

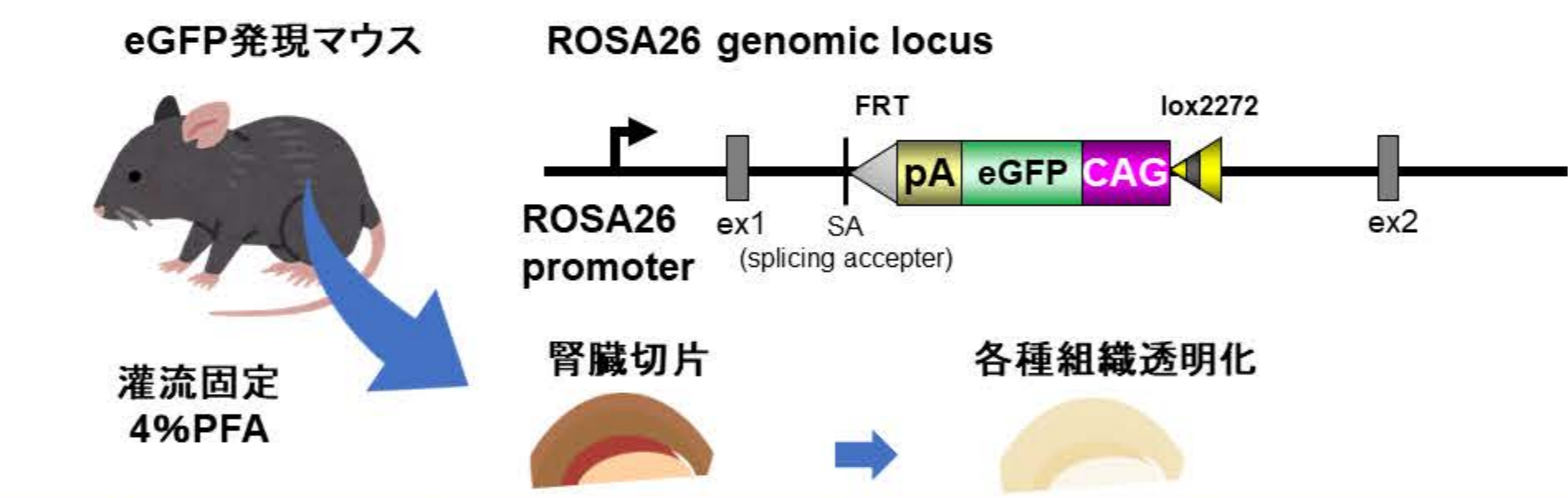
透明化組織の超微形態学的評価

東海大学伊勢原研究推進部
生命科学統合支援センター 鈴木雄祐

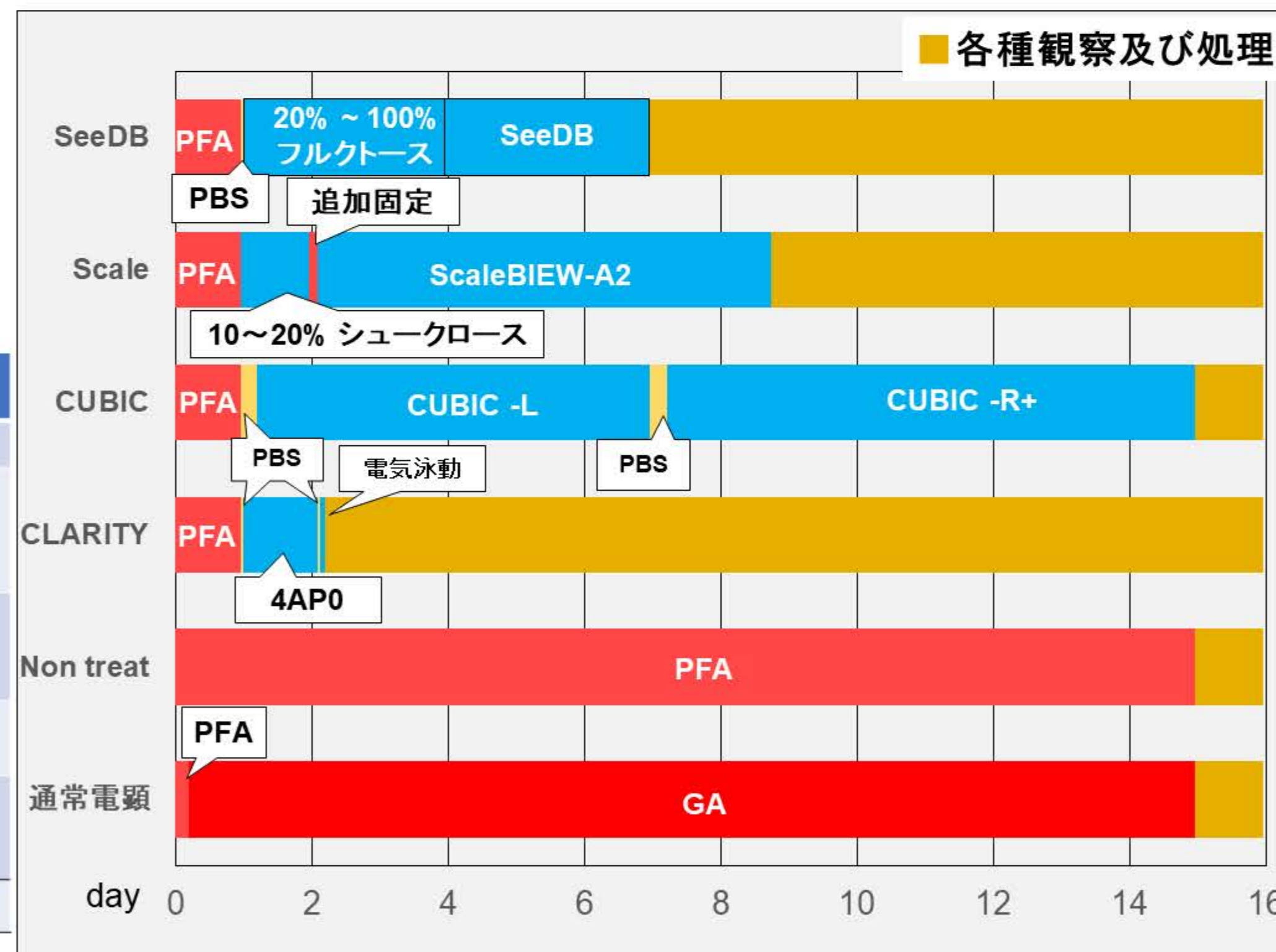
目的

近年、様々な組織透明化手法が開発され、共焦点レーザー顕微鏡等を用いて臓器を立体的に観察することが可能となった。最近では当施設の利用者から透明化処理を行った臓器の深部観察や電子顕微鏡での超微形態も含めた標本観察の相談を受けることが多く、適切な技術支援を行うためには透明化処理後検体の組織学的特性を把握しておく必要がある。そこで今回は当施設で観察依頼の多いマウスの腎臓を用いて、代表的な4種類の組織透明化手法(CUBIC、Scale、SeeDB、CLARITY)を実施し、各種透明化処理が超微形態に与える影響を確認することにした。

