

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500269

研究課題名(和文)快・不快情動が操る嗅覚表象の単離脳イメージング：行動解析との融合的アプローチ

研究課題名(英文)Olfactory network activity controlled by hedonic preference : Behavioral analysis and a voltage-sensitive dye imaging in the ex vivo brain preparations

研究代表者

梶原 利一 (Kajiwara, Riichi)

明治大学・理工学部・准教授

研究者番号：60356772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：異なる情動を引き起こす学習課題が、どのような異なる脳機能変化を引き起こしているのか？といった問題に対し、ex vivo単離脳標本実験系と行動解析との融合的な研究アプローチの可能性に着目した。嗅覚嫌悪学習課題によるモデル動物を作製しつつ、行動の変化が表れそうな脳部位の探索研究を並行して行った。嗅覚嫌悪学習課題を課したモルモットの単離脳からは、期待した脳機能変化を観測することはできなかったが、幼若モルモットへのウレタン麻酔薬の腹腔投与が、発達後の脳機能構造に変化を引き起こすことが確かめられた。このことは、行動実験課題と観測領野の工夫により、脳内表象変化も捉えられる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：How do the learning tasks inducing emotional responses cause the change of the brain function? For solving this problem, we focused on the fusional approach of animal behavioral analysis and ex vivo physiological analysis. We created model animals using a conditioned odor aversion (COA) learning paradigm. Additionally, exploratory surveys using voltage-sensitive dye (VSD) imaging of ex vivo brain preparations were performed. The visualization of the critical brain region for the learning behavior by applying the VSD imaging to brain preparations of COA model was unsuccessful. However, by applying VSD imaging to the olfactory cortices harvested from urethane-experienced animals, abnormal neural activity in response to electrical stimulation to the lateral olfactory tract was observed. This observation suggests that improvements in learning paradigm and recording procedures may enable us to measure the change of brain activities caused by behavioral changes controlled by the emotion.

研究分野：神経科学

キーワード：Odor aversion limbic system optical imaging voltage-sensitive dye isolated whole brain brain slice

1. 研究開始当初の背景

私たちは“こころの動き”が、知覚感受性や記憶の程度に影響を与えることを経験的に知っている。しかし、記憶や情動に関わる脳のしくみに関する知見が次々と蓄積された現在でも、異なる情動を引き起こす学習課題が、どのような異なる脳機能変化を引き起こしているのか？といった疑問に対して明確な答えが得られているとはいいがたい。この問題に取り組む手段として、例えば、c-Fos などの発現解析が挙げられるが、この方法では、学習後の強い神経興奮領域を同定することは可能だが、神経回路の動特性や情報制御順などの機能様式は理解できない。また、脳スライスを用いて、学習に伴うシナプス機能の変化を解析することも可能だが、この方法では、ある特定のシナプス部位の解析には有効であるが、辺縁系全体の神経回路の变化様式までは把握できない。本研究では、これらの問題を解決する手段として、*ex vivo* 単離脳標本実験系と行動解析との融合的な研究アプローチの可能性に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、(1)古典的な条件付け行動実験系の構築を行うとともに、(2)脳スライスおよび単離脳標本の実験系を新たに整備した上で、これらを活用して、(3)情動や報酬予測行動を支える嗅覚神経回路の探索と動作機構の解明にむけて、海馬のみならず、嗅内皮質や嗅周囲皮質などの周辺皮質の機能構造を解析し、学習に影響を受ける可能性の高い脳部位についての機能解析を進めることを目指した。また、(4)動物個体がもつ脳機能の変化が、単離脳という *ex vivo* 下の標本で追跡できるのか、という問題について検討を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 嗅覚嫌悪学習を課した学習モデルモルモットの作製 単離脳標本による脳機能計測との融合を見据え、専用のモルモット専用のテストケージを開発した。テストケージには、匂いの呈示一回につき数秒間、給水用の電磁弁を開放する機構を備え、動物は飲水時に匂いの呈示を受けられる仕様とした。匂い呈示及び飲水 30 分後に、嫌悪刺激として、塩化リチウム(0.15M 体重の 2%量)を腹腔投与し、内蔵不快感を与えた。条件付け前後の飲水量の測定により嫌悪学習が成立したかを確認した。
- (2) *ex vivo* 脳機能解析システムの再構築 多チャンネル電極を用いた誘発電位計測の高 S/N 化は、脳標本の温度コントローラー用電子回路および電源回路の改

良により行った。更に、脳標本を保持する為のチェンバー形状を工夫して、コンパクト化し、薬理的な実験を効率よく行えるように改良した。多点電極(16ch)により記録された集合電位記録から電流源密度解析を行うツールは Matlab により開発した。

