

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15465

研究課題名(和文) 覚醒下小動物PETを用いた統合的脳機能研究システムの開発

研究課題名(英文) The development of the small animal neuroimaging method for the reward system in the rat brain.

研究代表者

岡内 隆 (Okauchi, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・リサーチアソシエイト

研究者番号：80415405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラットに脳内自己刺激(ICSS)課題を遂行させながらPET撮像を行い、脳内報酬系に関わる神経活動を可視化するシステムを構築することを目的とした。Wistarラットの内側前脳束に双極性電極を一側性に刺しICSSの条件づけを十分に行った後、<sup>18</sup>F-FDGによるPETスキャンを実施し、ICSS遂行させた場合とさせない場合の脳内FDG集積をSPMにより比較した。解析の結果、賦活部位として右側視床後外側核、背側水道周囲灰白質、右外側水道周囲灰白質、左側前庭神経外側核、巨細胞性網様核が認められており、一方で抑制部位として前障、左側側坐核、島皮質、左側海馬台などが描出された。

研究成果の概要(英文)：Advances in PET imaging technologies with high sensitivity and resolution have enabled us to study dynamic changes of neurotransmitters and neural activity in small animals. Along the line, we focused on the reward system which is one of the fundamental brain function of living bodies and employed the paradigm of “intracranial self-stimulation (ICSS)” to elucidate the reward neural network by using small animal neuroimaging technique. As a result of our attempt, we found that ICSS has activated the lateral periaqueductal gray and vestibular nuclei, lateral posterior nuclei of thalamus but suppressed the neural activity in the nucleus accumbens or subiculum, insular cortex.

研究分野：核医学

キーワード：脳内報酬系 脳内自己刺激 FDG PET

### 1. 研究開始当初の背景

近年小動物においても高感度・高分解能による PET 撮像を行うことが可能となり、ラット・マウスにおける神経伝達機能や脳機能を対象とした分子イメージング研究が多くなされるようになった<sup>1),2),3)</sup>。しかし麻酔下での撮像が一般的であり、本来の機能が十分に反映されているとはいえない。また動物実験では神経機能に対して侵襲的な操作や観測法を選択できるが、神経機能のダイナミズムを複数のモダリティを組み合わせることで同時に追跡する研究は多くない。我々は Isomura ら<sup>4)</sup>の装置を応用して、「脳内報酬系」の一つの表現型である脳内自己刺激 (intracranial self-stimulation, ICSS) を PET 装置内においてラットに遂行させる試みを始めており、この実験系が確立すれば、脳内自己刺激行動における覚醒状態のニューラルマップを構築することが可能となる。

ICSS は Olds & Milner<sup>5)</sup> によって開発された古典的な行動パラダイムで、レバー押し反応により脳内に電気刺激が呈示され報酬効果が得られるため、その反応が強化される。その神経基盤には動機付けや意欲というヒトの高次脳機能にも共通する脳内報酬系が介在しており、現在でもその機能解明にしばしば用いられるツールである。

そこで我々は ICSS を習得したラットを用いて、ICSS 遂行条件または休止条件において [<sup>18</sup>F]FDG-PET を実施し、SPM 解析により試行条件間の比較を行い、ICSS 遂行に関連する神経ネットワークの解明を試みた。

### 2. 研究の目的

ヒトや動物を対象として、分子イメージング技術を利用した脳機能研究が盛んに行われている。ヒトではその実施に倫理的な制限がある一方、動物では侵襲的な操作と組み合わせ、分子・細胞レベルの検索も可能である。しかしその撮像の多くは麻酔下で行っており、覚醒下の機能を正しく反映していない。本研究では、覚醒下でオペラント課題を遂行させながら PET 撮像を行う「小動物オペラント - PET 撮像システム」を確立し、「脳内自己刺激行動」に関わる神経活動を可視化する。この小動物 PET イメージング撮像システムを確立することにより、脳内報酬系に限らずヒトにつながる幅広い脳機能の神経基盤解明に向けた知見を提供する統合的研究システムになると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脳内自己刺激行動に関するプロトコルの確立

