



Title	時間情報処理における小脳の役割
Author(s)	植松, 明子
Description	配架番号 : 2329
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12807号
Issue Date	2017-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12807
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92956
Type	doctoral thesis
File Information	Akiko_Uematsu.pdf, この論文の全文



学 位 論 文

時間情報処理における小脳の役割

(Studies on the role of the cerebellum in temporal
information processing)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

植 松 明 子

Akiko Uematsu

学 位 論 文

時間情報処理における小脳の役割

(Studies on the role of the cerebellum in temporal
information processing)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

植 松 明 子

Akiko Uematsu

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	4 頁
略語表	9 頁
第1章 「小脳歯状核の電気刺激によるタイミング予測の促進」	
1.1. 緒言	12 頁
1.2. 方法	14 頁
1.3. 結果	19 頁
1.4. 考察	25 頁
第2章 「小脳歯状核の時間特異的な神経活動の生成機構」	
2.1. 緒言	31 頁
2.2. 方法	34 頁
2.3. 結果	39 頁
2.4. 考察	44 頁
第3章 「脊髄小脳変性症での検討」	
3.1. 緒言	48 頁

3.2. 方法	50 頁
3.3. 結果	54 頁
3.4. 考察	56 頁
総括および結論	58 頁
謝辞	60 頁
引用文献.....	61 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

原著論文

1. Uematsu, A., Ohmae, S. & Tanaka, M. Facilitation of temporal prediction by electrical stimulation to the primate cerebellar nuclei. *Neuroscience* **346**, 190-196 (2017).
2. Ohmae, S., Uematsu, A. & Tanaka, M. Temporally Specific Sensory Signals for the Detection of Stimulus Omission in the Primate Deep Cerebellar Nuclei. *J. Neurosci.* **33**, 15432-15441 (2013).

総説

1. 植松明子、田中真樹
高次脳機能と小脳、Annual Review 神経 2015
中外医学社、pp. 107-114 (2015)

本研究の一部は以下の学会に発表した

国際学会

1. Uematsu A & Tanaka M

Temporal prediction signals in the cerebellar dentate nucleus are shaped by GABAergic inputs in behaving monkeys.

Society for Neuroscience Meeting 2016, San Diego, USA.

2. Ohmae A, Uematsu A & Tanaka M

Encoding of repetitive event timing by sensory gain modulation in the primate deep cerebellar nuclei.

Society for Neuroscience Meeting 2011, Washington DC, USA.

国内学会

1. 植松明子、田中真樹

Purkinje cells provide temporally-specific sensory signals to the primate cerebellar nucleus.

第39回日本神経科学大会、2016.7.22、パシフィコ横浜、横浜

2. 植松明子、田中真樹

Further properties of neurons in the primate cerebellar dentate nucleus responding to the oddball detection task.

第38回日本神経科学大会、2015.7.30、神戸国際展示場、神戸

3. 植松明子、田中真樹

Effects of electrical microstimulation to the primate cerebellar dentate nucleus on the

detection of stimulus omission in the missing oddball paradigm.

第 92 回日本生理学会大会、2015.3.23、神戸国際展示場、神戸

緒言

我々は、様々な場面で時間情報を利用している。一方、「時間がたつのがはやい」など時間そのものを感じているように話すが、我々は時間の感覚器を持たない。時間経過と共に変化する外界から入力を受け、外界に合わせて出力を行うには、感覚器から得た入力を、時間情報を利用できる形に脳内で処理する必要がある。この情報処理機構を調べることは、認知機能や行動制御の神経基盤を明らかにする上で重要である。

数百ミリ秒のタイミング予測は、運動制御や認知機能の両面で利用される。例えば、飛んでくるボールを打つときは、ボールが何時どこにあるか認識し、いつ手元に到達するか数百ミリ秒の精度で予測することが必要である。我々は音楽や周期的な音にリズムを感じ、その変化に気づくことができるが、これが可能となるのは音の間隔を学習し、次の音がいつ鳴るか予測できるからである。また、他者との会話において、相手の言葉の理解には、発話のテンポを把握し、次の音が発せられるタイミングを予測することが有用である。

これまでの研究で、時間情報処理に関わる部位として、前頭前野、補足運動野、後頭頂葉、海馬、大脳基底核、小脳が知られている¹⁻³。中でも、数百ミリ秒の時間情報処理と予測に関与することが示唆されているのは小脳である。小脳は小脳皮質と小脳核から構成される。小脳皮質には橋核を介して大脳皮質からの情報が入力され、小脳皮質からの出力はプルキンエ細胞を通じ小脳核へ送られる。さらに、小脳核からの出力は、視床を介し

て大脳皮質に投射する。この大脳小脳連関(図 1)で様々な情報処理が行われる。

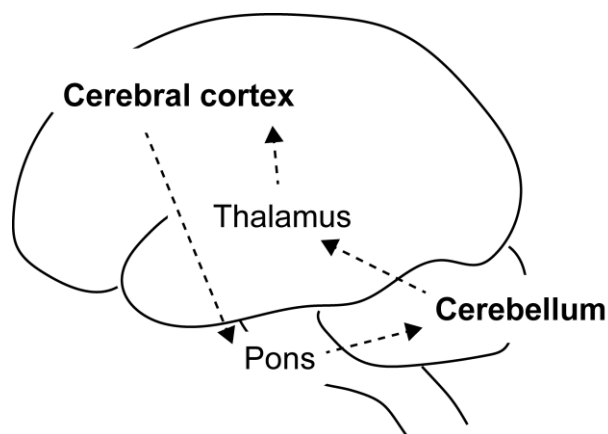


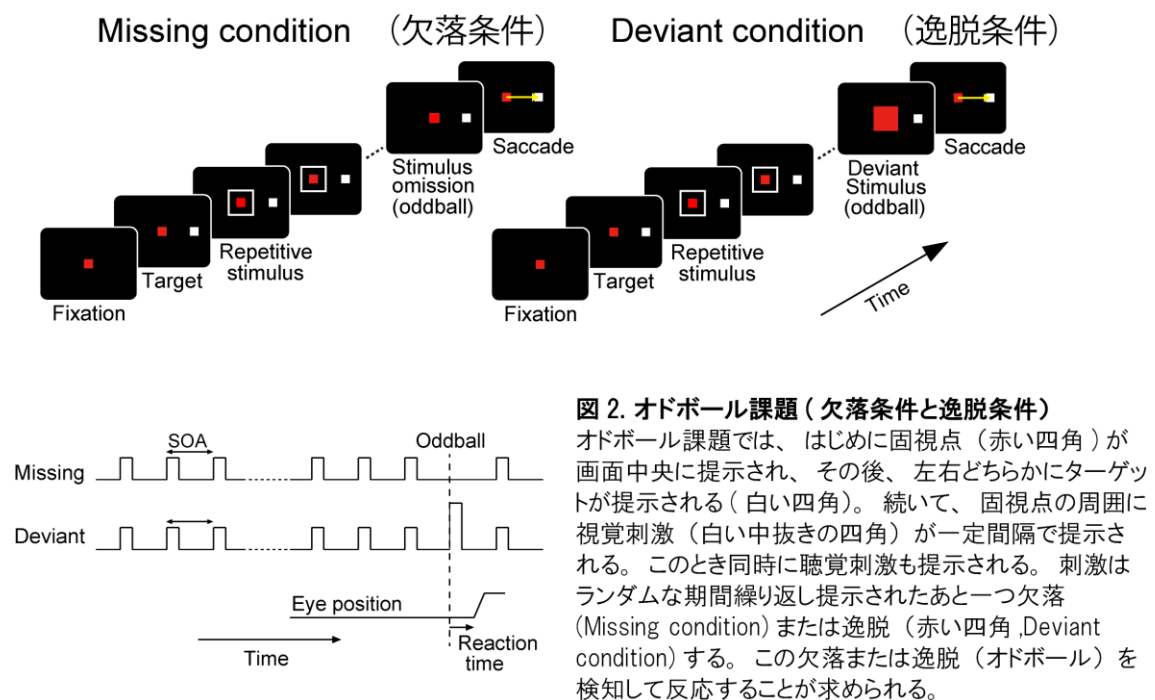
図 1. 大脳小脳連関

大脳皮質と小脳は視床や橋核を介して互いに連絡し、神経回路を形成している。

小脳の障害では、運動制御に影響がでることが知られており、古くから小脳と運動との関連が研究されてきた。しかし、近年では時間情報処理を含む高次脳機能への関与が報告され注目を集めている⁴⁻⁶。小脳皮質の中でもこれら高次機能との関与が脳機能画像で報告されているのは、霊長類において発達が著しい小脳半球の外側部である。この小脳半球外側部は大脳皮質から橋核を介して入力を受け、小脳核の中でも主に歯状核に投射し、歯状核から視床を介して運動野のみならず高次機能と関連が知られる前頭連合野および頭頂連合野に出力を送る^{7,8}。

我々は以前、サルにタイミング予測を必要とする課題(オドボール課題; 図 2)を訓練し、小脳歯状核から神経活動を記録した。この課題は、一定間隔で繰り返し提示される視聴覚刺激が数秒間継続したあと、一つ欠落(Missing condition)または逸脱する(Deviant condition)。この欠落または逸脱(両者をまとめてオドボールと呼ぶ)を検出し時間内にター

ゲットに向かってサッカード眼球運動を行うことができれば正解となる。オドボールと眼球運動を開始した時点の差を反応時間とした。欠落を検出するためには次に提示される刺激のタイミングを予測する必要がある。一方、逸脱の検出にはタイミング予測を必要としない。



課題遂行中のサル小脳歯状核から、刺激提示間隔に応じた神経活動の増減(神経応答)をみせるニューロンが記録された(図 3A)⁹。この神経活動の特徴は、①各繰り返し刺激に対する神経活動の低下の程度は刺激提示間隔に比例する、②繰り返し刺激の回数が増えるにつれて徐々に神経応答が大きくなる、というものであった。さらに、小脳歯状核に GABA 受容体作動薬であるムシモールを注入し、不活性化すると刺激の欠落に対する反応時間は遅延したが逸脱に対する反応時間の変化は見られなかった(図 3B)。これらの

結果から、小脳歯状核の神経活動はタイミング予測に関与していることが明らかとなった。

しかし、情報処理機構を解明するためには、この神経活動のパターンとタイミング予測の詳細な因果関係や、神経活動の形成機構など、さらに調べる必要があった。そこで、第1の研究では微小電気刺激を用いて、各視聴覚刺激提示に対する神経応答は、タイ

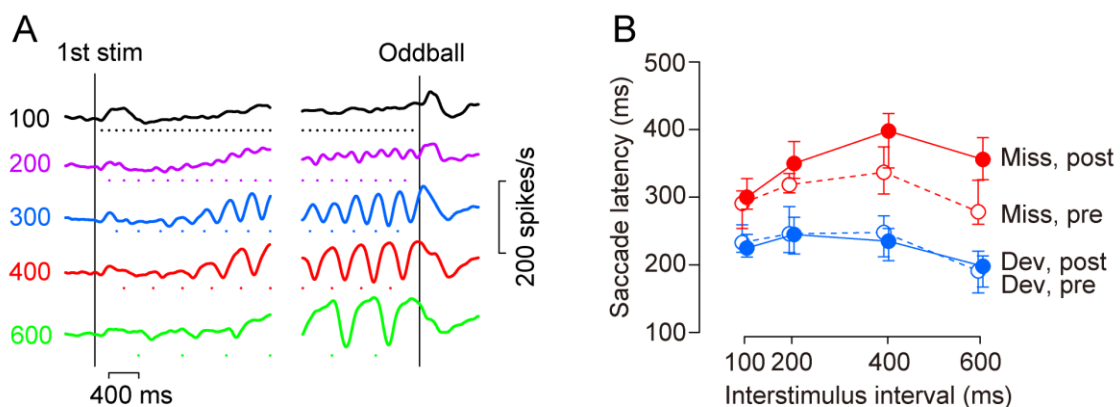


図3. 小脳歯状核の神経活動と不活性化の効果

A. オドボール課題遂行時、サル小脳歯状核で記録された神経活動。左は最初の繰り返し刺激、右はオドボールでデータを揃えている。各色は各刺激提示間隔ごとの神経活動を示す。ドットは繰り返し刺激が提示されたタイミングを示す。

B. 小脳核へのムシモール注入前(pre)と注入後(post)の反応時間の変化を示す。Missは欠落条件、Devは逸脱条件 (Ohmae et al., 2013)

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ミング予測を反映する信号であるのか、運動に伴う神経活動であるのかの検証と、神経応答における神経発火頻度の低下並びに増加とタイミング予測の関係を明らかにすることを試みた。また、神経応答が繰り返し刺激回数の増加につれ漸増するという特徴が、欠落検出に役割を果たすか調べた。第2の研究では、歯状核で得られた神経応答の形成に対する小脳皮質プルキンエ細胞からの GABA 性入力と苔状線維、登上線維の軸索側枝からのグルタミン酸性入力の影響を調べるため、GABA 性の入力とグルタミン酸性入力を薬理学

