

X線マイクロCT技術を用いた脳神経細胞の3次元再構築 3-dimensional reconstruction of nerve cells in the brain by X-ray micro-CT technology

水谷 治央^a、武田 佳彦^b、澤野 正和^a、百生 敦^a

Haruo Mizutani^a, Yoshihiko Takeda^b, Masakazu Sawano^a, Atsushi Momose^a

東京大学^a、筑波大学^b

University of Tokyo^a, University of Tsukuba^b

アブストラクト

脳の情報処理システム機構は未だ解明されていない部分が多い。その情報処理過程を明らかにするための基礎データとして、神経ネットワーク構造のような解剖学的知見が必要である。放射光を用いたX線CT技術を適用することで、神経回路網の形態的実体を解明することを目指す。タルボ干渉計X線顕微鏡にCTを組み合わせて、マウスの海馬CA1領域に存在する錐体神経細胞の3次元再構築に成功した。これは脳神経回路の立体地図を完成させるための礎となるかもしれない。

Abstract

Mechanism underlying information processing of the brain is little known. Anatomical structure of neural networks provides us fundamental data to elucidate it. We aim at resolving the main frame of neural circuits using x-ray CT technology by synchrotron radiation. X-ray micro-CT with Talbot interferometry revealed three-dimensional structure of hippocampal pyramidal neurons in the CA1 region of mice. This observation probably serve as a foundation for completing the stereo map of the neural network.

背景と研究目的： 認知・感情・思考・運動のような脳の高次機能は、大脳を中心とした神経回路により実現化している。そのため、その神経回路における情報処理システムの作動原理を記述することが、我々の高次脳機能の理解を深める。脳の各領域における情報処理過程は、その領域の解剖学的構造に規定されている。情報処理過程が不明な場合には、その領域の解剖学的構造を知ることで、情報処理過程に関する手がかりを得ることができ。中枢神経機能を高度に理解するためには、どのような神経回路活動が我々の行動を規定するのかを厳密に知る必要がある。その礎を築くため、神経ネットワーク構造の解剖学知見をナノスケールで解明し、3次元の広がり

を持った脳神経回路地図を手に入れることは、脳神経科学分野にブレイクスルーを生み出すための先決的な課題となる。

これまで、脳の立体地図を作成する手段として核磁気共鳴画像化法(MRI)を用いた3次元構築¹が行われている。しかし、MRIを利用した拡散テンソル画像では細胞体や神経線維の走行をナノスケールで観察することは不可能なため、細胞の全体像を可視化することはできない。また、共焦点顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて細胞を可視化する場合は、脳組織の一部を切片にして観察するため、広範囲な神経回路図を作成することは極めて難しい。これらの実験手法は画像分解能の高さと測定範囲の広さが両立しないため、脳の広い範囲に

おける詳細な神経回路網の可視化に至っていない。神経細胞体の位置、軸索や樹状突起の走行をできる限り全て識別し、究極的には、全脳の神経回路地図を精確に描写することが脳神経科学の発展を推し進める原動力となる。立体的な解剖学的地図から、神経回路のネットワーク結合パターン・神経線維の分岐パターンなどを抽出することで、脳内の情報処理メカニズムをより厳密に理解できるようになると予想される。

大型放射光施設におけるX線CT技術を用いた脳内画像測定法が、立体的でかつ広範囲な神経回路地図を手に入れる唯一の方法になるのではないかと考えている。我々がその地図を手に入れる日は、まだ遠い未来のことではあるが、その礎を構築することの意義は非常に大きい。

実験：マウスゲノム解読計画²において使用されたC57BL/6Jマウス的大脑を標本として用いた。4%パラホルムアルデヒドでマウスの全身を灌流固定後、脳を頭蓋骨から取り出し、一昼夜後固定した。位相及び吸収感度を増強するため、神経細胞にゴルジ染色³(Golgi-Cox法：染色液に水銀を含む)を施した。厚さ200 μm の脳矢状断及び冠状断スライスを作成し、リン酸緩衝液で満たされたセル内に入れて投影像を観察した。また、直径200 μm ・厚さ10 μm ・全長8mmのガラスキャピラリーに脳の組織を表面から垂直に挿入し、そのサンプルを回転させることで、CT画像を取得した。

大脳辺縁系の一部である海馬体を観測部位とし、特に、海馬CA1領域内の神経回路構造の可視化を試みた。試料をフレネルゾーン

プレートで検出器上に結像させる一般的なX線顕微鏡構成に加えて、検出器前段にX線タルボ干渉計⁴を配置した。顕微鏡としての倍率を19に設定し、位相及び吸収像の顕微観察を行った。また、スペckルの発生を低減するために、上流にディフューザーを配置した(技術的な詳細は、課題番号2006B1141を参照)。

