

超高压電子顕微鏡による嗅球のニューロンとグリアの三次元構造解析

High Voltage Electron Microscopy for Three-Dimensional Structure of Neuron and Glia in the Olfactory Bulb

樋田 一徳^a, 清蔭 恵美^{a, b}, 有井 達夫^c

Kazunori Toida, Emi Kiyokage and Tatsuo Arie

^a川崎医科大学解剖学^bDepartment of Anatomy and Neurobiology, School of Medicine, University of Maryland Baltimore^c自然科学研究機構生理学研究所脳機能計測センター形態情報解析室

要旨 超高压電子顕微鏡の医生物学領域への応用の最大の利点は、高エネルギー電子線による厚い切片の観察にある。更に厚い試料を傾斜して連続的な透過像をコンピューター画像処理することにより、切片内に埋もれている内部構造を高解像レベルで立体的に解析できる。この三次元トモグラフィ解析法は、通常の透過型電子顕微鏡の連続切片解析再構築法とともに脳内のニューロンやグリアの複雑な構造を理解するために極めて有効な解析手法である。本稿では超高压電子顕微鏡の概要を筆者らの具体的な解析例とともに紹介し、その有用性と将来の可能性について論じたい。

キーワード：超高压電子顕微鏡，嗅球，ニューロン，グリア，トモグラフィ

1. はじめに

超高压電子顕微鏡は、加速電圧が数百 kV を超える高エネルギー電子線を用いた透過型電子顕微鏡で、材料科学や結晶科学などの分野で開発使用されてきたが、1960年代後半より医学生物学の研究領域に応用が試みられて来た。日本では国立生理学研究所（現自然科学研究機構生理学研究所）の濱清名誉教授が中心となって、1981年度に生物学専用の加速電圧 1000 kV の超高压電子顕微鏡を同研究所に設置した^{1,2)}。これは4階建ての専用の建物内に設置され、鏡筒部分が1, 2階、電子銃部分が3, 4階を占める巨大な電子顕微鏡である。（<http://www.nips.ac.jp/kyodo/equipment.html#s1>）（なお現在では大阪大学超高压電子顕微鏡センターに更に巨大な3000 kV の超高压電子顕微鏡が設置されており、詳細は本特集の小澤一史教授の稿を参照いただきたい。）

導入以来様々な改良を加えられ性能が向上し、また設置直後より同研究所が共同利用実験として研究課題を全国公募し、国内のみならず韓国や米国など海外からも積極的に利用し成果を挙げて来た（<http://www.nips.ac.jp/kyodo/index.html>）²⁾。筆者らもこの共同利用により一貫して嗅球ニューロンとグリアの構造解析を行って来た。本稿ではこれまでの解析例を紹介しながら、超高压電子顕微鏡の特徴と有用性、そ

して将来の可能性について論じたい。

2. 嗅球の組織構築

嗅覚の一次中枢の嗅球は、他の脳領域に比べ少ないニューロン種により構成される単純な層構造が特徴である。その組織構築の中に豊富な神経活性化学物質が存在することから、様々な化学的マーカーによりニューロンとグリアの特異的染色が可能となり、更に共焦点レーザー顕微鏡によりニューロンの化学的・形態的多様性が明らかとなって来た^{3,4)}。一方で分子レベルの嗅覚情報処理機構の解析も目覚ましく進み、嗅球は多くの脳研究者より解析対象として注目されている。

3. 超高压電子顕微鏡による嗅球ニューロンの構造解析

具体的に筆者らが行なったラット嗅球ニューロンの超高压電子顕微鏡による構造解析についてまず紹介したい。嗅球表層にニューロンを主構成要素とした糸球体という直径100 μm の構造があり、それが特定な匂いに反応する機能的単位として注目されている。匂い情報処理に重要なのはニューロン間のシナプス結合である。近年、糸球体を構成するニューロンは化学的サブタイプに分かれている事がラットやマウスで明らかとなった⁴⁾。注目すべきは異なるタイプのシナプス結合を形成するニューロンは異なる形態を示し、特に糸球体内の突起網の構造が多様であることである⁴⁾。図1aとcは同じ標本を蛍光多重免疫染色したものであるが、完全に独立したニューロン群の糸球体内構造は全く異なる。そしてニューロンによっては共焦点レーザー顕微鏡で解析が

