

下等動物神経系における学習・記憶の  
メカニズムに関する生理工学的研究

1993年6月

博士(工学)

池野英利

豊橋技術科学大学



下等動物神経系における学習・記憶のメカニズム  
に関する生理工学的研究

下等動物神経系における学習・記憶の  
メカニズムに関する生理工学的研究

1993年6月

博士(工学)

池野英利

豊橋技術科学大学



## 下等動物神経系における学習・記憶のメカニズム に関する生理工学的研究

### 論文要旨

脳における高度な学習、記憶メカニズムの解明に関する研究の流れは、記憶に関連する部位や構造、さらに、神経細胞レベルでの応答特性とそのメカニズムの解明を進める段階に達している。特に、高等動物の脳と同様の記憶メカニズムが下等動物にも存在し、単純な学習、記憶が可能であることが示されて以来、細胞応答と行動の対応付けができ、個々の細胞が特定できる単純な神経系を用いた実験は、生物神経系における学習・記憶の原理を見い出すための有効なアプローチの一つとして用いられている。

エムラミノウミウシ (*Hermisenda Crassicornis*) は、光を条件刺激、回転を無条件刺激とする古典的条件付けによって連合学習を獲得し、これらの刺激の時間的関連を記憶することが示されている。この学習において、条件刺激を受容する視細胞では、学習獲得に伴い  $K^+$  電流の減少や光応答振幅の増大、光刺激終了後の応答の持続が実験的に示されている。本論文では、まず、学習獲得過程におけるイオン電流変化を膜電位固定法により測定し、記憶の形成に伴って  $K^+$  電流のみならず  $Ca^{2+}$  電流が減少することを示した。さらに、学習獲得に伴う mRNA の増大、及び、タンパク質の分子量の変化は、イオンチャネルや細胞構造の変化が生じる可能性を示唆していることから、細胞内染色法によって、学習獲得後の細胞形態の変化を調べ、樹状突起部分における体積の減少を明らかにした。この結果は、最終的に記憶が細胞間の結合状態という形で保持されることを表し、高等動物の脳において観測された“刈り込み”現象が、学習獲得の基本的メカニズムの一つであることを示すものである。

このように、生理実験によって記憶に伴う神経細胞の応答や構造の変化を求めることは可能であるが、実験によって得られるデータは、あくまで特定の条件下における現象を観測したものに過ぎず、実験結果の相互を関連付けて、そのメカニズムを説明するためには観測された現象を裏付ける原理を知る必要がある。本論文で提案する生理工学的アプローチは、生理実験、データ解析、さらに実験データとの対応付けが可能なモデルを工学的手法によって構築し、これまで漠然と捉えられていた現象や特性変化の因果関係を正確に同定し、その本質的メカニズムの解明を目指すものである。

学習獲得に伴うミウシの視細胞では、光応答振幅の増大及び光刺激終了後の脱分極状態の持続 (LLD: long-lasting depolarization) が観測されており、これは  $K^+$  チャネルのコンダクタンスの減少によって生じると考えられてきた。しかしながら、イオン電流特性と細



胞内  $\text{Ca}^{2+}$  メカニズムに基づく視細胞モデルを構築し、これによって学習獲得に伴う光応答変化を求めた結果、 $\text{K}^{+}$ コンダクタンスの減少は光応答振幅の増大を生じるのみで、LLDの発生には光刺激終了後における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の持続的な上昇が必要であることが明らかになった。一方、視細胞における学習原理に関しても、条件付けにおける刺激のパターンと学習獲得率の関係を説明し得るモデルを構築し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度値の上昇と前庭系有毛細胞からのシナプス入力に加え、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の時間的な変化が学習獲得にとって不可欠な要因であることを示した。

実験データに基づいて構築したモデルは、実験により観測された現象相互の関連やその原理の考察、さらには、新たな実験テーマを検討するための基本ツールとして活用することができる。本論文で得られた結果は、下等動物神経系の記憶メカニズムの解明に対する理工学的アプローチの有効性を示すものであり、今後、生理実験システム、コンピュータ環境、方法論が蓄積されると共に、様々な神経機能の本質的メカニズム解明に対し適用されていくものと考えられる。



# A Physiological Engineering Study on Learning and Memory Mechanisms in Nervous System of Lower Animals

## Abstract

Brain science is going to take a new turn for investigation of learning and memory mechanisms. An extensive amount of researches have revealed the sites and structures for learning and memory in the brain. Especially, characteristic changes in the neuron and synapse, called plasticities, have attracted a great deal of attention as a basis of learning. Plasticity is not only found in the brain of higher animals, but also in the nervous system of lower animals, such as insects, molluscs and so on. By using animals with simple neural networks, changings can be associated with cellular responses by conducting experiments of specific neurons. Thus, the simple nervous system can be used for analysis of cellular mechanisms and network structures, which have a capability for learning.

A marine mollusc, *Hermissenda Crassicornis*, is well known to have the ability to learn the association of two stimuli based on the classical conditioning. For this animal, light stimulus and rotation-induced turbulence are used for the association of conditioned stimulus (CS) and unconditioned stimulus (UCS), respectively. As a result of learning, physiological changes, for example; reduction of  $K^+$  current, increase of amplitude of the light response, and long-lasting depolarization (LLD) after light stimulus off, were observed in a type B photoreceptor (BPR) through the experiments. Furthermore, prolonged mRNA change and increase of 20-kDa protein were suggested to change drastically of structure in the BPR.

In this thesis, changes of ionic currents in the BPR were measured experimentally on the conditioning process. As a result of voltage-clamp measurements, the first evidence of  $Ca^{2+}$  current decrease by associative learning was presented. During the acquisition of memory, it was shown that  $K^+$  current was decreased in the early phase and later on  $Ca^{2+}$  current was decreased gradually. Furthermore, in the dendritic terminal of BPR, a decrease of volume after learning was revealed by the intracellular staining technique. This structural change is the first evidence that the temporal relation between CS and UCS is stored in the form of neural structure.



Through these experiments, some physiological changes were found, but the relation between observed phenomena and their underlying mechanisms could not be exhibited yet. In order to break the limit of experiments, a physiological engineering approach was proposed and applied to the analysis of learning and memory mechanisms in the BPR. This approach asserts that the physiological experiments and systematic analysis based on the experimental data have to be composed for analyzing complex neural mechanisms. Engineering techniques can contribute to both of these. For example, engineering techniques can be applied to improve the apparatus of the experiment and the data analysis environment. For the *Hermisenda* conditioning, a stimulus control system based on the personal computer was developed and utilized. The computerized experiment and the data analysis environment were realized by applying commercial software. Furthermore, the environment for modelling based on the experimental data were realized and the principle of experimental observations were investigated through reconstruction and simulation of the neural model.

By using this environment, the *Hermisenda* BPR model was proposed for analysis of learning and memory mechanisms. The BPR model was reconstructed based on the voltage-dependent ionic currents,  $I_A$ ,  $I_C$ ,  $I_{Ca}$  and the light induced current  $I_{lgt}$ , which were measured by the voltage clamp experiments. In order to describe the properties of time- and voltage-dependent ionic currents in the Hodgkin-Huxley type equations, the protocol of the voltage clamp experiment and a new method for parameter estimation from the current waveforms were proposed. It was shown that the nonlinear optimization was practically usable for fitting the model response to the experimental data and for estimating the model parameters. Furthermore, the cytosolic  $Ca^{2+}$  mechanism, which affects the characteristics of  $I_A$  and  $I_C$ , was introduced into the BPR model for detailed analysis. As cytosolic  $Ca^{2+}$  is known to work as a second messenger to activate protein phosphorylation, the model with the  $Ca^{2+}$  mechanism was usable for the estimation of intracellular condition.

From the experimental results, it has been obscurely regarded that the amplification and LLD in the BPR light response were generated by the reduction of  $K^+$  conductances. Thus BPR changes by learning were investigated by the model simulation and it was pointed out that the amplitude of light response could be increased by reduction of  $K^+$  currents. On the other hand, LLD could not be caused by a decrease of  $K^+$  conductances, but by the change of dynamics in the cytosolic  $Ca^{2+}$  mechanism.

Therefore, we assumed that the acquisition of learning in the BPR was proportional



to the product of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, its differentiation and binding amount of transmitter from vestibular hair cell. As a result of model simulation under this postulation, inter-stimulus interval (ISI) characteristics represent the experiments. Hence it was suggested that the acquisition of learning was progressed by the synergistic effect of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and the synapse transmission mechanisms. Furthermore, it was revealed from model responses that ISI characteristics could be caused by the time course of  $\text{Ca}^{2+}$  increase. Therefore cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  could be accomplished as a critical roll for acquisition and retention of memory in the photoreceptor.

The physiological engineering approach, which used the neural model based on experimental data, was an important method to reveal the relation between physiological phenomena and their underlying mechanisms. Learning mechanisms in the BPR were elucidated by the composite analysis of experiment and modelling. This approach is going to be supported by new experimental contrivances, analytical methods, and computing environment. It will be utilized for analysis of other kind of cellular and network mechanisms.



# 目次

1 序論	1
1.1 神経機構に対する生理工学的アプローチ	1
1.2 学習・記憶のメカニズム解明を目指して	2
1.3 本論文の構成	3
2 学習・記憶の神経機構	7
2.1 はじめに	7
2.2 生物神経系における情報処理とそのメカニズム	7
2.2.1 神経細胞の電気的特性と情報伝達	8
2.2.2 細胞内分子メカニズムと情報処理	10
2.3 脳における記憶と可塑性	10
2.3.1 脳における記憶の座	12
宣言的記憶の座	12
手続的記憶の座	14
2.3.2 長期増強, 長期抑圧とその分子メカニズム	16
2.4 下等動物における記憶とそのメカニズム	18
2.4.1 アメフラシにおける学習とそのメカニズム	19
2.4.2 ウミウシにおける古典的条件付けと学習・記憶のメカニズム	21
学習の獲得に伴う行動の変化	22
視細胞における特性変化	25
学習獲得の分子メカニズムと細胞の形態変化	32
2.5 まとめ	35
3 生理工学的研究のためのシステム環境	39
3.1 はじめに	39
3.2 生理工学的アプローチと環境	39



3.3	古典的条件付け訓練システム	42
3.3.1	ハードウェア構成	42
3.3.2	ソフトウェア仕様	44
3.3.3	使用結果	46
3.4	生理実験・データ解析システム	46
3.5	モデリング・シミュレーションシステム	50
3.6	まとめ	54
4	イオン電流機構に基づく細胞のモデル記述	57
4.1	はじめに	57
4.2	神経細胞のイオン電流モデル	57
4.2.1	イオン電流特性とそのモデル記述	57
4.2.2	イオン電流モデル記述と電位依存パラメータ	59
4.2.3	イオン電流モデルによる解析	60
4.3	イオン電流モデルのパラメータ推定法	62
4.3.1	膜電位依存パラメータ	63
4.3.2	膜電位固定実験プロトコル	64
	● プロトコル 1	64
	● プロトコル 2	64
	● プロトコル 3	64
	● プロトコル 4	65
4.3.3	パラメータ推定法	65
	● 第 1 段階 (過分極側における $h_{\infty}(V)$ )	65
	● 第 2 段階 (過分極側における $\tau_h(V)$ )	65
	● 第 3 段階 (脱分極側における全パラメータ)	67
	● 第 4 段階 (過分極側における $m_{\infty}(V)$ , $\tau_m(V)$ )	68
	● 第 5 段階 (膜電位パラメータの関数近似)	69
4.3.4	数値実験	70
	模擬実験データ	70
	推定結果	70
4.4	まとめ	77
5	ウミウシ B 型視細胞のイオン電流モデル	81
5.1	はじめに	81
5.2	実験条件	81



5.3	B 型視細胞のイオン電流特性とモデル記述	82
5.3.1	$I_A$ (急速活性, 不活性型カリウム電流)	83
5.3.2	$I_C$ (カルシウム依存性カリウム電流)	85
5.3.3	$I_{Ca^{2+}}$ (カルシウム電流)	90
5.3.4	$I_{lgt}$ (光活性化電流)	90
5.4	細胞内カルシウム濃度変化のモデル記述	93
5.4.1	細胞内カルシウム濃度変化のメカニズムとそのモデル	93
5.4.2	イオン電流に対する細胞内カルシウム濃度変化の影響	95
5.5	モデルシミュレーション	95
5.5.1	膜電流とイオン電流成分	95
5.5.2	光刺激に対する細胞応答	97
5.6	まとめ	99
6	視細胞における学習獲得とそのメカニズム	101
6.1	はじめに	101
6.2	学習メカニズムのモデル解析	102
6.3	学習獲得による視細胞応答の変化	104
6.4	学習における刺激間隔依存特性	106
6.4.1	前庭系有毛細胞とシナプスのモデル記述	108
6.4.2	刺激間隔依存特性と細胞内カルシウム	112
6.5	細胞, シナプスメカニズムと記憶	116
6.6	まとめ	118
7	結論	119
A	B 型視細胞のイオン電流モデル記述	123
A.1	A 電流 (急速活性・不活性化 $K^+$ 電流): $I_A$	123
A.2	C 電流 ( $Ca^{2+}$ 依存性 $K^+$ 電流): $I_C$	123
A.3	$Ca^{2+}$ 電流: $I_{Ca^{2+}}$	123
A.4	光活性化電流: $I_{lgt}$	124
A.5	漏れ電流: $I_L$	124
A.6	細胞内 $Ca^{2+}$ 機構	124
A.7	細胞応答 (細胞膜電位): $V$	125



B 前庭系有毛細胞, シナプスのモデル記述	127
B.1 有毛細胞モデル応答: $V_H$ . . . . .	127
B.2 有毛細胞-視細胞間シナプスモデル: $T_R$ . . . . .	127
謝 辞	129
参 考 文 献	131
本論文関連研究業績目録	147
一般研究業績目録	153

## 目 次

第1章 序論	1
1.1 聴覚の機能と平衡の関連 . . . . .	1
第2章 学習-記憶の神経機構	9
2.1 神経回路の構造と情報の流れ . . . . .	9
2.2 エンテロ-ミセラルネットワークにおいて用いられる回路モデル . . . . .	9
2.3 シナプスにおける情報の伝達の手続きメカニズム . . . . .	11
2.4 記憶に関連する回路の構造 . . . . .	13
2.5 センサの古典的的条件付け神経回路 . . . . .	15
2.6 CRF におけるシナプス伝達増大の分子メカニズム . . . . .	17
2.7 アップタインの感覚-運動不協調 . . . . .	20
2.8 アメフランシの感覚における学習の分子メカニズム . . . . .	21
2.9 エムミノウモウシ . . . . .	23
2.10 エムミノウモウシを用いた古典的的条件付け . . . . .	23
2.11 エムミノウモウシにおける連合学習回路の構造 . . . . .	24
2.12 学習回路による感覚の変化 . . . . .	25
2.13 アメフランシの感覚における連合学習回路 . . . . .	27
2.14 アップタインの感覚-運動系 . . . . .	28
2.15 学習回路による感覚の変化 . . . . .	29
2.16 学習回路による運動の変化 . . . . .	30
2.17 学習回路による感覚と運動の変化 . . . . .	31
2.18 アップタインに作るロシウム回路-V 回路の変化 . . . . .	31
2.19 アメフランシのための古典的的条件付け回路可塑性に対するイオン電流変化 . . . . .	33
2.20 アメフランシによるロシウム回路の学習回路メカニズムのモデル . . . . .	34
2.21 アメフランシによるロシウム回路の学習回路メカニズムのモデル . . . . .	35



# 目 次

## 第1章 序論

1.1 本論文の構成と事項の関連 . . . . .	4
----------------------------	---

## 第2章 学習・記憶の神経機構

2.1 神経細胞の構造と情報の流れ . . . . .	8
2.2 人工ニューラルネットワークにおいて用いられる細胞モデル . . . . .	9
2.3 シナプスにおける情報伝達の分子メカニズム . . . . .	11
2.4 記憶に関連する脳の部位 . . . . .	13
2.5 ウサギの古典的条件付け神経回路 . . . . .	15
2.6 LTP におけるシナプス伝達効率増大の分子メカニズム . . . . .	17
2.7 アメフラシの感覚-運動系神経回路 . . . . .	20
2.8 アメフラシ介在細胞における学習の分子メカニズム . . . . .	20
2.9 エムラミノウミウシ . . . . .	22
2.10 エムラミノウミウシを用いた古典的条件付け . . . . .	23
2.11 エムラミノウミウシにおける連合学習獲得の特性 . . . . .	24
2.12 学習獲得による腹足長の変化 . . . . .	26
2.13 ウミウシ神経系における細胞間シナプス結合 . . . . .	27
2.14 ウミウシの視覚・前庭系 . . . . .	28
2.15 学習獲得による視細胞光応答の変化 . . . . .	29
2.16 学習獲得による膜電流の変化 . . . . .	30
2.17 条件付け学習獲得に伴うカルシウム電流の変化 . . . . .	31
2.18 学習獲得に伴うカルシウム電流 I-V 特性の変化 . . . . .	31
2.19 学習獲得のための古典的条件付け訓練回数に対するイオン電流変化 . . . . .	32
2.20 Alkon によるウミウシ視細胞の学習獲得メカニズムのモデル . . . . .	34
2.21 Crow によるウミウシ視細胞の学習獲得メカニズムのモデル . . . . .	35



2.22	視細胞内におけるタンパク質の分子量の変化 . . . . .	36
2.23	連合学習獲得に伴う樹状突起の形態変化 . . . . .	36
2.24	樹状突起の体積変化の測定 . . . . .	37
2.25	学習獲得に伴う樹状突起の体積変化 . . . . .	38

### 第3章 生理工学的研究のためのシステム環境

3.1	生理工学的研究とその環境 . . . . .	40
3.2	インターフェース部のブロック図 . . . . .	43
3.3	制御ソフトウェアのブロック図 . . . . .	44
3.4	条件設定を行うデータシート画面の一部 . . . . .	45
3.5	刺激条件の設定画面とタイムチャート . . . . .	47
3.6	ウミウシ条件付けシステム . . . . .	48
3.7	生理実験システム . . . . .	49
3.8	生理実験, データ解析, シミュレーションのソフトウェア環境 . . . . .	50
3.9	会話型連続系シミュレータ: SIGMA の構造 . . . . .	52
3.10	SIGMA による Hodgkin-Huxley モデルの記述とシミュレーション . . . . .	53
3.11	CS2 システム構成図 . . . . .	54
3.12	CS2 による Hodgkin-Huxley モデル記述 . . . . .	55

### 第4章 イオン電流機構に基づく細胞のモデル記述

4.1	Hodgkin-Huxley によるヤリイカ巨大軸索の神経興奮のモデル記述 . . . . .	58
4.2	保持電位に対するイオン電流振幅の変化 . . . . .	66
4.3	膜電位固定の繰り返しによる $\tau_h$ の測定 . . . . .	67
4.4	脱分極側への膜電位固定に対する電流波形 . . . . .	68
4.5	過分極側における活性化パラメータ値の推定 . . . . .	69
4.6	4つの膜電位固定プロトコルとそれによって得られる膜電位依存パラメータの 範囲 . . . . .	71
4.7	パラメータ推定に用いたナトリウム電流模擬実験データ . . . . .	72
4.8	パラメータ推定に用いたカリウム電流模擬実験データ . . . . .	73
4.9	ナトリウム電流における膜電位依存パラメータの推定結果 . . . . .	75
4.10	カリウム電流における膜電位依存パラメータの推定結果 . . . . .	76
4.11	推定モデルのイオン電流波形 . . . . .	78
4.12	推定モデルの細胞応答 . . . . .	79



## 第5章 ウミウシ B 型視細胞のイオン電流モデル

5.1	ウミウシ B 型視細胞における膜イオン電流 . . . . .	84
5.2	ウミウシ B 型視細胞の等価回路モデル . . . . .	85
5.3	膜電位固定実験により測定された $I_A$ . . . . .	86
5.4	$I_A$ における活性化, 不活性化パラメータの定常値の膜電位依存特性 . . . . .	87
5.5	$I_A$ における活性化, 不活性化パラメータの時定数の膜電位依存特性 . . . . .	87
5.6	$I_A, I_{K+}$ のブロックにより抽出された $I_C$ . . . . .	88
5.7	$I_C$ における活性化, 不活性化パラメータの定常値の膜電位依存特性 . . . . .	89
5.8	$I_C$ における活性化, 不活性化パラメータの時定数の膜電位依存特性 . . . . .	89
5.9	カルシウム電流の測定結果と I-V 特性 . . . . .	91
5.10	光活性化電流 $I_{igt}$ . . . . .	92
5.11	B 型視細胞内カルシウム濃度変化メカニズムのモデル . . . . .	94
5.12	ウミウシ B 型視細胞における膜電流 . . . . .	96
5.13	光活性化電流モデル応答 . . . . .	96
5.14	時間幅の異なる光刺激に対する細胞応答 . . . . .	97
5.15	光応答時のイオン電流成分及び細胞内カルシウム濃度の時間的变化 . . . . .	98

## 第6章 視細胞における学習記憶とそのメカニズム

6.1	学習獲得に伴う B 型視細胞モデルの光応答変化 . . . . .	103
6.2	学習獲得による視細胞光応答の変化 . . . . .	104
6.3	カリウムコンダクタンス変化に伴う B 型視細胞の特性変化 . . . . .	105
6.4	細胞内カルシウム機構の特性変化によって再構成された学習獲得後の視細胞 応答 . . . . .	107
6.5	電流固定下における有毛細胞応答 . . . . .	109
6.6	B 型視細胞における連合学習獲得のモデル . . . . .	110
6.7	有毛細胞-B 型視細胞モデルにおける学習獲得の ISI 特性 . . . . .	112
6.8	学習獲得の刺激時間依存特性を調べるための CS, UCS プロトコル . . . . .	113
6.9	学習獲得の刺激時間依存特性 . . . . .	114
6.10	学習獲得過程における応答の時間的变化 . . . . .	115
6.11	ウミウシ視細胞における学習獲得の分子メカニズム . . . . .	117



# 表 目 次

## 第 2 章 学習・記憶の神経機構

- 2.1 下等動物を用いた学習・記憶に関する研究 . . . . . 19

## 第 4 章 イオン電流機構に基づく細胞のモデル記述

- 4.1 生理実験データに基づく細胞のモデル記述 . . . . . 61  
4.2 提案した方法により得られたナトリウム, カリウム電流の Hodgkin-Huxley 型  
方程式記述 . . . . . 74

## 第 6 章 視細胞における学習獲得とそのメカニズム

- 6.1 ウミウシ学習メカニズムのモデル解析 . . . . . 102



# 第 1 章

## 序論

### 1.1 神経機構に対する理工学的アプローチ

最近の半導体、コンピュータ技術の急速な発展は、高度な情報化社会を実現した反面、我々が日常ごく自然に扱っている情報量の膨大さ、その処理機構の複雑さを提示し、このような情報処理システムを工学的に実現することの困難さを浮き彫りにする結果となった。従来より、人間のような感覚、記憶能力を持つ機械の工学的実現を目指した研究は数多く行われ、コンピュータの演算速度の向上、記憶容量の増大に伴い、いずれ実現可能であると単純に考えられてきた時期もあった。しかしながら、ノイマン型コンピュータが我々の記述したアルゴリズムに従ってデータの処理を進めるマシンに過ぎないことが再認識されるにつれて、生物神経系における情報処理メカニズムの解明を目指した基礎的研究の必要性が明らかになってきた [44], [106].

生物における情報処理機能は、脳・神経系における膨大な数の神経細胞の状態変化によって実現されるものであり、そのメカニズムに関しては、従来より解剖学、神経生理学、心理学や生化学などの学問分野において研究が進められてきた [60], [84], [104]. 神経細胞における活動状態は、微小電極を用いた電位応答測定やパッチクランプ法によって、細胞内の電位変化や細胞膜に存在するイオンの通過する小孔(イオンチャネル)の開閉状態変化などの物理現象として捕えることができる。さらに最近では、神経細胞の活動を修飾、制御する細胞内メカニズムやシナプスにおける伝達物質の放出、受容過程などに関して分子レベルでの理解が進められており、脳・神経系における情報処理を支えるミクロなメカニズムが明らかにされつつある [64].

細胞活動を発現するメカニズムが、このような分析的アプローチによって、徐々に解きほぐされていく一方で、実験によって観測された神経活動の機能的意義や、いわゆる神経



系における情報処理アルゴリズムは、依然、推測の域を脱していない。工学は物理現象の本質的なメカニズムを理解し、さらにそれを人工的に実現することを目的に、システム解析理論やコンピュータシミュレーション技術などの数多くの方法論や手法を確立してきた。本論文では、地球上に存在する究極のシステムとも言うべき脳・神経系の解析に対して、単なる実験データの蓄積を乗り越え、その本質的なメカニズムに迫る方法の一つとして、工学的発想に基づく新たなアプローチである生理工学的研究を提唱し、これを下等動物における学習・記憶のメカニズム解明に対して適用する。

現在、多くの研究者によって進められている、人工ニューラルネットワーク研究も工学的手法を脳研究に適用する試みの一つと言えるが、特定の機能を実現したネットワークが実際の神経系に対応付けられるわけではなく、実験データとの関連の下で脳・神経系のメカニズムを説明できるとは限らない。本論文で提唱する生理工学的アプローチによる神経メカニズムの解析は、生理実験から理論的考察に至る研究プロセスに対して工学的手法を積極的に導入し、学際的指向の高い神経科学の分野において、工学者の発想に基づく基礎研究を進めるものである。すなわち、神経系を高度な情報処理システムとしてとらえ、その機能解明のための実験手法の開発、改良を進めていくと共に、実験データの解析に対してシステム解析理論やモデルシミュレーション技法を導入し、観測された現象の裏に潜む本質的なメカニズムを探るものである。

## 1.2 学習・記憶のメカニズム解明を目指して

生物が時々刻々と変わりゆく環境に適応し、生き抜くためには、学習・記憶の能力は欠かすことのできない重要な機能である。しかしながら、脳・神経系における最も基本的なこのメカニズムに関しても、その本質は未だ神秘のベールに包まれたままである。例えば、ほとんど無限の容量に思える人間の記憶が、脳内のどの部分に、いかにして蓄えられ、また、どのようにして瞬時に思い出されるのかなど、多くの謎が残されている。現在、哺乳動物など発達した脳における記憶メカニズムに関しては、大脳辺縁系や小脳を中心に研究が進められている [135]。一方、比較的単純な神経系を持つ下等動物を用いて、神経系における記憶の基本的なメカニズムを探ろうとする研究では、刺激の繰り返しによる感作や慣れ、複数刺激による連合学習に伴う行動変化と細胞やシナプス特性変化が対応付けられ、行動の変化に対応した神経系の学習メカニズムが調べられている [55], [124]。

エムラミノウミウシ (*Hermisenda Crassicornis*) は、連合学習の獲得に伴う神経細胞の特性変化とこれによって生じる行動変化の対応付けがなされている数少ない動物の一つであり、学習・記憶能力を持つ神経系のサンプルとして用いられている [9], [15]。すなわち、



ウミウシ神経系においては、学習獲得によって光刺激を受容する視細胞応答に変化が見られ、その影響が神経系の構造、細胞間のシナプス結合状態から、最終的には学習後の行動変化に至ることが明らかにされた。しかしながら、実験により得られるデータは、神経系の応答特性に関する断片的な情報に過ぎず、そのメカニズムに関しては、一般に、実験データからモデルを構築し、これを用いた説明付けがなされている。ウミウシの学習に関しても実験的知見に基づくモデルが提案されているが、実験データと対応付けられた定量的なモデル解析は行なわれておらず、学習に伴う細胞応答の変化の本質的メカニズムや応答変化相互の関連は不明確なままである。

本論文においては、ウミウシの連合学習に対する生理工学的研究として、実験的に観測される細胞応答特性を裏付けるモデルの構築及びこれを用いた学習メカニズムの解析をメインテーマとして研究を進めた。まず、生理実験からデータ解析、モデル構築に至るハードウェア及びソフトウェアに関して、生理工学的研究を展開していくための総合的なシステムという立場で実験、データ解析環境の整備を進めた。モデル構築の基礎となるデータは主として膜電位固定実験によって収集し、実験データからイオン電流モデルを構築する方法として、非線形最適化法を用いたパラメータ推定手法を提案した。さらに、イオン電流の特性に影響を及ぼすと共に細胞内セカンドメッセンジャーとして機能する細胞内カルシウムに関して、その濃度変化を記述するモデルを構築し、学習獲得後に見られる細胞応答変化に関して、イオン電流と細胞内カルシウムメカニズムの立場から考察を行なった。

最近では、イオン電流や細胞内分子メカニズムに基づく細胞のモデル記述が、神経システムの解析にとって有効な方法であることが認識されつつあり、様々な神経系に対し適用されている。また、パッチクランプ法によって微小な細胞のイオン電流測定や光学的測定法を用いた細胞内カルシウム濃度変化の実測も行われており、生理実験データに基づくモデルを用いた生理工学的解析手法は、様々な神経系の本質的メカニズムの解明に対して適用されると共に、生物の神経機構を工学的に応用するための基礎的研究となるであろう。

### 1.3 本論文の構成

図1.1は、本論文の構成と各事項の関連を示したものである。生物の学習・記憶に関しては、脳・神経生理学、心理学をはじめとする多くの分野で、膨大な研究成果が蓄積されている。特に、神経生理学では記憶を獲得、保持、再生する神経機構に対して、分析的なアプローチで、脳における記憶部位、記憶に関連すると思われる細胞応答の変化などが見い出されている。

外界からの刺激に基づく情報は、基本的には、脳・神経系における神経細胞やシナプス



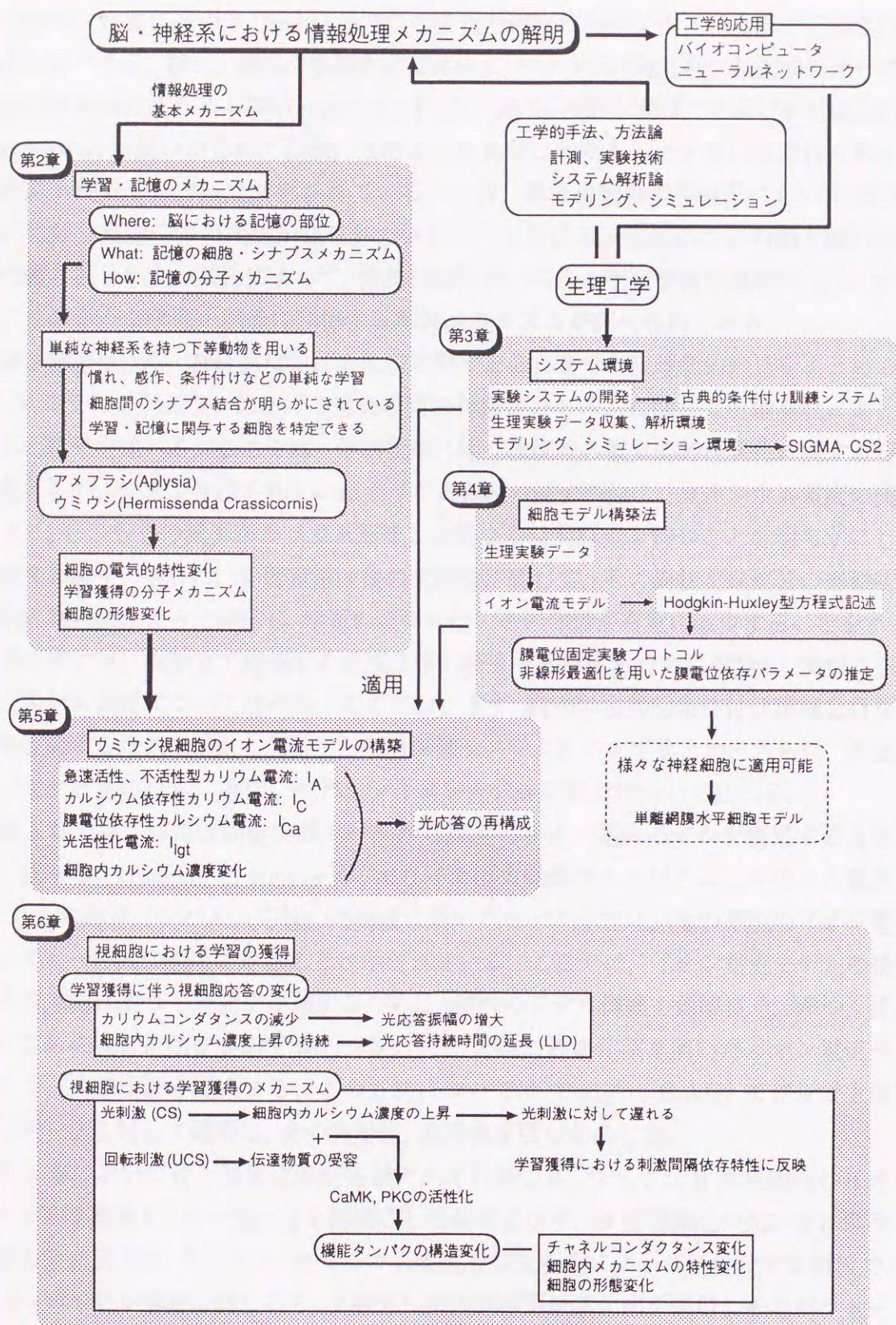


図 1.1 本論文の構成と事項の関連.



の可塑的な性質に基づき、細胞応答特性の変化や細胞の形態変化という形で記憶されると考えられている。特に、海馬や小脳などにおいて、テタヌス刺激の後、数週間のオーダーで細胞応答が増強される LTP(Long Term Potentiation) や逆に抑圧される LTD(Long Term Depression) が見いだされて以来、このような長期にわたるシナプスの伝達特性変化のメカニズムが分子レベルで解析されている。一方、無脊椎動物の神経系においては、感作、慣れに伴う細胞応答の変化が知られていたが、さらに本来関連のない刺激を短い時間間隔で繰り返し与えることによって、古典的条件付けによる連合学習を獲得することが示され、このような学習・記憶に関係する神経メカニズムが調べられている。

第2章では、脳・神経系における記憶に関するこれまでの生理学的知見をまとめると共に、エムラミノウミウシにおける連合学習の神経メカニズムに関して生理実験によって得られた結果を述べる。ここでは、学習獲得に伴う視細胞の電気的特性変化に関する新たな知見として、従来より示されていたカリウム電流の減少の他に、カルシウム電流の減少が起り、しかもその減少がカリウム電流とは異なる時間経過を持つことを明らかにした実験結果を示す。さらに、学習獲得前後の視細胞に関して、その樹状突起部分の形態変化を細胞内染色法によって測定し、学習の獲得に伴いその体積が有意に減少することを示した。

第3章では、本論文で提唱する生理工学的研究を促進するために開発し、実際に適用したシステム環境について述べる。ここでは、まず、動物の古典的条件付け訓練を行なう環境を改善する目的で新たに開発した刺激制御システムについてまとめ、さらに、本論文で用いたデータの収集、解析、モデルシミュレーション環境について述べる。

第4章では、膜電位固定実験データから細胞のイオン電流モデルを構築する方法について述べる。Hodgkin と Huxley が、ヤリイカ巨大軸索のナトリウム、カリウム電流の記述、さらに神経インパルス応答の再構成に用いたモデル記述は、他の細胞のイオン電流に対しても一般的に適用できることが示されている。ここでは、イオン電流モデルの構築及びこの方法に基づく研究を推進するために、細胞のモデル構築を効率良く、かつ、正確に行うための膜電位固定実験プロトコル、及び、非線形最適化法を用いたイオン電流モデルパラメータ推定法を提案する。この方法については、Hodgkin-Huxley モデルで生成した疑似データに対して適用し、その実用性、有効性を明らかにした。

第5章においては、膜電位固定実験データに基づき、ウミウシ B 型視細胞のイオン電流モデルを構築し、その光応答を再構成した結果を示す。B 型視細胞の光応答に関与する主要な電流成分は、カリウム、カルシウム電流及び光刺激によって活性化する電流であり、これらのモデル構築に関しても、実験データに非線形最適化法を適用しそのパラメータを抽出した。さらに、カリウム電流に影響を及ぼすと共に細胞内メカニズム活性状態の指標でもある、細胞内カルシウムについて、バッファとポンプに基づくモデルによる記述を行



なった。

第6章では、第5章において提案したモデルを用いて、生理実験で観測された視細胞応答特性変化の相互関連について考察を行ない、学習獲得後に見られる光応答振幅の増大がカリウム電流の減少に起因し、光刺激終了後の応答の持続は細胞内カルシウムが増大した状態が持続することによって生じることを示した。さらに、視細胞における学習獲得に関して視細胞-前庭系有毛細胞モデルを構築し、視細胞内におけるカルシウム濃度変化とシナプス入力に基づく学習獲得メカニズムによって、実験結果と同様の刺激間隔に依存した学習獲得特性が得られることを示した。

第7章では、本論文で得られた知見を基に神経系における学習・記憶の細胞メカニズムについてまとめ、結語とする。



## 第 2 章

# 学習・記憶の神経機構

### 2.1 はじめに

生物における学習・記憶、感覚、運動制御などの高度な情報処理機能は、神経細胞を基本素子とする神経系によって実現されている。神経細胞は、外界からの刺激や運動系への指令情報などを伝搬、処理するために特殊化した細胞であり、その情報処理機能に対しては、細胞膜を通過するイオン電流特性や細胞内における分子メカニズムなどが複雑に関与していると考えられている。すなわち、各種の生理、生化学実験によって得られる実験データと細胞応答特性との関連、さらにそれらの背後にあるメカニズムを解明することが、神経細胞が実現する情報処理機構の真の理解のためには不可欠である。特に、記憶は情報処理の基礎をなす重要な機能であり、その獲得(学習、記銘)、保持、想起のメカニズムに関して、神経細胞やシナプスにおける可塑的特性を中心に、膨大な実験、解析が進められてきた。本章では、まず、従来からの生理実験によって得られた知見に基づき、細胞、シナプスにおける可塑性を中心に、脳における記憶機構についてまとめる。一方、実験が比較的容易な下等動物の神経系を対象とする研究は、神経細胞レベルでの学習メカニズムを解明するためのアプローチの一つとして用いられている。本章の後半では、学習獲得に伴うウミウシ視細胞のイオン電流特性、形態の変化を生理実験によって明らかにした結果について述べる。

### 2.2 生物神経系における情報処理とそのメカニズム

19世紀後半に開始された生物電気に関する研究以来、神経系における信号の生成や情報の伝搬については、主として、その電気現象に着目した測定、解析が進められてきた[104]、



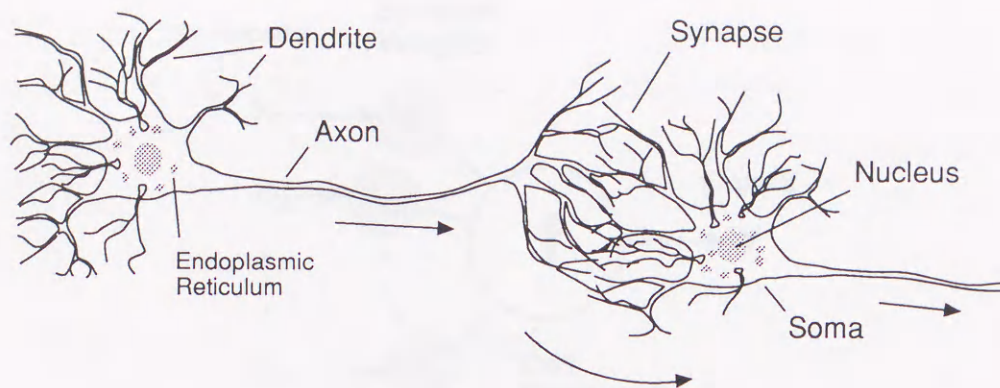


図 2.1 神経細胞の構造と情報の流れ。神経細胞は、細胞体 (Soma) から軸索 (Axon)、樹状突起 (Dendrite) が延長した特異的な形態を持つ。細胞体は、核 (Nucleus) や小胞体 (Endoplasmic Reticulum) など、細胞機能を発揮するために必要な機構を備えている。矢印は情報の流れを表す。

[88], [152]. 金属, ガラス微小電極を用いた細胞外, 細胞内の電位変化の測定や膜電位固定実験法によるイオン電流の測定は, 細胞の状態変化を電位や電流として捉えることを可能にし, さらに, パッチクランプ法の適用により, 細胞の電気的特性発現のメカニズムがイオンチャネルのレベルで測定, 議論されるようになった。また, 分子生物学, 遺伝子学的実験手法の発達に伴い, 細胞膜の構成やその機能を修飾する細胞内分子メカニズムに関しても, 多くの知見が得られている [93], [122].

### 2.2.1 神経細胞の電気的特性と情報伝達

神経細胞の形態や大きさは, その種類や部位によって異なるが, 一般に図 2.1 に示すように, 核を含む細胞体 (Soma) から多数の樹状突起 (Dendrite) と一本の軸索 (Axon) が延長した構造を持つ。神経細胞は他の細胞からのシナプス入力を, 感覚細胞は外界からの刺激を受容, 伝搬する機能を備えている。刺激やシナプスにおける伝達物質は, 細胞膜のイオンチャネルにおけるイオン透過性の変化, 細胞内の分子メカニズム活性化などを引き起こす。これによって, 細胞外液に対する細胞体内部の電位 (細胞膜電位) が変化し (膜電位応答), この電位変化に応じた頻度の活動電位が軸索において発生, 伝搬する。このような膜電位の変化は, 細胞内にガラス微小電極を刺入することによって比較的簡単に測定できることから, 従来より細胞応答のモニタとして広く用いられている。膜電位は細胞の状態を反映したものであり, 単一の細胞あるいは細胞群が保持, 伝搬する情報表現やその処理メカニズムの解明を目指して, 膜電位応答に関する実験, 解析が行なわれている。



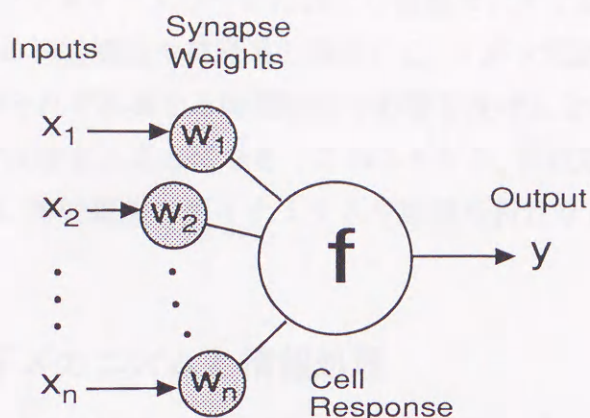


図 2.2 人工ニューラルネットワークにおいて用いられる細胞モデル。  $x_i$ : 別の細胞からの入力,  $w_i$ : シナプスにおける伝達効率を表す係数,  $f$ : 出力を決める関数,  $y$ : 細胞の出力。

シナプスにおいては、軸索を伝搬してきた活動電位に同期して神経伝達物質の放出が起こる。シナプス後細胞においては、伝達物質の受容に伴って、イオンチャネルにおけるイオン透過性の変化や細胞内分子メカニズムの活性化がもたらされ、膜電位の上昇(脱分極応答)や抑圧(過分極応答)が生じる。シナプス後細胞において脱分極応答を生じるシナプスは興奮性シナプスと呼ばれ、細胞体における膜電位の上昇、さらには軸索における活動電位の発生を促し、一方、過分極応答を生じる抑制性シナプスは活動電位発生を抑圧する効果を持つ。このようなローカルな膜電位変化は樹状突起内を伝搬し、その結果として細胞体の膜電位変化、さらに軸索における活動電位を生じる。

以上のような神経細胞の基本的な応答特性から、その情報処理機構は、樹状突起、細胞体さらには軸索における膜電位発生、伝搬の過程で実現されていると考えられ、細胞の膜電位応答特性を単純化した細胞モデルを結合することによって神経回路モデルを構成し、神経系における高度な機能の解明、人工的实现、応用をめざす研究が進められている[5],[29],[139]。このような研究では、神経細胞のモデルとして、図 2.2のように、シナプスにおける情報伝達を重み付き加算、細胞体における膜電位変化の統合、軸索への伝搬過程を、入力の総和と線形または非線形関数によって表したものが用いられている。すなわち、細胞モデルの入出力関数は次式のように表される。

$$y = f\left(\sum_i w_i \cdot x_i\right) \quad (2.1)$$

$f$ : 入出力関係を表す関数

(ステップ関数, シグモイド関数など)



このように、人工ニューラルネットワークにおける細胞モデルでは極めて単純な記述が用いられているが、実際の神経細胞や神経系の機能には、イオン電流の非線形特性や細胞内分子メカニズムなどがそれぞれ異なる時間特性で影響を及ぼし合い、その膜電位応答にもそれらの非線形特性が反映することになる。このことから、神経系における情報処理機構の真の理解のためには、神経細胞のダイナミクスや非線形特性などを考慮した実験、解析が必要である。

### 2.2.2 細胞内分子メカニズムと情報処理

細胞間のシナプスの多くは神経伝達物質を用いた化学シナプスであり、その特性や機構には細胞内分子メカニズムが深く関与している。シナプスにおける伝達物質の放出には、シナプス前細胞終末部の脱分極化と通常はこれに伴う細胞内カルシウム濃度の上昇が必要である。これによって、図2.3のようにシナプス小胞 (Synaptic Vesicle) の活性膜への移動が促され、小胞膜と活性膜の融合によってシナプス間隙 (Synaptic Cleft) に伝達物質 (Transmitter) が放出される。この伝達物質は、シナプス後膜 (Postsynaptic Membrane) 上にある伝達物質受容体 (Receptor) と結合することによって受容され、細胞膜応答を生じる。なお、細胞膜にある伝達物質受容体には、イオンチャネルに直結した構造を持ちチャネル特性に直接作用するものと、GTP 結合タンパクを介して細胞内の分子メカニズムを活性化させるものなどが見いだされている [155]。

さらに、膜電位応答を特徴付けるイオン電流特性に対しても、細胞内の分子メカニズムが強く反映しており、細胞内におけるカルシウム濃度によって特性が変化するカルシウム濃度依存性カリウム電流などが存在することが知られている。このように、細胞膜電位が生じる過程には細胞内カルシウムを中心とする分子メカニズムが介在しており、その機能解明が神経細胞における情報処理過程の真の理解にとっては不可欠である。また、神経系の学習、記憶機構は、細胞、特にシナプスにおける特性変化 (可塑性) によって実現されていると考えられているが、このメカニズムを理解する上でも電気的特性の測定、解析だけでなく、その特性に影響を及ぼしている分子メカニズムの解明が必要である。

## 2.3 脳における記憶と可塑性

生物を存在せしめる基本的な情報は、遺伝子という形で保持され、子孫へと受け継がれていく。一方、生後の個体が環境に適応し、生存していくための機能は、脳・神経系において、外界からの刺激を受容し、これに対して反応することによって獲得、あるいは実現されていく。脳・神経系の情報処理において基本となるのは学習・記憶の機能であり、記憶



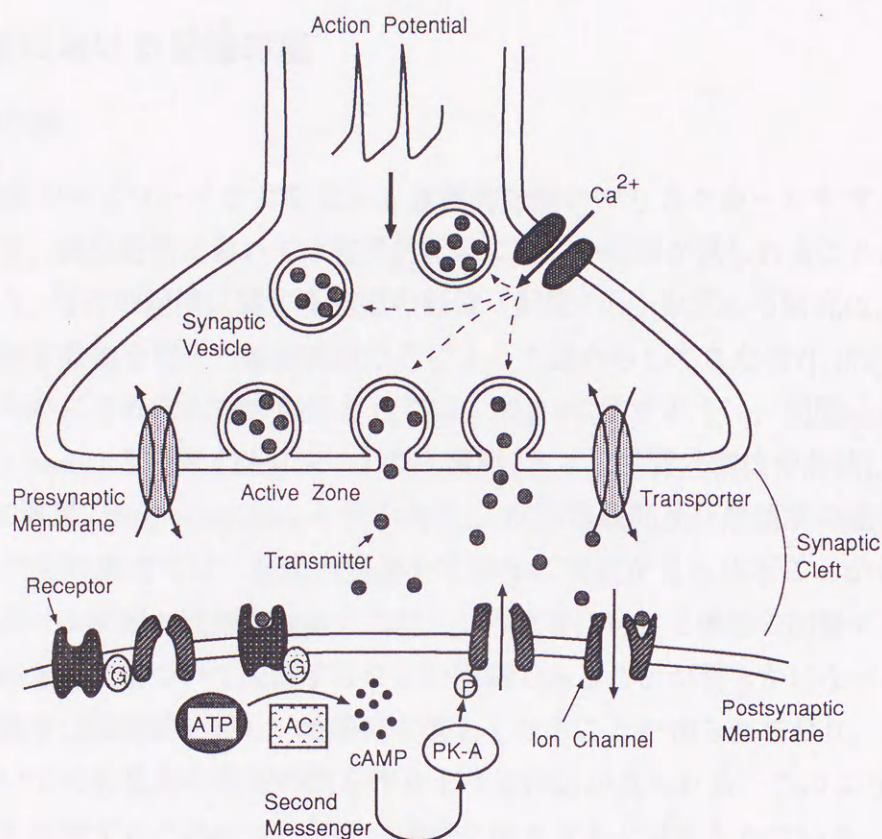


図 2.3 シナプスにおける情報伝達の分子メカニズム. 活動電位 (Action Potential) に伴うカルシウムイオンの流入によって, シナプス小胞 (Synaptic Vesicle) 膜と活性膜 (Active Zone) の融合が起こり, シナプス小胞に蓄えられた伝達物質 (Transmitter) がシナプス間隙 (Synaptic Cleft) に放出される. 放出された伝達物質は, シナプス後膜 (Postsynaptic Membrane) の受容体 (Receptor) において受容される. 伝達物質と結合する受容体には, イオンチャネルと直結しその開閉をコントロールするもの, GTP 結合タンパク質 (G) を介して, サイクリック AMP (cAMP) などのセカンドメッセンジャーを生成し, イオンチャネルの機能タンパクのリン酸化を活性化させるものなどが存在する. また, シナプス前膜 (Presynaptic Membrane) には伝達物質を回収する輸送体 (Transporter) と呼ばれるメカニズムが存在する.



を獲得、保持する脳の部位及びその神経メカニズムの解明を目指して膨大な研究がなされてきた [131], [148], [160].

ここでは、まず、脳において記憶に関与している脳の部位及び記憶メカニズムを反映した細胞応答変化と考えられる長期増強を引き起こすシナプスメカニズムを概観する。

### 2.3.1 脳における記憶の座

#### 宣言的記憶の座

記憶は事実やエピソードなどを覚える宣言的記憶とやり方やルールを覚える手続的記憶に大別でき、健忘患者においては宣言的記憶に著しい阻害が見られることが知られている。従来より、宣言的記憶に関する記憶の部位（記憶の座）を求める研究は、記憶障害を持つ人の事例や動物を用いた破壊実験などによって進められてきた [37], [82], [131]. これによって明らかにされた記憶の部位としては、図 2.4 に示すように、間脳における乳頭体 (Mammillary body) と視床 (Thalamus) の内側部 (主として背内側核や前核)、側頭葉内側部 (主として海馬 (Hippocampus) とその周辺)、前脳基底部及び前頭葉の連合野がある。

コルサコフ症の患者では、視床内側部や乳頭体に病変が見られることから、その症状から記憶における間脳の役割が推測された。この患者に対して単語の記憶テストを行った結果、単語の意味に基づいて記憶することが困難であることが明らかになった。また、逆向性健忘の程度は時間的に新しい物事ほど著しくなることが知られており、さらに、時間や空間についての失見当や架空の話を作り上げる作話が見られる。このような症状から、間脳は情報を記憶するためのコード化の過程に関与すると考えられている。

側頭葉内側部と記憶の関連については、てんかんの治療のために側頭葉の内側部を切除した患者 H.M. や海馬 CA1 にのみ限局した病変が見られた R.B. の事例などから推測されている。海馬の損傷では顕著な前向性健忘が認められるが、逆向性健忘はほとんど認められないことから、長期記憶として保持する過程に障害が生じていると考えられる。さらに、海馬及びその周辺部位は皮質連合野との密接な神経結合を持つことから、皮質連合野に対して記憶すべき情報を転送したり、そこから必要な情報を引き出したりする役割を果たしていると考えられる。また、H.M. においても、逆向性健忘が認められないことや、一部の運動記憶を学ぶ能力 (反復練習によって獲得される学習) が残っていることが示されている。この結果は、記憶の貯蔵と再生に関して、記憶の種類によって異なる複数の経路が存在することを示唆するものである。

前脳基底部は、アルツハイマー病の患者において病変の認められる部位であり、個々の事項は覚えられるが、それらの相互関連は記憶できない症状を示す。また、前頭連合野の



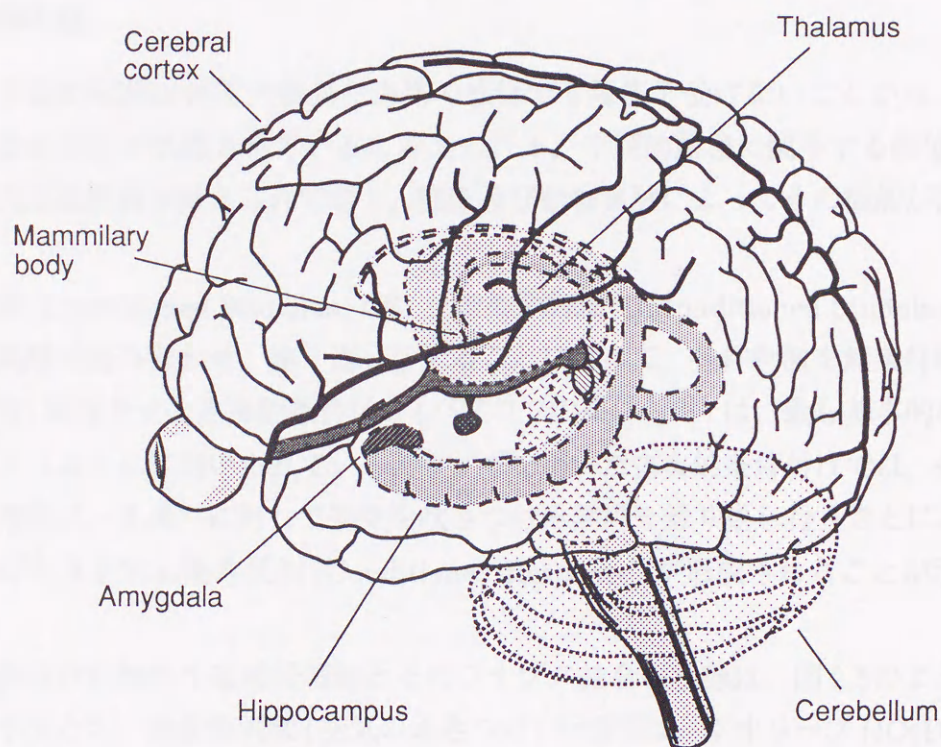


図 2.4 記憶に関連する脳の部位 [37]. 学習・記憶の獲得, 保持に関連する部位を特定することは極めて難しく, 完全に解明されたわけではないが, 乳頭体 (Mammillary body), 視床 (Thalamus), 海馬 (Hippocampus), 扁桃核 (Amygdala) 及び大脳皮質 (Cerebral cortex) が深く関与している. また, 運動などの手続き的記憶のメカニズムについては, 小脳 (Cerebellum) を中心に調べられている.



