

標的神経細胞の樹状突起形態の可視化(Ⅱ)： 様々な細胞種への応用と超高压電子顕微鏡観察

おかもとつぐひさ おがともふみ 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)
岡本嗣久, 小賀智文, 藤田一郎 | E-mail: tsugu@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を用いて、軽度固定した脳組織のスライスに対して、細胞内色素注入を行うことにより、目的の細胞の樹状突起をすみずみまで染色することができる(小賀ら, 本誌前号)。この手法は大脳皮質, 海馬, 大脳基底核, 小脳, 嗅球などの様々な脳部位だけでなく, 培養切片においても, 様々な細胞種に適用できる。また, 注入する色素を変えることで, 共焦点顕微鏡による観察に適した蛍光強度の高い試料や, 超高压電子顕微鏡による観察が可能な試料など, 目的に合わせた試料を作成することができる。本稿では, これらの応用例の技術的詳細を紹介する。

る要素が大きい。これに対し本手法の最大の利点は, 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。そのため, マカカ属サルなど, 蛍光タンパク質の遺伝子導入による標識が困難な動物種においても, 本手法を適用することで, 目的とする脳部位に存在する標的細胞の樹状突起形態を可視化することができる^{1,2)}。固定脳組織を用いる利点を活かし, ヒトの死後脳や手術時摘出組織³⁾, あるいは神経解剖学知見が著しく欠落している類人猿に対しても, 本手法を適用することにより大きな科学的進展が望める。

研究の目的に合わせた蛍光色素を用いることで様々な研究に応用できる。ルシファーイエローは分子量が小さい(分子量457)ため細胞内に色素が広がりやすく, また, 光変換(フォトコンバージョン)法を用いてジアミノベンチジン(DAB)を発色させる効率も良い。一方, 樹状突起棘(スパイン)などの微小構造を共焦点顕微鏡により撮影するには, より蛍光強度の強いAlexaFluor® 568が適している。しかし, AlexaFluor® 568は光変換を行うと, 細胞体付近がぼやけたように染まることが多い。このため, 目的に応じた色素の使い分けが必要となる。逆行性色素による標識, および上記2種類の蛍光色素注入を用いることで, 特定の領域に投射する細胞とそれ以外の細胞の樹状突起形態を, 異なる蛍光波長をもつ色素で染めわけすることも可能である。免疫染色と組み合わせることで, 特定の化

はじめに

本誌前号において, パラホルムアルデヒドによる灌流固定を軽く施したマウス, ラット, サルの大脳皮質錐体細胞への蛍光色素ルシファーイエローの細胞内標識法を紹介した。神経細胞の樹状突起形態を調べる方法としてはゴルジ染色が一般的であるが, この手法は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, 染色できる細胞の種類やその数は偶然に任せ

学的性質をもった細胞の形態を解析することも可能である。

大脳皮質だけでなく様々な脳部位にこの手法を適用することができる。本稿では、小脳プルキンエ細胞や海馬錐体細胞、線条体、嗅球僧帽細胞、培養組織への色素注入法について紹介する。本稿では、さらに、DAB染色を行った樹状突起断片を超高圧電子顕微鏡で観察する手法について述べる。超高圧電子顕微鏡による観察は、樹状突起およびスパインの形態の精度の高い測定を、能率よく実現することができる。

III 皮質錐体細胞以外への細胞内色素注入

小脳プルキンエ細胞への細胞内色素注入法

初めに、ラットの小脳プルキンエ細胞への細胞内色素注入法について述べる。先号で述べた方法でラットを灌流固定し⁴⁾、灌流後に小脳を取りだしたあと、スライサー (Vibratome Series 1500, Vibratome 社) を用いて矢状断に切片 (250 μm 厚) を作成する。プルキン

エ細胞は矢状面に対して平行に樹状突起を伸ばしているため、矢状断に切ることによって、プルキンエ細胞の樹状突起全体を含む切片を作成できる。スライス後、作成した切片を 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, シグマ) 溶液に 5 ~ 15 分浸漬して細胞核染色を行い、蛍光顕微鏡下で可視化した細胞核を確認する。プルキンエ細胞の核は顆粒層のすぐ外側に並んでおり、また非常に大きいため容易に判別できる。細胞内色素注入の際の微小ガラスピペット、メンブレンフィルタを用いた切片の固定に関しては、先号と同じ方法を用いる。

