

平成21年4月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500346
 研究課題名（和文） 神経活動の光学イメージングによる聴覚・平衡反射神経回路網の機能形成過程の解析
 研究課題名（英文） Optical analysis of functional development of the auditory and vestibular neural circuits
 研究代表者
 佐藤 勝重（SATO KATSUSHIGE）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
 研究者番号：80291342

研究成果の概要：

本研究は、発生初期胚脳幹の聴覚・平衡反射神経回路網に焦点をあて、神経電位活動の光学的イメージング法を用いてその機能構築過程を解析したものである。孵卵5.5-8日の鶏胚から第VIII脳神経を付けたままの標本を作製し、膜電位感受性色素で染色して、聴神経刺激に対する光学応答を記録した。解剖学的研究との比較から、脳幹内での応答領域と神経核の対応を検討した。また、各神経核におけるシナプス伝達の発現時期は、これまで考えられていた発生段階よりもかなり早いことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経生理学、神経機能発生学

科研費の分科・細目：神経科学, 神経・筋肉生理学

キーワード：光学計測、膜電位感受性色素、中枢神経系、機能発生、embryo、聴覚、平衡覚、生体染色

1. 研究開始当初の背景

個体発生の過程において、中枢神経系を構成するニューロン群が神経回路網を形成していくプロセスの解明は、中枢神経系の機能的構築を理解する上で、最も基本的な命題の一つである。脳幹は、体性・自律性感覚系、体性・自律性運動系、さらに循環・呼吸に関連した自発活動など、生命活動に関わる多く

の情報が直接入・出力し、処理・統合される重要な領域である。これまでに、解剖学的・組織学的解析により、脳幹内には数多くの神経核が同定され、それらの間の構造的なつながりが明らかにされてきた。しかしながら、これらの神経回路網が、機能的にどのように形成され成熟していくのかということは、ほとんど解明されていない。これは、発生初期

の中樞神経系を構成する神経細胞が小さく脆弱で、微小電極を適用することが困難であるばかりでなく、従来の電気生理学的測定法では、標本内の多数領域からニューロン応答を同時記録しその機能マッピングを行うことが不可能であったことが原因の一つと考えられる。

我々は、これまで、膜電位感受性色素を用いたニューロン電位活動の光学的イメージング法を発生初期胚脳幹に適用し、三叉神経(N. V)、舌咽神経(N. IX)および迷走神経(N. X)を中心に、その神経核を構成するニューロンの電位活動の時間的・空間的パターンを調べ、その発達過程を追跡してきた。この光学的測定法は、発生過程にある脆弱で小さいニューロンの電気的活動を、電極を刺入せずに測定できるうえ、標本上の非常に多数の微小分画領域からニューロン活動を同時記録できるという、他の測定法にはない大きな利点を有している。この測定法を駆使して、われわれは、発生初期の鶏胚、ラット胚において、N. V、N. IX、N. Xに関連した感覚核(三叉神経主知覚核、三叉神経脊髄路核、孤束核)および運動核(三叉神経運動核、舌咽神経核、迷走神経背側核)の領域を三次元的に同定し、その機能的構築過程を明らかにしてきた。この研究の中で、個体発生過程において、脳幹神経核間の機能的な連絡がどのようにして形成・成熟されるのか、ということが次の問題として挙がってきた。

2. 研究の目的

内耳神経(N. VIII)は、蝸牛神経と前庭神経から構成され、それぞれ、聴覚、平衡覚に関係する神経であり、これらの情報は、脳幹内でいくつかの神経核を経由して中枢に伝えられることが知られている。例えば、前庭動眼反射は、無意識のうちに中心窩視を可能にしている反射であり、視標を追跡する上で動物にとって必要不可欠な反射であるが、この反射回路の中継核(前庭神経核、動眼神経核、滑車神経核、外転神経核)は脳幹内に存在し、脳幹神経回路網の機能形成過程を明らかにする上で最適な研究対象であると考えられる。また、前庭迷路の刺激により、迷走神経の興奮や交感神経の抑制が起こること

