

黒質線条体線維の可視化～パーキンソンモデルにおける検証～ [大会長賞記録]

矢野竜太郎¹, 疋島啓吾^{2,3}, 安東 潔³, 小牧裕司^{2,3},
川井健司³, 井上貴史³, 山田雅之⁴, 伊藤豊志雄³,
八木一夫¹, 百島祐貴⁵, 岡野ジェイムス洋尚⁶, 岡野栄之²

¹首都大学東京健康福祉学部放射線学科 ²慶應義塾大学医学部生理学教室
³実験動物中央研究所 ⁴藤田保健衛生大学医療科学部放射線学科
⁵慶應義塾大学医学部放射線診断科 ⁶東京慈恵会医科大学再生医学研究部

はじめに

パーキンソン病における運動障害の主な原因は、大脳基底核を構成する黒質緻密部から線条体を連絡する黒質線条体神経線維の脱落である¹⁾。黒質線条体神経路は、比較的疎な神経束から構成され、また基底核領域の複雑な神経走行場に混在するためにMRIで評価することは困難である。これまでパーキンソン病患者におけるMRI評価として、diffusion tensor imaging (DTI) 解析を用い、黒質線条体間に設定したregion of interest (ROI) からfractional anisotropy (FA) が患者群において低いという報告²⁾があるが、神経走行構造をMRIで描出した報告はない。

一般的な黒質線条体線維の評価法は、tyrosine hydroxylase (TH) 染色によるドーパミンニューロンの病理組織解析であるが、複角度に傾斜した疎な神経路を連続的に評価することは困難である。そのため、組織解析を用いた神経路の検証においても、切片評価のみならず三次元的解析を用いた評価法が求められる。

以上を踏まえ、本研究では、顕微鏡的diffusion tensor tractography (DTT) および病理組織の三次元的解析法を開発し、小型霊長類マー

モセットのパーキンソンモデルの黒質線条体神経路を描出することを目的とした。

さらに、神経変性のモニタリング法確立のため、継時的voxel-based analysis (VBA) による黒質体積減少および神経線維構造変化を評価した。

方法と対象

① パーキンソン病モデルマーモセット

ドーパミンニューロンに選択的な神経毒1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 2 mg/kgの反復皮下投与により、無動、振戦、筋固縮、姿勢反射障害などのパーキンソン病様症候を発現させたマーモセット (n = 6, ♂) を対象とした^{3),4)}。MPTP投与前、投与3か月後で継時的MRIを実施し、その後、脳標本において顕微鏡的DTTおよび病理組織解析を実施した。本研究は、実験動物中央研究所の動物倫理委員会の承認の下、実施した。

② MRI計測

7T MRI (Biospec ; Buker biospin) を用いて、継時的MRIおよび顕微鏡的DTIにはそれぞれ62 mm, 22 mm内径のボリュームコイルを用いた。マーモセットに対し、専用のベッド保

キーワード diffusion, tractography, voxel-based analysis, Parkinson's disease model, nigrostriatal pathway

定、心拍同期、人工呼吸などの生理状態管理技術を用いて、実験系を同一条件で統一し、再現性よく繰り返し出来るように標準化する方法を開発した。

1) 継時的 voxel based morphometry (VBM) 評価

黒質ドーパミンニューロンの脱落を捉えるため MR 信号値シミュレーションを実施し、最適化した magnetization-prepared rapid gradient echo (MP-RAGE) 法を用いた。撮像条件は、MP-RAGE: TR/TE = 13/3.8 ms, time to inversion (TI) = 1500 ms, time to delay (TD) = 3700 ms, voxel size = (0.2 mm)³, No. of segments = 4, No. of average (NA) = 2, acquisition time = 1 h 40 min とした。画像統計解析を実施するため、マーモセットの標準脳テンプレート⁵⁾を用い、SPM8 による継時的 VBM を実施した。