プルキンエ細胞の染色の際に問題になるのは、細胞体から色素が漏れやすいことである。その正確な理由は不明であるが、プルキンエ細胞や大脳皮質 5 層の錐体細胞のような、大型の細胞体を持つ神経細胞でよく起こる問題である。そのため、プルキンエ細胞の細胞体に色素を注入しただけでは、樹状突起の先端まで色素が行き渡らないことが多い。そこで、まず細胞体に色素を注入し、樹状突起の一つ目の枝別れまで染めた

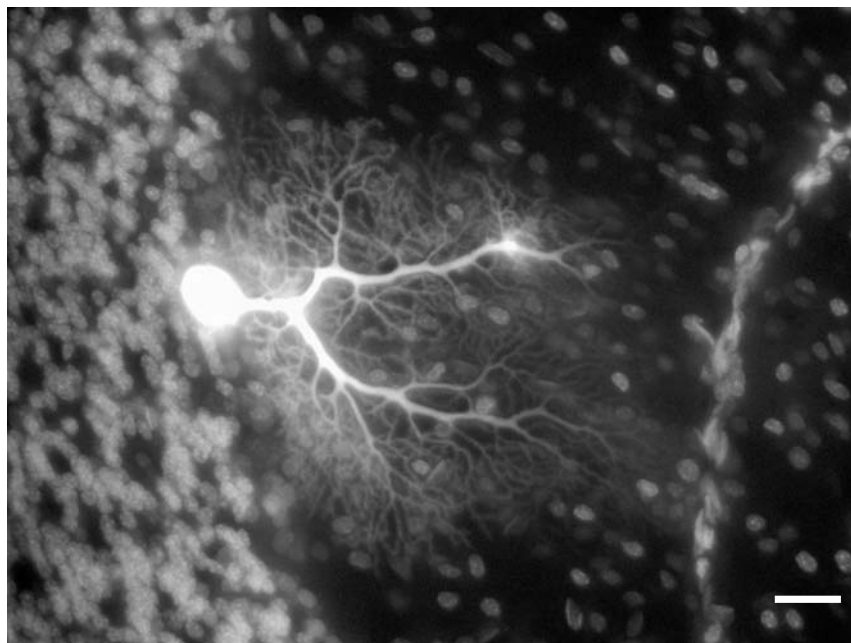


図1 小脳プルキンエ細胞への細胞内色素注入例

右側が小脳表層である。プルキンエ細胞の細胞核は非常に大きいため、顆粒層の外側に容易に見つけることができる。本細胞の染色では、細胞体、細胞体右側の一つ目の樹状突起分岐点、および右上部の樹状突起の計三ヵ所に対して AlexaFluor® 568 の細胞内色素注入を行い、樹状突起全体を染めている。スケールバー：24 μm 。(p.3 カラー図参照)

のち、いったん電極を抜き、樹状突起の分岐点に刺し直し、再度色素注入を行う。この方法により、およそ10～15分で細胞全体を染め上げることが可能になる(図1)。図1に示す細胞では、細胞体と樹状突起の計三か所で色素の注入を行うことで、樹状突起の全体像を可視化した。

嗅球僧帽細胞への細胞内色素注入法

ルシファーイエローの細胞内色素注入を嗅球の僧帽細胞へ適用した報告が出ている⁵⁾。僧帽細胞は嗅球表層に向かう主樹状突起と細胞体から側方に伸びる副樹状突起があり、その両方を染色するには切片を作成することなく、色素を注入する必要がある。このため、図2に示す方法で、前頭葉の一部を含むブロックを作成し、ブロックごと DAPI 染色を行い、顕微鏡下で、直接、細胞内色素注入を行う(図2)。DAB 反応を行うには、色素注入後の脳組織ブロックを薄切して作業を行う。

