

神経細胞の立体構築

萬年 甫

Three Dimensional Extent of Neurons

HAJIME MANNEN

Department of Anatomy, Tokyo Medical and Dental University

今日、基礎医学の領域であれ、臨床医学の領域であれ、神経系の構造や機能を論ずるには、ニューロンを細胞体とこれから出る一本の軸索という形に単純化し、このようなものが何個もつらなって回路網をつくっていると想定するのが普通である。定性的にみた場合、中枢神経系内のある細胞群から出た軸索が線維束をつくって長い距離を走り、特定の場所に到って他の細胞群と接触することの大綱はすでにわかっており、神経疾患の症状の説明や実験結果の解釈はこれらにたよって行われている。しかし実体はそれほど単純でないことも忘れてはなるまい。脊椎動物も高等なものになるにつれ、ニューロンは脳内の場所によってそれぞれ独特の枝ぶりを示す樹状突起を有し、また軸索からは多くの側枝がでて主枝とともに複雑な分枝をくり返すのが常である。そして定量的にみた場合、少なくとも今日の段階では一個一個のニューロンが何本の樹状突起を出し、それらがどの範囲にひろがり、どこからくる軸索と結合するか、また軸索の終枝はどこまで走り、途中で何本の側枝をいずこへ出し、全体として何個位のニューロンとシナプスをいとなむかというようなことになると我々はほとんど答えることができない。すなわち、一個のニューロンの全体像の把握は今後の大きな研究課題であることがわかる。いまだ不明のこれらの突起のひろがりや結合関係の詳細を明らかにすることにより、現在説明不可能な症状の発現機構も理解できる可能性がわいてくるわけで、その意味でこれらは決して解剖学的興味のみで追求されるべきではなく、神経学全体にかかわる大きな意義を秘めていると考えるべきであろう。

ところでニューロンの全体像をとらえる努力は決して

今日に始まったわけではなく、過去一世紀の間に熱心につき重ねられてきている。研究方法の上からはこれらを2つの方向に大別できる。ひとつは神経組織をときほぐしたり、培養したりして目的をとげようとするものであり、他は切片をつくり染色して観察しようとするものである。

ニューロンの突起に形態上2種の異なったものあることに気づき、それらに樹状突起と軸索という名称をあたえたのは Deiters²⁾である。彼が用いたのは脳や脊髄をクローム酸に浸して、固定を行うと同時に神経組織をふやかし、これを顕微鏡下にピンセットや針で細析してニューロンを分離する方法であった。これは方法自体原始的とはいってものうすい切片でみるのと異なり、ニューロンが大きく3次的にひろがっていることを実感させてくれるすぐれたものであるが、それらの細胞が実際に脳や脊髄の中でどこにどのように位置しているかについては何も知らせてはくれない。

組織培養についても同じことがいえよう。この方法によって突起の成長する過程、ニューロンと標的器官とのかかわり合い、ニューロンとグリアの関係など動的な面については貴重な情報が多数得られてきた。しかし培養されたものでは軸索と樹状突起の区別や小型ニューロンとグリアの鑑別も必ずしも容易でなく、さらに組織全体の中にくみこまれたニューロンの3次的展開についてはあまりうとろがない。神経系を生化学的にしらべるため、遠心分離法や酵素による細胞成分の分離が試みられているが、いずれも細胞体、核、核小体などを主な対象とし、突起はその起始部が問題になるだけで、ニューロンの全形を論ずるにはかなり距離がある³⁾。

東京医科歯科大学解剖学

〔連絡先：〒113 東京都文京区湯島1-5-45, 東京医科歯科大学解剖学, 萬年 甫〕

他方、前世紀後半に飛躍的に進歩した組織学的方法すなわち薄い切片をつくり、これに染色をほどこして観察するという手段は電子顕微鏡の出現によって一層洗練され、今日では細胞膜を割ってその微細構造を観察するまでに至っており、この先どれほど技術が開発されるか予測を許さない。しかし、これらの進歩は長所のみをそなえているわけではない。切片が薄ければ薄いほど構造の解析は微に入り細にわたることは自明であるが、反面きわめて大きいひろがりを示すニューロンの全体像の把握には不利にならざるをえない。

切片の厚みの制約に加えて染色法による制約も見逃すわけにはいかない。一つの染色法でニューロンのあらゆる部分を一挙に示してくれるものがないことは過去も現在も同じであり、我々は Nissl 法によって細胞体を、Weigert 法によって髄鞘を、Golgi 法、Cajal 法などの鍍銀法によって樹状突起や軸索などを染め出し、モザイクを作るようにそれらによって得られる部分像を合わせてニューロンの全体像を構成察知するのである¹⁰⁾。したがってこれは実像ではなく、必ずどこかに推測によって補う部分がでてくるのは避けがたいことである。

また実験的ないし病的に中枢神経系内に損傷がおこると、これに反応して軸索や髄鞘に変性がおこる。これらの変性を陽性に染め出して追求するものに Marchi 法や Nauta 法があるが、これらを駆使した伝導路の走行に関する研究は過去約一世紀にわたり多くの業績をあげてきた。しかし、これらをもってしても伝導路を線維の集団

