

PET イメージングとサル類モデルの組み合わせによる脳神経疾患
および高次脳機能の基礎的研究

永井裕司

平成 29 年度

The basic study for brain disorders and higher brain function by
combination of PET imaging and monkey models

Yuji NAGAI

2017 年度

目次

内容

第 I 章 総緒	1
第 II 章 ドーパミン神経毒 MPTP 投与パーキンソン病モデルサ ルの覚醒下 PET 測定によるドーパミン神経系バイオマーカーの 長期変化	3
II-1. 緒論	3
II-2. 材料・方法	5
II-3. 結果	9
II-4. 考察	11
II-5. 図表	15
第 III 章 音声チックモデルサルの音声チック発現時に認められ る側坐核および関連する辺縁系ネットワークの異常	23
III-1. 緒論	23
III-2. 材料・方法	25
III-3. 結果	29
III-4. 考察	34
III-5. 図表	38

第 IV 章 マカク属サルの吻内側尾状核を化学遺伝学的に神経活動抑制したときの報酬価値評価に与える影響	44
IV-1. 緒論	44
IV-2. 材料・方法	46
IV-3. 結果	53
IV-4. 考察	56
IV-5. 図表	61
第 V 章 総括	69
V-2. 付図	73
謝辞	74
引用文献	76

第 I 章 総 緒

脳機能は、特定の機能を担当する多数の神経細胞からなる集団が形成され、それらがネットワークを構築して協調することで生み出されると考えられている。またそれらネットワークが破綻することで精神神経疾患が発症すると考えられる。脳機能の異常がきたす疾患は多岐にわたり、その病態解明のために患者を対象とした研究のみならず多くの疾患モデル動物が用いられ様々な知見が得られている。特にサル類はヒトに対して解剖学的・生理学的な相同性が高く[109]、ヒトと同様の高次脳機能を有し、生物学的基盤に関する知見が豊富に存在することから妥当性の高いモデル動物として利用されている。

ヒトも動物も臨床において生きたまま体内の情報が得られる画像診断法は他にはない有益な情報を与えてくれる。そのうちインビボ核医学診断法に分類される陽電子放射断層撮像（positron emission tomography: PET）や単一光子放射断層撮像（single photon emission computed tomography: SPECT）は、同じ断層像が得られる X 線 Computed Tomography (CT)や Magnetic Resonance (MR) Imaging に比べ空間解像度は劣るが血流量や代謝活性、受容体密度など臓器・組織・細胞の機能分子を定量的に評価できる手法として利用されている。特に PET は感度が高く、定量性にも優れているため、様々な脳機能研究[130,147]や脳神経疾患研究[15,61,62,96,106,132,142]において利用されている。

研究に利用できる個体数が限られるサル類を対象とした研究では、同一個体から様々な情報を得るのに PET は有用な方法の 1 つ

であり、目的に適した PET トレーサーとサル類モデルを組み合わせることで脳神経疾患の病態や脳機能の機序の解明に重要な役割を果たしている [27,28,60,66,97,103,104]。そこで 3 つの組み合わせを用いた研究を実施し、その有用性について検討した。

第 II 章 ドーパミン神経毒 MPTP 投与パーキンソン病モデルサル の 覚 醒 下 PET 測 定 に よ る ドーパミン神経系バイオマーカーの長期変化

II-1. 緒 論

パーキンソン病 (PD) は黒質線条体ドーパミン (DA) 神経の進行性の変性・脱落という病理学的な特徴を有する疾患である。DA の前駆物質である 3,4-dihydroxyl-L-alanine (L-DOPA) の β 位を ^{11}C で標識した $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]\text{L-DOPA}$ [133,134,136] や 6 位を ^{18}F で標識した L-6- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluorodopa}$ [18,22,29,82,90,126,127,141] を使用して、DA 神経シナプス前機能を PET で評価した研究が多数あり、線条体 DOPA 取り込み能の有意な低下が PD 患者および PD モデルサルにおいて報告されている [22,29,90]。

DA 神経終末の密度は DA トランスポーター (DAT) を対象として評価されている [70,73]。様々な DAT 用トレーサーがあり、臨床では ^{11}C で標識した 2- β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)tropane ($[\text{}^{11}\text{C}]\beta\text{-CIT}$) [78] や 2- β -carbomethoxy-3 β -(4-fluoro-phenyl)tropane ($[\text{}^{11}\text{C}]\beta\text{-CFT}$) [118]、また ^{123}I で標識した N-(3-iodoprop-2E-enyl)-2- β -carbomethoxy-3 β -(4-methylphenyl)nortropane ($[\text{}^{123}\text{I}]\text{PE2I}$) [111] などがある。PE2I は他の DAT トレーサーより高い親和性を有し、他のモノアミントランスポーターより DAT への選択性が高い [51,75]。これらを含む DAT トレーサーを用いた PD の PET や SPECT 研究は線条体における DAT 結合の低下が一貫して認められている [42,43,52,65]。しかしながら ^{11}C で標識した PE2I を使用した PD 患者または PD モデルサルの研究はなかった。

PD 患者およびモデルサル DA 神経シナプス後機能として DA D₂ 受容体について調べた研究において、未服薬の PD 患者では D₂ 受容体トレーサーの ¹¹C-raclopride の集積が線条体において正常あるいは上昇している [26,117]、それに対し病期の進行した患者では正常から低下している [2,14,26,140]。つまり病期によって線条体の D₂ 受容体量が異なることが示唆されている。

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は確立されたサル類 PD モデル作製のために使用されている。それは MPTP が黒質緻密部の DA 神経に対して高い神経毒性を有するからである。サル類に MPTP の反復投与をすることで、PD と類似の症候である振戦、筋固縮、無動・寡動、姿勢保持障害などが引き起こされる。

PD の臨床症状が最初に認められるタイミングは、未だ不明な部分がある [38,74,95,141]。ヒトを対象とした研究では、症状発現前の被験者に複数の PET トレーサーを用いた研究は簡単ではない。この点において、MPTP 投与 PD モデルは潜伏期の長さを探索するために、また最初の PD 様症候が発現するときに脳内の DA 神経変性の進行がどうなっているのか確認するのにより適していると考えられる。しかしながら症候発現前から DA 神経シナプス前後のバイオマーカーについて PD モデルの同一個体を使って長期的に調べたものはほとんどなかった [146]。

加えて、最初に症候発現したタイミングを決めるのは難しいと考えられるが、振戦は有益な症状の 1 つである。振戦は PD 患者において最初に認められる症状の筆頭である [58,149]。これは振戦が患者自身やその家族が気づきやすいものであり、近隣の医院での相談が期待できる。PD 患者において 2 種類の振戦、安静時振戦および

企図振戦がともに認められ、特に安静時振戦は PD により特異的である。しかしながら MPTP 投与マカクサルでは、企図振戦がよく認められるが、安静時振戦はほとんど認められないのが過去の研究の一致した見解である[46,47,129]。また、他の症候の評価を定量するのは難しいと考えられる。したがって本研究では振戦が発現したかどうかに焦点を当てた。

本研究では、カニクイザルに対して MPTP の反復投与を行い、DA 神経の変性・脱落と振戦発現までの行動の変化の関係について、DAT 用トレーサーの ^{11}C -PE2I、DOPA 利用能評価用トレーサー [β - ^{11}C]L-DOPA、 D_2 受容体用トレーサーの ^{11}C -raclopride を使用した PET 測定と各種行動学的評価を用いて検討した。これにより、振戦発現までのフォローアップに合理的な評価指標となる PET および行動のバイオマーカーが決定され、DA 神経の変性・脱落の臨床的閾値を推定することができるだろう。

II-2. 材料・方法

II-2-1. 使用動物

3 頭のカニクイザル (*Macaca fascicularis*、オス、4~6 kg、M118、M119、M129) を用いた。サルを用いたすべての実験は放射線医学総合研究所の動物実験倫理委員会で承認され、飼育管理はアメリカ国立衛生研究所および放射線医学総合研究所のガイドラインに則って行われた。サルは空調管理された部屋に設置された個別ケージで飼育され、固形飼料、補助食（果物または野菜）およびビタミン C 錠剤が毎日与えられた。DA 神経系を評価する PET 測定は麻

酔による影響が大きいため[139]、覚醒下での PET 測定を実施できるように頭部固定具設置手術を行った。手術はペントバルビタール（15～30 mg/kg, i.v.）またはイソフルラン（1～3%）吸入麻酔による標準的なサル麻酔法で行われた。各個体の T1 強調 MR 画像を 1.5 テスラ MR 装置（Philips、Amsterdam、Netherlands）で取得した。

II-2-2. 実験スケジュール

本実験は、(1)MPTP 投与およびその後の隔離飼育、(2)行動評価、(3)PET 測定という一連の実験を 1 つのセットとし、PD の主要症候の 1 つである振戦が発現するまで 3～6 週間おきに繰り返した。詳細は以下の通り。

- (1) MPTP hydrochloride (Sigma-Aldrich、MO、U.S.A.)を 1 日 1 回 0.5 mg/kg で 1 日または 2 日連続で筋肉内投与。サルから排泄される MPTP の暴露から実験従事者を守るため投与後 72 時間の隔離飼育を行った。（実験セット第 1 週目）
- (2) 隔離飼育後、表 1 に示した観察項目について症候を観察し 1 日 1 回採点した。またケージ内での自発運動量を赤外線検出器で計測した。（実験セット第 2 週目）
- (3) その後、DA 神経系を評価する 3 種のトレーサーを用いて PET 測定を実施した。（実験セット第 3～6 週目）

II-2-3. 行動評価

行動評価は表 1 に示した観察項目を用いた症候観察による採点と、ケージ内自発運動量測定を行った。症候観察で使用した観察項

目は PD 統一スケール (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) の運動評価項目をもとに、主観をできるだけ省くため、該当項目が認められたか否かで採点できるよう改変したサル版を作成した。観察項目は振戦 8 点、姿勢保持障害 9 点、筋固縮 7 点、無動・寡動 9 点の計 33 点から構成された。自発運動量は赤外線検出器 (小原医科産業、東京、日本) をケージ前面扉に設置し、24 時間継続して測定し、実験セットごとに 1 日平均カウント数を算出して解析に使用した。

II-2-4. PET 測定およびデータ解析

PET 測定は動物用 PET 装置 SHR-7700 (浜松ホトニクス、浜松、日本) を用いて実施した。トレーサーには、DAT 密度を評価する [^{11}C]PE2I、DA 前駆物質の L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) の取込速度を評価する [β - ^{11}C]L-DOPA、DA D_2 受容体密度を評価する [^{11}C]raclopride を用いた。投与放射能および投与時比放射能は表 2 に示した。サルをモンキーチェアに覚醒下で保定し、頭部固定具を用いて頭部をチェアに固定した。トランスミッション測定は ^{68}Ge - ^{68}Ga 線源を用いて実施した。その後、トレーサーの静脈内投与直後から 90 分間のエミッション測定を実施した。MPTP 未処置時にそれぞれのトレーサーを用いた測定を個体ごとに 2 回ずつ実施し、再現性を確認した。PET データは 4.0mm の Colsher フィルターで画像再構成した。関心領域は PET 画像と MR 画像を重ね合わせた画像を用いて、尾状核、被殻、小脳に設定した。関心領域ごとの時間一組織放射能濃度曲線を取得し、以下の方法で定量解析した。

DAT および DA D₂ 受容体は尾状核または被殻をターゲット領域、小脳を参照領域とした **simplified reference tissue** 法[68,80]を用いて結合能（BP）を以下の式を用いて推定した。

$$C_T(t) = R_1 C_R(t) + \left(\frac{k_2 - R_1 k_2}{1 + BP} \right) C_R(t) \otimes e^{\left(\frac{-k_2 t}{1 + BP} + \lambda t \right)},$$

$C_R(t)$ は参照領域（小脳）の組織放射能濃度の経時変化、 $C_T(t)$ はターゲット領域の組織放射能濃度の経時変化、 k_2 はターゲット領域からの排泄速度定数、 R_1 はターゲット領域の取込／排泄と参照領域の取込／排泄の比、 λ は放射性同位体の物理的崩壊定数、 \otimes は **convolution** 演算記号を示す。

L-DOPA 取込速度はグラフ解析法[108]を用いて以下の式より K_i 値を推定した。

$$\frac{C_T(t)}{C_R(t)} = K_i \frac{\int_0^t C_R(t) dt}{C_R(t)} + f,$$

$C_R(t)$ は参照領域（小脳）の組織放射能濃度の経時変化、 $C_T(t)$ はターゲット領域の組織放射能濃度の経時変化を示す。この解析法は不可逆的トレーサーのために開発された。小脳は L-DOPA を DA に変換する酵素である芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）をほとんど含んでいないことが知られているため[84]、不可逆的結合のない参照領域として使用した。 $C_T(t)/C_R(t)$ を X 軸、 $\int_0^t C_R(t) dt / C_R(t)$ を Y 軸にグラフを描くと傾きが K_i 、切片が f の直線に相当する。

II-2-5. 統計解析

本実験では、個体ごとに第 1 セット 1 回目の MPTP 投与開始から振戦発現までの日数が異なり、単純には統計的に比較することがで

きなかったため、時間軸を標準化した。標準化は、各個体の実験期間を第1セット1回目のMPTP投与日から振戦発現後の最後のPET測定日までの日数を100%として、各実験セットにおけるPET測定日 (t_N) を式 $t_N = (t / t_T) \times 100 (\%)$ で実施した。

PETの定量値はSigmastat 3.11 (Systat Software) を用いてターゲット領域とステージを変数として反復測定2元配置分散分析を行った。主効果が認められた場合、Bonferroni法による多重比較検定を実施した。p値が0.05以下のとき有意差ありと判定した。

II-3. 結果

振戦発現までに要したMPTP累積投与量および日数は個体ごとに異なっていた(表3)。統計解析のため、振戦発現までに要した日数が最も短かったM129を基準に時間軸を標準化したところ、各期の3頭の平均はMPTP未処置期のStage 0は $t_N = 0\%$ 、MPTP投与後振戦発現前の早期のStage 1は $t_N = 6.1\%$ (3.8~8.0%)、中期のStage 2は $t_N = 52.1\%$ (50.5~53.4%)、振戦発現後の後期のStage 3は $t_N = 100\%$ となった。今後結果はこの時間軸を用いて記述する。

行動評価の結果を図1に示した。症候観察スコア(図1a)はステージが進むにしたがって上昇した。各ステージの平均スコアは、Stage 1で0.75、Stage 2で2.67、Stage 3で7.08だった。今回エンドポイントとした振戦は、企図振戦は認められたが安静時振戦は認められなかった。

自発運動量(図1b)はM118とM119はステージが進むにつれて減少した。一方、M129はStage 1において増加し、Stage 2以降に

減少した。振戦が認められた Stage 3 ではいずれのサルも Stage 0 の 30%以下に減少した。

尾状核および被殻の [^{11}C]PE2I の結合能はステージの進行とともに低下した。低下の進行度はターゲット領域内でも異なり、尾側被殻が最初に低下し、吻側被殻、尾状核という順に低下領域が広がった（図 2a）。最終的に Stage 3 の BP 値は Stage 0 の比として尾状核で $14.7 \pm 5.2\%$ 、被殻で $9.9 \pm 2.7\%$ まで低下した。統計解析の結果、ステージについて主効果を認め $[F(3,6) = 35.95, p < 0.001]$ 、ターゲット領域およびステージとターゲット領域の相互作用について主効果は認められなかった。多重比較検定を実施したところ、Stage 2 [$p = 0.002$ (vs. Stage 0), $p = 0.011$ (vs. Stage 1)]および Stage 3 [$p < 0.001$ (vs. Stage 0), $p < 0.002$ (vs. Stage 1)]の BP 値はともに Stage 0 および Stage 1 より有意に低下していた（図 3a）。

$[\beta\text{-}^{11}\text{C}]\text{L-DOPA}$ 取込速度は尾状核・被殻ともにステージの進行とともに低下した（図 2b）。最終的に振戦を認めた Stage 3 において Stage 0 の比として尾状核で $34.1 \pm 16.0\%$ 、被殻で $23.9 \pm 9.1\%$ まで低下した。統計解析の結果、Ki 値はステージ $[F(3,6) = 36.69, p < 0.001]$ に対して主効果を認めたが、ターゲット領域およびステージとターゲット領域の相互作用については認めなかった。多重比較検定で Stage 2 [$p = 0.002$ (vs. Stage 0), $p = 0.006$ (vs. Stage 1)]および Stage 3 [$p < 0.001$ (vs. Stage 0), $p < 0.002$ (vs. Stage 1)]はともに Stage 0 および Stage 1 より有意に低下していた（図 3b）。

$[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ の結合能は尾状核・被殻ともに有意な変化は認めなかった（図 3c）。

II-4. 考察

PET で推定された線条体 DA 神経変性度は、自発運動量の低下同様に、MPTP 累積投与量と関連していたことが本研究で示された。また、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ の結合能および $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]\text{L-DOPA}$ 取込速度がそれぞれ MPTP 未処置期の 14.7% および 34.1% まで低下したとき振戦が認められた。PD モデルや PD 患者を対象とした過去の研究では、DAT 密度、L-DOPA 利用能および D_2 受容体密度という PET で評価できるバイオマーカーはこれまで独立して使用されていた。しかし、本研究では、MPTP の潜在的な影響をより鋭敏に検出する方法を特定するため、同一個体に対して症候観察と自発運動量の比較、あるいは DA 神経シナプス前後のバイオマーカーの PET による比較を目的として、それらすべてのバイオマーカーを一括して使用した初めてのケースである。

これまで DA 類似物質の PET トレーサーを用いた PET 定量評価が MPTP 処置 PD モデルを用いて行われてきた。しかしながら、サルを用いた研究のその多くは、単一のトレーサーを用いて MPTP の処置前後を比較するものだった。本研究では、MPTP 反復投与を伴った複数のトレーサーを用いた長期にわたる経時的な PET 測定が実施された。それに加え、症候観察や自発運動量など行動評価も同時に実施したことで、DA 神経系の変化と行動との関連を示すことができた。

線条体 DAT 結合がステージの進行に伴って、つまり MPTP 累積投与量の増加に伴って減少していったという所見は、サル PD モデルや特発性 PD 患者の黒質線条体 DA 神経の進行性脱落という過去の所見と一致する [8,17,38,89,110]。また DA 神経シナプス前部のバ

イオマーカーが 80%以上低下することが振戦の発現に必要だと考えられた。これはサル PD モデルの *in vitro* 研究や PD 患者の死後脳研究において、症候発現に DA 神経終末の脱落が 70~80%、DA 神経全体の脱落が 50~60%、DA 含有量の低下が 70~90%必要という報告[7,115]によって支持される。また今回認められた PET 信号の減少パターンは、特発性 PD において被殻は尾状核より神経が脱落しているという点と類似している。PD 患者を対象とした過去の研究において、被殻の尾外側へ投射する神経の起点である黒質の腹外側部が、他の黒質の部位より脆弱であること[25,116]と関連していると考えられる。

Wullner らは長期 MPTP 投与によって神経脱落が引き起こされ、はっきりとした PD 症候が現れる前に自発運動量の低下が同時に認められることを報告している[146]。自発運動量が症候観察より優れている点として、MPTP に誘発された運動障害のより客観的な定量が可能なことである[20,63]。サル PD モデルにおいて、自発運動量は振戦と同様に MPTP の行動学的影響の検出が症候観察より鋭敏である。これは、サルモデルであっても、振戦および自発運動以外の異常行動を識別することは非常に困難であることを意味する。

$[\beta\text{-}^{11}\text{C}]\text{L-DOPA}$ 取込は、DA 神経密度、AADC 活性、DOPA から DA への変換、DA の貯蔵というものを反映すると考えられている[41]。これまでの報告では、DOPA 標識トレーサーである $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]\text{L-DOPA}$ と $^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ が用いられてきており、様々な比較がなされてきたが、特に末梢代謝物質 3-*O*-methyl 体への代謝速度について議論されてきた。すなわち $^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ から 3-*O*-methyl-6-FDOPA への代謝速度が $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]\text{L-DOPA}$ から 3-*O*-methyl-L-DOPA への代謝速度よ

りも速いということである[91,137]。3-*O*-methyl 体は脳へ移行し、参照領域を使用する解析において K_i 値に影響を与えると考えられている[123]。本研究では DOPA 利用能測定により適した $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]\text{L-DOPA}$ を使用したが、過去に報告された $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ を用いた研究と変化の度合いは同じぐらいだった[27,92]。

DA 神経前シナプスの PET 評価について、全体を通して $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]\text{L-DOPA}$ の低下度が $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ よりも小さい傾向にあるという経時変化を示した。DA 神経脱落度の低い早期において、DOPA 取込が一時的に上昇することは、生き残っている神経細胞の AADC が代償的に活性を高めることによって起きるといわれている[114]。もう 1 つの可能性として、 K_i と BP という異なる定量値を求める解析法の違いによるかもしれない。

