

マンガン神経トレーシング法 (MEMRI tract-tracing) による 霊長類視覚伝導路の描出と網膜神経分布の解析 [大会長賞記録]

山田雅之^{1,2}, 疋島啓吾^{2,3}, 藤吉兼浩^{4,5}, 百島祐貴⁶,
中村雅也⁴, 岡野栄之⁵, 玉置憲一²

¹藤田保健衛生大学医療科学部放射線学科 ²財実験動物中央研究所
³慶應義塾大学総合医科学研究センター ⁴同整形外科科学教室 ⁵同生理学教室 ⁶同放射線診断科

はじめに

視覚伝導路は網膜から投射された神経軸索の集合によって構成される“fiber structure”であり、その分布形態は解剖学的・生理学的な生体機能と密接に関連している。例えば、二つの眼球が頭部外側面に離れて配置される齧歯類動物と前面に並ぶ霊長類とでは、両眼視野の面積に関連して網膜膝状体投射路の分布形態が異なることはよく知られている¹⁾。すなわち、前者では一側の視神経のほとんどが視交叉を経て対側視索へと投射するのに対し、後者では同側と対側の視索へほぼ半数の割合で分岐し、その多くが両側の外側膝状体や上丘へと投射する^{2),3)}。このようなヒトや動物の視覚伝導路に関する神経解剖学的・形態学的な知見は、髄鞘染色や変性軸索渡銀染色といった神経染色法^{4),5)}、さらに軸索輸送物質を利用した神経トレーシング法⁶⁾やオートラジオグラフィ⁷⁾など病理組織学的な解析手法により得られたものである。従来の病理組織染色法や顕微鏡による神経微細構造の観察は、肉眼解剖では得ることが困難な視覚伝導路の網膜神経分布を明らかにしてきた。しかし、これらの方法は極めて侵襲性が高く、生体での観察が困難であることや、

それら解析の過程に解剖による対象組織の摘出、さらに病理標本の作製といった煩雑な作業を常に伴うことが欠点であった。したがって、臨床のみならず基礎医学研究においても、視覚伝導路の神経構造を生体のまま“*in situ*”に観察できる画像解析法の開発が求められてきた。

近年、磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging : 以下, MRI) による神経構造解析法がいくつか考案され、生体内の神経路を可視化する試みが報告されている。その一つは、水分子の拡散異方性を情報とする diffusion tensor imaging (以下, DTI) および tractography である^{8)~12)}。DTI は従来の拡散強調 MRI と同様に非侵襲的にデータが得られることから、近年では臨床だけでなく実験動物を対象とする基礎医学研究にも応用され、様々な神経構造の可視化技術として有用性が高まっている^{13)~16)}。しかし、DTI の解析結果からコンピュータ画像処理によって描かれる tractography は、一つのボクセルにおいて方向の異なる複数の神経線維が交差する場合など、複雑な神経構造の描出が原理的に困難とされる^{17)~19)}。このため高度に神経交差を呈することが知られるヒトや霊長類動物の視交叉の描出については、DTI の描出精度に関する何らかの検証が必要とされて

キーワード manganese-enhanced MRI (MEMRI), common marmoset, tract-tracing, visual pathway, diffusion tensor imaging

おり、現状では視覚伝導路に対する tractography の適用には解決すべき課題も残されている¹⁶⁾。

一方、DTI とは異なるアプローチで神経構造の可視化を実現する方法が、Pautler らによって報告された manganese-enhanced MRI (MEMRI) tract-tracing である²⁰⁾。MEMRI tract-tracing は、上述した病理組織学的手法に類似の MRI 神経トレーシング法であり、 Mn^{2+} のユニークな特徴を利用した生体の生理学的機序に基づく神経画像法である。本法は、これまで主にマウスやラットといった齧歯類実験動物を対象に視覚伝導路の可視化や、tractography の精度検証法として高い有用性が報告されてきたが、マンガンの毒性を理由にヒトへの利用は実現していない²¹⁾。他方、我が国の基礎医学研究、特に臨床への橋渡しとなるトランスレーショナルリサーチでは、齧歯類動物に加えてヒトにより近縁の霊長類実験動物が利用される傾向にある。このため、本法を霊長類動物の神経構造解析に適用することへの重要性が高まっている。

