

香りが記憶や情動と結びつく際の脳内神経機構に関する研究

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

梶 原 利 一

Olfactory information from the piriform cortex (PC) is relayed to the amygdala and the hippocampus via two parallel pathways. One of which is via the amygdaloid cortex (AC) and the other is via the entorhinal cortex (EC). Since these olfactory cortices are located in ventral part of the brain, it is difficult to analyze the neural propagation pattern under *in vivo* conditions. For studying these olfactory cortices, the use of the isolated whole brain *in vitro* preparation is one of the ideal methods. By imaging voltage-sensitive dye signals in the isolated whole brain, we can monitor the spread of neural activity. In fact, physiological connections among the olfactory cortices (PC, EC, and AC) were successfully investigated in our laboratory. In the more recent study, we suggested that the AC and EC represent functionally coupled structures in the olfactory stream of information (Kajiware et al. *Eur J Neurosci* 2007). However, stimulus frequency dependency, plasticity, and other neural network properties of the olfactory system are still not well understood. In the present study, we stimulated olfactory nerves repetitively at theta frequency (10Hz), and investigated the change of the spatio-temporal pattern of evoked neural activities in the olfactory cortices. And it was found that the neural activities propagated from the EC to the AC were enhanced under the influence of the repetitive stimulation to the olfactory nerves.

1. 緒 言

ある香りを入力として受けた時、我々は無意識のうちに過去の記憶と参照し、入力された香りを認識する。多くの場合、快・不快のような気持ちさえも抱く。これはどのような神経機構によるものなのであろうか？これまでに得られている嗅覚情報処理に関する知見を総合すると、嗅球からの出力信号は、梨状皮質－嗅内皮質を介して海馬へ入力する経路（海馬システム）では「認識」に関する情報が、梨状皮質－扁桃体周囲皮質を介して扁桃核へ入力する経路（扁桃体システム）では「情動」に関する情報が、それぞれ階層的な段階を経て並列に処理されていると考えられる。本研究では、これら神経経路の動作機構を詳細に調べる事を目的とした。

視覚や聴覚などにみられる感覚皮質と異なり、嗅覚系皮質は脳の腹側部に位置している為、*in vivo*での神経活動計測が容易ではない。そこで本研究ではモルモット単離脳標本の利用により、この問題を克服した。単離脳標本では、摘出した全脳は血管系を介して実験液が常に灌流されている為、3次元的な神経回路構造とその生理活性が維持されている。更に、嗅覚系皮質が頭蓋骨無しで露出されている為、電極アクセスが容易になるだけでなく、膜電位感受性色素で標本を染色すれば、神経活動のイメージングも

行う事が可能になる¹⁻³⁾。これまでに我々は、この実験系で嗅索を電気刺激した際の神経活動伝播パターンを解析し、情動系（扁桃体）システムの入り口にあたる扁桃体皮質が、記憶系（海馬）システムの一部である嗅内皮質に先行して活性化される事を示すと同時に、並列関係にあると思われたこれら扁桃体皮質と嗅内皮質の間には、実は機能リンクを可能にする神経経路が存在し、この経路が記憶と情動の情報統合機能に関わっている可能性を示唆している³⁾。本研究では、これまで行ってきた実験を発展させ、嗅索への刺激パターンを変化させた時の神経応答パターンを検討すると同時に、イメージングでは捉えられない脳深部の現象を解析する為の多点神経応答計測装置の開発を試みた。

