

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500343

研究課題名（和文） 外部刺激の呈示回数認知に関する研究

研究課題名（英文） Numerical Counting of External Stimulation

研究代表者

嶋 啓節（SHIMA KEISETSU）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60124583

研究成果の概要：頭頂葉から記録された多くの細胞は待機期間の開始からキー・リリースを促がす運動開始信号の間に顕著な細胞活動を示した。待機期間中、多くの頭頂葉の活動は特定の動作回数に選択的であった。さらに、その細胞活動は待機期間の開始に整列するものと、その後に来る運動開始信号に整列するものに分類された。頭頂葉の前部の 1, 2 野の細胞の殆どは待機時間とは無関係な活動を示し、同時に運動関連活動も動作回数には殆どの場合無関係であった。加えて、後部頭頂葉の 7 野の細胞に関して動作回数に関連を示した例は少数であった。

この頭頂葉をムシモールで破壊すると、サルは課題遂行が困難になった。これらの結果は頭頂葉が動作回数および刺激回数のカウンティングに重要な働きをしており、その課題の遂行に関する責任部位のひとつであることを示している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：細胞活動、カウンティング、サル、ムシモール、可逆的破壊

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究で、嶋らはサルが一連の運動課題をあらかじめ決められた試行回数でのスケジュールで遂行している時の細胞活動を検討した結果、前補足運動野において、バイナリー符号化様式で行動の試行回数をモニターしていることを示唆する細胞活動があることを明らかにした（J. Neurosci. 2006 Shima et al.）。興味ある事は、それらの細胞の

半数は一連の運動シーケンスの奇数回数の試行時に活動し、残りの半数は偶数回数の試行時に活動を示すことであった。このような細胞活動はコンピューターなど二進法カウンティング機器で広く使われている動作原理と似ている。一方、この細胞活動の別の見方として、霊長類における奇数と偶数の概念発生の萌芽的現象と解釈することも可能である。この細胞活動は前補足運動野におい

て数多く認められたが、補足運動野および一次運動野ではほとんど見られなく、試行回数の認知に関与していることを示した。

これまでのいくつかの行動学の研究では、サルなどの霊長類が数の認識をしていることが発表されている。同時に、数認識課題を用いた実験で、特定の部位の細胞活動が数の認識と密接に関連することがわかってきた。例えば、先に紹介した論文に先行する実験で、申請者らは自らが行う運動回数のカウンティングに頭頂葉の体性感覚野が関与していることを明らかにした (Sawamura, Shima & Tanji, Nature, 2002)。一方、スクリーンに呈示されたシンボルの数を認知する課題で Nieder ら (Science, 2002) は前頭前野の細胞活動を調べ、数の認識に前頭前野が関与していることを示した。

2. 研究の目的

申請者がこのプロジェクトで着目し明らかにしようとしているのは、外部から呈示された刺激の回数認知は脳のどの部位で、どのような神経機構によって成されるのだろうか、という問題である。その解明の手段として数認知課題遂行中のサルから単一細胞活動を記録し両者の関連を調べる。前頭葉 (前頭前野:46 野、前補足運動野、補足運動野)、頭頂葉 (SPL: 主に5野および7野) を主たる検討対象部位としてこのプロジェクトを進めた。

細胞活動の記録部位の根拠について以下に記す: ヒトおよびサルなどの霊長類での脳機能画像によるイメージングによって、数に関する情報が脳のどの部位で処理されているのかを明らかにしようとした研究は最近盛んに行われるようになってきた (Dehaene ら、Science, 1999、Trends Neurosci. 1998; Brannon と Terrence ら、Science, 1998; Eger ら、Neuron, 2003)。また、ヒトでの大脳の頭頂葉の障害例において、簡単な計算、たとえば $3 - 1$ あるいは $6 \div 3$ のような問いに正しい答えが出せなくなることが報告されている (Dehaene & Cohen, Cortex, 1997)。一方、Nieder & Miller (Proc Natl Acad Sci U S A, 2004; Science, 2002) は前頭前野の細胞が視覚的に呈示された対象物の数に依存した活動を示すことを報告している。これらの研究は主に視覚情報に基づいて数の大小についての判定を行わせる課題がほとんどである。これまで申請者が計画しているような、呈示された事象の回数がどこで認知されているのかについての研究は皆無である。