僧帽細胞は、嗅球において、顆粒細胞層(嗅球内部の細胞の密度が非常に高い層)のすぐ外側に並び、僧帽細胞層を形成している。DAPI 像を手掛かりに、こ

の層にある大型の核を持つ細胞へ色素注入を行う。しかし、主樹状突起が長い場合、その先端にある糸球体まで完全に染めることは難しい。そこで、小脳プルキンエ細胞の場合と同じく、主樹状突起の途中部に対して細胞内色素注入を行うことで、糸球体まで染めることができる。ある程度の熟練は必要とされるが、電極先端の径は樹状突起よりもはるかに細いため、色素注入は可能である。

海馬錐体細胞、線条体への細胞内色素注入

海馬錐体細胞、および線条体の中型有棘神経細胞に対しては、先号と同様の方法を用いて灌流固定を行い、脳ブロックの平坦化を行わずにスライスすることで、標本を作成することができる⁶⁾。

大脳皮質における非錐体細胞への細胞内色素注入

灌流固定、スライス切片の作成、細胞内色素注入の方法は先号と同じ方法を用いる。先号において、錐体細胞への細胞内色素注入の方法を述べたが、大脳の細胞種は核の形態によってある程度同定することができる(図3)。

3層においても5層においても、錐体細胞は DAPI

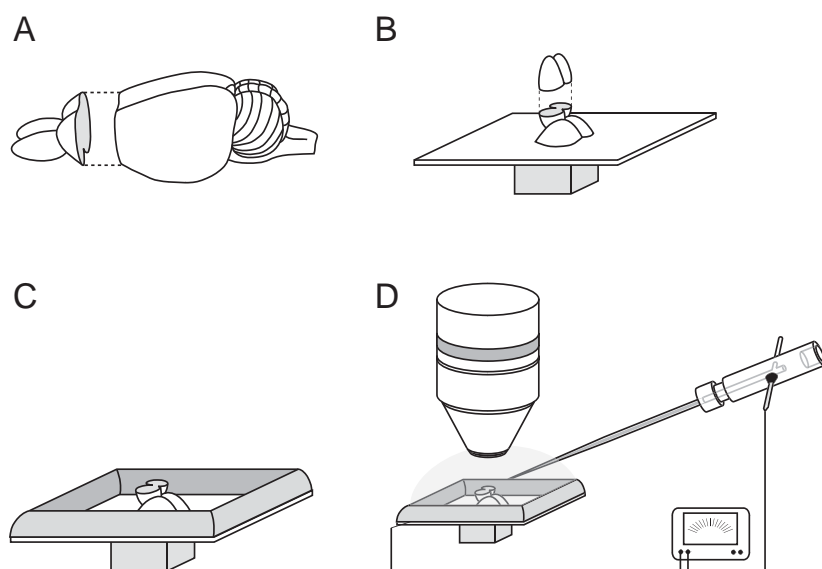


図2 嗅球への細胞内色素注入法

A：嗅球に対して細胞内色素注入を行う際には、まず前頭葉の一部を含むブロックを分離する。B：嗅球を含む脳ブロックをスライサーの台に接着し、スライサーで嗅球先端を分離する。C：スライサーの台の周囲に粘着ゴムを用いてチャンバーを作成する。D：顕微鏡下に固定し、リン酸緩衝液を加える。1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, シグマ) 液をリン酸緩衝液に1 ml 加えることにより、約15分で細胞核が可視化される。細胞内色素注入後は、粘着ゴムで作成したチャンバーを取り除き、スライサーに再度セットして、DAB 染色を行うための切片を作成する。

