

フラビン蛋白蛍光イメージングにより同定された 高次視覚領域の線維連絡の解析

目黒 玲子

新潟大学医学部保健学科

Analysis of Fiber Connections of the Higher Visual Cortical Areas Identified by Flavoprotein Fluorescence Imaging

Reiko MEGURO

School of Health Sciences, Faculty of Medicine,
Niigata University

要 旨

フラビン蛋白蛍光イメージングは、脳の細胞群が活動し酸素代謝が亢進した際に検出できるフラビン蛋白の緑色蛍光を利用し、脳の活動部位を描出するものである。この方法を応用した、フラビン蛋白蛍光増加分イメージングにより、視覚刺激のスピード変化に反応し、フラビン蛋白の蛍光が局所的かつ特異的に増加する大脳皮質小領域を描出できるようになった。そこで、本研究では、その特異的視覚特性を有する小領域の神経回路を明らかにし、視覚特性発現の神経解剖学的背景を明らかにしようとした。一次視覚野の外側にある高次視覚領域、外側内側領域 (LM)、前外側領域 (AL)、吻側外側領域 (RL)、LM と AL は視覚刺激のスピードアップ刺激に反応し描出されるが、それぞれへ、入出力神経線維を標識するためビオチン化デキストランアミンを限局注入した。LM, AL, RL それぞれは、視床の異なる後外側核重核と双方向性の密な神経連絡を有し、上丘の異なる層へ出力することが明らかとなった。視覚刺激のスピードアップ刺激に対するそれぞれの領域の特性の発現に、後外側核重核および上丘が関わる並列的な神経回路網が関与することが示唆された。

キーワード：フラビン蛋白蛍光イメージング、高次視覚領域、視床後外側核、上丘

緒 言

脳内の神経細胞群が活動すると酸素代謝が亢進し、細胞内電子伝達系のフラビン蛋白が緑色蛍光を発する。マウスの頭蓋骨を通した大脳皮質フラビン蛋白蛍光の計測は簡便かつ非侵襲的であり、

この計測法を用いた特異的外部刺激に反応する局所的な大脳皮質活動部位イメージングが開発され、このイメージング法による高次脳研究がおこなわれてきている^{1)–3)}。さらに、このイメージング法を応用したフラビン蛋白蛍光増加分イメージング (increased flavoprotein fluorescence imaging, 以

Reprint requests to: Reiko MEGURO
School of Health Sciences,
Faculty of Medicine, Niigata University,
2-746 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8518, Japan.

別刷請求先：〒951-8518 新潟市中央区旭町通 2-746
新潟大学医学部保健学科 目黒 玲子

下 IFFI) により, 視覚刺激のスピード変化に特異的に反応して蛍光増加を示す大脳皮質小領域が分離・同定された^{4b)}. それらの新たに分離・同定された小領域がどのような神経回路を形成しているかを明らかにするため, 神経トレーサーを用いた神経連絡解析をおこなった.

材料と方法

全ての実験は, 新潟大学動物実験倫理委員会の許可を得たプロトコールに従っておこなわれた.

8週齢以上の雄 C57BL/6J マウス (日本チャールズ・リバー社) (Japan Charles River) を用い, ウレタン麻酔下で (1.7 g/kg, 腹腔内注射), 経頭蓋 IFFI をおこなった. イメージング法の詳細は任海らの論文⁴⁾ を参照されたい. 簡単に述べると, 脳定位固定装置にマウス頭部を固定した後, 後部頭蓋を露出して IFFI 装置を設置し, 右眼を閉じて左眼に対して視覚刺激を与えた. 視覚刺激として, 鼻側から耳側へ動く縦縞模様を呈示する LCD モニターを左眼視野内に設置し, 低速 (10°/秒)・高速 (50°~75°/秒) をランダムに切り替えながら縦縞模様を動かし, スピードアップあるい

はスピードダウンのタイミングでフラビン蛋白蛍光が増加する右側の大脳皮質視覚領域を経頭蓋的に描出した.