研究では、外界に呈示された視覚、聴覚および振動覚刺激の回数の認知が脳のどの部位でどのような神経活動により支えられているのかを明らかにする。次に、その部位が実際に視覚・聴覚・振動覚刺激の回数の認知

のための責任部位か否かの判定を GABA アゴニスト局所投与による可逆的破壊実験で調べる。

数の認知に関する従来の研究は、呈示された特定の視覚画像の個数の認知にどのような神経活動が寄与しているのか、一方、申請者らが報告したのは、自らが行った運動の回数の認知に関するものである。何れの研究も数の認知に関する研究でマイル・ストーンとなるものとおもわれる。本研究では視点を全く変えて、外部から呈示した感覚刺激の回数がどのように認知されているのかに着目した点が特色であり独創的であると考えられる。従って、自己動作および視覚刺激の数のカウンティングがそれぞれ脳のどの部位で情報処理されているのかを知る事は非常に興味深く、この研究で回答を得ることができる。加えて、呈示刺激の回数に関して奇数回および偶数回の概念の萌芽がサルで起きているのか否かを具体的に検証できる。

3. 研究の方法

(1) 運動課題

日本サルを訓練して、外部に与えた種々のモダリティーの刺激の呈示回数を認知し、適切な反応を選択する課題を学習させる。本年度行う課題では、サルは視覚、聴覚および振動覚刺激の呈示回数に基づいて行う動作を決めなければならない。

コントロール課題

認知運動課題の各試行はサルが右手に装着したハンドルを決められた位置に保った後に開始した。ハンドルを待機位置に保つと 1 - 2 秒後に低い音が鳴り始めサルに待機期間が始まったことを知らせる。待機期間 (1.4 - 7.5 秒) 後に運動開始のトリガー信号としてモニター画面中央に赤色の信号 (5 X 5 cm の四角形) を提示する。サルはこの信号を合図としてハンドルを「押す」あるいは「引く」の運動を行う。行った動作が正解の場合には報酬としてジュースを与え、これを 1 試行とした。本課題では正解となる動作 (例えば「押す」) を 5 試行連続して行った後、もう一方の動作に切り替え (例えば「引く」)、その動作を 5 試行繰り返す。5 試行以内で動作を切り替えた場合、あるいは 6 試行以上同じ動作を続けた場合はエラーとし、報酬を与えない。すなわち、サルが最も効率良く報酬を得るためには 5 試行毎に動作を切り替えることが要求される。サルが特定の時間間隔を手がかりにして動作を切り替えるのを防ぐために同一動作 5 試行に要する時間 (1 ブロックとする) を 20 - 46 秒にした。

サルの学習課題: 白色モニター上に 1 秒間提示される視覚画像 (5 X 5 cm の赤の四角形)、聴覚刺激 (500 Hz のトーン刺激) あるいは

振動刺激（胸部に装着した振動装置による）の回数に応じて、運動トリガー信号（直径 5 cm の緑の円形を提示）後、刺激の呈示回数に応じて2種類のターゲット（左・右のボタン）の内から特定のひとつを選択して押させる。呈示された刺激の数が1, 3, 5回の場合は左ボタンを押し、2, 4回の場合は右ボタンを押さなければならない。モニターの背景が黄色の場合は要求する動作を逆転させる。すなわち、呈示された刺激の数が1, 3, 5回の場合は右ボタンを押し、2, 4回の場合は左ボタンを押さなければならない。呈示刺激の間隔はランダムとし、運動選択に時間の手がかりを与えないようにする。この認知課題の特徴は呈示刺激の回数の認知のみならず奇数・偶数の認知に特定の細胞がどのように関与しているのかを知る事ができる点である。単一細胞活動および筋電図（前肢、体幹および下肢）の記録は我々がこれまで行ってきたのと同様の方法でおこなう（J.Neurosci. 2006; Nature 2007, 2002）。各試行において、待機期間中の筋電図を詳細に検討し、特定の動作回数、或いは特定の動作に特化した筋活動がないことを確認する。

