

## SPring-8 放射光による神経回路 ネットワークの解析

### Analysis of Neuronal Circuit Network by Using Synchrotron Radiation at SPring-8

水谷 隆太<sup>a</sup>, 雑賀 里乃<sup>a</sup>, 竹内 晃久<sup>b</sup>,  
上杉健太郎<sup>b</sup>, 寺田 靖子<sup>b</sup>, 鈴木 芳生<sup>b</sup>

Ryuta Mizutani, Rino Saiga, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi,  
Yasuko Terada and Yoshio Suzuki

<sup>a</sup>東海大学工学部・大学院工学研究科・  
大学院総合理工学研究科

<sup>b</sup>高輝度光科学研究センター／SPring-8

**要旨** ニューロンは三次元的なネットワーク構造で神経回路を形成し、この神経回路により脳の様々な機能が実現されている。従って、脳組織の三次元構造を解析すれば、脳の機能メカニズムを明らかにできる。我々は、放射光 X 線を用いたマイクロモグラフィー法により脳組織を三次元解析し、脳の神経回路の研究を進めてきた。本論文では、その実際面を解説するとともに、神経ネットワーク構造の解析例について報告する。

キーワード：脳、三次元構造、X 線、マイクロモグラフィー

#### 1. はじめに

我が国では、脳の機能停止をもって、ヒトの死とすることができ。そもそも脳死自体、ヒト脳が考え出したことである。近年、脳は様々な角度から注目を集めており、多額予算が脳研究に投じられている。例えば、文部科学省の「脳プロ」<sup>1)</sup>と「革新的」<sup>2)</sup>が平成 26 年度に計 55 億円、米国の BRAIN Initiative が 2014 年度予算で約 110 億円、EU の Human Brain Project では 10 年間で約 1700 億円が計上されている。まさに、脳の、脳による、脳のための政治である。他の臓器だって生存に必要であるし、免疫系には「自己」があって、独自の状況判断を行うが、それとは別格の存在、これが脳である。よく考えてみると、脳は自分自身を高く評価しているだけで、実は自作自演かつ自画自賛であるが、世界的コンセンサスなのだからやむを得ない。

その大波が「顕微鏡」誌にも押し寄せた、というわけではないが、今回のお題もヒト脳の機能により考え出されている。

筆者らも脳の機能により、拙文を書いている。これら高度な脳機能は神経回路で実現されており、この神経回路はニューロン（神経細胞）の三次元的なネットワーク構造によるものである。本報告では、SPring-8 の放射光を用いた、脳の神経ネットワークの三次元解析<sup>3,4)</sup>について紹介する。

#### 2. X 線マイクロモグラフィー法の実際

我々は、脳組織の微細な三次元構造の解析に、放射光 X 線を用いたマイクロモグラフィー法を適用している。同法の理論的背景については、すでに本誌で戸田らの解説<sup>5)</sup>があるので、そちらに譲りたい。簡単に言えば、病院にある CT スキャンのマイクロ版というご理解でいいかと思う。ここでは理論は横において、我々が行っている測定の実際面を述べる。

本報告の測定は、放射光施設 SPring-8 で行っている。放射光を利用されない方には馴染みが薄いと思うので、簡単にご紹介したい。SPring-8 の「8」は、使われる電子のエネルギー 8 GeV にちなみ、このこともあって世界最高性能とされている。加速度運動する電荷（この場合はカーブする電子）からの双極子放射はドーナツ形であるが、8 GeV = 光速の 99.9999998% ともなると相対論的効果は相当大きい。このため、静止系では電子の速度方向に極端に引き伸ばされ、指向性の高い電磁放射に見える。これが放射光である。同施設は山陽本線相生駅から北にバスで 40 分程の山中にあり、一周約 1.5 km の蓄積リング棟（図 1a）等からなる。同棟の実験ホールは延々と続く体育館のよう（図 1b）で、ここに内周側から放射光が導き出される。その先には分光器やミラー等の機器が置かれ、まとめてビームラインという。これら各機器は、貨物コンテナに似た「ハッチ」（図 1c）の中に設置され、試料もハッチ内にセットし（図 1d）、ハッチを閉じて測定するしくみになっている。

