

Title	神経細胞の情報伝達機構に基づくシナプス可塑性モデル
Author(s)	鳥居, 鉦太郎
Citation	
Issue Date	1997-09
Type	Thesis or Dissertation
Text version	author
URL	http://hdl.handle.net/10119/850
Rights	
Description	Supervisor: 國藤 進, 情報科学研究科, 博士

博 士 論 文

神経細胞の情報伝達機構に基づくシナプス可塑性モデル

指導教官 國藤 進 教授

北陸先端科学技術大学院大学
情報科学研究科情報処理学専攻

鳥居 鉦太郎

1997 年 7 月 10 日

要 旨

神経細胞が持つ可塑的性質は学習・記憶の初期過程の候補として考えられており、ここに現在の情報処理理論に存在しない、新たな情報処理機構のヒントが隠されている可能性が高い。この性質を参考にするためには、まず情報がいかに表現され、またその情報がどのように伝達されて保持されるのかといった基本的機能を、その基本素子である神経細胞でとらえる必要がある。そこでこうした機構の鍵をにぎると思われるシナプスの可塑性に注目し、素量解析法の改良ならびに実験データの解析を行った。さらにこの結果から神経情報の伝達機構を検討し、生理学実験により時間パターンによる可塑的性質を明らかにした。

神経情報の伝達機構解明には、シナプスにおける神経伝達物質の放出機構を明らかにする必要がある。このためには得られた実験データの正確な解析が重要となる。この解析手法として素量解析法が知られるが、シナプスから得られる微小信号はノイズの影響を受けやすく、その精度には限界があった。そこで素量解析法のうちノイズによる影響を減少させる手法として進んでいると考えられる MEND(Maximum Entropy Noise Deconvolution)法の改良を試みた。この改良版は、実験データを離散データとして扱う際に、より精度の高い数値積分方式を用いてもとの情報をなるべく忠実に利用する方法を取り入れたものである。本改良版ではシミュレーション実験を行い、従来手法よりも良好な解析結果が得られるものであることを示す。さらに海馬の単一シナプスから得られた実験データに適用し、シナプスにおける神経伝達物質の素量放出量に大きな変動があることを明らかにする。

つぎに、素量解析の結果からシナプスにおける素量放出サイトでの状態遷移を検討し、刺激のタイミングがシナプス可塑性に重要であることを示す。情報の表現手段として従来から刺激の平均頻度が考えられてきたが、時間間隔の異なるパルス列が平均頻度と同じく重要な要素となりうる可能性を検討した。刺激に用いるパルス列は長・短 2 種類の刺激間隔を設定し、これを平均頻度は同じまま自己相関係列の異なるパターンとした。この時間パターン刺激はラット小脳プルキンエ細胞に投射する平行線維群に対して行い、パッチクランプ法を用いて異なるパターン刺激が異なる応答変化を引き起こすことを明らかにする。この結果は平均頻度は一定のままで、刺激パターンの違いにより情報を表現できることを示すものである。さらに、時間パターン刺激による抑制側から増強側までの応答変化を検討することにより、神経可塑性モデルの構築に大きなヒントを与えることを示す。

目 次

1	序論	1
1.1	はじめに	1
1.2	研究の背景	3
1.2.1	生理学的アプローチ	3
1.2.2	工学的アプローチ	9
1.2.3	統合的アプローチ	10
1.3	本研究の目的	11
1.4	本論文の構成	14
2	学習・記憶機構研究の現状	16
2.1	はじめに	16
2.2	海馬・小脳	17
2.3	神経細胞	18
2.4	シナプス	18
2.5	情報の表現方法と学習則	19
2.6	まとめ	20
3	神経伝達物質の素量解析	21
3.1	はじめに	21
3.2	概要	22
3.2.1	シミュレーション	23
3.2.2	解析モデルの改良	24
3.3	素量解析法	24

3.3.1	シナプスにおける神経伝達物質の放出機序	24
3.3.2	シナプス前膜・後膜の働き	26
3.4	シミュレーションデータの生成	28
3.4.1	素量放出およびノイズの仮定	28
3.4.2	データの生成	31
3.5	MEND による素量解析	33
3.5.1	MEND の基本原理	33
3.5.2	MEND の計算方法	35
3.6	MEND の改良と実験結果	37
3.6.1	MEND の改良	37
3.6.2	シミュレーション実験の結果	40
3.7	まとめ	56
4	単一シナプスの実験データを用いた素量解析	57
4.1	はじめに	57
4.2	実験の概要	58
4.2.1	測定部位	58
4.2.2	実験の方法	59
4.2.3	モノシナプスでの測定	60
4.3	実験データの素量解析	61
4.3.1	従来の手法による解析	62
4.3.2	使用データ	63
4.3.3	MEND 改良モデルによる解析	67
4.3.4	解析結果における q の妥当性	79
4.4	まとめ	80
5	時間パターン刺激の検討と電気生理実験	81
5.1	はじめに	81
5.2	神経細胞における情報の伝達方式	82
5.2.1	シナプス前膜における素量放出	82
5.2.2	基本素子としての神経細胞	85

5.2.3	時間コーディング	87
5.3	Hebb 型学習則とその問題点	89
5.3.1	Hebb の概念による学習則	89
5.3.2	Hebb 則の拡張表現	90
5.3.3	減衰項と飽和の問題	91
5.3.4	コバリアンス則と B C M 理論	91
5.4	時間パターン刺激による実験	94
5.4.1	実験の準備	94
5.4.2	実験設備のセットアップ	94
5.4.3	小脳スライスおよびプルキンエ細胞	95
5.5	実験の手順	98
5.5.1	パターン列の生成とトリガープログラム	98
5.5.2	時間パターン刺激で用いるパルス列	102
5.5.3	パターン刺激およびテスト刺激の方法	102
5.5.4	パッチクランプ	105
5.5.5	電気生理実験	106
5.6	まとめ	110
6	実験結果およびシナプス可塑性モデル	111
6.1	はじめに	111
6.2	同一細胞による連続実験の結果	112
6.2.1	15 秒間の刺激応答の変化について	112
6.2.2	15 秒間刺激前後の変化について	112
6.3	異なる細胞を用いた追加実験	117
6.3.1	実験の基準	117
6.3.2	実験結果	117
6.3.3	実験結果の考察	118
6.4	パターン刺激中の応答特性	121
6.5	各パターン内における応答波形の観察	124
6.5.1	正の相関のパターン	124
6.5.2	負の相関のパターン	125

6.5.3	定常	125
6.5.4	無相関のパターン	125
6.5.5	実験結果のまとめ	131
6.6	時間刺激によるシナプス可塑性機序の仮説	135
6.6.1	シナプス可塑性を生ずる要因	135
6.6.2	シナプスモデルの検討	137
6.7	まとめ	138
7	結論と今後の課題	139
7.1	結論	139
7.2	今後の課題	140
	謝辞	142
	参考文献	143
	本研究に関する発表論文	149

目 次

1.1	分子レベル	4
1.2	細胞レベル	5
1.3	細胞間シナプス結合レベル	6
1.4	閉回路レベル	7
1.5	統合されたネットワークレベル	8
1.6	行動レベル	8
1.7	本論文の構成	15
3.1	シナプス伝達	25
3.2	素量と興奮性シナプス後電位	26
3.3	シナプス前膜説	27
3.4	シナプス後膜説	28
3.5	素量放出の分布	29
3.6	ノイズの分布	30
3.7	コンボリューションした分布	32
3.8	乱数による放出確率	33
3.9	シミュレーション用データ(件数)	34
3.10	シミュレーション用データ(確率)	35
3.11	MEND 改良版の計算方法	39
3.12	最尤推定だけによる結果	40
3.13	エントロピーの効果	41
3.14	MEND(I) による $\lambda = 0.3$ の結果	42
3.15	MEND(I) による $\lambda = 0.9$ の結果	44
3.16	MEND(I) による $\alpha = 0.05$ の結果	45

3.17 MEND(I) による $\lambda = 0.64$ の結果	46
3.18 MEND(II) による $\lambda = 0.72$ の結果	47
3.19 2 サイトの放出分布	47
3.20 ノイズをコンボリューションした結果	48
3.21 もとの分布とノイズをコンボリューションした結果	48
3.22 生成したデータ	49
3.23 データ数 500 件による結果	49
3.24 データ数 50 件による結果	50
3.25 データ数 5,000 件による結果	50
3.26 シミュレーション用データ	51
3.27 MEND 改良版による $\lambda = 0.7$ の結果	52
3.28 $\lambda = 0.6$ の場合	53
3.29 各 MEND 法の特徴	54
3.30 変曲点 (シミュレーション)	55
4.1 海馬スライスと測定部位	59
4.2 集合的なシナプス	61
4.3 モノシナプス	62
4.4 モノシナプスの実験データ	65
4.5 ヒストグラム (1 - 500 件)	65
4.6 ヒストグラム (1 - 250 件)	66
4.7 ヒストグラム (251 - 500 件)	66
4.8 ノイズの標準偏差 = 1	69
4.9 ノイズの標準偏差 = 2	69
4.10 ノイズの標準偏差 = 4	70
4.11 ノイズの標準偏差 = 6	71
4.12 ノイズの標準偏差 = 8	72
4.13 ノイズの標準偏差 = 10	73
4.14 500 件	73
4.15 前半・後半の分布	74
4.16 前半 250 件	74

4.17 後半 250 件	75
4.18 変曲点 (実験データ)	75
4.19 q の変化 (100 件ごと)	77
4.20 m の変化 (100 件ごと)	77
4.21 q の変化 (50 件ごと)	78
4.22 m の変化 (50 件ごと)	78
5.1 Hebb 則とその拡張モデル ([52] を修正)	92
5.2 パルス列	100
5.3 定常刺激と各パターン刺激	103
5.4 テスト刺激とパターン刺激	105
5.5 実験手順の概要	107
5.6 スライスの作成およびパッチクランプ	108
5.7 平行線維と小脳プルキンエ細胞	108
6.1 刺激中の応答 (定常刺激)	113
6.2 刺激前後の応答 (定常刺激)	113
6.3 刺激中の応答 (正の相関のパターン刺激)	114
6.4 刺激前後の応答 (正の相関のパターン刺激)	114
6.5 刺激中の応答 (負の相関のパターン刺激)	115
6.6 刺激前後の応答 (負の相関のパターン刺激)	115
6.7 刺激中の応答 (無相関のパターン刺激)	116
6.8 刺激前後の応答 (無相関のパターン刺激)	116
6.9 パターン刺激中の反応 (正の相関のパターン刺激)	122
6.10 パターン刺激中の反応 (定常刺激)	122
6.11 パターン刺激中の反応 (負の相関のパターン刺激)	123
6.12 パターン刺激中の反応 (無相関のパターン刺激)	123
6.13 応答波形 (正の相関 : その 1)	126
6.14 応答波形 (正の相関 : その 2)	126
6.15 応答波形 (定常 : その 1)	127
6.16 応答波形 (定常 : その 2)	127
6.17 応答波形 (定常 : その 3)	128

6.18 応答波形（負の相関：その１）	128
6.19 応答波形（負の相関：その２）	129
6.20 応答波形（負の相関：その３）	129
6.21 応答波形（無相関：その１）	130
6.22 応答波形（無相関：その２）	130
6.23 応答波形（無相関：その３）	131
6.24 パターン刺激の違いによる実験結果	133
6.25 相関係数と応答強度の割合における想定した変化の関係	134
6.26 シナプス活性の状態遷移	136

表 目 次

3.1	λ と各適合度検定量の値	43
3.2	各 MEND の計算で扱う数値計算方式の違い	54
4.1	q, m の値 (5 0 0 件)	68
4.2	q, m の値 (2 5 0 件ごと)	70
4.3	q, m の値 (1 0 0 件ごと)	76
4.4	q, m の値 (5 0 件ごと)	76
5.1	m の標準偏差 (5 0 件ごと)	83
5.2	おもな実験装置	96
6.1	刺激中における興奮性シナプス後電流の総和の比較	112
6.2	15 秒間刺激前後の興奮性シナプス後電流の比較	112
6.3	追加実験の結果 (定常刺激)	119
6.4	追加実験の結果 (正の相関のパターン刺激)	119
6.5	追加実験の結果 (負の相関パターン刺激)	119
6.6	追加実験の結果 (無相関のパターン刺激)	120
6.7	追加実験の結果 (パターンごとの平均)	120
6.8	パターンごとの応答強度順位 (追加実験)	120

第 1 章

序論

1.1 はじめに

近年のハードウェア技術ならびにソフトウェア工学の進展により、かつては困難とされた情報処理がコンピュータにより可能となっている。しかしヒト脳に代表されるほ乳類の脳が持つ機能は多岐多様であり、多くの分野でいまなおコンピュータによる知能情報処理では実現不可能な部分が多い。脳の機能を考える際に重要な項目としてつぎの4点が挙げられる。

- 情報がどのように脳内の符合として表現されているのか
- 神経線維により符合がいかに伝達されているのか
- 伝達された符合がいかに保持されるか
- 保持された符合が必要な時どのようにして情報としてとり出されるのか

以上の問題は脳の機構を探る上で根本的な問題であり、神経細胞や神経回路網、あるいはより高次の機能レベルで研究を行う際に重要である。本研究では、始めの2項目に関連する基礎研究として実験データの解析ならびにモデルの構築を行う。具体的には、脳の神経細胞を参考にした学習モデル構築のため、工学的手法を用いた生体信号の素量解析によるシナプス伝達モデルを検討し、さらに時間パターンによる伝達信号の符合化を提案してその妥当性を確かめるための電気生理実験を行った。これにより、生理工学的に非常に興

味のある脳、特に学習・記憶に関与すると考えられている海馬や小脳のモデルの研究に、大きなブレークスルーをもたらそうとするものである。

人類の歴史は200万年前のアウストラロピテクスに始まる。ヒトはこの間に急速な進化、特に脳の形態的・機能的変化により、他の哺乳類にみられない高次の機能を得るに至った。脳の進化は生命の古い脳を原点に、その上に新たな部分が構築されるという、系統発生的に爬虫類脳(旧皮質)、下等哺乳類脳(古皮質)、高等哺乳類脳(新皮質)と積み重なって行われた。それぞれの脳の機能は本能的行動(旧皮質)、情緒的行動(古皮質)、理性的行動(新皮質)を司る。特に高等哺乳類では新皮質が急速に膨らみ、旧皮質、古皮質が内側にたたみこまれて辺縁系を構成するようになった。脳が持つ機能には、認識、運動、情動、学習・記憶、意識などがあり[1]、これらの機能が複雑に関連し合うことにより、ヒトがヒトらしく生命活動を行うものと考えられる。ヒト脳は、デオキシリボ核酸(DNA:Deoxyribonucleic Acid)、大脳新皮質について第3の記憶ともいわれる言語や道具を生み出した。さらに外界の変化(情報)を敏感にとらえ、過去の体験から内的環境を調整し、また社会的行動を行うことにより、地球上で画期的な繁栄をもたらした。脳はいったいどのように構築され、機能しているのだろうか。この課題は今日の科学における、残された最後のフロンティアのひとつであるともいえるのではないだろうか。

脳 - 中枢神経系のはたらきは、人体の中でも特に不明な点が多い。これはミクロな世界で非常に多くの細胞が連絡しながら複雑な機能を持ち、またヒトの場合は直接手を触れることがほとんどできないことによる。また認識、情動、学習・記憶、意識といったものがいったいなにかという根本的な問題が、いまなお不明確であることにもあるといえよう。こうした状況下で、脳の解明には短くても数百年の歳月を必要とするかもしれないし、さらにそれが可能である保証はどこにもない。しかし、その解明は人間の理解はもとより、脳に起因するさまざまな障害である神経疾患、精神疾患などの原因究明の鍵として大きく期待されている。また長い間の進化により巧みに構築された脳の神経回路網、およびその運用システムには、現代の科学が持たないすぐれた洞察が秘められているかもしれない。こうした点を踏まえ、本研究は従来にない学習・記憶モデルの構築の基礎研究をなすものである。

1.2 研究の背景

1.2.1 生理学的アプローチ

成人で重さ 1,400 グラム、容積 1.4 リットル前後 [2] あるというヒト脳は、神経細胞（ニューロン）、神経線維、グリア細胞、血管などから構成される。脳全体で神経細胞は 10^{10} 個以上あり、その 10^3 倍以上もの細胞間連絡により神経回路網が形成され [3]、高次の神経活動（情報処理）が行われている。神経細胞は大腦皮質に 140 億あると推計され [4]、また運動の調節機能を持つ小脳では 1,000 億以上あると考えられている。グリア細胞は神経細胞の 5～10 倍の数があり、神経系での体積の半分を占め、信号の伝導を早めるなどの働きがある [5]。これらの構成要素のうち、パルス信号の伝達が行われている神経細胞は高次機能を司る重要な要素であり、脳の情報処理はこの細胞が基本素子となる神経回路網により行われていると考えられている [2]。

神経細胞網において、神経細胞は複雑な情報を単純な電気信号に符合化し、情報の伝達を行っているらしい。また脳が行う情報処理は、発生した電気信号が符合化され、ネットワーク上を流れながら保存、解読されることにより行われると考えることができる（これは学習・記憶機能ととらえることもできる）。こうした点を踏まえ、脳の働きを解明するためのアプローチは、例えばミクロからマクロへ、つぎの各レベルに分けて考えることができる [6]。

- 分子・遺伝子レベル
- 細胞レベル
- 細胞間シナプス結合レベル
- 閉回路レベル
- 統合されたネットワークレベル
- 行動レベル

これらを簡単にまとめると、各レベルのアプローチは以下のとおりとなる（各図は [6] をもとに作成）

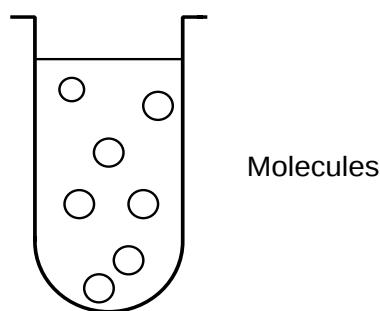


図 1.1: 分子レベル

- 分子・遺伝子レベル

神経細胞を構築する分子のレベルにおいて、分子生物学的にその化学構造や合成、分解の過程、タンパク質や細胞膜の構造を解明する。また近年研究成果の著しい遺伝子のレベルにより、発生統御機構の解明が期待される。

このレベルでは、神経細胞網が持つ情報処理機能に直接触れることはないものと思われるが、細胞の形態的变化の解明などで重要な位置をしめる。

- 細胞レベル

1 つの神経細胞について、その発生から成長の過程、軸索輸送や軸索における信号の伝達などの仕組みを解明する。

電気生理学の分野ではつぎの「細胞間シナプス結合レベル」とともに、シナプスにおける電気信号、化学物質による信号伝達の仕組みの研究が盛んに行われている。細胞の発生から成長に至る過程では、細胞から通常 1 本だけ伸びる軸索がどのようにして行き先を決め、分岐しながら他の細胞と結合するのか、またアルツハイマー症や惚けとも関連して、神経細胞の萎縮および死はどのように決められているのか、非常に注目されている。

図 1.2 で、丸印は 1 つの神経細胞を表し、そこから伸びる線が信号を伝える軸索を表している（以下同様）。図 1.2 では 1 つの濃い黒丸に注目している。

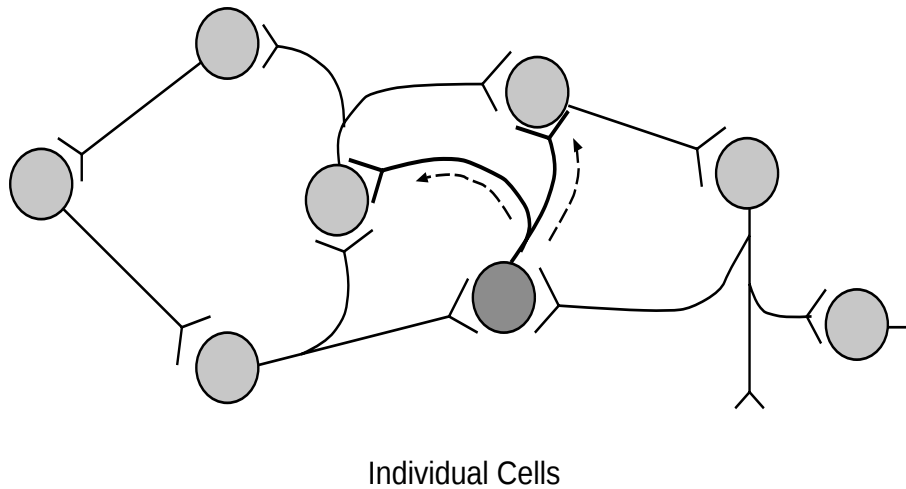


図 1.2: 細胞レベル

- 細胞間シナプス結合レベル

細胞から細胞への信号伝達について、シナプスの結合位置や信号の伝達方法、また信号伝達による結合部位の形態的・機能的変化について解明する。

特にシナプスにおける前膜の神経伝達物質、後膜にある受容体における研究は盛んで、これらがどのように作用し合ってシナプスにおいて信号が伝達されているのか、この解明が生理学上の大きな課題となっている。

実験手法としては、例えば微小電極を用いたパッチクランプ法 [7] による細胞内電位や細胞内電流の測定が行われている。また最近では、オプティカルレコーディングといった光計測法 [8] も行われている。この方法は、従来手法では困難だった海馬スライス平面上などにおける回路網レベルの計測で、大きな成果が期待されている。ところがどの方法も細胞体を傷つけることには変わらず、さらには顕微鏡下 (*in vitro*) による実験がどこまで生体 (*in vivo*) として通用するかといった実験手法上の問題がある。しかしながらこのレベルにおける実験研究は盛んに行われており、重要な知見も多く蓄積されている。またモデル構築の立場から考えると、このレベルでは神経細胞を回路網の基本素子としてとらえやすく、重要なレベルである。

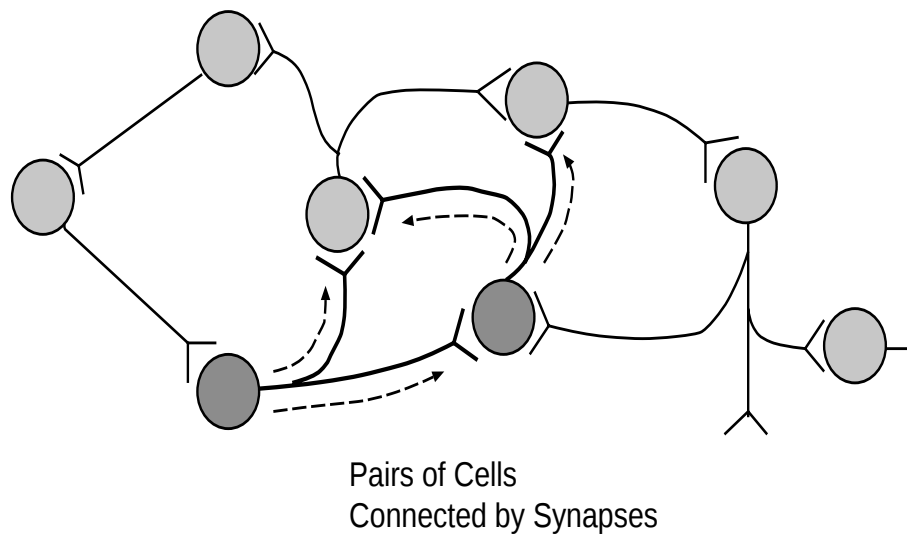


図 1.3: 細胞間シナプス結合レベル

- 閉回路レベル

複数の神経細胞が相互に結合して構成される、あるひとつの閉じた回路（閉回路）について、その機能や経路の維持について解明する。

神経細胞はさまざまな閉回路を構築しており、高次機能の基本的な部分はその回路によって獲得されと考えられる。例えば学習・記憶で考えると、信号がその閉回路を何回も通過することにより、しだいに記憶が定着するのではないかと考えられている。生理学的には古典的なペーペッツの回路がある。これは海馬から脳弓、乳頭体、視床前核を通り帯状回などに至る回路 [9] で、この回路が大腦皮質と接する部分で情報の定着（長期の記憶）が行われるのではないかと考えることができる。しかし閉回路はこのほかにも数多く存在することが分かっている程度であり、特定の閉回路をある機能と結び付けることはできていない。脳の各機能がどの回路によるものであるかといった研究は、いまの段階では難しいのが現状である。情報表現の立場からこうした回路が形成されるとするスパースコーディング仮説は、記憶容量の点からも注目されており、生理学的な支持も強くなってきている。

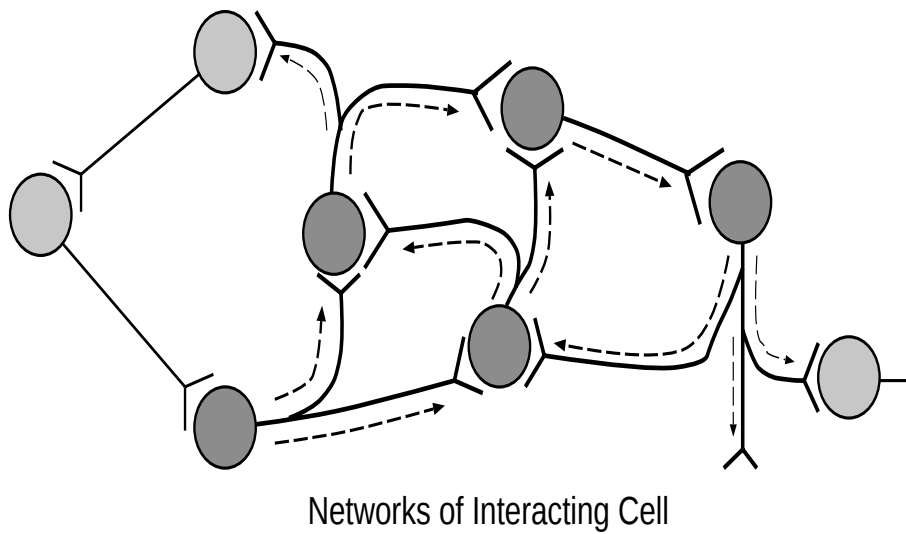


図 1.4: 閉回路レベル

- 統合されたネットワークレベル

脳の複数の回路網が連合し、ひとつの高次機能として働くメカニズムを解明する。

現在、脳のマクロ的解明では無侵略測定装置の開発などで臨床的な知見が増え、画期的な成果を収めつつある。ここでは機能地図とも関連して個体レベルの学習・記憶に視点が置かれる。またマクロ的視野からミクロ的視野に至る階層間において両者の基本コードはなにかといった理解が望まれる。

- 行動レベル

人間の行動面から、脳の機能との関連を解明する。

動物実験や記憶障害を持つヒトの臨床実験、心理学的実験により、脳の振舞いを明らかにしていこうとするものである。このレベルから得られる知見は、より下のレベルにも大きな示唆を与えることとなる。

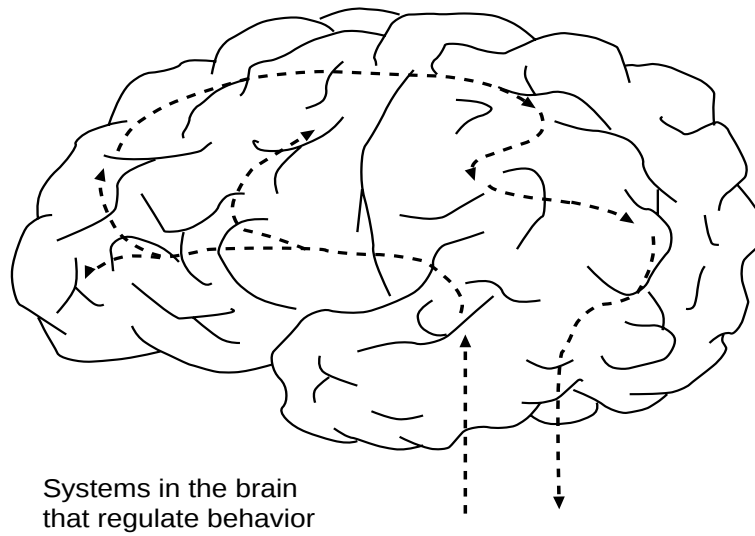


図 1.5: 統合されたネットワークレベル

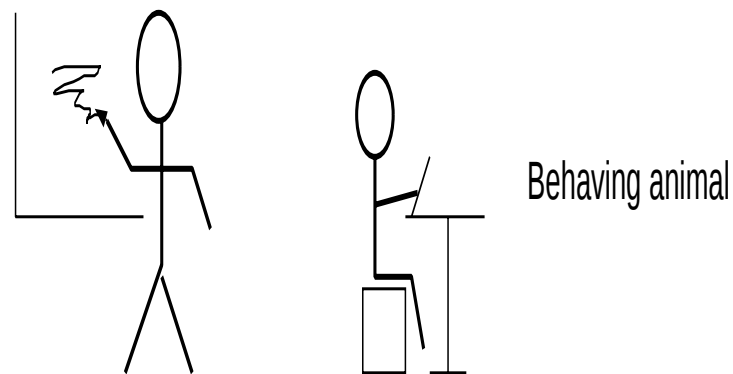


図 1.6: 行動レベル

以上の各段階は、どれもが関連を持ちながら研究されていかなければならず、またどれが欠けても十分な説明は不可能である。基本要素である神経細胞の振舞いを、分子生物学的、生理学的に把握しなければ、その要素が結合した時の振舞い、さらにはネットワークを構成した時の役割を論じることは難しいと思われる。木を見て森を見ず、またこれの逆でもいけない。近年の分子生物学の進歩により、遺伝子がすべてを語ると想定することも可能となっているが、ある瞬間の量子論的状态は語れても脳の高次機能を説明するにはな

お多方面からのアプローチが必要であると考えられる。生理学的アプローチは比較的微視的な立場であるが、ミクロからのボトムアップ的に行う方法、そしてマクロからトップダウン的に行う方法について、科学全体として、どちらかに偏ることなく研究は進められるべきであろう。またいままで見てきたように、医学・生理学の中の特定分野だけで脳の高次機能にせまることは能率が悪く、工学的手法による解析や電子機器の使用が重要なようになってきている。

1.2.2 工学的アプローチ

工学的アプローチにはふたつの方法が考えられる。ひとつは脳の構造はブラックボックスのまま、その振舞いを真似た工学モデルを構築するというものである。この場合は工学的応用がおもな目的となり、実際の脳における情報処理と内容が異なってもかまわないし、同一にする必要はまったくない。ただしブラックボックスの中身を解析することなどにより、新たな生理学的仮説を生み出す余地もあるといえよう。

もうひとつの方法は、複雑な脳の機能を生理学的知見をもとになるべく忠実にモデル化し、また知見の少ない部分については生理学に対して提案を行いながら、その仕組みに迫ろうというものである。この工学的手法の導入は、微細で複雑な対象において、生理学的手法では困難な問題に応用可能な部分がある。例えば生体での実験に制約のある脳に対し、特にコンピュータによるシミュレーションは、力を発揮するのではないだろうか。神経細胞間の連絡は、電気信号によるものと分かっている。またこの信号の伝搬は、全か無かの法則 (all-or-none law) にしたがっており、アナログ信号を巧みにデジタル表現で扱っている面がある。さらに信号処理面では、工学には長い間の技術的蓄積がある。これらの点で、コンピュータによるモデリングは都合が良い。

では、いままでにどのような成果を工学的アプローチはもたらしたであろうか。代表的なものとして、小脳における可塑性機構の存在を预言するモデルが David Marr によって構築されたことが挙げられる [10]。この機構は後に長期抑圧 (LTD: Long Term Depression) として生理学的に確かめられている [11, 12] が、Marr のモデルが直接に長期抑圧の存在を示唆したものではなかったにせよ、モデルの立場から可塑性機構の存在を指摘したものである。なお長期抑圧とは、興奮 (発火によるインパルス) をつぎのニューロンへ伝える働きをする興奮性のシナプス伝達効率が長時間継続する長期増強 (LTP: Long Term Potentiation) に対し、逆につぎのニューロンへの興奮を抑える抑制性のシナプス伝達効率が長時間継続

する現象をいう。

また小脳は運動の発現や姿勢の調整機能の一部他を司る部位と考えられており、工学的にも運動制御面で注目を集め、小脳を参考にした運動制御モデル [13] も考案されている。大脳でも基本的な知見はその機能に比べてまだ乏しく、全体のモデル化にはさらに困難が予想されるが、辺縁系において海馬に関連した学習・記憶方式に関してのモデル化が現在盛んに行われている。こうした中で生理学的知見をとりいれ、新たな示唆をもたらしたモデルとして、海馬にみられる θ 波のリズムを考慮したペーパッツ回路による連想記憶モデルの研究 [14] などがある。

以上のとおり、工学モデルは複雑な脳の高次機能についてその基本的なメカニズムを検討するのに有効な手段であるといえる。さらにこうしたモデルは、生理学実験に対して、その実験指針を与えるものとしても期待される。神経細胞網などを対象とする生理学実験は、近年急速に実験技術が高度化し多くの知見が蓄積されているにもかかわらず、多くの困難をかかえている。困難の一つとして、実験の指針を立てる際の仮説の構築過程が複雑であることが挙げられる。ここで基本メカニズムに注目した工学モデルは、その方向性を示すものとしても大きく期待される。

1.2.3 統合的アプローチ

神経情報機構の理論面での研究として、生理実験による確認がまだ不可能だった 1940 年代において W. McCulloch と W. Pitts が考えたニューロン素子を基本とする神経回路モデルや、D. Hebb により考案されたシナプス学習則であるヘップ則に遡ることができる。また D. Marr は解剖学的な見地に基づき、1969 年に小脳における学習理論を提案した。その後、1980 年代になって伊藤により小脳におけるシナプス伝達効率の低下が長期抑圧として発見され、Marr の計算理論は生理学的事実に合致しなかったものの、脳の計算理論と生理学の接近がはかられた。また 1973 年には T. V. P. Bliss と T. Lømo によってシナプスにおける伝達効率の長期増強が海馬において確認されている。学習・記憶機能を考える際はその痕跡となるものを特定する必要があるが、長期増強と長期抑圧はその有力な候補と考えられている。

心理学、生理学の両面からその妥当性が指摘されている記憶の分類として、L. R. Squire が提唱する宣言的記憶（陳述可能な事実を対象）と手続き的記憶（陳述できない技能的な記憶）がある。記憶に種類があることは、脳の高次機能のレベルで考えた場合、その記憶

メカニズムの違いが考えられる。しかし、より基本となる神経細胞における信号伝達方式または可塑的性質を考えた場合、そこには普遍的に説明できる統一理論の存在が予想される。すなわち、脳は神経細胞が機能的に結合した集合体として機能しているものの、記憶対象は一度符合化する必要があり、個々の神経細胞の基本的な情報表現の仕組みは統一されたものであると考えられるからである。学習・記憶機能の解明にはさまざまなアプローチ方法が考えられるが、以上の各アプローチ方法を統合した視点から情報伝達機構の解明が期待される。

1.3 本研究の目的

本研究の目的は、神経細胞が持つ可塑的性質のモデル化にある。そこで単一シナプスにおける素量放出の振舞いを解析し、この結果から時間コーディングによるモデルを提案し、さらに実験による検証を行う。これは従来からのポピュレーションコーディングによる平均頻度を用いた学習モデルとは異なるもので、時間情報による神経可塑性機構としての学習・記憶モデル構築を目指すものである。

まず、神経細胞のシナプスにおいて行われる情報伝達機構の仕組みを明らかにするため、その解析手法を検討した。生体を用いた実験では、微小な電流を測定するためにわずかなノイズが大きく測定結果に影響し、また一般的にデータ件数が少ないため、実験データの解析法の善し悪しが解析の精度に大きな影響を与える。素量解析はこうした実験データの解析法として期待される一手法であるが、なかでも D. M. Kullmann の提案する MEND(Maximum Entropy Noise Deconvolution) [15, 16] は、もとの信号分布を一切仮定せずに推定を行うといった、従来手法よりも進んだ計算方式である。この方式では、測定された信号が、もとの信号にノイズが加算されたものとする。そこでもとの信号分布とノイズ分布が確率事象として独立した分布であり、実験で得られた信号の分布がこれらのたたみ込みにより得られたものとしてとらえ、仮定したノイズの分布を逆たたみ込み演算してもとの信号分布を得ようとするものである。この手法の有効性を、MEND で導入された平滑化の項による影響を明らかにしながらシミュレーション実験により示した。また、MEND がデータの瓶詰めを基本としていることから貴重なデータをまとめて解析する方式であることを指摘し、これが解析結果を荒くする可能性を示した。そこで高精度な数値積分の導入による改良を施し、特にデータ件数が少ない場合でも、精度の高い解析が行える MEND 改良版を提案した。さらに、高度な実験手法により測定された 1 本の神経線維接続(モノシナプス)に

よるデータを用いて、同一のデータに対する従来手法と MEND 改良版の解析結果を比較した。ここで推定された信号分布におけるピークは、シナプスにおいて放出される素量数（神経伝達物質を含む小胞の数）に対応する。解析結果により、従来手法では 2 個目以降のピーク推定が困難であったのに対し、MEND 改良版では少なくとも 3 個目までの明確なピークを得ることができ、改良版がより有効な解析法であることを示した。これは素量の放出が 1 個、2 個、3 個と整数倍に放出されるとする従来から考えられてきた生理学的理論を、実験データの解析から支持するものである。また同一の刺激であっても、シナプスにおける神経伝達物質の放出素量には、かなりのばらつきがあることを示唆した。

生体における振舞いとして、一般的にゆらぎやカオス、あるいはノイズなどによる変動の可能性は従来から指摘されているが、シナプスにおいて素量放出数のばらつきが確認されたことは、従来考えられてきたシナプス伝達のメカニズムに新たな知見を提供するものである。従来から、比較的实验観察の容易な神経筋におけるシナプスでは、素量の放出が整数倍に対応して放出されることはよく知られている。しかし細かく複雑に線維が絡み合う中枢神経系では実験そのものが困難であり、比較的多数のシナプスによる集合電位での測定が主であった。そこでモノシナプスによる実験データをもとに、神経伝達物質の放出量が前膜に到達したパルスの大きさに対して不安定であることを示したことは、シナプス後膜との化学伝達の際に、多様な機能あるいは機構を提供する可能性があると考えられる。すなわち、シナプス結合の強度はシナプス前膜、後膜、あるいは両方により修飾されると考えられているが、伝達物質放出のばらつきにより結合荷重に変化をもたらす可能性がある。これまで神経細胞の可塑性機構の一部として、前膜へ到達したパルスの平均頻度が注目されてきた。ここで平均頻度は伝達物質放出と直接関連付けられており、長期増強や長期抑圧といったシナプスにおける修飾以外では、化学伝達の変動はあまり考慮されていなかった。しかし数多くある同一神経細胞上のシナプスでは、それぞれの活性状態がたがいに影響し合う現象が確かめられている。このことは、化学伝達の変動によりパルスの平均頻度だけでは表現されないメカニズムが存在する可能性を示唆するものとして重要な知見である。そこでこうした点をふまえた神経情報の伝達機構を考案し、それをシナプス可塑性モデルとして構築する。

脳の部位によって神経細胞の形態やそのネットワーク構造には大きな違いがあるが、進化の過程ないしはこれまでの生理学的知見から、個々の神経細胞自体は基本素子としてある程度統一された機構を持つ可能性がある。そこでシナプス可塑性のモデルを構築する際、

現在確認されている 2 種類の可塑的性質、長期増強および長期抑圧両方の現象を実現可能とするモデルが望まれる。本研究では長期増強と長期抑圧を神経細胞が持つ基本メカニズムとしてとらえ、基本素子として神経回路網に応用可能なモデルを検討する。ここでは長期増強と長期抑圧をなんらかの指標で連続的に起きる現象として検討する。Hebb によるシナプス結合荷重強化の概念 [17] 以来、神経細胞の学習則として、T. J. Sejnowski が 1977 年に提案したコバリエンス学習則 [18] や E. Bienenstock らが 1982 年に考案した BCM 理論 [19] などが考えられてきた。これらの理論は、シナプス前膜と後膜の興奮強度の相関により、その結合度すなわち可塑的变化が生じるというものである。しかしこれらは多くの場合、細胞への入力信号をパルスの平均頻度でとらえた興奮強度で説明しており、情報のキャリアとしてなにが重要なのかという点の説明に乏しいものであった。本研究で提案する可塑性理論は、刺激パターンの種類によりシナプスの伝達効率が抑制側から増強側まで連続的に変化するというものである。ここで従来の学習則が 1 回の発火による荷重変化や一定時間の平均頻度刺激、さらには後膜における膜電位という要素でモデルの構築が行われているのに対し、パターン刺激前後におけるシナプス結合の荷重変化に注目するものである。

パターン刺激で用いるパルス列の間隔は 2 種類用意し、この組合せを確率的な計算を行って相関係数の指標で表した刺激パターンを用いた。ここで一次の統計量としてパターン刺激の平均パルス頻度はすべて同一とし、パルス間隔のみが異なるものとした。パターン刺激の種類は正の相関 (Positive correlation)、負の相関 (Negative correlation)、無相関 (Uncorrelate) の 3 種類を用いた。また比較のためにパルス列の時間間隔がすべて等しい定常刺激 (Regular stimuli) も用意した。脳のモデルを構築する際、その生理学的検証は必須である。そこでパターン刺激がシナプス学習則モデルとして生理学的に妥当なものであるかを明らかにするために、ラットの小脳スライスを用いた電気生理実験を行う。実験で対象とした部位はプルキンエ細胞と平行線維間に存在するシナプスである。このシナプス結合では長期増強ならびに長期抑圧がすでに確認され、モデルの検証として適すると同時に運動制御にかかわる可能性も指摘されており、工学的に興味深い部位である。実験では、平行線維でパターン刺激した前後において、プルキンエ細胞の応答変化をパッチクランプ法により測定する。その結果、パターンの刺激間隔が無相関の場合は細胞からの応答出力は抑制され、逆に正の相関が強いと増強されるといった予備的結果が得られた。同一の平均刺激頻度で、抑制側から増強側に至る応答変化を得た実験結果は従来の生理学的知見には

存在せず、この結果は平均頻度に時間パターンを考慮した、シナプスの可塑的な情報伝達について新たな情報のコーディング理論の存在を示唆するものである。さらに実験結果についていくつかの生理学的仮定を行い、パターンの違いとシナプス可塑性変化の関係を考察した。

以上のとおり、本研究では神経情報の信号伝達機構の特質の一部を解明すると同時に、それをもとに学習・記憶の素過程をになうものとして脳の可塑性機構をモデル化し、その妥当性を実験的に示すことを目的とする。これらの結果は、情報の表現方法としてコーディング/デコーディングの機構解明で議論されている問題に対し、時間パターンによる情報の符合化による情報処理機構を示唆するものとしても期待される。

1.4 本論文の構成

本論文の構成は、第1章「序論」から第7章「結論」まで、全7章からなる。全体の流れを図1.7に示す。各章の内容はつぎのとおりである。

まず第1章（序論）では本研究が対象としている研究分野が生物学、工学にまたがる学際的研究であることもふまえ、両分野における背景や学際研究の必要性を指摘し、本研究の意義と目的を明らかにする。

第2章（学習・記憶機構研究の現状）では、脳を模倣する際に注目される海馬・小脳について、学習・記憶機構に関連する研究の現状について、述べる。

第3章（神経伝達物質の素量解析）では、素量解析法の検討および改良を行い、シミュレーション実験ならびに実験データの解析に適用し、その有効性を明らかにする。

第4章（単一シナプスの実験データを用いた素量解析）では、第3章で改良を施した素量解析の改良版を用いて、海馬モノシナプスにおける信号伝達機構の一部を明らかにする。

第5章（時間パターン刺激の検討と電気生理実験）では、第4章で得られた結果をもとに、情報の脳内表現において、パルス列の時間パターンが情報表現を可能とする可能性を検討し、これに基づいた実験を提案する。

第6章（実験結果およびシナプス可塑性モデル）では、実際にラット小脳を用いた電気生理実験を行い、第5章で検討したパターン刺激によるシナプス可塑性機構の妥当性について検討する。

第7章（結論）では全体の結論と今後の課題について述べる。

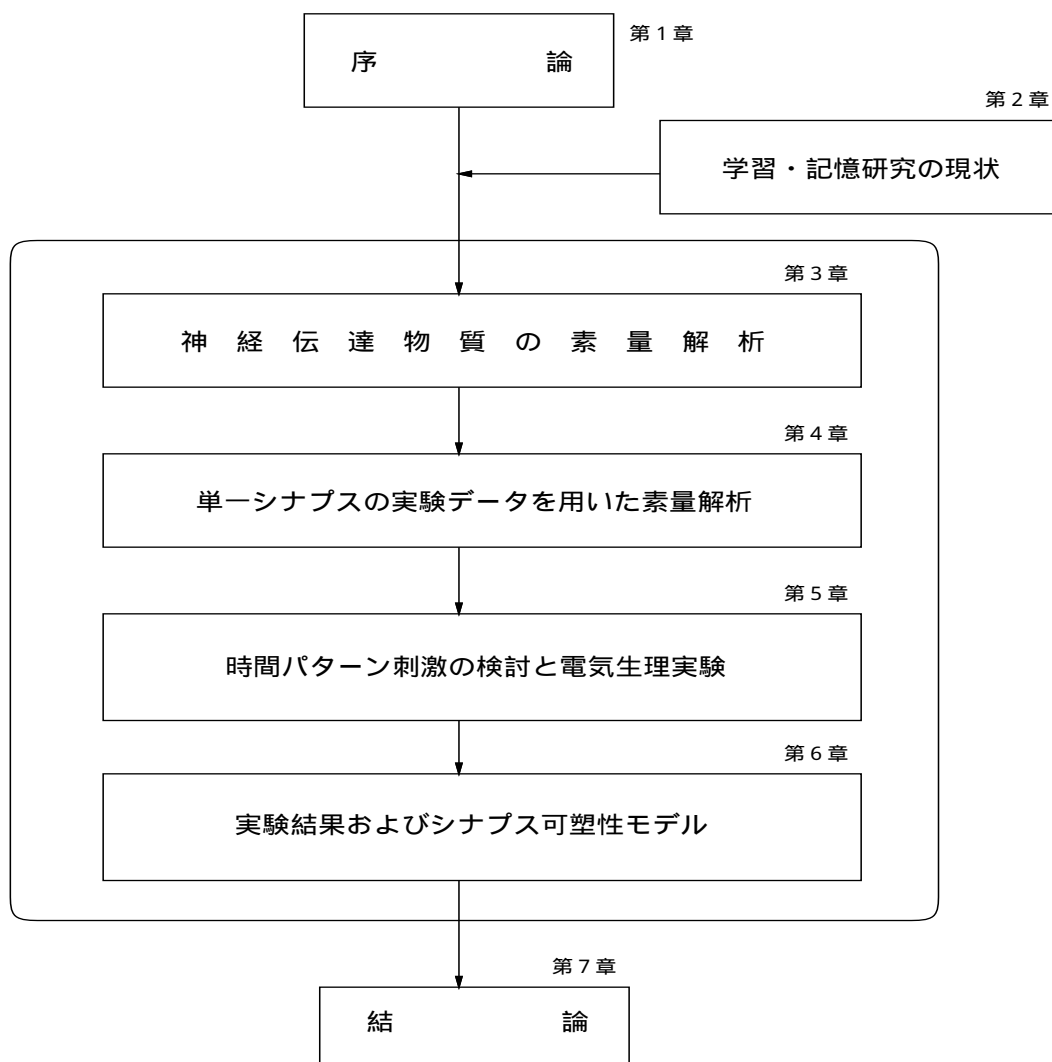


図 1.7: 本論文の構成

第 2 章

学習・記憶機構研究の現状

2.1 はじめに

現在、脳の高次の機能解明のために医学生物学的手法はもとより、工学的手法による解析またはモデリングといった学際的な研究が盛んに行われている。こうした研究の最終目標は、医学的には脳の理解はもとより、アルツハイマーや精神疾患などにおける中枢神経系の変異の予防や治療にある。また工学的には従来の理論にはなかった情報処理方式のヒントを得る、ないしは脳を模倣したハードウェアを構築することにある。高次機能のなかでも、海馬や小脳を含んだ学習・記憶ネットワーク機構は多方面から注目されている。その理由は、なにが記憶の痕跡として脳に存在するかという根本的な問題に対して、これらの部位で神経の可塑性が生理学的に確認され、また虚血や他の疾患によりこれらの部位で障害が起きた際、なんらかの種類の学習・記憶機能が損なわれることが臨床実験などで明らかにされているからである。学習・記憶ネットワークの中で重要な位置を占めると考えられる海馬や小脳の機能については、生理学的知見はまだ十分とはいえず、また工学的モデルもまだ脳を模倣したといえるレベルには達していないのが現状である。しかしこの学習・記憶の仕組みの解明は、工学的には現在、あるいは将来の計算機に期待される知識情報処理機能の実現にとって、大きなヒントを提供する可能性がある。

2.2 海馬・小脳

記憶の最終的な貯蔵庫は、視覚記憶の痕跡 [20] などから大脳皮質にあると考えられている。しかし記憶の前段階としての機能に関しては、たとえばてんかんによる海馬切除手術を受けて記憶障害がおきたイニシャル H.M. や R.B. などの臨床実験 [21, 22] から、海馬が記憶過程に関与すると考えられている。海馬 (hippocampus) は脳の側頭葉内側に両側に位置し、その形がタツノオトシゴに似ていることなどから命名された部位である。1960 年代末には海馬薄切切片法 [23] が確立され、臨床実験以外にも、こうした興味から海馬スライスを使用した電気生理学的実験が盛んに行われるようになった [24]。

海馬と記憶過程の関係を決定付けたのは、1973 年にウサギの海馬歯状回で発見された長期増強 [25, 26] である。これはガラス微小電極を用いて海馬のある部分に人工的なパルスを与え続けると、その後一定時間、パルスに対するシナプスの伝達効率が高く維持されることを確認した注目すべき実験結果であった。この現象は、パルスに対する反応の可塑性 (記憶の痕跡) を示すものとして大きな注目を集めている。

