

組織透明化液の可能性の研究

静岡県立富岳館高等学校

3 年 仙洞田 ひな子, 太田 紗菜

1 研究目的

科目「生物」で神経系分野を学習したとき、脳や各臓器の血管系がどのようになっているか。また発生段階において、個体の組織形成はどのように変化していくのかに興味を持った。

2016 年 9 月、課題研究で飼育していた姫ウズラの成体を用いて組織透明化液 (CUBIC 液) はどの程度まで組織を透明にでき、今後の研究にどのように活用できるかの検討を行った。

2 組織透明化 (CUBIC 液) について

組織透明化の原理として通常、生体組織は屈折率 1.33 の水に浸されているが、生体組織は線維状タンパク質や脂質などにより屈折率が 1.5 程度の構造を有する。このため、組織の構造物と溶媒の間には屈折率の差が生じ、反射、屈折、光散乱の原因となりうる。特に光散乱については、近年着目されている補償光学系など光学系の工夫を施しても取り除くことは困難である。したがって、生体組織を透明にするには、組織から高屈折率成分を取り除いたり、溶媒を高屈折率液体に置き換えたり、この両者を組み合わせることで、組織中の屈折率を均一にすることが必要となる。従来の組織透明化法は適当な染色法と組み合わせることが前提であったが、これらの方法をそのまま現在の生命科学研究に用いようとするときさまざまな制約があった。そこで、最新の蛍光顕微鏡技術や蛍光タンパク質の利用に最適な組織透明化法の開発が注目されているというのが現状である。

有機溶媒を用いた組織透明化法では蛍光タンパク質の褪色が大きな問題であったが、これは蛍光タンパク質の発色団が蛍光を発するのに水分子が必要なためである。組織透明化 (CUBIC) とは、Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis の略であり、CUBIC 法は水溶液ベースであり、蛍光タンパク質を褪色させることなく組織透明化を達成した方法である。尿素とアミノアルコール、界面活性剤を組み合わせることで光散乱を減らし、透明度を上げている。2 光子励起顕微鏡と組み合わせることで、蛍光タンパク質をある程度保持したまま、全脳規模の ultramicroscopy が可能となっている。難点としては、透明化に時間がかかること、組織が膨潤してもろくなることがあげられる。またこれにより、CUBIC 法ではヘムを溶出できるため、血液を多く含む臓器の深部イメージングにも有効である。

以上より、今回の研究では組織の透明化までは再現出来ると考え、CUBIC 液を作成し、鳥類である姫ウズラを用いて組織透明化の研究を行った。

3 透明化試薬 (CUBIC 液) の組成

滅菌蒸留水に尿素 25 g (粉末) を加え、テトラメチルエチレンジアミン

$(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (80wt%) 31.25ml、トリトン X100 (50 wt%) 30ml をそれぞれ最終濃度 (25 wt%)、(25 wt%)、(15 wt%) を加えたものを 100ml の CUBIC 液とした。

4 研究内容

ウズラの生物学的特徴は、①小型で、飼育面積が少なくすみ、単位面積に多羽数を飼育できる。②飼料摂取量が少なく、飼料費が安くすむ。③成長並びに性成熟がはやく、世代を年3～4回進めることが可能である。④胚発生がはやく、孵化日数が短い。⑤産卵能力が高く、体の割に大きい卵を産む。⑥強健で、飼育管理が容易である。以上の6点から今回の実験材料として姫ウズラを用いた。

(1) 方法・実験

ア 姫ウズラにジエチルエーテル($\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$ を用いて麻酔をかけ、遠沈管 (50ml) に各部が入るように切除しながら解剖し、また各臓器も切り分けて(頭部、脚、内臓(心臓、肝臓)) 封入する(この際にそれぞれの器官、臓器を確認する。)(図1、2)。

