

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：32104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590223

研究課題名(和文)フェレット大脳における脳溝形成への連合線維の役割

研究課題名(英文)Role of associative fiber tracts on sulcal development of the cerebrum in ferrets

研究代表者

澤田 和彦 (Sawada, Kazuhiko)

つくば国際大学・保健医療学部・教授

研究者番号：10284324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：生後4～90日の雌雄フェレットの大脳の固定標本から主要な脳溝および脳回の発生時期を特定した。また、大脳固定標本のMRI画像を7T MRI装置を用いて取得し、主に90日齢の大脳の形態について解析したところ、T1強調MRI画像から得られる最大強度投影マップ(MIPマップ)がミエリン化に基づく皮質領野の区分の再現することが明らかになった。脳溝の形態を定量的に解析したところ、頭頂連合野周囲の脳溝の発達に雌に比べて雄でよいことが明らかになった。また、拡散テンソル画像から脳溝領域および脳回領域の皮質下白質線束のFA値を計測したが、脳溝形成と皮質下白質線束の発達との間の関係は不明瞭であった。

研究成果の概要(英文)：Male and female ferrets at postnatal days (PDs) 4 to 90 were perfused with 4% paraformaldehyde solution, and the brains were removed. The chronology of sulcal and gyral emergences were clarified using those brain samples by gross anatomic observations. T1W-MRI was further acquired from the fixed brain using a high spatial resolution 7-tesla MRI. T1W-MRI-based maximum intensity projection (MIP) could delineate functional cortical areas related to myeloarchitecture in 3D. Quantitative analysis of the sulcal infolding revealed a male-prominent posterior extension of neocortical and archicortical sulci with cortical expansion in the temporo-parieto-occipital region of the cerebrum. Fractional anisotropy was measured in the subcortical white matter of the sulcal and gyral regions of the ferret cerebra using diffusion tensor imaging (DTI). However, it was unclear a relation of sulcal development with the development of subcortical white matter bundles.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：大脳 進化 系統発生 MRI フェレット volumetry 脳溝 脳回

1. 研究開始当初の背景

一部の哺乳動物では大脳皮質が著しく発達し、複雑な脳溝を形成する。我々はサルにおける脳溝形成の詳細と、脳溝発生と皮質下白質線維束の発達の関係を明らかにしてきた。しかし、胎仔を用いなければならないサルでは、実験に供する脳標本の確保が難しく、組織レベルでの解析を行うことが難しい。フェレットは脳溝を有する小型の実験動物で、脳溝パターンはヒトやサルとは異なっているが、出生後に脳溝が発生すること、サルに比べてかなり安価であることなど、ある程度の個体数を確保しての実験の実施が可能である。本研究では、フェレット大脳における脳溝形成と連合線維の発生・発達・有髄化の関係はMRI画像解剖的に検討する。更に、同一標本の組織切片を作製し、皮質層構造やミエリン化等について免疫組織化学的も行う。

2. 研究の目的

本研究では、フェレットの脳溝形成に関与する連合線維を特定し、その発生・発達・有髄化に伴う脳溝の形状と脳溝周囲の皮質層構造の変化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 生後 4, 10, 21, 42, 90 日の雌雄のフェレット(各 3~6 例)を灌流固定し、脳を取り出した。取り出した脳の表面を観察し、各齢の大脳で形成されている脳溝および脳回を同定した。
- (2) (1)で取り出した大脳の固定標本から 7T-MRI 装置を用いて T₁ 強調 MRI 画像、T₂ 強調 MRI 画像および拡散テンソル画像(DTI)を取得した。
- (3) (2)で取得した T₁ 強調 MRI 画像を用いて、大脳の構造(大脳皮質、皮質下白質、レンズ核、尾状核、扁桃核、海馬、嗅球)を segmentation し、画像解析ソフトウェア(Slice Omatic)により各構造の体積を計測した。
- (4) (2)で取得した T₁ 強調 MRI 画像で大脳皮質を segmentation し、画像解析ソフトウェア(Slice Omatic)を用いて最大強度投影法(MIP)法により T₁ 強調 MRI シグナル強度の大脳皮質内での領域差を三次元的に検討した。更に MRI 計測後の大脳の組織切片を用いてミエリン塩基性蛋白(MBP)の免疫染色を行い、大脳皮質における T₁ 強調 MRI シグナル強度の領域差と MBP 陽性線維の密度との関係を検討した。
- (5) (2)で取得した T₁ 強調 MRI 画像から画像解析ソフトウェア(Slice Omatic)を用いて脳溝形成頻度の定量的指標である Sulcation index (SI)を算出した。同時に volume-rendering 法により十字溝(crs)、シルビウス前溝(prs)、嗅裂(rf)、冠状溝(cns)、外側溝

