

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21246

研究課題名(和文) 犯罪捜査化学：組織透明化3Dイメージングによる新規死因究明法の確立

研究課題名(英文) Development of novel forensic technology by tissue clearing-based 3D imaging

研究代表者

田井中 一貴(Tainaka, Kazuki)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80506113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒトの死後検体を形態を保持したまま高度に透明化し、高解像度かつ網羅的に受傷臓器を3Dイメージングすることで、正確な死因を特定する新規死因究明法の確立を目的とする。大きなヒトの死後検体に適用可能な新規透明化プロトコルの開発に取り組み、3-5cm立方の大きな死後ヒト組織検体を高度に透明化することに成功した。また、皮質動脈破裂による硬膜下血腫の病変部位を用いて透明化・3Dイメージング解析を行い、皮質動脈破裂の検出に成功し、肉眼観察では見逃していた破裂も検出可能であることが分かった。肉眼及び2次元の組織分析では不可能であった破裂部位と周囲小動脈の3次元的な形態解析が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発する透明化試薬は、腐敗臭を有する検体にも適用できることから、腐敗・水死・ミイラ検体にも応用可能である。死因部位の網羅的な探索や凶器の特定、受傷経過時間の定量的解析により、世界標準の死因究明技術になることが期待できる。死因となりうる種々の臓器の網羅的高解像度イメージングにより、受傷部位・期間を特定することで、死因究明の精度が向上する。受傷部位の立体構造と凶器を照合することで、凶器の推定にも応用できる。様々なヒト組織検体に適用可能な拡張性の高い組織透明化手法を開発することで、DNA鑑定に匹敵する犯罪捜査における世界標準の死因究明技術となりえる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to establish a novel method for determining the exact cause of death by highly cleared human postmortem specimens while preserving their morphology, and by performing high-resolution and comprehensive 3D imaging of injured organs. We have developed a new tissue clearing protocol applicable to large human postmortem specimens, and have succeeded in achieving a high degree of transparency in large 3-5 cm cubic postmortem human tissue specimens. In addition, 3D imaging analysis was performed on a lesion site of a subdural hematoma caused by cortical artery rupture, and it was found that cortical artery rupture could be successfully detected, even ruptures that had been missed by conventional method.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：組織透明化 3Dイメージング 法医学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、オートプシーイメージングなどの3D可視化技術により、死因究明技術の精度が上がりつつある。しかしながら、解像度が不十分なため、肉眼的所見が非常に軽微な血管の破綻部位の検出や挫創・切創における凶器の正確な特定は依然として困難である。また、免疫染色などの標識技術と組み合わせることができないため、組織内部の受傷後の時間経過などを推定することも困難である。死因の判別が困難な事例において、検体中の死因となりうる血管破綻部位を精度よく特定するためには、大きな検体中の血管構造もしくは、出血部位を網羅的に検索する一般的な手法が求められる。我々はこれまでに哺乳類組織の透明化・染色技術に基づく3Dイメージング手法CUBICを開発した。CUBICは、マウス全身のように大きな哺乳類個体を高度に透明化し、シート照明型蛍光顕微鏡と組み合わせることで、個体内部の構造を一細胞解像度で可視化可能な技術である。透明化・3Dイメージング技術がヒト死後検体に適用できれば、汎用性の高い死因究明技術になりうる。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒトの死後検体を形態を保持したまま高度に透明化し、高解像度かつ網羅的に受傷臓器を3Dイメージングすることで、正確な死因を特定する新規死因究明法の確立を目的とする。既に確立されたCUBICによる組織透明化・3Dイメージング技術が、法医学サンプルに適用できるかを検証し、そこで得られた課題に基づいて法医学サンプルに最適な透明化手法を改良する。

