

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500480

研究課題名(和文) 画像支援定位脳手術の新規モデル確立に向けたミニブタの脳地図作製

研究課題名(英文) Brain atlas of the miniature pig to establish new animal model for image-assisted stereotaxic surgery.

研究代表者

齋藤 敏之 (SAITO, Toshiyuki)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：10162215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳の前臨床試験に利用可能な中型動物は現状では極めて限られている。本研究では、ミニブタを新たな脳研究用動物として導入するため、当該研究分野で活用できる脳地図の構築をめざした。本研究では、対象となるミニブタをメキシカンヘアレスブタとした。核磁気共鳴断層撮影装置(MR)による脳の断層イメージと実際の脳組織切片像を同一の水平基準面(軸)で参照できるような脳内マーカーを特定した。また、水平基準面に垂直な基準面(軸)を合わせるための前額断切片作製法等の技術的な検証を進めた。一連の検証で、両者の座標を統合するための共通基準面(軸)を調整・設定して、部分的ではあるが、統合脳地図(草稿)の作製が可能となった。

研究成果の概要(英文)：There are quite limited experimental large animals for use in preclinical brain research. In this study, we aimed to make the brain atlas of the miniature pigs for promoting the preclinical research. Mexican hairless pig has been used. In the brain of this animal, we examined to get images with the common standard planes by Magnetic Resonance (MR) measurement and those of the serial brain sections. There have been observed the intracerebral markers to set the common horizontal standard plane, anterior and posterior commissure. These markers were identified by the MR imaging and by Nissl staining of the brain sections. Besides, we put glass-markers visualized by MRI to adjust the common vertical standard planes in both the MR images and the brain sections. Technically, the common standards planes are able to be set in both the MR images and the brain sections, thereby partially making a draft of the integrated brain atlas using Mexican hairless pig.

研究分野：生理学・神経科学

キーワード：統合脳地図 ミニブタ ナビゲーション 脳の前臨床研究 脳の神経生理学的研究

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの脳機能を知る上で霊長類を用いた脳研究が欠かせないが、西欧では脳研究における霊長類の利用が厳しく制限されている。そのため、代替動物としてのブタに注目が集まり、ヒトを念頭においた脳研究が進められている(Sauleau, P. et al., 2009)。一方、国内ではナショナルバイオリソースプロジェクトで研究用霊長類の繁殖事業が進められているが、霊長類を用いた脳研究は施設・経費等の理由から極めて限定されている。また、かつて脳研究に多用されたイヌ・ネコは今では以前のように使えず、これに代わる中型動物が新たに必要となっている。

(2) 脳地図は脳内の神経核が存在する座標を表したもので、その情報は特定の脳内神経核にアプローチする際に必須である。ブタにおいては、家畜ブタの脳地図(Felix B. et al., 1999)はあるが、国内外において、前臨床研究で利用可能なブタの脳地図(デジタル化されたものを含む)は報告されていない。

(3) 研究代表者らはこれまでブタの脳定位固定装置の開発と脳の三次元座標の検証(Saito T. et al., 1998; 2009)を進めているが、家畜ブタでは個体毎のばらつきが予想以上に大きく、脳座標の再現性に劣るという問題があった。そこで、ミニブタを新たな対象として、前臨床用脳地図の作製の可能性を検証することとした。

2. 研究の目的

ミニブタを脳の前臨床研究に本格的に導入し、当該分野の研究を一層推進するための基盤を整備する。具体的には、画像支援による定位脳手術や機能的な脳イメージング、深部脳刺激による神経機能回復研究等に必要となるミニブタの脳地図を構築する。

3. 研究の方法

本研究は、動物実験委員会の承認を受け、自治医科大学先端医療技術開発センターにおいて主な動物実験を実施した。

(1) 機能的な脳地図の検証

メキシカンヘアレスブタ(体重 23.9~35.3 kg)にイソフルランあるいはセボフルラン吸入による全身麻酔を施し、従来の脳定位固定装置を使わないフレームレスナビゲーション法を用いた脳座標算出法を検証した。

まず初めに、当該ミニブタから頭部CTデータを取得し、テンプレート(雛形)として利用するため、頭蓋骨に存在する解剖学的な各マーカー間の距離などを計測した。次に、鼻の皮膚表面から刺激部位を変えながら、求心性の電気刺激を加えた。大脳皮質の一次体性感覚野(rostral region; Craner and Ray, 1991)において誘発電位測定を行い、空間的な誘発電位応答の差を解析した。

