

経頭蓋的自家蛍光イメージングで捉えた マウス体性感覚野機能マップの可塑性

池田 謙輔

新潟大学医学部医学科

北浦 弘樹・高橋 邦行

任海 学・澁木 克栄

新潟大学脳研究所システム脳生理学分野

Trans - Cranial Autofluorescence Imaging of Functional Map Plasticity in the Mouse Somatosensory Cortex

Kensuke IKEDA

School of medicine, Niigata University

Hiroki KITAMURA, Kuniyuki TAKAHASHI,

Manavu TOHMI and Katsuei SHIBUKI

Department of Neurophysiology,

Brain Research Institute, Niigata University

要 旨

脳組織の緑色自家蛍光の多くはミトコンドリアのフラビン蛋白に由来し、活動依存的に変化する。またマウス頭蓋骨は透明度が高いため大脳皮質の経頭蓋的な自家蛍光イメージングが可能である。本研究はこの方法を用い、マウスの尾の切断に伴う一次体性感覚野の機能マップ可塑性の解析を行った。生後1-2日のC57BL/6マウスの尾をエーテル麻酔下に切断し、体性感覚野の脳活動の記録を8-13週齢の時点で行った。刺激は後肢、及び残存する尾の根元部分に綿棒を介して振動刺激を50ヘルツで1秒間加えた。冷却CCDカメラで青色励起光(450-490ナノメートル)下の緑色自家蛍光(500-550ナノメートル)を撮影し、自家蛍光反応が最大に達した時点のイメージ(刺激後0.8-1秒)に定量的な評価を加えた。尾の根元部分に対する反応領域は後肢の反応に対する領域の後内側方に存在した。尾断群では対照群と比較すると互いの反応領域のピーク間距離が増大し、お互いの領域の境界方向に反応領域の広がりが増加するという変化が明らかとなった。これらの変化は尾の大部分に対応するはずの体性感覚野の領域に対する末梢からの入力が遮断された結果、この部分が尾の残存する根元部分からの入力を受けようになり、これに引きずられる形で後肢に対する反応領域も後内側方に拡大した

Reprint requests to: Katsuei SHIBUKI
Department of Neurophysiology
Brain research institute
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585, Japan

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通り1-757
新潟大学脳研究所システム脳生理学分野
澁木 克栄

ものと解釈される。以上、マウスの経頭蓋的フラビン蛋白蛍光イメージングにより、尾の切断によって引き起こされた体性感覚野機能マップの可塑性が証明された。

キーワード：体性感覚野，フラビン蛋白蛍光，脳機能イメージング，マウス，可塑性

緒 言

大脳皮質体性感覚野には体部位に応じたトポグラフィカルな機能マップが存在する^{1)–3)}。しかしながらこの機能マップは固定されたものではなく、生後の体性感覚野への末梢からの入力状況により可塑的に変化するものであることが知られている^{4)–6)}。このような体性感覚野機能マップの可塑性は、指を切除された患者において脳磁図にて確認されたという報告⁷⁾など、ヒトにおいても確認されており、幻肢痛との関連も論議されている^{8)–10)}。このように末梢部位からの入力によって皮質体性感覚野の機能マップがダイナミックに再編されることに関しては多くの報告があるものの、その多くは電極を脳表に刺して解析する電気生理学的手法によるものである。しかしながら、機能マップの可塑的变化に関して詳細な検討を行う場合には電気生理学的な点による解析だけでは困難であり、2次元的な機能マップを直接光学的に捉えるイメージング法が威力を発揮する^{11)–19)}。

フラビン蛋白蛍光イメージング法は脳活動に伴う自家蛍光変化を利用した解析法である²⁰⁾²¹⁾。フラビン蛋白の多くはミトコンドリアの電子伝達系に含まれる。この蛋白には還元型と酸化型が存在し、青色励起光を照射すると酸化型のみ緑色自家蛍光を発するという性質を持つ²²⁾²³⁾。神経細胞の活動によって細胞内カルシウム濃度が上昇し、酸素代謝が亢進すると、フラビン蛋白が還元型から酸化型へと変化するため、代謝の亢進した部位では緑色自家蛍光の上昇が起きる。したがって、この神経活動亢進に伴う緑色自家蛍光上昇を記録することにより脳表の中で代謝が亢進している部位をイメージとして同定することが可能となる²⁰⁾²¹⁾²⁴⁾ (図1A)。さらにこのイメージング法をマウスに応用する場合、マウスの頭蓋骨は非常に薄く、骨を透過して脳表が見えるため、頭蓋骨越

