

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660154

研究課題名(和文) 組織を透明化する試薬「Scale」の魚病研究への応用

研究課題名(英文) Application of an optical clearing reagent "Scale" to fish pathology

研究代表者

延東 真 (ENDO, Makoto)

東京海洋大学・その他部局等・教授

研究者番号：80128355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Scaleをはじめとした組織透明化試薬を魚病研究に適用し、病原体の侵入門戸や体内伝播経路を解明するための基盤を確立することを目的とした。各種透明化試薬を比較したところ、Scaleを改良したCUBICを用いた時に組織の透明性が最も高く、組織形態や抗原性なども保持されていた。また、蛍光標識した病原体を感染させたキンギョにおいて、魚体内の菌を蛍光顕微鏡下で可視化することができた。一方、RNAの保存性はSeeDBやClearTを用いた時が最も高かった。以上の結果から、目的に応じて透明化試薬を使い分けることで、病理組織学的、分子生物学的手法による感染症の診断が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fish diseases are generally diagnosed by histological and/or molecular biological analysis following the observation by eyes. However, it is difficult to examine the whole body and clarify the localization of pathogens. Here, we investigated whether the recently developed transparent techniques such as Scale, SeeDB, ClearT and CUBIC are applicable to diagnosis of fish diseases. CUBIC, which is modified from Scale was most effectively transparentized the fish body, and applicable to imaging of GFP and immunostaining. Furthermore, *Aeromonas hydrophila* labeled with DAPI could be visualized under a fluorescent microscope. Although DNAs were preserved in all transparent specimens and applicable to PCR, RNA was degraded by CUBIC due to containing basic aminoalcohols. On the other hand, RNA was highly preserved in organs treated with SeeDB or ClearT. Our results indicate that proper use of transparent techniques enable whole body diagnosis of the infectious disease in fish.

研究分野：環境毒性学

キーワード：組織透明化試薬 蛍光標識 魚類病原細菌 病理組織学 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚類の感染症の診断は、まず病魚の外部所見から解剖により病巣部を中心に採材し、病理組織学的解析を行うといったプロセスで行われる。しかしながら、外部所見と解剖を前提とした診断では、以下のような問題点があった。

- ① 広範囲な観察が困難なため、病原体の局在や動態がわかりにくい
- ② 多発性病巣の把握が困難
- ③ 摘出できない臓器の観察が不可能
- ④ 病巣をまだ形成していない初期の病変部は検査の対象にならない
- ⑤ 臓器の深部にある病巣は気付かないので、検査の対象にならない

一方、医療分野においては、解析対象の内部構造を非破壊で可視化する手法が行われている。例えば、ヒトの死因の究明には、CT スキャンや MRI (磁気共鳴画像診断) を用いた Ai (オートプシー・イメージング) による画像診断が近年注目されている。しかしながら、このような複雑・高価な技術を養殖魚の魚病診断に導入することは現実的ではなく、実際、どの養殖現場においても行われていない。また、透明骨格標本などによる内部構造の可視化もあるが、水酸化カリウムやトリプシンでタンパク質を分解する過程が含まれるため、免疫染色での抗原性の消失やアルカリによる RNA の断片化が起こり、その後に詳細な分子生物学的解析を行うことができない。さらに、組織を脱水する過程で有機溶媒を用いるため、蛍光色素を用いる実験も不可能である。そのため、健康に見えながら、体内のどこかに病原体が潜み、ある時排菌する、いわゆるキャリアの問題を解決できなかった。またウイルスや細菌などの病原体の侵入門戸や、菌の増殖部位、体内伝播などを説明することも困難であった。

(2) 2011 年、組織を完全に透明化できる試薬「Scale」が開発され (文献①)、体内に標識された蛍光を 3 次元で直接観察できるようになった。Scale は、組織を完全に透明化することで、固定した組織の深部を非破壊で詳細に、しかも蛍光色素で可視化することを可能にする。これにより、従来の外部所見と解剖を前提とした上記の魚病診断の問題点は、Scale を用いることですべて解消される。Scale が透明骨格標本などと大きく違う点は、サンプル中の蛍光色素のシグナルが失われてしまわないことである。透明化した組織での蛍光イメージング技術と生化学・分子生物学的手法を融合させることにより、魚体丸ごとを蛍光観察してから注目すべき組織にフォーカスを当て詳細に観察するといった、これまでは全く不可能だった「マクロからミクロへ」の連続的な解析が可能となる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、Scale を魚病研究に適用し、キャリアの問題や病原菌の侵入門戸および体内伝播経路の解明へと展開するための研究基盤を確立することを目的とした。Scale は、2011 年に報告された新しい技術であるため、マウス以外の生物に応用した例は皆無であった。そこで本研究では、Scale の組成や処理方法を検討し、魚類組織の透明化における最適条件を探索した。また、2011 年以降に報告された透明化試薬 SeeDB (文献②)、Clear^T (文献③)、CUBIC (文献④、⑤) との比較検討も行った。

