

## 伝導路解析法の歴史と展望

### History and Future Directions of Tract-Tracing Techniques

小 林 靖

Yasushi Kobayashi

防衛医科大学校解剖学講座

**要 旨** 伝導路の追跡は神経解剖学の中心課題のひとつである。伝導路の起始細胞、経路、終止を明らかにするために、髄鞘形成、変性による髄鞘脱落、変性髄鞘や変性軸索の染色、Golgi 染色、軸索輸送を利用した標識法、ウイルスによる標識法などが開発されてきた。伝導路の正常像を観察するには、その伝導路の構成ニューロンに特定の標識分子をできるだけ高濃度に取り込ませて可視化する必要がある。そのため現在では、さまざまな標識分子の遺伝子を導入し、伝導路の構成ニューロン自身に標識分子を産生させる方法が多く用いられている。さらに進んで、導入した遺伝子によってそのニューロンの活動を制御することで、伝導路の形態学的追跡と機能解析を同時に進めるといふ新しい研究領域が拓かれている。

キーワード：伝導路追跡、変性法、鍍銀法、軸索輸送、遺伝子導入

神経系は情報を処理し、伝える器官系である。情報は電気的興奮の形で細胞内を伝導され、化学的ないし電気的に他の細胞に伝達される。この興奮の伝わる経路である伝導路を明らかにすることが、神経解剖学の中心課題のひとつであり続けてきた。ヒトの場合、神経細胞の細胞体は直径数  $\mu\text{m}$  ~ 100  $\mu\text{m}$  程度の大きさ、興奮の伝達装置であるシナプスは数  $\mu\text{m}$  以下の大きさであるのに対して、興奮の伝導を担う軸索は細胞体のごく近傍で終わる場合もあれば、1 m 以上の距離を走行する場合もある。そのため、光学顕微鏡の解像度の限界に近い微細な構造と、肉眼解剖学的なスケールでの追跡とを両立させることが必要である。フレクシヒ (Paul Emil Flechsig) は彼の業績の集大成ともいえる「髄鞘形成に基づくヒトの脳と脊髄の解剖」(1920)の冒頭でこの困難を挙げている<sup>1)</sup>。伝導路の形態学的記載は、起始細胞、経路、終始部位の3点に集約されるが、それぞれに適した方法が異なっていることも事情を複雑にしている。神経解剖学に固有の課題である伝導路追跡の難しさを、先人はどんな方法でどのように克服しようとしてきたのだろうか。本稿では19世紀から最近までの伝導路追跡法の変遷とその時代的背景について、専門外の読者を対象に概観し、今後の方向を考えてみたい。

#### 1. 神経系の古典的染色法

神経細胞は樹状突起と軸索をもつ。樹状突起は通常複数存在し、細胞体から起こると枝分れを繰り返しながら次第に細

くなっていく。軸索は通常1本のみ細胞体から起こると、場合によってきわめて長距離を走行したのち枝分れをして終わる。このように神経細胞は総延長のきわめて長い突起をもつので、突起の容積の合計が細胞体の容積の1000倍以上にも達することがある。突起の内部に必要な蛋白は、細胞体で合成して送り届けなければならない。そのため神経細胞の細胞体には蛋白合成装置であるリボソームや粗面小胞体が豊富に存在し、突起の内部には輸送系が高度に発達している。

軸索のある程度以上太いものは髄鞘に覆われる。この髄鞘は脂質に富んでいるため、脂質をよく固定する重クロム酸等の薬剤で処理したのちにヘマトキシリンで染色することが行われた。ワイゲルト法(1882)<sup>2)</sup>とその変法は、髄鞘染色法として最も長く広く利用されてきた(図1A)。この方法で太い有髄線維が追跡可能となり、中枢の構造を研究する上で大きな貢献をなした。ただし、全ての髄鞘を染めるために、起始や終止の異なる線維が混在している場合に切片を越えて長距離追跡することは困難であった。また、細胞体との位置関係を見るために、髄鞘を染め出した後にカルミンを用いて細胞体を赤く染めることが行われたが、後述するニッスル染色に比べてコントラストは弱かった。のちにホルマリン固定のパラフィン包埋標本で染色可能なクリューバー・バレラ法<sup>3)</sup>が開発され、とりわけ病理学領域で多用されるようになった。クリューバー・バレラ法は数  $\mu\text{m}$  の厚さの切片で明瞭な染色像が得られ、クレシルバイオレットなどを用いて後述するニッスル染色を重ねることができる。その反面、中枢の細胞構築や髄鞘構築の解析に常用される数十  $\mu\text{m}$  厚の切片では分別が困難で美しい染色像を得られない。

細胞体の観察にはニッスル染色が広く用いられる。ニッス

〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2  
TEL: 04-2995-1478; FAX: 04-2996-5186  
E-mail: yasushi@ndmc.ac.jp  
2014年9月16日受付

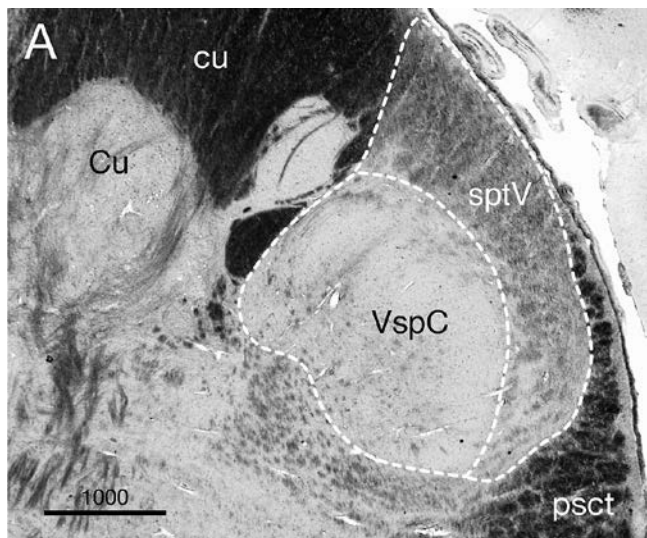


図1 神経系の古典的染色法

A. 髄鞘染色 (Weigert-Pal 法) を施した延髄横断面. 三叉神経脊髄路 (sptV) は径が細く髄鞘が薄い温痛覚線維を多く含み、髄鞘の濃い楔状束 (cu) や後脊髄小脳路 (psct) と染色の濃度が大きく異なる. Cu 楔状束核, VspC 三叉神経脊髄路尾側亜核. B. ニッセル染色で見る大脳皮質運動野の巨大錐体細胞. C. ゴルジ法で鍍銀された脊髄中間帯の大型細胞. スケールの単位は  $\mu\text{m}$ .

