

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700389

研究課題名（和文）扁桃体ネットワークの動作機構と投射様式の同時可視化解析
～嗅覚系を中心として～

研究課題名（英文）Visualization analysis of network physiology and anatomy of the amygdala - focusing on olfaction -

研究代表者

梶原 利一（KAJIWARA RIICHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：60356772

研究成果の概要（和文）：扁桃体ネットワークの機能構造を明らかにするため、モルモット単離脳を用いた光計測システムを構築した。これを用いて嗅覚神経刺激により誘導される神経興奮伝播パターンの刺激強度と刺激周波数依存性を明らかにした。また、多点電極から記録された集合電位波形を用いて電流源密度解析を行い、扁桃体皮質深部の信号伝播のしくみの一部を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to reveal the functional organization of the amygdaloid network, we developed the optical recording system using a guinea pig isolated whole brain. By using this experimental setup, we analyzed the dependency of stimulus intensity and frequency on the spatiotemporal patterns of the neural activity evoked by the electrical shock to olfactory nerve. In addition to the imaging study, laminar profiles of evoked field potentials were recorded in the amygdala using a multichannel silicon probe. Current source density analysis performed on the field responses revealed the propagation pattern of the neural activity in the deep structure of the amygdaloid cortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 / 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網，神経活動イメージング，扁桃体，嗅内皮質，梨状皮質，嗅覚

1. 研究開始当初の背景

扁桃体の垂核の内，嗅覚系の直接的な神経

支配を受ける扁桃体皮質核は，入力してくる嗅覚情報を基底外側核へと受け渡す。嗅覚情報は，この基底外側核において，他の感覚情

報や海馬からの記憶関連情報と関連付けられると考えられている。

しかし最近になり、皮質核が扁桃体の情報処理に積極的に関与している可能性も示唆されるようになってきた。Sevelingesらは、嗅覚入力と嫌悪刺激(体性感覚)の連合学習モデル動物を用いて集合電位解析を行い、条件付けの最中に扁桃体皮質核の神経応答だけが顕著に増大し、この増大が長時間持続する事を示した(Sevelinges et al., *Learn Mem* 2004)。また我々は、モルモット単離脳標本という特殊な *in vitro* 脳標本で神経活動イメージングを行い、扁桃体皮質核は嗅索を介して送り込まれる嗅覚情報を受け取るだけでなく、これと並列的に海馬体に送られ処理された情報を統合しうる領域である事を示した(Kajiwara et al., *Eur J Neurosci* 2007)。

これらの現象などから我々は、扁桃体皮質核が、嗅覚情報の一時的な保持や、基底外側核や視床下部への情報伝達ゲーティングといった機能において、重要な役割を果たしているのではないかと考えた。たとえば、皮質核は、嗅索から受ける入力パターンが変化したり、海馬体から連合入力を受けたりする事により、活動パターンが長期間大きく変化するような可塑性(情報の保持機能)や、活動様式の違いにより、基底外側核や視床下部の活動の大きさに影響を与える機構(情報伝達ゲート機構)を有しているという仮説である。既存の実験系でこの仮説を検証しようとすると、脳深部の応答を測る事が出来ない、つまり皮質核から次の情報伝達先(投射先)を知る事ができないという問題があるので、まず、脳深部計測や投射先の可視化などの方法による問題解決が必要と考えられた。

2. 研究の目的

空間的に張り巡らされた神経ネットワークの動作と神経投射様式を同時に解析できる実験系を新たに構築し、これにより嗅覚系における扁桃体の機能構造に関する仮説を検証する事を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験系の新規構築

これまで使用してきた膜電位イメージング専用タンデム型光学系には、接眼鏡筒およびフィルタターレットが設置されていない為、標本作製や電極配置作業の際は、別の実体顕微鏡を準備しなければならない、実験中の光学フィルターの交換が極めて困難、といった問題点があった。これら問題点を解決できる光学系を開発する。

(2) 膜電位イメージング

Hartley系モルモットから作製した単離脳標本において、嗅球の出力繊維(LOT)への電気刺激により惹起される嗅覚ネットワークの神経応答パターンを、膜電位イメージング法を用いて解析する。

(3) 多点集合電位計測

脳深部の神経応答計測を、16chシリコンプローブ電極により行う。記録した波形の電流源密度解析(CSD解析)を行い、扁桃体皮質の深部における神経情報の流れを推定する。

(4) 神経投射様式の解析

モルモットを用いて、逆行性トレーサーを扁桃体基底外側核に注入し、扁桃体皮質における投射神経細胞の分布様式を解析する。

4. 研究成果

単離脳の作製、スムーズな電極配置操作、二波長蛍光観察、などが行える新規光学実験系を構築した。オリンパス社製 MVX10 顕微鏡をベースとし、シグマ光機製 XY ステージを加工した大型架台と一体化させたシステムとした(図1)。本システムでは、試料(単離脳)の位置を最大で 60mm 異動でき、かつ変倍ズーム機構が装備されている為、標本作製や電極のセットが極めてスムーズに行える。また、膜電位イメージングのみならず、他の蛍光試薬による神経細胞の可視化観察も行うことが可能である。

