

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500281

研究課題名(和文) 逐次経頭蓋電気刺激法によるマウス頭頂連合野の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the mouse parietal association cortex by sequential transcranial electrical stimulation

研究代表者

菱田 竜一 (HISHIDA RYUICHI)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：90313551

研究成果の概要(和文)：私たちは、マウスでの経頭蓋電気刺激法を開発し、それを使って大脳皮質一次感覚野からマルチモダルな連合野へとつながる皮質経路を解析した。この方法で誘起した神経活動は、経頭蓋フラビン蛋白質蛍光イメージングにより検出し、一次感覚野からの皮質経路は、この刺激法を逐次用いることで追跡した。解析によって、各モダリティの感覚情報は視覚野・体性感覚野・聴覚野に囲まれた2野に集まり、そこから頭頂の連合野へと送られることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We developed a transcranial electrical stimulation technique to investigate cortical pathways linking primary to multimodal sensory association areas in mice. The evoked cortical responses by this method were revealed by transcranial flavoprotein fluorescence imaging. Cortical pathways arising from primary sensory areas were tracked by sequential applications of this technique. The results indicate that area 2, surrounded by visual, somatosensory and auditory cortices, receives input from all three primary sensory areas, and projects to the parietal association cortex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：フラビン蛋白質蛍光イメージング、in vivo、大脳皮質、領野間機能的結合、マルチモダリティ、連合野、高次領野、マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 大脳皮質高次感覚野

高次感覚野は、異なるモダリティの感覚情報の統合や、逆行的に一次感覚野の修飾をおこなうとされているが、その詳しいメカニズムはよく分かっていない。そこで研究代表者のグループは、分子機構の解析が容易な齧歯類を用いて高次感覚野の機能とそのメカニ

ズムの解明に取り組んできた。

(2) フラビン蛋白質蛍光イメージング

この問題に取り組むにあたり、研究代表者らのグループでは、フラビン蛋白質蛍光イメージング(ミトコンドリア酸素代謝とカップリングしたフラビン蛋白質の自家蛍光を使った脳機能イメージング)という新しい手法

を開発し、主要な研究手段として大脳皮質の解析をおこなってきた。脳切片における *in vitro* イメージングでは、領野間の機能結合の特性や可塑性を解析してきた。また、麻酔動物における *in vivo* イメージングでは、聴覚野・体性感覚野・視覚野の特性や経験依存的可塑性を明らかにしてきた。これらの研究により、大脳皮質の神経活動を、簡便かつ再現性高く定量的に測定できる方法として、フラビン蛋白質蛍光イメージングを発展させてきた。特にマウスの場合、頭蓋骨の透明度が高く、経頭蓋イメージングが可能であり、通常は難易度が高いとされるイメージング実験を、簡便かつ脳への侵襲も少ないものに行うことができる。我々は、このマウスの経頭蓋イメージングが特に有効な手法であることを実証してきた。

(3) 高次感覚野のイメージング

ところが、高次感覚野の経頭蓋イメージングは、自然刺激を用いる限り困難である。その理由は、麻酔により高次感覚野の反応性が低下し、さらには高次感覚野を活性化させる至適刺激が不明であることによる。しかし、脳切片における *in vitro* イメージングでは、一次感覚野とその周辺の高次領野との機能結合を、電気刺激を用いることで活性化し、その機能の一端を解析することができる。そこで麻酔動物の経頭蓋イメージングにおいても、電気刺激により一次感覚野と高次感覚野をつなぐ機能結合を活性化させれば、高次感覚野の機能の手がかりが得られるのではないかと期待した。

2. 研究の目的

(1) 経頭蓋電気刺激法の確立

一般に大脳皮質を電気刺激するには、従来の方法(図1左)では、頭蓋骨に穴を開け、電極を皮質に刺入する必要があるが、経頭蓋イメージングと両立しない。そこで頭蓋骨に穴を開けない経頭蓋電気刺激法を試みた(図1右)。まず、歯科用ドリルの刃でマウス頭蓋骨を削り、わずかな力で歪曲するまで薄くした。そこへ先端を丸めた太目の電極を、頭蓋骨に押し当て、圧力を加えると、頭蓋骨と脳実質の間のスペースが変形し、電極が薄い頭蓋骨を介して大脳皮質に接する。この状態で電流を流すと、脳脊髄液に拡散せずに、電極→頭蓋骨→大脳皮質へと刺激電流が流れると考えた。実際、予備実験をおこなったところ、刺激部位付近の大脳皮質を活性化することができた。

