九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Stereologyによる新たな神経科学研究基盤の確立

神野, 尚三
九州大学大学院医学研究院神経形態学分野

https://doi.org/10.15017/12489

出版情報：福岡醫學雜誌. 99 (8), pp.169-174, 2008-08-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

Stereology による新たな神経科学研究基盤の確立

九州大学大学院医学研究院 神経形態学分野

神　野　尚　三

はじめに

Stereology とは，３次元の構造に関する情報を２次元の断面から抽出し，定量化するための方法論である．従来から，２次元の切片を用いる定量解析には，検体に大きさ，形，方向などの違いがある場合，正確なデータが得られないという致命的な問題が存在することが知られていた．様々な試みの末，1984 年に発表された disector 法[補1)]により，stereology はこの問題を解決することに初めて成功した．現在では，生命科学の分野に留まらず，材料工学，鉱物学などの分野でも stereology の重要性が認識され，顕微鏡を使用する定量解析の標準的な手法となりつつある．本稿では，stereology について概説し，それによる研究の例として，我々が進めてきた海馬の GABA 作動性ニューロンの空間分布密度解析を紹介する．

１．Stereology について

1.1　組織標本を使用する定量解析が抱える諸問題

組織標本の解析は定性的な所見から始まる．顕微鏡を用いた丁寧な観察によって初めて得られる検体の大きさや分布，形態などについての詳細な情報は，全ての研究の基礎となるべき重要なものである．しかしながら，定性的なデータだけでは，統計学的な検討が難しく，結果が主観的なものになりやすい．このため，生理的組織と病的組織の比較など，さらなる研究を行う際には，定量的なデータが必要になる．定量解析の基本的な命題は，いかにして検体の正確な数を客観的に求めることができるか，ということである．組織標本に基づく定量解析は単純に思われるが，正確なデータを得ることは実は容易ではない．

最大の問題は，サンプリングバイアスである（図１）．これは，標本抽出の際に母集団を代表していない検体が選ばれるために生じる偏りのことであり，２次元的な切片を使って定量解析を行う場合，避けることが出来ない．例えば，大きな検体は小さな検体よりも検出されやすい（図１Ａ）．また，大きさが同程度でも，検体の形によって計測されやすさが異なることもある（図１Ｂ）．さらに，長軸が切片と直交している検体は並行しているものよりも計測されやすい（図１Ｃ）．すなわち，１枚の組織標本を使用する単純な定量解析では，そのデータは検体の数ではなく，サンプリングバイアスを反映しているに過ぎない可能性がある．

組織標本を用いる定量解析には，他にも特有の問題が存在する．一つは，脱水や包埋などの標本作製の過程で生じる切片の収縮や変形である．これらは，分布密度を計算する場合に障害となり，予備的な実験により補正する必要がある．また，免疫染色を行った標本を定量解析に使用する場合，抗体の不完全な浸透性が問題となる．すなわち，一部の抗体は厚切切片の深部に到達せず，切片の表面しか染色されない場合がある．この問題に対しては，あらかじめ抗体の浸透性を調べ，定量解析に使用する切片の深度を決めておく必要がある[1)]．これらの問題をきちんと考慮しなければ，組織標本から正確な定量データを得ることはできない．

1.2　Stereology の歴史

２次元的な切片に基づいて３次元的な構造の情報を得るための方法論を意味する stereology は，1961

Shozo Jinno
Department of Anatomy & Neurobiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan
Establishment of New Research Fundamentals in Neuroscience by Stereology

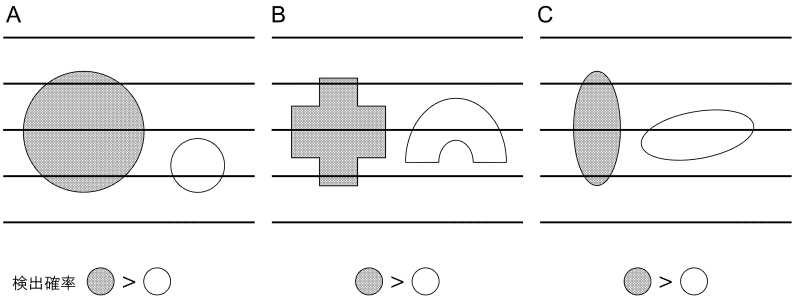

図１ サンプリングバイアスの例．（A）５枚の薄切切片（横線）と，それによりカットされた２つの検体を示す．大きさの違いにより，分離される切片の数が異なっている（大＝３枚，小＝１枚）．これにより計測される頻度（検出確率）に差が生じる．（B）形の違いもサンプリングに影響する．（C）同じ形，同じ大きさの検体でも，長軸と切片の角度の違いにより，検出確率に差が生じる．

