

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830012

研究課題名(和文)サル大脳における両眼視差情報伝達経路の解明

研究課題名(英文)Pathways for binocular disparity information in monkey cerebral cortex

研究代表者

池添 貢司(Koji, Ikezoe)

独立行政法人情報通信研究機構・脳情報通信融合研究センター脳情報通信融合研究室・研究員

研究者番号：10596430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類の左右の眼それぞれに投影される外界の像の間には、ずれ(両眼視差)が生じる。両眼視差は奥行き知覚ための手がかりとなり、多くの視覚関連領域で処理される。本研究課題では、両眼視差情報の情報処理に関わる神経回路を解明するための計測技術として、げっ歯類などの小動物で用いられていた生体内2光子カルシウムイメージング法をサルの視覚野で確立した。この方法を用いてサルの一次視覚野細胞の、応答特性に基づいた空間的な配列を細胞レベルの分解能で明らかにし、論文発表を行った。

研究成果の概要(英文)：Visual images projected to right and left eyes are slightly different from each other. The difference is called binocular disparity. Binocular disparity provides a clue for 3D perception and is processed among various visual areas. In this study, for investigating neural circuits processing binocular disparity, we developed recording techniques for monkey visual cortex using in vivo 2-photon calcium imaging, which had been mainly used for small animals, such as rodents. By using this technique, we showed a spatial arrangement of neurons according to their response properties and published the results in a scientific journal.

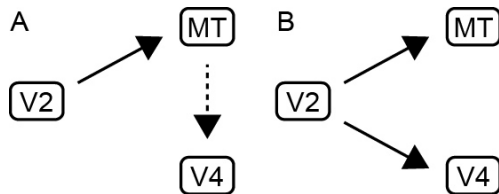
研究分野：システム神経科学

キーワード：神経科学 視覚 霊長類 2光子イメージング 機能構築

1. 研究開始当初の背景

ヒトやサルの2つの眼は左右に離れているために、左右の眼の網膜に投影される物体像は位置ずれを持っている。この位置ずれを両眼視差と呼び、両眼視差は奥行き知覚(3Dピジョン)に重要な手がかりを与える。視差情報は両眼からの情報が収れんする一次視覚野(V1)で初めて抽出される。その後、多くの中次、高次視覚野に伝達され処理される¹。

視覚情報は、その属性によって2つの経路(空間視経路: V1→V2→MT→MST、物体視経路: V1→V2→V4→IT)のいずれかに処理されていると考えられていた。神経解剖と生理の研究から視差情報も90年代までは空間視経路のみで処理されると考えられていたが、2000年代前半に研究代表者の所属する研究室と海外の研究室が、視差情報の内、細かい両眼視差や相対視差などの、空間視経路で処理される視差情報とは異なる側面が処理されていることを発見した。しかし、物体視経路特有の視差情報をもたらす視差情報処理経路は不明である。経路の分岐点であるV2野から2経路に視差情報が分配され平行に処理されるのか(下図B)、空間視経路の後に物体視経路に送られ処理されるのか(下図A)は不明である。



このことを明らかにするためには、V2細胞のうち、V4野へ軸索を投射し情報を伝達する神経細胞が両眼視差選択性を持つかどうかを調べる必要がある。

ある細胞が軸索を特定の領野へ投射していることを明らかにした上で視覚刺激に対する選択性を調べるには、従来は微小電極を用いた方法が用いられてきた。しかし、この方法は効率が悪く100個程度の細胞データを集めるために数年を要していた。近年、皮質深部を1μm程度の高分解能で観察できる2光子顕微鏡を用いた生体内イメージングと軸索逆行性蛍光トレーサーを用いて、生体内で、ある一つの領野に軸索を投射する細胞を同定する方法が開発された。同定したのちに細胞レベルでのカルシウムイメージングを用いて、個々の細胞の視覚刺激選択性を調べることによって、一度の実験で数十個の細胞の軸索投射先と刺激選択性を明らかにすることが可能になった²。

しかしながら、研究開始当初、2光子顕微鏡を使ったカルシウムイメージング法は、哺乳動物ではマウス、ラット、フェレット、ネコなど比較的小さい動物だけで行われており、サルでは行われていなかった。これはサル特有の技術的障壁に起因すると考えられ

る。たとえば、生体では呼吸や拍動に伴って脳が揺れる。サルのような大きな動物ではこの振動が大きく、対策を講じない場合数百μmに達する。これは10~20μmの大きさを持つ細胞体のイメージングにとっては大きな問題になる。本研究課題ではサル特有の技術的問題を解決し、2光子イメージング法をサル大脳皮質に適用させることを第一の目的とし、その上で、両眼視差情報がV2野からV4野へ伝達されているかを明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究課題では、両眼視差情報がV2野からV4野へ伝達されているかどうかを明らかにするために、以下のことを行うことを目的とした。