として追跡しうるだけでどの線維がどの細胞から出、途中でどこで何本側枝を出すかというような細胞レベルでの追及はなされていない。

自己の経験に照しても、神経組織を Nissl 法や Weigert 法で染めた薄い切片で観察しているだけでは突起の存在にはあまり注意が及ばない。その点 Golgi 法はニューロン像の把握に独特の利点を有する。この方法の特色は存在しているすべての細胞が染まるのではなく、一部の細胞のみが選択的に染まる。そのため染まった細胞は明るいバックの中に黒々と浮んで見える。そのこともあって厚い切片を作ることが可能である。しかし厚いとはいっても光学顕微鏡による観察では対物レンズの作動距離により制約を受け、精々 300 μm 程度が限度である。しかしこのような厚みで検鏡できるのはおそらく Golgi 染色の場合ぐらいであって、他の染色では細胞が重なり合って満足な観察は不可能である。とはいえ、Golgi 染色標本の場合でも、1個の神経細胞がそのすべての突起を含めて1枚の切片の厚みの中にすっきりおさまるという可能性は決して多くはない(図1)。突起が非常にはっきりした極性をもって特定の面に展開している細胞、たとえば小脳の Purkinje 細胞のようなものの場合でも樹状突起が小脳溝に垂直な矢状面に展開しているというだけで、軸索やそれから出る側枝の走行を含めると、その全体はとうてい 300 μm 程度の切片一枚におさまるものではない。これは切片作製時に切断方向をいろいろ変えて見ても同じことである。

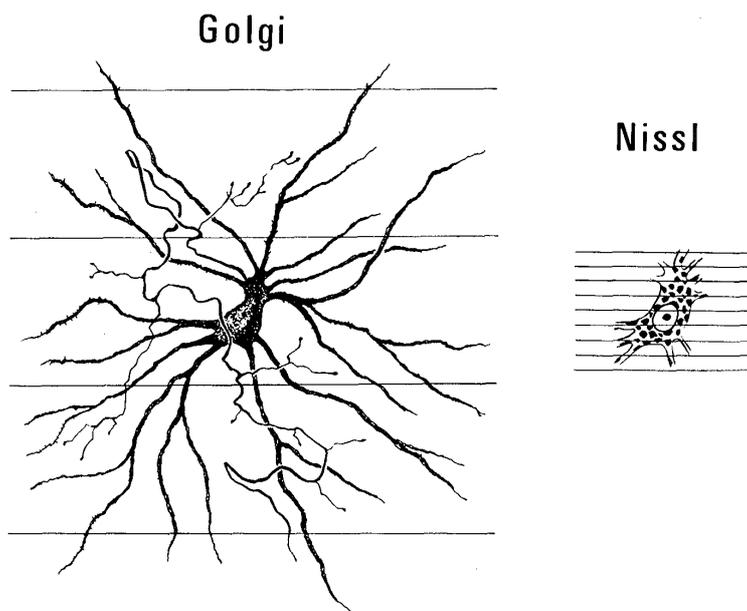


図1 一個の神経細胞が複数の連続切片に分断されることを示すシューマ。Nissl 法では細胞体しか染まらず、切片も厚くてもせいぜい30 μm ほどである。これに対し Golgi 法切片では 250 μm くらいの厚さでも観察できる。a は軸索を示す。他の突起は樹状突起

もとより、Golgi 法とても万能ではない。使用する固定染色液の浸透力が弱いので、よほど小さい動物でない限り脳全体を染色することは難しく、普通、脳を 5 mm 以下の厚さのいくつかの部分に切りわけて染色せねばならない。したがってこの際に、長距離を走る軸索の全走行を染める可能性は失われる。またいかなる機構によってある細胞は染色され、他の細胞は染まらないのかは不明であり、染まっている場合でも果たして 1 個のニューロンの全体が余すところなく表現されているとの保証はない。しかし突起を含めたニューロンの複雑な形態を知るために、現在この方法にかわるべきものがないため賞用されているというのが実状である。以上のように、少なくとも現段階でニューロンの全形をとらえるためには従来用いられてきた方法では不十分で、新たな工夫がぜひ必要である。

組織を薄く切ることによる制約をのり越えるには、多数の切片を用いて組織体や突起を再構築すればよい。その 1 つの例は Rovainen らによるヤツメウナギの脳を用いた研究¹³⁾であろう。彼らは電顕用切片をつくる際に用いられる封埋剤エポキシに脳を封埋し、5 μm の連続切片 2 万枚余をつくり、脳幹や脊髄にある巨大な中間細胞 (interneuron) の軸索の一本一本の走行や、Müller 線維の起始などを確認することができた。しかし、軸索が太い場合は追跡がやさしくても、細い場合はどの細胞から出たものかの同定や、どこで終末になるのかの判定に困難を感じている。また樹状突起を正確に再構築できなかったことも記しておかねばならない。しかし得られた結果は変性実験などでは得ることのできない信頼性をもっている。

最近、神経生理学の領域では微小電極によって単一ニューロンの活動電流を記録したあと、その細胞に色素を注入して、記録した細胞の細胞体や突起にゆきわたらせ、位置や大きさ、突起のひろがりをもとめる試みがなされている⁶⁾。これによって生体内にくみこまれているニューロンの三次元的ひろがりをもとめるのにある程度成功している。この方法は小動物や小さな臓器ではことに有利で、無脊椎動物の神経節細胞や脊椎動物の網膜などでは見るべき成果をあげている。

