

## 微小神経回路ダイナミクスの幾何学的・機能的構成解析

河 合 良 訓

東京慈恵会医科大学解剖学講座

### GEOMETRIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF MICROCIRCUIT DYNAMICS

Yoshinori KAWAI

*Department of Anatomy, The Jikei University School of Medicine*

Microcircuits, also known as local circuits, involve an excitatory recurrent feedback system, projection neurons, and inhibitory interneurons. Microcircuits are thought to serve as the morphological and functional units of brain function from sensation and locomotion to emotion and cognition. Is the architecture of microcircuits established deterministically or probabilistically? Is the functional activity of microcircuits correlated with the wiring design? To address these questions, stereology and neurogeometry seem to be promising tools for quantitative analysis of the morphometric parameters of microcircuits. Quantitation of specific synapses and synaptic connectivity is likely to provide a map of microcircuit wiring and even show a correlation between microcircuit architecture and functional dynamics. These methods and examples of microcircuits (cerebral cortex and nucleus of tractus solitarius) are introduced and discussed.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2009; 124: 63-70)

Key words: neurogeometry, microcircuit, synapse, cerebral cortex, nucleus of tractus solitarius

#### I. 微小神経回路とは

神経系における電気信号情報は、「神経伝導路」を通して特定の場所から別の特定の場所に伝達される。神経伝導路は通常複数の神経元の連鎖からなり、中継点である「神経核」で神経元を乗り換えることによって信号がより遠位の領域に伝搬される。この乗り換えの現象は、しばしば「中継」ということばで表現される場合が多いが、そこには信号の収束と発散ということも含まれている。その中継の場が、「神経核」であり、電子顕微鏡的スケールでは、「シナプス」である。特定の神経核において、入力としての電気信号は、加工・処理されて出力として送り出されると考えられている (Fig. 1A)。

神経系における電気現象は、このような伝導路

というルールに沿って走る電気信号の「流れ」が主役なのであろうか？ 神経核には、投射ニューロン以外にインターニューロン（多くの場合 GABA ニューロン）があるばかりでなく、投射ニューロンには軸索側枝によるフィードバックシステム（再帰回路）が存在する (Fig. 1B)。一般的に、神経核においては、外部からの刺激のない時でも、さまざまなレベルの電気活動が認められる。そうだとすれば、神経核ではたいていの場合、局所回路（微小回路）が常時活動していると考えられている。おそらく、特定の神経核における入力電気信号の加工・処理機構は、この局所回路活動の影響を強く受けるものと考えられる。

このような局所神経回路の特徴や重要性は、比較的古くから指摘されてきた。1914年、当時脊髄反射の研究を行っていたイギリスの Sherrington

卿の弟子である Brown が、筋紡錘からの伸展情報入力がない時でも脊髄前根に電気活動がみられることを発見し、その活動源を脊髄内に求め、central pattern generator (CPG) と命名した<sup>4)</sup>。現

在でも、呼吸、嚥下、歩行等、外部からの入力がないでも律動的運動出力を作り出す神経回路を CPG と呼んでいるが、その解剖学的実体は明らかにされていない。Golgi 染色を使って大脳皮質や海馬の細胞構築を明らかにし、アンモン角 CA1-4 を命名した Lorente de No (1902-1990) は、共鳴回路 (reverberatory circuit) の重要性を強調した<sup>12)</sup>。また、カナダの心理学者 Hebb (1904-1985) は、有名な Hebb 則を提唱し、cell assembly (= 再帰回路) の行動や学習における重要性を強調した<sup>8)</sup>。

