

博士論文

マンガン造影MRIの定量化とその手法による  
パーキンソン病責任領域の同定

東北大学大学院医学系研究科保健学専攻  
医用情報技術科学領域・医用画像工学分野

菊田 里美



# 目次

要約 .....	1
<b>1. 背景および目的.....</b>	<b>5</b>
<b>2. 原理 .....</b>	<b>11</b>
2-1. AIM-MRI について .....	11
2-2. MRI の原理と $T_1$ 値について.....	13
2-3. $Ca^{2+}$ 感受性蛍光色素を用いた光学 $Ca^{2+}$ イメージング .....	14
<b>3. 実験方法および使用機器.....</b>	<b>17</b>
3-1. 細胞内 $Ca^{2+}$ 上昇と $Mn^{2+}$ 蓄積の定量化.....	17
3-1-1. 大脳基底核線条体脳スライス標本の作成.....	18
3-1-2. $Ca^{2+}$ イメージング .....	19
3-1-3. $Ca^{2+}$ イメージングのデータ処理及び解析.....	19
3-2. パーキンソン病モデルマウスの作成.....	20
3-3. MRI による $T_1$ 値計測.....	21
3-3-1. $MnCl_2$ ファントムと $T_1$ 値計測.....	21
3-3-2. マウス脳の $T_1$ 値計測.....	23
3-4. MRI の画像解析 .....	24
3-4-1. $T_1$ マップ の作製.....	24
3-4-2. 標準脳への位置合わせ (レジストレーション).....	25
3-4-3. statistical parametric mapping (SPM) 解析 .....	26
3-4-4. 関心領域 (Region of Interest: ROI) の設定 .....	26
3-5. 固定脳標本の作製と免疫組織化学染色 .....	27
<b>4. 結果 .....</b>	<b>29</b>
4-1. AIM-MRI を用いた神経活動計測の定量化について .....	29
4-1-1. 活動電位の発生頻度と $[Ca^{2+}]_i$ 変化量.....	29

4-1-2. $[Ca^{2+}]_i$ 変化量と $Mn^{2+}$ クエンチ量.....	30
4-1-3. $Mn^{2+}$ の存在による $T_1$ 値の短縮.....	31
4-2 qAIM-MRI を用いた神経活動計の条件検討.....	33
4-2-1. $MnCl_2$ 投与によるマウス脳における $R_1$ 値の時間経過 .....	33
4-3 パーキンソン病における神経活動と病態の重篤度との関連についての検討.....	34
4-3-1. パーキンソン病モデル動物の生化学的な病態の重篤度の変化.....	34
4-3-2. パーキンソン病モデル動物の神経活動変異部位の同定.....	35
4-3-3. $R_1$ と生化学的な病態の重篤度の結果との関係 .....	36
<b>5. 考察 .....</b>	<b>38</b>
5-1. AIM-MRI を用いた神経活動計測の定量化について .....	38
5-1-1. 活動に伴う細胞内への $Mn^{2+}$ の流入.....	38
5-1-2. MRI パルスシーケンスの妥当性.....	39
5-1-3. MRI 計測のタイミングの妥当性.....	40
5-2. パーキンソン病における神経活動の変化 .....	41
5-2-1. パーキンソン病における神経活動の変化.....	42
5-2-2. 古典的な神経回路モデルとの不一致.....	44
5-2-2-1. 大脳基底核の出力核 .....	44
5-2-2-2. 大脳皮質と視床 .....	45
5-3. qAIM-MRI による全脳神経活動の優位性 .....	47
5-4. 本研究の制限.....	49
<b>6. 結語 .....</b>	<b>51</b>
<b>7. 謝辞 .....</b>	<b>53</b>
<b>8. 参考文献 .....</b>	<b>54</b>
<b>9. 図.....</b>	<b>63</b>

# 要約

## 背景

パーキンソン病は世界で 2 番目に患者数が多い難治性の神経疾患である。この疾患は黒質緻密部のドーパミンニューロンが脱落することにより、大脳基底核の神経活動が変化し症状が現れると考えられている。しかし、パーキンソン病により脳のどの領域の神経活動が変化するのか、どの領域の神経活動の変化と病態の重篤度とが連関しているのかは明らかではない。これらのことを明らかにするためには、全脳の神経活動を計測する必要がある。

全脳の非侵襲神経活動計測法として、近年、活動依存性マンガン造影 MRI (activation-induced manganese-enhanced MRI; AIM-MRI) が注目されている。この方法は、神経活動に伴う細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を  $\text{Mn}^{2+}$  に置き換えて、MRI で計測する方法である。しかし、本当に細胞内への  $\text{Mn}^{2+}$  流入が神経活動を反映しているのか検証した報告はなかった。加えて、従来の AIM-MRI は定量性に乏しく、神経活動を量的に評価することはできなかった。

## 目的

本研究では、まず、AIM-MRI で得られた結果が神経活動を表出することを明らかにした上で、AIM-MRI を定量的計測法 (quantitative AIM-MRI

(qAIM-MRI) として発展させることを目指した。その上で、パーキンソン病モデルマウスに qAIM-MRI を適用し、パーキンソン病による神経活動の変化を全脳で明らかにし、どの領域の神経活動の変化が病態の重篤度と関連しているのかを明らかにすることを目的とした。

## 方法

神経活動と細胞内への  $Mn^{2+}$  の流入との関係を明らかにするために、カルシウムイメージング法の  $Mn^{2+}$  クエンチ現象を利用し、単一細胞レベルで解析した。加えて、AIM-MRI を定量化するために、AIM-MRI で計測される縦緩和時間 ( $T_1$  値) と  $Mn^{2+}$  濃度が反比例することを確認し、全脳の  $T_1$  マップを作成する qAIM-MRI 法を確立した。

qAIM-MRI による全脳神経活動履歴計測により、パーキンソン病で神経活動が変化した領域を全脳に渡って計測した。さらにパーキンソン病による神経活動の変化と、病態の重篤度との相関解析を脳の各領域に対して行った。なお、病態の重篤度には、ドーパミン産生酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の線条体での発現量を用いた。

## 結果

神経活動が大きい細胞ほど細胞内に  $Mn^{2+}$  が蓄積することを単一細胞レベルで証明した。定量的な AIM-MRI 絶対値である  $T_1$  値と  $Mn^{2+}$  濃度が反比例す

ることを確認したうえで、この  $T_1$  値を直接計測することで  $Mn^{2+}$  濃度を定量的に計測できるという原理を利用して、AIM-MRI を定量的な計測法 qAIM-MRI として発展させた。

コントロール群とパーキンソン病モデル動物群との間の statistical parametric mapping (SPM) 解析により、有意に  $T_1$  値が変化している領域を可視化した結果、基底核内では、コントロール群に対しパーキンソン病モデル動物群で神経活動が有意に上昇していた領域が線条体内に観測された。さらに、大脳皮質（特に運動感覚皮質）や視床（特に束傍核）でもパーキンソン病モデル動物群で神経活動が有意に上昇していた。

次に神経活動が変化した領域と病態との関連についての検討を行った。その結果、基底核の中では背側線条体、腹側線条体の一部の  $T_1$  値の逆数 ( $R_1$  値) と TH の発現量との間に有意な相関がみられた。つまり、線条体の  $R_1$  値、すなわち線条体の神経活動の上昇は、パーキンソン病の重篤度を反映していることが示唆された。加えて、皮質（感覚運動皮質）と視床の束傍核の  $R_1$  値と TH 発現量との間にも有意な相関がみられた。

## 結論

本研究では神経活動に依存して細胞外から細胞内に  $Mn^{2+}$  が流入することを明らかにし、かつ  $Mn^{2+}$  の存在による  $T_1$  値の短縮効果および  $T_1$  値計測の定量

性について示し、AIM-MRI を定量的な計測法 qAIM-MRI として発展させた。  
qAIM-MRI をパーキンソン病モデルマウスに応用させた結果、パーキンソン病  
では線条体の活動が亢進していた。さらに、感覚運動皮質や、視床の束傍核が  
パーキンソン病発症メカニズムに関与している可能性が示唆された。



# 1. 背景および目的

大脳基底核は、線条体、淡蒼球外節と内節、視床下核、黒質緻密部および網様部から成り、1990 年に Alexander らによって大脳基底核神経回路モデルが提唱されている (図 1A)<sup>1</sup>。この回路モデルは、ヒト以外の霊長類、げっ歯類にも適用できる<sup>52</sup>。大脳基底核の主な情報の入力部位は線条体で、大脳皮質と視床からグルタミン酸を神経伝達物質とした興奮性の入力を受けている。一方大脳基底核の出力部位は淡蒼球内節と、黒質網様部である。淡蒼球内節・黒質網様部は、抑制性の神経伝達物質である  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を放出する GABA 作動性ニューロンにより構成されており、その投射先である視床のニューロンを抑制している。

大脳基底核の入力から出力まで情報を伝達している経路は主に、直接路、間接路の 2 つが挙げられる。直接路は、D1 ドーパミン受容体を発現している線条体の GABA 作動性投射ニューロン (D1 ニューロン) が、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節・黒質網様部に直接投射している経路である。間接路は D2 ドーパミン受容体を持つ線条体の GABA 作動性投射ニューロン (D2 ニューロン) が淡蒼球外節に投射し、視床下核のグルタミン酸性の興奮性ニューロンを介して淡蒼球内節・黒質網様部に至る経路である。したがって、大脳基底核の

出力核である淡蒼球内節・黒質網様部に対して、直接路は抑制性の入力をし、間接路は興奮性の入力をしていることになる（図 1A）。

黒質緻密部にはドーパミン作動性ニューロンが存在し、線条体へ投射している。上記のように、線条体の投射ニューロンには D1 ニューロンと、D2 ニューロンとがあり、これらのニューロンがそれぞれ、直接路ニューロン、間接路ニューロンである。黒質緻密部から線条体へのドーパミン投射の作用については、議論のあるところではあるが、一般的には、D1 ニューロンと D2 ニューロンに対して相反する作用を持つと考えられている<sup>1)</sup>。ドーパミンは、D1 ニューロンに対して D1 受容体を介して活動を亢進させる方向に働くため、直接路が活性化するが、D2 ニューロンに対しては、D2 受容体を介して活動を抑える方向に作用するため間接路は抑制されると考えられている。そのため、結果的にドーパミンの存在により基底核からの抑制性の出力は低下する。つまり、パーキンソン病などによりドーパミンが減少すると、直接路の活動は低下、間接路の活動は亢進し、その結果、基底核からの抑制性の出力が増加するといわれている（図 1B）<sup>1)</sup>。このように、ドーパミンレベルにより、直接路、間接路を介した淡蒼球内節・黒質網様部への入力に変化し、そのバランスにより大脳基底核からの出力の大きさが決定されると考えられる。

大脳基底核の疾患を代表するパーキンソン病は振戦、無動、筋固縮、姿勢保持障害などの症状を呈する難治性の神経疾患である。パーキンソン病では大脳基底核黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンが変性・脱落し、線条体のドーパミンが不足する<sup>1,2,3,4</sup>。線条体のドーパミンの不足は、直接路の活動低下と、間接路の亢進を誘発し、どちらも淡蒼球内節・黒質網様部ニューロンの活動を亢進させると言われている<sup>1</sup>。そのため基底核からの抑制性の出力が増加し、その結果、運動機能低下などの症状が誘発されると考えられている<sup>2</sup> (図 1B)。

しかし、上記モデルは大脳基底核神経回路の構造や、ドーパミンの不足による神経活動の変化を単純化しすぎているため、説明のつかない現象も多い<sup>3,5,6,7</sup>。例えば、上記モデルにある神経結合以外にも、実際には淡蒼球外節から淡蒼球内節への投射や、線条体 D1 ニューロンから淡蒼球外節への投射のような神経線維の連絡が存在していることも明らかになっている<sup>5,6</sup>。加えて、複雑な信号伝達経路に関与し得る代謝型受容体であるドーパミン受容体を、単に興奮作用、抑制作用の 2 種類の作用に分類していることも問題であると思われる<sup>5</sup>。また、パーキンソン病モデル動物において、2-デオキシグルコース法、電気生理学的手法、GAD (グルタミン酸脱炭酸酵素) やシトクローム酸化酵素の *in situ* ハイブリダイゼーション法などにより、大脳基底核の各領域の活動を検討したところ、

上記のモデルとは一致しない点もあることが報告されている<sup>5</sup>。このように、パーキンソン病の病態生理学を現在の基底核神経回路モデルだけで説明することは難しい。この問題を解決するためには、大脳基底核を含む脳の領域ごとの神経活動の変化と病態との関係を明らかにする必要がある。このためには、基底核内の複数の領域の神経活動を同時に計測し、病態との関連を調べる必要がある。そこで、脳全体の活動の変化をとらえることが可能であるといわれている、*in vivo* 神経活動イメージング法の AIM-MRI に着目した<sup>8,9,10</sup>。

AIM-MRI は、 $Mn^{2+}$  を造影剤として MRI 撮影を行うことで、神経活動の履歴を計測することができるといわれている比較的新しい手法である<sup>8,9,10</sup>。神経細胞では活動電位の発生に伴い、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルが開口し、 $Ca^{2+}$  が細胞外から細胞内へ流入する (図 2)。その際、 $Mn^{2+}$  が細胞外に存在していると、 $Mn^{2+}$  も  $Ca^{2+}$  チャネルを通り細胞内に流入する。しかし、 $Mn^{2+}$  は  $Ca^{2+}$  排出機構である  $Ca^{2+}$ -ATPase や  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger を通ることができず、神経活動に伴い  $Mn^{2+}$  は細胞内に蓄積する<sup>11,12</sup>。また、MRI で計測されるプロトン ( $H^+$ ) の縦緩和時間 ( $T_1$  値; 原理の章を参照) は、 $Mn^{2+}$  の存在によって短縮する。よって、 $Mn^{2+}$  を投与した動物に対して MRI を用いて  $T_1$  値計測を行うことにより、 $Mn^{2+}$  が細胞外に存在している状態の時に神経活動が高かった領域ほど、 $T_1$  値が短縮することが予想され、神経活動の履歴を計測することが可能

となる 9, 10, 13, 14, 15。

AIM-MRI を用いた脳活動計測の意義を明らかにするためには、神経活動と  $Mn^{2+}$  の蓄積量 との関係を示す必要がある。しかし、細胞内への  $Mn^{2+}$  蓄積と細胞活動との関係を検証した報告は調べた限り存在しないため<sup>9</sup>、これを明らかにする必要がある。

また、これまでの AIM-MRI は、神経活動に依存した細胞内への  $Mn^{2+}$  流入を、MRI の  $T_1$  強調画像の信号強度のコントラストを用いて検出し、神経活動が変化した領域の評価を行っていた。しかし、 $T_1$  強調画像の信号強度は相対値であるため<sup>5</sup>、動物間での比較や、同個体での経時的な変化の比較が難しい。相対値である信号強度での比較ではなく、絶対値である  $T_1$  値そのものを算出することで、動物間での  $Mn^{2+}$  蓄積量の比較を行うことが可能になると考えられる。しかし、 $T_1$  値 の計測には時間がかかるため、動物への麻酔の影響を考慮すると、できるだけ短時間での計測が望ましい。そこで、より正確かつ迅速に  $T_1$  値計測が可能になる最適なパラメータについて検討する必要がある。加えて、AIM-MRI をパーキンソン病の様な慢性疾患に用いる場合、 $MnCl_2$  投与から MRI 撮影までの時間をどの程度置くことにより  $Mn^{2+}$  が脳に到達し、神経活動を反映した  $T_1$  値計測が可能となるのかなど、検討が必要である。そこで、 $MnCl_2$  の投与量や、さらに  $T_1$  値計測までのタイミングのような、 $MnCl_2$  の投与から

撮影までの条件検討が必要である。

そこで本研究では、パーキンソン病における脳の各領域の神経活動の変化が病態の重篤度とどのように関連しているのかを明らかにすることを目的とし、まず、(1) 活動に伴う細胞内への  $Mn^{2+}$  の流入を、 $Ca^{2+}$  感受性蛍光色素の  $Mn^{2+}$  クエンチ（消光）現象を利用して、定量的に解析した。また、定量的な AIM-MRI への発展を目指し、 $Mn^{2+}$  の存在による  $T_1$  値の短縮効果と  $T_1$  値計測の定量性についての検証を行い、これらの結果から AIM-MRI を用いた神経活動計測の妥当性について検討した。さらに、(2) AIM-MRI を用いた神経活動計測実験を安定して行うための条件検討として、 $MnCl_2$  投与から MRI 撮影までのタイミングについての検討をした。その上で、(3) パーキンソン病による神経活動の変化と病態の重篤度との関連を明らかにするために、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 投与によりパーキンソン病モデル動物を作成し、AIM-MRI を用いた神経活動計測により、パーキンソン病における神経活動変異部位を明らかにし、生化学的な病態の重篤度の指標としての TH の発現量との相関関係の検討を行った。