損傷によっては時間的な順序に関連した記憶に障害が認められることから、この部位は時間的・空間的文脈の形成に関与している可能性が指摘されている。さらに、最終的な記憶の貯蔵庫は、感覚情報に関連付けられる連合野であると考えられている。最近ではPETなどにより、特定の感覚、事項を記憶、再生する際に機能する脳の部位を同定することも可能となっており、記憶に関連する部位に関しては、今後、より正確な測定が進むものと考えられる。

### 手続的記憶の座

一方、手続的記憶は視床内側部や海馬の損傷でも障害を受けないことから、宣言的記憶とは異なる部位で処理されていると考えられる。手続的記憶に関与する部位としては、小脳及び大脳基底核が考えられており、臨床及び動物実験によってその機能が調べられている。

条件刺激 (Conditioned Stimulus: CS) と無条件刺激 (Unconditioned Stimulus: UCS) を短い時間間隔で組み合わせ、繰り返し与えることによって、条件刺激を無条件刺激の前兆として学習、記憶させる古典的条件付け (パブロフの条件付け) は、最も基本的な手続的記憶のプロトコルとして用いられている。ウサギを用いた古典的条件付けでは、条件刺激である音の直後に、まぶたに対して空気を吹きつける訓練を繰り返し行うことによって、音だけでまばたきをする条件反射 (Conditioned Response) が形成されることが示されている [157]。

この条件付けに関与する神経細胞とそのシナプス結合の状態は、図 2.5 のように得られている。すなわち、無条件刺激 (空気のふきつけ) の情報は、下オリーブ (IO(DAO)) から出ている登上線維 (Climbing fiber) により小脳プルキニエ細胞 (Purkinje cell) に伝えられる。一方、条件刺激 (音) の情報は、蝸牛腹側核 (V Coch N) から橋核 (Pottine N) に伝えられ、ここから苔状線維 (Mossy fiber)、さらに平行線維 (Parallel fiber) を介してプルキニエ細胞に伝えられる。プルキニエ細胞は、小脳の中位核 (Int) に投影しており、最終的に連合された情報は、この部位に貯蔵されることが考えられている。記憶が形成された後は、条件刺激のみによって、無条件刺激を与えた場合と同様の出力が、赤核 (Red N) から脊髄の運動ニューロンに伝えられ、まばたきが生じることが考えられている。

一方、ネコを用いた実験では、小脳中位核への電気刺激を条件刺激、前肢への電気刺激を無条件刺激として与えることにより古典的条件付けが行われた。この条件付けでは、学習獲得に伴う赤核ニューロンのシナプス電位形状の変化や樹状突起部分でのシナプスの形成が報告され、学習・記憶が神経系の電気的特性変化から、さらに構造的変化をもたらす現象であることが示された [159]。



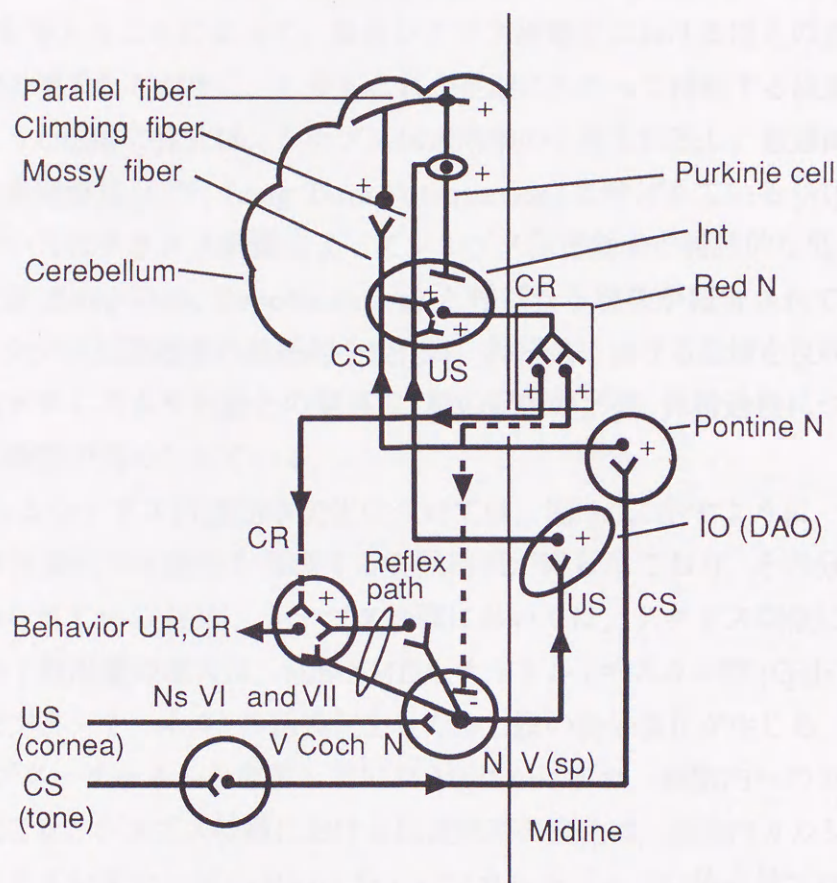


図 2.5 ウサギの古典的條件付け神経回路 [157]. 条件刺激 (CS) は蝸牛腹側核 (V Coch N) で受容され, 橋核 (Pontine) から苔状線維 (Mossy fiber), 平行線維 (Parallel fiber) を介してプルキニエ細胞 (Purkinje cell) に伝えられる. 一方, 角膜 (cornea) に与えられた無条件刺激 (UCS) は, V 核 (N V(sp)) から反射路 (Reflex path) を通じて, 直接, 無条件応答 (UR) に結び付くと同時に, 下オリーブ核 (IO(DAO)) から登上線維 (Climbing fiber) を介してプルキニエ細胞に伝えられる. 条件付け獲得後の反応は, 中位核 (Int) において, US が与えられた場合と同様の応答が CS によって喚起され, これが赤核 (Red N) を介して VI, VII 核 (Ns VI and VII) に伝えられ, 条件応答 (CR) を生じる.



### 2.3.2 長期増強、長期抑圧とその分子メカニズム

記憶に関連する脳の部位が特定されていく一方で、いかなる処理によって記憶が形成され、どのような形で保持されるかに関しても新たな知見が得られている。その一つとして、海馬などにおいて、テタヌス刺激 (5~400Hz 程度の頻度で、数秒から数十秒間にわたって刺激する) を与えることによって、集合シナプス後電位における傾きの急峻化、集合活動電位の振幅の増大などが生じ、しかもこれが長期にわたって持続する現象が報告されている。このような応答の変化は、シナプス伝達効率の上昇を反映し、数週間に渡って持続することから長期増強 (LTP: Long-Term Potentiation) と呼ばれている [31],[94],[108]。また、小脳においてはテタヌス刺激によってシナプス伝達効率の持続的な低下を反映した、長期抑圧 (LTD: Long-Term Depolarization) と呼ばれる現象が報告されている [85],[86]。このようなシナプス伝達効率の持続的な変化は、神経系における記憶を反映した現象と考えられ、そのメカニズムや行動との関連は、脳の記憶の形成、保持過程についての中心的テーマとして研究が進められている。

LTP に関わるシナプス伝達効率変化については、図 2.6 に示すように、シナプス前膜、後膜双方の特性変化の可能性を示唆する実験結果が得られており、その分子メカニズムの解明が進められている [105]。シナプス後膜においては、テタヌス刺激による伝達物質 (グルタミン酸) 放出量の増大は、non-NMDA チャネル (キスカル酸 (Quis), カイニン酸 (AMPA) リセプターチャネル) の活性化をもたらす膜の脱分極化が生じる。これに伴って NMDA リセプターチャネルを阻害していた  $Mg^{2+}$  がはずれ、細胞内へのカルシウムイオンの流入が起こる。シナプス後膜における伝達効率の変化は、細胞内カルシウム濃度の上昇に伴うプロテインキナーゼ C (PKC) や  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ ( $Ca^{2+}$ /CaMK) の活性化に伴う、シナプス後膜の機能性タンパク質のリン酸化による non-NMDA リセプターの感度上昇によって生じると考えられている [31]。

一方、LTP における伝達効率の変化には、シナプス前膜における伝達物質放出量の変化が関与するという可能性も指摘されている。すなわち、シナプス後膜からの逆行性伝達物質 (Retrigade transmitter) の受容やテタヌス刺激によるシナプス前膜の持続的な興奮で、細胞内カルシウム濃度の高い状態が継続する。これによって、環状グアニルシン-3',5'-一リン酸 (cGMP)、環状アデノシン-3',5'-一リン酸 (cAMP) や PKC を介したリン酸化が生じ、その結果として細胞膜特性の変化や、伝達物質放出量の上昇が起こるというものである。

さらに、LTD を獲得する小脳の神経回路においては、シナプス後細胞であるプルキンエ細胞に NMDA リセプターが存在しないことから、海馬 LTP とは異なるメカニズムが関



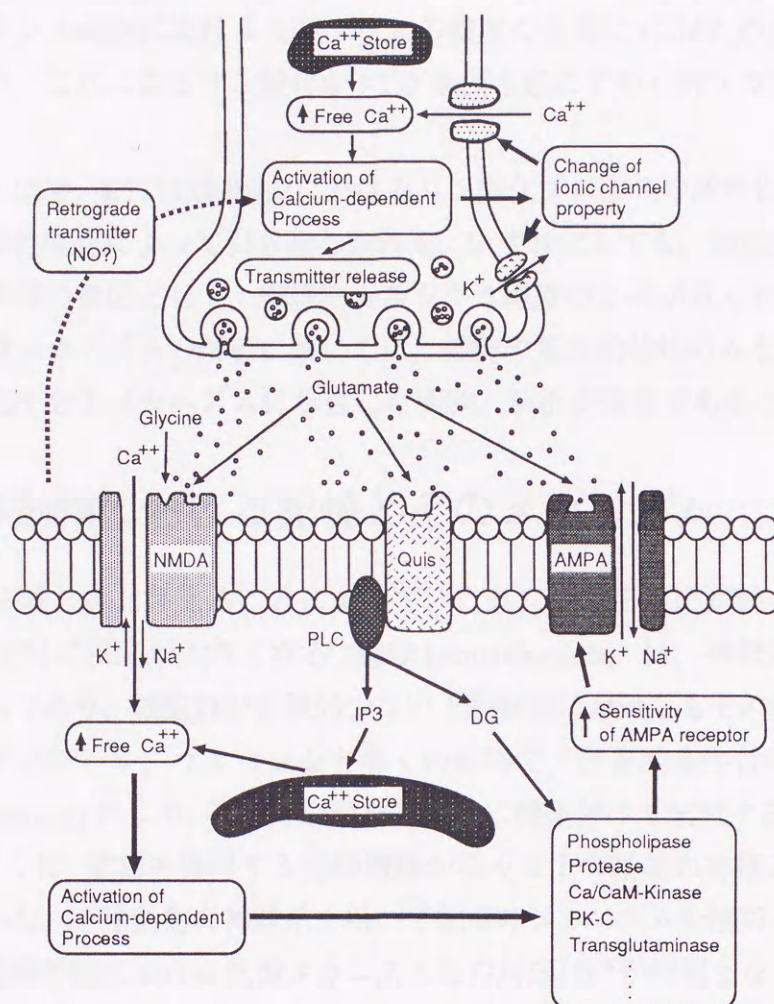


図 2.6 LTP におけるシナプス伝達効率増大の分子メカニズム。伝達物質であるグルタミン酸 (Glutamate) は、シナプス後膜にある NMDA 及び Quis, AMPA リセプターによって受容される。NMDA チャンネルの活性化及びホスホリパーゼ C (PLC) の活性化は、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こす。細胞内カルシウム濃度の上昇は細胞内分子プロセスを起動し、AMPA レセプターの感度を上昇させる。一方、シナプス前膜においても、持続的な興奮に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇及びシナプス後膜からの逆行性伝達物質 (Retrograde transmitter, 一酸化窒素 (NO) など) の影響により、細胞内分子プロセスが活性化し、イオンチャネルの開閉確率の変化することによって、興奮性が増大して伝達物質の放出効率が上昇する。



与していると考えられている。しかしながら、プルキンエ細胞に対してカルシウムキレータである EGTA を注入することによって LTD が起こらなくなることから、この場合にもカルシウム濃度上昇がシナプス特性変化にとって本質的な役割を果たしていることは確実である。プルキンエ細胞におけるカルシウムの濃度の上昇は cGMP の活性化を促すことが知られており、これによるリン酸化が LTD を引き起こす中心的メカニズムであると考えられている。

このように、LTP, LTD は細胞内におけるリン酸化プロセスの活性化による、シナプスの生化学的な特性変化によって引き起こされる。いずれにしても、細胞内の分子メカニズムを起動する共通の要因として、細胞内カルシウム濃度の上昇が見られることから、神経系における記憶メカニズムの解析においては、細胞の電気的特性のみならず、細胞内カルシウム濃度変化や分子メカニズムに着目した実験、解析が重要であると考えられる。

## 2.4 下等動物における記憶とそのメカニズム

特定の刺激を繰り返し与えることによって、これに対する反応が鈍くなる“慣れ (habituation)”や反対に反応が大きくなる“感作 (sensitization)”は、神経系の可塑性を反映した現象の一つであり、細胞数が比較的少ない下等動物においてもその獲得が知られている。さらに、アメフラシ、ウミウシなど多くの動物で、古典的条件付けによる連合学習 (associative learning) により、複数の刺激を時間的に関連付けて記憶することが確認され、表 2.1 に示すように、学習を獲得する神経機構が様々な下等動物の神経系に存在することが明らかになった。下等動物の神経系を用いて記憶のメカニズムを解析していくアプローチでは、高等動物の脳における記憶メカニズムとの対応付けが問題となるが、記憶の形成に伴い特性変化の生じる細胞を特定でき、さらに行動の変化との対応付けが容易であることから、学習、記憶の細胞メカニズムを解明するための有効な方法の一つとして用いられている。

本節では、まず、学習獲得のメカニズムに関して、細胞、神経回路レベルでの解析が詳細に行なわれている、アメフラシ (*Aplysia*)、エムラミノウミウシ (*Hermisenda Crassicornis*) について、これまでの生理実験、データ解析によって得られた知見をまとめる。次に、エムラミノウミウシの視細胞について、連合学習獲得の過程におけるイオン電流の変化を膜電位固定実験法によって測定し、学習獲得の過程でイオン電流の一種であるカルシウム電流が減少することを示した。さらに、カリウム電流の減少は条件付けを開始した直後から観測されるが、カルシウム電流の減少は条件付けがかなり進行した時点で生じることを明らかにした。



表 2.1 下等動物を用いた学習・記憶に関する研究.

動物	学習の形態	文献
<i>Octopus vulgaris</i> (octopus)	associative learning	[40]
Crayfish	habituation, sensitization	[102]
	adaptation	[121]
<i>Tritonia diomedea</i> (sea snail)	habituation, sensitization	[1]
<i>Pleurobranchaea californica</i> (sea snail)	associative learning	[123]
Cockroach	habituation	[177]
<i>Limax maximus</i> (slug)	associative learning	[67]
<i>Drosophila melanogaster</i>	associative learning	[137]
Honeybee	associative learning	[120]
Honeybee	habituation	[41]
<i>Aplysia californica</i>	habituation, sensitization,	[75]
	associative learning	
<i>Hermisenda crassicornis</i> (sea snail)	associative learning	[9]
<i>Hirudo medicinalis</i> (leech)	associative learning	[140]

一方、ウミウシ視細胞では、学習獲得に伴う生化学的変化についても多くの知見が得られている。すなわち、学習の獲得に伴って、視細胞内における mRNA の持続的な増大、特定のタンパクの増大などが報告されており、これらの結果から細胞膜さらには細胞形態の変化の可能性が指摘されていた。そこで、学習獲得前後の視細胞に関して、ニッケル-リジン化合物を用いた細胞内染色法によって細胞を染色し、その形態変化を調べた。その結果、視細胞の樹状突起部における体積に有意な減少が見られ、しかもこの形態変化が行動の変化と有意な相関を持つことを明らかにした。

#### 2.4.1 アメフラシにおける学習とそのメカニズム

アメフラシ神経系における慣れ、感作及び連合学習は、Kandel らによって示され、そのメカニズムが詳細に解析されている [90], [91]。アメフラシは、体内に入った海水を吹き出す水口 (Siphon) を刺激するとエラ (Gill) を引っ込める反射行動を示す。しかしながら、水口を繰り返し刺激すると、次第にエラの引き込み行動は弱くなり、慣れが生じていることがわかる。感覚細胞から行動を引き起こす運動ニューロンまでの神経回路は、図 2.7 のようになっており、水口への繰り返し刺激による水口感覚ニューロンから運動ニューロンへのシナプス伝達効率の低下が慣れの原因であることが示された。この場合にシナプス



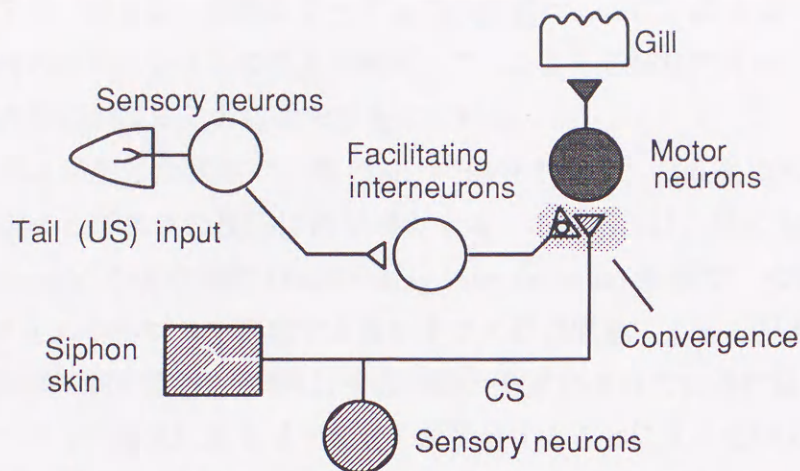


図 2.7 アメフラシの感覚-運動系神経回路 [90]. アメフラシは、水口 (Siphon skin) への刺激を条件刺激 (CS)、尾 (Tail) への刺激を無条件刺激 (US) として与えることによって条件付けを行なうことができる。この学習の獲得には、介在細胞 (Facilitating interneurons) における異シナプス構造が関与しており、運動ニューロン (Motor neuron) への伝達物質放出量の変化がエラ (Gill) の引き込み行動に影響を及ぼす。

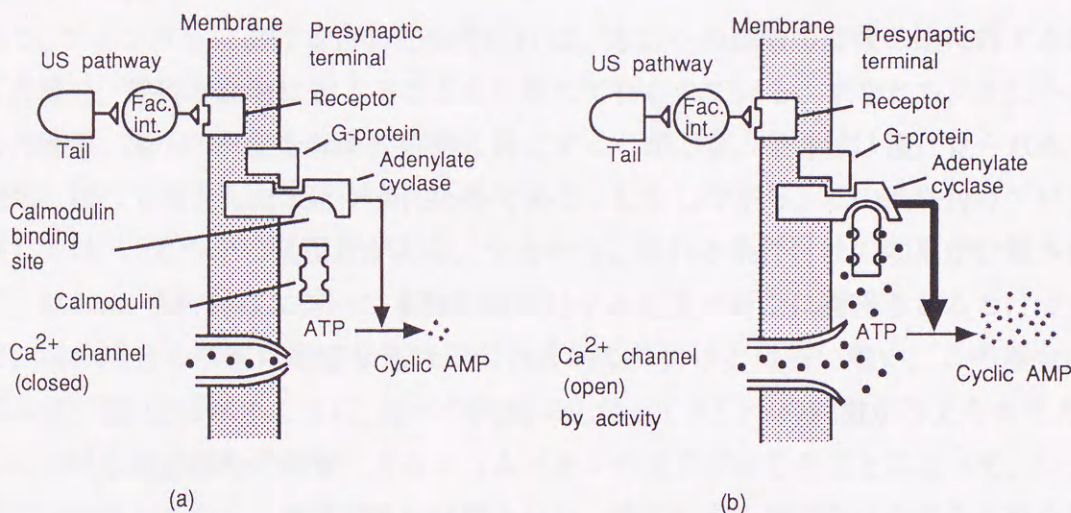


図 2.8 アメフラシ介在細胞における学習の分子メカニズム [90]. (a) 水口への刺激が与えられない状態では、シナプス前部 (Presynaptic terminal) は興奮せず、カルシウムチャネルは閉じたままである。尾 (Tail) に与えられた刺激は、介在細胞 (Fac. Int.) を経てシナプス前部におけるサイクリック AMP の活性化をもたらす、運動ニューロンへの伝達物質放出量を上昇させて感作を引き起こす。(b) 水口への刺激が与えられ、シナプス前部を興奮した状態では、カルシウムチャネルを通じてカルシウムイオンの流入が生じる。カルシウム濃度の上昇した状態で、US 刺激の影響が及ぶ場合には、サイクリック AMP (Cyclic AMP) 濃度が著しく上昇するために伝達物質の放出量が著しく増大し、顕著な感作が生じる。



伝達効率の低下は、繰り返し刺激によって水口の感覚ニューロンのカルシウムチャネルが閉じて、細胞内へのカルシウムの流入が減り、これによって細胞内カルシウム濃度が減少して伝達物質の放出が減ることによって生じている。

このような慣れが生じた状態で、尾 (Tail) の部分を刺激した直後に水口を刺激していくと、感作が起こってエラの反応は再び増大する。この感作は、尾における刺激受容細胞 (Sensory neurons) が介在細胞 (Facilitating interneurons) を経て、水口-運動ニューロン間のシナプス上にシナプスを形成する異シナプス促進構造によって引き起こされる。尾における刺激受容細胞の応答の影響は、介在細胞から放出された伝達物質 (セロトニン) を水口感覚ニューロンの終末にあるリセプターが受容することによって伝えられる。伝達物質受容の効果は、G タンパク (G-Protein) を介して、アデニル酸シクラーゼ (Adenylate cyclase) の活性化をもたらす。これによってサイクリック AMP (Cyclic AMP) 濃度が上昇する。サイクリック AMP 濃度の上昇は、サイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ (A キナーゼ) を活性化し、これによってカリウムチャネルを構成する機能性タンパクのリン酸化が引き起こされる。その結果として、カリウムチャネルコンダクタンスが減少し、膜の興奮性が増大することによって伝達物質の放出が増大するために、エラの引き込み反応が増大すると考えられている。

さて、アメフラシにおける古典的条件付けは、水口への刺激の直後に尾に対する刺激を与えた場合、感作が顕著に起こることを利用して行われている。すなわち、水口への刺激を条件刺激、尾への刺激を無条件刺激と見なすことができ、条件付け後に見られる水口への刺激に対して増大した反応が条件応答である。しかしながら、この条件付けプロトコルに関しては、いくつかの問題点がある。すなわち、感作と条件付けの効果が分離されておらず、さらに、条件付けに伴って条件刺激に対する応答が新たに獲得されるわけではないなど、この場合の学習は厳密な意味での古典的条件付けとはいえない。この場合のメカニズムは、図 2.8 に示すように、尾への刺激に先だって水口への刺激が与えられるために、水口における感覚細胞の興奮、カルシウムイオンの流入が生じることによって、シナプス前膜におけるカルシウム濃度が高い状態となり、尾に対する刺激だけが与えられた時よりもアデニル酸シクラーゼによる活性化が促進されることに基づくものであると考えられている。

#### 2.4.2 ウミウシにおける古典的条件付けと学習・記憶のメカニズム

アメフラシは感作に基づく条件付けによって連合学習を獲得するのに対し、エムラミノウミウシ (図 2.9) は、光刺激と回転などの重力刺激を、それぞれ条件刺激 CS、無条件



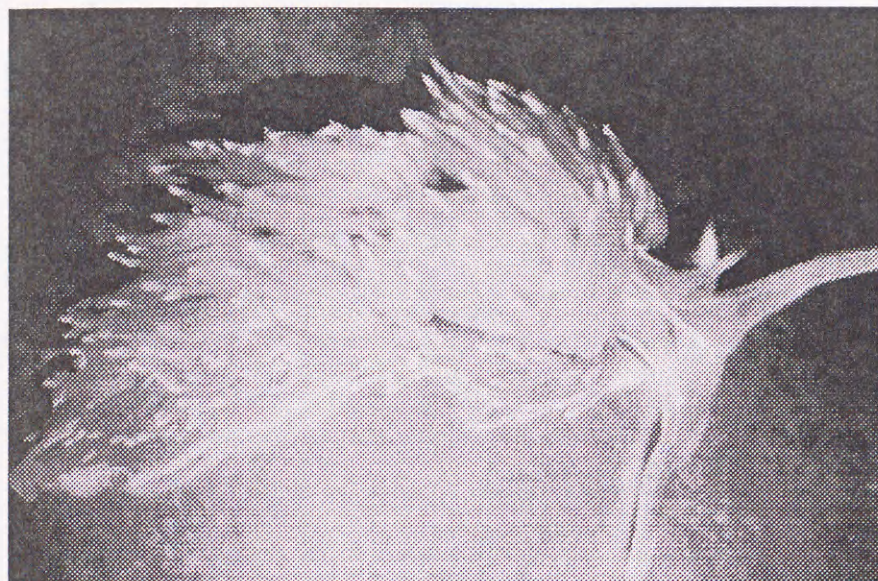


図 2.9 エムラミノウミウシ (*Hermisenda Crassicornis*)

刺激 UCS として用いる古典的条件付けによって、CS, UCS の時間関連を連合し学習、記憶することが示されている [15]。この条件付けは、ウミウシが光の方向に移動する (正の走光性) という性質を持つ一方、回転や振動など前庭系への重力刺激によって移動を停止し、腹足を収縮させて体を固定させる性質に基づいて行われた [7]。すなわち、条件付けによって光刺激と重力刺激の関連を連合学習した後は、光刺激だけで重力刺激を想起するため、生来持つ正の走光性が抑圧された行動を示す。

実際の条件付けは、図 2.10 のような装置によって行うことができる [52]。動物をターンテーブル上に放射状に配置したチューブの端に閉じ込め、光はターンテーブルの中心に照射する。これによってターンテーブル上の全ての動物に対して、同一の条件で光と回転刺激を与えることができる。比較条件としては、条件付けを行わないグループ (Naive)、光刺激または回転刺激のみを与えたグループ及び光と回転刺激に時間的関連を持たせずに条件付けを行なった (光と回転刺激をそれぞれ独立にランダムな時間間隔で与える) グループ (Random) が用いられる。

#### 学習の獲得に伴う行動の変化

条件付けによる行動の変化は、光照射と同時に動物を閉じ込めていたゲートを撤去した場合に、テーブルの中心に向かって移動する時間を測定することによって調べられた。その結果、図 2.11 のように、光と回転刺激をペアで与えたグループにのみ著しい行動の変



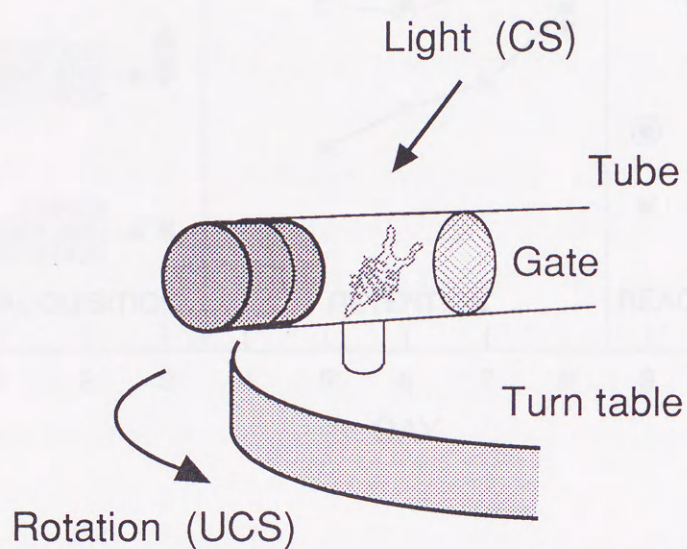


図 2.10 エムラミノウミウシを用いた古典的条件付け。ウミウシを透明なチューブ (Tube) の端にゲート (Gate) を設けて閉じ込め、このチューブをターンテーブル (Turn table) 上に放射状に配値する。条件付けは、光刺激とターンテーブルの回転を適当な時間間隔で与えることによって行なう。条件付けによる行動の変化は、光刺激のみを与えた状態でゲートを外し、ターンテーブルの中心に向かって一定の距離を移動するのに要した時間で評価する。



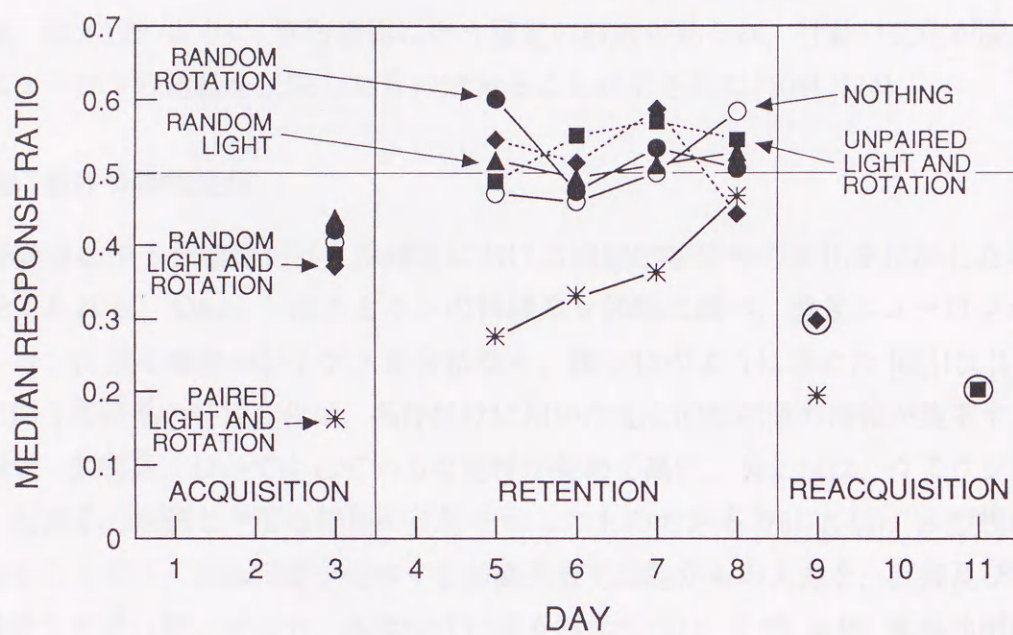


図 2.11 エムラミノウミウシにおける連合学習獲得の特性[10]. 応答比率の中央値 (MEDIAN RESPONSE RATIO) は、条件付け前に光の方向に 3cm 移動するのに要した時間 (A) と条件付け後に要した時間 (B) から、 $A/(A+B)$  により求めた。0.5 は行動変化が無いことを表し、条件付け後に走光性が抑制されると B が増大し、応答比率は 0 に近づく。条件付けを行わない (NOTHING)、ランダム (RANDOM LIGHT AND ROTATION, RANDOM LIGHT, RANDOM ROTATION) あるいは交互に刺激を与えた場合 (UNPAIRED LIGHT AND ROTATION) には、応答比率が 0.4 程度であるのに対し、ペアで与えた場合 (PAIRED LIGHT AND ROTATION) には 0.2 以下となる (ACQUISITION)。このグループも条件付けを止めると徐々に学習前の状態に戻っていく (RETENTION)。8 日目で、2 つの刺激をペアで与えて条件付けを行なうと、再び学習を獲得する。また、他のグループの動物でも刺激条件を変えれば学習を獲得することが確認された (REACQUISITION)。



化が起こり、しかも数日間にわたって持続することが明らかになった [10], [52]. 学習獲得の後、条件付けを行わないと次第に学習獲得度は低下していくが、これは忘却による効果と考えられる。なお、いずれのグループの動物も、光と回転刺激をペアで与える条件付けによって再学習が可能である。

さらに、ビデオカメラによって腹足の形状を撮影し、その長さを条件付け前後で比較した結果、図 2.12 のように、学習獲得に伴う腹足の収縮が見られ、行動の変化が腹足筋及び運動ニューロンの活動を反映したものであることが示された [109], [111].

### 視細胞における特性変化

学習獲得に伴う行動変化は、神経系における細胞応答特性の変化を反映した現象であると考えられる。Alkon らはウミウシの神経系を詳細に調べ、感覚ニューロンから運動ニューロンに至る細胞のシナプス結合状態を、図 2.13 のように求めた [6], [13], [17]. 学習獲得に伴う神経系の特性変化は、条件付けに用いた光と回転刺激の情報が集束する部位である視覚・前庭系において生じている可能性が極めて高い。図 2.14 は、ウミウシにおける視覚・前庭系の形態と主要な細胞の位置を示したものである [70], [144]. B 型視細胞は光を受容すると共に、回転刺激を受容する前庭系有毛細胞からの入力を、直接及び視神経節細胞を介して受け取っており、条件付けに伴う特性変化は、まず、条件、無条件刺激が収束するこの視細胞を中心に調べられてきた。

その結果、学習獲得に伴い光刺激に対する視細胞の膜電位応答の振幅が増大し、さらに光刺激を終了した後の応答持続時間も著しく延長する (LLD: Long Lasting Depolarization) ことが示された [173] (図 2.15). Alkon は、B 型視細胞応答に生じた LLD が、A 型視細胞に抑制的に作用し、この影響が最終的に運動ニューロンの活動を抑圧することによって正の走光性の減退が生じるという仮説を提案した。しかしながら、LLD は光刺激終了後に見られる応答変化であり、光刺激照射時の行動には直接関与することはない。光刺激照射時における行動の変化は、むしろ光応答振幅の増大によって引き起こされ则认为る。

一方、膜電位固定実験によって条件付け前後における B 型視細胞の膜電流が測定された結果、図 2.16 に示すように、学習の獲得に伴って振幅が著しく減少することが示されている [19], [26]. この膜電流の減少は、2 種類のカリウムイオン電流 (急速活性、不活性型カリウム電流:  $I_A$ , カルシウム依存性カリウム電流:  $I_C$ ) の減少に起因すると考えられている [2]. このような学習獲得後のイオン電流変化を引き起こすメカニズムには、細胞内カルシウムに依存した分子メカニズムが関与していると考えられる。

そこで、4 アミノピリジン (4-AP) やテトラエチルアンモニウム (TEA) によって  $I_A$  及び  $I_K$  をブロックし、さらに、細胞外のカリウムイオン濃度を上げてカリウムの平衡電位を膜



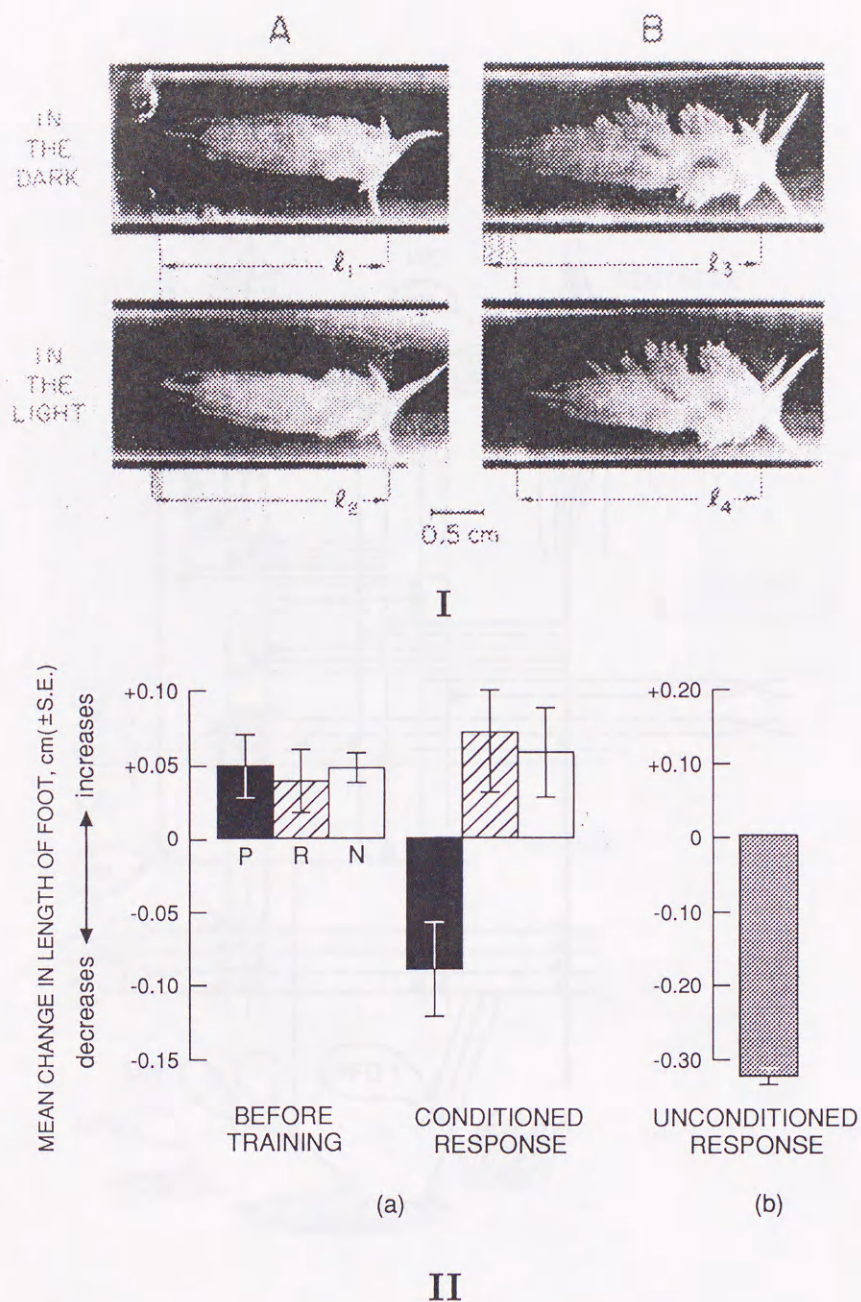


図 2.12 学習獲得による腹足長の変化 [109],[111]. I. ビデオカメラによって測定された学習に伴う腹足長の変化. A は条件付け前の動物であり, 光照射によって腹足をわずかに延長している. B は条件付け後の動物であり, 光照射によって腹足を収縮させている. II. P は光と回転刺激をペアで, R はランダムに与えて条件付けを行なった場合である. N は条件付けを行なわなかった場合を表す. いずれのグループも, 条件付けの前は光刺激で腹足が延長するのに対して, 条件付け後は P のグループにおいて光刺激による腹足の収縮が見られた (a). 腹足の収縮は回転刺激を与えた場合に生じる行動であり (b), 学習獲得により光刺激のみで回転刺激に対する応答が惹起されていると言える.



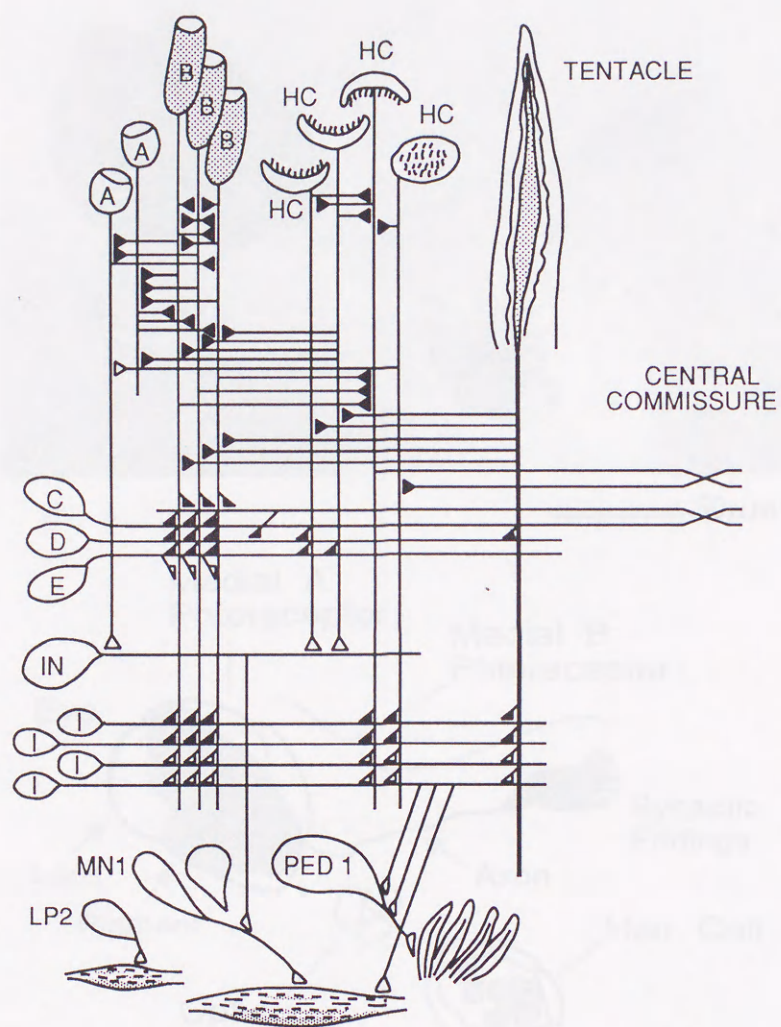


図 2.13 ウミウシ神経系における細胞間シナプス結合 [13]. A, B: A 型, B 型視細胞, HC: 前庭系有毛細胞, C, D, E: 視神経節細胞, IN, I: 介在細胞, MN, PED1, LP2: 運動ニューロン.



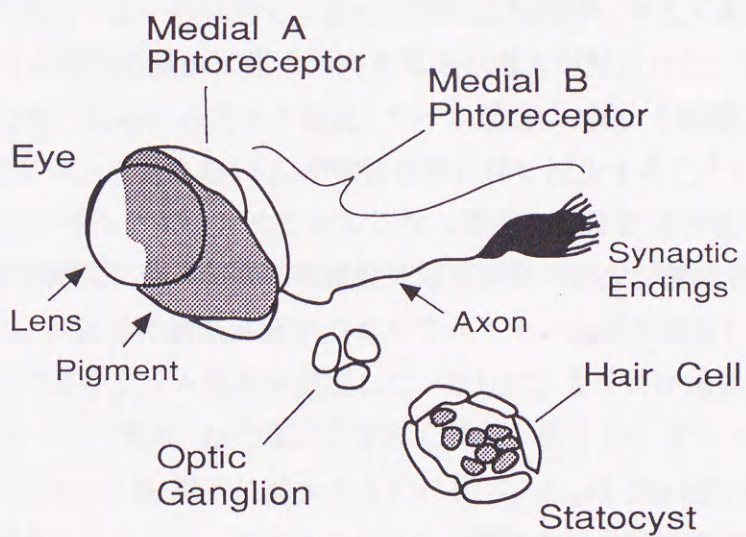
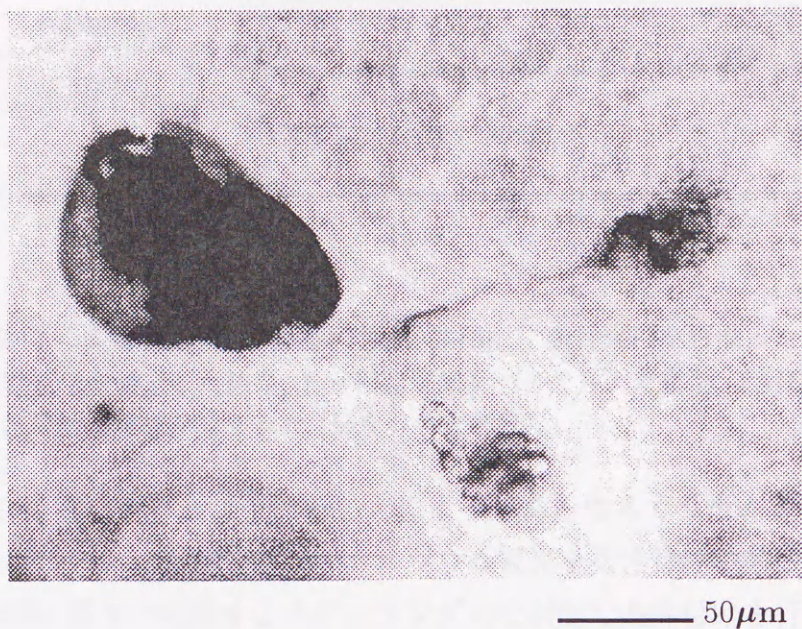


図 2.14 ウミウシの視覚・前庭系。視細胞 (Photoreceptor) はレンズ (Lens) とピグメント (Pigment) の後方に位置する [53]。本論文における実験は、Medial type B photoreceptor を対象に行なった (染色されている細胞)。下方には米粒状の石とそれを囲む有毛細胞 (Hair cell) からなる前庭系 (Statocyst) があり、視神経節細胞群は目と前庭系の間に存在する [70]。



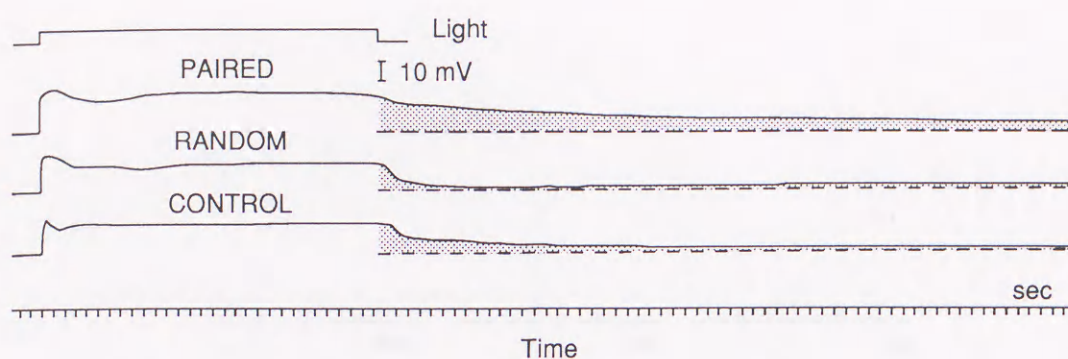


図 2.15 学習獲得による視細胞光応答の変化 [173]. 条件付けを行なった後, 光刺激に対する視細胞の膜電位変化を測定した結果, 光と回転刺激をペアで与えた動物 (PAIRED) の応答には, 光刺激終了後も持続的な継続が見られた (影をつけた部分).

電位固定を行なう電位レベルに上げることによってあらゆるカリウム電流成分を消失させて, 細胞内カルシウムに影響を及ぼすカルシウム電流を条件付けの前後について測定した [46]. その結果, 図 2.17 に示すように, ランダムな刺激で条件付けを行った場合には電流変化がほとんど見られないのに対し, 光と回転刺激を同時に与えて条件付けを行った場合には, カルシウム電流の減少に伴う外向き電流の増大が見られた. この時, 膜電位を保持電位に戻した時に見られる内向き電流 (テイル電流) の減少も観測されるが, これは TEA, 4-AP ではブロックされない  $I_C$  が学習獲得に伴い減少することによるものである.

固定する膜電位レベルを変化させてカルシウム電流の電位依存特性を求めた結果, 図 2.18 のように, 学習獲得に伴って全ての電位で電流振幅の減少が確認された. なお, この実験では, 固定電位に応じて細胞外液中のカリウムイオン濃度を調節して, カリウム電流を消失させた状態でカルシウム電流を測定した. さらに, 条件付け過程におけるカルシウム電流:  $I_{Ca}$  及びカリウム電流:  $I_C$  の変化を求めた結果, 図 2.19 に示すように,  $I_C$  が 100 回程度の刺激照射で元の 60 % 以下に減少するのに比べ,  $I_{Ca}$  は 200 回程度から減少が顕著に表れることが明らかになった. このようなイオン電流の減少特性の違いは, カリウムイオンとカルシウムイオンの機能の違いを反映したものであると考えられる.

すなわち, 外向き電流であるカリウム電流の減少は, B 型視細胞の膜電位応答の増大に直接関与するものと考えられる. 一方, カルシウム電流は細胞内に流入する電流であり, その減少は細胞応答に対して抑制的に働くが, その振幅はカリウム電流に比べて小さく, 細胞応答にはほとんど影響しない. しかしながら, カルシウム電流によって供給されるカルシウムイオンは, 学習獲得のための細胞内分子メカニズムを活性化させるセカンドメッセンジャーとして機能することから, カルシウム電流の減少は細胞内カルシウムの減少,



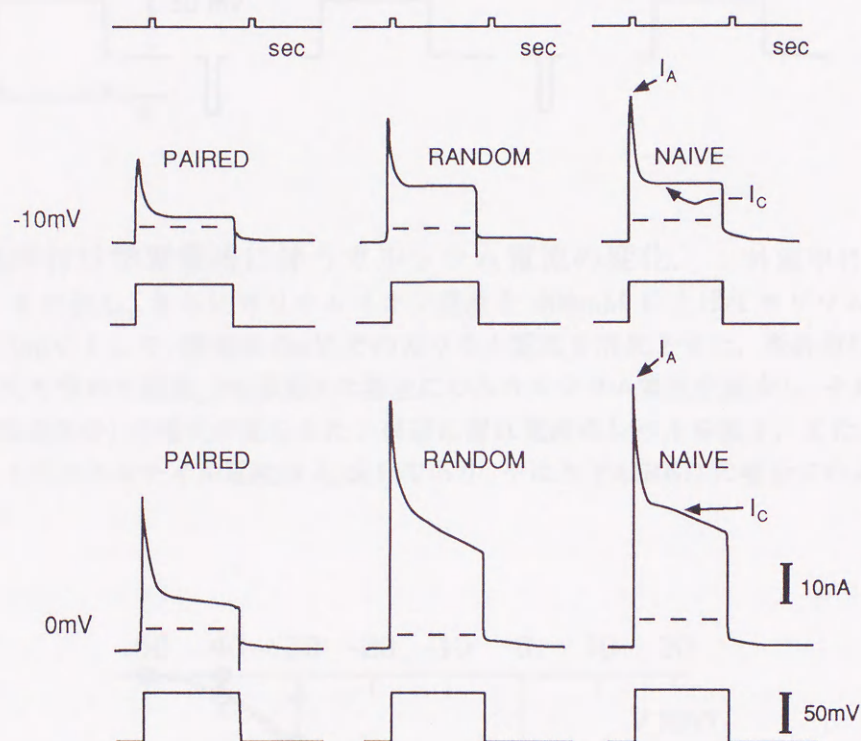


図 2.16 学習獲得による膜電流の変化 [19],[26]. 刺激をペアで与えて条件付けを行なった動物 (PAIRED), ランダムな刺激を与えて条件付けを行なった動物 (RANDOM), 条件付けを行なわなかった動物 (NAIVE) について, 膜電位固定実験により膜電流を測定した. 膜電位  $-10, 0\text{mV}$  の場合のいずれにおいても, PAIRED の場合にのみ, 膜電流振幅の著しい減少が見られた. RANDOM の場合の膜電流には, NAIVE の場合と有意な差が見られなかった. 破線は漏れ電流のレベルを表す.