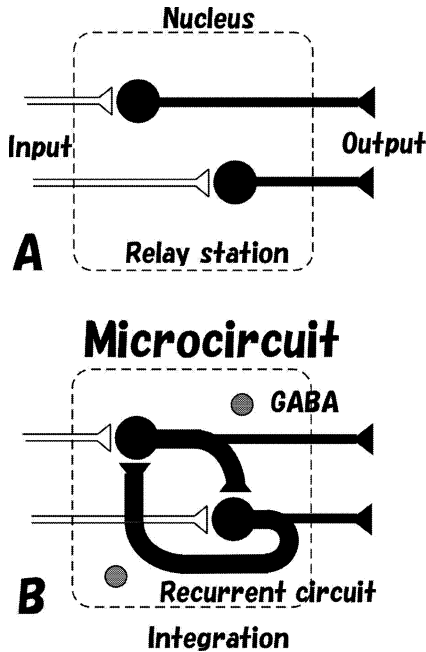


Fig. 1. A, Neurotransmission is often considered as a relay of input to output signals within a nucleus. B, Most nuclei contain GABAergic interneurons and recurrent axons in addition to input axons and output projection neurons. The recurrent synapses may overweigh input axons, thus establishing intranuclear neuronal circuits called as a microcircuit or a local circuit.

上記先駆者達が提唱した概念やその後のさまざまな分野の研究の展開によって、局所回路 (微小回路: microcircuit) の概念は発展した。すなわち局所回路とは、外部からの入力刺激がなくても固有の内在的電気活動を有するシナプス連鎖によるニューロン集団を意味し、記憶・学習を含むさまざまな脳機能の基盤要素と考えられるようになった。局所回路は、自律的電気活動 (ダイナミクス dynamics) を維持する興奮性シナプスの連鎖による再帰回路または共鳴回路を核 (kernel) に持ち、各種投射ニューロンや抑制性 GABA ニューロンをシナプス連結によって包含していると考えられる。従来神経伝導路の中継点としてとらえられがちだった神経核の構成や機能について、局所回路の視点を取り入れて再考がせまられているといっているかもしれない。CPG のように従来の神経核の境界を越えた空間的広がりを持つ場合もあるかもしれない。このような微小回路が、記憶の形成・

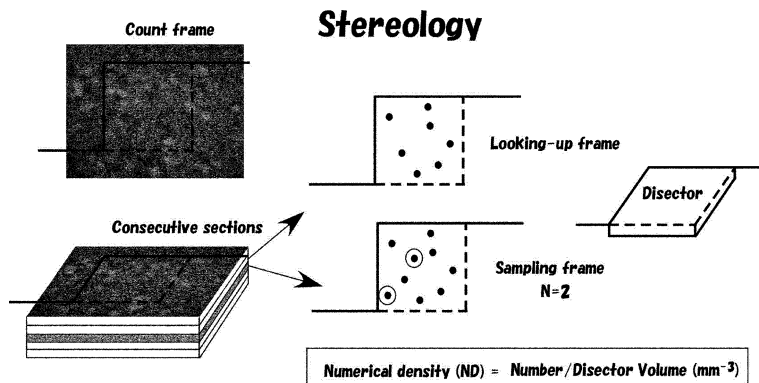


Fig. 2. Stereology is concerned with quantitative estimates of the objects of interest. For example, number of specific neuronal cell soma would be obtained from consecutive sections, one is for looking-up and another for sampling (or counting), by counting somal profiles that are present only in the sampling section. The number is usually expressed as numerical density.

保持・抽出などの高度の認知活動から感覚や運動などの脳の基本的機能まで幅広く担当する入力信号の計算原理 (computation) を実行しているかもしれない。その共通の回路構成や作動原理の特徴を定量化し、お互いに関連づけることは脳機能を理解するための重要な課題であると思われる。

Ramony Cajal (1852-1934) は、Golgi 鍍銀染色標本をもとにほとんどすべての神経系領域で、細胞のタイプや連絡 (伝導路) を記載した<sup>19)</sup>。彼の記載した神経伝導路体系はカハールサーキットとも呼ばれ、100 年以上を経た現在でも神経系の機能や病態を考える上で最も優良な資料を提供している。

カハールサーキットにあえて足りないものを探すとすれば、スケールを含めた定量的な情報と微小回路の概念 (興奮性および抑制性ニューロンの存在とその区別も含めて) ということになるが、最近これらの課題に真正面から取り組む研究が出てきている<sup>2)3)9)24)</sup>。この小論では、それらの研究の一端 (大脳皮質微小回路) とわれわれの研究内容 (延髄孤束核微小回路) を紹介し、微小回路の形態と機能の定量化とその相互関連性について若干の考察を加えたい。

