

ラット視交叉上核内VIP産生細胞に及ぼす光刺激の影響

(in situ hybridization法によるVIP mRNA発現の日内変動)

岡本 庄之助

京都府立医科大学眼科学教室

要 約

視床下部視交叉上核に存在する vasoactive intestinal peptide (VIP) 免疫陽性細胞には網膜よりの視神経線維の直接投射が知られているが、免疫組織化学的研究によりそれら細胞群のVIP免疫活性が明暗周期下において日内変動を示すとの報告がある。今回、この視交叉上核内VIP免疫陽性細胞の受ける光刺激の影響についてVIP合成の変化という点からVIPmRNAレベルでの解析をin situ hybridization法、およびこれらの結果をコンピューター画像処理を用いて定量化することにより検討を行った。通常の明暗周期(L/D、各12時間)にて飼育したラットではVIPmRNAは暗期において有意に増加し深夜の午前2時に最高値をとった。また点灯後は減少し昼間の午後2時に最小値を示した。次に、光刺激を除外した常暗下で飼育したラットにはこの日内変動は認められなかった。これらのことより、視交叉上核において光刺激はVIP合成に対し、VIPmRNAレベルで直接的に影響を与えられ、その結果、VIP免疫反応性は神経細胞体内での合成の調節に起因し日内変動を示す可能性が高いと考えられた。(日眼会誌 95:562-569, 1991)

キーワード: VIP, メッセンジャーRNA, 日内変動, 視交叉上核, In situ hybridization

The Influence of the Light Stimulus on VIP mRNA in VIP
Containing Neurons of the Rat Suprachiasmatic Nucleus

Shonosuke Okamoto

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

In this study, an in situ hybridization technique combined with computed image analysis was performed to examine whether or not synthesis of vasoactive intestinal peptide (VIP) was influenced by a light stimulus from the retina and diurnal changes of messenger RNA (mRNA) of VIP in the rat suprachiasmatic nucleus (SCN) were measured. The amount of mRNA was largest at 2:00am, second largest at 20:00pm during the dark phase and smallest at 14:00pm during the light phase. We also confirmed the onset of fluctuation of mRNA preceding the diurnal variation of the content of the VIP-like immunoreactivity established by semiquantitative immunocytochemistry and this fluctuation was abolished under constant dark conditions. The present finding strongly suggested that light stimulus from the retina primarily influenced the transcription of VIP mRNA and induced diurnal variation of VIP synthesis. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95:562-569, 1991)

Key words: Vasoactive intestinal peptide, mRNA, Diurnal variation, Suprachiasmatic nucleus, In situ hybridization

別刷請求先: 602 京都市上京区河原町通広小路ル 京都府立医科大学眼科学教室 岡本 庄之助
(平成2年8月31日受付, 平成2年10月22日改訂受理)

Reprint requests to: Shonosuke Okamoto, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

Hirokoji-agaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received August 31, 1990 and accepted in revised form October 22, 1990)

I 緒 言

視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus) は視交叉の背側に存在する神経核で¹⁾, 「外界の状態によって日周期の情報が得られない恒常条件下において, 生物の行動や機能的活動にみられる, ほぼ24時間の周期をもつリズム」と定義されるサーカディアンリズム (circadian rhythm, 概日リズム) の中枢と推測されており, いわば体内時計としての機能をもつとされ, 睡眠覚醒, 摂食, ホルモン分泌, 酵素活性等の様々な生理的リズムの維持に深く関わっていると考えられている^{2)~6)}. また, 視交叉上核への入力線維の一つに網膜よりの視神経線維の投射が知られており^{7)~12)}, 視交叉上核腹側部に局在するVIP (vasoactive intestinal peptide) 免疫陽性細胞には視神経線維の終末が電子顕微鏡的にも確認されている¹³⁾. この投射路は明暗情報がサーカディアンリズムを24時間の日周期に同調させることに重要な役割をもつと考えられている. 近年, 分子生物学的手法により形態学的に messenger RNA (以下 mRNA) の局在を検出する *in situ* hybridization 法が開発された¹⁴⁾. 本実験においてはラット視交叉上核におけるVIP mRNA の局在を明らかにするとともに明暗周期下での網膜からの光刺激の及ぼす影響に対し, VIP合成のため発現する mRNA の変動について *in situ* hybridization 法及び, computer 画像解析による定量化を試み, 検討を行った.

