

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500356

研究課題名（和文）霊長類の記憶形成・貯蔵における睡眠の機能的意義

研究課題名（英文）Significance of sleep for memory formation and storage in primates.

研究代表者

田村了以（TAMURA RYOI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授

研究者番号：60227296

研究成果の概要（和文）：本研究では、記憶形成の首座とされる海馬の神経活動を覚醒時と睡眠時で比較・解析することにより、霊長類の記憶形成・貯蔵における睡眠の機能的意義を明らかにするため、サルが実験室のケージ内で夜間に眠っているに眼球と筋肉の動き、各種神経活動などを記録し、睡眠ステージと海馬神経活動との相関を解析した。その結果、ノンレム睡眠時（記憶固定が起こる時期）に、低周波数領域の海馬脳波の出現が増加するとともに海馬の興奮性上昇を意味する脳波（リップル波）とニューロン発火が増加することが明らかになり、これが記憶固定に関わる神経基盤の一つであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study we recorded eye movements, muscle activities, scalp EEG, hippocampal EEG and hippocampal unit activities in the monkey during nocturnal sleep, and analyzed correlation between sleep stages and hippocampal neural activities in order to clarify the functional significant of sleep in the formation and storage of memory in primates. As a results we found that low frequency components of hippocampal EEG increased during non-REM sleep (a period in which memory consolidation is thought to be occur) accompanied by increases in hippocampal activities such as ripples and unit activities. These changes in hippocampal neural activity could be the neural substrate for memory consolidation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：認知、記憶

1. 研究開始当初の背景

海馬は記憶形成の首座として知られている。記憶は海馬神経回路内のシナプス結合強度の変化（シナプス可塑性）として形成され、

またその記憶痕跡は少なくとも一定期間は海馬内に貯蔵されると考えられている。1960年代から睡眠と記憶との関連性を明らかにしようとする研究が進み始め、今日ではとり

わけ睡眠と記憶固定との関係に注目が集まっている。睡眠が記憶固定を促進するとの知見が多く報告されている一方で、夢は覚醒後速やかに忘却されてしまうことは周知の事実であるとともに、「睡眠中に夢を見ることは、むしろ望ましくない記憶を排除する機能である」との仮説や「睡眠が記憶固定を促進する明確な証拠はない」との意見もあり、いまだに見解の一致を見ない。これまで、睡眠時に海馬の脳波やニューロン活動は特徴的な変化を示すことがげっ歯類を用いた研究より報告されてきた。例えば、ノンレム睡眠時には、海馬脳波上、鋭波が優位に出現するが、このとき錐体細胞の放電頻度は増加し群発放電を起こす傾向がある。一方、レム睡眠時には周期性徐波（いわゆるシータ波）が優位に出現し、錐体細胞の発火頻度は低下して群発放電はほとんど見られなくなる。

しかし、ヒトを含め霊長類で、海馬における神経活動の睡眠による影響を調べた研究は極めて少なく、またその知見が必ずしも一貫していない。

2. 研究の目的

本研究では、サルを用い、覚醒時または睡眠（ノンレムおよびレム）時に、海馬の歯状回または CA1 領域から脳波とニューロン活動を記録し、睡眠時の脳波の特徴（優位となる周波数帯域）とニューロンの発火特性（放電頻度や群発放電する傾向および脳波との相関）を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 被検動物と馴化訓練

2頭のニホンザルを用いた。神経活動記録用実験室に近赤外線 CCD カメラを取り付けたケージを設置し、サルを首輪とロープを装着した状態で週に2日、20時から翌朝9時まで夜間の睡眠訓練を行った。

(2) ヘッドホルダーの取り付けと各種電極の慢性埋め込み

上記の馴化訓練終了後、ペントバルビタール麻酔下でサルの頭蓋骨にヘッドホルダーを取り付けた。この手術から最低2週間の回

復期間をあけ、ケタミン・メドミジン麻酔下で脳地図上、海馬直上と推定される部位にマーカー用のタングステンロッドを刺入・固定した。脳定位固定装置から頭部を取り外した後、サルをMRIセンターに移送し頭部のMRIの撮像を行った。