## II. 定量的神経解剖学: ステレオロジーと幾何学的解析

微小神経回路構成の定量化のためには、まず正確性と再現性を犠牲にすることなく特定領域内のニューロンとシナプスの実数を算定する必要がある。単一の組織切片内の一定面積内の特定細胞の数をカウントする方法はよく使われるが、厳密に言えばそれは「細胞の数」ではなく「細胞プロフィールの数」のカウントである場合が多い。なぜなら、計測する組織切片は切片作成時に必然的に生じる細胞の断片を含み、それらが無原則 (無意識的) にカウントに入れたり除外したりするからである。そこで切片の厚み方向のカウントの重複あるいは無視を排除するために考案されたのがステレオロジー (stereology) である<sup>3)</sup>。その方法の概略を図に示す。すなわち 1 組の連続切片の 1 つを参照切片とし、もう 1 つを計測切片とする。参照切片に存在しない細胞を計測切片においてカウントする。計測のための空間は disector とよばれ、計測棒 (xy 軸方向) と切片の厚み (z 軸方向) の 3 次元軸を持つ。カウントは数密度 (ND: numerical density) で表現し、カウント数 / disector 体積 (mm<sup>3</sup>) でその数値を求める (Fig. 2)。

このステレオロジーの手法を用いることによっ

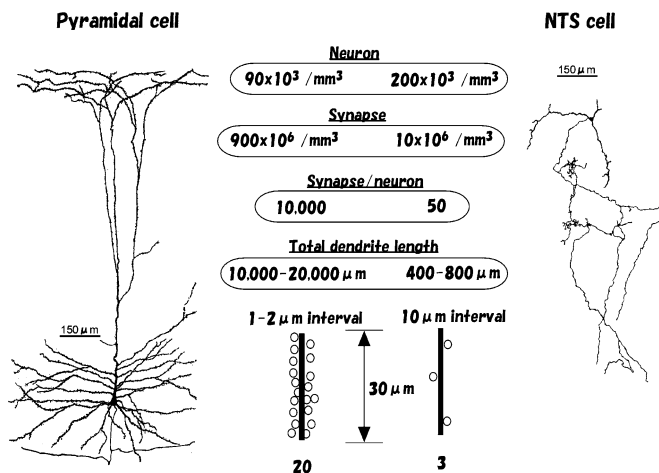


Fig. 3. A comparison of stereologically-obtained quantitative features of a cerebral cortex pyramidal cell and a nucleus solitarii (NTS) cell. In average, a dendritic segment of 30  $\mu\text{m}$  length makes contact with 20 and 3 synapses in pyramidal and NTS cells, respectively. Synapse density is quite different according to cell types.

て、動物種や中枢神経の領域を越えてニューロンやシナプスの数密度を比較・評価できる。具体例として、大脳皮質錐体細胞と孤束核ニューロンの結果を示す (Fig. 3)。

またステレオロジーの手法を併用して、垂直方向の6層構造に加えて大脳皮質のコラム構造の空間的特徴や特定層の特定ニューロンへのシナプス入力総数なども定量的に表現し比較できるようになった<sup>3)</sup>。このようにして大脳皮質の微小回路構成の定量的な地図が作られるようになった<sup>23)</sup>。

一方、細胞体、軸索、樹状突起の位置や走行に関する座標情報にもとづいてシナプス結合性 (特定のニューロン間のシナプスの総数や位置) を推定する方法が、Chklovskii, Stepanyants, Hellwig 等によって確立された<sup>9)24)</sup>。この幾何学的解析 (neurogeometry) によって微小回路を構成する特定ニューロン間のシナプス結合性を定量的に解析することが可能になった。その具体的方法は、細胞内染色を施した単一ニューロンの再構築像から得た細胞体や軸索、樹状突起の分岐点の座標情報をもとに、2個のニューロン由来の軸索と樹状突起が充分近接する (樹状突起棘の長さ  $1.5 \mu\text{m}$  以下) ポイントの個数が、両者の細胞体間の距離に応じてどのように変化するかをコンピュータで計測して地図化するというものである。それによれば、大脳皮質2/3層錐体細胞間の潜在的シナプス結合は、細胞体間の距離が小さくなるほどほど増大し、その数は最大6個程度になるという<sup>24)</sup>。この数は、ダブルパッチクランプ法と細胞内染色法による電子顕微鏡によるシナプス数の結果とよく一致することが確認された。このことは、細胞体、軸索、樹状突起の位置や走行などの幾何学的特徴が微小回路のシナプス結合性を規定することを理論的に示した。