- (3) *ex vivo* 脳スライスおよび単離脳標本を用いた脳機能解析 情動系と記憶系の神経回路機構を明らかにする目的で、扁桃周囲皮質、嗅内皮質、海馬、を含むマウス脳スライスの膜電位イメージング解析を行った。実験には 4-10 週令の C57BL および ICR 系統のマウスを用いた。膜電位イメージング解析は BrainVision 社製の専用カメラを使用し Tominaga らの方法に従い計測を行った(Tominaga et al. J Neurosci Methods, 2000)。単離脳標本は 150-250g の Hartle 系モルモットより作製し、膜電位イメージング(Kajiwara et al. Eur J Neurosci 2007) および、16ch シリコンプローブ電極を用いた電流源密度解析(CSD 解析)を適用した。実験では、外側嗅索を電気刺激し、梨状皮質、扁桃体周囲皮質、嗅内皮質、の脳領域において惹起される神経活動の計測を行った。
- (4) 単離脳標本実験系を用いた電気生理計測によって、神経回路の変化や異常を追跡できるかを検証する目的の実験として、出生後 5 日のモルモットにウレタン麻酔を腹腔投与し、麻酔から回復して数日後の個体の脳機能変化と構造変化を調べた。計測は、梨状皮質において(3)に記した膜電位イメージング法および CSD 解析法により行った。

4. 研究成果

- (1) モルモットに嗅覚嫌悪学習課題を課した結果、ラットと同様、1 回もしくは 2 回の嫌悪体験(内蔵不快感)によって、嗅覚を嫌悪体験と結びつけることが確認できた(図 1)。この条件付けの学習効果は、3 ヶ月にも及んだ。

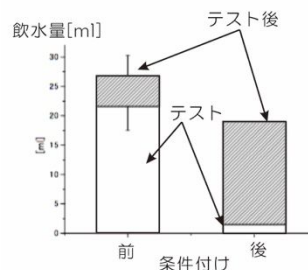


図 1: 条件付け前(左)および条件付け後(右)の、同種のニオイ呈示下での飲水量。白色バーはニオイ呈示あり、斜線バーはニオイ呈示なし。

- (2) これまで使用していた単離脳生理実験システムは、温度コントローラーからのスイッチングノイズが、微弱な神経応答計測に問題となっていた為、ペルチエ素子による温度制御回路を設計しなおし、新たに構築した。その結果スイッチングノイズの影響は無視できるレベルにまで軽減した。また、薬液の評価を行う際に問題となっていたチェンバー容積の縮小も実現した。

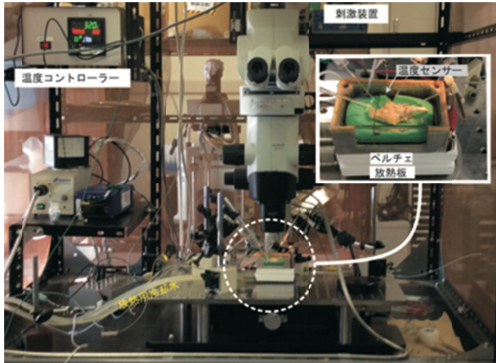


図2：改良した単離脳生理実験システム。温度コントローラー（左上）と薬液評価用小型チェンバー（破線円および枠内）

- (3) 脳スライスの膜電位イメージング解析。嗅内皮質を中心とした皮質 海馬および扁桃体間神経連絡を保持した脳スライスを用いて繰り返し入力に対する応答変化パターンを、膜電位イメージング法により解析した結果、40Hzで嗅周囲皮質36野を刺激すると、35野に持続性の神経興奮現象が認められた。持続性の神経興奮現象は、35野において扁桃体からの入力により制御を受ける可能性が過去の研究から示唆されているが、この35野の神経応答現象には、緩やかに不活性化するカリウム電流が深く関与していることが、低濃度（40 μ M）の4AP(4 Aminopyridine)の灌流実験結果から明らかになった。また、使用する実験動物の週齢差が、本実験結果に与えている可能性が示唆された。現時点では実験数が十分では無い状況ではあるものの、幼若な動物ほど、持続性の神経興奮が生じにくいという傾向が認められた。
- (4) 単離脳電気生理および光計測実験系を用いて、(1)で作製したモデル動物の行動変化を脳機能変化として抽出する試みは、現時点では成功には至っていない。変化を抽出できない原因として、現在使用している単離脳では、嗅上皮が取り除かれている為、実際に行動実験で用いる匂い物質ではなく、外側嗅索への電気刺激により惹起される神経応答解析しか行えていない点を考えている。
- 一方、生まれて間もないげっ歯類へウレタン麻酔を投与すると、神経変性が生

じる可能性が示唆されている。我々はこの知見に着目し、構築した単離脳実験システム系が、この神経変性を評価できるかについて調べた。ウレタン麻酔投与後1週間後の幼若モルモットから単離脳を作製し、電気刺激による嗅覚系神経経路の活動パターンを解析した結果、PairedPulse 応答の点で、対照群と比較して有意な変化が観測でき、さらに、この機能変化が抑制系の発達異常による可能性があることが免疫組織化学的手法により示された。この結果は、顕著な神経回路の変性が個体レベルで生じていれば、電気刺激による嗅覚経路の *ex vivo* 神経応答解析結果に、明確な差が見いだせる事を示している。近い将来、行動実験課題の工夫と、観測領野の再検討により、脳内表象変化も実現できるのではないかと考えている。

