

共焦点レーザースキャニング顕微鏡による 網膜神経節細胞の三次元形態の解析

澤井 元・田内 雅規

要旨 複雑な突起形状を有する中枢神経細胞の三次元構造を研究する方法は従来限られており、またそれらの方法によっても非常に時間と手間がかかる上に精度があげられないという問題点があった。しかし、最近になって実用化し普及しつつある共焦点レーザースキャニング顕微鏡 (CLSM) はこの問題を解決する可能性を持っている。本研究は、中枢神経系の中でも特に小さく、かつ樹状突起が幅の狭い層に密に展開している網膜神経節細胞の立体構造がCLSM観察によりどの程度解析可能かを検討したものである。Lucifer yellow CH 細胞内注入により網膜神経節細胞を可視化した網膜全伸展標本をCLSMで観察した。その結果、単一細胞の個々の樹状突起や軸索突起を高解像度の投射画像として観察することができた。さらに、細胞の光学的切片像から垂直面への投射像を構成することにより、個々の注入細胞についてその樹状突起の内網状層における展開面を同定し、outer ramifying cell とinner ramifying cellとに明瞭に分類することに成功した。

キーワード：網膜神経節細胞、樹状突起、軸索、共焦点レーザースキャン顕微鏡、細胞内注入、蛍光色素

はじめに

神経細胞の形態は一般に細胞体とそこから伸びる神経突起に大別される。神経突起はさらに他の細胞からのシナプス入力を受け取るための樹状突起と他の細胞へ活動電位を伝達するための軸索突起のふたつの部分に区別される。ところが、実際の神経細胞の形態には非常に多数のバリエーションが認められる。個々の細胞により、樹状突起の広がりや太さ、分岐の数、スパインの数、軸索突起の長さや太さ、側枝の数、終末部の広がりや terminal button の数や密度が異なっており、さらにそれらの細胞が神経組織内で複雑なネットワークを構築しているのである。従って、神経系の機能を理解するにはこのネットワーク構築を解明することが必要であり、その基礎としてネットワーク構成単位である個別の神経細胞の形態学的特徴を明らかにすることが極めて重要となる。

従来から単一神経細胞の形態を解析する為に様々な染色技法と観察手段が開発されてきた^{1,3,7,13,15}。しかしながら、全ての神経突起を含む単一細胞の形

態を可視化する完全な方法はトレーサーの細胞内注入方法^{1,13,15,16}以外にない。これは可視化可能なトレーサーを微小ガラス管電極に封入し、この電極を目的の細胞に刺入してトレーサーを細胞内に充填する方法である。この方法は予め神経細胞を蛍光標識しておき、蛍光顕微鏡観察下でLucifer yellow (LY) などの蛍光色素を細胞内に注入する方法^{10,16}が開発されたことによって、きわめて効率よく確実に単一神経細胞の形態を把握出来るようになった。ところが、三次元の組織内に展開している神経細胞の構造をこれまでの光学顕微鏡で解析するには、まず、対象を含む神経組織を10~50 μ m単位で連続的に薄切した標本を作製し、次に個々の切片における細胞の観察画像を再構成しなければならない。この作業には技術的困難さと膨大な手間と時間を要するという問題点がある。

最近、急速に普及している共焦点レーザースキャニング顕微鏡(confocal laser scanning microscope, CLSM)はこの問題を解決する可能性をもった新しい顕微鏡である^{8,14}。CLSMの長所の一つは、分

厚い試料を高い解像度で観察できる点である。これはCLSMが直進性にすぐれたレーザー光を観察対象に照射し、その反射光ないし励起光をピンホールを介して捉えるために焦点外から由来する光を除外できるからである。もう一つの長所は対象物の立体構造を任意の方向から観察（実際には画像解析）したり、任意の断面を実際に標本を切ることなく見ることが出来る点にある。これは、CLSMではピンホールを三次元的に走査（スキヤニング）して得られた対象の画像がCCDカメラを介してデジタルデータとしてコンピュータに送られるからである。従って、コンピュータでの画像処理によって対象物の立体構造を様々なイメージとして表示できる。

