コバルトとニッケルによるニューロンの 弁別マーキング法

酒 井 正 樹*

1. はじめに

HRP, cobalt, Lucifer Yellow などを用いたニューロンの形態の同定は今日盛んに行われているが、これらの手法が確立したとき、さらに一歩進んで、特定の2個あるいは2群のニューロンを弁別できるようなマーキング法への期待がすでにあったと思われる。なぜなら、電気生理学では従来“2つの神経単位間に、いかなる連絡があるか”について、もっとも関心を注いできたからである。

たしかに、電子顕微鏡レベルでは、HRP 法と Golgi 法や軸索変性法との組合せによって、解剖学的に特定できるニューロン間の連絡を調べる手法が発展した。しかし光顕レベルでは、上の期待に答えるようなめざましい技術的進歩は、これまでになかったと言える。当然、光顕では、2個のニューロン間に接触像が見えるといっても、そこにコンタクトがあるかどうかについては、説得力は弱い。しかしながら、現在の手法でも、両者相互の配置や形態から、どう見てもそこにコンタクトがあると思えないような光顕像もしばしば得られるのであって、生理学的知見を得たのち、直ちに2つのニューロン全体にわたるコンタクト様式を把握できれば、それは電顕による知見よりも informative でありうる。

本文では、光顕レベルの研究における弁別マーキング法について、現在使用されているものをいくつか紹介し、最近、筆者らが昆虫の神経で試みた cobalt と nickel による方法について述べる。

2. 弁別染色法とその問題点

機能的に同定された、あるいは形態的に区別されるニューロンを、異なるマーカーで標識する場合、むずかしさの原因は、まず第1に“これに適したよいマーカーや反応法がない”からではなく、“すでに

確立された染色法をもってしても、目的とするニューロンをほぼ完全に近い形で染め上げることは、やはりむずかしい”というところにある。

ちなみに筆者がルチーンに行っている、軸索からの重金属の backfill の場合をあげると、材料はコロギで、これは数の上でも標本作成の容易さにおいても、申分のないものである。しかし、4個体やった場合、1個はOK、1個はbad、残りの2個はoddというのが、通常の成績である。したがって、2群の同時染色となれば、データになる確率はよく見積っても $1/4 \times 1/4 = 1/16$ に減少する。ただし、染色の出来ばえに対する要求度は、研究の目的によって当然異なってくる。たとえば、生理学的に同定した2個のニューロン間の“どこに、どのくらいのコンタクトがあるか”を問題にする場合と、“ニューロンのタイプを識別する”だけの場合とでは、両者で要する努力には雲泥の差がある。筆者がここで掲げる技術目標は、前者の方である。

弁別染色の第2の困難さは、1個のニューロンの場合と比べ、マーキング後の組織処理が当然複雑となり、時間がかかることにある。しかも、組織が劣化したり、一方のための組織化学処理が他方へ影響することがあるので、これらを回避するための方策も考えねばならない。以下、現在行われている弁別マーキング法を紹介する。

HRP-HRP: これは正しくは弁別法とは言えないが、脊椎動物で広く適用されている。HRP 注入により、ネコの脊髓運動ニューロンと下降性脊髓路繊維¹⁾や求心性繊維²⁾との連絡様式が調べられ、運動ニューロンの樹状突起や細胞体上に、後者の終末 bouton が確認されている。ヤツメウナギの幼生では、下降性ニューロンが介在ニューロンとコンタクトする部位と、後者で発生する EPSP の関係が解析されてい

* Masaki SAKAI, 岡山大学理学部生物学教室 (〒700 岡山市津島中3丁目1-1)

る³⁾。この方法では、組織処理は1回のDAB-H₂O₂反応で済ませれるし、組織の劣化も少ない。ラベルされたニューロンの色は、いずれもかった色であるが、両者は注入された各々の構造のちがいで区別できる。

最近、ネコの筋一次求心性繊維のHRP染色⁴⁾で多数の脊髓ニューロンが、またハエの脳内にあって胸部へ連絡する下降性ニューロンの逆行性染色⁵⁾で、視葉→脳投射性ニューロンの突起が超元性(transneuronal)にラベル⁶⁾されることがわかってきた。この現象は、cobaltによっても生じることが報告されている⁷⁾。

