



神経形態学におけるデジタルカウント

Digital Counting in Neuro-Morphology

清蔭 恵美*, 松野 岳志, 濱本 真一, 樋田 一徳

Emi Kiyokage, Takeshi Matsuno, Masakazu Hamamoto

and Kazunori Toida

川崎医科大学解剖学

要旨 脳組織を構成するニューロンやグリアは3次元的な脳内に分布しており、組織標本として用いられる切片の僅か数十ミクロンの厚さの中にも多様に存在する。組織標本から実際の脳組織内に立体的に分布する細胞数や密度を推定する場合、サンプリングバイアスが大きな問題となる。そこで本稿では、細胞の大きさ、形、分布の偏りに左右されない disector 法による定量解析の必要性と、それを使った我々の定量解析について紹介する。

キーワード：細胞数カウント, stereology, disector 法, StereoInvestigator

1. はじめに

脳の各領域には多様なニューロンとグリアが存在し、それらが立体的・空間的に位置し、ニューロン相互に特異的にシナプス結合し、さらに様々な様式でグリアが関わることで領域特異的な神経回路を形成している。近年、細胞標識法やバイオイメージング技術の革新により、複雑な神経回路を有する脳領域においても分子から細胞レベルでの標識が可能となった^{1,2)}。また、特定のニューロンを標識することでそのニューロンの持つ形態的特徴が明らかになるだけでなく、それらが特定の脳領域に占める割合や密度等の定量的な解析も可能となり、定性的な形態学に客観的な要素を付け加えることができる。これまで空間内の細胞やシナプスといった対象物の分布を知るには、各切片断面でそれらをカウントし、さらにそれらを重積化することにより全体像を推測していた。しかし、対象物の大きさや形に違いがある場合や分布に偏りがある場合、正確性と再現性に問題が生じることが知られていた。そこで、その問題を解決するために2次元組織断面像(光学顕微鏡像・電子顕微鏡像)から実際の3次元空間に分布する対象物の幾何学的な量を推定するステレオロジー(stereology)が考案された。本稿では、まず stereology の概

要を述べ、その手法を使った実例を我々の定量解析の結果を用いて紹介したい。

2. Stereology

2.1 2次元組織標本を用いた定量解析の問題点

特定の脳領域を構成するニューロン群や局所神経回路を構成するシナプスの定量解析を行うには、3次元的な特定領域内に分布するそれらの実数を算出する必要がある。一般的に、組織切片内の特定の細胞をカウントする場合、単位面積当たりの数が算出されている。しかし、実際の組織切片には厚みがあり、そこに含まれる細胞の形や大きさは様々であるため、作製された組織切片の各断面には細胞の切れ端が必然的に含まれる。その結果、細胞をカウントする際に同じ細胞であるにもかかわらず重複して数える、または排除するといった規則性のない算出が生じる。例えば、大きな細胞は小さな細胞よりも検出されやすく(図1A)、また形が不整形な細胞ほど検出されやすいため、結果としてカウントの重複が生じる。

これとは別に組織標本を用いた定量解析で考慮しなければならない問題点として、標本作製過程で生じる切片の収縮がある。連続的に同じ厚さで作製した切片であっても、脱水や包埋時に起こる圧迫収縮・変性は避けられず、またカバーガラスの重みによる収縮も加わり、同じ厚さの組織標本を観察するのは困難である。このことは、空間的な特定の脳領域に局在する細胞分布密度の算定にも少なからず影響を及ぼす。さらに、免疫染色標本では、使用する抗体の浸透性の問題も大きい。多重蛍光染色の場合、ある抗体は切片の深部まで達しているが、別の抗体では表面しか染まらないといったことがよくある。これらの問題を解決するためには、切片の収縮率や抗体の浸透性をあらかじめ検討し、定量解析を組織標本のどこまでの厚さ(深さ)で行うかを決めておく必要がある。このような問題点を解決しなければ、2次元組織切片標本から正確な定量解析を行うことは難しくなる。そこで、組織切片の厚さ方向のカウントの重複と意識的な排除というサンプリングバイアスの問題を解決するために、1984年に disector 法という新しい stereology の概念が提唱された³⁾。