## 2. 原理

### 2-1. AIM-MRI について

AIM-MRI の原理についての模式図を図 2 に示す。細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が 2 – 2.5 mM 程度であるのに対し、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は 100 nM 程度であり、その差は約 2 万倍である。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は様々な機能を持った細胞内情報伝達分子であるだけでなく、細胞活動の指標にもなり得る。例えば活動電位の発生に伴い、細胞膜にある電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが開くと、細胞外から細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は上昇する<sup>16, 17, 18</sup>。ここで、細胞外に  $\text{Mn}^{2+}$  が存在している場合、 $\text{Mn}^{2+}$  はこの  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを通ることができるので、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの開口に伴い細胞内に流入する。 $\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase や  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger などの排出機構により細胞外へ能動的に排出されるのに対し、 $\text{Mn}^{2+}$  はこれらの排出機構を通ることができないため、 $\text{Mn}^{2+}$  は細胞内に蓄積する<sup>11, 12</sup>。つまり、活動が高い細胞ほど、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの開口時間が長いため、 $\text{Mn}^{2+}$  が細胞内により多く流入し、蓄積することが予想される。

一方で、MRI で計測できる  $\text{H}^+$  の縦緩和時間（以後  $T_1$  値と呼ぶ）は周囲に常磁性体があると短縮される。 $\text{Mn}^{2+}$  は常磁性体であるため、 $\text{Mn}^{2+}$  が周囲に多

く存在するほど、 $T_1$  値は短縮される<sup>13</sup>。つまり、活動が高かった細胞ほど  $Mn^{2+}$  が多量に流入し、かつ、排出されず細胞内に留まるため、 $T_1$  値が短縮するはずである。

$Mn^{2+}$  は生体における必須元素であり、生体内にも多少存在しているが、 $Mn^{2+}$  を投与することにより、通常の生体内より、より高濃度の  $Mn^{2+}$  が存在するようになる。

これらの性質を利用して、 $Mn^{2+}$  を造影剤として用い、組織のコントラストを強調したり、神経細胞に  $Mn^{2+}$  が取り込まれる特徴を利用して、軸索のトレースなどを行う MRI の手法が manganese-enhanced MRI (MEMRI, マンガン造影 MRI) である<sup>9,10</sup>。AIM-MRI は MEMRI の一種であり、 $Mn^{2+}$  を造影剤として、神経活動の履歴を非侵襲的に観察することが可能になるといわれている比較的新しい手法である<sup>8,9,10</sup>。

## 2-2. MRI の原理と $T_1$ 値について

水素の原子核である  $H^+$  は、おのおのの軸で回転 (スピン) しており、個々に小さな磁場を持っている。これを磁気双極子モーメントと呼び、任意の方向に並んでいる。そのため、全ての双極子モーメントがたがいに打ち消しあい、外部磁場  $B_0$  がない場合、正味の磁場はゼロである。ここに外部磁場  $B_0$  が存在



すると、 $H^+$  のスピンは棒磁石のようにふるまい、大きな外部磁場  $B_0$  に沿って整列する。しかし、全てが同じ方向を向くのではなく、ほぼ半数ずつ  $B_0$  方向と、 $B_0$  と反対方向に向く。ただし、 $B_0$  方向を向くスピンのわずかに多いため（約 100 万分の 1）、正味の磁化  $M$  は  $B_0$  の方向に、正味磁化  $M_0$  を作り出す。 $B_0$  内で  $H^+$  は  $B_0$  軸を中心に歳差運動をしていて複雑なため、ここでは、座標系自体が、 $B_0$  軸周りに、スピンと同じ方向、速度で回転している、回転座標系 ( $x'$ ,  $y'$ ,  $z$ ) を用いて考える。

$B_0$  の方向を向いている磁化ベクトル  $M$  に新たに別の外部磁場  $B_1$  を  $x'$  軸方向に一定時間印加すると、磁化ベクトルは  $x' - y'$  平面上に倒れる (図 3)。この外部磁場  $B_1$  を Radio Frequency (RF) パルスと呼び、特に、磁化ベクトルを  $90^\circ$  倒すパルスのことを  $90^\circ$  RF パルスまたは  $90^\circ$  パルスと呼ぶ。RF パルスが断たれると、磁化ベクトルはエネルギーを失いながら  $B_0$  の方向に戻っていく。この過程を縦緩和と呼び、磁化ベクトル  $M$  の  $z$  軸成分 ( $M_z$  成分) が  $B_0$  (=  $M_0$ ) に回復する時定数を、縦緩和時間 ( $T_1$  値) と呼ぶ。この縦磁化  $M_z$  の緩和は次式で表すことができ、MRI ではこの  $M_z$  成分を計測している。

$$M_z(t) = M_0 \left( 1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad (1-1)$$

1 つの  $90^\circ$  パルス印加後、別のパルスを印加するとき、印加する時間の間隔を TR (繰り返し時間, Repeat Time) という。  $t = TR$  のとき、式 (1-1) は

$$M_z(TR) = M_0 \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}\right) \quad (1-2)$$

となる。MRI で計測している信号は、 $H^+$  の歳差運動によって発生する電流（電磁誘導）であり、 $M_z$  成分を反映した値であるが、実際には磁場の不均一等により減衰した信号である。また、得られた信号に次元はなく、単位もない。さらに、自由に動けるプロトンの数  $N(H)$  も信号に影響する。つまり信号強度  $SI$  (Signal Intensity) は相対的な値であり、以下の式で表される。

$$SI \propto N(H) \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}\right) \quad (1-3)$$

この信号強度のコントラストを反映した MRI 画像は  $T_1$  強調画像と呼ばれる。しかし信号強度は、 $T_1$  値だけでなく  $N(H)$  にも依存する相対値であるため、 $T_1$  強調画像からは  $T_1$  値を求めることはできない。しかし、 $TR$  を変化させて取得した様々な  $TR$  における信号強度  $SI$  から、式 (1-3) の緩和曲線を求めることで、 $T_1$  値を算出することができる。

### 2-3. $Ca^{2+}$ 感受性蛍光色素を用いた光学 $Ca^{2+}$ イメージング

神経細胞が興奮すると、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇する。つまり細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を計測することにより間接的に細胞活動を知ることができる。つまり、 $Ca^{2+}$  イメージングを用いれば、多細胞から同時に細胞活動の情報を得ることができる 18, 19, 20, 21。

Ca<sup>2+</sup> 動態を計測するために、Ca<sup>2+</sup> 濃度の変化に伴いその蛍光を変化させる Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光色素を細胞内に導入し、イメージングを行う。一般に Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光色素は、蛍光を発する分子（発色団）と Ca<sup>2+</sup> キレート剤とが結合した分子である。Ca<sup>2+</sup> キレート剤とは、溶液中から Ca<sup>2+</sup> を取り除く試薬であるが、これは 4 つのカルボキシル基 (-COOH) を持つ。水溶液中ではカルボキシル基がイオン化する (-COO<sup>-</sup> になる) ので、Ca<sup>2+</sup> と錯体を形成する。このキレート剤に Ca<sup>2+</sup> が結合しているときとしていないときとで分子の構造が変化し、それが発色団の蛍光特性を変化させる<sup>22</sup>

Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光色素はイオンであるため、脂質二重膜の細胞膜を透過することができない。そのため、何らかの方法を用いて細胞内に色素を導入する必要がある。細胞内に Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光色素を導入する方法としては、細胞に直接色素を注入する方法、蛍光色素のアセトキシメチル (Acetoxy Methyl: AM) エステル体を用いる方法、軸索輸送による方法などがある。本研究では多細胞イメージングを目的としているので、脳スライス標本を色素溶液に浸すだけで多細胞に色素を導入することができる蛍光色素の AM エステル体を用い、細胞膜を透過させ蛍光色素を細胞内に導入する方法を用いた。AM エステル化とは、Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光色素のカルボキシル基と AM 基をエステル結合させ (-COOCH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>)、色素そのものを脂溶性にすることであり、この色素を

AM 体という。脂溶性になった色素は細胞膜を透過する。ただし、AM 体はイオンではないので、このままでは  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合しない。しかし、細胞内にはエステラーゼというエステル結合を切断する酵素があり、細胞内に入った色素の AM 体はエステラーゼにより加水分解され、元の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素に戻る。再びイオンに戻った色素は細胞膜を透過できず、細胞内に閉じ込められる。そのメカニズムを図 4 に模式的に示す。この画期的な方法を用いれば色素を簡便に細胞内に導入できる。

上記のような方法によって色素を導入した標本の蛍光強度を顕微鏡を用いて観察し、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を計測する<sup>19)</sup>。

### 3. 実験方法および使用機器

本研究は、東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会と遺伝子組換え実験安全専門委員会の規程に従い、許可を受けた上で行った。許可番号はそれぞれ、2014 医動-234、2014 医組換-015 である。

#### 3-1. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇と $\text{Mn}^{2+}$ 蓄積の定量化

##### 3-1-1. 大脳基底核線条体脳スライス標本の作成

本研究では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇と  $\text{Mn}^{2+}$  蓄積量を定量的に計測するために GAD67-GFP ノックインマウス<sup>23</sup> の皮質線条体スライス標本を用いた。GAD67-GFP ノックインマウスは抑制性伝達物質を放出する GABA 作動性ニューロンにのみ緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein; GFP) を発現している遺伝子組換えマウスである。線条体では 90% 以上が GABA 作動性ニューロンであるため、この GFP の蛍光を観察することで、ニューロンのほとんどを同定することができる。

12-23 日齢の GAD67-GFP ノックインマウスにハロセンで麻酔を施した後、脳を摘出し、95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$  を通気した人工脳脊髄液 (artificial

cerebrospinal fluid: ACSF) に浸し、冷却した。ACSF の組成は NaCl 137, KCl 2.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.58, MgCl<sub>2</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 21, glucose 10 (mM) である。冷却した大脳半球から振動刃スライサー (VT1200s, Leica) を用いて厚さ 300 μm の線条体を含む矢状断スライス標本を作成した<sup>24, 25</sup> (図 5)。作成したスライスは、95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub> を通気した ACSF 中で最低 1 時間以上室温で静置したのち実験に使用した。

### 3-1-2. Ca<sup>2+</sup> イメージング

線条体スライス標本を、色素導入用溶液に浸し、95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub> を通気した湿潤な 35 °C インキュベーターの中で 45 分静置することにより、Fura-2 LR/AM (Calbiochem) を細胞外より負荷した<sup>24, 26, 27</sup>。その後 ACSF で 15-30 分間同じインキュベーター中で細胞外の色素を洗い流した。色素導入用溶液は Fura-2 LR/AM 20 μM、sulforhodamine 101 (SR101, Sigma) 1 μM , Cremophor EL (Sigma) 0.02% を ACSF に溶解したものである。なお SR101 はグリア細胞の多くを占めるアストロサイトを選択的に染色する色素で、アストロサイトを識別するために使用した<sup>28</sup>。

蛍光観察は、Fura-2 LR を負荷した標本を正立落射蛍光顕微鏡 (BX-51WI, Olympus) 下の灌流チャンバーに静置して行った。蛍光は高速波長切替装置

(DG-4, Sutter) から 360, 380 nm の励起光を交互に照射した際の波長約 510 nm の蛍光 (F360, F380) を、対物レンズ (20×, 水浸, NA 1.0, Olympus) を通して顕微鏡に取り付けた冷却 EM-CCD (DU-885 または DU-897, Andor) で取得し、ソフトウェア iQ (Andor) を用いて記録した。

### 3-1-3. $\text{Ca}^{2+}$ イメージングのデータ処理及び解析

データの解析には ImageJ<sup>29</sup>, MATLAB (MathWorks), SciPlot (M. Wesemann, 1991-95) を使用した。本研究で用いた Fura-2 LR は、波長 380 nm で励起した場合、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇により蛍光強度を減少させ、波長 360 nm で励起した場合は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  にかかわらず、蛍光強度は一定であるという特徴を持つ<sup>30</sup>。蛍光色素の細胞内導入量などの違いに起因する蛍光強度の絶対値に依存しない量として、蛍光強度 F380 とその初期値 F380<sub>0</sub> から算出される  $\Delta\text{F380}/\text{F380}$  ( $= (\text{F380} - \text{F380}_0) / \text{F380}_0$ ) または R ( $= \text{F360}/\text{F380}$ ) の変化量  $\Delta\text{R}$  を電気刺激による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化量として用いた<sup>16, 30</sup>。また、Fura-2 LR は  $\text{Mn}^{2+}$  と結合すると蛍光が消光 (クエンチ) するという性質も持つ<sup>31</sup>。そこで  $\text{Mn}^{2+}$  によるクエンチを表す際には、 $\Delta\text{F360}/\text{F360}$  ( $= (\text{F360} - \text{F360}_0) / \text{F360}_0$ ) を用い、細胞内への  $\text{Mn}^{2+}$  流入の指標とした。

活動電位を発生させるために、大脳皮質と線条体との間の白質から伸びる神

経線維束に先端の直径が約 30  $\mu\text{m}$  のガラス電極を置き(図 6A アスタリスク), 刺激を行った。活動電位の発生頻度に依存した  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化を解析するために刺激強度 200  $\mu\text{A}$ 、持続時間 200  $\mu\text{s}$  の二相性 (biphasic) パルスを<sup>25</sup>, 1 回, 10 Hz 10 回, 20 Hz 20 回, 50 Hz 50 回与えることで刺激を行った。また, 活動電位の発生頻度による細胞内への  $\text{Mn}^{2+}$  の流入について解析するために, 通常の ACSF 灌流時 (コントロール) の刺激による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化 (図 6B) と, 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  灌流時の刺激による色素のクエンチ (図 6C) とを同じ細胞で比較した。刺激による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化量の振幅 ( $\text{Ca}^{2+}$  transient) を神経活動の指標とした (図 6B 矢印)。また, 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  灌流時の刺激直前 1 秒間と, 刺激後 8 秒後の 1 秒間の蛍光強度の平均値の差の大きさをクエンチ量と定義し,  $\text{Mn}^{2+}$  蓄積量の指標とした (図 6C 矢印)。刺激頻度・回数は 50 Hz 20 回または 20 Hz 20 回であった。また,  $\text{MnCl}_2$  は ACSF に溶解して灌流した。実験はすべて灌流液を  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  にコントロールして行った。

### 3-2. パーキンソン病モデルマウスの作成

生後 8-13 週年齢の雄マウス (C57BL/6J) を qAIM-MRI を用いた神経活動計測に使用した。生理食塩水 (大塚製薬) に溶解した 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride (MPTP, Sigma)



を体重比で 20 mg/kg 腹腔内投与し、それを 2 時間おきに 4 回繰り返すことでパーキンソン病モデル動物を作成した<sup>32</sup> (MPTP 群, n = 6)。control 群には同体積の生理食塩水を投与した (control 群, n = 6)<sup>32, 33</sup>。MRI の撮影者と、生化学解析の実験者は、どのマウスに MPTP もしくは生理食塩水を投与したのかわけられていない、ブラインド条件下で実験を行った。

### 3-3. MRI による T<sub>1</sub> 値計測

#### 3-3-1. MnCl<sub>2</sub> ファントムの T<sub>1</sub> 値計測

実験には MnCl<sub>2</sub> 濃度 0, 20, 40, 60, 80, 100 μM の擬似細胞内溶液ファントムを用いた。使用したファントムの MnCl<sub>2</sub> 以外の組成は以下のとおりである: agarose (アガロース) 2%, CH<sub>3</sub>KO<sub>3</sub>S (メタンサルホン酸カリウム) 140 mM, NaN<sub>3</sub> (アジ化ナトリウム) 2 mM, HEPES-Na (へぺス-ナトリウム塩) 20 mM (pH ~7.2)。NaN<sub>3</sub> は防腐剤の役割を果たしている。

