

2.5 膜電位イメージング手法の評価

実験手法をの正当性を評価するため、実際の昆虫の脳に本手法を適用し、評価した。エビガラスズメの触角神経に電気刺激を行い、触角葉での応答を記録した。

触角神経の電気刺激により、触角神経および、触角葉で脱分極応答が記録された。また、触角葉においては脱分極に続いて過分極反応が観察された（計測データ数；26）。計測結果の一例を図 2.5-1 に示す。図 2.5-1A は膜電位感受性色素により染色されたエビガラスズメの脳である。図右上に刺激のためのサクシオン電極がみられる。サクシオン電極は刺激部位である触角神経を吸引している。図中白枠が測定領域である。

刺激開始直後、触角神経のサクシオン電極先端で膜電位の脱分極が観察された（図 2.5-1B の b）。この脱分極が触角神経を伝播し、触角葉に到達し、領域として 2 又に分かれた応答を示した（図 2.5-1B の c）。この 2 又の形態は触角神経を走向する受容器神経の触角葉内での走向パターンとよく一致する。これより、刺激により受容器神経細胞が活動することがわかった。その後、過分極が触角葉上で観察される。過分極が発生した領域は脱分極が見られた領域と一致した（図 2.5-1B の e - k）。触角葉内の局所介在神経の多くは抑制性の伝達物質である GABA をシナプストランスマITTERとして持つことが免疫組織学的に判明している。この過分極応答は、局所介在神経による抑制性後シナプス電位を反映したものであると考えられる。

脱分極および過分極が観察された領域は大糸球体と呼ばれる領域と一致する。大糸球体は性フェロモンのみに感度を持つ触角上の匂い受容器細胞からの投射を受ける領域であり、フェロモン情報の処理がなされる場であると考えられている。大糸球体は cumulus と toroid と呼ばれる 2 つのサブコンポーネントからなっており（図 2.5-2）、応答領域はこれらの各領域と位置、形状とも一致する。触角においてフェロモン受容器の数は受容器全体の約 80% を占めていると考えられており、触角神経を刺激した場合、この領域の応答が強く得られるのは、入力神経の数の多さから当然と考えられる。

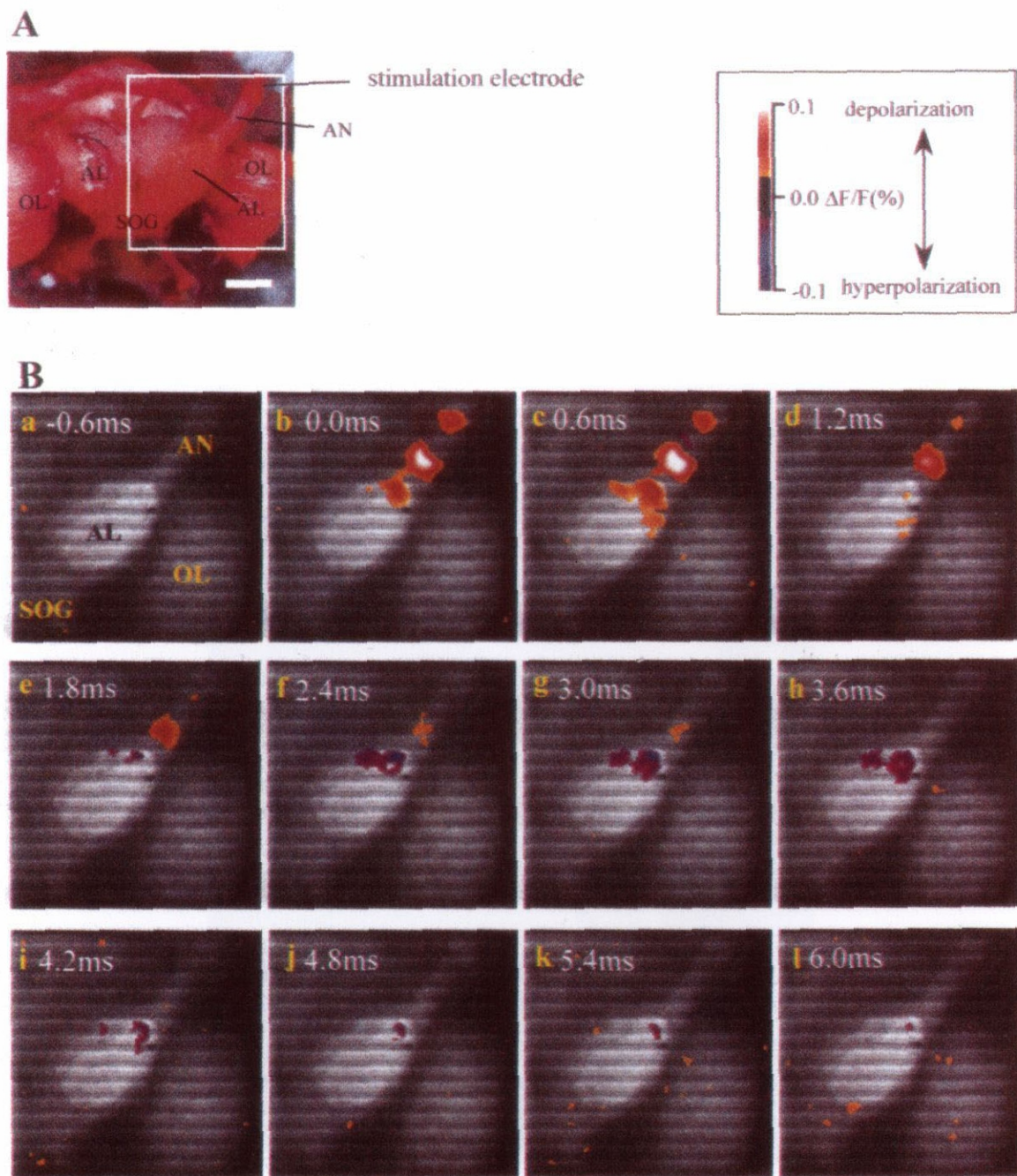


図 2.5-1 エビガラスズメ触角葉膜電位イメージング結果

A: 膜電位感受性色素で染色した脳. 白線四角領域が計測領域. スケールは 300 μm . B: 触角葉膜電位イメージング結果.

さらに、得られた応答が神経活動由来のものであるか検証するため、生理食塩水中の **Ca** イオンを **Mg** イオンに置換した **Ca free** 生理食塩水を用い計測を行った。化学シナプスでの神経情報伝達には **Ca** イオンの細胞内流入が必要であり、**Ca free** の生理食塩水環境下では化学シナプスでの情報伝達がブロックされると考えられる。

Ca free 生理食塩水環境下での結果の一例を図 2.5-3C に示す。図 2.5-3A の矢頭で示した領域からの記録である。正常生理食塩水環境下の **Control** に比較して、**Ca free** 環境下では脱分極成分に変化は見られないが、過分極成分が消失している。さらに、**Ca free** 生理食塩水を正常生理食塩水に置換すると、応答は **Control** データと同様、脱分極、過分極の 2 相性信号に復帰した。過分極のピーク時間にずれが認められるが、原因は不明である。**Ca free** 環境下で神経細胞の受けた非可逆性のダメージによる可能性がある。

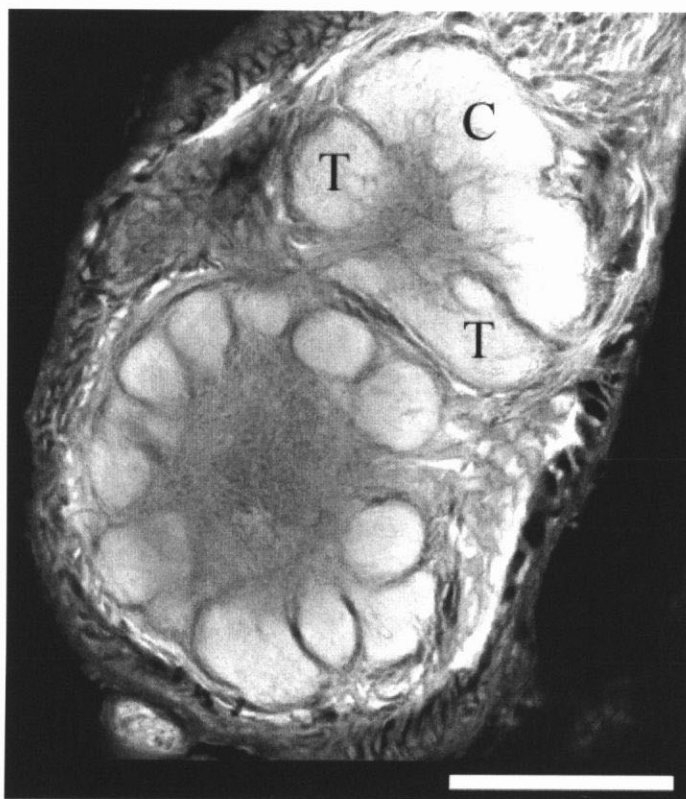


図 2.5-2 触角葉構造

カイコガ触角葉コンフォーカル画像 C: Cumulus, T: Toroid スケールは 100 μm .

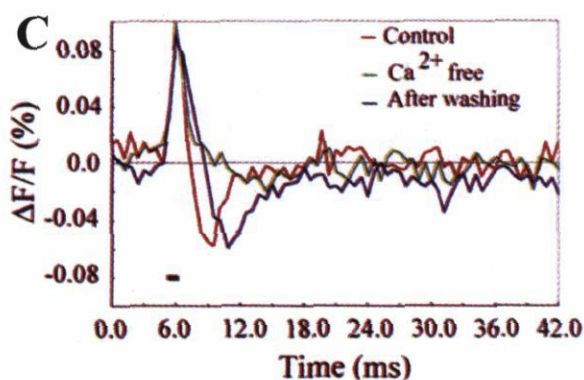
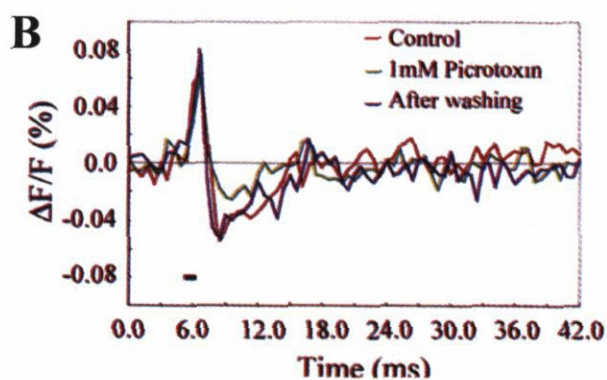


図 2.5-3 ピクロトキシン作用下および Ca free 環境下での触角葉応答

A: 受光デバイスによるエビガラスズメ触角葉の蛍光画像。矢印は B, C のグラフの記録領域を示す。スケールは 300 μm 。B: 1 mM ピクロトキシン環境下での応答の変化。C: カルシウムイオン不在環境下での応答の変化。B, C の下線は刺激タイミングを表す。

これらの結果は、刺激に対する信号の脱分極部分は前シナプス部の応答、すなわち匂い受容細胞の応答であることを示し、また過分極応答は後シナプスの応答であり、局所介在神経、出力神経の応答であることを示す。これらの応答は免疫組織学、電気生理学的知見と一致し、光学記録の正当性を示唆している。

