解剖誌　74：399-409（1999）

Mini Review

分子組織細胞化学の最近の進歩

小路　武彦

長崎大学医学部解剖学第三講座

（1999年3月25日受付，1999年5月10日受理）

要　約：細胞個々についての特異的遺伝子発現状態の検討は，細胞の生理状態を正確に把握するために必須なことと思われる．最終生産物の蛋白等の検索に関しては免疫組織化学が有効であるが，抗原性の固定による変化や，また蛋白の存在が必ずしもその場でのその時点での合成を意味しない事等問題点も多い．このような諸問題の解決法の一つとして開発された新しい組織化学的方法論がin situ hybridization（ISH）法であり，細胞単位での特定の核酸分子を局在化するものであった．我々はここ15年，特に解像力と簡便さの点で優れる非放射性ISH法の開発・改良に努力し，前処理条件の至適化や合成オリゴDNAプローブの導入などによる簡便化をもたらした．最近では，更にISH法によって検出されたmRNAの増減を転写レベルで解析するためにサウスウェスタン組織化学を独自に開発して応用に努めている．本稿ではこれらの分子組織細胞化学的方法論について概説したい．

Key words：In situ hybridization，非放射性プローブ，mRNA，転写調節因子，サウスウェスタン組織化学

緒　　言

Robert Hookによる細胞の発見[8]以来，生物諸器官の生理的・病理的変化の多くが組織学的形態情報として蓄積され，組織細胞生物学は形態学の重要な一角として脈々と発展を続けてきた．一方で，近年の細胞生物学の大躍進によりin vitroでの一様な細胞集団を解析することによって，細胞構造と機能更にはその生命体としての生活環（細胞増殖，細胞分化，細胞死）の調節機構に関する我々の知識は格段に向上している．しかしながら，in vitroでの解析結果が生体内での組織活動でも有効に作動しているものなのか培養条件下での人為的産物かの検討には，組織細胞レベルでの検討が必須であるのは自明であろう．

組織細胞形態学の基本は，組織切片を作製し，染料で着色し，そして顕微鏡観察することである．しかも，客観的な結果の理解の重要性から，現在では単純な形態変化の記載では不十分で，その形態変化の基盤となる物質的な変化の理解が求められている．その目的の為に，着色過程で特定の物質を同定するのが組織化学であり，更に酵素と基質の特異性を利用して酵素局在を視覚化するのが酵素組織化学，蛋白・糖質・脂質を抗原として用い抗原－抗体反応を利用するのが免疫組織化学と発展してきた．これらの方法論を礎に，更に核酸－核酸及び核酸－蛋白の塩基配列特異的な反応を利用し，遺伝子発現状態とその調節機構を細胞単位で検討するために開発・改良されつつあるのが分子組織細胞化学であり，その中心的方法論がin situ hybridization（ISH）[12,18]法とサウスウェスタン組織化学[21]更にはDNA鎖切断を検出するin situ nick translation[22]法やTUNEL[6]法である．

連絡先：小路　武彦　〒852-8523 長崎市坂本1-12-4
長崎大学医学部解剖学第三講座

我々は，特定のmRNAの発現状態を高解像力で視覚化・解析するために非放射性ISHの開発に努力し，更に最近ではそれらの結果を転写調節レベルで理解するための方法論としてサウスウェスタン組織化学を開発してきた．本稿では，我々のここ15年の研究結果を基に特にこれらの分子組織細胞化学的方法論に関する最近の進歩を概説する．

ISH法の歴史的背景

1969年にGall & Pardue[5]並びにJohn等[9]の2つのグループから独立的に染色体標本上でリボゾームRNA遺伝子の存在箇所を同定する方法としてISH法が報告された，染色体上での特異的な遺伝子座の検討やウイルス遺伝子DNA等の特異的塩基配列を有すDNAの細胞内同定法として利用された（chromosomal ISH）．1978年，Brahic & Haase[2]により同様の原理が，ウイルスRNAの検出法として利用可能なことが示されると，特異的なmRNA発現を細胞個々のレベルで解析する手段（histo ISH或いはhybrido-histochemistry）として一躍注目を浴びるに至った[12,18]．

ISH法の意義

細胞特異的な現象の解析には，集団の平均値としての解析では一般に不十分であり，細胞個々のレベルでの検討結果が要求される．ここに，分子生物学的な手法であるサザンブロット法やノザンブロット法とISH法との根本的な差異が認められる．

DNAを対象としたISH法

染色体標本上で特定の遺伝子DNAの存在箇所を検討することは，その数や位置に関して遺伝子に生じた種々の異常を個体の一部を利用することにより簡便に検索する方法を提供

する．特に，染色体レベルで生じた先天異常の早期検出には臨床的意義も高い．また，潜伏感染しているDNAウイルスの検出には必須である．ヒトの全遺伝子配列を決定するヒトゲノムプロジェクトの中でも，重要な地位を占めている．

RNAを対象としたISH法

組織或いは細胞特異的遺伝子発現状態を検討する事は，細胞の生理状態を正確に把握するばかりでなく細胞増殖・細胞分化・細胞死といったような様々な細胞現象の調節機構を解明する上で必須である．最終生産物の蛋白レベルでの検討には免疫組織化学が有効であるが，特にホルモン分子のような分泌性の蛋白の場合，蛋白合成後に貯蔵・分泌・取り込み等によりその局在に変化を生じ得るため，免疫組織化学的に検出されたある蛋白の存在が，必ずしもその細胞でのその時点での合成を意味しないことが警告され，産生を確認するためにはmRNAの発現の検討が要求される．また，免疫組織化学の問題点として対象とする抗原性の固定操作による変化や消失が指摘されており，たとえばステロイドホルモン受容体等では，マイクロウエーブ[28]やオートクレーブ[3,24]を用いての“superheating”による抗原の固定或いは賦活化法の導入により以前は陰性とされていたものが，実は陽性であったと判明した例も相次いでいる．抗原性物質の化学的な多様性の故に生じる問題であった．更に，非常に活発に分泌されてしまう蛋白の場合には，例え産生されていても細胞内濃度が検出感度以下である場合も知られる[4]．従って，免疫染色結果が陰性であった場合でも，必要に応じてISH法による再確認が必要である．更にその塩基配列しか判明していない遺伝子の細胞発現の検討が要求される先端的分野に於いても，遺伝子発現状態の組織細胞検索方法としてISH法の利用が不可欠である．

非放射性ISH法と種々の選択肢

ISH法の原理（Fig. 1）

雑種形成反応

DNAはアデニン（A），グアニン（G），チミン（T），シトシン（C）の四塩基から，またRNAはA，G，ウラシル（U），Cから構成されている．核酸塩基間に於いては，Aに対してT或いはUが，Gに対してはCが相補的であり，それぞれ二本及び三本の水素結合によって複合体を形成する（Fig. 1）．従って，標的とするmRNA等の塩基配列に相補的な塩基配列をもつ核酸分子（プローブ：探索子）と適切な環境で反応させると両鎖は二本鎖の安定な分子雑種を形成する．分子雑種の安定性は基本的には塩基間に形成された水素結合の総数に依存している．安定性はいわゆる融解温度（Tm値）で表され，一般的にはDNA鎖間で得られた次の式で計算される．Tm＝81.5＋16.6log[溶液中の塩濃度]＋0.41×(GC含量：%)－675/塩基数－0.61×(ホルムアミド濃度：%) この計算式を基本にして，DNA-RNA雑種の場合は5-8度加算し，RNA-RNA雑種の場合には10-15度加算する．要は，Tmとは塩基の半数が一本鎖化し残り半分が二本鎖化している温度のことである．本式から明らかな様に，Tmは塩濃度，GC含量，分子雑種の長さ，ホルムアミド濃度等によって影響を受ける．そこでより厳しい条件，即ちより相補性が高い雑種しか存在できないような条件をstringencyが高いと呼び，より特異的な分子雑種を得る上で必要である．高温度，低塩濃度，高濃度のホルムアミド存在下等が相応する．尚，これらの計算式は，溶液中での反応に関するもので，ISH法のような固層にあるmRNAと溶液中のプローブ核酸との反応の場合には，Tm値は約5°C下がると言われている．雑種形成反応の速度に関しては，溶液中ではプローブの塩基配列が単調で長く且つ高濃度である程速いことが知られているが，実際上は何れのプローブ核酸を用いる場合でも，(Tm－30) から (Tm－15)°Cで15-20時間ハイブリダイゼーションを行う．

