

多重免疫組織化学染色標本の定量的解析法の開発

秋山佳代¹、矢部一徳²、須藤伝悦³

筑波大学人間総合科学等支援室（医学系）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

小動物や人の組織切片に分布する生理活性物質などの様々な化学物質を、組織全体にわたり細胞レベルで定量し画像化する Brain Mapping Analyzer を開発した^[1,2]。この装置を用いて、同じ切片上に混在する複数の物質の分布を同時に測定して相関的に解析する、世界で初めての方法を開発した^[3,4]。今回、ラット脳の同一切片から三種類の物質を個別に定量し、それらの分布を比較解析した例を報告する。

1. はじめに

蛍光免疫組織化学染色法は、抗原抗体反応を利用して、組織切片上での標的化学物質の分布を詳細かつ正確に検出する手法である。スライドガラス上で、切片内に局在する標的化学物質（抗原）に、蛍光物質を標識した抗体を反応させて、蛍光顕微鏡下で蛍光物質の分布を通して分析するものである。

私共は、免疫組織化学染色した切片の蛍光強度分布を定量し画像化する Brain Mapping Analyzer を開発した^[1,2]。この装置は、落射蛍光顕微鏡の光路にピンホールを挿入しており、切片内の微小な領域だけを照射して、そこから発せられる蛍光だけを選択的に測定することができる。さらに、切片を載せた電動ステージをコンピューター制御の下で二次元方向に移動させて、切片全面をスキャンしながら蛍光強度分布を分析する。ステージの可動範囲が広いので、一度に小動物や人の脳切片全体を分析することが可能である。光検出器として高感度の光電子増倍管をセットしており、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。

今回 Brain Mapping Analyzer を用いて、同一切片上に複雑に混在する複数の物質の分布を定量し、それらを相関的に解析する方法を開発した^[3,4]。一例として、ドーパミン（神経伝達物質の一つ）の合成を律速段階で調節するタイロシン水酸化酵素（TH）と、この酵素活性を調節しているカルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II（CaMKII）及びカルモジュリン（CaM）のラット脳内での分布を解析し^[3]、先に報告した CaM 依存性のドーパミン合成メカニズム^[5,6]を組織化学的に再確認した。

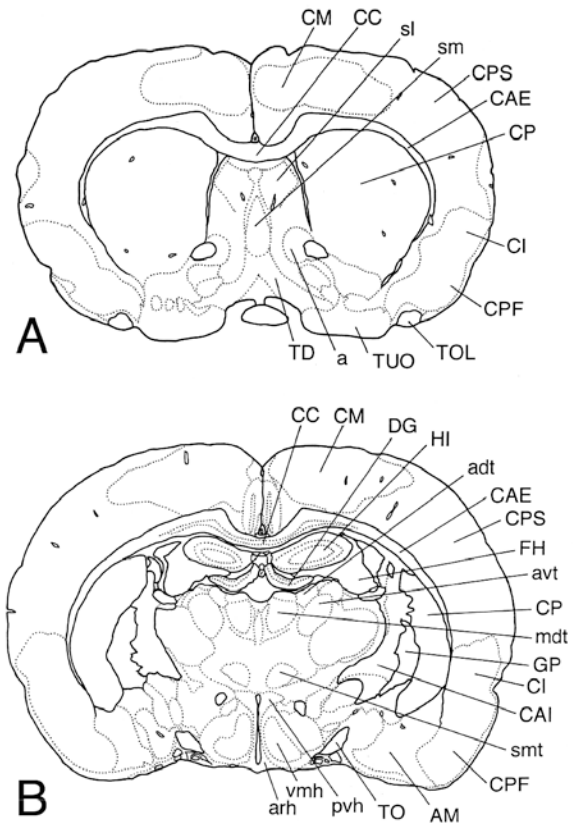


図 1. 分析したラット脳領域

耳孔線より吻側へ約 8.0 mm (A) 及び 5.1 mm (B) のラット脳の冠状切片を分析した。

図中の略字は以下の通りである： a, 側坐核; adt, 視床（背側前核）; AM, 扁桃; arh, 視床下部（弓状核）; avt, 視床（腹側前核）; CAE, 外包; CAI, 内包; CC, 脳梁; CI, 島皮質; CM, 運動皮質; CP, 線条体; CPF, 梨状皮質; CPS, 1 次体性感覚皮質; DG, 齒状回; FH, 海馬糸; GP, 淡蒼球; HI, 海馬; mdt, 視床（背内側核）; pvh, 視床下部（室傍核）; sl, 外側中隔核; sm, 内側中隔核; smt, 視床（内側下核）; TD, 対角帯; TO, 視索; TOL, 外側嗅索; TUO, 嗅結節; vmh, 視床下部（腹内側核）