ル (Franz Nissl) が考案した染色法で、メチレンブルーで神経細胞体を染める<sup>4)</sup>. 彼がこの方法を考案したのは1884年だったが、論文として公表したのは1894年である. 神経細胞体や樹状突起の起始部でニッセル小体 (顆粒) ないし虎斑よばれる顆粒がよく染まる (図1B). その実体は粗面小胞体である. 現在ではメチレンブルーよりもクレシルバイオレットやチオニンがよく用いられる. 大型の神経細胞ほどニッセル小体は濃染して粗い顆粒状に見え、細胞の種類によってその形態が異なる. ニッセル染色はアルコールで脱脂するため前述のワイゲルトの髄鞘染色法と併用できないが、ホルマリン固定標本に使用でき、手順が少なく安定して染まるため、近年の免疫組織化学法や軸索輸送を利用した標識法の際にも対比染色としてよく併用される.

これらに対して、ゴルジ法 (1873) は樹状突起や軸索を高いコントラストで染める方法としてきわめて有効であった<sup>5)</sup>. これは一部の細胞のみ銀が沈着して、細胞体とそこから伸び出す樹状突起や軸索を黒々と染め出す (鍍銀する) も

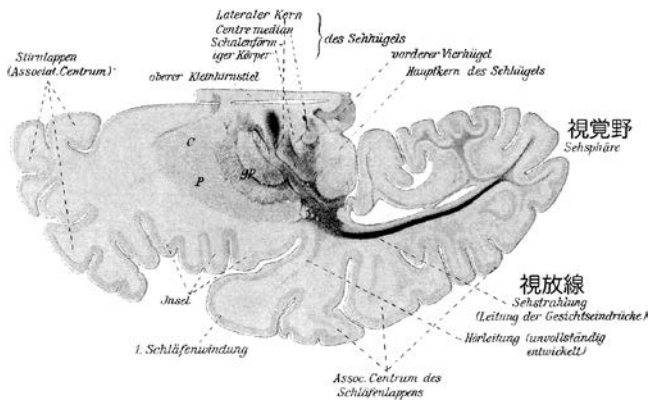


図2 髄鞘形成による伝導路追跡

フレクシヒが、ヒトの新生児の脳でワイゲルト法により、髄鞘形成の早い視放線を示した図<sup>1)</sup>.

ので、この方法で初めて1個の神経細胞の全体像が明らかになった (図1C). ゴルジ法には幼若の動物を使用する必要がある. また、染色結果は不安定で、全く鍍銀されない場合や逆に鍍銀される細胞が多すぎて組織全体が真っ黒になってしまうことがある. 同じ標本でも領域によって結果が異なることが多いので、同一条件の組織で数多く繰り返すことが可能な正常像の観察に適しているが、個体ごとに条件の異なる病的な例や実験例の解析には不向きである. ゴルジ法は伝導路解析にも重要なので、後で再び触れる.

## 2. 髄鞘形成を利用した伝導路追跡

前述のように髄鞘染色は特定の伝導路を染め分けることができない. しかしながら、発生の際に髄鞘は一斉に形成されるわけではなく、太い軸索からなる伝導路ほど早い時期に髄鞘形成が進行する. そのため発生の過程をたどると、髄鞘形成の早い伝導路を他と区別することが可能である. フレクシヒは側索背側部に髄鞘形成の早い線維束を記載し、それが下小脳脚に続くことから今日の後脊髄小脳路を記載し、これが胸髄核 (クラーク柱) と繋がっていると<sup>6)</sup>. 当時はワイゲルト法がまだ見出されておらず、ヘマトキシリン染色や塩化金による鍍金法で観察した結果であった. ワイゲルト法が開発されると、彼はそれを用いて大脳皮質の髄鞘形成を詳細に観察し、運動野や1次感覚野は髄鞘を早くとる (図2) のに対して、それ以外の領域は髄鞘形成が遅いことを見だし、この髄鞘形成の遅い領域を連合中枢 Associationscentren とよんだ<sup>1)</sup>. 今日使われる用語「連合野」の由来である. エディンガー (Ludwig Edinger) は髄鞘発生と比較解剖学的手法を併用して、脊髄後角からおこり交叉したのち対側の前側索を上行して間脳に至る経路を、下等脊椎動物において記載した<sup>7-9)</sup>.

## 3. (順行) 変性法

髄鞘染色は病的な組織にも用いられた. 神経細胞体や軸索が損傷を受けると、そこから遠位の軸索が変性に陥り、それを取り巻く髄鞘も分解される (図3). この二次変性 (Waller

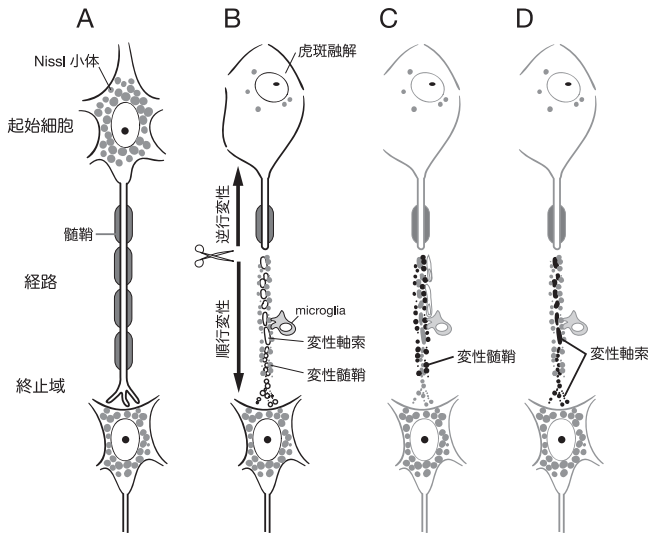


図3 変性法の概念

A. 上段のニューロンが下段のニューロンに軸索を伸ばしてシナプスをつくっているとす。B. ハサミの印の位置で軸索が切断されると、そこから遠位の軸索がまず変性し、さらに髄鞘が変性する。また、細胞体も膨化してニッスル小体を失い逆行変性する。C. マルキ法は変性髄鞘をオスミウムで黒く染める。D. グレース法、ナウタ法、フィンク・ハイマー法などは変性軸索を鍍銀する。髄鞘は軸索よりも遅く変性を始めるので、マルキ法はナウタ法などよりも損傷が起こってから良好な染色像が得られるまで長期間必要である。

