

# 家庭動物における認知症に係わる記憶機能の基盤となる 脳領域の回路解析

## Analysis of Neuronal Connectivity in Brain Regions Subserving Memory Functions Relevant to Dementia in Pets

東京農工大学大学院農学研究院獣医解剖学研究室 柴田秀史  
Hideshi Shibata, Tokyo University of Agriculture and Technology

キーワード：視床前核，帯状皮質，線維連絡解析，ウサギ，記憶

keywords: anterior thalamus, cingulate cortex, tract-tracing, rabbit, memory

### 1. はじめに

認知症は、家庭動物においてもその平均寿命が伸び高齢動物が増えるにもなって、増加してきている<sup>4)</sup>。認知症が発症すると動物の生活の質が低下して、飼い主の精神的、経済的負担が増加し、人の生活の質にも影響する。認知症のうち飼い主が名前を呼びかけてもわからなくなるといった症状を呈するのが記憶障害である。最近のラットを中心とした研究によると、記憶は海馬体のみならず、視床前核群、膨大後皮質といった複数の脳領域が正常に情報をやり取りすることによって機能することが明らかになりつつある<sup>1)</sup>。一方、ウサギにおいて、認知症の原因の1つであるアルツハイマー病類似の疾患が高コレステロール血症によって引き起こされることが明らかになってきた<sup>10)</sup>。ウサギはマウスやラットと比べて脳の記憶関連領域がよく分化し、同時に、より高度の学習能力がある動物であることが明らかになっており<sup>2-9)</sup>、記憶研究のための実験動物として最適である。しかし、上述の記憶に関連する脳領域がどのような神経回路を構成しているかについては、ほとんど明らかになっていない。

そこで、本研究では、ウサギを実験動物として使用し、記憶機能に必須の役割を果たす視床前核群のうち、背側前核 (AD) と腹側前核 (AV) が、膨大後皮質と海馬体を中心とした大脳皮質へどのような神経線維連絡を行っているかを、神経解剖学的トレーサーを使用して形態学的に解明した。

### 2. 材料と方法

本研究は、国立大学法人東京農工大学動物実験等に関する規定に則り、研究倫理委員会・動物実験小委員会の承認を得た後、関連法令を遵守して行った。

実験にはニュージーランドホワイト種の雄ウサギ 34羽 (体重 2.5 kg) を使用した。麻酔はキシラジン (10 mg/kg) とケタミン (50 mg/kg) の筋肉内投与あるいはペントバルビタール (60 mg/kg) の腹腔内投与によった。術後は感染防止のため enrofloxacin (5 mg/kg) を皮下投与した。

順行性標識実験では、ウサギを脳定位固定した後に 10% ビオチン化デキストランアミン (BDA; 分子量 10,000) を充填したガラス毛细管を Gergis と Wang<sup>3)</sup> のアトラスに従って AD あるいは AV に刺入し、8  $\mu$ A のパルス状 (7 s on/off) の直流電流を 20~30 分間通電して BDA を注入した。注入後 14 日で、ウサギを 4% パラホルムアルデヒドおよび 0.05% グルタルアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液で灌流固定した。ついで厚さ 50  $\mu$ m の凍結切片を作成した。切片は、1:50~200 に希釈した Elite ABC complex を含む トリス塩酸緩衝液中で反応し、ジアミノベンジンにて発色して、BDA 陽性線維および終末を可視化した。その後、切片をスライドガラスに添付し、乾燥後、ニッスル染色を行ってから鏡検した。

逆行性標識実験では、コレラトキシン B サブユニット (CTB) を蒸留水にて 1% に溶解し、BDA の注入方法に準じて、膨大後皮質および前海馬台の一部に注入した。注入後 7 日で BDA 注入例と同様に灌流固定、組織標本の作製、鏡検を行った。ただし、CTB 陽性細胞の可視化は、抗 CTB

抗体を一次抗体として用いる免疫組織化学法によった。

### 3. 結果

AD および AV の各領域に順行性トレーサーである BDA を限局して注入し、それぞれの核から投射する神経線維終末の領野分布と層分布を詳細に明らかにした。ついで、それらの皮質領野に逆行性トレーサーである CTB を注入することによって AD および AV における起始細胞の分布を詳細に明らかにした。得られた結果は以下の通りである。

#### 3.1. 背側前核の視床皮質投射

AD は膨大後皮質と前海馬台に強く投射することがわかった (図 1 A)。BDA 標識終末は、膨大後皮質の 29a-c 野では I, III, IV, VI 層に、30 野では I, IV 層、前海馬台では I, III-VI 層に多数見られた (図 1 B)。29b 野 I 層と 29c 野 I, III, IV 層の終末は斑状に分布する傾向があった。さらに、AD 吻側部は膨大後皮質尾側部を中心とした吻尾方向に比較的広い領域に、AD 尾側部は膨大後皮質吻側部を中心とした吻尾方向に比較的広い領域に投射するという部位対応関係が見られた。しかし、AD から前海馬台への投射には、特定の部位対応関係は見られなかった。