本研究では、この MEMRI tract-tracing をより複雑で発達した視覚伝導路をもつ小型霊長類実験動物コモンマーモセットに適用し、ヒトに類似するとされる視覚伝導路の描出と網膜神経分布の解析を目的とする。

方 法

対象動物

すべての動物実験は財実験動物中央研究所動物実験委員会の承認を得て行われた。対象動物は財実験動物中央研究所で実験動物として適切に飼育管理された成体のコモンマーモセット (*callithrix jacchus*) 雄4匹 (体重 280~350 g) とし、外科的処置および MRI ではイソフルレン吸入麻酔を使用した。麻酔下にある動物につ

いては、脈拍・血中酸素飽和度・体温を経時的にモニターし、それぞれを適切に調節した。

MRI

MRI 装置はブルカー製 PharmaScan 70/16 (7.0Tesla) に内径が 6 cm の送受信兼用ボリュームコイルを組み合わせて使用した。MEMRI tract-tracing は麻酔下で対象動物の右眼球内に $MnCl_2$ 水溶液 (1 mol/l, 0.5 μ L) を慎重に投与した。画像データの取得は、1例を投与直後から吸入麻酔下で経時的 (4.5, 5, 6, 12, 18, 21 時間後) に撮像し、他の3例については覚醒させたのちケージに戻し、24 時間後に再び麻酔下で MEMRI を実施した。MEMRI の撮像シーケンスは 3D gradient echo 法 (TR/TE = 40/3 ms, FA = 30°, FOV = 60 mm, matrix = 192 × 192, voxel size = 0.31 mm (isotropic)) を使用した。また、 Mn^{2+} の分布によって描かれる視覚伝導路の形態を確認する目的から、拡散強調 2D spin echo 法 (TR/TE = 3500/40 ms, b = 1000 s/mm², MPG = 12 non-collinear direction, voxel size = 0.31 × 0.31 × 0.94 mm) による撮像を同一個体で実施し、DTI tractography を東大放射線科開発の dTV II SR (<http://www.ut-radiology.umin.jp/people/masutani/dTV.htm>) を使用して作製した。

視覚伝導路の画像解析

経時的に撮像された MEMRI の画像データから 3D tract-tracing 画像を作成し、視交叉に投射する網膜神経分布の形態について、同一個体の DTI tractography と比較検討した。さらに、 $MnCl_2$ 投与後 24 時間の MEMRI tract-tracing 画像から、コモンマーモセットの視覚伝導路における Mn^{2+} の分布を解析し、網膜膝状体投射および網膜上丘投射の形態について検討した。

結 果

MnCl₂の右眼球内投与後、経時的に撮像したMEMRIの結果では、投与側眼球、同側視神経、および視交叉での信号増強が認められた (Fig. 1a~c). 投与後6時間では投与側視神経乳頭から眼球側視神経へのMn²⁺の移動が確認され (Fig. 1a), 18時間後には同側視神経が全体的に造影された (Fig. 1c). さらに21時間後のtract-tracing像では、両側性に分岐して視交叉へ投射する視神経の走行が認められ、その形態は同一個体について得られたDTI tractographyと類似した (Fig. 1. c, d). 視交叉より遠位の視覚伝導路には、明らかなコントラ

ストの増強を認めなかった.

麻酔から覚醒させ24時間後に撮像した3匹については、麻酔下で経時的に撮像した一例とは異なり、全例において同側および対側の視索、両側外側膝状体、さらに上丘が造影された. MEMRI tract-tracingは網膜膝状体投射や網膜上丘投射の概観を明瞭に描出し (Fig. 2a~d), 両側の外側膝状体ではコモンマーモセットについて報告された従来の病理組織学的所見²²⁾と一致する網膜依存性層構造の信号増強が認められた (Fig. 2c).

