

立 S22-06

X 線顕微鏡を用いた大脳シナプス 3 次元観察の試み

3-Dimensional Observation of Synapses in the Brain using X-ray Microscopy

水谷 治央^a, 大東 琢治^b
Haruo Mizutani^a, Takuji Ohigashi^b

^a 東京大学学術統合化プロジェクト, ^b 立命館大学総合理工学研究機構

^a Science Integration Program, University of Tokyo,

^b Research Organization of Science & Engineering, Ritsumeikan University

脳の機能を解明するための端緒として、シナプスを含む脳神経ネットワークの 3 次元構造を観察する事は重要である。そこで、結像型の軟 X 線顕微鏡に Computed Tomography を組み合わせ、樹脂包埋後に集束イオンビームで加工されたマウス大脳皮質の 3 次元構造観察を行った。これにより、細胞小器官の一部と思われる高密度分布を持つ 3 次元構造を観察する事が可能であった。

For the clue to the elucidation of the brain functions, observing the 3-dimensional structure of the neural networks including synapses is important. In this study, cerebral cortex of the mouse, which had been embedded in epoxy resin and fabricated by using a focused ion beam process, was observed 3-dimensionally by computed tomography with using the full-field imaging soft x-ray microscope. Then, the 3-dimensional structure with high density, which was considered as a part of organelle, was observed.

Keywords: synapse, neural network, mouse, 3-dimensional structure

背景と研究目的: 脳神経ネットワークの 3 次元構造観察は、脳の機能や構造の解明を行うための端緒として、重要な研究テーマとなっている。その際、どの構造をターゲットとして観察を行うかによって、分解能や視野、信号取得の手法が異なる様々な手段が開発されている。例えばシナプスや個々の神経細胞をターゲットとした、高分解能が要求される際においては、今のところ電子顕微鏡を用いた連続切片法による観察が有効とされている [1,2]。しかしこの手法は破壊的であり、かつ膨大な時間と手間が掛かるため、神経ネットワークの解読法として決定的な手段とは言い難いのが現状である。そこで我々は高分解能であり、非破壊で比較的厚みの或る試料を観察する事が可能な、結像型軟 X 線顕微鏡 [3] に着目し、これと Computed Tomography (CT) を組み合わせることで、非侵襲的な神経ネットワークの 3 次元観察を行う事を目的とした。

実験: C57BL/6J マウス(オス)を用いて、以下の手順で試料の作成を行った。

- (1) 2.5% グルタルアルデヒド、2% パラホルムアルデヒド、2 mM の塩化カルシウムを 30 mM の HEPES バッファの混合液を

- pH7.4 に調整したものを用いて灌流固定する。
- (2) 更に一晩、これを同様の固定液で温度を 4°C に保ったまま固定する。
- (3) マウスから脳を取り出し、その大脳皮質から 1mm³ 程度のブロックを切り出す。
- (4) 切り出したブロックを 30 mM の HEPES バッファで洗浄
- (5) 1% 四酸化オスミウム、1.5% ヘキサシアノ鉄酸塩ナトリウム、バッファの混合溶液で 4°C に保ち、1 時間浸漬固定する。
- (6) クエン酸鉛を用い、室温で 1 時間、ブロック染色する。
- (7) ブロックを徐々に濃度を上げたエタノール、酸化プロピレンで脱水する。
- (8) エポキシ樹脂に包埋する。
- (9) 樹脂ブロックを 70°C で 48 時間硬化させる。
- (10) 旋盤で直径 300 μm の円柱状に切り出す。
- (11) 集束イオンビーム加工で先端部を直径約 1 μm 程度に精密加工する。

以上の様に作成した試料を直径 500 μm のタンダステンワイヤーの先端に固定し、立命館大学 SR センター BL-12 の結像型軟 X 線顕微鏡を用いて CT による 3 次元観察を行った。観察条件は、試料を大気中に設置し、波長 1.87

nm を使用した。この時の光学系の倍率は 685 倍であり、ピクセルサイズは試料面において 35 nm 角に相当する。投影像は試料回転角 1.8 度毎に 100 枚取得した。その際の露光時間は 30 秒で 2 回取得し、積算することで統計量を向上させた。断層像の再構成は Convolution Backprojection 法で、Shepp-Logan フィルターを用いて行った。

