



Title	計時の生理学的研究
Author(s)	鈴木, 智貴
Description	配架番号 : 2389
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13010号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13010
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88840
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoki_Suzuki.pdf



学 位 論 文

計時の生理学的研究

(Neural mechanisms of timing)

2018年3月

北 海 道 大 学

鈴木 智貴

学 位 論 文

計時の生理学的研究

(Neural mechanisms of timing)

2018年3月

北 海 道 大 学

鈴木 智貴

目次

発表論文目録および学会発表目録	1頁
緒言	3頁
略語表	6頁
第1章：瞳孔径と主観的な時間経過との相関	
背景	7頁
実験方法	7頁
実験結果	9頁
考察	18頁
第2章：ノルアドレナリンが運動タイミングに及ぼす影響	
背景	20頁
実験方法	20頁
実験結果	22頁
考察	28頁
第3章：計時の際の線条体 LFP の解析	
背景	30頁
実験方法	31頁
実験結果	34頁
考察	42頁
総括および結論	46頁
謝辞	48頁
引用文献	49頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Tomoki W. Suzuki, Jun Kunimatsu, Masaki Tanaka. Correlation between pupil size and subjective passage of time in non-human primates. *J Neurosci.*, 36: 11331-11337 (2016).
2. Tomoki W. Suzuki, Masaki Tanaka. Causal role of noradrenaline in the timing of internally generated saccades in monkeys. *Neuroscience*, 366: 15-22 (2017).
3. 田中真樹, 鈴木智貴, 亀田将史, 竹谷隆司. 計時と予測の神経機構. *Brain and Nerve*, 69: 1213-1222 (2017).
4. 鈴木智貴, 國松淳, 田中真樹. Best articles of the year: 瞳孔径から主観的な時間経過の調節機構を探る. *北海道医学雑誌*, 92: 91 (2017).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Tomoki W. Suzuki, Masaki Tanaka. LFP in the primate caudate nucleus reflect different preparatory states during the time production task. 第40回日本神経科学大会, 2017年7月20日, 幕張メッセ.
2. Tomoki W. Suzuki, Masaki Tanaka. Oscillatory activity in the primate caudate nucleus correlates with different preparatory states in interval timing task. 第12回 国際大脳基底核学会 (IBAGS2017) 2017年3月27-30日, メリダ, メキシコ.
3. Tomoki W. Suzuki, Jun Kunimatsu, Masaki Tanaka. Correlation between pupil size and self-timed saccade latency in non-human primates. 第46回北米神経科学学会 (SfN2016) 2016年11月12日, サンディエゴ, 米国.

4. 鈴木智貴, 田中真樹. 瞳孔径と主観的な時間経過との相関 第93回 日本生理学大会 2016年 3月22日, 札幌.

5. 鈴木智貴, 田中真樹. 計時におけるノルアドレナリンシステムの役割. 平成27年度 生理学会北海道地方会, 2015年9月5日, 旭川

【緒言】

私たちはある程度正確に時間の経過を感じとり、それに基づいて行動を制御することができる。これはどのようなメカニズムによるものだろうか。特に、秒以下から分単位の時間情報は日常生活に欠かせない。概日リズムにおいて視交叉上核が決定的なペースメーカーとして機能するのは対照的に、この範囲での時間情報処理にはマスタークロックは存在せず、複数の脳部位が関わっていると考えられている¹⁻³。実際、時間情報処理の障害を主症状とする疾患が存在しない一方で、前頭連合野や大脳基底核あるいは小脳といった様々な脳部位の障害が、計時を必要とする行動課題の成績に大きな影響を及ぼす⁴。例えば、提示された2種類の時間長を弁別する課題をおこなうと、Parkinson 病のような大脳基底核疾患では成績が低下することが知られているが³、同様の結果は前頭前野や小脳に局所病変を持つ場合でも報告されている^{1,4,5}。脳機能画像を用いた研究でも、計時の最中に補足運動野や大脳基底核、外側小脳等の様々な脳領域で活動が上昇することが報告されている^{3,4}。しかしながら、こうした知見が蓄積されていく一方、計時の具体的な神経機構についてはほとんどわかっていない。これを詳しく調べるため、高度な認知機能を有しており、またヒトに類似の脳構造を持つニホンザルに時間生成課題⁶を訓練した(図1A)。行動指標としては、定量解析が容易かつ、疲労の影響が少ない眼球運動を用いた。この課題では、視覚刺激の提示(100 ms)から一定時間経過後に眼球運動をおこなうことで報酬が与えられた。

私は大学院入学前に共同研究者とともに線条体(尾状核)と小脳歯状核から単一ニューロン記録をおこない、これらの部位に眼球運動に先行して発火頻度の漸増を示すニューロン群があることを見出してきた⁷(図1Bは尾状核ニューロンの一例)。固視点の色に応じて3種類の異なる時間長(400, 1000, 2200 ms)を報告するようにサルを訓練すると、線条体ニューロンが生成時間に応じて発火頻度の上昇率を変化させるのに対し、小脳歯状核ニューロンは活動を上昇させるタイミングを変化させることを発見した。

計時に関連した神経活動は他にも様々な脳領域で報告されている。例えば、Merchant ら⁸はサルが周期的にボタンを押すときの補足運動野や前補足運動野におけるニューロン活動を記録しており、運動前に漸増を示すもの、前回の運動からの経過時間を発火頻度の大きさにコードするもの、などいくつかのサブタイプを報告している。頭頂葉においても、時間経過の測定中に発火頻度を徐々に変化させるニューロン活動が報告されている⁹。計時関連活動が観察された部位の局所的な不活性化が実際に計時の成績を変化させることから^{6,7,10}、これは計時に深く関与するようである。一方で、こうした神経活動がどのように生成、制御さ

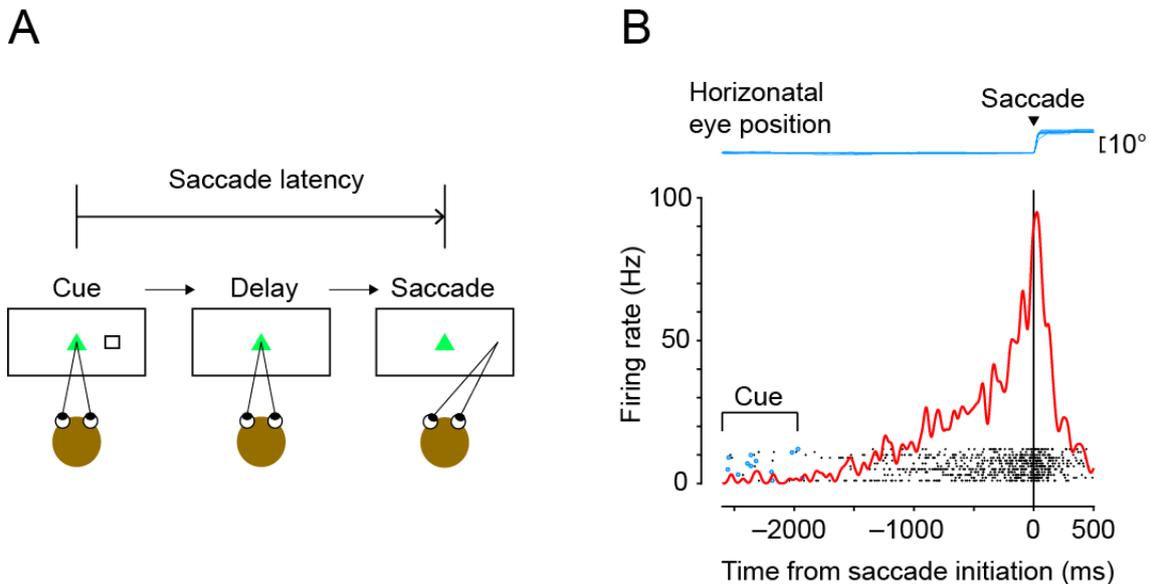


図1 時間生成課題

A, 手掛かり刺激 (cue) の提示後, しばらく待ってから自発的にサックードをおこなう。サックードが起こるまでの時間 (saccade latency) が一定時間以上であれば, 報酬が与えられる。B, 課題遂行中に記録した尾状核ニューロンの例。サックード開始にデータをそろえている。黒い点はこのニューロンの活動電位のタイミングを示しており, 各行は異なる試行を示している。青丸で示したのは, 各試行における手掛かり刺激のタイミングである。赤線は, このニューロンの平均発火頻度の推移を示している。上段は視線の水平位置を示している。

れているかは明らかでなく, 領域間連絡やネットワークレベルでの情報処理についてもほとんどわかっていない。

博士課程では, これを調べるために, 時間生成課題を用いた3つの実験をおこなった (図2)。第1章では, 気分や注意・覚醒状態が計時に影響を与えることに着目し, そうした内的因子の自律神経指標である瞳孔径の測定をおこなった。その結果から, 瞳孔径に関連した脳状態が主観的時間経過を変化させている可能性が示唆された。第2章では, 瞳孔径が青斑核のノルアドレナリン作動性ニューロンの活動とよく相関すること, ノルアドレナリンが上述の内的因子と深いかわりを持つことに着目し, ノルアドレナリン再取り込み阻害薬の投与が時間生成に及ぼす影響を調べた。第3章では, 計時に関連した神経活動の制御機構を探るために, 大脳皮質-基底核経路に着目し, 時間生成課題中の線条体 (尾状核) の局所フィールド電位 (local field potentials, LFP) を記録して解析した。

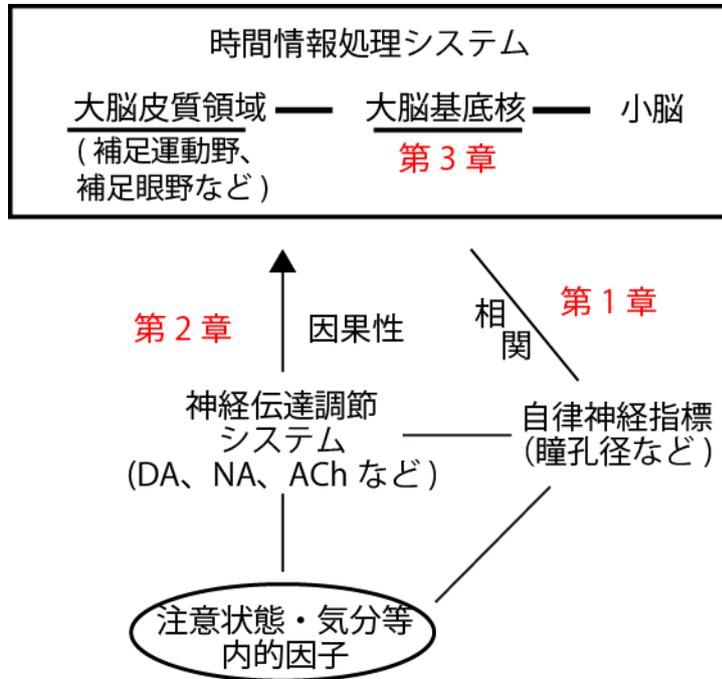


図2 1-3章の関係

DA：ドパミン， NA：ノルアドレナリン， ACh：アセチルコリン

【略語表】

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ANOVA	analysis of variance
a.u.	arbitrary unit
FFT	fast Fourier transform
LFP	local field potentials
MI	Modulation index

第1章 瞳孔径と主観的な時間経過との相関

【背景】

楽しい時間は早く過ぎ、退屈な時間は長く続くように感じられる。主観的な時間経過が、注意・覚醒状態、気分のような内的因子に影響されることは経験的に明らかであり、多くの心理物理実験でも確かめられている¹¹。例えば、強い感情を喚起するような画像はそうでない画像に比べて長く提示されているように感じられる¹²。また、うつ病患者は時間生成課題においてより長い時間長を報告する傾向にある¹³。こうした現象を説明するためのモデルはいくつか提唱されているが、その神経機構は不明である。様々な脳領域が時間情報処理に関わることがその解明を難しくしている。計時の神経機構を理解するためには、特定の脳部位における神経活動を調べるだけでなく、脳全体としての状態と計時との関係を調べることも重要であると考えられる。

瞳孔径の測定は脳全体の状態を調べる手段として有用である。瞳孔径は、注意や情動、知覚、ワーキングメモリなど、種々の要因によって変化する自律神経指標であり、内的因子の指標としてしばしば用いられてきた¹⁴⁻¹⁶。また、最近では、瞳孔径と様々な神経活動との相関が動物実験により示されている。例えば、げっ歯類を用いた実験で、大脳皮質ニューロンの膜電位の変動や視覚誘発応答のゲイン、集合電位の律動パターンなどと瞳孔径の相関が報告されている¹⁷⁻¹⁹。また、霊長類においては、体性感覚野や前部帯状皮質、青斑核などのニューロン活動が瞳孔径と相関することが示されている²⁰⁻²⁵。このように、瞳孔径は様々な脳部位における神経活動を反映しており、これを測定することで、時々刻々と変化する脳状態をモニターすることができると考えられる。

内的状態と時間情報処理との関係を調べるために、時間生成課題遂行中のニホンザルの瞳孔径を計測した。その結果、計時直前の瞳孔径と生成する時間長が逆相関することを発見し、瞳孔径に関連した脳状態が主観的時間経過の速度をバイアスしている可能性が示唆された。

【実験方法】

被検体

実験には3頭のニホンザル (*Macaca fuscata*, オス2頭, 6–8 kg) を用いた。イソフルラン (1–2%) による全身麻酔のもと、無菌的な処置によりヘッドホルダーとアイコイルを頭部と結膜下にそれぞれ留置した。術中と術後数日の間、鎮痛

薬（ペンタゾシン〈6.0 mg/day〉, ケトプロフェン〈1.5 mg/day〉）を投与した。手術から完全に回復したのち、動物に眼球運動を用いた課題を訓練した。訓練および実験中は、サルをモンキーチェアに乗せ、暗室の中で、頭を固定した状態で行った。眼球位置は、サーチコイル法で測定した（MEL-25, 演算子工業）。すべての実験プロトコルは、北海道大学動物実験委員会から事前に承認を得たものである。

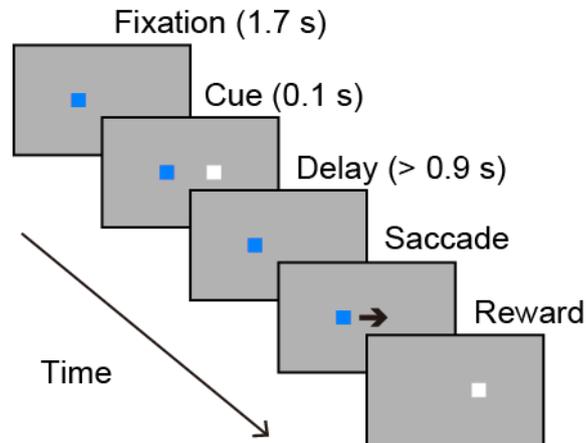
視覚刺激と行動課題

視覚刺激の提示には市販のプログラム（TEMPO; Reflective Computing）を用いた。視覚刺激は、サルの眼前46 cm に設置した LCD モニター（visual angle : $66 \times 40^\circ$ ）に提示した。時間生成課題では、各試行の最初に固視点（青色, 正方形, $0.3\text{-}0.5^\circ$ ）が中心から右または左に $6\text{-}7^\circ$ 離れた場所へ出現する。過度の瞳孔散大を防ぐために、灰色の背景（ 9.4 cd/m^2 , 全画面, または $66 \times 20^\circ$ ）を提示した。視線の位置が500 ms の間固視点の周囲 3° 以内にとどまった場合、それを固視の開始とみなし、1200 ms の固視の後、固視点から $12\text{-}14^\circ$ 離れた場所（モニター中心に対して固視点の反対の位置）に手掛かり刺激（白色, 正方形, $0.3\text{-}0.5^\circ$, 24.0 cd/m^2 ）を100 ms 提示した。各セッション内では、固視点と手掛かり刺激の位置は固定した。手掛かり刺激提示から一定時間経過後に手掛かり刺激のあった位置へ記憶誘導性に眼球運動（サッカード）すると報酬としてジュース（アクエリアス）を与えた。試行間間隔は3600–6000 ms とした。

実験1には3頭のサルを用いた。手掛かり刺激提示から1000–1700 ms の範囲内でサッカードした場合に報酬を与えた。対照実験として、視覚誘導性課題もおこなった。この課題では、最初に紫色の固視点（ $0.3\text{-}0.4^\circ$, 円形）がモニター中心に提示される。一定時間（1700 ms）の固視の後、左または右 7° の位置に標的を提示した。サルが400 ms 以内にこの位置へサッカードした場合に報酬を与えた。標的の出現から70 ms 以内におこったサッカード（予測性サッカード）は解析から除外した。

実験2には2頭のサルを用いた。この実験では、報酬を10試行ごとに増減させた（ $\sim 0.12, 0.24 \text{ ml/試行}$ ）。報酬量の切り替えに関する手掛かりは与えなかったため、サルは切り替え後最初の報酬をもらうことではじめて報酬量の違いに気がついたと考えられる。したがって、各報酬量のブロックの最初の試行が必ず報酬を伴った試行になるよう試行番号をずらしたうえで解析をおこなった。

実験3には2頭のサルを用いた。異なる固視点の色（ 8.1 cd/m^2 ）を用いて、長短2種類のうちどちらかの時間長条件を指示した。サル B では、シアン、ピンクと



400–900ms, 700–1300 ms, サルFでは、ピンク、緑を700–1200 ms, 1100–

図3 時間生成課題の時間系列

手掛かり刺激提示後、1秒以上たってからサッカードをおこなった場合に報酬を与えた。

1800 ms にそれぞれ対応させた。

データ解析

瞳孔径は赤外線式眼球位置測定装置（iRecHS2, Human Informatics Research Institute, AIST）を用いて計測した。眼球位置と瞳孔径をデジタル化し、各イベントのタイミング情報とともに1k Hz でサンプリングし、ファイルに保存した。解析にはMATLAB（Mathworks）を用いた。固視の開始後100 ms からサッカード直前50 ms までの間にまばたきのある試行は取り除いた。解析に使用した時間窓（手掛かり刺激直前500 ms）において ± 3.5 標準偏差の範囲から外れた値を示した試行も解析から除外した（0.35 %）。また、サッカードの終点が手掛かり刺激の位置から 5° 以上外れた試行は解析から除外した（9.9 %）。正解に必要なサッカード潜時の下限の60 %に満たない潜時でのサッカードは衝動性サッカードと定義し、別に解析した（図4）。各セッション内での瞳孔径の解析には標準化前の値（a.u.）を用いたが、セッション間の解析は各試行の瞳孔径をセッション内で z スコアに変換したうえでおこなった。実験2では、報酬量の効果を $\text{Modulation Index} : (R1-R2) / (R1+R2)$ （R1, R2は各報酬条件での値）として定量化した。統計学的な比較には、Student の t 検定を用いた。

