研究論文

大脳皮質聴覚野における海馬刺激強度依存的な応答変化の光計測^{*1}

宮崎 崇史^{*2}, 大神田 瑞樹^{*3}, 山本 純^{*3,*4},
佐々木 寛^{*5,*6}, 塚田 稔^{*3,*5}, 安西 祐一郎^{*2}

慶應義塾大学理工学部^{*2}, 玉川大学工学部^{*3}, 理化学研究所 脳科学総合研究センター^{*4},
玉川大学学術研究所^{*5}, 山形大学医学部^{*6}

Optical Recording of Hippocampal Stimulus Intensity
Dependent Responses to a Sound in the Auditory Cortex

Takashi Miyazaki,^{*2} Mizuki Okanda,^{*3} Jun Yamamoto,^{*3,*4} Hiroshi Sasaki,^{*5,*6}
Minoru Tsukada^{*3,*5} and Yuichiro Anzai^{*2}

Faculty of Science and Technology, Keio University^{*2}
Faculty of Engineering, Tamagawa University^{*3}
Brain Science Institute, RIKEN^{*4}
Tamagawa University Research Institute^{*5}
Yamagata University School of Medicine^{*6}

It is believed that the hippocampus and the neocortex are involved in several aspects of learning and memory. However, the relationship of the activities between the hippocampus and the neocortex are not well investigated. In the present study, we recorded the response to a sound stimuli in the auditory cortex of the anesthetized guinea pig by voltage sensitive optical recording. And we examined the effect of the hippocampal stimulation on the auditory cortex response by changing the stimulation current intensity. The results showed that the weak stimulation inhibits the auditory responses but the strong stimulation facilitates the responses. It means that the hippocampal activity can produce excitatory or inhibitory potentials, suggesting that it is an important neuronal basis of the memory consolidation process.

1. 序 論

これまでの臨床的¹⁾, 解剖学的²⁾, 生理学的³⁾, 理論的^{4,5)} 知見から, 海馬と大脳新皮質が脳の記憶に重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。

霊長類や齧歯類では大脳新皮質のほとんどの領野から海馬に対して嗅内野を介した投射があり, 海馬内のトリシナプティック回路を経た出力は再び嗅内野を介して新皮質へと投射する⁶⁾。このような回路構造によって, 記憶の固定が行なわれているとする仮説が有力で

ある²⁾。この仮説では, 新皮質で処理された情報は海馬で統合され, 再び新皮質に戻って長期的な記憶として定着すると考える。

脳が実際にこのような形で記憶処理を行なっているかどうかを検証するには, 海馬と大脳新皮質の活動の連関を調べる必要がある。海馬の CA1 領域から新皮質の前頭前野や下側頭皮質に対しては単シナプスの投射が存在し^{7,8)}, 海馬とこれらの領野の生理学的な関係について数多くの知見が報告されてきた⁹⁻¹²⁾。しかし, 嗅内野を介した経路しか持たない新皮質の他の領野に関して, 海馬との関係を調べた報告は少ない。

山本らは膜電位光計測法を用い, 音刺激による大脳新皮質聴覚野の活動が海馬に対する電流刺激によって抑制されることを報告し¹³⁾, 海馬活動が聴覚野の活動に影響を与え得ることを示した。聴覚野にも他の領野と同様に, 嗅内野への収斂性の投射と嗅内野からの分

^{*1} 2004 年 8 月 4 日受付, 2004 年 11 月 15 日受理

^{*2} 〒 223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

^{*3} 〒 194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1

^{*4} 〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

^{*5} 〒 194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1

^{*6} 〒 990-9585 山形県山形市飯田西 2-2-2

散性のフィードバック投射が存在することが報告されており¹⁴⁾、このような実験パラダイムによって嗅内野を介した海馬と新皮質間の機能的な連関を調べることができる。また、膜電位光計測法を用いることによって聴覚野内の神経活動の変化を細かい解像度で時間的に解析することが可能である。

