

## 標的神経細胞の樹状突起の可視化：(I) 軟固定大脳皮質への細胞内色素注入法

おがともふみ おかもとつぐひさ ふじたいちろう | 大阪大学大学院生命機能研究科認知脳科学研究室 (〒560-8531 豊中市待兼山1-3)  
小賀智文, 岡本嗣久, 藤田一郎 | E-mail: oga@bpe.es.osaka-u.ac.jp

### 実験のコツと注意点

パラホルムアルデヒドによる灌流固定を施した脳組織をスライスし、顕微鏡で目視しながら、目的とする神経細胞に、蛍光色素を細胞内注入することで、樹状突起をすみずみまで染色することができる。元来、網膜で開発されたこの手法に工夫を重ねることで、げっ歯類や霊長類の大脳皮質に適用が可能となり、哺乳類の大脳皮質神経細胞の形態を調べる新しい有用な方法となった。本手法は、旧来のゴルジ法に比べ熟練を要するが、S/N比の良い標本を多数得ることができるほか多くの利点を持ち、また様々な他技術との融合が可能である。本技術実施の際の、脳の固定、細胞内色素注入、免疫組織学的処理、技術的問題点の解決法の詳細について記載する。

### はじめに

神経細胞の樹状突起形態を調べる方法としては、1世紀以上に渡り、今日でもゴルジ法が有力な手法である。さらに、最近では、ジーンガンまたは遺伝子改変技術により遺伝子またはビーズを神経細胞に導入し、蛍光発色を用いて神経細胞形態を可視化することも可能である。しかしこれらのいずれの手法も、実験者が望む一つ一つの細胞を選んで染色することはできず、どの種類の細胞がどのくらいの数や密度で染まるかは

偶然に任せる要素が大きい。ひとつの組織切片の中で染まる数が少なければ例数を集めるのが難しく、多ければ、異なる細胞の樹状突起同士が重なり、解析が困難となるなどの問題点がある。

これらの問題点を解決する一つの方法として、パラホルムアルデヒドで弱く固定した脳をスライスし、個々の細胞核を蛍光標識により可視化したのち、顕微鏡下でそれらの細胞の中で選んだものに対して、蛍光色素ルシファーイエローを細胞内注入する方法がある。固定された標本において、細胞内にガラス微小電極を刺すことが可能であること、固定標本でも細胞内をルシファーイエローが効率的に拡散することは、当初予想もされておらず、この技術を開発し、網膜に適用した論文は驚きを持って迎えられた<sup>1)</sup>。

この技術はその数年後には、ヒトの手術摘出脳組織に適用された<sup>2)</sup>。オーストラリアのGuy Elstonはこの手法を、還流固定したサルに適用し<sup>3)</sup>、大脳皮質錐体細胞の樹状突起形態の系統的解析を長年にわたり行っている。近年、われわれは、Elstonとともに、この手法を様々な年齢のサルの大脳皮質に適用して、樹状突起の発達過程を調べている<sup>4,5)</sup>。この過程で、本技術は、改良が積み重ねられ、現在では、効率、染色の質において、ほぼ完成の域に近づいた。

本稿では、われわれ自身の経験に基づいて、マウス、ラット、サルの大脳皮質へ本手法を適用する際の基本技術について述べる。薬品、機器類については、

著者らの研究室において使用しているものを例として記した。本手法の様々な応用例（ルシファーイエロー以外の色素の使用，視床・海馬・線条体・嗅球の細胞への適用，超高圧電子顕微鏡標本への応用）については，次号で取り扱う。

## III この手法の利点

本手法の最大の利点は，実験者が望む細胞を選んで色素を注入し，形態を可視化することができることである。他の種類の細胞，他の層の細胞，すぐそばの細胞を染めなければ，個々の細胞の樹状突起を他の細胞の樹状突起が重なることなく，非常に高いS/N比で染めることができる（図4，5A）。これらの標識細胞は，蛍光のままであれば共焦点顕微鏡を用いた解析ができ，DAB処理（後述）をすれば，ゴルジ標本と同様，退色しない永久標本として使える。