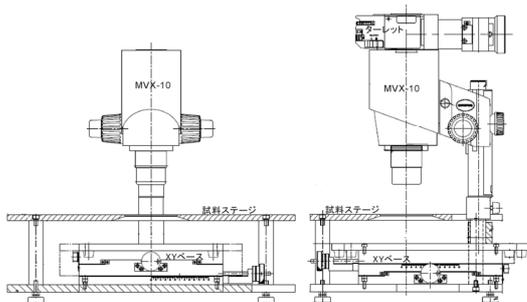


図1 構築した光学系の模式図

単離脳標本において外側嗅索(LOT)を刺激すると、神経興奮はまず前梨状皮質(APC)から後梨状皮質(PPC)へ伝播する。その後、神経興奮は内側径路を介して扁桃体皮質(AC)へ、外側経路を介して嗅内皮質(EC)へと伝播する。さらに、我々の過去の研究から、嗅内皮質に惹起された神経興奮は、吻側方向へ戻るように伝播し、扁桃体皮質を再び活性化させることもわかっている。この嗅覚系皮質の神経経路が、刺激強度に依存してどのように活性化されるのかを、単離脳の膜電位イメージングにより検証した結果、活性化される神経経路に大きな違いは認められなかった。しかし、刺激強度が強いほど、ACの興奮性は劇的に増大した。特にECを介した外側経路の影響が大きい特徴があった。また、刺激強度が極めて小さく、EC→ACの伝達経路が、ほとんど活性化されない場合でも、10Hzの繰り返し入力を与えられるとこの経路は活性化される事がわかった。

次に、脳深部の神経応答を解析する目的から、新たに脳深部多点神経応答記録・解析システム(図2)をMATLABにより開発した。

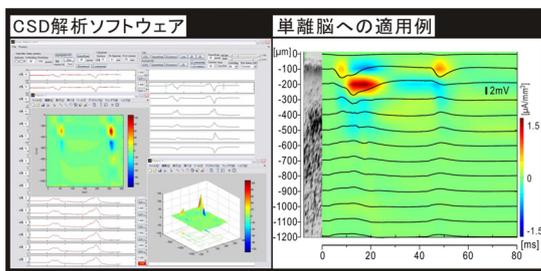


図2 開発したプログラムと解析結果例

このツールにより扁桃体皮質の深部の神経応答解析をおこなった結果、嗅球から扁桃体皮質への二つの神経経路のうち、梨状皮質

を介した経路は第I/II層上部に投射するが、嗅内皮質を介した経路については、第I/II層下部へ投射していることが判明した。また、繰り返し入力の影響を受けてシナプス電流の流入強度が顕著に増大する領域が第III層にある事も新たにわかった。更に、基底外側核の神経応答のピーク潜時は、皮質核の各層で惹起された神経応答の潜時よりも遅れていることから、嗅覚刺激による神経興奮は皮質核を経由して基底外側核へ到達することが推測された。これらの結果は現在論文として取りまとめ中である。

この情報の流れを解剖学的に検証する為、基底外側核への逆行性トレーサーNeuroDiIの圧注入をモルモットの脳において行った。200-300gのモルモット脳において、[A/P - 2.5 to - 3.5mm; M/L 7-7.5mm; (D/V) 7-8mm]の座標で、基底外側核におけるトレーサーの注入が確認できたが、皮質核において、予想していた程の数の投射細胞は確認できなかった。今後、注入量の増加や、トレーサーの種類と注入方式の変更など、プロトコルの大幅な改良を検討しなければならないと考えている。

本研究で目指したような嗅覚系ネットワークの機能構造に関する知見の蓄積は、たとえば、扁桃体や海馬に起因した精神疾患を、嗅覚異常により予見しようとする研究の基礎の確立という点において意義深いと考えられる。したがって、今回構築した単離脳実験システムは、とくに *in vivo* での計測が難しい後段の嗅覚系処理回路の研究を推し進める上で、極めて重要な役割を担うことが期待される。

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3件)

R. Kajiwara, T. Tominaga, I. Takashima, Enhancement of neural activities in the olfactory network induced by repetitive inputs to the olfactory nerve as revealed by voltage-sensitive dye imaging., *Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC:

Society for Neuroscience, 2010. Online., 査読無 , 2010, 479.15

I. Takashima, N, Kunori, R. Kajiwara. Voltage-sensitive dye imaging of piriform cortex activity in immature and mature guinea-pigs., *Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2010. Online.*, 査読無 , 2010, 816.20

梶原利一, 高島一郎, 単離脳標本による神経回路解析法, *BRAIN AND NERVE*, 査読無 , Vol.62 , 2010 , 243-254

〔学会発表〕(計3件)

I. Takashima, N, Kunori, R. Kajiwara. Voltage-sensitive dye imaging of piriform cortex activity in immature and mature guinea-pigs., *Neuroscience, 2010*. 2010年11月17日, San Diego

R. Kajiwara, T. Tominaga, I. Takashima, Enhancement of neural activities in the olfactory network induced by repetitive inputs to the olfactory nerve as revealed by voltage-sensitive dye imaging., *Neuroscience, 2010*. 2010年11月15日, San Diego

梶原利一, 記憶と情動の結びつけを可能にする神経機構～膜電位イメージング法による機能構造解析～, 第一回先端医療研究センター7T機能動態イメージングプロジェクト講演会, 2009年10月13日, 盛岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶原 利一 (KAJIWARA RIICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号 : 60356772