

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700314

研究課題名 (和文) X線ナノCTによる脳神経ネットワークの生後発達解析

研究課題名 (英文) Developmental analysis of neuronal networks in the brain using X-ray nano-tomography

研究代表者

水谷 治央 (MIZUTANI HARUO)

東京大学・総括プロジェクト機構・特任助教

研究者番号：40444103

研究成果の概要(和文):中枢神経系における神経回路網は、様々な高次脳機能を実現している。本研究課題では、放射光を光源とした高分解能 X 線顕微鏡を用いて、3次元脳神経回路地図を作成することを目的とした。ナノ分解能の性能を持つ結像型 X 線顕微鏡を用いて、マウス大脳皮質に含まれるシナプスを解像することが可能であった。また、X 線位相 CT により、大脳皮質の高分解能 3次元再構築に成功した。今後は、ナノ分解能 X 線顕微鏡を応用することで、脳神経回路の配線図が解読され、生後発達解析が進むことが期待される。

研究成果の概要 (英文) : Neural circuits in the central nervous system are the substrate of various high-order brain functions. Here, we aim to develop a three-dimensional mouse brain atlas of neural circuits using high resolution X-ray microscopy by synchrotron radiation. In this study, a nano-resolution full-field X-ray microscopy revealed synapses in the mouse cerebral cortex. Moreover, phase contrast X-ray tomography unveiled 3D structure of the mouse brain tissue with isometric nano-meter voxel sizes. In the near future, we will utilize that information to begin deciphering the wiring diagram of the developing brain by applying the nano-resolution X-ray microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網、X線イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳内の神経回路ネットワークがどのような配線構造をとっているのか、その解答を提出するのは容易なことではない。しかし、脳の高次機能を知る上で必要なデータ情報である以上、我々はこの難題の着地点を本格的に考察しなければならない。世界的に見ても、神経回路の配線図をいかにして再構築すべきかという議論がまき起きている。その一例として代表的なのは、” Human

Connectome Project (ヒトコネクトーム計画)” である。Sporns らが 2005 年にこの ”Connectome” というコンセプトを打ち出してから、脳の神経配線構造を詳細明らかにしようという動きが活発化している。彼らは MRI の拡散テンソル画像 (DTI) を用いて、ヒトの神経配線構造をラフな形で提示し、そのネットワーク構造を分析している。しかし、DTI の空間分解能は mm の単位であり、1 voxel 当たりに含まれる神経細胞の数は

5-7000 個相当に及ぶ。脳の最小機能単位であるニューロンが実際にどのような配線構造を持っているのかは、この手法で明らかにすることはできない。

(2) ニューロンを精細に観察するためには、顕微鏡技術が必須である。別の研究グループでは、空間分解能が高い電子顕微鏡を用いて、神経回路の配線図を再構築しようと考えている。ニューロンの配線図を同定するためには、大規模な観察視野が必要となる。そのため、電子顕微鏡で作成しなければならないスライス切片数は、ヒトの場合、数兆枚にも及ぶ。これは、研究者が手で処理できる能力を大幅に超えているため、ある程度自動化された手法の開発が試みられている。現在、電子顕微鏡で処理できる試料の大きさは、最大  $120 \times 120 \times 120 \mu\text{m}$  ブロック (スライス 2400 枚) であり、その画像分解能は約 10 nm である。電子顕微鏡による観察では、シナプス部位を同定することができるため、ニューロンの結合を精確に記述することができる。しかし、電子顕微鏡の観察が全自動化されたとしても、神経配線図の全貌を明らかにするためには、マウスでも約 6 千万枚のスライス切片が必要となり、現実的な数字ではない。我々ヒトを含めた詳細な “Connectome” を解読するには、MRI レベルの大視野をもちながら、電子顕微鏡レベルの高分解能観察が必要となる。

(3) ナノスケールの解像度を持ちながら、センチスケールの視野を対象とできる観察装置は現段階では存在しない。これまで神経科学の領域で使われてきた観察技術を用いて、“Connectome Project” を完了することは哺乳類において、ほぼ絶望的である。これを乗り越えるためには、革新的な技術が必要となる。私はその候補の一つとして、X 線を用いたイメージング法を提案する。X 線は物質透過性が高いため、大きな物体の内部構造を非破壊的に観察することができる。また、CT (Computed Tomography) を併用すれば、3 次元構造も測定でき、MRI と同様な断層撮影を可能とする。同時に、X 線は非常に波長の短い光である。透過性の高い硬 X 線領域の波長は 0.1 nm 程度であり、理論的にはこれと同等の波長分解能を持つことになる。つまり、X 線を光源として顕微鏡を構築すれば、理論分解能 0.1 nm の X 線顕微鏡を組み立てることができる。X 線顕微鏡に CT を組み合わせることで、ナノスケールの分解能でミリスケールの視野を確保し、その 3 次元立体構造を計測することができる。