HRP-cobalt: 両者でラベルした組織は、まずCo⁺⁺を硫化アンモニウムで、つぎにHRPをDAB-H₂O₂で、さらにCo⁺⁺を硝酸銀で反応させる。この方法の欠点は、最後の過程が、Co⁺⁺だけでなくHRPでラベルしたニューロンをも同様に増感染色してしまう可能性をもっていることである⁸⁾。軸索断端からの注入に際しては、HRPの軸索内拡散速度は遅いので、Co⁺⁺よりも先に注入しておく必要がある。また、昆虫の神経節の場合、DABは内部への浸透が著しく悪いので、神経節を分断する必要が生じる。この場合には、ニューロン間の関係をwhole mountで一望することはできなくなる。

HRP-Lucifer Yellow: ヒルの神経⁹⁾に適用されて、めざましい成果をあげている手法である。細胞内注入法により2個のニューロンをラベルしたものを写真に撮ると、HRP黒い突起上にLucifer yellowの輝く終末bouton像がくっきりと認められ、その接触像からはコンタクトがあることが十分にうかがえる。組織の処理は簡単で、通常の手順を逆に、まずDAB-H₂O₂反応、つぎにパラホルム固定を行う。

蛍光色素: 網膜への適用例¹⁰⁾として、Procion YellowとBrilliant Redがあげられる。前者は水平細胞を黄色に、後者はオレンジ色にマークする。しかし、一般には蛍光で輝く突起同士の接触部分は不明瞭である。また、細部まで視覚化できるマーカーは限られている。したがって、Evans Blueなど多くの蛍光色素は、微細構造の研究には向かず、脊椎動物の脳で利用されているように、かけ離れた2個所からの逆行性細胞体標識に用いられ、ニューロンの軸索分枝様式の研究に使用されている¹¹⁾。

重金属: 最近まで、金属イオンによる染色といえはcobaltに決っていた。しかし、2価イオンはル

表1 コバルトとニッケルの混合
によって生じる色調

Co ⁺⁺ : Ni ⁺⁺	色
0 : 10	濃 青
2 : 8	紫
4 : 6	深 紅
5 : 5	赤
6 : 4	茶
7 : 3	橙
10 : 0	黄

ベアン酸(rubeanic acid)と反応する錯体を形成し、各金属に特有な色を発生する。Quickeらは、Co⁺⁺とNi⁺⁺をアメフラシの神経に適用し、前者で細胞体を黄色に、後者で濃青色に染め分けることができた¹²⁾。この方法については、3、4節で詳しく述べる。

以上のほか、一方のニューロンをHRPで特定しておき、同じ標本をGolgi法で染色することにより、非選択的に染色できるいくつかのニューロンと、前者との関係を調べる手法がある¹³⁾。運がよければ、HRPニューロンとの接触像を得ることができる。また、あらかじめ軸索変性を起しておき、これとHRPニューロンとの関係を調べる方法もある¹³⁾。AchEやGADの抗体による免疫学的手法、cytochrome oxidaseやcatecholamine組織化学、³H-thymidine放射性同位元素法、これらとHRPとの組合せで弁別マーキングが行われている。それぞれの手法の詳細については、最近出版された成書⁸⁾を参照されたい。

3. コバルトとニッケルによる2色弁別染色

重金属によるこの方法は、他の弁別染色法が抱えている多くの欠点を克服しており、現在、無脊椎動物の神経連絡を研究する上では、先にあげたHRP-Lucifer yellow法に匹敵するか、それを凌いでいると思われる。以下、筆者の経験を基に、その特徴を述べる。

(1) 金属イオンは、細胞内または軸索断端のいず

図1 コオロギ最終腹部神経節における尾葉感覚神経と内側巨大介在ニューロン 両側の感覚神経(矢じり印)を15時間前に Ni^{++} で backfill した標本で、細胞内記録を行い、内側巨大介在ニューロン(MG)を Co^{++} - Ni^{++} でラベルした。左右対象にうっすらとみえるのが、ニッケルで濃青色に染まった感覚神経。左に黒くみえる太い樹状突起は、 Co^{++} - Ni^{++} でマゼンタ色に染まったMG Iのもの。同じ色だと左側では両者を区別しにくい、色をちがえると細部まで区別できる。

