

はそれぞれ機能の異なる小領域に細分されることも明らかになった。高次の運動野の領域では、運動情報だけではなく、運動に必要となる認知的な情報を伝える神経細胞も存在する。たとえば、大脳の内側面に位置する帯状回運動野では、尾側部 (CMAc) は運動の準備や実行そのものに関連した活動を示す神経細胞が大半であるが (図1A)、より高次的な吻側部 (CMAr) では、視覚性の感覚応答や抽象的な運動情報 (No-go 応答など) を示す神経細胞が多数観察される⁵⁾ (図1B)。長年にわたるサル単一ユニット記録を中心とした研究成果は、ヒトの脳機能イメージングの実験から得られる最新の知見ともよく一致しており、霊長類の各運動関連領域がどのよう

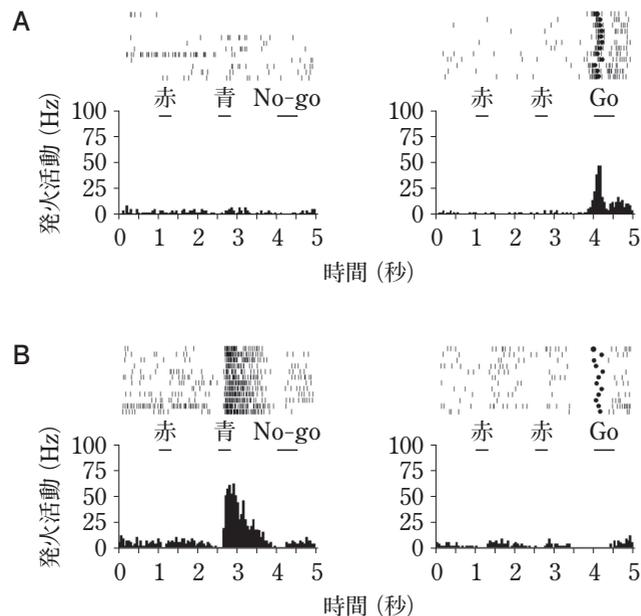


図1 帯状回運動野(CMA)の神経細胞の活動 (ref.5より改変転載)
 A: 帯状回運動野の尾側部 (CMAc) における運動の実行 (Go) に関与する神経細胞。
 B: 吻側部 (CMAr) における No-go 関連応答を示す神経細胞。サルは、同じ色が呈示されるとレバーを押し (Go)、異なる色が呈示されるとそのままレバーを保持する (No-go)。

な運動情報の処理を担当しているのかという「局在論」の問題に関しては、かなり詳細に理解されていると考えてよい。

しかしながら、運動野内の神経回路に注目してみると、「手を動かす」という単純な運動を実現する脳の仕組みでさえ、まだまだ未解決の問題が山積みなのである。たとえば、一般的に大脳皮質の細胞構築は6層から構成されるが (ただし、運動野は第IV層に乏しい)、運動を発現するために運動野内では層ごとに異なる役割を担っているのだろうか？

また、大脳皮質では、興奮性のグルタミン酸作動性の錐体細胞 pyramidal cell と、抑制性の GABA 作動性の介在細胞 interneuron が複雑な局所回路を形成している。介在細胞にも、バスケット細胞やマルチノッティ細胞といった多様な種類が存在する。では、特に運動野の錐体細胞や各種の介在細胞は、運動の発現に対してどのような機能を果たしているのだろうか？

さらには、これらの興奮性または抑制性細胞のあいだでは、発火活動とシナプス伝達を介して、どのような運動情報のやりとりを行っているのだろうか？

われわれの研究は、このような未解決の諸問題に焦点を当てて、新しい行動・生理学的手法を取り入れることにより、運動発現の皮質内回路機構の本質的な解明を目指すものである。

1. 運動発現の仕組みを探る研究手法の確立

1-1 頭部固定ラットの運動課題の開発

われわれの研究は、ラットが前肢の巧緻運動 skilled movement を発現する大脳皮質の回路機構を解明することを目指している。対象動物としてラットを使用する理由は、安定して供給され、均質な遺伝的背景を有し、解剖学や細胞生物学の豊富な知見があり、遺伝子操作技術を導入しやすい、という実験上のメリットがあるからである。じつは、ラットは、哺乳動物のなかでも上手に前肢の巧緻運動を発現する部類に属するといわれている⁶⁾。ラットは、長い指に分かれた前肢を器用に使って (図2)、昆虫を素早く捕らえ、穀物を一粒ずつ口にすることができる。しかし、ウシやウマやヒツ

ジヤイヌは、歩く走るは得意だが、食べ物を前肢の指でつかんで口にもっていきような動作ができない。ラットの単純な脳内には、「うまく手を動かす」ための基本的な動作原理が備わっているはずである。