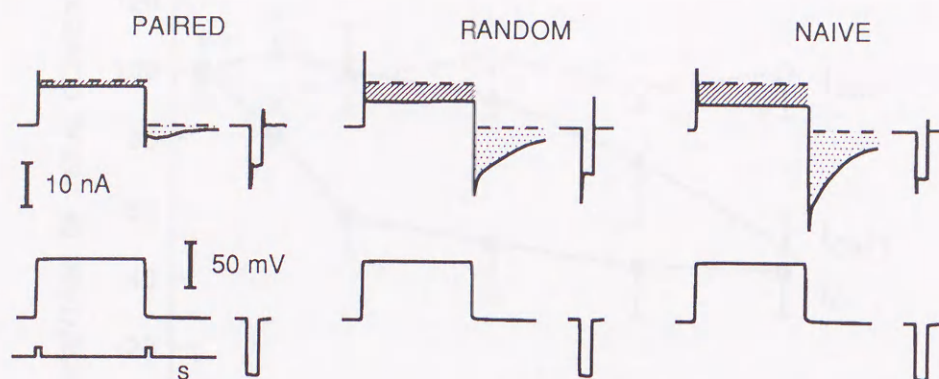


図 2.17 条件付け学習獲得に伴うカルシウム電流の変化。外液中に 4-AP(3mM), TEA(10mM) を付加し, さらにカリウムイオン濃度を 300mM に上げてカリウムイオンに対する平衡電位を 0mV として, 膜電位 0mV でのカリウム電流を消失させた。条件付けに伴うカルシウム電流の変化を求めた結果, PAIRED の場合にのみカルシウム電流が減少し, それに伴って外向き電流 (正の電流成分) の増大が見られた。破線は漏れ電流のレベルを表す。また, 膜電位固定終了時に見られる内向きのテイル電流は  $I_C$  成分であり, やはり PAIRED の場合にのみ減少していることがわかる。

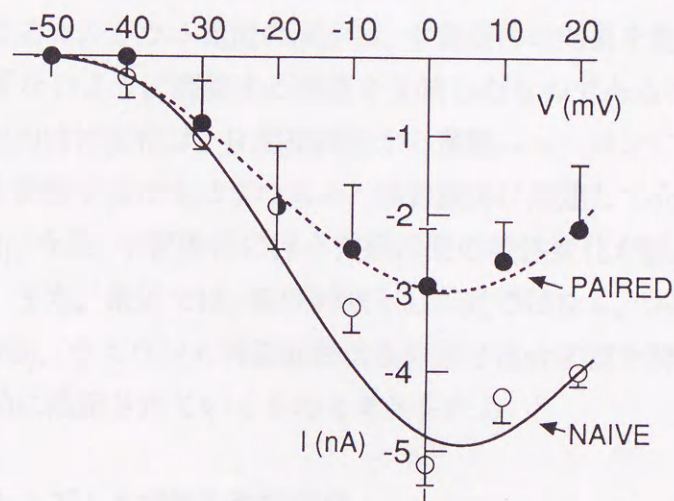


図 2.18 学習獲得に伴うカルシウム電流 I-V 特性の変化。学習獲得に伴うカルシウム電流の変化を様々な膜電位レベルで測定した。カルシウム電流のみを抽出するために, 外液中には 4-AP, TEA を加え, さらにカリウム電流の反転電位が固定電位に一致するようにカリウムイオン濃度を調節した。



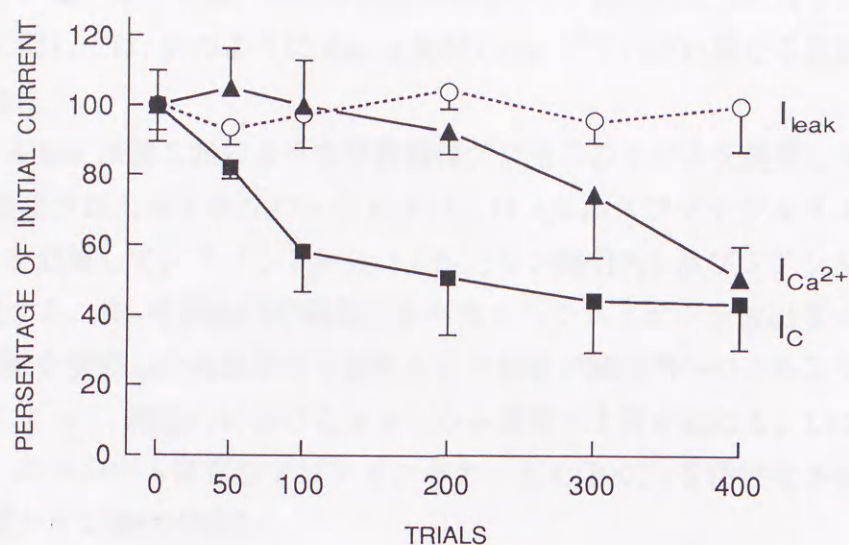


図 2.19 学習獲得のための古典的条件付け訓練回数に対するイオン電流変化。条件付けでは、3秒間の光、回転刺激を30秒間隔で、1日当たり50回あるいは100回与えた。電流測定は訓練を行なった翌朝、すなわち、訓練を始めて2日目 (TRIAL: 50, 100), 3日目 (TRIAL: 200), 4日目 (TRIAL: 300), 5日目 (TRIAL: 400) に測定した。漏れ電流はほとんど変化しないのに対し、カルシウム、カリウム電流は著しく減少する。

さらには学習獲得の抑制をもたらすことが予想される。このことから、条件付けを十分に行なった時点におけるカルシウム電流の減少は、学習獲得の効果を飽和させて、ある特定の性質に片寄り過ぎないように調整する機能を反映したものであると考えられる。

また、B型視細胞の特性変化は、B型視細胞から運動ニューロンに至る経路に存在する介在細胞の応答にも影響を及ぼすはずである。学習獲得に関連して介在細胞の応答変化も測定されており [74]、今後、学習獲得に伴う神経回路の特性変化が徐々に明らかにされていくと考えられる。また、最近では、条件刺激として光ではなく、エサを用いた条件付けも行なわれており [63]、ウミウシの神経回路は条件付け連合学習を解析するためのモデル神経系として多角的に活用されていくものと考えられる。

### 学習獲得の分子メカニズムと細胞の形態変化

学習獲得に伴うウミウシB型視細胞の特性変化に対しては、脳におけるシナプス伝達効率変化と同様のメカニズムが介在していることが実験的に示されている [114], [173]。すなわち、学習獲得後に見られる膜電流の減少は、細胞内カルシウム濃度の上昇に基づく、C-キナーゼ及びカルシウム依存性カルモジュリン ( $Ca^{2+}/CaM$ ) の活性化によってカリウムチャネルの機能タンパクがリン酸化され、カリウム電流が減少することによって生じる



と考えられている。条件刺激、無条件刺激の受容から、視細胞におけるリン酸化プロセスの発現機構に関しては、次のように Alkon 及び Crow がそれぞれ異なる仮説を提唱している [24],[43],[51]。

すなわち、Alkon は図 2.20 のような学習獲得プロセスのモデルを提案している。光刺激によって活性化されたホスホリパーゼ C (PLC) は 4,5-ホスファチジルイノシトール二リン酸 ( $\text{PIP}_2$ ) を分解して、イノシトール-1,4,5-三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) 及びジアシルグリセロール (DG) を生成する。 $\text{IP}_3$  は細胞内貯蔵部位からカルシウムイオンを放出させ、さらにこのとき、回転刺激を受容した前庭系有毛細胞応答の影響が細胞内へのカルシウム流入を促進させることによって、細胞内におけるカルシウム濃度の上昇が起こる。DG 及びカルシウムの上昇は、カルシウム依存性プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化させ、これによってタンパク質のリン酸化が進む。

一方、Crow は、図 2.21 のように、光刺激が細胞内カルシウム濃度の上昇をもたらした状態で、有毛細胞からのシナプス入力に加わることによって、PKC 及び  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  が活性化されることが、学習獲得のメインプロセスであると考えている。このような学習獲得プロセスのどちらが真のメカニズムであるのか、あるいは両プロセスの関与によるものなのかについての明確な結論は、現段階では得られていない。

しかしながら、CS、UCS の同時刺激によって細胞内メカニズムが活性化され、細胞における機能タンパクの構造変化を生じていることは事実であり、その実証として、学習獲得時における mRNA の増大 [129]、さらに高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用して、図 2.22 に示すように、分子量 27kDa タンパクの減少、20kDa タンパクの増大が見出されている [45],[130]。

このような細胞内部のリン酸化プロセスの持続的な活性化は、シナプスの形成や消失、さらには樹状突起の形態変化など、より恒久的な特性変化を引き起こすと考えられる。そこで、ニッケル-リジン複合化合物を用いて B 型視細胞を染色し、条件付け前後における形態の変化を測定した [28],[66],[68]。すなわち、3 日間の条件付けの後、 $0.25\text{M Ni}^{2+} / 0.25\text{M}$  リジン /  $0.5\text{M KCl}$  を電気泳動法により B 型視細胞に注入し、神経系全体を  $0.5\text{M}$  のルビアン酸によって沈澱反応させて発色させ、これを脱水、固定し標本を作成した [141]。こうして得られた標本について、B 型視細胞の形態を測定した結果、図 2.23 に示すように、学習を獲得した動物では樹状突起部分の断面積が有意に減少していることが明らかになった [21]。行動や電気的特性 (細胞膜の入力抵抗) と樹状突起部分の体積 (図 2.24) を、ペアの刺激により条件付けを行なったグループとランダムな刺激で条件付けを行なったグループ、条件付けを行わなかったグループで比較した。その結果、CS、UCS をペアで与え学習を獲得した場合にのみ、光刺激に対して腹足長が減少する (図 2.25(a)) のに対応して、



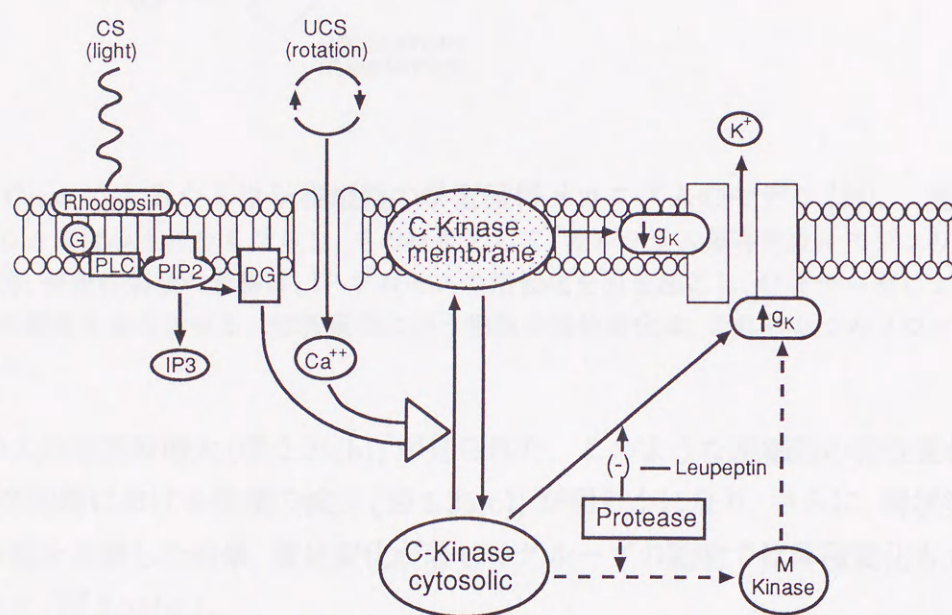


図 2.20 Alkon によるウミウシ視細胞の学習獲得メカニズムのモデル [22]. 条件刺激である光は細胞内の IP プロセスを活性化させる. 一方, 無条件刺激の影響は細胞内カルシウム濃度の上昇をもたらし, その結果, 細胞膜への C キナーゼの移動が起こり, カリウムチャネルの構造的変化が生じる.



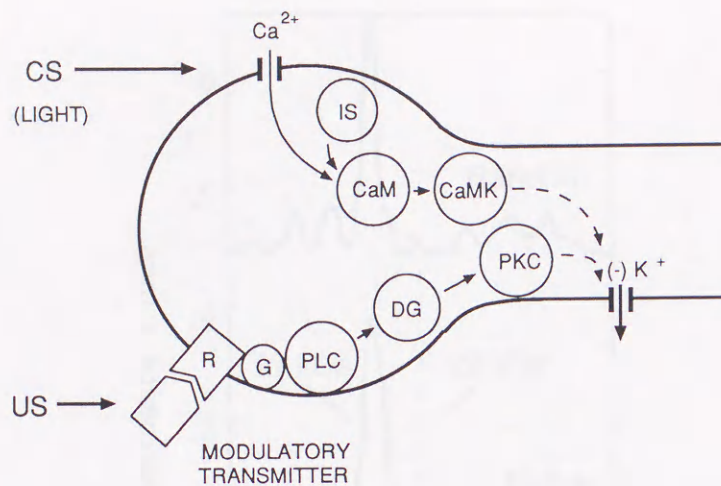


図 2.21 Crow によるウミウシ視細胞の学習獲得メカニズムのモデル [51]. 光刺激は細胞内カルシウム濃度の上昇をもたらす、その結果として、カルシウム依存性カルモジュリンが活性化される。一方、無条件刺激の影響は、IP プロセスの活性化を引き起こし、C キナーゼによるカリウムチャネルの構造を変化させる。学習獲得に伴う細胞の特性変化は、これら 2 つのプロセスの相乗効果による。

視細胞の入力抵抗の増大 (図 2.25(b)) が見られた。このような視細胞の特性変化に対応して、樹状突起部における体積の減少 (図 2.25(c)) が明らかになり、さらに、樹状突起の体積変化と行動を比較した結果、腹足変化が著しいグループの動物では体積変化も大きいことが示された (図 2.25(d))。

脳の発達や学習獲得の段階においても、遺伝子情報に従って神経細胞は樹状突起や軸索を延長してだけでなく、外界からの刺激に従ってシナプスの発芽、消滅などの形態変化を伴って、有機的な神経回路を形成していくことが示されている [30], [149]。本実験結果は、ウミウシにおける神経系においても、古典的条件付けに基づく連合学習を獲得する過程で、必要なシナプスを選択的に残し、不要な部分を消去するメカニズムが存在することを示唆するものである。

## 2.5 まとめ

脳における記憶のメカニズムに関しては、生理学、心理学などの分野を中心に、膨大な実験データが蓄積され、その結果、脳内において記憶の処理に関与する部位やそこでの情報の流れが徐々に明らかにされて来ている。記憶の形成、貯蔵に対しては、神経細胞内のメカニズムが重要な役割を果たしており、学習獲得は生化学反応プロセスに基づく現象で



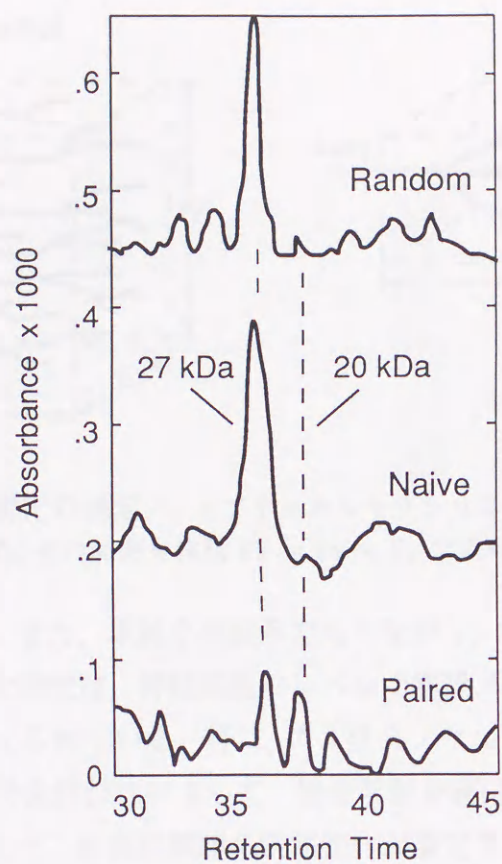


図 2.22 視細胞内におけるタンパク質の分子量の変化 [130]. HPLC によって測定を行なった結果, 条件刺激と無条件刺激をペアで与えた場合に, 分子量 27kDa のタンパク質が特異的に減少し, 一方, 20kDa のタンパク質が増大することが明らかになった.



図 2.23 連合学習獲得に伴う樹状突起の形態変化. B 型視細胞の樹状突起部分を拡大, 測定した結果, Paired のものは, その断面積が減少していた. いずれの場合も, 左側が軸索の方向である.



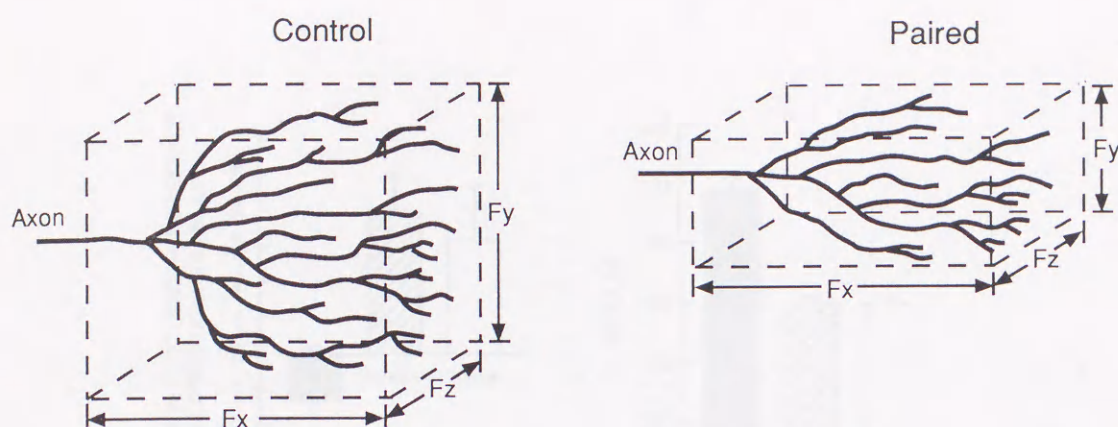


図 2.24 樹状突起の体積変化の測定. オプティカルセクションング [144] によって染色された突起が存在する範囲を求め、その範囲を体積  $F_x \times F_z \times F_y$  で近似的に表した。

あることが示されてきた。また、単純な神経系でありながら、学習を獲得することが知られている下等動物を用いた研究は、神経細胞のレベルで学習メカニズムを調べる上で有効なアプローチの一つと考えられている。特に、エムラミノウミウシは、光と回転刺激を短い時間間隔で与える古典的条件付けによって、連合学習を獲得することが知られ、学習獲得に伴う行動変化に対応して、B型視細胞の応答変化が測定され、その発生メカニズムについて研究が進められている。

本章では、このエムラミノウミウシに関し、その連合学習獲得の過程において、カリウム電流に加えカルシウム電流の減少が生じることを初めて明らかにした。カルシウム電流の減少は、細胞膜電位応答振幅を減少させる効果を持つと共に、細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制する効果を持ち、学習が過度に進むことを防ぐ働きを持つと考えられる。さらに、細胞内染色法によって、学習獲得に伴うB型視細胞の形態変化を測定し、学習獲得によって樹状突起部分の体積が有意に減少していることを示した。ウミウシ連合学習は、電氣的応答から細胞の構造変化に至る、様々なレベルでの神経細胞の特性変化を反映した現象であり、次章以降では、そのメカニズム解明に対して生理工学的アプローチの導入し、視細胞の学習獲得メカニズム解明を進める。



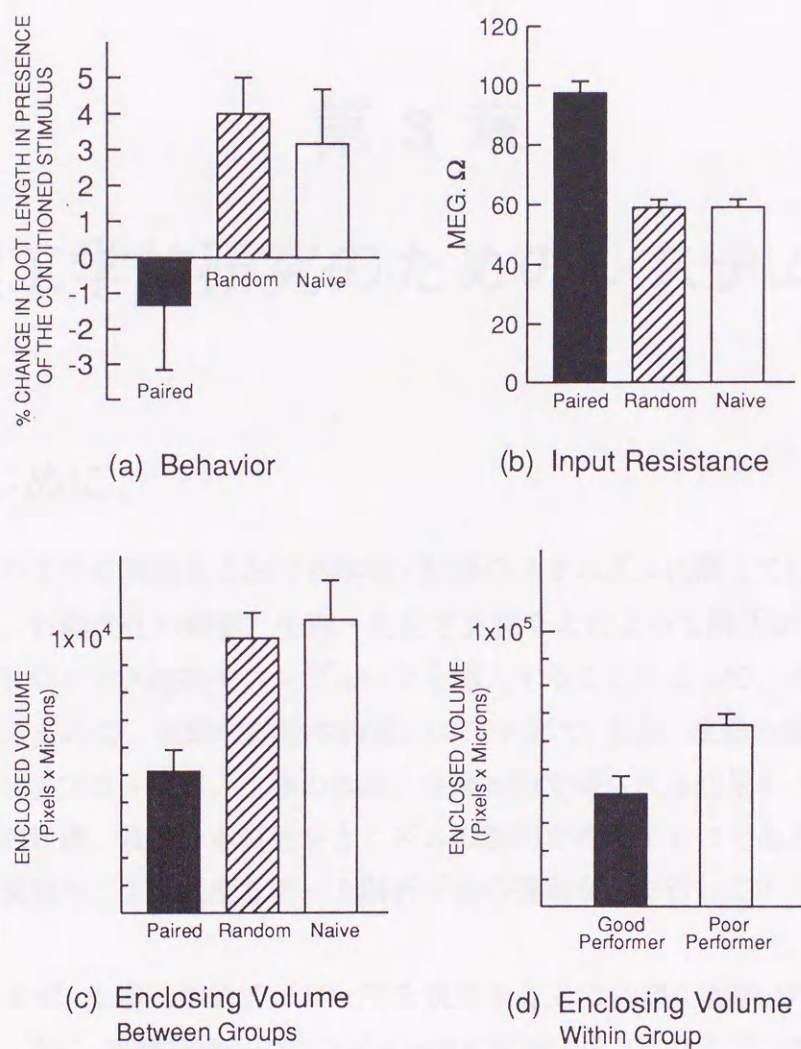


図 2.25 学習獲得に伴う樹状突起の体積変化。(a) 条件付けによる腹足長の変化。ペアの刺激を用いて条件付けを行なった場合 (Paired) にのみ、光刺激に対して腹足を収縮させるよう行動が変化する。(b) 細胞膜入力抵抗の変化。条件付けを行っていない (Naive) 場合、及び、ランダムな刺激で条件付けを行なった場合 (Random) に比べて、Paired の場合には視細胞の膜入力抵抗も増大する。(c) 樹状突起部の体積変化。染色された樹状突起部分の体積を測定した結果、Paired の場合にのみ著しい減少が見られた。(d) 行動の違いと体積変化。行動 (光照射時の腹足長の変化) によってグループ分けし、樹状突起部の体積を分類した結果、これらに相関が見られることが明らかになった。



## 第 3 章

# 生理工学的研究のためのシステム環境

### 3.1 はじめに

エムラミノウミウシ神経系における学習・記憶のメカニズムに関しては、これまで、動物の条件付け、行動変化の観測、生理・生化学実験などによって解明が進められてきた。最新のエレクトロニクス技術やコンピュータを導入することによって、その環境は飛躍的に向上しているものの、実験の効率や装置のコスト面で、依然、改善の余地が残されている。生理工学的アプローチは、生物の観測、生理実験で得られる知見をベースに、神経システムの機能的意義、及び、本質的メカニズムの解明をめざすものであるが、実験に必要な実験装置の開発や、より高度なデータ解析手法の提案などを行っていくことも重要な課題である。

本章では、まず、生理工学的アプローチを展開する上で必要な実験、データ解析環境について述べる。次に、実験技術へのコンピュータの応用として、ウミウシの古典的条件付けにおいて、条件、無条件刺激を制御するために、安価でかつ柔軟な条件付けシステムを実現、適用した結果について述べる。さらに、生理工学的研究を展開するためのソフトウェア環境の例として、本論文で行った生理実験、データ解析及びモデル・シミュレーションにおいて使用したシステムについてまとめる。

### 3.2 生理工学的アプローチと環境

生理工学的アプローチは、図 3.1 に示すように、生体・生理実験における技術としてだけでなく、実験データの処理、さらには、未知なる生体システムのメカニズム解明に対しても、工学技術、理論、手法などの適用を進めるものである。新たな実験技術、装置の開発は、



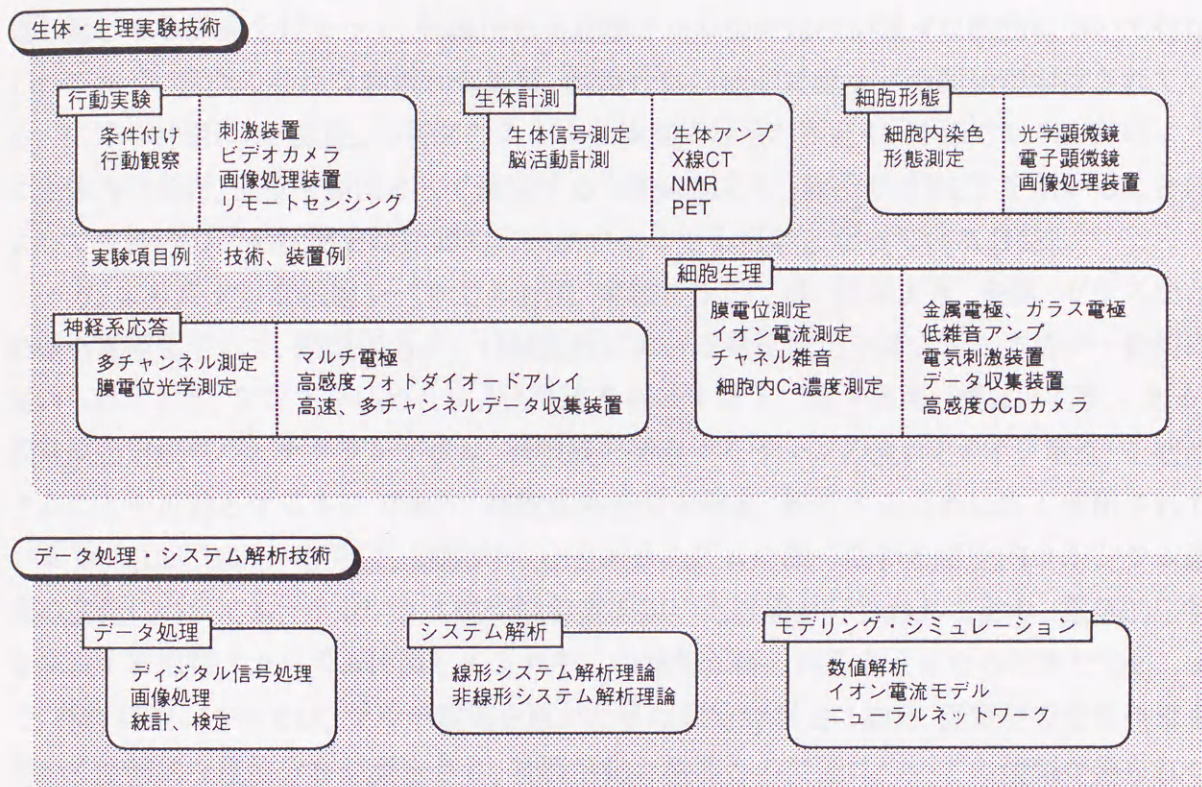


図 3.1 生理工学的研究とその環境。生体・生理実験には様々な技術、工学的手法が適用されている。ガラス微小電極を用いることによりイオン電流、さらにはチャンネルを通過するイオンの挙動というミクロな特性の測定が可能となった。また、光学的測定法は、非侵襲に、かつ、並列に細胞活動を計測する方法として注目されている。一方、実験で得られたデータの処理、及び、実験データに基づくシステム解析に対しても、信号処理理論、統計・検定、システム解析理論などが適用できると考えられる。このような手法が様々なデータに対して、簡単に適用できる環境を構築していくことが生理工学的研究を発展させていく上で重要である。



生理実験においては極めて重要な課題であり、多くの場合において、新たな発見の影には新たな実験技術の導入が見られる。

個体レベルの計測、実験としては、生態、行動、運動の観測があげられ、これに対してはビデオカメラと画像処理装置による行動観測システム、リモートセンシングシステムなどが開発、活用されている。また、学習・記憶に関連する行動実験として、特定の刺激を繰り返し提示する訓練を行なって、刺激情報を記憶させる条件付けが様々な動物について行なわれており、操作の容易な刺激制御装置、動物行動の観測装置などの開発が期待されている。生体の計測には、脳波、心電図のように生体電気信号の測定や、X線CT、NMRのように生体内の形態、部位を画像として測定する方法に加えて、最近ではPETを用いることによって生体内の活動状態を時空間的に観測することも可能となっている[138]。

一方、よりミクロな細胞レベルでの計測、実験については、従来より、金属、ガラスなどの微小電極を用いて、細胞内あるいは細胞外における電位変化を測定する方法が一般的に用いられており、アンプを始めとする測定系を構築する上で電子回路技術は不可欠である。膜電位固定法やパッチクランプ法は、細胞膜を通過するイオンの流れ(イオン電流)を観測することを可能とするものであり、細胞応答特性を測定、解析するために広く使用されている[35],[153],[154]。さらに、細胞内の分子メカニズムに深く関わる細胞内カルシウム濃度の変化についても、カルシウム感受性色素を用いた計測が行なわれており、電気的応答を発現する細胞メカニズムに関してより多くの情報が得られるようになってきた[92]。また、神経回路レベルでは、マルチ電極を用いた多点同時計測法に加え、膜電位感受性色素を用いて空間的な電位分布が測定され、神経活動と機能との関連についての情報が得られつつある[170]。膜電位の光学計測では、高感度のフォトダイオードアレイと低雑音のアンプを必要とし、さらに多チャンネルのデータを高速に収集する必要がある、最新の半導体技術、コンピュータシステムの導入が不可欠と言える。

一方、生理工学的研究アプローチは、実験により得られたデータの処理、解析に対して、未知システムの解析に適用されている様々な工学的手法を導入するものである。すなわち、実験データのフィルタリング、前処理、特徴量の抽出、有意性の評価に対しては、デジタル信号処理やデジタル画像処理、統計、検定などの理論、方法が有効に利用できる[147],[151],[162]。また、システムを線形と見なしその内部構造を解析する線形システム理論やVolterra, Wiener理論に代表される非線形システム理論の適用も進められている[116],[165]。一般に、神経システムのモデル記述には、非線形特性が含まれるため、解析的な取り扱いが困難であり、コンピュータシミュレーションによって、その挙動が求められる。特に細胞のイオン電流モデルは、イオン電流の特性が膜電位固定実験によって得られることから、実験データとの対応付けが可能なモデル記述として活用されている(第4章)。この



ように実験データの処理、解析に対し工学的手法を適用し、生理工学的研究を展開していくためには、そのプラットフォームとしてのコンピュータ及びソフトウェア環境の充実が重要である。

### 3.3 古典的条件付け訓練システム

生物における学習・記憶の最も基本的な形態の一つとしては、条件刺激 (CS: Conditioned Stimulus) と無条件刺激 (UCS: Unconditioned Stimulus) の時間的な関連を学習させる、古典的条件付け (パブロフの条件付け) が古くから用いられている [168]。この条件付けにおける学習の獲得は、CS, UCS を与えるタイミングに強く依存しており、正確なタイミングで適切な刺激 (複数の CS, UCS を用いる場合もある) を与える必要がある。対照として用いられる CS, UCS をランダムなタイミングで与える条件では、刺激の間の時間的関連が確立しないため、同じ回数だけ刺激を与えたとしても学習の獲得は起こらない。

このような古典的条件付けをウミウシについて行う場合、CS, UCS として使用する光源 (光刺激) とモータ (回転刺激) のスイッチングには、これまでハードウェアロジック回路を用いた装置が使用されてきた [161]。しかしながら、ハードウェアで構成されたこのような制御装置は高価であり、また、刺激条件の微妙な設定ができないなどの問題があった。そこで、スイッチングに用いているロジックをパーソナルコンピュータによってソフトウェア的に実現し、安価でしかも柔軟な条件設定のできるシステムを開発して、ウミウシの条件付けに対して導入を進めた [80]。

開発したシステムでは、訓練条件の設定、変更のすべてをディスプレイに表示されたデータシート上で行うことができることから、使用にあたってプログラミングは必要としない。また、刺激を与えるタイミングは、条件付けを行う前に、グラフィックス画面に表示させた刺激制御のタイミングチャートによって確認できる。さらに、設定した条件をファイルに保存しておくことによって、同一条件の訓練を繰り返し実行できる。この刺激装置制御システムは、様々な動物に対する条件付けにおいて、各種の刺激装置を一定またはランダムな時間間隔で制御する場合に活用できるものと言える。

#### 3.3.1 ハードウェア構成

本システムのハードウェアは、パーソナルコンピュータ (IBM-PC, AT またはその互換機) と刺激装置のスイッチングや刺激回数のカウントを行うインターフェース部から構成される。開発したインターフェース部は、4グループの動物を異なる条件、無条件刺激によって条件付けすることを目的に設計し、8台の刺激装置を独立に制御できる能力を



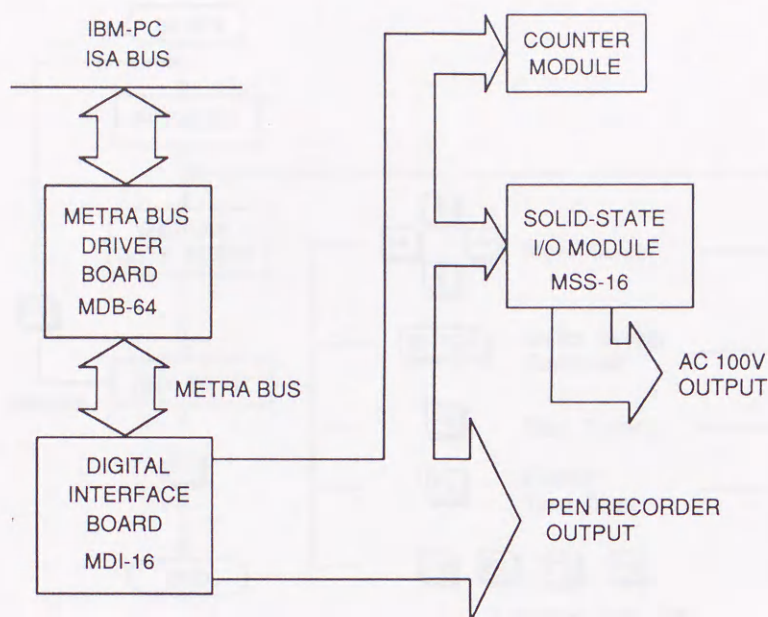


図 3.2 インターフェース部のブロック図. METRA BUS は, METRABYTE 社固有のバスシステムであり, MDB-64 によって IBM-PC の ISA バスに接続される. 使用したボードはデジタル I/O ボードであり, ISA バスに接続可能なものであれば他社の製品でも問題はない. 光源及びモータのスイッチングには SSR を用いている. カウンタモジュールは, 刺激を与えた回数のカウントを行う.

備えるものとした. なお, より多くの刺激装置や多数のグループに対する条件付けに対しては, インターフェース部の増設によって対応できる.

インターフェース部の構成は, 図 3.2 に示す. パーソナルコンピュータのバスには, ドライバボード MDB-64(METRABYTE) を挿入し, これにデジタルインターフェースボード MDI-16(METRABYTE) を接続した. 刺激装置のスイッチングは, MDI-16 の出力をソリッドステート I/O モジュール MSS-16(METRABYTE) に入力し, これによって SSR(Solid State Relay) を制御することにより行う. また, TTL レベルの MDI-16 の出力信号は, 刺激装置の動作状況を記録するためのペンレコーダ出力や, 刺激回数を計数するために設置したカウンタモジュールへの信号出力として用いた.

なお, 刺激装置制御の信号は, このようなインターフェースを増設することなく, パーソナルコンピュータに付属しているプリンタインターフェースなどから出力させることもできる(ただし, この場合にも刺激装置を制御するためのハードウェアは必要である). 制御が可能な時間は, 使用するハードウェアに依存するが, パーソナルコンピュータとしてクロック 12MHz の IBM-AT 互換機を用いて検証した結果, 50msec 以上の時間分解能が



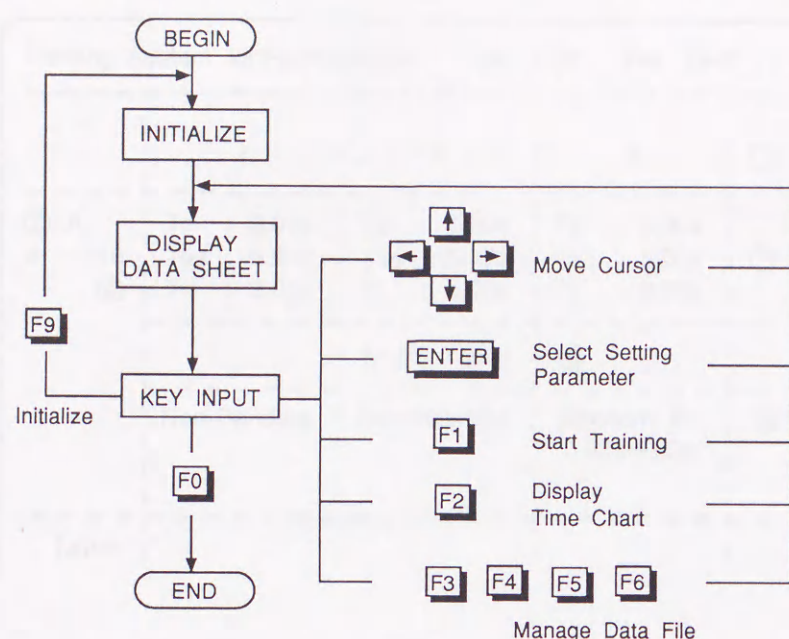


図 3.3 制御ソフトウェアのブロック図。影付きは入力するキーを表す。データファイルの管理機能としては、刺激条件のファイルへの書き込み、読みだし、データファイル名の表示、データファイルの消去がある。

得られた。

### 3.3.2 ソフトウェア仕様

刺激装置の制御ソフトウェアは、Turbo PASCAL Version 2.0 (BORLAND International) を用いて開発した。図 3.3 にプログラムの構成を示す。まず、プログラムの起動と共に各変数の初期化が行われ、刺激を与える条件設定のためのデータシートが画面上に表示される。条件の設定は、矢印キーによって設定する条件の位置にカーソルを移動させ、ENTER キーを入力することで始まる。ファンクションキーは訓練の開始、ファイルへの保存などを行う場合に使用する。

図 3.4 は刺激条件の設定を行っている画面の一部である。1 から 3 までの番号 (①) は制御すべき刺激装置に付けられた番号 (各装置は 1, 2, 3, ... と番号付けする) であり、② のアルファベットは異なる条件で刺激を与える動物のグループ (すなわち、グループごとに A, B, C, ... とラベルを付けていく) を表す。この画面表示は、各グループに対する刺激の条件を記入したデータシートを重ねた状態をイメージしており、PageUp または PageDown キーを入力することによって、別のグループの条件に移ることができる。



Training System for Hermissenda				Ver. 1.00	File : Test
	1	2	3	①	
② A	Td : 3.00s	Td : 3.00s	Td : 3.00s		
# : 10	Tsd : 5.00s	Tsd : 5.00s	Tsd : 5.00s	③	
④	Ti : 3.00s	Ti : 3.00s	Ti : 3.00s		
		A1 ↑ ( 1.00s)	⑤		
	Non-Random	Non-Random	Random Ti	⑥	
	-	-	0.00s-5.00s		
Label					

図 3.4 条件設定を行うデータシート画面の一部。グループ A の刺激条件を設定している。

一定の時間間隔で刺激を与える場合には、刺激を与える時間幅 (Td)、条件付けを開始してから最初の刺激を与えるまでの遅れ時間 (Tsd)、刺激を与える時間間隔 (Ti) 及び刺激回数を設定する (③,④)。刺激を与えるタイミングは、他の刺激装置に対して設定した条件に基づいて決めることもできる。すなわち、⑤において、参照するグループ名 (A,B,C...), 装置の番号 (1,2,3,...), 及び、参照する刺激の立ち上がり (↑) または立ち下がり (↓) からの時間を入力することによって設定することが可能である。この例は刺激装置 1 がオンとなってから、1 秒後に刺激装置 2 がオンになるように設定した場合であり、多くのグループや刺激装置を使用する条件付けにおいて刺激条件を変更したい場合に特に有効である。

ランダムな間隔で刺激を与える条件 (Ti を一様乱数で変化させる) は、通常は Non-Random と表示されている位置 (⑥) にカーソルを移動させ、改行キーを入力して Random に変更することによって設定できる。この例では、Ti の最小値を 0 秒、最大値を 5 秒に設定している (Ti の欄に表示された値は平均値を表す)。また、同一グループ内において特定の刺激がオンの場合に、別の刺激を必ずオフにするという複雑な条件 (排他的条件) もこの下の欄で、刺激の番号を入力するだけで設定できる。なお、いずれの欄においても、時間の単位には s(秒), m(分), h(時) が使用できる。

設定した条件は、グラフィックス画面上でタイムチャートとして表示され、視覚的に確認できる。図 3.5(a) は、2 つの刺激装置を用いた場合の刺激条件の設定例である。各刺激



の時間幅は20秒とし、刺激1は最小60秒から最大90秒のランダムな時間間隔で与えられるものとする。刺激2もランダムな時間間隔で与えられるが、排他的条件の指定により、刺激1と同時にオンになることはないものとする。この条件をタイムチャートで表示した結果が図3.5(b)であり、設定した条件を満たす制御パルス列が生成されていることを確認できる。なお、このグラフは時間を横軸に、各パルスの立ち上がりは刺激装置をオンにするタイミング、立ち下がりオフにするタイミングを表す。

条件付けの実行は、F1キーを入力することによって開始することができ、この条件付けに要する時間がデータシートのTraining欄に表示される。刺激条件の保存は、F4キーを入力した後、ファイル名を選択または入力することによって行うことができる。ファイルに保存したデータの読み込みやデータファイルの消去、ファイル名の表示は、それぞれF3, F5, F6キーによって行うことができる。

### 3.3.3 使用結果

開発したシステムは、豊橋技術科学大学及びNIH (National Institute of Health) において、ウミウシの古典的条件付けに使用されている。本装置は4グループの動物に対して異なる刺激条件で独立に条件付けを行うために開発したものであり(図3.6)、所要の仕様を満たす性能が得られた。さらに、開発したシステムは従来の装置に比べて安価であり、一度設定した条件を繰り返し使用できることから、条件付けを効率よく進めることが可能となった。

古典的条件付けは最も基本的な学習プロトコルの一つであり、本システムはラットやウサギなど他の動物に対する条件付けに対しても活用できる。動物の訓練や行動の観測など、長時間にわたる作業に対して様々な装置が開発されてきたが、これまで装置化されていた機器に対してもパーソナルコンピュータが応用できるものがあり、装置の低コスト化及び多機能化の面からも極めて有効であると考えられる。

## 3.4 生理実験・データ解析システム

生理実験データの収集、及び、その解析を進めていく上で、コンピュータの導入は極めて有効であり、生理実験のためのソフトウェアも数多く開発、市販されている[57]。しかしながら、これらのほとんどは実験システムのコントロール、実験データの収集を中心に考えられたものであり、収集したデータの解析環境が十分整備されているとは言えない。一方、データ解析用のソフトウェアにおいては、生理実験を直接意識したものではなく、汎用的なソフトウェアを用いて目的とする処理を実行できるように記述したり、機能を追加



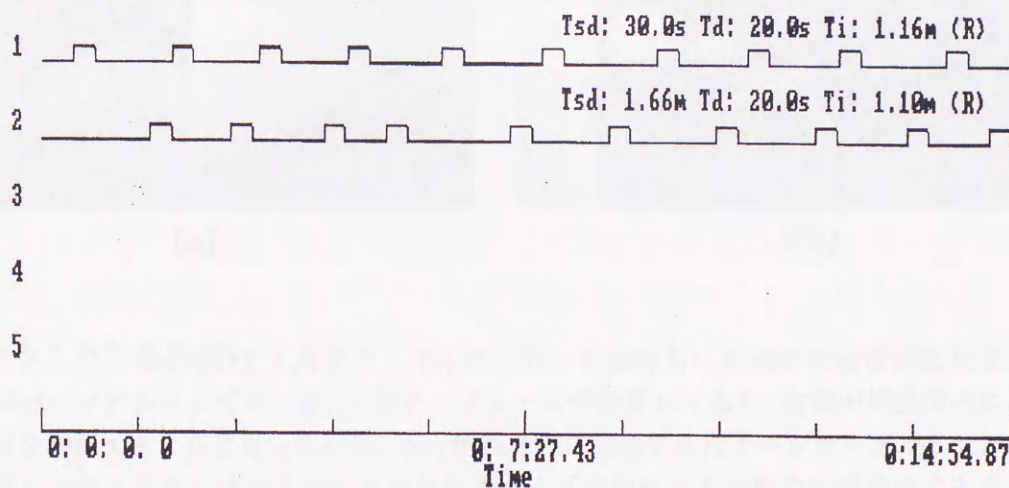
Training System for Hermissenda Ver. 1.00 File : testrnd

	1	2	3	4	5
A	Td : 20.0s	Td : 20.0s	Td :	Td :	Td :
# : 10	Tsd : 30.0s	Tsd : 1.66m	Tsd :	Tsd :	Tsd :
	Ti : 1.16m	Ti : 1.10m	Ti :	Ti :	Ti :
	Random Ti 60.0s-90.0s	Random Ti 38.7s-1.60m Ex Stim : 1	Non-Random -	Non-Random -	Non-Random -
Label	Light	Rotation			
Date	Mar. 15, 87'		Training	0:14:54.87	
Comment	Test Data For Random Condition				

1:Exec 2:Test 3:Load 4:Save 5:Erase 6:Dir 7: 8: 9:Clear 0:Quit

(a)

Test Training Condition ( Device : A )



Quit (y/n) ?

(b)

図 3.5 刺激条件の設定画面とタイムチャート. (a) 2つの刺激装置を制御するための条件設定例. (b) (a) で設定した条件によるスイッチングの状態.



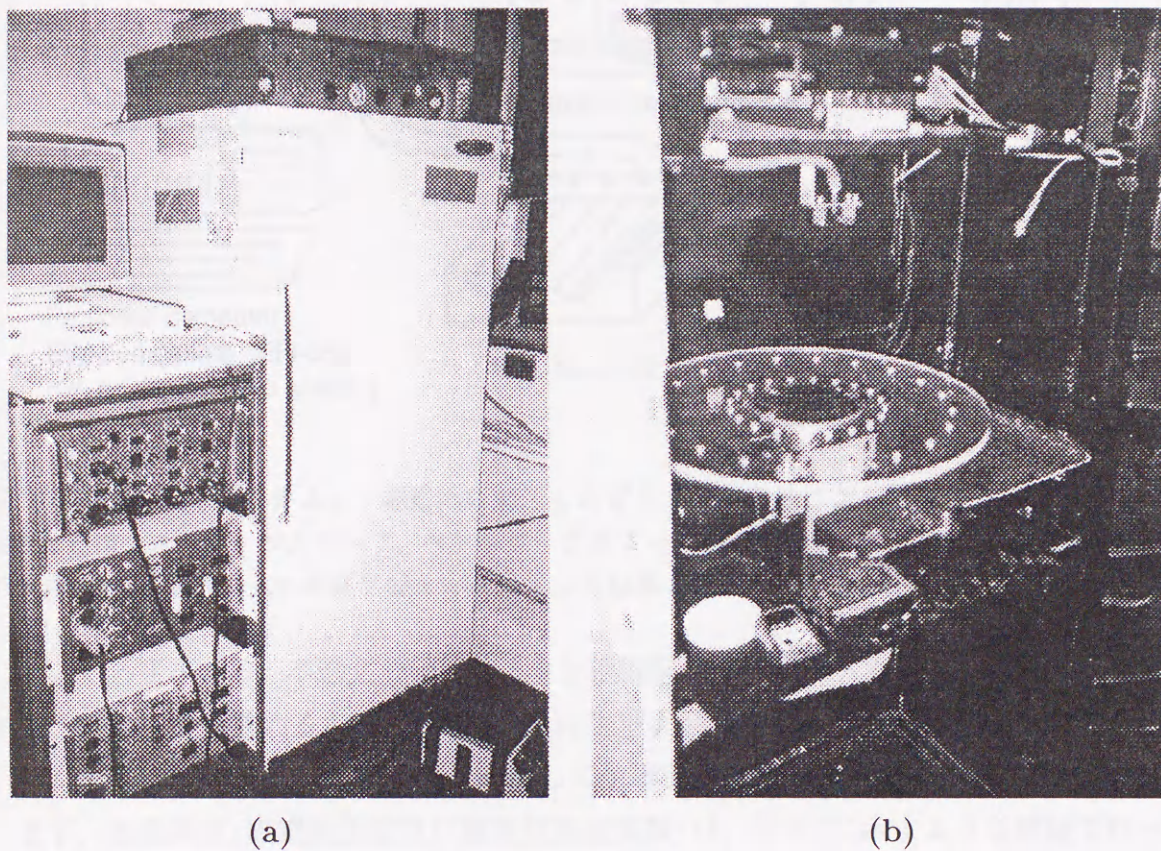


図 3.6 ウミウシ条件付けシステム (a) ウミウシの条件付けのための刺激制御装置。左側のラックにパーソナルコンピュータ、インターフェースが設置してあり、右側の恒温槽内にあるモータと光源を制御するようになっている。(b) 恒温槽内に設置されたターンテーブルと光源。アクリル板のターンテーブルにはウミウシを入れたチューブを固定するための穴が空けてある。ターンテーブルの下にあるモータによって回転刺激を与えることができる。ターンテーブルの上には、光源であるファイバーライトが設置してある。



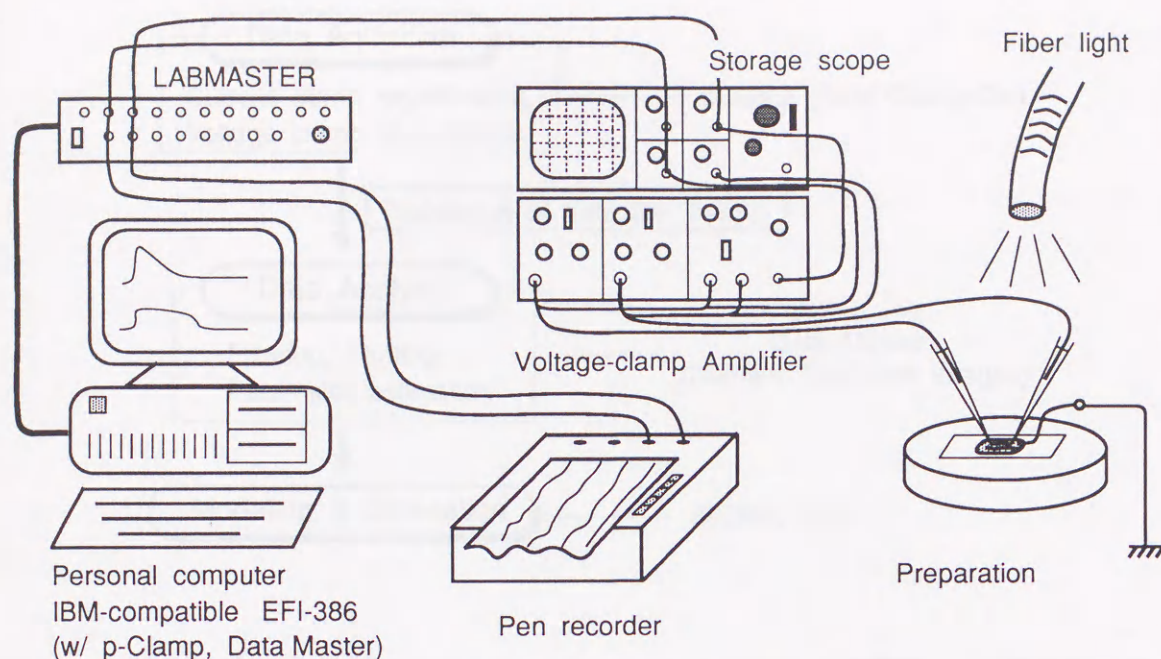


図 3.7 生理実験システム。細胞内に刺入したガラス微小電極によって測定された膜電位、膜電流などは、ストレージスコープ、ペンレコーダによって観測すると共に、LABMASTERによってA/D変換し、パーソナルコンピュータによって収集した。

していく必要がある。本論文では、ウミウシ視細胞の学習獲得メカニズムに対する生理工学的アプローチを進めるために、次のように生理実験からデータ解析に至る各々のステップにおいて、市販のソフトウェアを活用して生理実験及びデータの解析環境を構築した。

まず、生理実験(膜電流固定及び膜電位固定実験)は、図3.7に示すような環境で行った[72], [154]。実験条件の設定及びデータの収集にはp-Clamp (Axon Instruments, Inc.)を用い、実験で得られたデータは、p-Clampで用いられているデータファイルフォーマットでディスクファイルとして保存した。

こうして得られたデータファイルはフォーマット変換を行い、データ解析ソフトウェアData Master (Durham Technical Images)によって、フィルタリングやプロットなどの様々な処理を行った[58], [79]。Data Masterではユーザ独自の機能を自由に追加することができることから、データファイルのフォーマット変換、イオン電流モデルのパラメータ推定など、内部コマンドとして提供されていない処理については、新たにData Masterの外部コマンドとしてプログラムを作成、登録した。

本論文では、図3.8のように、2つの市販のソフトウェアに必要な機能を追加し、これらをデータファイルで結合することによって、生理実験データの収集、解析環境を実現し



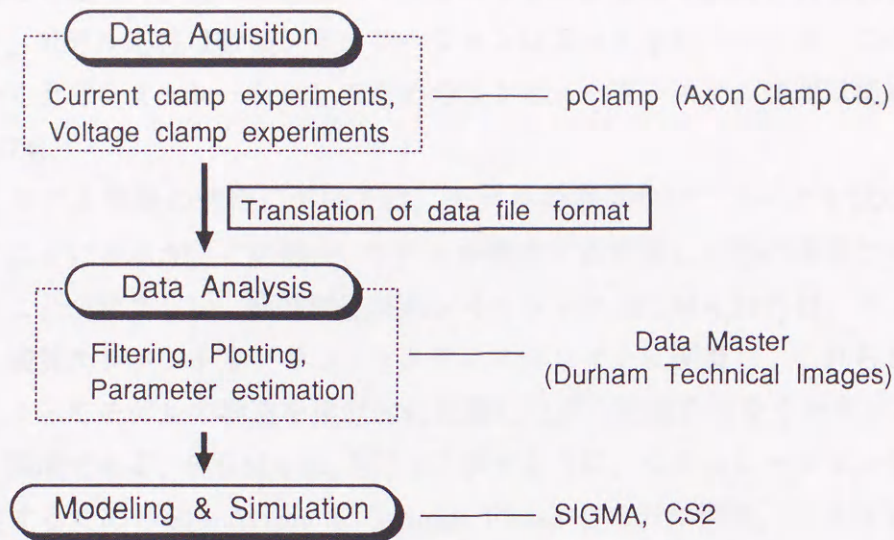


図 3.8 生理実験, データ解析, シミュレーションのソフトウェア環境. 生理実験, データ解析には, 2つの市販のソフトウェアを使用し, モデル構築及びシミュレーションには, 独自に開発したシミュレーションシステムを用いた.

た. いずれのソフトウェアも同一のパーソナルコンピュータ (IBM-PC, AT 互換機) において使用できることから, 通常の使用においては操作の複雑さはない. しかしながら, このような異なるソフトウェアを活用して, 実験から解析に至る環境を構築した場合には, 実験から解析に移る際に常にデータ形式あるいはファイルフォーマットの変換というオーバーヘッドを伴う点は解決すべき問題点である.

### 3.5 モデリング・シミュレーションシステム

神経細胞のように複雑な挙動を示すシステムの特性を調べ, その本質的メカニズムを解明する上で, モデリング及び数値シミュレーション法は極めて有効な手段である. 一般に神経細胞の挙動は細胞膜電位の時空間的变化として観測され, 時間に対する常微分方程式系, あるいは, 時間と位置に対する偏微分方程式系として扱われている. 軸索の一部分や単離した細胞体など, 空間的に等電位 (スペースクランプ状態) と見なせる領域の挙動は, 空間的に均一と考えられることから, このような領域における膜電位の時間的变化は, イオン電流のダイナミクスのみに基づく常微分方程式によって記述できる [164], [166].

