

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830006

研究課題名(和文)3次元行動計測と超音波解析による社会的相互作用の定式化と扁桃体ニューロン応答

研究課題名(英文) Amygdala neural activity during social interaction in rats: a study based on 3D-video and ultrasonic recording

研究代表者

松本 惇平 (Matsumoto, Jumpei)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：00635287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：無拘束下の自由な社会行動中のラットからニューロン活動を記録し、社会行動とニューロン活動の相関を調べた。ラットの社会行動を詳しく解析するため、まず、3次元ビデオ解析システム及び、超音波発声個体の弁別法を開発した。次に、これらを用いて扁桃体のニューロン活動を解析した。その結果、扁桃体のニューロンは自身の発声と相手の発声に対して異なる応答を示すこと、個体間の空間的關係によって活動強度が異なることが明らかになった。以上の結果から、自由な社会行動において適切な社会行動の遂行に重要な情報(自身と相手の行動や自身と相手との物理的關係に関する情報)が扁桃体で処理されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We recorded neural activity from socially interacting rat in a semi-naturalistic situation and investigated neural correlates with social behaviors. To this end, first, we developed a 3D-video analysis system and a method for identifying rats that emitted vocalizations. Then, based on these new techniques, we analyzed the neural activity in the amygdala. We found that the amygdalar neurons responded differently to the ultrasonic vocalizations emitted by the self and the partner. We also found that the firing rates of the amygdalar neurons changed depending on the spatial relationships between the interacting rats. These results indicate that the amygdala processes not only the actions of the self and the partner but also physical relationships between them, which are important information for executing appropriate social behaviors.

研究分野：神経科学

キーワード：社会行動 扁桃体 3次元ビデオ行動解析 超音波発声 ラット

1. 研究開始当初の背景

社会行動では、個体間の相互作用や時々刻々変化していく社会的状況に応じて各種脳機能が適切に協調して作動する。しかし、こうした自然に近い社会的場面におけるニューロン活動はこれまでほとんど解析されてこなかった。自由な社会行動における脳活動を理解するためには、この間に交わされる多種多様な行動を網羅的、定量的に記録し、ニューロン活動との相関を調べる必要がある。こうした網羅的・定量的な解析にはコンピュータによるビデオ解析が適している。しかし従来のビデオ解析システムでは2次元映像を用いていたため、動物同士が重なると個体を正しく弁別できない、立ち上がりやマウンティングなどの3次元的な動きが解析できない等の問題があった。また、ラットは社会的場面において盛んに超音波で鳴くことが報告されており、行動解析には映像だけでなく、各ラットの超音波発声の解析も重要であると考えられる。そこで本研究では、3次元映像及び各ラットの超音波発声を記録・解析できる新しい行動解析システムを開発し、それを応用してニューロン活動を解析する。

2. 研究の目的

(1) 3次元映像を撮影し、2匹の相互作用しているラットの動作を解析するシステムを構築する。

(2) 超音波発声と発声に関わる甲状披裂筋の活動を同時記録することで、筋活動から超音波発声を行った個体を弁別するシステムを構築する。

(3) 上記のシステムを用いて、社会行動と扁桃体のニューロン活動の相関を調べる。扁桃体は刺激の生物学的価値評価や社会的認知機能に関わり、社会性に最も重要な脳部位の一つであると考えられている。

3. 方法

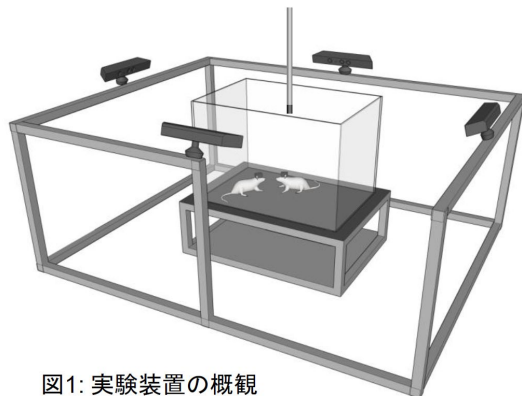


図1: 実験装置の概観

(1) 装置

図1に本研究で用いた装置を示す。図の中央の透明なアクリルケージにラットを入れて観察する。3次元映像を撮影するため、ケージの周りに4台の距離カメラ (Microsoft Kinect v1) を据え付けた。超音波発声を計測するため、ケージ中央上部に超音波マイク