変性)の状態にあるときに組織像を観察すると、変性に伴う小型細胞の集簇などが認められる<sup>10)</sup>。テュルク(Ludwig Türck)はこれを利用して脊髄の上行路と下行路を区別した。錐体前索路は彼の名を冠してテュルク束とよばれる。ただし、当時は変性を識別する方法が乏しくカルミン染色などで観察していたというので<sup>11)</sup>、追跡できるのはある程度まとまった線維束に限られていて、変性線維が正常線維の中に混在していると検出が困難であった。

変性線維を積極的に染め出す方法として、マルキ(Vittorio Marchi)が変性髄鞘をオスミウム酸で黒染する方法を開発し<sup>12)</sup>、広く用いられるようになった(図4A-B)。今日神経解剖学の初歩で教えられる古典的な伝導路の多くがこの方法で発見された。先に述べた脊髄におけるエディンガーの経路が視床まで達することは、マルキ法で明らかにされた<sup>13,14)</sup>。さらにエディンガー経路の中に、外側にあってガワーズ(Sir William Richard Gowers)の前外側上行路に含まれるものと、腹側にあって線維の疎なものと2群が区別された<sup>13)</sup>。前者がのちの外側脊髄視床路(エディンガー束とよぶことがある)、後者が前脊髄視床路にあたると思われる。

脊髄の損傷例で後索線維の変性が延髄まで追跡できることは、すでに19世紀半ばにテュルク(1851)が記載している<sup>10)</sup>。後索の線維が後索核で中継されたのち対側の内側毛帯を上行することは、脊髄視床路の場合と同様にエディンガーが髄鞘形成と比較解剖によって明らかにした<sup>15)</sup>。ヒトにおける脊髄上行路の局在に関しては日本の久留勝の業績が特筆される。

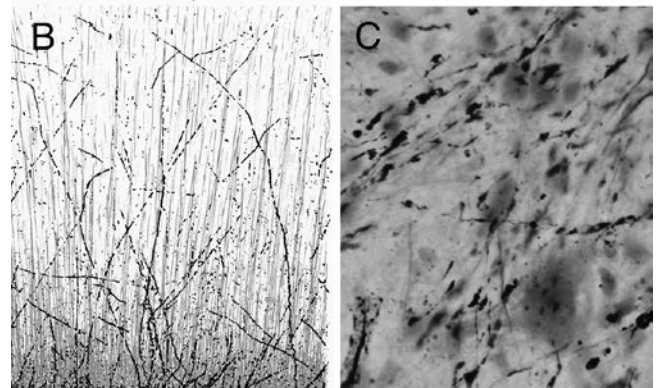
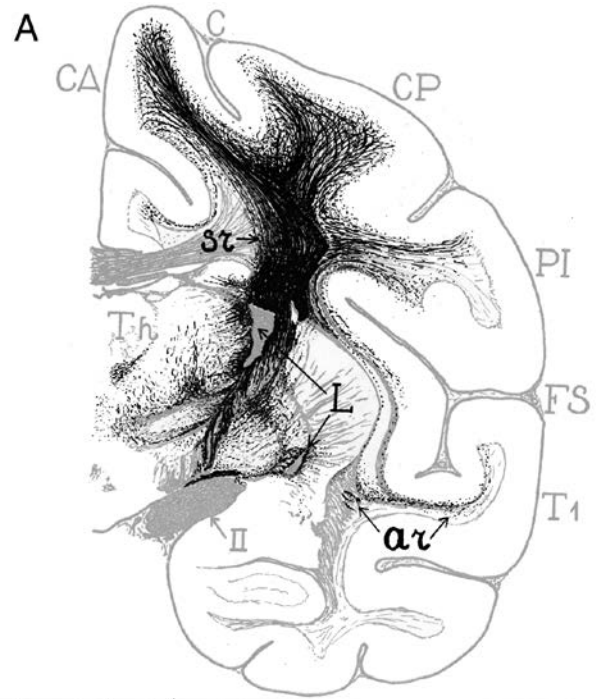


図4 マルキ法とナウタ法

A. マルキ法による伝導路追跡。視床破壊時の変性線維の分布を黒線で、脳の輪郭と区分をグレーで示す<sup>60)</sup>。B. マルキ法による大脳皮質内変性線維の標識。C. ナウタ法による伝導路終止部位の解析。大脳皮質破壊後の視床における変性線維を示す。

久留は外科医として末期癌患者の疼痛を緩和するために脊髄視床路等の切断術を実施していたが、その患者の死後にマルキ法で脊髄や脳を解析することで、伝導路の走行を明らかにするのみならず、伝導路の切断によって減弱した感覚を生前に調べておくことで、その伝導路の伝える感覚種について貴重な所見を報告した<sup>16)</sup>。

有髄線維束は終止部位に近づくにつれて髄鞘を脱ぎ、分枝して多くのシナプスボタンを形成する。マルキ法は変性髄鞘を染めるので、この終末部位まで追跡することはできなかった。そこで変性軸索や変性終末を鍍銀する方法としてグレース法<sup>17)</sup>が開発され、さらにナウタ法<sup>18,19)</sup>の登場によって、変性軸索ならびに終末前分枝を鍍銀しながら、正常線維の鍍銀を抑制できるようになると、経路のみならず終始部位の詳しい記載が可能となった(図4C)。また生存期間を延長することで、

細径の軸索の変性も検出できるようになった<sup>20)</sup>。

ただしその所見はあくまで神経核のレベルであって、その神経核のどの細胞がその伝導路の情報の受け手であるかを知ることにはできない。また、破壊部位を通過する線維も鍍銀するので、ある神経核を破壊しても、ナウタ所見では変性線維の起始細胞が破壊部位のみに分布すると解釈することは必ずしもできない。