## 2. 研究の目的

(1) マウス一匹の脳皮質カラム  $1\text{mm}^3$  程度

内に含まれるニューロンの配線図を X 線顕微鏡 CT を用いて明らかにする。X 線は物質透過性が高いため、大きな物体の内部構造を非破壊的に観察することができる。また、CT を併用すれば、3 次元構造も測定でき、MRI と同様な断層撮影を可能とする。そこで、X 線を光源として顕微鏡を組み立て、空間分解能 50 nm 程度の X 線顕微鏡を構築する。X 線顕微鏡に CT を組み合わせることで、ナノスケールの分解能でミリスケールの視野を確保し、神経回路配線図の 3 次元立体構造を計測する。

(2) 皮質カラム内に存在するニューロンの軸索と樹状突起の走行を同定し、一部については、シナプスによる結合を加味したネットワーク構造を再現する。マウスの生後発達に伴い変化する神経ネットワークのパターンをグラフ理論を用いて定量的に解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 空間分解能 50 nm を達成可能な FZP を用い、X 線顕微鏡光学系を組み立てる。試料回転ステージはスライドガイド式で、360 度回転させたときの軸ぶれ精度は  $\pm 100 \text{ nm}$  である。X 線画像検出器は可視光変換型の物を用いる。検出器は、可視光変換用蛍光面・カメラレンズ・CCD カメラにより構成されている。CT 画像再構成は、一般的な convolution back projection 法を用いる。測定条件は、X 線のエネルギー  $500\text{eV} \sim 12.4 \text{ keV}$ 、1 枚あたりの露光時間を 1 秒以内とする。

(2) C57BL/6J マウスをグルタルアルデヒド・パラホルムアルデヒド混合溶液にて灌流固定をした後、脳を頭蓋から取り出し浸漬固定する。大脳皮質から  $1\text{mm}^3$  程度のブロックを切り出し、ブロックをバッファで洗浄後、還元オスミウム溶液にて浸漬固定する。エタノール・プロピレンオキシドを用いて脱水した後、エポキシ樹脂に包埋する。薄切は、ウルトラマイクロトムを用い、ロッド加工は、マイクロ旋盤を用いる。

(3) X 線を用いてニューロンの画像を取得するためには、重金属を用いた細胞染色が必要になる。実験で適用したゴルジ染色 (Golgi-Cox 法) は水銀を含んだ溶液内で脳組織を処理するため、ニューロン内に塩化水銀が蓄積し、明瞭なコントラストのついた画像を得ることができる。また、Pitman らが報告したコバルト染色を応用し、神経活動依存的に重金属が細胞内に取り込まれる染色法を適用する。また、一般的な電子染色法を適用し、オスミウムや鉛を用いた膜系コントラストの増強を行う。

#### 4. 研究成果

(1) SPring-8 の BL20XU で行った実験において、X 線吸収投影像の観察により、 $0.6 \times 0.6 \times 2.5 \text{ mm}$  ( $0.9 \text{ mm}^3$ ) のブロックサイズに含まれるニューロン (ゴルジ染色) の観察が可能であった。このときの空間分解能は  $1 \mu\text{m}$  程度であり、その理由として X 線の回折及び検出器のボケなどが分解能を規定することが分かった。続いて、空間分解能を向上させるために、結像型の X 線位相差顕微鏡を構築し、同様に CT 法を組み合わせ、ニューロンの 3 次元再構築を行った。本光学系においては、空間分解能を  $200 \text{ nm}$  程度にまで上昇させることができ、上記の染色法を用いることで、ニューロンの 3 次元再構築を光学顕微鏡レベルの分解能で行うことが可能であった (図 1)。