II 実験方法

8週齢のWistar系雄ラットを42匹使用した. これらのラットは明暗周期(午前6時点灯, 午後6時消灯)の条件下, 自由給餌にて予め1週間飼育し, 前述の明暗周期に順応の後, 本実験に供した.

1. *in situ* hybridization

日内変動による変化に関しては, 32匹のラットを4群に分け, 6時間毎に, 午前2時, 8時及び午後2時, 8時の4回にわたり, 灌流固定した. 特に, 暗期にあたる午前2時, 午後8時においては光刺激による影響を除外するため灌流操作を暗室内安全光のもとで行った. また, 光刺激による影響を検討するために, 常暗状態において連続3日間飼育したラット(10匹)を午前2時及び, 午後2時に灌流固定した. 灌流方法はベントバルビタール深麻酔下, 氷冷0.1M phosphate buffer saline (PBS) にて, 左心室より灌流脱血, その後, 4%paraformaldehydeを含有する氷冷0.1M

phosphate buffer (PB) にて灌流固定し, 次いで同固定液中で4°C, 6時間浸漬後固定を行った. 固定後20% sucrose 含有0.1MPB中でcryoprotectionを行い, クリオスタットを使用し, 厚さ30 μ m, の全視交叉上核を含む前額断連続凍結切片を作成した. 試料はproteinase Kによる脱タンパク処理を行い, 再度後固定を行った. 次いで, ethanol系列で脱水の後, prehybridizationを2時間行った. hybridization溶液の組成は, 50%vol/vol formamide, 10%vol/vol dextran sulphate, 3 \times SSC(standard saline citrate; 1 \times SSC=150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 1 \times Denhart's 溶液, 100 μ g/ml yeast t-RNA, 100 μ g/ml salmon sperm DNA, 10mM DTT, 1.0mM EDTA とし^{15)~17)},

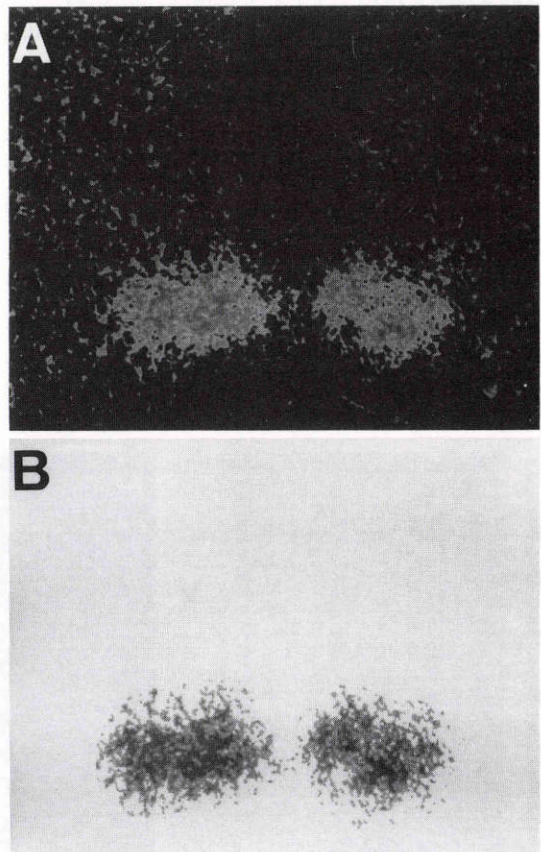


図1 画像解析プログラムにより入力されたX線フィルム上の陽性シグナル(A)は, コントラスト増強処理後, 背景の非特異シグナルを除去(B), 1切片あたりの濃度と面積の積を算出し, 全連続切片の総和を求め1個体のmRNAの相対量とした.(A, Bはブラウン管上の画像.)

