



技術解説

神経回路追跡技術

村上 富士夫*

Neuronal Tracing Techniques

Key words: Brain, Neuronal Circuit, Axonal Transport, Electrophysiology

脳を生体中の他の器官と区別せしめる特長の1つは、神経回路の存在である。すなわち脳の神経細胞は細胞体の直径の1000倍を越える距離に亘って軸索を伸ばし、他の神経細胞とシナプスを形成している。こうして作られた複雑な神経回路の働きによって、脳は認識や思考をはじめとする極めて高度な働きや、複雑な制御をすることができる。したがって、脳に存在する神経経路に関する知識は脳の働きを知るのに不可欠であり、古くからその解析技術の発展に力が注がれてきた。

i) 電気生理学的方法

古くから用いられ、現在でもよく用いられている方法の1つが刺激に対する応答を調べる電気生理学的方法である。脳に小さな電極を刺入し、パルス状の通電をおこなうと、その付近の神経細胞の細胞体や軸索は興奮(活動電位を発生)する。活動電位は軸索を伝導するため、それがつながっている神経細胞の細胞体から応答を記録することによって、刺激を与えた部位と記録をおこなった部位との関係を知ることが出来る(図1A)。しかし、刺激によってその部位にある神経細胞の細胞体を興奮させたのか、それとも通過線維を興奮させたのか区別することが出来ないことや、応答が1つのシナプスを介するものか複数のシナプスを介するものかを区

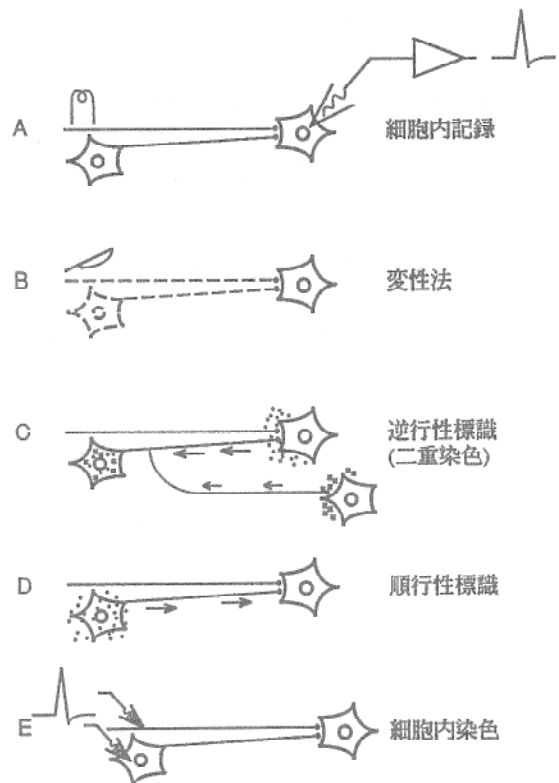


図1

別するのが必ずしも容易ではないことなどが、この方法に限界を与えている。また発達期の脳のように対象が小さい場合は適用が困難である。

ii) 形態学的方法

1) 鍍銀法

形態学的方法は、対象を直接目で見る事が出来るのが電気生理学的方法にはない強みである。古くから用いられ、今日の神経解剖学の教科書の記載の基礎を与えたのが、Nauta法に代表される鍍銀法によって得られた知見である。脳に傷をつけると、その部位にある神経細胞は



*Fujio MURAKAMI
1948年8月19日生
大阪大学基礎工学部卒業
現在、大阪大学基礎工学部生物工学科神経生理学研究室、教授、工学博士、神経生理学
TEL 06-844-1141 (内線 4760)

死に至り、そこに起源を有する軸索は変性を起こし、最終的には消失するが、変性の過程にある軸索を銀で選択的に染色することが出来る(図1B)。この方法を用いた場合、変性していない正常な軸索の染色もある程度は避けられない。また電気生理学的方法を用いた場合と同様に、通過線維に傷をつけることなく細胞体のみに損傷を与えるのは困難であるという問題があった。

iii) 軸索輸送の利用

神経細胞は、細胞体部で作られた様々な分子を軸索輸送という能動的な輸送機構を用いて軸索末端部まで運んでいる(順行性軸索輸送)。またこれとは逆に末端部から分子を取り込んで細胞体部まで輸送する機構も存在する(逆行性輸送)。近年これらの軸索輸送を利用する多くの方法が開発され、これにより神経回路について多くの新たな知見が得られた。

その1つはFast BlueやNuclear Yellowといった蛍光物質の利用によるものである。これらの物質を脳に注入すると、主に軸索末端部から取り込まれ、逆行性輸送によって運ばれて細胞体に至る。それを蛍光顕微鏡で観察する。この方法の特徴は二重染色をすることによって、単一の細胞の軸索が枝分れして2ヶ所以上の部位を支配しているかどうかを知りたい場合に利用できる。例えば異なる波長の蛍光を発する蛍光物質を異なる部位に注入した結果、ある細胞で両方の波長の蛍光の発光が観察されたとすると、この細胞は異なる2つの部位に同時に投射していると解釈される(図1C)。最近になって直径 $0.03\mu\text{m}$ という微小なラテックスビーズに蛍光物質を結合させたトレーサーが開発された¹⁾。この場合、脳に注入したトレーサーは殆ど拡散することなくその部位に留まるため、標識の効率が極めて高い。我々は最近これを用いて、発達期の大脳皮質の細胞が同側と対側の赤核を同時に支配することを明らかにした³⁾。

