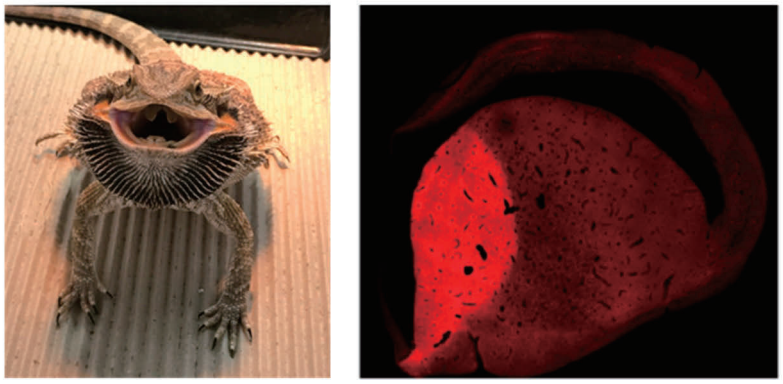
136　爬虫類前障の機能究明	乗本　裕明

【目的】本研究の目的は睡眠・覚醒における「前障（claustrum）」の役割解明である。哺乳類の脳領域である前障は全ての大脳皮質領野と相互投射を有していることから意識や記憶、感覚情報の統合など、高次な機能を担う脳領域であると推測されている。多くの脳疾患に関与しているとの報告もある。しかしながらその機能は謎に包まれたままである。その理由の一つに、前障の薄いシート状の構造のために、電気生理学的な記録が難しいことが挙げられる。研究代表者らはオーストラリアドラゴン（*Pogona vitticeps*）の脳において前障を発見した（Norimoto et al., Nature, 2020）。ドラゴンの前障は遺伝子発現、神経接続パターンともに哺乳類の前障に酷似していた。大きな違いはその形状である。ドラゴンの前障は楕円形で厚みのある構造をしており、神経活動の記録を行いやすい。この利点を生かすことで、哺乳類に先駆けて前障の役割を明らかにできる可能性が高い。そこで本研究では、睡眠・覚醒時における前障の神経活動を観察・解析し、その役割を明らかにすることを目指した。
【方法】*ex vivo* 脳標本を作製し、薬理学的手法で睡眠・覚醒様状態を再現した。その際の神経活動を観察することで、前障の睡眠・覚醒時脳波における必要性を検証した。
【結果】前障から自発的に徐波を発生する *ex vivo* 標本に、覚醒誘導作用があることが知られるセロトニン（5-HT）を還流適用したところ、覚醒様の脳波を観察することに成功した。この覚醒様脳波は前障よりもはるか後側にある脳領域である、後背側脳室隆起（pDVR）から発生し、前障へと伝播しているように見えた。そこで、pDVR のみからなる小さな切片を作製し、この欠片にセロトニンを適用したところ、覚醒様脳波が観察された。つまり、セロトニン誘導脳波の発生源が後背側 DVR であることが明らかになった。

ドラゴン（*Pogona vitticeps*）とその前障（右）



136. 爬虫類前障の機能究明

乗本　裕明

北海道大学 大学院医学研究院

Key words：前障，睡眠，覚醒，非モデル動物，局所場電位

緒　言

本研究の目的は睡眠・覚醒における「前障（claustrum）」の役割解明である。

哺乳類の脳領域である前障は全ての大脳皮質領野と相互投射を有していることから意識や記憶、感覚情報の統合など、高次な機能を担う脳領域であると推測されている。多くの脳疾患に関与しているとの報告もある。しかしながらその機能は謎に包まれたままである。その理由の一つに、前障の薄いシート状の構造のために、電気生理学的な記録が難しいことが挙げられる。

研究代表者はオーストラリアドラゴン（*Pogona vitticeps*, 以下ドラゴン）（図 1）を用いて睡眠の研究を進めてきた。なぜならば、

1. ドラゴンも哺乳類と同様、レム睡眠およびノンレム睡眠をとる［1］。
2. ドラゴンは全脳を摘出し、“培養”することが可能である（図 1）。
3. 眼球や鼻などの感覚器官が接続された状態で脳を摘出することが可能である。