的に遮断し、遮断前と遮断中の神経活動を比較した。さらに、近年、小脳疾患による高次機能変化が報告されていることから、第3の研究では、オドボール課題を用いて脊髄小脳変性症におけるタイミング予測機能の変化を検証した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BBS : Berg balance scale

CCA : cortical cerebellar atrophy

Cf : climbing fiber

DCCA : dominantly inherited cortical cerebellar atrophy

DN : dentate nucleus

GABA : γ -aminobutyric acid

Glu : glutamate

IA : nucleus interpositus anterior cerebelli

IP : nucleus interpositus posterior cerebelli

IO : inferior olive

MRI : magnetic resonance imaging

Pcell : purkinje cell

Pf : parallel fiber

SCA : spinocerebellar ataxia

SOA : stimulus onset asynchrony

SARA : scale for the assessment and rating of ataxia

第1章

「小脳歯状核の電気刺激によるタイミング予測の促進」

1.1. 諸言

小脳は、運動制御に関与するが、近年、時間予測機能を含む高次機能との関連も報告されている¹⁰⁻¹³。小脳の運動制御機構はよく調べられているが、高次機能に関連する機構はまだ不明な点が多い¹⁴⁻¹⁶。

以前の研究では、オドボール課題中のサル小脳歯状核で繰り返し刺激に応答する神経活動が記録され、神経活動記録部位を不活性化すると欠落検出は遅延した。この神経活動が欠落検出に関連していることは示されたが、その機構は検証の余地がある。まず、各繰り返し刺激に対する神経応答は、刺激提示タイミングの予測と、眼球運動を行おうとする状態のどちらを反映したものか明らかではない。小脳歯状核は前頭眼野などの眼球運動関連部位にも投射しており^{17,18}、歯状核のニューロンがサッカード前に徐々に活動が増加することを示した先行研究もあるため眼球運動を駆動する神経活動である可能性はある¹⁹。これに加え、神経応答における神経発火頻度の低下と増加と予測の関係も検証の余地がある。

これらの問題を明らかにするために、本研究では様々なタイミングで小脳歯状核に微小電気刺激を行い、電気刺激による反応時間の変化を比較した。電気刺激は、以前の研究で用いられたムシモールによる不活性化とは異なり、刺激部位の神経活動を一過性

に増加させることができる。また、タイミング予測なしに眼球運動を行う課題を用いることで、運動を駆動する信号か否かを検証した。さらに、課題中、繰り返し刺激の回数が増えるにつれて神経応答が大きくなるという特徴と、欠落検出との関係を調べた。

1.2. 方法

本研究では、4 頭のニホンザル (*Macaca fuscata*, H, A, I, Hk, 6–9 kg, うち雌は 2 頭) を用いた。実験は、北海道大学動物委員会から事前の承認を得て行った。

被験体

はじめに、サルが実験用チェアに自発的に座るよう訓練し、その後、全身麻酔下で頭部固定用の装置を取り付けるための手術を行った。サルが手術から十分に回復するまで 1 週間以上期間をあけた後、片目に眼球位置測定用のサーチコイルを埋設した。手術から回復した後、行動課題の訓練を開始した。行動課題をサルが習得した後、記録電極刺入用のチャンバーを、歯状核の直上に全身麻酔下の手術で取り付けした。感染防止のため、各手術の手術前と手術後の数日間、抗生剤を投与した。チャンバーの位置は事前に撮像した MRI 画像より決定した。課題の訓練中ならびに実験中はサルの頭は実験用のチェアに固定し、実験は暗室(実験ブース)内で行った。眼球位置は電磁誘導式眼位測定装置(MEL-25; 演算子工業)を用いて測定した。

刺激提示方法と行動課題

行動課題制御ならびにデータ取得には、TEMPO システム (TEMPO; Reflective computing) を用いた。視覚刺激提示には 24 インチのブラウン管モニター (Refresh rate, 60Hz) を用いた。モニターはサルの眼から 38 cm 離して設置した。

実験課題には、欠落オドボール課題と視覚誘導性サッカード課題を用いた。欠落オドボール課題では、最初に画面の中央に固視点 (0.5° , 赤色の四角) を提示した。サルがその点を見つめると、固視点の右または左、固視点から視度角 16° の位置に眼球運動のターゲット (1.0° , 白色の四角) を提示し、続いて固視点周囲に視覚刺激を繰り返し等間隔で提示した (2.0° , 白色の中抜き四角)。視覚刺激に合わせて聴覚刺激 (1500 Hz 矩形波, 35 ms) も提示した。刺激間隔は 150 ms、400 ms または 600 ms のいずれかとした。繰り返し刺激を 3600–5200 ms (神経活動記録時 2000–4800 ms) のランダムな期間提示した後、1 つ欠落させた。この刺激の欠落を検知してターゲットに向かってサッカードするようサルを訓練した。課題に成功するとサルに報酬として水またはジュースを与えた。

視覚誘導性サッカード課題では、サルが画面中央の固視点 (1.0° , 黄色の四角) を見つめると、2000–4000 ms 後、右または左にターゲット (1.0° , 白色の四角) を提示し、同時に固視点を消した。ターゲットが提示されるとターゲットに向かってサッカードを行うようサルを訓練した。ターゲット提示から 700 ms 以内にサッカードを行えば、報酬として水またはジュースを与えた。

神経活動の記録と電気刺激の方法

電気刺激を行う前に、タングステン電極 (Alpha Omega Engineering) を用いて神経活動記録を行い、繰り返し刺激に応答する神経活動を示すニューロンの位置を確認した。神経活動の特徴は、各繰り返し刺激に対する、神経活動の増減という応答反応があり、その反応が繰り返し刺激の回数が増加するにつれて大きくなるものである。記録電極を刺入する際、前後左右の座標位置は、記録チャンバーに取り付けたグリッドシステム (Crist Instruments) によって調節した。電極は 23 ゲージのステンレスのガイドチューブを用いて刺入し、マイクロマニピレーター (MS-97S; Narishige) を用いて遠隔で上下させ調節した。電極から得られたシグナルは 1000–10000 倍に増幅し (Model 1800; A-M Systems)、300–10kHz のフィルタリングを行い (Model 3625; NF Co.)、テンプレートマッチングによってオンラインで単一ニューロンからの波形を分離し、スパイク発生のタイミングを記録した (MSD または ASD; Alpha Omega Engineering)。スパイク波形の例を図 4 に示す。波形の記録は 50kHz で行っ

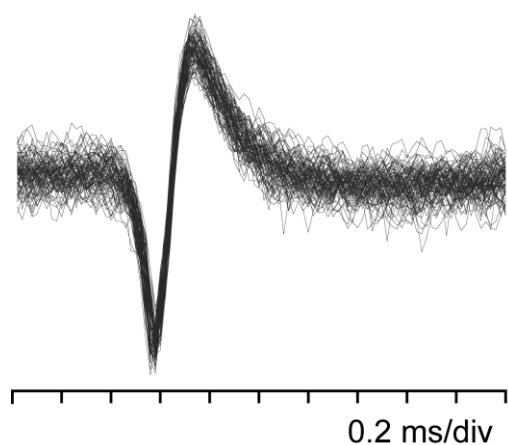


図4. スパイク波形の例

ニューロンのスパイク波形の例。神経発火による電位変化を時系列で記録しスパイク波形を描画した。テンプレートマッチングアルゴリズムにより、単一ニューロンのスパイクを分離した。

た。

歯状核の電気刺激は課題遂行中の様々なタイミングで、記録電極を用いて行った。刺激条件は、0.2 ms の二相性パルス、周波数は 200 または 300 Hz で刺激期間は 100 ms または 200 ms とした。先行研究において、100 μ A の電流強度で小脳核を電気刺激し、大脳皮質でニューロンの反応を記録した報告があったことから²⁰、電気刺激の電流強度の範囲を 80—100 μ A となるよう調節した。電気刺激は、前述の課題関連の神経活動が記録できた部位、または以前に記録した部位で行った。電気刺激のタイミングは各実験によって異なっているため、電気刺激の詳しいタイミングはこの後の結果または図の説明部分に記載する。

データ解析

データはデジタル化し、1k Hz でサンプリングを行った。データは実験中にオンラインで保存し、実験後に Matlab (Mathworks) を用いて解析した。いずれかの条件で電気刺激による反応時間変化が確認できたものについて詳しい定量解析を行った (Wilcoxon rank-sum test, $p < 0.05$)。

電気刺激部位の検討

実験終了後 2 頭のサルの小脳のスライス標本を作製した。1 頭は実験終了後、60 mg/kg

以上のペントバルビタールを投与し、グリッドを用いて目印のピンを挿入した後、抜脳、組織固定した。もう1頭のサルは、急性胃拡張症候群によって突然死したため、死亡確認後目印ピンを挿入し、内頸動脈から灌流固定を行った。脳組織は凍結標本としマイクロームを用いて 100 μ m に薄切し、クレシルバイオレットで染色した。また、多数の刺激を行った別の1頭に関しては、MRI 画像をもとに電気刺激部位を再構成した。

1.3. 結果

電気刺激による欠落検出の促進

組織切片及び MRI 画像で確認した電気刺激位置を図 5 に示す。

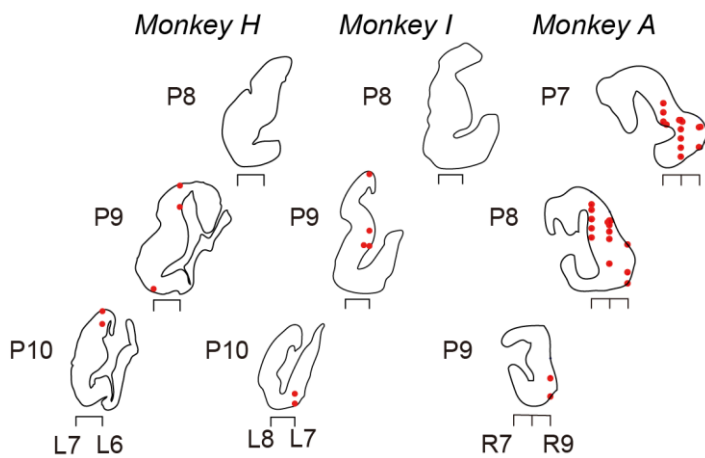


図 5. 電気刺激部位

赤丸は電気刺激を行った場所を示す。Pの数字は外耳道から後方に何 mm の位置かを示し、Pの数字が大きい方が尾側、小さいほうが吻側に対応する。LRの数字は左右の小脳核中央から左（L）または右（R）外側に何 mm かを示している。

電気刺激部位近傍で記録した神経活動の例を図 6A に示す。以前の研究

(Ohmae et al., 2013)と同様に、各繰り返し刺激に対する神経応答が確認された。この神経

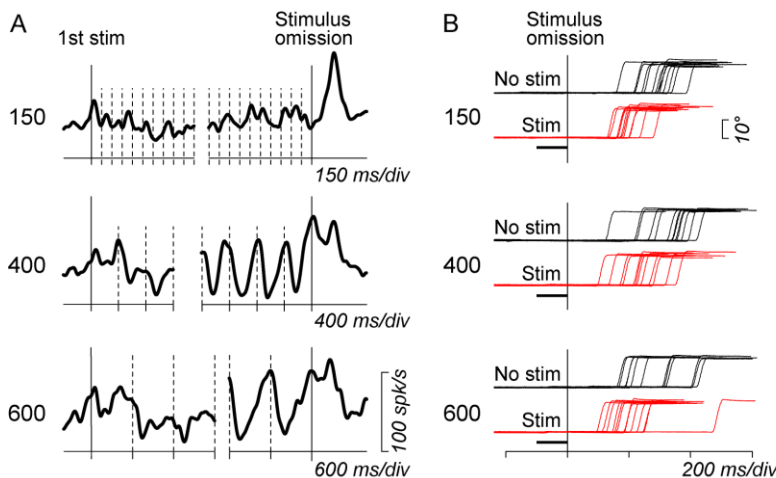


図6. 小脳歯状核の神経活動と電気刺激効果の一例

A. サルが欠落オドボール課題遂行中に小脳歯状核で記録した神経活動。

B. 電気刺激による反応時間の変化。電気刺激なし（黒線）と電気刺激あり（赤線）条件での水平方向の眼球運動を各刺激提示間隔（150, 400, 600ms）に分けて示す。

発火頻度の低下並びにそれに続く増加と欠落検出の関連を調べるため、刺激欠落 100 ms 前に電気刺激(100 ms)を行った。結果を図 6B に示す。図はターゲットが右に提示された試行の眼位を示し、縦軸上方向がモニター画面右である。電気刺激なし(黒線)と比較して電気刺激あり(赤線)では、どの刺激提示間隔においてもサッカードの開始が早まった(Wilcoxon's rank sum test, $p < 0.05$)。