イメージングと同じ視野で大脳皮質の血管分布の実像写真を撮影し, IFFI で同定された視覚領域の実脳上の位置を血管との位置関係を手掛かりに決定した (図 1 参照). その位置の頭蓋骨を局部的に開け, ガラス電極 (外径 40 μ m) 装着マイクロシリンジを用い, 10%ピオチン化デキストランアミン (以下 BDA, 分子量 3,000, Invitrogen Life Technology 社) 生食液 0.3 μ l を IFFI で同定された視覚領域へ限局注入した. BDA は, 神経終末および細胞体から逆行性および順行性に取り込まれて神経線維内を運ばれ, 運ばれた先の細胞体および神経終末を容易に高感度標識できる神経トレーサーである⁶⁾⁷⁾. トレーサーが運ばれるための1週間の生存期間の後, ペントバルビタールでの深麻酔下, マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液で還流固定し, 脳を取り出し, 組織化学的にトレーサーの可視化をおこなった. すなわち, 20%ショ糖液で凍結保護処理をおこなったのち, クライオマイクロトームで 50 μ m 厚の脳の前頭断連続切片を作製し, 3枚おきに集めた. 以

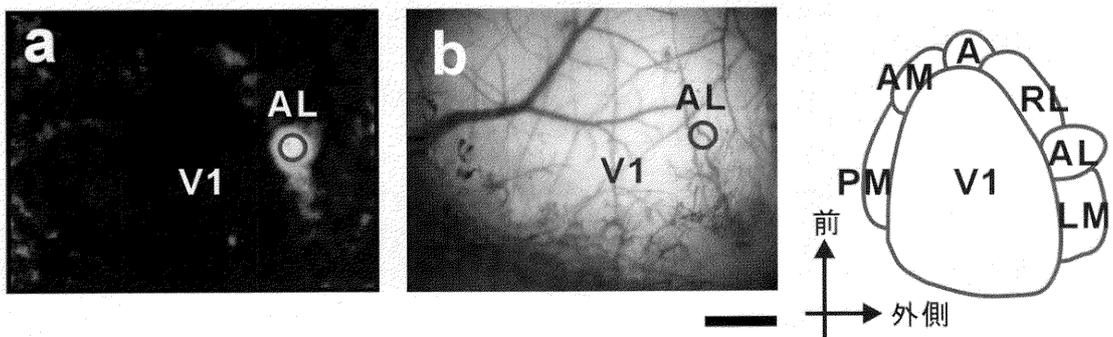


図 1 フラビン蛋白蛍光増加分イメージング (IFFI) 描出所見と実脳との対応

- a: IFFI で特異的視覚刺激により描出された大脳皮質領域 (図の白い領域, 丸印で示す). 隣接する一次視覚野 (V1) との位置関係から AL と同定された.
- b: a と同じ視野の脳表の写真. a の丸印と対応する実際の大脳皮質領域の位置を血管を手掛かりに決定した. スケール=1mm
- c: V1 の周囲に存在することが明らかとなっている高次視覚領域 (LM: 外側内側領域, AL: 前外側領域, RL: 吻側外側領域, A: 前領域, AM: 前内側領域, PM: 後内側領域).