さらにこの方法は実験用動物にも応用され、今後かなりの発展が予想される。注入に用いられる主なものは、procion yellow という色素や horseradish peroxidase など、樹状突起も軸索もかなりの距離にわたって追跡可能という。事実脊髄の Ia 抑制介在ニューロンや Renshaw 細胞では樹状突起は 150~500 μm 、軸索は 2 mm 以上にもわたって追跡されている³⁴⁾。また脊髄前角細胞

では軸索が前根に入るまでの経過および前角内部で軸索から出るいわゆる initial collaterals の微細な分枝までもはっきりとたどられるにいたっている¹⁾。しかしこの種の研究は生理学的に機能を確認した上で、形態学的解析を行うという点ですぐれてはいるものの、色素が比較的短時間 (1~11 時間) の間に突起のすべてにゆきわたるかどうかが問題で、その点なお技術的検討を要すると思う。

さきにも述べたごとく、単一ニューロンの全形をとらえるには現在のところ Golgi 染色がもっとも有効な手段であることは衆目の一致するところである。著者はもっぱらこの方法を用いてニューロンの立体観察をつづけてきているが、その詳細はすでに他の機会に発表してあるので、ここでは略述するにとどめる⁷⁾。要は細胞体の立体写真測量と、突起の切片越え追跡を組合せて行おうというものである。Golgi 標本に落射照明を行うと、透過照明ではシルエットしか観察できなかった細胞体の表面をあざやかに観察できる。この像を異なった 2 方向から撮影すると一対の立体写真が得られる。航空写真から等高線地図をつくる原理にもとづき、この立体写真を図化機にかけると細胞体の表面に等高線を描き入れることが可能となる。このようにすれば細胞体がいかに不規則な形をしていても、それぞれの形に即した表面積や体積を測定することができる。他方、連続切片による突起の切片越え追跡は隣り合う連続切片の相対する面にみられるそれぞれの突起の断端を正しく同定することにより、ミクロームで切断された突起の走行を再構築する操作である。これをくり返せば突起が多数の切片にわたって走ろうとも追跡が可能となる。

ここでは細胞体の立体計測はさておき、突起ごとに軸索の走行を切片越えによって得た結果を猫の脊髄の灰白質内にある諸種細胞について述べてみよう。この結果を見れば、従来行われてきた一枚の切片によって得られる所見がいかに重要な事実を見逃してきたかがうかがい知れる。

後柱膠様質の細胞は中枢神経系のニューロンの中でももっとも小型のものに属する。この細胞の樹状突起ならびに軸索を切片越え追跡によってとらえると、樹状突起だけを見ても、その内外方向、背腹方向および頭尾方向のひろがりの径は少ないもので 50 μm 、多いものは 300 μm を越えている¹⁵⁾。したがってその全形をとらえるには、切断面をどのように選んでも、厚さ 100 μm の単一切片だけでは不可能なことがわかる。軸索のひろがりをはるかに凌駕する。膠様質の細胞の軸索の走行をしらべるとはこれまで Golgi 法や変性実験が用いられ、軸

索は細胞から出ると Lissauer の辺縁帯に入り、2~3 節上ないし下行して後角内に戻るといわれている¹⁴⁾¹⁶⁾。しかしこの場合 Golgi 法の所見は一枚の切片での観察であり、変性実験は軸索の集団を対象としているので、個々のニューロンごとの軸索の走行は明らかでなかった。切線越え追跡法でとらえて見ると (図 2 E), 軸索は細胞体か

ら出て腹方に向かい、ついで背方に属曲して第 I 層にいたる。次の切片で Lissauer 辺縁体の中に入り、切片 12 枚約 1,200 μm を下降して再び第 I 層に戻り、水平方向を内側へ向かい、次の切片で再び第 II 層すなわち膠様質に達して終っているのがわかる¹⁵⁾。これは一例にすぎないがこのような小型細胞では生理学的に微小電極を挿入す

