

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」

研究課題「幼児脳の発達過程における
学習の性質とその重要性の解明」

研究終了報告書

研究期間 平成 15 年 10 月～平成 21 年 3 月

研究代表者：杉田 陽一
((独)産業技術総合研究所、研究グループ長)

§ 1 研究実施の概要

1. 研究の背景とねらい

幼児期に極めて多くのことが学習されていることは疑いようがない。また、記憶と深く関わっていると考えられる REM 睡眠も、幼児期には、かなりの割合で出現することが知られている。ところが、成人期になると、幼児期に学習した事柄は断片すら思い出せない。この経験的事実は、幼児期における学習と成人期の学習に大きな質的相違があることを示唆している。本研究グループの目標は、幼児期における学習の性質およびその重要性の神経科学的基盤を明らかにすることである。

本研究グループは、逆転視野への順応に視覚系の変化が伴うことを始めて明らかにし(Sugita, Nature 1996)、以来、欧米でも再び逆転視野への順応実験が活発に行われるようになり、視空間無視などの症例の改善(リハビリテーション)に応用する試みも行われている。また、手前にある障害物で一部分が隠された目標物体の見えない部分が補完されて知覚されること、そして、この補完が視覚情報処理の最初の段階である第一次視覚野で既に行われていることを明らかにした(Sugita, Nature 1999)。さらに、音源からの距離による音の時間遅れを計算に入れて視聴覚間相互作用が行われていることも明らかにしてきた(Sugita & Suzuki, Nature 2003)。少なくとも脳機能が劇的に変化する時期に特殊な視覚体験を行わせるので、成人よりも柔軟な可塑的变化が認められ、神経結合の変化もより容易に捕らえることが可能であろうと予測される。幼児期に特殊な視覚体験をさせる実験は、視覚情報処理の最初の段階(第一次視覚野)を対象として盛んに行われていたが、それ以降の処理の段階にまで切り込んだ研究はなされていない。今回の研究では、第一次視覚野の細胞を駆動する全ての視覚刺激を与え、高次領野の変化を検討する。また、霊長類以上の高等動物で初めて可能になる左右逆転視への順応実験は、成人したヒトやサルに短期間左右逆転鏡を装着させていて、脳機能が最も劇的に変化する幼児期に装着させた例は皆無である。このような感覚系の高次な機能が獲得されていく経過を明らかにすることは、生得説と経験説という古くからの問題に対する科学的な解を与えるだけでなく、幼児期と成人期の学習様式の相違及びその脳内メカニズムを明らかにすることに繋がると期待される。

2. 成果概要

- (1) **色彩を見た経験がない動物の「色」の認識**: 第4次視覚野の色感受性細胞が、光の波長成分に関わらず見えの色に対して応答することは良く知られている。生まれてからずっと無彩色の世界で育った動物は、「色」をどのように認識するのだろうか。また、第4次視覚野の特別な神経細胞はどのように動作するのだろうか、この問題を明らかにするために、生まれてから数年間、単色光だけで照明された環境でニホンザルを育てた。この数年間の間、網膜

に入射する光が、網膜の全ての光受容細胞を賦活するように配慮した。この後に、様々な視覚刺激に対する見本合わせ課題や類似性判断を行い、「色」をどのように認識しているのか心理学的方法を用いて検討した結果、単色光サルは、光の波長成分の違いを弁別することはできたが、「色の恒常性」に重篤な障害を持っていることが明らかになった。

正常サルを麻酔非動化して第1次視覚野から単一細胞活動記録を行った結果、方位選択性細胞の多くがマンセル表色系に対して選択性を持ち、照明光の波長成分を大きく変えても選択性が変わらない細胞が数多く存在していることを明らかにした。これに対して、単色光サルでは、マンセル表色系に対して選択性を持つ細胞が極めて少なく、さらに照明光の波長成分を変えると選択性も変化した。

以上の結果は、「色の恒常性」にも感受性期が存在していること、第一次視覚野の方位選択性細胞も「色の恒常性」に深く関わっていることを示している。

- (2) **左右逆転視野への順応**： 外科的手術によって視覚入力が逆転するようにさせられたハエやカエルやネコは、視野の逆転に適応できないが、ヒトやサルは逆転眼鏡装着による視野の逆転に対して、40日程度の期間を経て円滑な行動の回復とともに順応した視空間認識を達成できる。生後6か月のニホンザルに逆転鏡を装着したところ、驚くべきことに、装着した初日から活発に動き始め7日程度で順応が達成された。これらのサルに、1歳になった時と2歳になった時に再び逆転鏡を装着すると、再び7日間程度の期間で順応した。生後1年経過したサルに逆転鏡を装着しても、順応には40日程度の期間を要した。また、1歳半になった時と2歳になった時に再び逆転鏡を装着しても、以前に順応した効果が認められず、40日程度の期間を経てようやく順応が達成された。以上の結果は、視覚-運動協応にも、明瞭な感受性期が存在していることを示している。

- (3) **「動き」を検出する神経回路の発達**： 生まれて間もないサルを、1年間、ストロボ光の照明だけで飼育し、なめらかな動きを知覚できないようにして育てた。これらストロボ光で育ったサルの視覚を検査したところ、点滅光の知覚は正常サルと変わらない成績が得られたが、運動視に障害があることが明らかになった。ストロボ光サルは、静止しているものと動いているものの区別は可能だったが、動きの速度あるいは方向の判断をさせると、正常サルと比べて極めて劣った成績しか得られなかった。fMRIによって脳活動を測定すると、グレーティングやランダムドットを動かしてもMT野の応答が全く見られなかった。ところが、チェッカーボードパターンを点滅させると、MT野が強く応答した。この結果は、1年間、ストロボ光の照明だけで飼育したことによって、MT野の応答特性が大きく変化したことを示している。

ストロボ光サルに動きを手がかりにした形の判断(たとえば、棒が見えない4角形の枠内にあるランダムドットを枠外のドットが異なった方向に動いていると、4角形が明瞭に知覚される)をさせると、運動視に重篤な障害があるにも関わらず、正常サルと全く変わらない成績が得られ

た。視野の動きが複数の経路で処理されていて、動きを見えないように育てることで影響を強く受ける経路と影響をあまり受けない経路が存在している可能性を示唆している。

以上の結果は、「動き」の知覚にも感受性期が存在していることを示している。

- (4) **顔など複雑な図形知覚の発達：** 生後まもないサルを、親から離して「顔」を見せずに育てた。生後 16 日目には、正常な成人サルが示す表情を全て表出させた。これらの表情は、文脈と無関係に無作為に表出させるのではなく、授乳者を呼ぶとき、飲んでいいるミルクを取り上げられえるとき、驚いたときなどに応じて、正常サルと同じ表情を表出させた。「顔」を見せずに長期間(1年以上)育てても、適切な場面で適切な表情を表出させることが出来た。

選択的注視法を用いて、これら「顔」を見せずに育てたサルが、「顔」をどのように知覚するかを調べた。生まれてから1度も「顔」を見ていないにも関わらず、サルの顔に対する成績には正常サルとの違いが全く認められなかった。さらに、ヒトの顔に対する成績は、正常サルよりも正確に判断できることが明らかになった。ところが、ひとたびヒトもしくはサルの顔を見ると、見たことがある種の顔の相違は弁別できるが、他方の顔の相違を見分けることが困難になった。

以上の結果は、「表情」の表出が生得的に備わっていること、また、複雑図形としての「顔」と「表情」の知覚には初期経験が不要であること、さらに顔の知覚にも明瞭な感受性期が存在していることを示している。

§ 2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

脳機能が最も劇的に変化する幼児期に特殊な視覚体験をさせて、その後の発達経過を心理学的方法で検討すると同時に、正常に育てた実験動物にも同じ実験を行うことで視覚体験の効果を明らかにする。また、単一細胞活動記録および組織学的方法で線維投射様式を明らかにすることで、視覚体験の効果を生理心理学的に明らかにする。

(1) **色彩を見た経験がない動物の「色」の認識：** 第4次視覚野の色感受性細胞が、光の波長成分に関わらず見えの色に対して応答することは良く知られている。生まれてからずっと無彩色の世界で育った動物は、「色」をどのように認識するのだろうか。また、第4次視覚野の特別な神経細胞はどのように動作するのだろうか、この問題を明らかにするために、生まれてから数年間、単色光だけで照明された環境で動物(マカク属サル)を育てる。この数年間の間、網膜に入射する光が、網膜の全ての光受容細胞を賦活するように配慮する。この後に、様々な視覚刺激に対する見本合わせ課題や類似性判断を行い、「色」をどのように認識しているのか心理学的方法を用いて検討する。また、麻酔非動化して第1次視覚野と第4次視覚野の細胞の「色」に対する応答を記録す