今回、我々は本学保健福祉学部に導入されたCLSM（カールツアイス社製LSM410）を用いて、網膜神経節細胞の三次元形態観察を試みた。網膜神経節細胞は発生学的にも組織学的にも中枢神経系に属するため、従来から中枢神経系のモデル神経細胞として神経科学の様々な分野の研究に用いられてきた¹⁸⁾。眼球組織は外科的摘出が容易で、さらに網膜は強膜から簡単に剥離して、そのままスライドガラス上に平面展開する、いわゆる全伸展標本の作成が可能である。これにより視細胞層から視神経線維層に至る各層に位置する網膜細胞を一枚の標本として観察することが出来る。この利点を生かしながらCLSMを用いることにより、網膜神経節細胞の三次元構造解析がどのくらいの解像度で可能かを検討した。

材料と方法

動物：アルビノラット（SD、日本クレア）成体の雌7匹を用いた。

網膜神経節細胞の逆行性標識：動物を5%抱水クロラール腹腔内注射（0.5g/kg, B.W.）により麻酔後、その頭部を定位固定台に固定し、頭皮を正中切開、後頭骨を穿孔し、後頭葉吸引除去術により上丘背側表面を露出させた。4%Granular Blue (GB, Sigma)を含むジェルフォームを上丘表面に留置し、頭部を縫合した。

Lucifer yellow 細胞内注入：逆行性標識手術1-2週目以降に動物を致死量の麻酔投与（抱水クロラール腹腔内注射；1.5g/kg）後、左眼球を摘出した。強膜から剥離した網膜をフィルターペーパー上に伸展し、通気（95%酸素、5%炭酸ガス）した

培養液（Ames medium, Sigma）を環流したアクリルレジン製チャンバー内にセットした¹⁶⁾。ステージ固定式蛍光顕微鏡（Olympus BH）観察下でGB標識された網膜神経節細胞を同定したのち、Lucifer yellow CH (LY, Aldrich, 4% in 0.2M LiCl)を封入したガラス管微小電極を刺入し、LYをイオン泳動的に細胞内注入した。一枚の網膜につき6~15個の細胞にLYを注入した後、網膜を4%paraformaldehyde液（0.1M phosphate buffer, pH7.4）により固定した（4℃、一晚）。固定網膜をスライドガラス上に伸展し、褪色防止剤（Vectorshield, Vector）とカバーガラスで封入した。

CLSM観察：網膜標本をCLSM（LSM410, Carl Zeiss）により観察した。アルゴンレーザー（488nm）を標本に照射し、注入されたLYを励起した。走査速度500ms、8回アベレーシングによる走査を行った。また0.5 μ mごと30~50 μ mの深さに亘って走査し、Z軸の光学的薄切をおこなった。走査画像はIBMコンピュータと画像処理ソフトウェア（Carl Zeiss）により、ステレオイメージやXY平面投影像及びXZ平面投影像として再構成し、TIFF形式の画像データとして記録し、プリンター出力した。

結果と考察

単一网膜神経節細胞の形態はこれまでゴルジ染色法^{2,3)} やレーザーによる逆行性標識法⁴⁾ や細胞内注入法^{5,6,9,10,11,12,16,17,18)} を用いて光学顕微鏡観察されてきた。今回観察対象とした α 型網膜神経節細胞は多種類の脊椎動物網膜に広く認められるタイプで、その細胞体は大型で直径は15~25 μ mに及ぶ。樹状突起は細胞体よりも外側（強膜側）の内網状層においてほぼ平面的に展開し、突起は細胞体を中心に放射状に分枝を繰り返す。軸索突起は細胞体もしくは一本の一次樹状突起から出て、細胞体より内側（硝子体側）の視神経線維層のなかををほぼ直線的に走行する。従って、一枚の厚さ約200 μ mの網膜全伸展標本で、内在する一つの神経節細胞の網膜内軸索突起、細胞体および樹状突起の全形態を観察することが可能である。しかしながらこれらの構造がそれぞれ別々の層に分布するため、全構造を従来型の顕微鏡で同一平面で捉えることは不可能である。