この経頭蓋電気刺激法の特性を調べ、手法として確立するとともに、大脳皮質領野間の機能的結合の活性化に適切な方法であるかを調べることにした。

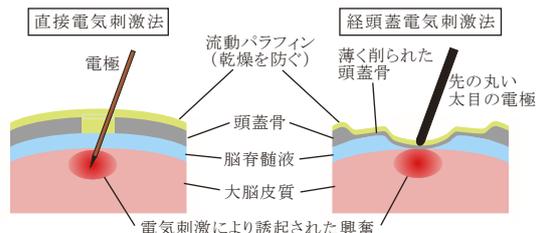


図1 大脳皮質を電気刺激する2つの方法

(2) 感覚情報伝達の大脳皮質マップの作製
経頭蓋電気刺激法では刺激電極の位置を容易に何回も変更できるので、一次感覚野から複雑な感覚情報処理システム全体を解析する、逐次経頭蓋電気刺激法という手法が可能である。

この手法を用いて、一次視覚野・一次体性感覚野・一次聴覚野から、様々な高次感覚野へと感覚情報が伝播する様相を明らかにし、全体の流れを俯瞰する機能マップを作製して、高次領野の機能に関する洞察を得ることにした。

(3) 頭頂連合野の生理的機能の解明

逐次経頭蓋電気刺激法を用いた予備実験をおこなったところ、複数の一次感覚野からの機能投射は頭頂連合野に収束するらしいことを見いだした。霊長類の頭頂連合野は、異なるモダリティの感覚情報を統合し、空間認知・記憶・学習を担うとされているので、これに相当するような機能をマウスの頭頂連合野も有するかもしれないと考え、検証することにした。

研究代表者のグループの吉武らは、プリズム装着による斜視マウスの視覚野応答を解析した。その結果、プリズム斜視により視覚野の応答が減弱するが、ヒゲが予め切除されたマウスではこの減弱が生じないことを見いだした。この結果は、ヒゲによる空間情報と視覚による空間情報とがプリズムにより食い違った場合、視覚情報が抑圧されるが、ヒゲを切ったマウスではヒゲ情報が入力されないため、この抑圧が生じないことを示唆している。このような視覚情報とヒゲ情報の干渉が生ずるためには視覚情報とヒゲ情報という2つの空間情報を統合する脳部位が必要だと考え、両者が収束する頭頂連合野は視覚情報とヒゲ情報の統合を担っているのではないかと推測した。そこで、この仮説の是非を調べることにした。

3. 研究の方法

本研究は、新潟大学動物実験指針に基づいておこなった。

①手術

マウスはウレタン(1.65 g/kg, i.p.)で麻酔した。局所麻酔(bupivacaine)を注入後、頭蓋骨

上の皮膚と左側の側頭筋を切除した。歯科用レジンをを用いて右頭蓋骨に金具を接着し、頭部を固定した。左頭蓋骨は歯科用ドリルの刃を使って削り、わずかな力で歪曲するまで薄くした。その後、表面を流動パラフィンで覆うことで乾燥を防ぎ、頭蓋骨の透明度を維持した。

②麻酔下マウスのイメージング

イメージング実験は麻酔開始から1時間以上経過してから始めた。マウスを $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 傾け、左半球の視覚野・体性感覚野・聴覚野を蛍光実体顕微鏡の視野に収めた。75ワットのキセノンランプを光源とする青色光($\lambda=470\text{-}490\text{ nm}$)で励起し、得られた緑色蛍光画像($\lambda=500\text{-}550\text{ nm}$, $128\times 168\text{ pixels}$)を、冷却 CCD カメラ(浜松ホトニクス ORCA-ER)を使って毎秒7コマの速度で60コマ取り込んだ。画像を滑らかにするため、 $5\times 5\text{ pixel}$ の空間フィルターをかけた。20-60秒間隔で20セットの画像を取り込み、平均加算した。その画像を刺激直前の3枚の画像の平均で割るという正規化をピクセル毎におこなった。

