

筑波大学

博士(医学)学位論文

睡眠覚醒と恒常性における局所皮質回路の摂動

2020

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

宮崎峻弘

目次

背景

実験手法

結果

考察

結論

謝辞

出典

参考文献

背景

睡眠とは、可逆的かつ一時的な意識の消失、感覚と運動の抑制、外界への反応低下を特徴とした周期的に生じる生理現象であり、内的、外的刺激によって容易に覚醒しうる状態である。睡眠はパターンや量が動物の種や年齢によって異なるものの、ヒトを含む幅広い動物に普遍的に認められ、発達した神経系を有する動物は睡眠を取らずには生存できない。つまり、睡眠は動物が生存するために必須の生理現象である。近年の技術的発展により、睡眠覚醒を制御・調節する神経メカニズムや、学習や記憶などの様々な脳機能と睡眠の関係は急速に理解が進んでいる。しかし、その一方で、睡眠中に脳内でどのような現象が起きているかは詳しくわかっていない。本論文ではこの睡眠という現象について大脳皮質局所回路から論じる。

睡眠の生理

睡眠には様々な形式がある。成人のヒトでは、一日一回の睡眠型の単相性睡眠を示す。ヒト以外の多くの動物では、一日頻回の睡眠型の多相性睡眠が見られる。また海洋哺乳類では脳半球の片方が覚醒し片方が寝ている半球睡眠(Mukhametov, Supin, and Polyakova 1977)といった特殊な睡眠が観察される。ただ、睡眠中に脳波を観測することで、睡眠はさらに大きく2つに分類される。NREM(non-rapid-eye-movement)睡眠と REM(rapid-eye-movement)であり、それぞれの脳波は異なる特徴を示す。睡眠の大部分を占める NREM 睡眠の脳波は、覚醒時の脳波と比較し、slow wave activity(SWA)と呼ばれる高振幅低周波数(δ 波、2-4 Hz)成分が増加する。SWA のような波形は脳波だけでなく、大脳皮質の膜電位や局所電位でも NREM 睡眠中に観察される(Vyazovskiy and Harris 2013)。NREM 睡眠はヒトでは SWA の占有率から更に3段階に分類され、睡眠深度の指標となっている。また、断眠し寝不足になることで、その後の回復睡眠では SWA が増加し、SWA は睡眠圧を示すとされる(Borbély 1982)。一方 REM 睡眠は、NREM 睡眠の後に出現する、NREM 睡眠と比較して時間的に短い睡眠であり、特に睡眠期の後半に出現頻度が高くなる。REM 睡眠の脳波はヒトでは入眠時の浅い睡眠に似た脳波を示すが、げっ歯類では海馬から発生する規則的なやや高振幅な脳波(θ 波、4-8 Hz)を示し、REM 睡眠の特徴として急速眼球運動の頻発、抗重力筋の筋緊張低下(アトニア)、自律神経の不安定化が観察される(Diekemann and Born 2010)。このように一見睡眠は一つの生理現象に見えるが、NREM 睡眠と REM 睡眠では全く異なる脳の活動が生じていることが脳波からわかる。

睡眠の神経学

睡眠覚醒の調節メカニズムとして、覚醒および NREM 睡眠、REM 睡眠で神経活動が高まるニューロンがあり、それらのニューロンの神経活動を変化させることで、睡眠や覚醒を促す、覚醒ニューロンや NREM 睡眠ニューロン、REM 睡眠ニューロンが知られてきた。

覚醒ニューロンとしてはモノアミンとペプチドによる調節が知られており、モノアミン

系としては青斑核(locus ceruleus)や背側縫線核(dorsal raphe nucleus)、腹側線条体(ventral striatum)、結節乳頭体核(tuberomammillary nucleus)からノルアドレナリンやセロトニン、ドパミン、ヒスタミンが視床や視床下部、大脳皮質、前脳基底部(basal forebrain)などに投射されることで、覚醒の重要な役割を果たしていると考えられる。また、それらの投射を受けている前脳基底部や脚橋被蓋核(pedunculopontine nucleus)からも大脳皮質にコリン作動性ニューロンを投射することで覚醒を促進するとされる。また、ペプチドとして外側視床下部(lateral hypothalamus)にあるオレキシンニューロンも、大脳皮質や青斑核、前脳基底部、視床に投射し、覚醒を維持している。このように、複数の神経核の神経活動の上昇により覚醒が生じていると考えられている。

一方、NREM 睡眠についても複数の神経核が関係しているが、視床下部の吻側の視索前野(preoptic area)が重要な役割を果たしている。視索前野からの GABA やコレシストキニン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、ガラニンなどのペプチドが、覚醒ニューロンがある青斑核や背側縫線核など、また前脳基底部などの神経活動を抑制する。また、脳幹の parafacial zone からの GABA 作動性ニューロンも神経活動を抑制する。さらに、前脳基底部の GABA 作動性ニューロンが大脳皮質に投射し NREM 睡眠を促進するとされている。

また、REM 睡眠については、脚橋被蓋核や背外側被蓋核(laterodorsal tegmental nucleus)、橋被蓋野の青斑下核(sublaterodorsal nucleus)が中心的な役割を果たしており、青斑下核のグルタミン酸作動性ニューロンが ventromedial medulla や脊髄の premotor neurons に投射し、GABA やグリシン作動性ニューロンを刺激することでアトニアを生じさせる。また、脚橋被蓋核や背外側被蓋核からのコリン作動性ニューロンが視床や前脳基底部に投射し、REM 睡眠の脳波を生み出していると考えられる(Liu and Dan 2019; Scammell, Arrigoni, and Lipton 2017)。

睡眠の機能

睡眠不足は高血圧や糖尿病などの生活習慣病やうつ病などの気分障害を悪化させる要因である。そのため、必要な睡眠を取ることが疾病予防、改善の観点から必要とされ、睡眠は身体的な健康維持に必要不可欠である。睡眠不足は脳機能にも影響を与え、集中力や記憶力の低下に繋がる。

睡眠と最も関係がある脳機能の一つに記憶と運動学習があり(Dickelmann and Born 2010)、NREM 睡眠と REM 睡眠で異なる寄与も示唆されている。記憶では、REM 睡眠は手続き記憶を強化し、NREM 睡眠は手続き記憶だけでなく陳述記憶も強化する(Squire and Zola-Morgan 1988)とされる。

また、運動学習については、NREM 睡眠中に生じるシナプス伝達の変化が深く関係している。運動野における神経伝達は主に視床や皮質間の入力を受け、2/3 層の皮質や深部に出力する(Weiler et al. 2008)。その中で皮質間でのシナプス伝達は新しい運動学習時に必須であると考えられており、実際に運動学習後に運動野内で形態学的変化や機能的変化が生

じ(Biane et al. 2016; Li et al. 2017; Peters, Chen, and Komiyama 2014; Rioult-Pedotti et al. 1998; Yang et al. 2014)、更には運動学習後の NREM 睡眠で樹状突起上の棘突起の形成が促進される(Gulati et al. 2014, 2017; Yang et al. 2014)、といった形でシナプス伝達の増強が生じていると考えられている。しかし、十分な運動学習後の運動野では新たに長期増強(LTP)が生じる余地はほとんど残っておらず、ほぼ飽和しているため(Rioult-Pedotti et al. 1998)、新たな学習にはシナプス伝達強度の脱飽和が必要であり、NREM 睡眠中にシナプス伝達強度が低下すると一般的に考えられている(Tononi and Cirelli 2014)。実際にシナプス伝達強度は学習のない NREM 睡眠で低下する(Diering et al. 2017; Maret et al. 2011; de Vivo et al. 2017)とされている。このような脳機能は睡眠中のシナプス伝達の様々な変化から生まれる現象として捉えられているものの、シナプス伝達強度を低下させる生理的な原理など、その実態は不明である。

そこで、本研究では神経活動の相動性、いわゆる機能的結合性 (FC: functional connectivity) に着目した。Hebb の学習則に代表されるように、FC は記憶の素過程であるシナプス可塑性と密接に関わり、FC の上昇、増強はシナプス伝達強度上昇を表し、FC の低下、弱化はシナプス伝達強度の低下を表すと考えられる。FC に関しては fMRI によるマクロレベルの解析が進んでおり、大脳皮質間の FC は NREM 睡眠中に減少し、REM 睡眠中は増加する(Chow et al. 2013; Horovitz et al. 2009; Koike et al. 2011; Picchioni, Duyn, and Horovitz 2013; Sämann et al. 2011; Spoomaker, Gleiser, and Czisch 2012)。しかし、領域間でなくニューロン間の FC と睡眠の関係はいまだ不明である。睡眠は全脳の現象である一方で、皮質の一部だけで SWA が観察されるなど、局所的制御の側面ももっており(Siclari and Tononi 2017)、NREM 睡眠時の SWA は局所的に制御され、運動学習の効率に関係する(Huber et al. 2004, 2006)。本研究では大脳皮質局所回路におけるニューロン間の FC 動態の観察と解析を行うことで、睡眠の機能を生み出す生理現象の発見を試みる。

本研究の目的とアプローチ

局所皮質回路の動態について解明するため、本研究では運動学習中枢である一次運動野ニューロンに注目した(Kawai et al. 2015; Sanes and Donoghue 2000)。運動学習は睡眠の主要な機能の一つであり(Peters, Liu, and Komiyama 2017)、覚醒中に学んだ運動技能に関与する運動野ニューロンが NREM 睡眠中の再活性化されることで睡眠中に運動技能を向上させることや、その機能に睡眠中の紡錘波が関係している可能性が言われている(Gulati et al. 2014; Ramanathan, Gulati, and Ganguly 2015; Yang et al. 2014)。しかし、通常の睡眠覚醒下でその局所回路内の FC がどのように変動するかは未解明である。そこで本研究では、二光子顕微鏡によるカルシウムイメージングを用いることで、自発的な睡眠覚醒および断眠、回復睡眠環境下におけるマウスの運動野で、多数の神経活動の同時記録を行った。更に、sparse Gaussian graphical models に基づいた FC を局所皮質回路に導入することで、神経活動から FC を推定し、睡眠覚醒における局所皮質回路の変化を捉え、睡眠中にどのような

現象が起きているのかについて迫った。

カルシウムイメージングについて

現在までに、睡眠中の *in vivo* における単一ニューロンレベルの解析はユニット電極などの電気生理学的アプローチを用いて多く行われてきた(Evarts 1964; Hengen et al. 2016; Hobson and McCarley 1971; Vyazovskiy et al. 2009; Watson et al. 2016a)。しかし、ユニット記録では多数ニューロンの同時記録、ニューロンの空間情報、さらにニューロンタイプの同定などを同時に実現することは困難であった(Nowak et al. 2003)。本研究では二光子顕微鏡によるカルシウムイメージングを用いることで、*in vivo* におけるニューロンの空間情報と活動を得た。

ニューロンは脱分極することで、細胞膜上に存在する電位依存性カルシウムチャンネルが開口し、カルシウムが流入してニューロン内カルシウムが上昇する(Tank et al. 1988)。そのため、ニューロン内のカルシウム濃度は神経活動を反映しており、カルシウムイメージングを行うことで、ニューロンの神経活動の観察が可能となる(Ding et al. 2014)。本研究では蛍光強度が変化するタンパク質をニューロンに発現させて、カルシウムイメージングを行うことで、神経活動を観察した。

また、二光子顕微鏡を用いることで、*in vivo* における複数ニューロンのカルシウムイメージングを可能とした。二光子顕微鏡は、蛍光物質が倍波長の光子を同時に二つ吸収することで励起する、二光子吸収過程を利用した蛍光顕微鏡である。二光子吸収過程の発生確率は低く、実質的には焦点以外では励起が生じないため、共焦点顕微鏡などと比較し、光毒性が低く、より深部組織の観察が可能となる。そこで、マウスの頭蓋骨をガラスに置換し、二光子顕微鏡で観察することで、*in vivo* における深部組織の画像を取得し、ニューロンのカルシウムイメージングを行った。

ガウシアングラフィカルモデルおよび lasso について

神経生理学の多ニューロン記録のような多変量データにおいては、ニューロンの活動(確率変数)の関係を相関係数で推定するのが主である(Hengen et al. 2016; Vyazovskiy et al. 2009)。しかし、相関係数では線形関係を仮定するため、ほぼ完全な同期活動を除いて多くの関係性を見逃してしまう。この問題を回避するため、本研究では、関係性を統計的学習の視点で解析した。用いたのは無向グラフィカルモデルの一つ **graphical Gaussian models (GGM)** である。グラフィカルモデルとは、複数の確率変数間の依存関係をグラフ構造として示す確率モデルで、ノードとエッジで表現される(Fig. 1)。ノードが要素、エッジが関係性を示す。グラフィカルモデルにおいて、関係がある(エッジの存在)とは「無関係ではない」という意味である。ここでいう無関係とは、二つの確率変数(ノード)の確率分布が他の変数を与えた時に条件付き独立である、と定義されている。本研究で用いる GGM は多変量正規分布の構造学習(関係を求めること)において、ノイジーな実数デー

タの最も実用的なグラフィカモデルである。また、GGMにおいて、弱い関係を条件付き独立として排除し、重要な関係を残したまま、安定した関係のみを導くため、確率分布を求める段階で疎構造(スパース性)を導入した。スパース性を導入したGGMの構造学習アルゴリズムを **glasso** (graphical least absolute shrinkage and selection operator) と呼ばれ、本研究でもこれを用いた(Friedman, Hastie, and Tibshirani 2008)。本研究では、睡眠・覚醒中の大脳皮質運動野の局所皮質回路を推定するため、ニューロンの経時的カルシウム信号を確率変数(ノード)として、**glasso** を用いてニューロン間の関係(エッジ、ここではFC)を解析した。

実験手法

実験動物

全ての実験は筑波大学動物実験委員会の承認のもと行われた。今回の実験では *Vgates-Cre* マウス(*Slc32a1^{tm2(cre)Lowl}*/J, Jackson Laboratory stock number: 016962)(Vong et al. 2011) と *Ai9 tdTomato reporter* マウス(B6.Cg-*Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}*/J, Jackson Laboratory stock number: 007909)(Madisen et al. 2009)を交配した *Vgat-tdTomato* マウスを用いた。全ての *Vgat-tdTomato* マウスは C57BL/6 を背景に持つマウスであり、尾から抽出した DNA に PCR を用いて遺伝子型の決定を行った。朝 9 時から明期となる 12 時間の明暗サイクルで適切に室温、湿度は維持され、餌食は自由に与えられた。

