

動物組織の透明化

－ブタ腎臓の糸球体観察－

北海道立教育研究所附属理科教育センター 村上 俊樹

〔キーワード〕 ブタ腎臓 透明化 糸球体観察

1 はじめに

当センターでは、高等学校理科研修講座において、ブタの腎臓の解剖と糸球体の観察を行っており、糸球体の観察は、ブタの腎臓に腎動脈から墨汁を注入した後、皮質部分の切片をつくり、これを顕微鏡で観察する方法を紹介している。しかし、この方法では、二次元の情報しか得ることができないため、三次元で組織のようすをとらえることは難しい。

近年、動物組織を透明化する技術が発展してきており、学校の実験室でも簡単に動物組織を透明化することができるようになってきた。動物組織を可視化して光を通すようにすることで、切片をつくらなくても簡単に三次元で組織のようすを顕微鏡で観察することができる。本研究では、独自に調製した透明化試薬を用いて、ブタの腎臓の組織を透明化し、三次元で糸球体のようすを観察する方法について紹介する。

2 ブタの腎臓に墨汁を注入する

バットに腎臓を載せ、必要に応じて肉を取り外しながら、腎動脈、腎静脈、輸尿管を確認する(図1)。

次に、水で10倍に希釈した墨汁を注射器に10mL取り、注射器の注射針を腎動脈に差し込み、もれないように

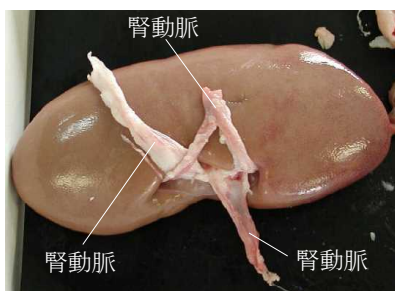


図1 腎動脈の確認

目玉クリップで押さえてから、ゆっくりと墨汁を注入する。この操作により、腎臓の表面の一部が黒く変色するようすが観察できる(図2)。



図2 墨汁を注入するようす

墨汁を注入した後、包丁などを使って腎臓を縦に切り、縦断面を観察する。しみ出てきた墨汁を生理食塩水で洗い流すと、色調の違いから皮質部分と髄質部分、腎うを観察することができる。皮質部分には、黒いシミのように見え



る毛細血管のかたまりを多数見ることができる(図3)。これが、糸球体である。

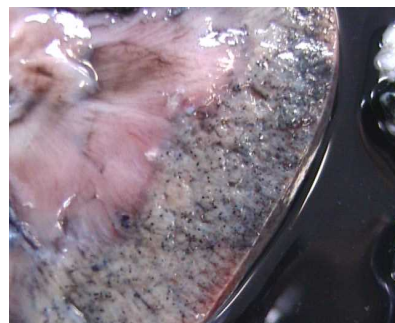


図3 皮質のようす

3 透明化試薬の調製

透明化に使用する試薬は、東京化成工業の動物用透明化試薬であるAnimal Tissue-Clearing Reagents "CUBIC"を使用することが望ましいが、本研究では、"CUBIC"を独自に調製した溶液(以下、調製CUBIC:図4)を使用した。

- ・ 25wt% Urea
Nacalai Tesque, 35904-45, Japan
- ・ 25wt% Ethylenediamine
Tokyo Chemical Industry CO., LTD.,
T0781, Japan
- ・ 15wt% Triton X-100
Nacalai Tesque, 25987-85, Japan

図4 調製CUBIC

4 組織の透明化処理

墨汁を注入した腎臓から、多数の黒いシミが見られる皮質部分の組織を5 mm 四方切り出し、調製CUBICを入れたサンプリングチューブに入れ、ウォーターバスを使って、次の①、②の手順で透明化処理を行った（図5）。

- ① 組織を調製CUBICに浸し、37℃で24時間ゆっくりと攪拌した。
- ② 新たに用意した調製CUBICに交換し、37℃で48時間インキュベートした。



図5 ウォーターバスでの攪拌

組織の外側から透明化が進んでくると、調製CUBICが黄色く変色してくる。これは、組織内の光を遮光する原因となっているヘモグロビンが溶解したためである。調製CUBICが透明の状態になるまで、適宜、新しいものに交換してインキュベートを続けた。48時間のインキュベート後、ほぼ組織が透明化したところで、顕微鏡で観察した。図6は、そのときのような様子である。

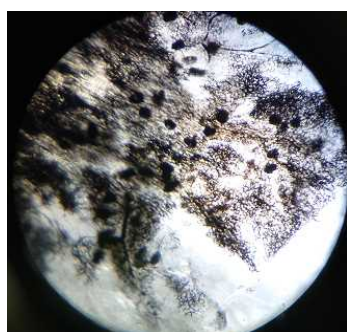


図6 透明化した組織（20x）

毛細血管の中に注入された墨汁は、調製CUBICに溶解しないため、そのようすをはっきりと観察することができた。

5 糸球体の観察

透明化した組織を、おおよそ1 mmの厚さに切り出し、顕微鏡を使って高倍率で観察すると、はっきりと糸球体を観察することができた（図7、8）。



図7 糸球体のようす（60x）

6 おわりに

これまで当センターで行ってきた糸球体の観察方法は、図9のような道具を作成し、組織の切片をつくるという細かい作業が必要であった。切片をつくったとしても、糸球体のある部分を切り出すことが難しかったり、切り出した組織の透過性が低かったりするため、糸球体のようすを鮮明に観察することが難しかった（図10）。

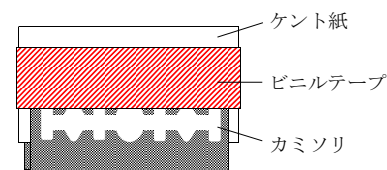


図9 切片をつくる道具



図10 従来の方法で観察

組織の透明化により、糸球体のようすを三次元で観察することができるようになった。しかし、透明化するために特殊な薬品を必要としたり、時間を要したりするなどの課題もある。今後は、必要な薬品の検討や、時間を短縮する方法について検討していきたい。

参考文献

- 1) 平成30年度 高等学校理科研修講座（物理基礎・化学基礎・生物基礎・地学基礎）テキスト 北海道立教育研究所
- 2) 未来の生命化学のフロンティアに たつ教員養成～先端実習を通じて～講義・実習マニュアル 国立大学法人旭川医科大学SLC事務局 2015（むらかみ としき 生物研究班）

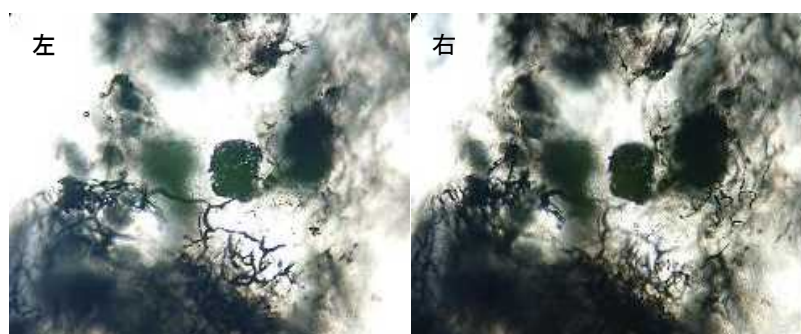


図8 糸球体のステレオペア画像（150x）