が明らかになってきており、脳幹神経回路網を介した情報の統合、処理過程を解析する上でも良い研究対象であると考えられる。

そこで、本研究は、聴覚および平衡覚に関係する神経回路網に焦点を当て、脳幹神経回路網の機能形成過程と三次元的機能構築過程を明らかにすることを目的として企画された。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

孵卵 5.5 日～8 日の鶏胚を用いた。まず、麻酔下に鶏胚を取り出し、実体顕微鏡下で第 VIII 脳神経(蝸牛神経および前庭神経)を付けたままの脳幹インタクト標本を作製した。

(2) 光学計測

a) 膜電位イメージングシステム:測定には、我々の研究室で独自に作成した、光学的 144 チャンネルおよび 1020 チャンネル同時測定システムを用い、脳幹内の 144～1020 ヶ所の領域からニューロン電位活動を光学的変化として同時記録した。

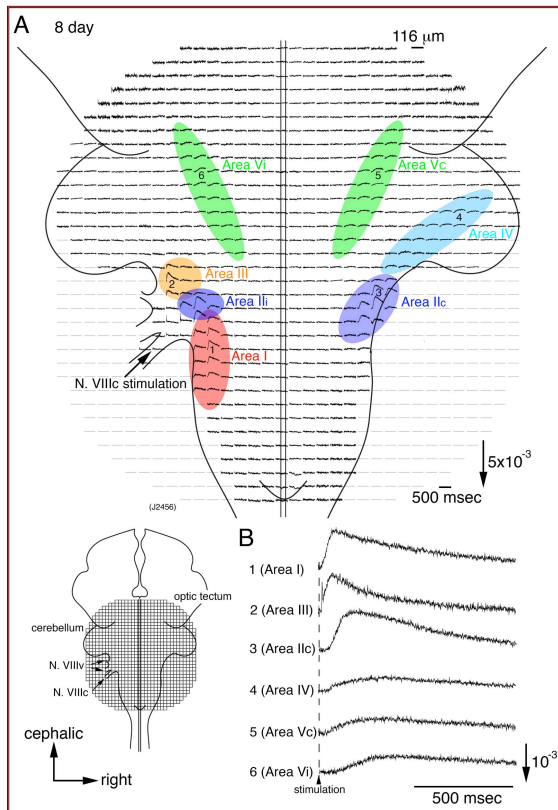
b) 膜電位感受性色素による染色法:標本を膜電位感受性色素 0.2mg/ml を含むリンゲル液に約 20 分間浸し染色した。膜電位感受性色素としては、メロシアニン・ローダニン系の NK2761 を用いた。我々はこれまでの経験から、この NK2761 が embryo の神経系では ①刺激に対する反応が大きく、②褪色が少なく、しかも、③毒性が少ないことを確認している (Momose-Sato et al.: J. Memb. Biol. 144, 1995)。

4. 研究成果

1) 蝸牛神経関連核の機能的同定

これまでの予備的な実験で、孵卵 8 日の鶏胚脳幹内において、迷走神経刺激などにより感覚核から興奮シナプス後電位が記録されている。そこでまず、孵卵 8 日の鶏胚蝸牛神経-脳幹標本を用いて実験を行ない、基本データを得た。具体的には、聴神経-脳幹 intact 標本を用い聴神経を吸引電極で刺激し、脳幹内での応答領域を同定した。次頁の図は、孵卵 8 日の鶏胚蝸牛神経-脳幹標本において、蝸牛神経刺激により誘発され

た神経応答を示したものである。応答領域を色で示してある。



機能的に同定した神経核は、これまでの解剖学的研究との比較から、

- Area I: Nucleus magnocellularis,
- Area III: Nucleus angularis,
- Area II: Nucleus laminaris,
- Area V: Nucleus lemnisci lateralis

