

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 228654

(P2002 - 228654A)

(43)公開日 平成14年8月14日 (2002.8.14)

(51)Int.Cl⁷

識別記号

F I

テ-マ-コード (参考)

G 0 1 N 33/48

G 0 1 N 33/48

M 2 G 0 4 5

A 6 1 B 10/00

A 6 1 B 10/00

P

D

V

Y

// G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 12数)

(21)出願番号 特願2001 - 21699(P2001 - 21699)

(22)出願日 平成13年1月30日 (2001.1.30)

(71)出願人 000114891

ヤマト科学株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番6号

(72)発明者 須藤 伝悦

茨城県つくば市並木3丁目22 - 13

(72)発明者 秋山 佳代

茨城県つくば市春日1丁目12 - 2 201棟703号

(72)発明者 矢部 一徳

茨城県真壁郡大和村大字大国玉2836

(74)代理人 100083806

弁理士 三好 秀和

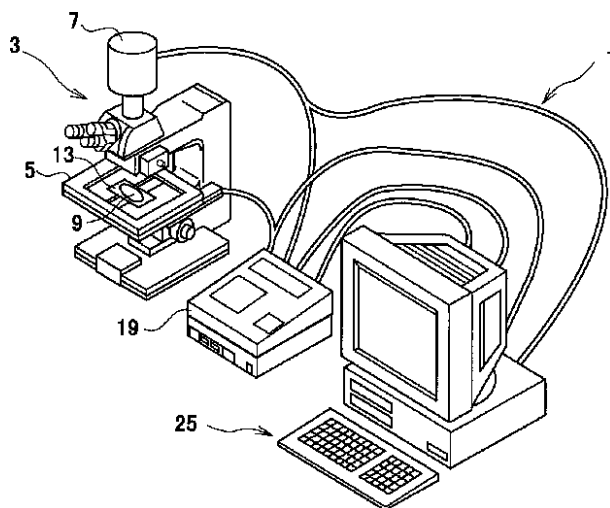
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組織マッピング方法及び組織マップ分析装置

(57)【要約】

【課題】 脳標本における同一標本上の複数の蛍光免疫組織化学反応を相関的に細胞レベルで解析し画像化する。

【解決手段】 組織試料9を載置したステージ5を2次元的に移動させながら上記試料9上の多数点の情報をフォトメータ7により測定し、この測定信号を入力しメモリ29に蓄積させて上記試料9の2次元情報を得て組織マップを作成する。このとき、上記試料9に試薬A'を反応させた後に、2次元方向に走査して上記試薬A'の反応部の分布状態図を作成し、次に上記の同一試料9に試薬B'を反応させた後に、2次元方向に走査して上記試薬B'の反応部の分布状態図を作成し、上記の工程を必要回数繰り返して上記の同一試料9に対する異なる試薬の反応部の分布状態図を作成する。同一試料9上の複数の物質の分布状態の差や比などの値から定量的に解析し解析することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 組織試料をステージに載置し、このステージを 2 次元的に移動させながら上記試料上の多数点の情報を測定装置により測定し、この測定した測定信号を入力しメモリに蓄積させることにより、上記試料の 2 次元情報を得て組織マップを作成する組織マッピング方法において、

マップを作成すべき組織試料に物質 A に特異的な試薬 A' を反応させた後に、上記試料を 2 次元方向に走査して上記試薬 A' 反応部の分布状態図を作成し、次に上記の同一試料に物質 B に特異的な試薬 B' を反応させた後に、上記試料を 2 次元方向に走査して上記試薬 B' 反応部の分布状態図を作成し、上記の工程を必要回数繰り返して上記の同一試料に対する異なる試薬の反応部の分布状態図を作成することを特徴とする組織マッピング方法。

【請求項 2】 組織試料上の一点の情報を測定する測定装置を設け、上記試料を載置して 2 次元的に移動するステージを設け、このステージを移動させながら前記測定装置からの測定信号を入力して上記試料上の多数点からなる 2 次元情報を蓄積させるメモリを設け、このメモリ内に、上記の同一組織試料を各試薬毎に反応せしめて 2 次元方向に走査して前記測定装置により得た各試薬反応部の分布状態の各データをそれぞれ各試薬毎に記憶せしめる複数の各分割メモリを備え、前記複数の各分割メモリのデータのうちから 2 つの異なる分割メモリのデータの分析値を演算する演算装置を設け、前記メモリ内の各分割メモリのデータに基づいて各試薬毎の分布状態図を作成すると共に前記演算装置により演算された分析値に基づいて分布状態図を作成する画像処理装置を設けてなることを特徴とする組織マップ分析装置。

【請求項 3】 前記複数の各分割メモリが、物質 A に特異的な試薬 A' を反応させた組織試料を 2 次元方向に走査して前記測定装置により得た上記試薬 A' 反応部の分布状態のデータを記憶する第 1 メモリと、物質 B に特異的な試薬 B' を反応させた同一の上記組織試料を 2 次元方向に走査して前記測定装置により得た上記試薬 B' 反応部の分布状態のデータを記憶する第 2 メモリと、物質 C に特異的な試薬 C' を反応させた同一の上記組織試料を 2 次元方向に走査して前記測定装置により得た上記試薬 C' 反応部の分布状態のデータを記憶する第 3 メモリと、から構成してなることを特徴とする請求項 2 記載の組織マップ分析装置。

【請求項 4】 前記ステージに、同一組織試料を前記ステージの所定位置に試料位置決め手段を設けてなることを特徴とする請求項 2 又は 3 記載の組織マップ分析装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、組織マッピング方法及び組織マップ分析装置に関し、特に同一標本上で起こっている複数の化学反応を同時にしかも相関的に細胞レベルで解析し画像化する組織マッピング方法及び組織マップ分析装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 人間の脳には、数千万以上の神経細胞が分布しており、それぞれの細胞内で起こっている化学反応の結果として、喜怒哀楽をはじめあらゆる感情や行動が支配されている。したがって、脳のどの領域でどのような化学反応が起こっているかを細胞レベルで調べることは、脳研究の中心的なテーマである。

【0003】 こうした研究のため動物の脳を実験材料とし、従来においては、脳の同一標本中での複数の物質の分布を調べるために、各物質をそれぞれ異なる蛍光物質で標識された抗体（例えば、A 物質に対してはフルオレセインイソチオシアナート（FITC）を結合した抗体、B 物質に対してはローダミン等を結合した抗体など）でラベルし、その標本を写真撮影するという組織化学的方法が一般的に行われてきた。

【0004】 また、従来においては生化学的方法も行われてきた。これは、標本を生化学的に分析する場合、標本を各部位ごとにメス等で切り分けるか、細い部位だけをパイプによってパンチし、試料を採集し、分析するというものである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 脳研究のテーマとしては、同一標本上で起こっている複数の化学反応を同時にしかも相関的に細胞レベルで解析することが課題となっている。この課題が解決されることは、多くの神経疾患を解析し、予防と治療法を開発する上で極めて有効な手段になると期待されるものである。