【実験結果】

時間生成課題では、手掛かり刺激提示から1000–1700 ms の範囲でサッカード

をおこなった場合に報酬を与えた（図 4）。図4 の黒実線は、全25回のセッションでのサッカード潜時の分布を示している（サル B, F : 10セッション, サル D : 5セッション）。大多数のサッカードは1000–1700 ms の範囲内におこなわれており、それより潜時の短いものは30%未満であった。1700 ms より遅いタイミングでサッカードが起こることは極めて稀であった (<0.1%)。潜時が600 ms 未満の試行については、別に解析をおこなった。

訓練中は固視の開始から手掛かり刺激出現までの時間は試行ごとにランダムにしていたが、実験中はこれを1700 ms に固定していた（図 3）。実験中、サルが固視の開始からではなく、手掛かり刺激の出現からの経過時間によってサッカードのタイミングを決めていることを確かめるために、メインセッションとは別にプローブセッションをおこなった。このセッションでは、固視の開始から手掛かり刺激出現までの時間は試行ごとに1400, 1700, 2000 ms の中からランダムに決めた。もしサルが固視の開始からの経過時間に基づいてサッカードのタイミングを決定しているのであれば、このセッションのサッカード潜時の分布が大きくばらつくことが予想されたが、実際には図4 の黒点線のようになり、メインセッションと酷似した分布を示した。600 ms 以上の潜時に関して、サッカードタイミングの分布のばらつきを比べたところ、プローブセッションではむ

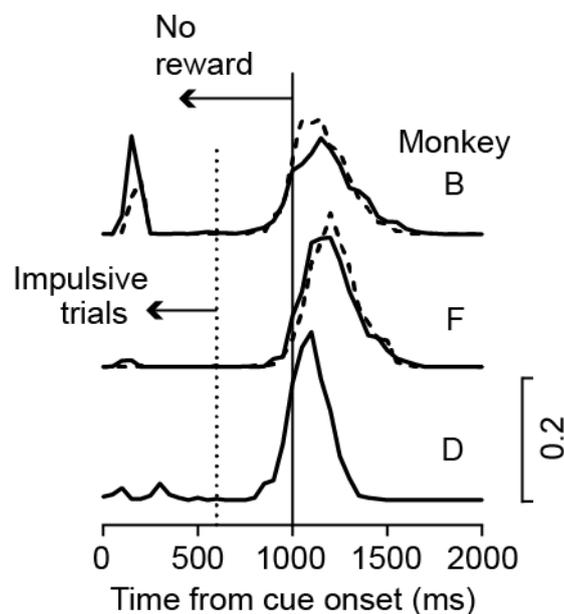


図4 サッカード潜時の分布

実線は実験1におけるサッカード潜時の分布をまとめたものである (n = 3175, 1831, 798試行)。破線は固視の開始から手掛かり刺激提示までの時間を1400, 1700, 2000 ms の中からランダムに選んだプローブセッション (n=5) のデータを示している (サル

B:1343試行, サルF:922試行)。相対度数の計算は50 ms ごとにおこなった。潜時が600 ms 以上のものを主な解析対象とし, それ以下のものは別に解析をおこなった。

しる実験セッションよりもばらつきが少なかった (サル B : 1.83×10^4 vs. 2.69×10^4 ms², サル F : 1.60×10^4 vs. 1.84×10^4 ms²; *F*-test, $p < 0.01$)。これらの結果から, サルは手掛かり刺激の提示からの経過時間に基づいてサッカードのタイミングを決定していると考えられた。

実験1

図5A は, サルFの代表的な実験における瞳孔径時間経過を示している。サッカード潜時の順に試行を3等分し, もっとも短いグループと長いグループの平均 (\pm 標準誤差) をそれぞれ赤と青で示している。両グループとも固視の開始直後に縮瞳したのち, 徐々に散瞳しているが, 2つのグループの間を比べると, 短い潜時のグループでより散瞳していた。これを定量的に調べるために, 手掛かり刺激直前500 ms 間の瞳孔径を, 全25セッションについて図5B にまとめた。全体として, 潜時が短い場合では, 長い場合にくらべて, 瞳孔が大きくなっていたことがわかった (one-tailed paired *t*-test, $p < 10^{-3}$)。次に, 瞳孔径とサッカード潜時の相関を調べた。瞳孔径もサッカード潜時も試行ごとのばらつきが非常に大きく, 試行ごとの相関係数は -0.10 ± 0.08 (標準偏差, $n = 25$, one-sample *t*-test, $p < 10^{-5}$)

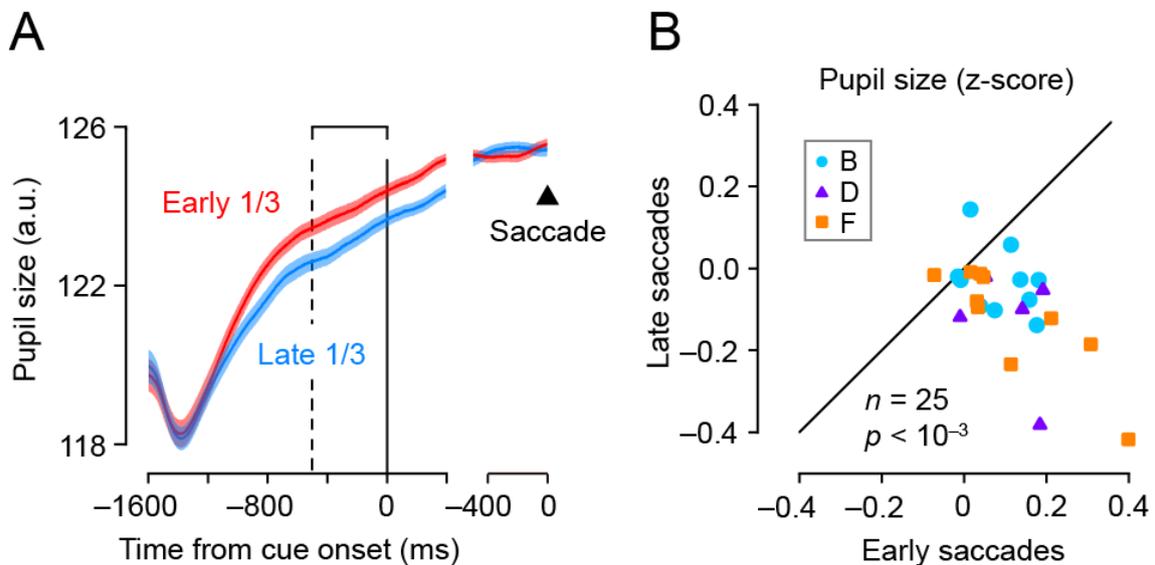


図5 瞳孔径とサッカード潜時の関係(実験1)

A, 代表的なセッションにおける瞳孔径の時間経過 (平均 \pm 標準誤差, サル F)。試行を潜時の順に3群にわけ, 最も短いグループと最も長いグループの平均 (\pm 標準誤差) をそれぞれ赤と青で示している。上部の括弧は定量解析に用いた時間幅を示す。右のパネ

ルはサッカード直前のデータを表している。B, 潜時の最も短いグループと最も長いグループとの比較。異なるシンボルはそれぞれ3頭のサルに対応している。

と, 統計学的に有意にゼロと異なっていたもののかなり小さな値を示した。背後にある相関関係を調べるために, 瞳孔径の順に10試行ごとの移動平均をとって Pearson の相関係数を調べたところ (図6 inset), その値は図6のような分布を示し, その平均値は有意にゼロと異なっていた (平均 \pm 標準偏差 = -0.24 ± 0.22 , $p < 10^{-4}$)。

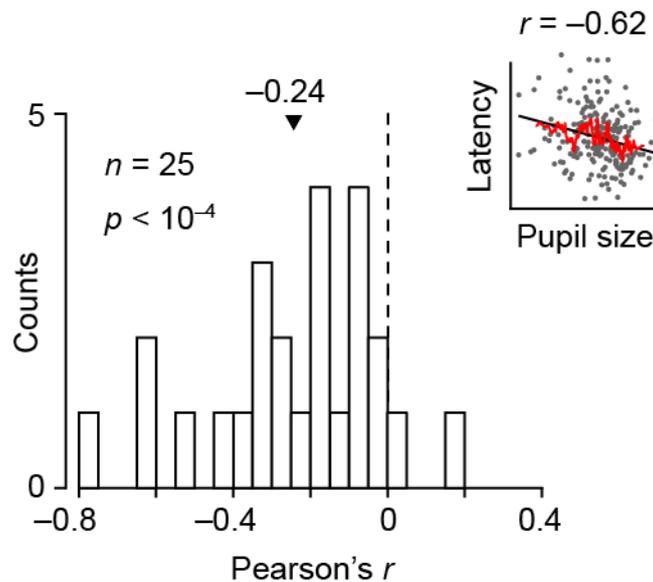


図6 瞳孔径とサッカード潜時の相関(実験1)

セッションごとにおこなった移動平均の後に求めた Pearson の相関係数のヒストグラム。右上図は図5A と同じセッションの例。

さらに詳しく調べるために, 各群の試行数が等しくなるようにデータを10個のグループに分けてプロットしたものが図7である。縦軸にはサッカード潜時の変化 (各セッションにおける平均からの差) を示している。赤色で示したように, 手掛かり刺激直前の瞳孔が大きいときほど, サッカード潜時が短くなっていた (Spearman's rank correlation coefficient $r_s = -0.94$, $p < 10^{-5}$)。一方, 視覚誘導性課題では (青色) 同様の効果は認められなかった ($r_s = -0.41$, $p = 0.25$)。このことから, 時間生成課題でみられた瞳孔径とサッカード潜時との間の相関は, サッカードそのものの促進効果によるものではないと考えられた。

潜時が短い試行では衝動性が亢進しており, これが瞳孔径と相関するのかもしれない。その可能性を調べるために, 衝動性サッカード (手掛かり刺激提示後 600 ms 以内に起こったサッカード) が5回以上起こった15セッションについて,

衝動性サッカードがみられた試行とそれ以外の試行との間で瞳孔径を比較した。

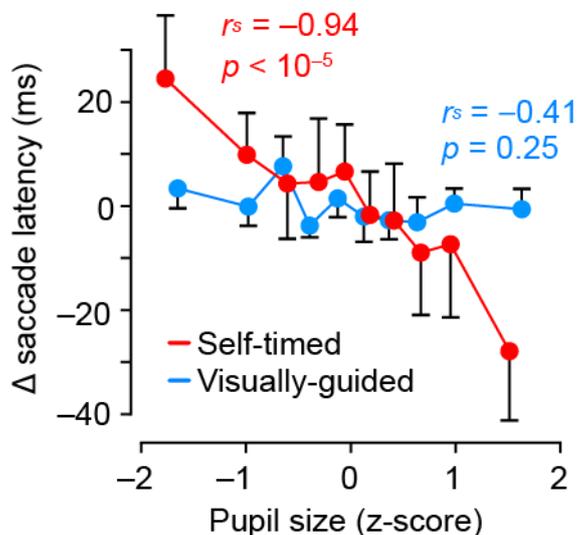


図7 瞳孔径と潜時変化（平均との差）の関係
エラーバーは ±95%信頼区間を示す。

サッカード潜時と瞳孔径の間に観察された負の相関が衝動性によるものであれば、衝動性サッカードがみられた試行では瞳孔が大きくなっているはずである。しかし、これらの試行間で統計学的に有意な差は認められなかった（衝動性試行： -0.05 ± 0.26 ，残りの試行： 0.01 ± 0.03 ，z-scores， $n = 15$ ，paired t -test， $p = 0.44$ ）。さらに、非衝動性試行（ > 600 ms）をサッカード潜時の順に3つのグループに分けると、瞳孔径は潜時の順に 0.10 ± 0.07 （標準偏差）， -0.03 ± 0.10 ， -0.05 ± 0.12 となっており、最も潜時が短いグループでは、衝動性サッカードのみられた試行にくらべて瞳孔径が有意に大きかった（one-tailed paired t -test， $p < 0.05$ ）。このことから、サッカード潜時と瞳孔径の相関は、衝動性の程度では説明できないと考えられた。

実験2

実験1では、試行ごとに変動する瞳孔径とサッカード潜時との相関を調べた。実験2では、瞳孔径を報酬量の操作により実験的に変動させ、サッカード潜時との相関を調べた。図8は、サルBの代表的な実験における瞳孔径の時間経過を示しているが、報酬量1倍（青色），2倍（赤色）の試行を10試行ごとに交互に切り替えたところ、条件間に明らかな違いが生じていた。

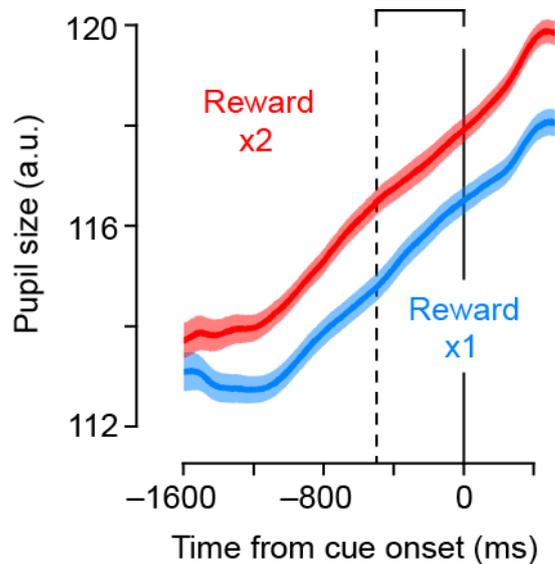


図8 サル B の代表的なセッションにおける瞳孔径の時間経過(平均± 標準誤差)

図9は、全12回（サル B, F につき各6セッション）の実験でのサッカード潜時（上段）と瞳孔径（下段）を示している。サルは報酬を得ることで始めて報酬条件の変化に気がつくと考えられるので、各報酬量のブロックの最初の試行が必ず正解になるようにデータをシフトさせてプロットしている。報酬量によって瞳孔径にもサッカード潜時にも大きな変動が生じたが、その方向は逆であった。各セッションにおいてこの2つの変動との間の相関係数を求めたところ、平均値は -0.28 ± 0.23 （標準偏差, $n=12$ ）であり、統計学的に有意にゼロと差があった（one-sample t -test, $p < 10^{-2}$ ）。各ブロック内での相関を調べたところ、報酬量1倍、2倍のブロックではそれぞれ 0.02 ± 0.35 （ $p=0.85$ ）、 -0.33 ± 0.33 （ $p < 10^{-2}$ ）となっていた。

さらに、瞳孔径の変化とサッカード潜時の変化を MI として定量化することでセッション間の比較をおこなったところ、強い負の相関が認められた（図10, $r_s = -0.85$, $n=12$, $p < 10^{-3}$ ）。このように、報酬量条件の間に大きな瞳孔径の違いが認められた実験ほど、サッカード潜時の変化も大きくなっていった。

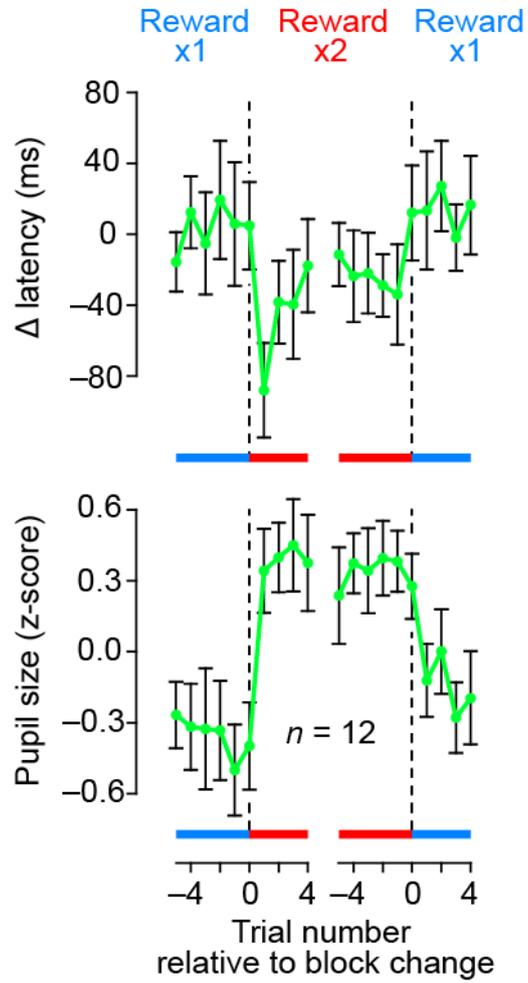


図9 報酬量の切り替え前後でのサッカド潜時(上段)と瞳孔径(下段)の変化
 データ点は、各セッションにおける中央値を全12回のセッションで平均したものを(±95%信頼区間)を示す。

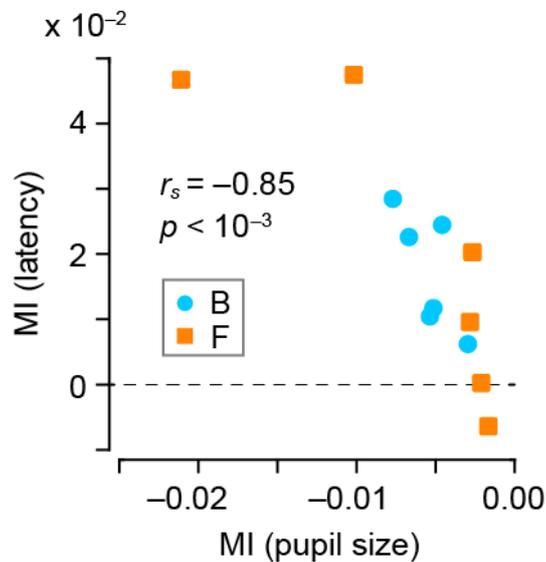


図10 瞳孔径と潜時の Modulation Indices (MIs)の相関

実験3

これまでの実験では、すべての試行において、同じ範囲の時間長（1000–1700 ms）でサッカードをおこなうように訓練していた。しかし、これでは瞳孔径が手掛かり刺激からのサッカードの潜時そのものと相関するのか、あるいは生成すべき時間長に対するサッカードタイミングの相対的なばらつきと相関するのか区別することができない。実験3では、サルに2種類の時間長条件での時間生成課題を訓練した。図11に示したのはサル F の代表的な実験のデータである。このサルでは、固視点がピンク色の場合は700ms 以上（short 条件）、固視点が緑色の場合は1100ms 以上（long 条件）待ってからサッカードと報酬を与えた。上段はサッカード潜時と瞳孔径の関係、下段はサッカード潜時の分布を示しており、各時間長条件は異なる色で示している。各時間条件内では潜時と瞳孔径との間に実験1–2同様に負の相関が認められ、回帰直線の傾きは -0.0048 と -0.0027 であり、有意にゼロと異なっていた（ $p < 10^{-3}$ ）。しかし一方で、同様の範囲のサッカードをおこなった場合であっても、2つの時間長条件の間を比べた場合、long 条件のときのほうがむしろ瞳孔径が大きくなっていた。これを定量的に調べるために、各条件の試行をサッカード潜時の順に3群に分けた（図11, 黒丸）。short 条件のうち、最も潜時の長いグループ（S3）では、long 条件のうちもっとも潜時の短いグループ（L1）よりも全体としては潜時が短かったのにもかかわらず、瞳