2. 方法

2.1 脳の固定及び切片作製

定量的な免疫組織化学標本を作製するには、組織を細部まで均一に固定する必要がある。心臓から固定液を注入し、血管系を通して全身に固定液を循環させて速やかに灌流固定を行った。

¹ E-mail: akiyamak@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3330

² E-mail: yabek@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3231

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

(1) Wistar ラットを麻酔し、心臓の動脈側からリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 100 ml) を注入して、静脈側から全身の血液を脱血した。(2) 続いて、新しく調製した固定液 (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, 250 ml) を灌流し、全身を固定した。(3) 脳を取り出し、厚さ約 5 mm のブロックに分割し、4°Cの固定液中で 5 時間、後固定した。(4) 脳ブロックを PBS で 1 時間 (15 分×4 回) 洗浄後、5%ショ糖を含む PBS 溶液に 4°Cで 12 時間浸漬した。この操作は、凍結操作時に組織内に氷が発生して、組織が損傷するのを防ぐものである。(5) 凍結標本用の包埋剤に脳を包埋し、ドライアイス上で凍結した。(6) クリオスタットで 20 μm の厚さに薄切し、ゼラチン・クロム明礬溶液でコーティングしたスライドガラスに貼り付けた。ゼラチンのコーティングは、反応中にスライドガラスから切片がはがれるのを防ぐ役目を持つ。本実験では、耳孔線から吻側へ約 8.0 mm (図 1 A) 及び約 5.1 mm (図 1 B) の切片を用いた。

2.2 免疫組織化学染色

同一切片を、TH、CaMKII 及び CaM の各抗体を用いて、イソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) 標識の 2 抗体法による蛍光免疫組織化学染色を行った。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) スライドガラスに貼り付けた切片を PBS で洗浄し、包埋剤を充分に取り除いた。(2) 標準血清を切片にのせ、4°Cで 2 時間反応した後、PBS で洗浄した。(3) 標的物質に対する抗体 (第 1 抗体) を切片にのせ、4°Cで 12 時間反応した後、PBS で洗浄して未反応の抗体を除去した。(4) FITC で標識した第 2 抗体を切片にのせ、遮光下の室温で 3 時間反応した。(5) 遮光下で数時間、PBS を交換しながら丁寧に洗浄した。未反応の抗体が切片上に残ると分析値に誤差が生じるため、充分に洗浄する必要がある。(6) 10%グリセリン PBS 溶液で封入し直ちに分析した。標本の保管は、4°Cの暗所で行う。

最初に TH の抗体で切片を染色し、蛍光強度を測定した。次に、PBS 中で丁寧にカバーガラスをはずし、CaMKII に対する抗体で染色して、標本を同じ座標にセットして測定した。同様に、同じ切片を CaM に対する抗体で染色し、同一座標下で測定した。2 番目以降の染色操作は、全て遮光下で行った。

各物質の蛍光強度の分析後、切片をニッスル染色或いはアセチルコリンエステラーゼ染色し、脳アトラスを参照して各部位を同定した。

2.3 分布分析

蛍光免疫組織化学染色した脳切片の全領域を、Brain Mapping Analyzer によって、20 μm 間隔で約 25 万~31 万領域に分割して測光した。最初に染色した物質 (TH) のデータは、染色後の測定から直接得られた。2 番目以降に染色した物質 (CaMKII と CaM) のデータは、各物質の染色前後の蛍光強度値の差から得られた。即ち、各領域の 2 回目と 1 回目の蛍光強度値の差から CaMKII のデータが得られ、3 回目と

