

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650225

研究課題名(和文) 生体脳深部線維連絡蛍光イメージングの開発

研究課題名(英文) Development of in vivo deep brain connection by fluorescence imaging

研究代表者

一戸 紀孝 (Noritaka, Ichinohe)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・部長

研究者番号：00250598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、我々は可視光の蛍光物質Alexa 555に効率の高い逆行性トレーサー・CTBを結合させたものを用いて、蛍光実体顕微鏡を用いて脳表から生体内での線維連絡を可視化する手法を開発し、電気生理学とウィルスベクターの組み合わせを用いて、神経回路における情報変換研究に用いてきた。本研究では、in vivo蛍光・定量トモグラフィ装置を用いて、組織透過性の高い遠赤外線蛍光色素Alexa 750をトレーサーに結合させ、マウス、ラット、マーモセットで利用できる生体脳での脳深部(扁桃体、大脳基底核、海馬、視床、内側前頭葉、帯状皮質)を含む全脳結合の可視化を生体内で可能にする手法の開発を可能にした。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded to develop that using in vivo fluorescence tomography equipment, CTB-Alexa 750 as a fiber tract tracer can be followed in vivo even in deep structures. Until now, our methods using CTB-Alexa 555 can only show cortical surface connections. This is the great development, especially, connection are concerned with deep brain region (e.g., amygdala, basal ganglia, hippocampus, thalamus, medial prefrontal cortex, cingulate). Especially, function of connected area can be electrophysiologically examined.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 融合脳計測学

キーワード：線維連絡 in vivo 蛍光色素 機能・解剖連関

### 1. 研究開始当初の背景

最近、我々は顔認知、物体認知に関わる腹側視覚系の最終段階と言われるマカクザルの下側頭葉において蛍光トレーサー(CTB-Alexa 555)を用いて線維連絡を生体内で脳表から可視化し、強い投射を持つ皮質カラムから神経活動を記録する方法を開発した(図1: Ichinohe ら, 投稿準備中)。この手法は、直接投射に基づいたネットワークシステムを可視化しつつ、神経活動を記録することを可能にし、領野間の相互作用・情報変換研究に、神経回路の観点をもたらす画期的なものと考えている。また、現在は、本手法をより溝の少なく小さく1つのチャンバーで多くの領野をカバー出来るマーモセットに適用して、聴覚系、視覚系、運動系の情報統合の研究を行なっている(図2)。しかし、この手法は脳表から見える領域にしか、適用できず、情動やモチベーションなどに関わる脳構造は、脳の深部や皮質の内側部など、脳の外側面から見えない領域にあり、皮質で処理された視覚情報などが、どのように情動やモチベーションに変化して行くかの過程を研究するには、現在の手法には、限界がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、*in vivo* 蛍光・定量トモグラフィ装置を用いて、組織透過性の高い遠赤外線蛍光色素 Alexa 750 をトレーサーに結合させ、マウス、ラット、マーモセットで使用できる生体脳での脳深部(扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、内側前頭葉、帯状皮質)を含む全脳結合の可視化を生体内で可能にする手法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

購入可能な CTB-Alexa 647 を、皮質、海馬、扁桃核に微量 0.12 - 0.3  $\mu$ l 注入し、1週間後に、*in vivo* 蛍光・定量トモグラフィ装置(FMT1500、Perkin-Elmer)で可視化する。すでに、マウスバレル皮質に 0.12  $\mu$ l 注入する試験は行っており、注入部位、視床、視床下部にラベルが見られ(図5)、CTB の免疫組織化学により、その投射の存在は裏付けられた。しかし、CTB の免疫組織化学で見られた、皮質—皮質投射(含む反対側のバレル皮質への投射)は、確認できなかった。しかし、まだ閾値を下げて画像工学の手法による、改善を行ったり、他の会社の *in vivo* 蛍光・定量トモグラフィ装置のデモをお願いして、どこまで免疫組織化学で検知できるレベルまで迫れるかに関して検討する。しかし、すくなくとも、視床や視床下部のラベルが確認できたのは、大きく道が開かれたと考えている。また、同じホルダーで 3T の MRI を撮像し、ステレオの値を決める手法の熟練を行なう。このホルダーはすでに perkin-elmer で

開発済みのものを用いているが、実際に、ステレオ装置の位置の数字の部位に別なトレーサーを注入し、そのずれが最小になるように、検討を行う。また、結合している領域に刺激電極と記録電極を入れて、機能的結合も確認する。

より組織透過度の高い Alexa 750 carboxylic acid, succinimidyl ester (molecular probes) と CTB を別々に購入し、Beckman Coulter 等の蛍光タンパク質ラベル化キットを用いて、CTB-Alexa 750 を合成/精製し、上と同様にマウスに注入し、その評価を行う。Alexa 750 は、*in vivo* 蛍光・定量トモグラフィ装置(FMT1500、Perkin-Elmer)のマウス脳腫瘍マーカーにおける検討により、Alexa 647 の 50 倍程度の感度を持つと言われ(Chen et al., 2009)、より少ない蛍光色素を含む脳領域の可視化がこれで可能になると考えられる。また、注入してから画像取得までの時間等の条件設定を行なう。

マウスで検討した結果をもとに、現在、Perkin-Elmer が FMT1500 用に開発し終えたラット用のホルダーを用いて、より頭部の大きいラットにおいて、上記のトレーサーがどこまで可視化可能か、同様な手法で行なう。また、Perkin-Elmer のカタログサイズから、考えてマーモセットの頭部もこれに角度を工夫すれば入ることが、分かったので、マーモセットでも同様の実験を行ない、可視化の程度、また角度の工夫や撮像条件の検討などにより、最終的にマウス、ラット、マーモセットで使える脳深部を含む簡便な生体内線維連絡可視化法のよい条件を見つける。