このような条件下において, 神経細胞の膜電位変化は, 時間と膜電位に依存した顕著な非線形特性を示すことが知られている. このような非線形システムの挙動を解析的に調べ



ることは極めて難しく、通常は数値シミュレーションによって解析が行なわれる。本論文においても、モデル応答は数値シミュレーションによって求めていくが、このような研究を進めていく上でシミュレーションのためのコンピュータシステム環境は極めて重要な意味を持つ [174]。

一般に、モデル構築の過程においては、モデルの構造やパラメータを試行錯誤的に変更していくことになるが、この場合、モデルを構成する要素と全体の構造との対応付けが容易であることが望ましい。会話型連続系シミュレータ:SIGMA[167]は、アイコンとして表示される演算エレメントをグラフィックディスプレイ上に配置し、これらを互いに接続することによってモデルの構造を視覚的に把握しながら記述を行なうモデリング・シミュレーション環境である。SIGMAは、図3.9に示すように、シミュレーションや結果出力の条件を設定するためのSimulation & Graphic Phaseとモデル構築、シミュレーションを支援するDiagram Phase, Macro Editor, Data Generatorから構成されている。

Diagram Phaseにおけるモデルの構築では、演算エレメントに対応したキーを入力し、クロスヘアカーソルによって配置する位置を指定する。また、配置したエレメント間を結ぶ接続線の座標も、同様の方法で指定していく。積分器における初期値など、エレメントに付属するパラメータの設定・変更も、カーソルにより目的とするエレメントを指定することによって行うことができ、正にシステムの回路図を作成する要領でモデル記述が可能である。

シミュレーションの実行から結果の表示に至る一連の処理は、必要なコマンドを記述したマクロファイルを作成、使用することによって自動的に行なうこともできる。このマクロファイルは、Macro Editorあるいはプログラム作成などに用いるテキストエディタを用いて編集・作成することができる。また、Data Generatorは、実験データなど外部ファイルからデータを読み込む機能である。SIGMAは非線形最適化手法に基づくモデルパラメータ推定機能を備えており、ファイルから読み込んだ実験データからモデルパラメータを推定することができる。

図3.10は、HodgkinとHuxleyが提案したヤリイカ神経軸索興奮のモデル(Hodgkin-Huxleyモデル)[73]をSIGMAを用いて記述し、シミュレーションを実行している状況である。SIGMAは、各エレメントの数や接続状態から、演算の規模やモデル各部の関連が視覚的に把握でき、CADやCAEを用いるのと同様の感覚で動的な非線形システムの記述が行えることから、システム解析に携わる研究者、技術者にとって受け入れやすい環境と言える。

最近になって、SIGMAと同様の発想に基づくシミュレーションシステム: VisSim (Visual Solutions, Inc.) も市販されている [169]。VisSimでは、いくつかの演算エレメントの集合



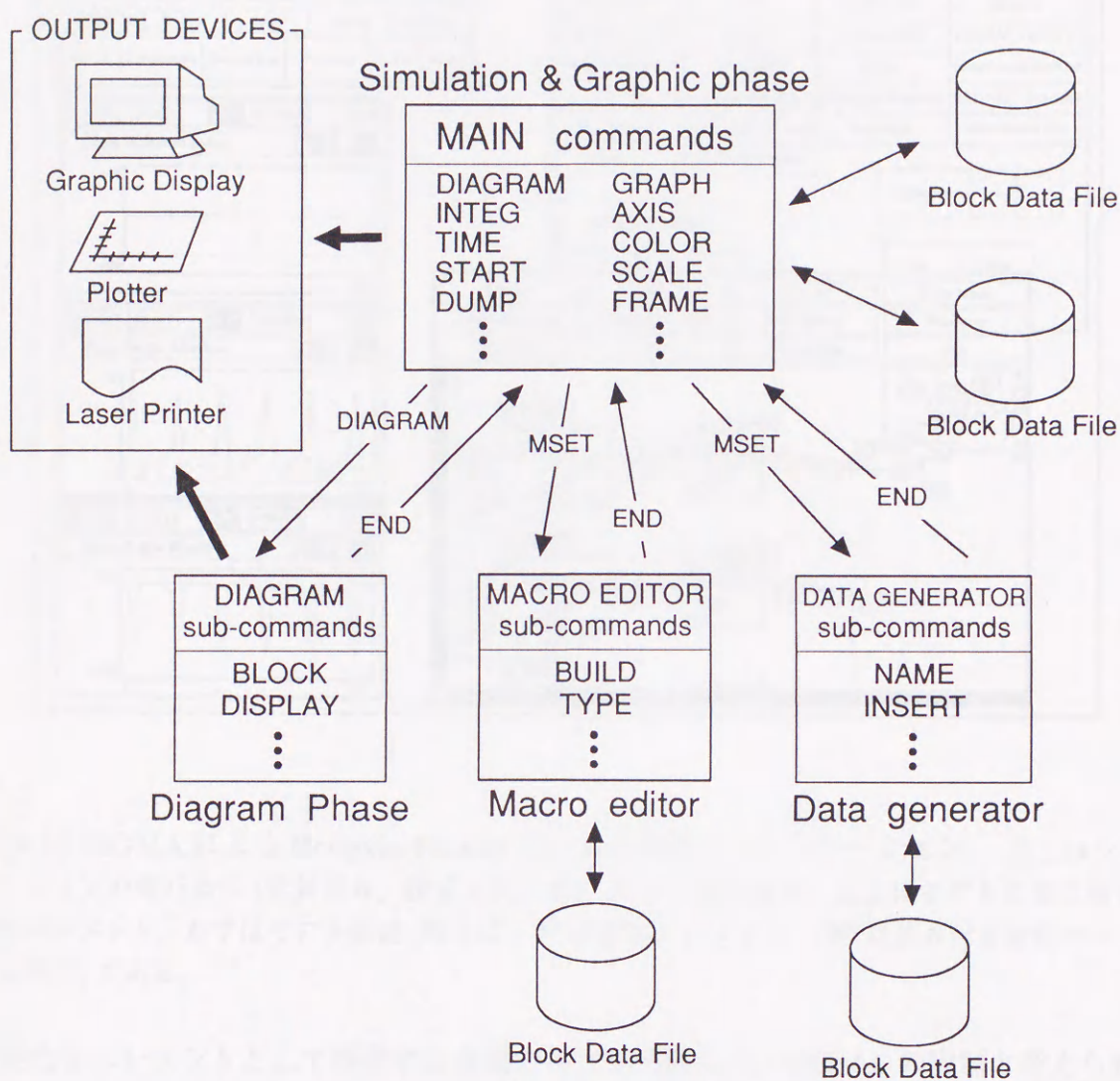


図 3.9 会話型連続系シミュレータ: SIGMA の構造. SIGMA は Simulation & Graphic phase を中心に、演算エレメントを接続してモデル記述を行う Diagram phase, シミュレーションの自動実行のためのマクロを作成する Macro editor, 実験データの読み込みなどの設定を行う Data generator から構成される. Diagram phase で作成したモデルやシミュレーションの実行結果は、ディスプレイやレーザプリンタに出力できる.



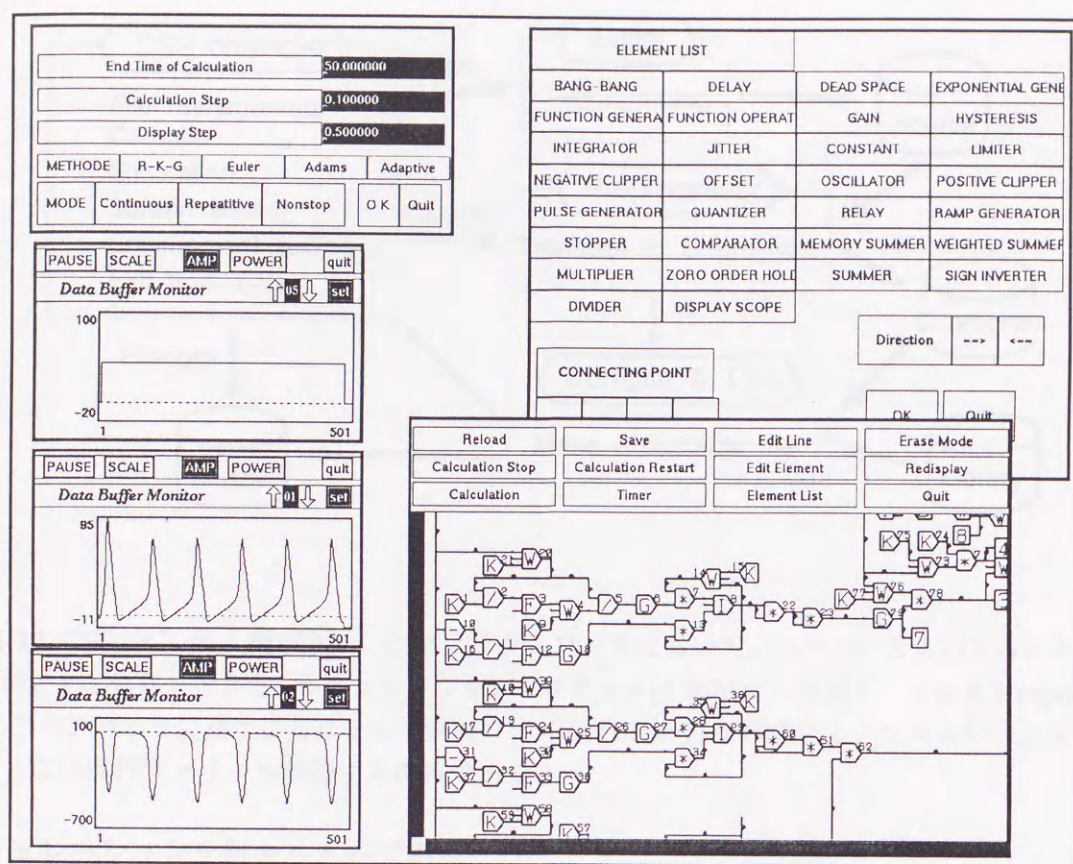


図 3.10 SIGMA による Hodgkin-Huxley モデルの記述とシミュレーション。左上はシミュレーションの実行条件 (計算刻み, 積分方法など), 左下は出力波形, 右上はモデル記述に用いる演算エレメント, 右下はモデル記述 (例えば, '\*' は乗算エレメント, 'W' は重み付き総和エレメントを表す) である。

を新たなエレメントとして使用する合成ブロック機能など, SIGMA の課題と考えられていた点が解決されている。また, SIGMA 及び VisSim はベースとして, X-window や MS-Windows を使用しており, このような標準的なウィンドウシステムを基に GUI (Graphic User Interface) に基づき, 実験からデータ解析, さらにシミュレーションに至る環境を開発, 整備していく必要がある。

一方, モデル構造やパラメータがある程度決まった後は, シミュレーションを効率良く実行することが最優先となる。本論文では, モデル構造やパラメータがある程度決まっからは, 連続系シミュレーションシステム CS2[77],[134] を使用して, シミュレーションを実行した。CS2 は, 図 3.11 に示すように, エディタで作成したプログラムをプリプロセッサにより C 言語に変換, これをコンパイルすることによって実行ファイルを作成し,



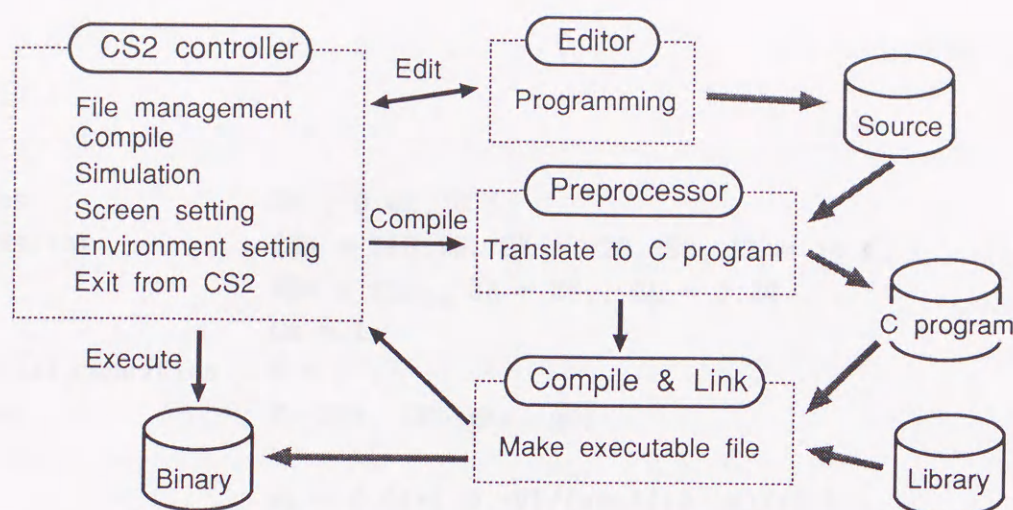


図 3.11 CS2 システム構成図. CS2 はコントローラにおいて、コマンドを入力することによって目的とする処理を行える。シミュレーションプログラムは Editor で作成し、これを Preprocessor 及び C コンパイラに通すことによって実行ファイル (Binary) を作成する。シミュレーションの実行は、この実行ファイルを起動するのみである。

シミュレーションを行なうものである。

図 3.12 は、CS2 によって記述した Hodgkin-Huxley モデルである。'@' で始まる文は、シミュレーション時間の設定、パラメータ値、結果出力する変数名などを指定する制御文であり、これらの制御文に引き続いてモデル記述を行う。モデルの構造は方程式にほぼ対応しており、各変数の間の相互関連を調べるためには式を追って行く必要があるため、モデル構築時には、その構造を把握することが SIGMA に比べて難しい傾向がある。しかしながら、SIGMA に比べてその記述はコンパクトでシミュレーション実行速度も速いことから、モデルやシミュレーション条件が複雑化するにつれてその有効性は高くなる。そのため、本論文におけるモデル構築、シミュレーションでは、SIGMA によりモデル構造の把握しながら部分的にシミュレーションを行い、全体の構造、パラメータを決定した後は CS2 によって様々な条件についてのシミュレーションを行うという方法を用いた。

### 3.6 まとめ

神経系の情報処理メカニズムに対して生理工学的アプローチを進めるために必要な環境について、本論文で利用したシステムを中心に展望した。パーソナルコンピュータやワークステーションは、生体・生理実験に対しても様々な形で導入されつつある。すなわち、



```

@timer      20., 0.01, 0.1;
@parameter  ENa = 115.15, EK = -20.453, EL = 10.6,
             GNa = 120., GK = 36., GL = 0.24,
             Cm = 1;
@initial_condition  V = 0.;
@print          V, INa, IK, gNa, gK;

an = 0.01*(10.-V)/(exp((10.-V)/10.)-1.);
bn = 0.125*exp(-V/80.);
am = 0.1*(25.-V)/(exp((25.-V)/10.)-1.);
bm = 4.*exp(-V/18.);
ah = 0.07*exp(-V/20.);
bh = 1./(exp((30.-V)/10.)+1.);

n = intgrl( an/(an+bn), an*(1.-n)-bn*n );
m = intgrl( am/(am+bm), am*(1.-m)-bm*m );
h = intgrl( ah/(ah+bh), ah*(1.-h)-bh*h );

gNa = GNa*m*m*m*h;
gK  = GK*n*n*n*n;

INa = gNa*(V-ENa);
IK  = gK *(V-EK );

I = 4. * ( step(5.) - step(150.) );

V = intgrl( V, ( I - INa - IK - GL*(V-EL) )/Cm );

```

図 3.12 CS2 による Hodgkin-Huxley モデル記述. '@' で始まる文はシミュレーションの時間刻み, パラメータ値に設定などを行う制御文である. 実際のモデル記述は 8 行目から始まる. ステップ波形の発生 step() や積分関数 intgrl() はライブラリとして備えている.



生理実験では、多くの機器を長時間にわたり正確にコントロールする、あるいは多くの計測データを収集するなどの機会が多くあり、コンピュータの活用が有効な分野の一つであると言える。

本論文では、生理実験、データ解析に至る過程に関しては、市販のソフトウェアに必要な機能を追加して、実験・解析環境を構築した。一方、モデリング、シミュレーションに関しては、新たにソフトウェアの開発を行なった。これによって、生理実験データの収集、解析、さらに、これに基づくモデリング、シミュレーションが可能となり、実験データの定性的な評価だけでは得られなかった特徴を抽出し得る環境が実現された。

しかしながら、本研究で実現した環境は、目的の異なるソフトウェアを統合したものであり、データファイルのフォーマット変換が必要である、各々のソフトウェアでユーザインターフェースが異なるなどの問題があった。これに対して、現在、GUI(Graphic User Interface)をベースにした統一的なユーザインターフェース環境がOSレベルで整備されつつあり、また、生理実験、データの解析、モデルシミュレーションなどを支援する様々なシステムも入手可能となっている[69]。このような支援環境の充実により、生体システムの本質的メカニズム解明を目指し、生理工学的研究アプローチが大いに適用されていくものと考ええる。



## 第 4 章

# イオン電流機構に基づく細胞のモデル記述

### 4.1 はじめに

神経系における情報伝達、処理機能は神経細胞の活動を伴った現象であり、そのモニターとしては、通常、神経細胞の膜電位変化(細胞応答)が測定されている。1952年、HodgkinとHuxley[73]によって、刺激に対する細胞応答の形状、発生頻度などが、細胞膜を通過するイオン電流特性によって記述できることが示されて以来、イオン電流に基づくモデル記述、解析が様々な神経細胞について行われている。イオン電流モデル、さらにイオン電流に基づく細胞モデルとしては、一般的にHodgkin-Huxleyが提案した記述が用いられている。しかしながら、このモデル記述は非線形連立常微分方程式であり、実験によって測定されたイオン電流波形から、必要なパラメータを求める過程が極めて煩雑であった。本章では、イオン電流機構に基づく細胞のモデル記述について述べた後、実験データからモデルパラメータを求める過程に非線形最適化法を用いた新しいモデル構築法を提案する。

### 4.2 神経細胞のイオン電流モデル

#### 4.2.1 イオン電流特性とそのモデル記述

細胞内外を隔る細胞膜は、細胞内におけるイオン(カリウム、ナトリウムなど)濃度を一定の状態に保つメカニズムを備えると共に、各イオンに対して異なる透過性(選択的透過性)を示すイオンチャネルを有している。細胞膜電位は、細胞内外に存在する主要なイオンの透過性の違いと細胞内外における濃度の不均衡によって生じ、その大きさは次式(Goldman-Hodgkin-Katzの式)で与えられる[88]。

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_o} \quad (4.1)$$



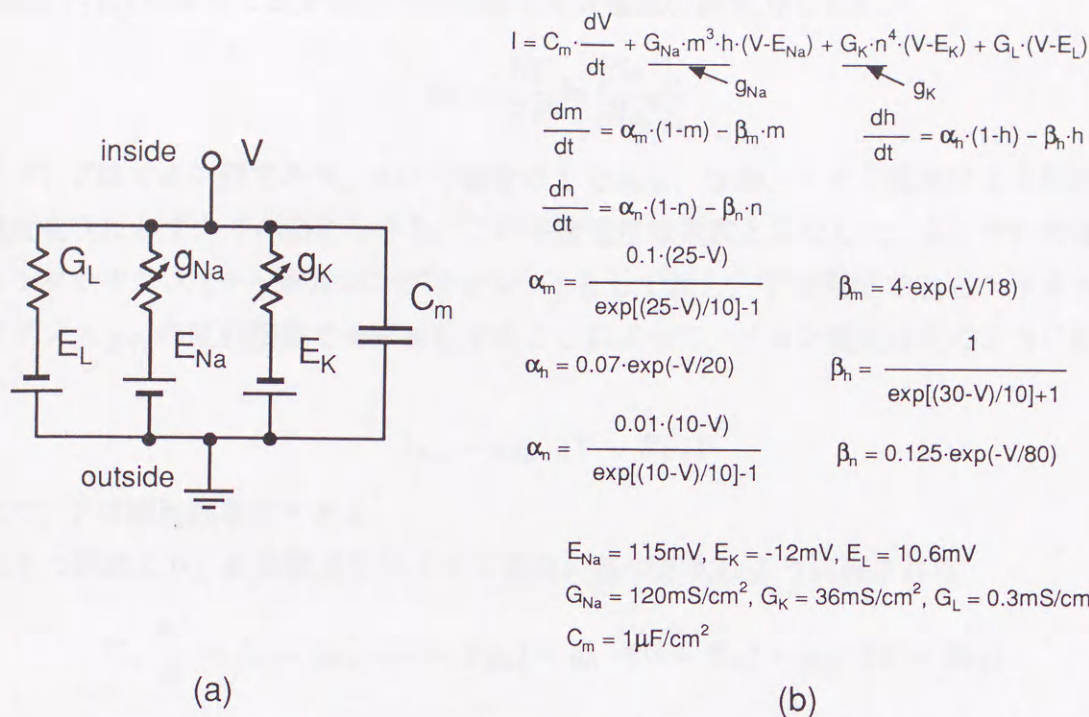


図 4.1 Hodgkin-Huxley によるヤリイカ巨大軸索の神経興奮のモデル記述 [73]. (a) 軸索細胞膜の等価回路モデル. イオン電流は起電力とコンダクタンスの直列接続で表し, それらが膜容量  $C_m$  に並列に接続されるとして表した. (b) 方程式記述. 最初の式は (a) の回路方程式,  $m$ ,  $h$ ,  $n$  の時間的変化は一次常微分方程式で表される. 方程式含まれるパラメータは, 膜電位に対して非線形の依存特性を持つ.

ただし,  $R$  は気体定数,  $T$  は絶対温度,  $F$  はファラデー定数である. また,  $P_K$ ,  $P_{Na}$ ,  $P_{Cl}$  はそれぞれ  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  に対する膜の透過定数で,  $[x]_i$ ,  $[x]_o$  はそれぞれ細胞内外におけるイオン  $x$  の濃度を表す. 静止状態の膜電位を求める上では上式は有効であるが, 実際の細胞においては, 各イオンの透過定数が膜電位に依存して大きく変化することから, 膜電位変化の動的特性を含めた解析はこのような記述では困難である.

Hodgkin と Huxley は, ヤリイカ巨大軸索に対して膜電位固定実験を行った結果から, 細胞膜を透過するイオンの流れをイオン種 ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) ごとに独立な電流成分 (イオン電流) としてとらえ, これを基に細胞膜の電気的特性を図 4.1 の等価回路と方程式によって記述した (Hodgkin-Huxley モデル, 以下 H-H モデルと略す) [73]. 各イオン種について (例として  $Na^+$  の場合を示す), 細胞内外の濃度勾配によって生じる平衡電位  $E_{Na}$  は, 次式



(Nernst の式) によって表され, これを各イオン電流の起電力とした.

$$E_x = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[Na^+]_i}{[Na^+]_o} \quad (4.2)$$

ここで,  $Z$  はイオン価であり,  $Na^+$  の場合は 1 である. なお, イオン電流による細胞内外の濃度変化はわずかであることから, この平衡電位は定数とみなした. 各イオンの透過率をコンダクタンス (チャネルコンダクタンス) として表し, 平衡電位  $E_{Na}$  とチャネルコンダクタンス  $g_{Na}$  の直列接続でモデル化することによって, イオン電流は次のように記述された.

$$I_{Na} = g_{Na} \cdot (V - E_{Na}) \quad (4.3)$$

ここで,  $V$  は細胞膜電位である.

以上の記述より, 細胞膜電位はイオン電流に基づき次のように表される.

$$C_m \frac{dV}{dt} = I_{in} - g_{Na} \cdot (V - E_{Na}) - g_K \cdot (V - E_K) - g_{Cl} \cdot (V - E_{Cl}) \quad (4.4)$$

ただし,  $C_m$  は細胞膜が持つキャパシタンス,  $I_{in}$  は外部から加えた刺激電流入力である. 膜電位に依存したイオンの膜透過性は, チャネルコンダクタンスに膜電位, 時間依存特性を導入することによって記述できる. H-H モデルでは, 細胞内への電流注入や特定のコンダクタンス変化に対する膜電位変化を求めることができることから, 細胞の電気的特性を記述, 解析する標準的なモデルとして様々な細胞に適用されている.

#### 4.2.2 イオン電流モデル記述と電位依存パラメータ

イオン電流モデルが構築できれば, 式 (4.4) によって, 細胞膜電位変化が得られ, イオン電流特性と細胞応答との関連を調べることができる. しかしながら, そのためには細胞によって異なるイオン電流成分を抽出, 測定し, さらにモデル記述に必要なパラメータを求める必要がある.

イオン電流の特性は, 通常, 目標とする電位 (コマンド電位) と細胞膜電位との差に応じた電流を細胞内に注入し, 膜電位を強制的にコマンド電位に一致させる膜電位固定実験によって測定される. 膜電位を一定に保つことによって, 式 (4.4) の左辺における  $dV/dt$  は 0 となり, このとき外部から加えた電流がイオン電流の総和となる. 複数のイオン電流が存在する場合に観測される電流は, 時間及び膜電位に対して異なる依存特性を持つ成分の総和であり, 目的とするイオン電流成分は, 特定のイオンチャネルの働きを阻害する薬物を細胞外液中に投与するなどの方法によって抽出, 測定される.



さて、イオン電流のモデル記述は次式で表され、その時間、膜電位依存特性はチャネルコンダクタンスの特性に帰着する。

$$I_{ion}(t, V) = g_{ion}(t, V) \cdot (V - E_{ion}) \quad (4.5)$$

ただし、 $t$  は時間、 $V$  は膜電位、 $E_{ion}$  は Nernst の方程式で得られるイオン種  $ion$  の平衡電位である。Hodgkin-Huxley モデルでは、チャネルコンダクタンスの特性を、活性化、不活性化という2つの独立したプロセスの積として、次のように記述する。

$$g_{ion} = G_{ion} \cdot m(t, V)^P \cdot h(t, V) \quad (4.6)$$

ただし、 $G_{ion}$  はコンダクタンスの最大値を表す定数、 $m$  及び  $h$  はそれぞれイオンチャネルが活性化、不活性化状態となる確率を表す変数(したがって、 $m$  及び  $h$  は0から1までの値をとる)、さらに  $P$  は  $m$  の状態数を表す指数である。

コンダクタンスの時間的変化を表す  $m$ 、 $h$  は、イオンチャネルを制御するゲート因子を仮定し、その動作を次の1次常微分方程式で表したものである。

$$\frac{dm(t, V)}{dt} = \alpha_m(V) \cdot (1 - m(t, V)) - \beta_m(V) \cdot m(t, V) \quad (4.7)$$

$$\frac{dh(t, V)}{dt} = \alpha_h(V) \cdot (1 - h(t, V)) - \beta_h(V) \cdot h(t, V) \quad (4.8)$$

すなわち、 $m$  及び  $h$  はゲート因子がチャネルを開放する状態にある確率を表し、 $(1 - m)$ 、 $(1 - h)$  はチャネルを閉鎖する状態にある確率を表す。 $\alpha$  及び  $\beta$  は、これらの状態間を遷移する速度を表すパラメータであり、一般に、膜電位に対して非線形の特性を示す。

以上のことから、イオン電流のモデル記述を得るためには、平衡電位  $E_{ion}$ 、最大コンダクタンス値  $G_{ion}$  及び指数  $P$  を求めると共に、速度パラメータ  $\alpha$ 、 $\beta$  の膜電位依存特性を求める必要がある。

### 4.2.3 イオン電流モデルによる解析

イオン電流に基づく細胞モデルは、Hodgkin-Huxley 以降、生理実験データと対応付けが可能な記述として、表4.1に示すように、様々な細胞・神経系に適用されている。神経軸索に対して提案されたこのモデル記述は、80年代になって、中枢神経や網膜細胞など、様々な細胞に適用されるようになり、また、最近では、細胞内におけるカルシウムイオン濃度変化やそれに伴うカリウム電流特性を考慮したモデル化も進められている。

生理実験データに基づいて構成されたイオン電流モデルの応用としては、特定のイオン電流変化と細胞応答との関連を調べる場合に適用されている。すなわち、イオン電流や



表 4.1 生理実験データに基づく細胞のモデル記述.

著者	細胞	対象	文献
Hodgkin, Huxley (1952)	squid giant axon	$I_{Na}, I_K$	[73]
Frankenhauser (1963)	<i>Xenopus laevis</i> sciatic nerve	$I_K, I_{Na}(I_p)$	[65]
Ebihara, Johnson (1980)	tissue-cultured heart cell	$I_{Na}$	[59]
Llinás et al. (1981)	squid giant synapse	$I_{Ca}$	[112]
Connor, Nikolakopoulou (1982)	<i>Archidoris motereyensis</i> giant neuron	Ca buffering	[48]
Zucker (1985)	squid giant axon	Ca diffusion	[178]
Beeler, Reuter (1986)	ventricular myocardial fiber	$I_{Na}, I_K, I_{Ca}$	[4]
Johansen et al. (1987)	leech anterior lateral giant cell	$I_{Ca}, I_{K(Ca)}$	[87]
Belluzzi, Sacchi (1988)	rat sympathetic neuron	$I_{Na}, I_A, I_K$	[32],[33]
Usui, Ikeno(1988)	retinal horizontal cell	$I_A, I_{K_A}, I_K,$ $I_{Ca}, I_{glutamate}$	[163]
Ikeno et al. (1989)	<i>Hermisenda</i> type B photoreceptor	$I_A, I_K, I_{K(Ca)}$ $I_{Ca}, I_{light}$	[78]
Yamada et al. (1989)	bullfrog sympathetic ganglion B type cell	$I_{Na}, I_{Ca}, I_K, I_{K(Ca)},$ $I_{AHP}, I_M, I_A, I_{syn}$ Ca buffering, K accumulation	[96],[175]
Torre et al. (1990)	<i>Triturus cristatus</i> rod	phototransduction	[158]
Borg-Graham (1991)	hippocampal pyramidal cell	$I_{Na}, I_K, I_A, I_{K(Ca)},$ $I_{AHP}, I_M, I_Q, I_{Ca}$ Ca buffering	[38],[39]
Ekeberg et al. (1991)	lamprey CNS neuron	$I_{Na}, I_K, I_{K(Ca)}, I_{Ca},$ $I_{syn}, I_{NMDA}$ Ca buffering	[61]
Brodin et al. (1991)			[42]
Koide, Farley (1992)	<i>Hermisenda</i> type B photoreceptor	$I_A, I_K, I_{K(Ca)}$ $I_{Ca}, I_{light}$	[98]
Lockery, Spitzer (1992)	<i>Xenopus</i> spinal neuron	$I_K, I_{Na}, I_{Ca},$ $I_{K(Ca)}, I_A$	[113]
McCormick (1992)	thalamocortical relay neuron	$I_A, I_K, I_{Na}, I_C,$ $I_L, Ca$ buffering	[119]
Shirakawa et al. (1993)	ventricular myocardial fiber	$I_{Na}$	[145]



膜電位応答はそれぞれ独立に測定され、しかも、これらの応答特性が時間や膜電位に依存した複雑な非線形特性を持つために、測定データを互いに関連付けて正確に評価、考察することが難しく、モデルを用いてこれらの間の因果関係の解析が行なわれている [97].

さらに、ギャップジャンクションと呼ばれる電気シナプスによって構成された神経回路は、単一細胞モデルをシナプスを表すコンダクタンスで結合することによってモデル記述が可能である。網膜外網状層における水平細胞は電気シナプスによって隣接細胞と結合した構造を持ち、網膜画像の空間処理、色対比信号を形成する機能を実現している。水平細胞のネットワークモデルは、単離、培養された水平細胞のイオン電流特性から構築された単離細胞モデル [163] を、電気シナプスを表すコンダクタンスで結合することによって構築され、網膜における時空間情報処理メカニズムの解析に用いられている [76], [89]. さらに、イオン電流モデルを用いることにより、細胞応答波形から細胞への入力電流を推定することが可能であることが示され、生理実験では測定が困難なシナプス入力 of 推定に対して適用されている [83].

このように、イオン電流モデルは、細胞生理レベルでの神経細胞、回路特性の解析を可能とし、生理実験とモデル・シミュレーション法との接点を提供するものである。すなわち、細胞応答におけるイオン電流の役割、伝達物質が細胞応答に及ぼす効果など、細胞応答特性の本質的メカニズム及びその機能的意義を解明する上で、イオン電流機構に基づくモデル記述は広く活用できる方法と言える。

### 4.3 イオン電流モデルのパラメータ推定法

実験データと対応付けが可能なイオン電流モデルは、細胞応答や神経機構に対する理工学的アプローチを進めていく上で基本的となる細胞のモデル記述である。しかしながら、一般に、イオン電流は時間や膜電位に依存した、動的かつ非線形な特性を示すことから、そのモデルに含まれるパラメータを実験データから推定することは容易ではない。これまでにも、電流の時間変化を対数プロットし、グラフ上で試行錯誤的に近似値を求めていく方法などが提案されているが、細胞応答の全範囲にわたる推定方法は確立されていない。

本節では、イオン電流モデルの構築に必要なデータを得るための膜電位固定実験プロトコル、及び、これによって測定されたデータセットからモデルパラメータを系統的に推定する方法を提案する [81]. その有効性は、H-H が提案したナトリウム、カリウム電流モデルによって生成した模擬実験データに対して適用し、推定されたパラメータを用いて各電流波形及び神経インパルス応答を再構成することによって確認した。



### 4.3.1 膜電位依存パラメータ

イオン電流のダイナミクスは、式(4.6)のように、活性化、不活性化パラメータによって表される。イオン電流の活性化に見られる非線形特性は  $m$  のべき乗によって近似され、 $m$  及び  $h$  の時間変化は式(4.7)によって記述される。 $\alpha$ ,  $\beta$  は膜電位固定実験データからは直接得られず、実験データと対応させる上では、これらの式と等価な次式の表現が用いられる場合が多い [156].

$$\tau_m(V) \cdot \frac{dm(t, V)}{dt} = m_\infty(V) - m(t, V) \quad (4.9)$$

$$\tau_h(V) \cdot \frac{dh(t, V)}{dt} = h_\infty(V) - h(t, V) \quad (4.10)$$

ただし、

$$\tau_m(V) = \frac{1}{\alpha_m(V) + \beta_m(V)} \quad (4.11)$$

$$\tau_h(V) = \frac{1}{\alpha_h(V) + \beta_h(V)} \quad (4.12)$$

$$m_\infty(V) = \frac{\alpha_m(V)}{\alpha_m(V) + \beta_m(V)} \quad (4.13)$$

$$h_\infty(V) = \frac{\alpha_h(V)}{\alpha_h(V) + \beta_h(V)} \quad (4.14)$$

この方程式に含まれる  $m_\infty(V)$ ,  $\tau_m(V)$  及び  $h_\infty(V)$ ,  $\tau_h(V)$  は、膜電位の関数 (膜電位依存パラメータ) である [71]. コンダクタンスの活性化を表す変数  $m(t, V)$  の定常特性  $m_\infty(V)$  は、過分極側 (静止電位付近から負の領域) においてはほぼ 0 であり、電位が正に向かう (脱分極化) につれて 1 に近づく S 字型特性を持つ。これとは逆に、不活性化を表す変数  $h(t, V)$  の定常特性  $h_\infty(V)$  は、過分極側ではほぼ 1 であり、脱分極化に伴って 0 に近づく逆 S 字型特性を持つ。また、時定数  $\tau_m(V)$  及び  $\tau_h(V)$  は、通常、膜電位に対して S 字、逆 S 字、あるいはベル型の特性を示す。

さて、イオン電流のモデル記述においては、電流のダイナミクスを規定する膜電位依存パラメータ  $m_\infty(V)$ ,  $\tau_m(V)$  及び  $h_\infty(V)$ ,  $\tau_h(V)$  を決定する必要がある。一般には、膜電位固定実験で得られた電流のピーク値や電流波形の対数値を直線で近似した時の傾きから、おおまかに値を決めた後、モデル応答を実際に計算しながら実験データと比較することにより試行錯誤的に各値を決定する方法が用いられてきた [65]. この手続きを多くの実験データに対して繰り返すことは非常に煩雑であることから、イオン電流のモデル記述を効率良く得るための新しい実験プロトコルとパラメータの系統的推定法を次のように提案する。



### 4.3.2 膜電位固定実験プロトコル

膜電位固定実験によりイオン電流を測定する場合、コマンド電位波形として、通常、膜電位を保持電位  $V_h$  から固定電位  $V_c$  にステップ状に変化させるプロトコルが用いられる [107]. この膜電位変化に対する  $m(t, V)$ ,  $h(t, V)$  の時間的变化は、式 (4.9) より、次のように記述される.

$$m(t, V_c, V_h) = m_\infty(V_c) - [m_\infty(V_c) - m_\infty(V_h)] \cdot \exp[-t/\tau_m(V_c)] \quad (4.15)$$

$$h(t, V_c, V_h) = h_\infty(V_c) - [h_\infty(V_c) - h_\infty(V_h)] \cdot \exp[-t/\tau_h(V_c)] \quad (4.16)$$

従って、膜電位固定時のイオン電流特性は、 $V_h$ ,  $V_c$  における膜電位依存パラメータの値を用いて、次のように表される.

$$\begin{aligned} I_{ion} = & G_{ion} \cdot \{m_\infty(V_c) - [m_\infty(V_c) - m_\infty(V_h)] \cdot \exp[-t/\tau_m(V_c)]\}^P \\ & \cdot \{h_\infty(V_c) - [h_\infty(V_c) - h_\infty(V_h)] \cdot \exp[-t/\tau_h(V_c)]\} \\ & \cdot (V_c - E_{ion}) \end{aligned} \quad (4.17)$$

膜電位依存パラメータは、それぞれ異なる膜電位依存特性を持っており、次の4種類の固定電位波形プロトコルを用いて実験を行うことにより、各パラメータの値が反映した電流波形が得られる.

#### ● プロトコル1

膜電位を、過分極側の保持電位  $V_h$  から脱分極側の固定電位  $V_c$  にステップ状に変更した時の電流振幅には、 $h_\infty(V_h)$  の値が反映されている. 従って、様々な保持電位レベルから一定の固定電位に膜電位固定した場合の電流振幅から、過分極側における  $h_\infty(V)$  の値が得られる.

#### ● プロトコル2

活性化に比べて不活性化の時定数が大きいことから、短い時間間隔  $T_0$  で2回膜電位固定を行った場合の電流回復の過程には、 $\tau_h(V_h)$  の値が反映されている. この実験を様々な保持電位について繰り返すことにより、過分極側における  $\tau_h(V)$  の値が得られる.

#### ● プロトコル3

過分極側から脱分極側に膜電位固定した場合には、通常、著しいイオン電流の活性化が見られる. 様々な固定電位に対する電流波形には、脱分極側における膜電位依存パラメー



タ及び  $G_m$ ,  $P$  の値が反映する。そのため、このプロトコルによって得られる電流波形から、脱分極側における全てのパラメータ値を求めることができる。

#### ● プロトコル 4

過分極側における  $m_\infty(V)$  及び  $\tau_m(V)$  は、膜電位を一時的に脱分極側に固定した直後に膜電位を過分極側に移行させた時に生じる電流 (テイル電流) 波形から得られる。

### 4.3.3 パラメータ推定法

イオン電流のモデル記述に必要なパラメータは、前節で述べた 4 種類の実験プロトコルにより測定された電流波形から、以下の 5 段階の過程により系統的に求めることができる。すなわち、最初の 4 段階で様々な膜電位における各パラメータ値を求め、最後の 5 段階でパラメータの膜電位依存特性を連続関数によって記述する。

#### ● 第 1 段階 (過分極側における $h_\infty(V)$ )

プロトコル 1 によって測定されるイオン電流波形 (図 4.2 (a)) は、 $m_\infty(V_h) \simeq 0$ ,  $h_\infty(V_c) \simeq 0$  が成り立つ範囲において、次式により近似が可能である。

$$I_{ion} \simeq G_{ion} \cdot \{m_\infty(V_c) \cdot (1 - \exp[-t/\tau_m(V_c)])\}^P \cdot \{h_\infty(V_h) \cdot \exp[-t/\tau_h(V_c)]\} \cdot (V_c - E_{ion}) \quad (4.18)$$

上式から、保持電位  $V_h$  の変更に伴う電流振幅変化には、主として  $h_\infty(V_h)$  が関与することがわかる。すなわち、異なる保持電位  $V_{h1} \sim V_{h2}$  について測定された電流振幅  $I_1 \sim I_5$  を、最大振幅  $I_1$  で規格化することによって、過分極側における  $h_\infty(V)$  の値が得られる (図 4.2 (b))。

#### ● 第 2 段階 (過分極側における $\tau_h(V)$ )

$h_\infty(V_c) \simeq 0$  が成立する脱分極側の固定電位から、 $m_\infty(V_h) \simeq 0$  である過分極側の保持電位に対して、ステップ状に膜電位を変更した場合の  $m(t, V)$ ,  $h(t, V)$  の時間特性は次式によって近似できる。

$$m(t, V_h) \simeq m_\infty(V_h) \cdot \exp[-t/\tau_m(V_h)] \quad (4.19)$$

$$h(t, V_h) \simeq h_\infty(V_h) \cdot \{1 - \exp[-t/\tau_h(V_h)]\} \quad (4.20)$$



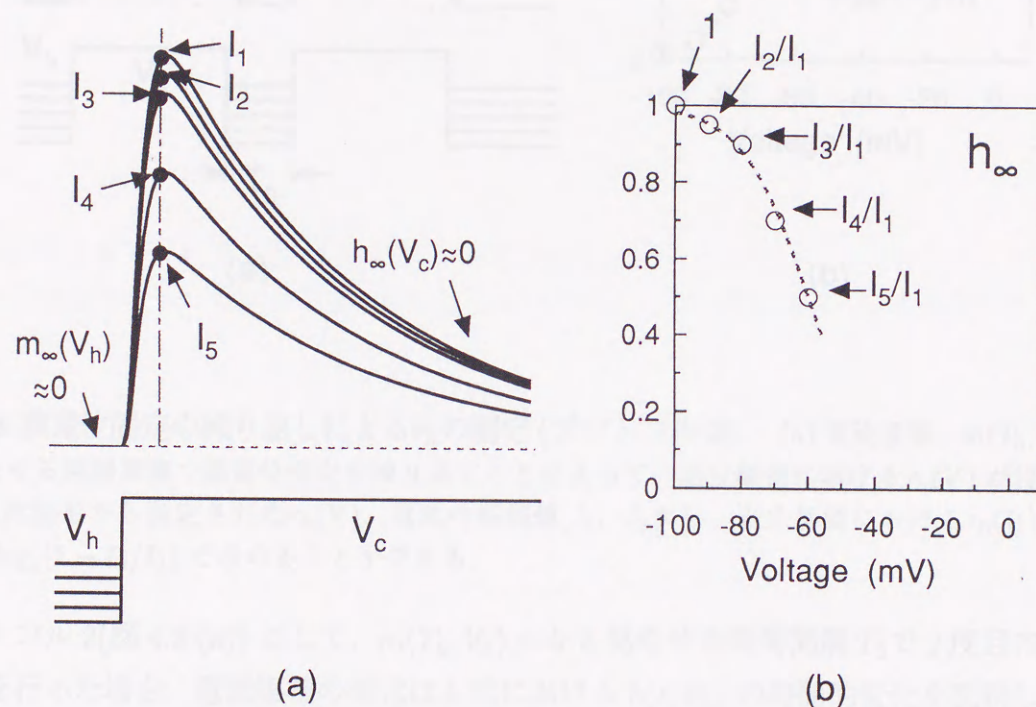


図 4.2 保持電位に対するイオン電流振幅の変化 (プロトコル 1). (a) 電流波形. 保持電位  $V_h$  を変更することによって, 同じ固定電位  $V_c$  に膜電位固定を行っても電流振幅は変化する. (b) 電流波形から測定された  $h_\infty(V)$ . 電流波形より測定した振幅を最大振幅で規格化した値は, 過分極側における  $h_\infty(V)$  の値に対応する.



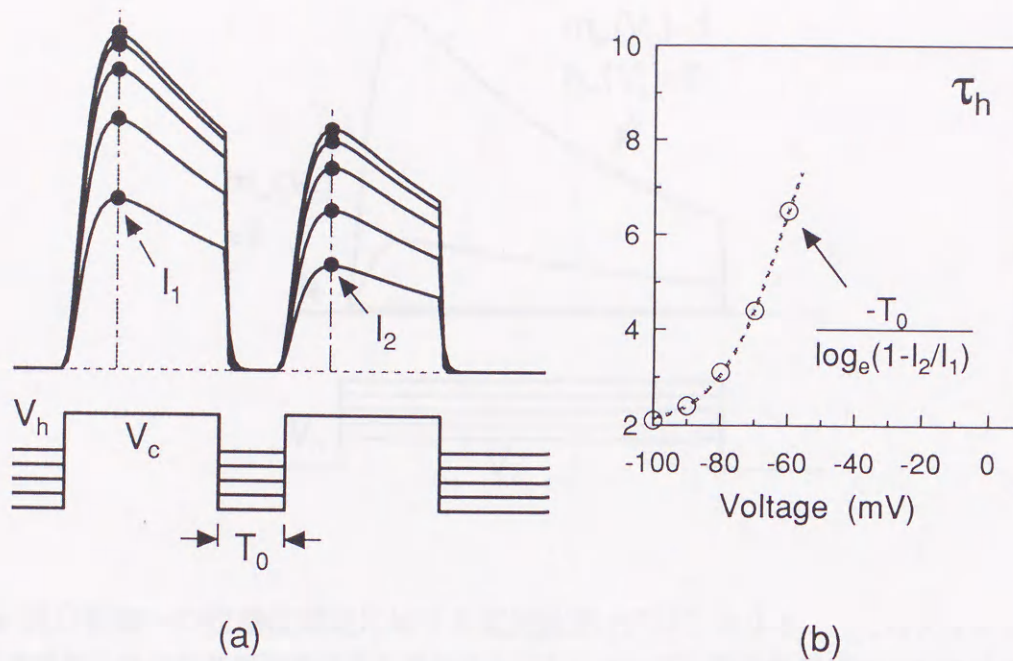


図 4.3 膜電位固定の繰り返しによる  $\tau_h$  の測定 (プロトコル 2). (a) 電流波形.  $m(T_0, V_h) \simeq 0$  と見なせる時間間隔で膜電位固定を繰り返すことによって, 過分極側における  $\tau_h(V)$  が得られる. (b) 電流波形から測定された  $\tau_h(V)$ . 電流の振幅値  $I_1, I_2$  から, 過分極側における  $\tau_h(V)$  の値は  $-T_0 / \log_e(1 - I_2/I_1)$  で求めることができる.

プロトコル 2 (図 4.3 (a)) として,  $m(T_0, V_h) \simeq 0$  と見なせる時間間隔  $T_0$  で 2 度目の膜電位固定を行った場合, 電流振幅の変化は上式における  $h(t, V_h)$  の時間的变化を反映したものとなる. すなわち, 膜電位固定後, 同一経過時刻で測定されたイオン電流の振幅  $I_1, I_2$  と  $T_0$  から,  $\tau_h(V_h)$  の値は次式によって得られる (図 4.3 (b)).

$$\tau_h(V_h) = \frac{-T_0}{\ln[1 - I_2/I_1]} \quad (4.21)$$

### ● 第 3 段階 (脱分極側における全パラメータ)

平衡電位  $E_{ion}$  は, 目的とするイオン電流の方向が反転する電位として測定ができ, また, イオン種ごとに生理食塩水中における値はほぼ決まっていることから, 本方法では  $E_{ion}$  の値は予め与えられるものと仮定する.

まず, 図 4.4 のように, 脱分極側に膜電位固定を行った場合の電流波形の中で振幅が最大の実験データを選び, これについて式 (4.17) で表されるモデル応答と, 実験データとの二乗誤差を評価関数として非線形最適化法を適用し, べき乗の指数  $P$ , 最大コンダクタ



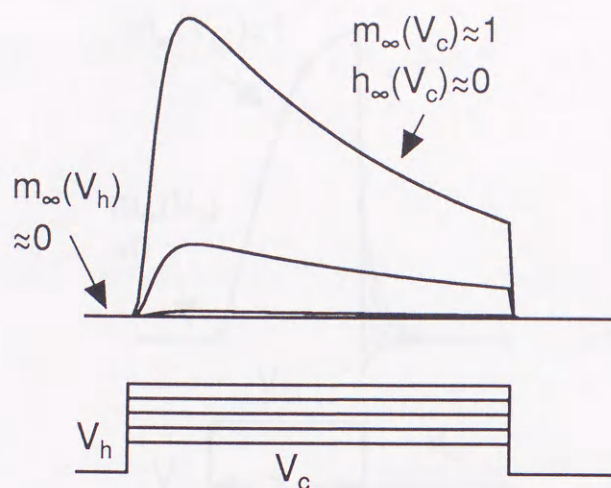


図 4.4 脱分極側への膜電位固定に対する電流波形 (プロトコル 3). このプロトコルで得られる電流波形に対して非線形最適化を適用することによって, 脱分極側における全パラメータ値が得られる.

ンス  $G_{ion}$  及び  $m_\infty(V_h)$ ,  $h_\infty(V_h)$  の値を推定する. 推定の初期値には,  $G_{ion}$  として電流のピーク振幅と  $(V_c - E_{ion})$  の商,  $\tau_h(V_c)$  として電流の不活性化部分を指数関数で近似した場合の時定数を用いる. その他のパラメータについては, イオン電流の一般的な形状から,  $\tau_m(V_c) \simeq \tau_h(V_c)/10$ ,  $P \simeq 3$ ,  $m_\infty(V_h) \simeq 0$ ,  $h_\infty(V_c) \simeq 0$  及び  $m_\infty(V_c) \simeq 1$ ,  $h_\infty(V_h) \simeq 1$  に設定した. 非線形最適化法としては, Marquardt 法や DFP 法などのアルゴリズムを使用することができる [136]. 次に,  $E_{ion}$ ,  $P$ ,  $G_{ion}$ ,  $m_\infty(V_h)$  及び  $h_\infty(V_h)$  を確定値とし, 異なる  $V_c$  に対するイオン電流波形に対して, 順次, 同様の最適化を行うことにより, 脱分極側における各パラメータの値を求めることができる.

#### ● 第4段階 (過分極側における $m_\infty(V)$ , $\tau_m(V)$ )

過分極側における  $m_\infty(V)$  及び  $\tau_m(V)$  の値は, 図 4.5 のように, プロトコル 4 によって得られたテイル電流から推定できる. すなわち, 過分極側保持電位  $V_h (m_\infty(V_h) \simeq 0)$  から, 脱分極側固定電位  $V_{c1} (h_\infty(V_{c1}) \simeq 0)$  に固定し,  $T_1$  秒後, 過分極側固定電位  $V_{c2}$  に変更した場合のテイル電流は次式で表される.

$$I_{ion} \simeq G_{ion} \cdot m(t, V_{c1}, V_{c2}, T_1)^P \cdot h(t, V_{c1}, V_{c2}, T_2) \cdot (V_{c2} - E_{ion}) \quad (4.22)$$

$$m(t, V_{c1}, V_{c2}, t_1) \simeq \int_0^t \frac{m_\infty(V_{c2} - m(\xi, V_{c2}))}{\tau_m(V_{c2})} d\xi$$



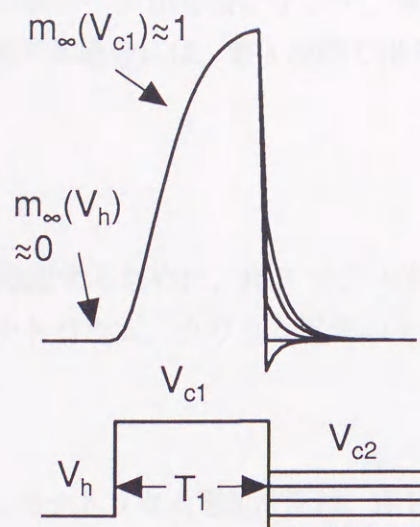


図 4.5 過分極側における活性化パラメータ値の推定 (プロトコル 4). 膜電位を  $V_{c1}$  から  $V_{c2}$  に変更した時の電流 (テイル電流) に対して, 非線形最適化法を適用することによって過分極側での  $m_{\infty}(V)$  及び  $\tau_m(V)$  の値が推定できる.

$$+ m_{\infty}(V_{c1}) \cdot \{1 - \exp[-T_1/\tau_m(V_{c1})]\} \quad (4.23)$$

$$h(t, V_{c1}, V_{c2}, t_1) \simeq \int_0^t \frac{h_{\infty}(V_{c2} - h(\xi, V_{c2}))}{\tau_h(V_{c2})} d\xi + h_{\infty}(V_{c1}) \cdot \{1 - \exp[-T_1/\tau_h(V_{c1})]\} \quad (4.24)$$

活性化パラメータの過分極側における値  $m_{\infty}(V_{c2})$ ,  $\tau_m(V_{c2})$  は, これまでの段階で得られたパラメータ値を確定値とし, これらの値のみを可変として非線形最適化法を適用することによって決定できる.

#### ● 第5段階 (膜電位パラメータの関数近似)

第4段階までに得られた各電位におけるパラメータ値から, パラメータ  $m_{\infty}(V)$ ,  $\tau_m(V)$  及び  $h_{\infty}(V)$ ,  $\tau_h(V)$  の膜電位依存特性を膜電位の関数として表す. 膜電位変化に対するイオン電流応答をモデル化する意味では, 使用する関数系の種類は本質的な問題ではなく, ここでは, 一般的な膜電位依存特性の形状に近いシグモイド関数やその合成系を用いた. なお, この場合の膜電位依存パラメータの関数近似も非線形最適化法を用いて行なうことができる.