一方、PD 患者を対象として別の DA 神経終末マーカーである dihydrotetrabenazine (DTBZ) と DOPA を直接比較した報告がある[82]。この報告において、DTBZ 結合能の低下と DOPA K_i 値の低下を比較した回帰直線の傾きは 1 とならないとされている。先に示したように、症候発現には 80%以上の神経終末脱落が必要で、DTBZ 結合能と DOPA K_i 値はともに DA 神経終末の脱落を反映するが、代償作用は関連付けられていない。今回の研究は無症候期から発症後早期に相当する時期を対象としており、Lee らは発症早期から後期を対象としている。PD およびモデル動物の無症候期において、DA 神経終末も DOPA 利用能もともに代償作用の影響を受けているかもしれない。またこれらのパラメーターは異なるシナプス前機能を異なる指標で評価するものである。さらに異なるパラメーターは DA 神経脱落に対して異なる代償変化をもたらすかもしれない。し

たがって無症候期における 2 つのパラメーターの直接比較が妥当かどうかわからない。

Lee らの結果と異なった別の説明として、使用した DA 神経終末マーカーが異なっていることが挙げられる。DTBZ は 2 型小胞モノアミントランスポーターと結合するトレーサーで、さらにセロトニントランスポーターやノルアドレナリントランスポーターへの親和性もある。したがって DTBZ は DA 神経終末密度の推定することに PE2I より向いていないかもしれない。

DA D₂ 受容体について本研究では有意な変化は認められなかった。過去の報告を見ると、MPTP 投与サルモデルについて症候の認められないとき DA D₂ 受容体密度は減少または健常と同等で、症候の認められた群では DA D₂ 受容体は増加する [8,28] という報告がある一方、変化がないという報告もある [30]。発症早期の PD 患者において、DA D₂ 受容体密度は被殻において健常と同等または増加するという報告がある [26,117]。しかしながら線条体 DA D₂ 受容体密度は DA 神経脱落が 90%以上にならないと増加しないという報告もある [37]。

本研究では、自発運動量と [¹¹C]PE2I のモニタリングによって PD の症候発現の閾値を定量的に決められる可能性を示した。すなわち振戦発現に必要な線条体 DA 神経終末脱落度は、MPTP 未処置期の 14.7%まで低下することである。そして [¹¹C]PE2I を用いた DAT 密度測定が神経変性度をもっとも鋭敏に検出する方法であることを示し、高リスク群を含め PD の発症前の早期診断に有用なバイオマーカーであると考えられた。さらに [¹¹C]PE2I の PET 測定は神経細胞移植治療の効果判定に有用であることも示されており [64]、PET を

用いた in vivo イメージングが診断だけでなく治療効果判定にも重要な役割を果たすことが示唆されている。

II-5. 図表

表 1 観察項目

Category	Item	Corresponding sign
Video recordings of monkeys' behaviors in their individual cages		
A	Motionless of limbs	Immobility
A	Remaining in the same place	Immobility
A	Unilateral tremor	Tremor
A	Bilateral tremor	Tremor
A	Stooped posture	Postural impairment
A	Sudden freezing while walking	Postural impairment
A	Walking with difficulty	Postural impairment
Opening the entrance door of the animal room		
B	Motionless except for head and eye movement	Immobility
B	Remaining in the same place	Immobility
B	Motionless of limbs	Immobility
B	Expressionless face	Immobility
The experimenter stood in front of the cage		

C	Sudden freezing while walking	Postural impairment
C	Walking with difficulty	Postural impairment
C	Stooped posture	Postural impairment
C	Excessive saliva in mouth	Immobility
Stimulated with the chain		
D	Slow gait and/or slow hand movement	Immobility
D	Awkward movement	Postural impairment
D	Walking with difficulty	Postural impairment
D	Fall from frozen position	Postural impairment
D	Motionless	Immobility
Rigidity		
E	Unilateral rigidity of upper limb, but full range of motion easily achieved	Rigidity
E	Unilateral rigidity of lower limb, but full range of motion easily achieved	Rigidity
E	Bilateral rigidity of upper limbs, but full range of motion easily achieved	Rigidity
E	Bilateral rigidity of lower limbs, but full range of motion easily achieved	Rigidity

E	Neck stiffness	Rigidity
E	Range of neck motion achieved with difficulty	Rigidity
E	Range of limb motion achieved with difficulty	Rigidity
Tremor		
F	Resting tremor unilaterally	Tremor
F	Resting tremor bilaterally	Tremor
F	Resting tremor in face	Tremor
F	Intentional tremor unilaterally	Tremor
F	Intentional tremor bilaterally	Tremor
F	Intentional tremor in face	Tremor

表 2 投与放射エネルギーおよび投与時比放射能

トレーサー	投与放射エネルギー (MBq)	投与時比放射能 (GBq/ μ mol)
[^{11}C]PE2I	61.1 ± 11.3	507.2 ± 452.3
[β - ^{11}C]L-DOPA	86.6 ± 10.1	39.0 ± 12.5
[^{11}C]raclopride	83.5 ± 4.7	100.4 ± 40.5

値は平均 \pm 標準偏差で示した。

表 3 振戦発現までに要した MPTP 累積投与量と日数

個体番号	MPTP 累積投与量 (mg/kg)	振戦発現までの日数
M118	7.5	204
M119	6.0	147
M129	2.0	112

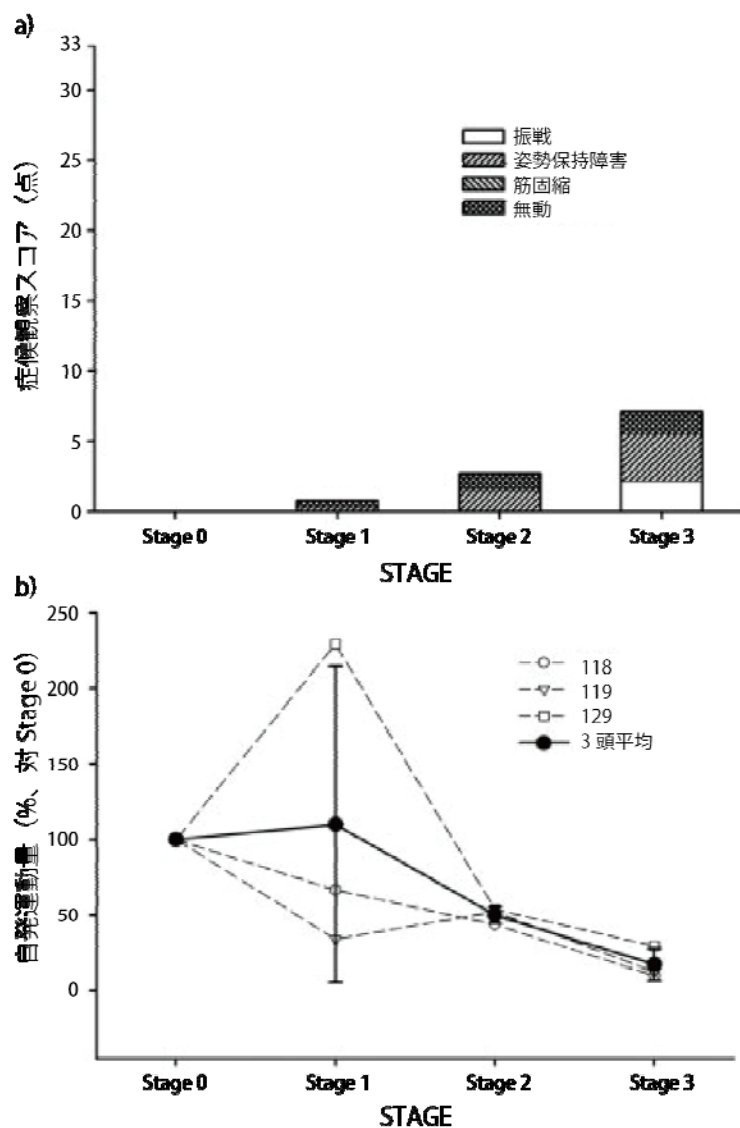


図 1：行動学的評価の結果。a)ステージと症候観察スコア。症候観察スコアは 4 症候を要素とした積み上げ棒グラフで示した。スコアは 3 頭平均を表す。b)自発運動量の経時変化。黒丸とエラーバーは 3 頭の平均±標準偏差を示す。白抜きシンボルは、それぞれ丸は M118、三角は M119、四角は 129 の各ステージの平均値を表す。

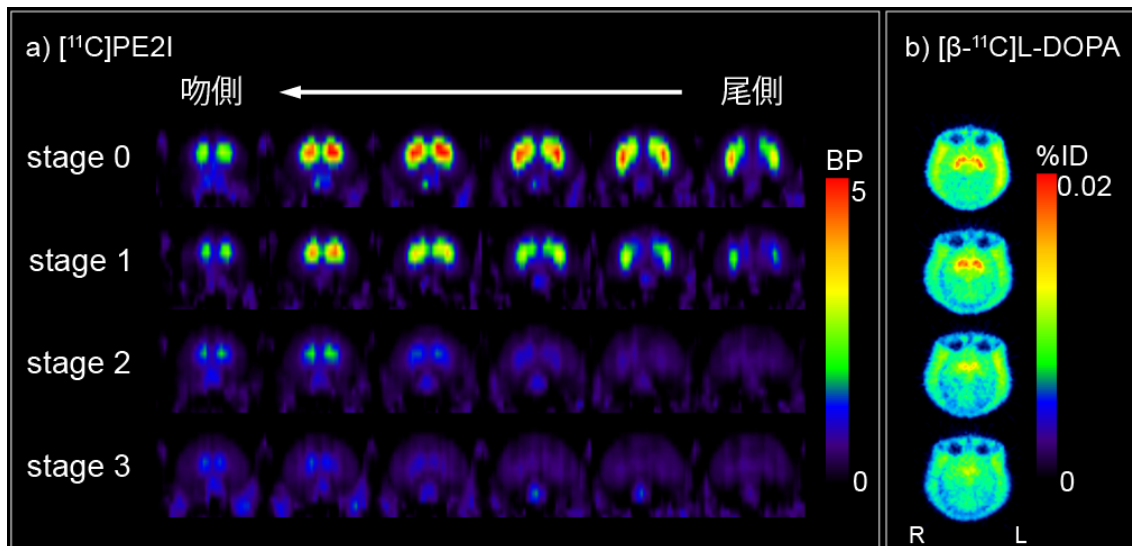
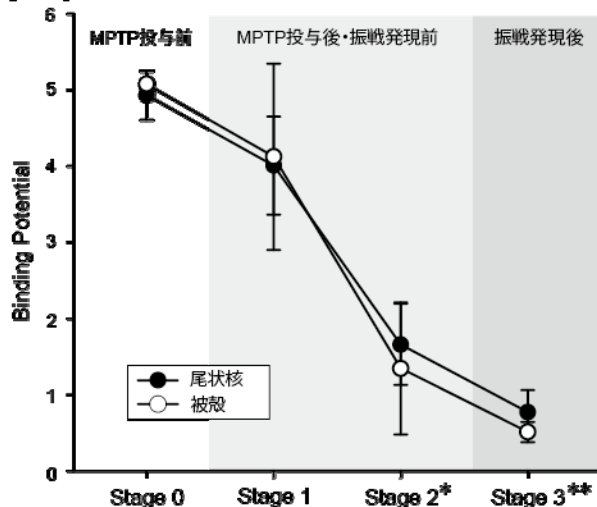
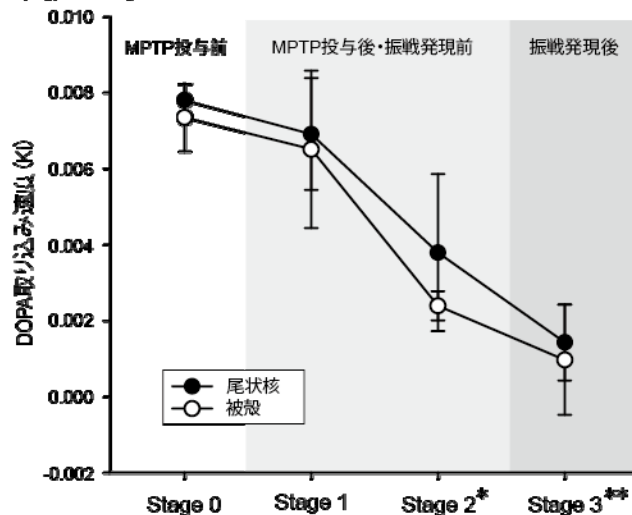


図 2 : PET 画像の経時変化。a) M119 から取得した [^{11}C]PE2I の結合能 (BP) 画像 (冠状断)。線条体の BP はステージが進むにしたがって低下し、尾外側が吻内側より早く低下した。b) M119 から取得した [β - ^{11}C]L-DOPA の軸断面画像。値は PET トレーサー投与後 30 ~ 90 分を加算した組織放射能濃度を投与放射能量で標準化したものの (% of injected dose) 。

a) [^{11}C]PE2I



b) [β - ^{11}C]L-DOPA



c) [^{11}C]raclopride

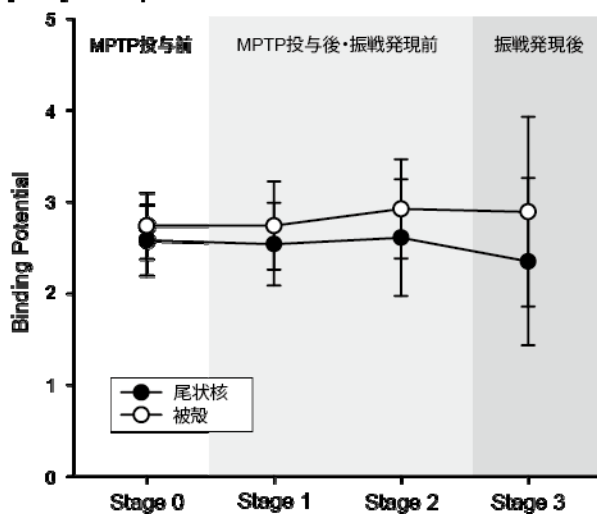


図 3 : a) [^{11}C]PE2I、b) [β - ^{11}C]L-DOPA、c)

[^{11}C]raclopride の定量値

(BP または K_i) の経時変化。値はターゲット領域ごとに 3 頭の平均で、エラーバーは標準偏差を示す。ターゲット領域とステージの 2 元配置分散分析で検証したところ、[^{11}C]PE2I の BP および [β - ^{11}C]L-DOPA の K_i はステージに対して有意な低下を認めた。Bonferroni の多重比較検定により、Stage 2 は Stage 0 に対して、Stage 3 は Stage 0 および 1 に対して有意差を認めた。

第 III 章 音声チックモデルサルの音声チック発現時に認められる側坐核および関連する辺縁系ネットワークの異常

III-1. 緒論

「発声」とは音を作り出すという幅を持ったことを意味し、ヒトの会話や動物の鳴き声などの音だけでなく、非言語性の音、例えば笑ったり泣いたり、恐怖や怒り、威嚇など感情的な音も含まれる。また例えば咳払いなどその他の意味のない音を、状況によって、他者から関心を引くためだったり、他者にコミュニケーションの意思を伝えたりするために、意味もなく作り出すこともある。発声の重要性を考えると、それが障害されることは日々の生活に重大な支障をきたすと容易に想像される。トゥレット症候群（TS）では、単純な運動チックと同様に、患者は抑止できない発声の衝動に苦しめられることがよくある。音声チックは、咳払いなどの単純なものから、汚言症や社会的に受け入れがたい言葉という複雑なものまで様々なものがある[119,135]。運動チックは皮質基底核ネットワークのうち感覚運動ループと呼ばれる神経回路によって発生することが、サルを使った詳細な研究によって明らかにされているが[86,87]、音声チックの責任部位や発症機序などはまだわかっていない。

ヒト以外の霊長類において、発声は2つの階層的に構成された神経路によって制御されている[69]。1つは前部帯状皮質(ACC)を起点とし中脳水道周囲灰白質、網様体を經由し、発声運動ニューロン

となって脳幹あるいは脊髄へと続く経路である。もう 1 つは一次運動野(M1)を起点とし網様体を經由して発声運動ニューロンへと続く経路である。これら解剖に対応するように、ACC と M1 は自発的な発声の準備段階で活動を示すため、発声制御において重要な役割を果たしている[45]。発声制御に重要な役割を果たしている 2 つの部位は、異なる神経回路に含まれており、M1 は被殻(Put)や淡蒼球内節などと構成する回路（感覚運動ループ）に属し運動機能に関与する[1]とともに運動チックの責任部位と考えられている[86,87]。

一方、ACC は側坐核(NAc)や黒質網様部などと構成する回路（辺縁系ループ）に属し、情動や動機などに関与している[1,94]。これらのことから、音声チックの責任部位や発症機序は運動チックのそれと本質的に異なっていないと考えられる。しかしながらこの考えを支持する文献は現時点ではない。霊長類 TS モデルの行動表現型はこれまで運動チックに限定されており、感覚運動ループを操作することで音声チックを安定して発現させる動物モデルの報告はない。

そこで発声に関わるもう 1 つの重要な部位である ACC が属する辺縁系ループの異常が音声チックに関与しているのではないかという仮説を立て、それを検証するため、ACC と強い結合のある大脳基底核の NAc に着目し、GABA_A 受容体阻害薬であるビククリンを NAc へ局所注入したときの脳血流の変化を PET で測定した。また ACC および NAc を含む複数の部位から電気生理学的手法により神経活動を記録し、音声チック発現時の脳神経活動について様々な手法を用いて検証した。

III-2. 材料・方法

III-2-1. 使用動物

3頭のニホンザル (*Macaca fuscata*、オス) および2頭のアカゲザル (*Macaca mulatta*、オス) を用いた。サル健康状態は獣医師によって管理され、水分摂取量、食餌量、体重などは日常的にモニタリングされた。サルを用いたすべての実験は京都大学霊長類研究所、放射線医学総合研究所、国立大学法人筑波大学、理化学研究所脳科学総合研究センターの各動物実験倫理委員会で承認され、飼育管理はアメリカ国立衛生研究所の実験動物飼育管理ガイドラインに則って行われた。ビククリン局所注入部位、神経活動記録部位およびPETによる脳血流量変化部位の確認のため、7T-MR装置 (Magnet: Kobelco and JASTEC、日本; Console: Bruker Biospin、Germany)によるT2強調像およびCT画像 (Accuitomo170、株式会社モリタ製作所、日本)を取得した。

III-2-2. 手術

音声チック発現時の電気生理学実験およびPET測定は覚醒下で実施するため頭部固定具設置手術を行った。またM1、大脳基底核およびACCから電気生理学的に神経活動を記録するためのチャンバー設置術も行った。手術はペントバルビタール (15～30 mg/kg, i.v.) またはイソフルラン (1～3%) 吸入麻酔による標準的なサル麻酔法で行われた。

III-2-3. PET 測定

1 頭のサルを用いて覚醒下で $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ 脳血流 PET 測定を実施した。装置は SHR-7700 (浜松ホトニクス、浜松、日本) を用い、吸収補正のため ^{68}Ge - ^{68}Ga 線源でトランスミッション測定を実施した。エミッション測定は $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ を自動合成・注入装置を利用してサルの下腿静脈より注入し、放射線モニターのカウントが一定値 (30 kcps) 以上になった時に開始し、120 秒間 (10 秒×12 フレーム) 実施した。エミッション測定は 1 日あたり 8~12 回測定し、被殻へのピククリン局所投与が 2 日、NAc への投与が 6 日の計 8 日で 69 回実施した。ピククリン非投与下 (コントロール) は測定日最初の 1~2 回で実施した。解析に使用したのは、コントロール 9 回、被殻への投与時に運動チック発現している最中の 14 回、NAc への投与時に音声チックが発現している最中の 12 回だった。すべてのエミッションデータは最初の 60 秒間の加算画像を 4.0mm の Hanning フィルターを用いた filtered back projection 法で再構成した。

III-2-4. PET 解析

PET の統計解析は MATLAB R2013b (MathWorks、MA、U.S.A.) 上で Statistical Parametric Mapping 8 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK; www.fil.ion.ucl.ac.uk) を用いて行った。すべての再構成画像の動き補正を行った。その補正画像を 3mm のガウスフィルターで平滑化し、脳だけをくりぬいた。局所脳血流量の変化を比較するため、画素値を標準化した。相対的な局所脳血流量の変化をコントロールおよび 2 種類のピククリン投与条件でボクセルごとに検定した。有意差の水準は多重比較補正あり

(corrected) の場合 $p < 0.05$ 、補正なし (uncorrected) の場合 $p < 0.001$ とした。

III-2-5. 行動評価

次に示す電気生理実験の間、サルはモンキーチェアに保定され、報酬を得るため非常に単純な視覚誘導腕伸ばし課題を実施した。この課題はサルが神経活動記録する数時間、静かにモンキーチェアに座らせるために導入した。自発行動や課題実行の様子はモニタリングおよびビデオ撮影した。この観察システムは顔、上肢、下肢、行動課題を別々に記録できるシステムである。また音声記録および上腕二頭筋、上腕三頭筋、大頰骨筋、口輪筋から筋電図も記録した。