そこで本研究ではこの実験パラダイムを発展させ、異なる強度の電流刺激を行ない、海馬内に生じる神経活動の違いによって聴覚野応答にどのように修飾されるかを検討した。これにより海馬と大脳新皮質聴覚野の経路に関する知見が深まり、海馬と大脳新皮質に基づいた記憶情報処理のメカニズムの理解へとつながると考えられる。

2. 実験方法

実験方法の多くの部分は既報¹³⁾と共通である。以下では、本研究において異なる点を中心に実験の概略を述べる。

実験には4~6週齢のメスのモルモット(250~400 g, $n = 3$)を用いた。実験動物の取扱いは、玉川大学の「動物実験に関する指針」に従った。外科手術では、まずアトロピン(0.2 ml/kg, 皮下注射)を麻酔の30分前に投与した。次に、混合麻酔(ケタミン:20 mg/kg, キシラジン:10 mg/kg, 筋肉注射, 1時間ごと)を両後足から初回のみ2倍量投与した。さらに、人工呼吸を行なうために気管切開を施し、カニューレを挿入した。そして筋弛緩剤臭化パンクロニウム(0.2 mg/kg, 筋肉注射, 3時間ごと)を投与して自発呼吸を停止し、人工呼吸に移行した。

測定領域の中心を大脳皮質一次聴覚野とするため、次のようにその位置を決定した。Bregmaを左側に下がった縫合線の分岐点から、正中線に平行に尾側に5 mm, 正中線に垂直に5 mm 下がり、その点を中心とした5 mm 角の正方領域を観測領域とした。また、Bregmaから正中線に沿って尾側に4.5 mm 進み、そこから正中線に対し左側頭方向に垂直に5 mm 下がった位置に孔を開け、海馬刺激用電極を刺入した。刺激電極には直径80 μ m のタングステン線の双極電極を用いた。電極の深さは約2.0 mm~2.5 mm とし、刺激電極から記録される局所電位を参考に深さを決定した。

露出した左聴覚野を、生理食塩水に溶かした濃度0.125 mg/ml の膜電位感受性色素 RH795 (Molecular Probes, Inc.) で約1時間染色した。その後色素を取り除き、計測を行なった。計測中は脳表面が乾燥しないように生理食塩水を必要に応じて滴下した。

計測には落射蛍光の光学系を使用し、540 $\pm$ 30 nm

の干渉フィルタ、580 nm のダイクロイック・ミラー、600 nm の吸光フィルタ、2倍の対物レンズ(NA 0.26)を用いた。脳表面からの蛍光シグナルは、128 $\times$ 128 チャンネルのMOS型撮像デバイスを使用した光計測システム(SD1001, FUJIFILM Microdevices)で記録した。

呼吸による脳表面の隆起の影響をなくするため、測定は人工呼吸に同期して行なった。色素の退色や細胞の光損傷を減らすため、計測時以外はシャットにより励起光が当たらないようにした。サンプリングは1.2 ms おきに行ない、S/Nを向上するため32回の計測データの加算平均を行なった。

音刺激には8 kHzの純音(持続時間10 ms, 音圧60 dB SPL)を用いた。音刺激はTDT System II (Tucker Davis Technologies)を用いて生成、出力し、スピーカを通じて右耳に提示した。

海馬への刺激は200 μ s のシングルパルスで、刺激は音刺激の出力タイミングに同期させた。実験は海馬刺激なしの場合の32回の計測をまず行ない、以降海馬刺激強度が0.19 mA, 0.38 mA, 0.57 mA, 0.76 mAの順番で各32回の計測を行なった。計測と計測の間隔は海馬刺激により海馬内に可塑的变化が生じないように20 sとした^{15,16)}。

測定終了後、刺激電極に5~10秒程度10 mAの電流を流して電極の刺入位置に痕跡を作った。さらに、脳を摘出しスライス切片を作成して電極先端が海馬CA1領域に位置していたことを確認した。

3. 実験結果

本研究では、麻酔下のモルモットから、音刺激を提示したときの大脳皮質聴覚野の活動を光計測法により記録した。このとき、音刺激提示と同時のタイミングで海馬CA1領域に電気刺激を行ない、海馬の刺激強度と聴覚野活動の変化の関係を調べた。

