

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650206

研究課題名(和文)放射線定位照射を利用した脳疾患モデル作成の基盤技術

研究課題名(英文)Development of a research technique to create animal model of brain lesions using therapeutic linear accelerator

研究代表者

田中 真樹 (Tanaka, Masaki)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：90301887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物の脳に治療用放射線の定位照射を行い、脳疾患モデルを作成することを試みた。3頭のニホンザルの右半球の前頭眼野を中心とした領域に計4回の照射を行った(130-150 Gy)。照射後数週間は浮腫が著明であり、行動指標として用いた眼球運動にも軽度の変化が認められたが、1か月程度の経過でMRI所見、行動ともに照射前のレベルに落ち着いた。1頭で約8か月にわたって観察を続けたところ、照射後4か月頃から後期障害が現れた。組織学的には白質を中心とした壊死巣と周囲の出血が認められたが、灰白質は層構造が保たれていた。今後はこの技術を脳深部に適用するとともに、低用量の照射で長期観察を行う。

研究成果の概要(英文)：We developed a research technique to create animal model of brain lesions using the therapeutic linear accelerator. A total of four irradiations (130-150 Gy) were performed on the right frontal eye field of three Japanese monkeys. During a few weeks following irradiation, brain edema was evident in MRI and the performance of oculomotor tasks was declined; however, it recovered thereafter. For one monkey that was followed up about 8 months, the behavioral deficits reappeared in the 4th month and gradually progressed. Postmortem histological examination in two animals revealed large necrosis in the white matter and surrounding hemorrhage, but the cortical gray matter retained layers. This technique can be applied to deep brain structures in the future study. We now plan to use lower doses and will follow up longer interval.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：神経科学 放射線治療装置 大脳皮質 霊長類 疾患モデル

### 1. 研究開始当初の背景

脳の損傷例を対象にした神経心理学研究や、脳の一部を可逆的・不可逆的に障害した実験動物の行動解析は、脳の機能を知るための最も基本的かつ重要な研究手法である。実際、優れた神経心理学研究や破壊実験によって、多くの高次脳機能の存在が明らかにされてきた。今後、脳活動の計測技術がいかに進歩しようとも、脳各部の機能を解明するには神経相関だけでは不十分で、障害や刺激効果などを調べることによって神経活動と脳機能の因果関係を証明する必要がある。また逆に、認知・行動との因果律を証明できない神経活動については、Brain-Machine Interfaceなどの特殊な利用法を除けば、それらを積極的に調べる意義を見いだすのは難しい。

これまで、実験動物を用いた脳の機能脱落法としては、外科的切除から神経作動薬の局所注入に至るまで、様々な方法が用いられてきた。しかし、これら従来の方法はいずれも侵襲的な操作と習熟した手技が必要であり、また、臨床的にみられるような数mmから数cmにおよぶ比較的広範な障害を脳深部に作成することは技術的に困難である。

### 2. 研究の目的

本研究では、がんの治療に用いられているX線定位照射装置(リニアック)を利用して、ヒトと相同の脳をもつマカクザルの脳の特定部位に破壊巣を作成することを試みる。開頭することなく脳深部に限局した障害をつくり、詳細な行動解析を行うことで、脳各部の機能を調べることができるとともに、将来的には電気生理学実験を組み合わせることで具体的な脳の情報処理を探ることができる。また、脳深部の梗塞、出血、腫瘍、変性などに引き続いて起こる機能代償のメカニズムを調べる研究を展開することも可能になる。さらに、この技術は脳機能を探るツールになるばかりでなく、将来的には脳深部刺激療法に代わる、侵襲の少ない機能的定位脳手術としての臨床応用につながる可能性を秘めている。

こうした発展性のある一連の研究の第一歩として、本研究では比較的容易な眼球運動課題を訓練したサルの大脳皮質の局所破壊を試み、行動への影響とMRI所見の解析、死後脳の病理学的検討を行う。これにより、放射線照射による機能脱落の基盤技術を確立し、これを利用した次の研究につなげていくことを目指す。

### 3. 研究の方法

実験には3頭のニホンザルを用いた。特定動物の飼養については札幌市の許可を得ている。すべての実験は北海道大学動物委員会の事前承認を得た上で、文科省ナショナルバイオリソース計画の指針を遵守して行った。