手術

二光子カルシウムイメージングに用いられたマウスは月齢 9-13 カ月の、雄 2 匹、雌 7 匹であり、長期間の観察のための頭蓋骨のガラス置換術を行った(Holtmaat et al. 2009; Mostany and Portera-Cailliau 2008)。手術では、2%イソフルランを導入維持に使用した。マウスの頭頂部の体毛を刈った後、除毛クリームを用いて毛を除去し、イソジンで頭皮の消毒を行った。前額部から後頭部にかけて頭蓋骨上の皮膚および軟部組織を除去したあと、左前頭骨の左運動野付近にドリルを用いて直径 1.5-2.5 mm の穴を開け、aCSF(122 mM NaCl, 1.7 KCl, 1.1 MgCl₂, 23 NaHCO₃, 1.2 CaCl₂, 1.1 KH₂PO₄, and 3.4 glucose)とゼルフォーム(Pfizer)を用いて硬膜上から骨片等を除去した。運動野の深度 300-400 μm にガラスキャピラリー(B100-30-7.5HP を EZP-60, Prime Tech で伸長後、P-97, Sutter Instrument を用いて研磨)を用いてカルシウム濃度依存蛍光タンパク質 GCaMP6s(Chen et al. 2013)を発現するアデノ随伴ウイルスベクター(rAAV-hSyn-GCaMP6s-WPRE, 4.0x10¹³ genomic copies/μl, serotype 2/9, UPenn Vector Core)を 2 か所に 150 nl ずつ注入した(BJ110 and BT200, BEX)。ウイルスベクターを注入後に再度硬膜上を清掃し、Lipidure-CM5206 (NOF Corporation)でコーティングをした直径 1.5-2.5 mm のウィンドウガラスを頭蓋骨の穴に設置した。ガラスを頭蓋骨と同じ深度で固定したまま接着剤を用いて周囲を固定することで、マウスの頭蓋骨にイメージングウィンドウを設置した。EMG 電極(AS633, Cooner Wire)は首の筋肉内に挿入し、後頭骨に接着剤で固定した。EEG 電極は右前頭骨と右頭頂骨にネジ(TE-00003, Matsumoto Industry)を用いて固定しその上から歯科用セメントを用いて頭部固定用のステンレス製のヘッドプレートを固定した。手術後、ヘッドプレートをシリコンチューブで保護し、ケージに戻した。

蛍光イメージング

蛍光イメージングはカスタマイズされた二光子顕微鏡(based on Axio Examiner Z1/LSM780, with a water-immersion objective W Plan-Apochromat 20x/NA=1.0, Zeiss)を用いて行われた(Nagayama et al. 2019)。顕微鏡下で自発的な睡眠覚醒状態を観察するため、トラ

ックボール型トレッドミルを顕微鏡下に設置した(Kanda et al. 2016)。手術後のマウスに2日間の回復期間の後、明期に1日5時間のトラックボール型トレッドミル環境への馴化を5日間行い、マウスは顕微鏡下のトレッドミル上で自発的な睡眠覚醒を行うようにした(Fig. 2A)。水浸対物レンズのため、頭蓋骨のイメージングウィンドウの上に37°Cの生理食塩水を還流し、観察深度を150-250 μm として運動野の第2, 3層を観察した。GCaMP6sは910 nm、tdTomatoは1040 nmの波長のTiSaレーザ(Maitai DeepSee, Spectra-Physics)を用いて励起し、各々の蛍光は500-550 nmと >555 nmの波長領域をnon-descanned GaAsP detector(BiG, Zeiss)を用いて検出した。1040 nmのレーザはtdTomatoは励起する一方でGCaMP6sを殆ど励起しないため、1040 nmのレーザは抑制性ニューロンの特定のみで使用し、カルシウムイメージングは910 nmのレーザを用いて行った。二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングは12時から17時(ZT3-8)の間、1回15分間を5-8回行った。イメージングのスキャン速度は8回/秒で画像は16 bit, 128x256 pixelで取得した(Fig. 2B)。

脳波、筋電図測定と睡眠覚醒のスコアリング

EEG/EMGは二光子顕微鏡下での実験中は常に記録し続けた。EEGは40000倍した後0.5-500 Hzのバンドパスフィルタを通し、EMGは4000倍した後1.5-1000 Hzのフィルタを通し(MEG-5200, NIHON KOHDEN)、16 bit, 2000 Hzのサンプリングレートで記録した(Digidata 1440A, Molecular Devices)。またカルシウムイメージングのスキャンと断眠装置の稼働タイミングも同時に記録することでイメージングタイミングとEEG/EMGのすり合わせを行い、断眠装置稼働の確認をした。EEG/EMGデータはClampex10.3(Molecular Devices)とカスタムMatlab programを用いて4秒毎に睡眠覚醒状態のスコアリングを行った(Funato et al. 2016)。

免疫染色

Vgat-tdTomatoマウスの運動野において抑制性ニューロン(GABAergic neurons)がtdTomatoを発現していることを確認するため、GAD1 mRNAに対するfluorescence in situ hybridization (FISH)およびtdTomatoに対する免疫染色を行った。16-38週のVgat-tdTomatoマウスを4%イソフルランで麻酔導入したあと、生理食塩水および4%パラホルムアルデヒド(4% PFA)を用いて還流固定した。取り出した脳は4°Cで12時間以上後固定後30%スクロース置換を3日以上行い、凍結組織切片作成用包埋剤(Tissue-Tek OCT compound, Sakura Finetek)で包埋し-80°Cで凍結された。クライオスタット(CM3050S, Leica)を用いて40 μm で脳切片を作成し、リン酸緩衝液(PB, 0.1 M)で洗浄後、FISH、免疫染色を行った。FISHでは、運動野を含んだ脳切片を0.3% Triton X-100で処理後、1 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K、0.75% glycine、0.25% 無水酢酸で処理した。処理後の脳切片にGAD1 mRNAのFITC標識プローブを60°Cで一晩hybridizationした。脳切片をRNase、0.3% H_2O_2 in tris-buffered salineで処理し、1% blocking reagent(11096176001, Sigma-Aldrich/Roche)で1時間のブロッキング

後、mouse anti-FITC antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (1:80000; 200-032-037, Jackson Immuno Research Laboratories)と rabbit anti-red fluorescent protein (RFP) antibody を加えた 1% blocking reagent/0.5% Triton X-100 in TBS を 4°C で一晩反応させた。その後脳切片を TNT (TBS, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween 20)で洗浄し、tyramide signal amplification biotin system (TSA Plus Biotin Kit, Perkin Elmer)を用いて、HRP を増幅した。再び TNT で洗浄後、streptavidin-conjugated Alexa Fluor 488 (1:1000; S32354, Thermo Fisher Scientific/Molecular Probes) と an Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:1000; A-11012 or A-21207, Thermo Fisher Scientific/Molecular)を加えた 1% blocking reagent in TBS で反応させた。染色後、脳切片を 0.1M PB で洗浄し、anti-photobleaching medium (H-1200, Vector Labs) と共にマウントした。切片画像は共焦点レーザー顕微鏡(Axio Imager Z2 and LSM700, Zeiss)を用いて取得し、それぞれ Alexa Fluor 488 陽性細胞 と Alexa Fluor 594 陽性細胞を GAD1 発現細胞、tdTomato 発現細胞としてカウントした(Fig. 2C)。

画像解析

二光子顕微鏡を用いて取得したカルシウムイメージング画像ファイルに対し、Fiji/ImageJ を用いてバックグラウンドを除去した後、それぞれのニューロンの細胞質を ROI で囲った。その後、各々の画像に対し ROI 毎の蛍光強度の平均値を算出し、ニューロン毎の蛍光強度の時系列データ (F_t)を作製した。退色や運動による乱れはほとんど影響を与えなかった。これ以降の演算処理及び統計処理は R (version 3.3.2) 、 python (3.6.0)、JMP(SAS institute) を用いた。

個々のニューロンにおける自発的な睡眠覚醒での蛍光強度の変化を比較するため、ニューロン毎に時系列データ F_t を Z-score (F_z) に変換した。

$$F_z = (\Delta F / F)_t = (F_t - F_0) / F_0$$

ただし、 F_0 は各 ROI において、時系列データの低位 10%の平均値とした。

睡眠覚醒に伴う各々のニューロンにおける神経活動については、各々のニューロン毎に、覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠で F_z を分類し、平均値を求めた。検定は、分類した F_z に対し睡眠覚醒間での Kruskal-Wallis 検定、その後 Wilcoxon 順位和検定及び Bonferroni 法を用い、ニューロン毎に睡眠覚醒状態に伴う神経活動の変化を求めた。例えば、一例として、W>N>R のニューロンは睡眠覚醒間で全ての組み合わせで有意差を認め、神経活動の高さの順を示している。また、全ての状態で有意差を認めないニューロンは unclassified と分類した。

無向グラフ Graphical Gaussian models の導入

本研究では2つのニューロン間の機能的結合性(FC)に着目した。FC を求めるにあたり、graphical Gaussian models (GGM) を用いた。GGM は多変量正規分布の構造学習モデルであり、ノイズを含む実データにおいて、2個のノード間の統計的依存性の解析に有用であ

る。本研究ではグラフィカルモデルにおけるノードにニューロンのカルシウム信号の経時変化、エッジはFCが当てはまる。以下、本研究に使用したGGMを簡潔に説明する。

任意の20秒間のM個のニューロンのカルシウム信号（蛍光強度変化）からFCを解析する場合を例とする。

まず、GGMは多変量正規分布を前提とするため、それぞれの蛍光強度変化を正規分布に変換する（詳細は後述）。すると、M個の蛍光強度変化のデータからM次元多変量正規分布（M個の正規分布の意味）がつくられ、その確率密度関数 $N(\mu, \Lambda^{-1})$ は(1)として示される。

$$\mathcal{N}(\mathbf{x}|\mu, \Lambda^{-1}) = (2\pi)^{-\frac{M}{2}}(\det \Lambda)^{\frac{1}{2}} \exp\left\{-\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \mu)^T \Lambda (\mathbf{x} - \mu)\right\} \quad (1)$$

ここで Λ は精度行列（共分散行列の逆行列）で、以下の通りのM行M列の正方行列である。

$$\Lambda = \begin{pmatrix} \Lambda_{1,1} & \cdots & \Lambda_{M,1} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \Lambda_{1,M} & \cdots & \Lambda_{M,M} \end{pmatrix}$$

また \mathbf{x} は、ノードi（i番目のニューロンの意味）の蛍光強度の経時変化 x_i ベクトルを並べた $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots, x_M)$ のM次元列行列である。

\det は行列式。

μ は \mathbf{x} の平均の行列であり、本研究では0となる。

ここで、二つの確率変数i、j（i番目とj番目のニューロンの蛍光強度変化）の確率分布が条件付き独立であることについて考える。

M個のニューロンの蛍光強度変化のうち、i番目とj番目を X_1 に、残りを X_2 に分類する。

$$X_1 = (x_i, x_j)$$

$$X_2 = (x_1, \dots, x_{i-1}, x_{i+1}, \dots, x_{j-1}, x_{j+1}, \dots, x_M)$$

この時にiとjの2つのニューロンの蛍光強度変化に統計的依存性がない（統計的に独立）ということは、 X_1 の確率分布が X_2 を与えた時に条件付き独立であるということである。条件付き独立とは、この場合、「 X_2 が与えられると X_1 が独立になる」という意味である。そこで、「 X_2 が与えられた時の X_1 の確率」の条件付き確率分布 $p(X_1|X_2)$ は、条件付き確率なので、以下の式のようになる。

$$p(X_1|X_2) = \frac{p(X_1 \cap X_2)}{p(X_2)} \quad (2)$$

式(2)において X_2 は与えられ、固定されているため、 $p(X_2)$ は定数となり、 $p(X_1|X_2)$ は $p(X_1 \cap X_2)$ に比例する。そして、 $p(X_1, X_2)$ を式(1)と考え、 x_i と x_j に関する項（ $\Lambda_{i,i}$, $\Lambda_{i,j}$, $\Lambda_{j,j}$ ）を全て取り出すと

$$p(X_1|X_2) \propto p(X_1, X_2) \propto \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\Lambda_{i,i}x_i^2 + 2\Lambda_{i,j}x_ix_j + \Lambda_{j,j}x_j^2\right)\right\} \quad (3)$$

となる。

ここで、もし $\Lambda_{ij}=0$ ならば、式(3)は

$$\exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\Lambda_{i,i}x_i^2 + 2\Lambda_{i,j}x_ix_j + \Lambda_{j,j}x_j^2\right)\right\} = e^{-\frac{1}{2}\Lambda_{i,i}x_i^2} \cdot e^{-\frac{1}{2}\Lambda_{j,j}x_j^2}$$

と x_i と x_j のそれぞれの成分の積と示され、精度行列 Λ の要素 $\Lambda_{ij}=0$ が必要十分であり、つまり式(2)は $\Lambda_{ij}=0$ とき i と j が独立であることを示している(井手 and 杉山 2015)。また、一方で絶対値 $|\Lambda_{ij}|$ は i と j の相動性の強さを示している。そのため、GGM の中で推定される精度行列 Λ が、ノード間のネットワーク構造を示すことになる。

機械学習アルゴリズム *glasso* の導入

複数ある列行列 \mathbf{x} において、常に成り立つ一意な精度行列 Λ を導くことは、一般には十分な \mathbf{x} があっても難しく、また一意な精度行列 Λ を導くのに十分な \mathbf{x} が得られないことも多い。しかし、精度行列 Λ の要素 Λ_{ij} に多くの 0 を含むスパース性を仮定することで、 \mathbf{x} から精度行列 Λ を推定する。

まずはスパース性を導入せずに精度行列 Λ を推定するために、精度行列 Λ について M 次元正規分布の最尤推定を行った。 M 次元正規分布に対して対数を取る対数最尤推定を行い、精度行列 Λ の成分の項以外を取り除いた。

$$\begin{aligned} \ln \prod_{n=1}^N \mathcal{N}(\mathbf{x}^{(n)} | 0, \Lambda^{-1}) &= \sum_{n=1}^N \left(-\frac{M}{2} \ln(2\pi) + \frac{1}{2} \ln(\det \Lambda) - \frac{1}{2} \mathbf{x}^{(n)T} \Lambda \mathbf{x}^{(n)} \right) \\ &\propto \frac{N}{2} \ln(\det \Lambda) - \frac{1}{2} \sum_{n=1}^N \mathbf{x}^{(n)T} \Lambda \mathbf{x}^{(n)} \\ &\propto \ln(\det \Lambda) - \text{Tr}(\Lambda \mathbf{S}) \quad (4) \end{aligned}$$

ここで Tr は行列のトレース、 \mathbf{S} は経験的な共分散行列を示す。対数最尤推定であることから、式(4)を最大化する精度行列 Λ が推定されるべき精度行列 Λ となる。ここで、式(4)にスパース性を導入してニューロン間の結合を推定するため、精度行列の L1 ノルム

$$\|\Lambda\|_1 = \sum_{i,j=1}^M |\Lambda_{i,j}|$$
 を禁則項として導入する。

$$\max_{\Lambda} (\ln(\det \Lambda) - \text{Tr}(\Lambda \mathbf{S}) - \rho \|\Lambda\|_1) \quad (5)$$