2. 実 験

2. 1. 単離脳標本

実験にはHartley系モルモット（150－250g）を使用し標本作製した。まずペントバルビタール（60mg/kg）の腹腔投与後、心臓より氷冷した実験液を灌流した。そして頭部が十分に冷却された後、丁寧に脳を取り出し、実体顕微鏡下にセットした測定用チェンバーに移した。この時点でのチェンバー内の灌流液の温度は15℃に維持した。次に、椎骨動脈よりカニューレを刺入し、対側の椎骨動脈、内頸動脈、下垂体動脈をシルク糸で縛った後、椎骨動脈から毎分6 mlの速度で実験液の灌流を開始した。そして90分以上かけてゆっくりと灌流液の温度を30℃まで上昇させた後、測定を開始した。液温調節は、チェンバー下にセットしたペルチェ素子の制御により行った。尚、実験液として以下の組成の、低分子デキストラン入り人工脳脊髄液を使用した。（in mM）NaCl, 126；KCl, 3；KH₂PO₄, 1.2；MgSO₄, 1.3；CaCl₂, 2.4；NaHCO₃, 26；glucose, 15；



How does the olfactory information input to the hippocampal and amygdaloid network?

Riichi Kajiware

Biomed. Res. Inst., AIST

HEPES, 2.1; and 3 % dextran (M.W. 70 000), saturated with 95% O₂ / 5 % CO₂.

2. 2. 神経活動の電氣的及び光学的計測

単離脳標本において、嗅球の出力繊維 (LOT) への電気刺激により惹起される嗅覚ネットワークの神経応答を、電気生理学的手法と神経活動イメージング手法の二つの手法により計測した。刺激電極には、双極性タングステン電極 (直径25 μ m, 先端間隔100 μ m) を使用した。0.9% NaCl液を充填したガラス電極 (電極抵抗は 5-10M Ω) を、細胞外誘導記録用電極として使用した。神経活動のイメージングを行う際は、膜電位感受性色素Di-4-ANEPPS (Invitrogen / Molecular Probes) により標本を染色した。膜電位感受性色素の調整法は、富永らの報告に従った⁴⁾。Di-4-ANEPPS 5 mgを1 mlエタノール及び0.5 mlクレモフォアEL10%水溶液により溶解し、ストック液とした。ストック液40 μ lを0.5 ml仔ウシ血清と0.5 mlの実験液に溶かしたもの (最終濃度0.2 mM) を直接脳表に滴下して標本を染色した。尚、標本を膜電位感受性色素で25分間染色した後、30分以上灌流液を流す事により、細胞膜に取り込まれず残った不要な色素を洗い流した。光計測は、KODAK製CCDイメージセンサ (KAI-1003) を基に我々が開発した装置により行った。光計測を行うための光学系は自作のタンデム型顕

微鏡を使用した。この顕微鏡では、第一及び第二対物レンズの組み合わせを変える事によって、倍率を0.5倍、1倍、及び2倍に切り替えられる。また、安定化電源を用いたハロゲン光源からの光は光ファイバーを介して顕微鏡へ送りこまれるが、535 nm ($\pm$ 20 nm) の帯域通過フィルターを通して後、ダイクロイックミラー (580 nmで50 %透過) で反射、標本に照射される。また、標本からの蛍光はダイクロイックミラーを透過した後、長波長域通過フィルター (600 nmで50%透過) を通してCCDで受光される。

3. 結 果

3. 1. 嗅索刺激により誘発される神経応答の刺激強度依存性

モルモット単離脳標本において外側嗅索 (LOT) を刺激すると、神経興奮はまず前梨状皮質 (APC) から後梨状皮質 (PPC) へ伝播する。その後、神経興奮は内側経路を介して扁桃体皮質 (AC) へ、外側経路を介して嗅内皮質 (EC) へと伝播する。これまでこれら二つの経路の関係は、完全に並列であると思われていたが、最近の我々の研究³⁾ によって、嗅内皮質に惹起された神経興奮は、吻側方向へ戻るように伝播し、扁桃体皮質を再び活性化させることがわかった (図1A 赤矢印)。つまり、嗅内皮質と扁桃体皮質は、機能的に結び付いているのである。我々は、この嗅内