行動中のラットの脳内活動を高精度で計測するためには、頭部を実験装置に定位固定するのが理想的である。ところが、頭部を固定したラットにレバー押しなどの前肢運動 (forelimb movement) 課題を遂行させる行動実験はきわめて困難であると長年考えられてきた⁷⁾。頭部固定状態でも舌運動 (licking) やヒゲ運動 (whisking) や四足歩行 (locomotion) は可能ではあるが、これらは脳幹や脊髄にあるパターン・ジェネレーターに駆動されるリズムカルな反復運動を主体とし^{8~10)}、大脳皮質からの運動指令により逐一駆動される前肢の巧緻運動⁶⁾とは本質的に異なるものである。

そこで、まず、頭部を固定したラットに、右前肢を使ってレバーを押し引きする運動課題を効率よくオペラント学習させる行動実験装置を開発した (特許4982854)。この運動課題では、ラットが右前肢でレバーを握って前方へ押し切り、そのまま1秒以上保持した後に、自らのタイミングでレバーを引き戻すと、口元にあるスパウト spout (飲み口) からでる報酬の甘い水滴を舐めることができる。この一連の操作は一見単純ではあるが、前肢

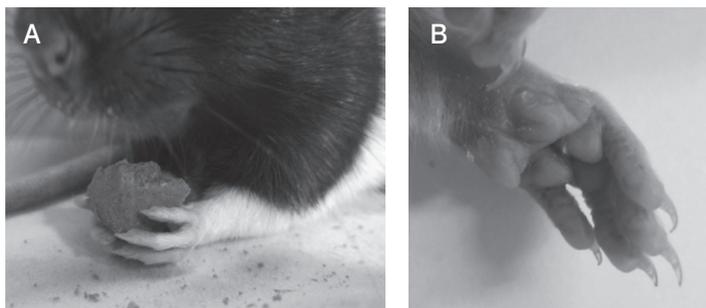


図2 ラットの前肢の巧緻運動
A: 両方の前肢を器用に使うって餌を食べるラット。
B: 関節のある前肢の長い指。

運動の位置や時間を調整する必要がある巧緻運動であるといえる。この学習装置を活用することにより、約2週間で効率よく頭部固定ラットに運動課題を学習させて、運動発現中に脳内活動を計測する実験を実施する体制を整えた¹¹⁾ (図3)。

さらに最近になって、オペラント学習におけるレバー (operandum) と報酬 (reinforcer) を合一化した「スパウトレバー」というユニークな装置を考案した (特許出願: 特願2011-139810)。スパウトレバーはレバーの先

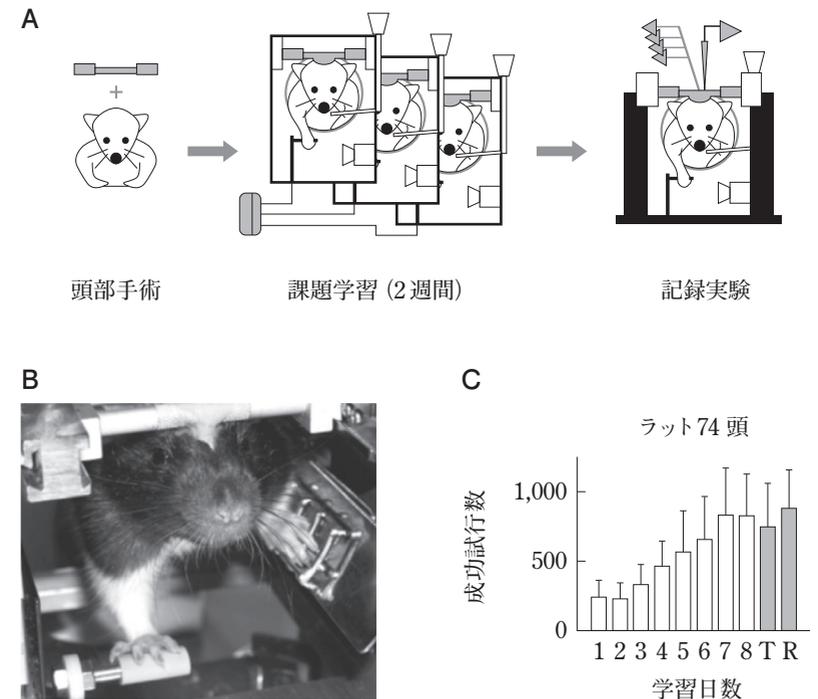


図3 頭部固定ラットの運動課題の学習 (ref.11より改変転載)