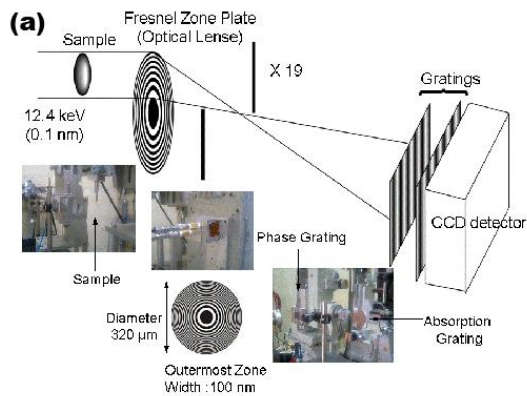


図 1. (a) タルボ型 X 線位相顕微鏡のセットアップ (b) マウス神経細胞の 3 次元再構成画像

ゴルジ染色はすべてのニューロンを染色することはできず、またシナプスを解像することもできないことから、ポテンシャルシナプス (神経線維の間が  $2 \sim 3 \mu\text{m}$ ) を介してニューロンが結合していると仮定して、ネットワークの接続状況を解析した。本実験で得られた有用な知見は、硬 X 線を用いることで、 $1 \text{ mm}^3$  程度の大きさを持つ厚い標本の CT 撮影が可能であることを示した点にある。

(2) 軟 X 線を用いた結像型 X 線顕微鏡 (図 2) の実験結果を右に記す。実験は、米国カリフォルニア州バークレーにある Advanced Light

Source の放射光ビームライン BL6.1.2 で行われた。X 線顕微鏡の光学系は、集光レンズとしてフレネルゾーンプレート (X 線を回折させて集光させる光学素子) を使用している以外は、可視光の顕微鏡とほぼ同等の光学系である。実験で用いた X 線のエネルギーは  $730 \text{ eV}$  で、得られた空間分解能は  $25 \text{ nm}$  となっている。鉛染色を主とした大脳皮質のスライス切片 (厚さ:  $200 \text{ nm}$ ) を観察したところ、シナプス構造 (図 2 中矢印) を含む細胞内小器官が画像化されており、シナプスを解像するのに十分な性能を持つことが示された。

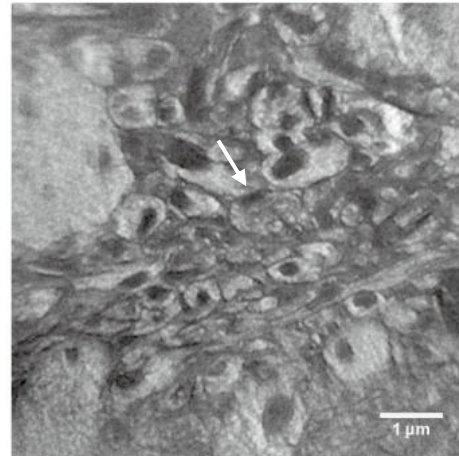


図 2. ナノ分解能結像型軟 X 線顕微鏡像。矢印はシナプスを示す。

(3) 東北大学多元物質研究所内に設置されている EUV 顕微鏡を用いて、大脳皮質の薄切片 (厚さ:  $500 \text{ nm}$ ) を用いた観察を行ったところ、無染色の生体標本であっても、光学顕微鏡とほぼ同等な分解能で、良好なコントラストのある画像を取得することが可能であった。結像系の開発により、空間分解能が向上すれば、無染色標本の X 線画像が取得可能であることが示唆された。これらの結果から、X 線顕微鏡を用いることで、生体を染色せずに、しかも高い空間分解能で観察可能であることが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Haruo Mizutani, Hiroshi Sagara, Akihisa Takeuchi, Takuji Ohigashi, Wataru Yashiro, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki, Atsushi Momose and Toshihisa Takagi, Nano-resolution X-ray tomography for deciphering wiring diagram of mammalian brain, AIP Conference Proceedings 1365, in press