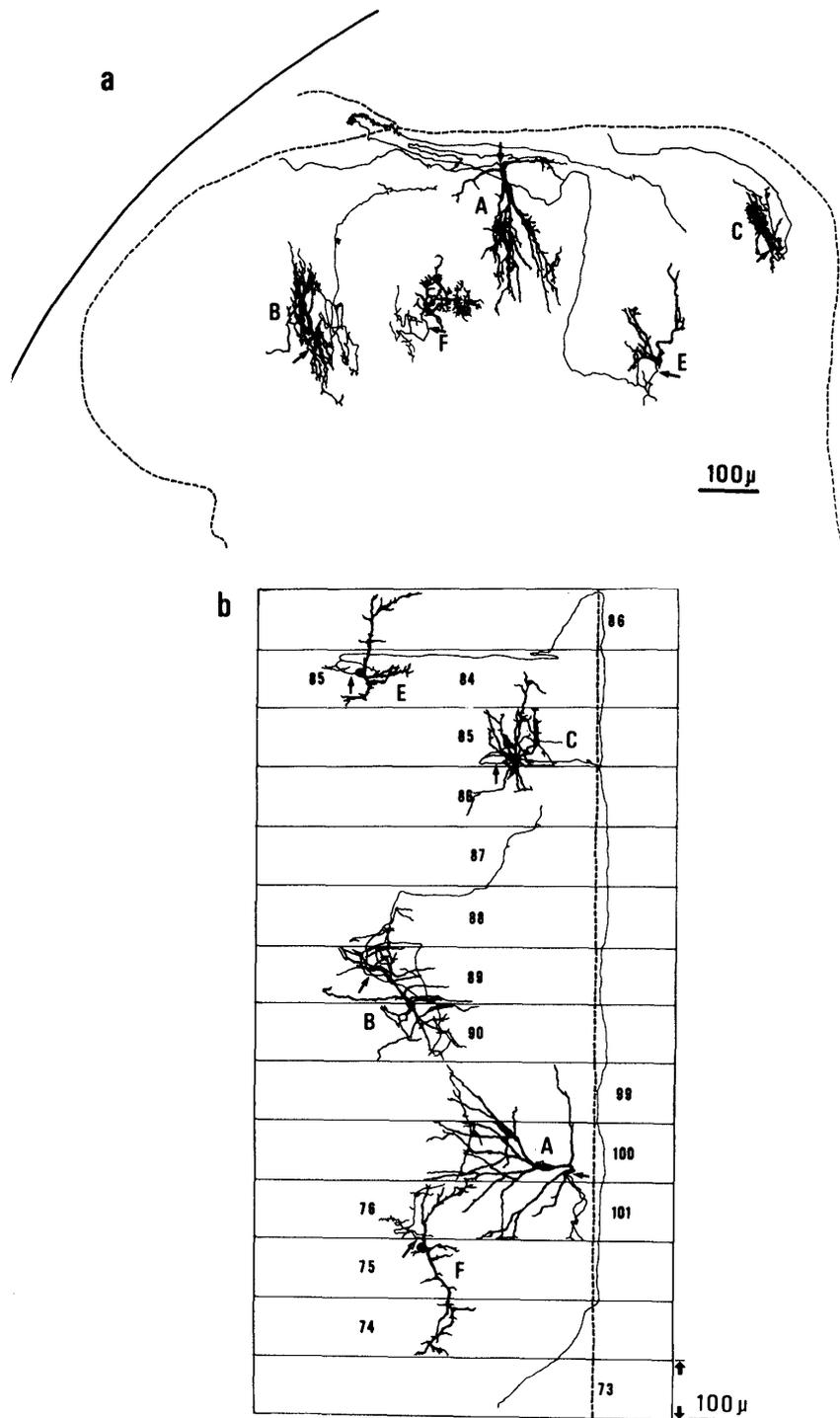


図 2 Golgi 法連続切片による後角膠様質細胞の立体的再構築. a は後角膠様質の横断面投射図. b は同矢状断面投射図. 特に細胞 E の軸索のひろがりに注目されたい (Sugiura, 1975)