③自然刺激による一次感覚野のマッピング

一次視覚野は赤色LEDを使って刺激した。LEDはマウスから30センチ離れた水平面に設置した。LEDを1秒間点灯して、オン反応を記録した。一次体性感覚野のバレル野は、ガルバノメーターで10ヘルツの振動刺激を何本かのヒゲに1秒間与えておこなった。前肢・後肢に相当する大脳皮質領野は、2極電極を用いて前肢・後肢の皮膚に電気刺激($500\text{ }\mu\text{A}\cdot 200\text{ }\mu\text{s}$ の2相性電流を10ヘルツで3発)を与えて可視化した。一次聴覚野は5-20 kHzのAM音を使って刺激した。音の持続時間は0.5秒、音圧は60 dB SPLを用いた。

④大脳皮質の電気刺激

大脳皮質に、 $50\text{-}600\text{ }\mu\text{A}\cdot 200\text{ }\mu\text{s}$ の2相性電流を10ヘルツで10発加えた。経頭蓋電気刺激法では、縫い針や先を尖らせた針金を電極として用いた。直接電気刺激法では、タングステン電極を用いた。グラント電極は側頭筋に設置した。

⑤スライスの調整

マウスをエーテルで深く麻酔して断頭した後、氷冷した生理食塩水中に脳を取り出した。マイクロスライサー(Dosaka, DTK-2000)を使って、一次視覚野と一次聴覚野含む厚さ $500\text{ }\mu\text{m}$ の冠状スライスを切り出した。そのスライスを生理食塩水中で1時間以上培養した後、実験に使用した。

⑥スライスのイメージング

酸素ガスで飽和した生理食塩水を $0.8\text{-}1.1\text{ ml/min}$ の速度で還流したチャンバーの中に、ポリテトラフルオロエチレン膜を設置した。その膜上に置いたスライスを倒立顕微鏡で

観察した。青色光($\lambda=470\text{-}490\text{ nm}$)で励起し、得られた緑色蛍光画像($\lambda=500\text{-}550\text{ nm}$)を、冷却 CCD カメラ(浜松ホトニクス HiSCA)を使って毎秒2コマの速度で40コマ取り込んだ。2分間隔で5セットの画像を取り込み、平均加算した。

⑦スライスの電気刺激

刺激電極には、テフロンコートした白金線(金属部分直径 $50\text{ }\mu\text{m}$)を用いた。白金線の切断面をスライス表面に置き、 $100\text{ }\mu\text{A}\cdot 200\text{ }\mu\text{s}$ の2相性電流を10ヘルツで20発加えた。

4. 研究成果

(1) 経頭蓋電気刺激法の特性

①刺激電極の形状

適切な電極を選択するため、幾つかの形状の電極を使って経頭蓋電気刺激をおこない、比較検討した(図2)。

先端のとがった縫い針は骨を貫通してしまい、皮質を刺激できなかった。先端を砥石で鈍らした縫い針は、効果的に刺激することができた。太さ1mmの針金では、刺激できるものの、低い電流密度のため効率が低く、太い形状がイメージングの邪魔になった。以上から、経頭蓋電気刺激法には先端を鈍らした縫い針が最適であるとの結論を得た。

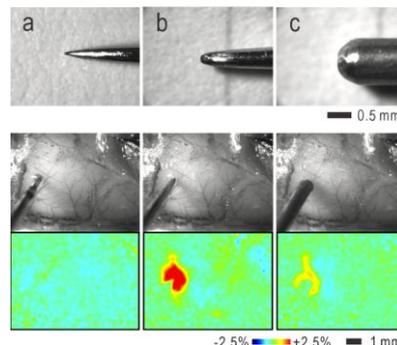


図2 電極の形状と誘起された反応

②経頭蓋電気刺激法の特性

従来の方法である直接電気刺激法と比較して、経頭蓋電気刺激法の特性を調べた。

まず、刺激強度と反応との関係を比較した(図3)。様々な刺激強度を皮質に加え、それによって誘起された神経活動を計測し、刺激効率の差異を明らかにした。経頭蓋電気刺激法では、直接電気刺激法と同程度の反応を得るには、より大きな電流強度が必要であることが分かった。

次に、誘起された神経活動の空間分布パターンと経時変化について比較した(図4)。一次視覚野中央付近を直接電気刺激法および経頭蓋電気刺激法で刺激し、その反応を計測した。刺激効率の差異は、刺激強度に差をつけることで補正した。電気刺激により誘起さ