L1 ノルム $\|\Lambda\|_1$ が導入されることによって、式(5)を最大化するために精度行列 Λ の要素 Λ_{ij} に適度に 0 を割り当てられ、精度行列 Λ にスパース性が導入される(岩波データサイエンス刊行委員会 2015)。ここで ρ は正則化パラメータであり、スパース性の程度を決めるある種の閾値のような働きをする。式(5)を解き精度行列を推定するため、R package *glasso* に含まれる *glasso method* を用いた(Friedman, Hastie, and Tibshirani 2008)。関数 *glasso* は、実験内で得られたデータから得られる経験的な共分散行列 \mathbf{S} と、正則化パラメータ ρ を引数として、戻り値として推定された精度行列 Λ が得られる。得られた精度行列 Λ の要素 Λ_{ij} を、 x_i と x_j の独立性、つまり FC として局所皮質回路を推定した。なお、推定される精度行列 Λ は対称行列となる。

glasso を用いた解析

睡眠覚醒に伴う FC の変化を調べるため、4 秒毎ずらした 20 秒の時間窓を設定し、それぞれの時間窓内での蛍光強度から精度行列 Λ の推定を行った。

glasso の引数である共分散行列 \mathbf{S} を求めるため、相対蛍光強度 $(\Delta F/F)_t$ から時間による変動を取り除くため、フレーム毎の差異を取った F_s を用いた。

$$F_s = (\Delta F/F)_t - (\Delta F/F)_{t-1}$$

F_s はニューロン毎の相対的蛍光強度の差異ベクトルであり、ニューロン毎に存在するため M 本のベクトルが得られる。 F_s の分布は、それぞれ平均値 0 の正規分布を示した。 F_s を一定の時間窓で区切ることによって得られた M 次元多変量データ F_s から、 F_s の 1 列ずつを行列 \mathbf{x} として、経験的共分散行列 \mathbf{S} に変換した。

$$\mathbf{S} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \mathbf{x}^{(n)T} \mathbf{x}^{(n)}$$

ただし、 N は一つの時間窓に含まれる M 次元多変量データの個数である。

また、適切な正則化パラメータ ρ を決定するために、ニューロン毎の蛍光強度の時系列データ F_t から NREM、wake における独立したニューロンペアの個数を調べた。20 秒の時間窓の中で各々のニューロンにおける蛍光強度の上昇イベントの有無を調べ、上昇イベントがどちらか一方のニューロンにも存在しない場合、その時間窓においてそのニューロンペアは独立であると定義した。そして、各マウス毎の NREM、wake について 4 分間の各ニューロンの上昇イベントの有無を調べ、独立したニューロンペアの個数を算出した。一方で、glasso を用いて同時刻の多変量データ F_s と様々な正則化パラメータ ρ から、独立したニューロンペアの個数を算出した。glasso から算出された独立したニューロンペアの個数の平均が、上昇イベントから算出された独立したニューロンペアの個数の平均と同じになる正則化パラメータ ρ を適切な正則化パラメータ ρ (0.0009-0.002) として決定した。以上の手法を用いて glasso の引数を導き、精度行列 Λ を推定した。断眠実験においても同様の手法を用い、正則化パラメータは同一領域の自発睡眠の正則化パラメータと同じ値を用いた。

ニューロンネットワークの機能的結合性の形成と強度についての算出の実際

ある時間窓 N における、推定された精度行列 Λ_N の要素 Λ_{Nij} はニューロン i とニューロン j の関係性を示している。要素 Λ_{Nij} が 0 のときは時間窓 N におけるニューロン i 、 j 間の独立性を示す一方で、要素 Λ_{Nij} が 0 でないときは非独立を示し、ニューロン間の相動性の存在、つまり機能的結合性 (FC) が形成されていると考えられる。そこで睡眠覚醒状態による FC の形成確率を求めた。推定された精度行列 Λ_N を以下の式に従って、行列 \mathbf{L}_N に変換した。

$$\text{formation of connectivity}(= \mathbf{L}_N) = \begin{pmatrix} L_{1,1} & \cdots & L_{M,1} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ L_{1,M} & \cdots & L_{M,M} \end{pmatrix}_N \begin{cases} L_{i,j} = 0 & (\Lambda_{N \ i,j} = 0) \\ L_{i,j} = 1 & (\Lambda_{N \ i,j} \neq 0) \end{cases}$$

睡眠覚醒状態のそれぞれの状態における、あるニューロン間の FC 形成確率(=Pr)は以下のように定義した。

$$\text{probability of connectivity}(= \mathbf{Pr}) = \frac{1}{n(N \in \text{wake})} \sum_{N \in \text{wake}} \mathbf{L}_N$$

ただし、これは覚醒(N ∈ wake)での定義であり、これを NREM 睡眠及び REM 睡眠についても同様に求めた。得られた行列 **Pr** の要素 Pr_{ij} がニューロン i とニューロン j の FC 形成確率を示す。

また、推定された精度行列 **Λ** の要素 Λ_{ij} の絶対値 |Λ_{ij}| は、ニューロン i とニューロン j の相動性の高さ、つまり |Λ_{ij}| は FC の強度を示すと考えられる。

そこで、あるニューロン間において FC を形成しているときの絶対値の平均値を、FC 形成強度(=St)として定義した。

connectivity strength(= **St**) =

$$\frac{1}{n(N \in \text{wake})} \sum_{N \in \text{wake}} \begin{pmatrix} L_{1,1} & \cdots & L_{M,1} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ L_{1,M} & \cdots & L_{M,M} \end{pmatrix}_N \begin{cases} L_{i,j} = |\Lambda_{i,j}| & (\Lambda_{i,j} \neq 0) \\ L_{i,j} = NA & (\Lambda_{i,j} = 0) \end{cases}$$

ただし、これは覚醒(N ∈ wake)での定義であり、これを NREM 睡眠及び REM 睡眠についても同様に求めた。また行列 **St** に関してはマウスごとに最大値を 1 として要素 St_{ij} の標準化を行った。以上の手法を用いて、各々の睡眠覚醒状態におけるニューロンペアの FC 形成確率(Pr)および FC 形成強度(St)について、Pr_{ij} 及び St_{ij} をニューロンペア毎に求めた。なお、検定についてはニューロンペアのサンプルサイズが大きいことから過剰検出となるため、結果の解釈にはそれぞれの分布の違いを示した。

計算には睡眠覚醒状態が変化しない時間を対象として、4 秒毎にずらすことで前後の時間窓と 16 秒重複させた 20 秒の時間窓を用い、睡眠覚醒状態が変化する前後 8 秒間を含む時間窓は取り除いた。また、十分な時間窓が得られなかったため、2 匹分の REM 睡眠の結果も取り除いた。

Pr と St の関係についての四分位ヒストグラム

各々の睡眠覚醒状態におけるニューロンペアの Pr および St の値に基づいて、相対的に 4 段階に順位分け(四分位)を行い、数値が大きい順に 1st から 4th と順位付けした。ただし、分位点上の値は下位のグループに振り分け、Pr が 0 のペアが 25%を超える場合は 0 以外のペアを上位 3 つのグループで三分位とした。

睡眠覚醒および、断眠や回復睡眠毎に順位分けされた Pr および St に基づいて、属するニューロンペアの比率を算出し、高さ及び色を用いて立体のヒストグラムで示した。また、

同一の状態における Pr と St の比較でも同一の手法で示した。ただし、Pr が 0 のペアは、St が存在しないため、取り除いた。

Pr 及び St とニューロン間距離の関係についての四分位ヒストグラム

カルシウムイメージングで取得した画像から、指定した各 ROI の中心をニューロンの位置として、各ニューロン間の直線距離を算出した。その距離に基づいて各ニューロンペアを 4 つのグループ(0-100, 100-200, 200-300, 300- μm) に分類した。各距離に基づいたグループの中で、Pr 及び St の順位付けを行い、高さおよび色を用いたヒストグラムで存在確率を示した。

断眠実験

自発睡眠の環境下でのカルシウムイメージングに加えて、断眠環境下でのカルシウムイメージングも行った。断眠環境下のイメージングは自発睡眠実験と同一マウスを用いて、自発睡眠と同一の条件で、前回の観察から 1 週間以上空けて行われた。頭部固定のステージ位置および、イメージング画像の比較を用いて、前回のイメージングと同一領域のイメージングを行った。断眠は最初の 4 時間(ZT3-6)にかけて行い、後の 1 時間(ZT7)に自発的な回復睡眠を行わせた。頭部を固定した状態での断眠を行うため、マウスの顔に風を吹きかけるエアブロー装置を用いた。装置は 3-7 秒間の稼働と休止をランダムで繰り返し、この装置を 4 時間断続的に稼働させることで、断眠を行った。EEG/EMG は常に記録し、通常の蛍光イメージングと同様の手法で 4 秒毎に睡眠覚醒状態のスコアリングを行い、断眠中は覚醒状態が 20 秒以上継続している時を覚醒と判定した。また、EEG から 1 から 4Hz におけるパワースペクトル密度(SWA:slow wave activity)の合計を算出し、ZT7 において断眠後の SWA の上昇を確認した。カルシウムイメージングは 14 時から 16 時(ZT5,6)までの 2 時間を断眠、16 時から 17 時(ZT7)までの 1 時間を回復睡眠として行った。

断眠および回復睡眠でのカルシウムイメージングおよび解析

断眠中の覚醒データには断眠開始 3, 4 時間(ZT5,6)のデータを用い、断眠後の回復睡眠(NREM 睡眠)のデータには断眠後 1 時間(ZT7)のデータを用いた。比較対象として、同時帯の自発睡眠の覚醒(ZT5,6)および NREM 睡眠(ZT7)のデータを用いて解析を行った。

断眠及び回復睡眠でのカルシウムイメージング画像についても、取得したイメージング画像から同様の手法でニューロン毎の蛍光強度の時系列データ(F_i)を作製した。それらの結果に対しウィルコクソンの符号順位検定を用いた。

また、断眠実験の時系列データ(F_i)についても、自発睡眠と同一の手法で GGM を用いて精度行列 \mathbf{A} を推定し、ニューロン間の FC 形成確率及び接続性形成強度について算出を行った。精度行列 \mathbf{A} を推定するときを設定する正則化パラメータは、個体毎に自発的覚醒睡眠時と同じ値を使用した。また、Pr や St の関係や距離との関係についても同一の手法

で求めた。

結果

運動野の神経活動は NREM 睡眠中に最も低く、REM 睡眠中に最も高くなる

トラックボール型トレッドミルを備え付けた二光子顕微鏡を用いて、自発的な睡眠覚醒状態におけるニューロンレベルでの神経活動を観察した(Fig. 2A) (Kanda et al. 2016)。ニューロン特異的 human synapsin-1 promotor の下流に GCaMP6s 遺伝子(Chen et al. 2013)を持ったアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を運動野の表層に注入することで、カルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6s を運動野第 II, III 層のニューロンに発現させ、カルシウムイメージングを行った。同時に興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを分類するため、不確実なスパイク幅を用いた電気生理学的手法に基づく分類でなく(Nowak et al. 2003)、GABA ニューロン特異的に tdTomato を発現する Vgat-tdTomato マウスを用いて分類した。Vgat-tdTomato マウスの tdTomato 発現特異性については、FISH および免疫染色を行い、tdTomato が GABA 作動性ニューロンに発現していることを確認した(Fig. 2C, tdTomato+/Gad1+ cells, 98.9%; tdTomato+/Gad1- cells, 0.3%; tdTomato-/Gad1+ cells, 0.8%; n = 913 cells 運動野第 2,3 層, n = 3 mice)。以上の手法により、GCaMP6s だけを発現しているニューロンが興奮性ニューロン、GCaMP6s と共に tdTomato を発現しているニューロンを抑制性ニューロンと特定した(Fig. 2B)。観察実験は明期(ZT3-7)に行い、その間マウスは頭部を固定されたまま二光子顕微鏡下のトレッドミルの上に保持され続け、カルシウムイメージング、脳波、筋電を記録した。(Fig 3A,B)。二光子顕微鏡による観察でも、興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロンの比率はおおよそ 8:2 であり、これはげっ歯類の大脳皮質における解剖学的な結果と一致していた(DeFelipe, Alonso-Nanclares, and Arellano 2002)。

最初に、睡眠覚醒状態での各々のニューロンにおける神経活動について調べた。興奮性ニューロンの全体的な神経活動の傾向としては NREM 睡眠で最も低下し、REM 睡眠で最も上昇した(Fig. 3C, all comparisons, $p < 0.001$, ANOVA followed by Tukey–Kramer test)。各々の神経活動の差を示す分散は NREM 睡眠と覚醒では近い値を示す一方で、REM 睡眠では高値を示した(Fig. 3C, mean±SD of Z-scored fluorescence intensity (Fz), n = 783 cells; Wake, 0.22 ± 0.18 ; NREM, -0.16 ± 0.14 ; REM, 0.35 ± 0.67)。抑制性ニューロンの活動でも興奮性ニューロンと同様の傾向を示した(Fig. 3C, Fz, n = 193 cells; Wake, 0.25 ± 0.19 ; NREM, -0.17 ± 0.14 ; REM, 0.37 ± 0.71 ; all comparisons, $p < 0.001$, ANOVA followed by Tukey–Kramer test)。この覚醒、REM 睡眠でニューロン活動が高く、NREM 睡眠では低いという結果は、電気生理学的手法によって得られていた結果に大方一致していた(Evarts 1964; Hengen et al. 2016; Hobson and McCarley 1971; Vyazovskiy et al. 2009; Watson et al. 2016a)。

次に睡眠覚醒に伴って各々のニューロンにおける神経活動がどのように変化していくのかについて調べた。興奮性、抑制性共に、各々のニューロンのうち、約 30%が覚醒で最も高い神経活動を示した(Fig. 3D)。そして、それらのニューロンが二番目に高い神経活動を示したのは NREM 睡眠と REM 睡眠でほぼ同数であった(Fig. 3E, $W > N > R$, $W > R > N$)。また、全てのニューロンのうち、約半数が REM 睡眠で最も高い神経活動を示し、それらの

ニューロンの 90%以上が覚醒で二番目に高い神経活動を示した(Fig. 3D,E, R>W>N)。更に NREM 睡眠で最も高い神経活動を有するニューロンは 4.5%と少なく、それらの 80%は覚醒で二番目に高い神経活動を示した(Fig. 3D,E, N>W>R)。しかし、N>W>R を示すニューロンの 62.5%を抑制性ニューロンが占めており、このような活動性を示す興奮性ニューロンはごく少数であった。他にも NREM 睡眠と REM 睡眠で共に高い神経活動を示すニューロン(N>R>W, R>N>W, N=R>W)はごく少数であり、これは運動野のニューロンは NREM 睡眠と REM 睡眠で活動するニューロンは明確に異なることを示唆した。更に、REM 睡眠で最も神経活動が高くなるニューロンは、覚醒や NREM 睡眠で最も神経活動が高くなるニューロンと比較して、神経活動が高くなる傾向を認めた(Fig. 3F, $p < 0.001$, ANOVA followed by Tukey–Kramer test)。