さらに、**GABA** ブロッカであるピクロトキシン (**Sigma** 社製, **picrotoxin P-1675**, アメリカ) を脳に作用させ応答を計測し、正常状況の応答と比較した。**GABA** は神経伝達物質の1つであり、鱗翅目昆虫の触角葉の局所介在神経がこの伝達物質を持つことが多くの例で検証されている。**GABA** は過分極性信号を後シナプス領域に発生させる。**GABA** のブロッカであるピクロトキシンを生理食塩水に混合し、**GABA** の作用をブロックした環境下では、脱分極成分は影響を受けないが、過分極成分のみ約 50%の減衰が認められた (図 2.5-3B) この応答はピクロトキシンを正常生理食塩水で洗い流すことで、**Control** データと同様なカーブまで復帰する。

この結果は、後シナプス以降の応答は局所介在神経、および出力神経が活動すると考えられるが、その中で、**GABA** を伝達物質とした局所介在神経のシナプス後電位をブロックしたためと考えられる。この結果は免疫組織学的[77]、また電気生理学的知見[88]と一致する。

以上の結果は鱗翅目昆虫の既知の生理学的、免疫組織学的知見と一致する。このことより本手法は昆虫において有効であることを示すばかりでなく、さらに実体顕微鏡を使用することで広いワークスペースが得られる環境下においても有効であることを示した。

第 3 章

膜電位イメージングの昆虫神経系への適用

3.1 匂い刺激により励起される触角葉振動応答の研究

本章では実際に膜電位イメージングを昆虫の触角葉に適用し、触角葉の神経応答からその神経ネットワーク回路の特性を得る。

3.1.1 触角葉での匂い刺激に対する膜電位応答

生体が行っている匂い情報処理の方法を明らかにするため、一般臭の情報処理系として、マルハナバチ (*Bombus terrestris*) の触角葉を使用した。昆虫の一般臭情報処理系と特別臭情報処理系では、嗅受容器特性が異なる。すなわち、一般臭情報処理系の受容細胞では1つの嗅受容器細胞が複数の匂いに感度を持ち、各匂いに対する感度が異なることが知られている

(**generalist receptor cells**)。これに対し特別臭情報処理系の受容細胞では、1つの嗅受容器細胞は特定(たとえば性フェロモンの特定分子)のみに感度を持つ(**specialist receptor cells**)。

本章では一般臭の刺激時に触角葉で発生する振動応答を可視化し、電気生理学的手法ではほぼ不可能であった触角葉での振動発生領域を明らかにする。

3.1.2 匂いに励起される振動応答の存在

一般臭に対する嗅球および触角葉での応答として、匂い刺激により発生する振動応答が注目されている。その機能としては、(1) セルアッセンブルコーディングによる匂い識別[89]、(2) 匂いのファインチューニング[90]などがあげられている。

本節では、脊椎動物に比べ基本構造は同等であるが、単純な系である昆虫の触角葉に膜電位光学計測法を適用し、一般臭により励起された振動現象の存在、および振動領域の分布および、振動周波数の時間変化を示す。

マルハナバチの触角に匂い刺激を行うと触角葉で膜電位の振動現象が発生する。膜電位イメージング法を用いることで、これらの応答を時空間的に記録し、さらに最大エントロピー法を用いることで、低レコーディングレートの記録にもかかわらず、高い周波数分離性と、出力周波数の高分解能化、および過渡応答に対応可能な少ないデータ点(短時間のデータ)からのパワースペクトルカーブの推定を可能とする。

FIR フィルタによりデータに対し 15-90 Hz のバンドパス処理を行い、その後データに MEM (Maximum Entropy Method) による周波数解析を適用した。1度の周波数解析に使用したデータ長は 600ms (250 データ点) であり、解析出力のパワースペクトルの周波数分解能は 0.25 Hz である。

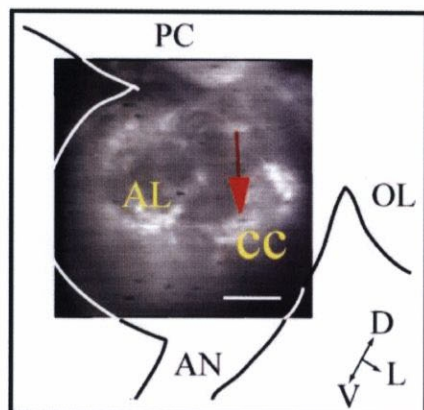
膜電位光学計測法により得られたマルハナバチの匂い刺激に対する触角葉の応答の 1 例を図 3.1.2-1 に示す。図 A が測定領域である。マルハナバチ触角葉の正面からの計測であり、図中矢印は図 3.1.2-1B, C の波形が計測されたピクセルの位置を示す。

匂い刺激に対する触角葉での神経応答は、清浄空気を与えた時の応答に比べ、isoamyl acetate 刺激時に信号の振幅の増大が見られた。すなわち、匂い刺激に対し刺激前の振幅は $\Delta F/F$ で 0.016% S.D.であるのに対し、刺激中は最大 0.079%まで増大した。刺激終了後は 0.014% S.D.にまで減少した。また、刺激期間中振幅の大きな信号は周期的であった（矢頭）。

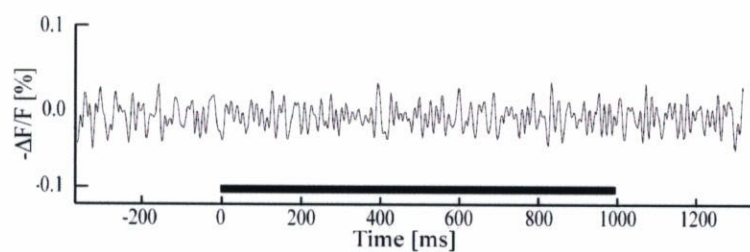
図 3.1.2-2 に示すように触角葉から得られた光学記録を、刺激前・刺激中・刺激後（解析データ長各 600ms）に分割し、各データに MEM を適用すると、刺激前、刺激後の信号に比べ、刺激期間中にパワの著しい増大が見られた（図 3.1.2-2A, 14 個体。以下個体数を N で表す）。次にこれらの振動が光源によるノイズではないことを示すため、振動が見られる触角葉上の領域と、その近傍（振動領域から 50-100 μm 離れた領域）から得られた刺激期間中の信号を周波数解析し、7 個体分のデータを重ね合わせて図 3.1.2-2B に示す。個体により、パワのピーク値が異なるため、各個体毎のデータを最大パワで規格化した。触角葉上の振動領域からの信号（赤）に対し同時に記録された触角葉内の振動領域近傍からの信号は有意に低く（有意水準 0.5%，以下有意差検定を行った有意水準を、有意確立 p を用い $p < \text{有意水準}$ の形で表す。検定方法: Wilcoxon, matched-pairs signed-ranks test），匂い刺激期間中に触角葉上に振動領域と非振動領域が存在することがわかった。もし、光源の不安定性のため、励起光強度が振動していた場合、ある程度均一に触角葉は染色されているため、触角葉全体で個体毎に同一周波数の振動が観察されることが考えられるからである。

また、1mM TTX (Sigma 社製, Tetrodotoxin T-8024, アメリカ) を溶かした生理食塩水で脳を処理すると、生理食塩水下で匂い刺激に対して見られた触角葉での振動応答（図 C 赤）が消失した（図 C 黒 N=6）。実験はまず、正常な生理食塩水で匂いに対する触角葉の応答を記録し、その後同一個体の脳を 1mM TTX を溶かした生理食塩水中で 4℃で 1 時間インキュベートし、再度匂い刺激を行いながら触角葉の応答を記録するという手順で行った。TTX はフグ毒として知られており、神経細胞膜上のナトリウムチャネルをブロックするため、神経は発火できない。TTX を投与することで、触角葉での匂いにより発生する振動現象が消失したという結果は、匂い刺激時に発生する触角葉での振動が神経活動に起因するものであることを示す。

A



B



C

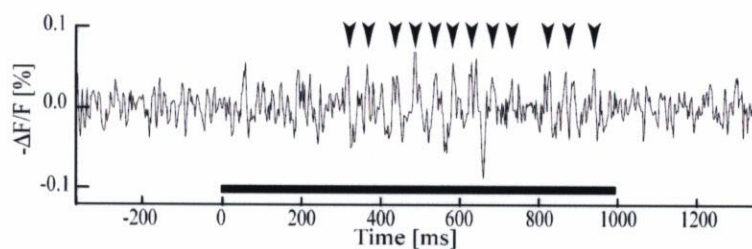


図 3.1.2-1 マルハナバチ触角葉匂い刺激応答

A: マルハナバチ触角葉電位感受性色素蛍光画像. 矢印は B, C のデータの記録ピクセル. スケールは 100 μ m. B: clean air による刺激. C: isoamyl acetate による刺激. clean air の刺激では見られなかった振幅の増大が観察された (矢印). B, C の下線は刺激タイミングを表す.

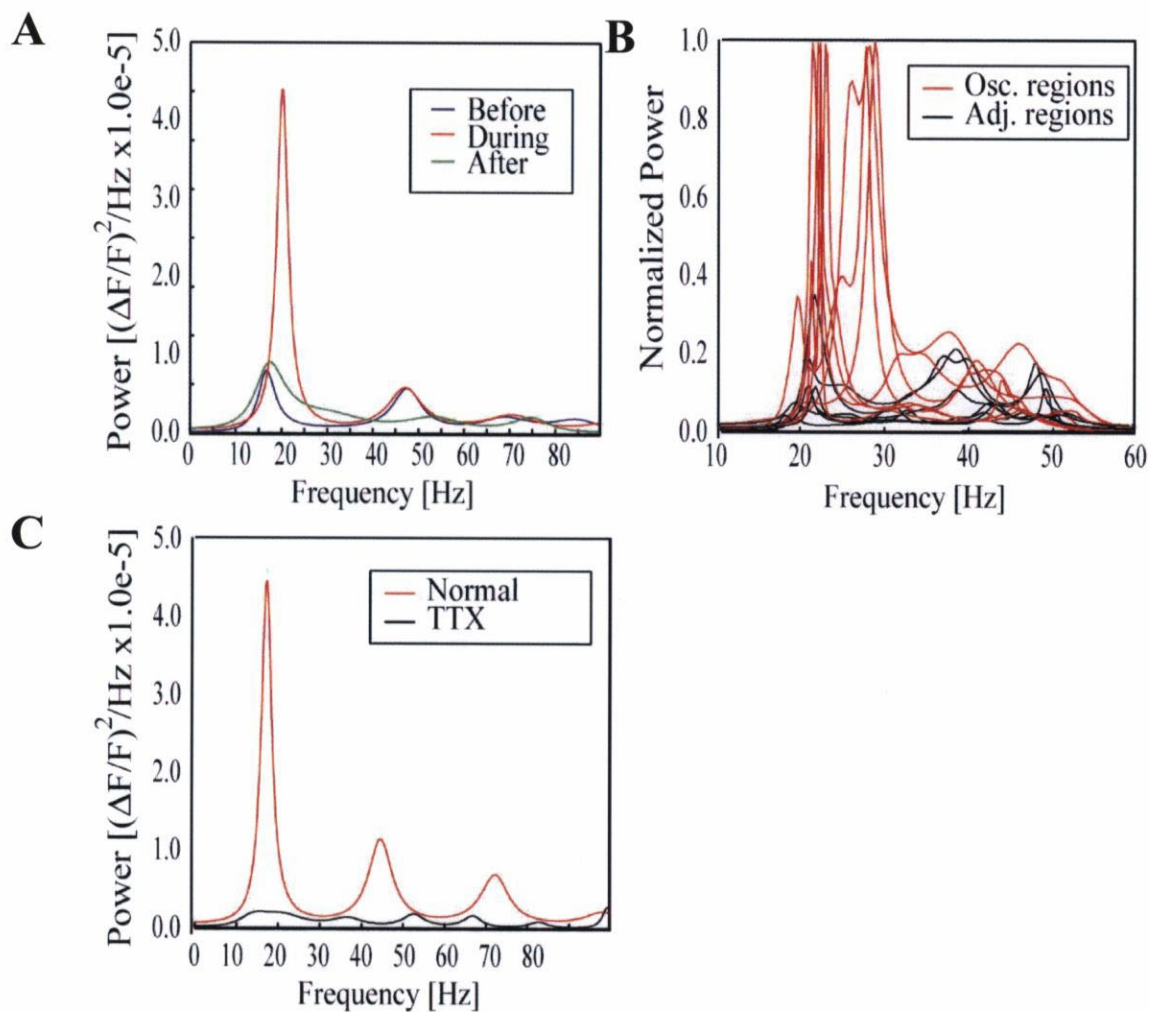


図 3.1.2-2 触角葉振動信号周波数解析結果

A: 刺激前（青）刺激中（赤）刺激後（緑）のパワの変化。刺激中に顕著なパワの増大が見られる。 B: 刺激中の 7 個体の振動領域（赤）とその近傍領域（50-100 μm ；黒）のパワの比較。 C: 正常環境で刺激により振動が観察された（赤）個体に対し TTX を作用させ Na チャネルをブロックすることで、振動が消失した（黒）。