る。

(2)網膜像の左右が逆転している動物の視空間認識： 外科的手術によって視覚入力が逆転するようにさせられたハエやカエルやネコは、視野の逆転に適応することが困難であるが、ヒトやサルは逆転眼鏡装着による視野の逆転に適応することができ、円滑な行動の回復とともに順応した視空間認識を達成する。研究代表者も、成人したヒトやサルに左右逆転眼鏡を数ヶ月装着させる実験をおこない、適応の経過を明らかにするとともに、この可塑性に視覚系の機能変化が伴うことを示してきた(Sugita, 1996)。また、Sekiyama et al.(2000) は、ヒトに左右逆転眼鏡を約 40 日間装着させる実験をおこない、手に関する視覚と体性感覚の関係が変化することを示している。では、生まれながら網膜像が通常とは左右逆転しているサルを育てたなら、サルはどのような視空間認識を示すのだろうか。脳機能が最も劇的に変化する幼児期に網膜像を逆転させるので、少なくとも、成人したヒトやサルよりも柔軟な順応を達成するのは間違いない。さらに、もし網膜の各部位と身体各部位との対応関係が経験によって如何様にも変更可能であれば、このサルは通常のサルと変わることはない視空間認識を達成すると考えられる。この点を心理学的に確認すると共に、可塑性に関わる脳の部位から単一細胞活動を記録し、その回路網の同定を試みる。

サルでの実験の予備実験として、まずヒトに左右反転眼鏡を 40 日間程度連続着用させる実験をおこない、行動実験および fMRI による脳計測で可塑的な変化に関わる脳の部位を推定する。この結果を踏まえて、上述のサルの実験を行う。

(3)滑らかな動きを見たことがない動物の動きの知覚： 生まれて間もないサルを、1 年間、ストロボ光の照明だけで飼育し、なめらかな動きを知覚できないようにして育てる。これらストロボ光で育ったサルの視覚機能、とくに動きの知覚について行動学的に検討する。

(4)顔を見た経験がない動物の「顔」や「表情」の認識： 顔・表情に特異的に応答する細胞が下側頭葉にまとまって存在することが知られている(Sugase et al., 1999)。これらの細胞の存在や相貌失認・物体失認などの症例から、顔の認識のための特別な神経回路の存在が示唆されている。では、生まれてから一度も「顔」を見たことがない動物は、「顔」を特別な視覚刺激として認識できるのだろうか。また、下側頭葉の特別な神経回路はどのように動作するのだろうか、この問題を明らかにするために、生まれてから数年間、全く「顔」を見たことがない動物(マカク属サル)を育てる。この数年間の間、視覚情報処理の最初の段階である第一次視覚野の全ての細胞が活動できるように、「顔」以外の豊富な視覚刺激を与えつづける。その後、様々な視覚刺激に対する動物自身の表情を観察すると共に、「顔」や「表情」をどのように認識しているのか心理学的方法を用いて検討する。また、痲酔非動化して下側頭葉神経細胞の「顔」や「表情」に対する応答を記録する。

(5)高次視覚機能の解剖学的検討： (1)～(4)で行った実験結果に基づいて、初期経験の効果による障害に組織学的な変化が伴っているか否かを明らかにする。

(2) 実施体制

グループ名	研究代表者又は主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
システム脳科学グループ	杉田陽一	産業技術総合研究所、研究グループ長	視覚機能の行動学的研究と神経生理学的研究
神経解剖研究グループ	端川 勉	理化学研究所脳科学総合研究センター、ユニットリーダー	皮質構築の組織学的研究

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 高次視覚機能獲得過程に関する行動科学・神経科学的研究(産業技術総合研究所、システム脳科学研究グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本研究のねらいのひとつは、脳機能が最も劇的に変化する幼児期に特殊な視覚体験をさせて、その後の発達経過を行動科学的方法で検討し、さらに大脳皮質の働きを単一細胞活動記録法で測定し線維投射様式を組織学的方法で描記することによって、幼児期と成人期における学習の性質の相違を科学的に明らかにすることである。一方、大脳皮質において視覚情報が逐次処理されていく様子は、かなり明らかにされてきている。しかし、行動学的(心理学的)に明らかにされた主観的知覚と神経科学の知見には、未だ大きな隔たりがあるのも事実である。たとえば、単一細胞活動記録法やfMRI法(機能的磁気共鳴画像法)による研究結果は、運動残効にMT野の活動が深く関わっていることを示している。しかし、心理学的な方法によれば、順応させる運動によっては、運動残効が両眼間で転移しないこと、すなわち、V1野の活動が運動残効に関わっていることを示す実験結果も数多く得られている。また、光の波長成分に対する選択性は、網膜から外側膝状体、V1野を経て下側頭葉に至る視覚経路で良く調べられているものの、物体の色がどのようにして知覚されるかは未だ明らかになっていない。運動盲あるいは色覚異常の動物を実験的に作り出し、視覚領野の機能変化を丹念に調べ上げることによって、色を創り出す神経回路あるいは動きを知覚する神経回路に必要な部位と細胞の応答特性を明らかにしようと試みた。

色を創り出す神経回路の発達： 生まれて間もないサルを、1年間、単色光の照明だけで飼育し、色を認識できないようにして育てた。このとき、網膜にある3種類の色受容細胞(錘状体)を全て賦活(活性化)できるように、単色光の波長を1分間毎に赤・緑・青

に変化させた。その後、これら単色光で育ったサル色彩感覚を検査したところ、色の類似性判断と恒常性に障害があることが明らかになった。単色光サルは、見本の色と同じ色の対象物を選ぶという見本合わせの課題では、長い訓練によって正常サルと同じ成績が得られるようになったが、見本の色によく似た対象物を選ぶという類似性判断の課題では、正常サルとは極めて異なった結果が得られた。この結果は、単色光サルが、正常サルとは異質な方法で色を分類していることを示している。さらに、いくつかの色の中から一つの色を選択するという課題の結果は、照明条件によって大きく変化し、単色光サルに「色の恒常性」が備わっていないことが明らかになった。これは、「色彩感覚」が生得的なものではなく、経験によって獲得されることを示している。

一方、「色の恒常性」には、色の同時対比（周辺を赤で囲まれると緑っぽく見え、逆に緑で囲まれると赤っぽく見える現象）が重要な役割を果たしていると考えられてきた。ところが、恒常性を失った単色光サルにも、色の同時対比が正常サルと全く同じように存在していることが明らかになった。この結果は、「色の恒常性」には、中心周辺拮抗機構のような局所的な対比だけでは不十分であることを示している。

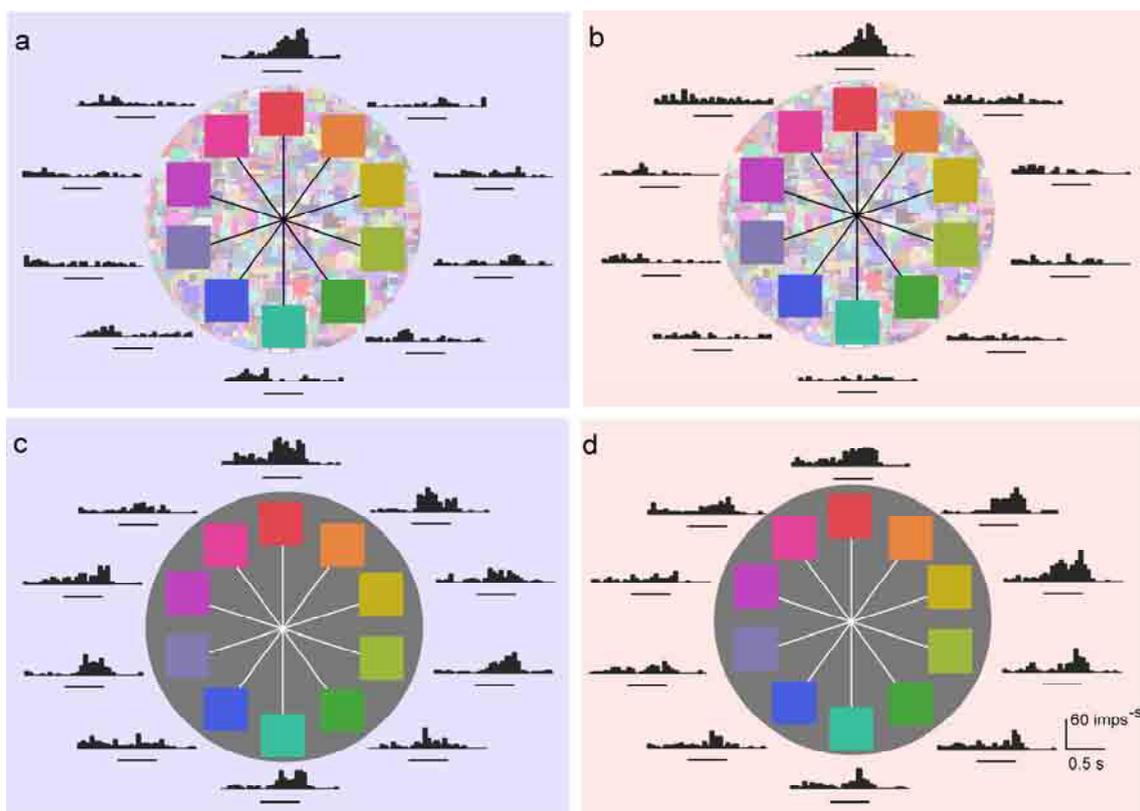


図1. V1 方位選択性細胞の応答。正常サルの V1 細胞の白色光照明下での応答 (a) と白色光照明下で R5 (赤) が反射した光の波長成分と全く同じ波長成分の光を Y5 (黄) が反射するように、照明条件を変えた時の応答 (b)。この細胞のマンセル紙に対する選択性は、照明光の波長成分を変えても変化しなかった。もう一つの V1 細胞の白色光照明下での応答 (c) と白色光照明下で R5 (赤) が反射した光の波