NREM 睡眠では神経活動の結びつきが弱まる一方で、REM 睡眠では強まる

睡眠覚醒状態における局所皮質回路の変化を見るため、GGM を用いて FC を導入し、運動野ニューロンペアにおける FC の変化を調べた。GGM は *glasso* アルゴリズムを用いて計算され、GGM によってニューロン間の FC の有無や強度が導かれる。あるニューロン間で神経活動が、非独立であるとき、そのニューロン同士は FC を有することを示す。また、ノイズ等の見かけ上の FC を取り除いた FC を導くため、適切な正則化パラメータ (ρ)を導入した。その条件の下で、FC 形成確率(Pr)および FC 形成強度(St)を導いた。Figure. 4A は導かれた FC を示しており、推定された FC の数は覚醒と比較して、NREM 睡眠で少なく、REM 睡眠で増加している様子を示している。Pr の平均は興奮性、抑制性ニューロンのニューロンペアを構成する種類に関わらず、REM 睡眠で最も高く、NREM 睡眠で最も低くなる傾向を示し、抑制性ニューロン同士ではその傾向が強く見られた(Fig. 4B, mean Pr, Exc–Exc pair, 0.11 ± 0.12 in W; 0.09 ± 0.11 in N, 0.13 ± 0.15 in R; Exc–Inh pair, 0.11 ± 0.13 in W; 0.09 ± 0.11 in N, 0.14 ± 0.16 in R; Inh–Inh pair, 0.11 ± 0.14 in W; 0.09 ± 0.12 in N, 0.16 ± 0.17 in R)。また St では NREM 睡眠で比較的急峻な変化を認めるものの、平均値は睡眠覚醒状態で大きな変化を認めなかった(Fig. 4C, mean St, Exc–Exc pair, 0.14 ± 0.08 in W; 0.14 ± 0.05 in N, 0.13 ± 0.07 in R; Exc–Inh pair, 0.14 ± 0.08 in W; 0.14 ± 0.05 in N, 0.13 ± 0.07 in R; Inh–Inh pair, 0.14 ± 0.08 in W; 0.15 ± 0.05 in N, 0.13 ± 0.06 in R)。ただ、ニューロンの種類および睡眠覚醒においても、Pr と St による関係性は見られなかった(Fig. 5A)。

高い機能的結合性形成確率を有するニューロンペアは睡眠覚醒によっても維持される

FC を形成するペアは、睡眠覚醒状態に伴い変化するかについて調べた。各々のニューロンペアを Pr および St の値に基づいて相対的に 4 段階に順位分け(四分位)を行い、睡眠覚醒間で順位の変化を比較した(1st から 4th の順に高値から低値を示す)(Fig. 6)。睡眠覚醒間の対角成分の存在確率が高いことは、Pr や St の順位の入れ替わりが少なく、睡眠覚醒間で FC を形成するペアは変化が少なく、固定されていることを示す。一方で、存在確率

が均一に分布すれば、睡眠覚醒間で形成するペアは大きく変化することを示す。Pr については、ペアを構成する種類に関わらず対角成分の存在確率が高い傾向にあり、Pr が高いニューロンペア (Fig. 6A, wake-1st/NREM-1st Pr pairs, $\geq 15.1\%$; wake-1st/REM-1st Pr pairs, $\geq 12.0\%$; NREM-1st/REM-1st Pr pairs, $\geq 15.4\%$) および低いペア (Fig. 6A, wake-4th/NREM-4th Pr pairs, $\geq 14.6\%$; wake-4th/REM-4th Pr pairs, $\geq 17.2\%$; NREM-4th/REM-4th Pr pairs, $\geq 20.6\%$) は共通していた。そのため、各ニューロンペア間の FC を形成する確率 Pr の順位は、睡眠覚醒に伴って大きな変化することはないことが示された。一方で、St では、存在確率が均一化する傾向を示し (Fig. 6B, wake-1st/NREM-1st St pairs, $\geq 12.6\%$; Wake-1st/REM-1st St pairs, $\geq 10.9\%$; NREM-1st/REM-1st St pairs, $\geq 11.9\%$; wake-4th/NREM-4th St pairs, $\geq 12.6\%$; Wake-4th/REM-4th St pairs, $\geq 10.8\%$; NREM-4th/REM-4th St pairs, $\geq 12.8\%$)、St では睡眠覚醒間で平均値は大きな変化がないにも関わらず、St の順位は各ニューロンペア間で大きく変化していることが示され、St はニューロンペア毎に、睡眠覚醒に伴って大きく変化することが示唆された。

断眠は局所回路の機能的結合性の強度を上げる

睡眠は、断眠することで睡眠圧が高まり、その後睡眠圧の解消のために回復睡眠をする、という生理学的な調節が生じる。そこで、断眠による神経活動の変化および、局所的なニューロンネットワーク構造の変化について調べた。断眠実験および回復睡眠実験は、観察環境下で専用装置を用いて ZT3 から ZT6 まで断眠を行うことで (Fig. 7A)、ZT5、6 に断眠実験、ZT7 に回復睡眠実験のイメージングを行った (Fig. 7B)。マウスの顔にランダムに風を当てることで断眠を行い、ZT5、6 での有意な睡眠時間の減少を認めた (Fig. 7C,D, % of NREM sleep at ZT5–6, $61.4 \pm 4.5\%$ without SD, $11.3 \pm 6.3\%$ with SD, $n=5$ mice, $p < 0.003$, paired t-test)。断眠実験は自発睡眠実験で用いたマウスと同一のマウスを用い、自発睡眠実験と同一領域のイメージングを行った。そのため、自発睡眠および断眠実験では同じニューロンの比較を行った。

各々のニューロンの神経活動について比較したところ、興奮性ニューロンにおいて断眠中の神経活動は同時間における自発的な覚醒中の神経活動と比較し僅かではあるが低下を認めた (Fig. 7F, mean $(\Delta F/F)_t$ for wakefulness at ZT5–6, 0.68 ± 0.46 without SD, 0.55 ± 0.36 with SD, $n=539$ cells, $P < 0.0001$, Wilcoxon signed rank test)。抑制性ニューロンでは違いは認めなかった (Fig. 7F, mean $(\Delta F/F)_t$ for wakefulness at ZT5–6, 0.56 ± 0.38 without SD, 0.49 ± 0.22 with SD, $n=120$ cells, $P=0.20$, Wilcoxon signed rank test)。一方で、FC については、断眠により多く変化を認め (Fig. 7G)、Pr については抑制性ニューロンだけに大きな変化が生じる一方で、興奮性ニューロンでは変化を認めなかった (Fig. 7H, median of Pr, Exc–Exc pair, 0.06 in W without SD, 0.06 in W during SD, $n=31\ 422$ pairs; Exc–Inh pair, 0.06 in W no SD, 0.09 in W during SD, $n=12\ 740$ pairs; Inh–Inh pair, 0.04 in W no SD, 0.14 in W during SD, $n=1412$ pairs)。また断眠中は全てのニューロンペアで St は増加したが、特に抑制性ニューロンで大きく増加し

た(Fig. 7I, median of St, Exc–Exc pair, 0.12 in W no SD, 0.14 in W during SD, n=18 458 pairs; Exc–Inh pair, 0.13 in W no SD, 0.16 in W during SD, n=8096 pairs; Inh–Inh pair, 0.14 in W no SD, 0.20 in W during SD, n=853 pairs)。これらの結果から、断眠中は局所皮質回路の FC が強化されることが示された。

回復睡眠は機能的結合性の強度を弱める

次に回復睡眠中の NREM 睡眠(ZT7)についても断眠と同様に調べた。NREM 睡眠中の SWA については断眠後に増加を認め(Fig. 8C, 38.0% in the absence of SD, 41.6% in the presence of SD, n=5 mice, P=0.013, paired t-test)、断眠による睡眠圧の増量を認めた(Borbély 1982)。ZT7 における自発睡眠における NREM 睡眠と回復睡眠における NREM 睡眠における神経活動は、興奮性ニューロン、抑制性ニューロンともに有意な差を認めなかった(Fig. 8A,B, Exc, 0.37 ± 0.15 without SD, 0.35 ± 0.16 with SD, n=539 cells, P=0.06, Wilcoxon signed rank test; Inh, 0.33 ± 0.12 without SD, 0.32 ± 0.14 with SD, n=120 cells, P=0.51, Wilcoxon signed rank test)。一方、自発睡眠と回復睡眠における各々のニューロンの神経活動は断眠による変化は認めないにもかかわらず、FC については断眠によって大きく変化した(Fig. 8D)。回復睡眠における Pr は自発睡眠と比較し、中央値は興奮性ニューロンペアで低下する一方で、抑制性ニューロンペアでは変化しなかった(Fig. 8E, Pr median, Exc–Exc pair, 0.06 in N no SD, 0.02 in N after SD; Exc–Inh pair, 0.05 in N no SD, 0.02 in N after SD; Inh–Inh pair, 0.03 in N no SD, 0.03 in N after SD)。また、第三四分位点は、興奮性ニューロンペアでは低下する一方で、抑制性ニューロンペアでは上昇した(Fig. 8E, Q3 of Pr, Exc–Exc pair, 0.15 in N no SD, 0.09 in N after SD; Exc–Inh pair, 0.16 in N no SD, 0.12 in N after SD; Inh–Inh pair, 0.18 in N no SD, 0.23 in N after SD)。一方、St はニューロンペアの種類に関わらず、回復睡眠で低下した(Fig. 8F, median (Q2) and lower quantile (Q1) of Pr, Exc–Exc pair, 0.18 and 0.15 in N no SD, 0.17 and 0.11 in N after SD; Exc–Inh pair, 0.18 and 0.15 in N no SD, 0.18 and 0.12 in N after SD; Inh–Inh pair, 0.18 and 0.16 in N no SD, 0.17 and 0.12 in N after SD)。これは断眠中に強化されていた FC が、回復睡眠中には弱化されている状態が観察されたと考えられた。

機能的結合性の生理的調節

断眠および回復睡眠による、それぞれのニューロンペアの FC の変化を調べるため、自発睡眠覚醒と同様の手法を用いて、Pr および St の値に基づいてニューロンペアを四分位し、順位の変化を比較した。自発覚醒中に低い Pr を持つ興奮性ニューロンペアは断眠中も低い状態のままであり(Fig. 9A, % of W-during-SD-4th/W-no-SD-4th Pr pairs, 21.8% in Exc–Exc; 15.5% in Exc–Inh; 12.8% in Inh–Inh)、断眠覚醒の Pr を構成する興奮性ニューロンペアは、自発覚醒中と共通性を示した。一方で、回復睡眠と自発睡眠では Pr に明らかな関係性は認めず、ニューロンペアに共通性は示されなかった。また、抑制性ニューロンでは、自発覚醒と断眠覚醒および、自発睡眠と回復睡眠の間でニューロンペアの共通性は示され

なかったが、断眠覚醒と回復睡眠の間では共通性が示された。(Fig. 9A, % of W-during-SD-1st/NREM-after-SD-1st Pr pairs, 10.8% in Exc-Exc; 16.3% in Exc-Inh; 19.1% in Inh-Inh)。St の四分位比較では、自発睡眠覚醒における St と同様に(Fig. 6B)、断眠覚醒と自発覚醒、回復睡眠と自発睡眠では明らかな関係性は示されなかった(Fig. 9B)。しかし、断眠覚醒で高い St を持つニューロンペアは回復睡眠でも共通しており、局所回路における強い FC はニューロンの種類によらず、断眠から回復睡眠まで変わらず維持された。

抑制性ニューロンに見られるニューロン間距離の影響

FC の空間的特徴を調べるため、ニューロン間の距離による FC の変化を調べた。イメージング画像から各ニューロン間の直線距離を、三平方の定理を用いて測定し、ニューロンペアを距離によって 4 つのグループに分類した(the percentage of pairs at each distance, 24.1–33.7% at <100 μm ; 34.6–45.8% at 100–200 μm ; 16.5–26.0% at 200–300 μm ; and 3.5–15.1% at >300 μm)。Pr および St の四分位によって分割されたニューロンペアを、更に距離によって分類し、その存在確率を示した(Fig. 10A,B)。Pr では、自発 NREM 睡眠および自発 REM 睡眠の抑制性ニューロンにおいて空間的特徴を認め、特に REM 睡眠で 300 μm 超の抑制性ニューロン間では高い Pr を持つニューロンペアが多くを占めた(Fig. 10A, at a distance of >300 μm , 1st Pr Exc-Exc pairs, 29.4% in W, 32.5% in N, 27.9% in R; 1st Pr Exc-Inh pairs, 30.4% in W, 33.6% in N, 27.4% in R; 1st Pr Inh-Inh pairs, 26.5% in W, 35.5% in N, 40.4%)。一方で、St では、自発的な睡眠覚醒においてはいかなる傾向も見られなかった(Fig. 10B)。これは、NREM 睡眠および REM 睡眠において、抑制性ニューロン同士は、隣接しないニューロン間でより FC を形成しやすいことが示唆された。一方、断眠では 300 μm 超の抑制性ニューロン間で高い Pr を持つニューロンペアが減少した(Fig. 10A, at a distance of >300 μm , 1st Pr pairs in W during SD, 21.6% in Exc-Exc, 16.3% in Exc-Inh, 12.9% in Inh-Inh)。同様の傾向は St でも認め、St ではニューロンの種類に関わらず、高い St を持つニューロンペアが減少した(Fig. 10B, at a distance of >300 μm , 1st St pairs in W during SD, 11.8% in Exc-Exc, 10.1% in Exc-Inh, 12.5% in Inh-Inh)。これは、断眠では隣接しないニューロン間の FC が弱まることが示唆された。更に、回復睡眠では 300 μm 超のニューロン間の Pr は、ニューロンの種類に関わらず、高い Pr を持つニューロンペアが更に減少し(Fig. 10A, at a distance of >300 μm , 1st Pr pairs in N following SD, 9.9% in Exc-Exc, 9.6% in Exc-Inh, 6.2% in Inh-Inh)、St では抑制性ニューロン間でのみで、高い St を持つニューロンペアが減少した(Fig. 10B, at a distance of >300 μm , 1st St pairs in N following SD, 21.0% in Exc-Exc, 25.0% in Exc-Inh, 16.2% in Inh-Inh)。これは、回復睡眠では隣接しないニューロン間の FC が減少していることが示唆された。これらの結果は、運動野におけるニューロンの投射の広がりなど、構造の存在や興奮性ニューロン、抑制性ニューロンの組織構造の差を示唆するものであった。

考察

本研究では、二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングによって、運動野において覚醒睡眠に伴って大きく変化する神経活動が観察された。神経活動は、全体的には覚醒と比較し、NREM 睡眠で低下する一方で、REM 睡眠で増加し、更に断眠に伴い活動はやや低下するものの、回復睡眠の時には NREM 睡眠と同等の活動性を認めた。また、本研究ではカルシウムイメージングデータに GGM および *glasso* を用いることで、各ニューロン間の活動性の相動性を示す FC という概念を導入し、これを用いて運動野における局所皮質回路の動態の解析も行った。実際に、覚醒と比較し、NREM 睡眠は FC が減少する一方で、REM 睡眠では増加し、断眠では覚醒と比較し FC が強化されるが、回復睡眠は NREM 睡眠と比較し弱体化し、減少する(Fig. 11)という局所皮質回路の変化が示された。また、各ニューロンペア間の Pr の順位は、睡眠覚醒間および、断眠、回復睡眠を通じて概ね維持される一方で、St の順位は睡眠覚醒間で維持されず大きく入れ替わることから、FC の強度は睡眠覚醒に伴い、ニューロンペア毎に大きく異なる変化をすることが示された。更に、ニューロン同士の距離が 300 μm 以上離れた抑制性ニューロンペアでは、REM 睡眠で FC が増加した一方で、断眠、回復睡眠で減少や弱体化しており、運動野の局所回路内においてニューロンの種類と距離による構造の差が示唆された。