匂いにより励起される振動周波数は計測した 14 個体において個体間で異なり、ピークパワの周波数の分散は 15.87 Hz^2 であった。ところが、同一個体中では複数回刺激に対して最大パワを示す振動は一定の周波数であった（分散： 1.1 Hz^2 ）。これは各個体が個体特有の周波数で匂い刺激に対し触角葉で振動を発生させていることを意味する。すなわち、特定の匂いに対する応答は、個体毎に周波数は異なるが、各個体では一定の応答を示す。そこで個体ごとの最大パワを示す周波数で、1 ピクセルごとに独立に MEM による周波数解析をおこない、分析の結果を 2 次元に再構成して触角葉での振動領域の分布を求めた（図 3.1.2-3）。

図 3.2 - 3 に匂い刺激時の触角葉の振動領域の分布を示す。図中 B は計測範囲であり、C-D は触角葉を拡大して示した（図中 B の赤枠部分）。比較のため、触角葉のコンフォーカル顕微鏡による組織画像を図中 A に示す。

振動領域は図 3.1.2-3 に示したように円状、または複数の円が結合した状態で局在化していた。円状の応答領域のパワの分布を求めると、最大パワの 40 から 50% の領域ではなだらかにパワが増大し（傾き； $0.13\%/ \mu\text{m}$ ）、50 から 60% の領域では急激に増大（傾き； $1.07\%/ \mu\text{m}$ ）、60 から 70% の領域ではなだらかな増大（傾き； $0.36\%/ \mu\text{m}$ ）を示した。これは、真の振動領域からの応答が組織の散乱、顕微鏡の焦点のずれなどの理由により拡散した結果であると考えられる。したがって真の領域の境界は急激なパワの増大からなだらかな増大へと変わる点、すなわち最大パワの 60% の領域の近傍にあると推定される。計測した 14 匹のマルハナバチに対し、最大パワの 60% 以上の領域の直径を求めると、 $47 \pm 11 \mu\text{m}$ であり、これは共焦点顕微鏡で記録、計測した糸球体の直径（ $46.7 \pm 7.6 \mu\text{m}$ N=5、図中 A の糸球体（G）のサイズを参照）とよく一致した。これらの結果は、マルハナバチの振動領域は糸球体を振動の単位としている可能性を示唆する。また、触角葉側方腹側に直径約 $30 \mu\text{m}$ 程度の振動領域がみられる。これは触角葉神経の細胞体クラスターの領域であり、細胞体の応答を反映していると考えられる。

異なる個体で同一刺激を行い領域を比較した結果、振動領域は個体毎に異なった。これは、測定時の焦点位置の違い、計測時の個体毎の脳の設置角度の違いの影響も考えられるが、マルハナバチは脳の大きさ、脳内構造物の位置が固体により異なるため、振動領域の違いはむしろ個体差によるものと考えられる。

以上により、①マルハナバチ触角葉で匂い刺激により振動現象が発現し、②振動は糸球体単位で発生することが明らかとなった。

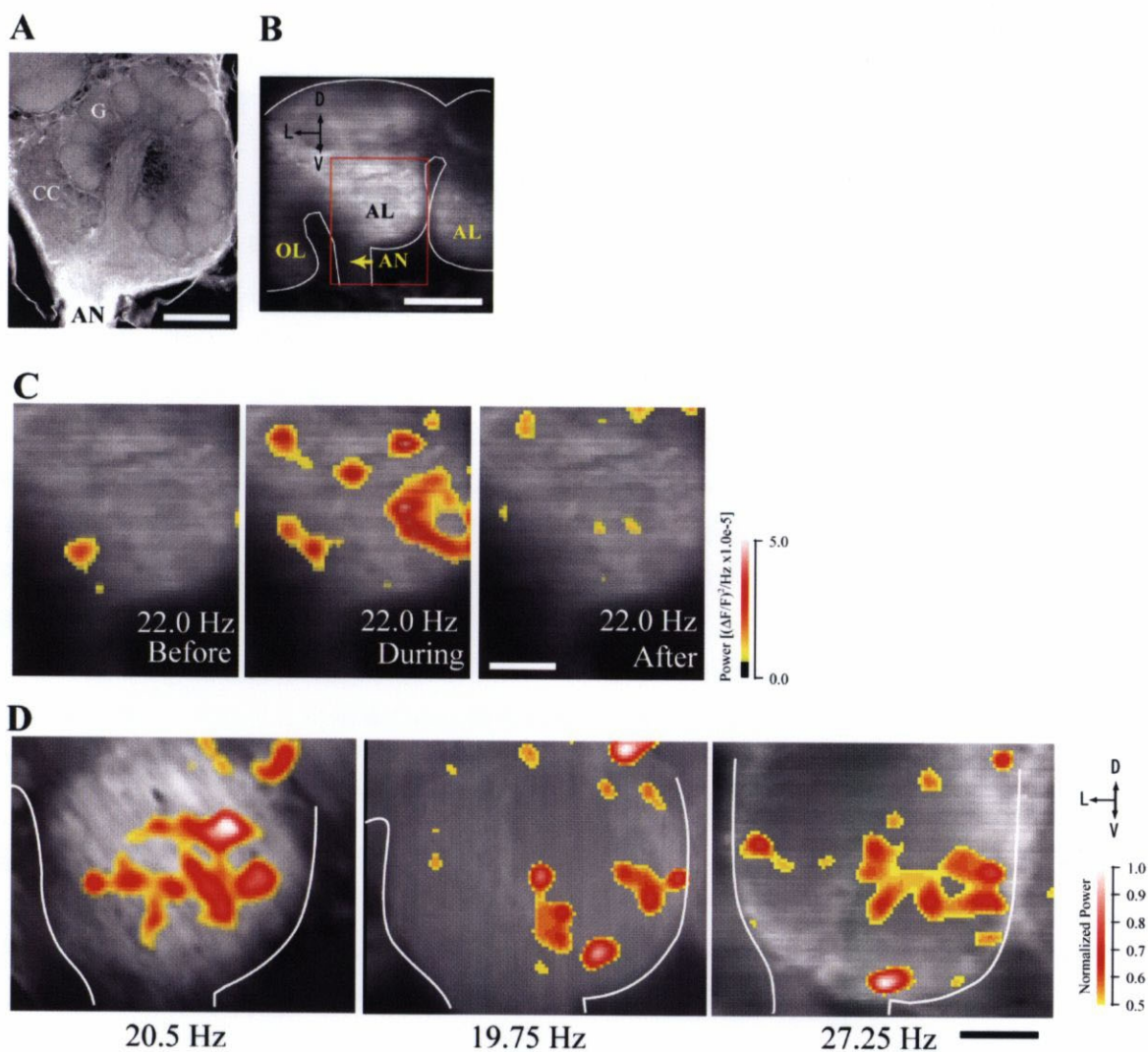


図 3.1.2-3 匂いに励起される振動信号の触角葉上の分布

A: マルハナバチ触角葉のコンフォーカル画像. スケールは 100 μm . B: 計測領域. 脳正面図赤線内が計測領域. スケールは 300 μm . C: Isoamyl Acetate による振動領域. スケールは 100 μm . D: 同じ匂いに対する異なる個体の振動領域. 領域及び振動周波数は個体毎で異なる. スケールは 100 μm .

3.2 カイコガ触角葉におけるセロトニン神経活動修飾効果の可視化

3.2.1 触角葉におけるセロトニンの効果

生体アミンの一種であるセロトニン (serotonin) は神経細胞のカリウムチャネル、電位依存性のカルシウムチャネルの開口によるカリウムイオン電流およびカルシウムイオン電流を抑制することがタバコスズメガの触角葉神経の培養細胞で確認されている[91]. これらのイオン電流が抑制された結果、神経軸索上を伝播するスパイクの電位の大きさおよび神経スパイクの持続時間は増大する。これはセロトニンにより神経活動が修飾されることを意味する。

カイコガ、タバコスズメガでは左右触角葉に一对のセロトニンを放出する神経 (セロトニン神経) が存在することが確かめられている[92]. このセロトニン神経は触角葉全域にほぼ均一に分枝を持ち、匂い処理系で触角葉の上位中枢であるキノコ体、前大脳側方領域、側副葉にも分枝を持つ。セロトニン神経はその形態より上位中枢から入力を受け触角葉でセロトニンを放出する遠心性神経であると考えられる[92]. セロトニン神経が触角葉内でセロトニンを放出する鍵刺激は触角に対する機械刺激であることも微小電極によるセロトニン神経からの膜電位記録で確認されている[92].

セロトニンが触角葉内で放出された場合、セロトニンの神経活動修飾効果は触角葉全域に均一に及ぶのか、局在化した領域のみに限られるのかを、膜電位イメージング法を使用することで明らかにした。

3.2.2 実験方法および前提条件の確認

図 3.2.2 に刺激方法と触角葉の構造を示す。刺激は触角神経を吸引電極により電気刺激することで行った。また、セロトニンは $10^{-4} - 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ の濃度で生理食塩水中に混合させた溶液にカイコガの脳を 12 分間浸すことで投薬した。

雄カイコガの脳は大糸球体 (MGC) と常糸球体 (Gs) に大別される。大糸球体は 3 つのコンポーネントからなっており、それぞれ Cumulus, Toroid, Horseshoe と呼ばれる。Cumulus はカイコガの性フェロモンの副成分である bombykal に応答する受容細胞が投射しており、bombykal の情報処理の領域であると考えられる。また、Toroid は性フェロモンの主成分である bombykol に応答する受容細胞が投射する領域であり、bombykol の情報処理の領域であると考えられている[93].