【0006】 ところが、従来においては、前者のような組織化学的方法では、例えば写真上で A 物質は緑色、B 物質は赤色等で示され、その分布を視覚的に観察することはできるが、物質の定量性を求めることはできないという問題点があった。また、顕微鏡内のフィルタを交換することにより、同一標本中の各蛍光物質由来の蛍光を分離する方法も検討されているが、フィルタによって完全に蛍光を分離することは不可能であり、その定量性に問題があった。

【0007】 また、後者のような生化学的方法では、標本を各部位ごとに切り取って採集する操作は複雑で非能率的であるとともに、極微細領域からの試料の採取は不可能である。さらに、分析までの煩雑な操作の過程で、不安定な化学物質の分析には誤差も大きくなるという問題点があった。

【0008】 従って、前者の組織化学的方法並びに後者の生化学的方法においても、同一標本上の複数の化学反

応を相関的に細胞レベルで解析することは不可能であるという問題点があった。

【0009】また、稀な疾患を有していた患者の組織試料は貴重なものであり、その試料の量も少ないことから、同一の試料を用いて種々の異なる物質に対して分布状態を調べることが望まれている。また、これらの試料は長期間保存され、その疾患に関する新たな知見が得られたとき、再度保存されている試料を用いて検討する必要も生じる。すなわち、同一の試料標本を用いて複数の物質に対する存在状態を定量的に評価する方法が求めら

れている。

【0010】本発明は上述の課題を解決するためになされたもので、その目的は、脳標本のような組織試料を測定すべき物質に特異的な試薬、例えば抗体で蛍光免疫組織化学的に染色し、標本上に分布する蛍光物質の強度の分布を光学的に分析し、同一標本上の複数の物質の分布や複数の化学反応を相関的に細胞レベルで解析し画像化し得る組織マッピング方法及び組織マップ分析装置を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために請求項1によるこの発明の組織マッピング方法は、組織試料をステージに載置し、このステージを2次元的に移動させながら上記試料上の多数点の情報を測定装置により測定し、この測定した測定信号を入力しメモリに蓄積させることにより、上記試料の2次元情報を得て組織マップを作成する組織マッピング方法において、マップを作成すべき組織試料に物質Aに特異的な試薬A'を反応させた後に、上記試料を2次元方向に走査して上記試薬A'反応部の分布状態図を作成し、次に上記の同一試料に物質Bに特異的な試薬B'を反応させた後に、上記試料を2次元方向に走査して上記試薬B'反応部の分布状態図を作成し、上記の工程を必要回数繰り返して上記の同一試料に対する異なる試薬の反応部の分布状態図を作成することを特徴とするものである。

【0012】したがって、脳標本などの組織試料は試薬A'にて特異的に染色され、この試料がステージにより2次元方向に移動されて上記の試料上に分布する試薬A'の光学特性（反射光、透過光、蛍光など）に基づく試薬A'のフォトメトリーのシグナル強度の分布状態図が画像化されて作成される。上記の同一試料は試薬B'にて同様に特異的に再度染色され、この同一試料が同様の工程を経て同一試料上に分布する試薬B'のフォトメトリーのシグナル強度の分布状態図が作成される。試薬A'や試薬B'のフォトメトリーのシグナル強度の分布状態は、脳標本などに存在する物質Aや物質Bの分布状態に1対1に対応するものであり、同一試料上の複数の化学物質の分布状態が同一位置における互いのシグナル値の差や比などの値に計算されて細胞レベルで画像化され、定量的に解析し分析することができ、脳内で起こっ

ている複数の化学反応を相関的に細胞レベルで解析することが可能となる。

【0013】以上の物質Aに特異的な試薬A'や物質Bに特異的な試薬B'などとしては、抗体や蛍光物質でラベルされた抗体が好ましく、このような抗体を一次抗体あるいは二次抗体として用いて脳標本などを染色すると、脳試料は蛍光免疫組織化学的に染色され、この試料はステージにより2次元方向に移動されて上記の試料上に分布する物質Aと特異的に結合する抗体にラベルされた蛍光物質の強度の分布状態図が画像化されて作成される。上記の同一試料は物質Bに特異的な抗体あるいは蛍光物質でラベルされた抗体にて、再度蛍光免疫組織化学的に染色され、この同一試料が同様の工程を経て同一試料上に分布する物質Bと特異的に結合する抗体にラベルされた蛍光物質の強度の分布状態図が作成され、このようにして同一試料上の複数の化学物質の分布状態が同一位置にある互いの蛍光強度のシグナル強度の差や比などの値に計算されて細胞レベルで画像化され、定量的に解析・分析されるとともに、脳内で起こっている複数の化学反応を相関的に細胞レベルで解析することが可能となる。

【0014】請求項2によるこの発明の組織マップ分析装置は、組織試料上の一点の情報を測定する測定装置を設け、上記試料を載置して2次元的に移動するステージを設け、このステージを移動させながら前記測定装置からの測定信号を入力して上記試料上の多数点からなる2次元情報を蓄積させるメモリを設け、このメモリ内に、上記の同一組織試料を各試薬毎に反応せしめて2次元方向に走査して前記測定装置により得た各試薬反応部の分布状態の各データをそれぞれ各試薬毎に記憶せしめる複数の各分割メモリを備え、前記複数の各分割メモリのデータのうちから2つの異なる分割メモリのデータの分析値を演算する演算装置を設け、前記メモリ内の各分割メモリのデータに基づいて各試薬毎の分布状態図を作成すると共に前記演算装置により演算された分析値に基づいて分布状態図を作成する画像処理装置を設けてなることを特徴とするものである。

【0015】したがって、請求項1記載の作用と同様であり、脳標本などの組織試料は物質Aに特異的な試薬A'にて特異的に染色され、この試料がステージにより2次元方向に移動されて上記の試料上に分布する試薬A'のフォトメトリーのシグナル強度の分布状態図が画像化して作成される。上記の同一試料は物質Bに特異的な試薬B'にて特異的に染色され、この同一試料が同様の工程を経て同一試料上に分布する試薬B'のフォトメトリーのシグナル強度の分布状態図が作成される。このような同一試料上の複数の化学物質の分布状態が、演算装置により同一位置にある互いのフォトメトリーのシグナル強度の差や比などの値に計算されて細胞レベルで画像化されるので、容易に且つ確実に定量的に分析し、解