2) 継時的 VBA DTI 評価

2D DTI-EPI 法を用い、撮像条件は TR/TE = 4500/28 ms, No. of segment = 6, NA = 4, b-value = 1000 s/mm², No. of motion probing gradient (MPG) = 12 axes, spatial resolution = (0.38 mm)² × 1.0 mm, acquisition time = 25 min とした。DTI 解析によって得られた全個体の FA 画像をテンプレートに標準化し、各 DTI 解析画像の VBA を実施した。

3) 顕微鏡的 DTT

マーモセットの標本脳に対し顕微鏡的 MRI のため造影剤による MRI 染色を施し、高分解能 3D DTI-SE 法を用いた。撮像条件は TR/TE = 500/28 ms, NA = 1, b-value = 2000 s/mm², MPG = 12 axes, spatial resolution = (55 μm)³, acquisition time = 1 week とした。DTI と DTT の解析には、Diffusion Toolkit および Track-Vis (MGH) を使用した。正常脳およびパーキンソン病モデル脳の DTT から黒質線条体神経構造の変性を評価した。

③ 病理組織解析

黒質線条体神経線維とその脱落分布の組織学的探索のため正常なマーモセット (n = 2) とさらに MRI 評価を終えたパーキンソン病モデル (n = 2) における脳パラフィンブロック (計 n = 4) を作製した。ドーパミンニューロンの三次元分布を解析するため、15 μm 厚の連続切片 240 枚 (3.6 mm 厚分) を作製した。次に、ドーパミンニューロンのマーカーである TH 抗体を用い自動染色装置 (BOUND-MAX; Leica) により脳全体に対し濃度均一性の高い免疫組織切片を作製した。さらに、スライドスキャナー (SCN400; Leica) により全組織切片を高解像度 DICOM 出力した (一枚あたり 4 GB)。得られた多数のデジタル病理組織データに対し、Amira Ver5.4 (Visage Inc.) を用いた線形の位置合わせ変換により三次元化し、最大値投影法によりドーパミンニューロンの脳内分布を可視化した。

結果と考察

本研究の結果を以下に示す。正常およびパーキンソン病モデルの顕微鏡的 DTT およびドーパミンニューロン分布の三次元画像を Fig. 1 に示した。正常モデルにおいて、顕微鏡的 DTT による黒質と線条体の連絡構造が、黒質線条体線維と一致することがわかった。パーキンソン病モデルは正常モデルに比し、顕微鏡的 DTT による Track 数は約半数に減少し、ドーパミンニューロンの線維数も同様に減少していることが確認された。DTT の高分解能化により、黒質線条体線維のような疎な神経走行を描出できた。DTT は水分子の拡散現象を観測した間接的な神経走行の可視化法であるため、基礎研究における神経路選択的な組織画像解析による検証が重要と考えられる。