2 回目の蛍光強度値の差から CaM のデータが得られた。これらのデータをコンピューターによって画像化し、同一切片内の各物質の分布の違いを検討した。

この方法では、切片をステージの同じ位置に正確に再配置する必要がある。その手法として、スライドガラスの端に三点のマークを付け、最初の測光の際に、これらのマークの座標値を測定しておく。次に、2 回目以降の測光で、ステージの微動装置を調節して、マークを正確に同じ座標にセットした。この操作による再配置の誤差は、1 μm 未満であった。

測光条件は、以下の通りである。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 \times /0.75 (倍率/開口数)、視野絞り 20 μm 、測光絞り 100 μm 、測光間隔 20 μm 、測光スピード 100 領域/秒。なお、液厚 100 μm の 1 mM 硫酸キニーネから発せられる蛍光強度を 100 とし、相対的な蛍光強度値を求めた。

3. 結果

3.1 各物質の分布

図 2 に、ラット脳の各領域における TH、CaMKII 及び CaM の分布図を示した。図 3 には、これらの分布を比較した図を示し、さらに図 4 には、各物質の実際の蛍光強度値を示した。TH、CaMKII 及び CaM は脳のほとんど全ての領域で観察されたが、その分布は各物質により異なっていた。

TH の分布： 線条体、視床下部、嗅結節、側坐核に高レベルで分布していた。線条体の吻側領域では、背外側から腹内側へ向かう濃度勾配が観察され、背外側部は腹内側部に比べて約 70%高レベルであった。

CaMKII の分布： TH や CaM に比べて、領域によるレベルの差が大きかった。海馬、大脳皮質、線条体、側坐核、嗅結節、外側中隔核、扁桃に高レベルの分布がみられ、海馬のレベルが最も高かった。視床下部は、低~中レベルであった。線条体吻側領域では、背側及び腹側部のレベルが中央部に比べて約 35%高かった。

CaM の分布： 他の二物質に比べて、比較的均一に分布していたが、大脳皮質、視床下部、嗅結節、海馬、側坐核、線条体には高レベルで分布していた。線条体吻側領域では、背外側部や腹側部のレベルが中央部よりも高かった。

3.2 三物質の分布の比較

TH、CaM、CaMKII は、線条体、側坐核及び嗅結節において共に高レベルで分布していた。線条体では特に、吻側背外側部と尾側部の領域において、全ての物質が極めて高いレベルを示した。運動皮質においても、三物質は比較的高レベルであった。

視床下部では、TH と CaM レベルが非常に高く、特に弓状核は強く染色されていたが、CaMKII レベルは低かった。海馬の CaMKII レベルは著しく高いが、TH と CaM は中~高レベルであった。CaMKII レベルは外側中隔核で高く、対角帯で低かったが、TH と CaM は両領域とも中レベルであった。