電極埋め込みでは、まず、MRI上のタングステンロッド先端座標から、刺激電極および誘発電位記録用電極の刺入座標を決定した。サルをペントバルビタールで麻酔後、各電極を目的脳領域（刺激電極は貫通路、記録電極は歯状回または CA1 領域）の脳定位座標へ向けて刺入した。目的脳領域に近づいたら、刺激電極に電気刺激を加えながら、電極を徐々に深部方向へ進めていき、最大の誘発電位が記録される部位（歯状回門部および貫通路）を確認後、その位置で（歯状回記録）、または、その約1mm深部で（CA1領域記録）記録電極をヘッドホルダーに固定した。また、ニューロン発火特性を調べる研究では同じ要領で4本の被覆ニクロムワイヤーからなる電極（テトロード）を、CA1領域に埋め込んだ。

皮質脳波の記録のため、前頭骨にステンレス製ビスを2本埋め込み（F7とF8）、両電極間で差動記録を行った。眼電図（EOG）記録用にテフロン被覆ステンレス線を左右外眼角上方約5mmの部位の皮下にその先端が位置するように埋め込んだ。また同様のステンレス線を筋電図（EMG）記録用に脊柱起立筋内に挿入し固定した。

(3) 覚醒時および睡眠時の神経活動記録

電極の埋め込み・固定の手術的操作から回復期間（約1週間）をおき、サルを馴化訓練時と同じ実験室のケージに入れた。CCDカメラでサルの状態（覚醒-睡眠）と行動をモニターし、同時に皮質および海馬の脳波、EOGおよびEMGを記録した。記録シグナルは前置増幅器および主増幅器を介して増幅し、オシロスコープで各波形をモニターした。

(4) 記録データの保存と解析

上記の実験で記録されたサルの画像データはDVDメディア上に記録した。また電気生理学的データはAD変換後、コンピュータの

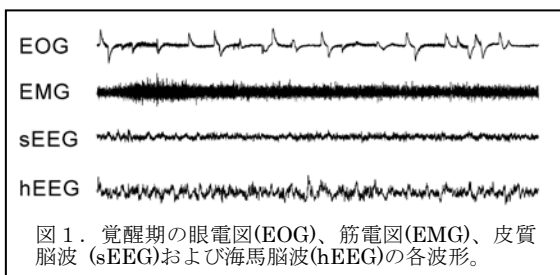
ハードディスク内に32.768秒(1セグメント)ごとに記録した。CCD カメラの画像、EOG、EMG および皮質脳波の1セグメントごとのデータから睡眠時期を覚醒時、睡眠ステージI-II、睡眠ステージIII-IV、REM睡眠期の4つの時期に分類した。サルの睡眠脳波はヒトの睡眠脳波と類似しており、ヒトを対象にする場合と同様に Rechtschaffen と Kales の基準を用いて睡眠ステージを分類した。海馬脳波と皮質脳波は各セグメント単位で高速フーリエ変換を行い各周波数成分のスペクトル振幅と睡眠時期との関連性を検討した。海馬の興奮性を意味する高周波振動(リップル)の検出は、記録波形から、まず100 Hzのハイパスフィルタにより高周波成分だけを抽出し、その波形を整流後に20 Hzのローパスフィルタを用いてエンベロープを抽出した。次に設定閾値を越えるエンベロープをリップル事象とし、各睡眠ステージにおけるリップル事象率(リップル事象数/セグメント時間)を計算した。テトロードから記録されたニューロン活動はオフラインで波形分離後、各睡眠ステージにおける発火数を計算した。睡眠の効果は睡眠率(全就床時間に対する全睡眠時間の割合)で表した。

4. 研究成果

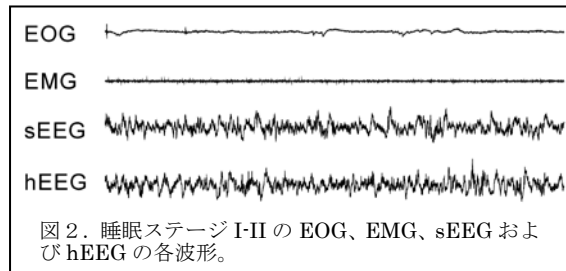
(1) サルの睡眠ステージ

サルは、覚醒時には開眼していることが多く、四肢の運動や姿勢の変換など、顕著な体動が認められたが、睡眠時は閉眼し座位で頭部を下垂していた。睡眠実験一回あたりの睡眠時間は7時間43分7秒~9時間59分39秒であり、平均睡眠率は73.74%であった。

