

## 大脳皮質シナプスの3次元観察に最適な軟X線光学系と試料サイズの検討

### Optimization of Soft X-ray Microscopy System for 3-dimensional Imaging of the Cerebral Cortex and Investigation of Size of the Sample

水谷 治央<sup>a</sup>, 大東 琢治<sup>b</sup>, 難波 秀利<sup>c</sup>, 竹本 邦子<sup>d</sup>, 木原 裕<sup>d</sup>, 高木 利久<sup>a</sup>

Haruo Mizutani<sup>a</sup>, Takuji Ohigashi<sup>b</sup>, Hidetoshi Namba<sup>c</sup>, Kuniko Takemoto<sup>d</sup>, Hiroshi Kihara<sup>d</sup>, Toshihisa Takagi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>東京大学 学術統合化プロジェクト, <sup>b</sup>立命館大学 総合理工学研究機構, <sup>c</sup>立命館大学 理工学部, <sup>d</sup>関西医科大学  
<sup>a</sup>Science Integration Program, University of Tokyo, <sup>b</sup>Research Organization of Science & Engineering, Ritsumeikan University,  
<sup>c</sup>Department of Physical Science, Ritsumeikan University, <sup>d</sup>Kansai Medical University

軟X線顕微鏡を用いてマウス大脳皮質に含まれるシナプスの3次元構造を観察するため、光学系のエネルギー分解能を300から225へ低下させることで焦点深度を深くし、より多くのフォトンフラックスを利用できるシステムを構築した。X線の波長1.7 nmを使用するときの適切な試料厚さは1.6 μm程度であった。これらの条件の下に、収束イオンビームを用いて、大脳の円柱状試料を削り出し、Computed Tomographyによる3次元観察を行なった。

For 3-dimensional imaging of the synapses in the mouse cerebral cortex by using a soft x-ray microscope, the optical system was optimized to take advantage of more photon flux and deeper focal depth by the introduction of the energy resolution decreased from 300 to 225. In case that the x-ray wavelength was 1.7 nm, appropriate sample thickness was 1.6 μm. Under these conditions, computed tomography of the cylindrical brain sample fabricated by focused ion beam was performed.

**背景と研究目的:** 脳の高次機能は、神経ネットワークを基礎的土台として構築されていると考えられている。そのため、神経ネットワークの配線構造を明らかにすることによって、脳高次機能の動作原理を解明する端緒となることが期待されている。そこで神経回路の配線図をいかにして観察し、再構築するかという方法論の議論がさかんに行われている。その実現のためには、神経細胞の接合部位であるシナプスを可視化できるのに十分な高分解能の観察手法が必要であり、そこで得られた観察画像から、3次元配線構造へと可視化し、神経ネットワークを解析する手段も必要となる。そこで近年、有効な手段として行なわれているのが、膨大な数の電子顕微鏡スライス画像を一枚ずつ取り込んでスタック化し、神経ネットワークの立体構築を行なう方法である[1]。しかし、この手法は破壊的の

プロセスである上に、時間が掛かり、作業手順の膨大さからミスが多くなる欠点がある。そこで、電子顕微鏡に代わる観察手法として着目したのが、X線顕微鏡である。近年、超微細加工技術の発展に伴って高分解能の光学素子の製作が可能になってきたため、X線顕微鏡はシナプスを観察できる分解能にまで達してきている。また、X線は、電子線に比べて透過力が高いため、より厚い試料を観察できることが利点である。この利点は、Computed Tomography (CT)の手法を適用することによって、非破壊で2次元画像である投影像群から3次元画像を再構成する事を可能とする。そこで本研究では、顕微CTによる神経ネットワークの高分解能3次元イメージングの実現を目指し、立命館大学SRセンターのBL-12に設置されている結像型軟X線顕微鏡[2,3]を用いて、光学系の最適化と、適切な試料サイズを検