孔径は L1 よりも S3 のほうが小さかった (one-tailed unpaired t -test, $p < 10^{-15}$)。

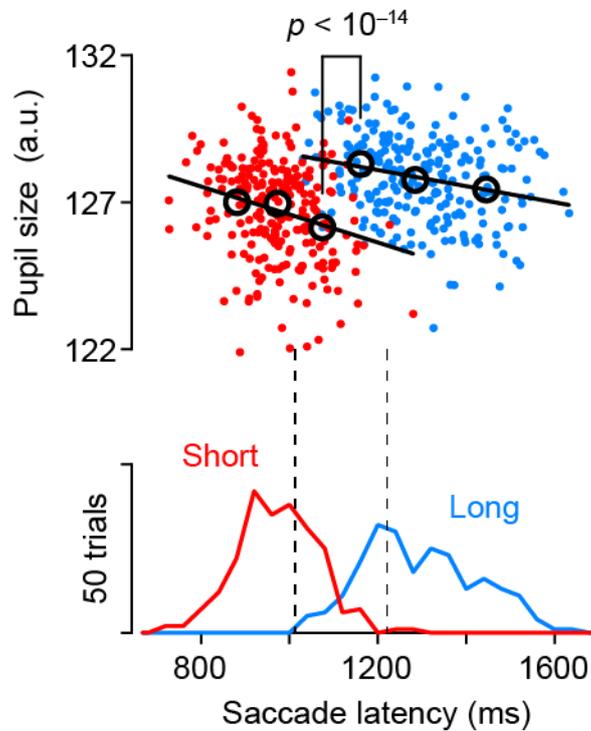


図11 異なる時間長条件間での比較(実験3)

代表的なセッション (サル F)。散布図の各点は1つの試行を示す。赤と青はそれぞれ short 条件と long 条件のデータである。回帰直線は条件ごとに求めた。黒丸は、各条件内の3グループそれぞれの平均値を示す。下のグラフはサッカード潜時の分布をしめしており、破線は S3 の最小値と L1 の最大値を示している。

この解析を全10回の実験 (サル B 4回, サル F6回) でそれぞれおこなったところ、7回の実験で S3 の瞳孔径が L1 よりも小さかった ($p < 10^{-3}$, 図12)。図4C は全実験をまとめたものである。実験間の比較においても、サッカード潜時は S3 よりも L1 で長かった (one-tailed paired t -test, $n = 10$, $p < 0.01$) にも関わらず、瞳孔径は S3 よりも L1 で大きくなっていった ($p < 10^{-2}$)。このように、瞳孔径は試行ごとのサッカード潜時の変動と相関したものの、サッカードの潜時そのものを必ずしも反映していなかった。

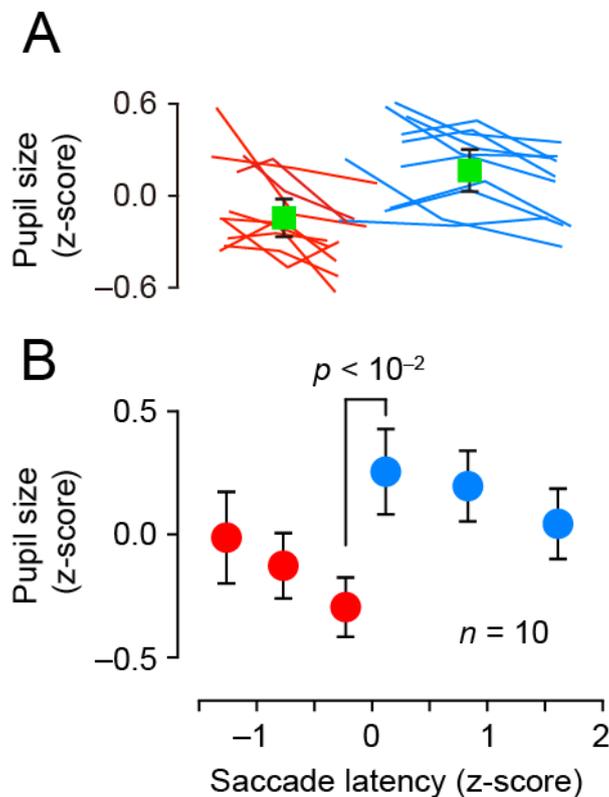


図12 瞳孔径と潜時の関係(実験3)

A, 各セッションにおける瞳孔径と潜時の関係。赤と青はそれぞれ **short** 条件と **long** 条件のデータを示す (S1-3, L1-3)。緑の正方形は、各条件内での瞳孔径の平均値 ($\pm 95\%$ 信頼区間) を示す。全体として、長時間条件に比べ **short** 条件で瞳孔が大きかったが (**one-tailed paired *t*-test, $p = 0.03$**), この違いは S3 と L1 の違いに比べると一貫性がなかった。B, 結果のまとめ。各グループ (S1-3, L1-3) の平均 $\pm 95\%$ 信頼区間を表示している。

【考察】

眼球運動を用いた時間生成課題において、瞳孔径とサッカード潜時との間に負の相関を見出した (図12)。視覚誘導性課題ではこうした相関がみられなかったため、サッカードそのものの促進効果ではデータを説明できない。また、報酬量の違いによって瞳孔径とサッカード潜時がそれぞれ逆方向に変動し、これらの変化の大きさには強い相関がみられた (図5)。サルに2種類の時間長を生成するよう訓練したところ、同じ時間長条件内では瞳孔径とサッカード潜時との間に負の相関が認められたが、異なる時間長条件間では、サッカード潜時が同程度であっても瞳孔径に違いがみられた (図6)。このように、瞳孔径は試行ごとの潜

時のばらつきと相関したが、必ずしもサッカードタイミングそのものを反映していなかった。これらのことから、瞳孔径に反映される脳状態は試行ごとに生じる主観的な時間長バイアスに関連していると考えられる。

時間情報処理は、衝動性と関係することが知られている^{26,27}。今回の課題においても、早いタイミングでのサッカードは高い衝動性を反映していたかもしれない。しかし、衝動的なサッカード（潜時<600 ms）がみられた試行で瞳孔が特に大きいといったことはなく、瞳孔径は衝動性の程度ではなく、計時の速度と関連していたと考えられる。

過去の研究では、時間生成の際に大脳皮質^{8-10, 28-31}、視床³²、大脳基底核³³⁻³⁵、小脳^{36,37}において発火頻度を徐々に増加させるようなニューロン活動が記録されており、こうした神経活動が閾値に達することで運動が発現する、と考えられている（accumulation to threshold model）。発火頻度の上昇率は運動タイミングの決定に重要であり、これが瞳孔径と相関するのかもしれない。実際、瞳孔径が視覚野ニューロンの応答ゲインと相関するという報告がある^{13,15}。瞳孔がより散大している状態では時間生成の際に発火頻度の漸増を示すニューロンの発火頻度の上昇率が上がり、結果として行動発現が早くなったのかもしれない。

先に述べたように瞳孔径は様々な神経活動と相関するが、中でも青斑核の神経活動との強い正相関がよく知られている¹⁷⁻²¹。青斑核はノルアドレナリン性の投射を広範な脳領域に送っていること³⁸から、これが時間生成に影響している可能性が考えられる。実際、Rammsayer ら³⁹は、時間長弁別課題の成績が、ノルアドレナリン再取り込み阻害薬（レボキセチン）の投与により改善することを報告している。ノルアドレナリンはニューロンの興奮性やシナプス入力のゲインを調節することが知られており⁴⁰⁻⁴⁴、また、青斑核の電気刺激が大脳皮質ニューロンの興奮性を増大させるという報告もあることから⁴⁵、ノルアドレナリン性の神経活動が上述のような神経活動の変化を引き起こすことはあり得そうなことである。ノルアドレナリンは注意、覚醒、情動などに深く関与するため^{38,46,47}、これが主観的時間経過に影響を及ぼす可能性がある。第2章では、その可能性を探った。

第2章 ノルアドレナリンが運動タイミングに及ぼす影響

【背景】

前章の研究により、瞳孔径と計時の相関が明らかになった。瞳孔径と青斑核ニューロンの活動が相関することがよく知られていることから、ノルアドレナリン性の神経活動が計時に関与する可能性が考えられる。ノルアドレナリンやドパミン、セロトニンのようなモノアミン類には脳各部の機能結合を動的に調節する役割があるとされており⁴⁷⁻⁵⁰、実際、脳機能画像と関連薬の投与を組み合わせた多数の研究がこの仮説を支持している⁵¹⁻⁵⁶。時間情報処理は様々な脳内経路に依存すると考えられているため、わずかな神経伝達の変化であったとしてもそれが脳全体での現象であれば、計時に大きな変化が生じることが予想される。

ノルアドレナリンは気分や注意・覚醒状態のような内的因子と深く関わっていることが知られている。例えば、動物の注意行動の発現の有無は青斑核ニューロンの感覚応答の大きさから予測することができるし⁵⁷、抗不安薬（ベンゾジアゼピン）の投与によってストレスに対する扁桃体や視床下部でみられるノルアドレナリン濃度の上昇は抑制される⁵⁸。前章で述べたように様々な内的因子が時間情報処理に影響を与えるが、ノルアドレナリンがこのプロセスに関与していても不思議ではない。ノルアドレナリンと計時の因果関係を調べるために、本研究では、ノルアドレナリン再取り込み阻害薬（レボキセチン）の投与が時間生成に及ぼす影響を調べた。

【実験方法】

被検体

実験には前章と同じ3頭のニホンザルを用いた。すべての実験プロトコルは、北海道大学動物実験委員会から事前に審査を受け、承認されている。

視覚刺激と行動課題

基本的な実験セットアップは第1章の実験と同様であり、引き続き時間生成課題を用いた（図13A）。モニターの中心に固視点（0.7°、青色、正方形）が提示されて各試行が始まる。視線が固視点の3°以内に400 ms 間とどまったことを検出すると、その後800, 1050, 1300 ms いずれかの固視時間の後に固視点からの右（あるいは左）15°の位置に手掛かり刺激（0.7°、正方形、白色）が100 ms 間提示される。刺激出現から1000–1700 ms 経過後にこの位置へサッカードをおこな

った場合に報酬を与えた。各セッション内で、手掛かり刺激の位置は一定とした。

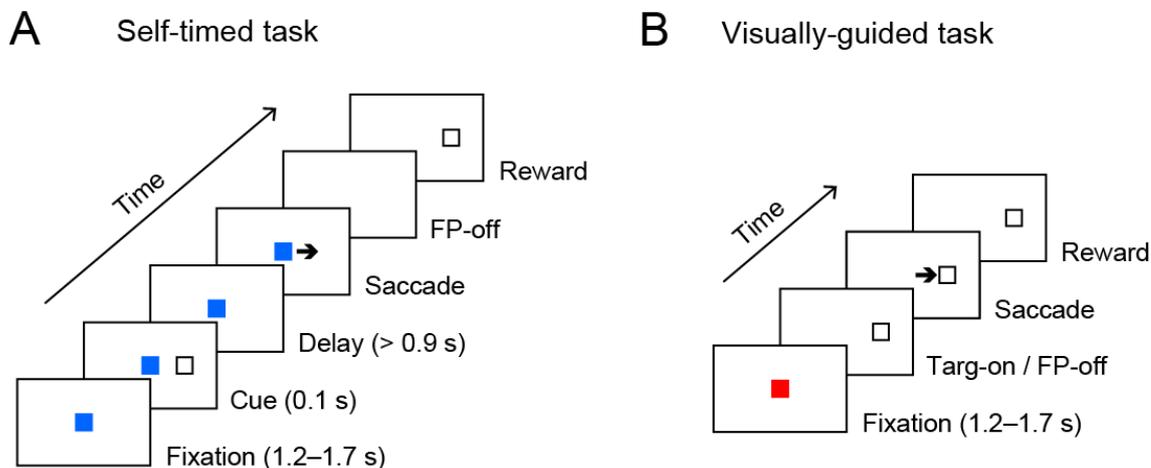


図13 時間生成課題(A)と視覚誘導性課題(B)

全43セッションの内39セッションでは、視覚誘導性課題(図13B)を20%の試行でランダムに提示した。この課題では、時間生成課題と区別できるようにするため、固視点の色を赤色にした。固視点が消えた直後にターゲットが提示され、700 ms 以内にターゲットへサッカードした場合に報酬を与えた。

薬剤投与

ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(レボキセチン, Pfizer, 0.4または0.8 mg)を0.1 gのスクロースとともに2 mLの水に溶かし、これを課題の開始から約1–1.5時間後に経口投与した。薬剤投与直前30分間(投与前期間)と薬剤投与直後30–90分の60分間(投与後期間)のデータの比較をおこなった。対照実験では、同濃度のスクロース水溶液のみを投与した。

瞳孔径の計測

当初は、課題遂行中の瞳孔径を計測することを計画していた。しかし、瞳孔径の変化を適切に計測するためにはモニター上への背景の提示等により過度の瞳孔散大を防ぐ必要があったが、3時間にわたって明室下で課題をおこなわせるのは困難であった。そのため、本実験では瞳孔径の計測はおこなわず、眼球運動の解析のみをおこなった。

データの収集と解析

第1章同様、データは1k Hz でサンプリングし、ファイルに記録した。解析には MATLAB を用いた。サッカードの終点が手掛かり刺激の位置から大きく外れた ($> 7^\circ$, 5.7%) 試行は解析から除外した。時間生成課題において、潜時が600 ms 未満の場合は衝動性サッカードと定義し、別に解析した (図14)。視覚誘導性課題では、サッカード潜時が70 ms に満たない場合は解析から除外した。各セッション内における解析では、投与前後でのサッカード潜時の中央値の変化を比較し、Wilcoxon rank sum test を用いて検定した。セッション間の解析では、サッカード潜時の中央値の平均を、paired *t*-test (投与前後) または one-way ANOVA (薬剤条件間) を用いて比較した。効果量 (Cohen's *d*) は、 $(\mu_{\text{post}} - \mu_{\text{pre}}) / \sqrt{(\sigma_{\text{post}}^2 + \sigma_{\text{pre}}^2) / 2}$ (μ : 平均, σ : 標準偏差, μ_{post} : 投与後期間の平均) として計算した。

【実験結果】

図14は代表的なセッションにおける、薬剤投与前 (黒色) と低用量レボキセチン (0.4 mg) 投与後 (赤色) のサッカード潜時の分布を示している。潜時が600 ms 未満の衝動性サッカードは別に解析した。それ以外の試行 (時間生成試行) をレボキセチン投与前後で比較すると、薬剤投与後に潜時が明らかに延長していた (中央値 [四分位範囲] = 1060 [998, 1150] vs. 1137 [1081, 1249] ms, $n = 149$, 287 試行, Wilcoxon rank sum test, $p < 10^{-11}$)。衝動性によって時間情報処理がバイアスするという報告があるため、衝動性サッカードの頻度を薬剤投与前後で比較したが、統計学的な有意差は検出されなかった (χ^2 test, $p = 0.70$)。薬剤投与後に衝動性サッカードの潜時が遅延していた (中央値 [四分位範囲] = 203 [193, 217] vs. 228 [211, 236] ms, $n = 18$, 39 試行, Wilcoxon rank sum test, $p < 10^{-11}$) が、同様の变化は対照実験でも認められた (後述)。

図15は全43セッションにおける薬剤投与後期間の時間生成試行の潜時の分布を投与前の潜時の中央値に対する相対的な値としてサルごとに示したものである (黒: 対照条件, 青: 低用量条件, 赤: 高用量条件)。6回の条件すべて (2種類の投与量 \times 3頭のサル) において、レボキセチン投与条件では、対照条件 (スクロース水溶液のみを投与) と比較して潜時が有意に延長していた (Kolmogorov-Smirnov test, $n = 374$ – 2442 試行, $p < 10^{-7}$)。

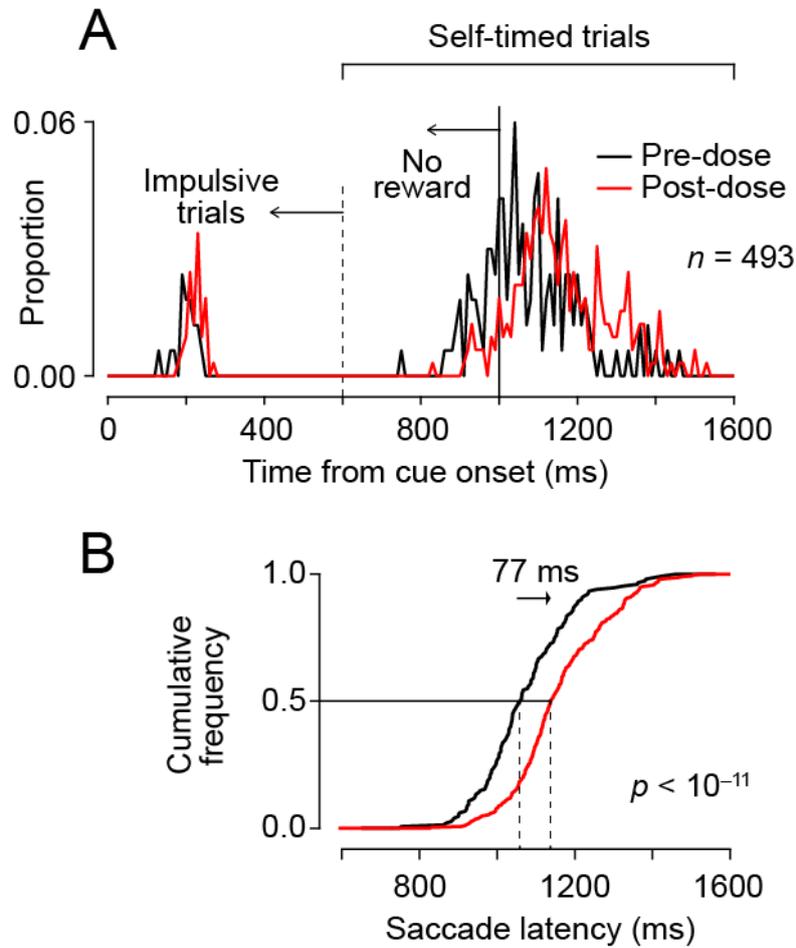


図14 代表的なセッション(低用量条件, サルB)におけるノルアドレナリン再取り込み阻害薬(レボキセチン)の時間生成への影響

A, 薬剤投与前(黒, $n = 167$ 試行), 投与後(赤, $n = 326$)の時間生成課題におけるサッカド潜時の分布。潜時が600 ms(破線)に満たない試行は別に解析した。1000 ms(黒線)以上たってからサッカドを行った場合に報酬を与えた。B, このセッションにおけるサッカド潜時の累積度数分布。投与前後で潜時の中央値に有意差がみられた(Wilcoxon rank sum test, $p < 10^{-11}$)。