定量的な形態解析によって、定性的に記述された微小回路の配線図の個々のシナプス結合に解剖学的な「重み」を付けることができるようになった<sup>2)</sup>。

### III. Peters 則と微小神経回路

米国の神経解剖学者 Alan Peters は、大脳皮質視覚野第4層への外側膝状体由来の軸索終末の電

子顕微鏡的定量解析を行い、Peters 則とよばれる原則を記載した<sup>3)8)</sup>。それは、「ニューロピルにおいて、特定の軸索と樹状突起の存在密度が高いほど両者の相互関係すなわちシナプス形成の確率が高くなる。」というものである。すなわち、細胞や突起の位置関係、軸索や樹状突起の存在密度の geometric な諸条件がシナプス結合性 (潜在的シナプス結合数) を規定するということが実験的に確認されたわけである。それは、一見当然の自然法則のようにみえるが、大脳皮質のように整然とした層構造、多様なニューロンタイプなどの一見して明らかな特異的回路構築がシナプス結合性の特異性に大きく反映されるものと誰れもが信じて疑わなかった (疑っていない) のも事実のようである。

ここに、いまだに完全な結論の出ていない、「微小神経回路の構築は、偶然の産物か (確率的あるいは統計的)、デザインされたもの (決定論的) ののか?」という命題が問われ続ける理由がある<sup>1)2)</sup>。特異的な回路構築 (デザイン) の要素も確かに存在する。しかし、定量的に全体的に見ると微小神経回路の構築は Peters 則に支配される確率的な要素がはるかに強い、というのがこの領域の専門家たちの共通認識になっているようである。このことは、微小神経回路のシナプス結合性を実験的に、理論的に定量解析することによって初めて明らかになったのである。その手法とアプローチの重要性を強調したい。もし、微小回路を構成するニューロン間のシナプス結合が個々のニューロン形態に依存する geometry に確率的に支配されるならば、それぞれのシナプス結合性の全体に対する「重み」を評価することが次に重要になってくる。

大脳皮質のコラム構造が単位となる微小回路に関して、定量的解析により明らかになったのは、次の諸点である<sup>2)</sup>。2/3層の錐体細胞間の興奮性シナプス結合が強い (興奮性再帰回路) という点。そのシナプスは全興奮性シナプスの約22%である。それに対して、神経伝導路として最も大きな視床由来の外來性入力は約5%に過ぎないということである。従来神経伝導路上のシナプス結合は、微小回路内の興奮性再帰回路のシナプス結合の約1/4の「重み」を持っているに過ぎないことが確認された。この解剖学的「重み」の違いは、機能に

どのように反映するのだろうか？ 最近、紫外線照射によるケージ化グルタミン酸放出の手法を用いて機能的なシナプス結合の定量化が行われ、geometricな解剖学的パラメータと相関することが明らかになった<sup>21)</sup>。

#### IV. 形態と機能

ニューロンの細胞体、軸索、樹状突起の位置や走行に関する幾何学的特徴とそれらによって規定されるシナプス結合性、およびそのシナプス結合によって作りだされる回路に固有の電気活動（ダイナミクス）の三者は表裏一体、三位一体の関係にあるといえる<sup>24)</sup>。すなわち、機能は形態に従う、または、形態は機能を定義する、という関係である。大脳皮質微小回路において形態学的解析パラメータと機能的ダイナミズムの間の相関関係は理論的にも実験的にも実証されたといってもいいだろう。それではその機能的なダイナミズムは個体レベルでどういう機能と対応づけられるのだろうか？

