

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

定量的神経画像による線条体疾患の病態解明と治療法開発に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 飯田 秀博

平成18(2006)年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

定量的神経画像による線条体疾患の病態解明と治療法開発に関する研究-----	3
飯田秀博	

### II. 分担研究報告

1. 動物・ヒト・疾患脳でのPET/MRI応用研究に関する研究 -----	9
林 拓也、大西 隆	
(資料) Intra-striatal Representation of Cortical Connections in Human and Macaque (in submission)	
2. PET画像撮像・解析法の構築に関する研究 -----	28
渡部浩司	
3. MRI撮像法・解析法の構築に関する研究 -----	30
佐藤博司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	32
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	別添

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
（総括・分担）研究報告書  
定量的神経画像による線条体疾患の病態解明と治療法開発に関する研究  
主任研究者 飯田秀博  
国立循環器病センター研究所

研究要旨：線条体は、我々が社会生活をする上で重要な意欲・認知に基づく行動を制御し、多くの神経難病、精神疾患の発症機構に関与する。しかし線条体の構造・機能の詳細はサル脳での侵襲的手法でしか調べられていない。本研究は、非侵襲的画像撮像・解析法によりサルおよびヒトの線条体内の構造分離と機能局在を解明し、線条体疾患の病態や治療有効性を定量的に評価する方法を確立し難治性精神・神経疾患の医療に貢献することを目標とする。

#### 分担研究者

林 拓也（国立循環器病センター研究所）  
渡部浩司（国立循環器病センター研究所）  
大西 隆（国立精神神経センター武蔵病院）  
佐藤博司（国立循環器病センター研究所）

#### A. 研究目的

本研究は、こころの研究科学事業の実現目標である「精神・神経疾患の病態解明と画期的な治療法の開発」を達成するため、多くの精神・神経疾患の病態に深く関与する「線条体」に着目し病態把握、治療法の開発に直結した知見を得ることを目的とする。線条体は古くから精神・神経疾患の病態に深く関与することが知られていたが、その機能・構造などの知見の多くはサルなどの動物実験の結果から推察されるものでヒトの線条体の知見は少ないかもしくは剖検脳でしか調べられない。本研究はMRI, PET等非侵襲的画像装置を用いて感度・特異性高い解析・技術によりヒト線条体の構造・機能・病態を解明するものである。

線条体はパーキンソン病、ハンチントン病、統合失調症などといった主要な精神神経疾患の病態に関連する。線条体は皮質下核のなかで最大の構造体であり尾状核と被殻から構成される。尾状核はオタマジャクシ状の形をして側脳室に沿って位置し、被殻は島皮質の内側に位置してその内側の淡蒼球とともにその形状からレンズ核ともよばれる。それら特徴的の形状から吻側の融合部分を除いて尾状核と被殻は肉眼的に区別できるがその微視的構造は全く同じである。すなわち両者のどこをとっても同じ組織形態で多数の中等大のニューロンの間に少数の大型ニューロンが散在する。線条体の腹内側には側座核とよばれる小さな細胞集団があるがこの核と他の線条体との境界を細胞構築に基づいて明確に定めることはできない。

線条体の細胞構築は一様であるが近年の組織化学や特に免疫組織化学の研究ではその内部に著しい部位差があることが示されている。例えばアセチルコ

リンエステラーゼの染色性によりマトリックスとストリオゾームという分画が知られる。Calbindin D28kによる免疫染色では側座核の殻部が染色されず明瞭に他の線条体と区別される。これら組織化学的特徴は線条体の内部構造や出入力構成とも関連性があることが示唆されている。

出入力形態と線条体内部構造の間も関連性が示唆されている。線条体の背側に位置する「背側線状体」は前頭葉背側部（運動野、前運動野、背側前頭前野等）、腹側に位置する「腹側線条体」は辺縁系皮質との線維連絡を多くもち前者は認知、後者は感情に基づく運動・行動の制御に関わっていると考えられている。電極を用いた神経細胞電気活動計測でも線条体内の機能的分離が示されている。

しかしこうした組織化学・出入力形態・機能分離の知見はすべて動物脳での剖検脳や侵襲の実験に基づき剖検脳を使う以外にヒトの線条体の評価はできない。

近年の画像撮像技術の進歩により非侵襲的に脳機能・構造を調べる手法が開発されてきている。機能的MRI (fMRI) による脳機能計測、拡散強調画像MRIを用いた線維連絡性の評価やPETによる受容体評価（特にドーパミン系受容体）も可能である。しかしいずれの方法も特異性や感度の点から線条体の機能・病態に直結する情報は不十分で画像法の高精度化が重要である。

本研究の次の3点を目的とする。すなわち、1) MRIによる線条体の線維連絡性評価法を確立し、個々の疾病患者の線条体について「構造的特徴」を把握することを可能にする。2) ヒト線条体内の効率的機能評価法を開発し従来の解析法ではできなかった連続PET撮像法によって複数の脳活動時の機能を評価する方法を確立し、個々の疾病患者の機能的特徴を明確化する。3) これら新しく開発した非侵襲的画像法により線条体疾患脳の病態解明や新しい診断法の開発、治療法の選択、治療効果判定に応用する。

#### B. 研究方法

1) 線条体の線維連絡性の定量的評価 (分担: 林・大西・佐藤、17—18年度)。拡散強調画像は1980年代から拡散強調磁場を用いるMRI撮像により水分子の拡散運動の異方性に基づいて信号が変化すること、脳白質や末梢神経で高い異方性が観察されることから技術開発が進んできた画像法である。その後、拡散強調画像は脳虚血性疾患の急性期の診断法として非常に感度・特異性ともに高い画像法としられ広く臨床現場で用いられるようになっていく (拡散強調信号変化の理由は未だ十分解明されていないが急性虚血時の“浮腫”により拡散異方性が著明に低下するためと考えられている)。

拡散強調画像による神経線維法では、上記の急性期虚血診断の拡散強調画像とちがって、あらゆる角度の方向で拡散を強調した画像を撮ることでそれぞれの画素毎にすべての方向への拡散能の情報を得る。方向毎の拡散能は単純に (数学的に用いられる)

「テンソル」を用いて表現できる。テンソルは3次元的な楕円のようなものでその最も長い軸が、最も拡散性が大きい方向とその拡散能を表し、その長軸は当該画素内で優位に存在する神経線維の方向に一致することが経験的にわかっている。さらにこのテンソルの長軸方向を隣の画素の長軸に繋げていくことであたかも神経線維を追跡するかのように空間的な曲線を描いていくことができる。これが現在行われている拡散強調画像による神経線維追跡法である。

従来からあるこの方法では灰白質内のようにあらゆる方向の神経線維が交雑している場所ではテンソルの現状が楕円から球状になるため長軸方向が判断できず線維追跡ができない。この問題を克服するため我々は従来の単純な最小二乗法によるテンソル評価ではなく、全ての角度方向の拡散強調データと boot strapping法というサンプリング手法を用いて確率的に長軸方向の確率分布を推定する。得られた確率的な長軸の拡散情報を基に再度サンプリングにより確率的な線維追跡を行う。これにより従来にならぬ確率的 (定量的) 線維連絡追跡を可能とする。

実際にこの方法により少数の結果は報告されているが未だその特異性は不明で線条体における評価はない。我々はサル脳でこの方法の妥当性を検証した上で、ヒト脳を対象として研究を進める。MRIには高磁場 (3テスラ) MRI装置を使用し、多方向性拡散強調撮像を行うシーケンスの導入と最適化、定量的神経線維追跡ツールの導入を行う。妥当性検証のためにはサル脳を用いて過去に調べられている線条体・大脳皮質間線維連絡性を解明する。必要に応じて神経追跡法による方法と比較して線条体の線維連絡性を解明する。これにより同法の妥当性が検証でき次第、正常ヒト脳での検討によって線条体の線維連絡性を解明する。解析にはオックスフォード大学で開発されたもので同大学より特別に提供されたソフト