4 頭のサル、全 53 部位の電気刺激有り、無し条件の反応時間を比較した(図 7)。

電気刺激は 3 頭のサルでは刺激欠落の 100 ms 前から 100 ms 間、サル I では刺激欠落の 200 ms 前から 200 ms 間行った。電気刺激と対側方向のサッカード条件で 41 (77 %) 箇所、同側方向のサッカード条件で 38 (72 %) 箇所において電気刺激により有意な反応時間短縮効果がみとめられた(Wilcoxon' rank sum test, $p < 0.05$)。3 要因分散分析で検定した結果、電気刺激の有無では反応時間に有意な差があったが($F_{(1, 34)} = 10.50$, $p < 0.01$)、刺激提示間隔($F_{(2, 34)} = 2.10$, $p = 0.14$)、サッカード方向($F_{(1, 34)} = 1.14$, $p = 0.29$)では有意な差はなかった。因子間に有意な交互作用はなかった(刺激 $\times$ 刺激提示間隔, $F_{(2, 34)} = 0.04$, $p =$

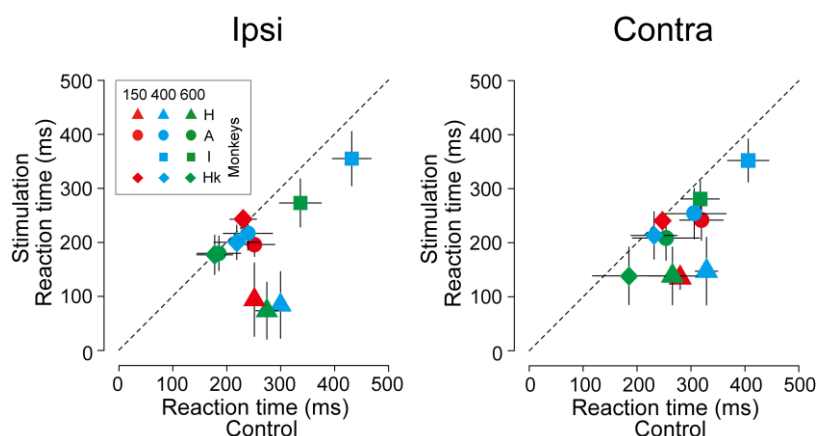


図7. 電気刺激効果の比較
電気刺激なしと電気刺激ありの同側または反対側へ眼球運動の反応時間時間を示す。同側、反対側への眼球運動ともに反応時間が短縮した。

0.96; 刺激×サッカード方向, $F_{(1, 34)} = 0.001$, $p = 0.97$; サッカード方向×刺激提示間隔, $F_{(2, 34)} = 0.06$, $p = 0.94$)。これらの結果から、電気刺激は欠落検出を促進し、その効果はサッカードの方向にも刺激提示間隔にも依存しないということが明らかになった。

課題関連の神経活動はタイミング予測信号ではなくサッカードの駆動信号であるという可能性を検証するために、タイミング予測を行わない眼球運動課題として視覚誘導性サッカード課題を用い、オドボール課題中の電気刺激の効果と比較した。視覚誘導性サッカード課題中、ターゲットを提示する直前 100 ms 間電気刺激を行ったところ、反応時間の差は平均で -1.4 ± 10.8 ms (SD, $n = 20$, 10 セッション, 両サッカード方向) だった。一方、オドボール課題で欠落直前 100 ms 間刺激を行ったところ -59.2 ± 47.3 ms (SD, $n = 20$) 反応潜時が短縮した。オドボール課題中の電気刺激は視覚誘導性サッカード課題の電気刺激に比べて明らかに反応時間短縮効果が大きかった (one tailed paired t-test, $p < 0.01$)。

電気刺激のタイミングによる影響

課題関連神経活動には繰り返し刺激提示間に発火頻度の低下と増加という特徴的なパターンがあった (図 6A と 図 8D)。しかし、電気刺激がこの神経活動の状態に関係なく、一定の遅延をもって眼球運動を駆動しているという可能性もあった。そこで、この繰り返

返し刺激提示間で電気刺激を加えるタイミングを変えると反応時間短縮効果が変化するかを検証した。これまでの刺激タイミングは刺激欠落の 100 ms 前としていたが、100 ms ずつ先行させていった (100–500ms)。繰り返し刺激の提示間隔は 400 ms のみとした。図 8A は 2 頭のサル (A および Hk) の 42 箇所での電気刺激における各試行での反応時間の分布を示す。赤色の印は各タイミング条件における反応時間の中央値を示す。100 ms ずつ刺激を先行させていくと、反応時間は徐々に早まった。電気刺激は刺激欠落前に、早期の誤ったサッカードを引き起こすことがあったが、繰り返し刺激欠落後のサッカードのみをみても電気刺激時の反応時間は電気刺激なし条件での反応時間と比べて明らかに短かった (図 8A)。図 8B は、42 箇所での電気刺激の反応時間の平均値を各刺激タイミングで示したも

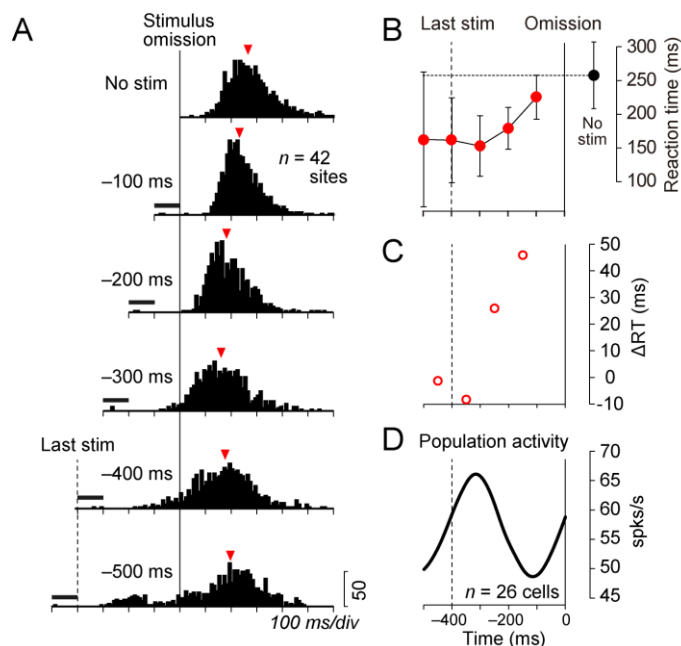


図8. 電気刺激タイミングと電気刺激効果の関係

A. 電気刺激のタイミングをオドボール直前の100 ms間から100 msずつ早めていった場合のn = 42箇所すべての試行の反応時間のヒストグラム。赤い逆三角形は中央値を示す。B. 各刺激タイミングでの刺激部位ごとの反応時間中央値の平均と標準誤差。C. 各刺激タイミング間での反応時間中央値の差。D. 刺激部位近傍で記録した26個のニューロンの神経活動の平均

のである。電気刺激のタイミングを一定間隔 (100 ms) で早めたが、反応時間は一定の割

合では減少しなかった。これは、刺激タイミングの各段階の反応時間の変化(差)をプロットすると明らかである(図 8C)。これらの結果は、電気刺激が一定時間後のサッカードを誘発したわけではないこと、および微小電気刺激の効果が欠落オドボール課題中に生じる内因性の神経信号によって影響を受けることを示している。

繰り返し刺激の反復回数と電気刺激による効果の関連

小脳歯状核のニューロンの神経応答は、繰り返し刺激の反復が進むにつれて漸増した。この神経活動の特徴と欠落検出との関係を明らかにするために、刺激提示間隔 400 ms の条件で、試行中の繰り返し刺激(第 2–10 番目)の直前に電気刺激をした。図 9 は、電気刺激後 600 ms 以内にターゲットに向けてサッカードが起こった試行の割合を示す。10 回目の刺

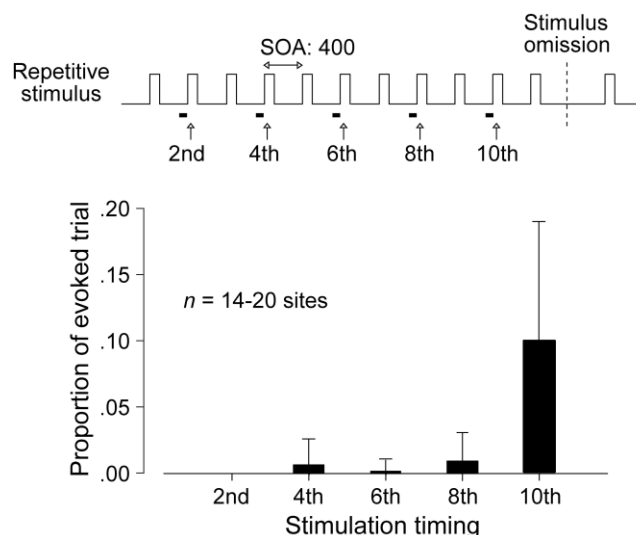


図9. 繰り返し早期における電気刺激の効果
2、4、6、8、10回目の繰り返し刺激提示直前
100 ms間電気刺激を行った場合に、ターゲット
へのサッカードが生じた割合を示す

激の直前に刺激を与えた場合は、約 10%の試行でサッカードが起こったが、初期(2–8 番

目)の繰り返し刺激直前に電気刺激を加えた場合はほとんどの試行でサッカードは誘発されなかった。さらに、電気刺激後 600 ms 以内にサッカードが生じなかった試行で、刺激欠落検出の反応時間を比較したところ、反応時間は各刺激条件の間で変化しなかった(一元配置分散分析、 $F_{(5,108)} = 0.82$ 、 $p = 0.54$)。これらの結果は、電気刺激によってサッカードが生じるには神経応答が増強した状態が必要であること、試行初期の神経信号が変化しても欠落検出には影響が及ばないことを示唆する。

1.4. 考察

今回の研究で、小脳歯状核への電気刺激が欠落オドボール課題における欠落検出を促進することが明らかとなり、各反復刺激に対して起こる神経発火頻度低下後の増加が次の刺激提示のタイミング予測を反映していることが示唆された。

小脳歯状核における神経信号はタイミング予測を反映している

小脳歯状核ニューロンの一部には、上丘への投射¹⁷、および視床を介した前頭眼野¹⁸への投射が知られている。従って、歯状核における神経信号は、サッカードを開始させる信号である可能性があった。また、欠落オドボール課題は、サルが刺激の欠落に反応してサッカードを行うため、歯状核の神経活動がサッカードの準備を反映している可能性を除外できなかった。実際、先行研究には、歯状核のニューロンがサッカード前に徐々に活動を増加していくことを報告したものがある¹⁹。しかしながら本研究では、電気刺激はオドボール課題における反応時間は短縮したが、視覚誘導性サッカードにおける反応時間は短縮しなかった。さらに記録部位の電気刺激により、ターゲットの方向にかかわらずサッカード開始が早まった(図 7)。これらの結果は、電気刺激はサッカードの準備ではなく、刺激の欠落検出を促進したことを示唆している。

欠落検出に利用される時間情報の神経表現の仮説

歯状核における神経活動は、2 つの顕著な特徴を示した⁹。1 つは、各反復刺激に対する神経活動の低下がおこり、その後に、次の刺激提示タイミング周りに向けて神経活動の増加がみられるという特徴である(図 3A と 6A)。もう1つは、各反復刺激に対する神経応答は、最初の数回の繰り返し刺激ではあまりみられず、反復が進むにつれて徐々に増加するという特徴である。これらの特徴は 2 つの異なるタイミング予測機構を反映したものである可能性はある(図 10A)。

