

神経形態学におけるデジタルトレース

Disital Tracing in Neuro-Morphology

清蔭 恵美, 野津 英司, 赤木 貴彦, 樋田 一徳
Emi Kiyokage, Eiji Notsu, Takahiko Akagi and Kazunori Toida

川崎医科大学解剖学

要旨 バイオイメージング技術の発展により, 特定のニューロン種の標識や単一ニューロンの可視化が可能となった。顕微鏡ステージの X・Y・Z 軸方向の情報を voxel に変換し, パソコン画面上でトレースを行うデジタルトレースは, トレースと同時に三次元的な観察や形態計測が得られ, “かたち”の情報を数値化し統計解析をすることが可能となる。本稿では, デジタルトレースでどのような解析が可能であるかについて紹介したい。

キーワード: ニューロントレース, 3次元立体再構築, 形態計測, ニューロルシダ

1. はじめに

各脳領域は複数の層構造から成り, その層は多様な神経活性化学物質を含有するニューロン種によって構成されている。近年, 免疫組織化学や分子生物学の手法を応用した技術進歩によって, 生命現象の可視化を目的としたバイオイメージングがますます盛んになり, 複雑な神経回路を有する脳領域においても分子から細胞レベルでの標識が可能となった^{1,2)}。これまでの研究から, 異なる神経活性化学物質を含有するニューロンは異なる突起の長さ, 分枝数, 突起分布等の形態特性を持ち, 異なる局所神経回路に関わっていると考えられるようになってきた³⁻⁶⁾。また特定の領域の単一ニューロンを可視化させ, long distance projection の解析も進んできている^{7,8)}。神経回路においては, 伸長する突起を含めたニューロン間のシナプスで情報伝達されることから, 単一ニューロンの形態像を明らかにし, さらに様々な形態計測によってニューロンを分類することは, 脳領域の局所神経回路やその機能を解明するために重要である。そこで本稿では, ニューロンのデジタルトレースによりどのような解析が可能であるかについて紹介したい。

2. ニューロントレーシング

ニューロントレーシング方法として, プリズムを用いた古典的な Camera-lucida がある。これは, 光学顕微鏡像とスケッチ像を重ね合わせながらマニュアルでトレースしてゆくもので, 写真では捕らえきれない細部の構造を鮮明に描くことができるのが特徴である。Camera-lucida の装置としては, 顕微鏡・照明トレース台・描画装置だけでよく, 安価で手軽に使えるのが利点である (図 1a)。さらに近年同様の原理で, 顕微鏡電動ステージの X・Y・Z 軸方向の情報を voxel に変換し, パソコン画面上でデジタルトレースをする Neuro-lucida (MBF Bioscience) が使われるようになってきた (図 1b)。Neuro-lucida は, ニューロントレーシング・ブレイクマッピング・連続切片の再構築・画像解析・形態計測等には欠かせない最先端のソフトウェアである。このソフトウェアを生み出した MBF Bioscience は 1987 年アメリカで Jack Glaser (現プレジデント) と Jack の父であり生理学者 Edmund Glaser によって創立され, 現在までのところ, 世界 39 カ国の約 1000 以上の研究室で利用されている。Neuro-lucida を使った研究成果はこれまで約 1500 篇の論文が, ステレオロジーと解剖学的マッピングに優れたソフトウェアである Stereo Investigator の研究成果は約 900 編が “Nature” “Science” “Neuron” “Journal of Neuroscience” 等の雑誌で発表され続けている。Neuro-lucida のシステムは, Neuro-lucida ソフトウェア, 光学顕微鏡に接続したビデオカメラ, もしくは CCD カメラ等のイメージオーバーレイ機器から構成されたもので, 高額なソフトウェアであるにもかかわらず国内では年間 12 ~ 13 台がコンスタントなペースで販売されていることから, 神経科学研究におけるゴールドスタンダード且つ特異的なソフトウェアであると言える (図 1c)。