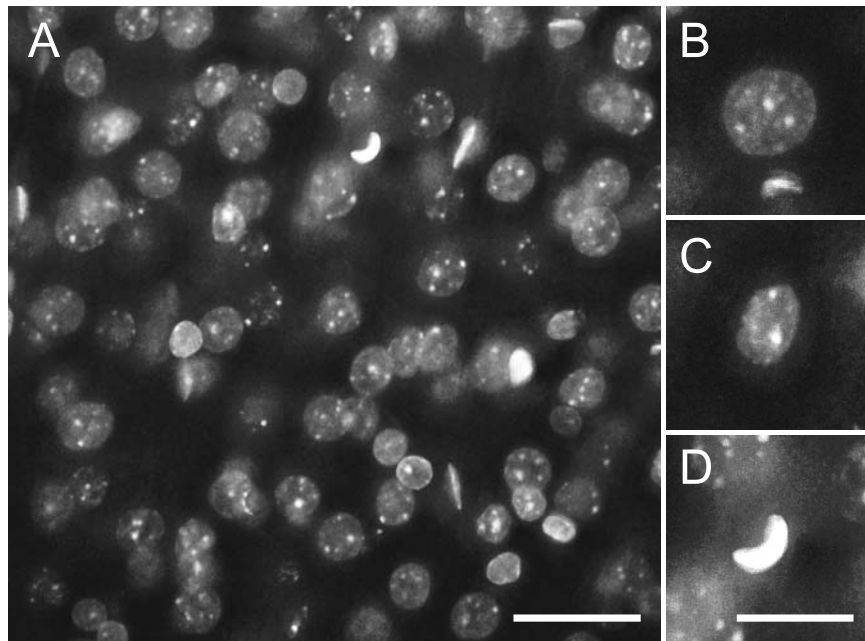


図3 大脳皮質細胞核のDAPI像

大脳皮質3層のDAPI染色像。A：細胞核は大きさ、形状、蛍光強度、核小体の分布など、様々な点で細胞種ごとに異なるため、錐体細胞の判別は容易である。左上は血管。B：錐体細胞の細胞核。大きく球形であり、蛍光強度が比較的低い。強染される顆粒が数個観察される。C：ニューログリア細胞の細胞核。錐体細胞に比べ、核全体の染まりが強い。錐体細胞で見られた強染される顆粒は明瞭ではなく、少し角ばった楕円形である。錐体細胞の細胞体近傍に密着して位置することが多い。D：血管付近に多く存在する細胞核。色素が血管内に広がってしまうことを避けるため、この核の周囲の細胞核に色素注入を行わないことが望ましい。スケールバー：12 μ m

による核染色像が他の細胞種に比べて大きく、蛍光強度は低く、球形に近い。また、4層有棘星状細胞 (*Spiny stellate cell*) はDAPI像が滑らかな球形であるが錐体細胞の細胞核よりも小さく、蛍光強度も高いため、一見して錐体細胞と弁別できる。これに対しニューログリアフォーム細胞 (*Neurogliaform cell*, 抑制性神経細胞の一種) は、DAPIによる核染色像がさらに小さく、やや角ばった円形や歪んだ円盤状をしており、蛍光強度が高い⁷⁾。これらの核形態の特徴から判断して、ニューログリアフォーム細胞のみを選択して細胞内色素注入を行うことが可能である (図4)。

ニューログリアフォーム細胞以外の抑制性神経細胞の核の形態の分類については現在、研究が進行中である。

培養スライスへの細胞内色素注入法

灌流固定した動物から取り出した組織ではなく、組織培養を行っているスライス切片に対しても色素注入を行うことができる。培養切片を室温にさらすと、す

ぐに細胞膜が自己融解され、色素が漏れるようになる。そこで、培養組織を恒温器から出したら、なるべく早く4% PFA in 0.1 M リン酸緩衝液中に15分程度浸漬する。200 μ m以上の厚さの場合、切片内部が固定されないことがあるので、あまり厚すぎないことが望ましい。固定後、切片をリン酸緩衝液で洗浄し、DAPIに5~15分間浸漬し、細胞核を可視化する。切片をメンブレンフィルタ (AABG02500, ミリポア) の上に乗せ、さらにもう一枚穴のあいたメンブレンフィルタを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。固体培地上で培養を行っている場合はメンブレンフィルタを用いずに、短く切ったピアノ線などを切片両脇に置き、切片を浮かせないようにするといった方法を取る。以下は先号と同様の方法で染色することが可能である。ステージを動かしたときに切片表面が振動するようであれば、固定時間をさらに15分長くする。