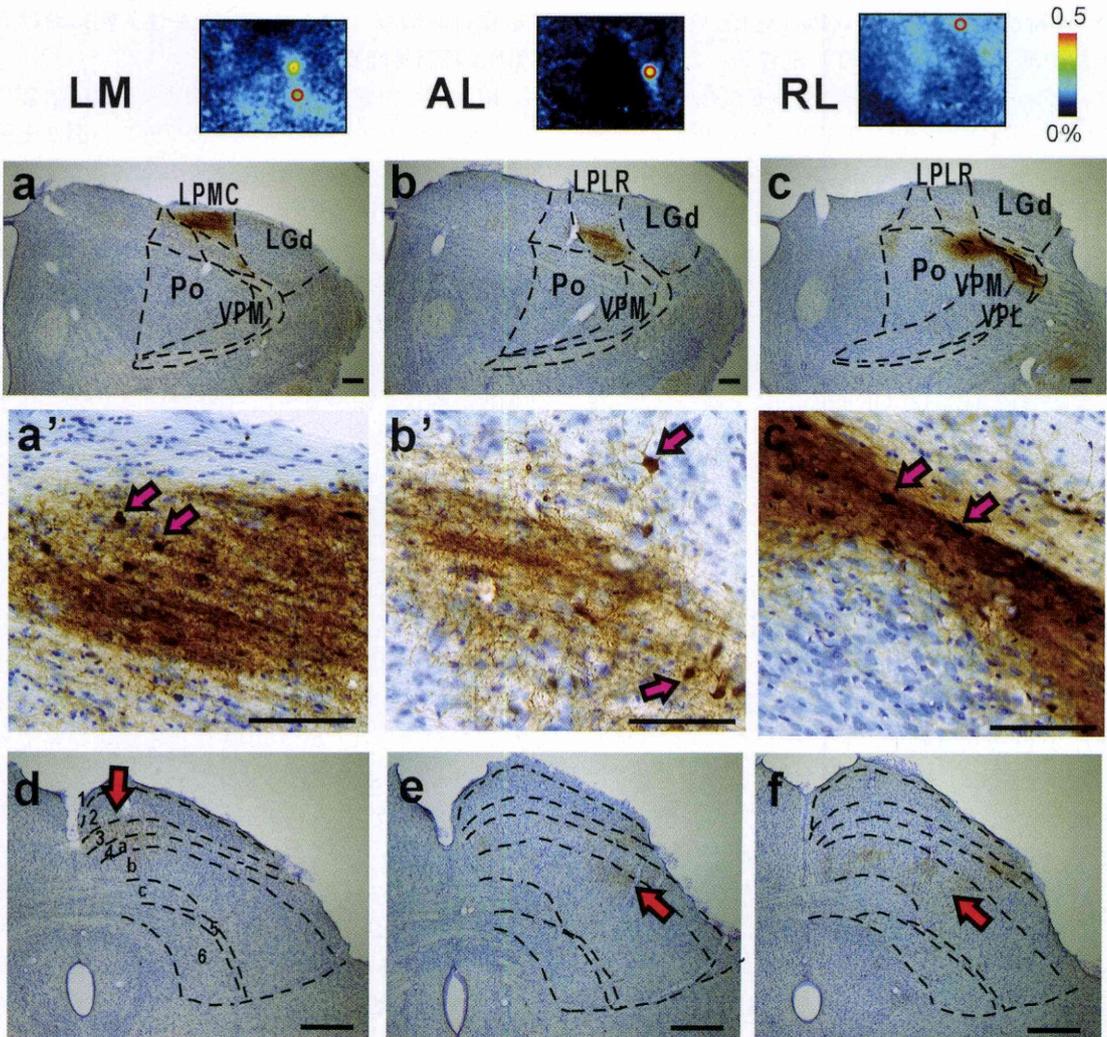


図2 IFFIで描出されたLM, AL, RLの線維連絡

IFFIでスピードアップ刺激により描出されたLM, AL, RLそれぞれへトレーサー（ビオチン化デキストランアミン, BDA）を注入した例において、視床後外側核（LP, 図 a-c'）および上丘（図 d-f）で観察されたBDA 標識神経要素（茶褐色）の所見を示す。それぞれのIFFI像を上段に示し、BDA注入位置を赤丸印で示した。カラーバーは蛍光増加割合を示す。図 a'-c'はそれぞれ図 a-cの強拡大所見である。スケール＝0.2mm

図 a, a', d: LMへBDAを注入した例で、LPの尾側内側核（LPMC）にBDA標識神経終末および神経細胞（赤矢印）、上丘浅層（第3層, 赤矢印）にBDA標識神経終末が見られた。

