

審査の結果の要旨

氏名 小谷定治

小脳運動学習の1つである瞬目反射条件付けは、CS (Conditioned Stimulus)として音、US (Unconditioned Stimulus)として瞼への侵害刺激を時間的に組み合わせて反復提示することにより、音を聞いただけで瞼を閉じるようになる(CR: Conditioned Response)学習である。瞬目反射条件付けの遅延課題は、学習に関与する入出力経路が明らかであり、また、必須の脳領域が小脳と脳幹であることが解明されている唯一の学習課題である。この学習の機構を明らかにするためには、神経細胞の活動を記録して、学習特異的な活動変化を見出すことが重要である。しかしながら、同一細胞からの電気生理学的記録は数時間から半日程度を超えて行うことは一般に困難であるので、条件付けに数日を要する intact 動物の瞬目反射条件付け学習では、このような研究は不可能であった。そこで小谷定治は、この学習に必須の小脳と脳幹のみを残し上位中枢を除去することにより数時間の連続した条件付けで学習をさせることが可能な除脳標本学習系の開発をおこなった。そして、その除脳標本を用いて、単一プルキンエ細胞からの学習特異的神経活動変化を記録し、解析をおこなった。

【除脳標本学習系の開発】

瞬目反射条件付けには、小脳・脳幹が必須で海馬・大脳新皮質が修飾的にはたらくことが知られている。そこで、モルモット(Hartley)を用いてイソフルラン吸入麻酔下に視床と脳幹の間を切断し、除脳標本を作成した。麻酔停止後、CSとして音、USとして瞼への電気刺激を用い、USがCSに遅れて始まり、同時に終了する遅延課題の条件付けをおこなった。CSとUSの時間間隔を250msとして条件付けを行ったところ、約300試行でCSに対して瞼を閉じるようになった。またそのCRは、US提示付近にピークを持っていた。一方でCSとUSを時間的に組み合わせずに提示した場合(偽条件付け)には、CSに対する応答は見られなかった。

【CR獲得時のプルキンエ細胞活動の解析】

数時間に及ぶ連続した条件付けにより学習することが明らかとなったモルモット除脳標本を用いて、電気生理学的解析をおこなった。除脳標本に対し、瞬目反射条件付けに必須であることが知られている小脳皮質 simplex lobe (Lobule HVI)にガラス被覆タングステン電極を挿し、細胞外ユニット記録を開始した。そしてプルキンエ細胞のユニット記録を続けながら、CS-USの時間間隔が400msの遅延課題(条件付け群)、あるいはCSとUSを時間的に組み合わせずランダムに提示する偽条件付け(偽条件付け群)を連続しておこなった。CSとして音、USとして瞼への電気刺激を用いた。解析は1session(50trial)毎におこない、各sessionにおけるCSに対するプルキンエ細胞の応答を興奮性応答、抑制性応答、両者を含む複合型応答、無応答の4種に分類した。

条件付け群、偽条件付け群とも半分超のプルキンエ細胞でCSに対する応答がトレーニングの過程で変化した。条件付け群ではCSに対する応答が減少する細胞(興奮性応答 無応答 抑制性応答)が多数見られた。偽条件付け群ではCSに対する応答が増加する細胞(抑制性応答 無応答 興奮性応答)が多数見られた。また一方でCSに対する応答が増加する

細胞が条件付け群で、減少する細胞が偽条件付け群で見られたが、これらは興奮性応答と無応答の間の変化だった。つまり無応答 抑制性応答という変化が条件付け特異的な CS に対する応答の減少であり、抑制性応答 無応答という変化が偽条件付け特異的な応答の増加であることが明らかとなった。また興奮性応答を示す細胞の数は最初の session と学習後あるいは偽条件付け後の session の間でほぼ同じだった。これは学習前から学習後まで興奮性の応答を示し続けていた細胞に加えて、興奮性応答 無応答の変化を示す細胞と無応答 興奮性応答の変化を示す細胞の数がほぼ同じだったことに起因していた。

また学習成立後の瞼の筋電位とプルキンエ細胞の応答の発火パターンの相関解析をおこなったところ、CR の波形と高い相関をもつ応答を示す細胞が存在した。プルキンエ細胞より抑制性の入力を受ける中位核は瞬目反射学習後に CR の波形と同様の発火パターンを示すことが知られている。よって CR の波形と有意な負の相関をもつ発火パターンを示すプルキンエ細胞を CR のタイミングに關与する細胞とした。この有意な負の相関を示す発火パターンが naïve の状態から存在したのか、それとも条件付けにより獲得されたのかを明らかにするために、学習後の瞼の筋電位と条件付けの最初の session のプルキンエ細胞の発火パターンの相関係数を計算した。すると学習後に CR の波形と負の相関をもつ興奮性応答を示すプルキンエ細胞は、naïve の状態から既にこのような発火パターンを示していた、つまりこれは条件付けにより獲得されたものではないことが明らかとなった。一方で学習後に CR の波形と負の相関をもつ無応答、あるいは抑制性応答を示すプルキンエ細胞は naïve の状態ではこのような発火パターンを示していなかった、つまりこれらは条件付けに伴って獲得されたものであることが明らかとなった。またこれらの細胞の多くは CS に対する応答が条件付けにより減少した細胞であった。つまり小脳皮質 simplex lobe には、条件付けにより、CS に対する応答が US 提示付近の時点で減少するような細胞が存在することが明らかとなった。

本研究は、除脳標本における瞬目反射条件付け学習系を開発し、またその学習中の単一プルキンエ細胞の応答の経時変化を記録・解析した最初の研究である。そしてプルキンエ細胞の活動の変化を偽条件付けの場合と比較することにより、学習に関連した活動変化を特定することができた。プルキンエ細胞は中位核に対して抑制性シナプスを形成していることから、本研究で明らかとなった学習に伴うプルキンエ細胞の発火の減少は、中位核の発火増加とそれに続く CR の発現を誘起すると考えられる。一方で偽条件付けではプルキンエ細胞の発火が増加し逆方向の変化が起きると考えられる。また CR の波形とプルキンエ細胞の発火パターンの相関解析より、US 提示付近で中位核の脱抑制を起こすことで CR のタイミングの形成に寄与する細胞が存在することも示唆された。上記の考察は 30 年以上前から理論的には予想されていた。本研究は実験的にその現象を捉えることに成功し、学習による行動の発現と神経回路の可塑的变化という 2 つの階層を結びつけることができたという点で非常に意義がある。一方で、本研究では偽条件付けにより条件付け時とは逆方向のプルキンエ細胞の活動変化が起こり、何らかの学習が起こっていると考えられるので、現在の小脳の運動学習モデルにこの CS と US のランダム提示による可塑的变化を取り込む必要があることを示唆する。

以上の通り、本研究は、小脳皮質 Simplex lobe プルキンエ細胞の、瞬目反射学習に伴う活動変化を初めて明らかにしたものであり、学習・記憶の神経生物物理学に寄与するところ大である。よって、本研究は、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと判定した。