prehybridizationには同組成の溶液から dextran sulphateを除いたものを使用した。また、プローブには³⁵S-dATPを用いて nick-translation法により標識した、約700base pairのラットVIP complimentary DNA (以下cDNA) プローブを使用し¹⁸⁾、最終濃度 8.7×10^7 dpm/mlにて、hybridizationを37°Cにて24時間行った。その後、試料は室温において2×SSCで15分間洗浄の後、0.5×SSC中に浸漬し37°Cにて2時間 posthybridizationを行った。各々の灌流時刻に摘出した試料は同一の反応条件とするため、各時刻間で切片の形態を変えることで同一容器内で hybridizationを行った。また、対照としては大腸菌プラスミド DNA, pBR332を使用したプローブを同様の条件で hybridizationを行った。これらの切片は chrome-gelatineにて表面処理したスライドガラスにマウントし、アルコール系列で脱水後、X線フィルム(Hyperfilm βmax film, Amersham)を用いて macroautoradiographyを行った。次いで、乳剤(NTB2, Kodak)を用いての microautoradiographyを行い、明視野及び暗視野下において光学顕微鏡的観察を行った。

2. Computer 画像解析装置を用いた mRNA の半定量的解析

VIPmRNA hybridization シグナルの日内変動及び、常暗条件下における変化を検討するために日内変動(32匹, n=8)、常暗条件(10匹, n=5)について macroautoradiography による X線フィルムを用い

た画像解析を行った。画像解析には personal computer (NEC, PC9801RA5)を、画像解析プログラムにはラトックシステム製 Image Command 4198を使用した。X線フィルム上のシグナルは顕微鏡に接続されたビデオカメラによってブラウン管上に映し出される(図1A)。次に、この画像を加算積分入力を行いコントラストを増強した後、二値化処理により予め設定された陽性シグナルの濃度以下を除外した(図1B)。これらの各画像について(濃度)×(面積)の積を算出し、全視交叉上核を含む25枚の連続切片の総和を求めることにより1個体あたりの値とした。その後、得られた値を各時刻間について統計学的処理を行った。

III 結 果

1. autoradiography による VIPmRNA の検出

VIPmRNA シグナルは視床下部においては視交叉上核にのみ認められ、特に、視交叉に接した腹側部に強いシグナルが観察された(図2A, B)。また、X線フィルム上においても陽性シグナルは同様に全時刻に認められたが、特に、暗期にあたる午前2時、午後8時(図3A, D)に強いシグナルを認め、昼間の午後2時(図3C)において最も弱いシグナルを認めた。また、常暗条件下では午前2時、午後2時間において時刻間の有意差は認められなかった(図4A, B)。さらに、pBR332を使用した対照群では陽性シグナルは認められなかった。

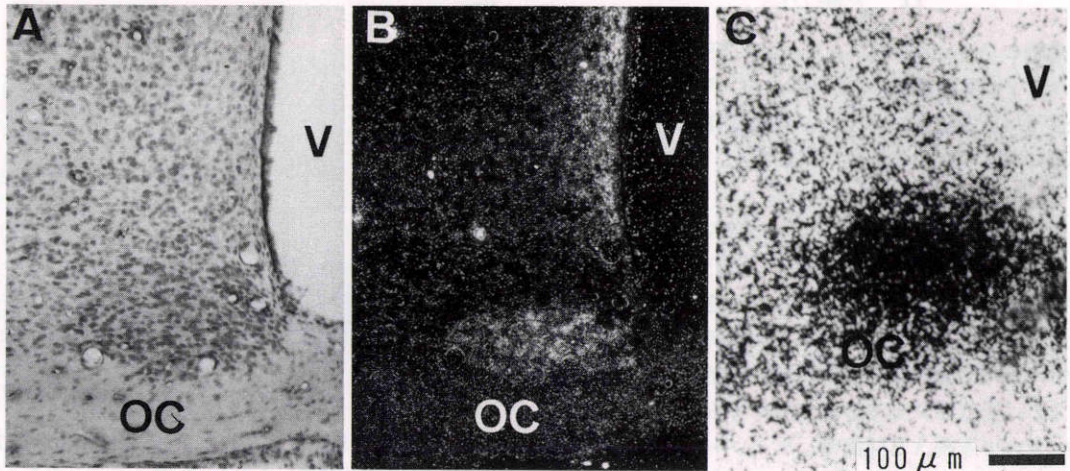


図2 視交叉上核におけるVIPmRNAのオートラジオグラフィ。視交叉上核の腹側部に強いシグナルを認めたが背側部には陽性シグナルは認められなかった。(A: 明視野, B: 暗視野, C: X線フィルム)。OC: 視交叉, V: 第三脳室 A, B, C: ×78, トルイジン青対比染色。