### 3. 研究の方法

既存のCUBIC技術により皮質動脈破裂による硬膜下血腫の病変部位6例を用いて透明化・3Dイメージング解析を行い、皮質動脈破裂の検出を試みた。剖検で摘出された脳全体をホルマリン固定し、破裂した疑いのある皮質動脈を含む部位をブロック(3-5 cm × 2-5 cm × 1-2 cm)として切り出した。CUBIC透明化法に従い、CUBIC-L、CUBIC-Rの順に処理して切り出した脳ブロックを透明化した。具体的な操作を以下に示す。固定された各脳ブロックをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄して、ホルマリンを除去した。脱色および脱脂のために、各ブロックをCUBIC-Lに浸漬し、45℃で12日間穏やかに振とうした。その間にCUBIC-Lを1回交換した。続いて、各サンプルを室温で数回PBSにより洗浄した後、脳標本を1/2希釈したCUBIC-Rに浸漬し、室温で終夜振とうした。最後に、原液のCUBIC-Rにより室温で2日間振とうし、組織を透明化した。組織中に残留する血液成分および血管は、比較的強度の自家蛍光を有している。そこで、透明化検体の自家蛍光をシート照明型蛍光顕微鏡により観察した。既に確立されている病理学的観察方法によるダブルチェックを実施するために、イメージングを完了したサンプルをPBS洗浄後、パラフィン包埋した。パラフィン切片を作製し、エラスチカ・ワンギーソン染色による血管染色により血管破綻部位を観察した。シート照明型蛍光顕微鏡で得られた光学的断面画像をImarisソフトウェアにより3D再構成し、破裂した動脈を探索した。また、組織病理学的画像と比較することで、原理検証を行った。

### 4. 研究成果

6つのうち5つの症例で、組織病理学により、シルビウス裂近くの皮質動脈に由来する枝の根またはその近くで動脈破裂が発生したことが確認できた。CUBIC法を使用することにより、5つのうち4つの症例で動脈破裂を明確に視覚化することができた。1つの症例において、動脈破裂はイメージング範囲外に存在した。CUBIC透明化処理による組織への影響を観察したところ、全ての症例において動脈には明確な損傷は認められなかったが、脳実質の内部に小さな亀裂が認められる症例もあった。

代表的な症例の結果を以下に示す。肉眼的観察では、破裂部位に出血沈着物がなかったにもかかわらず、皮質動脈または小枝の破裂は明確ではなかった。3D-CUBICイメージングにより小さな枝の根元で皮質動脈が破裂したことが分かった。また、断面画像から、小枝の根元にある皮質動脈の破裂だけでなく、組織病理学的画像でも確認できるように、破裂部位の近傍にくも膜の裂傷と小さな結節があることが分かった(図1)。

CUBIC法により、組織病理学的検査と同程度の水準で詳細に動脈構造を視覚化できること、また、従来の方法にCUBIC法を追加することでいくつかの利点が得られることが判明した。まず、CUBICによる分析は、破裂として認識しにくい小さな表面的な変化しかない場合でも、破裂を明確に視覚化できたことから、従来の肉眼的観察よりも動脈破裂の検出に優れている。また、動脈破裂とそれに隣接する動脈の詳細な3D形態解析が可能になる点である。CUBIC法は、組織ブロックから非破壊的に仮想組織切片を作成することができるため、病理切片の位置とスライス方向を最適化することができる。このため、病変部位に焦点を当てた効率的かつ効果的な病理学的検索が可能となった。

ただ、一方でいくつかの問題点が明らかになった。CUBIC法に基づく透明化手法は、組織ブロックをゼリー状に脆弱化する、つまり組織の物理的強度を減弱させる。このため、検体内部の構造を破損しないように注意深く取り扱う必要がある。透明化組織は元の組織ブロックよりも

1.5 倍程度膨潤するが、パラフィン包埋時に検体が脱水処理により収縮するため、蛍光 3D イメージングと組織病理解析における縮尺が大きく異なるという問題がある。CUBIC 法による透明化では、検体が大きすぎる、もしくは内部組織に脂質含量が高い部位を含む場合には十分な透明度が得られない。以上の課題を克服するために新たな透明化手法の開発に取り組み、上記 ~ の課題を解決した新規透明化プロトコルの開発に成功した。今後は法医学分野における標準的な死因究明技術の確立に向けて、実用例を拡張する。