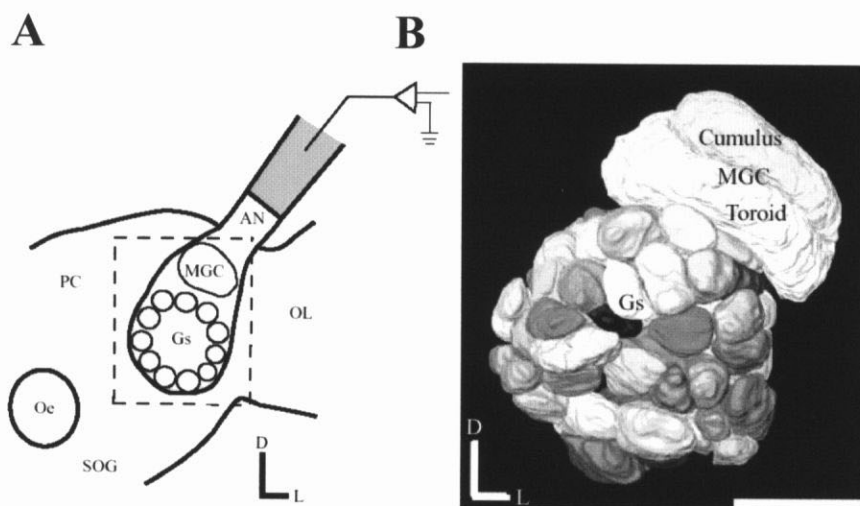


図 3.2.2-1 触角葉刺激セットと触角葉の構造

A: 触角神経を吸引電極により電気刺激を行うセットアップの概略図. 図中点線四角の領域が触角葉である. B: 触角葉の構造. Cumulus は性フェロモン bombykal の情報を, Toroid は性フェロモン bombykol の情報を処理する領域であると考えられている. AN: 触角神経, D: 背側方向, Gs: 常糸球体, L: 側方, MGC: 大糸球体, Oe: 食道, OL: 視葉, PC: 前大脳, SOG: 食道下神経節. スケール: 100 μm .

本実験はセロトニンの薬理効果を観察するため, 計測中の脳外液 (生理食塩水) をセロトニン溶液と置換する工程を含むため, 刺激電極と触角神経間の電気抵抗が液交換時の物理的作用により変化する可能性がある. この問題に対し以下の対策を考えた. 本来セロトニンの受容体は神経軸索上にはほぼ存在しないと考えられる. もし, 触角からの受容細胞の神経軸索の束である触角神経でセロトニンによる神経活動の修飾効果がなく, 触角葉で効果が認められるならば, 触角神経・刺激電極間の電気抵抗の変化による刺激強度の変化がわずかに発生しても, 触角神経の刺激に対する応答強度で触角葉の応答を規格化することにより生理食塩水での触角葉の応答とセロトニンを含む生理食塩水に脳外液を交換した後の応答を比較することが可能である. そのため, 触角神経の応答がセロトニンの投与で変化が見られないことを確認した (図 3.2.2-2). すなわち, 触角葉でセロトニンによる膜電位最大値, および神経活動持続時間の増大の効果が確認された状態においても, 触角神経の応答ではセロトニンによる薬理効果は観察されないの で, 触角神経の応答は規格化用のリファレンス値として使用可能であることが示された.

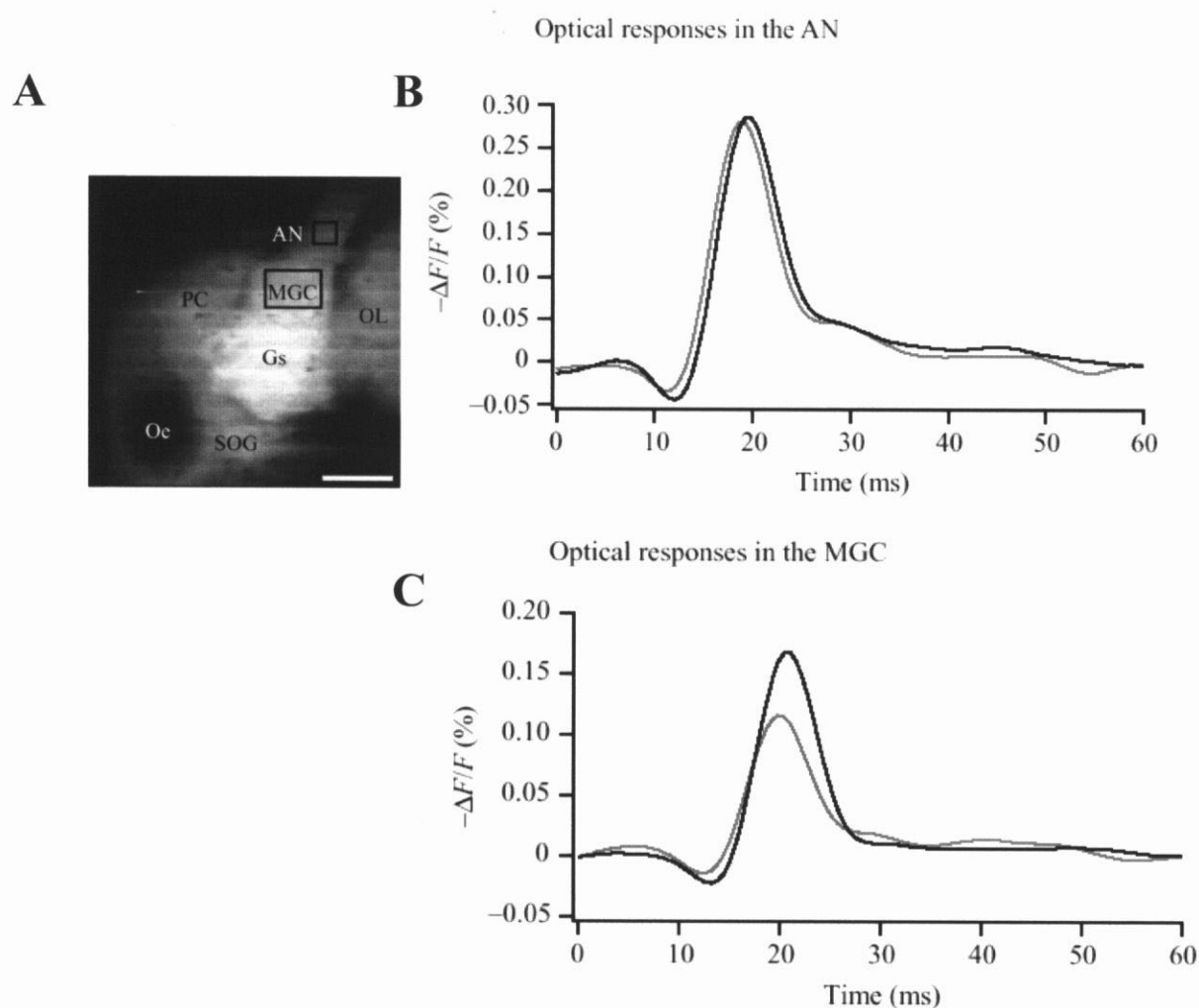


図 3.2.2-2 触角神経および触角葉 MGC でのセロトニン薬理効果

セロトニン投与による神経活動の変化は触角神経ではみられないが、触角葉MGCでは観察された。A:カイコガ脳の計測時の蛍光イメージ。B:触角神経でのセロトニン $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ 投与前（灰色）と投与後の応答（黒）。グラフは図A中のANと示した四角で示した領域（100 ピクセル， $70 \times 70 \mu\text{m}$ ）の蛍光変化を加算平均で求めた。C:触角葉MGCでのセロトニン $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ 投与前（灰色）と投与後の応答（黒）。グラフは図A中のMGCと示した四角で示した領域（384 ピクセル， $168 \times 112 \mu\text{m}$ ）の蛍光変化を加算平均で求めた。スケール: $100 \mu\text{m}$ 。

3.2.3 セロトニンの触角葉における薬理効果

触角神経の電気刺激による触角葉のイメージング結果をセロトニン投与前、投与後、および投与前後の神経活動の差分について図 3.2.3-1 に示す. セロトニンによる神経活動の差分 S_{effect} は式 3.2.3-1 により各ピクセル出力ごとに独立に計算した.

$$S_{effect} = (R_{after} - R_{before}) / R_{before} \tag{3.2.3-1}$$

ここで R_{before} は触角神経の最大応答値で規格化されたセロトニン投与前の応答強度であり, R_{after} は触角神経の最大応答値で規格化されたセロトニン投与後の応答強度である.
セロトニン投与により神経応答は増大した. さらに, 触角葉内の領域にはセロトニンの効果が一定ではなく, セロトニンにより神経活動が増大する領域が局在することが観察された.

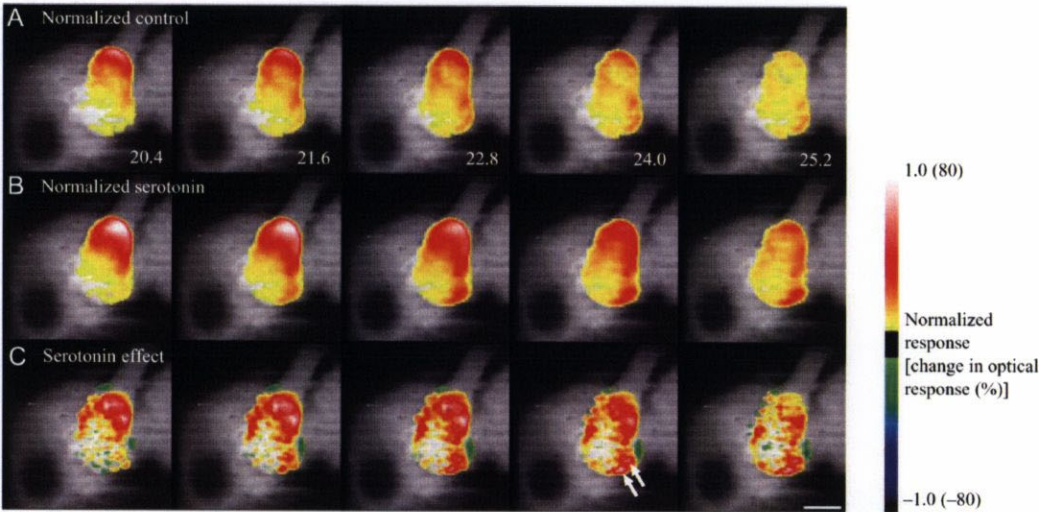


図 3.2.3-1 セロトニン投与による触角葉の応答強度の変化の分布

A:触角神経の最大応答値で規格化された触角神経電気刺激による触角葉応答. 右下の数字は刺激開始からの経過時間をしめす. また, 応答強度をカラーバーで右に示す. カラーバーのレンジは±1.0 である. B:触角神経の最大応答値で規格化されたセロトニン投与後の触角神経電気刺激による触角葉応答. C:A および B より求められた触角葉応答のセロトニン投与による効果. カラーバーのレンジはセロトニン投与前の応答に対しセロトニン投与後の応答が±80%の増強/減少を表現しうるように設定した. セロトニンの薬理効果は MGC および Gs の一部で特に大きく, 矢印の領域は 2 つの常系球体のサイズとほぼ一致する大きさである.

セロトニン投与によるこれらの応答の変化が細胞死などの不可逆な効果の影響ではないことを示すため、セロトニン投与後の脳を生理食塩水で 15 分洗浄し、セロトニン投与効果が消失することを確認した (図 3.2.3-2).