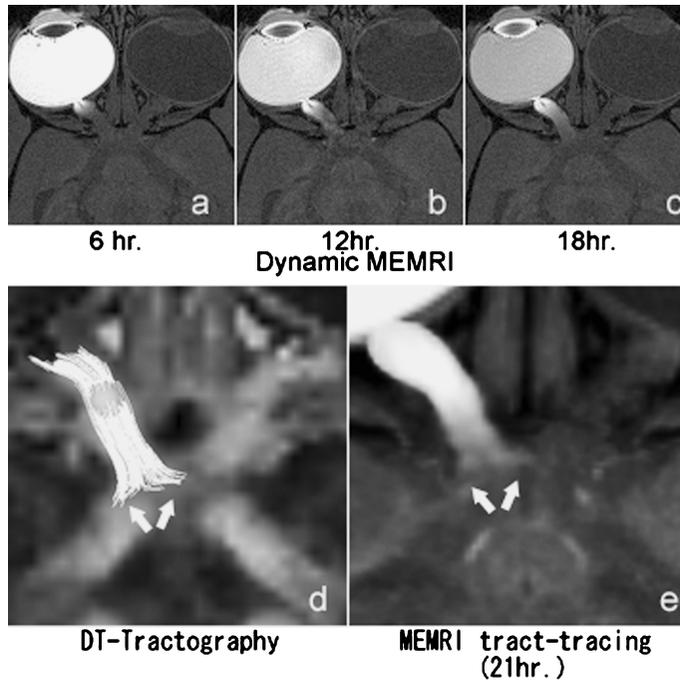


Fig. 1. Dynamic MEMRI tract-tracing of retinal projection pathway in anesthetized marmoset

a-c: Contrast enhancement on ipsilateral optic nerve induced by Mn²⁺ migration from injected retina.

d,e: Comparison of retinal innervation into optic chiasm between DTI tractography and MEMRI tract-tracing.

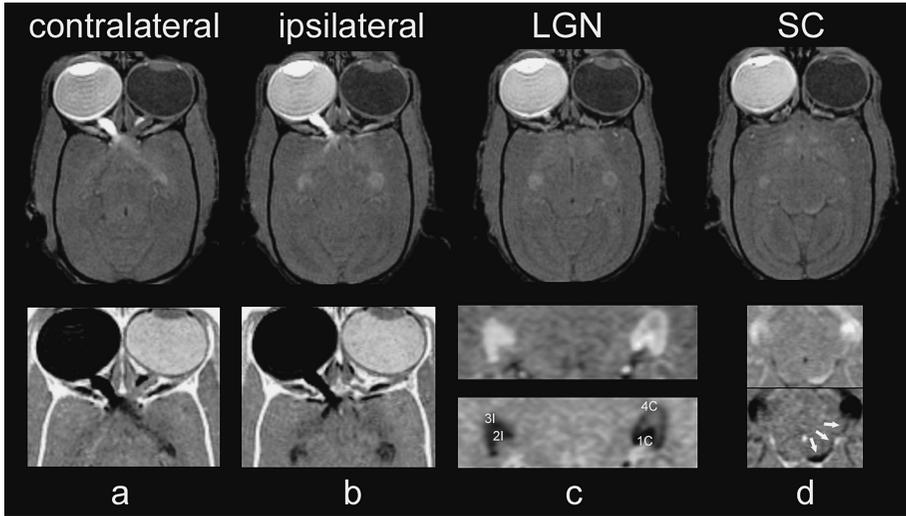


Fig. 2. 3D-MEMRI tract-tracing at 24hr after intravitreal $MnCl_2$ injection
 a : Contralateral retinal projection on left optic tract depicted by Mn^{2+} distribution.
 b : Ipsilateral retinal projection on right optic tract depicted by Mn^{2+} distribution.
 c : Laminar Mn^{2+} distribution of retinal afferents over lateral geniculate nuclei.
 2I, 3I : Internal layers receiving ipsilateral retinal projection fibers
 1C, 4C : Internal layers receiving contralateral retinal projection fibers
 d : Superior colliculus and its brachium (arrow).