焦点となる部位を細胞活動記録により探索し細胞活動の特徴を明らかにし、次にムシモールの効果を調べる。これにより、外部に呈示された刺激の回数のモニターなどに関与する部位に関して、実際上の責任部位か否かを明らかにする。焦点となる部位は、前頭前野、前補足回運動野、上・下頭頂葉(5, 7a, 7b 野を中心として)であると推察している。

現有の多細胞活動同時記録システムを用いることにより、速やかな投与部位の探索・決定を行い、設備備品として申請した「マイクロインジェクター」（バイオリサーチ K.K）を用いてムシモール（5 µg/µl）2µl を微量投与し、その際の行動変化を調べる。具体的には、まずサルが遂行する初期の試行をコントロール・データとする。次に、ムシモールの注入を開始し、その際のデータを連続して取り込む。1-100 試行および1500 以上の試行では動作の安定性が不十分であるため注入実験のデータとして使用しない。ムシモールの注入実験は最短のインターバルでも1週間に1回とし、十分な回復期間を設けた。

ムシモール注入実験終了後、トレーサー（5% Diamidino yellow :DY, 5% Fast blue :FB, および5% WGA-HRP）を目的とする部位に注入する。3週間（DY および FB）および3日（WGA-HRP）の生存期間の後、過量のネンブタール（50mg/kg, i. p.）を投与してサルを麻酔し、りん酸緩衝液（pH 7.4）と10%ホルマリン液でかん流する。脳の凍結連続組織標本（厚さ：50µm）を作製し、必要な処理

を行った後、コンピュータと連動する顕微鏡を用いることにより神経連絡部位を明らかにすると同時にどの程度（範囲と密度）の神経連絡があるのかを定量的に解析する（NeuroReport, 2004, 2002, Nerusci. Res., 2005, 2001）。

その際のデータを連続して取り込む。1-100 試行および1500 以上の試行では動作の安定性が不十分であるため注入実験のデータとして使用しない。ムシモールの注入実験は最短のインターバルでも1週間に1回とし、十分な回復期間を設ける。

ムシモール注入実験終了後、トレーサー（5% Diamidino yellow :DY, 5% Fast blue :FB, および5% WGA-HRP）を目的とする部位に注入する。3週間（DY および FB）および3日（WGA-HRP）の生存期間の後、過量のネンブタール（50mg/kg, i. p.）を投与してサルを麻酔し、りん酸緩衝液（pH 7.4）と10%ホルマリン液でかん流する。脳の凍結連続組織標本（厚さ：50µm）を作製し、必要な処理を行った後、コンピュータと連動する顕微鏡を用いることにより神経連絡部位を明らかにすると同時にどの程度（範囲と密度）の神経連絡があるのかを定量的に解析する（NeuroReport, 2004, 2002, Nerusci. Res., 2005, 2001）。

（2）細胞活動の記録

サルが上述した運動課題を正解率 95%以上で遂行できるようになったあと、細胞活動を記録するための手術を無菌的に行った。手術は塩酸ケタミン（2mg/kg）とネンブタール（30mg/kg）麻酔下で行い、細胞活動記録部位上部の頭蓋骨を歯科用ドリルで取り金属性チェンバーをのせた。細胞活動の記録は標準的な方法で行った(5)。記録部位は SPL である。記録部位の主要なところには通電によって微小破壊痕をつくり記録部位同定のための印とした。

（3）組織標本

実験終了時、過量のネンブタール麻酔下でサルを生理食塩液、次いで、3.4%ホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液（PH7.4）でかん流した。更に3.4%ホルムアルデヒドを含む10%と20%のサッカロースリン酸緩衝液でかん流した後、脳を取り出し3.4%ホルムアルデヒドを含む20%のサッカロースリン酸緩衝液中に保存した。2-3日後、矢状断で50µmの厚さの連続凍結切片を作製した。切片はニッスル染色し細胞活動記録部位の同定を行った(7, 14)。