III-2-6. 電気生理実験手技

手術からの回復後、MR-CT 重ね合わせ画像を用いてチャンバーと記録部位の相対的な位置を確認した。そして微小電極ガイドにより関心部位 (NAc、M1、ACC) のマッピングを実施した。各関心部位は神経活動特性および以前の報告[86,87]で確認されている解剖学的境界との関係によって特定され、また標準脳アトラス[76]とも比較した。このマップをもとに電気生理実験を進め、記録実験ごとに記録電極とともに CT を撮影し、MR と重ね合わせることで記録部位を都度同定した。ビククリン投与部位も同様に実験ごとに CT 撮影し、MR と重ね合わせることで投与部位を同定した。

局所フィールド電位 (LFP) を細胞外信号の band pass filtering (8 pole Butterworth filter、cutoff 2-300Hz、sample rate 5kHz) で抜き出した。いったん記録電極および投与針を設置したら、ビククリンを

被殻または NAc に 4 μ L 投与し、効果がないあるいは弱い場合、1 日当たり最大 8 μ L まで投与した。

III-2-7. 電気生理データ解析

LFP データを MATLAB と Neuroexplorer を用いて行動イベントとの関係をオフラインで解析した。信号をダウンサンプリングなど各種操作して処理後、チック関連イベントの信号の大きさ、開始、終了、持続時間などを抜き出した。筋電図 (EMG) および音声信号も同様に処理した。行動イベントは記録ビデオをフレームごとに解析し、EMG や音声と時間軸を合わせて関連のない行動イベントを排除した。取得した信号からのタイムスタンプを用いて、周辺ヒストグラムを構築した。チックと電位スパイク放電の規則性分析はイベントの出現率の変動係数 (CV) として算出した。明確に異常行動を認めた実験セッションについて 4 秒ごとに瞬間的な CV を算出した。そして平均 CV を視覚化するために、瞬間 CV から得られたビンをランダムにシャッフルして、CV の大きな瞬時変動を除去した。すべての統計解析は Student の t 検定を用いた。

LFP スパイクなしで発声を引き起こされることもあったため、それを検証するため、神経活動記録部位間の相互作用を個々の LFP 信号の **phase-phase coupling** 解析によって調べた [6]。他の解析法としてコヒーレンス解析などがあるが、それは **phase** だけでなく信号強度の影響も受ける。チック出現時、特定周波数帯で強度増強が見られたので、本実験において **phase** 共分散の単独検出が同期の評価に適していると考えられた。**coupling** 条件は $|\Delta\text{phase}| < \text{const}$ で表され、 Δphase は $\phi_1(t) - \phi_2(t)$ で表現され、 $\phi_1(t)$ と $\phi_2(t)$ はたとえば NAc と

ACC など離れた脳領域の独立した 2 つの LFP 信号の時間 t における **phase** を意味する。全時間を通した Δ **phase** の分布は、2 つの信号がある一定の値で行き来する場合、一様分布から逸脱する。その分布の半径方向距離は **phase-phase coupling** の強度の定量に使える、 $r=0$ のとき一様分布で、 $r=1$ のとき単峰性分布を示す。本研究では、この半径方向距離を **phase-phase coupling strength (PPCS)** とする。PPCS を算出するため、LFP データから LFP スパイクのない音声発生時のデータを抜き出し、(1)NAc と ACC および (2)NAc と M1 という組み合わせで解析した。最終的に PPCS はセッションをまたいで平均化された Δ **phase** から導かれ、コントロール実験由来の同じ計算値を減算し、周波数帯域で区分けした 23×23 のマトリックス上に PPCS を表現した。特定周波数帯域における有意差を検証するため、母集団 PPCS を推定し、同帯域のコントロールデータと Student の t 検定を用いて比較した。

III-3. 結果

辺縁系および感覚運動ネットワークの生理学的活性を破たんさせるため、GABAA 受容体阻害薬であるビククリンを NAc または被殻へ局所投与した。NAc へ投与したとき繰り返し複雑な発声（図 1a）を引き起こすことに成功し、音声を解析したところ周波数スペクトラムは”grunt”と呼ばれるもので最もよく説明された[44,50]（図 1c）。誘発した音声は構造化されており、健常なサルで発声されたものと同様であるため、ヒト患者における複雑な音声チックとよく似たものと示唆された。そして音声チックを引き起こした部位はすべてのサルにおいて一貫して NAc の中で限局していた（図

1d 左)。次に運動チックを誘発するため、被殻の特に感覚運動に密接な背外側部位 (図 1d 右) へビククリンを投与したところ、口頭顔面領域 (図 1b) や腕で運動チックを繰り返し誘発することに成功した。しかしながら音声チックは一度も認められなかった。チックの平均持続時間は運動チック (780 ms) の方が音声チック (254 ms) より有意に長かった ($p < 0.0001$, t test)。

音声チックと運動チックの行動特性を比較するため、時間依存的なチック発現間隔の変化を音声チックおよび運動チックそれぞれでグラフにした (図 2a,b)。示した例において、音声チックは 2~4 秒間隔で発現する傾向があり、特にビククリン局所投与から 400~1200 秒の間によく認められた (図 2a)。一方、運動チックは 1 秒前後の間隔で発現する傾向にあった (図 2b)。チック発現間隔を定量解析し比較したところ、音声チック (3.4 ± 3.3 s (mean \pm s.d.)) は運動チック (1.8 ± 1.3 s) より有意に長かった ($p < 0.0001$, t test)。チックの発現は音声チックも運動チックもともに時間によって、より規則的に発現する状態 (lower coefficient of variance [CV]) とより不規則に発現する状態 (higher CV) とを繰り返していた (図 2c)。平均 CV は音声チック (0.69 ± 0.33) の方が運動チック (0.63 ± 0.21) より有意に高かったが ($p < 0.0001$, t test)、その数値上の差は小さかった。

次に NAc のビククリンによる脱抑制によってどの脳部位が活性化するのか全脳的に特定するため、 $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ を使った局所脳血流 PET 測定を行った。その結果、ACC、扁桃体、海馬において両側性に有意な局所脳血流の増加を認めた (T value > 3.37 , uncorrected $p < 0.001$)。この活性パターンは音声チックに特徴的で、運動チッ

クにおいてはビククリンを投与した同側の M1 および反対側の小脳で有意な局所脳血流の増加を認めた。この活性パターンをよく示すのは両チック発現時のデータを直接比較したものである（図 2g）。ACC、扁桃体および海馬の局所脳血流は運動チックより音声チック発現時の方が有意に高かった（ $T \text{ value} > 5.47$ 、 $\text{corrected } p < 0.05$ ）。一方、M1 および小脳は運動チック発現時の方が有意に高かった（ $T \text{ value} > 5.47$ 、 $\text{corrected } p < 0.05$ ）。

音声チック発現時に辺縁系ネットワークの局所脳血流が増加する生理学的基盤は何か検証するため、複数部位の LFP を同時記録した。NAc にビククリンを局所投与したすぐ後から、繰り返し大きな LFP の偏向、すなわち LFP スパイクと呼ばれる電気生理学的に異常な神経活動放電のマーカー[86,87]を NAc および ACC の両部位において認めた（図 3a）。音声チック発現時に M1 においても LFP スパイクを認めたが、振幅は小さかった（図 3a）。ここで重要なのは、ACC および NAc の LFP スパイクの発現が音声チックよりも多いことである。この所見はすべての LFP スパイクが音声チックの誘因になっているわけではないことを反映しているが、チック発現時は ACC の LFP スパイクが先に発現していた。しかしながら興味深いのは、別の場面において、LFP スパイクが先んじてなくても音声チックの発現していたことである（図 3b、影部分）。また音声チックの周波数特性が先立つ LFP スパイクの存在に関係なく定性的に類似していたことにも注意すべきである（図 3c）。

運動チック発現時においては、背外側被殻にビククリン局所投与後、M1 において大きな LFP スパイクを認めた（図 3d）。重要な点として、被殻と M1 の LFP スパイク数が運動チックの発現数と同じ

であったことである（図 3d）。これは LFP スパイクの発現が運動チックの出現によく対応していることを示す。被殻の LFP スパイクを起点として EMG データを整列させると、きれいな単峰性のチック関連 EMG が被殻の LFP スパイク発現直後に描かれた（図 3e）。しかしながら、同じ解析を音声データと NAc の LFP スパイクで実施すると二峰性を示し、1 つ目の山は LFP スパイクの前に描かれ（図 3f）、因果関係は弱いと考えられた。

LFP スパイクの大きさについて、音声チック発現時の ACC のものは運動チック発現時の M1 より有意に小さかった（ $p < 0.0001$ 、 t test）。ACC の LFP スパイクの短さは音声チックの長さを反映する。ビククリン局所投与部位である NAc と被殻の LFP スパイクの大きさはそれぞれのチック発現時で同等だった。LFP スパイクの時間間隔は音声チック発現時の方が運動チック発現時より長かった（ $p < 0.0001$ 、 t test）。この所見は音声チックモデルのチック発現間隔が長かったことも反映した。チックの行動学的解析と同様に、LFP スパイクの発現は時間によってより規則的に発現する状態とより不規則に発現する状態とを行ったり来たりしていた。しかしながら、その遷移は運動チックモデル（図 2e）より音声チックモデル（図 2d）の方が顕著ではなかった。たしかに、LFP スパイクの規則性は、平均では音声チックモデルの方（ $CV = 0.32 \pm 0.03$ ）が運動チック（ $CV = 0.47 \pm 0.04$ ）よりも有意に規則性が高かった（ $p < 0.0001$ 、 t test）（図 2f）。LFP スパイクのより規則的な発現にもかかわらず、音声チックの発現がより不規則的であるという所見は、上述のように、音声チック生成に対して神経と行動イベント間の因果関係は一見弱いように見えた。

したがって、音声チック発現時は2つの電気生理学的状態、LFPのある場合とない場合、が存在する。音声チック発現時に皮質～基底核ネットワークで何が起きているのかより理解するために、より詳細なLFPデータの解析、特にパワースペクトル密度(power spectral density, PSD)およびphase-phase couplingについて解析した。まず音声チックに明白に関連したLFPスパイクをデータから抽出し、PSDをNAc、ACCおよびM1のデータから計算し、ビククリン投与前の状態と比較した。この解析により2つの重要な所見が得られた。解析を行ったそれぞれの部位において、アルファ帯域(7~12 Hz)のPSDパワーが増加した。特にNAcとACCは顕著に増加した(図4a)。この信号の結果として、NAcと皮質(ACCおよびM1)間の同帯域におけるphase-phase couplingの増強も同定された。同じ解析をLFPスパイクの明白ではない音声チック関連のLFPデータでも解析したところ、PSDパワーはNAc、ACC、M1のどの領域もコントロールに比べ検出可能なパワーの増加は認められなかった。しかしながらphase-phase coupling解析をしたところ、NAc:ACCおよびNAc:M1のどちらの組み合わせにおいてもアルファ帯域においてphase-phase couplingの増強が認められた(図4bおよびc)。アルファ帯域において統計解析したところ、NAc:ACCの組み合わせ(tic PPCS, 0.26 ± 0.006 vs. control PPCS, 0.23 ± 0.007 ; $p = 0.0034$, t test [mean \pm sem])もNAc:M1の組み合わせ(tic PPCS, 0.28 ± 0.008 vs. control PPCS, 0.24 ± 0.007 ; $p < 0.0001$, t test [mean \pm sem])も有意に増加していた(図4d)。低ベータ帯域(13~20 Hz)ではcontrolに比べ有意差は認められなかったが、高ベータ帯域(21~40 Hz)ではNAc:M1の組み合わせで有意に低

下していた (tic PPCS, 0.22 ± 0.007 vs. control PPCS, 0.30 ± 0.005 ; $p < 0.0001$, t test [mean \pm sem]) (図 4d)。

III-4. 考察

本研究において、NAc のかなり限局した領域の脱抑制によってサルが発声を一貫して誘発することができ、TS 患者の複雑な音声チックに似ていることが示された。この音声チックモデルにおいて、音声チックの発現は急性で可逆性であり、背外側被殻を脱抑制して引き起こした運動チックと同様であった。PET イメージングによって、局所薬理学的操作の効果は辺縁系ネットワークに属するいくつかの皮質～皮質下領域に広範囲に影響が及ぶように両側性に拡張されていたことを示した。音声チックモデルのネットワーク異常は、ビククリン投与側の皮質～基底核ネットワークに限定されていた運動チックモデルのそれとは明らかに異なっていた。局所脳血流の増加所見に基づいて、特に基底核とその出力先皮質において、LFP の多点同時記録によって LFP スパイクを繰り返し同定したが、チックタイプごとに関連した LFP スパイクの特性には顕著な違いがあった。また音声チックの発生に関連し、明らかな LFP スパイクのない音声チック発現時の NAc、ACC および M1 間の位相間結合の増加を示すアルファ帯域 (7~12 Hz) の異常も同定した。

LFP スパイクの生成とチック症状の発現が音声チックより運動チックの方がより密接に関連していたことは注目に値する。音声チックで直接の因果関係が弱かったのは 2 つの重要な所見によって説明される。1 つは、実験中最もチックが激しい時間帯において、運動チックとは異なり、LFP スパイクの発現が必ずしも発声を伴わなか

ったことである。この所見のもっともらしい説明は、M1は皮質～延髄あるいは皮質～脊髄連絡を直接持って速い運動を制御する運動ニューロンを支配しているのに対し[31,124]、ACCは複数のシナプスを介して発声を制御することである[69]。つまり、ACCに比べM1の運動チックに関連した異常な神経活動放電はより容易にチック生成の引き金となるだろう。加えて、LFPスパイクの振幅はACCよりM1の方が有意に大きく、LFPスパイクに続く運動チックのより効率的な生成にも寄与する。

2つ目は、NAc、ACCおよびM1のLFPスパイクとの関連なしに音声チックが発現できることである。この所見は難解に見えるが、音声チックの基本的な性質および行動を駆動する神経メカニズムを明らかにする重要な手がかりを提供することができる。運動チックとは対照的に、今回観察された音声チックはLFPスパイクの直接の結果として発現したものではないだろう。むしろ、音声チックはアルファ帯域の信号伝達増強が出現することによる結果だろう。この信号伝達はPSDから示されるようにLFPスパイク波形で生じる、またはアルファ帯域の位相間結合の増強に対する反応としても発生する。そのような結合がバックグラウンドのLFP活動から明確な電位スパイクなしに発生することに注目することが重要である。結合の増強は異なるネットワーク間で情報を転送する機序として特定されており[6,39]、異なる結合周波数への変化は、運動や精神神経疾患で皮質～基底核相互作用において認められている[5,33,57,79]。アルファ範囲の低周波振動の顕著な変化の同定は、患者からの生理学的記録で観察されている[11,85,150]。

このアルファ帯域の信号伝達増強は動物の内的情動状態の変化を反映しているだろう。内的状態の変化のメカニズムに関する仮説として、NAc へのビククリン局所投与が NAc の神経細胞の活性化を介して、辺縁系ネットワークにおけるドーパミン放出の基礎レベルの上昇を導くというものがある。この仮説を支持するように、ラットの NAc にビククリンを局所投与すると、用量依存的に NAc の細胞外ドーパミンの有意な増加を引き出す[148]。そのような細胞外ドーパミンの増加は、警戒心や動機づけに変化をもたらし[13]、結果として発声を引き起こしたり、促進したりするだろう。この仮説は、発声するモチベーションが高まるにつれて、自発発声に先行する ACC の準備活性がかなり大きくなることを示す以前の報告とよく似ている[45]。また今回認められた扁桃体－海馬複合体の活性化は発声行動のサブセットと密接に関連する情動的／動機づけ的な *salience* を増加させるだろう。

高められた感情的／動機づけ的状态の反応としてのチックは、異常行動の「半随意的 (semi-voluntary)」な表現として記述される。臨床的に、チックは「不随意 (involuntary)」とは異なり、半随意的なものとしてよく定義される[77,135]。なぜならそれらの発現は、ある重症度では、意識的制御下にあるからである[24]。チックは意識的に抑制されることがあり、潜在的には根本的な心理的緊張を和らげるために発現されなければならない抑えられない衝動として経験されることが多い[32,81]。チックへの衝動を意識しているという意識的な経験は、一般的に前駆衝動と呼ばれている。そのようなチックの半随意的な面は TS 患者で一般的にみられるが、その根底にある神経機序は多くの部分がまだわかっていない。今回検

証したチックに関連した神経活動、例えば LFP スパイクや顕著なアルファ帯域の位相間結合の出現などは前駆衝動と神経生理学的関連があると示唆される。TS 患者を対象としたイメージング研究において、辺縁系関連領域である ACC や扁桃体が前駆衝動やチック発現中に特に活性化する領域として同定されている[10,102,145]。

TS は幅広い症状プロファイルを示す多面的疾患である。本研究において、TS の最も問題となる症状の 1 つである音声チックを NAc のビククリンによる脱抑制によって引き起こすことができることを示した。音声チックの神経基盤は、皮質－基底核ネットワークにおける連続的な LFP スパイクなどの運動チックの神経基盤と似た特性を共有しているが、LFP スパイクとチック発現の因果関係は、LFP スパイクがないときに発生するチックを駆動するように見えるアルファ帯域の位相間結合の増強のように音声チックでより複雑なようである。以上のことから、皮質－基底核ネットワークの低周波数帯域の異常なリズムの同期が音声チック発声の重要な特徴であると示唆される。

III-5. 図表

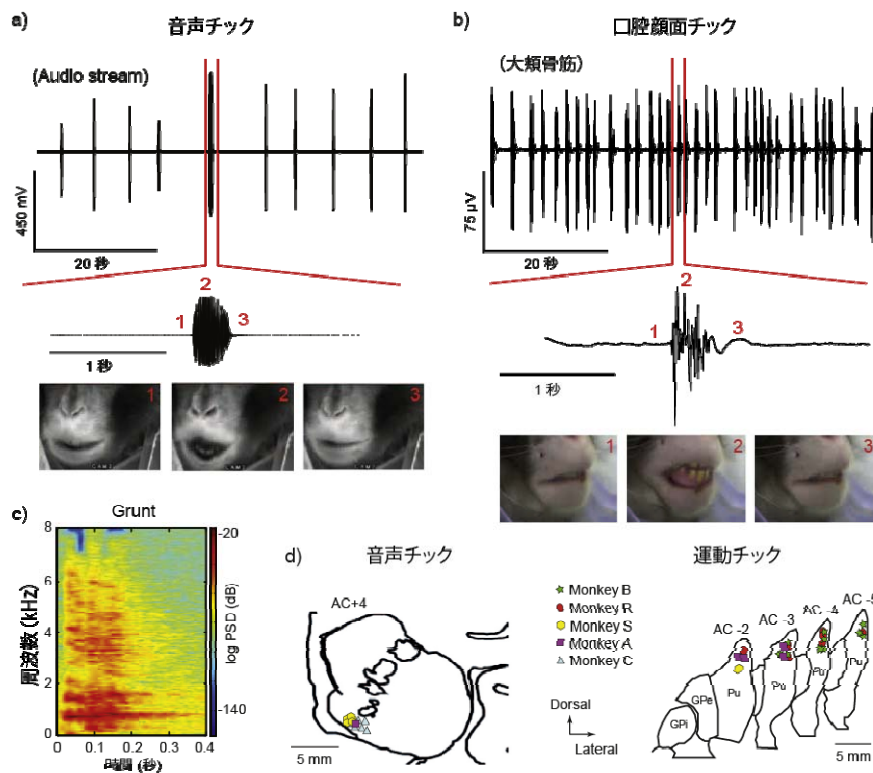


図 1：線条体の脱抑制は部位によって音声チックまたは運動チックを引き起こす。a)側坐核へビククリンを投与したときに現れる音声チックの一例。上段は 60 秒間の音声記録データ、下段は単一の音声チックデータを拡大したもので、数字は写真と対応する。b)背外側被殻にビククリンを投与したときに現れる運動チックの一例。上段は 60 秒間の口腔顔面領域の筋電データ、下段は単一の筋電データを拡大したもので、数字は写真と対応する。c)音声チックのスペクトログラムで”grunt”と呼ばれる音声で良く説明される。d)ビククリンの投与部位。AC の後ろの数値は AC からの前後方向への距離（mm、吻側は+、尾側は-）を示す。（AC：前交連、PSD：power spectral density、Pu：被殻、GPi：淡蒼球内節、GPe：淡蒼球外節）