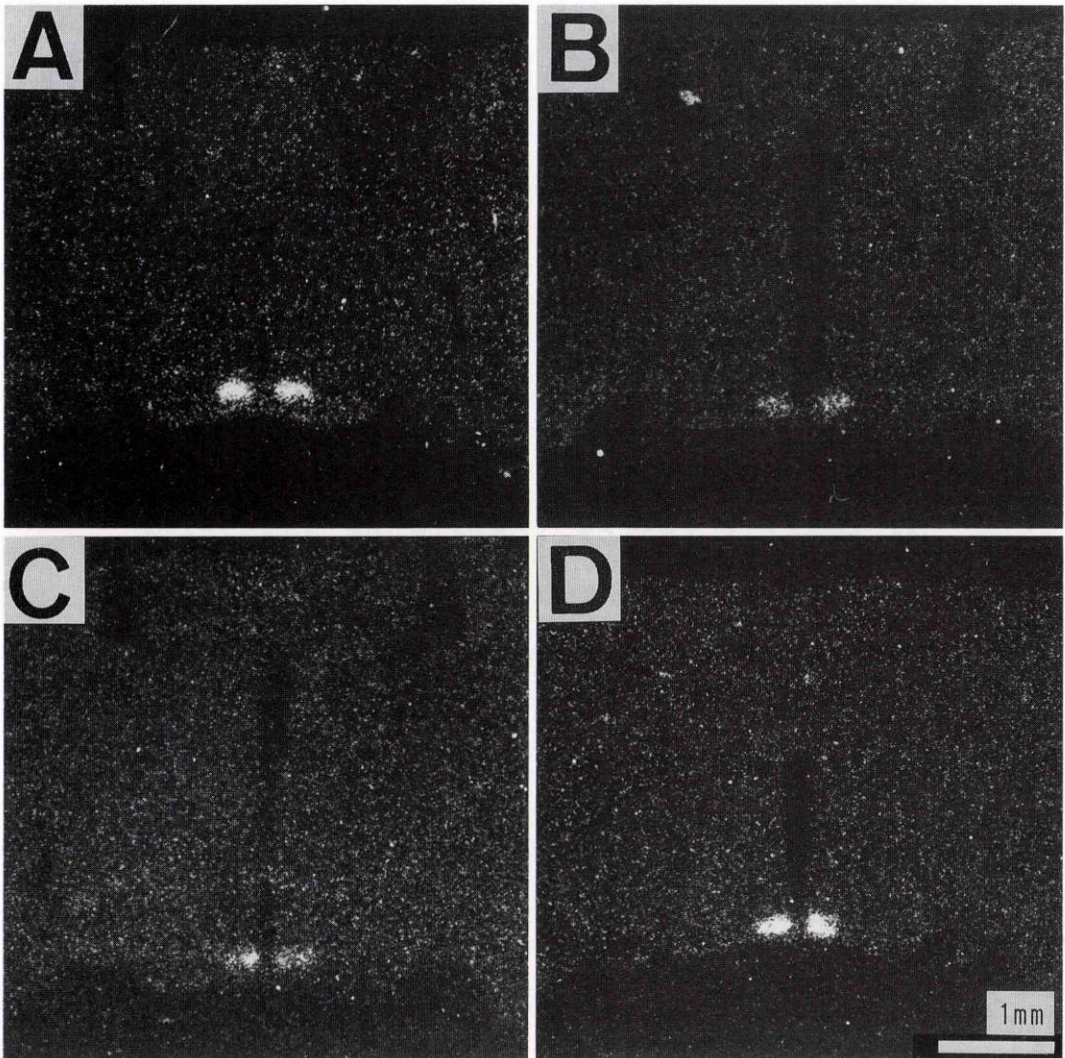


図3 明暗周期下において飼育したラットの視交叉上核の中央、ほぼ同一レベルでのX線フィルムによるオートラジオグラフィー(A:午前2時, B:午前8時, C:午後2時, D:午後8時)。A, B, C, Dは全て、同一容器内にて反応過程を進めた。全時刻に陽性シグナルを認めたが、暗期にあたるA, Dにおいては明期のB, Cに比べ明かなシグナルの増強を認めた。×15。