図 b, b', e: ALへBDAを注入した例で、LPの吻側外側核（LPLR）にBDA標識神経終末および神経細胞（赤矢印）、上丘中間層（第4a-b層, 赤矢印）にBDA標識神経終末が見られた。

図 c, c', e: RLへBDAを注入した例で、LPLR下部およびその外方延長部〔外側膝状体背側核（LGd）と後内側/後外側腹側核（VPM/VPL）の間〕に、BDA標識神経終末および神経細胞（赤矢印）が見られ、上丘中間層（第4b層, 赤矢印）にBDA標識神経終末が見られた。

降, 浮遊法にて, 切片を0.1%TX-100含有リン酸緩衝生理食塩水(PBS-T)洗浄後, 3%アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体(ABC-elite, Vector社)含有PBS-Tで40分間incubationし, PBS-T洗浄後, ジアミノベンジジン含有トリス緩衝液に過酸化水素を加えた液でincubationし, BDA-ABCを茶褐色に発色させた. 切片をゼラチンコートスライドガラスにマウントし, 脱水・脱脂をおこない, 1枚おきに対比染色を施したのち, 全てピオライト(応研商事)で封入し, 光学顕微鏡(BX-50, Olympus)にて観察した. 視床核区分はPaxinosら⁸⁾に従い, 上丘の層区分はSwanson⁹⁾に従った.

結 果

外側内側領域(LM)へのBDA注入例におけるBDA標識神経要素の分布

LMは1次視覚野(V1)外側に位置し⁴⁾¹⁰⁾(図1c), IFFIで視覚刺激のスピードアップに反応し(図2上段左), またV1同様にスピードダウンにも反応した. 視床の後外側核(LP)の垂核である尾側内側核(LPMC)にBDA標識神経終末および神経細胞体が密に分布していた(図2a, a'). また, 中脳の上丘浅層(第3層)に, BDA標識神経終末が観察された(図2d). この他, 従来の報告どおり¹⁰⁾V1に多数の細胞体および神経終末が観察された.

前外側領域(AL)へのBDA注入例におけるBDA標識神経要素の分布

ALはV1外側やや前方に位置し⁴⁾¹⁰⁾(図1c), IFFIで視覚刺激のスピードアップに反応し(図2上段中央), スピードダウンには反応しなかった. LPの垂核である吻側外側核(LPLR)にBDA標識神経終末および神経細胞体が密に分布していた(図2b, b'). また, 上丘中間層(第4a-4b層)にBDA標識神経終末が観察された(図2e). この他, 従来の報告どおり¹⁰⁾V1に多数の細胞体および神経終末が観察され, またLMに相当する領域に神経終末が観察された.

吻側外側領域(RL)へのBDA注入例におけるBDA標識神経要素の分布

RLはV1外側前方に位置し⁴⁾¹⁰⁾(図1c), IFFIで視覚刺激のスピードアップに反応し(図2上段右), より速いスピードへの変化によく反応し, スピードダウンには反応しなかった. 視床において, LPLR深部およびその外方延長部(外側膝状体背側核と後内側/後外側腹側核の間)に, BDA標識神経線維および神経細胞体が密に分布していた(図2c, c'). また, 上丘中間層(第4b層)にBDA標識神経線維が観察された(図2f). この他, 従来の報告どおり¹⁰⁾V1に多数の細胞体および神経終末が観察され, また体性感覚連合野に相当する領域に神経終末が観察された.