ウェアを使用する。動物の実験は全て麻酔下にて行う。ヒトの研究は正常者を対象として行う。

2)

2-1. 線条体機能の評価: ヒトの脳機能はPETや機能的MRIの技術発展によって解明がすすんだ。これら手法では通常ある課題や行動評価中には、複数の大脳皮質活動が観察される。こうした複数の賦活は神経線維連絡の多い部位同士でよく観察されるようであるがそうでない場合、もしくは線維連絡が知られていない場所同士の場合もある。複数の脳活動を観察した場合に、課題遂行のために複数の大脳皮質が独立して並列で活動しているのか、皮質内での階層的な情報処理 (直列的活動) をしているかの解釈は非常に難しい。

経頭蓋磁気刺激は近年神経科学分野でよく用いられる脳機能マッピングの手法で、安全に一過性に大脳皮質の一部を機能修飾することができる。この経頭蓋磁気刺激を脳機能イメージングと併用することで当該部位の他部位の脳活動の因果関係を特定できネットワーク内の情報処理の方向性を推測することができると思われる。

背側前頭前野は背側線条体との線維連絡が非常に多く、認知に基づく行動の制御に関わっている。うつ病、パーキンソン病、統合失調症で見られる認知機能障害にも関わっている。背側前頭前野の関わる認知課題において経頭蓋磁気刺激・機能画像装置を組み合わせることで、前頭前野とその機能関連部位のネットワークとしての機能を解明できる。本研究は、すでに脳定位装置下経頭蓋磁気刺激と機能画像評価の経験・研究実績を持つカナダ・マギール大学、モントリオール神経研究所と共同で研究を行う。正常被験者を対象とする。

2-2. ポジトロンエミッショントモグラフィ (PET) によるレセプター密度 (Bmax) ・親和性 (Kd) 同時測定と頭部動き補正による高精度ドーパミン機能定量画像化。従来の方法では参照部位と線条体の放射能の取込比に基づいた受容体評価しかできなかった。また使用する薬剤の放射能半減期が比較的長い (11Cの場合20分程度) 同日に2回繰り返して検査を行うことは不可能であった。本研究では一撮像内に連続して放射性元素標識薬剤を投与することで同時にレセプター密度 (Bmax), 親和性 (Kd) を算出する。もしくは安静時・賦活時の違う生理状況下での結合能を評価する方法を開発することで効率的かつ精度の高い受容体・神経伝達物質評価法とするものである。方法の検証のために動物実験による基礎データ収集を行ったのちに正常者での検討を行う。使用放射性標識薬剤はドーパミンD2受容体を標識する<sup>11</sup>C-ラクロプライドを使用する。

3. 病態脳での定量的画像評価の応用と治療効果判定。ヒト疾患脳（統合失調症、脳卒中、パーキンソン病）、MPTP処置パーキンソン病モデルサルなどにおけるMRIによる線維連絡性評価、PETによる線条体受容体評価を行い、方法の妥当性と応用性評価、病態解明、診断法の確立並びに治療効果判定を行う。治療法にはES細胞移植・遺伝子治療を評価し線条体内機能分離に基づいた移植部位の最適化、線条体内ドーパミンシナプス前後機能、移植細胞の神経線維構築等を評価する。パーキンソン病モデルサルにおける定量画像を用いた新規治療評価には京都大学脳神経外科・高橋淳講師、京都大学生体構造医学・出澤真理助教授、大阪大学医学部臨床遺伝子治療学・森下竜一教授の協力を得る。

#### （倫理面への配慮）

研究計画は国立循環器病センターの倫理委員会による承認を受けたのちに開始する。ヒト対象の場合にはヘルシンキ宣言に基づく倫理面に配慮し文書によるインフォームドコンセントが得られた例について検査を行う。動物実験はGuidelines for Animal Research on Human Care and Use of Laboratory Animals (Rockville, National Institute of Health/Office for Protection from Research Risks, 1996)に基づき国立循環器病センター動物福祉委員会の承認を経て行う。

#### C. 研究結果

現時点では当初の計画通り進行しており、17年度の上半期において線維連絡性評価の基礎的な撮像技術・解析技術について体制を整えることができた。当該研究費の支援により高精度な撮像に必須なハードウェアを整備することで18年度には十分な体制が整うと考えられる。すでに線条体の線維連絡性については正常サル脳、正常ヒト脳でのデータ収集・解析が大筋で終了したところでサルでは過去の知見に良く一致した結果、ヒトとサルの相違が定量的に評価でき進化的側面から重要な知見が得られた。

また線条体一部の核（側座核殻部）の線維連絡性に基づいた分離法が発案でき、今後疾病患者での病態変化同定に使用できると考えられる。側座核は細胞構築からは他の線条体との境界線引きが困難であるがCalbindin D28Kの染色性が大きく異なることで知られる核である。我々は前頭葉を腹側内側部（眼窩前頭皮質および前帯状回を含む部位）その相補的な部位である外側前頭葉皮質（運動野・前運動野・前頭前野を含む）との線維連絡性を評価することでヒト・サルともに側座核の殻部によく一致した部位・形状の線条体内分画を同定することができた。線条体殻部は特に、統合失調症、薬物依存症、病的賭

博、パーキンソン病の一部の病態に関わっていると想定されており、本結果は同部位の線維連絡性の検討がこれら病態の解明や診断につながることを示唆する。

MRIによる拡散強調画像法の技術はこれら応用研究を行う過程で成熟した。拡散強調画像法の多くは撮像装置メーカーから供給されないため、独自に撮像シーケンスを開発、作成した。ヒト脳用シーケンスは従来プログラミングの修正により、サル用はmulti-shot法を組み合わせる技術により、ラット用にはスピネコー法による拡散強調画像撮像法を独自に開発し磁場不均一性に由来する歪みが最小限に抑えられたSN比の高い画像を収集することができるようになった。MRI拡散強調画像の動物実験環境を整えることで動物・ヒトに渡った同じMRI検査法が行える状況が整い、画像法の妥当性検証からヒトの病態脳での評価まで平行して進められる状況が整った。

2) 線条体—前頭葉機能の解明のための研究（経頭蓋磁気刺激と非侵襲的画像装置と認知機能評価）はすでにモントリオール神経研究所においてデータ収集を開始したところで現在まで約1/2のデータを取り終えている。予備的検討では仮説に則った結果が観察されており今後継続したデータ収集が重要である。

PETによる撮像ドーパミン機能定量化についてはシミュレーションによる検査プロトコルの確立が済んだ状況である。17年度末に新たに導入した動物専用の高解像度PET装置(microPET)を用いて動物実験を主体とした基礎データ収集を18年度から開始する予定である。予備的に行った検討では1撮像内2回投与によって線条体の放射能動態評価に耐えるデータが得られ今後の解析結果が期待される状況である。

3) まだMRI、PETによる画像評価法が確立しておらず病態脳での評価は未だ行えないが、国立循環器病センター病院、国立精神神経センター武蔵病院と協力し疾病患者の選択とデータ収集の環境整備を行っている状況である。また再生治療による線条体疾患の治療法開発においては現在MPTP処置パーキンソン病モデルサルを作成中、またより効率的なサル骨髄間質細胞由来若しくはES細胞由来ドーパミン細胞の分化・培養を試みている段階である。18年度から実際にモデル動物における移植術および評価が可能になると考えている。

