

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500230

研究課題名（和文） 時間弁別課題を用いた時間認知の神経機構の解明

研究課題名（英文） A study on neural mechanisms in time perception using duration discrimination task

研究代表者

生塩 研一 (OSHIO KEN-ICHI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30296751

研究成果の概要：脳の前頭前野や大脳基底核は時間計測に関与すると考えられていますが、具体的な役割は未解明です。我々は引き続き呈示された図形の表示時間の違いを弁別する課題をサルに与えて、その課題遂行中に個々の神経細胞の活動を調べました（大脳基底核では世界初）。前頭前野が時間の長短を大まかに分ける標準時間によってフィルタリングすること、また、大脳基底核が遅延期間で時間長を発火頻度で符号化していることを見出しました。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・認知科学

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，大脳基底核，
霊長類

1. 研究開始当初の背景

「時計を使わずに自分で10秒を計ってください」と言われたら、誰でもそこそこのタイムを出せるだろう。そのとき、実際には頭の中で「いち、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、人によっては足でリズムをとりながら10まで数えることで10秒を当てようとするであろう。この場合、1秒

を作り出すメカニズムが問題の本質となる。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秒を計ろうとするはずだ。この課題設定では被験者が人生経験の中で度々出会う1秒という時間長を長期記憶にちゃんと埋め込んでいるかどうかは鍵となる。

では、そもそもその1秒をどうや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をあまり惹かず、その脳内機構は未解明である。視覚や聴覚はそれぞれの感覚器が刺激を受容して、脳内のそれぞれの感覚野が情報処理を行う。一方、時間は感覚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。ヒトを使った fMRI や PET の脳機能イメージング実験、それから、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た。しかし、それら個々の領域で具体的に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のが現状である。

個々の脳領域の時間知覚における具体的な機能的役割を明らかにするには、電気生理実験（ユニットレコーディング）によって個々のニューロンレベルでの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 Sakurai et al. (2004) 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、遅延期間における前頭前野ニューロンの活動からその機能的役割を明らかにし、原著論文 (Oshio et al., 2006) 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。

- Oshio K, Chiba A, Inase M (2006) “Delay period activity of monkey prefrontal neurons during duration-discrimination task” *Eur J Neurosci* 23: 2779-2790.
- Niki H, Watanabe M (1976) “Prefrontal unit activity and delayed response: relation to cue location versus direction of response”, *Brain Res* 105: 79-88.
- Leon MI, Shadlen MN (2003) “Representation of time by neurons in the posterior parietal cortex of the macaque” *Neuron* 38(2): 317-327.
- Sakurai Y, Takahashi S, Inoue M (2004) “Stimulus duration in working memory is represented by neural activity in the monkey prefrontal cortex”, *Eur J Neurosci* 20: 1069-1080.

2. 研究の目的

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。また線条体は、視床などを介して前頭前野と解剖学的なループ回路を形成しているだけでなく、以前から指摘されている運動制御に加えて、最近、認知過程との関連が報告されている領域であり、申請者は前頭前野と関連した時間情報処理をしている可能性が高いと推察している。

本研究期間内には、まず、時間弁別課題の視覚刺激呈示期間（時間を計る期間）における前頭前野ニューロンの活動記録し、遅延期間における申請者らの知見と総合して、前頭前野の刺激呈示期間における機能的役割を解明する。引き続き、大脳基底核の線条体からもユニットレコーディングにより時間弁別課題遂行中のニューロン活動を記録し、視覚刺激呈示期間や遅延期間における線条体の機能的役割を明らかにする。