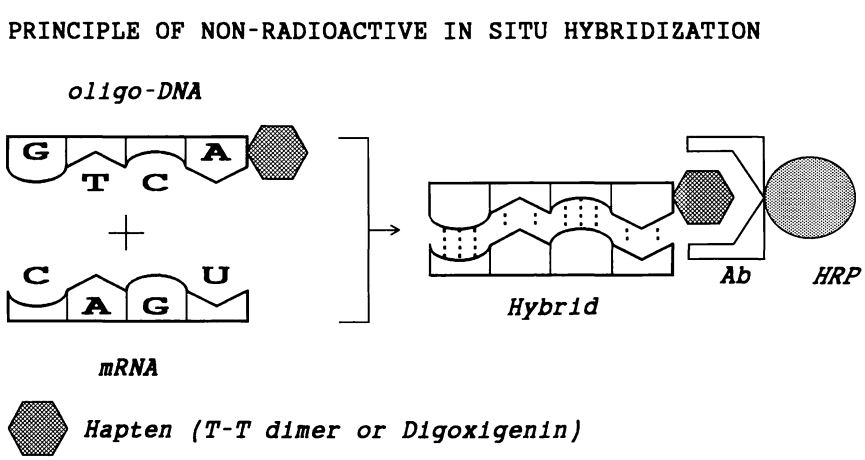


Fig. 1. Principle of nonradioactive in situ hybridization with an oligo-DNA probe. (1) Thymine-thymine (T-T) dimerized or digoxigenin (Dig)-labeled oligo-DNA is hybridized in situ with a tissue section. (2) After appropriate washing, T-T dimer or Dig is reacted with horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti-(T-T dimer) or anti-Dig. (3) Finally, the sites of HRP are visualized enzyme-immunohistochemically.

シグナルの視覚化

ISH 法では，プローブとして用いる核酸を放射性或いは非放射性物質で標識し，雑種形成反応後その標識物の特性或いは活性を利用してその存在箇所を視覚化する．放射性法では，オートラジオグラフィーによりシグナルを銀粒子からなる黒点として検出し，非放射性法の場合には最終的に horseradish peroxidase（HRP）等の酵素や或いは蛍光色素で標識した抗ハプテン抗体を反応させ主として免疫組織化学的にシグナルを視覚化するのが一般的である．

放射性法か非放射性法か？

ISH 法は，かつて ^{3}H，^{32}P 或いは ^{35}S 等の放射性同位元素（RI）標識プローブを用いて行われていた．これに対し，近年注目を集めている非放射性の免疫組織化学的 ISH 法の特徴をまとめると以下のようになる．

長所

RI 標識プローブを使用する場合と比較して，1）半減期が実質上なく一度標識したプローブ核酸は極めて安定に長期間利用可能である．2）全ての行程が2-3日以内で完了し簡便である．3）解像力が大変よく，細胞個々のレベルはもとより，場合によっては細胞内局在の検討も可能である．4）電顕的なアプローチが必要な場合，成功例は殆ど非放射性法で，方法が確立している．5）ヒトへの危険度や廃棄物の処理上，経済的で安全である．

批判と現状

1）免疫組織化学的 ISH 法への代表的批判は，感度が RI 法に比べて低いというものであった．しかしこれは，オートラジオグラフィーの銀粒子の一つ一つが特異的シグナルであるという誤った認識から由来する．どちらの方法にせよ，反応物の一定密度以上の局所的集積が陽性シグナルと見なされるので，signal/noise 率の観点から考察すれば，両者の有効なシグナル検出感度には本質的な差異は認められない．2）定量性に関して，従来非放射性 ISH 法の結果は定量化出来ないとされた．しかし，現在では画像処理装置が一般化し RI 法と同様にシグナルの定量化が可能になっている．3）ハプテンとして選んだ標識が内在している場合，非特異的反応の存在が指摘されるが，現在では動物・植物を通し天然には存在しない thymine-thymine（T-T）dimer[12,32] や，動物組織には存在しない digoxigenin（Dig）[4,15,16] 等の抗原性物質の利用が開発されている．4）シグナル検出に用いた酵素活性が組織細胞に内在する場合が指摘されるが，通常使用される HRP 等の活性に関しては種々の阻害法が考案されており，実際上殆ど問題にならない．

種々の選択肢

プローブ核酸

プローブとして用いられる核酸は，二本鎖のいわゆる cDNA，一本鎖 DNA 或いは合成オリゴ DNA と一本鎖の RNA である．二本鎖 cDNA[7,12] は，クローン化されたバクテリアのプラスミドから切り出すか polymerase chain reaction（PCR）により作製される．二本鎖 DNA プローブは，使用時に一本鎖化する必要があり，又ハイブリダイゼーション中に両鎖間で re-annealing が生じるのでアンチセンス鎖の実効濃度を一定に保つのは難しい．一本鎖 DNA は，以前はウイルスベクターを用いて得られていた[29] が，現在では asymmetric PCR 法や特殊なエクソヌクレアーゼを利用して一方の DNA 鎖のみ消化する方法により簡便に作製が可能となっている．センス或いはアンチセンス鎖しか含まないので効率の良いハイブリダイゼーションを行える．しかし作製が最も簡便なのは合成オリゴ DNA[4,15,18,25,30] であり，標的とする mRNA 配列が判れば任意の配列を直ちに合成して利用できる．これも一本鎖 DNA であるが，通常は25から60-mer 程度のものを合成する．DNA 合成機があれば 1 塩基当たり 5-6 min で合成可能であるし，外注しても1-2週間以内にしかも安価に入手可能である．RNA プローブは，特殊なベクターへ cDNA を組み込み，RNA ポリメラーゼを利用して作成する．DNA に較べて組織成分への非特異的吸着傾向が強く，その特異性の検定法や特異的シグナルを残すための RNase の利用に問題点がある[20] が，適切に利用されれば有効である．本稿では，合成オリゴ DNA の利用を中心に話を進める．

