

組織透明化試薬を用いた生体試料の深部イメージング技術

今井 猛

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 感覚神経回路形成研究チーム

(〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町2-2-3)

Deep-tissue imaging using optical clearing agents

Takeshi Imai

RIKEN Center for Developmental Biology, Laboratory for Sensory Circuit Formation,

2-2-3, Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, 650-0047

E-mail: imai@cdb.riken.jp

要旨

生体試料の3次元情報を得る上で、レーザー走査型蛍光顕微鏡は有用であるが、一方で深部観察をする上では、試料中で生じる光散乱が大きな制約となっている。近年、複数のグループによって、生体試料中の散乱体を取り除くか溶媒の屈折率調整を行うことで光散乱を押さえる技術が開発されている。これらの方法によって、脳の神経回路をはじめとする生体試料の3次元像を大規模に取得できるようになりつつある。本稿では、最近開発された組織透明化法について紹介するとともに、透明化試料の顕微鏡観察にあたって考慮すべき点についても議論したい。

近年、光学顕微鏡技術の発達とGFPを始めとする蛍光タンパク質の開発が相まって、生命科学の分野では3次元蛍光イメージングが盛んになってきている。蛍光断層像の取得が可能な共焦点顕微鏡を用いると、蛍光タンパク質で標識された生体試料を数10マイクロメートルの深さまで3次元的に画像取得できる。2光子励起顕微鏡を用いると数100マイクロメートルの深さまで可視化することができる。こうした3次元蛍光イメージング技術は生体試料内部の構造を明らかにする上で非常に有効だが、生体組織の全体像を明らかにするにはまだ十分ではない。例えば、脳の神経細胞はしばしば数mmに亘って複雑な突起を伸ばすが、上記の方法ではその全体像を描くことは困難である。

生体試料の深部イメージングを行う上で最大の障害は光散乱である。生体組織はコラーゲンなどからなるタンパク質性の繊維の他に、脂質に富んだ脂肪組織、髄鞘、細胞膜、細胞内小器官といったさまざまな小構造物を含んでおり、これらが光散乱の原因、すなわち散乱体となる。微細な多数の散乱体によって生じる光散乱については、補償光学系で解決することは困難である。光散乱の程度は、散乱体の大きさによっていくつかの近似が知られており、例えば、散乱体の大きさが光の波長よりも小さい場合にはレイリー散乱が適用される。レイリー散乱は光の波長が長いほど小さくなるため、長波長の励起光を用いる多光子励起顕微鏡は光散乱の影響を受けにくい。もう1点重要なことは、光散乱の程度は散乱体の比屈折率、すなわち、散乱体と溶媒の屈折率の比に強く依存するということである。従って、散乱体と溶媒の屈折率が近づけば近づくほど、光散乱は減ることになる。

生体試料をより深くまで可視化するために透明化しようという試みは100年以上も前からなされているが、これはいかにして散乱を減らすかということにつける。これまでに知られている方法は、散乱体の屈折率を溶媒に近づけるか、溶媒の屈折率を散乱体に合わせるか、もしくはその組み合わせである。たとえば、透明骨格標本の作製は、アルデヒド架橋固定した標本をアルカリ処理やプロテアーゼ処理してペプチド結合を切断した後、グリセリン置換を行う¹⁾。また、透明度が非常に高いことで知られるBABB法は、エタノール処理によって脱水処理し、組織中の脂質成分を取り除いた後、屈折率の高い有機溶媒で置換を行う²⁾。しかしながら、こう

した方法ではGFPなどの蛍光タンパク質までも変性・消光してしまうという問題点があった。蛍光タンパク質を用いる現代生命科学の要請に適った組織透明化法を目指し、この数年間で水溶液ベースの新しい組織透明化試薬が開発されている。そこで本稿ではそれらについて紹介すると共に、蛍光顕微鏡を用いてイメージングを行う上で考慮すべき点についても言及したい。