麻酔下にてラットの内側前脳束へ一側性に電極を刺入し、同時に頭部固定用のアプリケーションを頭頂に装着した。術後動物が回復したらオペラントボックス内にて脳内自己刺激課題を一定の反応水準を超えるまで習得させた。

#### ➤ 刺激電極留置手術

9 週齢の雄性 Wistar 系ラット 18 匹 (体重 231.7 ± 7.3 g, 平均 ± SD) を用いた。1.5% イソフルラン麻酔下にてラットを脳定位固定装置に保定し、双極性電極を右側内側前脳束に刺入留置した (ブレグマ後方 3.8 mm, 右側 1.8 mm, 硬膜下 7.8 mm, 図 1)。ショックジェネレータからの刺激を電極に送るため、デンタルセメントにて頭蓋骨上にコネクタを固定した。

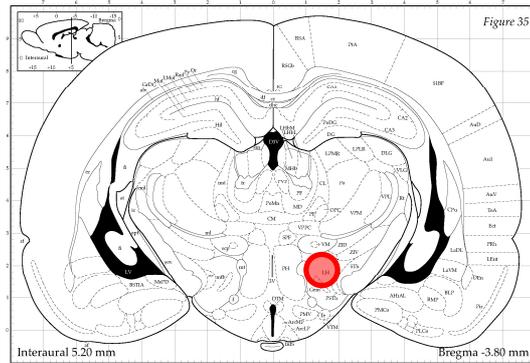


図 1. 刺激電極留置目標部位。赤丸にて右側内側前脳束を示す。

術後 1 週間の回復期間を置いて、小動物用 CT 装置 (CosmoScan, RIGAKU) を用いて留置電極の位置を確認した (図 2)。

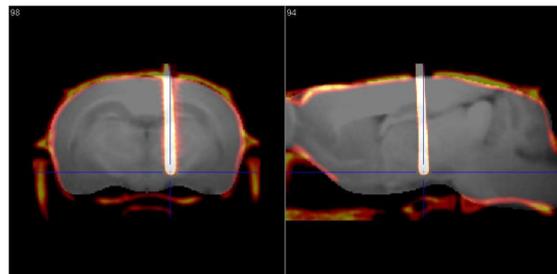


図 2. ラット脳 MRI テンプレートに重ね合わせた典型 CT 像。

#### ➤ ICSS 条件づけ

術後 2 週間経過して ICSS の条件づけを開始した。ICSS はオペラント条件づけの一種であり、レバー押し等の条件反応により電気刺激が脳に呈示される。刺激自体に報酬効果があり、強固な連合が形成されるとともに、刺激強度によって条件反応の成績が動的に変化するため、動機づけ評価の関数として用いることができる。

条件づけの期間は、刺激強度が 1 分ごとに 250-550 μA の範囲で上昇と下降を繰り返す刺激系列を連日 1 時間行った。この間、実験者によりプライミング刺激が呈示され、ラットの自発的なレバー押し反応が強化されるようにシェーピングされた。また刺激強度の変動範囲も各個体の刺激感受性に依って変更し、レバー押し反応が刺激強度に依存した反応曲線を示すようになった時点で ICSS 課題を習得したとみなし、その最大レバー押し

回数の 80%の反応数に相当する電流値をその個体の至適刺激強度とした(図3)

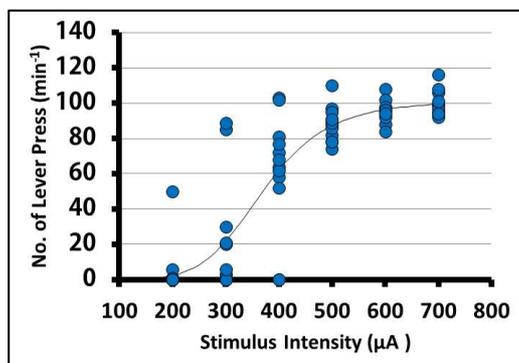


図3. ICSS 条件づけによるレバー押し反応曲線(典型例). 一定範囲の刺激電流に対する反応にシグモイド曲線をあてはめ 80%の反応数を示す電流値を至適刺激強度とした.