- (1) 2光子顕微鏡による細胞レベルでのカルシウムイメージング法を用いて細胞集団の視覚刺激応答特性を明らかにする方法をサル大脳皮質視覚野で確立すること。
V1細胞集団の方位チューニングを細胞レベルで調べること。
方位チューニングと細胞の位置との関係を調べること。
より高次の視覚野でもカルシウムイメージング法を確立すること。

- (2) 確立された技術と逆行性軸索トレーサーの生体内イメージング法を組み合わせ用いて、両眼視差情報がV2野からV4野へ伝達されているかどうかを明らかにすること。

3. 研究の方法

ここでは上記(1)のサルV1における2光子イメージングを用いた方位チューニングと細胞の位置との関係を調べる方法について記述する。

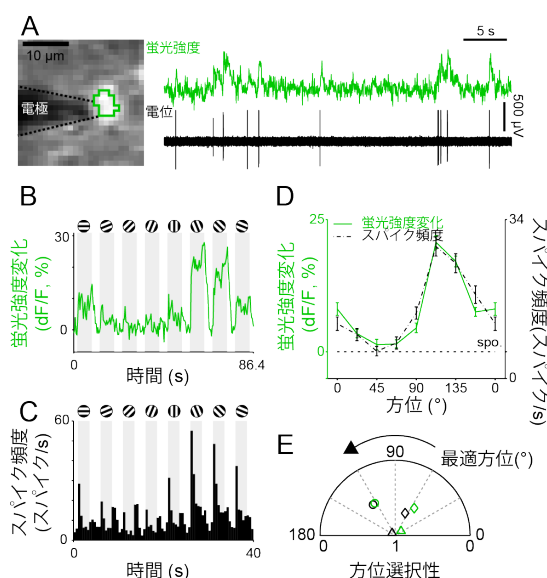
被験体には、カニクイザル(*Macaca fascicularis*)を4頭用いた。カニクイザルは安定的に入手可能であり、体が小さいためin vivo 2光子イメージングに適していた。計測実験はサル1頭につき、週1回のペースで繰り返し行った。サルにクエン酸フェンタニルと臭化パンクロニウム、または臭化ベクロニウムを投与し鎮痛非動化し、人工呼吸下で実験を行った。常に動物の心電図、血中酸素飽和度、血圧、呼気CO₂濃度、体温を適切な値に維持した。実験中はあらかじめ頭部に固定しておいたヘッドポストで頭部を固定した。

V1野の脳表面を3mm四方の範囲で露出させ、細胞膜透過型のカルシウム感受性色素Oregon Green BAPTA-1 AMを微小ガラス管を用いて圧注入した。色素は60分程度で自動的に細胞内にロードされる。呼吸、心拍による胸部の動きが脳に伝わらないように対策を行い、2光子顕微鏡でイメージングを行っ

た。液晶モニタを用いて片眼に縞刺激を提示し、各細胞の蛍光応答を計測した。縞刺激の傾きを変えることによって、各細胞の方位チューニングを得た。方位チューニングから細胞がもっともよく応答する方位（最適方位）とチューニングの強さ（方位選択性の強さ）を調べた。最適方位または方位選択性の強さと細胞の位置との間の関係性（方位マップ、方位選択性マップ）を調べた。さらに方位マップと方位選択性マップの関係についても調べた。