逆行性標識色素と組み合わせれば投射先のわかった細胞の形態を調べることができ，免疫組織化学を組み合わせれば神経化学的性質のわかった細胞の形態を調べることができる<sup>6,7</sup>。今後，*in vivo* 2光子イメージングと組み合わせることで，生理学的性質や機能についての知見と形態との関係を調べることもできるであろう。さらに，死後脳，手術時摘出脳においても，高品質の標本が得られることから，ヒトや類人猿などへの適用も可能である。

## III 実験手法

### 1. 被検体の灌流固定

被検体の灌流固定は本実験において非常に重要なステップであり，その成否が実験の出来を左右する。固定液は，被検体の灌流固定の直前か前日に作成する。固定液はパラホルムアルデヒド（PFA; 1.04005.1000, extra pure paraformaldehyde, メルク）を用いる。安定した成果を得るためには，固定液の強度が実験間で一定であることが大事である。固定液の調製日やパラホルムアルデヒドのメーカーも統一することが望ましい。1LのMilli-Q水に対し，3滴の5M NaOHを加え，8% PFA in Milli-Qを調製する。溶液を50℃以下に保

ちながらホットプレート上で攪拌する。PFAの溶解中に誤って溶液を沸騰させてしまった場合はその溶液は廃棄し，新たに固定液を作成する。PFAが溶解した後，濾紙を用いて濾過する。

### 1.1. マウス・ラットの灌流固定

ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル<sup>®</sup>，75 mg/kg，腹腔注，共立製薬）を過剰投与し，痛み反応の完全な消失を確認の後，開胸する。右心室にハサミで切り込みを入れ，左心房から0.1 Mリン酸緩衝生理食塩水（PBS; pH 7.2; 2.65 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 16 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9.5 g NaCl in 1L 純水）を流す。組織学実験によく使われるリン酸ナトリウムによる緩衝液ではないことに注意。右心房から流れ出る液体が透明になったのを確認してから体重と等重量の4% PFA in 0.1 Mリン酸緩衝液（PB）を流す（70 mL/min）。固定後，速やかに脱脳する。

### 1.2. サルの灌流固定

本研究室では生後2日齢から4.5歳齢までのカニクイザル（*Macaca fascicularis*）に本手法を適応している<sup>4,5</sup>。塩酸ケタミン（ケタラル<sup>®</sup>，25 mg/kg，筋注，三共製薬）による沈静化の後，ペントバービタルナトリウム（ネンブタール<sup>®</sup>，75 mg/kg，静注または腹腔注，大日本住友製薬）を過剰投与する。この後の灌流固定の方法はラットと同様である。生理食塩水および固定液の流速は個体の年齢に応じて決定する必要がある。成体では270 mL/minが最適であった。若年齢の個体についての最適流速は検討中である。

## III スライス切片の作成

研究の目的に合わせて，どのような面に平行にスライスを作成するかが決まる。われわれの場合は，錐体細胞の基底樹状突起の形態の全貌を明らかにすることが主目的であるため，大脳皮質表面に平行な面でスライスを作っている<sup>4,5</sup>。そのために，目的部位を含む脳ブロックを切り出した後，脳深部をトリミングすることにより，ブロック厚を脳表から4~7 mmの厚さにする。その際，脳表面のカーブとブロック底面のカーブが平行になるようにすることが，次のステップで，脳ブロックを平坦化する上で重要である。

次に、その脳ブロックを大型のスライドガラス2枚の間に挟み、4% PFAに浸し4℃で12～24時間安置する。このようにして脳表面の平坦化されたブロックをスライサー (Vibratome Series 1500, Vibratome 社) を用いて脳表面と平行に切片 (250  $\mu\text{m}$  厚) を作成する。

### III 層の決定

脳表と平行に薄切した切片では、細胞密度の高い大脳皮質第4層や白質を含む部位はやや白く濁って見える。第3層の細胞に注入したい場合には、第4層が含まれているスライス切片を探し、その切片または1枚皮質表面側の第3層を含む切片に対して色素を注入する。細胞核の像から層を判別できるため (図3)<sup>3)</sup>、スライス切片を1  $\mu\text{g/ml}$  DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, シグマ) 液に5～15分漬け、細胞核染色を行い、蛍光顕微鏡下で可視化した細胞核を確認し、注入層の最終確認を行う。