結果および考察：タルボ干渉計を用いて観察した海馬CA1領域の錐体細胞位相像と、干渉計を用いないで観察した吸収像の投影写真をFig. 1に示す。ピクセルサイズは228nm、分解能は約800nmであった。神経細胞のエッジを検出する能力は位相コントラストの方が高い。細胞の内外を判別するのは吸収コントラストの方が容易である。

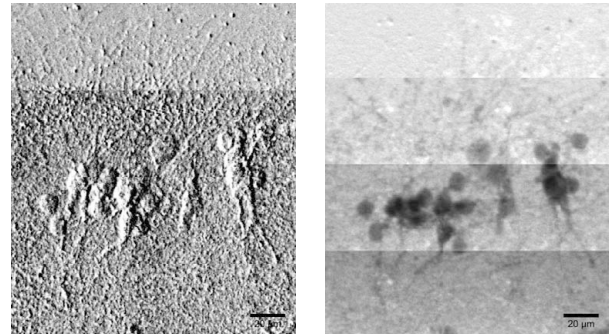


Fig. 1. Images of hippocampal pyramidal neurons in the CA1 region of mice with Talbot interferometry (left) and without it (right).

海馬錐体細胞のCTによる3次元再構築像(位相像と吸収像)をFig. 2に示す。スライス標本同様、細胞のエッジは位相コントラストで強調される。位相像では、細胞内外で強度に差異がなく、通常の画像処理ではそれを区別することができない。吸収像では、細胞内の同定が容易で、細胞を抜き出すことができる

が、その検出感度は位相像に劣る。

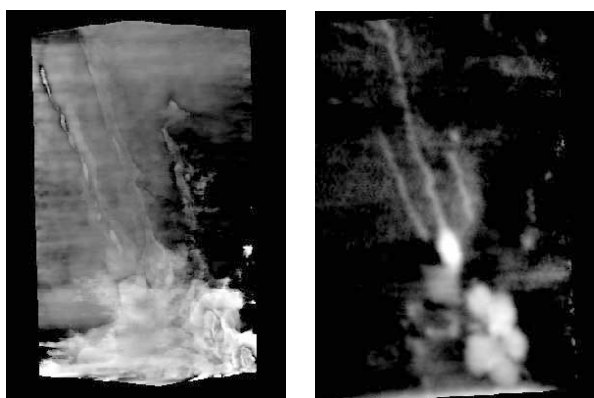


Fig. 2. Three-dimensional rendering views of the pyramidal neurons with Talbot interferometry (left) and without it (right).

組織の構造が保持されている脳スライス及びキャピラリー標本において、脳神経細胞の可視化に成功した。現段階では、タルボ干渉計 X 線顕微鏡による投影像は、光学顕微鏡の分解能にまで達していないが、細胞染色法の改良、光学系の進展により、感度もしくは分解能が上昇する見込みはある。今後、さらなる研究を積み重ねることで、分解能上昇のみならず、広視野化が実現する可能性もある。今回の実験で、脳神経回路立体地図の作成に向けて小さな第一歩を踏み出したと言えよう。

今後の課題：ゴルジ染色は神経細胞のみを選択的に染め上げることが可能であるが、全細胞の約 1/10 程度しか可視化できない。次回は、光酸化法などを用いて、全ての神経細胞を金などの重金属で染め上げる試みが必要である。また、CTの測定は長時間に及ぶため、試料乾燥やドリフトの危険性に曝されている。ムラのないマイクロ CT 画像を取得するためには、それらの予防策に細かく対応していかなければならない。さらに、神経細胞のエッジをス

キャンして、細胞像を3次元的に再構築するような画像解析法を適応し、細胞内と細胞外を区別する処理を施す必要がある。

謝辞

ビームライン BL20XU において技術的なサポートをして頂いた竹内晃久、鈴木芳生両氏 (JASRI) に深く感謝の意を表します。また、メディカルバイオ・トライアルユースをコーディネートしていただいた大東琢治、篠原邦夫両氏 (JASRI) に厚く御礼申し上げます。最後に本研究を全面的に理解・支援して頂いている東京大学 高木利久教授に心から感謝申し上げます。

参考文献

1. Yu, X., et al. In vivo auditory brain mapping in mice with Mn-enhanced MRI. *Nat. Neurosci.* **8**: 961-8. (2005).
2. Waterston, R. H., et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520-62. (2002).
3. Gibb, R. and Kolb, B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J. Neurosci. Methods* **79**: 1-4. (1998).
4. Momose, A., et al. Demonstration of X-Ray Talbot interferometry. *Jpn. J. Appl. Phys.* **42**: L866-L868. (2003).

キーワード

脳神経細胞、神経回路網、3次元再構築、タルボ干渉計、X 線マイクロ CT