考 察

本研究では MEMRI tract-tracing を小型霊長類実験動物であるコモンマーモセットに応用し、視覚伝導路の形態解析を試みた。結果、これまで主に齧歯類動物で報告されてきた^{23),24)} Mn^{2+} の網膜神経節細胞への取り込みと、その軸索輸送に基づく網膜神経投射路の信号増強がコモンマーモセットについても確認され、ヒトに類似の視覚伝導路が MRI によって可視化された。既にアカゲザルなど大型の霊長類動物を対象に MEMRI tract-tracing の応用は報告されているが²⁵⁾、本結果により国内外での研究利用が急増している小型霊長類コモンマーモセットの視覚伝導路についても、本法が有効な神経構造解析手法であると考えられた。

MEMRI tract-tracing は Mn^{2+} のユニークな特徴、すなわち①コントラスト増強効果によ

り、その局在が MRI で検出可能であること、② Ca^{2+} との類似性からカルシウム電位依存チャンネルを介して神経細胞内に取り込まれること、③軸索輸送によって神経路を移動すること、を利用した神経画像法である²⁶⁾。また、視覚伝導路における本法の機序は、軸索輸送性を利用する点で従来の神経トレーシング法と類似しており、生体の生理学的機能に基づく神経投射路の可視化法と考えられる。本法がコモンマーモセットの両側外側膝状体において描出した層構造のコントラスト増強が、各層の網膜依存性を示す病理組織学的知見²²⁾と一致したことは、このことを裏付けるものと考えられる。

一方、本結果では $MnCl_2$ の眼球内投与後、麻酔下で撮像した場合と、いったん覚醒させてから撮像した場合とでは、造影される網膜投射路の範囲が大きく異なった。この原因は明確ではないが、 Mn^{2+} の造影効果は眼球内に投与さ

れる MnCl_2 の濃度や量, トレースされる神経路の長さに影響を受けるとされ²⁴⁾, 使用する麻酔薬が網膜神経節細胞における Mn^{2+} の取り込みに影響を与える可能性も示唆される. また, Mn^{2+} の軸索輸送が高速輸送であるとの報告に加え²⁴⁾, 能動輸送よりもむしろ拡散 (diffusion) に依存している可能性も指摘されている²⁷⁾. したがって, 本法の原理・機序については, さらに詳細な検討も必要である.

結 語

MEMRI tract-tracing は “*in situ*” に神経構造の観察が可能な神経画像解析法である. マンガンの神経毒性を理由にヒトへの適用は容易ではないが, 本研究により齧歯類のみならず霊長類であるコモンマーモセットにも適用できることが明示された. 今後, 神経解剖学や神経生理学といった基礎医学研究, あるいは霊長類実験動物を対象とするトランスレーショナルリサーチでの本法の有用性が期待される.

文 献

- Magnin M, Cooper HM, Mick G: Retinohypothalamic pathway: a breach in the law of Newton-Muller-Gudden? *Brain Res* 1989; 488: 390-397
- Hoyt WF, Luis O: The primate chiasm. Details of visual fiber organization studied by silver impregnation techniques. *Arch Ophthalmol* 1963; 70: 69-85
- Kupfer C, Chumbley L, Downer JC: Quantitative histology of optic nerve, optic tract and lateral geniculate nucleus of man. *J Anat* 1967; 101 (Pt 3): 393-401
- Kluver H, Barrera E: A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1953; 12: 400-403
- Nauta WJ: [The so-called terminal degeneration in the central nervous system as seen in silver impregnation.] *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 1950; 66: 353-376
- LaVail JH, LaVail MM: Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 1972; 176: 1416-1417
- Cowan WM, Gottlieb DI, Hendrickson AE, Price JL, Woolsey TA: The autoradiographic demonstration of axonal connections in the central nervous system. *Brain Res* 1972; 37: 21-51
- Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D: MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J* 1994; 66: 259-267
- Basser PJ, Pierpaoli C: Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *J Magn Reson B* 1996; 111: 209-219
- Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M: MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 1986; 161: 401-407
- Mori S, Crain BJ, Chacko VP, van Zijl PC: Three-dimensional tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1999; 45: 265-269
- Moseley ME, Cohen Y, Kucharczyk J, Mintorovitch J, Asgari HS, Wendland MF, Tsuruda J, Norman D: Diffusion-weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system. *Radiology* 1990; 176: 439-445
- Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, et al.: *In vivo* tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography. *J Neurosci* 2007; 27: 11991-11998
- Mori S, Zhang J: Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron* 2006; 51: 527-539
- Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Shibata S, Okano HJ, Toyama Y, Okano H: Visualization of peripheral nerve degeneration and regeneration: monitoring with diffusion tensor tractography. *Neuroimage* 2009; 44: 884-892
- Yamada M, Momoshima S, Masutani Y, Fujiyoshi K, Abe O, Nakamura M, Aoki S,