これらの知見などから海馬は学習・記憶の基礎過程をなすものと考えられているが、難しい点は海馬がその役目をすべて担っている訳ではない [27]、ということである。これは扁桃体など、海馬以外の破壊があっても学習機能が損なわれることがあること [28]、あるいは海馬の損傷だけでは完全に機能が損なわれないこともあることなどからいえる。しかし、学習の痕跡と長期増強の痕跡の間には、関連性がある可能性が指摘されている [29]。したがって長期増強の確認された海馬を抜きにしては、学習・記憶機能が語れないというのも事実で、こうした機能の中心であることには変わりない。

以上のように海馬は注目されているにもかかわらず、その長期増強の発生メカニズムはまだ生理学的に明らかにされていない。海馬研究における大きな問題点の一つは、この長期増強がシナプスの前膜、後膜どちらに起因するものかが分からないことである。これを解決する一手法として、電気生理学的な実験結果を解析し、神経伝達物質放出のメカニズムを明らかにする努力がなされている。本研究では、神経伝達物質の放出素量を解析しようとする素量解析法 [7, 30] について検討を行う。以下に長期増強とシナプスの関係を述べる。

2.3 神経細胞

神経細胞 (Neuron) は信号の伝達における基本単位であり、核を含む細胞体 (Soma) と細胞体からのびる樹状突起 (Dendrite)、通常 1 本だけ長くのびる軸索 (Axon) からなる。樹状突起は他の細胞からの情報を受けとり、逆に軸索は他の細胞へ情報を送る働きがある。軸索の先端部分はいくつかに枝分かれしており、その終末は他の神経細胞の細胞体あるいは樹状突起にわずかな間隙 (数百 nm) を挟んで結びつく形となっている。この終末部分は少し膨らんだ構造をしており、終末ボタンともよばれている。終末ボタンと間隙を挟んだ相手側部分をあわせてシナプスと呼ぶ。1 個の神経細胞には数百から数万のシナプスが存在する。

シナプスは間隙を挟んで前膜と後膜とに分かれるが、前膜に伝わったパルスは神経伝達物質の放出を引き起こす。こうしてシナプス間隙に放出された神経伝達物質のあるものは後膜にある受容体 (Receptor) と結合し、結果として後膜に興奮性シナプス後電位 (EPSP: Excitatory Post Synaptic Potential) を引き起こす。したがって、細胞から細胞への信号伝播はシナプスで電気信号がいったん化学物質に置き換えられ、後膜に再び電気信号を起こす、というアプローチをとることになる。化学物質による伝達は、電気信号よりも明らかに速度が遅い。にもかかわらず信号の伝達にこうした方法がとられるのはなぜであろうか。これは、一過性の電気信号ではその性質から記憶の基礎となる可塑的性質を持ちにくいからではないか。そして、神経伝達物質という化学物質 (グルタミン酸分子など) を介することにより、この可塑性を生み出しているのではないか。この点は長期増強の責任部位 (前膜か後膜か) をはっきりさせることなどにより、明らかにされることが期待されている。

2.4 シナプス

海馬における長期増強現象から、脳が行う学習の初期過程はシナプスの機能が変化する可塑的現象であると考えられている。そして、この可塑性は一過性の信号としてでは考えにくく、なんらかの物質が関与していると考えられる。前で述べたとおり、シナプスでは軸索を伝わった電気信号により、シナプス前膜から間隙に物質が放出される。そしてこの物質 (神経伝達物質) は、シナプス後膜にある受容体に取り込まれたり酵素で分解されたり、さらにはシナプス前膜に再吸収されたりする。したがって、細胞体の興奮により発生した電気信号は軸索を走り、シナプスにおいて化学物質の遊離として物質の信号に転換す

ることになる。シナプス後膜では、受容体の種類に応じていくつかのイオンチャンネルが開閉され、興奮性シナプス後電位を引き起こすイオン流入が起きる。この際に注目されているのがカルシウムイオン (Ca^{2+}) やナトリウムイオン (Na^{+}) などのイオンで、こうしたイオンの流入量によってその細胞がどう反応するかが結果的に決まると考えられている。

後膜におけるカルシウムイオンの増大は、シナプス後膜にあるイオンチャンネルの開閉も関与する。このチャンネルのあるものは、後膜の受容体に神経伝達物質が結合することにより結果的に開かれると考えられている。したがって、神経伝達物質と受容体の関係はイオン流入の鍵の一つをにぎっていることになる [31]。生理学上の重大問題となっているシナプス前膜、後膜のどちらに長期増強の直接のトリガーがあるかという問題は、簡単に考えると神経伝達物質と受容体のどちらに責任があるかという問題になる。この点に関しては、シナプス前膜説と後膜説がある。この問題は以前から関心が持たれて非常に多くの研究がなされてきたが、決定的な結論はないものの、例えば海馬 CA1 野では後膜側が、また海馬 CA3 野では前膜が働くとする研究成果もここ数年で発表されてきている。

前膜説とは刺激によって前膜からの神経伝達物質の放出量がしだいに増えるため、物質が後膜の受容体と結合する率が増加し、後膜におけるイオン流入が増えるとする説である。この場合、放出量の増加が直接の原因となるので、前膜説という。また後膜説とは、刺激によってしだいに後膜にある受容体の感受性が増大し、イオン流入などが増えるという説である。この場合は後膜にある受容体が関係しているので、後膜説という。また両方が関与する可能性もあり、これも有力な説であるといえる。はたして前膜、後膜のどちらに原因があるのかといった問題を解決する手法として素量解析法が期待されている。この手法は前膜からの最小の放出素量を求めると同時に、素量に対する後膜の応答強度を求め、時間とともにこれらの値がどう変化するかによって、前膜、後膜の関与の度合を調べようとするものである。

2.5 情報の表現方法と学習則

脳の工学的モデルには、海馬の長期増強モデルとして神経細胞の等価回路モデル [32] などの研究があるが、海馬を基礎におき、皮質を含めたマクロ的なネットワークモデルの研究も盛んである。こうした中で、海馬から海馬傍回、大脳皮質に至る 3 層構造モデル [33] が、生理学的裏付けとともに注目されている。かつて、個々の記憶は各神経細胞と対応しているとする”おばあさん細胞”説があった。これは赤ちゃんがおばあさんを見て反応する

際、おばあさんの顔を認識する特定の細胞が興奮するというものである。しかし、特定の細胞が1対1に記憶に該当するという説は、脳の持つ補間的な働きを考えると無理がある。そこで現在は、複数の部分で記憶を異なったパターンで補間的に保持するトレーシング回路や、スパースコーディングといった冗長性のある記憶方式が有力である。今後、こうした考えに基づくモデルが生理学での基礎研究にヒントを与えるかもしれない。しかしながら、こうした工学的モデルはなかなか生理学者や実験家の納得するものとなりにくい。生理学的知見を考慮しても、現在の工学的モデルは実験レベル、あるいは生理学レベルで分かっていることから距離がありすぎるからである。こうした問題を少なくする一つのアプローチとして、神経細胞を出発点としたモデルからボトムアップにとらえたモデルの構築が挙げられる。

2.6 まとめ

実際の脳については、もはや医学生物学の特定の立場においてのみ解明されるものではなく、工学など多分野からの研究による必要性が認識されている。高次機能のうち、特に重要かつ注目されている学習・記憶については、その長期記憶は海馬からなんらかの神経網を通して新皮質に情報が伝わり、そこで保存されていると考えられている。そして海馬は学習・記憶の前段階として重要な働きをすることが、臨床実験などから分かっている。しかし同時に、海馬だけの機能は限られており、扁桃体をはじめその周辺部位とも密接に連係しているらしい。海馬を出発点としてミクロ的なアプローチを行う時には、この辺を注意していかなければならない。海馬がすべてではないからである。また小脳の研究においても同様のことがいえる。以上をふまえ、脳の研究はミクロからマクロに至るさまざまな段階でのアプローチが存在するが、各レベルでの連係は必須であり、もはや単独のアプローチで解決可能な対象ではないとことがいえる。こうした状況において、脳の研究は工学的な手法による解析や情報理論から大きな示唆を与えられる可能性があると同時に、工学での未知の分野が開かれる可能性を持つものである。

第 3 章

神経伝達物質の素量解析

3.1 はじめに

海馬における長期増強現象は 20 年以上前にその存在が確認されているが、神経細胞における可塑的性質の責任部位は、少なくともその初期過程ではシナプスにあることが分かっている。しかしその具体的メカニズムはいまだに明らかにされていない。すなわち、シナプスを構成する前膜、後膜のはたらきが不明で、そのどちらかまたは両方が可塑性に貢献しているのか分かっていない。

ここで前膜の問題を考えると、神経伝達物質の放出に関するだけでもつぎの点を明確にする必要がある。

1. 到達したインパルスにより一度にどれ位の放出量があるのか
2. インパルスの大きさに依存した量なのか
3. 一定のインパルスでは一定の放出量があるのか
4. なにが伝達物質となっているのか
5. インパルスの到達のみにより放出が引き起こされるのか
6. 放出の増加あるいは減少はなにによって決められるのか

また後膜についてはつぎの点が挙げられる。

1. といった伝達物質に対して反応する受容体があるのか
2. 受容体の種類に応じた後膜での電位変化の仕組みはなにか
3. 受容体の感受性増大は、神経伝達物質のみによるものか
4. 受容体の感受性が増大してる時間はなにによって決まるか
5. 前膜への逆行性シグナルは存在するのか

本研究ではシナプス可塑性モデル構築のため、まずシナプスにおいて情報が伝達される仕組みを解明する。そのためには、前膜側の神経細胞における一定の刺激に対して、前膜から放出される神経伝達物質の素量数を求める必要がある。素量解析法は、神経細胞における可塑的性質の責任部位を明らかにするための手法として期待されている。しかし本研究の目的は責任部位を明確にすることではなく、素量解析のより合理的な手法を示すと同時にシナプスにおける神経伝達物質の放出量が、同一の刺激に対してつねに一定かを実験データで検証することにある。そこで本章では、まずシミュレーション実験による解析法の検討およびその改良を行う。従来、素量解析の手法は実験結果に統計的分布を当てはめるなどの方法 [34, 35] がとられてきたが、ノイズの影響などでうまくいっていない。そこで、より良好な結果が期待できる工学的手法を適用し、解析を行った。この手法については、その妥当性を確認するためにまずシミュレーション実験を行った。シミュレーション実験は、神経細胞からの測定信号の分布をあらかじめ想定し、これに仮定したノイズを加えたデータを作成し、もとの分布を推定するものである。推定の方法としては、基本的にはこれまで発表されている中で最も進んでいると思われる既知の手法を使用しているが、本研究ではより良好な結果が期待できるよう、部分的な改良を行った。

また次章で行う実験データによる解析では、高度の実験技術が必要とされ、先駆的な研究によって得られたモノシナプスの実験データ [34] を使用した。これにより、現在最も進んでいると思われる手法により、最も高精度なデータによる解析が可能となった。

3.2 概要

本章の柱はつぎの2つである。

1. ミュレーション

現在最も進んでいると思われる素量解析の一手法について、シミュレーション実験を行い、その有効性を確認した。

2. 解析モデルの改良

上記で使用した解析法についての問題点を指摘し、モデルに改良を施した。

これらについて、以下にその概要を述べる。

3.2.1 シミュレーション

シミュレーションにおける前提としてまず必要となるのは、シナプス小胞の放出による素量の振幅がどのくらいになるかという点である。本実験では、振幅を仮定し、素量の放出数を放出サイト（リリースサイト）数ととらえて、データの生成を行った。以下に素量放出による解析法の考え方を説明し、それを基にして作成したデータおよび解析結果を述べる。データの生成では、データがもとの信号とノイズが加算したものとして観測された結果であると考え、さらにそれぞれの分布を確率事象として独立した分布であると考え、実験で得られた信号の分布が、これらのたたみ込みによって得られたものとする。そこでノイズの分布を逆たたみ込み演算し、もとの信号分布を得ようとするものである。仮定したノイズと神経細胞の反応信号の分布はたたみ込み演算により合成し、モンテカルロ法によりシミュレーション用データを作成する。そしてこのデータに対して、工学的方法でノイズの影響を低減させようとするものである。

ノイズ除去はディコンボリューションによるもので、ちょうどたたみ込み演算（コンリューション）の逆を行うことにより、もとの神経細胞における応答信号の分布を推定する。この演算の方法としては、現在最も進んでいると思われる Kullmann の提案する手法である MEND を使用した。MEND は従来の最尤推定の計算にエントロピーの考えを導入したものである。ここで最尤推定だけでは、小さなノイズの影響からくるこまかな信号の起伏を忠実に再現しすぎてしまう、という欠点を持っている。Kullmann はこの点を克服するために、小さな起伏をなだらかにしてノイズの影響をおさえる平滑化の効果がある、エントロピーの考えを導入した。本章では、シミュレーションデータを作成して最尤推定と MEND による解析の比較実験を行った。

3.2.2 解析モデルの改良

シミュレーション実験により、Kullmann の MEND による解析法は従来の最尤推定だけによる解析よりたいへん良好なことが分かった。しかし同時に、MEND による解析の欠点も明らかとなった。これは計算の中で実験データをヒストグラム状にまとめてデータを無駄にしている面があり、解析結果に悪影響を与えている点である。シミュレーション実験のレベルでは、データはいくらでも多量に作成して使うことができる。しかし実際の実験では、生きた細胞は数時間の間しか持たないため、得られる信号データには限りがあるのである。しかも実験の最初の段階では測定環境が不安定な時期があり、測定されたデータのうち、使用可能な部分は限られている。

信号解析にとって、データの不足は重大問題である。しかし有限のデータであることが解決されない限り、得られたデータを有効に使う工夫をしていかなければならない。したがって、せっかくのデータをヒストグラム状にまとめることはなるべく避けたい。本研究ではこの問題に注目して、MEND のヒストグラム状にまとめる部分を数値積分の形に改良し、有限のデータをより有効に利用できる MEND 改良版を考案した。

3.3 素量解析法

前に述べたとおり、本研究はシナプス可塑性における前膜・後膜の役割を明らかにするものでないが、信号処理の一手法として素量解析法の検討を行い、さらに実験データへの同手法の適用を行うために、素量解析の考えを以下に述べる。

3.3.1 シナプスにおける神経伝達物質の放出機序

神経細胞における可塑的性質の機序を解明するための方法として、素量解析法がある。素量解析法とは、素量数や微小興奮性シナプス後電位の振幅を求めることにより、長期増強あるいは長期抑圧の責任部位を明らかにしようとするものである。ここで素量とは、神経伝達物質が格納されているシナプス小胞を意味する。神経伝達物質の放出はこの小胞単位で行われており、したがって素量は伝達物質放出量解析の単位となるものである。

海馬において、細胞から軸索を伝わって流れたインパルスは、神経終末に達するとカルシウムイオンなどの流入により神経伝達物質（グルタミン酸分子）の放出をもたらす。この神経伝達物質は、シナプス前膜にある小胞の中に数千個存在するものである。個々の小

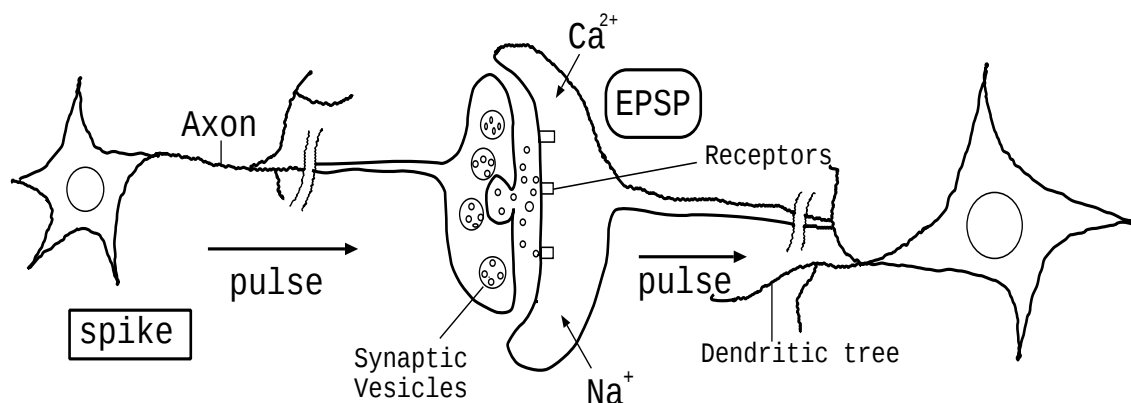


図 3.1: シナプス伝達

胞に含まれる神経伝達物質の量は、シナプス内ではほぼ一定であると考えられている。カルシウムイオンなどの流入により、ゲル化していた神経終末内はゾル化し、シナプス前膜に接した小胞の膜が破れて中身がシナプス間隙に放出される。放出された伝達物質のあるものは、シナプス後膜にある受容体 (Receptor) と結合する。その結果として、シナプス後膜でカルシウムイオンやナトリウムイオンなどの外部からの流入、あるいは細胞内におけるカルシウムプールからのカルシウムイオン流入が起き、しだいに脱分極の引き金となることが知られている (図 3.1)。

モノシナプスの実験では、海馬薄切切片においてある細胞からある細胞へ 1 本の神経線維が介している細胞の対を探し出し、電極を固定する。これによりある細胞への刺激に対して、ほぼ単独と考えられるシナプスによって起きた電位を測定することができる。従来の集合電位ではこのモノシナプスによる実験とは異なり、単独のシナプスのふるまいの結果として測定することは困難である。

刺激電極からは、数秒ごとに (-) のグルタミン酸イオンを与えてパルス (スパイク) を発生させる。こうして反応側の細胞体に刺した電極で得られた数百回以上のデータを、実験環境が安定している範囲で使用する。シナプス前膜では、軸索輸送やシナプス間隙からの伝達物質再取り込みなどによって小胞は再生産されるが、刺激にたいして反応を起こさない場合もある。したがってこうした場合は、記録側電極に反応がない 0mV として記録される。また細胞内外にはじめから存在するイオンの濃度については、グリア細胞からの補給や細胞膜にあるイオンポンプによって濃度が一定に保たれていると考えることができる。

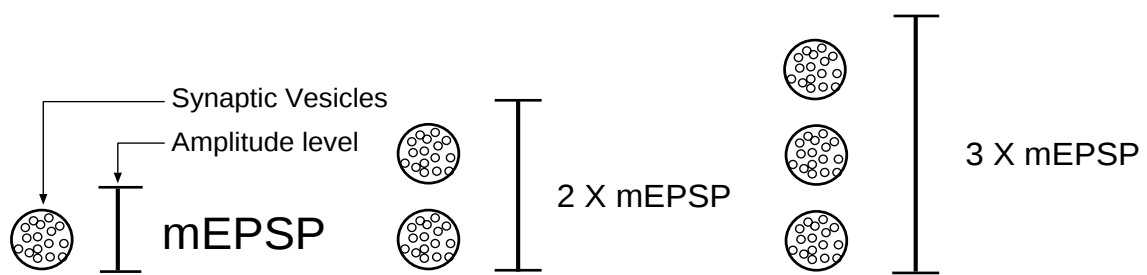


図 3.2: 素量と興奮性シナプス後電位

こうして測定されたデータについて縦軸を頻度、横軸を振幅で表すと、ノイズに混ざった反応の分布が得られる。これはまた、各振幅に対する反応の出現頻度としてとらえることができる。

数百回以上のスパイクから得られた振幅データにおいて、多くは反応 0mV が最も多く、それに続いて比較的はっきりした山が現れる。この山はシナプス前膜からの 1 個の小胞放出によるシナプス後膜の反応と考えられており、興奮性シナプス後電位 (EPSPs) の構成要素となる微小興奮性シナプス後電位のうち、ここではこれを最小興奮性シナプス後電位 (mEPSP) とする。強い振幅ほど頻度が少ない傾向にあるが、反応のない失敗の山 (振幅 0mV の山) と、それに続く 2 つめの山以外ははっきりとした山が現れにくい。もし小胞の放出が刺激に対して 1 個、2 個と整数倍に増えていくなれば、図 3.2 のように最小の個数である 1 個 (1 素量) の放出による山の整数倍に対応して、別の山が現れるはずである。しかしノイズなどの影響で、そうした山が本当に存在するかは中枢神経系でははっきりしていない。

3.3.2 シナプス前膜・後膜の働き

素量解析は放出される小胞の素量数や最小興奮性シナプス後電位 (mEPSP) の振幅を求めるもので、従来から統計的分布を当てはめる手法により行われているが、ノイズの影響が解析を難しくしている。素量放出の機序が明らかになれば、刺激の回数によって振幅の分布がどのように変化するかを分析することにより、長期増強の主役がシナプス前膜、後膜あるいは両方にあるかの示唆を得ることが期待される。素量あたりの振幅は、刺激の回数が増えるにしたがって増大していく傾向にある (長期増強のため) が、一般に放出素量

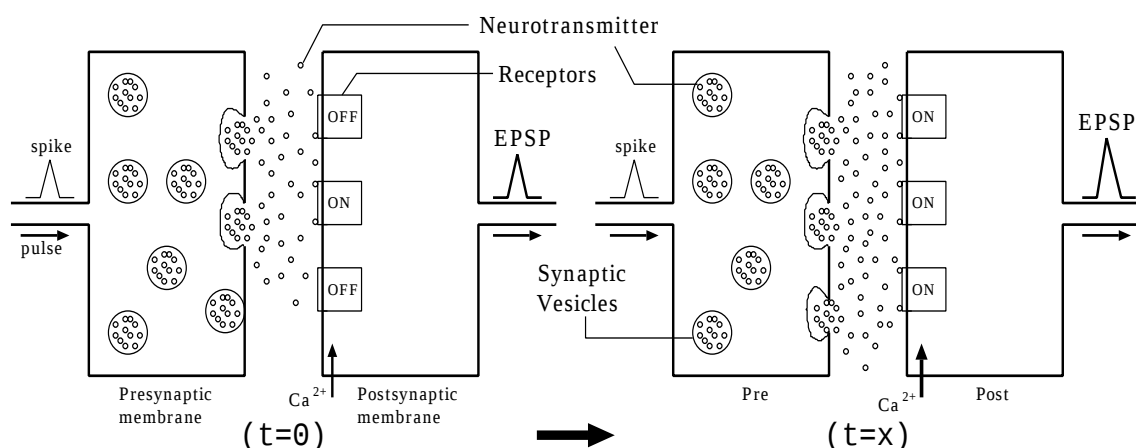


図 3.3: シナプス前膜説

数の平均値が増大する傾向があればシナプス前線維起源、素量 1 個あたりの平均振幅が増大する場合はシナプス後線維起源を意味する [36]。つぎに具体的な図による説明を行う。

図 3.3 はシナプス前膜説を説明するものである。左の時間 $t = 0$ (初期状態) では、スパイクによって前膜にある小胞 2 個がはじけ、中身の神経伝達物質がシナプス間隙に放出されている。このとき後膜にある受容体は 1 つしか作動状態 (ON) になっていない。さらに刺激を続け、時間 $t = x$ (分) のときをしてみる。この場合はスパイクの大きさが変わらなにもかわらず、小胞が 3 つもはじけている。したがって、間隙に放出される物質の量も多くなり、その結果として受容体が 3 つ作動状態 (ON) となっている。つまり刺激が繰り返されるとともに、前膜における小胞がはじけやすくなったものである (前膜説)。後膜における矢印は、受容体が作動状態になると、その数に比例してイオンの流入量が増加していることを示す。

つぎに図 3.4 はシナプス後膜説を説明するものである。図 3.3 とは時間 $t = x$ における小胞と受容体の様子が異なる。ここではある程度刺激を受けても放出される小胞の数は変わらない。しかし受容体を見てみると、すべて作動状態 (ON) となっている。間隙に放出されている物質の量は同じである。それにもかかわらずこうしたことが起きるのは、受容体の感受性が高まり (後膜説)、時間 $t = 0$ では反応しなかった受容体まで、時間 $t = x$ で反応した結果であると考えられる。

図 3.3、3.4 の例は小胞の放出および受容体の振舞いを単純に表現したもので、実際の仕組みはもっと複雑である。また後膜において発生する興奮性シナプス後電位は、前膜起源に

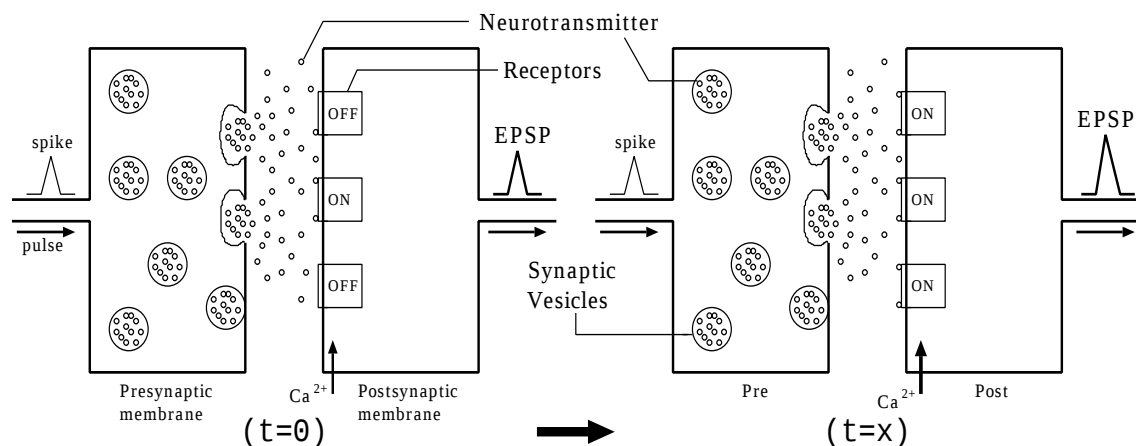


図 3.4: シナプス後膜説

しる後膜起源にしる、長期増強によってしるに増加する傾向にあるので、測定した反応の分布はしるにシフトする傾向がある。したがって、このことは素量解析で求める素量の個数や振幅の平均値に影響を与える。解析結果についてはこの辺を注意する必要がある。

以上にみてきたように、シナプスにおける可塑性はその前膜あるいは後膜における機能的変化をもたらすものであると考えられている。

3.4 シミュレーションデータの生成

信号解析の手法の妥当性については、いきなり実験データを使用しても求める対象が未知であるため、その確からしさは分からない。そこであらかじめ測定信号とノイズに関するシミュレーションデータを用意し、システムの妥当性を確かめる必要がある。またシミュレーション実験によりシステムの問題点を把握して改良を施すことにより、より精度の高いシステムを目指す。本節では、こうした理由により生成したシミュレーション実験用データの生成方法について述べる。

3.4.1 素量放出およびノイズの仮定

シミュレーションデータの作成にあたっては、素量放出の分布とノイズの分布を仮定しなければならない。

素量放出の分布については、これまでの知見からおおよそその最小興奮性シナプス後電位 (mEPSP: 小胞 1 個による興奮性シナプス後電位の値) が仮定できる。また素量放出の分布 (放出サイト) は、この最小興奮性シナプス後電位の整数倍に対応して存在すると考えられる。こうした点を踏まえて、シミュレーションでは最小興奮性シナプス後電位を 3mV とし、つぎの振幅の位置 (これを放出サイトとする) を 6mV、9mV、12mV と、3mV ごとに 4 つの放出サイトを仮定した。また反応が起きなかった失敗の結果 (実際にも存在する) を考慮して 0mV の山も設け、それぞれのサイトを中心とする正規分布を適当な大きさ (確率) で設定した。ここで 4 つのサイトの確率密度は 0.5 (残りはノイズの分と 0mV の分となる) としてある。また各サイトの分布は、振幅 3、6、9、12 を中心として、標準偏差をそれぞれ 0.5、0.6、0.9、0.9 とした。なお 3mV における変動係数は 17% とした。仮定した分布は図 3.5 のとおりである。横軸は振幅、縦軸は確率を表し、横軸の振幅は -4mV から 16mV とした (以下同様)。

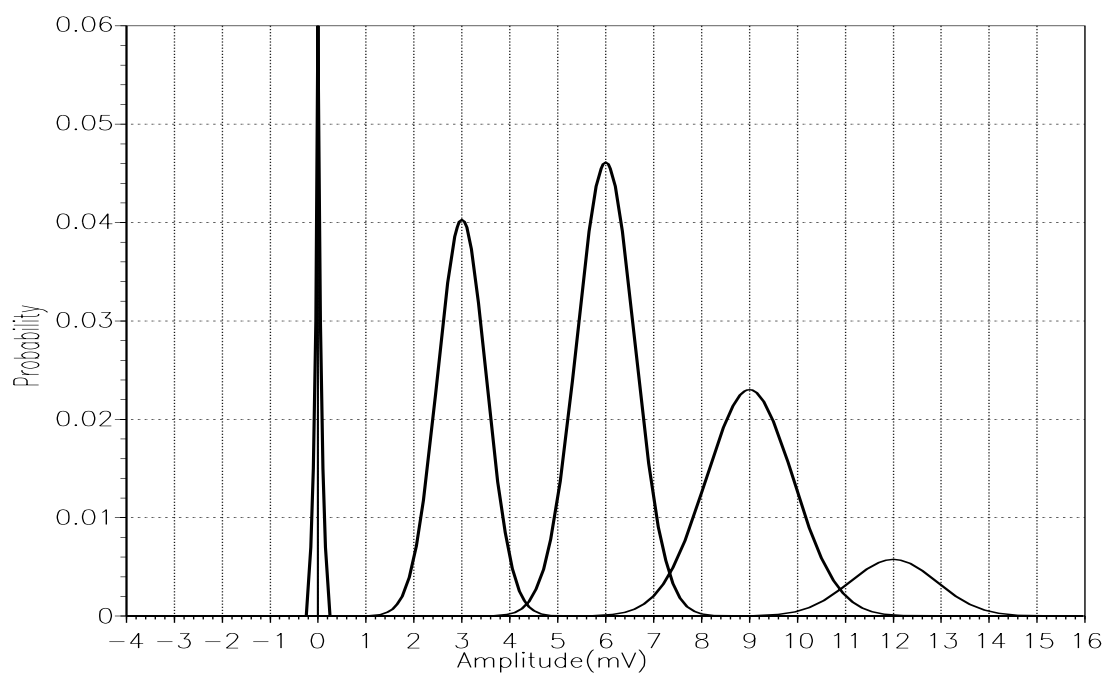


図 3.5: 素量放出の分布

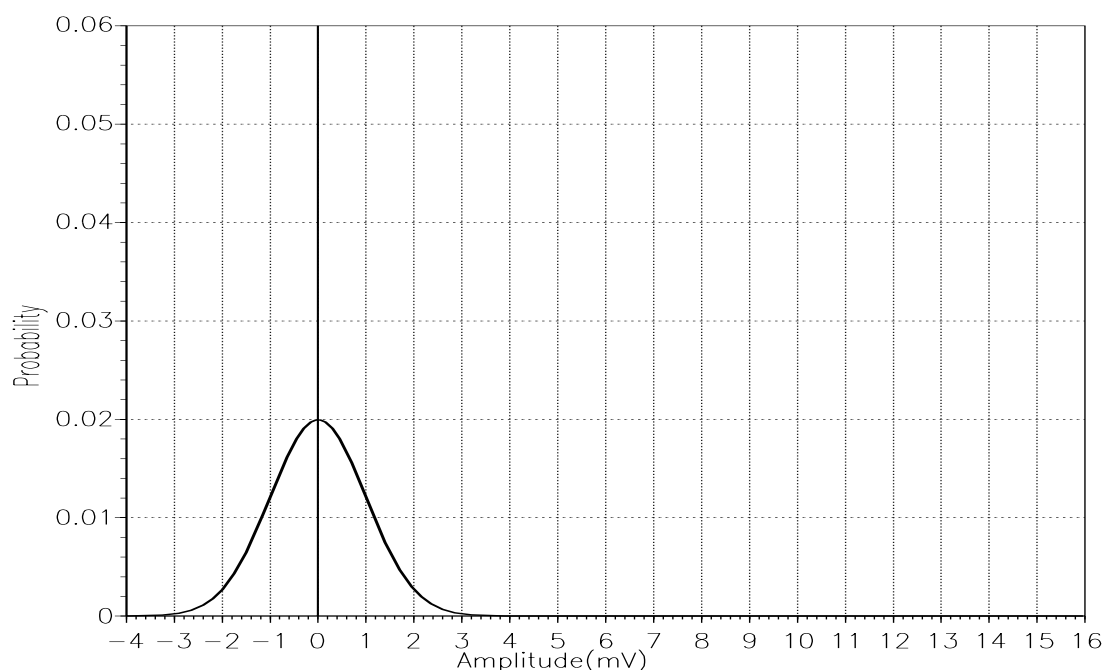


図 3.6: ノイズの分布

ノイズの仮定は非常に難しい。単に解析法の妥当性を確かめるだけであれば、適当な分布を仮定すればよいが、シミュレーションでなく実験データを使った解析ではそう簡単に決めることはできない。ノイズには商用周波数を拾ったものや測定機器からの熱雑音などがあり、さらにイオンチャンネルの開閉に伴う膜ノイズなどがある。対象はなにであれ、多くの信号処理ではこのノイズの分布をいかにとらえ、どう効果的にノイズを除去していくかが長年の課題になっている。この問題の解決は困難をともなうが、その分布としては一般的にはガウス分布をなすであろうと考えられている。そこで本研究ではシミュレーションおよび実験データを使った解析においても、ノイズの分布をガウスノイズと仮定する。シミュレーションにおいて、ノイズの分布（確率密度）は平均が 0mV 、標準偏差を 1 としたガウス分布を算出し、さらに強さ（縦軸の確率）を $\frac{1}{20}$ 倍した。こうして作成したノイズ分布が図 3.6 である。なお、ノイズの中心（ 0mV ）から端までの振幅の幅はほぼ 3mV であり、これは仮定した振幅の各サイトの間隔に等しくなっている。

3.4.2 データの生成

シミュレーション用のデータは、信号とノイズそれぞれの分布がたたみ込まれたものとして生成する。これは解析で行うノイズディコンボリューションにおいて、たたみ込みの逆の演算を行うことにより、もとの信号分布（素量放出分布）を求めるためである。ここで式 (3.1) のとおり、測定された波形 $y(t)$ がもとの信号 $s(t)$ とノイズ $n(t)$ の独立でしかも線形に作用した結果と考えれば、式 (3.2) のとおり測定信号の分布がこれらの分布の線形の積分演算によって得られたと仮定することができる。ここで $P_y(x)$ は測定された信号の分布を意味し、 $P_s(x)$ 、 $P_n(x)$ はそれぞれもとの信号の分布、ノイズの分布を意味する。なお $*$ はたたみ込み演算を意味する。したがって、この線形性を利用したディコンボリューションによりもとの分布を推定する演算が得られることになる。

$$y(t) = s(t) + n(t) \quad (3.1)$$

$$P_y(x) = P_s(x) * P_n(x) \quad (3.2)$$

ただし、 $*$ はつぎのとおり 2 つの分布 $f_1(t)$ 、 $f_2(t)$ のたたみ込み積分を表す。

$$f(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f_1(\tau) f_2(t - \tau) d\tau \quad (3.3)$$

したがって、データの生成法は放出分布とノイズ分布のたたみ込み演算が基本となる。たたみ込み演算は、ガウス分布をなすノイズの各振幅における値（ノイズの強さ）を素量放出分布の振幅に掛け合わせていくことにより行う。ここで各振幅に対するノイズおよび素量放出の確率を離散値で求めるため、データの -4mV から 16mV までの範囲について、0.5mV 間隔で振幅値を 40 件用意する。ここで間隔を広くとりすぎると、山や谷がもとのデータから消えてしまう。また逆に間隔を狭くしすぎるとヒストグラムにおいて 1 つの瓶 (bin) に入るデータがほとんど 0 か 1 となってしまう。そこでここでは 40 分割（40 瓶）とした。この分割の問題は MEND の欠点でもあり、後で述べるように本研究での改良ポイントになる部分である。

前で仮定した素量放出分布、およびノイズをたたみ込み演算した結果を図 3.7 に示す。図 3.5 に新たに加わった曲線がコンボリューション結果である。ノイズの影響により各振幅の山が低くなり、逆に谷が上昇しているのが分かる。ここでもとのリリースサイトの放出確

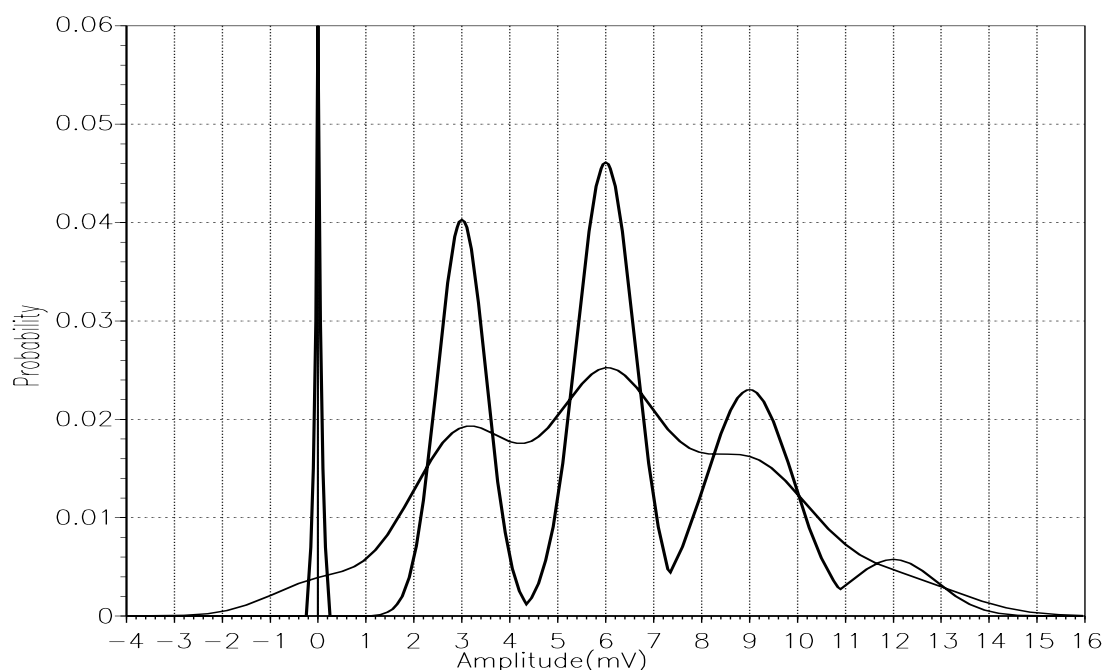


図 3.7: コンボリューションした分布

率が 0.5 であり、これにノイズの影響によりさらに確率は小さくなるが、この分布はあくまでもこの後でデータを生成するための過程であり、全確率が 1 となる必要はない。

こうして得られたノイズを含んだ振幅の確率分布について、さらにモンテカルロ法を用いる。これは生体の反応を考慮して乱数を使用するもので、コンボリューションにより得られた分布を基に新たな分布を生成するものである。ヒストグラムの作成は、乱数からこの分布にあったデータを合計が 500 件になるまで生成し、該当の振幅（瓶）に足していくことにより行う。

0.5mV 間隔で生成したノイズを含む分布を図 3.8 に、さらに 500 件のデータについて、40 の瓶からなるヒストグラムにまとめたグラフを図 3.9 に示す。なおノイズデータについても、同じ 0.5mV の間隔で 40 の瓶からなるヒストグラムにまとめ、生成する。これはコンボリューションにおいて、信号とノイズの各瓶は同じ間隔になっている必要があるためである。なお、瓶はヒストグラムにおける箱状の各値を意味し、データは該当の各瓶に瓶詰めされている。また実際の計算で使用するため、件数を確率に置き換えたヒストグラムを図 3.10 に示す。

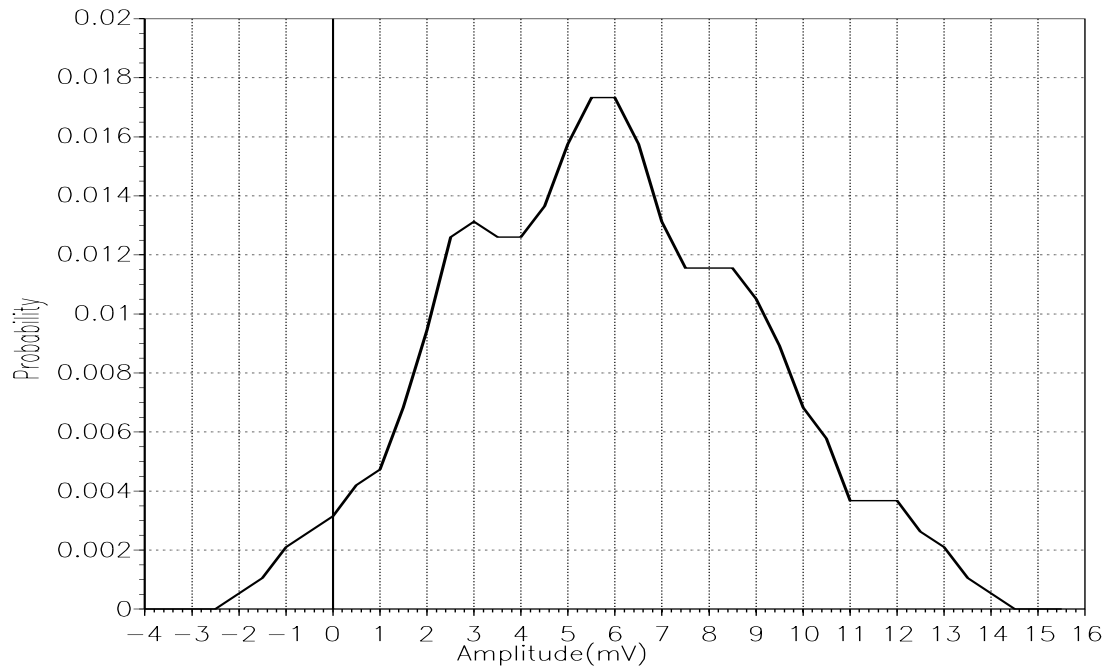


図 3.8: 乱数による放出確率

3.5 MEND による素量解析

3.5.1 MEND の基本原理

MEND(Maximum Entropy Noise Deconvolution) の基本原理は、最尤推定 (ML:Maximum likelihood)[37, 38] におけるノイズディコンボリューション [39] にある。ディコンボリューションの前提は、データがコンボリューションされたものである、という点にある。ここでは放出分布とノイズ分布のコンボリューションが前提となる。前に述べたように、推定の方法は得られたデータが本来の信号分布にノイズの分布がたたみ込まれたものであると仮定し、そのノイズをディコンボリューションすることにより、もとの信号分布を推定しようとするものである。

コンボリューションされたデータに対し、MEND では最尤推定法による推定を行う。ただし、MEND ではさらにエントロピーの考えが導入されている。ここでエントロピーの値は推定結果をフラットにする働きをし、最尤推定が細か過ぎる推定を行うのを防ぐために非常に有効な役割を持つものである。

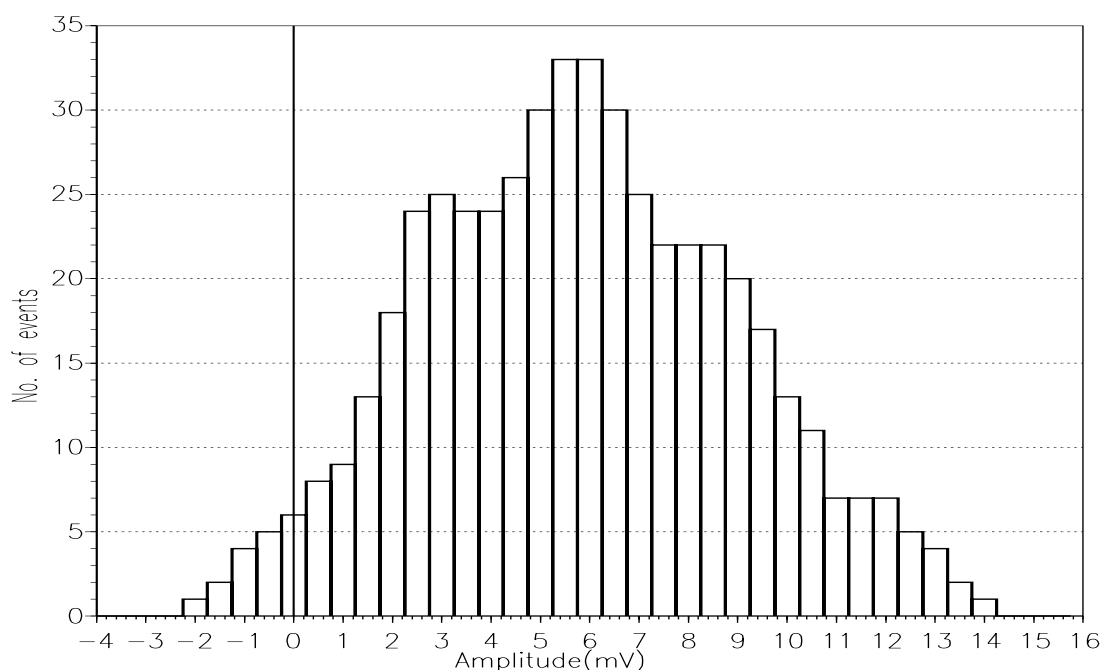


図 3.9: シミュレーション用データ (件数)

最尤推定の計算は E-M (Expectation-Maximization) アルゴリズム [37] を用い、ディコンボリューションにおいてヒストグラム状のデータからガウス分布で仮定したノイズの影響を弱めていく。

最尤推定は多くの分野で用いられている方法であるが、繰り返し述べているようにこの方法だけでは、ノイズによって起きる小さな山までを忠実に再現してしまうという欠点がある。そこであまりにも忠実に小さな山を再現しないよう、推定をフラットにする調整を行うため、この働きのある最大エントロピー法 (MEM: Maximum Entropy Method) [41] を参考にしたエントロピーの値を同時に用いる。

この調整は、最尤推定の式にエントロピーの値を項としてつけ加え、適合度の考えを使って最尤推定、エントロピーそれぞれの影響度の比率を調節することにより行われる。こうしてエントロピーの項は、ノイズからくる小さな山をフラットにする役目を果たすことになる。ノイズの多い世界でのディコンボリューション法として、この調整は適合度検定の考えを利用して有意水準 $\alpha = 0.5$ (50%) が経験的にも良いことが分かっている [41]。これはシミュレーションで視覚的に求められた結果であるが、もとの信号の分布において、各

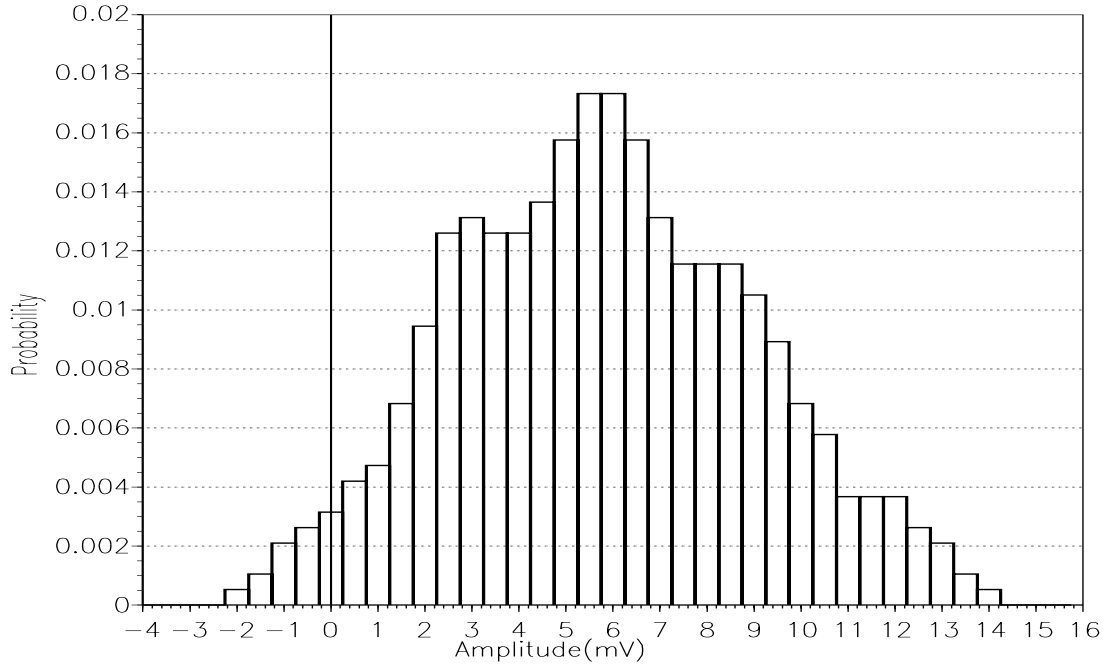


図 3.10: シミュレーション用データ (確率)

サイトの放出確率を 0.5 とした点に合致している。またこうした生体の場合には、50%のデータについて棄却可能と考えることもできるのではないか。これらの実験結果については次節で述べる。

3.5.2 MEND の計算方法

もとの信号にノイズをコンボリューションし、瓶詰めされた信号のヒストグラムの振幅を $a(a_i, i = 1, \dots, N)$ 、ノイズを $g(g_i, i = 1, \dots, k, \dots, N)$ (ただし k は定数で、 g_k は 0mV を示す) もとの信号を $s(s_j, j = 1, \dots, N)$ とおくと、尤度関数 L はつぎのとおりとなる。ここで N はヒストグラムの瓶の数である。

$$L = \sum_{i=1}^N a_i \log \left(\sum_{j=1}^N s_j g_{i-j+k} \right) \quad (3.4)$$

式 (3.4) において、 a_i と s_j および g_i とともにヒストグラムの瓶詰めの幅は同一であり、 s と g が線形に作用するものと仮定する。各 a_i における $s * g$ (ただし $*$ はたたみこみを表す) の計算は、ガウスノイズの各成分 (各振幅の確率密度) すべてを s_j に掛けたものの和となる。