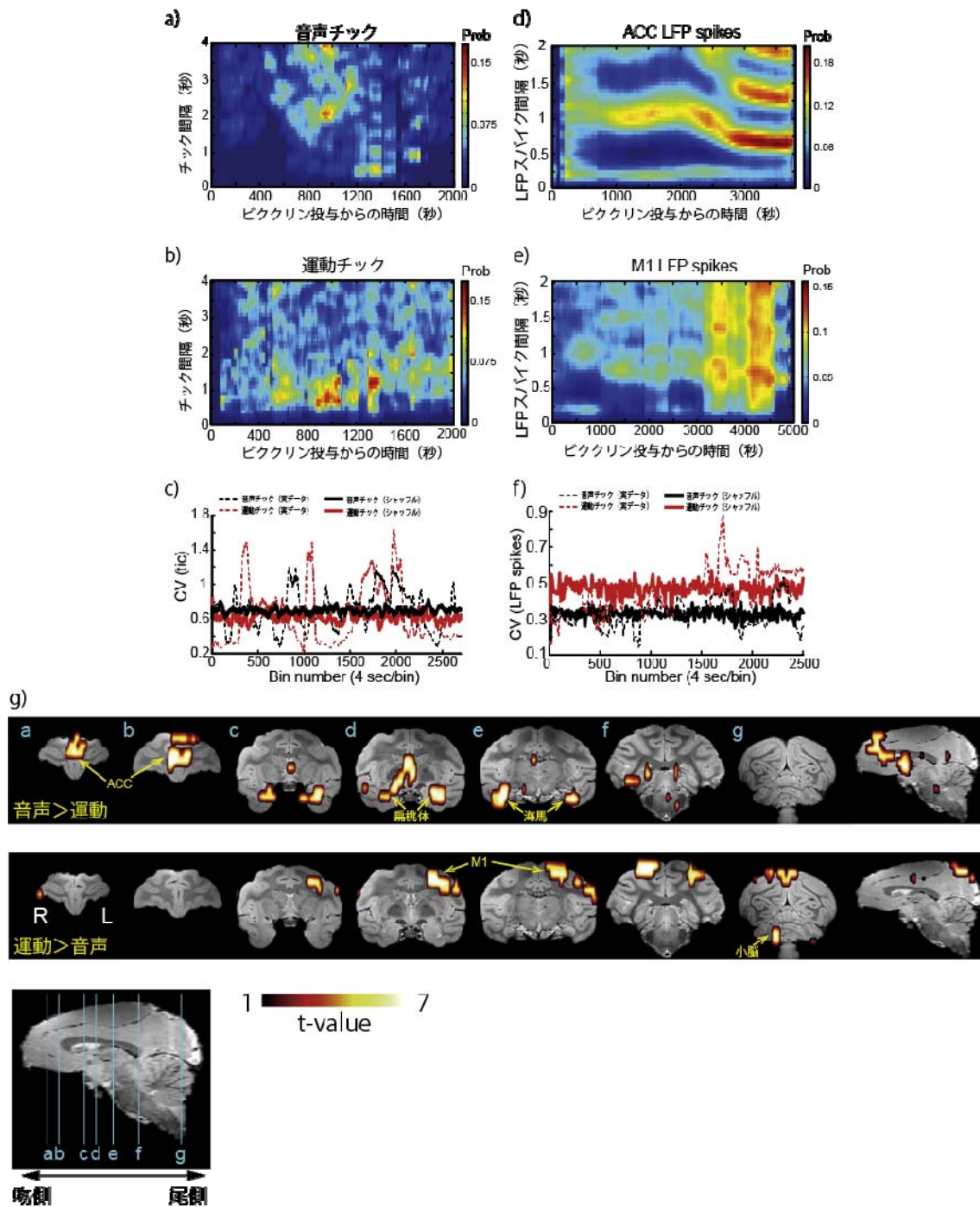


図 2：行動および LFP イベントの時間動態と PET 解析結果。a)側坐核へビククリンを投与したときの音声チック間隔の時間変動特性。b)被殻へビククリンを投与したときの運動チック間隔の時間変動特性。c)音声および運動チックそれぞれの実データ（破線）またはシ

シャッフルデータ（実線）の変動係数（CV）の経時変化。変動係数は4秒おきに算出した。d)側坐核へビククリンを投与したときの前部帯状皮質（ACC）のLFPスパイク間隔の時間変動特性。e)被殻へビククリンを投与したときの一次運動野（M1）LFPスパイク間隔の時間変動特性。f) ACCのLFPスパイクおよびM1のLFPスパイクそれぞれの実データ（破線）またはシャッフルデータ（実線）の変動係数の経時変化。変動係数は4秒おきに算出した。g)側坐核投与条件において被殻投与条件より有意に血流増加した部位を示すPET画像（上段）および被殻投与条件において側坐核投与条件より有意に血流増加した部位を示すPET画像（中段）。上中段の一番右の画像は正中の矢状断像を示す。冠状断像の位置は下段のアルファベットの位置と対応する。

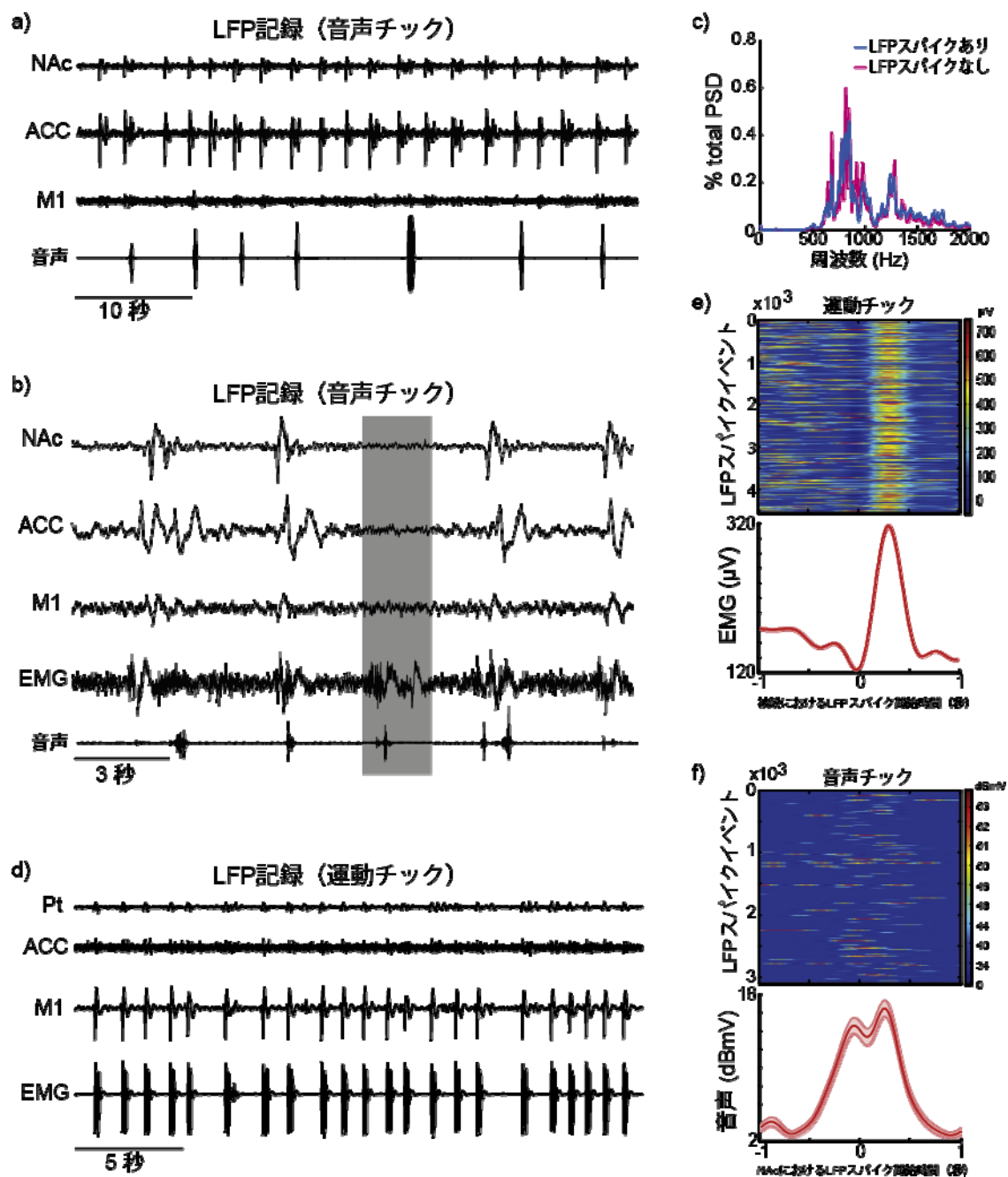


図 3：電気生理学的記録により音声チックと運動チックの時空間的動態の違いを明らかにした。a)側坐核（NAc）へビククリンを投与したときの LFP 記録データの一例。ACC において大きな LFP スパイクが認められる。音声チックの出現数は LFP スパイクの出現数より小さい。b) 側坐核（NAc）へビククリンを投与したときの

LFP 記録データの別の一例。音声チックが LFP スパイクなしで出現している（影部分）。c)LFP スパイクの有無それぞれの音声チックの平均 PSD。d)被殻（Pt）へビククリンを投与したときの LFP 記録データの一例。各部位の LFP スパイクと運動チック（EMG）が 1 対 1 対応している。e)被殻の LFP スパイクを起点とした平均 EMG 記録。f)側坐核の LFP スパイクを起点とした平均音声記録。LFP スパイク開始時（0 秒）を挟んで二峰性になっている。（略語 PSD：power spectral density、M1：一次運動野、EMG：筋電図、

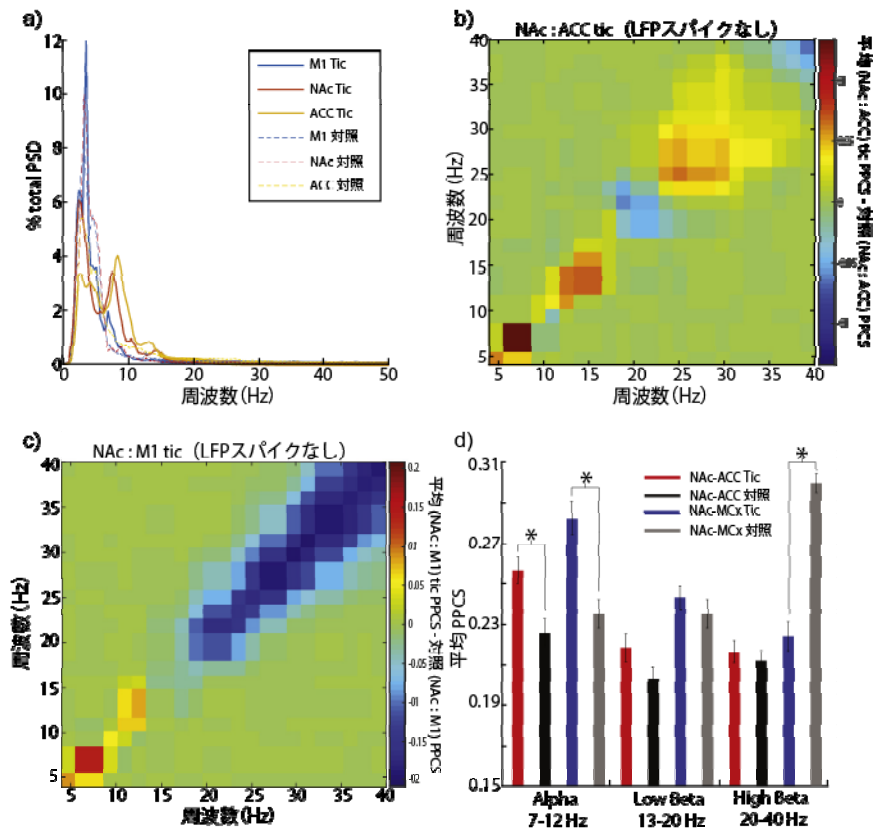


図 4：音声チック出現時の LFP データのスペクトルおよび phase-phase coupling 解析。a) 音声チックまたは対照条件での LFP 記録部位における信号の PSD。音声チック条件においてアルファ帯域（7-12Hz）の PSD が増加している。b) および c) 側坐核（NAc）と前部帯状皮質（ACC）および側坐核と一次運動野（M1）の 2 つの組み合わせによる LFP スパイクのない音声チック発現時の LFP データを使った phase-phase coupling 解析結果。周波数間で求めた PPCS 相互作用を音声チック条件から対照条件を引いたものをプロットした。アルファ帯域において高い信号を認める。d) 各条件下の平均 PPCS の棒グラフ。有意な差のある組み合わせを*で示した。

（PSD：power spectral density、PPCS：phase-phase coupling strength）

第 IV 章 マカク属サルの吻内側尾状核を化学遺伝学的に神経活動抑制したときの報酬価値評価に与える影響

IV-1. 結論

吻内側尾状核 (rmCD) は脳深部にある線条体の一部で、前頭葉の辺縁系領域、特に眼窩前頭皮質からの強い神経投射がある[53]。電気生理学の実験において眼窩前頭皮質は期待する報酬量の大きさに応じて神経活動が変化することが報告されている。一方、運動などに対して同じ神経細胞集団は比較的弱い関与を示す[59,100]。これら解剖学および生理学的特徴は、rmCD が報酬系回路の一部であるという仮説を支持する[54]。しかしながら、報酬の評価や意思決定に対して rmCD がどのような役割を果たすのか霊長類ではまだ証明されていない。この問いに答えるため rmCD の神経活動を操作したいが、脳の左右の役割がはっきりとしている感覚や運動とは異なり、報酬やそれに関連する機能は脳の左右差が比較的小さいため、責任部位の片側に障害を与えても機能は障害されない[23]。したがって報酬系機能における役割を検証するためには両側性に rmCD の操作を行う必要がある。

近年の遺伝子導入技術の進歩により、ウイルスベクターを脳の局所に注入して神経細胞集団に感染させ、その活動を操作する人工受容体を発現させることが可能となっている。その中で化学遺伝学的技術である DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) は複数の脳部位の神経活動を同時に、繰り返し、非侵襲的に操作できる人工受容体である。DREADD の 1 つである変

異型ヒトムスカリン性アセチルコリン 4 受容体 (hM4Di) を標的の神経集団に発現させたとき、内在性受容体には活性のない物質 *clozapine-N-oxide* (CNO) の全身投与によってその神経集団の活性は一時的に抑制される [3]。この手法はげっ歯類を用いた多くの研究に用いられている。しかし、意図したように化学遺伝的抑制を達成するためには、hM4Di を標的部位に正確に発現させるとともに神経活動を抑制するのに十分高いレベルで発現させる必要がある。さらに活性物質である CNO が hM4Di を活性化させるのに十分高い濃度で作用させなければならない。これまで受容体発現量を確認するには脳を取り出して組織学的解析が必要であったり、また受容体と活性物質の結合特性を *ex vivo* で解析する必要があったりしたため、多くの実験動物が必要だった。特に研究に利用できる個体数が限られるサルでは、このような遺伝子導入技術を応用した脳機能の操作に成功した研究例はごく少数だった。

本研究では hM4Di の発現を PET 薬剤の [^{11}C]clozapine (^{11}C -CLZ) [56] を用いて生体で非侵襲的にイメージングする手法およびそれによって効率化されたウイルスベクターを用いた遺伝子導入法で rmCD に導入した hM4Di がマカク属サルの報酬関連行動に及ぼす影響について報告する。マカク属サルの rmCD に hM4Di 遺伝子発現ウイルスベクターを投与し、 ^{11}C -CLZ の PET 測定により hM4Di 発現場所やレベルを画像化し、さらに CNO の受容体阻害 PET 測定により hM4Di 占有率を測定した (図 1a および b)。この実験は行動実験で使用する CNO の最適投与量を決定するために使用した。そして両側 rmCD に発現させた hM4Di を CNO により活性

化することで、マカク属サルの報酬価値判断をはっきりと繰り返し変化させることに成功した。

IV-2. 材料・方法

IV-2-1. 使用動物

12 頭のマカク属サル（カニクイザル 2 頭、アカゲザル 8 頭、ニホンザル 2 頭、4.2～9.8 kg、5～14 歳、オス 11 頭、メス 1 頭）を用いた。サルを用いたすべての実験は国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所の動物実験倫理委員会で承認され、飼育管理はアメリカ国立衛生研究所の実験動物飼育管理ガイドラインに則って行われた。サルは空調管理された部屋に設置された個別ケージで飼育され、固形飼料、補助食（果物または野菜）およびビタミン C 錠剤が毎日与えられた。ウイルスベクターの投与あるいはムシモルの投与に供した個体は MR 撮像および CT 撮影をプロポフォールまたはペントバルビタールによる標準的な麻酔下で実施した。

IV-2-2. ベクター作成方法

アデノ随伴ウイルスベクター（AAV2-CMV-hM4Di [AAV-hM4Di] および AAV2-CMV-HA-hM4Di [AAV-HA-hM4Di]）はヘルパーフリーの三重感染法で生成し、親和性クロマトグラフィーによって精製された。ウイルス力価は Taq-Man 技術を用いた定量的 PCR で測定した。転写プラスミド（pAAV-CMV-hM4Di-WPRE）は AAV 骨格プラスミドに hM4Di 断片と WPRE 配列を挿入することで作成した。

レンチウイルスベクター (Lenti-hSyn::hM4Di-CFP [Lenti-hM4Di-CFP]および Lenti-syn::CFP [Lenti-CFP]) は以前報告した方法 [34,55]によって作成した。I293T 細胞 (Lenti-X Invitrogen 632180, Life Technologies) にレンチ骨格プラスミドとパッケージ化プラスミド (gift from Didier Trono; Addgene plasmids) を感染させ、上清を Ultraculture 培地 (Invitrogen) に交換した。上清を含むレンチウイルスベクターを収集・濃縮し、 -80 度で保存した。ウイルス力価は以前示した方法 [83]による定量的 PCR で測定した。転写プラスミド (hM4Di-CFP gene) は hM4Di-mCherry 配列の mCherry を cerulean cyan fluorescent protein (CFP)に置換し、さらに Lenti-syn::GFP ベクターの GFP 配列を置換して複製した。

IV-2-3. 手術手技およびベクター投与方法

表 1 にベクター投与に使用したサル、投与したウイルスベクター、投与量、ウイルス力価、投与部位をまとめた。ウイルスベクター投与手術の前に、MR および CT の重ね合わせ画像を作成し、投与部位を決定した。ウイルスベクター投与手術はイソフルラン吸入による標準的な麻酔法で行った。頭部を定位装置に固定し、頭がい骨を露出後、頭部位へ注射針を入れるための穴 (8 mm 前後) を開けた。硬膜を数 mm 切開し、30G の針を付けたハミルトンシリンジを投与部位から 2~3 mm 深いところまで刺入し、5 分間待機後、投与部位まで戻してウイルスベクターを投与した。投与速度は 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ で、投与終了後 15 分間待機後、ゆっくりとハミルトンシリンジを引き上げた。

ウイルスベクターの効果を従来の方法（ムシモルの局所投与）と比較するため、頭部固定具および2つのチャンバーを頭部に設置する手術を行った。

IV-2-4. 薬剤の調整および投与方法

CNO は、最終的に 6 ml となるよう 2.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) 生理食塩水に溶解した。行動実験のとき、CNO (3 mg/kg) または溶媒 (2.5% DMSO) を伏在静脈より静脈内投与し、投与 15 分後から行動実験を開始した。PET による占有率測定実験のときは、CNO (1, 3, 10 mg/kg) をエミッション測定 10 分前に伏在静脈より投与した。In vitro 電気生理実験では、人工脳脊髄液を使って 1 μ M になるよう CNO を溶解した。CNO 溶液は用時調整した。

ムシモルは 3 μ g/ μ l または 4 μ g/ μ l の濃度で生理食塩水に溶解した。投与カニューレを投与部位へ刺入し、オイル駆動マニピュレーターで固定し、ムシモル溶液 (2 μ l) を 0.2~0.4 μ l/min で投与した。行動実験は投与完了直後から開始した。実験の都度 CT 撮影を実施し、MRI と重ね合わせて投与部位を毎回確認した。

IV-2-5. PET 測定

PET 測定は microPET Focus220 スキャナー (Siemens) を用いてイソフルラン吸入麻酔下で実施した。吸収補正のための ^{68}Ge - ^{68}Ga 線源を用いたトランスミッション測定後、エミッション測定を ^{11}C -CLZ (265~405 MBq) の投与後 90 分間実施した。リストモードで収集されたデータは、sinogram に変換され、Hanning フィルターを用いた filtered back projection で画像再構成した。関心領域は個体

ごとに冠状断 MR 上で設定した。投与部位を中心とした 5 断面を除いた領域を線条体の基準部位として設定した。経時変化を見るため、被殻に投与した個体について、線条体比 120% を境界とした関心領域を投与側に設定し、反対側の対応する部位に反転させた関心領域を対照として設定した。rmCD に投与した個体については、投与痕のある MR 断面の尾状核の下半分に関心領域を設定した。それぞれの関心領域から 30～90 分の平均標準化取込量（standardized uptake value, $SUV = [\text{組織放射能濃度 } Bq/cm^3 \times \text{体重 } g / \text{投与放射能} \\ \text{量 } Bq]$ ）を算出した。そして基準部位に対する比を線条体比として算出した。