図1AはLYを細胞内注入した網膜神経節細胞の蛍光顕微鏡写真で、Bは同一細胞をさらにdiami-

no-benzidine (DAB) の光酸化反応により発色処理したのち、透過光で顕微鏡観察したものである。比較的低倍の対物レンズを使用して焦点深度を深く取っているにもかかわらず全構造を焦点ボケなく捉えることは出来ていない。両図とも樹状突起に焦点が合わされているが、樹状突起の一部、特に図の左上部分の樹状突起は焦点外になっている。細胞体(*印)はさらにボケており、軸索突起にいたっては同定できない。また、Aの蛍光写真をBの透過光による写真と比べると、Aでは細かな樹状突起のコントラストが良い反面、焦点の合っていない細胞体から飛来する蛍光がフレアとなって細胞体のみならず周辺の樹状突起の解像度を悪化させている。このように、従来の蛍光顕微鏡では焦点面の上下部分から放射された蛍光が焦点の合っていないボケた像として結像するため、観察像の解像度が著しく低下するという問題点を抱えている。この問題を解決するため、蛍光観察では出来る限り薄切した標本か培養細胞標本が用いられるが、厚さ約200 μm に過ぎない網膜全伸展標本をさらに水平かつ連続的に薄切する事は非常に困難である。

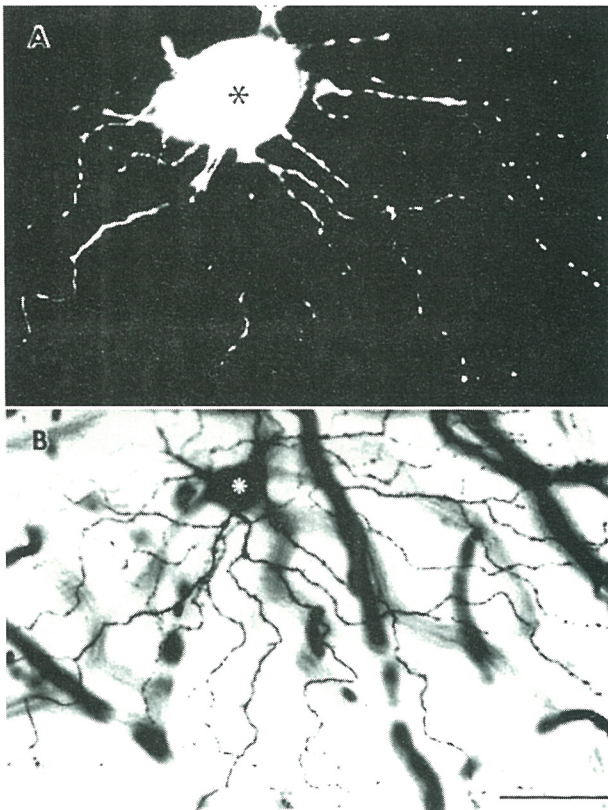


図1：網膜神経節細胞の顕微鏡観察像。A、LY細胞内注入し、蛍光顕微鏡で観察。B、同じ細胞をDAB光酸化法による発色処理後、透過光で観察したもの。*；細胞体、Scale；20 μm

CLSMでは比較的厚い試料であっても焦点ボケがほとんどない画像が得られる。図2はLY細胞内注入した α 型網膜神経節細胞をCLSMを用いて観察した結果、得られた画像である。63倍の対物レンズを用いて100 μm 平方の視野(XY平面)を深さ(Z軸方向)約30 μm に渡って走査し、得られた三次元画像情報をXY平面に投影したものである。高倍の対物レンズを用いているため、解像度が良い反面焦点深度が浅くなるが、ほとんど全ての樹状突起が明瞭に観察されるばかりでなく細胞体(*印)や軸索突起(白矢頭)までもがはっきりと捉えられた。このように全構造が明瞭な投射像を得ることは細胞体の大きさや樹状突起の太さ、広がり、分枝様式等の定量化にとって不可欠な作業である。ところが、従来型顕微鏡を用いて投射像を得るには視野と焦点を変えながら観察者が自ら描画するか、または視野や深さの違う複数枚の写真を撮影してから投射像を再構成する以外なかった。これは極めて時間のかかる作業であり、褪色の速い蛍光標本では特に高解像度の像を構成することは難しい。

