First release: 7 October 2021

Science

4 June 2021; accepted 14 September 2021
Published online 7 October 2021
10.1126/science.abj7960

REPORTS

グリアフレームワーク：アストロサイトとオリゴデンドロサイトが、支持する軸索に沿って短い列をなして集まっていることを指す。

Cite as: R. Schurr, A. A. Mezer *et al.*, *Science* 10.1126/science.abj7960 (2021).

The glial framework reveals white-matter fiber architecture in human and primate brains

グリアフレームワークにより、ヒトと霊長類の脳における白質繊維の構造を明らかにする

Roey Schurr* and Aviv A. Mezer

Edmond and Lily Safra Center for Brain Sciences, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel.

***Corresponding author. Email: roey.schurr@mail.huji.ac.il**

ヘブライ大学は、イスラエルの国立大学である。

Uncovering the architecture of white-matter axons is fundamental to the study of brain networks. We developed a method for quantifying axonal orientations at ~15 micron resolution. This method is based on the common Nissl staining of postmortem histological slices. Nissl staining reveals the spatial organization of glial cells along axons. Using structure tensor analysis, we leveraged this patterned organization to uncover the local axonal orientation. We used Nissl-based structure-tensor analysis to extract fine details of axonal architecture and demonstrated its applicability in multiple datasets of humans and non-human primates. Nissl-based structure tensor analysis can be used to compare fine-grained features of axonal architecture across species, and is widely applicable to existing datasets.

Authors contributions: Conceptualization, methodology, formal analysis, visualization and writing; RS and AAM. Supervision: AAM.

図1-4, 補足図1-19

古典的な神経組織染色法であるニッスル染色を用いて、霊長類脳の白質の繊維走行(神経結合)を可視化したのが、本研究の「売り」である。お金があまりかかっていない研究である。著者の数も少ない。
Scienceは、独創的な(only one)研究論文が掲載される。「ヤモリはどうやって壁に貼りついていられるのか？」「ある種のヘビはどのようにして滑空するのか？その力学モデル」など。

拡散テンソル画像法(Diffusion Tensor Imaging)

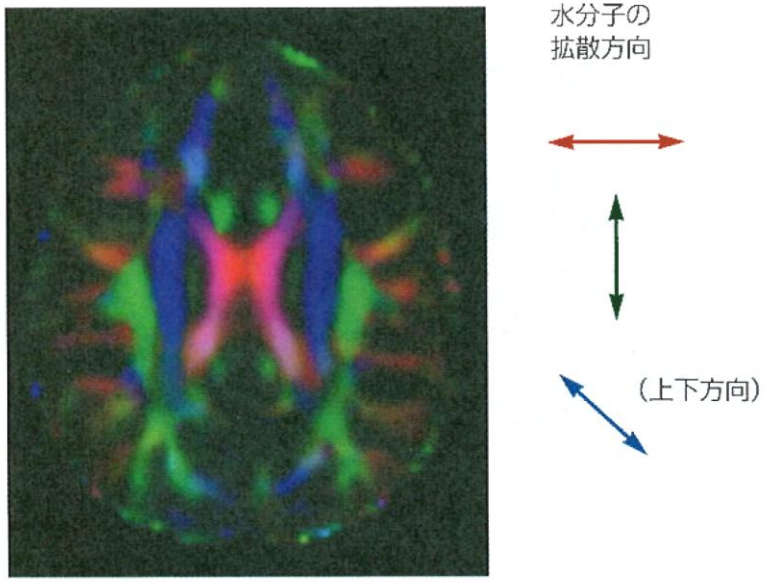


図 20-5A　MRI による拡散の異方性の測定
白質中の水分子の拡散は異方性であり，この異方性は MRI で測定することができる。画像内の各部位の色や明るさは，小体積（ボクセル）の組織における拡散を表す。明るさは拡散の異方性の程度に相関している。灰白質と脳室が暗いのに対して（等方性拡散），白質の大部分が明るく示される（拡散の異方性が高い）。色は白質線維の優位な方向を表す。**赤色**は拡散が左右方向で最大となることを示し，**緑色**は前後方向で，**青色**は上下方向で拡散が最大となることを示す。（Ben-Shachar, Dougherty, and Wandall 2007 より）

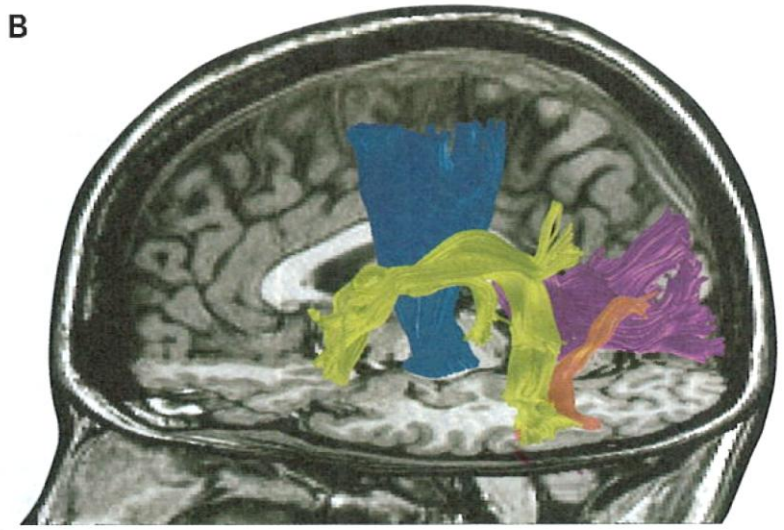


図 20-5B　DTI から再構成した白質の神経線維束
それぞれの「仮想線維束」は，DTI の測定値を，脳内のある位置から出発して異方性が最大となる経路をたどることにより計算された。図には，読むために重要であると考えられる 4 つの線維束が描かれている。**黄色**の線維は，側頭頭頂皮質（言語理解に重要な役割を示すウェルニッケ野を含む）と外側前頭皮質（言語の産出に関係するブローカ野）とを結ぶ上縦束である。**紫色**の線維は，2 つの後頭葉領域と 2 つの側頭葉領域をつなぐ脳梁を通過する。**青色**の線維は，内包後脚を通過する放線冠線維である。最後に，**オレンジ色**の線維は，後部側頭後頭皮質（文字認識に重要であると考えられている領域を含む）と，後頭葉と側頭葉の境界の皮質外側面を結んでいる。

神経線維である軸索方向に水分子は自由に動きますが、軸索方向以外の水分子の運動は制限されているという拡散異方性を利用し、脳の神経線維の走行状態を可視化する解析法です。神経線維の走行位置、健康状態が分かります。

