

平成 30 年度
学位論文（博士）

ブロック単位およびトライアル単位のプロアクティブ抑制に
おける大脳皮質活動の領域特異的修飾

平成 30 年 9 月 25 日提出

玉川大学大学院脳科学研究科

脳科学専攻

学籍番号 142725002

吉田 純一

0. 目次

0. 目次	2
1. 要旨	3
2. 導入	4
3. 実験方法	7
4. 実験結果	18
5. 考察と結論	32
6. 引用文献	41
7. 図表	50
8. 謝辞	68

1. 要旨

プロアクティブ抑制（proactive inhibition）は文脈の変化に応じて主体的に行動の開始を遅らせる行動抑制のひとつである。先行研究によりプロアクティブ抑制には大脳皮質や皮質下領域が関わることを示唆されてきたが、スパイク活動の解析例はほとんどなくニューロンレベルでの制御機構は不明であった。加えて先行研究ではプロアクティブ抑制を引き起こす文脈変化のタイムスケールについては特に考慮されていなかった。そこで本研究では、はじめに、異なるタイムスケールの文脈変化をもつプロアクティブ抑制（ブロック単位とトライアル単位のプロアクティブ抑制）を観察できる新しいラットの行動課題を構築した。そして、この課題に関連する大脳皮質の神経活動をマルチニューロン記録によって記録し、ニューロンレベルでのプロアクティブ抑制の制御機構の解明に挑戦した。

まず、ブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制を同一課題で誘導するために、ストップシグナル課題をベースに、頭部固定したラットに前肢で反応させる行動抑制課題を開発した。この課題は go 信号に応じてレバー押し運動をする go 試行と go 信号直後の stop 信号によりレバー押し運動の中断が可能になる stop 試行から構成され、go 試行だけの Go (G) ブロックと 2 つの試行が混在する Go& Stop (GS) ブロックが交互にくり返される。go 試行の反応時間は G ブロックのときに比べて GS ブロックのときに遅くなり（ブロック単位でプロアクティブ抑制）、さらに GS ブロック内では直前の試行が go 試行のときに比べて stop 試行のときの方がより反応時間が遅くなった（トライアル単位のプロアクティブ抑制）。次に、この課題を遂行しているラットの大脳皮質における神経活動の記録・解析を行った。ブロック単位のプロアクティブ抑制では、一部の眼窩前頭皮質 (OFC) のニューロンが試行開始前から継続的に活動を減弱させ、二次運動皮質 (M2) のニューロンは運動の準備段階に顕著に活動を亢進させ、その後運動の開始直前に一次運動皮質 (M1) で活動の減弱が見られた。一方、トライアル単位のプロアクティブ抑制では、一部の OFC ニューロンは継続的に活動を亢進させた一方、M2 ニューロンは有意な変化を示さず、M1 ニューロンは反応時間が遅延しているのにも関わらず運動開始直前に活動を亢進させていた。

上記の結果は、異なるタイムスケールの文脈変化で誘導される 2 種類のプロアクティブ抑制は、大脳皮質においてそれぞれ別々のメカニズムによって制御されている可能性を示している（研究業績[1]）。

2. 導入

プロアクティブ抑制は行動抑制の一つであり、とくに開始しようとしている行動を中断しなくてはいけなくなる可能性がある状況下で、主体的にその行動の開始（反応時間）を遅らせる行動抑制のことである（Verbruggen and Logan, 2009）。この行動抑制には、動物が反応時間を遅くすることで適切な行動（その行動を実行するのか抑えるのか）を選択しやすくなるという利点がある。今日までプロアクティブ抑制を含む行動抑制の研究には、ストップ・シグナル課題がしばしば用いられてきた（Vince, 1948; Lappin and Eriksen, 1966; Logan et al., 1984; Verbruggen and Logan, 2009）。この課題では被験体は go 信号に対してすばやく反応することが求められる（go 試行）。一方で、時に go 信号のあとに提示される stop 信号に対してはその反応を抑制することが求められる（stop 試行）。ヒト（Rieger and Gauggel, 1999）、サル（Emeric et al., 2007; Nelson et al., 2010）、げっ歯類（Mayse et al., 2014）それぞれを被験体とした実験では、stop 試行直後の go 試行の反応時間は go 試行直後のそれよりも長くなることが報告されている。この遅延効果は数試行の内に消失する。このことはプロアクティブ抑制が試行単位という短いタイムスケールの文脈変化によって起こることを意味している。そこで、本稿ではこのようなプロアクティブ抑制を「トライアル単位のプロアクティブ抑制」と呼ぶことにする。一方、ヒトを対象とした研究では、go 試行と stop 試行の混ざったブロックにおける go 試行の反応時間は go 試行だけのブロックにおける反応時間よりも遅くなることが知られている（Verbruggen et al., 2005; Verbruggen and Logan, 2009）。また、stop 試行があるかも知れないことを示す事前信号を提示する（ルールの変化を提示する）ことでも、ヒトやサルではプロアクティブ抑制が起こることが報告されている（Chikazoe et al.,

2009; Verbruggen and Logan, 2009; Zanbelt et al., 2013)。これらの効果は文脈の変化が続く限り継続する。このことはプロアクティブ抑制がブロックやルールという比較的長いタイムスケールの文脈変化によっても生じることを意味している。本稿ではこのようなプロアクティブ抑制を「ブロック単位のプロアクティブ抑制」と呼ぶことにする。以上のことから、プロアクティブ抑制が異なるタイムスケールの文脈変化によって起こる可能性を考えることができる。

プロアクティブ抑制の異常は、行動の実行と抑制のバランスを欠いたパーキンソン病 (Jahanshahi et al., 2015a) やトゥレット症候群 (Ganos et al., 2014)、アルコール依存症 (Hu et al., 2015)、摂食障害 ((Bartholdya et al., 2016) などの疾患で報告されてきた。それゆえに、プロアクティブ抑制の神経メカニズムを明らかにすることは生理学的な観点だけでなく、病態生理学的な観点においても非常に重要であると考えられる。近年の健康な被験者を対象とした機能的脳イメージング研究は、大脳皮質や線条体、中脳といった脳部位がストップ・シグナル課題におけるブロック単位やトライアル単位のプロアクティブ抑制に関わっていることを明らかにしてきた (Vink et al., 2005; Chikazoe et al., 2009; Stuphorn and Emeric, 2012; Zandbelt et al., 2013; van Belle et al., 2014; Vink et al., 2015)。とくに、大脳皮質—大脳基底核ループを構成する前運動皮質や補足運動皮質、頭頂皮質、下前頭回といった大脳皮質領域はプロアクティブ抑制との関係がくり返し示唆されてきた (Aron, 2011; Jahanshahi et al., 2015b; Meyer and Bucci, 2016 などの総説を参照のこと)。しかしながら、一部の研究を除き、ほとんどの報告は集団の神経活動の解析に基づいており、ニューロン単位での神経活動の解析は行われていなかった。たとえば、トライアル単位のプロアクティブ抑制を示すサルの運動関連領域におけるニューロンの活動や (Chen et

al., 2010; Pouget et al., 2011; Stuphorn and Emeric, 2012)、ポスト・エラー・スローイング（失敗した試行の次の試行で起きる反応時間の遅延）を示すラットの背内側前頭前皮質におけるニューロンの活動（Narayanan and Laubach, 2008; Narayanan et al., 2013）など、少数の研究例しか報告されていない。それに加えて、先行研究ではプロアクティブ抑制を誘導する文脈変化のタイムスケールの違いを考慮しておらず、トライアル単位のプロアクティブ抑制もブロック単位のプロアクティブ抑制もいずれも文脈の変化によって起こる同じ「プロアクティブ抑制」として区別されずに扱われてきた。結果として、トライアル単位とブロック単位のプロアクティブ抑制は同じ神経メカニズムによって制御されているのか、それとも全く異なるメカニズムによって制御されているのかは明らかになっていなかった。

そこで我々は、この問題に取り組むためにラットを使った新しいストップ・シグナル課題を開発した。ラットはこの課題を遂行中にブロック単位（長いタイムスケール）およびトライアル単位（短いタイムスケール）の文脈変化のそれぞれに応じて反応時間の遅延、すなわち、プロアクティブ抑制を示した。このストップ・シグナル課題中のラットの大脳皮質からマルチニューロン記録を行って単一ニューロンレベルで神経活動を解析した。その結果、ブロック単位とトライアル単位のプロアクティブ抑制は行動上は非常に似通った行動抑制ではあるが、大脳皮質の各領域（一次および二次運動皮質 M1, M2、眼窩前頭皮質 OFC、後頭頂皮質 PPC）ではまったく異なる神経活動の修飾が観察された。本研究は、行動的に同じような反応時間の遅延であっても、それを誘導する文脈の変化の違いによっては異なる神経メカニズムが制御を担っていることを示した、我々が知る限り初めての報告である。なお、本研究の内容は原著論文として *Neuroscience* 誌に発表した (Yoshida et al.2018)。

3. 実験方法

動物と手術

すべての実験は「玉川大学動物実験に関する規程」に従い玉川大学動物実験委員会にて承認された実験計画（承認番号 H22/28-32）に基づき、文部科学省の定めた「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、日本神経科学学会の定めた「Guidelines for Animal Experimentation in Neuroscience」に沿って行った。すべての手術はイソフルラン麻酔下で行い、動物が感じる痛みが最小限となるように努めた。本研究の動物実験の方法は先行研究（Isomura et al., 2009, 2013; Kimura et al., 2012, 2017; Saiki et al., 2014, 2017; Nonomura et al., 2017; Soma et al., 2017）において確立されたものである。

本研究では7匹の Long-Evans 系ラット（体重 277 ± 29 g、オス）を実験に使用した。ラットはヘッドプレート取り付け手術までは多頭飼いで飼育し、プレート取り付け後は個飼いで飼育した。飼育ケージ内では自由に餌と水を摂取でき、また、室内の明暗は12時間周期（午前9時消灯；午後9時点灯）で変わるように設定した。ラットは手術前に10分間のハンドリングを2日間にわたって受けた。

頭部を固定するヘッドプレート（CFR-2, Narishige, Tokyo, Japan）を取り付けるために、麻酔吸入器（Univentor 400 anesthesia unit, Univentor, Zejtun, Malta）を使用したイソフルランガス麻酔（導入, 4.5%; 維持, 2.0-2.5%）でラットを麻酔下に誘導し、脳定位固定装置（SR-10R-HT, Narishige）に頭部を固定して手術を行った。頭皮切開時の局所麻酔としてリドカインゼリー（AstraZeneca, Osaka, Japan）を切開部へ塗布した。麻酔中の体温保持にはアニマルウォーマー（BWT-100, Bio Research Center,

Tokyo, Japan) を使用して 37°C以上を維持した。参照および接地電極 (Teflon-coated silver wires, A-M systems, WA, USA; 125 μ m in diameter) は小脳上の硬膜と頭骨との間に埋め込んだ。手術後には鎮痛剤 (meloxicam, 1 mg/kg s.c., Boehringer Ingelheim Japan, Tokyo, Japan) を皮下注射し、抗生物質を含む軟膏 (gentamicin ointment, 0.1% us. ext., MSD, Tokyo, Japan) を切開部に塗布した。

手術後 6 日以上経ってから、訓練を行うためにケージの飲水ボトルを取り外して給水制限を開始した。飲水量は訓練中に十分足りるように調整したが、必要に応じて訓練後に寒天ブロック (1 ブロックに約 15 ml の水を含む) を適量与え、体重が給水制限開始前の 80%以下とならないようにした。

行動課題

プロアクティブ抑制を調べるために、我々は自由反応型ストップ・シグナル課題 (free response Stop-Signal Task: frSST) を開発した (Fig. 1A)。これは頭部固定下のラットが簡単に go 反応および stop 反応を学習できるようにしたストップ・シグナル課題である。この frSST では、ラットが右前肢を使って正しく「スパウトレバー」(オペラント学習に用いられる道具と報酬系が一緒になった装置: Kimura et al., 2012) を動かすと、レバーの先端からサッカリン溶液の水滴が報酬として提示される。スパウトレバーは水平に動くようになっており (可動域は前方から後方までで 12 mm で、前端を 0%、後端を 100%として表記する)、この課題では 0-20%を「push」領域、65-79%を「hold」領域、80-100%を「lick」領域とした (Fig. 1A, left)。解析のために、50%をレバー押し反応、80%をレバー引き反応の境界線と定めた。一切の力を加えていないときにはレバーは 60%の位置に戻る。

はじめに、頭部固定下のラットに go 試行の訓練を行った (Fig. 1A, upper)。ラットは各試行を始めるにあたり、まずスパウトレバーを hold 領域まで引いて、一定時間保持しなければならない。保持の時間は訓練中の成功試行数に応じて 0 ms から最大 1500 ms まで段階的に伸ばしていった。レバーを必要な時間保持すると (最終段階ではランダムに 500-1500 ms の保持時間)、続いて go 信号 (10 kHz の純音、300 ms) が提示される。ラットが go 信号提示から 1,500 ms 以内にレバーを push 領域まで押して、さらに、lick 領域まで引ききると、レバーの先端から報酬が提示される (成功 go 試行)。報酬はマイクロポンプを使ってレバーの先端から供出される (0.1% サッカリン溶液 5 μ l \times 2 ショット)、この報酬供出に伴うポンプ音は報酬音として作用する (この報酬音は stop および reward 試行では stop 信号としても作用することが期待される)。この成功 go 試行では、反応時間は go 信号の提示からレバーが 50% レバー押し反応境界線を越えるまでの時間として計算した。ラットがレバーを押すより先に手前側に引いてしまったときや 1,500 ms 以内にレバーの押し引きを完了できなかったときは、その試行は失敗 go 試行として扱われてラットに報酬は与えられない。解析上、成功失敗いずれの go 試行においても、ラットが go 信号のあとにレバーを引かずにレバーを押した場合は、レバー押し反応を行った試行として取り扱った (Fig. 2 を参照)。試行が完了したあとには試行間間隔 (inter-trial interval: ITI; 成功 go 試行のあとは 1,000-3,000 ms に、失敗 go 試行のあとには 7,000-9,000 ms に設定) を挿入し、ラットには試行間間隔をハウスランプの点灯によって明示した。4 個体自動訓練装置 (O'hara & Co., Ltd., Tokyo, Japan; Isomura et al., 2009) を使用することで、複数の個体を並行して、1 個体あたり 1 日 1-2 時間の訓練で 3 週間以内に go 試行の訓練は完了した。

ラットが go 試行を学習したあとに、1 個体用記録装置 (TaskForcer; O'hara & Co., Ltd.) に移して frSST 遂行中の神経活動の記録を行った。この frSST は、Go ブロック (G-ブロック; 成功試行 30 回で終了) と Go & Stop ブロック [GS-ブロック; go 試行 (62.5%; 8 試行モジュールの 5 試行分) と stop 試行 (37.5%; 同 3 試行分) がランダムに出現; 成功試行計 70 回で終了] が交互にくり返されるスケジュールからできている (Fig. 1A and B)。ブロックの切り替えには 3 連続の reward 試行 (Reward ブロック: R-ブロック) を挿入して、ラットに G/GS ブロックの切り替えを明示した (Fig. 1B)。

go 試行と同様に stop および reward 試行においても、ラットは試行を開始するために、レバーを手前に引き一定時間保持する必要がある。stop 試行が開始すると、go 信号と同時または go 信号に続いて一定の遅延時間の後に報酬音 (ポンプ音) が提示される (Fig. 1A, middle)。go 信号から報酬音までの遅延時間は、前日の課題中の go 試行の反応時間の中央値 (100–460 ms) を使用した。一方、reward 試行のときは、go 信号は提示されずに報酬音だけが提示される (Fig. 1A, lower)。stop 試行と reward 試行のいずれの場合も、ラットはレバー押し反応を要求されておらず、レバーを自由に口元に引いて報酬を得ることができる (たとえレバー押しをしたとしても罰則はないため、ラットは自由に反応を選択してよい)。ラットは go 試行の訓練を通してすでに報酬音の意味を学習している。そのため、この frSST の stop 試行において、追加訓練を経ずとも、報酬音は go 信号によって起こるレバー押し反応に対して stop 信号として機能した (Fig. 2A)。なお、ラットが stop 試行でレバー押し反応のキャンセルを選択しやすくなるように、レバー押し方向のトルクを重くしてレバー押し反応のコストを大きくした。

ブロック単位のプロアクティブ抑制は、GS ブロックの成功 go 試行に続く go 試行 (*go-go*(GS-block)試行) と、G ブロックの成功 go 試行に続く go 試行 (*go-go*(G-block)試行) との比較によって観察できると期待される。すなわち、*go-go*(G-block)試行に比べて *go-go*(GS-block)試行の反応時間が遅くなるという、ブロック単位の長いタイムスケールの文脈変化による反応時間の遅延が予想される (Fig. 1C)。同様にトライアル単位のプロアクティブ抑制は、GS ブロックの成功 stop 試行に続く go 試行 (*stop-go*(GS-block)試行) と、GS ブロックの成功 go 試行に続く go 試行 (*go-go*(GS-block)試行) との比較によって観察できると期待される。つまり、*go-go*(GS-block)試行に比べて *stop-go*(GS-block)試行の反応時間が遅くなるという、直前の 1 試行の短いタイムスケールの文脈変化による反応時間の遅延が予想される (Fig. 1C)。今回の神経活動の解析では、直前の stop 試行にはレバー押し反応を抑制できた成功 stop 試行と抑制できなかった失敗 stop 試行の両方を含めた。ただし行動上の解析として、成功 stop 試行と失敗 stop 試行を分けた場合の反応時間の遅延効果についても確認を行った (結果の項を参照)。これは一部の先行研究で、stop 信号そのものの経験だけでなく、stop 試行の結果 (抑制できたか否か) も次の試行の行動に影響する可能性が示唆されていたためである (Emeric et al., 2007; Schachar et al., 2004; Verbruggen and Logan, 2008a; 2008b; Verbruggen et al., 2008)。

ブロック切り替え直後に go 試行の反応時間がどのように変化したのかを確認するため、ブロック切り替え前後 10 試行にわたって成功 go 試行に続く go 試行 (*go-go* 試行) の反応時間の比較を行った (Fig. 2D を参照)。また、トライアル単位のプロアクティブ抑制の効果が何試行先まで持続しているのかを確認するため、stop 試行から 1 試行後、2 試行後、3 試行後の go 試行の反応時間を比較した (Fig.