長成分と全く同じ波長成分の光を Y5（黄）が反射するように、照明条件を変えた時の応答（d）。この細胞の選択性は、照明光の波長成分を変えると、大きく変化した。

正常サル V1 野の活動と「色の恒常性」との間の関係を明らかにするために、モンドリアン図形の上に置いたマンセル紙に対する応答を記録した。マンセル紙の輪郭を受容野上に置くと、方位選択性細胞の多くが特定のマンセル紙に対して選択的に応答した。さらに、照明光の波長成分を大きく変えても、マンセル紙に対する選択性が変わらない細胞も数多く確認された（図 1 a, b）。

これに対して、単色光照明下で育てたサルの V1 方位選択性細胞は、マンセル紙に対して応答しない細胞が多く、また応答しても選択性を持たない細胞がほとんどであった（図 2）。

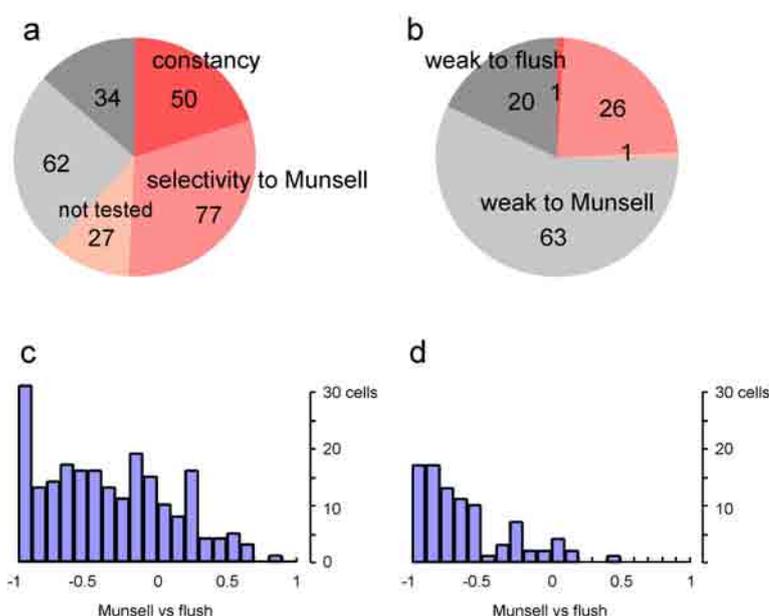


図 2. V1 野方位選択性細胞の分布。(a) 正常サルから記録した細胞の約 2/3 はマンセル紙によく応答し、そのほとんどがマンセル紙に対して選択制を持っていた。(b) 単色光で育てたサルから記録した細胞は、約 1/4 だけがマンセル紙に対してよく応答した。しかし、その大部分の細胞は、照明光の波長成分を変化させると、選択性を変化させた。

以上の結果は、これまで高次視覚野で実現されると考えられてきた「色の恒常性」に、V1 野が深く関連していることを示している。

「動き」を検出する神経回路の発達：生まれて間もないサルを、1 年間、ストロボ光の照明だけで飼育し、なめらかな動きを知覚できないようにして育てた。これらストロボ光で育てたサルの視覚を検査したところ、点滅光の知覚は正常サルと変わらない成績が得られたが、運動視に障害があることが明らかになった。ストロボ光サルは、静止している

ものと動いているものの区別は可能だったが、動きの速度あるいは方向の判断をさせると、正常サルと比べて極めて劣った成績しか得られなかった。fMRI によって脳活動を測定すると、グレーティングやランダムドットを動かしてもMT野の応答が全く見られなかった。ところが、チェッカーボードパターンを点滅させると、MT野が強く応答した。この結果は、1年間、ストロボ光の照明だけで飼育したことによって、MT野の応答特性が大きく変化したことを示している。

ストロボ光サルに動きを手がかりにした形の判断（たとえば、枠が見えない4角形の枠内にあるランダムドットを枠外のドットが異なった方向に動いていると、4角形が明瞭に知覚される）をさせると、運動視に重篤な障害があるにも関わらず、正常サルと全く変わらない成績が得られた。視野の動きが複数の経路で処理されていて、動きを見えないように育てることで影響を強く受ける経路と影響をあまり受けない経路が存在している可能性を示唆している。

左右逆転視野への順応： 外科的手術によって視覚入力が逆転するようにさせられたハエやカエルやネコは、視野の逆転に適応できないが、ヒトやサルは逆転眼鏡装着による視野の逆転に対して、40日程度の期間を経て円滑な行動の回復とともに順応した視空間認識を達成できる。生後6か月のニホンザルに逆転鏡を装着したところ、驚くべきことに、装着した初日から活発に動き始め7日程度で順応が達成された。これらのサルに、1歳になった時と2歳になった時に再び逆転鏡を装着すると、再び7日間程度の期間で順応した。生後1年経過したサルに逆転鏡を装着しても、順応には40日程度の期間を要した。また、1歳半になった時と2歳になった時に再び逆転鏡を装着しても、以前に順応した効果が認められず、40日程度の期間を経てようやく順応が達成された。以上の結果は、視覚-運動協応にも、明瞭な感受性期が存在していることを示している。



図3. 生後16日目のサルの表情

顔や表情など複雑な図形知覚の発達： 生後まもないサルを、親から離して「顔」を見せずに育てた。生後16日目には、正常な成人サルが示す表情を全て表出させた。これらの

表情は、文脈と無関係に無作為に表出させるのではなく、授乳者を呼ぶとき、飲んでい
るミルクを取り上げられえるとき、驚いたときなどに応じて、正常サルと同じ表情を表
出させた。「顔」を見せずに長期間（1年以上）育てても、適切な場面で適切な表情を表
出させることが出来た(図3)。「顔」と「表情」の知覚を調べるために。生まれて間も
ない時から1年間「顔」を見せずに育てたサルに、「顔」と「表情」の見本合わせ課題を
行わせた。ところが、生まれてから1度も「顔」を見ていないにも関わらず、成績には正
常サルとの違いが全く認められなかった。これらの結果は、「表情」の表出が生得的に備
わっていること、また、複雑図形としての「顔」と「表情」の知覚には初期経験が不要で
あることを示している。

「顔」を見せずに育てたサルが、「顔」や「表情」を知覚する際に、正常サルと全く同
じ脳部位が活動しているのだろうか？これを明らかにするために、fMRIを用いて脳
活動を計測した。その結果、生後2年間、顔を見ずに育っても、顔に対して選択的に応答
する部位が正常サルとほぼ同じ場所に確認された(図4)。

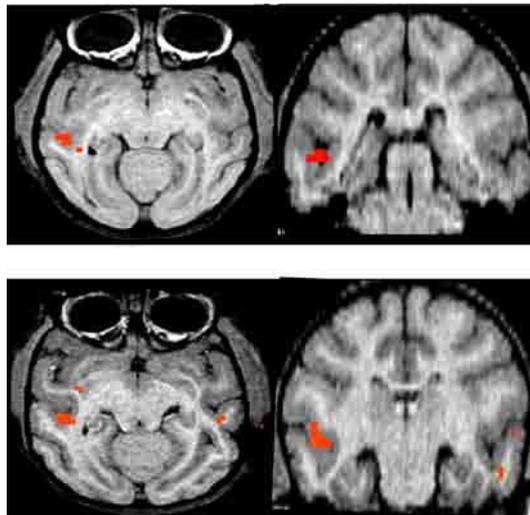


図4. 正常サル(上)と顔を見せずに育てたサル(下)から記録した顔に対して選択的に応答した
部位。

「顔」を見せずに育てたサルが、「表情」を正しく表出し、「顔」と「表情」を正常
に知覚できるものの、重篤な社会的障害を示した。たとえば、威嚇している成人サルに
自ら近づいて行き攻撃されることが度々あった。このことは、「顔」や「表情」の違い
を知覚できても、「表情」が表す情動あるいは社会的意味に対して正しい応答を選択で
きないことを示している。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、高次視覚機能感受性期について検討した。その結果、色彩感覚・動きの知覚・

視覚-運動協応・顔など複雑図形の知覚のどれに対しても明瞭な感受性期が存在していることが明らかになった。単一細胞活動記録と線維投射の解剖学的検討については、やり残した実験が数多く残っているが、これらを速やかに遂行することで高次視覚機能およびその発達についての理解が格段に進むものと期待される。

昨今、教育システムの改革の必要性が叫ばれて来ているが、現在行われている教育改革が顕著な効果を示しているかは甚だ疑わしい。その理由の一つとして、研究代表者は幼児期から思春期、成人期を通して発達していく生物学的視点の欠如があると考えている。ヒトの神経系は、発達過程の中で動的に変化し、その変化に伴って環境との関わり方も当然変化させる。そのような発達に伴う神経系の変化の基本原理を、学習機構を媒介として明らかにすることで、生物学的な基盤に立った教育システムの開発に対して、本研究は多くのものを資することができるのではないかと考える。

