

簡便な自作装置による脳組織透明化技術の開発と検討

工藤-浅部 幸紹（秋田大学大学院医学系研究科 器官病態学講座）

KUDO-ASABE Yukitsugu : Development and examination of brain tissue clearing technique using a simple homemade device

The CLARITY method is a method for analyzing the three-dimensional structure of brain tissue by clearing tissue, but the equipment is expensive. We are working to simplify the clearing equipment by using readily available materials, and we report that we have now seen a path forward.

1. 研究の背景と目的

脳組織の形態研究はその神経細胞の立体構築，血管分布にという点では依然として不明な部分が多い分野である．立体組織構造を観察する手法として組織透明化技術による立体組織観察がある．これは CLARITY 法として既に確立しているが，機器が高額で気軽には利用できない（図 1）．私達は CLARITY 法を基準として，組織透明化の装置を入手しやすい材料を用いて自作し，組織透明化技術の簡便化することに取り組んできており，今回その道筋が見えてきたので報告する．

そこで私は水冷式の冷却装置を自作し，電気泳動槽に熱伝導性の高いアルミ管を配置することで，効率よく組織を冷却することに成功した．冷却水の水温と循環流量をモニタリングし，冷却効率が高くなるように設定し，透明度の高い透明化組織標本を作成する．以下前述の①と②について説明する．

① 組織切片作成：我々は今までに組織透明化処理をしたマウス脳の三次元再構成実験を重ねており，約 150 μm （通常の組織標本の厚さは 3-5 μm 程度）の厚さまでは三次元再構成が可能であることを実証してきた．今回は約 2mm の厚さの脳切片を作成するため，マウスから脳を摘出した後，緩衝ホルマリンに 1 晩浸けて固定する．翌日メスを用いて求める厚さに薄切する．また後の工程は CLARITY 法に沿って進める．

② 組織透明化：熱に対する冷却対策として，泳動槽の内側をゴムチューブとアルミ管でルートを作り，外側に置いた氷水を循環させることで，水温の上昇を抑えている（図 2）．

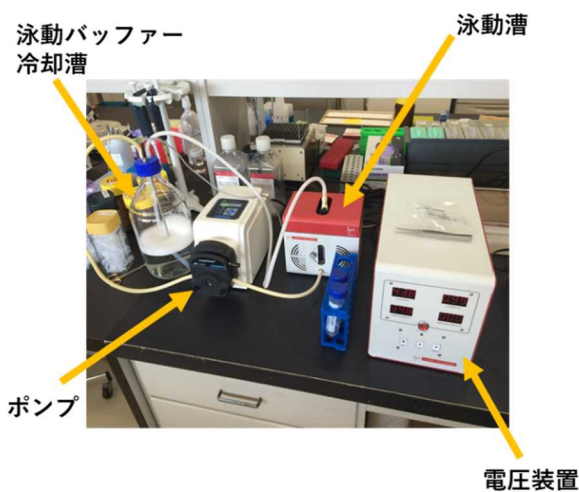


図 1. 市販されている高価な透明化用電気泳動装置の一例
X-CLARITY™ Tissue Clearing System
(Logos Biosystems)

2. 方法

CLARITY 法における組織透明化実験の流れは①組織切片作成 ②組織透明化である．またこの方法には電気泳動の過程が存在するが，その際に発生する熱によって組織が膨張・変形してしまうという問題がある．



図 2. 冷却機能を新設した電気泳動装置

3. 結果と今後に向けて

今回の熱膨張・変形に対する冷却対策をした透明化実験において、5時間後における組織の変化はほとんどなかった(表1・図3)。冷却対策の効果は実感できた一方で、組織は完全に透明にはなっておらず、今後水温と反応時間の至適条件の検討を行う予定である。

表 1. 泳動バッファの経時変化

	冷却・有	冷却・無
時間 (分)	水温 (°C)	
0	27	15
30	24	55
60	30	95
90	34	以降計測中止
120	20	
150	20	
180	27	
210	28	
240	23	
270	25	
300	30	



図 3. 電気泳動後のマウス脳

謝辞

研究を進めるにあたり、ご指導いただいた秋田大学大学院医学系研究科器官病態学講座 後藤明輝教授、吉田誠講師、研究室の皆様、脱気装置を貸していただいた千田進介総括技術長補佐には深謝いたします。

参考文献

1) Eunsoo, Lee.et al(2016)ACT-PRESTO: Rapid and consistent tissue clearing and labeling method for 3-dimensional(3D)imaging. Scientific Reports, DOI: 10.1038/srep18631