といった強力な長所を有するためである。

これまでの検討で、研究代表者はドラゴンにおいて前障のホモログを発見した［2］。ドラゴンの前障は遺伝子発現、神経接続パターンともに哺乳類の前障に酷似していた。大きな違いはその形状である。ドラゴンの前障は楕円形で厚みのある構造をしており、神経活動の記録を行いやすい（図 1）。この利点を生かすことで、哺乳類に先駆けて前障の役割を明らかにできる可能性が高い。そこで本研究では、睡眠・覚醒時における前障の神経活動を観察・解析し、その役割を明らかにすることを目指した。

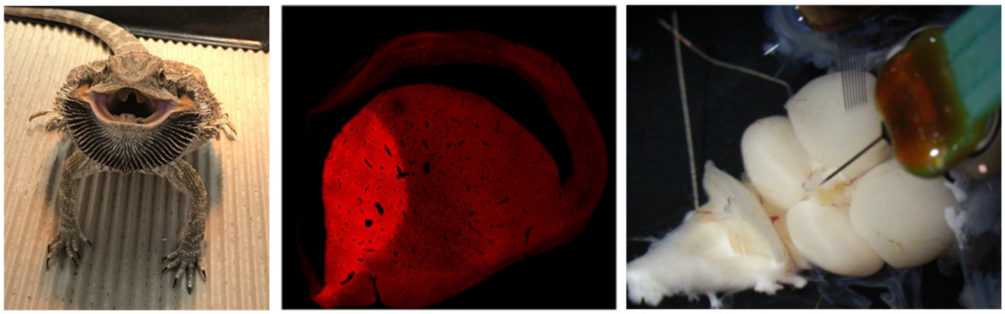


図 1. ドラゴン（左）、ドラゴンの前障（中）、全脳 *ex vivo* 標本（右）

方　法

1. *ex vivo* 標本を用いた睡眠・覚醒時脳波の起源の探索

研究代表者のこれまでの研究において、ドラゴンから全脳を摘出し、生きたまま“培養”することに成功している［2］。摘出したドラゴンの脳は神経活動的には睡眠状態であったため、本研究では薬理学的に覚醒状態を誘導することを試みた。ドラゴンの覚醒時には 8～30 Hz の周波数成分のパワーが増加することが知られているため、

これを脳状態変化の指標とした。

薬物としては、睡眠時に脳内濃度が低く、覚醒時に高いことが知られており、さらには覚醒誘導作用があることの知られるセロトニン（5-HT）を還流適用した。

結果および考察

1. セロトニン適用による覚醒時脳波の誘導

睡眠時に脳内濃度が低く、覚醒時に高いことが知られており、さらには覚醒誘導作用があることが知られるセロトニン（5-HT）を全脳 *ex vivo* 標本に還流適用したところ、覚醒様の脳波を観察することに成功した（図2）。一過的ではあるが再現性高く覚醒時脳波が観察されたため、その発生源となる神経回路を同定すれば安定した覚醒誘導を行うためのヒントが得られるのではと考え、2 以降の実験を行った。