- (掲載確定), 査読有
- ② 水谷治央, バイオイメージングにおける X 線ナノビームの活用, 日本放射光学会誌 23, 195-201, 2010, 査読有
  - ③ Takeo Ejima, Fumihiko Ishida, Hiromichi Murata, Mitsunori Toyoda, Tetsuo Harada, Toshihide Tsuru, Tadashi Hatano, Mihiro Yanagihara, Masaki Yamamoto and Haruo Mizutani, High throughput and wide field of view EUV microscope for blur-free one-shot imaging of living organisms, Optics Express 18, 7203-7209, 2010, 査読有
  - ④ Haruo Mizutani, Yoshihiro Takeda, Atsushi Momose, Akihisa Takeuchi and Toshihisa Takagi, X-ray microscopy for neural circuit reconstruction, Journal of Physics Conf. Series 186, 012092, 2009, 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① 水谷治央, 相良洋, 竹内晃久, 大東琢治, 高木利久, X 線ナノトモグラフィーによるマウス脳組織の 3 次元再構築, 第 88 回日本生理学会大会, 横浜, 2011 年 3 月 28-30 日
- ② 水谷治央, X 線顕微鏡を用いて脳神経回路の配線図を解読する, 先端計測シンポジウム「軟 X 線顕微鏡の生体観察への応用と展開」, 仙台, 2011 年 3 月 3 日
- ③ 水谷治央, 高分解能 X 線トモグラフィー法による脳神経ネットワークの再構築を目指して, 第 24 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム「生命現象のイメージング」, つくば, 2011 年 1 月 7-10 日
- ④ Haruo Mizutani, Hirashi Sagara, Takuji Ohigashi and Toshihisa Takagi, X-ray nanoscope with synapse resolution for neuronal circuit reconstruction, 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2010), San Diego, USA, 2010 年 11 月 13-17 日
- ⑤ 水谷治央, 相良洋, 竹内晃久, 大東琢治, 矢代航, 上杉健太郎, 鈴木芳生, 百生敦, 高木利久, ナノ分解能 X 線トモグラフィーによるマウス大脳皮質の神経回路配線図解読, 第 33 回日本神経科学大会, 神戸, 2010 年 9 月 2-4 日
- ⑥ Haruo Mizutani, Hiroshi Sagara, Akihisa Takeuchi, Takuji Ohigashi, Wataru Yashiro, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki, Atsushi Momose and Toshihisa Takagi, Nano-resolution X-ray tomography for deciphering wiring diagram of mammalian brain, 10th International Conference on X-Ray Microscopy, Chicago, USA, 2010 年 8 月 15-20 日
- ⑦ Fumihiko Ishida, Takeo Ejima, Mitsunori Toyoda, Toshihide Tsuru, Tadashi Hatano, Mihiro Yanagihara and Haruo Mizutani, Development of wide field of view EUV microscope using normal-incident multilayer optics with LPP light source, 10th International Conference on X-Ray Microscopy, Chicago, USA, 2010 年 8 月 15-20 日
- ⑧ 水谷治央, 大東琢治, 難波秀利, 竹本邦子, 木原裕, 高木利久, 大脳皮質シナプスの 3 次元観察に最適な軟 X 線光学系と試料サイズの検討, ナノテクノロジー放射光利用研究の最前線 2009, 滋賀県草津, 2010 年 5 月 7 日
- ⑨ 石田史彦, 江島丈雄, 柳原美廣, 水谷治央, 透過型軟 X 線反射多層膜顕微鏡を用いた生体試料の観察, 第 57 回日本応用物理学関係連合講演会, 平塚, 2010 年 3 月 17-20 日
- ⑩ 水谷治央, 上杉健太郎, 窪川かおる, 星野真人, 高木利久, 形態多様性理解のための脊椎動物およびその近縁種の 3 次元再構築, 平成 20 年度・21 年度 SPring-8 重点メディカルバイオ領域課題成果報告会, 神戸, 2010 年 3 月 15 日
- ⑪ 水谷治央, バイオイメージングにおける X 線ナノビームの活用, X 線ナノ集光技術研究会, 吹田, 2009 年 8 月 10-11 日
- ⑫ Haruo Mizutani, Yoshihiro Takeda, Atsushi Momose, Akihisa Takeuchi and Toshihisa Takagi, X-ray nano-tomography for neural circuit reconstruction, 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009), Kyoto, Japan, 2009 年 7 月 27 日~8 月 1 日
- ⑬ 水谷治央, 高木利久, X 線ナノトモグラフィーを用いた大規模神経ネットワークの解読, 脳と心のメカニズム第 9 回冬のワークショップ, 留寿都, 2009 年 1 月 13-15 日
- ⑭ 水谷治央, 高木利久, X 線ナノトモグラフィーによる大規模神経回路網の再構築, 定量生物の会第 1 回年会, 東京, 2009 年 1 月 10-12 日
- ⑮ Haruo Mizutani, Yoshihiro Takeda, Atsushi Momose, Akihisa Takeuchi and Toshihisa Takagi, X-ray microscopy for neural circuit reconstruction, 9th International Conference on X-Ray Microscopy, Zürich, Switzerland, 2008 年 7 月 20-25 日
- ⑯ 水谷治央, 武田佳彦, 百生敦, 竹内晃久,

高木利久，神経回路網再構築のための新たなX線イメージング法，第31回日本神経科学学会，東京，2008年7月9-11日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 治央 (MIZUTANI HARUO)  
東京大学・総括プロジェクト機構・  
特任助教  
研究者番号：40444103

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：