2E を参照 ; それぞれ *stop-go-go-go*, *stop-go-go-go*, *stop-go-go-go* と記載)。

電気生理学的記録

go 試行の訓練完了後、イソフルラン麻酔下のラットの頭骨および硬膜に 2 ~ 4 箇所、直径 1.0-1.5 mm の小孔を開窓した。開窓した位置は、M1 (1.0 mm anterior, 2.5 mm left lateral from bregma)、M2 (3.5 mm anterior, 2.4 mm left lateral)、PPC (4.0 mm posterior, 2.0 mm left lateral)、OFC (4.0 mm anterior, 2.0 mm left lateral; see **Fig. 3A**) である。M1 と M2 の座標は、予備実験で皮質内微小刺激 (50 to 100 μ A, 50 pulses at 100 Hz) を行い、右前肢の運動を誘発できた位置を使用した (data not shown ; Saiki et al., 2014, 2017; Kimura et al., 2017; Soma et al., 2017 を参照)。また、PPC と OFC の座標については、先行研究を参考にして位置を決定した (PPC, Erlich et al., 2015; OFC, Bari et al., 2011)。すべての開窓箇所は記録実験までシリコン充填材 (DentSilicone-V, Shofu, Kyoto, Japan) で密閉した。

細胞外マルチニューロン記録法 (マルチユニット活動として記録後に、多数のシングルユニットにクラスタリング) によって、行動課題を遂行中のラットから大脳皮質各領域の深層のニューロンの発火活動を記録した (Isomura et al., 2009; Saiki et al., 2014, 2017; Soma et al., 2017)。記録電極には 32 チャンネル (32ch) のシリコンプローブ (Isomura32-A32, NeuroNexus Technologies, MI, USA; Saiki et al., 2017) を使用し、たわみ防止のために脳表でアガロースゲル (2% agarose-HGT, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に埋め込んだ状態でシリコンプローブを各領域深層まで刺入した [M1, M2, PPC (at a depth of up to 1,250 μ m from the surface), and OFC (3,800 μ m deep)]。プローブの刺入にはマイクロマニピュレータ (1760-61, David Kopf Instruments,

CA, USA; SMM-200, Narishige) を使用し、刺入後 1 時間静置してから記録を開始した。なお、一度の実験セッションで同時に 2 領域からの記録を行った。シリコンプローブから記録したシグナルは、まず 32ch ヘッドステージ (MPA32I, Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany; gain, 10) で増幅し、さらに追加増幅およびフィルタリングを行った (FA64I, Multi Channel Systems; final gain, 2,000; band-pass filter, 0.5 Hz to 10 kHz)。これらのシグナルは 20 kHz のサンプリングレートでデジタル化し、2 台の 32ch ハードディスクレコーダー (LX-120, TEAC, Tokyo, Japan) で保存した。このときにスパウトレバーの位置情報および課題イベントの発生時刻情報 (例、go 信号や報酬音の提示時刻) も同期した状態で保存した。

スパイクの分離

保存したシグナルに、シリコンプローブのテトロード配列ごとにオフラインでシングルユニットに分離する処理を施した。要点を記すと、マルチユニット状態のスパイク群に対し、半自動スパイク分離ソフトウェアである「EToS」(Takekawa et al., 2010, 2012; <http://etos.sourceforge.net/>) を使用し、各スパイクの検出およびクラスタリングを行った。さらに、手動スパイククラスタリング・ソフトウェアの「Klusters」と「NeuroScope」(Hazan et al., 2006) を使用し、手動的に各スパイククラスターの統合、分割、削除を行って、より精度の高いシングルユニットのスパイククラスターとして解析に供した。このときにシングルユニットとして採用する基準としては、そのスパイククラスターの自己相関にみられるスパイク不応期が 2 ms より長いこと、他のスパイククラスターとの相互相関に 2 ms より長い不応期がないこと、を用いた。

スパイク活動の解析

各ニューロン（スパイククラスター）のスパイク活動の解析は、以下のように MATLAB（MathWorks, MA, USA）を使用して行った。まず、分離したすべてのニューロンは、そのスパイク波形の幅に応じて、regular-spiking ニューロン（RS；主に興奮性ニューロンから成る）と fast-spiking ニューロン（FS；主に抑制性ニューロンから成る）に分類した（Simons, 1978; Bruno and Simons, 2002; Kim et al., 2016；**Fig. 3B**を参照； ≥ 0.5 ms for RS neurons and < 0.5 ms for FS neurons; Isomura et al., 2009; Saiki et al., 2014, 2017）。各ニューロンの機能的（課題に関連する）スパイク活動を調べるためには、成功 go 試行の go 信号提示時またはレバー押し反応開始時を基準（0 ms）としてスパイク列を並べなおした（ranging from -500 ms to +500 ms from the event）。スパイク活動の課題関連性を検出するために、並べなおしたスパイク列から累積分布を作成し、これと一様分布との間で Kolmogorov-Smirnov 検定（KS 検定）を行った。我々の一連の研究では、この KS 検定で p 値が 10^{-6} 未満のときにそのニューロンのスパイク活動は課題に関連していると定義した（Saiki et al., 2014, 2017; Kimura et al., 2017; Soma et al., 2017）。

この解析で課題関連と分類されたニューロンのスパイク活動は、さらに、go 信号提示時を基準とした peri-event time histogram（PETH；10-ms ビン）における活動ピークの時間位置をもとに PRE タイプおよび POST タイプの細目に分類した（PRE, with the peak before go-cue-onset; POST, after go-cue-onset; **Fig. 3C**を参照）。

プロアクティブ抑制に関連するスパイク活動の変化は、前述の比較条件間の平均スパイク頻度（*SR*）の変化率を、各イベントウィンドウ（pre-ITI, ITI, pre-cue,

post-cue, and pre-push) で定量的に評価した (Fig. 6 を参照) :

ブロック単位のプロアクティブ抑制に関するスパイク頻度変化率(%)

$$= (SR_{go-go (GS-block)} - SR_{go-go (G-block)}) / SR_{go-go (G-block)} \times 100$$

トライアル単位のプロアクティブ抑制に関するスパイク頻度変化率(%)

$$= (SR_{stop-go (GS-block)} - SR_{go-go (GS-block)}) / SR_{go-go (GS-block)} \times 100$$

反応時間 (RT) の変化率についても同様に計算し、スパイク頻度変化率との
相関の解析に使用した (Fig. 7 を参照) :

ブロック単位のプロアクティブ抑制に関する反応時間変化率(%)

$$= (RT_{go-go (GS-block)} - RT_{go-go (G-block)}) / RT_{go-go (G-block)} \times 100$$

トライアル単位のプロアクティブ抑制に関する反応時間変化率(%)

$$= (RT_{stop-go (GS-block)} - RT_{go-go (GS-block)}) / RT_{go-go (GS-block)} \times 100$$

加えて、各ニューロンの課題関連スパイク活動が go 信号とレバー押し反応のいずれのイベントに強く関連して活動を変化させたかを示す指標を算出した (Fig. 8A を参照)。この解析には go-go (G-block) 試行のデータを使用した。まず、各ニューロンにおいて go 信号提示時とレバー押し反応開始時のそれぞれを時間基準として、反応時間の長さの上位 25% の試行と下位 25% の試行を用いて PETH を描画した。つぎに、それぞれの時間基準で、反応時間の上位および下位データ群の PETH の間で receiver operating characteristic (ROC) 曲線を求め、そこから D 値を算出した (対象時間 : go cue, 0 ms to + 500 ms; push, -500 ms to 0 ms)。この計算によって go 信号に対する D 値 (D_{cue}) とレバー押し反応に対する D 値 (D_{push}) が得られる。この 2 つの D 値を用いて、いずれの時間基準でより強くスパイク活動が変化したのかを示す Cue-Push preference を以下の式で求めた :

$$\text{Cue-Push preference} = (D_{\text{push}} - D_{\text{cue}}) / (D_{\text{push}} + D_{\text{cue}})$$

Cue-Push preference は、+1 に近いほど go 信号（感覚性入力）に関連して、-1 に近いほどレバー押し反応（運動性出力）に関連してスパイク活動が変化したことを意味する指標である。

今回はスパイク活動自体の特徴を調べる解析（Fig. 3; Tables 1-3）には、成功 go 試行が 100 試行以上、かつ、全試行中のスパイク数が 100 スパイク以上のニューロンのみを対象とした。また、プロアクティブ抑制におけるスパイク活動の変化を調べる解析（Figs. 4-8; Tables 1 and 2）には、1) 成功 go-go(G-block)試行、成功 go-go(GS-block)試行、成功 stop-go(GS-block)試行のデータがいずれも 20 試行以上あり、2) これらのデータはいずれもスパイク数が 50 スパイク以上で、さらに、3) これらのいずれかが課題関連であったニューロンのみを使用した。

組織学的観察

記録実験を完了したラットは、十分量のウレタン（2–3 g/kg, i.p., Nacalai Tesque）による深麻酔をかけた後、4%ホルムアルデヒド/0.1 M PBS を使った灌流固定を施した。回収された脳サンプルは後固定を行った後に、マイクロスライサー（VT1000S, Leica, Wetzlar, Germany）を使って 50 μm 厚に薄切した。薄切した切片はニュートラルレッド（Nacalai Tesque）によるニッスル染色を行い、顕微鏡（BX51N, Olympus, Tokyo, Japan）下の観察でシリコンプローブの刺入箇所を確認を行った。

統計解析

今回の研究では、7匹のラットに frSST を遂行させて、ブロック単位およびトリアル単位のプロアクティブ抑制に関する大脳皮質の制御メカニズムについて調べた。これらの7匹から得た、445個のM1ニューロン、595個のM2ニューロン、413個のPPCニューロン、616個のOFCニューロンを解析の対象とした。行動およびスパイク活動のデータは、以下に示す検定方法を適切に使い分けて解析した。すなわち、Wilcoxon 符号順位検定（必要に応じて Bonferroni の調整を実施）、カイニ乗検定（および残差分析）、Kruskal-Wallis 検定（および Scheffe の多重比較検定）、KS 検定を行い、p 値は 0.05 未満を有意性の閾値とした（スパイク活動の課題関連性のための KS 検定を除く）。また、多重比較検定としては Benjamini または Hochberg の false discovery rate (FDR) の調整を行った (**Figs. 6 and 7 and Table 4**)。これらの検定は、MATLAB の Statistics and Machine Learning Toolbox (MathWorks) を利用して実施した。文中および図表中では、特に記載がない限りは平均±標準偏差 (SD) または中央値のみ、サンプル数、検定名、p 値を記述する。

4. 実験結果

ストップ・シグナル課題中のブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制

本研究では、頭部固定下のラットが前肢を使った運動においてブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制を生じうる、新しいストップ・シグナル課題（free-response Stop-Signal Task: frSST）を開発した（Fig. 1；詳細については実験方法を参照）。この frSST では、ラットはスパウトレバーを右手で手前に引き、一定時間レバーを保持することで各試行を自発的に開始する。この保持時間は訓練過程で徐々に延長されていき、最終的な frSST では 500~1500 msec の間で試行ごとにランダムに決定されている。go 試行の際には、保持時間の後に go 信号が提示され、ラットが信号提示から 1500 msec 以内にレバーを押してから引くと、報酬音（ポンプ音）とともにレバー先端から報酬としてサッカリン水溶液が提示される（Fig. 1A, upper）。また、stop 試行では、go 信号と同時、または、go 信号につづいて報酬音が提示される。このとき、報酬音とともに報酬もレバー先端から提示されるため、ラットは必ずしもレバー押し反応をしなくても報酬を得ることができる（Fig. 1A, middle）。実際、ラットは go 試行の訓練過程で報酬音が報酬の提示を意味することをすでに学習しているため、go 信号が直前に提示されていても報酬音が提示されればレバー押し反応をキャンセルする行動がみられた（Fig. 2A）。すなわち、この stop 試行中の報酬音は stop 信号として作用していたと考えられる。また同様の理由で、reward 試行で報酬と報酬音だけが提示されたときにもレバー押し反応を行う必要はなく（Fig. 1A, lower）、実際にラットはレバー押しせずに報酬を得る行動を示した（data not shown）。frSST のセッションは、go 試行だけの G ブロックと go 試行と

stop 試行がランダムに起こる GS ブロックが R ブロックを挟んでくり返されるブロック制のスケジュールで実施した (Fig. 1B)。

この frSST のスケジュールでは、2 種類の異なる文脈変化に応じて go 試行の反応時間の遅延すなわちプロアクティブ抑制を別々に評価できると考えられた (Fig. 1C)。ひとつは、G ブロックで成功 go 試行に続く go 試行 (go-go(G-block)試行：青色で表記) と、GS ブロックで成功 go 試行に続く go 試行 (go-go(GS-block)試行：緑色で表記) の反応時間の比較で、後者の反応時間がより遅くなることが予想された。すなわち、ブロック単位という長いタイムスケールの文脈変化で go 試行の反応時間が遅延するブロック単位のプロアクティブ抑制の発生が期待された。もうひとつは、go-go(GS-block)試行と GS ブロックの stop 試行に続く go 試行 (stop-go(GS-block)試行：赤色で表記) の比較で、stop-go(GS-block)試行の反応時間がより遅延すると予想された。つまり、直前の 1 試行という短いタイムスケールの文脈変化によって go 試行の反応時間が遅延するトライアル単位のプロアクティブ抑制の発生が期待された。

予想通り、今回実験に使用した 7 匹のラットは、計 53 セッションの frSST を通して試行タイプごとにレバー押し反応の実行・抑制を切り替え、かつ、文脈の変化に応じて go 試行の反応時間を遅延させることを示した (Fig. 2；それぞれの記録セッション数は ラット#1, 5 セッション； ラット#2, 5 セッション；ラット#3, 4 セッション；ラット#4, 10 セッション；ラット#5, 16 セッション；ラット#6, 8 セッション；ラット#7, 5 セッション)。まず、試行タイプごとのレバー押し反応率 (試行開始後、最初にレバー押し反応をした頻度) を調べると (Fig. 2A)、go 試行では、若干 GS ブロックが低かったものの、G ブロック、GS ブロックともに非常に高いレ