(2) 統合脳地図の検証

(1)と同程度の体重をもつメキシカンヘアレスブタを用いて、脳地図作製に向けた作業を進めた。

前述した方法を用いて吸入麻酔により全身麻酔を施し、CTとMRIデータを取得する際に位置を参照するためのマーカーを埋め込んだ。その後、CTとMRIデータを取得した。撮影終了後、ヘパリン加生理食塩水、続いて、4%ホルマリン含有リン酸緩衝液(pH7.4)を両側内頸動脈より頭部に向けて灌流した。灌流後、頭部を脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨の一部を切除した。プレグマを基点とした所定の位置で鉛直方向と水平方向にガラスマーカーを挿入・固定した。固定後、CTならびにMRIデータを取得し、挿入したマーカーの位置を確認した。MRI画像データにおいては、標準基準面を引くために必要な前交連と後交連を視認した(後述)。その後、マーカーとともに脳を取り出し、切片作製までホルマリン液内に保存した。

次に、前述した吸入麻酔により全身麻酔を施したメキシカンヘアレスブタを用いて、その頭部を4%ホルマリン含有リン酸緩衝液(pH7.4)にて血管灌流し、脳を固定・摘出した。それらの脳から、連続凍結切片の作製を試みた。正中線に沿って半切した脳にゼラチンを塗布し、ゼラチンが固化したことを確認してからグリセリンを含む0.1Mリン酸緩衝液に浸漬した。その後、ドライアイスで持続的に冷却したミクロトームのステージに当該脳を固定した。50µmの厚さで矢状断の連続切片を切り出し、特大スライドガラス上にマウントした。乾燥後、ニッスル染色を行い、封入した。

一方、あらかじめ脳内に挿入・固定したマーカーをもとに角度調整を行い、水平基準面に垂直な前額断凍結切片を作製する方法を検証した。

4. 研究成果

(1) 機能的な脳地図の検証

以下の図1に示す頭蓋骨のマーカーをもとに誘発電位を検出できる脳座標を求めた。

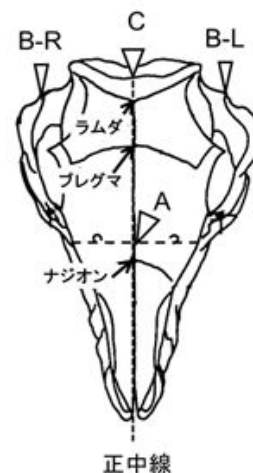


図1 .メキシカンヘアレスブタの頭蓋骨マーカーを示した模式図。A ; 左右の眼窩下孔と前頭間縫合との交点、B-L ; 左側側頭骨頬骨突起上端、B-R ; 右側側頭骨頬骨突起上端、C ; 頂稜と矢状縫合の延長線との交点。

鼻の皮膚表面に電気刺激を与えた時、rostral region で最大誘発電位が検出される座標は、 $x = 9.1 \pm 1.19$ mm; $y = -51.0 \pm 4.67$ mm; $z = -8.8 \pm 0.48$ mm (3例の平均値 \pm 標準偏差)であった。座標の標準偏差の値は平均値の13%以下で、その値は極めて小さかった。

本研究から、メキシカンヘアレスブタでは頭蓋骨の解剖学的マーカーをもとに、従来型の脳定位固定装置を利用しないフレームレスナビゲーションにより、機能的な脳地図を作製できる可能性が示された。

(2) 統合脳地図の検証

図2に、セボフルラン吸入麻酔により全身麻酔を施したメキシカンヘアレスブタの頭部をMRIにて撮影した画像の一例を示した。

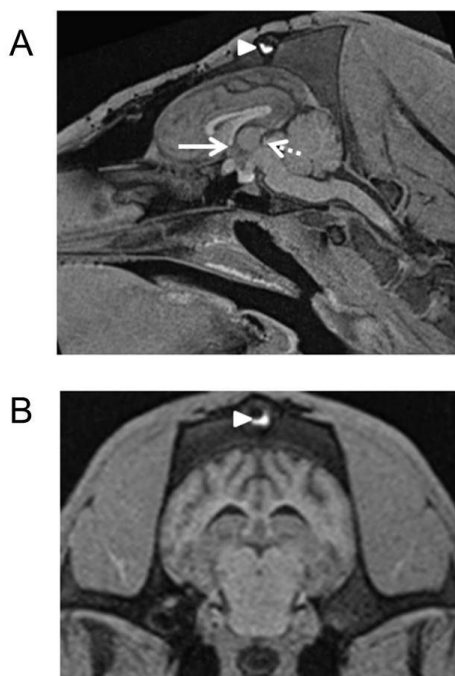


図2 .1.5テスラMRIにより撮影したメキシカンヘアレスブタの脳の矢状断イメージ(A)と前額断イメージ(B)(スライス厚、1mm)