を設置した。ニューロン活動及び筋活動はラットの頭部のコネクタに接続した小型の無線機を通して記録した。

(2) 3次元ビデオによる行動解析

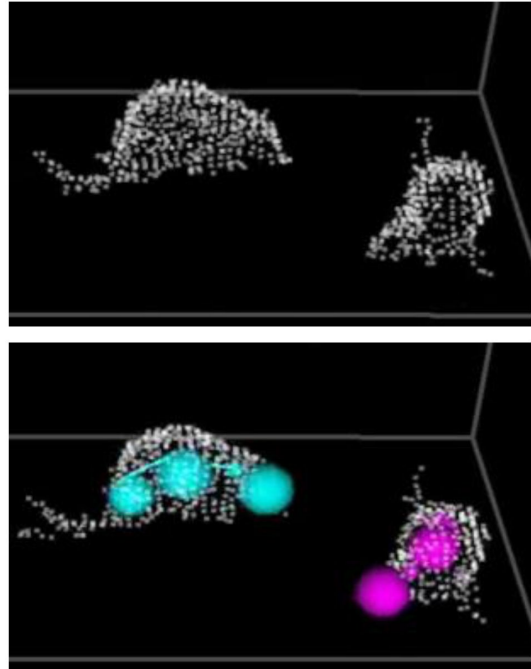


図2: 3次元映像を用いたラットの行動解析

3次元映像を取得するため、本研究では距離カメラを用いた。距離カメラとは、距離画像 (各画素がカメラから物体表面までの距離を表す) を撮影することが出来るカメラである。4台の距離カメラから得られた距離画像の各画素を3次元空間上にプロットすることで、ラットの表面を覆う3次元の点群を得た (図2上)。こうして得られた3次元のラットの“殻”の中に、頭部・頸部・胴体・尾部を表す球体が関節で繋がれた骨格モデルをフィッティングすることで、各体部位の位置を推定する (図2下)。さらに、推定された各個体の体部位の軌跡から、追跡行動やマウンティングなどの行動を判定する。

(3) 甲状披裂筋活動を用いた超音波発声の弁別

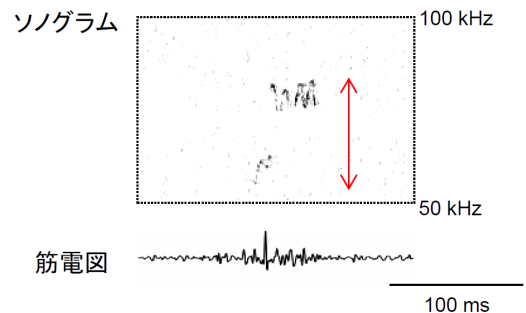


図3: 超音波(上)と筋電図(下)の同時記録例

甲状披裂筋にステンレス製双極電極を埋め込んだラットから、無線装置を用いて筋電

図を記録した(図3下)。筋電図の信号は100-300Hzのバンドパスフィルタにかけた。同時に超音波を超音波マイクから記録し、ソノグラムを計算した(図3上)。ソノグラムから超音波発声の起きた時刻を検出し、発声と筋活動との時間関係をもとに各超音波を発声した個体の弁別を行った。

(4)ニューロン活動の解析

上記の筋電図電極に加えて扁桃体にタングステン製のテトロド電極を埋め込んだラットと筋電図電極のみを埋め込んだラットをケージ内に入れ、20分間自由に社会行動を行わせ、この間のニューロン活動、筋電図、超音波、3次元映像を記録した。解析ではまず、超音波発声に対するニューロン応答を調べた。発声は上記の方法を用いて弁別を行い、自己および相手が発声した場合を分けて解析した。さらに、3次元ビデオ解析によって得られた各個体の頭部の軌跡から各個体の空間的關係とニューロンの発火頻度の關係を、以下の3要因分散分析によって解析した：頭部間距離(近距離(20 cm未満)、遠距離(20 cm以上))×自身の行動(静止,接近,離脱)×相手の行動(静止,接近,離脱)。

