

人脳内に分布する神経伝達物質の定量的解析法の開発

矢部一徳¹、秋山佳代²、須藤伝悦³

筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

私共は、小動物の脳内神経伝達物質の分布を全領域に渡り、細胞レベルで定量的に分析する方法を開発してきた^[1-8]。更に、この方法を基に人脳を分析するための Human Brain Mapping Analyzer を開発し^[9]、様々な神経伝達物質やその関連物質の分布を解析してきた^[9-16]。今回、その中から人脳を定量分析するための検体の処理方法、標本の作製法、自家蛍光の除去法及び得られた分析結果について報告する。

1. はじめに

神経系の情報伝達は、シナプスにおける神経伝達物質の授受によって行なわれている。従って、脳内の各部位における神経伝達物質の分布を分析する事は、中枢機能を解明する上で、さらに種々の疾病の発症機序を解明する上で極めて重要である。従来の研究は、主に生化学的方法と免疫組織化学的方法によって行なわれてきた。生化学的方法は物質量や活性値を定量するのに優れているが、試料採取と前処理操作での誤差をはじめ、分析感度や物質の死後変性による誤差等によって、正確で詳細な定量値を得ることが困難であった。一方、免疫組織化学的方法では、活性物質の抗体に対する免疫性は死後比較的長い時間安定しており、各物質の分布を細胞レベルで詳細に、しかも正確に識別することが可能である。しかし、それらを定量的に分析するのに良い方法がなかった。テレビカメラを使用した画像解析装置では、直線性、再現性、感度などの点において問題がある。また、レーザーコンフォーカル顕微鏡はマクロ標本の分析には使用できない。

私共は、小動物の脳標本を蛍光免疫組織化学的に染色し、その蛍光強度の分布を細胞レベルで定量する Brain Mapping Analyzer を開発し^[1]、種々の脳内神経化学物質の分布を分析してきた^[1-8]。この解析法は、テレビカメラを用いた画像解析法や電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー法と比べて、少なくとも 4 桁以上微細で正確な分析結果を得ることができる。さらに、この装置を基に、人脳内に分布する神経化学物質を分析するための Human Brain Mapping Analyzer とその解析法を開発した^[9]。この装置によって、人脳の切片全面を数ミクロン毎に数百万領域に分割して様々な神経化学物質の分布を分析し、定量的に画像化できる他、各領域の蛍光強度値を抽出して統計処理することができる。

本報告では、この装置を利用して人脳を定量分析するための検体の処理方法、標本の作製方法、免疫

組織化学染色法、非特異的な自家蛍光の除去法、並びに得られた分析結果について報告する。

2. 標本の作製法

本実験では、神経病歴及び精神病歴を持たない 3 体の男性（50-70 歳）の脳を使用した。これらはいずれも筑波大学に医学教育・研究のために遺族より献体として提供されたものである。定量分析を行うためには、組織を細部まで均一に完全に固定しなければならない。小動物を用いた実験では、全身に固定液を灌流し、その後脳を取り出していた。しかし、人の全身を固定するには固定液が大量に必要である上、死後時間が経過しているために脱血、固定がうまくいかない可能性がある事などから、脳を取り出した後に注入固定を行なった。免疫反応性には死後時間も関係してくることから、死後 8 時間以内の脳を用いた。

2.1 人脳の固定

脳はできる限り血管を傷つけないよう硬膜を付けた状態で取り出した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で満たしたバットにガーゼを張り、その上に、脳を裏返して置いた。両側の内頸動脈及び脳底動脈にカニューレを挿入し、ペリスタポンプを用いて PBS (2ℓ) を毎分約 65 ml の速度で注入して脱血した。続いて 4%パラホルムアルデヒドと 0.2%グルタルアルデヒドを含む PBS 溶液 (6ℓ) によって注入固定を行なった。脳の硬膜をはずし、前額断の厚さ 1cm のブロックに分割し、4%パラホルムアルデヒドの PBS 溶液 (4℃) で 2 日間、後固定を行なった。さらに脳ブロックを PBS 溶液 (4℃) で 3 日間洗浄し、5%ショ糖 PBS 溶液 (4℃) に 4 日間浸漬した。ショ糖液を浸透させることによって、凍結時に組織内の氷の発生を抑制し、組織の損傷を防ぐことができる。各脳ブロックの軟膜と血管を丁寧に取り除き、ドライアイス上で急速に凍結させ、乾燥を防ぐため密封して -80℃で保存した。