#### D. 考察

MRIによる線維連絡性の評価は現在の所、未だ正常サル・ヒトでの線条体—大脳皮質間の連絡性の評価が可能になった段階であるが、この評価だけでも幾

つかの病態の解明を深めることができる可能性があり今後病態脳での評価や診断能の評価が重要である。今後、線条体からの出力路の同定と観察、他の皮質下皮質（視床・扁桃核・視床下核など）との連絡路の同定の可能性の評価も重要である。

経頭蓋磁気刺激法と脳画像装置を組み合わせた研究においても成果が期待される。同時にモントリオール神経研究所との共同研究によって最新の画像解析法、磁気刺激法についての研究交流を行うことができたのも重要な成果である。

PETによる機能評価についてはまだ基礎的データ収集の段階であるが十分評価に耐えるデータが収集できており、今後さらなる放射能標識薬剤の調製法の確立、データ収集法・解析法の最適化が必要である。

#### E. 結論

新しい画像評価法（定量的MRI線維連絡性評価、1撮像PET受容体評価法）による病態解明、診断法開発の基盤が整ってきた。今後病態脳での応用性・妥当性や動物実験による更なる基礎データ収集が重要である。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

銭谷勉, 渡部浩司, 工藤博幸, 飯田秀博. 完全データを利用したピンホールSPECT. *Med Imag Tech* 23: 9-16, 2005

猪股亨, 飯田秀博, 久富信之, 藤原守, 三浦岩. PET用<sup>15</sup>O製造のための小型サイクロロン開発計画. *原子核研究* 49:89-94, 2005

林拓也, 大西隆, 石田康, 宇川義一, 飯田秀博. 経頭蓋磁気刺激効果のPETによる研究. *神経内科*, 62: 5-10, 2005

市原隆, 飯田秀博. 3D PETの理論と実践. In: 3D PETの理論と実践 (B B, WT D, eds): 東京メディカルシステムズ, 2005

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, Sumemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* 115:102-109,

2005

Kudomi N, Hayashi T, Teramoto N, Watabe H, Kawachi N, Ohta Y, Kim KM, Iida H. Rapid quantitative measurement of CMRO<sub>2</sub> and CBF by dual administration of <sup>15</sup>O-labeled oxygen and water during a single PET scan—a validation study and error analysis in anesthetized monkeys. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1209-1224, 2005

Ogawa M, Watabe H, Teramoto N, Miyake Y, Hayashi T, Iida H, Murata T, Magata Y. Understanding of cerebral energy metabolism by dynamic living brain slice imaging system with [<sup>18</sup>F]FDG. *Neurosci Res* 52:357-361, 2005

Watabe H, Jino H, Kawachi N, Teramoto N, Hayashi T, Ohta Y, Iida H. Parametric imaging of myocardial blood flow with <sup>15</sup>O-water and PET using the basis function method. *J Nucl Med* 46:1219-1224, 2005

Suzuki A, Tashiro M, Kimura Y, Mochizuki H, Ishii K, Watabe H, Yanai K, Ishiwata K, Ishii K. Use of reference tissue models for quantification of histamine H<sub>1</sub> receptors in human brain by using positron emission tomography and [<sup>11</sup>C]doxepin. *Ann Nucl Med*, 19 (6): 425-433, 2005.

Shidahara M, Watabe H, Kim KM, Kato T, Kawatsu S, Kato R, Yoshimura K, Iida H, Ito K. Development of a practical image-based scatter correction method for brain perfusion SPECT: comparison with the TEW method. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 32 (10): 1193-1198, 2005.

Ohnishi T, Hashimoto R, Mori T, Nemoto K, Moriguchi Y, Iida H, Noguchi H, Nakabayashi T, Hori H, Ohmori M, Tsukue R, Anami K, Hirabayashi N, Harada S, Arima K, Saitoh O, Kunugi H. The association between the Val58Met polymorphism of the catechol-O-methyl transferase gene and morphological abnormalities of the brain in chronic schizophrenia. *Brain*, 2005

Fujita M, Ichise M, Zoghbi S S, Liow J. S, Ghose S, Vines D C, Sangare J, Lu J Q, Cropley V L, Iida H, Kim KM, Cohen R M, Bara-Jimenez W, Ravin A B, Innis R B. Widespread decrease of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson's disease. *Ann Neurol*(in press)

Ohnishi T, Hashimoto R, Mori T, Nemoto K, Moriguchi Y, Iida H, Yamada M, Noguchi H, Nakabayashi T, Hori H, Ohmori M, Tsukue R, Anami K, Hirabayashi N, Harada S, Arima K, Saitoh O, Kunugi H. The association between the Val158Met polymorphism of the Catechol-O-methyl transferase gene and morphological abnormalities of the brain in chronic schizophrenia. *Brain* (in press).

Nemoto K, Ohnishi T, Mori T, Moriguchi Y, Hashimoto R, Asada T, Kunugi H. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene affects age-related brain morphology. *Neurosci Lett* (in press)

Hiroki M, Kajimura N, Uema T, Ogawa K, Nishikawa M, Kato M, Watanabe T, Nakajima T, Takano H, Imabayashi E, Ohnishi T, Takayama Y, Matsuda H, Uchiyama M, Okawa M, Takahashi K, Fukuyama H. Effect of Benzodiazepine Hypnotic Triazolam on the Relationship of Blood Pressure and Paco<sub>2</sub> to Cerebral Blood Flow during Human Non Rapid Eye Movement Sleep. *J Neurophysiol*. 2005 Oct 26; [Epub ahead of print]

Hirao K, Ohnishi T, Hirata Y, Yamashita F, Mori T, Moriguchi Y, Matsuda H, Nemoto K, Imabayashi E, Yamada M, Iwamoto T, Arima K, Asada T. The prediction of rapid conversion to Alzheimer's disease in mild cognitive impairment using regional cerebral blood flow SPECT. *Neuroimage*. 2005 Aug 26; [Epub ahead of print]

Sakai Y, Kumano H, Nishikawa M, Sakano Y, Kaiya H, Imabayashi E, Ohnishi T, Matsuda H, Yasuda A, Sato A, Diksic M, Kuboki T. Cerebral glucose metabolism associated with a fear network in panic disorder. *Neuroreport*. 2005;16(9):927-31..

Hirata Y, Matsuda H, Nemoto K, Ohnishi T, Hirao K, Yamashita F, Asada T, Iwabuchi S, Samejima H. Voxel-based morphometry to discriminate early Alzheimer's disease from controls. *Neurosci Lett*. 2005 Jul 15;382(3):269-74.

Moriguchi Y, Ohnishi T, Kawachi T, Mori T, Hirakata M, Yamada M, Matsuda H, Komaki G. Specific brain activation in Japanese and Caucasian people to fearful faces. *Neuroreport*. 2005 Feb 8;16(2):133-6.

Hiroki M, Uema T, Kajimura N, Ogawa K, Nishikawa M, Kato M, Watanabe T, Nakajima T, Takano H, Imabayashi E, Ohnishi T, Takayama Y, Matsuda H, Uchiyama M, Okawa M, Takahashi K, Fukuyama H. Cerebral white matter blood flow is constant during human non-rapid eye movement sleep: a positron emission tomographic study. *J Appl Physiol*. 2005 May;98(5):1846-54.