興奮性再帰回路の活動は、微小回路に固有のダイナミクスを与え準安定的状態を形成し、記憶の

保持に関与したり、またその「ゆらぎ」状態そのものが確率共振を引き起こしたりすると考えられている<sup>10)11)24)</sup>。睡眠（脳波）・覚醒、長期記憶、回路の可塑性などに深く関係する大脳皮質ニューロンの同期振動の開始や停止には、微小回路における興奮性および抑制性シナプス活動の均衡が重要であるという報告もある<sup>14)23)</sup>。大脳皮質微小回路のダイナミズムは、知覚運動情報の処理から認知機能に関係していると考えられている。

#### V. 孤束核微小回路とダイナミクス

われわれは、大脳皮質微小回路での上記アプローチを延髄孤束核に適用し、内臓知覚情報処理機構の解明に取り組んでいる。ステレオロジーや幾何学的解析を使って、機能的ダイナミクスと形態学的パラメータの相関解析を通して、次のことを明らかにしてきた<sup>15)16)25)27)–29)</sup>。詳細は、前掲参考文献にゆずるが、ここではその概略を示す (Fig. 4)。

細胞体サイズ（小型～大型）および化学的性質（グルタミン酸性 vs GABA 性）などの特徴を異にする孤束核ニューロン群が特定の亜核領域に分布

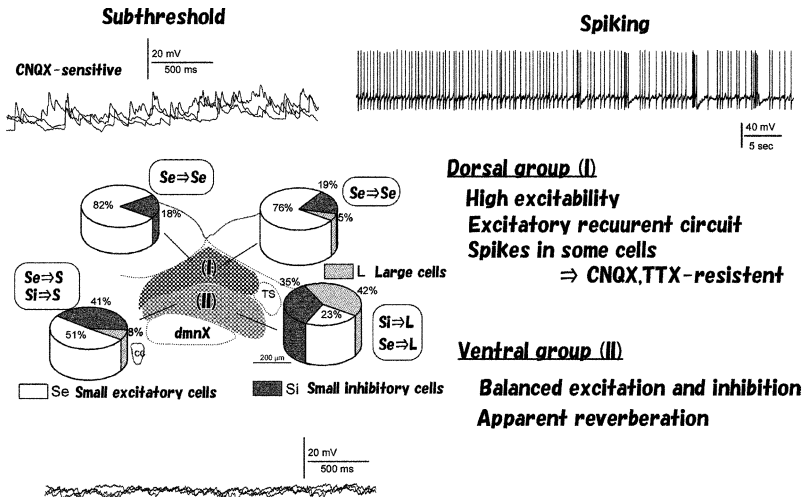


Fig. 4. Correlation of geometric synaptic connectivity with synaptic dynamics in the nucleus of tractus solitarius. Population percentages of three types of NTS cells (Se, Si, L) are shown in 4 subregions of the NTS as pie charts. Geometric synaptic connectivity is considered to be proportional to the population density, according to Peters' rule. Spatial (dorsal vs ventral) excitability difference in terms of electrophysiological dynamics is evident and correlated with geometric results. Cc: central canal, CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, dmnX: dorsal motor nucleus of the vagus, TTX: tetrodotoxin.

する。小型ニューロンは豊富な軸索側枝を有し、シナプス前要素として微小回路の電気活動を牽引する。大型ニューロンは、軸索側枝を持たず投射ニューロンとして、微小回路の出力要素として機能している。小型ニューロンには興奮性（グルタミン酸性：Se）と抑制性（GABA 性：Si）があり、亜核領域によってその存在比率が違ふ。それに対し大型ニューロンは、すべて興奮性（グルタミン酸性：L）である。