れの場合でも、異なるイオンを容易にかつ同じ条件で注入できる。したがって、単一ニューロンの軸索分枝の研究にも使用できる^{(12), (14), (15)}。(2)軸索終末でのコンタクトを調べるに十分な、解像度が得られる。(3)試薬は安全で安価。(4)組織処理は簡単かつ短時間。(5)長時間観察しても退色しない。(6)発色剤であるルベアン酸は組織を劣化させないので、電顕用の標本としても使える。(7)2色以上の多重弁別染色も簡単に行える。(8)必要とあらば、さらに銀増感処理を行い、目的部位のより細部を染め出すことができる。

重金属とルベアン酸の反応は、下記(Ni^{++} の場合を例示している)の通りで、 $^{26}\text{Fe}^{++}$ では茶色、 $^{27}\text{Co}^{++}$ では黄色、 $^{28}\text{Ni}^{++}$ では濃青色、 $^{29}\text{Cu}^{++}$ では暗緑色を呈する錯体が生成される。

これらのうち、弁別染色用として Co^{++} と Ni^{++} を用いると、それぞれの明色と暗色とが互いによりコントラストをなす。しかし、 Co^{++} の黄色は、背景となる神経節の透明ないし灰白色に対し、あまり強いコントラストは示さない。ところが Co^{++} 溶液と Ni^{++} 溶液を一定の比で混合し、ルベアン酸と反応させると、黄色から濃青色までの間のいろいろな色調を作り出せることがわかった(表1)⁽¹⁵⁾。

このうち、 $\text{Co}^{++}:\text{Ni}^{++}=4:6$ のものは赤ブドウに近い深紅色で、背景に対しても Ni^{++} でラベルしたニューロンに対しても、よいコントラストをもっている。この色は、背景に対するコントラストの点では、 Ni^{++} の濃青色よりも勝っており、単独で backfill に使用する場合でも、マーカーとしては最もすぐれている。第3のニューロンを別な色でマークしたい場合には、 $\text{Co}^{++}:\text{Ni}^{++}=2:8$ でできる紫色がよい。これは前2者とも十分に区別できる。

ところで、このような Co^{++} 溶液と Ni^{++} 溶液の混合で生まれる色調は、いかなる反応生成物によるのか? 筆者は、 Co^{++} と Ni^{++} とルベアン酸が合体して、

複雑な錯体が形成されるかも知れないと考え、種々の色溶液についてスペクトル吸収を分析してみた。しかし結果は、 Co^{++} 溶液と Ni^{++} 溶液の各々が吸収スペクトルの単純な加算として説明されることがわかった。つまり、あくまでも Co^{++} 錯体分子と Ni^{++} 錯体分子が混合しているだけであった。

ここで、 Co^{++} と Ni^{++} のマーキングにおける性質を少し比べてみたい。 Co^{++} と Ni^{++} は周期率表ではともにⅧ族に属し、原子量は $\text{Co}^{++}=58.95$, $\text{Ni}^{++}=58.71$, 電気陰性度は $\text{Co}^{++}=1.70$, $\text{Ni}^{++}=1.75$ で、ともによく似ている。にもかかわらず、次のような違いが見い出された。

(1) Ni^{++} は Co^{++} に比べ、軸索からの漏れが少ない。これは backfill における最も有利な性質であり、 Ni^{++} が従来の Co^{++} を凌いでいることが証明された。(2) 軸索内での拡散速度は、 Co^{++} の方がはやい。これは $\text{Co}^{++}:\text{Ni}^{++}=6:4$ 混合液を注入してから、遠方のかつ細い突起を見ると、黄色味がかって見えること、また細胞内注入を行った場合、通電時間が短いとオレンジ色になるといったことから、推測できる。後者は電極先端からの放出が Co^{++} の方が多いことによるのかも知れない。(3) 他の研究者の報告¹⁶⁾によれば、別々のガラス電極に0.25Mの両液を充填し、抵抗と通電性を比べたところ、 Co^{++} は平均65M Ω , Ni^{++} は40M Ω であった。また、5~10nAの通電中、電流 block をおこしたものは前者で50%, 後者で2%あり、いずれの点でも Ni^{++} の方がマーキング物質としては勝っていると思われる。

ちなみに記しておく、 Co^{++} も Ni^{++} もともに生体の必須微量元素である。貧血症を防ぐビタミン B_{12} は、コバルト錯化合物である。また、 Ni^{++} は膜の構造と代謝に必要であるとされている。しかし、 Ni^{++} は一方で肺や副鼻腔の癌の原因になるとも言われている。取り扱い量が少なければ、問題はないであろう。