析することができる。

【0016】請求項3によるこの発明の組織マップ分析装置は、請求項2記載の組織マップ分析装置において、前記複数の各分割メモリが、物質Aに特異的な試薬A'を反応させた組織試料を2次元方向に走査して前記測定装置により得た上記試薬A'反応部の分布状態のデータを記憶する第1メモリと、物質Bに特異的な試薬B'を反応させた同一の上記組織試料を2次元方向に走査して前記測定装置により得た上記試薬B'反応部の分布状態のデータを記憶する第2メモリと、物質Cに特異的な試薬C'を反応させた同一の上記組織試料を2次元方向に走査して前記測定装置により得た上記試薬C'反応部の分布状態のデータを記憶する第3メモリと、から構成してなることを特徴とするものである。

【0017】したがって、試薬A'を反応させた組織試料の試薬A'反応部の分布状態のデータは第1メモリに格納され、試薬B'の場合は第2メモリに格納され、試薬C'の場合は第3メモリに格納されるので、各試薬A'、B'、C'に対応する反応部の画像処理や異なる試薬に対応する反応部のデータ間の差や比などの値の計算が容易となる。

【0018】請求項4によるこの発明の組織マップ分析装置は、請求項2又は3記載の組織マップ分析装置において、前記ステージに、同一組織試料を前記ステージの所定位置に試料位置決め手段を設けてなることを特徴とするものである。

【0019】したがって、複数の試薬により反応した同一組織試料の反応部が確実に重ね合わさって画像化され、2つの異なる分割メモリのデータの差や比などの値も確実に画像化され、解析できる。

【0020】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について図面を参照して詳細に説明する。

【0021】図1及び図2を参照するに、本実施の形態に係わる組織マップ分析装置（MapAnalyzer）1は、落射型蛍光顕微鏡3を用いて試料の測光データの2次元分布を求めるものである。顕微鏡3はオートスキャンニングステージ5（以下、「スキャンニングステージ」という）、測定装置としての例えばフォトメータ7を有する。

【0022】フォトメータ7には、検出器に感度や定量性の上で最も信頼性のあるフォトマル（光電子増倍管、Photomultiplier）が用いられており、干渉フィルタと測光絞りが検出器の受光前面に挿入されている。励起ビームは、視野絞りと開口絞りによって任意に絞ることができ（標本9面での最小スポット：100倍の対物レンズ使用時0.8μmφ、20倍の対物レンズ使用時6μmφ）、目的とする試料としての例えば標本9の微小領域からの光だけを選択して測光することが可能である。

【0023】図3を参照するに、スキャンニングステー

ジ5には、同一組織試料としての同一標本9をスキャンニングステージ5の所定位置に設置するための試料位置決め手段としての例えば位置決めピン11が少なくとも2箇所設けられており、標本9を貼り付けたスライドガラス13にも上記の位置決めピン11を挿脱可能な位置決め穴15が同数設けられている。

【0024】また、試料位置決め手段の他の例としては、図4に示されているようにスライドガラス13の隣り合う2側縁を突当てるための突当て部材17がスキャンニングステージ5に設けられており、残りの2側縁に設けられたスライドガラスおさえ18でスライドガラスを所定位置に固定する。なお、上記の突当て部材17は少なくとも3箇所の突当てピンであっても構わない。いずれにしても、スライドガラス13をスキャンニングステージ5の所定位置に着脱可能であれば特に限定されるものではない。また、スキャンニングステージ5上に位置決め用のマーカを付与せしめて、スライドガラス13をこのマーカにその都度位置決めするようにしても構わない。

【0025】測光コントローラ19は、上記のスキャンニングステージ5をXY方向に移動制御するステージ制御装置21、フォトメータ7を制御する測光制御装置23を有する。

【0026】システムコントローラ25は、ステージ制御装置21及び測光制御装置23に指令信号を出力する主制御系MCS27と測光データを記憶するためのメモリ29を有する。

【0027】このメモリ29内には複数の分割メモリ31が備えられており、複数の各分割メモリ31は、測定すべき同一組織試料としての同一標本9を各試薬A'、B'、C'、...毎に反応せしめてからスキャンニングステージ5を介してXY方向の2次元方向に走査してフォトメータ7により測定して得た各試薬反応部の分布状態の各データ（透過光、反射光、蛍光などの強度データ）をそれぞれ各試薬A'、B'、C'、...毎に記憶せしめるものである。

【0028】複数の各分割メモリ31としては、例えば、試薬A'を反応させた組織標本9をXY方向に走査してフォトメータ7により得た上記試薬A'反応部の分布状態のデータを記憶する第1メモリ31Aと、試薬B'を反応させた同一の上記組織標本9をXY方向に走査してフォトメータ7により得た上記試薬B'反応部の分布状態のデータを記憶する第2メモリ31Bと、試薬C'を反応させた同一の上記組織標本9をXY方向に走査してフォトメータ7により得た上記試薬C'反応部の分布状態のデータを記憶する第3メモリ31Cと、いう具合に各試薬A'、B'、C'、...毎に設けられる。

【0029】また、システムコントローラ25には、データや指令を入力するためのキーボードの如き入力装置33と、CRTの如き表示装置35が設けられている。さらに、上記の複数の各分割メモリ31A、31B、3

1 C、...のデータのうちから 2 つの異なる分割メモリ 3 1 のデータ間の差や比などの分析値を演算する演算装置 3 7 が設けられている。また、上記のメモリ 2 9 内の各分割メモリ 3 1 A、3 1 B、3 1 C、...毎のデータに基づいて各試薬 A'、B'、C'、...毎の分布状態図（組織マップ）を作成する画像処理装置 3 9 が設けられている。なお、この画像処理装置 3 9 は上記の演算装置 3 7 により演算された分析値に基づいて分布状態図（組織マップ）を作成することもできる。

【0030】スキャンニングステージ 5 は、測光コントローラ 1 9 からの指令により、X、Y 方向に 0.25 μm 以上のステップ幅で自由に走査する。走査速度は 100 測光ポイント/秒であり、走査範囲は 140 × 140 mm 以内で任意に選択することができる。標本 9 を一定の速度で移動させながら、各測光ポイントの透過光、反射光、蛍光などの強度が測定され、システムコントローラ 2 5 に取り込まれる。蛍光を用いる場合であっても、各ポイントは励起ビームによって 0.01 秒しか照射されないため、照射による蛍光の退色はほとんどみられない。

【0031】より詳しくは、スキャンニングステージ 5 上に配置された標本 9 が発する光は顕微鏡 3 を介してフォトメータ 7 によって検出される。検出した測光信号は、測光制御装置 2 3 を介してシステムコントローラ 2 5 内の主制御系 MCS 2 7 に出力され、メモリ 2 9 内に蓄積される。システムコントローラ 2 5 と測光制御装置 2 3 とは測光データ転送専用回線によって接続されている。