年に International Society for Stereology を設立した Elias によって提唱された造語である[2]．最初の stereology とみなせる解析は，空間密度を求めるための Delesse 法[3]であり，今から 160 年ほど前にさかのぼる[4]．さらに 1935 年頃から，stereology に相当する解析手法が生物学や材料工学などの分野で次々と開発されていった[5]．1980 年代まで広く行われていた Abercrombie 法[6][補2]も，同じ頃に発表された stereology の一種である．しかし，これらの古典的な stereology では，検体の大きさや形，方向などについての仮定 assumption を必要とし（assumption-based stereology），サンプリングバイアスによって結果が左右されるという問題があり，現在では使用されることが少なくなっている．これに対し，1984 年に発表された disector 法[7]は，検体についての仮定を必要としないようにデザインされた stereology の手法であり（design-based stereology），原理的にサンプリングバイアスが存在しない．オリジナルの physical disector 法[補3]による解析では，隣接する二枚の薄切切片の組み合わせを使用し，look-up section[補4]に含まれる検体は数えず，reference section[補4]だけに含まれる検体の数を計測する．これにより，２次元的な切片を使用して，３次元的なサンプリングを行うことが可能になる．さらに後年，disector 法の理論を厚切切片に適用する optical disector 法[8][補5]なども考案され，現在では，design-based stereology は組織標本を用いた定量解析の de facto standard になっている[9]．

1.3 Computer-assisted stereology の確立

近年，コンピュータの性能が著しく向上し，大容量の画像データを取り扱うことが容易になったことは，computer-assisted stereology を可能にし，定量解析に革新をもたらした．我々も早くから，computer-assisted optical disector の確立を目指し，共焦点レーザー顕微鏡と画像解析ソフトウェアをマクロプログラムによって制御する，独自の解析システムによる研究をスタートさせた[1]．図２にその解析法を示す．共焦点レーザー顕微鏡では，厚い切片内の任意のレベルで薄い光学的断層像（光学切片）が得られる．我々のシステムでは，この光学切片のスタックを利用し，optical disector 法に基づくサンプリングとマッピングを行っている．本法では，look-up section に断面が現われた検体はサンプリングから除外し，reference section だけに断面が現われたものの数を計測する．この作業は，検体の上端（図２の黒丸印）の位置を調べ，disector height[補6]（図２）に含まれているものを検出することと同義である．これにより，検体は大きさや，形，方向などの要素を失い，サンプリングバイアスのない定量が可能になる．

このように，optical disector 法は優れた定量解析の手法であるが，いくつかの注意すべき点もある．最も重要なことは，検体よりも小さな間隔で光学切片を取り込むことである．試料の中に含まれる全ての検体が漏れなく同定されることは，optical disector 法を行う際の前提条件である．また，厚切切片の表面はサンプリングを行わない領域である guard space とすることが望ましい（図２）．これは，lost cap[補7]や，切片の損傷が発生している可能性が高いためである[10]．