3. マニュアルトレースとデジタルトレース

次にマニュアルトレースとデジタルトレースの違いについて説明したい。図 2a は, ラット嗅球スライスに抗 calbindin 抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったものである。この標本を Camera-lucida でトレースしたものを図 2b に示す。マニュアルトレースの特性としては, 光学顕微鏡接眼レンズを通して切片像を直に見ながらトレースをするため, 複雑に絡み合う突起の明瞭さ, 色調, 解像度が非常に優れている点が挙げられる。比較のため, 同じ標本を Neuro-lucida でデジタルトレースを行った (図 2c 左)。マニュアルトレースに比べ突起分枝や突起の折れ曲がりぐあいのスムーズさ, 突起径の正確さに関してややラフな感じは否めないが, X 軸・Y 軸方向に Z 軸方向 (焦点深度) を加えることで, Camera-lucida では表現することが不可能であった突起の重なりや空間的広がり情報が得られ, パソコン画面上でトレース像を自由に回転させてあらゆる方向からニューロンを観察できるようになる (図 2c 左, 中央, 右)。このようなニューロンの 3 次元観察の結果, 細胞形態像から空間的な神経回路構築や細

〒 701-0192 倉敷市松島 577
TEL: (+81) 86-462-1111 ext. 27520; FAX: (+81) 86-462-1199
E-mail: ekiyokage@med.kawasaki-m.ac.jp
2011 年 2 月 14 日受付

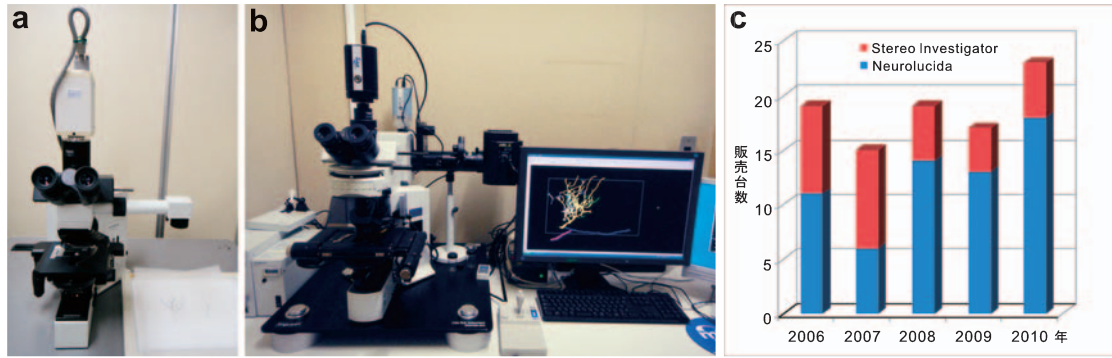


図1 Camera-lucida と NeuroLucida
a; Camera-lucida のセット b; NeuroLucida のセット c; NeuroLucida と Stereo Investigator の過去5年間の国内販売台数.