CLSMが持つ利点は厚い試料を焦点ボケなく観察できる点だけではない。CLSMを用いると厚い試料に含まれる細胞や小器官の立体像を任意の角度から観察した像に簡単に再構築できる。図3は図2の細胞の走査画像から作製したステレオ画像である。付属のステレオグラスを通してみると立体視が成立し、軸索と樹状突起がそれぞれ細胞体の前後に位置しているのがわかる。図4はさらに硝子体側からみたXY平面投射像上に走査画像のZ軸情報(深さ)を色別で表示したものである。表層を走行する軸索は赤、細胞体は黄色、さらに深部に位置する樹状突起は個々の深さに応じて緑から青で表されている。

一般に α 型網膜神経節細胞は樹状突起が内網状層の内側(硝子体側: inner ramifying)に展開するものと外側(強膜側: outer ramifying)に展開するものの二種類に分類される^{5,9)}。前者はON中心型の受容野をもち、光の照射に対してスパイク放電頻度を増大させるのに対して、後者はOFF中心型の受容野をもち、光の照射によってスパイク放電が抑制される^{5,9)}。従って、樹状突起の展開する位置を調べる事によって、個々の細胞の機能を知ることが出来る。従来型の顕微鏡で樹状突起の展開面を正確に知るには網膜伸展標本から対象の細胞を含む部分の垂

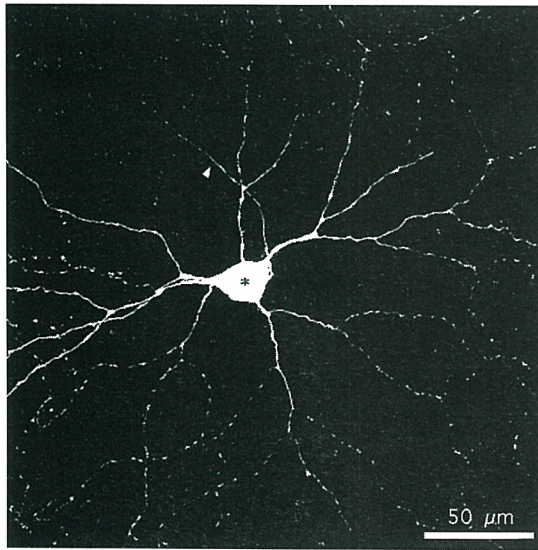


図2： α 型網膜神経節細胞のCLSM観察像。三次元走査画像をXY平面に投影したもの。*；細胞体、矢頭；軸索

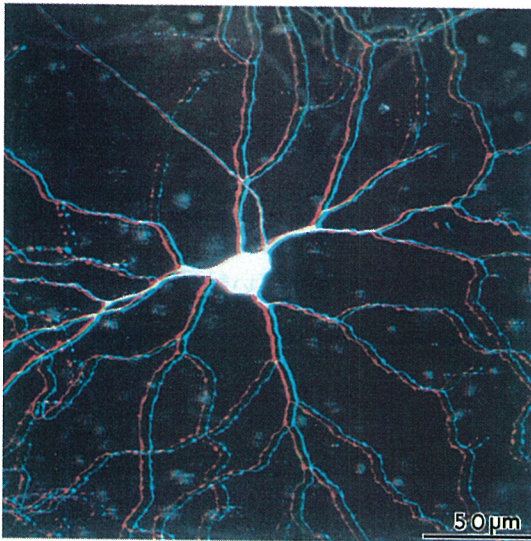


図3： α 型網膜神経節細胞のCLSM観察像。図2の細胞の三次元走査画像から作製したステレオイメージ(視角7度)。付属のステレオグラスを通してみると立体像が観察される。