イ 細胞の固定のため、シャーレに切除した各部を入れ、オートクレーブに10分間かける。

ウ 作成した CUBIC 液に切除した各部を10日間、38℃の恒温器にいれ、2日ごとゆっくり攪拌させる。

エ 透明化した各部を取り出し、臓器や器官をさらに細かく解剖し臓器の構造や組織の確認をする。



図1 使用した各部の説明図



図2 CUBIC液に浸した直後の臓器

(2) 結果

ア 筋組織が透明になったことで各組織の内部構造や骨格を容易に観察することができた。



図3 透明化前の心臓



図4 透明化後の心臓

イ 臓器は完全には透明にはならなかったが部分的には観察できた。



図5 CUBIC液に浸した臓器

- ウ 眼球では、角膜部分以外は透明にならなかった。特に表面の強膜、脈絡膜、網膜部分が黒色のまま色素が残った。
- エ 脳は透明になったことで内部構造を観察でき、視神経などの細かい部分の内部も見る事ができた。



図6 加熱処理前の頭部



図7 CUBIC液に浸した頭部



図8 透明化後の頭部

- オ CUBIC液に個体の色素が抜け落ちたことで液が濁った。
- カ 部屋が明るい場所では脊椎や骨格の接合部が観察しやすかった。

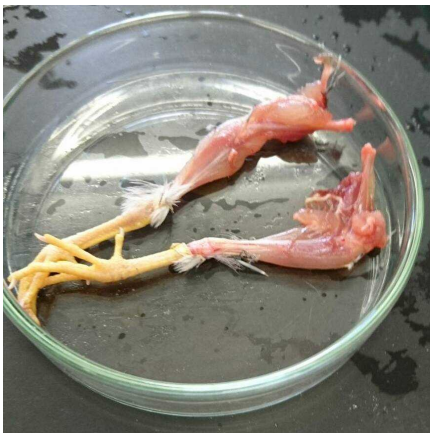


図9 加熱処理前の脚



図10 CUBIC液に浸した脚



図11 透明化後の脚

- キ 切除しきれなかった羽毛は透明化しなかった。

姫ウズラ各部の透明度変化表

	頭部 (全体)	心臓	くちばし	眼球	表皮組織	筋組織	脚 (全体部)	骨	脳	肝臓
解剖直後の色	赤色	赤色	黄色	黒	赤色	赤色	黄色(足先) 赤色(腿)	白	灰色	赤色
オートクレープにかけた後の色	白色	赤褐色	白色	黒	白色	白色	黄色(足先) 赤色(腿)	白	肌色	赤褐色
CUBIC液浸透10日後の色	黄色(透明) 眼球は黒色	黄色(透明)	黄色(透明)	黒	黄色(透明)	黄色(透明)	黄色(透明)	黄色(半透明)	黄色(透明)	赤褐色
CUBIC液浸透10日後の透明度	△	△	○	×	○	○	○	△	○	×

※CUBIC液浸透10日後の透明度においては、ほぼ完全に透明だったものを○、一部分が不透明だったものを△、透明にならなかったものを×とした。
 ※頭部の全体的には骨組織、眼球部分以外は概ね透明であった。心臓部は心房部分が完全に透明化しなかった。骨組織では、関節部の密度が高い部分は透明化していなかった。
 ※眼球部の瞳孔部分は透明になっていたが、強膜部分では黒いまま残り透明にならなかった。また、肝臓部分は色素がCUBIC液に多量に染み出していた。

