

論文の内容の要旨

論文題目 Unitized representation of paired objects in area 35 of the macaque perirhinal cortex

和訳 マカクサル傍嗅皮質 35 野における図形対のユニット化した神経表現

指導教員 宮下 保司 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 富士道 涼子

図形同士の連合関係を長期記憶として表現する神経細胞はサル下部側頭葉 (IT) で初めて報告された。IT の単一神経細胞記録から、IT の神経細胞は学習を通して刺激選択性を獲得し、また幾何学的には類似性がない図形同士を時間的に近接して提示するとその視覚刺激双方に関連した神経活動を示すようになる、ということが明らかになっている。IT は傍嗅皮質(Perirhinal cortex)を含むが、破壊実験によりこの傍嗅皮質が刺激間の連合記憶が形成されるうえで特に重要な役割を果たしていることが知られている。傍嗅皮質は A35 と A36 という 2 つの細胞構築学的に異なるサブ領域を持つ(図 1a)。我々は先行研究においてそのうち A36 が刺激間の連合記憶の脳内表象に関与していることを明らかにした。一方、A35 に関しては課題遂行中のサルから得られた知見は未だない。この理由は、A35 が嗅脳溝(rhinal sulcus)の基底部の狭く細長い領域であり課題遂行中の動物において単一神経細胞活動を戦略的に記録してることが困難なためである。そこで我々は高解像度の磁気共鳴画像(MRI)を用いて in vivo で記録精度をあげる方法と標準的な手法である組織学的同定法の 2 つの方法を組み合わせることにより、これまでは困難であった課題遂行中のサルの A35 へのアプローチを可能にし系統的な単一神経活動記録を試みた。こうして得られた A35 の神経活動を解析し、この領野の連合記憶についての表現を調べた。

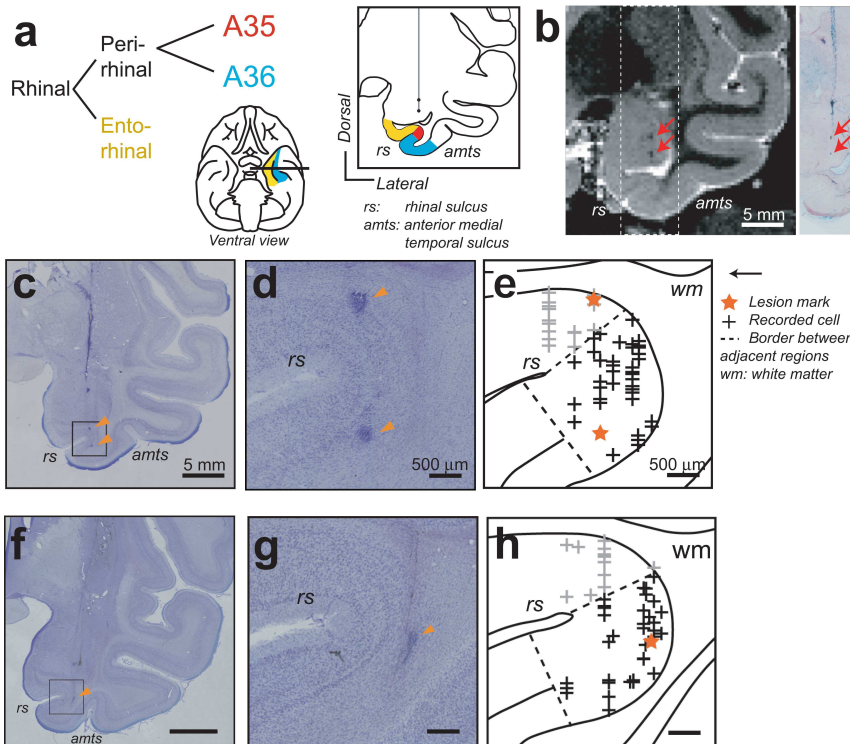


図1
A35 からの戦略的な単一神経細胞記録。
 a) 嗅皮質の構造的区分と目標部位 (A35, 赤)。b) MRI で検出した標識 (矢印) と Prussian blue 反応による染色結果。c) 及び f) Nissl 染色切片。矢頭は損傷マーカーを示す。d) 及び g) c) 及び f) の一部を拡大したもの。e) 及び f) 再構成した神経細胞の記録位置。星印は損傷マーカー位置を示す。