と考えられた。また、蝸牛神経刺激によって、小脳からも応答 (Area IV) が得られたが、adult ではこのような応答領域は報告がなく、発生期における一時的な投射が存在することが示唆された。

2) 蝸牛神経関連核の機能発達

次に、孵卵8日以外の標本にも測定対象を広げ、シナプス後電位に対応する slow signals が、発生段階のどの時期にどの部位で最初に形成されるのかを、機能マッピングとそれに対応した領域の形態マッピングとの比較から総合的に解析した。右上図は、孵卵6-8日の標本から得られた結果をまとめたもので、上段はNormal Ringer液、下段はMgイオンをCaイオンで置換した液を用いた結果を標本別にまとめたものである。この表か

A. Normal

stage	preparation	Nuclei Magnocellularis (Area I)		Nuclei angularis (Area III)		Nuclei laminaris (Area IIc)		Nuclei lemnisci lateralis (Area Vc)		Cerebellum (Area IV)	
		ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral
6 day	J2451										
	J2451										
	J2454	x									
	J2410	x									
	J2449										
7 day	J2332	x									
	J2396	x									
	J2447	x									
	J2762	x									
8 day	J2336	x									
	J2365	x									
	J2416	x									
	J2450	x									
	J2456	x									
	J2765	x									

B. Mg²⁺-free

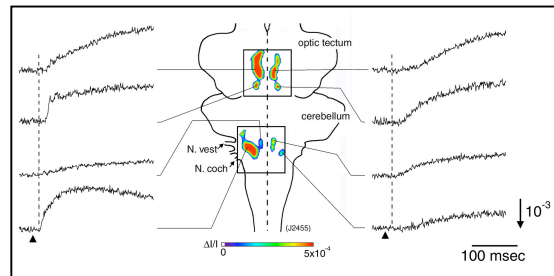
stage	preparation	Nuclei Magnocellularis (Area I)		Nuclei angularis (Area III)		Nuclei laminaris (Area IIc)		Nuclei lemnisci lateralis (Area Vc)		Cerebellum (Area IV)	
		ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral
6 day	J2451										
	J2451										
	J2454	x									
	J2410	x									
	J2449										
7 day	J2332	x									
	J2396	x									
	J2447	x									
	J2762	x									
8 day	J2336	x									
	J2365	x									
	J2416	x									
	J2450	x									
	J2456	x									
	J2765	x									

x EPSP (+)
x EPSP (-)
 () out of detected area

ら、各神経核におけるシナプス伝達の発現時期は、これまで孵卵10-11日位と考えられていたが、実際にはそれよりもかなり早いことが明らかとなった。

3) 前庭神経関連核の機能発達

一方、第VIII脳神経には、蝸牛神経の他に前庭神経が含まれており、前庭動眼反射の入力路となっている。そこで、前庭神経の電気刺激により脳幹内に誘発される神経応答の検出を試みた。



上図は、孵卵8日の鶏胚脳幹標本で、前庭神経のうち頭側の枝を電気刺激したときに得られた光学応答を示したものである。電気刺激により、前庭神経核に加えて、動眼神経核、滑車神経核、外転神経核に対応する領域からシグナルが得られていることがわかる。また、左上図の図と比べて、蝸牛神経刺激と前庭神経刺激とでは、応答領域が異なることが明らかとなった。

前庭神経関連核におけるシナプス伝達の機能発生がいつから、どのようにして起こるのか、また、それは、前庭神経の枝によって差があるのか、応答領域はどうか、といった点に関しては、今後さらに検討する必要がある。