本研究の特色・独創的な点は、時間知覚の脳内機構について、1) 各試行で異なる呈示時間を用い（サルに与えた時間弁別課題は後述）、2) 前頭前野と線条体からユニットレコーディングにより単一ニューロン活動を記録して時間知覚の脳内機序を系統的に理解しようとしている点にある。これまで行われてきた時間知覚課題では、固定された「見本時間」と「テスト時間」との見本合わせ課題のように、固定された見本時間がよく採用されてきた。しかし、その場合、長期にわたるトレーニング期間中に何らかの形で見本時間が長期記憶され、それを元にテスト時間の長さを判断してしまうことが危惧される。一方、申請者は固定された見本時間ではなく、各試行で異なる呈示時間の2つのテスト刺激を継時的に呈示して、そのいずれの呈示時間が長かったかを判断させる呈示時間弁別課題を与えた。呈示時間の違いによるパラメトリックな効果を解析することで、初めて、明示的な時間情報処理の符号化過程などを調べるのが可能となる。また、申請者は脳機能イメージング実験から示唆された時間知覚関連領域の中でも前頭前野と線条体に注目し、視覚刺激呈示期間・遅延期間におけるそれらのニューロン活動を解析することで、時間知覚における前頭前野と線条体の機能的役割を解明することを目的とした。ちなみに、時間弁別課題遂行中の線条体ニューロン活動をユニットレコーディングで記録した報告は皆無であり、本研究課題の実験が世界初となる。

時間知覚の問題は、事象の時間的順序、運動のタイミング、それから音楽やリズム、さらには言語理解にも関わっており、それら知覚活動の脳内機序理解にも資するため、時間知覚の脳内機序解明が切望されている。また、ADHD(注意欠陥多動性障害)や統合失調症の患者の時間弁別能力が低いことから、時間弁別能力を症状の客観的な評価指標とする可能性や、その能力の改善を治療に役立てられる可能性もあわせもつ。

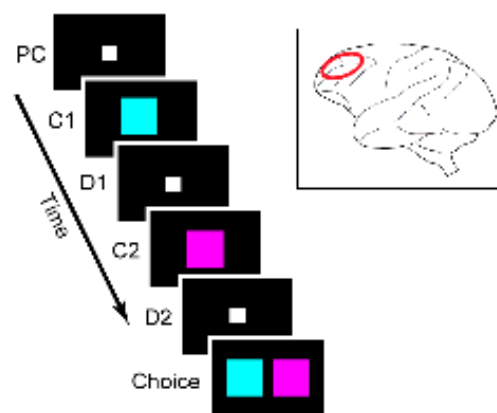
3. 研究の方法

サルに時間弁別課題を与えてトレーニングし、課題が成績よくできるようになった時点で、その課題遂行中に前頭前野と大脳基底核の線条体から単一ニューロン活動を記録した。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、サルが課題遂行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・選択期間におけるニューロンの発火の様子との関係を解析することで、視覚刺激呈示時間の計測過程、計測した時間情報の符号化過程、符号化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。1年目は主に前頭前野、2年目以降は線条体からのニューロン活動も記録した。

研究計画を遂行するための研究体制としては、基本的には申請者が単独で進め、申請者は研究代表者として本研究を職務として行った。

実験は暗くした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3つのボタン(1つは保持用、2つは応答用)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。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。本研究でサルに与えた時間弁別課題について説明する。時間的に変化しない色のついた図形(青色か赤色の四角形)を視覚刺激として用い、それがコンピューターディスプレイ上に表示されている間の時間をサルが計るべき呈示時間として与えた。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1秒間表示される。引き続いて、1番目の視覚刺激(青色か赤色の四角形)を表示。1秒の遅延期間後に2番目の視覚刺激(赤色か青色の四角形/1番目の視覚刺激と違う色)を表示。1秒の遅延期間後に視覚刺激である青色と赤色の四角形を左右にならべて同時に呈示し、呈示

時間が長い方の色を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。時間弁別する時間長としては認知過程とも関係が深い、数百ミリ秒から数秒より選んだ。具体的には、200ミリ秒から1600ミリ秒の間(200ミリ秒間隔)で約20ペアの長短呈示時間を予め決めておいて、各試行でそれらのペアからランダムに選び、呈示時間の長短の順序や赤青の順序もランダムに与えた。つまり、固定された見本時間を与えるのではなく、種々の刺激呈示時間のテスト刺激を2つ継時的に呈示し、そのいずれが長いかを判断させるのである。こうすることによって、固定された時間を長期記憶する可能性を回避でき、呈示時間を計って符号化する過程を調べられる。