Fig. 1は8 kHzの純音を提示し、それと同時に海馬に電気刺激を行なったときの大脳皮質聴覚野の神経活動を光計測した結果の時系列画像である。図中のスケールバーは1 mmを示し、画像の上が背側、左が吻側である。画像の各点には蛍光強度変化に対して擬似カラーを割当てており、対応関係をカラーバーに示した。蛍光強度変化は膜電位変化に比例するため、赤の部分は神経活動が強いことを表わす。海馬刺激を与えない場合の画像に代表されるように、神経活動は聴覚野の背側部から始まりその後活動が全体に拡がっていくような時間経過をたどる。

0.19 mAの電流刺激を海馬に与えた場合、すでに報

Fig. 1 Optical images of auditory responses

Fig. 2 Time courses of auditory responses

告¹³⁾ されているように、刺激なしの場合に比べ聴覚野の応答は抑制された。この電流刺激をさらに強くしていくと聴覚野の応答抑制は小さくなり、0.76 mA でははっきりと刺激なしの場合よりも強い応答を示した。海馬刺激の影響を空間分布でみると、背側では強い影響があるが、腹側では影響が小さい。

また、聴覚野応答の時間的变化を調べるため計測画

Fig. 3 Effect of hippocampal stimulation on auditory responses

像中から3点 A (68, 34), B (109, 28), C (78, 82) を選んで応答の時間推移を示した (Fig. 2)。グラフの横軸は音刺激提示時刻を基準として経過時間、縦軸は膜電位変化に比例した蛍光強度変化を表している。海馬刺激の有無にかかわらず、音刺激提示後約 20 ms 後から応答が始まり 30 ms 後から 40 ms 後までの間にピークに達する。海馬刺激を行なった場合の聴覚野応答への影響は応答のピーク時点ですでに表われているが、ピーク後の応答経過で差がより大きく表れた。

このように海馬刺激の影響は背側と腹側、ピークとピーク後で違いが見られる。ここで、ピーク潜時に関してヒストグラムを描くと二峰性となり (Fig. 3A)、速い山が背側、遅い山が腹側に対応していることが分かった。Fig. 3A は海馬刺激なしの場合のヒストグラムで、横軸はピーク時刻、縦軸はピクセル数を表わしている。このような分布は刺激条件によらずほぼ一定であることから、ピーク潜時の分布をもとに各点を背側と腹側に分類することとした。そして、海馬刺激の効果を定量化するため、各点の時間推移をもとに聴覚野応答のピーク値とピーク後の一定区間の応答の平均値を使ってグラフに示したものが、それぞれ Fig. 3C と D である。ピーク値は音刺激提示後から 57 ms までの範囲の最大値、ピーク後の応答は音刺激提示後 57 ms から 81 ms までの 20 個のデータの平均値を用いて計算した (Fig. 3B)。また、海馬刺激の効果をみるため

海馬刺激なしの場合を 100%として正規化し、背側および腹側のそれぞれについて集計して平均値 ± 標準誤差として Fig. 3C, D に表示した。グラフの見易さのため Fig. 3D において 0.57 mA と 0.76 mA のエラーバーの向きを入れ替えた。

Fig. 3C, D からは、海馬刺激が 0.19 mA, 0.38 mA では抑制性に働き 0.57 mA および 0.76 mA では興奮性に働いていること、海馬刺激の効果は背側よりは腹側、ピークよりはピーク後で強いことが分かる。同様の結果が他の個体からも確認された。

4. 考 察

本実験では、海馬刺激強度を変化させた時の音刺激に対する大脳新皮質聴覚野の応答を光計測法により調べた。結果で述べたように、海馬刺激を行なわなかった場合に比べ海馬刺激の電流値が 0.19 mA から 0.38 mA の範囲では聴覚野の応答に対し抑制性に働き、それよりも大きい場合には逆に興奮性に働くことが分かった。

ここではまず、膜電位感受性色素による光計測シグナルの解釈について議論する。次に、今回の結果の記憶処理における意義を考察する。最後に、解剖学的な知見などをもとに、今回の結果がどのような神経基盤によって生じた可能性があるかを検討する。