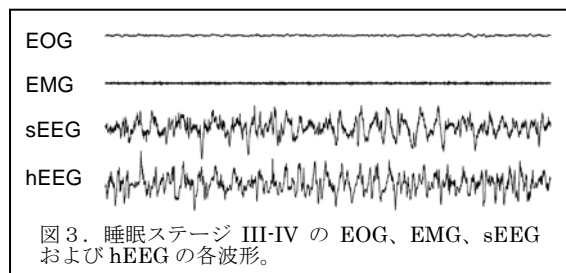
睡眠ステージは記録画像、EOG、EMG、皮質脳波所見から以下の①~④にわけた。



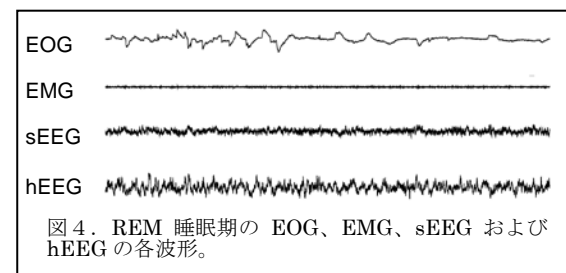
①覚醒期：皮質脳波は低振幅で速い種々の周波数が混在した波形が出現した。EMGは体動を、EOGは眼球運動をそれぞれ反映し大きな波形変動を認めた(図1)。



②睡眠ステージI-II：比較的低振幅で種々の周波数の混在した波形と振幅のやや大きな棘波が出現した。明瞭なK複合波や睡眠紡錘波は認められなかった。EOG上、緩徐な眼球の動きを認めたがEMG上では筋の動きはほとんど認められなかった(図2)。



③睡眠ステージIII-IV：皮質脳波上、高振幅な徐波が優位に出現した。EOGおよびEMG上で眼球、筋の動きをほとんど認めなかった(図3)。

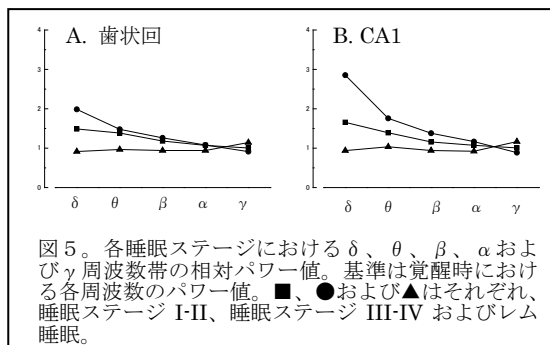


④REM睡眠期：睡眠ステージIに類似した低振幅で速い種々の周波数が混在した皮質脳波が出現した。EMG上で筋活動は認めないが、EOG上で明瞭な急速眼球運動を認めた(図4)。

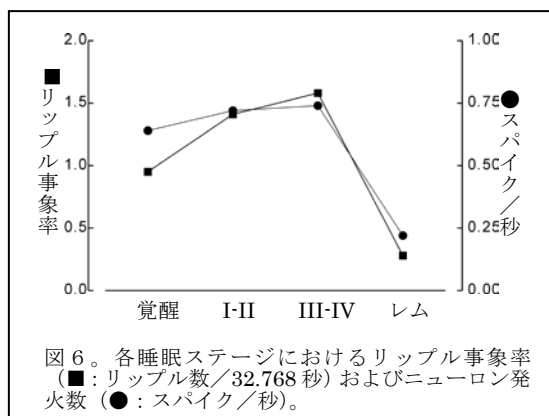
睡眠中の各睡眠ステージが占める平均の割合は睡眠ステージI-IIが67.70%、睡眠ス