A35からの戦略的単一神経細胞活動記録：

- 1) 単一神経細胞活動記録実験を開始する前に、陽極電流を流してエルジロイ微小電極の先端を電気分解し、A35の背側直上にMRIで検出可能な標識として金属沈着を作成した(図1a, b)。電極の先端位置はサル脳の高解像度構造画像上で低シグナルスポットとして可視化された金属沈着の位置座標とした。電極の先端位置座標はX線からも得た。日々の単一神経細胞活動記録実験ではより記録に適したタングステン微小電極を用いて行った。全てのタングステン微小電極はX線によりその位置を記録した。よって各神経細胞の記録位置はX線由来の水平面(the horizontal plane)におけるXY座標とマニピュレーター由来の垂直方向(深さ方向)のZ座標で表現される。MRIで検出される金属沈着の座標を共通の参照物とすることで、全ての記録位置をMRI上に正確に重ね合わせることができるようになった。この方法によって記録した神経細胞が嗅脳溝の基底部の狙い通りの場所に入っているか否かを決定できるようになった。
- 2) 全ての単一神経細胞記録が終了したあと、嗅脳溝基底内または電気生理学的に同定した白質から嗅脳溝基底部への遷移部位に電氣的にいくつかの微小な損傷マーカーを作成した(図1c-d, f-g)。1)でつけた金属沈着はPrussian blue反応によりまた損傷マーカーはNissl染色により可視化し、記録部位の再構成に用いた(図1e, 1h)。

対連合課題：

A35の神経応答を調べるために、2つの図形間の長期連合記憶を必要とする対連合課題を用いた。各試行において、手がかり刺激が300ms提示された後に2秒間の遅延期間をはさんで2つの選択図形が提示される。一つは手がかり刺激の対刺激で他方は別の対からの刺激である。サルは手がかり刺激の対になっている方の図形(対刺激)を正しく選ぶことで報酬を得る。視覚刺激は16枚の単色のフーリエ図形からなる。各サルは95%以上の正答率を示した。

私は対連合課題遂行中の2匹のサルにおいて全部で181個の神経細胞をA35から記録した。こ

のうち67個の神経細胞が手がかり刺激呈示期間(64個)または遅延期間(18個)中に有意に刺激選択性を示した ($P < 0.01$, one-way ANOVA)。これらを以後、刺激選択的神経細胞と称する。67個の刺激選択的神経細胞のうち、15個の神経細胞が両期間で刺激選択性を見せた。これら刺激選択的神経細胞の空間分布を各サルにおいて冠状面で見ると、どちらのサルにおいても刺激選択的神経細胞の大部分はA35内で固まって存在し、前後軸方向に沿って3–4 mmの長さの範囲に集中する傾向があった。

私はまず全体的なA35神経細胞の神経応答を調べた。A35で記録された手がかり刺激に選択的な神経細胞の平均発火頻度を見てみると、A36で観察されるような対連合を記録する刺激選択性のパターンだった。これを対連合応答という。そこで私は先行研究で得られたA36の神経活動(Naya et al., 2003)と今回A35から記録した神経活動を比較することにした。A36の神経特性の一部は既に報告済みだが(Naya et al., 2003)、今回の報告ではA36から取れた全神経細胞について新たに解析しなおしてある。