まず、光計測シグナルに含まれる神経活動の起源について考える。大脳皮質表面を上から見たときの膜面積のほとんどを樹状突起が占めるため、光計測シグナルは興奮性や抑制性の後シナプス電位成分が主であるという解釈¹⁷⁾が一般的であり、同時に局所電位記録や細胞内記録を行なったときの比較もこの解釈を支持している。活動電位も計測シグナル中に含まれると考えられるが、シナプス電位の成分が支配的であることに加え、データの加算平均、神経組織による光散乱、非焦点面からの光の混入などの複合的な理由により、特に *in vivo* では分離は極めて困難である。

また一般に大脳新皮質は細胞の分布によって垂直方向に 6 層 (I 層 ~ VI 層) に分類されており¹⁸⁾、聴覚野も同様である。光計測シグナルがどの層の活動を反映しているかについては、色素の染色深度や顕微鏡の焦点を変化させたときの応答¹⁹⁾、スライスでの活動伝播の様子²⁰⁾から、モルモット聴覚野ではほぼ 200 ~ 300 μm の深度、II 層から III 層上部までに含まれる神経細胞の活動を最も強く反映していると推測される。

次に、今回の結果分かった海馬 CA1 領野と大脳皮質聴覚野が持つ機能的連関の記憶過程における意義について考える。海馬から大脳皮質への投射経路の役割についての有力な仮説のひとつは、短期記憶から長期

記憶への記憶の固定に関与している²⁾というものである。最近ではシナプスの長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) が大脳皮質の可塑性の基礎になっていることを示唆する結果^{21, 22)}が報告されており、いわゆる長期記憶が大脳皮質内にこうした形で保持されている可能性が高い。今回海馬 CA1 領野への刺激の違いが、大脳皮質聴覚野に見られる応答に対して抑制性にも興奮性にも働くことが分かったが、これは海馬からの入力によって大脳皮質聴覚野に LTP や LTD などのシナプス可塑性を起こしやすくしている可能性がある。また、海馬刺激の強度は同時に賦活される神経細胞の数に対応すると考えられるため、海馬刺激を強くしていったときに聴覚野への影響が抑制性から興奮性へと変化したことは、海馬内の神経活動の大きさが大脳皮質に記憶が固定される時の情報に対する重要度を表現している可能性がある。

最後に、解剖学的な知見をもとに海馬刺激が聴覚野応答を変化させる神経基盤を考える。海馬 CA1 領野から大脳皮質聴覚野への同定されている経路は、CA1 から嗅内野を経た投射で、嗅内野に対する順行性トレーサ PHA-L の注入によって聴覚野の I 層深部、II ~ III 層および VI 層が染まることが報告されている¹⁴⁾。この報告からは、結合が興奮性であるか抑制性であるかや細胞の種類などは分らないが、光計測で主に記録されていると思われる皮質の II, III 層への投射が存在することから、海馬 CA1 の活動が嗅内野動を経て聴覚野の II, III 層の細胞に抑制性や興奮性の作用を与えたと推測できる。

このように、海馬刺激が強度に応じて聴覚野応答に対し抑制性にも興奮性にも働く機序について、以下のような可能性が考えられる。(1) 嗅内野から聴覚野への投射は興奮性と抑制性それぞれが存在すると考える。海馬刺激強度が小さいときは抑制性シナプス伝達主体で聴覚野応答は抑制され、刺激強度が増すにつれ興奮性の寄与が抑制を上回るようになった。(2) 嗅内野から聴覚野の抑制性細胞およびそれらをさらに抑制する細胞に対して興奮性投射が存在すると考える。刺激強度が小さいときは抑制性細胞のみが刺激され聴覚野の応答が抑制されるが、刺激強度が増すにつれそれらを抑制する細胞への刺激が強まり、脱抑制によって応答が強まった。通常音刺激に対して聴覚野が応答する場合抑制系も活動しており¹⁹⁾、海馬刺激なしの場合より応答が強くなる場合があることも矛盾しない。(3) 皮質錐体細胞に存在する GABA_A 受容体は興奮性に働く場合があり^{23 ~ 25)}、嗅内野からの投射先の抑制性細胞が錐体細胞に対して作っているシナプスが刺激強度