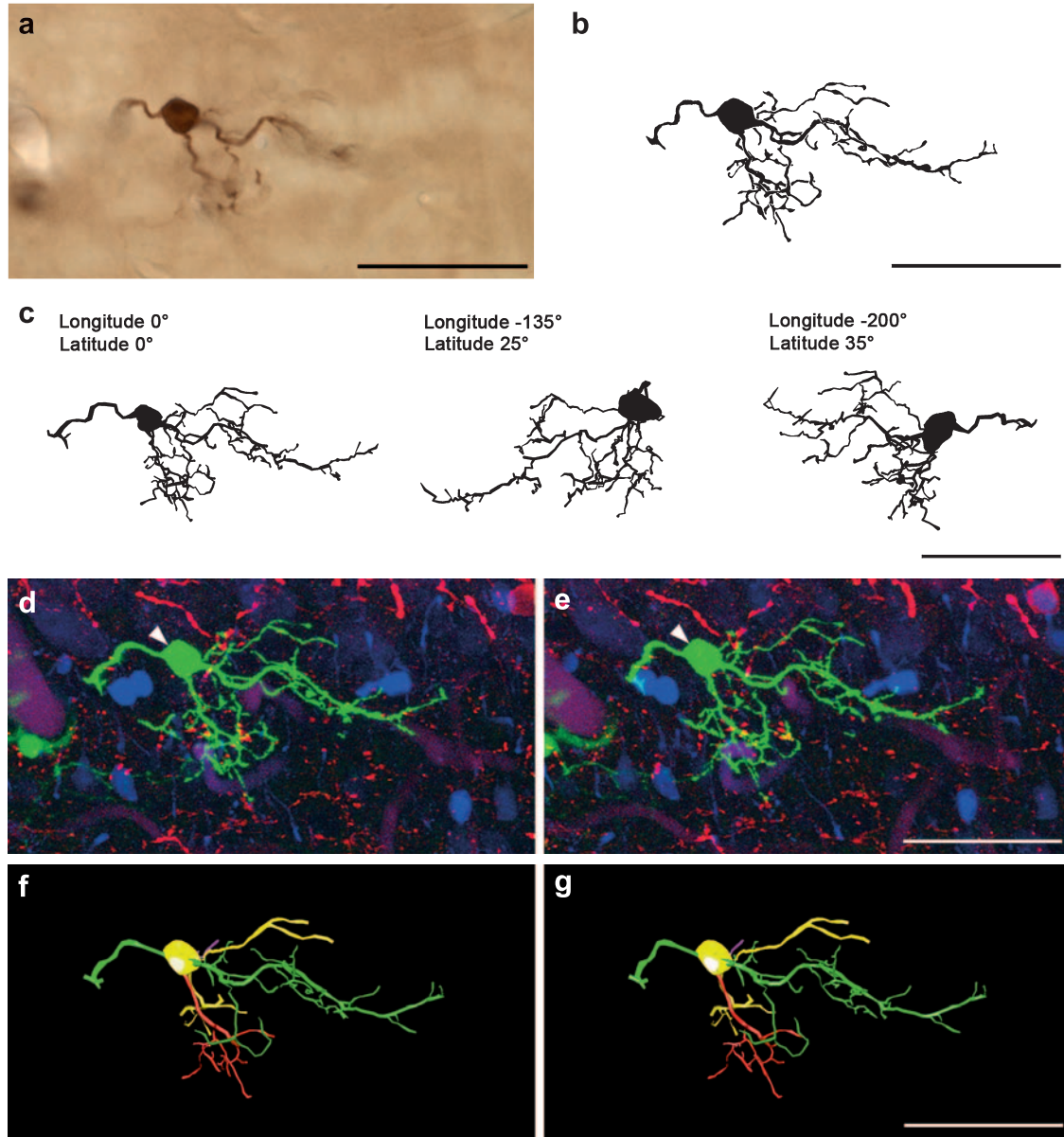


図2 マニュアルトレースとデジタルトレース

a; 抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学染色. b; a のニューロンを Camera-lucida でトレースした全体像. c; a のニューロンを NeuroLucida でトレースした正面像 (左). 正面から経度 -135 度, 緯度 25 度に回転した像 (中央). 正面から経度 -200 度, 緯度 35 度に回転した像 (中央). d, e; 抗 calbindin 抗体 (緑) 抗 parvalbumin 抗体 (赤) 抗 calretinin 抗体 (青) を用いた蛍光多重染色. calbindin 陽性細胞 (白鏟) は a と同一細胞. d, e はステレオ像 ($\pm 7.2^\circ$) f, g; calbindin 陽性細胞 (白鏟) を NeuroLucida でトレースした像. 細胞体から派生した突起は異なる色で表示. f, g はステレオ像 ($\pm 7.2^\circ$) Scale bars; $50 \mu\text{m}$ (a-c, e, g).