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 9 件)

- 1 Sato T, Kajiwara R, Takashima I, Iijima T. (2016) A novel method for quantifying similarities between oscillatory neural responses in wavelet time-frequency power profiles. *Brain Res* **1636**, 107-117 査読有 DOI:10.1016/j.brainres.2016.01.054
- 2 Kajiwara R and Takashima I. (2015) Early exposure to urethane anesthesia: effects on neuronal activity in the piriform cortex of the developing brain. *Neurosci Lett* **600**, 121-126 査読有 DOI:10.1016/j.neulet.2015.06.012
- 3 Sato T, Hirino J, Matsukawa M, Furudono Y, Kajiwara R, Takashima I and Iijima T. (2014) Algorithm of olfactory information processing for discrimination of similar odors. *AROMA RESEARCH* **15**, 3-9 査読有
- 4 Kunori N, Kajiwara R, Takashima I. (2014) Voltage-sensitive dye imaging of primary motor cortex activity produced by ventral tegmental area stimulation. *J NEUROSCIE* **34**, 8894-8903 査読有 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5286-13.2014
- 5 Tominaga T, Kajiwara R, Tominaga Y. (2013) VSD imaging method of *ex vivo* brain preparation. *J Neurosci Neuroeng* **2**, 211-219. 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/jnsne.2013.1051>
- 6 Kajiwara R, Takashima T, Tominaga T. (2013) Whole-scale voltage imaging of limbic network using isolated brain

preparation.

Neuro2013 Meeting planner S3-4, 2-3

査読無

- 7 Kunori N, Kajiwara R, Takashima I. (2013) Optical imaging of neuronal activity in bilateral motor cortex of rats after unilateral ventral tegmental area. *Neuro2013 Meeting planner P3-1*, 114 査読無
- 8 Tomianaga T, Tominaga Y, Kajiwara R. (2012) Suppression of a slowly inactivating potassium current enhances the interaction between the perirhinal cortex and entorhinal-hippocampal neuronal activities. *Neurosci Res Suppl* 72, G10-2 査読無
- 9 Tomianaga T, Tominaga Y, Kajiwara R. (2012) Transmission of neuronal activity between the perirhinal cortex and entorhinal-hippocampal cortex is controlled by slowly inactivating potassium conductance: A VSD imaging study. *Neuroscience Meeting Planner* 2012, 148.02. 査読無

[学会発表](計 7 件)

- 1 Kudos H, Negishi S, Kajiwara R, Takashima I. (2015) Microfluidic Biomonitoring System Using Os-HRP Redox Conversion Based Biosensors. *The-3rd Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering* 2015/11/18-20 Change-mai, Thailand
- 2 Kajiwara R. (2014) Whole-scale voltage imaging of limbic network using ex vivo brain preparations. *International Symposium on Translational Neuroscience & XXXII Annual Conference of the Indian Academy of Neurosciences* 2014-11-01 – 2014-11-03 BENGALURU INDIA
- 3 Tominaga T, Kajiwara R, Tominaga Y. (2013) Slowly inactivating potassium conductance controls transmission at area 35 of perichinal cortex: VSD imaging study. 第 51 回日本生物物理学会年会 京都 20131028-20131030
- 4 Kajiwara R, Takashima T, Tominaga T. (2013) Whole-scale voltage imaging of limbic network using isolated brain preparation. 第 36 回日本神経科学学会, 第 56 回日本神経化学学会, 第 23 回日本神経回路学会合

同大会 京都 20130620-20130623

- 5 Kunori N, Kajiwara R, Takashima I. (2013) Response of rat frontal neuronal activity evoked by stimulation of the basal forebrain. 第 36 回日本神経科学学会, 第 56 回日本神経化学学会, 第 23 回日本神経回路学会合同大会 京都 20130620-20130623
- 6 Tomianaga T, Tominaga Y, Kajiwara R. (2012) Suppression of a slowly inactivating potassium current enhances the interaction between the perirhinal cortex and entorhinal-hippocampal neuronal activities. 第 35 回日本神経科学大会 名古屋
- 7 Tomianaga T, Tominaga Y, Kajiwara R. (2012) Transmission of neuronal activity between the perirhinal cortex and entorhinal-hippocampal cortex is controlled by slowly inactivating potassium conductance. *Neuroscience2012 Ernest N. Morial Convention Center. (New Orleans, USA)*

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 梶原利一 (KAJIWARA RIICHI)
明治大学・理工学部・准教授
研究者番号: 60356772
- (2) 研究分担者 富永貴志 (TOMINAGA TAKASHI)
徳島文理大学・神経科学研究所・准教授
研究者番号: 20344046
- (3) 連携研究者 高島一郎 (TAKASHIMA ICHIRO)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・人間情報研究部門・研究グループ長
研究者番号: 90357351
- (4) 連携研究者 佐藤孝明 (SATO TAKAAKI)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員
研究者番号: 20344187