が上がるにつれて抑制性から興奮性に変化したと考える。これらの可能性のいずれが正しいのか、あるいは複合的な結果であるのかは今回の結果から断定するのは難しく、これらの仮説の特徴を踏まえた検証実験が必要である。

またこれ以外に、海馬刺激によって聴覚経路中の大脳皮質より下位の部位が影響を受けた可能性も考えられる。音刺激は内耳の蝸牛で神経活動に変換され、蝸牛神経核、上オリーブ核、外側毛帯核、下丘、内側膝状体を経て大脳新皮質聴覚野に到達することが知られている。しかし、海馬からこれら皮質下の各部位への直接投射は知られていないことから、大脳皮質より下位の部位への海馬刺激の影響が今回の現象の原因である可能性は低いと考える。

なお、今回の結果では観測領域の腹側より背側に海馬刺激の効果が強く表れた。この理由として、腹側には一次聴覚野 (AI) の腹側にあるとされる VRB 領域²⁶⁾からの応答が含まれていた可能性が挙げられる。海馬 CA1 や嗅内野から VRB への投射は特に知られていないため、VRB では海馬刺激の影響が小さく、結果として観測領域腹側における海馬刺激の効果を弱めたという仮説が成り立つ。Wallace らは AI に比べ VRB では潜時が約 10 ms 遅れるということを報告²⁶⁾しており、これも Fig. 3A の潜時分布と一致する。しかし、AI は今回定義した背側領域よりもかなり広いことや、Wallace らがスパイクによって潜時を計算しているのに対し光計測では EPSP の潜時であり結果が一致するとは限らないことから、背側も腹側も AI であり AI 内部に 2 種類の EPSP 潜時の分布が存在した可能性もある。その場合は海馬からの投射が腹側よりも背側でより強く結合していると考えられる。

今回の結果により、海馬から嗅内野を介した大脳皮質への経路の性質の一部が明らかになり、この系が記憶の長期な固定に実際に関与していることが示唆された。ただし、今回の現象の神経生理学的基盤の同定や、実際に海馬の活動によって皮質内に LTP、LTD などのシナプス可塑性が生じるかどうかの検証は今後の課題である。

5. ま と め

本研究では記憶に中心的な役割を果たしていると考えられる、大脳新皮質と海馬間の活動の関連を調べるため、海馬 CA1 領域に対する電気刺激によって大脳皮質聴覚野の音刺激応答がどう変化するかを光計測法によって観測した。その結果、刺激強度によって聴覚野応答の増加あるいは減少が見られた。このことから、

海馬活動が嗅内野を介して大脳皮質聴覚野における情報処理に強く関与していることが示唆された。

謝 辞

本研究は、文部科学省の 21 世紀 COE プログラム「全人的人間科学プログラム」の援助を受けた。

参 考 文 献

- 1) Squire, L.R., Knowlton, B., and Musen, G. (1993): The structure and organization of memory, *Annu. Rev. Psychol.*, Vol.44, pp.453-495
- 2) Lavenex, P. and Amaral, D.G. (2000): Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity, *Hippocampus*, Vol.10, pp.420-430
- 3) Buzsáki, G. (1996): The hippocampo-neocortical dialogue, *Cereb. Cortex*, Vol.6, pp.81-92
- 4) Rolls, E.T. (1989): Functions of Neuronal Networks in the Hippocampus and Neocortex in Memory. In Byrne, J.H. and Berry, W.O. (Eds.), *Neural Models of Plasticity: Experimental and Theoretical Approach.* (pp.240-265) San Diego, CA: Academic Press
- 5) O'Reilly, R.C. and Rudy, J.W. (2000): Computational principles of learning in the neocortex and hippocampus, *Hippocampus*, Vol.10, pp.389-397
- 6) Eichenbaum, H. (2000): A cortical-hippocampal system for declarative memory, *Nature Rev. Neurosci.*, Vol.1, pp.41-50
- 7) Ferino, F., Thierry, A.M., and Glowinski, J. (1987): Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat, *Exp. Brain Res.*, Vol.65, pp.421-426
- 8) Zhong, Y.-M. and Rockland, K.S. (2004): Connections between the anterior inferotemporal cortex (area TE) and CA1 of the hippocampus in monkey, *Exp. Brain Res.*, Vol.155, pp.311-319
- 9) Laroche, S., Jay, T.M., and Thierry, A.-M. (1990): Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region, *Neurosci. Lett.*, Vol.114, pp.184-190
- 10) Qin, Y.-L., McNaughton, B.L., Skaggs, W.E., and Barnes, C.A. (1997): Memory reprocessing in corticocortical and hippocampocortical neuronal ensembles, *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B*, Vol.352, pp.1525-1533