その結果、 $a = \log s * g$ より尤度 L が最大となる s_j を探せば、尤もらしい値が求まることになる。

$\sum_{j=1}^N s_j g_{i-j+k}$ は離散型のたたみこみ積和である。この尤度関数の最大値を求めるため、つぎのように EM アルゴリズム [40] を用いる。

$$s_j^+ = \frac{1}{\sum_{i=1}^N a_i} \sum_{i=1}^N a_i h_{ij} \quad (3.5)$$

$$h_{ij} = \frac{s_j g_{i-j+k}}{\sum_{j=1}^N s_j g_{i-j+k}} \quad (3.6)$$

式 (3.5) において h_{ij} は事後確率的な計算になっており、式 (3.6) の分子の s_j は適当な小さな値から計算を始める。 s_j^+ は初期値として s_j に再設定され、収束条件まで繰り返し計算を行う。ここで使用した E-M アルゴリズムは、E(Expectation) ステップと M(Maximization) ステップとからなる。これは E ステップで計算された s_j を、つぎの S ステップで再度初期値として設定しなおし、M ステップとして収束条件までこの計算を繰り返すものである。

この推定法によるディコンボリューションの結果は、あまりにも忠実に小さな山を再現してしまい、もとの分布に合わない。そこでこの分布をフラットにする項を加え、より適当な分布を求めようとするのが MEND である。フラットにするための計算としては、熱力学から応用され、X 線画像解析 [41] でもよく使われる最大エントロピー法を参考にエントロピーの値を用いる。MEND では s_j の計算はつぎのとおりとなる（ただし式 (3.8) は式 (3.6) に同じ）

$$s_j^+ = \left(\frac{1}{\sum_{i=1}^N a_i} \sum_{i=1}^N a_i h_{ij} \right)^\lambda \left(\frac{1}{N} \right)^{1-\lambda} \quad (3.7)$$

$$h_{ij} = \frac{s_j g_{i-j+k}}{\sum_{j=1}^N s_j g_{i-j+k}} \quad (3.8)$$

ここで λ はラグランジェ乗数と似た働きをする。 λ を 0 から 1 に増やすにつれて、エントロピーによる影響（フラットにする）は少なくなる。またエントロピーは通常 $-\sum_{j=1}^N s_j \log_e s_j$ で表されるが、 s の合計を 1 とするために式を変形し、 $-\left(\frac{e}{N}\right) \sum_{j=1}^N s_j \log_e s_j$ ($e^{-1} \frac{e}{N} = \frac{1}{N}$) より最大値を求める。計算は小さい λ から始め、少しずつ値を増やしていく。この際、カイ 2 乗検定を行い、カイ 2 乗の値が自由度より大きい間は λ を増やし、ほぼ等しくなった

ところで計算をやめる。有意水準 α はこの後で検討しているように、0.05 (5%) の計算もやっているが、0.5 (50%) が経験的によい。

また、瓶詰めされたデータを使っているための誤差をなくするために g を離散値として計算するつぎの式も Kullmann によって提案されている。今後式 (3.7) を MEND(I)、式 (3.9) を MEND(II) と呼ぶ。

$$s_j^+ = \left(\frac{1}{M} \sum_{l=1}^M h(d_l - v_j) \right)^\lambda \left(\frac{1}{N} \right)^{1-\lambda} \quad (3.9)$$

$$h(d_l - v_j) = \frac{s_j g(d_l - v_j)}{\sum_{j=1}^N s_j g(d_l - v_j)} \quad (3.10)$$

式 (3.10) において、 $d(d_l, l = 1, \dots, M)$ 、 d_l は M 個の振幅の離散値を表す。また v_j は s_j における振幅値で、 $d_l - v_j$ により計算された振幅に該当するノイズの強さが $g(d_l - v_j)$ で表される。したがって、MEND(I) 式に比べてノイズの計算箇所がより精密になっている。

なお、カイ 2 乗検定では各区画の期待度数ができるだけ 5 以上となるようにしなければならない、という欠点を持つ。そこでここではカイ 2 乗検定の代わりに、コルモゴロフ - スミルノフ検定を用いた方がより適切である。この場合は、小さい λ から始めて、有意水準 $\alpha = 0.5$ のときは α が 0.5 よりも小さい間、 λ を増やしていく。

3.6 MEND の改良と実験結果

3.6.1 MEND の改良

MEND では、データをヒストグラム状に近似したデータを使用している。実際の生体を使用した測定ではデータ数に限りがあり、有限のデータを有効に使用必要がある。したがって、MEND のこの近似の部分は実験によって得られた貴重なデータをわざわざまとめてしまうことにより、無駄にしている側面がある。以下に具体的な問題箇所と改良点を説明する。

Kullmann が提案する MEND には、瓶詰め方式 (binned form : MEND(I) 式) と非瓶詰め方式 (unbinned form : MEND(II) 式) とがある。瓶詰め方式ではすべてのデータをヒストグラムに近似して計算する。また非瓶詰め方式はデータの近似を止めた計算でより合理的であるとしているが、これはすべての近似を止めた訳ではない。式 (3.9)、(3.10) から

分かつとおり、実際にはノイズ g についてだけ近似を止め、もとの信号 s の部分についてはそのまま瓶の計算が残っている。したがって Kullmann の計算では、MEND(II) 方式でも十分な改良が行われているとはいえない。そこで本研究では s の部分で数値積分を行い、より合理的な解析を行うつぎの式に改良した。

$$s^+(v) = \left(\frac{1}{M} \sum_{l=1}^M h(d_l - v) \right)^\lambda \left(\frac{1}{N} \right)^{1-\lambda} \quad (3.11)$$

$$h(d_l - v) = \frac{s(v)g(d_l - v)\delta v}{\int s(v)g(d_l - v)\delta v} \quad (3.12)$$

$$s(s_i, i = 1, \dots, M)$$

$$d(d_l, l = 1, \dots, M)$$

$$v(v_i, i = 1, \dots, M)$$

ここで v は M 回の測定信号の振幅の値、 δv は数値積分における振幅の幅を意味する。式 (3.11) を今後 MEND 改良版と呼ぶ。簡単に式を検討してみると、まず MEND 改良版では、式から明らかなように瓶の添字が一切なくなった形式となっている。

式 (3.12) において、分母は数値積分の形となり M 回の振幅データにおけるある信号と、それに見合ったノイズの積分を計算している。また分子は、そのうちのある $s(v)$ について信号とノイズを掛けたものである。

式 (3.11) で分かつとおり、 M 回のすべての計算により、ある信号 s の振幅におけるすべての振幅の影響の平均が与えられ、さらにエントロピーの値が掛けられている。ここで注意する点は、あくまでも s はある振幅での放出確率を表し、 $s(v)$ はその点における振幅を意味しているということである。さらに d_l と v の差を計算したものは、 M 回中のある振幅データから今対象としている s のところの振幅からの距離を意味する。この距離は振幅であり、ノイズの分布において、この振幅の値がどのくらいのノイズの強さであるかが求まることになる。

分子の δv は分母との調整のためである。実際の計算では -4mV から 16mV までを 500 分割した s を推定することになる。したがって厳密な意味ではヒストグラムを排除したことにはならないが、データ件数が 500 件であることを考えると有効な計算レベルにあるとい

えよう。なお、数値積分の計算はつぎのとおり 4 次の拡張シンプソン則を使用し、 δv については 500 分割した値である 0.04mV とした。

$$\begin{aligned} & \left(\frac{17}{48} s_1 g(d_l - v_1) + \frac{59}{48} s_2 g(d_l - v_2) + \frac{43}{48} s_3 g(d_l - v_3) + \frac{49}{48} s_4 g(d_l - v_4) \right. \\ & + \sum_{i=5}^{N-4} s_i g(d_l - v_i) \\ & \left. + \frac{49}{48} s_{N-3} g(d_l - v_{N-3}) + \frac{43}{48} s_{N-2} g(d_l - v_{N-2}) + \frac{59}{48} s_{N-1} g(d_l - v_{N-1}) + \frac{17}{48} s_N g(d_l - v_N) \right) \delta v \end{aligned}$$

図 3.11 において、EPSP は測定された振幅の値であり、まず推定する s_i の大きさ (確率) における振幅値 v_i との差を求める。つぎにその値 (振幅の差) に該当するノイズの大きさを計算し、これをいま対象としている s_i に対応するノイズの値として s_i に掛けるものである。

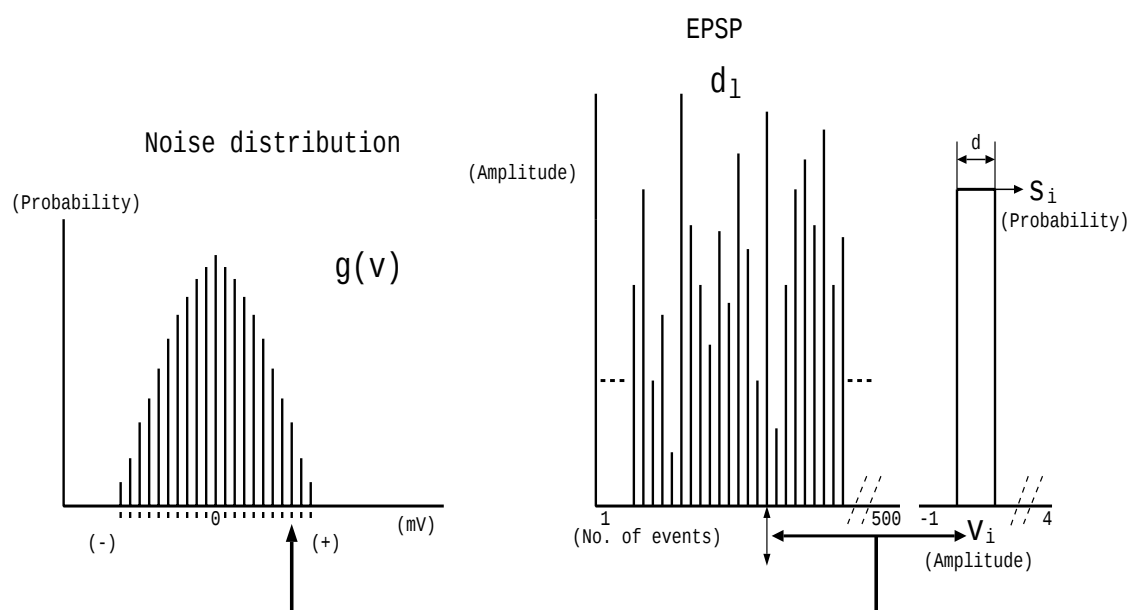


図 3.11: MEND 改良版の計算方法

3.6.2 シミュレーション実験の結果

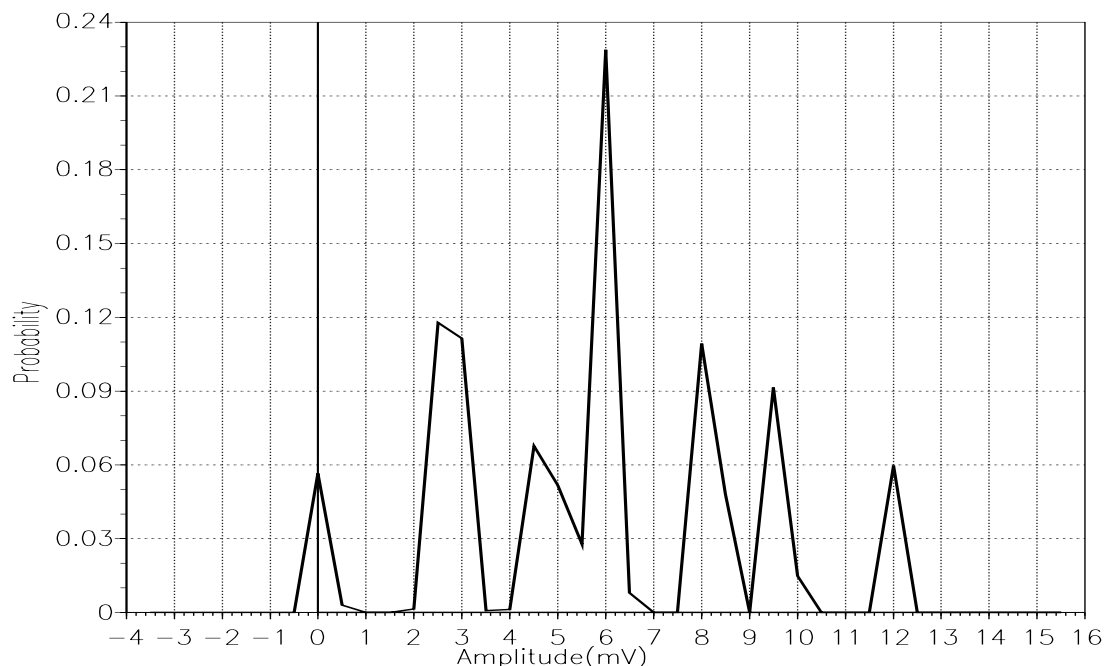


図 3.12: 最尤推定だけによる結果

まず、図 3.12 は MEND を用いないで行った、最尤推定 (ML) の結果である。この場合は 6mV、12mV あたりは推定できているものの、他の山は振幅が異なり、山の数も実際より増えてしまっている。これはノイズの影響により細かい振幅までも忠実に再現しすぎた結果である。山の起伏ははっきりとしているが、これではまったく解析結果として使用できるレベルにない。したがって細かな起伏については、なだらかにする工夫が必要であり、MEND ではエントロピーの項がこの役目を果たすことになる。

ではエントロピーの効果はどの程度のものだろうか。これを確認するために、式 (3.7) において λ を 0 とし、最尤推定の計算部分は行わずにエントロピーの部分だけとしてみる。この結果をグラフに表すと図 3.13 のとおりとなる。この場合、推定結果は当然のこととしてフラットな一直線であり、すべての振幅がエントロピーの値となっている。値は 0.025 となっているが、これはデータが 40 個 (瓶) であるため、 $\frac{1}{N} = \frac{1}{40}$ の値からきている。

ここまでで、最尤推定と最大エントロピーの影響は λ で調節でき、前者の影響が大きいと推定が細くなる傾向にあり、反対に後者の影響が大きい場合はフラットになる傾向があることが分かった。ではこの調整をどのようにしたらよいのだろうか。

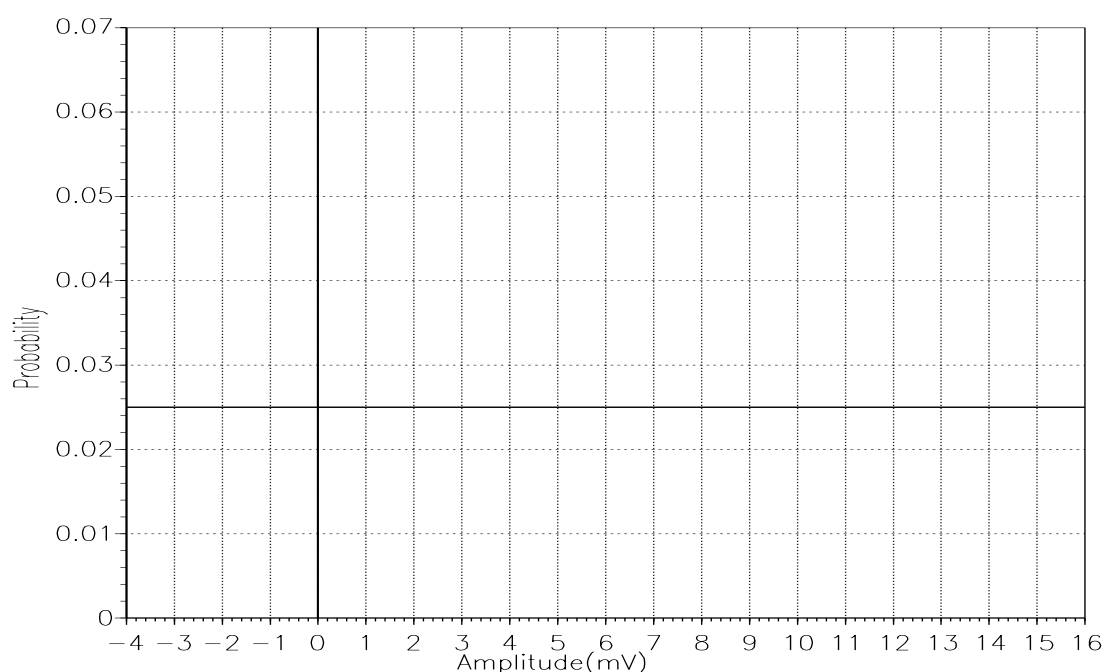


図 3.13: エントロピーの効果

実験として、 λ を 0.3 にした場合を図 3.14 に、0.9 にした場合を図 3.15 に示す。0.3 では最大エントロピーによる影響がまだ強く、山の分布が分からない。また 0.9 ではかなりピークがはっきり出てきている。しかし荒さも同時に出てきており、さらに 0.9 という、ほとんど最尤推定の影響下にある値でよいのだろうか。 λ を決める基準がないと、実験データでもとの分布が分からない場合に困ることになる。そこで、つぎにこの λ を決める基準について述べる。

変数 λ の値とデータ件数

Kullmann は λ の調整において、適合度検定による有意水準 50% を提案している。通常、有意水準として使われるパーセント点は 3%、5% 程度である。したがって半分のデータを捨ててしまう 50% という値は異常に見える。しかし、ここではあくまでの λ 値を決める目安としてたまたま適合度検定を用いたにすぎず、視覚的に判断して決められた値である。後で比較するため、図 3.17 で有意水準 5% とした結果を図 3.16 に示す。なおこの検定は、推定結果に対して仮定したノイズを再度コンボリューションし、どれだけもとのノイズを含

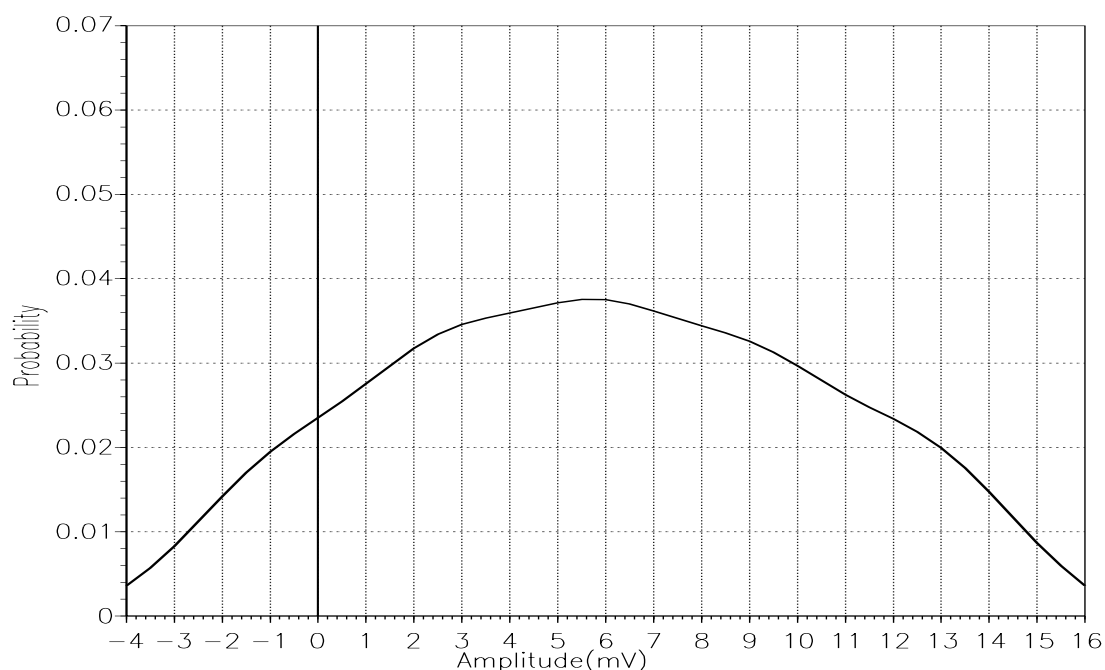


図 3.14: MEND(I) による $\lambda = 0.3$ の結果

む分布に近いかを検定するものである。また収束条件は 1^{-10} とした（以下同様）。

ここで、50%水準で λ の値がいくつになるかが必然的に注目される。そこで本研究では、作成したシミュレーションデータを用いて λ の値を適合度検定の検定量によって求めた。その結果が表 3.1 である。表の左側は MEND(I) 式によるもの、右側が MEND(II) 式によるものである。(I) 式では適合度検定法としてカイ 2 乗検定を用い、(2) 式ではコルモゴロフ - スミルノフ検定も用いた。その結果、(1) 式では λ がほぼ 0.64 のとき、また (2) 式ではコルモゴロフ - スミルノフ検定で λ はほぼ 0.72 で 50%水準となることが分かった。

したがって検定法による違いを考慮すると、 λ は 0.7 位であることが分かった。また両式による違いは、表のとおりこのデータではほとんど現れない。この値ではデータを 50% も棄却することになるが、図 3.17、3.18 のとおりほぼピーク位置が示唆されており、視覚的にもだいたいの推定が行えていることがわかる。ノイズの多い世界における推定処理として、この 50% はぎりぎりのところであると思われる。ちなみに λ が 0.9 の場合は、表から計算するとほとんどデータを棄却していることになり、とても採用することはできない。

表 3.1 において、おもなパーセント点と検定量の値はつぎのとおりである。

表 3.1: λ と各適合度検定量の値

	MEND(1)	MEND(2)	
λ	χ^2	χ^2	K-S
0.10	431.4		
0.20	307.6		
0.30	209.6		
0.40	136.0		
0.50	83.4	83.6	36
0.57	57.0		
0.58	53.9		
0.60	47.9	47.8	24
0.62	42.5		
0.63	40.0		
0.64	37.6	37.4	22
0.70	25.4	25.1	19
0.71	23.7	23.4	13
0.72	22.1	21.8	11
0.80	12.2		
0.90	5.4		

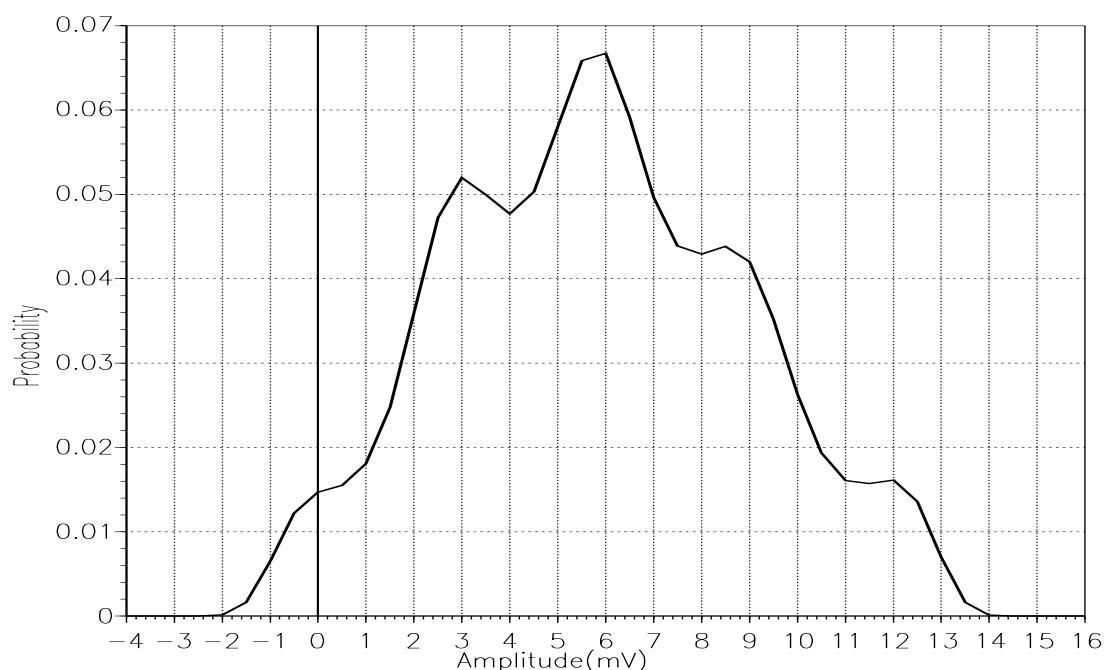


図 3.15: MEND(I) による $\lambda = 0.9$ の結果

カイ 2 乗検定 (Chi-square Test) : $\chi^2_{0.5}(40)=39.3$, $\chi^2_{0.05}(40)=55.7$

コルモゴロフ - スミルノフ検定 (K-S:Kolmogorov-Smirnov's Test) : $\alpha(0.5)=12$

つぎに、データ件数と解析結果との関係を調べてみる。実際の実験データは、限られたデータ件数しか得られないが、データ件数がどのように結果に影響するかは注目に値する。ここで用いた分布は図 3.19のとおり放出サイトを 3mV、6mV とし、失敗（無反応）の山として 0mV を確率 0.25 パーセントで設定した。なお、図では 0mV の上の部分は省略した。ノイズについては前の仮定と同一とし、両者をコンボリューションした結果を重ねたのが図 3.21 である。畳み込まれた分布に基づき、まず 500 件のランダムなデータを作成した（図 3.22）。このデータを使用して MEND(II) で計算した結果が図 3.23 である。そして、データ件数を 10 分の 1、逆に 100 倍にしてそれぞれ 50 件、5,000 件とした結果を図 3.24、3.25 に示す。 λ はいずれも 0.7 である。

50 件ではピークは現れるものの、振幅の値がかなりずれてしまった。また 5,000 件にした場合では、2 つの山のピークがはっきりしたことが分かる。6mV のピークについてはうまく現れないが、5,000 件による結果のほうがやや膨らみが出て、500 件の場合より強調さ

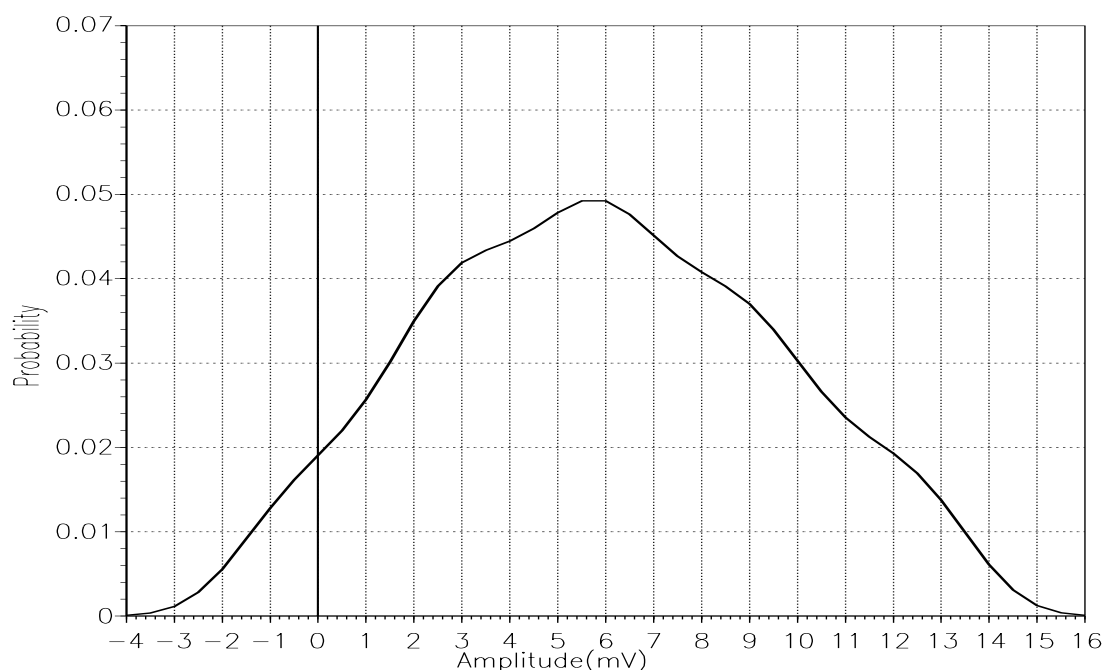


図 3.16: MEND(I) による $\alpha = 0.05$ の結果

れている。この結果から、データ件数については多いほど有利であることがわかった。また MEND(II) の計算では、データ件数が多いほど収束しやすくなった。

MEND 改良版での実験結果

MEND 改良版では、ヒストグラム状に作成したデータは使用しない。500 回分の各振幅の値をモンテカルロ法によって得て、実際のデータと仮定する。500 件のデータ数と確率の分布については、MEND と同一である。なおこのデータ数については、実際の実験で得られるデータが、数百から千数百件（回）分であることが多いという前提から設定した。

MEND では、使用するデータが振幅（横軸）と確率（縦軸）で表される。これに対し、MEND 改良版では振幅の値（縦軸）そのものを使用する。MEND 改良版の計算方法で述べたとおり、この場合は得られた振幅に対してすべてのノイズを演算している。そこで MEND(II) 式がなお図 3.10 にあるヒストグラム状のデータを必要とする（図 3.26 の離散値も同時に使用する）のに対し、MEND 改良版では図 3.26 で得られる振幅だけで済む。

したがって、この改良版では実際のデータに手を加えることなく、そのまますぐに解析

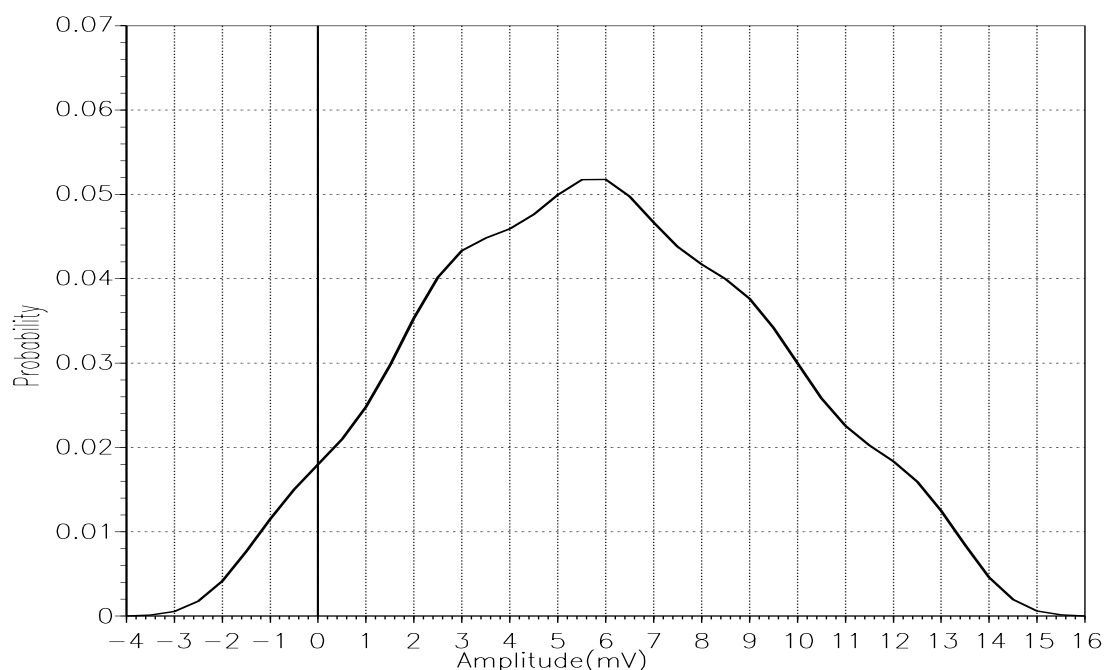


図 3.17: MEND(I) による $\lambda = 0.64$ の結果

処理を行うという、理想的な手法となっていることが分かる。MEND 改良版による推定結果を図 3.27 に示す。 λ の値は MEND で得られた値から、0.7 を使用した。縦軸の確率は、これまでよりかなり小さくなっているが、これは瓶の数がそれまで 40 だったのに対し、最大限まで増やした 500 に増えているためである。図から明らかなように、MEND 改良版では推定の山が滑らかで自然である。これは MEND(I) や (II) のように、粗い瓶詰めを行っていないためである。6mV のピークはより顕著になり、振幅の値もほぼ正確である。また他の 3mV、9mV、12mV についてはなおピークは明らかにはなっていないものの、やや強調されてきている。

MEND 改良版は、単に結果の瓶詰めに細かくして推定をなめらかにしたというものではない。本質的には前項で述べたとおり、その計算過程において明らかに異なる方針のもとで、瓶詰めになくす限界まで追求したものである。

素量解析で重要な点は、1 素量における興奮性シナプス後電位の大きさである。したがって、こうした推定分布に求められるのは、谷の深さや山の裾はあまり重要でなく、山のピークとなる振幅の正確さである。こうした点からいうと、最小興奮性シナプス後電位 (mEPSP)

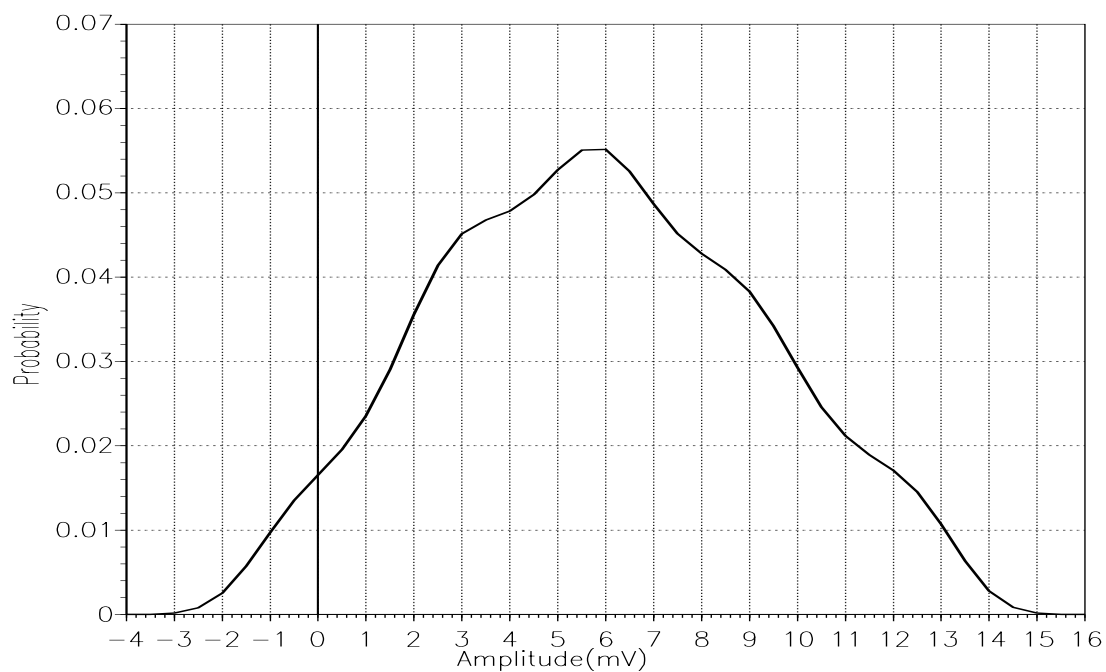


図 3.18: MEND(II) による $\lambda = 0.72$ の結果

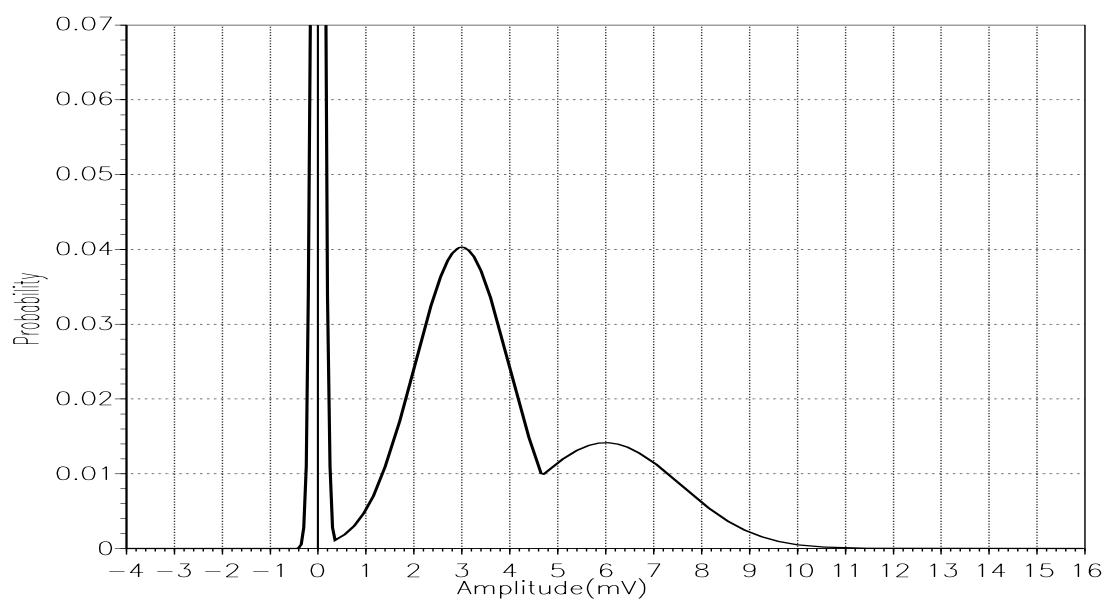


図 3.19: 2 サイトの放出分布

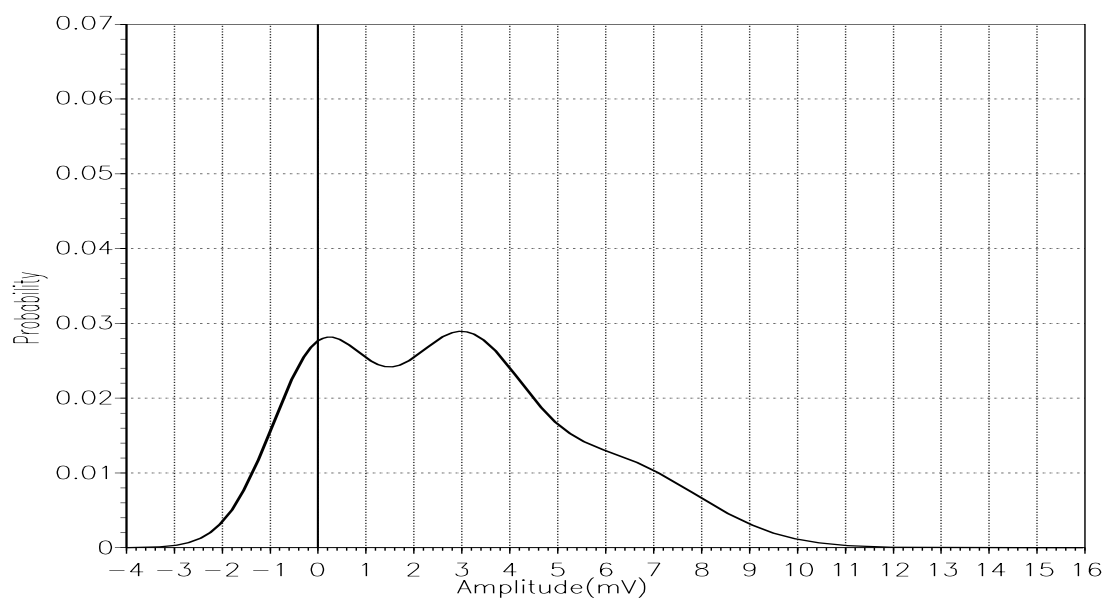


図 3.20: ノイズをコンボリューションした結果

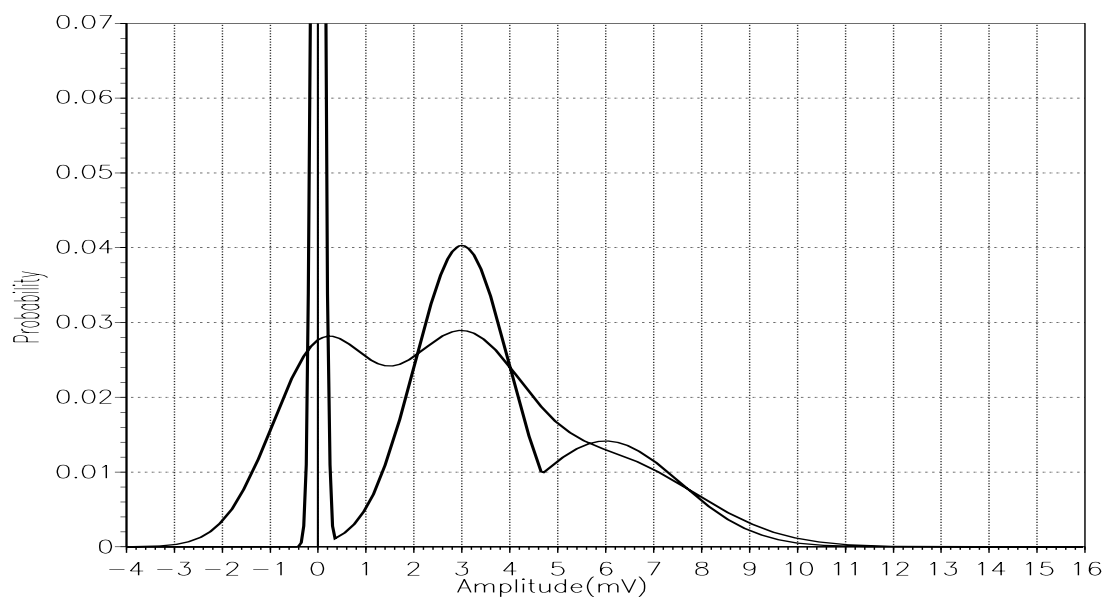


図 3.21: もとの分布とノイズをコンボリューションした結果

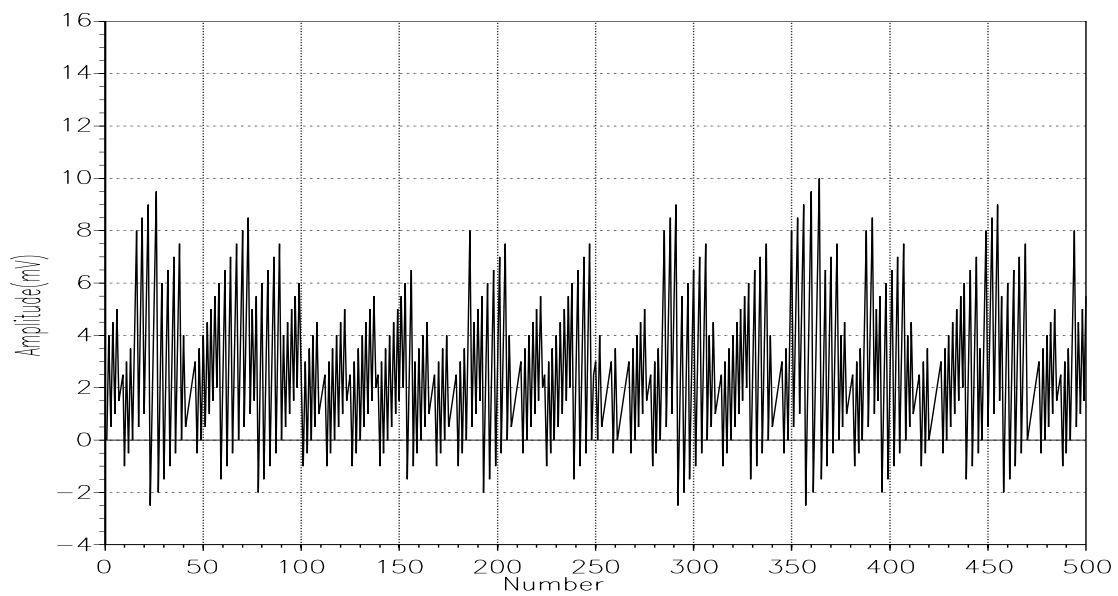


図 3.22: 生成したデータ

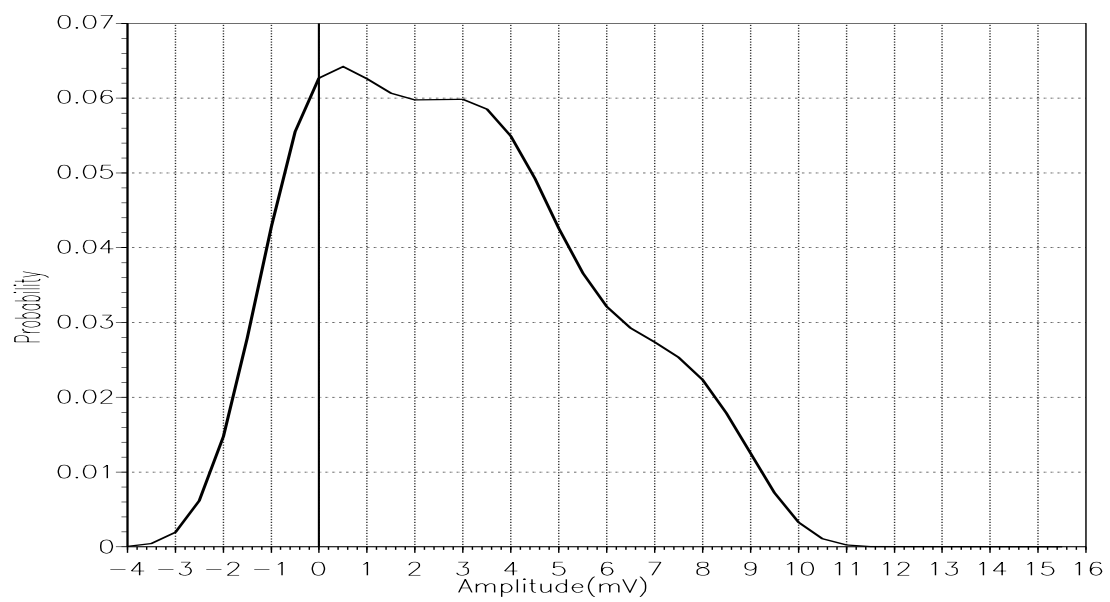


図 3.23: データ数500件による結果

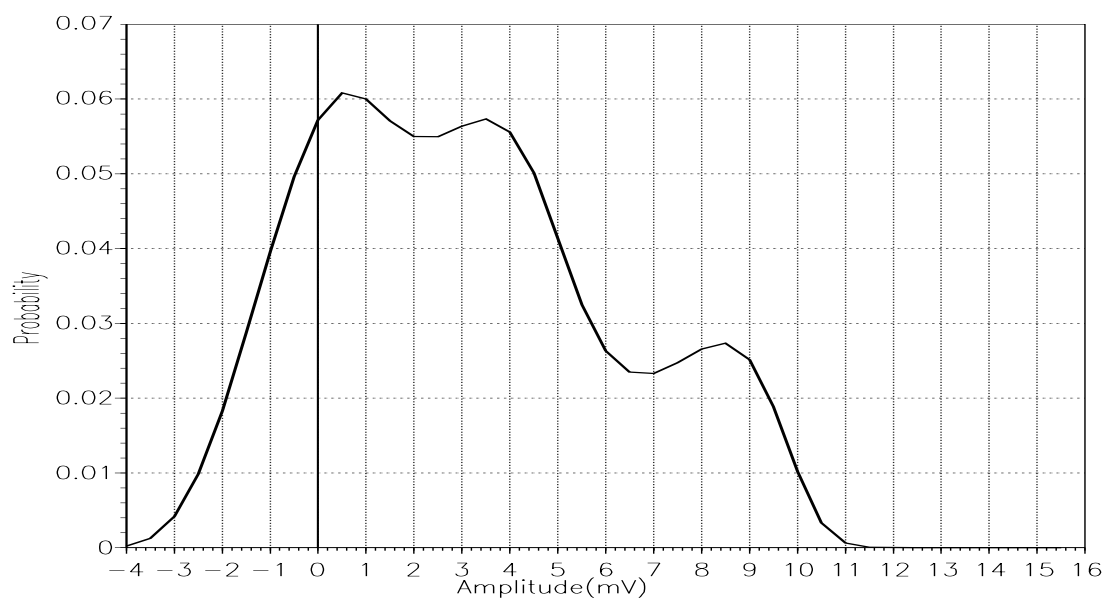


図 3.24: データ数 50 件による結果

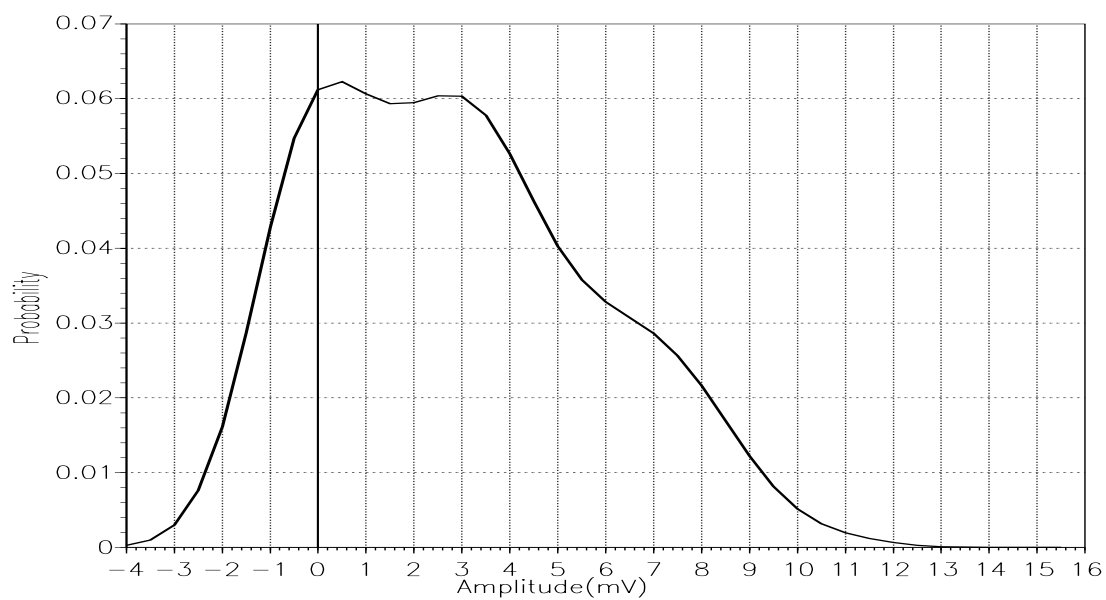


図 3.25: データ数 5,000 件による結果

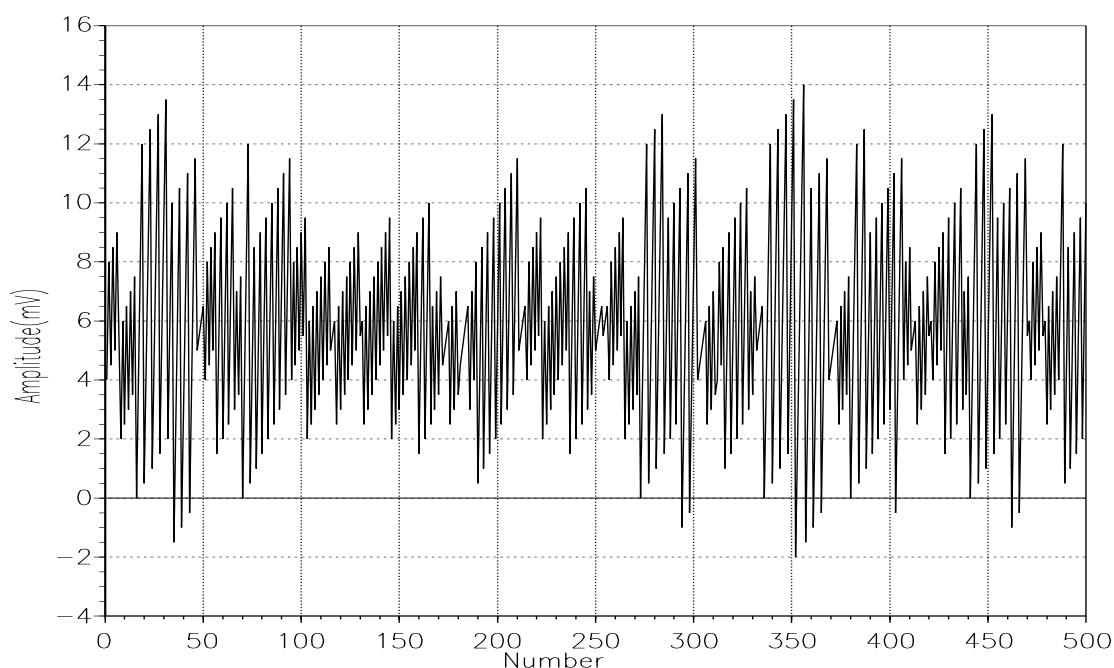


図 3.26: シミュレーション用データ

の振幅が何 mV になるのかといったことが、最も重要なポイントであるといえる。

したがって、このシミュレーションデータにおいては、3mV の山のピークがまず注目される。しかし、3mV の放出サイトは他のサイト、特に 6mV のサイトの影響を受けてしまい、ピークははっきりしない。一方、6mV についてはかなり頂点が細かく読める程度にピークが存在する。MEND(I)、(II) では表示上の瓶の影響もあって、この場合 0.5mV の幅でしかピークを推定できない。MEND 改良版では 0.04mV まで細かく限定できるため、実用性が十分である。その理由は、実際の実験において得られるデータが 1^{-1} 以上の精度を持つため、推定もその精度で行うことが望ましいからである。ただしどのくらいが実用性のある精度であるかについては、データ数や振幅の上下限によって異なる。