本論文の要点

エルサレムELSCの神経科学者であるAviv Mezer教授とRoey Schurr博士は、白質の神経線維をマッピングして視覚化するための新しい手法を開発した。

約140年前から存在する技術(ニッスル染色)を利用したが、これまでは脳の白質の繊維構造の研究には使用されてこなかった。

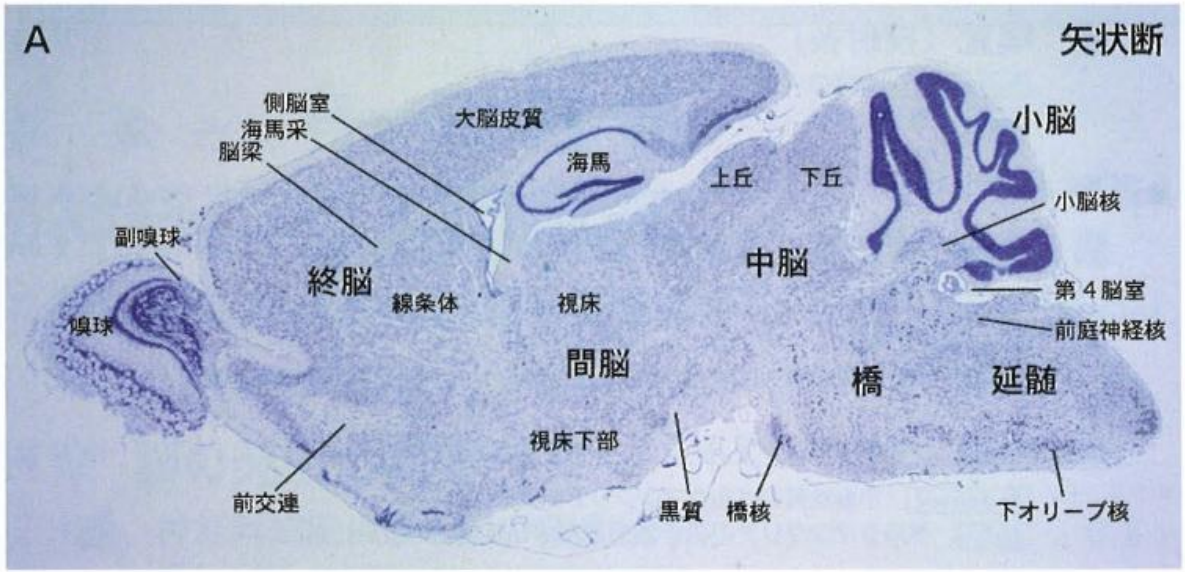
白質は、主に神経線維(軸索)とグリアで構成されている。驚いたことに、グリア細胞が短い列のパターンを形成していることにSchurr博士は気がついた。さらに、グリア細胞の列は、局所的な神経線維と一致しているように見えた。「徹底的な文献調査を行ったところ、1992年にこのグリア細胞の組織化について記述した論文を発見したが、この発見は私たちの分野では注目されなかった」とSchurrは語っている。

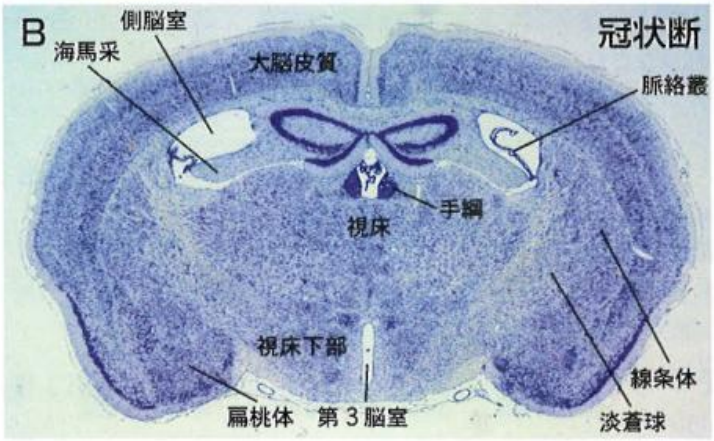
筆者らは、画像処理分野の簡単な計算ツールを使えば、パターン化された細胞組織を利用して、白色の構造を明らかにできると考えた。ニッスル染色の画像では、白質は一見すると均一に見える。しかし計算機を使用すると、隠されていた白質繊維の微細な構造を示すカラフルなマップが突然現れた。「これは、多くの科学者が白質の研究で探していたパズルの重要なピースだとすぐにきがついた」とSchurrは述べている。

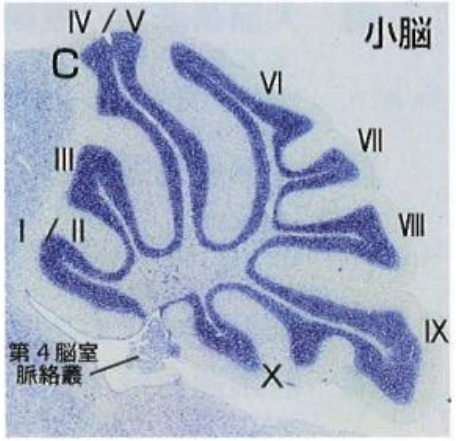
研究者たちが「Nissl-ST」（「Nissl-based Structure Tensor」）と名づけたこの技術は、Nissl染色を行った脳切片の白質に適用することができる。Nissl染色は脳科学の分野で最も一般的な染色法であるため、高解像度の脳切片をデジタル化したデータセットやオープンソースのアトラスなど、世界中で多くの染色法が公開されている。

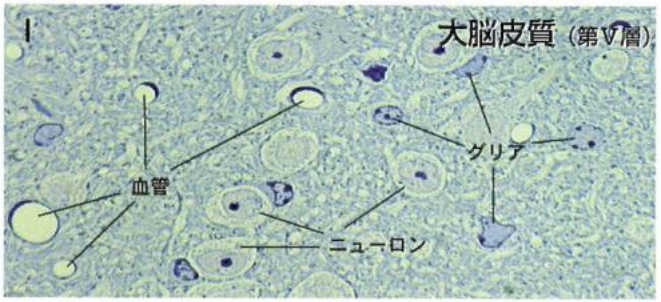
"Nissl-STの応用は、正常な脳の発達、加齢、そして神経変性や統合失調症などの白質に影響を及ぼす病的状態における白質の研究に、将来大きな可能性を秘めている。“ とMezerは結論づけた。

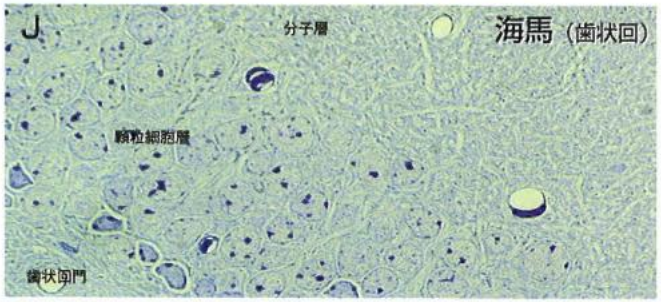
Nissl Staining (ニッスル染色)

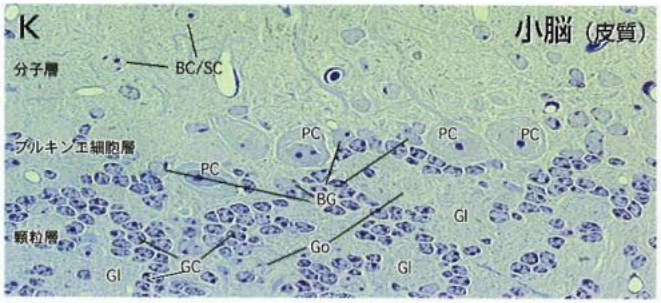


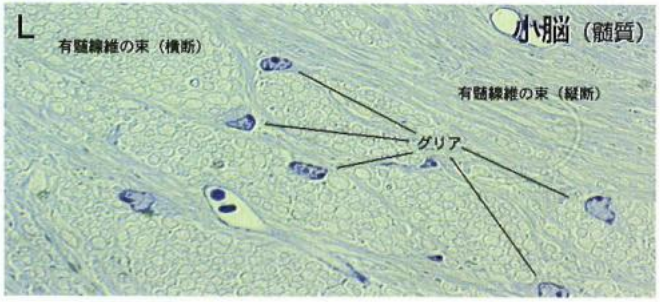












マウス成脳のパラフィン切片（5 μm厚，A~H）とエポン切片（1 μm厚，I~L）をクレシル紫で染色すると，脳の組織像を観察することができる．AとB）矢状断および冠状断切片．脳各部の位置や組織構築，細胞構築が観察できる．C）小脳の矢状断像．10個の小葉と，分子層・顆粒層・髄質からなる層構造が明瞭である．D~H）脳各部の組織構築．大脳皮質では6層からなる層構造（I~VI）を識別できる．拡大をあげたGとHでは，大型ニューロンの核内の核小体が濃染し，核周囲部も不均一に濃染している（ニッスル小体）．I~L）電子顕微鏡に用いるエポン包埋組織から準超薄切片を作成しニッスル染色を施すと，細胞の形態学的特徴がより詳細に見えてくる．これらの図は，北海道大学大学院医学研究科－清水秀美氏の提供による．BC/SC：バスケット細胞／星状細胞，BG：バーグマングリア，CA1-3：アンモン角1~3領域，CC：脳梁，DG：歯状回，EPL：外網状層，GC：顆粒細胞，Gl：小脳糸球体，GL：糸球体層，Go：ゴルジ細胞，Gr：顆粒細胞層，IPL：内網状層，LM：網状分子層，MCL：僧房細胞層，ONL：嗅神経線維層，Or：上昇層，PC：プルキンエ細胞，Py：錐体細胞層，Ra：放射状層，Su：海馬台