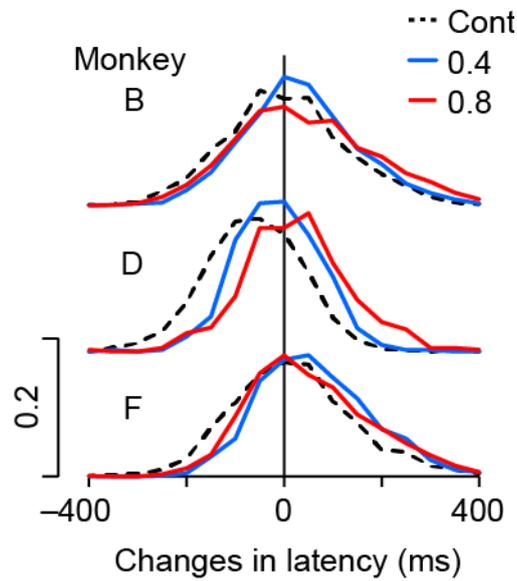


図15 時間生成試行における、薬剤投与後のサッカド潜時の分布
 それぞれ、 $n = 6160, 1451, 4923$ 試行。各セッションで投与前期間の中央値からの相対値を求めた。

薬剤の時間生成への影響を定量化するために、各セッションで投与前後の時間生成試行における潜時の中央値を比較したところ（図16）、24回（低用量，高用量条件各12回ずつ）のうち、18回の実験では潜時の変化がみられた（Wilcoxon

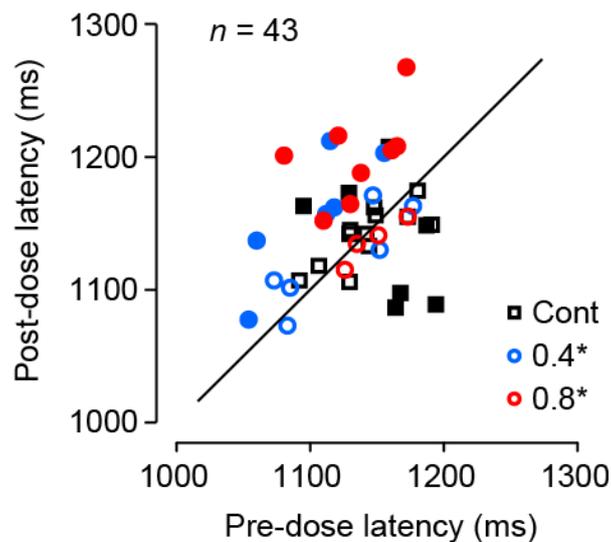


図16 薬剤投与前後における潜時の中央値の比較
 塗りつぶしは $p < 0.01$ (Wilcoxon rank sum test) を示す。

rank sum test, $p < 0.05$)。多くの場合 (83%, 15/18回, 低用量条件: 7回, 高用量条件: 8回) では, 潜時の延長が認められた。一方, 対照条件においては11/19回では潜時の変化が認められず, 3回で潜時の延長, 5回では短縮がみられた。全体として, サッカード潜時はレボキセチン投与条件ではいずれも延長 (two-tailed paired t -test, $p < 0.02$) したが, 対照条件では変化しなかった ($p = 0.43$)。

レボキセチン投与と時間生成との関係をさらに調べるために, 薬剤投与前後でのサッカード潜時の変化を, 時間生成課題(図17A)と視覚誘導性課題(図17B)とで比較した。時間生成試行において, 潜時の変化量は薬剤条件によって異なっていた (one-way ANOVA, $p < 0.01$)。事後検定では, 投与量によらず, 対照条件にくらべて潜時変化に有意な違いが認められた (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$) が, レボキセチン投与量による違いは認められなかった ($p = 0.83$)。一方で, 視覚誘導性試行においては, 条件間での潜時変化量の違いは認められなかった (one-way ANOVA, $p = 0.25$)。

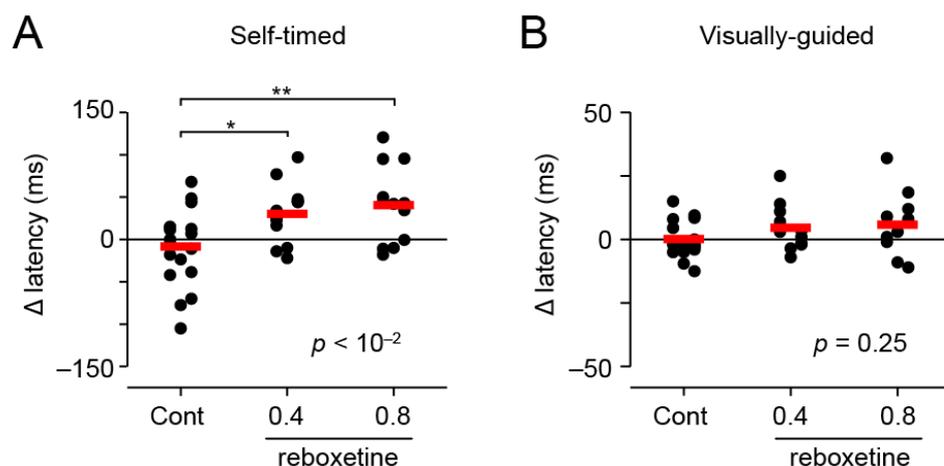


図17 条件間のサッカード潜時の中央値の変化量の比較

A, 時間生成試行, $n = 43$ セッション。B, 視覚誘導性試行, $n = 39$ セッション。各条件で同じサルからのデータは縦に並べて示している。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Tukey-Kramer test)。

上述の比較を潜時変化の効果量 (Cohen's d) についておこなった場合でも, 同様な結果が得られた。時間生成試行において, 効果量の平均値は対照条件で -0.09 ± 0.39 (標準偏差, $n = 19$; 中央値, -0.06), 低用量条件で 0.29 ± 0.31 ($n = 12$; 中央値, 0.28), 高用量条件で 0.30 ± 0.34 ($n = 12$; 中央値, 0.36) となり, 有意差を認めた (one-way ANOVA, $F_{2, 40} = 6.31$, $p < 0.01$)。事後検定では, いず

れの投与量でも対照条件との間に有意差がみられたが (Tukey-Kramer test, $p < 0.02$), 用量による効果量への有意な違いは認められなかった ($p = 1.0$)。視覚誘導性試行についても同様の比較をおこなったが, 平均値は対照条件で 0.08 ± 0.46 (標準偏差, $n = 17$; 中央値, 0.16), 低用量条件で 0.23 ± 0.37 ($n = 11$; 中央値, 0.08), 高用量条件で 0.28 ± 0.64 ($n = 11$; 中央値, 0.10) となり, 統計学的に有意な違いはなかった (one-way ANOVA, $F_{2, 36} = 0.62$, $p = 0.55$)。このように, レボキセチンの投与で時間生成試行におけるサッカードが遅延したが, 視覚誘導性サッカードには変化がみられなかった。

衝動性についての解析

第1章で述べたように, サッカード潜時の違いが衝動性の程度の違いによって生じている可能性がある。図15-17の結果は, レボキセチンが衝動性に与えた影響に由来するのかもしれない。これを調べるためにレボキセチン投与前後での衝動性サッカードの割合を比べたところ, 多くの場合 (低用量: 10/12, 高用量: 10/12) で違いは認められなかった (Fisher's exact test, $p > 0.05$)。6回以上の衝動性サッカードを認めた21回の実験 (対照条件: 10セッション, 低用量: 5セッション, 高用量: 6セッション) に関して, 投与前後での衝動性サッカードの割合の変化を対照条件とレボキセチン投与条件で比較したが, 統計的に有意な違いは認められなかった (unpaired t -test, $t_{19} = 0.23$, $p = 0.82$)。投与前後どちらにおいても6回以上の衝動性サッカードを認めた12回の実験のそれぞれにおいて, 衝動性サッカードの潜時を薬剤投与前後で比較したところ, 薬剤条件に関わらず, 多くの場合で延長が認められた (対照条件: 4/5セッション, 低用量: 3/3セッション, 高用量: 2/4セッション, Wilcoxon rank sum test, $p < 0.05$)。また全体として, 衝動性サッカードの潜時変化には対照条件とレボキセチン投与条件の間で違いはなかった (平均 \pm 標準偏差: 15.6 ± 4.8 ms < 対照条件>, 15.6 ± 6.2 ms < レボキセチン>, unpaired t -test, $t_{10} = 0.01$, $p = 0.99$)。したがって, 本実験においてレボキセチン投与は衝動性に影響をあたえなかったものと考えられる。

その他のパラメータへの影響の解析

他の行動パラメータへの薬剤投与の影響を調べるために, サッカード潜時の変動係数, サッカードの最大速度, サッカードの精度 (サッカードの終点とターゲットとの距離により定量化) を各セッションで測定した。各値に関して, 投与前後の変化を薬剤条件間で比較した。その結果, 時間生成試行においては, いずれのパラメータにも有意差を認めなかった (図18A-C, 左)。視覚誘導性試行にお

いては、変動係数とピーク速度には条件間の違いはみられなかった（図18A, B, 右, $p > 0.05$ ）。一方で、サッカードの精度に関しては条件間の違いを認め（図18C, 右, $F_{2, 36} = 5.96$, $p < 0.01$ ），事後検定で、高用量条件と他の2条件との間に有意差を認めた（Tukey-Kramer test, $p < 0.05$ ）。これらのことから、レボキセチン投与の影響は時間生成にある程度選択的に認められたといえる。

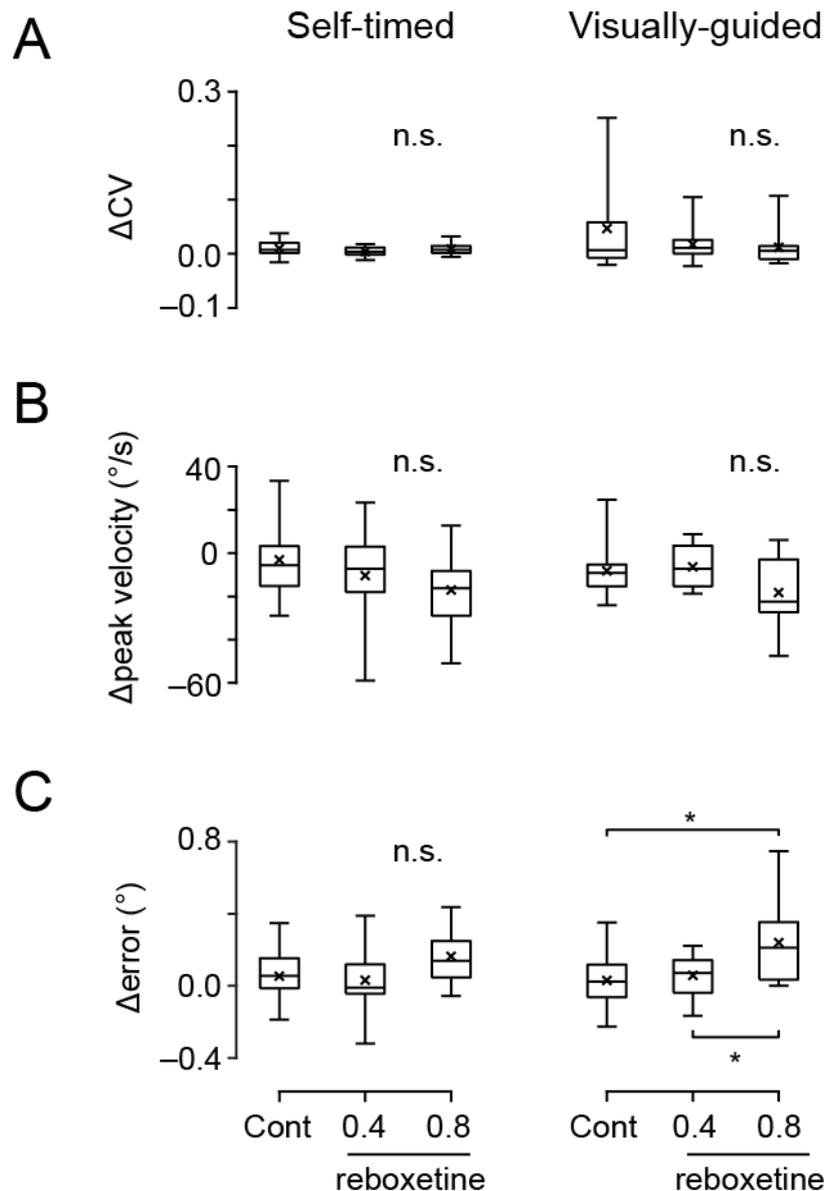


図18 潜時の変動係数(A), サッカードの最大速度(B), 精度(C)の条件間の比較
箱ひげ図は中央値, 四分位値, 最大値, 最小値を示している。Xは平均値を表す。* $p < 0.05$ (Tukey-Kramer test)。

【考察】

ノルアドレナリン再取り込み阻害薬（レボキセチン）の経口投与により、時間生成試行におけるサッカード潜時が延長した。同種の薬剤が注意欠陥・多動性障害（attention deficit hyperactivity disorder, ADHD）の症状を緩和することが知られていることから⁶⁰、衝動性の低下により短潜時のサッカードが減少し、その結果、全体として潜時が遅延した可能性があった。しかし、レボキセチン投与によって衝動性サッカードの割合は変化しておらず、この可能性は考えにくい。また、視覚誘導性サッカードや衝動性サッカードの潜時にはレボキセチンの効果は認められなかったため、時間生成試行における潜時の延長は、サッカード生成に関わる視覚運動系への影響によるものではないと考えられた。また、他のパラメータ（潜時の変動係数、最大速度、サッカード精度）を調べてみると、一部（高容量条件における視覚誘導性サッカードの精度）を除いては、レボキセチン投与の効果は認められず、本実験におけるレボキセチンの効果は時間生成に選択的であったといえる。

ノルアドレナリン再取り込み阻害薬がヒトやサルで大規模な機能再編を引き起こすことが最近の脳画像研究で明らかにされている^{53,54,60,61}。時間情報処理に多数の脳領域が関わっていることを考えると、レボキセチン投与が時間生成のパフォーマンスを変化させたことは驚くべきことではない。実際、Rammsayerら³⁹は、レボキセチン投与がヒトの時間長弁別課題の成績を向上させることを報告しているし、Penneyら⁶³は $\alpha 2$ -アドレナリン受容体の刺激薬や拮抗薬が数十秒程度の範囲での時間生成行動に影響を与えることをラットで報告している。これに対して本研究は、日常の行動制御に不可欠と考えられる1秒程度の時間処理にも、ノルアドレナリン関連薬の投与が影響を及ぼしうることを初めて明らかにしたものである。

第1章の研究では、瞳孔径とサッカード潜時が逆相関することを示した。瞳孔径と青斑核の神経活動に正相関があることを考慮すると、レボキセチン投与によって脳内ノルアドレナリン濃度が上昇し、結果としてサッカード潜時が短縮することが期待された⁶⁴。しかし、実際はこれとは逆の結果となり、レボキセチン投与によって潜時は延長した。これにはいくつかの理由が考えられる。

第一に、第1章と第2章の研究では、解析対象とした時間幅に大きな違いがある。前章の実験では試行ごとに瞳孔径と潜時の相関を調べたが、本章の実験では薬剤投与前後でデータを比較した。レボキセチン投与が比較的長期にわたって脳全体のネットワーク状態を遷移させる一方で、瞳孔径は時々刻々と変化する瞬間的なノルアドレナリン性情報伝達を反映している可能性がある。実際、前章で

は、同じ時間長条件内では瞳孔径と潜時の負の相関を認めたが、異なる時間条件間では認められなかった（図12）。レボキセチンの投与や時間条件の提示はネットワークの状態を遷移させるが、試行ごとの内的状態の変動とは関連しないのかもしれない。

第二の理由としては、ノルアドレナリン再取り込み阻害薬が前頭前野におけるドパミン濃度を上昇させることが知られており⁶⁵⁻⁶⁷、これが時間生成に影響を及ぼした可能性がある。前頭前野⁴やドパミン^{29, 35, 68, 69}は時間情報処理に深く関わっていることが知られており、今回の実験での時間生成試行におけるサッカード潜時の変化には、前頭前野におけるドパミン濃度の変化が関与していたのかもしれない。異なる神経伝達調節物質がしばしば協調的に働くことが知られており^{49, 50}、ノルアドレナリンとドパミン性伝達の両方が上昇することが時間生成の変化に重要であった可能性がある。

第三の理由として、ノルアドレナリン性情報伝達には一過性の成分と持続性の成分の2種類があるとされており^{19, 21}、レボキセチンがこれらに対して異なった影響をあたえていた可能性がある。これら2つの成分は、青斑核ニューロンのバースト活動とベースライン活動に対応しており、それぞれが異なる機能を持っていると考えられている¹⁹。例えば、レボキセチンの投与が主に持続性成分の情報伝達に影響を与え、瞳孔径は主に一過性成分の活動を反映する、ということは大いにあり得る。これについては、今後、動物実験による検証が必要である。

本研究により、ノルアドレナリン再取り込み阻害薬が自発性眼球運動のタイミングを変化させることが明らかになった。様々な内的状態による計時の変化の少なくとも一部にはノルアドレナリンが関与しているのかもしれない。今後、脳部位特異的にノルアドレナリン性情報伝達を操作することで、その詳細が明らかになるものと期待される。

第3章 計時の際の線条体 LFP の解析

【背景】

大脳基底核が時間情報処理に重要であることが知られている¹⁻⁴。特に線条体は広範な大脳皮質領域からの投射を受けている部位である^{70,71}。前章までに述べたように、時間情報処理には様々な脳領域が関わるが、線条体がこれらからの情報を統合し、これが計時に関連した神経活動を生成しているのかもしれない。実際、線条体において時間情報処理と相関するような活動がこれまでに動物実験により報告されてきた^{35,72-78}。時間生成課題をおこなっているサルの尾状核でも、手掛かり刺激の提示直後から活動上昇を開始し、運動開始のタイミングでピークに達するような活動を示すニューロンが多数記録される^{7,35}。興味深いことに、これらの多くは、測定する時間長に応じて計時中の発火頻度の上昇率を変化させた。具体的には、より長く待ってから運動を開始する場合には、発火頻度はゆっくりと上昇し、結果としてより遅いタイミングでピークに達する。この活動の上昇率を制御することが、最終的に行動開始のタイミングを適切なタイミングで行動を開始するうえで重要と考えられる。同部位の不活性化が運動タイミングを変化させることも⁷、この仮説と合致する。しかし、こうした信号がどのようにつくられ、その時間経過がどうやって調節されるのかはわかっていない。

これを調べるための方法として、局所フィールド電位 (local field potentials, LFP) に着目した。LFP は、シナプス後電位を含む、様々な神経活動を反映することがわかっており、局所回路の状態を調べる手段として用いられてきた⁷⁹。大脳基底核において行動依存的な LFP 律動が報告されているが⁸⁰⁻⁸⁴、これは、皮質基底核間の情報伝達の動的な成分を反映するのかもしれない^{80,83-85}。実際、Parkinson 病患者の大脳基底核では、しばしば持続的な~20-30Hz 律動が観察されることがわかっており⁸⁶⁻⁸⁸、運動障害や病的な大脳皮質-基底核情報伝達との関連性が指摘されている^{85,89}。神経毒により線条体内のドパミン終末を除去した Parkinson 病モデル霊長類でも、線条体のニューロン活動や LFP に 8-15 Hz (low-beta) の異常な律動がみられることが知られているが⁹⁰⁻⁹⁷、このとき大脳皮質-基底核間の機能結合にも変化が生じることが示唆されている⁹⁸。また一方で、Parkinson 病では時間情報処理に障害が生じていることが、様々な行動課題を用いて明らかにされてきており⁹⁹⁻¹⁰⁶、LFP の律動成分を調べることで計時の神経機構にせまるうえで有効かもしれない。