さらにその至適強度に固定した課題を 30 分間遂行させ習熟度を確認した(図4)

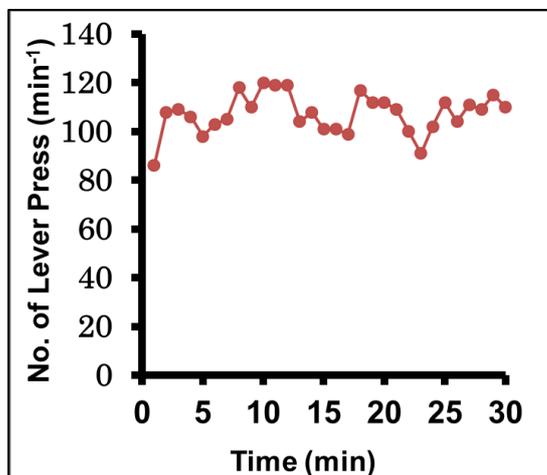


図4. 至適刺激強度に固定し30分間試行させた際のレバー押し反応.

## (2) [<sup>18</sup>F]FDG-PET による脳内自己刺激行動(ICSS)のニューロマッピング

ICSS 課題を習得したラットを対象に [<sup>18</sup>F]FDG-PET を実施し、ICSS 遂行時の脳内の賦活部位(エネルギー代謝の昂進または抑制が生じる部位)を描出した。(比較条件は ICSS 遂行条件および休止条件とし SPM 解析による差分の有意性を検定した)

### ➤ トランスミッションスキャン

PET スキャンには2台の microPET Focus220 (Siemens) を使用した。ラット頭部のアタッチメント部の減弱補正を行うため、頭部位置が再現可能な固定装置を用いて、FDG-PET の前日にトランスミッションスキャンを実施した。実施にあたっては、1.5% isoflurane 吸入麻酔下においてラットを固定装置に保定し、68Ge-68Ga 線源を用いて30分間のスキャンを行った。位置の再現を確保するために事前に保定姿勢を十分に検討し、異なる撮像日であってもトランスミッションおよび

[<sup>18</sup>F]FDG 画像の高い一致を示した。

### ➤ 固定刺激強度による ICSS 課題

ICSS 遂行時と休止時における神経活動の差を見るため PET スキャン直前に行動課題を行った。条件づけにより ICSS 課題を習得したラット13匹を ICSS 遂行条件または休止条件のいずれかにランダムに分け、自由行動下において 75 MBq の [<sup>18</sup>F]FDG を尾静脈内 bolus 投与した。その直後から ICSS 遂行群は個々の至適強度固定下で30分間の ICSS 課題を遂行させ、休止群は刺激リレーに繋いだ状態で30分間チャンバー内に留置した。2回目は実験条件を交替した。ICSS 遂行条件において、30分間に1000回以上のレバー押しを示した個体を解析に用いる基準とした。

### ➤ [<sup>18</sup>F]FDG-PET スキャンおよび画像処理

PET スキャンはトランスミッションの翌日および4日後に実施した。その直前に実施した行動課題の後、ラットをイソフルレン麻酔下で頭部固定装置に保定し、 [<sup>18</sup>F]FDG 投与から55分経過した時点で30分間のスキャンを行った。収集はリストモードにて行い、事前に取得したトランスミッション画像を用いた減弱補正および散乱補正を行った上で FBP および MAP 再構成により30分間の static 画像を得た。PMOD ソフトウェア® (PMOD Technologies) を用いて以下の処理を行い SPM 解析用の画像を作製した(図5)