#### 4. 逆行変性法

伝導路の起始細胞を知るにはニッスル (1894) 以来、逆行変性が用いられた。この方法は、軸索を損傷された神経細胞体が膨化してニッスル小体を失う (虎斑融解) ことを利用して、損傷された部位を通る伝導路の起始細胞を同定するものである (図 3B)。多種類の伝導路が錯綜する部位に損傷があると結果の解釈が難しいが、大脳皮質や小脳皮質は表面にあって限局した損傷を作成できるので、動物実験において明確な所見を得ることができる。ウォーカー (Arthur Earl Walker) がこれを視床から大脳皮質に投射する細胞の解析に<sup>21)</sup>、ブロードアル (Alf Brodal) が小脳皮質に投射する細胞の解析に利用して成果をあげた<sup>22)</sup>。ただし逆行変性は幼若な動物で、しかもある程度大きなニューロンでないと識別しにくいことがある。その上、変性像は正常像から連続的に変化するため、中間の像を呈する細胞がどこまで陽性所見なのかを知ることは困難であった。また、場合によっては大きいニューロンでも変性が現われにくく、例えばネコの脊髄辺縁細胞は小脳に投射するにもかかわらず、脊髄を半切すると変性するが、小脳を除去しても変性が認められないという報告がある<sup>23)</sup>。さらに、変性したニューロンは膨化して形態が著しく変化するため、さまざまなサイズと形のニューロンが混在する領域では、変性細胞が、正常の細胞構築の中のどの要素に相当するのかを判別し難かった。すなわち逆行変性法までの手法では、伝導路の起始は核ないしその亜区分のレベルまでしか記載できず、しかも起始細胞の正常像を知ることが困難であった。

#### 5. ゴルジ法による局所回路研究

すでに述べた Golgi 法は、伝導路解析に関しても重要である。とりわけ局所回路の解析に大きく貢献した。小脳皮質や大脳皮質内部の伝導路に関する研究は、カハール (Santiago Ramón y Cajal) の数ある業績の中で今日最も引用されるものである。小脳皮質の登上线維と苔状線維、プルキンエ細胞、顆粒細胞、星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞といった構成要素間の連絡の基本はゴルジ法によって解明された<sup>24)</sup> (図 5)。カハールはゴルジ法によってニューロン説を提唱したが、同じ方法でゴルジが網状説を主張し真っ向から対立したことは萬年の著作<sup>25)</sup> に詳しい。

#### 6. 軸索輸送を利用した標識法

変性法によって今日知られている代表的な伝導路が解明さ

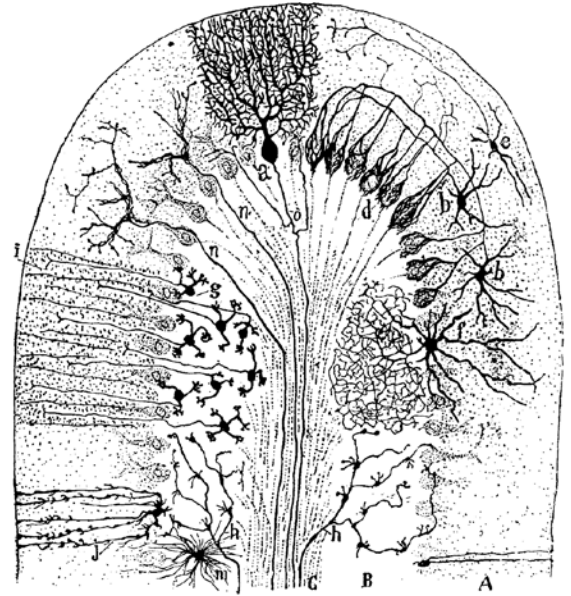


FIG. 11. — Coupe transversale et demi-schématique d'une circonvolution cérébelleuse chez les mammifères, d'après les renseignements fournis par la méthode de Golgi.

A, zone moléculaire; — B, zone des grains; — C, couche de substance blanche; — a, cellule de Purkinje vue de face; — b, petites cellules étoilées de la couche moléculaire; — d, arborisations terminales axiales descendantes provenant des cellules étoilées, et formant les corbeilles autour du corps des cellules de Purkinje; — e, cellules étoilées superficielles; — f, grandes cellules étoilées de la couche des grains; — g, grains avec leur cylindre-axe ascendant et bifurqué en i; — h, fibres mousues; — j, cellule épithéliale ou névroglique en panache; — m, cellule névroglique de la couche des grains; — n, fibres grimpanes.

#### 図 5 ゴルジ法による局所回路の解析

カハールはゴルジ法によって小脳皮質の入出力線維の分布様式ならびに皮質内回路の基本を確立した<sup>24)</sup>。

れたものの、この方法には限界があった。ヒトの病理例では損傷の範囲がある伝導路にのみ限局することは少ない。動物実験においてすら、意図した部位に限局して損傷をつくるのは難しく副損傷の懸念がつきまとった。また、線維が変性に陥る時期が線維径によって異なり、太い線維は早く、細い線維は遅く変性像を呈するので、損傷から標本作成までの至適生存期間を決定するのが困難であった。さらに、当然ではあるが変性線維や細胞が正常ではどのような形態を示すのか知ることにはできなかった。

こうした問題を解決して伝導路解析に新しい時代を切り拓いたのが軸索輸送を利用した標識法である。前述のように神経細胞は輸送系が発達している。細胞体に取り込まれたある種の分子は軸索輸送で軸索終末に運ばれ、軸索終末に取り込まれたある種の分子は逆に細胞体へと運ばれる (図 6)。前者を順行性輸送、後者を逆行性輸送とよぶ。こうした分子に蛍光色素を結合させたり標本処理によって発色させたりすれば、注入した部位から輸送された分子の存在部位を特定できる。分子によって順行性に輸送されやすいものと逆行性に輸送されやすいものがあるので、これらを使い分けることによって注入部位に細胞体を持つニューロンが軸索をどこに送っているか、注入部位に軸索終末を持つニューロンの細胞体がどこにあるかを確認し、それらの軸索や細胞体の正常像 (少なくとも正常像に近いもの) を観察することができる。

