古典的手法の再検討—よりよい逆行性染色技術—

西野浩史*

節足動物の神経系の染色には電極を細胞内に刺入して染色液を注入する細胞内染色法と軸索を途中で切断してそこから色素を注入する逆行性染色法(バックフィル)がある。逆行性染色は遠心性神経の形態の同定には欠かせない技術であるが、簡便でなおかつ長距離の注入の可能な色素はほとんど見当たらないのが現状である。

重金属を用いた染色は古典的に用いられてきた手法であるが、毒性が強いため、長距離の生体染色には不向きとされてきた。また、塩化ニッケルと塩化コバルトを用いた二重染色は細胞体レベルでは識別可能であるが、詳細な分枝領域の差異を検出できるまでには至っていなかった。

著者は染色・銀増感の各ステップを改良することで長距離の染色、そして二重染色を高い再現性で実現することに成功した。本稿ではその改良点に重点をおいて解説したい。

はじめに

節足動物の神経細胞の染色同定・観察には近年、ルシファーイエローや Alexa Fluor (Molecular Probes) などの蛍光色素を用いた細胞内染色法と共焦点レーザー顕微鏡を用いた光学切片の作製により革命的と言ってよいほど高解像度での観察が可能になり、主流として定着しつつある。とりわけその全像が中枢神経節内におさまる介在ニューロンの観察には有効である。

一方、遠心性神経は長い軸索を持つため細胞内染色によりニューロンの全像を観察するのは容易ではない。そこで生体の軸索を切断し、そこから色素を原形質流動を利用して注入する方法が用いられ、これは一般に逆行性染色(バックフィル)と呼ばれる。神経切断端の末梢側から注入すれば感覚ニューロンの細胞体や運動ニューロンの軸索終末を、中枢側から注入すれば、感覚ニューロンの軸索終末や運動ニューロンの細胞体および樹状突起を染色することができる。染色色素としては近年、蛍光色素(例: デキストラノローダミン)やニューロバイオチンが好まれる傾向があるが、前者は簡便ではあるが長距離の染色には不向きであり、後者は長距離の染色に向くが簡便性に劣るため、主流としては定着していない。

ニッケルやコバルトのような重金属を用いたニューロンの染色法は古典的ではあるが今もなお簡便かつ汎用性の高いツールである。これと組み合わせる銀増感法はニューロンの細かい分枝パターンを最も美しく再現する方法としてもっともすぐれたものの一つであろう¹⁾。しかしながらその具体的な染色法は研究グループにおいてまちまちであり、標本の出来、不出来を左右する要因について

は不明な点が多い。私は昆虫の肢の末梢にある自己受容器の軸索の中樞投射を重金属のバックフィル法により調べてきた。感覚ニューロンの軸索は運動ニューロンの軸索に比べ遙かに細いため、1 cm 以上の距離を染色するのは困難であると考えられてきたが、私は染色の各ステップを徹底して改良し、中枢神経節から 2 cm 以上離れた感覚ニューロンの染色、増感、ホールマウントでの観察および切片化を容易に行えるようにした^{2,3)}。さらに塩化ニッケルと塩化コバルトによる二重染色、増感により、2つの異なるニューロン間のわずかな分枝領域の違いを観察することが可能になった³⁾。本稿では 1. 染色液, 2. 染色方法, 3. 発色・固定方法, 4. 銀増感, 5. 二重染色の 5 項目に分けて解説する。以上の染色ステップの基本については組織の論文や参考書を参照されたい^{1,4,5)}。参考文献の多くが著者の専門領域である昆虫の感覚器の研究に偏っていることを了承して頂きたい。