しに光学的イメージングが可能になる。

そこで我々は経頭蓋的フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて、生後間もないマウスの尾を切断し、その結果生ずると予想される大脳皮質体性感覚野機能マップの変化を捉えることを試みた。なお、本研究は平成16年度医学研究実習において得られた結果を基にまとめたものである。

方 法

実験には対照群として11匹、尾断群として8匹のC57BL/6マウスを使用した。尾断群は出生後2日または3日目にエーテル麻酔し、尾を剪刃にて切断した。覚醒後、親マウスのケージに戻して対照群と同一の環境で8–13週飼育し、成体となった後にイメージングを行った。イメージングは経頭蓋的にフラビン蛋白自家蛍光を利用して行った。ウレタン1.7g/kgの腹腔投与によって麻酔したマウスの頭部を実体顕微鏡下に固定して頭部皮膚を切除し、頭蓋骨表面の乾燥を防いで透明性を維持するためにワセリンを薄く塗布した。経頭蓋的に青色励起光(450–490nm)を脳表に照射し、脳表より放射される緑色自家蛍光(500–550nm)を冷却CCDカメラにより撮影した(図1B)。体温は38℃に維持し、酸素の自発呼吸下に測定を行った。刺激は機械刺激装置の先端に綿棒を取り付け、50Hz、1秒間の振動刺激を左後肢足底または尾の根元部分に加えた。反応は対側の一次大脳皮質体性感覚野より1秒あたり9フレームの頻度で撮影した。尾断群における尾の刺激は切断端の残存部の刺激により行われた。30秒毎に繰り返して得られた画像データを32回試行分加算平均した後、5×5マトリックスフィルターで平滑化して画質を向上させた。刺激直前の5フレームの平均に対する各フレームの蛍光強度変化($\Delta F/F$)を算出し、グレースケールで表示した。尾

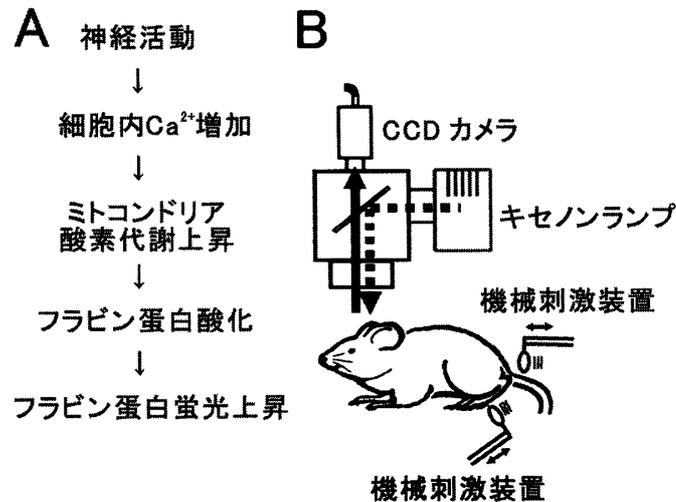


図1 フラビン蛋白蛍光イメージングの原理と実験方法
A, フラビン蛍光イメージングの原理. B, 実験手法.
実体顕微鏡下に得られた蛍光反応を CCD カメラで
捉え, 画像化する.

と後肢の各反応領域のピークを画像上より求め、2点を結ぶ線分上の輝度変化をプロットすることにより反応分布を求め(図2B), これに対してさらなる定量的解析を加えた。

結 果

後肢又は尾に振動刺激を加えると、体性感覚野にフラビン蛋白蛍光の上昇が観察された。反応は刺激開始後0.3秒で既に認められ、0.8–1秒後にピークに達した。刺激終了後数秒で血流増加によると思われる血管像の暗化が認められた。以下の解析はピーク時点での蛍光反応像に対して行った。刺激強度が強いときは尾の反応領域と後肢の反応領域が重なったが、刺激強度を弱めることによって両者を分離することが出来た(図2A)。対照群、尾断群ともに全ての実験において、尾の刺激に反応する体性感覚野の領域は後肢の刺激に反応する領域の後内側に隣接して存在していた。