学会発表 (国内)

林 拓也ほか、MRI拡散強調画像・定量的線維連絡性解析による線条体路分節化の試み、第20回大脳基底核研究会、蒲郡 2005年7月9日-10日

圓見純一郎、佐藤博司、山本明秀、飯田秀博 拡散テンソル画像によるfiber tractographyの精度評価法の検討 ラットを用いたマンガン増強MRI法との比較 日本分子イメージング学会 京都 2006年

大西隆 磁気刺激と神経画像を用いた計測：PET,fMRIとの同時刺激計測について:シンポジウム 磁気刺激の新しい展開 第35回日本臨床神経生理学会学術大会、福岡、11.31, 2005.

大西隆 自閉症スペクトラムの神経画像：シンポジウム：第28回日本神経科学学会年会、横浜、7.26-28 (28), 2005.

大西隆 自閉症スペクトラムの神経画像:シンポジウム 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会、大阪、7.6-8(6), 2005.

橋本亮太、野口広子、志津野朋子、岡田景子、中林哲夫、堀弘明、大西隆、根本清貴、森健之、馬場敦、工藤耕太郎、大森まゆ、高橋晶、津久江亮太郎、穴見公隆、平林直次、原田誠一、有馬邦正、斉藤治、功刀浩 COMT (カテコールアミンメチルトランスフェラーゼ) Val/Met多型と認知機能・性格傾向との関連 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会、大阪、7.6-8(7), 2005.

橋本亮太、志津野朋子、野口広子、岡田景子、大西隆、根本清貴、森健之、田谷真一郎、貝淵弘三、功刀浩 Rho GTPase-activating protein であるChimerin 2遺伝子のH204Rミスセンス多型は見当識と関連する 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会、大阪、7.6-8(7), 2005.

大西隆、橋本亮太、根本清貴、森健之、野口広子、志津野朋子、岡田景子、中林哲夫、堀弘明、馬場敦、工藤耕太郎、大森まゆ、高橋晶、津久江亮太郎、穴見公隆、平林直次、原田誠一、有馬邦正、斉藤治、功刀浩 COMT (カテコールアミンメチルトランスフェラーゼ) Val/Met多型は統合失調症での脳形態異常に関与する 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会、大阪、7.6-8(6), 2005.

根本清貴、大西隆、橋本亮太、森健之、守口善也、志津野朋子、岡田景子、朝田隆、功刀浩 BDNF遺伝子の一塩基多型Val66Metが脳構造および加齢に及ぼす影響 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会、大阪、7.6-8(6), 2005.

森健之、大西隆、根本清貴、橋本亮太、野口広子、志津野朋子、岡田景子、中林哲夫、堀弘明、馬場敦、工藤耕太郎、大森まゆ、高橋晶、津久江亮太郎、穴見公隆、平林直次、原田誠一、有馬邦正、斉藤治、功刀浩、松田博史 統合失調症における進行性の白質変化～拡散テンソル画像による検討 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会、大阪、7.6-8(7), 2005.

学会発表(国外)

Hayashi T et al. Intra-striatal representation of cortical connections in primates. 12<sup>th</sup> Annual Meeting of Human Brain Mapping 2006, Florence Italy, June 11-15, 2006

Piao R, Hayashi T et al. Intra-callosal representation of inter-hemispheric connections in primates. 12<sup>th</sup> Annual Meeting of Human Brain Mapping 2006, Florence Italy, June 11-15, 2006

Watabe H, et al. A novel reference tissue approach for multiple injections of [C-11]Raclopride. International Conference Neuroreceptor Mapping Copenhagen, July 2006

Ohnishi T, Hashimoto R, Mori T, Nemoto K, Moriguchi Y, Noguchi H, Nakabayashi T, Hori H, Ohmori M, Tsukue R, Anami K, Hirabayashi N, Harada S, Arima K, Saito O, Kunugi H. The Association between the Val158Met Polymorphism of the Catechol-O-Methyl Transferase Gene and Morphological Abnormalities of the Brain in Chronic Schizophrenia, 20th meeting of Korean Society of Biological Psychiatry, Seoul, Korea, September 29-30(30), 2005.

Nemoto K, Ohnishi T, Hashimoto R, Mori T, Moriguchi Y, Shizuno T, Okada K, Asada T, Kunugi H. The Val66Met Polymorphism of the BDNF Gene Affects Brain Morphology and Aging, 20th meeting of Korean Society of Biological Psychiatry, Seoul, Korea, September 29-30(30), 2005.

Mori T, Ohnishi T, Nemoto K, Hashimoto R, Saitoh O, Matsuda H, Kunugi H.

Age-Dependent White Matter Integrity Disruption in Schizophrenia Revealed by Diffusion Tensor Imaging, 20th meeting of Korean Society of Biological Psychiatry, Seoul, Korea, September 29-30(30), 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書  
定量的神経画像による線条体疾患の病態解明と治療法開発に関する研究  
－ヒト・動物・疾患脳での応用研究－  
分担研究者  
林 拓也、大西隆  
国立循環器病センター研究所

研究要旨：本研究の目的は、非侵襲的画像撮像・解析法により線条体内の構造分離と機能局在を解明し線条体疾患の病態や治療有効性を定量的に評価する方法を確立することで難治性精神・神経疾患の医療に貢献することである。本分担研究は画像解析技術を実際にサル脳・ヒト脳に応用することでその妥当性・精度の検証と病態・診断への応用方法につき検討することである。

目的：

脳は神経細胞のもつ神経線維や神経突起が構成する神経回路により情報を伝達・処理する。ある神経回路は一つの情報を低次から高次に情報の集約化・抽象化、もしくはその逆の高次から低次レベルへ情報を分散・具体化する。脳を神経回路網・連絡性を解明することで脳疾患の病態を深く理解することができると考えられる。しかし未だこうした方法に確立したものはなくサルなどの動物実験によって得られた知見からヒト脳の状態を推定せざるを得なかった。本分担研究は非侵襲的なMRI拡散強調画像法や新しいPET撮像法を応用することで、皮質・線条体線維連絡性の解明や線条体機能評価による病態解明・診断法開発を目的とする。

方法：

線維連絡性の評価に拡散強調画像法を用いた。MRI画像装置には高磁場(3Tesla)装置を用いた。装置メーカーから供給される通常の撮像シーケンスでは十分な情報量のデータが収集できないため独自に撮像シーケンスを開発、作成した。一部のサルにおいて拡散強調画像により評価した線維連絡性がどれほど特異的なのかも検証した。このために同一サルで、神経線維トレーサーとして用いられる重金属のマンガン(Mn)を脳内に注入しその後のMnの動態をT1強調MRIにより追跡する方法(Saleem et al, Neuron 2002)と比較した。

線条体は、一般的な染色法による組織学的評価では細胞構築は比較的均一で、肉眼的な形状からの部位同定(尾状核、被殻など)でしか線条体内の分画を線引きする方法はなかった。これはMRI, PET等の画像を用いても同様で一般にMRIで観察されるT1, T2値やPETによる受容体・血流・代謝トレーサーの評価においても線条体内は比較的均一である。近年、特殊な免疫組織化学的染色によって線条体が場所によってかなり変化に富む性質をもっていることが明らかにされてきた。それらのうちよく知られ

たものがCalbindin D28Kである。この蛋白は神経細胞のカルシウム(Ca)濃度安定化に重要で神経細胞変性にも関わる因子として知られているが本蛋白に対する免疫組織学的性質が線条体内の一分画(側座核の殻部)で明瞭に異なることが示され(Meredith et al. J Comp Neurol, 1996)、その後の検討でこの分画が大脳皮質との線維連絡性においても他と異なるパターンをとっていることが確認された。我々はこれらの知見に基づいて大脳皮質の線維連絡性によって側座核の殻部が同定できないか検証した。