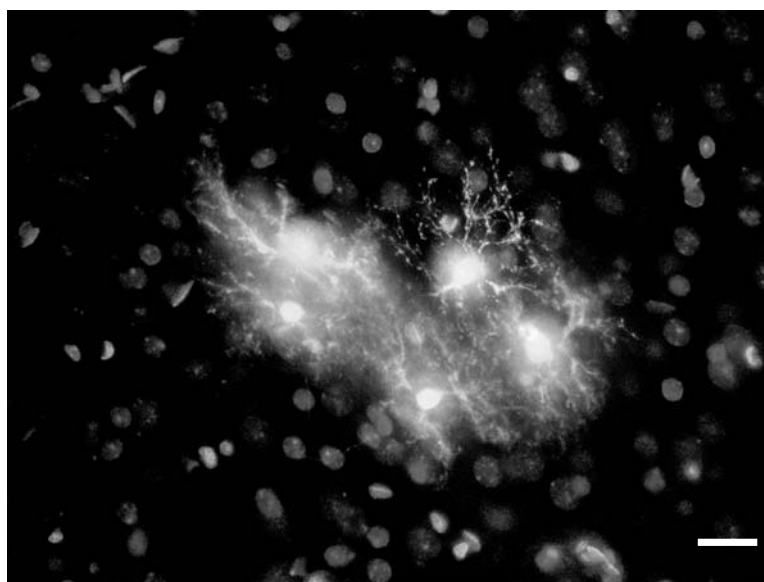


図4 ニューログリア細胞への細胞内色素注入

細胞核の形態から判断してニューログリア細胞と予想した細胞5個に色素を注入した。染色された細胞は予想通り、ニューログリア細胞のみであった。スケールバー：24 μ m。(p.3カラー図参照)

色素注入がうまくいかないときの問題解決法

『嗅球、あるいは小脳において、色素が注入箇所から漏れる』灌流固定による固定の度合いは、脳の部位によって少しずつ異なり、小脳や嗅球において良い標本を作成するためには、大脳での細胞色素注入時よりも素早く、少し強く固定する必要がある。特に小脳ブルキンエ細胞は細胞膜が壊れやすく、10程度の細胞に細胞内色素注入を行い、1細胞が樹状突起末端まで染められる程度である。各部位に適した固定を行うことと、複数の細胞に色素注入を行い、細胞膜が維持されている細胞を根気よく探すことが重要である。

III 超高压電子顕微鏡観察への応用

樹状突起やスパインの形態や大きさは樹状突起におけるシナプス入力信号の統合過程に影響を及ぼす⁸⁻¹⁰。樹状突起スパインの柄の直径は、多くが0.1 μ m以下であり、これらの微小構造を精度良く形態学的に定量するには、電子顕微鏡を用いた解析が必要である。超薄切片(70 nm)を通常の電子顕微鏡で観察する方法では細胞内部の微細構造(たとえば、シナプス小胞やシナプス後膜)が観察できるが、スパインの形状を決

定するには、何十枚もの連続超薄切片を作成しなくてはならず、高度な技術と、膨大な時間と労力が必要とされる。また、超薄切片ごとの伸縮のばらつきによる誤差も生じる。

この問題点を解決する方法のひとつは、加速電圧が100万電子ボルトを超える超高压電子顕微鏡による電子線トモグラフィー法を適用することである。この方法を用いることで、厚い(~4 μ m)試料に含まれる10~20 μ mの長さの樹状突起断片を、比較的短時間で三次元再構成することができる。以下、サル大脳皮質錐体細胞にルシファーイエローの細胞内色素注入を行った切片から超高压電子顕微鏡観察用の試料を作成し、樹状突起の三次元構造を再構成する手法について述べる。

なお、我々が超高压電子顕微鏡を用いた大阪大学超高压電子顕微鏡センターは国内外の研究者に広く開放されている(<http://www.uhvm.osaka-u.ac.jp/jp/>)。

(灌流後)前固定

2% グルタルアルデヒド(電子顕微鏡グレード, 071-02031, Wako), 2% パラホルムアルデヒド(PFA: extra pure paraformaldehyde, メルク) in 0.1 M リン酸緩衝液の中に切片を浸漬し、4 $^{\circ}$ Cで一晩切片を前固定す

る。固定後、リン酸緩衝液中で切片を10分間（6回）洗浄する。

光変換法を用いたDAB染色

DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydro chloride) はオスミウム好性のため、DABで染色されている細胞は、四酸化オスミウムで固定染色を行う過程で強調され、電子顕微鏡で観察することが可能である。このため、まず細胞に注入された蛍光色素をDAB発色へ光変換する。細胞内色素注入を行った切片を0.05% DAB (S2002-25G, SIGMA) in 0.1 M リン酸緩衝液中に、4℃で30分以上浸漬し、DABを切片内部に浸透させる。その後、切片をスライドガラス上に置き、切片の上に同濃度のDAB溶液を数滴垂らし、カバーガラスを付