(ls)、前シルビウス溝(rsss)、後シルビウス上溝(csss)、偽シルビウス溝(pss)、海馬溝(his)、嗅溝(rs)および板状溝(ss)各脳溝の形態を三次元的に再現した。

- (6) (2)で取得した DTI 画像を用いて脳溝周辺領域および脳回周辺領域の皮質下白質の Fractional anisotropy(FA)値を計測した。脳溝領域として十字溝(crs)、冠状溝(cns)、外側溝(ls)、シルビウス上溝(sss)、偽シルビウス溝(pss)を、脳回領域として前シルビウス回(ASG)、後シルビウス回(PSG)、冠状回(CNG)、外側回(LG)、上シルビウス回(SSG)、前外シルビウス回(AEG)、後外シルビウス回(PEG)、視覚領域(VCA)をそれぞれ選んだ。
- (7) (4)で作製した組織切片を用いて抗 NeuN 抗体(神経細胞のマーカー)を用いて免疫染色を行い、各脳溝および脳回の周辺領域での神経細胞数を計測した。脳溝領域として十字溝(crs)、冠状溝(cns)、外側溝(ls)、前シルビウス上溝(rsss)、後シルビウス上溝(csss)偽シルビウス溝(pss)を、脳回領域として前シルビウス回(ASG)、後シルビウス回(PSG)、冠状回(CNG)、外側回(LG)、上シルビウス回(SSG)、前外シルビウス回(AEG)、後外シルビウス回(PEG)、視覚領域(VCA)をそれぞれ選んだ。

4. 研究成果

- (1) フェレット大脳皮質では、4 日齢には既に十字溝(crs)と前上シルビウス溝(rsss)が確認できた。10 日齢にはシルビウス前溝(prs)と冠状溝(cns)がみられ、大脳吻側半の脳回が形成された。大脳尾側半では、10 日齢に偽シルビウス溝(pss)と嗅脳溝(olfs)が、21 日齢には後上シルビウス溝(csss)と外側溝(ls)がみられ、これらの脳溝の発生により 21 日齢までに大脳尾側半の脳溝が形成された。また、このような脳溝・脳回の形成に性差はみられなかった。
- (2) T₁ 強調 MRI 画像および T₂ 強調 MRI 画像から大脳皮質や尾状核(Cd)、レンズ核(Ln)、扁桃核(Amg)、海馬(Hip)、皮質下白質線維(脳梁や外包)など、大脳の主要な構造が確認できた。

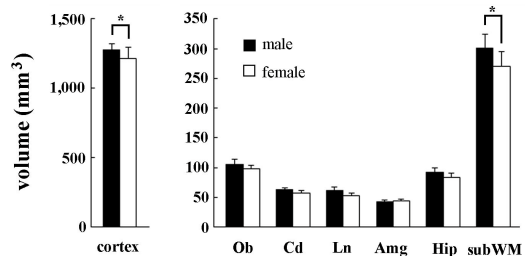


図 1.フェレット大脳の各構造の体積。

Ob: 嗅球 Cd: 尾状核 Ln: レンズ核

Hip: 海馬 subWM: 皮質下白質 *P<0.001

T₁ 強調 MRI 画像を基にこれら大脳の各構造の体積を計測したところ、大脳皮質の体

積は雄で $1,317 \pm 92.0 \text{ mm}^3$ 、雌で $1,214 \pm 80.5 \text{ mm}^3$ 、皮質下白質線維の体積は雄で $312 \pm 32.9 \text{ mm}^3$ 、雌で $271 \pm 23.8 \text{ mm}^3$ で、ともに雌に比べて雄で統計的に有意に大きかった(図 1)。他の構造(嗅球、尾状核、レンズ核、扁桃体、海馬)については雌雄で差が認められなかった(図 1)。

- (3) T_1 強調 MRI 画像を基に MIP 法により大脳皮質内での T_1 強調シグナルの強さを調べたところ、大脳皮質には T_1 強調シグナルが強い横帯と弱い横帯が交互に並んでいることがわかった(図 2)。このような信号の縞状の分布は、フェレット大脳の皮質領野の区分と類似していたため、各皮質領野の T_1 強調シグナルの強さを計測した。更に、大脳皮質における有髄線維の密度は、皮質領野ごとに異なることから、各皮質領野の組織切片を作製し、抗ミエリン塩基性蛋白(MBP)抗体を用いて免疫染色を行い、有髄線維の密度を計測した。その結果、有髄線維は、 T_1 強調シグナルが強い皮質領野(一次運動野、二次感覚野、一次聴覚野)では密度が低く、 T_1 強調シグナルが弱い皮質領野(一次感覚野、一次視覚野、頭頂連合野)では密度が高く、 T_1 強調シグナル強度と有髄線維の密度の間には、明瞭な負の相関($r = -0.440$)が認められた。