尾断群の典型例では後肢、尾各領域とも対照群に比べて互いの境界方向へと反応領域が広がっていることが確認できた(図2Ab)。この切断によって生じた広がりを定量的に評価するために、画

像上で後肢・尾各領域の反応のピーク点を求めて両点を結ぶ線分を引き(図2Ba), その線分上での蛍光強度変化の分布を求めた(図2Bbc)。反応領域の境界側への広がりを定量的に評価するため、後肢・尾の各反応領域において反応のピーク値(図3Aのa), ピークとピークの距離(図3Aのb), またピークの半値となる点とピークとの水平距離(半値幅, 図3Aのc, d)を計測した。さらにcとdの2つの距離の内、境界方向のものは「境界側」とし、境界方向と反対を向いた距離は「反対側」とした。ピーク値は対照群・尾断群においてほぼ変化がないか、むしろ尾断群において低下していた(図3Ba)。しかし、ピーク間の距離は尾断群において有意に増大し(図3Bb), また、半値幅についても後肢・尾の各領域とも境界側において有意な増大を認めるものの、反対側では有意な差は見られなかった(図3Bcd)。

以上の結果を別の角度からさらに検討するため、両領域のピークを結ぶ直線とこれとピークにおいて直交する直線上においてピークから等距離の4点を設定し、4点での蛍光強度を測定した(図3C)。このときの距離は、蛍光強度分布の反対側での半値幅とした。その結果、尾断群では対照

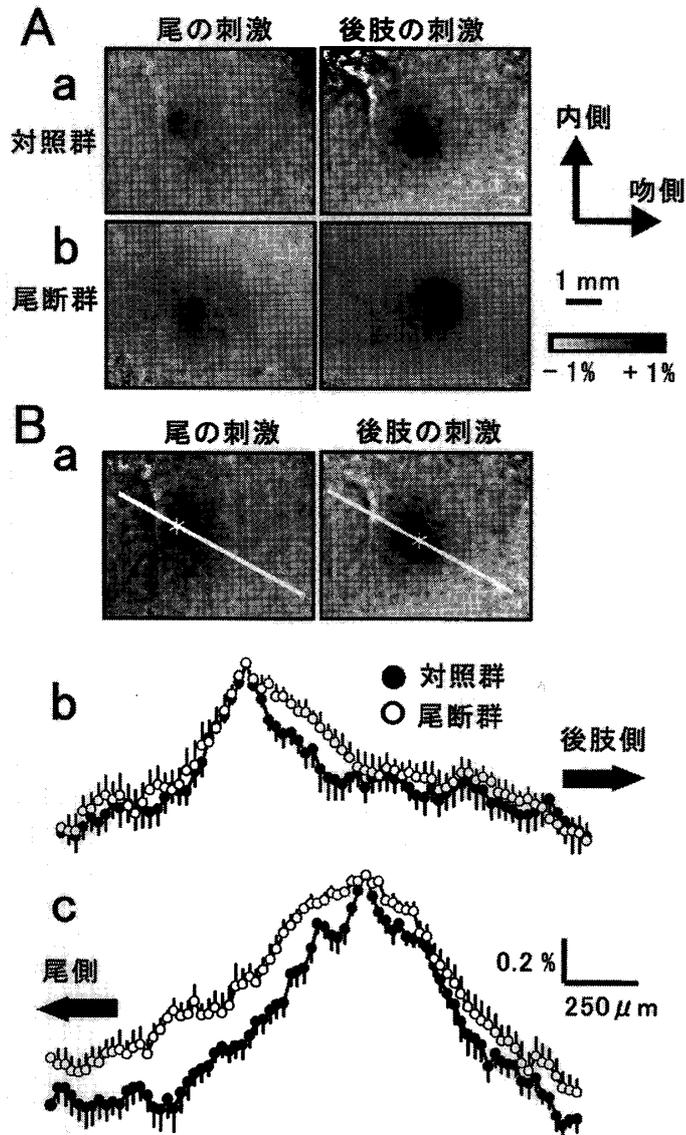


図2 対照群および尾断群におけるフラビン蛋白蛍光反応

Aa, 対照群の反応. 左は尾, 右が後肢の刺激に対する反応. b, 尾断群における反応. 尾, 後肢ともに両者の境界方向に向かって反応領域がやや拡大している. B, 両反応のピーク(*)を結ぶ線分を引き(aの白線), その線分上における蛍光強度変化の分布をピーク値をそろえて評価した(b: 尾の反応領域, c: 後肢の反応領域).