2.2 Disector 法とは

組織学における stereology 解析は1946年に Abercrombie により発表され⁴⁾、1970年には Underwood によって一定の厚みの切片から目的の対象物の空間密度を求める unfolding 法⁵⁾が発表された。これらの方法では、ランダムに選んだ数枚の切片から対象物(例えば、細胞の核など)の直径を計測し、ヒストグラムを作製して細胞核の平均値を求め単位体積当たりの密度を算出するものである。この場合、核の形は球と仮定して計算されたものであり、実際には核形の不整や方向性、分布の偏りがあるためサンプリングバイアスにより、結果が左右され使えない場合が多い。これに対して、1984年に Sterio によって発表された disector 法は、対象物の仮定やヒストグラムの作製の必要もなく、かつサンプリングバイアスが存在しないまったく新しい stereology の考え方である。この方法

〒701-0192 倉敷市松島577

TEL: 086-462-1111 ext. 26420; FAX: 086-462-1199

* E-mail: ekiyokage@med.kawasaki-m.ac.jp

2016年7月24日受付, 2016年9月7日受理

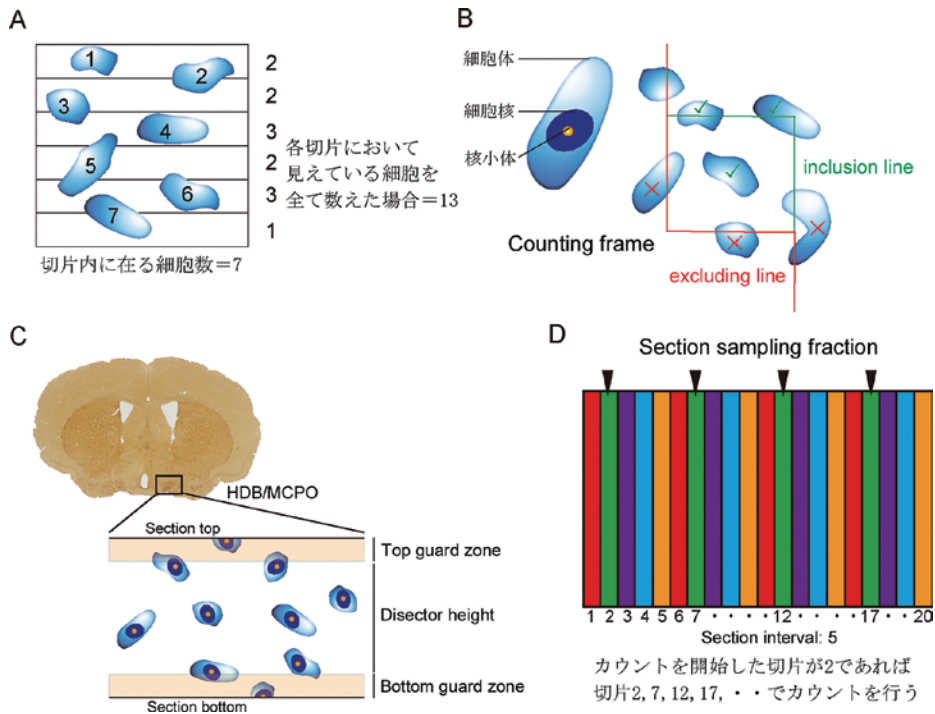


図1 Stereology によるサンプリング。A；カウントによる問題点。切片内にある実際の細胞数は7個であるが、各断面に見えている細胞をすべて数えた場合、細胞数は13個になる。B；カウント対象（細胞体、核、核小体）とカウンティングフレーム、カウント対象が excluding line（赤）に被る細胞はカウントに含めず、inclusion line（緑）のみにかかる細胞はカウントする。C；計測を行う空間（disector height）の設定。切片のトップとボトムからサンプリングしないガードゾーンを決める。D；セクション・サンプリング・フラクション。仮に解析する切片間隔を5に設定すると、スタートの切片が2であれば7, 12, 17でカウントを行う。HDB/MCPO:対角帯水平部領域。