1. Scale法, CUBIC法

GFPなどの蛍光タンパク質の蛍光を保持したまま組織を透明化する方法として、2011年に理化学研究所の宮脇らはScale法と呼ぶ組織透明化法を発表した³⁾。Scale液はタンパク質変性作用のある尿素、界面活性剤およびグリセリンを含む水溶液であり、タンパク質や脂質などの散乱体の屈折率を下げることで組織を透明にすることができる。蛍光タンパク質は一般に強固な立体構造を取っており、尿素溶液中でも安定に保持されるため、蛍光タンパク質の蛍光は損なわれない。Scaleの問題点として、透明化に時間がかかる、透明度が不十分であるという点が指摘されていたが、これらの点は、2014年に理化学研究所の上田らによって報告されたCUBIC法によって改善された⁴⁾。CUBIC法では、Scale法で用いていたグリセリンに代えてアミノアルコールを用い、短時間で効率よく透明化することができる。また最終的にスクロースを用いて溶媒の屈折率も上げることで、更に透明度を上げることに成功している。これらの方法は比較的簡便に組織を透明化できる利点がある一方、透明化の過程で組織の膨張や変形を伴う。このため、組織がもろくなる、微細な構造が損なわれる、といった問題があり、微細構造の解析には向かない。比較的マクロな構造の3次元解析に威力を発揮するものと期待される。

2. CLARITY法

組織の構造を強固に保ったまま散乱体を取り除いて組織を透明化する試みとして、スタンフォード大学のダイセロスらは2013年4月にCLARITY法を発表した⁵⁾。Scale法やCUBIC法では組織がもろくなるという問題点があるが、CLARITY法では組織中のタンパク質をポリアクリルアミドゲルに架橋することでこの問題を克服した。ゲルに架橋した試料を界面活性剤を含む緩衝液に浸けて電流を流すことで脂質を取り除き、その後溶媒の屈折率を調整することで透明化する。CLARITY法ではタンパク質成分がゲルに架橋されているため、抗体などを用いて繰り返し組織

染色できるという点も利点である。この論文は大きなセンセーションをもって迎えられ、サイエンス誌が2013年の10大ブレイクスルーに選んだほどであったが、各ステップが非常に煩雑であるために再現性が低く、当初期待されたほどは普及していない。

3. SeeDB法

組織透明化の応用が最も期待されているのは神経科学分野である。神経細胞はしばしば複雑で長い神経突起を伸ばすことで神経回路を構成している。近年、神経回路の全貌を3次的に可視化することで脳を理解しようという機運が高まっており、光学顕微鏡と組織透明化を組み合わせたアプローチがその一助になるものと期待されている。神経回路の定量的な解析を行う上で重要なことは、組織の形態が保持されていること、蛍光タンパク質などの神経線維マーカーの蛍光が十分に保持されていることである。そこで筆者らは組織にダメージを与えることなく組織を透明化する試薬の検討を行った。組織のダメージを防ぐ上では、変性剤や界面活性剤は使わず、極力溶媒の屈折率調整のみで解決すべきであると考え、様々な高屈折率水溶液について検討を行った。屈折率が高い水溶液としては飽和ヨウ化亜鉛水溶液（屈折率1.62）が知られているが、塩濃度が高い水溶液はタンパク質の塩析を引き起こすため、適さなかった。一方、糖類も水への溶解度が高く、その水溶液は高屈折率になることが知られている。我々はその中でもフルクトース溶液が透明化に最適であることを見出した。飽和フルクトース水溶液は常温での質量%濃度が80%、屈折率が1.49に達する。フルクトースは還元糖であるため、生体試料中のアミノ基とメイラード反応を生じ、自家蛍光をもつ褐色物質を生じるという問題があるが、我々は微量のチオールを添加によりこの反応を抑えられることを見出した。著者らは、高濃度フルクトース（屈折率1.49-1.50）とチオールを組み合わせた組織透明化法をSeeDB法と名付け、2013年6月に発表した⁶⁾。SeeDB法は他の方法に比べて短時間で透明化できるうえ、他の方法で見られるような生体試料の大きさの変化や微細形態へのダメージが見られないという特長を持つ。蛍光タンパク質の蛍光も、これまでの透明化法よりも良く保持されていることが判明した。また、細胞膜を含む脂質も試料中に保持されているため、脂溶性蛍光色素を用いた神経線維の染色・同定に適している。筆者らは、マウス脳標本をSeeDB処理することで、共焦点レー