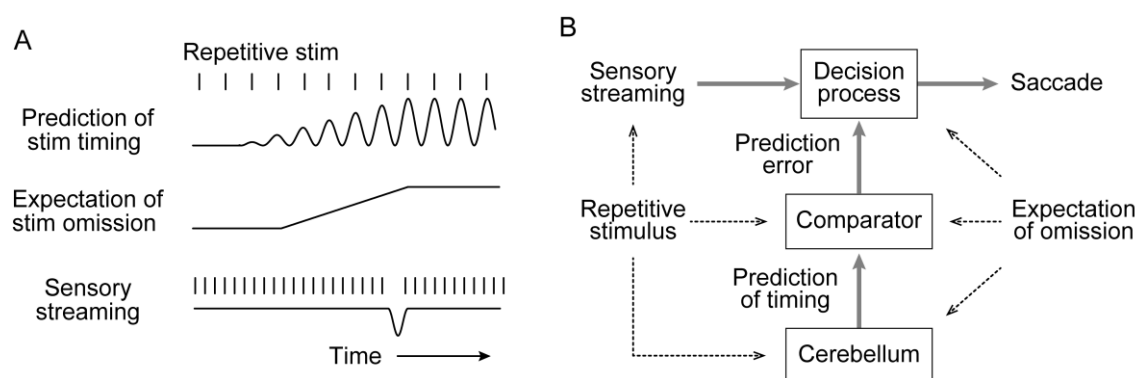


図10. オドボール課題遂行時の3種類の時間特異的なシグナルとそれらの情報処理過程の概念図
A. 上段: 長いSOAの繰り返し刺激が提示された場合に生じると考えられている刺激提示タイミング予測シグナル。中段: トライアル中どの時点で欠落が生じるかを予測するシグナル。下段: 短いSOAの繰り返し刺激が提示されそれらのうち一つが欠落した場合に生じるシグナル。B. Aで示された各シグナルがオドボール課題遂行中にどのように利用されるかの仮説を示す。

視聴覚刺激反復中に神経応答が徐々に大きくなっていく時間経過は、繰り返し刺激の開始から 3600–5200 ms 後に刺激欠落が起こるという課題設定に一致しており、神経応答の増大は、サルが持つ、刺激の欠落への期待の高まりに関連していると推測できる。

これを支持する結果として、繰り返し刺激初期の電気刺激ではサッカードは誘発されなかったが(図 9)、反対に 150 ms の刺激提示間隔を用いた試行では、神経応答の大きさはほんのわずかであったにも関わらず、電気刺激はサッカードを促進した(図 6B および 7)。これらの結果は、刺激の欠落を検出するためには、各試行における刺激の欠落への期待と各繰り返し刺激に対する次の刺激タイミングの予測の両方が必要であることを示唆している(図 10B)。この刺激欠落への期待を反映する信号は、小脳外で生成されている可能性がある。

電気刺激による反応時間短縮効果から、小脳における神経応答の上昇部分が、次の刺激提示タイミングの予測を反映していることが示唆された。各刺激に対する神経活動低下の大きさは、刺激提示間隔に比例するため、抑制からの回復の時間経過は、刺激の間隔に依存する(図 3A と 6A)。以前の研究では、神経活動低下後、増加してくる神経活動の大きさが、オドボール課題における個々の試行の反応時間と相関していることを見出した⁹。本研究では、刺激欠落直前の電気刺激は反応時間を短縮したが、刺激提示直後の電気刺激は刺激のタイミングから予測されたものよりもはるかに弱い効果しか示さなかった。これは、各繰り返し刺激の提示直後に神経活動が抑制されることに関連していると考えられ(図 8D)、各刺激提示が時間予測のための信号をリセットするという仮説を支持する。図 7 および図 8 でみられるように電気刺激後、サッカードまでには数百ミリ秒経過しており、電気

刺激の効果は比較的長く続くことが観察できる。これは、小脳の出力信号が、最終的にサッカードを誘発するための予測誤差信号を生成するために、さらに処理されているであろうことを示唆している。電気刺激は、早期かつ誤った欠落検出を引き起こすことがあった(図 8A)。これは、強力な小脳の出力がサッカードを引き起こす予測誤差信号に直ちに変換された結果かもしれない。

本研究では、電気刺激により、150 ms および 400 ms の両方の刺激提示間隔の試行において反応時間が短縮された。一方、以前の研究でにおける記録部位の不活性化では、刺激提示間隔が 400 ms を超える試行でのみサッカードが遅延した⁹。しかし、これらの一見矛盾する結果は、脳が刺激提示間隔に基づいて、自動的に 2 つの欠落検出機構を選択するという仮説²¹と一致する。より短い刺激提示間隔(例えば、 < 250 ms)の欠落検出は、離散的な繰り返し刺激をグループ化することに依存しており、この情報処理は小脳の外で行われる(図 10B)、対照的に、より長い刺激提示間隔での欠落検出には小脳が関与するタイミング予測が必要となっているだろうと考えられる。脳は、「連続した感覚入力の停止」または「予測していたタイミングで刺激が提示されないという誤差」、この 2 つの異なるシステムから生じる信号を同時に監視しており、最も早く利用可能であった信号がサッカードを引き起こすと予想される(図 10B)。通常は短い刺激提示間隔では小脳には予測信号は生じないが、歯状核に与えた電気刺激が人工的な欠落検出のための信号を生成したと考

えられる。

歯状核における神経活動は、刺激の提示タイミングの予測を反映しており、これらの信号は、下流の構造でさらに統合されて、規則的な刺激入力の欠落による予測誤差信号を生成することが推測される(図 10B)。将来の研究において、小脳とつながりのある視床、大脳皮質および基底核の役割を調べることで、小脳の時間的予測信号が時間知覚および時間に依存した行動を制御する機構をさらに明らかにすることが可能である。

第2章

「小脳歯状核の時間特異的な神経活動の生成機構」

2.1. 緒言

第1章では、オドボール課題遂行中、繰り返し刺激に対するサル小脳歯状核ニューロンの神経応答における神経発火頻度の上昇が次の刺激のタイミングを反映していることを示唆した。第2章では、この神経応答の生成機構の解明を目指した。

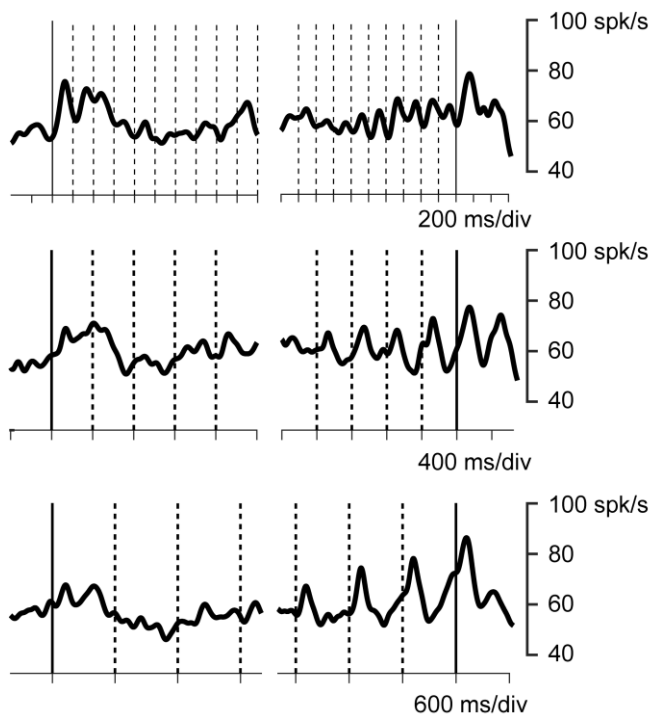


図11. 小脳皮質プルキンエ細胞の単純スパイク

オドボール課題遂行中のサル小脳皮質プルキンエ細胞から記録した単純スパイクの神経活動。繰り返し刺激の提示間隔は上から200 ms、400 ms、600 ms。

小脳は、運動の高次制御や非運動性の認知機能にも関与することが報告されている^{5,22-24}。小脳皮質の中でも、外側小脳皮質は、歯状核の腹側を介して連合野を含む前頭・頭頂皮質と連絡していること^{25,26}、小脳核への入力の大半は、小脳皮質プルキンエ細胞によることが先行研究で報告されていた²⁷。プルキンエ細胞からの小脳核への入力分布は

一様ではないが、皮質からの多数の出力が核に収束するという構造は明らかであった²⁸。

そこで、小脳核の神経活動とプルキンエ細胞の神経活動の関連を調べるため、プルキンエ細胞から神経活動記録を行った。また、プルキンエ細胞のスパイクの特徴として、平行線維からの入力を反映する単純スパイクと下オリブ核からの登上線維の入力を反映する複雑スパイクがある。プルキンエ細胞から両スパイクを記録し神経応答生成への寄与を明らかにしようと試みた。結果、小脳皮質プルキンエ細胞から、小脳歯状核で記録したものと同様に繰り返し刺激に一致して活動の増減を見せる神経活動を記録した(図 11)。しかし、解析に足るだけの数のニューロンを記録することが困難であり、また、この神経活動が実際、歯状核の記録部位に投射しているか確認できなかったことから検証方法を変更した。

小脳歯状核において神経活動を変化させる機構については、議論が分かれる。これまでによく調べられている機構は、運動に伴う神経活動に関するものである。小脳歯状核や中位核において、運動に伴った一過性の活動が知られている^{29,30}。小脳歯状核への入力は主に小脳皮質からの GABA 性入力と苔状線維の軸索側枝と登上線維の軸索側枝によるグルタミン酸性の入力である(図 12)。小脳核で神経活動増加がおこる機構としては、小脳皮質の活動低下による脱抑制、グルタミン酸性入力の増加、一過性の抑制後のリバウンド現象という機構が考えられている³¹⁻³⁴。歯状核において、神経発火頻度の増加を起こすことができる入力の1つは興奮性入力であるが、登上線維の発火頻度は約 1Hz と低

く、前出のような(図 3A と 6A) 400 ms ごとの神経活動応答を引き起こすとは考え難い。また、今回の課題でみられる神経応答は、その神経活動増加時の時間経過からみて、抑制に続く一過性のバーストを特徴とするリバウンド現象が主な形成機構である可能性は低い。残る苔状線維軸索側枝からの入力については、歯状核には入力が少ないという報告はあるが³⁵、グルタミン酸性入力が歯状核での神経活動増加に寄与するという研究報告もあり検証の余地がある。そこで、小脳核への主な二種類の入力が、GABA 性とグルタミン酸性であるという点に着目し、これらを薬理的に遮断し、前後の神経活動の比較を行うことで、苔状線維からの入力と小脳皮質プルキンエ細胞からの入力のどちらが神経応答を形成するのか明らかにしようと試みた。

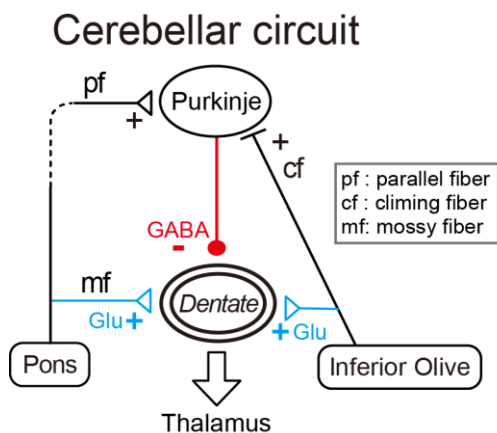


図 12. 小脳核への主な 2 種類の入力

小脳核への主な 2 種類の入力は、小脳皮質プルキンエ細胞からの GABA 性入力と苔状線維、登上線維の軸索側枝によるグルタミン酸性の入力である

2.2 方法

被験体

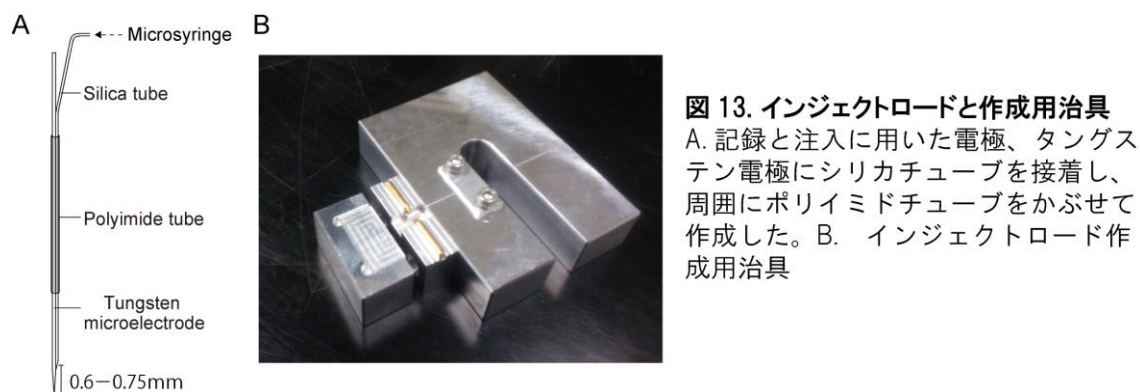
本研究では、3 頭のサル (Macaca fuscata、6–9 kg、H、Z および A、うち雄は2頭) を用いた。第1章と同様の方法でサルの訓練と手術を行った。サル H、A は第1章で用いたのと同じ個体である。