最小興奮性シナプス後電位については、6mV のサイトが判明し、6mV 以前にサイトらしきものがあることが分かれば、これまでの生理学的知見からそれが最小興奮性シナプス後電位であることが想定できる。さらに 6mV が 2 番目のサイトであると考えられれば、それは素量 2 個によるものであり素量 1 個のサイトは 6mV の半分である 3mV と推定することができる。また 2 例目のデータ (図 3.19) のように、最初のピークがはっきり現れると

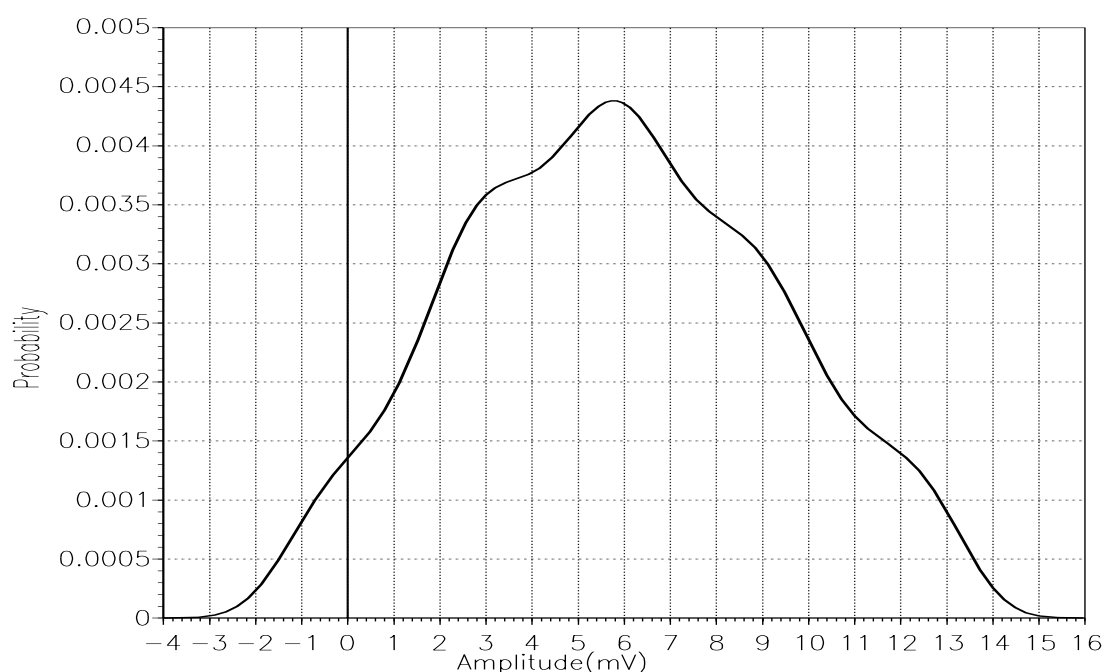


図 3.27: MEND 改良版による $\lambda = 0.7$ の結果

きは直接最小興奮性シナプス後電位が求まり、今度は逆に 6mV の山を推定することが可能となる。以上のことから、この改良版による効果は正しいピークを求めるという実用面で、従来手法よりも大きな効果が期待できることが分かった。これらについては、さらに考察で検討する。なお比較のために $\lambda = 0.6$ とした結果を図 3.28 に示す。

素量解析では谷の深さや山の裾はあまり重要でなく、山のピークの数とその振幅値の正確さが重要になる。しかし、MEND (I) では表示上の瓶の影響もあって、たとえば 20mV の幅を 40 分割するといった程度でしかピークを推定できない。これに対し MEND (II) と MEND 改良版では、この場合 500 分割すると 0.04mV の幅で細かく推定できるため、実用性が十分である。その理由は、実際の実験において得られるデータが 0.1mV 以上の精度を持つため、推定もその精度で行うことが望ましいからである。ただし、どのくらいが実用性のある精度であるかについては、データ数や振幅の上下限值によって異なる。ここで MEND (II) において瓶の数を 500 に増やした際、各区画におけるデータ数は激減し、適合度検定にはコルモゴロフ - スミルノフ検定を使う必要が出てくる。コルモゴロフ - スミルノフ検定は、各区画における期待度数が 5 に満たなくても使用できる利点を持つ。しか

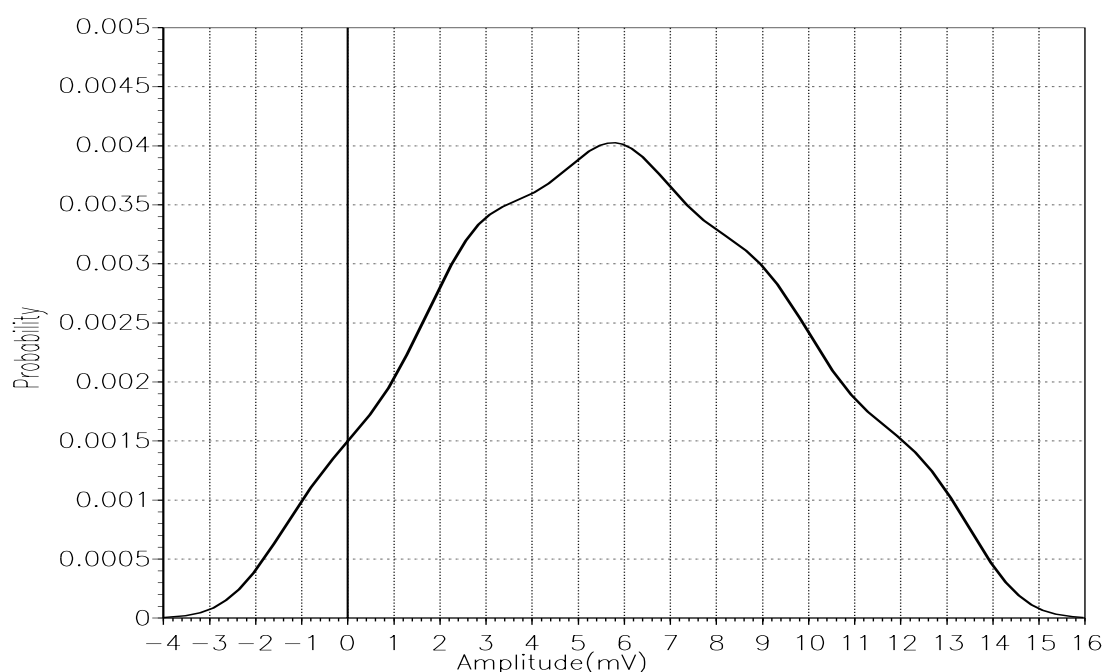


図 3.28: $\lambda = 0.6$ の場合

し、特に標本数が少ない場合などでは検定が荒くなる欠点を含むため、生体の限られた数のデータで用いる場合には注意が必要である。これに対し、MEND 改良版ではカイ 2 乗検定を用いるために分子の δv の調整で積分の区間数を減少させても、高精度の計算に依存した部分により瓶数を増やした MEND (II) とほぼ同等な結果が得られるという利点を持ち、さらには計算時間の節約にもつながるものとなっている。

最後に MEND(I)、(II) および MEND 改良版の違いについてまとめる。MEND 改良版では式の右辺はヒストグラムにおける瓶の計算とは別のもので、数値積分による連続量の計算となっている。これはニュートン・コーツ系の高精度の数値積分により、MEND(I)、(II) の台形則に近い計算以上の精度を実現するものである。MEND(II) で瓶を 500 として計算精度を高めることは可能であるが、MEND 改良版では分子における δv を増加させて区間を 500 以下としても、実用上問題ない程度の精度で結果が得られるという利点がある。これは式の分母における連続量における計算に精度を依存した形となっているためで、計算時間上でもより有利な方式となっている。さらに MEND(II) ではコルモゴロフ - スミルノフ検定を用いているが、データ件数が少なるほど検定が荒くなり、MEND の重要な要素であ

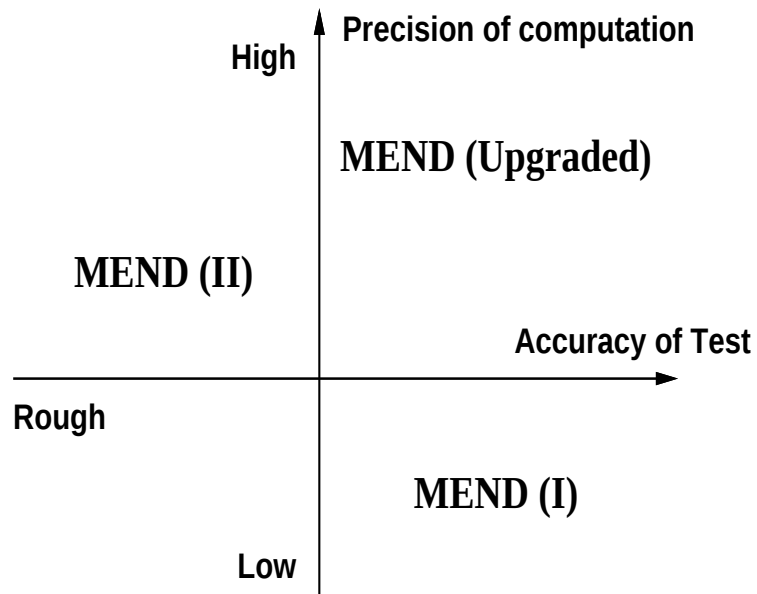


図 3.29: 各 MEND 法の特徴

表 3.2: 各 MEND の計算で扱う数値計算方式の違い

	MEND (I)	MEND (II)	MEND (Upgraded)
Form	Binned	Unbinned	Numerical integral
Precision	Low	Medium	High
Test	χ^2	K-S	χ^2 , K-S

る λ の決定に大きな影響を与えかねない。こうして MEND(II) では計算精度と適合度検定のどちらかを犠牲にしている側面がある。この点 MEND 改良版では、よく用いられるカイ 2 乗検定の利点を残したまま、計算精度もある程度維持できる方式となっている。各 MEND の特徴を表 3.2 および図 3.29 に示す。

MEND はヒストグラム状に近似する計算方式により、データを無駄にしてしまう側面がある。また解析結果におけるピークの位置が、瓶詰めの数に影響されて精度が悪くなってしまうという問題点がある。その点で MEND 改良版は、ヒストグラムによる近似部分を改良することにより、データを最大限、有効活用することを可能にした。またつぎのとおり、素量放出部位のピーク数を視覚にたよらず定量的に求める手法を工夫した。

推定結果のピークを明らかにすることは、素量解析では非常に重要なポイントになるが、前の章で行ったシミュレーションでは推定結果が単峰性の山となり、ピークは 1 つしかはっきりしていない。また、実験データによる推定結果では 1 つ目と 2 つ目の間にピークではないコブがあり、ピークを示唆しているものの、そのままでは明確な判断ができない。そこでピークの存在をより明確にするため、各振幅における傾斜を計算することにより、変曲点を求めた。シミュレーションでの推定結果(図 3.27)から求めたものを図 3.30 に示す。ここで縦軸は傾斜の度合、横軸は振幅値を示しており、山と谷の間で傾斜の反転が起きて

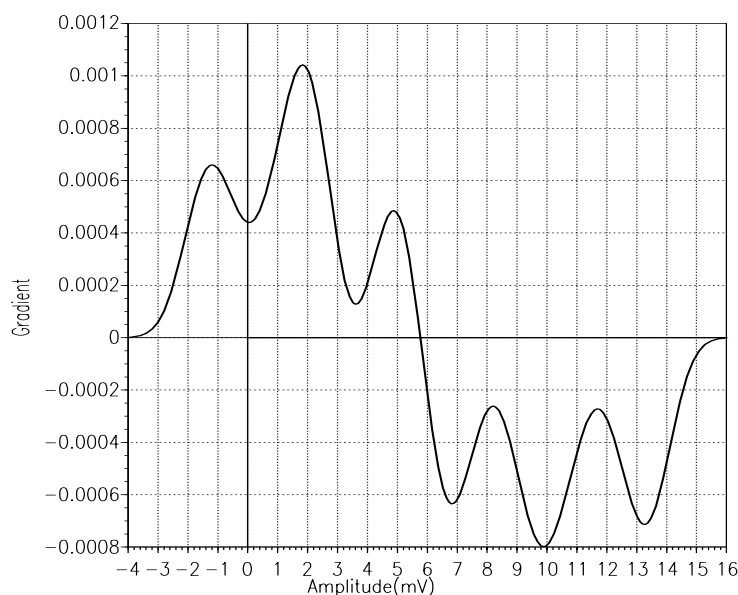


図 3.30: 変曲点 (シミュレーション)

いることがわかる。したがって、5 つの右下がりの箇所ピークが存在が示唆された。この5 つはそれぞれ 0、3、6、9、12mV の放出部位を示すものである。この方法は、もともとはっきりしている山以外のピークの正確な振幅値を求めるものではないが、視覚にたよらず、変曲点と変曲点の間にピークが存在する可能性を示すものとして重要である。

3.7 まとめ

本章で行ったことはつぎの 2 項目である。

1. 素量解析法として提案されている MEND について、シミュレーション実験によりその有効性を確認した。
2. MEND の問題点を明らかにし、その解決策として高精度な計算手法を導入した MEND 改良版を提案した。

MEND はあらかじめデータの分布を仮定したりヒストグラムのオーバーラップを行うという、従来からの統計的手法をとらない。このため統計的分布に左右されることなく、データに忠実な推定を行うものとして期待される。さらに MEND 改良版は、生体における有限のデータに対してよりデータを有効に用いる方法として、素量解析において有効な手段であるといえる。そこで MEND 改良版のモノシナプスにおける素量解析への適用は、従来では明確にされなかった、1 素量が受容体に与える影響や長期増強、長期抑圧といったレベルでのシナプス可塑性機序の解明にも役立つものとして期待される。

第 4 章

単一シナプスの実験データを用いた素量解析

4.1 はじめに

電気生理の実験では集合的なシナプスの反応を測定（ポピュレーションレコーディング）したものが多い。神経細胞間では、数千ものシナプスが接続し合っている。したがって、ある細胞に電極をあてて別の細胞への信号伝達を測定しようとする、多くの場合その細胞では複数の細胞を経由したシナプスによる反応結果しか測定できないことになる。素量解析を行う場合、神経線維 1 本からの直接に伝達された反応を解析するのが妥当であると思われる。それは、集合的な反応から個々のシナプスの振舞いを解析することが困難だからである。そこで本研究では、ある細胞からある細胞へ、1 本の神経線維のみで接続されているモノシナプス [42] による実験データを用いて、MEND 改良版を使用した解析を行った。モノシナプスは数が非常に少なく、電極を刺しながら見つけていくという高度な技術が必要であるが、本章では先駆的な研究によって得られたモノシナプスの実験データ [34] を用い、現在最も進んでいると思われる手法により解析を行うものである。

素量解析に関連した光学的測定では、シナプスにおける小胞内の分子数は一定であると考えられている。しかし素量放出についてはいまのところ電気生理学的な実験により確認するしかない。実験ではモルモットの種類であるギニアピッグ (Guinea pig) などの海馬スライスを、細胞がすぐに死なないように一定温度 (34) の灌流液に浸しながら行う。また細胞の状態が安定して測定可能となるまで、40 分は必要である [34, 43]。つぎにこのス

ライス上で、歯状回にある細胞体（顆粒細胞）に微小ガラス管で（-）イオン溶液（マイナスパルス）を与え、インパルスを発生させる。微小ガラス管には（-）イオンが満たされている。そこで、これに（-）イオンを注入すると同じ極である（-）どうしが反発し合い、微小ガラス管の先端の穴からイオンがはじけ出される。こうして目的の細胞にインパルスを人工的に発生させることができる。なお、これらの（-）イオンとして、グルタミン酸イオンが使用される。インパルスはこの微小ガラス管（マイクロピペット、Glu（グルタミン酸）ピペット）のそばに挿入されたスパイクピペットで測定される。一方、興奮性シナプス後電位は軸索の延長にある別の細胞体でマイクロピペットで測定される。モノシナプスによる実験では、ピペットの位置を少しずつ変えながら 1 対 1 対応のモノシナプスを探すことによって行われる。サンプリング周波数は例えば 1 ミリ秒を 10 に分けて行い、30KHz のノイズフィルターを使用する。細胞は数時間でへたってしまうため、得られるデータは有限である。こうして数百件のデータが AD 変換の後パソコンなどに入力され、実験データとして保存されることになる。

4.2 実験の概要

4.2.1 測定部位

本節では海馬における測定の部位および実験の方法、さらにデータの品質において重要なポイントとなるモノシナプスについて述べる。海馬を長軸に垂直なスライス切片でみると、海馬へのおもな入力線維、出力線維を認めることができる。またこうしてスライスした海馬は、図 4.1（[34] をもとに作成）のとおりに CA1 野、CA2 野、CA3 野、CA4 野とよばれる部分から構成される [44]。CA4 野で馬蹄形に位置する細胞は顆粒細胞で、入力線維のおもなものはこの細胞群に到達し、興奮性シナプスを作る。さらに顆粒細胞の軸索（苔状線維：mossy fiber：mf）は CA3 野に伸びており、CA3 野、CA4 野にある錐体細胞を興奮させる。

興奮性シナプス後電位の測定では、刺激および反応測定の箇所にはいくつかの組合せがある。そのうちのひとつとして本研究で用いたデータの測定箇所は、顆粒細胞から苔状線維を通して CA3 野の錐体細胞に至る経路である。この経路において、後で述べるモノシナプスを探し出して測定を行う。刺激は顆粒細胞に与え、その反応を錐体細胞側で測定する。長期増強は苔状線維から錐体細胞へのシナプスで発生する。なお、顆粒細胞でもスパイク

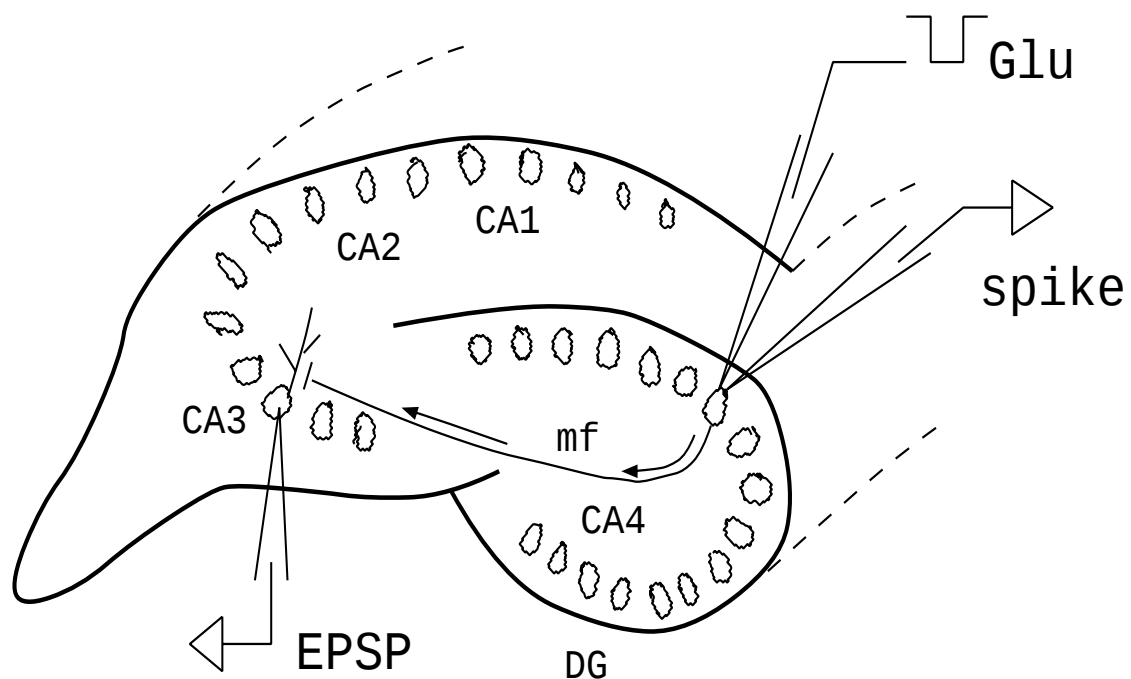


図 4.1: 海馬スライスと測定部位

のモニターを行う。

4.2.2 実験の方法

ここでは入手した実験データの測定方法を述べる。ギニアピッグの海馬から厚さ 0.3mm のスライスを作成し、標準の灌流液に浸して安定させた後、海馬歯状回の顆粒細胞層の刺激により CA3 野の錐体細胞においてガラス微小電極で細胞内記録を行う。記録は細胞が十分安定した段階で行い、自発性の興奮性シナプス後電位や変則的なスパイクが起きていない区間について 500 個の興奮性シナプス後電位をデータとして用いた。海馬歯状回における顆粒細胞の近傍にはグルタミン酸ピペットを挿入し、60 ~ 100ms の間で刺激時間を調整後、これを 1Hz で与えて刺激ごとに 0 ~ 2 個のスパイクを発生させている。スパイクが 2 回起きた場合は最初のスパイクに対応する興奮性シナプス後電位を用い、スパイクが起きなかったものはデータとして用いていない。興奮性シナプス後電位の値は、その直前およびスパイク前の電位勾配を計算してベースラインの校正を行ったものを用いている。また、もう一つの電極を刺激電極の近くに刺入することにより、刺激パルスを測定する。こ

うして歯状回側の2つの電極を移動させながら、ごく稀に見つかる、刺激に対応する興奮性シナプス後電位の時間的タイミングが一致する部位を探した後で測定を行う。この時間的なタイミングに変動が起きない場合は他の顆粒細胞による興奮性シナプス後電位が含まれてないものと考えられ、顆粒細胞と錐体細胞とは苔状線維によりモノシナプスで接続されているものと判断される。興奮性シナプス後電位はローパスフィルタを通してテーブルコードに記録し、さらにAD変換によりパソコンのデータとして取り込んだものをワークステーションで解析処理した。

この実験のシナプス伝達の機序については、顆粒細胞層に放出されたグルタミン酸が、偶然、測定中の錐体細胞に達するシナプスを持つ顆粒細胞を刺激した時を前提に考えている。このとき顆粒細胞にあるグルタミン酸感受部位が刺激されてスパイクが発生し、インパルスが苔状線維を伝播してシナプス前膜に到達する。その後、前膜では神経伝達物質(グルタミン酸)を含む小胞の放出が起き、シナプス後膜に存在する非NMDA型受容体(non N-methyl-D-aspartate receptor)の内のキスカル酸受容体(Quisqualate receptor)に作用し、単純な興奮性シナプス後電位が発生するものと考えられる。なおこのニューロンでは、電極からの刺激がない場合でも自然発生的に起こる自発性の興奮性シナプス後電位が起きている。これは、前膜から洩れ出したりシナプス間隙に遊離して存在した微量な神経伝達物質に起因するもの、あるいは細胞体自身によるもの、また細胞体に刺入した記録電極に起因する圧力などの物理的な刺激によるものと考えられる。これらの自発性興奮性シナプス後電位については、もう一方の電極で刺激電極からの刺激パルス进行しながら記録を行っているため、刺激と応答のタイミングおよび応答の波形によりその特定が可能となっている。したがって実験終了後に解析で用いるデータは、純粹に刺激による応答のみが記録された区間を用いた。

4.2.3 モノシナプスでの測定

可塑的变化がシナプスで起きる可能性が高いことは、前に述べたとおりである。したがって、シナプスにおける素量放出量の測定が重要になってくるが、実験においてこのシナプスの振舞いを見究めるのは難しい。その理由は、ある細胞からある細胞へのシナプス接続は無数であり、通常の実験では図4.2のように興奮性シナプス後電位が得られてもそれは複数の集合的なシナプスの反応になってしまうからである。特に一度他の細胞を介してから伝達では、時間的な遅れにより測定信号の波形をゆがめてしまう。

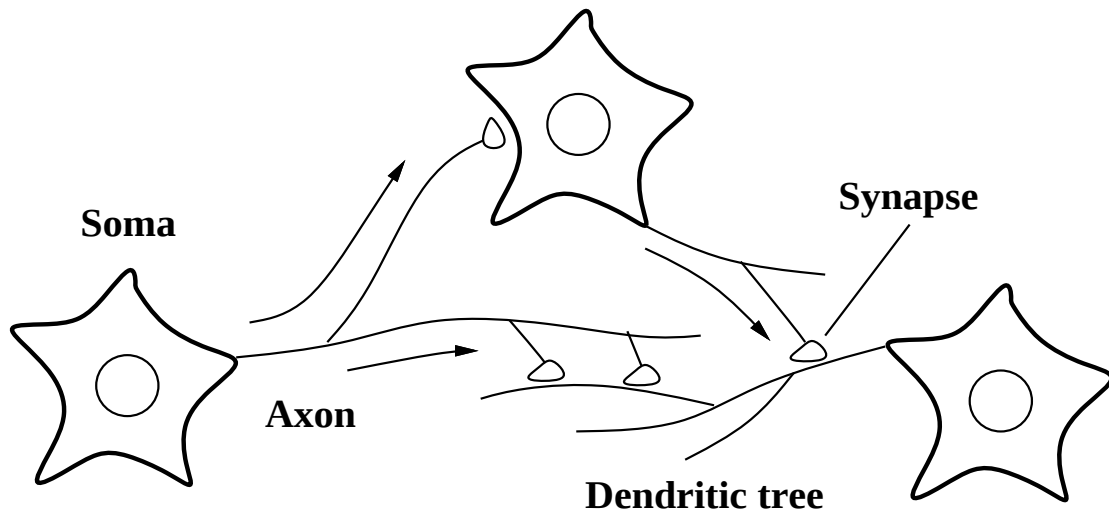


図 4.2: 集合的なシナプス

シナプスの大きさや形はさまざまである。そこで各シナプスのインパルスに対する反応（特性）もまちまちであり、単に興奮性シナプス後電位をシナプスの数で割ればよいというものではない。またもし形態が同じであったとしても、実験対象としている連絡路が、いくつかのシナプスを持っているかを正確に数えるのは容易ではない。興奮性シナプス後電位はノイズに埋もれた非常に小さい振幅である。したがって、誤差を無視して憶測で1つのシナプス数を導くことは不適切である。

そこで考えられたのが、モノシナプスを探し出して行う実験である [34]。これまでの知見から、無数にあるシナプスのうち、ごく一部にある細胞からある細胞へ、1本の線維で接続されるものがあることが知られている。これをモノシナプスとよび、電極を当てながら図 4.3 のようなモノのシナプスを探していくものである。本研究はモノシナプスのデータを想定したものであり、これによる測定結果を用いて解析を行っている。なお、線維の先端でごく近傍において複数のシナプスに別れるものは、そこで行われる伝達の時間的な遅れにについての大きな影響はないと思われる。

4.3 実験データの素量解析

以下ではモノシナプスによる実験結果を用いた解析結果を述べる。まず最初に、従来行われてきた統計的分布を測定結果のヒストグラムに当てはめる方法を簡単に述べ、つぎに

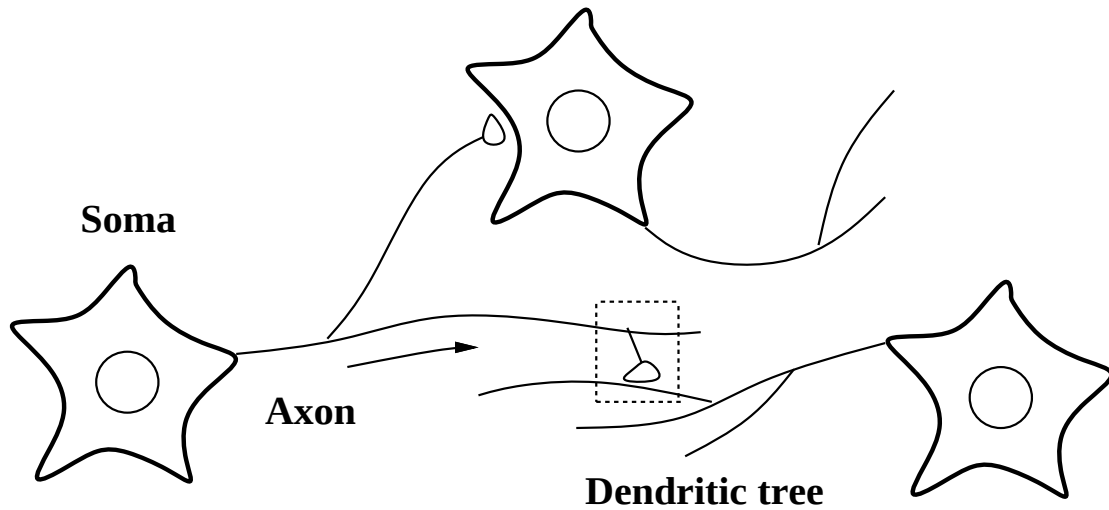


図 4.3: モノシナプス

MEND 改良版による解析を行う。

素量解析において、振幅は長期増強の影響により、刺激の回数が増えるにしたがって増大していく傾向にある。こうした状況の基で、一般に放出素量数の平均値が増大する傾向が認められればシナプス前線維起源、素量 1 個あたりの平均振幅の増大が認められた場合はシナプス後線維起源を意味する [7]。しかし本実験データは長期増強が起きていない、純粋な興奮性シナプス後電位を測定したものである。

4.3.1 従来の手法による解析

従来から素量解析で行われてきた方法として、各種統計分布の理論曲線を測定結果から作成した振幅のヒストグラムに当てはめるものがある [45]。この方法では、最尤推定を行いながらピークの値を求めていく。統計的分布としてはパスカル分布、ポワソン分布、2 項分布などが使用される。この手法を用いた解析で、本研究で使用するデータとほぼ同一のものによる結果 [34] として、500 件のデータをヒストグラムにしてさらに統計的分布を最尤推定して当てはめたものがある。この結果では、パスカル分布、2 項分布については失敗の 0mV とそのつぎの山（放出サイト）が出現しているだけだが、ポワソン分布についてはさらにつぎの山がかろうじて出現し、他の分布より合うことが明らかにされている。

こうした実験で得られた振幅のヒストグラムに統計的分布曲線を当てはめる方法では、

ヒストグラムの山谷の位置と理論曲線とを合わせるのは難しい。特にデータ件数の少なくなる 2 番目以降 (0mV の山を 0 番目とする) の山については、理論分布を試すだけの情報に乏しくなる。この手法では、スパイクを与える直前における細胞電位の変動をノイズとしてとらえ、ある程度のノイズ除去が可能である。しかし 2 番目以降の放出サイトを区別できるまでにはいたっていない。

ノイズを含んだものとして、しかもそれが統計的分布に見合うような推定を行うと、どうしても大きな特徴に分布が推定されてしまう。ノイズは小さい振幅ほどその影響が大きいと思われるので、こうした傾向はノイズ除去の必要性をいっそう強くする。

4.3.2 使用データ

最初に述べた実験方法により測定された結果が、図 4.4 である。縦軸の単位は mV、横軸は件数として興奮性シナプス後電位の値をプロットしたものである。この値はアンプを経てテープレコーダに記録した後、AD 変換を行ってパソコンに保存したものである。全体のデータのうち、使用可能な区間における 500 件の興奮性シナプス後電位はすべて -0.5mV から 4mV の範囲にある。これを 0.1mV 間隔の振幅でヒストグラムにまとめたものが、図 4.5 である。なおもとのデータは 0.01mV の精度があるが、ヒストグラムにした段階で振幅は 0.1mV 間隔になっている。また図 4.5 は 500 件すべてのデータについてであるが、前半と後半のそれぞれ 250 回で分けたものが図 4.6、4.7 である。これらはいずれも 0mV が一番頻度が高く、0.3mV 前後につぎのピークがあるように見える。またそのつぎの山もありそうだが、はっきりと分らない。また振幅が大きくなるにつれて頻度も下がっているのが分かる。10 件以下になるとノイズによる影響もかなり含まれて、多少の山谷の信頼性はそう高くないものと思われる。

例えば長期増強は実験しているそのときに起きているため、実験のある区間を比較すると長期増強による素量放出の分布がどう変わってくるかが分かる。用いたデータは、モノシナプスにおける長期増強の基礎実験によるものである。素量解析はシナプス可塑性機序解明のために期待される手法であるが、小胞の放出および興奮性シナプス後電位の解析は、長期増強が起きていなくても可能である。これはシナプス後膜における反応 (興奮性シナプス後電位) は、長期増強に関係なく得られるからである。そこで本研究で目的とする前膜からの素量放出量の測定は、MEND 改良版によってこのデータを解析することにより実現可能となる。モノシナプスによる実験は、1 日 1 回できるかどうかの実験を 1 ヶ月間続け

てやっと 1 回成功するといった、非常に時間のかかる実験である。本研究ではこのデータの条件を踏まえて、まず興奮性シナプス後電位のうちの最小の振幅とそれに続く放出サイトの推定を行った。

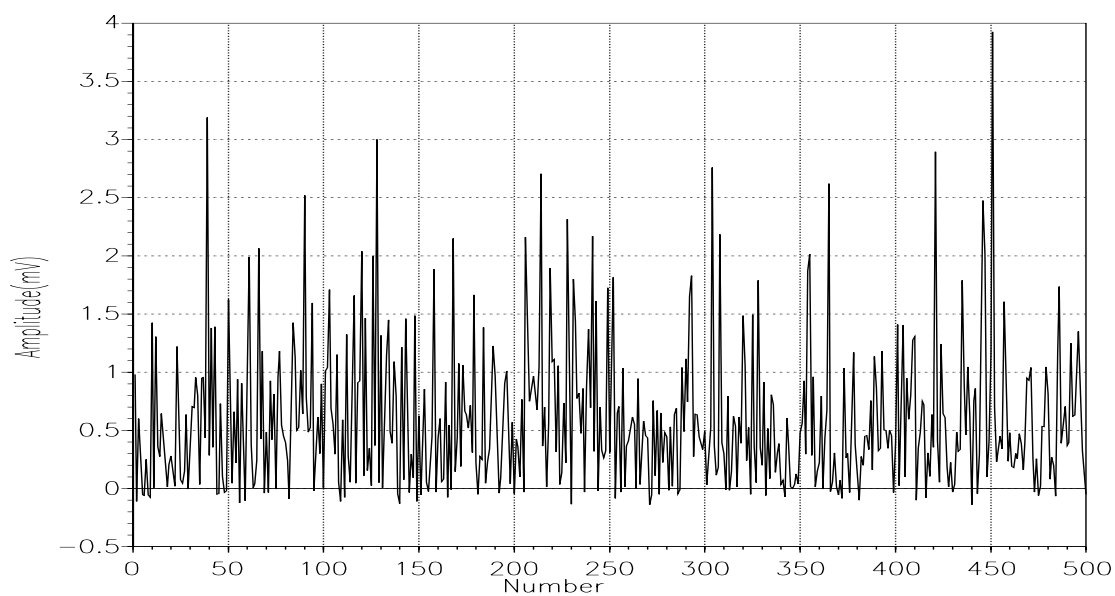


図 4.4: モノシナプスの実験データ

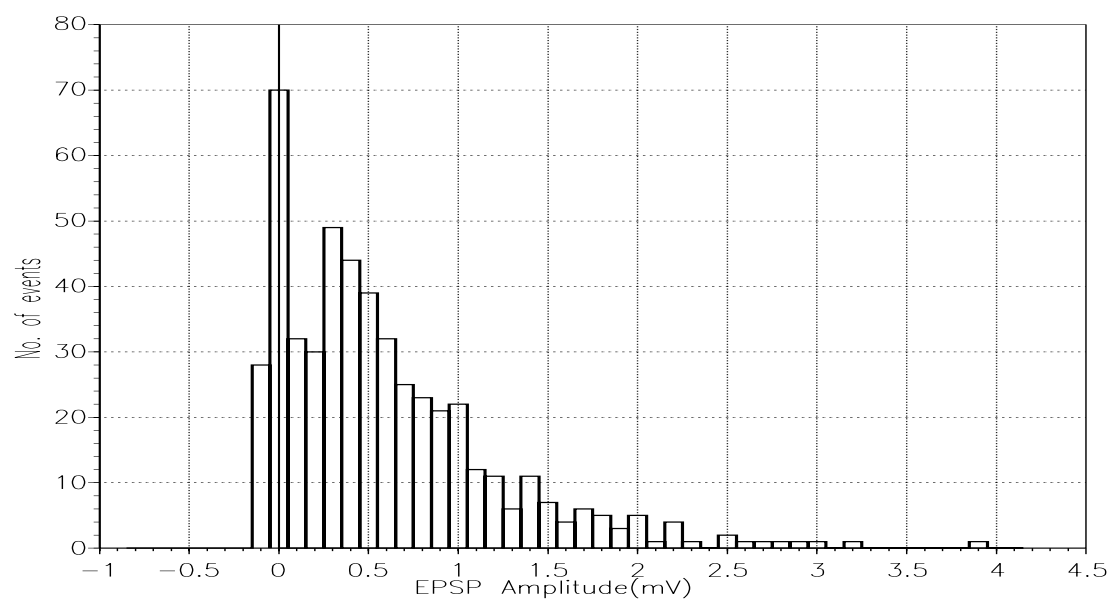


図 4.5: ヒストグラム (1 - 500 件)

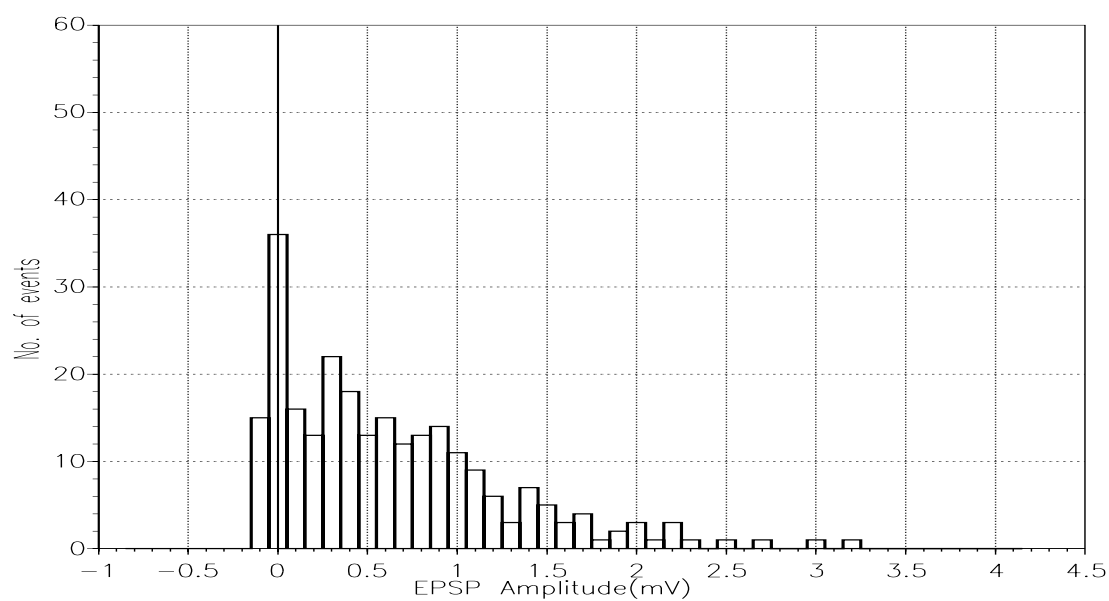


図 4.6: ヒストグラム (1 - 2 5 0 件)

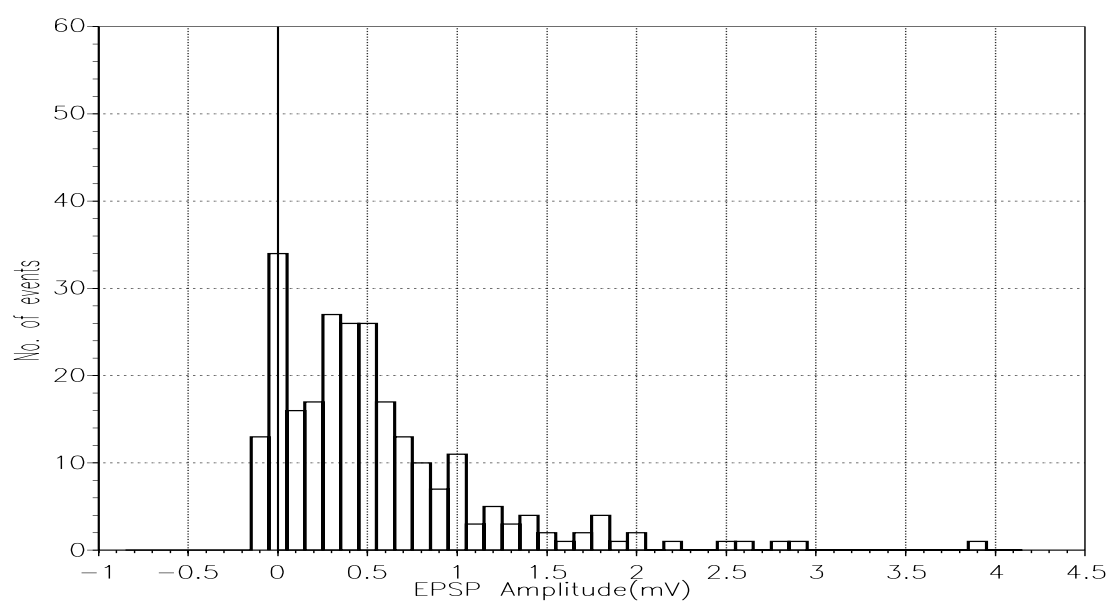


図 4.7: ヒストグラム (2 5 1 - 5 0 0 件)

4.3.3 MEND 改良モデルによる解析

MEND はノイズの影響を積極的に軽減していこうとする手法である。この解析法ではまずノイズの仮定を行わなければならない。ノイズの扱いについては、統計的分布による推定がこうした仮定をしないで済むのに対し、MEND は未知であるノイズの分布を仮定しなければならない、ノイズの仮定と推定結果にはトレードオフの関係にある。ノイズについてはシミュレーションの際にも述べたとおり、その仮定は非常に難しい。そこで本研究では、いくつかのノイズの種類を用意して試してみた。ノイズのバリエーションは標準偏差と強さ（確率）の調整による。素量解析では、放出サイトの振幅、すなわち各サイトのピークの振幅を求めることが重要である。したがって、ノイズの分布においてはその標準偏差が大きな意味を持ってくる。

ここではシミュレーションで仮定したように、ノイズをガウス分布と仮定する。標準偏差を 0.1 と、0.2 から 1.0 まで 0.2 間隔で増やしながらその強さを 0.03 倍して計算し、違いを確認した。ただし、ここでいう標準偏差は単位の調整を行った値であり、0.1 とは通常の標準偏差 1 に相当する。これらの結果が図 4.8 から図 4.13 である。図から分かれるとおり、ノイズの標準偏差が大きくなるにつれて、その影響を受けて計算結果が滑らかな分布となっていく。したがって、実際のノイズの標準偏差が大きかった場合は、MEND(I)、(II) および MEND 改良版による解析は困難になる。しかし、これほどのノイズが本当に発生しているのならば、実験においてより確実なグラウンドの確保や電磁波等の遮断、あるいはタイプの異なるノイズフィルタの使用などにより、計算の前処理でノイズを軽減すべきである。以降、標準偏差は 1（計算上は 0.1）として計算を行った。

素量解析は最小の興奮性シナプス後電位（mEPSP）の振幅と平均素量数を求めるものである。最小の興奮性シナプス後電位（mEPSP）については計算結果から 1 番目の山のピークがもし判明すれば、その振幅値が小胞 1 個による興奮性シナプス後電位と考えられる。また平均の素量数（1 回のスパイクで放出される素量数）は、振幅値の平均をこの振幅値で割ることにより算出できる [34]。実験データについて、MEND 改良版による計算を行った結果をグラフに示す。また同時に区間を変えながら最小振幅 q と平均素量数 m の値を算出した。

表 4.1: q , m の値 (500 件)

section	q	m	average	total
500	0.37	1.56	0.58	293.38

表 4.1 は 500 件すべての区間 (section) を計算した結果で、 $q=0.37$ 、 $m=1.56$ となった。なお total は振幅値の合計、average はその平均である (以下同様)。この表より、500 回の全区間において素量 1 個あたりが後膜におよぼす平均振幅は 0.37mV であり、また 1 回のスパイクによって、平均 1.56 個の素量 (小胞) が前膜からシナプス間隙に放出されたことになる。この場合、2 番目、3 番目に現れるピークはそれぞれ 0.92mV 、 1.41mV である。小数点以下 2 桁を四捨五入すると、1 番目と 2 番目、2 番目と 3 番目の間隔は約 0.5mV と等しくなる。素量の考えから、こうした結果からは素量 2 個目 (2 倍) 3 個目 (3 倍) といったことが示唆される。ただし q は 0.37mV となるので正確に等倍とはいいきれなく、 0.65mV あたりにコブがありさらに細かい山が実在する可能性もある。なお図 4.14 は、もとのデータである図 4.5 に対応する。

500 件のデータは測定の際に記録されており、時系列データととらえることができる。そこでつぎに前半、後半それぞれ 250 回に分けて計算した (図 4.16、4.17)。前半、後半の違いを比較するため、図を重ね合わせたものが図 4.15 である。図 4.16 においては反応のなかった回である 0mV を 0 番目の山とすると、はっきりと 6 番目の山まで確認することができる。また 1.6mV から 1.7mV にかけてコブが発生している。これはシミュレーションによる経験から、 1.6mV あたりにあるピークによるものかもしれない。