【0032】主制御系 MCS 2 7 はステージ制御装置 2 1 に対して指令信号を出力し、スキャンニングステージ 5 を任意の測定位置に移動させる。ステージ制御装置 2 1 からスキャンニングステージ 5 へ出力されるパルス信号は、主制御系 MCS 2 7 にも出力される。主制御系 MCS 2 7 はステージ制御装置 2 1 からのパルス信号に基づいてデータの蓄積を繰り返し行うことにより、標本 9 の測光の 2 次元分布が得られる。

【0033】本発明の装置は試料からの反射光あるいは蛍光または試料を透過する透過光を測定するものである。本装置に用いられる光学系の例を図 5 に示す。図 5 の A は反射光あるいは蛍光を測定する場合であり、図 5 の B は透過光を測定する場合の光学系を例示したものである。

【0034】図 5 の A において、ハロゲンランプ 4 1 から出た光は、集光レンズ 4 2、熱遮断フィルタ 4 3、シャッター 4 4、開口絞り 4 5、視野絞り 4 6 を介して光束が絞られ、ダイクロイックミラー 4 7 により反射され、対物レンズ 4 8 を介して標本（組織試料）9 に集光される。試料により反射された光、または照射された光により励起された蛍光は、対物レンズ 4 8 を介しダイクロイックミラー 4 7 を通過し、測定系にはいる。測定系

では、投影レンズ 4 9、シャッター 4 4、赤外線カットフィルタ 5 0、バンドパスフィルタ（干渉フィルタ）5 1、測光絞り 5 2 を介しフォトマル（光電子増倍管）5 3 に入り、光量が測定される。なお、参照符号 5 はスキャンニングステージであり、これは X Y 方向に移動され、試料表面が走査される。

【0035】図 5 の B は透過光で測定する場合であり、ハロゲンランプ 4 1 から出た光は、集光レンズ 4 2、熱遮断フィルタ 4 3、シャッター 4 4、開口絞り 4 5、視野絞り 4 6 を介して光束が絞られ、バンドパスフィルタ（干渉フィルタ）5 1 を介しミラー 5 5 により反射され標本（組織試料）9 に照射され、試料を透過する透過光が、A の場合と同様な測定系（図示せず）に導かれ光量が測定される。なお、参照符号 5 6 は標本 9 上の測定部位に光を集めるための集光器である。

【0036】上記の測光操作を蛍光の場合を例に簡単にまとめると以下になる。

【0037】（1）蛍光免疫組織化学染色した標本 9 の微小領域（測光ポイント）が、絞りこんだ励起ビームで照射される。

【0038】（2）この領域で発せられた蛍光は、対物レンズ 4 8 と測光絞り 5 2 を通してフォトマル 5 3 に集積され、その強度が測定される。

【0039】（3）標本 9 がオートスキャンニングステージ 5 によって次の測光ポイントへ移動され、蛍光強度が測定される。

【0040】（4）各微小領域の蛍光強度のデータがシステムコントローラ 2 5 のメモリ 2 9 に記憶されて蓄積され、スキャンした全体領域の画像が構築され、カラーやモノクロの図で表示装置 3 5 に表示される。

【0041】次に、本発明の実施の形態の組織マッピング方法について説明する。

【0042】本発明のマッピング法は組織試料内に存在する物質に特異的な試薬を結合させ、結合した部分に生ずる光学的な変化あるいは特性を、透過光、反射光あるいは蛍光などを用いて測光（フォトメトリー）するものである。従って、結合する試薬自体が蛍光を発するか、特有の吸収波長を有するというような光学的な特徴あるいは特性を有する場合は、これを光学的マーカーとして測光することができるばかりか、試薬自体に光学的マーカーがない場合であっても、試薬が特定の物質と結合することにより吸収波長が変化するなどの光学的特性が変化する場合は、これを光学的マーカーとして測光することができる。

【0043】本発明で用いる物質に特異的な試薬とは、この物質に特異的に結合する物質や特異的に反応する物質を意味するものである。特定の物質に特異的に結合あるいは反応する物質は、すなわち特異的な試薬は測定しようとする物質の種類に応じて選択されるが、例えば、その物質に対する抗体、特定のレセプターに結合するリ

ガンド、特定の酵素に対する基質などが挙げられ、測定しようとする物質によっては、ビオチン - アビジン系のようにより特定の物質に結合することが知られている物質を応用することも可能である。

【0044】これらの、抗体やリガンドなどには結合した抗体やリガンド自体が蛍光を生じるようにそれら自体に蛍光物質を結合させて、生じる蛍光を光学的マーカーとして測光することもできるが、抗体の場合は、まず、測定しようとする物質に特異的な抗体を結合させた後、この抗体に対する蛍光物質を結合した抗体（蛍光標識抗 - 抗体）を用いて染色する、いわゆる二抗体法により蛍光免疫組織化学染色を施すことができる。

【0045】測定しようとする物質に対する抗体は、公知の方法に従い、マウス、ウサギ、ヒツジ、ヤギなどの動物を免疫することにより得られるが、測定しようとする物質によってはすでに市販されているものもあり、これらを利用することができる。

【0046】また、蛍光標識抗 - 抗体としては、蛍光物質で標識された抗 - ウサギ IgG 抗体（血清）、抗 - ヒツジ IgG 抗体（血清）、抗 - マウス IgG 抗体（血清）など多くのものが市販されており、これらのものを利用することができる。

【0047】従って、測定しようとする物質に対する抗体自体に蛍光物質を公知の方法に従い結合させ、この抗体を用いて免疫組織化学染色することはもちろん可能であるが、上記のような蛍光物質で標識した抗 - 抗体が市販されていることから、これらの蛍光標識抗 - 抗体（血清）を用いる二抗体法による免疫組織化学染色が容易であり、より汎用性があることから好ましいものである。

【0048】標識する蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート（FITC、励起波長；496nm、蛍光波長；518nm）、テトラメチローリイソチオシアネート（TRITC、励起波長；554nm、蛍光波長；565nm）、ライサミンローダミンスルホニルクロリド（LRSC、励起波長；572nm、蛍光波長；590nm）やスルホローダミン101酸クロリド（テキサスレッド、励起波長；592nm、蛍光波長；610nm）などのローダミン類など多数のものが知られており、いずれのものも使用できるが、一連のマッピングにおいて使用する蛍光物質としては同一のものであることが定量性見地から好ましいものである。しかしながら、異なる蛍光物質であってもこれらの物質が発する蛍光強度と濃度との関係を補正することによって使用することができる。

【0049】組織標本は、スライドガラス上に固定した組織試料を測定しようとする物質に特異的に結合する試薬を用いて処理し、洗浄して未結合の試薬を除去することにより作製される。また、前記した二抗体法を用いる場合には、上記の操作に続けて、蛍光物質を結合した抗 - 抗体などで標本を処理し、未結合の蛍光標識化抗 - 抗