1. 染色液

海外の研究グループは塩化コバルトやコバルトヘキサミンを多用する傾向にあるが⁶⁾、目的以外のニューロンに取り込まれやすい傾向があること、銀増感により軸索が黒化するにはより多くの時間を要することから、通常のパックフィルには塩化ニッケル-nickel(II)chloride hexahydrate (Merck) をすすめたい。染色液の濃度は染色液の流れる距離、染色のきめの細やかさを決定する重要な要素である。従来 0.5M–1 M 程度のものが使われてきたが、この濃度では浸透圧が高すぎるため軸索の収縮がおこり、長距離の染色には不適切であることが示唆されている⁷⁾。著者は試行錯誤の末、昆虫の神経においては 0.25M が最適であることを見いだした²⁾。純粋な塩化ニッケルではルベアン酸により薄い青色に発色されるが(後で説明)、これに少量の塩化コバルトを混ぜ込むことによってはるかに見栄えの良い濃紺色を呈する²⁾。著者の研究室ではあらかじめ蒸留水に溶かした 1 M の塩化ニッケルと塩化コバルトのストック溶液を作ってから、1 ml の使い捨てシリンジを用いて染色液の計量、保存、パイプへの充填を行っている。0.23ml の 1 M NiCl_2 および 0.02ml の 1 M CoCl_2 をシリンジで吸引して 0.25ml とし、さらに蒸留水を吸引して 1 ml にしたのち、すべて空容器に注出し、十分攪拌してからこれをもう一度吸引し、冷蔵庫中で保存している。カビなどの繁殖がおこらない限り、シリンジ中で最低 1 年は保存できる。

*Hiroshi Nishino, 北海道大学電子科学研究所神経情報研究分野(〒060-0812 北海道札幌市北区北12条西6丁目)

2. 染色方法

組織学の参考書では逆行性染色に神経切断端をワセリンでシールし、そこに染色液を満たす方法が紹介されており⁴⁾、海外の研究者は現在でもこの方法を使用しているようである。しかしながらワセリンは神経の切断端に付着すると著しく染色液の浸透を阻害する一方、シールが不完全だと容易に染色液が漏れ出すため神経断端からのバックフィルにはそぐわないと結論せざるをえなかった。

筆者は酒井らによって開発された方法⁸⁾があらゆる神経からのバックフィル染色に極めて有効であることを確認している。これは染色液を充填したキャピラリーパイプの断端に神経断端を浸すことによって少数の軸索のみを染色する方法であるが、染色液の漏れがおこりにくく、長距離の染色に最適である。以下に染色手順をかいつまんで説明する。

まず、低温麻酔した動物(体液の量を減らすため、内臓は除去しておくのが良い)をインセクトピンで蜜蝋を入れたガラスシャーレに固定したのち、目的の神経を露出する。神経が乾かない程度に少量のリンガー液を垂らす。あらかじめキャピラリーパイプ(Hematocrit tubes, Drummond Scientific Company, USA)はアルコールランプで熱を加えて引き、先端を細くしておく。直径1 mm 前後の電極作製用のガラス管を同様に細く引き伸ばしたものでも代用できる。カミソリを用いてパイプの先端を目的の神経の直径に合わせて斜めに切ったのちに塩化ニッケルをシリンジで詰める。ガラスシャーレのふちに plasticine(廉価で実験動物の拘束用にも使える細工用粘土。低温中で硬化し、室温中で軟化する。インターネットで購入可⁹⁾)でパイプを固定し、plasticine をつまんで変形させながらパイプの先端がなるべく目的とする神経断端に近づくように微調整する。切断した神経断端を先端を鉤状に曲げたインセクトピン(先端を研磨したもの)で持ち上げて染色液に浸す(図1)。神経を浸したら直ちに冷蔵庫中(約4℃)の湿室(水を十分しみこませたタオルペーパーを敷いたフタ付きの容器)に移し、数時間～数日静置する。冷蔵庫中に静置するのは

図1 逆行性区別染色の一例 コオロギ脛節屈筋を支配する運動神経を塩化コバルトで、伸筋を支配する運動神経を塩化ニッケルで染色している。染色液を充填したキャピラリーパイプは plasticine で蜜蝋台の縁に固定されている。

動物の動きを減じるため、神経の新鮮さを長時間維持するため、きめの細かい染色像を得るためである。

以上がバックフィルの手順であるが、この染色のポイントとは1) 作業を手早くすること、2) 神経が乾燥しないようにすること、3) 神経を持ち上げるときに強いテンションを加えないようにすること、4) パイプの先端が組織や体液中につかないよう注意すること、である。湿室中に静置している間に体液の流動により、神経の浸っているパイプの先がリンガー中についてしまう場合があるが、これはあらかじめティッシュペーパーを細く割いて作った"こより"の先端を目的の神経近傍に置く一方で、反対側端をガラスシャーレの縁に置き、体液の迂回路をつくってやることで回避できる。バクテリアの繁殖を防ぐには神経近傍に低濃度に薄めたペニシリン水溶液を塗っておくと効果的である。