バー押し反応率を示していた (G-blocks, $97.3 \pm 3.9\%$ as the mean and SD; GS-blocks, $97.0 \pm 4.1\%$; Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction, $p = 0.014$)。一方で、go 信号と報酬音 (stop 信号) に遅延のある stop 試行では、同じ GS ブロックにある go 試行と比べてレバー押し反応率は有意に減少していた (*delayed stop trials*, $44.1 \pm 28.8\%$; $p = 9 \times 10^{-10}$ compared with go trials in GS-blocks)。go 信号と報酬音に遅延のある stop 試行と遅延のない stop 試行の間では、後者の方がレバー押し反応率が低い傾向はあるものの、統計的に有意な差はなかった (*non-delayed stop trials*, $12.3 \pm 20.0\%$; $p = 0.192$ compared with *delayed stop*)。go 信号と報酬音に遅延のない stop 試行と reward 試行との間にはレバー押し反応率に有意差が検出され、reward 試行ではほとんどレバー押し反応が見られなかった (*reward trials*, $8.1 \pm 17.6\%$; $p = 0.039$ compared with *non-delayed stop*)。これらの結果から、たしかにラットは試行タイプに応じてレバー押し反応を切り替えていたことが示された。

つぎに、ブロック単位およびトライアル単位で文脈が変化したときの go 試行の反応の変化について検証を行った。レバー押し反応率についてみると、ブロック単位で文脈が変化する go-go(G-block)試行と go-go(GS-block)試行との間に有意な差はなかったが (Fig. 2B, upper; go-go trials in G-blocks, $83.6 \pm 13.4\%$; go-go trials in GS-blocks, $82.4 \pm 13.9\%$, $n = 53$ sessions; Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction, $p > 0.05$)、トライアル単位で文脈が変化する go-go(GS-block)試行と stop-go(GS-block)試行の間の比較では、stop-go(GS-block)試行のほうが有意にレバー押し反応率が低下していた (Fig. 2B, lower; go-go trials in GS-blocks, $82.4 \pm 13.9\%$; stop-go trials in GS-blocks, $p = 2 \times 10^{-8}$)。このトライアル単位の文脈変化で生じた go 試行のレバー押し反応率の低下が、Fig. 2A で観察された G ブロックと GS ブロックとの間のすべての go 試

行のレバー押し反応率低下の要因である可能性が考えられる。

さらに、成功 go 試行におけるレバー押し反応時間について調べると、ブロック単位の文脈変化があるときも (Fig. 2C, upper; go-go trials in G-blocks, 244.2 ± 110.0 ms; go-go trials in GS-blocks, 260.9 ± 128.3 ms, $n = 53$ sessions; Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction, $p = 2 \times 10^{-4}$)、トリアル単位の文脈変化があるときにも (Fig. 2C, lower; go-go trials in GS-blocks: 260.9 ± 128.3 ms; stop-go trials in GS-blocks: 297.1 ± 146.5 ms; $p = 1 \times 10^{-7}$)、有意な反応時間の遅延が生じていた。ちなみに、先行する stop 試行に stop 信号の遅れがあるときもないときも、つづく go 試行での反応時間の遅延を確認した (*delayed stop-go trials* 298.6 ± 146.4 ms; $p = 1 \times 10^{-7}$; *non-delayed stop-go trials*: 293.6 ± 146.6 ms; $p = 4 \times 10^{-5}$)。このように、この frSST においてラットはブロック単位およびトリアル単位の文脈変化に応じてプロアクティブ抑制を示していたことが確認できた。

ところで、今回の課題では報酬音を stop 信号として使用していることから、この遅延効果が stop 試行そのものの影響ではなく報酬予測の変化に基づく影響である可能性も考えられた。この可能性を検証するために、stop 信号として 10 kHz の純音のみを提示し、その 0~500 msec 後 (ランダム) に報酬を別に提示する frSST を改良した課題もラット 1 匹に予備的に試みた。その結果、この課題条件においても、ラットは 3 セッションすべてでブロック単位およびトリアル単位のプロアクティブ抑制を示した (go-go trials in G-blocks, 302 ± 77 ms, $n = 248$ trials; go-go trials in GS-blocks, 325 ± 92 ms, $n = 212$ trials; stop-go trials in GS-blocks, 356 ± 90 ms, $n = 96$ trials; Wilcoxon rank sum test; block-based, $z = -4.08$, $p = 4.5 \times 10^{-5}$, trial-based, $z = -4.12$, $p = 3.8 \times 10^{-5}$)。したがって、今回観察された frSST 中の 2 種類のプロアクティブ抑制は、

報酬音を stop 信号として使うという frSST 独自の課題デザインに由来する、報酬予測の変化に基づくものでないと考えられる。

また、ブロック単位のプロアクティブ抑制は、GS ブロック中に起きたトライアル単位のプロアクティブ抑制の効果が長期の履歴として残った結果に過ぎず、実際には2つのプロアクティブ抑制は本質的に同一のものである可能性も考えられた。そこで、我々はこのブロック単位のプロアクティブ抑制が、ブロックの切り替え直後にすみやかに変化するのかどうかを検証した (Fig. 2D; 多くのセッションで最低 5-6 回の G-GS または GS-G ブロック切り替えあり)。各ブロックの切り替え前後 10 試行以内から、成功 go 試行に続く go 試行 (go-go 試行) のレバー押し反応時間を集計して解析を行った。その結果、GS ブロックの最初 10 試行中の反応時間は G ブロックの最後 10 試行中のそれよりも有意に遅く (first go-go trials in GS-blocks, 342.9 ± 128.5 ms; last go-go trials in G-blocks, 299.7 ± 112.5 ms; Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction, $p = 0.036$)、また、G ブロックの最初 10 試行中の反応時間は GS ブロックの最後 10 試行中のそれよりも遅い傾向があった (first go-go trials in G-blocks, 342.8 ± 124.7 ms; last go-go trials in GS-blocks, 375.1 ± 137.1 ms; $p = 0.099$)。一方で、ブロック内の最初と最後 10 試行で反応時間を比べたときには有意な差はみられなかった (GS-blocks, $p = 0.192$; G-blocks, $p = 0.099$)。したがって、go 試行のレバー押し反応時間は、G ブロックと GS ブロックとが切り替わった直後すみやかに変化していたことが示唆された。加えて、直前の stop 試行が何試行先の go 試行にまでレバー押し反応時間に影響を与えるかについても調べたところ、直後 1 試行先の go 試行までにしか反応時間を有意に遅延させる影響を与えていなかったことを確認した (Fig. 2E; stop-go-go-go, 332.5 ± 171.1 ms; stop-go-go-go, 282.7 ± 142.5 ms; stop-

go-go-go, 283.8 ± 137.6 ms; Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction, $p = 4 \times 10^{-5}$ between stop-go-go-go and stop-go-go-go; $p > 0.1$ between stop-go-go-go and stop-go-go-go; $p = 2 \times 10^{-4}$ between stop-go-go-go and stop-go-go-go)。つまり、トライアル単位のプロアクティブ抑制の累積がブロック単位のプロアクティブ抑制にみえる可能性は非常に低いと考えられた。また、課題スケジュール上、GS ブロックの方が G ブロックに比べて後にくるためにモチベーションの低下が反映されやすい、という可能性も考えられた。そこで、両ブロックで試行間の長い休止時間 (>30 s; from the end of ITI to the start of lever-hold) の発生頻度を比べたが、両者に有意な差はみられず ($n = 53$ sessions; G-block, $0.52 \pm 0.56\%$; GS-block, $0.41 \pm 0.45\%$; Wilcoxon signed-rank test, $z = 1.484$, $p = 0.137$)、いずれのブロックでも同等のモチベーションでラットは課題に取り組んでいたことが示唆された。

ところで、課題中の試行の失敗は次の試行の反応時間を遅くすることが一般に知られている (post-error slowing; Narayanan and Laubach, 2008; Narayanan et al., 2013)。そのため、トライアル単位のプロアクティブ抑制は、「誤って」レバー押し反応をしてしまった stop 試行 (誤 stop 試行; 行動課題上は誤りではなく次善といえる) の効果によって起きた可能性も考えられた。そこで、誤試行が次の試行の反応時間に与える影響を検証した。誤 go 試行に続く go 試行の反応時間は、正 go 試行に続く場合と比べて有意な遅延は生じておらず、むしろより反応時間を早くする方向に傾いていた (previous correct, 261 ± 128 ms; previous error, 255 ± 121 ms; Wilcoxon signed rank test, $z = 1.155$, $p = 0.248$)。これは誤 stop 試行と正 stop 試行に続く go 試行の反応時間を比べても同様の結果が確認できた (previous correct, 292 ± 161 ms; previous error, 280 ± 146 ms; $z = 0.257$, $p = 0.798$)。また、正・誤の条件を揃えた上で、

go 試行または stop 試行に続く go 試行の反応時間を比べると、やはり stop 試行に続く方が反応時間は遅くなっていた（上述の反応時間を比較のこと）。以上を踏まえると、トライアル単位のプロアクティブ抑制は stop 試行の「誤り」によって引き起こされたわけではなく、stop 試行という経験そのものによって起きたと考えることができる。

これまでの解析から、2つのプロアクティブ抑制が異なる文脈の変化を受けて発生した行動の遅延であるということを示した。しかし、両者が異なるメカニズムによって駆動されるのか、共通のメカニズムを有するのかは、行動解析のみで断言することは非常に難しい。そこで、我々はプロアクティブ抑制に関わる大脳皮質の各領域の細胞活動を電気生理学的に解析し、両者の神経メカニズムについて比較検討を行った。

課題中の大脳皮質各領域の神経活動

大脳皮質における運動情報の主な最終出力領域である一次運動皮質（M1）と、先行研究でプロアクティブ抑制との関係が示唆されてきた二次運動皮質（M2）、後部頭頂皮質（PPC）、眼窩前頭皮質（OFC）といった皮質領域（Vink et al., 2005; Chikazoe et al., 2009; Zandbelt et al., 2013; van Belle et al., 2014; Vink et al., 2015）の個々のニューロンのスパイク活動を解析するため、マルチニューロン記録を行った。Isomura et al. (2009) と同様の方法で、記録したニューロンをスパイク幅に応じて regular spiking（RS；主に興奮性ニューロンから構成される）と fast spiking（FS；主に抑制性ニューロンから構成される）に分類した（**Fig. 3B** and **Table 1A**; RS, $n = 1,469$; FS, $n = 600$ ）。さらに、成功 go 試行の go 信号提示とレバー押し反応開始のいずれかに関連してス

スパイク頻度に変化があった場合、そのニューロンは課題関連ニューロンとして取り扱った（詳細は実験方法を参照）。多くの RS および FS ニューロンが go 信号提示またはレバー押し反応開始のいずれかのイベント周辺でスパイク活動を変化させ、課題に関連する神経活動を呈した（**Fig. 3B** and **Table 1A**; RS, $n = 783$; FS, $n = 341$ ）。以降の解析では、課題関連ニューロンだけを使用した。

Figure 3Cには M1 と M2、PPC、OFC の各 RS および FS ニューロンの go 信号提示時の課題関連スパイク活動を示してある（**Table 1A** を参照）。この図ではピーク時間に応じて並べ替えを行ってある。便宜上、これらのニューロンは PRE タイプ（ピークが go 信号より前にあったもの）と POST タイプ（ピークが go 信号より後にあったもの）に分類した。PRE タイプと POST タイプの比率について調べると、まず、RS ニューロンでは FS ニューロンに比べて PRE タイプの比率が有意に高かった（**Fig. 3C** and **Table 2A**）。RS ニューロンにおいては、OFC は他の大脳皮質領域に比べてより PRE タイプニューロンの比率が高かった（**Table 2B**）。なお、以降の解析では、全領域で十分な FS ニューロン数を得られなかったことから FS ニューロンの解析は行わず、RS ニューロンに関する解析に集中した。つぎに、POST タイプの RS ニューロンについて、go 信号提示からスパイク活動がピークに達するまでの潜時に着目して解析を実施した。まず、PPC のニューロンは他の領域のニューロンに比べて有意に早いピークまでの潜時を有していた（**Fig. 3C**; median peak time: M1, 140 ms; M2, 190 ms; PPC, 60 ms; OFC, 305 ms; e.g., PPC-RS vs. M1-RS, Scheffe multiple comparison test following Kruskal–Wallis test, $p = 0.010$; 詳細は **Table 3** を参照）。同様の結果は他の検定方法を実施した際にも得られており（例、Kolmogorov-Smirnov test with Bonferroni correction, data not shown）、PPC が他の M1、M2、OFC に比べて早い段階で go 信号提示に関連

する情報処理を行っていることが示唆された。

加えて、上記の M1-RS および M2-RS ニューロンの神経活動については、両者がレバー押しに関して異なるタイムコースを示すことを観察した。一定数の POST タイプの M1-RS ニューロンは (Fig. 3C, upper left)、レバー押しの開始から終了までの間にピークを示していた (Fig. 3D, left)。一方で POST タイプの M2-RS ニューロンは、レバー押しの開始から終了にかけてピークを持つ集団は顕著に集中しているわけではなかった (Fig. 3D, right)。これらの特徴は、M1 が実際の運動に関する情報を処理していて、M2 がより高次の情報処理に関わっているという一般に確立されたアイデアと合致している。

ブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制における神経活動の修飾

つぎに我々は、ブロック単位およびトライアル単位のプロアクティブ抑制を誘導するような文脈変化の下で、これら皮質領域の PRE および POST タイプニューロン (Table 1) の課題関連活動が修飾を受け得るのかを検証した。Figure 4A は代表例の POST タイプ M1 ニューロンのスパイク頻度を示しており、ブロック単位のプロアクティブ抑制では活動が減弱し、一方でトライアル単位のプロアクティブ抑制では亢進している。Figure 4B には、M1 の PRE および POST タイプ RS ニューロンの go-go(G-block)試行における各ニューロン集団の平均スパイク頻度 (青色) を上段に、ブロック単位 (緑色) とトライアル単位 (橙色) でのスパイク頻度の差分 (Fig. 1C を参照) を下段に、ITI の開始前後からレバー押し反応前にかけて描画してある (統計的な検定結果については Fig. 6 および Table 4 を参照)。M1 の RS ニューロンでは、ITI 前後や go 信号提示前後には目立ったスパイク頻度の変化は起きていなか

ったようであった。しかし、ブロック単位の文脈変化の下では、POST タイプのニューロンでレバー押し反応の直前でスパイク頻度が減弱していた。一方でトライアル単位の文脈変化の下では、この時間帯でスパイク頻度が亢進していた。このスパイク頻度の修飾のあった時間帯は運動実行の局面であり、プロアクティブ抑制によってレバー押し反応を遅延させている局面だと考えられる。そのため、この M1 で観察された修飾はプロアクティブ抑制に何らかの関わりをもっている可能性が考えられる。

M2 の RS ニューロンでは、M1 と異なるスパイク頻度の修飾が観察された (Fig.5 ; 統計的な検定結果については Fig. 6 と Table 4 を参照)。Fig. 5A には代表的な PRE タイプの M2-RS ニューロンのスパイク頻度を示してある。ブロック単位のプロアクティブ抑制にのみ活動の亢進がみられる。このように、M2 では PRE タイプ、POST タイプともに、ブロック単位の文脈変化の下では、ITI 開始前から go 信号提示後までの運動準備に関わる局面でスパイク頻度が亢進していた (Fig. 5B, green)。一方で、トライアル単位の文脈変化の下では目立ったスパイク頻度の修飾はみられなかった (Fig. 5B, orange)。運動準備の局面ではレバー押し反応を遅延させるための予備的な処理がなされていると推測されるため、やはりこの M2 の活動の修飾もプロアクティブ抑制に何らかの関係があることが考えられた。PPC と OFC についても同様の解析を行ったが、PPC ではトライアル単位のプロアクティブ抑制のレバー押し直前のみで、OFC ではいずれの文脈変化の下でもとくに目立ったスパイク活動の修飾は観察されなかった (data not shown)。

さらに、より定量的な検証を行うために、各イベントウィンドウでのスパイク頻度の変化率を算出し、すべての皮質領域、PRE および POST タイプにおいて、

系統的に統計検定を実施した (Fig. 6 and Table 4)。Figure 4 で示したように、M1 の POST タイプ RS ニューロンはレバー押し反応前のウィンドウにおいて、ブロック単位の文脈変化の下ではスパイク頻度は減弱し、逆に、トライアル単位の文脈変化の下ではスパイク頻度は亢進していた。また Figure 5 で示したように、M2 の RS ニューロンはブロック単位の文脈変化の下でのみ運動準備の時間帯で有意なスパイク頻度の亢進がみられた。また、PPC の POST タイプ RS ニューロンは、トライアル単位の文脈変化の下ではレバー押し反応前のウィンドウにおいて有意にスパイク頻度が亢進していた。このような変化の傾向は、スパイク頻度の変化率 (%) を使った検定だけでなく、スパイク頻度の差分 (spk/s) で検定したときにも得られた (data not shown)。

つづいて、これらのスパイク頻度の修飾とプロアクティブ抑制との間の関係を調べるために、文脈が変化したときの各イベントウィンドウにおけるスパイク頻度の変化率 (Fig. 6) とレバー押し反応時間の変化率 (Fig. 2 を参照) との相関を調べた。Figure 7 は代表的な結果を示したものである (Fig. 6 の矢印で示したデータ群における相関関係を示している)。M1 の POST タイプの RS ニューロンは、ブロック単位の文脈変化の下では、レバー押し反応前のウィンドウにおけるスパイク頻度の変化率とレバー押し反応時間変化率との間に有意な負の相関 (Fig. 7A)、すなわち、スパイク頻度が減弱するほど反応時間が遅延することを示した。しかし、トライアル単位の文脈変化の下では、両者に有意な相関関係は検出されなかった (Fig. 7B)。M2 の RS ニューロンは、ブロック単位の文脈変化の下で、運動の準備期間に相当する各イベントウィンドウにおいて顕著なスパイク頻度の修飾を呈していたものの、これらのスパイク頻度の修飾は反応時間との間に有意な相関を示さなかった (Fig.