実験はファントムの撮影、動物の撮影共に静磁場強度 9.4 T の縦型 MRI 装置 (AV400WB, Bruker Biospin) を用いて行い MRI 装置付属のソフトウェア ParaVision 5.1 (Bruker Biospin) で信号を記録した。

MnCl<sub>2</sub> 濃度を変化させたファントムの T<sub>1</sub> 値計測には高速撮像が可能な Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement-Variable Repetition Time (RARE-VTR) と Inversion Recovery (IR) 法の一つである Inversion Recovery-RARE (IR-RARE) を用いた。IR-RARE は反転回復 (Inversion Recovery) パルスシーケンス法の一つで、90° RF パルスの印加の前に 180° RF パルスが用いられる。この 2 つの RF パルスの間隔を反転時間 (Inversion time :TI) と言い反転回復パルスシーケンスでは、TR の代わりに TI を変化させることで、T<sub>1</sub> 値を求める。

以下、RARE-VTR、IR-RARE のそれぞれのパラメータについて示す。ファントムの撮影に用いた RARE-VTR のパラメータは、TR = 26.6, 50, 100, 150, 250, 450, 800, 1500, 2500, 4000, 6000, 9000, 12000 ms, effective Echo Time (TE<sub>eff</sub>) = 9.87 ms, Field-of-View (FOV) = 3.0 × 3.0 cm, matrix = 256 × 256, スライス厚 0.5 mm, スライス枚数 1 枚、Echo Train Length (ETL) = 2 に設定した。撮影時間は 1 h 18 min 33 s であった。IR-RARE のパラメータは、TR = 18 s, TE<sub>eff</sub> = 6.39 ms, FOV = 3.0 × 3.0 cm, matrix = 256 × 256, スライス厚 0.5 mm, スライス枚数 1 枚、TI = 26.6, 50, 100, 150, 250, 450, 800, 1500, 2500, 4000, 6000, 9000, 12000 ms, ETL = 2 に設定した。撮影時間は 8 h 1 min 9 s であった。ファントムはサージカルテープで寝台に固定し、撮像部位

がコイル中心付近にくるように寝台をセットした。位置決め撮像をし、目的部位がコイル中心にきているか確認し、大きくずれている場合はファントムの位置を調整し、撮像を行った。

### 3-3-2. マウス脳の $T_1$ 値計測

MPTP または 生理食塩水を投与してから、組織の固定までの実験スケジュールを図 7 に示す。MPTP または 生理食塩水を投与後 1-2 週間後のマウスの腹腔内に、生理食塩水に溶解した  $MnCl_2$  を 0.2 mmol/kg の容量で 24 時間おきに 2 回投与した<sup>9</sup>。より長い時間、より多くの  $Mn^{2+}$  が細胞外に存在することで、神経活動が恒常的に高い細胞により多くの  $Mn^{2+}$  が細胞内に蓄積することが想定されるため  $MnCl_2$  は 2 回に分けて投与した<sup>13</sup>。

マウスの脳の  $T_1$  値計測には RARE-VTR 法を用いた。撮影パラメータは以下の通りである: TR = 450, 600, 900, 1500, 2500, 4500, 7500 ms, TE<sub>eff</sub> = 8.11 ms, FOV = 1.6 × 1.6 cm, matrix = 128 × 128, スライス厚 0.5 mm, スライス枚数 20 枚, ETL = 2。撮影時間は 19 min 8 s であった。

標準脳への位置合わせのための解剖画像として、 $T_1$  値計測の直後に  $T_2$  強調画像も撮影した。シーケンスは RARE を使い TE<sub>eff</sub> = 22 ms, TR = 2500 ms であった。

撮像では、体温保持用の温水を灌流させたチューブを寝台にセットし、マウスにイソフルラン (Mylan) で麻酔を行い、バイトバーを用いて寝台に固定した。麻酔濃度は導入時で 2-3%、維持時は 1-2% であった。吸入ガスには 20% O<sub>2</sub>, 80% Air を混合して使用した。寝台に固定する際、呼吸パッドと温度センサー・体温保持用の布をマウスに取り付け (図 8)、撮像部位がコイル中心付近にくるように寝台をガントリにセットした。位置決め撮像をし、目的部位がコイル中心にあるか確認し、大きくずれている場合はマウスの位置を調整した。このとき、コイル中心から撮像部位中心の z 軸方向のずれは 1 mm 以内に抑えた。撮像中はマウスの呼吸と体温と体動を常にモニターし、麻酔濃度・麻酔流量・温水の温度・温水の流速をコントロールすることでマウスの体調管理を徹底した。位置合わせも含め、マウスは MRI ガントリの中で約 30 分過ごし、撮像後は速やかにホームケージに戻された。

### 3-4. MRI の画像解析

#### 3-4-1. T<sub>1</sub> マップ の作製

T<sub>1</sub> マップ は ParaVision 5.1 (Bruker BioSpin) で作製した。各 TR で取得した MRI 画像に 3 × 3 × 1 のガウシアンフィルタをかけ、画像をスムージ

ングした後、信号強度 (signal intensity, SI) を下記の関数でピクセルごとにフィッティングし、 $T_1$  値を求めた。

$$SI(TR) = A \left( 1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) \quad (2)$$

$T_1$  値が 500 ms 以下のピクセルと 4000 ms 以上のピクセルは外れ値とし、解析から除外した。

### 3-4-2. 標準脳への位置合わせ (レジストレーション)

作製した  $T_1$  マップ とマウス脳アトラス (Allen Reference Mouse Brain Atlas <sup>34</sup> (2014 Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas, <http://mouse.brain-map.org/>)) との位置合わせは次に示す手順で行った。

1) マウスの脳テンプレートを  $T_2$  強調画像として 3D-RARE で取得した。パラメータは  $TE_{\text{eff}} = 45$  ms, matrix size =  $256 \times 256 \times 256$ , field-of-view (FOV) =  $2.2 \times 2.2 \times 2.2$  cm<sup>3</sup> であった。

2) SPM8 (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, University College London) を用いて、各マウスの  $T_2$  強調画像を、脳テンプレートの  $T_2$  強調画像に位置合わせを行った。そのとき同時に同じ変位行列で  $T_1$  マップ も変形・移動させることにより、 $T_1$  マップ を脳テンプレートにレジストレーションし

た。

3) pMod software (PMOD Technologies) を用いてマウス脳アトラスを 脳テンプレートに手動でレジストレーションした。

### 3-4-3. statistical parametric mapping (SPM) 解析

標準脳に位置合わせを行った後の  $T_1$  マップ について、コントロール群の  $T_1$  値と MPTP 投与群の  $T_1$  値との差を比較するために、ピクセルごとに群間検定をする解析法である statistical parametric mapping (SPM) 解析 を行った。SPM8 を用いて unpaired Student' s t-test により  $P < 0.025$  で有意差がある領域を検出した。

### 3-4-4. 関心領域 (Region of Interest: ROI) の設定

マウスの脳の各領域の  $T_1$  値の逆数である  $R_1$  値解析のために、3-4-2 でレジストレーションしたマウス脳アトラスにより、背側線条体 (dCPu)、腹側線条体 (vCPu)、大脳皮質の感覚運動野 (Ctx)、視床の束傍核 (PF)、海馬 (HIP)、側坐核 (NAc) の領域を同定し、そこに Region of Interest (ROI: 関心領域) を設定した (図 9)。

### 3-5. 固定脳標本の作製と免疫組織化学染色

固定脳標本の作製のために、灌流固定を行った。頸椎脱臼による安楽死の後、マウスを手術板に固定、開腹開胸、翼状針 (25 G × 3/4 inch) を左心室へ 2.5 mm 挿入し、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS: リン酸緩衝生理食塩水, 日水製薬) 30 ml、4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) を溶解した PBS 30 ml の順に流速 3 ml/min の速さでペリスタリックポンプ、もしくはシリンジを用いて灌流した。その後脳を取り出し、十分な量の 4% パラホルムアルデヒド溶液中に保存した後、10% sucrose (ナカライテスク) PBS に置換した。その後、約 24 時間後に、浮いていた脳が沈んでいるのを確認し、順次 20% sucrose PBS、30% sucrose PBS に置換した。

固定脳標本の凍結切片を作製し、ドーパミン合成に必須な酵素であるチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase; TH) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。光学濃度解析により、線条体の TH の発現量を見積もった。また、TH の発現量と  $T_1$  値との関連についての解析には、実験バッチ毎にコントロール群の光学濃度の平均値を 1 として、MPTP 投与動物間での比較をした。この線条体の TH の発現量はパーキンソン病において、運動行動試験の成績と相関があるという報告があるため<sup>35</sup>、TH 発現量を病態の重篤度の指標として用いた。

ドーパミンニューロンが存在する黒質緻密部、腹側被蓋野に対しては、ニューロンマーカーである NeuN に対する抗体及び TH に対する抗体を用いた蛍光二重染色を行い、TH 陽性細胞をドーパミン作動性ニューロンとして、その数をカウントし、単位面積あたりのドーパミン作動性ニューロン数を示した。



## 4. 結果

### 4-1. AIM-MRI を用いた神経活動計測の定量化について

#### -Quantitative AIM-MRI (qAIM-MRI) への検討-

##### 4-1-1. 活動電位の発生頻度と $[Ca^{2+}]_i$ 変化量

刺激強度を 200  $\mu$ A、刺激頻度と回数を 1 回, 10 Hz 10 回, 20 Hz 20 回, 50 Hz 50 回にそれぞれ変化させた場合の、ある細胞における蛍光強度変化  $-\Delta F380/F380$  の時間経過を図 10A に示す。この図より、刺激の頻度が増すごとに蛍光強度、つまり  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が大きくなっていることが分かる。図 10B は図 10A で示した  $[Ca^{2+}]_i$  変化について、刺激をする直前の 10 フレームをベースラインとし、51 細胞から得られた刺激後の  $-\Delta F380/F380$  の振幅の最大値の平均値を刺激頻度別に比較したものである。この図より、刺激頻度が高いほど、 $[Ca^{2+}]_i$  変化量が大きくなっていることが分かる。1 回刺激と 10 Hz 10 回刺激との間には有意な差が見られなかったが、その他の各刺激頻度における  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の間には有意な差があった (Friedman 検定, Tukey の多重比較)。この結果より、刺激頻度が高いほど、つまり、活動電位の発生頻度が高いほど  $[Ca^{2+}]_i$  変化量が大きくなることが確認された。

#### 4-1-2. $[Ca^{2+}]_i$ 変化量と $Mn^{2+}$ クエンチ量

図 11 A,B は、同じニューロンから得られた、コントロール時の刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  変化量 (図 6B) を横軸に、 $50 \mu M MnCl_2$  灌流時のクエンチ量 (図 6C) を縦軸にとり、それらの関係を示した図である。図 11A は、刺激頻度  $50 Hz$  で  $20$  回、図 11B は刺激頻度  $20 Hz$  で  $20$  回の刺激した場合の  $[Ca^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量との関係を示している。 $50 Hz$ 、 $20 Hz$  どちらの刺激でも  $[Ca^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量との間には有意な相関があった ( $p < 0.0001$ ; 相関係数の検定)。 $50 Hz$   $20$  回の刺激を行った場合の  $[Ca^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量 ( $q$ ) の回帰直線は  $q = 0.4 [Ca^{2+}]_i + 0.011$  であり、 $20 Hz$   $20$  回の刺激を行った場合の回帰直線は  $q = 0.35 [Ca^{2+}]_i + 0.015$  であった。また、これらの回帰直線について、回帰直線の傾きの差の検定を行ったところ、 $50 Hz$   $20$  回 刺激をした場合と、 $20 Hz$   $20$  回の刺激をした場合との間に有意な差はなかった ( $p = 0.18$ )。図 10B で示したように、細胞ごとの  $[Ca^{2+}]_i$  変化量は活動電位の発生頻度に関係しているので、異なる刺激頻度で刺激した場合の  $[Ca^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量との関係を合わせてもその相関が崩れることはないと思われる。そこで、これらの結果を合わせて表示したところ、その相関性に変化はなかった (図 12 A) ( $p < 0.0001$ ; 相関係数の検定)。コントロール時の  $[Ca^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量 ( $q$ ) と

の回帰直線の傾きは  $q = 0.38 [Ca^{2+}]_i + 0.013$  であった。この結果は、活動電位の発生頻度が高い細胞ほど、より多くの  $Mn^{2+}$  が電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルを通り、細胞外から細胞内へ流入することを示している。

同じの実験をアストロサイトでも行った (図 12B)。その結果、ニューロンと同様にアストロサイトのクエンチ量も、 $[Ca^{2+}]_i$  変化量と有意に相関しており ( $p < 0.0001$ ; 相関係数の検定) 回帰直線は  $q = 0.31 [Ca^{2+}]_i + 0.014$  であった (考察参照)。

#### 4-1-3. $Mn^{2+}$ の存在による $T_1$ 値の短縮

図 13A, B は各  $MnCl_2$  濃度のファントムに対して、 $T_1$  値計測法としては gold standard である IR-spin echo 法に類似の方法である IR-RARE と、高速撮影が可能な RARE-VTR で撮影した場合の、信号強度の回復を表したものである。図 13C, D は、IR-RARE, RARE-VTR で撮影した MRI 画像である。縦に示した数字はそれぞれの  $MnCl_2$  濃度 ( $\mu M$ )、横に示した数字は  $TI$  (s) または  $TR$  (s) である。IR-RARE ではインバージョンパルスを加えて撮像するため、縦磁化は  $-180^\circ$  倒される。そのため、 $TI = 0$  では信号強度が負となり、その後時間とともに正の値に回復していく。しかし、今回用いた MR 装置では、信号強度が絶対値で表わされるため、フィッティングの際には信号がゼロにな

る点 (null ポイント) より前を、負の信号として扱い、フィッティングを行った (図 13A)。信号強度の回復の速さが  $\text{MnCl}_2$  濃度が高くなるにつれ、速くなっていることが分かる (図 13A, C)。RARE-VTR でも  $\text{MnCl}_2$  濃度が高いほど信号強度の回復が早くなっていることが分かる (図 13B, D)。図 14 は IR-RARE, RARE-VTR で測定した各ファントムの  $\text{MnCl}_2$  濃度と  $T_1$  値の逆数 ( $R_1$  値) との関係を示したものである。図 14 に示すように IR-RARE, RARE-VTR のどちらのシーケンスで撮影した場合も、 $\text{MnCl}_2$  濃度と  $R_1$  値は比例関係にあることが確認された ( $p < 0.0001$ ; 相関係数の検定)。つまり、 $\text{Mn}^{2+}$  濃度が高いほど  $T_1$  値が短縮することが示された。さらに、IR-RARE, RARE-VTR それぞれで計測した、 $\text{MnCl}_2$  濃度と  $R_1$  値との関係について、回帰直線の傾きの差の検定、回帰直線の切片の検定を行ったところ、これら 2 つの間には有意な差は見られなかった ( $p > 0.99$ )。IR-RARE は  $T_1$  値計測のシーケンスでは信頼性が高い方法である IR-Spin Echo 法の高速化しうる変法であるが、それでもなお撮影時間が長い。一方、RARE-VTR の撮影時間は比較的短い。今回、信頼できるシーケンスである IR-RARE と同じ結果が得られたことから、高速撮像シーケンスである、RARE-VTR を用いて計測された  $T_1$  値は信頼できる値であるといえる。

以上の結果から、AIM-MRI を用いた定量的な神経活動計測が可能であることが示された。本研究ではこの定量的な AIM-MRI 法を Quantitative

AIM-MRI (qAIM-MRI) と命名した。

#### 4-2. qAIM-MRI を用いた神経活動計測の条件検討

##### 4-2-1. $\text{MnCl}_2$ 投与によるマウス脳における $R_1$ 値の時間経過

図 15A は  $\text{MnCl}_2$  投与前から  $\text{MnCl}_2$  投与後 72 時間 までの脳室の  $R_1$  値の時間経過を示している。使用したマウスは 3 匹で、 $n$  は脳室に置いた ROI の数を示している。 $\text{MnCl}_2$  投与前の  $R_1$  値と比較すると、 $\text{MnCl}_2$  を投与して 5 時間後に脳室の  $R_1$  値が最も高くなり ( $p < 0.001$ )、その後、時間経過とともに、 $R_1$  値は減少した。24 時間後では  $\text{MnCl}_2$  投与前の  $R_1$  値と比較して依然有意に上昇はしているが ( $p < 0.05$ )、48 時間後以降の  $R_1$  値は、 $\text{MnCl}_2$  投与前の  $R_1$  値と有意差がなかった (Friedman 検定)。一方脳実質 (大脳皮質) の  $R_1$  値は、 $\text{MnCl}_2$  投与 5 時間後まで急速に上昇するのは脳室とほぼ同じであるが、その後  $R_1$  値は緩やかに上昇し 48 時間後に最大値に達した。その後、徐々に  $R_1$  値は低下していくが、72 時間後でも高い値を保っていた (図 15B)。これらの結果は、腹腔から投与した  $\text{Mn}^{2+}$  の脳脊髄液 (細胞外液) の濃度は、投与 5 時間程度後にピークに達し、投与 48 時間後には投与前の濃度まで減少しているが、細胞内に取り込まれた  $\text{Mn}^{2+}$  は 48 時間後も細胞内に蓄積していることを示