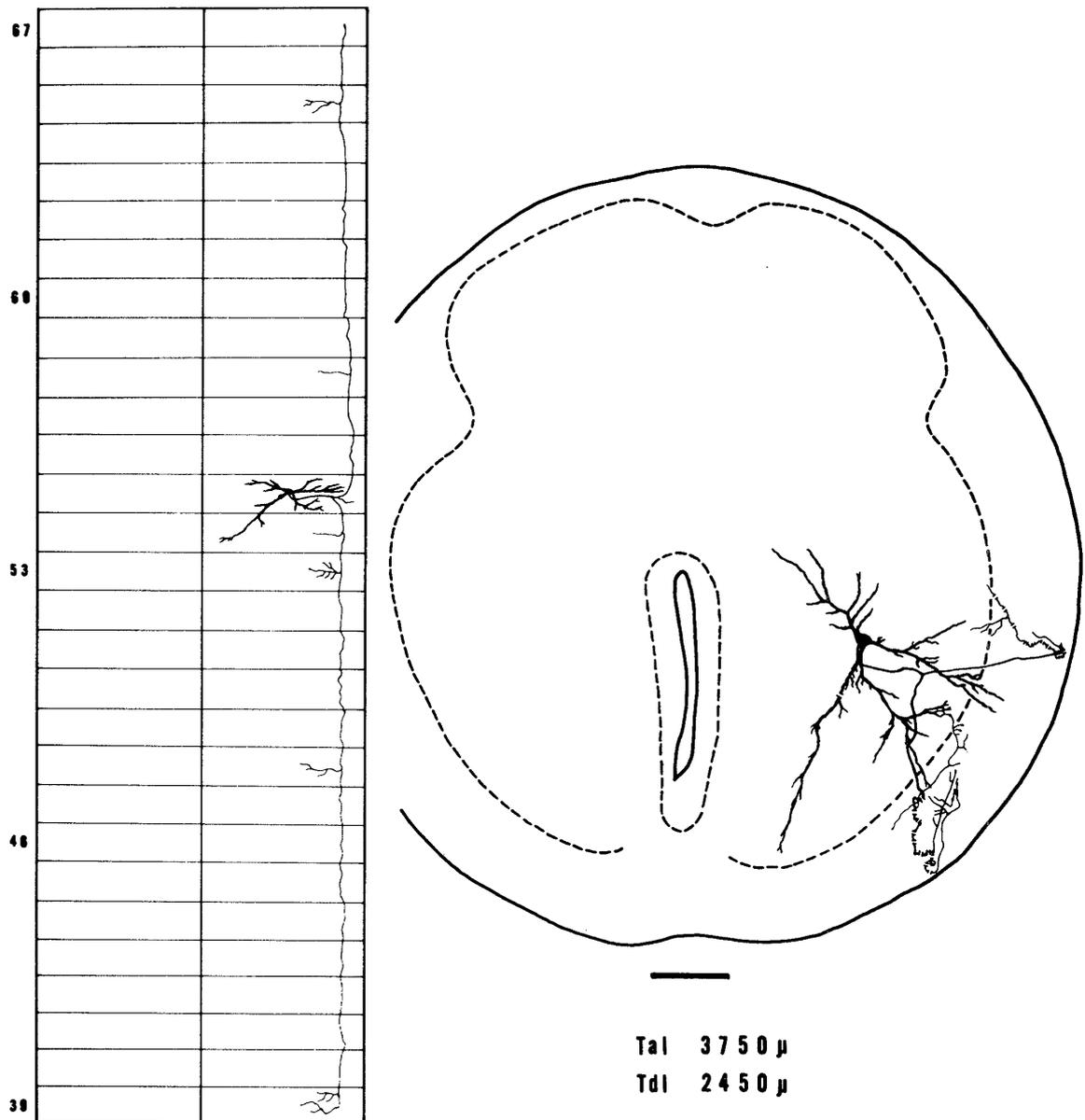


図3 Golgi染色連続切片による脊髓介在ニューロンの立体的再構築. 連合細胞の一例. 図の左半は脊髓の長軸に平行な面に投射した突起の走行. 左端の数字は連続切片の番号を示す. 切片一枚の厚さは $100\ \mu\text{m}$. 図の右半は脊髓の長軸に垂直な面に投射した図. aが軸索. 図の上部が後角にあたる. 図下の太線は $100\ \mu\text{m}$. Tal, Tdl はそれぞれ軸索の総長, 樹状突起の総長を示す

ることもむずかしく, したがって単一ニューロンとしての探求が不可能でもあるので, このようなGolgi法による切片越え追跡の結果は直接証明として重要視されてよいと思う.

脊髓の灰白質の中には, 上記の膠様質, クラーク柱, 前角細胞などの形態学的に直ちに識別できるいわば特異細胞の他に, 多数のいわゆる中間細胞が存在している⁹⁾.

この種の細胞は軸索の走行によって3種に分類できる. すなわち,

1) 連合細胞すなわち軸索が完全に同側を走るもの.

2) 交連細胞すなわち軸索が対側に分布するもの.

3) 上記の混合型すなわち軸索が両側に分布するもの.

例をあげて説明しよう. 図3は連合細胞の一例で, 細胞体は前角外側部にある. 樹状突起は前角の中央部にひろがっている. 軸索は細胞体から出ると間もなく分岐し, そのうちの一本は同側の側索中部に入って約 $1,200\ \mu\text{m}$ 上行する. これに対し他の分枝は同じく同側の側索前部に入り, 約 $1,600\ \mu\text{m}$ 下行し, いずれの分枝も前角外側縁部で終わっている. 軸索は他側におもむくことはな