結果および考察： はじめに、どの程度の構造まで観察できるのか確認実験を行った。ウルトラマイクロームを用いて作製した 200 nm 厚の切片の観察像を Fig. 1 に示す。波長は 1.87 nm で露光時間は 4 分であった。その後の CT による断層像と表示を対応させるため、グレイスケール表示の色調を反転し、白い部分が吸収が高くなる様に設定している。これにより、神経線維やミトコンドリア、髄鞘等の構造がコントラスト良く観察出来ている事がわかる。また、シナプスらしい構造も観察されたため。この様な観察結果が CT による 3 次元観察にも期待される。

Figs. 2 (a) と (b) に、CT により再構成された 2 次元断面像を示す。矢印で示した位置付近に吸収が高く（グレイスケール表示では白く表される）、密度が高いと考えられる構造が見られる。この構造は連続的に試料長軸方向に沿っているため、連続的に脳の構造とは無関係の、試料作成時の FIB 加工、または染色過程で発生したアーティファクトであろうと考えられる。

Fig. 3 (a) に試料調軸方向の断面像を示す。この点線部を拡大した画像を Fig. 3 (b) に示す。不鮮明ながらも、点線で囲んだ部位に白い輝点が見られる。これはこの断層像の前後数レイヤーにも同様に見られることから、再構成などのアーティファクトでは無い。直径約 1 μm 弱程度の大きさから、ミトコンドリアのような細胞小器官の一部と考えられる。

今回の観察において、2 次元試料観察時に見られたような明瞭な 3 次元構造を観察する事は出来なかった。今後の課題として、試料作成の条件が挙げられる。特に今回の試料では作成時に発生したと思われるアーティファクトが見えているため、これを軽減するための条件出しを行う必要がある。また光学系のエネルギー分解能を向上させる事により、より像が鮮明に成る事が期待されるが、一方で光量の低下する問題も発生するため、より一層の検討が必要である。

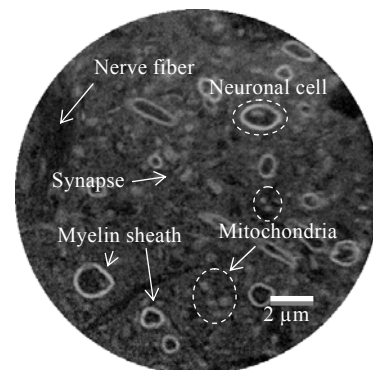
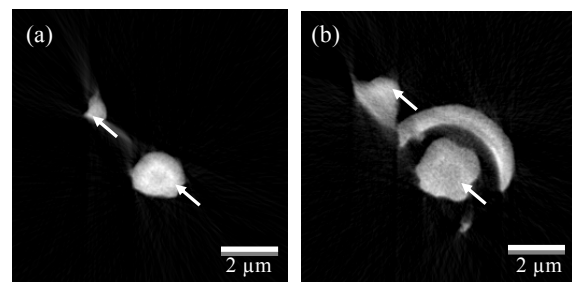
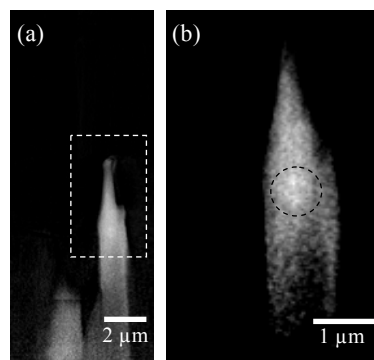


Fig. 1. Sliced section image (inverse contrast)



Figs. 2 Cross sectional images



Figs. 3 Cross sectional images along longitudinal direction of the sample. (b) is magnified image indicated by dashed square in (a)

文 献

- [1] J. W. Lichtman, J. R. Sanes, Curr. Opin. Neurobiol. 18 (2008) 346-353.
- [2] K. L. Briggman, M. Helmstaedter, W. Denk, Nature 471 (2011) 183-188.
- [3] A. Hirai, K. Takemoto, K. Nishino, N. Watanabe, E. Anderson, D. Attwood, D. Kern, M. Hettwer, D. Rudolph, S. Aoki, Y. Nakayama, H. Kihara, J. Synchrotron Rad. 5 (1998) 1102-1104.

論文・学会等発表

- [1] 水谷治央、相良洋、竹内晃久、大東琢治、高木利久、第 88 回日本生理学会大会 (ポスター発表)
- [2] T. Ohigashi, H. Fujii, K. Usui, H. Namba, H. Mizutani, K. Takemoto and H. Kihara, 10th International Conference on X-ray Microscopy : XRM10 (ポスター発表)