胞の機能的意義への理解が深まることがデジタルトレース最大の特徴であると考えられる。

NeuroLucidaは、共焦点レーザー顕微鏡で得られた連続画像スタックからリアルタイムで画像平面間の正確な焦点距離を特定し、全画像スタックを通して焦点を合わせることができる。このため明視野照明顕微鏡を使ったトレースと同じよ

うにニューロンの3次元再構築が可能である(図2d-g)。さらに、S/N比の高い画像では、Auto Neuron機能を使った自動トレースが有効なため、突起のひとつひとつをパソコン画面上で辿ってクリックをする基本的なデジタルトレースよりは、5分の1から10分の1の速さでニューロンの立体再構築が完成でき、広範囲の高解像度画像を自動トレースするこ

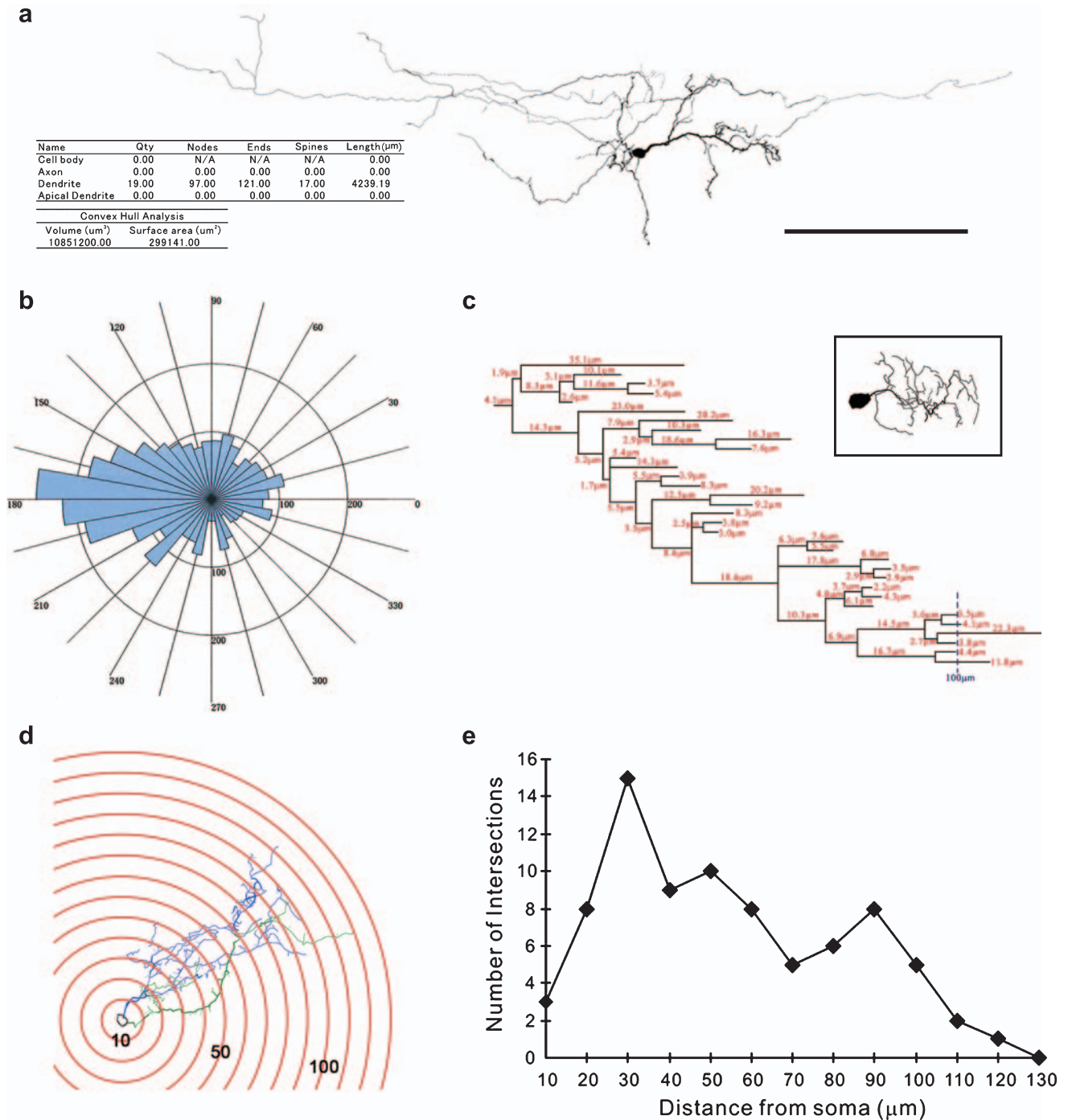


図3 細胞の形態計測

a; 連続切片越えにNeuroLucidaでトレースし、立体再構築したニューロン。左表は各形態計測のパラメーターを示す。Scale bar; 100 μm。b; aのニューロンのPolar histogram。c; 四角括弧内に挿入したニューロンのDendrogram。d; Sholl analysis。細胞体を中心に置き半径を10 μm 毎増やした同心円を赤で示した。e; 細胞体からの距離(X)とintersection数(Y)の関係を示すグラフ。

とで生産性の向上に役立つ (図 2f, g). また, 最新バージョン NeuroLucida 10 では, 隣り合う連続画像スタックを自動でつなぎ合わせ, 高倍率による高解像度画像を広範囲に得ることができるようになり, ニューロントレースに費やす時間の短縮が期待できる.

4. 形態計測

NeuroLucida は, 連続切片上に見られるニューロンの突起を繋げニューロンの 3 次元的再構築ができるだけでなく, トレースと同時に形態計測データが得られることも CameraLucida とは異なる特性である. 図 3a のニューロンは, 厚さ 50 μm の 6 枚の連続切片を切片越えにトレースしたもので, 解析プログラム NeuroLucida Explorer によって樹状突起及び軸索の全長・突起数・分枝数・棘 (スパイン) 数・ブートン数・突起直径・表面積・突起が広がった体積 (Convex hill volume) 等のパラメーターが表示されている (図 3 表). 