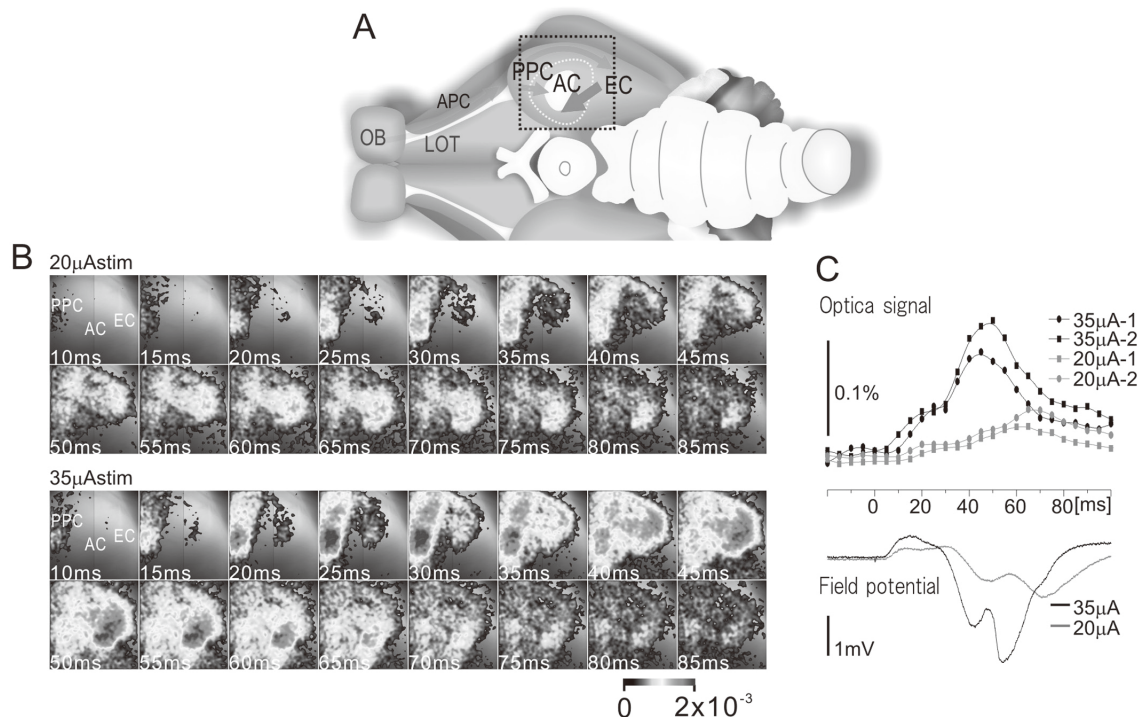


図1 外側嗅索 (LOT) 刺激により誘発される神経応答の刺激強度依存性

- A. モルモット単離脳を腹側より見た模式図。嗅索刺激により惹起された神経興奮は、二つの経路 (直接的な内側経路と嗅内皮質を介する外側経路) を経由して扁桃体皮質へ送られ統合される。OB: 嗅球, LOT: 外側嗅索, APC: 前梨状皮質, PPC: 後梨状皮質, AC: 扁桃体皮質, EC: 嗅内皮質, 破線で囲まれた領域は観測領域。
B. 20 μ A (上) および 35 μ A (下) で刺激した際の嗅覚皮質における神経興奮伝播パターン。
C. 扁桃体皮質の任意のピクセルにおける光シグナル (上) と集合電位 (下)。

皮質と扁桃体皮質を結ぶ神経経路が、刺激強度に依存してどのように活性化されるのかを検証した。図1Bは、LOT刺激時の神経興奮伝播パターンを表す。上段の結果において、刺激後20msにイメージ中央のACの領域が、45msにECが活性化され、65msには再び、ACが活性化された。下段の結果では、刺激後15msにAC、35msにEC、50msにはACが再度活性化された。つまり、LOTへの刺激強度が多少変化しても、扁桃体皮質へ入力する二つの経路（内側経路：PPC→AC、外側経路：PPC→LEC→AC）が活性化されるという現象に大きな変化は認められなかった。図1Cの波形は、二種類の刺激条件下で得られた扁桃体皮質の神経応答の時間経過を表している。上が任意の二箇所から導き出した光シグナル（膜電位変化に比例した蛍光変化）、下が細胞外記録電極により同時測定した集合電位である。光シグナルトレースは二峰性を示し（図1C上）、このピーク間隔とほぼ同一の間隔を持つ二つの集合スパイク電位が、電気生理学的な計測によっても確かめられた（図1C下）。