図 4.6 は, 各プロトコルによって得られる膜電位依存パラメータ値の範囲を示したものである. 過分極側の特性を含め応答範囲全般にわたるモデル記述を得るためには, 4つの



プロトコル全てについての実験データが必要となるが、興奮性の刺激に対する応答など、脱分極側における特性を議論する場合には、第3段階で得られるパラメータ値及びその記述だけで十分である。

#### 4.3.4 数値実験

提案した方法の有効性を確認するために、H-H モデルを用いて模擬実験データを生成し、提案した方法によってナトリウム、カリウム電流のモデル記述を求めた。

##### 模擬実験データ

各実験プロトコルに対応したナトリウム電流波形は、H-H モデルを4次のRunge-Kutta法を用いて数値的に解くことによって求めた(図4.7)。サンプリング間隔は、プロトコル1, 3については0.02msec, プロトコル2については0.04msec, プロトコル4については0.01msecとした。観測雑音として、標準偏差 $\sigma = 0, 20, 40$ の正規乱数を重畳して、ノイズに対する推定精度を評価した。

カリウム電流に関してもナトリウム電流と同様の方法で、各プロトコルに対する電流波形を生成し、これに対して観測雑音を重畳させて模擬実験データを得た(図4.8)。この場合のサンプリング間隔は、プロトコル1, 3, 4については0.1sec, プロトコル2については0.2secとした。

H-H モデルにおけるカリウム電流は不活性化パラメータを含まず、プロトコル1, 2に対して電流の変化はほとんどない。このような電流成分については、 $h$ パラメータの推定を行なう第1, 第2段階を省略することができ、活性化パラメータ $n$ (ここでは、ナトリウム電流の活性化パラメータを区別するために $n$ を用いる)に関する手続きだけでよい。

##### 推定結果

模擬実験データに対して提案したパラメータ推定法を適用し、イオン電流モデル記述を求めた。なお、第3, 第4段階における非線形最適化には、Marquardt法を適用した[125]。ナトリウム電流については、まず、第1, 第2段階で過分極側における $h_{\infty}(V)$ 及び $\tau_h(V)$ を求めた。次に、第3段階において、固定電位に依存しない $P$ ,  $G_{ion}$ 及び $m_{\infty}(V_h)$ ,  $h_{\infty}(V_h)$ を推定し、これらの値を用いて様々な固定電位 $V_c$ に対する $m_{\infty}(V_c)$ ,  $\tau_m(V_c)$ 及び $h_{\infty}(V_c)$ ,  $\tau_h(V_c)$ を求めた。第4段階において過分極側における $m_{\infty}(V)$ ,  $\tau_m(V)$ を推定することにより、応答の全範囲にわたる $m$ ,  $h$ パラメータ値が得られ、これらの特性をシグモイド関数及びその線形和によって膜電位の関数として記述した(図4.9)。カリウム電流



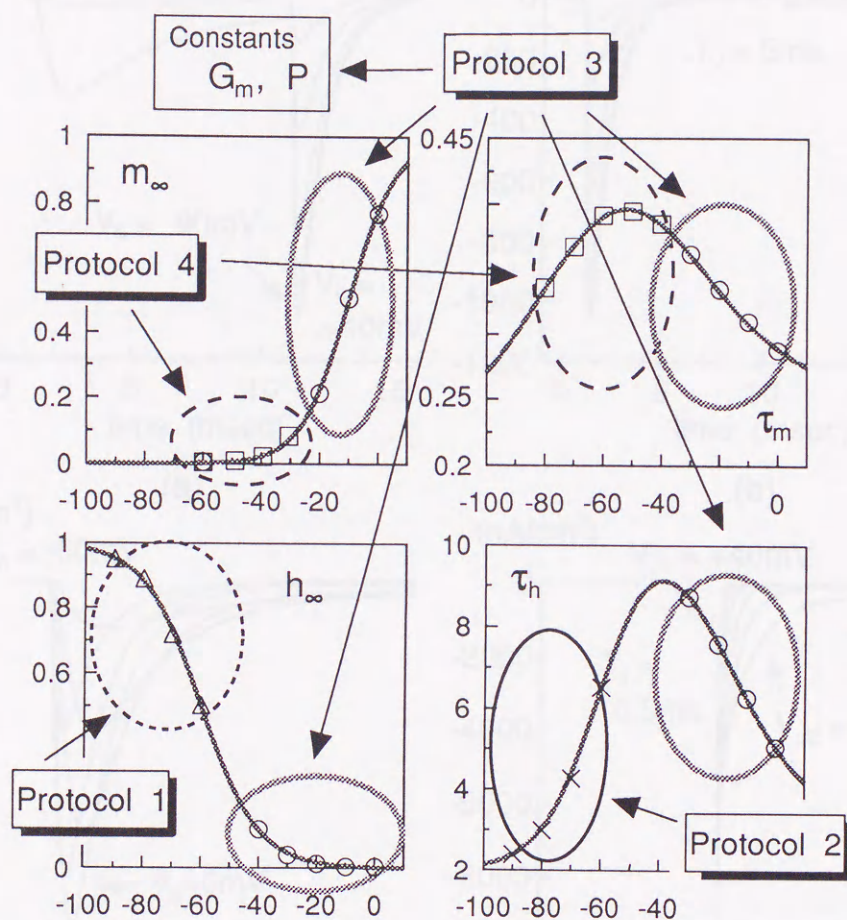


図 4.6 4つの膜電位固定プロトコルとそれによって得られる膜電位依存パラメータの範囲。プロトコル1, 2で得られるデータからは、過分極側における  $h_\infty(V)$ ,  $\tau_h(V)$  の値が得られる。脱分極側における全てのパラメータ値は、プロトコル3で測定されたデータに非線形最適化を適用することによって求まる。過分極側における  $m_\infty(V)$ ,  $\tau_m(V)$  の値は、プロトコル4で得られるテイル電流より得られる。



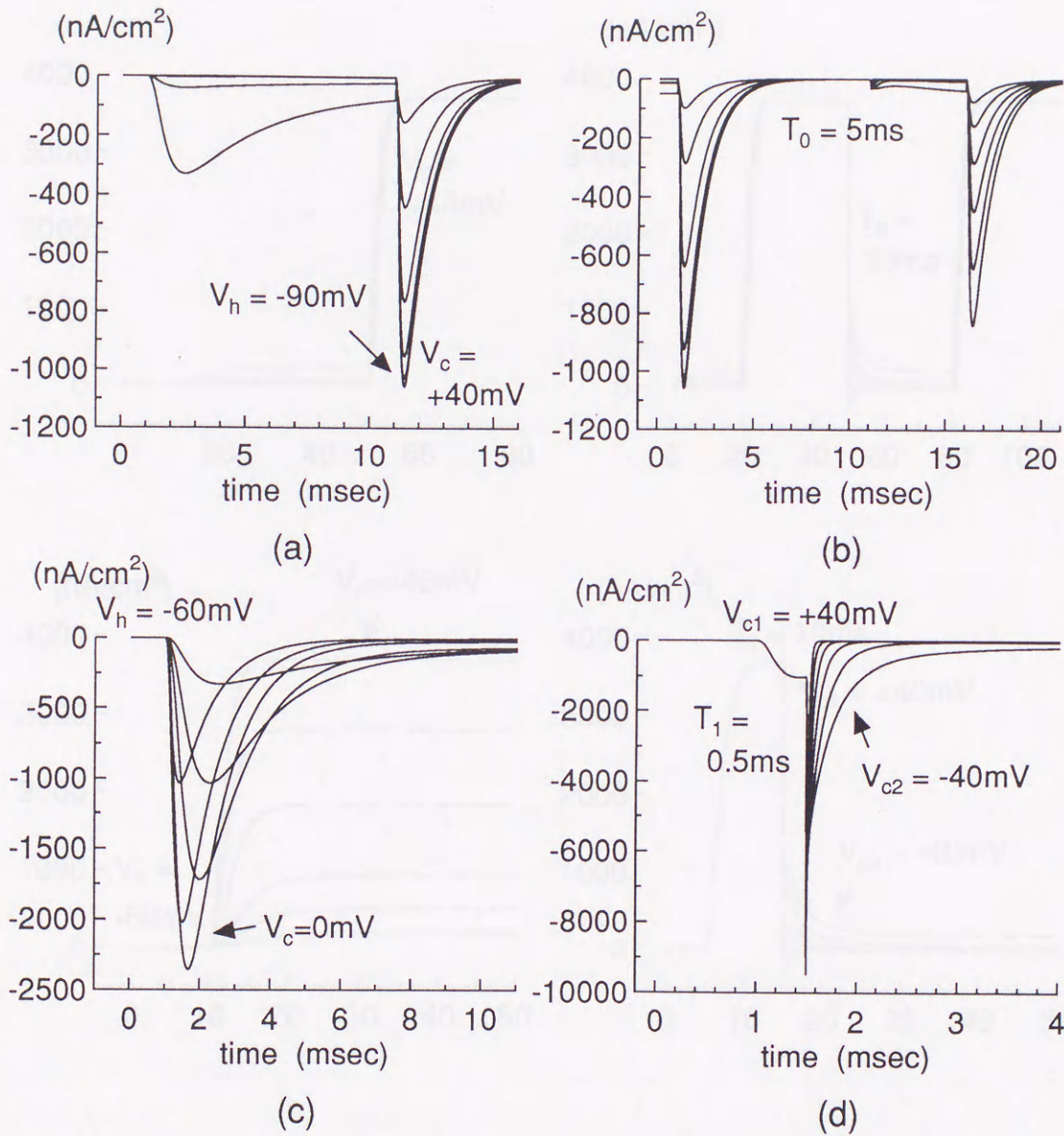


図 4.7 パラメータ推定に用いたナトリウム電流模擬実験データ (観測雑音 = 0). (a) プロトコル 1 によって得られる電流, (b) プロトコル 2 によって得られる電流, (c) プロトコル 3 によって得られる電流, (d) プロトコル 4 によって得られる電流.



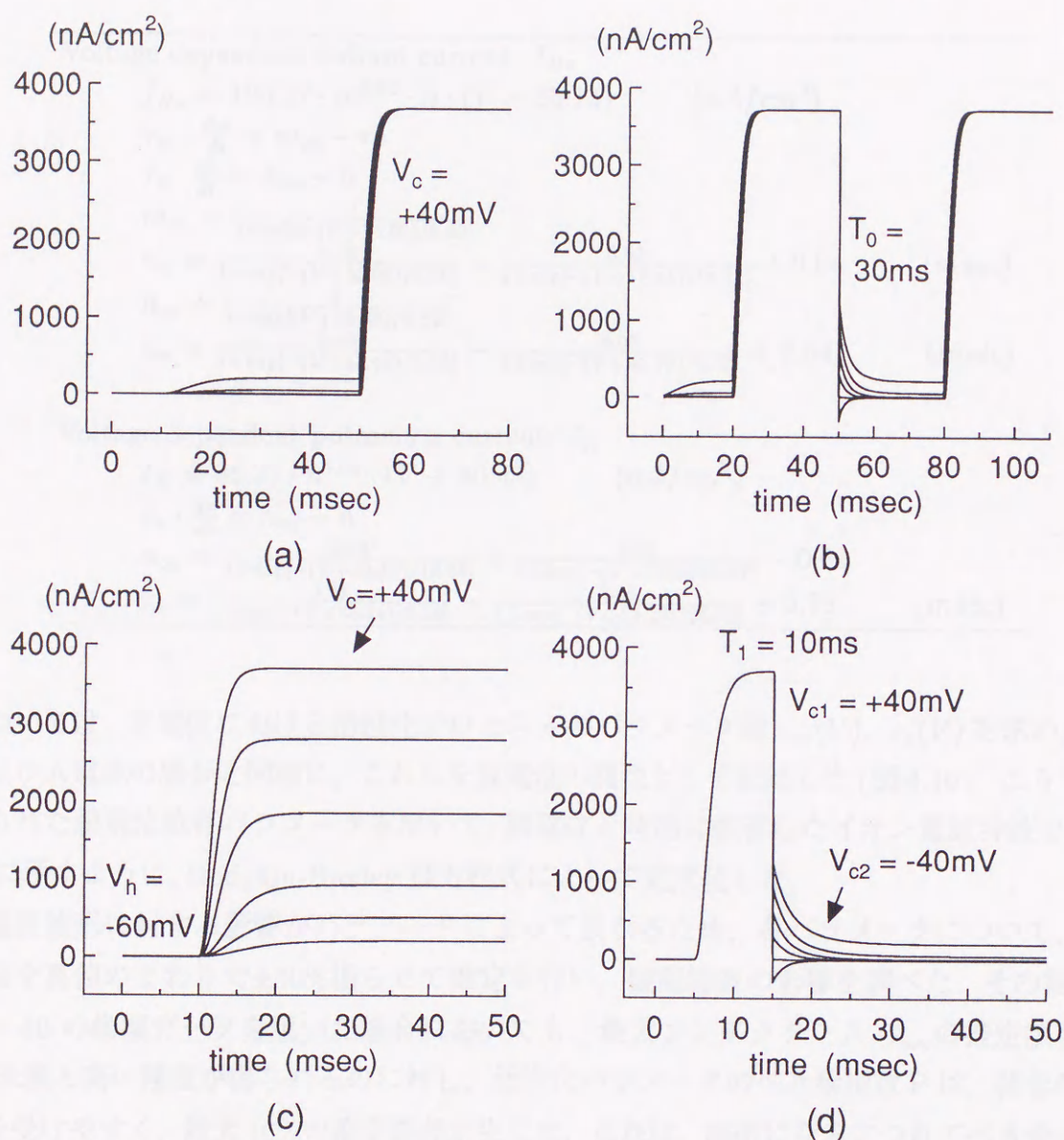


図 4.8 パラメータ推定に用いたカリウム電流模擬実験データ (観測雑音 = 0). (a) プロトコル 1 によって得られる電流, (b) プロトコル 2 によって得られる電流, (c) プロトコル 3 によって得られる電流, (d) プロトコル 4 によって得られる電流.



表 4.2 提案した方法により得られたナトリウム, カリウム電流の Hodgkin-Huxley 型方程式記述.

Voltage dependent sodium current: $I_{Na}$	
$I_{Na} = 120.27 \cdot m^{3.00} \cdot h \cdot (V - 55.15)$	$(nA/cm^2)$
$\tau_m \cdot \frac{dm}{dt} = m_{\infty} - m$	
$\tau_h \cdot \frac{dh}{dt} = h_{\infty} - h$	
$m_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp[-(V + 34.60)/8.93]}$	
$\tau_m = \frac{0.72}{1 + \exp[-(V + 52.06)/9.50]} - \frac{0.63}{1 + \exp[-(V + 17.41)/14.11]} + 0.04$	$(msec)$
$h_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp[(V + 54.89)/6.84]}$	
$\tau_h = \frac{6.46}{1 + \exp[-(V + 43.44)/5.26]} - \frac{8.03}{1 + \exp[-(V + 45.79)/6.13]} + 2.64$	$(msec)$
Voltage dependent potassium current: $I_K$	
$I_K = 36.31 \cdot n^{4.00} \cdot (V + 80.45)$	$(nA/cm^2)$
$\tau_n \cdot \frac{dn}{dt} = n_{\infty} - n$	
$n_{\infty} = \frac{0.84}{1 + \exp[-(V + 53.10)/13.86]} + \frac{0.15}{1 + \exp[-(V + 2.64)/20.67]} - 0.01$	
$\tau_n = \frac{3.61}{1 + \exp[-(V + 79.44)/8.28]} - \frac{8.46}{1 + \exp[-(V + 54.29)/24.19]} + 5.78$	$(msec)$

については, 各電位における活性化プロセス  $n$  のパラメータ値  $n_{\infty}(V)$ ,  $\tau_n(V)$  を求め, ナトリウム電流の場合と同様に, これらを膜電位の関数として記述した (図 4.10). こうして得られた膜電位依存パラメータを用いて, 膜電位と時間に依存したイオン電流特性を, 表 4.2 に示すように, Hodgkin-Huxley 型方程式によって定式化した.

電流波形に対する影響がパラメータによって異なるため, 各パラメータについて, 初期値を真値のまわりで  $\pm 30\%$  振らせて推定を行い, 観測雑音の影響を調べた. その結果,  $\sigma = 40$  の模擬データを用いた場合においても, 最大コンダクタンス  $G_{ion}$  の推定誤差は  $5\%$  未満と高い精度が得られるのに対し, 活性化パラメータのべき乗指数  $P$  は, 雑音の影響を受けやすく, 最大  $16\%$  の推定誤差が生じた. これは, 高次になるにつれてべき乗の指数に対する電流形状の変化が少なくなるため, 低めのべき乗数でもかなり良い近似が得られることに起因する.

各電位における活性化, 不活性化パラメータの定常値については, 取り得る値の範囲が  $0 \sim 1$  に制限されており,  $7\%$  未満の誤差で推定できた. 一方, 活性化, 不活性化パラメータの時定数は, 電流振幅が小さく SN 比が低下する部分で推定精度の低下が見られ,  $\tau_m(V)$ ,  $\tau_h(V)$ ,  $\tau_n(V)$  の最大誤差は, それぞれ,  $12\%(-30mV)$ ,  $23\%(-50mV)$ ,  $17\%(-90mV)$  であった. 応答範囲全域にわたるパラメータ値を精度良く求めるためには, 細胞外液中にお



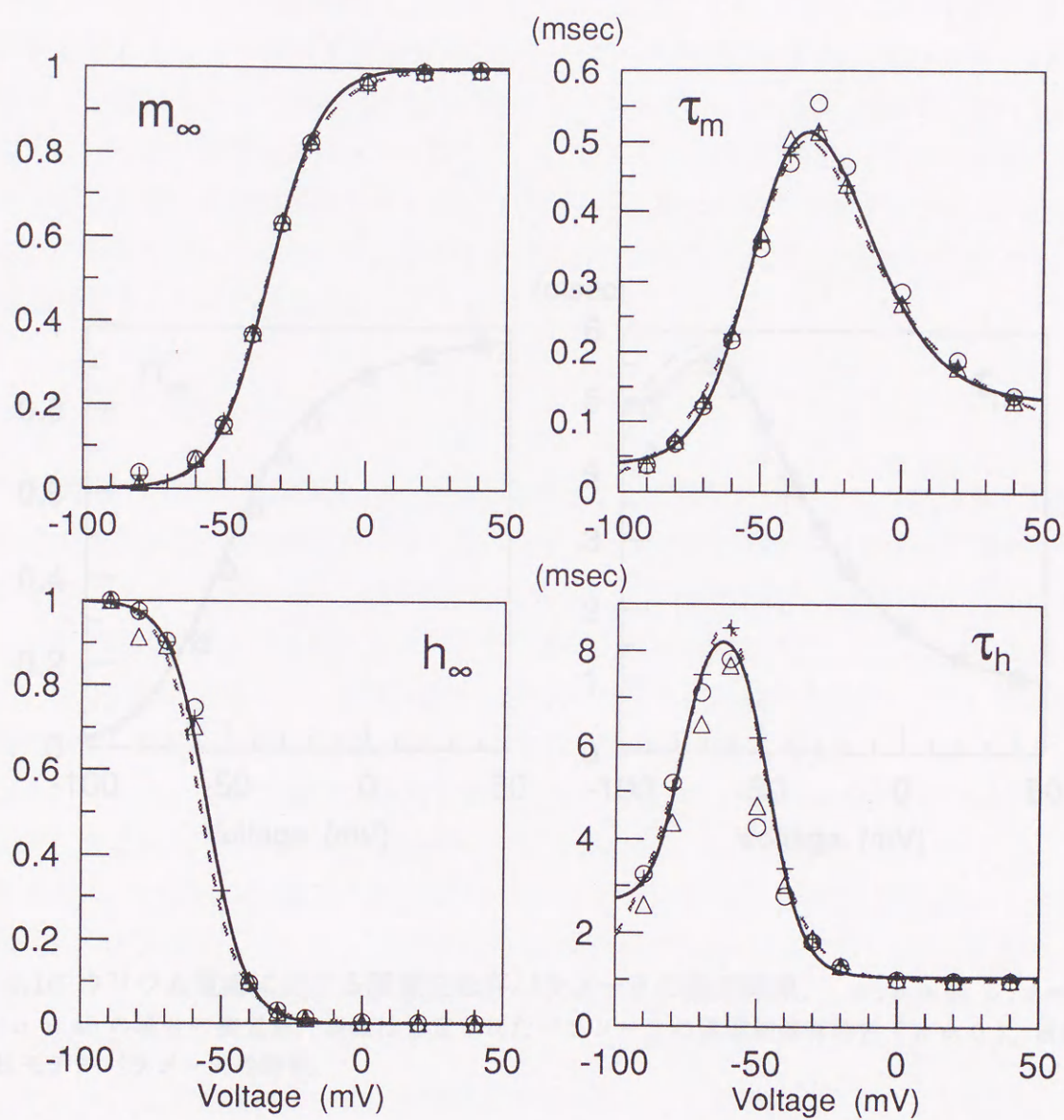


図 4.9 ナトリウム電流における膜電位依存パラメータの推定結果. + :  $\sigma = 0$ , o :  $\sigma = 20$ ,  $\Delta$  :  $\sigma = 40$  の場合の推定値. 実線は推定されたパラメータの膜電位依存特性 ( $\sigma = 0$ ), 破線は H-H モデルパラメータの特性.



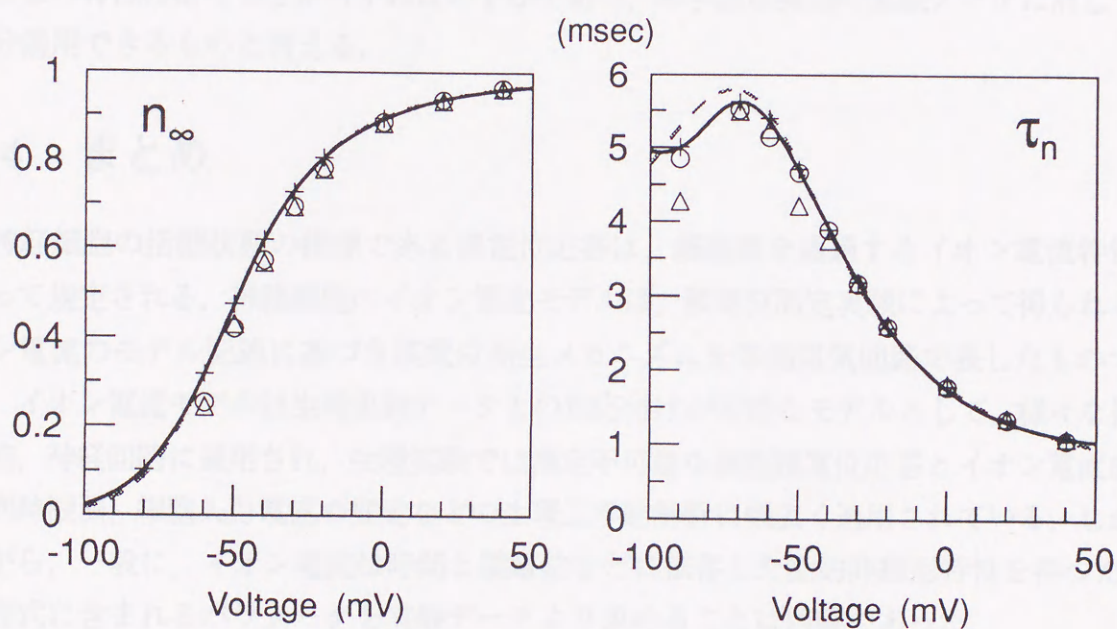


図 4.10 カリウム電流における膜電位依存パラメータの推定結果.  $+$ :  $\sigma = 0$ ,  $\circ$ :  $\sigma = 20$ ,  $\triangle$ :  $\sigma = 40$  の場合の推定値. 実線は推定されたパラメータの膜電位依存特性 ( $\sigma = 0$ ), 破線は H-H モデルパラメータの特性.



けるイオン濃度を調節して、目的とするイオン電流の平衡電位  $E_{ion}$  を変更し、電流波形の SN 比を改善するなどの方法が考えられる。

提案した方法によって得られたイオン電流モデルの妥当性を確認するために、膜電位固定状態での膜電流波形を再構成し、H-H モデルと比較した結果 (図 4.11), 時間的な変化及び最終値ともよく一致する波形が得られた。ピーク振幅にわずかな違いが見られるが、再構成した細胞モデルの膜電位変化 (神経インパルス応答) を比較した結果、図 4.12 に示すように、応答の形状自体は良く一致した。パラメータの推定誤差はインパルス発生のタイミングに影響する傾向が見られるが、その違いも実験的に得られるデータに見られる標本ごとの特性のばらつきからすればわずかであり、本手法は実際の実験データに対しても十分適用できるものと言える。

#### 4.4 まとめ

神経細胞の活動状態の指標である膜電位応答は、細胞膜を通過するイオン電流特性によって規定される。神経細胞のイオン電流モデルは、膜電位固定実験によって得られるイオン電流のモデル記述に基づき膜電位発生メカニズムを等価電気回路で表したものである。イオン電流モデルは生理実験データとの対応付けが可能なモデルとして、様々な神経細胞、神経回路に適用され、生理実験では測定不可能な細胞膜電位応答とイオン電流成分の同時観測、細胞入力電流の推定などの理工学的解析に幅広く適用されている。しかしながら、一般に、イオン電流は時間と膜電位などに依存した動的非線形特性を持つため、方程式に含まれるパラメータを実験データより求めることは困難であった。

本章では、4 種類の膜電位固定実験プロトコルを用いて測定した電流波形に対し非線形最適化法などを適用して、イオン電流の H-H 型方程式記述に必要なパラメータを系統的に推定していく方法を提案した。提案した方法を評価するために、H-H モデルによって生成した模擬実験データに本手法を適用し、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  電流のパラメータの推定を行い、実際のデータに適用する上で十分な推定精度が得られることが確認できた。本手法は、次章において、ウミウシ視細胞における各イオン電流成分のパラメータ推定に適用する。



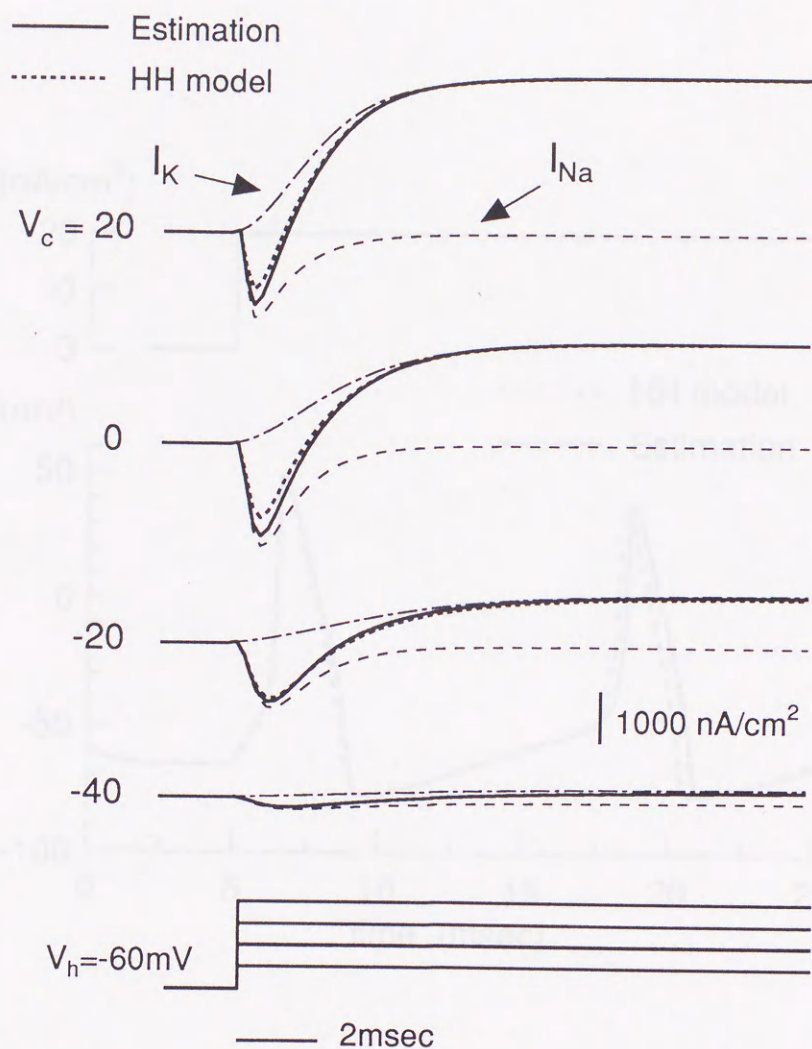


図 4.11 推定モデルのイオン電流波形。膜電位固定実験によって測定される膜電流を H-H モデル (点線) と推定モデル (実線) で比較した。内向きのピーク付近に違いが見られるものの時間特性や定常値については十分な近似が得られている。破線及び一点鎖線は、それぞれ、 $I_{Na}$ ,  $I_K$ を表す。



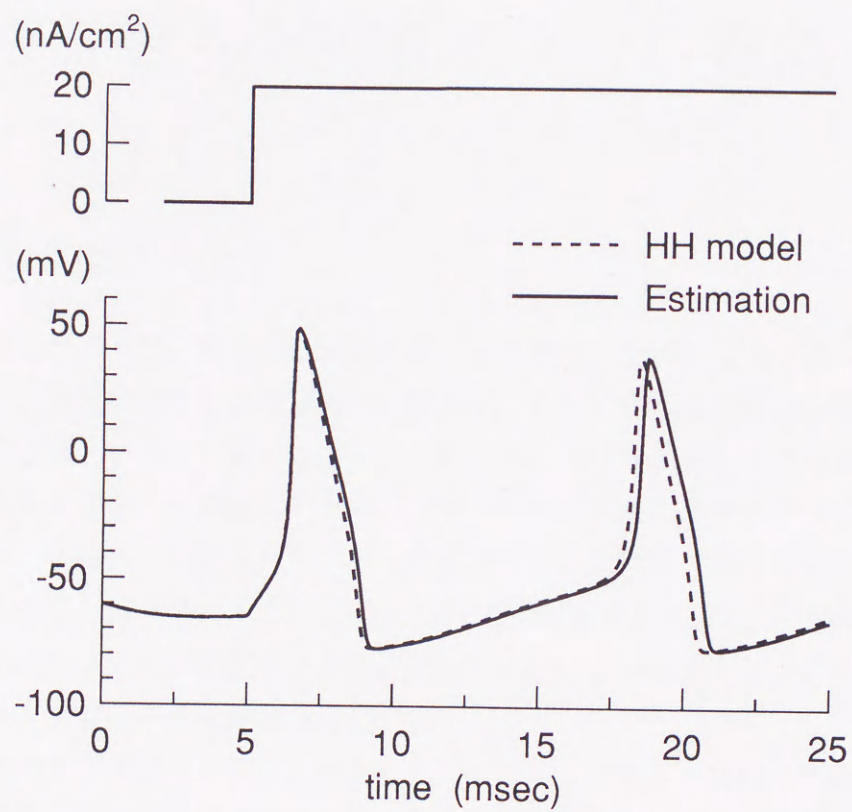


図 4.12 推定モデルの細胞応答.  $20 \text{ nA/cm}^2$  のステップ状の電流刺激に対する H-H モデルと推定モデルの応答を比較した. 推定誤差の影響が, 2 回目のインパルス発生のタイミングのずれとして現れている.



## 第5章

# ウミウシ型視細胞のイオン電流モデル

### 5.1 はじめに

第3章で述べたように、元と神経細胞を有いた古典型の材料によって、エムラミノウスウシでは、1) 細胞膜内外のイオン濃度差、さらに膜電位の恒常化を生じることが実験的に示されている。しかしながら、生体実験によって得られる結果は、ある条件下における細胞のふるまいを説明したものであらず、その背後にあるメカニズムが解明されたこととは、実験的に観察される現象、現象が示唆するメカニズムとを区別する必要がある。本章では、ウミウシ型視細胞におけるイオン電流の発生機構を説明するために、まず、生体細胞のイオン電流成分を電気生理学実験によって測定し、この生体実験データに基づきイオン電流モデルを開発する。

一方、細胞内に流れるカルシウム濃度変化は、イオン電流の特性に影響を及ぼすと共に、細胞内の分子メカニズムを調節するセカンドメッセンジャーとして機能することが知られている[10][11]。そこで、イオン電流とは異なる時間特性を持つ細胞内カルシウム濃度変化に関する記述も本型視細胞モデルに導入し、細胞のイオン電流及び細胞内分子メカニズムとの関連付けが可能なモデルとした。

### 5.2 実験条件

米国カリフォルニアから提供されたエムラミノウスウシ (Sea Life Supply Co., Sand City, CA) は、海水の温度を12~13°Cで保った水槽内で飼育した。飼育場においては、午前8時から午後5時までの光を照射する15時間の日-夜サイクルを用い、全ての実験は動物の自然リズムを考慮して、明サイクル中に行った。



## 第 5 章

# ウミウシ B 型視細胞のイオン電流モデル

### 5.1 はじめに

第 2 章で述べたように、光と回転刺激を用いた古典的条件付けによって、エムラミノウミウシでは、B 型視細胞の光応答振幅や時間特性、さらに膜電流の振幅変化を生じることが実験的に示されている。しかしながら、生理実験によって得られる応答は、ある条件下における細胞のふるまいを観測したもの過ぎず、その背後にあるメカニズムが解明されたと言えるには、実験的に観測される応答、現象が矛盾なく説明できる基本原理を見いだす必要がある。本章では、ウミウシ視細胞における学習獲得の基本原理を解明するために、まず、B 型視細胞のイオン電流成分を膜電位固定実験によって測定し、この生理実験データに基づきイオン電流モデルを構築する。

一方、細胞内におけるカルシウム濃度変化は、カリウム電流の特性に影響を及ぼすと共に、細胞内の分子メカニズムを起動するセカンドメッセンジャーとして機能することが知られている [62],[99]。そこで、イオン電流とは異なる時間特性を持つ細胞内カルシウム濃度変化に関する記述を B 型視細胞モデルに導入し、細胞応答とイオン電流及び細胞内分子メカニズムとの関連付けが可能なモデルとした。

### 5.2 実験条件

米国カリフォルニアから空輸されたエムラミノウミウシ (Sea Life Supply Co., Sand City, CA) は、海水の温度を 12~13°C に保った水槽内で飼育した。飼育時においては、午前 6 時から午後 6 時まで光を照射する 12 時間の明-暗サイクルを用い、全ての実験は動物の日周リズムを考慮して、明サイクル中に行った。



実験には、中枢神経系を人工海水 ASW( $430\text{mM Na}^+$ ,  $10\text{mM K}^+$ ,  $50\text{mM Mg}^{2+}$ ,  $10\text{mM Ca}^{2+}$ ,  $10\text{mM Tris buffer}$ ) 中に摘出した後、B 型視細胞から延長する軸索を切断した標本を用いた。軸索の切断は、神経インパルスの発射を消失させ、膜電位固定を容易にするだけでなく、他の神経細胞からの入力を遮断し、B 型視細胞のみのイオン電流を測定する意味で効果的である。また、電極の刺入を容易にするため、細胞表面をプロテアーゼ (Protease type VI, Sigma Chemical Co.) によって酵素処理した。

膜電位固定実験では、 $3\text{M}$  の  $\text{KCl}$  を充填した 2 本のガラス微小電極 (電極インピーダンス:  $10\sim 20\text{M}\Omega$ ) を視細胞に刺入し、1 本は膜電位測定用に、他方は電流注入用に使用した。細胞の条件を一定にするため、全ての応答は細胞への電極を刺入後、約 10 分間暗順応状態に保った後、記録を開始した。膜電位固定実験時の保持電位は、暗順応時の静止膜電位の平均値  $-60\text{mV}$  とし、光によって誘発される電流については、2 分ごとに光刺激を照射して測定を行った。実験データはペンレコーダによって記録すると共に、p-Clamp (Axon Instruments, Inc.) によって収集した (第3章, 3.3 節を参照)。

### 5.3 B 型視細胞のイオン電流特性とモデル記述

B 型視細胞における膜電流は、脱分極側への膜電位変化に対して、図 5.1(a) のように、膜電位変化直後に急速に活性化、やがて定常的な値に落ちつく特性を示す。また、電流振幅の膜電位依存特性も、図 5.1(b) のように非線形な特性となる。一方、過分極側への電位変化に対しては、ほぼ線形の応答を示す。

暗状態下における B 型視細胞では、以下に示す、細胞内より流れ出す外向きのカリウム電流と細胞内に流れ込む内向きのカルシウム電流が見いだされており、これらのイオン電流成分と漏れ電流の総和が、図 5.1(a) に示した膜電流として観測される (外向きの電流を正として表す) [20], [25]。

#### 1. カリウム電流

- 急速活性、不活性型カリウム電流:  $I_A$
- カルシウム依存性カリウム電流:  $I_C$
- 遅延整流性カリウム電流:  $I_{K^+}$   
(この成分は、 $0\text{mV}$  以下ではほとんど活性化せず、無視できる)

#### 2. カルシウム電流

- L 型カルシウム電流:  $I_{\text{Ca}^{2+}}$



3. 漏れ電流:  $I_l$ 

一方, 光刺激の照射に対しては, 照射直後にナトリウム電流の急速な活性化が見られると共に, 細胞内カルシウム濃度の上昇が報告されている [50]. 光刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇に対応して, 光を照射している間は持続的な内向き電流が見られる.

すなわち, B 型視細胞の電気的特性は, B 型視細胞に存在するイオン電流成分によって規定され, 図 5.2 のような等価回路によって表される.

5.3.1  $I_A$  (急速活性, 不活性型カリウム電流)

様々な神経細胞において見いだされているこの電流成分は, 図 5.3 のように,  $I_A$  は 4-アミノピリジン (4-AP) によってブロックされることから, ASW 中で測定した電流波形から 4-AP (5mM) を付加した ASW 中で測定した波形の差分として抽出される [3], [49]. この電流成分は, 膜電位をステップ状に変化させた場合, 極めて急速に活性化, 不活性化していく特性を示す. 図 5.1 において膜電位固定直後に見られる急峻な外向き電流は, この成分に起因して生じる.

この電流成分は時間及び膜電位に依存した特性を持つことから, Hodgkin-Huxley 型方程式によって記述するために, 第4章で提案したイオン電流モデルのパラメータ推定法を適用し, 活性化, 不活性化パラメータの膜電位依存特性を求めた. なお, パラメータの推定は, 細胞の応答範囲及び  $I_A$  の活性化する範囲を考慮して,  $-40\text{mV}$  より脱分極側について行った.

$I_A$  は Hodgkin-Huxley 型方程式によって, 次のように記述する.

$$I_A = G_A \cdot m_A^{P(A)} \cdot h_A \cdot (V - E_K) \quad (5.1)$$

$$\tau_{mA} \cdot \frac{dm_A}{dt} = m_{A\infty} - m_A \quad (5.2)$$

$$\tau_{hA} \cdot \frac{dh_A}{dt} = h_{A\infty} - h_A \quad (5.3)$$

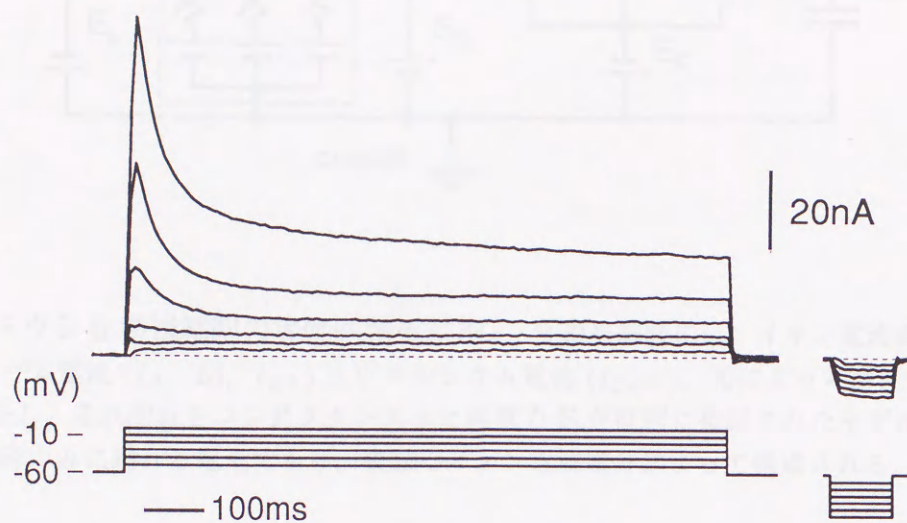
非線形最適化のアルゴリズムとしては Marquardt 法を用い [125], 各電位における定常特性及び時定数の値を求め, その膜電位依存特性を次式のようにシグモイド関数によって近似した (図 5.4, 図 5.5).

$$m_{A\infty} = \frac{1}{1 + \exp[-(V + 24)/8]} \quad (5.4)$$

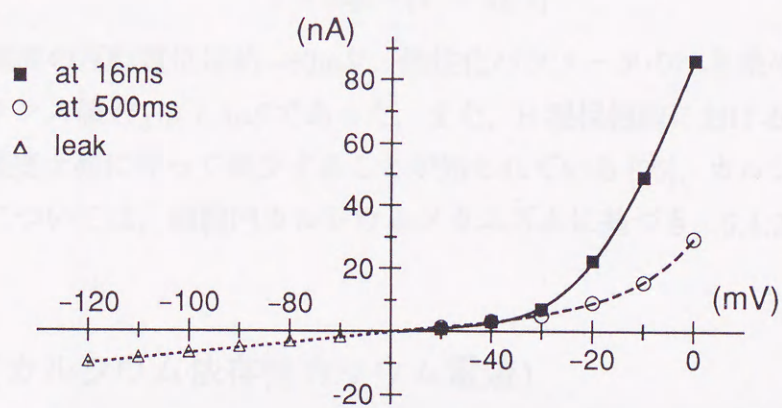
$$\tau_{mA} = \frac{0.004}{1 + \exp[(V + 23)/6.5]} + 0.0025 \quad (5.5)$$

$$h_{A\infty} = \frac{1}{1 + \exp[(V + 41)/9]} \quad (5.6)$$





(a)



(b)

図 5.1 ウミウシB型視細胞における膜イオン電流。(a) 保持電位-60mV から様々な固定電位 (-50, -40, -30, -20, -10mV) に膜電位固定した時に観測される電流。上段が膜電流, 下段は膜電位変化を表す。(b) 固定電位に対する膜電流の振幅特性 (I-V 特性)。



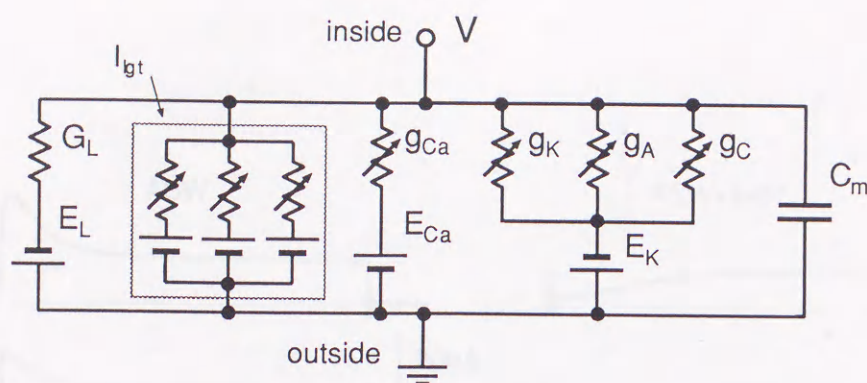


図 5.2 ウミウシ B 型視細胞の等価回路モデル. B 型視細胞には, イオン電流成分として, 3 種類のカリウム電流 ( $I_A$ ,  $I_C$ ,  $I_{K+}$ ) 及びカルシウム電流 ( $I_{Ca^{2+}}$ ), 光によって活性化される電流 ( $I_{igt}$ ) が存在し, それぞれをコンダクタンス  $g$  と起電力  $E$  が直列に接続されたモデルで表す.  $I_{igt}$  は, 光照射時のみに現れる電流であり, 複数のイオン電流成分によって構成される.  $C_m$  は膜容量を表す.

$$\tau_{hA} = \frac{0.07}{1 + \exp[-(V + 5)/7]} + 0.08 \quad (5.7)$$

なお, この電流の反転電位は約  $-80\text{mV}$ , 活性化パラメータのべき乗の指数  $P(A)$  は 3, 最大コンダクタンス値  $G_A$  は  $1.3\mu\text{S}$  であった. また, B 型視細胞における  $I_A$  電流は, 細胞内カルシウム濃度上昇に伴って減少することが知られている [25]. カルシウム濃度に依存したこの特性については, 細胞内カルシウムメカニズムに基づき, 5.4.2 節でモデル記述する.

### 5.3.2 $I_C$ (カルシウム依存性カリウム電流)

B 型視細胞においては, 遅延整流性カリウム電流  $I_{K+}$  は膜電位  $0\text{mV}$  以下ではほとんど活性化されず, 通常の応答の範囲 ( $-60 \sim 0\text{mV}$ ) では無視することができる. さらに, カルシウム電流  $I_{Ca^{2+}}$  の時間依存性はほとんど無く,  $I_A$  及び  $I_{K+}$  のブロッカーである, 4-AP, テトラエチルアンモニウム (TEA) を付加した ASW を用いて,  $I_A$ ,  $I_{K+}$  をブロックした状態で観測される電流の時間特性は, カルシウム依存性カリウム電流  $I_C$  を反映したものとなる [128].

$I_C$  の膜電位依存パラメータは,  $I_{Ca^{2+}}$  及び漏れ電流  $I_l$  を取り除いた後の電流波形 (図 5.6) から,  $I_A$  と同様に非線形最適化法を適用して求めた. 図 5.7 及び図 5.8 は, こうして得られた活性化, 不活性化パラメータの定常特性と時定数の電位依存特性であり, これより  $I_C$



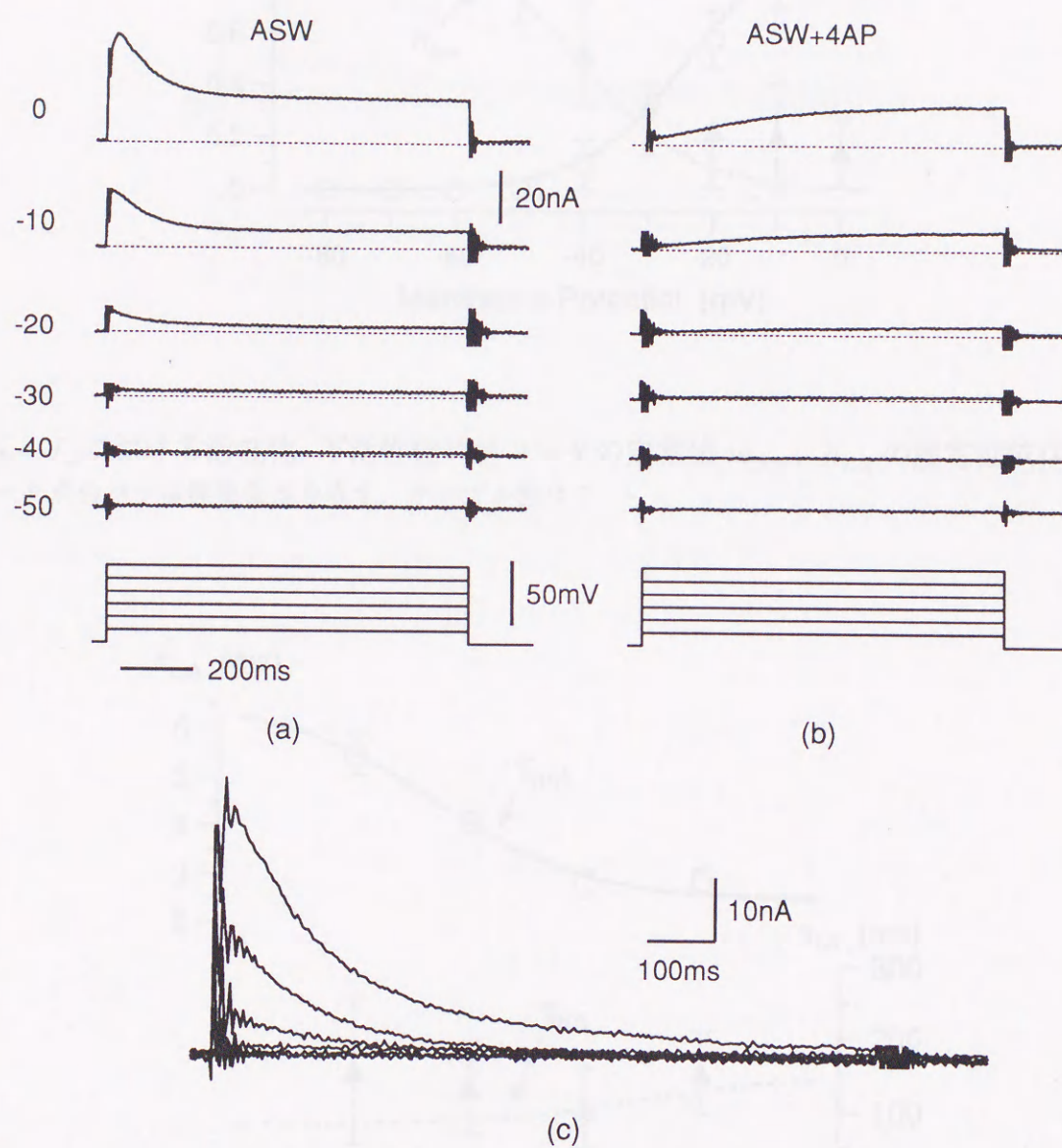


図 5.3 膜電位固定実験により測定された  $I_A$ . (a) ASW 中において観測された膜電流. (b) 5mM の 4-AP を加えた ASW 中において観測された膜電流. (c) (a) と (b) の差分として得られた  $I_A$ . 保持電位  $-60\text{mV}$ , 固定電位  $-50, -40, -30, -20, -10, 0\text{mV}$ .



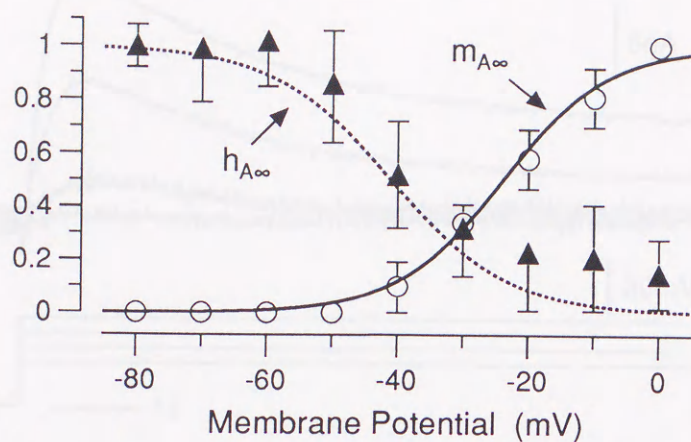


図 5.4  $I_A$ における活性化, 不活性化パラメータの定常値  $m_{A\infty}$ ,  $h_{A\infty}$ の膜電位依存特性. データ点のバーは標準偏差を表す. サンプル数は 7.

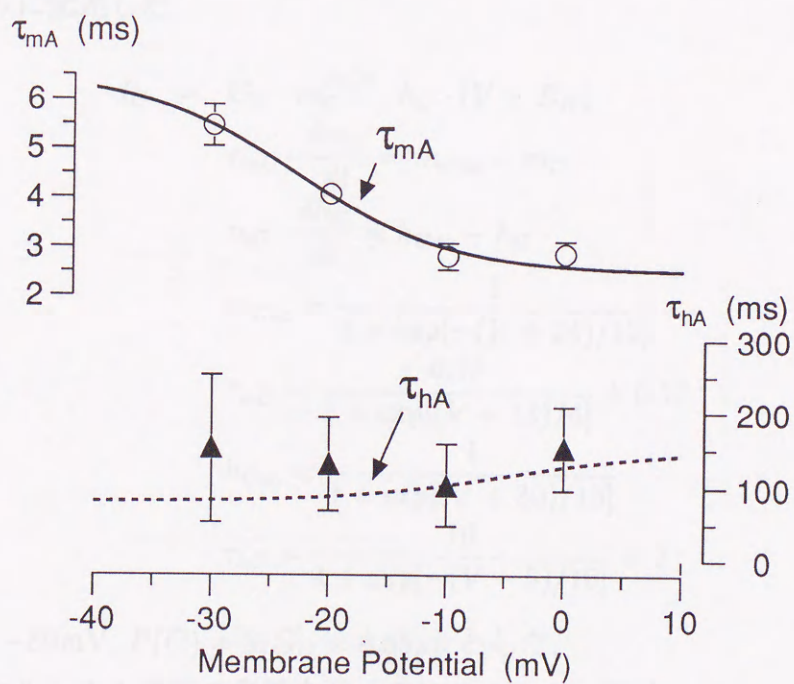


図 5.5  $I_A$ における活性化, 不活性化パラメータの時定数  $\tau_{mA}$ ,  $\tau_{hA}$ の膜電位依存特性. データ点のバーは標準偏差を表す. サンプル数は 7.



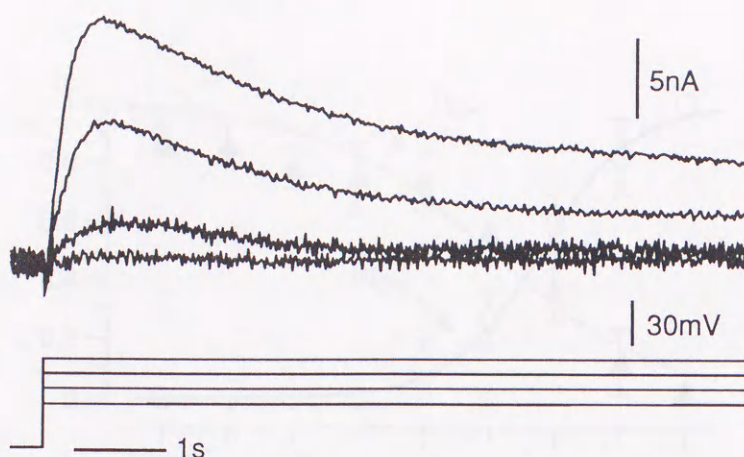


図 5.6  $I_A$ ,  $I_{K+}$  のブロックにより抽出された  $I_C$ . ASW 中に 4-AP(5mM), TEA(10mM) を付加することにより,  $I_A$  及び  $I_{K+}$  を除去することができる. この電流波形から, 漏れ電流とカルシウム電流の影響 (どちらの電流成分も時間依存特性はほとんどなく, 電流振幅にのみ影響する) を除去した結果  $I_C$  成分が得られる. 保持電位  $-60\text{mV}$ , 固定電位  $-30, -20, -10, 0\text{mV}$ .

電流は次のように記述した.

$$I_C = G_C \cdot m_C^{P(C)} \cdot h_C \cdot (V - E_K) \quad (5.8)$$

$$\tau_{mC} \cdot \frac{dm_C}{dt} = m_{C\infty} - m_C \quad (5.9)$$

$$\tau_{hC} \cdot \frac{dh_C}{dt} = h_{C\infty} - h_C \quad (5.10)$$

$$m_{C\infty} = \frac{1}{1 + \exp[-(V + 24)/12]} \quad (5.11)$$

$$\tau_{mC} = \frac{0.18}{1 + \exp[(V + 13)/4]} + 0.12 \quad (5.12)$$

$$h_{C\infty} = \frac{1}{1 + \exp[(V + 30)/13]} \quad (5.13)$$

$$\tau_{hC} = \frac{10}{1 + \exp[-(V - 5)/10]} + 2 \quad (5.14)$$

ただし,  $E_K = -80\text{mV}$ ,  $P(C) = 3$ ,  $G_C = 0.55\mu\text{S}$  とした.

$I_C$  は細胞内カルシウム濃度の影響を強く受けるカリウム電流であり, B 型視細胞においては, カルシウム濃度の上昇によって, 電流振幅の減少が示されている. カルシウム濃度変化に対する  $I_C$  の変化については,  $I_A$  と同様, 細胞内カルシウムメカニズムに基づき, 5.4.2 節でモデル記述を行う.



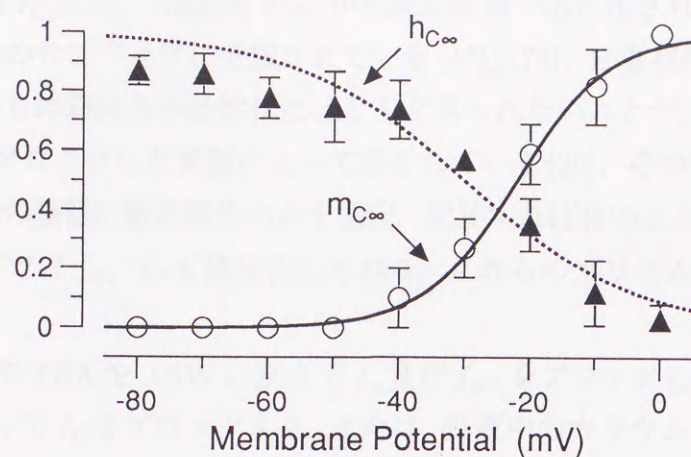


図 5.7  $I_C$ における活性化, 不活性化パラメータの定常値  $h_{C\infty}$ ,  $m_{C\infty}$ の膜電位依存特性. データ点のバーは標準偏差を表す. サンプル数は7.