- Tamaoki N, Okano H : Diffusion-tensor neuronal fiber tractography and manganese-enhanced MR imaging of primate visual pathway in the common marmoset : preliminary results. *Radiology* 2008 ; 249 : 855-864
- 17) Alexander AL, Hasan KM, Lazar M, Tsuruda JS, Parker DL : Analysis of partial volume effects in diffusion-tensor MRI. *Magn Reson Med* 2001 ; 45 : 770-780
- 18) Mori S, van Zijl PC : Fiber tracking : principles and strategies –a technical review. *NMR Biomed* 2002 ; 15 : 468-480
- 19) Wiegell MR, Larsson HB, Wedeen VJ : Fiber crossing in human brain depicted with diffusion tensor MR imaging. *Radiology* 2000 ; 217 : 897-903
- 20) Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP : *In vivo* neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 1998 ; 40 : 740-748
- 21) Koretsky AP, Silva AC : Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 2004 ; 17 : 527-531
- 22) Spatz WB: The retino-geniculo-cortical pathway in *Callithrix*. I. Intraspecific variations in the lamination pattern of the lateral geniculate nucleus. *Exp Brain Res* 1978 ; 33 : 551-563
- 23) Thuen M, Singstad TE, Pedersen TB, Haraldseth O, Berry M, Sandvig A, Brekken C : Manganese-enhanced MRI of the optic visual pathway and optic nerve injury in adult rats. *J Magn Reson Imaging* 2005 ; 22 : 492-500
- 24) Watanabe T, Michaelis T, Frahm J : Mapping of retinal projections in the living rat using high-resolution 3D gradient-echo MRI with Mn²⁺-induced contrast. *Magn Reson Med* 2001 ; 46 : 424-429
- 25) Murayama Y, Weber B, Saleem KS, Augath M, Logothetis NK : Tracing neural circuits *in vivo* with Mn-enhanced MRI. *Magn Reson Imaging* 2006 ; 24 : 349-358
- 26) Pautler RG : *In vivo*, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 2004 ; 17 : 595-601
- 27) Lowe AS, Thompson ID, Sibson NR : Quantitative manganese tract tracing : dose-dependent and activity-independent terminal labelling in the mouse visual system. *NMR Biomed* 2008 ; 21 : 859-867

***In Vivo* Visualization and Analysis of Primate Retinal Projection Pathway Using Manganese-enhanced MRI Tract-Tracing [Presidential Award Proceedings]**

Masayuki YAMADA^{1,2}, Keigo HIKISHIMA^{2,3}, Kanehiro FUJIYOSHI^{4,5},
Suketaka MOMOSHIMA⁶, Masaya NAKAMURA⁴, Hideyuki OKANO⁵,
Norikazu TAMAOKI²

¹*Faculty of Radiological Technology, School of Health Sciences, Fujita Health University
1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192*

²*Central Institute for Experimental Animals*

³*Center for Integrated Medical Research, Departments of ⁴Orthopedics, ⁵Physiology, and ⁶Radiology,
School of Medicine, Keio University*

Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) tract-tracing has been used for *in situ* morphological analysis of several experimental animals, including rodents. We used a 7-tesla MR imager to perform this seminal technique on common marmoset monkeys, whose complex retinal projection pathway is analogous to the human visual pathway. We found that the distribution of divalent manganese cation (Mn^{2+}) extricated from $MnCl_2$ solution injected into unilateral eyes produced marked contrast enhancement that clearly delineated the retinal projection pathway. Configurations of the retinal innervations depicted by MEMRI tract-tracing were consistent with findings of previous histopathological studies. In conclusion, MEMRI tract-tracing is a robust tool for *in vivo* neuronal imaging analysis of the non-human primate visual pathway as well as for other experimental medical research in animals.