唆している。

この結果から、 $\text{MnCl}_2$  投与後 48 時間後の  $R_1$  値を神経活動の履歴を反映した  $R_1$  値であると判断し、撮影タイミングを  $\text{MnCl}_2$  投与 48 時間後に設定した。

### 4-3. パーキンソン病における神経活動と病態の重篤度との関連についての検討

#### 4-3-1. パーキンソン病モデル動物の生化学的な病態の重篤度の変化

MPTP 投与群では、MPTP 投与 11-20 日後、線条体の TH 密度はコントロール群と比較して  $89.8 \pm 2.2\%$  に減少していた ( $P < 0.002$ ; 図 16a, c)。MPTP 投与マウス群の黒質緻密部の単位面積あたりのドーパミンニューロンの数は、コントロール群と比較して約 72% に減少していた (control:  $254 \pm 21$  vs. MPTP:  $184 \pm 25 \text{ mm}^{-2}$ ; 図 16b, d)。腹側被蓋野のドーパミンニューロンの数は、MPTP 投与マウス群とコントロール群とで有意な差はなかった (control:  $288 \pm 32$  vs. MPTP:  $274 \pm 38 \text{ mm}^{-2}$ ; 図 16b, e)。

これらの結果から、MPTP 投与マウスはパーキンソン病と同様に、黒質緻密部におけるドーパミンニューロンの変性が起こっていることが確認できた。しかし、ドーパミンニューロン数の減少率がそれほど大きくないことから、これ

らのマウスは、重篤度の低いパーキンソン病モデルであると考えられる<sup>50</sup>。

#### 4-3-2. パーキンソン病モデル動物の神経活動変異部位の同定

パーキンソン病モデルマウス群とコントロールマウス群とに  $\text{MnCl}_2$  を 24 時間おきに 2 回投与し、その後ホームケージで自由に行動させ 48 時間後に  $T_1$  値計測を行い  $T_1$  マップを作製した。作製した  $T_1$  マップ を標準脳に合わせてレジストレーションすることで、各々のマウスの脳の座標関係は同じになるため、パーキンソン病モデルマウス群 ( $n = 6$ ) の  $T_1$  マップとコントロールマウス群 ( $n = 6$ ) の  $T_1$  マップとをピクセルごとに検定を行う、SPM 解析を行った。図 17 は、パーキンソン病モデル群の  $T_1$  値がコントロール群の  $T_1$  値と比較して、 $p < 0.025$  以下で有意に減少していた領域を色づけして表示している（有意であると判断された領域の体積が 27 voxels 以下の領域は除外した）。大脳基底核の中では、線条体 (CPu) に含まれる領域の  $T_1$  値がパーキンソン病モデル群において有意に減少していた (Student's t-test の t 値 3.21 ( $P < 0.01$ ), 正中から左側に (M-L) = - 1.91, ブレグマから吻側方向に (A-P) = 0.75, 背側脳表から腹側へ (D-V) = 2.93 (mm))。この結果は、パーキンソン病モデルマウスではコントロールマウスと比較して、線条体の神経活動が上昇していることを示している。

皮質 (Ctx) と視床 (Th) の一部においてもパーキンソン病モデル群で  $T_1$  値が有意に減少していた領域が見られた (図 17, 感覚運動皮質:  $t$  値 3.51 ( $P < 0.01$ ), M-L = - 1.77, A-P = 0.75 and D-V = 1.1 (mm), 束傍核 3.08 ( $P < 0.02$ ). M-L = - 0.4, A-P = - 2.75, D-V = 3.76 (mm)). これらの結果は、大脳皮質や視床の神経活動が低下するとしていたパーキンソン病の神経回路の古典的モデルとは一致しない結果である (考察参照)。

#### 4-3-3. $R_1$ 値と生化学的な病態の重篤度の結果との関係

パーキンソン病において、どの領域の神経活動の変化が病態の重篤度と関連があるのかについて明らかにするために、脳の各部位の  $R_1$  値と、結果 4-3-1 で示した生化学的な病態の重篤度の変化との関係を調べた。線条体の TH の発現量はパーキンソン病モデル動物において、運動行動試験の成績と相関があるという報告があるため<sup>35</sup>、TH 発現量を病態の重篤度の指標として用いた。

図 9 で示した領域に ROI を置き MPTP 投与によるパーキンソン病モデル動物での、 $MnCl_2$  投与後 48 時間後の背側線条体 (dCPu)、腹側線条体 (vCPu)、大脳皮質の感覚運動野 (Ctx)、視床の束傍核 (PF)、海馬 (HIP)、側坐核 (NAc) の  $R_1$  値と、線条体の TH 密度との関係をプロットした (図 18)。黒丸がパーキンソン病モデルマウス、白丸がコントロールマウスである。 $MnCl_2$  投与 48 時



間後の背側線条体 (A-P = 0.25 mm と - 0.5 mm ( $P < 0.05$ ))、腹側線条体の一部 (A-P = 0.25 mm ( $P < 0.05$ ))、皮質 (A-P = 0.25 mm ( $P < 0.05$ ))、束傍核 (A-P = -0.2 mm ( $P < 0.02$ )) の  $R_1$  値と、線条体 TH 発現量との間に、相関があった (図 18, 相関係数の検定)。また、パーキンソン病において脳活動があまり変化しないとされている側坐核や海馬では、 $R_1$  値と、線条体 TH 発現量との間に有意な相関は見られなかった ( $P > 0.05$ )。

この結果は、線条体 (特に背側部) と感覚運動皮質、視床の束傍核の神経活動がパーキンソン病の重篤度と相関していることを示している。

## 5. 考察

### 5-1. AIM-MRI を用いた神経活動計測の定量化について

#### —qAIM-MRI に向けた検討—

##### 5-1-1. 活動に伴う細胞内への $Mn^{2+}$ の流入

線条体スライス標本を用いた  $Ca^{2+}$  イメージングにより、刺激頻度が高いほど、つまり活動電位の発生頻度が高い細胞ほど、 $[Ca^{2+}]_i$  変化量が大きくなることが明らかとなった (図 10)。これは、活動電位の発生頻度が上昇したことによって電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの、延べの開口時間が増加したことによるものと考えられる。

また、結果 4-1-2 に示したように、コントロール時の電気刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  変化量が大きい細胞ほど、 $Mn^{2+}$  による蛍光色素のクエンチ量は大きくなった (図 11, 12)。これは、活動電位の発生によって開口する電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの延べの開口時間が上昇し、その結果、より多くの  $Mn^{2+}$  が電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルを通り、細胞外から細胞内へ流入したためと考えられる。これらの結果は、活動電位の発生頻度が高いほど、細胞内に  $Mn^{2+}$  が流入、蓄積することを示している。また、アストロサイトに対しても同様の実験を行ったとこ

ろ、アストロサイトでも、ニューロンと同じように、神経活動の大きさに相関して、 $Mn^{2+}$  が細胞内へと流入することが示された。電位依存性カルシウムチャネルや、グルタミン酸受容体のうち N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体チャネルを含む  $Ca^{2+}$  を透過するイオンチャネルはアストロサイトにも発現している<sup>36, 37</sup>。そのため、アストロサイトにおいてもプレシナプスから放出されるグルタミン酸に反応してこれらのチャネルが活性化し、 $Mn^{2+}$  が流入することができる。つまり、細胞外に  $Mn^{2+}$  が存在していると、隣接したニューロンの活動に相関して、アストロサイトにも  $Mn^{2+}$  が流入、蓄積することが考えられる。

#### 5-1-2. MRI パルスシーケンスの妥当性

結果 4-1-3 から、IR-RARE, RARE-VTR のどちらの撮像シーケンスを用いた場合でも、 $MnCl_2$  濃度に比例して、 $R_1$  値は大きくなることから、 $MnCl_2$  濃度に応じて  $T_1$  値が短縮することが確認できた (図 13)。RARE とは Carr Purcell-Meiboom Gill (CPMG) パルス系列を用い、複数のエコー信号をそれぞれ異なる位相エンコード量のもとで収集する方法のことで、一般的に高速スピネエコー (fast spin echo: FSE) 法と呼ばれている<sup>38</sup>。IR-RARE は、 $T_1$  値計測のシーケンスとしては gold standard である、IR-spin echo 法を高速化した方

法であるため、より正確な  $T_1$  値を求めることができるシーケンスである。しかし、撮影時間が極めて長いため、麻酔などによる動物への負担を考えると、実際に動物を撮影する場合には非現実的な撮影時間となってしまう。一方、RARE-VTR は、IR-RARE と比較して短い時間で撮影が可能だが、Signal-to-Noise Ratio (SNR) が低いという問題や、RF パルスのスライス選択性が不十分な場合に問題が生じる。そこで、これら 2 つの方法で同一ファントムを撮影し、その結果得られる  $T_1$  値の差異を検証し、RARE-VTR での撮影が妥当であるかどうかを確認した。その結果、これら 2 つの  $MnCl_2$  濃度と  $R_1$  値との関係に違いはなかった (図 14)。この結果より、動物に対する  $T_1$  値計測にはより撮像時間が短いシーケンスである RARE-VTR 法を用いた。

このように、qAIM-MRI により神経活動履歴計測が可能であることが確認された。

### 5-1-3. MRI 計測のタイミングの妥当性

脳室の  $R_1$  値は  $MnCl_2$  投与 5 時間後に最も高くなり、48 時間後には  $MnCl_2$  投与前のレベルに戻っていた (図 15A)。この結果は、脳脊髄液の  $Mn^{2+}$  濃度が  $MnCl_2$  の投与から約 5 時間後に最大値に達し、その後ゆっくり減少していくことを示している。一方、脳実質の  $R_1$  値は、 $MnCl_2$  投与 48 時間後に

最大になった (図 15B)。この結果は、細胞内に蓄積した  $Mn^{2+}$  の排出は極めて遅いことを示している。これらの結果は、AIM-MRI により計測される神経活動の履歴は  $MnCl_2$  投与約 5 時間後までの神経活動を反映していることを示唆している。また、 $MnCl_2$  投与 48 時間後では、細胞外液の  $Mn^{2+}$  が投与前のレベルであり (図 15A)、かつ細胞内にはまだ蓄積されていることが示唆されたため (図 15B)、 $MnCl_2$  投与 48 時間後に  $T_1$  値計測を行うことが、最も適切な計測のタイミングであると思われる。

以上のように本研究では、神経活動と  $Mn^{2+}$  蓄積量が相関していること、 $T_1$  値の絶対値計測により  $Mn^{2+}$  濃度を定量可能であることを示し、 $T_1$  値を定量化した AIM-MRI により神経活動を定量的に計測できることを示した。加えて、AIM-MRI における  $MnCl_2$  投与後の脳脊髄液と脳実質の  $R_1$  値の時間経過から最適な撮影タイミングを提案した。この  $T_1$  値を定量的に計測する新しい AIM-MRI 法を qAIM-MRI と命名した。

## 5-2. パーキンソン病における神経活動の変化

本研究では、パーキンソン病モデルマウスの脳の複数の領域で、神経活動が有意に上昇していたことを示唆する結果が得られた (図 17)。これらのことにつ

いて考察する。

### 5-2-1. パーキンソン病における線条体の活動の上昇

一般的にドーパミンは、線条体の直接路ニューロンには D1 ドーパミン受容体を介して活動を亢進させる方向に働き、それとは対照的に間接路ニューロンには D2 ドーパミン受容体を介して活動を抑える方向に働くとされている<sup>1</sup>。このことから、ドーパミンの枯渇により、線条体全体で見した場合の神経活動は活動亢進と減弱とが相殺されてしまい、変化が起きているようには見えないと考えることもできる。事実、6-hydroxydopamine (6-OHDA) の投与により、ドーパミンニューロンを破壊したパーキンソン病モデルラットにおいて、直接路ニューロンの平均発火頻度は減少し、間接路ニューロンの平均発火頻度は上昇したという報告がある<sup>39</sup>。一方、6-OHDA によるパーキンソン病モデルラットでの、線条体ニューロンの自発発火の頻度は細胞種によらず上昇するという報告もある<sup>40</sup>。今回の qAIM-MRI による神経活動計測の結果では、パーキンソン病モデル群において、線条体の神経活動が上昇するという結果が得られた。これらのことについて以下のように考察する。(i) 健常時の直接路ニューロンの平均発火頻度は、間接路ニューロンの平均発火頻度と比較して、非常に低い<sup>39, 41</sup>。6-OHDA の処理によるドーパミンの不足の影響は、間接路ニューロンに対する

抑制性の減少、つまり発火頻度の上昇（脱抑制）が、直接路ニューロンに対する興奮性の減少、つまり発火頻度の減少よりも大きく表れる。その結果、ドーパミンの不足により、間接路ニューロンの発火頻度の上昇の方が支配的となり、線条体全体としての活動は上昇したとして検出されたことが考えられる。(ii) 直接路ニューロンの D1 受容体のドーパミンに対する親和性は低く、それに対して、間接路ニューロンの D2 受容体のドーパミンに対する親和性はより高い<sup>42</sup>。それゆえパーキンソン状態におけるドーパミンの不足は、間接路ニューロンにより大きな影響を与えることが考えられる。(iii) 線条体の Medium spiny ニューロンは 6-OHDA の処理によってオシレーション発火を起こす<sup>4</sup>。散発的な発火と比較して、オシレーション発火は、結果として多くの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こす<sup>18, 21, 43</sup>。qAIM-MRI は  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を  $\text{Ca}^{2+}$  と同様の動態をとる  $\text{Mn}^{2+}$  の流入として検出しているため、結果としてパーキンソン病モデルマウスでは、背側線条体に多くの  $\text{Mn}^{2+}$  が蓄積したことが考えられる。

また、前述のとおり、アストロサイトにおいても  $\text{Ca}^{2+}$  流入量と  $\text{Mn}^{2+}$  の流入量は相関していた (図 12B)。MRI ではニューロンとアストロサイトを区別することができないため、細胞内への  $\text{Mn}^{2+}$  の蓄積による  $T_1$  値の短縮が、ニューロンへ蓄積したものなのか、アストロサイトに蓄積したものかは区別できない。しかしながら、どちらの細胞でも神経活動に伴って  $\text{Mn}^{2+}$  が蓄積すること

が確認できているため (図 12)、少なくとも、神経活動が変化すれば qAIM-MRI で検出することができると考えられる。

さらに、線条体は皮質と視床の束傍核から、グルタミン酸性の興奮性の入力を受けている。SPM の結果から、皮質と視床の神経活動の上昇も見られたことから、これらの領域の神経活動の上昇は、結果として線条体への興奮性の入力を増やすことにつながり、それゆえに、線条体の神経活動が上昇したことが示唆される。

## 5-2-2. 古典的な神経回路モデルとの不一致

### 5-2-2-1. 大脳基底核の出力核

古典的な大脳基底核の神経回路モデルでは、ドーパミンの枯渇は間接路の活動の上昇と、直接路の活動の減少を引き起こし、その結果、基底核の出力先である視床への抑制性の出力が上昇するとされている。しかし、SPM 解析の結果、パーキンソン病モデル群での黒質網様部と淡蒼球内節の  $T_1$  値は、コントロール群と比較して有意な差は見られなかった (図 17)。このことから、黒質網様部と淡蒼球内節の平均の発火頻度はパーキンソン病で大きく変化していないことが考えられる。実際、パーキンソン病により発火パターンは変化するものの、



発火頻度は変わらないということが淡蒼球内節<sup>44</sup>、黒質網様部<sup>45</sup>で報告されている。このことから、qAIM-MRIのような、神経活動の履歴を計測する手法では、発火パターンの違いは検出できなかったために、コントロール群とパーキンソン病モデル群との間に有意な差が見られなかったことが考えられる。