2.2 標本薄切

本研究では前額断ブロックを左右半球に半切し使用した。脳ブロックを解凍し 13%ポリビニルアルコールを含む PBS 溶液に包埋し、再び凍結した。続いて、大型の凍結切片用マイクロトーム (Cryo-Microtome, PMV, Sweden) を用いて 20 μm の厚さで連続的に薄切した。薄切した標本を PBS 溶液上に浮かべてしわを伸ばし、水溶性のポリビニルアルコールを除去し、

¹ E-mail: yabek@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3231

² E-mail: akiyamak@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3330

³ E-mail: dsutoo@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3113

スライドガラス (75 x 150 mm) に張り付けた。スライドガラスには標本のはがれを防止するため、予めゼラチン-クロム明礬溶液 (ゼラチン 0.5%, クロム明礬 0.1%) でコーティングを施した。

3. 非特異的自家蛍光の除去法

高齢の人脳、特に白質のミエリン内には、若齢のラットやマウスには見られない、リポフスチン等に由来する非特異的な自家蛍光が存在する。そのため、従来の蛍光免疫組織化学的分析法では人の脳を直接分析することは困難であった。そこで、人脳の自家蛍光を除去するために幾つかの方法を試みた。

3.1 化学反応による除去法

(1) 有機溶媒による溶解：エタノール、メタノール又はクロロホルムに標本を 30 分間~24 時間浸した。(2) 酸、アルカリによる遊離・溶解：1N 塩酸に 10 分間、或いは 0.1N 水酸化ナトリウム溶液に 5 分間浸した。(3) 酸化・還元処理：i) 0.25% 過マンガン酸カリウム (KMnO₄) に 20 分間浸した後、蒸留水で洗浄し、Pal 溶液 (1% 亜硫酸カリウムと 1% シュウ酸の混合液) に 1~2 分間浸し、PBS で洗浄した。ii) 過酸化水素水に 2~3 分間浸した。iii) 水素化アルミニウムリチウム溶液又は水素化ホウ素ナトリウム溶液に 10 分間浸した。(4) 酸化漂白反応：デシケーター内で脳標本の水分を十分に除去し、飽和塩素ガスに 2 週間曝した。デシケーター内のガスを十分に吸引した後、標本を無水エタノールに 10 分間浸し、PBS で洗浄した。各処理後、非特異的蛍光物質の有無を Human Brain Mapping Analyzer で測定した。

3.2 光学的手法による除去法

顕微蛍光分光光度計 (SPM-RFL, Nikon) によって、人脳の特異的蛍光物質のスペクトルを分析し、励起波長及び干渉フィルターを調節することによる除去法を検討した。

3.3 二重測光法による除去法

未染色の脳標本を PBS で 2 時間洗浄し、水溶性の蛍光物質を取り除き、Human Brain Mapping Analyzer で各脳領域における非特異的な蛍光強度を測定した。続いて、切片を蛍光免疫組織化学的に染色し、装置の同一座標にセットし、同一条件下で再び測定した。免疫反応後の蛍光強度値より反応前の値を差し引き、純粋な免疫組織化学的蛍光強度値を求めた (図 1)。同一座標に標本をセットする際、スライドガラスの三端にガラスペンで特定の 3 点をマークして、二度目の測定の目印とした。

4. 蛍光免疫組織化学染色

目的の抗体を用いてイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) ラベルの 2 抗体法によって、蛍光免疫組織化学的に染色した。各抗体の濃度は、予備実験から決定した。免疫組織化学染色の操作手順を以下に示す。(1) 標本を PBS で 2 時間洗浄した。(2) 標準血清を切片にのせ、4°C で 2 時間反応させた後、PBS で 1 時間洗浄した。(3) 各物質に対する抗体 (第 1 抗体) を 1.2 ml 切片にのせ、4°C で 12 時間反応させた。(4) PBS で 30 分ずつ 3 回洗浄した。(5) FITC で標識化された第 2 抗体を切片にのせ、アルミホイル