MRI と重ねて、ステレオでの結合スポットを決定する条件をラット、マーモセットで見だし、マウスで行なったように、他のトレーサー注入で、その手法の確認や、電気生理による機能的結合を確認する。

### 4. 研究成果

購入可能な CTB-Alexa 647 を、皮質、海馬、扁桃核に微量 0.12 - 0.3  $\mu$ l 注入し、1週間後に、*in vivo* 蛍光・定量トモグラフィ装置(FMT1500、Perkin-Elmer)で可視化する。すでに、マウスバレル皮質に 0.12  $\mu$ l 注入する試験は行っており、注入部位、視床、視床下部にラベルが見られ(図5)、CTB の免疫組織化学により、その投射の存在は裏付けられた。しかし、CTB の免疫組織化学で見られた、皮質—皮質投射(含む反対側のバレル皮質への投射)は、確認できなかった。しかし、まだ閾値を下げて画像工学の手法による、改善を行ったり、他の会社の *in vivo* 蛍光・定量トモグラフィ装置のデモ

をお願いして、どこまで免疫組織化学で検知できるレベルまで迫れるかに関して検討する。しかし、すくなくとも、視床や視床下部のラベルが確認できたのは、大きく道が開かれたと考えている。また、同じホルダーで 3T の MRI を撮像し、ステレオの値を決める手法の熟練を行なう。このホルダーはすでに perkin-elmer で開発済みのものを用いているが、実際に、ステレオ装置の位置の数字の部位に別なトレーサーを注入し、そのずれが最小になるように、検討を行ったところ、非常にマッチングがうまく行く事がわかった。また、結合している領域に刺激電極と記録電極を入れて、機能的結合を調べたところ、強い LFP が観察され結合が強い事が明らかにされた。

より組織透過度の高い Alexa 750 carboxylic acid, succinimidyl ester (molecular probes) と CTB を別々に購入し、Beckman Coulter 等の蛍光タンパク質ラベル化キットを用いて、CTB-Alexa 750 を合成/精製し、上と同様にマウスに注入し、その評価を行う。Alexa 750 は、in vivo 蛍光・定量トモグラフィ装置 (FMT1500、Perkin-Elmer) のマウス脳腫瘍マーカーにおける検討により、Alexa 647 の 50 倍程度の感度を持つと言われ (Chen et al., 2009)、より少ない蛍光色素を含む脳領域の可視化がこれで可能になることが、判明した。

マウスで検討した結果をもとに、現在、Perkin-Elmer が FMT1500 用に開発し終えたラット用のホルダーを用いて、より頭部の大きいラットにおいて、上記のトレーサーがどこまで可視化可能か、同様な手法で行なう。また、Perkin-Elmer のカタログサイズから、考えてマーモセットの頭部もこれに角度を工夫すれば入ることが、分かったので、マーモセットでも同様の実験を行ない、可視化の程度、また角度の工夫や撮像条件の検討などにより、最終的にマウス、ラット、マーモセットで使える脳深部を含む簡便な生体内線維連絡可視化法において、ほぼ同じ条件で可能である事がわかった。

また、MRI とも重ねて、ステレオでの結合スポットを決定する条件をラット、マーモセットで見だし、マウスで行なったように、他のトレーサー注入で、その手法の確認や、電気生理による機能的結合を確認したところ、前頭葉間の結合、前頭葉・側頭葉の結合において、上記の事が確認され、マーモセットでも、同方法が可能である事が確認された。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

Oga T, Aoi H, Sasaki T, Fujita I, Ichinohe N. Postnatal development of layer III pyramidal cells in the primary visual, inferior temporal, and prefrontal cortices of the marmoset. *Front Neural Circuits*. 2013 Mar 8;7:31. (査読有り)

Ichinohe N, Borra E, Rockland K. Distinct feedforward and intrinsic neurons in posterior inferotemporal cortex revealed by in vivo connection imaging. *Sci Rep*. 2012;2:934. (査読有り) doi: 10.1038/srep00934.

Suzuki S, Harasawa N, Ueno K, Gardner JL, Ichinohe N, Haruno M, Cheng K, Nakahara H. Learning to simulate others' decisions. *Neuron*. 2012 Jun 21;74(6):1125-37. (査読有り) doi: 10.1002/cne.23160.

Watakabe A, Hirokawa J, Ichinohe N, Ohsawa S, Kaneko T, Rockland KS, Yamamori T. Area-specific substratification of deep layer neurons in the rat cortex. *J Comp Neurol*. 2012 Nov 1;520(16):3553-73. (査読有り) doi: 10.1002/cne.23160.

Kurotani T, Miyashita T, Wintzer M, Konishi T, Sakai K, Ichinohe N, Rockland KS. Pyramidal neurons in the superficial layers of rat retrosplenial cortex exhibit a late-spiking firing property. *Brain Struct Funct*. 2013 Jan;218(1):239-54. (査読有り) doi: 10.1007/s00429-012-0398-1.

[図書] (計 1 件)

一戸紀孝「線維連絡に基づく他者意図認知の脳基盤 (ブレインサイエンス・レビュー 2012: 編集: 伊藤正男、川合述史) (2012) クバプロ p205-223.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

一戸 紀孝 (Noritaka Ichinohe)

独立行政法人国立精神・神経医療研究  
センター・神経研究所・微細構造研究  
部・部長

研究者番号：00250598