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、頭部固定具を装着し、記録用ステンレスチャンバー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(FHS, USA)を刺入して細胞外記録法によりニューロン活動を拾った。電極は一次元油圧マイクロマニピュレータ(Narishige, JAPAN)を進めた。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。まず、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、時間知覚における前頭前野の機能的役割の解明を試みた。これまで、遅延期間のデータ解析を進めてきた(Oshio et al., 2006)ので、その知見に基づいて、刺激呈示期間のニューロン活動を中心に解析を進め、時間知覚における前頭前野の役割を絞り込んでいった。また、ニューロン活動記録実験と平行して、別のサルトレーニングも開始した。

前頭前野のニューロン活動記録実験を実施したのと同じチェンバーから、電極の刺入角度を調整するなどして線条体にもアプローチできたので、線条体からもニューロン活動を記録した。その記録実験によって得られた線条体ニューロン活動データについて、刺激呈示期間・遅延期間でオフライン解析し、時間知覚におけるニューロン活動記録領域の機能的役割の解明を試みた。

4. 研究成果

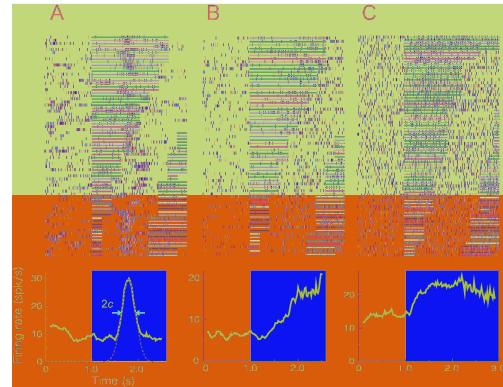
(1) 行動データ

サルが実際に時間弁別課題を行った際の行動データでは、1つの試行内で呈示した時間長のペアが同一であっても、長短の順序によって正答率が異なる場合が多かった。例えば、0.2秒が先で1.0秒が後の試行と、1.0秒が先で0.2秒が後の試行で正答率が異なっていた。もし、呈示された2つの時間長をそれぞれ独立に符号化してから両者を比較するのであれば、正答率は呈示された順序には依存しないはずだ。従って、今回の実験では1番目に呈示された時間長(C1)の符号化が2番目の時間長(C2)の符号化に影響を与えていた事が考えられる。そこで、C1呈示期間中に前頭前野でどのような時間情報処理が行われるのかを調べるため、個々のニューロンの活動データを解析した。

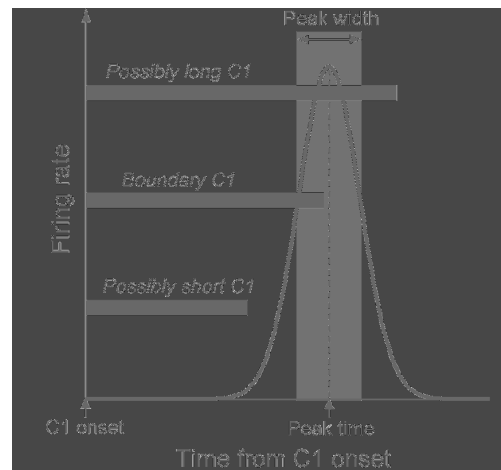
(2) 前頭前野ニューロンの機能的役割

2頭のサルから、847個の前頭前野ニューロンの活動を記録した。そのうち、C1期間中に発火頻度が増加したニューロンは160個であり、これらのC1応答ニューロンについて活動様式を詳細に調べた。C1応答ニューロンはC1期間中にいろいろな時間発展を示したので、各ニューロンの発火頻度ヒストグラムを階層的クラスター解析により分類した。類

似度のまとまり具合から、160個のC1応答ニューロンを10個のグループに暫定的に分類できた。各グループの平均発火頻度ヒストグラムから、さらに、単峰性の phasic タイプ(下図 A)、徐々に発火頻度が高くなる ramping タイプ(B)、高発火頻度を維持する sustained タイプ(C)、その他に分類できた。中でも、phasic タイプは全体の過半数(51.9%)を占めたので、これらのニューロンについてさらに解析を行った。