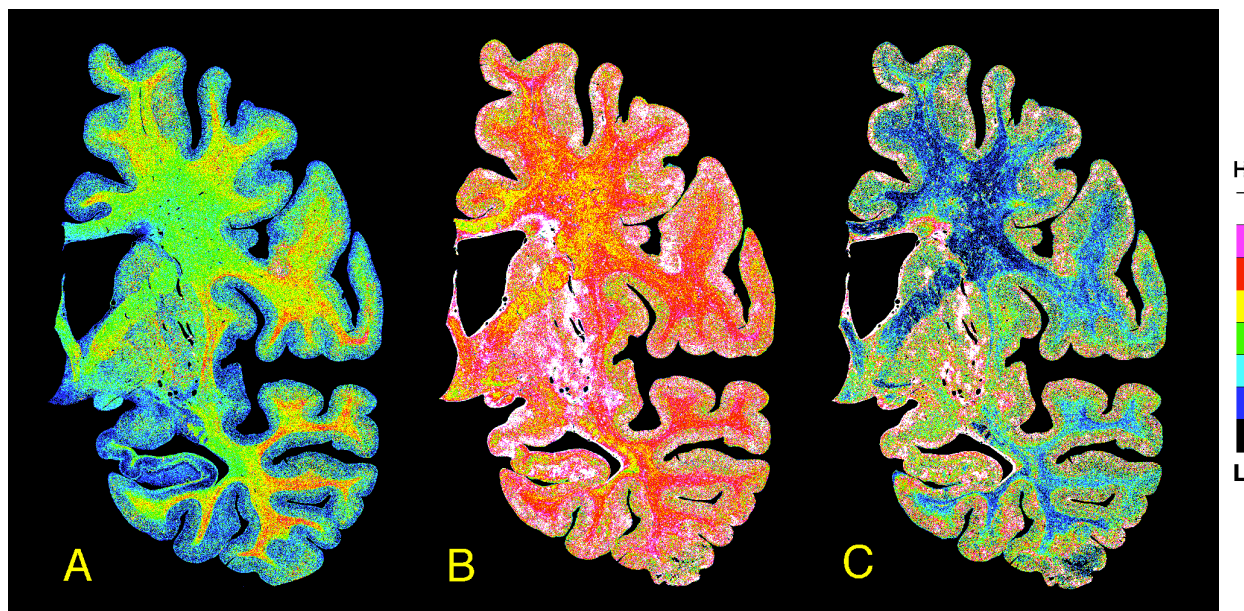


図 1. 人脳切片に見られる非特異的自家蛍光の除去法

人脳にはリポフスチンなどに起因する非特異的な蛍光物質が分布しており、蛍光免疫組織化学的に染色した標本から目的とする物質の分布を直接得ることはできない。コリンアセチル基転移酵素 (ChAT) の分析を例に、その除去方法を示す。染色前 (A) と染色後 (B) に同一条件下で各領域の蛍光強度を測定し、その差より純粋な ChAT の蛍光強度値 (C) を求めた。

A: 人脳切片における非特異的自家蛍光の強度分布図

B: ChAT 抗体による免疫組織化学染色後の蛍光強度分布図。免疫組織化学染色と自家蛍光の分布が混合している。

C: 純粋な ChAT の蛍光強度の分布図。B に示したデータから A に示したデータを差引くことによって得られる。

(J. Neurosci. Methods 85: 161-173, 1998 より引用)