本論文の図の構成

図1: Nissl-ST法の基礎的有用性の実証
役割: Nissl-ST法が、白質構造の詳細な軸索配向を解析できることを初めて実証する図である。
脳梁という明確な白質線維束を対象に、グリア細胞の配向が軸索の配向と整合していることを示している。
高解像度での局所的な構造（タイル単位のgODF）を可視化することで、Nissl-ST法の精度と信頼性を示している。
重要性: Nissl-ST法の基本的な解析能力を示し、以降の応用可能性を議論する土台を提供する。

図2: Nissl-ST法と既存手法の比較
役割: Nissl-ST法が他の技術（偏光光イメージング [PLI] および拡散MRI [dMRI]）と同等以上の精度で軸索配向を可視化できることを実証している。
脳梁やEdinger’s combなど、複雑な領域における細部構造を解析し、既存手法より高解像度であることを強調している。
重要性: 他手法との比較により、Nissl-ST法の優位性（特に微細構造の解析能力）を明確にし、この手法の科学的価値を高める。

図3: Nissl-ST法の限界と適応性の評価
役割: 軸索配向の一貫性（coherence）をマッピングすることで、Nissl-ST法の適用可能な領域と限界を評価しています。
脳梁のような単一束領域では高い精度を示す一方、centrum semiovale(反卵円中心)のような複雑な軸索交差領域では限界があることを示唆している。
Edinger’s combの解析を通じて、複雑な交差構造にも適用可能であることを示している。
重要性: 本手法の限界を明示しつつ、その能力の範囲を正確に定義することで、実用的な応用に向けた指針を提供する。

本論文の図の構成

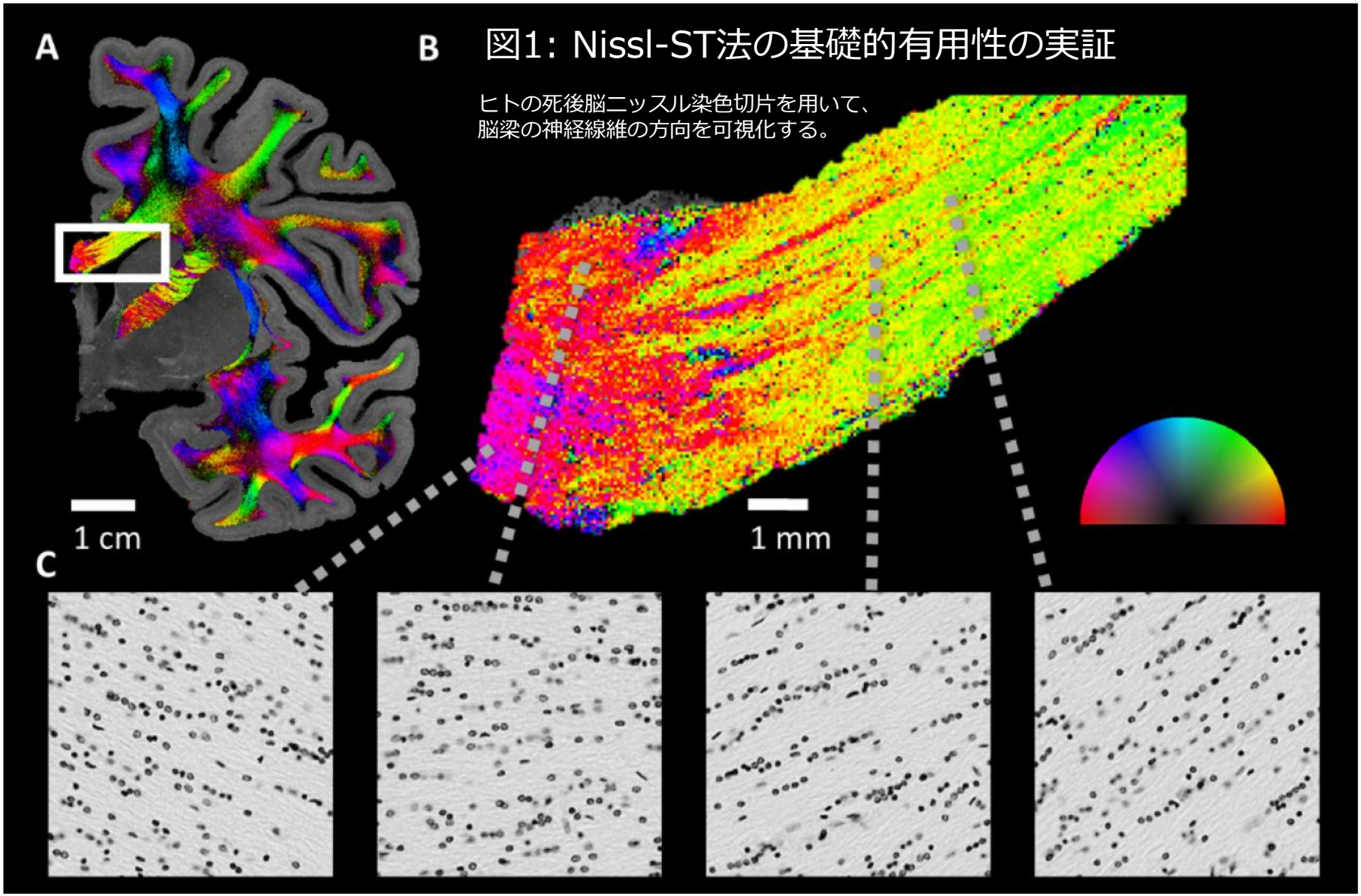
図4: Nissl-ST法の汎用性と種間の適用性の実証
役割: ヒトおよび非ヒト霊長類の複数のデータセットにおいて、Nissl-ST法が一貫して有効であることを示している。
特に、Edinger's combのような特徴的な白質構造が種間で保存されていることを強調し、Nissl-ST法の種間比較研究への応用可能性を示唆している。
重要性: 既存の多様なデータセットに適用可能であることを示すことで、Nissl-ST法の普遍的な価値を示している。

〇総合的な役割
図1～図4の全体的な意義:

図1: Nissl-ST法の基本的な解析能力を示す基礎データ。
図2: 他手法との比較を通じたNissl-ST法の科学的価値の検証。
図3: 本手法の適用可能な条件と限界の明確化。
図4: 種間での普遍的な適用性を示し、将来的な比較研究への展望を提供。

グリア細胞の面内配向を測定するために、構造テンソル解析を用いた。構造テンソル解析は、テクスチャー画像の局所配向の定量化によく用いられる計算画像処理の手法である。構造テンソルは，x軸とy軸に沿った画像強度の偏微分から得られる行列である。この行列の第2固有ベクトルは，強度値の変化が少ない方向，すなわちNissl染色された白質のグリア列のような配向性構造に沿った方向を指す。私たちは、構造テンソル解析を用いてグリア列の方向性を定量化し、その下にある繊維構造を可視化した。この手法を「Nissl-based structure tensor」（Nissl-ST）と呼んでいる。