視覚刺激と行動課題

視覚刺激提示方法、行動課題とも多くは第1章と同様である。実験は、TEMPO システムによって制御した。視覚刺激は、24 インチのブラウン管モニター (リフレッシュレート: 60Hz、ソニー) または 27 インチ液晶ディスプレイ (リフレッシュレート: 60–144Hz、BenQ) で提示した。実験は内部を暗くした実験ブース内で行った。モニターは、眼から 38 cm または 40 cm 離れた位置に配置した。行動課題には、前章と同様の欠落オドボール課題を用いた⁹。繰り返し刺激の提示期間は 2000–4800 ms とした。

神経活動記録と薬物注入の方法

タングステン微小電極(径 $150\text{ }\mu\text{m}$, 抵抗は 1kHz で $9\text{M}\Omega$; Frederick Haer & Co Inc.)とシ



リカチューブ ($100/75\text{ }\mu\text{m}$ OD / ID; Polymicro Technologies Inc.)から記録注入電極を自作した(図 13)。薬物は GABA 受容体拮抗薬として gabazine (SR 95531 hydrobromide; Tocris, $1\text{--}4\text{mM}$)、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬として(±)-3-(2-カルボキシピペラジン-4-イル)プロピル-1-ホスホン酸((±)CPP; Sigma-Aldrich, 0.5mM)、AMPA 型受容体拮抗薬として 1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-6-ニトロ-2, 3-ジオキソベンゾ(f)キノキサリン-7-スルホンアミド水和物(NBQX; Sigma Aldrich, 0.5mM)を用いた。記録位置は、チャンバーに取り付けたグリッドシステム(Crist Instruments)を用いて調整した。記録注入電極を構成するシリカチューブを gabazine またはCPPとNBQXの混和物を含む $10\text{ }\mu\text{L}$ の Hamilton マイクロシリンジに接続した状態で、電極を 23 ゲージのステンレスパイプを介して脳に挿入し、マイクロマニピュレーター(MO-97S; Narishige)を用いて遠隔操作で進めた。薬物注入前と注入後に歯状核の後部から単一ニューロン活動の記録を行った。スパイク検出方法は第1章と同様である。

オドボール課題関連の神経活動を探索し⁹、課題関連ニューロンを確認後、少なくとも各条件で 10 試行の薬物注入前のデータを収集した。その後、同じニューロンを記録し続けた状態で、薬物の局所注入を試みた。これらの薬物は、マイクロポンプ (Nanojet CXY-1; Chemyx inc.) を用いて 5-10 nL / 分の速度で注入した。各部位の総注入量は、0.1-0.4 μ L であった。いくつかの実験では、薬剤の漏れを防ぐために薬物注入を行う前の神経活動記録中、シリンジに負圧を加えた。

各ニューロンの薬物注入前および注入後のスパイク波形の記録には、スパイクソーティングシステム (ASD; Alpha Omega Engineering) を用いた。50 kHz でサンプリングしオンラインで保存した。スパイク幅はスパイク波形のピークとトラフの時間差とした。

データ分析

データをデジタル化し、1kHz でサンプリングし、実験中に TEMPO システムを使用してファイルに保存した。実験後、Matlab (Mathworks) を使用してデータをオフラインで分析した。解析は、反復刺激ごとに発火頻度の変調を示し、薬物注入後の各条件において 15 試行以上記録できたニューロンに対して行った。最初の繰り返し刺激の提示前 400 ms 間、サッカード前 400 ms 間、サッカード後 150 ms 間のいずれでも薬物注入後の発火頻度変化が確認できなかったデータ、または、実験後にシリカチューブからの薬物放出を確認すること

ができなかったデータは解析から除外した。

定量解析では、薬物注入前に得られたデータと、薬物注入開始後 4 分以降に得られたデータとを比較した。神経活動変化を調べるために、平均発火率をガウスフィルタ ($\sigma = 30 \text{ ms}$) でスムージングしたものを利用した。各薬物の効果は、400 ms の刺激間隔を用いた試行の、刺激欠落前の 800 ms 間の発火率を比較することによって評価した。神経応答の薬物注入による変化を定量化するために、薬物注入前後に得られたデータ対に対し、回帰分析を行い、各ニューロンのベースライン係数(オフセット)およびゲイン係数(スロープ)を計算した。ゲイン係数が 1 より小さければ薬物投与により神経応答が減弱したことを示す。ベースラインの神経活動は、刺激開始前の 400 ms 間(ベースライン期間)の神経活動とした。結果は Student t-test を用いて有意水準 5%で評価した。

組織学的評価

サル Z の記録部位を図 14 に示す。実験の最後に、電極に陰性の直流電流 ($10\text{--}20 \mu\text{A}$, $< 1 \text{ 分}$, $800\text{--}1000 \mu\text{C}$) を流すことにより、小脳皮質下部と、神経活動記録部位の二点にマーキングを行った(図 14, 青矢印)。約一週間後、ミダゾラムおよびメデトミジンによる鎮静を行った後、動物をペントバルビタールナトリウム ($> 60 \text{ mg / kg}$, 腹腔内) で深麻酔した。麻酔後グリッドシステムを使用していくつかのランドマークピンを挿入した。次いで、0.1

mM のリン酸緩衝食塩水、続いて 4% のパラホルムアルデヒドで経心的に灌流固定した。

脳を取り出し、一晩後固定し、40% スクロースで平衡化した。マイクロームを用いて 50 μ m 厚

の冠状凍結切片を作成し、切片をクレシルバイオレットで染色した。

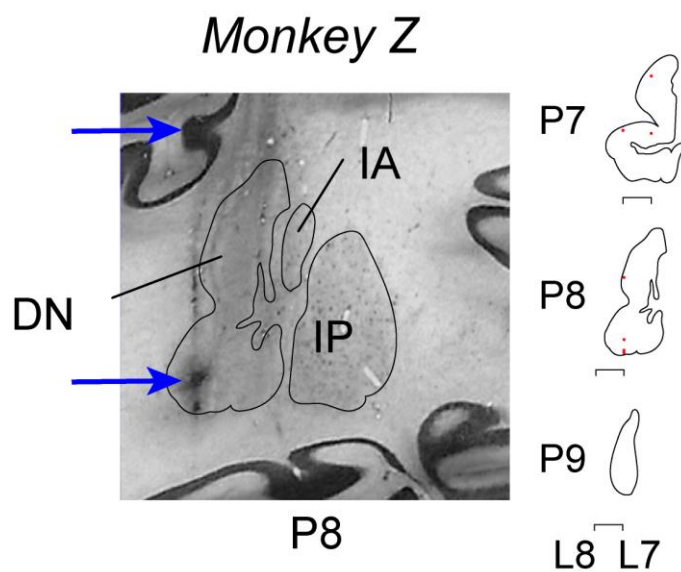


図 14. 神経活動記録部位

赤丸は薬物注入と神経活動記録を行った部位を示す。P の数字は外耳道からの距離（尾側方向、mm）を示し、L の数字は左右歯状核間からの距離（左外側方向、mm）を示す。青矢印はマーキング跡を示す。

2.3. 結果

GABA 受容体拮抗薬の効果

図 15 にオドボール課題における GABA_A 受容体拮抗薬 (gabazine) の注入前および注入後の代表的なニューロンの神経活動を示す。gabazine 投与後、最初の視覚刺激提示前 400 ms 間 (図 15、左パネル、黒色バー) のベースラインの発火頻度は、91.8 spike/s から 133.1 spike/s に増加し (unpaired - t test, $p < 0.05$)、各反復刺激に対する神経応答は減弱した。刺激欠落前の 800 ms 間 (図 15、右のパネル、黒いバー) のゲイン係数およびベースライン係数の値はそれぞれ 0.66 および 76.6 であった。gabazine の投与

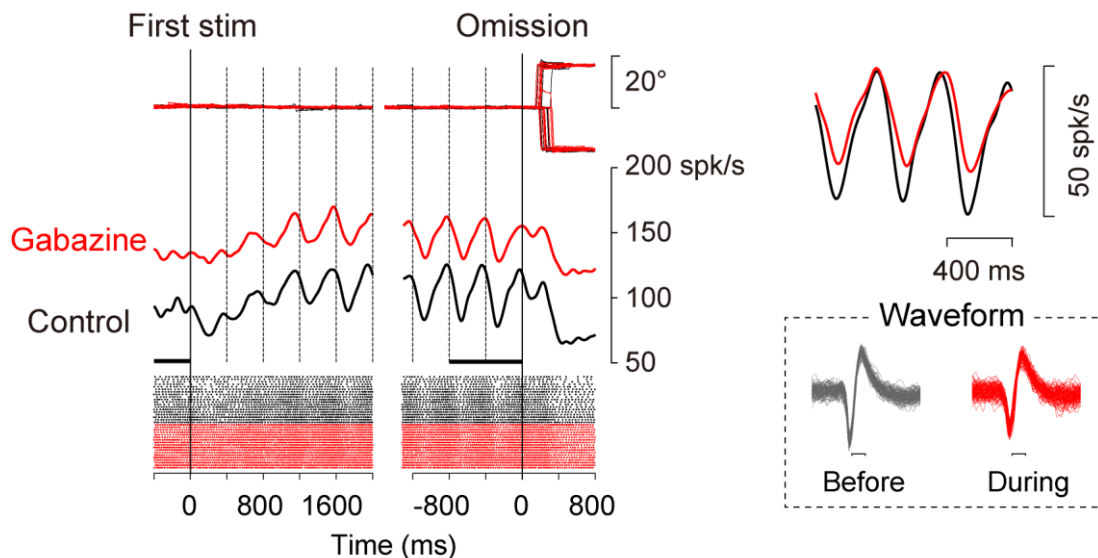


図15. GABA受容体阻害剤投与による神経活動変化

左のパネルは、最初の視覚刺激提示時または刺激欠落時でそろえた神経活動及び眼位を示す。黒色並びに赤色は、それぞれ薬物投与前と投与後のデータを示す。右上のパネルは、ベースラインシフトなしの神経発火率の拡大トレースであり、刺激欠落直前の神経応答の大きさを薬物投与前後で比較した。ラスタは3ポイントにつき1ポイントプロットした。右下のパネルは、薬物投与前と投与後のスパイク波形を示す。スケールは200 μ sを表す。

後のスパイク波形はわずかに変化した、ニューロンは記録期間を通して十分に単離されていた。薬物投与中にサッカード反応時間は変化しなかったが (202.4 ± 36.2 ms 対 213.3 ± 56.2 ms、平均 $\pm$ SD、Wilcoxon ranksum test、 $p = 0.77$)、これは薬物注入の量が非常に少ないためと考えられる。

図 16A は、14 個のニューロンから得たデータをまとめたものである。

gabazine を投与した場合、神経応答は減弱した。薬物注入前および投与後の試行間で計算されたゲイン係数の平均は、1 より有意に小さかった (平均 $\pm$ SD, 0.87 ± 0.2 , one sample t-test, $p < 0.05$)。一方、刺激提示前のベースライン活動は有意に増加した (gabazine 注入前および注入後の平均 $\pm$ SD, 58.1 ± 24.8 spike/s および 73.7 ± 7.2 spike/s; $n = 14$, one-tailed t-test, $p < 0.05$)。同様に、刺激欠落前 800 ms の間のニューロ

