研究活動報告書

１．研究活動テーマ

臓器組織の教育用立体モデルの制作

－看護専門基礎教育における３Ｄプリンターの活用と画像アーカイブ構築の試み－

２．研究活動組織

研究活動者：日本赤十字豊田看護大学・教授・黒川　景

３．要旨

人体の組織構造の理解は、機能を含めたより深い理解のために欠かせないが、初学者にとって組織の立体構造を理解することは容易ではない。教育用の組織立体像のアーカイブ構築を目標として、これまで方法論や手順の確立に取り組んできた。先に、染色を要しない自家蛍光法による組織立体像の撮影条件や、3D プリンターへの出力法を確立したが、特異的な蛋白を検出して組織構築を明らかにする免疫染色法を、立体構造を保持したまま用いるには、抗体の浸透性の面で大いに改善する必要がある。近年、免疫組織染色を迅速に行う方法として電界攪拌法が開発され、病理検査の実務でも利用されているが、この方法による抗体の組織浸透性を検討した。

撮影した立体組織像を回転させて動画で示すと理解が深まることから、ナレーション付きの動画教材を制作し、学内のイントラネットによる映像配信プラットフォームを用いて教材の配信を実践した。

４．キーワード

組織透明化法、免疫組織化学、共焦点レーザー顕微鏡、形態機能学、医学教育

５．研究活動報告

（１）研究活動の背景・目的

人体の構造と機能をよりよく理解するためには、肉眼的レベルから顕微鏡レベルに至る人体の構造を統合して理解することが重要であるが、肉眼的レベルの構造に比べて顕微鏡レベルの構造は、通常平面による観察手法をとるため、初学者にとって組織の立体構造の把握は容易ではない。実際の教育の場でも、組織像の理解が困難であるとの感想をよく聞く。

近年、最先端の研究レベルでは、顕微鏡による撮影法、画像処理技術の進歩、蛍光物質

の開発、改良を背景として、さらに組織の透明化法の改善が進み、特に遺伝子の導入や組み換え技術を用いたマウス等の実験系では、組織の構造を構成する蛋白等の分布を含めて精細な画像で解析する技術が進んだ（Ertürk A., Becker K., Jährling N. et al., 2012; Yokomizo T., Yamada-Inagawa T., Yzaguirre A.D. et al. 2012; Renier N., Wu Z., Simon D. et al., 2014; Tainaka K., Kubota S., Suyama T. et al., 2014)。このような最先端の技術を、幅広い裾野を持つコメディカルの教育課程を含めた医学教育にも導入する試みによって、学生の理解が進むのではないかと考え、教育用の組織立体像のアーカイブ構築を目標とし、これまで方法論や手順の確立に取り組んできた。

既に昨年度の研究で、肝、腎、肺の組織について、染色を要しない自家蛍光法による組織立体像の撮影条件や、3D プリンターへの出力法を確立した。蛍光抗体法を用いた画像撮影では、高いレベルの自家蛍光は観察の妨げになるため、いかに自家蛍光を減弱させるかという先行研究はあるが(Baschong W., Suetterlin R., Laeng R.H., 2001)、自家蛍光を積極的に用いて画像を撮影しようという試みは見つからなかった。これまでの研究で、共焦点レーザー顕微鏡を用い、レーザー光の出力、励起および検出波長を調整することにより、組織の構造や、条件がよければ細胞のある程度の形態を観察することが可能であることを明らかにした。また、自家蛍光によって構成された腎糸球体の立体像構造を、3D プリンターに出力することにも成功した（黒川, 2015)。

自家蛍光は、細胞や組織を構成する成分に基づくものであることを考えれば、励起波長、検出波長やその強度を網羅的に検索することによって、ある程度構成する物質の推定に至る可能性があるのではないかと考えられるが、この方法論に関するはっきりとした先行研究は見当たらない。組織構築を形成するタンパクの同定には、一般的な薄切切片において免疫組織化学法が用いられる。蛍光物質を発現させる遺伝子を導入したモデルマウスでは、遺伝子発現による特異的蛋白の分布を解析できるが、一般の検体では、組織切片上の蛋白質の同定法として免疫組織化学法が標準的な方法である。組織の立体構造を保持したまま免疫組織法を用いようとする際には、組織への抗体や蛍光物質の浸透性が大きな障害となる。Yokomizo ら（2012）によれば、約 150μm が抗体の浸透の限界で、切片厚として 300μm 以下にする必要があると記載している。自らの経験でも、100μm 強が限界であろうと考えている。