但し、本研究で用いたMRIで撮像された画像の空間分解能は125  $\mu\text{m}$ より悪いため、マウスでは非常に狭い領域である淡蒼球内節及び黒質網様部の活動の変化を検出できなかった可能性もあることに注意が必要である。

#### 5-2-2-2. 大脳皮質と視床

SPM解析の結果、大脳皮質（特に感覚運動皮質）や視床（特に束傍核）でもパーキンソン病モデル動物群で神経活動が有意に上昇しており、さらにこれらの領域の $R_1$ 値は線条体のTH発現量とも強い相関があった。図1で示す古典的な皮質基底核回路モデルでは、基底核からの抑制性の出力の増加により、視床、皮質の活動は低下するとされている。皮質運動野は視床の運動性視床核と称される外側腹側核、前腹側核、内側腹側核からグルタミン酸性の興奮性の入力を受けている。それゆえ、皮質運動野の活動の上昇は、運動性視床核の活動の上昇が原因の一つと考えられる。図17で示す、パーキンソン病における矢状断面で見た活動上昇部位のうち、視床内の吻側に位置する活動上昇部位は運動

性視床核と非常に近い。このことから本研究で用いたパーキンソン病モデルでは運動性視床核の活動が上昇したことが、皮質運動野の活動の上昇につながったことが示唆される。また、これらの領域では、パーキンソン病により発火パターンは変化しないものの、 $\beta$  振動が増加するという報告もある<sup>46</sup>。さらにドーパミンの枯渇は一次運動野のバースト発火も増大させると言われている<sup>42</sup>。これらのことから、 $\beta$  振動の増加やバースト発火の増大が、本研究で見られた皮質運動野の活動の上昇につながったことが考えられる。

一方、運動性視床核が皮質を制御しているのに対して、同じく視床の束傍核は線条体にグルタミン酸性の投射をしており、基底核の機能を制御している。パーキンソン病患者では、黒質ドーパミンニューロンと同様に、視床の束傍核を含む視床髄板内核群のニューロンが選択的に脱落しており、パーキンソン病症状の出現に関与しているという報告がある<sup>47</sup>。本研究における MPTP の投与により作成したパーキンソン病モデルマウスは、ドーパミンニューロンの脱落の割合も少なく、パーキンソン病で見られるような行動異常も見られなかった。このことは、本研究で用いたモデルは視床髄板内核群のニューロンの脱落が起きておらず、軽度のパーキンソン病状態だったことが考えられる。一方で、パーキンソン病により束傍核のニューロンの活動も上昇することも報告されており<sup>48</sup>、本研究で見られた束傍核の活動の増大と一致している。

これらのことから、皮質と視床で観察される活性の変化については、今後も議論の余地がある。今後パーキンソン病で皮質と視床で観察される活性の変化について明確にするために、重篤度を変化させたパーキンソン病モデルを用いるなど、パーキンソン病のステージを考慮した研究が必要であると考えられる。

### 5-3. qAIM-MRI による全脳神経活動の優位性

これまでの AIM-MRI は  $T_1$  強調画像を用いて、相対値である信号強度を評価していたため、動物間の比較が難しかった。また、同個体であっても、一度 MRI 装置から出してしまった場合には神経活動の比較が難しかった。これに対して、qAIM-MRI は  $T_1$  値という絶対値で評価を行っているため、動物間、課題の前後での神経活動計測が可能になる。

Tambalo らは本研究と同様に ラットを用いて脳の  $T_1$  緩和時間を計測する手法を報告している<sup>13</sup>。しかしながら、この報告では、 $MnCl_2$  を投与後の脳のいくつかの部位の  $T_1$  値を示しているに過ぎない。また、神経活動と  $Mn^{2+}$  蓄積との関係を示していないことに加えて、細胞内の  $Mn^{2+}$  濃度を最もよく反映している撮影タイミングを示していないため、応用性に欠けていた。本研究では、これらの点についての検討を行っていることから、qAIM-MRI は Tambalo

らの提案手法による問題点を克服した手法であると言える。

qAIM-MRI と同様に全脳の神経活動を計測する手法として、MRI を用いた神経活動計測法である、functional MRI (fMRI) や、positron-emission tomography (PET)、single-photon emission computed tomography (SPECT) などが挙げられる。fMRI は、血中ヘモグロビンの酸化還元反応と血流の変化を検出して脳活動として読み替え、脳の活性部位を捉える手法であり、神経活動を直接計測していない。PET, SPECT は脳活動に伴う糖代謝の変化や、ドーパミン受容体の変化<sup>49</sup>、を捉える手法として用いられているが、これらの計測法も直接脳活動を捉えているわけではない。加えて、これら全ての非侵襲イメージング法はスキャナー中での脳活動のみを反映している。それに対して qAIM-MRI は神経活動である細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を、 $\text{Ca}^{2+}$  と同様の動態をとる  $\text{Mn}^{2+}$  に置き換え、 $T_1$  値を直接計測することで、脳全体の神経活動計測を定量的に行うことが可能であり、パーキンソン病のような疾患動物モデルの神経活動変異部位の検出が可能となる。さらに本研究で用いた qAIM-MRI は、脊髄脳関門を破壊することなく、 $\text{MnCl}_2$  を腹腔内に直接投与することで、 $\text{Mn}^{2+}$  がゆっくりと、均一に脳内に到達していると考えられる。 $\text{MnCl}_2$  を投与した後、動物は自由に行動し、その神経活動の履歴を  $\text{Mn}^{2+}$  の蓄積として検出するため、

T<sub>1</sub> 値計測中は MRI スキャナーの中で課題を行う必要もなく、麻酔深度による神経活動変化の影響も関係ない。そのため、計測に高度なスキルを必要としない点も qAIM-MRI のメリットともいえる。

このように、qAIM-MRI はパーキンソン病に限らず、他の神経疾患や学習・記憶の過程などに伴う神経活動の変化の履歴を定量的に捉えることが可能な計測法であり、様々な研究に応用可能な計測法であると言える。

#### 5-4. 本研究の制限

qAIM-MRI は、血流や代謝の変化ではなく、直接的な神経活動の履歴を非侵襲的に脳全体にわたって計測することが可能な手法である。しかし、MRI は解像度に限界があり、細胞レベルでの評価は難しいため、細胞種を区別した神経活動の計測はできないことが、qAIM-MRI を用いた神経活動計測の限界と考える。

また、本研究における MPTP の投与により作成したパーキンソン病モデルマウスは、ドーパミンニューロンの脱落の割合も少なく、パーキンソン病で見られるような行動異常も見られなかった。これは、本研究で用いたパーキンソン病モデルマウスが軽度のパーキンソン病であったことが考えられるが、パーキンソン病による神経活動の変化と病態の重篤度との関係を明らかにするために

は、重篤度を変化させたパーキンソン病モデルを用いるなど、パーキンソン病のステージを考慮した研究が必要であると考ええる。

## 結語

本研究では、まず、神経活動に依存して細胞外から細胞内に  $Mn^{2+}$  が流入することを示し、さらに MRI で計測される  $T_1$  値の逆数  $R_1$  値が  $Mn^{2+}$  濃度に比例していることを示した。これらの結果より、AIM-MRI を用いた神経活動計測の妥当性を示した。さらに、この  $T_1$  値を直接計測することで  $Mn^{2+}$  濃度を定量的に計測できるという原理を利用して、本研究では AIM-MRI を定量的な計測法 qAIM-MRI として発展させた。また、qAIM-MRI を用いた神経活動計測実験を行う条件として、 $MnCl_2$  投与から MRI 撮影までのタイミングは 48 時間後が最適であることを明らかにした。この qAIM-MRI を用いて  $T_1$  値計測を行い、パーキンソン病モデル動物群で有意に  $T_1$  値が変化している領域を可視化した結果、基底核内では、線条体の神経活動が有意に上昇していることを明らかにした。さらに、パーキンソン病モデル動物群では、大脳皮質（特に運動感覚皮質）や視床（特に束傍核）において、有意に神経活動が上昇していた。また、 $R_1$  値と、線条体の TH の発現量との間の相関解析を行った。その結果、基底核の中では背側線条体、腹側線条体の一部の  $R_1$  値と TH の発現量との間に特に大きな相関がみられた。つまり、線条体の  $R_1$  値、すなわち神経活動の強度は、パーキンソン病の重篤度と相関していることが示された。加

えて、皮質（運動感覚皮質）と視床（特に束傍核）の  $R_1$  値と TH 発現量との間にも有意な相関がみられたことから、これらの領域がパーキンソン病発症メカニズムに関与している可能性がある。

以上のように本研究では、qAIM-MRI 法が、全脳の神経活動履歴を計測できることを示すと共に、qAIM-MRI をパーキンソン病モデルマウスに適用し、パーキンソン病の責任領野を脳全体の中で可視化することに成功した。この結果は従来異なる手法による研究データと齟齬は認めず、これを補完し得る。また本研究では、これまでのマンガン造影 MRI の手法を改良した結果、様々な脳疾患の研究を加速するための手法の基盤を確立した。qAIM-MRI は今後、パーキンソン病だけでなく、様々な神経疾患のメカニズム解明や、学習記憶に関わる領域の同定など、脳機能解明に向けた研究への発展が期待される。



## 謝辞

本研究を進めるに当たり、免疫組織化学染色および解析を行ってくださった徳島大学大学院薬学研究科の中村幸代さん、山村行生さん、笠原二郎先生に深く感謝の意を表します。

MRI に関する画像処理、シーケンス作成に於いて多大なる御協力を賜りました田村元先生に深く感謝の意を表します。

本研究で使用した実験動物の維持に尽力して頂いた、東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設のスタッフの方々、ならびに小動物用 MRI の使用を許可して頂いた東北大学大学院医学系研究科共通実験機器管理室に感謝の意を表します。

適切かつ親身に直接御指導、御教授してくださいました小山内実先生に心から深く感謝いたします。

日頃からご指導を頂いている、森一生先生、本間経康先生に感謝いたします。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金、JST, CREST の予算補助を受けて行われた。

## 参考文献

1. Alexander, G. E. and Crutcher, M. D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.*, 13, 266-271
2. Albin, R. L., Young, A. B, Penney, J. B., (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.*, 12, 366-375.
3. Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., Martigoni, E. (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*, 62, 63-88,
4. Murer, M. G., Tseng, K. Y., Kasanetz, F., Belluscio, M. and Riquelme, L. A. (2002) Brain Oscillations, Medium Spiny Neurons, and Dopamine. *Cell Mol. Neurobio.*, 22, 611-632
5. Obeso, J. A., Marin, C., Rodriguez-Oroz, C., Blesa, J. et al., (2008) The Basal Ganglia in Parkinson's Disease: Current Concepts and Unexplained Observations. *Ann. Neurol.*, 64, S30-S46
6. Gerfen, C. R. and Surmeier, D. J. (2011) Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.*, 34, 441-466

7. Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. & Di Filippo, M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci.* 17, 1022–1030
8. Koretsky, A. P. and Silva, A. C. (2004) Manganese-enhanced magnetic resonance. *NMR Biomed.*, 17, 527-531
9. Silva, A. C. & Bock, N. A. (2008) Manganese-enhanced MRI: An exceptional tool in translational neuroimaging. *Schizophr. Bull.* 34,595–604
10. Duyn, J. & Koretsky, A. P. (2008) Magnetic resonance imaging of neural circuits. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5, S71–S78
11. Nelson, M. T. (1986) Interactions of divalent cations with single calcium channels from rat brain synaptosomes. *J. Gen. Physiol.* 87,201–222
12. Narita, K., Kawasaki, F. & Kita, H. (1990) Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs. *Brain Res.* 510, 289–295
13. Tambalo, S., Daducci, A., Fiorini, S., Boschi, F., Mariani, M., Marinone, M., Sbarbati, A. and Marzola, P (2009) Experimental protocol for activation-induced manganese-enhanced MRI (AIM-MRI) based on

- quantitative determination of Mn content in rat brain by fast T1 mapping. *Magn. Reson. Med.*, 62, 1080-1084
14. Lin, Y.-J. & Koretsky, A. P. (1997) Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: An approach to direct imaging of brain function. *Magn. Reson. Med.* 38, 378–388
  15. Aoki, I., Naruse, S. & Tanaka, C. (2004) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR Biomed.* 17, 569–580
  16. Grynliewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3450
  17. Nicholls, J. G., Martin, A. R., Wallace, B. G. (1947) FROM NEURON TO BRAIN: A Cellular and Molecular Approach to the Function of the nervous System 3rd ed., Sinauer Associates, Inc., U. S. A., pp184-236
  18. Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M. & Yuste, R. (2005) Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci. Res.* 52, 132–138
  19. 小山内 実. (2010) バイオイメーjing. 臨床医工学・情報学スキルアップ

シリーズ 1 臨床医工学スキルアップ講座 (春名 正光, 八木 哲也, 田中 正夫, 明石 満編)、大阪大学出版会、大阪、pp. 81-102

20. Takahashi, N., Takahara, Y., Ishikawa, D., Matsuki, N., Ikegaya, Yuji. (2010) Functional multineuron calcium imaging for systems pharmacology. *Anal Bional Chem.*, 398, 211-218
21. Smetters, D., Mjewska, A., Yuste, R. (1999) Detecting Action Potentials in Neuronal Populations with Calcium Imaging. *Methods*, 18, 215-221
22. Tsien R. Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396-2404
23. Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K., Kaneko, T. (2003) Fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.*, 467, 60-79
24. Osanai, M., Yamada, N., Yagi, T. (2006) Long-lasting spontaneous calcium transients in the striatal cells. *Neurosci. Lett.*, 402, 81-85
25. Osanai, M., Tanaka, S., Takeno, Y., Takimoto, S., Yagi, T. (2010) Spatiotemporal properties of the action potential propagation in the

- mouse visual cortical slice analyzed by calcium imaging. PLoS ONE, 5(10), e13738
26. 小山内 実. 細胞内イオンイメージング法、生体サンプルの細胞への細胞内イオンイメージング用色素の導入方法及び細胞内イオンイメージング用色素導入用容器. 特開 2013-215114A. 2013
27. Tamura, A. et al. (2014) Both neurons and astrocytes exhibited tetrodotoxin-resistant metabotropic glutamate receptor-dependent spontaneous slow  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in striatum. PLoS ONE 9, e85351
28. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. D. & Helmchen F. (2004) Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. Nat. Methods 1, 31–37
29. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 9, 671–675 (2012).
30. Vorndran, C., Minta, A., and Poenie, M. (1995) New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes. Biophys. J., 69, 2112-2124
31. Amano, K., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H. & Karaki, H. (1997) Palytoxin-induced increase in endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the

- rabbit aortic valve. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355, 751–758 (197).
32. Kuroiwa, H., Yokoyama, H., Kimoto, H., Kato, H., Araki, T. (2010) Biochemical alterations of the striatum in an MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease. *Metab Brain Dis.*, 25, 177-183
33. Yokoyama, H. et al. (2010) Therapeutic effect of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice. *Metab. Brain Dis.* 25, 135–143
34. Lein, E. S. et al. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–176
35. Rozas, G., Lo'pez-Martín, E., Guerra, M.J., Labandeira-García, J.L. (1998) The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J. Neurosci. Meth.*, 83, 165-175
36. Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S. A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 523–530
37. Pereira Jr., A. & Furlan, F. A. (2009) On the role of synchrony for

- neuron–astrocyte interactions and perceptual conscious processing. *J. Biol. Phys.* 35, 465–480
38. 森一生、山形仁、町田好男 (2010) *CT と MRI –その原理と装置技術-*、コロナ社、東京、pp.154-156
39. Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C. & Gonon, F. (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J. Neurosci.* 26, 3875–3884
40. Chen, M.-T., Morales, M., Woodward, D. J., Hoffer, B. J. & Janak, P. H. (2001) In vivo extracellular recording of striatal neurons in the awake rat following unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Exp. Neurol.* 171, 72–83
41. Calabresi, P., Mercuri, N. B., Sancesario, G. & Bernardi, G. (1993) Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons. Implications for Parkinson's disease. *Brain* 116, 433–452
42. Ellens, D. J. & Leventhal, D. K. (2013) Electrophysiology of basal ganglia and cortex in models of Parkinson Disease. *J. Parkinson. Dis.* 3, 241–254
43. Suzuki, S. et al. (2000) Ca<sup>2+</sup> dynamics at the frog motor nerve terminal. *Pflugers Arch.* 440, 351–365
44. Kita, H. & Kita, T. (2011) Cortical stimulation evokes abnormal



- responses in the dopamine-depleted rat basal ganglia. *J. Neurosci.* 31,10311–10322
45. Lobb, C. J. & Jaeger, D. (2015) Bursting activity of substantia nigra pars reticulata neurons in mouse parkinsonism in awake and anesthetized states. *Neurobiol. Dis.* 75, 177–185
46. Nakamura K. C., Sharott A., Magill P. J. (2014) Temporal coupling with cortex distinguishes spontaneous neuronal activities in identified basal ganglia-recipient and cerebellar-recipient zones of the motor thalamus, *Cereb Cortex* 24:81–97, doi:10.1093/cercor/bhs287, pmid:23042738
47. Henderson J. M., Carpenter K., Cartwright H., Halliday G. M. (2000) Loss of thalamic intralaminar nuclei in progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease: clinical and therapeutic implications *Brain*, 123, 1410-1421
48. Halliday, G. M. (2009) Thalamic changes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15S3, S152–S155
49. Politis, M. (2014) Neuroimaging in Parkinson disease: from research setting to clinical practice. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 708–722
50. Sedelis, M., Schwarting, R. K. W. & Huston, J. P. (2001) Behavioral

phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain. Res.* 125, 109–125

51. Kikuta, S., Nakamura, Y., Yamamura, Y., Tamura, A., Homma, N., Yanagawa, Y., Tamura, H., Kasahara, J., Osanai, M. (2015) Quantitative activation-induced manganese-enhanced MRI reveals severity of Parkinson's disease in mice. *Scientific Reports* 5: 12800, doi: 10.1038/srep12800.

52. Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C.(1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cell revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci.*, 10, 3421-3438

図 1

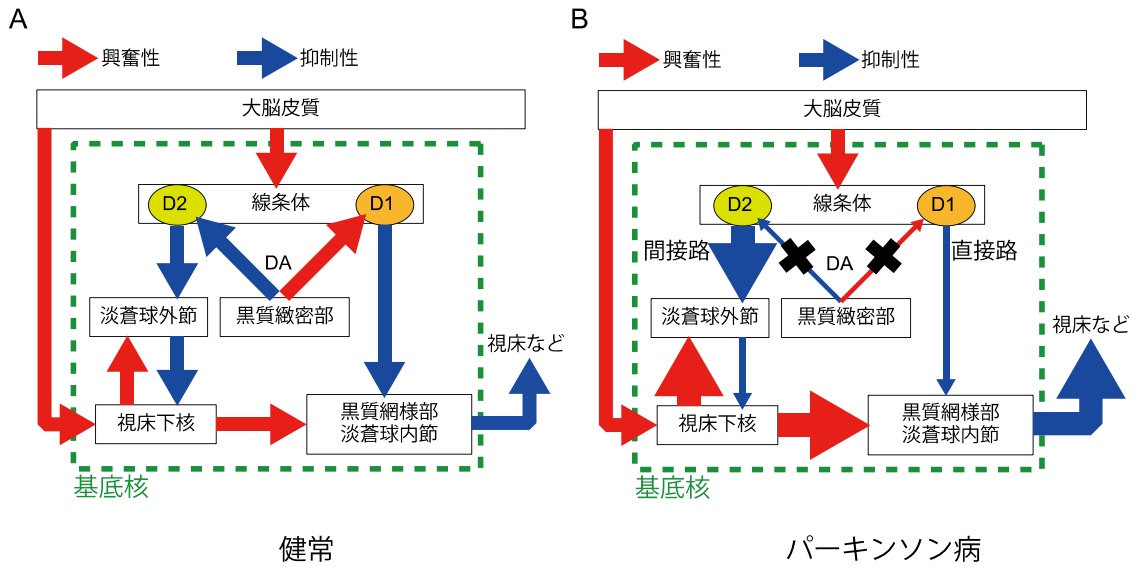


図 1. 大脳基底核回路のモデル (文献 1 より改変)

健全 (A) と、パーキンソン病 (B) における、一般的な大脳基底核回路のモデル。赤矢印: 興奮性、青矢印: 抑制性の作用を示す。線の太さは神経活動の大きさを表している。

図 2

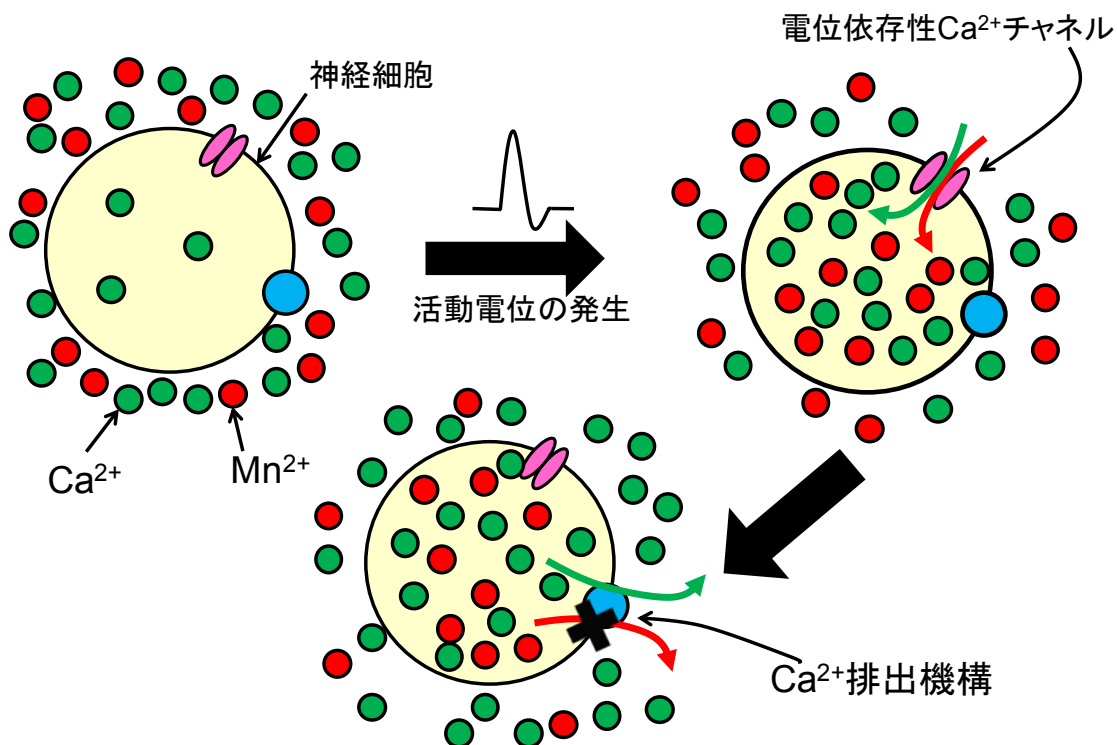


図 2. 細胞内への  $Mn^{2+}$  の流入、蓄積のメカニズムを表した模式図  
緑:  $Ca^{2+}$ 、赤:  $Mn^{2+}$  を示している。細胞の脱分極（活動電位）に伴い、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルを通り、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  共に細胞内へ流入する。その後  $Ca^{2+}$  は  $Ca^{2+}$  排出機構から細胞外に排出されるが、 $Mn^{2+}$  はここを通過せず、細胞内に蓄積する。

図 3

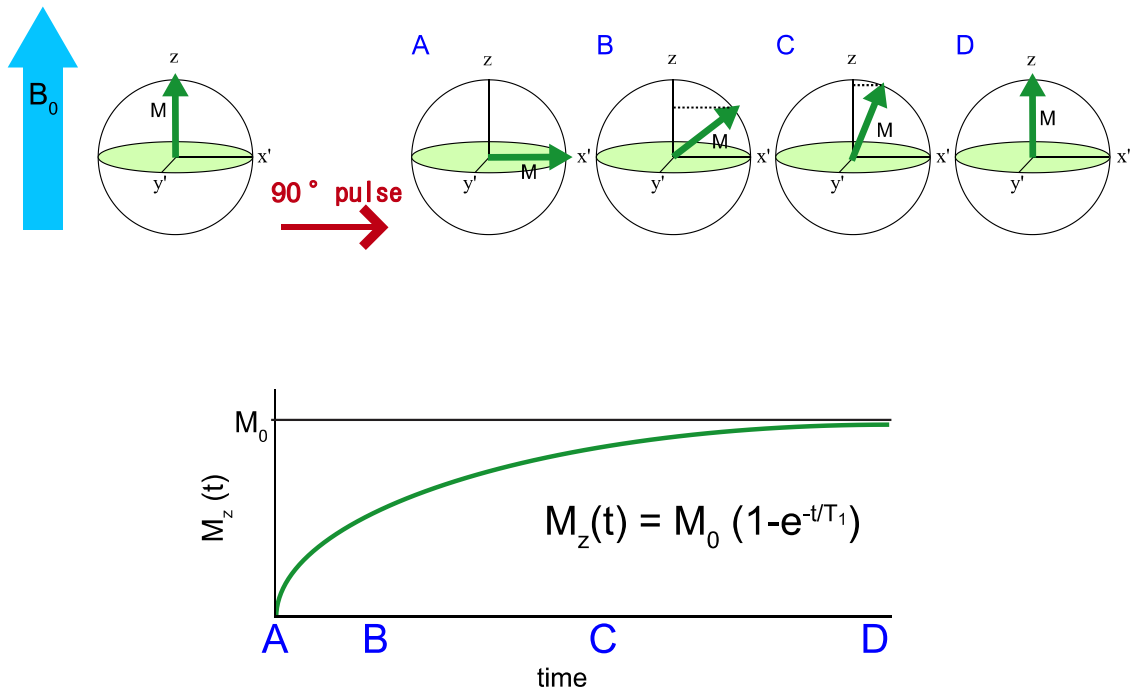


図 3. 回転座標系において磁化ベクトル  $M$  が回復していく様子と縦磁化の緩和曲線

図 4

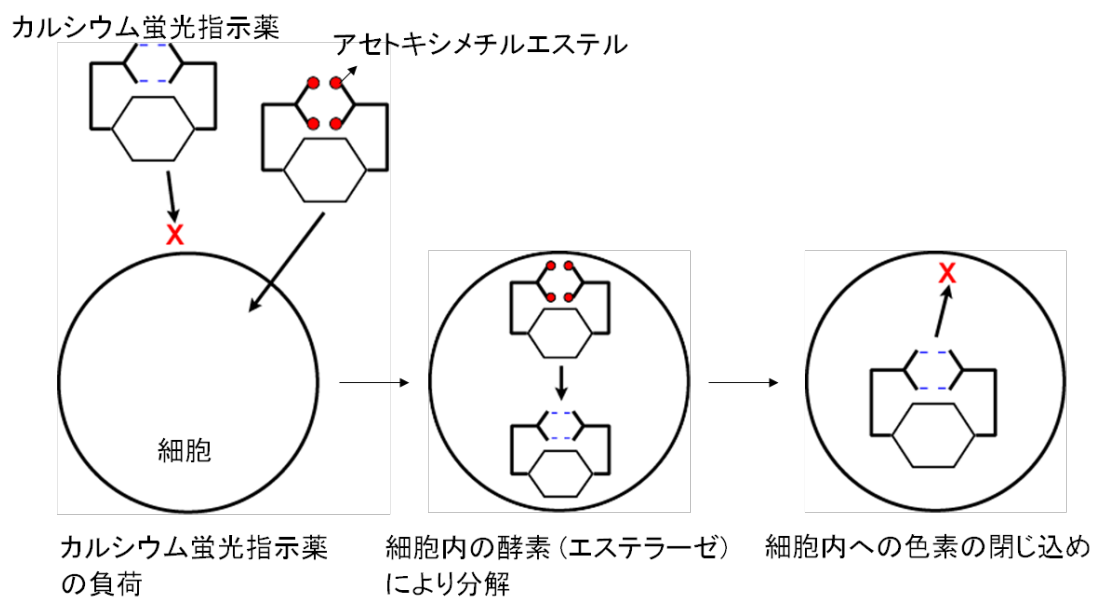


図 4.  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色の AM 体が細胞内に取り込まれ、細胞内に保持される様子を示した模式図

図 5

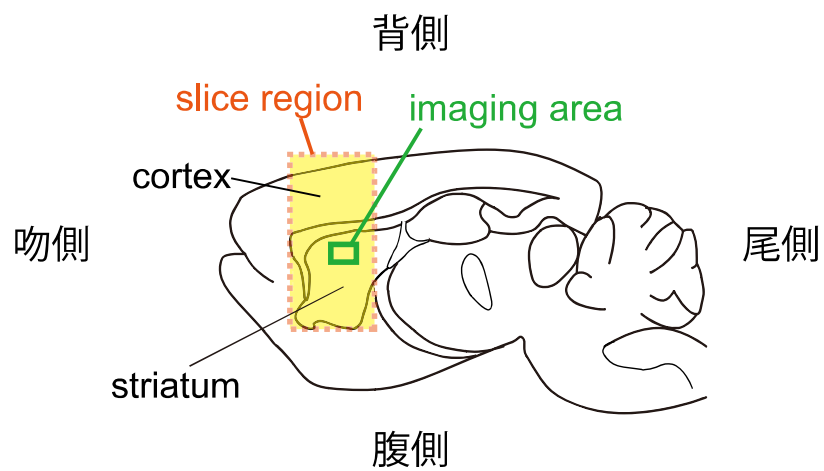
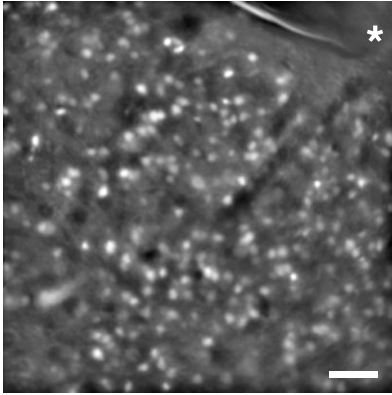


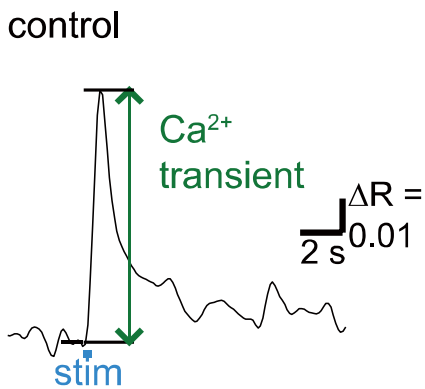
図 5. マウス脳の矢状面の模式図  
黄色で示す部分を含むようにスライス標本を作成した。

図 6

A



B



C

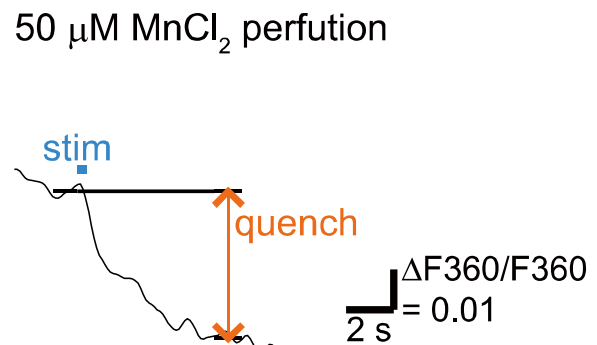


図 6. 刺激による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化量と  $\text{Mn}^{2+}$  によるクエンチ量

A: GAD67-GFP マウスの線条体脳スライス標本の GFP 蛍光画像。線条体の GABA 作動性ニューロンは、GFP の蛍光で同定し、ROI は GFP 陽性の細胞体に設置することで、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素の蛍光変化を計測した。刺激電極の先端をアスタリスク (\*) で示している。スケールバーは 50 $\mu\text{m}$  を示す。B: コントロール時の刺激による蛍光強度の時間経過。刺激後直の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化の振幅 ( $\text{Ca}^{2+}$  transient) を矢印で示している。C: B と同じ細胞における 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  灌流時の、刺激による 蛍光強度の時間経過。刺激直前約 1 秒間と、刺激後 8 秒後から 9 秒後の約 1 秒間の蛍光強度の平均値の差の大きさをクエンチ量と定義し、矢印で示す。B, C とも刺激強度、頻度は一定であり、刺激をしている時間をバーで示す。(文献 51 図 1 より改変)。