結果：

MRI拡散強調画像法を用いた大脳皮質と線条体の線維連絡性はサル、ヒト脳で非常に良く対応した結果が得られた(図1)。従来古典的トレーサーによる手法によって明らかにされてきた大脳皮質－線条体線維連絡性のパターン、すなわち、大脳皮質から最も近い線条体内の場所に投射する(closest rule, Kemp & Powell, Brain 1970)と遠隔にある大脳皮質が線条体内で近い場所に縦列に配置し投射する(longitudinal pattern, Selemon & Goldman-Rakic, J Neurosci 1987)が想定されてきたが、拡散強調画像によっても、それぞれのパターンが、被殻と尾状核で再現されることを確認した。

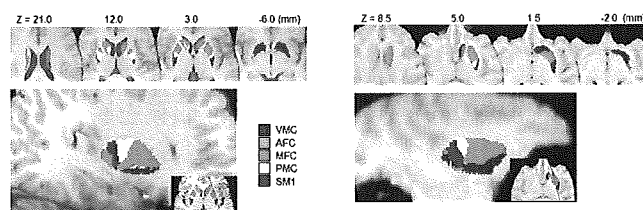


図1. 被殻における前頭葉線維連絡性の配置。大脳皮質から最も近い線条体の場所に投射路が配置していることがサル・ヒトで共通して認められた。VMC: 帯状回・眼窩前頭皮質、AFC: 前頭極、MFC: 背側前頭前野、PMC: 前運動野、SM1: 一次感覚運動野

しかもこうしたパターンはサル脳、ヒト脳ともに共通のパターンを示し、霊長類動物内での線維連絡性の相同性が確認できた。一方で線維連絡性を定量的に評価することでヒトの線条体がサルに比して（相対的に）非常に多くの前頭前野からの投射を受けていることを確認した。

拡散強調画像とMn神経追跡法との比較の結果、サルにおける大脳皮質と線条体・視床との連絡性が、両方で良く一致した部位で確認できた。

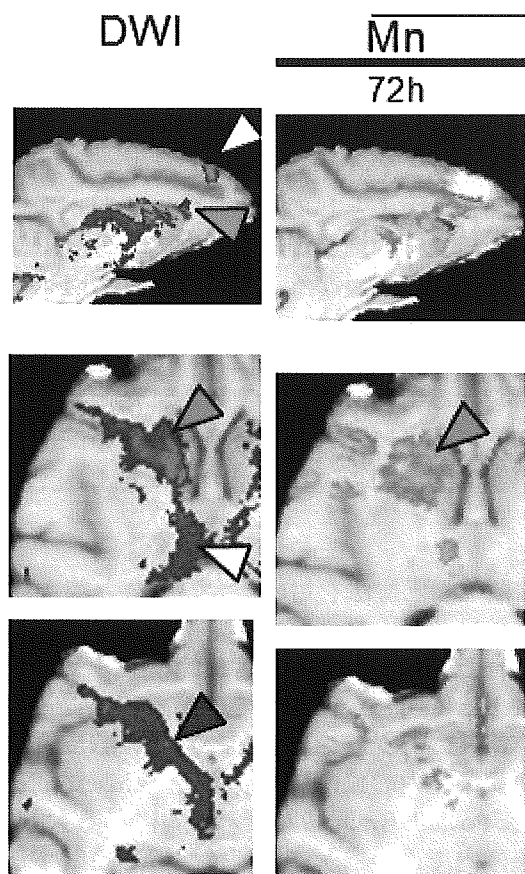


図3. MRI拡散強調画像による上前頭内側皮質の線維連絡性評価(左)とマンガン(Mn)による神経線維追跡法による線維連絡性(右)。上前頭内側皮質の種の部分(上段白矢頭)、尾状核頭部(中段、青矢頭)、視床背内側部(中段黄矢頭)、淡蒼球(下段赤矢頭)において両方で線維連絡性が評価できた。

側座核の同定に関しては、前頭葉を腹側内側部（眼窩前頭皮質および前帯状回を含む部位）その相補的な部位である外側前頭葉皮質（運動野・前運動野・前頭前野を含む）との線維連絡性を評価することでヒト・サルともに側座核の殻部によく一致した部位・形状の線条体内分画を同定することができた（図3）。線条体殻部は特に、統合失調症、薬物依存症、病的賭博、パーキンソン病の一部の病態に関わっていると想定されており、本結果は同部位の線維連絡性の検討によってこれら病態の解明や診断につ

ながることを示唆する。

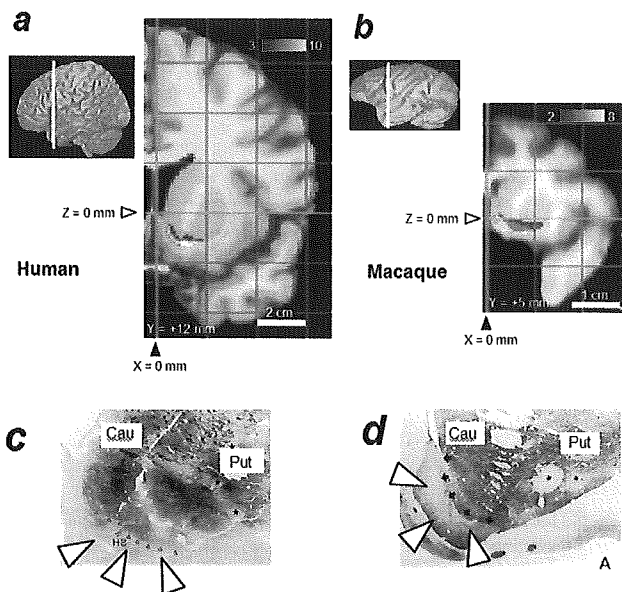


図3. 前頭葉内の帯状回・眼窩前頭皮質とそれいがないの背側前頭葉部分との線維連絡性によって区分した線条体(上段、左:ヒト、右:サル)。相対的に帯状回・眼窩前頭皮質と線維連絡性が高い部位は個体を越えて再現性をもって線条体腹内側部に分布した。これはCalbindin D28Kの免疫染色(下段、左:ヒト、右:サル)による側座核の殻部に一致する部位に相当すると考えられた。

#### 考察:

サル脳とヒト脳の結果は、方法論の検証が未だ必要ではあるが、これら結果は霊長類の大脳皮質・線条体連絡性の進化的側面を強調する重要な知見である。また新しい線維連絡性の評価法によって従来になかった画像診断、病態診断に直結した情報を得られる可能性も示唆された。

まだデータ収集法や解析方法に条件の最適化を行う必要があるが、これらの結果は拡散強調画像線維連絡性評価法の妥当性を十分示唆するもので今後さらに詳細な検討が必要である。

#### 学会発表

林 拓也ほか、MRI拡散強調画像・定量的線維連絡性解析による線条体路分節化の試み、第20回大脳基底核研究会、蒲郡 2005年7月9日-10日

Hayashi T et al. Intra-striatal representation of cortical connections in primates. 12<sup>th</sup> Annual Meeting of Human Brain Mapping 2006, Florence Italy, June 11-15, 2006

Piao R, Hayashi T et al. Intra-callosal representation of

inter-hemispheric connections in primates. 12<sup>th</sup> Annual  
Meeting of Human Brain Mapping 2006, Florence Italy,

June 11-15, 2006

(資料)

**Title:**

Intra-striatal Representation of Cortical Connections in Human and Macaque

**Authors:**

Takuya Hayashi, M.D., Ph.D.<sup>1,2</sup>; Hiroshi Sato, Ph.D.<sup>1</sup>; Shinichi Urayama, M.S.<sup>3</sup>; Takashi Hanakawa, M.D., Ph.D.<sup>3</sup>; Hiroshi Watabe, Ph.D.<sup>1</sup>; Babak A. Ardekani, Ph.D.<sup>4</sup>; Noboru Teramoto, B.S.<sup>1</sup>; Hidenao Fukuyama, M.D., Ph.D.<sup>3</sup>; Hidehiro Iida, Ph.D.<sup>1</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

<sup>2</sup>McConnell Brain Imaging Centre, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

<sup>3</sup>Department of Functional Brain Imaging, Human Brain Research Center, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

<sup>4</sup>Center for Advanced Brain Imaging, Nathan Kline Institute for Psychiatric Research, NY, USA

**Corresponding author:**

Takuya Hayashi, M.D., Ph.D.