本研究では、計時関連活動の背景にあるメカニズムを探るため、時間生成課題遂行中のサルの線条体 (尾状核) LFP を記録して解析した。

【実験方法】

被検体

実験には3頭のニホンザル (*Macaca fuscata*, メス2頭, 6–9 kg) を用いた。第1章に記述したのと同様の手順で手術をおこない、頭部に電極刺入用のチャンバーを取りつけた。すべての実験プロトコルは、北海道大学動物実験委員会の審査を受け、事前に承認を得たものである。

視覚刺激と行動課題

前2章と同様に視覚刺激の提示には市販のプログラム (TEMPO; Reflective Computing) を用いた。

前章までに用いた時間生成課題に若干の変更を加えて提示した (図19A)。モニター中央に固視点 (0.5–0.7°, 白色, 正方形) が現れることで試行が始まり、視線位置が3° 以内に400 ms とどまったのが検出されると、固視点の色 (形) を変化させた。色と形は、異なる時間長条件を表しておりそれぞれ short (400 ms), medium (1000 ms), long (2200 ms) の3種類の時間長と対応している (図19A, 下)。一定時間 (800–1700 ms) 経過後、手掛かり刺激を固視点の左または右16° の位置に提示した (100 ms)。指示された時間長だけ待ってから手掛かり刺激提示位置へサッカードをおこない、再提示した刺激に対して800 ms または880 ms 後まで固視を続けた場合、報酬を与えた。サッカードが800 (short), 1700 (medium), 3200 ms (long) 経過するまでにおこらなかった場合は失敗とみなし報酬は与えなかった。

反応性課題 (図19B) では、サッカードのタイミングは、手掛かり刺激出現1000–2500 ms 後に固視点を消すことで指示した。サルが600 ms 以内に手掛かり刺激提示位置へサッカードした場合に報酬を与えた。報酬のタイミングはほとんどの場合時間生成課題と同じだが、4セッションにおいては固視点消滅の1400 ms 後に与えた。

41回のセッション (サル G: 13, サル B: 14, サル F: 14 セッション) からデータ収集した。すべてのセッションにおいて、時間生成課題 (3種類の時間長) と反応性課題を疑似ランダムな順番で提示した。各試行の報酬量は課題によらず一定とした。また、一部のセッション (サル B: 5, サル F: 7 セッション) では反応性課題のみを提示する試行ブロックも用意し、報酬量を操作した。この場合、通常の報酬量 (R×1) と2倍の報酬量 (R×2) の試行をランダムに提示した。

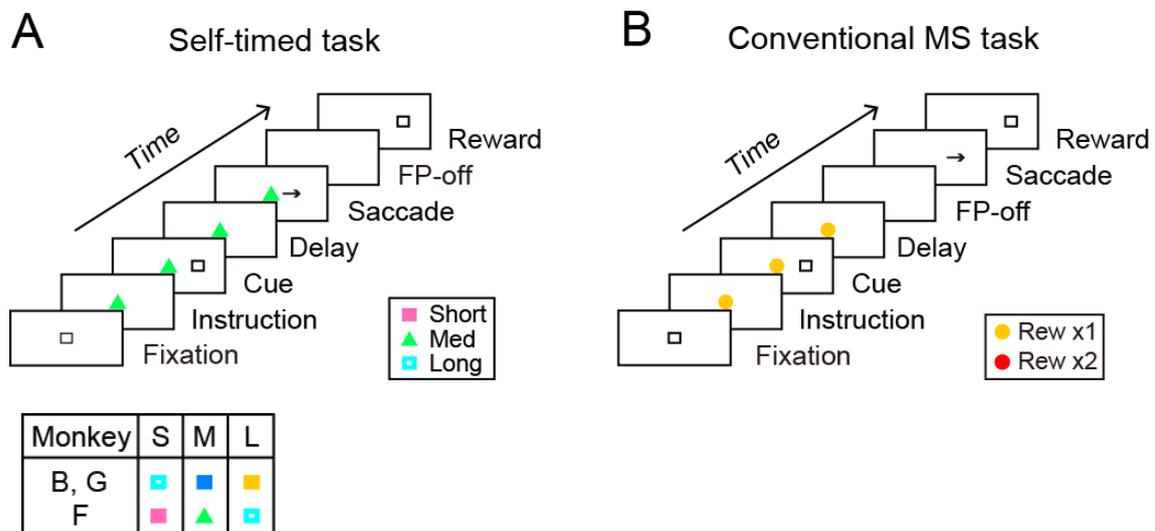


図19 時間生成課題(A)と反応性課題(B)

これらの試行で異なった色の固視点を用いることで、事前に報酬量を明示した（サル B：赤色と紫色の正方形，サル F：黄色と赤色の正円）。

電気生理学的手法

事前に尾状核頭部から単一ニューロン記録をおこない、サッカードの準備活動が記録された部位から LFP データを記録した（図20）。記録用チャンバーにグリッドを取り付け、ステンレスガイドチューブ（23G）を通して右（サル B）または左（サル G, F）の尾状核に電極を刺入した。ほとんどのセッション（38/41）ではタングステン性の単極電極を用いたが、残りのセッションではニクロムワイヤを4本用いて自作した電極（コンタクト間：2 mm）を使用するか、単電極を3本刺入した。信号はガイドチューブまたは硬膜上に置いた Ag-AgCl 電極を基準として増幅、フィルター（1-100 or 1-300 Hz, Model 1800 or 3600; A-M systems）した。7回のセッションでは50Hz の交流を減少させるためにノッチフィルターを用いた。データは、44か所の記録部位から得た（サル G: 13, サル B: 15, サル F: 16か所）。

解析方法

サッカードの終点が手掛かり刺激の位置から8°以上離れていた試行は解析から除外した。時間生成課題では、サッカード潜時が指示された時間長（400, 1000,

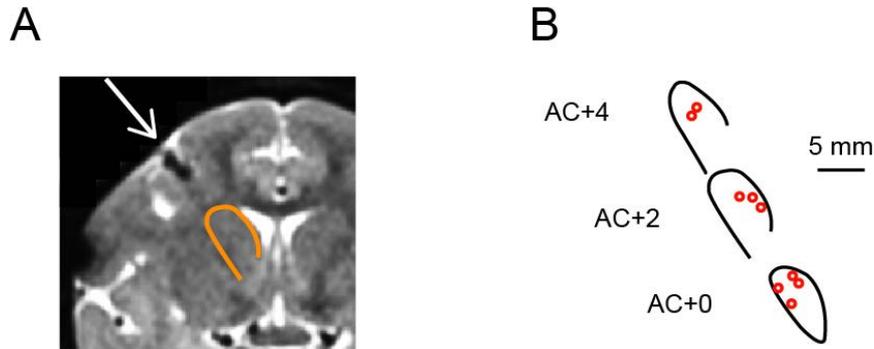


図20 記録部位

A, 前交連から前方2 mm (AC+2) レベルの冠状断 MRI 画像 (サル F)。橙色が尾状核の輪郭を示す。白矢印は電極の刺入角度を示す。B, 記録部位。尾状核輪郭は MRI をもとに描いた。

2200 ms) の60%に満たない場合, あるいは設定された上限 (800, 1700, 3200 ms) よりも長い場合は解析対象としなかった。反応性課題については正解試行のみを解析対象とした。固視を開始する200 ms 前からサカード開始後100 ms に LFP の振幅が中央値 $\pm 140 \mu\text{V}$ を超えた試行は解析から除外した。

事象関連電位 (event-related potentials, ERP) の解析 (図22) では LFP を手掛かり刺激出現のタイミングにそって, 試行ごとに手掛かり刺激直前500 ms の平均値でベースライン補正した後に試行間で平均した。各記録部位, 各課題条件において, 応答のピークを手掛かり刺激出現後100–200 ms (サル G) または 150–300 ms (サル B, F) の期間で探し, そのタイミングを中心とした11 ms 間の平均値の絶対値を求めた。各記録部位について, 4課題条件の応答のうち最大のものが1, 最小のものが0となるように標準化した。具体的には, $(x - \min) / (\max - \min)$ により計算した (x : ある条件における応答の大きさ, \max : 最大応答, \min : 最小応答)。

LFP のスペクトログラムを求めるために, ハミング窓を用いて10 ms おきに300 ms の時間幅で高速フーリエ変換 (fast Fourier transform, FFT) をおこなった (図23)。推定されたパワーは課題条件を指示する直前の400 ms 間 (固視点の色が変わる直前) の平均値と標準偏差を用いて z-score 化した。

特定周波数帯域のパワーの時間変化は, 4次バターワースフィルターを時間軸において両方向にかけた後にヒルベルト変換を行うことで求めた (図24B)。この場合も課題条件を指示する直前400 ms 間のデータを用いて z-score 化した。時間

とパワーの間の順位相関係数（図24 C, D）の計算は、手掛かり刺激の平均提示時間からサッカードの100 ms 前（delay period）までの期間を10個の期間にわけたうえでおこなった。この際、手掛かり刺激出現前のデータは取り除いた。

手掛かり刺激の直前500 ms 間のパワースペクトル（図25）はハミング窓を用いて FFT により推定した。パワーは、課題条件の指示の直前400 ms 時点から直後400 ms までの500 ms 期間の平均と標準偏差を用いて z-score として表した。

同時に数か所からの記録をおこなった部位（サル B, F それぞれ3か所）については、体積伝導（volume conduction）の効果を減弱させるため、周波数解析の場合には re-referencing をおこなった^{75,77}。具体的には、尾状核境界より2 mm 離れた白質内の電極を基準に双極導出するか（サル B）、他の2つの電極の中間電位を基準にした（サル F, コンタクト間間隔：3–4 mm）。特に記述がない場合には、こうして得られたデータは他の38か所のデータと区別せずに解析した。統計学的な解析には、one-way repeated-measures ANOVAs と事後の paired *t*-test, あるいは unpaired *t*-test を用いた。

【実験結果】

時間生成課題の際のサッカード潜時の分布を図21に示す。固視点の色と形による指示に応じて、サルは試行ごとに適切にサッカード潜時を変えることがで

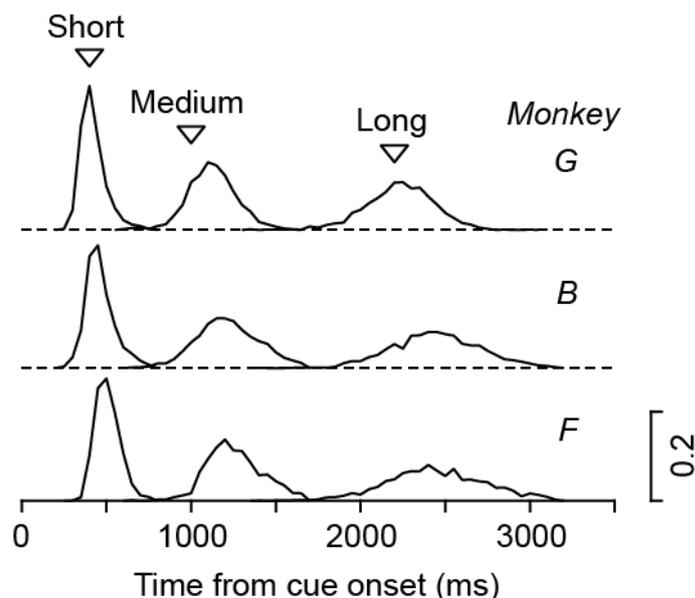


図21 サッカード潜時の分布

サル G, B, F ($n = 3224, 4403, 4584$ 試行) のデータ。三角形は各時間長条件における正解試行の境界を示す。これより潜時が長い場合にのみ報酬を与えた。

きた。自発的なサッカードに先立つ準備活動が尾状核前部において記録されたが⁷, こうしたニューロンが存在する部位から LFP を記録した (図20)。

時間長の違いによる視覚応答のゲイン変化

対側視野に手掛かり刺激が提示された際の視覚誘発電位を図22A に示す。ピーク潜時は個体によって異なり, 約150 ms 後から250 ms 後に最大応答が観察され

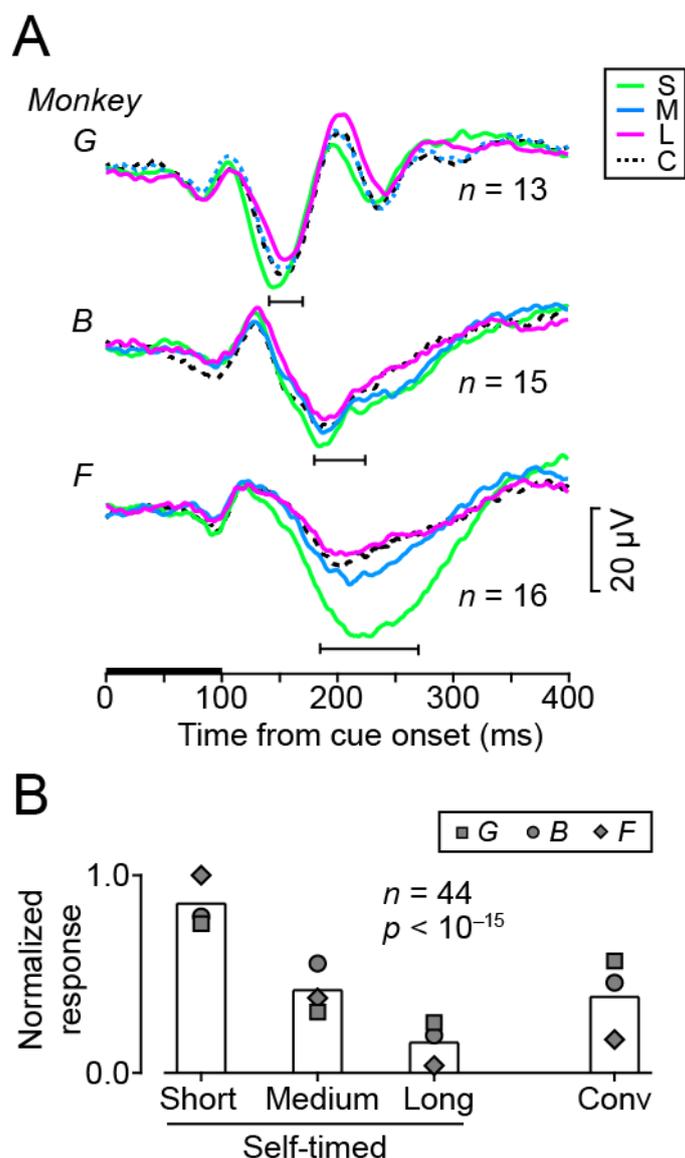


図22 条件による視覚誘発電位の変化

A, 対側視野に提示された手掛かり刺激に対する視覚応答。異なる色は異なる課題条件を表す。横軸にある黒いバーは手掛かり刺激の提示期間を示す。各個体におけるトレース下の横線は最大応答がみられた範囲を表す。B, 応答の大きさの定量解析。異なるシンボルは異なる個体を表す。時間長による有意差を認めた (repeated-measures ANOVA, $p < 10^{-15}$)。

た。手掛かり刺激はすべての条件で同じものを用いているにもかかわらず、課題条件（各色に対応）によって視覚応答の大きさに違いがみられた。応答は short 条件（緑色）で大きく、long 条件（マゼンタ）で小さかった。

各記録部位における視覚誘発電位の振幅について、全44か所分のデータを図22Bにまとめる。時間生成課題の3つの時間条件間の比較をおこなったところ、応答の大きさに有意差を認めた (one-way repeated-measures ANOVA, $F_{2,86} = 55.7$, $p < 10^{-15}$)。事後検定により、これら3つのどのペアについても有意差が認められた (two-tailed paired t -test, $p < 10^{-3}$)。

線条体 LFP の周波数解析

課題条件間での視覚応答ゲインの違いは、大脳皮質-線条体経路の機能結合の違いを反映しているかもしれない。過去の研究から大脳基底核 LFP が大脳皮質-基底核間情報伝達と関連することが示唆されており⁸³、ネットワーク状態を調べるために、線条体 LFP の周波数解析をおこなった。

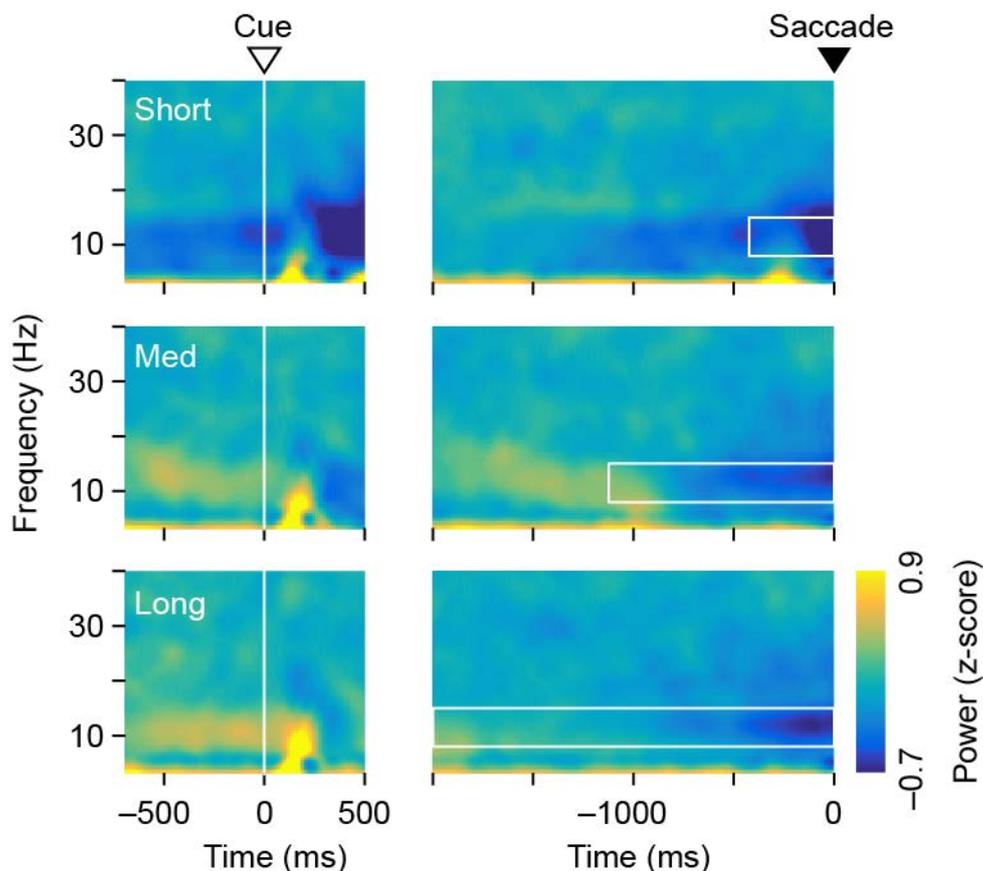


図23 時間生成課題時の各周波数における活動変化(サル G)