^a 〒701-0192 倉敷市松島577

TEL: +81-86-462-1111 ext. 27353; FAX: +81-86-462-1199

E-mail: toida@med.kawasaki-m.ac.jp

2008年8月25日受付

不可能である (図 1a)。この点, 超高圧電子顕微鏡は素晴らしい解像力で直径 $1\ \mu\text{m}$ 以下の細い突起の複雑な絡まり具合を確実に追跡する (図 1b, d)。更に最低倍率 1000 倍で広視野撮影した場合でも高解像解析が可能で (図 1e, f), 光学顕微鏡と従来の透過型電子顕微鏡とのギャップを見事に補い, シナプスの三次元的な糸球体内分布について別の観点からの情報が得られる。

4. 超高圧電子顕微鏡による嗅球グリアの構造解析

グリアの構造は複雑である。実際に顕微鏡下のアストロサイトは“たわし”のような形態で (図 2a), また免疫化学マーカーである S100B (図 2b-d) や GFAP (図 2c, d) で染色しても全体像は描出しえない。

このアストロサイトを超高圧電子顕微鏡で解析すると, 光学顕微鏡の解像度を超える $0.1\ \mu\text{m}$ 以下の膜状構造が嗅球顆粒細胞群を個別に取り囲んでいる像が立体的に観察される