群に比べ, 後肢・尾各領域とも境界側にずれた点における蛍光変化が, 反対側にずれた点の蛍光変化と比べて大きくなっていることが確認された.

以上から尾断群では尾の反応領域, 後肢の反応領域いずれにおいてもお互いの境界方向に反応領域の拡大が生ずることが明らかとなった.

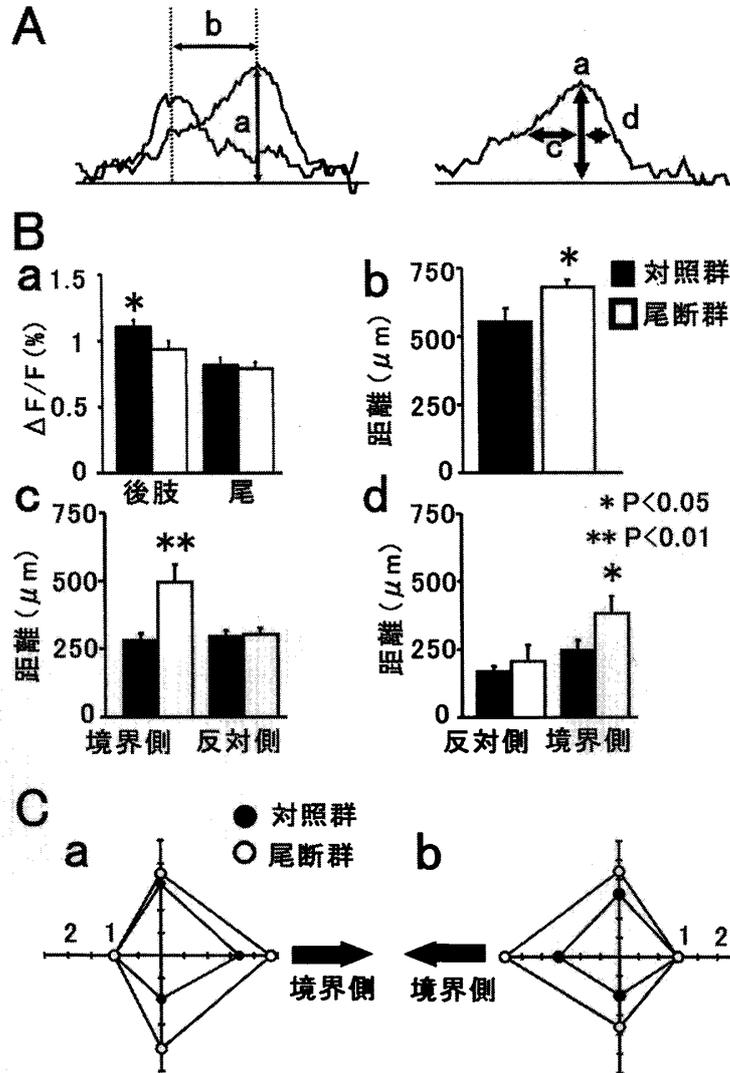


図3 尾断群における領域拡大の定量的評価

A, 領域拡大を定量的に評価するために a: ピーク値, b: ピーク間距離, ピークの半値となる点のピークからの距離 (c, d) を求め, 反応領域の広がり指標とした. c, d については後肢領域, 尾領域ともに境界側, 境界の反対側を区別して表示した. Ba, ピーク値, Bb, ピーク間距離, Bc, 尾の反応領域の広がり, Bd, 後肢の反応領域の広がりを示す結果. * は 5%, ** は 1% の有意差を示す (Mann - Whitney U 検定). C, 反応領域の反対側の広がり基準として同距離の点をピークから 4 方向に取り, 各点での蛍光強度変化を反対側の値を 1 としてプロットした. a は尾の反応領域, b は後肢の領域の結果. 対照群 11 匹, 尾断群 8 匹の平均値を表示.