体を洗浄除去し、測定しようとする物質が蛍光物質でラベルされた組織標本を得る。そしてこのようにして調製された組織標本はスキャニングステージ上に載置され、走査されることにより、それぞれの位置における光量が測光される。

【0050】この測光に際し、組織試料標本が前もって蛍光をもつ色素（エオジンやメチルグリーンなど）で染色されている場合や組織自体が自ら蛍光の発生を有するような場合など、組織標本自体が蛍光を有する場合には、抗体が結合する前の試料標本を予め測光しておき、この測定値をもとに、抗体が結合したときの状態を求めることもできる。

【0051】測定する物質がレセプターとリガンドの場合や酵素と基質などのように、特異的に結合する物質が知られている場合には、リガンドや基質自体あるいは、蛍光物質を結合したリガンドや基質の誘導体を上記の「特異的な試薬」として用いることができる。また、測定しようとする物質が酵素のようなタンパク質のようなもので、このタンパク質に対する抗体産生が可能なものであれば、このタンパク質を抗原として、免疫することにより抗体が容易に得られ、この抗体は上記の「特異的な試薬」として用いることができる。

【0052】一方、測定する物質が、アミノ酸、ポリペプチドや脳内アミンのように低分子であって、そのもの自体では抗体を産生し得ないものであるときは、以下のようにして、蛍光免疫組織化学染色を行い、これらの物質に対してマッピングを行うことができる（Geffard, M. ら、Brain Res. 294:161-165; 1984およびGeffard, M. ら、J. Neurochem. 42:1593-1599; 1984）。

【0053】脳内アミンのマウスの脳におけるマッピングの場合を例に挙げて説明する。まず、インビトロで、脳内アミンとグルタルアルデヒドとを反応させ、脳内アミンにグルタルアルデヒドが縮合した高分子量のアミン - グルタルアルデヒド縮合体を得、このものを抗原としてウサギを免疫し、血清から抗体を得る。

【0054】一方で、マウスを用いて、心臓からグルタルアルデヒドを灌流すると、生体内でも同様の縮合反応が生じ、マウスの脳内で、脳内アミンと灌流されたグルタルアルデヒドとが縮合し、アミン - グルタルアルデヒド縮合物が生成し、脳内アミンが存在していた位置で固定される。次に、この脳をスライスし、スライドガラス上に固定した標本を得、別途調製したウサギの抗 - アミン - グルタルアルデヒド縮合物抗体で処理し、マウス脳内アミン - グルタルアルデヒド縮合体に、抗 - 脳内アミン - グルタルアルデヒド縮合物ウサギ抗体を結合させる。次いで、蛍光標識した抗 - ウサギ IgG 抗体（血清）を用いて処理することにより、試料標本が調製される。

【0055】以上のように、本発明では、脳内に存在するタンパク質のみならず、脳内アミンのような低分子の

物質に対しても蛍光免疫組織化学染色を施すことができ、本発明のマッピング分析装置 (MapAnalyzer) により蛍光を測光することによりマッピングすることが可能となる。

【0056】

【実施例】次に、上述したマッピング分析装置 (MapAnalyzer) を用いてラット脳の同一標本における複数の物質に対する多重マッピング法について、実施例として、タイロシン水酸化酵素、カルモジュリンおよびカルモジュリン依存性プロテインキナーゼIIを例として具体的に説明する。

【0057】特異的な試薬として、それぞれ、抗 - タイロシン水酸化酵素抗体 (TH抗体、試薬A')、抗 - カルモジュリン抗体 (CaM抗体、試薬B')、および抗 - カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII抗体 (CaMKキナーゼII抗体、試薬C') を用い、二次抗体として、蛍光物質 (FITC) で標識された、これらの抗体に対する抗 - IgG抗体 (血清) を用いた二抗体法により蛍光免疫組織化学染色を行った。

【0058】用いた上記の各抗体について詳しく説明すると、TH抗体は、Chemicon International, Inc.社から購入したものであり (Catalog No. AB151)、ラット副腎髄質の腫瘍組織から精製したTHを抗原とし、ウサギから抗体を作製したものである。

【0059】CaM抗体は、Transformation Research, Inc.社から購入したものであり (Catalog No. 5016)、牛精巢から精製したCaMを用い、ヒツジから抗体を作製したものである。

【0060】さらに、CaMKキナーゼII抗体は、Chemicon International, Inc.社から購入したものであり (Catalog No. MAB8699)、マウスを精製したCaMKキナーゼIIで免疫し、脾臓のリンパ球をマウス骨髓腫細胞 (NS1/SP2) と融合して、6G9ハイブリドーマクローンを作り、抗体を腹水内で作製し、プロテインA分別で精製されたものである。

【0061】また、FITCで標識化されたFITC標識化抗 - ウサギIgGヤギ血清は、Zymed Lab., Inc.社から購入したものである (Catalog No. 65-6111)。

【0062】また、FITC標識化抗 - ヒツジIgGウサギ血清は、Vector Lab., Inc.社から購入したものである (Catalog No. FI-6000)。

【0063】そして、FITC標識化抗 - マウスIgGヤギ血清は、American Qualex International, Inc.社から購入したものである (Catalog No. A106FU)。

【0064】組織試料標本を次のようにして調製した。

【0065】まず、ラットをペントバルビタールで麻酔し、心臓より4%のバラホルムアルデヒドと0.2%のグルタルアルデヒドとの混合液で灌流固定する。ラット脳を摘出し、液体窒素あるいはドライアイスで凍結した後、クリオスタットを用いて20μmの厚さにスライス

し、ゼラチンでコーティングされたスライドガラスに貼り付け、試料標本を作製した。

【0066】次に、このラット脳の標本に対して、上記の抗体を用いて蛍光免疫組織化学染色を行うが、まず二抗体法によるFITCを用いたTHに対する蛍光免疫組織化学染色を行った。操作手順は以下のとおりである。

【0067】(1) 上記の標本をPBS (phosphate-buffered saline) で20分間洗浄する。

【0068】(2) 正常ヤギ血清で2時間、4℃で前処理し、抗 - ウサギIgGヤギ血清の非特異的結合をブロックする。

【0069】(3) PBSで60分間洗浄する。

【0070】(4) 200倍に希釈したTH抗体を標本にのせ、4℃で12時間反応させる。

【0071】(5) PBSで20分間×3回洗浄する。

【0072】(6) FITC標識化抗 - ウサギIgGヤギ血清を100倍に希釈して、標本にのせ、室温で3時間反応させる。

【0073】(7) PBSで20分間×3回洗浄する。

【0074】(8) 10%グリセリンで封入し、直ちにマッピング分析装置 (MapAnalyzer) で測定する。

【0075】次に、以上のようにTH分布の測光を行った同一標本に対して、200倍に希釈したCaM抗体と200倍に希釈したFITC標識化抗 - ヒツジIgGウサギ血清を用いてTH抗体の場合と同様にして、CaMの免疫組織化学染色を行い、マッピング分析装置 (MapAnalyzer) で測定した。染色に先立ち標本上のグリセリンをPBSで洗浄し、除去した。