けずにルシファーイエローに対する励起光（430 nm 近傍の青色光）を顕微鏡下で照射する。この際、染色の進行度合いを顕微鏡で確認しながら進める。0.1 M カコジル酸緩衝液（10.7 g $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.23 ml 36.7% HCl in 1L 純水）中で切片を10分間（6回）洗浄する。

（灌流後）後固定

2% 四酸化オスミウム（ OsO_4 4% 溶液，電子顕微鏡グレード，157-01141, Wako）in 0.1M カコジル酸緩衝液の中に切片を入れ、遮光下で4℃，2時間静置することにより、後固定を行う。その後、スライス切片を0.1 M カコジル酸緩衝液内で10分間（6回）洗浄する。四酸化オスミウムは酸化しやすく毒性も高いた

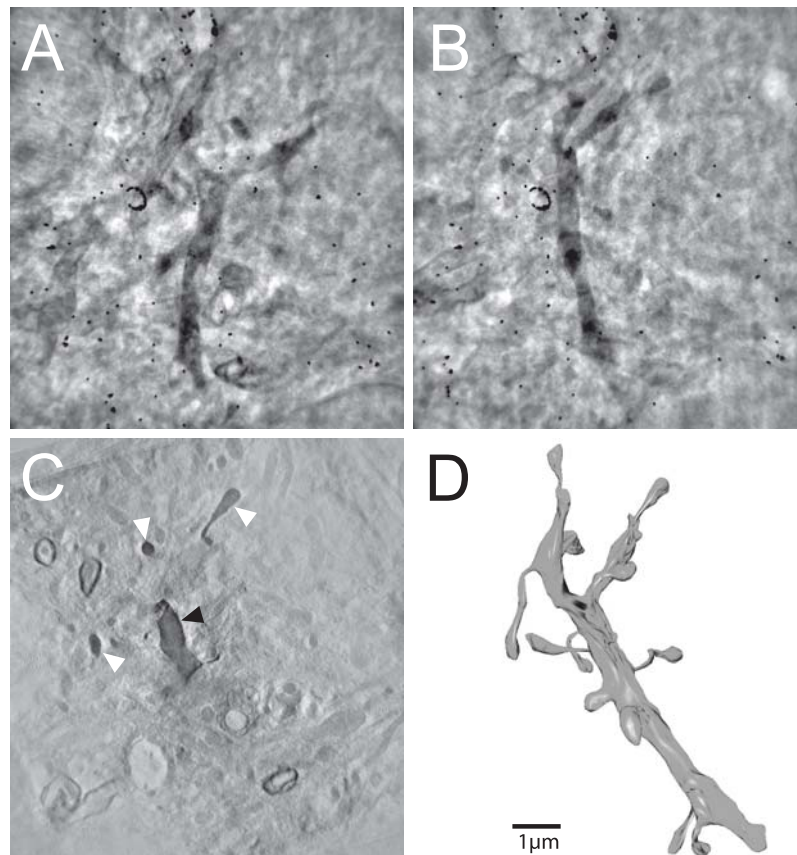


図5 超高压電子顕微鏡トモグラフィと三次元再構成

A：超高压電子顕微鏡を用いて撮影した、サル大脳皮質（一次視覚野）の錐体細胞の樹状突起像。ステージを1度ずつ傾けて撮影を行う。この画像では-30度傾けて撮影している。B：ステージを+30度傾けて撮影した、Aと同一の樹状突起。C：3次元構造再構成ソフトウェアIMODを用いてトモグラフィ処理を行い作成した断層画像。樹状突起の中央部（黒矢印）およびスパイン（白矢印）の断面が確認できる。D：断層画像をもとに行った、樹状突起の三次元再構成。スパインのネックの形状まで詳細に再構成できている。