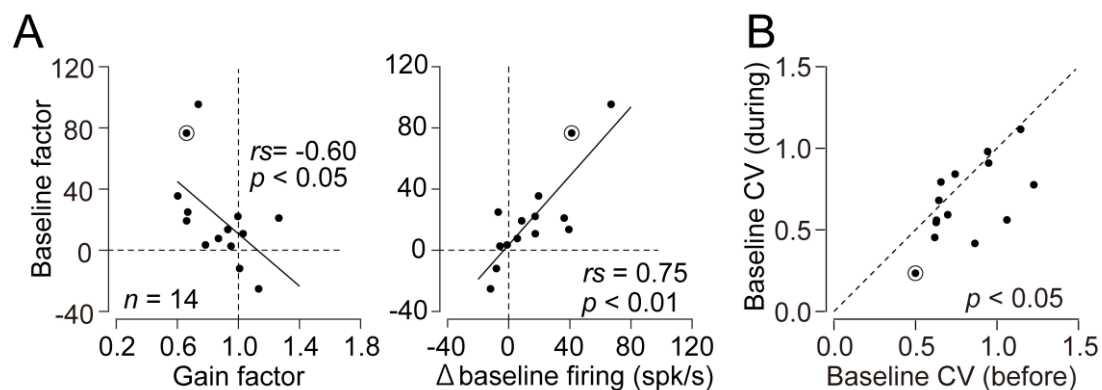


図16. GABA受容体拮抗薬の効果

14のgabazine実験のまとめ。個々の神経応答の変化とベースライン活動の大きさを比較した。Bull's eyeは図15で提示したニューロンを示す。A. ゲインおよびベースライン係数は薬物注入の前後の、スパイク密度(刺激欠落の800 ms前)から計算した。 Δ ベースラインは、視覚刺激提示前400 msの平均発火率の差である。B. gabazine注入前後のベースラインの神経活動のスパイク間隔の変動係数を比較した。

ン活動から計算されたベースライン係数は、平均 21.1 ± 31.7 spike/s (SD) であり、有意に正の値となった (one-sampled t-test, $p < 0.05$)。また、ベースライン係数とゲイン係数は負の相関があり、(スピアマンの順位相関係数、 $r_s = -0.60$ 、 $p < 0.05$) これらの変化は互いに関連があり、特定の薬理作用の結果である可能性が示唆された。反応時間は、薬物投与後に変化しなかった (平均 $\pm$ SD、 287.6 ± 75.9 ms 対 286.9 ± 70.4 ms、paired t-test、 $p = 0.88$)。個々の実験では、14 回のうち 1 回のみ反応時間 (213.9 ± 46.5 ms 対 250.8 ± 64.5 ms、平均 $\pm$ SD、Wilcoxon ranksum test、 $p < 0.05$) が変化した。

また、gabazine 投与はベースラインの神経活動のばらつきを減少させた。図 16B は、薬物注入前および投与後のベースライン期間のスパイク間隔の変動係数 (CV) の比較である。CV は、gabazine 投与中に有意に減少した (平均 $\pm$ SD、 0.81 ± 0.22 対 0.68 ± 0.24 、 $n = 14$ 、paired t-test、 $p < 0.05$)。

グルタミン酸受容体アンタゴニストの効果

図 17 は、グルタミン酸受容体アンタゴニスト (CPP および NBQX の混和物) の投与前および投与後の神経活動の一例を示す。CPP + NBQX 混和物の注入後、刺激開始 400 ms 前のベースライン活動は、 58.8 spike/s から 35.9 spike/s と有意に減少した (unpaired t-test、 $p < 0.05$)。ゲインおよびベースライン係数は、それぞれ 0.98 および -17.37 であり、

ベースラインは大きく低下したが神経応答はほぼ一定であったことを示している。ニューロンは記録期間を通して十分に単離されており、薬物注入後のスパイク波形の形状は注入前のものと類似していた。

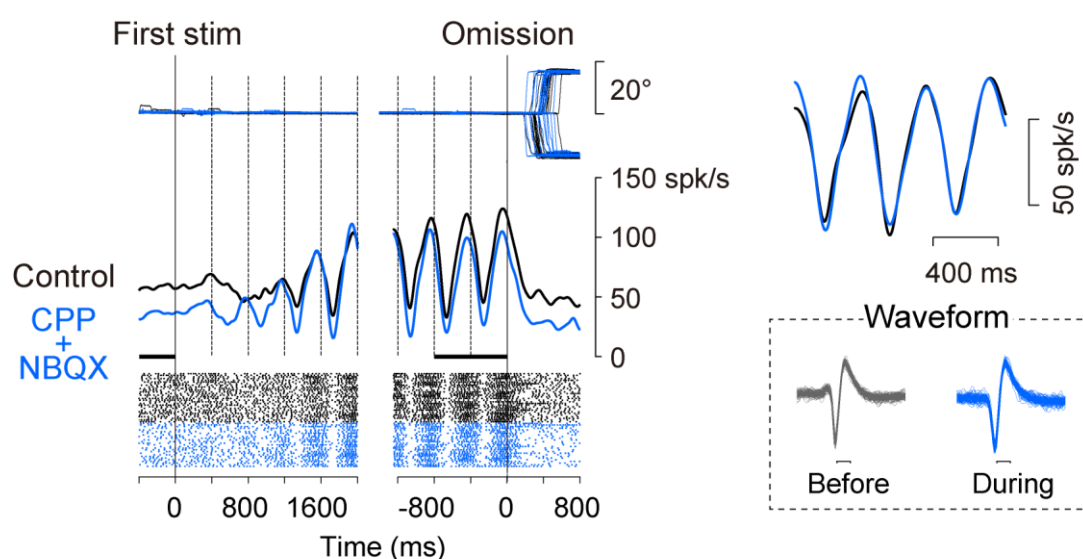


図17. CPP+NBQX投与前後の神経活動変化

黒色並びに青色のトレースは、それぞれ、薬物投与前並びに後のデータを示す。図の構成は、ラスタをすべてプロットしていることを除き図15と同じである。

図18は、11個のニューロンのデータをまとめたものである。全体ではベースラインの神経活動は変化しなかった(注入前および注入後の平均 $\pm$ SD、 57.9 ± 18.5 spike/s および 56.0 ± 21.9 spike/s; $n = 11$, paired t-test, $p = 0.64$)。11個のニューロンのうち8個がベースラインの神経活動の有意な変化を示した(unpaired t-test, $p < 0.05$)。ゲインとベースライン係数は全体として薬物投与による変化を示さなかった(ゲイン係数: 0.89 ± 0.18 , $n = 11$, one-sample t-test, $p = 0.07$, ベースライン係数: 6.03 ± 11.45 , one

-sample t-test, $p = 0.11$)。また、これらの因子は相関していなかった(スピアマンの順位相関係数、 $r_s = 0.13$ 、 $p = 0.71$)。したがって、グルタミン酸性入力は、ベースライン活動の調整や、繰り返し刺激に対する応答のゲインを決める上での役割は小さいと考えられる。ベースライン発火率に有意差はなかった(unpaired-t test, $p = 0.39$)。

図 18 B は、図 16 B と同様に変動係数(CV)を比較したものである。gabazine 投与時とは対照的に、CV は CPP + NBQX 投与時に有意に増加した(平均 $\pm$ SD, 0.90 ± 0.17 対 1.03 ± 0.27 , $n = 11$, paired-t test, $p < 0.05$)。

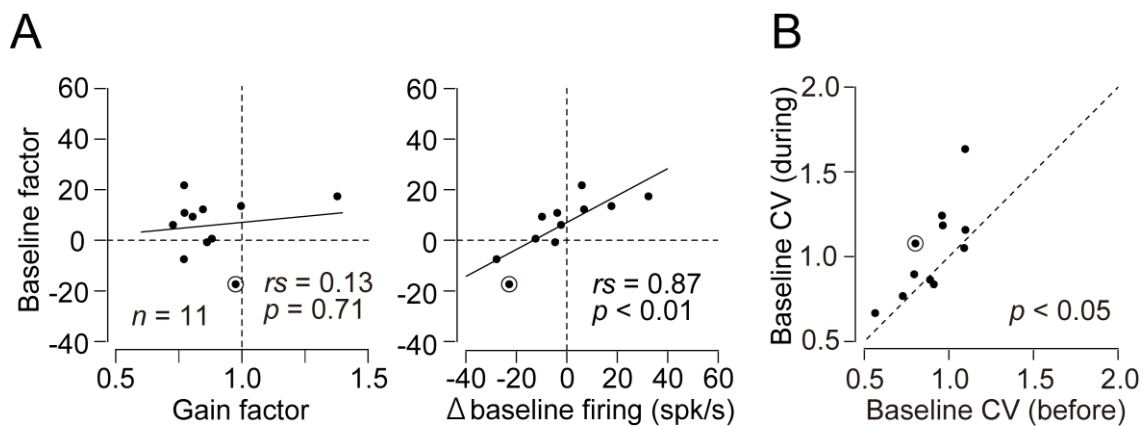


図18. グルタミン酸受容体拮抗薬の効果

A. 11回の実験のまとめ。各パネルは、個々の神経活動応答の変化とベースライン活動の大きさを比較した。Bull's eyeは図17で提示したニューロンを示す。B. CPP+NBQX注入前後のベースラインの神経活動の変動係数の比較。

2.4 考察

小脳歯状核への GABA 性入力を遮断したところ、繰り返し刺激に対する神経応答が減弱した。一方、グルタミン酸性入力の遮断では神経応答の変化は明らかではなかった。小脳歯状核でのタイミング予測を反映する神経活動の形成には GABA 性の入力が必要であり、グルタミン酸性の入力は神経応答に影響しうるが、その程度は限定的であることが示唆された。

GABA 性入力およびグルタミン酸性入力の小脳歯状核における神経活動形成への影響

今回の実験で、GABA 性入力を遮断するとベースラインの発火率が上昇し、神経応答は小さくなった(図 15 と 16)。ベースライン活動の上昇は、以前の研究で報告された結果と一致している³⁴。GABA 性入力遮断による神経応答減弱は、タイミング予測を反映する信号の形成に重要であるのは、小脳皮質プルキンエ細胞からの抑制性入力の増加と減少である可能性を示唆する。今回 GABA 受容体を遮断しても、神経応答を完全になくすることができなかったが、その理由としては、歯状核の樹状突起が大きく³⁶、薬物がすべての受容体を遮断することができなかったことがあげられる。

小脳核へのグルタミン酸性入力は、苔状線維と登上線維の側枝である。しかし、登上線維の発火頻度は約 1Hz ほどである。本研究では神経活動は 400 ms 間隔で提示さ

れた視覚刺激に一致した応答を示すことから、登上線維からの入力が歯状核の神経応答に影響するとは考え難いため、神経応答形成に影響しうるのは苔状線維の入力の阻害効果であると考えられる²⁷。全体として、グルタミン受容体遮断は、ベースラインの発火率および神経応答を変化させなかった。これは、小脳歯状核での神経活動形成に対して、グルタミン酸性入力の効果は小さいことを示している。しかし、今回、グルタミン酸性入力の遮断により変動係数の上昇がみとめられた。入力の減少にも関わらず、ばらつきの増加がみられており、歯状核へのグルタミン酸性入力スパイク発生確率のばらつきを低下させ、小脳皮質からの入力の伝達の効率化など何らかの役割を果たしている可能性はある。

GABA 受容体またはグルタミン酸受容体を遮断した際、いくつかのニューロンは、入力遮断の方向と異なる神経活動の変化を示した。抑制性の GABA 性入力の阻害では、ベースラインの神経活動は増加すると考えたが、一部で低下した(図 16)。また、グルタミン酸性の入力は興奮性入力であるため、受容体の阻害は神経活動の低下を引き起こすと予測していた。しかし、ベースラインの発火頻度は一部のニューロンで増加した(図 18)。ベースラインの神経活動が、このように予想と異なった挙動を示した理由としては、介在ニューロンの影響が考えられる。歯状核において、GABA 作動性およびグリシン作動性介在ニューロンが報告されている²⁸。薬剤が記録中の神経細胞よりもむしろ、記録中のニューロンに入力する抑制性介在ニューロンの樹状突起に作用したことが原因であると考えら

れる。これらの問題は、今後、光遺伝学的手法を用いて、プルキンエ細胞または苔状線維からの入力のみを操作することで解決できるかもしれない。

GABA 性入力の遮断により神経応答が小さくなったが、これは抑制性介在ニューロンを介した苔状線維からの入力を主に阻害した可能性もある。しかし、小脳歯状核に多数のプルキンエ細胞入力があること、グルタミン酸性入力阻害時、全体として神経応答変化がみられなかったことから、その可能性は低いといえる。

今回の研究では、小脳皮質からの入力が歯状核のタイミング予測信号形成に重要であることがわかった。さらに詳細な機構を明らかにするためには、小脳皮質が神経応答の形成に寄与する仕組みを調べる方法の開発が必要である。