近年、免疫組織染色を迅速に行う方法として電界攪拌法を用いた装置が開発され、病理検査の実務でも一部で利用され始めている（サクラファインテックジャパン, 2014)。薄切切片に対する抗原抗体反応を、通常室温で 1 時間、ないし冷蔵下に一昼夜かけて行うところを、この装置を用いると、抗体を含む反応液に荷電をかけることによって、5 分に短縮することができる。反応時間の短縮や試薬の節約を目的として開発された装置であるが、組織の浸透性の改善に利用できないかと考え、検討を行った。

組織立体画像を用いての教育効果を上げるためには、効果的なプレゼンテーションの方

法を工夫することが必要である。立体画像は、適度な速度に回転を加えると、視覚的にとらえやすくなる。そこで、これまでに得られた組織立体画像の回転動画を含む、効果的な視覚教材の作製を試みることとした。平成 27 年度、日本赤十字豊田看護大学に私立大学等教育研究活性化設備整備事業により、動画作成システムおよび映像配信プラットフォームが導入されたため、作製した動画教材を、学内のイントラネットにアップロードし、今後の形態機能学、病理学等の専門基礎科目に活用する環境づくりを進めることとした。

（２）研究活動の方法

①電界撹拌法による立体組織への抗体、蛍光標識浸透性の検討

9 か月齢のマウス（C57BL/6）をイソフルランで吸入麻酔し、十分な麻酔深度を得て苦痛がないことを確認した後、開腹し、試料作製用に肝臓を摘出した。動物実験にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、愛知医科大学で同大学の動物実験規定に基づき必要な教育訓練を受け、実験の申請手続きを行った上で実施した。PBS で溶解した 4%パラホルムアルデヒド溶液で 4℃、一晩振盪固定を行った後、約 2mm 角に組織を切り出した。PBS で 3 回洗浄の後、非特異的抗原抗体反応をブロックするため、組織を 0.4% Triton X-100、4%ヤギ血清を含有する PBS（以下ブロッキング溶液）に浸漬し、4℃一晩振盪した。その後、ブロッキング溶液に、一次抗体として細胆管のマーカーである CD66a（CEACAM-1）の抗体（10μg/ml, R&D System）を電界撹拌法装置（サクラファインテック）で反応させた。スライドグラス上に溶液が漏出しないよう、撥水サークル（サクラファインテック）を貼り付け、サークル内に組織切片を置き、400μl の抗体を希釈した反応液に浸した。電界撹拌法の電極の距離、電圧といった条件は、反応液の液量に合わせてマニュアル通りとし、それぞれ別の試料で 90 分、180 分、360 分反応させた。反応後、ブロッキング溶液で 2 回洗浄し、さらにブロッキング溶液で 4℃一晩振盪した。再び二次抗体の反応を電界撹拌法で、一次抗体と同条件、同時間で行った。一次抗体である CD66 の抗体はラットのモノクローナル抗体であるため、二次抗体には Alexa 647 でラベルした抗ラット抗体（200 倍希釈、ThermoFisher）を用い、さらに核染色のため、Hoechst 33342（20μg/ml）を反応液に加えた。二次抗体反応後、0.4% Triton X-100 を溶解した PBS で 2 回洗浄し、さらに同溶液で 4℃一晩振盪した。その後、メタノール置換（50%メタノール 10 分 1 回、100%メタノール 10 分 2 回）を行った後、benzyl alcohol と benzyl benzoate を 1:2 に混合した溶液（BABB 溶液）に一晩浸漬し、組織を透明化した。底に円形のカバーガラスを埋め込んだシャーレを BABB 溶液で満たし、その中に試料を入れ、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710（Carl Zeiss 社）で観察した。試料のカバーガラス側の最下面から上方（Z 軸方向）100μm の面を撮影し、試料の表面から細胆管が染色される距離を測定した。

一次抗体のコントロールとして、CD66 抗体と同じアイソタイプであるラット IgG2aκ

抗体を同濃度で反応させ、細胆管に染色性を示さないことを確認した。

通常の振盪による抗体反応として、一次抗体、二次抗体を 4℃で各 3 日間反応させた試料における抗体浸透性を検討し、電界撹拌法と比較した。

なお、通常の振盪法では、肝類洞の血管内皮マーカーである LYVE (10μg/ml、MBL) を一次抗体とし、二次抗体に Alexa647 でラベルした抗ラット抗体(200 倍希釈、ThermoFisher) を反応させて重染色を行い、細胆管と類洞の走行を示した立体画像を、②の動画教材作製に使用した。