手術に先立って、自発的にチェアに座る

ようにサルをあらかじめ訓練し、頭部のMRIを撮像した。イソフルレンによる全身麻酔下で無菌的操作によって眼位測定用のアイコイルと頭部固定用の器具を埋め込んだ。術後は十分な鎮痛を行い、必要に応じて抗生剤の投与を行った。十分な回復期間の後、眼球運動課題を数ヶ月にわたって訓練した。1頭に関しては、これまで神経活動記録に用いていた個体で実験を行った。

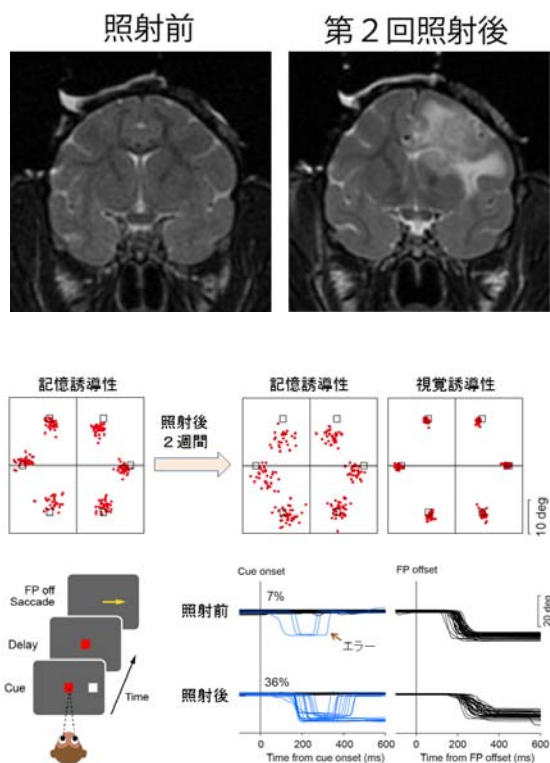


学内共同利用研究施設にある定位脳放射線治療用の直線加速器リニアック (linear accelerator, LINAC) を用いて3頭のサルに計4回の照射を行った。医学物理士である分担研究者の協力を得て、事前に撮像したMRI対応の頭部固定装置のCT画像と、同装置にサル頭部を固定して撮像したMRI画像をもとに照射計画を立て、右の弓状溝前壁を中心に直径6-10mmの範囲に130-150Gyの照射を行った。リニアックのオーバーヒートを防ぐため、20分程度の間隔で5-6回に分けて照射した。照射後は継続的にMRI撮像を行うとともに、行動の評価を行った。これらの研究は研究協力者である助教2名と複数の大学院生、研究補助員とともに行った。

### 4. 研究成果

X線照射直後は照射部位の周囲に著明な浮腫を認めた。全身状態に著変なく、比較的

早期に行動課題の評価を行うことができた。1頭目のサル (monkey N) では、1回目の照射後は一過性に眼球運動のパフォーマンスが軽度低下していたものの数週間の経過で回復し、これとともに MRI 画像上も一部の T1 高信号部位を残して照射前と大差ない状態となった。

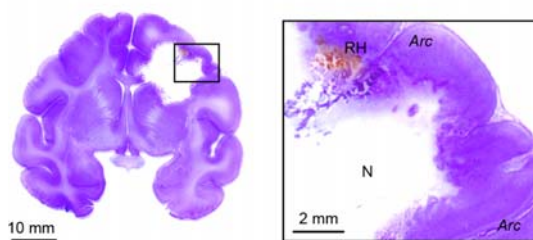


こうした結果から、さらに効率的に破壊巣を作製するため、約3か月後に同部位に2度目の照射を行ったところ著明な浮腫を生じ、行動課題の遂行が困難となり、これはその後約3か月にわたって回復しなかった。この個体は以前から長期にわたって生理学実験に用いており、照射前からややパフォーマンスが悪いという問題があったため、別に2個体を用意して 150Gy (monkey R) または 130Gy (monkey C) の照射を行った。照射後、白質の著明な浮腫を認めるとともに、前頭葉機能を反映する作業記憶を要する眼球運動課題の成績や滑動性追跡眼球運動のゲインの低下が一過性に低下した。長期間観察を続けた個体 (R) では、行動上の変化は2か月以内に収まるが、5か月後からは遅発性の障害が生じていた。

放射線照射後2～8か月後にこれらのサルの脳を組織学的に検索したところ、いずれも白質を中心とした大きな壊死巣と出血を認めた。周囲の灰白質は意外にも層構造が保たれていたが、細胞数の減少が認められた。