ザー顕微鏡で2mm程度、2光子励起顕微鏡を用いるとそれ以上の深さまで可視化できることを見出した。

4. 透明化試料の顕微鏡観察

しかしながら、SeeDBのような高屈折率透明化試薬を用いて脳標本の深部イメージングを行うには、標本の透明度を上げるだけでは不十分である。まず、通常の対物レンズの作動距離は限られており、厚みのある標本を観察するには十分な作動距離を確保する必要がある。また、生体試料観察用の対物レンズは水浸レンズであることが多く、高屈折率液体中の試料をイメージしようとするすると球面収差を生じ、十分な明るさと分解能を得ることができない。そこで筆者らは顕微鏡メーカーに作製を依頼して、SeeDBの屈折率（1.49）に合わせた超長作動距離（8mm）対物レンズを用いることにした。また、SeeDB処理した標本を観察する際には、2,2'-thiodiethanolと水の混合液からなる高屈折率の液体をイメージングに用いると良いことを見出した。そして、2光子励起顕微鏡を用いて最適な条件下で観察することで、厚さ約6mmの成体マウス脳の透明化試料を上から下まで可視化することに成功した⁶⁾。

透明化試料の顕微鏡観察をするにあたって明らかになったもう1つの問題は、いかにして広範囲の画像を取得するかという点である。透明化技術によって深くまで画像取得できるようになったため、従来のポイントスキャン型の共焦点レーザー顕微鏡や二光子励起顕微鏡を用いると、たとえマウスといえども全脳の画像を取得するには膨大な時間がかかる。また、大規模な画像を取得する場合には電動ステージを用いてスキャンし、最後に大量の2次元画像を貼り合わせることになるが、その際の精度も問題となる。こうしたことから、透明化試料を短時間で大規模に画像取得できる光シート顕微鏡が注目されている。光シート顕微鏡は励起光を薄いシート状に照射し、2次元の蛍光像を取得するため、格段に早く3次元画像の取得ができる。実際に、BABB法やCUBIC法の透明化標本に関しては、光シート顕微鏡の1種であるUltramicroscopeを用いてマウス全脳の画像取得に成功している^{2,4)}。但し、光シート顕微鏡では蛍光像をCCDないしCMOSカメラを用いて画像取得するため、蛍光シグナルが試料中で散乱することは避けられず、従って試料の透明度が十分に高くないと光散乱の影響を大きく受けることになる。観察領

域の広さと解像度のどちらを優先するかによって顕微鏡法を選択する必要がある。

5. 今後の展望

生体試料を透明化するうえで、脂質の除去が鍵となる場合があること、溶媒の屈折率が重要なファクターであることは認識されてきているが、それ以外の観点でどのような試薬が適しているのかに関しては統一的な理解はなされていない。筆者は、水溶液を用いて透明化する場合には、タンパク質成分が十分に水和して凝集を起こさないことや、試薬が組織中に浸透しやすいことなども重要なファクターであると考えている。透明化液の最適な屈折率については、成体マウス脳標本においてはおよそ1.49程度のものである^{4,6)}。この値は、生体試料における主要な散乱体である脂質の屈折率に極めて近い。

今後は、更に透明度を上げることで光シート顕微鏡を活用し、より大きな標本の画像取得を可能にするという方向性の他、蛍光タンパク質で標識されていない標本に対して、抗体などを用いて蛍光標識して透明化するためのより簡便な方法が望まれている。生きた動物の透明化も今後の目標の1つではあるが、生きた動物組織の屈折率を調整するためにはある程度侵襲的にならざるを得ず、適用可能な動物や部位は限られるであろう。透明化技術は3次元蛍光像を広範囲に亘って定量的に解析するという現代生命科学の要請に応えるものであり、益々の改良・応用が期待される。

本研究は科学研究費補助金若手研究（A）、JSTさきがけ、三菱財団、住友財団、中島記念国際交流財団、理化学研究所の助成を受けた。共同研究者の柯孟岑博士、藤本聡志博士（理化学研究所）に感謝いたします。

文 献

- 1) Taylor, W.R.: “An enzyme method of clearing and staining small vertebrates.” Proc. USA Natl. Museum **122** (1967) 1–17.
- 2) Dodt, H.U. et al.: “Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the

whole mouse brain.” *Nat. Methods* **4** (2007) 331–336.

