

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 石川 大介

オペラント条件づけとは、特定の自発行動と刺激（報酬または懲罰）との連合性を学習することで、その後その行動が生じる頻度が変化する現象である。ミクロの視点で見れば、「学習」とはより好ましい結果を得られるように神経回路が可塑的に変化することである。行動は対応した神経活動により惹起されるため、行動の背景にある神経回路の可塑的な変化を詳細に検討するためには「神経活動」と報酬（または懲罰）刺激とを連合学習させるニューラル・オペラント条件づけが行われてきた。サルは運動皮質神経やヒトの側頭葉神経の活動電位（以下、発火）が、報酬（または懲罰）により随意に制御されることが示されてきた。しかし、従来の先駆的な研究では、制御された神経の発火が様々な外界の特徴（行動、認知、意識、報酬など）と相関があることから、必ずしも神経の活動のみを選択的に制御しているとは言いきれなかった。また、神経の発火（出力）のみを記録できる手法を用いていることから、発火制御を担うシナプス活動（入力）の動態についても明らかではなかった。そこで、行動などを伴わず、発火やシナプス活動に対して純粋に条件づけを行うための実験系を構築した。

海馬は運動との直接の関連性が低く、記憶に関連した特徴的な神経活動を示し、報酬系神経核と密に連携している。これらのことから、海馬神経の神経活動を条件づけることにした。また、従来のオペラント条件づけで報酬に用いられてきた「えさ」では獲得のために運動を伴い、さらに報酬系の活性化タイミングを制御できない。代表的な報酬系神経核である外側視床下部に電気刺激を与えることで、報酬を与えることにした。さらに、自作したオンライン解析システムと組み合わせることで、リアルタイムに神経活動を解析し、特定の神経活動パターンの出現直後に報酬系を電気刺激することが可能となった。これらを組み合わせることで、外界の影響と切り離れた「脳内完結型の純粋なニューラル・オペラント条件づけ」が初めて可能となった。本研究では、ニューラル・オペラント条件づけにより、海馬神経の発火の自己制御性、自己制御のシナプス活動動態、および自己制御の調節機構を検討した。

発火（出力）の強化

覚醒下マウスの背側海馬 CA1 野神経より、細胞接着記録を行い、発火を記録した。海馬神経は大分すると 2 種類の発火パターンを示すことで知られている。一つは、単発発火、もう一つは、バースト発火である。バースト発火は、他の発火と異なり、神経回路の下流へ高確率で出力することができる。そこで、バースト発火に対する条件づけを行うことにした。「バースト発火の出現の 50 ミリ秒以内に、外側視床下部を電気刺激する」条件づけを行った結果、条件づけ開始後から徐々にバースト発火の頻度が上昇していき、15 分程度でバースト発火の頻度が 150%程度まで強

化された。一方、単発発火の頻度は強化されなかった。次に、NMDA 受容体の関与を検討するため、NMDA 受容体の阻害薬である MK801 を前処置したマウスで条件づけしたところ、強化されなかった。さらに、バースト発火の発生タイミングと無関係に報酬刺激した場合も強化されなかった。これらのことから、マウスは 15 分という短時間に、バースト発火と報酬との連合性を学習したことが示唆された。次に、強化の経路特異性について検討するために、同一個体の同側海馬 CA1 野の 2 細胞より同時に発火を記録し、任意の一方の細胞のバースト発火に選択的に条件づけを行った。その結果、条件づけされた細胞ではバースト発火頻度が強化された一方、非条件づけ細胞では強化されなかった。このことから、バースト発火の発生に関わる特定の神経回路が、選択的に強化されることが示唆された。

シナプス活動（入力）の強化

バースト発火を引き起こすのは、大きな興奮性入力である。バースト発火の強化を引き起こす背景メカニズムを検討するため、海馬 CA1 野神経より電位固定記録を行い、特定の興奮性入力に対して条件づけを行うことにした。まず、条件づけ前の興奮性入力の状態を、興奮性入力の大さの分布を解析した。バースト発火を引き起こす興奮性入力は、分布の上位 1% の強度の入力に相当する。そこで、上位 1% の興奮性入力強度を閾値として設定し、閾値を超えた強度の興奮性入力の発生に対し、50 ミリ秒以内に外側視床下部へ電気刺激することで、条件づけを行った。その結果、閾値を超えた興奮性入力の頻度は、バースト発火と同様の時間経過で強化された。一方、閾値を超えた興奮性入力の「強度」や「閾値下の」興奮性入力の頻度は強化されなかった。NMDA 型受容体拮抗薬を前処置した場合や、閾値を超えた興奮性入力の発生と無関係なタイミングで条件づけした場合には、強化されなかった。さらに、報酬以外の神経核への刺激で条件づけした群でも、強化されなかった。これらのことから、バースト発火の強化は、上位 1% の強度閾値を超えた興奮性入力、(i) 選択的に、(ii) NMDA 受容体依存的に、(iii) 報酬との連合学習により、強化されることが明らかになった。

モチベーションによる強化の調節

麻酔下でも同様の強化が生じるかどうか検討するため、ウレタン麻酔下の海馬神経のバースト発火に対して条件づけを行った。その結果、バースト発火頻度は強化されなかった。このことから、バースト発火の強化には動物の意図が関与すると考えた。内的な動機が強化に与える影響を検証するため、ドパミン D₁ 受容体の選択的阻害薬を前処置してから、条件づけを行った。その結果、強化が阻害された。次に、強制水泳試験を 2 日間行った絶望またはうつ様モデルマウスで条件づけを行ってみた。その結果、強化が障碍された。この障碍は、抗うつ薬であるフルオキセチンを 1 日目と 2 日目の試験の間に 3 回投与することにより回復した。このことから、バースト発火の強化には意図または内発的動機が関与することが示唆された。

本研究の結果から、マウスは事前トレーニングがなくても、海馬の特定の発火および興奮性シナプス活動を、短時間かつ経路選択的に強化（自己制御）できることが明らかとなった。本結果は、記録神経に投射する上流の特定の細胞集団が、報酬との連合学習でより高頻度に活動するようになった結果であると考察される。従来の研究では、神経補綴の目的で、主に運動皮質の神経

の発火パターンが注目されてきた。本研究で、皮質よりも海馬神経の活動の方が、短時間で自己制御可能であることも示唆された。このことは、海馬神経の活動の神経補綴機器への応用、精神疾患の臨床治療への応用可能性を示唆する。本研究で運動やえさを伴わず、脳内完結型のオペラント条件づけに初めて成功した。本実験系は、学習の本質である神経活動に純粹に迫る、優れた実験プラットフォームになると期待される。以上より、博士(薬学)の授与に値すると判断した。