【0076】なお、CaMの免疫組織化学的蛍光強度は、脳標本の各微小領域におけるCaM染色前後の蛍光強度の差から求めた。

【0077】次に、以上のようにCaM分布の測定を行った同一標本に対して、100倍に希釈したCaMKキナーゼII抗体と40倍に希釈したFITC標識化抗 - マウスIgGヤギ血清を用いて、CaM抗体の場合と同様にしてCaMKキナーゼIIの蛍光免疫組織化学染色を行い、マッピング分析装置 (MapAnalyzer) で測定した。

【0078】なお、CaMKキナーゼIIの免疫組織化学的蛍光強度は、脳標本の各微小領域におけるCaMKキナーゼII染色前後の蛍光強度の差から求めた。

【0079】次に、以上のようにして得られた同一標本からの各物質の分布分析 (マッピング) 方法について説明する。

【0080】標本の全領域を20μm間隔で測光し、各標本から約40万点のデータを得た。最初に染色した物質 (TH) の免疫組織化学的蛍光強度の分布は、染色した標本を測定することにより直接得られる。なお、必要に応じ、染色前に試料標本のバックグラウンドを測定し、この値を差し引いてTHの免疫組織化学的蛍光強度の分布を求めることもできる。そして、2番目以降に染色し

た物質（CaMおよびCaMキナーゼII）の免疫組織化学的蛍光強度分布は、各物質の染色前後の蛍光強度の差から得られる。

【0081】すなわち、まず脳標本をTH抗体で染色し、その標本の全領域における蛍光強度を測定する。このデータ（1回目のデータ）は、THの分布を示すものであり、得られた蛍光強度を8～256段階に層別化し、標本上の各点における蛍光強度を明度差（白黒）もしくはカラー化して表示すると、図6Aに示すような画像が得られる。この画像（図面においては白黒表示である）において、より黒い部分がTHの量が多い部分、すなわちTHが局在する部分である。なお、作製した脳標本はラットの脳を冠状面でスライスしたものであり、画像の上方向がラットの頭頂部に相当する。また、図中、参照符号61は大脳皮質運動野、62は線条体、63は嗅結節、64は前交連、65は側坐核、66は外側中隔核、67は対角帯、68は梨状皮質、69は島皮質をそれぞれ示し、得られた画像より、THは線条体62、側坐核65、嗅結節63、大脳皮質運動野61に多く局在していることがわかる。

【0082】得られたデータ（1回目のデータ）はシステムコントローラ25のメモリ29内の第1メモリ31Aに保存される。

【0083】次に、上記の同一標本をCaM抗体で染色する。この染色した標本をスキャンニングステージのまったく同じ位置にセットし、同一条件下で再び測光する。この蛍光強度のデータ（2回目のデータ）はシステムコントローラ25に送られ、システムコントローラ25のメモリ29内の第2メモリ31Bに保存される。そして、演算装置37により各測光点において、2回目の値から1回目の値を差し引くことにより、CaMの分布を示すデータが得られ、このデータを層別化して表示すると、図6のBに示すような画像が得られる。

【0084】さらに、上記の同一標本をCaMキナーゼII抗体で染色し、同様に測光する。この蛍光強度のデータ（3回目のデータ）はシステムコントローラ25に送られ、システムコントローラ25のメモリ29内の第3メモリ31Cに保存される。そして、演算装置37により各測光点において、3回目の値から2回目の値を差し引くことにより、CaMキナーゼIIの分布を示すデータが得られ、このデータを層別化して表示すると、図6のCに示すような画像が得られる。

【0085】以上のようにして、マップ分析装置（MapAnalyzer）を用い、TH、CaMやCaMキナーゼIIのそれぞれに対して定量的画像が得られる。なお、これらの定量的画像、図6のA～Cとそれらの生データはそれぞれメモリ29に格納される。

【0086】次に、以上のようにして得られた同一標本からの各物質の分布の比較について説明する。

【0087】以上のようにTH、CaM、CaMキナー

ゼIIの各定量的画像をメモリ29に記憶できるので、マップ分析装置（MapAnalyzer）を用いて、各領域における物質間の免疫組織化学的蛍光強度を定量的に比較し、解析することができる。

【0088】例えば、標本の各微小領域における純粋なCaMキナーゼIIの免疫組織化学的蛍光強度（図6のC）からCaMの免疫組織化学的蛍光強度（図6のB）を差し引き、この差を画像化すると、図7のAのような画像が得られる。この図7のAの画像において黒い部分はCaMよりもCaMキナーゼIIが多く分布する領域を示している。

【0089】逆に、図7のBの画像は、CaMの蛍光強度（図6のB）からCaMキナーゼIIの蛍光強度（図6のC）を差し引き、この差を画像化したものであり、黒い部分はCaMキナーゼIIよりもCaMが多く分布する領域を示している。

【0090】さらに、CaMキナーゼIIの蛍光強度（図6のC）をCaMの蛍光強度（図6のB）で割り、この比（CaMキナーゼII / CaM）を画像化すると、図7のCで示されるような画像を得ることもできる。黒い部分は、CaMキナーゼIIがCaMに比べ相対的に多い部分を示している。

【0091】得られた画像より、TH、CaMおよびCaMキナーゼIIは、線条体62の外側部、側坐核65、嗅結節63、大脳皮質運動野61で共に高く、これらの領域が脳内で重要な役割をはたしていることが考えられる。さらに、CaMキナーゼIIはCaMよりも外側中隔核66、線条体62の内側部、大脳皮質の梨状皮質68と島皮質69で高く、逆にCaMはCaMキナーゼIIよりも対角帯67で高く分布することがわかる。

【0092】以上のように、本発明の組織マップ分析装置（MapAnalyzer）は、視野絞りと開口絞りによって励起ビームが絞り込まれ、各測光ポイントは励起ビームによって0.01秒しか照射されないため、一回の測光で蛍光の退色はほとんどみられない。ちなみに、実験では、50回の分析を繰り返しても同じデータが得られたので、実施例のように、染色→測光→染色→測光の繰り返し操作を行っても、誤差のない値を得ることができる。しかも、マップ分析装置（MapAnalyzer）は、検出器にフォトマル（光電子増倍管）を用いているので、TVカメラを用いた画像解析装置と比較して2桁以上、定量性が優れている。

