O-10

単離標本系における匂い嫌悪条件付けは、嗅覚系神経活動の忌避的応答を誘発する

In vitro odor-aversion conditioning enhances the conditioned odor-evoked activities of olfactory center in the land slug

○橋口小春 [1]，石田康平 [2]，斎藤稔 [3]，小松﨑良将 [4]
*Koharu Hashiguchi[1], Kohei Ishida[2], Minoru Saito[3], Yoshimasa Komatsuzaki[4]

Abstract: We have focused on neural activities of the olfactory center (procerebrum; PC) of the land slug using electrophysiological technique and voltage imaging technique. The previous results showed that the local field potential of PC shows an oscillation of about 1 Hz and the neural activity of PC propagates from the distal to proximal regions. In the present study, We found that at 1 hour after the in vitro aversive training, the neural activity were increased by the conditioned odor, which are similar to the responses to natively aversive odors, while no significant changes were observed for another attractive odor..

1.　はじめに

ナメクジは哺乳動物に比べて神経細胞が少なく，中枢神経系が比較的単純であるが，嗅覚系が発達しており，匂いに対する高い識別能力を有している．また，脳神経節を単離した際に，酸素供給を行わなくても長時間神経活動を続けることができる。このように，哺乳動物に比べて取り扱いが容易であるため，ナメクジは嗅覚神経系の研究によく用いられている．ナメクジの匂い情報処理の中枢は前脳葉と呼ばれ，その部位から局所場電位（Local Field Potential; LFP）を測定すると，約 1 Hz の周波数を持ったスパイク状の自発振動が記録される．また，その先端部から基部に向かって LFP スパイクが伝搬することが知られている．

ナメクジは匂い味覚連合学習能も持っていて，次のような古典的条件付け学習による長期記憶形成が可能である．ナメクジに誘引性匂い物質（条件刺激）を与えた直後に，忌避性味覚物質（無条件刺激）を与えることで両者を関連付けて学習し，その後誘引性匂い物質を与えると忌避反応を示すようになる．本研究では，ナメクジの嗅覚受容器と味覚受容器を付けたまま脳神経節を単離し，標本の状態で生体と同じような条件付け操作を行い，条件付けを行った匂いと行わなかった匂いでの条件付け前後の前脳葉の LFP 振動の匂い応答変化，また先端部から基部に向かう神経活動の伝搬速度の匂い応答変化を調べることを目的とした．

2.　実験方法

本研究で使用したナメクジは，実験室で飼育された 2~4 ヵ月齢，体重 0.5~1 g のチャコウラナメクジである．以下，チャコウラナメクジを単にナメクジと記す．解剖によりナメクジの嗅覚受容器と味覚受容器を付けたまま脳神経節を単離し，神経細胞の膜電位の変化によって蛍光強度が変化する膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS で脳神経節を染色し，pH 7.6 に調整した生理食塩水に浸した．そして，前脳葉にガラス電極を吸着させて LFP を測定した（Fig.1）．また，Di-4-　ANEPPS の蛍光強度変化から前脳葉における神経活動の伝搬の様子を測定した（Fig.2）．

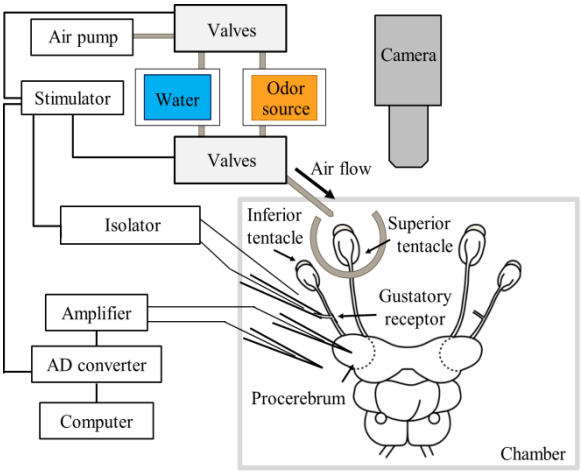

Figure 1.　Experimental apparatus

1: 日大理工・院（前）・物理　2: 日大文理・院（後）　3: 日大文理・教員・物理生命 4: 日大理工・教員・物理

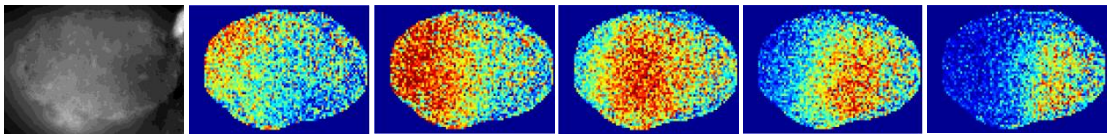

Figure 2. Propagation of the neural activity of PC. The upper left figure shows the fluorescence image of PC. The other pseudo-color images were obtained from the fluorescence changes of the voltage-sensitive dye, Di-4-ANEPPES. The time interval is 0.1 s.