#### < SPM 解析に向けた PET 画像処理手順 >

1. 各 PET 画像をラット脳 MRI テンプレートに準じたオリエンテーションおよびサイズに変換
2. マスキングにより頭部周辺のみを抽出
3. MRI テンプレートへの自動重ね合わせ
4. 全脳領域における [<sup>18</sup>F]FDG 集積量を標準化
5. FDG テンプレートへの重ね合わせ

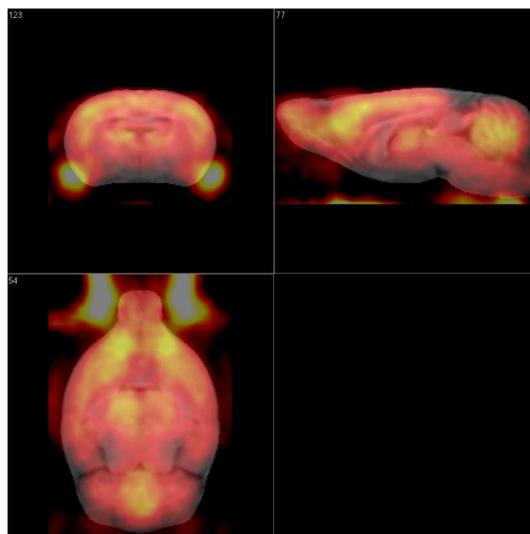


図5. SPM 解析に用いるための MRI-PET 画像の重ね合わせ.

#### ▶ SPM 解析

解析用に処理された PET 画像は各行動条件によってまとめられ、下記解析手続きに従って対比較され統計画像を得た。

#### < SPM 解析条件 >

- ・ 使用ソフトウェア：MATLAB 7.11 および SPM8
- ・ 統計デザイン：Paired t-test（ICSS 遂行条件および休止条件の個体内比較）
- ・ データ配置：「ICSS 遂行条件 - 休止条件」により賦活部位を、「休止条件 - ICSS 遂行条件」により抑制部位を解析
- ・ 対データ数：11 件
- ・ 棄却水準：uncorrected  $p = 0.005$  ( $t = 3.169, df = 10$ )

#### 4. 研究成果

本研究では、覚醒下でオペラント課題を遂行させながら PET 撮像を行う「小動物オペラント - PET 撮像システム」を確立し、「脳内自己刺激行動」に関わる神経活動を可視化することを目的とした。脳内自己刺激（intracranial self-stimulation; ICSS）はオペラント条件づけの一つであり、動物はレバー押しにより脳内報酬系と言われる中脳辺縁系ドーパミン投射系への電気刺激を報酬として得ることを学習する。この ICSS の神経基盤について、脳全体の神経ネットワークとしての ICSS による脳内神経活動の変化については不明点が多く、我々は ICSS をラットに遂行させ、 $^{18}\text{F}$ FDG-PET によりその課題に関わる神経回路のマッピングに取り組んできた。

まず本助成の開始年度である 27 年度から 28 年度初頭にかけて「通常のオペラントボックスにおける脳内自己刺激行動（ICSS）の習得」に向けて、ICSS の課題遂行が常時可能となるよう条件整備に重点を置いた。プロトコルの概略としては、あらかじめ 9 週齢の Wistar ラットの内側前脳束に双極性電極を一側性に刺入し、2 週間の回復期間を置いて ICSS の条件づけを行い学習させた。研究を開始した当初は、刺激電極装着手術の失敗、装着後まもない時期での電極脱落、電極刺入位置のズレによる刺激に対する動物の無応答などが発生し、ICSS 習得に至らないケースが多く見られたが、手術および条件付け等の手技向上により刺激電極を刺入したラットのほぼすべてにおいて堅調な ICSS 習得が可能となった。