図 7

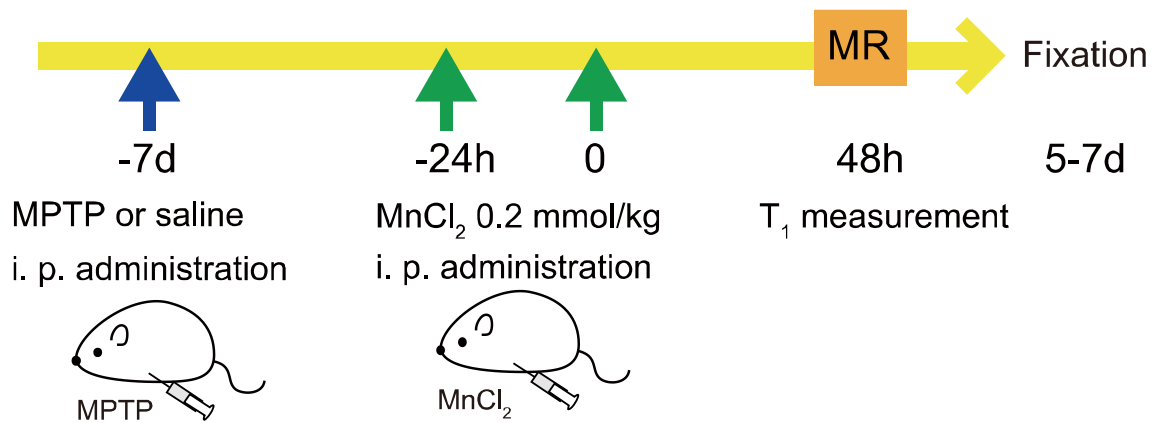


図 7. MPTP 投与と MRI 撮影のスケジュール  
(文献 51 Supplementary FigureS4 より改変)。

図 8

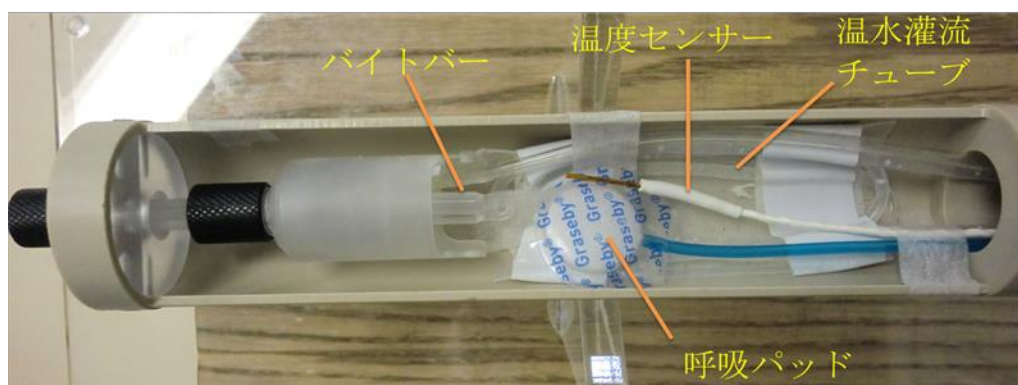


図 8. 寝台にセットした温水還流チューブ・呼吸パッド・温度センサー・マウス固定装置

図 9

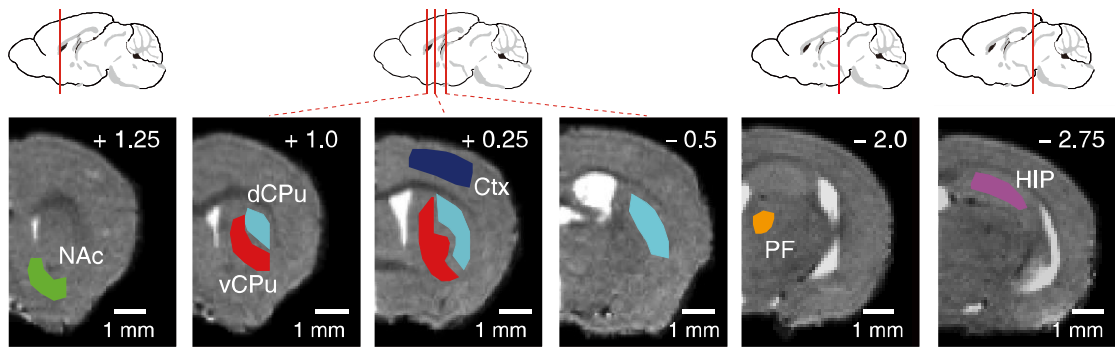


図 9.  $T_1$  値計測における ROI の設定

$T_1$  値計測の際に設定した ROI (関心領域) を示す。右上の数字はそれぞれ、ブ  
レグマからの距離を表おり、スケールバーは 1mm である。NAc: 側坐核,  
dCPu: 背側線条体, vCPu: 腹側線条体, Ctx: 皮質, PF: パラファシキュラーニ  
ュークレウス, HIP: 海馬。(文献 51 図 4 より改変)。

図 10

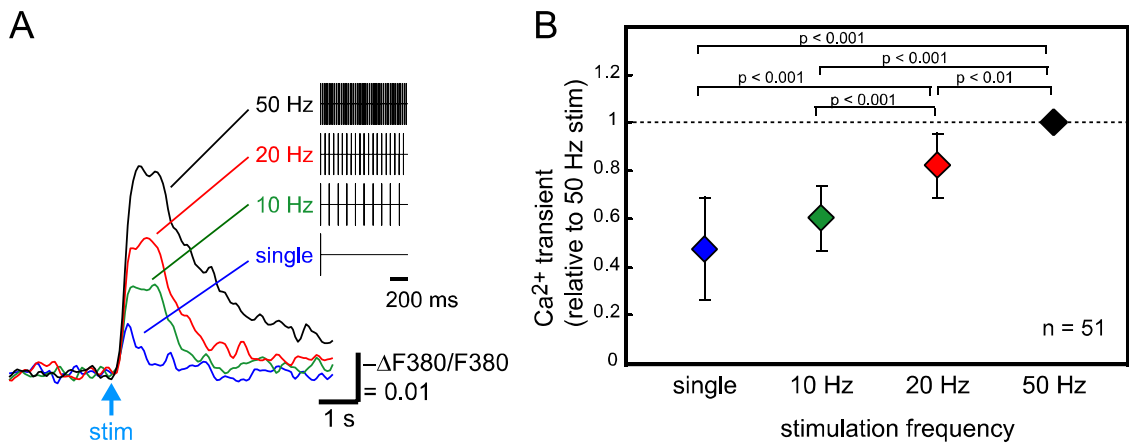


図 10. 刺激に応じた  $[Ca^{2+}]_i$  上昇

A: ある細胞の各刺激頻度に対する  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の時間経過。横軸は時間、縦軸は  $[Ca^{2+}]_i$  変化。刺激している時間をバーで示している。刺激は単発刺激を除き全て  $200 \mu A$  で、1 秒間。B: A で示した  $[Ca^{2+}]_i$  変化量のピーク値について、細胞ごとの平均値を刺激頻度別に比較したグラフ。50 Hz 刺激時を基準に正規化した (エラーバー: 標準偏差)。(文献 51 Supplementary FigureS1 より改変)。

図 11

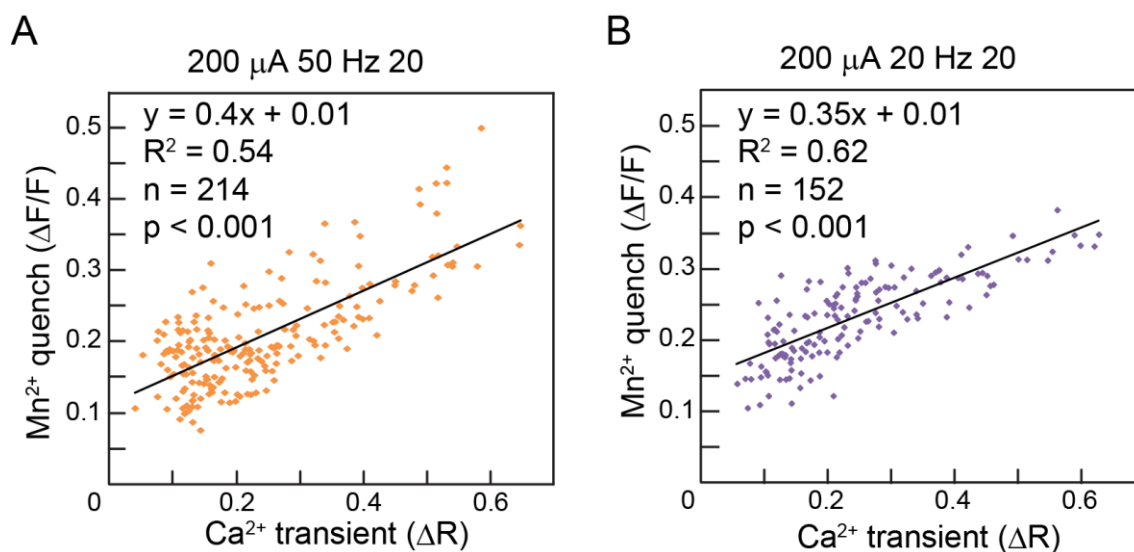


図 11. 刺激頻度ごとの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化と  $\text{Mn}^{2+}$  クエンチとの関係  
左: 200  $\mu\text{A}$  50 Hz 20 回、右: 200  $\mu\text{A}$  20 Hz 20 回 刺激をした時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化と  $\text{Mn}^{2+}$  クエンチとの関係を表したグラフ。横軸: コントロールにおける  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化量 ( $\text{Ca}^{2+}$  transient,  $\Delta R$ , 図 6. A で示す)。縦軸: 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  灌流時における  $\text{Mn}^{2+}$  クエンチ量 (quench,  $-\Delta F_{360}/F_{360}$ , 図 6. B で示す)。刺激頻度 50 Hz を 20 回で刺激を行った場合のコントロール時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量の回帰直線の傾きは 0.4, 切片は 0.011。刺激頻度 20 Hz を 20 回で刺激を行った場合のコントロール時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量の回帰直線の傾きは 0.35, 切片は 0.015。(文献 51 Supplementary FigureS2 より改変)。

図 12

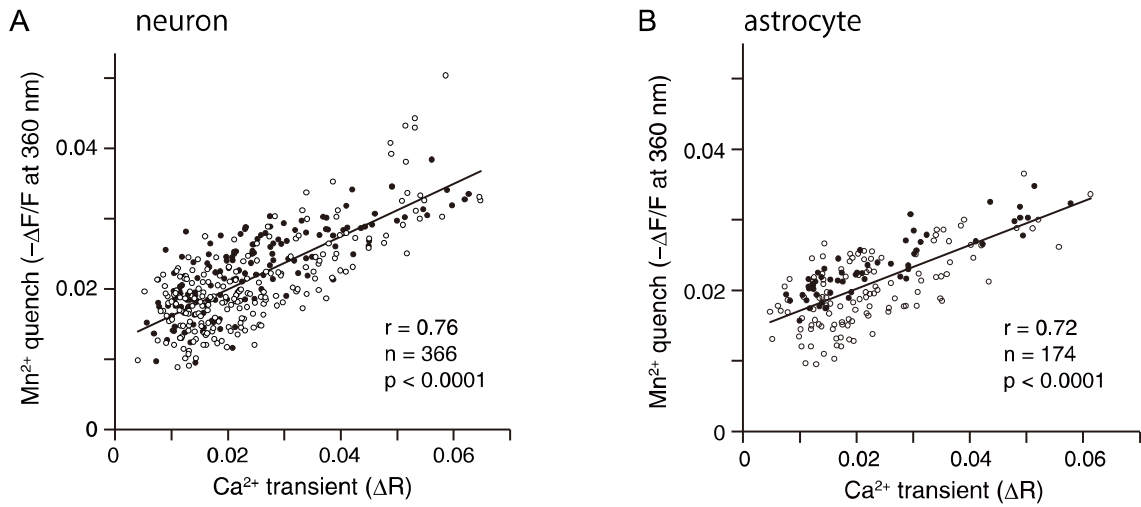


図 12.  $[Ca^{2+}]_i$  変化と  $Mn^{2+}$  クエンチとの関係

図 11. A, B で示した刺激頻度ごとの  $[Ca^{2+}]_i$  変化と  $Mn^{2+}$  クエンチとの関係を、併せたもの。横軸、縦軸は図 11 と同じである。A がニューロン、B がアストロサイトを、黒丸が 20Hz20, 白丸が 50Hz20 を示している。A ニューロンは $[Ca^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量の回帰直線の傾きは 0.38, 切片は 0.013。B アストロサイトは $[Ca^{2+}]_i$  変化量とクエンチ量の回帰直線の傾きは 0.31, 切片は 0.014。(文献 51 Supplementary FigureS2 より改変)。

図 13

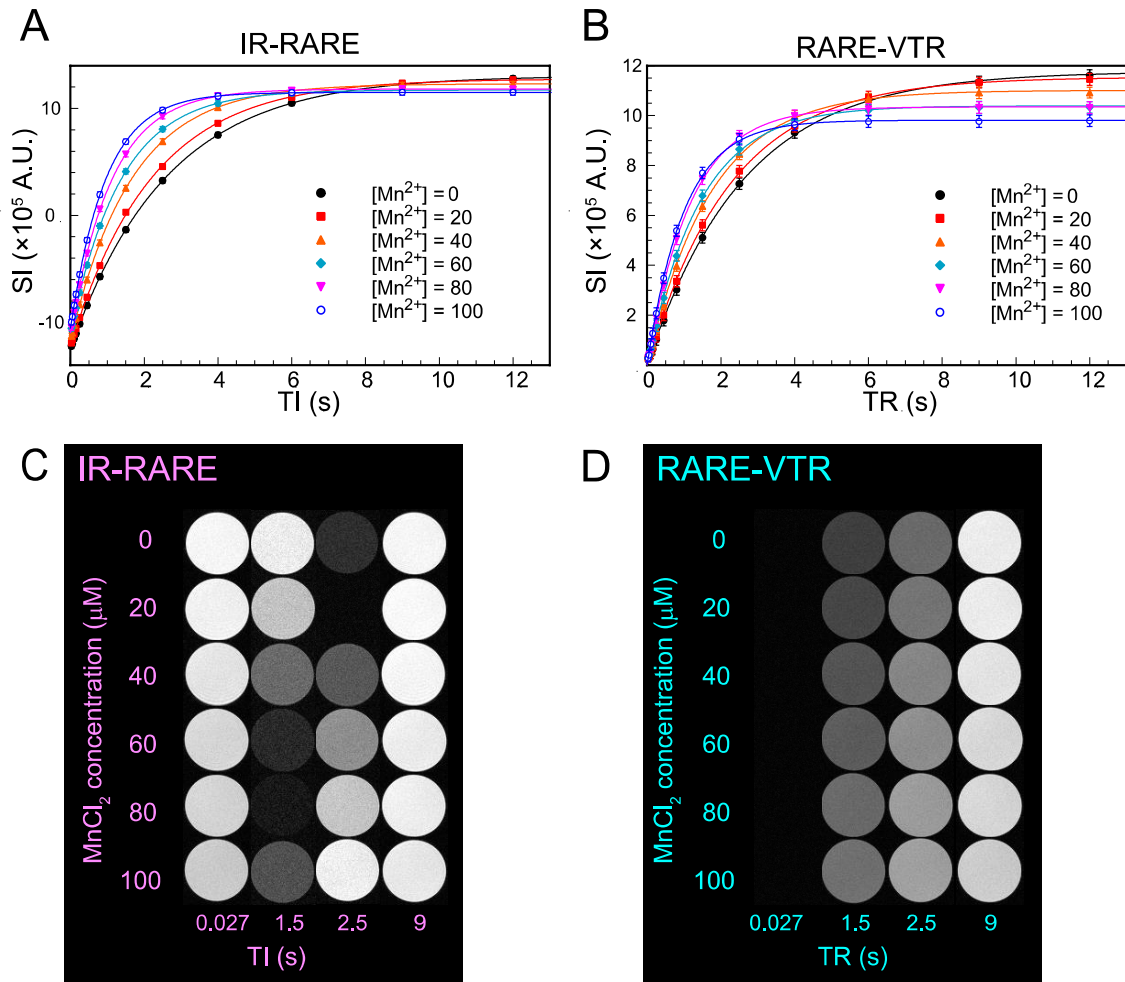


図 13. IR-RARE, RARE-VTR シーケンスで撮影した各  $MnCl_2$  濃度ファントムの縦緩和率

A: IR-RARE を用いた場合の各  $MnCl_2$  濃度ファントムにおける信号強度の回復のグラフ。横軸 TI (s) 縦軸信号強度。B: RARE-VTR を用いた場合の各  $MnCl_2$  濃度ファントムにおける信号強度の回復のグラフ。横軸 TR (s) 縦軸信号強度。C: IR-RARE で撮影した各  $MnCl_2$  濃度のファントムに対し、各 TI (s) で撮影した MRI 画像。D: RARE-VTR で撮影した各  $MnCl_2$  濃度のファントムに対し、各 TR (s) で撮影した MRI 画像。