McConnell Brain Imaging Centre,

Montreal Neurological Institute,

McGill University

3801 University Street, Montreal, Quebec, Canada H3A2B4

E-mail: [thayashi@ri.ncvc.go.jp](mailto:thayashi@ri.ncvc.go.jp)

## Summary

Basal ganglia work in concert with the cortex to orchestrate cognitive functions, emotional behaviors, and movements<sup>1</sup>. The striatum, an input station in the basal ganglia, receives information mainly from the cerebral cortex via cortico-striatal connections<sup>2</sup>, and striatal dysfunctions are closely related to psychiatric and movement disorders. However, knowledge of cortico-striatal connectivity has been collected exclusively in macaque by axonal tracing methods<sup>3-13</sup>. Here, we show connectivity patterns between cortex and striatum both in human and macaque using the non-invasive method of diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DWI). DWI-based striatal connectivity of Brodmann's area 9 yielded similar results as tracer (MnCl<sub>2</sub>) tractography in the macaque. In both species, evaluation of the striatal connectivity of ventro-mesial frontal cortex allowed us to isolate a region of the ventral striatum which corresponds to the 'shell' region. By investigating global cortical connectivity, we confirmed the species homology in topography of cortical connections, but found that the human striatum had intensive connectivity to the dorsal frontal cortex as compared to macaque, suggesting a capacity of human striatum to process a large volume of prefrontal information. This study provides insights into evolution of the prefronto-striatal network in primates.

## Main Text

The functional properties of a brain region are determined by its connectivity pattern<sup>14</sup>. The striatum, located deep in the brain, consists of neurons with a relatively homogenous cytoarchitectonics and has been classified into territories linked to specific functions, based on the connectivity pattern<sup>15-17</sup>. The cortical projection to the striatum has been intensively studied in macaque by techniques that trace axons which have degenerated after destruction of cortical neurons<sup>3</sup>, or have been labeled by antero- or retro-grade tracers pre-injected into the cortex or striatum<sup>4, 5, 7-13</sup>.

The axonal tracing studies in macaque have suggested two apparently conflicting patterns of cortico-striatal connectivity. One connectivity pattern is a ‘proximity rule’, in which cortical inputs topographically terminate in the nearest region of the striatum<sup>3, 5, 7, 12, 17</sup>, while the other is ‘overlapping’, in which different cortical territories projects to the similar region of the striatum<sup>4, 5, 9</sup>. Interests in the ‘overlapping’ pattern<sup>17, 18</sup> was focused on because the rostro-dorsal striatum (caudate and rostro-dorsal part of the putamen) received longitudinally-arranged projections from different association cortices (i.e. prefrontal, parietal, temporal association cortices) in tracer studies<sup>4, 5</sup>. Thus, this area is termed the ‘associative’ striatum, while the rostro-ventral region is the ‘limbic’; and the caudal region is the ‘somatosensory’, all based on the specific cortical connectivities<sup>16</sup>.

In human, a few studies have examined cortico-striatal connectivity by *post-mortem* histology<sup>19</sup>. A recent study using diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DWI) evaluated fronto-striatal fibers and found a similar organization to that in macaque tracing studies<sup>20</sup>. However, the sensitivity of DWI relative to axonal tracing is not known, and the species homology can only be addressed by using the same method of observation in human and macaque.

We probed the pattern of cortico-striatal connectivity using DWI for both human and macaque. The DWI data in the macaque was obtained using an echo planner imaging (EPI) sequence with sub-millimeter spatial resolution (0.89 mm) and high angular resolution (55 directions) of diffusion sensitizing gradients to probe diffusion motion (MPG). Despite the inherent vulnerability of EPI images to susceptibility-related distortions, our protocol successfully generated images free from significant distortion (Figure 1a), and diffusion anisotropy calculated from DWI data took higher values in regions corresponding to the white matter in histological section (Supplementary Figure S1).

A probabilistic algorithm was applied to the DWI data in order to express connectivity as a confidence of the streamline<sup>21, 22</sup> built upon the statistical probability distribution of the principal eigenvector of the diffusion tensor<sup>23</sup>. Note that connectivity refers here not to the packing density of neuronal fibers, but to the probability on the location of the true tract. Fiber density, the degree of myelination, or the diameter of fibers, cannot be distinguished by the current technique.

We investigated whether this technique yields similar results to the tracer methods for determining cortico-striatal connections. In one animal, we tracked the DWI connectivity seeding from 27 voxels (5.83  $\mu$ L) in the left superior medial frontal cortex (a part of prefrontal cortex, corresponding to Brodmann’s area 9, BA9), and subsequently, injected into the same site the MRI-visible tracer manganese chloride ( $MnCl_2$ ), which traces neuronal fiber connections trans-synaptically<sup>13</sup>. The MRI signal was followed for 7 days (168 h) post injection.

We found significant signal enhancement by manganese in several regions over different time scales (Figure 2a). The rostral striatum (caudate head), known to receive projections from BA9<sup>5</sup>, showed a gradual increase in normalized MRI signals, up to 13% at 72 h post injection, and then declined (Figure 2b, Supplementary Figures S3). Importantly, by expressing the probability of the DWI connection as a relative value scaled by the total connectivity to the whole cerebral cortex, we found a close co-localization of Mn and DWI connectivity in the pallidum, substantia nigra, thalamus, white matter (corpus callosum) (Figure 2a), and the rostral striatum (Figure 2b). In striatum, the highest connectivity seeded from BA9 was located at X, Y, Z = -11, 6, 3.5mm (in AC-PC space), close to the highest Mn enhancement (Figure 2b, Supplementary Table S1). The intra-striatal location of the BA9 connectivity was largely the same whether the striatum or BA9 was used as the seed (starting point of tracking)<sup>24</sup> (Supplementary Table S1).

We then acquired DWI data from 10 hemispheres of 5 healthy human subjects at a spatial resolution of 2 mm using 81 angles of MPG fields. The calculated FA displayed an image quality and spatial resolution relative to brain size (Figure 1b), and quantitative values (Supplementary Figure S2), which were very close to the macaque images. We probed the striatal connectivity of the human BA9 by using a seed of the left striatum and two targets of the population-based BA9 (left side)<sup>25</sup> and the rest of cerebral cortex (the cerebral cortex of left hemisphere except the BA9). We found that the highest connectivity passing through BA9 was located in the rostral striatum (putamen) at a more caudal location than in the macaque (coordinates of X, Y, Z = -23, 4, 11 mm). The relative locations in the putamen along an anterior-posterior axis were 0.45 and 0.24 (from the anterior end of the putamen) in the human and macaque, respectively (Figure 2b, c, Supplementary Table S1). This result led us to infer that the frontal cortex rostral to BA9 (corresponding to the majority of the ‘prefrontal’ cortex) sends projections in a wider area in the rostral human striatum than in macaque<sup>26</sup>.