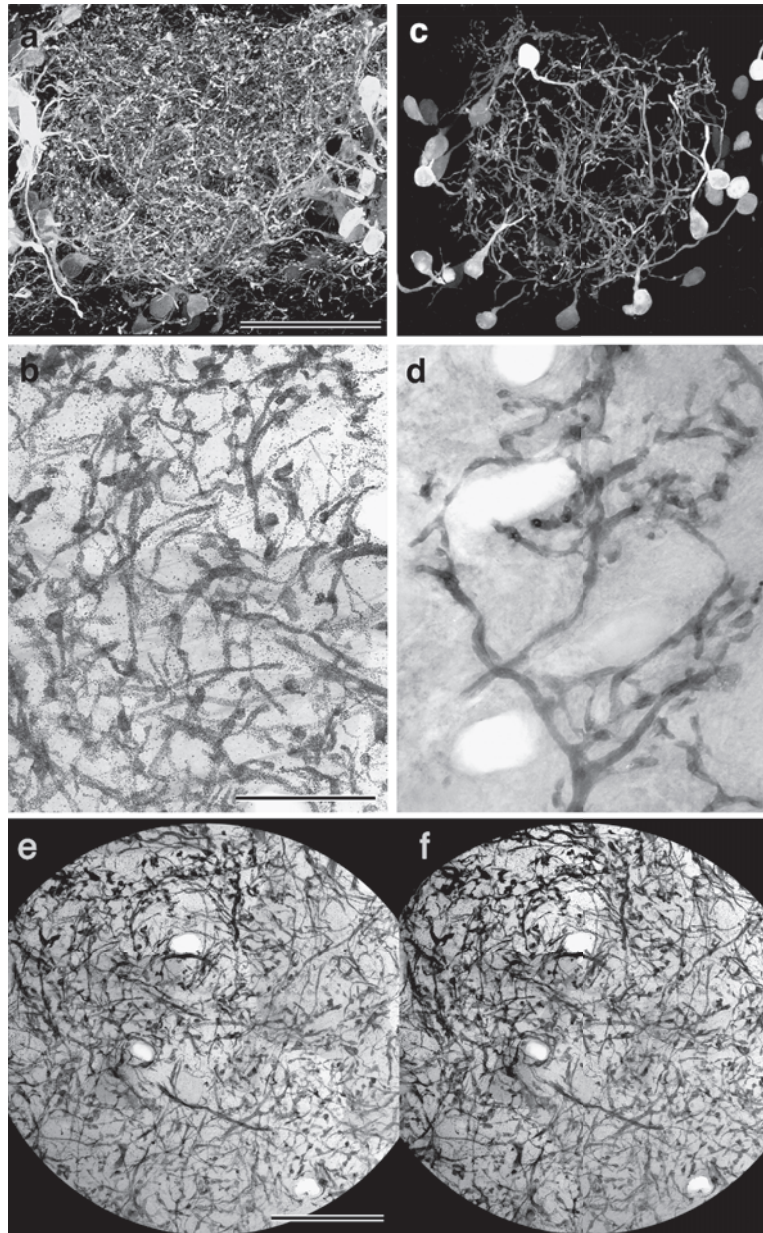


図 1 超高圧電子顕微鏡によるニューロンの構造解析

a; ラット嗅球糸球体 Tyrosine Hydroxylase (TH) 免疫陽性ニューロンの共焦点レーザー顕微鏡投射像 ($50\ \mu\text{m}$ 厚)。 b; TH ニューロンの超高圧電子顕微鏡像 ($5\ \mu\text{m}$ 厚)。 c; Calbindin (CB) 免疫陽性ニューロンの共焦点レーザー顕微鏡投射像 ($50\ \mu\text{m}$ 厚)。 d; CB ニューロンの超高圧電子顕微鏡像 ($5\ \mu\text{m}$ 厚)。 e, f; TH ニューロンの超高圧電子顕微鏡ステレオ像 ($5\ \mu\text{m}$ 厚; $\pm 8^\circ$)。 a と c は同じ標本の多重免疫染。 b, e, f は FluoroNanogold を銀増感したもの⁷⁾, d は Cobalt/Nickel- 増感 DAB 発色による⁸⁾。 Scale bars; a は $50\ \mu\text{m}$, b は $5\ \mu\text{m}$, e は $25\ \mu\text{m}$, a と c, b と d, e と f は同倍率。

(図 3a, b). 顆粒細胞は細胞体が敷石状に集塊しているが、一方で顆粒細胞間に薄いシート状構造が介在している事が、透過型電子顕微鏡超薄切片観察でも確認されており、この構造の立体的形態が超高压電子顕微鏡で観察可能となる(図 3c, d).

超高压電子顕微鏡は傾斜撮影した写真を立体視するだけでなく(図 3a-d), 正確に制御した試料傾斜により 2° 間隔で $\pm 60^\circ$ 連続傾斜撮影を行い、その連続傾斜撮影像をデジタル処理する事により三次元トモグラフィー解析を可能にする. 図 3c, d に示す嗅球顆粒細胞層のアストロサイトの突起の一部を 5° 間隔で $\pm 60^\circ$ 連続傾斜撮影し、そのデータを 360° 回転観察可能なデジタルデータに変換した(図 3e; 15° 間隔の連続回転像). このデジタルデータは三次元的ボクセル情報となっており、顆粒細胞を覆う面積の比率が計測でき、また任意の断面像の情報が得られる. 図 3f-h は $3\mu\text{m}$ 厚の試料を120枚の連続再スライスし、そのうちの36枚目(f), 46枚目(g), 56枚目(h)を示す. 換言すれば 25nm という極超薄切片像の情報も取得可能となる. トモグラフィー解析したゴルジ染色部位の超薄切片を通常の透過型電子顕微鏡で観

察すると、薄いシート状の構造が銀染色されている(図 3i). この構造が、島状に集塊する顆粒細胞間の化学的コミュニケーションにどのように関与するのかが今後の課題である.

なお、トモグラフィーに用いたソフトは、“IMOD”というフリーのソフトウェアで、トモグラフィーのみならず連続切片再構築や立体画像表示まで幅広く利用できる(<http://bio3d.colorado.edu/imod/>; 現在、筆者らが使用しているのは Version 3.9.3 で、随時更新されている.) これ以外にも数多くあり、詳しくは以下のサイトを参照いただきたい. (<http://www.hitachi-hitec.com/em/tem/h7650.html>, <http://www.jeol.co.jp/services/analytical/no49/p05.html>)

5. 超高压電子顕微鏡の今後の可能性

以上の筆者らの解析例以外に、生理学研究所共同利用実験による多くの素晴らしい研究があるので併せて参照されたい^{2,5,6)}.

超高压電子顕微鏡の今後は、特に分子レベルの化学・生物学の発展による観察材料の多様化、技術進歩による顕微鏡自体の革新とともに様々な可能性が考えられる. 広視野で原子