3. 2 高次視覚機能獲得過程に関する組織学的研究（理化学研究所 神経解剖研究グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

実施方法:

錐体細胞の機能発現依存性の形態的特長を捕まえるために、DAPI (diamidino-2-phenylindole) 染色法を用いて錐体細胞の核 DNA を蛍光顕微鏡で観察しながら、蛍光色素 (Lucifer Yellow) を細胞内注入し、蛍光色素で染色された細胞の共焦点レーザー顕微鏡での観察を試みた。一方で、これまでのシナプス越えレーザー標識技術は皮質・皮質間の線維結合の解析には適していなかったため、本プロジェクトにおいては、特定の機能に特化する皮質・皮質間の視覚情報伝達様式を効率的に捕らえるため、より安全、且つ信頼性の確保できるウィルストレーザー標識法の開発に取り組んだ。

実施内容・成果:

本プロジェクトにおける神経回路の形態学的解析は生理学的解析に引き続き行う体制にあった。数年を要して実験前育成に成功した動物は貴重なデータを提供してきており、現在はおおた生理学的解析の終了の段階にあるため、神経解剖研究グループでは、解析を対照動物から実験群動物にうつすタイミングにきている。サル大脳皮質の錐体細胞の細胞内注入標識関連においては手技上の困難さから十分なデータは得られなかったが、

トレーサー開発関連においては信頼性の高い手技が開発されたことにおいて成果が得られた。

トレーサー開発関連における成果として、ブタコロナウイルス（HEV）プラーククローン 67N 株 (HEV pc67N) のゲノムの解明とトレーサーとしての有用性の確認が挙げられる。HEV pc67N の RNA ゲノムは約 30.6Kb からなり (DNA Data Bank Japan に登録済み、Accession No. AB362589)、同属コロナウイルスとの比較考察から ns2 遺伝子領域が HEV pc67N による感染メカニズムにとって重要な責任配列であることが示唆された。

このトレーサーを神経路解析に適用し、光学顕微鏡のおよび電子顕微鏡的にその伝播特性を調べたところ、他のトレーサーに比べて、1) 神経細胞特異的でグリア細胞への感染はみられず、2) 投与量を極微量までコントロールでき、3) 伝播速度がかなり遅いため、特定神経路内の伝播様式や脳炎 (感染後期になってはじめてみられる) の病態変化の詳細な解析が可能であり、4) ヒトへの自然感染はなく、適切管理のもとでは実験従事者の安全性が充分確保される、などの特徴をもっていることが判ってきた。

ウィルストレーサー開発に関しての類似研究としては、HSV (herpes simplex virus)、PRV (pseudorabies virus)、RV (rabies virus) などの向神経性ウイルスを用いた研究があげられる。それらを用いた研究は主にヨーロッパや北米で行われてきた。それに比べて HEV は全く注目されてこず、日本のわれわれのグループだけがそのトレーサーとしての価値を見出したものである。

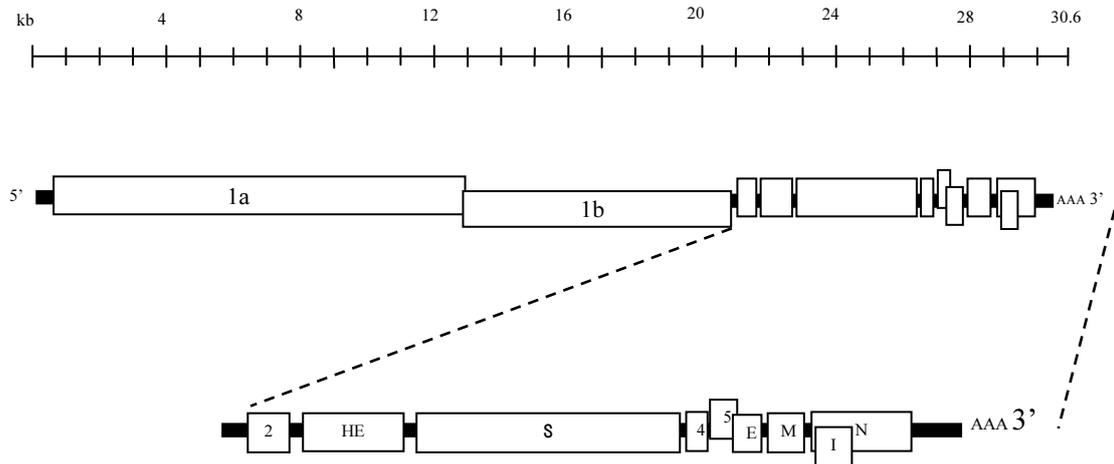
本課題の組織学的研究を遂行するにあたって、まず標識技術の開発が必要と考え、それに取り組んできた。現在論文執筆中であり、詳しい研究内容については以下のように発表する予定である。なお、サル視覚野における線維連絡網の解析は実験群の個体の生理学実験の終了を待ってから漸次すすめることにしている。それに先立ち、対照群の実験をすすめているところであるが、現在はまだ部分的にデータを収集している段階にある。

- 1) W.-Z. Bai, T. Taniguchi, Y.-C. Li, N. Hirano, S. Sato, Y. Sugita, K. Tohyama and T. Hashikawa: Neurotropism and distinctive neural propagation of plaque-cloned 67N strain of swine coronavirus characterized by genome sequencing and inoculation experiments. (図 1 A, B)
- 2) W.-Z. Bai, Y.-C. Li, N. Hirano, Y. Sugita, K. Tohyama and T. Hashikawa: Immune response of OX42-positive cells to the infected cortical neurons in the rat induced by a neurotropic coronavirus. (図 2)
- 3) W.-Z. Bai, N. Hirano, Y. Sugita, K. Tohyama and T. Hashikawa: Transneuronal propagation of hemagglutinating encephalomyelitis virus following striatal inoculation in the rat. (図 3)
- 4) Y.-C. Li, W.-Z. Bai, N. Hirano, S. Sato, Y. Sugita, K. Tohyama and T. Hashikawa: Ultrastructural bases of a neuron-specific dissemination of swine coronavirus HEV pc67N

strain: Vesicle-mediated transneuronal propagation and pivotal role of non-neuronal inflammatory cells. (図 4)

- 5) Y.-C. Li, W.-Z. Bai, N. Hirano, S. Sato, Y. Sugita, K. Tohyama and T. Hashikawa: Coronavirus infection of rat dorsal root ganglia: Ultrastructural characterization of viral replication, transfer, and the early response of satellite cells. (図 5)

Genome structure of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus



Structural Proteins

HE : Hemagglutinin-Esterase Glycoprotein
 S : Spike Glycoprotein
 E : Small Membrane Protein
 M : Integral Membrane Glycoprotein
 N : Nucleocapsid Protein

Non-Structural Proteins

ORF1a, 1b : replicase polyprotein
 2a : NS2
 4 : NS4.9
 5a : NS12.7

図 1 A :

ブタコロナウィルスのゲノム RNA は約 30600 塩基からなる。非構造タンパク産生遺伝子のうち、ウィルス複製遺伝子 (1a, 1b) とヘマグルチニンエステラーゼ糖タンパク遺伝子領域には含まれた、機能不明の遺伝子領域 (NS2) が、HEV ウィルスの神経細胞への感染性に深く関与していることが、他のコロナウィルスのゲノムとの比較から明らかになった。

Labeling example of a commissural projection column in the rat primary auditory cortex

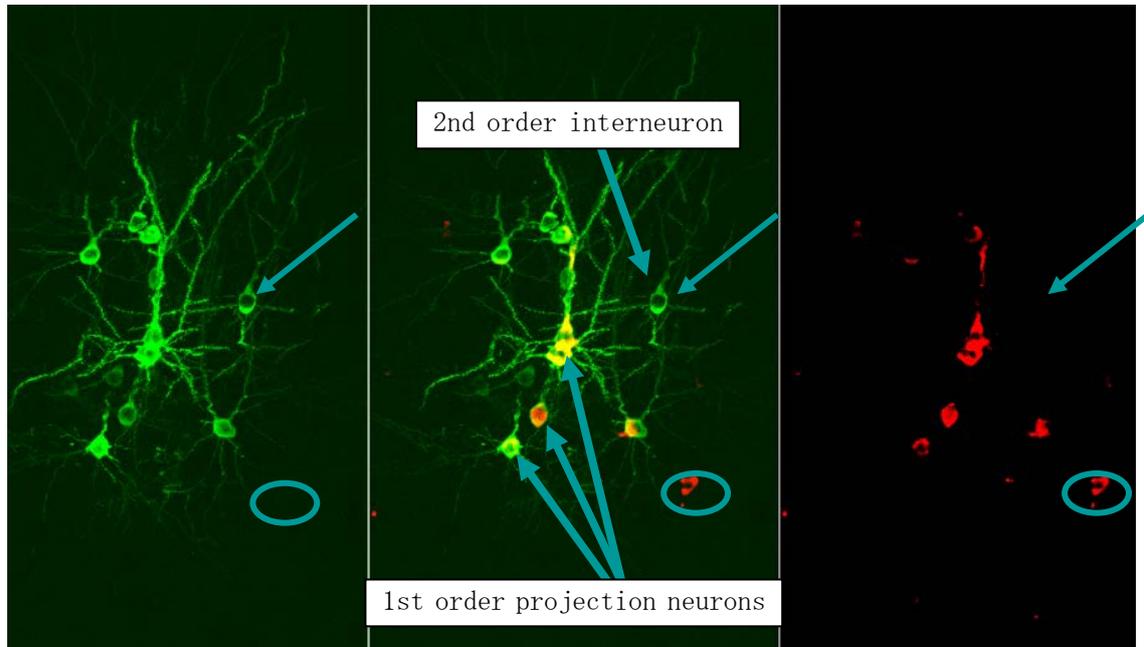


図1 B :