4. 2色染色法の手順

backfill を習得した者なら、直ちに成功できる。筆者は、1Mの塩化コバルト溶液と塩化ニッケル溶液を用い(溶液濃度の吟味については、文献15, 17を参照されたい)、コオロギの最終腹部神経節にある介在ニューロンと求心性繊維終末との関係を調べている(図1)。一方、細胞内注入の場合は、2M溶液を用いる。40~50nA陽性パルス(500msec)を10分間通電する。いずれの場合も、とり出した神経節は3mlの緩衝液(0.15M sodium cacodylate+8%

sucrose, pH7.8)に浸し、これにエタノールに飽和溶解させたルベアン酸液を3滴加えて、約15分間おく。この間、容器をよく揺すりながら実体鏡下で反応の進行を見る。その後、10%ホルマリン(上記の緩衝液中)に少なくとも15分間おき、70%, 100%エタノール中でそれぞれ10分間ずつ脱水し、ついでサリチル酸メチルで透徹する。固定液はホルマリンがよく、グルタルアルデヒドやブアンは組織に黄色味をつけるので細部の観察に支障をきたす。でき上がりを観察してみると、広応直後よりも2~3日後の方が細部が鮮明になるような印象を受ける。サリチル酸メチル中に保存しておいて、退色することはない。ただし、上記の脱水時のアルコール中に長くおくと、退色する。

5. おわりに

ここに紹介した新しい2色による弁別マーキング法は、2個または2群のニューロン間の連絡や位置関係を、光顕レベルで調べる上で有力な手法である。とはいえ、1種のニューロンのマーキングに比べれば、やはり成功のチャンスは低く苦勞も多い。しかしながら、それでもこの方法は簡便さという点では初心者にもわけなくやれる程度のものでありながら、でき上がりの見事さには驚くべきものがある。赤と青とが織りなすニューロンのジャングルは、まるで万華鏡のようであり、その美しさは一度覗き見るとアイビースから目を離れられなくさせるほどのものである。暇のある向きには、ぜひ一度試してみられることをお勧めする。

かくして、光顕レベルでのニューロンのコンタクトが明瞭に同定できるのであるから、さらにその部分が、電顕レベルにおいて組織劣化なしに明瞭に識別できるならば、最高であろう。このために、なにかよい方法はないかと知恵を搾っているところである。

文 献

- 1) Shinoda, Y., Yokota, J., & Futami, T.: Neurosci. Lett., 23, 7-12 (1981)
- 2) Brown, A. G. & Fyffe, R. E. W.: J. Physiol., 313, 121-140 (1981)
- 3) Christensen, B. N. & Teubl, W. P.: J. Physiol., 297, 299-318 (1979)

- 4) Hongo, T., Kudo, N., Yamashita, M., Ishizuka, N. & Mannen, H.: Biomed. Res., 25 (6), 722-727 (1981)
- 5) Nässel, D.R.: Brain Res., 206, 431-438 (1981)
- 6) Triller, A. & Korn, H.: Exp. Brain Res., 40, 233-236 (1981).
- 7) Strausfeld, N. J. & Obermayer, M: J. Comp. physiol., 110, 1-12 (1976)
- 8) Strausfeld, N. J. (ed) : Functional Neuroanatomy, Springer-verlag (1983)
- 9) Macagno, E. R., Muller, K. J., Kristan, M. B., Deriemer, S. A. & Granzow, B.: Brain Res., 217; 143-149 (1981)
- 10) Kaneko, A.: J. Physiol., 213, 95-105 (1971)
- 11) Van der Kooy, D., Kuypers, H. G. J. M. & Catman-Baevoets, C. E.: Brain Res., 158, 189-196 (1978)
- 12) Quicke, D. L. J. & Brace, R. C.: J. Microscopy, 115, 161-163 (1979)
- 13) Somogi, P., Hodgson, A. & Smith, A.: Neurosci., 4, 1805-1852 (1979)
- 14) Jones, K. A. & Page, C. H.: J. Neurobiol., 14-6, 441-456 (1983)
- 15) Sakai, M & Yamaguchi, T.: J. Insect Physiol., 29-5, 393-397 (1983)
- 16) Delcomyn, F.: J. Neurobiol., 12-6, 623-627 (1981)
- 17) Altman, J. S. & Hackney, C. M.: J. Neurobiol., 13-5, 403-441 (1982)