Peters 則を適用して、細胞内染色によって再構築した各種ニューロンの幾何学的解析を行うと、孤束核微小回路のシナプス結合性について次のことが判明した (Fig. 4)。背側領域 (I) では、約 80% のシナプスが興奮性小型ニューロン間のシナプスである (Se⇒Se)。一方、腹側領域 (II) では、興奮性シナプスと抑制性シナプスが拮抗している (興奮性：抑制性=1:0.8~1.5)。すなわち、背側群ニューロンは興奮性再帰回路の性質を強く有していることが示唆された。孤束核微小回路のシナプス入力に関する上記の幾何学的解析結果を機能的ダイナミクスと比較するとその相関性ははっきりしてることがわかった。たとえば、孤束核ニューロンからパッチクランプ・ホールセル記録によりシナプス後電流を記録し、興奮性（グルタミン酸性）および抑制性（GABA 性）の自発性シナプス後電流の発生頻度 (Hz) の比率を算出すると、背側領域では 90%、腹側部では 50~60% が興奮性であり、幾何学的解析結果と高い相関性を示すことがわかった。この結果を裏付けるように、閾値下細胞膜電位を比較してみると、背側ニューロン群では CNQX 感受性シナプス後電流が高頻度に認められ、腹側ニューロン群では電位の振幅は小さい。また、背側領域では多くのニューロンが自発発火し、そのうちいくつかのスパイクは、CNQX やテトロドトキシン抵抗性を示した<sup>5)17)</sup>。すなわち、背側領域では、高い興奮性を持ったニューロン群が興奮性再帰回路を形成していることが示唆された<sup>7)17)26)</sup>。それに対し、腹側グループでは、背側グループからの興奮性入力と近傍の GABA ニューロンから抑制性入力拮抗し、外部入力信号に対して適切な出力応答が形成されることが示唆された<sup>20)</sup>。

従来層構造が認められないとされてきた孤束核

においても、他の知覚性神経核や大脳皮質で見られるような層構造に相当するニューロン群の構成があるのかもしれない。各ニューロン群は、中枢神経系の領域や処理するモダリティーの種類を越えて、微小回路構成という新たな枠組のなかで共通の役割を担っているのかもしれない。

## VI. おわりに

神経系のはたらきは環境に適応して未来を予測することである。動物は、知覚と運動というかたちでなかば反射的に環境に適応しているが、神経系が複雑になれば学習や認知機能をとおして未来を予測することで、よりよく環境に適応することができる。神経系が複雑になれば、カハールサーキットだけでは説明できない現象、たとえば記憶や非線形計算、を実現している実体をともなった構造機能が神経系のなかに生じてきているはずである。その実体の候補のひとつとして微小神経路または局所神経回路が注目されているといっているかもしれない。局所神経回路内のシナプス結合の性質を定量的に解析することによって回路のいろいろな特徴が浮き上がってきていると思われる。相対的に小さな外来性入力信号は just enough & just-in-time に微小回路に影響を与えるにすぎない。その入力信号は、微小回路固有の活動がゆらぎ・ノイズであれば、確率共振をとおして非線形計算を可能にするであろう<sup>6)13)</sup>。大脳皮質や海馬などの微小回路は同期振動をとおして Hebb 則を実行しているようだ。こうしてみると脳や神経回路をコンピュータにたとえるのはもはや時代錯誤であろう。しかし、あえて神経回路の特徴の一面をコンピュータ用語を用いて表現すれば、それはメモリと電源を兼備した徹底した省エネルギー型素子になるかもしれない。細胞内シグナル伝達系、筋収縮から認知機能まで生物系は、自然物理現象と同じように、ゆらぎ・ノイズに大きく依存したシステムであるかもしれない。

## 文 献

- 1) Anderson JC, Binzegger T, Douglas RJ, Martin KA. Chance or design? some specific con-