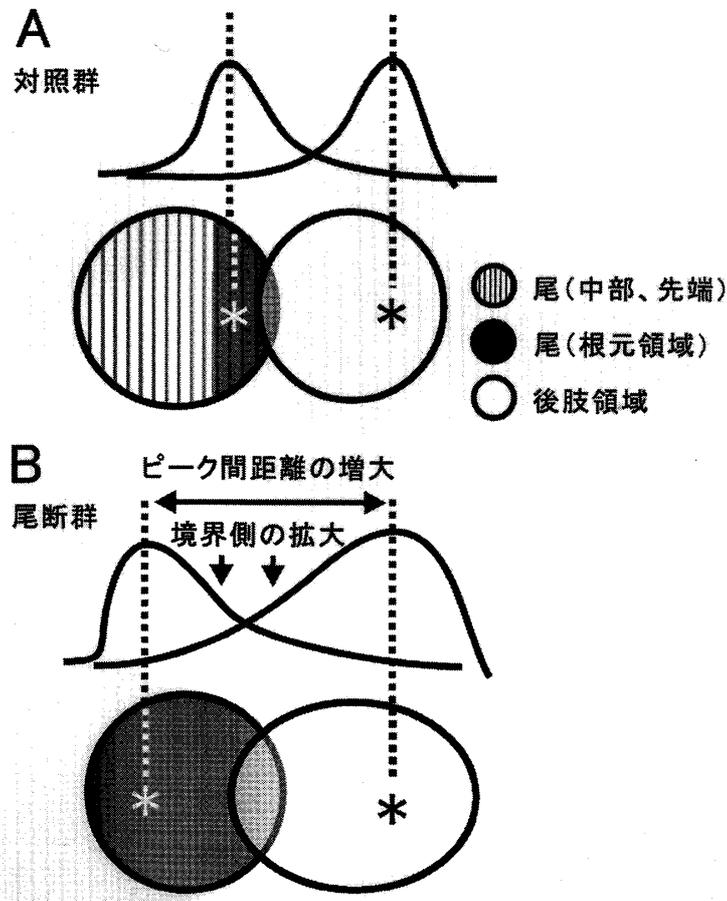


図4 反応領域の変化のメカニズム

尾の大部分を切断すると、残った根元部分の反応領域が、末梢入力が見失われた中部・先端領域に侵入すると考えられる。それによりピークがシフトし、ピーク間距離が増大すると同時に見かけ上の後肢反応領域側の広がりが増加する。また、後肢領域においても根元部分のピークの移動に伴い、反応領域が尾側へ拡大する。

考 察

我々は生後2-3日の時点で尾を切断した成体マウスにおいて、残存した尾の根元および後肢刺激に対する次体性感覚野の反応領域が互いの境界側に拡大するという知見を得た。もしこの結果が尾断群において単純に刺激強度が対照群よりも強かった、もしくは刺激部位の末梢受容器の感度上昇によるものであるとするならば、反応ピーク値が尾断群において増大すると考えられるが、その

ような知見は得られていない(図3Ba)。また単純に反応が強くなったとしても互いの境界側のみ特異的に反応領域の拡大が生じたという知見(図3C)を説明することが出来ない。従って本研究で見られた反応領域の拡大は大脳皮質体性感覚野における可塑的变化を反映するものと考えられる。末梢入力の遮断された体性感覚野の領域へ向けて隣接領域が拡大するという結果は電気生理学的な研究においても示されている。Merzenichらはヨザルの指を切断することにより切断された指

の領域は隣接指や掌に広がるようになったと報告しており⁵⁾、また指を切断せずとも神経線維を切断することによっても体性感覚野のマップの再編が生じたとする報告や⁴⁾²⁵⁾、隣接した2本の指を縫合して数ヶ月おきだけでも両者の境界が無くなって両方の指にまたがった受容野をもつニューロンが出現することも報告されている²⁶⁾。さらにこれら感覚の制限とは逆に特定の部位を用いるトレーニングを課すことによってもその領域が増大するという報告もある²⁷⁾²⁸⁾。以上我々の得た知見や従来からの研究結果を総合すると、経頭蓋的フラビン蛋白蛍光イメージング法によってマウス体性感覚野可塑性を捉えることが出来ると結論される。