では、2枚の連続切片の1つを look-up section とし、もう1つを reference section とする。look-up section に含まれない対象物を reference section でカウントを行うものである。計測を行う空間を disector と呼び、計測面積 (XY 軸) と切片の厚さ (Z 軸) から3次元的なサンプリングが可能となる。これらは、physical disector 法とも呼ばれ、対象物が明瞭に観察できうる顕微鏡の解像度が重要になるため薄い連続切片ペアに適應されてきた。さらに、2枚の連続切片を必要とせず、1枚の厚い切片の連続光学断面像を用いた optical disector 法も発表され、組織標本定量解析を行う際のスタンダードとなっている。

2.3 デジタルカウント

以上のことは、既に多くの論文により報告もされ、神経形態学による対象物の定量はバイアスのないカウント法によらなければならないともされてきた⁶⁾。これまでの定量解析は手作業による計測が主流であったが、コンピューターの性能や画像解析ソフトの開発により半自動化された解析システムが使われるようになってきた。また、共焦点レーザー顕微鏡の普及により厚い切片空間の立体的観察が可能となり、任意の深さレベルで解像度の高い光学断面像が得られるようになった。我々は、共焦点レーザー顕微鏡によるZ軸方向の連続光学切片のスタック画像と、disector 法と基本原理が同じである optical fractionator 法によって細胞数をデジタルカウントする StereoInvestigator (MBF Bioscience, USA) を用いて解析を行っている。StereoInvestigator は1995年に開発され、これまで約5000編以上の雑誌で発表され続けている神経科学分野ではよく知られたソフトウェアである（詳細は web 参照, www.mbfbioscience.jp)。Optical fractionator では、カウント対象（核、核小体、細胞体）の決定とカウンティン

グフレームの設定や（図1B）、切片作製時の破損や収縮を考慮し、切片のトップとボトムからサンプリングしないガードゾーンを決め、実際に計測を行う空間の高さである disector の設定を行う（図1C）。また、深さ方向の分解能を上げるため、高倍率で開口係数の高い対物レンズを使用し、カウント対象よりも小さい厚さの間隔で光学断面像を得る必要がある。このようにして取り込んだ各画像から重複カウントを避けるため、設定した disector 内の細胞を1回のみ数えることをルールとしている。さらに、サンプリングバイアスを避けるため、システムティック・ランダム・サンプリングにより、偏りが少なく、効率的なサンプリング法を用いて統計学的に有意な解析結果を得ることができる。これには、解析に用いる切片の間隔を一定に選択するセクション・サンプリング・フラクションや（図1D）、各切片における解析対象領域内でのサンプリング箇所を決定するエリア・サンプリング・フラクションがある。次の章では、実際に StereoInvestigator を使った我々の研究データを示す。

3. Disector 法を用いた定量解析の実際

3.1 マウス嗅球へ投射する対角帯水平部アセチルコリンニューロンの分布密度

嗅覚の一次中枢である嗅球は、単純な層構造と比較的少数のニューロン種から構成されているにもかかわらず豊富な神経化学物質を含む魅力的な脳領域である。空気中の匂い物質が鼻腔の粘膜上皮にある嗅細胞の受容体に結合し、その匂い情報が電気シグナルとなり嗅細胞の軸索によって嗅球内へと送られる（求心性入力）。嗅球内へ入ってきた匂い情報は、投射ニューロン、抑制性介在ニューロン及び他の脳領域から

嗅球内へと送られてきた遠心性線維（遠心性入力）との間で調整され、最終的には投射ニューロンの軸索によって高次中枢へと運ばれる⁷⁾。嗅球への遠心性入力には、縫線核を起始核に持つセロトニンニューロン⁸⁾、青斑核からのノルアドレナリンニューロン⁹⁾、対角帯水平部から投射するアセチルコリンニューロン¹⁰⁾の3つが主に知られている。これら遠心性ニューロンは大脳皮質の広範囲へと投射し覚醒レベルを調整するとされているが、嗅覚情報処理にどのように関わっているかは依然不明なままである。そこで、まず対角帯水平部から嗅球へ投射するニューロンのうちアセチルコリンニューロンが一体どれくらいの割合で存在するのか、その分布密度について StereoInvestigator を用いて算出した。