非放射性標識物の選択

プローブ核酸の標識物としては，HRP 等の酵素（酵素組織化学的方法），FITC 等の蛍光色素，或いは biotin，Dig や T-T dimer 等の抗原性物質（免疫組織化学的方法）が知られている．酵素組織化学的にシグナルを検出する方法では，酵素活性を維持する必要から必ずしもハイブリダイゼーションの至適条件での反応が行なえない点，分子サイズの大きなものを標識するためプローブの組織内への浸透性が悪い点，立体障害による雑種形成反応の阻害等の欠点があり，実際上 ISH に使用される場合は極めて限られる．蛍光色素で標識する方法は，特に共焦点レーザー顕微鏡と画像処理システムの一般化に従って注目されており，実際染色体上での特異的な遺伝子局在を証明する最も有効な方法（FISH 法）となっている．しかし，組織内 mRNA の検出に関しては，取り分け自家蛍光や高いバックグラウンド等の影響により画像処理無しでは明確なシグナルは得られにくい現状がある．そこでむしろ，FITC などの蛍光物質をひとつのハプテンとして利用する方法が試みられている．免疫組織化学的 ISH 法は，現在最も信頼性を獲得しているものであるが，それぞれのハプテンに特異的な利点と欠点が認められる．化学的な修飾法は，一般に反応性の調節が難しく，また反応させる前駆物質がしばしば不安定或いは危険物質であるため利用例は少ない．Biotin は，biotin 化核酸アナログを酵素反応を利用して取り込ませる．Biotin のハプテンとしての有能さや検出系の洗練度は群を抜くが，内因性の biotin の問題を避けることが出来ない．Dig や BrdU 等のハプテンも基本的には biotin と同様にして核酸へ導入出来る．Dig は現在広範に利用されているものの一つで，特に合成オリゴ DNA との併用で注目される．但し，過剰な Dig での標識は，組織・細胞の疎水性成分と非特異的な結合を増大することに留意する[16]．上記の全ての化学的及び生化学的標識法に共通する欠点として，実際上標識率の制御が困難である点と標識後の精製操作の必

要性である．これらの問題点を意識して我々が独自に開発した方法がT-T dimer法[12,18]である．標識法として他の方法と最も異なる点は，DNAそのものを抗原化する点である．DNAにはピリミジン塩基の一つとしてTが含まれるが，Tが隣接している所に紫外線（UV：λ=254 nm）が照射されると，ピリミジン環の二重結合が解裂し両者間に安定なシクロブタン構造が形成され，T-T dimerとよばれる．従って，この標識法は物理学的な修飾法と理解され，ハプテン化反応中になんら不要な物質の混入は無く標識後のプローブの精製も不要である．付け加えるに，Tの隣接箇所は100塩基中2-4箇所あれば十分で，実際上殆どの遺伝子に利用可能である．

ISH試料としての特徴

試料としては，培養細胞からサイトスピン標本，新鮮（未固定）凍結切片，既固定凍結切片，パラフィン切片，樹脂包埋切片まで必要に応じて何でも利用可能である．何れの場合にせよ，mRNAの検出を目的とするならRNAの保存度の検討を予め行ない，試料としての適切さを評価し取捨選択すべきである．

ISH法の基本操作（Table 1）

全体的な操作手順をTable 1に示した．各々の詳細[20]はここでは避けるが，特にRNAを研究標的とする場合は，RNaseの不要な混入・作用をいかに除くかが重要ある．

試料の作製と固定について

新鮮凍結切片の場合には，厚さ2-3 mmで直径が1 cm以下の試料をOCT compound(Miles)に包埋し直ちにエタノール/ドライアイスやアセトン/ドライアイスにて凍結する．凍結ブロックはできるだけ低温（−80°C以下）で保存し，速やかに使用する．使用に際し，クリオスタットで5-6 μmの切片とし，シラン処理グラススライドに拾い直ちにヘアードライヤー（RT）で乾燥させる．ISHに際し，RNAの組織切片への不動化並びに形態の維持を目的として固定を行なうが，アセトンやエタノール/酢酸（3：1）に比べ，4％パラホルムアルデヒド（PFA)/PBS固定が優れていた[15,16]．既固定凍結試料の作製法は他書を参照されたい[10,20]．パラフィン切片の作製に当たっては，組織を4％PFA/PBSにて室温で6 hrから一晩程度固定した後，通常の操作に従ってパラフィンに包埋する．至適な固定温度や時間は組織の種類や大きさなどで異なる．切片はシラン処理スライドグラスに拾い室温で保存する．

前処理について

0.2 N HCl処理は通常陽性電荷をもつ塩基性蛋白質を切片から除去するもので，陰性電荷をもつプローブ核酸との静電気的反応を下げるための処理である．PFAで強く固定され

Table 1. Up-to-dated procedures for in situ hybridization using T-T dimerized synthetic oligo-DNA probes in paraffin embedded sections[18].

1. Cut sections in 5–6 μm thickness and place them on silane-coated glass slides in a routine procedure[a].
2. Prior to use, warm at 60°C for at least 30 min, deparaffinized through toluene and then rehydrated with serial ethanol solutions.
3. Immerse in 0.3–3% H_2O_2 in methanol for 15 min to inhibit endogenous peroxidase activity, if necessary.
4. After a brief washing with deionized, mili-Q water (DW), immerse in 0.2 N HCl for 20 min and wash successively with DW and PBS.
5. Immerse in 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 10 min and wash with PBS briefly.
6. Treat with proteinase K (Wako) (10–200 μg/ml in PBS) at 37°C for 15 min and wash with PBS (5 min, 3 times).
7. Fix in 4% PFA (Merk)/PBS for 5 min and wash twice with 2 mg/ml glycine/PBS for 5 min each.
8. After brief washings with PBS and DW, successively, immerse in 40% deionized formamide (Nacalai)/4×SSC[b] until to be used for hybridization.
9. Put 20–30 μl of the hybridization mixture[c] on each slide and keep it in a moist chamber humidified with 40% formamide/4×SSC at 37–42°C for 15–17 hrs. Under the conditions, no covers to avoid evaporation of the medium are needed.
10. Wash 5 times with 50% formamide/2×SSC[d] for 1 hr each time at 37°C and 2 times with 2×SSC for 15 min each time.
11. Put 30–40 μl of the blocking solution[e] and leave to stand for 1 hr in a moist chamber humidified with PBS.
12. React with 30–40 μl of the blocking solution including HRP labeled anti-(T-T dimer) monoclonal antibody (Kyowa Medex) (1 : 80) for 15–17 hrs in the moist chamber.
12. Wash 4 times with 0.075% Brij35/PBS for 15 min each.
13. After a brief washing with PBS, visualize the HRP sites in a chromogen solution containing 3,3'-diaminobenzidine-4HCl (DAB), H_2O_2, nickel and cobalt.
14. Dehydrate with serial up-graded ethanol solutions, cleared with xylene and mounted without any counterstaining.

[a] Unless otherwise specified, all steps are performed at room temperature (RT).

[b] 1×SSC; 0.15 M NaCl in 0.015 M sodium citrate buffer (pH 7.0).

[c] The constituents of hybridization mixture; 10 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4), 0.6 M NaCl, 1 mM EDTA, 1×Denhardt's solution (0.02% BSA, 0.02% Ficoll 400, 0.02% polyvinylpyrrolidone), 250 μg/ml yeast tRNA, 125 μg/ml salmon sperm DNA, 10% (w/v) dextran sulfate, 40% deionized formamide and 1–4 μg/ml T-T dimerized oligo-DNA probe. If necessary, 200 U/ml heparin and 0.01% (w/v) SDS are included. It is heat-denatured before hybridization.

[d] If necessary, 0.075% Brij 35 (Sigma) is included, and for a more stringent washing lower concentrations of salt such as 0.5×SSC and 0.2×SSC are used.