れた神経活動の皮質上での広がり方と時間経過は、経頭蓋電気刺激法と直接電気刺激法とで大きな差異は見られなかった。

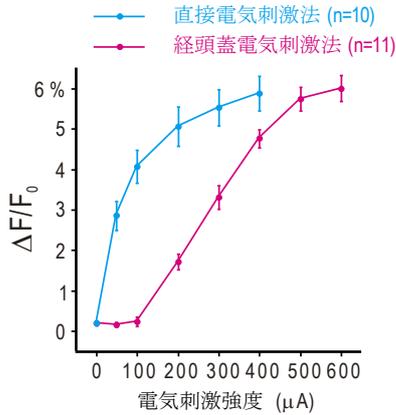


図3 刺激強度と反応との関係

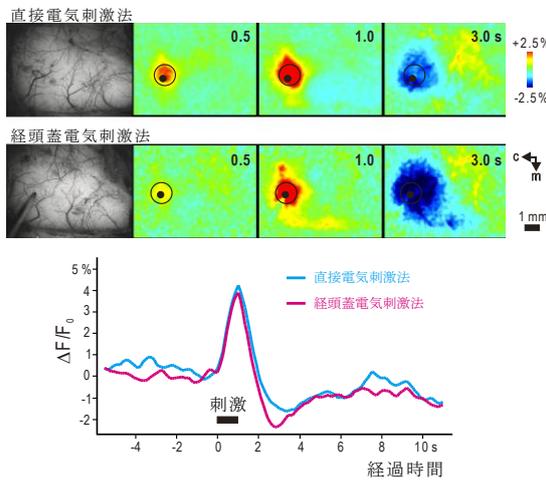


図4 2つの電気刺激法の比較

③ 経頭蓋電気刺激法の刺激層

経頭蓋電気刺激法で主に刺激される皮質層を特定するため、浅い層または深い層に電極を刺入した直接電気刺激と、誘起された神経活動の空間分布パターンについて比較した(図5)。

直接電気刺激法で一次視覚野中央付近を刺激した。II/III層を刺激した場合に比べ、V層を刺激した時には神経活動の誘起は顕著な広がりを見せた。同様の傾向は、スライスを用いた実験でも観察された。一方、経頭蓋電気刺激法で同部位を刺激した時に見られた活動の空間パターンは、II/III層を刺激した時と類似していた。従って、経頭蓋電気刺激法は、大脳皮質の浅い層・II/III層を主に刺激していると結論できた。

一般に、大脳皮質の異なる領野にはII/III層の錐体細胞から投射されているとされて

いる。従って、II/III層を主に刺激する経頭蓋電気刺激法は、大脳皮質領野間の機能的結合を刺激・可視化するのに適した方法であると考えられる。

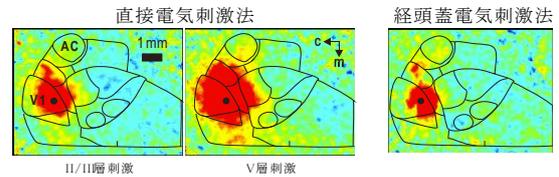


図5 経頭蓋電気刺激法の主たる刺激層

④ 可視化された機能的結合の薬理学的特性

経頭蓋電気刺激法によって可視化された機能的結合の基本的特性を調べた。その機能的結合を含むスライスを調整し、*in vitro* イメージングを用いた薬理学的実験によって、その結合のグルタミン酸受容体依存性を調べた(図6)。

一次視覚野の外側・内側に位置する二次視覚野IV2とmV2が互いに投射していることを経頭蓋電気刺激法によって明らかにしたが、同部位を切り出したスライスにおいても、相互への結合を可視化することができた。そのスライスイメージングにおいて、グルタミン酸受容体のアンタゴニストCNQXを投与すると、相互への活動伝播が消失したことから、IV2・mV2間の機能的結合はグルタミン酸依存性であることが分かった。

以上から、グルタミン酸依存性な皮質内機能的結合を経頭蓋電気刺激法によって可視化できることが実証できた。

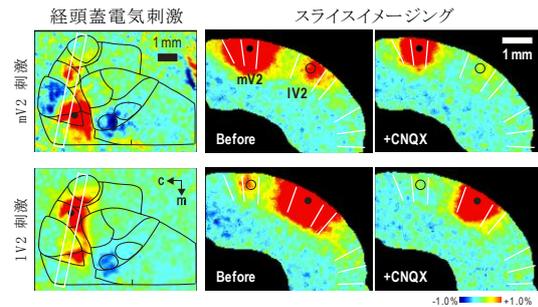


図6 可視化された機能的結合の薬事学的性質

(2) 感覚情報伝達経路の探索

初めに、各モダリティの自然刺激により、各一次感覚野をマップした。次に、一次感覚野を経頭蓋電気刺激して誘起された神経活動を記録した。『その後、伝播した活動部位に電極を移し、同じく電気刺激して活動を記録した。』以降、『』で囲まれた操作を繰り返す逐次経頭蓋電気刺激法をおこない、感覚情報の伝播経路を調べた。