【0093】なお、この発明は前述した実施の形態に限定されることなく、適宜な変更を行うことによりその他の態様で実施し得るものである。

【0094】本実施形態においては測光コントローラ19とシステムコントローラ25とが別々になっているが、測光コントローラ19がシステムコントローラ25の内部に組み込まれていても、逆に測光コントローラ19の内部に主制御系MCS27とメモリ29とが組み込

まれていても構わない。

【0095】

【発明の効果】以上のごとき発明の実施の形態の説明から理解されるように、請求項1の発明によれば、脳標本などの組織試料は特異的な試薬A'にて特異的に染色され（特異的な試薬A'として抗体を用いるときは蛍光免疫組織化学的に染色され）、この試料をスキャンニングステージにより2次元方向に移動してマップ分析装置により測光し、上記の試料上に分布する試薬A'の光学的特性（例えば、蛍光強度など）に基づき試薬A'の分布状態図を画像化できる。上記の同一試料は特異的な試薬B'にて蛍光免疫組織化学的に染色され、この同一試料を同様の工程を経て測光することにより同一試料上に分布する試薬Bの蛍光物質の強度の分布状態図を画像化できる。したがって、同一試料上の複数の化学反応の分布状態を互いの差や比などの値に計算して相関的に細胞レベルで画像化でき、容易に且つ確実に定量的に分析できる。また、本発明の方法は非破壊的であり、しかも測定前の試料の状態に影響を受けないものであるから、同一の試料標本に対して異なる物質の分布状態をくり返して何度でも調べることができる。

【0096】請求項2の発明によれば、請求項1記載の効果と同様であり、脳標本などの組織試料は試薬A'にて特異的に（試薬A'として抗体を用いれば蛍光免疫組織化学的に）染色され、この試料をスキャンニングステージにより2次元方向に移動してマップ分析装置により測光し、上記の試料上に分布する試薬A'の光学的特性（例えば、蛍光強度など）に基づき試薬A'の分布状態図を画像化できる。上記の同一試料は特異的な試薬B'にて同様に染色され、この同一試料を同様の工程を経て測光することにより同一試料上に分布する試薬B'の分布状態図を画像化できる。したがって、同一試料上の複数の物質の分布状態を互いの差や比などの値に計算して、相関的に細胞レベルで画像化でき、容易に且つ確実に定量的に分析し、解析することができる。

【0097】請求項3の発明によれば、特異的な試薬A'を反応させた組織試料の試薬A'反応部の分布状態のデータを第1メモリに格納でき、特異的な試薬B'の場合は第2メモリに格納でき、特異的な試薬C'の場合は第3メモリに格納できるので、各試薬A'、B'、C'に対応する反応部の画像処理や異なる試薬に対応する反応部のデータ間の差や比などの分析値の計算を容易にできる。

【0098】請求項4の発明によれば、複数の試薬により反応した同一組織試料の位置を確実に重ね合わせることができるので、測定操作が容易となるとともに得られる画像の正確性が向上する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施の形態を示すもので、組織マップ分析装置の斜視図である。

【図2】本発明の実施の形態に係わる組織マップ分析装置の構成ブロック図である。

【図3】本発明の実施の形態のスキャンニングステージの部分的な斜視図である。

【図4】本発明の実施の形態の他のスキャンニングステージの部分的な斜視図である。

【図5】本発明の実施の形態に係わる組織マップ分析装置の光学系の一例を示す図である。

【図6】ラットの脳組織における各物質の存在状態を示すマップ図であり、図中、Aはタイロシン水酸化酵素（TH）の、Bはカルモジュリン（CaM）の、Cはカルモジュリン依存性プロテインキナーゼII（CaMKII）の分布状態をそれぞれ示す画像である

【図7】図6に示す、CaMとCaMKIIの存在状態のデータに基づき演算した結果を示すマップ図であり、図中、Aは、CaMKIIのデータ（図6のC）からCaMのデータ（図6のB）を差し引いたもので、CaMKIIがCaMよりも多く存在する領域を示し、Bは逆にCaMのデータ（図6のB）からCaMKIIのデータ（図6のC）を差し引いたもので、CaMがCaMKIIよりも多く存在する領域を示し、さらに、CはCaMKIIとCaMとの比をとったもので、CaMKIIがCaMに比べて相対的に多く存在する領域を示している画像である。

【符号の説明】

- 1 組織マップ分析装置
- 3 落射型蛍光顕微鏡
- 5 スキャンニングステージ（ステージ）
- 7 フォトメータ（測定装置）
- 9 標本（組織試料）
- 11 位置決めピン（試料位置決め手段）
- 13 スライドガラス
- 15 位置決め穴
- 17 突当て部材（試料位置決め手段）
- 18 スライドガラスおさえ
- 19 測光コントローラ
- 21 ステージ制御装置
- 23 測光制御装置
- 25 システムコントローラ
- 27 主制御系MCS
- 29 メモリ
- 31A 第1メモリ（分割メモリA）
- 31B 第2メモリ（分割メモリB）
- 31C 第3メモリ（分割メモリC）
- 33 入力装置
- 35 表示装置
- 37 演算装置
- 39 画像処理装置
- 61 大脳皮質運動野
- 62 線条体

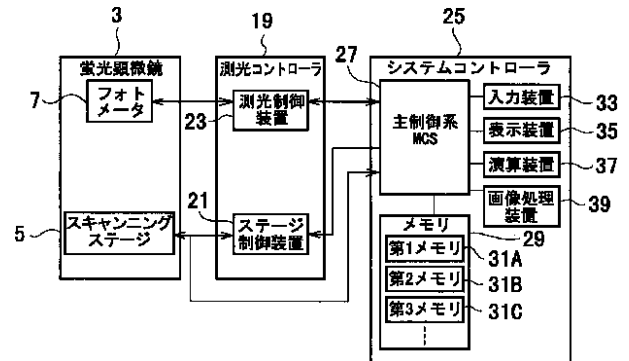
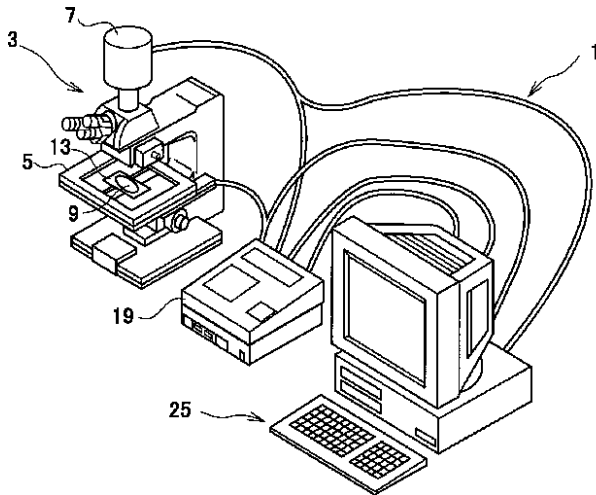
6 3 嗅結節
6 4 前交連
6 5 側坐核
6 6 外側中隔核