図 3b には, 図 3a の細胞体から派生した突起の極性を表す Polar histogram を示す. さらに Dendrogram analysis では, トレースしたニューロン (図 3c 挿入図) を模式図化して分枝間の突起の長さや平均突起径を表すことができる (図 3c). この他, よく使われる形態解析法として Sholl analysis があり, 個々のニューロンが持つ形態像を特徴づけるために使われる定量解析法である. 即ち細胞体を中心として同心円状に半径を段階的に増やしてゆき (例えば 10 μm 毎), その各円周と突起が交差する点 (intersection), 各同心円内に分布するスパイン・終末・分枝等の定量解析が可能である (図 3d). 例として, Sholl analysis から得られた細胞体からの距離と intersection 数の関係をグラフに示す (図 3e). Intersection 数の増加は, 突起の複雑な折れ曲がりや, 枝分かれが多いことを示すと考えられる. このニューロンの場合, 細胞体から近い 30 μm 付近で intersection 数のピークが見られる (図 3e). ここに挙げた他にも多数の解析法があり, 研究者の目的にあった解析法を組み合わせることで細胞形態を特徴づけるための手段が広がる. このような各種形態計測は,

その細胞が持つ形態特性を数値化し, さらに統計解析によって変化を明らかにすることで形態学に客観性を持たせることができる.

5. その他の機能

NeuroLucida には, 上述の形態計測機能以外にも画像解析に必要な優れた機能を持っている. これまで主にニューロントレースについて述べてきたが, トレースしたニューロンが脳組織のどの位置で, どのように樹状突起や軸索を伸長させているかを理解するためには Solid Modeling Module が有用である. 組織構造の輪郭を連続切片越えでトレースし再構築したオブジェクトは (図 4a 左), 固体表面を持つかのように表現され, またその外表面は中の構造が見えるように透明化が可能である (図 4a 右). 作成した 3D グラフィックはどんな角度にもダイナミックに回転させることができ, 実際には見ることができない位置からの観察が可能になる. 複雑な脳構造とその構造組織を構成するニューロンの関係を 3D グラフィックで表現することで, 個々のニューロンが局所神経回路や脳領域の機能にどのように関わっているかを推察し, トレースしたニューロンをさらに際立たせる.