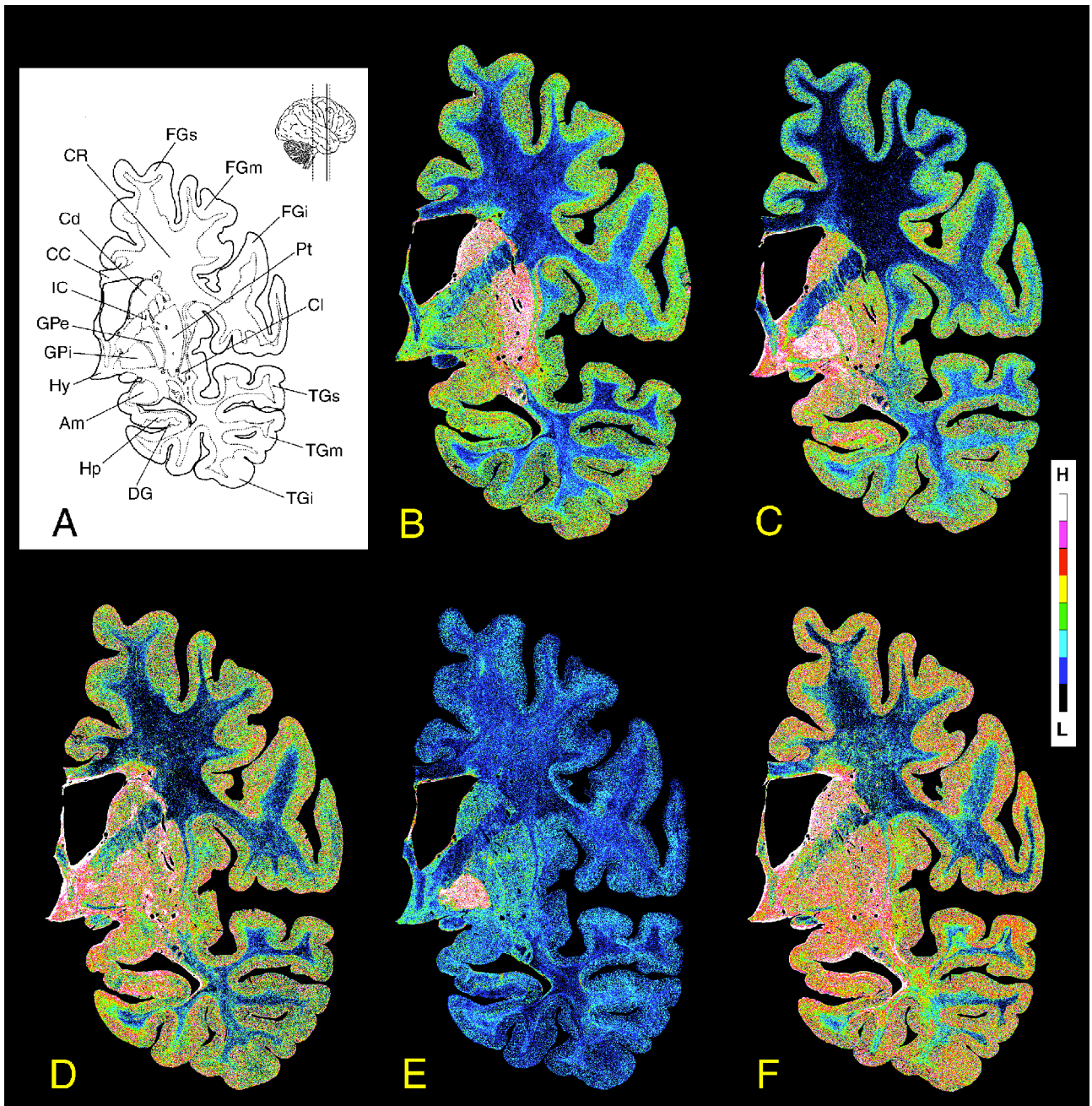


図2. 正常な人脳における様々な神経化学物質の分布図の一例

染色した脳標本を Human Brain Mapping Analyzer を用いて、50 μm 間隔で約 300 万領域に分割し、各領域における蛍光強度値を測定した。得られたデータを 8 段階の強度に分類し、カラー表示した。

A: 分析した脳切片の部位; 右上の挿入図に私共が分析した領域を点線で示した。ここに示したデータの切断面は実線で示した。Am, 扁桃; CC, 脳梁; Cd, 尾状核; Cl, 前障; CR, 放射冠; DG, 齒状回; FGi, 前頭葉下前頭回; FGm, 前頭葉中前頭回; FGs, 前頭葉上前頭回; GPe, 淡蒼球外節; GPi, 淡蒼球内節; Hp, 海馬; Hy, 視床下部; IC, 内包前脚; Pt, 被殻; TGi, 側頭葉下側頭回; TGm, 側頭葉中側頭回; TGs, 側頭葉上側頭回