A: 実験の流れ (A: 運動図)。

B: 右前肢でレバーを操作する頭部固定ラット。

C: 運動課題の学習結果。すべてのラットが約2週間で前肢の運動課題を学習した。学習完了後、記録用装置に移動し (T)、記録実験を実施した (R)。

端から報酬の水滴がでてくる構造をとっており、ラットは前肢でレバーを引き寄せて先端を舐めるというきわめて自然な動作から学習を開始する。このスパウトレバーを導入した結果、前肢で押して保持して引くという運動課題の学習をわずか1日から数日間で完了するという学習効率の劇的な向上を達成した¹²⁾。また、この装置を用いて、聴覚刺激によるGo/No-go弁別課題などをきわめて短時間で学習させることも可能になった¹²⁾。

1-2 行動中の動物からの傍細胞記録法の確立

Evarts以来、無麻酔・行動中の動物の脳内における神経細胞の発火活動を調べるために、細胞外記録法（特に単一ユニット記録法）が威力を発揮してきた。細胞外記録法は神経細胞の発火に伴う細胞外の微弱な電位変化を細胞間隙に配置した金属微小電極で計測する電気生理学的手法である。ところが、細胞外記録法では、記録細胞の位置（皮質層・亜領域など）や細胞サブタイプ（錐体細胞・各種の介在細胞）や軸索結合（シナプス部位や投射先など）を確定することは著しく困難である。

この欠点を克服するため、1996年、カナダのピノー（D. Pinault）は、単一神経細胞の発火活動を記録した後に、その細胞に特異的に可視化色素（バイオサイチンなど）を電気浸透的に付加して、顕微鏡下で細胞形態を詳細に観察できるジャクスタセルラー（傍細胞）記録法juxtacellular recordingを開発した¹³⁾。初期のころは麻酔状態で傍細胞記録が試みられていたが、やがて無麻酔・自然睡眠中の頭部固定動物の脳にも適用されるようになった。しかしながら、近年まで覚醒し行動している動物に傍細胞記録を適用する研究は皆無に等しかった。その理由のひとつとして、頭部を固定した小型動物に特定の行動をさせることがかなり難しいことがあげられる。せっかく長い時間をかけて1頭の動物に行動課題を学習させても、いったん1個の神経細胞からの傍細胞記録を得てしまうと、その貴重な動物を翌日までに灌流固定しなければ記録細胞を顕微鏡下で可視化することができなくなるからである。このことは、逆にいえば、頭部固定状態で行動課題を遂行する動物の個体数を十分に確保さえすれば、行動中の動物を対象にした

傍細胞記録実験が実現できることを意味する。そこでわれわれは、前述の運動課題を効率的に学習した頭部固定ラットの脳皮質からの傍細胞記録を試みて、行動に関連する神経細胞の発火活動の記録とその記録細胞の形態学的同定に世界で初めて成功したというわけである¹¹⁾。

1-3 マルチニューロン活動の記録と解析

大脳皮質の回路機構を調べるためには、複数の神経細胞の発火活動を同時に計測するマルチニューロン記録法multi-neuronal recordingが有効である¹⁴⁾。われわれは、頭部固定状態で前肢の運動課題を遂行するラットの脳皮質において、16チャンネルのシリコンプローブsilicon probeを使ったマルチニューロン記録も行った¹¹⁾。このシリコンプローブは、近接する4電極からなるテトロード型配置を複数備える形状であり、それぞれのテトロード型配置で10細胞から15細胞ほどの発火活動を同時に記録することができる。テトロード型配置の4チャンネルずつの記録データは、そのままでは多数の神経細胞の発火活動が大小入り混じっている状態であり、スパイク・ソーティングspike-sortingと呼ばれる作業を経て、個々の記録細胞の発火活動として分離していく。スパイク・ソーティングはマルチニューロン記録の解析の要となるきわめて重要な過程であり、高度な計算処理が要求される。共同研究者の竹川高志博士（理化学研究所）は、従来法よりも格段に高精度のアルゴリズム（変分ベイズ法）を組み込んだスパイク・ソーティング用のソフトウェアEToSを自主開発した¹⁵⁾。現在は、さらに改良を加えたEToSバージョン3が無償でダウンロードすることが可能となり、国内外で活用されはじめている¹⁶⁾。

2. 運動野細胞の機能的活動を探る

2-1 運動野の皮質層の役割

ヒトやサル的一次運動野は、大脳皮質の層構造のうち、第IV層がほとんど存在しないことが知られている。一方、ラットの一次運動野の前肢領域は一次体性感覚野の前肢領域と重複しているため（sensori-motor cortex）、例外

的に第IV層が存在する6層構造のままである^{17,18)}。運動野の内部では、特に第II／III層の錐体細胞から第V層の錐体細胞への興奮性の軸索結合が豊富であり、第V層の錐体細胞からは線条体や視床や脊髄へ直接投射する^{17,18)}。そこで、第II／III層は運動の準備を担当し、第V層は実行を担当する、というような「層から層へ(layer-by-layer)」の運動情報の処理の仮説が提起される。われわれは、前肢の運動課題を遂行中のラットの一次運動野の前肢領域からの傍細胞記録を試みることによって、この仮説を検証した¹¹⁾。