睡眠覚醒における神経活動の変化

本研究から得られた運動野における神経活動は、多くのニューロン(>90%)は覚醒中もしくは REM 睡眠中に最も活動性が高く、これはこれまでの細胞外ユニット電極を用いた研究(Evarts 1964; Hengen et al. 2016; Hobson and McCarley 1971; Vyazovskiy et al. 2009; Watson et al. 2016a) や二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージング研究(Seibt et al. 2017)から得られた見地にも沿う結果となり、本研究でも正しく神経活動を捉えられたと考えられる。また、一部のニューロン(5%)が NREM 睡眠中に最も活動性が高くなったことは、マルチユニットによる多数の神経活動の研究(Watson et al. 2016b)でも、低い発火頻度の一部のニューロンが NREM 睡眠中にやや活動性が高くなることと合致している。実際に、NREM 睡眠中に最も神経活動が高くなるニューロンは、覚醒や REM 睡眠中に最も活動性が高くなるニューロンと比較して、相対的な活動は低くなっており、NREM 睡眠中に最も活動性が高くなるニューロンは低い発火頻度であることが示唆される。このように二光子顕微鏡によるカルシウムイメージングによって、ニューロンのサブタイプに分類した上で *in vivo* における多数の神経活動を同時観察することが可能であると同時に、比較的神経活動の低いニューロンの神経活動を解析することも可能であった。

一方で、本研究と同様の二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングを広域で行った研究では、皮質の錐体ニューロンの神経活動は NREM 睡眠で低下し、REM 睡眠では更に低下するとされている(Niethard et al. 2016)。実際に、 $W>N>R$ という神経活動を行う興奮性ニューロンは本研究でも 15.6%を占めており、そのニューロン群は多数ではないものの、

広域のカルシウムイメージングの結果に影響を与えていたの可能性がある。また、本研究では抑制性ニューロン選択的に tdTomato を発現させることで、興奮性、抑制性ニューロンに分類し神経活動を調べたが、神経活動の平均では大きな差は認めなかった。しかし、NREM 睡眠で最も神経活動が高いニューロンでは興奮性、抑制性間で違いが存在する(Fig. 3E)など、様々なサブタイプを内包していることが示唆される。実際に、パルブアルブミン陽性抑制性ニューロンとソマトスタチン陽性抑制性ニューロンのそれぞれのサブタイプでは睡眠覚醒に伴い神経活動の変化に違いがあるとされており(Niethard et al. 2016, 2018)、そのサブタイプの構成によって割合の違いが生じていると考えられる。

皮質ニューロンの睡眠覚醒に伴う神経活動の変化は、神経調節物質の拡散性伝達や視床からの神経伝達によって生じる(Kanda et al. 2017; Steriade, Amzica, and Contreras 1996)。その為、本研究において観察された皮質ニューロンにおける神経活動の変化は、睡眠覚醒に伴って変化する神経伝達によって、各々のニューロンの膜電位などの生理学的メカニズムが変化し、結果として神経活動の変化として表れていると考えられる。しかし、眠気が高まり、脳波上 SWA が増加する断眠において、皮質ニューロンの神経活動に大きな変化は生じなかった。これは皮質ニューロンのオプトジェネティクス刺激が SWA を増加させないという研究(Rodriguez et al. 2016)も示している通り、SWA が単に個々の皮質ニューロンの神経活動の変化を反映しているのではなく、皮質ニューロンが集まった領域としての活動の変化を反映していることを示唆する。その為、本研究の様に、個々の神経活動だけでなく、局所神経回路としての解析が必要であることを改めて表すものである。

また、本研究では断眠や回復睡眠による神経活動の変化はほとんどないという結果が得られたが、電気生理学を用いた他の研究では、断眠は神経活動にほとんど影響を与えない結果(Hengen et al. 2016)や増加するという結果(Vyazovskiy et al. 2009)が示されている。ただ、神経活動に影響しない結果が得られた研究ではジェントルハンドリングによる断眠を行った一方で、増加した結果が得られた研究では興味刺激による断眠を行っている。本研究のエアブローの忌避反応を用いた断眠はジェントルハンドリングと同様に、断眠に伴いマウスに対して強いストレスがかかる一方で、興味刺激は自発的な覚醒であり、ストレスも低いと考えられる。そういった断眠手法やストレスが神経活動に変化を与えたと考えられる。

睡眠覚醒での局所神経回路における機能的関係

本研究では GGM および glasso から推定される FC という概念を導入し、睡眠における局所回路の動態について調べた。本研究におけるニューロンの神経活動の相動性を示す FC は、シナプス可塑性やセルアセンブリと関係した、シナプス伝達による相互作用や求心性の入力の変化を反映している(Hebb 1949)と考えられる。その観点から見ると、本研究で得られた運動野において FC の存在確率である Pr が NREM 睡眠中に減少している結果は、入力の低下を示しており、そのような低頻度のシナプス伝達が生じることで LTP の

弱化に寄与する(Martin, Grimwood, and Morris 2000; Neves, Cooke, and Bliss 2008)と考えられる。近年の運動学習に対する研究では、運動野において NREM 睡眠は飽和したシナプス伝達強度の脱飽和を担うとされており(Tononi and Cirelli 2014)、本研究の NREM 睡眠の疎な FC はこの考え方を支持する結果である。

また、断眠中における興奮性ニューロンの FC の強化は、NREM 睡眠が生じないことでシナプス伝達の脱飽和が生じなくなっていることを示しており、断眠によって運動学習後の運動記憶強化が阻害される(Stickgold 2005)ことを説明する。更に、断眠中の興奮性ニューロン間の Pr が覚醒から変化しないことは、覚醒が継続することで断眠による新たな棘突起の形成の阻害を示していると考えられ、若いマウスの皮質において断眠により棘突起が増加せずに消退することに一致する(Maret et al. 2011)。このように、覚醒中の運動学習によって強化されたシナプス伝達が、NREM 睡眠に伴い多くのニューロン同士でシナプス伝達強度が弱体化され、強化されるための余地を作り出すことで新たな記憶を行えるようにする、という運動学習に対する睡眠覚醒における一連の効果を、本研究で用いた FC の概念を導入し、その変化を調べることで局所皮質回路の動態の変化として説明しうることが示されたと考えられる。

また、断眠では、抑制性ニューロンも FC の増加、強化が認められた。断眠はてんかん発作のリスクとされており(Malow 2004)、抑制性ニューロンにおける FC の増加、強化は、断眠中に興奮性ニューロンで生じる強い FC によって高まった興奮性を抑制するための生理学的変化が生じている様子を示している可能性がある。

REM 睡眠では運動学習後の運動野において、新たな棘突起を拡大させつつ、余剰な棘突起の刈り込みを行うことで、運動学習の長期的な維持を促進するとされている(Li et al. 2017)。本研究における REM 睡眠の FC 変化を見ると、FC は増加と弱体化という結果であり、FC の増加は、新たな棘突起の拡大を行い、弱体化を阻止することで既に学習した運動スキルを長期に維持する役割を示していると考えられる。また、REM 睡眠は、一般に睡眠後期の NREM 睡眠後に連続して生じる(Dickelmann and Born 2010)ことから、REM 睡眠の FC の弱体化はそれまでの NREM 睡眠中に生じた脱飽和の結果としての弱体化したシナプスを示していると考えられる。

運動皮質における局所神経回路とニューロン構造の機能的関係

本研究では、これまでの細胞外ユニット電極を用いた研究(Evarts 1964; Hengen et al. 2016; Hobson and McCarley 1971; Vyazovskiy et al. 2009; Watson et al. 2016a)と異なり、画像としてカルシウムイメージングを行ったことから、*in vivo* において神経活動をしているニューロンの正確な位置関係が得られた。そのため、ニューロン間の水平方向での距離と神経活動、FC としての関係についての結果が得られ、実際に 300 μm 以上離れた、特に抑制性ニューロンにおける FC が睡眠覚醒に伴い大きく変化する様子が認められた。皮質における抑制性ニューロンだけでも様々なサブタイプ、形態があり(Markram et al. 2004)、更

に動物種によってニューロン密度(Herculano-Houzel, Manger, and Kaas 2014)や走行(Alstermark, Ogawa, and Isa 2004)にも差が存在することから、具体的な距離の意義は低いと思われるが、運動野におけるクラスター構造の存在を示唆すると考えられた。実際に視覚野などでは鉛直方向のクラスターの柱構造が存在し、視覚情報の処理を行っている一方で、運動野においては各筋や運動単位を支配するクラスター構造は存在するが、視覚野などと比較し境界があいまいであるとされる(Keller 1993)。ただ、運動野第 2,3 層における錐体ニューロンの軸索側枝はサルでは水平方向に 3 mm 以上広がる一方で、抑制性ニューロンの一つであるバスケットセルでは 500 μm 程度の広がり(Keller 1993)、抑制性ニューロンの方が狭い構造を形成している可能性が考えられる。そのため、本研究の 300 μm 以上離れたニューロン間での NREM 睡眠や REM 睡眠などでの特に抑制性ニューロンにおける大きな FC の変化は、潜在的に存在するクラスター構造に依存し、睡眠中の運動野におけるクラスター構造の変動を示している可能性が考えられる。このような変化が新たな運動単位の取得や、成長に伴う運動への適応、脳卒中後の運動リハビリなどで生じる神経回路の可塑性(Murphy and Corbett 2009)と関係している可能性がある。また、一般に臨界期が存在する視覚野ではパルブアルブミン陽性抑制性ニューロンが可塑性に関係しているとされており(Yazaki-Sugiyama et al. 2009)、もしもこの距離による FC の変化にこれらの抑制性ニューロンが関係しているのであれば、はっきりとした臨界期がない運動野と比較し、視覚野では睡眠覚醒間での距離による FC の変化が生じない可能性ある。

本研究における今後の課題

本研究では、二光子顕微鏡を用いた大脳皮質のカルシウムイメージングを行った。そのため、麻酔などとは異なり、自発的な睡眠における個々の神経活動の観察を行え、そのデータから FC の解析を行った。しかし、蛍光タンパク質の蛍光強度変化速度はニューロンの膜電位変化速度と比較し遅く、カルシウムイメージングは電気生理学と比べ神経活動の解像度が低くなる(Steriade, Amzica, and Contreras 1996; Steriade, Timofeev, and Grenier 2001)。そのため、ニューロン間のシナプス伝達の強度変化は、電気生理学で扱われる ms 単位での神経活動が支配的ではないとされるものの(Crunelli and Hughes 2010)、本研究では ms 単位での神経活動および FC の解析は行えなかった。

また、*glasso* はスパース性を導入することで、主要な FC 以外を取り除かれる。そのため、今回の解析の対象から除かれた小さな FC や、より複雑なニューロン同士の関係が存在する可能性がある。その為、更なる理解には新たな実験手法や統計処理方法が必要とされる。

結論

本研究では、睡眠覚醒において、局所皮質回路での運動皮質ニューロンの神経活動およびニューロン間の FC についての解明を行った。神経活動は電気生理学で得られていた見地から予想された結果と概ね一致した一方で、FC の概念を局所皮質回路に導入することで、睡眠覚醒間で局所皮質回路がダイナミズムに変化する様子が示された。これらの変化は睡眠が持つ機能が、局所皮質回路の動態の生理的变化として捉えられたと考えられる。また、距離による FC の変化からは、運動皮質の潜在的な組織構造や、睡眠が組織構造を変化させる可能性が示唆された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を賜りました筑波大学国際睡眠医科学研究機構、柳沢正史教授に心から感謝の意を表します。また、グラフィカルモデルを導入しデータを解析するにあたり、統計数理研究所、日野英逸教授から多くの情報とご指導を頂いたことで本研究が大きく進み、深く感謝申し上げます。

本研究において常にご指導いただきました筑波大学国際睡眠医科学研究機構、上田壮志助教授に多大なるご指導をいただき、深く感謝いたします。また、本研究の立ち上げから、辻野なつ子さん、石井亮さんからの多大の助言を賜り感謝いたします。本研究において多くの助力を頂きました中司大樹さん、笠木靖弘さん、木塚真梨子さんにも感謝いたします。また、他柳沢・船戸研究室の方々にも研究を続けるにあたり、多くの助けを頂き感謝いたします。

研究生活を行える環境を維持するためのご協力を頂きました筑波大学精神神経科、新井哲明教授、根本清貴准教授および、水海道厚生病院、石崎病院、桜井病院にも深く感謝申し上げます。

本研究は、日本学術振興会科学研究費（助成番号16K18358、26220207、26507002、25293247、19K12111、17H06095、19K12111、17H06095）、最先端研究開発支援プログラム（FIRSTプログラム）、文部科学省世界トップレベル国際研究拠点形成促進プログラム（WPI）、科学技術振興機構（助成番号JPMJCR1761、JPMJCR1655）、山田科学振興財団、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団によった。

出典

本学位論文ではCerebral Cortex, Volume 30, Issue 7, July 2020, Pages 3977–3990, (doi.org/10.1093/cercor/bhaa012)に掲載された論文の内容を、Oxford University PressのCopyright Clearance Centerで手続き後、再利用している。

参考文献

- Alstermark, B., J. Ogawa, and T. Isa. 2004. "Lack of Monosynaptic Corticomotoneuronal EPSPs in Rats: Disynaptic EPSPs Mediated Via Reticulospinal Neurons and Polysynaptic EPSPs Via Segmental Interneurons." *Journal of Neurophysiology* 91(4): 1832–39.
- Biane, Jeremy S. et al. 2016. "Thalamocortical Projections onto Behaviorally Relevant Neurons Exhibit Plasticity during Adult Motor Learning." *Neuron* 89(6): 1173–79.
- Borbély, A. A. 1982. "A Two Process Model of Sleep Regulation." *Human neurobiology* 1(3): 195–204. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7185792>.
- Chen, Tsai Wen et al. 2013. "Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity." *Nature* 499(7458): 295–300.
- Chow, H. M. et al. 2013. "Rhythmic Alternating Patterns of Brain Activity Distinguish Rapid Eye Movement Sleep from Other States of Consciousness." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(25): 10300–305. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1313401110>.
- Crunelli, Vincenzo, and Stuart W. Hughes. 2010. "The Slow (1 Hz) Rhythm of Non-REM Sleep: A Dialogue between Three Cardinal Oscillators." *Nature Neuroscience* 13(1): 9–17.
- DeFelipe, Javier, Lidia Alonso-Nanclares, and Jon I. Arellano. 2002. "Microstructure of the Neocortex: Comparative Aspects." *Journal of Neurocytology* 31(3-5 SPEC. ISS.): 299–316.
- Dickelmann, Susanne, and Jan Born. 2010. "The Memory Function of Sleep." *Nature Reviews Neuroscience* 11(2): 114–26. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn2762>.
- Diering, Graham H et al. 2017. "Homer1a Drives Homeostatic Scaling-down of Excitatory Synapses during Sleep." *Science* 355(6324): 511–15.
- Ding, Jing Jin et al. 2014. "Structural Basis of the Ultrasensitive Calcium Indicator GCaMP6." *Science China Life Sciences* 57(3): 269–74.
- Evarts, Edward V. 1964. "Temporal Patterns of Discharge of Pyramidal Tract Neurons during Sleep and Waking in the Monkey." *Journal of neurophysiology* 27(2): 152–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14129768> <http://psycnet.apa.org/psycinfo/1965-00771-001>.
- Friedman, Jerome, Trevor Hastie, and Robert Tibshirani. 2008. "Sparse Inverse Covariance Estimation with the Graphical Lasso." *Biostatistics* 9(3): 432–41.
- Funato, Hiromasa et al. 2016. "Forward-Genetics Analysis of Sleep in Randomly Mutagenized Mice." *Nature* 539(7629): 378–83. <http://dx.doi.org/10.1038/nature20142>.
- Gulati, Tanuj et al. 2017. "Neural Reactivations during Sleep Determine Network Credit Assignment." *Nature Neuroscience* 20(9): 1277–84.
- Gulati, Tanuj, Dhakshin S. Ramanathan, Chelsea C. Wong, and Karunesh Ganguly. 2014. "Reactivation of Emergent Task-Related Ensembles during Slow-Wave Sleep after Neuroprosthetic Learning." *Nature Neuroscience* 17(8): 1107–13.