X 軸のゼロは手掛かり刺激（左）またはサッカード開始（右）を示す。白枠は図24において解析対象とした周波数帯域（8-15 Hz）を示す。

サル G から記録した13か所の LFP の各周波数成分の時間経過を図23に示す。左右のパネルではそれぞれ、手掛かり刺激のタイミングとサッカード開始のタイミングにデータをそろえてある。低周波数帯域活動の変化が、サッカード直前とともに、手掛かり刺激出現の前にも認められる。これら部位ではサッカードに先行して発火頻度を漸増させるニューロンが多数記録されていたことから、まずは遅延期間中の LFP の各周波数成分の時間推移を調べた。

図24A はサッカード前の事象関連電位 (A), 図24B はまたは8-15 Hz の周波

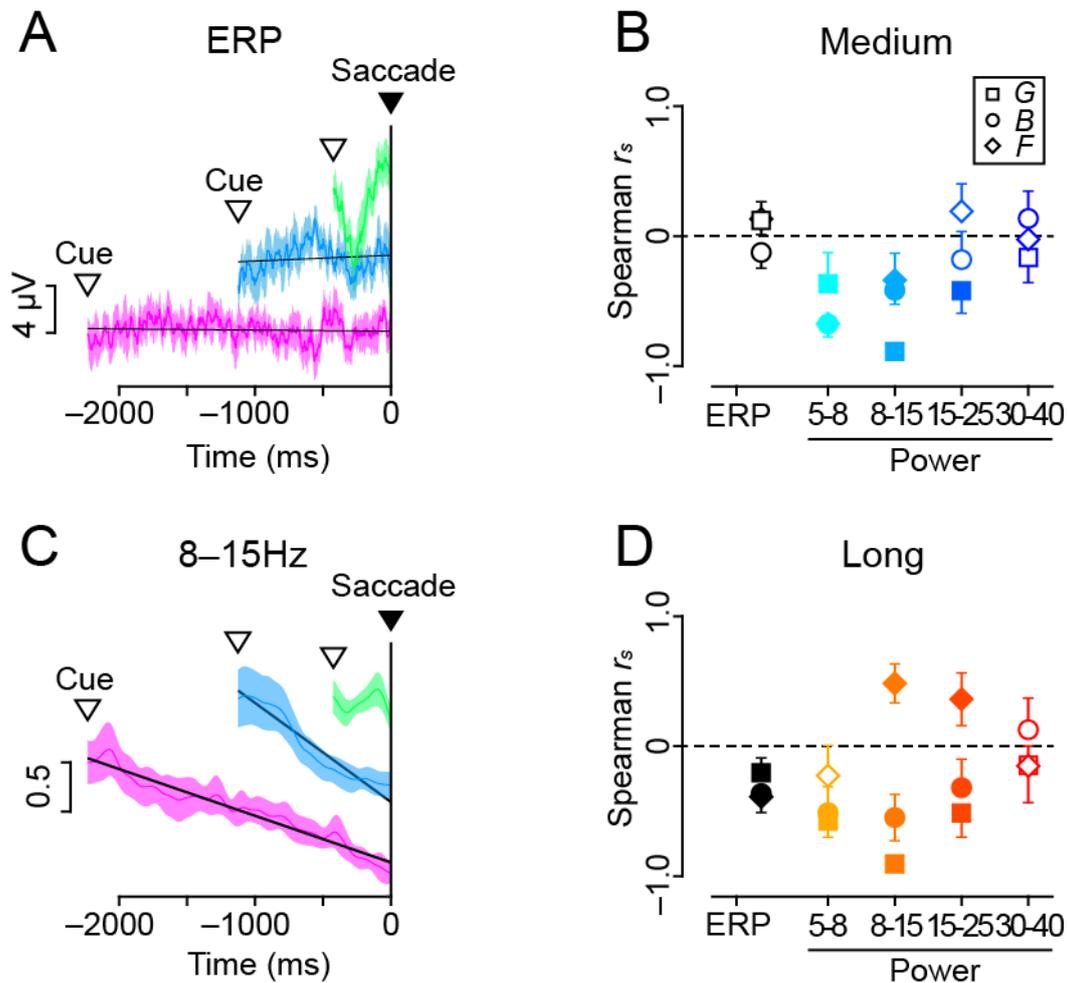


図24 時間変化する成分の解析

A, 事象関連電位 ($\pm 95\%$ 信頼区間) の時間経過 (サル G, $n = 13$)。上から順に short, medium, long 条件を示しており、見やすくするために条件ごとに縦軸方向にトレースをずらして表示している。B, 低周波数帯域 (8-15 Hz) におけるパワーの時間経過。C, D, medium 条件 (C) または long 条件 (D) における、時間と各周波数成分 (または電位) との間の順位相関係数 (r_s)。異なるシンボルは異なる個体を表す。ゼロと有意に異なる (one-sample t -test, $n = 13-16$, $p < 0.05$) データは塗りつぶしてある。

数成分（パワー）（B）の時間経過を示している。事象関連電位はほとんど平坦であるが、低周波数成分はサッカーに先立って徐々に減少している。これを定量化するために、medium 条件（C）、long 条件（D）において時間と各周波数成分（または電位）の間の順位相関係数を求めた（方法参照）。低周波数帯域（5–25 Hz）では明らかな時間変化が認められ、特に8–15 Hz では相関係数がすべての個体でゼロと有意に差があった。一方、高周波数帯域（30–40 Hz）では相関が認められなかった。

図23左ではより長い時間長条件で低周波数帯域のパワーが大きくなっていたが、これを定量的に調べるために、手掛かり刺激出現直前（500 ms）について各サルにおけるパワースペクトルを求めた（図25 A–C）。若干の差はあるものの、どの個体でも明らかに long 条件で低周波数帯域のパワーが大きく、short 条件で小さくなっていた。long 条件と short 条件で最もパワーの違いが大きかったのは、サル G, B, F のそれぞれで10.7, 13.2, 7.8 Hz の成分であった。図25A の鍵括弧で示した周波数帯域のパワーを3時間長条件間で比べたのが図25B である。条件間で有意差を認め（repeated-measures ANOVA, $F_{2,86} = 68.2$, $p < 10^{-17}$ ）、事後検定では、これら3つのうちどのペアにも有意な差を認めた（ $p < 10^{-5}$ ）。このように、低周波数帯域の活動は時間長条件依存的な変化を示した。

これらの結果が体積伝導（volume conduction）によって、尾状核外の離れた脳構造（例えば、大脳皮質）における電気活動を反映している可能性を除外するために、re-referencing を用いたデータのみ（ $n = 6$, 方法参照）に対して再度解析をおこなった。すると、図25B で用いた周波数帯域におけるパワーの平均値は short, medium, long 条件でそれぞれ 0.12 ± 0.20 （標準偏差, $n = 6$ ）、 0.45 ± 0.33 、 0.62 ± 0.40 であり、統計学的に有意な差が認められた（repeated-measures ANOVA, $F_{2,10} = 23.8$, $p < 10^{-3}$ ）。したがって、今回発見した特定周波数での条件間によるパワーの違いは比較的局所的な現象を反映しており、大脳皮質などの信号の体積伝導では説明できないと考えられた。

各条件内におけるサッカー潜時と低周波数成分の関係

第1章では、同じ時間長条件内では手掛かり刺激直前の瞳孔径とサッカー潜時が相関することを示した。低周波数帯域のパワー変化も各時間長条件内の潜時の違いと相関するか調べるために、各時間長条件、各サッカー方向について潜時によってデータを二分割して低周波数成分を比較したところ、long 条件かつ対側にサッカーする場合（短潜時群： 0.35 ± 0.40 < 平均 \pm 標準偏差 >、長潜時群： 0.46 ± 0.54 , $n = 44$ sites, two-tailed paired t -test, $p < 0.02$ ）のみで有意差

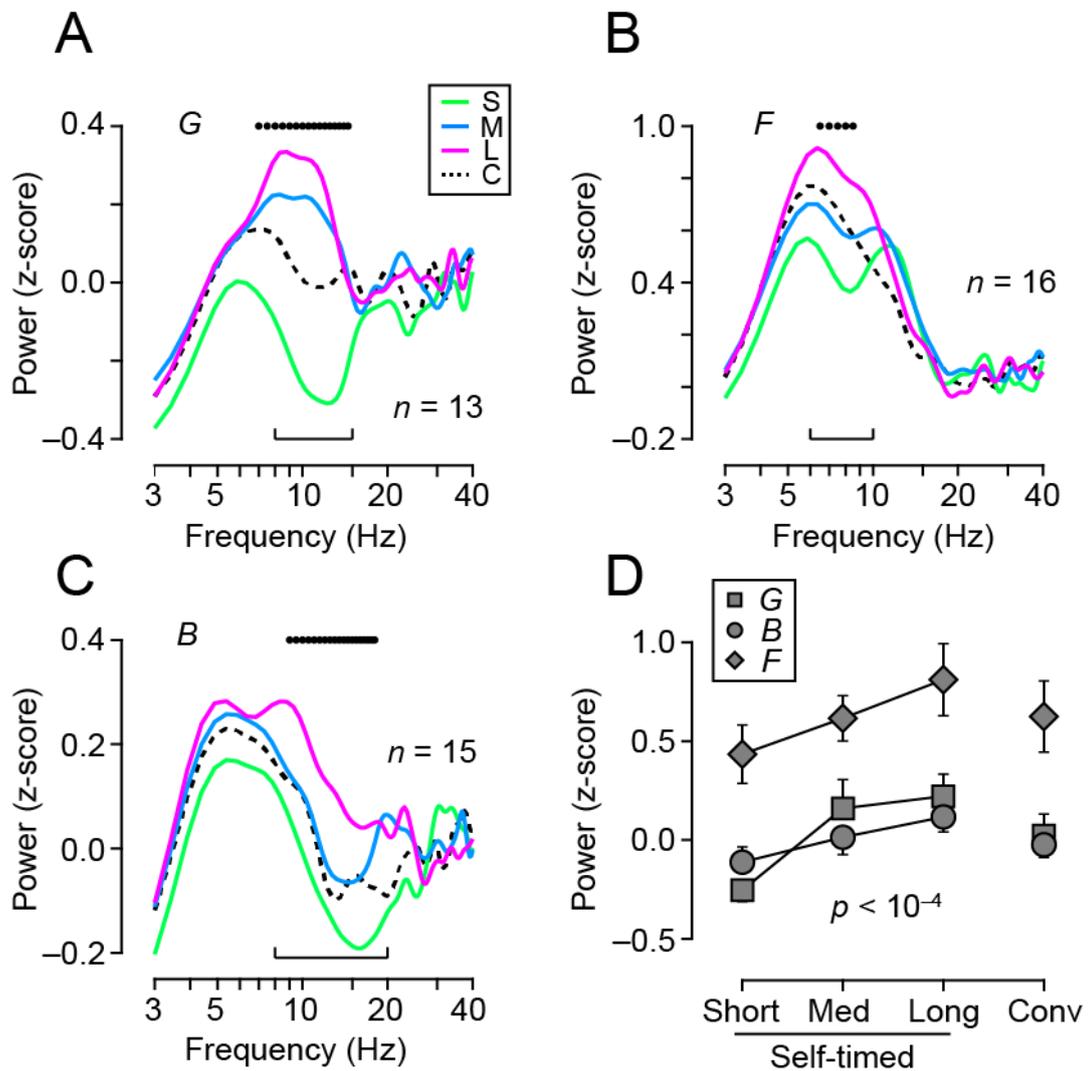


図25 手掛かり刺激直前のパワースペクトル

A–C, 各個体におけるパワースペクトル ($n = 13$ – 16)。黒点は時間長条件間で有意差の見られた周波数帯域を示す (one-way ANOVA, 2 Hz bin with 0.5 Hz step, $p < 0.01$)。鍵括弧は定量解析に使用した周波数帯域を示す。D, 低周波数成分の時間長条件間の比較 ($n = 44$)。異なるシンボルは異なる個体を表す。エラーバーは $\pm 95\%$ 信頼区間。

が認められ、他の5つの場合では有意な差は検出されなかった ($p > 0.2$)。このように、尾状核 LFP の低周波数帯域活動は異なる時間長条件間では明らかな変化を示すのに対して、一部の場をを除いては各時間長条件内での実際の潜時の長短を反映しなかった。

線条体 LFP に対する報酬量の効果

線条体の神経活動は報酬量に強く影響されることが知られている¹⁰⁷。報酬までの時間が長いと報酬の価値は低くなることが知られていること（時間割引き）から、今回の課題ではより長い時間長条件ほど報酬量が小さく見積もられていた可能性が考えられる。もしそうだとすると、図25でみられた時間長による変化は報酬量の違いを反映していたのかもしれない。これを検証するために、反応性課題で2種類の報酬量（R×1, R×2）を提示してこの効果を調べた。2条件でサッカード速度が変化したこと（ 406 ± 105 vs. 422 ± 107 °/s, $n = 24$ <2方向×12セッション>, paired *t*-test, $p < 0.01$ ）からサルはこれらを区別できていたと考えられた。先ほどまでと同様の周波数帯域において、報酬量条件、または時間長条件（long, short）で比較をおこなったところ、サルBではどちらも有意な差があり（ $n = 5$, paired *t*-test, $p < 0.03$ ），サルFでは後者にのみ有意差を認めた（ $n = 9$, paired *t*-test, 報酬条件： $p = 0.1$, 時間長条件： $p < 0.01$ ）。

図26は14か所の結果をまとめたものである。全体として、報酬量の効果（R×1-R×2により計算）と、時間長の効果（long-short）はいずれもゼロとは有意に異なっていた（one-sample *t*-test, $p < 0.05$ ）。このことから、報酬量の違いは確かに線条体 LFP に影響を与えることがわかった。もし時間長条件によるパワー変化が報酬量の違いによりもたらされているとすれば、この2つは正相関することが期待される。つまり、より強い時間長効果を示した記録部位は、より強い報酬量効果も示すはずである。しかし、実際は負の相関が認められた（ $n = 14$, $r_s = -0.55$, $p < 0.05$ ）。したがって、時間長条件による低周波数成分変化が報酬量

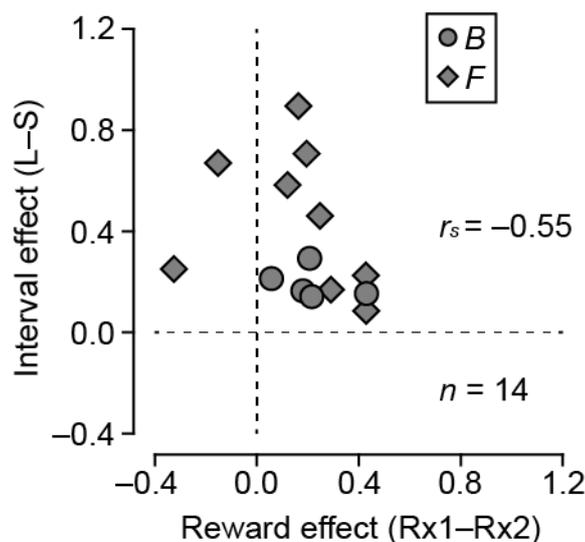


図26 報酬量と時間長条件が低周波数帯域の活動に及ぼす影響の比較

の違いによって間接的にもたらされた可能性は低いと考えられる。

これをさらに追及するため、より広い周波数帯域への影響を調べたところ、報酬量と時間長の操作はそれぞれ異なったパワースペクトルの変化をもたらしていた。図27Aは各報酬量条件におけるパワースペクトルを示している(サル B, $n=5$)。この2つの変化は、図26の解析で使用した周波数帯域(図26A, 鍵括弧)を超えて生じているようにみえる。この2つの差を、10の周波数帯域に分けて計算し、時間長(long-short)による差と比較したところ、明らかな違いが認められた(図27B)。これを定量的に調べるために、14か所ある記録部位のそれぞれにおいて、この2つ(報酬量 $\times 1$ - 報酬量 $\times 2$, long-short)の間の相関を調べた(図28)。全体として、相関係数の平均値にはゼロとの有意な差が認められなかった($n=14$, one sample t -test, $p=0.85$)。したがって、報酬量が尾状核 LFP に及ぼす影響は時間長条件によるものとは質的に異なるものであり、時間長条件間の違いが主観的な報酬量の違いのみから生じる可能性は考えにくい。

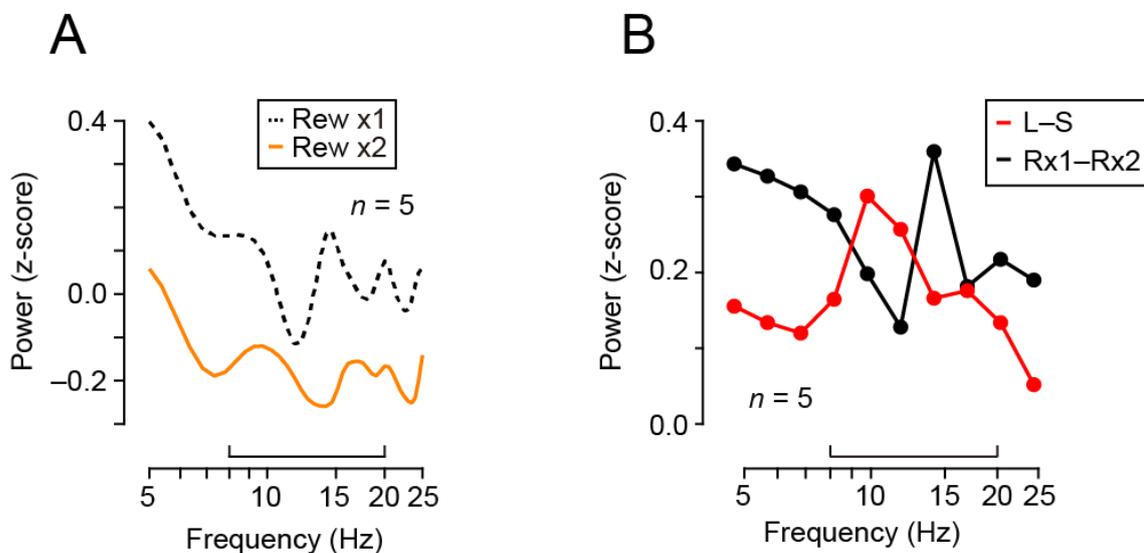


図27 報酬量による影響

A, 各報酬量条件におけるパワースペクトル(サル B)。鍵括弧は図25の解析で使った周波数帯域を示す。B, 報酬量の違いによる変化($R \times 1 - R \times 2$, 黒色)と時間長条件間による変化(long-short, 赤色)の比較。パワーの差は10の周波数帯域に分割して計算した。