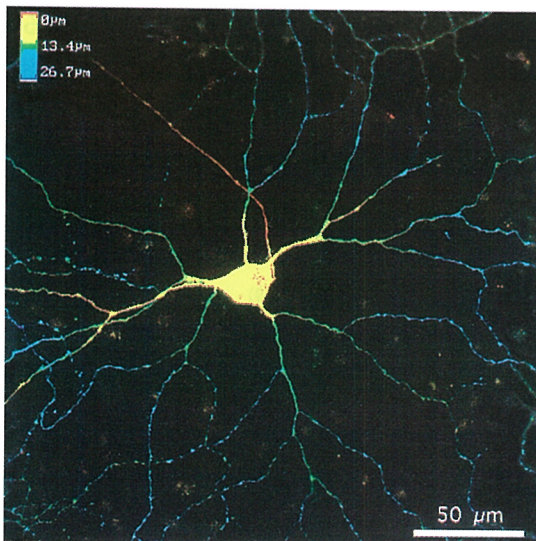


図4： α 型網膜神経節細胞のCLSM観察像。図2の細胞の三次元走査画像をXY平面に投影したのち、z軸(深さ)を色別表示したもの。

直切片を作製して観察するより他にないが、これは技術的にも極めて難しくかつやり直しの効かない作業であった。CLSMでは観察対象の細胞の三次元走査画像を元にして、コンピュータ上で任意の方向から見た画像を構成したり、自由な角度の光学的断面像を構成したりすることができる。従って貴重な網膜標本を垂直にスライスすることなく、簡単にその垂直像を得ることが出来る。我々はこの特徴を生かして、注入細胞の樹状突起展開面を調べてON型かOFF型かに分類出来るか否かを検討した。図5AとBは2種類の α 型網膜神経節細胞を三次元走査し、その全体像をXY平面(下段)とXZ平面(上段)に投影したものである。XZ平面像からはA、Bの細胞ともその樹状突起がほぼフラットに展開している(黒矢頭)ことが観察されるばかりでなく、Bの樹状突起の展開面がAに比べてより細胞体から遠く(強膜側)に位置することから、AがON型、BがOFF型細胞である事がわかった。今回CLSMを使うことにより、網膜標本に対して無侵襲で網膜神経節細胞の垂直像を得ることが出来た。網膜神経節細胞には α 型細胞以外にも形態・機能の異なる β 型・ γ 型・ δ 型細胞がサブクラスとして存在し、それぞれがON型とOFF型を持つ^{11,18)}。しかし、ONないしOFF型の樹状突起の内網状層における展開面が各サブクラス間で同じなのか異なっているのかは明らかでない。網膜神経節細胞の樹状突起はアマクリン細胞や双極細胞からの入力を受ける場所であり、その展開が内網状層のどの深さで行われているかは網膜細胞間のネットワークを解明する上で重要な点であるが、CLSMを駆使することによりこの点の解明されることが期待される。

CLSMで得られる一連の光学的切片像は、画像データとして提供されるため、画像解析ソフトウェアによりさまざまな定性的・定量的解析が可能である。各構造の大きさや数などを汎用の画像解析ソフトウェアを用いて正確かつ能率的に計測できる。走査時間により時間分解能が制限されるが、蛍光標識した特定の細胞内小器官、細胞内物質、細胞表面の微細構造の時空間的变化を解析することも可能である。我々も網膜神経節細胞の樹状突起におけるシナプス終末の分布の時空間的变化の解析を目指しているところである。