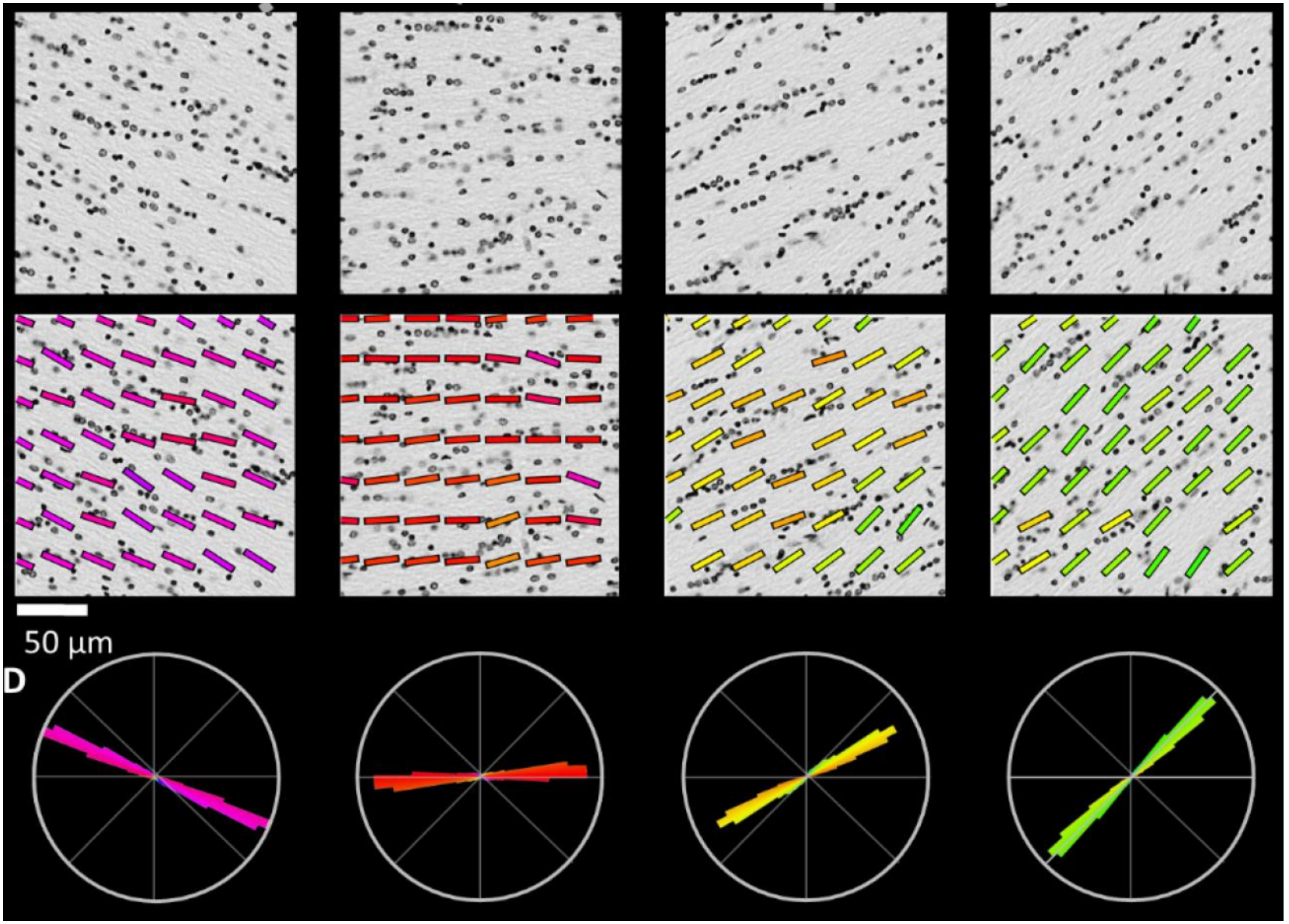
Fig.1 Nissl-based structure tensor (Nissl-ST) analysis of the human corpus callosum.



(A)ヒト脳右半球の冠状切片における面内配向マップ(200 um^{2}のタイル、15 umの平滑化カーネル)。右の半円に従って色分けされている。面内配向は、各タイルの構造テンソルのピーク配向として計算される。(B) パネル(A)で示した脳梁(CC)領域の拡大図で、50×50 um^{2}のタイルで計算した。

Fig.1

Nissl-based structure tensor analysis of the human corpus callosum.



(C) 脳梁に沿ったさまざまな場所のグリアフレームワークの例。上：グリア細胞(アストロサイトやオリゴデンドロサイト)は近傍の軸索に沿って短い列をなしている。下。グレースケール画像の上に、ピクセル単位の配向を重ねて表示したもの。
(D) 各タイルにおけるグリア細胞の配向密度関数 (gODF; glial-rows orientation density function)の極座標ヒストグラム。

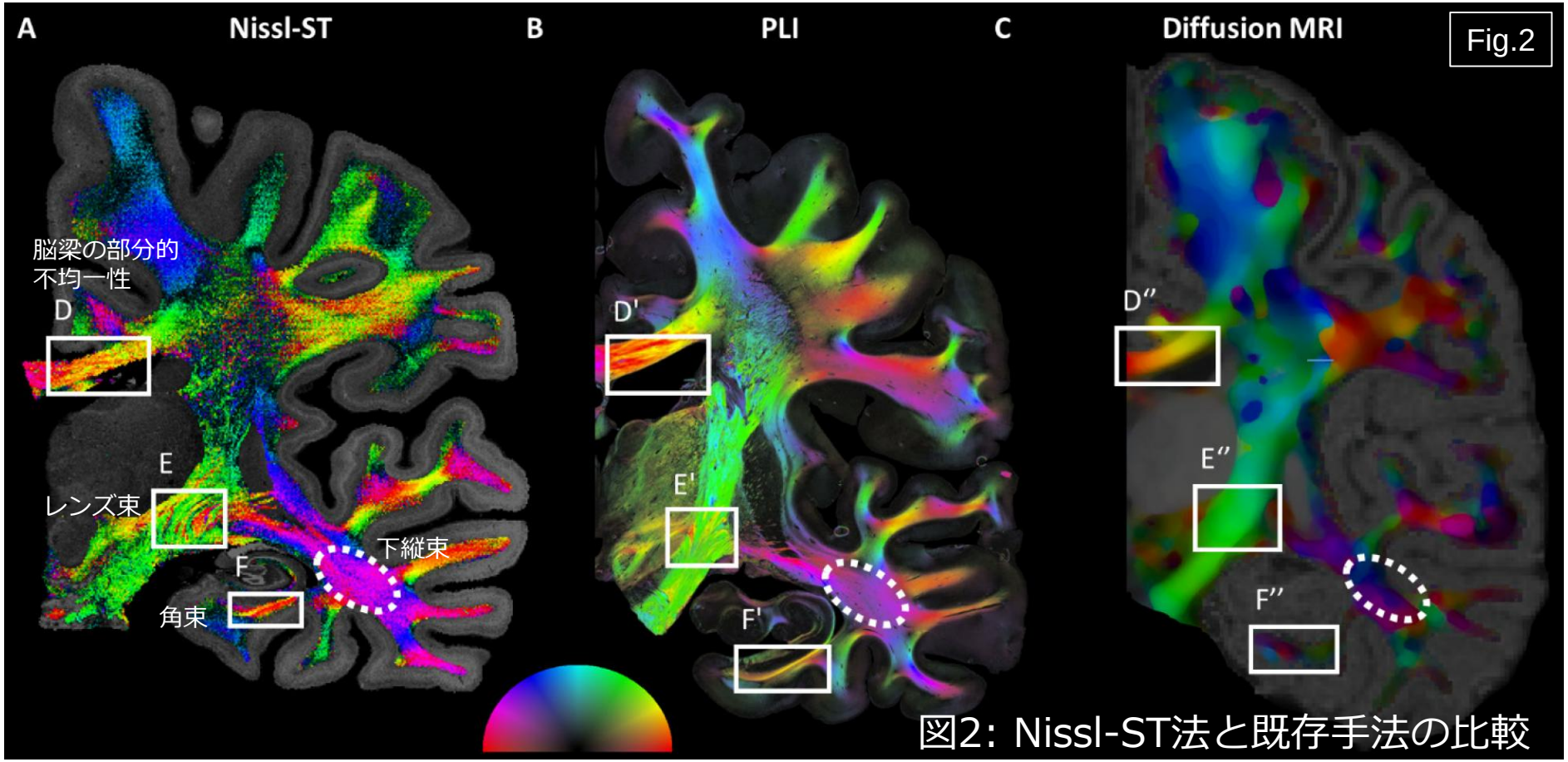
Fig.2

Comparison of Nissl-based structure tensor and other methods

本論文で開発された方法

光散乱計測法
(偏光イメージング)