2. 画像解析装置を用いた半定量的解析に対する統計学的処理

前述の方法により得られた結果を各時刻別にし、各時刻間での検定結果を示す(表1)。各時刻間については、午前2時に最も高値を、また午後2時に最小値を示した。その結果、午後2時から午後8時、午後8時から午前2時に有意な増加を、また午前2時から午前8時に有意な減少をみとめた。常暗条件下においては午前2時と午後2時の間に有意な差は認められなかつ

た(図5)。

IV 考 按

視交叉上核は視床下部の腹側部、視交叉の直上に位置し、第三脳室底の両側に存在する神経核であり、機能的にはサーカディアンリズムすなわち、概日リズムの中核であると考えられている。哺乳類におけるサーカディアンリズムの研究はRichterのラットを用いた車まわし運動に関する研究²⁾にはじまり、視床下部の

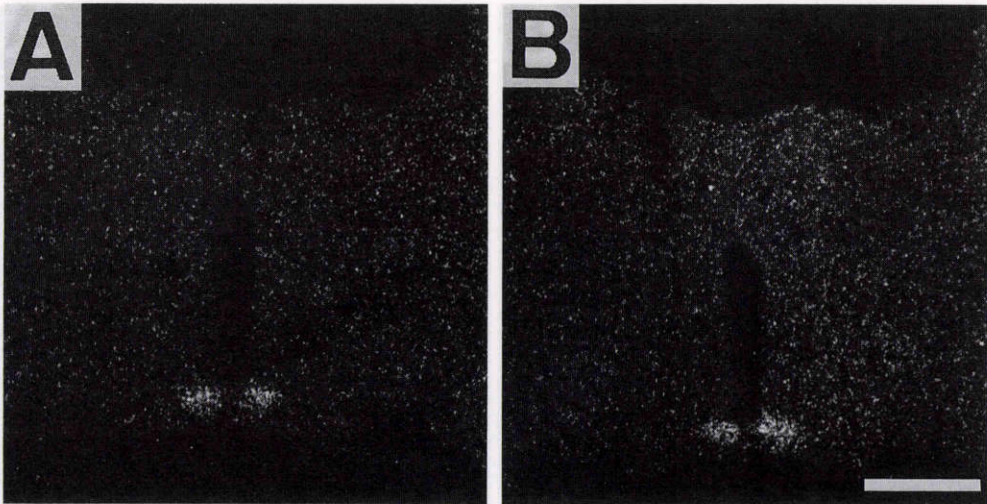


図4 常暗条件下において飼育したラットの視交叉上核の中央、ほぼ同一レベルでのX線フィルムによるオートラジオグラフィー (A:午前2時, B:午後2時). 光刺激による影響を検討するために、常暗状態において連続3日間飼育したラットを明暗周期下で最大値, 最小値を示した午前2時, 午後2時にお灌流固定し, 比較した. 両者にVIPmRNA陽性シグナルの著明な差はなかった. $\times 15$

表1 X線フィルムによるオートラジオグラフィーを画像解析装置を用いて定量化し統計学的処理をおこなった. 得られた結果を各時刻別にし, 各時刻間での検定結果を示す. 各時刻間については, 午前2時に最も高値を, また午後2時に最小値を示した. その結果, 午後2時から午後8時, 午後8時から午前2時に有意な増加を, また午前2時から午前8時に有意な減少をみとめた.

VIPmRNAの日内変動

時刻	濃度 \times 面積 (n=8, M \pm S.D.)
A: 午前2時	34.93 \pm 3.52
B: 午前8時	20.71 \pm 3.31
C: 午後2時	18.36 \pm 4.70
D: 午後8時	25.29 \pm 6.84

*p<0.01
 ★p<0.05

破壊によって車回し運動のサーカディアンリズムが消失することを観察し, 視床下部内にサーカディアンリズムの中核が存在する可能性を初めて報告した. 続いて, 視交叉上核の両側破壊実験により, ラットの飲水行動や車回し運動³⁾, またコルチコステロン分泌のサーカディアンリズムが消失すること⁴⁾. さらに睡眠リズムにみられるサーカディアンリズムも消失する