### III ルシファーイエローの細胞内注入

外径1.0 mmの芯入りガラス管 (TW100F-4, World Precision Instruments) から、電極プラー (Model P-97, サッター社) を用いて、神経細胞に色素を注入するための微小ガラスピペットを作製する (図1)。微小ガラスピペットの抵抗値はルシファーイエロー溶液 (後述) を充填した状態で250～300 M $\Omega$ である。

スライス切片を1  $\mu\text{g/ml}$  DAPI in PBに5～15分間浸漬し、細胞核を可視化する (図1B)。スライス切片をメンブレンフィルタ (AABG02500, ミリポア) の上に乗せ、さらにもう一枚のメンブレンフィルタでスライスの上に乗せて挟みスライスが動かないように固定

する (図2)。上に乗せるメンブレンフィルタには径5 mm程度の穴を事前にあけておき、この穴を通して、色素注入を行う。色素注入用のチャンバーには、0.1 M PBSを満たす。

微小ガラスピペットの後端から8%ルシファーイエロー in 0.05 M Tris buffer (pH 8.4; Lucifer Yellow CH dilithium salt, L0259, シグマ) を毛細管現象により導入する。0.1 M LiCl溶液を満たしたキャピラリーホルダ (MEH710, World Precision Instruments 社) に微小ガラスピペット後端を挿入し、マニピュレータ (Mechanical Micromanipulator, ライカマイクロシステムズ社) に取り付ける。注入において、油圧式/電動式マニピュレータより上記のピボット式マニピュレータの方がはるかに、高能率である。

細胞核を可視化した切片を対物上下動式蛍光顕微鏡 (Eclipse FN-1, ニコン社) 下にセットする。40倍水浸対物レンズ (NIR Apo 40x/0.80w, ニコン社) を用い、スライス表面から約30  $\mu\text{m}$ の深さにある細胞核を目印にして色素を注入する (図3)。これは、染色された樹状突起が、スライス表面で切断されるケースを減らすためである。

まず、微小ガラス管の先端を目的とする細胞の細胞核に近づける。ガラス管先端から少量色素を流出してみて、標的細胞の細胞膜の影が見えることを確認する。この時に、色素が細胞の中に拡散して入ってしまうようであれば、それは、固定の過程で細胞膜が傷み、穴があいているためである。そのような細胞に色素を注入しても良い標本を得ることはできない。

さらに、微小ガラス管をわずかに進めると細胞膜が少しだけ凹んだように見える。この状態でマニピュレータの後端を叩き、ガラス管の先端を細胞内に刺入する。色素の注入には定電流装置 (World Precision