②効果的な組織立体画像のプレゼンテーション法の検討と動画教材の配信

これまでに作製した立体組織像より、共焦点レーザー顕微鏡の画像処理ソフトウェアである ZEN2012（Carl Zeiss 社）を用いて回転動画を作製した。提示する画像の角度、回転角度のピッチ、回転速度を検討し調整を行った。解説のナレーションをかんたん！AITalk 3（AI 社）で作製し、Adobe Premiere Elements 14 (Adebe 社) を用いて動画と音声の編集を行った。編集した動画は、mp4 形式に変換した後、映像配信プラットフォームであるクラストリームを用いてアップロードし、日本赤十字豊田看護大学の学内イントラネットで閲覧可能とした。

（3）研究活動の結果

電界撹拌法で一次抗体、二次抗体各 90 分ずつ反応させた試料では、試料の表面から細胆管が約 40μm 染色された（図 1 a、赤矢頭)。180 分では約 50μm（図 1 b、赤矢印)、360 分では約 75μm 染色された（図１ c 、赤矢印)。

一次抗体、二次抗体各 3 日間ずつ、通常の振盪で反応させた量では、試料の表面から 70～75μm 染色された（図１ d 、赤矢印)。電界撹拌法で 360 分反応させた場合の抗体の浸透は、通常の振盪で 3 日間かかる浸透距離に匹敵することが示されたが、肝小葉全体が染色されるのには程遠い状況であった。