- B: タイロシン水酸化酵素 (TH) の免疫組織化学的分布図
- C: グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の免疫組織化学的分布図
- D: グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の免疫組織化学的分布図
- E: サブスタンス P (SP) の免疫組織化学的分布図
- F: カルモジュリン (CaM) の免疫組織化学的分布図

(B&F: *J. Neurosci. Res.* **63**: 369-376, 2001; C&D: *Human Brain Mapping* **11**: 93-103, 2000; E: *Neurosci. Res.* **35**: 339-346, 1999 より引用)

で遮光し、室温で 3 時間反応させた。以後の操作は全て遮光下で行なった。(6) PBS で 3 時間ずつ 6 回洗浄した。(7) 10%グリセリン PBS 溶液で封入した。標本を 4°C の暗所に保管し、直ちに分析した。蛍光免疫組織化学染色の際に、ラットの脊髄切片を人脳標本と同時に染色し、染色条件の指標とした。蛍光免疫組織化学染色された標本は、暗所低温下で一週間は安定である。

5. 定量分析

分析には Human Brain Mapping Analyzer[®]を用いた。この装置は落射蛍光顕微鏡のカメラマウントに高感度の光電子増倍管をセットしてあり、ピンホールを通して、標本の微細な領域からの特定な蛍光強度を計測する装置である。顕微鏡のステージはコンピューターで制御されており、標本全面の蛍光強度の分布を細胞レベルで一度に分析できる。ステージの最大可動範囲は 150 x 150 mm、最小測光間隔は 0.25 μ m、測光スピードは 100 領域/秒である。

測定条件： 励起波長 420-490 nm, 干渉フィルター 530 nm, 光電子増倍管の印加電圧 850 V, 対物レンズ 20 x / 0.5 (倍率/開口数), 測光間隔 50 μ m, 視野絞り 40 μ m, 測光絞り 100 μ m。本研究では、1 枚の脳標本から約 300 万領域のデータを得た。得られた蛍光強度値を 8 段階にカラー表示し、各物質の分布を解析した。ウランガラスを蛍光強度のスタンダードとして使用した。

6. 結果と考察

高齢の人脳にはリポフスチン等に由来する自家蛍光が存在するため、小動物の脳標本のように直接、分析することが出来ない。非特異的自家蛍光は、有機溶媒、酸・アルカリ、過酸化水素水による酸化処理、水素化アルミニウムリチウムや水素化ホウ素ナトリウムによる還元処理では、ほとんど消去できなかった。過マンガン酸カリウムによる酸化処理は、非特異的自家蛍光の強度を約 50 % 減少させたが、組織標本が痛み、免疫組織化学染色に使用する事ができなかった。塩素ガスによる酸化漂白反応は自家蛍光の強度を約 90 % 減少させたが、再現性に問題があった。さらに、自家蛍光は広い波長領域の励起光で励起され、発せられる蛍光も広い波長領域に渡るため、励起波長の選択や干渉フィルターによって、免疫組織化学的蛍光と自家蛍光を分離することはできなかった。

そこで、Human Brain Mapping Analyzer を用いて免疫組織化学染色前後に同一条件下で同じ部位の蛍光強度を 2 回測光し、反応後の値から反応前の値を差し引く二重測光法を用いて純粋な蛍光強度値を得た。この方法は、化学的反応を用いた消去法と異なり、蛍光の退色や組織標本の痛みもほとんど無く、最も正確で再現性があった(図 1)⁹⁾。この方法によって得られた各物質の純粋な蛍光強度の分布を図 1 及び図 2 に示している。

コリンアセチル基転移酵素 (アセチルコリンの合成酵素, ChAT)^{9),10)}、タイロシン水酸化酵素(カテコルアミンの合成酵素, TH)^{10),16)}、グルタミン酸脱炭酸酵素(GABA の合成酵素, GAD)¹⁴⁾、グルタミン酸脱水素酵素(グルタミン酸のレベルを調節する酵素,