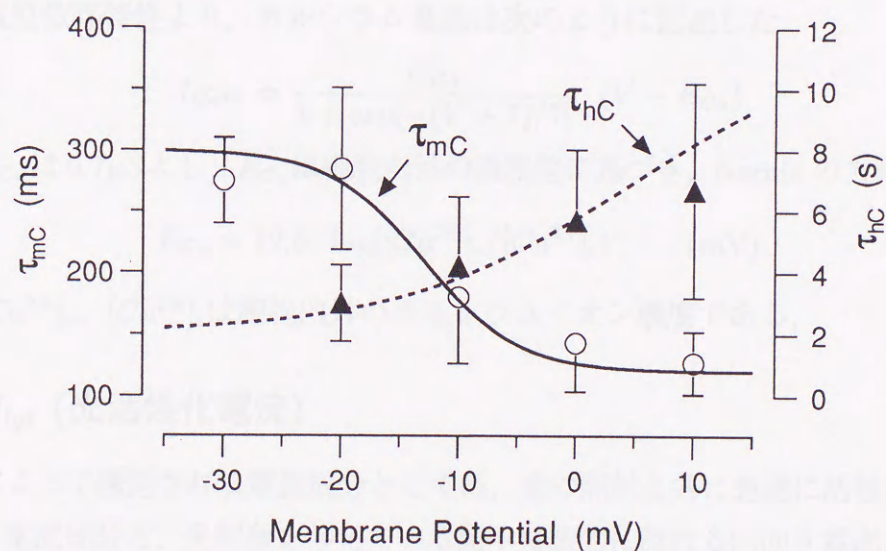


図 5.8  $I_C$ における活性化, 不活性化パラメータの時定数  $\tau_{mC}$ ,  $\tau_{hC}$ の膜電位依存特性. データ点のバーは標準偏差を表す. サンプル数は7.



### 5.3.3 $I_{Ca^{2+}}$ (カルシウム電流)

カルシウム電流  $I_{Ca^{2+}}$  は、 $-30\text{mV}$  付近から脱分極側で活性化されるが、その時間特性によっていくつかのサブタイプに分類されている [47],[176]。B 型視細胞における  $I_{Ca^{2+}}$  は L 型であり、しかも時間的な不活性化はほとんど見られないことが、コバルト (Co) を用いて  $I_{Ca^{2+}}$  電流をブロックした実験によって示されている [20]。そのことから、 $I_{Ca^{2+}}$  については、電流振幅の膜電位依存特性のみを測定、記述すれば良いことになるが、この電流が活性化する電位では  $I_A$ 、 $I_C$  も活性化しており、これらのカリウム電流から分離する必要がある。

そこで、4-AP や TEA を ASW に加えて  $I_A$  及び  $I_{K+}$  をブロックした状態で、さらにセシウム (Cs) によって  $I_C$  をブロックする、または、外液中のカリウムイオン濃度を調整してカリウム電流に対する平衡電位を固定電位に一致させることにより、カリウム電流を完全に除去した状態で測定される膜電流からカルシウム電流を求めた。すなわち、カリウム電流を除去した状態で観測される電流に含まれる成分は、カルシウム電流と漏れ電流であり、過分極側に膜電位固定した時の電流値から得られる漏れ電流成分を除くことにより、カルシウム電流が求まる。図 5.9(a) のように、カリウム電流が存在しない状態では電流の時間的な変化は見られず、カルシウム電流は活性化は極めて速く、不活性化も見られず、図 5.9(b) のように約  $-40\text{mV}$  から脱分極側で活性化する。

この膜電位依存特性より、カルシウム電流は次のように記述した。

$$I_{Ca^{2+}} = \frac{G_{Ca}}{1 + \exp[-(V + 7)/7]} \cdot (V - E_{Ca}) \quad (5.15)$$

ただし、 $G_{Ca}$  は  $0.7\mu\text{S}$  とし、 $E_{Ca}$  は細胞内外の濃度差に基づき、Nernst の方程式で表した。

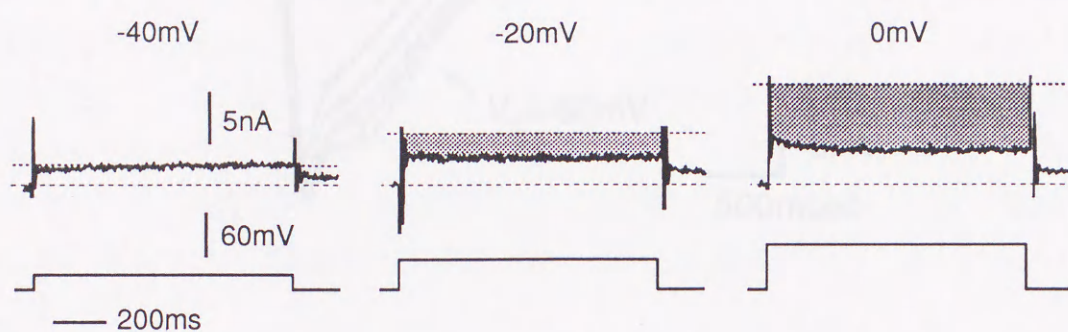
$$E_{Ca} = 12.5 \cdot \log([Ca^{2+}]_o/[Ca^{2+}]_i) \quad (\text{mV}) \quad (5.16)$$

ここで、 $[Ca^{2+}]_o$ 、 $[Ca^{2+}]_i$  は細胞内外のカルシウムイオン濃度である。

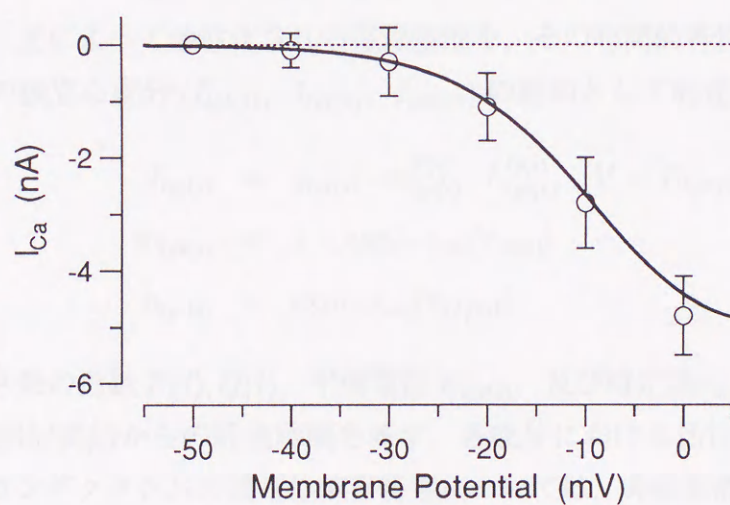
### 5.3.4 $I_{lgt}$ (光活性化電流)

光刺激によって誘発される電流成分としては、光の照射と共に急速に活性化、不活性化する内向き電流成分と、光刺激を与えている間中持続的に流れる内向き電流が観測される [25]。時間的な変化の速い成分は光によって活性化されるナトリウム電流であり、膜電位固定下でフラッシュ光 (時間幅  $33\text{msec}$ ) を与えた時、図 5.10 のように、急峻なピークとそれに続く緩慢な電流として観測される。一方、持続的な電流成分は、光刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇に伴う  $I_A$ 、 $I_C$  の抑制などを含み、この特性が持続的な光応答形状に大きく影響している。





(a)



(b)

図 5.9 カルシウム電流の測定結果と I-V 特性. (a) 4-AP, TEA, Cs によってカリウム電流をブロックした状態で観測される膜電流. この電流と漏れ電流の差 (網掛け部分) がカルシウム電流に相当する. 保持電位 -60mV, 固定電位 -40, -20, 0mV. (b) カルシウム電流振幅の膜電位依存特性. データ点のバーは標準偏差を表す. サンプル数は 7.



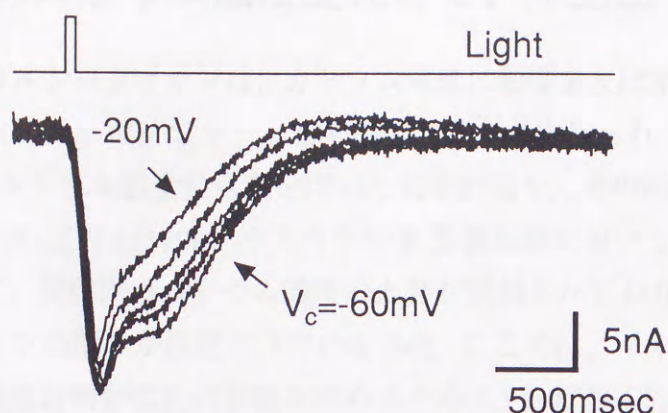


図 5.10 光活性化電流  $I_{lgt}$ . 膜電位を一定に固定した状態で、時間幅 1/30sec の白色光を照射した場合に観測される電流. 固定電位  $-60, -50, -40, -30, -20$  mV.

ここでは、光によって活性化される電流波形を、その時間的特性から、次式によって表される3つの独立な成分 ( $I_{lgt(1)}$ ,  $I_{lgt(2)}$ ,  $I_{lgt(3)}$ ) の総和として記述した.

$$I_{lgt(i)} = g_{lgt(i)} \cdot m_{lgt(i)}^{P(i)} \cdot h_{lgt(i)}^{Q(i)} \cdot (V - E_{lgt(i)}) \quad (5.17)$$

$$m_{lgt(i)} = 1 - \exp[-t_{on}/\tau_{on(i)}] \quad (5.18)$$

$$h_{lgt(i)} = \exp[-t_{on}/\tau_{off(i)}] \quad (5.19)$$

ただし、べき乗の指数  $P(i), Q(i)$ , 平衡電位  $E_{lgt(i)}$ , 及び時定数  $\tau_{on(i)}, \tau_{off(i)}$  は定数であり,  $t_{on}$  は光刺激照射開始からの経過時間を表す. 各成分における活性化, 不活性化の時間特性, 及び, コンダクタンスの膜電位依存特性については, 非線形最適化法を適用して実験データからパラメータを推定した. これより, コンダクタンス  $g_{lgt(i)}$  は次式のように, 膜電位  $V$  あるいは細胞内カルシウム濃度  $[Ca^{2+}]_i$  の関数として表した.

$$g_{lgt(1)} = G_{lgt(1)} \cdot \left( \frac{0.6}{1 + \exp[-(V + 34)/16]} + 0.4 \right) \quad (5.20)$$

$$g_{lgt(2)} = G_{lgt(2)} \cdot \left( \frac{0.26}{1 + \exp[-(V + 17)/5]} + 0.74 \right) \quad (5.21)$$

$$g_{lgt(3)} = G_{lgt(3)} \cdot \beta \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(0)}}{[Ca^{2+}]_{i(0)}} \quad (5.22)$$

ここで,  $G_{lgt(1)}, G_{lgt(2)}, G_{lgt(3)}$ , 及び,  $\beta$  は定数である. また,  $[Ca^{2+}]_i$  は細胞内カルシウム濃度,  $[Ca^{2+}]_{i(0)}$  は静止状態における細胞内カルシウム濃度 ( $= 0.1 \mu\text{M}$ ) を表す.



## 5.4 細胞内カルシウム濃度変化のモデル記述

細胞内におけるカルシウムイオンは、カリウム電流に影響を及ぼすと共に、細胞内プロセスに対するセカンドメッセンジャーとして機能することが知られており、Arsenazo III や Fura-2 などのカルシウム感受性色素を用いた光学計測や、その結果に基づくモデル記述が行われている [101],[103],[179]。ウミウシの B 型視細胞においても、光刺激や膜電位の脱分極化によって、細胞内カルシウム濃度の上昇が観測されており、学習獲得過程におけるカルシウムイオンの関与が注目されている [50]。ここでは、イオン電流や学習獲得に対するカルシウム濃度時間的変化の影響を求めるために、B 型視細胞のイオン電流モデルに対して、カルシウム濃度変化のメカニズムを導入した結果についてまとめる。

### 5.4.1 細胞内カルシウム濃度変化のメカニズムとそのモデル

細胞内のカルシウム濃度を決定する主な要因は、カルシウム電流、小胞体などのカルシウム貯蔵部位 (カルシウムバッファ) 及び細胞膜におけるカルシウムポンプメカニズムである [175]。さらに、B 型視細胞においては、光刺激によるカルシウム濃度の上昇が報告されており、これらのメカニズムから図 5.11 のように細胞内カルシウム濃度変化を記述した。

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = -\frac{I_{Ca^{2+}}}{2FD_V} - k_f \cdot B \cdot [Ca^{2+}]_i + k_b \cdot CaB + pCa + lCa \quad (5.23)$$

ここで、第1項は  $I_{Ca^{2+}}$  によって細胞内に流入する  $Ca^{2+}$  成分を表した。ただし、 $F$  はファラデー定数、 $D_V$  は細胞質の体積 (細胞を完全な球と仮定し、細胞半径を  $10 \mu m$ 、細胞質の厚さを  $0.1 \mu m$  とした) である。

第2、第3項は、貯蔵物質  $CaB$  としてバッファに蓄えられることにより減少するカルシウムイオン、及び、 $CaB$  からの分離によって供給される成分である。一方、バッファにおける  $CaB$  の変化は次式によって表す。

$$\frac{dCaB}{dt} = k_f \cdot B \cdot [Ca^{2+}]_i - k_b \cdot CaB + pCaB \quad (5.24)$$

ただし、 $pCaB$  はバッファ内の貯蔵物質濃度を一定状態に保つためのポンプメカニズムであり、次のように静止状態における濃度  $CaB_0$  との差に比例した濃度変化をもたらすものとして記述した。

$$pCaB = \frac{CaB_0 - CaB}{\tau_B} \quad (5.25)$$

ここで、 $\tau_B$  は比例定数である。



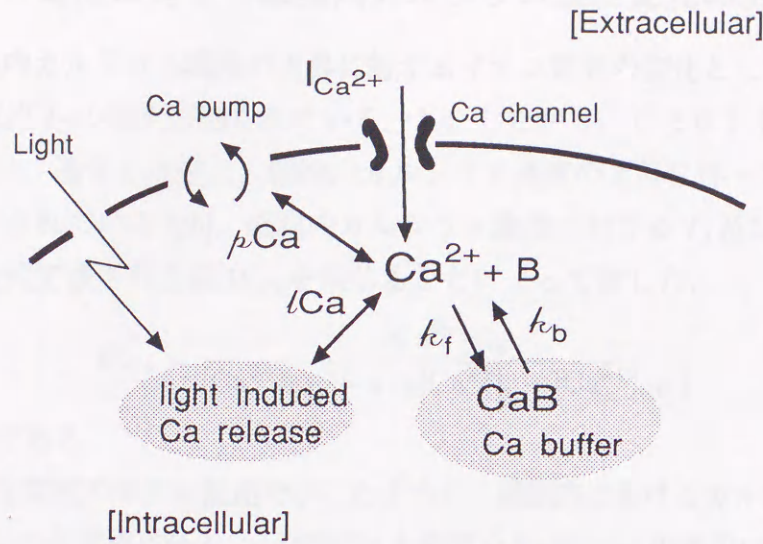


図 5.11 B 型視細胞内カルシウム濃度変化メカニズムのモデル。細胞内におけるカルシウム濃度の変化には、カルシウムチャネルを通じて細胞内に流入するカルシウム電流、小胞体などにおけるバッファ機構、及び、ATP ポンプ、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換ポンプなどが関与する。視細胞では、さらに、光刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇が報告されている。

$pCa$  はカルシウムポンプによって排除される  $\text{Ca}^{2+}$  を表し、次式のように、静止状態におけるカルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_{i(0)} = 0.1\mu\text{M}$ ) との差に比例した濃度変化 (比例定数:  $\tau_p$ ) をもたらすとして記述した。

$$pCa = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{i(0)} - [\text{Ca}^{2+}]_i}{\tau_p} \quad (5.26)$$

$lCa$  は光刺激によって生じる細胞内カルシウム濃度の上昇を表し、ここでは、光刺激の提示によって  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の静止レベルが変化するポンプとして、次のように記述した。

$$lCa = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{i(l)} - [\text{Ca}^{2+}]_i}{\tau_l} \quad (5.27)$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{i(l)}}{dt} = \begin{cases} \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{i(l_{gt})} - [\text{Ca}^{2+}]_{i(l)}}{\tau_{inc}} & (\text{光刺激時}) \\ \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{i(0)} - [\text{Ca}^{2+}]_{i(l)}}{\tau_{dec}} & (\text{暗時}) \end{cases} \quad (5.28)$$

ここで、 $\tau_l$ ,  $\tau_{inc}$ ,  $\tau_{dec}$  は、濃度変化の時間特性を決める定数である。

このモデルにおけるパラメータは、Connor & Alkon による実験結果 [50] 及び同種の海洋腹足類 (*Archidornia Motereyensis*) の神経細胞を扱った Connor & Nikolakopoulou [48] のモデルなどを基に、最終的には再構成したイオン電流や光応答形状を実験データと比較することにより決定した。



### 5.4.2 イオン電流に対する細胞内カルシウム濃度変化の影響

通常は、細胞内カルシウム濃度の上昇に対するイオン電流の変化として、カルシウム依存性カリウム電流  $I_C$  の増大が知られている。しかしながら、ウミウシB型視細胞における  $I_C$  及び  $I_A$  では、通常とは逆に、細胞内カルシウム濃度の上昇に伴って、その振幅が減少することが示されている [25]。細胞内カルシウム濃度に対する  $I_A$  及び  $I_C$  の変化は、その電流振幅に次式で表される項  $W_{Ca}$  を乗じることによって表した。

$$W_{Ca} = \frac{[Ca^{2+}]_{i(0)}}{[Ca^{2+}]_{i(0)} + \alpha \cdot ([Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(0)})} \quad (5.29)$$

ここで  $\alpha$  は定数である。

また、光活性化電流のモデル記述で示したように、細胞内におけるカルシウム濃度の上昇は、持続的な光活性化電流成分  $I_{lgt(3)}$  の振幅にも影響を及ぼす。この効果は、式 (5.22) に示したように、コンダクタンスにカルシウム濃度に依存した項  $\beta \cdot ([Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(0)}) / [Ca^{2+}]_{i(0)}$  を乗じることによって表している。

## 5.5 モデルシミュレーション

### 5.5.1 膜電流とイオン電流成分

細胞膜電位を一定の電位に固定した場合 ( $dV/dt = 0$ ) の膜電流は、イオン電流の総和として得られる。すなわち、暗時における膜電流は次式によって表される。

$$I = I_A + I_C + I_{Ca^{2+}} + I_L \quad (5.30)$$

$I_L$  は漏れ電流であり、膜電位に比例した成分として、次式によって表される。

$$I_L = G_L \cdot (V - E_L) \quad (5.31)$$

ただし、 $G_L$  は  $0.05\mu S$ 、 $E_L$  は  $-60mV$  である。

図 5.12 は、こうして得られる膜電流を様々な固定電位について重ね書きした結果であり、時間、振幅特性とも実験データを良く近似していることが確認された。この時のイオン電流成分を観測すると、立ち上がりの急峻な特性は  $I_A$  によって形成され、 $I_A$  が不活性化した後には、 $I_C$ 、 $I_{Ca^{2+}}$  及び  $I_L$  によって決まる。

一方、時間的変化の異なる 3 つの電流成分の合成によって記述した光活性化電流  $I_{lgt}$  は、図 5.13 のように、実験データを良く近似していることがわかる。 $I_{lgt(1)}$ 、 $I_{lgt(2)}$  は、光刺激の照射直後に見られる一過性の電流成分であり、 $I_{lgt(3)}$  は光刺激が持続する間中見られる電流成分である。



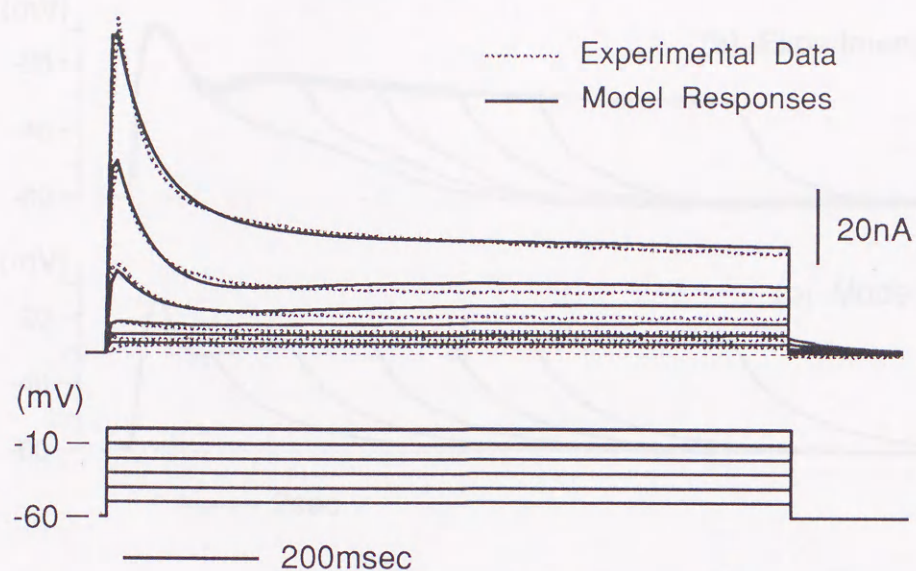


図 5.12 ウミウシ B 型視細胞における膜電流. 実線: モデル応答, 破線: 実験データ. 保持電位  $-60\text{mV}$ , 固定電位  $-50, -40, -30, -20, -10, 0\text{mV}$ .

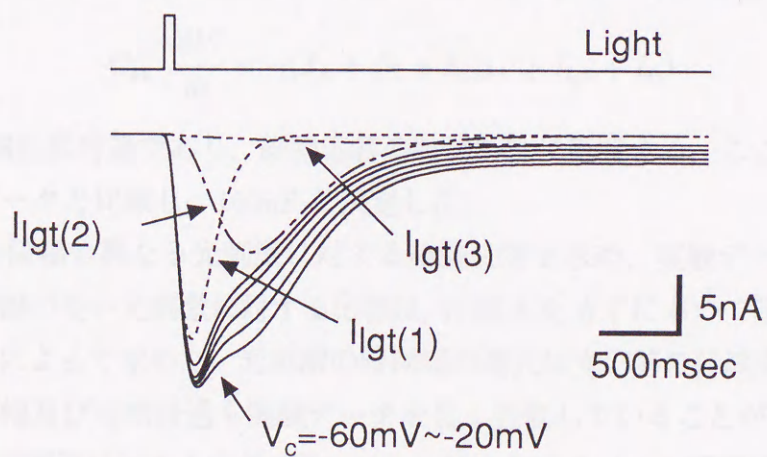


図 5.13 光活性化電流モデル応答. 光活性化電流は, その時間特性から, 3 つの電流成分  $I_{lgt}(1)$ ,  $I_{lgt}(2)$ ,  $I_{lgt}(3)$  の合成によって記述した.



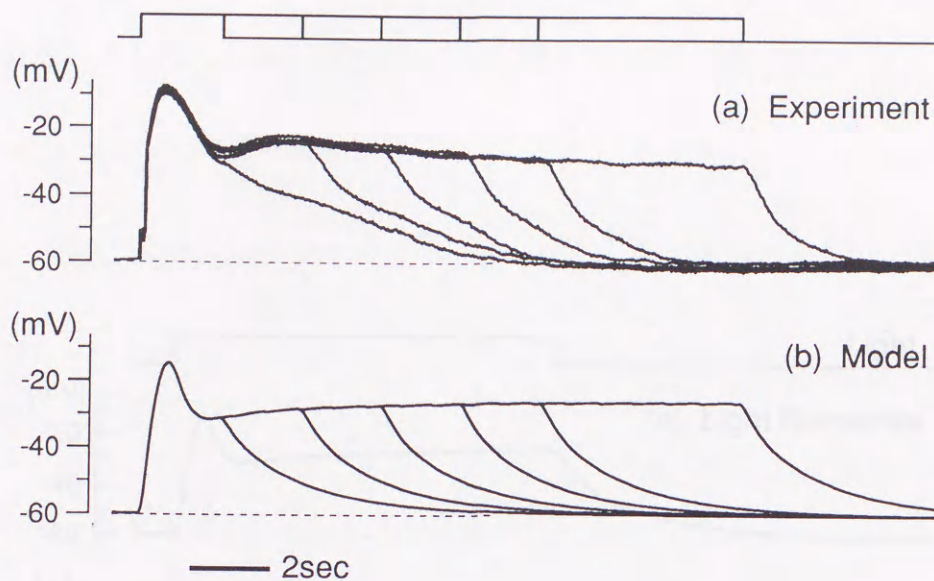


図 5.14 時間幅の異なる光刺激に対する細胞応答. (a) 実験データ. (b) モデル応答 ( $\tau_{l(on)}=10\text{sec}$ ,  $\tau_{l(off)}=0.1\text{sec}$ ,  $\tau_{inc}=10\text{msec}$ ,  $\tau_{dec}=10\text{msec}$ ).

### 5.5.2 光刺激に対する細胞応答

細胞応答として観測される膜電位  $V$  の変化は、イオン電流の特性によって規定される。B 型視細胞の応答は、その等価回路 (図 5.2) から、次のように求めることができる。

$$C_m \cdot \frac{dV}{dt} = -(I_A + I_C + I_{Ca^{2+}} + I_{lgt} + I_L) \quad (5.32)$$

ただし、 $C_m$  は細胞膜容量であり、細胞応答の時間特性に影響する。ここでは、モデルの光応答を実験データと比較し、 $100\text{nF}$  と決定した。

図 5.14 は、時間幅の異なる光刺激に対する細胞応答を求め、実験データと比較した結果である。時間幅の長い光刺激に対する応答は、付録 A.6, A.7 において暗状態へ戻す時刻を変更することによって求めた。光刺激の時間幅の増大は光応答の持続をもたらし、その場合の応答の振幅及び時間経過も実験データを良く近似していることがわかる。さらに、時間幅  $10\text{sec}$  の光刺激に対する応答 (図 5.15(a)) 時におけるイオン電流成分の時間的变化は、図 5.15(b) のように、光刺激直後には  $I_{lgt}$  の急速な活性化が生じ、その結果、膜電位は脱分極側に移行し、他の膜電位依存性イオン電流成分が活性化される。また、応答の持続部分においては、各イオン電流成分の時間的变化はほとんどなく、イオン電流の総和によって決まる膜電流値に基づき、脱分極状態に保たれることがわかる。



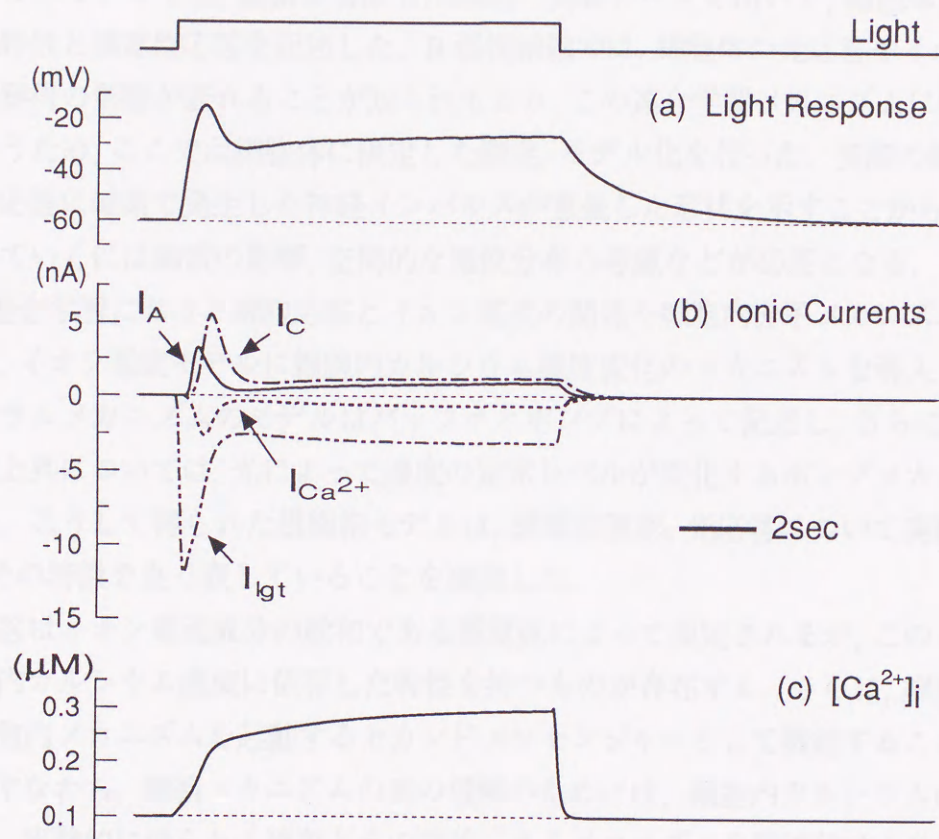


図 5.15 光応答時のイオン電流成分及び細胞内カルシウム濃度の時間的变化。(a) 時間幅 10sec の光刺激に対する細胞応答。(b) 光応答時におけるイオン電流の時間的变化。(c) 光応答に対する細胞内カルシウム濃度の変化。



一方、光刺激照射時における細胞内カルシウム濃度は、図 5.15(c) のように、刺激の開始から少し遅れて上昇し、刺激が継続している期間は高い状態が持続する。

## 5.6 まとめ

本章では、膜電位固定実験データに基づくウミウシ B 型視細胞のイオン電流モデルを提案した。このモデルでは、軸索を切断した細胞の実験データを用いて、細胞体におけるイオン電流特性と膜電位応答を記述した。B 型視細胞では、細胞体の光応答やイオン電流に、連合学習獲得の影響が表れることが知られており、この連合学習メカニズムに限定した解析を行なうため、ここでは細胞体に限定した測定、モデル化を行った。実際の細胞応答は、細胞体の応答に軸索で発生した神経インパルスが重畳した形状を示すことから、モデルを発展させていくには軸索の影響、空間的な電位分布の考慮などが必要となる。

一方、連合学習における細胞応答とイオン電流の関連や細胞内分子メカニズムを検討するために、イオン電流モデルに細胞内カルシウム濃度変化のメカニズムを導入した。細胞内カルシウムメカニズムのモデルはバッファとポンプによって記述し、さらに、光刺激に伴う濃度上昇については、光によって濃度の定常レベルが変化するポンプメカニズムとして表した。こうして得られた視細胞モデルは、膜電流波形、光応答について実験データと比較し、その特徴を良く表していることを確認した。

細胞応答はイオン電流成分の総和である膜電流によって規定されるが、このイオン電流には細胞内カルシウム濃度に依存した特性を持つものが存在する。さらに、細胞内カルシウムは細胞内メカニズムを起動するセカンドメッセンジャーとして機能することが知られている。すなわち、細胞メカニズムの真の理解のためには、細胞内カルシウムに関する実験と共に、実験的に得られる現象とその背後にあるメカニズムを関連付ける必要あり、イオン電流と細胞内カルシウムメカニズムに基づくモデル化は、様々な神経細胞及び神経系に適用できる概念と言える。



## 第6章

## 視細胞における学習獲得とそのメカニズム

## 6.1 はじめに

学習獲得後のウミウシでは、行動の変化に対応して、新野視細胞におけるカリウム電流、カルシウム電流の減少や光応答形状の変化が観察されている[40][41]。従来より、学習獲得に伴う光応答の変化は、網膜膜における細胞コンパクスのリン酸化によるカリウムイオンコンダクタンスの減少に対応すると考えられ、その機序についてイオン電流に基づくモデルによる説明がなされてきた[42][43]。しかしながら、これらのモデルではカリウムイオン電流の増減や光応答に影響を及ぼす細胞内カルシウム濃度変化(細胞内カルシウムメカニズム)が考慮されておらず、イオン電流とは異なるダイナミクスを持つ、カスミウシの動態が光応答に及ぼす影響を検討することは不可能であった。

一方、Watanabeら[44]はウミウシ視細胞における光応答の特性をコンダクタンスやキープパナンスなどによって構成した単純な回路でもモデル化し、学習獲得のメカニズムについてシミュレーションをおこなっている。しかしながら、このモデルにおいて得られた光応答の時間的経緯は、光応答の大幅な遅延によって歪んでおり、実際に観察されたLLDとは性質の異なるものである。さらに、細胞・細胞間伝達や電位調節に対する依存性(Spike-Triggered Inhibition)等についても、このモデルでは考慮されておらず、学習が説明されておらず、また、このような性質を引くためにメカニズムについても言及されていない。すなわち、このような単純な回路モデルを用いた解析では、複雑な動態におよぼす影響を把握することはできても、その応答の背後に潜む基本原理を明らかにすることは困難であった。

本章では、第5章で定めたイオン電流の細胞内カルシウムメカニズムに基づく詳細な多変数モデルを用い、学習獲得に伴う網膜膜光応答変化及び学習獲得のダイナミクスにつ



## 第 6 章

# 視細胞における学習獲得とそのメカニズム

### 6.1 はじめに

学習獲得後のウミウシでは、行動の変化に対応して、B 型視細胞におけるカリウム電流、カルシウム電流の減少や光応答形状の変化が観測されている [163], [173]. 従来より、学習獲得に伴う光応答の変化は、細胞膜における機能タンパクのリン酸化によるカリウムチャネルコンダクタンスの減少に起因すると考えられ、その関連性についてイオン電流に基づくモデルによる検証がなされてきた [78], [98]. しかしながら、これらのモデルではカリウムイオン電流の振幅や光応答に影響を及ぼす細胞内カルシウム濃度変化 (細胞内カルシウムメカニズム) が考慮されておらず、イオン電流とは異なるダイナミクスを持つ、カルシウムの動態が光応答に及ぼす影響を検討することは不可能であった。

一方、Werness ら [171] はウミウシ神経系における各細胞の特性をコンダクタンスやキャパシタンスなどによって構成した単純な回路でモデル化し、学習獲得のメカニズムについてシミュレーションを行なっている。しかしながら、このモデルにおいて得られた光応答持続時間の延長は、応答振幅の大幅な増大によって生じており、実験で観測された LLD とは性質の異なるものである。さらに、条件・無条件刺激の時間間隔に対する依存 (ISI: Inter-Stimulus Interval) 特性についても、CS, UCS を同時に与えた場合に全く学習が獲得されておらず、また、このような ISI 特性を引き起こすメカニズムについても言及されていない。すなわち、このような単純な細胞モデルを用いた解析では、神経回路応答のおおまかな特徴を把握することはできても、その応答の背後に潜む基本原理を知ることは困難であった。

本章では、第 5 章で提案したイオン電流と細胞内カルシウムメカニズムに基づく詳細な B 型視細胞モデルを用い、学習獲得に伴う視細胞光応答変化及び学習獲得の ISI 特性につ



表 6.1 ウミウシ学習メカニズムのモデル解析.

年	著者	モデルの特徴と主な結果
1989	Ikeno et al.	1. イオン電流に基づく B 型視細胞のモデル記述 2. カリウム電流減少による光応答振幅の増大
1989	Alkon et al.	1. RC 回路による細胞モデル記述 2. 視細胞, 視神経節細胞, 有毛細胞を含む神経回路モデル 3. CS, UCS のタイミングによる B 型視細胞応答の変化
1992	Koide & Farley	1. イオン電流に基づく B 型視細胞のモデル記述 2. カリウム電流の減少による光応答振幅の増大
1992	Werness et al.	1. RC 回路による細胞モデル記述 2. 視覚-前庭系神経回路モデル 3. 学習獲得に伴う光応答振幅の増大, LLD(?) 4. 学習獲得における ISI 特性

いて考察を行なう。まず, 学習獲得に伴う光応答変化である LLD は, カリウムコンダクタンスの減少では起こらず, 光刺激終了後もカルシウム濃度の高い状態が持続する必要があることを明らかにした。さらに, 前庭系有毛細胞応答及び有毛細胞-視細胞間シナプス特性をモデル記述し, 連合学習における ISI 特性を求めた [110], [118]。その結果, 有毛細胞からの伝達物質受容量と視細胞内カルシウム濃度の上昇に加え, カルシウム濃度の時間的変化が学習獲得プロセスの活性化に寄与していると仮定することにより, 実験と同様の ISI 特性が得られることを示した。これらの結果は, ウミウシ視細胞における学習の獲得及び学習後の光応答変化は, カルシウム濃度の上昇とそのダイナミクスによって決まることを示すものである。

## 6.2 学習メカニズムのモデル解析

従来より, ウミウシの学習獲得メカニズムの解明に対しては, 実験データに基づく細胞及び神経回路モデルを用いた研究が進められている。表 6.1 に示すように, 1989 年に提案した B 型視細胞モデルはイオン電流特性に着目したものであり, 学習獲得に伴うカリウム電流の減少が光応答振幅の増大を引き起こすことを明らかにした [78], [142]。同様のモデル記述及び解析は, 1992 年になって Koide & Farley [98] によってもなされ, カリウム電流振幅の減少が光応答振幅の増大を生じるという結果を示している。

一方, Alkon らは細胞の電氣的特性を単純な RC 回路, シナプス電流を電流源としてモ



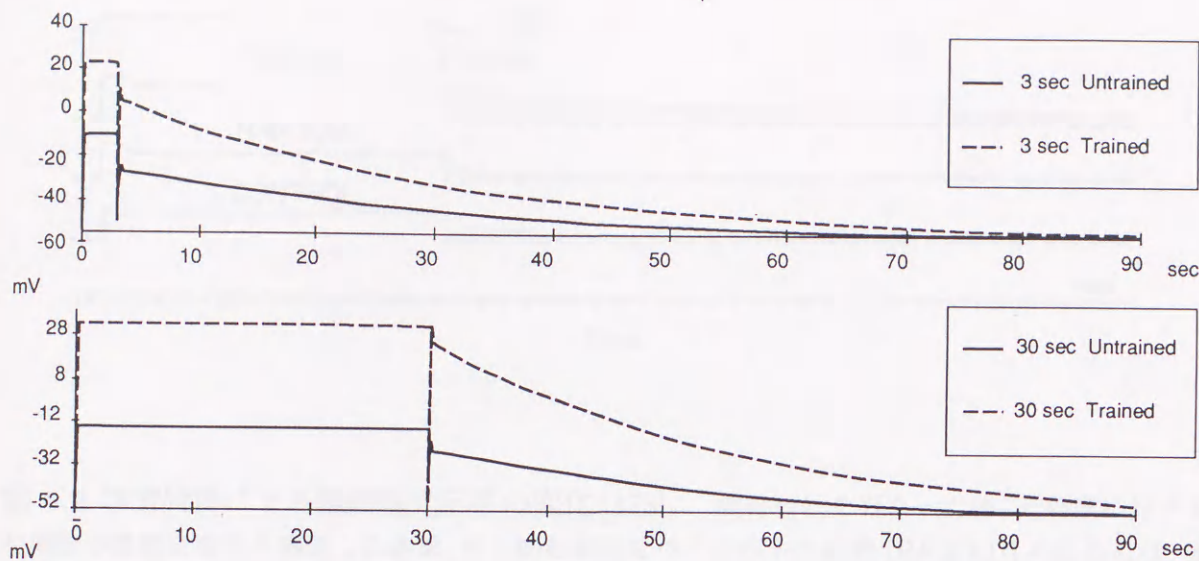


図 6.1 学習獲得に伴う B 型視細胞モデルの光応答変化 [171]. 学習獲得によって光応答振幅は大幅に増大し、これに伴い光刺激終了後も脱分極状態が持続する。しかしながら、この応答変化は実験によって得られた LLD 波形 (図 2.15) とは大幅に異なる。

デル記述することにより、視細胞、視神経節細胞及び前庭系有毛細胞からなる神経回路モデルを構築し、学習が獲得される刺激間隔で CS, UCS を提示した場合、視細胞の光応答持続時間が増大することを示した [23]. このモデルは、Alkon の仮説に基づいて、学習時における応答を再構成したものであるが、学習獲得のメカニズムや学習に伴う視細胞の応答変化については記述されていなかった。

そこで、Werness らは、このモデルを発展させて、学習獲得に伴うカリウム電流の変化を膜抵抗変化として表し、学習に伴う応答変化及び学習獲得の刺激間隔依存特性 (ISI (Inter-Stimulus Interval) 特性) を求めた [171],[172]. その結果、CS, UCS をペアで与えた場合にのみ膜抵抗の上昇、及び、図 6.1 に示すような光応答の変化が示された。Werness らは、この応答を LLD と解釈しているが、この場合の光刺激終了後の応答の持続は応答振幅の大幅な増大によって生じているものであり、実験によって得られている LLD とは異なっている。さらに視細胞の応答レンジは、通常、0mV より過分極側であるが、このモデルでは +20~+30mV に達していることから、このモデルシミュレーション結果は、学習に伴う膜抵抗の上昇が、視細胞における光応答振幅増大を引き起こすことを定性的に示したに過ぎないと言える。また、視細胞の膜電位上昇に基づく学習獲得メカニズムによって ISI 特性が得られることを示しているが、このような特性を生じる細胞やシナプスメカ



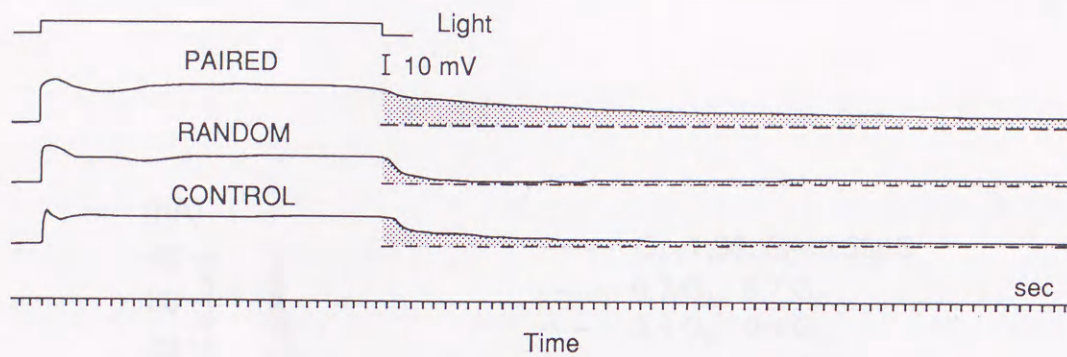


図 6.2 学習獲得による視細胞光応答の変化 [173]. 条件付けを行なった後, 光刺激に対する視細胞の膜電位変化を測定した結果, 光と回転刺激をペアで与えた動物 (PAIRED) の応答には, 光刺激終了後も持続的な継続が見られた (影をつけた部分).

ニズムについては言及されていない. すなわち, 学習獲得の生理メカニズムを詳細に議論していくためには, 実験データ及び実際の細胞メカニズムと対応付けが可能なモデルを用いたシミュレーション, 及び, 解析が必要である.

### 6.3 学習獲得による視細胞応答の変化

連合学習獲得に伴うウミウシ B 型視細胞の光応答振幅の増大及び光刺激終了後の LLD は, カリウムチャネルコンダクタンスの減少によって生じていると考えられ, カリウム電流に関する細胞内メカニズムについて生理実験が行われた [15]. しかしながら, カリウム電流変化と光応答変化の関連についての確証は得られておらず, ここでは第5章で提案した B 型視細胞のイオン電流モデルを用いたシミュレーションによって光応答変化を生じる細胞メカニズムを求めた.

従来より, B 型視細胞における膜電流の減少や光応答振幅の増大及び LLD は, カリウムコンダクタンス値の減少に起因する現象であると考えられてきた. 学習を獲得したグループ (PAIRED: CS, UCS を同時に提示) と獲得していないグループ (RANDOM: CS, UCS を無相関に提示, CONTROL: 訓練を行わない) について光応答を測定した結果, 図 6.2 に示すように, PAIRED の場合にのみ, 光刺激終了後も脱分極状態が有意に持続する LLD (網かけ部分) が生じることが示されている [173]. 本節では, 提案したモデルにより, カリウムコンダクタンス値の変化に対する膜電流及び光応答の変化を求め, LLD に対する寄与を調べた. 学習獲得によって  $I_A$ ,  $I_C$  のコンダクタンスが減少することで, 図 6.3(a)



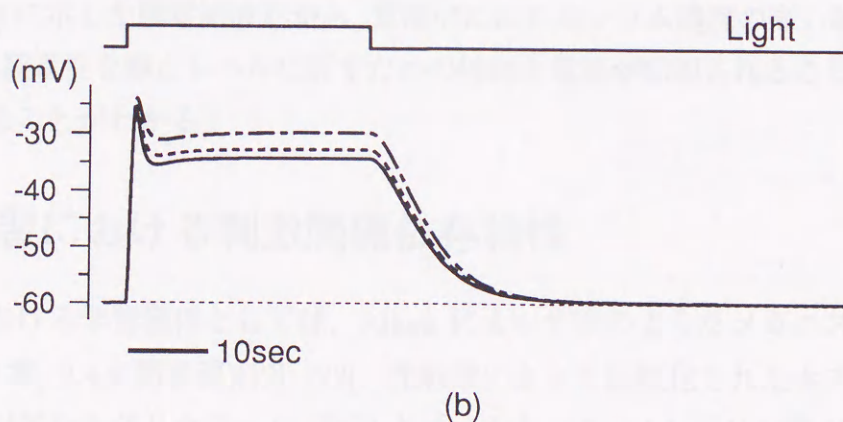
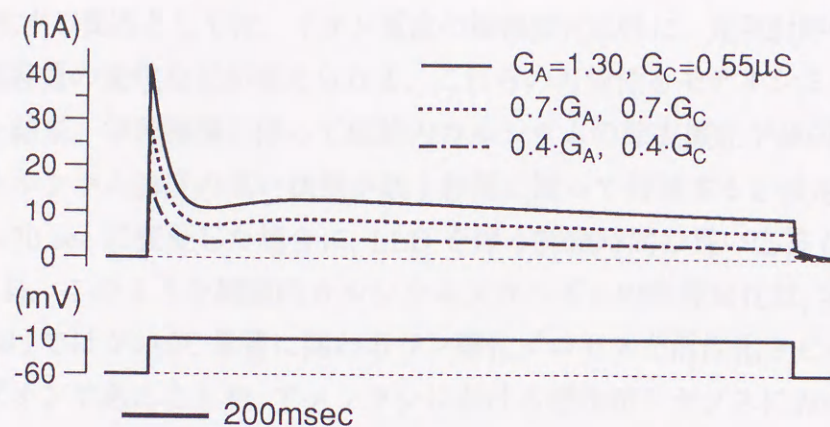


図 6.3 カリウムコンダクタンス変化に伴う B 型視細胞の特性変化. (a) カリウムコンダクタンス変化による膜電流の変化. 破線:  $I_A$ ,  $I_C$  のコンダクタンスを実線の場合の 70% に設定した場合の膜電流. 一点鎖線:  $I_A$ ,  $I_C$  のコンダクタンスを実線の場合の 40% に設定した場合の膜電流. 保持電位  $-60\text{mV}$ . 固定電位:  $-10\text{mV}$ . (b) カリウムコンダクタンス変化による光応答の変化. 破線:  $I_A$ ,  $I_C$  のコンダクタンスを実線の場合の 70% に設定した場合の光応答. 一点鎖線:  $I_A$ ,  $I_C$  のコンダクタンスを実線の場合の 40% に設定した場合の光応答.



に示すように膜電流振幅は全体的に減少し、逆に、(b)のように光応答振幅は増大した。この結果は、学習獲得に伴うカリウムコンダクタンスの減少が、光応答振幅の増大をもたらすことを裏付ける一方、光刺激終了時の時間特性はほとんど変わらず、カリウムコンダクタンス変化ではLLDが生じないことを示している。

LLDを発生する要因としては、イオン電流の振幅変化以外に、光照射時の細胞の状態の持続や細胞膜容量の変化などが考えられる。これらの可能性をモデルシミュレーションにより検討した結果、学習獲得に伴って細胞内カルシウムの除去機能が減弱し、光刺激終了時に細胞内カルシウム濃度の高い状態が数十秒間に渡って持続すると仮定し、時定数 $\tau_{dec}$ を1 secから20 secに変更した場合に、LLDを伴う持続時間の長い応答 (PAIRED) が得られた (図6.4)。このような細胞内カルシウムメカニズムの特性変化は、実験的には明らかにされたわけではないが、学習に関わるリン酸化プロセスを活性化させる要因の一つがカルシウムイオンであることや、アメフラシにおける感作がシナプスにおけるカルシウムの持続的な上昇によって引き起こされていることなどから、学習獲得を促進する効果として数十秒にわたるカルシウムの蓄積が生じている可能性は十分考え得るものである [90]。また、図6(b)に示した膜電流波形から、電流的にはカルシウム濃度の高い状態が刺激終了後も持続し、膜電位を静止レベルに戻すための外向き電流が抑制されることによってLLDが生じていることがわかる。

## 6.4 学習における刺激間隔依存特性

視細胞における学習獲得としては、Alkonによって次のようなメカニズムが提案されている (第2章, 2.4.2節参照) [12], [22]。光刺激によって活性化されたホスホリパーゼC (PLC) は、ジアシルグリセロール (DG) とイノシトール-1,4,5-三リン酸 ( $IP_3$ ) を生成し、 $IP_3$ 及び有毛細胞からのシナプス入力による細胞内カルシウム濃度を上昇させる。その結果、カルシウム ( $Ca^{2+}$ ) とDGによってカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ ( $Ca^{2+}/CaMII$ ) 及びカルシウム依存性プロテインキナーゼ-C (PKC) が活性化され、機能タンパクのリン酸化が進むことで、学習獲得に伴う様々な細胞特性変化を生じる。一方、Crowは、光刺激による視細胞内カルシウム濃度上昇と有毛細胞からのシナプス入力によるPLCの活性化によって、イノシトールリン脂質代謝プロセスが起動され、イオンチャネルを構成する機能タンパクのリン酸化が進むことによって学習が獲得され则认为している [51]。

このようにB型視細胞の学習獲得に関して複数の仮説が提唱されているが、光刺激によってカルシウム濃度が上昇することから、濃度の高い状態で有毛細胞からのシナプス入



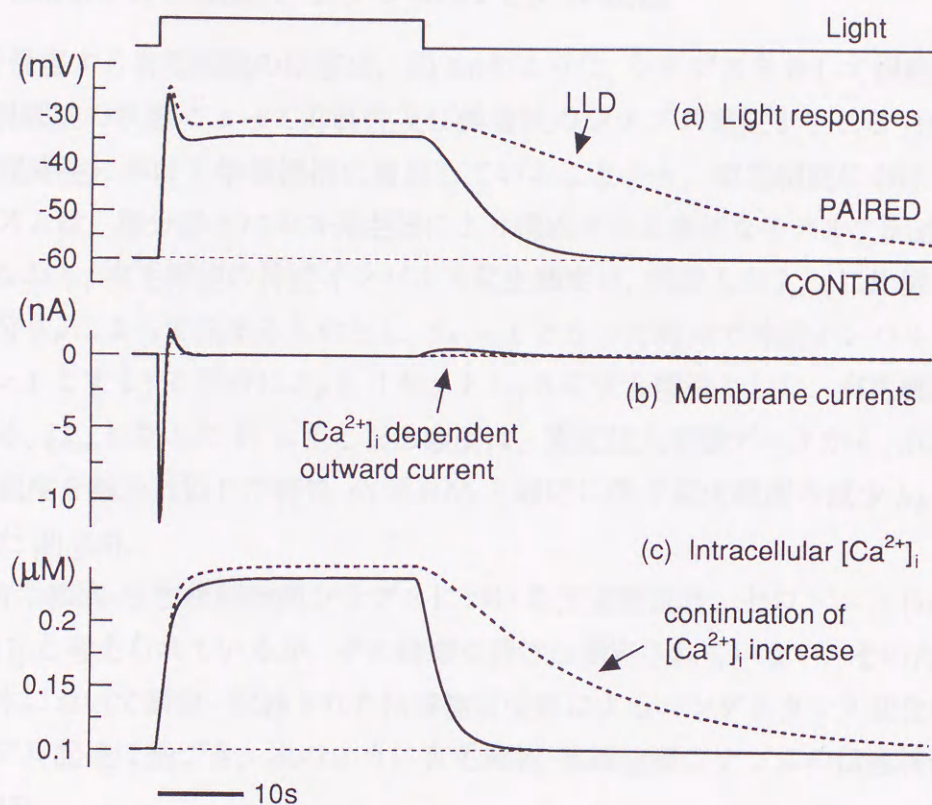


図 6.4 細胞内カルシウム機構の特性変化によって再構成された学習獲得後の視細胞応答.

実線 (CONTROL) :  $\tau_{dec} = 1\text{sec}$ ,  $G_A = 1.3\mu\text{S}$ ,  $G_C = 0.55\mu\text{S}$ ,  $G_{Ca} = 0.07\mu\text{S}$ . 破線 (PAIRED) :  $\tau_{dec} = 20\text{sec}$ ,  $G_A = 0.42\mu\text{S}$ ,  $G_C = 0.22\mu\text{S}$ ,  $G_{Ca} = 0.049\mu\text{S}$ . (a) 光応答. 実験的に測定された光応答と同様の振幅の増大, 及び, 光刺激終了後の応答の持続 (LLD) が見られる. (b) 膜電流. 光応答の持続は, 光刺激終了時に生じる外向き電流が抑制されることによって生じる. (c) 細胞内カルシウム濃度. 光刺激と膜電位の脱分極化によって生じた細胞内カルシウム濃度の上昇が持続することによって, 光刺激終了時の外向き電流を抑制し, LLD を生じる.