7C; 代表例として M2 の PRE タイプ RS ニューロンの go 信号提示前のウィンドウにおけるブロック単位の文脈変化の下の結果を示す)。すべての大脳皮質領域、PRE および POST タイプ、イベントウィンドウ、そして、ブロック単位およびトライアル単位の文脈変化において相関関係を検証したが、スパイク頻度の変化率と反応時間の変化率との間に有意な相関がみられたのは、先述した M1 の POST タイプ RS ニューロンのブロック単位の文脈変化におけるレバー押し反応前のウィンドウ ($r = -0.513, p < 0.001$ after FDR control) と、M1 の PRE タイプ RS ニューロンのブロック単位の文脈変化におけるレバー押し反応前のウィンドウ ($r = -0.559, p < 0.01$) だけであった。この結果から、ブロック単位のプロアクティブ抑制において、M1 の RS ニューロンはレバー押し反応の前の時間帯で直接的に反応時間の遅延を制御していたと推察される。一方、トライアル単位のプロアクティブ抑制においては、別の機構によって反応時間の遅延が生じていた可能性がある。

プロアクティブ抑制における OFC サブニューロン集団の役割

これまでの解析では、OFC ニューロンにはプロアクティブ抑制に関連する目立った変化は検出されなかった。しかし、過去の研究で OFC は行動抑制において非常に重要な脳領域であることがくり返し指摘されてきた。また、上記の解析においても、OFC の POST タイプ RS ニューロンは、FDR 調整後に有意性は残らなかったものの、一部のイベントウィンドウにおいて比較的大きなスパイク頻度の変化率を呈していた (Fig. 6 を参照)。そのため、OFC の RS ニューロン全体ではなく、機能的に異なる一部のニューロン集団がプロアクティブ抑制に関わっている可能性が考えられた。この可能性を検証するために、各ニューロンの機能的な違いを示す新た

な特徴量を算出し、その特徴量とプロアクティブ抑制におけるスパイク頻度の変化率との関連を検証した。

まず、各ニューロンが go 信号提示（感覚入力）とレバー押し反応開始（運動出力）のいずれの時間基準に関連してより大きくスパイク活動を変化させたかを表す Cue-Push preference という特徴量を算出した（Fig. 8A；詳細は実験方法を参照）。この特徴量は、ニューロンが go 信号提示の時間基準に関連してスパイク頻度を強く変化させるほど+1の値に近づき、レバー押し反応開始の時間基準に関連してスパイク頻度を強く変化させるほど-1に値が近づくという性質をもつ。したがって、この Cue-Push preference はそのニューロンの活動がどちらの課題イベント、すなわち感覚性処理と運動性処理のどちらの過程により近いのかを大まかに示す指標となっている。実際に各領域のニューロン活動をこの特徴量で調べると、M1 や M2 といった運動出力に深く関わる領域の RS ニューロンは、運動性処理に関連してスパイク活動が変化するニューロンが多かった（Fig. 8B and Table 5A）。この特徴量の分布を OFC の POST タイプ RS ニューロンで調べてみると、他の領野とは異なり、このニューロン群の活動は運動性方向への分散がほとんどなく、非常に強く感覚性処理側に偏って集まっていた（Fig. 8B）。

つぎに、この OFC の POST タイプ RS ニューロンにおいて、Cue-Push preference と、ブロック単位およびトライアル単位の文脈変化時のスパイク頻度変化率との間の相関を検証した。全体的に見ると、ブロック単位の文脈変化の下では両者は負の相関を示す傾向があり、トライアル単位の文脈変化の下では正の相関を示す傾向があった（Fig. 8C）。つまり、相対的に感覚性処理に強く関連して（より認知的な過程で）スパイク頻度に変化する OFC の POST タイプ RS ニューロンは、ブロック単位の

プロアクティブ抑制の下ではスパイク頻度が減弱する傾向があり、逆に、トライアル単位のプロアクティブ抑制の下ではスパイク頻度が亢進するという、両方向性の変化を示していた。

5. 考察と結論

本研究では、げっ歯類が異なるタイムスケールの文脈変化に応じてどのようにプロアクティブ抑制（反応開始の遅延）を制御しているのかについて調べた。この目的のために、我々は頭部固定下のラットがブロック単位およびトライアル単位のプロアクティブ抑制を生じる、スパウトレバーを使った新しいストップ・シグナル課題（fdSST）を開発した（Fig. 2）。この課題を行っているラットの M1、M2、PPC、OFC からマルチニューロン記録によってスパイク活動を計測し、とくに、課題に関連するスパイク活動を示した PRE および POST タイプ RS ニューロンに着目して解析を進めた（Figs. 3 and 8; Tables 1, 2, 3 and 5）。それぞれの大脳皮質領域のニューロンは、ブロック単位とトライアル単位のプロアクティブ抑制では異なるスパイク活動の修飾を示した。M1 の POST タイプ RS ニューロンは、ブロック単位のプロアクティブ抑制の下ではレバー押し反応の直前、言い換えると運動実行のときにだけスパイク活動が減弱していたが、トライアル単位のプロアクティブ抑制の下ではこの局面で活動は亢進していた（Figs. 4 and 6; Table 4）。このニューロン群のスパイク活動の修飾は、ブロック単位のプロアクティブ抑制のときにはレバー押し反応時間と有意に負の相関関係をもっていたが（スパイク活動が減弱するほど反応時間が遅延した）、トライアル単位のプロアクティブ抑制のときには有意な相関はみられなかった（Fig. 7）。一方、M2 の RS ニューロンは、ブロック単位のプロアクティブ抑制のときには運動準備の時間帯でスパイク活動が継続的に亢進していたが、トライアル単位のプロアクティブ抑制のときには有意な変化を示さなかった（Figs. 5 and 6; Table 5）。さらに、感覚性処理に関連してスパイク活動を変化させる OFC の一部の RS ニューロンは、ブロック単位とトライアル単位のプロアクティブ抑制の間で

大きな両方向性のスパイク頻度の修飾を呈した (Fig. 8)。Figure 9 は本研究で得られた知見を模式的にまとめた図である。これらの領域の質的に異なる活動修飾を鑑みるに、ブロック単位とトライアル単位のプロアクティブ抑制は、後者の単純な累積効果で前者が生じる共通メカニズムによるものではなく、異なる大脳皮質の神経メカニズムによって制御されている異なる行動抑制である可能性が高い。我々の知る限り、本研究は文脈変化のタイムスケールの違うプロアクティブ抑制は異なる機構によって制御されている可能性を示した初めての報告である。

ラットにおける 2 つのプロアクティブ抑制の行動学的評価

ストップ・シグナル課題は、プロアクティブ抑制を含むヒトやサル of 行動抑制を調べることに非常に適した実験パラダイムである (Vince, 1948; Verbruggen and Logan, 2008b; Chen et al., 2010)。近年では霊長類だけではなく、遺伝子組換えや薬理実験といった操作実験が容易にできるげっ歯類においても頻繁にこの実験パラダイムが用いられている (Eagle and Robbins, 2003; Bryden et al., 2012; Schmidt et al., 2013; Bryden and Roesch, 2015; Mayse et al., 2015; Mallet et al., 2016)。例えば、Mayse et al. (2014) は、ラットに stop 試行がセッション中に一定頻度で現れるストップ・シグナル課題をやらせることで、ラットもプロアクティブ抑制 (本研究のトライアル単位のプロアクティブ抑制に相当する行動抑制) を行うことを報告している。だが、従来は、霊長類であれげっ歯類であれ、異なるタイムスケールの文脈変化で起こるプロアクティブ抑制を比較するような研究は報告されていなかった。また、げっ歯類においては、そもそもブロック単位のプロアクティブ抑制が起こるかどうかについても不明なままであった。本研究で開発した frSST はげっ歯類で初めてブロック

単位のプロアクティブ抑制を誘導できたストップ・シグナル課題であり、この点はプロアクティブ抑制研究において非常に意義のある進展であるといえる。なぜなら、げっ歯類を使った研究はヒトやサルを使った研究に比べて各種の操作実験を導入しやすく（例、局所的薬理実験、光遺伝学的操作実験など）、今後は行動と神経活動との相関関係の観察だけでなく、これらの操作技術をもちいた因果関係を検証する研究のさらなる進展も期待されるからである。

さらに、我々の frSST では行動課題の効率および質的側面が格段に向上した。従来のストップ・シグナル課題では、動物が go 信号で誘発される反応を stop 信号に応じて抑制することを学習するために長い訓練期間を要していた（ラットでは約 2-3 ヶ月；Eagle and Robbins, 2003; Schmidt et al., 2013）。我々の課題では、スパウトレバーの特性を活かすことで、ラットに報酬音は運動反応が不要なことを意味すること（stop 信号として機能すること）を go 試行の訓練の中で学習させることができ、そのため、約 3 週間の go 試行の訓練のあと追加の訓練を経ずにストップ・シグナル課題を実行させることができた。加えて、報酬として少量のサッカリン水溶液を使用したことから、フードペレットを報酬に用いる課題に比べて 1 セッションあたり多くの成功試行数のデータを取得できた（1 セッションあたり 500-900 成功試行）。また、この課題は頭部固定下で行うため、精度の高いレバー運動の計測や安定した神経活動の記録が実現できた。このように、我々は frSST を用いたことで、2 種類のプロアクティブ抑制を効果的に誘導して評価することができた。

ブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制の機能とそのメカニズム

一般に、プロアクティブ抑制は、状況に応じて運動反応の開始を遅らせることでその反応を実行するか抑制するかを適切に選択できるようにする、合理的な機能であると考えられている (Verbruggen and Logan, 2008b)。このようなプロアクティブ抑制に対する見解は、我々の研究においても妥当であると思われた。すなわち、ラットは異なるタイムスケールで行動の選択までの時間を戦略的に遅延させていたようである (Fig. 2C-E)。ブロック単位のプロアクティブ抑制では、文脈の変化を認識するまでに多少の時間が必要な可能性はあるものの、長期間(ブロック単位)にわたって反応の遅延を継続することで行動の最適化を行っていた。一方でトライアル単位のプロアクティブ抑制は、直前の試行という短いタイムスケールの状況変化を受けて一時的に反応を遅延させていた。これはブロックが切り替わった直後などに特に有効な適応だと考えられる。ところで、直前に突発的な出来事が起こると非特異的な行動抑制(反応時間の遅延や反応そのものの抑制)が引き起こされることが以前から知られている (Wessel and Aron, 2013, 2017; Wessel et al., 2016)。ラットが stop 試行中に報酬(音)を提示されることもこのような出来事に相当している可能性があり、トライアル単位のプロアクティブ抑制は、このような意図しない、受動的な行動抑制のひとつである可能性も考えられる。いずれにしても、タイムスケールの異なる2つのプロアクティブ抑制が存在するという仮説は、各皮質領域で観察された活動の修飾パターンが両者で異なっていたこととも合致している (Fig. 9; 以下を参照)。確証を得るまではいかないものの、2つのプロアクティブ抑制は異なる文脈変化に対する別々の適応の形だと推測できる。

ブロック単位のプロアクティブ抑制では、OFC のとくに感覚性(認知的な)処理に関連して活動を変化させるニューロンで、運動準備から運動実行の局面でス

パイク頻度を減弱させる傾向があった (Fig. 9, upper)。一方、M2 と (とくに POST タイプの) M1 のニューロンは、運動準備の局面でスパイク頻度が亢進していた。つづいて、(POST タイプの) M1 のニューロンは、運動実行の局面でそのスパイク頻度が減弱していた。先行研究では、OFC は他の行動抑制である「リアクティブ抑制」、すなわち、外部刺激に応じて行動を瞬時に停止させることに関わっていることがくり返し報告されてきた (Aron et al., 2003; Aron, 2011; Bryden and Roesch, 2015; Jahanshahi et al., 2015b)。実際に、OFC のニューロンは行動を停止させるときに活動が亢進する (Bryden and Roesch, 2015)。本研究の GS ブロックでは、stop 試行がランダムに発生するため運動反応の突然の停止が起こりやすい一方、go 試行では (反応の開始を遅らせる必要はあるものの) 運動反応を中断してしまてはいけない。そのため、基本的には GS ブロックの go 試行で運動反応の停止に関わる OFC ニューロンの活動が減弱し、運動反応そのものは起こしやすくなっている状態は合理的なメカニズムだと考えられる。また、げっ歯類の M2 は目標指向的行動において状況依存的に行動を選択することに関わっていることが示唆されている (Sul et al., 2012; Siniscalchi et al., 2016)。霊長類でげっ歯類の M2 に相当すると推測されている補足運動野も目標指向的な行動の切り替えに関わっている (Isoda and Hikosaka, 2007)。そのため、ブロック単位のプロアクティブ抑制の運動準備の際にみられた M2 の活動の亢進は、目標指向的に行動を切り替えるため、すなわち、通常の運動反応から遅い運動反応への切り替えのために起きたのかもしれない。運動準備の局面で観察された M1 の活動の亢進は、この M2 の活動の亢進の影響だと考えられる。運動実行時には M1 で反応時間に逆相関する形でスパイク頻度が減弱していたが、これは M1 が運動情報の主な最終出力領域であることを踏まえると、このときに亢進した M1

の活動は反応時間そのものを反映していたと考えられる。

トライアル単位のプロアクティブ抑制では (Fig. 9, lower)、より認知的な過程で活動を変化させる OFC のニューロンで持続的なスパイク頻度の亢進がみられ、(POST タイプの) M1 と PPC でも運動実行の局面でスパイク頻度が亢進していた。前述した仮説を踏まえると、トライアル単位のプロアクティブ抑制は直前に stop 試行という予想外の出来事があったことで生じる受動的な (意図せずに起きた) 運動反応の遅延であった可能性がある。つまり、直前にあった stop 試行によって次の go 試行で運動反応を停止するような制御が起こり、この制御を超えて運動反応を実行したために反応時間が遅延したと推測できる。したがって、一部のニューロン群で OFC の活動が亢進していたのは運動反応を停止させる制御を反映しており、反応時間とは相関しない M1 と PPC (PPC の一部のニューロンも最終的な運動出力を担っていることが知られている) の活動の亢進は、この運動反応の停止を打ち破るために生じていた可能性が考えられる。