最も早い時期に順行性標識に使用されたのが放射性アミノ

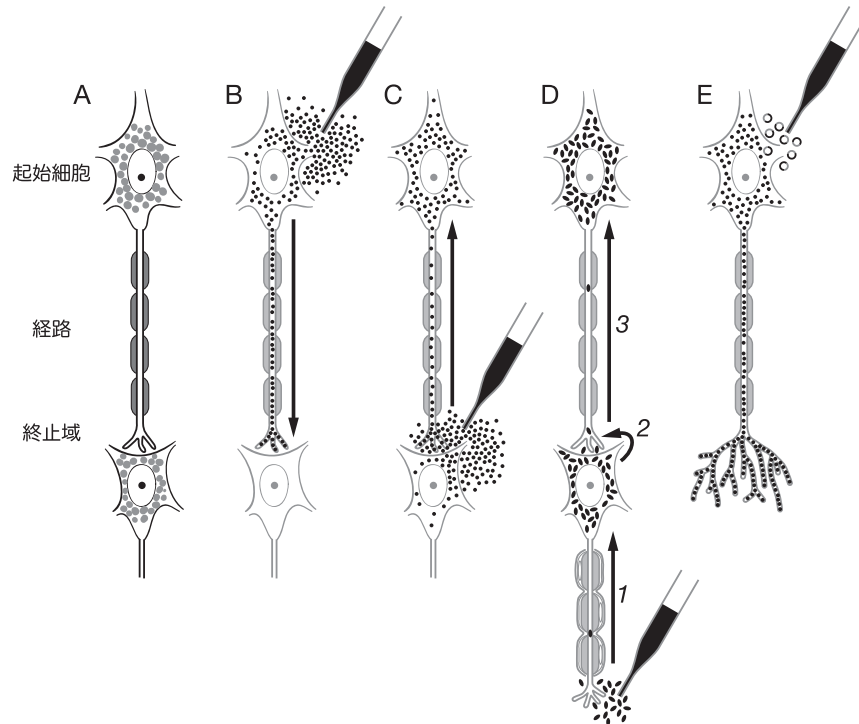


図6 軸索輸送による標識法の概念

A. 上段のニューロンが下段のニューロンに軸索を伸ばしてシナプスをつくっているとする (B以降はニッスル小体を省略)。B. 放射性アミノ酸, BDA, PHA-L等の順行性標識物質を注入すると, 注入部位のニューロンがこれを取り込み, 軸索輸送によって順行性に輸送する。この標識物質を可視化することで伝導路の経路と終止部位が明らかになる。C. HRP, WGA-HRP, 蛍光色素, CTB等の逆行性標識物質を注入すると, 注入部位の終末がこれを取り込み, 軸索輸送によって逆行性に輸送する。この標識物質を可視化することで伝導路の起始細胞が明らかになる。D. 越シナプス性の逆行性標識。狂犬病ウイルスのような神経向性ウイルスを注入すると, ニューロンに取り込まれたウイルスが逆行性に輸送されて (1) 細胞体で複製され, この細胞にシナプスをつくっている別のニューロンに取り込まれ (2), さらに逆行性に輸送されて (3) 複製される。これを可視化することで, 伝導路の連鎖を解析することが可能となる。E. 遺伝子導入による伝導路解析。ウイルスベクター, エレクトロポレーション等でニューロンに特定のレポーターの遺伝子を導入すると, 細胞体でレポーターが産生されて突起のすみずみまで標識することができる。

酸である<sup>26)</sup>。よく用いられるのはトリチウムで標識されたロイシンとプロリンで, 中枢に注入されると細胞体に取り込まれて蛋白合成に使用される。合成された蛋白は細胞の突起のすみずみまで輸送されて局所で酵素あるいは構造蛋白として機能する。これを数日から2週間程度の生存期間のうちに固定して切片とし, オートラジオグラフィの手法で観察すれば, 注入部位の神経細胞体から出た軸索の走行が追跡できる (図6B)。この方法は比較的大量の amino 酸を注入して多数のニューロンを同時に標識することが可能で, ある伝導路の概要を観察するのに適している (図7A)。その反面, 観察できるのは感光した銀粒子であり, 標識軸索の正常像は確認できない。また, そのために標識がシナプスボタンを示すのか通過性の軸索を示すのかが区別されない。

起始細胞の同定法としては西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) が同じ頃から使用され始めた。クリステンソンとオルソン (1971) は骨格筋に注入した HRP が軸索内を逆行性に輸送され, 脊髄前角の運動ニューロンの細胞体に蓄積しているのを可視化して, HRP の伝導路研究利用への先鞭を付けた<sup>27)</sup>。HRP は酵素組織化学的に可視化される。順行性に

も逆行性にも輸送されるが, とりわけ逆行性に輸送された細胞体の正常像が観察できることは画期的であった (図6C)。HRP は高濃度の溶液が作成可能で, ガラス管マイクロピペットに充填して神経細胞の電気生理学的解析を実施した後に細胞内注入を行うのにも利用された。ただし, HRP は細胞内で分解されていくので, 注入後数日で固定処理を行う必要があり, 長期間生きさせておく実験には不適である。また, 注入部位に軸索終末を持つ細胞の一部しか標識できない (感度が低い) という問題があった。したがって, HRP よりも感度の高い標識物質が開発されると, そちらに座を譲ることになった。HRP に代わる標識物質の代表例として, 蛍光色素, デキストランアミン, 細胞膜の糖鎖に結合するレクチン, コレラ毒素 B サブユニットなど細菌毒素, ラテックスビーズが挙げられる。

神経系に限らず, 免疫組織化学染色や遺伝子導入の際にレポーターとして蛍光物質が使用されることは多いが, 蛍光物質自体に軸索輸送されるものがある。True Blue, Fast Blue, Diamidino Yellow, Fluoro-Gold などである<sup>28-32)</sup>。これらの物質は逆行性に輸送されて起始細胞に蓄積する (図7B)。免疫