CLSMの欠点としては蛍光標本の褪色が挙げら

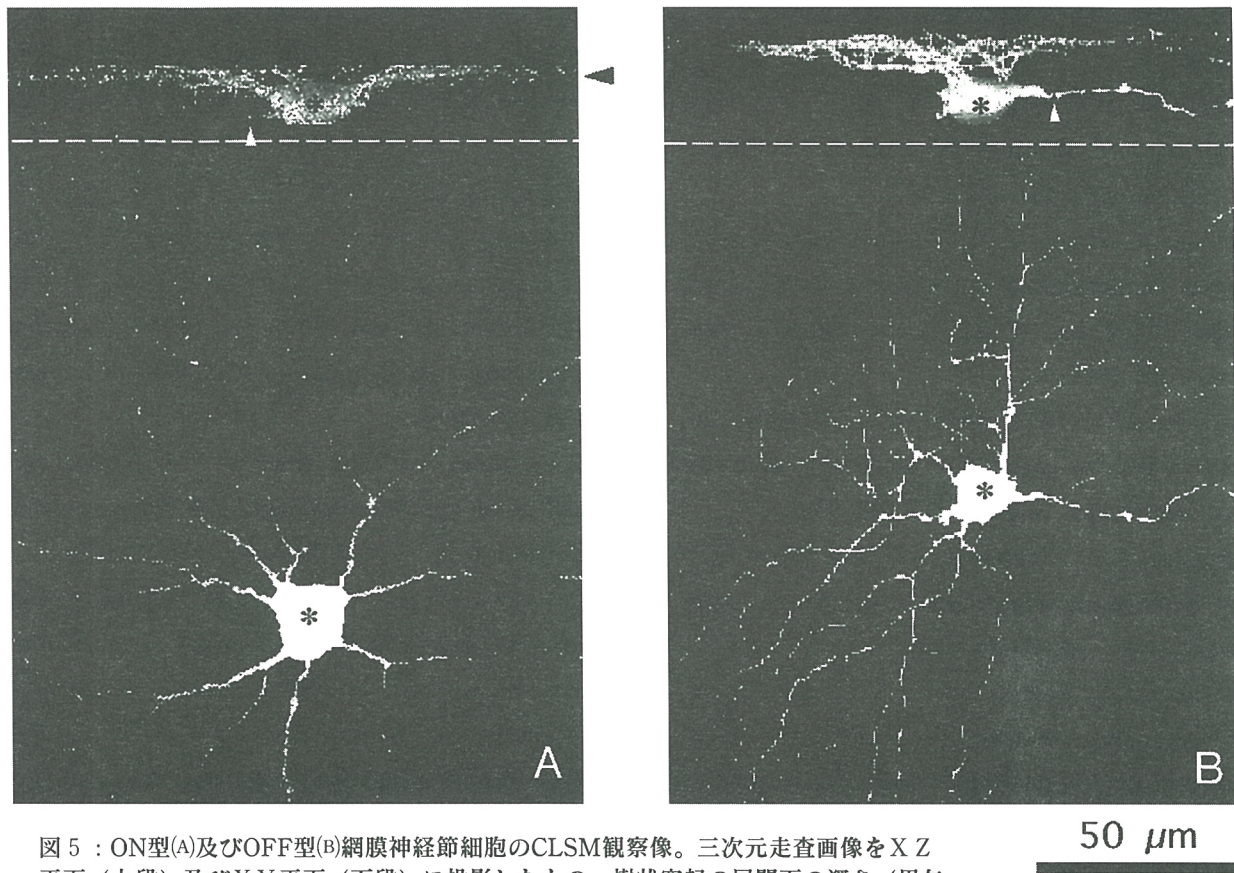


図5：ON型(A)及びOFF型(B)網膜神経節細胞のCLSM観察像。三次元走査画像をXZ平面（上段）及びXY平面（下段）に投影したもの。樹状突起の展開面の深さ（黒矢頭）がAとBで異なる。*；細胞体、白矢頭；軸索

れる。従って、微弱な蛍光標本を繰り返し観察することが困難となる。褪色防止剤の使用、光源出力や加算処理回数を押さえる等の対処が考えられるが、褪色は本質的にはCLSMの欠点というよりも蛍光標本が本来抱えている問題である。

CLSMでは蛍光標識に変えて、金属（金、銀、鉛、鉄など）を標識物質に用いてその反射光を観察する事が可能である。現段階では金属標識は蛍光標識に比べて解像度の点で劣っている。しかし今後の技術的改良により解像度が上がれば、半永久的な金属標識標本を作成してCLSMによって繰り返し観察することが期待される。その一方で、蛍光褪色を軽減する新しい技術を導入したCLSM (Two-photon Microscope)が最近AT&T. Bell研究所によって開発された⁸⁾。従来のCLSMが一つの高エネルギーのphotonを使って蛍光物質を励起させるのに対して、このTwo-photon Microscopeは二つの低エネルギーのphotonを使うことによって、非焦点領域にある蛍光物質が励起され褪色する事を抑えるもので、焦点外の励起が減少するため解像度もあがるという⁸⁾。