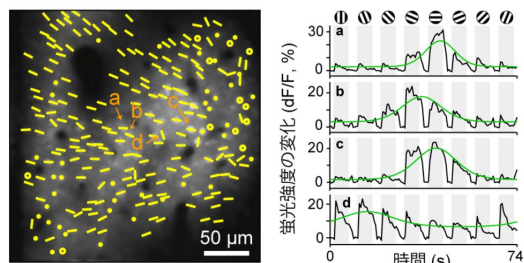
4. 研究成果

最初にイメージングの蛍光応答で得られる方位チューニングから、スパイク（活動電位）活動で得られるチューニングを推定できるかどうかを調べた（下図）。



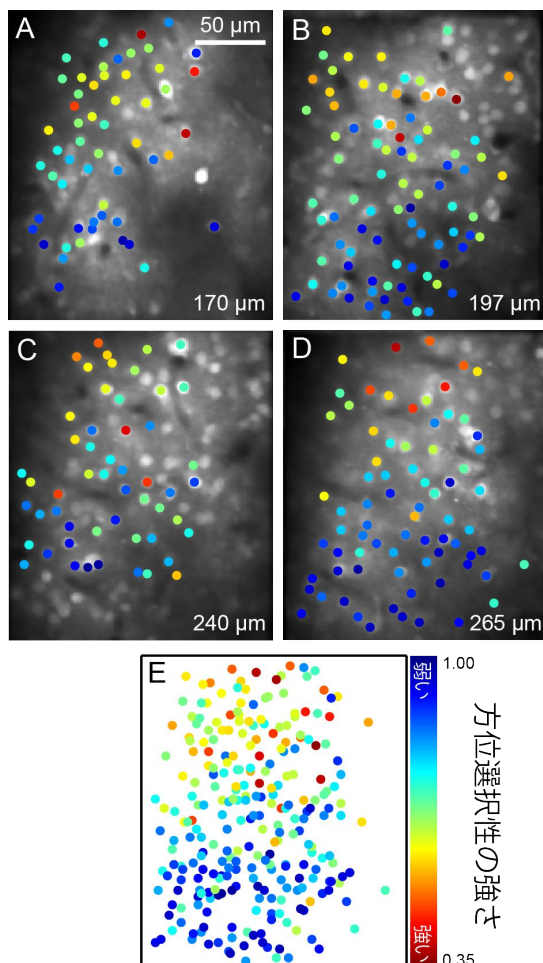
カルシウムイメージングとスパイク活動の計測を同時に行ったところ (A) スパイク発生直後に蛍光強度が上昇し、スパイク頻度が高い場合には蛍光強度変化も大きくなっていることがわかった。このことは蛍光強度変化の大きさはスパイク発火頻度を反映していることを示している。次に同じ細胞から方位チューニングを蛍光強度変化とスパイク頻度から求めた (B-D)。2 つのチューニングはよく一致しており、最適方位、方位選択性の強さがほぼ一致していた。3 個の細胞から同様の計測を行ったところすべての細胞で、蛍光強度変化とスパイク頻度から調べた最適方位と方位選択性の強さはよく一致していた (E)。このことから 2 光子イメージングで得られる蛍光強度変化を使って細胞の最適方位や方位選択性を推定できることがわかった。

計側面内のすべての細胞から同時に蛍光応答を計測し、それぞれの細胞の方位チューニングを調べ、最適方位マップを得た (右上図; 細胞の最適方位をバーの傾きで表している)。



近接した細胞は似た最適方位を持っていた。図の計側面上部では左上向きの方角を好む細胞が多く、下部に移るにしたがって最適方位が徐々に変化し、計側面下部では左下向きを好む細胞が多いことがわかる。より詳しく見るとごく近接した細胞でも最適方位が 45 度以上異なるような細胞が存在していることがわかった (例: 細胞 d)。このことから V1 の方位地図は従来の方法で提案されていたような、完全に規則的な構造をもつわけではなく、ある程度の乱雑さを含んでいることがわかった。

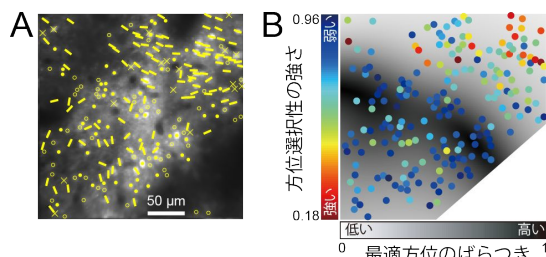
方位チューニングから方位選択性の強さを求め、細胞が方位選択性の強さに基づいて規則的に配置しているか (方位選択性強度マップ) を調べた (下図)。下図では方位選択性の強い細胞を赤系の色で示した。計測領域 A-D は脳表面に沿っては同じ位置にあり、表面からの深さだけが異なる。



A-D の各計測領域において、近接している細胞

胞は似た方位選択性の強さを持っていた。計測領域上部の細胞は強い方位選択性を持ち、領域下部では細胞は弱い方位選択性を持つことがわかる。このことはA-Dのマップを重ねて表示すると(E)よりはっきりとわかる。このことから、計測を行ったV1の第2層では似た方位選択性の強さを持つ細胞群は皮質表面に対して垂直な方向に集合していることがわかった。

最適方位マップと選択性の強度マップの関係を調べた(下図)。



最適方位マップ(A)から、局所領域に存在する細胞の最適方位のばらつきを計算し、マップを作製した(Bのグレースケールマップ)。このマップと方位選択性の強度マップを重ねると、方位選択性の強い細胞は最適方位のばらつきが少ない(細胞の最適方位がそろっている)ところに集中していることがわかる。このことから、細胞の方位選択性の強さは、周辺に存在する細胞の最適方位のばらつきと関係していることが明らかとなり、このことから細胞の方位選択性の形成に局所領域での情報統合が寄与していることが示唆された。