#### 3.2. 腹側前核の視床皮質投射

AV は膨大後皮質および前海馬台の長軸方向には限局する領域に投射し、AV 腹側部を占める小細胞部 (AVp) と背側部を占める大細胞部 (AVm) とで投射部位が異ることがわかった (図 1 C-H)。

AVp への BDA 注入例では、膨大後皮質 29a-c 野の I, IV 層、30 野の I, IV 層に、前海馬台では I, VI 層に標識終末が見られた (図 1 C, D)。29, 30 野とも I 層の終末は斑状に分布する傾向があった (図 1 D)。ただし、膨大後皮質および前海馬台とも I 層の浅部には終末は少なかった。さらに、AVp 吻側部は膨大後皮質の尾側部および前海馬台の側頭側部に、AVp 尾側部は膨大後皮質の吻側部および前海馬台の中隔側部に投射するという部位対応関係が存在した。

AVm はその背外側部と腹内側部で投射が異り、AVm 背外側部への BDA 注入例では 29a-c 野の I 層に斑状に終末が観察された (図 1 E, F)。さらに IV 層にも終末が見られた。前海馬台では I,

V 層に終末が見られた (図 1 E, F)。29 野、前海馬台とも I 層浅部には終末は少なかった。それに対して、AVm 腹内側部への注入例では、29a-c 野 I 層では浅部に多数の終末が見られ、それより深部で斑状の終末が見られた (図 1 G, H)。ただし、最深部にはほとんど観察されなかった。29a-c 野以外の皮質領野への投射は見られなかった。

AVm (背外側部および腹内側部) から膨大後皮質への投射には、AVm 吻側部は膨大後皮質の尾側部に、AVm 尾側部は膨大後皮質の吻側部に投射するという部位対応関係が存在した。また、AVm 背外側部から前海馬台への投射には、その吻側部は前海馬台の側頭側部に、尾側部は前海馬台の中隔側部に投射するという部位対応関係が見られた。

### 4. 考察

本研究の結果、ウサギの AD および AV から大脳皮質への投射の解剖学的詳細が初めて明らかになった (図 1)。AD は 29 野 I, III, IV, VI 層、30 野 I, IV 層、前海馬台 I, III, V, VI 層に投射し、AVp は 29, 30 野 I, IV 層、前海馬台 I, VI 層、AVm 背外側部は 29 野 I, IV 層、前海馬台 I, V 層、AVm 腹内側部は 29 野 I 層に投射する。これらの視床皮質投射は、基本的にはラットと類似するもの<sup>5,6,8)</sup>、多くの点でラットと異なることがわかった。

従来、ウサギの視床投射は帯状皮質に逆行性トレーサーを注入し、AD, AV における標識細胞の分布を検索した報告のみが存在する<sup>10)</sup>。それによれば AD は 29, 30 野に明確な部位対応関係なく投射するとされ、AV は AVm 内側部が膨大後皮質吻側部に、外側部が膨大後皮質 (特に 29a-c 野) 尾側部に投射すると報告されている<sup>10)</sup>。AD, AV から起始する神経線維終末の領野および層分布は従来まったく報告されておらず、本研究によって初めて明らかになった。

ウサギによる識別性回避行動の学習実験によると<sup>2)</sup>、学習訓練によって引き起こされる AD における神経活動は、学習の最初期過程で増加するのに対して、AV では学習の後期過程で増加することが示されている。したがって、AD からの投射は新規な条件刺激に関する情報を、AV からの投射は学習された条件刺激に関する情報を、それぞれ膨大後皮質と前海馬台へ伝達する経路になっていると考えられる。

さらに、ラットにおいて、AD, 膨大後皮質、

前海馬台には、水平面内において頭部が向いている方向を符号化する頭部方向ニューロン (head direction cell) が存在することから<sup>11)</sup>、AD から膨大後皮質および前海馬台への投射経路は、頭部の方向に関する情報をそれらの皮質へ伝達する重要な経路の一つであることが示唆される。

本研究で明らかになったADおよびAVから膨大後皮質および前海馬台への投射経路は、ウサギの学習・記憶、空間認知、空間行動といった高次神経機能の一部に関与することは確実である。今後、これらの領域の形態学的、生理学的研究がさらに進展すれば、ウサギの認知機能の神経機構がいつそう明らかになり、記憶障害や地誌的障害をはじめとする認知症の予防法や治療法の開発にもつながると考えられる。

## 5. 文献

- 1) Aggleton, JP et al (2010) *Eur J Neurosci*, 31, 2292
- 2) Gabriel, M (1993) Discriminative avoidance learning: a model system. In: Vogt, BA and Gabriel, M. eds *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus*, Birkhäuser, Boston, pp 478-526
- 3) Gergis, M and Wang, S-H (1981) *Stereotaxic Atlas of the Rabbit Brain*, Warren H Green, St Louis
- 4) 中山 (2004) *理学療法科学*, 19, 169
- 5) Shibata, H (1993) *J Comp Neurol*, 337, 431
- 6) Shibata, H (1993) *J Comp Neurol*, 330, 533
- 7) Sparks, DL (2008) *J Alzheimer's Dis*, 15, 641
- 8) Van Groen, T and Wyss, JM (1995) *J Comp Neurol* 358, 584
- 9) Vogt, BA (1993) Structural organization of cingulate cortex: areas, neurons, and somatodendritic transmitter receptors. In: Vogt, BA and Gabriel, M. eds *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus*, Birkhäuser, Boston, pp 19-70
- 10) Vogt, LJ et al (1992) *J Comp Neurol*, 319, 205
- 11) Wiener SI and Taube JS (2005) *Head Direction Cells and the Neural Mechanisms of Spatial Orientation*, MIT Press, Cambridge