力を受容することが、視細胞における学習獲得の基本的なメカニズムと考えられる。ここでは、前節の視細胞モデルに対して有毛細胞応答、有毛細胞-視細胞間シナプス特性の影響を含めた記述を行ない、カルシウム濃度上昇とシナプス入力に基づく学習を仮定し、刺激間隔とカルシウムメカニズムとの関連を調べた。

#### 6.4.1 前庭系有毛細胞とシナプスのモデル記述

UCSを受容する有毛細胞の応答は、図6.6のように、シナプスを介して視細胞に伝えられ、B型視細胞の状態によって抑制性及び興奮性のシナプス電位を生じる[15],[117]。本論文では視細胞における学習機構に着目していることから、有毛細胞における応答の発生メカニズムは、積分器とパルス発生器により構成される単純なモデルで記述した(付録B.1)。すなわち、有毛細胞の神経インパルス発生頻度は、刺激入力  $I_{stim}$  に比例した変数  $F$  の時間積分  $S_F$  によって決まるものとし、 $S_F = 1$  となった時点で神経インパルスを発生させる ( $V_I = 1$  とする) と同時に  $S_F$  をリセットし、0にする構造とした。有毛細胞の入出力特性である、 $I_{stim}$  に対して  $V_I = 1$  となる頻度は、電流注入実験データから、刺激強度に対する発生頻度を線形近似した特性  $F$  (図6.5) と順応に伴う発火頻度の減少  $h_F$  の積によって記述した[8],[56]。

一方、有毛細胞-B型視細胞間シナプスにおける伝達物質は、セロトニン[54]あるいはGABA[117]と考えられているが、その詳細な特性は測定されていない。そのため、ここでは他の標本において測定・記述された伝達物質受容によるコンダクタンス変化の実験データ及びモデル記述に基づき、次のように有毛細胞-視細胞間シナプスの伝達特性をモデル化した[143]。

すなわち、B型視細胞において受容された伝達物質は  $Cl^-$  チャネルのコンダクタンス変化をもたらし、これによってシナプス電流が生じる。伝達物質受容に伴うコンダクタンスの時間的变化は、時定数の異なる2つの一次遅れ系 ( $\tau_F = 20$  msec,  $\tau_S = 70$  msec) の和で近似した。また、コンダクタンス値は膜電位には依存しないと仮定して、シナプス電流  $I_{Cl}$  を次のように記述した。

$$I_{Cl} = G_{Cl} \cdot T_R \cdot (V - E_{Cl}) \quad (6.1)$$

$$T_R = K_F \cdot T_F + K_S \cdot T_S \quad (6.2)$$

$$\frac{dT_F}{dt} = \frac{V_I - T_F}{\tau_F} \quad (6.3)$$

$$\frac{dT_S}{dt} = \frac{V_I - T_S}{\tau_S} \quad (6.4)$$

ただし、 $G_{Cl}$  は最大コンダクタンス値、 $V$  は膜電位、 $E_{Cl}$  は反転電位である。 $T_R$  はリセプ



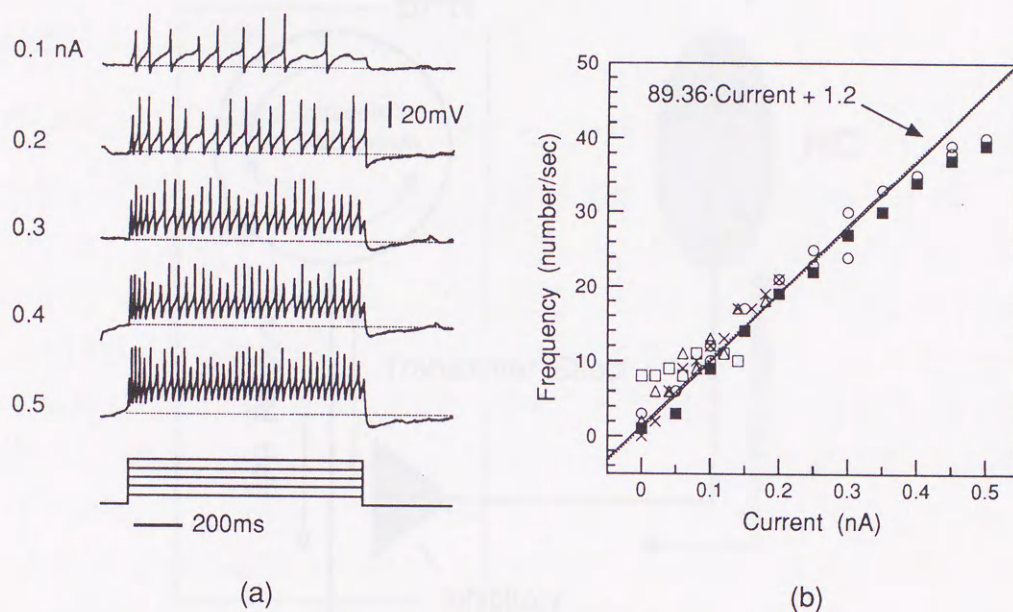


図 6.5 電流固定下における有毛細胞応答 (a) 有毛細胞応答. 電流振幅の増大に伴いスパイクの発生頻度も上昇している. スパイクの振幅の違いはサンプリングのタイミングのずれによって生じている. (b) 電流振幅に対するスパイク発生頻度特性. 電流振幅とスパイクの発生頻度の関係は, 0.4 nA 以下ではほぼ比例していることがわかる. 0.4 nA を越えてからは飽和特性が見られるが, ここでは電流 0~0.4 nA の特性を対象とし, 図中に示した直線によって有毛細胞の入出力特性を表した.



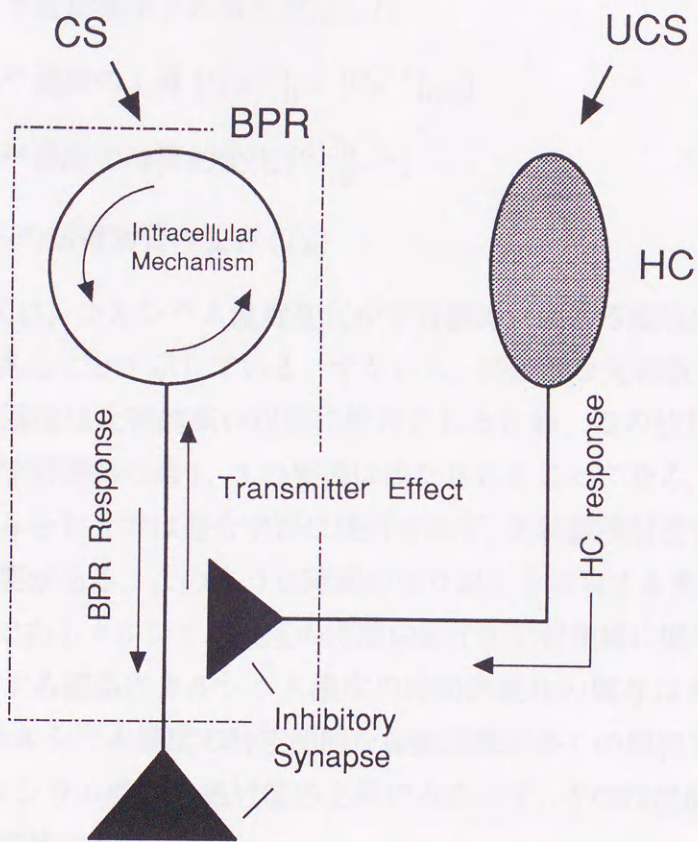


図 6.6 B 型視細胞における連合学習獲得のモデル。 BPR: B 型視細胞, HC: 有毛細胞, CS(light): 条件刺激 (光), UCS(rotation): 無条件刺激 (回転). HC で受容された UCS は, HC-BPR 間シナプスを介して BPR に影響を及ぼす. BPR においては, CS による細胞内カルシウム濃度の上昇と伝達物質受容によって細胞内分子メカニズムが起動され, 学習の獲得 (機能タンパクのリン酸化など) が進む. 学習獲得に伴う BPR 応答の変化は, 軸索を伝搬しシナプスを介して他の細胞に伝えられる.



ターにおける伝達物質の受容量に相当し、独立な2つのシステム  $T_F$ ,  $T_S$  の和 ( $K_F$ ,  $K_S$  は係数) として表した。

伝達物質の受容による  $I_{Cl}$  の増加は、有毛細胞応答に伴い B 型視細胞応答振幅の減少、またはわずかな増大をもたらす [117]。一方、 $Ca^{2+}/CaMII$  や PKC の活性化には、細胞内カルシウム濃度変化と有毛細胞からのシナプス入力の本質的に関与していると考え、次の3つの要因によって学習が獲得されると仮定した。

1. 視細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇 ( $[Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(0)}$ )
2. 視細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の時間的变化 ( $\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt}$ )
3. 有毛細胞からの伝達物質の受容 ( $T_R$ )

ここで、第2の要因は、カルシウム濃度変化が学習獲得に関わる細胞内リン酸化プロセスの活性化に必要であることを示している。すなわち、持続的な光刺激を与えた場合、視細胞内のカルシウム濃度は比較的高い状態に維持されるため、この状態で有毛細胞への回転刺激を加えれば学習獲得の第1, 3の要因は満たされることになる。しかしながら、このような刺激の組み合わせでは連合学習は獲得されず、光刺激照射直後の短い時間内で回転刺激を与える必要がある。このような時間の切り出しを実現する要因としては、セカンドメッセンジャーであるカルシウム濃度の時間的变化が学習獲得に関与していると仮定した。学習獲得に対する細胞内カルシウム濃度の時間的变化の関与は実験的には明らかになっていないが、カルシウム濃度の時空間的な振動現象が多く細胞で見い出されていることから [34]、カルシウム濃度の絶対値の上昇のみならず、その時間的变化が何らかの機能的意義を持つ可能性は高い。

この仮説に基づき、リン酸化プロセスの活性度  $L$  をカルシウム濃度の上昇量とその時間的变化及びシナプスで受容される伝達物質量  $T_R$  の積によって表した。また、学習は活性化されたリン酸化プロセス活性度  $L$  の時間的な集積によって獲得されると仮定し、次式のように学習獲得度  $S_L$  を  $L$  の時間積分によって定義した。

$$L = \begin{cases} K_L \cdot T_R \cdot ([Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(p)}) \cdot d[Ca^{2+}]_i/dt & ([Ca^{2+}]_i \geq [Ca^{2+}]_{i(p)}, d[Ca^{2+}]_i/dt \geq 0) \\ 0 & (otherwise) \end{cases} \quad (6.5)$$

$$S_L = \int L dt \quad (6.6)$$

ただし、 $[Ca^{2+}]_{i(p)}$  はリン酸化プロセスが活性化し始める細胞内カルシウム濃度を表す定数である。



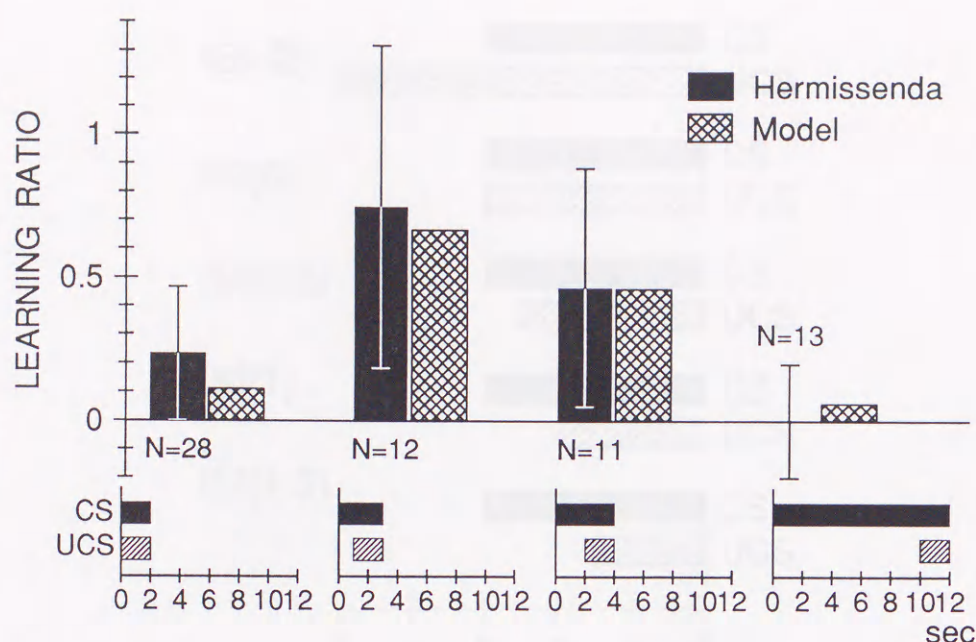


図 6.7 有毛細胞-B 型視細胞モデルにおける学習獲得の ISI 特性. Hermisenda: 動物実験データ [118]. Model: 提案したモデルによるシミュレーション結果. LEARNING RATIO = 0 は学習が獲得されていないことを表す. UCS を提示する 1 秒前に CS を提示した場合に, 最も良く学習が進むことがわかる. 実験では, 光源方向に移動する時間を行動の指標とした.

#### 6.4.2 刺激間隔依存特性と細胞内カルシウム

古典的条件付け連合学習の特徴の一つとして, 光刺激 (CS) と回転刺激 (UCS) の時間間隔に対する学習獲得の依存性が極めて高いことが知られている. Matzel らは, ウミウシの連合学習において, CS 提示の 1 秒後に UCS を与えた場合に学習が最も良く進むことを行動実験によって示している [118]. ここでは, 前節で提案したモデルを用いて, この実験と同様の条件でシミュレーションを行い ISI 特性の生成メカニズムを考察した.

すなわち, UCS の時間幅を常に 2 秒間として, CS 提示開始時刻を変化させた時の学習獲得の状態を, CS, UCS を 45 秒間隔で 50 回提示した後の  $S_L$  の値によって評価した. なお, 学習獲得度の絶対値を決める係数  $K_L$  については, 実験データとの比較により  $3.07 \times 10^7$  に設定したが,  $S_L$  の絶対値には物理的な意味は無く, 刺激条件間での相対的な差に意味がある. すなわち, 図 6.7 に示す様に CS 提示の 1 秒後に UCS を提示した場合に学習獲得は最大となり, CS, UCS 条件に対する変化は行動実験データ [118] に極めて近い結果が得られた.

一方, UCS を提示するタイミングを, 図 6.8 のように変化させた場合の学習獲得は, CS



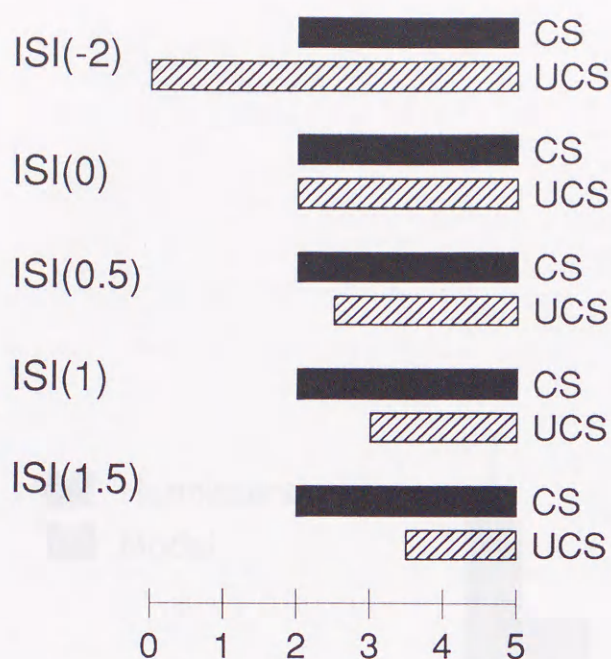


図 6.8 学習獲得の刺激時間依存特性を調べるための CS, UCS プロトコル. 例えば, ISI(-2) は, CS 刺激の 2 秒前に UCS を提示することを表す. このような刺激パターンを 30 秒間隔で 50 回提示して条件付けをおこなう.

提示開始 1 秒後の時点で UCS を提示した場合に最大となり, 500msec 程度ずらせるだけで極めて悪化することが知られている [110]. モデルシミュレーションにおいても, 図 6.9 に示すように, ISI = 1 sec の場合に比べて他の条件では, 全く学習が進まないか (ISI = -2 sec の場合), 低い学習獲得率となる. なお, シミュレーション結果では実験データと比較して, ISI = 1.5 sec の場合と ISI = 1 sec の場合の学習獲得率の差は小さい. しかしながら, 図 6.7 の場合には, ISI = 2 sec でも学習獲得率は ISI = 1 sec の場合に比べてあまり低下していないことから, 学習獲得率の ISI 依存特性は行動変化の測定方法にも依存すると考えられる. すなわち, 図 6.7 は光源方向への移動時間を, 図 6.9 は光刺激に対する腹足長の変化を行動変化の指標としており, その違いが実験結果の違いとして表われたものと考えられる.

図 6.10 は, CS 提示開始の 1 秒後に UCS を提示した場合の視細胞, 有毛細胞モデルの応答波形である. 細胞応答や伝達物質の受容に比べて細胞内カルシウム濃度上昇は遅く (矢印), 学習獲得を最大にするためには, この特性に合わせて UCS を提示する必要がある. また, 光刺激照射を続けるとカルシウム濃度変化が小さくなるため, CS 提示開始後



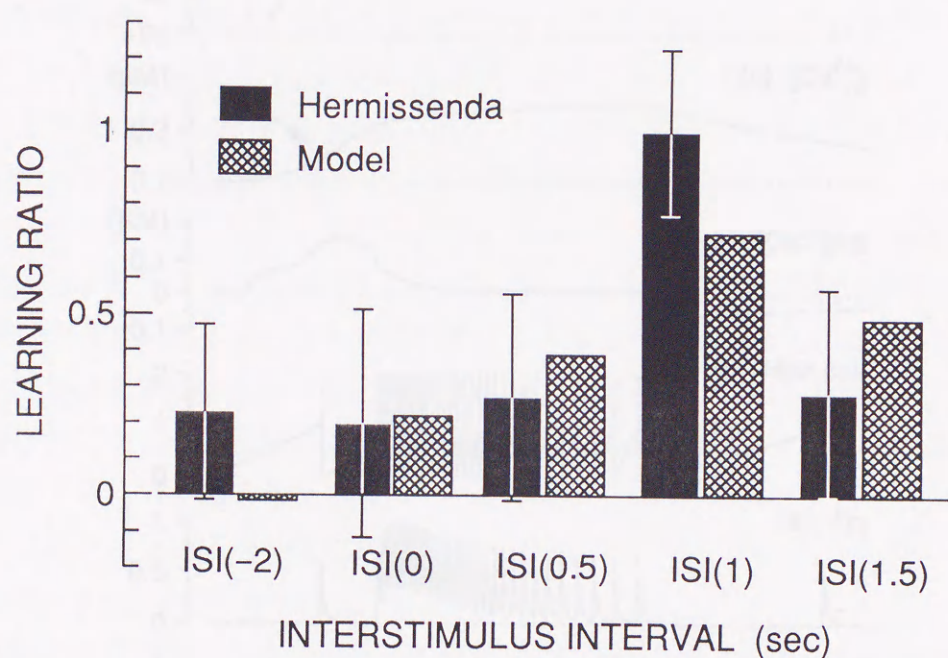


図 6.9 学習獲得の刺激時間依存特性. Hermissenda: 動物実験データ [110]. Model: 提案したモデルによるシミュレーション結果. LEARNING RATIO = 0 は学習が獲得されていないことを表す. UCS を提示する 1 秒前に CS を提示した場合に, 最も良く学習が進むことがわかる. 実験では, 光刺激に対する腹足長の変化を指標とした.



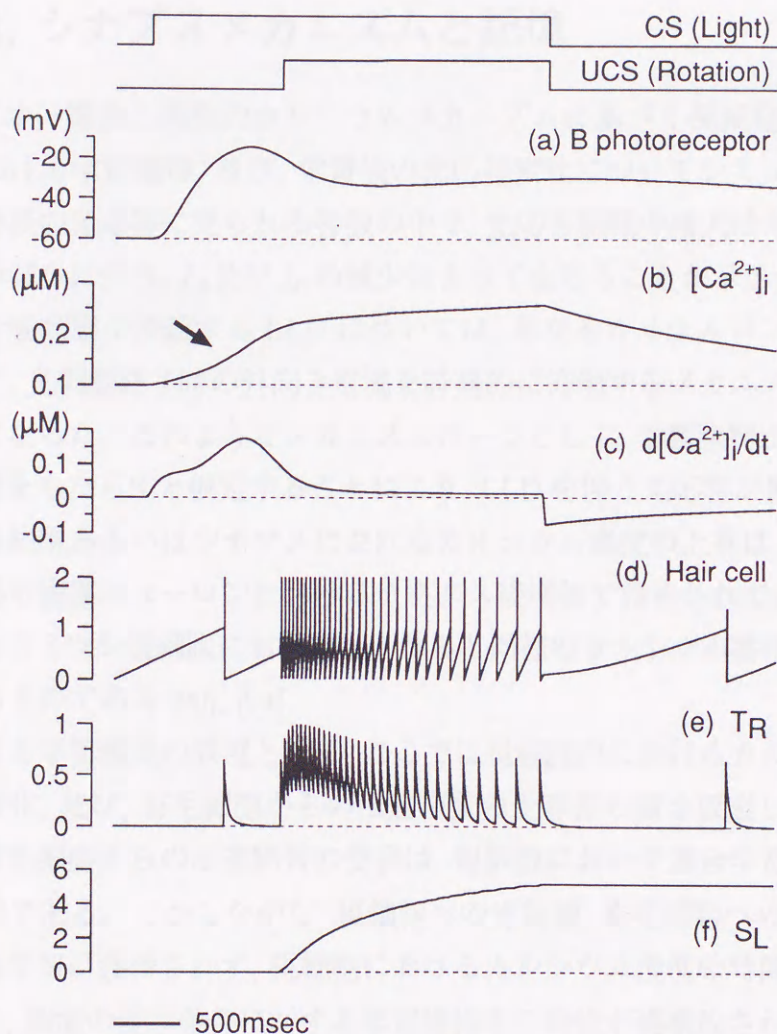


図 6.10 学習獲得過程における応答の時間的变化。(a) 視細胞応答, (b) 視細胞内カルシウム濃度, (c) カルシウム濃度の時間的变化, (d) 有毛細胞応答, (e) 視細胞における伝達物質受容量, (f) 学習獲得度. 光刺激に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇は遅く (矢印), この時間特性に合わせて回転刺激を提示することによって学習獲得は最大となる. すなわち, 学習獲得の ISI 特性は, 細胞内カルシウム濃度の時間的变化によって生じる.



の数秒以内に UCS を提示しなければならない。すなわち、この場合の ISI 特性は、光刺激に対する細胞内カルシウム濃度上昇の遅れとカルシウム濃度の時間変化によって形成されている。

## 6.5 細胞、シナプスメカニズムと記憶

本章では、イオン電流と細胞内カルシウムメカニズムに基づく視細胞モデルによって、B 型視細胞における学習獲得、及び、学習後の光応答変化についてシミュレーションを進めた。学習獲得後の光応答に見られる特徴の中で、光応答振幅の増大はカリウムイオンコンダクタンスの減少に伴う、 $I_A$  及び  $I_C$  の減少によって生じることが示された。一方、光刺激終了後も脱分極状態が持続する LLD については、単なるカリウムコンダクタンス変化では説明できず、光刺激終了時の外向き電流を特異的に抑制するメカニズムが必要であることが明らかになった。このようなメカニズムの一つとして、学習獲得が細胞カルシウム濃度上昇の持続をもたらすと仮定することにより、LLD を伴う光応答が再構成された。記憶の形成に伴う細胞あるいはシナプスにおけるカルシウム濃度の上昇は、アメフラシにおける慣れの獲得や海馬ニューロンにおけるテタヌス後増強で報告されており、シミュレーションの結果はウミウシ視細胞においてもこれらと同様のカルシウム蓄積効果が存在することを示唆するものである [90], [94]。

視細胞における学習獲得の原理として、ここでは視細胞内におけるカルシウム濃度上昇とその時間的变化、及び、有毛細胞からの伝達物質の受容量の積を仮定した。カルシウム濃度の上昇と有毛細胞からの伝達物質の受容は、視細胞において連合学習を獲得するための基本的な要因である。しかしながら、視細胞への光刺激、有毛細胞への回転刺激を与え続けた場合には学習は獲得されず、視細胞におけるカルシウム濃度の時間的变化を考慮することによって、刺激の提示条件に対する学習獲得率の特性が再構成された。これまでの実験及びシミュレーションの結果から、光と回転刺激による連合学習の獲得に伴う視細胞応答、形態変化は、図 6.11 のようなメカニズムによって生じると考えられる。

すなわち、光刺激や有毛細胞からの伝達物質は、イノシトールリン脂質の代謝プロセス (PI レスポンス) を活性化させ、この結果生じた  $IP_3$  は、小胞体などの細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム濃度上昇をもたらす。細胞内カルシウム濃度の上昇は、カルシウム依存性カルムジュリン ( $Ca^{2+}/CaM$ ) を活性化を引き起こす。また、 $IP$  レスポンスはジアシルグリセロール (DG) を生成し、これによって C キナーゼ (PK-C) の活性化が起こる。学習獲得後の特性変化は、光刺激によって細胞内カルシウム濃度が上昇した状態で、さらに有毛細胞からの伝達物質受容の効果が相乗的に作用し、 $Ca^{2+}/CaM$  及び C キナーゼが



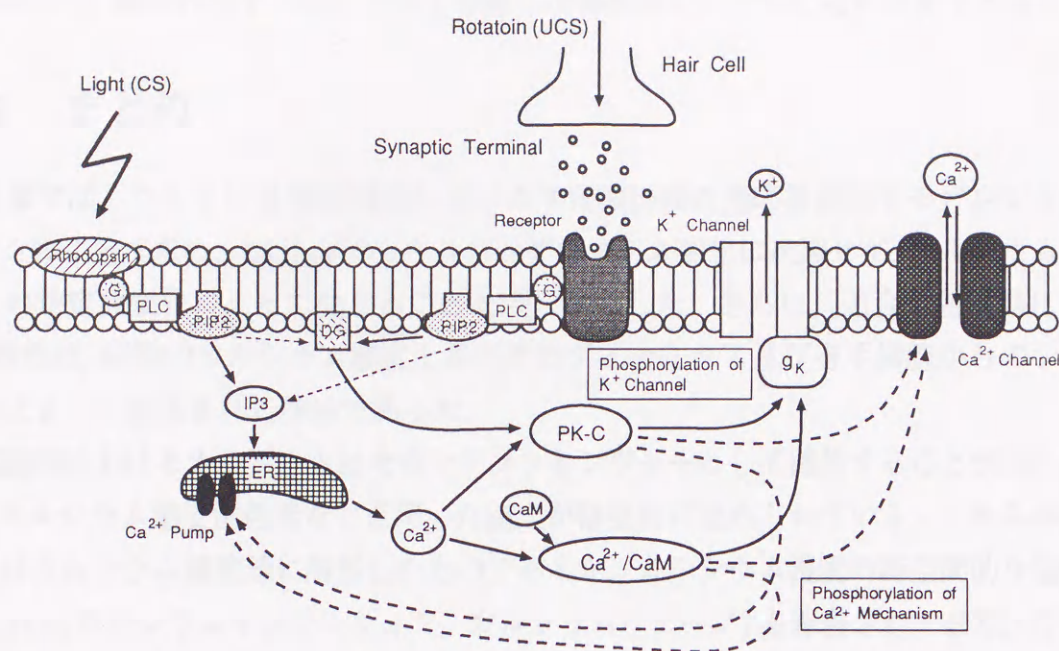


図 6.11 ウミウシ視細胞における学習獲得の分子メカニズム。光刺激及び有毛細胞からの伝達物質は、PI レスポンスを活性化させる。IP3 は小胞体に作用して、細胞質中に  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させる。細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  の活性化を促し、一方、DG は PK-C を活性化させる。学習に伴う細胞の電気的特性変化などは、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  及び PK-C の相乗的効果によって生じるタンパク質のリン酸化の結果もたらさせる。G: GTP 結合タンパク、PLC: ホスホリパーゼ C, PIP2: 4,5-ホスファチジルイノシトール二リン酸, IP3: イノシトール-1,4,5-三リン酸, DG: ジアシルグリセロール, ER: 小胞体, CaM: カルモジュリン, PK-C: C キナーゼ。

活性化することで細胞膜における機能タンパクのリン酸化が進むことによって起こる。機能タンパクのリン酸化は、カリウム、カルシウムチャネルのコンダクタンス及びカルシウムポンプの時間特性、さらには樹状突起形状を変化させる可能性がある。

従来より、神経細胞や神経回路メカニズムに関しては、膜電位応答やイオン電流など電氣的応答特性の測定及びこの結果に基づくモデル記述がなされ、細胞やシナプスにおける学習獲得についても、興奮性シナプス入力による EPSP とシナプス後細胞の興奮の相乗的影響として解釈されている。しかしながら、B 型視細胞モデルを用いたシミュレーションの結果、シナプス後細胞のカルシウム濃度が上昇した状態で、細胞内分子メカニズムを起動する伝達物質を受容することにあり、膜電位やシナプス入力の極性(興奮性、抑制性)が直接影響しているわけではない。最近では、抑制性シナプスにおける LTP なども報告されており [100]、細胞における学習、記憶に関しては、膜電位応答やイオン電流のみに基づ



く解析から、細胞内分子メカニズムを考慮した実験及びモデル記述が必要である。

## 6.6 まとめ

本章では、ウミウシ B 型視細胞における学習獲得後の光応答変化をモデルシミュレーションによって求め、LLD がカリウムコンダクタンス変化に起因せず、カルシウムメカニズムの時定数変化によって生じることを明らかにした。さらに、連合学習獲得における ISI 特性は、細胞内カルシウム濃度上昇とそのダイナミクス及び有毛細胞からのシナプス入力によって形成される特性であった。

細胞内におけるカルシウムはセカンドメッセンジャーとして機能することが知られており、カルシウム感受性色素などを用いた測定が積極的に進められている。これらの研究の多くはカルシウム濃度値に着目したものであるが、カルシウム濃度の時空間的な振動現象 [34],[146](カルシウムオシレーション、カルシウムウェーブ) も報告されており、これら時空間的なカルシウム濃度変化が様々な細胞メカニズムに対して重要な役割を果たしている可能性も十分考えられる。



## 第 7 章

### 結論

我々は、経験を通じて獲得した記憶に基づき外界を認識し、日々の生活を営んでいる。記憶は各人の履歴、人格であり、その喪失や障害は、生活のあらゆる面に重大な影響をもたらす。脳における記憶のメカニズムに関する膨大な研究成果の蓄積により、今や記憶に関連する部位や構造がある程度特定され、神経細胞やシナプスレベルでの状態変化が測定される段階に至っている。さらに、ヒトの脳における高度な学習、記憶も、神経回路によって実現される機能の一つであり、共通のメカニズムが下等動物の神経系にも存在する可能性が示された。Alkon は、ウミウシの神経系を用いて、古典的条件付けによる連合学習獲得に伴う神経細胞の応答変化を示し、さらに、脳における記憶の形成時に見られる現象が、この場合にも生じていることを明らかにした。このことは、脳というスーパーコンピュータのメモリ方式を解析していく途上で、メモリが少なく、構造も簡単なワンボード・マイクロコンピュータが見い出された状況に相当し、下等動物神経系を通じて学習・記憶の本質的メカニズムを解析すると言う、新たなアプローチを切り開くものであった。

第 2 章では、これまでの研究によって明らかにされてきた、脳における記憶部位、学習・記憶の神経回路について述べた後、アメフラシ及びウミウシを用いた古典的条件付けとこれによって得られた主な結果をまとめた。ウミウシを用いた実験では、光を条件刺激、回転を無条件刺激として与えることによって、これらの刺激の時間的関連を記憶し、行動の変化と共に条件刺激を受容する視細胞においてカリウム電流の減少、光応答の増大や持続が示されていた。本論文では、学習獲得過程におけるイオン電流変化を測定し、記憶の形成に伴ってカリウム電流の減少が生じると共にカルシウム電流も減少していることを実験的に示した。さらに、学習獲得後の mRNA の増大、及び、タンパク質の分子量の変化は細胞の構造的変化を示唆しており、細胞内染色法によって細胞を染色し、条件付け前後の細胞の形態を測定した結果、樹状突起部分の体積が減少することを示した。樹状突起体積と



行動の間には高い相関が見られたことから、この結果、視細胞において獲得された記憶が最終的には細胞間の結合状態という形で保持されることを表すものと言える。

しかしながら、このような生理実験によって測定されたデータは、あくまで特定の条件下における細胞の状態を観測したものに過ぎず、実験によって得られた結果の関連、及び、そのメカニズムについては十分な説明付けがなされていなかった。本論文で導入した生理工学的アプローチは、生理実験、データ解析、及び、実験データに基づくモデル構築に対して工学的手法を適用するものであり、これまで漠然と捉えられていた現象や特性の因果関係を正確に同定することを目的として研究を進めた。

第3章では、ウミウシの条件付けのために開発した刺激制御装置、及び、本論文で用いた生理実験及びデータ解析、モデルシミュレーション環境について述べた。パーソナルコンピュータは、条件付けを行なう際には刺激装置のコントローラとして、生理実験時にはデータ収集、解析装置として用い、さらに、モデルの構築及びシミュレーションを支援するツールとして使用した。さらに、第4章では、生理実験データと対応付けが可能な細胞のモデル記述方法として、Hodgkin-Huxley 型方程式を用いたイオン電流モデル記述に基づく細胞モデルについて述べ、方程式に含まれる膜電位依存パラメータを求めるための膜電位固定実験プロトコルと非線形最適化を用いた推定法を提案した。

さて、学習獲得に伴うウミウシ神経細胞の応答変化としては、視細胞における光応答振幅の増大及び光刺激終了後の脱分極状態の持続 (LLD) が報告されている。このような光応答変化については、これまでカリウムチャネルのコンダクタンス変化に伴う、カリウム電流の減少によって生じると考えられてきたが、その関連についての明確な結論は得られていなかった。第5章では、この視細胞について、膜電位固定法によるイオン電流の測定、及び、モデル記述に必要なパラメータの推定を行なった。視細胞における主要なイオン電流成分であるカリウム電流 ( $I_A$ ,  $I_C$ ) は、細胞内カルシウム濃度の上昇によって抑制されることが示されている。さらに、細胞内におけるカルシウムは分子メカニズムを起動するセカンドメッセンジャーとして機能することが知られており、イオン電流と異なる時間特性を持つカルシウム濃度変化の影響を考慮するために、バッファとポンプに基づく細胞内カルシウムメカニズムのモデルを導入した。

第6章では、まず、この視細胞モデルを用い学習獲得後の光応答の変化についてシミュレーションを行なった。その結果として、カリウムチャネルのコンダクタンス減少は、光応答振幅の増大を生じるものの LLD には直接影響せず、LLD が生じるためには、細胞内カルシウム濃度の上昇が持続し、光刺激終了時に生じる外向き電流が抑制される必要があることを明らかにした。すなわち、光刺激終了後における脱分極状態の持続は、細胞内カルシウムの蓄積を表す指標と見なされる。カルシウム濃度の上昇が学習獲得のプロセスを起動



する要因であることから、LLD は1回の刺激に対する学習獲得効率の上昇を反映した現象であると言える。また、学習獲得後における視細胞の光応答変化と行動変化の関連を明らかにするためには、視細胞から運動ニューロンに至る各神経細胞の特性を測定していく必要があるが、光刺激照射中における行動変化には、カリウムコンダクタンスの減少による光応答振幅の増大のみが影響し、光刺激終了後のLLDは直接関与しないと考えられる。

一方、視細胞のチャネルコンダクタンスやカルシウムメカニズムの特性変化を生じる原理については、これまでは電気生理、生化学実験データに基づき、細胞内カルシウム濃度の上昇と有毛細胞からのシナプス入力を受容に伴う分子メカニズムの活性化が考えられてきた。本論文では、細胞内カルシウム濃度の上昇に加え、その時間的な変化を考慮することによって、行動実験と同様の学習獲得の刺激間隔依存特性が得られた。細胞内におけるカルシウム濃度には時空間的な変化や振動現象が見られるが、その機能的意味については未だ明らかにされていない。カルシウム濃度変化のメカニズムのみならずその意味を解明していくためにも、今後、カルシウム濃度のみならずその変化に注目した実験及び解析を進めていく必要があると考えられる。

このように、実験データに基づくモデル記述は、実験により観測された現象相互の関連を求め、実験結果から得られた仮説を検証するだけでなく、実験に対する予備的知見や新たな実験テーマを探るための基本ツールとして活用することができる。また、最近では、単離・培養した神経細胞を用いて、神経回路を人工的に形成させる試みも進められている。実験データとの対応付けが可能なモデル記述、シミュレーション技法を用いれば、人工的に作られた神経回路がどのような応答をするのか、さらにどのような機能を持つのかを求めることもできる。バイオコンピュータとして期待されている神経細胞を用いた情報処理マシンの構築においては、現在のデバイス設計用CAD、CAEシステムに相当する、いわゆる神経回路CADシステムが必要であろう。本論文において進めた細胞レベルでのモデル記述法は、そのような将来のコンピュータ開発に向けての基本技術として活用できるものと考えられる。

さらに、実在する生物神経系の解析を通じて、新たな人工ニューラルネットワークの基本構造、学習アルゴリズムが得られることが期待されており、ウミウシの学習メカニズムを基にしたパターン認識ニューラルネットワークも提案されている[18]。このように、人工ニューラルネットワーク構築においては、生物神経系の持つ情報処理メカニズムの本質を理解し、それを工学的に応用していくことが有効な手段の一つと考えられ、今後、目的に応じて様々な動物の神経系をモデルにしたネットワークが提案されていくものと思われる。

最後に、本論文で行った記憶メカニズムに対するアプローチは、従来からの生理学的実



験手法に加えて, 工学的な解析手法を学習・記憶の研究に対して導入するものであった. 工学は神経システムの解明を推進していくために必要な実験システム, コンピュータ環境の構築のみならず, 実験的に得られたデータの処理及び解析に適用できる方法論の一つであり, 本論文で提案した生理工学的方法が, 今後, 様々な神経メカニズムの解明に対して適用されること期待する.

## 付録 A

### B 型視細胞のイオン電流モデル記述

#### A.1 A 電流 (急速活性・不活性化遅延電流): $I_A$

$$I_A = G_A \cdot m_A^2 \cdot p_A \cdot W_A \cdot (V - E_A)$$

$$\frac{dm_A}{dt} = m_{\infty} - m_A \quad \frac{dp_A}{dt} = p_{\infty} - p_A$$

$$m_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp(-(V + 23)/8)} \quad p_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp(-(V + 23)/6.5)} + 0.0025$$

$$\tau_m = \frac{0.07}{1 + \exp(-(V + 11)/9)} \quad \tau_p = \frac{0.07}{1 + \exp(-(V + 11)/7)} + 0.08$$

$$W_A = \frac{[Ca^{2+}]_{int}}{[Ca^{2+}]_{int} + 0.5 \cdot ([Ca^{2+}]_{int} - [Ca^{2+}]_{out})}$$

#### A.2 C 電流 ( $Ca^{2+}$ 依存性 $K^+$ 電流): $I_C$

$$I_C = G_C \cdot m_C \cdot p_C \cdot W_C \cdot (V - E_C)$$

$$\frac{dm_C}{dt} = m_{\infty} - m_C \quad \frac{dp_C}{dt} = p_{\infty} - p_C$$

$$m_{\infty} = \frac{0.15}{1 + \exp(-(V + 23)/12)} \quad p_{\infty} = \frac{0.15}{1 + \exp(-(V + 13)/4)} + 0.12$$

$$\tau_m = \frac{10}{1 + \exp(-(V + 30)/10)} \quad \tau_p = \frac{10}{1 + \exp(-(V + 3)/10)} + 2$$

$$W_C = \frac{[Ca^{2+}]_{int}}{[Ca^{2+}]_{int} + 0.5 \cdot ([Ca^{2+}]_{int} - [Ca^{2+}]_{out})}$$

#### A.3 $Ca^{2+}$ 電流: $I_{Ca^{2+}}$

$$I_{Ca^{2+}} = \frac{G_{Ca}}{1 + \exp(-(V + 7)/7)} \cdot (V - E_{Ca})$$

$$E_{Ca} = 12.5 \cdot \log([Ca^{2+}]_{int}/[Ca^{2+}]_{out})$$



## 付録 A

### B 型視細胞のイオン電流モデル記述

#### A.1 A 電流 (急速活性・不活性化 $K^+$ 電流): $I_A$

$$\begin{aligned}
 I_A &= G_A \cdot m_A^3 \cdot h_A \cdot W_{Ca} \cdot (V - E_K) \\
 \tau_{mA} \cdot \frac{dm_A}{dt} &= m_{A\infty} - m_A, \quad \tau_{hA} \cdot \frac{dh_A}{dt} = h_{A\infty} - h_A \\
 m_{A\infty} &= \frac{1}{1 + \exp[-(V + 24)/8]}, \quad \tau_{mA} = \frac{0.004}{1 + \exp[(V + 23)/6.5]} + 0.0025 \\
 h_{A\infty} &= \frac{1}{1 + \exp[(V + 41)/9]}, \quad \tau_{hA} = \frac{0.07}{1 + \exp[-(V + 5)/7]} + 0.08 \\
 W_{Ca} &= \frac{[Ca^{2+}]_{i(0)}}{[Ca^{2+}]_{i(0)} + \alpha \cdot ([Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(0)})}
 \end{aligned}$$

#### A.2 C 電流 ( $Ca^{2+}$ 依存性 $K^+$ 電流): $I_C$

$$\begin{aligned}
 I_C &= G_C \cdot m_C^3 \cdot h_C \cdot W_{Ca} \cdot (V - E_K) \\
 \tau_{mC} \cdot \frac{dm_C}{dt} &= m_{C\infty} - m_C, \quad \tau_{hC} \cdot \frac{dh_C}{dt} = h_{C\infty} - h_C \\
 m_{C\infty} &= \frac{1}{1 + \exp[-(V + 24)/12]}, \quad \tau_{mC} = \frac{0.18}{1 + \exp[(V + 13)/4]} + 0.12 \\
 h_{C\infty} &= \frac{1}{1 + \exp[(V + 30)/13]}, \quad \tau_{hC} = \frac{10}{1 + \exp[-(V - 5)/10]} + 2 \\
 W_{Ca} &= \frac{[Ca^{2+}]_{i(0)}}{[Ca^{2+}]_{i(0)} + \alpha \cdot ([Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(0)})}
 \end{aligned}$$

#### A.3 $Ca^{2+}$ 電流: $I_{Ca^{2+}}$

$$\begin{aligned}
 I_{Ca^{2+}} &= \frac{G_{Ca}}{1 + \exp[-(V + 7)/7]} \cdot (V - E_{Ca}) \\
 E_{Ca} &= 12.5 \cdot \log([Ca^{2+}]_o/[Ca^{2+}]_i)
 \end{aligned}$$



#### A.4 光活性化電流: $I_{lgt}$

$$I_{lgt} = I_{lgt(1)} + I_{lgt(2)} + I_{lgt(3)} \cdot \beta \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(0)}}{[Ca^{2+}]_{i(0)}}$$

$$I_{lgt(1)} = g_{lgt(1)} \cdot m_{lgt(1)}^5 \cdot h_{lgt(1)} \cdot (V - E_{lgt(1)})$$

$$I_{lgt(2)} = g_{lgt(2)} \cdot m_{lgt(2)}^5 \cdot h_{lgt(2)} \cdot (V - E_{lgt(2)})$$

$$I_{lgt(3)} = G_{lgt(3)} \cdot m_{lgt(3)} \cdot (V - E_{lgt(3)})$$

$$g_{lgt(1)} = G_{lgt(1)} \cdot \left( \frac{0.6}{1 + \exp[-(V + 34)/16]} + 0.4 \right)$$

$$g_{lgt(2)} = G_{lgt(2)} \cdot \left( \frac{0.26}{1 + \exp[-(V + 17)/5]} + 0.74 \right)$$

$$m_{lgt(1)} = 1 - \exp[-t_{on}/0.1], \quad h_{lgt(1)} = \exp[-t_{on}/0.095]$$

$$m_{lgt(2)} = 1 - \exp[-t_{on}/0.28], \quad h_{lgt(2)} = \exp[-t_{on}/0.28]$$

$$m_{lgt(3)} = 1 - \exp[-t_{on}/1]$$

$t_{on}$ : 光刺激開始からの経過時間

#### A.5 漏れ電流: $I_L$

$$I_L = G_L \cdot (V - E_L)$$

#### A.6 細胞内 $Ca^{2+}$ 機構

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = -\frac{I_{Ca^{2+}}}{2 \cdot F \cdot D_v} - k_f \cdot B \cdot [Ca^{2+}]_i + k_b \cdot CaB + pCa + lCa$$

$$pCa = \frac{[Ca^{2+}]_{i(0)} - [Ca^{2+}]_i}{\tau_p}$$

$$lCa = \frac{[Ca^{2+}]_{i(t)} - [Ca^{2+}]_i}{\tau_l}$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{i(t)}}{dt} = \begin{cases} \frac{[Ca^{2+}]_{i(lgt)} - [Ca^{2+}]_{i(t)}}{\tau_{inc}} & : \text{光刺激時} \\ \frac{[Ca^{2+}]_{i(0)} - [Ca^{2+}]_{i(t)}}{\tau_{dec}} & : \text{暗時} \end{cases}$$

$$\frac{dCaB}{dt} = k_f \cdot B \cdot [Ca^{2+}]_i - k_b \cdot CaB + pCaB$$

$$pCaB = \frac{CaB_0 - CaB}{\tau_B}$$



A.7 細胞応答 (細胞膜電位):  $V$ 

$$C_m \cdot \frac{dV}{dt} = \begin{cases} -I_A - I_C - I_{Ca^{2+}} - I_L - I_{lgt} & : \text{光刺激時} \\ -I_A - I_C - I_{Ca^{2+}} - I_L & : \text{暗時} \end{cases}$$

単位

time : sec, voltage : mV, current : nA

## 標準パラメータ値

parameter	value	parameter	value
$G_A$	1.3 ( $\mu$ S)	$[Ca^{2+}]_o$	10 (mM)
$G_C$	0.55 ( $\mu$ S)	$[Ca^{2+}]_{i(0)}$	0.1 ( $\mu$ M)
$G_{Ca}$	0.07 ( $\mu$ S)	$[Ca^{2+}]_{i(lgt)}$	0.8 ( $\mu$ M)
$G_{lgt(1)}$	3 ( $\mu$ S)	$F$	$9.649 \times 10^4$ (C/M)
$G_{lgt(2)}$	2.5 ( $\mu$ S)	$D_v$	$0.1244 \times 10^{-15}$ (l)
$G_{lgt(3)}$	0.12 ( $\mu$ S)	$k_f$	1
$G_L$	0.05 ( $\mu$ S)	$k_b$	0.001
$E_K$	-80 (mV)	$\tau_p$	3 (sec)
$E_{lgt(1)}$	40 (mV)	$\tau_l$	10 (sec)
$E_{lgt(2)}$	40 (mV)	$\tau_{inc}$	10 (msec)
$E_{lgt(3)}$	0 (mV)	$\tau_{dec}$	1 (sec)
$E_L$	-60 (mV)	$\tau_B$	10 (sec)
$C_m$	100 (nF)	$CaB_0$	0.0182 (mM)
$\alpha$	0.01		
$\beta$	0.5		



## 付録 B

## 前庭系有毛細胞、シナプスのモデル記述

B.1 有毛細胞モデル応答:  $V_H$ 

$$V_H = E_H + V_H$$

スルミタに等し

$$g_H = \int (I - h_H) dV, V_H = 0, (I_H < 0.05 \text{ の場合})$$

$$g_H = 0, V_H = 0, (I_H = 0 \text{ となった時点})$$

神経インパルス発生位置

$$I_H = 0.05 \cdot I_{max} + 1.25$$

$I_{max}$ : 外周刺激

膜電位による発生頻度と減衰:

$$h_H \cdot \frac{dV_H}{dt} = h_H V_H - h_H$$

$$h_H = \frac{1}{1 + \exp[(I_{max} - 0.2)/0.05]}$$

B.2 有毛細胞-視細胞間シナプスモデル:  $T_H$ 

$$T_H = K_T \cdot T_H + K_T \cdot T_H$$

$$T_H \cdot \frac{dT_H}{dt} = V_H - T_H, T_H \cdot \frac{dT_H}{dt} = V_H - T_H$$

シナプス電流:  $I_H = G_H \cdot T_H \cdot (V_H - E_H)$

外周刺激電流

$$I_H = \int I_H$$



## 付 録 B

### 前庭系有毛細胞，シナプスのモデル記述

#### B.1 有毛細胞モデル応答: $V_H$

$$V_H = S_F + V_I$$

スパイク応答:

$$S_F = \int F \cdot h_F dt, \quad V_I = 0 \quad (S_F < 1 \text{ の場合})$$

$$S_F = 0, \quad V_I = 1 \quad (S_F = 1 \text{ となった時点})$$

神経インパルス発生頻度:

$$F = 89.36 \cdot I_{stim} + 1.20$$

$I_{stim}$ : 外部刺激

順応による発生頻度の減少:

$$\tau_{hF} \cdot \frac{dh_F}{dt} = h_{F0} - h_F$$
$$h_{F0} = \frac{1}{1 + \exp[(I_{stim} - 0.2)/0.01]}$$

#### B.2 有毛細胞-視細胞間シナプスモデル: $T_R$

$$T_R = K_F \cdot T_F + K_S \cdot T_S$$

$$\tau_F \cdot \frac{dT_F}{dt} = V_I - T_F, \quad \tau_S \cdot \frac{dT_S}{dt} = V_I - T_S$$

シナプス電流:  $I_{Cl} = G_{Cl} \cdot T_R \cdot (V - E_{Cl})$

学習獲得度:

$$S_L = \int L dt$$



$$L = K_L \cdot T_R \cdot ([Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i(p)}) \cdot d[Ca^{2+}]_i/dt$$

$$([Ca^{2+}]_i \geq [Ca^{2+}]_{i(p)}, d[Ca^{2+}]_i/dt \geq 0)$$

$$L = 0 \quad (otherwise)$$

## 単位

time: sec, voltage: mV, current: nA

## 標準パラメータ値

parameter	value	parameter	value
$K_F$	0.01	$G_{Cl}$	0.05 ( $\mu S$ )
$K_S$	0.01	$E_{Cl}$	-65 (mV)
$\tau_F$	20 (msec)	$[Ca^{2+}]_{i(p)}$	0.12 ( $\mu M$ )
$\tau_S$	70 (msec)	$K_I$	$3.07 \times 10^7$
$\tau_{hF}$	2 (sec)		



## 謝辞

本論文に関する研究を進めるにあたり、浅学非才の筆者に対して、学生時代から今日に至るまで、研究に対する真摯な姿勢、情熱とともに終始懇切なる御指導を賜った豊橋技術科学大学情報工学系 臼井支朗教授に深く感謝いたします。

生理実験を中心にエムラミノウミウシの学習、記憶のメカニズムに関して、この分野のリーダーである NIH D. L. Alkon 博士から直接御指導賜ったことは、私にとりまして筆舌に尽くせぬ喜びであり、心から感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、有益な御討論、御助言を頂いた豊橋技術科学大学電気電子工学系 中村哲郎教授、同情報工学系 伊藤宏司教授、同知識情報工学系 吉田辰夫教授に感謝いたします。

本研究の成果は、豊橋技術科学大学と舞鶴工業高等専門学校との間の二年間にわたる人事交流に負うところが大きく、この機会を与えて下さるとともに懇切なる御指導、御教授を賜った豊橋技術科学大学 佐々木慎一学長、楠 菊信副学長、高橋 正副学長、舞鶴工業高等専門学校 東慎之介元校長ならびに若林二郎校長に感謝いたします。

C. Collin 博士、I. I. Lederhendler 博士をはじめとする NIH NINDS の方々からは、エムラミノウミウシの飼育から生理実験にわたる多くの知識を御教授いただいた。ここに、感謝いたします。

本研究をすすめるにあたり、舞鶴工業高等専門学校電気工学科 戸田尚宏講師、豊橋技術科学大学知識情報工学系 神山斉己助手、同情報工学系 中内茂樹助手、石井宏幸教務職員には、有益な御討論をいただくと共に研究生活全般にわたり、惜しめない御支援、御協力を頂いた。心より感謝いたします。

本論文は8年間にわたる研究の集大成であり、日頃から御支援、御協力いただいた東海大学開発工学部生物工学科 榊原 学教授、舞鶴工業高等専門学校 教官各位、ならびに豊橋技術科学大学生体情報工学研究室の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、研究に対する理解と共に常に支援を続けてくれた両親ならびに妻 淑子、また、一緒に過ごすべき多くの時間を研究に費やすことを許してくれた早紀子、成高に感謝いたします。



## 参考文献

- [1] P. D. Abraham and A. D. D. Willock. Periodicity of a fixed action pattern in the avian song *Trichops diadematus*. *Communications in Zoolog. Biol.*, Vol. A5, pp. 271-280, 1972.
- [2] J. Aronson, D. L. Allen, and J. T. Moore.  $Ca^{2+}$  dependent protein kinase in yellowish ephelocarpus from a biophysical basis. *Journal of Neurophysiology*, Science, Vol. 224, pp. 1254-1257, 1964.
- [3] D. J. Adams, S. J. Smith, and S. B. Thompson. Ionic currents in molluscan neurons. *Ann. Rev. Physiol.*, Vol. 1, pp. 141-167, 1969.
- [4] G. W. Taylor and R. Reuter. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J. Physiol.*, pp. 177-210, 1977.
- [5] 谷本一孝. コエーラ・コシキエーラ. 東京電機大学出版局, 1965.
- [6] T. Akaike and D. L. Allen. Sensory convergence on central visual neurons in *Hermissenda*. *J. Neurophysiol.*, Vol. 44, No. 3, pp. 507-512, 1980.
- [7] D. L. Allen. Associative training of *Hermissenda*. *J. Gen. Physiol.*, Vol. 64, pp. 79-84, 1974.
- [8] D. L. Allen. Response of hair cells to electrical stimulation. *J. Gen. Physiol.*, Vol. 56, pp. 507-520, 1973.
- [9] D. L. Allen. A biophysical basis for molluscan associative learning. In C. D. Woody, editor. *Conditioning*, pp. 147-172, Plenum, 1982.
- [10] D. L. Allen. Learning in a marine mollusk. *Science*, Vol. 180, No. 1, pp. 79-84, 1963.



## 参 考 文 献

- [1] F. D. Abraham and A. O. D. Willows. Plasticity of a fixed action pattern in the sea slug *Tritonia diomedea*. *Communications in Behav. Biol.*, Vol. A6, pp. 271-280, 1972.
- [2] J. Acosta-Urquidi, D. L. Alkon, and J. T. Neary.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase injection in a photoreceptor mimics biophysical effects of associative learning. *Science*, Vol. 224, pp. 1254-1257, 1984.
- [3] D. J. Adams, S. J. Smith, and S. H. Thompson. Ionic currents in molluscan soma. *Ann. Rev. Neurosci.*, Vol. 3, pp. 141-167, 1980.
- [4] G. W. Beeler and H. Reuter. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.*, pp. 177-210, 1977.
- [5] 合原一幸. ニューラルコンピュータ. 東京電機大学出版局, 1988.
- [6] T. Akaike and D. L. Alkon. Sensory convergence on central visual neurons in *Hermisenda*. *J. Neurophysiol.*, Vol. 44, No. 3, pp. 501-513, 1980.
- [7] D. L. Alkon. Associative training of *Hermisenda*. *J. Gen. Physiol.*, Vol. 64, pp. 70-84, 1974.
- [8] D. L. Alkon. Responses of hair cells to statocyst rotation. *J. Gen. Physiol.*, Vol. 66, pp. 507-530, 1975.
- [9] D. L. Alkon. A biophysical basis for molluscan associative learning. In C. D. Woody, editor, *Conditioning*, pp. 147-170. Plenum, 1982.
- [10] D. L. Alkon. Learning in a marine snail. *Scientific American*, Vol. 249, No. 1, pp. 70-84, 1983.