以上の結果を北米神経科学学会学会誌 The Journal of Neuroscience に発表した。サル大脳皮質の方位地図の研究は1960年代から行われていたが、最適方位マップと選択性強度マップの関係については未解明であり、論争があった。2光子カルシウムイメージング法を適用し、マップを単一細胞レベルで可視化したことによってこの論争に決着がついた。

以上のように、サル大脳皮質視覚野において生体内2光子カルシウムイメージング法を確立し、研究課題の目的のうち重要かつ困難と思われたものを達成することができた。

次に中次視覚野のV4野への同様の計測・解析手法の拡張を行ったところ、V4野においても、細胞の視覚応答を計測し、応答特性と細胞の位置との関係を調べることができた。サルにおいて中次以上の視覚野での2光子カルシウムイメージングは世界初であり、この結果は、学会発表を行い、現在論文投稿準備中である。

逆行性軸索トレーサー技術と2光子イメージング法を組み合わせる方法につ

いてはげっ歯類の大脳皮質を用いて、ある特定の領野へ投射する細胞からカルシウムイメージングを用いて感覚応答を計測する手法を確立した。

両眼視差情報がV2野からV4野へ伝達されているかどうかについては、研究期間内に明らかにすることができなかったが、必要な技術はすべて整えることができたので、今後の研究で明らかにする予定である。

<引用文献>

1. Parker, *Nat Rev Neurosci*, 2007
2. Jarosiewicz et al, *Curr Biol*, 2012

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

池添貢司、森理也、喜多村和郎、田村弘、藤田一郎. Relationship between the Local Structure of Orientation Map and the Strength of Orientation Tuning of Neurons in Monkey V1: A 2-Photon Calcium Imaging Study. *J Neurosci*, 33: 16818-16827, 2013. 査読有、doi: 10.1523/JNEUROSCI.2209-13.2013.

[学会発表](計 8 件)

池添貢司. 2光子イメージングで見る霊長類大脳皮質の情報処理. 応用脳科学コンソーシアムCiNet研究ワークショップ、2014年12月9日、京都大学 東京オフィス(東京・港区).

池添貢司. Orientation maps in monkey V1 and V4 visualized at the single-neuron resolution: a 2-photon calcium imaging study. Vision, Memory Thought: how cognition emerges from neural network、2014年12月06日、東京大学(東京・文京区).

池添貢司. Spatial arrangement of neurons in monkey V1 and V4 according to their orientation selectivity: A 2-photon calcium imaging study. Asia-Pacific Conference on Vision (APCV2014)、2014年7月19日、かがわ国際会議場(香川・高松).

池添貢司. サル大脳皮質 V1 野の方位地図: 2光子カルシウムイメージングによる解析. 立命館大学視覚科学統合研究センターシンポジウム、2014年3月13日、立命館大学(滋賀・草津).

池添貢司、西本伸志、竹内遼介、深澤宇紀、齋藤優介、藤田一郎. Functional architecture for orientation and spatial frequency tuning in monkey V4 revealed by in vivo 2-photon calcium imaging of visual responses to natural movies. Neuroscience 2013 (annual meeting of society for neuroscience)、2013年11月13日、サンディエゴ(カリフォルニア・米国).

齋藤優介、池添貢司、西本伸志、竹内遼介、深澤宇紀、藤田一郎．サル V4 細胞の自然動画に対する視覚応答の 2 光子 Ca^{2+} イメージングによる解析: (II) 方位・空間周波数選択性に関する空間配置．視覚科学フォーラム第 17 回研究会、2013 年 8 月 5 日、立命館大学(滋賀・草津)．
竹内遼介、池添貢司、西本伸志、齋藤優介、深澤宇紀、藤田一郎．サル V4 細胞の自然動画に対する視覚応答の 2 光子 Ca^{2+} イメージングによる解析: (I) エンコーディングモデル解析による応答特性の推定．視覚科学フォーラム第 17 回研究会、2013 年 8 月 5 日、立命館大学(滋賀・草津)．

池添貢司、西本伸志、竹内遼介、深澤宇紀、齋藤優介、藤田一郎．In vivo 2-photon calcium imaging of visual responses to natural movies in monkey V4. 第 23 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日、京都国際会議場(京都府・京都市)．

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院生命機能研究科認知脳科学研究室

<http://www2.bpe.es.osaka-u.ac.jp/>

大阪大学大学院生命機能研究科最新研究成果

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/ikezoe-fujita-20131016/>

脳情報通信融合研究センター

<http://cinet.jp/index.html>

researchmap

<http://researchmap.jp/ikezoe/>

ResearchGate

https://www.researchgate.net/profile/Koji_Ikezoe

6．研究組織

(1) 研究代表者

池添 貢司 (IKEZOE Koji)

独立行政法人情報通信研究機構・脳情報通信融合研究センター脳情報通信融合研究室・研究員

研究者番号：10596430