4. 研究成果

(1) 3次元ビデオ行動解析システムの開発

本研究では社会行動の解析のために新たに3次元ビデオ行動解析システムを開発した。そのため、まずシステムの動作を検証するため、オスラット同士の社会行動およびオスとメスの性行動を同システムで撮影・解析し、実験者が手動で算出したパラメータと比較した。その結果、各体部位位置の推定誤差は平均2~4 cmと小さく、また、マウント・追跡行動、頭部同士の接触などの行動イベントの検出も手動で行ったものと強く関連していた。本システムはラットの社会行動を3次元ビデオを用いて解析できる世界初のシステムであり、従来の2次元システムと比較して、動物同士が重なっても安定して個体を識別できること、3次元的な動きを解析できること等の利点がある。開発した3次元システムのアルゴリズムおよび動作検証結果は論文として公開した(Matsumoto et al., 2013)。またソフトウェアもオープンソースソフトウェアとして公開した(<http://matsumotoj.github.io/>)。さらに、富山大学神経精神医学講座と共同でこの3次元システムを新規物体探索試験の解析に応用する試みも行った(Matsumoto et al., 2014)。

(2) 甲状披裂筋活動を用いた超音波発声の弁別方の開発

まず、下喉頭神経切除により発声を障害したメスラットと筋電図を埋め込んだオスを対面させ、オスの超音波発声と甲状披裂筋活動の相関を調べた。その結果、50 kHz帯の超

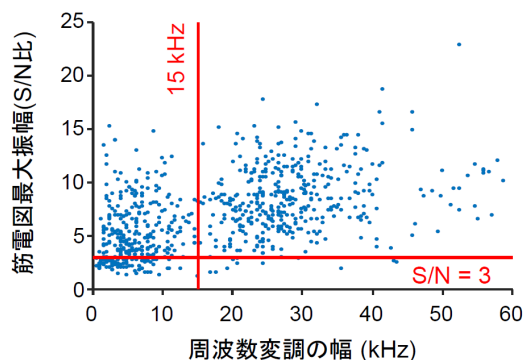


図4: 発声の周波数変調と筋活動振幅の關係

音波発声のうち、周波数変調の幅(図3矢印)が特に大きい発声(FM call)が起こる際には、ほぼ必ず甲状披裂筋の高振幅活動を伴うことが明らかになった(図4)。以上の検討に基づき、社会行動中の2匹のラットから記録されたFM callを各ラットの甲状披裂筋の高振幅活動の有無によって弁別するアルゴリズムを開発した。これまで社会行動中の2個体から記録される超音波はどちらが発声したのか区別することが困難であり、開発した方法は今後の他の様々な社会行動の研究にも役立つことが期待される。

(3) 社会行動中の扁桃体ニューロン活動

合計16個のニューロンを扁桃外側核および境界領域から記録した。図5に超音波発声(FM call)に対するニューロン応答の例を示す。図のニューロンは、相手の発声に対して有意に興奮性の応答し($p < 0.05$, paired t-test)、自身の発声には抑制性に応答する傾向を示した($p < 0.1$, paired t-test)。この他にも2個のニューロンが超音波発声に対して応答を示し、そのうち1個は自身の発声に対して興奮性に応答し、もう1個は相手の発声に対して抑制性に応答した。以上の結果は、扁桃体のニューロンが自身及び相手の発声に対して異なる応答を示すことを示唆する。