実験方法として、C57BL/6J マウス（8-10 週齢，雄）の嗅球へ逆行性トレーサーである fluorogold (FG) を注入し、4 日後に還流固定を行い 50 μm 厚の冠状断連続スライスを作製した。対角帯水平部の領域を含む連続スライスから 4 枚間隔で 5 枚のスライスを選び、対角帯水平部から嗅球へ投射する細胞を抗 FG 抗体で、アセチルコリンニューロンを標識するために抗 vesicular acetylcholine transporter (VAcChT) 抗体を用いて蛍光染色を行った（図 2A-C）。その後、各標本は共焦点レーザー顕微鏡で光学切片間隔 1 μm にて 3 次元モニター撮影を行った。StereoInvestigator のパラメーターとして、カウンティングフレームは 60 μm \times 60 μm 、disector

の高さは 10 μm で設定した。対角帯水平部の領域を設定し（総カウンティングエリア；1.5 mm^2 ，図 2C の黄線），システマティック・ランダム・サンプリングのもと、等間隔でカウンティングフレームを配置し、カウンティングエリア内のすべてのカウンティングフレームに存在する細胞数（カウント対象を細胞体とする）をカウントした（図 2C）。この時、細胞体の一部が inclusion line のみにかかる細胞はカウントし、excluding line に被る細胞はカウントに含めず（図 2D），設定した disector（10 μm ）内の細胞を 1 回のみ数えるというルールに従ってカウントした。実際にカウントした細胞数は、FG 陽性（+）細胞 178 個、VAcChT（+）細胞 48 個、FG（+）/VAcChT（+）細胞 33 個で、概算された総体積中（0.31 mm^3 ）に含まれる細胞数は、それぞれ 7317 個、1973 個、1356 個であった。その結果、対角帯水平部から嗅球へ投射する細胞のうち、アセチルコリンニューロンは約 15% を占めることが明らかとなった。現在、他のニューロン群を同定し、それらの分布密度についても解析を進めている。

3.2 嗅球層房細胞樹状突起上のシナプス密度解析

stereology は核や細胞体を対象とした細胞数のカウントが主流であるが、マイクロからナノへの高精細イメージングが可能になった現状により、光学顕微鏡観察スケール（マイクロ）での disector 法を用いた定量解析を、電子顕微鏡観察スケール（ナノ）に応用しシナプス分布密度の解析を試みた。方法