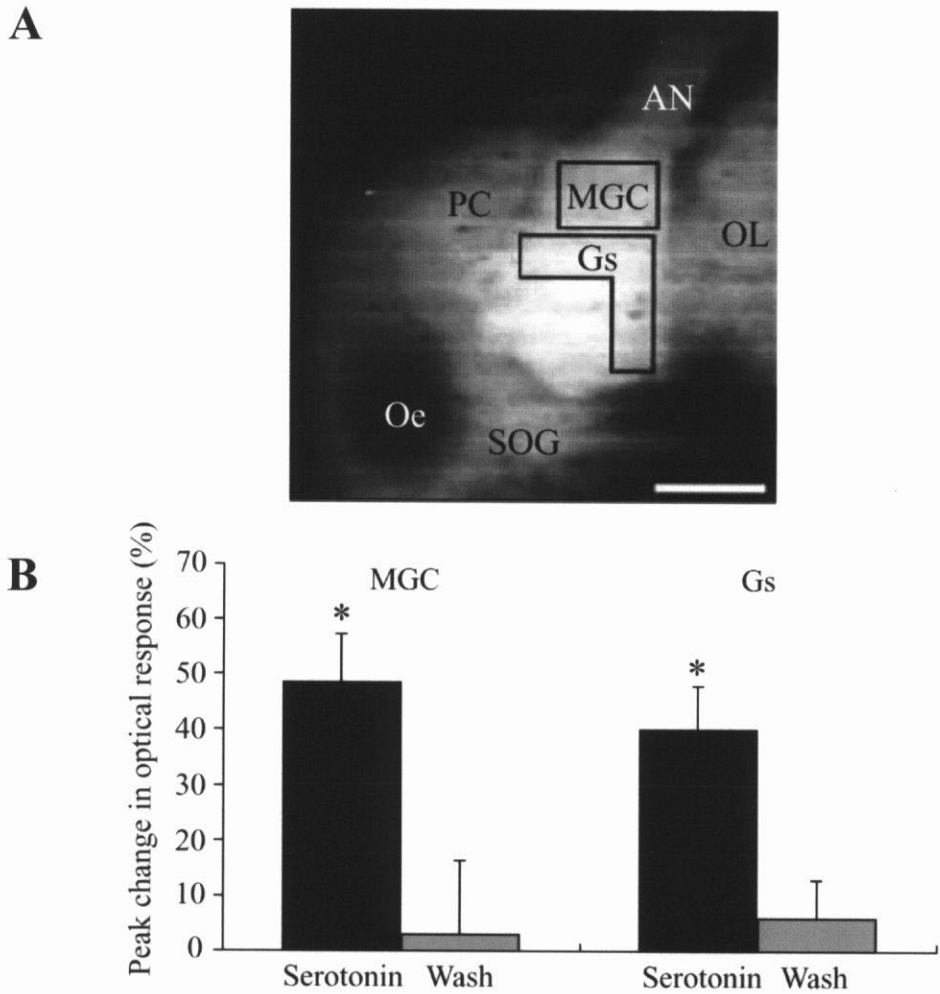


図 3.2.3-2 洗浄によるセロトニン投与効果の消失

セロトニン投与後 15 分間の生理食塩水の洗浄によりセロトニン投与効果は消失し、セロトニン投与前の応答レベルに復帰した。A:カイコガ触角葉膜電位感受性色素蛍光画像 B:セロトニン投与前の最大応答強度に対するセロトニン投与後、洗浄後の応答変化率。図中 MGC および Gs で示されるグラフは図 A 中の MGC, Gs で示された黒線で囲まれた領域からのデータである。MGC および Gs のセロトニン投与による応答強度と洗浄前の応答強度は有意に異なった (MGC: $p < 0.001$. Gs: $p < 0.005$, t-test)

3.2.4 セロトニンによる神経応答持続時間と応答領域の局在性

セロトニンをカイコガの脳に投与することで、触角神経電気刺激により発生する触角葉の神経応答は最大値、応答持続時間も増大することが観察された。このセロトニンによる神経応答の修飾作用を領域別に詳細に評価した。

図 3.2.4-1 にセロトニン投与により増加した触角葉神経応答持続時間の領域別の比較を示す。神経応答時間は応答のピーク値の半値幅と定義した。結果は MGC 領域においてセロトニン投与により応答持続時間は $6.6 \pm 0.2 \text{ ms}$ から $8.3 \pm 0.2 \text{ ms}$ へ増大し、Gs ではセロトニン投与により応答持続時間は $8.3 \pm 0.2 \text{ ms}$ から $10.1 \pm 0.2 \text{ ms}$ へ有意に増大した。

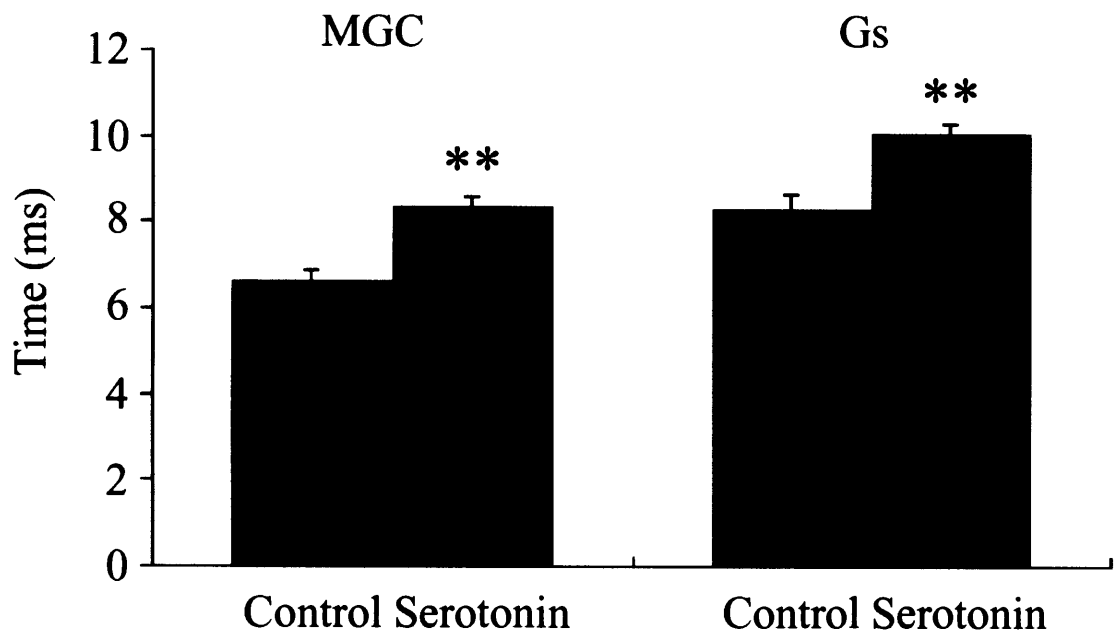


図 3.2.4-1 セロトニンによる神経活動持続時間の増大効果の領域差

MGC, Gs 領域いずれにおいても神経応答持続時間はセロトニンの投与によりセロトニン投与前 (Control) の応答持続時間に対し有意に増大した (MGC: $p < 0.005$, Gs: $p < 0.005$, t-test)。

次に、セロトニンによる神経活動修飾効果の触角葉上の分布を調べた。結果の一例を図 3.2.4-2 に示す。MGC 領域のセロトニン神経修飾効果について 10 個体、Os 領域については 7 個体のデータを統計処理し、各触角葉の領域のセロトニンによる神経応答増強効果を領域毎に比較した (図 3.2.4-3)。その結果触角葉上で解析した全ての領域で応答強度の増大が観察されたが、応

答増強作用は領域により有意な差が存在することが判明した。性フェロモンの情報処理を行う領域であるMGCではcumulus(性フェロモン副成分 bombykal の情報処理領域)に比較し toroid 領域(性フェロモン主成分 bombykol の情報処理領域)でよりセロトニンの神経活動増強効果の増大が見られた。これは性フェロモンの主成分である bombykol に対する情報処理が副成分である bombykal の処理に比較してよりセロトニンによる応答増強効果を受けることを意味する。また、cumulus, toroid 各コンポーネント内では cumulus では cumulus の中心部分が中心側、側方の cumulus に対し有意にセロトニンによる神経応答増強効果が高かった。また、toroid 領域においては toroid 内でのセロトニン神経応答増強効果は観察されなかった。このことは cumulus 内でさらに小さな情報処理単位が存在する可能性を示差する。さらに、常糸球体領域(Gs)では領域によりセロトニンによる応答増強効果は大きく異なるとの結果を得た。匂いの情報処理は糸球体単位で行われている可能性が示差[72,73]されていることより、各匂い情報に対応して、セロトニンの神経応答増強効果はそれぞれ異なる可能性を示した。

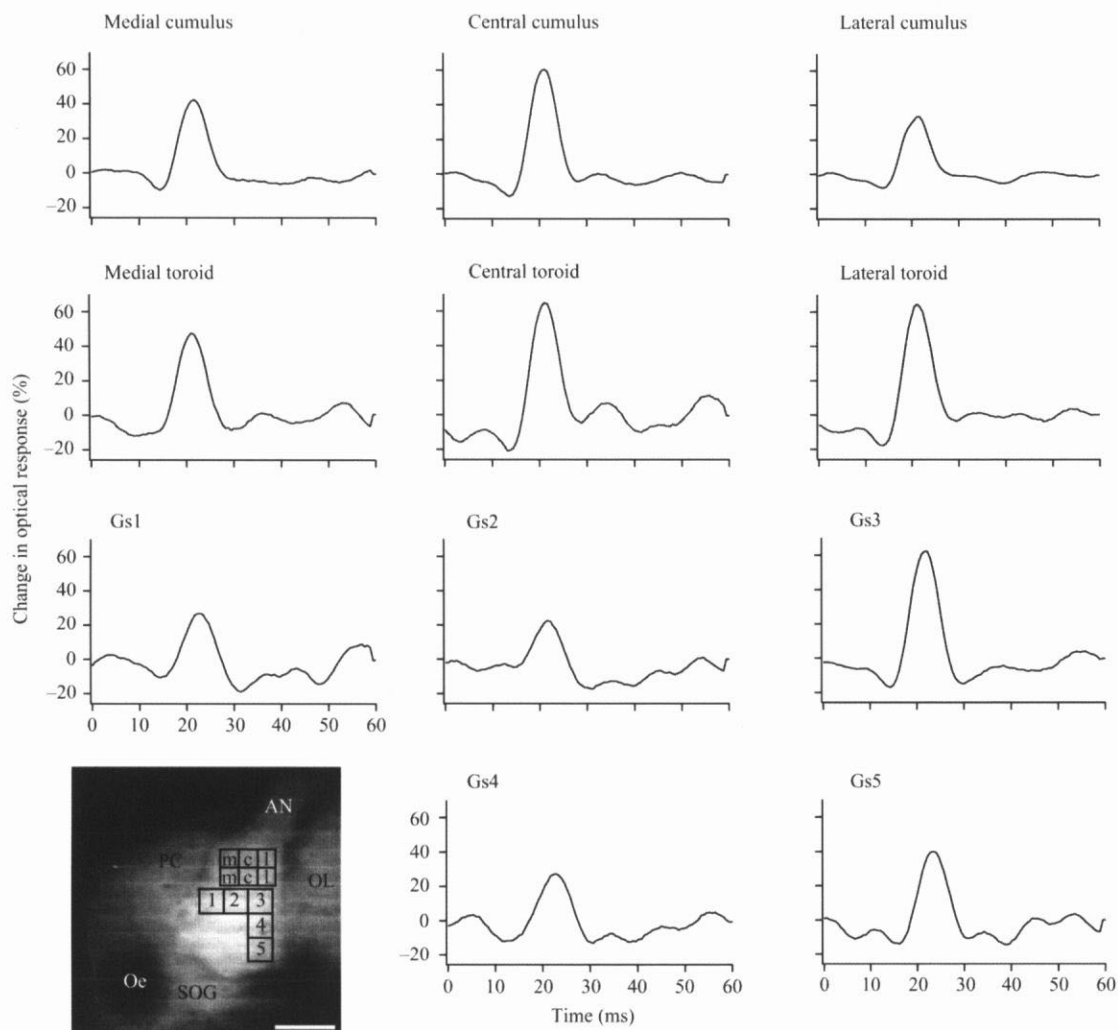


図 3.2.4-2 觸角葉でのセロトニンによる神経活動増幅効果の分布

セロトニンによる神経活動の増幅効果は觸角葉上で均一な分布を示さず、局在性が観察された。内挿図は脳の蛍光画像であり、内挿図内に示したように MGC を中心側 cumulus(Medial cumulus)、中心 cumulus(Central cumulus)、側方 cumulus(Lateral cumulus)、中心側 toroid(Medial toroid)、中心 toroid(Central toroid)、側方 toroid(Lateral toroid)、の 6 分割し、各セロトニン神経活動増強率をグラフ化した。Gs 領域では領域 1-5 の領域についてセロトニン神経活動増強率をグラフ化した。