あくまで予測ではあるが、frSST 中に一時的にこれらの皮質領域の活動を抑制させることで、2 つのプロアクティブ抑制のメカニズムの違いをより鮮明にできるのではないかと考えられる。たとえば、M2 の活動を go 信号停止前に抑制させるとブロック単位のプロアクティブ抑制に大きな影響が出る一方、OFC で同様の抑制をするとトライアル単位のプロアクティブ抑制でより強い影響が生じると予想される。

それでは、このようなプロアクティブ抑制における大脳皮質各領域で観察された神経活動の修飾には、他のどのような神経回路メカニズムが関わっているのだろうか？皮質内に注目するなら、今回は解析に耐えうる十分なニューロン数が得

られなかったため検証できないが、RS ニューロンの活動の修飾は抑制性の FS ニューロンによって制御されていた可能性が考えられる。また、皮質下の脳構造を考慮するなら、大脳基底核も今回の皮質 RS ニューロンの活動の制御に関与した候補のひとつである (Yin and Knowlton, 2006; Aron, 2011; Jahanshahi et al., 2015b)。大脳基底核の中でもとくに視床下核 (subthalamic nucleus: STN) は、突発的な出来事によって引き起こされる行動抑制において中心的な役割を担っていることが知られている (Wessel and Aron, 2013, 2017; Wessel et al., 2016)。前述したように、トライアル単位のプロアクティブ抑制はこの行動抑制の一種である可能性があり、その場合、少なくともトライアル単位のプロアクティブ抑制はこの STN による制御を受けているのではないかと推測される。STN は興奮性の投射を黒質網様部 (Substantia nigra pars reticulata: SNr) に伸ばしており、この SNr は抑制性の投射を黒質緻密部 (Substantia nigra pars compacta: SNc) や視床といった行動の開始に必要な領域に伸ばしている。つまり、STN が発火することで行動の開始に必要な皮質下の領域の活動は低下し、行動が起こりにくくなると考えられる。また、STN は大脳皮質—大脳基底核—視床—大脳皮質ループ (Nambu et al., 2002) を構成しており、このループ回路を通して今回観察された大脳皮質での神経活動の修飾が生じた可能性も考えられる。小脳も大脳皮質との間にループ回路を有しており (Bostan et al., 2013; Shakkottai et al., 2017)、このループ回路を介してプロアクティブ抑制時の大脳皮質の活動が制御されていた可能性もある。事実、本研究とは若干異なる行動抑制ではあるものの、プロアクティブに行動の実行・抑制を切り替える行動に小脳—大脳皮質ループを構成する脳構造 (視床、淡蒼球、小脳歯状核) の神経活動が重要であることが報告されている (Yoshida and Tanaka, 2009; Kunimatsu and Tanaka, 2010;

Kunimatsu et al., 2016)。

精神・神経疾患に見られるプロアクティブ抑制の障害

前述したように、ヒトの精神・神経疾患の患者では、厳密な区分はされていないもののある種のプロアクティブ抑制の障害が報告されている (e.g., Parkinsonism, Tourette's syndrome, alcoholism, and eating disorders; Ganos et al., 2014; Hu et al., 2015; Jahanshahi et al., 2015a; Bartholdy et al., 2016)。これらの報告ではブロック単位とトライアル単位のプロアクティブ抑制の違いを考慮しておらず、もしかしたら異なるプロアクティブ抑制の障害をそれぞれ報告している可能性も考えられる。今回の研究結果から、行動上同じようなプロアクティブ抑制であっても、原因となる文脈変化のタイムスケールが異なると制御する神経メカニズムも別のものと予想される。そのため、適切にプロアクティブ抑制の種類を区別した上でそれぞれの疾患における行動障害を調べることで、各疾患に対するより正確な病態に対する知見が得られるのではないかと考えられる。また、今回我々が開発した frSST をこれらの疾患のモデル動物 (例 Rios et al., 2016) に適用することで、神経回路レベルでのより詳細な病態研究が可能になると期待できる。

結論

本研究は、異なるタイムスケールの文脈変化に応じてプロアクティブ抑制がどのように制御されているのかについて、新しいストップ・シグナル課題を開発し、この課題中のラットの大脳皮質から神経活動を記録して研究を行った。その結果、行動上は同じような反応時間の遅延であっても、文脈変化のタイムスケールが

異なると（つまり、ブロック単位それともトライアル単位のタイムスケールで起こるかどうかで）、大脳皮質での神経活動の修飾はまったく異なっていることを発見した。この神経活動の修飾の違いは、これらのプロアクティブ抑制が異なる神経メカニズムによって制御されていることを示唆している。本研究は、異なるタイムスケールの文脈変化に応じて異なる神経メカニズムがプロアクティブ抑制の制御を担っている可能性を示した初めての報告であり、今後の行動抑制の神経メカニズムの研究において重要な一歩だといえる。

6. 引用文献

- Aron AR, Fletcher PC, Bullmore ET, Sahakian BJ, Robbins TW (2003) Stop-signal inhibition disrupted by damage to right inferior frontal gyrus in humans. *Nat Neurosci* 6:115-116.
- Aron AR (2011) From reactive to proactive and selective control: developing a richer model for stopping inappropriate responses. *Biol Psychiatry* 69:e55-68.
- Bari A, Mar AC, Theobald DE, Elands SA, Oganya KC, Eagle DM, Robbins TW. (2011) Prefrontal and monoaminergic contributions to stop-signal task performance in rats. *J Neurosci* 31:9254-9263.
- Bartholdy S, Campbell IC, Schmidt U, O'Daly OG (2016) Proactive inhibition: An element of inhibitory control in eating disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 71:1-6.
- Bostan AC, Dum RP, Strick PL (2013) Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends Cogn Sci.* 17:241-254.
- Bruno RM, Simons DJ (2002) Feedforward mechanisms of excitatory and inhibitory cortical receptive fields. *J Neurosci* 22:10966-10975.
- Bryden DW, Burton AC, Kashtelyan V, Barnett BR, Roesch MR (2012) Response inhibition signals and miscoding of direction in dorsomedial striatum. *Front Integr Neurosci* 6:69.
- Bryden DW, Roesch MR (2015) Executive control signals in orbitofrontal cortex during response inhibition. *J Neurosci* 35:3903-39014.
- Chen X, Scangos KW, Stuphorn V (2010) Supplementary motor area exerts proactive and reactive control of arm movements. *J Neurosci* 30:14657-14675.

- Chikazoe J, Jimura K, Hirose S, Yamashita K, Miyashita Y, Konishi S (2009) Preparation to inhibit a response complements response inhibition during performance of a stop-signal task. *J Neurosci* 29:15870-15877.
- Eagle DM, Robbins TW (2003) Lesions of the medial prefrontal cortex or nucleus accumbens core do not impair inhibitory control in rats performing a stop-signal reaction time task. *Behav Brain Res* 146:131-144.
- Emeric EE, Brown JW, Boucher L, Carpenter RH, Hanes DP, Harris R, Logan GD, Mashru RN, Paré M, Pouget P, Stuphorn V, Taylor TL, Schall JD (2007) Influence of history on saccade countermanding performance in humans and macaque monkeys. *Vision Res* 47:35-49.
- Erich JC, Brunton BW, Duan CA, Hanks TD, Brody CD (2015) Distinct effects of prefrontal and parietal cortex inactivations on an accumulation of evidence task in the rat. *eLife* 4: e05457.
- Ganos C, Kühn S, Kahl U, Schunke O, Feldheim J, Gerloff C, Roessner V, Bäumer T, Thomalla G, Haggard P, Münchau A (2014) Action inhibition in Tourette syndrome. *Mov Disord* 29:1532-1538.
- Hazan L, Zugaro M, Buzsáki G (2006) Klusters, NeuroScope, NDManager: a free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *J Neurosci Methods* 155:207-216.
- Hu S, Ide JS, Zhang S, Sinha R, Li CS (2015) Conflict anticipation in alcohol dependence - A model-based fMRI study of stop signal task. *Neuroimage Clin* 8:39-50.
- Isoda M, Hikosaka O (2007) Switching from automatic to controlled action by monkey medial

frontal cortex. *Nat Neurosci* 10:240-248.

Isomura Y, Harukuni R, Takekawa T, Aizawa H, Fukai T (2009) Microcircuitry coordination of cortical motor information in self-initiation of voluntary movements. *Nat Neurosci* 12:1586-1593.

Isomura Y, Takekawa T, Harukuni R, Handa T, Aizawa H, Takada M, Fukai T (2013) Reward-modulated motor information in identified striatum neurons. *J Neurosci* 33:10209-10220.

Jahanshahi M, Obeso I, Baunez C, Alegre M, Krack P (2015a) Parkinson's disease, the subthalamic nucleus, inhibition, and impulsivity. *Mov Disord* 30:128-140.

Jahanshahi M, Obeso I, Rothwell JC, Obeso JA (2015b) A fronto-striato-subthalamic-pallidal network for goal-directed and habitual inhibition. *Nat Rev Neurosci* 16:719-732.

Kim H, Ährlund-Richter S, Wang X, Deisseroth K, Carlén M (2016) Prefrontal parvalbumin neurons in control of attention. *Cell* 164:208-218.

Kimura R, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Ohkubo F, Kitamura K, Matsuzaki M, Sakai Y, Isomura Y (2012) Reinforcing operandum: rapid and reliable learning of skilled forelimb movements by head-fixed rodents. *J Neurophysiol* 108:1781-1792.

Kimura R, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y (2017) Large-scale analysis reveals populational contributions of cortical spike rate and synchrony to behavioural functions. *J Physiol* 595:385-413.

Kunimatsu J, Suzuki TW, Tanaka M (2016) Implications of lateral cerebellum in proactive control of saccades. *J Neurosci* 36:7066-7074.

- Kunimatsu J, Tanaka M (2010) Roles of the primate motor thalamus in the generation of antisaccades. *J Neurosci* 30:5108-5117.
- Lappin JS, Eriksen CW (1966) Use of a delayed signal to stop a visual reaction-time response. *J Exp Psychol* 72:805-811.
- Logan GD, Cowan WB, Davis KA (1984) On the ability to inhibit simple and choice reaction time responses: a model and a method. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* 10:276-291.
- Mallet N, Schmidt R, Leventhal D, Chen F, Amer N, Boraud T, Berke JD (2016) Arky pallidal cells send a stop signal to striatum. *Neuron* 89:308-316.
- Meyer HC, Bucci DJ (2016) Neural and behavioral mechanisms of proactive and reactive inhibition. *Learn Mem* 23:504-514.
- Mayse JD, Nelson GM, Avila I, Gallagher M, Lin SC (2015) Basal forebrain neuronal inhibition enables rapid behavioral stopping. *Nat Neurosci* 18:1501-1508.
- Mayse JD, Nelson GM, Park P, Gallagher M, Lin SC (2014) Proactive and reactive inhibitory control in rats. *Front Neurosci* 8:104.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res* 43:111-117.
- Narayanan NS, Laubach M (2008) Neuronal correlates of post-error slowing in the rat dorsomedial prefrontal cortex. *J Neurophysiol.* 100:520-525.
- Narayanan NS, Cavanagh JF, Frank MJ, Laubach M (2013) Common medial frontal

mechanisms of adaptive control in humans and rodents. *Nat Neurosci.* 16:1888-1895.

Nelson MJ, Boucher L, Logan GD, Palmeri TJ, Schall JD (2010) Nonindependent and nonstationary response times in stopping and stepping saccade tasks. *Atten Percept Psychophys* 72:1913-1929.

Nonomura S, Fujiwara-Tsukamoto Y, Kajihara T, Fujiyama F, Isomura Y (2017) Continuous membrane potential fluctuations in motor cortex and striatum neurons during voluntary forelimb movements and pauses. *Neurosci Res* 120:53-59.

Pouget P, Logan GD, Palmeri TJ, Boucher L, Paré M, Schall JD (2011) Neural basis of adaptive response time adjustment during saccade countermanding. *J Neurosci* 31:12604-12612.

Riger M, Gauggel S (1999) Inhibitory after-effects in the stop signal paradigm. *Br J Psychol* 90:509-518.

Ríos A, Barrientos R, Alatorre A, Delgado A, Perez-Capistran T, Chuc-Meza E, García-Ramirez M, Querejeta E (2016) Dopamine-dependent modulation of rat globus pallidus excitation by nicotine acetylcholine receptors. *Exp Brain Res* 234:605-616.

Saiki A, Kimura R, Samura T, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y (2014) Different modulation of common motor information in rat primary and secondary motor cortices. *PLoS One* 9:e98662.

Saiki A, Sakai Y, Fukabori R, Soma S, Yoshida J, Kawabata M, Yawo H, Kobayashi K, Kimura M, Isomura Y (2017) *In vivo* spiking dynamics of intra- and extratelencephalic projection neurons in rat motor cortex. *Cereb Cortex* (in press) doi: 10.1093/cercor/bhx012.

- Schachar RJ, Chen S, Logan GD, Ornstein TJ, Crosbie J, Ickowicz A, Pakulak A (2004) Evidence for an error monitoring deficit in attention deficit hyperactivity disorder. *J Abnorm Child Psychol.* 32:285-293.
- Schmidt R, Leventhal DK, Mallet N, Chen F, Berke JD (2013) Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nat Neurosci* 16:1118-1124.
- Shakkottai VG, Batla A, Bhatia K, Dauer WT, Dresel C, Niethammer M, Eidelberg D, Raïke RS, Smith Y, Jinnah HA, Hess EJ, Meunier S, Hallett M, Fremont R, Khodakhah K, LeDoux MS, Popa T, Gallea C, Lehericy S, Bostan AC, Strick PL (2017) Current Opinions and Areas of Consensus on the Role of the Cerebellum in Dystonia. *Cerebellum* 16:577-594.
- Simons DJ (1978) Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysiol* 41:798-820.
- Siniscalchi MJ, Phoumthippavong V, Ali F, Lozano M, Kwan AC (2016) Fast and slow transitions in frontal ensemble activity during flexible sensorimotor behavior. *Nat Neurosci* 19:1234-1242.
- Soma S, Saiki A, Yoshida J, Ríos A, Kawabata M, Sakai Y, Isomura Y (2017) Distinct laterality in forelimb-movement representations of rat primary and secondary motor cortical neurons with intratelencephalic and pyramidal tract projections. *J Neurosci* 37:10904-10916.
- Stuphorn V, Emeric EE (2012) Proactive and reactive control by the medial frontal cortex. *Front Neuroeng* 5:9.