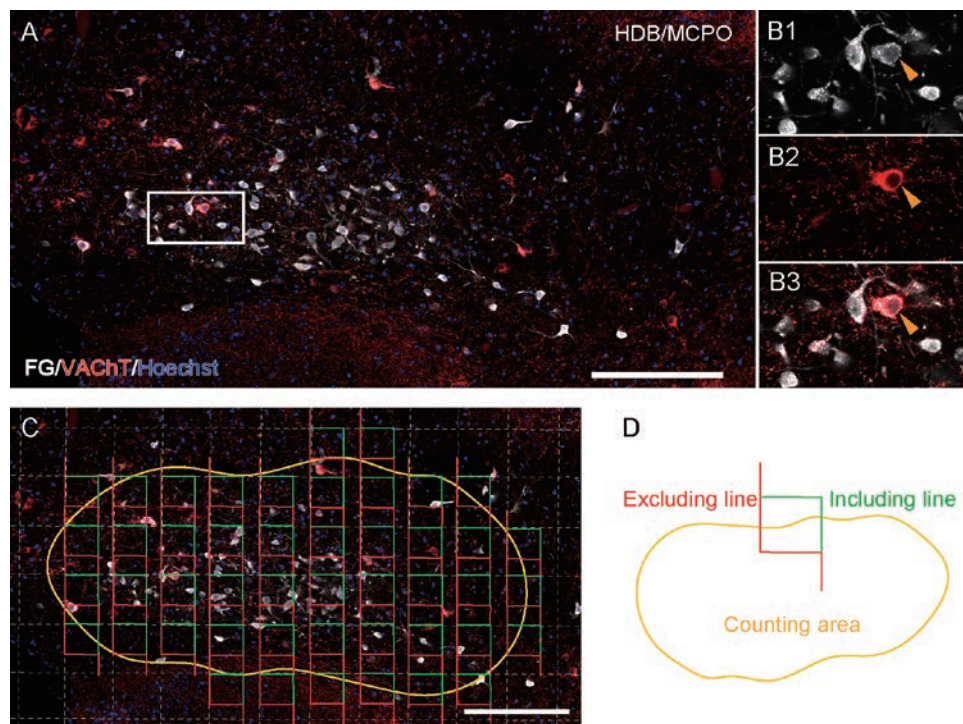


図 2 マウス嗅球へ投射する対角帯水平部アセチルコリンニューロンの分布密度。A；抗 vesicular acetylcholine transporter (VAcChT：赤) と抗 fluorogold (FG：白) 抗体を用いた蛍光染色像。アセチルコリンニューロンの起始核である対角帯水平部領域 (HDB/MCPO) を含む冠状断切片。B1;FG 陽性細胞。B2;VAcChT 陽性細胞。B3;Marge 像。起始部から嗅球へ投射するアセチルコリンニューロンを示す (オレンジ線)。C;エリア・サンプリング・フラクション (黄線で囲んだ領域) とシステマティック・ランダム・サンプリング。カウンティングエリア (黄線) を選択すると、解析エリア内にグリッドがランダムに等間隔で配置される (システマティック・ランダム・サンプリング)。D；カウントのルール。カウンティングエリアのカウンティングフレーム内にある細胞体 (カウンティング対象) を 1 回のみカウントする。Scale bars; 200 μm (A, C)。

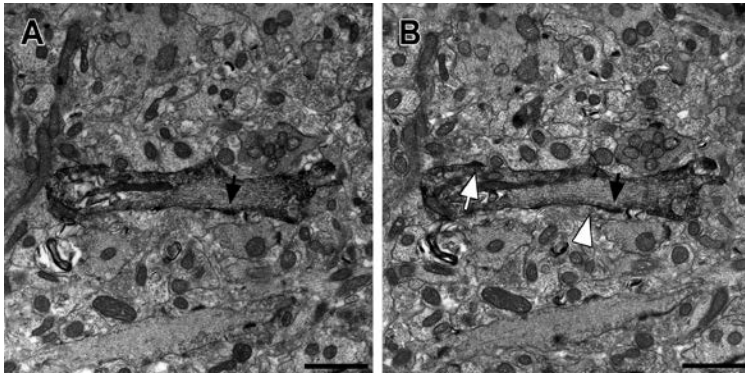


図3 嗅球僧房細胞樹状突起上のシナプス密度解析. A ; look-up section B ; reference section. 非対称性シナプス (矢印) と対称性シナプス (鏃) をそれぞれ示す. A と B 両方に認められるもの (黒矢印), B のみに認められるものを (白鏃, 白矢印), B のみに認められるものをカウントした. Scale bars; 1 μm (A, B).

として、ウイルスベクターを用いて単一の嗅球僧帽細胞を標識し、二次樹状突起の細胞体近傍および細胞体から 200 μm 離れた樹状突起を含む領域を電子顕微鏡用にエポン包埋し 75 nm 厚の連続超薄切片を作製した。細胞体近傍では 20 枚の連続切片を 4 セット、細胞体から 200 μm では 20 枚の連続切片を 3 セット作製し、標識された二次樹状突起が入るように、それぞれのセットごとに倍率 1 万倍で 5 \times 5 のモニターカメラ撮影 (実際の撮影領域: 30 μm \times 30 μm) を行った^{11,12)}。次に、それぞれの連続切片の 1 枚目を look-up section, 2 枚目を reference section とし、標識された二次樹状突起の部分をカウンティングエリアとした。reference section のみに存在するシナプスをカウントし、それ以降 2 枚目を look-up section, 3 枚目を reference section とするという手順で 20 枚の範囲内で二次樹状突起上に含まれるシナプスの数を求めた。シナプスの密度 (N) は、下記の式で求めた。

$$N = Q_s / at$$
 (Qs-, reference section のみに含まれたシナプス総数; a はカウンティングエリアの総面積; t は測定に用いた超薄切片の厚さ)