この他によく用いられるものとして西洋ワサビ過酸化酵素(horseradish peroxidase, HRP)がある。これもやはり主に軸索終末から取り込まれて細胞体へ運ばれる。これをジアミノベン

ジジン(DAB)などの分子を利用して可視化することが出来る。すなわち酸化を受けることによって呈色反応を示すが、HRPはこの反応の触媒として働くため、脳の切片に H_2O_2 の存在下でDABを投与すると、HRPの存在部位が特異的に着色される。このようにして輸送されたHRPを高感度に検出することが出来る。

HRPは逆行性にはかなりよく輸送されるが、順行性には余り運ばれない。順行性トレーサーとして比較的好く使われてきたのは放射性同位元素(主にトリチウム)で標識されたアミノ酸で、これを注入すると、近傍の細胞体から取り込まれた後、何らかの蛋白質の合成に用いられ、軸索輸送で終末まで運ばれる(図1D)。これをオートラジオグラフィの技術を利用して可視化することが出来る。アミノ酸の輸送は輸送方向の特異性が高く、順行性にしか輸送されない。ネコやサルではトリチウム標識アミノ酸を眼球に注入すると網膜の神経節細胞に取り込まれ、外側膝状体まで運ばれるが、そこで更にシナプスを乗り越えて大脳皮質視覚領まで運ばれる。この性質を利用してWieselとHubelは、左右の眼から外側膝状体を通して大脳皮質に至る入力は、皮質で入り交じらずに分離して分布し、いわゆる眼優位性コラムを形成することを示した²⁾。

オートラジオグラフィを適用するには、RIを取り扱ったり、RI動物を飼育するための施設が必要である上、結果を得るまでに長時間待たねばならない。また光学顕微鏡で観察されるのは放射線を受けることによって生じた銀の粒子であり、標識された軸索や終末の形態を直接観察することは出来ないという苛立たしきがあった。

近年になって登場した植物性レクチンの一種であるPhaseolus vulgaris-leucoagglutinin(PHA-L)は、これらの問題を一挙に解決した。PHA-Lを先端の細い($50\mu\text{m}$ 程度)のガラス管に充填して電気泳動的、または圧力を加えて脳に注入すると近傍の神経細胞の細胞体や樹状突起から取り込まれ、順行性軸索輸送によって運ばれる。PHA-Lそのものは眼で見えないが、その後抗PHA-L抗体を用いて免疫組織化学的

方法を用いて染色することが出来る。一般的に用いられる方法は①抗PHA-Lヤギ血清②ビオチン化抗ヤギイムノグロブリン③HRPを結合させたアビジンという順序で投与し(アビジンとビオチンには強い親和性があるため結合する)、最後にDABを加えて呈色させるという方法が用いられる。このようにして染色された神経細胞は、オートラジオグラフィを用いた場合と異なり、細胞の全体像を直接観察することが出来るという利点があり、得られた結果の信頼性が高い。したがって少量の線維しか投射していないような弱いものであっても、PHA-Lを用いることによって明らかにすることが出来る。また注入されたレクチンは、その部位から余り拡散することなく近傍の細胞の膜に結合するため、局所的な標識が可能である。このため、他の方法で困難であった脳内の局所的な投射パターンを明らかにすることが可能となる。筆者らはPHA-Lを用いて、生後発達期のネコには交差性の脳一赤核投射が存在することを明らかにした(図2)^{4),5)}。

iv) 細胞内染色法

これまで述べてきた、いずれのトレーサーを用いても、得られた知見の不確実性が残る。例えば最後に述べたPHA-Lを用いる場合でも、通過線維からのトレーサーが取り込まれる可能性はさほど高くないものの、否定はできない。また逆行性トレーサーも通例軸索終末からだけではなく、通過線維や注入の際に切断された線維の断端からの取り込みは避けられない。これに対し、細胞内注入法は、トレーサーを充填した先端の直径が $0.1\mu\text{m}$ 程度の細いガラス管を神経細胞内に刺入し、トレーサーを直接細胞内に注入しようというものであり、前述のような問題を避けることができる。トレーサーとしてはHRPの他、ビオチンを主成分とするバイオサイチンが有用であり、よく用いられる。これらの物質を高濃度の塩溶液に溶かすことによって、細胞の電氣的応答をも同時に記録することが出来るため、刺激に対する応答を調べることによって細胞を同定したのち、トレーサーの注