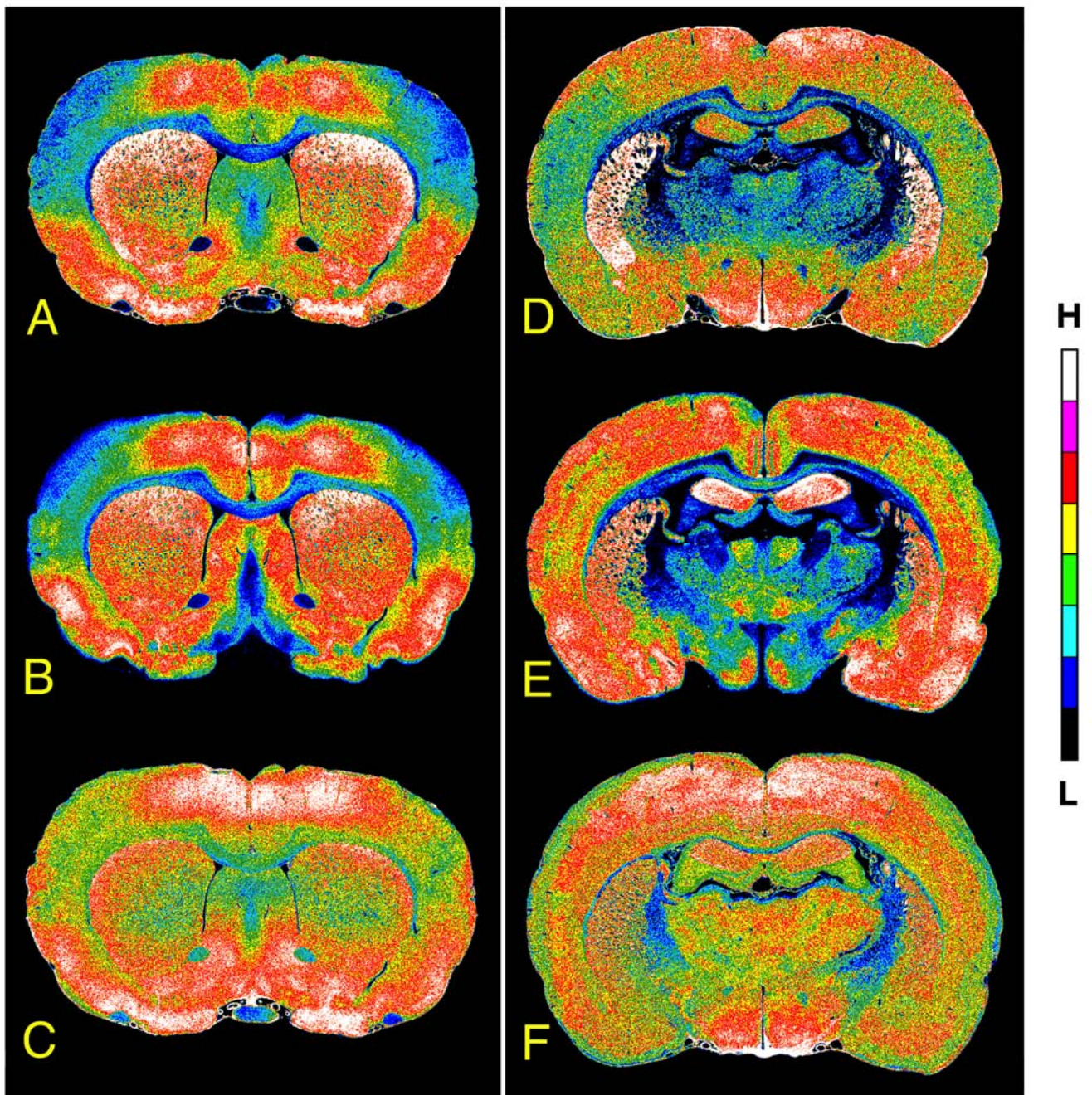


図2. 同一組織標本から得られた3つの異なる神経化学物質の定量的分布図

三重に染色したラット脳切片の免疫組織化学標本から、Brain Mapping Analyzer によって、TH (A, D)、CaMKII (B, E) 及び CaM (C, F) 分布の定量的データを抽出した。A-C は図 1A の領域、D-F は図 1B の領域での切片を分析したものである。ラット脳切片を 20 μm 間隔で測光し、約 25 万領域 (A-C) 及び約 31 万領域 (D-F) における各物質の濃度分布を検出した。得られたデータを 8 段階のレベルに分類し、カラー表示した。

(*Brain Res.* **933** (2002) 1-11 より引用)