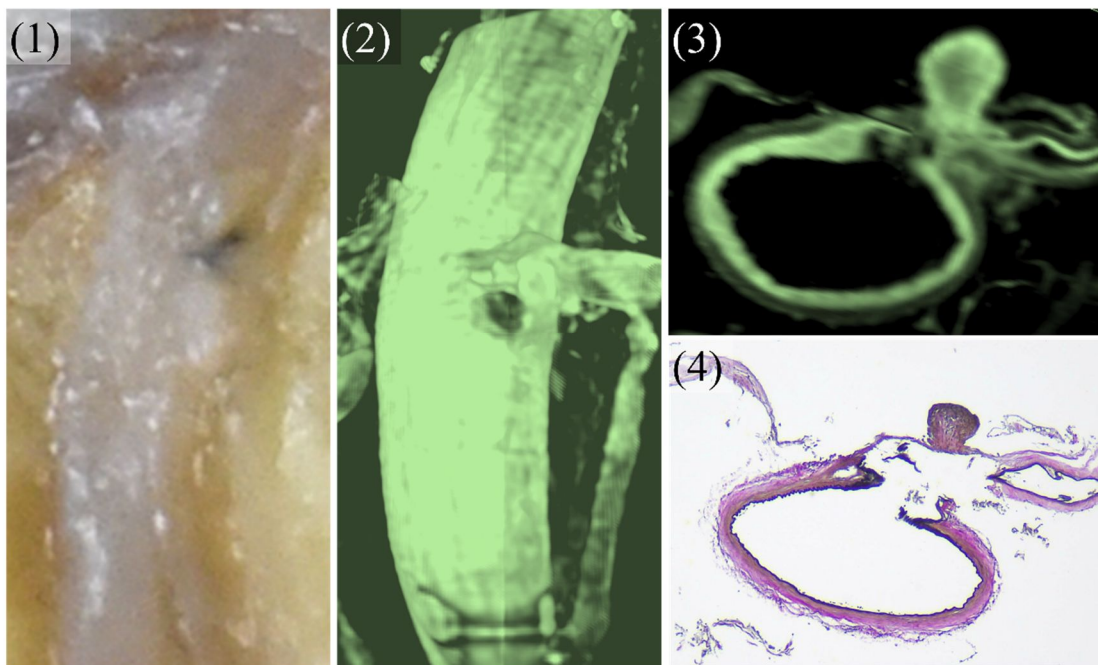


図1 . マクロな肉眼的初見(1)と透明化・3D イメージングによる再構成画像(2-3)、エラスチカ・ワンギーソン染色による組織病理学的画像(4)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Ode KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saido TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR.	4. 巻 11
2. 論文標題 Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15906-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito N, Tainaka K, Macpherson T, Hikida T, Yamaguchi S, Sasaoka T.	4. 巻 156
2. 論文標題 Neurotransmission through dopamine D1 receptors is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 58-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.04.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota SI, Takahashi K, Mano T, Matsumoto K, Katsumata T, Shi S, Tainaka K, Ueda HR, Ehata S, Miyazono K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Whole-organ analysis of TGF- $\beta$ -mediated remodelling of the tumour microenvironment by tissue clearing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01786-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi M, Yoshihara K, Suda K, Nakaoka H, Yachida N, Ueda H, Sugino K, Mori Y, Yamawaki K, Tamura R, Ishiguro T, Motoyama T, Watanabe Y, Okuda S, Tainaka K, Enomoto T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102258.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田井中一貴
2. 発表標題 脳透明化
3. 学会等名 第3回若手育成セミナー「神経回路の可視化・操作・モデリングのための最先端技術」（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------