<http://dx.doi.org/10.1038/nn.3759>.

- Hebb, D. O. 1949. "The Organization of Behavior; A Neuropsychological Theory." *The American Journal of Psychology* 63(4): 633.
- Hengen, Keith B. et al. 2016. "Neuronal Firing Rate Homeostasis Is Inhibited by Sleep and Promoted by Wake." *Cell*: 1–12.
- Herculano-Houzel, Suzana, Paul R. Manger, and Jon H. Kaas. 2014. "Brain Scaling in Mammalian Evolution as a Consequence of Concerted and Mosaic Changes in Numbers of Neurons and Average Neuronal Cell Size." *Frontiers in Neuroanatomy* 8(AUG): 1–28.
- Hobson, J. Allan, and Robert W. McCarley. 1971. "Cortical Unit Activity in Sleep and Waking." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 30(2): 97–112.
- Holtmaat, Anthony et al. 2009. "Long-Term, High-Resolution Imaging in the Mouse Neocortex through a Chronic Cranial Window." *Nature Protocols* 4(8): 1128–44.
<http://www.nature.com/articles/nprot.2009.89>.
- Horowitz, S. G. et al. 2009. "Decoupling of the Brain's Default Mode Network during Deep Sleep." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(27): 11376–81.
- Huber, Reto et al. 2006. "Arm Immobilization Causes Cortical Plastic Changes and Locally Decreases Sleep Slow Wave Activity." *Nature Neuroscience* 9(9): 1169–76.
<http://www.nature.com/articles/nn1758>.
- Huber, Reto, M Felice Ghilardi, Marcello Massimini, and Giulio Tononi. 2004. "Local Sleep and Learning." *Nature* 430(6995): 78–81.
- Kanda, Takeshi et al. 2016. "Sleep as a Biological Problem: An Overview of Frontiers in Sleep Research." *The Journal of Physiological Sciences* 66(1): 1–13.
- . 2017. "Promising Techniques to Illuminate Neuromodulatory Control of the Cerebral Cortex in Sleeping and Waking States." *Neuroscience Research* 118: 92–103.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010217301141>.
- Kawai, Risa et al. 2015. "Motor Cortex Is Required for Learning but Not for Executing a Motor Skill." *Neuron* 86(3): 800–812.
- Keller, Asaf. 1993. "Intrinsic Synaptic Organization of the Motor Cortex." *Cerebral Cortex* 3(5): 430–41.
- Koike, Takahiko, Shigeyuki Kan, Masaya Misaki, and Satoru Miyauchi. 2011. "Connectivity Pattern Changes in Default-Mode Network with Deep Non-REM and REM Sleep." *Neuroscience research* 69(4): 322–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238510>.
- Li, Wei, Lei Ma, Guang Yang, and Wen-Biao Gan. 2017. "REM Sleep Selectively Prunes and Maintains New Synapses in Development and Learning." *Nature Neuroscience* 20(3): 427–37.
<http://www.nature.com/articles/nn.4479>.
- Liu, Danqian, and Yang Dan. 2019. "A Motor Theory of Sleep-Wake Control: Arousal-Action

- Circuit." *Annual review of neuroscience* 42: 27–46.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30699051>.
- Madisen, Linda et al. 2009. "Resource A Robust and High-Throughput Cre Reporting and Characterization System for the Whole Mouse Brain." *Nature Neuroscience* 13(1): 133–40.
<http://dx.doi.org/10.1038/nn.2467>.
- Malow, Beth A. 2004. "Sleep Deprivation and Epilepsy." *Epilepsy Currents* 4(5): 193–95.
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1111/j.1535-7597.2004.04509.x>.
- Maret, Stephanie et al. 2011. "Sleep and Waking Modulate Spine Turnover in the Adolescent Mouse Cortex." *Nature neuroscience* 14(11): 1418–20.
- Markram, Henry et al. 2004. "Interneurons of the Neocortical Inhibitory System." *Nature Reviews Neuroscience* 5(10): 793–807.
- Martin, S J, P D Grimwood, and R G M Morris. 2000. "Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis." *Annual Review of Neuroscience* 23(1): 649–711.
- Mostany, Ricardo, and Carlos Portera-Cailliau. 2008. "A Craniotomy Surgery Procedure for Chronic Brain Imaging." *Journal of Visualized Experiments* (12): 18–19.
<http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=680>.
- Mukhametov, L. M., A. Y. Supin, and I. G. Polyakova. 1977. "Interhemispheric Asymmetry of the Electroencephalographic Sleep Patterns in Dolphins." *Brain Research* 134(3): 581–84.
- Murphy, Timothy H., and Dale Corbett. 2009. "Plasticity during Stroke Recovery: From Synapse to Behaviour." *Nature Reviews Neuroscience* 10(12): 861–72.
- Nagayama, Mizuo et al. 2019. 11727 *Artificial Neural Networks and Machine Learning – ICANN 2019: Theoretical Neural Computation*. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-30487-4_8
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-30487-4>.
- Neves, Guilherme, Sam F. Cooke, and Tim V.P. Bliss. 2008. "Synaptic Plasticity, Memory and the Hippocampus - a Neural Network Approach to Causality." *Nature Reviews Neuroscience* 9(January 2008): 65–75.
- Niethard, Niels et al. 2016. "Sleep-Stage-Specific Regulation of Cortical Excitation and Inhibition." *Current Biology* 26(20): 2739–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.035>.
- Niethard, Niels, Hong-Viet V. Ngo, Ingrid Ehrlich, and Jan Born. 2018. "Cortical Circuit Activity Underlying Sleep Slow Oscillations and Spindles." *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 201805517.
- Nowak, Lionel G et al. 2003. "Electrophysiological Classes of Cat Primary Visual Cortical Neurons in Vivo as Revealed by Quantitative Analyses." *Journal of neurophysiology* 89(3): 1541–66.
- Peters, Andrew J., Simon X. Chen, and Takaki Komiyama. 2014. "Emergence of Reproducible Spatiotemporal Activity during Motor Learning." *Nature* 510(7504): 263–67.
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature13235>.

- Peters, Andrew J., Haixin Liu, and Takaki Komiyama. 2017. "Learning in the Rodent Motor Cortex." *Annual Review of Neuroscience* 40(1): 77–97.
- Picchioni, Dante, Jeff H. Duyn, and Silvina G. Horovitz. 2013. "Sleep and the Functional Connectome." *NeuroImage* 80: 387–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.067>.
- Ramanathan, Dhakshin S., Tanuj Gulati, and Karunesh Ganguly. 2015. "Sleep-Dependent Reactivation of Ensembles in Motor Cortex Promotes Skill Consolidation" ed. James Ashe. *PLOS Biology* 13(9): e1002263.
- Rioult-Pedotti, Mengia S., Daniel Friedman, Grzegorz Hess, and John P. Donoghue. 1998. "Strengthening of Horizontal Cortical Connections Following Skill Learning." *Nature Neuroscience* 1(3): 230–34.
- Rodriguez, Alexander V. et al. 2016. "Why Does Sleep Slow-Wave Activity Increase after Extended Wake? Assessing the Effects of Increased Cortical Firing during Wake and Sleep." *Journal of Neuroscience* 36(49): 12436–47.
- Sāmān, Philipp G. et al. 2011. "Development of the Brain's Default Mode Network from Wakefulness to Slow Wave Sleep." *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 21(9): 2082–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330468>.
- Sanes, Jerome N, and John P Donoghue. 2000. "Plasticity and Primary Motor Cortex." *Annual Review of Neuroscience* 23(1): 393–415. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.23.1.393>.
- Scammell, Thomas E., Elda Arrigoni, and Jonathan O. Lipton. 2017. "Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep." *Neuron* 93(4): 747–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.014>.
- Seibt, Julie et al. 2017. "Cortical Dendritic Activity Correlates with Spindle-Rich Oscillations during Sleep in Rodents." *Nature Communications* 8(1): 684. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00735-w>.
- Siclari, Francesca, and Giulio Tononi. 2017. "Local Aspects of Sleep and Wakefulness." *Current Opinion in Neurobiology* 44: 222–27. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438816302410>.
- Spormaker, Victor I., Pablo M. Gleiser, and Michael Czisch. 2012. "Frontoparietal Connectivity and Hierarchical Structure of the Brain's Functional Network during Sleep." *Frontiers in Neurology* 3(May): 1–10. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2012.00080/abstract>.
- Squire, Larry R., and Stuart Zola-Morgan. 1988. "Memory: Brain Systems and Behavior." *Trends in Neurosciences* 11(4): 170–75. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166223688901440>.
- Steriade, M., F. Amzica, and D. Contreras. 1996. "Synchronization of Fast (30–40 Hz) Spontaneous Cortical Rhythms during Brain Activation." *Journal of Neuroscience* 16(1): 392–417.
- Steriade, M, I Timofeev, and F Grenier. 2001. "Natural Waking and Sleep States: A View from inside Neocortical Neurons." *Journal of neurophysiology* 85(5): 1969–85.

- Stickgold, Robert. 2005. "Sleep-Dependent Memory Consolidation." *Nature* 437(7063): 1272–78.
<http://www.nature.com/articles/nature04286>.
- Tank, David W., Mutsuyuki Sugimori, John A. Connor, and Rodolfo R. Llinás. 1988. "Spatially Resolved Calcium Dynamics of Mammalian Purkinje Cells in Cerebellar Slice." *Science* 242(4879): 773–77.
- Tononi, Giulio, and Chiara Cirelli. 2014. "Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration." *Neuron* 81(1): 12–34.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.025>.
- de Vivo, Luisa et al. 2017. "Ultrastructural Evidence for Synaptic Scaling across the Wake/Sleep Cycle." *Science* 355(6324): 507–10.
- Vong, Linh et al. 2011. "Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons." *Neuron* 71(1): 142–54.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.028>.
- Vyazovskiy, Vladyslav V. et al. 2009. "Cortical Firing and Sleep Homeostasis." *Neuron* 63(6): 865–78.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.024>.
- Vyazovskiy, Vladyslav V, and Kenneth D Harris. 2013. "Sleep and the Single Neuron: The Role of Global Slow Oscillations in Individual Cell Rest." *Nature Reviews Neuroscience* 14(May): 1–9.
- Watson, Brendon O. et al. 2016a. "Network Homeostasis and State Dynamics of Neocortical Sleep." *Neuron* 90(4): 839–52.
- . 2016b. "Network Homeostasis and State Dynamics of Neocortical Sleep." *Neuron* 90(4): 839–52. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627316300563>.
- Weiler, Nicholas et al. 2008. "Top-down Laminar Organization of the Excitatory Network in Motor Cortex." *Nature Neuroscience* 11(3): 360–66.
- Yang, Guang et al. 2014. "Sleep Promotes Branch-Specific Formation of Dendritic Spines after Learning." *Science (New York, N.Y.)* 344(6188): 1173–78.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24904169%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4447313>.
- Yazaki-Sugiyama, Yoko et al. 2009. "Bidirectional Plasticity in Fast-Spiking GABA Circuits by Visual Experience." *Nature* 462(7270): 218–21.
- 井手剛, and 杉山将. 2015. *異常検知と変化検知 = Anomaly Detection and Change Detection*. 講談社. <https://ci.nii.ac.jp/ncid/BB19245944.bib> (June 28, 2020).
- 岩波データサイエンス刊行委員会. 2015. *岩波データサイエンス*. 岩波書店.
<https://ci.nii.ac.jp/ncid/BB19625311.bib> (June 28, 2020).

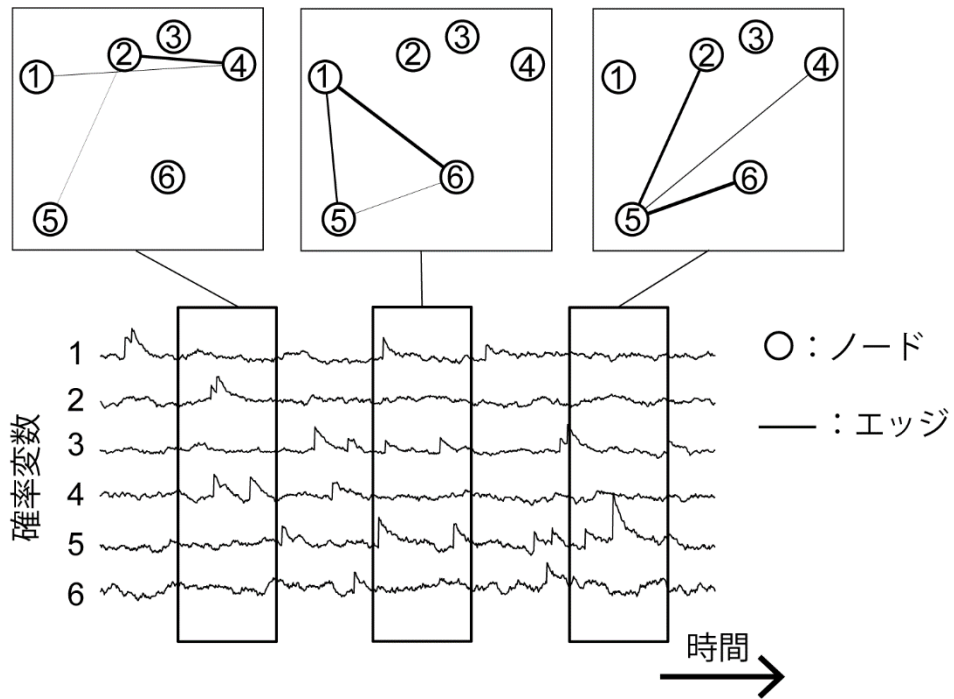


Figure 1. 確率変数間の依存関係をグラフ構造として示した例
 各々のノードの確率変数から依存関係を求め、ノード間の関係の有無をエッジによって示す。エッジの太さは関係の強さを示す。

