

## X線マイクロCT技術を用いた大脳皮質神経回路網の3次元再構築 3-dimensional reconstruction of neural networks in the cerebral cortex by using X-ray micro-CT technology

水谷 治央<sup>a</sup>、武田 佳彦<sup>a</sup>、百生 敦<sup>a</sup>、竹内 晃久<sup>b</sup>、大東 琢治<sup>b</sup>、高木 利久<sup>a</sup>

Haruo Mizutani<sup>a</sup>, Yoshihiro Takeda<sup>a</sup>, Atsushi Momose<sup>a</sup>, Akihisa Takeuchi<sup>b</sup>, Takuji Ohigashi<sup>b</sup>, Toshihisa Takagi<sup>a</sup>

東京大学<sup>a</sup>、高輝度光科学研究センター<sup>b</sup>

University of Tokyo<sup>a</sup>, JASRI<sup>b</sup>

### アブストラクト

神経回路網は私達の様々な脳高次機能を生み出している。その情報処理過程を明らかにするためには、神経ネットワーク構造の解剖学的知見が基礎データとして必要である。放射光を用いたX線マイクロCT技術を適用することで、神経回路網の3次元構造を解明することを目指す。ゴルジ法及びコバルト法を用いて、マウス全脳に渡る一部の神経細胞を染色した。タルボ干渉計とX線顕微鏡にCTを組み合わせて、大脳皮質の錐体神経細胞の3次元再構築に成功した。これらの結果は哺乳類の神経回路配線図を明らかにする上で有用な知見となるだろう。

### Abstract

Neuronal circuits build our various higher brain functions. Anatomical structures of neuronal networks will provide us with fundamental views to elucidate their information processing. We aim at developing a three-dimensional atlas of neuronal circuits using X-ray micro-CT technology by synchrotron radiation. We stained neurons of whole mouse brain with Golgi-Cox and cobalt method. Heavy metals including mercury used in the method enhance X-ray absorption and phase contrast. X-ray micro-CT displayed 3D images of fibriform axons and dendrites of various neurons. X-ray microscopy with Talbot interferometry revealed stereographic structures of pyramidal neurons in the cerebral cortex. This observation probably serves as a foundation for achieving the 3D mammalian brain atlas of neuronal circuits.

### 背景と研究目的:

脳の神経細胞ネットワークが実現する生命システムの動作原理を解明するためには、その機能を規定する“配線構造”を知ることが必須である。しかし、神経細胞の形態的つながりを実験で網羅的に明らかにすることは、現在のところ、非常に困難である。神経細胞を拡大して可視化するためには、組織を切片化しなければならず、脳組織を傷つけてしまうし、脳全体を視野に収めようと思えば、神経細胞を観察する空間分解能が得られない。神経ネットワークを切断しないで、神経のシナプス結合パターンを高分解能・広範囲で可視

化する技術的障壁は、想像以上に高いと考えられている。

我々は、非侵襲的に内部構造を観察できるX線CT技術を用いることで、脳全体の神経細胞とそのネットワーク構造を3次元的に再構築することを目的としている。近年急速に発展したX線顕微鏡の空間分解能はナノスケールに達しており、単一細胞レベルで生物試料を観察することが可能である。また、X線の物体透過性の高さから、CTを付け加えることで、厚い試料でも非破壊的に細胞の立体像を得ることができる。そこで、本課題においては、高分解能X線イメージング技術を応

用し、哺乳類における神経ネットワークの形態的配線構造を3次的に可視化することを目指す。

#### 実験:

生後3週齢のマウス(C57BL/6J)の脳を観察標本として用いた。4%パラホルムアルデヒド/1%グルタルアルデヒド溶液にて、マウス全身を灌流固定後、脳を頭蓋骨から取り出し、一昼夜後固定した。神経細胞の一部をGolgi-Cox法(染色液に水銀を含む)及びコバルト法により染色した。エタノールと酸化プロピレンを用いて脱水処理した後、Epon樹脂にて試料を包埋し、一辺150 $\mu\text{m}$ の角柱状サンプルを作成した。そのサンプルを粘土で測定器具に固定し、ステージを回転させることで、CT画像を取得した。

体性感覚野の脳皮質を観測部位とし、特に、皮質2/3層に存在する錐体細胞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<sup>1</sup>を配置した。顕微鏡としての倍率を17.6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(課題番号2007A1137を参照)。使用したエネルギーは8~12.4keV。

#### 結果、および、考察:

タルボ干渉計を用いて観察した脳皮質錐体細胞の位相CT像をFig. 1に示す。サンプルをEpon樹脂に包埋することで、測定中の試料変形を最小限に抑えることができたため、神経線維の同定が精度良く行うことが可能となった。しかし、長時間の露光によりEpon

樹脂の溶解が若干認められるため、今後はサンプルの急速凍結なども視野に入れ、X線による試料損傷をさらに軽減させる必要がある。ピクセルサイズは247nm、分解能は約800nmであった。