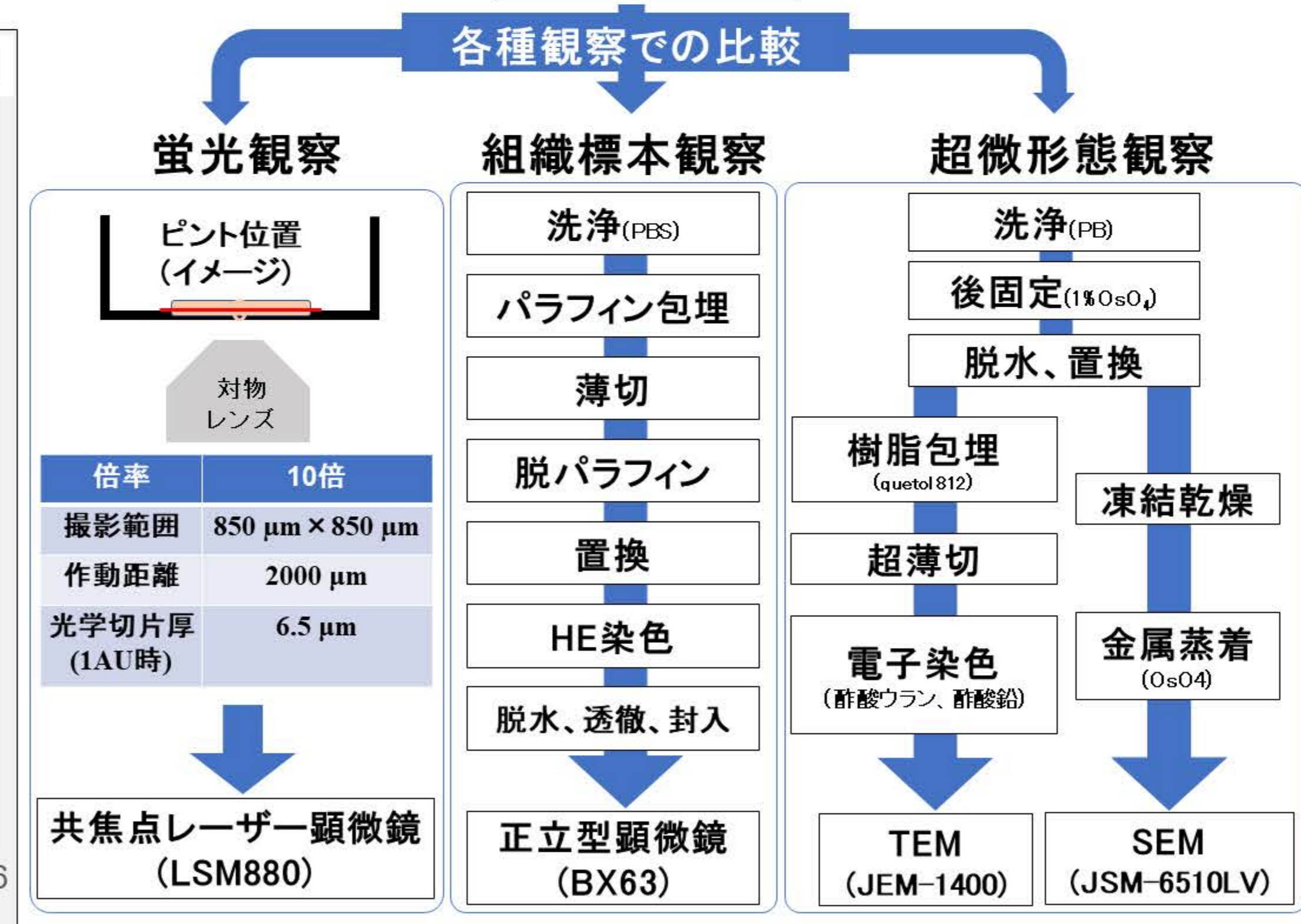
材料・方法



各種透明化の工程

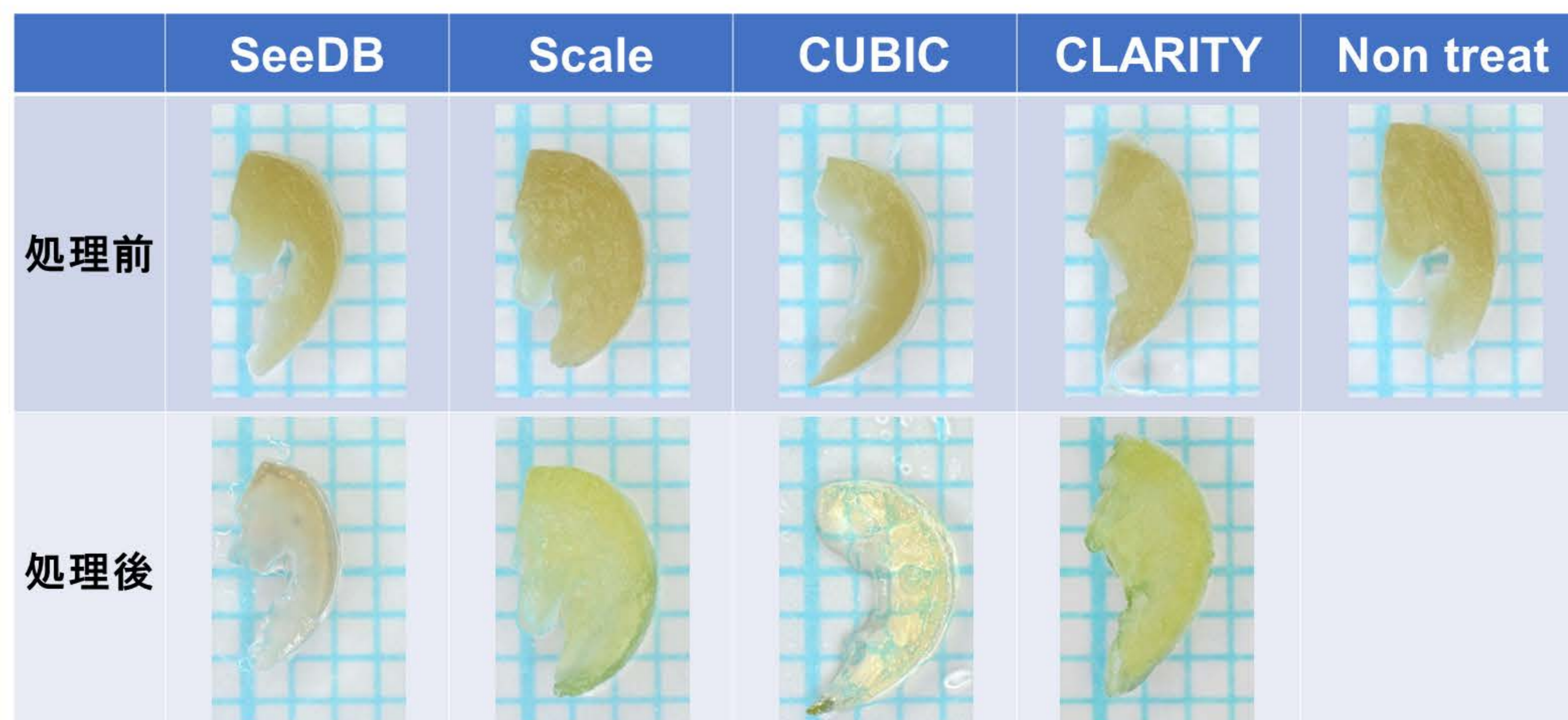


各種透明化



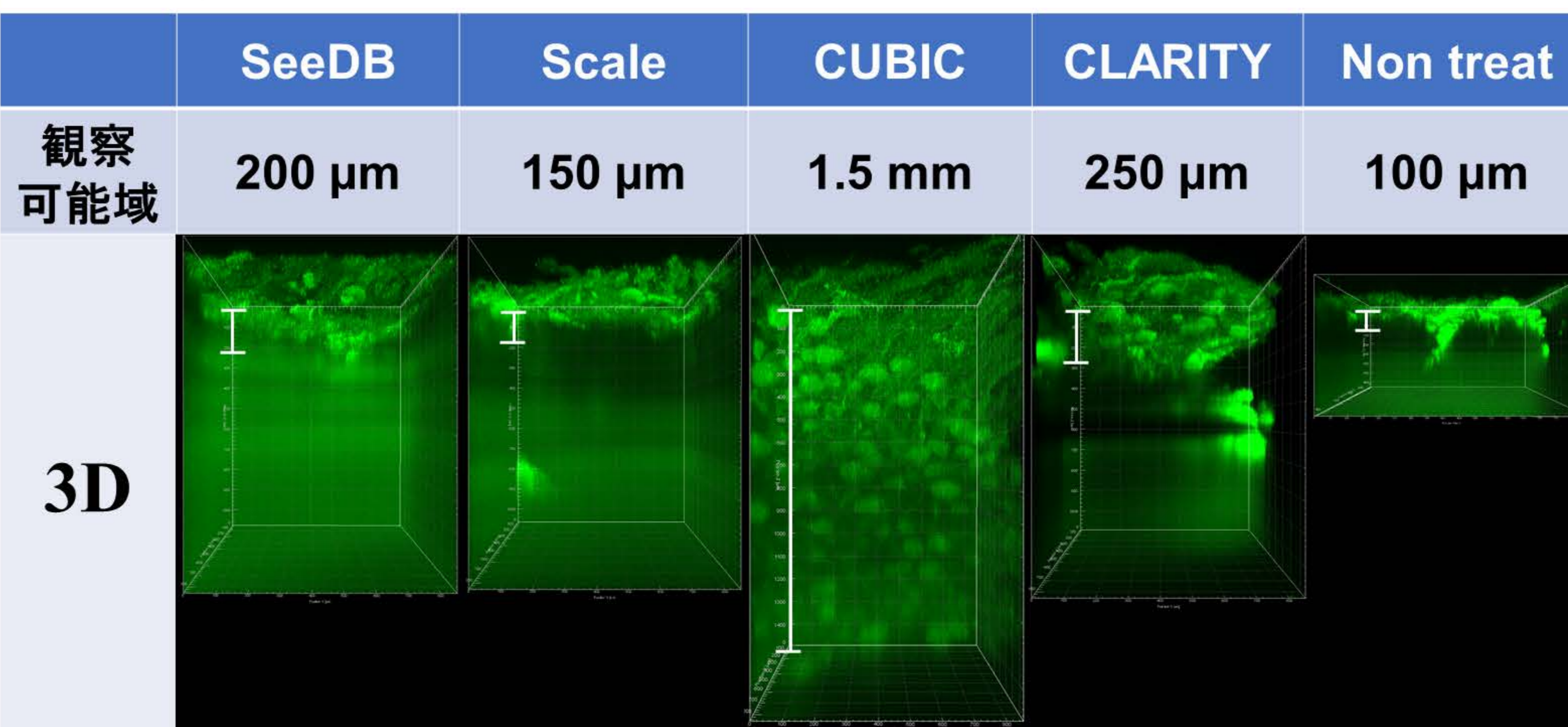
	SeeDB法 (宝珠医学 vol32)	Scale法 (和光純薬 商品説明)	CUBIC法 (東京化成工業)	CLARITY法 (Lee et al. (2016))
原理	溶液の置換	脱脂	脱脂	脱脂
行程①	フルクトース置換	シュクロース置換凍結包埋後、解凍	脱脂・脱色 (CUBIC-L)	ポリアクリルアミドゲル固定 (ゲル化剤をポリアクリルアミドゲル担体に架橋)
溶液成分	フルクトース α-チオグリセロール	-	Triton-X100 アミノアルコール	アクリルアミド VA-044
行程②	置換 (SeeDB)	脱脂・置換 (SCALEVIEW-A2)	置換 (CUBIC-R+)	SDS電気泳動 (脂質を除去)
溶液成分	フルクトース α-チオグリセロール	尿素 Triton-X100 グリセロール	アンチピリン ニコチンアミド	SDS ホウ酸
作業日数	7日	9日	15日	3日