等が報告された⁵⁾. 一方, 両側の視交叉上核の破壊されたラットに視交叉上核を移植することでサーカディアンリズムの機能回復が認められるとの報告⁶⁾もあり, ラットにおいて視交叉上核はサーカディアンリズムの中核と考えられるに至った. また, 視交叉上核には, 免疫組織化学的研究によりVIP¹⁹⁾²⁰⁾, arginine vasopressin (AVP)²¹⁾をはじめ数種のペプチドホルモン含有神経細胞が確認されているが, 近年, 視交叉上核内においてAVP含有神経細胞内mRNAが光刺激の影響に関係なく日内変動を示すというUh1らの報告²²⁾があり, AVP含有神経細胞がサーカディアンリズムの中核機能を待つ可能性が高いと考えられている. しかし, サーカディアンリズムの周期は, その定義からも明かであるように日周期の24時間と正確に一致することはなく, 生体は自らのサーカディアンリズムを日周期に同期させる同調機能 (synchronization) を持っている. この際, 網膜よりの視覚情報はこの同調機能の維持に対し非常に重要な役割を果たすものと考えられ, 光刺激がどのような伝達経路で入力し, どの種の神経細胞がこのような同調機能をもつかが注目されている. 網膜よりの視神経線維の一部が視交叉上核に入力することは autoradiography, 電子顕微鏡観察による手法を用いて報告されており^{7)~11)}, Terubayashiら¹²⁾の HRP (horse radish peroxidase) を用いた順行性軸

VIP mRNA in the SCN

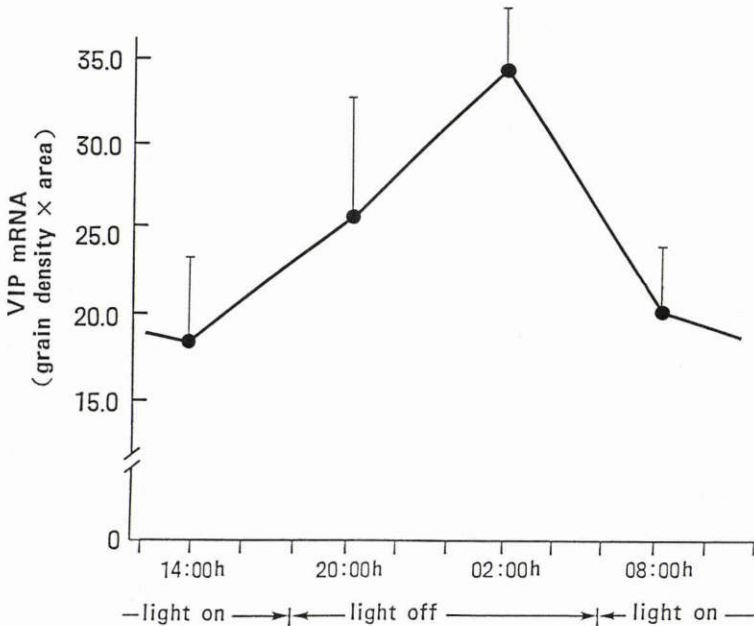


図5 VIPmRNA およびVIP免疫活性の日内変動. VIPmRNAは午前8時と午後2時においてはほぼ低同レベルをとり, 消灯後2時間の午後8時には午後2時と比べて有意の増加を示し, 午前2時に最高値をとった. これに対し, VIP免疫活性は消灯4時間後の午後10時においても日中と同レベルにあり, 午前2時に初めて増加を示した. この高レベルは午前10時まで持続した. 両者の結果よりVIPmRNAの変動は常にVIP免疫反応性の変動に対し先行し, 外界よりの明暗情報は神経細胞体内においてmRNA発現のレベルでVIP合成の調節をおこなう可能性が高いと考えられた.

索輸送実験によっても確認されている. さらに, Iyataらは, 視神経線維の切断後に起こる神経終末の変性像及び前述の各種ペプチドに対する免疫組織化学陽性産物を同時に電子顕微鏡的に観察することでVIP免疫陽性細胞に視神経線維が直接終末することを確認するとともに¹³⁾, VIP免疫反応性が日内変動することを報告した²³⁾. しかし, VIP日内変動の機序を論ずる上で免疫組織化学的手法においてはVIP産生経路の終末産物を検出するにとどまり, 免疫反応性の変化が神経細胞体内における産生の変化であるのか, あるいは神経終末での放出の調節によるものという点は未だ不明であった. 近年, 分子生物学的手法により, 形態学的にmRNAの局在を直接検出するin situ hybridization法が開発されるとともに種々の神経伝達物質や介在物質としてのペプチドを合成する遺伝子の核酸配列が明らかにされ, これらのペプチド合成遺伝子の発