対連合の度合いを定量化するために、手がかり刺激呈示期間中の特定の刺激に対する平均発火頻度とその対刺激に対する平均発火頻度との間の相関係数を各神経細胞について計算した。この相関係数を対連合指数(Pair-Coding Index, PCI)と定義した。仮に単一の神経細胞が刺激対と無関係に刺激選択性を示せば、PCIの期待値は0に近づく。手がかり刺激に選択性を示す神経細胞についてPCIの分布を見ると、A36と同様に有意に正に偏っていた (A35, $n = 64$, median = 0.39; A36, $n = 73$, median = 0.54; $P < 0.001$ for both areas, Wilcoxon's signed-rank test)。このことはA35の神経細胞は集団として対連合を表現していることを示唆している。A35の神経細胞のPCIの分布はA36と有意な差は無かった ($P = 0.13$; Kolmogorov-Smirnov test)。このことは2つの領野間には対連合に関して階層的な上下関係はないということを示唆している。

遅延期間の神経活動は連合記憶の情報を時間的に伝えると考えられている(Fuster, 1999; Naya et al., 1996)。そこで私は先の手がかり刺激選択的神経細胞を遅延期間にも刺激選択性がある(= 遅延選択的神経細胞)か否かで2群にわけた。遅延期間にも選択性を持つ神経細胞のPCI ($n = 15$, median = 0.78) は遅延期間にまで刺激選択性を維持できなかった神経細胞 ($n = 49$, median = 0.29) に比べて有意に高いPCIを持っていた (Kolmogorov-Smirnov test, $P = 0.021$)。この傾向はA36でも観察され、A35の遅延選択的神経細胞のPCIはA36のものとは有意な差はなかった ($P = 0.37$)。A35では、手がかり期間に刺激選択性を示さない3つの神経細胞を含む18個の神経細胞が遅延期間選択性を示した。A36では40個だった。以後、私はこれらの遅延選択的神経細胞に注目して解析した。

A35から記録された代表的な遅延選択的神経細胞の応答を示す(図2a)。この細胞は手がかり期間に提示された特定の刺激に対して最も強い応答を示す(最適刺激、赤色の線)。一方、その対刺激が提示されると、最適刺激の時と同等に反応をする(対刺激、マゼンダの線)。この最適刺激とその対刺激からなる組を第一対(the primary pair)と呼ぶことにする。この第一対に対する強い応答に対して、この神経細胞は他のどの対に属する刺激を手がかり刺激として提示してもほとんど反応しない(残りの対への平均応答、灰色の線)。我々の研究室では以前A36の神経細胞が最適刺激とその対刺激に対する応答が相関しているような対連合応答をすると報告した(Naya et al., 2003)。しかしながらA36では、たとえ神経細胞が高いPCI値を持っていたとしても特に遅延期間に選択性を示す場合にこれらの神経細胞において最適試行での神経活動と対試行での神経活動とは弁別がつくものであった。一方で、図2のA35の神経細胞は最適試行での神経活動と対試行での神経活動を区別するのは難しいものだった。このように特定の図形対に選択的に反応し、その図形対内は区別しないような神経活動はA35において神経細胞が図形対