- Sul JH, Jo S, Lee D, Jung MW (2011) Role of rodent secondary motor cortex in value-based action selection. *Nat Neurosci* 14:1202-1208.
- Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. (2010) Accurate spike sorting for multi-unit recordings. *Eur J Neurosci* 31:263-272.
- Takekawa T, Isomura Y, Fukai T (2012) Spike sorting of heterogeneous neuron types by multimodality-weighted PCA and explicit robust variational Bayes. *Front Neuroinform* 6:5.
- van Belle J, Vink M, Durston S, Zandbelt BB (2014) Common and unique neural networks for proactive and reactive response inhibition revealed by independent component analysis of functional MRI data. *Neuroimage* 103:65-74.
- Verbruggen F, Liefoghe B, Notebaert W, Vandierendonck A (2005) Effects of stimulus-stimulus compatibility and stimulus-response compatibility on response inhibition. *Acta Psychol (Amst)* 120:307-326.
- Verbruggen F, Logan GD (2008a) Long-term aftereffects of response inhibition: memory retrieval, task goals, and cognitive control. *J Exp Psychol Hum Percept Perform.* 34:1229-1235.
- Verbruggen F, Logan GD (2008b) Response inhibition in the stop-signal paradigm. *Trends Cogn Sci.* 12:418-424.
- Verbruggen F, Logan GD (2009) Proactive adjustments of response strategies in the stop-signal paradigm. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* 35:835-854.
- Vince MA (1948) The intermittency of control movements and the psychological refractory

- period. *British Journal of Psychology* 38:149–157.
- Vink M, Kahn RS, Raemaekers M, van den Heuvel M, Boersma M, Ramsey NF (2005) Function of striatum beyond inhibition and execution of motor responses. *Hum Brain Mapp* 25:336-344.
- Vink M, Kaldewaij R, Zandbelt BB, Pas P, du Plessis S (2015) The role of stop-signal probability and expectation in proactive inhibition. *Eur J Neurosci* 41:1086-1094.
- Wessel JR, Aron AR (2013) Unexpected events induce motor slowing via a brain mechanism for action-stopping with global suppressive effects. *J Neurosci* 33:18481-18491.
- Wessel JR, Aron AR (2017) On the globality of motor suppression: unexpected events and their influence on behavior and cognition. *Neuron* 93:259-280.
- Wessel JR, Jenkinson N, Brittain JS, Voets SH, Aziz TZ, Aron AR (2016) Surprise disrupts cognition via a fronto-basal ganglia suppressive mechanism. *Nat Commun* 7:11195.
- Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* 7:464-476.
- Yoshida A, Tanaka M (2009) Enhanced modulation of neuronal activity during antisaccades in the primate globus pallidus. *Cereb Cortex* 19:206-217.
- Yoshida J, Saiki A, Soma S, Yamanaka K, Nonomura S, Ríos A, Kawabata M, Kimura M, Sakai Y, Isomura Y. *Neuroscience*. (2018) Area-specific modulation of functional cortical activity during block-based and trial-based proactive inhibition. *Neuroscience*. 388:297-316.

Zandbelt BB, Bloemendaal M, Neggens SF, Kahn RS, Vink M (2013) Expectations and violations: delineating the neural network of proactive inhibitory control. Hum Brain Mapp 34:2015-2024.

7. 図表

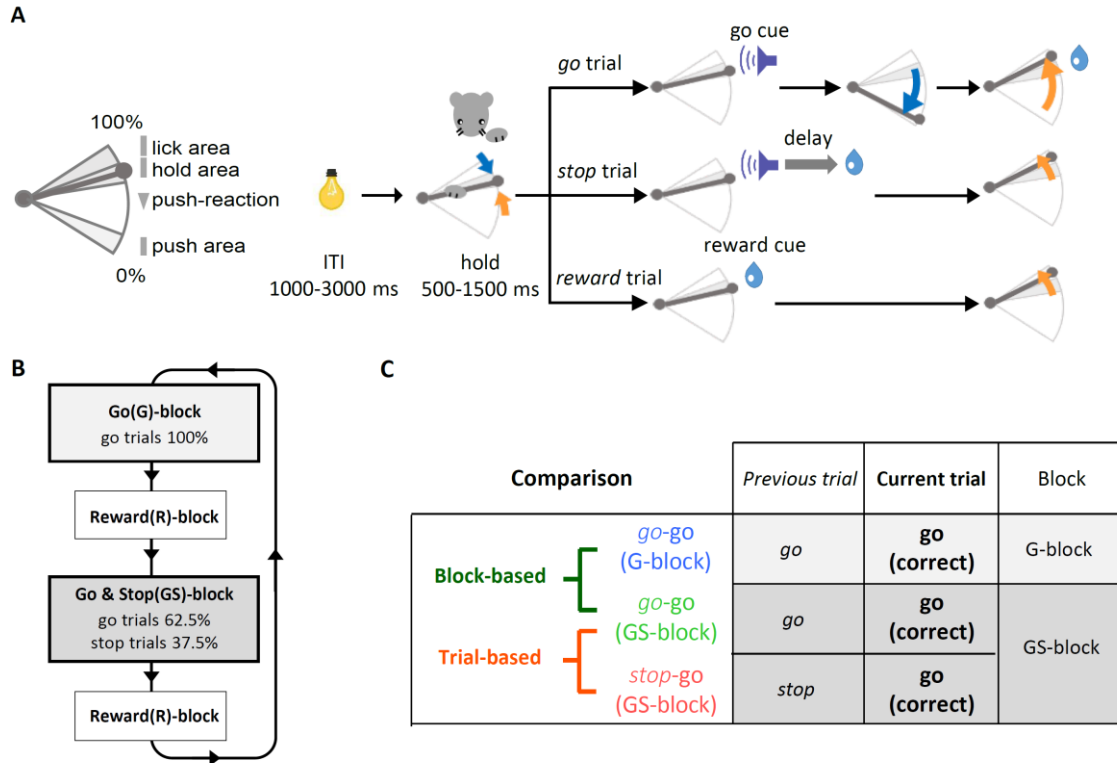


Figure 1. ブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制を調べるための行動課題のデザイン A, go、stop および reward 試行から構成される free response Stop-Signal Task (frSST)。B, frSST の 1 セッションにおける Go ブロック (G ブロック : go 試行のみが出現) と Go & Stop ブロック (GS ブロック : go 試行と stop 試行がランダムに出現) のくり返しスケジュール。両者の切り替えの間には Reward ブロック (R ブロック) が挿入される。C, ブロック単位のプロアクティブ抑制の行動や神経活動を検出するときは *go-go* (G-block) 試行と *go-go* (GS-block) 試行との間で比較を行い、トライアル単位のプロアクティブ抑制において検出するときは *go-go* (GS-block) 試行と *stop-go* (GS-block) 試行との間で比較を行う (詳細は実験方法を参照 ; Yoshida et al., 2018)。

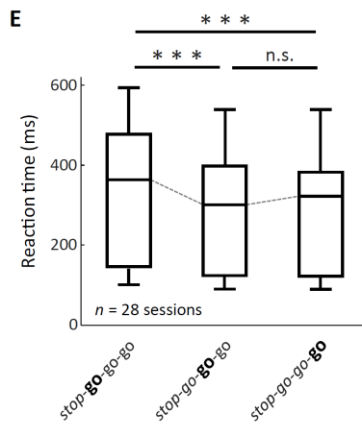
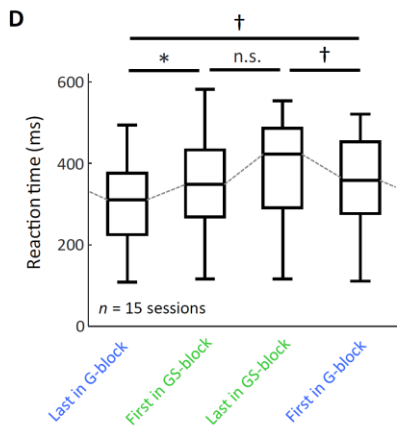
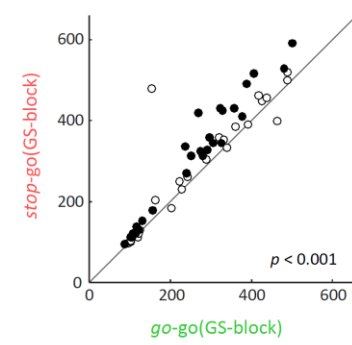
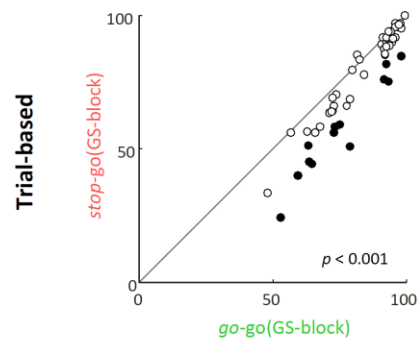
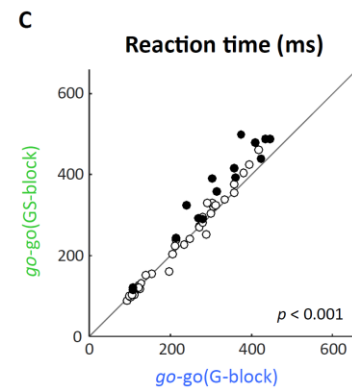
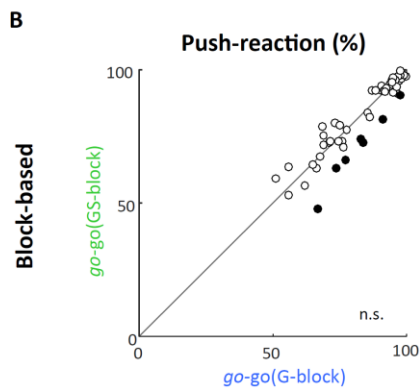
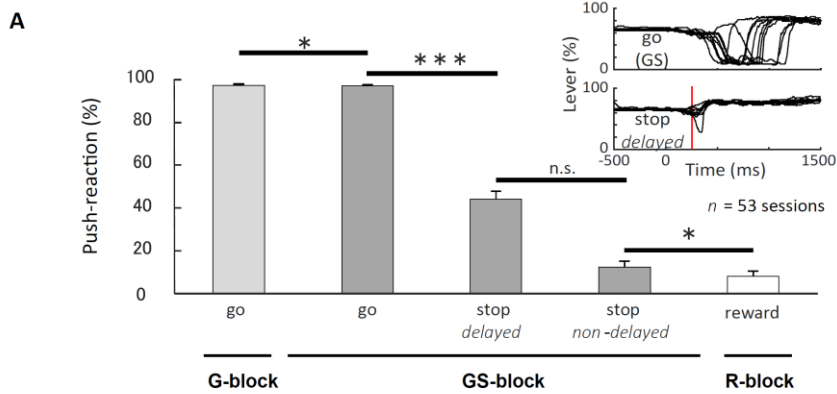


Figure 2. 行動課題の成績 **A**, 各試行タイプの平均レバー押し反応率 ($n = 53$ sessions in seven rats)。棒グラフはレバー押し反応率 (%), エラーバーは標準誤差 (SEM) を意味する。*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; n.s., not significant。挿入図は代表的なセッションの GS ブロックの go 試行と delayed-stop 試行のそれぞれのレバー軌跡。はじめの 10 試行のレバー軌跡を描画しており、go 信号の開始時間を 0ms とした。赤線は stop-signal delay を表す。**B**, ブロック単位 (upper) およびトライアル単位 (lower) の文脈変化における go 試行のレバー押し反応率の比較 (Fig. 1C を参照)。それぞれの丸は各セッションのデータを現しており、黒く塗りつぶされたセッションは統計的に有意に反応率が変わったことを意味している ($p < 0.05$ by Wilcoxon rank sum test)。図中に提示した p 値はセッション全体の検定結果である。**C**, ブロック単位およびトライアル単位の成功 go 試行のレバー押し反応時間の比較。各点の上側へのシフトは反応時間の遅延を、すなわち、プロアクティブ抑制が起きたことを意味している。**D**, G および GS ブロックの最初と最後 10 試行中の成功 go-go 試行のレバー押し反応時間 (有意なブロック単位のプロアクティブ抑制の起きた 15 セッションのデータ)。**E**, stop 試行のあと 1 試行目、2 試行目、3 試行目の成功 go 試行の反応時間 (連続して go 試行が続いたときのみを解析対象にした; 有意なトライアル単位のプロアクティブ抑制の起きた 28 セッションのデータ)。破線は反応時間の中央値の遷移を示す。†, $p < 0.10$; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; n.s., not significant (Yoshida et al., 2018)。

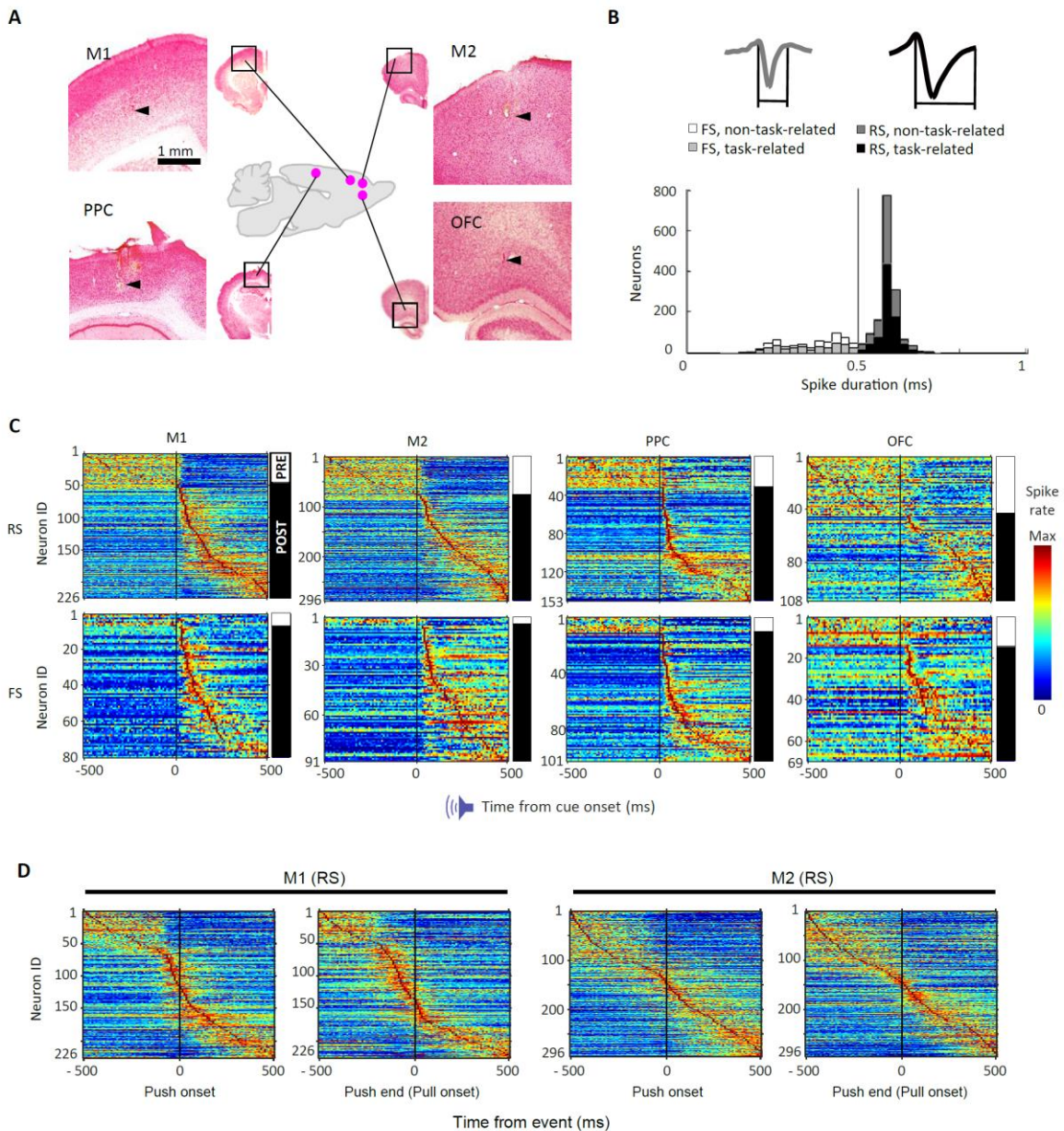


Figure 3. それぞれの大脳皮質領域の機能的（課題関連）スパイク活動 **A**, 一次運動皮質（M1）、二次運動皮質（M2）、後部頭頂皮質（PPC）、眼窩前頭皮質（OFC）からのマルチニューロン記録。矢頭は電極の刺入跡を示す。**B**, スパイク幅に基づいた記録ニューロンの regular-spiking (RS; spike duration, ≥ 0.5 ms) または fast-spiking (FS; < 0.5 ms) ニューロンへの分類（top insets）。課題中のイベントに関連してスパイク活動が統計的に有意に変化したことから、多くのニューロンが機能的（課題に関連する）ニューロンとして分類された（詳細は実験方法を参照）。**C**, 各領域の RS (upper) と FS (lower) ニューロンの機能的神経活動。各行は各ニューロンの標準化したスパイク活動を示す。