このように、多くの手続きと調整を経た後、本研究期間によりやく環境を整えて、サルへ

のX線定位照射を開始することができた。開頭することなく破壊巣を作ることができるため、侵襲が少なく、数日間の早い回復期間の後に行動を評価することができた。照射直後は局所の浮腫がひどく、パフォーマンスの低下も見られたが、予想以上に短期間で障害から回復した。初期の障害からの回復後、1例では明らかな再燃が認められ、これはがんの放射線治療でよく問題となる慢性障害と同じものであると考えられる。壊死の進行にともなう画像上の変化を詳しく調べるためには、さらに長期間の観察が必要と考えられる。これまでの研究成果については、現在、論文を作成している。



サル脳への放射線の局所照射とその行動評価を組み合わせた研究は、おそらく世界初の試みである。ある程度の個体数と長期的な観察ができる体制を構築することができれば、脳科学、放射線医学の双方にとって有意義な様々な研究の展開が期待される。平成26年度からさらに3年間の予定で挑戦的萌芽研究として採択されたので、本研究を発展的に継続する。今後はより低用量の照射を行い、さらに長期間の観察を続けることを予定している。

## 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4件)

- ① Matsushima, A. & Tanaka, M. (2014) Different neuronal computations of spatial working memory for multiple locations within versus across visual hemifields. *J. Neurosci.* 34: 5621-5626. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0295-14.2014. 【査読あり】
- ② Matsushima, A. & Tanaka, M. (2014) Manipulation of object choice by electrical microstimulation in macaque frontal eye fields. *Cereb. Cortex* 24: 1493-1501. doi: 10.1093/cercor/bht009. 【査読あり】
- ③ Ohmae, S., Uematsu, A. & Tanaka, M. (2013) Temporally specific sensory

signals for the detection of stimulus omission in the primate deep cerebellar nuclei. *J. Neurosci.* 33: 15432-15441. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1698-13.2013.

【査読あり】

- ④田中真樹、國松 淳、大前彰吾 (2013) 時間の測り方 一脳による時間の符号化. 脳と神経 (Brain and Nerve) 65: 941-948. <http://www.igaku-shoin.co.jp/misc/pdf/bn/6508.pdf> 【査読なし】

[学会発表] (計 28 件)