図 14

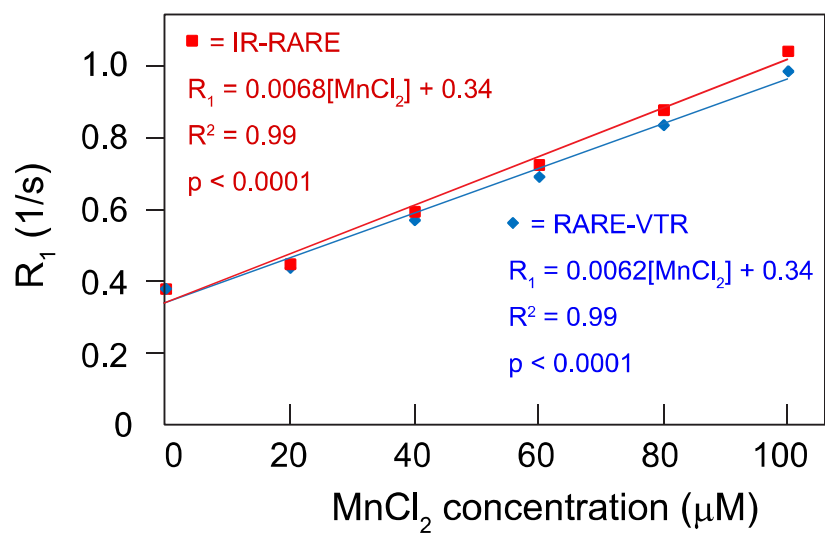


図 14. IR-RARE, RARE-VTR シーケンスで撮影した  $\text{MnCl}_2$  濃度と  $T_1$  値の関係

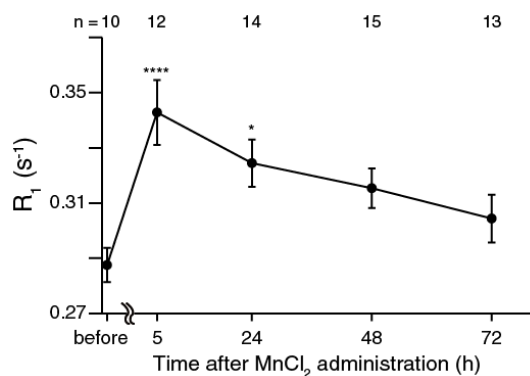
横軸:  $\text{MnCl}_2$  濃度。縦軸:  $R_1$  値( $1/T_1$  (1/s))。IR-RARE, RARE-VTR 共に  $p < 0.0001$ ; (相関係数の検定)。



図 15

A

脳室



B

皮質

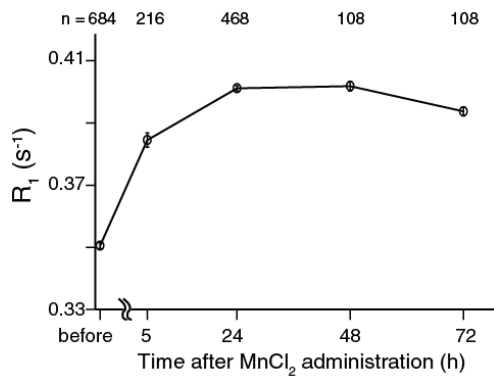


図 15. MnCl<sub>2</sub> 投与後の脳室と皮質の R<sub>1</sub> 値の時間経過

横軸: 時間。縦軸: R<sub>1</sub> 値(1/T<sub>1</sub> (1/s))。MnCl<sub>2</sub> を投与した後の脳室 (A) と大脳皮質 (B) の R<sub>1</sub> 値の時間経過について示している。MnCl<sub>2</sub> 投与後 5 時間後と 24 時間後の脳室の R<sub>1</sub> 値はどちらも、MnCl<sub>2</sub> 投与前と比較して有意に上昇している。\*\*\* p < 0.001, \* p < 0.05。n は ROI の数を示している。(文献 51 Supplementary FigureS5 より改変)。

図 16

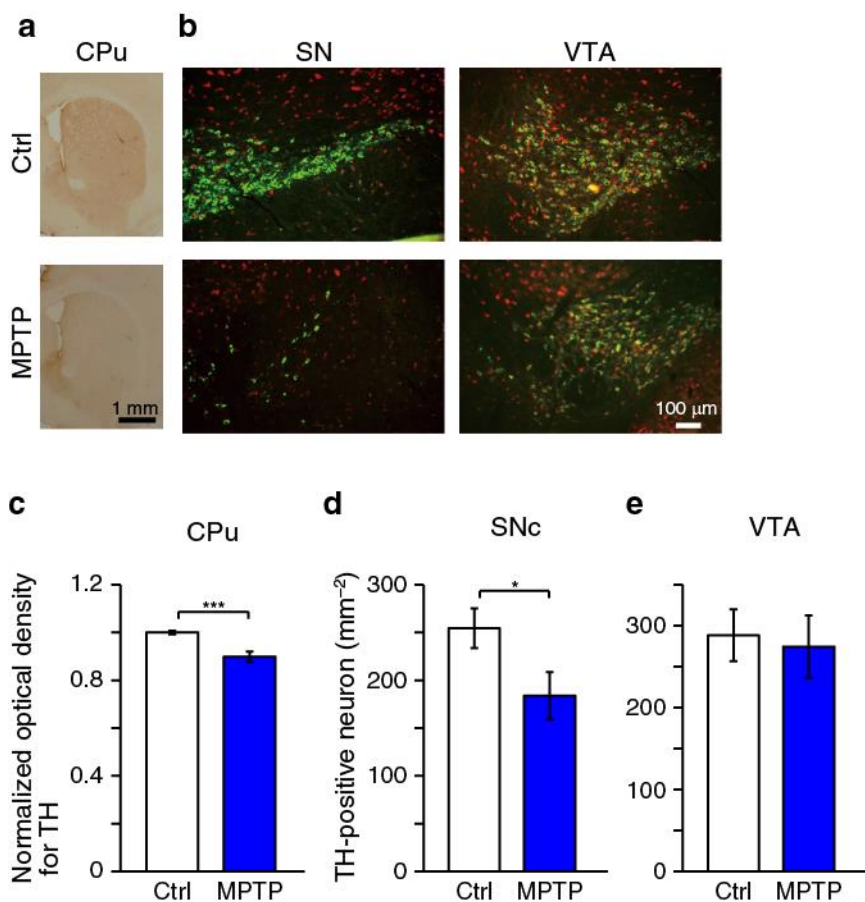


図 16. MPTP 投与によるの線条体 TH 密度と黒質緻密部ドーパミンニューロン数の減少

(a) TH 抗体による免疫組織化学染色後の線条体 (CPu) の顕微鏡画像。上段がコントロール (Ctrl), 下段が MPTP 投与マウス (MPTP)。スケールバーは 1 mm。(b) 黒質 (SN) と側坐核 (VTA) における、全てのニューロン (赤) と、TH 陽性ニューロン (緑) の蛍光写真。スケールバーは 100  $\mu$ m。(c) コントロール動物群、MPTP 群、の線条体 TH 密度の比較。TH 密度は、各バッチのコントロール群の平均値で規格化している。\*\*\*P < 0.002。(d,e) コントロール動物群、MPTP 群間での黒質緻密部 (SNc, d) と側坐核 (VTA, e) における、TH 陽性ニューロンの数の比較。\*P < 0.05。(c-e)  $n_{ctrl} = 6$  mice,  $n_{MPTP} = 6$  mice。(文献 51 図 3 より改変)。

図 17

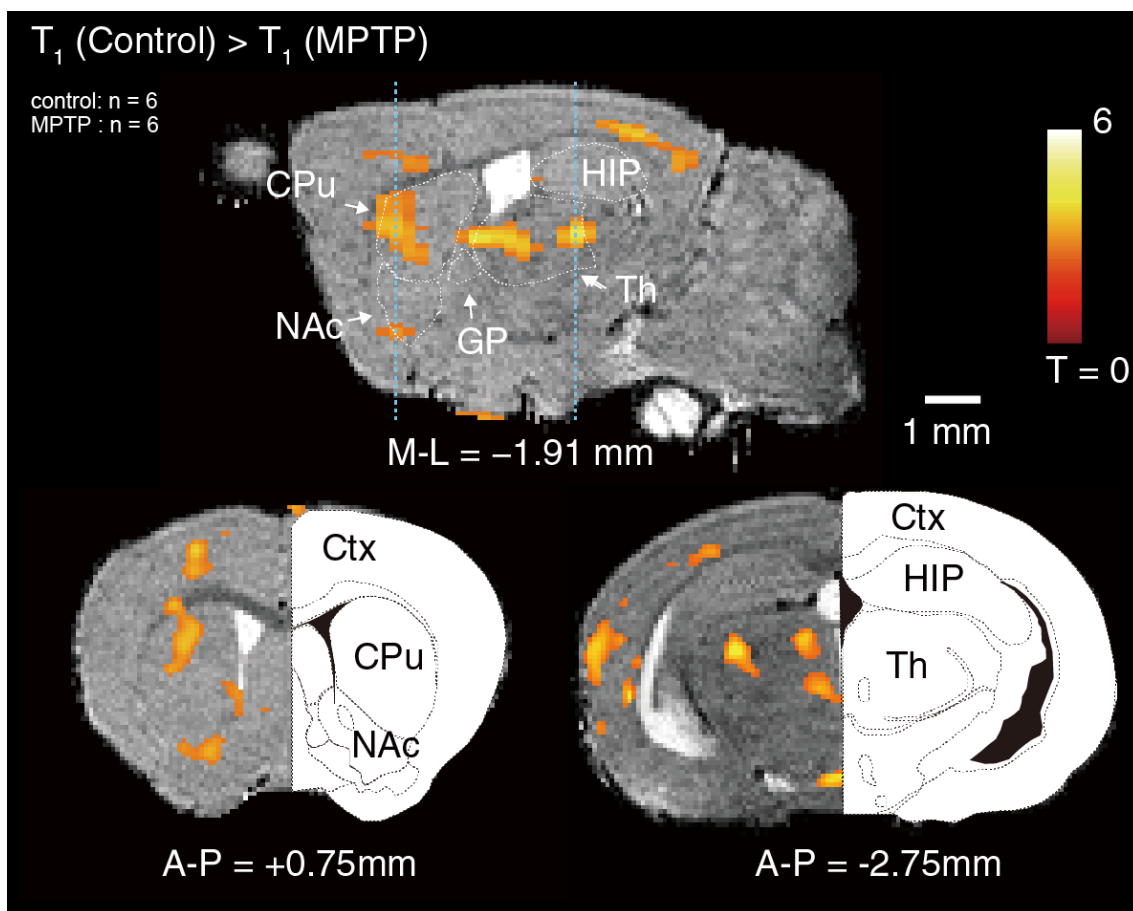


図 17. パーキンソン病モデル動物において神経活動が上昇していた領域  
パーキンソン病モデル群がコントロール群と比較して、 $T_1$  値が有意に減少して  
いた領域を、 $T_2$  強調画像テンプレートの上に疑似カラー表示している。上図は  
矢状断面、下図は冠状断面の脳画像である。T は Student's t-test の t を示し  
ている。値側坐核 (NAc), 淡蒼球 (GP), 海馬 (HIP), 線条体 (CPu), 皮質 (Ctx),  
視床 (Th) の  $T_1$  値がパーキンソン病モデルマウス群で有意に減少しているの  
がわかる。論文と同じ図を使うときは必ず図の説明でも引用する。(文献 51 図  
2 より改変)。

18

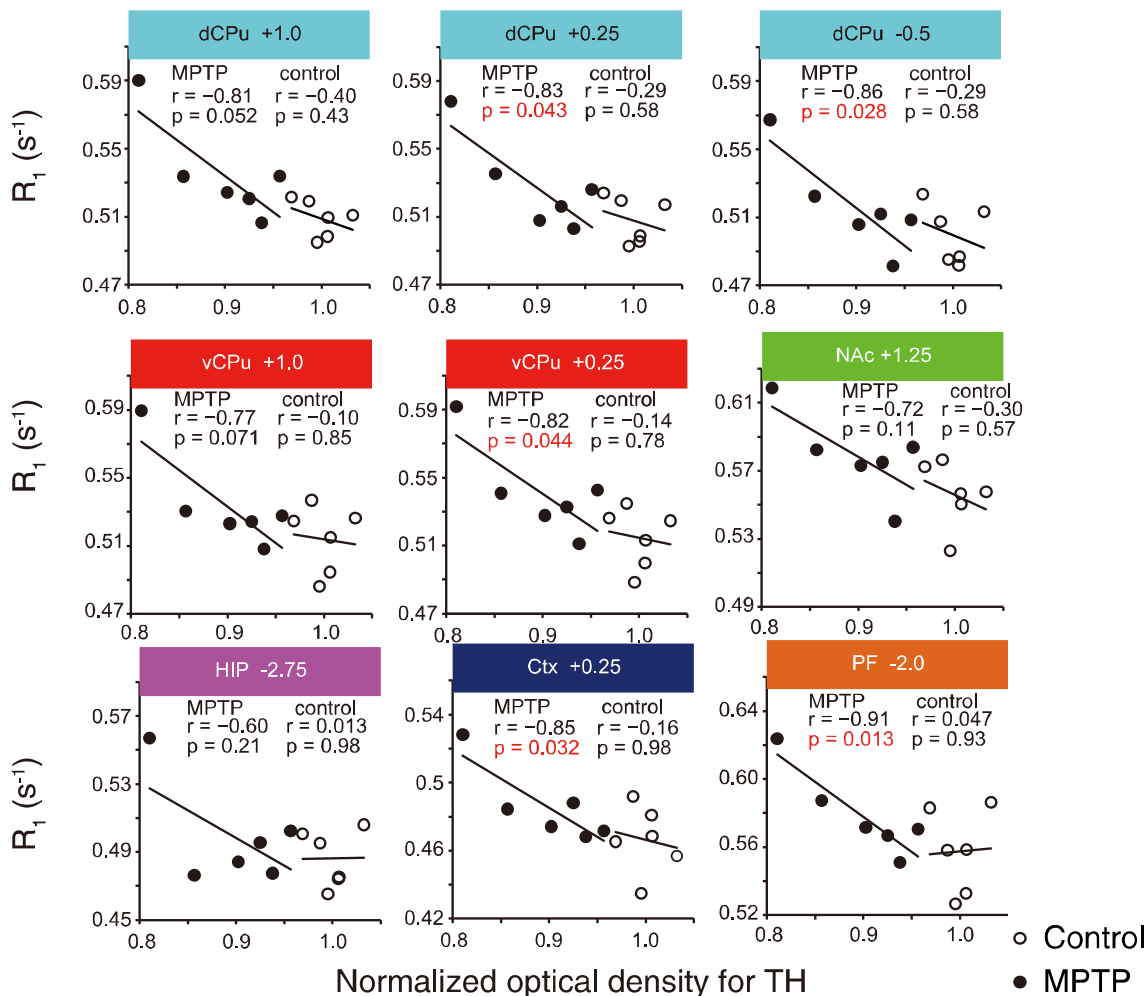


図 18. 様々な脳領域の  $R_1$  値と線条体 TH 発現量との関係

$MnCl_2$  投与 48 時間後における パーキンソン病モデルマウス (黒丸)、コントロールマウス(白丸) の様々な脳領域の  $R_1$  値と線条体 TH 発現量との関係。図 9 で示した領域に ROI を置きそれぞれの脳領域の  $R_1$  値を求めた。NAc: 側坐核, dCPu: 背側線条体, vCPu: 腹側線条体, Ctx: 皮質, PF: パラファシキュラーニュークレウス, HIP: 海馬。(文献 51 図 4 より改変)。