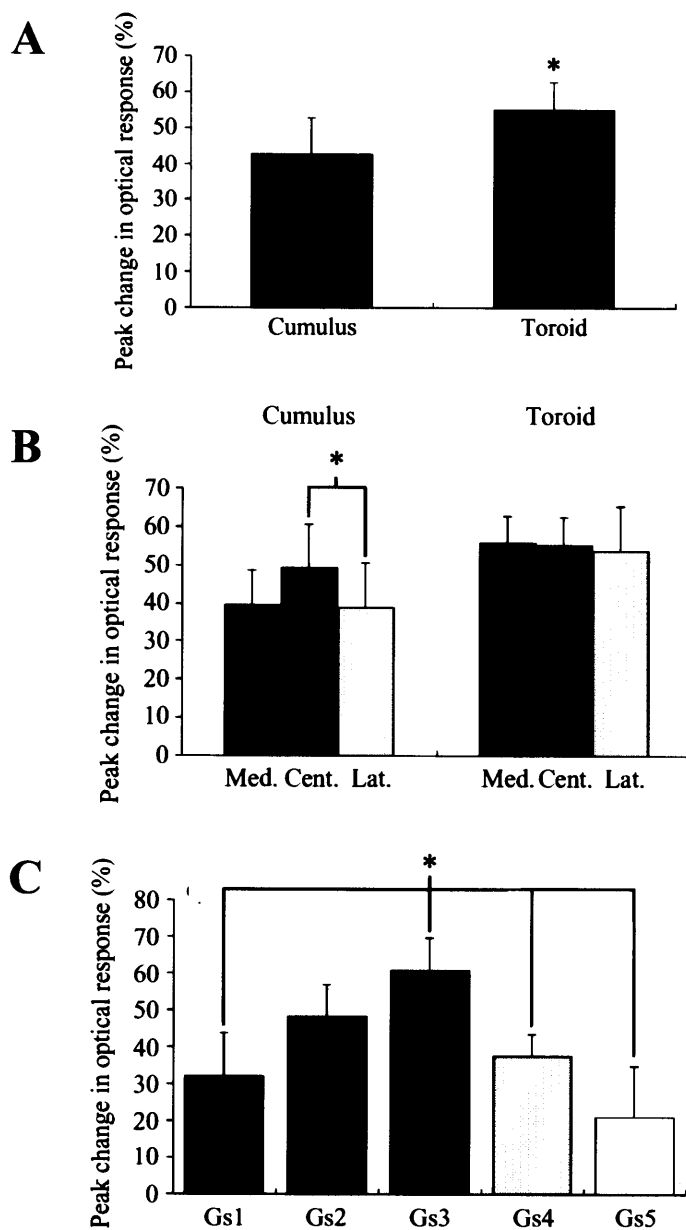


図 3.2.4-3 セロトニンの神経応答増強効果の領域別の比較

A:性フェロモン処理系である MGC 内で性フェロモンの主・副成分の情報処理の場である toroid, cumulus において, セロトニンによる神経活動の増強効果に有意な差が観察された. B:cumulus, toroid 内のセロトニンの神経応答増強効果は cumulus の中心領域のみに効果の差がみられたが, 他の領域では同じ効果であった. C:常系球体領域 (Gs) では領域毎にセロトニンの神経応答増強効果に違いが観察された.

第 4 章

結論

本論文では、昆虫神経系を計測可能とする膜電位イメージング手法を開発し、それにより、昆虫の匂い処理 1 次中枢である触角葉の応答を次空間的に高分解能で記録した。さらに、匂い刺激により励起される振動応答を最大エントロピー法により、解析可能であることを示した。また、触角葉内でセロトニンの効果を可視化した。

これらの成果を具体的に示すと

(1) 昆虫神経系に対して高速、高分解能な膜電位イメージング手法を確立した。

昆虫の神経系において、膜電位イメージングは本研究以前に成功例はない。これは、昆虫の神経系が脊椎動物の神経系に比し、記録視野での神経密度が低く、測定対象物としては膜電位イメージングにおいて不利なものであることによる。

本研究により、複数種の昆虫にも適用できる膜電位イメージング手法を確立した。

(2) 実体顕微鏡での膜電位イメージングの成功

通常、膜電位イメージングは正立、もしくは倒立顕微鏡を使用して行われる。これはそれらの顕微鏡の対物レンズの開口数が大きいため、効率的に測定対象が発する蛍光を受光できるためである。しかしながらこれらのレンズは高開口数を得るため一般にレンズの焦点距離が短い

(0.3 - 2 mm 程度)。そのため、たとえば昆虫の脳の応答を記録する場合、脳を摘出し、脳のみにして計測する必要がある。実体顕微鏡では対物レンズの開口数が小さいが、焦点距離が大きく (5 cm 程度)、測定のために脳を摘出する必要がない。本研究では実体顕微鏡を使用した系で膜電位イメージングに成功しており、昆虫の行動をモニタしながらの膜電位イメージングなどのより実態に近い計測が可能である。

(3) 匂い刺激時の神経応答のイメージングの成功

匂い刺激時の昆虫の触角葉での膜電位イメージングに成功した。また、MEM により解析することで、より鮮明に応答を示した。

(4) 触角葉振動現象の空間分布の解明

触角葉において、匂い受容時に膜電位の振動現象が見られることが脊椎、無脊椎動物で報告されていた。これらは電気生理学的な電極による記録であり、振動領域は不明であった。本研

究により振動の空間分布が明らかになった。

(5) 触角葉の振動単位の推定

本研究の結果は、触角葉の糸球体のサイズと振動領域のサイズはよく一致することを示した。すなわち、振動は糸球体単位で発生することを示唆した。

(6) セロトニンの神経応答増強効果の可視化

生体アミンの一種であるセロトニンを触角葉に投与することで、セロトニンの神経応答増強効果を記録した。セロトニンの効果は①応答強度の増大化、②応答持続時間の長大化であることを明らかにした。さらにセロトニンの神経強度の増大化の効果は触角葉に均一に現れるのではなく、局在化していることを明確にした。これにより昆虫の触角葉で生体アミンの効果の計測が本手法により有効に行うことが可能であることを示した。

以上

参考文献

- [1] Cohen, LB., Keynes, RD. and Hille, B.(1968) Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature*, 218 438-441.
- [2] Tasaki, I., Watanabe, A. and Sandlin, R. (1968) Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 61 883-888.
- [3] Cohen, LB. and Keynes, RD. (1969) Optical changes in the voltage-clamped squid axon. *J. Physiol.*, 204 100P+.
- [4] Cohen, LB., Hille, B., Keynes, RD., Landowne, D. and Rojas, E. (1971) Analysis of the potential-dependent changes in optical retardation in the squid giant axon. *J. Physiol.*, 218 205-237.
- [5] Cohen, LB., Salzberg, BM., Davila, HV., Ross, WN., Landowne, D., Waggoner, AS. and Wang, CH. (1974) Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J. Membr. Biol.*, 19 1-36.
- [6] Orbach, HS., Cohen, LB. and Grinvald, A. (1985) Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. *J. Neurosci.*, 5 1886-1895.
- [7] London, JA., Zecevic, D. and Cohen, LB. (1986) Simultaneous monitoring of activity of many neurons from invertebrate ganglia using a multielement detecting system. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 40 115-131.
- [8] Shrager, P., Chiu, SY., Ritchie, JM., Zecevic, D. and Cohen, LB. (1987) Optical recording of action potential propagation in demyelinated frog nerve. *Biophys. J.*, 51 351-355.
- [9] London, JA., Zecevic, D. and Cohen, LB. (1987) Simultaneous optical recording of activity from many neurons during feeding in *Navanax*. *J. Neurosci.*, 7 649-661.
- [10] Kauer, JS., Senseman, DM. and Cohen, LB. (1987) Odor-elicited activity monitored simultaneously from 124 regions of the salamander olfactory bulb using a voltage-sensitive dye. *Brain Res.*, 418 255-261.
- [11] Wu, JY., London, JA., Zecevic, D., Hopp, HP., Cohen, LB. and Xiao, C. (1988) Optical monitoring of activity of many neurons in invertebrate ganglia during behaviors. *Experientia*, 44 369-376.
- [12] Zecevic, D., Wu, JY., Cohen, LB., London, JA., Hopp, HP. and Falk, CX. (1989) Hundreds of neurons in the *Aplysia* abdominal ganglion are active during the gill-withdrawal reflex. *J. Neurosci.*, 9 3681-3689.

- [13] Zecevic, D. (1996) Multiple spike-initiation zones in single neurons revealed by voltage-sensitive dyes. *Nature.*, 381 322-325.
- [14] Antic, S., Major, G., Chen, WR., Wuskel, J., Loew, L. and Zecevic, D. (1997) Fast voltage-sensitive dye recording of membrane potential changes at multiple sites on an individual nerve cell in the rat cortical slice. *Biol. Bull.*, 193 261.
- [15] Oka, K., Ogawa, H. and Fujita, S. (1994) Glutamate-induced depolarization in earthworm ventral nerve cord. *Neurosci. lett.*, 179 41-44.
- [16] Grinvald, A., Frostig, RD., Lieke, EE. and Hildesheim, JG. (1988) Optical imaging of neuronal activity. *Physiol. Rev.*, 68 1285-1336.
- [17] Lam, YW., Cohen, LB., Wachowiak, M. and Zochowski, MR. (2000) Odors elicit three different oscillations in the turtle olfactory bulb. *J. Neurosci.*, 20 749-762.
- [18] Hildebrand, JG. (1996) Olfactory control of behavior in moths: central processing of odor information and the functional significance of olfactory glomeruli. *J. Comp. Physiol. A*, 178 5-19.
- [19] Menco BPhM. (1980) Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat, and dog. II. Cell apices, cilia, and microvilli. *Cell Tissue Res.*, 211 5-29.
- [20] Hoskins, SG., Homberg, U., Kingan, TG., Christensen, TA. and Hildebrand, JG. (1986) Immunocytochemistry of GABA in the antennal lobes of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.*, 244 243-252.
- [21] Kent, KS., Harrow, ID., Quartararo, P. and Hildebrand, JG. (1986) An accessory olfactory pathway in *Lepidoptera*: the labial pit organ and its central projections in *Manduca sexta* and certain other sphinx moths and silk moths. *Cell Tissue Res.*, 245 237-245.
- [22] Christensen, TA. and Hildebrand, JG. (1987) Male-specific, sex pheromone-selective projection neurons in the antennal lobes of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A*, 160 553-569.
- [23] Oland, LA., Orr, G., Tolbert, LP. (1990) Construction of a protoglomerular template by olfactory axons initiates the formation of olfactory glomeruli in the insect brain. *J. Neurosci.*, 10 2096-2112.
- [24] Kanzaki, R., Arbas, EA. and Hildebrand, JG. (1991) Physiology and morphology of protocerebral olfactory neurons in the male moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A*, 168 281-98.