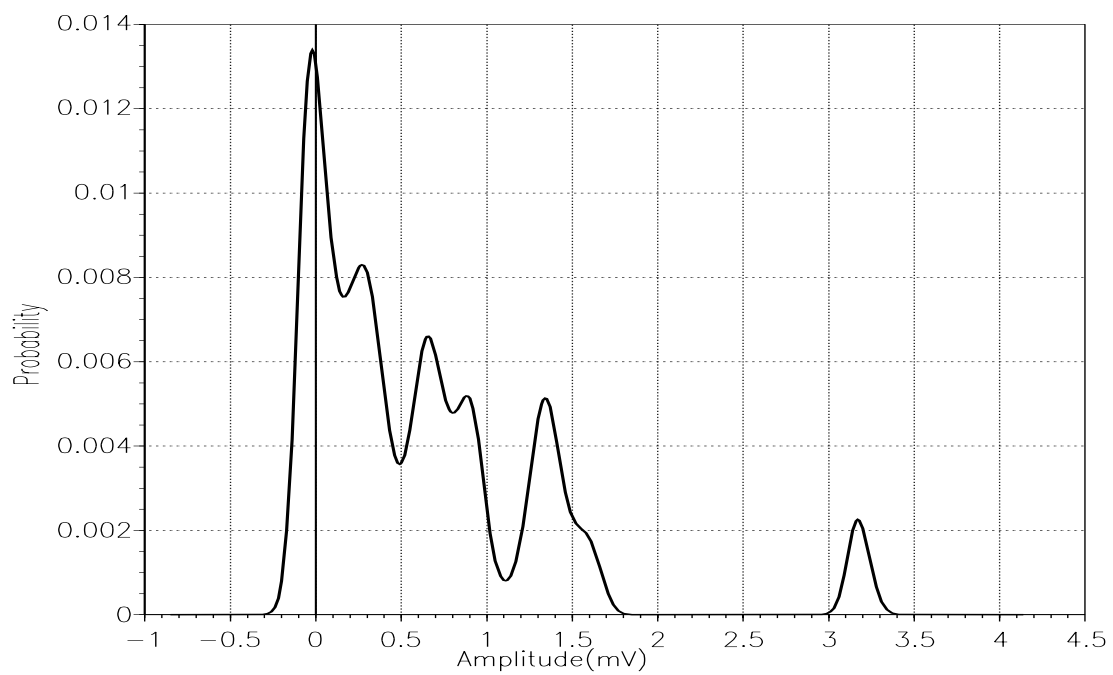


図 4.8: ノイズの標準偏差 = 1

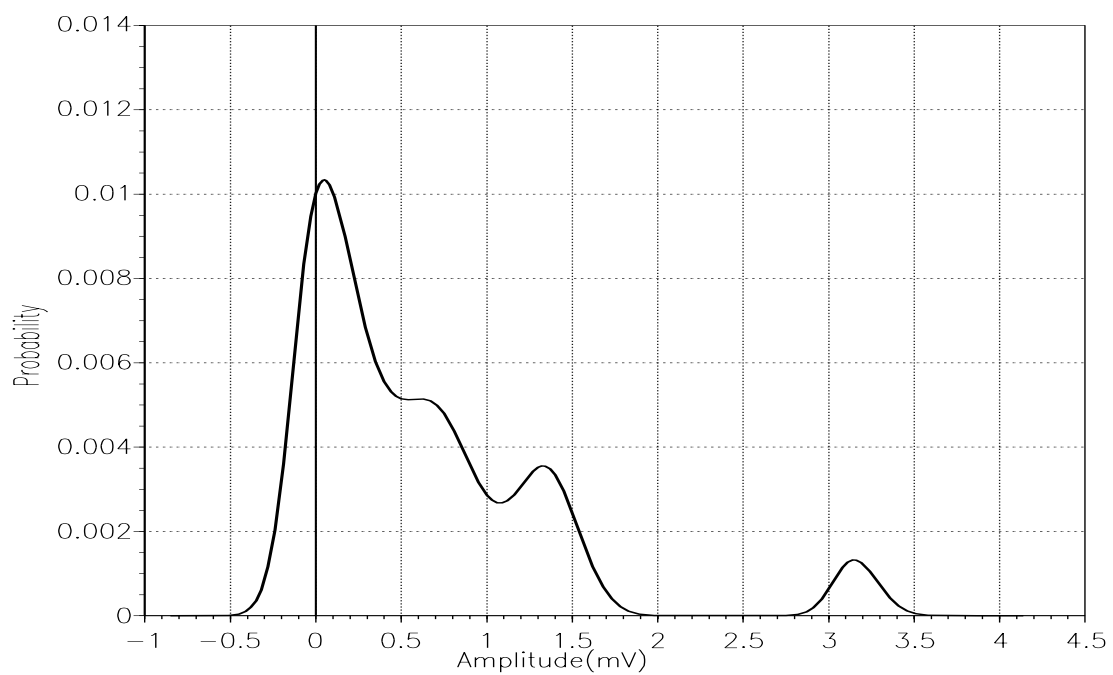


図 4.9: ノイズの標準偏差 = 2

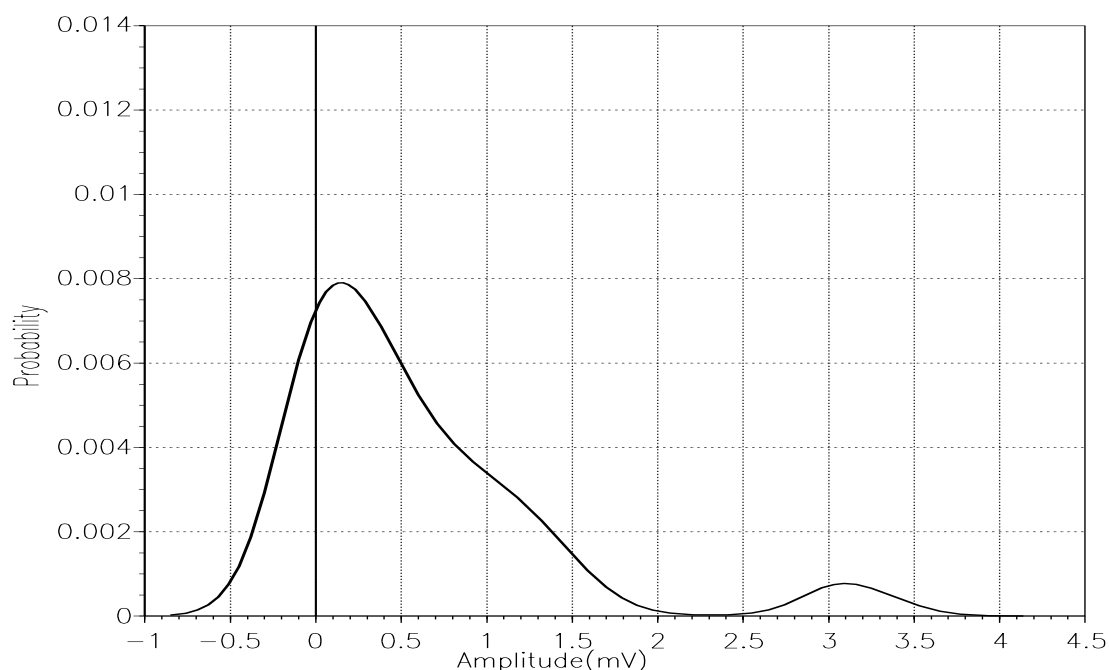


図 4.10: ノイズの標準偏差 = 4

つぎに後半を見てみると、今度は6個のピークが確認でき、同様に2.1mVあたりにピークを示唆するコブが見られる。また図 4.16、4.17は図 4.6、4.7とそれぞれ対応する。これらからは1番目から3番目の山が約0.1mVの誤差でほぼ同じ振幅に位置することが分かり、かなり良好な結果を得ることができた。qとmの値は表 4.2のとおり、それぞれ前半が0.34mV、1.82個、後半が0.38mV、1.42個となった。この結果からは前半、後半でのqの値がそれほど変化しない割にmの減少がやや目だっていることが分かる。

さらに、実験データを用いた推定結果から変曲点を求めたものを図 4.18に示す。この結果により、推定結果だけでははっきりしなかった、失敗を除いた2つ目のピーク(0.65mV

表 4.2: q, mの値(250件ごと)

section	q	m	average	total
1-250	0.34	1.82	0.62	157.44
251-500	0.38	1.42	0.54	135.94

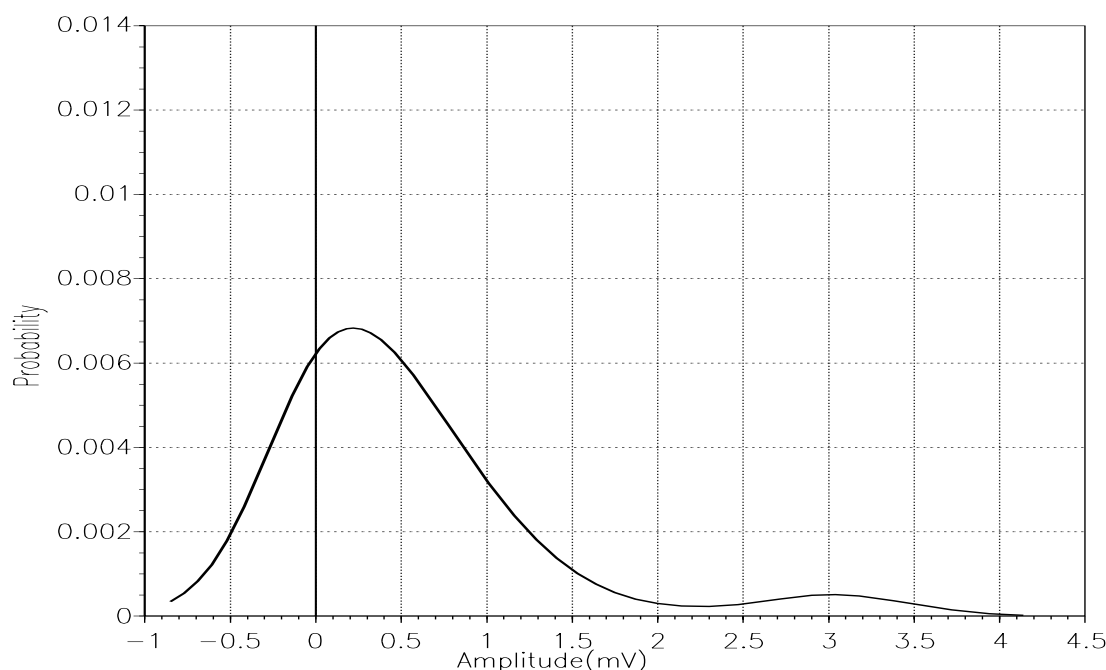


図 4.11: ノイズの標準偏差 = 6

前後)の存在が明らかとなった。ここで比較的数据件数の多いはじめの数個の山は重要な情報であり、特に1つ目と2つ目、3つ目のピークの値およびそれらの間隔が、シナプス前膜、後膜のはたらきを明らかにする上でのポイントとなる。

また計算の区間を縮めた場合について考察を行う。区間を減少させた場合は、ノイズの仮定がより大きな意味を持ってくる。これはより1件あたりのデータが強調され、ノイズの振幅によって推定結果の形がかなり変わってしまうからである。はっきりとしたノイズの分布が分かっていない以上短い区間での厳密な検討はできないが、 q と m の変化を見ることは、測定中のシナプスの状態がどう変化したかを知る上で重要である。そこでさらに100回ごと、50回ごとに間隔を区切った計算結果が表4.3、4.4である。ここで q の値は各1番目のピークの値からのものであり、また表どうしでの m の値の合計は異なる。

これらの表には興味深い内容がある。それは、 q と m の推移をみると、図4.19の q にはそれほど大きな変化が見られないのに対し、他の図(図4.20~4.22)における q と m にはかなりばらつきがあることである。前半、後半に2分した場合は、後半の m が減少していることを示唆するものと思われた。しかしその内訳として細かく分割したものからは、そ

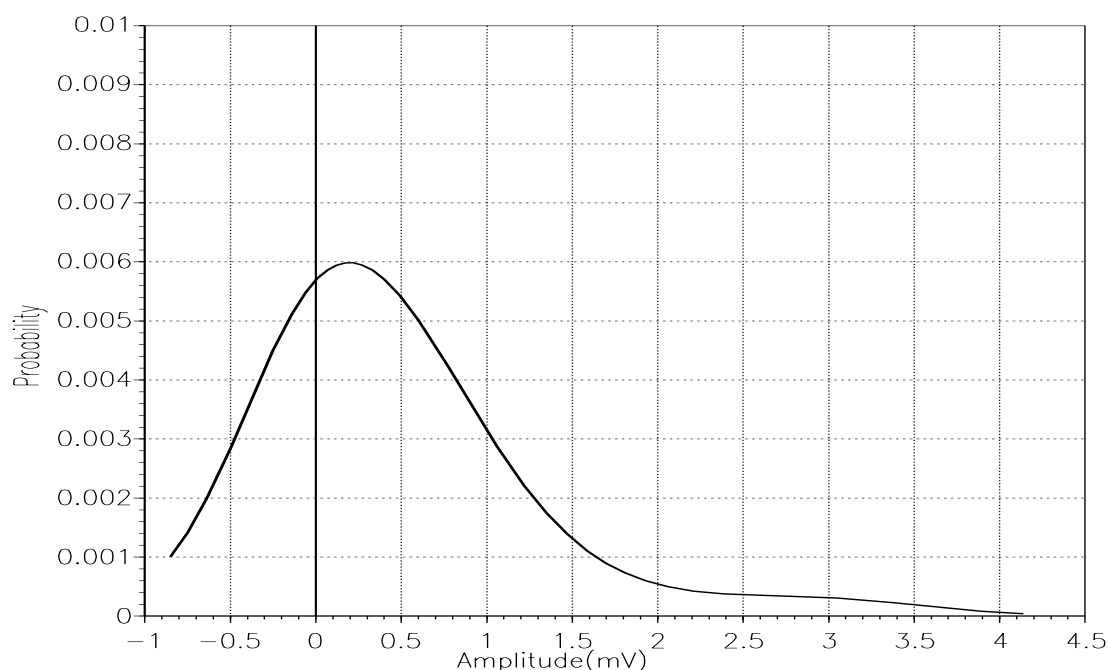


図 4.12: ノイズの標準偏差 = 8

といった傾向は見られない。この原因はどこにあるのだろうか。その理由としては、各区間の q の値が区間ごとに微妙に変化することにより、 m の変化が単調に減少しないことが考えられる。2 分割では q を前半、後半で固定しているため、250 回の合計としては後半の m が減少していることになる。こうした結果は、前に述べたとおりノイズの仮定によってかなり左右される。しかし、このデータの場合、 q が一定で m が減少したとはいえない場合も存在することを示唆する結果となった。前に述べたとおり、今回使用したデータは長期増強の基礎実験によるもので、長期増強は起きていない。したがって前半、後半の変化は長期増強によるものではない。

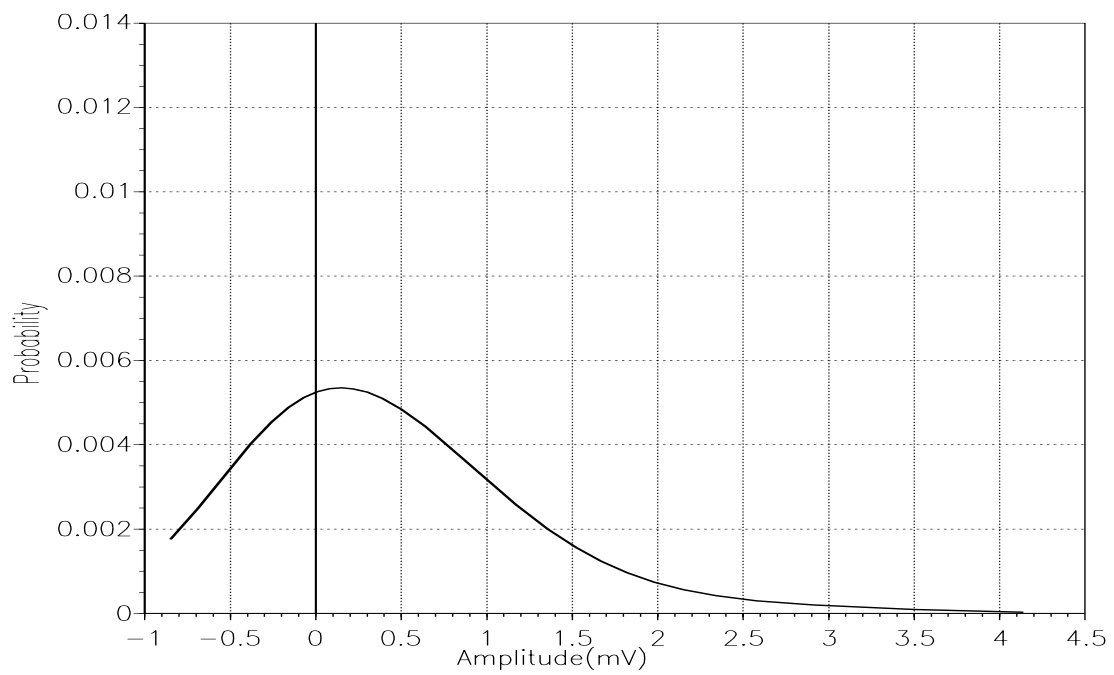


図 4.13: ノイズの標準偏差 = 1 0

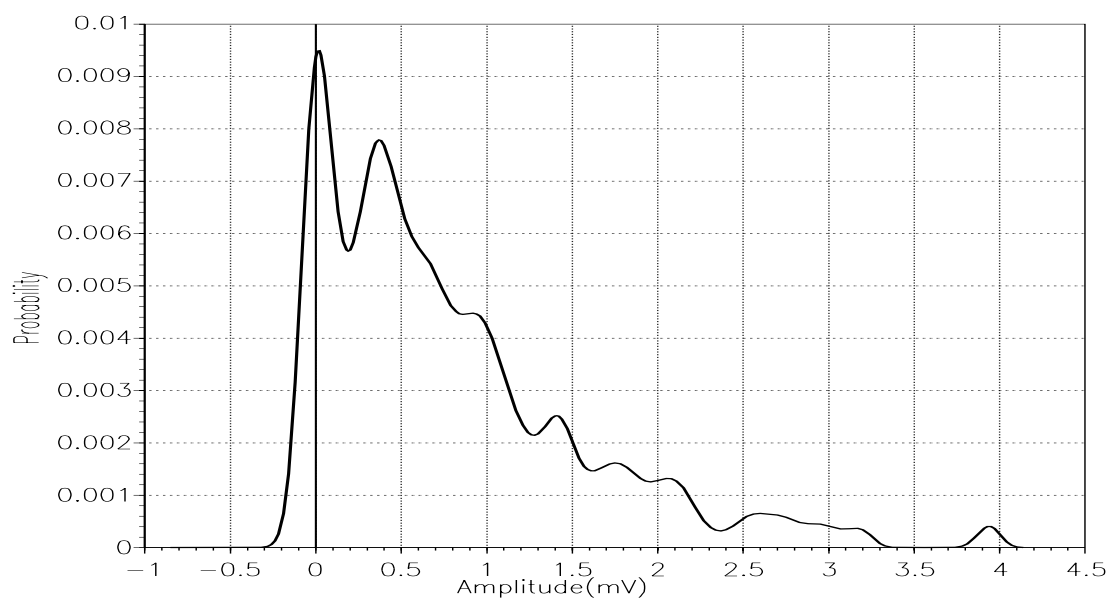


図 4.14: 5 0 0 件

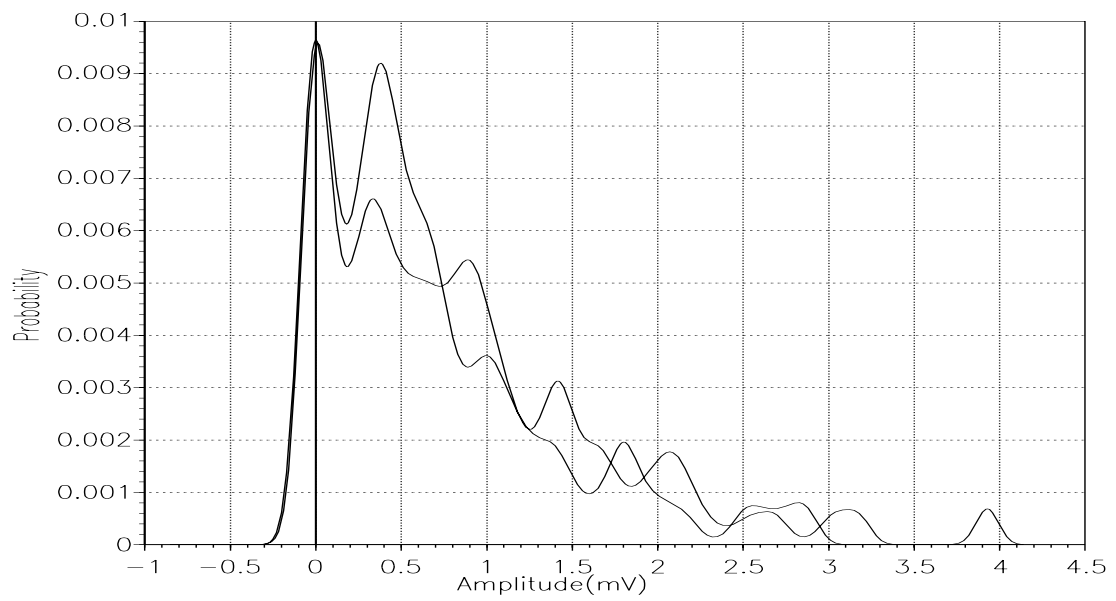


図 4.15: 前半・後半の分布

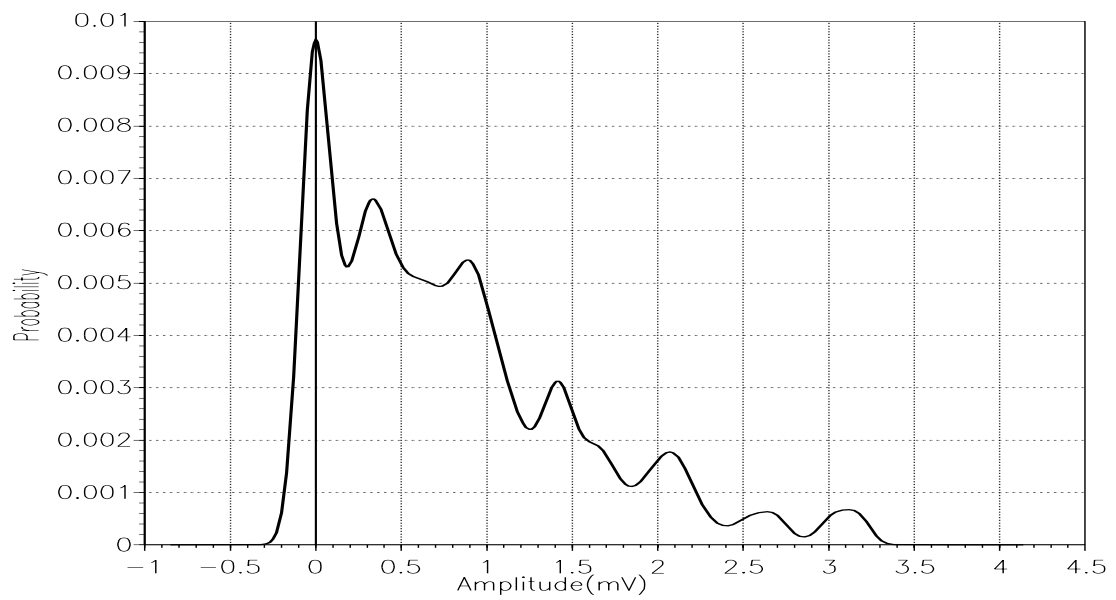


図 4.16: 前半250件

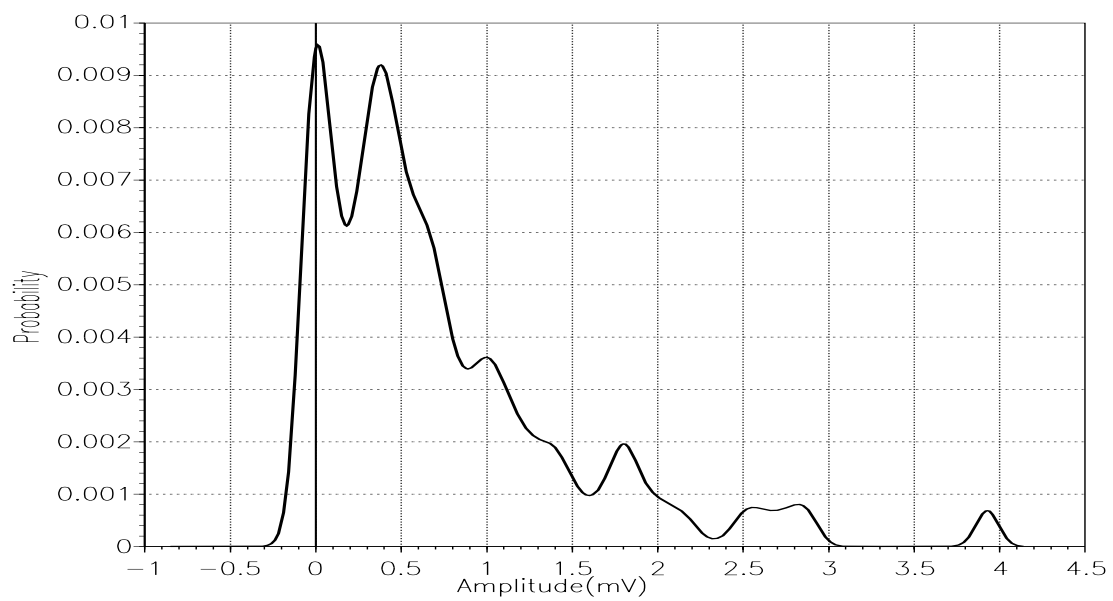


図 4.17: 後半 250 件

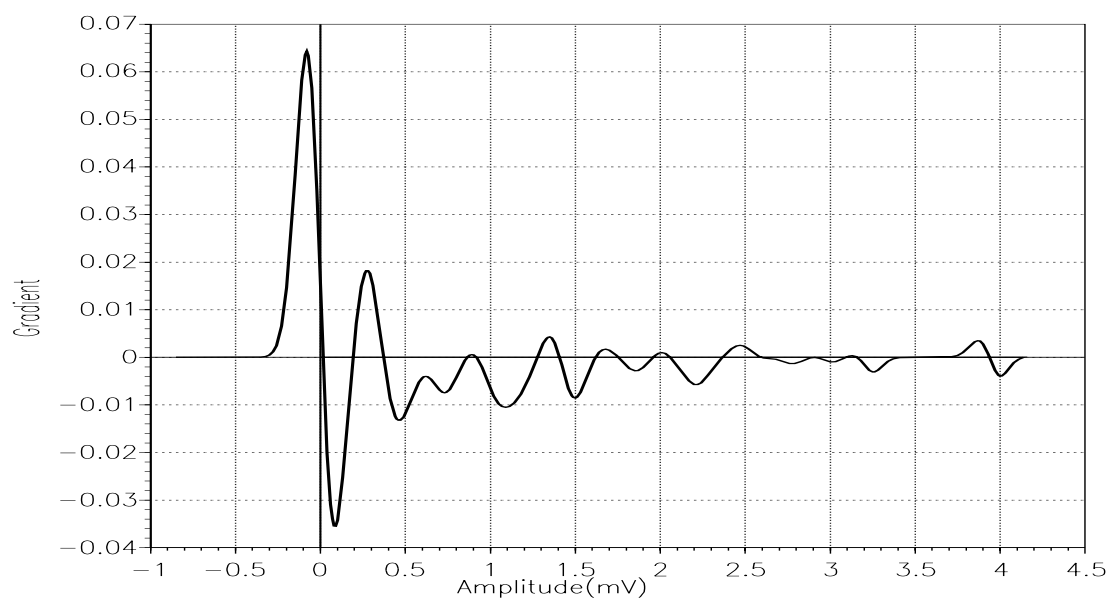


図 4.18: 変曲点 (実験データ)

表 4.3: q, mの値 (1 0 0 件ごと)

section	q	m	average	total
1-100	0.36	1.52	0.55	55.37
101-200	0.35	1.71	0.60	60.38
201-300	0.36	1.83	0.66	66.06
301-400	0.33	1.48	0.49	49.73
401-500	0.29	2.10	0.61	61.83

表 4.4: q, mの値 (5 0 件ごと)

section	q	m	average	total
1-50	0.27	1.77	0.48	24.46
51-100	0.46	1.32	0.61	30.90
101-150	0.32	2.12	0.68	34.40
151-200	0.49	1.04	0.51	25.98
201-250	0.30	2.76	0.83	41.68
251-300	0.49	0.97	0.48	24.37
301-350	0.38	1.23	0.47	23.80
351-400	0.33	1.54	0.51	25.92
401-450	0.34	2.11	0.72	36.05
451-500	0.28	1.82	0.51	25.77

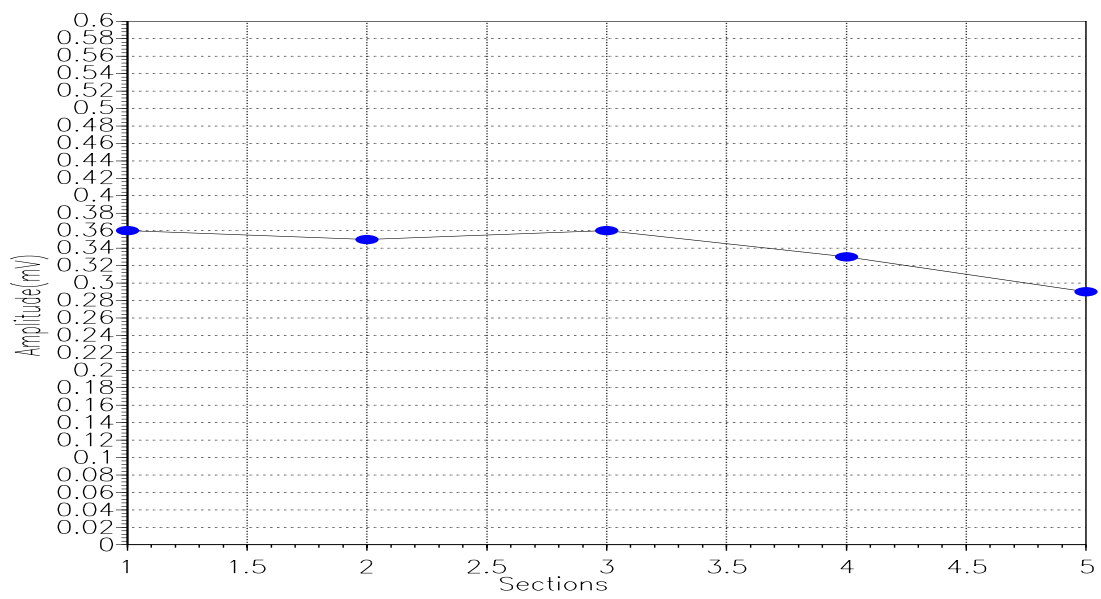


図 4.19: q の変化 (100 件ごと)

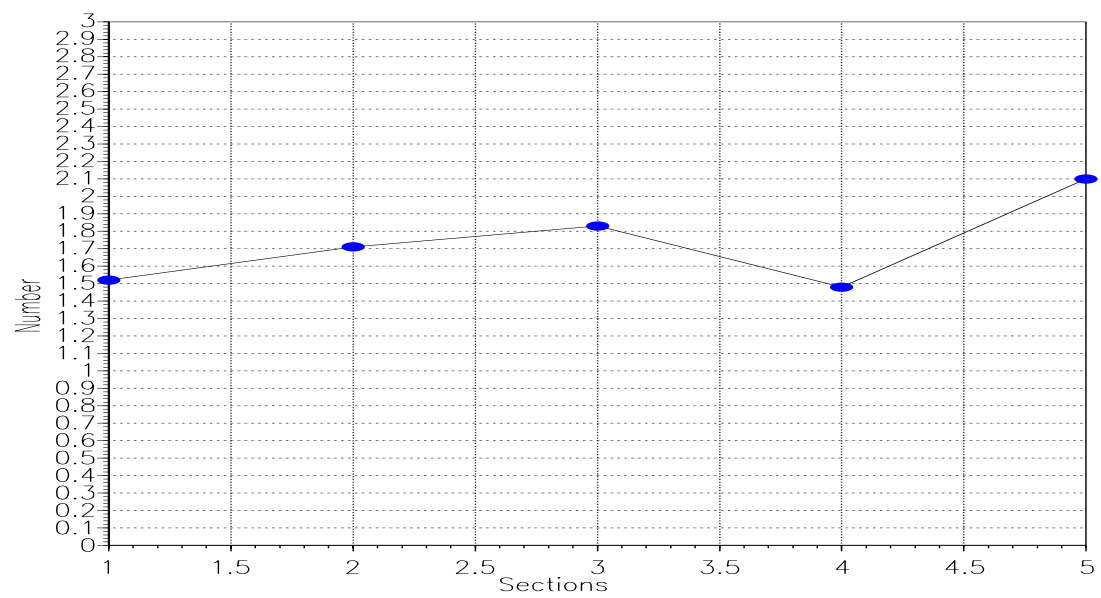


図 4.20: m の変化 (100 件ごと)

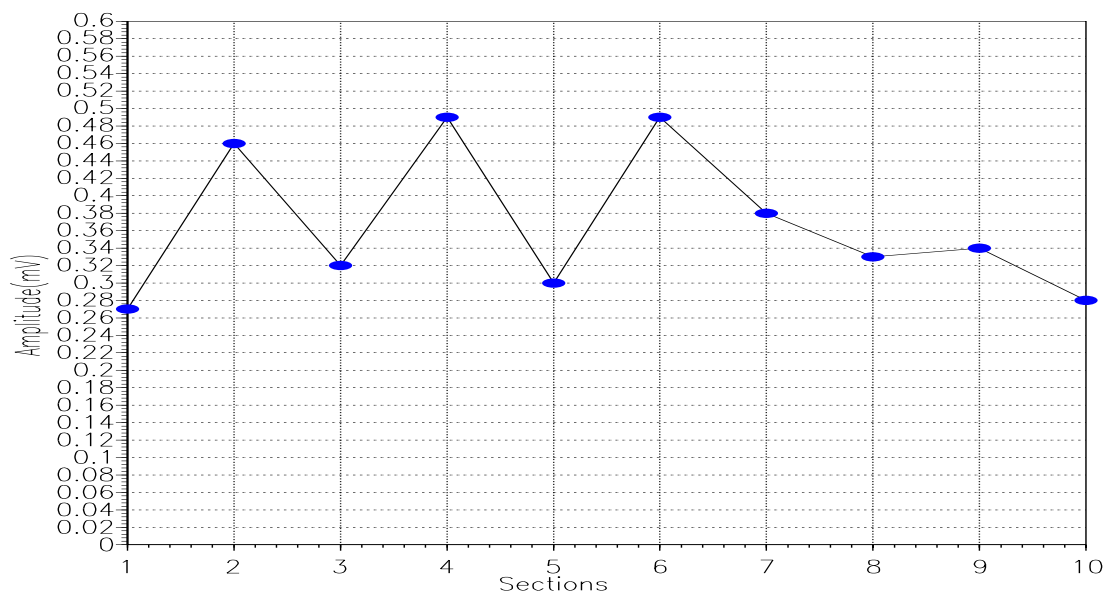


図 4.21: q の変化 (50 件ごと)

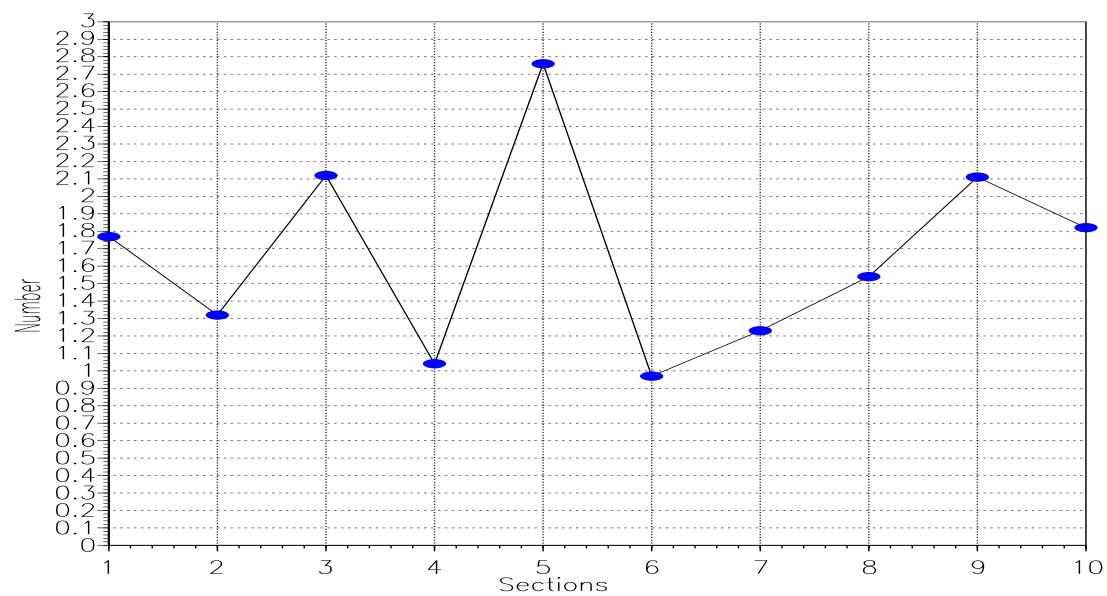


図 4.22: m の変化 (50 件ごと)

4.3.4 解析結果における q の妥当性

素量解析で注目される q の推定値が最小のピークの振幅になるとした理由は、モノシナプスによる応答であること、および与えた刺激に対して数個の伝達物質が放出されるよう、シナプス前膜における神経伝達物質の放出量をおさえたことの 2 点からなる。

前者については電極を CA3 野の錐体細胞に刺入し、安定した状態で顆粒細胞層に微小ピペットから微量のグルタミン酸を放出すると、ごく稀に、ある特定の部位にのみに、記録中の錐体細胞に興奮性シナプス後電位を誘発することがある。この特定の部位の範囲は、ほぼ顆粒細胞の直径に相当し、記録中の錐体細胞へ軸索を送る顆粒細胞がグルタミン酸に応じて発火したため、インパルスが伝導してシナプスに達したものと考えられる。さらにグルタミン酸ピペットの近傍に刺入した細胞外電極からは、各興奮性シナプス後電位に一定時間先行して顆粒細胞の活動電位を記録することができ、このとき各興奮性シナプス後電位間の潜時が変動した際も、先行する活動電位がこれに一致して変動することが確かめられている。またグルタミン酸の放出持続時間を延長した際にも、活動電位はそれに応じて増加することが確認されている。これらの結果から、こうして得られた興奮性シナプス後電位はグルタミン酸が単一のシナプス前細胞を興奮させた結果として得られたものであり、 q と m の素量解析への適用が可能であると考えられる [36]。なお、モノシナプスを得るために培養細胞を用いる例はよく見られるが、用いた実験データはスライスを用いたもので、培養細胞よりも生体 (*in vivo*) に近いものとなっている。

後者の神経伝達物質の放出量を押えた点については、通常シナプス前膜から一度に放出される神経伝達物質の小胞の放出量は数十～数百と多く、これを横軸を振幅にしたヒストグラムで放出量の頻度を表すと、釣鐘型の形となる。このままでは素量解析で求めたい最小の興奮性シナプス後電位 (mEPSP) の振幅は頻度が少なく、しかも他の振幅にまぎれて解析しにくくなってしまう。そこで、使用した実験データでは一度に放出される素量放出量を減少させるため、APB (2-Amino-4-phosphonobutyric acid) が用いられている。APB が q の値に重大な影響を与えず、比較的低濃度で神経伝達物質の放出を低減させる働きのあることは実験で確認されており [34]、これにより数マイクロモルレベルの濃度で 1 回の刺激に対して小胞の放出を数個以内とし、素量放出量を押えてある。なおスパイクが成功したにもかかわらず興奮性シナプス後電位が起きていないものについては、APB により小胞の放出が起きなかった失敗と考えられ、そのまま放出失敗のデータとして用いている。以上の 2 点の理由から、解析で用いた q の値は失敗を除いた最小の興奮性シナプス後電位にな

と考えられる。

4.4 まとめ

本章で行ったことはつぎの 3 項目である。

1. MEND 改良版を用いてモノシナプスによる実験データの解析を行った。
2. 実験データの解析から q の推定値を求め、さらにシナプス前膜における素量放出量にはかなりのばらつきがあることが判明した。
3. 同一の実験データにたいする従来手法と MEND 改良版の解析結果の比較を行った。その結果、ピークの推定について従来手法が 1 ~ 2 個が限界であったのにたいし、MEND 改良版では少なくとも 3 個の推定が可能であり、MEND 改良版がより有効な手法であることを示した。

高度な実験技術を要するモノシナプスによる実験データを用い、現在進んでいると思われる手法を改良した MEND 改良版により素量解析を行ったことは、実験手法ならびに解析手法として高度なレベルにあるといえる。そしてここで得られたシナプス前膜における素量放出の機序は、シナプス可塑性機構を検討する際に重要な知見となりうるものである。さらにこの結果は、シナプス可塑性モデルの構築に実験的裏付けを与えるものとして期待される。次章以降ではこの手がかりにより、シナプスがいかに情報を符合化し伝達しているかといった機構の提案を行い、検証のための電気生理実験を行う。

第 5 章

時間パターン刺激の検討と電気生理実験

5.1 はじめに

現在の電子回路の主要部品であるトランジスタや大規模集積回路といった半導体、さらにはこれらを多数含むオペアンプは、その内部理論を知らずしても利用可能である。その理由は、これら素子の機能と入出力特性が明確に定義されており、規格の入力を行えば高精度で計算上期待される特性が得られるからである。これを脳におきかえてみると、半導体（基本素子）は神経細胞にあたる。これまでの考えから、神経細胞の働きは、おばあさん細胞説に代表される単一の神経細胞が特別の一表現を実現するといったものではなく、いくつかの神経細胞が協調したものであるとする考え方が妥当であると思われる。しかし脳あるいは限定した神経回路の振舞いを明らかにしてモデルの構築を行おうとする際、基本素子である神経細胞における入力情報の表現方法および伝達機構の検討は不可欠である。さらに、例えば小脳におけるプルキンエ細胞は、数万本以上といわれる入力線維とシナプスによる接続が行われていることから分かりますとおり、神経細胞は単一であってもすでにシナプスを介したネットワークを構築しているとも考えられるのである。したがって、おばあさん細胞、スパースコーディングといった概念から神経素子をとらえるよりも、単体でネットワーク機能を持つ神経細胞の特質をいかにとらえるかといったアプローチが重要であると思われる。本章ではこうした点から、脳における情報の表現方法ならびに基本素子としての神経細胞が行う情報処理機能に注目し、学習則構築に必要な電気生理実験を行う。

5.2 神経細胞における情報の伝達方式

5.2.1 シナプス前膜における素量放出

前章では、シナプス前膜における神経伝達物質の放出が細胞の安定状態でもかなりの変動をしているという結果を示した。これはモノシナプスによる実験データを用いて、MEND改良版による素量解析結果により判明したものである。素量数の放出は失敗の0を除いて1個である確率が高いものの、2~3個までの放出の合計は1個の確率よりも高くなることが示唆された。この結果はシナプスの可塑性機構、特に前膜を中心とした情報の符合化(コーディング)ならびに増強から抑圧に至る可塑性機構のモデル構築に重要となる知見である。

ここではまず、前章で行った実験結果を用いてシナプス前膜における素量放出量を検討し、シナプス前膜が可塑的性質に果たす役割を考える。前章で使用した実験データは長期増強あるいは長期抑圧は起きていない。また q 、 m の遷移を見る限り、細胞は衰弱せず安定な状態にあったと考えられる。50件ごとの計算結果は q についてはほぼ横ばいで、 m についてはしだいに上昇傾向が見られた。これにたいしてして100件ごとの計算結果は q も m も上下に大きくふれ、細かい区間においてはこれらの値がかなり変化していることが分かった。そこで50件ごとの m の値について、表5.1のとおり偏差を求めた。

前章で検討したとおり、 q の算出根拠は妥当であると思われる。そこで q をもとに計算される m の値についてもデータとしての信頼性が損なわれることはないと考えられる。したがって、こうしたばらつきはシナプス前膜における素量放出量の変動を表すものとも考えられるが、この変動は統計処理における誤差の範囲内である。したがってこれらの値からは明確な判断はできないが、表5.1から標準偏差を求めた値は0.57となった。この値は絶対的な値であるため、単一のシナプス前膜における素量放出変動としては扱いにくい。そこで相対的な指標として変動係数を求め、34%の値を得た。

一方、図4.14からは失敗の山を除いてほしい0.4、0.9、1.4と0.5mV間隔にピークが存在する結果となった。これは前膜に存在する素量放出サイトのから、最小の素量(1個)のほぼ整数倍に対応して素量の放出が起きていることを示すものである。また頻度の少ない後半の分布を除いても、確率的に1個から2~3個以上の素量が放出されていることを示すものであり、同じ強さの刺激に対して放出量にはかなりの変動があることが明らかとなった。刺激パルスの電氣的強度が一定の際、その平均頻度が前膜からの素量放出量の決定に重要であることが以前から指摘されている。しかし、今回明らかとなった放出素量数

表 5.1: m の標準偏差 (5 0 件ごと)

section	q	m	$m - \overline{m}$
1-50	0.27	1.77	0.102
51-100	0.46	1.32	-0.348
101-150	0.32	2.12	0.452
151-200	0.49	1.04	-0.628
201-250	0.30	2.76	1.092
251-300	0.49	0.97	-0.698
301-350	0.38	1.23	-0.438
351-400	0.33	1.54	-0.128
401-450	0.34	2.11	0.442
451-500	0.28	1.82	0.152

のばらつきを考慮すると、平均頻度以上に大きな要素が存在する可能性が考えられる。すなわち、前膜からの素量数の変動により、そこにはアクティブゾーンでの活性状態に遷移が生じ、放出中のもののほかに、放出可能なものと不可能なものに分かれると考えることができる。これをさらに実際の複数個のシナプス結合で考えると、隣あったシナプスは、そこである確率においてこれまで知られる多様な応答特性を持つ可能性がある。

ここで長期増強あるいは長期抑圧の複数シナプス間のメカニズムとして、皮質で考えられている例としてつぎの 5 つがある [46]。

1. 同シナプス性長期増強 (Homosynaptic LTP)
2. 連合性長期増強 (Associative LTP)
3. 同シナプス性長期抑圧 (Homosynaptic LTD)
4. 異シナプス性長期抑圧 (Heterosynaptic LTD)
5. 連合性長期抑圧 (Associative LTD)

これらはすべて神経細胞に接続される 2 本の神経線維に注目し、片方あるいは両方からのインパルスによって、後膜の神経細胞にどのような変化があるかを示すもので、同時に

シナプスにおける可塑的变化を表している。それぞれでの概要はつぎのとおりである。なお Homosynaptic LTD 以外は、後膜における応答活性があるものとする。

同シナプス性長期増強 (Homosynaptic LTP)

一方の神経線維からのみ頻度の高いインパルスが到達した場合、そのシナプスの結合は強化される。

連合性長期増強 (Associative LTP)

一方の神経線維から低頻度の高いインパルスが、もう一方からの高頻度のインパルスに同期して起きた場合、低頻度であった方のシナプス結合が強化される。

同シナプス性長期抑圧 (Homosynaptic LTD)

片方の神経線維のみから高頻度のインパルスが到達した際、その線維のシナプスの結合強度は減弱する。

異シナプス性長期抑圧 (Heterosynaptic LTD)

片方の神経線維のみから高頻度のインパルスが到達した際、もう一方の線維のシナプスの結合強度は減弱する。

連合性長期抑圧 (Associative LTD)

一方の神経線維から低頻度の高いインパルスが、もう一方からの高頻度のインパルスに非同期で起きた場合、低頻度であった方のシナプス結合が減弱する。

こうしたシナプスの性質に加え、シナプス機能の多様性を生む要素としてつぎのことが考えられる。すなわち、前膜における放出素量数のばらつきは、たとえインパルスが到達しても、ある確率で素量放出が起きないシナプスを生じる可能性がある。したがって、平均頻度のみを考えた場合、こうしたシナプスの多様性が考慮にはいないことになる。ここに従来の平均頻度によるポピュレーションコーディングの考えにない、新たな情報の符号化方式、しかも平均頻度の枠組をも包含した理論が考えられる。

いま神経細胞に接続する複数のシナプスを考えると、確率的にインパルスの応答に対して素量放出の起きないシナプスの存在が考えられる。さらにその不応答の状態が、そのシナプスで継続して起きた場合、例えば異シナプス性の減弱が起きる可能性がある。不応期については、その後到達する刺激パルスの時間タイミングによってもふるまいに変化が生じる。すなわち、インパルス発生の直後であれば脱分極によってつぎのインパルスが起きない絶対不応期と、この期間を過ぎた後でもしばらく閾値が通常よりも高い状態が続く相対不応期が知られる。またシナプス活性状態の遷移により、連合性による減弱の可能性もある。

こうした機構を実現するには、放出確率のばらつきが時間間隔の異なるパルス列により強調された場合、そこにはパターン刺激による前膜の変動がより明確に現れることとなる。例えば同シナプス性の減弱がある刺激回数 k で起きる場合、ある周期で $k - 1$ 以内ずつのインパルスが到達する場合とある周期で k 以上のインパルスが到達する場合によって、そのシナプスの結合は後者では減弱となるが前者では減弱が起こらない。これは時間パターンによるインパルスが情報を符合化する仕組みとして、平均頻度より時間パターンとする説を支持するものと考えられる。モノシナプスのふるまいを実験的に示す図 4.14からは、比較的確率の高い 1 個から 3 個までの素量放出が確認されている。ここで、実験の解析結果における 1 素量に対する後膜の最小興奮性シナプス後電位 (mEPSP) 約 0.4mV から 3 個の約 1.4mV まで大きなばらつきが同じ強度の刺激に対して起きたことを考えると、シナプスにおける化学物質による情報伝達では刺激強度よりも刺激回数 (頻度) が重要であることも示唆される。

5.2.2 基本素子としての神経細胞

脳のモデルを構築する際、脳ではいかに情報が符合化されているのかを明らかにすることが重要な課題となる。そこで神経回路網を構成する基本素子である神経細胞における符合のコード化 / デコード化の方法、ならびに入出力特性を知ることがモデル構築の鍵を握るものと思われる。

脳の皮質には領野とよばれる各高次機能の担当区域がある。個々の区画の境界は明確ではないが、サルなどによる動物実験やヒトにおける臨床実験により、そのだいたいの位置関係が明らかにされている。ここで感覚、運動、認識など高次機能のモデルを考える際、その領野におけるネットワークとしての機能ならびに入出力が問題とされる。例えば視覚

機能においては皮質において視覚野における 6 層の神経細胞層ならびに層を貫通した微小領域が 1 単位と考えられ、その中にある膨大な神経細胞を個々にとらえるよりも、より明確な理解が期待されている。これはある 1 つの細胞が 1 つの視覚対象を記憶するのではなく、いくつかの微小領域が連動して初めて視覚記憶が実現されている知見が実験により得られていることによる。また分散した複数の神経細胞による記憶といった、スパースコーディングの考えも記憶容量やノイズに対するロバスト性の面から支持されている。経験的にも、ヒト脳で通常でも一日数万といった神経細胞が死滅している反面、ある日を境に特定の形状ないしは視覚記憶が失われるということがないことから、これは確かな説であると考えられている。一方、視点を脳の皮質から辺縁系や小脳に移すと、そこでは一様な連続構造をとる皮質と異なり、機能に特化した細胞集合体の集まりとなる。辺縁系は連合系（皮質）との連絡を密にして高次機能に深く関わっている。ここでの機能も特定の一細胞が特定機能を実現しているとは考えにくい。例えば海馬は嘔血に対して脳の中でも最も弱い部位であるが、その分小梗塞も高い率で起きていると思われる。しかし、ある時突然特定の種類の記憶が不可能となることは、重大な障害が発生した時以外は起きない。小脳にいたっては、細かい機能ごとに微小なゾーンが集まった区画が解剖学的に認められ、ここでも特定の一細胞による機能限定は考えにくい。

以上をふまえると、脳は複数の神経細胞が含まれる微小な区画ごとの単位（コラム構造）で、ある特定の機能を実現していることが予想される。またこうした構造の利点は、死滅した神経細胞の代替が可能であることや、コラムにおける神経網が多様な入出力機能を生み出すことを可能にしていることが考えられる。そこで脳のモデルを構築する場合、自己励起状態にある複数神経の集合体（セルアセンブリ）としての神経回路に視点を置き、重複しながら、あるいは離れた回路網といかに連結しながら分散的にセルアセンブリが形成されているかを探ることが重要となる。しかし同時に、その神経回路を構築している素子である神経細胞のふるまいを探ることもネットワークモデル構築の鍵をにぎっているものと思われる。すなわち神経回路は外界からの情報を入力し、適切な処理をほどこした上で出力を行うものであるが、コンピュータネットワークのノードにあたる部分で、ある情報がいかにコード化されて到達し、いかにその符合が情報として解釈されてまたコード化されていくのかといった根本的な問題には、基本素子の理解が不可欠である。さらに脳が扱う情報は、神経細胞を経由する限りすべて電気信号によるインパルスにコード化されている。したがって、ある情報が個体レベルの学習・記憶であろうとも、海馬や小脳における

より細胞・分子レベルの可塑的性質であろうとも、統一された符合理論による理解の可能性があるものと思われる。実際の脳における情報処理は数十ミリ秒程度から実現されているという知見、あるいは数 Hz 以内でごく短い時間に送られる少ないインパルス数でも、十分意味のある情報がやりとりされているという考えもある。しかしシナプスの接続数が膨大な神経細胞に限ってみれば、こうした少ないインパルスでも樹状突起あるいは細胞体に到達する合計は短時間でも数多く、しかも周波数はシナプス数に比例的に増大することになる。こうした点からも単独細胞による検討は重要であるといえる。

5.2.3 時間コーディング

脳が持つ可塑性のモデルを構築する場合、現在確認されている 2 種類の性質、長期増強および長期抑圧現象を入力情報に依存させた形で 1 つの神経細胞で確認し、両者を連続的な出力信号の変化として説明する実験的裏付けが必要となる。こうした見地に関連する研究として、これまで T. J. Sejnowski が 1977 年に提案したコバリアンス学習則や E. Bienenstock らが 1982 年に考案した BCM 理論がある。これらの理論は、後で検討するようにシナプス前膜と後膜の興奮強度の相関により、その結合度すなわち可塑的性質に変化が生じるというものである。こうした考えは、長期増強または長期抑圧のどちらか一方の目的で実験を行った際、もう一方の現象が見られたことに起因するものであった。そこではじめから両方の現象を考えたモデルではなかったため、モデルと実験結果の整合性に難点があった。さらにこの場合、細胞への入力信号をパルスの平均頻度でとらえた興奮強度の相関だけで説明されており、情報のキャリアとしてなにが重要なのかという点の説明に乏しいものであった。

現在、情報のキャリアとしてなにが根幹をなすものかという激しい議論が行われている。候補として従来考えられてきたのは、シナプスに到達するパルスの平均頻度であるというものであった。これは到達したパルスの総数によって、符合化された信号が伝達されるというものであったが、わずかなパルス数だけで符合化されている実験報告もあり、生理学的な見地にそぐわない面がある。一方、平均ではなく、時間的パターンによるものとする考えが B. J. Richmond や L. M. Optican らによって 1987 年に提唱されている [47]。また塚田らによって、海馬において時間パターン刺激の種類に応じて、長期増強の強度に変化が起きる実験結果が報告されている [48, 49]。このパターン刺激では、パルスの時間間隔について長短 2 種類用意したパルス列を用いている。パルス列の長い刺激間隔または短い刺

激間隔が続く確率を基に相関係数の指標で表し、正の相関から負の相関まで、数種類のパルス系列を用意したものである。この場合、一次の統計量としての平均頻度は同一なため、実際の生体で起きていると考えられる特定のパルス頻度の周波数帯域において、豊富なパターンの適用が可能であると考えられる。ところで周波数の長期増強や長期抑制に対する影響については、どの部位の細胞かによって大きく異なる。例えば海馬 CA1 野においては 10Hz 以上の高頻度で長期増強が起き、1~3Hz で長期抑圧が起きることが知られている。しかし違う部位でのある細胞では、どちらの周波数でも長期増強が起きる場合がある。したがって、これらの可塑的現象は、細胞ごとに決められているよりはその入力形態によって修飾されている可能性も考えられる。2 種類の異なる入力線維による相互作用も、神経可塑性の理論において重要な要素であると考えられる。海馬における長期抑圧に対して小脳における平行線維と登上線維の同時刺激による長期抑圧や、小脳での平行線維だけの刺激による長期増強 [50] など、神経線維どうしの相互作用についてはより深い理解が求められる。

そこで本章では前章までの結果もふまえ、1 種類の線維から到達するパルス列に依存した形で、細胞において抑制から増強までの応答が連続的に起きる可能性を確かめるため、パルス列の時間的な表現である時間コーディングの検討を行う。従来から考えられてきた、インパルスの平均頻度が細胞の応答を決める重要な要素であることは広く認められているが、抑制から増強までの現象を統一的に表現するには無理な面がある。すなわち、同一の細胞で抑制・増強を起こすには、パルスの平均頻度のレンジ幅を広くとる必要があるとも考えられるからである。また人為的な高頻度刺激で得られる長期増強は、その周波数は実際の神経細胞では通常認められないものである。なお、パルスの平均頻度によらない刺激を考えたものとして、 θ バースト刺激がある [51]。これは、海馬で見られるリズムである θ 波に同期したバースト刺激を与えた場合、谷では同期させず波形の山の部分で同期させると、長期増強が認められるというものである。しかし、実験的に確認されている θ 波を用いているものの、バースト刺激については人為的な高頻度刺激となっている。また小脳ではいまのところ θ 波のようなリズムは測定されておらず、リズムが可塑性にとって必ず必要な要素である保証はない。

5.3 Hebb 型学習則とその問題点

神経回路モデルでよく使われる学習則として、Hebb による概念を基本として考えられている Hebb 型学習則がある。これはシナプス前膜側の活性化と同時に後膜側が興奮することにより、そのシナプス結合の強度が増すというものである。ここでは前膜、後膜の状態をある時間幅での平均パルス発火頻度あるいは膜電位とした連続値でとらえられている。実際の神経細胞による伝達はデジタル的なパルス列によって行われているものとして考えられるが、こうした工学モデルは Hebb 則の改良モデルあるいは反 Hebb 則などとして非常に多くの提案がなされている。これらに対して本章で検討する可塑性モデルは、時間パターン刺激によるパターン刺激前後の可塑的变化のモデルであり、時間的な情報を考慮したものとして本質的に異なるものである。本節ではこうした工学モデルの考え方を考察するために、従来から考えられてきた学習モデルを概観し、その問題点を指摘する。

5.3.1 Hebb の概念による学習則

シナプス可塑性モデルとして従来から考えられてきている基本原理として、Hebb 則が挙げられる。これはつぎの 1949 年に発表された Hebb の概念 [17] がもととなって考えられた学習則である。

When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cell such that A's efficiency, as one of the cell firing B, is increased.