標本の大触角にはエアーポンプで条件刺激として誘引性であるニンジンとキュウリの匂いを与えた．そして，ニンジンの匂いを与えている際に無条件刺激として味覚受容器に電気刺激を与えた．この条件付けを 3 回行った．その後，再びニンジンとキュウリの匂いを大触覚に与え，このとき生じる前脳葉における LFP 振動の周波数変化と神経活動の伝播速度の変化を調べた．

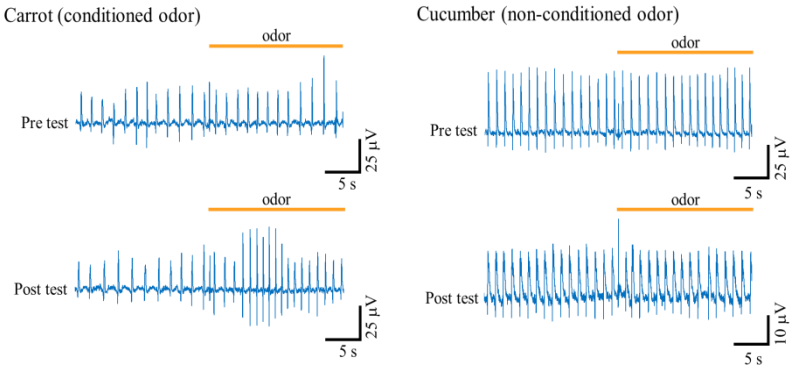

Figure 3.　Oscillatory activities of LFP

3.　結果

Figure 3 に条件付け前後の LFP 振動の波形を示す。条件付け後（Post-test）では，条件刺激であるニンジンの匂いを与えると LFP 振動の周波数が増加することが分かる．一方，条件付けをしていないキュウリの匂いに対しては，そのような LFP 振動の周波数の増加は見られなかった．Figure 4 にそれぞれの匂いによる周波数の変化率を示す．条件付け後にはニンジンの匂いを与えると，LFP 振動の周波数が約 20%増加した．このような周波数の増加は，本来は忌避性の匂い刺激によって生じるものである [1]．さらに本研究では，条件付け後にはニンジンの匂いを与えると，前脳葉の神経活動の伝搬速度も約 20%増加することが分かった（Fig.5）．このような神経活動の伝搬速度の増加も，本来は忌避性の匂い刺激によって生じるものである [1]．以上の結果より，ナメクジの標本においても匂い味覚連合学習が誘導されていることが示唆された．

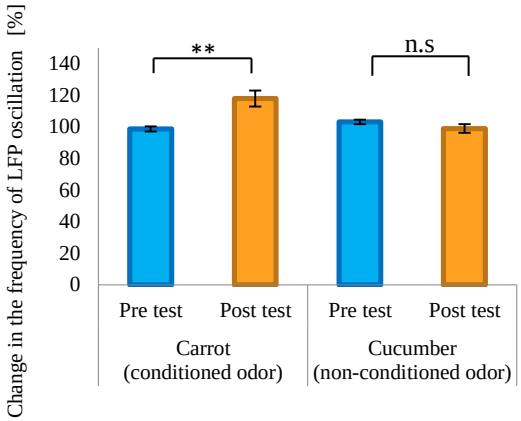

Figure 4.　Change in the frequency of LFP oscillation by the carrot odor

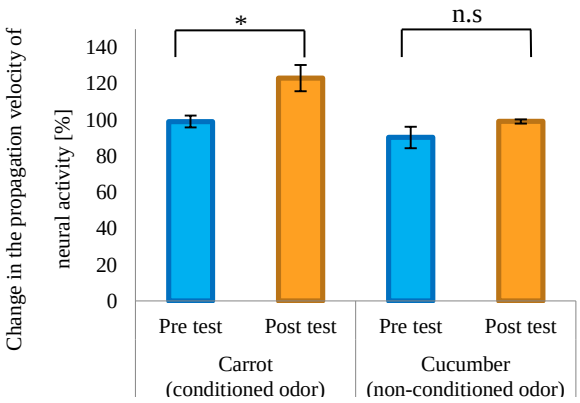

Figure 5.　Change in the propagation velocity of neural activity by carrot odor

4.　参考文献

[1] Y. Hamasaki, T. Shimokawa, K. Ishida, Y. Komatsuzaki, S. Watanabe, M. Saito, “Coherency Evaluation of Spatiotemporal Neural Activities in the Molluscan Olfactory Center Applying Extracellular Recording with Wavelet Analysis”, J Biophysics Vol.3, pp. 291-297, 2013.