ステージ III-IV が 10.35%、REM 睡眠期が 20.97%

(2) 海馬脳波の周波数スペクトル解析



歯状回における海馬脳波の周波数スペクトルの振幅は、覚醒時を基準とすると、 δ 帯域とは θ 帯域では non-REM 睡眠時に増加する傾向にあった。一方 REM 睡眠期では、いずれの帯域もわずかではあるが周波数スペクトル振幅は減少し、 γ 帯域だけはわずかに増加した(図 5 A)。CA1 領域における海馬脳波では、この傾向がより明瞭になった(図 5 B)。



(3) 海馬の興奮性評価

海馬の興奮性を評価するため、睡眠ステージと CA1 領域のリップル事象率およびニューロン放電数との相関を調べた。リップル事象率およびスパイク数ともに、ノンレム睡眠が深くなるにつれて増加したがレム睡眠ではになると顕著に減少した(図 6)。

(4) まとめ

本研究では、まず、①夜間に非拘束状態で睡眠下のサルから皮質脳波や海馬脳波を含むいろいろな生理学的指標や行動状態をモニターするシステムを開発し、②ヒトと同様な睡眠ステージ分類が可能であることを明らかにした。次に、③各睡眠ステージと海馬脳波との相関を検討し、サルではノンレム睡眠時に低周波数領域 (δ 帯域や θ 帯域) のパワーが増加するが、レム睡眠時には θ 帯域の

パワーは増加せず、むしろ γ 帯域のパワーが増加することを明らかにした。さらに、④ノンレム睡眠時には海馬の興奮性(リップルやニューロン活動)が高まるが、レム睡眠時には低下していることも明らかにした。

これら結果は、これまでのげっ歯類の研究から得られた知見との類似点と相違点を明確するものであると同時に、こうした海馬領域での活動特性が睡眠の記憶固定に関わる神経基盤の一つであることを示すものである。

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 6 件)

- 1) Tamura R, Nishida H, Eifuku S, Nagao K, Fushiki H, Watanabe Y, Ono T. Short-term synaptic plasticity in the dentate gyrus of monkeys. PLoS ONE, 査読あり, 6: e20006, 2011.
- 2) Tamura R, Eifuku S, Uwano T, Sugimori M, Uchiyama K, Ono T. A method for recording evoked local field potentials in the primate dentate gyrus in vivo. Hippocampus, 査読あり, 21: 565-574, 2011.
- 3) Eifuku S, De Souza WC, Nakata R, Ono T, Tamura R. Neural representations of personally familiar and unfamiliar faces in the anterior inferior temporal cortex of monkeys. PLoS ONE, 査読あり, 6: e18913, 2011.
- 4) Eifuku S, Nakata R, Sugimori M, Ono T, Tamura R. Neural correlates of associative face memory in the anterior inferior temporal cortex of monkeys. J Neurosci, 査読あり, 30: 15085-15096, 2010.
- 5) De Souza, WC, Feitosa, MAG, Eifuku S, Tamura R, Ono T. Face perception in its neurobiological and social context. Psychol Neurosci, 査読あり, 1: 15-20, 2008.
- 6) 田村了以, 上野照子, 小野武年. 覚醒下ラット島皮質の味覚応答特性. 日本味と匂学会誌, 査読あり, 15: 337-340, 2008.

[学会発表] (計 19 件)

- 1) 田村了以, 西田悠, 永福智志, 北村貴志, 伏木宏彰, 渡邊行雄. サルの海馬脳波と睡眠ステージ. 第 87 回日本生理学会大会, 2010, 5. 19-21, 盛岡.
- 2) 永福智志, 中田龍三郎, 大門良男, 杉森道也, 小野武年, 田村了以. サル前部下側頭皮質における「顔」の連合記憶の神経基盤. 第 87 回日本生理学会大会, 2010, 5. 19-21, 盛岡.
- 3) 田村了以, 西田悠, 永福智志, 永尾薫, 伏木宏彰, 渡邊行雄. 霊長類の海馬脳波—睡眠ステージ相関. 第 33 回日本神経科学