本研究では生後2-3日の時点で尾の切断を行ったが、予備的な実験において成体マウスの尾を切断した場合でも切断後約2週間で同様な反応領域の変化が認められている。先行研究では末梢入力遮断後数ヶ月たってから測定を行った研究が多いが⁴⁾⁵⁾²⁶⁾、Hickmottらによると前肢のdenervation後1時間からマップの変化が起こり始め、14日後にはほぼ完全に安定して28日後とはほぼ変わらないとしており²⁵⁾、Weissらはヒトにおいて指の切断後10日目で既にマップに変化が見られたとしている⁷⁾。従って可塑性が生ずる時間経過においても本研究の知見とこれまでの研究の結果とは一致する。

尾断群において生じた体性感覚野の反応領域の変化についてみると、後肢領域・尾領域共に互いの境界側へ向かって拡大しており(図2, 3)、両者のピーク間距離は尾断群において増大していることが明らかとなった(図3B)。この変化は次のように解釈できる。尾の切断により失われた反応領域(尾の中部・先端領域)はそれに隣接する尾の根元領域に変化してしまう。尾の先端領域と後肢領域の間に根元領域は存在するので(図4A)、根元領域の反応中心は失われた先端領域へとシフトする(図4B)。それに伴って後肢領域も尾の先端方向へと引きずられるように拡大すると考えられる。すなわち、隣接した根元のピークが欠損領域へ移動することによってピーク間距離の増大が

生じ、さらに尾・後肢両領域における境界側での見かけ上の反応分布の拡大が起きたと考えられる。

これまで外来性の色素を用いない脳機能の光学的測定法としてintrinsic signalが用いられてきた。これは脳活動に伴う酸素消費の亢進にともない、毛細血管内のヘモグロビンが脱酸素化される時の色調変化を吸光度変化としてイメージングする方法である²⁹⁾³⁰⁾。本研究において使用したフラビン蛋白蛍光イメージング法は頭蓋骨越しでも約1%程度の蛍光強度変化を捉えることが可能であり、これはintrinsic signalで得られるものに比べて10倍程度大きい。これまで体性感覚野の可塑性において光学的方法による報告が少ないのは、intrinsic signalによる方法では触覚刺激に対する体性感覚野の反応は局在や時間経過は安定しているものの、領域の広がりや反応強度が一定しにくいからであると考えられる²⁹⁾。本研究において光学的測定法により体性感覚野の可塑性を報告したが、今回見られた領域の拡大は比較的小さな変化であったため、これを十分に捉えられるだけの検出能力を備えた光学的測定法である経頭蓋的フラビン蛋白イメージングが非常に有効であった。マウスは様々な遺伝子改変操作が容易で、脳研究において非常に重要な動物であるが、2ヶ月程度の比較的短期間の医学研究実習期間中に、非熟練研究者の手によってマウス体性感覚野可塑性を明確に捉えることが出来たのは驚くべき結果である。今後この研究成果を基にマウス体性感覚野可塑性の分子・細胞機構の研究が進展するものと期待される。

結 語

フラビン蛋白に由来する緑色自家蛍光変化が神経活動依存的に変化することを利用し、マウス体性感覚野の機能イメージングを経頭蓋的に行った。その結果、生後数日のレベルで尾を切断した個体の体性感覚野機能マップの可塑的变化が明らかになった。