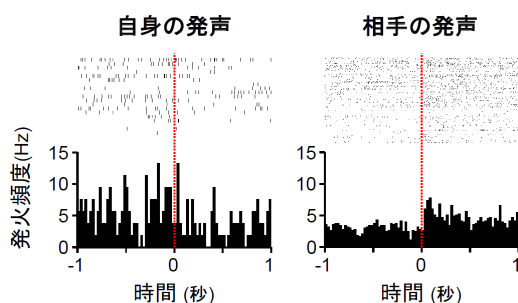


図5: 超音波発声に対するニューロン応答の例

図6に2個体の種々の空間的關係における、あるニューロンの発火頻度を示す。分散分析の結果、このニューロンはすべての主効果と相手の行動と自身の行動の交互作用が有意であった($p < 0.05$)。以上の結果から、このニューロンは互いの距離が近づくと活動が強まり、さらに自身が相手に接近し、且

つ相手が自身から離れていく状況で最も強く応答することが明らかになった。このように、空間関係によって有意に発火頻度を変化させるニューロンは合計で9個見つかり、そのうち、6個が距離の主効果、7個が自身の行動の主効果、5個が相手の行動の主効果、4個が何らかの交互作用を示した。以上の結果から、扁桃体のニューロンは自身と相手の空間関係を符号化していることが示唆された。

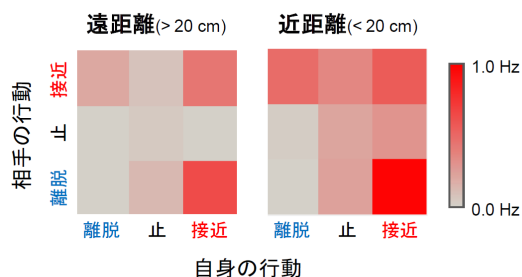


図6: 個体間の空間関係に応じて発火頻度を変化させるニューロンの例

以上の結果から、自由な社会行動において、適切な社会行動の遂行に重要な情報（自身と相手の行動や自身と相手との物理的関係に関する情報）が扁桃体で処理されていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Matsumoto J, Uehara T, Urakawa S, Takamura Y, Sumiyoshi T, Suzuki M, Ono T, Nishijo H (2014) 3D video analysis of the novel object recognition test in rats. Behav Brain Res, 272:16-24. (査読あり)
doi: 10.1016/j.bbr.2014.06.047.

Matsumoto J, Urakawa S, Takamura Y, Malcher-Lopes R, Hori E, Tomaz C, Ono T, Nishijo H (2013) A 3D-video-based computerized analysis of social and sexual interactions in rats. PLoS One, 8(10):e78460. (査読あり)
doi: 10.1371/journal.pone.0078460.

〔学会発表〕(計9件)

松本惇平, 動物の神経生理学的並びに行動学的パラメータの計測による評価系の構築, 第37回日本生物学的精神医学界合同年会, 2015年9月(発表確定), タワーホール船堀(東京)

松本惇平, ラットの3次元ビデオ行動解析システムの開発, 包括脳冬のシンポジウム, 2014年12月, 東京医科歯科大学(東京)

Matsumoto J, 3D video analysis of object exploration in rats. Neuroscience 2014, 2014年11月, Washington DC (USA)

松本惇平, ラットの社会行動及び物体探索行動の3次元ビデオ行動解析システム,

第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学会大会 合同年会, 2014年9月, 奈良県文化会館(奈良)

松本惇平, ラットの物体探索の3次元ビデオ解析システム. 第37回日本神経科学大会, 2014年9月, パシフィコ横浜(横浜)

Matsumoto J, Assignment of USVs to each of freely interacting rats based on thyroarytenoid muscle EMGs and relationships between the USVs and 3D head locations. Ultrasonic Communication in Rodents, 2014年8月, 東京大学(東京)

松本惇平, ラットの社会行動及び性行動の3次元ビデオ解析システム. 北陸実験動物研究会第46回研究会, 2014年1月, 富山大学(富山)

Matsumoto J, A 3D-video-based computerized analysis of social and sexual interactions in rats. Neuroscience 2013, 2013年11月, San Diego (USA)

松本惇平, ラットの社会行動及び性行動の3次元ビデオ解析システム. Neuro 2013, 2013年6月, 国立京都国際会館(京都)

〔その他〕

ホームページ等

<http://matsumotoj.github.io/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 惇平 (MATSUMOTO, Jumpei)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 00635287