HEV トレーサーを皮質間結合解析に適用すると、第一義的に標識されるニューロン (1st order projection neuron) とそれに連なって二次的に標識されるニューロン (2 nd order interneuron) を区別することができる。このトレーサーが皮質の局所神経路構成の解析に有効であることがわかった。

Glial cell responses against HEV infected neurons

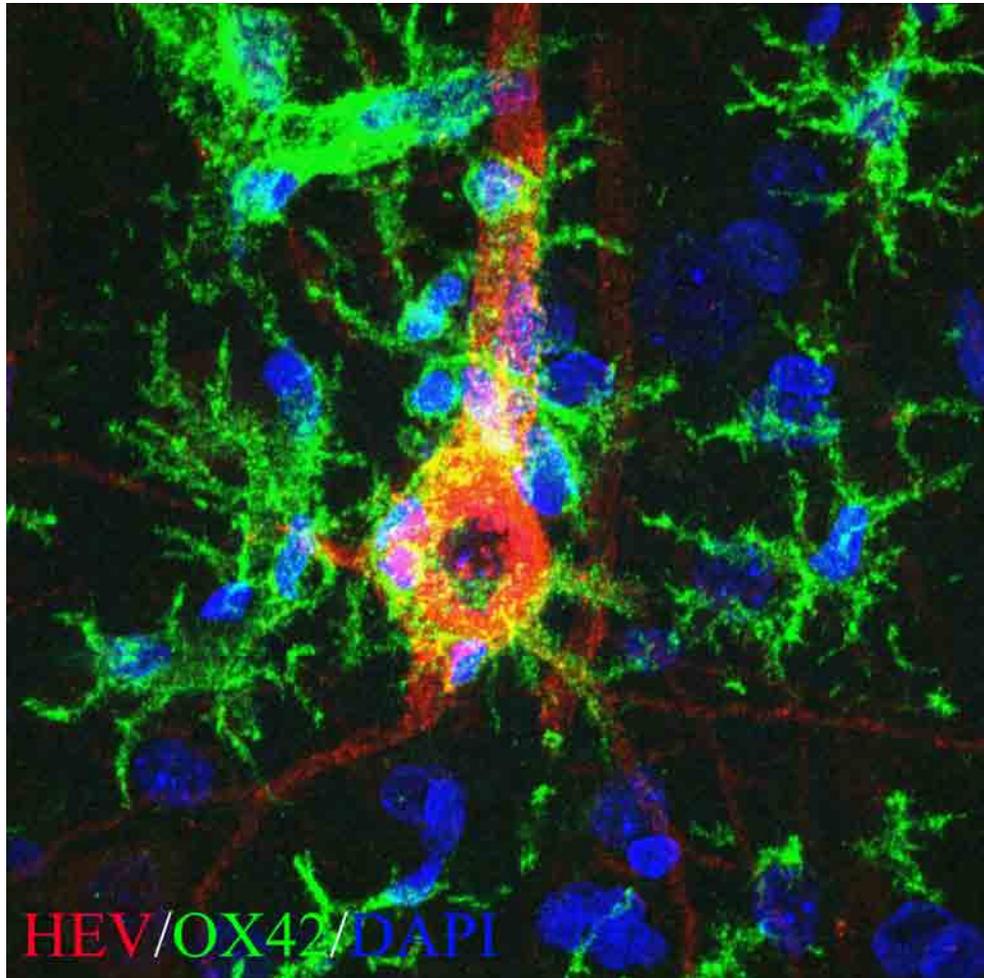


図2：

感染初期にはあまり見られなかったが、感染がすすむとグリア細胞の応答が見られるようになる。この図ではHEVに感染したニューロン(赤色)の周りにミクログリア(緑色)が集まってきているところを示している(青色は細胞の核を示す)。ただし、詳細に調べた結果、グリア細胞ではHEV抗原は確認されず、グリア細胞内ではウィルスの複製が行われていないことが示された。電顕的な観察(後述)では断片状になったウィルス破片がみられるのでグリア細胞内ではウィルスの不感染化のための処理が進んでいるものと解釈される。

Striatal inoculation experiments to assess dose dependency, spatiotemporal characteristics, and propagation direction of HEV infection

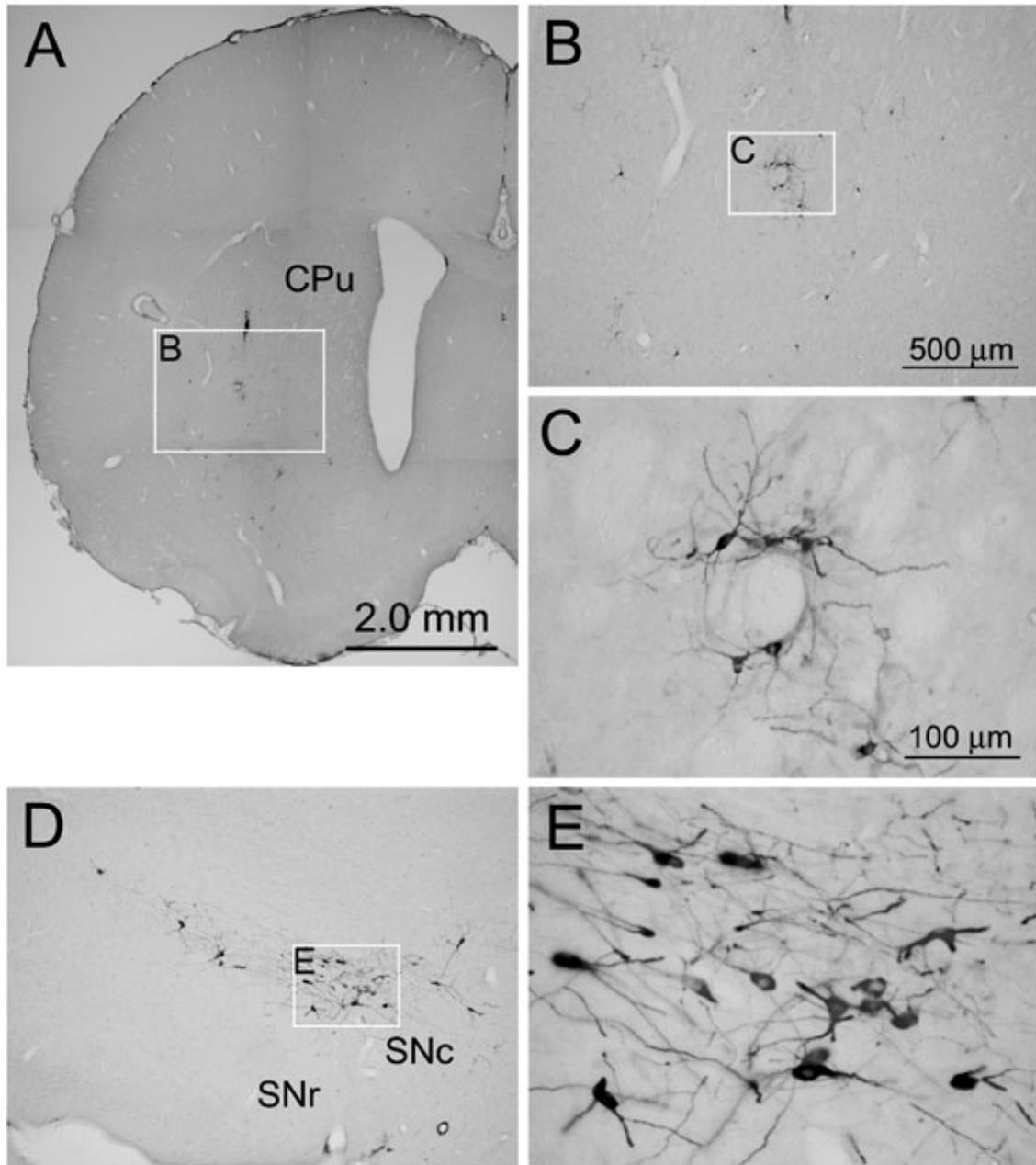


図 3 :

極微量 (3 PFU/20nl) を線条体に投与して2日後には、注入部位のほか (A, B, C)、中脳の黒質 (D, E) に標識細胞が現れた。黒質では線条体に投射する緻密部 (SNc) にも標識細胞がみられ、線条体から投射を受ける網様部 (SNr) にはそれがみられなかったことから、このウイルスの中中枢神経系内での伝播はもっぱら逆行性におこっている事が確認された。