ここで Hebb はシナプス学習則を明示的に示した訳ではなく、「セル B の興奮が近傍にあるセル A からの軸索により引き起こされ、これが継続されてなんらかの成長過程ないしは代謝的变化が一方、または両方のセルにもたらされ、セル B を発火させているセル A の効率が增加する」とした概念を述べたものである。これは神経あるいはシナプスの可塑性を説明するものとして今日なお重要な概念である。この考えは、シナプスで結ばれる 2 つの神経細胞の興奮状態が相関することにより、その結合強度が上昇する方向に変化するものであることを定式化したものである。こうして Hebb の概念は Hebb 型相関学習として、

後にさまざまな変形タイプや反 Hebb 型学習則のヒントとなったが、基本概念として依然重要視されるものとなっている。Hebb の概念は数学的に記述され、一般的につぎのとおり表わされる。

シナプス a における前膜での活性状態を j 、後膜での活性状態を i とすると、その結合強度は W_{ij} で表わされる。これを離散時間 t で考えると、つぎのとおりとなる。

N : 自然数, R : 実数, $i \in N, j \in N, t \in R$,

$$W_{ij}(t+1) = W_{ij}(t) + \Delta W_{ij}(t), \quad (5.1)$$

where

$$W_{ij} : R \rightarrow R,$$

$$\Delta W_{ij}(t) = F(a_i(t), a_j(t)),$$

$$a_i : R \rightarrow R,$$

$$a_j : R \rightarrow R,$$

$$F : R \times R \rightarrow R.$$

ここで F はシナプス前膜および後膜の活性度を示す関数として結果的に定義されるが、この関数の特性を決める要素は多様である。ここに Hebb 則を基本としたさまざまな拡張則が考えられている理由がある。例えば前膜、後膜における発火の周波数によるものとする場合や、膜電位によるものとする場合がある。発火の周波数については、一般的に発火頻度が高ければそこでの活性が高くなると考えられる。また膜電位は細胞内における細胞外に対する電位差を意味し、通常細胞内は負の状態にある。細胞の発火は、この電位がある閾値を越えた場合に発生するもので、一般的に膜電位が高いほど発火しやすくなる。

5.3.2 Hebb 則の拡張表現

基本的な Hebb 則における前膜、後膜の活性度はシナプス前膜、後膜における平均発火頻度を表す。これは電気生理実験において細胞への刺激頻度を高くした場合、その頻度に応じて活性効率が上昇することが認められることから考えられたものである。そして刺激頻度によりシナプス前膜における小胞の放出がより頻繁になる、あるいは後膜における受容体等の感受性が高くなるためと考えられている。しかし活性効率の上昇には刺激頻度以

外にもいくつかの要素があり、このモデルは決定的なものではない。例えば海馬において認められる θ 波に同期した刺激では、より効率が高くなることが知られている。

また刺激頻度ではなく、細胞の膜電位によるとする考えもある。細胞体は脂質二重層構造による細胞膜で外部と仕切られており、内部の外部による電位差（静止電位）はマイナス数十 mV に達する。細胞の発火（脱分極）には閾値を越える細胞内電位の上昇が必要である。これは膜蛋白質などが関連する正イオンの流入などにより引き起こされるものであるが、細胞内電位が静止電位から離れて脱分極側に近い状態にあるほど発火が起きやすくなる。こうした知見から膜電位など他の要因をも考慮し、シナプス前膜、後膜それぞれの活性状態を関数で表わしたものも考えられている [52]。

5.3.3 減衰項と飽和の問題

Hebb の概念は基本的な部分では一般的に支持されるものとなっているが、生理学的知見にそぐわない面も多い。これはセル A ならびにセル B の活性がともに継続して高い場合、その結合は無限に強くなる一方となってしまうからである。生体でのこうした無限の結合強化は、微小なイオン電流で活動する神経細胞において起こりうるとは考えにくい。そこで数学モデルで Hebb の概念をそのまま学習則として表現した場合、必然的に飽和が起きることは明確である。また実験的に明らかにされている長期増強、長期抑圧の両現象について、Hebb 則はシナプスの荷重度上昇により長期増強を表すことは可能であるが、長期抑圧について説明が困難である。すなわち飽和が起きず、しかも荷重の増強だけでなく減衰をも考慮した学習則でないと生理学的知見に合わないのである。

そこで飽和の問題を解決するため、Hebb 則の拡張や反 Hebb 則によるモデルが数多く考案されている。一例として、減衰項を導入し、ある条件で増強がおさまり減衰に転じる特性を持つモデルも検討されている [52]。ここでは前膜において減衰項を設けたため全体として飽和する可能性はなくなり、反対に無限に減衰することもない。しかしこの減衰項は数学的に求められたものであり、生理学知見による裏付けに乏しい面がある。さらに後膜における活性状態の飽和などの問題は考慮されておらず、神経細胞の機能を表すモデルとしてはなお不十分である。

5.3.4 コバリアンス則と BCM 理論

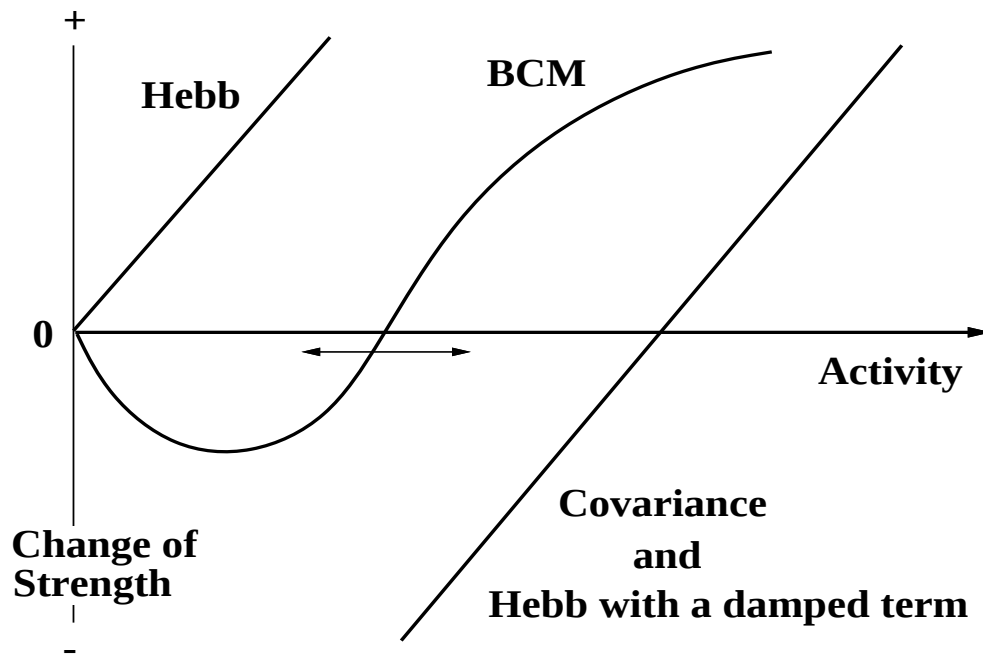


図 5.1: Hebb 則とその拡張モデル ([52] を修正)

Sejnowski の考案したコバリアンス学習則 [18] は、シナプス前膜、後膜の活性度の相関による、より生理学的にも妥当とされるモデルである。このモデルは前膜および後膜における共分散を加重変化の指標とするもので、出力ニューロンの平均発火率、入力ニューロンの平均発火率を用いている。ここでシナプスにおける結合の強さは前シナプスと後シナプスが正の相関を持つ場合は増強に、負の相関を持つ場合は減弱となる機構を持つ。また相関がない場合は、時間変化によっても加重に変化がないことになる。

また E. Bienenstock らが 1982 年に考案した BCM 理論 [19] は、シナプス活性における長期増強と長期抑圧の境界点 (閾値) が平均頻度によりシフトするもので、長期増強、長期抑圧側ともしだいにゆるやかな学習曲線となる学習理論である。これは飽和を避けると同時に後膜の活性がゼロとなった場合、結合強度も不変となる学習曲線であり、また平均頻度で閾値が変わるといった点で、部分的には生物学的にも納得のいく理論である。コバリアンス学習則および BCM 理論の特性を図 5.1 に示す。図 5.1 において、縦軸はシナプス前膜と後膜、すなわち 2 つの神経細胞を結合するシナプスにおける結合強度を意味する。この結合強度が高い場合はシナプス伝達がより強く行われ (結合が増強する) 反対に弱い場合は伝達が弱まる (結合が減弱する) ことを示す。また横軸はここではシナプス後膜の

活性状態を意味し、右へ行くほど発火の頻度が高いことを示す。これらは一般的に発火頻度が高いほど、シナプス結合の強度が増加することを意味するものである。

基本的な Hebb 則がシナプスの結合強化側（+側）だけで説明されしかも飽和する傾向にあるのに比べ、コバリアンス学習則は減弱側（-側）をも説明し、式の上からは飽和も回避されている。また BCM 理論では左右に移動可能な分岐点により、閾値の変化を可能としている。しかし、これらの 2 つ学習則でも生物学的に不十分な点がある。すなわち、どちらも長期増強、長期抑圧への閾値として分岐点が存在するが、これはシナプスにつねに増強または減弱の性質が備わっていることを意味する。したがって、このままでは実験で増強しか起きない、また減弱しか起きない神経細胞のふるまいを表現するには無理な点もある。そこで閾値を 2 箇所設けてそれぞれの学習曲線を別に定義し、2 箇所の閾値によって増強だけ、減弱だけ、あるいはそれら両方といった学習曲線を定義した理論も考えられている（ABS 理論 [53]）。

これらの学習則は、生理学的な裏付けが無理な減衰項を設けずにシナプスの活性をもとに学習を導いたものであるが、後膜の活性要因としては、自己励起以外では前膜からのパルスの伝播によるものとしている。自己励起としてはてんかんなどで見られるバースト状の発振が挙げられるが、学習・記憶モデルとしての学習則にはなじまない側面がある。したがって前膜の活性および後膜の活性指標の共分散をとる方式は、信号伝達における入出力関係があいまいである。パルス信号の伝達はいくまでもシナプス前膜側から発生するものであり、後膜における活性状態は、それ以前に置きた前膜からの伝播による結果が反映されたものであると考えることができる。したがって、前膜と後膜における活性状態の原因は時間的に異なった時点での事象であり、これを同時に計算した場合はその点が反映されないこととなる。そこで神経細胞における学習則を構築する際は、あくまでも入力情報としてシナプス前膜からの情報伝達機構を中心にとらえる方法も重要であると考えられる。本研究ではこうした点を踏まえ、後膜においてはその膜電位を考慮する。そして前膜からの情報伝達が単位時間においてどうシナプス全体に影響を与えているかといった点に注目し、時間コーディングによる学習則を提案する。

5.4 時間パターン刺激による実験

5.4.1 実験の準備

神経情報の信号伝達機構の解明と、それに基づく脳の可塑性モデルを構築するために必要な実験指針を示す。この実験では中枢神経系における電気生理実験を行い、新たな学習理論の構築として展開可能な実験結果を得ることを目指す。従来、細胞間におけるパルス信号としてその平均頻度が重要視されてきたが、神経細胞が時間的なパターンによる情報の符合化を行っている、といった信号伝達の特性を持つ可能性を検討する。まず、パターン刺激を用いた実験を行うために構築した設備、および実験方法の概要について述べる。

海馬および小脳において細胞の可塑的現象が確認されているが、どちらの現象もパターン刺激によって抑制側から増強側まで連続的に確認された報告はない。海馬においては長期増強のみ、その強度がパターン系列によって変動することが分かっている。従来、刺激については平均頻度が重要視され、また短時間に刺激を2回与える刺激 (Paired-pulse stimuli) や、 θ 波などのリズム、さらには2入力の刺激での同期といった実験が主であった。こうした状況で、本実験では1入力によるパターン刺激により、平均の刺激頻度を同一にしたまま、同じ細胞で連続的に抑制側から増強側までの可塑性が起きる可能性を探る。そのため水浸対物レンズを用いた正立型光学顕微鏡でスライス上の細胞の確認を行いながら、小脳プルキンエ細胞におけるパッチクランプ法で実験を行う。そこで本実験では、高精度の刺激装置からのパターン刺激システム、ならびに高性能プローブにより電位変動の記録を可能とする電気生理実験システムを構築した。

5.4.2 実験設備のセットアップ

電気生理実験の設備構築において、特に注意を要する点はノイズ対策である。しかし、3章でも検討したとおり電子・電気機器からのノイズをゼロにすることは現在不可能である。そこで顕微鏡ステージにおけるノイズの影響を最小限とする努力が必要となる。具体的には防震台、ファラデーケージ、および確実なグラウンドの確保である。防震台は実験室において床に強度のある位置で、コーナになるべく近い壁際に設置した。またファラデーケージの金網はなるべく強く張れしかも硬い材質を選び、風圧や震動から発生するケージ内の電気容量の変化を押えた。

グラウンドのとり方については、グラウンドループを避けるため一点にその接点を集中

させた。なおコンピュータ機器、特にディスプレイ装置やコンパクトな設計で液晶タイプのノート型パソコンからは、ノイズの放出が非常に大きい。そこでこれらの機器については、ステージから一番遠い位置とした。また人体が持つ静電気は測定はもとより、放電により電子機器に悪影響を及ぼす恐れがある。このため随所に静電防止対策を行った。さらに AC 電源や照明機器からのノイズ対策として、ケーブルラインおよび照明のシールドを行った。

本システムが使用する電源はなるべく少ない箇所からしかも確実なグラウンドのとれている箇所を用いた。また最終段階の対策として記録装置にノイズフィルタを使用した。このフィルタは 10KHz のローパスフィルタで、10KHz を越える信号は通常の細胞では起きないことが予想されたるために用いる。以上によりノイズの影響は無視できるほどまで低減された。また灌流液はサーモスタットを使用し、たえず一定の温度を保つようにして温度のドリフトを押えた。灌流液については流入口と吸引部分で微妙な電位変動が起きないように対策を施した。なお記録モードに入った際は振動や静電ノイズをを与えないため、顕微鏡には一切触れない。そこで電磁波防止クロスで顕微鏡を覆うといった、従来にない、電磁波ノイズを効果的に遮断する方法を考案した。用意したおもな装置は表 5.2 のとおりである。このほかには一般的な生物実験で用いられる用具および脳スライス作成のための手術器具、スライス中の細胞を維持するために用いる混合ガス (95% O_2 , 5% CO_2)、各種試薬などがある。

5.4.3 小脳スライスおよびプルキンエ細胞

ここでは実験に用いる脳切片 (スライス) としてどの部位を用いるかを検討する。シナプス可塑性に関する実験を行う場合、ラットなどの中枢神経におけるスライス中の細胞、または培養した細胞が通常用いられる。培養細胞を用いた場合、細胞どうしが複雑にからみあうことなく、また必要な細胞を選択して用いることができるという利点がある。しかし人工的に培養を行った細胞での実験では、はたしてどこまで実験結果が生体に近いかを判断しにくい。本実験ではなるべく生体 (*in vivo*) に近い条件で実験をする必要から、一般的に用いられるラットのスライスを用いた。部位の選定では、長期増強ならびに長期抑圧が観察されている部位であり、また学習・記憶機構に深く関与するとされる海馬または小脳を検討した。海馬は長期増強が最初に確認された部位でもあり、長期増強に関する知見は多い。また最近では長期抑圧に関する実験結果の報告も出てきている。小脳については

表 5.2: おもな実験装置

製 品 名	用 途
Digital Data Recorder	デジタルデータ記録装置
Video cassette Recorder	画像および信号記録
Color Video Monitor	顕微鏡画像
Camera Controller	顕微鏡用カメラコントローラ
Oscilloscope	オシロスコープ
Electronic Stimulator	刺激装置
Pico Injector	エア注入器
Temperature Controller	チャンバー用温度維持装置
Micoro Drive	電極微動制御装置
Mercury Lamp Power Supply	水銀ランプ電源装置
Halogen Lamp Power Supply	ハロゲンランプ電源装置
Peristaltic Pump	灌流液用ポンプ
CCD Camera	顕微鏡用 CCD カメラ
Micro Manipulator	電極粗動制御装置
Piezo Drive	電極微動装置
Microscope	正立型水浸顕微鏡
Vibration Isolation Table	防震台
Film Recorder	写真撮影用
Personal Computer	信号測定用
Personal Computer	パターン刺激用
HEKA EPC-9	パッチクランプ用アンプ
Slicer	脳スライス作成
Micropipette Puller	電極作成
Compressor	防震台用
Cage	ノイズ対策ケージ

長期抑圧が最初に確認された部位でもあり長期抑圧の実験例が多いが、長期増強の実験報告もある。以上のことから海馬も小脳もシナプス可塑性に関する実験対象としてはどちらでも問題はない。本実験では小脳制御モデルの見地からも関心の高い、小脳プルキンエ細胞と平行線維間のシナプスに注目した。また小脳長期抑圧は平行線維と登上線維の同時刺激（2入力）によって起こることが確認されているが、小脳プルキンエ細胞と平行線維間のシナプスのみ（1入力）における長期抑圧、長期増強の可能性も検討する。

小脳は末梢および大脳皮質側との入出力を行っているが、その経路や情報の種類は多種で複雑である。小脳の運動に関連する機能としては、中枢神経系との協調の他、運動制御、学習やプログラミングといった働きの一部に関与するものと考えられている。こうした複雑な経路や機能を持つ一方で、小脳皮質の入出力はある基本回路から構成されており、また形態的にも規則正しい一様な構造を持つ。小脳皮質の細胞は5種類あり、その中でもプルキンエ細胞は小脳で最も大きい細胞である。本実験で対象とする小脳虫部のおもな機能としては、体幹の運動制御が考えられている。ここでプルキンエ細胞は平行線維および登上線維の2つの異なる入力を受け、この同時刺激により小脳核に対して抑制性の信号が出力される。

これを証明する実験系として、前庭動眼反射による水平性眼球運動の前向き制御がある。頭部が水平に回転した場合、その情報は水平半規管により検出され、また網膜上で起きた像のぶれは補正される。このとき、半規管からの回転情報と網膜誤差の情報がそれぞれ平行線維と登上線維に伝達され、プルキンエ細胞は像のぶれを補正する計算を行い、その結果が抑制信号として小脳核に送られることが知られている。こうして眼球の動作を支持する筋肉には小脳からの調整が行われ、ぶれに対する補正が行われている。ヒトに視野が左右逆さとなる逆転プリズム眼鏡をかけさせると、しだいに眼球運動が逆さの視野に順応してくることが分かっている。そこで小脳はこうした学習機能を司っているものと考えられ、その根拠としてプルキンエ細胞における長期抑圧現象が示されている。こうした知見からも、可塑性機構のモデルを構築する実験として、小脳は海馬と並んで有望な部位であると考えられる。

5.5 実験の手順

5.5.1 パターン列の生成とトリガープログラム

パターン刺激は、平行線維に対して水晶発振子を用いた高精度の刺激装置から、アイソレータにより絶縁したパルスを与えることにより行う。刺激装置へはコンピュータからパルス波形で刺激のトリガーを与える。この際、時間パターンのトリガーパルス列を計算するために、トリガープログラムの開発を行った。このプログラムではトリガーパルスの間隔、時間、個数の設定を可能とし、さらに波形の同時モニタを行うため、サーマルプリンタへの制御信号も同時に送信するものである。プログラムの初期画面例はつぎのとおりである。

[TRIGGER PROGRAM FOR PATCH CLAMP SYSTEM (j.c V3.0)]

CH1:STM CH2:REC CH3:PRN CH4:100 CH5:MRK CH6: 25 CH7:LST CH8:POW CHC:CLR									
[0]	INITIAL	PULSE	:	30	times	[1]	PRE-TRG	DELAY	: 100 msec.
[2]	SWEEP	TIME	:	15	sec.	[3]	DURATION	1	: 100 msecs.
[4]	FINAL	PULSE	:	30	times	[5]	INTERVAL	TST	: 3000 msecs.
[6]	REC	INTERVAL	:	20	times	[7]	DURATION	2	: 100 msecs.
[8]	PRINT	TIME	:	5	times	[9]	MILISEC	ROOP	: 540 times/msecs.

設定可能なパラメータは全部で 10 あり、パターン刺激前後のテスト刺激およびパターン刺激中の刺激間隔、刺激時間、プリンタ記録のタイミングなどの設定が可能である。またパターン刺激における刺激間隔は別にデータファイルとして持ち、さまざまなパターン刺激のトリガーを発生することが可能である。各パラメータの意味はつぎのとおりである。

INITIAL PULSE

テスト刺激はパターン刺激前後に行われるが、パターン刺激前に何回テスト刺激を行うか設定する。

PRE-TRG DELAY

応答信号の直前からの印刷記録を行うため、トリガーパルスと刺激パルスの時間間隔を設定する。

SWEEP TIME

パターン刺激を行う時間を設定する。

DURATION 1

トリガーパルス 1 回の時間を設定する。

FINAL PULSE

テスト刺激はパターン刺激前後に行われるが、パターン刺激後に何回テスト刺激を行うか設定する。

INTERVAL TST

テスト刺激を行う際の時間間隔を設定する。

REC INTERVAL

プリンタへの印刷タイミングのインターバルを設定する。この設定がないと膨大なプリント用紙が必要となり、実験途中で紙切れとなる。そこで用紙の節約のため、テスト刺激中はある時間間隔を設けて定期的な印刷記録のみとする。ただし、応答信号の記録はすべてハードディスクに保存される。

DURATION 2

プリンタ印刷用トリガーパルス 1 回の時間を設定する。

PRINT TIME

1 回の印刷タイミングにおいて、何回分のテスト刺激応答を印刷するか設定する。

MILISEC ROOP

パソコンで 1msec の時間を生成するために必要なループ回数を設定する。

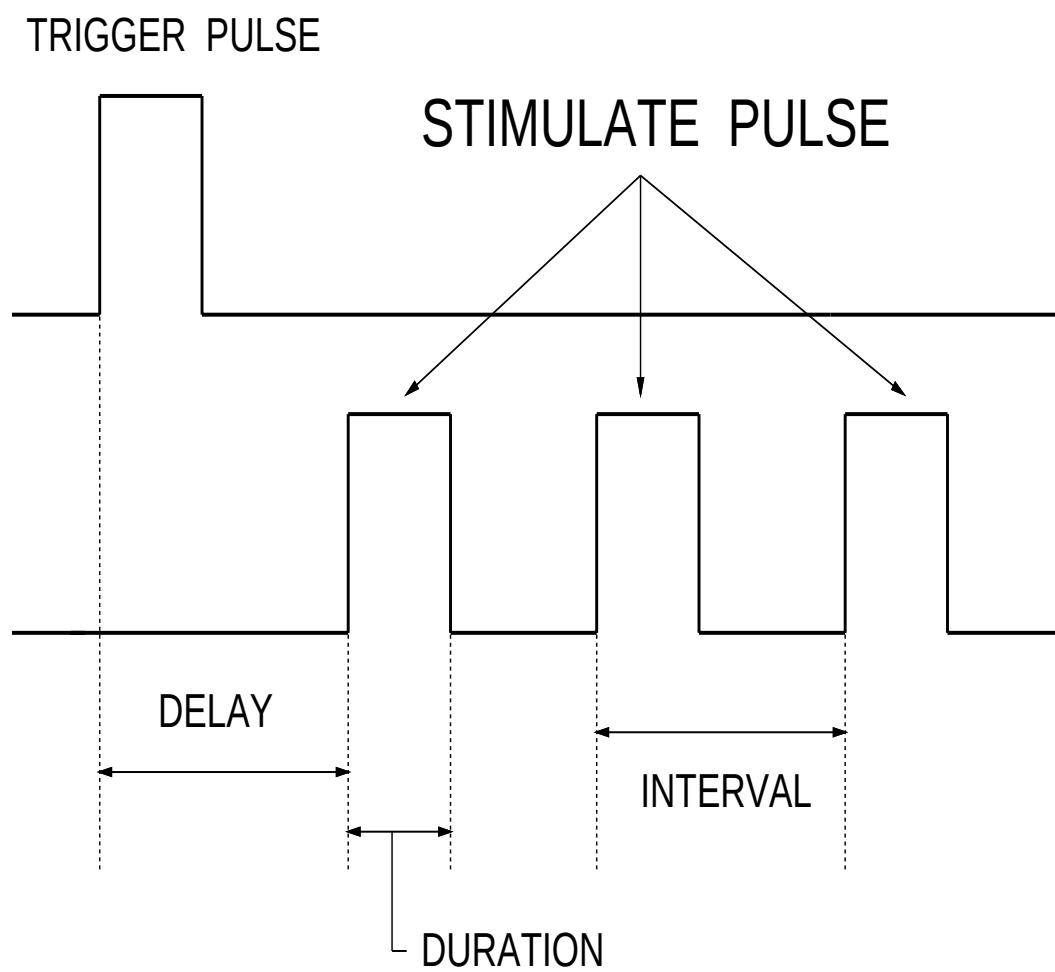


図 5.2: パルス列

図 5.2は定常刺激 (Regular stimuli) におけるトリガーパルスとの関係を示す。トリガーパルス用コンピュータから、パラメータで指定されたタイミングでトリガーパルスが発生し、パターン刺激 (この場合はレギュラーパターン) が開始される。この際、トリガーパルスは刺激装置および応答記録装置、さらには印刷装置にも送られ、必要に応じてそれぞれの動作が開始される。

パターン刺激ではパルス列の間隔を 2 種類用意し、この組合せを確率的な指標として相関係数で表した刺激パターンを用いる。ここでパターンの種別を表すためにはなんらかの指標が必要である。そこで、刺激パルスの時間間隔の違いを数学的な指標で表すものとして、相関係数を用いた。相関係数自体の生理学的な意味の検討は次章で行う。刺激パルス列は正の相関、負の相関、無相関のパターン刺激 3 種類と定常刺激、計 4 種類用意した。この際、一次の統計量としてのパターン刺激の平均パルス頻度は 8Hz ですべて同一とし、二次の統計量であるパルス間隔のみが異なるものとした。なお定常刺激はパルスの間隔がすべて同一の 8Hz によるものである。

この頻度の決定は、刺激頻度が 1~5Hz で長期抑圧、50Hz 以上で長期増強が起こる細胞があると考えられていることから行った。かりにこれらの周波数帯域を用いてしまうと、時間コーディングの判断以前に長期増強または長期抑圧が起きてしまうことになる。可塑性を決める要素として平均頻度は大前提として重要な要素であるが、頻度だけで結果がある程度決まってしまう帯域を用いた場合、時間パターンによる比較がしにくくなる。そこで周波数頻度に依存しない形で時間パターンの実験を行うには、この間の周波数が適していると判断した。また長期増強も長期抑圧も起こらなかった 10Hz でも燐酸化をはじめとする変化が起きた報告例があり、生化学的になんらかの影響が示唆されている。そこで 5Hz を越えた数 Hz が適していると判断し、パターン刺激の平均頻度および定常刺激を 8Hz に設定した。なお 8Hz での長期増強の報告が同様の実験系で報告されているが [56]、これはまだ必ず起きると確定されたものではなく、この現象が高い確率で起きるものでなければ本実験への悪影響はない。

実験では、パターン刺激前後のプルキンエ細胞の応答変化をパッチクランプ法により測定する。なお前にも検討したとおり、長期増強や長期抑圧の刺激頻度による基準は部位によってまちまちであり、海馬 CA1 野では 1~5Hz で長期抑圧が起きるとされるのに対し、第 3 章でも行った海馬 CA3 ではこの周波数では長期抑圧が起きないとされる。さらにリズムなど、平均頻度以外の要素も大きく関係することが分かっている。したがって、部位を

考慮せずに頻度だけでは長期増強や長期抑圧の起きる基準を決めるのは不可能であり、だいたいの目安として本実験では低頻度と高頻度の刺激を用いなかったものである。

5.5.2 時間パターン刺激で用いるパルス列

2つの隣接するパルスの間隔に 50ms (短い間隔) と 200ms (長い間隔) の2種類を設定し、15秒間に120発の刺激をするように配列した(一次の統計量は等しくなっている)。その刺激パターンはマルコフ相関を指標にして、異なる3種類の配列を作成した。また、コントロールとして 8Hz、120 発の定常刺激 (Regular stimuli) を用いた (図 5.3)

定常 (Regular) :

- ・ 8Hz で 120 回の刺激 (刺激はつねに 125msecs ごとに行われる)

正の相関 (Positive correlation) :

- ・ 相関係数 $P=0.8$ になるようにパルスを配列したもの。刺激間隔は 90% の確率で、その直前の刺激間隔に等しい。

負の相関 (Negative correlation) :

- ・ 相関係数が $P=-0.8$ になるようにパルスを配列したもの。刺激間隔は 90% の確率で、その直前の刺激間隔と異なる。

無相関 (Uncorrelated) :

- ・ 相関係数 $P=0$

5.5.3 パターン刺激およびテスト刺激の方法

パターン刺激を行う際、その前後でシナプス後膜のある樹状突起上で応答がどう変化するかを測定しなければならない。そこで測定用の電極を樹状突起に刺入する必要があるが、使用するプルキンエ細胞の樹状突起は比較的太い基底部分でも数マイクロといった細さであり、現存する実験技法では困難である。そこで 30~50 マイクロメートルと大きい、プルキンエ細胞の細胞体で測定を行う。樹状突起で発生した電位変化は細胞体へと流れるため、

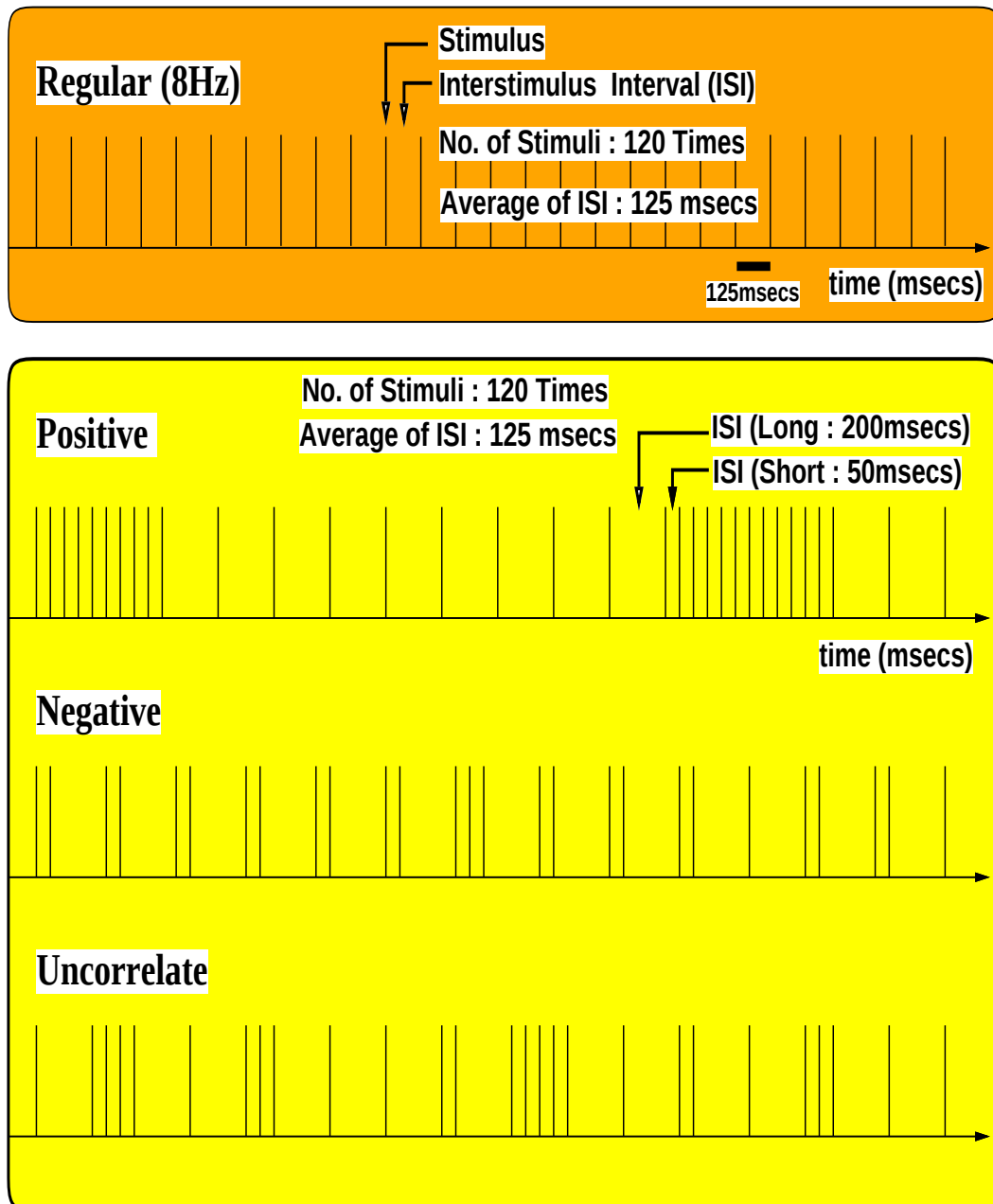


図 5.3: 定常刺激と各パターン刺激

細胞体での測定も可能である。しかし細胞体までの距離に比例して減衰することが考えられ、樹状突起にあるシナプス後膜で直接測定したものではない。このことは実験結果の解析に注意を要するが、本実験では主にシナプス前膜での素量放出による可塑性を検討しており、後膜では集合電位として細胞体での応答変化が測定できれば問題ない。また樹状突起は絶縁機能をもつミエリン膜である間隔ごとに覆われており、高速でしかも減衰をなるべく防ぐ構造を持つ。そこで細胞体に到達する電流波形の時定数の変化は小さく、後膜において発生した電流波形の特徴は維持されるものと仮定した。

以上をふまえ、図 5.4 のとおりパターン刺激前後でテスト用の刺激 (テスト刺激) を行う。テスト刺激は細胞に増強や抑圧といった影響を与えない頻度で行う必要があり、パターン刺激前では応答が安定してから 10 分間程度、またパターン刺激後では細胞の衰弱が認められない限り継続してテスト刺激を行う。なお状況によっては、パターン刺激後のテスト刺激で、細胞が安定した際に別のパターン刺激を同一の細胞に対して行う。こうした同一の細胞に対して 2 回以上のパターン刺激を与える際には、実験結果の判断に注意を要する。すなわち、与えるパターン刺激の前に異なるパターン刺激がすでに与えられた場合、その後のテスト刺激で安定が確認されたとしても、なんらかの影響が残っている可能性がある。しかしその反面、異なる細胞において測定したパターン刺激の実験結果を同一の基準で比較することが可能かといった問題もある。したがって、実験に際しては細胞に対して 1 つパターン刺激しか行わないものと、いくつかのパターンが同一の細胞に対して行うものの両方の実験を行うのが妥当であると考えられる。

テスト刺激は長期増強、長期抑圧ともに報告されていない安全な頻度を用いる。そこで 20 秒に 1 回、0.05Hz でシナプス前膜側の線維を刺激する。テスト刺激を与える際の電流強度は、後膜での細胞応答が 200pA 前後となるように調節した。これはテスト刺激で 300pA 以上の応答がある場合、テスト刺激中あるいはパターン刺激中に、細胞体で発火が起きる可能性が高くなるためである。発火が起きた場合、細胞体内は生化学的に異なるフェーズに移行する可能性があり、目的の実験に支障があるためこれを避ける。また逆にあまり小さな刺激では、第 3 章の結果にあるように素量の放出失敗が増加し、反応するシナプスの総計が小さくなるため、細胞体での応答測定やパターン刺激前後の比較が困難となる。

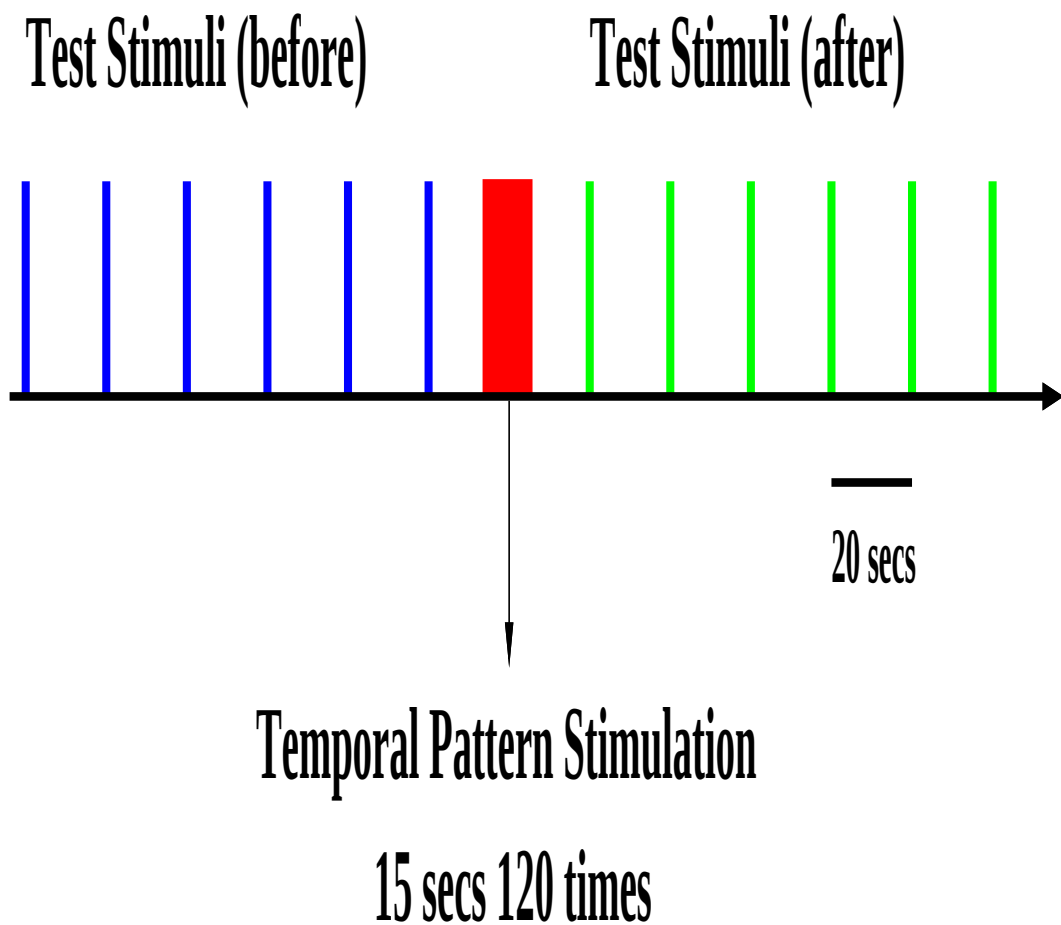


図 5.4: テスト刺激とパターン刺激

5.5.4 パッチクランプ

本実験ではプルキンエ細胞に対してパッチクランプ法による電流記録を行う。パッチクランプ法 [54] は、細胞膜にガラス管でできた微小電極を密着させ、その部分にあるイオンチャネルを流れる電流を測定するものである。また、密着した部分を吸引することにより細胞膜を破り、細胞内とガラス管内部を貫通させて細胞内外の電流の流れを測定するという全細胞記録 (whole-cell recording) が可能である。細胞膜を破る際は、膜との抵抗がギガオームの大きさになるまで密着させて行う。

実験では、細胞体においてシナプス後膜における受容体の応答を調べるため、電圧固定

による全細胞記録を行う。ここで電圧固定とは、細胞内の電圧を固定したまま、細胞膜を流れる電流を測定するものである。これに対して電流固定は細胞膜を通過する電流を一定に固定し、電圧の変化を測定するものである。本実験では細胞内の電圧に変動が起きにくい電圧固定モードを用いる。その理由は静止電位を保った状態で、AMPA 受容体 (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor) によるプルキンエ細胞の応答を測定するためである。このモードでは、細胞膜をコンデンサととらえることにより、抵抗成分と合わせた等価回路として実験系をとらえることができる。実際の測定では特殊なオペアンプを用いた高性能プローブに電極を接続し、微小な電流を計測する。なお、このときガラス電極の内部は細胞内に近い組成の内液を充填し、細胞内部と同一の電位が保たれる。

5.5.5 電気生理実験

実験の概要はつぎのとおりである。図 5.6 にはスライス作成からパッチクランプまでの過程を示す。まずラット (wistar 系 1~3 週齢) の小脳を用いてスライス (矢状断、厚さ約 $200\mu\text{m}$) を作成する。スライサーはバイブレーション方式の DTK-3000 (DSK 社製) を用いる。つぎに、スライスは 37 の灌流液 (Ringer) 中で 1 時間以上維持した後で実験に用いる。実験は顕微鏡 (Zeiss 社製 AXIOSCOPE) 下で、つねに 32 の灌流液が $2\text{ml}/\text{min}$ の流速で流れている条件で行う。パッチクランプとその記録には EPC-9 PATCH CLAMP AMPLIFIER および PULSE PROGRAM (ともに HEKA 社製) を用いる。

パッチクランプは先端口径 $3\mu\text{m}$ 程度 (電極抵抗は $3\text{--}6\text{M}\Omega$) のピペットにピペット内液を装填したものをを用い、スライス表面のプルキンエ細胞において全細胞記録 (whole cell recording) を行う。刺激には先端口径 $5\mu\text{m}$ 程度のピペットに灌流液 (Ringer) を装填したものをを用いて、分子層の軟膜に近い部分のスライス表面を局所的に刺激して平行線維刺激 (Parallel fiber stimulation) を行う [55]。刺激パルスは観察される興奮性シナプス後電流 (EPSCs: Excitatory Post Synaptic Currents) が 200pA 程度になるような $5\sim 50\mu\text{A}$ の電流を、刺激時間約 $100\mu\text{s}$ のスクエアパルスで図 5.7 に示す平行線維に与えるものである。刺激の手順は図 5.5 に示す。以下に実験手順および使用した灌流液、ピペット内液を示す [56]。

- 1. Dissect out the cerebellum from rat brain.**
- 2. Make brain slices with a vibrating slicer.**
- 3. Incubate at 37 degrees C. more than 1h. before recording.**
- 4. Move a slice to the recording chamber.**
- 5. Put the parallel fibre-stimulating electrode on the molecule layer.**
- 6. Make the formation of a giga seal on a Purkinje cell.**
- 7. Whole-cell patch-clamp.**
- 8. Stimulate parallel fibres and record EPSCs from the Purkinje cell.**