3. 2. 嗅索への繰り返し刺激により惹起される神経応答パターン

齧歯類がニオイの識別や探索を行う際のスニッフィン

グ周波数は約4–12Hzといわれている⁵⁾。もし外側嗅索（LOT）が繰り返し電氣的な刺激を受けると神経応答は、どのように脳内へ伝えられるのであろうか？我々はこの問題を検討する為に10Hzで外側嗅索（LOT）を繰り返し電気刺激し、これにより惹起される神経応答の活動パターンを解析した。図2Aのように、モルモット単離脳標本のLOTに刺激電極を配置し電気刺激を施した。図2Bは、刺激により誘導された細胞外記録電位波形である。10HzでLOTを6回刺激すると、後部梨状皮質（PPC）および嗅内皮質（EC）では、100ms間隔で振幅の大きい下向き集合電位が6回記録された。扁桃体皮質（AC）では、1回目の刺激に対する応答が極めて小さいものの、2回目以降において、顕著な下向き集合電位が観測された。つまり、繰り返し入力が与えられる事によって、ACの反応性が高まった事が読み取れる。

ではこのとき、ACの神経応答は、どのような神経経路の活性化により増大したのであろうか？我々は、図2の破線で囲まれた領域において、神経活動イメージングを行った。その結果が図2Cである。繰り返し刺激の一回目、二回目、三回目の刺激に対する応答を上段、中段、下段に示した。上段では、刺激後25msにPPCで神経興奮が認められ、85msに神経興奮がECまで伝播している様子がわ

