

## 脳神経組織の三次元構造解析 Three-dimensional microstructure analysis of nerve tissue

水谷 隆太<sup>1</sup>、竹腰 進<sup>2</sup>、長村 義之<sup>2</sup>、竹内 晃久<sup>3</sup>、上杉 健太朗<sup>3</sup>、鈴木 芳生<sup>3</sup>

Ryuta Mizutani<sup>1</sup>, Susumu Takekoshi<sup>2</sup>, Yoshiyuki Osamura<sup>2</sup>, Akihisa Takeuchi<sup>3</sup>,

Kentaro Uesugi<sup>3</sup> & Yoshio Suzuki<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 東海大学工学部生命化学科、<sup>2</sup> 東海大学医学部病理診断学、<sup>3</sup> 高輝度光科学研究センター

<sup>1</sup>Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Tokai University School of Medicine;

<sup>3</sup>Research & Utilization Division, JASRI/SPRing-8

### アブストラクト

脳神経組織の微細構造を明らかにすることを目的として、X線マイクロCT解析を行った。得られた構造では、神経細胞の詳細な三次元像が観察できた。今回行った金属染色による神経細胞のマイクロCT解析は、様々な神経組織に適用可能であり、神経系の機能を司る構造的基盤を明らかにできる。脳神経組織において、神経細胞は三次元構造として神経ネットワークを形成しており、このような神経組織の構造解析を進めれば、脳機能のシミュレーションも可能になると考えられる。

### Abstract

An x-ray microtomographic analysis of nerve tissue is described. The obtained structure revealed the three-dimensional microarchitecture comprised of neural cells in the nerve tissue. This metal-staining microtomographic analysis can be applied to any nerve tissues, thereby shedding light on the underlying structural basis of neural functions. Neurons embedded in the brain constitute a neural circuit as a three-dimensional network. Therefore, analysis of the three-dimensional microstructure of the brain tissue could lead to simulation of human brain functions.

### 研究の背景：

細胞等の生体組織は、分子とは異なり不均一性を有しており、不均一なまま1つ1つの三次元構造を解析することが求められる。本研究では、マイクロCT法を中枢神経系組織に適用することにより、ニューロンレベルでの脳の三次元構造を解析することを目的とした。脳の三次元構造の解明は、すなわち脳の神経回路の解明であり、脳の機能メカニズムの解明につながる。

マイクロCT法により生体組織の三次元構造を解析するためには、十分なコントラ

ストのあるX線透過像を得ることが必須である。生体組織は軽元素からなっており、そのままではコントラストは微弱である。一方、光学顕微鏡による組織観察では、試料を様々な手法で染色することが一般的に行われている。マイクロCT法においても、X線観察に適した方法で染色して三次元構造を解析すれば、組織の着目すべき点、例えば神経系ではニューロンを観察することが可能になる。2006B期では、ショウジョウバエ脳神経節を金属染色することにより、神経細胞の三次元構造を明らかにできることを見出し、マイクロ造影

法 (microcontrasting) として報告している [参考文献 1、2]。本課題では、金属染色によりヒト脳組織の三次元構造を明らかにし、また、特異的染色剤等を用いることで、組織中の特定部位の可視化を行ったので、以下に報告する。

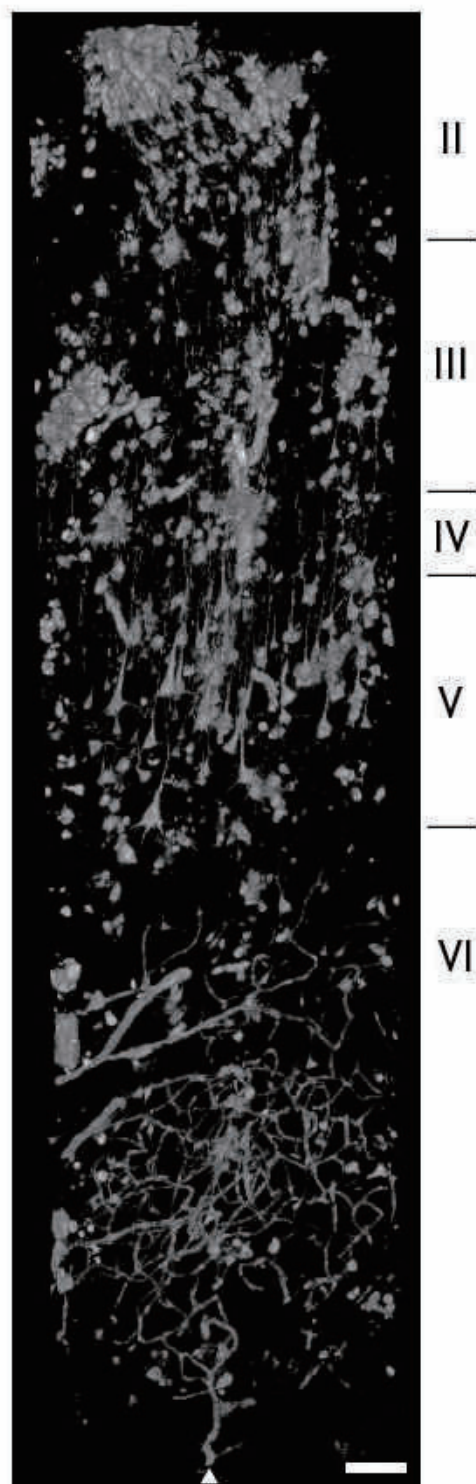
実験：

ヒト脳組織の三次元構造解析

病理解剖により摘出されたヒト大脳より、前頭葉皮質のブロック標本を作成し、ホルマリン固定の後、5~10mm 角程度に細切し、ゴルジ鍍銀法により金属染色した。ゴルジ法では、神経細胞とともに毛細血管も染色されることが知られている。得られた染色標本をエタノール等に慣らした後にエポキシ樹脂に浸漬し、ほう素珪酸ガラスキャピラリで円柱状に細切した。これをそのまま熱硬化させ、測定試料とした。なお、本研究は、医療機関において臨床研究に関する審査委員会の認可を得て、実施している。