尚、電界撹拌法では、太い血管腔の周囲の細胆管がある程度染色され、ある程度抗体が浸透しているものと思われた。

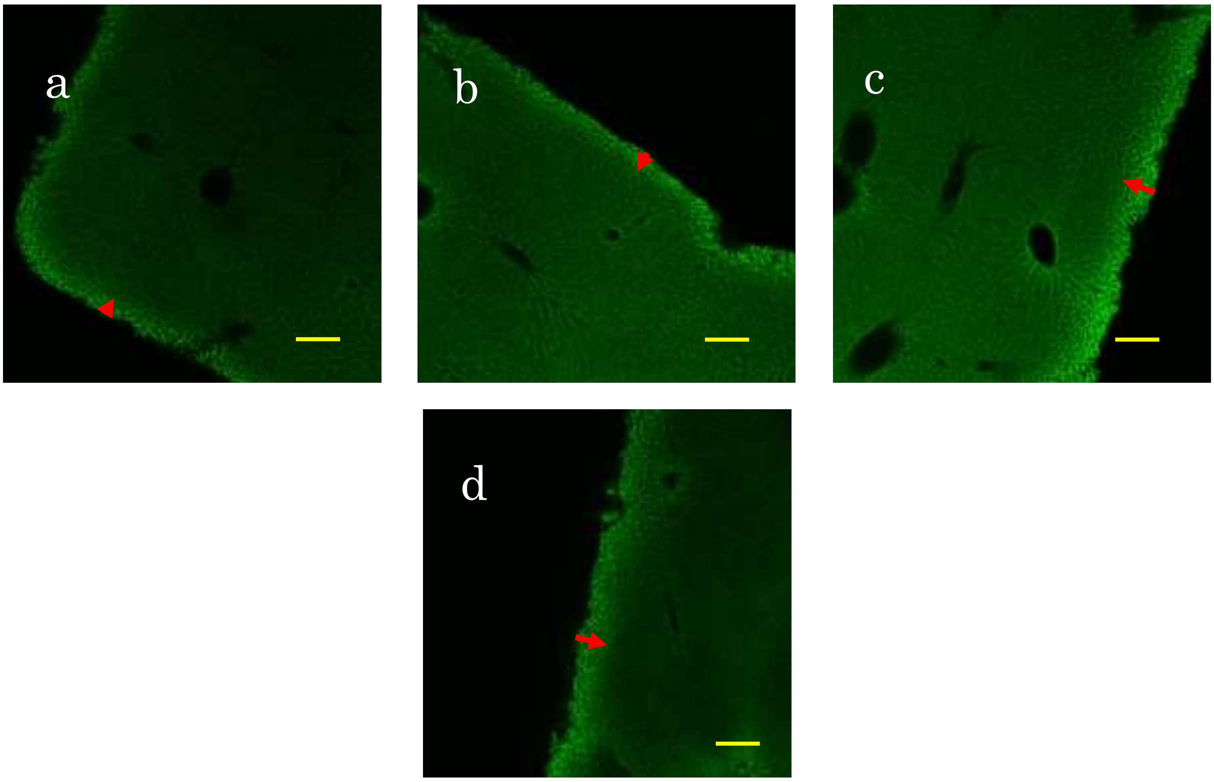

図１　電界撹拌法による抗体の浸透距離

試料の表面から抗体が浸透した距離に応じて、細胆管が緑色蛍光で網目状に染色されている。黄色のスケールバーは 100µm。

ａ：電界撹拌法で一次抗体、二次抗体各 90 分反応、ｂ：同 180 分、ｃ：同 360 分、

ｄ：通常の振盪で各 3 日間反応

①効果的な組織立体画像のプレゼンテーション法の検討と動画教材の配信

今回およびこれまでに作製した組織立体画像を利用して、次の 2 本のナレーション付き動画教材を作製した

「肝末梢組織　類洞と毛細血管」（2 分 30 秒）（図２ａ）

「腎糸球体　精巧な濾過装置」（2 分 00 秒）（図２ｂ）

「肝末梢組織」では毛細胆管と類洞の走行の関係を回転画像で示した。「腎糸球体」では、糸球体とその周囲の尿細管との立体構造、および 3D プリンターで出力した糸球体模型を回転させて提示した。

作製した動画教材を、映像配信プラットフォームであるクラストリームを用い、イントラネット環境で閲覧可能とした。特に動画、音声が途切れることなく、順調なストリーミング配信がなされることを確認した。

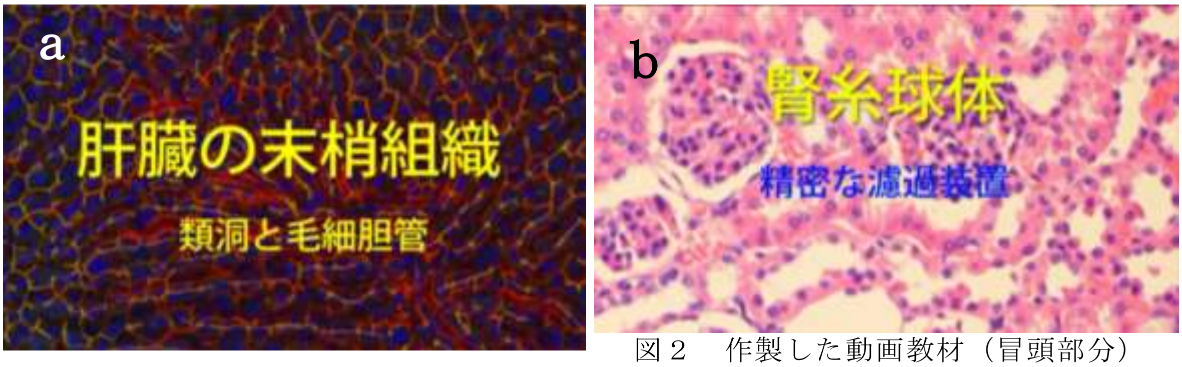

図２　作製した動画教材（冒頭部分）

（４）考察

電界撹拌法は、手術中の迅速病理診断に、通常は時間のかかる免疫組織化学法を導入するため、抗原抗体反応を短縮することを目的に開発された。病理検査での利用のため、特定のマーカーに関しては、5 分間で抗原抗体反応が終了する反応条件のプロトコールが整備されている。今回の電界撹拌法による抗体の組織の浸透性に関する検討では、通常の振盪法では 3 日かかる浸透距離が、6 時間の反応で得られることが明らかになった。肝小葉全体の抗体浸透にはまだ遠いが、さらに反応時間を長くすることによって、抗体浸透距離が延びるものと考えられる。

しかし、もともと電界撹拌法の装置が、薄切切片上の抗原抗体反応の短縮を目標としたものであるため、現状の装置では通常のスライドグラス向けになっており、厚みのある試料に対応する仕様となっていない。装置の設定時間も、99 分が限界となっており、180 分、360 分の反応は、それぞれ 90 分の反応を 2 クールおよび 4 クール実施した。今回は、スライドグラス上に撥水リングを添付し、その中に反応液を置いたが、組織の浸透性をよくするために、Triton X のような界面活性剤を反応液に添加すると、界面活性剤の濃度が濃くなるにつれて表面張力が低下し、スライドグラス上に載せることのできる反応液の量が低下する。今回の実験では、立体的な試料であるため、薄切切片よりもやや濃度が高い 0.4%の Triton X 溶液を使用したが、この濃度で 400μL の反応液を用いるのが限界であった。反応時間が長くなると、反応液の蒸発が進むため、360 分の反応では、2mm 厚の試料の上面ぎりぎりまで反応液が減少しており、これ以上の反応には反応液を追加する必要があった。しかし、反応液の容量に応じて、電極間の距離と電圧が設定されるため、反応液を追加ると液量の正確な把握が困難になり、反応条件の規定に問題が生じる状況であった。立体的な試料では、現状市販されている装置では使用に問題があり、試料の厚さに対応した反応溶液を入れられる容器を用意し、その容器で電界撹拌を行うことのできる装置の開発が必要であることが明らかとなった。