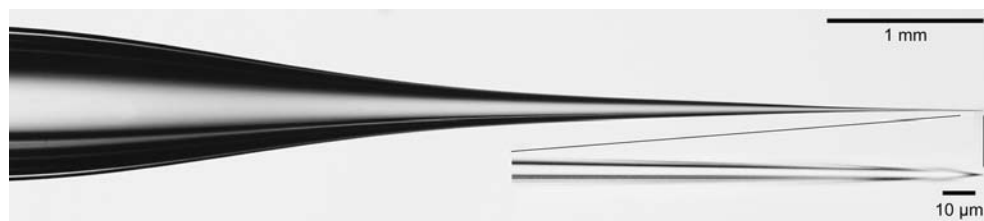


図1 色素注入に用いている微小ガラス管の顕微鏡写真

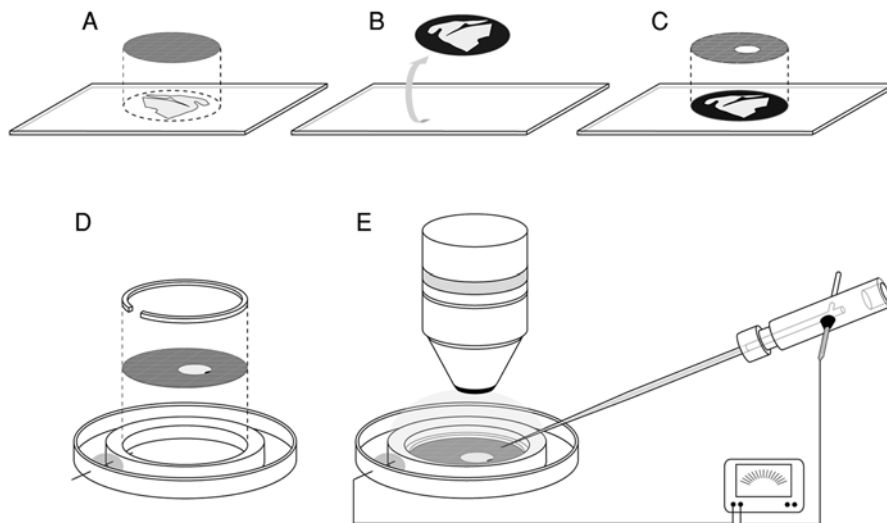


図2 チャンバーへスライス切片を平坦にマウントする方法

A：スライス切片を裏向けにしてスライドガラス上に載せ水分を取る。色素注入個所が中央にくるようにメンブレンフィルタをのせ、筆を使いメンブレンフィルタにPBを含ませる。B：スライドガラスからスライス切片の乗ったメンブレンフィルタをスライドさせるように引き抜き裏返してスライドガラスに乗せる。C：色素注入個所が中央にくるようにメンブレンフィルタに穴をあける。穴をあけたメンブレンフィルタをスライドガラス上のメンブレンフィルタに合わせてのせる、筆を使いPBを含ませる。D：スライドガラスからメンブレンフィルタに挟まれたスライス切片を抜き取り、色素注入用チャンバーにのせる。E：色素注入用チャンバーにPBSを満たし、蛍光顕微鏡下にセットする。

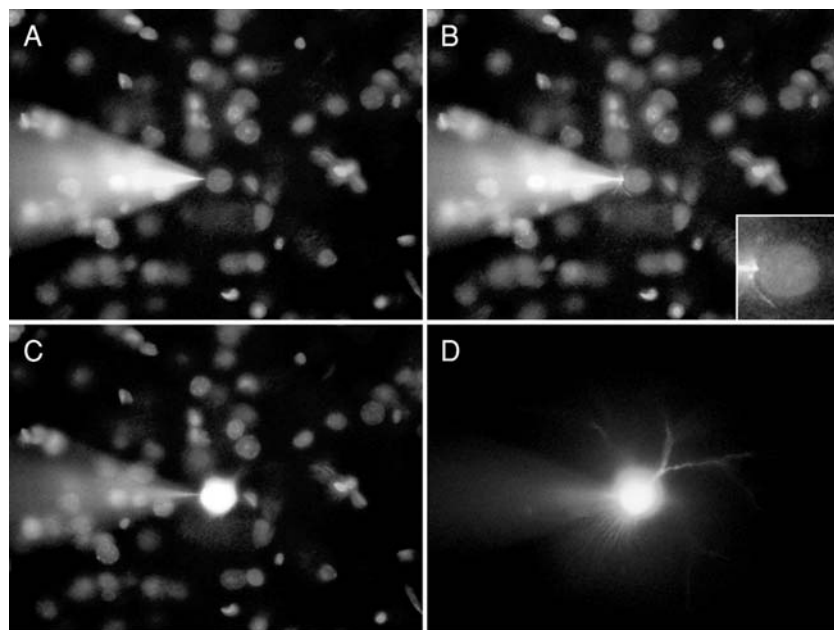


図3 細胞内注入の手順

A：ルシファーイエロー（LY）を含むガラス微小電極を、DAPIで標識した目的とする細胞の細胞核へと近づける。B：少量の電流を流し、LYを放出する。標的細胞の膜がしっかりしたものであれば、核と流出色素の間に、細胞質が暗くみえる（インセット）。C：細胞に電極を刺入する。LYは一瞬にして細胞体と樹状突起の基部に拡散し、その後、ゆっくりと樹状突起先端部やスパインへと拡散が進む。D：顕微鏡のフィルターを変え、LYのみが励起される状態で観察し、焦点面を変えながら樹状突起先端まで染まっているかどうかを確認する。被写界深度が浅いため、写真ではすべての樹状突起が染まっていないようにみえる。