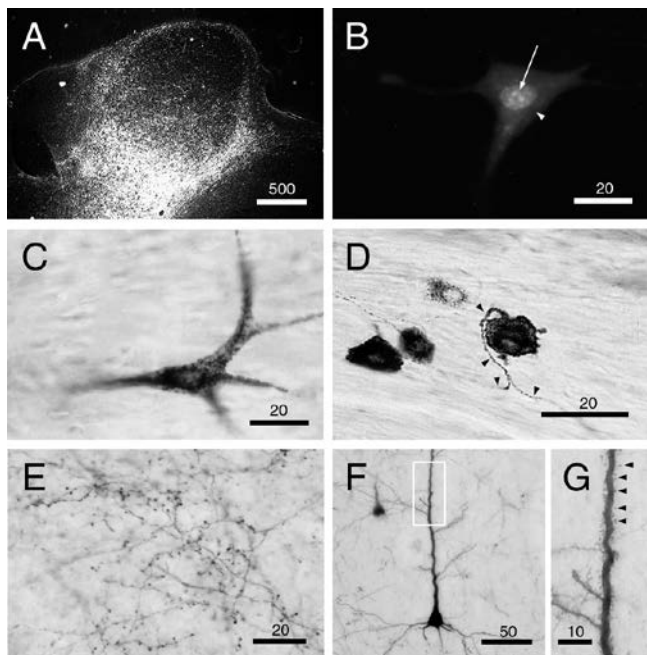


図7 軸索輸送による標識像

A. 放射性アミノ酸による順行性標識標識. 帯状回に注入し, 視床前核に分布する標識線維を暗視野撮影したもの. B. 蛍光色素による逆行性標識. 視床後外側腹側核に True Blue を注入し, 小脳虫部に Diamidino Yellow を注入して対側の脊髄 VII 層に見られた二重標識細胞. True Blue は細胞質に青い蛍光 (三角印) を, Diamidino Yellow は核に黄色い蛍光 (矢印) を呈する. C. WGA-HRP による逆行性標識. 視床後外側腹側核に注入し, 対側の脊髄 VII 層に見られた標識細胞. D. Isolectin B4 による標識. 顔面皮膚のヒゲの領域に注入し, 同側の三叉神経節に見られた標識細胞. 細胞体から伸び出す軸索が細胞体近傍で二分して中枢と末梢に向かう (三角印). E. BDA による順行性標識. 帯状回に注入し, 同側の視床前核に見られた標識軸索と終末. 黒い顆粒状の標識は, 通過性ないし終末ボタンと考えられる. F. CTB による逆行性標識. 帯状回に注入し, 対側の帯状回 III 層に見られた交連ニューロン. 樹状突起と軸索が高いコントラストで可視化される. G. CTB で標識された尖頂樹状突起 (F の四角内) の拡大像. 十分な量の標識物質が取り込まれると樹状突起棘 (三角印) まで詳細に観察可能である. スケールの単位は  $\mu\text{m}$ .

染色等の処理が不要で切片を作成するとすぐ結果を観察できる上, 標識効率が非常に高いので有用である. 順行性にも輸送されるので軸索側枝の解析に使用されることがあったが<sup>33)</sup>, 軸索を観察する場合はその体積が微小で内部に蓄積する蛍光物質の量が限られており, 蛍光強度が弱く褪色も早いので現在ではあまり用いられない.

蛍光色素の中でもカルボシアニン色素のグループは, 脂溶性で細胞膜の脂質に溶解して拡散する. DiI (1,1'-diiodo-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), DiO (3,3'-diiodo-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), DiA (4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-methyl-pyridinium) など, 異なる蛍光を発する近縁物質が開発されていて多重標識も可能である. これらの色素を生体に注入すると, 食作用で取り込まれた小胞の細胞膜とともに軸索輸送で迅速に運ばれ, 起始細胞

が同定できる. 死後固定された組織でも軸索の膜を伝って拡散するので, 軸索の追跡が可能である<sup>34)</sup>. ただし, 能動的に輸送されるのではないので, 拡散に長時間かかる. 胎児の脳のように髄鞘の少ない組織では有効だが, 成体ではあまり拡散が見られない. 髄鞘の脂質が多くなると軸索への溶解が減少し, また髄鞘に溶解した色素は髄鞘節を超えて拡散できないことが理由だと考えられる.

レクチンの中で早くから用いられたのはコムギ胚芽凝集素 Wheat germ agglutinin (WGA) である. WGA は HRP に結合させると標識効率が格段に上がってより多くの細胞を標識するだけでなく, 樹状突起にまでよく行き渡って標識ニューロンの種類を同定するのに有用であった (図 7C)<sup>35)</sup>. レクチンはその他にもインゲンマメ凝集素 *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) がよく用いられる<sup>36,37)</sup>. 軸索を高いコントラストで標識し, その形態を細部まで観察することができる. 比較的少数の細胞の軸索の順行性標識に有効である.

細胞によって膜表面に発現する糖鎖の種類が異なり, レクチンは種類によって結合する糖鎖の種類が異なるので, 一部の細胞のみに結合して取り込まれるものを使用すれば, 注入部位を通る伝導路の中で特定のものを選択的に標識することもできる. たとえばマメの一種である *Bandeiraea simplicifolia* (*Griffonia simplicifolia*) 由来の isolectin B4 (IB4) は末梢神経の無髄一次求心線維の一部に結合して輸送される (図 7D) ので, 末梢に注入したり神経の断端に塗布したりすることで痛覚伝導路の一部を中枢まで追跡できる<sup>38,39)</sup>. 他にもダイズ凝集素 Soy bean agglutinin<sup>40)</sup>, トウゴマ凝集素 *Ricinus communis* agglutinin<sup>41)</sup> などが一次求心線維に取り込まれるが, 糖鎖による区分と機能との相関が必ずしも明確でないので, 今日では他の方法を選択することが多い.

デキストラン (グルコース重合体) の誘導体であるデキストランアミンも, 広く用いられている (図 7E)<sup>42)</sup>. 順行性標識物質として主に用いられるが逆行性にも輸送される. デキストランアミンにビオチンを結合させたビオチン化デキストランアミン (BDA) や各種蛍光色素を結合させた Fluoro-ruby, Fluoro-emerald などが市販されており, 標識軸索や細胞が容易に観察可能である. とりわけ順行性に輸送された場合に軸索の形態をきわめてよく可視化できる優れた標識物質である.

細菌が産生する毒素も伝導路追跡に利用される. コレラ菌 *Vibrio cholerae* が産生する毒素の B サブユニット (CTB) は神経細胞の細胞膜の受容体に結合する部位を含む. 毒性は A サブユニットにあるので CTB は細胞内に取り込まれても細胞を障害することなく軸索輸送されて細胞体に蓄積する (図 7F, G). CTB に HRP を結合させておけば酵素組織化学的に, CTB 単体では免疫組織化学的に検出できる. CTB に蛍光色素を結合させれば蛍光顕微鏡下で直接観察することも可能である.