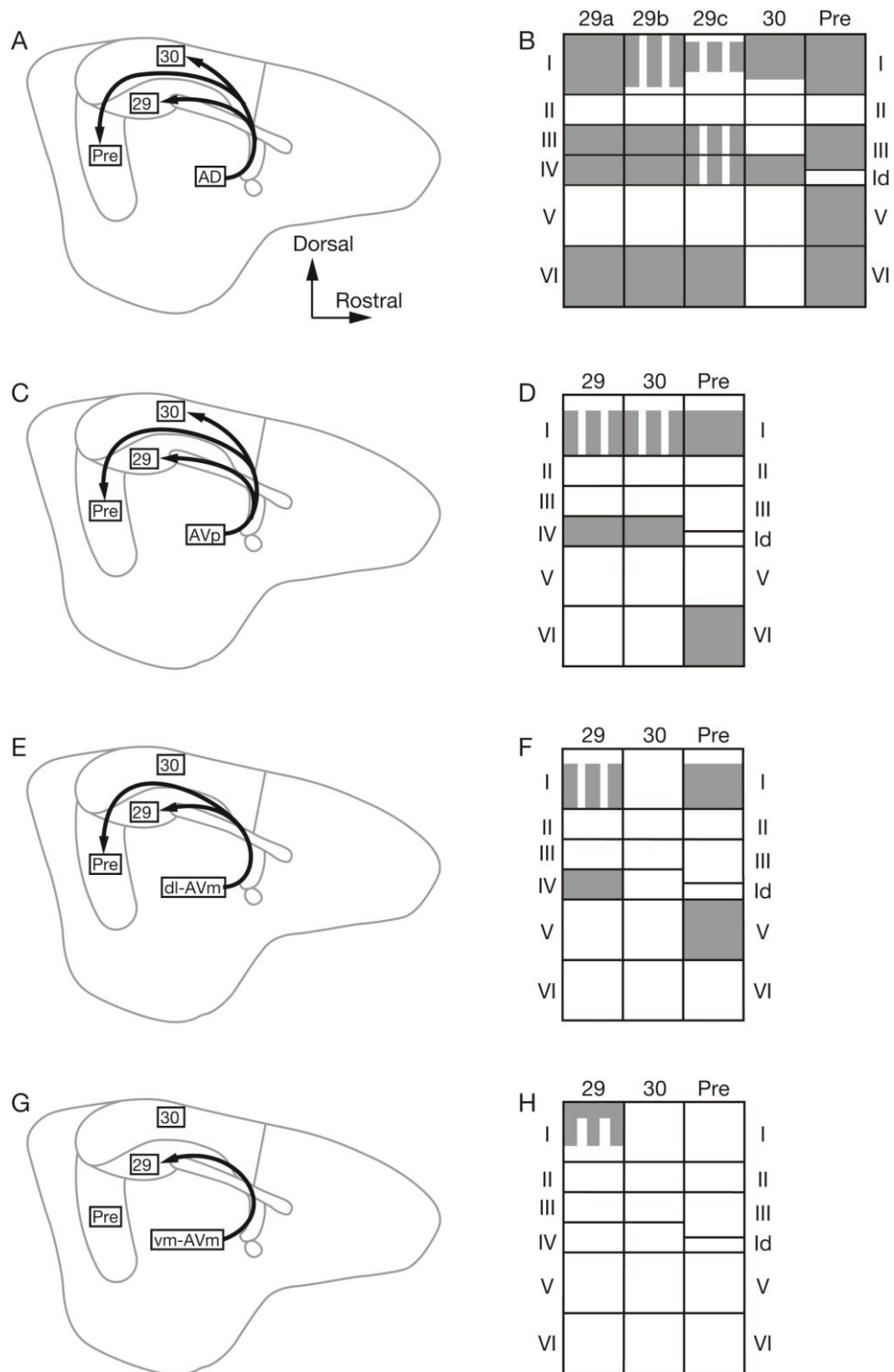


図1 ADおよびAVが投射するおもな皮質領野と各領野における神経終末の層分布を示す模式図。A, B: ADからの投射。C, D: AVpからの投射。E, F: AVm背外側部からの投射。G, H: AVm腹内側部からの投射。一部の領域には終末が斑状に分布することに注意。略語: AD, 背側前核; AVm, 腹側前核大細胞部; AVp, 腹側前核小細胞部; dl-AVm, AVm背外側部; Pre, 前海馬台; vm-AVm, AVm腹内側部。アラビア数字は領野区分をローマ数字は層区分を示す。