近年共焦点レーザー顕微鏡を使った蛍光多重染色の観察は, 細胞の局在や細胞内に発現する様々な物質の共存関係を調べる強力なツールとして神経科学分野で広く使われているが, 長時間の観察で蛍光の退色は避けられない. そこで我々は, NeuroLucida に Olympus BX51-Disk Scan Unit (DSU) 顕微鏡を組み合わせ画像の自動収集を行うシステムを導入した (図 1b). 共焦点レーザー走査法よりも速く三次元画像スタックが得られ, また電動ステージにより XY 軸方向に画像を連続的に自動収集し, 広範囲視野をひとつの画像モニターにマージすることが可能となった. さらに得られた三次元画像スタックやモニター画像はそのイメージ上でトレースやマッピングが可能であるため, 細胞数カウントや共存関係の解析がスムーズに行えるようになった (図 4b). ニューロントレースには高解像度の画像スタックが得られる共焦点

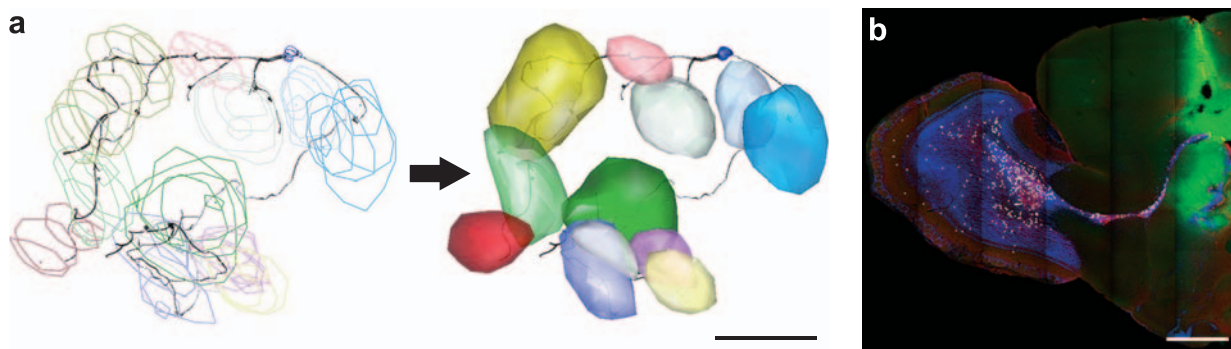


図 4 3D グラフィックとバーチャルスライド

a ; 嗅球糸球体内接を連続切片越えてトレースし再構築したワイヤーフレーム (左) を 3D グラフィックで表示した (右).
b ; マウス嗅球側脳室下帯に cell tracker green (緑) を注入したスライスに抗 polysialic acid neural cell adhesion molecule 抗体 (赤) と hoechst (青) を用いた蛍光多重染色のモニター画像. 注入箇所から嗅球の方向へ移動している細胞をマークしてある (白点). Scale bars ; 50 μm (a), 1 mm (b).