結果① 透明度評価

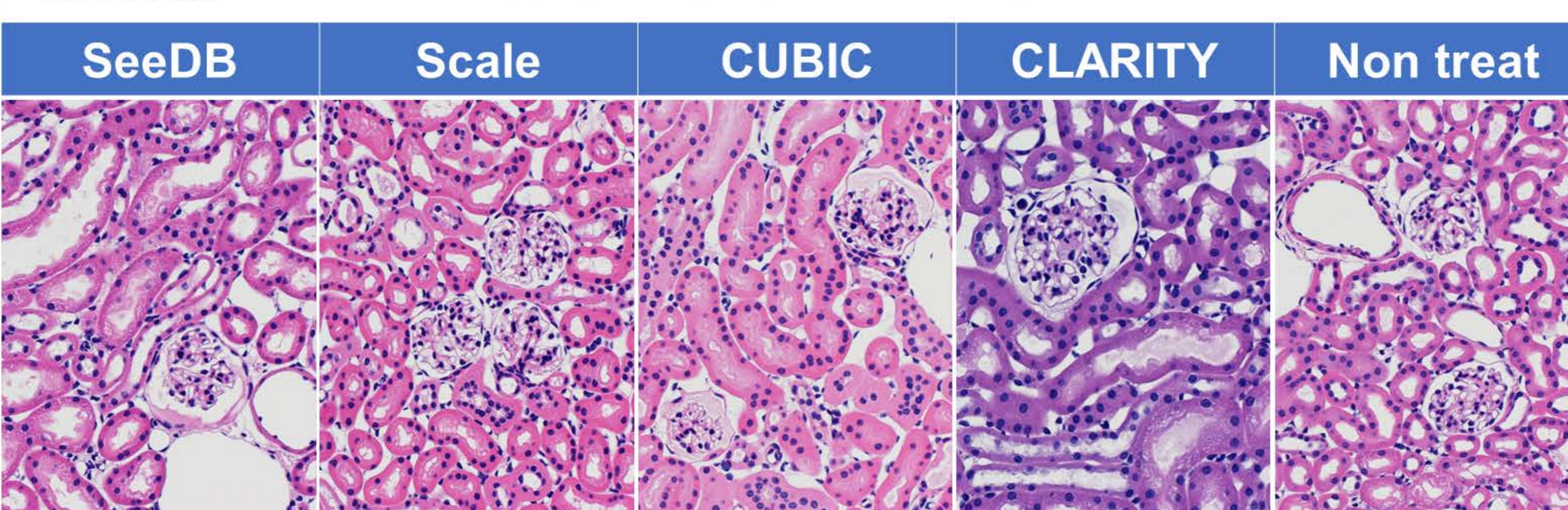


透明化処理後の腎臓において、CUBICが一番透明度が高くなっていた。Scale、CUBIC、CLARITYでは組織の膨張、SeeDBでは収縮がみられた。

結果② 蛍光による立体構造観察

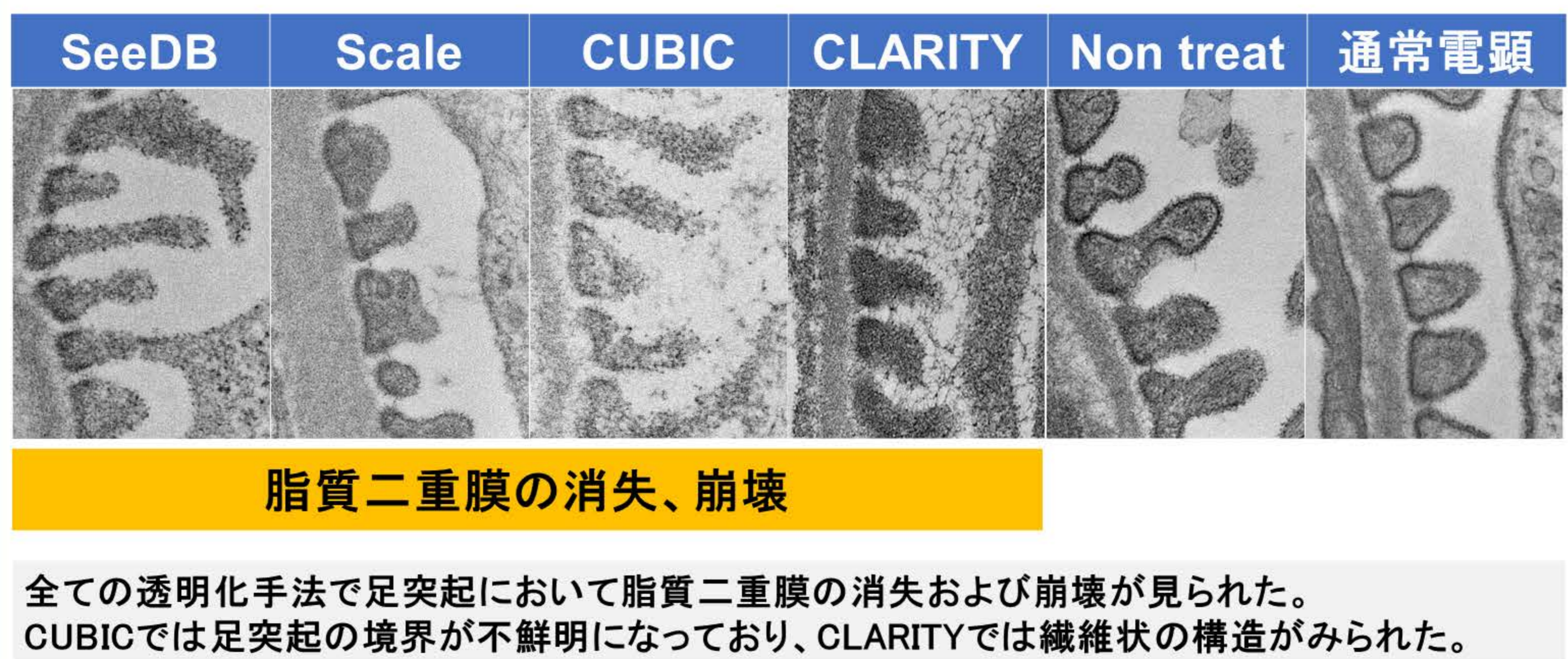


結果③ 組織学的評価 - HE染色 -



全ての透明化手法においてHEの染色性と組織学的形態に変化がみられた。CUBICでは細胞質でエオシンが淡く染まり、尿細管の膨張が顕著であり、CLARITYでは、細胞質がヘマトキシリンで濃く染まっていた。

結果④ 透過型電子顕微鏡観察



結果⑤ 走査型電子顕微鏡観察



腎臓における各種評価

	SeeDB	Scale	CUBIC	CLARITY
透明度	○	△	◎	△
観察可能深度 (LSM880)	△	△	○	△
組織の状態 (光顕)	×	△	×	○
染色性 (HE染色)	△	△	×	×
形態の保持 (電顕)	△	×	×	×

考察

- ・蛍光観察はCUBICがどの手法よりも深部まで観察することができた。
- ・HE標本での組織学的評価は、どの手法でも組織構造と染色性に影響がみられた。
- ・超微形態観察においては、全て脂質二重膜の消失、または崩壊による表面構造の変化が確認されたが、SeeDBは比較的構造を維持していた。
- ・試料数の制限がある場合や同一試料での二次的観察を考える場合は、目的に合わせて透明化手法を選択する必要がある。

透明化組織の超微形態学的評価

東海大学 伊勢原研究推進部生命科学統合支援センター 鈴木 雄祐