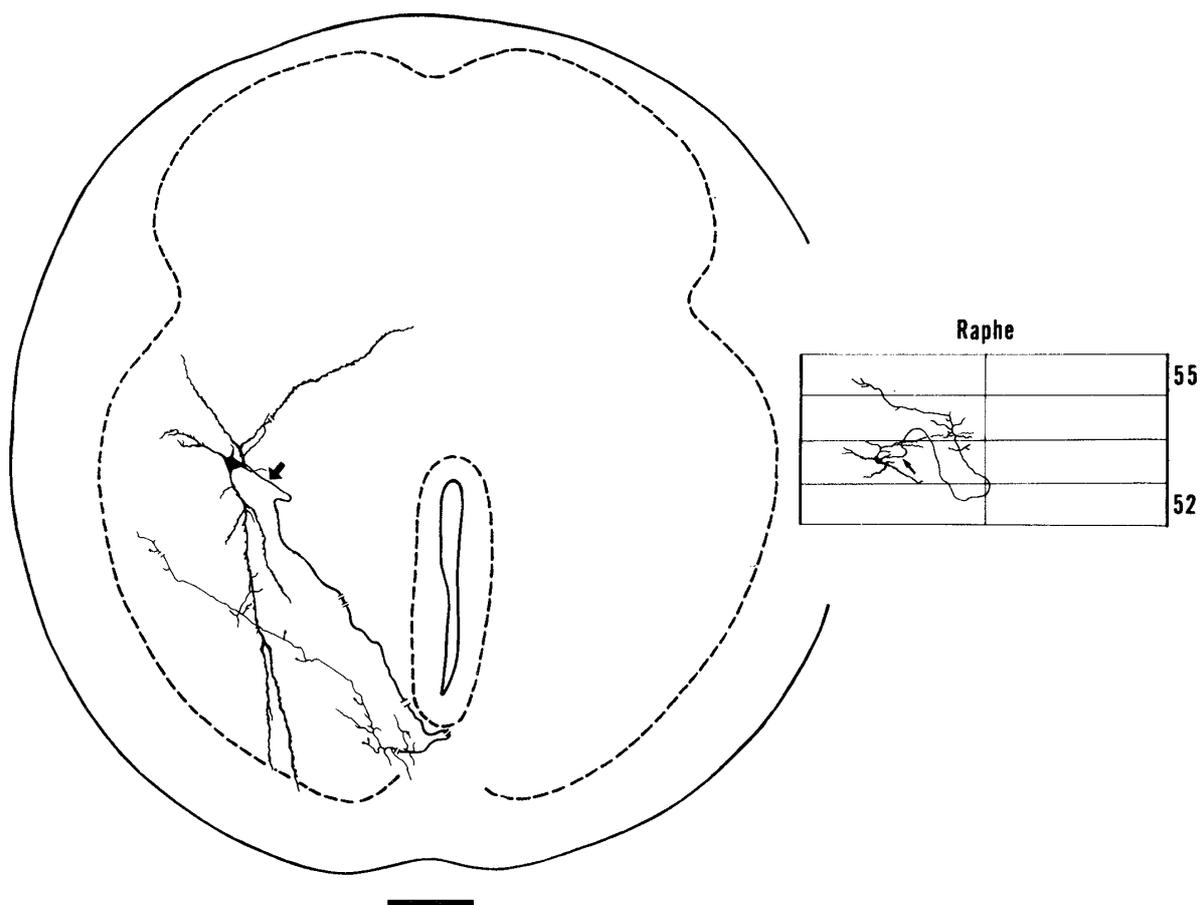


図4 連合細胞の一例. 軸索は一旦正中線を越えたのち、ただちに起始側に戻ってゆく

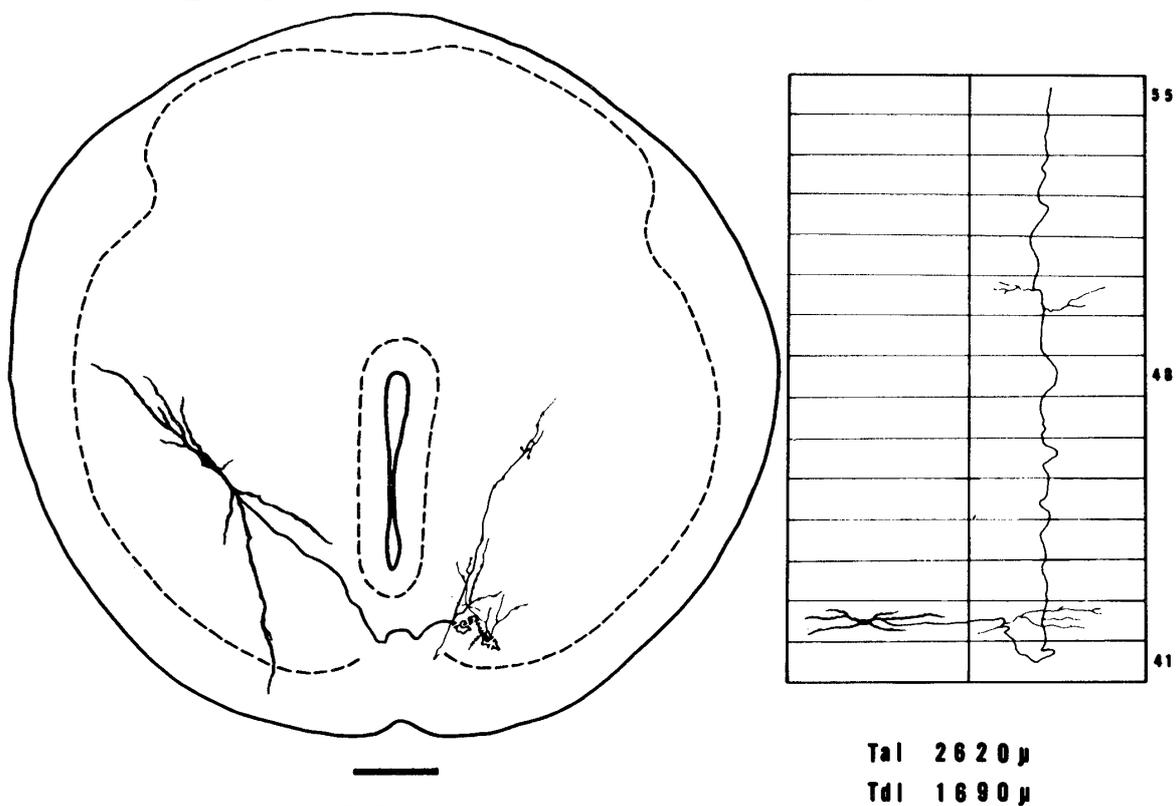


図5 交連細胞の一例. 説明は図3に準ずる

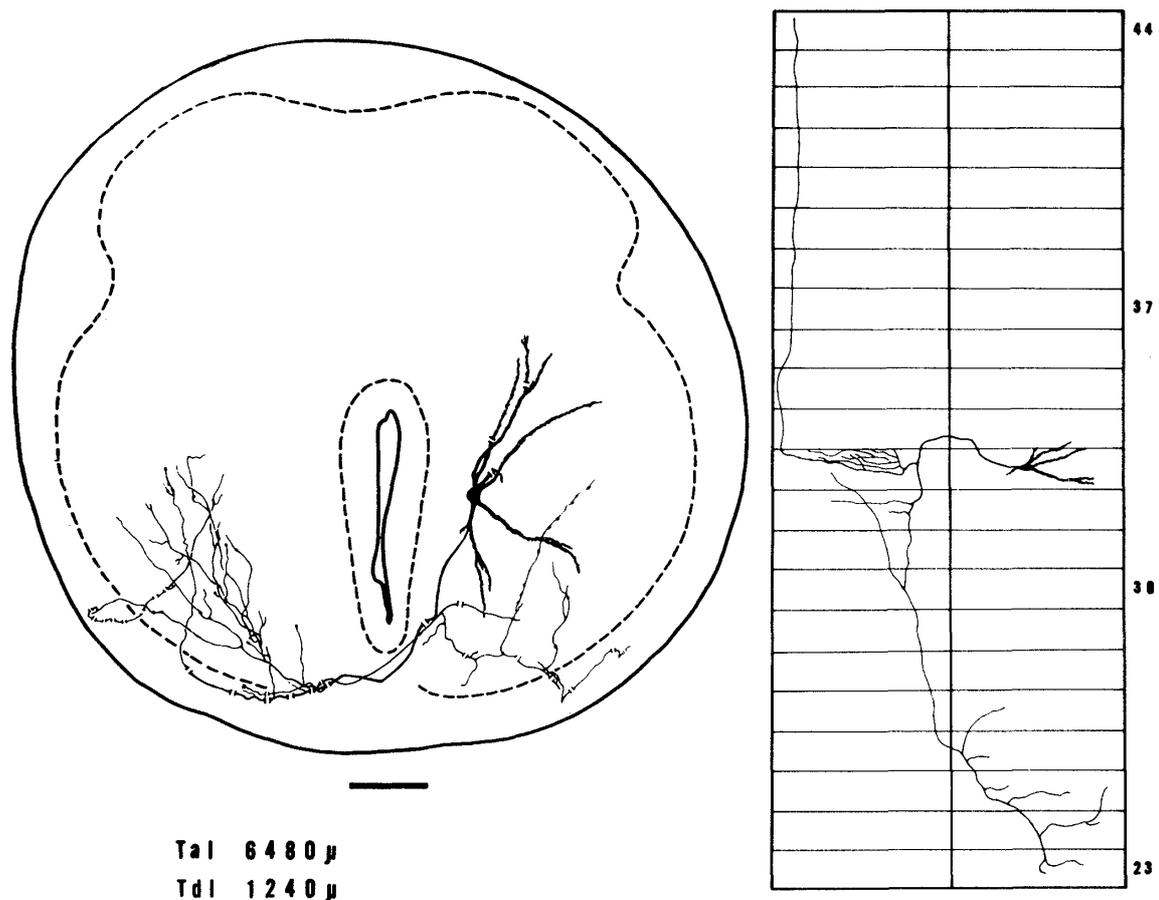


図6 混合細胞の一例. 説明は図3に準ずる

く、典型的連合細胞といえる。図4は前角背外側部にある細胞で、樹状突起はほぼ背腹方向に展開している。軸索は細胞体から出ると頭尾方向に大きく波うつ走行を示しつつ縫線に向い、縫線を横切って対側に入るや、にわかにもとの方向にひき返し、母細胞と同じ側の前角に分布する。たとえわずかに対側に入るとはいえ、本質的には連合細胞である。もし切片越え追跡を行わなければ、交連細胞とみなされてしまう危険がある。

図5は典型的な交連細胞である。細胞体は前角中部にあり、樹状突起はほぼ双極性に背外方と腹内方に向かい、水平に展開している。軸索は樹状突起の一本から出たのちを縫線に向かい、これを越えたのち、上行性となる。終始灰白質内にとどまり、途中数本の水平側枝を出し、対側の前角内側部で終る。軸索の総長は約1m2,600 μ mである。