討する事を目的とした。

**実験**：試料として、C57BL/6J マウスの大脳皮質を用いた。大脳皮質は、2.5%グルタルアルデヒド・2%パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定を行なった後、同溶液にて一晩浸漬固定した。これを1%四酸化オスミウム溶液にて後固定し、クエン酸鉛を用いてブロック染色を行った。脱水処理はエタノール・プロピレンオキサライドを用いて行い、エポン樹脂に包埋し、70・2 昼夜で樹脂を硬化させた。この樹脂ブロックをウルトラマイクロトームで超薄片に切り出して電顕メッシュ上に乗せ、電子染色を行ったものの観察を行なった。また、CT 計測においては、収束イオンビーム (FIB)を用いて、試料を直径約1 $\mu$ m の円筒状に加工したものを観察した。

光学系の最適化として、最終的にCT を行なうことを前提に、分光用ピンホールを従来の15  $\mu$ m から20  $\mu$ m に変更した。これにより、エネルギー分解能は計算値で300 から225 へと低下するが、空間分解能をさほど低下させずにより多くのフォトンフラックスを得られ、また光学系の焦点深度を12  $\mu$ m 程度まで深くすることが出来た。本研究ではこのセットアップで観察を行なった。

**結果及び考察**：波長1.7、1.9、2.3 nm の3種類を用いて1  $\mu$ m 厚切片の観察を行ない、そこから平均的な透過率とコントラストを求めた (Table)。この表より、1.7 nm の時が最も透過率が高い上にコントラストが高くなっているのは、波長を短くすることで包埋樹脂の透過率が高くなるのに対して、染色に使用した重金属の吸収率はさほど変化しないためと考えられる。ここで透過率を0.44 として波長1.7 nm の時の厚さに対する透過率曲線を描くと、およそ1.6  $\mu$ m 厚で透過率は0.2 以下となる。この厚さを、CT を行なう為に十分な透過率のしきい値であると仮定し、FIB 加工で樹脂包埋ブロックの削り出しを行なって微細な試料を作成し、CT を行なった。このとき波長1.8 nm を用い、投影像取得は3.6°毎に50 投影行なった。この際ひとつの投影角あたりに、露光時間60 秒で得られた投影像を3 枚積算したものを1 枚の投影像として用いることで、画像の統計量の向上を図った。こうして得られた一連の測定データに対し、試料及び光学系のドリフトを手動で補正した上で

Filtered Back-Projection 法で再構成を行なった。Fig. 1 に再構成を行なった試料の1 断面を示す。内部に明確な構造が観察できない上に、再構成像周囲のエッジが大きくぼけているのは、試料のドリフト以上にX線照射に因る試料の収縮が原因であることが測定開始時と終了後の投影像の比較から判明した。この収縮は、試料の脱水不足か樹脂の重合不良が原因である可能性がある。

Table: Relationship between transmittance, contrast and wavelength

| Wavelength [nm] | 2.3  | 1.9  | 1.7  |
|-----------------|------|------|------|
| Transmittance   | 0.36 | 0.36 | 0.44 |
| Contrast        | 0.19 | 0.20 | 0.25 |

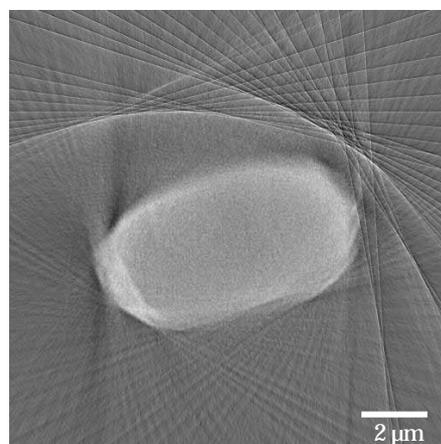


Fig. 1: Cross section of the cerebral cortex of a mouse

**今後の課題**：包埋樹脂の選定及び包埋方法の再検討を行なう必要がある。

#### 参考文献

- [1] J. W. Lichtman and J. R. Sanes, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 18, (2008), 346-353.
- [2] A. Hirai et al., *J. Synchrotron Rad.* 5, (1998), 1102-1104.
- [3] A. Hirai et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* 38, (1999), 274-278.

#### キーワード

・シナプス

神経細胞間に形成される情報伝達に関わる接合部位とその構造。主に小胞 (直径は約40 nm) を持つ化学シナプスである。情報を伝える方の細胞をシナプス前細胞、伝えられる方の細胞をシナプス後細胞という。神経細胞はシナプスを介して結合し、複雑なネットワークを構築している。