(p.3 カラー図参照)

Instruments 社) を用い、10～20 nA の電流を流す。樹状突起の先端までルシファーイエローが満たされ、樹状突起スパインが視認できるようになるまで色素の注入を続ける。ルシファーイエローの細胞内注入が可能なのは、被験体を灌流固定してから約1週間である。それ以後になると、スライスに残留したPFAによる固定が進み、ルシファーイエローが細胞の中を拡散しなかったり、細胞から外へ漏れ出ていくようになる。注入セットを2台用意し、熟練した技術を持つ者が2～3名で注入を行うと、1週間の間に1頭の動物から1,200個を超す細胞の標本を得ることができる。

### 免疫染色法

ルシファーイエローを細胞内注入したスライス切片を0.6  $\mu\text{g/ml}$  ビオチン化抗ルシファーイエロー抗体 (A-5751, インビトロジェン), 2% bovine serum albumin, 5% sucrose, 1% Triton-X (X100, シグマ-アルドリッチ), 0.1% sodium azide を含む0.1 M PB に浸漬し、室温 (20～25  $^{\circ}\text{C}$ ) で5～10日間攪拌浸漬する。スライス切片を0.1 M PB で5分間 (3回) 洗浄した後、1% SAB-HRP (RPN1051, streptavidin biotin horseradish

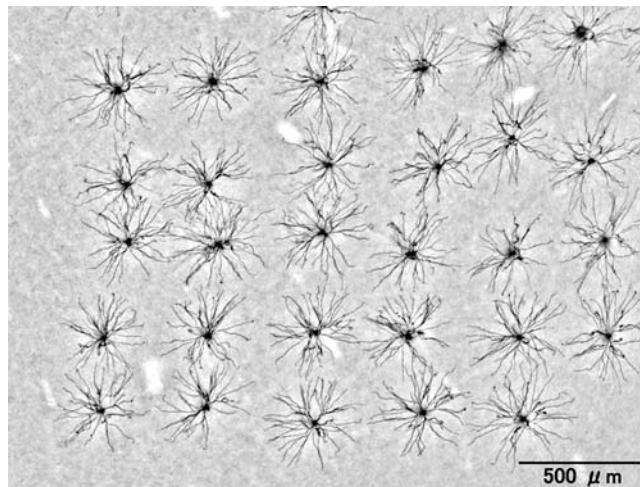


図4 サル側頭葉視覚連合野TE野の3層錐体細胞

脳表面を上からみており、基底樹状突起が細胞体から放射状に出ている様子がわかる。色素の注入は、隣同士の細胞の樹状突起が重ならない距離だけ離れた細胞を選んで行われている。

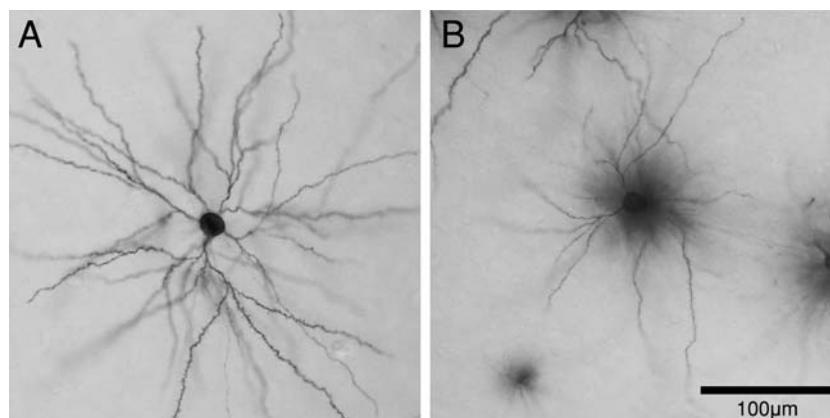


図5 実験の成功例と失敗例

A: 蛍光色素が細胞内にのみ注入されており、色素が細胞外に流出していない。B: 蛍光色素が細胞体近傍から細胞外へ流出している。

peroxidase complex, GE Healthcare) in 0.1 M PB 中で2時間攪拌浸漬する。1%過酸化水素水 (in 0.1 M PB) 中に5分間浸漬する。スライス切片を洗浄後、0.05%ジアミノベンチジン (DAB; in 0.1 M PB) 中に10分間浸漬し、0.01%過酸化水素水を加えDABが発色するまで攪拌する(図4)。発色終了後、0.1 M PBでスライス切片を洗浄し、0.1 M PBとグリセリンの1:1混合液でカバーガラス封入を行う(図4)。