このような放射光施設はどこでも、勝手に実験ができるわけではない。前もって課題申請し、審査を経て認められて初めて実験ができる。だいたい科研費と同じような感じであるが、SPring-8 の場合は半年毎に課題募集がある。また、課題が通った際には、報文を出す義務が生じる。以前は旅費が支給されるなど、いい時代もあったが、現在では 1 シフト（8 時間）あたり 1 万円強の消耗品相当額が請求される。保秘のために成果を公開したくない御用の向きには、特別の利用料を払って結果を専有するオプション等もある。

測定課題が通れば、実際に放射光 X 線を用いて実験することになる。X 線が可視光等に勝る点は、透過性と直進性である。この性質によって、分厚い検体でも内部構造を三次元的に観察できる。しかし、この X 線の性質が逆に欠点となって、生物試料はそのままでは可視化が難しい。これは、炭素・酸素などの軽元素が X 線と相互作用しにくいためである。そこで、我々は検体を重元素で標識し<sup>6,7)</sup>、X 線で観察しやすくしている。X 線による可視化研究の分野では、染色せずに測定するのが主流で、我々の方法はむしろ邪道である。しかし、光学顕微鏡や電子顕微鏡の分野の方々にとって、標識

<sup>1)</sup> 〒 259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1  
TEL: 0463-58-1211 ext. 4184  
E-mail: ryuta@tokai-u.jp  
2014 年 7 月 31 日受付



図1 放射光施設 SPing-8 での実験の様子。(a) 円環状の巨大な建物が蓄積リング棟。それに囲まれるのが三原栗山(標高341 m)。写真の提供:RIKEN/JASRI。(b) 蓄積リング棟の実験ホールに入ったところ。照明・空調・内装等の雰囲気から、どこまでも続く体育館のようである。この写真の右側にハッチがある。(c) BL47XU ビームラインの光学ハッチ(奥半分)と実験ハッチ(手前半分)。ここで図2のショウジョウバエ脳の構造を解析した。他にも多数のビームラインが配置され、多種多様な実験が行われている。(d) BL47XU 実験ハッチ内で試料を回転ステージにマウントしたところ。右奥からの照明で光っているのが試料で、測定時にはこの照明は消して、放射光 X 線を左奥から右手前に向けて照射する。

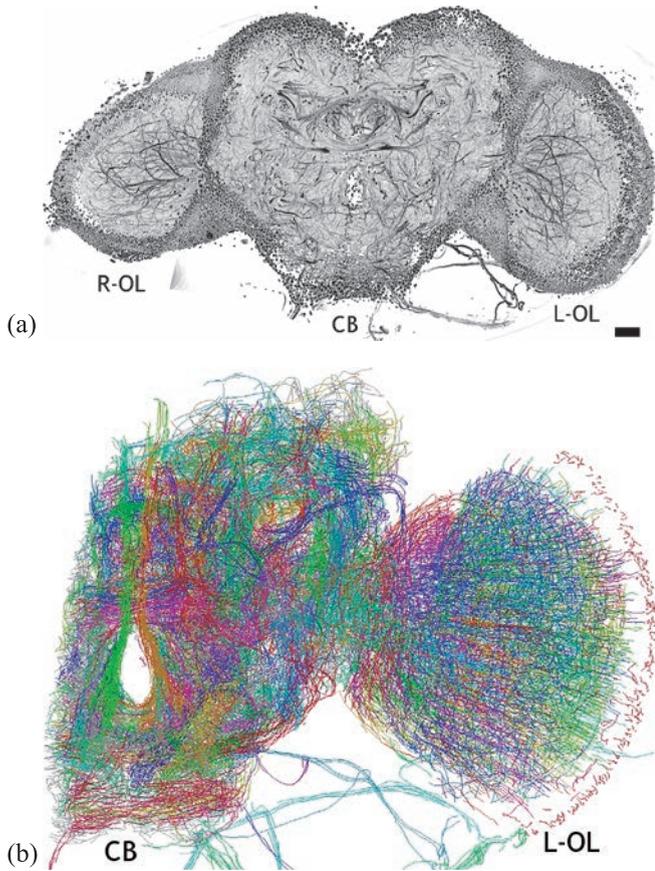
や染色は普通のことと拝察する。免疫電顕法では鉄貯蔵タンパク質のフェリチンが標識として使われることがあるが、X線による可視化でも、遺伝子操作によるフェリチンの過剰発現が有効である<sup>8)</sup>。

