

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19632

研究課題名（和文）霊長類での神経賦活マンガン造影MRI法の確立および社会行動神経ネットワークの解明

研究課題名（英文）Establishment of neuronal activation-induced manganese-enhanced MRI method and elucidation of neural networks underlying social behavior in non-human primates

研究代表者

中村 克樹（NAKAMURA, Katsuki）

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：70243110

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：近年、MRI装置を用いて神経活動の履歴を全脳で見ることができ、各条件間の差を定量化できるMRI撮像方法がげっ歯類で試みられている。本研究では、小型霊長類であるコモンマーモセットでこの定量的神経賦活マンガン造影MRI法を確立することを目的とし、塩化マンガン溶液を動物に投与する際の投与量や急性毒性の有無および複数回投与の可能性を探った。また、手法の有用性の評価のため、テスト条件での神経活動の描出を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マーモセットはげっ歯類と比べると使用頭数に限りがあり、疾患モデルの脳機能評価としてはより低侵襲性の手法が望まれる。神経賦活マンガン造影MRI法ではマンガンを注入してから自由行動下で負荷をかけ、その後のMRI撮像自体は麻酔下で実施できることが大きな利点である。この低侵襲で、MRI装置のコストが少なく、直接の脳活動を可視化できる神経賦活マンガン造影MRI法をマーモセットで確立する一歩を進めたことは、将来非ヒト霊長類の脳機能マップの作製や精神神経疾患モデルの脳機能評価に繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：Recently, quantitative manganese-enhanced MRI (qMEMRI) method has been used in rodents to visualize neural activity in a whole brain and to quantify the differences between tasks. In this project, we aimed to apply the qMEMRI method to a small new-world primate, Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). To establish the methods, we explored the dosage and acute toxicity of manganese chloride solutions for administration to marmosets and investigate the possibility of multiple session for each subject. To evaluate the usefulness of the method, we also adjusted the dosage whether the enough contrast will be obtained to visualize the neural activity in the test conditions.

研究分野：認知神経科学

キーワード：脳機能イメージング マーモセット

1. 研究開始当初の背景

小型霊長類のマーモセットは、体が小さく繁殖能力に優れる利点や遺伝子改変技術の開発により近年実験動物としての利用が高まっている。特に、げっ歯類と比べて発達した大脳皮質を持ちヒトに近い社会性に富んだ行動を示すため、社会行動の研究対象として期待が寄せられている。また、社会行動や認知行動の障害を主症状とする精神神経疾患のモデル動物としても非常に有用である。しかし、長い間実験動物として利用されてきたマカクサルと比べてマーモセットの認知機能や社会行動、そしてそれらに関わる神経機構については未だ十分に解明されていない。さらに、行動評価方法や脳機能の測定技術の開発はまだ発展途上にある。精神神経疾患モデルが作出されたとき、脳機能を計測することは病態を解明する上で不可欠であるが、特に小型で体力のないマーモセットでは低侵襲な脳機能測定方法が望ましい。

神経賦活マンガン造影 MRI (magnetic resonance imaging) 法とは、マンガンイオン (Mn^{2+}) がカルシウムイオン (Ca^{2+}) に擬態して電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通過し、細胞外から細胞内へと移動する特性を利用したイメージング手法である。体内に注入された Mn^{2+} が血液脳関門を通過して脳内へ達する。細胞外に存在する Mn^{2+} は脱分極に伴って細胞膜の Ca^{2+} チャンネルを通過し、細胞内に移動する。その結果、 Mn^{2+} が神経活動の高い細胞へ蓄積されていく。マンガンは磁性を持ち T1 短縮効果を生じるため、活動の高い神経細胞内に蓄積したマンガンが MRI 撮像時に T1 強調画像で高信号となって検出される。この信号変化を利用して脳活動を MRI で可視化・定量化することができるのである。この方法はげっ歯類で試みられ、成果が報告されている。本研究では、この神経賦活マンガン造影 MRI 法を小型霊長類であるマーモセットに応用することを試みた。

マーモセットはげっ歯類と比べると霊長類では、性成熟に数年単位の期間が必要であり、疾患モデルを作出するサイクルは長くなる。また産仔数が 1～2 頭であり、その希少性も高い。このため、疾患モデル動物の行動・脳機能評価としてはより低侵襲性の手法が望まれる。その点で、神経賦活マンガン造影 MRI 法は低侵襲で脳機能イメージングができるという大きな利点がある。非侵襲的な脳機能イメージングとしては神経細胞の賦活から生じる血管反応を測定する functional MRI (fMRI) が主流である。しかし、感覚刺激に対する脳の応答を調べる fMRI では撮像装置の中で動物が覚醒していなければならないという制約がある。覚醒マーモセットを MRI 撮像するためには頭部の固定と一定時間体を動かさない訓練が必要であり、多大な時間と労力を要する上に撮像時間も限られる。この点、神経賦活マンガン造影 MRI 法ではマンガンを注入してから自由行動下で負荷をかけ、その後の MRI 撮像自体は麻酔下で実施できることが大きな利点である。また、fMRI は多チャンネルの送受信コイルが必要であり、非常に高価となるため霊長類を撮像できる装置は国内でも数えるほどしかない。しかし、この手法は通常の構造画像の撮像と同一のセットアップで実施できることも大きな利点である。そして最大の利点は、fMRI では神経細胞の活動から生じる血管反応という二次的な現象を反映しているのに対して、神経賦活マンガン造影は神経細胞の活動を直接可視化できるという点である。この低侵襲で、MRI 装置のコストが少なく、直接の脳活動を可視化できる神経賦活マンガン造影 MRI 法をマーモセットで確立することは、非ヒト霊長類の脳機能マップの作製や精神神経疾患モデルの脳機能評価に繋がり、非常に有用なツールとなると考えた。