*in vivo*拡散MRI



(A) Nisslベースの構造テンソル(Nissl-ST、有効解像度～15 μm、200×200 μm^{2}のタイルで可視化), (B) 偏光イメージング(PLI、面内解像度1.3×1.3 μm^2) (C) *in vivo*拡散MRI（解像度1.25 mm）で、平面に投影したpeak orientationを示す。DTI imageの急激な変化を最小限に抑えるため，メディアンフィルターを用いて画像を平滑化してある。下縦束 (ILF、破線の楕円）のように、主要な繊維束が平面に対して垂直に交差している領域でも、すべての方法で面内軸索の方向性が類似していると推定された。

偏光イメージング： 3D 神経線維構造を明らかにするための最強方法の一つは、3D Polarized Light Imaging (3D-PLI)である。これは、Forschungszentrum Jülich で開発された神経イメージング技術である。繊維の方向は、偏向光を照射することで再構成される。線維が交差する領域は再構成が難しい。

Fig.2

Comparison of Nissl-based structure tensor and other methods

本論文で開発された方法

光散乱計測法
(偏光イメージング)

*in vivo*拡散MRI

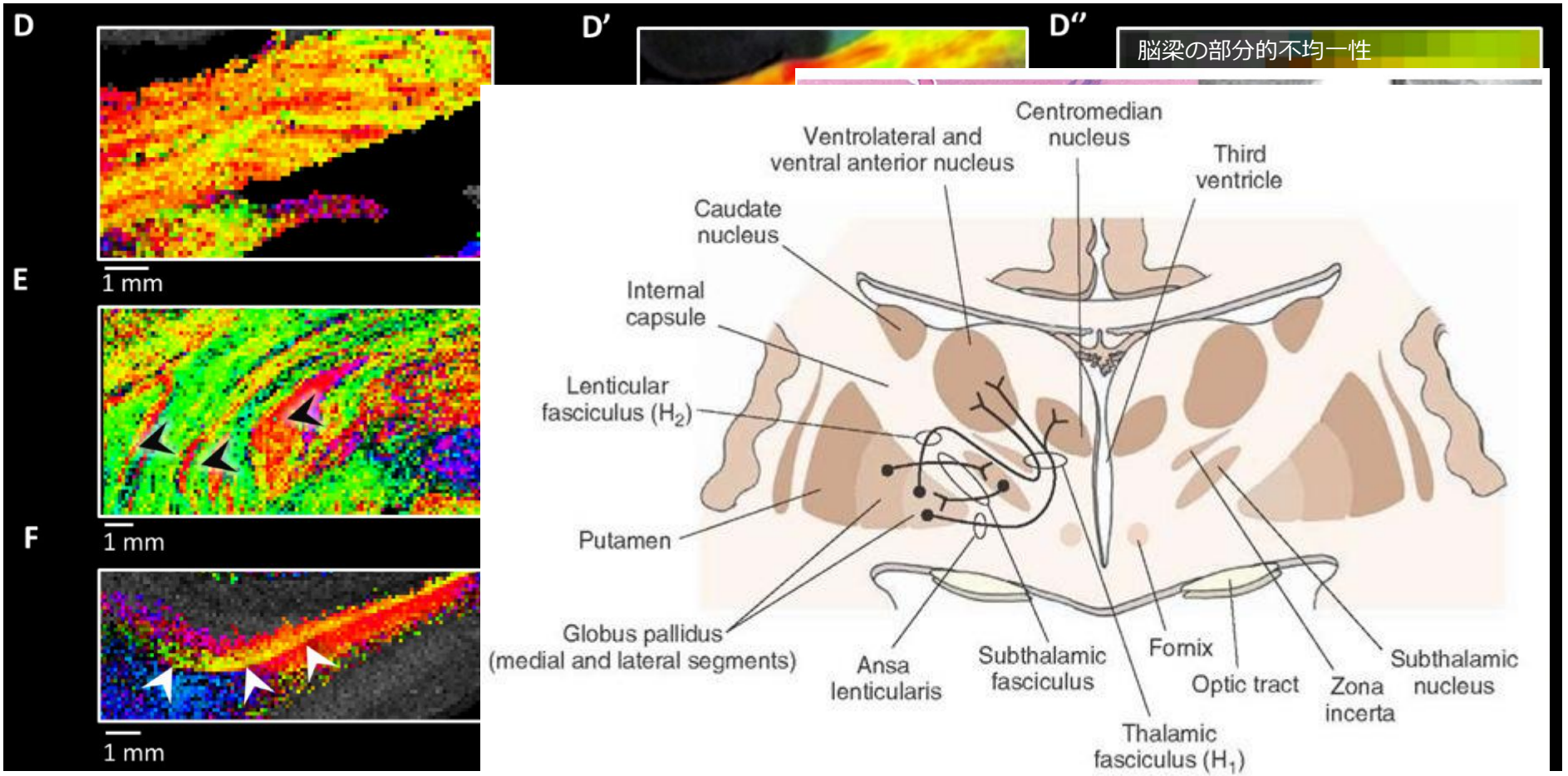


図2: Nissl-ST法と既存手法の比較

軸索が交差する領域にグリアのフレームワークが存在するだろうか？
(A)～(C)で白枠で示した領域を50×50 μm^{2}のタイルで可視化した拡大図。(D) 脳梁の局所的な不均一性. (E) 視床下核と内淡蒼球を結ぶレンズ束（Lenticular Fasciculus. 赤色で示される。黒の矢頭）の軸索が内包（緑）を通過することで「エディンガーの櫛」と呼ばれる交差繊維の入れ替わりパターンが生じる。 (F) 海馬と内嗅皮質を結ぶ角束（黄色で示される。白矢印）。μm
これらの微細な繊維構造は、Nissl-STとPLIで捉えられるが、はるかに低い解像度で測定される*in vivo*拡散MRIでは観察できない。

Fig.2

Comparison of Nissl-based structure tensor and other methods

本論文で開発された方法

光散乱計測法
(偏光イメージング)