測定は BL20XU 下流ハッチで行った。ゴルジ法ではクロム酸銀により染色されるが、その吸収端には関わりなく 12.0keV の単色X線を用いて、回転角 0.10 度ごとに 1800 枚の投影像を得た。測定視野が縦 0.65mm 横 1.00mm に限られ、試料全てが収まらないことから、キャピラリ軸方向に 550 $\mu\text{m}$  ずつ移動させながら 4 回に分けて測定を行った。移動距離を基にして、ピクセルサイズは 0.50 $\mu\text{m}$  と見積もられた。また、これら 4 回分の三次元構造のつなぎあわせは、プログラム Slice [3]を用いて行った。

得られた構造 (Fig.1) では、大脳新皮質に特徴的な層状構造が観察された。下部の白質層に見られる管腔状の構造は、標本の切断面から染色が進んだ毛細血管と思われるが、このような構造はこれまで観察されたことがな



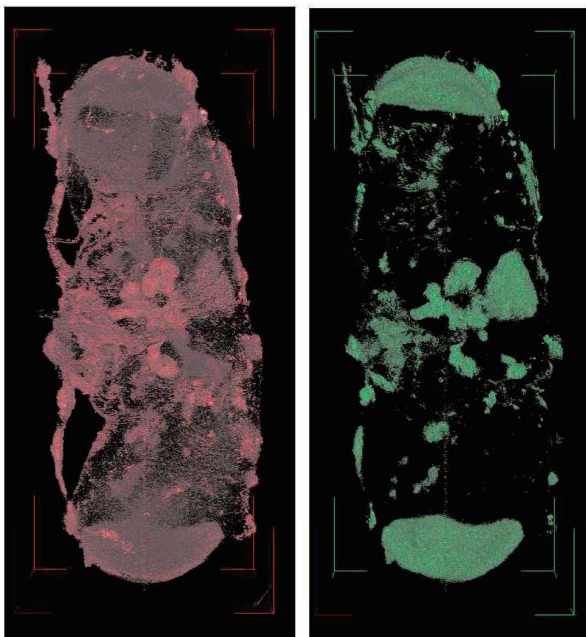
**Fig.1.** ヒト大脳皮質の三次元構造。外顆粒細胞層 (II)、外錐体細胞層 (III)、内顆粒細胞層 (IV)、内錐体細胞層 (V)、多形細胞層 (VI) が認められる。白質の管腔状の構造は、毛細血管と考えられる。スケールバーは 100 $\mu\text{m}$ 。

いため、組織学的な検討が必要と考えている。

## 特異的染色法による構造解析

中枢神経系において、糖鎖が軸索の伸長や損傷の修復に影響を及ぼしていることが明らかにされている。糖鎖等の機能分子を染色し、その三次元構造を解析すれば、いままでにない神経組織の形態形成メカニズムが明らかにできると考えられる。それぞれの機能分子ごとに、特異的に結合することがわかっている物質を金属化合物で標識化し、化学的あるいは免疫学的に染色すれば、特定の物質の三次元構造上での局在を明らかにできる。

そこでマンノースに特異的に結合することが報告されている金コロイド標識ホウ素化合物[参考文献 4]を用い、ショウジョウバエ成虫の脳神経節におけるマンノース構造の三次元局在を解析した (Fig.2)。



**Fig.2.** ショウジョウバエ脳神経節を金コロイド標識ホウ素化合物により染色した後、鍍銀法により白金染色した。左が Pt L<sub>III</sub> 吸収端、右が Au L<sub>III</sub> 吸収端の三次元差分像。いずれも線吸収係数  $29.6\text{cm}^{-1}$  以上に相当する部分を表示した。

得られた構造では、視葉と複眼をつなぐ部分の構造が、三次元構造として可視化でき、特異的染色法の有効性が示された。

まとめ :

今後、様々な染色像を元に神経回路を明らかにすることにより、脳機能の再現が可能になると思われる。また、工業製品で行われるリバースエンジニアリングを生体組織に置き換えて考えると、組織の構成技術が確立できれば、生体組織の三次元微細構造解析は臓器等の複製製作にもつながると期待される。

参考文献 :

1. Mizutani, R. *et al.* *Proceedings of the Fifth East Asian Biophysics Symposium*, S388 (2006).
2. Mizutani, R. *et al.* *J. Synchrotron Radiat.* **14**, 282-287 (2007).
3. Nakano, T. *et al.* "Slice" Softwares for basic 3-D analysis, <http://www-bl20.spring8.or.jp/slice/> (2006)
4. Kanayama, N. & Kitano, H. *Langmuir* **16**, 577-583 (2000).

論文発表 :

上記参考文献 1 および 2。

キーワード :

中枢神経系、脳、三次元構造、鍍銀法、マイクロ造影法、マイクロCT ; Central nervous system (CNS), brain, three-dimensional structure, metal impregnation, microcontrasting, computed microtomography.