継時的 VBA の解析結果を Fig. 2 に示した。MPTP 投与前後での VBM により、パーキン

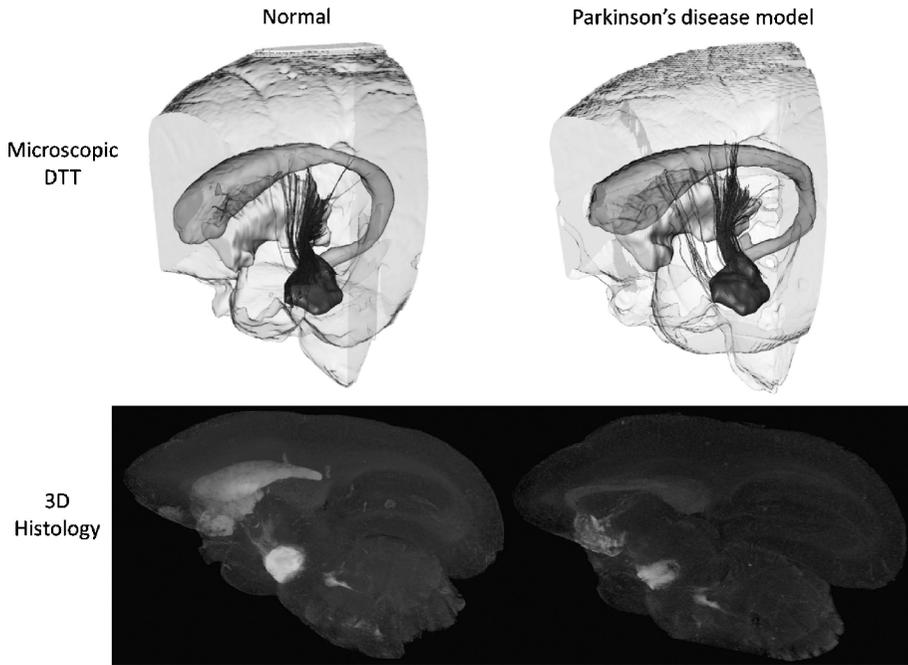


Fig. 1. Visualization of the nigrostriatal pathway of normal and Parkinson's disease marmoset model by microscopic DTT and 3D histological analysis

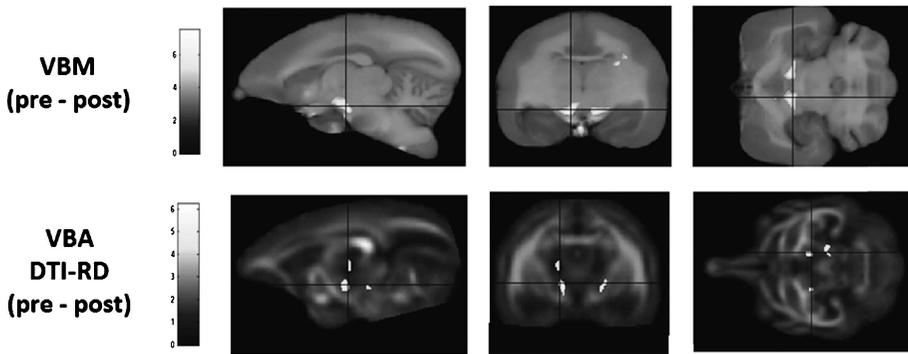


Fig. 2. Longitudinal VBA of Parkinson's disease marmoset model

ソン病モデルにおいて黒質緻密部の体積減少が確認された。ドーパミンニューロンの分布から黒質緻密部の体積を比較すると約70%減少した。また Fig. 3 における病理組織拡大画像から明らかな細胞数の減少が確認された。以上より、継時的なVBMによりドーパミンニューロ

ンの脱落を捉えることができた。DTIの解析では、radial diffusivity (RD)の増加が黒質線条体線維の線維起始部において確認できた。起始部は構造上、比較的密な神経走行を有するため、その変化を捉えられたと考えられる。