レーザー顕微鏡を使い、細胞の局在や共存関係の解析には多少解像度は低くても蛍光色素の退色が少ないDSU顕微鏡を使い分けることで効率よく正確な解析結果が得られる。

前述の細胞総数や細胞密度を推定する場合、立体学的解析法 (Stereology) の概念は重要である^{9,10}。ステレオロジーは、二次元・三次元構造物の幾何学的量を推定する統計的な方法論で、数・長さ・面積・表面積・体積等を解析することができ、最近では細胞総数を算出する際にはステレオロジーを用いることが常識となっている¹⁰。これまで一枚の切片から定量解析を行う場合サンプリングバイアスが問題となっていた。つまり、細胞数算出の対象となる細胞の大きさ、形等によって計測されやすさが異なってくる (大きい細胞、形が複雑なものほど検出されやすい)。この問題を解決するため、2枚の薄い切片の組合せを用いたサンプリング法 (Physical disector 法) によって解析が行われるようになってきた⁹。最近では、共焦点レーザー顕微鏡を使って厚い切片から光学連続切片を用いるサンプリング法 (Optical disector 法) が簡便でよく使われている。しかし、厳密にステレオロジーを行うとなると、切片毎に偏りなくカウントを行う箇所をランダムに選び、且つサンプリング箇所では切片の厚みを考慮した Optical disector 法による細胞算出を行わねばならず非常に複雑で手間がかかる。この点 Stereo Investigator は、この煩雑な方法をシステマティックに行い、統計学的にも正確な解析結果を最小限の時間で得ることができる最も有用なソフトウェアである (詳細は web 参照, www.mbfbioscience.jp)。すなわち、NeuroLucida は三次元画像スタックから単一細胞の形を立体再構築によって明らかにするのに対して、Stereo Investigator は対象の細胞が標本全体もしくは脳領域中での空間的位置づけの解析に特化したソフトウェアであると言える。この2つのソフトウェアを同一パソコン上で使い、同一標本を違う視点でトレースし観察することにより、統合的な立体学的解析が可能となる。

6. おわりに

神経科学研究は、ゴルジ染色されたニューロンをトレースしその形態像を分類することから始まった。しかし、イメー

ジング技術の発展によりある種の細胞や単一細胞の可視化が可能になった現在でさえ、ニューロンの形態は十分明らかにされていないのが現状である。このためニューロンの形を明らかにすることは、脳機能解明のための近道のひとつと考える。本稿では、NeuroLucida を使ったデジタルトレースによって、これまでマニュアルトレースでは得られなかったニューロンの3次元立体再構築像や、ニューロンの形態計測によって形の違いを数値化し統計解析を行うことで新たな細胞分類の可能性を提示した。これをきっかけに神経科学以外の研究分野においても応用され、デジタルトレースの利点から得られる知見によって読者の各研究の新たな展開を希望する。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり有益な御助言、御示唆をいただいたMBF ジャパン株式会社 岡田憲和様に深甚なる感謝の意を表す。本稿に関わる研究は平成21年度私立学校施設整備費補助金 (基盤研究装置)、川崎医科大学プロジェクト研究費 (21-601, 21-612, 22-A6, 22-A51) を受けた。

文 献

- 1) Furuta, T., Tomioka, R., Taki, K., Nakamura, K., Tamamaki, N. and Kaneko, T.: *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1497–1508 (2001)
- 2) Mitsui, S., Saito, M., Hayashi, K., Mori, K. and Yoshihara, Y.: *J. Neurosci.*, **25**, 1122–1131 (2005)
- 3) Toida, K., Kosaka, K., Aika, Y. and Kosaka, T.: *Neuroscience*, **101**, 11–17 (2000)
- 4) Kosaka, T. and Kosaka, K.: *Neurosci. Res.*, **60**, 56–72 (2008)
- 5) Kiyokage, E., Pan, Y.Z., Shao, Z., Kobayashi, K., Szabo, G., Yanagawa, Y., Obata, K., Okano, H., Toida, K., Puche, A.C. and Shipley, M.T.: *J. Neurosci.*, **30**, 1185–1196 (2010)
- 6) Kosaka, T. and Kosaka, K.: *Neurosci. Res.*, **67**, 275–292 (2010)
- 7) Eyre, M.D., Antal, M. and Nusser, Z.: *J. Neurosci.*, **28**, 8217–8229 (2008)
- 8) Kuramoto, E., Fujiyama, F., Nakamura, K.C., Tanaka, Y., Hioki, H. and Kaneko, T.: *Eur. J. Neurosci.*, **33**, 95–109 (2011)
- 9) Sterio, D.C.: *J. Microsc.*, **134**, 127–136 (1984)
- 10) Coggeshall, R.E. and Lekan, H.A.: *J. Comp. Neurol.*, **364**, 6–15 (1996), Erratum in: *J. Comp. Neurol.*, **369**, 162 (1996)