CNO が hM4Di を占有する割合を部分占有率（Occ）として以下の式を用いて推定した。

$$Occ = \frac{URS_{NT} - URS_{CNO}}{URS_{NT} - 100}$$

URS_{NT} および URS_{CNO} はそれぞれ CNO 未負荷時および CNO 負荷時の投与部位における線条体比を示す。部分占有率と CNO 投与用量（ D_{CNO} ）の関係は以下の Hill 関数で表すことができる。

$$Occ = \frac{(D_{CNO})^n}{(D_{CNO})^n + (ED_{50})^n}$$

ED50 は占有率 50% になるときの CNO 投与用量、n は Hill 係数を示す。

IV-2-6. 行動課題および解析

課題は reward-size task を用いた [93]（図 1c および d）。この課題は、サルがバーに触ることで始まり、最初に視覚刺激が表示さ

れ、赤い信号が続いて表示される。赤い信号が緑の信号に変わった後、200～1000 ms でサルがバーを離すと緑の信号が青に変わり、その直後に報酬であるジュース（1～8 滴）が与えられる。バーを離すのが早すぎたり、1000 ms 以上経っても離さなかったりした場合は「失敗」としてカウントされ、同じ条件で次の試行が行われる。報酬量（1～8 滴）は最初に表示される視覚刺激の種類によって決定される。したがってサルは視覚刺激が提示された段階で与えられる報酬量が予測でき、その試行を成功させるか否かを選択できる。行動実験前は水分補給を制限し、のどが渴いた状態で実施した。実験は 1 セッションあたり 100 分間実施した。ベクター未投与状態の 2 頭（#190, #199）、AAV-hM4Di を投与された 3 頭（#171, #184, #190）、AAV-HA-hM4Di を投与された 2 頭（#182, #183）、ムシモル局所投与された 2 頭（#181, #182）に対して実験を行った。

報酬量ごとに成功できなかった率（エラー率、E）をセッションごとに計算した。エラー率は報酬量に対して反比例を示すことが分かっており [93]、動機づけの程度を推定することができる。本実験では以下の式でエラー率（E）を求めた。

$$E = \frac{c}{R + b}$$

R は報酬量、c と b は定数を示す。

また処置内容と報酬量、処置内容と報酬量と薬剤投与後時間のエラー率に対する効果を検証するため反復測定分散分析を行った。

Tukey's HSD の多重比較も事後検定した。

IV-2-7. 組織学的解析

2 頭のカニクイザル（#127 と #157）をペントバルビタールの深麻酔による安楽死後、生理食塩水とその後の 4%パラホルムアルデヒド PBS 緩衝液で還流固定をした。頭部を定位装置に取り付け、投与部位を含む 12~20 mm 厚の冠状断脳ブロックを切り出した。脳ブロックは同じ PBS 緩衝液に一晩以上浸漬後、別の PBS 緩衝液（30%スクロース、0.02% NaN₃）に移し 4℃で保存した。組織解析には 50 μm 厚の連続切片を作製して使用した。CFP の免疫染色のため、6 枚おきの切片を 1%スキムミルクに室温で 1 時間浸漬後、ウサギ抗 GFP モノクローナル抗体を含んだ PBS 溶液（含む：0.1% Triton X-100 と 1%ヤギ血清）に 4℃で一晩インキュベートした。その後、ビオチン化されたヤギ抗ウサギ IgG 抗体を含む新たな同じ培養液に室温で 2 時間、さらに avidin-biotin-peroxidase 複合体で室温 2 時間インキュベートした。抗原を見るため、0.04% diaminobenzidine (DAB)、0.04% NiCl₂、0.003% H₂O₂ を含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液で反応させた。未使用の切片の一部は Nissl 染色に使用した。

染色した切片は Biorevo（Keyence）を使用して光学顕微像をデジタルで取り込んだ。CFP 染色画像シリーズは Adobe Photoshop を使用して傾きを手動で微調整し、PMOD を使用して 3D 像へ再構成した。

IV-2-8. 血中および脳脊髄液中の CNO および CLZ 濃度測定

CNO が CLZ へ逆代謝されるという報告[19,67]があるため、血中および脳脊髄液内 CNO とその逆代謝産物の CLZ の測定を実施した。血液および脳脊髄液は伏在静脈および腰椎穿刺により取得し

た。3頭のサルに対しては CNO (3mg/kg) 静脈内投与から 15 分と 120 分後に採取した。この時間は行動実験の開始直前および終了 5 分後に相当する。また別の 3 頭に対して、CNO (3mg/kg) 静脈内投与後 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 分に採取した。サンプリングはケタミン麻酔下にて行われた。サンプルは分析まで -80°C で保存した。

CNO および CLZ の定量分析は島津製作所の UHPLC LC-30AD と MS AB Sciex Qtrap 6500 を組み合わせたシステムで実施した。CNO および CLZ の標準物質を用いてそれぞれの定量換算関数を作成し、サンプル内の CNO または CLZ 濃度を求めた。

IV-2-9. *in vitro* 電気生理実験

14.5 胎日齢の B6J マウス胚から脳神経細胞を分離キットで分離した。分離神経細胞は 1×10^6 細胞 / ml となるよう神経細胞培養液に懸濁した。細胞懸濁液の 20 μl を poly-L-lysine と Matrigel でコーティングした 150 μm おきに 8×8 のグリッド上に微小電極が設置された MED 64 多電極皿 (MED-P515A、Alpha MED Scientific) に流し込み、組織培養液で維持し、5% CO_2 、 37°C で培養した。培養 7 日目、AAV-hM4Di ベクターを 48 時間かけて感染させ、培養 14 日目、神経の細胞外活動電位を測定した。測定は、ベースライン (baseline 条件) を測定後、同じ培養液に CNO ($1 \mu\text{M}$) を加えた後から 20 分間測定した (CNO 条件)。さらに CNO のない培養液で 20 分間洗い流した後、再度活動電位を測定した (washout 条件)。細胞外スパイク電位は先に決めておいた閾値 ($30 \mu\text{V}$) を超えたときとした。baseline 条件で 25 Hz 未満の発火頻度を示す単一

データを解析で使用した。平均発火頻度について条件間で反復測定一元配置分散分析による統計解析を行い、Bonferroni法による多重比較を事後検定した。

IV-3. 結果

2頭のサルに対し右側被殻に Lenti-hM4Di-CFP、左側被殻に Lenti-CFP ベクターをそれぞれ投与した（図 2a および b）。1頭目のサル（#157）を使ってベクター投与 82 日後に ^{11}C -CLZ-PET 測定を実施したところ、右側被殻に ^{11}C -CLZ の高い集積（ > 6 SUV）を認めた（図 2c）。また脳組織切片の免疫染色像において hM4Di-CFP 陽性神経細胞をベクター投与部位に認め、その領域が ^{11}C -CLZ 集積部位（線条体比 120%以上）とよく似ていた（図 2f）。さらにベクター投与 82～575 日後まで経時的に ^{11}C -CLZ-PET 測定をした結果、反対側に比べ有意に高い状態が保たれていた（図 2g）ことから、この期間 hM4Di 発現レベルが高く安定していたと示唆された。2頭目のサルはベクター投与前から 72 日後まで ^{11}C -CLZ の PET 測定を経時的に行い、46 日後に ^{11}C -CLZ の集積が上限に達したと考えられた（図 2k）。

1頭目のサル（#157）を用いて次に示す行動課題で使用する CNO 投与用量を検討するため、CNO 負荷時 ^{11}C -CLZ-PET による hM4Di 占有率測定も実施した。CNO（1, 3, 10 mg/kg）を静脈内投与後 10 分で ^{11}C -CLZ-PET を行った。その結果、ベクター投与側である右側被殻の ^{11}C -CLZ 集積量は CNO 投与量依存的に低下し（図 3c）、Hill 関数とよく一致し、50%占有率になる CNO 投与用量は 2.3 mg/kg だった（図 3d）。一方、CNO が CLZ へ逆代謝されたかどうか

を確認するため、CNO (3 mg/kg) 静脈内投与後の血中および脳脊髄液中の CNO および CLZ 濃度を測定したが、CLZ は有意に増加しなかった。以上のことから、hM4Di 占有率が 50~60% になる 3 mg/kg を行動実験で使用する CNO 投与用量とした。

次に hM4Di を介してサルの評価判断行動を変化させるため、rmCD へ AAV-hM4Di ベクターを 3 頭のサルに対して投与した。これらのサルのうち 1 頭(171)は ^{11}C -CLZ-PET を経時的に実施し、45 日後に上限に達したように見られた (図 3b)。他の 2 頭は約 30 日で ^{11}C -CLZ-PET 測定を行い、rmCD において高い集積を認めた (図 5a および b)。

1 頭目のサル(171)に対して、CNO (3 mg/kg i.v.) 負荷時に reward-size task を行ったところ、未負荷時に比べ報酬量にかかわらず全体的に有意なエラー率の上昇を認めた (two-way ANOVA, main effect of treatment, $F_{4,66} = 6.5$, $p = 1.6 \times 10^{-4}$; post hoc TukeyHSD, $p = 2.7 \times 10^{-11}$, CNO vs. Post vector; $p = 3.4 \times 10^{-6}$, CNO vs. Vehicle; 図 4a)。またエラー率の有意な上昇はセッションの全時間を通して見られた (three-way ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,9} = 10.7$, $p = 0.0095$) と同時に、時間とともにエラー率も増加した (interaction with time, $F_{4,216} = 9.2$, $P = 0.073$; main effect of time, $F_{4,216} = 15.5$, $P = 3.4 \times 10^{-11}$) (図 4d)。CNO 負荷翌日、エラー率は未負荷時に戻った (post hoc TukeyHSD, $P = 0.20$; Post CNO vs Post vector; 図 4a)。これらのことから CNO の hM4Di に対する効果は投与後 24 時間以内になくると考えられた。また CNO を負荷していないベクター投与前後 (pre-vector と post-vector) ではエラー率に有意な差は認められなかったことから、hM4Di 単独での影響は

なかったと考えられた。他の 2 頭についても CNO 負荷時に reward-size task を実施したところ、#171 同様にエラー率の増加が認められた（図 5c および d）。

3 頭すべてにおいて、反応時間に対して CNO の影響は認められなかった（two-way ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,134} = 0.12$, $P = 0.72$ ）。またどの条件下でもサルは 100 分以内に満腹になり、新たな試行は行わなくなった。1 セッションあたりの報酬量は CNO 負荷によってやや低下したが有意ではなかった（ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,32} = 3.1$, $P = 0.09$ ）。以上のことから、CNO 負荷によるエラー率の上昇は一般状態の変化によるものではないと考えられた。

報酬量評価に対する rmCD 活動抑制の影響を定量するため、エラー率(E)と報酬量(R)の関係を解析した。エラー率は $E = c / (R + b)$ で表現され、 c は求められたパフォーマンスに対して必要な報酬要件を定量するパラメーター、 b はフィッティング曲線全体の上下動を定量するパラメーターである。Vehicle 負荷時に比べ、CNO 負荷によりパラメーター b も c も増加した（図 4b および c）。 b の増加は報酬量の差に対する鋭敏さが失われたことを反映し、 c の増加は正答のパフォーマンスの実施に必要な報酬量が増えたことを意味する。したがって hM4Di を介した rmCD の活動抑制によって報酬に対する感受性が低下したと考えられた。

2 頭のサルに対してベクター投与せず CNO を負荷して reward-size task を行ったが、有意な変化は認められなかった（main effect of treatment, $P > 0.05$ ）。また他の 2 頭に対しては AAV-HA-hM4Di ベクターを両側 rmCD に投与し、 ^{11}C -CLZ-PET で十分な RI 集積増

加を認めず、reward-size task も CNO 負荷によって有意な変化は認められなかった (main effect of treatment, $P > 0.05$)。先に示した行動に影響を認めた 3 頭のうち 1 頭はウイルスベクターを 2 回投与されており、1 回目は CNO 負荷によって reward-size task に有意な変化を認めなかった (#184; main effect of treatment, $F_{1,4} = 0.006$, $P = 0.94$)。そのときの ^{11}C -CLZ-PET において、 ^{11}C -CLZ の集積が左側は rmCD に集積していたのに対し、右側はやや上方にずれていたことから、再度ウイルスベクターを同部位に投与した。その結果、rmCD での ^{11}C -CLZ の集積を認め、reward-size task での行動に変化を起こすことができた。

次に従来の方法である薬物の局所投与による rmCD の抑制と比較するため、2 頭のサルに対して GABA_A 受容体作動薬であるムシモルの局注実験を行った。注入部位は CT 撮影により実験の都度確認し、rmCD に相当する部位へ注入したことを確認した (図 6b)。その結果、hM4Di を介した抑制と同様に、全体的なエラー率の増加が認められ (main effect of treatment, $P < 0.01$) (図 6c および d)、パラメーター b と c がともに増加し (図 6e および f)、報酬に対する感受性が低下していたと考えられた。片側のみにムシモルを投与して rmCD を抑制してみたが、エラー率は増加する傾向にあったものの有意差は認められなかった (main effect of treatment, $P = 0.065$)。これらのことから、報酬価値判断に異常を来すには両側の rmCD を抑制する必要がある、hM4Di を介した化学遺伝的手法が従来の方法と同等であることが示された。

IV-4. 考察

本研究において、抑制性 DREADD である hM4Di を CNO で活性化し、rmCD の神経活動を抑制することで、サル意思決定における報酬に対する感受性の低下をはっきりと繰り返し引き起こすことができた。反応時間や総獲得報酬量に影響はなかったことから、注意や意欲などの低下ではないと考えられた。この報酬感受性の低下は、報酬関連行動に重要ないくつかの前頭前野領域から強い入力を受けている rmCD で推定された機能と一致する[53]。rmCD の神経活動を抑制している間に見られた報酬感受性の低下は、眼窩前頭皮質の両側除去実験の結果と似ていた[125]。つまり rmCD はモチベーションや報酬関連情報に重要な部位である眼窩前頭皮質を含む前頭前野領域からの情報を統合させると示唆される[4,12,71,107,120,138,144]。またムシモルによる rmCD の神経活動抑制は hM4Di を介した抑制と同じ行動への影響をもたらした。すなわちこの領域の神経活動の低下は報酬感受性の低下に対して特異的で、実験技術上のアーティファクトではないと考えられる。これらの実験から、また hM4Di の発現に失敗した結果も含め、rmCD という小さな領域が予測された報酬価値の評価に必須であると考えられる。

抑制性 DREADD の hM4Di もムシモル局注もともに rmCD の神経活動を一時的に抑制し同様の行動変化をもたらしたので、どちらの手法も本研究結果を得るには十分な手法である。しかしながら DREADD のような化学遺伝的手法はムシモルのような薬理学的手法よりいくつかの利点があるため、サルへの適用を望まれていた。1 つ目は、一度 hM4Di の発現量が安定すれば（つまりベクター投与から 4～6 週間以降であれば）、CNO を全身投与することによっ

てターゲット部位を選択的に繰り返し抑制することができる。それに対し薬物の局所投与は、それに必要なカニューレを保持するチャンバーが必要だったり、実験の都度カニューレを刺入する必要があるったり、小さいながらも神経細胞への物理的なダメージを伴う。2つ目は、hM4Di 発現量の安定した時期であれば、理論的には CNO の投与によって毎回同じ神経細胞の活動を抑制できる。一方、薬物の局所投与はカニューレの刺入部位、薬物の広がり方などが毎回細かく異なるため、影響を受けた組織・細胞がどれなのか知ることは難しい。DREADD であれば死後脳の組織染色により細胞レベルで特定することが可能である。3つ目は、ベクター投与を複数回実施することで、より広い領域[34]、あるいは離れた複数の部位の神経活動を1回の全身投与で影響を与えることができる。4つ目は細胞種特異的なウイルスベクター[83]や経路選択的なウイルスベクター感染法[72,105]を使うことで、神経細胞の種類や解剖学的な連絡、あるいはその他の様々なマーカーによってより特異的な神経回路を操作することも可能である。最後5つ目として、ベクターが感染した神経細胞には細胞体から神経終末まで hM4Di が発現する。

hM4Di が発現している神経終末シナプスにおいて、CNO をマイクロインジェクションすると神経伝達物質の放出が抑制されることが報告されており[128]、経路特異的な機能解析に利用可能である。

今回、行動への影響だけでなく、 ^{11}C -CLZ-PET 測定によって皮質下領域において hM4Di の位置および安定性について *in vivo* で可視化することができた。hM4Di 発現が安定しているときターゲット部位が影響を受けているかどうか知ることは、特に1頭あたりに費やす実験期間、労力、その他のリソースが多く必要なサ

ル類において、行動実験を行うとき非常に有利である。この手法の潜在的な価値は、hM4Di 発現の弱さやターゲットからのずれと報酬関連行動への影響がなかったことの相関に見られたように、hM4Di 発現の PET による可視化は、一連の行動実験を開始する前に行うスクリーニングとして、特に長期にわたる実験において有用である。

CNO による hM4Di 占有率を *in vivo* で測定する方法としても ^{11}C -CLZ-PET を用いた。用量占有率曲線をもとに、占有率 50~60% となる 3 mg/kg を行動実験で使用することにした。この用量で報酬量感受性の低下を繰り返し引き起こすことができた。またこの用量では脳脊髄液内に CLZ の有意な増加は認められなかった。過去の報告において、より高濃度 (10 mg/kg) で鎮静やモチベーションの消失など CNO の行動への影響は認められなかった[34]。この所見は、少なくともヒトやモルモットで CNO から CLZ への逆代謝が認められており[19,67]、CLZ は抗精神病薬で鎮静効果を持っていることから、CNO の投与量は重要な課題である。このような副作用の懸念があることから、CNO に変わる DREADD 作動薬として compound 21 や Perlapine などが報告され[21]、それらのサル類への有用性の検討、そしておそらくヒトにおける長期使用の可能性について調査が必要である。

^{11}C -CLZ で hM4Di の PET イメージングが成功したのは、CLZ の血液脳関門透過性が高かったこと、および CLZ の hM4Di への親和性が高かったことによると考えられる[101]。 ^{11}C -CLZ-PET 画像のベースライン画像は、内在性の受容体（例えばセロトニン、ドーパミン、アドレナリン、ヒスタミンおよびムスカリン性アセチルコリ

ンなどの各受容体) に対するある程度の親和性を反映する[3]。それら内在性受容体への結合による干渉の可能性があるにもかかわらず、hM4Di 発現部位の ^{11}C -CLZ 集積は 5 頭のサルにおいてベースラインより 20%以上高かった。この差は参照部位を用いた信頼性のある検出を可能にするために十分高い信号雑音比だった。より特性の高い PET トレーサーが開発されれば、脳内遺伝子発現の PET モニタリングの有用性がより改善されると考えられる。

本研究で、hM4Di を CNO で活性化させることで、過去の解剖や単一神経細胞記録の研究と一致して、rmCD が報酬価値の判断に重要であることが判明した。CNO を使った機能実験の前に、DREADD が働く機構やそれによって大規模かつ拡散した神経集団をカバーする可能性、そして PET イメージングによる DREADD 発現の確認能力は、サル類を用いた長期的な行動研究への応用に向けて魅力的なツールとし、将来の臨床応用という潜在的な可能性へ向けて研究を推進すべきであろう。

IV-5. 図表

表 1 ウイルスベクター投与実験のまとめ

個 体 番 号	種	ベクターの種 類	投 与 量 (μ L)	力 価 (particles/ mL)	投 与 部 位
171	ニホンザル	AAV2-CMV- hM4Di	3 per side	2.0×10^{13}	rmCD (左 右)
184	アカゲザル	AAV2-CMV- hM4Di	3 per side*	2.0×10^{13}	rmCD (左 右)
190	アカゲザル	AAV2-CMV- hM4Di	3 per side	2.0×10^{13}	rmCD (左 右)
182	アカゲザル	AAV2-CMV-HA- hM4Di	3 per side	1.8×10^{13}	rmCD (左 右)
183	アカゲザル	AAV2-CMV-HA- hM4Di	3 per side	1.8×10^{13}	rmCD (左 右)
127	カニクイザ ル	Lenti-hSyn- hM4Di-CFP	30	2.0×10^9	PUT (右)
		Lenti-hSyn-CFP	30	2.0×10^9	PUT (左)
157	カニクイザ ル	Lenti-hSyn- hM4Di-CFP	30	2.0×10^9	PUT (右)
		Lenti-hSyn-CFP	30	2.0×10^9	PUT (左)

*: #184 は同部位へのベクター投与を 2 回実施した。PUT, putamen.