- 3) Hama, H. et al.: “Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain.” *Nat. Neurosci.* **14** (2011) 1481–1488.
- 4) Susaki, E.A. et al.: “Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis.” *Cell* **157** (2014) 726–739.
- 5) Chung, K. et al.: “Structural and molecular interrogation of intact biological systems.” *Nature* **497** (2013) 332–337.
- 6) Ke, M.T. et al.: “SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction.” *Nat. Neurosci.* **16** (2013) 1154–1161.

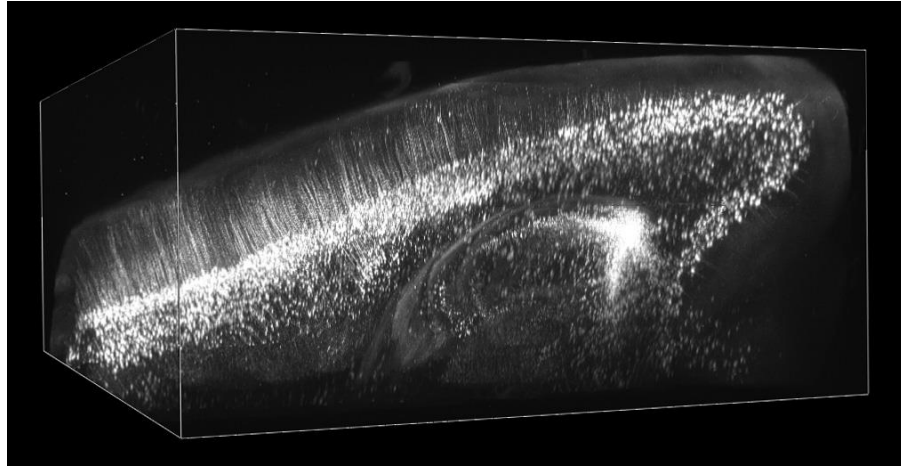


図1 マウスの大脳皮質と海馬を含む脳領域の可視化(4mm×5mm×2mm)。一部の神経細胞を蛍光タンパク質YFPで標識したトランスジェニックマウスの固定脳標本をSeeDBで透明化処理し、2光子励起顕微鏡で観察した。図は画像貼り合わせを行った後、3次元再構成したもの。

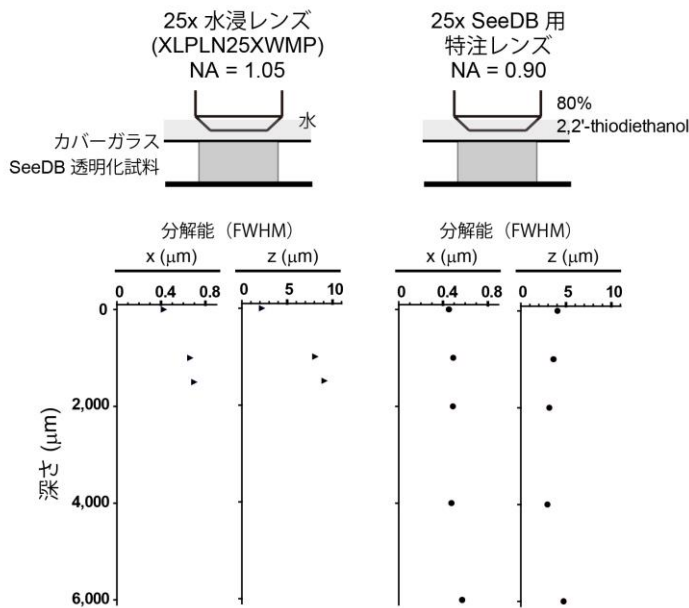


図2 高屈折率に対応した特注対物レンズ(オリンパス社)における分解能の向上。アガロースに蛍光ビーズ(直径 $0.5\mu\text{m}$)を埋め込んだ後、SeeDBで透明化し、2光子励起顕微鏡を用いて分解能(full width at half maximum)を測定した⁶⁾。SeeDB試料中の分解能は高屈折率対応特注レンズの方が優れている。透明化試料の観察にあたっては球面収差も重要なファクターであることが分かる。