長のうち一つをランダムに選んで呈示した。1秒の遅延期間後に緑色の四角形を3つ横に並んで表示した。このとき、表示される位置が左なら呈示時間長が「短い」、中央なら時間長が「中程度」、右なら時間長が「長い」ことをトレーニング期間に教示した。位置への選択性の影響を排除するため、呈示された視覚刺激の位置を記憶する課題もトレーニングし、時間弁別課題を遂行中の活動を記録したニュー



ロンは、引き続いて、この位置課題を行った。課題の切り替えはサルには明示しないが、試行錯誤で気付くことは予備実験で確認した。

(3) 上記2つの課題に対するニューロン活動記録実験について説明する。それぞれの課題で段階を追ってトレーニングを進め、サルが課題を十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に入った。実験は暗くした防音防電磁波のシールド内にて行った。モンキーチェアに座らせたサルの30cm前には、6.5インチ・コンピューターディスプレイとボタン（保持用と視覚刺激選択用）とスピーカー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設置した。サルが1.5秒以内にボタン押しで正解すると報酬（フルーツジュース）を与えた。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ー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観察した。トレーニング期間は、約半年から1年かかった。ニューロン活動記録実験では、頭部をステレオに固定し、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）で刺入した。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点テン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。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。ニューロン活動を記録する脳領域は、前頭前野と背内側運動前野とした。また、ニューロン活動記録実験と平行して、別のサルのトレーニングも進めた。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、より詳細なデータ解析を進めた。運動前野や頭頂葉からも記録した。それらのデータからの時間知覚における前頭葉の機能的役割を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 1年目（2017年度）運動前野は前頭葉にある脳領域で、脳の情報処理の流れでは一次運動野の一つ上流に位置する。ヒト以外の霊長類で、時間長の情報処理に内側運動前野のニューロンが関わっていることを示した論文がある（Marchant et al., 2014, 2015）。その論文では、リズム的な動作をしているときに、経過した時間などを表現するニューロンが見つかったと報告されている。このことは、前頭葉の中で運動前野も時間長の情報処理に何らかの役割を果たしていることを示すもので興味深い。申請者は以前、時間長を弁別する課題の遂行中に、補足運動野（SMA）のニューロン活動を記録した経験がある。運動前野はそもそも運動に強く関連しているが、補足運動野の下流にあたる脳領域であり、時間情報処理にも関わっている可能性は高い。実は、この内側運動前野は当初、研究期間の2年目に取り組む予定にしていたが、いろいろな情報を総合的に判断した結果、前倒して1年目に記録実験を実施した。実験の結果、内側運動前野では、申請者の実験課題でも時間長の弁別に関わるニューロンが見つかった。例えば、視覚刺激の開始から1秒くらいで一時的な発火を示すニューロン、刺激の開始から1.5秒くらいで持続的な発火を示すニューロン、視覚刺激が終了した後で時間長のカテゴリに応じた異なる発火頻度を示すニューロンなどある。パイロットデータとして、平成29年7月の日本神経科学大会では、1頭のサルから得られたデータを、平成30年3月の日本生理学会大会では、2頭のサルから得られたデータを発表した。

(2) 2年目（2018年度）2017年度に開始した時間3分割課題での背内側運動前野のニューロン活動の計測を引き続き行った。申請者は以前、補足運動野（SMA）のニューロン活動を記録した。背内側前頭皮質の運動前野はそもそも運動に強く関連しているが、補足運動野の下流にあたる脳領域であり、時間情報処理にも関わっている可能性は高い。実験の結果、課題に関連するニューロン活動を多数記録できた。視覚刺激の開始から1秒くらいで一時的な発火を示すニューロンは、発火頻度がピークを示す時間は視覚刺激の開始から1.1秒を中心に分布していた。短い時間長では1.0秒前後の時間長を提示しており、このタイミングで視覚刺激が消えるかどうか、つまり、短い時間長の視覚刺激をフィルタリングしているニューロンが背内側運動前野にあると考えられる。他にも、そのフィルタリングの結果を記録するかのように引き続く遅延時間に発火頻度が高くなるニューロンや、逆に、中程度や長い時間長の視覚刺激の後の遅延時間に発火頻度が高くなるニューロンもあった。これまでに記録した背内側運動前野では、応答性の特徴としては一時的に発火頻度が高まるニューロンが多く、また、時間長としては短い時間長カテゴリに応答するニューロンが多い傾向にあった。