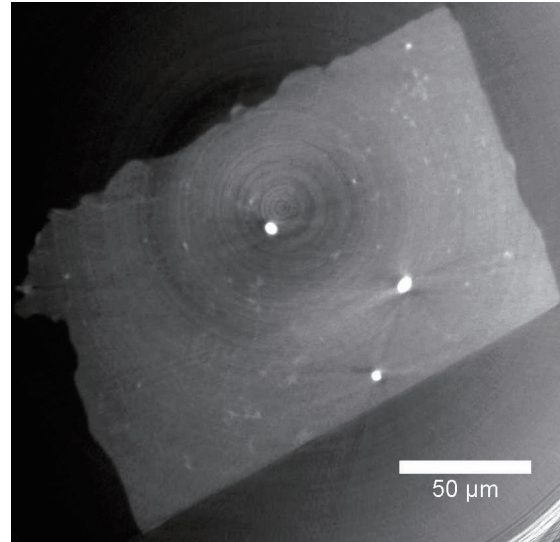


Fig. 1. Reconstructed CT image of pyramidal neurons in the mouse cerebral cortex with Talbot interferometry.

位相CTを用いて、脳皮質2・3層に存在する錐体細胞を3次的に再構築した(Fig. 2)。

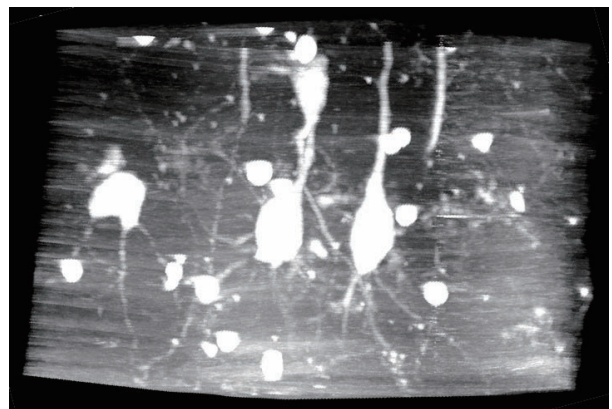


Fig. 2. Three-dimensional rendering view of the pyramidal neurons in the cortical layer 2/3.

コバルト法により染色した神経細胞は、本手法で画像化することはできなかった。その原因として考えられるのは、神経細胞内に蓄積したコバルトの濃度が不十分だったと考え

られる。光学顕微鏡において、神経細胞内に黒色の沈殿物質が認められることから、微量な元素でも検出できる蛍光X線による画像化が有効かもしれない。

今後の課題:

神経回路の配線図を明らかにするためには、少なくとも「神経線維を追跡できること」及び「神経結合(シナプス)を同定できること」の2つの要件を満たすことが必須である。今回の実験では、前者を満たすための染色法を新しく試みたが、成功しなかった。今後、我々生物学者は、ゴルジ染色を超えた神経線維の有効な染色法を開発しなければならない。ゴルジ染色による画像は非常に明瞭であるが、その染色原理が分からないため、機能との関連付けが難しい。コバルト染色は、電気的活動のあった神経細胞の中に積極的に取り込まれるため、そのネットワーク構造は、実際に脳内で機能していると考えてよい。コバルト染色のような、活動依存的な神経染色法がX線イメージングに活用できるようになれば、機能的神経回路網の解析を推進できるようになる。また、全ての神経細胞を染色する方法を開発し、それをヒトの死後脳に適用することができれば、人間の脳神経回路の配線図を将来的にすべて明らかにすることも視野に入ってくるだろう。ゴルジ染色が開発されてから、130年以上経った現在、神経細胞を重金属で染色する新たな手法の開発が求められている。

神経の接続はシナプスにより行われていることから、神経の結合様式を明らかにするためには、シナプスの可視化も同時に必要となる。シナプスにはシナプス小胞やシナプス後肥厚部が存在するので、同定はさほど難しく

はないが、それらの構造物を確認するためには、空間分解能として20~30nm程度の顕微技術が要求される。X線顕微鏡の分解能をシナプスが同定できる程度にまで向上させ、実用化しなければならない。一方、免疫染色を用いれば、シナプスが特異的に発現しているタンパク質を標識することも可能であるが、哺乳類の脳のように厚みのある試料に適應することは極めて困難である。

また、同時に神経線維が切断されない程度の大視野で脳を観察する必要がある。もし、有効な神経細胞の染色法が開発されたとして、1mm<sup>3</sup>程度の神経組織サンプルを20nmの分解能で見るためには、どうしたらよいだろうか。3次元再構築の手法としてCTに依存しなければ、X線共焦点顕微鏡や、蛍光X線顕微鏡による3次元構築も有望ではないだろうか。今後のX線光学の進歩には大きな期待を寄せている。

参考文献:

1. Momose, A., et al. Biomedical imaging by Talbot-type x-ray phase tomography. *SPIE Proc.* **6318**: 63180T (2006).

学会発表状況:

- Mizutani, H., et al., Three-dimensional reconstruction of neurons in the brain by using X-ray micro-CT technology. *Neurosci. Res.* **58 sup.1**: S184 (2007).

キーワード:

神経回路網、大脳皮質、3次元再構築、タルボ干渉計、X線マイクロCT