標識した検体は、次に測定に適した形にする。細胞は $\mu\text{m}$ ~ $\text{nm}$ スケールの構造をもっており、生物学で求める分解能も $\mu\text{m}$ ~ $\text{nm}$ のスケールとなる。しかし、生体軟組織はやわらかく、そのままでは測定中に微細な変形が起こりうる。このため、組織をエポキシ樹脂に包埋・硬化して測定する。樹脂には様々な種類があるが、我々は光学的な性質を重視して、岩石の薄切標本の作成に使われる Petropoxy 154 を用いている。濁りが視認できるようなものは、X線小角散乱の効果で画像ボケが生じる可能性があり、勧められない。

得られた試料は、マウント金具<sup>6)</sup>に取り付けて測定に用いる。SPing-8でのマイクロトモグラフィー測定は、BL20B2, BL20XU, BL37XU, BL47XUなどで行われており、空間分解能は $10\ \mu\text{m}$ から $100\ \text{nm}$ 程度まで<sup>9-12)</sup>が実現されている。検出器は、2000ピクセル程度の幅のものが主に使われ、視野幅は(分解能 $\times$ ピクセル数 $\div 2\sim 4$ )となる。測定では設定すべき

パラメータがいくつもあるが、なかでも重要なのがX線エネルギー(波長)である。元素はそれぞれ固有のX線吸収スペクトルをもち、電子軌道のエネルギー準位に対応して、階段状のプロファイルを示す。この段の部分、各軌道の名称にならってK吸収端あるいはL吸収端などと呼ぶ。見たい元素が決まっていれば、X線エネルギーはその元素の吸収端の上に設定すると良い。また、エネルギーの低い(波長の長い)X線は、吸収係数が大きくなり、厚みのある試料での測定が難しくなる。生物試料では、 $1\ \text{mm}$ の試料厚みでエネルギー下限の目安は $8\ \text{keV}$ であり、数 $\text{mm}$ 厚なら $12\ \text{keV}$ である。

放射光施設は昼夜分かたず稼働しており、試料を多数持参して、泊りがけて測定を行う。24時間休みなく実験することになるので、チームに分かれるなどして、交替で測定するのが望ましい。測定装置は、説明を受ければ誰でも操作可能な種類のものである。ご希望があれば、学部学生向けの写真入りマニュアルをご覧に入れることもできる。我々がBL20XUで行っている典型的な場合は、1データセット(約15 GB)の測定が数分で済むので、3日間測定をぶっ続けると数TBのデータが得られる。共焦点顕微鏡等で三次元像が



どう管理されているかは存じ上げない。しかし、10 TB 単位となるとストレージ装置もそれなりの価格であり、データを持ち帰ったあとの保管の方策も考えておく必要がある。

### 3. 神経ネットワーク構造の解析

さて、持ち帰った X 線像データは、専用のソフトウェアで処理して断層像にする。これを再構成計算と呼んでいる。ソフトは公開されており、無料で誰でも利用できる。スライス毎にこの計算を繰り返して断面を積み重ね、三次元像を得る。

本報告で研究対象としている脳組織は、非常に複雑な構造をしている。一例を図 2a に示す。これはキロショウジョウバエの脳神経節の三次元構造<sup>4)</sup>である。この図では、X 線吸収係数の三次元分布をレンダリングしている。X 線が電子との相互作用で吸収・散乱されることを考えると、この三次元像は電子の密度分布を表していることになる。結晶学と同様に、電子密度は構造の全てであり、それ以上のものはない。しかし、このままでは構造が入り組んでいることは分かるが、

図2 キロショウジョウバエ脳神経節の三次元構造。文献4)より改変。(a) X線吸収係数をグレースケールで表した。ハエとちょうど正面から見つめ合う向きで描いている。手前部分を切り取り、内部の構造が見えるようにした。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$ 。(b) この三次元像をもとに構築した脳左半分のネットワーク構造。構造をグループ分けし、色で示している。CB, central brain; OL, optic lobe.