*in vivo*拡散MRI

Fig.2

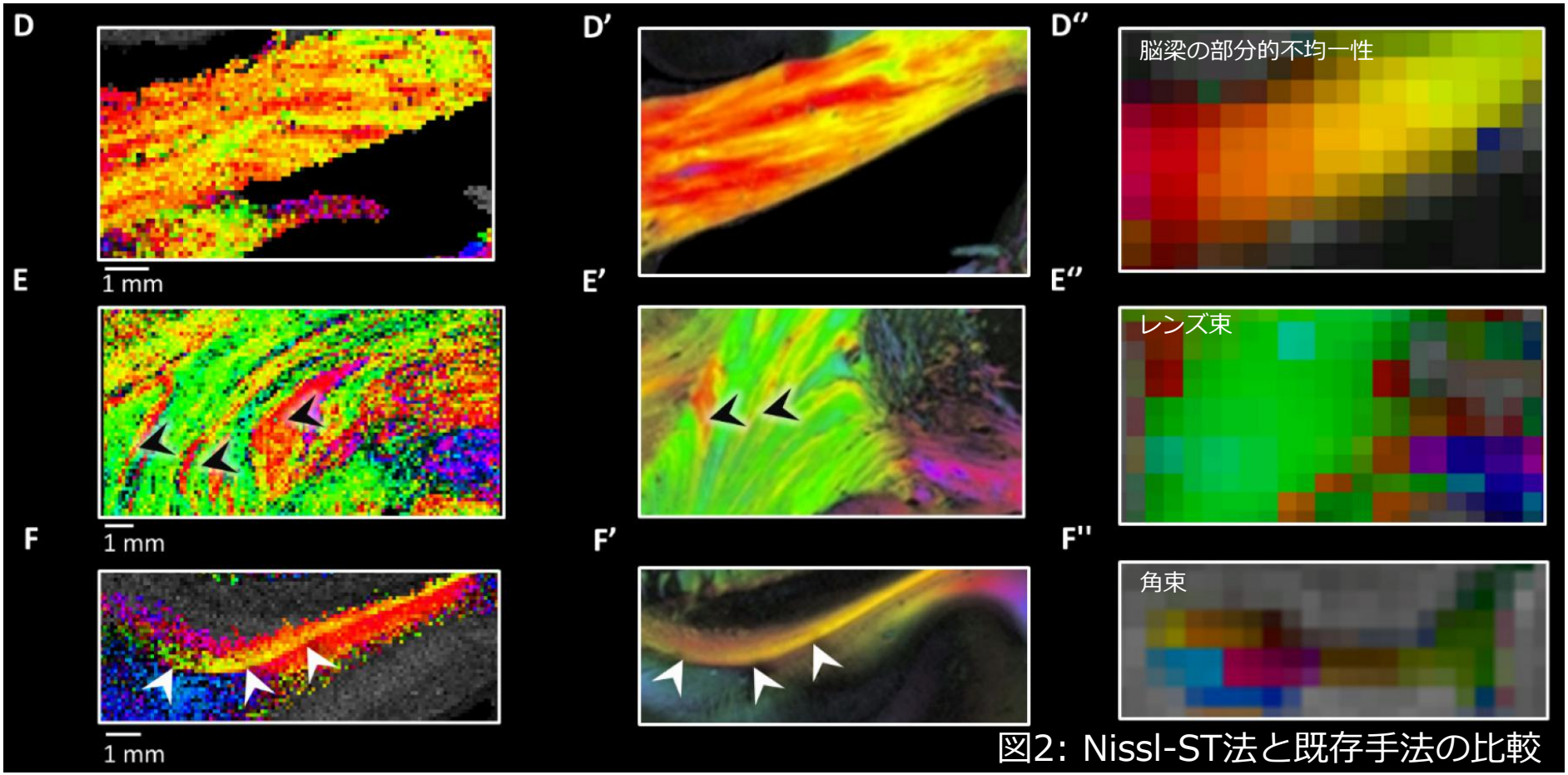
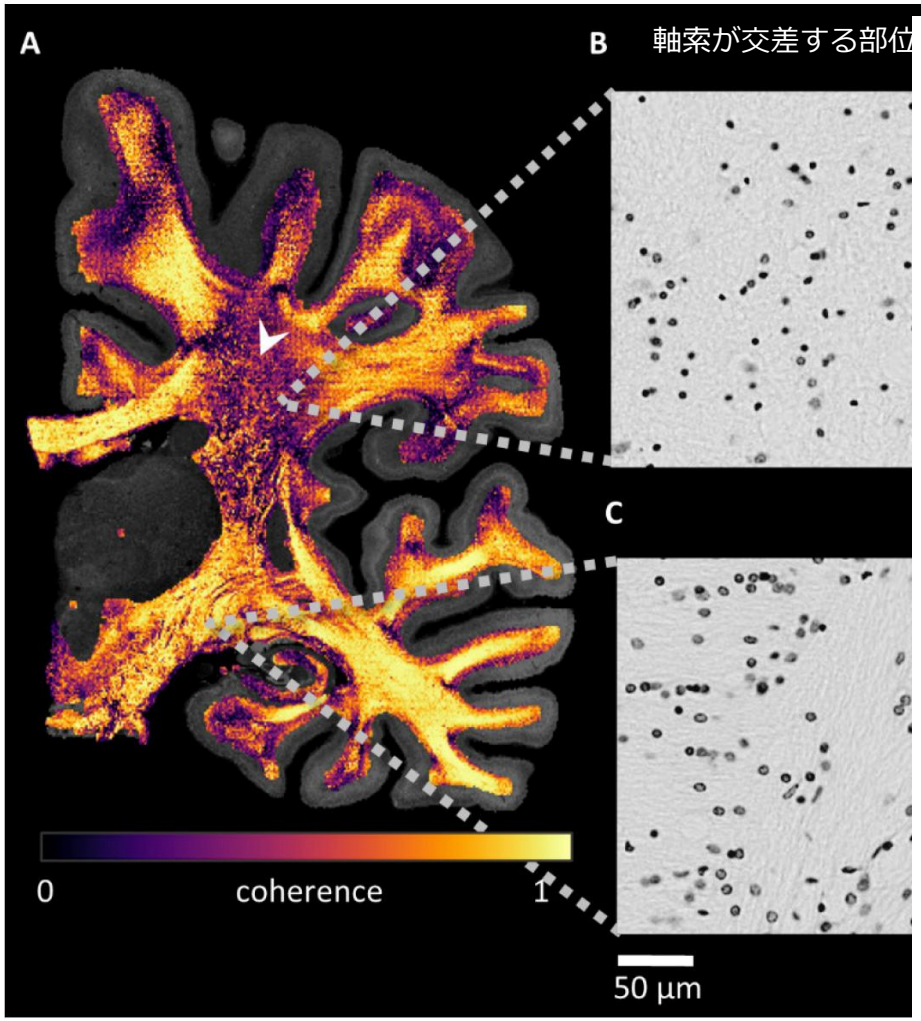


図2: Nissl-ST法と既存手法の比較

軸索が交差する領域では、グリア細胞はどのように分布しているのだろうか？この疑問は生物学的に重要な意味を持つ。もしグリアのframeworkが繊維の交差領域に存在しているとすれば、グリア細胞の空間的な構成が機能的な意味を持つという仮定が強まり、グリア細胞がある回路に特異的であり、回路間で共有されていないという証拠が得られる。筆者たちは、軸索が交差する領域でグリアの枠組みが維持されていることを裏付ける証拠を見つけた。まず、Nissl染色した画像のみを用いて、PLIから得られたマップと同様のマップを得ることができたことから、glia frameworkは脳全体の特徴であることが示唆された。第二に、下縦束を横切る面内の軸索を支持するグリア細胞は、短いグリア列の空間的構成を保持している。これらの結果は、軸索が交差する領域でもがglia frameworkが維持されていることを示唆している。

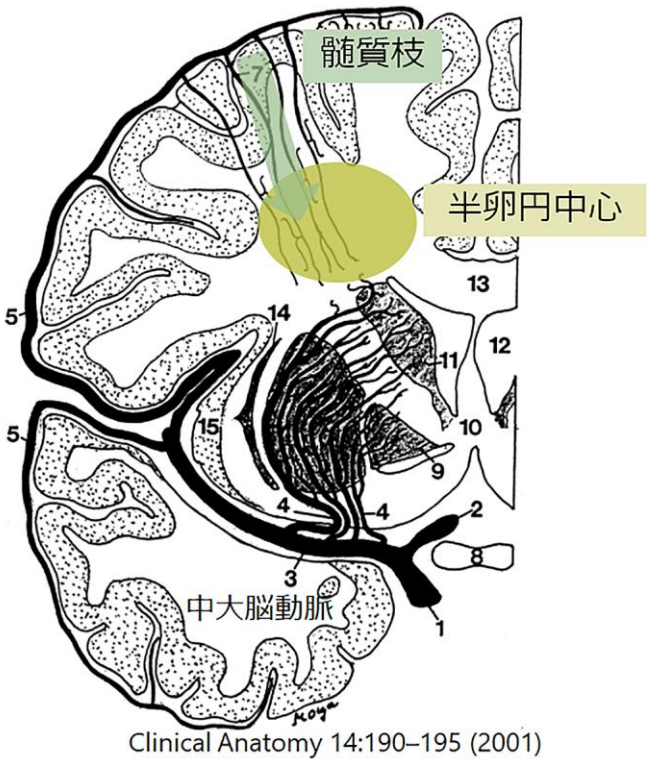
Fig.3

Coherence of Nissl-based structure tensor across the brain



解剖

・半卵円中心(centrum ovale)：側脳室上端より上の部分（側脳室がaxial像で見えていないレベル）　＊卵を半分に割ったようみみえることが「半卵円」という名前の由来
・血管支配：**髄質枝**（脳表を走行する血管から垂直に脳室方向へ向かう枝）が主体
＊半卵円中心の一部は**ACAとMCAの境界還流領域（分水嶺）に該当**する(external border zone)
＊分水嶺領域の梗塞に関してはこちらをご参照ください。