(2) 蛍光標識した病原体を感染させ、病原体が器官のどの部分に局在するか、また、どのような伝播動態を示すかを詳細に確認できるようにするために、透明化処理をしたサンプルの組織学および分子生物学的解析へのアプリケーションについても検討した。

3. 研究の方法

(1) 供試魚として、ゼブラフィッシュ、メダカ、キンギョを用いた。低温麻酔した後、延髄を切断して即殺した。固定液が魚体内へ浸透しやすくするため、鰓蓋を切除し、さらに、内臓を傷つけないように正中線に沿って腹部を切開した。その後、直ちに 50 mL の 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。固定後、文献に記載されている方法により、ScaleA2、SeeDB、Clear^T、CUBIC で透明化処理を行った。

(2) 組織学的観察を行うために、透明化処理をしたサンプルを Morse 液に浸漬して脱灰した後、常法により組織切片を作製し、HE 染色を行った。さらに、抗βアクチン抗体 H-300 (Santa Cruz Biotech 社) を用いた蛍光免疫染色により、内在性タンパク質の抗原性の保持を評価した。

(3) 内在性タンパク質の活性を評価するため、pEGFP をトランスフェクションした EPC 細胞およびトランスジェニックニジマスの稚魚を透明化処理し、蛍光顕微鏡により緑色の蛍光を観察した。

(4) 透明化処理をしたサンプルから鰓および肝臓を採取し、ISOGEN II (ニッポンジーン社) またはプロテナーゼ K/フェノール/クロホルム法によりゲノム DNA および total RNA を抽出した。1.5% アガロースゲル電気泳動およびβアクチンをターゲットとした PCR 法により DNA および RNA の分解度を評価した。

(5) 蛍光標識した病原体の魚体内動態や局在を明らかにするために、DAPI、アクリジンオレンジ、PKH26 など蛍光標識した *Aeromonas hydrophila* を腹腔内に注射した。12 時間後、透明化処理を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) 代表的な小型魚類であるメダカを用い、試薬の組成や処理方法を検討し、組織の透明化における最適条件を探索した。また、*ScaIe* 試薬だけでなく、*SeeDB* や *Clear^T* などについても検討した。その結果、透明度は、*Clear^T* > *ScaIeA2* > *SeeDB* の順であったが、いずれも透明度は高くなかった (図 1)。鱗を除去したところ、筋肉組織は透明化されていたことから、鱗や色素胞が透明化に影響を与えることが予想された。一方、頭部、腹膜および鰓は、いずれの試薬に用いても透明にはならなかった。また、組織学的解析を行ったところ、いずれの試薬も組織の形態や染色性には影響を与えなかった (図 2)。透明化にかかる時間は、*Clear^T* が 2 日、*SeeDB* が 1 週間であったのに対し、*ScaIeA2* では 2 週間であった。

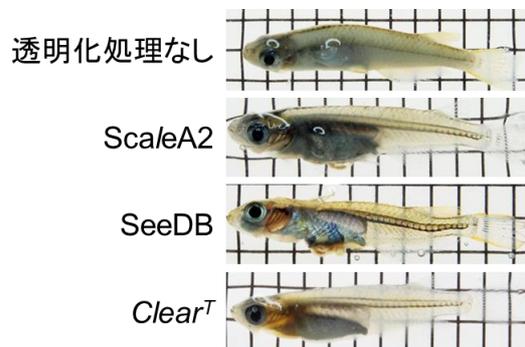


図 1 各種透明化試薬を用いて透明化したメダカの透明性の比較

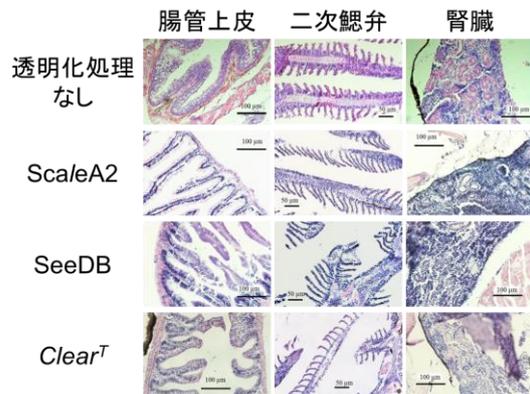


図 2 各種透明化試薬で処理したメダカの腸管上皮、二次鰓弁および腎臓の組織形態の比較

(2) 各種透明化試薬で処理したメダカの鰓および肝臓から total RNA を抽出し、電気泳動により RNA の保存性を比較したところ、*ScaIeA2* では RNA の分解が見られたが、*SeeDB*、*Clear^T* においては、試薬を DEPC 処理し、さらに低温で操作することで高品質の RNA が検出できた (図 3)。