3. 発色・固定方法

発色は固定前に行う。染色液に浸っている部分を切除し、パイプを除去したのちに動物をすぐにリンガー液に浸す。発色剤としてルベアン酸溶液(十分量を100%エタノールに溶かし、沈殿が生じるまで飽和させたもの)を用いる。4～5滴の飽和ルベアン酸を神経組織に直接付着しないようリンガー液を通して与える。塩化ニッケルで染色されたニューロンは紺色に、塩化コバルトではオレンジ色に発色する(図2A)。約20分室温放置し、神経が十分に濃く発色したら、標本をリンガー液で数回リンスしたのちに固定に移る。これまでは一般にホルムアルデヒド溶液が固定液として用いられてきたが、アルデヒド固定は増感の進行に伴い銀粒子が標本表面や気管内部に付着するのを促進し、ホールマウントでの観察を著しく阻害するためおすすめできない。著者はFEA 固定液やアルコールで固定した標本では強い増感が可能であることに着目してきた。これは恐らくアルコールにより組織への増感液の浸透が良くなるためと考えられる。しかし、一方で、固定が強すぎるため、増感時に組織が強く退縮し、組織切片がつくれなくなるという難点があった。そこで折衷策を考案した。私は40～50%のエタノール中で標本を5分程度前固定してからブアン固定液中¹⁰⁾で3時間程度後固定(冷蔵庫中)するようにしている。これにより、抜けの良い強い増感が可能になるばかりでなく、きれいな組織切片を作製できるようになった。また、ニッケルとコバルトの発色時の色合いが長時間維持されるため美しい二重染色が可能になった。

固定後はアルコールシリーズで脱水し、サリチル酸メチル中で透徹する。透徹することにより染色の出来映えをチェックすることができるだけでなく、強い増感も可能になる¹¹⁾ので都合が良い。通常感覚ニューロンの細胞体は銀増感を行わなくても十分に美しい染色像を得ることができる(図2B)。

4. 銀増感法

銀増感の基本手順については参考書を参照されたい^{4, 5)}。私の用いている増感液(developer base)の組成(アラビアゴム2.0g, ヒドロキノン0.17g, クエン酸0.74g, ショ糖10g/蒸留水100cc)はBacon and Altmann(1980)を改変

したものであるが、そこで推奨されている温度(60度)より若干低い温度(57~58度)で増感を進めた方が組織へのダメージが少ない(HJ Pflüger との私信)。増感を速く進めたい場合はクエン酸の量を少なくし、ゆっくり進めたい場合は多くする。増感液は23~25分おきに新しいものに替えるようにする。これにより銀粒子が組織表面に付着するのが抑えられる。染色された軸索が十分に黒化したら標本を純水(57~58度)へ移して増感を停止させ、さらに純水(室温)へ移したあとでアルコールシリーズにより脱水し、サリチル酸メチルで透徹する。

5. 二重染色

蛍光色素を用いて二重染色された標本はコントラストは良いが、自家蛍光による干渉によりニューロンの分枝領域の微妙な違いが判別しづらい。一方、重金属を用いて二重

染色された標本は増感なしでは細部が不明瞭で(図2A)⁸⁾、増感すると塩化ニッケルもコバルトも黒化するため逆に判別が難しくなるという問題があった。

ここに紹介してきた染色・固定法が適用された標本を増感すると増感が進行しても発色時の色合いが十分に保たれる。二重染色用の染色液として上記のニッケル主体の水溶液(Ni:Co=23:2)と純粋な塩化コバルト水溶液を用いる。ニッケルにより標識されたニューロンは増感の進行に伴い、紺色から濃い黒色に変化し、コバルトで標識されたニューロンはオレンジ色から同系色の茶色に変化する(図2C)。二重染色された標本は軟質アラルダイト(組成; Araldite A: 54g; 硬化剤(Hardener)44.5g; 加速剤(Accelerator)2.5g; Dibutyl phthalate 9.5g)に包埋し、プラスチック切片にして評価すると細部の違いがよくわかる(図2D)。ちなみに著者は標本の長期保存がさくという理由で切片をカナダバルサムに封入している。