【目的】近年、様々な組織透明化手法が開発され、共焦点レーザー顕微鏡等を用いて臓器を立体的に観察することが可能となった。最近では当施設の利用者から透明化処理を行った臓器の深部観察や電子顕微鏡での超微形態も含めた標本観察の相談を受けることが多く、適切な技術支援を行うためには透明化処理後検体の組織学的特性を把握しておく必要がある。そこで今回は当施設で観察依頼の多いマウスの腎臓を用いて、代表的な4種類の組織透明化手法(CUBIC、Scale、SeeDB、CLARITY)を実施し、各種透明化処理が超微形態に与える影響を確認することにした。【方法】GFP発現マウスの腎臓で、CUBICとScaleは市販品を用いて添付書に従い、SeeDBは柯ら(2014)の方法に、CLARITYはLeeら(2016)に従って透明化処理を行った。立体的構造観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて、超微形態観察は走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて行った。【結果・考察】手法ごとに透明度は異なり、組織の膨張がみられた。また電子顕微鏡観察では全ての手法で細胞の剥離または膜構造の破壊が認められたが、SeeDBは比較的構造を維持していた。透明度と形態維持度合は各手法により異なる為、研究の目的に合わせた透明化手法を選択する必要がある。

記入上のお願い

- ・原稿は半ページにまとめてください。
- ・図や写真は掲載不可とします。
- ・書式（フォント、行間、文字数等）は変更しないでください。
- ・左肩の「P00」（ポスター番号）は主催者が記入します。そのまま残してください。