(3) *Scale*、*SeeDB*、*Clear^T* では組織の透明度は十分とはいえず、また蛍光顕微鏡による観察では、組織の自家蛍光も強かったため、蛍

Scale SeeDB Clear^T

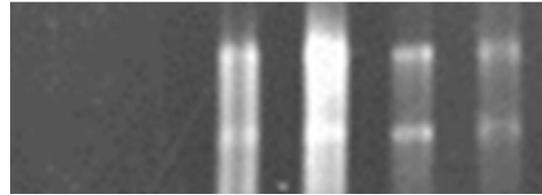


図 3 各種透明化試薬によって透明化したメダカの鰓および肝臓から抽出した RNA の電気泳動像

光標識した病原体を観察するには多くの課題が残されていた。そこで、2014 年に開発された *Scale* の改良法である CUBIC 法についても検討し、蛍光標識した魚類病原細菌の魚体内での分布の可視化や、透明化した組織の病理組織学的および分子生物学的解析へのアプローチが可能かを明らかにするために以下の実験を行った。

供試魚として、黒色素胞を持たないキンギョを用い、CUBIC 処理後の魚体の透明性および組織形態の維持について調べたところ、*Scale*、*SeeDB*、*Clear^T* で処理した場合に比べて筋肉の透明性が高く、組織の形態も維持されていた (図 4)。また、抗アクチン抗体を用いた蛍光免疫染色 (図 5a)、および pEGFP を導入した EPC 細胞の観察 (図 5b) では、タンパク質の保存性も高いことが明らかとなった。なお、GFP 導入トランスジェニックニジマスにおいては、自家蛍光との差が明瞭ではなかった。

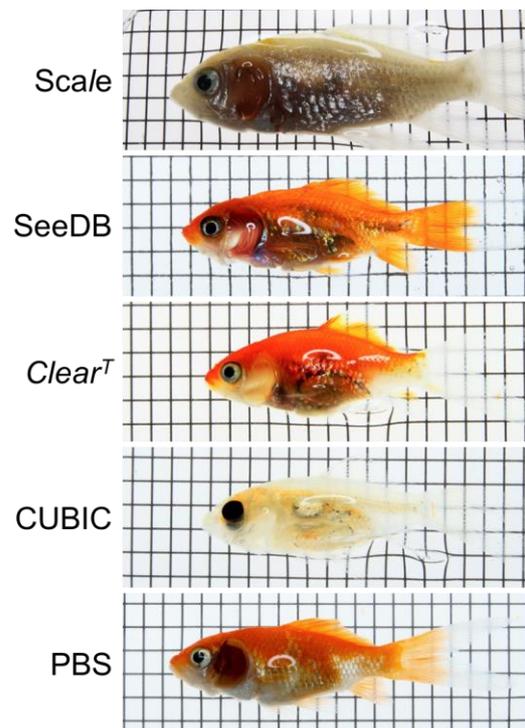


図 4 各種透明化試薬を用いて透明化したメダカの透明性の比較。PBS は陰性対照として用いた。

一方、CUBIC 処理をしたキンギョの DNA はある程度保存されていたものの (図 6a, b), RNA の保存性は極めて低く (図 6c), RT-PCR によ

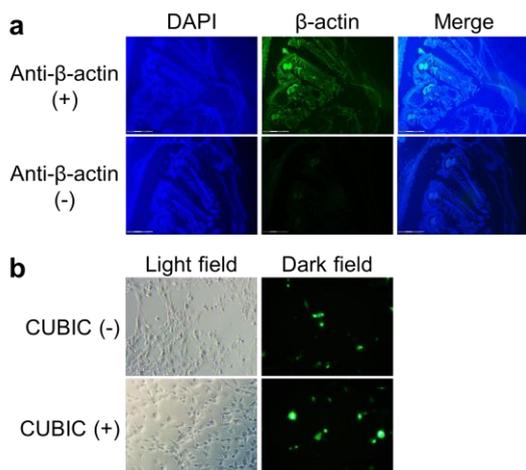


図 5 CUBIC 処理後のタンパク質の抗原性および安定性。(a) CUBIC 処理をしたキンギョの鰓における β アクチンタンパク質の局在; (b) CUBIC 処理をした GFP 導入 EPC 細胞の蛍光顕微鏡像。