図 5.5: 実験手順の概要

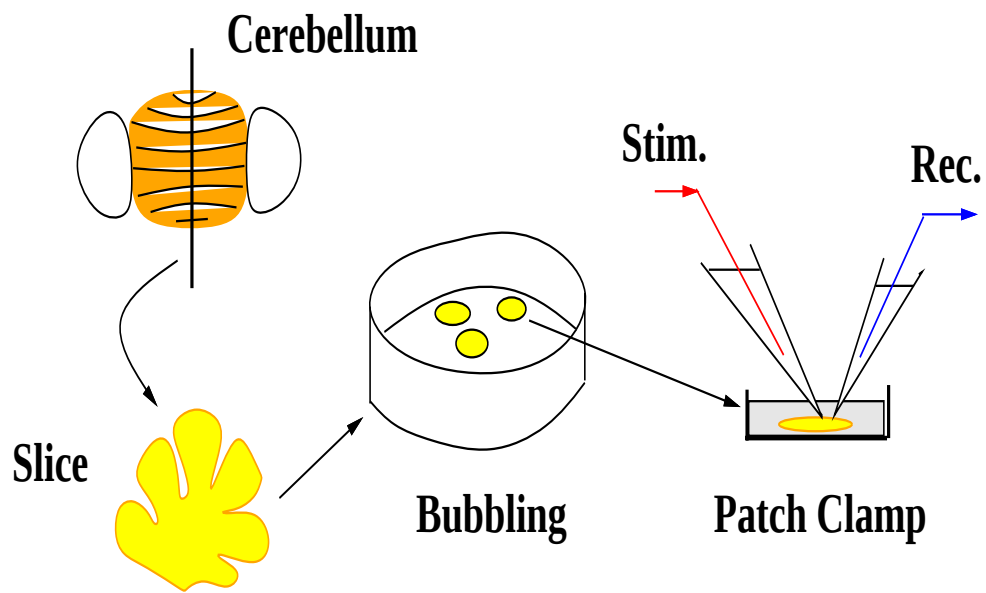


図 5.6: スライスの作成およびパッチクランプ

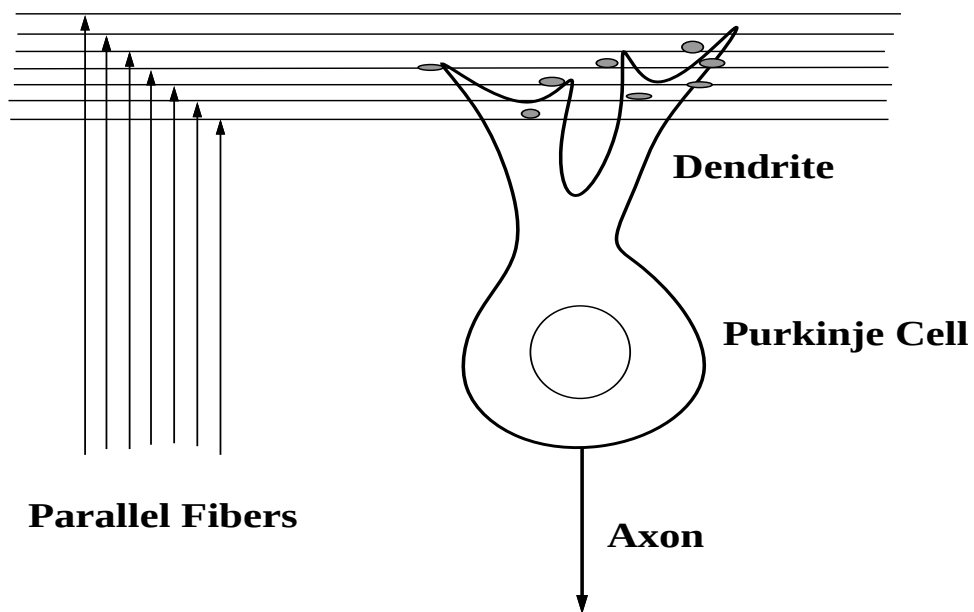


図 5.7: 平行線維と小脳プルキンエ細胞

灌流液：119mM NaCl, 2.5mM KCl, 26mM NaHCO₃, 1mM NaH₂PO₄, 1.3mM MgSO₄, 2.5mM CaCl₂, 10mM glucose, 30μM picrotoxin with 95%O₂, 5%CO₂

電極内液：122.5mM Cs-gluconate, 8mM NaCl, 10mM HEPES, 10mM BAPTA, 2mM Mg-ATP, 0.3mM Na₃-GTP, 5mM QX-314, pH. 7.3

なお、本実験の正当性を確認するためつぎの実験を行った。

- ピクロトキシン (Picrotoxin) による GABA 作動性受容体の影響
- 2 回刺激 (Paired-pulse stimuli) による刺激部位の確認
- CNQX 存在下における応答の確認

まずピクロトキシンによる GABA 作動性の影響については、プルキンエ細胞における抑制性のチャンネル応答の影響を無くすために、その阻害剤として知られるピクロトキシンによる働きを確認した。細胞外液へのピクロトキシンの投与前後の確認により、確実に GABA 作動性の影響が阻害されることを確認し、パターン刺激実験で用いた。これは本実験で対象としている AMPA 型受容体によるプルキンエ細胞の応答が、同時に別の経路などから生じた抑制性であるギャバによって阻害されるのを防ぐため、純粋に AMPA 受容体の応答結果を求めるために使用するものである。

つぎに 2 回刺激による刺激部位の確認は、刺激電極の位置が正しく平行線維を刺激するものであるかを確認するためのもので、2 回の連続した刺激では、もし平行線維の刺激が行われているとプルキンエ細胞の 2 回目の応答強度は 1 回目よりも強くなり、登上線維側を刺激していると逆に 2 回目の応答強度は小さくなることが知られている [57]。そこで何回かこの実験を繰り返し、間違いなく平行線維を刺激する位置を確認した。

最後に CNQX による応答測定の確認について、CNQX は AMPA などの非 NMDA チャネルの拮抗剤として知られ、実験において AMPA 受容体の応答を測定しているか否かを確認するために行った。さらにはナトリウムチャンネルによる発火を押えるため、作用の確認後、QX314 を用いることとした。

5.6 まとめ

本章で行ったことはつぎの2項目である。

1. 素量解析の結果からシナプスにおける情報の符合化ならびに伝達機序を検討し、パターン刺激が重要な要素となりうる可能性を指摘した。
2. 情報の時間コーディングの妥当性を明らかにするため、電気生理学実験の設備を構築し、小脳スライスを用いたパターン刺激の実験の指針を示した。

神経細胞における学習則は、従来から数多く考案されてきている。しかし多くの場合は、Hebb の概念に代表されるように前膜と後膜における平均頻度、あるいは膜電位といった指標を用いている。これに対して時間情報の見地から時間間隔の違いによる情報表現を提案し、パターン刺激による可塑性モデルの考えを提案した。そこで情報がいかに符合化され、可塑的变化を生じるのかといった問題点を実験的に明らかにするための実験計画をたてた。

第 6 章

実験結果およびシナプス可塑性モデル

6.1 はじめに

数式のうえで実験データに合わせた学習則モデルについては、結果としてそれぞれの項がなにを意味するのかを説明するのが難しくなってくる傾向にある。こうした工学モデルは、工学的な利用の点ではまったく問題にならないが、生理学モデルとして知見を与えるものではなく、さらなる実験の指針を示すものでもない。本章ではこの点にも留意しながら第 5 章で検討した実験の結果を分析し、パターン刺激の妥当性を検討する。まず各パターンの刺激について、同じ細胞を用いて行った実験結果を検討する。ここで 1 つのパターンを行った後のテスト刺激では、応答が安定するのを待ってからつぎのパターン刺激を行っているが、それ以前に 2 回、3 回と行われた刺激パターンの場合、影響が皆無であるとはいえないという欠点がある。また逆に、細胞のサイズやそのときの刺激強度が一定であるという利点からは同一の細胞で連続した方が好ましい。そこでこうした長所、短所をうまく使い分けながら解析をすすめていく必要がある。

本実験では、パターン刺激前後の応答変化についておおまかな傾向を把握し、パターン刺激の有効性を確認すると同時にモデルの基本型を構築するという目的がある。本章ではさらにパターン刺激中における応答状況について、より詳しく分析を行い、パターンが生理学的にどのような意味を持つものか検討を行い、その結果のモデルへの反映を試みる。

6.2 同一細胞による連続実験の結果

6.2.1 15 秒間の刺激応答の変化について

表 6.1: 刺激中における興奮性シナプス後電流の総和の比較

Pattern	Positive	Negative	Regular	Uncorrelate
The First	192.6	273.9	353.9	303.6
Total	34,816.1	37,196.6	43,814.2	35,265.1
Total/The first	180.7	135.8	123.8	116.1

今回用いた 4 種類のパルス列はいずれも 120 回の刺激となっており、刺激回数はどのパターンも等しくなっている。しかし興奮性シナプス後電流の総和には大きな変化がみられた。1 番目の刺激における興奮性シナプス後電流の大きさを 100 として毎回の変化をまとめると、特に図 6.3 ではパターンに依存した変化がみられる。1 番目の応答値 (300pA 前後) で全応答の総和を割った結果、15 秒間における総和の大小関係は表 6.1 のとおりとなった。

6.2.2 15 秒間刺激前後の変化について

15 秒間のパターン刺激によって、その後で行ったテスト刺激による興奮性シナプス後電流が増大するもの (図 6.2-6.4) と、減少するもの (図 6.6-reffig:9) とに分かれた。パルス系列の違いによる大小関係は図 6.2 のとおりとなり、特に正の相関刺激 ($P=0.8$) と無相関 ($P=0$) の違いは顕著であった。

以上の結果より、一次の統計量 (刺激回数) が同じでも二次の統計量 (刺激パターン) を変化させることにより、興奮性シナプス後電流の起こりかたに違いが起きること示唆する結果が得られた。

表 6.2: 15 秒間刺激前後の興奮性シナプス後電流の比較

Pattern	Positive	Regular	Negative	Uncorrelate
Variations	138.3%	103.2%	92.1%	73.4%

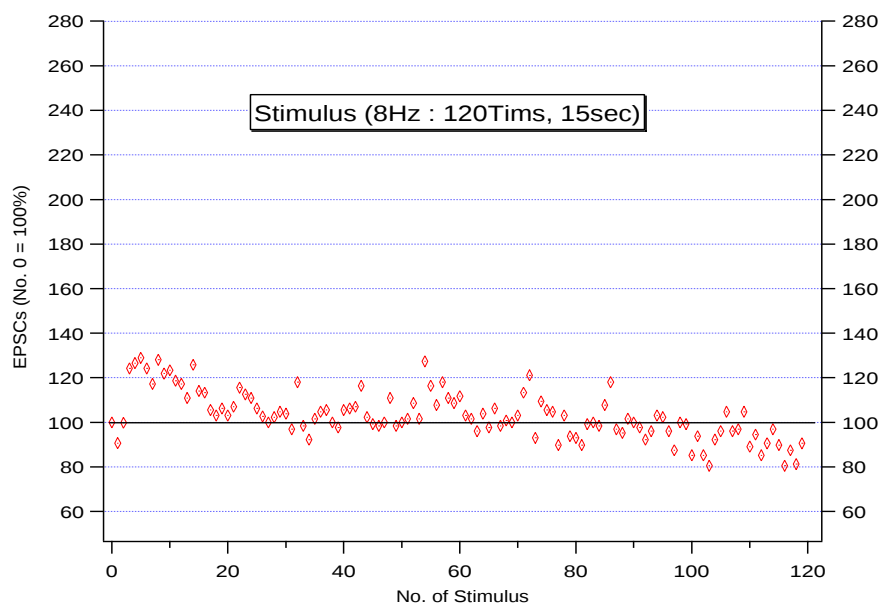


図 6.1: 刺激中の応答 (定常刺激)

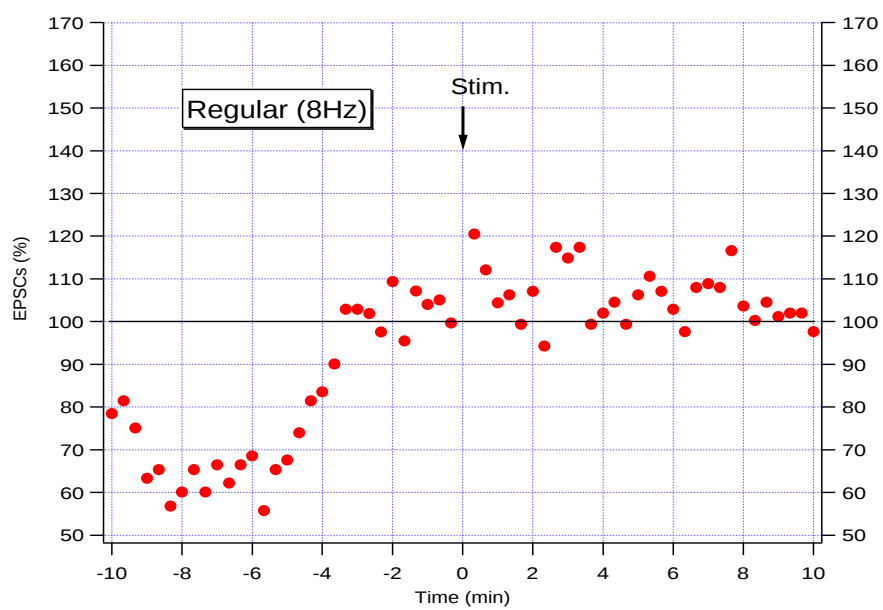


図 6.2: 刺激前後の応答 (定常刺激)

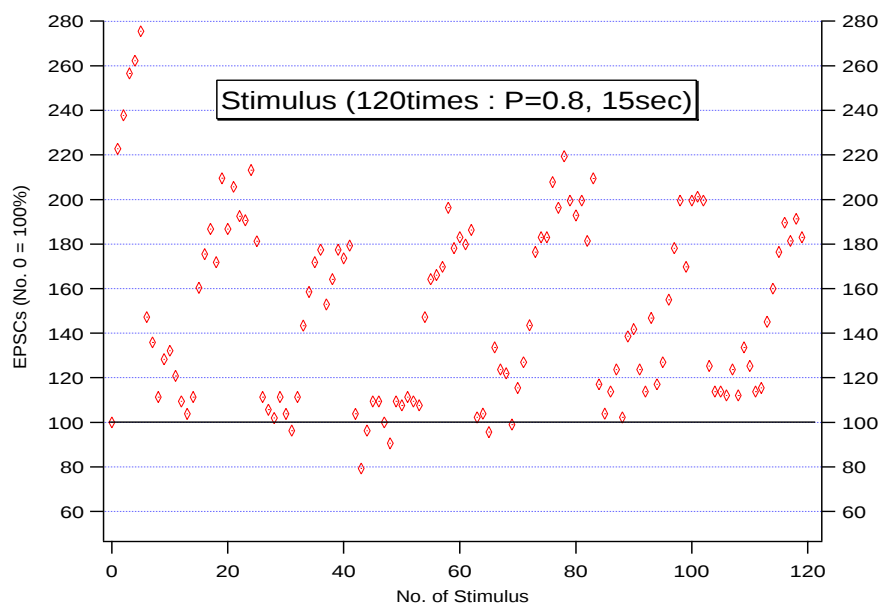


図 6.3: 刺激中の応答 (正の相関のパターン刺激)

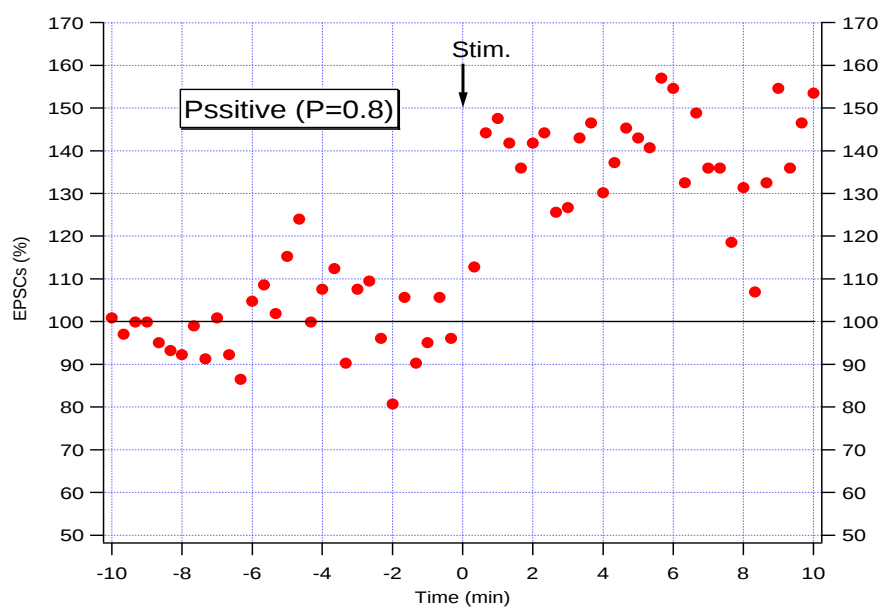


図 6.4: 刺激前後の応答 (正の相関のパターン刺激)

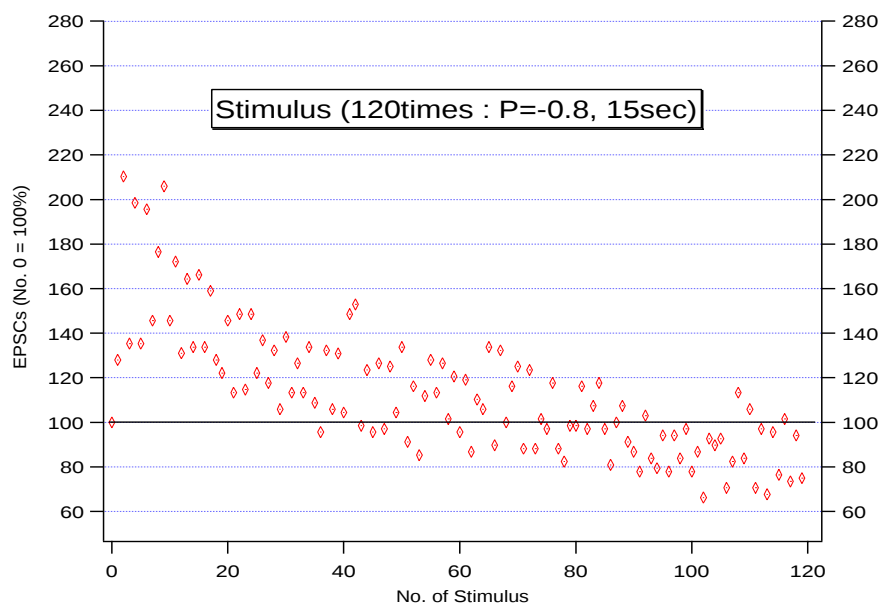


図 6.5: 刺激中の応答 (負の相関のパターン刺激)

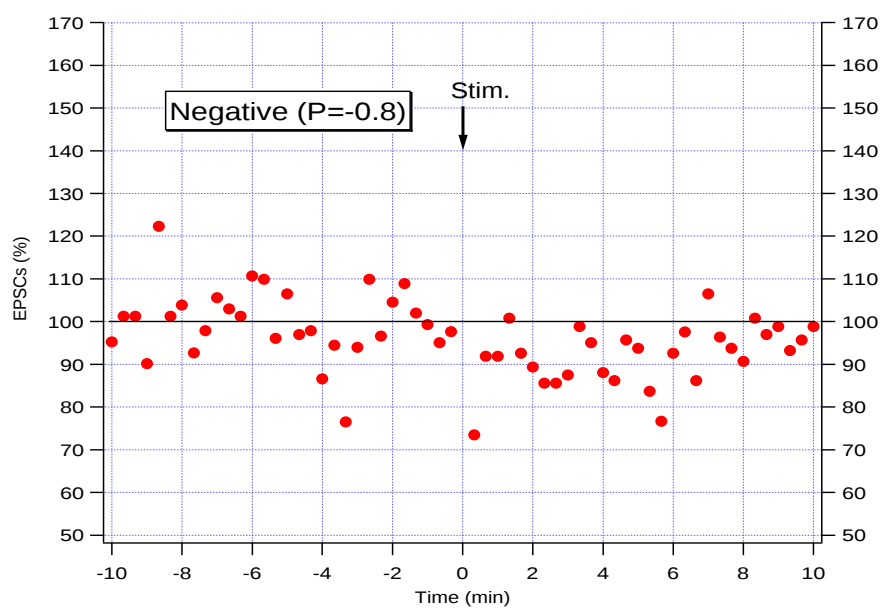


図 6.6: 刺激前後の応答 (負の相関のパターン刺激)

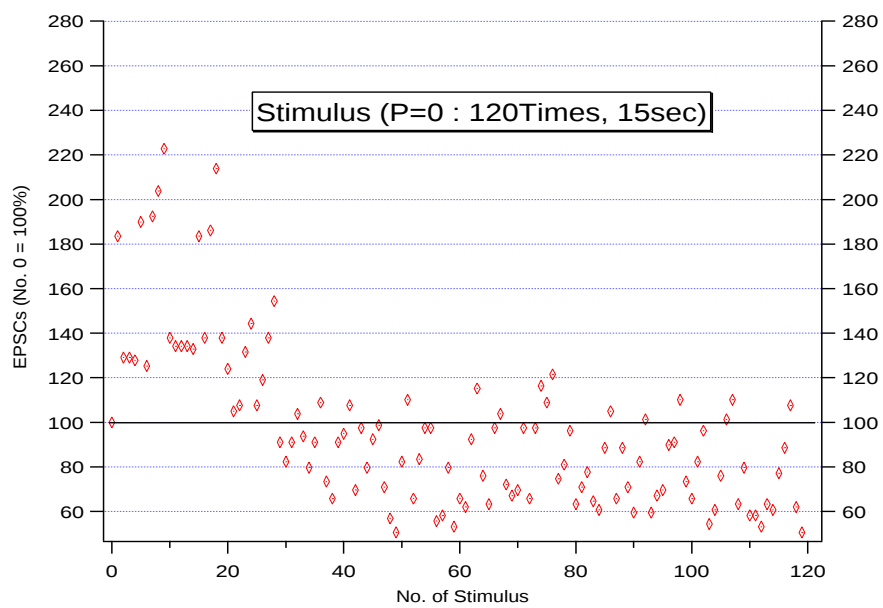


図 6.7: 刺激中の応答（無相関のパターン刺激）

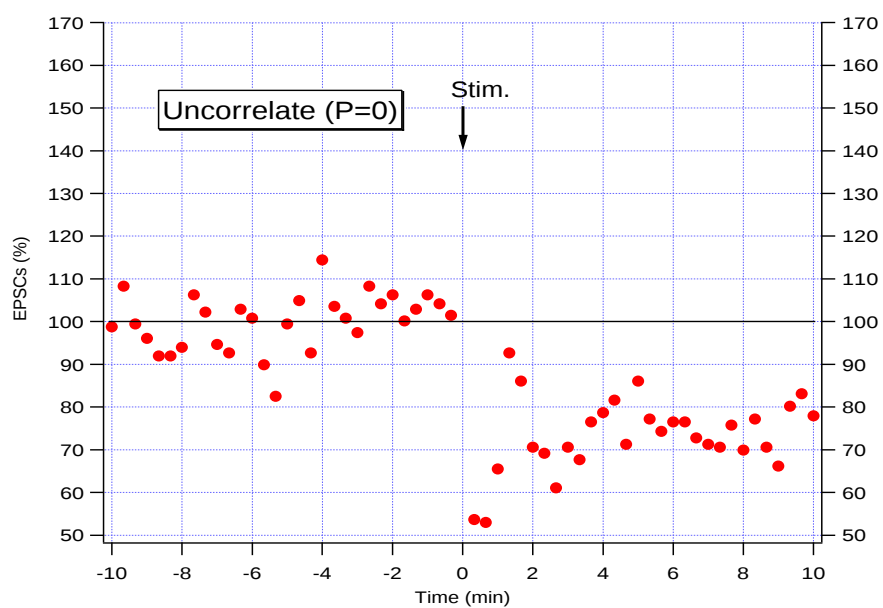


図 6.8: 刺激前後の応答（無相関のパターン刺激）

6.3 異なる細胞を用いた追加実験

6.3.1 実験の基準

追加実験の結果は前節とは異なる 10 件である。同一の細胞に対する 2~3 回目のパターン刺激による結果も含まれているが、それによる影響は少ないと思われるデータを用いた。2~3 回目における結果を用いた判断基準はつぎのとおりである。直前に他のパターン刺激が行われてそれが長期増強あるいは長期抑圧となった場合、これは長時間その影響が持続するため、他のパターン刺激をつぎに行うのは不可能である。また長時間使用されたために減衰が起きているものは、減衰を除く応答変化を見究めるのが困難で使えない。しかしパターン刺激の後でほとんど応答に増減の変化がなかったものは、そのパターン刺激はなんらかの理由でほとんど意味をなさなかった訳で、減衰していない限り比較的参考になる結果であると思われる。

またやや増強ぎみであったものは、ある状況において、応答がもとの状態に安定するまである程度時間をおいてつぎのパターン刺激が可能であると思われる。ここである状況とは、若干の増強傾向にあったものが次に抑制側と思われるパターン刺激を受け、さらにそのパターン刺激後の応答が減弱した場合、これはやはり減弱の効果があつたと見なせる可能性がある。また時間的な時期は多様であるが、増強後には必ず減弱が起きる。したがって、こうした例では減弱とは見なせない可能性も考えられるが、もし増強前の安定状態と増強時の応答強度の差以上に減弱が起きていればこうした点もある程度解決されるものと思われる。

6.3.2 実験結果

表 6.3以降における各項目の意味はつぎのとおりである。なお単位はすべて pA で、小数点以下 2 桁で四捨五入した。また表の値は応答時の波形から電流のピーク（最大値）を求めたものである。

No. of Cell (細胞番号)

実験で用いた神経細胞の管理番号で、最後に*の付くものはその細胞において 2 回目のパターン刺激、**の付くものは同じく 3 回目のものを意味する。

Test stimuli(pre) (テスト 刺激 (pre))

パターン刺激前のテスト刺激の平均応答を意味する。合計の刺激回数は異なるが、どれも 30 回 (10 分) 以上行い、ほぼ安定した段階で打ち切ったものである。

The first value (1 件目の値)

パターン刺激における 120 回のうち第 1 回目の刺激に対応する応答で、パターン刺激による影響のない 1 件目のデータとしてとらえるためのものである。

Total (総和)

パターン刺激における 120 回の応答の合計。

Total/The first (総和/1 件目の値)

総和を 1 件目の値で割り、パターン刺激直前の状態に比べてパターン刺激中にどのような変動があったかを求めるものである。

Total/pre(avg.) (総和/pre(平均))

目的は前の総和/1 件目の値と同様であるが、応答には若干のふらつきがあるため、1 件目の値を用いた場合は正確な判断ができないことがある。そこでパターン刺激前の安定状態をコントロールとするために求めたものである。

Test stimuli(post) (テスト 刺激 (post))

パターン刺激後のテスト刺激の平均応答を意味する。合計の刺激回数は異なるが、どれも 30 回 (10 分) 以上 (長い場合は 90 分) 安定した状態が続いている。

6.3.3 実験結果の考察

表 6.3 ~ 6.6 で各パターンでの平均を求めた結果を、表 6.7 に示す。

以上の各表においては、おもに 1 回目のパターン刺激による結果を用いるために異なる細胞を使用した結果が混在している。そこで値によっては絶対的なものであり、相対的な比較ができないものも含まれる。表 6.7 を用いてさらに各パターン前後のテスト刺激を比較する

表 6.3: 追加実験の結果 (定常刺激)

No. of Cell	R0327E4-4	R0330E1-1	R0331E2-7
Test stimuli(pre)	182.9	139.6	236.9
The first value	191.4	140.8	196.7
Total	27763.0	30908.5	31539.6
Total/The first	145.1	219.5	160.3
Total/pre(avg.)	151.8	221.4	133.1
Test stimuli(post)	221.7	184.2	266.7

表 6.4: 追加実験の結果 (正の相関のパターン刺激)

No. of Cell	P0309E3-3	P0308E1-2*	P0331E404
Test stimuli(pre)	238.3	166.8	197.9
The first value	231.9	159.5	206.4
Total	27497.9	34216.5	35439.6
Total/The first	118.6	214.5	171.7
Total/pre(avg.)	115.4	205.1	179.1
Test stimuli(post)	381.7	212.7	199.8

表 6.5: 追加実験の結果 (負の相関パターン刺激)

No. of Cell	N0120E2-5	N0308E1-4*
Test stimuli(pre)	201.6	189.8
The first value	179.8	215.5
Total	32032.5	21904.3
Total/The first	178.2	101.6
Total/pre(avg.)	158.9	115.4
Test stimuli(post)	164.9	186.3

表 6.6: 追加実験の結果 (無相関のパターン刺激)

No. of Cell	U0328E5-5*	U0331E2-7**
Test stimuli(pre)	154.9	259.3
The first value	152.0	234.0
Total	23165.1	31126.3
Total/The first	152.4	133.0
Total/pre(avg.)	149.5	120.0
Test stimuli(post)	132.5	174.4

表 6.7: 追加実験の結果 (パターンごとの平均)

Pattern	Regular	Positive	Negative	Uncorrelate
Test stimuli(pre)	186.5	201.0	195.7	207.1
The first value	203.7	176.3	197.7	193.0
Total	30070.4	32384.7	26968.4	27145.7
Total/The first	175.0	168.3	139.9	142.7
Total/pre(avg.)	168.8	166.5	137.1	134.8
Test stimuli(post)	224.2	264.7	175.6	153.5

表 6.8: パターンごとの応答強度順位 (追加実験)

Pattern	Positive	Regular	Negative	Uncorrelate
Test stimuli(pre)	201.0	186.5	195.7	207.1
Test stimuli(post)	264.7	224.2	175.6	153.5
Variations	131.7%	120.2%	89.7%	74.1%
Variations*	138.3%	103.2%	92.1%	73.4%

と表 6.8のとおり、予備実験で得られた順位と同様な結果が得られた。変化率 (Variations) は (テスト刺激 (post)/テスト刺激 (pre)) $\times$ 100 で求め、予備実験の結果 (*) と比較した。変化率はあくまでも各パターンでの 2~3 件だけのデータによる平均となっておりまだ少ないが、パターン刺激による可塑的变化が存在することがなお示唆される結果となった。したがってパターン刺激による可塑的变化の考えは、ある程度の妥当性を有する学習則とも考えることができる。

こうしたシナプス可塑性のモデル構築では、学習曲線として用いた関数において、パラメータの変更による変化の範囲内で実験結果に対応しうる可能性がある。これを明らかにするためには、パターン刺激中においてなにが変化率に影響したかを、生理学的知見もまじえて明らかにする必要がある。また各パターンで平均するとききれいな順位となるが、パターン内での細胞による違いを見てみるとその値にはかなりのばらつきが生じている。ここで用いた実験結果はテスト刺激の観察により問題ないと思われ、またパターン刺激中の際だった減衰や発火も起きていない。さらにパターン刺激後のテスト刺激 (テスト刺激 (post)) の間、線形に減弱するといった細胞の減衰傾向は見られていない。変化率の変化に貢献している可能性について、パターン刺激中の応答を分析しておく必要がある。追加実験での結果を受けて、以上の点もふまえた検討を次節で行う。

6.4 パターン刺激中の応答特性

図 6.9以下で、データが 2 件の場合はそれぞれを $\circ$ 、 $\times$ で、3 件ある場合は $\circ$ 、 $\times$ 、 $\triangle$ で応答の値を示す。また直線で示されているのは、最小二乗法により全体の傾向を推定したものである。興奮性シナプス後電流は個々の細胞の大きさや、与える刺激強度によって異なるため、縦軸において絶対的な比較を行うのは意味がない。しかしパターン中の刺激が進む過程での傾向を相対的に比較する上では、効果的な方法であると考えられる。前節では各パターン内でのふらつきが示されたが、これらの結果からパターンの種類はもとより同一のパターンでも時間遷移で見た応答の傾向はまちまちであることが明らかとなり、これが値のふらつきを生じさせる要因であることが想定される。なお図の横軸は第 1 回目 (No. 0) から第 120 回目 (No. 199) までを等間隔で表したもので、実際の時間間隔としては正確に表現されていない。

ここで結果を大まかに見てしまえば、ほぼ共通している点として、ほぼどのパターン刺激についても刺激回数が進むにしたがって興奮性シナプス後電流が低下傾向となるものが

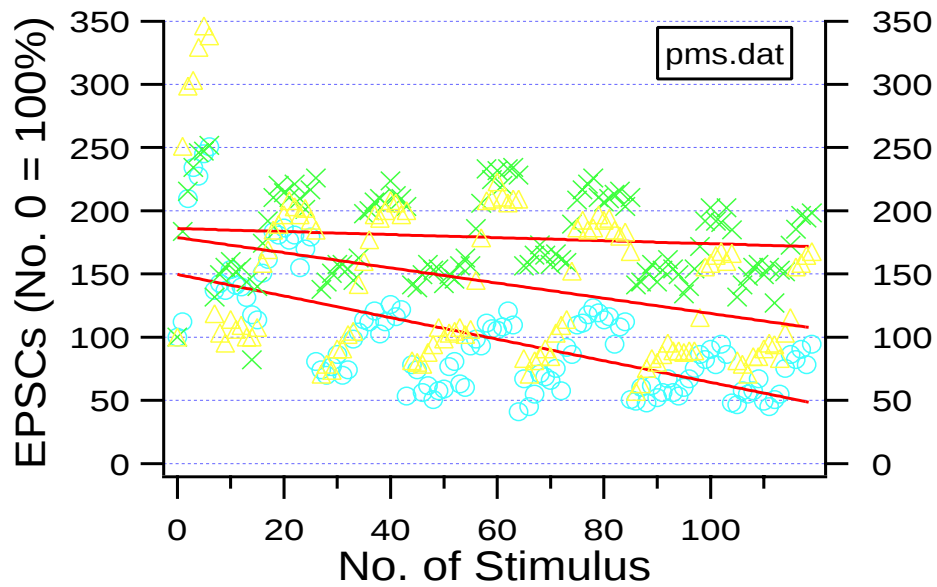


図 6.9: パターン刺激中の反応 (正の相関のパターン刺激)

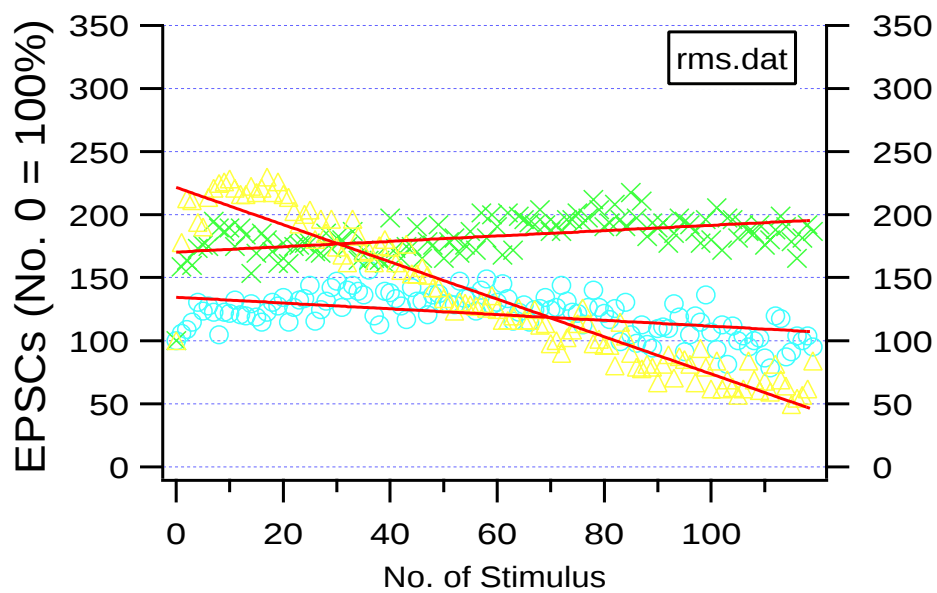


図 6.10: パターン刺激中の反応 (定常刺激)

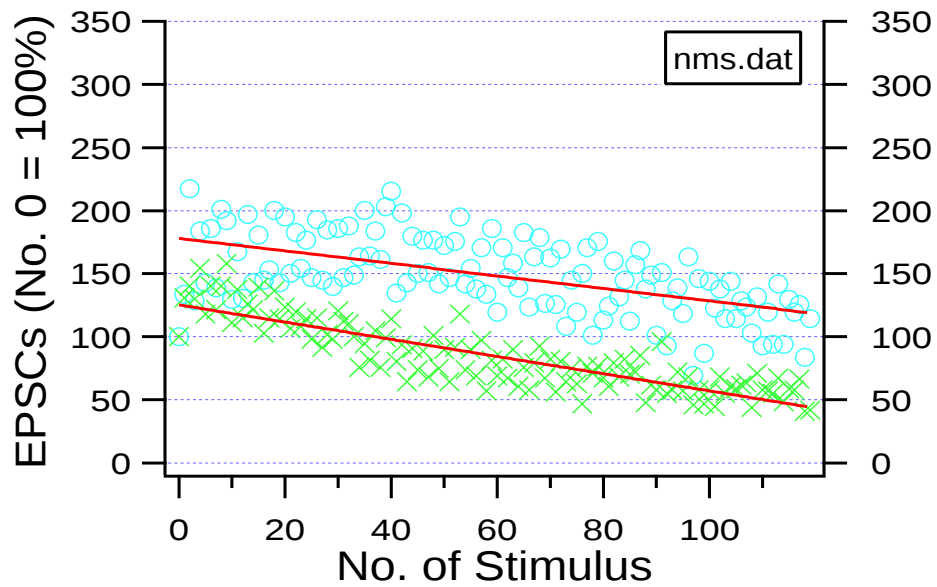


図 6.11: パターン刺激中の反応 (負の相関のパターン刺激)

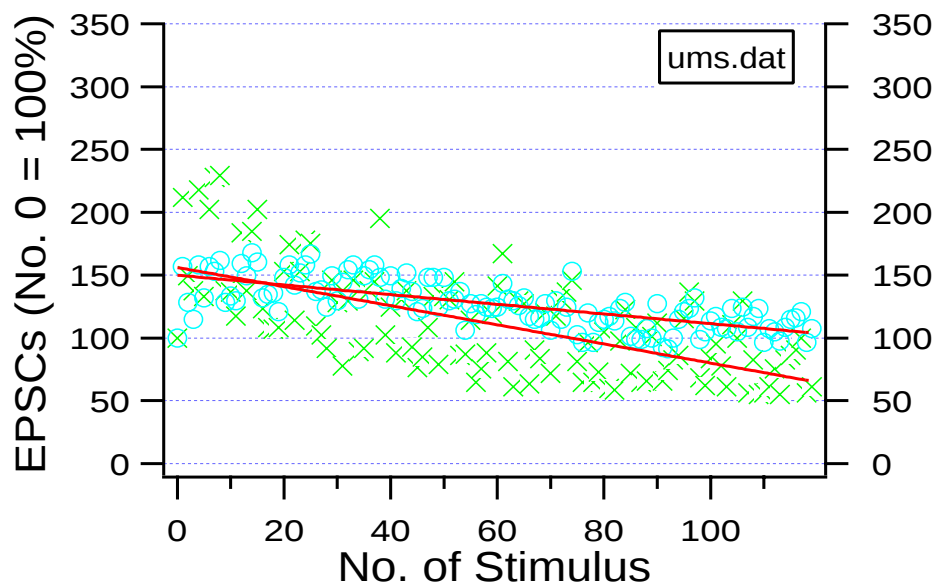


図 6.12: パターン刺激中の反応 (無相関のパターン刺激)

多いということが挙げられる。これは前にも検討したとおり、細胞の衰弱から起きるものではないと思われる。したがって、この原因としては一般的な考えとして前膜からの素量放出数が減少した場合と、後膜において受容体の感受性が低下した場合とが想定される。なお定常刺激については明らかに異なる傾向が現れているが、この刺激は平均頻度は同じであるものの刺激間隔はすべて 125msec であり、ここでは時間パターン刺激との比較は直接は難しい。したがって、ここでは低下傾向がパターン列の相関には関係なく一定レベルで起きているものと考え、さらに細かい分析で各パターンの違いを検討する。なお定常刺激については、ここでは急激な低下の起きていない 2 件を多数決により代表データと見なし、この後の検討で用いることとする。

6.5 各パターン内における応答波形の観察

実験の結果、これまでに以下の可能性が明らかとなった。

- パターン刺激の種類によりテスト刺激の応答に変化が起きる
- パターン刺激中は概ねどのパターンも応答に低下傾向が見られる

第 1 点の応答変化の原因が時間パターン刺激によることは明らかとなった。しかしパターン刺激のなにが応答変化に貢献しているか、といった根本的な問題に対しては第 2 点の結論ではまったく解答にならない。そこでさらに時間パターン刺激中における分析を行うため、個々の応答波形について以下の各項で検討する。図 6.13 以降に各パターンで見られる代表的な応答波形を示す。横軸は時間、縦軸は応答の強さ (pA) であり、測定されたものは、伝達物質としてはグルタミン酸、受容体は非 NMDA 型受容体の一つである AMPA 型による、早い興奮性シナプス後電流であると想定される。なお、ここでは波形の大小を個々の図において相対的に比較するのが目的であるため、異なる図におけるスケールは一定でない。

6.5.1 正の相関のパターン

図 6.13 は、正の相関 (Positive correlation) において短い刺激間隔が続く部分での典型例である。はじめの応答は概して小さく、3 回目までは増加傾向にあった後、2 ~ 3 回の周期を持って微かな増減が繰り返される。また連続した刺激の後には連続中の平均の 7 ~ 3 割と

なり、この大きさはつぎの連続刺激まで増減しないで保たれる。全体での低下傾向とは別に、この連続刺激中の微小時間での増減は磷酸化などによる複雑な経路から起きる減少ではなく、放出サイトでの素量準備量および供給能力の制約から起きる変動であると思われる。また図 6.14 も同様な傾向があるが、ここでは短い刺激間隔において増減を繰り返しながら全体として増加傾向にあることが分かる。この結果は後で検討するとおり、単に前膜による素量放出だけでない別の要因の可能性も考えられる。

6.5.2 負の相関のパターン

負の相関 (Negative correlation) では、短い間隔で刺激が 2 回続くものが多いという特徴がある。図 6.18 はその典型例である。2 回の応答のうち、2 番目の応答はつねに 1 番目の応答より大きくなる。これは神経細胞でよくみられる現象である、短時間での連続した 2 回刺激による応答の亢進 (Paired-pulse facilitation) に似ており、素量の放出が促された可能性が考えられる。図 6.19 は 3 回連続したものを含んだ例であるが、同様に増加傾向となっている。またいったん増加したものの、すぐもとのレベルに戻ってしまうことがこの図から明らかである。図 6.20 からは短時間での増加から、刺激頻度が低くなった時点で急速にもとに戻る様子がより明確となっている。

6.5.3 定常

図 6.15 は刺激間隔の密度を高くして傍観したものである。このパターンはすべて同一の刺激間隔を持つが、全体的な低下傾向と非周期的な増減のばらつきが見られる。同じ部分として対応はしていないが、拡大していったものが図 6.16、6.17 である。一定した周期性はないものの、わずかな増減が繰り返されているのがわかる。これは素量の受容と供給の均衡が保たれている状況とも考えられる。

6.5.4 無相関のパターン

図 6.21 ~ 6.23 では、これまで見てきた正の相関、負の相関における特徴を合わせ持った応答が見られる。2 回の短時間刺激のときは負の相関での連続刺激 (Paired pulse stimuli) の特徴が、3 回以上ある場合は定常刺激 (Regular stimuli) の短時間部分の先頭位置の振舞いに良く似ている。

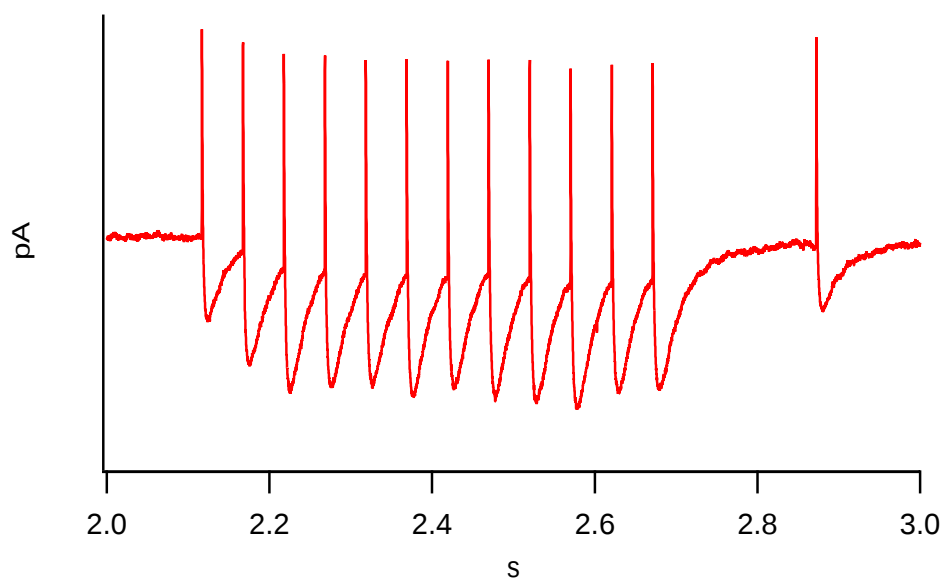


図 6.13: 応答波形 (正の相関 : その 1)

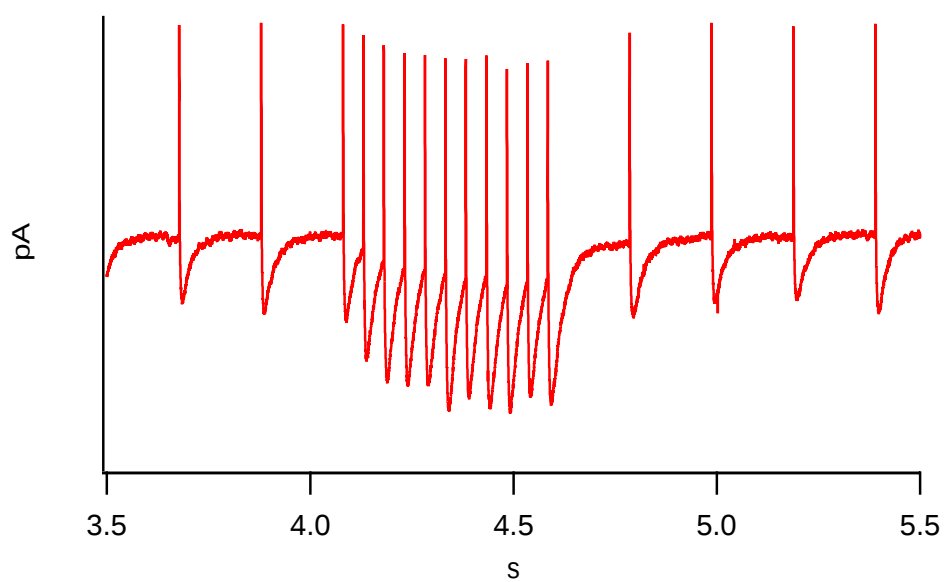


図 6.14: 応答波形 (正の相関 : その 2)

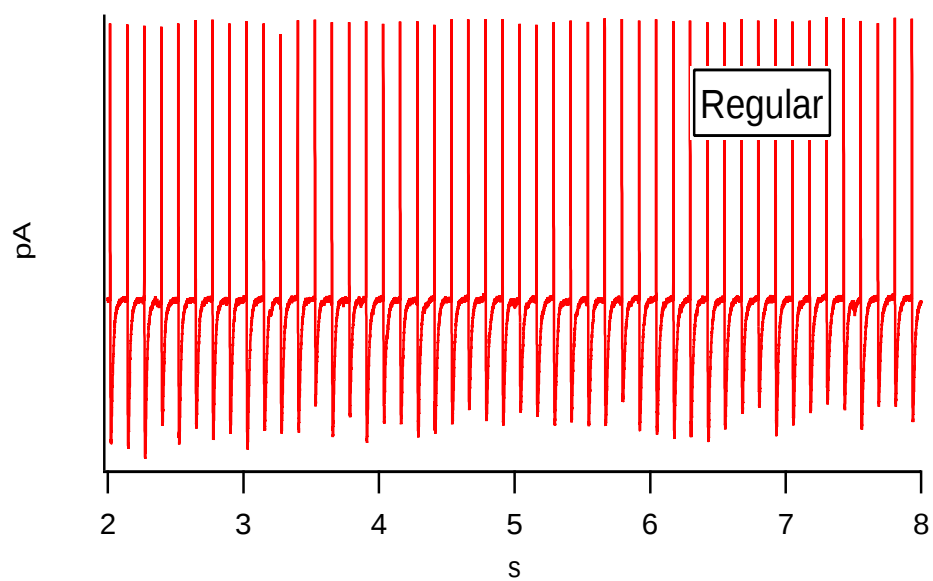


図 6.15: 応答波形 (定常 : その 1)

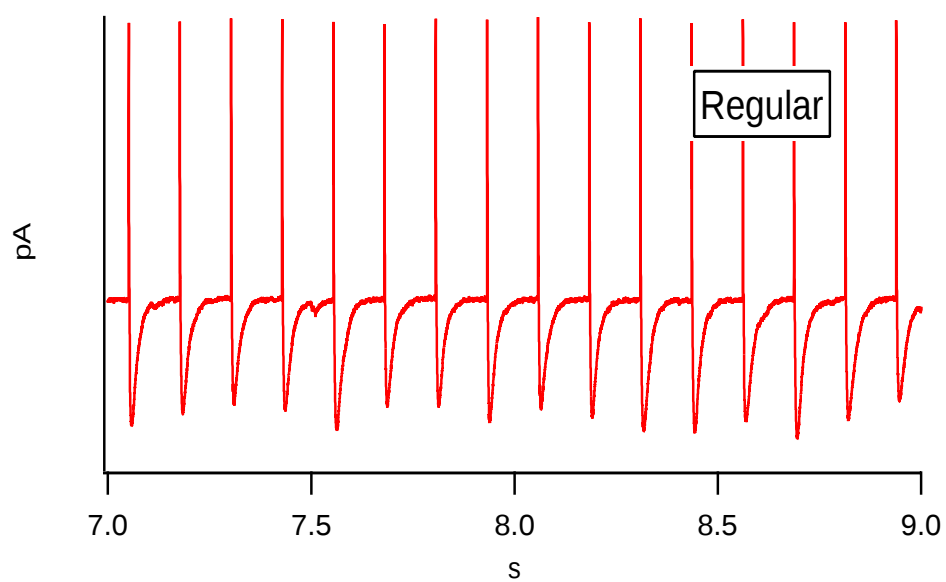


図 6.16: 応答波形 (定常 : その 2)