引用文献

- 1) Penfield W and Boldrey E: Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain* 60: 389 - 443, 1937.
- 2) Marshall WH, Woolsey CN and Bard P: Cortical representation of tactile sensibility as indicated by cortical potential. *Science* 85: 388 - 390, 1937.
- 3) Marshall WH, Woolsey CN and Bard P: Observations on cortical somatic sensory mechanisms of cat and monkey. *J Neurophysiol* 4: 1 - 24, 1941.
- 4) Merzenich MM, Kaas JH, Wall J, Nelson RJ, Sur M and Felleman D: Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience* 8: 33 - 55, 1983.
- 5) Merzenich MM, Nelson RJ, Stryker MP, Cynader MS, Schoppmann A and Zook JM: Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J Comp Neurol* 224: 591 - 605, 1984.
- 6) 岩村吉晃: 神経心理学コレクションタッチ. 医学書院, 東京, pp84 - 90, 2001.
- 7) Weiss T, Miltner WH, Huonker R, Friedel R, Schmidt I and Taub E: Rapid functional plasticity of the somatosensory cortex after finger amputation. *Exp Brain Res* 134: 199 - 203, 2000.
- 8) Flor H, Elbert T, Knecht S, Wienbruch C, Pantev C, Birbaumer N, Larbig W and Taub E: Phantom - limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature* 375: 482 - 484, 1995.
- 9) Schady W, Braune S, Watson S, Torebjork HE and Schmidt R: Responsiveness of the somatosensory system after nerve injury and amputation in the human hand. *Ann Neurol* 36: 68 - 75, 1994.
- 10) Moore CE and Schady W: Investigation of the functional correlates of reorganization within the human somatosensory cortex. *Brain* 123: 1883 - 1895, 2000.
- 11) Dragoi V, Sharma J and Sur M: Adaptation - induced plasticity of orientation tuning in adult visual cortex. *Neuron* 28: 287 - 298, 2000.
- 12) Schuett S, Bonhoeffer T and Hübener M: Pairing - induced changes of orientation maps in cat visual cortex. *Neuron* 32: 325 - 337, 2001.
- 13) Sengpiel F, Gödecke I, Stawinski P, Hübener M, Löwel S and Bonhoeffer T: Intrinsic and environmental factors in the development of functional maps in cat visual cortex. *Neuropharmacology* 37: 607 - 621, 1998.
- 14) Sengpiel F, Stawinski P and Bonhoeffer T: Influence of experience on orientation maps in cat visual cortex. *Nat Neurosci* 2: 727 - 732, 1999.
- 15) Crair MC, Gillespie DC and Stryker MP: The role of visual experience in the development of columns in cat visual cortex. *Science* 279: 566 - 570, 1998.
- 16) Crair MC, Ruthazer ES, Gillespie DC and Stryker MP: Relationship between the ocular dominance and orientation maps in visual cortex of monocularly deprived cats. *Neuron* 19: 307 - 318, 1997.
- 17) Nguyen TT, Yamamoto T, Stevens RT and Hodge CJ Jr: Reorganization of adult rat barrel cortex intrinsic signals following kainic acid induced central lesion. *Neurosci Lett* 288: 5 - 8, 2000.
- 18) Gochin PM, Bedenbaugh P, Gelfand JJ, Gross CG and Gerstein GL: Intrinsic signal optical imaging in the forepaw area of rat somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8381 - 8383, 1992.
- 19) Polley DB, Chen - Bee CH and Frostig RD: Two directions of plasticity in the sensory - deprived adult cortex. *Neuron*. 24: 623 - 637, 1999.
- 20) 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* 549: 919 - 927, 2003.
- 21) Murakami H, Kamatani D, Hishida R, Takao T, Kudoh M, Kawaguchi T, Tanaka R and Shibuki K: Short - term plasticity visualized with flavoprotein autofluorescence in the somatosensory cortex of anaesthetized rats. *Eur J Neurosci* 19: 1352 - 1360, 2004.

- 22) Chance B, Cohen P, Jobsis F and Schoener B: Intracellular oxidation - reduction states in vivo. *Science* 137: 499 - 508, 1962.
- 23) Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME and McKhann GM: Cellular autofluorescence - is it due to flavins? *J Histochem Cytochem* 27: 44 - 48, 1979.
- 24) Rosenthal M and Jobsis FF: Intracellular redox changes in functioning cerebral cortex. II. Effects of direct cortical stimulation. *J Neurophysiol* 34: 750 - 762, 1971.
- 25) Hickmott PW and Merzenich MM: Local circuit properties underlying cortical reorganization. *J Neurophysiol* 88: 1288 - 1301, 2002.
- 26) Clark SA, Allard T, Jenkins WM and Merzenich MM: Receptive fields in the body surface map in adult cortex defined by temporally correlated inputs. *Nature* 332: 444 - 445, 1988.
- 27) Jenkins WM, Merzenich MM, Ochs MT, Allard T and Guic - Robles E: Functional reorganization of primary somatosensory cortex in adult owl monkeys after behaviorally controlled tactile stimulation. *J Neurophysiol* 63: 82 - 104, 1990.
- 28) Elbert T, Pantev C, Wienbruch C, Rockstroh B and Taub E: Increased cortical representation of the fingers of the left hand in string players. *Science* 270: 305 - 307, 1995.
- 29) Zepeda A, Arias C and Sengpiel F: Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *J Neurosci Methods* 136: 1 - 21, 2004.
- 30) Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD and Wiesel TN: Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324: 361 - 364, 1986.

(平成 16 年 12 月 27 日受付)