以上に述べた軸索輸送を利用した標識法は, 起始核から終止核まで 1 個のニューロンの突起が直接到達する伝導路の解析に用いられる. WGA, 破傷風毒素の C-fragment<sup>43)</sup> など,

一部の物質がシナプスを越えて輸送されるという報告があり、複数のニューロンが直列に連なった伝導路の解析に利用されたが、標識の効率が十分ではなかった。

## 7. ウイルス

標識物質が少量取り込まれただけでも、その細胞内で再び複製されて量が増加すれば、シナプス越えの追跡も安定して可能となる。その目的に好適なのが神経向性ウイルス *neurotropic virus* である<sup>44)</sup>。現在ではおもに狂犬病ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、単純ヘルペスウイルスがこの目的で用いられる<sup>45)</sup>。この狂犬病ウイルスを例えば骨格筋に注入すると、神経終末から取り込まれたウイルスは逆行性に細胞体に輸送されたのち増殖して、その細胞にシナプスをつくる他のニューロンの終末に再度取り込まれて細胞体へと輸送され、細胞体を標識する (図 6D)<sup>46,47)</sup>。注入後の生存期間を調節すれば、シナプス 1 個のみ越えたニューロンを標識したり、複数のシナプスを越えて連絡するニューロンを標識したりすることが可能である。

これは伝導路の追跡法として画期的であり、従来の方法では不明であった多くの神経連絡を明らかにした。その反面、ウイルスや感染動物の取り扱いに厳密な物理的封じ込めが必要なこと、生存期間をあまり長くすると動物の状態が悪化することなど、取り扱いに難しさがある。最近ではウイルスや動物に遺伝子操作を施して、特定のニューロンでのみ複製されるようにしたり、特定のニューロンに取り込まれるようにしたり、シナプスを 1 個以上越えないようにしたり、ウイルスにさまざまな特性を付与する試みがなされ、後述するベクターとしてのウイルス利用と境界が曖昧になってきた。参考文献として、初期のものと最近のものを挙げる<sup>48,49)</sup>。

## 8. Genetic tracing

遺伝子改変動物を作成してニューロンにレポーター分子を産生させることも、特定の伝導路を可視化する方法のひとつである。遺伝子工学技術の進歩で特定の性質を持った細胞、たとえば特定の伝達物質、受容体、チャネルなどを発現する細胞や特定の発生系列に属する細胞に、限定してレポーター遺伝子を発現させることが可能になってきた。WGA などを発現させることで、外部からの取り込みよりはるかに高濃度の WGA が細胞内を満ち、ウイルスを使用せずにシナプス越えの標識を行うこともできる<sup>50)</sup>。多種類の細胞が混在するような領域で細胞種ごとの線維連絡を選択的に標識することは、従来の標識物質では困難だったが、この手法を使えばそれが可能となる。

遺伝子導入の方法として、ウイルスベクターも広く用いられている。ウイルスを遺伝的に改変して増殖できないようにすれば、注入部位においてそのウイルスに感染したニューロンのみがレポーター分子を発現する。神経向性ウイルスのうちアデノウイルス<sup>51)</sup>、アデノ随伴ウイルス<sup>52)</sup>、単純ヘルペスウイルス<sup>53)</sup>、レンチウイルス<sup>54)</sup>、シンドビスウイルス<sup>55)</sup> が

多く用いられる。導入された遺伝子によってレポーター分子が産生されることで、突起のすみずみまで標識することが可能となり、単一ニューロンの軸索分布の全体を捉えることができるようになってきた (図 6E)。あるニューロンがどの神経核やどの細胞に興奮を伝達しないし抑制しているかという情報だけでなく、軸索側枝でどの領域とどの領域にどんな密度で投射しているかを評価することができる。シンドビスウイルスを用いた方法については本誌の倉本らによる総説に詳しく<sup>56)</sup>。

## 9. 今後の方向

このように、伝導路の解析法は時代とともにより効率の高い、選択性の高い、正常像を観察可能な手法に移り変わってきたといえる。効率の高さとは、ある伝導路を標識しようとした際にできる限り多くのニューロンを標識できるという側面と、あるニューロンを標識しようとした際にその樹状突起や軸索のすみずみまで漏れなく標識できるという側面がある。選択性とは、初期にはある部位に起始、経路あるいは終止がある伝導路のみを標識し、他の伝導路を標識しないという意味が中心であったが、今日では特定の伝達物質をもつニューロンのみを標識する、特定の発生系列のみを標識するといったさまざまな選択性を付与することが可能になってきた。正常像を観察可能という点では、genetic tracing において、損傷作成はもとより標識物質の注入すらしないで特定のニューロンを生涯にわたって識別することが可能になっている。ただし、遺伝子操作を行ったニューロンが正常像を呈するかどうかという議論は常につきまとうので、所見の慎重な解釈が必要である。

遺伝子導入以前の時代、標識のための物質は当然のことながらニューロンに取り込まれやすい分子でなければならなかった。それが現在では、遺伝子の導入によって目的のニューロンに任意のペプチドや蛋白分子を発現させることが可能になり、従来では細胞内に取り込まれなかった多様な性質の分子を利用することができる。遺伝子改変によって、特定の細胞に interleukin 2 受容体を発現させておき、動物の脳室やクモ膜下腔に immunotoxin を投与してその細胞を脱落させることがすでに 90 年代から行われていた<sup>57,58)</sup>。そこからさらに進んで、ある伝導路に発現させた分子によって、その伝導路の活動を制御することが可能となってきた。例えば、木下らは順行性と逆行性のウイルスベクターを用いてサルの脊髄の特定の介在ニューロンを可視化すると同時に、doxycycline 投与でそれらの活動を停止させて、上肢の精密な運動への影響を明らかにした<sup>59)</sup>。このような研究によって、神経系のさまざまな伝導路の追跡とその機能解析が同時に行われて、神経系の構造と機能に関してより深い洞察が可能となるだろう。

## 文 献

- 1) Flechsig, P: Anatomie des menschlichen Gehirns und Rückenmarks auf myelogenetischer Grundlage, Thieme, Leipzig (1920)