また、界面活性剤の濃度以外に、組織への抗体の浸透性を改善するための反応液の検討

も必要である。Renier ら（2014）は、iDISCO と名付けた組織への抗体浸透性を改善するプロトコールを発表した。この方法を追試したが、組織を酸や有機溶媒で処理し、通常の標本作製法よりかなり組織変性が強いものと思われ、染色状態も良好とはいえなかった。時間もかかり、決して容易ではないプロトコールである。電界撹拌法を併用すれば、もう少しマイルドな反応条件で、抗体浸透性を高めることができる可能性が考えられる。より効率の良い新たなプロトコールの開発が今後の課題である。

①効果的な組織立体画像のプレゼンテーション法の検討と動画教材の配信

動画制作や配信の環境については、私立大学等教育研究活性化設備整備事業により日本赤十字豊田看護大学で整備された状況となり、一度良い組織立体画像が得られれば、相応の手間と時間はかかるが、動画教材を作製できる状況であることが確認された。形態機能学、病理学等の講義での利用とともに、学内のイントラネット配信により、学生が随時閲覧して繰り返し見ることができる環境が整った。組織立体画像の蓄積は時間のかかる作業であるが、今後、さらにコンテンツの充実を図る必要がある。

（５）結論

組織学を含めた人体の構造、機能は、看護教育における初年度に行われる。看護師になるという明確な目標を持って入学するが、そこで学ぶ医学は日進月歩で新しい情報が加わり、難解な内容も多く含まれている。学年が上がり、看護の専門課程で学ぶ内容を修得すれば、人体の構造、機能の深い理解の必要性がよく理解できるようになるが、初年度の段階では看護の専門課程との関連が直ちに理解しにくく、学習意欲が低下する学生が出てくることも危惧されるところである。視覚的に理解しやすいように工夫した教材を用いることによって、出来る限り複雑な人体のしくみをわかりやすく示し、興味を持ってもらえるように工夫することは重要であるが、そのためには、基礎研究の成果を含めた様々な技術的裏付けが必要である。蛍光抗体法については、まだ十分なサイズの立体組織を染色する簡易な方法の開発には遠いが、バックグラウンドである研究を教育に還元する普段の努力によって、教材を蓄積し配信していくことは、看護学部で医学教育に携わるものとして、重要な活動である。

（６）謝辞

本研究は、日本赤十字学園教育・研究及び奨学金基金の援助を得て、細かい技術的な面を含めた検討を行うことができた。サクラファインテックの応治比呂美様、山下貢様には、電界撹拌法装置の利用、検討を快諾していただき、技術的な指導をいただいた。また、日本赤十字豊田看護大学に私立大学等教育研究活性化設備整備事業により導入された動画作成・配信システムは、教材作製とその閲覧環境の整備に強力なツールであった。日本赤十

字豊田看護大学専門基礎の高見精一郎先生には、効果的なプレゼンテーションのための動画作成ツールの活用方法について、丁寧なご指導をいただいた。愛知医科大学医学部病理学講座および動物実験施設には、設備の利用をお許しいただいた。研究にご協力いただいた皆様に厚く御礼申し上げる。

（７）引用文献

Baschong W., Suetterlin R., Laeng R.H. (2001). Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). J Histochem Cytochem, 49(12), 1565-1572.

Ertürk A., Becker K., Jährling N. et al. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. Nat. Protocols, 7(11), 1983-1995.

黒川　景 (2015). 共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織立体モデルの制作　３D プリンターの活用を含めた教育用画像の作製法. 日本赤十字豊田看護大学紀要, 10(1), 97-107.

Renier N., Wu Z., Simon D. et al. (2014). iDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. Cell, 159, 896-910.

サクラファインテックジャパン (2014). 電界撹拌染色装置　ヒスト・テック R-IHC. http://www.sakura-finetek.com/newproduct/R-IHC.html, 2016 年 5 月 19 日.

Tainaka K., Kubota S., Suyama T. et al. (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. Cell, 159, 911-924.

Yokomizo T., Yamada-Inagawa T., Yzaguirre A.D. et al. (2012). Whole-mount three-dimensional imaging of internally localized immunostained cells within mouse embryos. Nat Protoc, 7(3), 421-431.