We then probed the striatal connectivity of the ventro-mesial frontal cortex. Macaque tracing suggests that this area is tightly connected to the ‘shell’ division of nucleus accumbens<sup>1</sup>, the only area that is histochemically distinguished from the rest of the striatum in either species<sup>27</sup>. By estimating which of the two complementary frontal cortical targets (the ventro-mesial vs. the lateral-outer frontal cortices) had the greatest connectivity to the ventral striatum (VS), we could reproducibly isolate the ‘shell’ region from the rest of the VS in both species (Figure 3a), corresponding to the immunohistochemical pattern of calbindin D28K, a member of the calmodulin superfamily of calcium binding proteins<sup>27</sup> (Figure 3b).

These results suggest that the lateral-outer prefrontal cortex, but not the ventro-mesial cortex, projects more dominantly to the rostro-dorsal striatum in human than in macaque. This hypothesis was further tested by probing striatal connectivity for each of nine *a priori* subdivisions of the cerebral cortex (Figure 4a, Supplementary Methods). Importantly, using such complementary cortical targets, we are able to quantitate the probability of connection at each voxel in the striatum, analogous to the method by which we verified the correspondence to Mn-based connectivity.

By analyzing every cortico-striatal connection, we detected the species commonality in the intra-striatal topology of the cortico-striatal connectivity (Figure 4a and Supplementary Table S4). In both species, the putamen disclosed the

proximity rule in the location of the connectivity to frontal, occipital, temporal, and parietal sectors reproducing previous tracing studies (most of rostral part of putamen<sup>3,5,7,17</sup>, postero-inferior putamen<sup>3,6</sup>, rostral and infero-posterior striatum<sup>10</sup>, and dorsal and posterior striatum<sup>8</sup>, respectively) (see also, Supplementary Figure S4a). The caudate showed a longitudinal pattern<sup>5</sup> in the connectivity to ventro-mesial, prefrontal, and parietal areas (Supplementary Figure S4b) as suggested in tracing studies. The proximity pattern in human agrees with the fronto-striatal connectivity studied previously by DWI<sup>20</sup>.

However, looking at the quantitative connectivity pattern, we found significant differences between species in striatal connectivity ( $F(5.589)=16.946$ ,  $P<0.001$ ). The human striatum had a higher probability of connection to the dorsal frontal areas ( $P<0.01$ , AFC, MFC, PMC, and SM1 in Figure 4b) but fewer connections to the extra-frontal cortices ( $P<0.01$ , OCC, TEM, and INS in Figure 4b) than in macaque. This was also true when looking at the associative striatum (defined as the caudate body plus a part of the putamen and the caudate head rostral and dorsal to the AC). In human, the associative striatum had a higher connectivity to the prefrontal sectors than in macaque ( $F(1.862)=7.133$ ,  $P=0.004$  in repeated ANOVA,  $P<0.05$  in post-hoc comparison, Figure 4c, Supplementary Table S6).

These differences between species were explained neither by the difference in the relative size of the cortical sectors (Supplementary Table S2, 4 and 5), nor by a difference in the data acquisition (including resolution and number of direction of MPG) between species (Supplementary Methods, and Table S6). Considering that the white matter is macroscopically homogenous in the degree of myelination (including density and the diameter of myelin) in macaque (Supplementary Figure S1) and in human<sup>28</sup>, the differences in large-scale connectivity must arise from differences in the amount of axonal fibers.

The higher connectivity between human striatum and dorsal frontal cortex found in this study supports the current knowledge of the evolution of the primate frontal lobe. Human prefrontal white matter<sup>29</sup>, not cortex<sup>30</sup>, was most disproportionately enlarged compared to other primates, stressing the importance of the frontal interconnectivity in the human. Our results emphasize the increase in human striatal connections from the dorsal frontal rather than from the ventro-mesial cortex.

Our results indicate that the topological patterns are similarly represented in both species, but their quantities are distinct between the two species. This study provides an evolutionary insight into the connectivity pattern, and stresses the importance of the dorsal prefrontal cortex in cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loops in humans.



## Methods

*Magnetic Resonance Imaging:* In the macaque study, we collected diffusion-weighted data from 8 hemispheres from 4 monkeys (*Macaca mulatta*) weighing from 5.2 to 7 kg, after keeping animals under deep anesthesia (see Supplementary Methods). All procedures were approved by the National Cardiovascular Center Committee for Animal Welfare, and conformed to National Institutes of Health guidelines for the humane care and use of laboratory animals. Images were acquired with a 3-Tesla Signa Horizon Lx VH3 MRI scanner (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI, USA) that provides a maximum gradient strength of  $40 \text{ mT m}^{-1}$  rising in  $268 \mu\text{s}$  with a standard 280 mm diameter birdcage coil. DWI data were collected with a multi-shot spin-echo type EPI sequence (TR=2800 ms; TE=58.6 ms; number of shots=4; b-value= $1000 \text{ s/mm}^2$ ; matrix size= $192 \times 192$ ; field of view (FOV)=17 cm; interleaved gapless acquisition of 51 slices; slice thickness=0.9mm; averaged for 6 continuing repeated scans) applied with motion probing gradient (MPG) pulses in 55 evenly spaced angular directions. We also obtained six non-DWI images (b-value=0) before, during, and after DWI. The total time to acquire DWI and non-DWI images was 6 h 30 min. For structural reference, we also obtained high-resolution T1- and T2-weighted images.

In the human study, we collected MRI data from 10 hemispheres from 5 healthy subjects (4 male, 1, female, aged 27-38 years) who gave informed written consent approved by the Kyoto University Ethics Committee. Images were acquired with a 3-Tesla Trio MRI scanner (Siemens, Erlangen, Germany) that provides a maximum gradient strength of  $40 \text{ mT m}^{-1}$  at  $200 \mu\text{s}$ , and an eight-channel phased-array resonator with an inner diameter of 240 mm. We collected diffusion-weighted data by a twice-refocused single-shot spin echo EPI sequence (TR=7800ms; TE=79ms; FOV=192 mm; matrix size= $96 \times 96$ ; interleaved acquisition of 68 gapless slices; slice thickness=2.0mm; b-value= $700 \text{ s/mm}^2$ ; 81 evenly spaced angular directions of MPG). We also obtained 9 non-DWI (b-value=0) images intermittently during the diffusion-weighted sequence. The total time for the DWI protocol was 15 min. High-resolution T1- and T2-weighted images and a  $B_0$  field-map were also obtained for registration and correction of susceptibility-related distortions.

*Analysis of DWI data:* After correction for motion and distortion, we calculated from the DWI data, fractional anisotropy (FA) based on a model of diffusion tensor<sup>23</sup>, and estimated the probabilistic density function (*pdf*) of the principal eigenvector of the diffusion tensor<sup>21</sup>. Based on the *pdf*, the connection path sample was traced from the seed point and integrated at any voxel in the brain<sup>21</sup>. By setting another region of interest (target), we chose a part of samples passing through this region. When comparing Mn and DWI connectivity, we tested both directions of connectivity paths analysis (seeding from BA9 to a target in the striatum or seeding from the striatum to BA9) and also tested the connectivity of the complementary cortex other than BA9 (the rest of cortex). The rest of the tractography was performed with striatal voxels as seeds and multiple complementary cortical sectors as targets. Note here that by using the complementary cortical targets or seeds, we could express the probability of connection to any of targets (or from any of seeds) scaled by the total connectivity to targets (or from seeds) which is equivalent to the connectivity to (or from) the whole cerebral cortex.