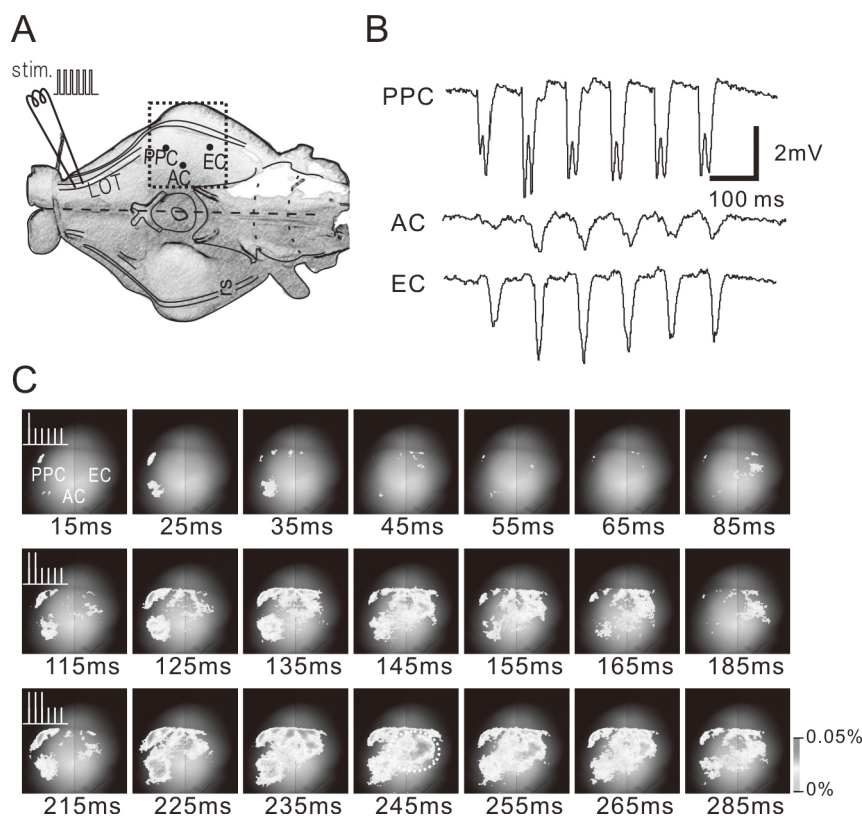


図2 外側嗅索（LOT）を繰り返し刺激した際の嗅覚ネットワークの神経応答

- モルモット単離脳標本の模式図。
- 後部梨状皮質（PPC）、扁桃体皮質（AC）、嗅内皮質（EC）における細胞外記録。
- 図Aの破線で囲まれた領域で観測した神経活動伝播パターン。

かる。更に、2回目(中段)、3回目(下段)と、繰り返し LOT に刺激が入力されると、嗅覚系皮質の全体にわたって神経応答の顕著な増大が認められた。著しい変化が生じたのは、EC と AC の領域であった。下段 245 ms のイメージの白破線内において、EC の応答の顕著な増大に引きずられて AC の領域が大きく活性化されることが判明した。

3. 3. 脳深部神経活動計測の為の機器開発

我々の所有する光計測システムで検出する光シグナルは、脳表面からおよそ 300 ミクロンまでの深さにある組織全体から発せられる蛍光シグナルを加算したものと考えられる¹⁾。本研究では、これよりも深部の脳皮質領域や、更に深部に位置している海馬や扁桃体外側核の神経活動を記録する為に、多点電極記録システムの構築を試みた。市販の 16 チャンネルシリコンプローブの使用を想定し、ヘッドアンプに電極が直接挿入できるような仕様とした。初段のヘッドアンプ部で 10 倍、後段の信号処理回路部で 10 倍、合計 100 倍のゲインを有するシステムとした。初段と後段の間にはカットオフ 0.1 Hz のハイパスフィルターを配置し、後段のアナログ信号処理回路部では、カットオフ 2 kHz を有する 4 次ローパスベッセルフィルターを構成した。

16 チャンネルから記録される集合電位は、市販の AD コンバータを介してコンピュータに取り込み、取り込んだデータは Matlab によって、CSD 解析を行えるような仕様とした。

4. 考 察

モルモット単離脳標本に膜電位イメージングを適用して、嗅覚神経経路の機能構造解析を行った。外側嗅索 (LOT) を電気刺激すると、神経興奮はまず前梨状皮質 (APC) から後梨状皮質 (PPC) へ伝播し、その後、神経興奮は内側経路を介して扁桃体皮質 (AC) へ、外側経路を介して嗅内皮質 (EC) へと伝播した後、EC に惹起された神経興奮は、

吻側方向へ戻るように伝播し、扁桃体皮質を再び活性化させた。今回の研究によって、刺激強度を変化させても、この伝播様式が大きく変化しない事がわかった。しかし、刺激強度が強いほど、AC の興奮性は劇的に増大した。特に EC を介した外側経路の影響が大きいようであった。また、刺激強度が、極めて小さく、EC → AC の伝達経路が、ほとんど活性化されない場合でも、繰り返し入力を与えられとこの経路は活性化される事がわかった。

本実験では、標本の特性上、匂い物質を実際に与えて脳の活動を見ることが出来ないため、電気刺激を擬似的に与えた。刺激強度の強弱は、与えられた匂い物質の濃度の高低を表す可能性もあるが、匂いの種類の差を表している可能性もある。刺激強度の増大によって、弱い刺激強度では活性化されていなかった LOT の神経線維 (つまりその元にある嗅細胞) が新たに刺激されたと考える事ができるためである。つまり、ある匂い物質については、EC - AC 間の経路を活性化させるには不十分でも、他の匂い物質については、この経路を大きく活性化させる可能性を有している事が示唆される。また、繰り返し刺激の実験結果から、かすかな匂いでも間隔を置いて、繰り返し与えられる事が、EC - AC の経路の活性化には、効果的である事も示唆された。