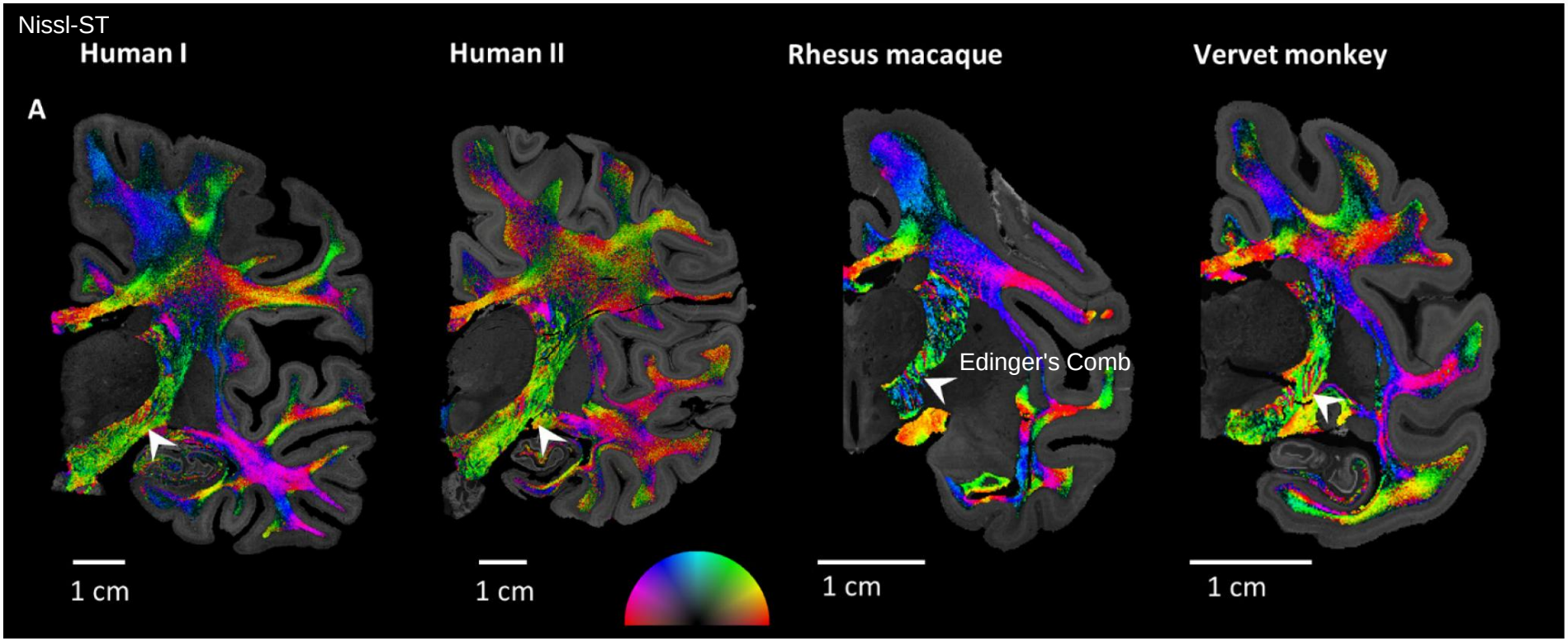


(A)図2Aと同じ脳切片での面内配向のコヒーレンスマップ。半卵円
なる。
(B) 半卵円中心の軸索交差領域の拡大図。グリア細胞の配列のばらつきが配向密度関数 (gODF; glial-rows orientation density function)に反映されている(右)。
(C) 内側-外側軸（赤）に沿った軸索が、内側-外側軸（緑）に沿った軸索と交差する、エディンガーの櫛の領域におけるグリアの配置の拡大図。この領域での交差は、グリア細胞の短い列の向きの急激な変化として現れる。
軸索交差以外の潜在的な信号源(血管や灰白質近くのニューロン)は，Nissl-STで抽出したピークの方向性に影響を与えないことがわかった。