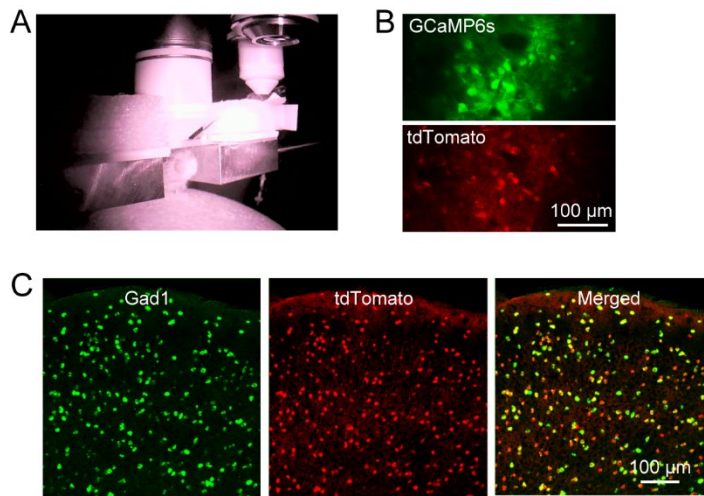


Figure 2.運動野のカルシウムイメージングおよびマウスの様子

(A) 二光子顕微鏡に置かれた観察環境のマウスの様子。

(B) GCaMP6s と tdTomato 画像、rAAV2/9-hSyn-GCaMP6s-WPRE ベクターを Vgat-tdTomato マウスの運動野に注入し、大脳皮質第 2,3 層を二光子顕微鏡を用いて観察した。

(C) Vgat-tdTomato マウス運動野の Gad1 mRNA に対する FISH および tdTomato に対する免疫染色画像、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

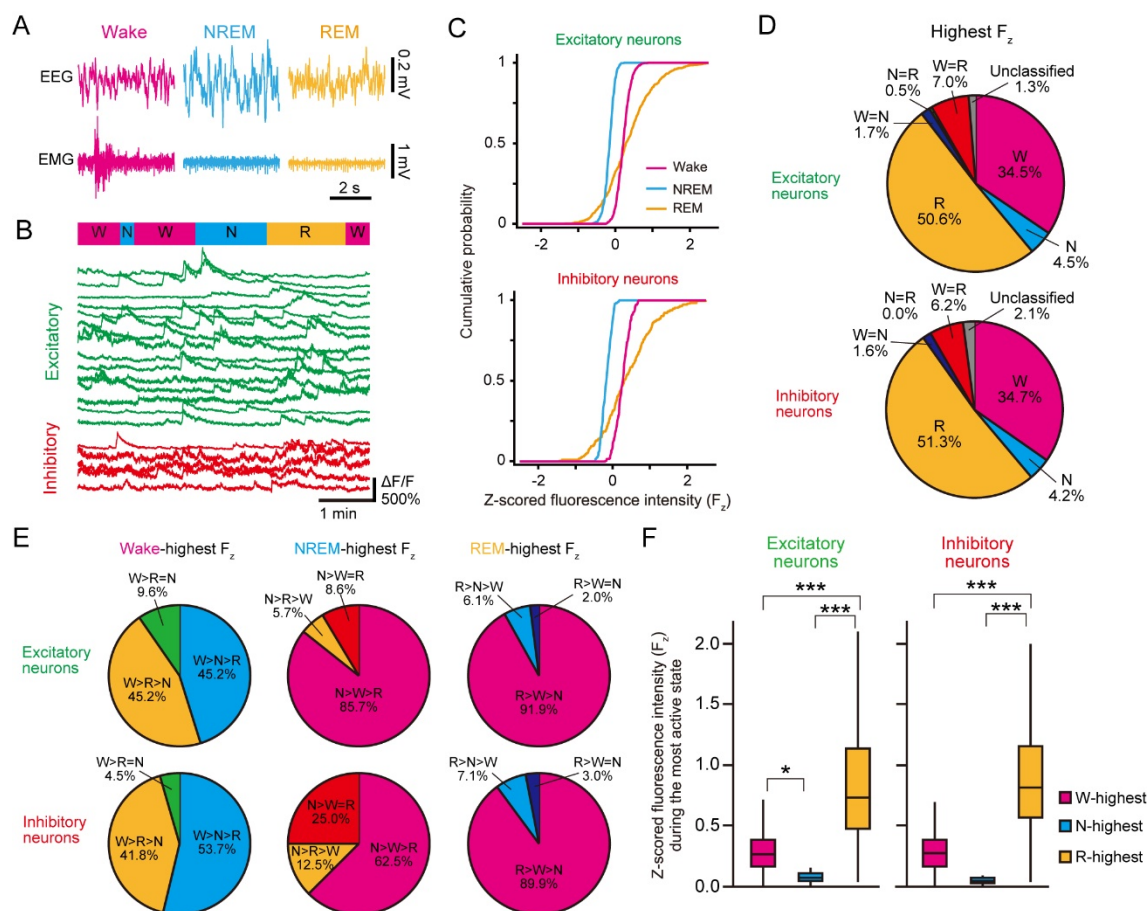


Figure 3. 睡眠に伴う運動野ニューロンのカルシウムイメージングの変化

- (A) 二光子顕微鏡観察環境下での脳波及び筋電図、左から覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠。
- (B) 睡眠覚醒サイクルにおけるニューロンの GCaMP6s の相対蛍光強度の一例、上に状態が示され、一本の線が一つのニューロンを示した。緑が興奮性ニューロン、赤が抑制性ニューロンを示す。
- (C) 興奮性ニューロン、抑制性ニューロンについての GCaMP6s 蛍光強度 z-score の累積度数分布。
- (D) 各ニューロンが最も蛍光強度が高い状態を示す円グラフ、=は有意差なし、上から興奮性ニューロン、抑制性ニューロンを示す。
- (E) 各ニューロンの状態による蛍光強度変化を示した円グラフ、左からそれぞれ覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠で最も高い蛍光強度を示すニューロンであり、上から興奮性ニューロン、抑制性ニューロンを示す。
- (F) 最も蛍光強度が高い状態における、ニューロン毎の平均蛍光強度を示したボックスプロット、左から興奮性ニューロン、抑制性ニューロンを示す。

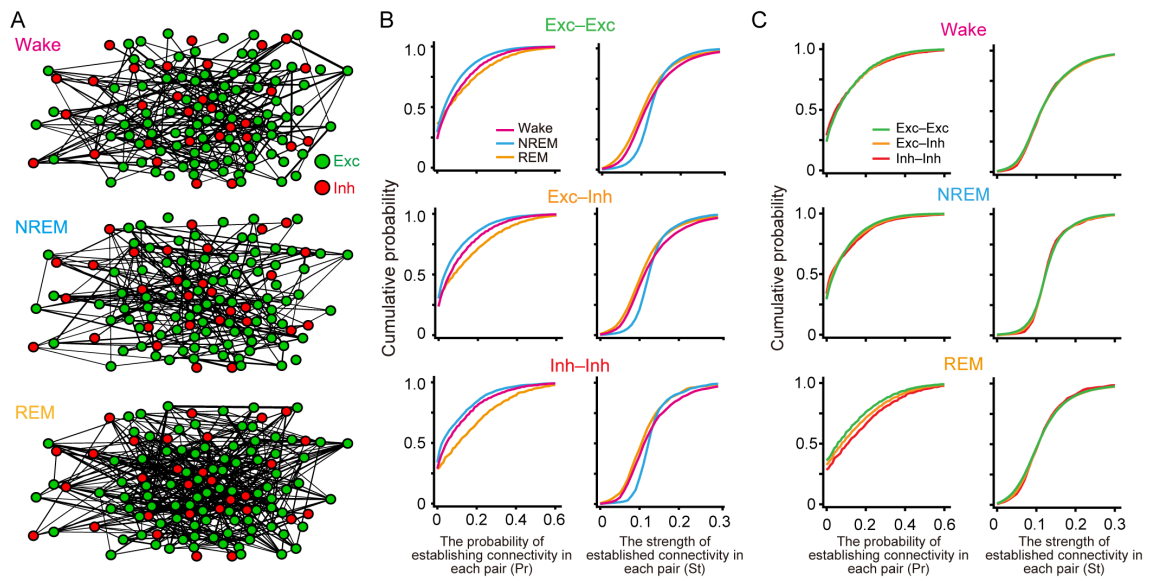


Figure 4. 機能的結合性(FC)の変化

- (A) GGM を用いて推定された FC の一例、上から覚醒時、NREM 睡眠、REM 睡眠、緑点が興奮性ニューロン、赤点が抑制性ニューロンを示す。位置は二光子顕微鏡で観察された位置を、線の存在が FC の形成、太さが強度を示す。St \geq 0.15 のみを描写した。
- (B) ニューロンペアの種類による FC 形成確率(Pr)(左)および FC 形成強度(St)(右)の累積度数分布、上から興奮性ニューロン同士、興奮性と抑制性、抑制性同士を示す。
- (C) 睡眠覚醒による Pr(左)および St(右)の累積度数分布、上から覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠を示す。

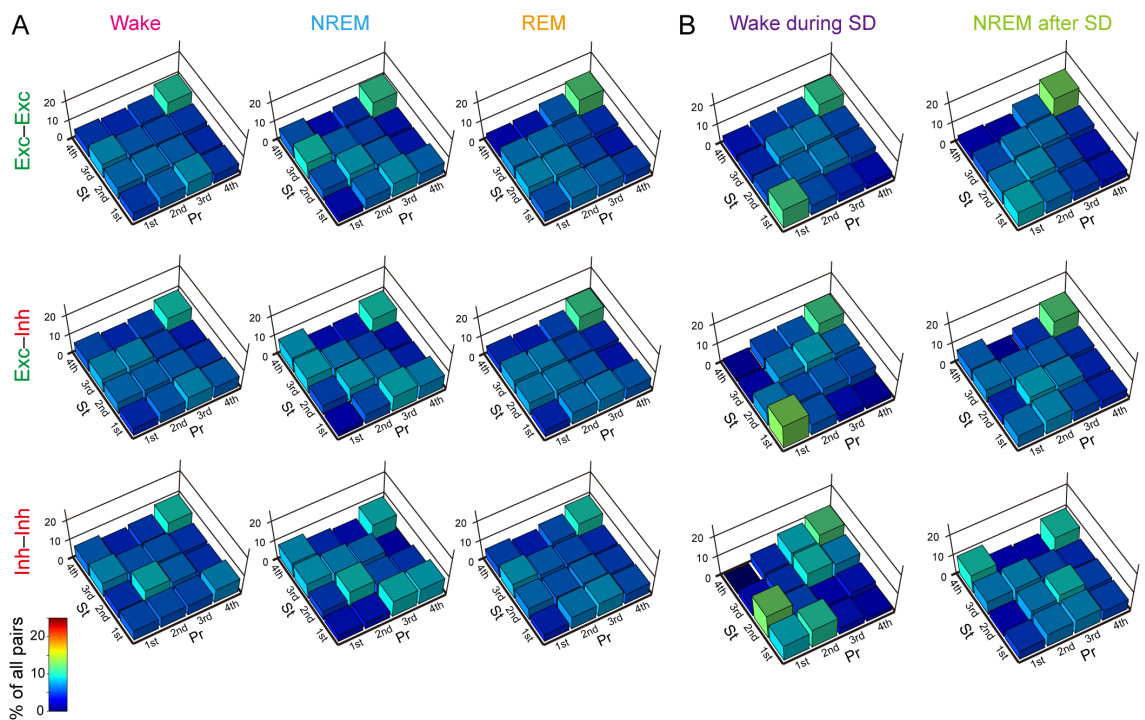


Figure 5. 睡眠覚醒における Pr と St の関係

- (A) 覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠における、同一状態における四分位した Pr および St の存在確率を示した 3D 棒グラフ、1st から 4th に向かって上位から下位に並んでおり、正面は Pr、側面は St で分類した。上から興奮性ニューロン同士、興奮性と抑制性、抑制性同士を示す。
- (B) 断眠、回復睡眠における同一状態における四分位した Pr および St の存在確率を示した 3D 棒グラフ、(A)と同様に示す。

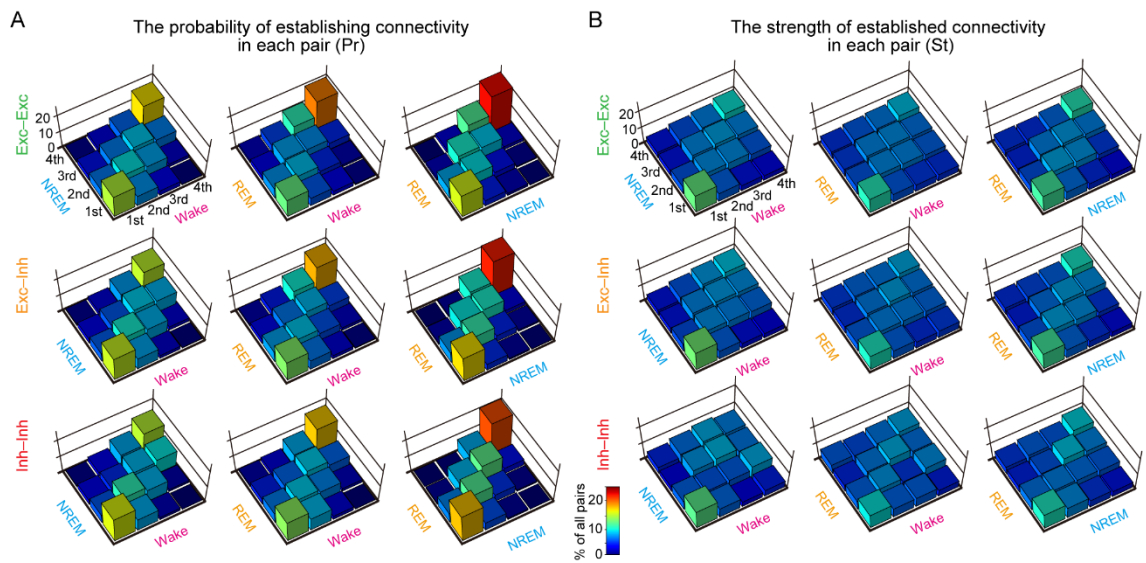


Figure 6. 睡眠、覚醒における Pr および St の存在確率の変化

(A) 睡眠覚醒における Pr の四分位の存在確率を示した 3D 棒グラフ、1st から 4th に向かって上位から下位に並んでおり、上から、興奮性ニューロン同士、興奮性と抑制性、抑制性同士を示す。