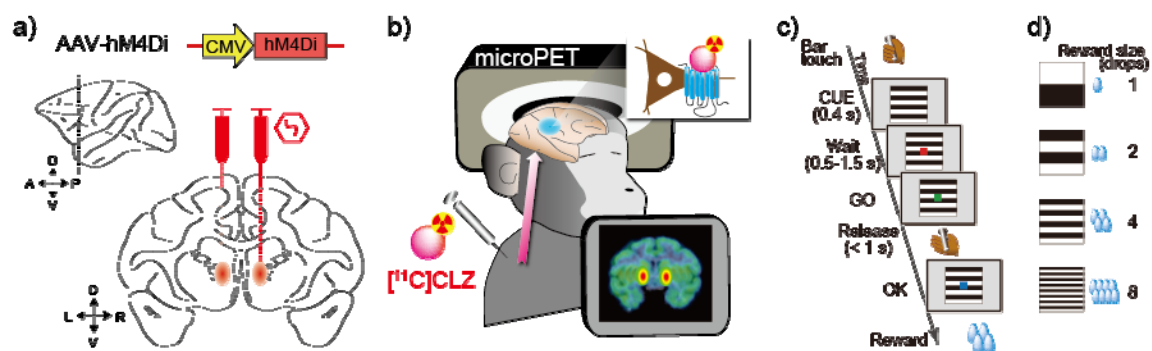


図 1：実験デザイン。a)両側の吻内側尾状核に AAV-hM4Di ベクターの投与。b) $[^{11}\text{C}]\text{CLZ}$ による PET 測定で DREADD 発現のモニター、および CNO 負荷時の DREADD 占有率の測定。c)reward-size 課題の実施時、CNO を静脈内投与して吻内側尾状核の活動を化学遺伝学的に抑制する。d)reward-size 課題で出される CUE に対応した報酬量。

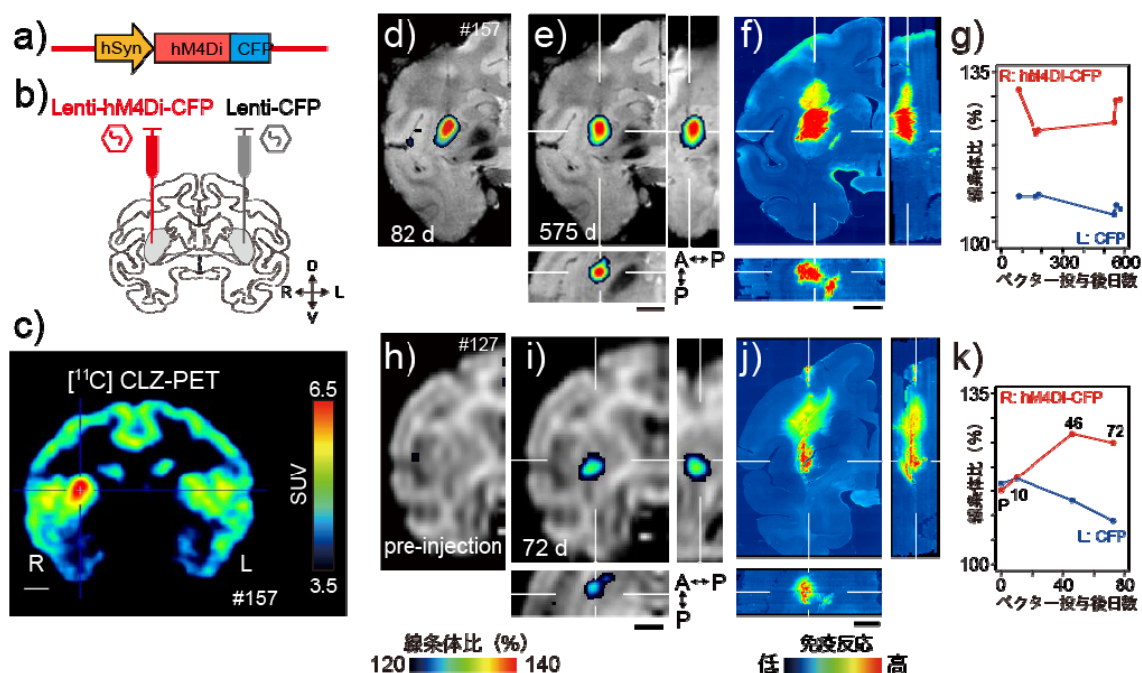


図 2 : hM4Di 発現の PET による可視化の妥当性確認。a) レンチウイルスベクターの構造。b) レンチウイルスを投与する部位の模式図。c) #157 から取得した $[^{11}\text{C}]$ CLZ-PET 測定で得られた SUV 画像（冠状断）。d) #157 から取得したベクター投与 82 日後に測定した $[^{11}\text{C}]$ CLZ-PET と MRI の重ね合わせ画像。PET 画像は線条体比 (%) で 120% 以上のみ表示した。e) #157 から取得したベクター投与 575 日後に測定した $[^{11}\text{C}]$ CLZ-PET と MRI の重ね合わせ 3 断面像。f) #157 から取得した $300\mu\text{m}$ 間隔の 30 枚の抗 CFP 免疫染色像を 3 次元再構成した画像。パネル e) と位置合わせをした。g) #157 の標準化した uptake value の経時変化。赤は hM4Di 発現部位、青は反対側の対応する部位を示す。h-k) 別個体 (#127) で d-g) と同様の解析を行った結果。

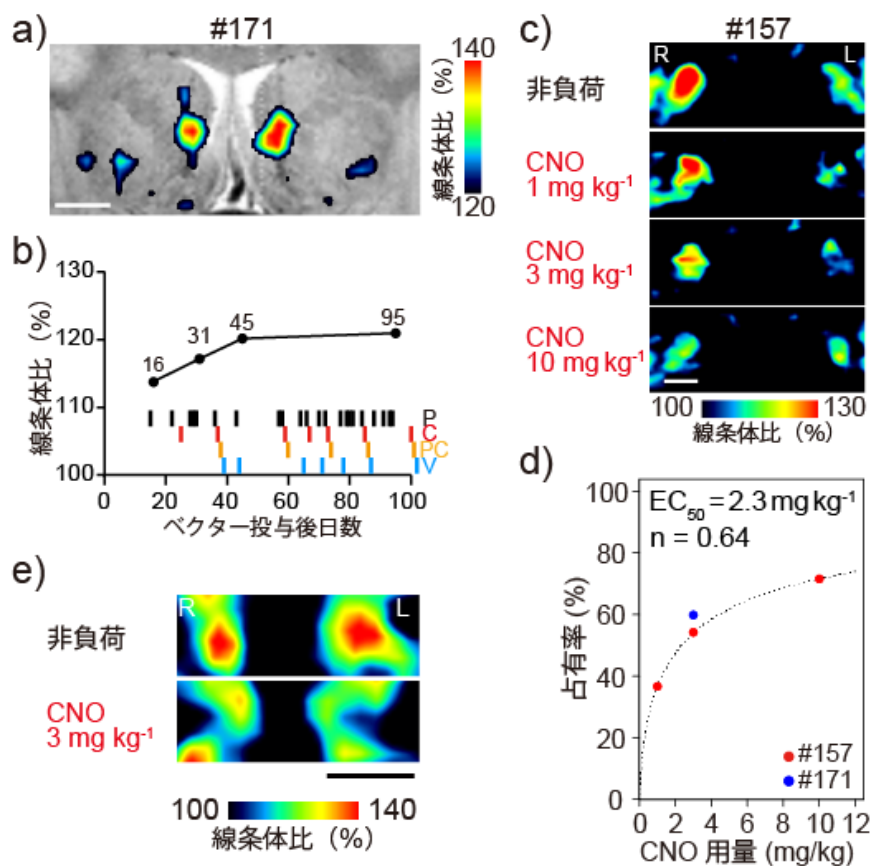


図 3：両側吻内側尾状核に発現した hM4Di の PET モニタリング。

a) #171 から取得したベクター投与 45 日後の $[^{11}\text{C}]\text{CLZ}$ -PET と MRI の重ね合わせ画像。PET 画像は線条体比(%)で 120%以上のみ表示した。b) #171 の標準化した uptake value の経時変化。グラフ下部の色つきマークは行動課題を実施したタイミングを示す。(P: ベクター投与後、C: CNO 負荷、PC: CNO 負荷翌日、V: 溶媒) c) #157 から取得した標準化 $[^{11}\text{C}]\text{CLZ}$ -PET 冠状断像。上から CNO 非負荷、CNO 1, 3, 10 mg/kg 負荷時の画像を示した。d) CNO 投与用量に対する hM4Di 占有率の関係。赤は #157、青は #171 から得られたデータを示す。占有率が 50% になる CNO 用量 (EC_{50}) は 2.3 mg/kg と推定された。n は Hill 係数を示す。e) #171 から得られた CNO 非負荷

および 3 mg/kg 負荷時の標準化 [^{11}C]CLZ-PET 冠状断像。すべてのスケールバーは 5mm を示す。

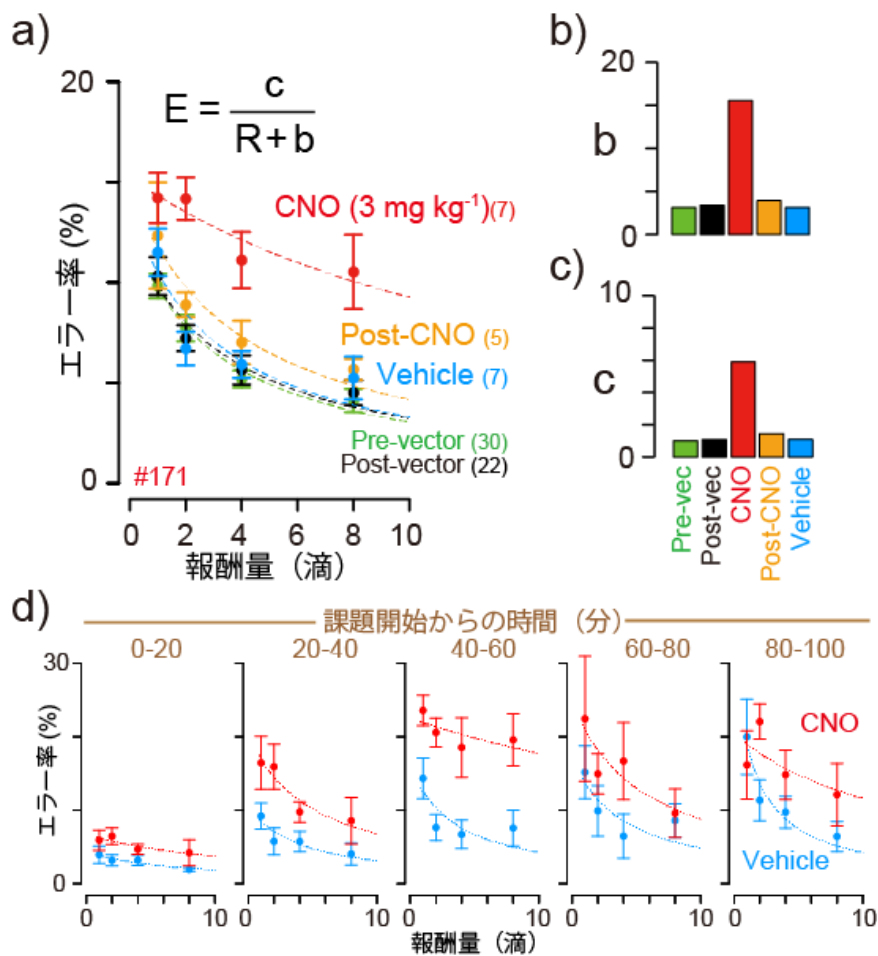


図 4：化学遺伝学的抑制による行動への影響。a) #171 の課題成績。ベクター投与前 (pre-vector、緑)、ベクター投与後 (post-vector、黒)、CNO 負荷時 [CNO (3 mg kg⁻¹)、赤]、CNO 負荷翌日 (Post-CNO、橙)、溶媒負荷時 (Vehicle、青)。ドット曲線は式 $E=c/(R+b)$ に最もよくフィットしたものを示す。E はエラー率、R は報酬量、c と b は変数。b) および c) 最もよくフィットしたときの変数 b, c。d) #171 の行動への影響の経時変化。

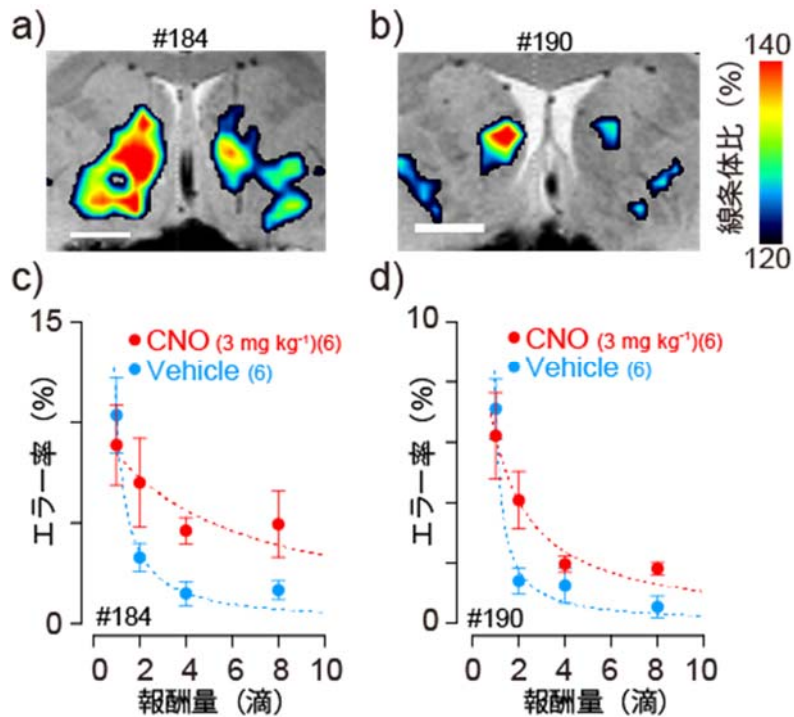


図 5： 吻内側尾状核の化学遺伝学的抑制によって引き起こされた報酬量感受性の低下。a)および b) #184 および#190 から取得した標準化 [¹¹C]CLZ-PET と MR 画像の重ね合わせ冠状断像。c)および d) reward-size 課題の成績に見られる吻内側尾状核の化学遺伝学的抑制の影響。赤は CNO 負荷時、青は溶媒負荷時。ドット曲線は式 $E = c / (R + b)$ に最もよくフィットしたものを示す。E はエラー率、R は報酬量、c と b は変数。

第 V 章 総括

サル類を用いて脳機能や脳神経疾患の研究を進めるとき、研究に利用できる個体数が限られるため、1頭からできるだけ多くの情報を得られるよう必要な実験手法を選択する。その方法の中で PET は感度が高く、定量性にも優れており、目的に適した PET トレーサーとサル類モデルを組み合わせることで脳神経疾患の病態の解明や脳機能の発現機序の解明に重要な役割を果たしている。本論文では PET イメージングとサル類モデルの 3 つの組み合わせの研究について記述した。

1 つ目は、ドーパミン (DA) 神経毒 MPTP の反復投与によるパーキンソン病 (PD) モデルサルの DA 神経系の経時変化に関する研究である [99]。PD は黒質線条体 DA 神経の進行性の変性・脱落という病理学的な特徴を有する疾患である。発症に至る過程は長期に渡るため、早期発見は重要な課題の 1 つであった。MPTP はドーパミン神経を選択的に変性・脱落させる神経毒である。これをカンクイザルに反復投与し、MPTP 投与前から PD 様症候 (特に振戦) が発現するまで行動学的評価および線条体 DA 神経系バイオマーカーの PET 測定を経時的に行った。その結果、DA 神経終末を反映する DA トランスポーター (DAT) 密度および DOPA 利用能が振戦発現前から有意に低下し、それとともに自発運動量も低下した。特に DAT は振戦発現時に 80% 以上の低下を認めており、PD 患者死後脳研究において線条体の DA 神経終末が 80% 以上脱落していること [7,115] と一致していた。一方、後シナプス機能を評価する DA D₂ 受容体密度や他の行動指標に有意な変化は認められなかった。以上のことから、PET による線条体 DAT 密度測定は PD モデルサルの

DA 神経変性を鋭敏に捉えられ、行動指標は自発運動量が最も適していると示唆された。

2 つ目はトゥレット症候群 (TS) モデルサルの音声チック発現時に認められる側坐核および関連する辺縁系回路の異常に関する研究である[88]。TS は、咳払いや奇声を繰り返してしまいう音声チックと、まばたきや顔しかめなどの動きを繰り返してしまいう運動チックを特徴とする神経発達障害である。音声チックが重篤な場合、公共の場で大きな吠え声をあげたり、社会的に受け入れられない言葉を発してしまいう汚言症を呈したり、自身の肉体的・精神的苦痛だけでなく、社会生活にも大きな影響を及ぼすことがある。運動チックは適切なモデル動物が存在し研究が進んでいるが、音声チックモデルは存在せず、必ずしも全ての患者に有効な治療法も開発されていなかった。そこで 5 頭のサルに対して線条体の一部である側坐核に GABA 拮抗薬のビククリンを局所投与して神経活動を脱抑制したところ、異常で複雑な発声を繰り返して誘発させることに全頭成功し、音声解析したところ”grunt”と呼ばれるもので最もよく説明された[44,50]。この音声チック発現時に脳活動がどのような変化をもたらすのか検証するため $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ を用いた脳血流 PET 測定を実施した。その結果、側坐核も含まれる辺縁系回路に属する ACC や扁桃体、海馬の脳血流が運動チック出現時に比べ有意に増加していた。さらに側坐核、ACC、M1 という 3 つの部位から局所フィールド電位 (LFP) を同時記録したところ、音声チック発現タイミングと一致して異常な神経放電の指標となる LFP スパイクが 3 部位において確認され、それらの LFP スパイクは同期していたことが確認された。ACC と M1 は自発的な発声の準備段階で活動を示すた

め、発声制御において重要な役割を果たしていることが知られており[45]、側坐核、ACC、M1 という 3 部位間の同期による異常な脳内ネットワークの活性化によって音声チックが誘発されたと考えられた。

3 つ目は、マカク属サルの rmCD を化学遺伝学的に神経活動抑制したときの報酬価値評価に与える影響に関する研究である[98]。rmCD が報酬系回路の 1 つであるという仮説[54]が支持されているが、報酬の評価やそれに伴う意思決定にどのような役割を果たしているかサル類では証明されていなかった。報酬やそれに関連する機能は脳の左右差が比較的小さく[23]、この問いに答えるには両側性に rmCD を操作する必要があるため、複数の脳部位の神経活動を同時に、繰り返し、非侵襲的に操作できる DREADD を用いることにしたが、これまでサル類に DREADD を導入したとき脳内で DREADD がどこにどれぐらい発現したのか不明なまま実験を進める必要があった。そこで DREADD の発現を *in vivo* で確認するため DREADD 用 PET リガンド [^{11}C]CLZ を開発した。サルの rmCD に抑制性 DREADD である hM4Di をウイルスベクターで導入し、[^{11}C]CLZ の PET 測定で発現を確認できた個体で報酬価値を判断させる課題を実施したところ、DREADD にのみ作用する CNO を投与したときのみ報酬の価値判断を変化させることに成功し、rmCD が報酬価値判断に必須であることを示した。

本論文ではサル類疾患モデルを作成する方法として、1 つ目はドーパミン神経毒 MPTP の反復投与を、2 つ目は GABA 拮抗薬ビククリンの局所投与を使用した。MPTP は不可逆的にドーパミン神経細胞を変性・脱落させるため、PD モデルとして長期に渡って安定し

て症候を発現するという利点があり、近年は ES 細胞や iPS 細胞などを用いた細胞移植治療研究において利用されている [35,36,113,131,143]。2 つ目の研究で用いたビククリン局所投与は作用範囲が空間的にも時間的にも限定的で脳機能局在を検証する上で有用である [86,87,121,122]。しかしながら研究に利用できる個体数に限りのあるサル類においては、不可逆的反応のため失われた神経細胞および機能は元に戻らないことや、局所投与するのに侵襲的な操作が必要なことはデメリットとなる場合がある。またモデルを再現性高く作成するには高度な技術も必要とされる。サル類モデルを用いて脳機能を調べるとき、侵襲性が低く、特定の神経活動を一定期間繰り返し操作でき、機能を評価するのに必要な脳領域を広さに関係なくカバーできることが理想的な条件として挙げられる。それを実現する一つの方法として 3 つ目で用いた DREADD [3] がある。DREADD は比較的新しい技術でこれを用いた脳機能研究の報告は近年指数関数的に増加している (図 1) が、サル類を対象とした報告は本論文の 3 つ目を含めわずか 5 つである [34,49,98,105,112]。サル類を対象とした研究で DREADD がまだ普及していない原因の 1 つとして、標的部位に正確に発現し、神経活動を操作するのに十分高いレベルで発現しているか確認するには組織学的解析に頼るしかなかったことが挙げられる。今回 DREADD の 1 つである hM4Di を *in vivo* でイメージングできる PET リガンドが開発できたことで、サルへの DREADD 導入が効率化されたと考えられ、サルへの利用が促進されるものと期待される。

脳機能をサルでより厳密に検証することは、脳疾患の病態解明に重要な知見をもたらすと考えられる。今後は従来のサル類モデルだけでなく、

DREADD のような遺伝子導入技術も取り入れた新たなサル類モデルが確立されると考えられる。特にげっ歯類では一般的となっている細胞種特異的あるいは経路選択的な DREADD 導入[9,16,40,48]は厳密な検証に強力なツールとなり、PET イメージングにより効率化が図られることで、脳機能および脳神経疾患研究に寄与すると期待される。