GDH)¹⁴⁾、サブスタンス P (SP)¹³⁾ 及びカルモジュリン(CaM)¹⁶⁾ の分析の結果、それぞれの物質は脳領域に依存して分布しており、各物質の分布には差異がみられた。特に、尾状核、被殻及び淡蒼球などの領域で物質間に特徴的な分布が観察された。ChAT は、被殻、尾状核、淡蒼球、扁桃、前障などの領域に高レベルで分布していた。TH は尾状核と被殻で特に高い分布が見られた。GAD のレベルは淡蒼球と視床下部で最も高く、淡蒼球の外節よりも内節に高い分布が見られた。GDH は灰白質全体に比較的均一に分布していたが、被殻、尾状核、淡蒼球、視床下部などに高レベルで存在した。SP は淡蒼球の内節にのみ高レベルで局在していた。CaM は灰白質の全ての領域で比較的高い分布を示したが、尾状核と被殻のレベルが最も高かった。本法によって得られた結果は以前の生化学的・組織化学的観察結果と対応しており、正確な分布と定量値を細胞レベルで得ることができた。

今回確立した分析方法は、従来の方法と比較して著しく安定した正確な結果が得られる。こうして得られる分析結果は、中枢機能の解明や種々の神経疾患の発症機序解明のための基礎的データを提供するものである。

参考文献

- [1] 須藤伝悦, 秋山佳代, 前田一郎. 脳内神経伝達物質分布分析のための顕微測光装置システムの開発, 日本薬理学雑誌 91 (1988) 173-180.
- [2] D. Sutoo, K. Yabe, K. Akiyama, Atlas of the rat brain: quantitative distribution of the choline acetyltransferase, *Kitasato Arch. Exp. Med.* 64 (1991) 221-262.
- [3] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, K. Kohno, Multiple analysis of tyrosine hydroxylase and calmodulin distributions in the forebrain of the rat using a microphotometry system, *Brain Res. Bull.* 26 (1991) 973-982.
- [4] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, N. Nishida, Quantitative immunohistochemical distribution of choline acetyltransferase in the rostral forebrain of the rat, *Neurosci. Res.* 11 (1991) 63-70.
- [5] K. Akiyama, K. Yabe, D. Sutoo, Quantitative immunohistochemical distributions of tyrosine hydroxylase and calmodulin in the brains of spontaneously hypertensive rats, *Kitasato Arch. Exp. Med.* 65 (1992) 199-208.
- [6] M. Hanawa, T. Asano, K. Akiyama, K. Yabe, K. Tsunoda, T. Tadano, D. Sutoo, Effect of Zena F-III, a liquid nutritive and tonic drug, on the neurochemical changes elicited by physical fatigue in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66 (2000) 771-778.
- [7] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, A novel technique for quantitative immunohistochemical imaging of various neurochemicals in a multiple-stained brain slice, *J. Neurosci. Methods* 118 (2002) 41-50.
- [8] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Comparison analysis of distributions of tyrosine hydroxylase, calmodulin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a triple stained slice of rat brain, *Brain Res.* 933 (2002) 1-11.
- [9] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative mapping analyzer for determining the distribution of neurochemicals in the human brain, *J. Neurosci. Methods* 85 (1998) 161-173.

- [10] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, K. Kohno, Quantitative analysis of immunohistochemical distributions of cholinergic and catecholaminergic systems in the human brain, *Neuroscience* 58 (1994) 227-234.
- [11] K. Yabe, D. Sutoo, K. Akiyama, K. Kohno, Quantitative immunohistochemical distributions of some neurotransmitters and related enzymes in the human brain, XIIth International Congress of Pharmacology (Montréal, Canada), 1994.
- [12] K. Yabe, K. Akiyama, D. Sutoo, Quantitative immunohistochemical distributions of various neurochemicals in the human brains, XIIIth International Congress of Pharmacology (München, Germany), 1998.
- [13] D. Sutoo, K. Yabe, K. Akiyama, Quantitative imaging of substance P in the human brain using a brain mapping analyzer, *Neurosci. Res.* 35 (1999) 339-346.
- [14] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative maps of GABAergic and glutamatergic neuronal systems in the human brain, *Human Brain Mapping* 11 (2000) 93-103.
- [15] D. Sutoo, K. Yabe, K. Akiyama, Quantitative distribution of various neurochemicals in the human brain using a human brain mapping analyzer, In: T. Kato (Ed.), *Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia*, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 45-46.
- [16] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative imaging of tyrosine hydroxylase and calmodulin in the human brain, *J. Neurosci. Res.* 63 (2001) 369-376.