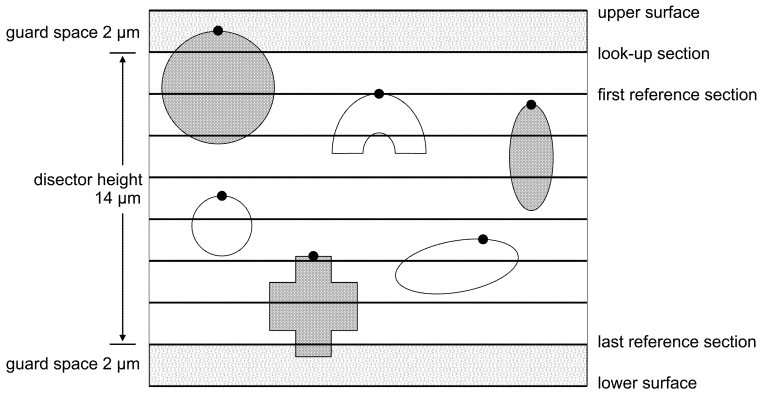

図２　Optical disector 法による解析の例．共焦点レーザー顕微鏡によって組織標本から取り込まれた光学切片（横線）のスタックを使用して，３次元的なサンプリングを行う．また図では，切片の表面から２μm までを guard space に設定し，サンプリングから除外し，内部の 14 μm だけを disector height（disector 法に基づいてサンプリングを行う空間）として解析に利用している．

我々は約 10 年にわたり，computer-assisted optical disector の確立に向けて，独自の取り組みを続けてきた．現在では，共焦点レーザー顕微鏡で取り込んだスタック画像の自動最適化からサンプリング・マッピングまでを PC Workstation 上で行うことで，高効率・高精度の定量解析を実現している．次章でその研究例を紹介する．

２．海馬 GABA 作動性ニューロンの空間分布密度解析

2.1　背景

ニューロン説を唱えたスペインの偉大な神経解剖学者 Ramón y Cajal がニューロンの形態学的多様性を報告して以来[11]，中枢神経系の GABA 作動性ニューロンは解剖学的，電気生理学的，神経化学的に多様なサブタイプに分類されることが示されてきた．さらに近年の集学的な研究により，シナプス可塑性やネットワークの活動性の制御におけるサブタイプ特異的な役割が徐々に明らかになってきている[12]．例えば，GABA 作動性ニューロンのサブタイプの一部は，海馬から内側中隔や海馬台，膨大後皮質などの海馬外領域に投射しており，これらの複数領域における同期的活動に関与している可能性がある[13]．その一方で，中枢神経系における GABA 作動性ニューロンの研究は，いくつかの問題に直面している．第一には，GABA 作動性ニューロンのサブタイプについて統一された分類がないことである．研究者によって，異なった分類，名称が使用されている．第二には，stereology による定量的な研究が十分になされておらず，定性的な研究データを脳の統合的な理解へと発展させることが難しいことである．このため我々は，神経化学的に分類された海馬の GABA 作動性ニューロンのサブタイプについて，computer-assisted optical disector による厳密な空間分布密度解析を行うことを計画した．神経化学的なサブタイプは，解剖学に留まらず，生理学，生化学の分野でも頻用されており，様々な分類のハブとして機能することが期待できた．また，免疫蛍光多重染色を組み合わせることで，定量化に必要な検体数を効率的に集めることが出来ると考えられた．本研究の目標は，神経化学的サブタイプについての詳細な定量データを得て，中枢神経系の GABA 作動性ニューロンの研究にブレイクスルーをもたらすことであった．

2.2　実験方法

一連の定量解析では，全てオスのマウス（C57BL/6J，20-25 g，8-12 w）を使用した．９種類の神経化学マーカーについて，各４-６頭のマウスを灌流固定し，海馬を背側部，中間部，腹側部の３ブロックに分割した後，ビブラトームにより，50 ミクロンの連続切片を作製した．背側海馬と腹側海馬を比較するために，それぞれから４～９枚の切片をランダムに選択し，免疫蛍光多重染色を行った．共焦点レーザー顕微鏡を

用いて，海馬全体を３次元的に取り込み，optical disector 法に基づくサンプリングを行った．全てのマーカーについて，予備的に抗体の浸透性をチェックし，完全に染色されている深さに限定して disector height を設定した．また，免疫染色の前後で切片の３次元的取り込みを行い，変形，収縮の補正を行った．