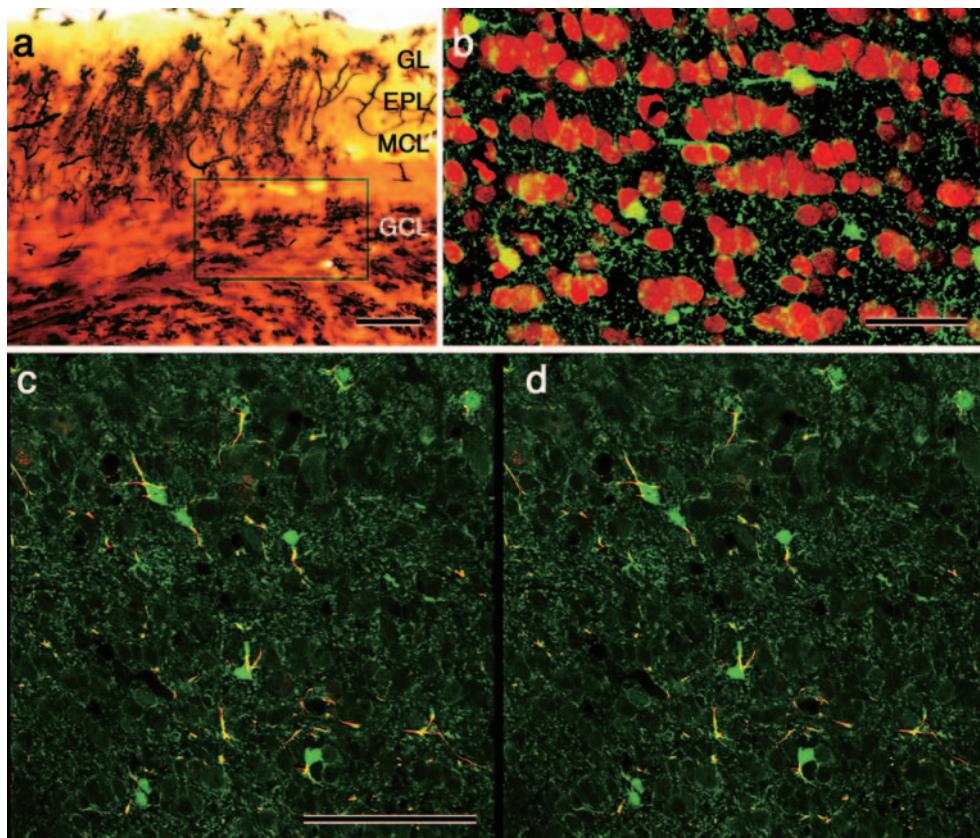


図2 光学顕微鏡によるグリアの解析

a; ラット嗅球ゴルジ銀染色の光学顕微鏡投射像 ($100\mu\text{m}$ 厚). GL; 糸球体層, EPL; 外網状層, MCL; 僧帽細胞層, GCL; 顆粒細胞層. 四角枠は顆粒細胞集塊を覆う Astrocyte 像を示す. b; aの四角枠に相当する顆粒細胞層の免疫染色像 ($50\mu\text{m}$ 厚). 緑; 抗 S100B 抗体, 赤; PI (Propidium Iodide= 核酸染色). S100B 免疫陽性要素が顆粒細胞を取り囲んでいる. c, d; 顆粒細胞層の免疫染色ステレオ像 ($50\mu\text{m}$ 厚; $\pm 5^\circ$). 緑; 抗 S100B 抗体, 赤; GFAP. S100B 免疫陽性要素の一部に GFAP 免疫陽性が認められる. b と同様, S100B 免疫陽性要素が個々の顆粒細胞を取り囲んでいるのが立体的に観察できる. Scale bars; aは $100\mu\text{m}$, bは $50\mu\text{m}$, cは $100\mu\text{m}$, cと dは同倍率.