イクヒストグラム (go 信号提示を 0 ms として並びを揃えて、擬似カラーで表示したもの)。各ニューロンはスパイクヒストグラムのピーク時間によって (早いものから遅いものへ) 並べなおした。ヒストグラムの横にある棒はスパイクヒストグラムのピーク時間に応じて機能的に分類した PRE タイプ (ピークが go 信号提示よりも前) と POST タイプ (ピークが go 信号より後) を表している。Tables 1-3 も参照。D, M1 および M2-RS ニューロンのレバー押しの開始および終了の時間基準で並べた機能的神経活動。ピーク位置に応じてそれぞれ順番を並べなおしてある (Yoshida et al., 2018)。

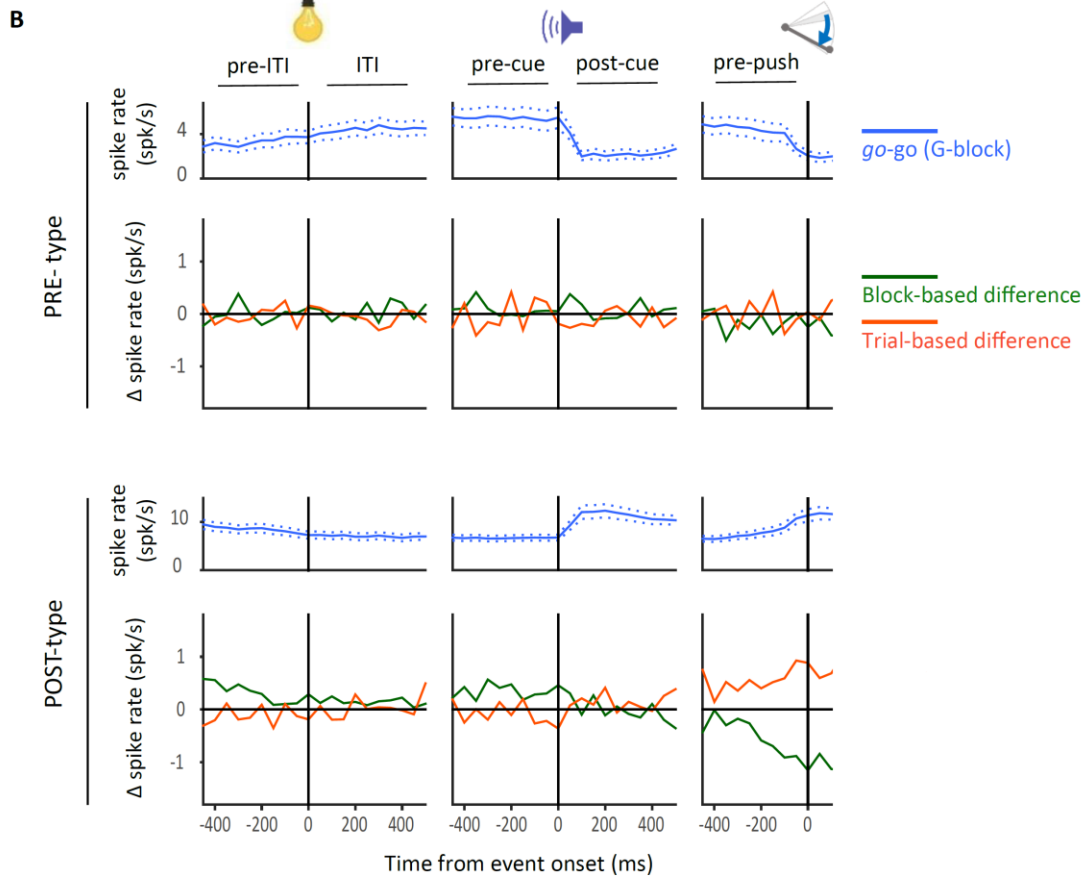
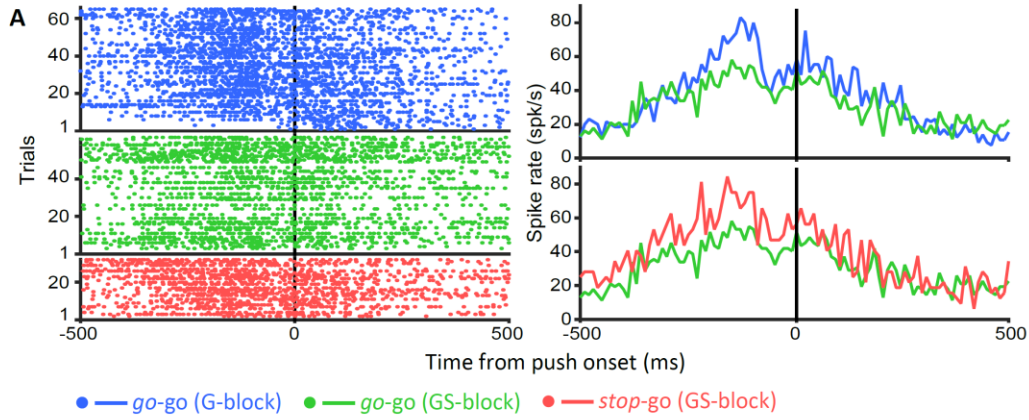


Figure 4. M1 の PRE および POST タイプ RS ニューロンのブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制におけるスパイク頻度差分の遷移 A, 代表的な M1-RS ニューロンにおけるレバー押し反応開始を時間基準としたスパイクラスタプロット (left) と平均スパイク活動 (right) B, PRE および POST タイプの M1-RS ニューロン集団のスパイク頻度 (各上段) とブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制におけるスパイク頻度の差分 (各下段)。青色の線は成功 go-go (G-block) 試行における ITI 開始、go 信号提示、レバー押し反応開始を基準として整列させた平均スパイク頻度を表している。実線はスパイク頻度の平均を、破線は標準誤差を意味している。緑色の線はブロック単位のスパイク頻度 (spike rate: SR) の差分 ($SR_{go-go (GS-block)} - SR_{go-go (G-block)}$) を、橙色の線はトライアル単位のスパイク頻度の差分 ($SR_{stop-go (GS-block)} - SR_{go-go (GS-block)}$) を意味している。ビン幅は 50 ms (Yoshida et al., 2018)。

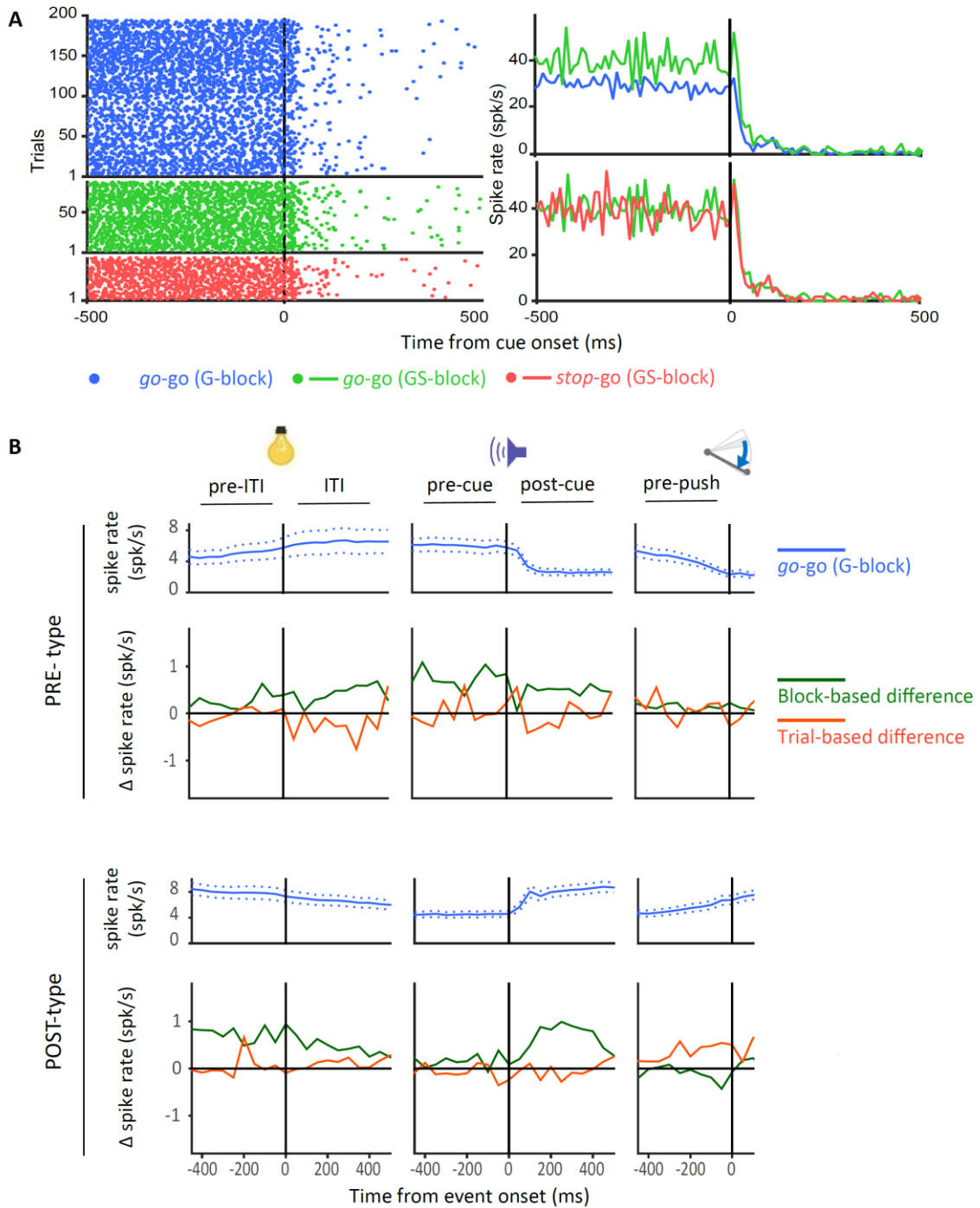


Figure 5. M2 の PRE および POST タイプ RS ニューロンのブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制におけるスパイク頻度差分の遷移 Fig. 4 の説明文を参照 (Yoshida et al., 2018)。

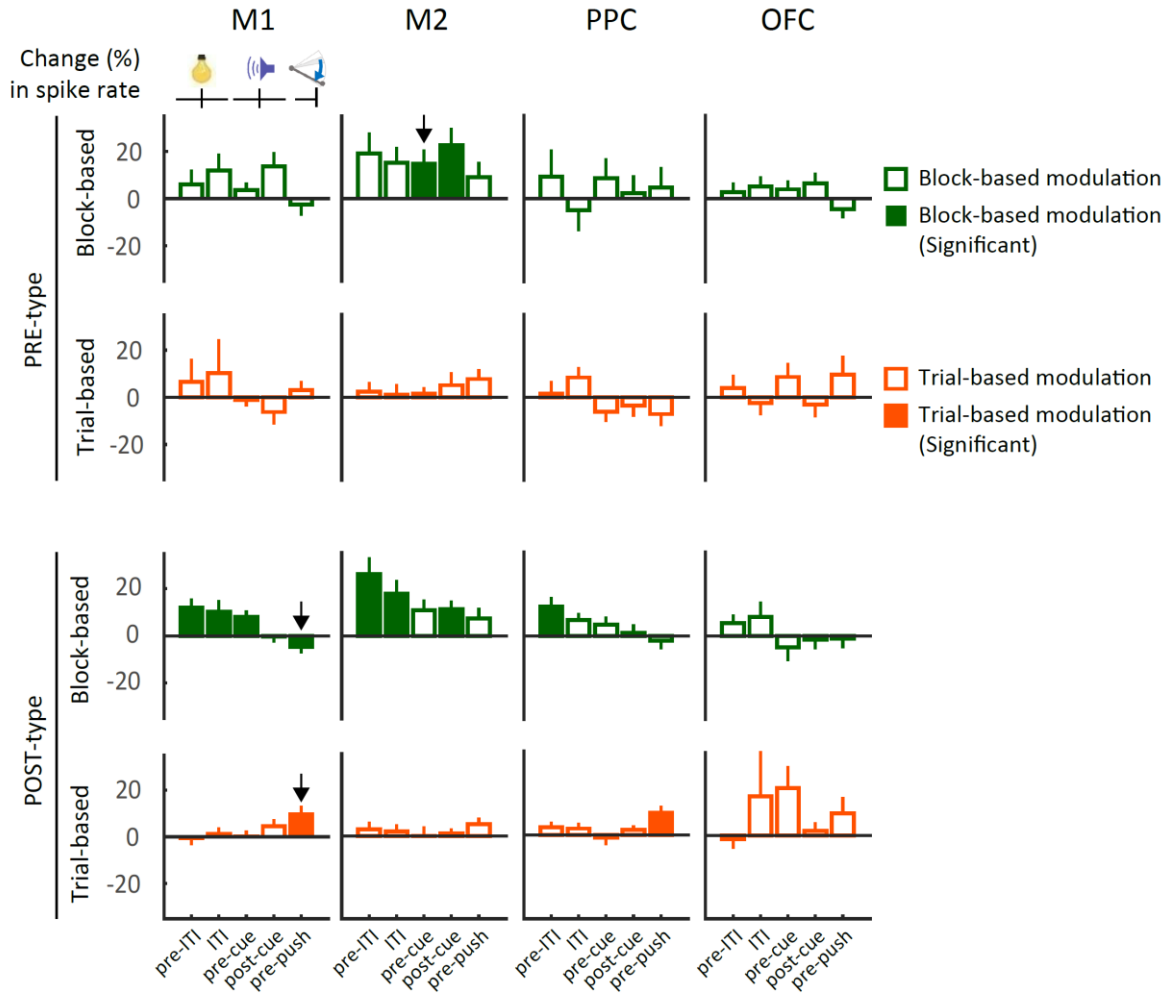


Figure 6. すべての大脳皮質領域におけるブロックおよびトライアル単位のプロアクティブ抑制に関するスパイク頻度変化率のまとめ 棒グラフは各ニューロン群の5つのイベントウィンドウ（pre-ITI, ITI, pre-cue, post-cue, and pre-push）におけるスパイク頻度変化率（%）の平均値を表している。エラーバーは標準偏差を示している。塗りつぶされた棒グラフはFDRの調整後も統計的に有意に変化していたことを意味している（ $p < 0.05$ in Table 4）。3つの矢印は Fig. 7 で解析結果を表示したデータを指している（Yoshida et al., 2018）。

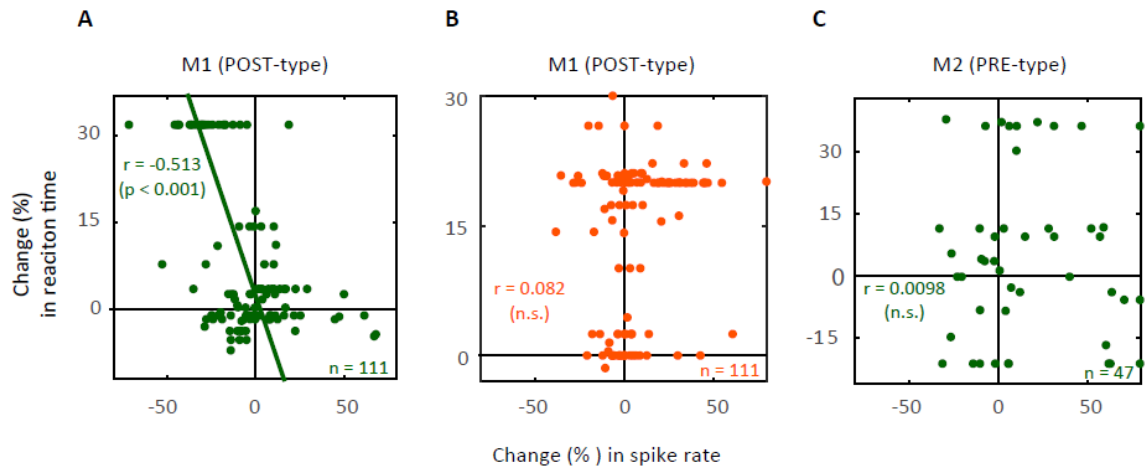


Figure 7. プロアクティブ抑制におけるスパイク頻度の変化率と反応時間の変化率との相関解析結果の代表例 **A**, ブロック単位のプロアクティブ抑制における M1 の POST タイプ RS ニューロンの相関解析結果 (pre-push window)。 **B**, **A** と同じニューロン群のトライアル単位のプロアクティブ抑制での結果 (pre-push window)。 **C**, ブロック単位のプロアクティブ抑制における M2 の PRE タイプ RS ニューロンの相関解析結果 (pre-cue window)。それぞれの点は 1 つのニューロンの結果を示しており、FDR の調整後も有意な相関が見られたときは回帰直線も併せて描画した (Yoshida et al., 2018)。