[e] The blocking solution contains 500 μg/ml normal mouse IgG, 5% BSA, 0.3 M NaCl, 100 μg/ml yeast tRNA, 100 μg/ml salmon sperm DNA in PBS.

た組織ではこれらの蛋白質の除去は困難であり，パラフィン切片での有効性は低い．Triton X-100 処理は，特に PFA で強く固定された組織でシグナルの増大に寄与する場合がある．プローブの組織への浸透性の増大によると考えられる．

Proteinase K 処理は，mRNA を周囲の蛋白質を消化除去して露出させ，プローブとの反応性を増大させる非常に有効な操作であるが，処理条件の至適化が必要である．パラフィン切片では特に必須な操作である[10,32]が，新鮮凍結切片でも

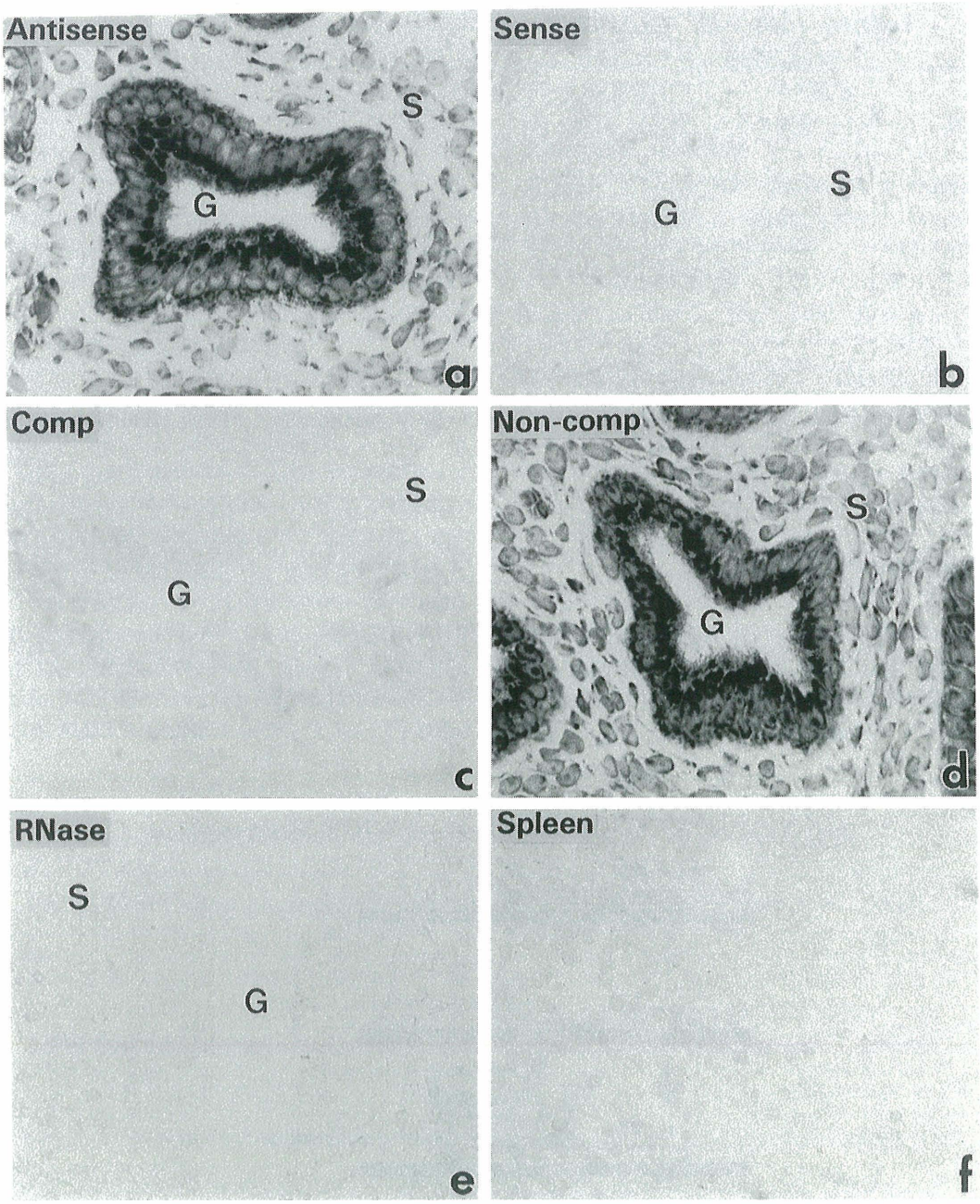


Fig. 2. An example of a set of control experiments[15]. The set was performed to verify the specificity of the signals for estrogen receptor (ER) mRNA in the frozen sections of monkey uterus. (a) Antisense: A section was hybridized with Dig-ER antisense oligo-DNA. Strong staining for ER mRNA was found in glandular epithelial cells as well as stromal cells. (b) Sense: An adjacent section to the section hybridized with the antisense probe was hybridized with Dig-ER sense oligo-DNA. No staining was found. (c) Competition: An adjacent section was hybridized with Dig-ER antisense probe in the presence of an excess amount (33-fold) of non-labeled ER antisense oligo-DNA. The signal for ER mRNA was markedly reduced. (d) Non-competition: When an adjacent section was hybridized with Dig-ER antisense probe in the presence of an excess amount (33-fold) of non-labeled unrelated oligo-DNA. The intensity of ER mRNA signal was not changed, compared to that of "competition test". (e) RNase: A section was digested with RNase A before hybridization, and then hybridized with Dig-ER antisense probe. The section was not stained essentially. (F) Negative tissue: A section of spleen was used as a negative tissue. G, gland; S, stroma.

有効性は明らかである[15,16]. 本操作は，オリゴDNAプローブを用いてもやはり有効である[11].

ハイブリダイゼーションと洗浄

ハイブリダイゼーション混液の組成はTable 1に示した. 混液は，使用前に沸騰浴に7-10分漬けプローブ等を一本鎖化させる. この点は特に，二本鎖DNAプローブでは重要である. 長い二本鎖，一本鎖DNAの場合には，予めDNase IやS1 nuclease消化により200-300塩基程度の長さに切断する. ハイブリダイゼーションの温度やホルムアミド濃度等は，予想される分子雑種のTm値から算出される. 通常は（Tm－15）から（Tm－30）°C位で反応させる. 洗浄では，雑種形成反応に用いたstringencyよりもやや高い条件（高温度・低塩濃度・高濃度のホルムアミド等）で洗浄し，過剰のプローブ並びに非特異的雑種を除去する. 非特異的呈色が強いようなら，0.075% Brij35[15,30]を添加して洗う. 免疫組織化学のステップでは，通常の免疫染色と考えてよい. しかし，確かにmRNA-DNA分子雑種は安定ではあるが，RNaseやDNaseに配慮するに越したことはない. 我々は，競合阻害効果を期待して抗体溶液には酵母tRNA並びにサケ精巣DNAを添加しており，また抗体も極力精製したものを使用している. T-T dimer法の場合は，現在HRP標識マウス抗T-Tモノクローナル抗体（協和メデックス）を用いている.