- 大会, 2010, 9.2-4, 神戸.
- 4) 永福智志, 大門良男, 中田龍三郎, 杉森道也, 小野武年, 田村了以. サル前部下側頭皮質における「顔」の連合記憶の神経機構. 第33回日本神経科学大会, 2010, 9. 2-4, 神戸.
 - 5) 田村了以, 西田悠, 永福智志, 永尾薫, 伏木宏彰, 渡邊行雄. サルの海馬シータ波と睡眠ステージ. 第57回中部日本生理学会大会, 2010, 10.15-16, 名古屋.
 - 6) Eifuku S, Nakata R, Daimon Y, Ono T, Tamura R. Neural basis for associative face memory in the anterior inferior temporal cortex of macaque monkeys. 40th Ann Meet Soc Neurosci, 2010, 11.14-19, San Diego.
 - 7) 西田悠, 永福智志, 永尾薫, 伏木宏彰, 渡邊行雄, 田村了以. サル海馬歯状回とCA1の睡眠脳波. 第19回「海馬と高次脳機能」学会, 2010, 11.20-21, 金沢.
 - 8) 永福智志, De Souza WC, 中田龍三郎, 小野武年, 田村了以. サル前部下側頭皮質における個人的親近性のニューロン表現. 第19回「海馬と高次脳機能」学会, 2010, 11.20-21, 金沢.
 - 9) Tamura R, Eifuku S, Sugimori M, Uwano T, Ono T. Long-term synaptic plasticity induced in the primate hippocampus. The 36th Congr IUPS, 2009, 7.29-8.1, Kyoto.
 - 10) Eifuku S, Daimon Y, De Souza WC, Sugimori M, Ono T, Tamura R. Neural basis of associative memory of faces in the monkey anterior inferior temporal cortex. The 36th Congr IUPS, 2009, 7.29-8.1, Kyoto.
 - 11) Eifuku S, Daimon Y, Nakata R, Sugimori M, Ono T, Tamura R. Neural organization for associative temporal cortex. The 39th Ann Meet Soc Neurosci, 2009, 10.17-21, Chicago.
 - 12) 小座野紘子, 杉森道也, Woomi Y., 上野照子, 永福智志, 田村了以. ラット歯状回における神経新生への反復刺激後長期増強誘導の影響. 第32回日本神経科学大会, 2009, 9.16-18, 名古屋.
 - 13) 永福智志, 大門良男, 中田龍三郎, 杉森道也, 小野武年, 田村了以. サル前部下側頭皮質における「顔」の連合記憶の神経基盤. 第32回日本神経科学大会, 2009, 9.16-18, 名古屋.
 - 14) 永福智志, 中田龍三郎, 杉森道也, 小野武年, 田村了以. サル脳における顔表象の探求. 第39回日本臨床神経生理学会学術大会, 2009, 11.19, 北九州.
 - 15) 小座野紘子, 杉森道也, 上野照子, 永福智志, 田村了以. 歯状回の成体神経新生に対する貫通路高頻度刺激の影響. 第18回「海馬と高次脳機能」学会, 2009, 11.21-22, 金沢.
 - 16) 西田悠, 永福智志, 北村貴志, 伏木宏彰,

- 渡辺行雄, 田村了以. サル海馬の睡眠脳波. 第18回「海馬と高次脳機能」学会, 2009, 11.21-22, 金沢.
- 17) 西田悠, 永福智志, 杉森道也, 北村貴志, 伏木宏彰, 渡辺行雄, 田村了以. サルの海馬脳波と睡眠ステージ. 第56回中部日本生理学会, 2009, 12.4-5, 金沢.
 - 18) Tamura R, Sugimori M, Eifuku S, Uwano T, Ono T. Characteristics of synaptic plasticity in the dentate gyrus of monkeys. 2nd WFSBP Asia-Pacific Congr & 30th Ann Meet JSBP, 2008, 9.11-13, Toyama.
 - 19) 田村了以, 杉森道也, 北村貴志, 永福智志, 上野照子, 小野武年. サル海馬体における神経可塑性. 第31回日本神経科学大会, 2008, 7.9-11, 東京.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/ins/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 了以 (TAMURA RYOI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 60227296

(2) 研究分担者

永福 智志 (EIFUKU SATOSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号: 70262508

(3) 連携研究者

杉森 道也 (SUGIMORI MICHIIYA)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 20464026