Electron microscopic confirmation of HEV replication in the infected cells

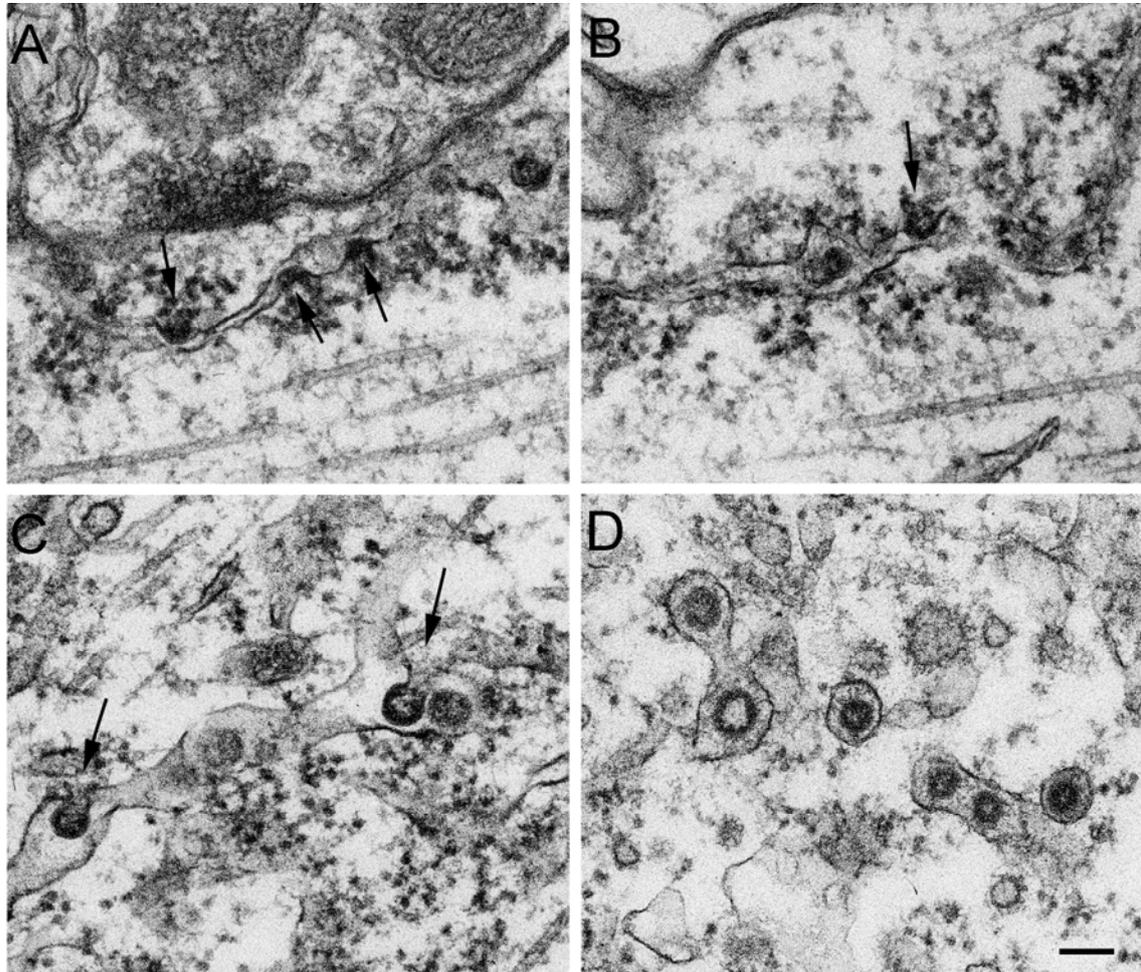


図 4 :

いろいろな段階のウイルス複製像が電顕的に確認された。ウイルス RNA は細胞質内粗面小胞体の外膜（細胞質側）に接してヌクレオカプシドの複製をはじめ（A, B）、その外膜（ウイルスエンベロープとなる）をともなって小胞体内腔に萌芽（C）し、取り込まれた小胞体の膜につつまれて完成した膜内粒子（D）となる。その際にはエンベロープから外に伸びるスパイクが形成されている。

HEV replication in peripheral neurons and satellite cell response

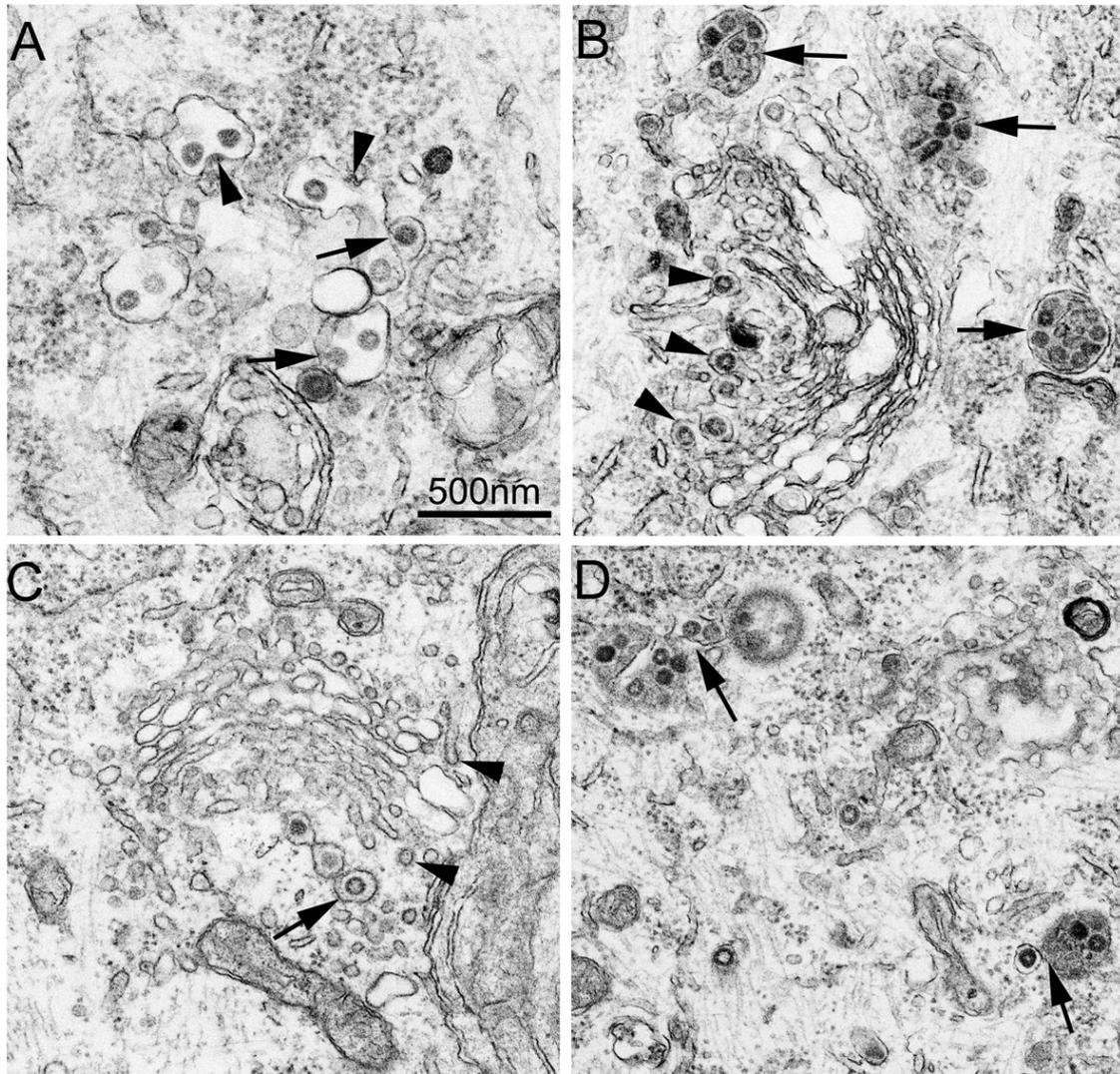


図5 A :

末梢神経ニューロンにおけるウイルス感染の電顕観察。後根神経節細胞質では盛んに粗面小胞体でのウイルス複製 (A)、ゴルジ装置での顆粒の熟成 (B, C) がみられる。一方で、比較的大きな小胞に多数のウイルス粒子が取り込まれて、それらが断片化されていく様子もみられる (B, D : 矢印)。