表1 姫ウズラ各部の透明度変化表

(3) 考察

- ア 表皮組織、筋組織は全体的に透明になったことが確認でき、内部構造を観察しやすくなった。
- イ 臓器では特に肝臓から染み出る色素によって CUBIC 液が濁ったことで他の周辺臓器も透明化が不十分となった可能性が高いと考えられる。このことから、血液等の色素が表皮組織や筋組織に比べて多いと考えられるので、CUBIC 液の状態を定期的に確認し、移し替える必要があることが分かった。
- ウ 眼球では、黒い色素が原因で透明にならなかったことから、恐らくメラニン色素は CUBIC 液では透明にならないのではないかと考えられた。
- エ これまで脳を観察する際は、解剖することで表面的に確認することが可能であった。しかし、CUBIC 液に浸すことで表面的な観察と内部の観察の両方に生かせることが分かった。
- オ イと同様の理由から、CUBIC 液ではすべての組織が完全に透明にはならないことが分かった。
- カ 明るい場所では、骨格の骨の接続部の観察だけでなく組織が透明になることで解剖しなくても骨の数を数えるなど、内部構造を容易に観察できることが分かった。
- キ 羽毛は透明化が難しいことが分かったため、次回以降は羽毛をすべて除去する必要がある。

今回の研究目的は組織透明化の可能性の検討であったため、CUBIC 液がどの程度まで組織を透明化できるかという点で成果が得られたと考えられる。しかし、組織の作成段階での準備不足や溶液の交換等が適切にできていない部分もあったため、より正確な結果を得るために、これらは今後の検討課題である。

5 感想

レントゲンや CT スキャンのように内部が透けて全体的に構造を観察することができた。そのことから、骨格標本をつくることができると考えられるので、進化の過程における相同器官の観察には非常に適しているのではないかと思った。

CUBIC 液を作成する際の試薬は危険性が高く、取り扱いには細心の注意を払い、扱う際

は手袋・マスクを着用することで危険性を防いだ。また解剖のために、姫ウズラの命を頂いたので、倫理的観点において十分に配慮して実験を行うことができた。

CUBIC 液を浸した臓器の観察では特に悪臭が強く、においをどのように消せばよいのかと感じた。また心臓は心室、心房の確認とともに動脈などの太い血管を観察できたことで、表面から内部までを一度に観察できたことは非常に感動的だった。課題として感じたことは、詳しい臓器の各部の名称や血管系の名称について、勉強不足だったため、判断することが不可能だったことである。

6 今後の課題

今回の実験では体内の組織が透明になるという目的は果たすことができたが、次の実験では、脳内や各臓器の血管系がどのように構成されているのかを検討し、臓器の切片を作成することで、組織内の毛細血管を観察することを目的としたい。また、本来は組織から溶け出した色素を除去するために、濁った時点で CUBIC 液を新たに移し替えることをすればさらに多くの組織が透明になったのではないかと考えられるので、次回は定期的に観察を怠らないようにしたい。

そのためには、生物の心臓が拍動している段階に透明化液に干渉しない色素を含む液体を注入することで溶液を体内全体に循環させ、組織の観察を行う研究を行いたい。また、新たな研究課題として発生段階の卵内の胚をそれぞれの時期ごとに透明化することで、鳥類の組織形成の内部構造の把握ができるのではないかと考えている。

今回は鳥類で実験を行ったが、他の生物ではどのような結果になるのか期待がもてる研究であった。

7 謝辞

本研究を進めるにあたり、旭川医科大学 川辺淳一 特任准教授に、実験方法について助言を頂いた。ここに感謝申し上げます。

8 参考文献

- ・成体の脳を透明化し 1 細胞解像度で観察する新技術を開発ーアミノアルコールを含む化合物カクテルと画像解析に基づく「CUBIC」技術を実現ー, 独立行政法人理化学研究所 独立行政法人科学技術振興機構, http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140418_1/#note1 (2014.4.18)
- ・Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging Etsuo A Susaki^{1-3,7}, Kazuki Tainaka^{1-3,7}, Dimitri Perrin^{4,7}, Hiroko Yukinaga³, Akihiro Kuno^{1,2,5,6} & Hiroki R Ueda¹⁻³
- ・農林水産省ホームページ (<http://www.maff.go.jp/>) (2016)
- ・組織透明化試薬を用いた 3D 蛍光イメージングのすすめ 今井 猛
独立行政法人理化学研究所多細胞システム形成研究センター感覚神経回路形成研究チーム (<https://seikagaku.jbsoc.or.jp/10.14952/SEIKAGAKU.2015.870225/data/>)