V-2. 付図

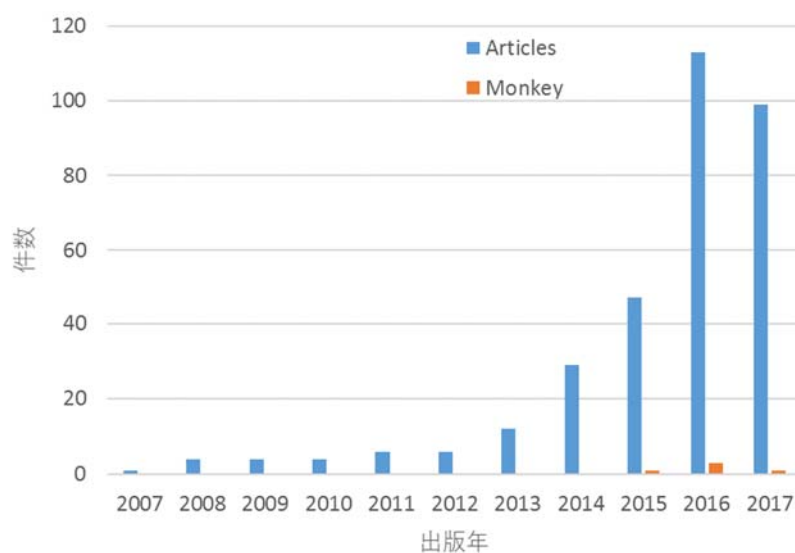


図 1 PubMed 検索結果。PubMed で DREADD 関連論文を検索した結果で、青は全検索結果、橙はサルを対象とした報告を示す。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました伊藤名誉教授ならびに夏堀雅宏教授に深く感謝いたします。

また PET を用いた脳研究について何も知らなかった私にも研究機会を与えてくださった量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・脳機能イメージング研究部の須原哲也部長に心より謝意を表します。

サル類を用いた脳 PET 研究について一からご指導いただきました日本医科大学千葉北総病院リハビリテーション科の大林茂部長に心より感謝いたします。

本論文の研究遂行ならびに論文作成に際し、終始ご懇篤なるご指導を賜りました量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・脳機能イメージング研究部の南本敬史チームリーダーならびに樋口真人チームリーダー、福島医科大学の伊藤浩教授、京都大学霊長類研究所統合脳システム分野の高田昌彦教授、井上謙一助教、Kevin W. McCairn 博士、大学共同利用機関法人・自然科学研究機構・生理学研究所・認知行動発達機構研究部門の磯田昌岐教授、筑波大学・医学医療系・生命医科学域・認知行動神経科学研究室の松本正幸教授、理化学研究所・脳科学総合研究センター・象徴概念発達研究チームの入来篤史シニア・チームリーダー、米国 Laboratory of Neuropsychology, National Institute of Mental Health, National Institutes of Health の Barry J. Richmond 博士に心から感謝いたします。

本論文の研究実施にあたり、多大なるご協力とご助言をいただきました量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・脳機能

イメージング研究部の前田純博士、季斌博士、堀由紀子博士、大西新博士、金子博行博士、平林敏行博士、藤本淳博士、菊地瑛理佳氏、同研究所・分子イメージング診断治療研究部機能分子計測チームの青木伊知男チームリーダー、国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・機能画像診断開発部・分子探索子開発室の木村泰之室長、理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・分子動態イメージング研究ユニットの岡内隆氏、実験動物中央研究所の安東潔博士、東京医科歯科大学・脳神経機能外科の稲次基希博士、大学共同利用機関法人・自然科学研究機構・生理学研究所・認知行動発達機構研究部門の二宮太平博士、ドイツ

Department of Neuroscience, School of Medicine and Health Sciences, Carl von Ossietzky University Oldenburg の加藤陽子博士、米国 National Laboratory of Neuropsychology, National Institute of Mental Health, National Institutes of Health の Walter Lerchner 博士ならびに Mark A.G. Eldridge 博士、韓国 Neurodegenerative Disease Laboratory, Korea Brain Research Institute の Ju-Young Lee 博士に心より感謝いたします。

PET 薬剤合成にご協力いただきました量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・標識薬剤開発部の張明栄部長、熊田勝志博士ならびに所属スタッフの皆様に心より感謝いたします。

最後に獣医師という道を示してくれた父、長きに渡り支えてくださった母、兄に感謝の意を表します。

引用文献

1. Alexander, G.E., DeLong, M.R., and Strick, P.L. 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* **9**: 357–381.
2. Antonini, A., Schwarz, J., Oertel, W.H., Beer, H.F., Madeja, U.D., and Leenders, K.L. 1994. [¹¹C]raclopride and positron emission tomography in previously untreated patients with Parkinson's disease: Influence of L - dopa and lisuride therapy on striatal dopamine D₂-receptors. *Neurology.* **44**: 1325–1325.
3. Armbruster, B.N., Li, X., Pausch, M.H., Herlitze, S., and Roth, B.L. 2007. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 5163–5168.
4. Averbek, B.B., Lehman, J., Jacobson, M., and Haber, S.N. 2014. Estimates of projection overlap and zones of convergence within frontal-striatal circuits. *J. Neurosci.* **34**: 9497–9505.
5. Bahramisharif, A., Mazaheri, A., Levar, N., Richard Schuurman, P., Figee, M., and Denys, D. 2016. Deep brain stimulation diminishes cross-frequency coupling in obsessive-compulsive disorder. *Biol. Psychiatry.* **80**: e57-58.

6. Belluscio, M.A., Mizuseki, K., Schmidt, R., Kempter, R., and Buzsáki, G. 2012. Cross-frequency phase-phase coupling between θ and γ oscillations in the hippocampus. *J. Neurosci.* **32**: 423–435.
7. Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., and Seitelberger, F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* **20**: 415–455.
8. Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., Crossman, A.R., Bioulac, B., Brotchie, J.M., and Gross, C.E. 2001. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **21**: 6853–6861.
9. Bock, R., Shin, J.H., Kaplan, A.R., Dobi, A., Markey, E., Kramer, P.F., Gremel, C.M., Christensen, C.H., Adrover, M.F., and Alvarez, V.A. 2013. Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat. Neurosci.* **16**: 632–638.
10. Bohlhalter, S., Goldfine, A., Matteson, S., Garraux, G., Hanakawa, T., Kansaku, K., Wurzman, R., and Hallett, M. 2006. Neural correlates of tic generation in Tourette

- syndrome: an event-related functional MRI study. *Brain J. Neurol.* **129**: 2029–2037.
11. Bour, L.J., Ackermans, L., Foncke, E.M.J., Cath, D., van der Linden, C., Visser Vandewalle, V., and Tijssen, M.A. 2015. Tic related local field potentials in the thalamus and the effect of deep brain stimulation in Tourette syndrome: Report of three cases. *Clin. Neurophysiol.* **126**: 1578–1588.
 12. Bouret, S. and Richmond, B.J. 2010. Ventromedial and orbital prefrontal neurons differentially encode internally and externally driven motivational values in monkeys. *J. Neurosci.* **30**: 8591–8601.
 13. Bromberg-Martin, E.S., Matsumoto, M., and Hikosaka, O. 2010. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron.* **68**: 815–834.
 14. Brooks, D.J., Ibanez, V., Sawle, G.V., Playford, E.D., Quinn, N., Mathias, C.J., Lees, A.J., Marsden, C.D., Bannister, R., and Frackowiak, R.S.J. 1992. Striatal D₂ receptor status in patients with Parkinson’s disease, striatonigral degeneration, and progressive supranuclear palsy, measured with 11C-raclopride and positron emission tomography. *Ann. Neurol.* **31**: 184–192.
 15. Buchsbaum, M.S., Christian, B.T., Lehrer, D.S., Narayanan, T.K., Shi, B., Mantil, J., Kemether, E., Oakes, T.R., and Mukherjee, J. 2006. D2/D3 dopamine receptor

- binding with [F-18]fallypride in thalamus and cortex of patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* **85**: 232–244.
16. Bull, C., Freitas, K.C.C., Zou, S., Poland, R.S., Syed, W.A., Urban, D.J., Minter, S.C., Shelton, K.L., Hauser, K.F., Negus, S.S., Knapp, P.E., and Bowers, M.S. 2014. Rat nucleus accumbens core astrocytes modulate reward and the motivation to self-administer ethanol after abstinence. *Neuropsychopharmacology*. **39**: 2835–2845.
 17. Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M., and Kopin, I.J. 1983. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 4546–4550.
 18. Calne, D.B., Langston, J.W., Martin, W.R.W., Stoessl, A.J., Ruth, T.J., Adam, M.J., Pate, B.D., and Schulzer, M. 1985. Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease. *Nature*. **317**: 246–248.
 19. Chang, W.-H., Lin, S.-K., Lane, H.-Y., Wei, F.-C., Hu, W.-H., Lam, Y.F., and Jann, M.W. 1998. Reversible metabolism of clozapine and clozapine N-oxide in schizophrenic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. **22**: 723–739.

20. Chassain, C., Eschalier, A., and Durif, F. 2001.
Assessment of motor behavior using a video system and a clinical rating scale in parkinsonian monkeys lesioned by MPTP. *J. Neurosci. Methods.* **111**: 9–16.
21. Chen, X., Choo, H., Huang, X.-P., Yang, X., Stone, O., Roth, B.L., and Jin, J. 2015. The first structure-activity relationship studies for designer receptors exclusively activated by designer drugs. *ACS Chem. Neurosci.* **6**: 476–484.
22. Chiueh, C.C., Firnau, G., Burns, R.S., Nahmias, C., Chirakal, R., Kopin, I.J., and Garnett, E.S. 1987.
Determination and visualization of damage to striatal dopaminergic terminals in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism by [^{18}F]-labeled 6-fluoro-L-dopa and positron emission tomography. *Adv. Neurol.* **45**: 167–169.
23. Clark, A.M., Bouret, S., Young, A.M., Murray, E.A., and Richmond, B.J. 2013. Interaction between orbital prefrontal and rhinal cortex is required for normal estimates of expected value. *J. Neurosci.* **33**: 1833–1845.
24. Cohen, A.J. and Leckman, J.F. 1992. Sensory phenomena associated with Gilles de la Tourette’s syndrome. *J. Clin. Psychiatry.* **53**: 319–323.

25. Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. 1999. The substantia nigra of the human brain. *Brain*. **122**: 1437–1448.
26. Dentresangle, C., Veyre, L., Le Bars, D., Pierre, C., Lavenne, F., Pollak, P., Guerin, J., Froment, J.-C., and Brousolle, E. 1999. Striatal D2 dopamine receptor status in Parkinson's disease: An [^{18}F]dopa and [^{11}C]raclopride PET study. *Mov. Disord*. **14**: 1025–1030.
27. Doudet, D.J., Chan, G.L., Holden, J.E., McGeer, E.G., Aigner, T.A., Wyatt, R.J., and Ruth, T.J. 1998. 6- [^{18}F]fluoro-L-DOPA PET studies of the turnover of dopamine in MPTP-induced parkinsonism in monkeys. *Synapse*. **29**: 225–232.
28. Doudet, D.J., Holden, J.E., Jivan, S., McGeer, E., and Wyatt, R.J. 2000. In vivo PET studies of the dopamine D2 receptors in rhesus monkeys with long-term MPTP-induced parkinsonism. *Synapse*. **38**: 105–113.
29. Doudet, D.J., Wyatt, R.J., Cannon-Spoor, E., Suddath, R., McLellan, C.A., and Cohen, R.M. 1993. 6- [^{18}F]fluoro-L-dopa and cerebral blood flow in unilaterally MPTP-treated monkeys. *J. Neural Transplant. Plast*. **4**: 27–38.
30. Doudet, D.J., Jivan, S., Ruth, T.J., and Holden, J.E. 2002. Density and affinity of the dopamine D2 receptors in aged symptomatic and asymptomatic MPTP-treated monkeys: PET studies with [^{11}C]raclopride. *Synapse*. **44**: 198–202.

31. Dum, R.P. and Strick, P.L. 1991. The origin of corticospinal projections from the premotor areas in the frontal lobe. *J. Neurosci.* **11**: 667–689.
32. Dure, L.S. and DeWolfe, J. 2006. Treatment of tics. *Adv. Neurol.* **99**: 191–196.
33. Dzirasa, K., Phillips, H.W., Sotnikova, T.D., Salahpour, A., Kumar, S., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., and Nicolelis, M.A.L. 2010. Noradrenergic control of cortico-striato-thalamic and mesolimbic cross-structural synchrony. *J. Neurosci.* **30**: 6387–6397.
34. Eldridge, M.A.G., Lerchner, W., Saunders, R.C., Kaneko, H., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J., Ji, B., Higuchi, M., Minamimoto, T., and Richmond, B.J. 2016. Chemogenetic disconnection of monkey orbitofrontal and rhinal cortex reversibly disrupts reward value. *Nat. Neurosci.* **19**: 37–39.
35. Emborg, M.E., Zhang, Z., Joers, V., Brunner, K., Bondarenko, V., Ohshima, S., and Zhang, S.-C. 2013. Intracerebral transplantation of differentiated human embryonic stem cells to hemiparkinsonian monkeys. *Cell Transplant.* **22**: 831–838.
36. Emborg, M., Liu, Y., Xi, J., Zhang, X., Yin, Y., Lu, J., Joers, V., Swanson, C., Holden, J., and Zhang, S.-C. 2013. Induced pluripotent stem cell derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain. *Cell Rep.* **3**: 646–650.

37. Falardeau, P., Bédard, P.J., and Di Paolo, T. 1988.
Relation between brain dopamine loss and D₂ dopamine
receptor density in MPTP monkeys. *Neurosci. Lett.* **86**: 225–
229.
38. Fearnley, J.M. and Lees, A.J. 1991. Ageing and
Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity.
Brain. **114**: 2283–2301.
39. Fell, J. and Axmacher, N. 2011. The role of phase
synchronization in memory processes. *Nat. Rev. Neurosci.*
12: 105–118.
40. Ferguson, S.M., Phillips, P.E.M., Roth, B.L., Wess, J., and
Neumaier, J.F. 2013. Direct-pathway striatal neurons
regulate the retention of decision-making strategies. *J.*
Neurosci. **33**: 11668–11676.
41. Firnau, G., Sood, S., Chirakal, R., Nahmias, C., and
Garnett, E.S. 1987. Cerebral metabolism of 6-[¹⁸F]fluoro-l-
3,4-dihydroxyphenylalanine in the primate. *J. Neurochem.*
48: 1077–1082.
42. Frey, K.A., Koeppe, R.A., Kilbourn, M.R., Vander Borght,
T.M., Albin, R.L., Gilman, S., and Kuhl, D.E. 1996.
Presynaptic monoaminergic vesicles in Parkinson's disease
and normal aging. *Ann. Neurol.* **40**: 873–884.
43. Frost, J.J., Rosier, A.J., Reich, S.G., Smith, J.S., Ehlers,
M.D., Snyder, S.H., Ravert, H.T., and Dannals, R.F. 1993.
Positron emission tomographic imaging of the dopamine

- transporter with ^{11}C -WIN 35,428 reveals marked declines in mild Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **34**: 423–431.
44. Fukushima, M., Saunders, R.C., Leopold, D.A., Mishkin, M., and Averbeck, B.B. 2014. Differential coding of conspecific vocalizations in the ventral auditory cortical stream. *J. Neurosci.* **34**: 4665–4676.
 45. Gemba, H., Miki, N., and Sasaki, K. 1995. Cortical field potentials preceding vocalization and influences of cerebellar hemispherectomy upon them in monkeys. *Brain Res.* **697**: 143–151.
 46. Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H., and Youdim, M.B.H. 1991. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* **208**: 273–286.
 47. Gomez-Mancilla, B., Boucher, R., and Bédard, P.J. 1991. Effect of clonidine and atropine on rest tremor in the MPTP monkey model of parkinsonism. *Clin. Neuropharmacol.* **14**: 359–366.
 48. Gompf, H.S., Budygin, E.A., Fuller, P.M., and Bass, C.E. 2015. Targeted genetic manipulations of neuronal subtypes using promoter-specific combinatorial AAVs in wild-type animals. *Front. Behav. Neurosci.* **9**: 152.
 49. Grayson, D.S., Bliss-Moreau, E., Machado, C.J., Bennett, J., Shen, K., Grant, K.A., Fair, D.A., and Amaral, D.G. 2016. The rhesus monkey connectome predicts disrupted

- functional networks resulting from pharmacogenetic inactivation of the amygdala. *Neuron*. **91**: 453–466.
50. Green, S. 1975. Variation of vocal pattern with social situation in the japanese monkey (*Macaca fuscata*): A field study. pp. 1–102. In: Primate Behav., (Rosenblum, A.L. ed.), Academic Press, .
 51. Guilloteau, D., Emond, P., Baulieu, J.-L., Garreau, L., Frangin, Y., Pourcelot, L., Mauclaire, L., Besnard, J.-C., and Chalon, S. 1998. Exploration of the dopamine transporter: *in vitro* and *in vivo* characterization of a high-affinity and high-specificity iodinated tropane derivative (*E*)-*N*-(3-iodoprop-2-enyl)-2 β -carbomethoxy- 3 β -(4'-methylphenyl)nortropine (PE2I). *Nucl. Med. Biol.* **25**: 331–337.
 52. Guttman, M., Burkholder, J., Kish, S.J., Hussey, D., Wilson, A., DaSilva, J., and Houle, S. 1997. [¹¹C]RTI-32 PET studies of the dopamine transporter in early dopa-naive Parkinson's disease: Implications for the symptomatic threshold. *Neurology*. **48**: 1578–1583.
 53. Haber, S.N., Kim, K.-S., Maily, P., and Calzavara, R. 2006. Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. *J. Neurosci.* **26**: 8368–8376.

54. Haber, S.N. and Knutson, B. 2010. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology*. **35**: 4–26.
55. Han, X., Qian, X., Bernstein, J.G., Zhou, H., Franzesi, G.T., Stern, P., Bronson, R.T., Graybiel, A.M., Desimone, R., and Boyden, E.S. 2009. Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. *Neuron*. **62**: 191–198.
56. Hartvig, P., Eckernäs, S.Å., Lindström, L., Ekblom, B., Bondesson, U., Lundqvist, H., Halldin, C., Nägren, K., and Långström, B. 1986. Receptor binding of N-(methyl- ^{11}C) clozapine in the brain of rhesus monkey studied by positron emission tomography (PET). *Psychopharmacology (Berl.)*. **89**: 248–252.
57. de Hemptinne, C., Ryapolova-Webb, E.S., Air, E.L., Garcia, P.A., Miller, K.J., Ojemann, J.G., Ostrem, J.L., Galifianakis, N.B., and Starr, P.A. 2013. Exaggerated phase-amplitude coupling in the primary motor cortex in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 4780–4785.
58. Hoehn, M.M. and Yahr, M.D. 1967. Parkinsonism onset, progression, and mortality. *Neurology*. **17**: 427–427.
59. Hollerman, J.R., Tremblay, L., and Schultz, W. 1998. Influence of reward expectation on behavior-related neuronal activity in primate striatum. *J. Neurophysiol.* **80**: 947–963.

60. Howell, L.L. and Murnane, K.S. 2011. Nonhuman primate positron emission tomography neuroimaging in drug abuse research. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **337**: 324–334.
61. Huang, C., Mattis, P., Tang, C., Perrine, K., Carbon, M., and Eidelberg, D. 2007. Metabolic brain networks associated with cognitive function in Parkinson's disease. *NeuroImage*. **34**: 714–723.
62. Huang, W.-S., Chiang, Y.-H., Lin, J.-C., Chou, Y.-H., Cheng, C.-Y., and Liu, R.-S. 2003. Crossover study of ^{99m}Tc -TRODAT-1 SPECT and ^{18}F -FDOPA PET in Parkinson's disease patients. *J. Nucl. Med.* **44**: 999–1005.
63. Imbert, C., Bezard, E., Guitraud, S., Boraud, T., and Gross, C.E. 2000. Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the macaque monkey. *J. Neurosci. Methods*. **96**: 71–76.
64. Inaji, M., Okauchi, T., Ando, K., Maeda, J., Nagai, Y., Yoshizaki, T., Okano, H., Nariai, T., Ohno, K., Obayashi, S., Higuchi, M., and Suhara, T. 2005. Correlation between quantitative imaging and behavior in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res.* **1064**: 136–145.
65. Innis, R., Baldwin, R., Sybirska, E., Zea, Y., Laruelle, M., Al-Tikriti, M., Charney, D., Zoghbi, S., Smith, E., Wisniewski, G., Hoffer, P., Wang, S., Milius, R., and Neumeyer, J. 1991. Single photon emission computed tomography imaging of monoamine reuptake sites in

- primate brain with [^{123}I]CIT. *Eur. J. Pharmacol.* **200**: 369–370.
66. Inoue, M., Mikami, A., Ando, I., and Tsukada, H. 2004. Functional brain mapping of the macaque related to spatial working memory as revealed by PET. *Cereb. Cortex.* **14**: 106–119.
67. Jann, M.W., Lam, Y.W.F., and Chang, W.H. 1994. Rapid formation of clozapine in guinea-pigs and man following clozapine-N-oxide administration. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **328**: 243–250.
68. Jucaite, A., Odano, I., Olsson, H., Pauli, S., Halldin, C., and Farde, L. 2006. Quantitative analyses of regional [^{11}C]PE2I binding to the dopamine transporter in the human brain: a PET study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **33**: 657–668.
69. Jürgens, U. 2009. The neural control of vocalization in mammals: a review. *J. Voice.* **23**: 1–10.
70. Kaufman, M.J. and Madras, B.K. 1991. Severe depletion of cocaine recognition sites associated with the dopamine transporter in Parkinson’s-diseased striatum. *Synapse.* **9**: 43–49.
71. Kennerley, S.W. and Wallis, J.D. 2009. Evaluating choices by single neurons in the frontal lobe: outcome value encoded across multiple decision variables. *Eur. J. Neurosci.* **29**: 2061–2073.