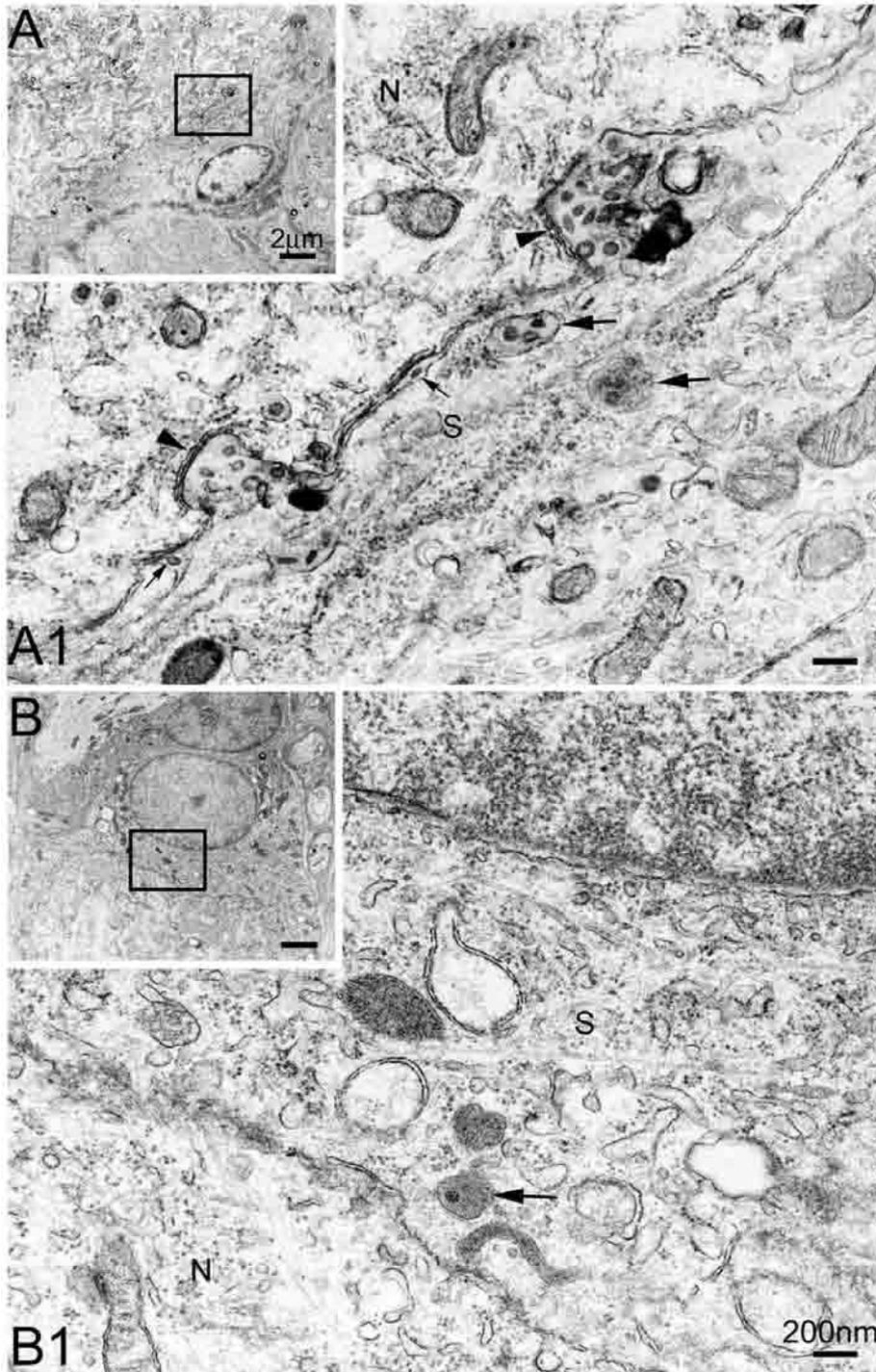


図5 B :

感染神経節ニューロンから細胞間隙に放出されたウイルス粒子は感染ニューロンを取り囲むサテライト細胞に捕捉され、内部のライソゾーム様構造に取り込まれていく過程が観察される。

(2) 研究成果の今後期待される効果

信頼度の高いウィルスプローブの開発により、精緻な神経回路をあきらかにすることができる。高次脳機能の発現をつかさどる大脳皮質の神経回路の構造基盤はほとんど解明されていないのが現状で、これを解決するためには解析技術の新規開発によるブレークスルーが必要と考える。生理学的解析をきちんと支える形態学的解析があいまってはじめて統合的な脳機能の理解が深まるにちがいない。本研究を継続的、発展的に展開することによって、幼児期からの視覚機能の発達メカニズムの背景にある皮質構造の構成原理の解明が期待される。

§ 4 研究参加者

①杉田グループ

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	杉田 陽一	産業技術総合研究所	研究グループ長	行動実験・単一細胞活動記録	H15.10～H21.3
	月浦 崇	産業技術総合研究所	主任研究員	MRIによる脳活動測定	H15.10～H21.3
	梶原 利一	産業技術総合研究所	主任研究員	光計測法による脳活動測定	H15.10～H21.3
	積山 薫	産業技術総合研究所	客員研究員	行動実験	H15.10～H21.3
*	山本 澄子	JST	チーム事務員		H15.12～H21.3
*	渡邊 千尋	JST	研究補助員	行動実験	H16.1～H16.12
*	中村 道子	JST	CREST研究員	神経解剖	H16.4～ H16.9
*	栗生 俊彦	JST	CREST研究員	行動実験	H16.4～H16.6
*	阿部 有希子	JST	研究補助員	行動実験	H16.4～H17.3
*	石島 かつ江	JST	研究補助員	行動実験	H16.4～H17.3
*	飯田 麻恵子	JST	研究補助員	行動実験	H17.1～H17.3
*	羽瀨 由子	JST	CREST技術員	行動実験	H17.4～H17.9
*	藤巻 慎一	JST	CREST技術員	行動実験	H17.4～H18.3
*	間中 ゆうこ	JST	CREST技術員	単一細胞活動記録	H17.4～H21.3
*	佐藤 育	JST	研究補助員	行動実験	H17.4～H17.8

*	坂尻 千恵	JST	研究補助員	行動実験	H18.2～H18.3
*	神谷 玲子	JST	研究補助員	行動実験	H18.4～H18.4
*	吉本 美穂	JST	研究補助員	単一細胞活動記録	H18.8～H18.9
*	山本 舞子	JST	CREST技術員	単一細胞活動記録	H20.4～H21.3
*	石井 勝好	産業技術総合研究所	招聘研究員	神経解剖	H18.8～H19.4
*	MD. Shadhad Hossain	産業技術総合研究所	特別研究員	神経解剖	H18.8～H18.10
*	吉本 美穂	産業技術総合研究所	実験補助員	単一細胞活動記録	H18.10～H18.12
*	阿瀬見 典昭	産業技術総合研究所	特別研究員	単一細胞活動記録	H18.11～H19.5
*	山本 龍子	産業技術総合研究所	実験補助員	単一細胞活動記録	H18.1～H20.3
*	山本 舞子	産業技術総合研究所	実験補助員	単一細胞活動記録	H18.1～H20.3
	大塚 菊江	産業技術総合研究所	実験補助員	単一細胞活動記録	H19.1～H20.3
*	永野 忠聖	産業技術総合研究所	特別研究員	単一細胞活動記録	H19.8～H20.3
*	深津 智香	産業技術総合研究所	実験補助員	単一細胞活動記録	H20.10～H20.10
*	飯島 美恵子	産業技術総合研究所	実験補助員	行動実験	H20.12～H21.3

②端川グループ

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	端川 勉	理化学研究所	ユニットリーダー	皮質構造の組織学的観察	H15.10～H21.3
	清原 義幹	理化学研究所	研究員	皮質構造の組織学的観察	H15.10～H19.12
	境 和久	理化学研究所	研究員	皮質構造の組織学的観察	H15.10～H21.3
	白 万柱	理化学研究所	研究員	皮質構造の組織学的観察	H15.10～H20.9
	李 艶超	理化学研究所	研究員	皮質構造の組織学的観察	H19.1～H21.3
	星 登美子	理化学研究所	研究員	皮質構造の組織学的観察	H20.4～H21.3
	遠山 稿二郎	岩手医科大学	教授	皮質構造の組織学的観察	H15.10～H21.3
	K. S. Saleem	ワシントン大学	研究員	皮質構造の組織学的観察	H15.10～H21.3

§ 5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

§ 6 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 7 件)

【杉田グループ】

1. Sugita, Y.: Experience in early infancy is indispensable for color perception. *Current Biology* 14, 1267-1271 (2004).
2. Sugita, Y.: Contextual modulation in the V1 real motion cells. *NeuroReport* 15, 2219-2222 (2004).
3. Sugita, Y.: Face perception in monkeys reared with no exposure to faces. *Proceedings of National Academy of Science, USA*. 105, 394-398 (2008).
4. Manaka, Y. & Sugita, Y.: Insufficient visual information leads to spontaneous Bipedal walking in monkeys. *Behavioral Processes* in press (2009).
5. Sugita, Y.: Innate face processing. *Current Opinion in Neurobiology* in press (2009).

【端川グループ】

6. Akagi, T., Ishida, K., Hanasaka, T., Hayashi, S., Watanabe, M., Hashikawa, T. & Tohyama, K.: Improved methods for ultracryotomy of CNS tissue for ultrastructural and immunogold analyses. *J.J. Neurosci. Methods* 153, 276-282 (2006).
7. Saleem, K. S., Price, J. L. & Hashikawa, T.: Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic subdivisions of the perirhinal and parahippocampal cortices in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* 500, 973-1006 (2007).