2. 研究の目的

近年 MRI 装置を用いて神経活動の履歴を全脳で見ることができ、各条件間の差を定量化できる定量的神経賦活マンガン造影 MRI 法がげっ歯類で試みられている。この方法の有用性に注目し、小型霊長類であるマーモセットを用いて神経活動を全脳で可視化できる神経賦活マンガン造影 MRI 撮像手法を確立するという着想に至った。本研究では、まずこの方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

被験体として 2 頭のメスアダルトマーモセットを用いた。まずマンガン投与前に T2 強調画像および T1map 画像を撮像した。麻酔をしたマーモセットは非磁性体で作られた頭部固定装置に固定した(図 1)。この装置はマーモセットの両耳・両眼窩下・上顎の 3 点で固定し、コイル中心近くに脳が位置するように設計されている。このため、再現性高く同じ位置の脳活動の撮像が可能となり、条件間の比較ができる。撮像時の麻酔・生体モニター・保温などを含めて現有のシステムを利用した。



図 1. MRI 用頭部固定装置の使用例

先ず、塩化マンガン溶液を動物に投与する際の投与量および投与方法・経路を検討した。動物への負担が少なく、且つ神経活動を描出できるコントラストが得られる方法であることが必須である。げっ歯類を用いた先行研究では腹腔内投与が主流であるため、初回実験の投与量はげっ歯類での先行研究 (Tambalo et al., 2009, Kikuta et al., 2015) を基に 40mg/kg body weight とし、塩化マンガン (MnCl₂) をピシンバッファーで溶解し、滅菌処理したのちに投与間隔 24 時間あけ、2 分割して腹腔内へ投与した。

手法の有用性の評価のため、テスト条件での神経活動の描出を試みた。関与する脳領域が既に明らかになっている運動系に着目し、マンガン注入後に片側前肢の動きをギプスでソフトに制限して飼育し、T1 map および T2 強調画像の撮像を行った。マンガン注入から撮像までの時間はげっ歯類での先行文献 (Kikuta et al., 2015) を基に 48 時間とした。その後、体内からのマンガン完全排出を待ち、約 1 か月後にもう一度マンガン注入を行った。2 回目は対側前肢の動きを制限し、同様に撮像した。運動制限した前肢と同側および反対側の運動領域の賦活を MRI データ解析により比較した。

4. 研究成果

実験では、まずマーモセットにマンガン溶液を投与することによるマンガン急性毒性の有無を評価した。2 頭ともに 1 回目の投与後は麻酔覚醒後からの行動に変化なく、摂餌量や活動量は低下しなかった。一方、2 回目の投与後は麻酔覚醒後の翌日に活動量がやや低下し、摂餌量の経度低下を認めた。しかし、これらの症状も翌日には消失した。1 か月後の投与においても同様で、マーモセットにおけるマンガン急性中毒は軽度の悪心程度で致死的でないことがわかった。

マンガンは磁性を持ち T1 短縮効果を生じるため、活動の高い神経細胞内に蓄積したマンガンが MRI 撮像時に T1 強調画像で高信号となって検出される。この信号変化を利用して脳活動を MRI で描出する、という原理である。これまで報告されているげっ歯類を用いた多くのマンガン造影法では、コントラスト変化を T1 強調画像の条件間の差として算出している。しかし、MRI の信号強度は絶対値ではなく装置やコイルの状態により変化する。これに対して T1 緩和時間 (R1 値) は絶対値に近く、信号強度計測に対して様々な影響を受けにくいという点がある。本研究では、各組織の T1 緩和時間を計測し条件間で比較を試みた。

初回投与前の MRI 画像と 2 回目投与前の MRI 画像を比較したところ、有意な R1 値の変化はなく、マンガンの hydration が 1 か月間で十分であることが分かった。げっ歯類では 1 頭につき 1 回のマンガン投与のみであるが、マーモセットはげっ歯類と比べて実験使用可能な頭数に限りがあり、1 頭で複数回の投与が望ましい。今回の結果は、少なくとも 2 回の投与実験が可能であることを示した。テスト条件では、左右の一次運動野においてマンガンの蓄積に差があると期待され、R1 値の比較をおこなったが、期待した左右のコントラストを認めなかった。引き続きマンガン溶液の投与量、投与経路および撮像パラメータの調整が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	鴻池 菜保 (KONOIKE Naho) (80645169)	京都大学・霊長類研究所・特定助教 (14301)	平成29年度～令和元年度
連携研究者	三輪 美樹 (MIWA Miki) (50645348)	京都大学・霊長類研究所・特定研究員 (14301)	平成29年度～平成30年度