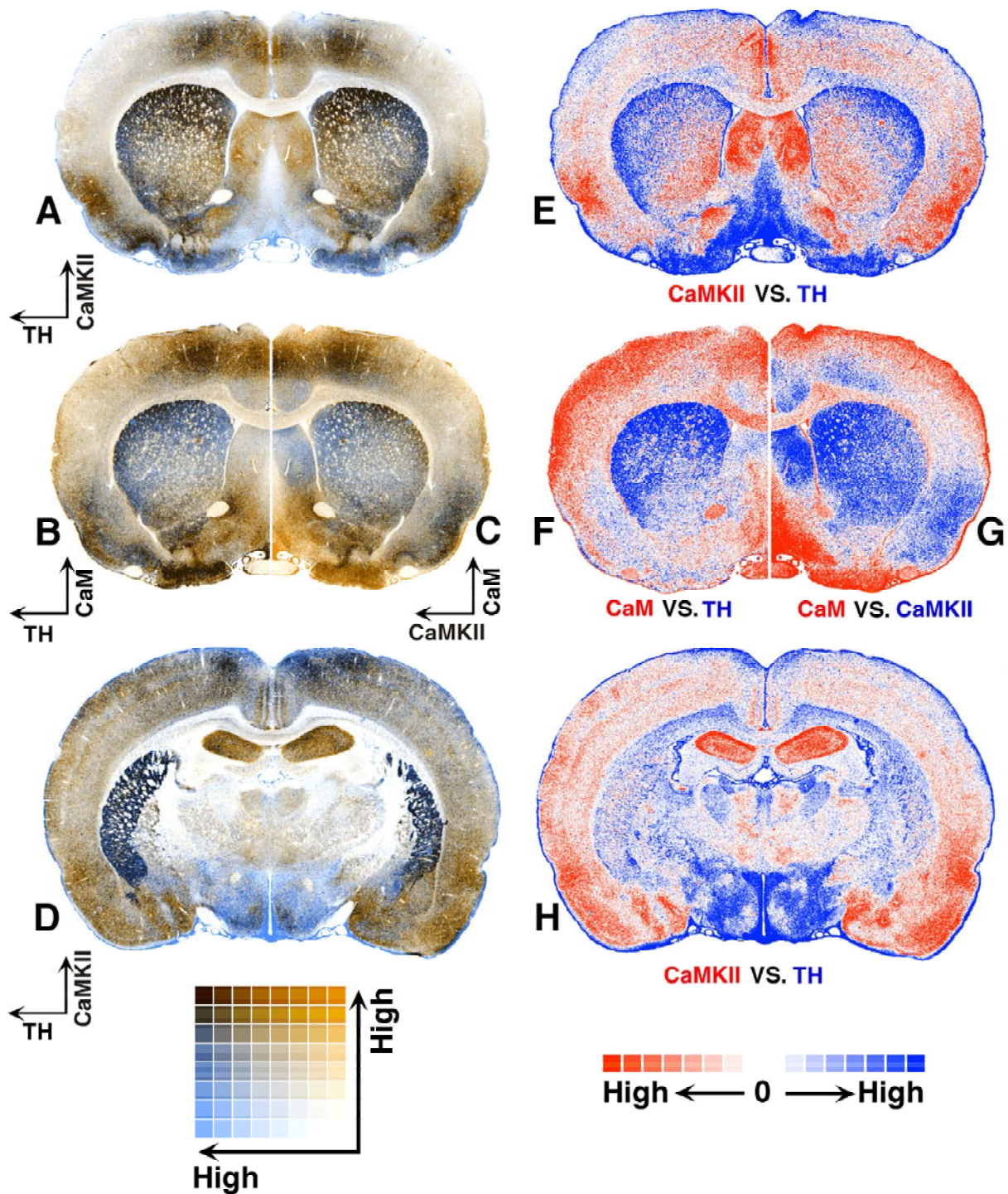


図3. 同一組織標本内での複数の神経化学物質の比較解析

図2に示したTH、CaMKII及びCaMのデータを用いて、物質間での分布の比較解析を行った。A-C及びE-Gは図1Aの領域、D及びHは図1Bの領域での切片を解析した結果である。

A-D: 2つの物質の分布を同一座標上で比較した。各物質の蛍光強度を青又は黄の濃淡で8段階に分割し、それらを組み合わせた64色で表示している。A及びD: TH(青)とCaMKII(黄)、B: TH(青)とCaM(黄)、C: CaMKII(青)とCaM(黄)の分布の関係を比較している。

E-H: 同一座標上における2つの物質間の濃度差を、相対的に赤と青の濃淡で各8段階に表示した。E及びH: THに比べてCaMKIIレベルが高い領域を赤で示し、CaMKIIに比べてTHレベルが高い領域を青で示している。同様に、CaM(赤)とTH(青)の分布の差をFに、CaM(赤)とCaMKII(青)の分布の差をGに示している。

(Brain Res. 933 (2002) 1-11 より引用)