- [25] Hildebrand, JG., Christensen, TA., Harrow, ID., Homberg, U., Matsumoto, SG. and Waldrop, BR. (1992) The roles of local interneurons in the processing of olfactory information in the antennal lobes of the moth *Manduca sexta*. *Acta. Biol. Hung.*, 43 167-74.
- [26] Christensen, TA., Waldrop, BR., Harrow, ID. and Hildebrand, JG. (1993) Local interneurons and information processing in the olfactory glomeruli of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A*, 173 385-399.
- [27] Malun, D., Oland, LA. and Tolbert, LP. (1994) Uniglomerular projection neurons participate in early development of olfactory glomeruli in the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, 350 1-22.
- [28] Anton, S. and Hansson, BS. (1994) Central processing of sex pheromone, host odour, and oviposition deterrent information by interneurons in the antennal lobe of female *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Comp. Neurol.*, 350 199-214.
- [29] Av-Ron, E. and Rospars, JP. (1995) Modeling insect olfactory neuron signaling by a network utilizing disinhibition. *Biosystems*, 36 101-108.
- [30] Homberg, U., Hoskins, SG. and Hildebrand, JG. (1995) Distribution of acetylcholinesterase activity in the deutocerebrum of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.*, 279 249-259.
- [31] Kloppenburg, P. and Hildebrand, JG. (1995) Neuromodulation by 5-hydroxytryptamine in the antennal lobe of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 198 603-611.
- [32] Ochieng, SA., Anderson, P. and Hansson BS. (1995) Antennal lobe projection patterns of olfactory receptor neurons involved in sex pheromone detection in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Tissue Cell*, 27 221-32.
- [33] Wu, W., Anton, S., Lofstedt, C. and Hansson, BS. (1996) Discrimination among pheromone component blends by interneurons in male antennal lobes of two populations of the turnip moth, *Agrotis segetum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93 8022-8027.
- [34] Anton, S., Lofstedt, C. and Hansson, BS. (1997) Central nervous processing of sex pheromones in two strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) *J. Exp. Biol.* 200 1073-1087.
- [35] Sun, XJ., Tolbert, LP. and Hildebrand, JG. (1997) Synaptic organization of the uniglomerular projection neurons of the antennal lobe of the moth *Manduca sexta*: a laser scanning confocal and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 379 2-20.

- [36] Heinbockel, T., Kloppenburg, P. and Hildebrand, JG. (1998) Pheromone-evoked potentials and oscillations in the antennal lobes of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A*, 182 703-714.
- [37] Rossler, W., Tolbert, LP. and Hildebrand, JG. (1998) Early formation of sexually dimorphic glomeruli in the developing olfactory lobe of the brain of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, 396 415-428.
- [38] Heinbockel, T. and Hildebrand, JG. (1998) Antennal receptive fields of pheromone-responsive projection neurons in the antennal lobes of the male sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A*, 183 121-133.
- [39] Nighorn, A., Gibson, NJ., Rivers, DM., Hildebrand, JG. and Morton, DB. (1998) The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferents and projection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. *J. Neurosci.*, 18 7244-7255.
- [40] Christensen, TA., Waldrop, BR. and Hildebrand, JG. (1998) GABAergic mechanisms that shape the temporal response to odors in moth olfactory projection neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 855 475-81.
- [41] Vickers, NJ. and Christensen, TA. (1998) A combinatorial model of odor discrimination using a small array of contiguous, chemically defined glomeruli. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 855 514-516.
- [42] Heinbockel, T., Christensen, TA. and Hildebrand, JG. (1999) Temporal tuning of odor responses in pheromone-responsive projection neurons in the brain of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, 409 1-12.
- [43] Kloppenburg, P., Ferns, D. and Mercer, AR. (1999) Serotonin enhances central olfactory neuron responses to female sex pheromone in the male sphinx moth *manduca sexta*. *J. Neurosci.*, 19 8172-8181.
- [44] King, JR., Christensen, TA. and Hildebrand, JG. (2000) Response characteristics of an identified, sexually dimorphic olfactory glomerulus. *J. Neurosci.*, 20 2391-2399.
- [45] Kloppenburg, P. and Heinbockel, T. (2000) 5-Hydroxy-tryptamine modulates pheromone-evoked local field potentials in the macroglomerular complex of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.*, 203 1701-1709.
- [46] Sadek, MM., Hansson, BS., Rospars, JP. and Anton, S. (2002) Glomerular representation of plant volatiles and sex pheromone components in the antennal lobe of the female *Spodoptera littoralis*. *J. Exp. Biol.*, 205 1363-1376.

- [47] Mercer, AR. and Hildebrand, JG. (2002) Developmental changes in the density of ionic currents in antennal-lobe neurons of the sphinx moth, *Manduca sexta*. *J. Neurophysiol.*, 87 2664-2675.
- [48] Kanzaki, R. and Shibuya, T. (1983) Olfactory neural pathway and sexual pheromone responses in the deutocerebrum of the male silkworm moth, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.* 18, 131-133.
- [49] Kanzaki, R., Arbas, EA., Strausfeld, NJ. and Hildebrand, JG. (1989) Physiology and morphology of projection neurons in the antennal lobe of the male moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A* 165 427-453.
- [50] Kanzaki, R. and Shibuya, T. (1986) Identification of the deutocerebral neurons responding to the sexual pheromone in the male silkworm moth brain. *Zool. Sci.* 3,409-418.
- [51] Boeckh, J., Distler, P., Ernst, KD., Hosl, D. and Malun, D. (1990) In Chemosensory information processing (Schild D ed.), Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp. 201-228.
- [52] Hansson, BS., Christensen, TA. and Hildebrand, JG. (1991) Functionally distinct subdivisions of the macroglomerular complex in the antennal lobe of the male sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, 312, 264-278.
- [53] Hansson, BS., Ljungberg, H., Hallberg, E. and Lofstedt, C. (1992) Functional specialization of olfactory glomeruli in a moth. *Science*, 256, 1313-1315.
- [54] Hoskins, SG., Homberg, U., Kingan, TG., Christensen, TA. and Hildebrand, JG.. (1986) Immunocytochemistry of GABA in the antennal lobes of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.*, 244, 243-252.
- [55] Christensen, TA., Heinbockel, T. and Hildebrand, JG. (1996) Olfactory information processing in the brain: encoding chemical and temporal features of odors. *J. Neurobiol.*, 30, 82-91.
- [56] Ochieng', SA., Anderson, P. and Hansson, BS. (1995) Antennal lobe projection patterns of olfactory receptor neurons involved in sex pheromone detection in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Tissue & Cell*, 27, 221-232.
- [57] Christensen, TA., Harrow, ID., Cuzzocrea, C., Randolph, PW. and Hildebrand, JG. (1995) Distinct projections of two populations of olfactory receptor axons in the antennal lobe of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Chemical Senses*, 20, 313-323.
- [58] Arian, ED. (1942) Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *J. Physiol.*, 100

459-473.

- [59] Freeman, WJ. (1978) Spatial properties of an EEG event in the olfactory bulb and cortex. *Neurophysiol.*, 44 586-605.
- [60] Wehr, M. and Laurent, G. (1999) Relationship between afferent and central temporal patterns in the locust olfactory system. *J. Neurosci.*, 19 381-390.
- [61] Gedeveni, DM. and Bagdassarov, EB. (1980) Analysis and simulation of the bioelectric 55 counts/sec rhythm produced by the olfactory bulb. *Int. J. Biomed. Comput.*, 11 247-256.
- [62] Freeman, WJ. (1987) Simulation of chaotic EEG patterns with a dynamic model of the olfactory system. *Biol. Cybern.*, 56 139-150.
- [63] Li, Z. and Hopfield, JJ. (1989) Modeling the olfactory bulb and its neural oscillatory processings. *Biol. Cybern.*, 61 379-392.
- [64] Grobler, T. and Erdi, P. (1991) Dynamic phenomena in the olfactory bulb. *Acta. Biochim. Biophys. Hung.*, 26 61-65.
- [65] Erdi, P., Grobler, T., Barna, G. and Kaski, K. (1993) Dynamics of the olfactory bulb: bifurcations, learning, and memory. *Biol. Cybern.*, 69 57-66.
- [66] Gelperin, A., Rhines, LD., Flores, J. and Tank, DW. (1993) Coherent network oscillations by olfactory interneurons: modulation by endogenous amines. *J. Neurophysiol.*, 69 1930-1939.
- [67] Delaney, KR., Gelperin, A., Fee, MS., Flores, JA., Gervais, R., Tank, DW. and Kleinfeld D. (1994) Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91 669-673.
- [68] Gelperin, A. (1994) Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*, 369 61-63.
- [69] Kleinfeld, D., Delaney, KR., Fee, MS., Flores, JA., Tank, DW. and Gelperin A. (1994) Dynamics of propagating waves in the olfactory network of a terrestrial mollusk: an electrical and optical study. *J. Neurophysiol.*, 72 1402-1419.
- [70] Dorries, KM. and Kauer, JS. (2000) Relationships between odor-elicited oscillations in the salamander olfactory epithelium and olfactory bulb. *J. Neurophysiol.*, 83 754-765.
- [71] Okada, K., Kanzaki, R., and Kawachi, K. (1996) High-speed voltage-sensitive dye imaging of an in vivo insect brain. *Neurosci. Lett.* 209 197-200.
- [72] Ai, H., Okada, K., Hill, ES., and Kanzaki, R. (1998) Spatio-temporal activities in the antennal lobe analyzed by an optical recording method in the male silkworm moth

- Bombyx mori*. Neurosci. lett. 258 135-138.
- [73] Okada, K. and Kanzaki, R. (2001) Localization of Odor-induced Oscillations in the Bumblebee Antennal Lobe. Neurosci. lett. 136 133-136.
- [74] 神野耕太郎 (1991) ニューロン活動の光学的測定の背景と展開. 神経科学レビュー 5 155-187
- [75] Ross, W.N., B.M. Salzberg, L.B. Cohen, A. Grinvald, H.V. Davila, A.S. Waggoner, and C.H. Wang (1977). Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and birefringence in stained giant axons : optical measurement of membrane potential. J Membr Biol, 33, 141-183.
- [76] Homberg, U., Montague, RA. and Hildebrand, JG. (1998) Anatomy of antenno-cerebral pathway in the brain of the sphinx moth *Manduca sexta* Cell Tissue Res. 254 254-281
- [77] Distler, PG. and Boeckh, J. (1997) Synaptic connections between identified neuron types in the antennal lobe glomeruli of the cockroach, *Periplaneta americana*: II. Local multiglomerular interneurons. J. Comp. Neurol., 378, 307-319.
- [78] Hansson, BS. (Ed) Insect Olfaction, Springer (1999)
- [79] Lieke, EE. (1992) Optical recording of neuronal activity in the insect central nervous system: odorant coding by the antennal lobes of honeybees. Eur. J. Neurosci, 5 49-55
- [80] Grinvald, A., Lieke, EE., Frostig, RD, and Hildesheim, R. (1994) Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by real-time optical imaging of macaque monkey primary visual cortex, J. Neurosci. May;14 2545-2568.
- [81] 城戸健一 デジタル信号処理入門 (1993) 丸善 (株)
- [82] Hamming, RW. Digital Filters (1977) Prentice-Hall
- [83] Burg, JP. (1967) Maximum entropy spectral analysis, In: Paper presented at 37th meeting of the society of exploration geophysicists, Oklahoma City.
- [84] 江原義郎 デジタル信号処理 (1991) 東京電気大学出版局
- [85] 日野幹雄 スペクトル解析 (1977) 朝倉書店
- [86] 斎藤正男 篠崎寿夫 デジタル情報処理の基礎理論 (1985) 東海大学出版会
- [87] 赤池弘次, 中川東一郎 ダイナミックシステムの統計的解析と制御 (1972) サイエンス社
- [88] Hansson, BS. ed.: Insect Olfaction, (1999) Springer
- [89] Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, BH. and Laurent, G. (1997) Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. Nature, 390 70-74.