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)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kinoshita, M. (2007) Spontaneous depolarization waves of multiple origins in the embryonic rat CNS. **European Journal of Neuroscience** 25, 929-944. (査読有)
- ② Sato, K., Kinoshita, M. and Momose-Sato, Y. (2007) Optical mapping of spatiotemporal emergence of functional synaptic connections in the embryonic chick olfactory pathway. **Neuroscience** 144, 1334-1346. (査読有)
- ③ Momose-Sato, Y., Kinoshita, M. and Sato, K. (2007) Development of vagal afferent projections circumflex to the obex in the embryonic chick brainstem visualized with voltage-sensitive dye recording. **Neuroscience** 148, 140-150. (査読有)
- ④ Momose-Sato, Y., Kinoshita, M. and Sato, K. (2007) GABA-induced intracellular Ca^{2+} elevation in the embryonic chick brainstem slice. **Neuroscience Letters** 411, 42-46. (査読有)
- ⑤ Momose-Sato, Y., Kinoshita, M. and Sato, K. (2007) Embryogenetic expression of glossopharyngeal and vagal excitability in the chick brainstem as revealed by voltage-sensitive dye recording. **Neuroscience Letters** 423, 138-142. (査読有)
- ⑥ Sasaki, T., Nariai, T., Maehara, T., Sato, K., Oda, K. and Ishii, K. (2007) A comparative study of bioradiography in human brain slices and preoperative PET imaging. **Brain Research** 1142, 19-27. (査読有)
- ⑦ Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2008) Optical analysis of neural circuit formation in the embryonic brain. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 35, 706-713. (査読有)
- ⑧ Glover, J. C., Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2008) Using voltage-sensitive dye recording to image the functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. **Developmental Neurobiology** 68, 804-816. (査読有)

⑨ Wang, S., Sato, K., Giurfa, M. and Zhang, S. (2008) Processing of sting pheromone and its components in the antennal lobe of the worker honeybee. **Journal of Insect physiology** 54, 833-841. (査読有)

⑩ Momose-Sato, Y., Mochida, H. and Kinoshita, M. (2009) Origin of the earliest correlated neuronal activity in the chick embryo revealed by optical imaging with voltage-sensitive dyes. **European Journal of Neuroscience** 29, 1-13. (査読有)

⑪ Mochida, H., Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2009) Switching of the transmitters that mediate hindbrain correlated activity in the chick embryo. **European Journal of Neuroscience** 29, 14-30. (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

① Momose-Sato, Y., Kinoshita, M. and Sato, K. Depolarization waves in the embryonic CNS visualized with voltage-sensitive dye imaging. 7th IBRO World Congress of Neuroscience. July 12-17, 2007, Melbourne, Australia.

② Sato, K., Kinoshita, M. and Momose-Sato, Y. Development of vagal afferent projections circumflex to the obex in the embryonic chick brainstem visualized with voltage-sensitive dye recording. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. November 3-7, 2007, San Diego, USA.

③ Momose-Sato, Y., Mochida, H., Kinoshita, M. and Sato, K. The origin of the depolarization wave at an early phase of the chick development revealed by optical imaging with a voltage-sensitive dye. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. November 3-7, 2007, San Diego, USA.

④ Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K. Regulation of spontaneous rhythmic activities in the caudal medulla by the spinal cord in the chick embryo. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. November 3-7, 2007, San Diego, USA.

⑤ Inaji, M., Nariai, T., Sato, K., Momose-Sato, Y., Maehara, T. and Ohno, K. Intraoperative intrinsic optical imaging in brain tumor surgery. 6th Congress of the Asian Society for Stereotactic, Functional and Computer Assisted

Neurosurgery. May 22-24, 2007, Fujiyoshida, Japan.

⑥ Nariai, T., Sato, K., Maehara, T., Inaji, M., Hosoda, C., Ishii, K. and Ohno, K. Optical signal of human cerebral cortex induced by sound stimulation as monitoring tool of parasympathetic structure of dominant hemisphere. The 13th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping. June 10-14, 2007, Chicago, USA.

⑦ Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K. Regional gradient of neuronal excitability to generate spontaneous activity in the hindbrain of the chick embryo. 6th FENS Forum of European Neuroscience. July 12-16, 2008, Geneva, Switzerland.