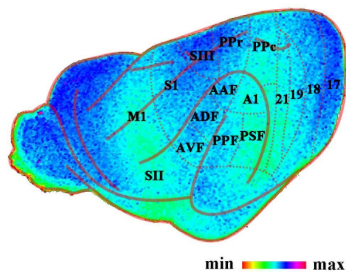


図 2. フェレット大脳の T_1 強調 MRI に基づく最大強度投影法(MIP 法)マップ

- (4) 雌雄の成獣フェレットの脳の T_1 強調 MRI 画像を用いて各脳溝を描出し、大脳皮質の SI および各脳溝の SI を算出した。第脳全体の SI は雄で 0.550 ± 0.037 、雌で 0.490 ± 0.035 で、雌に比べて雄で脳溝形成の頻度が高いことが明らかになった。また、各脳溝の SI は、嗅裂(rf)、外側溝(ls)、後シルビウス上溝(csss)、偽シルビウス溝(pss)、海馬溝(his)および板状溝(ss)の SI が雌に比べて雄で有意に高かった。
- (5) 雌雄の成獣フェレットの脳の T_1 強調 MRI 画像を用いて Volume-rendering 法により各脳溝を三次元再構築し、その三次元構造を解析した。大脳の前半部の脳溝では、古皮質と新皮質の境界となる嗅裂(rf)と板状溝(ss)・前部が雌に比べて雄で深かった。大脳の後半部では、古皮質の脳溝である海馬溝(his)と板状溝(ss)・後部が雌に比べて雄

で深く、更に新皮質の脳溝である外側溝(ls)、後シルビウス上溝(csss)、偽シルビウス溝(pss)が雌に比べて雄で深く、且つ雄で後方に拡張していた。

- (6) 雌雄の成獣フェレットの脳の拡散テンソル画像を用いて大脳の FA マップを作成した。雌雄の大脳ともに脳溝・脳回の各領域の皮質下白質の FA 値は高い値を示したが、FA 値の領域差および雌雄差は認められなかった。
- (7) 雌雄の成獣フェレットの大脳の組織切片を作製し、抗 NeuN 抗体(神経細胞のマーカー)を用いて免疫染色を行った。脳溝領域として十字溝(crs)、冠状溝(cns)、外側溝(ls)、前シルビウス上溝(rsss)、後シルビウス上溝(csss)、偽シルビウス溝(pss)を、脳回領域として前シルビウス回(ASG)、後シルビウス回(PSG)、冠状回(CNG)、外側回(LG)、上シルビウス回(SSG)、前外シルビウス回(AEG)、後外シルビウス回(PEG)、視覚領域(VCA)を選び、各領域の皮質の神経細胞数を計測した。外側溝、後シルビウス上溝、上シルビウス回の皮質の神経細胞数は雌に比べて雄で多く、性差がみられた。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Sawada K, Watanabe M (2012) Development of cerebral sulci and gyri in ferrets (*Mustela putorius*). *Congenital Anomalies* (Kyoto) 52(3): 168–175.
2. Sawada K, Horiuchi-Hirose M, Saito S, Aoki I (2013) MRI-based morphometric characterizations of sexual dimorphism of the cerebrum of ferrets (*Mustela putorius*). *Neuroimage* 83: 294–306.
3. Sawada K (2014) Application of gyrification stages of primates to gyrencephalic non-primate mammal, ferret (*Mustela putorius*). *Advanced Studies in Biology* 6: 1–6.

[学会発表](計 4 件)

1. 澤田和彦 (2012) フェレット大脳における脳溝・脳回の形成. 第 117 回日本解剖学会総会全国学術集会(甲府) 2012 年 3 月 26 ~ 28 日
2. 澤田和彦, 廣瀬美和, 齋藤茂芳, 新田展大, 青木伊知男 (2012) 生後の発達に伴うフェレット大脳外套の形態変化. 第 52 回日本先天異常学会学術集会(東京) 2012 年 7 月 6 ~ 8 日
3. Sawada K, Horiuchi-Hirose M, Saito S, Aoki I (2013) Sexual dimorphism of cerebral morphology in ferrets analyzed by MRI volumetry. 第 36 回日本神経科学大会(京都) 2013 年 6 月 20 ~ 23 日

4. 澤田和彦、廣瀬美和、齋藤茂芳、青木伊知
男 (2014) MRI を用いたフェレット大脳の
ミエリン化に基づく皮質領野区分の可視
化 . 第 119 回日本解剖学会総会全国学術集
会(栃木)
2014 年 3 月 27 ~ 29 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ktt.ac.jp/tiu/tiu-style/category5/25/research-paper-pt25/research-paper-pt25.pdf>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 和彦 (つくば国際大学・医療保健
学部・教授)

研究者番号 : 10284324