2.3 結果と考察

まず最初に，GABA 作動性ニューロンの全てのサブタイプを標識すると考えられるマーカーである GAD67 を使用して，マウス海馬における GABA 作動性ニューロンの分布密度について，optical disector 法による解析を行った（図３）[1]．これにより，海馬における GABA 作動性ニューロンの分布密度が，層や領域，さらに背側部と腹側部によって有意に異なることが明らかになった．次に，神経化学マーカーによって同定される GABA 作動性ニューロンの主要な８種類のサブタイプについて，同様の解析を行った．本研究で使用したマーカーは３種類のカルシウム結合タンパク［Parvalbumin（PV），Calretinin（CR），Calbindin D28K（CB）］，４種類の神経ペプチド［Neuropeptide Y（NPY），Somatostatin（SOM），Cholecystokinin（CCK），Vasoactive intestinal protein（VIP）］と neuronal nitric oxide synthase（NOS）である．一連の研究[14)～16)]によって，各マーカーを発現している神経化学的サブタイプについて，海馬の層，領域特異的な分布密度を明らかにした．さらに，海馬における GABA 作動性ニューロンの神経化学的細胞構築を初めて解明した（表１）[17]．

海馬の GABA 作動性ニューロンは，錐体細胞や海馬外領域からの入出力と共に複雑なネットワークを構成している．上記の stereology 解析によって得られた定量データは，GABA 作動性ニューロンの多様なサブタイプによる海馬の活動性の時間的，空間的制御システムの集学的研究や，構造に即したニューラルネットワークのシミュレーション研究など，幅広い領域の研究の基礎として役立つことが期待される．

まとめ

Ramón y Cajal の偉業に代表される古典的で定性的な解剖学研究が，長きにわたって脳研究の礎となっ

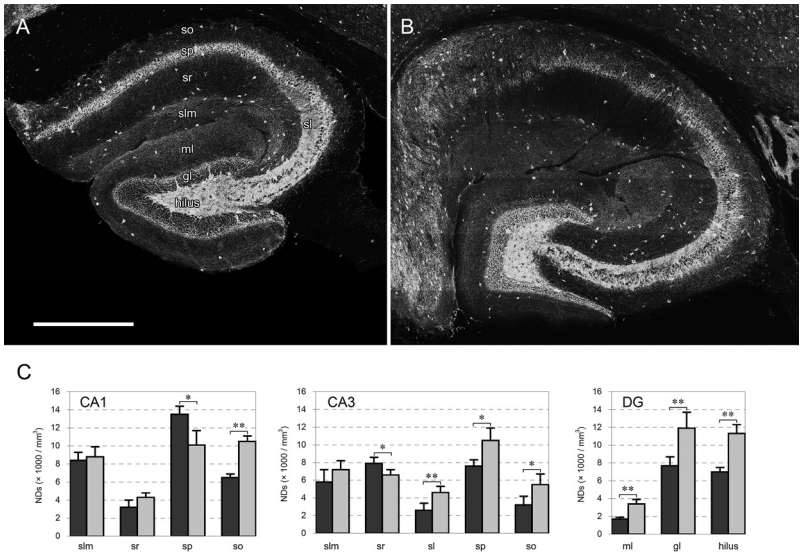

図３ マウス海馬における GAD67 陽性ニューロンの空間分布様式の解析．（A，B）背側海馬（A）と腹側海馬（B）の免疫染色像．共焦点レーザー顕微鏡のプロジェクション画像のモンタージュ．（C）海馬の各層における GAD67 陽性ニューロンの空間分布密度（× $10^3 mm^{-3}$）．スケールバー＝500 μm．黒カラム＝背側海馬．灰カラム＝腹側海馬．$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$．gl, granule cell layer ; ml, molecular layer ; sl, stratum lucidum ; slm, stratum lacunosum-moleculare ; so, stratum oriens ; sp, stratum pyramidale ; sr, stratum radiatum．（文献 17 より改変）．