図2 A. ルベアン酸で発色させた固定前の標本。図1で逆行性染色された後胸神経節を用いている。塩化ニッケルで染色された伸筋運動ニューロンの細胞体(2個)は紺色に、塩化コバルトで染色された屈筋運動ニューロン(4個)はオレンジ色に標識されている。B. 塩化ニッケルで逆行性染色されたコオロギの自己受容器(腿節内弦音器官)。ルベアン酸で発色後、サリチル酸メチルで透徹している。C, D. 銀増感後の透徹標本(C)とその横断切片(D)。図2Aに示した神経節を固定、透徹後、増感したもの。塩化ニッケルで染色された伸筋運動ニューロン(白抜き米印)の色は青から黒色に変化し、塩化コバルトで染色された屈筋運動ニューロン(黒抜き米印)はオレンジ色から茶色に変化する。伸筋運動ニューロンの樹状突起は屈筋運動ニューロンのそれより側方に分布しているが、一部はオーバーラップしていることがわかる。

以上、要点をかいつまんで説明してきたが、重金属を用いたバックフィル・増感の利点は1) 他の染色法に比べ簡便であること, 2) 長距離でなおかつ細い神経の染色が可能であること, 3) 二重染色によりわずかな投射領域の差異も検出できること, 4) 永久標本が作れること, にある。一方, この二重染色には短所もある。それは2つのニューロン間の分枝領域のオーバーラップの度合いが強い場合, 塩化コバルトで染色されたニューロンの分枝が観察しづらくなることである。この点については今のところ切片をなるべく薄くすることで対処するしかない。

上記の方法の有効性はゴキブリ, バッタ, キリギリス, コオロギなどの昆虫で確認済みであるが, 重金属を用いた染色は甲殻類では必ずしもうまくいかないこと(岡山大学, 新井田教授との私信), より毒性の少ないコバルトヘキサミンやコバルトリジンを用いることで良好な結果が得られている報告例もある^{12, 13)}ので参考にされたい。

バックフィルは神経解剖学のみならず神経生理学の基礎になる技術である。良い電気生理のプレパレーションをつくるには予め対象とする神経組織の位置, 周囲との結合様式をしっかりと把握しておく必要がある。染色により末梢神経系の中で従来見落とされていたニューロングループや²⁾, 全く新しいタイプの感覚ニューロンが発見されることも決して稀ではないことを付記しておく^{14, 15)}。

謝 辞

本稿を執筆する機会を与えて下さった小泉修先生(福岡女子大学), 有益なコメントを頂いた水波誠先生(東北大学)に深く感謝する。なお, 本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金(13740477, 80332477)の支援を受けて行われた。

文 献

- 1) Bacon, J.P., Altman, J.S.: Brain Res., 138, 359-363 (1977)
- 2) Nishino, H., Sakai, M.: J. Exp. Biol., 200, 2583-2595 (1997)
- 3) Nishino, H.: J. Comp. Neurol., *in press* (2003)
- 4) Altman, J.S., Tyler, N.M.: Neuroanatomical Techniques: Insect Nervous System., PP.373-402 New York: Springer-Verlag (1980)
- 5) Tyler, N.M., Shaw, M.K., Altman, J.S.: Neuroanatomical Techniques: Insect Nervous System., PP.429-446, New York: Springer-Verlag (1980)
- 6) Burrows, M.: The Neurobiology of an Insect Brain., Oxford University Press (1996)
- 7) Peters, B.H., Altman, J.S., Tyler, M.: J. Comp. Neurol., 233, 269-284 (1985)
- 8) Sakai, M., Yamaguchi, T.: J. Insect Physiol., 29, 393-397 (1983)
- 9) <http://www.jovi.cl/>
- 10) Gregory, R.E. et al.: Stain Technology, 55, 151-160 (1980)
- 11) 水波 誠: 比較生理生化学, 9, 148-155 (1992)
- 12) Matheson, T.: J. Comp. Physiol. [A], 170, 101-120 (1992)
- 13) Nishikawa, M., Yokohari, F., Ishibashi, T.: J. Comp. Neurol., 361, 165-176 (1995)
- 14) Bräunig, P., Hustert, M.: Nature, 283, 768-770 (1980)
- 15) Sugawara, T.: Cell Tissue Res., 284, 125-142 (1996)