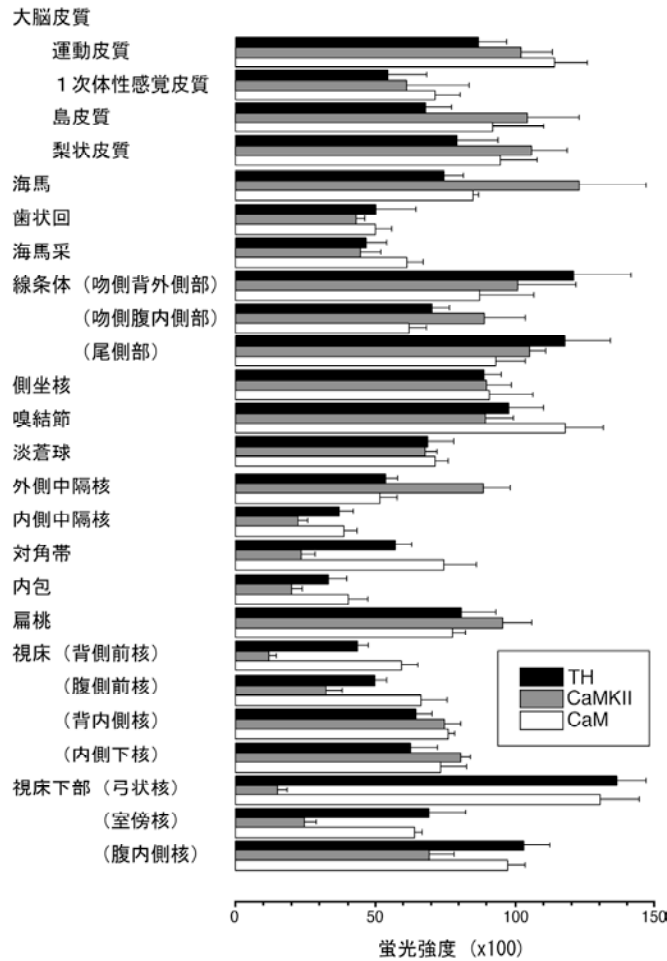


図4. 各脳領域における TH、CaMKII 及び CaM の免疫組織化学的蛍光強度値

三重免疫組織化学染色したラット脳切片から Brain Mapping Analyzer によって各物質の濃度を抽出した。10 匹のラットから同一領域の切片をそれぞれ 2 枚ずつ (合計 20 枚) 選んで分析し、各領域あたり約 1000-3000 個のデータを集め、平均値±標準偏差値を求めた。各領域のデータは、標準物質である 1 mM 硫酸キニーネの蛍光強度を 100 とした時の相対的蛍光強度値で示している。(Brain Res. 933 (2002) 1-11 より引用)

4. 考察

神経伝達物質は、脳内の様々な情報を伝え、その働きを調節する重要な役割を担っている。脳の各部位の機能を知るためには、ドーパミンを始めとする神経伝達物質の分布を詳細かつ定量的に分析することが不可欠である。私共は、その分析法と装置の開発を行い、種々の物質の分布を細胞レベルで定量し画像化する、Brain Mapping Analyzer を完成した^{1),2)}。この装置は、国内外の大学等で様々な研究に使用されている。

この装置を用いて実験を重ね、日常の生活を通して摂取されたカルシウムが脳内の CaM 依存系を活性化して TH を賦活化し、引き続き線条体や側坐核でドーパミンの合成能を亢進する事を、他に先駆けて解明した¹⁷⁻⁹⁾。この基礎的メカニズムを基に、脳内ドーパミン作動系に異常が示唆されている幾つかの疾病

を分析し、新たな発症機序の解明や予防法と治療法を開発するための基礎的データを提供してきた^{15, 6, 10-17)}。

脳の構造と機能は極めて複雑で、しかも緻密であるため、部位が僅かにずれるだけで機能が異なっている。従って、脳の様々な機能や神経化学物質の相互作用を解析するためには、同一組織切片上で複数の物質の分布を定量することが不可欠である。これまで、同一切片上で各物質をそれぞれ異なる蛍光物質で標識し、定性的に観察する方法はあったが、それらを定量するのに良い方法がなかった。今回、Brain Mapping Analyzer を用いて、多重免疫組織化学染色の前後に同一条件下で蛍光強度を測定し、精密にその差を求めることにより、複数の物質の分布を定量的に比較解析することに成功した^{13,4)}。