- 11) Thierry, A.-M., Gioanni, Y., Dégénétais, E., and Glowinski, J. (2000): Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics, *Hippocampus*, Vol.10, pp.411–419
- 12) Siapas, A.G. and Wilson, M.A. (1998): Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep, *Neuron*, Vol.21, pp.1123–1128
- 13) 山本 純, 門司廣之, 大神田瑞樹, 塚田 稔, 佐々木寛, 福西宏有, 安西祐一郎 (1999): 音と海馬の複合刺激によってモルモット聴覚皮質に誘起されるダイナミックな相互作用, *日本神経回路学会誌*, Vol.6, No.1, pp.11–16
- 14) Swanson, L.W. and Köhler, C. (1986): Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat, *J. Neurosci.*, Vol.6, No.10, pp.3010–3023
- 15) O'Boyle, M.P., Do, V., Derrick, B.E., and Claiborne, B.J. (2003): In vivo recordings of long-term potentiation and long-term depression in the dentate gyrus of the neonatal rat, *J. Neurophysiol.*, Vol.91, pp.613–622
- 16) Skelton, R.W., Miller, J.J., and Phillips, A.G. (1983): Low-frequency stimulation of the perforant path produces long-term potentiation in the dentate gyrus of unanesthetized rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Vol.61, pp.1156–1161
- 17) Grinvald, A., Lieke, E.E., Frostig, R.D., and Hildesheim, R. (1994): Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by real-time optical imaging of macaque monkey primary visual cortex, *J. Neurosci.*, Vol.14, No.5, pp.2545–2568
- 18) Abeles, M. (1991): *Corticonics: Neural Circuits of the Cerebral Cortex*, Cambridge University Press
- 19) Horikawa, J., Hosokawa, Y., Kubota, M., Nasu, M., and Taniguchi, I. (1996): Optical imaging of spatiotemporal patterns of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition in the guinea-pig, *J. Physiol.*, Vol.497, No.3, pp.629–638
- 20) Kubota, M., Sugimoto, S., Horikawa, J., Nasu, M., and Taniguchi, I. (1997): Optical imaging of dynamic horizontal spread of excitation in rat auditory cortex slices, *Neuroscience Letters*, Vol.237, pp.77–80
- 21) Buonomano, D.V. and Merzenich, M.M. (1998): Cortical plasticity: From synapses to maps, *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol.21, pp.149–186
- 22) Allen, C.B., Celikel, T., and Feldman, D.E. (2003): Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity *in vivo*, *Nature Neurosci.*, Vol.6, No.3, pp.291–299
- 23) Staley, K.J., Soldo, B.L., and Proctor, W.R. (1995): Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors, *Science*, Vol.269, pp.977–981
- 24) Gullledge, A.T. and Stuart, G.J. (2003): Excitatory actions of GABA in the cortex, *Neuron*, Vol.37, pp.299–309
- 25) Fujii, H., Aihara, K., and Tsuda, I. (2004): Functional relevance of 'excitatory' GABA actions in cortical interneurons: A dynamical systems approach, *J. Integr. Neurosci.*, Vol.3, No.2, pp.183–205
- 26) Wallace, M.N., Rutkowski, R.G., and Palmer, A.R. (2000): Identification and localisation of auditory areas in guinea pig cortex, *Exp. Brain Res.*, Vol.132, pp.445–456