その結果、細胞体近傍の二次樹状突起の概算されたシナプスの密度 (平均 \pm 標準偏差) は、非対称性シナプスが 1.05 ± 0.31 個/ μm^3 で、対称性シナプスが 0.74 ± 0.18 個/ μm^3 であった。また、細胞体から 200 μm 離れた二次樹状突起上のシナプス密度は、非対称性シナプスが 1.96 ± 0.05 個/ μm^3 で、対称性シナプスが 1.27 ± 0.05 個/ μm^3 と算出された。比較のため実測数を示すと、細胞体近傍の非対称性シナプス 0.94 個/ μm^3 , 対称性シナプス 0.67 個/ μm^3 で、細胞体から 200 μm 離れた樹状突起上では、非対称性シナプス 2.04 個/ μm^3 , 対称性シナプス 1.33 個/ μm^3 であった。概算値と実測値は極めて近い値であり、ナノスケール領域への応用が期待できる。

4. おわりに

神経科学研究はニューロンをトレースし、その形態像を分類する定性解析から始まった。しかし、近年ニューロンのデジタルトレースによって、3 次元的立体再構築像を得られるだけでなく、種々の形態計測により形の違いを数値化し統計解析を行うことで新たな細胞分類の可能性を提示した¹³⁾。また、これら厚みのある脳組織標本は 3 次元的空間を持つため、

ここに含まれる各細胞の複雑な形態だけでなく細胞密度やシナプス密度にも注意を払わなければならない。Stereology によるサンプリングバイアスを排除した厳密な定量解析は、これまでの定性的な形態解析に客観的・統計学的データを付加することができる。共焦点レーザー顕微鏡、デジタル電子顕微鏡、解析ソフトを上手く組み合わせることで、システムチックな定量形態解析が可能となり神経科学分野の各研究における新たな展開が期待できる。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり有益な御助言、御示唆をいただいた MBF ジャパン株式会社 岡田憲和様に深甚なる感謝の意を表する次第である。本稿に関わる研究は平成 21 年度私立学校施設整備費補助金 (基盤研究装置)、川崎医科大学プロジェクト研究費 (26G-6, 27G-4) を受けた。

文 献

- 1) Furuta, T., Tomioka, R., Taki, K., Nakamura, K., Tamamaki, N. and Kaneko, T.: *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1497–1508 (2001)
- 2) Suzuki, Y., Kiyokage, E., Sohn, J., Hioki, H. and Toida, K.: *J. Comp. Neurol.*, **523**, 262–280 (2015)
- 3) Sterio, D.C.: *J. Microsc.*, **134**, 127–136 (1984)
- 4) Abercrombie, M.: *Anat. Rec.*, **94**, 239–247 (1946)
- 5) Underwood, E.E.: *Quantitative stereology*, Addison-Wesley Publishing, Reading (1970)
- 6) Saper, C.B.: *J. Comp. Neurol.*, **364**, 5 (1996)
- 7) Shepherd, G.M., Chen, W.R. and Greer, C.A.: *Olfactory bulb: The Synaptic Organization of the Brain*. New York: Oxford University Press, 165–216 (2004)
- 8) McLean, J.H. and Shipley, M.T.: *J. Neurosci.*, **7**, 3016–3018 (1987)
- 9) Shipley, M.T., Halloran, F.J. and de la Torre, J.: *Brain Res.*, **329**, 294–299 (1985)
- 10) Macrides, F., Davis, B.J., Youngs, W.M., Nadi, N.S. and Margolis, F.L.: *J. Comp. Neurol.*, **203**, 495–514 (1981)
- 11) Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M. and Roberts, R.C.: *Microscopy techniques and the study of synapses*. In: Mendez-Vilas A and Diaz J, (Eds.), *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. 3rd edition. Badajoz, Spain: Formatex. 164–170 (2007)
- 12) McCollum, L.A. and Roberts, R.C.: *Neuroscience*, **271**, 23–34 (2014)
- 13) 清藤恵美, 野津英司, 赤木貴彦, 樋田一徳: *顕微鏡*, **46**, 132–136 (2011)