現状態の解析が可能となった¹⁴⁾. 今回, 本実験においてはVIP合成遺伝子の配列が解明される¹⁸⁾にあたり, 複製した相同DNA(cDNA)を用いてin situ hybridization法を行い, VIPmRNAの局在を確認するとともに, これらの結果をcomputerによる画像処理を用いて定量化を試みた. ラット視交叉上核におけるVIPmRNAの局在は既に報告されている免疫組織化学による陽性細胞の局在に一致し, 視交叉上核の腹側部だけに認められ, 背側部, その他に認められた免疫陽性線維内には存在しなかった. また, 摘出した全時刻においてVIPmRNAの発現が認められ, ペプチドはVIP免疫陽性細胞体において合成されると考えられた. 次に, computerによる画像処理を用いて定量化した各時刻について得られた値について多重比較検定を行った. その結果VIPmRNAは消灯後2時間の午後8時には午後2時と比べて有意の増加を示し, 午前2

時に最高値をとった。また、点灯後2時間の午前8時には既に、有意に減少し午後2時とほぼ同レベルであり暗期に明かな増加傾向を示した。この結果を Takahashi らの VIP 免疫陽性反応の日内変動の報告と比較した場合、VIP 免疫反応は午後2時に最低値をとった後、消灯後4時間経過した午後10時までは有意の増加を示さなかった。また、午前2時に最高値をとったが、点灯後4時間経過した午前10時まで高値が持続した。この結果、VIPmRNA の変動は常に VIP 免疫反応性の変動に対し先行し、VIP 免疫反応性の変化は神経細胞体内での合成の調節による可能性が高いと考えられた。次に、明暗刺激を除外した常暗条件においては先の日内変動において最高値をとった午前2時、最低値をとった午後2時の2回に試料を摘出し、時刻間の変化を同様の方法にて検討したが有意な差は認められず、このような日内変動は網膜よりの光刺激に起因したものと考えられ、Uhl らの報告に見られる AVP 免疫陽性細胞での日内変動とは異なると考えられた²²⁾。しかし、視神経における神経伝達物質は未だ確定しておらず、どのような機序で VIP 含有神経細胞が視覚情報を受け合成を制御するのかは不明である。また、視交叉上核には他に縫線核からの投射をはじめいくつかの入力が知られており、これらの情報もまた VIP 含有神経細胞に対し影響を与えられられる。以上のことより VIP 含有神経細胞は網膜よりの視覚情報(光刺激)以外にも種々の入力を受け、これらを統括しサーカディアンリズムの中核と考えられる AVP 含有神経細胞群等に情報を伝達する介在機能をもつ可能性が高いと推測された。

近年、組織形態を computer を用いて画像処理し、定量化を行う方法が報告されているが²⁴⁾²⁵⁾、in situ hybridization 法は組織形態上での動的発現状態を検出するという特徴を有しており、このような画像処理による定量化は northern blot に代表される filter hybridization 法と異なり形態情報を加味した組織単位、細胞単位という生理的狀態での動的解析が可能であると考えられた。本実験においても、画像処理による定量化を試みたが、特にその理由として、視交叉上核は解剖学的に複雑な形態をとり、その領域を正確に限定し、摘出することが困難であるためである。今回、定量化を前提に in situ hybridization 法を行うにあたり、ラットにおいては吻尾径700 μ m の視交叉上核を完全に含むよう厚さ30 μ m 連続切片を25枚、吻尾長750 μ m にわたり作成し、1個体あたりの値とみなした。ま

た、各時刻間で切片の形を変えることで時刻間の識別を可能とし、浮遊切片のまま同一容器内で反応を進めた。この結果、1切片あたりの放射性標識プローブ量の少量化、さらに試料間での反応中の誤差の減少が可能と考えられた。また、感光には X 線フィルムを用いた autoradiography を行った。これはエマルジョン浸漬による autoradiography と比較して解像能にはやや劣るものの乳剤膜厚や現像条件による変化を除外できると考えられ、定量化解析を行う場合、適当であると考えられた。しかし、この方法による定量化はあくまで同時に反応を行った試料間での相対的半定量であり、これらの VIPmRNA 発現量の日内変動の絶対量の比較には他の定量的手法の併用が必要であると考えられた。