本法では、各物質を同じ蛍光物質 (FITC) で標識しているため、同一の励起波長と干渉フィルターを使用することができた。標本を同一条件下で測光することにより、正確な差を得ることができる。さらに、ピンホールを通して目的とする微小領域だけを照射し、各領域の照射時間も 0.01 秒と短いため、励起光による蛍光の退色がほとんど無く、多重測光の際に極めて再現性の高いデータが得られた。

本実験において、線条体と側坐核に、TH、CaM 及び CaMKII が共に高レベルで分布していた。本結果を既報の結果^{15,9)}と合わせて考えると、これらの領域におけるドーパミン合成は、CaM 及び CaMKII を介してカルシウムによって調節されることが示唆される。嗅結節と運動皮質においても、三物質が比較的高いレベルで分布しており、これらの領域においても、CaM 系を介して TH が活性化される可能性が示唆される。一方、視床下部において、TH と CaM は高レベルで分布していたが、CaMKII レベルは比較的低かった。このことから、視床下部における TH の活性化は、CaMKII 以外のプロテインキナーゼによって主に調節される可能性が考えられる。

5. まとめ

Brain Mapping Analyzer を用いて、同一組織切片上に分布する複数の化学物質の分布を定量し、相関的に解析する方法を開発した。一例として、ラット脳内の TH、CaMKII 及び CaM を解析し、線条体と側坐核において、三物質が共に高レベルで分布することを確認した。これらの領域において、カルシウムが CaM 系を介して TH を活性化し、ドーパミンレベルを増加させることが示唆される。

本法は、同じ組織内での複数の化学物質の相関作用を解析できるため、様々な脳機能や神経疾患等を研究する上で、極めて有効な手段になると考える。

謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (12922044, 13922045, 13922047, 14922050, 15922046, 17927001, 17928009 及び 18927001) の援助を受けて行った。

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. Akiyama, K. Yabe, Quantitative mapping analyzer for determining the distribution of neurochemicals in the human brain, *J. Neurosci. Methods* 85 (1998) 161-173.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] D. Sutoo, K. Akiyama, Regulation of blood pressure with calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain and its related phenomena, *Brain Res. Rev.* 25 (1997) 1-26.
- [6] D. Sutoo, K. Akiyama, Regulation of brain function by exercise, *Neurobiol. Dis.* 13 (2003) 1-14.
- [7] D. Sutoo, K. Akiyama, M. Geffard, Central dopamine-synthesis regulation by the calcium-calmodulin-dependent system, *Brain Res. Bull.* 22 (1989) 565-569.
- [8] 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.
- [9] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative imaging of tyrosine hydroxylase and calmodulin in the human brain, *J. Neurosci. Res.* 63 (2001) 369-376.
- [10] K. Akiyama, D. Sutoo, Rectifying effect of exercise on hypertension in spontaneously hypertensive rats via a calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain, *Brain Res.* 823 (1999) 154-160.
- [11] D. Sutoo, K. Akiyama, Effect of cadmium or magnesium on calcium-dependent central function that reduces blood pressure, *Arch. Toxicol.* 74 (2000) 1-4.
- [12] K. Akiyama, D. Sutoo, The mechanism by which exercise reduces blood pressure, In: *Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia*, T. Kato (Ed.), Elsevier, Amsterdam (2000) 109-110.
- [13] D. Sutoo, K. Akiyama, Opposite effects of calcium and magnesium on the central blood pressure regulation in the spontaneously hypertensive rats, *Jpn. J. Pharmacol.* 86 (2001) 366-368.
- [14] D. Sutoo, K. Akiyama, Neurochemical changes in mice following physical or psychological stress exposures, *Behav. Brain Res.* 134 (2002) 347-354.
- [15] D. Sutoo, K. Akiyama, The significance of increase in striatal D₂ receptors in epileptic EL mice, *Brain Res.* 980 (2003) 24-30.
- [16] D. Sutoo, K. Akiyama, Music improves dopaminergic neurotransmission: demonstration based on the effect of music on blood pressure regulation, *Brain Res.* 1016 (2004) 255-262.
- [17] D. Sutoo, K. Akiyama, Daily exercise and stress on brain function, In: *Trends in Exercise and Health Research*, R. L. Swan (Ed.), Nova Science, New York (2005) 23-48.