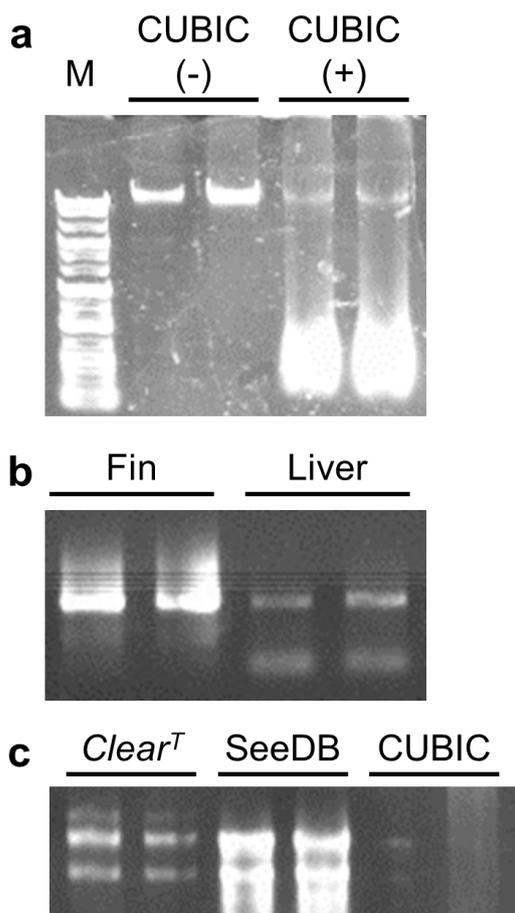


図 6 CUBIC 処理後の DNA の安定性。(a) CUBIC 処理したキンギョの鰭から抽出したゲノム DNA の電気泳動像; (b) CUBIC 処理したキンギョの鰭および肝臓のゲノム DNA から PCR により増幅した β アクチン遺伝子; (c) CUBIC 処理したキンギョの内臓から抽出した total RNA。

る定量は困難であった。CUBIC に含まれるアミノアルコールの高い pH により RNA が加水分解されている可能性が示唆された。

DAPI, アクリジンオレンジ, PKH26 などで蛍光標識した *A. hydrophila* を CUBIC 処理した後、蛍光顕微鏡で観察したところ、いずれも CUBIC 処理による褪色は見られなかった (図 7a)。また、DAPI で標識した *A. hydrophila* を用いた時に最も自家蛍光が少なく、検出感度も高かった。そこで、DAPI 標識した *A. hydrophila* をキンギョに感染させ、CUBIC 処理後に蛍光顕微鏡下で観察したところ、腸管の他、肝臓、脾臓、胆嚢と思われる臓器において *A. hydrophila* の局在が観察された (図 7b)。

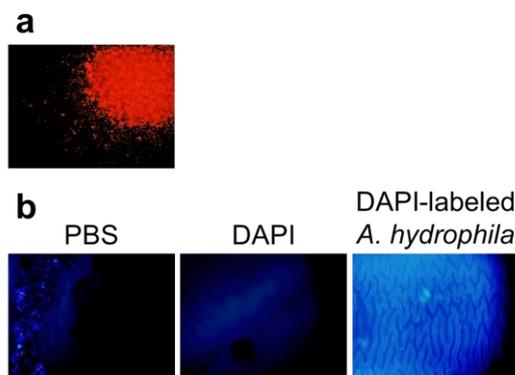


図 7 蛍光標識 *A. hydrophila* を用いた感染実験。(a) CUBIC 処理をしたアクリジンオレンジ標識 *A. hydrophila*; (b) DAPI 標識 *A. hydrophila* を感染させたキンギョの腸管における菌の局在。

(4) 以上の結果から、Scale を改良した CUBIC を用いることで、蛍光標識した病原体を 3 次元で可視化することが可能となった。一方、RNA の保存性については、SeeDB や Clear^T の方が優れていた。このように、透明化試薬によって特徴が異なるため、目的に応じて試薬を使い分けることで、病理組織学および分子生物学的手法による詳細な解析も可能であることが明らかとなった。これらの成果により、魚病診断におけるキャリアーの問題や魚類の感染機構解明へと展開できることが期待される。

<引用文献>

- ①Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. Nat Neurosci. 2011;14(11):1481-1488
- ②Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. Nat Neurosci.

2013;16(8):1154-1161

- ③Kuwajima T, Sitko AA, Bhansali P, Jurgens C, Guido W, Mason C. *Clear^T*: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development*. 2013;140(6):1364-1368

- ④Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*. 2014;157(3):726-739

- ⑤Tainaka K, Kubota SI, Suyama TQ, Susaki EA, Perrin D, Ukai-Tadenuma M, Ukai H, Ueda HR. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell*. 2014;159(4):911-924

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

延東 真 (ENDO, Makoto)
東京海洋大学・学術研究院・教授
研究者番号：80128355

(2) 研究分担者

舞田 正志 (MAITA, Masashi)
東京海洋大学・学術研究院・教授
研究者番号：60238839

片桐 孝之 (KATAGIRI, Takayuki)
東京海洋大学・学術研究院・助教
研究者番号：50361811

二見 邦彦 (FUTAMI, Kunihiko)
東京海洋大学・学術研究院・助教
研究者番号：00513459