それらの発火頻度ヒストグラムは単峰性のピークが特徴的であり、そのピークを Gauss 分布で近似して、ピーク幅とピーク時間を求めた。ピーク幅は、0.4-0.6秒がもっともニューロン数が多かった。ピーク時間は、C1の開始時から0.7-0.9秒後がもっとも多かった。このピーク時間は、単にC1の視覚刺激に対する応答としてはかなり遅いタイミングであり、何らかの認知過程と関連があると考えるのが妥当である。今回の時間弁別課題において各試行でサルに呈示した、より短い呈示時間の平均とより長い呈示時間の平均との中間値は0.9秒であり、ピーク時間の最頻値に近い。つまり、phasic タイプニューロンは、呈示時間の長短を分ける基準の時間長を与え、それとC1の長さを比較する事で、C1が結果的に長いのか短いかを推定していると考えられる(下図参照)。



つまり、前頭前野は計るべき時間の呈示期間中にC1を長短のいずれかにフィルタリングする機能があると考えられる。このことは、エラー試行解析からも支持された。エラー試行のピーク時間を解析したところ、C1が短い試行ではピーク時間は早く、C1が長い試行では遅かった。これはピーク時間が長短の判断基準になっていたという仮説を支持する。

(3) 線条体ニューロンの機能的役割

時間弁別課題遂行中の線条体ニューロンの活動を個々のニューロンレベルで記録したのは、本実験が世界初である。

線条体ニューロンについては、C1後の遅延期間D1と、C2後の遅延期間D2でその活動を調べた。200個の線条体ニューロンの活動を記録したところ、D1応答ニューロンは29個、D2応答ニューロンは113個だった。D1応答ニューロンは、直前に呈示されたC1の時間長に依存した活動を示すものが多く見られた。29個のD1応答ニューロンのうち、C1の時間長に対して正の相関を示した、つまり、C1が長いほどD1の発火頻度が高くなったのは11個(38%)、逆にC1の時間長に対して負の相関を示したのは6個(21%)であった。

113個のD2応答ニューロンのうち、C2が長い試行(SL試行)で発火頻度が高かったのは27個(24%)で、C2が短い試行(LS試行)で発火頻度が高かったのは86個(76%)だった。発火頻度が高かった方の試行タイプ(SLかLS)について、D1と同様に直前に呈示されたC2の時間長に対する依存性を調べた。LS試行で応答の強かったニューロンは、C2の時間長に対して、正の相関を示したのが8個(9%)、相関がなかったのは36個(42%)、負の相関を示したのが42個(49%)だった。SL試行で応答の強かったニューロンは、C2の時間長に対して、正の相関を示したのが8個(30%)、相関がなかったのは16個(59%)、負の相関を示したのが3個(11%)だった。LS試行で応答の強かったニューロンでC2に対して負の相関を示したものが多かったのが際立った。結局、線条体では時間長を砂時計のように発火頻度の大きさで符号化していることがユニットレコーディング実験によって初めて分かった。

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2件)

- ① 生塩研一、千葉惇、稲瀬正彦、Temporal filtering by prefrontal neurons in

duration discrimination、European Journal of Neuroscience、28巻、2333-2343、2008年、査読有

- ② 千葉惇、生塩研一、稲瀬正彦、Striatal neurons encoded temporal information in duration discrimination task、Experimental Brain Research、186巻、671-677、2008年、査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 生塩研一、時間弁別課題におけるサル前頭前野の機能的役割、日本物理学会第64回年次大会、2009年3月30日、東京
- ② 生塩研一、時間弁別課題中のサル線条体の時間処理、第31回日本神経科学大会、2008年7月10日、東京
- ③ 生塩研一、Neural activity of monkey prefrontal neurons in duration discrimination、科研費特定領域研究「統合脳」シンポジウム”Time in Brain”、2007年12月15日
- ④ 生塩研一、時間弁別課題中のサル線条体の手がかり期の神経細胞活動、第30回日本神経科学大会、2007年9月12日
- ⑤ 生塩研一、時間弁別課題の刺激呈示期間におけるサル前頭前野ニューロンの活動、第30回日本神経科学大会、2007年9月10日、横浜市

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・助教
研究者番号：30296751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし