

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659091

研究課題名（和文）フラビン蛍光差分イメージングの機能的神経回路網解析への応用

研究課題名（英文）Application of the differential flavoprotein fluorescence imaging for analysis of the functional neural circuits

研究代表者

目黒 玲子（MEGURO REIKO）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30251804

研究成果の概要（和文）：深麻酔下のマウスの大脳皮質において、フラビン蛋白蛍光差分イメージングで、視覚刺激のスピードアップに反応して描出される小領域に対し、確実に神経トレーサーを注入し、かつその領域の入出力神経回路を的確に標識する手技を確立した。さらに、これまで視覚刺激の動きに関与することが知られていなかった視床核を新たに見出した。また、大脳皮質から上丘への投射は、小領域ごとに異なる層分布を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We have established procedures for the exact and efficient injection of the neural tracer into the individual cortical areas, which reacted to speed-up visual stimuli and were visualized by the differential flavoprotein fluorescence imaging in deeply anesthetized mice. We have firstly identified some thalamic areas with processing center of speed-up visual stimuli, and also found cortical areal distinct terminations in the superior colliculus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎科学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：機能解剖学、フラビン蛋白蛍光イメージング、視覚系

## 1. 研究開始当初の背景

脳が活動すると酸素代謝が亢進し、電子伝達系のフラビン蛋白は緑色蛍光を発する。このフラビン蛋白蛍光を利用し、マウス大脳皮質の活動領域を可視化したのが、経頭蓋フラビン蛋白イメージングである。連携研究者らは、この原法を発展させ、特定の刺激の“変化”に反応して神経活動性が“増加”する領域を可視化する、“差分イメージング”を開発した。研究開始当初は、この新たなイメージング法により、視覚刺激のスピードアップに対して特異的に活動性が増加する視覚皮質小領域が新たに同定されたばかりであ

った。

## 2. 研究の目的

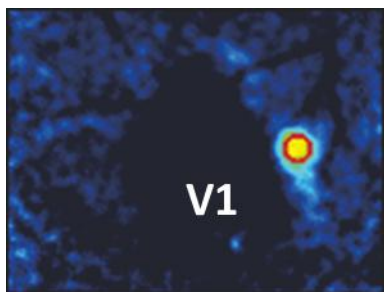
（1）新たに同定された視覚刺激の“スピードアップ”に強く反応する領域は、どのような入出力回路を持っているのだろうか。このことがわかれば、“スピードアップ”情報処理に関わる神経回路網が初めて明らかにされうる。しかしながら、このイメージング法では、大脳の表面の活動性しかわからないため、より深部の視床や脳幹部を含む情報処理系の全容を知るには、別の手技が必要となる。

(2) 申請者は、これまで、神経トレーサーを生体脳の局所領域に注入し、神経細胞にそのトレーサーを取り込ませ、軸索突起あるいは細胞体へと輸送させ、還流固定した動物の脳でトレーサーを可視化し、局所領域の入出力回路を明らかにする実験をおこなってきた。この手技と“差分イメージング”とを組み合わせ、特定の情報処理に関わる新たな神経回路を機能解剖学的に明らかにする方法を確立しようと考えた。

### 3. 研究の方法

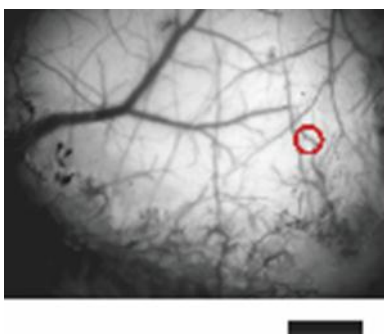
(1) イメージングで描出された領域の座標決定

連携研究者のもとで、“差分イメージング”法を用い、視覚刺激の“スピードアップ”に反応するマウス大脳皮質の視覚性小領域を描出した。



上図は右側大脳皮質を背側から見たもので、図の上が大脳の前方、図の下が大脳の後方である。中央の暗く広い領域がV1、すなわち1次視覚野で、視覚刺激の“スピードアップ”に全く反応しない。黄色の領域が“スピードアップ”に強く反応した領域で、赤い丸で示している。V1との位置関係から、この領域はAL(前外側視覚関連領域)と考えられた。スケールバーは1mmを示す。

引き続き、同じ動物の大脳皮質表面を同じカメラで明視野撮影したのが下図である。



上図と対応する場所に赤丸を描いてある。この赤丸の位置を、脳定位固定装置上の座標に

置き換え、トレーサーを注入すべき位置を決定した。

(2) トレーサーの局所注入

頭蓋骨を局所的に除去した後、(1)で決定した座標の位置へ、トレーサーを詰めたガラス電極の先を刺入した(深さ1mm未満)。ガラス電極の先の口径は40 $\mu$ m程度で、電極の太い側は1 $\mu$ lハミルトン注射シリンジの針先に接着され、注射シリンジのプラグによりトレーサーは圧注入された。トレーサーは、神経細胞要素に取り込まれて順行性および逆行性に運ばれる、ビオチン化デキストランアミンを使用した。注入後、マウスは麻酔から覚醒させ、通常環境で飼育した。

(3) トレーサーの可視化標本の作製、およびトレーサーが運ばれた領域の同定

5~7日の生存期間の後、マウスを4%パラホルムアルデヒド液にて還流固定し、脳を取り出し、20%ショ糖液に沈めた。凍結薄切装置、すなわちクライオスタットにて、50 $\mu$ m厚の連続横断切片を作製し、ナトリウムリン酸緩衝液(PBS)に取った。3枚おきに切片を集め、PBSで洗浄した後、ビオチン化デキストランアミンと化学的に結合する「アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体」と反応させた。さらに、呈色物質であるDAB、過酸化水素と反応させ、ビオチン化デキストランアミンを茶色に呈色させた。これらの切片をスライドガラスに載せ、乾燥後、アルコール脱水、キシレン透徹を経て、封入剤・カバーガラスで封入した。神経核を明らかにするため、別の切片群では対比染色を施した。

(4) 観察

光学顕微鏡によりトレーサー標識の明視野観察をおこなった。

まず、大脳皮質のトレーサー注入部を観察し、大脳皮質内に限局していることを確認した。次いで、視床におけるトレーサー標識の分布、上丘におけるトレーサー標識の分布を確認し観察した。

### 4. 研究成果

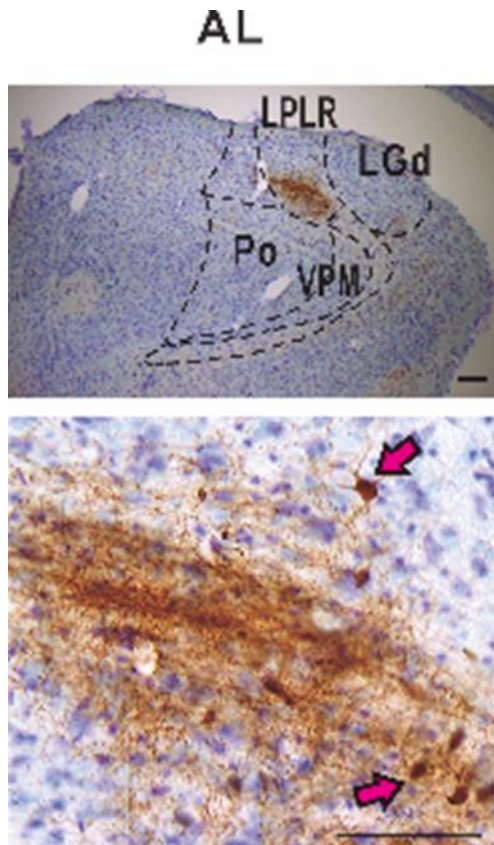
(1) 研究の主な成果

上記3で述べた方法を確立したことで、機能的特性が明らかでない皮質領域について、その機能発現の背景となる神経回路、すなわち入力系と出力系とを明らかにできるようになった。

差分イメージングにより、いろいろな刺激変化に対応して反応性がアップする数々の小領域を検出することができるようになった。

た。それら特異性の明らかな小領域はこれまでの研究では分離・同定されていなかったもので、本研究で確立された方法を用いれば、それぞれの特異的回路網を新たに明らかにすることができる。

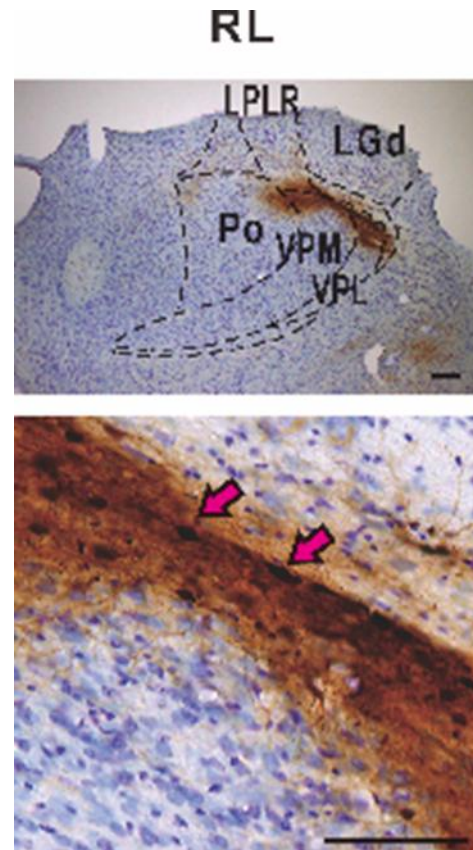
上記3で示した、視覚刺激の“スピードアップ”に反応したAL（前外側視覚関連領域）へトレーサーを注入した実験では、視床において、下図に示す領域に、標識神経細胞および標識神経線維を観察することができた。



この組み写真の上図は視床の弱拡大像、その標識産物（茶色）の密な部分を拡大したのが、下図である。スケールバーは200 $\mu$ m。マウス右側の視床で、図の右が外側、図の上方が背側である。LPLR（吻側外側後外側核）の腹側部分に標識産物（茶色）が密にみられた。拡大図では、それらが、標識細胞体（矢印で示す）および標識神経線維（茶色い点状の集積）であることが確認された。すなわちこの領域は、大脳皮質のALへ投射し、かつ投射を受ける場所、ということになる。LPLRのこの領域が、視覚刺激のスピードに関する情報処理にあたる場所、ということ、本研究により初めて明らかになったことである。

視覚刺激の“スピードアップ”に反応する大脳皮質の小領域は他にもあり、ALより前方

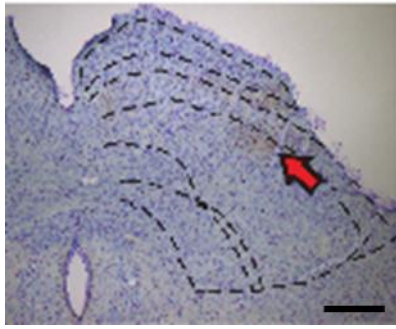
にあるRL（吻側外側視覚関連領域）は、ALに比べ、より速いスピードへの変化に反応する領域であることが差分イメージングにより明らかにされた。この領域へも上記同様の方法でトレーサーを注入し、神経回路を明らかにした。



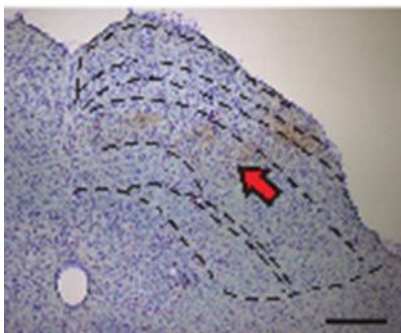
この組み写真の上図は視床の弱拡大像、その標識産物（茶色）の密な部分を拡大したのが、下図である。スケールバーは200 $\mu$ m。ALで密な標識産物が観察されたレベルよりも吻側の視床である。LPLR（吻側外側後外側核）およびLGd（外側膝状体背側核）より腹側の部分で、VPM（内側後腹側核）の背側部に、標識産物（茶色）が密にみられた。拡大図では、それらが、標識細胞体（矢印で示す）および標識神経線維（茶色い点状の集積）であることが確認された。この標識領域は、大脳皮質のRLへ投射し、かつ投射を受ける場所、ということになる。VPM背側のこの領域が、視覚刺激のより速いスピードに関する情報処理にあたる場所、ということ、本研究により初めて明らかになったことである。

さらに、上丘を観察したところ、ALへの注入例およびRLへの注入例ともに、上丘浅層および深層に限局的に標識神経線維が分布していた。

AL



RL



写真はマウス右側の上丘で、図の右が外側、図の上方が背側である。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。点線は、上丘の層を区切るもので、図の上方の3つの層が浅層、それより下方の層が深層である。標識産物（茶色）が浅層および深層（矢印で示す）に分布していることがわかる。上丘の浅層は、網膜から直接入力を受ける場所で、視覚対象を「見る」機能に関わる。上丘深層は、浅層からの視覚情報に加え、様々な感覚入力を受け、運動系中枢へ出力する場所である。本研究は、視覚刺激のスピードアップに関する情報処理を担う大脳皮質 AL および RL が、上丘のこれらの層へ出力していることを初めて明らかにした。

#### (2) 成果の国内外における位置づけ

大脳皮質における視覚情報処理に関わる高次脳領域に関して、これまで、マウスという小動物においてはほとんど機能的に明らかになっていなかった。ところが、最近、海外の研究者らにより、カルシウムイメージングという本研究とは異なる方法により、視覚刺激に対する異なる空間的および時間的機能特性を有する小領域群が分離・同定されてきている (Andermann ら、2011 年、Marshall ら、2011 年)。多くの研究者が、次のステップとして、それら高次脳領域をめぐる神経回

路網について興味をひかれるであろう。本研究により確立された手技を用いた高次脳領域の線維連絡の研究は、そのような科学者の研究の一助となると考えられる。

#### (3) 今後の展望

差分イメージングにより、視覚刺激のスピードアップ以外にも、視覚刺激の形状変化、色調変化などに特異的活動性を示す領域が明らかになっており、今後、そのような領域に関する神経回路網も明らかにされうる。臨床におけるさまざまな視覚異常の神経回路的な背景も徐々に明らかになると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

任海学 (代表)、上丘を経由するマウス高次視覚野の応答、日本神経科学学会、2011 年 9 月 17 日、横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

目黒 玲子 (MEGURO REIKO)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：30251804

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

任海学 (TOHMI MANABU)  
新潟大学・脳研究所・助教  
研究者番号：10401770