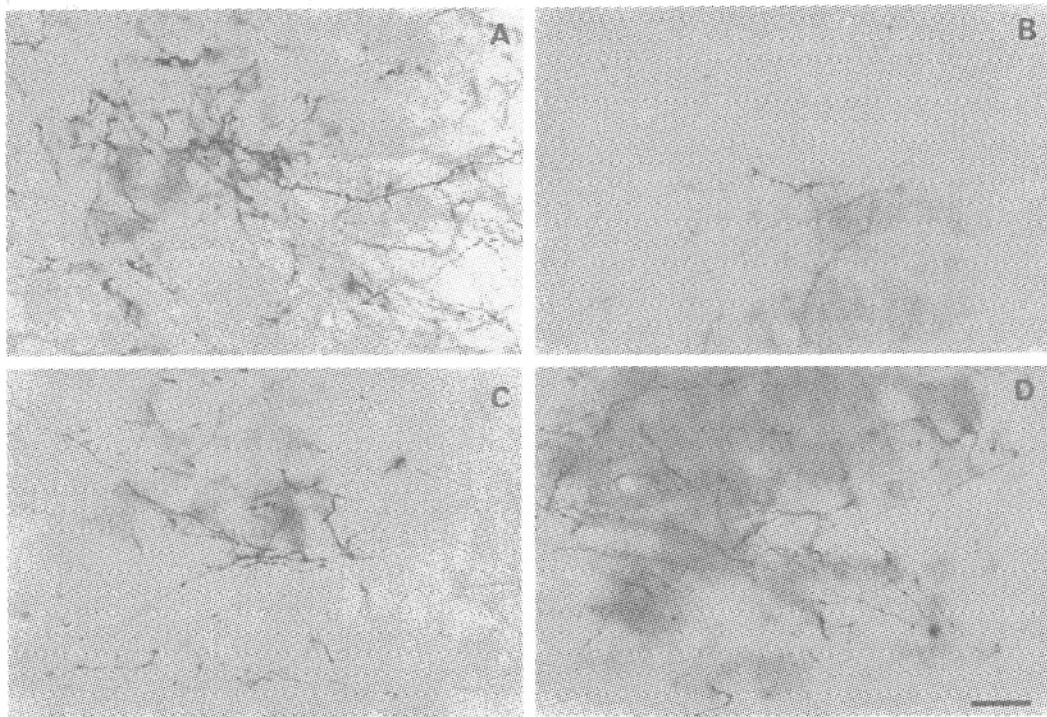


図2 PHA-Lによって染色された脳一赤核線維
AとBはそれぞれ生後30日のネコの同側(PHA-Lの注入側に対して)と対側の赤核。CとDは生後約3週時に大脳皮質を一側性に壊したネコで、それぞれ同側、対側の赤核である。バーの長さは $25\mu\text{m}$ 。

入をおこなうことも出来る(図1E)。またHRPの場合、細胞体に注入を行うと、かなりの距離にわたって軸索を染色することが出来る。篠田らはこの方法を用いて赤核から脊髄へ投射する神経細胞が、脊髄の中でいくつものレベルで側枝を出していることを明らかにした⁶⁾。

v) 脂溶性トレーサー

DiI(1, 1'-dihexadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)もDiO(3, 3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate)も順行性または逆行性トレーサーとして用いることの出来る蛍光物質であるが、他のトレーサーと異なるのは脂溶性である点である。そのためこれらは軸索輸送によって運ばれるだけでなく、脂質が主成分である細胞膜中に溶け込んで膜中を拡散によって移動してゆく。このうち後者の方は細胞が生きていても死んでいても起こる。したがって脳組織をホルマリンなどを用いて固定した後でも、DiIやDiOを注入して神経回路を調べることが出来る。これは発達期の脳など小さくて生きている状態では容易でない材料にも適用可能である⁷⁾。またこの2種の色素のうちDiIは弱い励起で充分強い蛍光を発するため、レーザー顕微鏡やSITカメラなどと組み合わせて用いることによって、脳の中の生きた神経細胞の回路形成の過程を追うことが出来るようになりつつある。

おわりに

近年の研究においては、生きた脳を切片にして活動を記録する脳切片法や、組織や細胞を単離培養して神経細胞の挙動を調べる器官培養法・細胞培養法が重要な研究手段として用いられるようになり、細胞の分子レベルで様々な現象を解明する有力な手段となっている。しかし、脳をシステムとして理解するには神経回路に関する知見は重要である。以上述べてきた神経回路追跡法の進歩によって、神経回路に関する知見はここ10年程の間著しく増加した。しかし、大脳皮質のように複雑な部位に関しては不明な点がまだまだ多く残っており、研究技術の更なる発展が望まれる。

参考文献

- 1) Katz, L. C. & Iarovici, D. M. : *Neurosci.*, 34, 511-520 (1990).
- 2) Hubel, D. H. et al. : *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 278, 377-409 (1977).
- 3) Murakami, F. et al. : *Abst. Soc. Neurosci.*, 17, 765 (1991).
- 4) Murakami, F. & Higashi, S. : *Brain Res.*, 447, 98-108 (1988).
- 5) Higashi, S. et al. : *J. comp. Neurosci.*, 299, 312-326 (1990).
- 6) Shinoda, Y. et al. : *Brain Res.*, 242, 321-325 (1982).
- 7) Godemnt, P. et al. : *Development*, 101, 697-713 (1987)