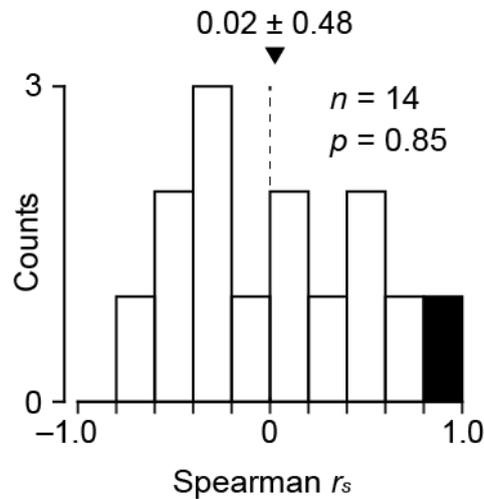


図28 2つのパワー変化(図26B)間の相関係数の分布($n = 14$)
相関係数がゼロと有意に異なる ($p < 0.05$) データは塗りつぶしてある。

【考察】

時間生成課題を遂行中のサル尾状核から LFP を記録して解析した。手掛かり刺激に対する視覚応答を調べたところ、時間長による影響を認めた。ネットワークレベルでの変化を探るために周波数解析をおこなったところ、計時中に低周波成分のパワーが経時変化していた。さらに手掛かり刺激が提示される直前の LFP を調べたところ、低周波数帯域のパワーには時間長条件間で明らかな違いがあり、より長い時間長を計るときほど大きくなっていった。これは多点電極を用いて双極で LFP を導出した場合にも観察されたため、大脳皮質などの離れた脳部位からの体積伝導ではなく、ある程度局所的な現象と考えられる。また、時間割引によって報酬の価値が変化するため、報酬量の違いによるパワースペクトルへの影響も検討したが、時間長条件の違いによるものとは質的に異なるものであった。

計時の最中に、低周波数帯域に選択的な時間変化を認めた(図24)。これまでに、Bartolo ら^{73,74}はサルが周期的なタッピングをおこなう際に被殻 LFP に10–20 Hz 域の活動変化が起こることを示しており、Emmons ら⁷⁶はラットが時間生成をおこなう際に背内側線条体 LFP の1–8 Hz 域の活動が変化することを報告している。今回発見した計時の際の尾状核 LFP の変化は、こうした研究結果と一致する。また、尾状核では計時の最中に活動の漸増を示すニューロンが多数記録さ

れるが⁶、今回、同部位の LFP の低周波数成分も同様の時間変化を示すことが明らかとなった。しかし、LFP の低周波数成分の時間変化がニューロンの発火頻度の変化と具体的にどのように関連するかは不明であり、今後詳しく調べる必要がある。

手掛かり刺激に対する視覚応答の大きさは、報告する時間長が短い条件で大きかったが(図22)、計時の直前に時間長依存的なスペクトル変化がみられたこと(図25)と関連しているのかもしれない。低周波数帯域の活動上昇が大脳皮質-基底核間の情報伝達の抑制と関連することが示唆されていることから⁸³、より長い時間長を計る際にはこのシステムの伝達効率の低下が起こり、それが尾状核における視覚応答の抑制につながったのかもしれない。こうした計時に先立つネットワーク状態の変化が、最終的に意図したタイミングで運動を開始するために役立っている可能性がある。具体的には、尾状核ニューロンの発火頻度の上昇率が、皮質-線条体の機能結合の強弱によって調節されているのかもしれない。最近、時間生成時の線条体ニューロンの時間の表象は、計る時間長に応じ時間方向に拡大、縮小されることが示されている⁷⁵。低周波数帯域活動が減少するような状況では、皮質線条体路の情報伝達が亢進しており、計時関連ニューロン活動の時間変化が早まるのかもしれない。

異なった時間長条件間で低周波数成分に違いがみられた一方で、同一の時間長条件下ではサカード潜時による LFP の変化は明らかではなかった。対照的に、第1章では、計時直前の瞳孔径が、同一条件下での確率的な潜時の変動と相関し、異なる条件でのサカード潜時そのものを反映しないことが示された。これらの結果から、同一条件下での試行ごとのばらつきは大脳基底核とは別の計時システムで生じている可能性がある。瞳孔径と青斑核の神経活動の相関がよく知られており、青斑核から線条体への投射が例外的に非常に乏しいこと¹⁰⁸⁻¹¹⁰も、この仮説と合致する。実際、こうした計時の確率的な変動は小脳の神経活動によく反映されることがわかっており^{6,37}、また小脳には豊富なノルアドレナリン作動性の入力が存在しているため¹¹¹⁻¹¹⁴、こうした試行ごとの変動は大脳皮質-小脳システムで生じるのかもしれない(図29)。

試行ごとに与える指示に応じて2種類の時間長を生成させると、Parkinson 病では生成時間の分布が互いに近づくことが知られている(“migration effect”)¹¹⁵。

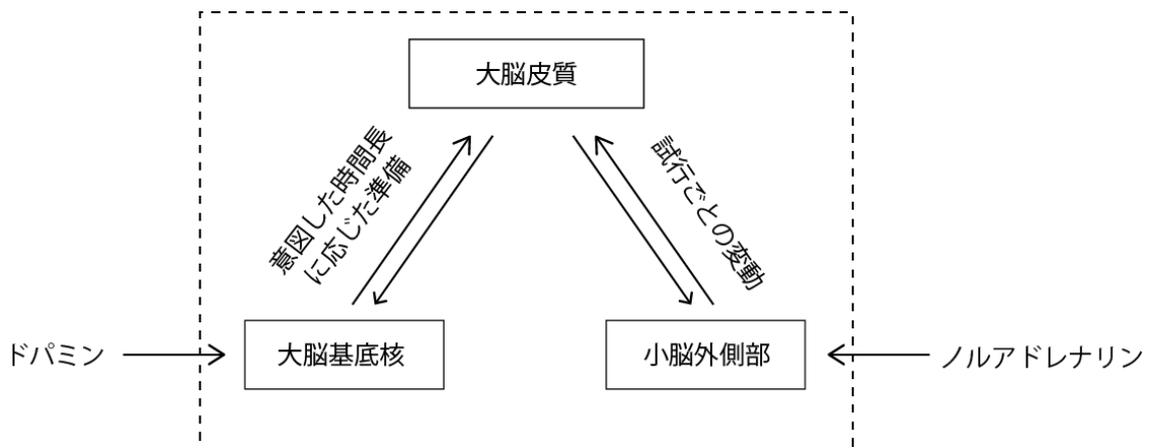


図29 2つの計時システム

Parkinson 病では大脳基底核から持続的な高振幅の低周波数律動が観察されることが知られており⁸⁶⁻⁸⁸，本研究でみられたような時間長に応じた低周波数成分の動的な変化に対応する調節機構が働かず，時間長に合わせた神経活動の計時変化が生じないのかもしれない。実際，ドパミン補充療法により律動性活動は減弱し，migration effect もみられなくなることが知られている¹¹⁵。また，本研究の記録部位の近傍にドパミン関連薬剤を投与すると，生成時間が延長または短縮することが報告されており⁷⁶，線条体へのドパミン性投射が時間長依存的な準備状態の形成に役立っている可能性がある。

今回観察されたような低周波数帯域活動が具体的にどのように生じるのかはわかっていない。少なくとも，Parkinson 病における律動性活動の生成については淡蒼球外節-視床下核間の相互連絡^{94,116-118}や皮質線条体入力¹¹⁹⁻¹²⁰，線条体内の介在ニューロンの活動など¹²¹⁻¹²⁷が関与すると考えられている。線条体ニューロンの膜電位と LFP が相関すること^{128,129}，線条体膜電位に10-20 Hz の範囲での律動性変化がみられること^{130,131}が報告されており，線条体 LFP はこれらを反映するのかもしれない。多くの研究が線条体ニューロンの発火タイミングと LFP 律動性活動との相関を報告しており^{73,74,76,93,132,133}，また，線条体内にアセチルコリン受容体刺激薬を微量注入することで8-30 Hz 域での律動性活動が生じることから¹³⁴，線条体における情報処理は低周波数帯域活動と密接に結びついているようである。

本研究により，計時に先立って線条体 LFP に時間長依存的な変化が起きるこ

とがわかった。皮質-基底核ネットワークの準備状態の変化が、適切な計時とそれに基づく行動発現に重要なのかもしれない。

【総括および結論】

本研究から、以下の知見が得られた。

第1章

- ・主観的な時間の長さが、計時直前の瞳孔径と逆相関した。
- ・一定の時間長を測定する際、瞳孔径は試行ごとの計時結果の変動と相関したが、異なる時間長を測定する際、瞳孔径は時間長そのものとは相関しなかった。

第2章

- ・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬の投与により、主観的な1秒が延長した。

第3章

- ・測定しようとする時間長に応じ、線条体の視覚応答ゲインが変化した。
- ・線条体 LFP の低周波数成分が計時中に時間変化した。
- ・測定しようとする時間長に応じ、計時前の低周波数成分に変化が生じた。
- ・低周波数成分は試行ごとの計時結果の変動と相関しなかった。

計時には、前頭連合野や大脳基底核、小脳といった様々な脳領域が関わることで知られている。全体的な脳状態に着目して実験をおこなったところ (1-2章)、こうした脳部位における時間情報処理に対し、ノルアドレナリンシステム等によって調節されるような脳全体規模の状態が常に影響を及ぼしている可能性が示唆された。これが、気分や注意・覚醒状態のような内的因子が主観的時間経過を変容させる機構なのかもしれない。

第3章では計時に関連した神経活動の生成・制御機構について検討した。線条体 LFP を解析した結果、測定する時間長に応じて大脳皮質-大脳基底核間の機能結合に変化が生じている可能性が示唆された。こうした変化が線条体の神経活動の時間経過を変化させることで、適切なタイミングでの行動発現が可能となっているのかもしれない。今後、電気刺激や薬理学的操作と線条体 LFP 記録などを組み合わせた、より直接的な方法でこの仮説を検証する必要がある。

第3章の研究によって、大脳皮質-大脳基底核ネットワークは試行ごとに生じる計時の確率的な変動には関与しないことが示唆されたが、これは尾状核の単一ニューロン活動のデータともよく合致する。一方で、第1章では自律神経指標である瞳孔径が試行ごとの変動と相関することが明らかとなった。小脳歯状核の神経活動がこうした試行ごとのばらつきをよく反映すること、小脳には豊富

なノルアドレナリン作動性入力があることから、大脳皮質-小脳ネットワークが内的因子による調節の主なターゲットなのかもしれない。小脳の計時関連活動へのノルアドレナリン関連薬の作用を調べることで、そのメカニズムを調べるうえで有効であると考えられる。

【謝辞】

本研究遂行にあたって多くの方々にご協力をいただきました。研究全般において直接ご指導ご鞭撻賜り，本学位論文作成に当たり惜しみないご助力をいただきました北海道大学医学研究院・田中真樹教授に心より感謝いたします。また，実験手技の初歩的なところから直接ご指導くださいました当研究室助教・國松淳先生（現・米国国立衛生研究所）に深く感謝いたします。また，鈴木真理さん，森智子さん，弘中愛さん，宮口尚絵さんには，事務手続きや動物の管理等に関して様々なサポートをいただきました。研究に関し様々な助言をいただいた神経生理学教室のすべての皆さまに感謝いたします。最後になりますが，武田科学振興財団様からは手厚い奨学助成をいただきました。感謝申し上げます。

【引用文献】

- 1 Mauk, M. D. & Buonomano, D. V. The neural basis of temporal processing. *Annu Rev Neurosci* **27**, 307-340 (2004).
- 2 Ivry, R. B. & Schlerf, J. E. Dedicated and intrinsic models of time perception. *Trends Cogn Sci* **12**, 273-280 (2008).
- 3 Merchant, H., Harrington, D. L. & Meck, W. H. Neural basis of the perception and estimation of time. *Annu Rev Neurosci* **36**, 313-336 (2013).
- 4 Coull, J. T., Cheng, R. K. & Meck, W. H. Neuroanatomical and neurochemical substrates of timing. *Neuropsychopharmacology* **36**, 3-25 (2011).
- 5 Mangels J. A., Ivry R. B. & Shimizu N. Dissociable contributions of the prefrontal and neocerebellar cortex to time perception. *Cogn Brain Res* **7**, 15–39 (1998).
- 6 Tanaka, M. Inactivation of the central thalamus delays self-timed saccades. *Nat Neurosci* **9**, 20-22 (2006).
- 7 Kunimatsu, J., Suzuki, T. W., Ohmae, S. & Tanaka, M. Distinct roles of the basal ganglia and the cerebellum in self-timing (In submission).
- 8 Merchant, H., Zarco, W., Pérez, O., Prado, L. & Bartolo, R. Measuring time with different neural chronometers during a synchronization-continuation task. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19784-19789 (2011).
- 9 Jazayeri, M. & Shadlen, M. N. A Neural Mechanism for Sensing and Reproducing a Time Interval. *Curr Biol* **25**, 2599-2609 (2015).
- 10 Xu, M., Zhang, S. Y., Dan, Y. & Poo, M. M. Representation of interval timing by temporally scalable firing patterns in rat prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 480-485 (2014).
- 11 Wittmann, M. The inner experience of time. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 1955-1967 (2009).
- 12 Gil, S. & Droit-Volet, S. Emotional time distortions: the fundamental role of arousal. *Cogn Emot* **26** (2012).
- 13 Mioni, G., Stablum, F., Prunetti, E. & Grondin, S. Time perception in anxious and depressed patients: A comparison between time reproduction and time production tasks. *J Affect Disord* **196**, 154-163 (2016).
- 14 Laeng, B., Sirois, S. & Gredebäck, G. Pupillometry: A Window to the Preconscious? *Perspect Psychol Sci* **7**, 18-27 (2012).
- 15 Graur, S. & Siegle, G. Pupillary motility: bringing neuroscience to the

- psychiatry clinic of the future. *Curr Neurol Neurosci Rep* **13**, 365 (2013).
- 16 Sirois, S. & Brisson, J. Pupillometry. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* **5**, 679-692 (2014).
- 17 Reimer, J., Froudarakis, E., Cadwell C. R., Yatsenko D., Denfield G. H. & Tolias A. S. Pupil fluctuations track fast switching of cortical states during quiet wakefulness. *Neuron* **84**, 355-362 (2014).
- 18 McGinley, M. J., David, S. V. & McCormick, D. A. Cortical Membrane Potential Signature of Optimal States for Sensory Signal Detection. *Neuron* **87**, 179-192 (2015).
- 19 Vinck, M., Batista-Brito, R., Knoblich, U. & Cardin, J. A. Arousal and locomotion make distinct contributions to cortical activity patterns and visual encoding. *Neuron* **86**, 740-754 (2015).
- 20 Iriki, A., Tanaka, M. & Iwamura, Y. Attention-induced neuronal activity in the monkey somatosensory cortex revealed by pupillometrics. *Neurosci Res* **25**, 173-181 (1996).
- 21 Ebitz, R. B. & Platt, M. L. Neuronal activity in primate dorsal anterior cingulate cortex signals task conflict and predicts adjustments in pupil-linked arousal. *Neuron* **85**, 628-640 (2015).
- 22 Joshi, S., Li, Y., Kalwani, R. M. & Gold, J. I. Relationships between Pupil Diameter and Neuronal Activity in the Locus Coeruleus, Colliculi, and Cingulate Cortex. *Neuron* **89**, 221-234 (2016).
- 23 Aston-Jones, G. & Cohen, J. D. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* **28**, 403-450 (2005).
- 24 Murphy, P. R., O'Connell, R. G., O'Sullivan, M., Robertson, I. H. & Balsters, J. H. Pupil diameter covaries with BOLD activity in human locus coeruleus. *Hum Brain Mapp* **35**, 4140-4154 (2014).
- 25 Varazzani, C., San-Galli, A., Gilardeau, S. & Bouret, S. Noradrenaline and dopamine neurons in the reward/effort trade-off: a direct electrophysiological comparison in behaving monkeys. *J Neurosci* **35**, 7866-7877 (2015).
- 26 Wittmann, M. & Paulus, M. P. Decision making, impulsivity and time perception. *Trends Cogn Sci* **12**, 7-12 (2008).
- 27 Pine, A., Shiner, T., Seymour, B. & Dolan, R. J. Dopamine, time, and impulsivity in humans. *J Neurosci* **30**, 8888-8896 (2010).
- 28 Maimon, G. & Assad, J. A. A cognitive signal for the proactive timing of action in macaque LIP. *Nat Neurosci* **9**, 948-955 (2006).

- 29 Mita, A., Mushiake, H., Shima, K., Matsuzaka, Y. & Tanji, J. Interval time coding by neurons in the presupplementary and supplementary motor areas. *Nat Neurosci* **12**, 502-507 (2009).
- 30 Murakami, M., Vicente, M. I., Costa, G. M. & Mainen, Z. F. Neural antecedents of self-initiated actions in secondary motor cortex. *Nat Neurosci* **17**, 1574-1582 (2014).
- 31 Parker, K. L., Chen, K. H., Kingyon, J. R., Cavanagh, J. F. & Narayanan, N. S. D1-dependent 4 Hz oscillations and ramping activity in rodent medial frontal cortex during interval timing. *J Neurosci* **34**, 16774-16783 (2014).
- 32 Tanaka, M. Cognitive signals in the primate motor thalamus predict saccade timing. *J Neurosci* **27**, 12109-12118 (2007).
- 33 Lee, I. H. & Assad, J. A. Putaminal activity for simple reactions or self-timed movements. *J Neurophysiol* **89**, 2528-2537 (2003).
- 34 Turner, R. S. & Anderson, M. E. Context-dependent modulation of movement-related discharge in the primate globus pallidus. *J Neurosci* **25**, 2965-2976 (2005).
- 35 Kunimatsu, J. & Tanaka, M. Striatal dopamine modulates timing of self-initiated saccades. *Neuroscience* **337**, 131-142 (2016).
- 36 Ashmore, R. C. & Sommer, M. A. Delay activity of saccade-related neurons in the caudal dentate nucleus of the macaque cerebellum. *J Neurophysiol* **109**, 2129-2144 (2013).
- 37 Ohmae, S., Kunimatsu, J. & Tanaka, M. Cerebellar roles in self-timing for sub- and supra-second intervals. *J Neurosci* **37**, 3511-3522 (2017).
- 38 Samuels, E. R. & Szabadi, E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Curr Neuropharmacol* **6**, 235-253 (2008).
- 39 Rammsayer, T. H., Hennig, J., Haag, A. & Lange, N. Effects of noradrenergic activity on temporal information processing in humans. *Q J Exp Psychol B* **54**, 247-258 (2001).
- 40 Waterhouse, B. D., Moises, H. C. & Woodward, D. J. Noradrenergic modulation of somatosensory cortical neuronal responses to iontophoretically applied putative neurotransmitters. *Exp Neurol* **69**, 30-49 (1980).
- 41 McCormick, D. A. Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. *Trends Neurosci* **12**, 215-221 (1989).
- 42 Carr, D. B., Andrews, G. D., Glen, W. B. & Lavin, A. alpha2-Noradrenergic

