

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500423

研究課題名(和文) コモンマーモセットの電子アトラスの作成

研究課題名(英文) Web-based brain atlas of the common marmoset

研究代表者

徳野 博信 (TOKUNO, Hironobu)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・副参事研究員

研究者番号：40212071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：コモンマーモセットの脳および脊髄の組織画像データベースを作成し・広く公開した。現段階(2014年4月)のコンテンツとしては、成体の脳・脊髄・生後0日の脳が含まれ、補足的にフクロモモンガ脳、アカゲザルとニホンザルの脊髄の組織画像がアップロードされている。染色法としては、ニッスル、AChE染色、各種カルシウム結合タンパク質免疫染色、NeuN染色、各種トランスポーター染色などさまざまな染色法が用いられている。ズーム可能な総切片数は約3900、データ総量は290GBに及んでいる。データベースを基にしたアトラスの英文単行本も2冊出版され、国際的に高い評価を得ている。

研究成果の概要(英文)：We have established brain and spinal cord web atlas of the common marmoset. This internet-based database is available from all over the world (<http://marmoset-brain.org>). We have zoomable histological images of adult brains, adult spinal cord, and brains of postnatal day 0 on the database. Additionally, we have images of sugar glider brain and spinal cords of Rhesus and Japanese macaques. Used staining methods are Nissl, AChE histochemistry, immunostaining of various calcium binding proteins, NeuN, neurotransmitter transporters. The total numbers of sections is now about 3900, which correspond to 290GB in data size. Two atlas books have been published based on our image database.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：コモンマーモセット 脳 アトラス トランスポーター 免疫組織化学 バーチャルマイクロコピー  
インターネット データベース

## 1. 研究開始当初の背景

神経科学において高次の脳機能の研究には、ヒトに近縁の動物を用いた実験的研究が必要不可欠である。これまでわが国においては、主にニホンザルが主に用いられてきている。ところが、ニホンザルの入手について、動物愛護や環境保護の観点からのクレームが上がり、供給が不十分になった。この対策としてわれわれは 2004 年から実験動物の全面的な切り替えをおこない、小型霊長類であるコモンマーモセットの飼育を開始した。それは、さまざまな検討の結果、コモンマーモセットの以下に挙げる利点があるからである。

- (1) コモンマーモセットのメリット
- (2) 日本クレア社が実験動物として商業的に生産・販売しており、安定的に入手可能。
- (3) 繁殖・生育がクリーンな環境で行われており、人獣共通感染症の危険が少ない、ニホンザルでは、ヒトにとって致死的な B ウィルスが問題。
- (4) 体重が 350-450 g 程度で、飼育ケージや飼料等のコストが軽減される。
- (5) 性格が臆病でありヒトを攻撃して怪我をさせる危険が低い。
- (6) ヒトと同じ真猿類であり、ラットなどと違い視覚優位の動物である。
- (7) 脳のサイズはニホンザルに比べて小型であり、標準サイズのスライドグラスを用いることができ、組織標本の作製が容易で低コスト。
- (8) 繁殖効率がよく成長が速い。1ペアの親から 5 カ月おきに 2-3 頭の新生児が得られる。誕生後は 1-1.5 年程度で成体になる。ニホンザルでは年一産一子で成長に 4-5 年かかってしまう。
- (9) 遺伝子組み替えマーモセットの作出の成功が報告され、脳高次機能と遺伝子の関わりについての研究も、大きく進展している。

わが国においてのコモンマーモセットの神経科学における利用は、先に記したように 2004 年に申請者の研究室と、国立精神・神経センター神経研究所（小平）がほぼ同時期に開始している。その後、京都大学霊長類研究所（犬山）や理化学研究所分子イメージング研究プログラム（神戸）でも利用を開始している。また今後、理化学研究所脳科学総合研究センター（和光）自然科学研究機構基礎生物学研究所（岡崎）での大規模な利用が開始計画されている。各研究所での利用が広まることにより、将来は大学・企業などでの利用も飛躍的に伸びることも、見込まれる。今の段階でコモンマーモセットの実験利用の基盤整備を行うことは、将来我が国の神経科学さらにはライフサイエンスの発展のために意義のあることと考えられる。