⑧ Sato, K. and Momose-Sato, Y. Functional organization of the glossopharyngeal and vagus nerve-related nuclei in the embryonic rat brainstem: Optical mapping with voltage-sensitive dyes. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

⑨ Momose-Sato, Y., Mochida, H. and Sato, K. Switching of the transmitters that mediate hindbrain correlated activity in the chick embryo. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

⑩ Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K. Neuronal excitability to generate spontaneous activity in the medulla and spinal cord of the chick embryo. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

⑪ Maehara, T., Inaji, M., Nariai, T., Sato, K. and Ohno, K. Application of intraoperative intrinsic optical imaging in epilepsy surgery. American Epilepsy Society 62nd Annual Meeting. December 5-9, 2008, Seattle, USA.

⑫ 佐藤勝重, Glover J. C., 佐藤容子: 光学的イメージング法による鶏胚聴覚神経回路網の機能発達過程の解析. 2007年3月20-22日 第84回日本生理学会 (大阪)

⑬ 佐藤容子, 佐藤勝重, 木下雅恵: ラット胚中枢神経系における自発性脱分極波の origin の光学的解析. 2007年3月20-22日

第84回日本生理学会 (大阪)

⑭ 佐藤勝重, Glover J. C., 佐藤容子: 鶏胚脳幹聴覚神経回路網の機能発達過程の光学的解析. 2007年9月10-12日 第30回日本神経科学学会 (横浜)

⑮ 佐藤容子, 佐藤勝重, 木下雅恵: ラット胚中枢神経系における自発興奮波の時空間パターンと origin の同定: 光学的イメージングによる解析. 2007年9月10-12日 第30回日本神経科学学会 (横浜)

⑯ 稲次基希, 佐藤勝重, 成相直, 百瀬-佐藤容子, 大野喜久郎: ラット皮質線条体における膜電位感受性色素による神経伝達イメージング. 2007年9月10-12日 第30回日本神経科学学会 (横浜)

⑰ 中森智啓, 佐藤勝重, 田中光一, 浜崎浩子: Chick 終脳における刷り込み成立に伴う神経回路活性の解析. 2007年9月10-12日 第30回日本神経科学学会 (横浜)

⑱ 佐藤勝重, 木下雅恵, 佐藤容子: 鶏胚脳幹迷走神経回路網の機能発達過程の光学的解析. 2008年3月25-27日 第85回日本生理学会 (東京)

⑲ 佐藤容子, 持田啓, 木下雅恵, 佐藤勝重: 鶏胚中枢神経系における脱分極波の origin の同定: 光学的イメージングによる解析. 2008年3月25-27日 第85回日本生理学会 (東京)

⑳ 佐藤勝重: 初期胚脳幹における機能的神経回路網形成に対する光学的アプローチ. 2008年3月25-27日 第85回日本生理学会 (東京)

㉑ 佐藤勝重, 木下雅恵, 佐藤容子: 鶏胚脳幹における迷走神経求心線維の機能発達過程の光学的解析. 2008年7月9-11日 第30回日本神経科学学会 (東京)

㉒ 佐藤容子, 持田啓, 木下雅恵, 佐藤勝重: 光学的イメージングによる鶏胚中枢神経系における脱分極波の origin の同定. 2008年7月9-11日 第30回日本神経科学学会 (東京)

㉓ 木下雅恵, 佐藤容子, 佐藤勝重: 鶏胚後脳における神経興奮性の部位差. 2008年7月9-11日 第30回日本神経科学学会 (東京)

〔図書〕（計 1 件）

① Maekawa, F., Sato, K. and Ohki-Hamazaki, H.
Approaches to the visualization of neural
pathways in chick imprinting. In: **Neural
Pathways: New Research**. Ed. Columbus, F.
Nova Science Publishers, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 勝重 (SATO KATSUSHIGE)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師
研究者番号：80291342

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 容子 (SATO YOKO)
関東学院大学・人間環境学部・教授
研究者番号：70251501