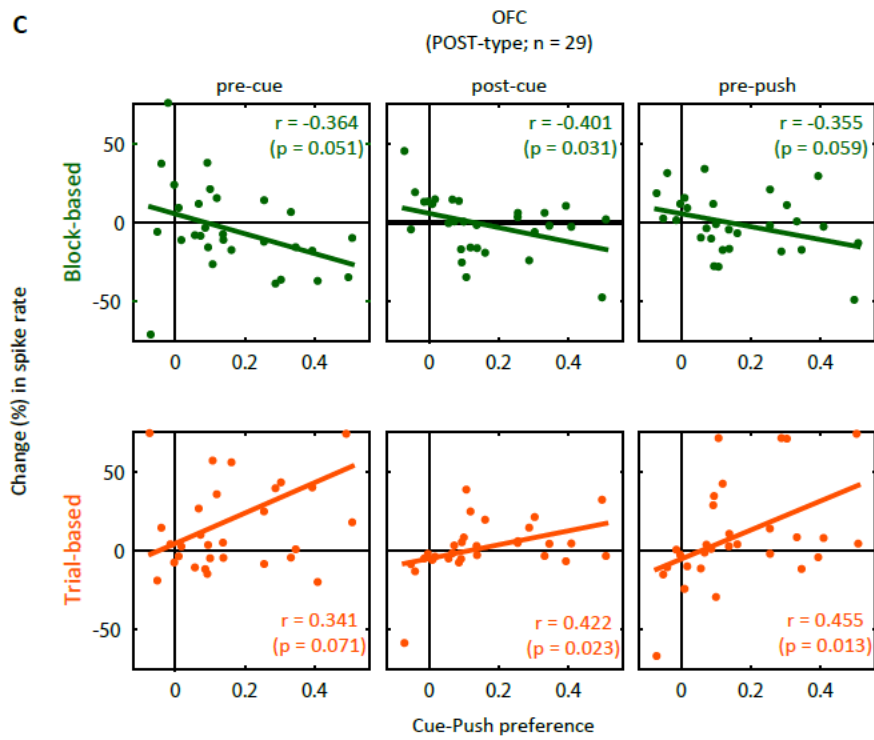
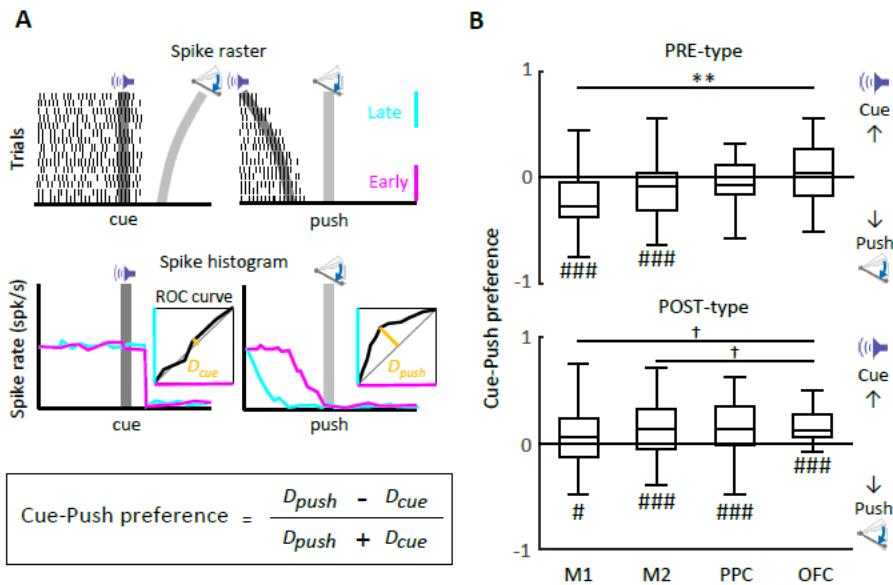
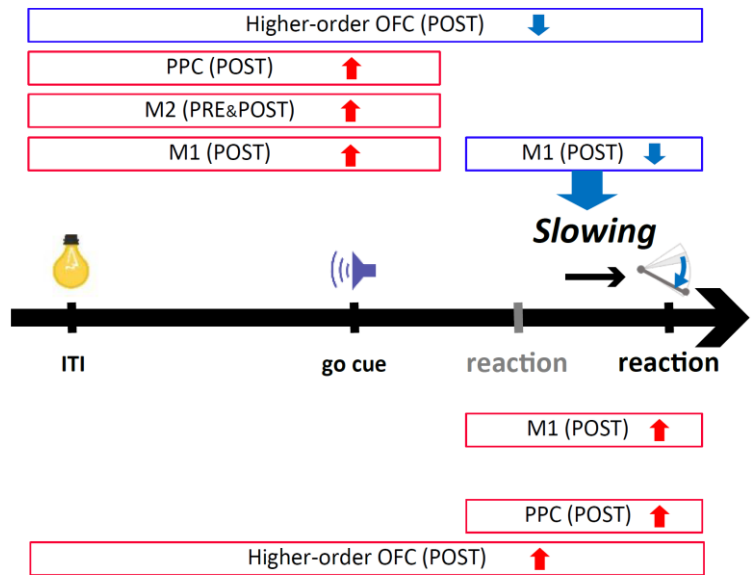


Figure 8. 感覚性処理と運動性処理に関連する各ニューロンの応答性の解析 **A**, Cue-Push preference。レバー押し反応時間の速かった上位 25%の試行から作成したスパイクヒストグラム (Early; スパイクラスターとヒストグラムでマゼンダ色として表示) と下位 25%の試行からのスパイクヒストグラム (Late; シアン色として表示) を比較し、receiver operating characteristic (ROC) 解析で d 値 (D) を算出。go 信号提示とレバー押し反応開始の時間基準でそれぞれ整列させて作成したスパイクヒストグラムから D_{cue} と D_{push} (黄色で表示) を求め、これから Cue-Push preference を $(D_{push}-D_{cue})/(D_{push}+D_{cue})$ という計算式で算出した。**B**, 4 つの皮質領域の RS ニューロンの Cue-Push preference の分布。上段は PRE タイプ、下段は POST タイプの結果を示す。箱ひげ図の上段、中央、下段の線はそれぞれ第三四分異値、中央値、第一四分位値を表し、箱ひげの上端と下端はそれぞれデータの最大値、最小値を示している。ハッシュは Cue-Push preference が有意に 0 からずれていることを意味する : #, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$ (Table 5A)。ダガーおよびアスタリスクは 2 領域間で有意に差があったことを意味する : †, $p < 0.1$; *, $p < 0.05$ (Table 5B)。**C**, OFC の POST タイプ RS ニューロンにおける Cue-Push preference とプロアクティブ抑制の際のスパイク頻度変化率との相関。上段はブロック単位のプロアクティブ抑制の結果を、下段はトライアル単位のプロアクティブ抑制の結果を示す。また、左から pre-cue、post-cue、pre-push ウィンドウの結果を示している。各点の一つのニューロンのデータを意味しており、相関係数と検定結果の p 値にくわえ回帰直線も併せて描画した (Yoshida et al., 2018)。

**Block-based
proactive inhibition**



**Trial-based
proactive inhibition**

Figure 9. プロアクティブ抑制における各皮質領域の活動の修飾をまとめた図 上段はブロック単位の、下段はトライアル単位のプロアクティブ抑制の結果をまとめている。上向き赤色の矢印はスパイク活動が亢進するように修飾されたことを、下向き青色の矢印はスパイク活動が減弱するように修飾されたことをそれぞれ示している (Yoshida et al., 2018)。

Table 1. Classification of RS and FS neurons in four cortical areas

A. Analyses of functional activity						
Cortical area	RS neurons			FS neurons		
	Non-task-related	PRE	POST	Non-task-related	PRE	POST
M1	102	52 (23.0)	174 (77.0)	37	7 (8.8)	73 (91.3)
M2	172	90 (30.4)	206 (69.6)	36	6 (6.6)	85 (93.4)
PPC	80	35 (22.9)	118 (77.1)	79	12 (11.9)	89 (88.1)
OFC	332	49 (45.4)	59 (54.6)	107	13 (18.8)	56 (81.2)

B. Analyses of modulation of functional activity in proactive inhibition (RS neurons only)

Cortical area	PRE	POST
M1	40 (26.5)	111 (73.5)
M2	47 (31.5)	102 (68.5)
PPC	13 (15.9)	69 (84.1)
OFC	26 (47.3)	29 (52.7)

% in parenthesis.

(Yoshida et al., 2018)

Table 2. Statistics on proportion of PRE-type RS neurons (Fig. 3)

A. Comparison between RS and FS neurons (chi-square test)				
Cortical area	df	χ^2	p	Sig.
M1	1	7.72	0.005	**
M2	1	21.16	4×10^{-6}	***
PPC	1	4.88	0.027	*
OFC	1	13.02	3×10^{-4}	***

B1. Comparison among cortical areas (2x4 chi-square test)			
df	χ^2	p	Sig.
3	21.12	1×10^{-4}	***

B2. Post-hoc analysis (residual analysis following B1)				
Cortical area	Adjusted residual		p	Sig.
	PRE	POST		
M1	-2.30	2.30	0.021	*
M2	0.74	-0.74	0.458	
PPC	-1.82	1.82	0.068	
OFC	4.08	-4.08	5×10^{-5}	***

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (Yoshida et al., 2018)

Table 3. Statistics on peak time of POST-type neurons (Fig. 3)

A. Comparison of peak time of POST-type RS neurons
among cortical areas (Kruskal-Wallis test)

n	df	H	p	Sig.
557	3	48.61	2×10^{-10}	***

B. Post-hoc analysis (Scheffe multiple comparison test following A)

pair	p	Sig.
M1 vs. M2	0.106	
M1 vs. PPC	0.010	*
M1 vs. OFC	0.003	**
M2 vs. PPC	5×10^{-7}	***
M2 vs. OFC	0.217	
PPC vs. OFC	5×10^{-8}	***

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (Yoshida et al., 2018)

Table 4. Statistics on spike rate modulations under proactive inhibitions (Fig. 6)

Comparison of change (%) in spike rate under proactive inhibition
(Wilcoxon signed-rank test with false discovery rate (FDR) control)

Functional subtype	Proactive inhibition	Window	M1		M2		PPC		OFC	
			p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.	p	Sig.
PRE	Block	pre-ITI	0.405		0.069		0.685		0.517	
		ITI	0.143		0.017		0.244		0.218	
		pre-cue	0.166		0.007	*	0.273		0.292	
		post-cue	0.040		0.007	*	0.839		0.091	
		pre-push	0.687		0.357		0.946		0.137	
	Trial	pre-ITI	0.936		0.783		0.893		0.354	
		ITI	0.893		0.719		0.057		0.657	
		pre-cue	0.757		0.363		0.191		0.238	
		post-cue	0.085		0.688		0.946		0.159	
		pre-push	0.861		0.090		0.216		0.381	
POST	Block	pre-ITI	3×10^{-4}	**	5×10^{-4}	**	0.004	*	0.056	
		ITI	0.008	*	0.003	*	0.032		0.090	
		pre-cue	1×10^{-4}	**	0.068		0.106		0.275	
		post-cue	0.457		0.005	*	0.486		0.721	
		pre-push	0.012	*	0.611		0.072		0.770	
	Trial	pre-ITI	0.048		0.755		0.137		0.247	
		ITI	0.576		0.430		0.245		0.611	
		pre-cue	0.054		0.069		0.457		0.048	
		post-cue	0.130		0.604		0.131		0.611	
		pre-push	0.004	*	0.018		5×10^{-5}	**	0.294	

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (after FDR-controlling procedure; Yoshida et al., 2018)

Table 5. Statistics on Cue-Push preference (Fig. 8)

A. Bias of Cue-Push preference in each neuron group (Wilcoxon signed rank test)						
Functional subtype	Cortical area	n	df	z	p	Sig.
PRE	M1	45	44	-4.216	2×10^{-5}	###
	M2	80	79	-3.461	5×10^{-4}	###
	PPC	18	17		0.396	
	OFC	27	26	0.825	0.409	
POST	M1	119	118	2.392	0.017	#
	M2	141	140	5.743	9×10^{-9}	###
	PPC	85	84	4.345	1×10^{-5}	###
	OFC	27	26	4.084	4×10^{-5}	###

#, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$

B1. Comparison of Cue-Push preference among cortical areas (Kruskal-Wallis test)

Functional subtype	n	df	H	p	Sig.
PRE	170	3	13.23	0.004	**
POST	372	3	8.78	0.032	*

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

B2. Post-hoc analysis (Scheffe multiple comparison test following B1)

Functional subtype	pair	p	Sig.
PRE	M1 vs. M2	0.246	
	M1 vs. PPC	0.206	
	M1 vs. OFC	0.007	**
	M2 vs. PPC	0.875	
	M2 vs. OFC	0.220	
	PPC vs. OFC	0.878	
POST	M1 vs. M2	0.995	
	M1 vs. PPC	0.563	
	M1 vs. OFC	0.064	†
	M2 vs. PPC	0.677	
	M2 vs. OFC	0.085	†
	PPC vs. OFC	0.421	

†, $p < 0.1$; **, $p < 0.01$ (Yoshida et al., 2018)

8. 謝辞

本研究の実施および博士論文の作成にあたり長年に渡ってご指導下さった本学脳科学研究所の礪村宜和博士にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。礪村博士がこの登り下りの多い本研究の進捗に根気強くお付き合い下さったおかげで本研究を完成させることができましたことを、心から感謝しております。また、同研究所の酒井裕博士、木村實博士のご助言を通して本研究の質を何段階にも渡ってより良くすることができました。まことにありがとうございます。North Western University の齊木愛希子博士、University of California Irvine の相馬祥吾博士、順天堂大学の山中航博士、本学脳科学研究の野々村聡博士、本学脳科学研究科博士課程の Alain Rios さんおよび川端政則さんには実験系の構築、データ解析、論文の執筆を通して大変多くのことを勉強させて頂きました。システム神経科学分野について素人同然であった自分がこうして一つの研究をまとめられたのは皆さまのサポートなくは考えられませんでした。改めて御礼を申し上げます。

また、本研究の重要なステップで福島県立医科大学の小林和人博士、生理学研究所の南部篤博士および Janelia Research Campus の Dr. Eva Pastalkova から頂いたアドバイスは本研究のみならず私の研究テーマの方向性を考えていく上でも非常に重要なものでした。貴重なアドバイスを頂戴できたことを非常に感謝しております。そして、今回の学位審査についてはお忙しい中主査を務めてくださった本学脳科学研究所の坂上雅道博士、副査をして下さった同研究所の松元健二博士、鮫島和行博士、そして、外部審査としてご参加下さった北海道大学の田中真樹博士に厚く御礼申し上げます。この審査過程を通して頂戴したコメントを基にした解析を加

えていったことで本研究の質を上げていくことができました。また、本審査を進めるにあたってご尽力下さった本学脳科学研究所所長の小松英彦博士をはじめ本学関係者の皆様に、心から感謝申し上げます。くわえて、本学脳科学研究所磯村研究室の碓合千恵さん、丸山葉子さん、後藤美帆さん、吉松ひと美さん、そして本学脳科学研究科修士課程の重住宙さんには玉川大学での研究生活において多岐に渡ってご支援頂いてきたことを改めて御礼申し上げます。

最後に、本学内外を問わず多くの皆様から頂戴したご支援、ご協力の下に本研究が完遂できましたことをここに感謝申し上げます。