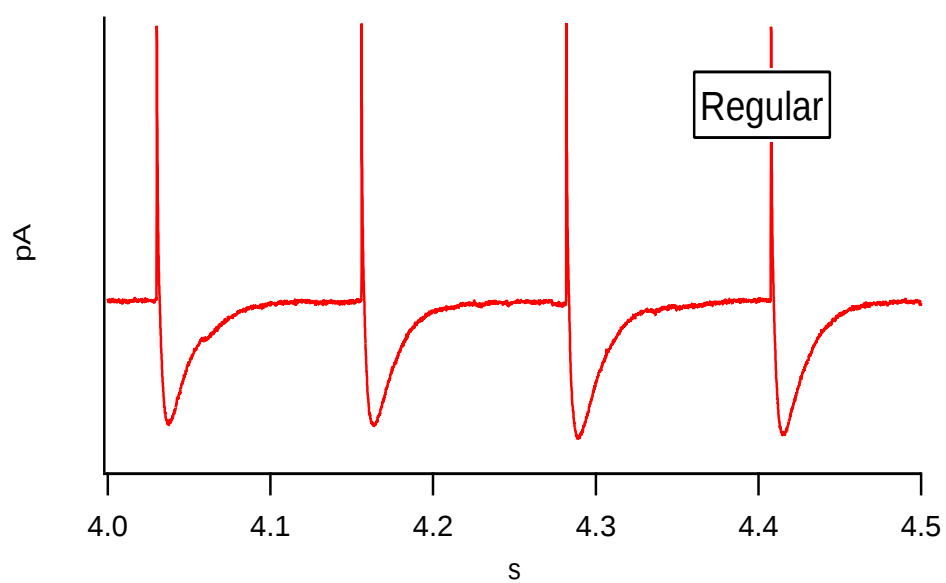


図 6.17: 応答波形 (定常 : その 3)

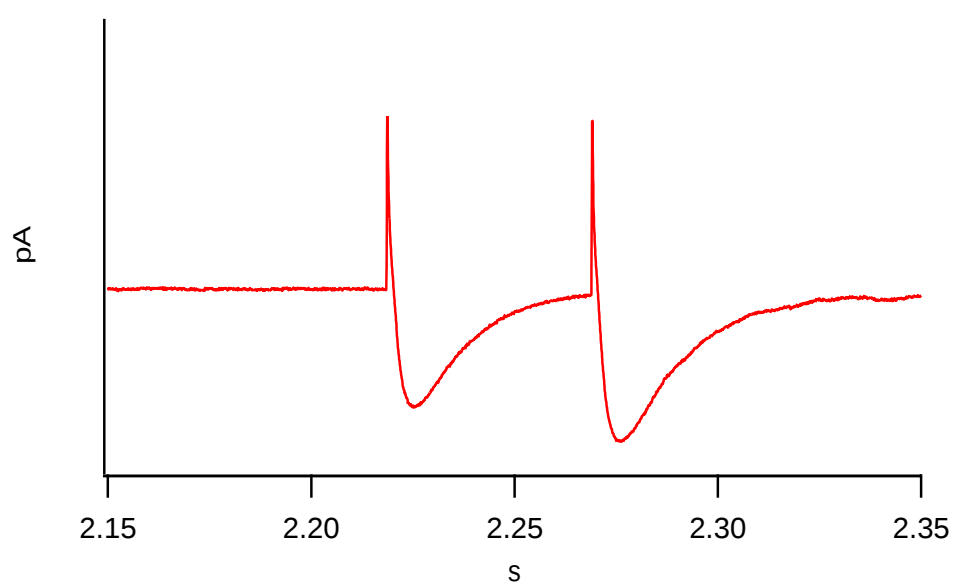


図 6.18: 応答波形 (負の相関 : その 1)

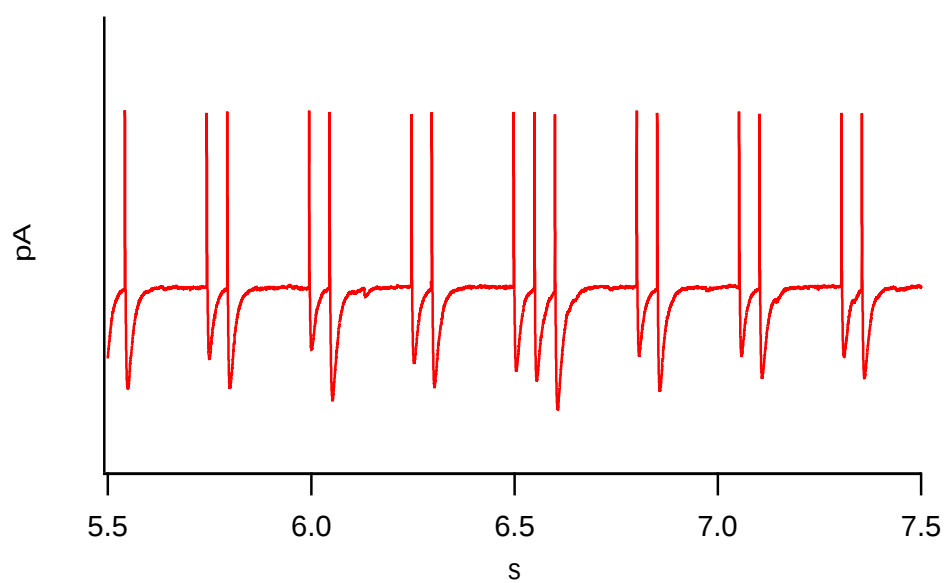


図 6.19: 応答波形 (負の相関 : その 2)

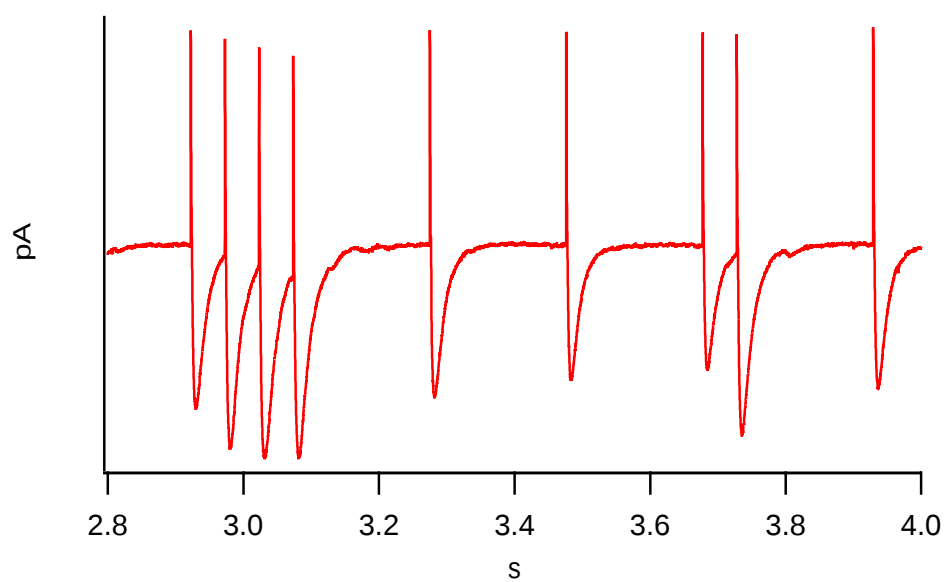


図 6.20: 応答波形 (負の相関 : その 3)

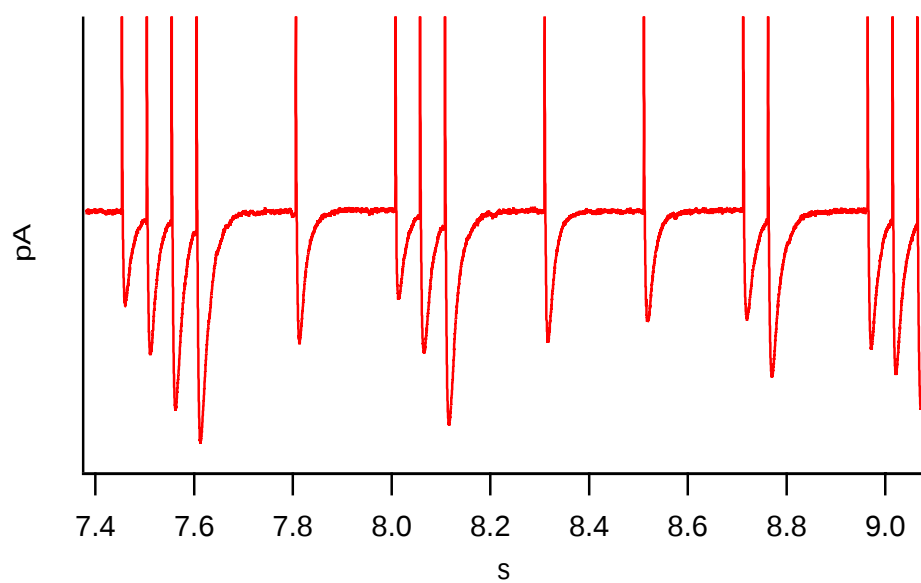


図 6.21: 応答波形（無相関：その１）

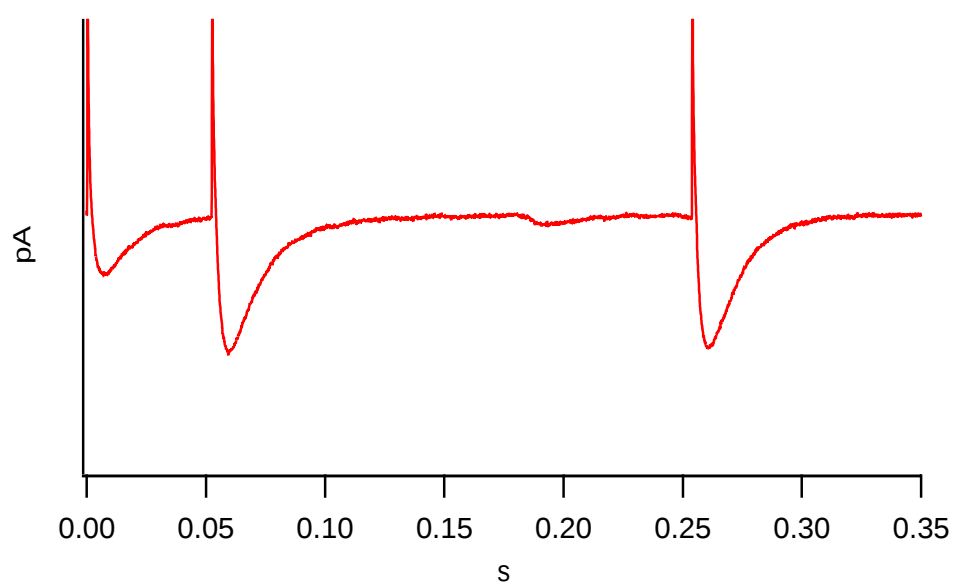


図 6.22: 応答波形（無相関：その２）

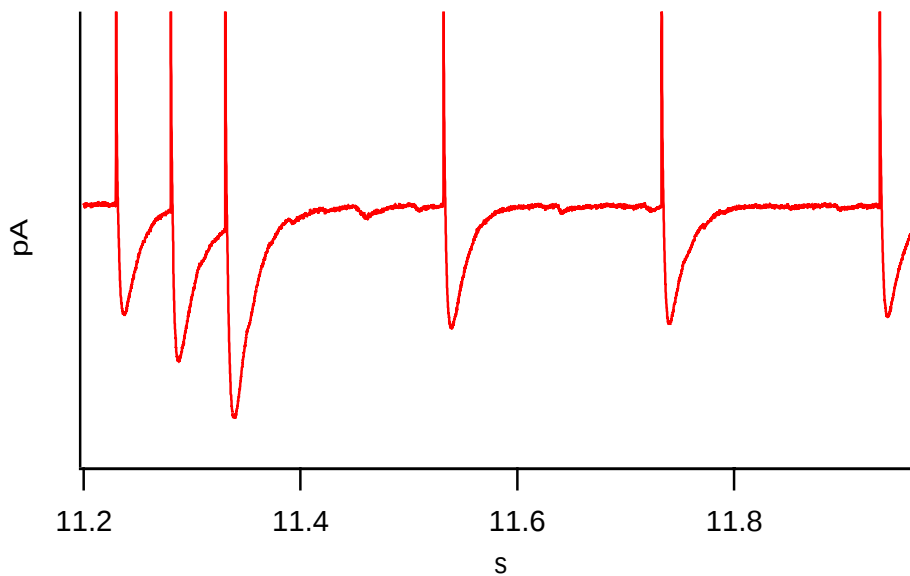


図 6.23: 応答波形 (無相関 : その 3)

6.5.5 実験結果のまとめ

実験で得られた結果は図 6.24 のとおりである。図 6.24 において横軸は相関係数、縦軸はシナプス後細胞における応答強度の割合を示す。この割合の算出方法はつぎのとおりである。応答強度は興奮性シナプス後電流の大きさをもとに決め、パターン刺激前に行うテスト刺激による興奮性シナプス後電流の平均値を 100% とする。さらにパターン刺激後のテスト刺激による興奮性シナプス後電流の平均値を求め、パターン刺激前後の興奮性シナプス後電流の変化の割合を求めたものである。したがって、100% はパターン刺激の前後で応答強度の割合に変化がなかったことを意味する。なおテスト刺激は、シナプスに可塑的変化を生じないと考えられる強度と頻度で行われたものである。

ここで、パターン刺激の結果生じる応答強度の割合に変化がない場合を 1 として縦軸の値を $P(x)$ で表せば、パターンの違いで飽和が防止されることを示すだけでなく、指標によってさまざまな応答強度が表現可能である可能性が示唆される。また相関係数を意味する横軸の x の値は、 -1 から $+1$ の間に限定される。こうした定義域の設定により、この範囲でさまざまな時間パターン系列が表現できる。さらに相関係数や平均頻度の違いによる十分な実験結果で有意性を含む検証する必要があるが、以上の実験結果はパターン刺激

によるシナプス可塑性変化の可能性として考えることもできる。なお測定された正の相関 (Positive correlation) と無相関 (Uncorrelate) の 2 点を通る曲線を考えると、それは X 軸上の少なくとも 1 点で交差することになり、この横軸上の点を θ とした。

$$P : C \rightarrow S,$$

$$C = \{x | -1 \leq x \leq 1\},$$

$$S = \{y | y \geq 0, y \in R\},$$

$$\begin{cases} 1 < P(x) \leq Const. & \text{if } \theta < x \leq 1, \\ P(x) = 1 & \text{if } x = -1 \text{ or } x = \theta, \\ 0 \leq P(x) < 1 & \text{if } -1 < x < \theta. \end{cases}$$

前に検討したとおり、従来の学習則では飽和の問題を生理学的な裏付けのない減衰項を用いたり、平均頻度の違いだけで可塑的強度を表す、また前膜と後膜の相関にのみ結合強度が変化するという工学モデルが考えられてきた。しかし図 6.24 が示す実験結果は、同一の周波数に対してでもさらに相関係数による可塑性変化の違いが生じる可能性を示すものである。また本実験では後膜側の膜電位を一定の値に固定した実験を用いている。そこで前膜と後膜の相関以前に、前膜側におけるパルスの時間情報が、シナプス可塑性に大きな影響を与えていることを示唆するものである。

なお実験結果は 3 種類の時間パターン刺激によるものだけで、連続して相関係数と応答強度の関係を示すには実験的裏付けを必要とするが、一つの可能性として図 6.25 の仮定が考えられる。本実験ではテスト刺激の応答に注意を払い、応答がパターン刺激前のテスト刺激のレベルで安定してからつぎのパターン刺激を行っている。しかしパターン刺激を連続して与えたものも含んでいる。次節ではこれを前提にして実験結果の妥当性について検討する。

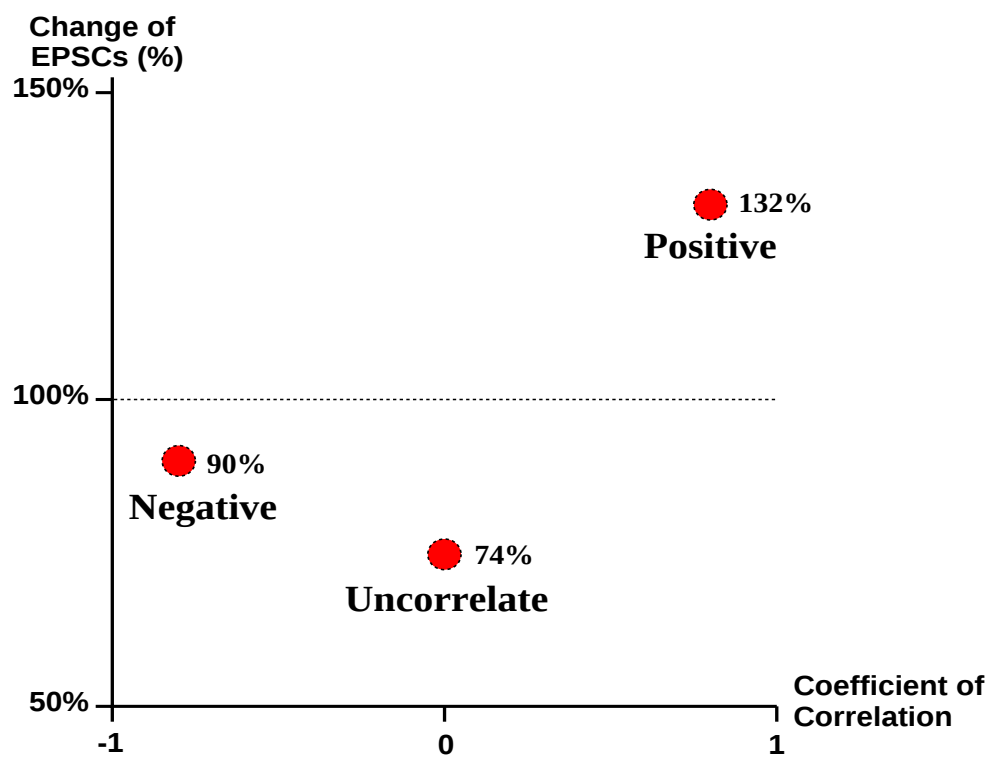


図 6.24: パターン刺激の違いによる実験結果

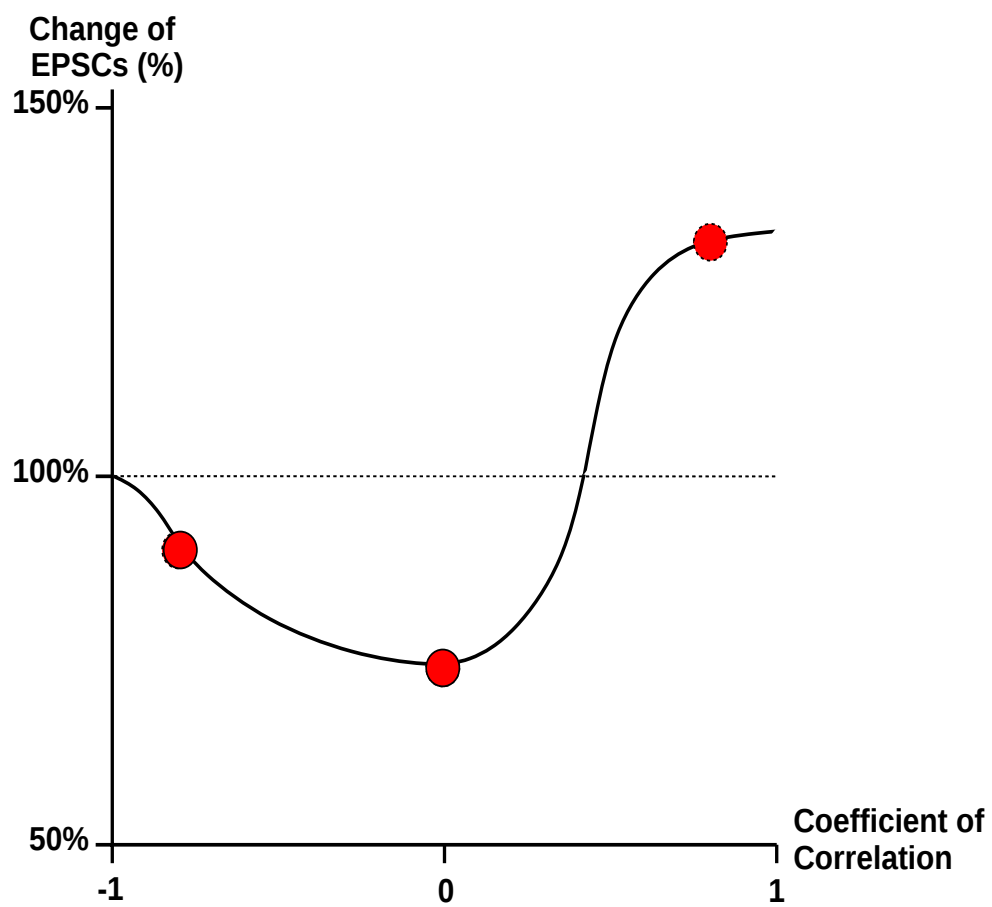


図 6.25: 相関係数と応答強度の割合における想定した変化の関係

6.6 時間刺激によるシナプス可塑性機序の仮説

6.6.1 シナプス可塑性を生ずる要因

前節で各パターン刺激ごとの応答波形を見てきた。その結果、パターンによって特徴的な応答状況があることが明らかとなった。これはパターン刺激後の応答変化の機序を考える上で、特に参考となる特性である。すなわち、時間パターンが作り出す刺激パルス列が、頻度の高い部分の繰り返し回数や高い部分どうしの間隔によって、応答に微妙な変化を生み出す原因となっていることが示唆されたことになる。本研究では、こうした現象が起きる要因として、つぎの4点を仮定する。これ以降は仮定の域を出ないものであるが、一仮説としてこれらを定義し、時間パターン刺激によるシナプス可塑性現象の妥当性を検討する。

- 前膜における素量放出量のばらつき：

第3章において明らかとなったとおり、素量の放出には可塑性に関係なくばらつきがある。これにより、ある確率で異シナプス性の減弱がシナプスのアクティブゾーン、さらにはシナプス全体で起こる場合が考えられる。

- 高頻度の刺激による素量放出の増加：

テタヌス刺激などの高頻度刺激で素量の放出が増加するのは妥当な考えであるが、本実験で用いた（テタヌスに比べて）低頻度のパターン刺激であっても、時間間隔の短い（テタヌスに比べると非常に低頻度である）部分では似たような現象が考えられる。

- 後膜における高頻度の刺激による代謝型グルタミン酸受容体の働き：

数十 Hz 以上での刺激頻度がシナプスにおける代謝型グルタミン酸受容体を活性化させることは、実験的に報告例がある [58, 59]。本実験での短い刺激間隔の部分は 20 Hz に相当する頻度であるが、代謝型グルタミン酸受容体の活性が起きることは十分考えられる。

- 異シナプス性減弱機構：

前膜における素量放出量のばらつきと関連して、素量の放出が一時的に減少すると、瞬間的に減弱傾向となったアクティブゾーンないしはシナプスがまれに発生する可能

性がある。そしてさらにこのシナプスの状態がある確率で連続で起きた場合、これは本格的に減弱傾向をたどるシナプスとして固定される可能性がある。

図 6.26 は以上のシナプス前膜についての知見から、確率的に前膜の状態が変わりうることを示す。図における 3 種類のシナプスの状態線維はつぎのとおりである。Ready (実行可能) は活性状態で放出が起きているものである。Wait (待機) はまさに放出可能な状態に遷移が移行したものの、実際はタイミングのずれなどで放出は起きていない。また Stop (停止) はなんらかの原因でその瞬間に放出が不可能な状態にあるものを意味する。Wait (待機) あるいは Stop (停止) 状態のシナプスが同じ神経線維上にある場合、そのシナプスは Ready (実行可能) のシナプスとの相関関係により、確率的に異シナプス性減弱が起きる可能性が高くなる。また少ない確率であると思われるが、その状態が連続した場合は本格的な抑制へと移行することも考えられる。

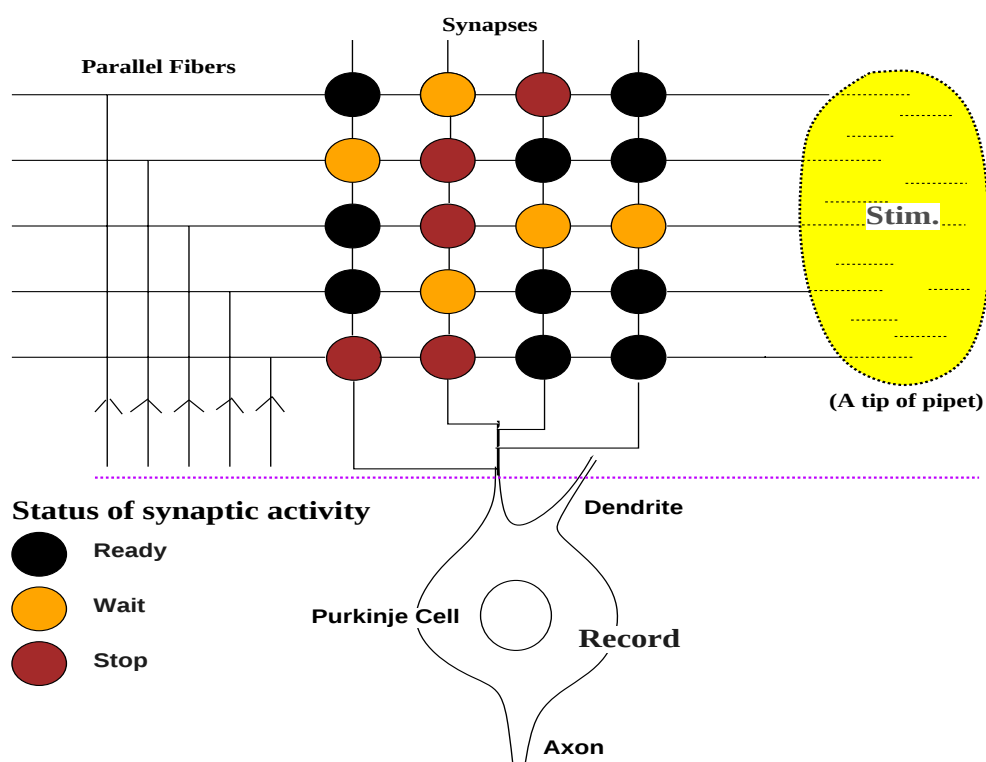


図 6.26: シナプス活性の状態遷移

一方、パターン中の高頻度の部分は、一般的には素量の放出量を増大させるものとして想定可能であるが、高頻度中の刺激回数により微妙な変化が生じる可能性がある [60, 61]。ここで素量の放出がないままこれが短い区間でたて続けに 4 回続くと、そのシナプスが減弱傾向を持つものと仮定する。この場合、その直後も続いて短い区間による刺激が数回起きた場合、まだ減弱傾向の初期段階にあるシナプスは、高頻度による応答特性によりもとの状態に戻る事となる。しかし、4 回程度で短い刺激が終了してしまった場合はこれとは異なり、減弱傾向の初期段階にいるままつぎの刺激を待つことになる。ここでつぎの刺激が単発であったり、素量放出量のばらつきからくる放出失敗が引き続いて起きた場合、これは本格的な抑制状態へと移行することになる。また高頻度の刺激が 5、6 回以上続いた場合、この刺激は 20Hz の連続刺激としてシナプス後膜の活性を促す。その要因としては代謝型グルタミン酸受容体の作用が挙げられる。なお、負の相関 (Negative correlation) のパターン刺激は以上の見地からは増強も減弱も起こさない範囲でパルス列が構築されており、実験結果のとおり大きな応答変化は見られないものと想定される。

6.6.2 シナプスモデルの検討

以上の実験ならびに可塑性機構の仮説により、本章で提案したモデルの中核部分 ($P(x)$) について、各パターンの応答変化がどう起きるかを仮定する。

正の相関 (Positive correlation)

正の相関 (Positive correlation) パターンでは、その特徴的な連続した高頻度部分のパルス列が応答に大きな影響を与えている。このパターンは高頻度が続くため、その部分における平均周波数が瞬間的に全体の平均周波数より高くなる。したがって前膜および後膜が活性される頻度が高くなり、結果として応答が上昇することになる。ここで数回以上の刺激が続いた場合、後膜における代謝型グルタミン酸受容体を活性化させる。前膜においては、数回以上続いた刺激のために異シナプス性減弱が起きつつあり、前膜側では全体として減弱要素が強くなるが、その影響以上に受容体の活性が代謝型グルタミン酸受容体により行われ、シナプス全体としては高い活性状態となる。

負の相関 (Negative correlation)

負の相関 (Negative correlation) パターンに特徴的な 2 回の連続刺激 (Paired-pulse stimulation) による影響は、連続刺激以降は必ず長い刺激間隔となって、ほとんど可塑的效果がない。異シナプス性減弱や増強の可能性については、短時間での連続刺激が多くても 3 回、ほとんど 2 回しかないため、こうした減少が起きる前提条件が成立しない。

無相関 (Uncorrelation)

正の相関パターンと似て、その特徴的な連続した高頻度部分のパルス列が前膜での活性に貢献しているが、連続回数が正の相関パターンよりも少ない点で大きく異なる。すなわち、後膜における代謝型グルタミン酸受容体を活性化させるのに必要なレベルの高頻度刺激 (短時間における平均周波数) がここでは作られず、後膜の活性亢進がないまま前膜における異シナプス性減弱が起きてしまう。そこで上記 2 つのパターンに比べてシナプスは低い活性を示すこととなる。

6.7 まとめ

本章で行ったことはつぎの 3 項目である。

1. 実験結果の解析により、パターン刺激がシナプス可塑性に大きな要素となりうることを明らかにした。
2. パターン刺激のより具体的な生理学的妥当性を検討した。
3. シナプス可塑性モデルの考えから、さまざまな条件における実験指針を提供した。

従来、学習モデルはわずかな生理学的知見をもとに、それぞれ以外の多くの自由な要素を学習曲線にとり入れることが多かった。本モデルも知見としてはわずかなものであるが、モデルの検証のための実験を行い、その妥当性が確認されたことは大きな意義があるといえる。

第 7 章

結論と今後の課題

7.1 結論

神経細胞が持つ情報の可塑性機構の機序解明のために、理論ならびにモデル化、実験検証を統合したアプローチによりシナプス可塑性モデルの提案をした。本論文ではまず、脳を対象とした研究におけるアプローチ方法を検討して、研究の方針を決定し（序論）つぎに脳の機能を解剖学的、また機能的に検討し、情報伝達機構の鍵をにぎるとされるシナプス可塑性に注目した（第2章）。ここでシナプス可塑性の機序解明のために必要な素量解析法について、工学的アプローチからこの手法の妥当性および問題点を明らかにし、より高度な解析処理を可能とする MEND 法についての検証ならびに改良を行った（第3章）。さらに MEND 改良版を実験の実験データ解析に適用し、シナプスにおける素量放出機序を検討した。ここでは素量放出量に大きな変動があることを解析結果から明らかにすることができた（第4章）。

こうした解析結果はシナプス可塑性モデルのための理論構築のヒントとなり、従来にない時間コーディングによる情報表現を用いた学習理論のヒントを提案した。さらに本提案に基づいてラット小脳を用いた電気生理学実験を行った（第5章）。第6章では学習理論の妥当性を実験結果から検討し、大まかな部分で支持される結果が得られた。以上のとおり、本論文では時間コーディングの考えをもとに、従来にないシナプス学習則を実験的裏付けとともに提案した。本学習則は、コンピュータによる知識情報処理の分野はもとより、実験方針における指針として重要な原理を提供するものである。前者については、工学的な神経回路モデルを構築する際、その素子として神経細胞の可塑的性質を考慮した新たなモ

デルが期待される。これは従来型のモデルの多くが、神経素子への入力パルスの頻度により神経素子どうしの結合荷重を変化させているのに対し、各頻度においてさらに細かく時間パターンによる情報の伝達という形で結合荷重を変化させる要素を含むものである。また後者については、神経細胞の可塑性実験を行う際の実験指針として、従来の平均頻度の違いや複数細胞の同期、またはθ波によるリズムとの同期といった検討だけでなく、時間情報がどう構成されているかという実験課題を提供するものである。これはパルス間隔の違い、刺激時間、平均頻度を含むもので、これらの組合せでさまざまな時間情報が構成されている可能性を指摘するものである。

7.2 今後の課題

本研究では、パターン刺激によって引き起こされる神経可塑性現象の可能性を実験的に示した。さらにこの結果を用いて、平均頻度によらず入力パターンに依存して起きる抑制側から増強側までの応答を説明する神経可塑性モデルを検討した。しかし E. T. Rolls らの、平均頻度による情報表現と時間パターンによる情報表現には、情報量の差がほとんどないという主張もある。また時間パターン刺激が平均頻度として再コーディングされている可能性も指摘されている。そこで実験については今後も厳密な意味での生体 (*in vivo*) との違いも考慮しながら、パターンの刺激間隔時間や刺激の平均頻度についてのより豊富な実験データをもとにした解析が課題である。

時間コーディングの考えについては、近年その重要性が指摘されつつあるが [62]、より合理的な定義を可能とする指標を考えることも課題として残る。本研究で数学的な指標として用いた相関係数については、その妥当性について生理学的な説明を行わなければならない。また後膜がどのように貢献するかといった問題についても、素量解析法などによる理解はもとより、分子生物学的知見が多く必要となる。神経可塑性モデルの構築にあたっては、本研究で用いた相関係数について、その定義をより明確に行わなければならない。これにはこれまで検討したとおり、パターン刺激中において可能性のある代謝型グルタミン酸受容体についての考慮が必要であると考えられる。シナプス可塑性に深くかわる代謝型グルタミン酸受容体については、活性の上昇だけでなく、減少についても検討が必要である。

神経細胞の中には、ごく短時間の低頻度パルスが重要な働きをしていると思われるものがある。こうした機能については、ぼう大なシナプスからパルスの伝播が行われている場

合であれば、それぞれのシナプスにおけるパルスが重合することにより、樹状突起では高頻度のパルス伝搬が実現されている可能性がある。本モデルは比較的長いパターン刺激時間を持った場合について検討しているが、今後は短時間のシナプス加重によるシナプス駆動コーディングの機能の解明も必要である。これは一種の時間パターンではあるが、これまで部分的に検討したようにシナプスの空間的な問題であるともいえる。一般的に時空間コーディングとよばれる研究分野は、あくまでも複数の神経細胞の関連を空間的に見るものであるが、ここでの空間コーディングの意味はそれとは異なり、シナプス空間時間パターンコーディングともいえる新たな概念であるといえる。この概念は小脳長期抑圧、例えば前庭動眼反射における平行線維からの複数の運動パターン候補を形成する際に有効な機構として考えられる可能性もある。なお、シナプス前膜におけるパターン刺激と後膜の AMPA 受容体の応答に関する可塑性構築に注目するだけでなく、後膜側での活性状態の変化、ならびに樹状突起における逆伝播現象 [63] をも考慮する必要がある。

本研究において、モデルの具体的な応用課題としては小脳の前底動眼反射が考えられる。平行線維が登上線維との同時刺激で果たす役割について、時間コーディングの妥当性についての考察が求められる。前底動眼反射において、これをフィードバック誤差学習としてプルキンエ細胞が起こす長期増強、長期抑圧の統一的な理論で理解する努力が行われている。ここで平行線維からの働きとして、登上線維からの入力に対して複数の候補を挙げているとする提案がある。その仕組みとしては、バスケット細胞などの抑制的な修飾が平行線維からの入力に対して行われ、位相の異なる候補群を生成しているとする説などがある。本研究の実験では、バスケット細胞などによる抑制性の働きは押えてある。そこで平行線維が時間コーディングに依存した刺激パターンによってのみでも、登上線維からの信号に対する候補として様々な位相を起こす可能性も考えられ、より深い検討が必要である。

謝辞

本研究を行なうに当たり、研究方針について終始御指導を賜った國藤 進教授に深謝致します。松澤 照男教授には、関連する副テーマ研究をはじめ多くのご指導をいただきました。ここに深謝致します。さらに本論文をまとめるにあたって、木村 正行教授、下平 博助教授には有益な御助言と御審査をいただき、深く感謝いたします。

金沢大学名誉教授の山本 長三郎博士には、本研究に重要な文献のご紹介をいただき、貴重な実験データを提供していただくとともに、数多くの御指摘をいただきました。ここに深謝いたします。

岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所の山森 哲雄教授には、特別研究学生として受け入れていただき、実験方針ならびに小脳の研究方法について御指導いただき、深く感謝いたします。さらに、フランス CNRS の Raymond T. Kado 教授には、電気生理実験における設備のセットアップならびに電子工学、電気生理学についての御指導をいただきました。杏林大学医学部の山口 和彦教授には、実験のポイントについて生理学的な御助言を度々いただきました。ここに心から感謝いたします。また岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所の木津川 尚史博士には、実験手法および生化学に関する御助言や御討論をいただきました。ここに感謝いたします。

米国ワシントン大学医学部の和泉 幸俊助教授には、生理学についての御助言をはじめ、多面に渡って数多くの励ましをいただき、心から感謝いたします。

北陸先端大情報科学研究科助手の Thanaruk Theeramunkong 博士、ならびに九州東海大学講師の三原 孝志博士には、工学的立場から度々アドバイスをいただきました。ここに感謝いたします。最後に、國藤・佐藤研究室の皆様に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] 伊藤正男 編, “脳のはたらき”, 講談社サイエンティフィック (1992).
- [2] 品川嘉也, “分子素子と神経細胞”, 数理科学, vol. 344, pp. 40-45 (1992).
- [3] 丸山六三, “神経細胞の物質識別子と機能性分子”, 共立出版 (1982).
- [4] 時実利彦, “脳の話”, 岩波書店 (1982).
- [5] Nicholls, J. G., Martin, A. R. and Wallace, B. G., “From neuron to brain”, Sinauer Associates (1992).
- [6] Levitan, I. B., Kaczmarek, L. K., “The Neuron”, Oxford University Press (1991).
- [7] Bekkers, J. M., Stevens, C. F., “Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus”, Nature, Vol. 729, pp. 346-724 (1990).
- [8] 塚田稔, “海馬の神経回路の可塑性と海馬 - 皮質系の記憶情報処理”, 玉川大学工学部 (1993).
- [9] R. L. アイザックソン著 田代信維 監訳, “大脳辺縁系と学習”, 共立出版 (1986).
- [10] Marr, D., “A theory of cerebellar cortex”, J. Physiol., Vol. 202, pp. 437-470 (1969).
- [11] Ito, M., “The Cerebellum and Neural Control”, Raven Press (1984).
- [12] Ito, M., Sakurai, M. and Tongroach, P., “Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells”, J. Physiol., Vol. 324, pp. 113-134 (1982).

- [13] 細木信也, “小脳ネットワークのロボティクスへの応用”, 電子情報通信学会 信学技報, NLP91-34, pp. 23-30 (1991).
- [14] 森田昌彦, “海馬の神経回路モデル”, 東京大学大学院工学系研究科修士論文 (1988).
- [15] Kullmann, D. M., “Quantal analysis using maximum entropy noise deconvolution”, J. Neurosci. Methods, Vol. 44, pp. 47-57 (1992).
- [16] Kullmann, D. M., “Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude”, Nature, Vol. 357, pp. 240-244 (1992).
- [17] Hebb, D. O., “The Organization of Behavior”, Wiley, pp. xi-xix (1949).
- [18] Sejnowski, T. J., “Storing covariance with nonlinearly interacting neurons”, J. Math. Biology, Vol. 4, pp. 303-321 (1977).
- [19] Bienenstock, E., Cooper, L. and Munro, P., “Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex”, J. Neurosci. Vol. 2, pp. 32-48 (1982).
- [20] 宮下保司, “視覚再認識記憶のニューロン機構”, 神経研究の進歩, Vol. 32, No. 4, pp. 553-565 (1988).
- [21] Milner, B., Corkin, S. and Teuber, H. L., “Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome”, Neuropsychologia, Vol. 6, pp. 215-234 (1968).
- [22] Zola-Morgan, S., Squire, L. R. and Amaral, C. G., “Human amnesia and the medial temporal region”, J. Neurosci., Vol. 6, pp. 2950-2967 (1986).
- [23] Yamamoto, C., Kawai, N., “Seizure discharge evoked in vitro in thin section from guinea pig hippocampus”, Science, Vol. 155, pp. 341-342 (1967).
- [24] 和泉幸俊, “海馬長期増強の誘導機序とその問題点”, 神経精神薬理, Vol. 11, No. 11, pp. 911-934 (1989).

- [25] Bliss, T. V. P., Lømo, T., “LONG-LASTING POTENTIATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE DENTATE AREA OF THE ANAESTHETIZED RABBIT FOLLOWING STIMULATION OF THE PERFORANT PATH”, *J. Physiol.*, Vol. 232, pp. 331-356 (1973).
- [26] Bliss, T. V. P., Lømo, T., “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path”, *J. Physiol.*, Vol. 232, pp. 331-356 (1973).
- [27] 小野武年, 中村清実, “扁桃体・海馬の物体および空間認知ニューロン”, *電子情報通信学会誌*, Vol. 73, No. 2, pp. 109-117 (1990).
- [28] 小野武年, 福田正治, “記憶における扁桃体の役割”, *神経研究の進歩*, Vol. 32, No. 4, pp. 566-582 (1988).
- [29] 山本長三郎, “脳の可塑性の物質過程”, *科学*, Vol.55, No. 7, pp. 415-422 (1985).
- [30] Larkman, A., Hannay, T., Stratford, K. and Jack, J., “Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation”, *Nature*, Vol. 360, pp. 70-73 (1992).
- [31] Bashir, Z. I. and Collingridge, G. L., “Synaptic plasticity: long-term potentiation in the hippocampus”, *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 2, pp. 328-335 (1992).
- [32] Kitajima, T., Hara, K., “A model of the mechanism of cooperativity and associativity of long-term potentiation in the Hippocampus: a fundamental mechanism of associative memory and learning”, *Biol. Cybern.*, Vol. 64, pp. 365-371 (1991).
- [33] 黒田洋一郎, “ヒトの記憶・学習メカニズム”, *BRAIN MEDICAL*, Vol. 3, No. 1, pp. 13-20 (1991).
- [34] Yamamoto, C., Higashima, M., Sawada, S. and Kamiya, H., “Quantal Components of the Synaptic Potential Induced in Hippocampal Neurons by Activation of Granule Cells, and the Effect of 2-Amino-4-phosphonobutyric Acid”, *Hippocampus*, Vol. 1, No. 1, pp. 93-106 (1991).

- [35] Redman, S., "Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system", *Physiol. Rev.*, Vol. 70, No. 1, pp. 165-198 (1990).
- [36] 山本長三郎, "海馬のシナプス長期増強", *神経研究の進歩*, Vol. 32, No. 4, pp. 69-80 (1988).
- [37] Dempster, A. P., Laird, N. M. and Rubin, D. B., "Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm", *J. Roy. Statist. Soc. B.*, Vol. 39, pp. 1-21 (1977).
- [38] Aghat, M., Ibrahim, M. T., "Maximum Likelihood Estimation of Mixtures of Distributions", *Royal Statistical Society* (1984).
- [39] Walmsley, B., Edwards, F. R. and Tracey, J., "The Probabilistic Nature of Synaptic Transmission at a Mammalian Excitatory Central Synapse", *J. Neurosci.*, Vol. 7, No. 4, pp. 1037-1046 (1987).
- [40] Green, P. J., "On Use of the EM Algorithm for Penalized Likelihood Estimation", *J. R. Statist. Soc. B.*, Vol. 52, No. 3, pp. 443-452 (1990).
- [41] Gull, S. F., Daniell, G. J., "Image reconstruction from incomplete and noisy data", *Nature*, Vol. 272, pp. 686-690 (1978).
- [42] Sawada, S., Kamiya, H. and Yamamoto, C., "Simultaneous recording of presynaptic spikes and excitatory postsynaptic potentials from monosynaptically connected hippocampal neurons", *Neurosci. Lett.*, Vol. 103, pp. 34-38 (1989).
- [43] Yamamoto, C., "Activation of Hippocampal Neurons by Mossy Fiber Stimulation in Thin Brain Sections in Vitro", *Exp. Brain Res.*, Vol. 14, pp. 423-435 (1972).
- [44] 山本長三郎, 岩間吉也, "標準生理学 I", 金原出版 (1991).
- [45] Korn, H., Mallet, A., Triller, A. and Faber, D. S., "Transmission at a Central Inhibitory Synapse. II. Quantal Description of Release, With a Physical Correlate for Binomial n ", *J. Neurophysiol.*, Vol. 48, No. 3, pp. 679-707 (1982).
- [46] Tsumoto, T., "Long-term Potentiation and long-term depression in the neocortex", *Progress in Neurobiology*, Vol. 39, pp. 209-228 (1992).

- [47] Richmond, B. J., Optican, L. M., "Temporal encoding of two-dimensional patterns by single units in primate inferior temporal cortex. II. Quantification of response waveform", *J. Neurophysiol.*, Vol. 57, No. 1, pp. 147-161 (1987).
- [48] Tsukada, M., "A proposed model of the hippocampal-cortical memory system and temporal pattern sensitivity of LTP in hippocampal neurons", *Concepts in Neuroscience*, Vol. 3, No. 2, pp. 213-224 (1992).
- [49] Tsukada, M., Aihara, T., Saito, H. and Kato, H., "Hippocampal LTP depends on spatial and temporal correlation of inputs", *Neural Networks*, Vol. 9, No. 8, pp. 1357-1365 (1996).
- [50] Sakurai, M., "Synaptic modification of parallel fibre-Purkinje cell transmission in in vitro guinea-pig cerebellar slices", *J. Physiol.*, Vol. 394, pp. 463-480 (1987).
- [51] Huerta, P. T., Lisman, J. E., "Synaptic plasticity during the cholinergic theta-frequency oscillation in vitro", *Hippocampus*, Vol. 6, pp. 58-61 (1996).
- [52] Brown, T. H., Kairiss, E. W. and Keenan, C. L., "Hebbian Synapses", *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol. 13, pp. 475-511 (1990).
- [53] Artola, A., Brocher, S. and Singer, W., "Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of the rat visual cortex", *Nature*, Vol. 347, pp. 69-72 (1990).
- [54] Neher, E., Sakmann, B., "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres", *Nature*, Vol. 260, pp. 799-802 (1976).
- [55] Llano, I., Marty, A., Armstrong, C. M. and Konnerth, A., "Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices", *J. Physiology*, Vol. 434, pp. 183-213 (1991).
- [56] Salin, P. A., Malenka, R. C. and Nicoll, R. A., "Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses", *Neuron*, Vol. 16, pp. 797-803 (1996).

- [57] Konnerth, A., Llano, I. and Armstrong, C., “Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 87, pp. 2662-2665 (1990).
- [58] Batchelor, A. M., Garthwaite, J., “Frequency detection and temporally dispersed synaptic signal association through a metabotropic glutamate receptor pathway”, *Nature*, Vol. 385, pp. 74-77 (1997).
- [59] Scanziani, M., Salin, P. A., Vogt, K. E., Malenka, R. C. and Nicoll, R. A., “Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors”, *Nature*, Vol. 385, pp. 630-634 (1997).
- [60] Markram, H., Tsodyks, M., “Redistribution of synaptic efficacy between neocortical pyramidal neurons”, *Nature*, Vol. 382, pp. 807-810 (1996).
- [61] Tsodyks, M., Markram, H., “The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, pp. 719-723 (1997).
- [62] Thomson, A. M., “More than just frequency detectors?”, *Science*, Vol. 275, pp. 179-180 (1997).
- [63] Markram, H., Lubke, J., Frostscher, M. and Sakmann, B., “Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs”, *Science*, Vol. 275, pp. 213-215 (1997).

本研究に関する発表論文

- [1] 鳥居 鉦太郎, 松沢 照男, 國藤 進, “デコンボリューションモデルにおける神経伝達物質の素量解析”, 日本生物物理学会 第 31 回年会予稿集, p. 197 (1993).
- [2] 鳥居 鉦太郎, 國藤 進, 松沢 照男, “海馬ニューロンにおける神経伝達物質の素量解析”, 計測自動制御学会 第 8 回生体・生理工学シンポジウム論文集, pp. 333-336 (1993).
- [3] 鳥居 鉦太郎, 松沢 照男, 國藤 進, “海馬シナプスにおける神経伝達物質の素量解析”, 日本生物物理学会 第 32 回年会講演予稿集, p. 100 (1994).
- [4] 鳥居 鉦太郎, 國藤 進, 松沢 照男, “海馬シナプス伝達における素量解析”, 計測自動制御学会 第 9 回生体・生理工学シンポジウム論文集, pp. 75-78 (1994).
- [5] Torii, K., Kunifuji, S. and Matsuzawa, T., “QUANTAL ANALYSIS DURING LTP IN HIPPOCAMPAL MONOSYNAPTIC NEURONS USING NOISE DECONVOLUTION”, in: proc. of the Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, p. 21 (1995).
- [6] 鳥居 鉦太郎, 木津川 尚史, 松沢 照男, 國藤 進, “小脳プルキンエ細胞・平行線維シナプス伝達における時間パターンコーディング”, 日本生物物理学会 第 34 回年会予稿集, p. 129 (1996).
- [7] 鳥居 鉦太郎, 木津川 尚史, 國藤 進, 松沢 照男, “時間パターン刺激による神経可塑性モデルの研究”, 電子情報通信学会 信学技報, NC96-204, pp. 377-384 (1997).
- [8] Torii, K., Kitsukawa, T., Kunifuji, S. and Matsuzawa, T., “A Synaptic Model By Temporal Coding”, in: proc. of VISION, RECOGNITION, ACTION: NEURAL MODELS OF MIND AND MACHINE, p. 31 (1997).

- [9] 鳥居 鉦太郎, 國藤 進, 松沢 照男, “ノイズデコンボリューション法による海馬LTPの素量解析”, 計測自動制御学会論文集, Vol. 33, No. 8, pp. 812-818 (1997).
- [10] Torii, K., Kitsukawa, T., Kunifuji, S. and Matsuzawa, T., “A Study on Synaptic Model By Temporal Pattern Stimulation”, in: proc. of BCEC97:Bio-Computing and Emergent Computation, pp. 251-260 (1997).