まず、レバーを引く前肢運動の準備、開始、実行の各局面に相当する発火活動を示す細胞を傍細胞記録により記録し、それらの記録細胞を可視化することによって、多くは形態学的に錐体細胞であることを同定した(図4A)。それらには錐体細胞の特徴である尖頭および基底樹状突起や棘突起(スパイン)を顕微鏡下で明瞭に確認できた。そして集計の結果、運動の局面ごとに、浅層の細胞も深層の細胞も一緒になって活動が変化することが判明した(図4B)。たとえば、第II／III層にも、IV層、V層、VI層にも、運動の実行中に発火活動が大きく増加する錐体細胞がいくつも観察された。このことは、運動野の各層が異なる機能を分担しているのではなく、各機能に対して全層が一丸となって関与している(multi-layer activation)ことを示している。ただし、平均発火率でみると、第II／III層の錐体細胞は1 Hz以下のものが多く静かであるのに対して、第V層では数Hz以上の活発なものが多く、同じ運動局面で運動野の全層が活動するとしても、浅層と深層では質的に異なる計算処理をしている可能性が高い。特に、運動情報は運動野内の浅層から深層へ一方に処理されるだけなのか、あるいは線条体や視床とのループも使って浅層と深層のあいだで増幅回路のように運動情報を反復処理しているのか、今後の詳細な検討が必要であろう。

2-2 運動野の錐体細胞と介在細胞のはたらき

運動野では、浅層や深層にかかわらず、興奮性の錐体細胞は運動の発現に対して多様な発火活動を示すことが明らかとなった。では、運動野の抑制性の介在細胞の機能はどのようなものであろうか？

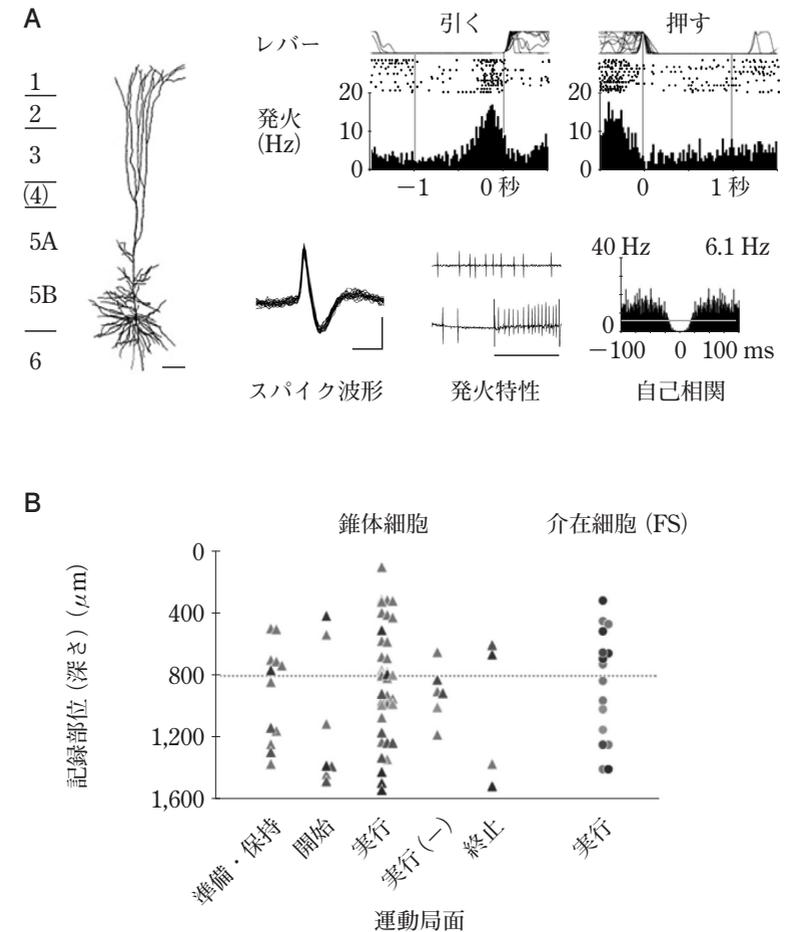


図4 運動野の錐体細胞の傍細胞記録 (ref.11より改変転載)

A: 運動野の第V層に位置する錐体細胞。この細胞はレバーを引く直前に発火活動が高まった。運動の準備に関与している可能性がある。

B: 傍細胞記録により得られた運動野の錐体細胞と介在細胞 (FS) の皮質内分布。各局面に活動する細胞が浅層にも深層にも分布していた。錐体細胞は運動発現に対して多様な活動を示すが、介在細胞 (FS) は運動の実行に活動するものが大半であった。