第3章

「脊髄小脳変性症での検討」

3.1. 緒言

脊髄小脳変性症は、小脳、脳幹、脊髄小脳路あるいはそれらの連絡線維の変性により、小脳性運動失調を呈する疾患の総称である³⁷。この疾患は治療法の開発に力が注がれているが、いまだ根本的な治療法は確立されていない。しかし近年、病態の解明が進んでおり、対症療法も行われていることから、今後の治療法開発に期待がかかる。

脊髄小脳変性症の機能評価に使用される臨床評価スケール、scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)、Berg Balance Scale (BBS)などは運動機能进行评估するものである。しかし近年、小脳の高次機能への関与が明らかになったことで、小脳障害と高次機能障害の関連に着目した研究が増えている。これまでの研究で、小脳変性症では、学習による予測の調整の障害、言語障害、注意機能の低下など高次脳機能の変化が報告されている³⁸⁻⁴⁰。

第1章、2章で小脳核ならびに小脳皮質がタイミング予測信号を保持していることを示した。従って、脊髄小脳変性症では他の高次機能と同様にタイミング予測機能が低下していることが推測される。本研究では、脊髄小脳変性症とタイミング予測機能の関連性を評価するため、脊髄小脳変性症の患者群と健常対照群のオドボール課題における欠落検出の反応時間を比較した。

用語

- ・ **SARA** とは、歩行、立位、坐位、言語障害、指追いつ験、指―鼻試験、手の回内・回外運動、踵―すね試験の 8 項目に関してスコアリングを行う。40 点満点で得点が高いほうが重症となる。
- ・ **BBS** とは、立ち上がり、立位保持、坐位保持、坐り、トランスファー、閉眼での立位保持、両足を揃えての立位保持、両手前方、拾い上げ、振り返り、360° 方向転換、踏み台昇降、タンデム立位、片足立位の 14 項目のスコアリングによりバランス機能を評価する。得点が低い方が重症となる。
- ・ **Spinocerebellar ataxia type 6**; (優性遺伝性脊髄小脳変性症、純粋小脳型) 第 19 染色体短腕に位置する電位依存性 Ca チャネル $\alpha 1 A$ サブユニット遺伝子 (CACNA1) の CAG リピート伸長により発症する。
- ・ **Spinocerebellar ataxia type 31**; (優性遺伝性脊髄小脳変性症、純粋小脳型) 第 16 染色体長腕 BEAN/TK2 遺伝子の非翻訳型 5 塩基リピート挿入による。Cl⁻ チャネル遺伝子のスプライシング異常が引き起こされることにより小脳変性をきたすと考えられている。

3.2. 方法

参加者

この研究は、北海道大学病院の倫理委員会による承認のもと、自主臨床研究の一部として行った(臨床研究番号: 自 011-0114)。実験の開始時にすべての被験者から文書にてインフォームドコンセントを得た。17 名の脊髄小脳変性症患者および 30 名の健常対照群を対象とした。患者群のうち 13 例は脊髄小脳失調 6 型(SCA6)、2 例は脊髄小脳失調 31 型(SCA31)、2例は遺伝子異常未確定(1 例は CCA、1 例は DCCA)であった。患者群および対照被験者群の特性は以下の通りであった。患者群の平均年齢 $\pm$ SD(61.3 $\pm$ 7.1、範囲:45–74)および対照被験者群(60.6 $\pm$ 9.4、範囲:40–77)には有意差がなかった。性別指数は 2 群で差はなかった。罹病期間の中央値は 10 年であった。表1に脊髄小脳変性症患者群の臨床データを示す。

Class	Age	Sex	Duration	SARA	BBS
CCA	45	M	9	11	47
DCCA	53	F	6	8.5	56
SCA31	62	M	4	13	47
	65	M	8	21	24
SCA6	49	M	18	12	53
	58	F	10	23.5	15
	59	F	8	9.5	50
	60	F	10	14	45
	61	F	12	18	23
	63	M	12	16	46
	63	M	20	8	49
	64	F	8	11.5	47
	65	M	10	7.5	52
	65	F	15	16.5	46
	68	M	30	38	20
	68	F	14	20	31
	74	F	6	18.5	23

表 1 脊髄小脳変性症患者群の臨床データ

脊髄小脳変性症群の参加者の疾患分類 (Class)、年齢、性別、罹患期間 (Duration, year)、SARA スコア、BBS スコアを示す

装置

実験課題は、Matlab Psychometric ToolBox を用いて開発した。3 つのボタンスイッチをつけた自作のボックスの左ボタンを視覚刺激の提示に用い、中央のボタンを応答用ボタンとして使用した(図 19)。

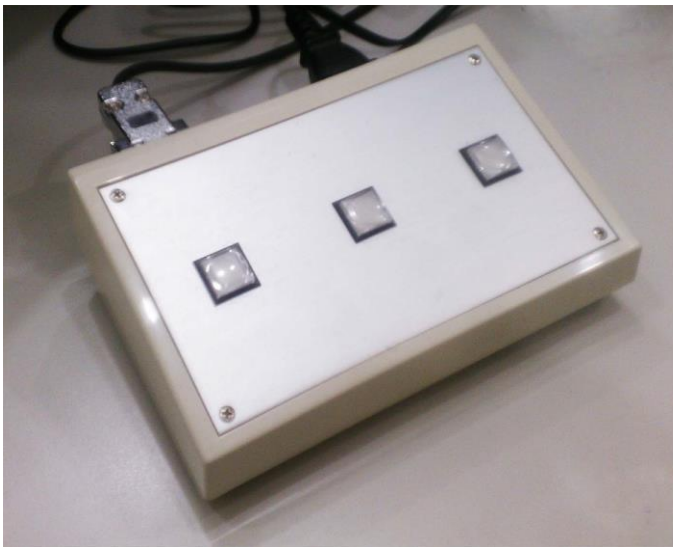


図 19. スイッチボックス
左のボタンで視覚刺激を提示し、
中央のボタンを応答用ボタン
とした

行動課題

行動課題にはオドボール課題を用いた。第 1 章、2 章で用いた欠落オドボール課題に加え、タイミング予測なしで正解することができる逸脱オドボール課題を対照課題として用いた。視覚刺激はスイッチボックスの左側のボタンを光らせることで提示した。参加者は椅子にすわり、スイッチボックスは参加者の正面の机上に設置した。各試行では、視覚刺激としてボックスの左ボタンを一定間隔(600, 900, 1200 ms)で繰り返し点滅(赤色、50 ms)させ、同時

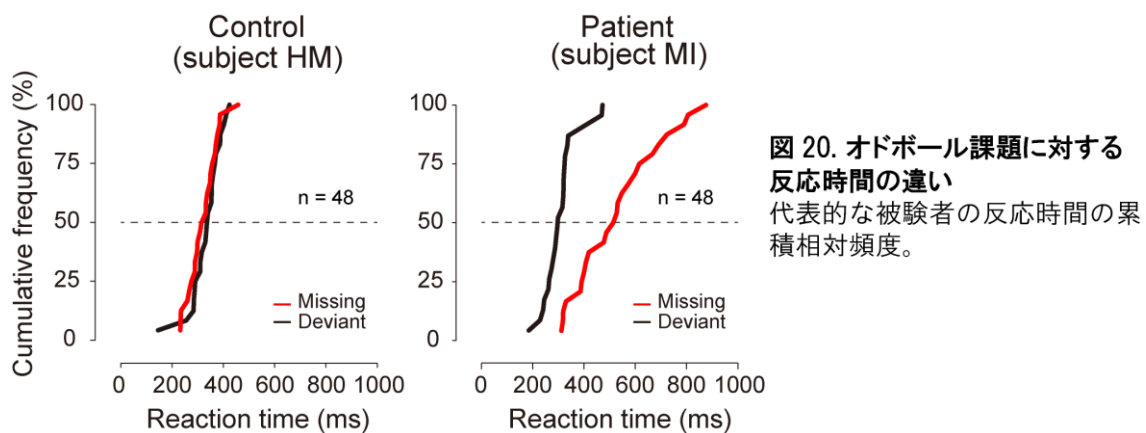
に聴覚刺激(1000 Hz)を提示した。視聴覚刺激を7—9回繰り返し提示した後、試行の半分では緑色の光と高周波の音声刺激(2000 Hz)を提示し(逸脱オドボール)、他の試行では、繰り返し刺激の1つを欠落させた(欠落オドボール)。参加者は、反復刺激の変化または欠落を検出した後、できるだけ早くボタンを押すように求められた。反応時間は、刺激の変化または欠落が生じた時間とボタンを押した時間の差とした。

データ分析と統計

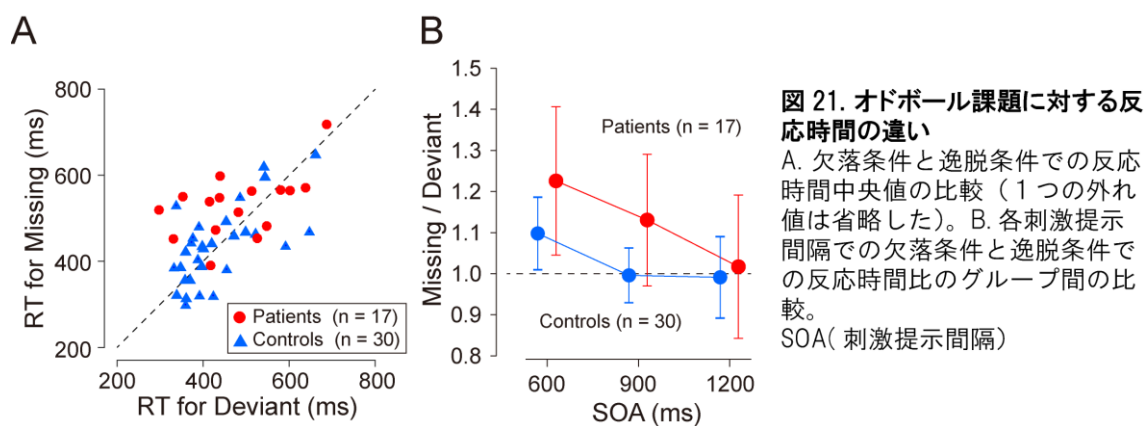
データの測定には Matlab Psychometric Tool Box を使い、USB ボードを利用してサンプリングを行った。統計解析にも Matlab を使用した。各参加者内での逸脱条件と欠落条件の反応時間変化の検定には Kolmogorov-Smirnov test を用いた。脊髄小脳患者および対照被験者の各条件での反応時間は unpaired t-test および分散分析(ANOVA)を用いて比較した。臨床スコアと反応時間の相関の有無はスピアマン相関係数を用いて評価した。p 値が 0.05 未満であれば、結果は統計的に有意であるとした。

3.3. 結果

欠落条件では、参加者は欠落の検出をするためには、次の各刺激タイミングを予測する必要があった。一方、逸脱条件では、タイミング予測を必要とせず、逸脱刺激に反応してボタンを押すことで正解できた。タイミング予測に対する小脳変性症の影響を明らかにするた



め、欠落条件と逸脱条件の反応時間を比較した。代表的な患者および対照の反応時間の累積頻度分布を図 20 に示す。患者例では、逸脱条件と欠落条件における反応時間の違いが明らかである。図 21 A にすべての被験者について欠落条件および逸脱条件の反応時間のプロットを示す。運動の影響を除き、タイミング予測機能を評価するため、欠落条件の反応時間と逸脱条件の反応時間の比を計算し、患者群と対照群で比較した(図 21B)。患者群と対照群において反応時間の比は、二元配置分散分析で群間ならびに刺激提示間隔ともに有意であり(群間差: $F_{(1, 135)} = 4.08$, $p < 0.05$, 刺激提示間隔: $F_{(2, 135)} = 3.74$, $p < 0.05$)、交互作用はなかった($F_{(2, 135)} = 0.55$, $p = 0.58$)。



相関分析

欠落条件と逸脱条件の反応時間比と従来の臨床スコア、臨床数値との相関を調べた。表 2

に各刺激提示間隔の反応時間比(欠落条件の反応時間/逸脱条件の反応時間)とSARA

スコア、BBS、罹患期間(Duration)、発症年齢(Onset)との相関を示す。各刺激提示間隔

における反応時間比は、どの値とも有意な相関を示さなかった。

			SARA	BBS	Duration	Onset
Oddball (n = 17)	RT ratio	SOA 600	-0.22	0.14	-0.26	0.07
		SOA 900	-0.16	0.07	-0.16	0.01
		SOA 1200	-0.28	0.24	-0.02	0.22