図6は混合型の一例である。細胞体は前角内側部にあり、樹状突起はこの層の外側にひろがる。軸索は樹状突起の一本から発し、1枚上の切片で正中線を越えたのち、再びもとの切片に戻り、分岐して上行枝と下行枝に

分かれる。上行枝は母細胞と同じ高さで、対側の前角の主として外側半に数本の細い側枝をおくる。ついで側索前部に入り、にわかには上行姿勢をとる。そして切片11枚、約1,100 μ m上行して対側の前角外側半に終わる。他方、下行枝は灰白質の中を下り、切片8枚下方で再び正中線を越えて母細胞の側に戻り、前角の腹半に分岐して終っている。途中より一本の側枝が出て、母細胞と同じ高さの対側の前角外側部に向けて上っていくのが認められる。軸索の総長は約6,400 μ mである。

これらの細胞はいずれも最近のRéthelyiとSzenthágothaiの分類¹²⁾によれば中等大脊髄固有短軸索介在ニューロン (medium range propriospinal and very short propriospinal interneuron) の群に属するとみなしてよからう。しかし、ここで問題になるのは短軸索細胞という表現である。この言葉を最初に用いたのはRamón y Cajal¹¹⁾である。彼は脊髄内細胞を2つの大きな群、すなわち短軸索細胞と索細胞に分けた。前者は軸索が灰白質の中にとどまっているが、後者は灰白質から出て白質の形成に参加するという。彼はさらに索細胞を3つのタ