(2) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 3 件、国際会議 1 件)

【杉田グループ】

1. Sugita, Y.: Development of color constancy. 神経科学学会, 2006 年 7 月 21 日, 京都
2. Sugita, Y.: Neuronal correlates of motion aftereffect. Asian Conference on vision, 2006 年 7 月 31 日, Matsue

3. Sugita, Y.: Active transformation of sensory input in cortex. Rutgers Biomedical Conference 2007年3月19日, New Brunswick, USA

4. Sugita, Y.: Sensitive Period in higher visual functions. 神経科学学会, 2007年9月, 横浜

② 口頭発表 (国内会議 0 件、国際会議 1 件)

1. Hayashida, T., Ishida, K., Bai, W.-Z., Hirano, N., Hanasaka, T., Sato, S., Taniguchi, T., Tohyama, K. & Hashikawa, T.: Transmission electron microscopic imaging of transported neurotropic swine coronavirus (HEV) in central nervous system neurons after inoculation into striatum and skeletal muscles in rat. The 16th International Microscopy Congress, 2006年9月3-8日, Sapporo, Japan

③ ポスター発表 (国内会議 7 件、国際会議 9 件)

【杉田グループ】

1. Nakamura, M. & Sugita, Y.: Neuronal correlates of motion aftereffect in monkeys. Society for Neuroscience, 2004, San Diego

2. Manaka, Y. & Sugita, Y.: Handwriting analysis activates fusiform face area. Society for Neuroscience, 2006, Atlanta

3. Manaka, Y. & Sugita, Y.: Brain activity for compound visual stimuli. Society for Neuroscience 2007, San Diego

4. Manaka, Y., Tsukiura, T. & Sugita, Y.: Face perception in monkeys before and after first exposure to faces. Society for Neuroscience, 2008, Washington, DC

【端川グループ】

5. Bai, W., Tohyama, K., Hirano, N., Sato, S. & Hashikawa, T.: Transneuronal tracing with haemoagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) inoculated in the rat primary auditory cortex. Society for Neuroscience, 2004年10月23-27日, San Diego, California, USA

6. 平野紀夫, 平秀晴, 佐藤成大, 端川勉, 遠山稿二郎: ブタ血球凝集性脳脊髄炎ウイルス感染によるラット中枢神経症状は HEV 抗体投与により阻止される. 日本神経ウイルス研究会, 2005年6月9-11日, 浜松

7. Bai, W., Hayashida, T., Nakatomi, R., Tohyama, K., Hirano, N., Sato, S. & Hashikawa, T.: Looking for reliable virus probes to examine multisynaptic neural circuits, 日本神経ウイルス研究会, 2005年6月9-11日, 浜松

8. Bai, W., Tohyama, K., Hirano, N., Sato, S. & Hashikawa, T.: Haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) as a low toxic and high sensitive transneuronal tracer for revealing multisynaptic circuits. 日本神経科学会, 2005年7月26-28日, 横浜

9. Hayashida, T., Bai, W.-Z., Hirano, N., Sato, S., Tohyama, K. & Hashikawa, T.: Ultrastructural examination of hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) in substantia nigra neurons after inoculation into the rat striatum. 日本神経科学会, 2005年7月26-28日, 横浜

10. Bai, W., Hayashida, T., Tohyama, K., Hirano, N., Sato, S. & Hashikawa, T.: Sensitive trans-synaptic tracing for visualizing multi-synaptic neural circuits by swine hemagglutinating

encephalomyelitis virus with extra-low dose. Society for Neuroscience, 2005年11月12-16日, Washington, D.C.

11. Bai, W., Hirano, N., Taniguchi, T., Tohyama, K. & Hashikawa, T.: Spatial and time-dependent transneuronal propagation of swine coronavirus (hemagglutinating encephalomyelitis virus, HEV) in the rat central nervous system after its hind footpad inoculation. 日本神経科学会, 2006年7月19-21日, 京都
12. Hashikawa, T., Bai, W.-Z., Li, Y.-C., Hayashida, T., Hirano, N., Taniguchi, T., Sato, S. & Tohyama, K.: A novel multisynaptic network tracer swine coronavirus: Neuromorphological assessment of the centripetal propagation. Federation of Asia-Oceanian Neuroscience Societies, 2006年11月30日, Hong Kong, China
13. Bai, W.-Z., Li, Y.-C., Hirano, N., Tohyama, K. & Hashikawa, T.: Hemagglutinating encephalomyelitis virus as a transneuronal tracer. International Brain Research Organization, 2007年7月12-17日, Melbourne, Australia
14. Bai, W., Li, Y.-C., Hirano, N., Tohyama, K. & Hashikawa, T.: The response of microglia and astrocytes to the infected cortical neurons induced by a coronavirus. 日本神経科学会, 2007年9月10-12日, 横浜
15. Li, Y.-C., Bai, W., Hirano, N., Tohyama, K. & Hashikawa, T.: The morphologies and trans-neuronal transfer of swine hemagglutinating encephalomyelitis virus in the central nervous system. 日本神経科学会, 2007年9月10-12日, 横浜
16. Li, Y.-C., Bai, W.-Z., Hayashida, T., Hirano, N., Tohyama, K. & Hashikawa, T.: The morphologies of swine hemagglutinating encephalomyelitis virus in rat pyramidal cells and the non-neuronal cell-facilitated transneuronal transfer. Society for Neuroscience, 2007年11月3-7日, San Diego, California, USA

(3) 特許出願

- ①国内出願 (0件)
- ②海外出願 (0件)

(4) 受賞等

- ①受賞 なし
- ②新聞報道

1. 左右逆の見える眼鏡で5週間生活. 読売新聞 (首都近郊) (2004年4月5日)
2. 色彩感覚は後天的. 産経新聞 (2004年7月27日)
3. 色の認識力は後天的. 茨城新聞 (2004年7月27日)
4. 色彩感覚経験の賜物. 静岡新聞 (2004年7月27日)

5. 色彩感覚は乳幼児期に. 山陽新聞 (社会面),(2004年7月27日)
6. 色の感覚は乳幼児期に発達. 東京新聞, 1面 (2004年7月27日)
7. 色彩感覚生後に発達. 北海道新聞 (2004年7月27日)
8. 色彩感覚乳幼児期の体験影響. 毎日新聞, 2面 (2004年7月27日)
9. 色彩感覚乳幼児期に習得. 日本経済新聞 (社会面), (2004年7月27日)
10. 色彩感覚生後に獲得. 読売新聞(2004年7月2日)
11. 色彩感覚は後天的. 日刊工業新聞(2004年7月27日)
12. Lighting Up the Rainbow. Science News (2004年7月31日)
13. ”認識力”は乳幼児期に決まる. 産経新聞 (関西版)(2005年6月20日)
14. 複雑な視覚情報を認識する脳の機能を解明. nature jobs&events 日本語版 (2005年7月29日)
15. 猿の赤ちゃん顔見ずに育っても表情識別が可能. 日本経済新聞 (社会)(2008年1月3日)
16. 「顔の識別」能力は生まれつき備わる. 朝日新聞(夕刊) (2008年1月4日)
17. Eleves sans visages. La Recherche (2008年3月15日)

③その他 なし

(5) その他特記事項

1. 杉田陽一: 情動の表出と理解の神経機構. 電子情報通信学会誌 89巻 17-21 (2005)
2. 杉田陽一: 異種感覚統合の神経基盤. 基礎心理学研究 (印刷中)

§7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成16年9月3日	平成16年第1回 杉田チーム合同会議	岩手医科大学	6名	進捗状況の報告及び研究の 進め方についての打合せ
平成17年4月27日	平成17年第1回 杉田チーム合同会議	産業技術総合研究所 つくば北	4名	進捗状況の報告及び研究の 進め方についての打合せ
平成17年9月16日	平成17年第2回 杉田チーム合同会議	岩手医科大学	17名	進捗状況の報告及び研究の 進め方についての打合せ

平成 18 年 4 月 21 日	平成 18 年度 第 1 回 杉田チーム合同会議	産業技術総合研究所 つくば北	5 名	進捗状況の報告及び研究の進め方についての打合せ
平成 18 年 9 月 23 日	平成 18 年度 第 2 回 杉田チーム合同会議	産業技術総合研究所 つくば北	7 名	進捗状況の報告及び研究の進め方についての打合せ
平成 19 年 10 月 15 日	平成 19 年度 第 1 回 杉田チーム合同会議	岩手医科大学	10 名	進捗状況の報告及び研究の進め方についての打合せ
平成 20 年 11 月 8 日	平成 20 年度 第 1 回 杉田チーム合同会議	岩手医科大学	6 名	CREST 研究「幼児脳の発達」のまとめと反省

§ 8 結び

生後間もないサルを特殊な視覚環境下で育てて、その効果を検討する仕事は、続けていく経過で様々な問題が生じた。

1. 幼児サルの頭骸骨が薄く軟かいため、固定が非常に困難だった。このため、fMRI 記録や単一細胞活動記録が大幅に遅れた。
2. 突然の病死、とくに単一細胞活動記録を行う直前に「動きを見せずに育てた」サルが2頭立て続けに病死した。

現在は、体重の軽い(3.5Kg 以下)のサルの頭部を手術せずに固定できるようになり、生後1年経過したサルの脳活動が計測できるようになった(下図)。



新たにサル3頭を、1年間動きを見せずに育てて、現在、固視訓練を行っている。
また、幼児サルのヒトによる飼育もスムーズに行えるようになり(下図)、訓練も順調に進み始めた。



当初に予定していた脳活動記録と解剖学的検討の大半が残されているが、残された期間内に可能な限り遂行し、また、CREST 終了後にも実験を続けていくと予定している。