付 記

本研究は文部省科学研究費、一般B (07457415) および総合A1995 (07307016) の援助を受けて行われたものである。

文 献

- 1) Bishop, G.A. and King, J.S. (1982). Intracellular horseradish peroxidase injections for tracing neural connections. (in Tracing neuronal connections with horseradish peroxidase, ed. Mesulam, M.-M.) pp185-247, Chichester: John Wiley & Sons.
- 2) Boycott, B.B. and Wässle, H. (1974). The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J.Physiol. (Lond.)*, 240: 397-419.
- 3) Ramón y Cajal, S. (1892) The structure of the retina (translated by Thorpe, S.A. and Glickstein, M.), Springfield, Illinois: Charles C Thomas Publisher.
- 4) Dreher, B., Sefton, A.J., Ni, S.Y.K. and Nisbett, G. (1985). The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion

- cells in albino and hooded rats. *Brain Behav. Evol.*, 26: 10-48.
- 5) Famiglietti, E.V. and Kolb, H. (1976). Structural basis for on- and off-center responses in retinal ganglion cells. *Science*, 194: 193-195.
- 6) Fukuda, Y., Hsiao, C.-F., Watanabe, M. and Ito, H. (1984). Morphological correlates of physiological identified Y, X, and W cell in cat retina. *J. Neurophysiol.*, 52: 999-1013.
- 7) Maranto, A.R. (1982). Neuronal mapping: a photooxidation reaction makes Lucifer yellow useful for electron microscopy. *Science*, 217: 953-955.
- 8) Nerbonne, J.M., Rakowski, R.F. and Bloch, R.J. (1995). Illuminating approaches to cellular physiology. *Trends Neurosci.*, 18: 241-243.
- 9) Nelson, R.E., Famiglietti, E.V. and Kolb, H. (1978). Intracellular staining reveals different level of stratification for ON- and OFF-center retinal ganglion cells in cat retina. *J. Neurophysiol.*, 41: 472-483.
- 10) Peichl, L. (1989). Alpha and delta ganglion cells in rat retina. *J. comp. Neurol.*, 286: 120-139.
- 11) Peichl, L. (1991). Alpha ganglion cells in mammalian retinae: common properties, species differences, and some comments on other ganglion cells. *Visual Neurosci.*, 7: 155-169.
- 12) Saito, H.A. (1983). Morphology of physiologically identified X-, Y-, and W-type retinal ganglion cells of the cat. *J. comp. Neurol.*, 221: 279-288.
- 13) Stewart, W.W. (1978). Functional connections between cells as revealed by dye coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell*, 14: 741-759.
- 14) Shotton, D. and White, N. (1989). Confocal microscopy: three dimensional biological imaging. *TIBS* 14, 435-439.
- 15) Stretton, A.O. and Kravitz, E.A. (1968). Neuronal geometry: determination with technique of intracellular dye injection. *Science*, 162: 132-134.
- 16) Tauchi, M. and Masland, R.H. (1984). The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. *Proc. Roy. Soc. B (Lond.)*, 223: 101-119.
- 17) Tauchi, M., Morigiwa, K. and Fukuda, Y. (1992). Morphological comparisons between outer and inner ramifying alpha cells of the albino rat retina. *Exp. Brain Res.*, 88: 67-77.
- 18) Wässle, H. and Boycott, B.B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.*, 71: 448-480.

Three-dimensional Structure of Rat Retinal Ganglion Cells Analyzed by Confocal Laser Scanning Microscope

HAJIME SAWAI, MASAKI TAUCHI

Department of Welfare System and Health Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja-shi, Okayama 719-11, Japan

ABSTRACT A confocal laser scanning microscope (CLSM) has a great advantage for analyzing three-dimensional structure of neuronal cells, which has been difficult and time-consuming with a conventional microscope. We report here that the innovative microscope can provide us new insights for morphological features of mammalian retinal ganglion cells (RGCs) which were injected intracellularly with a fluorescent dye Lucifer yellow. By means

of CLSM, both dendritic and axonal processes located in different focal planes can be observed at a single image without any blur. Without sectioning flat mounted retinas vertically, CLSM enabled us to identify either on-type cells or off-type cells clearly and easily on the basis of their reconstructed vertical image.

Key words: Retinal ganglion cell, Dendrite, Axon, Confocal laser scanning microscope, Intracellular injection