- ①田中真樹、Neural basis of temporal processing: a role of the cerebellum、第91回日本生理学会シンポジウム「認知機能を支える神経回路研究の最前線」、2014. 3. 17、鹿児島大学、鹿児島市
- ②Yoshida A. & Tanaka M. Differential roles of two type neurons in the primate globus pallidus external segment. Program No. 365.17. Society for Neuroscience, 2013. 11. 11, San Diego, USA
- ③ Kunitatsu J. & Tanaka M. The basal ganglia indirect pathway plays a role in temporal processing. Program No. 365.13. Society for Neuroscience, 2013. 11. 11, San Diego, USA
- ④ Matsushima A. & Tanaka M. Distinct neuronal mechanisms for remembering multiple locations within vs. across visual hemifields. Program No. 263.24. Society for Neuroscience, 2013. 11. 10, San Diego, USA
- ⑤田中真樹、Role of the cerebellum in temporal prediction、CiNetセミナー、2013. 10. 15、大阪大学、吹田市
- ⑥Matsuyama K, Kunitatsu J & Tanaka M. Predictive activity in the primate motor thalamus during the missing oddball task. International Symposium on Prediction and Decision Making 2013. Poster No. 10. 2013. 10. 14, Kyoto Univ
- ⑦田中真樹、小脳の時間表現、東京医科歯科大学脳科学セミナー、2013. 9. 27、東京
- ⑧松嶋藻乃、田中真樹、複数の物体に対する注意の配分—サル前頭前野の神経活動による検討。日本生理誌 76 (2) : 79、2013. 9. 7、旭川医大
- ⑨國松 淳、大前彰吾、鈴木智貴、田中真樹、時間再現における基底核と小脳の役割の比較」第7回Motor control研究会、2013. 9. 6、東大
- ⑩鈴木智貴、國松 淳、田中真樹 一定の時間経過を報告する際の線条体ニューロンの活動、平成25年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ ポスター発表 システム
- 33 (C12)、2013. 8. 31、名古屋国際会議場
- ⑪Kunitatsu J, Ohmae S, Tanaka M, Neuronal representation of temporal information in the basal ganglia and the cerebellum. 2013. 6. 22, 京都国際会館
- ⑫Matsushima, A., Itoh, S., Yoshida, A., Kurkin, S., Yabe, I., Sasaki, H., Tanaka, M. Contribution of the cerebellum to perceptual prediction. 2013. 6. 20, 京都国際会館
- ⑬Yoshida A & Tanaka M. Neuronal activity during rapid action selection in the primate globus pallidus external segment. 2013. 6. 20, 京都国際会館
- ⑭田中真樹 小脳の時間情報処理、平成24年度 京都大学霊長類研究所共同利用研究会「行動特性を支配するゲノム基盤と脳機能の解明」2013. 3. 16、犬山市
- ⑮田中真樹 タイミング予測の神経機構：第15回山形めまい研究会、2013. 3. 2、山形市
- ⑯國松 淳、大前彰吾、田中真樹 時間再現課題における小脳と基底核の役割、脳と心のシンポジウム 第13回冬のワークショップ、2013. 1. 10、留寿都
- ⑰ Tanaka M. Multiple components of prefrontal signals for covert tracking of moving object: The 3rd International Symposium on Prefrontal Cortex Searching for Mechanism of Mind. 2012. 11. 29-30, Kyoto Univ
- ⑱Kunitatsu J. & Tanaka M. Role of striatal dopamine in the initiation of self-timed saccades. 日本神経科学大会、2012. 9. 19、名古屋国際会議場
- ⑲ Matsushima A. & Tanaka M. Neuronal correlates of working memory for multiple locations. 日本神経科学大会、2012. 9. 18、名古屋国際会議場
- ⑳國松 淳、田中真樹 線条体ドパミンによる自発的な運動のタイミング調節。日本生理誌 75 (4) : 202、2012. 9. 1、札幌市
- ㉑ Habtemariam A、松嶋藻乃、田中真樹 Saccade target selection determines direction of cerebellar adaptation. 日本生理誌 75 (4) : 202、2012. 9. 1、札幌市
- ㉒松嶋藻乃、田中真樹 記憶すべき複数刺激の相対位置により異なる二つの符号化。日本生理誌 75 (4) : 202、2012. 9. 1、札幌市
- ㉓吉田篤司、田中真樹 即時的な行動選択に関わる淡蒼球の神経活動。日本生理誌 75 (4) : 205、2012. 9. 1、札幌市
- ㉔松山 圭、國松 淳、田中真樹 サル視床ニューロンにおける反応性から予測性への活動変化。日本生理誌 75 (4) : 205、2012. 9. 1、札幌市
- ㉕田中真樹 タイミング予測の神経機構、国

立精神神経センター システム神経科学セミナーシリーズ第4回、2012. 8. 30、国立精神神経センター神経研究所、小平市

- ⑳松嶋藻乃、田中真樹 サル前頭眼野の電気刺激による物体選択の操作. 複数の刺激位置を記憶するための神経機構. 包括脳ワークショップ ポスター発表 104-C 69、2012. 7. 26、仙台国際センター
- ㉑松山 圭、國松 淳、田中真樹 オドボール課題遂行中のサル視床ニューロンの予期的活動. 第6回生理研Motor Control研究会、2012. 6. 23、岡崎
- ㉒國松 淳、田中真樹 自発性サッカードのタイミング制御におけるドパミンの関与. 第6回生理研Motor Control研究会、2012. 6. 23、岡崎

[図書] (計2件)

- ①田中真樹、松嶋藻乃 (2014) 第39章「視線の制御」(邦訳) カンデル神経科学 (Principles of Neural Science, 5th ed)、メディカル・サイエンス・インターナショナル、東京 (pp. 879-900) 【査読なし】
- ②田中真樹 (2014) 「時間情報処理における大脳小脳連関の役割」 *In*: ブレインサイエンス・レビュー2014 (廣川信隆編) クバプロ、東京 (pp. 165-186) 【査読なし】

[その他]

ホームページ等

<http://niseiri.med.hokudai.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 真樹 (TANAKA MASAKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90301887

### (2) 研究分担者

石川 正純 (ISHIKAWA MASAYORI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：80314772

### (3) 研究協力者

國松 淳 (KUNIMATU JUN)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：50632395

宮本 直樹 (MIYAMOTO NAOKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：00552879