雑種形成可能なRNAの検索

RNAを標的とする場合，RNAの保存度の検討が必須であり，色々な方法が可能である. しかし，その簡便性と結果の安定性から，我々はメチルグリーン/ピロニンY染色(MP)[21,26]によりピンクの染色を観察することで全RNA量の保存度の評価を行っている. この方法は，永久標本の作製が可能で且つRNA染色の特異性が高いことが特徴である. この染色法で呈色しないなら，その標本はmRNAのISH法には不適当と評価され試料より除去される. 更に，我々は28S rRNAに対する相補的なオリゴDNAプローブを用いてISH法によるRNA保存度の検討も進めている[18,32]. この方法によると，より直接的にISHによる雑種形成反応に参加可能なRNAの保存度が検討できるため，陽性対照としても有用である. 過度の架橋性の固定により，MP染色では強陽性にも関わらずそのRNAの雑種形成反応への参加は不可能になっている場合がある. また，この方法はISHでの前処理条件の至適化にも大変有効である[32]. またMP染色では不適当と判断されるものでも使用せざるを得ない場合もある. その様な場合には，28S rRNAの染色強度からどの程度のRNAが保存されているかを測定し，保存度の良好な状態での発現量を予想することも可能となっている.

対照実験の重要性（Fig. 2）

雑多な物質が混在する組織・細胞標本での研究の場合，検出シグナルの特異性を証明するための対照実験が必要である. 合成オリゴDNAプローブ等の場合の例をFig. 2挙げた. 二本鎖DNAプローブの場合の例は他書に詳しい[16]. 何れにせよ，得られたシグナルが本当に特異的なものであるのかどうかの検証には種々の対照実験が必要である. 合成オリゴDNAプローブの場合について説明すると，シグナルがRNA由来であって，DNAあるいは蛋白質との反応による結果でないことを，RNaseの前処理でシグナルは消失するがDNaseでは影響されないことにより示す. 特異的なmRNAによるのであってrRNAやtRNAとの反応でないこ

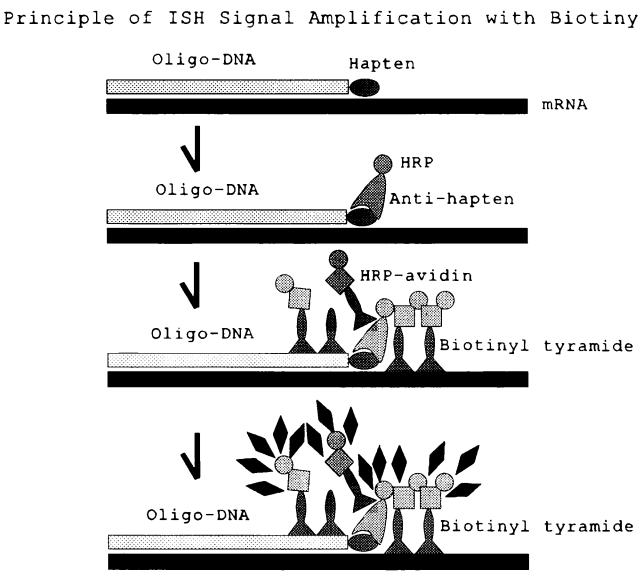


Fig. 3. Principle of nonradioactive in situ hybridization method combined with catalyzed signal amplification using biotinyl tyramide. Firstly, target RNA is hybridized with a haptenized oligo-DNA probe. Next, HRP-labeled anti-hapten antibody is reacted with the hapten molecules of the probe. Then, biotinyl tyramide is allowed to be precipitated around the sites of HRP in the presence of hydrogen peroxide. After successive reaction with HRP-labeled streptavidin, the sites of HRP are visualized by precipitation of chromogen compounds.

とを示すために，そのmRNAを発現していないことが知られている組織があれば陰性対照組織として用いる．得られたシグナルが塩基配列特異的であることを示す必要があるが，センス鎖をプローブとした時呈色しないことを示すのは決して最善の対照ではないことを強調したい．GC含量（実際のGとかCの数は異なる）がアンチセンス鎖と同じというだけのものである．塩基配列特異性を示す最も信頼できる対照実験は，競合試験であると思われる．即ち，アンチセンスプローブと同じ配列をもつ無標識のDNAの過剰量存在下でシグナルが消失するが，同一でないDNAの過剰量存在下では呈色に変化がないことを示す．更に，Tmの計算上過剰にstringentな条件でのハイブリダイゼーション後の洗浄により，シグナルが予想通り激減することを示すのも一法である．

感度の増大法（Fig. 3，Fig. 4）

前処理条件などの徹底的至適化により非放射性ISH法の感度は10年前に比較して格段に増大したが，劣悪環境で保存された試料や発現量の極めて少ないmRNAを研究対象とする際，更なる感度が要求される場合がある．HRPを可視化系として利用した時，種々のレベルでの感度増大が可能である．我々はISHによる特異的mRNAの検討を行う場合，HRPの視覚化に3, 3'-diaminobenzidine（DAB）とH_2O_2の他にニッケルとコバルトイオンを加えて検出感度を約10倍高めている[1]．しかし更に感度を必要とする場合，biotinylated tyramineを利用したcatalyzed signal amplification（CSA）（catalyzed reporter deposition（CARD））法が注目される[19]．その原理と応用例をそれぞれFig. 3とFig. 4に示した．また，観察方法を変えることでもシグナルを増大できる．簡単には位相差顕微鏡の使用[16]であり，最近では共焦点レーザー顕微鏡を駆使していく方法も盛んである．

mRNA発現と転写調節因子（Fig. 5）

特定の細胞で，特定の遺伝子が存在しそのmRNAが存在していることがISHによって確認されるわけであるが，そのmRNAの発現量はあくまでも産生と分解のバランスの結果であって転写調節レベルでの制御状態を必ずしも反映しているわけではない．Fig. 5に示したように，遺伝子の転写は基本転写因子と遺伝子特異的転写調節因子によって調節されており，特定の遺伝子の転写調節レベルでの理解には遺伝子特異的転写調節因子の細胞単位での解析が必要と思われる．しかし，一般的にそのような転写因子の発現量は低く，精製し抗体を作製するのはしばしば困難であり，その組織細胞化学的な検索は極めて遅れている．一方で，分子生物学的な解析により多数の転写因子が発見され，プロモーター領域の調節領域にある反応エレメントやその塩基配列が同定されつつある．

このような背景のもとで，我々は，特定の塩基配列を持つ二本鎖のDNAをプローブとして切片と反応させると特定の蛋白を局在化出来る事を見い出し，この方法論にオリゴ組織化学[13,14]（後でサウスウェスタン組織化学[17,21]と改名）という名称を付した．この方法により抗体等を用いることなく