表 2 反応時間比と臨床データの相関 (Spearman rs 値)

Duration; 罹患期間、Onset; 疾患発症年齢

3.4 考察

脊髄小脳変性症の患者群では、対照群と比較して、オドボール課題における逸脱条件での反応時間と欠落条件での反応時間の比が有意に大きく、欠落検出反応が遅延した。このことから脊髄小脳変性症ではタイミング予測機能が低下することが示唆された。

以前の研究で、サルの小脳歯状核を不活性化した際に、刺激欠落条件における反応時間が延長することが知られており⁹、患者群での反応時間の遅延は歯状核またはそこに投射する小脳皮質の変性による可能性が高い。脊髄小脳変性症では主に虫部から変性が起こること、各遺伝子変異型により小脳内での変性部位の分布の違いなどが報告されているが、SCA6 患者の小脳半球部の変性が報告されている⁴¹。

今回のオドボール課題の成績は、従来の臨床スコアとは相関しなかった(表 2)。オドボール課題を用いることで、従来の臨床スコアでは検出できなかった変化が検出可能となるかもしれない。

脊髄小脳変性症の症状はどの脳部位が障害されるかにより変化する。小脳変性による高次機能障害の評価は治療法の効果判定やリハビリ計画において有用であると考えられる。オドボール課題の利点としては簡便に行うことができる点、反応時間を用いるため、SARA、BBS のように他者の視点によるスコア化を必要とせず評価者による結果のばらつきを防ぐことができるという点がある。

今回、オドボール課題により脊髄小脳変性症におけるタイミング予測機能の低下が示唆されたが、今後、この課題を利用し適切な高次機能評価を行うためには、複数の評価法を組み合わせることが必要である。また、参加者から視覚刺激を注視し続けることは負担となるという意見があった、病状によっては眼球運動障害がおこることも考慮すると、刺激提示を聴覚のみで行うなど改良も必要である。

総括および結論

1. 本研究から得られた新しい知見

- ・ オドボール課題遂行中にサル小脳歯状核において見られた神経応答の上昇部分が次の繰り返し刺激の提示タイミングを反映していることが示唆された。また、神経応答の大きさの漸増が刺激の欠落への期待を反映しており、欠落検出には期待と次の刺激タイミングの予測に関連する神経応答の両方が必要であることを示唆した。
 - ・ 小脳歯状核における、タイミング予測を反映した神経応答を形成するのは、主に小脳皮質プルキンエ細胞からの GABA 性入力であると考えられる。
 - ・ 脊髄小脳変性症ではタイミング予測機能が統制群に比べて低下する可能性を示した。
- また、オドボール課題の成績は、従来の臨床検査の成績とは相関せず、相補的な検査法となる可能性が示唆された。

2. 新知見の意義

小脳歯状核における神経活動がオドボール課題遂行に果たす役割、並びに小脳核の信号形成への小脳皮質からの入力の寄与を示した。これにより、知覚刺激の提示タイミングの予測という、これまであまり知られていない小脳の高次機能に関連する神経活動の処理機構の一部を明らかにできた。さらに脊髄小脳変性症患者におけるタイミング予測機能も評価した。

3. 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

小脳核で記録されたタイミング予測信号が、小脳核以降でどのように情報処理されていくかを、オドボール課題を用いて視床、大脳皮質および基底核で神経活動記録を行うことで明らかにしていくことができる。小脳核を不活性化または活性化し、他の部位の神経活動を調べることで小脳核と当該部位の機能の関連を調べることも情報処理機構を明らかにする手わかりとなる。また、今回用いたオドボール課題を改良し、他の課題を組み合わせることで、脊髄小脳変性症における高次機能評価が可能となるかもしれない。

4. 今後の課題

第1章の電気刺激実験において、今回サルに用いたオドボール課題では眼球運動を行動指標にしていたため、眼球運動に関連する神経活動を分離することが困難であった。今後、運動を伴わないタイミング予測課題を開発する必要がある。また、第2章の薬物注入方法では、受容体遮断効果が消失した後の神経活動を記録することができなかった。今後の研究では、光遺伝学的手法などを用いて神経活動を一時的に操作することが有効であると考えられる。第3章に関して、高次機能評価に用いるためには、オドボール課題単独では不十分であり、複数の課題と組み合わせる必要がある。複数の課題は、対象者の負担を増加させることも踏まえて、臨床利用に足るような課題セットを考えなければいけない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの皆様にご協力頂きました。田中真樹教授には研究方法から論文執筆まで全ての過程に渡りご指導頂き心より感謝申し上げます。技術補助員の皆様には、実験動物の世話や手術の補助、その他さまざまな場面でご協力頂きました。また、生理学研究所の南部篤先生、橘吉寿先生、知見聡美先生には注入電極の作成方法をご指導いただきました。北海道大学電子科学研究所、技術部機械工作室の武井将志様には今回の注入電極の作成に際し、治具の開発にご協力いただきました。第3章の研究にご参加いただきました皆様と、ご協力ならびにご指導頂きました北海道大学神経内科学教室の佐々木秀直先生、矢部一郎先生、伊藤さやか先生に厚くお礼申し上げます。研究を進める上で、ご助言を頂きましたすべての皆様に感謝いたします。最後に、研究に関して様々なご助力をいただきました神経生理学分野の皆様に感謝いたします。この研究は、文部科学省および国立研究開発法人・日本医療研究開発機構(AMED)からの支援を受けて行われました。

引用文献

1. Buhusi, C. V & Meck, W. H. What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 755-65 (2005).
2. Coull, J. T., Cheng, R.-K. & Meck, W. H. Neuroanatomical and neurochemical substrates of timing. *Neuropsychopharmacology* **36**, 3-25 (2011).
3. Fontes, R. *et al.* Time perception mechanisms at central nervous system. *Neurol. Int.* **8**, 14-22 (2016).
4. Schmahmann, J. D. & Sherman, J. C. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* **121**, 561-579 (1998).
5. Koziol, L. F. *et al.* Consensus Paper: The Cerebellum's Role in Movement and Cognition. *The Cerebellum* **13**, 151-177 (2014).
6. Mariën, P. *et al.* Consensus paper: Language and the cerebellum: an ongoing enigma. *Cerebellum* **13**, 386-410 (2014).
7. Strick, P. L., Dum, R. P. & Fiez, J. a. Cerebellum and nonmotor function. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**, 413-34 (2009).
8. Bostan, A. C., Dum, R. P. & Strick, P. L. Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends Cogn. Sci.* **17**, 241-54 (2013).

9. Ohmae, S., Uematsu, A. & Tanaka, M. Temporally Specific Sensory Signals for the Detection of Stimulus Omission in the Primate Deep Cerebellar Nuclei. *J. Neurosci.* **33**, 15432-15441 (2013).
10. Coull, J. T. & Nobre, A. C. Where and when to pay attention: the neural systems for directing attention to spatial locations and to time intervals as revealed by both PET and fMRI. *J. Neurosci.* **18**, 7426-35 (1998).
11. O'Reilly, J. X., Mesulam, M. M. & Nobre, A. C. The cerebellum predicts the timing of perceptual events. *J. Neurosci.* **28**, 2252-60 (2008).
12. Roth, M. J., Synofzik, M. & Lindner, A. The cerebellum optimizes perceptual predictions about external sensory events. *Curr. Biol.* **23**, 930-5 (2013).
13. Avanzino, L. *et al.* The cerebellum predicts the temporal consequences of observed motor acts. *PLoS One* **10**, 1-14 (2015).
14. Thach, T. W., Goodkin, H. P. & Keating, J. G. the Cerebellum and the Adaptive Coordination. *Annu. Rev. Neurosci* **15**, 403-42 (1992).
15. Ito, M. *The cerebellum: brain for an implicit self*. (FT press, 2012).
16. Manto, M. *et al.* Consensus Paper: Roles of the Cerebellum in Motor Control—The Diversity of Ideas on Cerebellar Involvement in Movement. *The Cerebellum* **11**, 457-

487 (2012).

17. May, P. J., Hartwich-Young, R., Nelson, J., Sparks, D. L. & Porter, J. D. Cerebellotectal pathways in the macaque: Implications for collicular generation of saccades. *Neuroscience* **36**, 305-324 (1990).
18. Lynch, J. C., Hoover, J. E. & Strick, P. L. Input to the primate frontal eye field from the substantia nigra, superior colliculus, and dentate nucleus demonstrated by transneuronal transport. *Exp. Brain Res.* **100**, 181-186 (1994).
19. Ashmore, R. C. & Sommer, M. a. Delay activity of saccade-related neurons in the caudal dentate nucleus of the macaque cerebellum. *J. Neurophysiol.* **109**, 2129-44 (2013).
20. Holdefer, R. N., Miller, L. E., Chen, L. L. & Houk, J. C. Functional connectivity between cerebellum and primary motor cortex in the awake monkey. *J. Neurophysiol.* **84**, 585-90 (2000).
21. Ohmae, S. & Tanaka, M. Two different mechanisms for the detection of stimulus omission. *Sci. Rep.* **6**, 20615 (2016).
22. Stoodley, C. J. & Schmahmann, J. D. Functional topography in the human cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuroimage* **44**, 489-501 (2009).

23. Buckner, R. L. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron* **80**, 807-15 (2013).
24. Kansal, K. *et al.* Structural cerebellar correlates of cognitive and motor dysfunctions in cerebellar degeneration. *Brain* **140**, 707-720 (2017).
25. Middleton, F. Cerebellar output: motor and cognitive channels. *Trends Cogn. Sci.* **2**, 348-354 (1998).
26. Dum, R. P. & Strick, P. L. An unfolded map of the cerebellar dentate nucleus and its projections to the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* **89**, 634-9 (2003).
27. De Zeeuw, C. I. Spatiotemporal firing patterns in the cerebellum. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 327-344 (2011).
28. Uusisaari, M. & De Schutter, E. The mysterious microcircuitry of the cerebellar nuclei. *J. Physiol.* **589**, 3441-57 (2011).
29. Fortier, P. A, Kalaska, J. F. & Smith, A. M. Cerebellar neuronal activity related to whole-arm reaching movements in the monkey. *J. Neurophysiol.* **62**, 198-211 (1989).
30. Harvey, R. J., Porter, R. & Rawson, J. A. Discharges of intracerebellar nuclear cells in monkeys. *J. Physiol.* **297**, 559-580 (1979).
31. van Kan, P. L., Gibson, A. R. & Houk, J. C. Movement-related inputs to

- intermediate cerebellum of the monkey. *J. Neurophysiol.* **69**, 74-94 (1993).
32. Ishikawa, T. *et al.* Releasing dentate nucleus cells from Purkinje cell inhibition generates output from the cerebrocerebellum. *PLoS One* **9**, (2014).
 33. Steuber, V., Schultheiss, N. W., Silver, R. A., De Schutter, E. & Jaeger, D. Determinants of synaptic integration and heterogeneity in rebound firing explored with data-driven models of deep cerebellar nucleus cells. *J. Comput. Neurosci.* **30**, 633-658 (2011).
 34. Holdefer, R. N., Houk, J. C. & Miller, L. E. Movement-related discharge in the cerebellar nuclei persists after local injections of GABA(A) antagonists. *J. Neurophysiol.* **93**, 35-43 (2005).
 35. Dietrichs, E., Bjaalie, J. G. & Brodal, P. Do pontocerebellar fibers send collaterals to the cerebellar nuclei? *Brain Res.* **259**, 127-131 (1983).
 36. Sultan, F., Czubyko, U. & Thier, P. Morphological classification of the rat lateral cerebellar nuclear neurons by principal component analysis. *J. Comp. Neurol.* **455**, 139-155 (2003).
 37. Matilla-Dueñas, A., Corral-Juan, M., Volpini, V. & Sanchez, I. The spinocerebellar ataxias: clinical aspects and molecular genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **724**, 351-74

- (2012).
38. Roth, M. J., Synofzik, M. & Lindner, A. The cerebellum optimizes perceptual predictions about external sensory events. *Curr. Biol.* **23**, 930-935 (2013).
 39. Suenaga, M. *et al.* Cognitive impairment in spinocerebellar ataxia type 6. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 496-9 (2008).
 40. Matsuda, S. *et al.* Top-down but not bottom-up visual scanning is affected in hereditary pure cerebellar ataxia. *PLoS One* **9**, 1-22 (2014).
 41. Lukas, C. *et al.* Dissociation of grey and white matter reduction in spinocerebellar ataxia type 3 and 6: A voxel-based morphometry study. *Neurosci. Lett.* **408**, 230-235 (2006).