* 6 7 対角帯
6 8 梨状皮質
6 9 島皮質

*

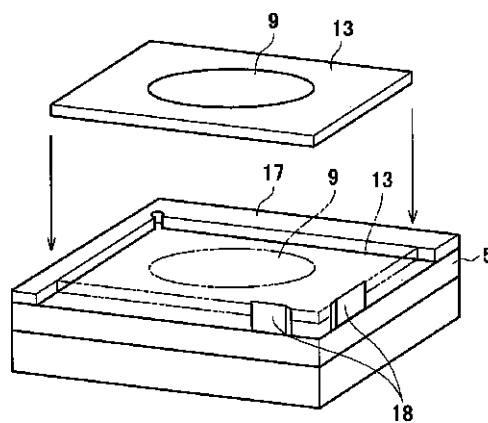
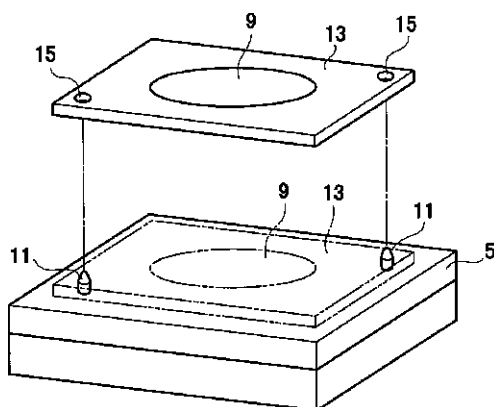
【図1】

【図2】

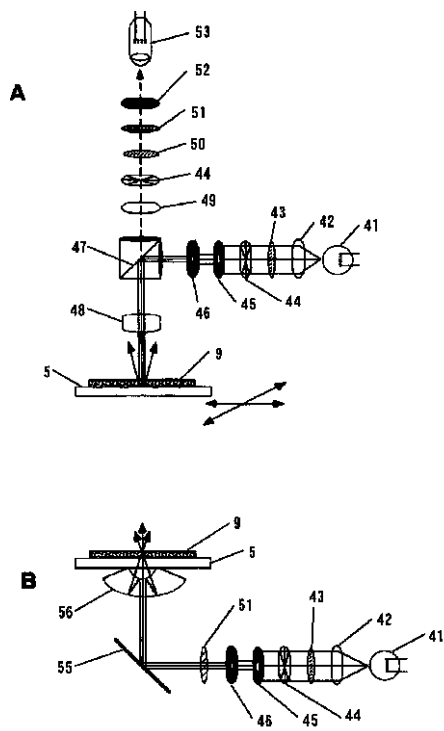


【図3】

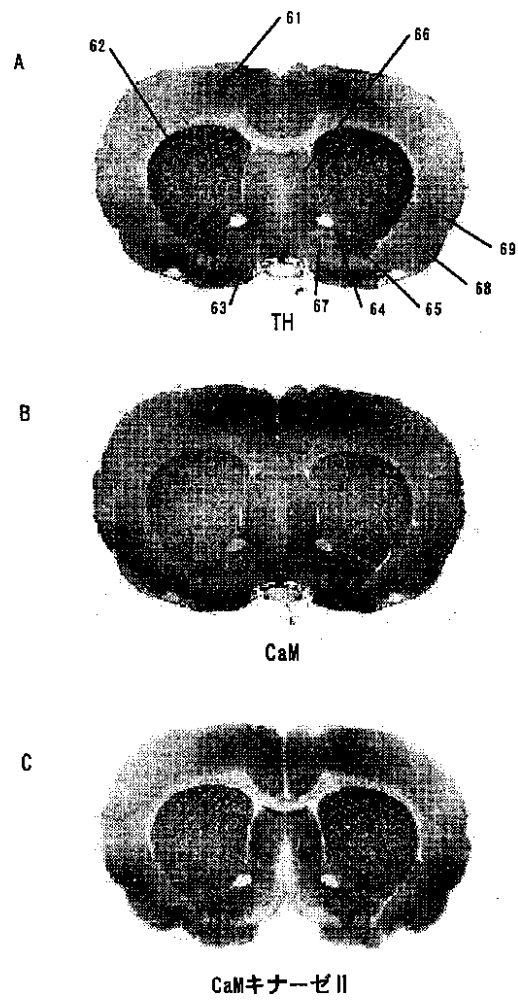
【図4】



【図5】



【図6】



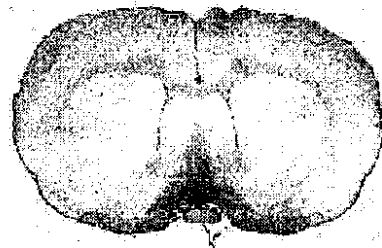
【図7】

A



CaMキナーゼII-CaM

B



CaM-CaMキナーゼII

C



CaMキナーゼII/CaM

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 BA14 BB23 BB24 BB46 CB01
CB26 DA20 FA16 FB03 FB07
FB12 FB16 GC15

专利名称(译)	组织标测方法和组织图分析装置		
公开(公告)号	JP2002228654A	公开(公告)日	2002-08-14
申请号	JP2001021699	申请日	2001-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	YAMATO SCI		
申请(专利权)人(译)	大和科学株式会社		
[标]发明人	須藤伝悦 秋山佳代 矢部一徳		
发明人	須藤 伝悦 秋山 佳代 矢部 一徳		
IPC分类号	G01N33/48 A61B10/00 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/58 G06K9/00		
CPC分类号	G01N33/5005 G01N33/582 G06K9/00127		
FI分类号	G01N33/48.M G01N33/48.P A61B10/00.D A61B10/00.V G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/BA14 2G045/BB23 2G045/BB24 2G045/BB46 2G045/CB01 2G045/CB26 2G045/DA20 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB16 2G045/GC15		
代理人(译)	三好秀		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：在细胞水平上对同一样本中的多个样本进行相关的荧光免疫组织化学反应相关分析和成像。 解决方案：在移动载物台5进行二维移动的载物台5的同时，用光度计7测量样本9上许多点的信息，并将该测量信号输入并存储在存储器29中。 获得样本9的二维信息以创建组织图。 此时，在使样品9与试剂A'反应之后，通过在二维方向上进行扫描来生成试剂A'的反应部分的分布状态图，然后将试剂B'添加至上述相同的样品9。 反应后，在二维方向上扫描以创建试剂B'的反应部分的分布图，并重复上述步骤必要的次数，以针对上述同一样品9分布不同试剂的反应图。 创建。 可以定量分析和分析诸如在同一样品9上的多种物质的分布状态的差异和比率之类的值。