	Dorsal								Ventral							
	PV	CR	CB	NPY	SOM	CCK	VIP	NOS	PV	CR	CB	NPY	SOM	CCK	VIP	NOS
CA1	19.3	10.6	21.3	32.9	14.1	5.3	9.9	22.1	17.6	12.3	19.5	20.1	17.8	9.0	13.7	17.3
CA3	29.3	6.1	14.4	47.7	20.7	10.5	4.4	23.3	19.7	7.3	33.2	35.5	20.7	10.4	4.9	29.2
DG	14.3	8.0	3.8	20.8	8.0	2.5	5.5	51.6	11.2	6.6	4.2	28.8	21.1	2.0	7.1	52.6
Total	20.4	9.1	16.0	33.3	14.0	5.8	7.5	29.4	16.8	8.8	21.5	28.6	19.7	7.8	8.4	31.2
CA1																
so	20.6	5.4	45.4	48.0	47.5	4.5	3.7	18.1	25.5	5.4	41.2	42.4	55.1	5.3	4.3	7.5
sp	42.4	19.9	8.8	39.6	3.4	5.6	20.7	29.4	37.9	19.0	9.2	21.3	6.6	10.7	23.6	20.7
sr	7.2	14.7	15.9	27.5	2.2	12.8	11.6	16.9	0.9	12.1	17.0	6.5	2.6	16.3	13.5	27.8
slm	0.7	7.5	17.1	20.0	0.4	2.0	5.2	21.6	0.0	13.4	15.2	9.4	0.0	7.5	15.0	17.4
CA3																
so	40.6	6.6	28.4	56.3	31.6	17.8	3.4	11.5	27.8	1.6	39.1	56.5	48.2	7.3	0.5	8.0
sp	42.4	6.3	5.3	65.8	27.4	7.1	5.3	20.8	28.5	11.1	21.0	36.8	15.1	8.1	7.0	35.3
sl	30.4	3.8	1.9	85.8	50.4	23.8	12.7	31.1	9.8	12.4	19.6	42.2	7.8	22.4	8.7	13.1
sr	10.9	6.3	17.5	31.6	6.2	12.8	3.7	14.2	11.7	7.6	39.8	30.2	14.8	18.3	6.8	29.0
slm	0.9	3.1	29.8	8.6	0.0	0.0	1.4	61.3	0.0	2.8	46.9	1.0	0.3	1.7	2.8	65.3
DG																
hilus	7.4	15.9	4.4	56.7	47.1	1.7	6.1	49.0	8.6	8.8	8.2	81.7	68.1	1.9	11.2	45.4
gl	24.7	9.1	2.2	12.9	0.6	3.2	7.0	36.9	19.5	9.6	1.7	6.3	0.9	3.1	8.2	44.6
ml	2.4	3.5	7.1	13.5	0.0	1.8	2.4	85.6	5.3	2.6	2.9	2.7	0.3	0.5	1.1	69.0

0 ≤ 10%	10 ≤ 20%	20 ≤ 30%	30 ≤ 40%	40 ≤ 50%	50% ≤

表 1　マウス海馬の GABA 作動性ニューロンにおける神経化学的マーカーの発現率．各層での発現率はカラースケールで示している．（文献 17 より改変）．

てきたことに異論の余地はないであろう．しかしながら，分子レベルから個体レベルに至る現代の神経科学研究の膨大なデータを統合的に理解するための研究基盤としては，もはやそれだけでは不十分と言わざるを得ない．その一方で，従来の解剖学研究に代わる基盤が確立されていないことも事実である．このことは，現代の神経科学研究の発展を阻害する要因の一つになっている．本稿で示したような，脳の各種の構成要素についての stereology による厳密な定量解析は，新たな神経科学研究基盤を確立する上で画期的な意義を有するものである．

謝　辞

本研究の遂行ならびに本総説の執筆にあたり，終始ご指導，ご鞭撻を賜った小坂俊夫教授に心より感謝申し上げます．また，実験に関して貴重なご助言を頂いた秋鹿祐輔先生，福田孝一准教授に深く感謝いたします．