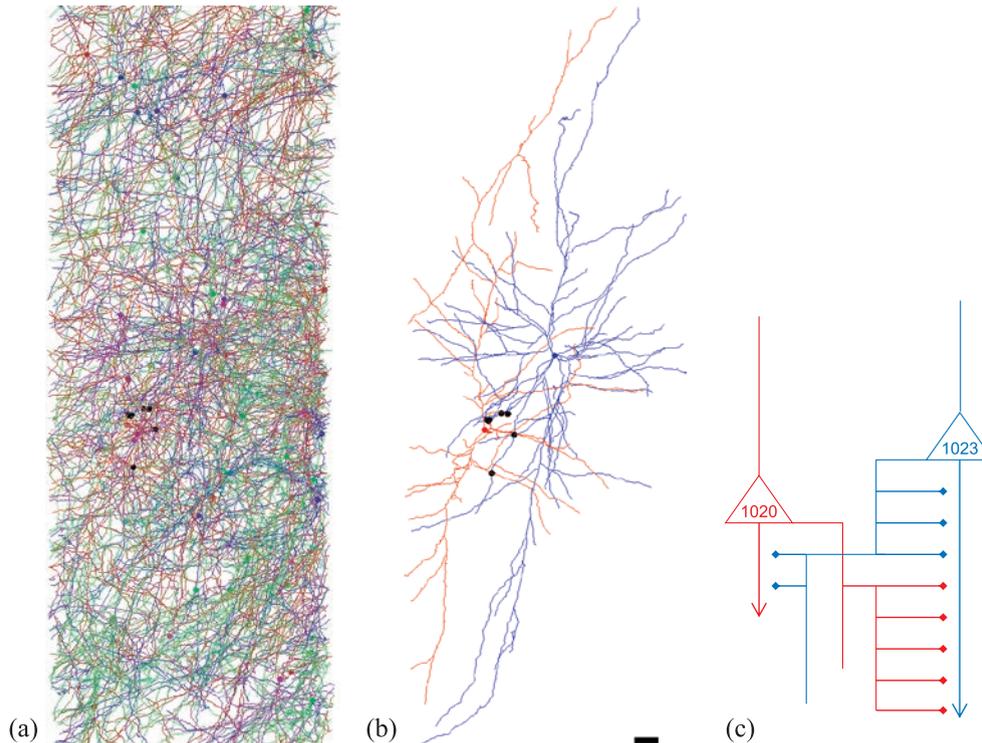


図3 (a) ヒト大脳組織の三次元像から解析した神経ネットワーク構造の一部。上が脳表側。ニューロン毎に色分けしている。丸い点で細胞体の位置を示す。(b) この構造のうち、2つのニューロン1020(赤)と1023(青)だけを抜き出した。ニューロン間の接続を黒い点で示す。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$ 。(c) ニューロン1020と1023が構成する神経回路。三角が細胞体、矢印がニューロンからの出力、それ以外の線が入力を示す。

ヒトが理解するのは到底不可能である。何らかの方法で、ヒトにも理解できる形にしなくてはならない。

そこで、三次元像をトレースして構造モデルを構築する。すなわち、デカルト座標で構造を記述しなおす作業を行う。このモデル構築により単純化された構造を図 2b に示す。どこも単純化されていないではないか、とお叱りを受けるといけないので定量的な言い訳をすると、データ量として 20 GB から 18 MB に 3 ケタ以上小さくなり、はるかに把握しやすくなっている。この結果に関しては、我々なりに議論を行って論文にしたが、なんと 8 誌に拒否され、ようやく電子顕微鏡関連の学術誌で報告することができた<sup>4)</sup>。見当違いと思いつつも、この場をお借りして感謝申し上げる。その過程ではいろいろ感じる事があったが、従来の分野別の視点からは相当なご批判を受けた。これは、我々の考えが非常識なこともあると思う。しかし、同時に何か誤解があるようで、この結果は、蛋白質の結晶構造解析で言えば粘土モデルに相当し、脳の全てがわかったわけではない。ただのスタート点であり、脳機能の解明にはまだいくつもの段階が必要である。

その一つが、構造モデルから神経回路を解析するステップである。神経回路は数多くのニューロンが接続して成り立っている。したがって、ニューロンの相互関係から、回路を決定する必要がある。ここでは別の解析例として、ヒト大脳組織の三次元構造<sup>3)</sup>を図 3 に示す。ヒト脳はさらに理解不能な複雑なネットワーク構造(図 3a)を持っているが、個別のニューロンを見れば、それが理解できるレベルになる。図 3b では、ニューロン 2 つを取り出して表示している。これらのニューロンは、入力と出力の神経突起が近接している部分があり、そこでシナプス接続していると考えられる。もとの三次元像でこのような相互関係を見るのは困難だが、モデル構造ならニューロン間の関係が簡単に取り出せる。これをもとに決定した回路を図 3c に示す。取り出した 2 つのニューロンは入出力を互いに接続し合っており、正帰還がかかっている。機能的には、電子工学でいうフリップフロップやマルチバイブレータのような働きが想像できる。同様の回路は他にも見いだされ、ヒト脳神経回路の基本単位の一つと考えられる。