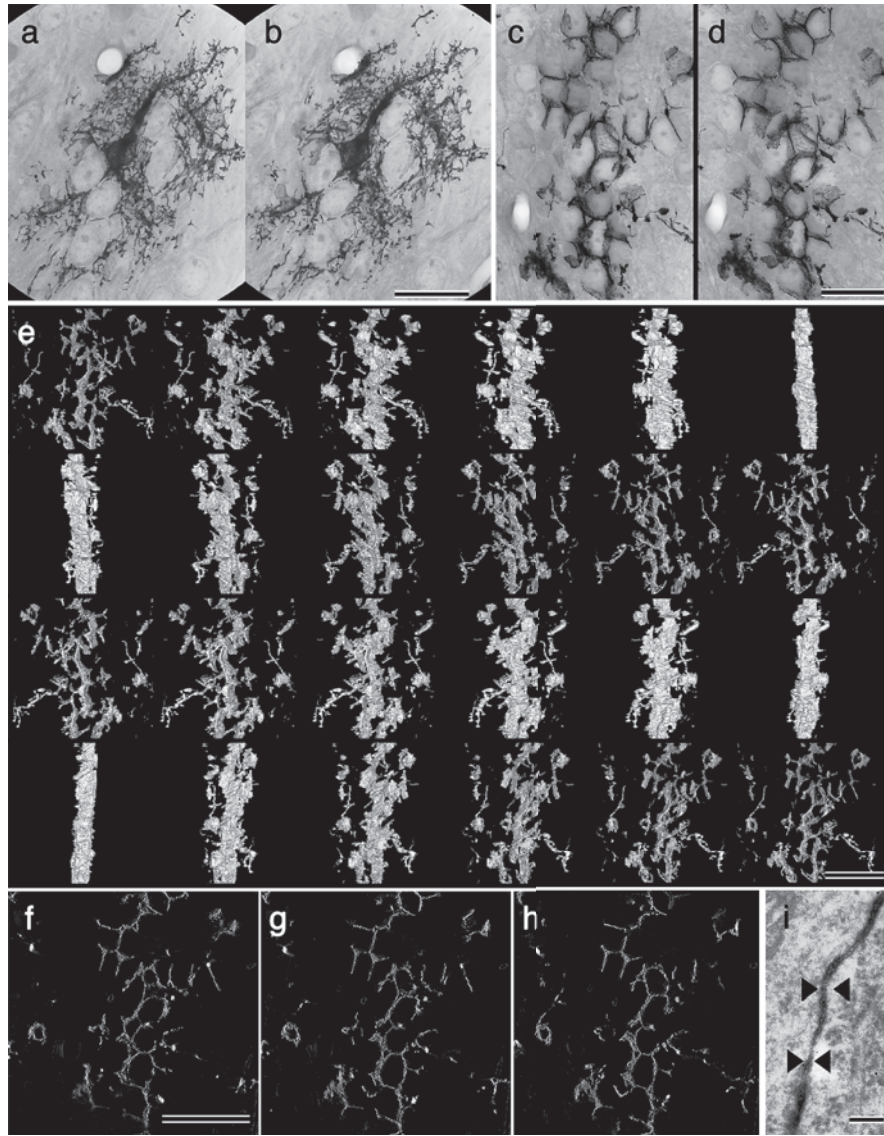


図3 超高压顕微鏡によるグリアの解析

a, b; ラット嗅球ゴルジ銀染色された Astrocyte の超高压顕微鏡ステレオ像 (5 μm 厚; $\pm 8^\circ$). Astrocyte が顆粒細胞集塊を取り囲んでいる. c, d; 顆粒細胞の突起の一部のステレオ像 ($\pm 8^\circ$). e; c, d の像をトモグラフィ解析し, 15° 間隔で 360° 回転した像. f, g, h; e で得られた 3 μm 厚の三次元再構築像を連続的に 120 枚再スライスし, そのうちの 36 枚目 (f), 46 枚目 (g), 56 枚目 (h) の 250 nm 間隔の断面像を示している. i; トモグラフィ解析した同じ標本の隣接部位の超薄切片像 (75 nm 厚). 顆粒細胞間に見られたゴルジ染色陽性シート状構造 (相対する鎌で示す).

Scale bars; a は 100 μm , b は 50 μm , c, e, f は 100 μm , i は 0.1 μm , c と d 及び f-h は同倍率.

レベルの観察が可能な高解像力を用いた無機と有機の接点の探索, 高い電子線透過能や短い波長を用いた未固定材料の観察, またデジタル処理など, 夢は大きく膨らむ. ただ装置や技術がいかに進歩しても, 我々は, “よき試料を得て何を見るか?” を常に追求することが重要であろう.

本稿で紹介した解析事例は, 前述の自然科学研究機構生理学研究所超高压電子顕微鏡共同利用実験 (NIPS; H-1250M), 及び日本学術振興会科学研究費補助金 (19500295) により得られたものである.

文 献

- 1) 濱 清, 有井達夫: 電子顕微鏡, 35, 141-143 (2000)
- 2) 有井達夫, 他: 生理学研究年報第 27 巻 p. 369-379 (2006)
- 3) 樋田一徳: 顕微鏡, 40, 20-26 (2005)
- 4) Toida, K.: *Anat. Sci. Int.*, 83, 207-217 (2008)
- 5) Kosaka, T. and Hama, K.: *J. Comp. Neurol.*, 249, 242-260 (1986)
- 6) Hama, K., Arii, T., Katayama, E., Marton, M. and Ellisman, M.H.: *J. Neurocytol.*, 33, 277-285 (2004)
- 7) Toida, K., Kosaka, K., Aika, Y. and Kosaka, T.: in Nagatsu T. et al. (Ed), *Advance in Behavioral Biology* vol. 53, Kluwer Academic/Plenum: 2002, p. 289-292
- 8) Toida, K., Kosaka, K., Heizmann, C.W. and Kosaka, T.: *J. Comp. Neurol.*, 392, 179-198 (1998)