本稿の要旨は一部は第94回日本眼科学会において発表した。稿を終えるにあたり、御指導と後校閲を賜りました京都府立医科大学第2解剖学教室井端泰彦教授、御校閲を賜りました京都府立医科大学眼科学教室赤木好男博士、ならびにプローブを御提供下さいました東北大学医化学教室岡本宏教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Lydic R, Alber HE, Tepper B, et al: Three dimensional structure of the mammalian supra-chiasmatic nuclei. A comparative study of five species. *J Comp Neurol* 204: 225-237, 1982.
- 2) Richter CP: Sleep and activity: Their relation to the 24-hour. Sleep and Altered States of Consciousness. *Proc Res Assoc Nerv Ment Dis* 45: 8-29, 1967.
- 3) Stephan FK, Zucker I: Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1583-1586, 1972.
- 4) Moore RY, Eichler VB: Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following supra-chiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42: 201-206, 1972.
- 5) Ibuka N, Kawamura H: Loss of circadian sleep-wakefulness cycle in rat by supra-chiasmatic nucleus lesion. *Brain Res* 96: 76-81, 1975.
- 6) Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H: Transplantation of the neonatal supra-chiasmatic nuclei into rats with complete bilateral supra-chiasmatic lesions. *Neurosci Res* 1: 67-72, 1984.
- 7) Berk ML, Finkelstein JA: An autoradiographic determination of the efferent projections of

- the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 226: 1-13, 1981.
- 8) **Guldner FH, Woeff JR**: Retinal afferents from gray-type-2 and gray-type-2 synapses in the suprachiasmatic nucleus. *Exp Brain Res* 32: 83-89, 1978.
 - 9) **Hendricson AE, Wagoner N, Cowan WM**: An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch* 135: 1-26, 1972.
 - 10) **Moore RY, Lenn NJ**: A retino-hypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146: 206-210, 1972.
 - 11) **Okamura H, Takahashi Y, Terubayashi H**, et al: VIP-like immunoreactive neurons and retinal projections in the rat suprachiasmatic nucleus. *Biomedical Res* 8: 253-262, 1987.
 - 12) **Terubayashi H, Fujisawa H, Itoi M**, et al: HRP-histochemical detection of retinal projections to the hypothalamus in neonatal rats. *Acta Histochem. Cytochem* 18: 433-438, 1985.
 - 13) **Ibata Y, Takahashi Y, Okamura H**, et al: Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons a direct retinal projection. *Neurosci Lett* 98: 1-5, 1989.
 - 14) **Gall JG, Pardue ML**: Formation and detection of RNA-DNA hybrid-molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 378-383, 1969.
 - 15) **Okamura H, Berod A, Julien JF**, et al: Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: In situ hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neurosci Lett* 102: 131-136, 1989.
 - 16) **Mary LP, Hames BD, Higgins SJ**: In situ hybridization in nucleic acid hybridization IRL PRESS oxford. Washington DC 179-202, 1985.
 - 17) **Uhr GR**: *In Situ Hybridization in Brain*. Plenum. N Y, 1986.
 - 18) **Nishizawa M, Hayakawa N, Yanaihara N**, et al: Nucleotide sequence divergence and functional constraint in VIP precursor mRNA evolution between human and rat. *FEBS Lett* 183: 55-59, 1985.
 - 19) **Loren I, Emson PC, Fahrenkrug A**, et al: Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4: 1953-1956, 1979.
 - 20) **Said SI, Mutt V**: Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. *Science N Y* 10: 561-564, 1977.
 - 21) **Vandensande F, Dierckx K, DeMey J**: Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei. *Cell Tissue Res* 156: 377-380, 1975.
 - 22) **Uhr GR, Reppert SM**: Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: Circadian variation in normal Brattleboro rats. *Science* 232: 390-394, 1986.
 - 23) **Takahashi Y, Okamura H, Yanaihara N**, et al: Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res* 497: 374-377, 1989.
 - 24) **Benno RH, Joh TH, Tucker LW**, et al: Quantitative immunocytochemistry of tyrosine hydroxylase in the rat brain. I. Development of a computer assisted method using the peroxidase-antiperoxidase technique. *Brain Res* 246: 225-236, 1982.
 - 25) **Fujita S**: The microcomputer-based color image analyzer and its application to histochemistry. *J Histochem Cytochem* 31: 238-240, 1983.