まず、視覚情報の皮質内伝達経路を解析した(図7)。一次視覚野 V1 を刺激したところ、外側と内側の二次視覚野 IV2 と mV2 に活動が伝播した。IV2 および mV2 に電極を移して刺激すると、IV2・mV2 間の相互結合が可視化された他に、活動の一部が2野へと伝播することが明らかになった。

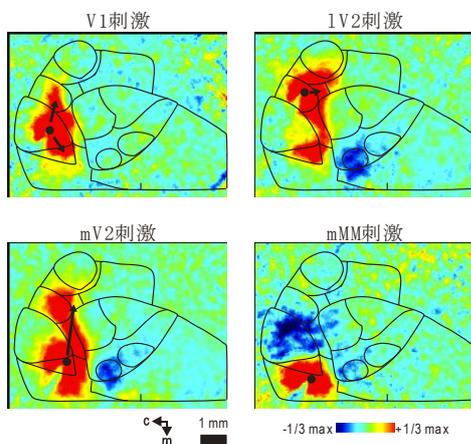


図7 逐次経頭蓋電気刺激法による視覚情報伝達経路の解析

同様の実験を、一次体性感覚野と一次聴覚野を起点としておこなった。一次体性感覚野のバレル野・前肢・後肢および一次聴覚野から2野への伝播が観察できた(図8)。

以上の結果から、視覚・聴覚・体性感覚野という3つの異なるモダリティの感覚情報は、視覚野・聴覚野・体性感覚野に囲まれた2野に収束することが明らかになり、2野がマルチモデルな統合に機能していることが示唆された。

次に、2野からの伝達経路を解析するため、2野を起点とした逐次経頭蓋電気刺激法をおこなった(図8)。2野からは内側の頭頂連合野へと活動は伝播し、さらにその後は正中線に沿って前方の前頭葉へと伝播した。また、2野と頭頂連合野は相互に投射していた。この結果は、両者の機能が互いに関連していることを示しているのかもしれない。以上より、異なるモダリティの感覚情報を2野および頭頂連合野が受け取ることから、霊長類の頭頂連合野と同様に、マウスの頭頂連合野も感覚情報を統合して空間認知・記憶・学習などの機能を持つかもしれないという示唆を得られた。

(3) 空間認知に機能するマウス頭頂連合野

頭頂連合野を破壊、その機能を損傷させたマウスと、何も処置をしていないマウスとに、プリズムを装着した。1週間の飼育の後、LED光刺激に対する一次視覚野の応答をイメージングによって定量した。

抑圧の程度を比較したところ、頭頂連合野を破壊したマウスでは視覚野応答抑圧が見られなかった。従って、マウス頭頂連合野には、異なるモダリティの感覚情報を統合して空間を認知する機能があるという結果が得られた。つまり、霊長類の頭頂連合野の機能の少なくとも一部については、マウス頭頂連合野も相同な機能を持っていると考えられる。