72. Kinoshita, M., Matsui, R., Kato, S., Hasegawa, T., Kasahara, H., Isa, K., Watakabe, A., Yamamori, T., Nishimura, Y., Alstermark, B., Watanabe, D., Kobayashi, K., and Isa, T. 2012. Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates. *Nature*. **487**: 235–238.
73. Kish, S.J., Shannak, K., and Hornykiewicz, O. 1988. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **318**: 876–880.
74. Koller, W.C. 1992. When does Parkinson's disease begin? *Neurology*. **42**: 27-31.
75. Kuikka, J.T., Baulieu, J.L., Hiltunen, J., Halldin, C., Bergström, K.A., Farde, L., Emond, P., Chalon, S., Yu, M., Nikula, T., Laitinen, T., Karhu, J., Tupala, E., Hallikainen, T., Kolehmainen, V., Mauclaire, L., Maziere, B., Tiihonen, J., and Guilloteau, D. 1998. Pharmacokinetics and dosimetry of iodine-123 labelled PE2I in humans, a radioligand for dopamine transporter imaging. *Eur. J. Nucl. Med.* **25**: 531–534.
76. Kusama, T. and Mabuchi, M. 1970. Stereotaxic atlas of the brain of *Macaca fuscate*, University of Tokyo Press, Tokyo.
77. Kwak, C., Dat Vuong, K., and Jankovic, J. 2003. Premonitory sensory phenomenon in Tourette's syndrome. *Mov. Disord.* **18**: 1530–1533.

78. Laihinen, A.O., Rinne, J.O., Någren, K.A., Lehtikoinen, P.K., Oikonen, V.J., Ruotsalainen, U.H., Ruottinen, H.M., and Rinne, U.K. 1995. PET studies on brain monoamine transporters with carbon-11- β -CIT in Parkinson's disease. *J. Nucl. Med.* **36**: 1263–1267.
79. Lalo, E., Thobois, S., Sharott, A., Polo, G., Mertens, P., Pogosyan, A., and Brown, P. 2008. Patterns of bidirectional communication between cortex and basal ganglia during movement in patients with Parkinson disease. *J. Neurosci.* **28**: 3008–3016.
80. Lammertsma, A.A. and Hume, S.P. 1996. Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *NeuroImage.* **4**: 153–158.
81. Leckman, J.F., Walker, D.E., and Cohen, D.J. 1993. Premonitory urges in Tourette's syndrome. *Am. J. Psychiatry.* **150**: 98–102.
82. Lee, C.S., Samii, A., Sossi, V., Ruth, T.J., Schulzer, M., Holden, J.E., Wudel, J., Pal, P.K., De La Fuente-Fernandez, R., Calne, D.B., and Stoessl, A.J. 2000. In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **47**: 493–503.
83. Lerchner, W., Corgiat, B., Der Minassian, V., Saunders, R.C., and Richmond, B.J. 2014. Injection parameters and virus dependent choice of promoters to improve neuron

- targeting in the nonhuman primate brain. *Gene Ther.* **21**: 233–241.
84. Lloyd, K.G. and Hornykiewicz, O. 1972. Occurrence and distribution of aromatic L-amino acid (L-DOPA) decarboxylase in the human brain. *J. Neurochem.* **19**: 1549–1559.
 85. Marceglia, S., Servello, D., Foffani, G., Porta, M., Sassi, M., Mrakic-Sposta, S., Rosa, M., Barbieri, S., and Priori, A. 2010. Thalamic single-unit and local field potential activity in Tourette syndrome. *Mov. Disord.* **25**: 300–308.
 86. McCairn, K.W., Bronfeld, M., Bebelovsky, K., and Bar-Gad, I. 2009. The neurophysiological correlates of motor tics following focal striatal disinhibition. *Brain J. Neurol.* **132**: 2125–2138.
 87. McCairn, K.W., Iriki, A., and Isoda, M. 2013. Global dysrhythmia of cerebro-basal ganglia-cerebellar networks underlies motor tics following striatal disinhibition. *J. Neurosci.* **33**: 697–708.
 88. McCairn, K.W., Nagai, Y., Hori, Y., Ninomiya, T., Kikuchi, E., Lee, J.-Y., Suhara, T., Iriki, A., Minamimoto, T., Takada, M., Isoda, M., and Matsumoto, M. 2016. A primary role for nucleus accumbens and related limbic network in vocal tics. *Neuron.* **89**: 300–307.
 89. Meissner, W., Prunier, C., Guilloteau, D., Chalon, S., Gross, C.E., and Bezard, E. 2003. Time-course of

- nigrostriatal degeneration in a progressive MPTP-lesioned macaque model of parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* **28**: 209–218.
90. Melega, W.P., Grafton, S.T., Huang, S.-C., Satyamurthy, N., Phelps, M.E., and Barrio, J.R. 1991. L-6-[¹⁸F]fluoro-DOPA metabolism in monkeys and humans: biochemical parameters for the formulation of tracer kinetic models with positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **11**: 890–897.
 91. Melega, W.P., Luxen, A., Perlmutter, M.M., Nissenson, C.H.K., Phelps, M.E., and Barrio, J.R. 1990. Comparative in vivo metabolism of 6-[¹⁸F]fluoro-L-DOPA and [³H]L-DOPA in rats. *Biochem. Pharmacol.* **39**: 1853–1860.
 92. Melega, W.P., Raleigh, M.J., Stout, D.B., DeSalles, A.A., Cherry, S.R., Blurton-Jones, M., Morton, G.G., Huang, S.-C., and Phelps, M.E. 1996. Longitudinal behavioral and 6-[¹⁸F]fluoro-l-DOPA-PET assessment in MPTP-hemiparkinsonian monkeys. *Exp. Neurol.* **141**: 318–329.
 93. Minamimoto, T., Camera, G.L., and Richmond, B.J. 2009. Measuring and modeling the interaction among reward size, delay to reward, and satiation level on motivation in monkeys. *J. Neurophysiol.* **101**: 437–447.
 94. Morecraft, R.J. and Van Hoesen, G.W. 1998. Convergence of limbic input to the cingulate motor cortex in the rhesus monkey. *Brain Res. Bull.* **45**: 209–232.

95. Morris, E.D., Babich, J.W., Alpert, N.M., Bonab, A.A., Livni, E., Weise, S., Hsu, H., Christian, B.T., Madras, B.K., and Fischman, A.J. 1996. Quantification of dopamine transporter density in monkeys by dynamic PET imaging of multiple injections of ^{11}C -CFT. *Synapse*. **24**: 262–272.
96. Mure, H., Hirano, S., Tang, C.C., Isaias, I.U., Antonini, A., Ma, Y., Dhawan, V., and Eidelberg, D. 2011. Parkinson’s disease tremor-related metabolic network: characterization, progression, and treatment effects. *NeuroImage*. **54**: 1244–1253.
97. Murnane, K.S. and Howell, L.L. 2011. Neuroimaging and drug taking in primates. *Psychopharmacology (Berl.)*. **216**: 153–171.
98. Nagai, Y., Kikuchi, E., Lerchner, W., Inoue, K., Ji, B., Eldridge, M.A.G., Kaneko, H., Kimura, Y., Oh-Nishi, A., Hori, Y., Kato, Y., Hirabayashi, T., Fujimoto, A., Kumata, K., Zhang, M.-R., Aoki, I., Suhara, T., Higuchi, M., Takada, M., Richmond, B.J., and Minamimoto, T. 2016. PET imaging-guided chemogenetic silencing reveals a critical role of primate rostromedial caudate in reward evaluation. *Nat. Commun.* **7**: 13605.
99. Nagai, Y., Obayashi, S., Ando, K., Inaji, M., Maeda, J., Okauchi, T., Ito, H., and Suhara, T. 2007. Progressive changes of pre- and post-synaptic dopaminergic biomarkers

- in conscious MPTP-treated cynomolgus monkeys measured by positron emission tomography. *Synapse*. **61**: 809–819.
100. Nakamura, K., Santos, G.S., Matsuzaki, R., and Nakahara, H. 2012. Differential reward coding in the subdivisions of the primate caudate during an oculomotor task. *J. Neurosci*. **32**: 15963–15982.
 101. Nawaratne, V., Leach, K., Suratman, N., Loiacono, R.E., Felder, C.C., Armbruster, B.N., Roth, B.L., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. 2008. New insights into the function of M₄ muscarinic acetylcholine receptors gained using a novel allosteric modulator and a DREADD (designer receptor exclusively activated by a designer drug). *Mol. Pharmacol*. **74**: 1119–1131.
 102. Neuner, I., Werner, C.J., Arrubla, J., Stöcker, T., Ehlen, C., Wegener, H.P., Schneider, F., and Shah, N.J. 2014. Imaging the where and when of tic generation and resting state networks in adult Tourette patients. *Front. Hum. Neurosci*. **8**: 362.
 103. Obayashi, S., Nagai, Y., Suhara, T., Okauchi, T., Inaji, M., Iriki, A., and Maeda, J. 2009. Monkey brain activity modulated by reward preferences: a positron emission tomography study. *Neurosci. Res*. **64**: 421–428.
 104. Obayashi, S., Suhara, T., Nagai, Y., Maeda, J., Hihara, S., and Iriki, A. 2002. Macaque prefrontal activity

- associated with extensive tool use. *Neuroreport*. **13**: 2349–2354.
105. Oguchi, M., Okajima, M., Tanaka, S., Koizumi, M., Kikusui, T., Ichihara, N., Kato, S., Kobayashi, K., and Sakagami, M. 2015. Double virus vector infection to the prefrontal network of the macaque brain. *PloS One*. **10**: e0132825.
 106. Okubo, Y., Suhara, T., Suzuki, K., Kobayashi, K., Inoue, O., Terasaki, O., Someya, Y., Sassa, T., Sudo, Y., Matsushima, E., Iyo, M., Tateno, Y., and Toru, M. 1997. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature*. **385**: 634–636.
 107. Padoa-Schioppa, C. and Assad, J.A. 2006. Neurons in the orbitofrontal cortex encode economic value. *Nature*. **441**: 223–226.
 108. Patlak, C.S. and Blasberg, R.G. 1985. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. Generalizations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **5**: 584–590.
 109. Petrides, M. 2005. Lateral prefrontal cortex: architectonic and functional organization. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **360**: 781–795.
 110. Prunier, C., Bézard, E., Montharu, J., Mantzarides, M., Besnard, J.-C., Baulieu, J.-L., Gross, C., Guilloteau, D., and Chalon, S. 2003. Presymptomatic diagnosis of

- experimental parkinsonism with ^{123}I -PE2I SPECT.
NeuroImage. **19**: 810–816.
111. Prunier, C., Payoux, P., Guilloteau, D., Chalon, S., Giraudeau, B., Majorel, C., Tafani, M., Bezard, E., Esquerré, J.-P., and Baulieu, J.-L. 2003. Quantification of dopamine transporter by ^{123}I -PE2I SPECT and the noninvasive Logan graphical method in Parkinson's disease. *J. Nucl. Med.* **44**: 663–670.
 112. Raper, J., Morrison, R.D., Daniels, J.S., Howell, L., Bachevalier, J., Wichmann, T., and Galvan, A. 2017. Metabolism and distribution of clozapine-N-oxide: Implications for nonhuman primate chemogenetics. *ACS Chem. Neurosci.* **8**: 1570-1576.
 113. Redmond, D.E., Weiss, S., Elsworth, J.D., Roth, R.H., Wakeman, D.R., Bjugstad, K.B., Collier, T.J., Blanchard, B.C., Teng, Y.D., Synder, E.Y., and Sladek, J.R. 2010. Cellular repair in the parkinsonian nonhuman primate brain. *Rejuvenation Res.* **13**: 188–194.
 114. Ribeiro, M.-J., Vidailhet, M., Loc'h, C., Dupel, C., Nguyen, J.P., Ponchant, M., Dollé, F., Peschanski, M., Hantraye, P., Cesaro, P., Samson, Y., and Remy, P. 2002. Dopaminergic function and dopamine transporter binding assessed with positron emission tomography in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **59**: 580–586.

115. Riederer, P. and Wuketich, S. 1976. Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **38**: 277–301.
116. Rinne, J.O. 1991. Nigral degeneration in Parkinson's disease in relation to clinical features. *Acta Neurol. Scand.* **84**: 87–90.
117. Rinne, J.O., Laihinen, A., Rinne, U.K., Någren, K., Bergman, J., and Ruotsalainen, U. 1993. PET study on striatal dopamine D₂ receptor changes during the progression of early Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **8**: 134–138.
118. Rinne, J.O., Laihinen, A., Någren, K., Ruottinen, H., Ruotsawnen, U., and Rinne, U.K. 1995. PET examination of the monoamine transporter with [¹¹C]β-CIT and [¹¹C]β-CFT in early Parkinson's disease. *Synapse.* **21**: 97–103.
119. Robertson, M.M., Eapen, V., and Cavanna, A.E. 2009. The international prevalence, epidemiology, and clinical phenomenology of Tourette syndrome: a cross-cultural perspective. *J. Psychosom. Res.* **67**: 475–483.
120. Roesch, M.R. and Olson, C.R. 2004. Neuronal activity related to reward value and motivation in primate frontal cortex. *Science.* **304**: 307–310.
121. Rotge, J.Y., Aouizerate, B., Amestoy, V., Lambrecq, V., Langbour, N., Nguyen, T.H., Dovero, S., Cardoit, L., Tignol, J., Bioulac, B., Burbaud, P., and Guehl, D. 2012. The

- associative and limbic thalamus in the pathophysiology of obsessive-compulsive disorder: an experimental study in the monkey. *Transl. Psychiatry*. **2**: e161.
122. Saga, Y., Richard, A., Sgambato-Faure, V., Hoshi, E., Tobler, P.N., and Tremblay, L. 2016. Ventral pallidum encodes contextual information and controls aversive behaviors. *Cereb. Cortex*. bhw107.
 123. Sawle, G.V., Burn, D.J., Morrish, P.K., Lammertsma, A.A., Snow, B.J., Luthra, S., Osman, S., and Brooks, D.J. 1994. The effect of entacapone (OR-611) on brain [^{18}F]-6-L-fluorodopa metabolism Implications for levodopa therapy of Parkinson's disease. *Neurology*. **44**: 1292–1292.
 124. Shinoda, Y., Yokota, J., and Futami, T. 1981. Divergent projection of individual corticospinal axons to motoneurons of multiple muscles in the monkey. *Neurosci. Lett*. **23**: 7–12.
 125. Simmons, J.M., Minamimoto, T., Murray, E.A., and Richmond, B.J. 2010. Selective ablations reveal that orbital and lateral prefrontal cortex play different roles in estimating predicted reward value. *J. Neurosci*. **30**: 15878–15887.
 126. Snow, B.J., Vingerhoets, F.J., Langston, J.W., Tetrud, J.W., Sossi, V., and Calne, D.B. 2000. Pattern of dopaminergic loss in the striatum of humans with MPTP

- induced parkinsonism. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*.
68: 313–316.
127. Sossi, V., de la Fuente-Fernández, R., Holden, J.E.,
 Doudet, D.J., McKenzie, J., Stoessl, A.J., and Ruth, T.J.
 2002. Increase in dopamine turnover occurs early in
 Parkinson's disease: evidence from a new modeling
 approach to PET ^{18}F -fluorodopa data. *J. Cereb. Blood Flow
 Metab.* **22**: 232–239.
128. Stachniak, T.J., Ghosh, A., and Sternson, S.M. 2014.
 Chemogenetic synaptic silencing of neural circuits localizes
 a hypothalamus→midbrain pathway for feeding behavior.
Neuron. **82**: 797–808.
129. Stern, Y. 1990. MPTP-induced parkinsonism. *Prog.*
Neurobiol. **34**: 107–114.
130. Suhara, T., Yasuno, F., Sudo, Y., Yamamoto, M., Inoue,
 M., Okubo, Y., and Suzuki, K. 2001. Dopamine D2 receptors
 in the insular cortex and the personality trait of novelty
 seeking. *NeuroImage*. **13**: 891–895.
131. Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A.,
 Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi,
 M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H.,
 Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N.,
 Sasai, Y., and Hashimoto, N. 2005. Dopaminergic neurons
 generated from monkey embryonic stem cells function in a
 Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* **115**: 102–109.

132. Takahashi, H., Higuchi, M., and Suhara, T. 2006. The role of extrastriatal dopamine D2 receptors in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. **59**: 919–928.
133. Tedroff, J., Aquilonius, S.M., Hartvig, P., Lundqvist, H., Bjurling, P., and Långström, B. 1992. Estimation of regional cerebral utilization of [^{11}C]-L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) in the primate by positron emission tomography. *Acta Neurol. Scand.* **85**: 166–173.
134. Tedroff, J., Aquilonius, S.-M., Hartvig, P., Bredberg, E., Bjurling, P., and Långström, B. 1992. Cerebral uptake and utilization of therapeutic [β - ^{11}C]-L-DOPA in Parkinson's disease measured by positron emission tomography. Relations to motor response. *Acta Neurol. Scand.* **85**: 95–102.
135. The Tourette Syndrome Classification Study Group 1993. Definitions and classification of tic disorders. *Arch. Neurol.* **50**: 1013–1016.
136. Torstenson, R., Hartvig, P., Långström, B., Westerberg, G., and Tedroff, J. 1997. Differential effects of levodopa on dopaminergic function in early and advanced Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **41**: 334–340.
137. Torstenson, R., Tedroff, J., Hartvig, P., Fasth, K.-J., and Långström, B. 1999. A comparison of ^{11}C -labeled L-DOPA and L-fluorodopa as positron emission tomography tracers

- for the presynaptic dopaminergic system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**: 1142–1149.
138. Tremblay, L. and Schultz, W. 1999. Relative reward preference in primate orbitofrontal cortex. *Nature.* **398**: 704–708.
139. Tsukada, H., Harada, N., Nishiyama, S., Ohba, H., Sato, K., Fukumoto, D., and Kakiuchi, T. 2000. Ketamine decreased striatal [^{11}C]raclopride binding with no alterations in static dopamine concentrations in the striatal extracellular fluid in the monkey brain: Multiparametric PET studies combined with microdialysis analysis. *Synapse.* **37**: 95–103.
140. Turjanski, N., Lees, A.J., and Brooks, D.J. 1997. In vivo studies on striatal dopamine D₁ and D₂ site binding in L-dopa-treated Parkinson's disease patients with and without dyskinesias. *Neurology.* **49**: 717–723.
141. Vingerhoets, F.J., Snow, B.J., Tetrud, J.W., Langston, J.W., Schulzer, M., and Calne, D.B. 1994. Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP-induced dopaminergic lesions. *Ann. Neurol.* **36**: 765–770.
142. Volkow, N.D., Wang, G.-J., Telang, F., Fowler, J.S., Logan, J., Childress, A.-R., Jayne, M., Ma, Y., and Wong, C. 2006. Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J. Neurosci.* **26**: 6583–6588.

143. Wakeman, D.R., Weiss, S., Sladek, J.R., Elsworth, J.D., Bauereis, B., Leranth, C., Hurley, P.J., Roth, R.H., and Redmond, D.E. 2014. Survival and integration of neurons derived from human embryonic stem cells in MPTP-lesioned primates. *Cell Transplant.* **23**: 981–994.
144. Wallis, J.D. and Miller, E.K. 2003. Neuronal activity in primate dorsolateral and orbital prefrontal cortex during performance of a reward preference task. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 2069–2081.
145. Wang, Z., Maia, T.V., Marsh, R., Colibazzi, T., Gerber, A., and Peterson, B.S. 2011. The neural circuits that generate tics in Tourette’s syndrome. *Am. J. Psychiatry.* **168**: 1326–1337.
146. Wüllner, U., Pakzaban, P., Brownell, A.-L., Hantraye, P., Burns, L., Shoup, T., Elmaleh, D., Petto, A.J., Spealman, R.D., Brownell, G.L., and Isacson, O. 1994. Dopamine terminal loss and onset of motor symptoms in MPTP-treated monkeys: A positron emission tomography study with ^{11}C -CFT. *Exp. Neurol.* **126**: 305–309.
147. Yamada, M., Uddin, L.Q., Takahashi, H., Kimura, Y., Takahata, K., Kousa, R., Ikoma, Y., Eguchi, Y., Takano, H., Ito, H., Higuchi, M., and Suhara, T. 2013. Superiority illusion arises from resting-state brain networks modulated by dopamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 4363–4367.

148. Yan, Q. 1999. Focal bicuculline increases extracellular dopamine concentration in the nucleus accumbens of freely moving rats as measured by in vivo microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* **385**: 7–13.
149. Yanagisawa, N. 1988. Long-term therapy of Parkinson's disease. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* **77**: 1378–1382.
150. Zauber, S.E., Ahn, S., Worth, R.M., and Rubchinsky, L.L. 2014. Oscillatory neural activity of anteromedial globus pallidus internus in Tourette syndrome. *Clin. Neurophysiol.* **125**: 1923–1924.