単位で連合記憶を表現していることを示唆している。

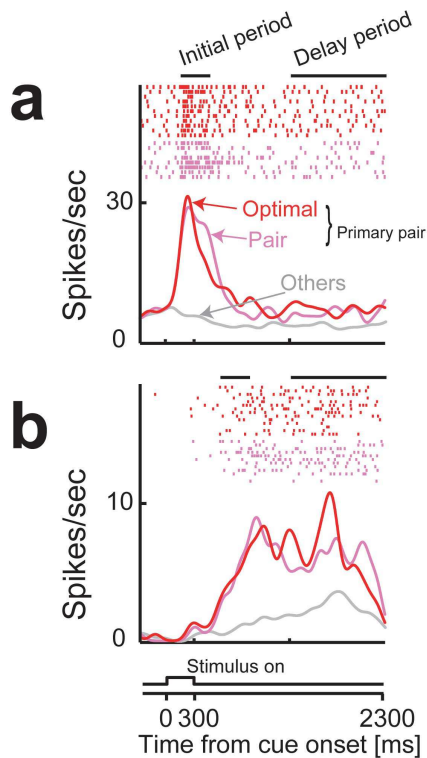


図 2

A35 から記録された遅延選択的神経細胞の例。

ラスタープロットとスパイク密度関数は手がかり刺激提示開始時で揃えて表示してある。

そこで私は最適試行と対試行との間を発火頻度では区別することが難しいという傾向が A35 の遅延選択的神経細胞全体でも観察されるかを ROC 曲線解析で調べた。ROC 曲線解析では、各神経細胞のふるまいから観察した試行が最適刺激が提示された試行なのか対刺激が提示された試行なのかを区別できるか推定することができる。ROC 曲線より下の部分の面積(AUC)は 2 種類の試行の間の弁別能力を示す指標になる。AUC が 1 に近いほど確実な弁別を意味し 0.5 に近いほど弁別ができないことを意味する。A35 においては、第一対内の各刺激(= 最適刺激と対刺激)間の弁別能力を示す指標である AUC の中央値は 0.65 であった。一方、A36 においては 0.79 であった。AUC の分布は A36 よりも A35 の方が有意に低かった (図 3 左、Kolmogorov-Smirnov test, $P=0.02$)。このことは A36 に比べて A35 の方が最適試行に対する神経応答と対試行に対する神経応答がより同等であることを示唆している。続いて、各神経細胞が第一対とその他の対をどれくらい弁別しているのかふるまいをみた(対間の弁別)。対間の弁別に対して AUC の値は A35 (median = 0.72)と A36 (median = 0.72) とでは有意に差は無かった (図 3 右、Kolmogorov-Smirnov test, $P=0.92$)。このことは、A35 が A36 に比べて対間の弁別能力に変わりはなく、これらの結果が単に A35 の神経細胞が刺激選択性が低いことを反映しているわけではないことを示唆している。

最適刺激 vs 対刺激

第一対 vs その他の対

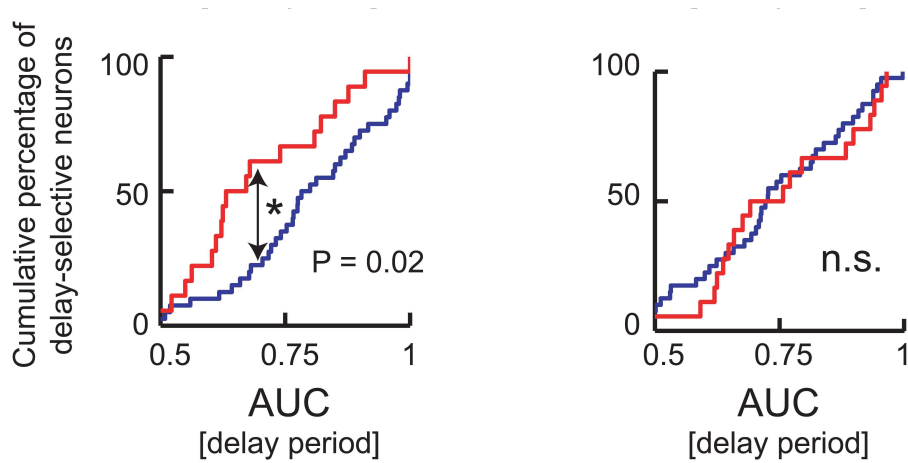


図 3
A35(赤)と A36(青)に
ける AUC の比較。

以上より、本研究において私は系統的に A35 の神経細胞から神経活動を記録することに成功し、A35 の神経細胞が対連合を表現していること、特に遅延期間に刺激選択性を示す細胞については A36 と比較して対連合の表現がより抽象度が高い表現になっていることを示した。