イブすなわち同側性細胞, 交連細胞および複合細胞にわけた。そして彼のいう短軸索細胞とは, (1)軸索が短いこと, (2)軸索の分布が灰白質の中に限られることの2つの条件をそなえていなければならない。しかし, これらのいずれも言うはやすく行は難く, 実体は決して明確にされていたわけではなかった。さきに記載した細胞のうち, 図4, 5はRamón y Cajalのいう2条件をそなえている。

ところで, 短軸索というにせよ, 長軸索というにせよ, 決め手になる軸索の絶対長がわからぬ限り, 軸索の長短を云々するのは早計である。もっとも切片の上で測った長さは, その細胞にとって一生のある時期のものであり, その時は短かくても, のちに伸長して長軸索になる場合もないとはいえない。また単一切片で短軸索と考えられたニューロンが, 実際には長い軸索を有するという事も十分考えられる。我々が切片越え追跡によって測定した軸索の総長はRamón y Cajalのいう短軸索細胞についても索細胞についても千差万別であり, したがって長軸索ニューロンと短軸索ニューロンを区別するには人為的な基準をもうけるしかない。この場合長さをもとにするには, 現段階ではまだまだ確実な資料に乏しい。一般には細胞体が大きい細胞は軸索も太くかつ長い距離を走り, 小さい細胞は軸索も細く, 短いと考えられているものの, 直接の証拠は示されていない。

ところで我々は脊髄後角で軸索の分布が灰白質内に局限していながら枝分れがきわめて豊富で, 総長が15,000 μm を越え, 索細胞のそれを大きく上回る細胞を観察することができた。これらの例で軸索分枝全体のひろがりの内外径, 背腹径および頭尾径はそれぞれ970, 600および800 μm であり, 軸索全分枝つくる終末の数は約100にのぼる。これには途中で他の細胞の樹状突起の棘(spines)とつくる接触などは含まれていない⁸⁾。

以上あげたわずかの例からも明らかのように, 突起を含めた1個のニューロンの立体的ひろがりには想像以上に大きく, このようなものが多数錯綜して構成する神経系の複雑さは息をのむばかりである。現在までに築き上げられた伝導路に関する知識は莫大なものではあるが, これらを構成する個々のニューロンの形態というもっとも基礎的な問題ではまだまだ暗中摸索といっても過言ではないと思う。

文 献

1) CULLHEIM, S. & KELLERTH, J. O.: *Neuroscience Letters* 2, 307-313, 1976

- 2) DEITERS, O.: Untersuchungen über Gehirn u. Rückenmark des Menschen u. der Säugetiere, Braunschweig, Vieweg und Sohn, 1865
- 3) JANKOWSKA, E. & LINDSTROM, S.: Morphology of interneurons mediating Ia reciprocal inhibition of motoneurons in the spinal cord of the cat. *J Physiol* 226: 805-823, 1972
- 4) JANKOWSKA, E.: Identification of interneurons interposed in different spinal reflex pathways, In Golgi Centennial Symposium, ed. by M. Santini, pp 235-246, Raven Press, New York, 1975
- 5) KATER, S. B. & NICHOLSON, C.: "Intracellular-Staining in Neurobiology" Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1973
- 6) 黒川正則: 脳の機能と物質. 岩波書店, 1973
- 7) MANNEN, H.: Morphological analysis of an individual neuron with Golgi's method, In Golgi Centennial Symposium, ed. by M. Santini, pp 61-70, Raven Press, New York, 1975
- 8) MANNEN, H. & SUGIURA, Y.: Reconstruction of neurons of dorsal horn proper using Golgi-stained serial sections. *J Comp Neurol* 168: 303-312, 1976
- 9) MANNEN, H.: Reconstruction of axonal trajectory of individual neurons in the spinal cord using Golgi-stained serial sections. *J Comp Neurol* 159: 357-374, 1975
- 10) 萬年 甫: 神経学の源流, 2-カハールとともに. 東京大学出版会, 1969
- 11) RAMÓN Y CAJAL, S.: Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres, Maloine, Paris, Tome 1. 1909
- 12) RÉTHELYI, M. & SZENTÁGOTHAJ, J.: Distribution and connections of afferent fibers in the spinal cord, In somatosensory system. Handbook of sensory physiology vol. II, ed. by A. Iggo, pp 207-252, Springer, Berlin, 1973
- 13) ROVAINEN, C. M., JOHNSON, P. A., ROACH, E. A. & MANKOVSKY, J. A.: Projections of individual axons in lamprey spinal cord determined by tracings through serial sections. *J Comp Neurol* 149: 193-202, 1973
- 14) SCHEIBEL, M. E. & SCHEIBEL, A. B.: A structural analysis of spinal interneurons and Renshaw cell, In The interneuron, UCLA Forum Med., No. 11, ed. by M. A. B. Brazier, pp 159-208, University of California Press, Los Angeles, 1969
- 15) SUGIURA, Y.: Three dimensional analysis of neurons in the substantia gelatinosa Rolandi. *Proc Japan Acad* 51: 336-341, 1975
- 16) SZENTÁGOTHAJ, J.: Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa Rolandi. *J Comp Neurol* 122: 219-239, 1964