The results of connectivity were analyzed in the anterior/posterior commissure (AC/PC) space in each species. For

statistics of the connectivity pattern, a repeated measures analysis of variance was performed with an inter-hemispheric factor (species), and intra-hemispheric dependent variables of connectivity pattern (probabilities of each striatal connection to the cortical target). Huynh-Feldt adjustments were applied when the assumption of sphericity was violated in Mauchly's sphericity test. When an interaction (species  $\times$  connectivity pattern) was significant, a post-hoc analysis was performed using Student's t-test to compare each connectivity between species. The two-tailed significance level was  $P < 0.05$ .

For data analysis, we used the Software Library (FSL, [www.fmrib.ox.ac.uk/~fsl/](http://www.fmrib.ox.ac.uk/~fsl/)) from the Oxford Center for Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain; PyBLD ([homepage2.nifty.com/peco/pybld/pybld.html](http://homepage2.nifty.com/peco/pybld/pybld.html)) built upon the Python environment; and SPSS (version 12.0).

*Histology:* The histology of white matter was assessed in one animal (case 1: mon0016) by staining with Luxol Fast Blue (LFB) which has a specific affinity to the lipoprotein and choline bases contained in myelin.

*Manganese Tractography in the Macaque:* After performing DWI-based tractography, we evaluated manganese (Mn) tractography in the same animal (case 2, mon1006). Fourteen days after the DWI imaging session, the animal was anesthetized and received a stereotaxic injection of 1.0  $\mu$ l of 0.8 M  $MnCl_2$  at the position corresponding to the seedmask in DWI, and repeated scans of T1-weighted MRI were conducted before, and at 24, 48, 72, 96, and 168 h after the injection.

## References:

1. Haber, S. N. & Gdowski, M. J. in *The Human Nervous System* (eds. Paxinos, G. & Mai, J. K.) 676-738 (Elsevier Academic Press, San Diego, 2004).
2. Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. B. & Bernardi, G. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci* **19**, 19-24 (1996).
3. Kemp, J. M. & Powell, T. P. The cortico-striate projection in the monkey. *Brain* **93**, 525-546 (1970).
4. Yeterian, E. H. & Van Hoesen, G. W. Cortico-striate projections in the rhesus monkey: the organization of certain cortico-caudate connections. *Brain Res* **139**, 43-63 (1978).
5. Selemon, L. D. & Goldman-Rakic, P. S. Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci* **5**, 776-794 (1985).
6. Saint-Cyr, J. A., Ungerleider, L. G. & Desimone, R. Organization of visual cortical inputs to the striatum and subsequent outputs to the pallido-nigral complex in the monkey. *J Comp Neurol* **298**, 129-156 (1990).
7. Yeterian, E. H. & Pandya, D. N. Prefrontostriatal connections in relation to cortical architectonic organization in rhesus monkeys. *J Comp Neurol* **312**, 43-67 (1991).
8. Yeterian, E. H. & Pandya, D. N. Striatal connections of the parietal association cortices in rhesus monkeys. *J Comp Neurol* **332**, 175-197 (1993).
9. Flaherty, A. W. & Graybiel, A. M. Two input systems for body representations in the primate striatal matrix: experimental evidence in the squirrel monkey. *J Neurosci* **13**, 1120-1137 (1993).
10. Yeterian, E. H. & Pandya, D. N. Corticostriatal connections of the superior temporal region in rhesus monkeys. *J Comp Neurol* **399**, 384-402 (1998).
11. Ferry, A. T., Ongur, D., An, X. & Price, J. L. Prefrontal cortical projections to the striatum in macaque monkeys: evidence for an organization related to prefrontal networks. *J Comp Neurol* **425**, 447-470 (2000).
12. Nambu, A., Kaneda, K., Tokuno, H. & Takada, M. Organization of corticostriatal motor inputs in monkey putamen. *J Neurophysiol* **88**, 1830-1842 (2002).
13. Saleem, K. S. et al. Magnetic resonance imaging of neuronal connections in the macaque monkey. *Neuron* **34**, 685-700 (2002).
14. Passingham, R. E., Stephan, K. E. & Kotter, R. The anatomical basis of functional localization in the cortex. *Nat Rev Neurosci* **3**, 606-616 (2002).
15. Alexander, G. E., DeLong, M. R. & Strick, P. L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* **9**, 357-381 (1986).
16. Parent, A. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci* **13**, 254-258 (1990).
17. Parent, A. & Hazrati, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* **20**, 91-127 (1995).

18. Percheron, G., Yelnik, J. & Francous, C. in *The Basal Ganglia: Structure and Function* (eds. McKenzie, J. S., Kemm, R. E. & Wilcock, L. N.) 87-105 (Plenum, London, 1984).
19. Wiesendanger, E., Clarke, S., Kraftsik, R. & Tardif, E. Topography of cortico-striatal connections in man: anatomical evidence for parallel organization. *Eur J Neurosci* **20**, 1915-1922 (2004).
20. Lehericy, S. et al. Diffusion tensor fiber tracking shows distinct corticostriatal circuits in humans. *Ann Neurol* **55**, 522-529 (2004).
21. Behrens, T. E. et al. Characterization and propagation of uncertainty in diffusion-weighted MR imaging. *Magn Reson Med* **50**, 1077-1088 (2003).
22. Behrens, T. E. et al. Non-invasive mapping of connections between human thalamus and cortex using diffusion imaging. *Nat Neurosci* **6**, 750-757 (2003).
23. Basser, P. J., Mattiello, J. & LeBihan, D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J* **66**, 259-267 (1994).
24. Theoretically, the same streamlines will be estimated even when the seed and target are exchanged, however this may not hold depending on the geometry of the streamline, the data acquisition or the tractographic analysis of the DWI images. The directionality of tractography (from seed to target) is only a mathematical process and has no relation to the axonal fiber directions (from neuronal cell body to axonal ending). The fiber directionality cannot be estimated by the current technique. We assume that human cortico-striatal connectivity is unidirectional as in the macaque.
25. Rajkowska, G. & Goldman-Rakic, P. S. Cytoarchitectonic definition of prefrontal areas in the normal human cortex: II. Variability in locations of areas 9 and 46 and relationship to the Talairach Coordinate System. *Cereb Cortex* **5**, 323-337 (1995).
26. Note here, however, that the homology of the intra-striatal location of the BA9 connectivity depends on the coordinates of the target we selected within BA9. Details of the diversities and similarities within BA9 should be addressed not only by the cytoarchitectonics but also by the connectivity patterns in the two species. For details, see Petrides, M. & Pandya, D.N. Dorsolateral prefrontal cortex: comparative cytoarchitectonic analysis in the human and the macaque brain and corticocortical connection patterns. *Eur J Neurosci* **11**, 1011-1036 (1999).
27. Meredith, G. E., Pattiselanno, A., Groenewegen, H. J. & Haber, S. N. Shell and core in monkey and human nucleus accumbens identified with antibodies to calbindin-D28k. *J Comp Neurol* **365**, 628-639 (1996).
28. Meier-Ruge, W., Ulrich, J., Bruhlmann, M. & Meier, E. Age-related white matter atrophy in the human brain. *Ann N Y Acad Sci* **673**, 260-269 (1992).
29. Schoenemann, P. T., Sheehan, M. J. & Glotzer, L. D. Prefrontal white matter volume is disproportionately larger in humans than in other primates. *Nat Neurosci* **8**, 242-252 (2005).
30. Semendeferi, K., Lu, A., Schenker, N. & Damasio, H. Humans and great apes share a large frontal cortex. *Nat Neurosci* **5**, 272-276 (2002).