「オペラント - PET に向けた実験環境の整備」を完了し、以後 ICSS 習得動物を用いた PET プロトコルを開始した。その概略としては、十分に ICSS を習得したラットに  $^{18}\text{F}$ -FDG を尾静注しその後 30 分間 ICSS を遂行させるか、またはオペラント装置内に 30 分間置き、その後 30 分間の PET 撮像を行った。それによって得られた各々の PET 画像データを SPM 解析し、ICSS 遂行により賦活ま

たは逆に抑制される脳領域を検索した（Paired t test, uncorrected  $P = 0.005$ ）。その結果、賦活部位として右側視床後外側核、背側水道周囲灰白質、左側前庭神経外側核、巨細胞性網様核が認められており、一方で抑制部位として前障、左側側坐核、島皮質、左側海馬台が描出された。結果概要を図 6 に示す。

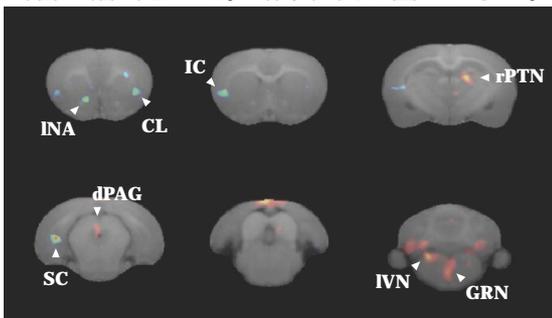


図 6. SPM 解析により抽出された領域（Hot 表示は賦活領域、Cold 表示は抑制領域）。rPTN: 右側視床後外側核、dPAG: 背側水道周囲灰白質、GRN: 延髄巨細胞性網様核、IVN: 左側前庭神経核、INA: 左側側坐核、CL: 前障、IC: 島皮質、SC: 海馬台（uncorrected  $p = 0.005$ ）。

#### 結論

今回、ICSS 課題遂行に伴うラット脳内報酬系における神経ネットワーク解明を目的とした脳機能イメージング解析システムの開発の結果を報告した。SPM 解析の結果では、報酬系に関わる側坐核および島皮質の抑制、痛覚に関わる視床核や三叉神経関連領域の賦活が示された。関連する生理機能分子の選択的な分子プローブを応用することによって、これらの領域が担う役割が明らかにされることが期待される。

#### < 引用文献 >

- 1) Endepols H et al, J Neurosci 30:9708, 2010
- 2) Wang X et al, JNM 54:1969, 2013
- 3) Cui Y et al, NeuroImage 108:17, 2015
- 4) Isomura Y et al, Nat Neurosci 12:1586, 2009
- 5) Olds J & Milner P, J Comp Physiol Psychol 47:419, 1954

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) 岡内隆、武玉萍、重田美香、林中恵美、和田康弘、渡辺恭良、崔翼龍 「内側前脳束の脳内自己刺激後における脳内糖代謝変容部位の検索」 第 12 回日本分子イメージング学会学術集会、2017 年

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
岡内 隆 (OKAUCHI, Takashi)  
国立研究開発法人 理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・リサーチアソシエイト  
研究者番号：80415405

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

崔 翼龍 (SAI, Yokuryu)

国立研究開発法人 理化学研究所・ライフ  
サイエンス技術基盤研究センター・ユニッ  
トリーダー

和田 康弘 (WADA, Yasuhiro)

国立研究開発法人 理化学研究所・ライフ  
サイエンス技術基盤研究センター・副チー  
ムリーダー

林中 恵美 (Hayashinaka, Emi)

国立研究開発法人 理化学研究所・ライフ  
サイエンス技術基盤研究センター・テクニ  
カルスタッフ

武 玉萍 (Wu, Yuping)

国立研究開発法人 理化学研究所・ライフ  
サイエンス技術基盤研究センター・リサー  
チアソシエイト

重田 美香 (Shigeta, Mika)

国立研究開発法人 理化学研究所・ライフ  
サイエンス技術基盤研究センター・テクニ  
カルスタッフ