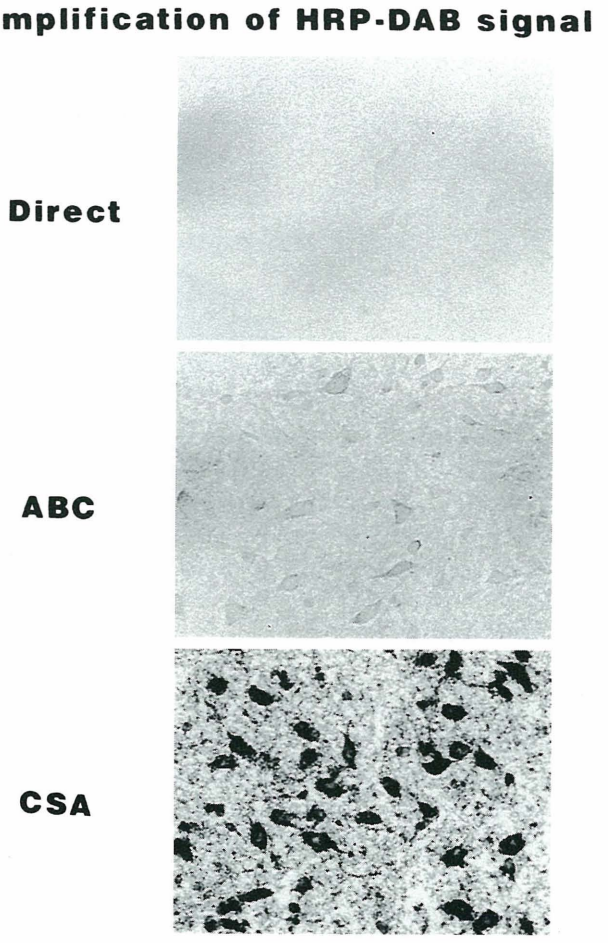


Fig. 4. Remarkable enhancement of 28S rRNA signal by catalyzed signal amplification (CSA)[19]. The frozen sections of rat brain fixed with 4% PFA in PBS were hybridized with a very low concentration of T-T dimerized oligo-DNA complementary to rat 28S rRNA. In the immunohistochemical steps, the signal was detected by the different methods. In any methods, the sites of HRP were visualized according to Adams' method[1]. Top panel (Direct): The signal was detected by the direct method with HRP-labeled anti-(T-T dimer). The staining for 28S rRNA was barely detectable. Middle panel (ABC): After hybridization, the signal was detected using the HRP-labeled avidin-biotin complex (ABC) method. The intensity of 28S rRNA signal was increased small but significantly. Bottom panel (CSA): After hybridization, the section was reacted with HRP-labeled anti-(T-T dimer), biotinyl tyramide and HRP-labeled streptavidin, successively. Now the signal was very clear.

特定の遺伝子の転写調節因子の発現状況を細胞個々のレベルで検出することが可能となった．

サウスウェスタン組織化学への展開

サウスウェスタン組織化学の背景

かつて，ラット脳下垂体パラフィン包埋切片に於いてproopiomelanocortin（POMC）mRNAの発現を非放射性ISH法によって検討していた．その際に，陰性対照プローブとして当時の慣例に従ってバクテリアのプラスミドである

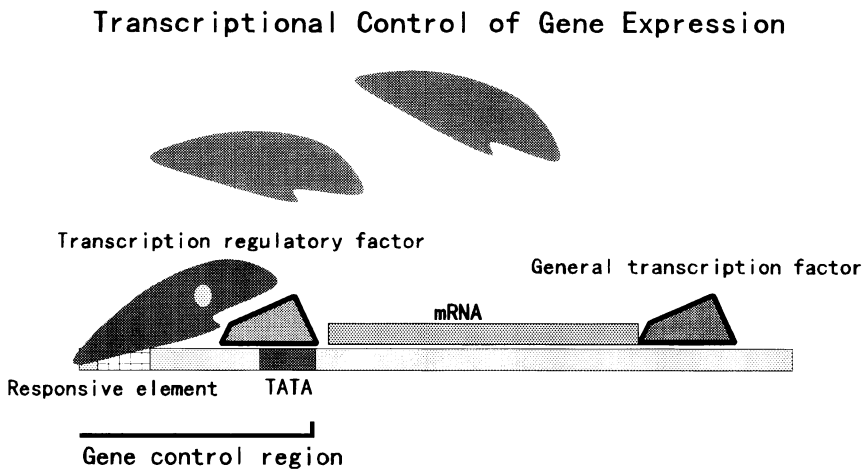


Fig. 5. Schematic presentation of the regulation of gene transcription. There are two categories in transcription regulatory proteins. One is a group of proteins forming transcriptional machinery and is involved in the transcription of genes directly by binding to TATA box or other consensus sequences as general transcription regulatory factors. Another group consists of gene specific transcription regulatory factors, which bind to the specific responsive element consensus sequence in the gene control region of the target genes and are activated to control the activity of transcriptional machinery.

pBR322を用いた．POMC mRNAのシグナルはproteinase Kの前処理に依存しており，処理濃度を100 μg/ml（37°C, 15 min）に上げると中葉細胞並びに前葉細胞の一部の細胞質に染色を得た．一方，対照プローブのpBR322 DNAではproteinase K濃度が100 μg/mlの場合は染色は認められなかったが，プロテアーゼの濃度を下げていくとPOMC mRNAと同様な染色を得た．このpBR322 DNAによる染色は，特異的な蛋白成分との反応結果と解釈されたがその実体は不明であった．1987年，Tully & Cidlowskiはこれまでに報告されたpBR322 DNAにはグルココルチコイド反応エレメントDNA consensus配列に一致する部分が5カ所あることを報告[31]し，実際にサウスウェスタンブロット法[27]により特異的にグルココルチコイド受容体と結合することを明らかにした．これらの事実により，pBR322 DNAシグナルがグルココルチコイド受容体の局在を示すものと考えられ，この事は特異的塩基配列を持つ二本鎖のDNAによりそのDNAに特異的に結合する蛋白を組織切片上で局在化出来ることを示唆していた．

サウスウェスタン組織化学の原理（Fig. 6）と実際（Table 2）

二本鎖化したDNAはその塩基配列によって立体構造が若干異なり，その差異が蛋白との特異的結合と密接に関係する．そこで本法では，Fig. 6に示したように特異的塩基配列を有する二本鎖DNA部位か或るいはその特定の塩基配列を持つ一本鎖のオリゴDNA（＋鎖と－鎖）を合成し，両者を二本鎖化したものをT-T dimerやDigで末端標識しプローブとする．プローブ核酸と蛋白との反応には塩濃度が重要な因子となる．塩濃度が低すぎると非特異的な結合が増大し，塩濃度が高すぎると両者の反応は阻害される．最終的にHRP等

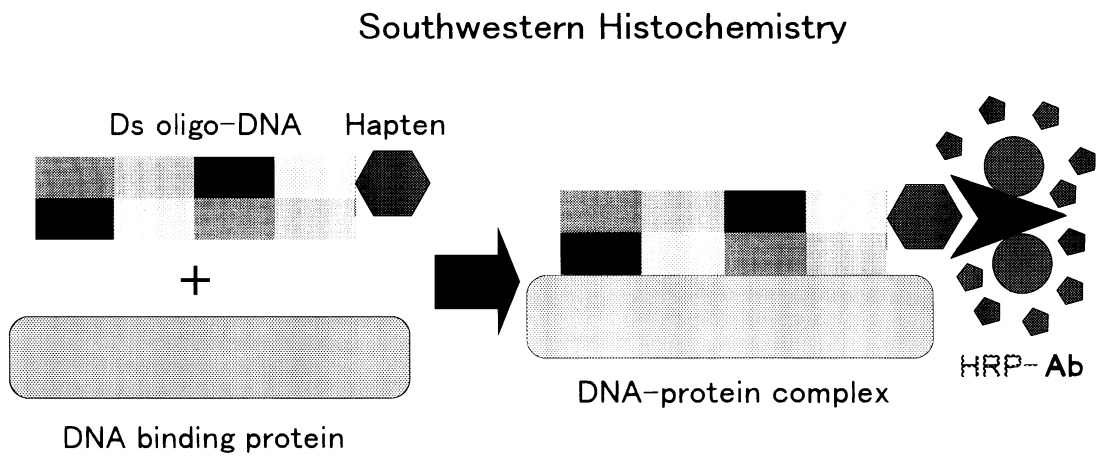


Fig. 6. Schematic presentation of Southwestern histochemistry[21]. (1) The (+) and (−) strands of specific DNA consensus sequence in target response element are synthesized and annealed after synthesis. The 3' ends of both strands are labeled with a haptenic compound such as T-T dimer or Dig. (2) The double-stranded oligo-DNA with a hapten is reacted with tissue sections. (3) Finally, HRP-labeled anti-hapten antibody is reacted with the sections and the sites of HRP are visualized with DAB and hydrogen peroxide.