本研究で確立した継時的 voxel-wise statis-

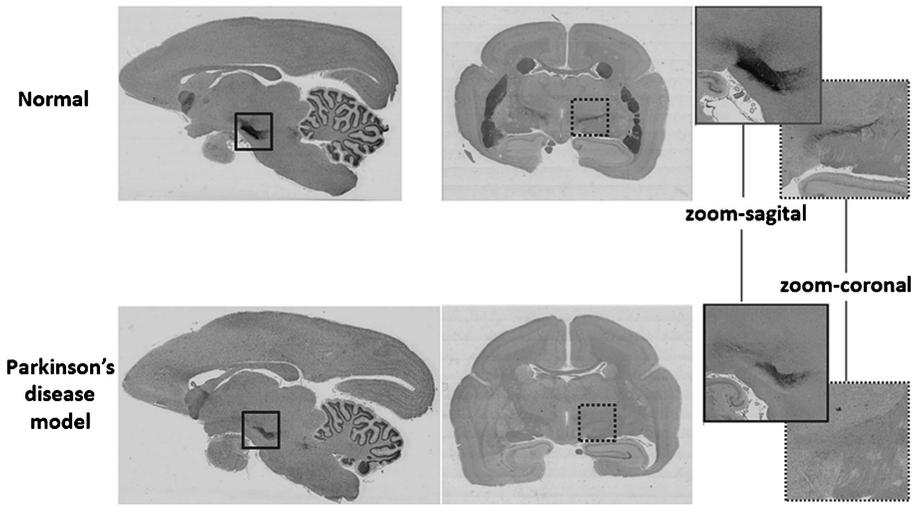


Fig. 3. Histological analysis of normal and Parkinson's disease marmoset model

tics は、前臨床研究における様々な病態の発症のモニタリングや先進的新規治療法の効果判定において強力な診断ツールと成り得る。

結 語

開発した顕微鏡的 DTT によって、黒質線条体神経路のような基底核レベルでの疎で複雑な神経走行を捉えることに成功した。今後、脳内における様々な神経走行の解析が可能となる。また、確立した前臨床研究における継時的な VBA は、霊長類遺伝子改変技術を用いた⁶⁾パーキンソン病モデルの評価に用いており、パーキンソン病のメカニズムの解明への貢献が期待される。

文 献

1) Jankovic J : Parkinson's disease : clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry

2008 ; 79 : 368-376

- 2) Yoshikawa K, Nakata Y, Yamada K, Nakagawa M : Early pathological changes in the parkinsonian brain demonstrated by diffusion tensor MRI. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004 ; 75 : 481-484
- 3) Ando K, Maeda J, Inaji M, Okauchi T, Obayashi S, Higuchi M, Sahara T, Tanioka Y : Neurobehavioral protection by single dose l-deprenyl against MPTP-induced parkinsonism in common marmosets. Psychopharmacology (Berl) 2008 ; 195 : 509-516
- 4) Ando K, Obayashi S, Nagai Y, et al. : PET analysis of dopaminergic neurodegeneration in relation to immobility in the MPTP-treated common marmoset, a model for Parkinson's disease. PLoS One 2012 ; 7 : e46371
- 5) Hikishima K, Quallo MM, Komaki Y, et al. : Population-averaged standard template brain atlas for the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Neuroimage 2011 ; 54 : 2741-2749
- 6) Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al. : Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. Nature 2009 ; 459 : 523-527

Visualization of the Nigrostriatal Fibers : Verification in an Animal Model of Parkinson's Disease [Presidential Award Proceedings]

Ryutaro YANO¹, Keigo HIKISHIMA^{2,3}, Kiyoshi ANDO³,
Yuji KOMAKI^{2,3}, Kenji KAWAI³, Takashi INOUE³,
Masayuki YAMADA⁴, Toshio ITOH³, Kazuo YAGI¹,
Suketaka MOMOSHIMA⁵, Hirotaaka J. OKANO⁶, Hideyuki OKANO²

¹*Department of Radiological Sciences, Faculty of Health and Welfare, Tokyo Metropolitan University
7-2-10 Higashiogu, Arakawa-ku, Tokyo 116-0012*

^{2,5}*Departments of ²Physiology and ⁵Radiology, Keio University School of Medicine*

³*Central Institute for Experimental Animals*

⁴*School of Health Science, Fujita Health University*

⁶*Division of Regenerative Medicine, Jikei University School of Medicine*

Movement dysfunction in Parkinson's disease is caused by the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. We used a microscopic diffusion tensor tractography (DTT) technique with isotropic resolution of 55 μm and 3-dimensional histological analysis to visualize the nigrostriatal pathway in the common marmoset, a small primate. We also developed longitudinal voxel-based analysis to detect the distribution of degeneration. In this study, we report visualization of the nigrostriatal pathway by microscopic DTT and assessment of neuronal degeneration in Parkinson's disease in a marmoset model by longitudinal voxel-based analysis.