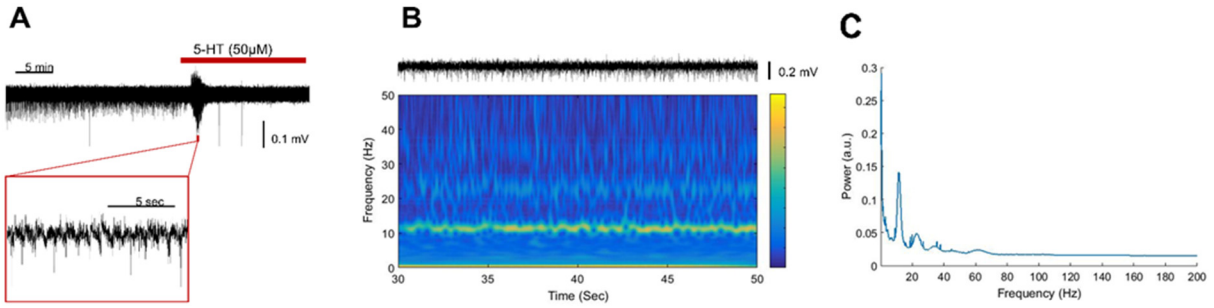


図 2. 全脳摘出標本で誘導された覚醒様脳波

A）脳表に配置したガラス電極から記録した脳波。セロトニン（5-HT）の適用により覚醒様脳波が誘導された。

B、C）セロトニン適用時の脳波に対しウェーブレット変換を行った。10～30 Hz の周波数帯域の活動が増強していることがわかる。

2. 覚醒様脳波の発生源の検討

セロトニンによる覚醒様脳波の誘導作用がどの脳領域へ作用した結果であるかを調べるために、摘出全脳標本を各脳領域に切り分け、多電極アレイの上に配置することで神経活動のスクリーニングを行った。その結果、前障を含む背側脳室隆起（dorsal ventricular ridge：DVR）全体がセロトニンの適用によって 20 Hz 振動を発することを発見した（図 3）。DVR は爬虫類の前脳の大部分を占める脳領域である。

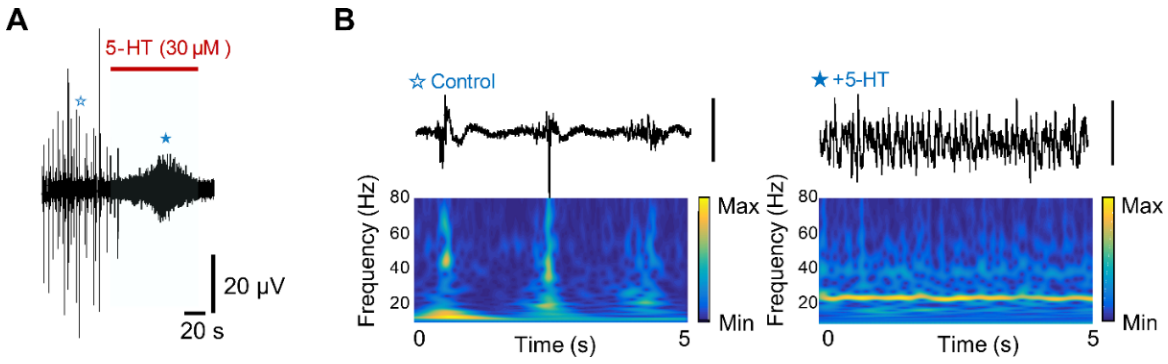


図 3. DVR 標本で誘導された覚醒様脳波

A） セロトニン（5-HT）の適用により DVR の活動状態の切替えが観察された。

B） セロトニン適用前は徐波睡眠様脳波が 1～2 秒おきに観察された（左）。セロトニン適用により、20 Hz の振動が誘導された（右）。Scale bar：20 μV。

3. セロトニン誘導脳波は pDVR から発生し前障へと伝播する

DVR はいくつかの亜領域に分けられる。例えば、前内側の DVR は哺乳類の前障（claustrum：Cla）のホモログであることが知られており、また、ここから徐波睡眠時脳波が生まれることが分かっている。一方で、後背側の DVR の役割についてはまだ明確になっていない。研究代表者はこの DVR 内のどこから覚醒時脳波が生まれるかを検証した（図 4）。

DVR から 700 μm 厚の水平方向切片を作製し、多電極アレイの上に配置した。すると、前内側 DVR から徐波睡眠が発生し、後方へと伝播する様子が確認できた。次に、セロトニンを適用したところ、前内側 DVR で徐波睡眠様脳波が抑制され、後背側 DVR から 20 Hz 振動が生まれる様子を観察することに成功した。この 20 Hz 脳波は前方まで伝播していた。後背側 DVR が起源となる脳波が観察されるのはこれが初である。後背側 DVR は哺乳類の扁桃体という脳部位と相同性が高いことが知られている。