白三角は頭蓋骨プレグマに埋め込んだマーカーを示す。白実線矢印は前交連、白破線矢印は後交連を示す。

図2Aに示したMRIイメージにおいて、水平基準面を設定する際に必要なマーカーである前交連と後交連を確認できた。

次に、実際の脳組織でこれらのマーカーを確認する作業を行った。その結果、図3に示すように、ニッスル染色した矢状断脳切片に

おいて、前交連と後交連を確認できた。



図3 .ニッスル染色を施した矢状断凍結脳切片(写真、部分)。正中線から外側へ約1mmの位置で作製した。白実線矢印は前交連、白破線矢印は後交連を示す。

図3をもとに、前交連と後交連を結ぶ水平基準面(軸)とそれに垂直な垂直基準面(軸)を設定した。また、後交連の前端をゼロとした時の暫定的な座標を付与し、家畜ブタの脳地図(Felix B. et al., 1999)をもとに、主な神経核の名前を付した。その一部を図4に示した。

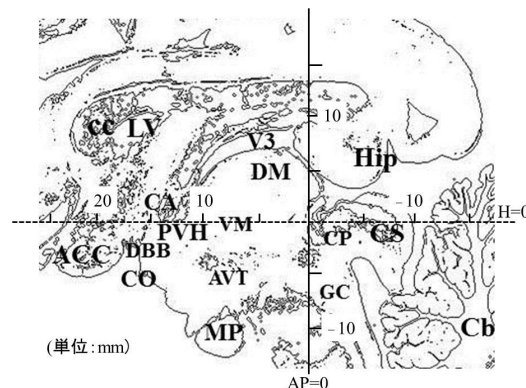


図4 .ニッスル染色を施した矢状断脳切片(図3)における基準軸の設定と暫定座標。水平基準軸(H=0)には吻側方向(左側)をプラス、尾側方向(右側)をマイナスとして、5mm毎に目盛をつけた。垂直基準軸(AP=0)には背側方向をプラス、腹側方向をマイナスとして、5mm毎の目盛をつけた。また、図中には主な神経核の略称を付した。図中の略称の詳細は以下の通りである。

ACC: 側坐核, AVT: 腹側被蓋野, CA: 前交連, Cb: 小脳, cc: 脳梁, CO: 視交叉, CP: 後交連, CS: 上丘, Hip: 海馬, DBB: プローカの対角帯, FR: 網様体, GC: 中心灰白質, LV: 側脳室, MP: 乳頭体前核, PVH: 視床下部・室傍核, VM: 視床内側腹側核, V3: 第3脳室

図2AのMRIイメージと図3・4の脳組

織切片、双方に共通した水平基準面(軸)(前交連と後交連を結ぶ基準線; H=0)と垂直基準面(軸)(後交連の前端を通る垂直基準線; AP=0)を引くことが可能となった。また、MRIで可視化した頭蓋骨マーカー(頭蓋骨プレグマ等内に埋め込んだマーカー)と水平ならびに垂直基準面(軸)との距離を測定することで、頭蓋骨マーカーをもとにフレームレスナビゲーションを用いて、前交連、後交連、その他の脳内神経核の座標を求めることが可能になると考えられる。

これまでの研究で、メキシカンヘアレスブタのMRI撮影で得た脳の前額断イメージデータと前額断脳切片を相互に参照できるデータを整備するためには、脳切片作製時における角度調整などで詰めめの検証が残っているが、MRI撮影で得た脳の矢状断イメージと矢状断脳切片(ニッスル染色脳切片)の間では、断片的ではあるが、矢状断脳切片で視認できるいくつかの神経核の位置をMRIの座標で読み取ることが可能となった。

本研究で整備を進めているミニブタの統合脳地図について、必要とされる一連のデータをデジタル化し、統合して利用できるプラットフォームを整える必要である。現在進めている統合脳地図が整備されると、ミニブタ(メキシカンヘアレスブタ)を用いた画像支援による定位脳手術などの前臨床研究に新たな道を拓き、当該分野の研究の進展に大きく貢献できると考える。

<参考文献>

Craner SL, Ray RH. (1991) Somatosensory cortex of the neonatal pig: I. Topographic organization of the primary somatosensory cortex (SI). *Journal of Comparative Neurology* 306 (1): 24-38.