## 2. 研究の目的

脳の実験的研究にはそのガイドとしての「地

図」、すなわち脳のアトラスが必要不可欠である。特定の脳の部位にアクセスするために、脳定位手術は解剖・生理・薬理的な実験のすべてにおいて日常的に行われており、その際にも常に脳のアトラスが参照される。Stephan らによるコモンマーモセットのアトラスは 1980 年に出版されているがすでに絶版であり、入手が困難である。また、Palazzi らが、近年新たなアトラスを出版したが、その内容はさほどすぐれてはいない。

本研究では、新たにコモンマーモセットの脳アトラスを整備し広く提供することが目的とした。現在の各種の最新の技術レベルをふまえて、以下のように古いタイプのアトラスとは一線を画したものを最終目標にした。

- (1) 従来の細胞構築を見るためのニッスル染色、化学構築を明らかにするための各種免疫染色や組織化学的染色をおこなう。
- (2) 組織標本をスキャンして、デジタルの画像データを作成する。
- (3) データの公開には web サーバーを運用し、ズーム可能な画像ファイルを配信することにより、マクロのイメージだけでなく、対物レンズ 10-20 倍程度のミクロの像も遠隔地からでも任意に観察できるものとし、広く世界的に公開するものとする。

端的に言えば「Google Earth に類似したものをコモンマーモセットの脳（および脊髄）について作る」ということを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

当研究所において、われわれの維持しているコモンマーモセット繁殖コロニーを利用して、コモンマーモセットの脳の組織標本を作成、デジタルスライド化して、Web 経由でアクセス可能にし、データベースとして広く公開する。

コモンマーモセットを深麻酔下に 4%パラフォルムアルデヒド溶液で径心室的に灌流固定する。固定後、脳定位手術装置によって、脳のマーキングをおこなう。数ヶ所に既知の座標のマーキングを行った後に脳を取り出し、凍害障害防止のためにグリセリン液に浸漬する。その後、脳の凍結切片を作成するが、その際切断面のデジタル写真をすべて作成し、後の標本のための標準断面画像とする。

切片の処理について応用可能なのは

1. ニッスル染色（細胞構築）
2. 髄鞘染色（髄鞘構築）
3. アセチルコリンエステラーゼ染色
4. NADPHd 染色
5. サイトクロームオキシダーゼ染色
6. パルプアルブミン免疫染色
7. カルレチニン免疫染色

8. カルピンジン免疫染色
9. ニューロフィラメント免疫染色
10. チロシン水酸化酵素免疫染色
11. ドーパミントランスポーター免疫染色
12. セロトニントランスポーター免疫染色
13. ノルエピネフリントランスポーター免疫染色
14. 興奮性アミノ酸トランスポーター免疫染色
15. NeuN 免疫染色および、スキャン後の Nissl 対比染色

である。以上についてはこれまでの予備実験で、すべてコモンマモセットの脳で染色可能であることを確認済みである。

作成した標本について、データのデジタル化を行う。現在当研究所には Carl Zeiss MIRAX SCAN という顕微鏡標本デジタル化のための装置が設置されている。本件研究の目的にもっとも適した装置であり、現在利用中である。

こうして得られた画像データは Zoomify 技術を用いて断片化し、サーバーにアップロードして、インターネット経由のユーザーに高速配信する。

#### 4. 研究成果

コモンマモセットの脳および脊髄の組織画像データベースを作成し・広く公開した。現段階(2014年4月)のコンテンツとしては、成体の脳・脊髄・生後0日の脳が含まれ、補足的にフクロモモンガ脳、アカゲザルとニホンザルの脊髄の組織画像がアップロードされている。染色法としては、ニッスル、AChE 染色、各種カルシウム結合タンパク質免疫染色、NeuN 染色、各種トランスポーター染色などさまざまな染色法が用いられている。ズーム可能な総画像数は約 3900、データ総量は 290GB に及んでいる。データベースを基にした国際的共同研究も行い(著名なアトラス学者である Charles Watson と George Paxinos との共同研究)、アトラスの英文単行本も 2 冊出版され、国際的に高い評価を得ている。

(1) The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates, George Paxinos, Charles Watson, Michael Petrides, Marcello Rosa, Hironobu Tokuno, 2011, Elsevier, San Diego