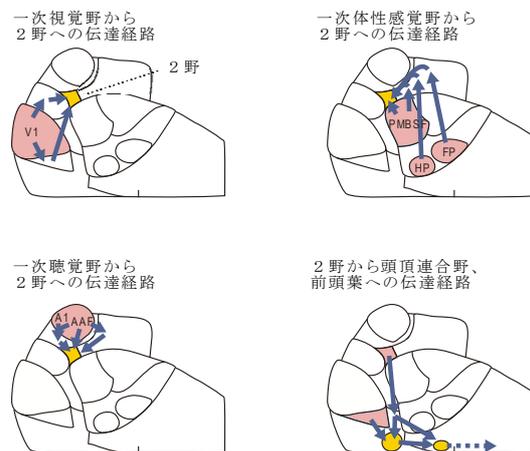


図8 感覚情報の伝達経路

(4) まとめ

高次領野の機能とそのメカニズムを解析していくうえで、遺伝子改変動物を利用しやすいという利点を持つモデル生物・マウスは大変有用な実験対象である。ところが意外なことに、マウスの神経解剖学的な知見は驚くほど少なく、感覚情報の大脳皮質経路も明らかにされていなかった。おそらくはその小ささ故、より大きな齧歯類・ラットが解析の対象に古くから選択されてきたからだと思われる。もちろん同じ齧歯類であるので、解剖学的にはマウスとラットはよく似ていると期待できる。しかし、マウスを使った解析を進めていくには、マウスの神経解剖学的知見をおさえることが必要である。本研究で確立した経頭蓋電気刺激法は、フラビン蛋白質蛍光イメージングと組み合わせることで、非常に簡便に皮質内の機能的結合を可視化することで、本研究でも実証したように、マウスの神経解剖学的知見の穴を素早く埋めることができる。この方法を利用することで、高次感覚野の機能とそのメカニズムの解明という研究が、今後さらに発展することが期待できる。

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 9 件)

- ① Komagata S, Chen S, Suzuki A, Yamashita H, Hishida R, Maeda T, Shibata M, Shibuki K. Initial phase of neuropathic pain within a few hours after nerve injury in mice. J Neurosci, vol. 31, 4896-4905, 2011. 査読有
- ② Watanabe K, Kamatani D, Hishida R, Shibuki K. Timing-dependent effects of whisker trimming in thalamocortical slices including the mouse barrel cortex. Brain Res, vol. 1385, 93-106, 2011. 査読有
- ③ Komagata S, Tamaki K, Hishida R, Takeshita N, Shibuki K. Nociceptive cortical responses during capsaicin-induced tactile allodynia in mice with spinal dorsal column lesioning. Neurosci Res, vol. 69, 348-351, 2011. 査読有
- ④ Ohshima S, Tsukano H, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K. Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning. Neurosci Res, vol. 67, 51-58, 2010. 査読有
- ⑤ Kitaura H, Hishida R, Shibuki K. Transcranial imaging of somatotopic map plasticity after tail cut in mice. Brain Res, vol. 1319, 54-59, 2010. 査読有
- ⑥ Tohmi M, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Shibuki K. Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of mouse cortical activity and plasticity. J Neurochem, vol. 109 Suppl s1, 3-9, 2009. 査読有
- ⑦ 澁木克栄、吉武講平、駒形成司、塚野浩明、大島伸介、渡邊健児、任海学、菱田竜一。マウス大脳皮質感覚野の経験による修飾。生体の科学、60巻、75-80頁、2009、金原書店。査読なし
- ⑧ Kubota Y, Kamatani D, Tsukano H, Ohshima S, Takahashi K, Hishida R, Kudoh M, Takahashi S, Shibuki K. Transcranial photo-inactivation of neural activities in the mouse auditory cortex. Neurosci Res, vol. 60, 422-430, 2008. 査読有
- ⑨ 澁木克栄、駒形成司、吉武講平、塚野浩明、菱田竜一。感覚野経験依存的可塑性の経頭蓋蛍光イメージング。「蛋白質核酸酵素」増刊号、53巻、512-517頁、2008、共立出版。査読なし

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① 菱田竜一、渡邊健児、工藤雅治、澁木克

栄。逐次経頭蓋電気刺激法によって明らかにされたマウス一次感覚野から連合野への情報集積。日本神経学会、名古屋国際会議場、2009年9月。

- ② Hishida R, Watanabe K, Kudoh M, Shibuki K. Cortical pathways from the primary sensory areas to multimodal association cortices revealed by sequential transcranial stimulation in mice. 36th International Congress of Physiological Science, Kyoto in Japan, July, 2009.
- ③ Hishida R, Shibuki K. Sequential transcranial electrical stimulation revealed cortico-cortical connections from the visual cortex to the auditory cortex in anesthetized mice. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting, Washington in USA, November, 2008.
- ④ 菱田竜一、澁木克栄。経頭蓋電気刺激を用いた麻酔下マウス高次視覚野から一次聴覚野への機能的結合のイメージング。日本神経学会、東京国際フォーラム、2008年7月。

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Shibuki K, Hishida R, Tohmi M, Takahashi K, Kitaura H, Kubota Y. Flavoprotein fluorescence imaging of experience-dependent cortical plasticity in rodents. (in) In vivo optical imaging of brain function 2nd Edition (Frostig R ed). CRC Press, New York, pp193-220, 2009. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~physio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱田 竜一 (HISHIDA RYUICHI)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：90313551

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：