Table 2. Procedures for Southwestern histochemistry using fresh frozen sections[21].

1. Freeze fresh tissue samples embedded in OCT compound (Miles Inc.) quickly as possible using an ethanol/dry ice bath.
2. Cut sections at a thickness of 5–6 μm and place them on silane-coated glass slides according to routine procedure.
3. Fix with 4% PFA in PBS (pH 7.4) at 4°C for 10 min.
4. Wash 3 times with PBS for 5 min each.
5. Immerse in 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) containing 5% non-fat dry milk, 50 mM NaCl and 1 mM EDTA (TMSE) for 1 hr.
6. Put 20–30 μl of the TMSE solution including T-T dimerized probe DNA at 1–5 μg/ml on each slide and keep it in a moist chamber overnight.
7. Wash twice with TMSE solution and three times with PBS for 15 min each.
8. Put 30–40 μl of PBS containing 5% BSA, 500 μg/ml normal mouse IgG, and 100 μg/ml salmon testis DNA on each slide and leave it stand for 30 min – 1 hr in a moist chamber.
9. React with 30–40 μl of HRP-labeled mouse monoclonal anti-(T-T dimer) antibody (Kyowa Medex, 1 : 80) dissolved in PBS containing 5% BSA and 100 μg/ml salmon sperm DNA for 30 min – 3 hrs.
10. Wash 4 times with 0.075% Brij35 in PBS for 15 min each and once with PBS alone for 5 min.
11. Visualize the HRP sites in a chromogen solution containing 0.5 mg/ml DAB, 0.01% H_2O_2, 0.02% $NiSO_4(NH_4)_2SO_4$ and 0.25% $CoCl_2$.
12. Dehydrate with serial up-graded ethanol solutions, clear with xylene and mount.

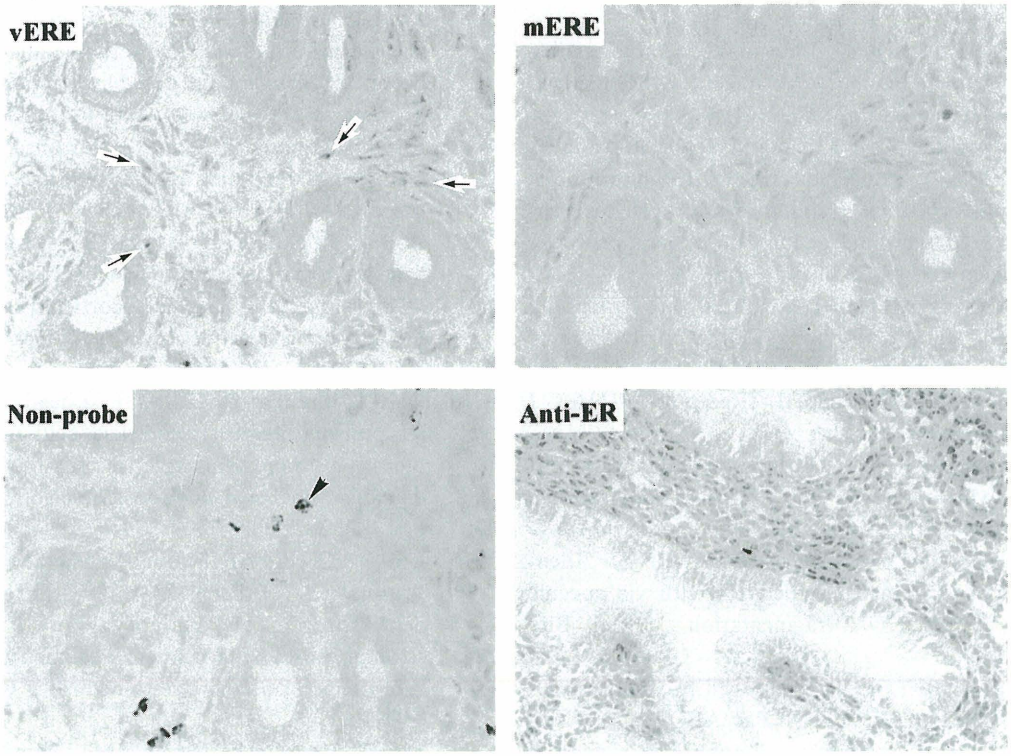


Fig. 7. Localization of ERα in frozen sections of mouse uterus by Southwestern histochemistry and immunohistochemistry[21]. A fresh frozen section of mouse uterus (at the diestrus stage) was fixed with 4% PFA in PBS for 10 min at 4°C and reacted with T-T dimerized vitellogenin estrogen responsive element (vERE) oligo-DNA probe at 5 μg/ml (A). Arrows indicate positive cells. As negative controls, an adjacent section to the section used in (A) was reacted with mutated ERE (mERE) (B) or without any probe DNA (C). All those slides were counterstained with hematoxylin lightly. (D) A fresh frozen section was fixed with 4% PFA in PBS for 10 min at 4°C, preincubated with 1% BSA/PBS for 30 min at RT and then reacted overnight with monoclonal anti-ERα antibody (1D5, 1 : 100, DAKO) dissolved in 1% BSA/PBS at RT. After appropriate washing with PBS containing 0.075% Brij 35, HRP-labeled goat anti-mouse Ig (1 : 100, Chemicon) dissolved in 1% BSA/PBS was reacted for 1 hr at RT. Then the slides were washed with PBS containing 0.075% Brij 35 and the sites of HRP were visualized with DAB and hydrogen peroxide in the presence of nickel and cobalt ions[1]. Arrow head indicates the staining for endogenous peroxidase activity. Magnification; ×300 (for A, B, and C) and ×150 (for D). In both methods, stromal cell nuclei were positive for ER.

の酵素や或いは蛍光色素で標識した抗ハプテン抗体を反応させ通常の免疫組織化学的にシグナルを視覚化する．Table 2に実験操作を示した．ここでは詳述しないが，本実験においても種々の対照実験が必要である．

応用例（Fig. 7）

応用例として，cyclic AMP responsive element 結合蛋白をラット小腸切片に於いて局在化した例[17]やepidermal growth factor receptor（EGFR）遺伝子のエンハンサー蛋白であるETFや抑制因子であるGCFの局在をサウスウェスタン組織化学で検討し，ヒトA431細胞でのEGFR mRNAの高発現の一つの理由としてETFの過剰発現を示した例がある[23]．ここではマウス子宮切片で，エストロゲン受容体の発現解析に於いてその有効性を免疫染色結果と比較した例を示した（Fig. 7）[21]．

結　語

生化学的あるいは分子生物学的解析方法とは如実に異なり，組織切片上での特異的生体分子の発現を検討することは，その発現量の解析のみならず，発現細胞の同定をはじめ莫大な蓄積をもつ形態情報の活用を可能とする．事実本稿で述べたような分子組織細胞化学的な方法論により細胞の生理的・病理的状態の理解レベルは蛋白から遺伝情報分子レベルまで飛躍的に高められた．しかしそこに，顕微鏡無くして組織・細胞観察はなく，ハード並びにソフト面での新たな方法論の開発なくしてまた観察レベルの向上も望めない．方法論の開発は取りも直さず新たな次元で細胞をみたいという学問的必然性と情熱の発露の結果であることは言うまでもない．形態科学の更なる進展を望みたい．