- 2) Weigert, C.: *Centralbl. med. Wiss.*, **42**, 753–757 (1882)
- 3) Klüver, H. and Barrera, E.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **12**, 400–403 (1953)
- 4) Nissl, F.: *Neurol. Zentralbl.*, **13**, 507–508 (1894)
- 5) Pannese, E.: *J. Hist. Neurosci.*, **8**, 132–140 (1999)
- 6) Flechsig, P.: Die Leitungsbahnen im Gehirn und Rückenmark des Menschen auf Grund entwicklungsgeschichtlicher Untersuchungen, Engelmann, Leipzig (1876)
- 7) Edinger, L.: *Anat. Anz.*, **2**, 145–153 (1887)
- 8) Edinger, L.: *Anat. Anz.*, **4**, 121–128 (1889)
- 9) Edinger, L.: *Deut. med. Wochenschr.*, **16**, 421–426 (1890)
- 10) Türck, L.: *Sitzungsberichte Kaiserl. Akad. Wiss.*, **6**, 288–312 (1851)
- 11) Rasmussen, A.T.: Some trends in neuroanatomy, Brown, Dubuque (1947)
- 12) Marchi, V. and Algeri, G.: *Riv. Sper. Freniat. Med. Legal.*, **12**, 208–252 (1886)
- 13) von Sölder, F.: *Neurol. Centralbl.*, **16**, 308–312 (1897)
- 14) Quensel, F.: *Neurol. Centralbl.*, **17**, 482–493 (1898)
- 15) Edinger, L.: *Neurol. Centralbl.*, **4**, 73–76 (1885)
- 16) 久留 勝 : 医学綜報, **2**, 429–713 (1949)
- 17) Glees, P.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **5**, 54–59 (1946)
- 18) Nauta, W.J.H. and Gyax, P.A.: *Stain Tech.*, **26**, 5–11 (1951)
- 19) Nauta, W.J.H. and Gyax, P.A.: *Stain Tech.*, **29**, 91–93 (1954)
- 20) Bowsher, D. et al.: *Brain*, **83**, 150–159 (1960)
- 21) Walker, A.E.: The primate thalamus, Univ. of Chicago Press, Chicago (1938)
- 22) Brodal, A.: *Z. ges. Neurol. Psychiat.*, **169**, 1–153 (1940)
- 23) Sprague, J.M.: *J. Neurophysiol.*, **16**, 464–474 (1953)
- 24) Ramón y Cajal, S.: Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés, Maloine, Paris, Vol. 2 (1911)
- 25) 萬年 甫 : ラモニ・カハール 神経学の源流, 東京大学出版会, 東京 (1992)
- 26) Cowan, W.M. et al.: *Brain Res.*, **37**, 21–51 (1972)
- 27) Kristensson, K. and Olsson, Y.: *Brain Res.*, **29**, 363–365 (1971)
- 28) Bentivoglio, M. et al.: *Neurosci. Lett.*, **12**, 235–240 (1979)
- 29) Bentivoglio, M. et al.: *Neurosci. Lett.*, **18**, 25–30 (1980)
- 30) Kuypers, H.G. et al.: *Exp. Brain Res.*, **40**, 383–392 (1980)
- 31) Kuypers, H.G.J.M. and Huisman, A.M.: *Adv. Cell. Neurobiol.*, **5**, 307–340 (1984)
- 32) Schmued, L.C. and Fallon, J.H.: *Brain Res.*, **377**, 147–154 (1986)
- 33) Ugolini, G. and Kuypers, H.G.J.M.: *Brain Res.*, **365**, 211–227 (1986)
- 34) Godement, P. et al.: *Development*, **101**, 697–713 (1987)
- 35) Trojanowski, J.Q. et al.: *J. Neurocytol.*, **10**, 441–456 (1981)
- 36) Gerfen, C.R. and Sawchenko, P.E.: *Brain Res.*, **290**, 219–238 (1984)
- 37) Ter Horst, G.J. et al.: *Brain Res.*, **307**, 379–383 (1984)
- 38) Ambalavanar, R. and Morris, R.: *Neuroscience*, **47**, 421–429 (1992)
- 39) Kobayashi, Y. and Matsumura, G.: *Neurosci. Lett.*, **217**, 89–92 (1996)
- 40) Plenderleith, M.B. et al.: *Neurosci. Lett.*, **86**, 257–262 (1988)
- 41) Yamamoto, T. et al.: *Brain Res.*, **274**, 325–328 (1983)
- 42) Brandt, H.M. and Apkarian, A.V.: *J. Neurosci. Methods*, **45**, 35–40 (1992)
- 43) Cabot, J.B. et al.: *Neuroscience*, **40**, 805–823 (1991)
- 44) Kuypers, H.G. and Ugolini, G.: *Trends Neurosci.*, **13**, 71–75 (1990)
- 45) Ugolini, G.: *J. Neurosci. Methods*, **194**, 2–20 (2010)
- 46) Kelly, R.M. and Strick, P.L.: *J. Neurosci.*, **23**, 8432–8444 (2003)
- 47) Dum, R.P. and Strick, P.L.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, **23**, 245–249 (2013)
- 48) DeFalco, J. et al.: *Science*, **291**, 2608–2613 (2001)
- 49) Zampieri, N. et al.: *Neuron*, **81**, 766–778 (2014)
- 50) Yoshihara, Y. et al.: *Neuron*, **22**, 33–41 (1999)
- 51) Kinoshita, N. et al.: *Chem. Senses*, **27**, 215–223 (2002)
- 52) Chamberlin, N.L. et al.: *Brain Res.*, **793**, 169–175 (1998)
- 53) Sandler, V.M. et al.: *J. Neurosci. Methods*, **121**, 211–219 (2002)
- 54) Blömer, U. et al.: *J. Virol.*, **71**, 6641–6649 (1997)
- 55) Furuta, T. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1497–1508 (2001)
- 56) 倉本恵梨子, 他 : 顕微鏡, **46**, 125–131 (2011)
- 57) Kobayashi, K. et al.: *PNAS*, **92**, 1132–1136 (1995)
- 58) Watanabe, D. et al.: *Cell*, **95**, 17–27 (1998)
- 59) Kinoshita, M. et al.: *Nature*, **487**, 235–238 (2012)
- 60) Poliak, S.: The main afferent fiber systems of the cerebral cortex in primates, Univ. California Press, Berkeley (1932)