- [11] D. L. Alkon. ウミウシの学習と神経回路 (久田光彦 訳). 日経サイエンス, 9月号, pp. 26-37, 1983.
- [12] D. L. Alkon. Calcium-mediated reduction of ionic currents: a biophysical memory trace. *Science*, Vol. 226, pp. 1037-1045, 1984.
- [13] D. L. Alkon. Changes of membrane currents during learning. *J. Exp. Biol.*, Vol. 112, pp. 95-112, 1984.
- [14] D. L. Alkon. Changes of membrane currents and calcium-dependent phosphorylation during associative learning. In Daniel L. Alkon and Charles D. Woody, editors, *Neural Mechanisms of Conditioning*, pp. 3-18. Plenum, 1985.
- [15] D. L. Alkon. *Memory traces in the brain*. Cambridge University Press, 1987.
- [16] D. L. Alkon. 記憶とニューラルシステム (久田光彦, 高橋幹雄, 梅 哲夫 訳). 日経サイエンス, 9月号, pp. 52-64, 1989.
- [17] D. L. Alkon, T. Akaike, and J. Harrigan. Interaction of chemosensory, visual and statocyst pathways in *Hermisenda crassicornis*. *J. Gen. Physiol.*, Vol. 71, pp. 177-194, 1978.
- [18] D. L. Alkon, K. T. Blackwell, G. S. Barbour, A. K. Rigler, and T. P. Vogl. Pattern-recognition by an artificial network derived from biologic neuronal systems. *Biol. Cybern.*, Vol. 62, pp. 363-376, 1990.
- [19] D. L. Alkon, J. Disterhoft, and D. Coulter. Conditioning-specific modification of postsynaptic membrane currents in mollusc and mammal. In J. P. Changeux and M. Konishi, editors, *The Neural and Molecular Bases of Learning*, pp. 205-238. John Wiley & Sons, 1987.
- [20] D. L. Alkon, J. Farley, M. Sakakibara, and B. Hay. Voltage-dependent calcium and calcium-activated potassium currents of a molluscan photoreceptor. *Biophys. J.*, Vol. 46, pp. 605-614, 1984.
- [21] D. L. Alkon, H. Ikeno, J. Dworkin, D. L. McPhie, J. L. Olds, I. Lederhendler, L. Matzel, B. G. Schreurs, A. Kuzirian, C. Collin, and E. Yamoah. Contraction of neuronal branching volume: An anatomical correlate of Pavlovian conditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 87, pp. 1611-1614, 1990.



- [22] D. L. Alkon, J. Olds, and T. Nelson. The physical reality of memory. In M. Ito and Y. Nishizuka, editors, *Brain signals transduction and memory*, pp. 229–240. Academic Press, 1989.
- [23] D. L. Alkon, F. Quek, and T. P. Vogl. Computer modeling of associative learning. In D. S. Touretzky, editor, *Advances in Neural Information Processing System 1*, pp. 419–435. Morgan Kaufmann Publishers, 1989.
- [24] D. L. Alkon and H. Rasmussen. A spatial-temporal model of cell activation. *Science*, Vol. 239, pp. 998–1005, 1988.
- [25] D. L. Alkon and M. Sakakibara. Calcium activates and inactivates a photoreceptor soma potassium current. *Biophys. J.*, Vol. 48, pp. 983–995, 1985.
- [26] D. L. Alkon, M. Sakakibara, R. Forman, J. Harrigan, I. Lederhendler, and J. Farley. Reduction of two voltage-dependent  $K^+$  currents mediates retention of a learned association. *Behav. Neural Biol.*, Vol. 44, pp. 278–300, 1985.
- [27] D. L. Alkon, T. P. Vogl, and D. Tam. Memory function in neural and artificial networks. In Michael L. Commons, Stephen Grossberg, and John E. R. Staddon, editors, *Neural Network Models of Conditioning and Action*, pp. 1–11. Lawrence Erlbaum Associates, 1991.
- [28] U. Altrup and M. Peters. Procedure of intracellular staining of neurons in the snail *Helix pomatia*. *J. Neurosci. Methods*, Vol. 5, pp. 161–165, 1982.
- [29] 麻生英樹. ニューラルネットワーク情報処理. 産業図書, 1988.
- [30] C. H. Bailey and E. R. Kandel. Structural changes accompanying memory storage. *Annu. Rev. Physiol.*, Vol. 55, pp. 397–426, 1993.
- [31] M. Baudry and G. Massicotte. Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and mammalian memory. *Concepts in Neuroscience*, Vol. 3, No. 1, pp. 79–98, 92.
- [32] O. Belluzzi and O. Sacchi. The interactions between potassium and sodium currents in generative action potentials in the rat sympathetic neurone. *Journal of Physiology*, Vol. 397, pp. 127–147, 1988.



- [33] O. Belluzzi and O. Sacchi. A quantitative description of the sodium current in the rat sympathetic neurone. *J. Physiol.*, Vol. 380, pp. 275-291, 1986.
- [34] M. J. Berridge. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, Vol. 361, pp. 315-325, 1993.
- [35] F. Bezanilla, J. Vergara, and R. E. Taylor. Voltage clamping of excitable membranes. In G. Ehrenstein and H. Lecar, editors, *Methods of Experimental Physics*, Vol. 20, pp. 445-511. Academic Press, 1982.
- [36] M. P. Blaustein. Calcium transport and buffering in neurons. *Trend in Neurosciences*, Vol. 11, No. 10, pp. 438-443, 1988.
- [37] F. E. Bloom, A. Lazerson, and L. Hofstadter. *Brain, Mind, and Behavior*. W. H. Freeman and Company, 1985.
- [38] L. J. Borg-Graham. Modelling the somatic electrical response of hippocampal pyramidal neurons. Technical report, Massachusetts Institute of Technology, 1989.
- [39] L. J. Borg-Graham. Modelling the non-linear conductances of excutable membranes. In J. Chad and H. Wheal, editors, *Cellular Neurobiology*, pp. 247-275. IRL Press, 1991.
- [40] B. B. Boycott and J. Z. Young. A memory system in *Octopus vulgaris* landmark. *Proc. Roy. Soc. B*, Vol. 143, pp. 449-480, 1955.
- [41] G. Braun and G. Bicker. Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *J. Neurophysiol.*, Vol. 67, No. 3, pp. 588-598, 1992.
- [42] L. Brodin, H. G. C. Trâvén, A. Lansner, P. Wallén, and Ö. Ekeberg. Computer simulation of N-Methyl-D-Aspartate receptor-induced membrane properties in a neuron model. *J. Neurophysiol.*, Vol. 66, No. 2, pp. 473-484, 1991.
- [43] J. H. Byrne and T. Crow. Examples of mechanistic analyses of learning and memory in invertebrate. In Jr. J. L. Martinez and R. P. Kesner, editors, *Learning and Memory A Bioblogical View*, pp. 329-358. Academic Press, 2 edition, 1991.
- [44] J. L. Casti and A. Karlqvist, editors. 現実の脳 人工の心 (中村正郎 訳). 共立出版, 1991.



- [45] C. Collin and D. L. Alkon. Neural correlates of memory storage. In T. Narahashi, editor, *Ion Channels Volume 3*, pp. 159-175. Plenum Press, 1992.
- [46] C. Collin, H. Ikeno, J. F. Harrigan, I. Lederhendler, and D. L. Alkon. Sequential modification of membrane currents with classical conditioning. *Biophys. J.*, Vol. 54, pp. 955-960, 1988.
- [47] J. A. Connor. Calcium current in molluscan neurons: measurement under conditions which maximize its visibility. *J. Physiol.*, Vol. 286, pp. 41-60, 1979.
- [48] J. A. Connor and G. Nikolakopoulou. Calcium diffusion and buffering in nerve cytoplasm. In R. M. Miura, editor, *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, Vol. 15, pp. 79-101. American Mathematical Society, 1982.
- [49] J. A. Connor and C. F. Stevens. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.*, Vol. 213, pp. 21-30, 1971.
- [50] J. Connor and D. L. Alkon. Light- and voltage-dependent increase of calcium ion concentration in molluscan photoreceptor. *J. Neurophysiol.*, Vol. 51, No. 4, pp. 745-752, 1984.
- [51] T. Crow. Cellular and molecular analysis of associative learning and memory in *Hermissenda*. *Trends in Neurosciences*, Vol. 11, No. 4, pp. 136-142, 1988.
- [52] T. J. Crow and D. L. Alkon. Retention of an associative behavioral change in *Hermissenda*. *Science*, Vol. 201, pp. 1239-1241, 1978.
- [53] T. J. Crow and D. L. Alkon. Associative behavioral modification in *Hermissenda*: cellular correlates. *Science*, Vol. 209, pp. 412-414, 1980.
- [54] T. Crow and M. S. Bridge. Serotonin modulates photoresponses in *Hermissenda* type-B photoreceptor. *Neuroscience Letters*, Vol. 60, pp. 83-88, 1985.
- [55] W. J. Davis. Invertebrate model systems. In Jr. J. L. Martinez and R. P. Kesner, editors, *Learning and Memory A Biological View*. Academic Press, 1986.
- [56] L. J. DeFelice and D. L. Alkon. Voltage noise from hair cells during mechanical stimulation. *Nature*, Vol. 269, No. 5629, pp. 613-615, 1977.



- [57] J. Dempster. *Computer Analysis of Elctrophysiological Signals*. Academic Press, 1993.
- [58] Durham Technical Images. *PC Data Master Ver. 2.0 User's Manual*, 1988.
- [59] L. Ebihara and E. A. Johnson. Fast sodium current in cardiac muscle. *Biophys. J.*, Vol. 32, pp. 779-790, 1980.
- [60] J. C. Eccles. 脳 - その構造と働き - (木村 裕, 小野武年 訳). 共立出版, 第2版, 1979.
- [61] Ö. Ekberg, P. Walleén, A. Lansner, H. Tråvén, L. Brodin, and S. Grillner. A computer based model for realistic simulations of neural networks. *Biol. Cybern.*, Vol. 65, pp. 81-90, 1991.
- [62] 遠藤實, 西塚泰美, 八木康一, 宮本英七 (編). カルシウムイオンと細胞機能. 共立出版, 1988.
- [63] J. Farley, L. M. Grover, L. Sun, S. S. Huang, H. L. Eisthen, C. Girolami, and R. Wu. Chemosensory conditioning of *Hermisenda Crassicornis*. *Behav. Neurosci.*, Vol. 104, No. 4, pp. 583-596, 1990.
- [64] G. D. Fischbach. 脳と心 (橋本隆紀, 小幡邦彦 訳). 日経サイエンス, 11月号, pp. 12-24, 1992.
- [65] B. Frankenhaeuser. A quantitative description of potassium currents in myelinated nerve fibers of *Xenopus Laevis*. *J. Physiol.*, Vol. 169, pp. 424-430, 1963.
- [66] S. M. Fredman. Intracellular staining of neurons with nickel-lysine. *J. Neurosci. Methods*, Vol. 20, pp. 181-194, 1987.
- [67] A. Gerperin. Rapid food-aversion learning by a terrestrial mollusk. *Science*, Vol. 189, pp. 567-570, 1975.
- [68] T. Görös, M. Antal, Éva Oláh, and Gy. Székely. An improved cobalt labeling technique with complex compounds. *Acta. biol. Acad. Sci. hug.*, Vol. 30, No. 1-2, pp. 79-86, 1979.
- [69] B. Hedwig and M. Knepper. NEUROLAB, a comprehensive program for the analysis of neurophysiological and behavioural data. *J. Neurosci. Methods*, Vol. 45, pp. 135-148, 1992.



- [70] E. Heldman, Y. Grossman, T. P. Jerussi, and D. L. Alkon. Cholinergic features of photoreceptor synapses in *Hermisenda*. *J. Neurophysiol.*, Vol. 42, No. 1, pp. 153-165, 1979.
- [71] B. Hille. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer, 1984.
- [72] 平本幸男, 竹中敏文. 実験生物学講座 5 電気的測定法. 丸善, 1982.
- [73] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, Vol. 117, pp. 500-544, 1952.
- [74] T. M. Hodgson and T. Crow. Cellular correlates of classical conditioning in identified light responsive pedal neurons of *Hermisenda crassicornis*. *Brain Research*, Vol. 570, pp. 267-271, 1992.
- [75] R. D. Howkins and E. R. Kandel. Is there a cell-biological alphabet for simple forms of learning? *Psychological Review*, Vol. 91, No. 3, pp. 375-391, 1984.
- [76] 池野英利. 膜イオン電流とギャップ特性に基づく網膜水平細胞の時空間モデル. 修士論文, 豊橋技術科学大学, 1985.
- [77] 池野英利. 連続系シミュレーションシステム: CS2 の使用法. 情報教育と研究の現状・舞鶴高専, Vol. 16, pp. 66-73, 1988.
- [78] 池野英利, 榊原学, 臼井支朗. イオン電流に基づくウミウシ視細胞応答の再構成. 電子情報通信学会論文誌, Vol. J72-D-II, No. 12, pp. 2094-2102, 1989.
- [79] 池野英利, 大崎達也. データ解析とモデルシミュレーションのためのシステム環境. 情報教育と研究の現状・舞鶴高専, Vol. 18, pp. 59-68, 1990.
- [80] 池野英利, 榊原学, 臼井支朗. パーソナルコンピュータを用いた古典的条件付けのための刺激制御装置. 日本生理誌, Vol. 53, No. 10, pp. 362-367, 1991.
- [81] 池野英利, 神山齊己, 臼井支朗. 神経細胞イオン電流のモデルパラメータ推定法. 電子情報通信学会論文誌 D-II, Vol. J76-D-II, No. 5, 1993.
- [82] R. L. Isaacson. 大脳辺縁系と学習 (田代 信雄 監訳). 共立出版, 1982.
- [83] 石井宏幸, 神山齊己, 臼井支朗. イオン電流モデルを用いた神経細胞の入力電流推定法. 電子情報通信学会論文誌 D-II, Vol. J75-D-II, No. 12, pp. 2056-2065, 1992.



- [84] 伊藤正男, 佐伯胖 (編). 認識し行動する脳 - 脳科学と認知科学. 東京大学出版, 1988.
- [85] M. Ito. Molecular mechanisms of long-term depression in the cerebellum. In M. Ito and Y. Nishizuka, editors, *Brain signal transduction and memory*, pp. 199-212. Academic Press, 1989.
- [86] 伊藤正男. 長期抑圧 - そのメカニズムと役割 -. 松本元, 大津展之 (編), 神経細胞が行う情報処理とそのメカニズム, pp. 139-158. 培風館, 1991.
- [87] J. Johansen, J. Yang, and A. L. Kleinhaus. Voltage-clamp analysis of the ionic conductances in a *leech* neuron with a purely calcium-dependent action potential. *J. Neurophysiol.*, Vol. 58, No. 6, pp. 1468-1484, 1987.
- [88] D. Junge. *Nerve and muscle excitation*. Sinauer Associates, 2 edition, 1981.
- [89] 神山齊己. 網膜外網状層神経回路の理工学的研究. 博士論文, 豊橋技術科学大学, 1991.
- [90] E. R. Kandel. Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. In E. R. Kandel and J. H. Schwartz, editors, *Principles of neural science*, pp. 816-833. Elsevier, 2 edition, 1985.
- [91] E. R. Kandel and R. D. Hawkins. The biological basis of learning and individuality. *Scientific American*, Vol. September, pp. 53-60, 1992.
- [92] 唐木英明, 工藤佳久, 栗山熙 (編). 実験医学臨時増刊号 細胞内カルシウム実験法, 第7(6)巻. 羊土社, 1989.
- [93] 葛西道生, 吉岡亨, 木島博正, 塚原保夫, 栗原堅三, 鈴木英雄. 神経情報伝達分子. 培風館, 1988.
- [94] 加藤宏司, 伊藤憲一, 工藤佳久. 可塑性 - 海馬のシナプス長期増強 (long-term potentiation, LTP) を中心にして -. 松本元, 大津展之 (編), 神経細胞が行う情報処理とそのメカニズム, pp. 89-138. 培風館, 1991.
- [95] 小林春雄, 熊倉鴻之助, 畠中寛. 神経情報生物学入門. オーム社, 1990.
- [96] C. Koch. Biophysics of computation: toward the mechanisms underlying information processing in single neurons. In E. L. Schwartz, editor, *Computational Neuroscience*. MIT Press, 1989.



- [97] C. Koch and I. Segev, editors. *Methods in neuronal modeling*. MIT Press, 1989.
- [98] M. Koide and J. Farley. Voltage- and current-clamp simulation of *Hermisenda* type B cell responses. In *Analysis and Modeling of Neural Systems*, pp. 207–211. Kluwer, 1992.
- [99] 小島至. カルシウムと細胞情報. 羊土社, 1992.
- [100] H. Korn, Y. Oda, and D. S. Faber. Long-term potentiation of inhibitory circuits and synapses in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 89, pp. 440–443, 1992.
- [101] P. G. Kostyuk, S. L. Mironov, A. V. Tepikin, and P. V. Belan. Cytoplasmic free Ca in isolated snail neurons as revealed by fluorescent probe fura-2: Mechanisms of Ca recovery after Ca load and Ca release from intracellular stores. *J. Membrane Biol.*, Vol. 110, pp. 11–18, 1989.
- [102] F. B. Krasne. Excitation and habituation of the crayfish escape reflex: the depolarizing response in lateral giant fibers of the isolated abdomen. *J. Exp. Biol.*, Vol. 50, pp. 29–46, 1969.
- [103] 久場健司. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の局在と膜電流. 山田和生 (編), 不整脈研究の進歩 Vol.1. ライフメディコム, 1992.
- [104] S. W. Kuffler, J. G. Nicholls, and A. R. Martin. *From neuron to brain*. Sinauer Associates, 1984.
- [105] 黒田洋一郎. 記憶のしくみと化学物質. 日本化学会 (編), 脳の働きを科学する. 大日本図書, 1992.
- [106] S. Ladd. 機械じかけの脳をつくる (大江秀房 訳). 啓学出版, 1989.
- [107] B. Lancaster. Isolation of potassium currents. In J. Chad and H. Wheal, editors, *Cellular Neurobiology*, pp. 97–119. IRL Press, 1991.
- [108] R. W. Landfield and S. A. Deadwyler, editors. *Long-term potentiation: From biophysics to behavior*. Alan R. Liss, 1988.
- [109] I. I. Lederhendler and D. L. Alkon. The role of graviception in classically conditioned visual responses of the marine snail *Hermisenda*. In S. Watanabe, G. Mitarai, and S. Mori, editors, *Biological Sciences in Space 1986*, pp. 209–216, 1987.



- [110] I. I. Lederhendler and D. L. Alkon. The interstimulus interval and classical conditioning in the marine snail *Hermisenda crassicornis*. *Behavioral Brain Research*, Vol. 35, pp. 75–80, 1989.
- [111] I. I. Lederhendler, S. Gart, and D. L. Alkon. Classical conditioning of *Hermisenda*: origin of a new response. *J. Neurosci.*, Vol. 6, No. 5, pp. 1325–1331, 1986.
- [112] R. Llinás, Z. Steinberg, and K. Walton. Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. *Biophys. J.*, Vol. 33, pp. 289–322, 1981.
- [113] S. R. Lockery and N. C. Spitzer. Reconstruction of action potential development from whole-cell currents of differentiating spinal neurons. *J. Neurosci.*, Vol. 12, No. 6, pp. 2268–2287, 1992.
- [114] J. J. LoTurco, D. A. Coulter, and D. L. Alkon. Enhancement of synaptic potential in rabbit CA1 pyramidal neurons following classical conditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85, pp. 1672–1676, 1988.
- [115] G. Lynch. *Synapse, circuit, and the beginnings of memory*. MIT Press, 1986.
- [116] P. Z. Marmarelis and V. Z. Marmarelis. *Analysis of physiological systems: the white-noise approach*. Plenum, 1978.
- [117] L. D. Matzel and D. L. Alkon. GABA-induced potentiation of neuronal excitability occurs during contiguous pairings with intracellular calcium elevation. *Brain Research*, Vol. 554, pp. 77–84, 1991.
- [118] L. D. Matzel, B. G. Schreurs, I. Lederhendler, and D. L. Alkon. Acquisition of conditioned association in *Hermisenda*: Additive effects of contiguity and the forward interstimulus interval. *Behav. Neurosci.*, Vol. 104, No. 4, pp. 597–606, 1990.
- [119] D. A. McCormick and J. R. Hubenard. A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J. Neurophysiol.*, Vol. 68, No. 4, pp. 1384–1400, 1992.
- [120] R. Menzel. Neurobiology of learning and memory: the honeybee as a model system. *Naturwissenschaften*, Vol. 70, pp. 504–511, 1983.



- [121] A. J. Mercier, H. Bradacs, and H. L. Atwood. Long-term adaptation of crayfish neurons depends on the frequency and number of impulses. *Brain Res.*, Vol. 598, pp. 221-224, 1992.
- [122] 御子柴克彦, 野田昌晴. 分子神経生物学. 丸善, 1989.
- [123] G. J. Mpitsos and W. J. Davis. Learning: classical conditioning and avoidance conditioning in the mollusk *Pleurobranchaea*. *Science*, Vol. 180, pp. 317-320, 1973.
- [124] G. J. Mpitsos and K. Lukowiak. Learning in gastropod molluscs. In *The Mollusca*, Vol. 8, pp. 95-267. Academic Press, 1985.
- [125] 中川徹, 小柳義夫. 最小二乗法による実験データ解析. 東京大学出版会, 1982.
- [126] 中西重忠. 神経伝達を受容機構. 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.
- [127] T. Narahashi. Overview of toxins and drugs as tools to study excitable membrane ion channels: II. transmitter-activated channels. *Methods in Enzymology*, Vol. 207, pp. 643-658, 1992.
- [128] T. Narahashi and M. D. Herman. Overview of toxins and drugs as tools to study excitable membrane ion channels: I. voltage-activated channels. *Methods in Enzymology*, Vol. 207, pp. 620-642, 1992.
- [129] T. J. Nelson and D. L. Alkon. Prolonged RNA changes in the *Hermissenda* eye induced by classical conditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85, pp. 7800-7804, 1988.
- [130] T. J. Nelson, C. Collin, and D. L. Alkon. Isolation of a G protein that is modified by learning and reduces potassium currents in *Hermissenda*. *Science*, Vol. 247, pp. 1479-1483, 1990.
- [131] 仁木宏明. 脳と記憶. 共立出版, 1989.
- [132] Y. Nishizuka. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, Vol. 258, pp. 607-614, 1992.
- [133] 西塚泰美. 脳の化学情報伝達の仕組み. 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.



- [134] 大槻秀樹, 池野英利. 連続系シミュレーションシステム: CS2. 情報教育と研究の現状・舞鶴高専, Vol. 17, pp. 69-80, 1989.
- [135] J. P. Pascoe, W. F. Supple, and B. S. Kapp. Learning and memory: Vertebrate models. In Jr. J. L. Martinez and R. P. Kesner, editors, *Learning and Memory A Biological View*. Academic Press, 2 edition, 1991.
- [136] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, and W. T. Vetterling. *Numerical recipes in C*. Cambridge University Press, 1988.
- [137] W. G. Quinn and Y. Dudai. Memory phases in *Drosophila*. *Nature*, Vol. 262, pp. 576-577, 1976.
- [138] R. Restak. *The brain*. Bantam, 1984.
- [139] D. E. Rumelhart, J. L. McClelland, and The PDP Research Group. *Parallel distributed processing*. MIT Press, 1986.
- [140] C. L. Sahley and D. F. Ready. Associative learning modifies two behaviors in the leech, *Hirudo medicinalis*. *J. Neurosci.*, Vol. 8, No. 12, pp. 4612-4620, 1988.
- [141] M. Sakai and T. Yamaguchi. Differential staining of insect neurons with nickel and cobalt. *J. Insect Physiol.*, Vol. 29, No. 5, pp. 393-397, 1983.
- [142] M. Sakakibara, H. Ikeno, S. Usui, and D. L. Alkon. Model of *Hermisenda* type-B photoreceptor response based on principal soma currents. In *Vision, Memory, and Temporal Lobe*. Elsevier, 1990.
- [143] R. Schneggenburger and A. Konnerth. GABA-mediated synaptic transmission in neuroendocrine cells: a patch-clamp study in a pituitary slice preparation. *Pflügers Arch*, Vol. 421, pp. 364-373, 1992.
- [144] S. L. Senft, R. D. Allen, T. Crow, and D. L. Alkon. Optical sectioning of HRP-stained molluscan neurons. *J. Neurosci. Methods*, Vol. 5, pp. 153-159, 1982.
- [145] 白川正輝, 臼井支朗, 安野尚史, 谷口 彰彦 外山淳治. 活動電位脱分極相に基づく心室筋 Na 電流モデル記述の改良. 電子情報通信学会論文誌 D-II, Vol. J76-D-II, No. 3, pp. 653-662, 1993.



- [146] J. Sneyd, S. Girard, and D. Clapham. Calcium wave propagation by calcium-induced calcium release: An unusual excitable system. *Bulletin of Mathematical Biology*, Vol. 55, No. 2, pp. 315-344, 1993.
- [147] R. R. Sokal and F. J. Rohlf. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, 2 edition, 1981.
- [148] L. R. Squire. *Memory and Brain*. Oxford University Press, 1987.
- [149] M. G. Stewart. Changes in dendritic and synaptic structure in chick forebrain consequent on passive avoidance learning. In R. J. Andrew, editor, *Neural and behavioral plasticity*. Oxford Science Publications, 1991.
- [150] 鈴木英雄, 吉岡亨, 桐野豊, 葛西道生. 情報生物学入門. 培風館, 1986.
- [151] 鈴木良次, 佐藤俊輔, 池田研二, 吉川昭 (編). 生体信号. コロナ社, 1989.
- [152] 鈴木泰三, 田崎京二, 中浜博. 生理学通論 I. 共立出版, 1972.
- [153] Smith T. G. Jr., J. L. Barker, B. M. Smith, and T. R. Colburn. Voltage clamping with microelectrodes. *J. Neurosci. Methods*, Vol. 3, pp. 105-128, 1980.
- [154] Smith T. G. Jr., H. Lecar, S. J. Redman, and P. W. Gage, editors. *Voltage and patch clamping with microelectrodes*. American Physiological Society, 1985.
- [155] 竹中敏文. ニューロンとレセプター. 培風館, 1989.
- [156] D. C. Tam and D. H. Perkel. Quantitative modeling of synaptic plasticity. In R. D. Hawkins and G. H. Bower, editors, *Computational Models of Learning in Simple Neural Systems*, pp. 1-30. Academic Press, 1989.
- [157] R. F. Thompson. The neurobiology of learning and memory. *Science*, Vol. 233, pp. 941-947, 1986.
- [158] V. Torre, S. Forti, A. Menini, and M. Campani. Model of phototransduction in retinal rods. In *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology*, Vol. LV, pp. 563-573, 1990.
- [159] N. Tsukahara. Cellular basis of classical conditioning mediated by the red nucleus in the cat. In D. L. Alkon and C. D. Woody, editors, *Neural mechanisms of conditioning*, pp. 127-139. Plenum Press, 1986.



- [160] 塚原仲晃. 脳の可塑性と記憶. 紀伊國屋書店, 1987.
- [161] C. L. Tyndale and T. J. Crow. An IC control unit for generating random and nonrandom events. *IEEE Trans. on Biol. Eng.*, Vol. BME-26, No. 12, pp. 649-655, 1979.
- [162] 臼井支朗, 伊藤宏司, 三田勝己. 生体信号処理の基礎. オーム社, 1985.
- [163] 臼井支朗, 池野英利. 膜イオン電流に基づく単離網膜水平細胞応答の再構成. 電気学会論文誌 C, Vol. 108-C, No. 7, pp. 478-484, 1988.
- [164] 臼井支朗, 池野英利, 神山斉己. イオン電流機構に基づく神経細胞ネットワーク シミュレーション. 病態生理, Vol. 8, No. 4, pp. 337-342, 1989.
- [165] 臼井支朗, 池野英利. 網膜神経細胞応答の非線形・非定常解析. 鈴木良次, 佐藤俊輔, 池田研二, 吉川昭 (編), 生体信号, pp. 112-124. コロナ社, 1989.
- [166] 臼井支朗, 池野英利, 神山斉己, 石井宏幸. 神経回路のモデル化とシミュレーション. バイオメカニズム学会誌, Vol. 16, No. 3, pp. 188-195, 1992.
- [167] S. Usui, R. Matsuda, H. Ikeno, and H. Miyachi. Continuous system simulator (SIGMA) on personal computer. In *Proceedings of JSST International Conference*, pp. 135-140, 1986.
- [168] A. M. Uttly. 神経系の情報伝達 (鈴木 良次, 曾我部 正博, 川人 光男 訳). サイエンス社, 1982.
- [169] Visual Solutions, Inc. *VisSim User's Guide*, 1989.
- [170] P. D. Weer and B. M. Salzberg, editors. *Optical methods in cell physiology*. Wiley-Interscience, 1986.
- [171] S. A. Werness, S. D. Fay, K. T. Blackwell, T. P. Vogl, and D. L. Alkon. Associative learning in a network model of *Hermisenda crassicornis*. *Biol. Cybern.*, Vol. 68, pp. 125-133, 1992.
- [172] S. A. Werness, S. D. Fay, T. P. Vogl, K. T. Blackwell, and D. L. Alkon. A model of associative learning in *Hermisenda crassicornis*: sensitivities to temporal relationships of stimuli. In *Proceedings of Annual International Conference of the IEEE EMBS*, Vol. 13(1), pp. 1423-1424, 1991.



- [173] A. West, E. Barnes, and D. L. Alkon. Primary changes of voltage responses during retention of associative learning. *J. Neurophysiol.*, Vol. 48, No. 5, pp. 1243–1255, 1982.
- [174] M. A. Wilson, U. S. Bhalla, J. D. Uhley, and J. M. Bower. GENESIS: a system for simulating neural networks. In D. S. Touretzky, editor, *Neural Information Processing System 1*, pp. 485–492. Morgan Kaufmann Publishers, 1989.
- [175] W. M. Yamada, C. Koch, and P. R. Adama. Multiple channels and calcium dynamics. In *Methods in Neuronal Modeling*, pp. 97–133. MIT Press, 1989.
- [176] 吉岡亨. 電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル. *生体の科学*, Vol. 40, No. 3, pp. 217–225, 1989.
- [177] N. F. Zilber-Gachelin and M. P. Chartier. Modification of the motor reflex response due to repetition of the peripheral stimulus in the cockroach. I. Habituation at the level of an isolated abdominal ganglion. *J. Exp. Biol.*, Vol. 59, pp. 359–381, 1973.
- [178] R. S. Zucker. Synaptic facilitation and residual calcium. In A. I. Selverston, editor, *Model Neural Networks and Behavior*, pp. 461–475. Plenum, 1985.
- [179] R. S. Zucker. Model of calcium regulation in neurons. In J. H. Byrne and W. O. Berry, editors, *Neural Models of Plasticity*. Academic Press, 1989.



## 本論文関連研究業績目録

### 著書

1. Sakakibara, M., Hama, H., Ueda, H., and Allan, D.L.: Model of *Hermissenda* type-B photoreceptor response based on pacemaker and currents, *Vises, Memory, and the Temporal Lobe*, Kluwer, 421-423(1990)

### 学術論文

1. 日本文理 栗野英樹 膜イオン電流に基づく神経回路モデルの構築, 電気学論文集, Vol.108-C No.7, 779-784(1983)
2. Pollin, G., Hertz, E., Harrigan, J.F., Lederhendler, L., and Allon, D.L.: Sequential modification of dendritic contents with classical conditioning, *Biophys. J.*, Vol.64, 945-960(1993)
3. 栗野英樹, 藤原孝, 日本文理: イオン電流に基づくクマロン受容体応答の再構成, 電子情報通信学会論文誌 D-II, Vol.772-D-II, No.12, 2661-2670(1989)
4. Allan, D.L., Hama, H., Oworkin, J., McPhee, D.L., Ueda, H., Lederhendler, L., Matsui, L., Schreier, B.G., Kunita, A., Coffey, C., and Yamashita, E.: Construction of neuronal breeding colony. An in vitro model of Pavlovian conditioning, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.87, 1611-1614(1990)
5. 栗野英樹, 藤原孝, 日本文理: パーソナルコンピュータを用いた古典的条件付けのモデル化, 電気学論文集, Vol.108-C No.10, 1067-1077(1983)
6. 栗野英樹, 日本文理, 日本文理: 神経回路イオン電流のモデル - 19. モデル化 - 電子情報通信学会論文誌 D-II, Vol.772-D-II, No.5, 1047-1054(1989)



## 本論文関連研究業績目録

### 著書

1. Sakakibara, M., Ikeno, H., Usui, S., and Alkon, D.L.: Model of *Hermissenda* type-B photoreceptor response based on principal soma currents, *Vision, Memory, and the Temporal Lobe*, Elsevier, 421-426(1990)

### 学術論文

1. 臼井支朗, 池野英利: 膜イオン電流に基づく単離網膜水平細胞応答の再構成, 電気学会論文誌, **Vol.108-C**, No.7, 478-484(1988)
2. Collin, C., Ikeno, H., Harrigan, J.F., Lederhendler, I., and Alkon, D.L.: Sequential modification of membrane currents with classical conditioning, *Biophys. J.*, **Vol.54**, 955-960(1988)
3. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗: イオン電流に基づくウミウシ視細胞応答の再構成, 電子情報通信学会論文誌 D-II, **Vol.J72-D-II**, No.12, 2094-2102(1989)
4. Alkon, D.L., Ikeno, H., Dworkin, J., McPhie, D.L., Olds, J.L., Lederhendler, I., Matzel, L., Schreurs, B.G., Kuzirian, A., Collin, C., and Yamoah, E.: Constraction of neuronal branching volume: An anatomic correlate of Pavlovian conditioning, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **Vol.87**, 1611-1614 (1990)
5. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗: パーソナルコンピュータを用いた古典的条件付けのための刺激制御装置, 日本生理学雑誌, **Vol.53**, No.10, 362-367(1991)
6. 池野英利, 神山齊己, 臼井支朗: 神経細胞イオン電流のモデルパラメータ推定法, 電子情報通信学会論文誌 D-II, **Vol.J76-D-II**, No.5, 1047-1054(1003)



7. Sakakibara, M., Ikeno, H., Usui, S., Collin, C., and Alkon, D.L.: Reconstruction of ionic currents in a molluscan photoreceptor, *Biophys. J.*, in press
8. 池野英利, 臼井支朗・ウミウシ視細胞における古典的条件付け連合学習メカニズム・電子情報通信学会論文誌 D-II, 条件付採録

## 解説論文

1. 臼井支朗, 池野英利, 神山斉己: イオン電流機能に基づく神経ネットワークシミュレーション, 病態生理, **Vol.8**, No.4, 337-342(1989)
2. 池野英利: 生物神経細胞への工学的アプローチ, 電気学会雑誌, **Vo.110**, No.2, 140(1990)
3. 臼井支朗, 池野英利, 神山斉己, 石井宏幸: 神経回路のモデル化とシミュレーション, バイオメカニズム学会誌, **Vol.16**, No.3, 188-195(1992)

## 国際会議

1. Usui, S., Matsuda, R., Ikeno, H. and Miyachi, H. : Continuous system simulator (SIGMA) on personal computer, *JSST International Conference*, 135-141(1986)
2. Usui, S., Ikeno, H., Sakakibara, M. and Alkon, D.L. : Neural principles of associative learning : Reconstruction of ionic currents in the *Hermisenda* type B photoreceptor, *INNS First annual Meeting (Boston), Neural Networks*, **Vol.1**, Suppl.1, 280(1988)
3. Usui, S., Ikeno, H., Kamiyama, Y. and Sakakibara, M. : A spatio-temporal model of the retinal horizontal cell layer, *Proceedings of the Annural International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, **Vol.10**, Pert.3, 1490-1491(1988)
4. Sakakibara, M., Usui, S., Ikeno, H. and Alkon, D.L. : Neural principles of associative learning, *Proceedings of the Annural International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, **Vol.10**, Pert.3, 1492-1493(1988)
5. Ikeno, H., Sakakibara, M., Usui, S., and Alkon, D.L. : Reconstruction of photoreceptor responses in nudibranch mollusc, *Hermisenda Crassicornis*, based on isolated ionic currents, *Proceedings of IJCNN*, **Vol.2**, 602(1989)



6. Sakakibara, M., Ikeno, H., Usui, S. and Alkon, D.L. : Model of *Hermisenda* type-B photoreceptor response based on principal soma current, *Proceedings of The International Symposium of Vision, Memory and Temporal Lobe*, Chap.49, 421-426(1990)
7. Ikeno, H. and Usui, S. : Model analysis of associative learning in the photoreceptor of marine mollusc, *Hermisenda Crassicornis*, *International Conference on Artificial Neural Networks*, accepted

## 学会発表

### 【電気関係学会東海支部連合大会】

1. 池野英利, 村瀬一之, 臼井支朗 : 膜イオン電流に基づく水平細胞応答の再構成, 昭 59 電気関係学会東海支部連合大会, **382**, 382(1984)
2. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗 : ウミウシ視細胞における学習初期過程のイオン電流モデル, 昭 61 電気関係学会東海支部連合大会, **492**, 492(1986)
3. 榊原学, 池野英利, 臼井支朗 : ウミウシの学習における神経機構, 昭 63 電気関係学会東海支部連合大会, **553**, 553(1988)
4. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗 : 条件付け訓練のための刺激制御システム, 平成元電気関係学会東海支部連合大会, **547**, 547(1989)
5. 池野英利, 臼井支朗 : ウミウシ神経細胞における連合学習メカニズム, 平成 4 電気関係学会東海支部連合大会, **306**, 306(1992)

### 【電子情報通信学会全国大会】

1. 臼井支朗, 池野英利, 宮地寿人 : パソコンによる連続系シミュレーション, 昭 61 電子通信学会総合全国大会, **S19-8**, (7)285-(7)286(1986)
2. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗 : 条件付けによるウミウシ視細胞の特性変化, 電子情報通信学会春季全国大会, **SD-1-3**, (7)287-(7)288(1989)

### 【神経回路学会全国大会】

1. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗 : カルシウム濃度依存特性を考慮した B 型視細胞応答のモデル記述, 神経回路学会第 2 回全国大会, **P4-4**, 150-151(1991)



## 【日本神経科学学会】

1. 池野英利, 村瀬一之, 臼井支朗: 膜イオン電流とギャップ特性に基づく網膜水平細胞層の時空間モデル, 第8回神経科学学術集会, 1B05, 48(1984)
2. 榊原学, 池野英利, Alkon, D.L., 臼井支朗, 渡辺悟: ウミウシ B 型視細胞のイオン電流モデル, 第10回神経科学学術集会, (1986)
3. 池野英利, 臼井支朗:  
ウミウシ B 型視細胞における連合学習の細胞内カルシウム機構, 第16回日本神経科学学会, Neuroscience Research, 17, S293(1992)

## 【その他】

1. 池野英利, 村瀬一之, 臼井支朗: 膜イオン電流とギャップ特性を考慮した網膜水平細胞の時空間モデル, 第5回バイオメカニズム学術講演会, 2109, 129-130(1984)
2. 榊原学, 臼井支朗, 池野英利: ウミウシ連合学習のイオン電流モデル, 第66回日本生理学会大会, 2A0945-401, 119(1989)

## シンポジウム, 研究会

### 【電子情報通信学会技術報告】

1. 臼井支朗, 池野英利, 宮地寿人, 村瀬一之: 網膜水平細胞層の再構成, 電子通信学会技術報告, MBE84-86, 23-31(1985)
2. 池野英利, 宮地寿人, 重松浩一, 臼井支朗: 連続系のデジタルシミュレーション技法, 電子通信学会技術報告, MBE85-93, 103-112(1986)
3. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗: イオン電流モデルによるウミウシ B 型視細胞学習メカニズム, 電子情報通信学会技術報告, MBE87-112, 79-84(1988)
4. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗: 視覚・前庭神経干渉によるウミウシ連合学習のメカニズム, 電子情報通信学会技術報告, MBE89-126, 9-14(1990)
5. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗: ウミウシ前庭系有毛細胞応答と連合学習機構, 電子情報通信学会技術報告, NC90-90, 131-136(1991)

### 【生体・生理工学シンポジウム】



1. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗: ウミウシ視細胞における学習初期過程のイオン電流モデル, 第1回生体・生理工学シンポジウム, **1A1-4**, 25-28(1986)
2. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗: ウミウシ視細胞のイオン電流特性と学習メカニズム, 第3回生体・生理工学シンポジウム, **2B1-3**, 277-280(1988)
3. 池野英利, 神山齊己, 臼井支朗: 細胞イオン電流のモデルパラメータ推定法に関する一考察, 第6回生体・生理工学シンポジウム, **2A2-3**, 243-246(1991)
4. 池野英利, 臼井支朗: ウミウシ神経系における連合学習メカニズム, 第7回生体・生理工学シンポジウム, **1A1-4**, 27-32(1992)

### 【その他】

1. 池野英利, 臼井支朗, 榊原学: ウミウシ視細胞における学習初期過程のイオン電流モデル, 第8回神経情報科学研究会 (1986)

## 紀要等

1. 池野英利: 連続系シミュレーションシステム:CS2 の使用法, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.16**, 66-73(1988)
2. 大槻秀樹, 池野英利: 連続系シミュレーションシステム:CS2, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.17**, 69-80(1989)
3. 池野英利, 大崎達也: データ解析とモデルシミュレーションのためのシステム環境, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.18**, 59-68(1990)



## 一般研究業績目録

### 著書

1. 山田, 幸則, 中川, 幸三, 森田, 康雄, 佐野, 伊郎, 市丸, 肇三, 田中, 孝雄: なまほどわかる片  
—大衆—, 育出版 (1985)
2. 白井文朗, 佐野英利: 演算機と人間の思考形態—半信半疑, 生体信号—人間の  
思考の過程—, 6, 2, コロナ社, 112-122 (1989)
3. 白井文朗 (監訳), 佐野英利 (訳): 心によるグラフィックス技法, オーム社 (1991)  
(Annotated), L. Programming principles in computer graphics, John Wiley & Sons  
(1986)

### 学会発表

#### 【情報処理学会東海支部連合大会】

1. 山田幸一, 佐野英利, 白井文朗: ガラチア星団における星域とそのパターナイズ, 第37  
号3 (情報処理学会東海支部連合大会, 419, 422 (1992))
2. 白井文朗, 佐野英利, 中野哲郎, 安部幸次: SPICEY の可視化技術と動画像プログラム  
—CAPS—, 第64号 (情報処理学会東海支部連合大会, 392, 396 (1991))
3. 白井文朗, 佐野英利, 山田幸一: 人間の思考形態と生体信号—生体信号システムシミュレータの構築  
—, 第61号 (情報処理学会東海支部連合大会, 512, 519 (1990))

#### 【電子情報通信学会全国大会】

1. 白井文朗, 佐野英利, 山田幸一: 演算機から見た人工知能の基本構造, 第59号 (電子  
情報学会全国大会, 2767, (7)149-(7)149-3 (1984))



## 一般研究業績目録

### 著書

1. 山根, 池野, 中川, 高谷, 添田, 前野, 北原, 伊藤, 竹内, 柴田, 田中: なるほど!!わかる!! 一太郎, 森北出版 (1986)
2. 臼井支朗, 池野英利: 網膜神経細胞応答の非線形・非定常解析, 生体信号 - 計測と解析の実際 -, 6.2, コロナ社, 112-122(1989)
3. 臼井支朗 (監訳), 池野英利 (訳): C によるグラフィックス技法, オーム社 (1993) (Ammeraal, L., Programming princiles in computer graphics, John Wiley & Sons (1986))

### 学会発表

#### 【電気関係学会東海支部連合大会】

1. 猿山秀一, 池野英利, 臼井支朗: ボルテラ展開における基底とそのパラメータ, 昭 57 電気関係学会東海支部連合大会, **419**, 419(1982)
2. 臼井支朗, 池野英利, 中村哲郎, 安田幸夫: SPICE2 の回路接続自動解析プログラム: CAPS, 昭 58 電気関係学会東海支部連合大会, **399**, 399(1983)
3. 臼井支朗, 池野英利, 神山斉己, 上村千幸: 神経生理システムシミュレータの開発, 昭 61 電気関係学会東海支部連合大会, **512**, 512(1986)

#### 【電子情報通信学会全国大会】

1. 臼井支朗, 江角浩二, 池野英利: 網膜生理から見た人工網膜の基本構造, 昭 59 電子通信学会総合全国大会, **2767**, (7)148-(7)148-2(1984)



2. 臼井支朗, 榊原学, 池野英利, 神山齐己, 安西昭之: 神経回路シミュレータの開発, 電子情報通信学会創立 70 周年記念総合全国大会, **1532**, (6)210(1987)

### 【神経回路学会全国大会】

1. 池野英利, 榊原学, 臼井支朗: 連合学習則を用いたパターン分類・認識ニューラルネットワーク, 神経回路学会第 1 回全国大会, **P2-8**(1990)

### 【高専情報処理教育研究協議会研究発表会】

1. 山根敏, 池野英利, 中川重康: ネットワークを用いた情報教育システム, 高専情報処理教育研究協議会研究発表会, **Vol.8**, 7-10(1988)
2. 池野英利, 山根敏, 一色弘三: 電気工学科計算機システムの情報教育への活用, 高専情報処理教育研究協議会研究発表会, **Vol.9**, 132-135(1989)
3. 池野英利, 仲川真次, 片又貴博: 統一的グラフィックスプログラミング環境の実現, 高専情報処理教育研究協議会研究発表会, **Vol.10**, 180-183(1990)
4. 北原紀之, 中川重康, 池野英利, 山根敏, 一色弘三, 高谷富也, 野瀬佳正: COSMOS システムの概要, 高専情報処理教育研究協議会研究発表会, **Vol.10**, 1-4(1990)
5. 一色弘三, 池野英利, 中川重康, 山根敏, 北原紀之: 電気工学科における情報教育 - 系統的なカリキュラムとその運用 -, 高専情報処理教育研究協議会研究発表会, **Vol.10**, 52-55(1990)
6. 山根敏, 一色弘三, 池野英利, 中川重康, 北原紀之: 電気工学科における情報処理教育 - 低学年における授業と実験内容 -, 高専情報処理教育研究協議会研究発表会, **Vol.11**, 70-73(1991)

### 【その他】

1. 臼井支朗, 池野英利, 中村哲郎: SPICE2 の会話形回路図入力化の試み, 情報処理学会第 27 回全国大会, **2L-6**, 1411-1422(1983)
2. 臼井支朗, 池野英利, 御手洗玄洋: 鯉網膜外網状層の時空間機構と人工網膜, 第 23 回日本 ME 学会大会, **6-1-7**, 502-503(1984)
3. 中川重康, 池野英利, 柴田和作, 北原紀之: 学生実験における新しい試み, 昭和 61 電気学会全国大会, **2,2**(1986)



## シンポジウム, 研究会

### 【電子情報通信学会技術報告】

1. 臼井支朗, 江角浩二, 池野英利, 八木哲也, 御手洗玄洋: 網膜 L 型水平細胞層の構造と空間特性, 電子通信学会技術報告, **MBE83-102**, 97-102(1984)

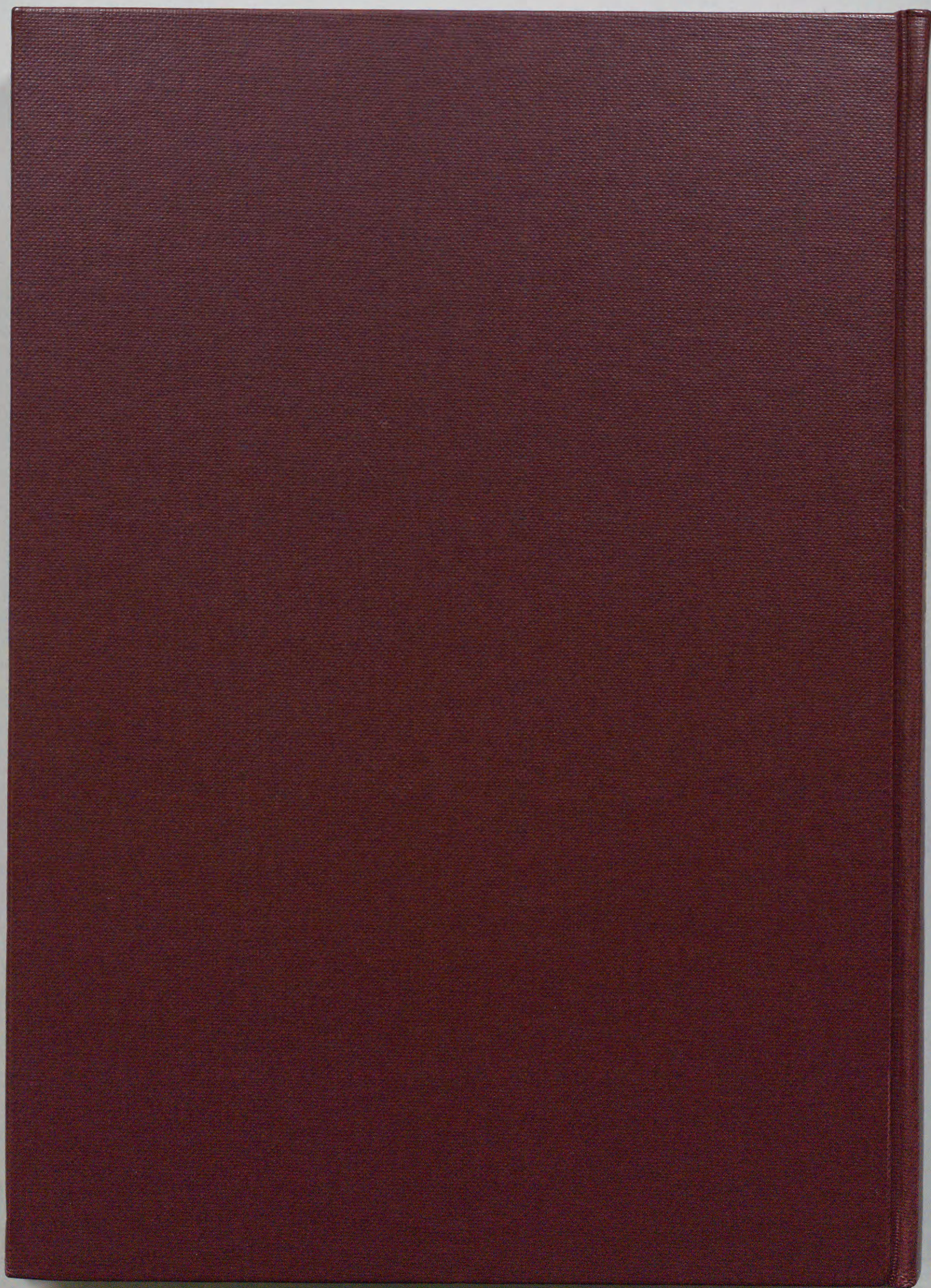
## 紀要等

1. 柴田和作, 北原紀之, 中川重康, 池野英利: 電気工学実験における新しい試み, 高専教育, **Vol.9**, 49-52(1986)
2. 岡林泰広, 池野英利: 技術計算用グラフィックスインターフェース:MGL98, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.13**, 60-62(1986)
3. 池野英利: MS-Network におけるメール転送ユーティリティ:Mailman, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.17**, 57-68(1989)
4. 柴田勉, 池野英利: レーザプリンタグラフィックス出力ライブラリ, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.17**, 81-85(1989)
5. 人見繁, 池野英利: ニューラルネットワークの学習アルゴリズム, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.17**, 86-91(1989)
6. 前川晃伸, 池野英利: オブジェクト指向言語によるシミュレーションプログラム, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.18**, 69-73(1990)
7. 大崎達也, 仲川真次, 池野英利: デジタルフィルタシミュレーションシステムの開発, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.18**, 74-79(1990)
8. 木村文信, 池野英利: 神経回路の論理演算特性, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.18**, 80-83 (1990)
9. 片又貴博, 衣川敏郎, 池野英利: COSMOS におけるグラフィックスライブラリ, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.19**, 173-183(1991)
10. 池野英利, 衣川敏郎, 片又貴博: C++によるオブジェクト指向プログラミング, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, **Vol.19**, 54-77(1991)

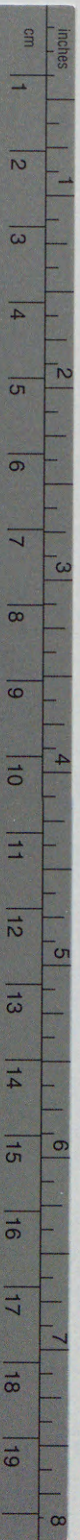


11. 衣川敏郎, 片又貴博, 池野英利: COSMOS への招待, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, Vol.19, 162-172(1991)
12. 池野英利, 仲川真次, 片又貴博: ネットワークコンピューティング環境におけるグラフ作成システム, 舞鶴工業高等専門学校・紀要, Vol.26, 43-48(1991)
13. 池野英利, 片又貴博, 衣川敏郎: カメラ画像に基づく多面体ワイヤースケッチモデル構築システム, 舞鶴工業高等専門学校・紀要, Vol.27, 29-32(1992)
14. 衣川敏郎, 池野英利, 三輪浩: 流体力学的水理現象の計測・データ処理システムの開発, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, Vol.20, 72-77(1992)
15. 芦田宏之, 畑中諭志, 池野英利: 似顔絵作成システム「画匠」, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, Vol.20, 78-83(1992)
16. 芦田宏之, 畑中諭志, 池野英利: グラフ作成システム LaGraph の開発, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, Vol.20, 79-95(1992)
17. 今江功次郎, 池野英利: COSMOS における Fortran77 グラフィックスライブラリ, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, Vol.20, 96-103(1992)
18. 阪谷信幸, 山口順也, 今江功次郎, 池野英利: コンピュータ制御によるスロットレーシングゲーム, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, Vol.20, 104-109(1992)
19. 片又貴博, 池野英利: 技術論文用図ソフトウェア CoDraw の紹介, 情報処理教育と研究の現状, 舞鶴高専, Vol.20, 110-117(1992)





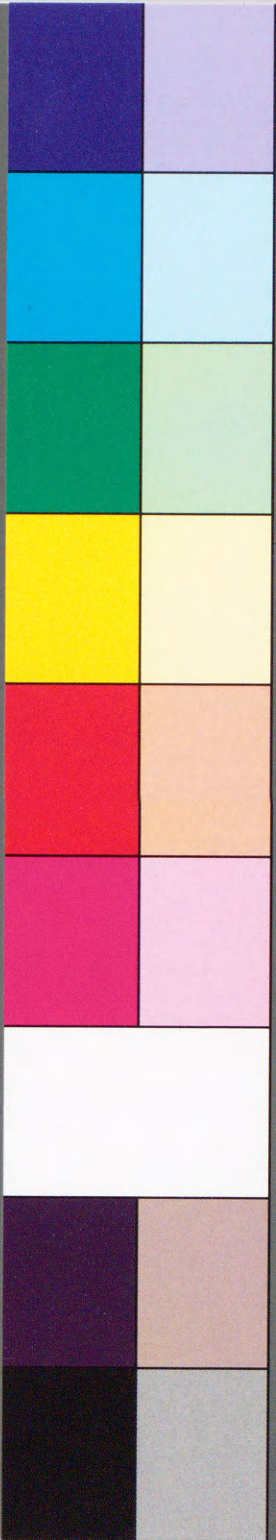




# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