め、この作業はドラフト内で行い、オスミウム酸廃液は金属廃液として廃棄する。

脱水および樹脂置換

固定後、組織内の水分を上昇系列のエタノールで脱水する。50%、70%、80%、90%エタノールに、切片をそれぞれ10分間浸漬し、その後99.5%エタノール中に切片を一度くぐらせたのち、100%エタノール中で15分間浸漬する。バイアル瓶内で酸化プロピレン(propylene oxide, 167-11076, Wako)中に10分間(2回)切片を浸漬し、その後、熱硬化樹脂50% Quetole 812 (13.36 g Quetole 812, 9.1 g DDSA, 5.95 g MNA, 0.38 g DMP30 for 10 ml 酸化プロピレン)に浸し、ドラフト内で一晩浸漬する。翌日50% Quetole 812を100% Quetole 812に置換し、3~8時間切片を浸漬し、樹脂を浸透させる。樹脂置換後、新たに調製した100% Quetole 812内に切片を入れ、60℃で72時間静置し、樹脂を硬化させる。

超薄切およびグリッドへの固定

超薄切片作成用マイクローム(Ultra-cut J, Reichert-Jung)を用いて、樹脂包埋標本を4 μ mの厚さに薄切し、フォルムバル(0.5%フォルムバル溶液, 日新EM, 604)支持膜を張ったグリッドに乗せる。グリッドの薄切片側にもフォルムバル支持膜を張り付ける。

3次元再構成を行う際の指標とするために切片に金コロイド粒子をまぶす作業を次に行う。グリッドをピンセットでつかみながら、直径60 nmの金コロイド粒子を含む溶液(BBInternational, GC60)5 μ lを滴下し、5~10分間安置する。その後、濾紙を用いてグリッド上の金コロイド溶液を吸い取る。グリッドの反対面に対しても同様の手順で金コロイドを付着させる。その後、強い電子線による切片の変形を防ぐため、グリッドの両面にカーボン膜を蒸着させ、試料支持膜とする。

超高圧電子顕微鏡での撮影と三次元再構成

観察角度を-60度から+60度まで、角度1度ステップでグリッドを傾斜させて、超高圧電子顕微鏡による撮影を行う。撮影後、3次元構造再構成のためのフリーソフトウェアIMOD(コロラド大: <http://bio3d.colorado.edu/imod/>)を用いて、試料を連続的に傾斜させて撮影した多数の投影像から、切片表面方向に対して平行な断層画像を作成する(トモグラフィ処理)。

断層画像を元に、対象物を三次元再構築する。通常の電子顕微鏡による連続超薄切片像を用いた三次元再構築法では、撮影、切片同士の位置合わせ等に長い時間がかかるが、本手法を用いれば、約10 μ m長の樹状突起を約8時間で三次元再構築することが可能である(図5)。

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/>

二回にわたり細胞内色素注入の技術を紹介した。これらの技術が現在の形態学研究のさらなる発展に貢献できれば幸いである。

参考文献

- 1) Elston GN, et al : Spinogenesis and pruning scales across functional hierarchies. *J Neurosci* **29** : 3271-3275, 2009.
- 2) Elston GN, et al : 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. *Cerebral Cortex* doi:10.1093/cercor/bhp203, 2009.
- 3) Elston GN, et al : The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey. *J Neurosci* **1**; **21** : RC163, 2001.
- 4) 小賀智文, 他 : 標的神経細胞の樹状突起形態の可視化 : (I) 軟固定大脳皮質への細胞内色素注入法. *脳* **21**, Vol. 12, No. 4 : 71-77, 2009.
- 5) Reyher CK, et al : Olfactory bulb granule cell aggregates: morphological evidence for interperikaryal electrotonic coupling via gap junctions. *J Neurosci* **11** : 1485-1495, 1991.
- 6) Santos HR, et al : Spine density and dendritic branching pattern of hippocampal CA1 pyramidal neurons in neonatal rats chronically exposed to the organophosphate paraoxon. *Neurotoxicology* **25** : 481-494, 2004.
- 7) Elston GN, et al : Comparison of dendritic fields of layer III pyramidal neurons in striate and extrastriate visual areas of the marmoset: a Lucifer yellow intracellular injection. *Cerebral Cortex* **6** : 807-813, 1996.
- 8) Stuart GJ, et al : Dendrites. 2nd Edition, Oxford University Press, 2008.
- 9) Chklovskii DB, et al : Cortical rewiring and information storage. *Nature* **431** : 782-788, 2004.
- 10) Kasai H, et al : Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* **26** : 360-368, 2003.