

パラフィン包埋組織を用いた血管構造の3次元可視化技術の開発

千葉知宏

杏林大学医学部病理学教室

背景

血管の異常は、良悪性を問わず、様々な疾患において診断、治療の両側面において重要な変化である。悪性腫瘍に生じる異常血管は分子標的薬の標的であり、肺高血圧症の血管は病態の本態である。こうした異常血管は多くの場合、50～500 μm程度の径を有しており、その全体像を観察・解析するためには工夫が必要である。3 μm程度の厚さで作成される通常の病理組織標本で評価する場合には、切片を連続的に多数作成する必要がある、血管構造を詳細に観察するための特殊な染色法を追加することも考慮すると膨大な労力が必要となる。

近年、組織透明化技術が進歩し、マウスやサル的大脑などで、ある程度のサイズの臓器を薄切する事なく、観察する成功例が報告されている¹⁾。透明化した組織において血管のみを蛍光染色することにより、比較的大きな血管病変を三次元的に観察することが可能となる。組織透明化技術は、現在のところ実験動物での利用が主体であり、臨床的に得られ、保存されたパラフィン包埋組織での技術は未だ確立していない。

本研究では、パラフィン包埋された病理標本を用いて、血管新生 (angiogenesis) 及び血管のリモデリング (remodeling) を3次元で可視化する技術の開発を目的とする。具体的には、微小血管増生 (microvascular proliferation, MVP) が豊富な神経膠芽腫 (glioblastoma)、及び、血管リモデリングが病態の本質とされる肺高血圧症の異常血管 (叢状病変 Plexiform lesion) を観察することを目標として、パラフィン包埋組織からの極厚標本作成及び組織透明化方法の確立を目指す。

方法

組織透明化法には多くの方法があるが、特殊な機器を用いない簡便な方法に注目した。2013年に理研のグループが開発した段階的にFructose溶液に浸漬させてゆく

SeeDB法 (SeeDB1法)²⁾ およびFructoseの代わりにX線造影剤として利用される高屈折率のイオヘキソールを用いたSeeDB変法 (SeeDB2法)³⁾ と、市販の組織透明化試薬であるFocusClear kit (CelExplorer社) を用いて、ヒト標準臓器検体の透明化を試みた。

結果と考察

肺および肝臓の組織片を用いて、1～3mmの厚さの検体をSeeDB1法により透明化したところ、1mmでは概ね透明に、3mmではべっこう状の半透明にすることが可能であった (図1)。現在の方法では、1mm程度までの透明化が効率が良いが、この程度の厚さでも目的の血管病変は十分に評価可能と考えられる。

次に、肺、肝臓、脳、腎臓の組織片を用いて、SeeDB1、SeeDB2およびFocusClearを比較したところ、SeeDB1法およびSeeDB2法で同等に透明化でき、FocusClearでは透明化の効果があまり得られなかった (図2)。FocusClear法は、プロトコール上、数100μm程度の厚さの組織の透明化が推奨されており、今回用いた数mmまでの透明化には有効でなかった。SeeDB法に関しては、SeeDB1およびSeeDB2法のいずれも大きな差はなく、より簡便で安価なSeeDB1法を用いることが有用と考えられた。また、透明化の際に、一度パラフィンに包埋した検体

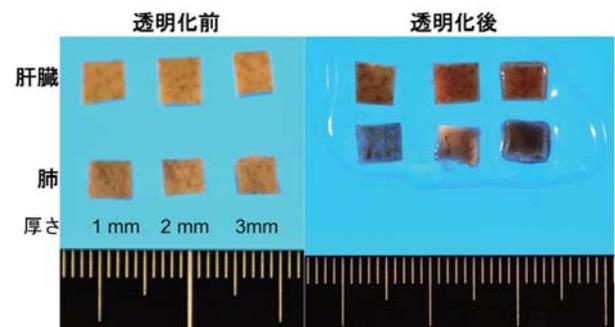


図1 肺および肝臓組織を用いたSeeDB1法による組織透明化。

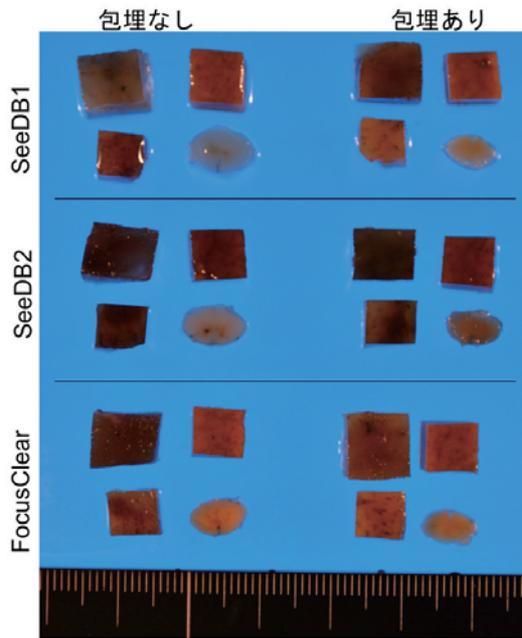


図2 パラフィン包埋ないし未包埋の肺，肝臓，脳，腎臓組織を用いた組織透明化。SeeDB1法，SeeDB2法およびFocusClear法を比較した。

とホルマリン固定された状態で包埋されなかった検体の両者が同様に透明化されることも確認した。

今後、蛍光染色と透明化を組み合わせ、蛍光強度を維持しながら透明化できる最適な方法を検討する予定である。

参考文献

- 1) Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157: 726-739, 2014.
- 2) Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature Neuroscience* 16: 1154-1161, 2013.
- 3) <https://sites.google.com/site/seedbresources/seedb2-protocol>