- siderations concerning synaptic boutons in cat visual cortex. *J Neurocytol* 2002; 31: 211-29.
- 2) Binzegger T, Douglas RJ, Martin KA. A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. *J Neurosci* 2004; 24: 8441-53.
  - 3) Braitenberg V, Schüz A. *Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity*. Berlin: Springer; 1998.
  - 4) Brown G. On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function of the nervous system. *J Physiol (Lond)* 1914; 49: 18-46.
  - 5) Champagnat J, Siggins GR, Koda LY, Denavit-Saubie M. Synaptic responses of neurons of the nucleus tractus solitarius *in vitro*. *Brain Res* 1985; 325: 49-56.
  - 6) Faisal AA, Selen LP, Wolpert DM. Noise in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 292-303.
  - 7) Fortin G, Champagnat J. Spontaneous synaptic activities in rat nucleus tractus solitarius neurons *in vitro*: evidence for re-excitatory processing. *Brain Res* 1993; 630: 125-35.
  - 8) Hebb DO. *The Organization of Behavior*. New York: Wiley; 1949.
  - 9) Hellwig B. A quantitative analysis of the local connectivity between pyramidal neurons in layers 2/3 of the rat visual cortex. *Biol Cybern* 2000; 82: 111-21.
  - 10) Hô N, Destexhe A. Synaptic background activity enhances the responsiveness of neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2000; 84: 1488-96.
  - 11) Lau PM, Bi GQ. Synaptic mechanisms of persistent reverberatory activity in neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10333-8.
  - 12) Lorente de No R. Vestibulo-ocular reflex arc. *Arch Neurol Psychiatry Chicago* 1933; 30: 245-91.
  - 13) Mariño J, Schummers J, Lyon DC, Schwabe L, Beck O, Wiesing P, Obermayer K, Sur M. Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. *Nat Neurosci* 2005; 8: 194-201.
  - 14) McCormick DA, Shu Y, Hasenstaub A, Sanchez-Vives M, Badoual M, Bal T. Persistent cortical activity: mechanisms of generation and effects on neuronal excitability. *Cereb Cortex* 2003; 13: 1219-31.
  - 15) Okada T, Yoshioka M, Inoue K, Kawai Y. Local axonal arborization patterns of distinct neuronal types in the caudal nucleus of the tractus solitarius. *Brain Res* 2006; 1083: 134-44.
  - 16) Okada T, Tashiro Y, Kato F, Yanagawa Y, Obata K, Kawai Y. Quantitative and immunohistochemical analysis of neuronal types in the mouse caudal nucleus tractus solitarius: focus on GABAergic neurons. *J Chem Neuroanat* 2008; 35: 275-84.
  - 17) Paton JF, Rogers WT, Schwaber JS. Tonically rhythmic neurons within a cardiorespiratory region of the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Neurophysiol* 1991; 66: 824-38.
  - 18) Peters A, Payne BR. Numerical relationships between geniculocortical afferents and pyramidal cell modules in cat primary visual cortex. *Cereb Cortex* 1993; 3: 69-78.
  - 19) Ramon y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. Paris: Maloine; 1909.
  - 20) Smith BN, Dou P, Barber WD, Dudek FE. Vagally evoked synaptic currents in the immature rat nucleus tractus solitarii in an intact *in vitro* preparation. *J Physiol (Lond)* 1998; 512: 149-62.
  - 21) Shepherd GM, Stepanyants A, Bureau I, Chklovskii D, Svoboda K. Geometric and functional organization of cortical circuits. *Nat Neurosci* 2005; 8: 782-90.
  - 22) Shu Y, Hasenstaub A, Badoual M, Bal T, McCormick DA. Barrages of synaptic activity control the gain and sensitivity of cortical neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 10388-401.
  - 23) Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA. Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 2003; 423: 288-93.
  - 24) Stepanyants A, Chklovskii D. Neurogeometry and potential synaptic connectivity. *Trends Neurosci* 2005; 28: 387-94.
  - 25) Tashiro Y, Kawai Y. Glial coverage of the small cell somata in the rat nucleus of tractus solitarius during postnatal development. *Glia* 2007; 55: 1619-29.
  - 26) Tell F, Jean A. Ionic basis for endogenous

- rhythmic patterns induced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors in neurons of the rat nucleus tractus solitarii. *J Neurophysiol* 1993; 70: 2379-90.
- 27) Yoshioka M, Kawai Y. Activity-dependent reorganization of local circuitry in the developing visceral sensory system. *Neuroscience* 2007; 150: 905-14.
- 28) Yoshioka M, Okada T, Inoue K, Kawai Y. Pattern differentiation of excitatory and inhibitory synaptic inputs on distinct neuronal types in the rat caudal nucleus of the tractus solitarius. *Neurosci Res* 2006; 55: 300-15.
- 29) Yoshioka M, Tashiro Y, Inoue K, Kawai Y. Postnatal development of GABAergic axon terminals in the rat nucleus of tractus solitarius. *Brain Res* 2006; 1107: 111-20.