文　献

1) Adams JC (1981) Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. J Histochem Cytochem 29: 775
2) Brahic M, Haase AT (1978) Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 75: 6125–6129
3) Ehara H, Deguchi T, Koji T, Yang M, Ito S, Kawada Y, Nakane PK (1996) Autoclave antigen retrieval technique for immunohistochemical staining of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections of human prostate. Acta Histochem Cytochem 29: 311–318
4) Furusu A, Miyazaki M, Koji T, Abe K, Ozono Y, Harada T, Nakane PK, Hara K, Kohno S (1997) Involvement of IL-4 in human glomerulonephritis: An in situ hybridization study of IL-4 mRNA and IL-4 receptor mRNA. J Am Soc Nephrol 8: 730–741
5) Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA 63: 378–383
6) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493–501
7) Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakane PK (1996) Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. Endocrinology 137: 1938–1948
8) Hooke R (1665) Micrographia, Royal Society, London
9) John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 223: 582–587
10) Koji T, Moriuchi T, Nakane PK (1988) Improved tissue preparation for in situ localization of specific mRNA using non-radioactive DNA probes: Effects of protease digestion and probe size on signal detection in frozen and paraffin sections of rat pituitary glands. Acta Histochem Cytochem 21: 187–200
11) Koji T, Sugawara I, Kimura M, Nakane PK (1989) In situ localization of c-myc mRNA in HL-60 cells using non-radioactive synthetic oligodeoxynucleotide probes. Acta Histochem Cytochem 22: 295–307
12) Koji T, Nakane PK (1990) Localization in situ of specific mRNA using thymine-thymine dimerized DNA probes: Sensitive and reliable non-radioactive in situ hybridization (Review). Acta Pathol Jpn 40: 793–807
13) Koji T, Yamada S, Izumi S, Nakane PK (1990) Oligo histochemistry: a new approach to localize DNA-binding proteins. J Histochem Cytochem 38: 1052
14) Koji T, Yamada S, Kayashima K, Nakane PK (1992) A new approach to localize glucocorticoid receptor using DNA probe containing glucocorticoid responsive element DNA consensus sequences. Acta Histochem Cytochem 25: 681–687
15) Koji T, Brenner RM (1993) Localization of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rhesus monkey uterus by nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin-labeled oligodeoxynucleotides. Endocrinology 132: 382–392
16) Koji T, Chedid M, Rubin JS, Slayden OD, Csaky KG, Aaronson SA, Brenner RM (1994) Progesterone-dependent expression of keratinocyte growth factor mRNA in stromal cells of the primate endometrium: Keratinocyte growth factor as a progestomedin. J Cell Biol 125: 393–401
17) Koji T, Komuta K, Nozawa M, Yamada S, Nakane PK (1994) Localization of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsive element (CRE) binding proteins by Southwestern histochemistry. J Histochem Cytochem 42: 1399–1405
18) Koji T, Nakane PK (1996) Recent advances in molecular histochemical techniques: In situ hybridization and southwestern histochemistry (Review). J Electron Microsc 45: 119–127
19) Koji T, Kanemitsu Y, Hoshino A, Nakane PK (1997) A novel amplification method of nonradioactive in situ hybridization signal for specific RNA with biotinylated tyramine. Acta Histochem Cytochem 30: 401–406

20) 小路武彦 (1998) In situ hybridizationの基礎と基本手技. 小路武彦 (編) In situ hybridization技法, 学際企画, 東京, pp 3-77
21) Koji T (1999) In situ localization of gene-specific transcription regulatory factors by Southwestern histochemistry (Review). Acta Histochem Cytochem 32: 255-260
22) Koji T (1999) Introduction to the detection of DNA strand breaks. In: Koji T (ed) Molecular Histochemical Techniques, Springer Lab Manuals, Springer-Verlag, Heidelberg (in press)
23) Komuta K, Kanematsu T, Nakane PK, Koji T (1998) Localization of epidermal growth factor receptor enhancer protein in A431 epidermoid carcinoma cells by southwestern histochemistry. Acta Histochem Cytochem 31: 267-276
24) Matsumi H, Yano T, Koji T, Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H (1998) Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: A possible involvement of nitric oxide in the follicular development. Biochem Biophys Res Commun 243: 67-72
25) Razzaque MS, Koji T, Taguchi T, Harada T, Nakane PK (1994) In situ localization of type III and type IV collagen-expressing cells in human diabetic nephropathy. J Pathol 174: 131-138
26) Schulte EKW, Lyon HO, Hoyer PE (1992) Simultaneous quantification of DNA and RNA in tissue sections. A comparative analysis of the Methyl Green-Pyronin technique with Gallacyanin chromalum and Feulgen procedures using image cytometry. Histochem J 24: 305-310
27) Silva CM, Tully DB, Petch LA, Jewell CM, Cidlowski JA (1987) Application of a protein-blotting procedure to the study of human glucocorticoid receptor interactions with DNA. Proc Natl Acad Sci USA 84: 1744-1748
28) Slayden OD, Koji T, Brenner RM (1995) Microwave stabilization enhances immunocytochemical detection of estrogen receptor in frozen sections of macaque oviduct. Endocrinology 136: 4012-4021
29) Sugawara I, Koji T, Ueda K, Pastan I, Gottesman M, Nakane PK, Mori S (1990) In situ localization of the human multidrug resistance gene mRNA using thymine-thymine dimerized single stranded cDNA. Jpn J Cancer Res 81: 949-955
30) Tsurusaki T, Koji T, Sakai H, Kanetake H, Saito Y (1998) Expression profile of prostate-specific antigen messenger RNA assessed by in situ hybridization is a novel prognostic marker for patients with untreated prostate cancer. Clin Cancer Res 4: 2187-2194
31) Tully DB, Cidlowski JA (1987) pBR322 contains glucocorticoid regulatory element DNA consensus sequences. Biochem Biophys Res Commun 144: 1-10
32) Yoshii A, Koji T, Ohsawa N, Nakane PK (1995) In situ localization of ribosomal RNAs is a reliable reference for hybridizable RNA in tissue sections. J Histochem Cytochem 43: 321-328

Recent Advances in Molecular Histochemical Techniques

Takehiko Koji

Department of Histology and Cell Biology, Nagasaki University School of Medicine

1-12-4, Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan

To understand better the physiological states of cells and tissues, it is essential to analyze the regulatory mechanism of cell-type or tissue-type specific gene expression in individual cells. For this purpose, in situ hybridization (ISH) has been regarded as a powerful molecular histochemical method. Over the past decade, we made lots of efforts to establish nonradioactive ISH protocol with thymine-thymine dimerized or digoxigenin-labeled synthetic oligo-DNA probes, including extensive optimization of pretreatment, evaluation of hybridizable RNA and new trials of signal amplification. Furthermore, we have originally developed a new method, Southwestern histochemistry, which localizes specific transcription regulatory factors and allows us to understand the fluctuation of mRNA levels detected by ISH at the level of transcription regulation of the gene in individual cells. Here, I will review the outlines of these methods with recent progress and will see what we can see by combining them.

Key words: in situ hybridization, nonradioactive probe, mRNA, transcription regulatory factor, southwestern histochemistry