補　遺

補 1）仮名の著者 Sterio によって 1984 年に発表された stereology の手法．従来から行われてきた，１枚の切片だけを使用する２次元的な定量とは異なり，２枚の切片の組み合わせから３次元的な定量を行うことで，正確なデータを得ることを可能にした．
補 2）Abercrombie によって 1946 年に発表された stereology の手法．検体の大きさが一定であるという仮定 assumption に基づき，大きさによる検出頻度の補正を行う．
補 3）２枚の薄い物理的な切片（physical section）の組み合わせを使用して，サンプリングを行う．Sterio によるオリジナルの disector 法．
補 4）physical disector 法に基づくサンプリングでは，組になる２枚の薄切切片をそれぞれ，reference section と look-up section に設定し，その間に含まれている検体の数を計測する．
補 5）厚切切片から得られる光学切片（optical section）について，look-up section と reference section を設定し，physical disector 法と同様のサンプリングを行うもの．簡便さがそのメリットであるが，薄い光学切片が不可欠であり，高開口数の対物レンズや，共焦点レーザー顕微鏡などを使用することが必要となる．
補 6）disector 法に基づいて，実際にサンプリングを行う領域のこと．
補 7）切片を作製する段階で，表面から脱落したり，同定することが出来なくなる要素のこと．

参 考 文 献

1】 Jinno S, Aika Y, Fukuda T and Kosaka T : Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical disector using confocal laser scanning microscope. Brain Res. 814 (1-2) : 55-70, 1998.
2) Elias H : Stereology. Science. 156 (3778) : 1137-1140, 1967.
3) Delesse MA : Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches, C.R. Acad. Sci. 25 : 544-545, 1847.
4) Haug H : History of neuromorphometry. J Neurosci Methods. 18 (1-2) : 1-17, 1986.
5) Agduhr E : A contribution to the technique of determining the number of nerve cells per volume unit of the tissue, Anat. Rec. 80 : 191-202, 1941.
6) Abercrombie M : Estimation of nuclear population from microtome sections. Anat. Rec. 94 : 239-247, 1946.
7】 Sterio DC : The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J Microsc. 134 (Pt 2) : 127-136, 1984.
8) Gundersen HJ : Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. J Microsc. 143 (Pt 1) : 3-45, 1986.
9) Schmitz C and Hof PR : Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience. 130 (4) : 813-831, 2005.
10) Hedreen JC : Lost caps in histological counting methods. Anat Rec. 250 (3) : 366-372, 1998.
11) Ramón YC : Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et es Vertebres. Malonie, Paris, 1911.
12】 Klausberger T and Somogyi P : Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. Science. 321 (5885) : 53-57, 2008.
13】 Jinno S, Klausberger T, Marton LF, Dalezios Y, Roberts JD, Fuentealba P, Bushong EA, Henze D, Buzsáki G and Somogyi P : Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. J Neurosci. 27 (33) : 8790-8804, 2007.
14) Jinno S, Aika Y, Fukuda T and Kosaka T : Quantitative analysis of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the mouse hippocampus with optical disector. J Comp Neurol. 410 (3) : 398-412, 1999.
15) Jinno S and Kosaka T : Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. J Comp Neurol. 449 (1) : 1-25, 2002.
16) Jinno S and Kosaka T : Patterns of expression of neuropeptides in GABAergic nonprincipal neurons in the mouse hippocampus : Quantitative analysis with optical disector. J Comp Neurol. 461 (3) : 333-349, 2003.
17】 Jinno S and Kosaka T : Cellular architecture of the mouse hippocampus : a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. Neurosci Res. 56 (3) : 229-245, 2006.

（参考文献のうち，数字がゴシック体で表示されているものについては，著者により重要なものと指定された分です.）

プロフィール

神野　尚三（じんの　しょうぞう）
九州大学講師（大学院医学研究院 基礎医学部門 神経形態学分野）．医博.

◆略歴：1994 年３月 九州大学 医学部卒業．同年４月 九州大学 医学部 精神科神経科入局．1996 年３月 初期臨床研修修了．同年４月 九州大学 大学院医学系研究科 解剖学第三講座入学．2000 年３月 同大学院修了．同年４月 九州大学 大学院医学研究院 神経形態学分野 助手．2004 年９月～2006 年２月 連合王国 オックスフォード大学 薬理学講座 博士研究員．2008 年４月より現職.

◆研究テーマ：多様な機能を有する中枢神経系の構造的な解明を目指し，stereology に基づく定量解析，トレーサーや分子解剖学的，電気生理学的手法による広域ニューロンネットワークの集学的研究に取り組んでいる.