- receptors activation enhances excitability and synaptic integration in rat prefrontal cortex pyramidal neurons via inhibition of HCN currents. *J Physiol* **584**, 437-450 (2007).
- 43 Zhang, Z., Cordeiro Matos, S., Jego, S., Adamantidis, A. & Séguéla, P. Norepinephrine drives persistent activity in prefrontal cortex via synergistic $\alpha 1$ and $\alpha 2$ adrenoceptors. *PLoS One* **8**, e66122 (2013).
- 44 Ohta, H., Kohno Y., Arake M., Tamura R., Yukawa S., Sato Y., Morimoto Y., Nishida Y. & Yawo H. Adrenergic receptor-mediated modulation of striatal firing patterns. *Neurosci Res* **112**, 47-56, (2016).
- 45 Marzo, A., Totah, N. K., Neves, R. M., Logothetis, N. K. & Eschenko, O. Unilateral electrical stimulation of rat locus coeruleus elicits bilateral response of norepinephrine neurons and sustained activation of medial prefrontal cortex. *J Neurophysiol* **111**, 2570-2588 (2014).
- 46 Chamberlain, S. R., Müller, U., Robbins, T. W. & Sahakian, B. J. Neuropharmacological modulation of cognition. *Curr Opin Neurol* **19**, 607-612 (2006).
- 47 Sara, S. J. & Bouret, S. Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron* **76**, 130-141 (2012).
- 48 Corbetta, M., Patel, G. & Shulman, G. L. The reorienting system of the human brain: from environment to theory of mind. *Neuron* **58**, 306-324 (2008).
- 49 Brezina, V. Beyond the wiring diagram: signalling through complex neuromodulator networks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 2363-2374 (2010).
- 50 Marder, E., O'Leary, T. & Shruti, S. Neuromodulation of circuits with variable parameters: single neurons and small circuits reveal principles of state-dependent and robust neuromodulation. *Annu Rev Neurosci* **37**, 329-346 (2014).
- 51 Schaefer, A., Burmann I., Regenthal R., Arélin K., Barth C., Pampel A., Villringer A., Margulies D.S., & Sacher J. Serotonergic modulation of intrinsic functional connectivity. *Curr Biol* **24**, 2314-2318 (2014).
- 52 van Wingen, G. A., Tendolkar I., Uner M., van Marle H.J., Denys D., Verkes R.J., & Fernández G. Short-term antidepressant administration reduces default mode and task-positive network connectivity in healthy individuals during rest. *Neuroimage* **88**, 47-53 (2014).
- 53 Metzger, C. D., Wieggers, M., Walter, M., Abler, B. & Graf, H. Local and global resting state activity in the noradrenergic and dopaminergic pathway modulated by reboxetine and amisulpride in healthy subjects. *Int J Neuropsychopharmacol*

- 19** (2015).
- 54 Guedj, C., Monfardini E., Reynaud A. J., Farnè A., Meunier M. & Hadj-Bouziane F. Boosting norepinephrine transmission triggers flexible reconfiguration of brain networks at rest. *Cereb Cortex* (2016).
- 55 van den Brink, R. L., Pfeffer T., Warren C.M., Murphy P.R., Tona K.D., van der Wee N.J., Giltay E., van Noorden M.S., Rombouts S.A., Donner T.H., & Nieuwenhuis S. Catecholaminergic Neuromodulation Shapes Intrinsic MRI Functional Connectivity in the Human Brain. *J Neurosci* **36**, 7865-7876 (2016).
- 56 Klaassens, B. L., Rombouts S. A., Winkler A. M., van Gorsel H .C., van der Grond J., & van Gerven J. M. Time related effects on functional brain connectivity after serotonergic and cholinergic neuromodulation. *Hum Brain Mapp* **38**, 308-325 (2017).
- 57 Aston-Jones, G., Rajkowski J., Kubiak P. & Alexinsky T. Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *J Neurosci* **14**, 4467-4480 (1994).
- 58 Ide, Y., Maehara Y., Tsukahara, S., Kitahata, LM. & Collins, JG. The effects of an intrathecal NMDA antagonist (AP5) on the behavioral changes induced by colorectal inflammation with turpentine in rats. *Life sciences* **60**, 1359 - 1363 (1973).
- 60 Michelson, D., Allen A.J., Busner J., Casat C., Dunn D., Kratochvil C., Newcorn J., Sallee F.R., Sangal R.B., Saylor K., West S., Kelsey D., Wernicke J., Trapp N.J., & Harder D. Once-daily atomoxetine treatment for children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* **159**, 1896-1901 (2002).
- 61 Grefkes, C., Wang, L. E., Eickhoff, S. B. & Fink, G. R. Noradrenergic modulation of cortical networks engaged in visuomotor processing. *Cereb Cortex* **20**, 783-797 (2010).
- 62 Rae, C. L., Nombela C., Rodríguez P. V., Ye Z., Hughes L. E., Jones P. S., Ham T., Rittman T., Coyle-Gilchrist I., Regenthal R., Sahakian B. J., Barker R .A., Robbins T.W., & Rowe J.B. Atomoxetine restores the response inhibition network in Parkinson's disease. *Brain* **139**, 2235-2248 (2016).
- 63 Penney, T. B., Holder, M. D. & Meck, W. H. Clonidine-induced antagonism of norepinephrine modulates the attentional processes involved in peak-interval timing. *Exp Clin Psychopharmacol* **4**, 82–92 (1996).
- 64 Faber, N. J. Neuromodulation of pupil diameter and temporal perception. *J*

- Neurosci* **37**, 2806-2808 (2017).
- 65 Carboni, E., Tanda, G. L., Frau, R. & Di Chiara, G. Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem* **55**, 1067-1070 (1990).
- 66 Bymaster, F. P., Katner J. S., Nelson D. L., Hemrick-Luecke S. K., Threlkeld P. G., Heiligenstein J.H., Morin S.M., Gehlert D.R., & Perry K.W. Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* **27**, 699-711 (2002).
- 67 Swanson, C. J., Perry K.W., Koch-Krueger S., Katner J., Svensson K. A., & Bymaster F. P. Effect of the attention deficit/hyperactivity disorder drug atomoxetine on extracellular concentrations of norepinephrine and dopamine in several brain regions of the rat. *Neuropharmacology* **50**, 755-760 (2006).
- 68 Buhusi, C. V. & Meck, W. H. What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nat Rev Neurosci* **6**, 755-765 (2005).
- 69 Soares, S., Atallah, B. V. & Paton, J. J. Midbrain dopamine neurons control judgment of time. *Science* **354**, 1273-1277 (2016).
- 70 Nambu, A. Somatotopic organization of the primate Basal Ganglia. *Front Neuroanat* **5**, 26 (2011).
- 71 Wall, N. R., De La Parra, M., Callaway, E. M. & Kreitzer, A. C. Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron* **79**, 347-360 (2013).
- 72 Chiba, A., Oshio, K. & Inase, M. Striatal neurons encoded temporal information in duration discrimination task. *Exp Brain Res* **186**, 671-676 (2008).
- 73 Bartolo, R., Prado, L. & Merchant, H. Information processing in the primate basal ganglia during sensory-guided and internally driven rhythmic tapping. *J Neurosci* **34**, 3910-3923 (2014).
- 74 Bartolo, R. & Merchant, H. β oscillations are linked to the initiation of sensory-cued movement sequences and the internal guidance of regular tapping in the monkey. *J Neurosci* **35**, 4635-4640 (2015).
- 75 Mello, G. B., Soares, S. & Paton, J. J. A scalable population code for time in the striatum. *Curr Biol* **25**, 1113-1122 (2015).
- 76 Emmons, E. B., Ruggiero, R. N., Kelley, R. M., Parker, K. L. & Narayanan, N. S. Corticostriatal Field Potentials Are Modulated at Delta and Theta Frequencies during Interval-Timing Task in Rodents. *Front Psychol* **7**, 459 (2016).

- 77 Bakhurin, K. I., Goudar V., Shobe J. L., Claar L. D., Buonomano D. V. & Masmanidis S. C. Differential Encoding of Time by Prefrontal and Striatal Network Dynamics. *J Neurosci* **37**, 854-870 (2017).
- 78 Emmons, E. B., De Corte B. J., Kim Y., Parker K. L., Matell M. S. & Narayanan, N. S. Rodent Medial Frontal Control of Temporal Processing in the Dorsomedial Striatum. *J Neurosci* **37**, 8718-8733 (2017).
- 79 Buzsáki, G., Anastassiou, C. A. & Koch, C. The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* **13**, 404-420 (2012).
- 80 Courtemanche, R., Fujii, N. & Graybiel, A. M. Synchronous, focally modulated beta-band oscillations characterize local field potential activity in the striatum of awake behaving monkeys. *J Neurosci* **23**, 11741-11752 (2003).
- 81 Berke, J. D., Okatan, M., Skurski, J. & Eichenbaum, H. B. Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron* **43**, 883-896 (2004).
- 82 DeCoteau, W. E., Thorn, C., Gibson, D. J., Courtemanche, R., Mitra, P., Kubota, Y. & Graybiel, A. M. Oscillations of local field potentials in the rat dorsal striatum during spontaneous and instructed behaviors. *J Neurophysiol* **97**, 3800-3805 (2007).
- 83 Leventhal, D. K., Gage, G. J., Schmidt, R., Pettibone, J., R. Case, A. C. & Berke, J. D. Basal ganglia beta oscillations accompany cue utilization. *Neuron* **73**, 523-536 (2012).
- 84 Feingold, J., Gibson, D. J., DePasquale, B. & Graybiel, A. M. Bursts of beta oscillation differentiate postperformance activity in the striatum and motor cortex of monkeys performing movement tasks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 13687-13692 (2015).
- 85 Brittain, J. S. & Brown, P. Oscillations and the basal ganglia: motor control and beyond. *Neuroimage* **85 Pt 2**, 637-647 (2014).
- 86 Hurtado, J. M., Gray, C. M., Tamas, L. B. & Sigvardt, K. A. Dynamics of tremor-related oscillations in the human globus pallidus: a single case study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1674-1679 (1999).
- 87 Brown, P., Oliviero, A., Mazzone, P., Insola, A., Tonali, P. & Di Lazzaro, V. Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, 1033-1038 (2001).
- 88 Levy, R., Ashby P., Hutchison W. D., Lang A. E., Lozano A. M. & Dostrovsky J. O. Dependence of subthalamic nucleus oscillations on movement and

- dopamine in Parkinson's disease. *Brain* **125**, 1196-1209 (2002).
- 89 Engel, A. K. & Fries, P. Beta-band oscillations--signalling the status quo? *Curr Opin Neurobiol* **20**, 156-165 (2010).
- 90 Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B. & DeLong, M. R. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* **72**, 507-520 (1994).
- 91 Nini, A., Feingold, A., Sloviter, H. & Bergman, H. Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* **74**, 1800-1805 (1995).
- 92 Soares, J., Kliem, M. A., Betarbet, R., Greenamyre, J. T., Yamamoto, B. & Wichmann, T. Role of external pallidal segment in primate parkinsonism: comparison of the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism and lesions of the external pallidal segment. *J Neurosci* **24**, 6417-6426 (2004).
- 93 Leblois, A., Meissner, W., Bioulac, B., Gross, C. E., Hansel, D. & Boraud, T. Late emergence of synchronized oscillatory activity in the pallidum during progressive Parkinsonism. *Eur J Neurosci* **26**, 1701-1713 (2007).
- 94 Tachibana, Y., Iwamuro, H., Kita, H., Takada, M. & Nambu, A. Subthalamo-pallidal interactions underlying parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia. *Eur J Neurosci* **34** (2011).
- 95 Moran, A., Stein, E., Tischler, H. & Bar-Gad, I. Decoupling neuronal oscillations during subthalamic nucleus stimulation in the parkinsonian primate. *Neurobiol Dis* **45**, 583-590 (2012).
- 96 Devergnas, A., Pittard, D., Bliwise, D. & Wichmann, T. Relationship between oscillatory activity in the cortico-basal ganglia network and parkinsonism in MPTP-treated monkeys. *Neurobiol Dis* **68**, 156-166 (2014).
- 97 Deffains, M., Iskhakova, L., Katabi, S., Haber, S. N., Israel, Z., & Bergman, H. Subthalamic, not striatal, activity correlates with basal ganglia downstream activity in normal and parkinsonian monkeys. *Elife* **5** (2016).
- 98 Gatev, P. & Wichmann, T. Interactions between cortical rhythms and spiking activity of single basal ganglia neurons in the normal and parkinsonian state. *Cereb Cortex* **19**, 1330-1344 (2009).
- 99 Benecke, R., Rothwell, J. C., Dick, J. P., Day, B. L. & Marsden, C. D. Disturbance of sequential movements in patients with Parkinson's disease. *Brain* **110 (Pt 2)**, 361-379 (1987).

- 100 Artieda, J., Pastor, M. A., Lacruz, F. & Obeso, J. A. Temporal discrimination is abnormal in Parkinson's disease. *Brain* **115 Pt 1**, 199-210 (1992).
- 101 Pastor, M. A., Artieda, J., Jahanshahi, M. & Obeso, J. A. Time estimation and reproduction is abnormal in Parkinson's disease. *Brain* **115 Pt 1**, 211-225 (1992).
- 102 Lange, K. W., Tucha, O., Steup, A., Gsell, W. & Naumann, M. Subjective time estimation in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **46**, 433-438 (1995).
- 103 Honma, M., Kuroda, T., Futamura, A., Shiromaru, A. & Kawamura, M. Dysfunctional counting of mental time in Parkinson's disease. *Sci Rep* **6**, 25421 (2016).
- 104 Smith, J. G., Harper, D. N., Gittings, D. & Abernethy, D. The effect of Parkinson's disease on time estimation as a function of stimulus duration range and modality. *Brain Cogn* **64**, 130-143 (2007).
- 105 Koch, G., Costa, A., Brusa, L., Peppe, A., Gatto, I., Torriero, S., Gerfo, E. L., Salerno, S., Oliveri, M., Carlesimo, G. A. & Caltagirone, C. Impaired reproduction of second but not millisecond time intervals in Parkinson's disease. *Neuropsychologia* **46**, 1305-1313 (2008).
- 106 Tabu, H., Aso, T., Matsushashi, M., Ueki, Y., Takahashi, R., Fukuyama, H., Shibasaki, H. & Mima, T. Parkinson's disease patients showed delayed awareness of motor intention. *Neurosci Res* **95**, 74-77 (2015).
- 107 Kawagoe, R., Takikawa, Y. & Hikosaka, O. Expectation of reward modulates cognitive signals in the basal ganglia. *Nat Neurosci* **1**, 411-416 (1998).
- 108 Swanson, L. W. & Hartman, B. K. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol* **163**, 467-505 (1975).
- 109 Jones, B. E. & Yang, T. Z. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* **242**, 56-92 (1985).
- 110 Baldo, B. A., Daniel, R. A., Berridge, C. W. & Kelley, A. E. Overlapping distributions of orexin/hypocretin- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *J Comp Neurol* **464**, 220-237 (2003).
- 111 Bloom, F. E., Hoffer, B. J. & Siggins, G. R. Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. I. Localization of the fibers and their synapses. *Brain Res* **25**, 501-521 (1971).

- 112 Olson, L. & Fuxe, K. On the projections from the locus coeruleus noradrenaline neurons: the cerebellar innervation. *Brain Res* **28**, 165-171 (1971).
- 113 Nyström, B., Olson, L. & Ungerstedt, U. Noradrenaline nerve terminals in human cerebral cortices: first histochemical evidence. *Science* **176**, 924-926 (1972).
- 114 Yamamoto, T., Ishikawa, M. & Tanaka, C. Catecholaminergic terminals in the developing and adult rat cerebellum. *Brain Res* **132**, 355-361 (1977).
- 105 Malapani, C., Rakitin B., Levy R., Meck W. H., Deweer B., Dubois B. & Gibbon J. Coupled temporal memories in Parkinson's disease: a dopamine-related dysfunction. *J Cogn Neurosci* **10**, 316-331 (1998).
- 116 Plenz, D. & Kital, S. T. A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* **400**, 677-682 (1999).
- 117 Bevan, M. D., Magill, P. J., Terman, D., Bolam, J. P. & Wilson, C. J. Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci* **25**, 525-531 (2002).
- 118 Shouno, O., Tachibana, Y., Nambu, A. & Doya, K. Computational Model of Recurrent Subthalamo-Pallidal Circuit for Generation of Parkinsonian Oscillations. *Front Neuroanat* **11**, 21 (2017).
- 119 Sharott, A., Magill, P. J., Harnack, D., Kupsch, A., Meissner, W. & Brown, P. Dopamine depletion increases the power and coherence of beta-oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *Eur J Neurosci* **21**, 1413-1422 (2005).
- 120 Walters, J. R., Hu, D., Itoga, C. A., Parr-Brownlie, L. C. & Bergstrom, D. A. Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in organizing slow oscillations in basal ganglia output after loss of dopamine. *Neuroscience* **144**, 762-776 (2007).
- 121 Bevan, M. D., Booth, P. A., Eaton, S. A. & Bolam, J. P. Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J Neurosci* **18**, 9438-9452 (1998).
- 122 Sato, F., Lavallée, P., Lévesque, M. & Parent, A. Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *J Comp Neurol* **417**, 17-31 (2000).
- 123 Kita, H. & Kita, T. Number, origins, and chemical types of rat pallidostriatal projection neurons. *J Comp Neurol* **437**, 438-448 (2001).
- 124 Mallet, N., Le Moine, C., Charpier, S. & Gonon, F. Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in

- vivo. *J Neurosci* **25** (2005).
- 125 Tepper, J. M., Wilson, C. J. & Koós, T. Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Res Rev* **58**, 272-281 (2008).
- 126 Berke, J. D. Functional properties of striatal fast-spiking interneurons. *Front Syst Neurosci* **5**, 45 (2011).
- 127 Mallet, N., Micklem B. R., Henny P., Brown M. T., Williams C., Bolam J. P., Nakamura K. C., Magill P. J. Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron* **74**, 1075-1086 (2012).
- 128 Goto, Y. & O'Donnell, P. Network synchrony in the nucleus accumbens in vivo. *J Neurosci* **21**, 4498-4504 (2001).
- 129 Leung, L. S. & Yim, C. Y. Rhythmic delta-frequency activities in the nucleus accumbens of anesthetized and freely moving rats. *Can J Physiol Pharmacol* **71**, 311-320 (1993).
- 130 Kasanetz, F., Riquelme, L. A. & Murer, M. G. Disruption of the two-state membrane potential of striatal neurones during cortical desynchronisation in anaesthetised rats. *J Physiol* **543**, 577-589 (2002).
- 131 Nonomura, S., Fujiwara-Tsukamoto, Y., Kajihara, T., Fujiyama, F. & Isomura, Y. Continuous membrane potential fluctuations in motor cortex and striatum neurons during voluntary forelimb movements and pauses. *Neurosci Res* **120**, 53-59 (2017).
- 132 Howe, M. W., Atallah, H. E., McCool, A., Gibson, D. J. & Graybiel, A. M. Habit learning is associated with major shifts in frequencies of oscillatory activity and synchronized spike firing in striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16801-16806 (2011).
- 133 Thorn, C. A. & Graybiel, A. M. Differential entrainment and learning-related dynamics of spike and local field potential activity in the sensorimotor and associative striatum. *J Neurosci* **34**, 2845-2859 (2014).
- 134 McCarthy, M. M., Moore-Kochlacs C., Gu X., Boyden E. S., Han X. & Kopell N. Striatal origin of the pathologic beta oscillations in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11620-11625 (2011).