4. 研究成果

SPL の細胞は待機時間の開始から運動開始の間に活動を示すものが大多数であった。しかし、その活動は運動開始に向かっている漸

増的なものも認められたが、待機時間の開始から運動開始まで持続的に続くもの、あるいは待機時間の開始時にもっとも大きな活動を示し、その後徐々に活動が減少していくものが多かった。待機期間の特定の時期に活動を示す細胞も認められた。また、多くの細胞は複数の待機時間に大きな活動を示した。

図1に示した5個のSPLの細胞はそれぞれ動作の1回目、2回目、3回目、4回目或いは5回目の時に最大の活動を示している。

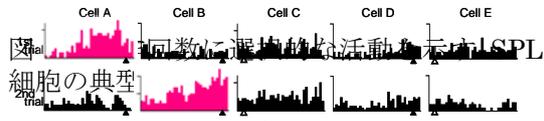


図1の他に、図には示していないが複数の動作回数で、待機時間の開始直後に大きな細胞活動を示す細胞も認められた。また、図の動作回数を選択すると、活動の上昇を示す細胞の多くは、動作の種類に依存する活動を示した。図2には実際にサルが課題を遂行している時の行動パターンを示した。

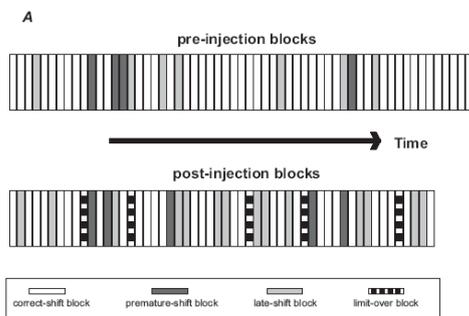


図2、ムシモール投与前後のサルの行動様式の典型例

ムシモール投与前は殆どのブロックで成功しているのに対して、ムシモール投与後では同じ動作を5回連続して成功することが著しく減少し、4回の動作で動作を変更したり、6回同じ動作を繰り返してしまうことが多いことがわかる。また、途中で課題を中断してしまうことが顕著にみられるようになった。

図3には課題遂行時の成功率の推移をけいじ的に示した。この図から明らかなように

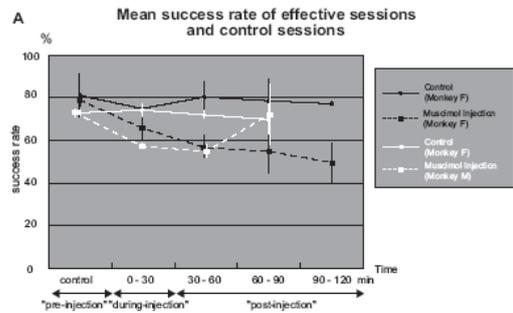
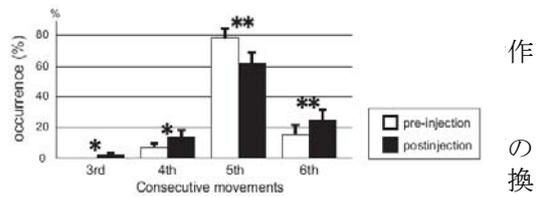


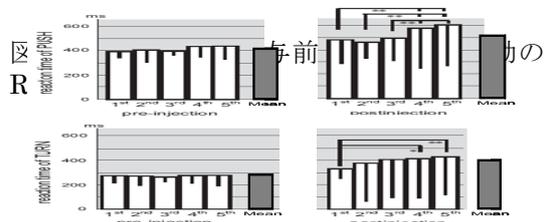
図3、ムシモール投与前後のサルの行動の成功率の推移

ムシモール投与前は80%近くの成功率を示しているのに対して、投与後では約50%に低下する。また、興味あることに、両側のSPLにムシモールを投与したサルFでは時間が経過しても行動の傷害がムシモール投与前の値には回復しなかったのに対して、片側の脳にムシモールを注入したサルMでは1時間30分後にはコントロール時の値に回復した。また、図4には薬物投与前と投与後における動作の詳細を示した。この図から明ら