2年目は実験装置の不具合が多く、実験が進められない時期もあったので、過去に取得していた、視覚刺激と聴覚刺激の両方を使った実験データの解析も進めた。前頭前野のニューロン活動を調べたところ、聴覚刺激より視覚刺激に反応するニューロンの方が多く、また、発火頻度も視覚刺激のときの方が高い傾向にあった。特定の感覚種に反応したり、特定のタイミングで反応したりするなど多様性に富んだニューロンも見出された。視覚刺激と聴覚刺激への反応

の違いから、前頭前野では時間だけを抽出した処理がなされるのではなく、感覚種に依存した処理に関わっている可能性があると考え。2018年7月の日本神経科学大会では、時間3分割の実験データを、2019年3月の日本生理学会大会では、視覚刺激と聴覚刺激の両方を使った実験で得られたデータを発表した。

(3) 3年目(2019年度)実験機器の不具合を修復させながら実験を進めた。その解析結果を元に時間長の弁別における背内側運動前野の機能的役割を検討した。また同じ実験課題で前頭前野からも記録した。また、感覚種に依存しないニューロン活動も前頭前野のデータ解析を中心に調べた。実験に使った時間長は、0.2秒、0.6秒、1.0秒の3パターン。これを視覚刺激か聴覚刺激でサルに提示した。サルに2つの時間長を続けて提示したのち、長い方を選択させた。課題遂行中の内側運動前野と前頭前野(どちらも前頭葉にある脳領野)のニューロン活動をユニットレコーディングで記録したところ、いずれの脳領野でも感覚種に依存せず時間長の情報をコードしたニューロンが見つかった。各領野の役割の相違については、今後の詳細な解析が必要である。また、脳内に時間を計る中枢があるとすると、感覚刺激で提示される時間長を計るとき、外界からの感覚刺激がなく脳内で時間を生成するときとで、その中枢のニューロンが情報処理に共通して関わっているはずである。そのことを調べる実験を急遽追加で行った。実験に使った時間長は、0.8秒、1.6秒、3.2秒の3パターン。まず、そのいずれかの時間長を緑色の四角形で提示した(時間長計測)。続いて、赤い四角形が提示され、決まった時間が経過した時にボタンを離すと報酬としてジュースを与えた(時間長生成)。時間長計測で0.8秒、1.6秒、3.2秒のそれぞれに対して、時間長生成は3.2秒、1.6秒、0.8秒とした。データが取れ始めたところだったが、時間長計測と時間長生成の両方で課題依存の反応を示すニューロンが前頭前野で見つかった。研究成果は、学会発表として2件行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chiba A, Morita K, Oshio K, Inase M	4. 巻 69(1)
2. 論文標題 Interval timing of visual and auditory cues for duration discrimination in monkey prefrontal cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 S140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chiba A, Oshio K, Inase M	4. 巻 68(1)
2. 論文標題 Neuronal activity involved in temporal classification in the monkey medial premotor areas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 S158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chiba A, Morita K, Oshio K, Inase M	4. 巻 70(1)
2. 論文標題 Neuronal activity of the monkey prefrontal cortex in a duration estimation and production task	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 S141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 千葉惇, 生塩研一, 稲瀬正彦
2. 発表標題 サル背内側前頭皮質の神経細胞における時間認知機構
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiba A, Morita K, Oshio K, Inase M
2. 発表標題 Interval timing of visual and auditory cues for duration discrimination in monkey prefrontal cortex
3. 学会等名 第96回日本生理学会大会, Federation of the Asia and Oceanian Physiological Societies 9th meeting (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉惇、生塩研一、稲瀬正彦
2. 発表標題 サル前頭前野と内側運動前野における特徴的な時間計測関連活動
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 千葉惇、生塩研一、稲瀬正彦
2. 発表標題 サル内側運動前野における時間 3 分類課題の神経細胞活動
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉惇、守田和紀、生塩研一、稲瀬正彦
2. 発表標題 異種感覚刺激の時間弁別におけるサル内側運動前野での時間情報表現
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉惇、守田和紀、生塩研一、稲瀬正彦
2. 発表標題 時間知覚・生成課題におけるサル前頭前野の神経細胞活動
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし
------

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考