考 察

V1外側に位置する高次視覚領域LM, AL, RLは, IFFIによりそれぞれ異なる視覚反応特性を持つことが示され, かつBDAによる線維連絡解析により, それぞれ異なる視床核領域と密接な入・出力関係を持つことが明らかとなった. また, 上丘への出力もそれぞれ上丘内の異なる層に終わることが明らかとなった. すなわち, とりわけ視床との連絡においては, LM, AL, RLは独立的かつ並列的であることがわかった. LM; AL, RLいずれも従来の報告どおり¹⁰⁾V1との連絡が確認されV1経由の視覚情報を受けていることは明らかだが, 各々の特性発現に関し, 視床のLP垂核との特異的な神経連絡が大きな役割を演じていることが示唆された. LPは視覚情報をSC浅層を介して受け¹¹⁾⁻¹³⁾, 高次視覚領域へ投射することが知られ¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾, 外側膝状体背側核-V1系と並列的に存在する重要な視覚系として認められてきた. よって, 上丘がLP垂核へ何らかのさらには何種類かの特異的視覚情報を供給していると考えられる. 実際, V1破壊によりLM, AL, RLの視覚反応特性に変化は見られなかったものの, 上丘破壊ではそれらの特性が減弱した, という報告がなされている⁴⁾. 上丘浅層からLP尾側部への投射があることは従来から確認されていることだが

11)–13), 今後より詳細な, 層特異的あるいは細胞種特異的な上丘–LP 連絡が解明されれば, LM, AL, RL 特性の背景となる神経回路網がより明らかとなることが期待される。

結 語

IFFI でスピードアップ視覚刺激により特異的に活動性が増すことが示された, 複数の分離した大脳皮質高次視覚領域は, 線維連絡解析により, それぞれが特異的神経回路を有することが明らかとなり, それが, 視覚刺激に対するそれぞれの特異的な反応性の背景となることが示唆された。

謝 辞

研究全般へのご助言をいただいた, 新潟大学脳研究所システム脳生理学分野教授 澁木克栄先生, IFFI を担当してくださった, 同助教 任海学先生に深謝いたします。

本研究に関連して, 平成 23 年度日本学術振興会科学研究費補助金(挑戦的萌芽研究)(23659091)による援助をいただき深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Husson TR, Mallik AK, Zhang JX and Issa NP: Functional imaging of primary visual cortex using flavoprotein autofluorescence. *J Neurosci* 27: 8665–8675, 2007.
- 2) Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T and Tanaka R: Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol (Lond)* 549: 919–927, 2003.
- 3) Tohmi M, Kitaura H, Komagata S, Kudoh M and Shibuki K: Enduring critical period plasticity visualized by transcranial flavoprotein imaging in mouse primary visual cortex. *J Neurosci* 26: 11775–11785, 2006.
- 4) Tohmi M, Meguro R, Tsukano H, Hishida R and Shibuki K: The extrageniculate visual pathway generates distinct response properties in the higher visual areas of mice. *Curr Biol* 24: 587–597, 2014.
- 5) Tohmi M, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R and Shibuki K: Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of mouse cortical activity and plasticity. *J Neurochem* 109 (Suppl 1): 3–9, 2009.
- 6) Horie M, Meguro R, Hoshino K, Ishida N and Norita M: Neuroanatomical study on the tecto-suprageniculate–dorsal auditory cortex pathway in the rat. *Neuroscience* 228: 382–394, 2013.
- 7) Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N and Honig MG: Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods* 103: 23–37, 2000.
- 8) Paxinos G and Watson C: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed, Academic Press, San Diego, 2001.
- 9) Swanson LW: *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Elsevier, Tokyo, 1992.
- 10) Wang Q and Burkhalter A: Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol* 502: 339–357, 2007.
- 11) Sefton AJ, Dreher B and Harvey A: Visual System. In: Paxinos G (ed) *The Rat Nervous System*. 3rd ed, Elsevier, Tokyo, pp1082–1202, 2004.
- 12) Taylor AM, Jeffery G and Lieberman AR: Subcortical afferent and efferent connections of the superior colliculus in the rat and comparisons between albino and pigmented strains. *Exp Brain Res* 62: 131–142, 1986.
- 13) Takahashi T: The organization of the lateral thalamus of the hooded rat. *J Comp Neurol* 231: 281–309, 1985.
- 14) Kamishina H, Conte WL, Patel SS, Tai RJ, Corwin JV and Reep RL: Cortical connections of the rat lateral posterior thalamic nucleus. *Brain Res* 1264: 39–56, 2009.

(平成 27 年 3 月 9 日受付)