- [90] Wehr, M. and Laurent, G., (1996) Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature*, 384 162-165.
- [91] Mercer, A., Hayashi, JH. and Hildebrand, JG. (1995) Modulatory effects of 5-hydroxytryptamine on voltage-activated currents in cultured antennal lobe neurons of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 198 613-627
- [92] Hill, ES., Iwano, M., Gatellier, L. and Kanzaki, R (2002) Morphology and physiology of the serotonin-immunoreactive putative antennal lobe feedback neuron in the mail silkmoth *Bombyx mori* *Chem. Senses* 27 475-483
- [93] So, K. and Kanzaki, R. (2000) Identification of glomerular structures in the antennal lobe of *Bombyx mori* *Zool. Sci.* 17 108(Abstr.)
- [94] 甘利俊一 神経回路網の数理 (1978) 産業図書 (株)
- [95] Waldrop, B., Christensen, TA. and Hildebrand, JG. (1987) GABA-mediated synaptic inhibition of projection neurons in the antennal lobes of the sphinx moth, *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol.* 161, 23-32.
- [96] Wehr, M. and Laurent, G. (1996) Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature*, 384 162-165.
- [97] 甘利俊一編 ニューラルネットの新展開 (1993) サイエンス社
- [98] Christensen, TA. and Hildebrand, JG. (1987) Male-specific, sex pheromone-selective projection neurons in the antennal lobes of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A* 160, 553-569.
- [99] Christensen, TA., Waldrop, BR. and Hildebrand, JG. (1998) Multitasking in the olfactory system: context-dependent responses to odors reveal dual GABA-regulated coding mechanisms in single. *J. Neurosci.* 18(15), 5999-6008.

発表文献等

A. 英 文

1. Okada K, Kanzaki R (2002) Time sequence of Odor-induced Oscillations in the Bumblebee Antennal Lobe, (投稿準備中)
2. Hill ES, Okada K, Kanzaki R (2003) Visualization of modulatory effects of serotonin in the silkworm antennal lobe. *J. Exp. Biol* 206:345-352
3. Okada K, Kanzaki R (2001) Localization of odor-induced oscillations in the bumblebee antennal lobe, *Neurosci. lett.* 136: 133-136
4. Ai H, Okada K, Hill ES, and Kanzaki R (1998) Spatio-temporal activities in the antennal lobe analyzed by an optical recording method in the male silkworm moth *Bombyx mori*, *Neurosci. lett.* 258: 135-138
5. Okada K, Kanzaki R and Kawachi K (1996) High-speed voltage-sensitive dye imaging of an *in vivo* insect brain, *Neurosci. Lett.* 209: 197-200

B. 和 文

1. 岡田公太郎, 藍浩之, 神崎亮平 (2001) 昆虫触角葉における膜電位振動現象の可視化 *日本味と匂学会誌* 8(3):597-600
2. 藍浩之, 岡田公太郎, 神崎亮平 (1998) 光学的計測法による昆虫の中脳における匂い情報処理の時空間的解析 *日本味と匂学会誌* 5(3):549-552

2. 総 説

A. 和 文

1. 岡田公太郎, 神崎亮平 (2002) 膜電位感受性色素によるニオイ情報処理過程の解析
最大エントロピー法の利用 日本生物物理学会 (印刷中)

3. 著 書 (分担執筆)

A. 和 文

1. 神崎亮平, 加沢知毅, 岡田公太郎 (2002) 昆虫脳の嗅覚系の構造「アロマサイエンスシリーズ 21 (2) においと脳・行動」外池, 渋谷編, フレグランスジャーナル社 (印刷中)
2. 岡田公太郎, 神崎亮平 (2002) 昆虫におけるにおい情報処理「アロマサイエンスシリーズ 21 (2) においと脳・行動」外池, 渋谷編, フレグランスジャーナル社 (印刷中)
3. 神崎亮平, 藍浩之, 岡田公太郎, 熊谷恒子 (1999) 昆虫の脳における匂い情報の処理と行動発現 日本味と匂学会誌 6 巻 2 号 p. 121-137

4. 学会発表など

1) 国内学会, シンポジウムでの招待講演

1. 岡田公太郎 (2002) 昆虫触角葉での匂い情報のダイナミックコーディング. 第 46 回
日本応用動物昆虫学会大会, 第 18 回 IPC 討論会 (3 月, 東京)

2) 国際学会および海外の学会での発表

1. Okada K and Kanzaki R (2001) Visualization of oscillator in neural networks of a
insect antennal lobe, *International Symposium on the Microbrain Systems*
(Tsukuba, Japan, Oct 13-14)
2. Okada K and Kanzaki R (1998) Spatial distribution of oscillation signals evoked
by olfactory stimulation in the antennal lobe of an insect by optical recording

- moths, *The 5th International Congress of Neuroethology* (San Diego, USA, Aug 23-28)
3. Okada K and Kanzaki R (1998) Visualization of oscillatory region in the antennal lobe of insects by optical recording methods, *Society for Neuroscience* (Los Angeles, USA, Nov 7-11)
 4. Ai H, Okada K and Kanzaki R (1998) Two distinct pathways to the male silkworm moth *Bombyx mori* antennal lobe shown by optical and electrophysiological recording, *The 5th International Congress of Neuroethology* (San Diego, USA, Aug 23-28)
 5. Ai H, Okada K and Kanzaki R (1998) Spatio-temporal activities in the antennal lobe analyzed by electrophysiological and optical recording methods in the male silkworm moth *Bombyx mori*, *Society for Neuroscience* (Los Angeles, USA, Nov 7-11)
 6. Kanzaki R, Ai H, Okada K and Yokokawa T (1998) High-speed voltage-sensitive dye imaging of the antennal lobe in *Bombyx mori*, *2nd International Symposium on Insect Pheromones* (WICC-International Agricultural Centre Wageningen, The Netherlands 30 March - 3 April)
 7. Okada K, Kanzaki R and Kawachi K (1997) Measurement of neural activities in a deutocerebrum of a bee brain by high-speed optical recording, *Society of Neuroscience* (New Orleans, LA, USA, Oct 25-30)

8. Ai H, Okada K and Kanzaki R (1997) Olfactory processing by the silkworm brain analyzed by optical and intracellular recording, *Society of Neuroscience* (New Orleans, La, USA, Oct 25-30)
9. Okada K, Kanzaki R and Kawachi K (1996) Visualization of neural activity in *in vivo* insect brains, *XIIIth international biophysics congress*, International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB) (Amsterdam, The Netherlands, 11-16 August). p.183
10. Okada K, Kanzaki R and Kawachi K (1996) Measurement of neural activities in an antennal lobe of a moth brain by high-speed, voltage-sensitive dye imaging, *Society of Neuroscience* (Washington, D.C., Nov 16-21) Vol. 22 p. 1079
11. Okada K, Kanzaki R and Kawachi K (1995) Optical recording with voltage-sensitive dye in an insect brain, *The 4th International Congress of Neuroethology* (Cambridge, England, Sep.3-8) p.390

3) 国内学会での発表

1. 岡田公太郎, 藍浩之, 神崎亮平 (2001) 昆虫触角葉における膜電位振動現象の可視化. 第 35 回日本味と匂学会 (10 月 3 - 5 日, 高知県立県民文化ホール)
2. 岡田公太郎, 蘇克敬, 神崎亮平 (2000) 昆虫脳匂い刺激時の振動現象の光学計測とその機能. 第 71 回日本動物学会 (9 月 21 - 23 日, 東京大学)
3. 岡田公太郎, 藍浩之, 神崎亮平 (1999) 匂い刺激で生じた昆虫脳振動応答の可視化と解析. 第 70 回日本動物学会 (9 月 27-29 日, 山形大学)
4. 岡田公太郎, 藍浩之, 佐藤彩子, 神崎亮平(1998) 匂い刺激で生じた昆虫脳振動応答領域の光学測定法による可視化. 第 69 回日本動物学会 (9 月 26-28 日, 広島大学)
5. 藍浩之, 岡田公太郎, 神崎亮平(1998) 光学的計測法による昆虫の微小脳における匂い情報処理の時空間的解析. 第 32 回日本味と匂学会 (10 月 7-9 日, 郡山市民文化センター)
6. 藍浩之, 岡田公太郎, 神崎亮平(1998) 光学的計測法, 組織学的および電気生理学的手法により示された雄カイコガ中脳における感覚ニューロンの 2 つの経路. 第 9 回日本比較生理生化学会 (7 月 9 - 11 日, 幕張)
7. 藍浩之, 岡田公太郎, 神崎亮平 (1997) 光学的計測および細胞内記録法によるカイコガ脳の匂情報経路の解析. 第 8 回日本比較生理生化学会 (7 月 18-20 日, 北海道大学)
8. 藍浩之, 岡田公太郎, 神崎亮平 (1997) 光学的計測および細胞内記録法によるカイコガ脳の匂情報経路の解析. 第 8 回日本比較生理生化学会 (7 月 18-20 日, 北海道大学)
9. 藍浩之, 岡田公太郎, 三嶋竜弥, 神崎亮平(1997) カイコガ脳における嗅覚情報経路

ー電気生理学的, 光学的計測法によるアプローチ. 第68回日本動物学会 (10月2
- 4日, 奈良女子大学)

10. 岡田公太郎, 神崎亮平 (1995) *in vivo* 昆虫脳におけるオプティカル・レコーディン
グ. 第4回バイオイメーjing学会 (10月21-22日, 慶応義塾大学)

謝辞

まず始めにこのような機会を与えてくださいました東京大学大学院情報理工学系研究科知能機械情報学専攻下山勲教授に感謝いたします。教授とは農林水産省の生物系特定産業技術研究推進機構を通じ、数々のご指導をいただきました。ありがとうございました。

また、筑波大学生物科学系神崎亮平教授は、約10年前、神経生理学を全く知らない私をこの世界に非常に強力に導いてくださいました。今日の私があるのも一重に神崎先生のご指導のおかげです。ありがとうございました。

東京大学 先端科学技術研究センター河内啓二教授は、それまでソフトウェアの開発会社でシステムエンジニアをしていた私に研究者としての道を開いていただきました。学位を持たず、昆虫の生理学にも無知な私を **ERATO** プロジェクトの河内微小流動プロジェクトの技術員、研究員として採用していただき、また、当時、昆虫では世界的にも誰も成功していなかった膜電位イメージングにトライした私を、初めて何らかの応答が得られるまでの約2年もの間、暖かく見守っていただきました。ありがとうございました。

最後に、仕事を抱え、家事、育児を行ないながら大きなサポートをしてくれた妻ひろみに感謝します。私が疲れてダウンしているときに満面の笑みで遊びを強要する娘結花に感謝します。二人は私の力の源になってくれました。ありがとう。