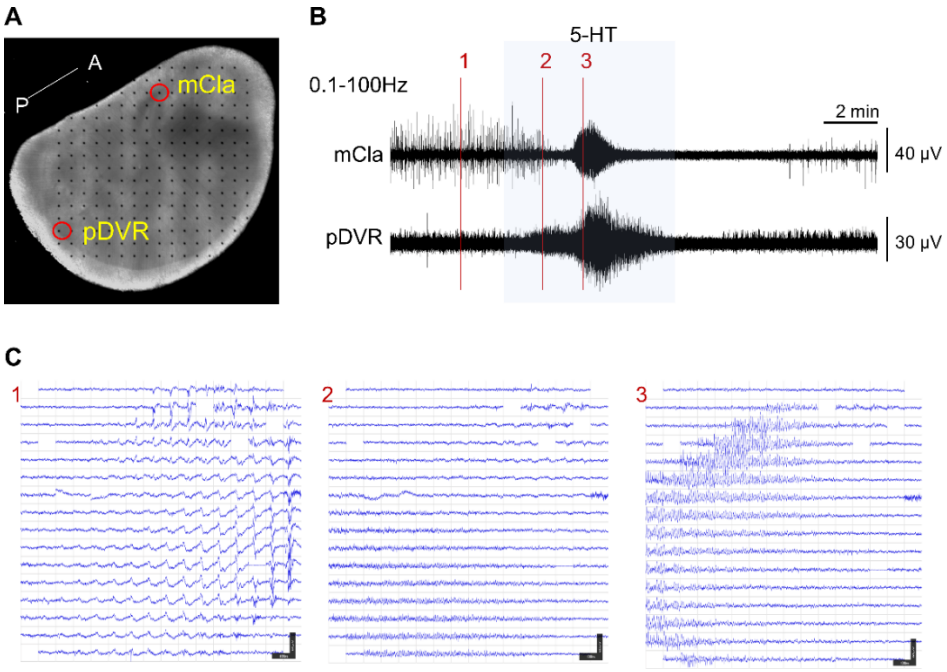


図 4. 前内側 DVR 標本で誘導された覚醒様脳波

A) 水平方向の DVR 切片を多電極アレイの上に配置した。A：anterior、P：posterior、mCla：medial claustrum（前内側 DVR と同義）、pDVR：posterior DVR。

B) セロトニンの適用による一過的な活動変化が生じ、これは washout することにより元に戻った。

C) B の各タイムポイントにおける DVR 全体の神経活動をプロットした。1 のタイムポイントでは mCla（前内側 DVR）を起源とする徐波が、2、3 では pDVR（後背側 DVR）を起源とする 20 Hz 振動が観察された。Scale bar：x 軸 1 s、y 軸 60 μV。

4. セロトニン誘導脳波の発生に前障は必要ではない

覚醒様脳波の発生に前内側 DVR が必要であるかどうかを確かめるために、DVR 標本から前内側 DVR のみを切除し、再度局所場電位の記録を行った。すると、標本から徐波睡眠様の脳波が消えた一方で、セロトニン誘導性の覚醒様脳波は観察された。この結果は、前内側 DVR がセロトニンによる覚醒様脳波に必要ではないことを意味している。

5. pDVR の小切片はセロトニン誘導性脳波の発生に十分

最後に、後背側 DVR のみからなる小さな切片を作製した。この欠片にセロトニンを適用したところ、覚醒様脳波が観察された。つまり、セロトニン誘導脳波の発生源が後背側 DVR であることが明らかになった。

本研究を通じて、前障は徐波睡眠様の脳波を生じるが、セロトニン誘導性脳波の発生源ではなく、受け手であることが明らかになった。今後の課題は一過的ではなく、継続して摘出脳に覚醒状態を観察できるような条件の確立、およびレム睡眠状態を誘導し、その際の前障の活動を観察することである。それを実現するためには前障や pDVR の活動操作および上流ネットワークからの投射を精査する必要がある。これらを調べるための準備はすでにできているので、継続して研究を進めていきたい。

文　献

1） Shein-Idelson M, Ondracek JM, Liaw HP, Reiter S, Laurent G. Slow waves, sharp waves, ripples, and REM in sleeping dragons. Science. 2016 Apr 29;352(6285):590-5. PMID: 27126045 DOI: 10.1126/science.aaf3621

2） Norimoto H, Fenk, LA, Li H, Tosches MA, Flores TG, Hain D, Reiter S, Kobayashi R, Macias A, Arends A, Klinkmann M, Laurent G. A claustrum in reptiles and its role in slow wave sleep. Nature. Feb;578(7795):413-418. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32051589 DOI: 10.1038/s41586-020-1993-6.