#### 4. おわりに

個別のニューロンから構成されるヒト脳の神経回路を決定した報告は、現時点では我々のみと思われる。しかし、それを目指した研究は他にも広く行われている。最も研究が進んでいるのが、連続切片を無数に作成し、その電子顕微鏡像をスタックする方法<sup>13)</sup>である。電子顕微鏡は微細構造を可視化する点でやはり強力で、nm スケールの構造が全て可視化される。しかし、何もかも見えてしまうというのは実社会と同じで困った面もあり、三次元像の解析にかかるマンパワーは分解能の 3 乗に反比例して大きくなる。つまり、神経回路の決定や結果の解釈が現実的でなくなってしまう。複数の構造を比較する時に、膨大なデータにどう対処するのか、興味

が持たれる。また、脳機能の理解という点では、計算機上の研究<sup>14)</sup>が急速に進展しており、少し先行されてしまっている気もする。我々としては、目前の解析を進めることで、将来的に、精神疾患など脳の疾患に関わる皆さんの一助になればと願ってやまない。

#### 謝 辞

本研究は、竹腰進、井野元智恵、中村直哉、長村義之、大塚正人、木村稜、大澤資樹(東海大学医学部)、新井誠、大島健一、糸川昌成(東京都医学総合研究所)各氏との共同研究である。加えて多くの方々のご指導お力添えを頂いており、全て挙げられなくて恐縮ながら、関係各位に心より謝意を表す。本研究の一部は、文部科学省科学研究費(21611009, 25282250, 25610126)ならびに所属機関からの各種の補助により行っている。放射光施設 SPring-8 での測定は、長期利用課題(2011A0034-2013B0034, 2011B0041-2013B0041)および一般課題(2013A1384, 2014A1057)により行っている。ヒト組織を用いた研究は、東海大学の「人を対象とする研究」に関する倫理委員会と、同医学部臨床研究審査委員会のほか、各関連機関における倫理に関する委員会等での審査を経て、認められた条件に従って実施している。

#### 文 献

- 1) 文部科学省: 脳科学研究戦略推進プログラム, 科学技術白書, p. 100 (平成 21 年)
- 2) 文部科学省: 「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」について (平成 26 年 4 月)
- 3) Mizutani, R., Takeuchi, A., Uesugi, K., Takekoshi, S., Osamura, R.Y. and Suzuki, Y.: *Cerebral Cortex*, 20, 1739-1748 (2010)
- 4) Mizutani, R., Saiga, R., Takeuchi, A., Uesugi, K. and Suzuki, Y.: *J. Struct. Biol.*, 184, 271-279 (2013)
- 5) 戸田裕之, 小林正和, 鈴木芳生, 竹内晃久, 上杉健太郎: 顕微鏡, 44, 199-205 (2009)
- 6) Mizutani, R. and Suzuki, Y.: *Micron*, 43, 104-115 (2012)
- 7) Mizutani, R., Shimizu, Y., Saiga, R., Ueno, G., Nakamura, Y., Takeuchi, A., Uesugi, K. and Suzuki, Y.: *Scientific Reports*, 4, 5731 (2014)
- 8) Mizutani, R., Taguchi, K., Ohtsuka, M., Kimura, M., Takeuchi, A., Uesugi, K. and Suzuki, Y.: *J. Synchrotron Radiat.*, 20, 581-586 (2013)
- 9) Mizutani, R., Takeuchi, A., Hara, T., Uesugi, K. and Suzuki, Y.: *J. Synchrotron Radiat.*, 14, 282-287 (2007)
- 10) Mizutani, R., Takeuchi, A., Uesugi, K. and Suzuki, Y.: *J. Synchrotron Radiat.*, 15, 648-654 (2008).
- 11) Mizutani, R., Taguchi, K., Takeuchi, A., Uesugi, K. and Suzuki, Y.: *Nucl. Instrum. Meth. A*, 621, 615-619 (2010)
- 12) Mizutani, R., Takeuchi, A., Osamura, R.Y., Takekoshi, S., Uesugi, K. and Suzuki, Y.: *Micron*, 41, 90-95 (2010)
- 13) Helmstaedter, M.: *Nat. Methods*, 10, 501-507 (2013)
- 14) Bengio, Y., Courville, A. and Vincent, P.: *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 35, 1798-1828 (2013)