(B) 睡眠覚醒における St の四分位の存在確率を示した 3D 棒グラフ、(A)と同様に示す。

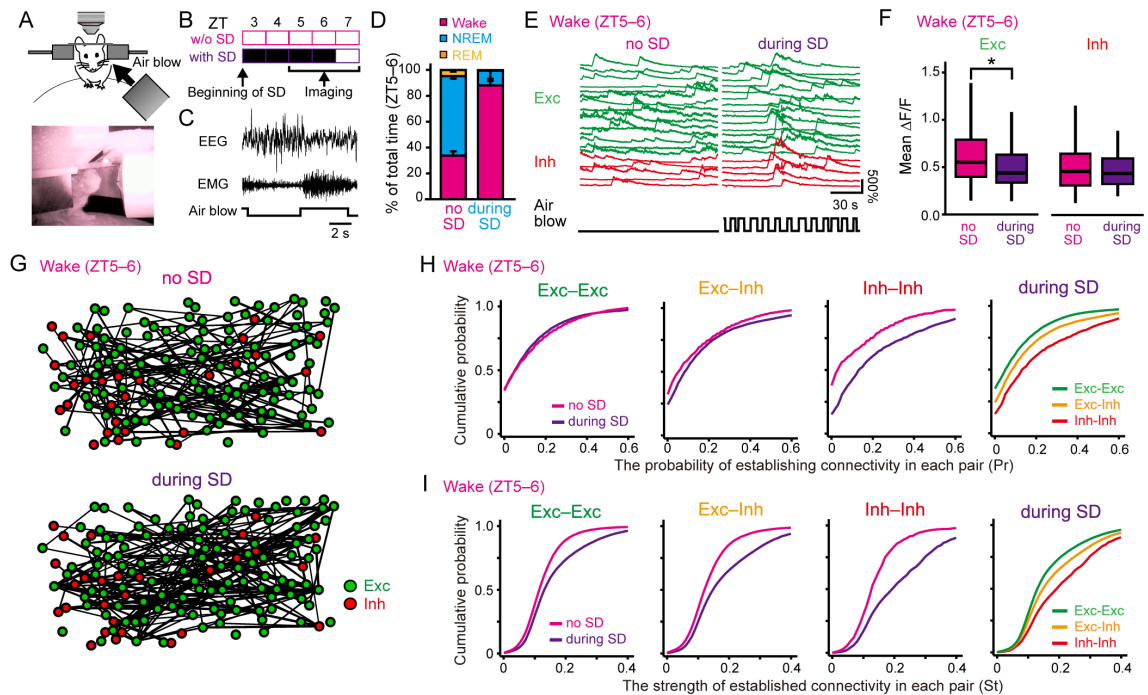


Figure 7. 断眠中における運動野のカルシウムイメージングおよびFCの変化

- (A) 観察環境下での断眠手法を示した図およびマウスの様子、マウスの顔面前方の白いチューブから風が当てられた。
- (B) 断眠実験のスケジュール、自発睡眠(上)では ZT3 から 7 までイメージングを行ったが、断眠実験では ZT3 から 6 まで断眠し、ZT5、6 が断眠環境でのイメージング、ZT7 が回復睡眠環境でのイメージングを行った。
- (C) 断眠中の脳波(上)、筋電図(中)と断眠装置の作動(下)の一例。
- (D) ZT5、6 における断眠装置による睡眠時間の変化。
- (E) 自発覚醒および断眠環境下での個々のニューロンにおける相対蛍光強度変化の一例、Figure 3 (B)と同じ手法を用い、下線が断眠装置の作動を示す。
- (F) 自発覚醒および断眠環境下でのニューロンの平均蛍光強度の比較したボックスプロット、左が興奮性ニューロン、右が抑制性ニューロンを示す。
- (G) 自発覚醒時(上)、断眠時(下)における GGM を用いて推定された FC の一例、Figure 4 (A)と同じ手法で示す。
- (H) ニューロンペアの種類による Pr の累積度数分布、Figure 4 (B) (C)と同じ手法を用い、左から興奮性ニューロン同士、興奮性と抑制性、抑制性同士、断眠環境下でのニューロンの種類による違いを示す。
- (I) ニューロンペアの種類による St の累積度数分布、(H)と同じ手法で示す。

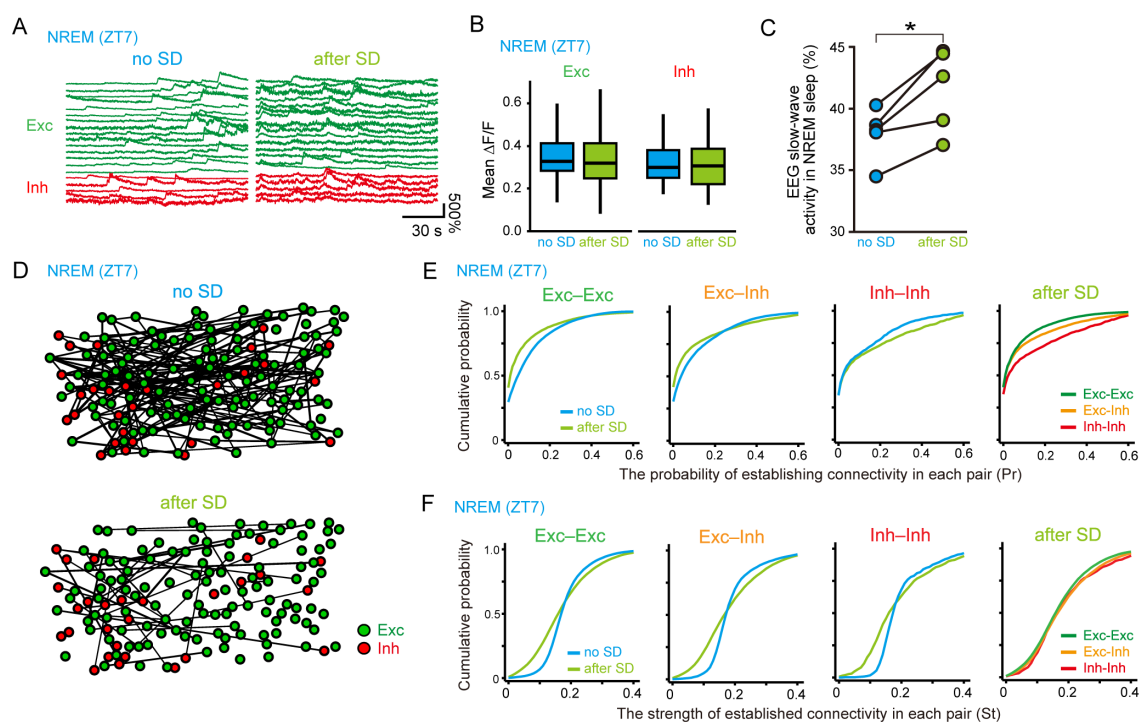


Figure 8. 回復睡眠における運動野のカルシウムイメージングおよびFCの変化

- (A) NREM 睡眠および回復睡眠環境下での個々のニューロンにおける相対蛍光強度変化の一例、Figure 3 (B)と同じ手法で示す。
- (B) NREM 睡眠および回復睡眠環境下でのニューロンの平均蛍光強度の比較したボックスプロット、左が興奮性ニューロン、右が抑制性ニューロンを示す。
- (C) NREM 睡眠および回復睡眠環境下での SWA の変化
- (D) NREM 睡眠(上)、回復睡眠時(下)における GGM を用いて推定された FC の一例、Figure 4 (A)と同じ手法で示す。
- (E) ニューロンペアの種類による Pr の累積度数分布、Figure 4 (B) (C)と同じ手法で示す。左から興奮性ニューロン同士、興奮性と抑制性、抑制性同士、断眠環境下でのニューロンの種類による違いを示す。
- (F) ニューロンペアの種類による St の累積度数分布、(E)と同じ手法で示す。

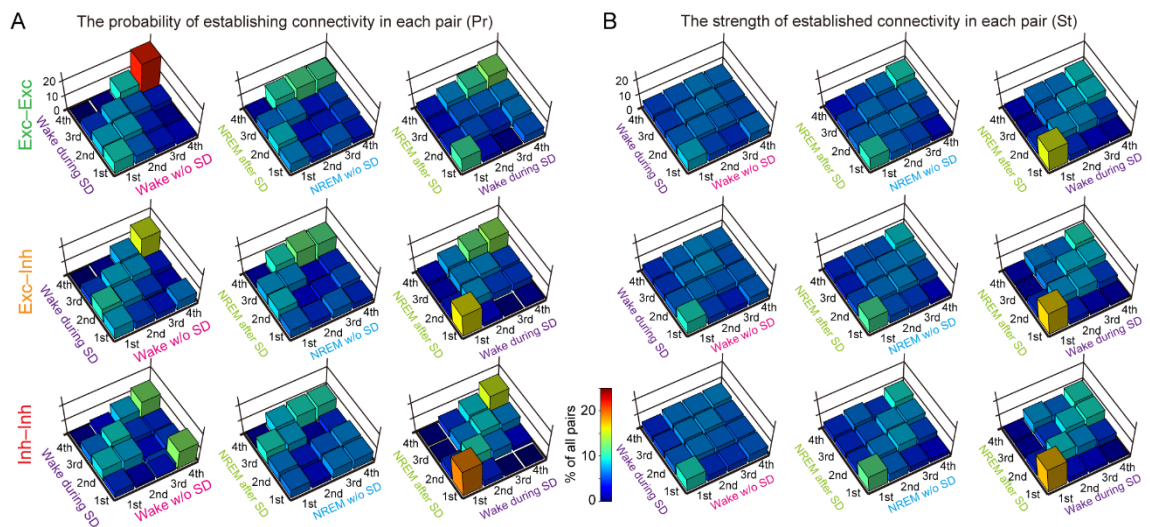


Figure 9. 断眠及び回復睡眠における Pr および St の存在確率の変化

- (A) 断眠、回復睡眠における Pr の四分位の存在確率を示した 3D 棒グラフ、1st から 4th に向かって上位から下位に並んでおり、上から興奮性ニューロン同士、興奮性と抑制性、抑制性同士を示す。
- (B) 断眠、回復睡眠における St の四分位の存在確率を示した 3D 棒グラフ、(A)と同じ手法で示す。

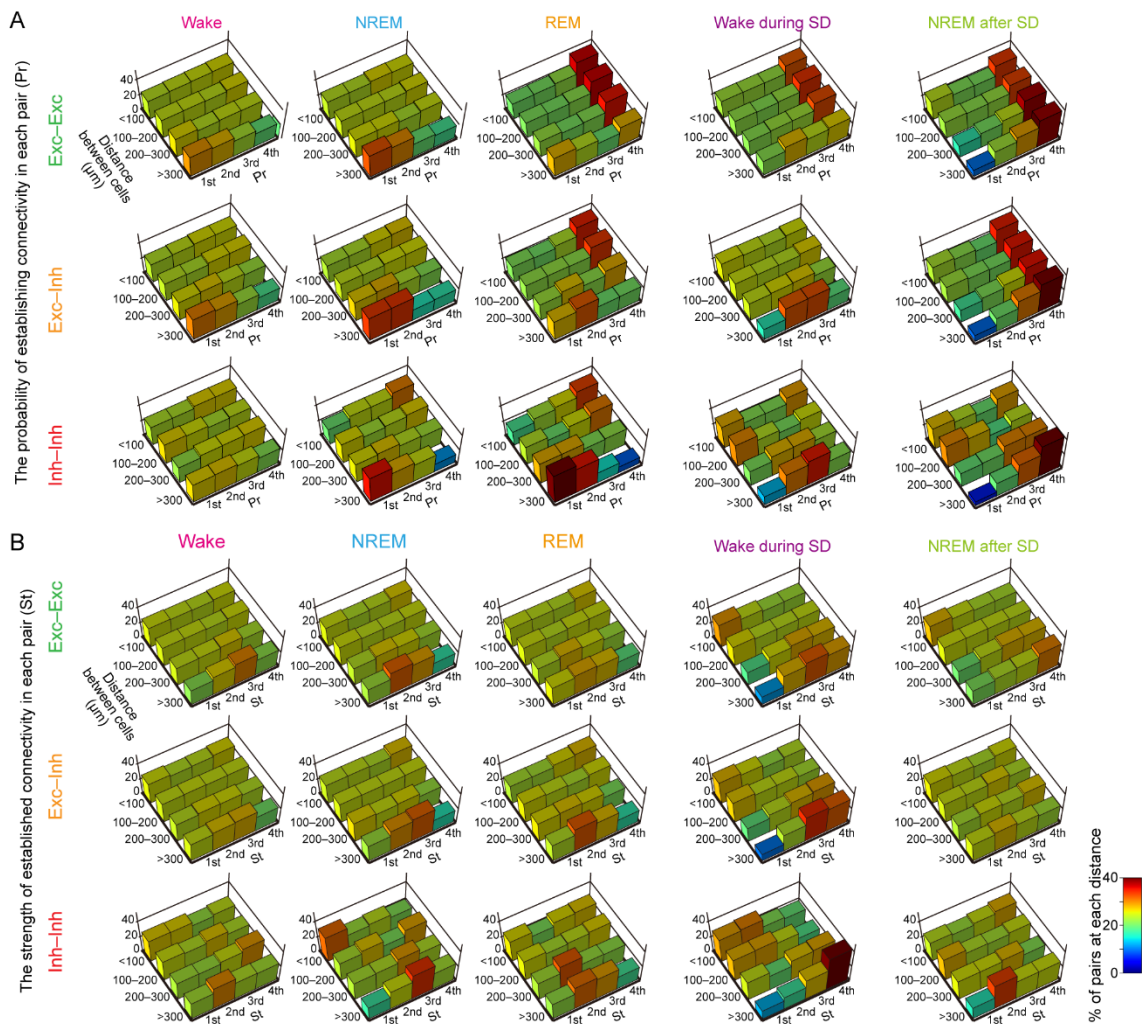


Figure 10. Pr および St の距離による変化

(A) 四分位した Pr を、ニューロン間の距離によって分類した存在確率を示した 3D 棒グラフ、1st から 4th に向かって上位から下位に並んでおり、上から興奮性ニューロン同士、興奮性と抑制性、抑制性同士、左から覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠、断眠、回復睡眠を示す。

(B) 四分位した St を、ニューロン間の距離によって分類した存在確率を示した 3D 棒グラフ、(A)と同じ手法で示す。

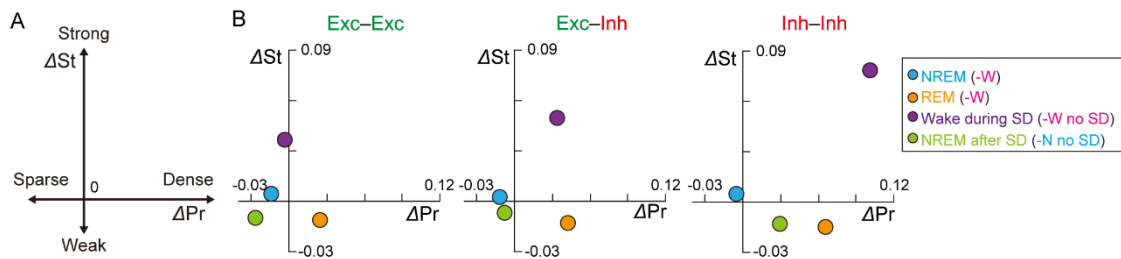


Figure 11. 睡眠覚醒における FC の変化

- (A) FC の Pr および St における変化を示すダイアグラム。覚醒における Pr および St の平均値を基準として、NREM 睡眠などの Pr および St の平均値の差 (ΔPr および ΔSt) を示す ($\Delta Pr = (\text{各々の Pr 平均値}) - (\text{覚醒の Pr 平均値})$)。Pr の低値は疎な構造、高値は密な構造を意味する。同様に St の低値は軟弱な構造、高値は強固な構造を意味する。
- (B) NREM 睡眠、REM 睡眠、断眠、回復睡眠における FC の変化、左から興奮性ニューロン同士、興奮性と抑制性、抑制性同士を示した。NREM 睡眠と REM 睡眠は ZT3-7 の覚醒を、断眠、回復睡眠ではそれぞれ ZT5-6、ZT7 の覚醒を基準とした。