(2) Atlas of the Spinal Cord: Mouse, Rat, Rhesus, Marmoset, and Human, Gulgun Sengul, Charles Watson, Ikuko Tanaka, George Paxinos, 2011, Elsevier, San Diego

成体脳のアトラスについては、<http://marmoset-brain.org> で公開中である。また、われわれの公開ウェブサイトと論

文は、Google において "marmoset "および " brain " というキーワードで検索したところ検索結果順位が一位になっている(2014年4月28日現在)。

われわれの築いてきたデータベースは世界で唯一のマモセット脳アトラスであり、総合的に高い国際的評価を受けることができた。

また、これまでの成果をこの2年間、本神経科学総会やシンポジウムで発表し紹介している。予想をはるかに上回る数の人々が関心を抱き、活発な議論がなされた。コモンマモセットに興味を持つ研究者がかなりの速度で増加している。

また、2013年10月には所属研究所主催による国際シンポジウム(マモセットの神経科学-解剖・発生・機能)が開催され、国内演者9名外国演者9名の発表が2日間にわたって行われた。多数の聴衆を集め成功裏に終わることができた。この際にも本データベースの紹介を広く行うことができた。当該シンポジウムをもとにした論文集を日本神経科学学会の英文機関紙 Neuroscience Research において、特集号として発刊することが決まっております。申請者が Guest Editor として編集を行う予定である。

本研究の発展とその成果の公開に基づき、本邦でのコモンマモセットの神経科学での利用・応用が大きく推進され、脳研究、特に高次の脳機能の生後発達についての研究が広く発展することが期待される。

#### 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 5 件)

1. ニューロサイエンスの最新情報 デジタル脳アトラスの現状と可能性

徳野博信

Clin Neurosci 2013; 31(9) : 1104-1105 (査読：有)

2.

Experimental techniques for neuroscience research using common marmosets.

Tokuno H, Moriya-Ito K, Tanaka I.

Exp Anim. 2012;61(4):389-397. Review. (査読：有)

3.

Decision making and risk attitude of the common marmoset in a gambling task.

Tokuno H, Tanaka I.

Neurosci Res. 2011 Nov;71(3):260-265. (査

読：有)

4.

Effects of constant daylight exposure during early development on marmoset psychosocial behavior.

Senoo A, Okuya T, Sugiura Y, Mimura K, Honda Y, Tanaka I, Kodama T, Tokuno H, Yui K, Nakamura S, Usui S, Koshihara M.

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2011 Aug 1;35(6):1493-1498. (査読：有)

5.

Internet-based atlas of the primate spinal cord.

Tokuno H, Tanaka I, Senoo A, Umitsu Y, Akazawa T, Nakamura Y, Watson C.

Neurosci Res. 2011 May;70(1):128-132. (査読：有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1.

Hironobu Tokuno, Introduction, The 6th Igakuken International Symposium on Marmoset Neuroscience, 2013.10.3, Tokyo

2.

徳野博信, 守屋敬子, 田中いく子, 海津敬倫, 市川眞澄 コモンマーモセット嗅球の構造 第36回日本神経科学大会 2013.6.23、京都市

3.

徳野博信 マーモセット脳と脊髄のインターネットアトラス 第2回 日本マーモセット研究会 大会 2013.2.28、東京都 (招待講演)

4.

徳野博信, 田中いく子, 海津敬倫 マーモセット脳における神経伝達物質トランスポーター分布のデータベース化 第35回日本神経科学大会 2012.9.21、名古屋市

〔図書〕(計 3 件)

1.

脳入門のその前に 徳野博信 共立出版 141p 2013

2.

脳 - 「かたち」と「はたらき」 Watson, Kirkcaldie, Paxinos 著 徳野博信 訳 共立出版 211p 2012

3.

The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates, George Paxinos, Charles Watson, Michael Petrides, Marcello Rosa, Hironobu Tokuno, 324p 2011, Elsevier, San

Diego

〔その他〕

ホームページ等

<http://marmoset-brain.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳野 博信 (TOKUNO, Hironobu)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・副参事研究員

研究者番号：40212071

(2) 研究分担者

田中 いく子 (TANAKA, Ikuko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号：60142650

(3) 連携研究者

なし