EC は海馬と結び付いて記憶系の情報処理に関わる事が知られるが、AC は、脳深部の扁桃体重核と結び付いて、情動の情報処理に関与する。本研究で得られた結果は、入力する匂い物質の違いによって、記憶と情動の結び付きに関与する神経経路が活性化されやすかったり、されにくかったりする事を意味しているのかもしれない。

今回の研究のようにモルモット単離脳標本を用いれば、スライス標本の使用では不可能な、複雑な神経ネットワークの解析が行えるが、脳深部で生じた現象までは、解析することが出来ない。そこで本研究では、脳深部の多点電気生理計測を可能にする計測システムを新たに構築した。今

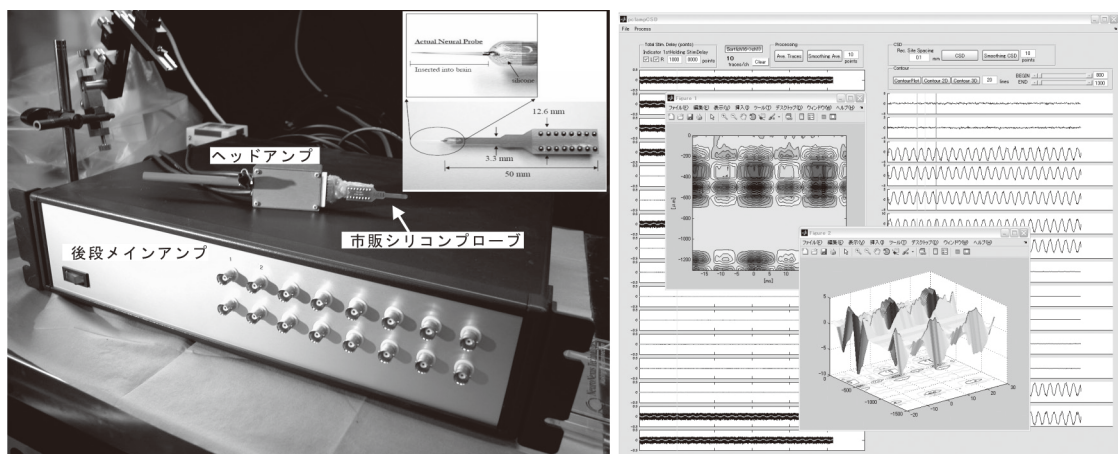


図3 開発した多チャンネルアンプ (左) と波形解析ソフトウェア (右)

後は、この装置を既存の単離脳標本実験システムと組み合わせて使用し、脳深部の複数箇所からの神経応答解析を進める事によって、嗅覚系における海馬や扁桃体ネットワークの動作様式をより詳しく明らかにしてゆきたいと考えている。

(参考文献)

- 1) de Curtis M., Takashima I., & Iijima T. (1999) Optical recording of cortical activity after in vitro perfusion of cerebral arteries with a voltage-sensitive dye. *Brain Res* **837**, 314-319.
- 2) Biella G.R., Gnatkovsky V., Takashima I., Kajiwarara R., Iijima T., & de Curtis M. (2003) Olfactory input to the parahippocampal region of the isolated guinea pig brain reveals weak entorhinal-to-perirhinal interactions. *Eur J Neurosci* **18**, 95-101.
- 3) Kajiwarara R., Tominaga T., & Takashima I. (2007) Olfactory information converges in the amygdaloid cortex via the piriform and entorhinal cortices: observations in the guinea pig isolated whole-brain preparation. *Eur J Neurosci* **25**, 3648-3658.
- 4) Tominaga T., Tominaga, Y., Yamada, H., Matsumoto, G. & Ichikawa, M. (2000) Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *J. Neurosci. Meth* **102**, 11-23.
- 5) Kepecs A., Uchida N., & Mainen Z.F. (2007) Rapid and Precise Control of Sniffing During Olfactory Discrimination in Rats. *J Neurophysiol* **98**, 205-213.