Fig.4

Applicability of Nissl-based structure tensor across datasets

ヒト死後脳①　ヒト死後脳②　アカゲザル　ベルベットモンキー

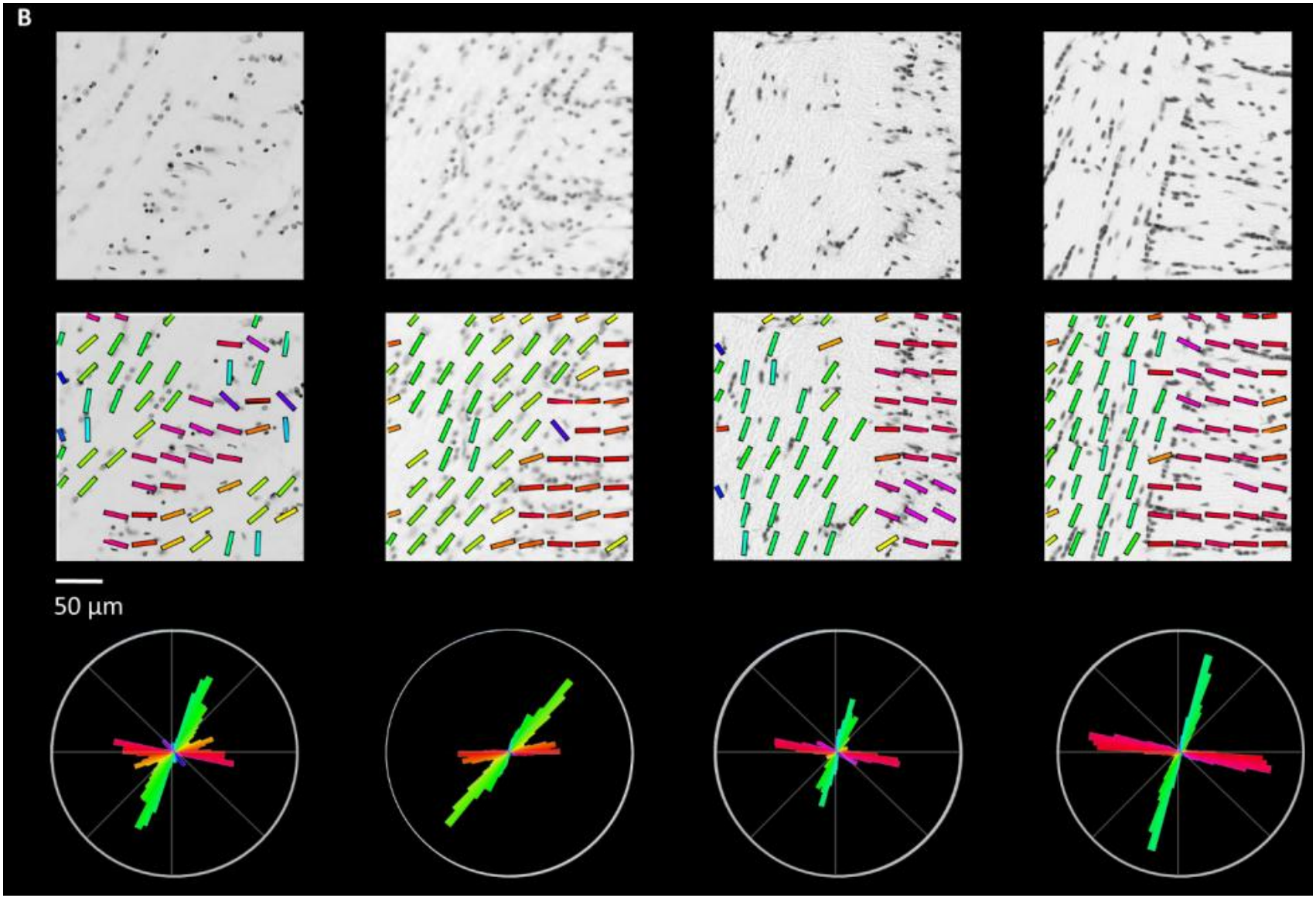


異なるデータセットおよび異なる生物種でNissl-STは適用可能だろうか？

複数のデータセットおよび種に対するNissl-STの広範な適用性を確立するために、我々は4つの独立したデータセットの組織切片にNissl-STを適用した：2つのヒトの標本および2つの非ヒト霊長類（アカゲザルとバーベットモンキー；http://brainmaps.org/）。(A)各データセットから得られたオリエンテーションマップ。Nissl-STは、データセット間で類似した特徴を持つ方位マップを抽出することに成功した。さらに、Edinger's Comb（白矢印）の領域は種を超えて保存されており、各標本でグリア列の交差が同様の特徴を示すことがわかった（図4B）。

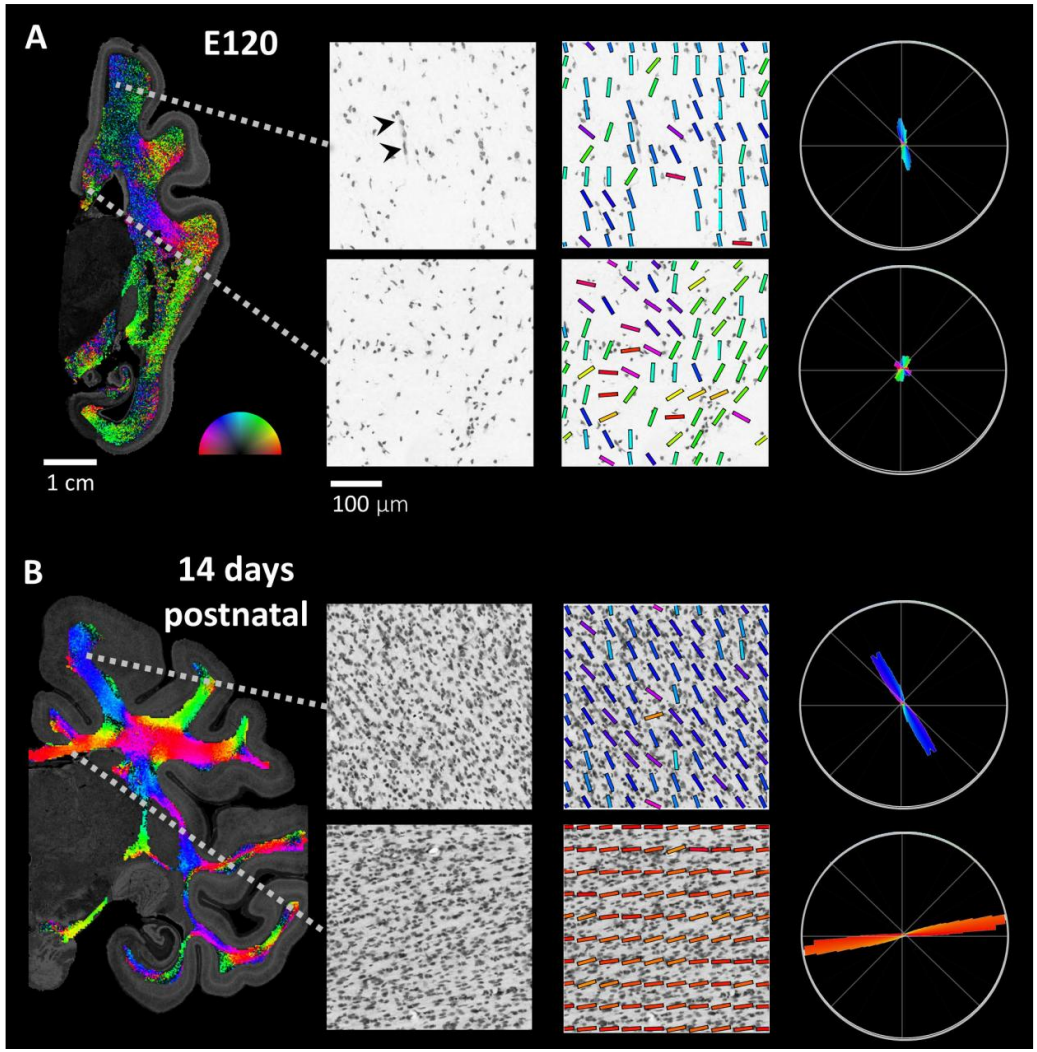
Fig.4

Applicability of Nissl-based structure tensor across datasets



(B）各標本のEdinger's Combのタイルを拡大した図（（A）の白矢印部分）。この領域では、種を超えて特徴的な軸索の交差が保存されている。

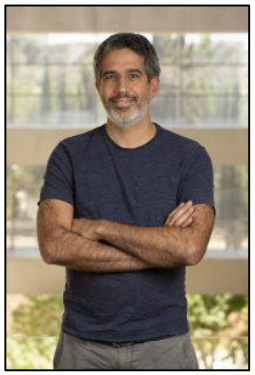
Nissl-ST reveals developmental differences in the pre- and post-natal macaque brain.



異なる細胞タイプの相対的な割合は発生に伴って変化するため、発生の初期段階ではNissl-STのシグナルの主な発生源が他の細胞タイプ（例えば、内皮細胞）である可能性があり、それによってグリアの短い列の効果が隠されてしまうのではないかと考えられる。成体のアカゲザルのデータセットを120日胚期と14日生後で比較した。これらのデータから、120日胚期ではグリア細胞（またはその前駆細胞）の密度が14日後の脳と比べて非常に低く、後者の方が成体の場合によく似ていることがわかった。さらに、E120の時点では、細胞が短い列をなして組織化されているようには見えなかった。一方、生後14日目の脳では、グリア細胞はすでに軸索の予想される方向に沿って短列に組織化されていた。したがって、今後、発生の中間段階に焦点を当てた研究が進めば、白質経路全体の髄鞘形成のプロセスと順序を明らかにすることができるだろう。

Summary

Nissl-STは、正常な発育、正常な加齢、および統合失調症のような白質に影響を及ぼす病的状態における白質の研究に今後使用できる可能性が大きい。このようなNissl-STの応用には、組織学的なデータが提示する可能性のある独自の課題を考慮する必要がある。例えば、ミクログリアの反応を伴う病理状態では、グリア細胞の空間的な分布に変化が見られることがある。

Nissl-ST、PLI、およびミエリン染色に基づく構造センサー分析に共通する特徴は、ミエリン化された軸索に対して感度が高いことである。現在のNissl-STの実装は2次元的なものであり、面内の繊維の方向性を解決することはできない。今後、同じ切片でNissl-STとPLIを直接比較することで、面内と面外の両方の方向性に対する感度の違いがより明らかになるかもしれない。
今回提案した手法をさらに発展し、Nissl-ST法を三次元データセットに適用したい。そのためには、セクション間の染色のばらつきを補正するための特殊なツールが必要となる。このようなデータセットは、神経画像データと統合することができるだろう。

Nissl-STのモデルフリーのアプローチは、Nissl染色された脳切片に、これまで使われていなかった驚くほど豊富な情報層を明らかにする。既存の手法と比較した場合のNissl-STの利点は、白質から得られる新規マップと、皮質および皮質下構造から得られるマップのコレジストレーションにある。これにより、白質構造のマップと灰白質構造のアトラスを簡単に統合することができる。