Félix B, Léger ME, Albe-Fessard D, Marcilloux JC, Rampin O, Laplace JP. (1999) Stereotaxic atlas of the pig brain. *Brain Research Bulletin* 49(1-2):1-137.

Sauleau P, Lapouble E, Val-Laillet D, Malbert CH. (2009) The pig model in brain imaging and neurosurgery. *Animal*. 3(8):1138-51. doi: 10.1017/S1751731109004649.

Saito T, Bjarkam CR, Nakamura M, Nemoto T. (1998) Determination of stereotaxic coordinates for the hippocampus in the domestic pig. *Journal of Neuroscience Methods*. 80(1):29-36.

Saito T, Fujiwara S, Sasaki Y, Niwa K, Nemoto T, Kasuya E, Sakumoto R, Ymaguchi T. (2009) Measurement of hippocampal neural activity by radiotelemetry in unrestrained piglets. *JARQ* 43 (3): 247- 254.

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 2 件)

Uga M, Saito T, Sano T, Yokota H, Oguro K, Rizki EE, Mizutani T, Katura T, Dan I, Watanabe E. (2014) Direct cortical hemodynamics mapping of somatotopy of pig nostril sensation by functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI). *Neuroimage* 査読有 91: 138-145.

Saito T, Uga M, Tsuzuki D, Yokota H, Oguro K, Yamamoto T, Dan I, Watanabe E (2013) Evoked potential mapping of the rostral region by frameless navigation system in Mexican hairless pig. *Journal of Neuroscience Methods* 査読有 212:100-105.

〔学会発表〕(計 6 件)

Uga M, Saito T, Yokota H, Oguro K, Rizki EE, Mizutani T, Katura, Dan I, Watanabe E. The development of functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI): the direct cortical hemodynamic mapping of the miniature pig's somatosensory area. *fNIRS 2014 Montreal, Canada*, 2014 October 10-12

Uga M, Saito T, Tsuzuki D, Yokota H, Oguro K, Rizki EE, Mizutani T, Dan I, Watanabe E. Functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI) of the miniature pig brain : the comparison of hemoglobin species. *Neuroscience 2014, Nagoya Congress Center (Nagoya, Aichi)*, 2014 September 11-13

宇賀美奈子、齋藤敏之、續木大介、横田英典、小黒恵司、山本剛、檀一平太、渡辺英寿：頭蓋骨上の基準点に基づくフレームレスナビゲーションシステムを用いたミニブタの脳座標の決定。第 35 回日本神経科学大会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)、2012.9.18-21

齋藤敏之、宇賀美奈子、續木大介、横田英典、小黒恵司、山本剛、檀一平太、渡辺英寿：ミニブタにおける frameless stereotaxy の検証。第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学(岩手県・盛岡市)、2012.9.14-16

Uga M, Saito T, Tsuzuki D, Yokota H, Oguro K, Yamamoto T, Dan I, Watanabe E. Application of frameless navigation method for evoked potential mapping in the brain of Mexican hairless pig. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012.7.15 -17

齋藤敏之・渡辺英寿：ミニブタを用いた脳の高次機能解析とヒト中枢神経メカニズム・病態解明への応用」自治医大ビッグセン

ターシンポジウム。秋葉原コンベンションセンター（東京都・千代田区）2012.6.11

〔その他〕

ホームページ等

日経産業新聞 2014年1月22日 「脳の働き7mm 感覚で特定-電気信号と血流で 腫瘍手術に応用へ」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 敏之 (SAITO, Toshiyuki)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：10162215

(2) 研究分担者

渡辺 英寿 (WATANABE, Eiju)
自治医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：50150272

(3) 連携研究者

佐々木 誠一 (SASAKI, Sei-ichi)
茨城県立医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：50153987

(4) 研究協力者

檀 一平太 (DAN, Ippeita)
小黒 恵司 (OGURO, Keiji)
横田 英典 (YOKOTA, Hidenori)
宇賀 美奈子 (UGA, Minako)