## III 実験がうまくいかないときの問題解決法

この実験手法を利用した際に起こるトラブルのいくつかと、その解決方法を次に述べよう。

1. 『色素が細胞核の中には入るが、神経突起の先端まで広がらない』ガラス電極を細胞に深く刺しすぎているのが原因である。電極をわずかに後退させる。
2. 『色素が注入箇所から漏れる』固定が悪い(固定が足りない場合もあるし、固定しすぎた場合もありうる)。また、細胞への微小ガラス管の刺入が深すぎる場合もある。
3. 『蛍光顕微鏡下で見ていたときには美しい標本だと思っていたのだが、DAB標本にしたところ、細胞体のまわりに色素が漏れていた』最も良く起きる問題の一つである(図5B)。2と同様、固定が不十分あるいは固定をしすぎのスライスでは、細胞膜が傷んでおり、ルシファーイエローが外に漏れる。また、初心者は、できるだけ多くルシファーイエローを細胞に注入しようとする傾向があるが、そうしてはいけない。注入中に、細胞をよく観察し、樹状突起先端およびスパインまでルシファーイエローが及んだと判断したら、即座に注入電流をとめ、電極を細胞から抜く。
4. 『微小ガラス管刺入時に組織が電極によって引っ張られる』『またはDAPI像が濁って見える』この2つとも、灌流固定が不十分なことが原因である。スライス切片をチャンバーよりとりはずし、再度、短時間(30分から3時間くらい)、4%PFA中に入れて、後固定を行うことで、事

態が改善することもある。次回の実験の際には、固定液の量を増やす。

5. 『実験終了後、スライスからメンブレンフィルタを外そうとしたところ、スライスがメンブレンフィルタにへばりついてしまっている』これも、灌流固定が不十分なことが原因である。メンブレンフィルタごと4%PFAに入れて数時間放置した後、スライスをはがすことを試みる。
6. 『微小ガラス管の刺入跡が組織に残る』灌流固定の際の固定液の量が多すぎることが原因であり、固定液の量を減らす。

## III おわりに

色素の細胞内注入時の動画を下記のURLにて公開している。

<http://www2.bpe.es.osaka-u.ac.jp/cellinjection/>

さらに参考にしていただきたい。引き続き、次号において、本実験手法の様々な応用例を紹介する。

## 参考文献

- 1) Tauchi M, Masland RH : The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. Proc R Soc Lond B November 22, **223** : 101-119, 1984.
- 2) Buhl EH, Schlote W : Intracellular Lucifer yellow staining and electron microscopy of neurons in slices of fixed epithumorous human cortical tissue. Acta Neuropathol **75** : 140-146, 1987.
- 3) Elston GN, Rosa MGP : The occipitoparietal pathway of the macaque monkey: comparison of pyramidal cell morphology in layer III of functionally related cortical visual areas. Cereb Cortex **7** : 432-452, 1997.
- 4) Elston GN, Oga T, Fujita I : Spinogenesis and pruning scales across functional hierarchies. J Neurosci **29**(10) : 3271-3275, 2009a.
- 5) Elston GN, Oga T, Okamoto T, Fujita I : Spinogenesis and pruning from early visual onset to adulthood: An intracellular injection study of layer III pyramidal cells in the ventral visual cortical pathway of the macaque monkey. Cereb Cortex Doi: 10.1093/cercor/bhp203, 2009b.
- 6) DeLima AD, Voigt T, Morrison JH : Morphology of the cells within the inferior temporal gyrus that project to the prefrontal cortex in the macaque monkey. J Comp Neurol **296** : 159-172, 1990.
- 7) Tanigawa H, et al : Distribution, morphology, and GABA immunoreactivity of horizontally projecting neurons in the inferior temporal cortex. J Comp Neurol **401** : 129-143, 1998.