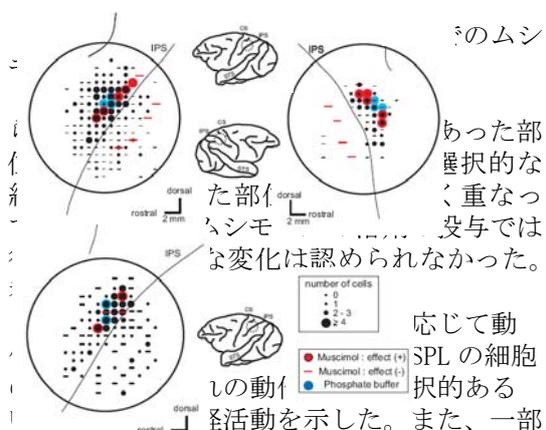
るブロックが殆どであるのに対して、ムシモールを投与した後では4回あるいは6回の連続動作で、次の動作を切り替える割合が有意に増加していることがわかる。また驚くべきことに、ムシモール投与後では3回の連続動作の後で、次の動作の切り替えをするブロックも見られた。この現象はムシモール投与前には皆無であった。

図5には動作回数の推移とRTの関係を示したが、ムシモール投与前に比較して、投与後ではRTの平均値が有意に上昇していた。



また、試行回数での RT の変化を詳細に検討してみると、コントロールでは動作の回数が増しても RT の有意な変化は認められなかったが、ムシモール投与後では動作回数が増すにしたがって RT の長さが遅延する様子が見て取れる。ムシモール投与後に試行回数での RT の変化の統計検定してみると、試行前半部と後半部では有意差が認められた。また、特徴的なことは、この現象は動作の種類に関わらず認められた。一方、反応時間 (MT) はムシモール投与前後において有意な変動を示さなかった。また、試行回数における有意差も認められなかった。

このようなムシモールの効果は SPL に投与された時のみ発現し、後部頭頂葉では認められなかった (図 6)。また、この図から明



のムシモールの効果は、後部頭頂葉では認められなかった。また、一部の細胞では複数の動作回数での細胞活動が認められた。このような行動時にムシモールを SPL に注入すると、いろいろな種類のエラーが認められた。しかし、動物は同じ動作を 7 回継続することはなかった。後部、頭頂葉へのムシモールの注入では傷害は認められないことから、これは SPL に選択的な現象であることが明らかであり、この部位が動作回数のカウントの責任部位であることが示唆された。これらの結果は前頭前野、補足運動野および前補足運動野ではこのような細胞が認められなかったことから、回数表現は SPL 内で発現し、統合された情報が前頭葉に伝送されているものと思われる。すなわち、

この実験で用いた課題遂行において SPL, 前補足運動野はそれぞれの異なった機能に關与している可能性があり、前頭前野は課題全体の統合、進行過程により深く關与していることが示唆された。

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 4 件)

① Mita, A., Mushiake, H. and Shima, K., Matsuzaka, Y. and Tanji, J. (2009)

Interval time coding by neurons in the presupplementary and supplementary motor areas.

Nature Neurosci., 印刷中、査読有り

② Wang, Y., Matsuzaka, Y., Mushiake, H. and Shima, K. (2008)

Spatial distribution of cingulate cortical cells projecting to the primary motor cortex in the rat.

Neurosci. Res., 60:406-411 (2008)、査読有り

③ Tanji, J. Shima, K., and Mushiake (2007)

Concept-based behavioral planning and the lateral prefrontal cortex.

Trends in Cog. Sci., 11:528-534、査読有り

④ Shima, K., Isoda, M., Mushiake, H. and Tanji, J. (2007)

Categorization of behavioral sequences in the prefrontal cortex.

Nature, 445:315-318、査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋 啓節 (SHIMA KEISETSU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：6 0 1 2 4 5 8 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし