

## 組織透明化試薬 SeeDB を用いた脳の 3D 蛍光イメージング

柯 孟岑、今井 猛

3D fluorescence imaging of the brain using an optical clearing agent, SeeDB

Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai : Laboratory for Sensory Circuit Formation, RIKEN Center for Developmental Biology (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) E-mail : imai@cdb.riken.jp

### はじめに

近年、GFP をはじめとする蛍光タンパク質の普及に伴い、組織中の細胞や微細な形状を 3 次元的に蛍光標識することが可能になった。また、3 次元蛍光像の取得を可能にする技術として、共焦点顕微鏡や 2 光子励起顕微鏡が普及してきている。しかしながら、生体組織中では光散乱が生じる為、共焦点顕微鏡で数 10  $\mu\text{m}$ 、2 光子励起顕微鏡を用いても数 100  $\mu\text{m}$  の深さまでしか高解像度の画像を得ることができない。このため、例えば数 mm にわたって突起を伸ばす神経細胞の形状の全貌を知るのは、従来非常に困難であった。

近年、光散乱を減らして深部の蛍光画像を取得するための方法として、固定組織を「透明化」する方法がいくつか開発されている。生体中では、生体成分（タンパク質や脂質など）が溶媒（水）に比べて高い屈折率をもつことから光散乱が生じる。そこで、組織を透明化するには、溶媒の屈折率を上げるか、組織から高屈折率成分を除去する必要がある。従来、BABB（ベンジルアルコールと安息香酸ベンジルの 1:2 混合物）やジベンジルエーテル（3DISCO 法）など、高屈折率有機溶媒を用いた透明化法がよく用いられてきたが、これらは蛍光タンパク質を消光させるという問題点があり、用途が限られていた<sup>1,2</sup>。最近、蛍光タンパク質の蛍光を保持した組織透明化法として、尿素を用いた *Scale* 法や、組織をポリアクリルアミドゲルに固定したのち界面活性剤による脂質除去を行う CLARITY 法が報告されている<sup>3,4</sup>。しかしながら、これらの方法は透明化の過程で微細な形態が損なわれるおそれがあること、処理に時間がかかることなどが問題点として挙げられる。

そこでわれわれは、水溶性で生体組織の形態や組成、蛍光タンパク質の蛍光を損なうことなく短時間で簡便に組織を透明化する方法 SeeDB (See Deep Brain) を開発した<sup>5</sup>。SeeDB 液は水とフルクトース、還元剤からなる簡単な組成であり、わずか 3 日ほどの処理で組織を透明化することができる。これまでの方法では組織が透明化処理の過程で膨潤・収縮するという問題があったが、SeeDB 法では組織の大きさや細胞の微細な形状が一定に保たれている。変性剤や界面活性剤を用いないため、蛍光タンパク質はもちろん、DiI などの脂溶性の色素も蛍光が保持されている。抗体染色をしたい場合には抗体の浸透性に優れた CLARITY 法が有利だが、蛍光タンパク質や蛍光神経トレーサーのイメージングが主な

目的であれば、SeeDB 法は最も簡便で効率的な方法であると言えよう（表 1）。特に、蛍光タンパク質で標識された脊椎動物脳の小～中規模回路を共焦点顕微鏡や 2 光子励起顕微鏡を使ってイメージングし、微細な接続様式を明らかにするのに適した方法である。

## 原理

SeeDB 法は、BABB 法等と同じく、溶媒の屈折率を上げ、生体成分の屈折率に近づけることで組織を透明化する。フルクトースは水に対する溶解度が高いため、25°Cにおける飽和溶液（80.2% w/w）で屈折率が 1.49 と、グリセロールなどよりも高く、固定した生体組織の屈折率にきわめて近い。また、フルクトースの濃度を徐々に上げていけば組織の膨張・収縮も起こらないため、組織の変形を最小限に抑えることができる。フルクトースは還元糖であるため、組織を長時間処理するとメイラード反応が進んで好ましくない自家蛍光産物を生じるという問題があるが、これは $\alpha$ -チオグリセロールなどの還元剤の添加によって防ぐことができる。

高濃度のフルクトース溶液は粘度が高いため、サンプルが大きくなればなるほど試薬の浸透性が下がり、透明化の効率が下がる。通常、2 光子励起顕微鏡を用いて透明化サンプルの蛍光イメージングをする場合には、対物レンズの作動距離が深さの制約となる（2 光子励起顕微鏡に使われる対物レンズの作動距離は通常 2mm 程度）。従って、対物レンズの作動距離を考慮してサンプルを適当な厚さにトリミングした方が透明化の効率は良い。脆弱なサンプルはアガロースに包埋して透明化することができるが、この場合もフルクトースの浸透性を損なわないように、アガロース部分を程度にトリミングすると良い。

## 準備

### [1] 実験材料

蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変動物（マウス、ゼブラフィッシュなど）。<sup>※1</sup> DiI などの脂溶性神経トレーサーや Alexa 標識デキストラントレーサーで蛍光標識した組織のほか、ホールマウント抗体染色によって染色したサンプルも SeeDB で透明化できる。<sup>※2</sup>

### [2] 使用機器

- チューブローテーター（タイテック社など）（50ml コニカルチューブ用）
- シーソーシェーカー（オプション）
- エアインキュベーター（オプション）

### [3] 実験器具

- リングピンセット

---

<sup>※1</sup> *in utero* electroporation を用いて蛍光タンパク質を発現させる場合、DNA の可視化によく用いられる FastGreen は自家蛍光の原因となるので使わない方がよい。どうしても DNA 溶液を標識したい場合は 0.05% AlexaFluor 647-dextran で代用できる。

<sup>※2</sup> 但し、通常のホールマウント抗体染色では抗体は 100-250 $\mu$ m までしか浸透しない。

- 穴あきスプーン (Fine Science Tools 社など) (オプション)
- 50ml コニカルチューブ
- プラスチックペトリディッシュ (100mm 径)
- カバーガラス (松浪硝子工業株式会社 40×60 mm C050701 など)
- シリコンゴムシート (十川ゴム社 K-125 など) ※3

#### [試薬]

- リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)
- 4%パラホルムアルデヒド/PBS [ビーカーに PBS と paraformaldehyde を 4%(w/v)加え、ドラフト中で加熱しながら攪拌して溶解。要時調製。] ※4
- 20、40、60、80%フルクトース (w/v) [50 ml コニカルチューブに D(-)フルクトース (≥99%) をそれぞれ 4 g、8 g、12 g、16 g と α-チオグリセロール (≥95%) 100 μl を加え、更に水を加えて 20 ml にする。SeeDBp プロトコルにおいては水の代わりに 0.1×PBS を用いる。] ※5※6
- 100%フルクトース (w/v) [50ml コニカルチューブに D(-)フルクトース 20 g、α-チオグリセロール 100 μl を加え、更に水を加えて 20 ml にする。]
- SeeDB (80.2% w/w フルクトース) [50 ml コニカルチューブに D(-)フルクトース (≥99%) 20.25 g と水 5 ml を加え、65°Cに温めて完全に溶解する。溶液を室温に戻した後、α-チオグリセロール 100 μl を加える。]
- SeeDB37 (84.4% w/w フルクトース) [50 ml コニカルチューブに D(-)フルクトース (≥99%) 27 g と水 5 ml を加え、65°Cに温めて完全に溶解する。溶液を室温に戻した後、α-チオグリセロール 100 μl を加える。] (オプション)
- 1%アガロース [アガロースを PBS に加え、電子レンジで加熱して十分溶かす。使用する前に 40°Cまで冷ます。]

## プロトコル

### [1] SeeDB 標準プロトコル

脊椎動物の様々な組織に対して使うことができるが、ここではマウス脳を例に紹介する。

① マウスをペントバルビタールで麻酔した後、4%パラホルムアルデヒド/PBS で還流固定を行う。その後、脳を取り出して 4%パラホルムアルデヒド/PBS で 4°Cで一晩固定する。3週齢までであれば全脳でも透明化可能だが、成体マウスの場合は脳を半分に切るか 1-2 mm 厚のスライスを作製することが望ましい。

② サンプルを PBS で 3 回洗浄する。

---

※3 1 mm 刻みでさまざまな厚さのものが売っているので、サンプルに合わせて適切な厚さのものをを用いる。

※4 劇薬につき、取り扱いおよび廃液処理に注意。

※5 要時調製

※6 このコニカルチューブをそのまま透明化処理に用いる。

- ③ (オプション) 脆弱なサンプルの場合には 1%アガロースに包埋する。サンプルが厚くなりすぎないように、アガロースの余分な部分はトリミングする。特に、イメージングしたい部分が表面近くになるようにする。
- ④ サンプルを 20 ml の 20%フルクトースが入った 50 ml コニカルチューブに入れる。チューブは室温下、ローテーターで 4-8 時間転倒回転する (約 4 rpm)。脆弱なサンプルやスライスの場合にはシーソーシェーカーを用いても良い (約 17 rpm)。\*7 サンプルは傷つけないよう、リングピンセットまたは穴あきスプーンで拾うと良い。
- ⑤ サンプルを 40%フルクトースのチューブに移し、室温で 4-8 時間転倒回転する。
- ⑥ サンプルを 60%フルクトースのチューブに移し、室温で 4-8 時間転倒回転する。
- ⑦ サンプルを 80%フルクトースのチューブに移し、室温で 12 時間転倒回転する。\*8
- ⑧ サンプルを 100%フルクトースに移し、室温で 12 時間転倒回転する。
- ⑩ サンプルを SeeDB に移し、室温で 24 時間転倒回転する。最大 48 時間まで延ばしても良い。うまく透明化できている場合、光にかざすと組織が透明になっているのが分かるはずである。琥珀のように透けていて、中心部分に曇った部分がなければうまくいっている。
- ⑪ (オプション) 成体マウス脳の場合は更に SeeDB37 に移して 37°C で 24-48 時間転倒回転することで更に透明度を上げることができる。
- ⑫ 透明化したサンプルはできるだけ早く (数日以内) イメージングすることが望ましい。

## [2] SeeDBp

胎児や新生仔マウスの脳などでは、SeeDB 標準プロトコルを用いると組織が若干膨潤する場合がある。その場合は、20-80%フルクトースを調製する際、水の代わりに 0.1×PBS を用いる。手順は SeeDB 標準プロトコルと同様。

## [3] イメージングチャンバー

SeeDB で透明化したサンプルは、SeeDB (もしくは SeeDB37) に浸けた状態でマウントする。サンプルに厚みがあるため、われわれは市販のシリコンゴムシートをスぺーサーに用いて専用のイメージングチャンバーを自作している (図 1)。通常の水浸対物レンズを用いる場合はカバーガラスでサンプルをシールして水をイマージョンに用いればよい。長作動距離対物レンズを用いる場合やイメージングが長時間に亘る場合は、イマージョン液を保持できるように自作の大きなガラスボトムディッシュでチャンバーをシールし、その上にイマージョン液を入れる。倒立顕微鏡を用いる場合はガラスボトムディッシュにサンプルを入れてやればよい。SeeDB37 で透明化したサンプルをイメージングする場合は、フルクトースが析出しないよう、サンプルをチャンバーごと 37°C に保温しながらイメージングする。

## [4] 深さの補正

ドライレンズ (屈折率 1.0) や水浸レンズ (屈折率 1.33) を用いて画像取得する場合、SeeDB

---

\*7 サンプルが小さい場合には 35 mm 培養ディッシュ中で振とうしても良い。

\*8 60%フルクトースまではサンプルは最終的に沈むが、80%以降ではサンプルは沈まない。

で透明化した試料は屈折率が 1.49 と高いため、深さの数値を補正する必要がある<sup>6</sup>。

## 実験例

Thy1-YFP (H ライン) マウスの脳を SeeDB37 で透明化し、2 光子励起顕微鏡 (オリンパス社、FV1000MPE) と市販の水浸レンズ (オリンパス社、XLPLN25XWMP, 25x、NA = 1.05) を用いて作動距離 (2 mm) の深さまで画像取得した。また、MBF Bioscience 社のソフトウェア NeuroLucida を用いて 3D レンダリングを行った (図 2)。共焦点顕微鏡で水浸レンズを用いてイメージングした場合で深さ 1-2 mm 程度、2 光子励起顕微鏡で SeeDB 専用の長作動距離対物レンズ (オリンパス社より入手可能) を用いてイメージングした場合は 6 mm 程度の深さまで画像取得可能である<sup>5</sup> (動画<sup>7,8</sup>)。取得した画像を元に神経回路の再構成や定量解析を行う際には、われわれは NeuroLucida を使用している<sup>5</sup>。

## おわりに

SeeDB は特別な機器や試薬を必要とせず、短時間で容易に組織透明化が可能であるため、共焦点顕微鏡や 2 光子励起顕微鏡を使って誰でも手軽に深部イメージングを行うことができる。近年開発が進んでいる様々な蛍光タンパク質ツールと相まって有用な技術であると考えられる。紙面の都合で紹介できなかった様々な Tips については、著者らによるウェブサイト SeeDB Resources を参照されたい<sup>9</sup>。

## 文献

- 1 Dodt, H. U. *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* **4**, 331-336, doi:10.1038/nmeth1036 (2007).
- 2 Erturk, A. *et al.* Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* **7**, 1983-1995, doi:10.1038/nprot.2012.119 (2012).
- 3 Hama, H. *et al.* Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature neuroscience* **14**, 1481-1488, doi:10.1038/nn.2928 (2011).
- 4 Chung, K. *et al.* Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* **497**, 332-337, doi:10.1038/nature12107 (2013).
- 5 Ke, M. T., Fujimoto, S. & Imai, T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature Neuroscience* **16**, 1154-1161, doi:10.1038/nn.3447 (2013).
- 6 Bucher, D., Scholz, M., Stetter, M., Obermayer, K. & Pfluger, H. J. Correction

methods for three-dimensional reconstructions from confocal images: I. Tissue shrinking and axial scaling. *J Neurosci Methods* **100**, 135-143 (2000).

7 <http://youtu.be/pg2YOc5OcBI>.

8 [http://youtu.be/1tQ\\_ZiOFc60](http://youtu.be/1tQ_ZiOFc60).

9 <https://sites.google.com/site/seedbresources/>.

表 1 各種透明化法の比較

	BABB <sup>1</sup> , 3DISCO <sup>2</sup>	Scale <sup>3</sup>	CLARITY <sup>4</sup>	SeeDB <sup>5</sup>
手順・成分など	脱水、脂質の除去、高屈折率有機溶媒に浸漬	尿素、グリセロール、Triton-X100、水	ポリアクリルアミドゲル固定、SDS 電気泳動による脂質除去、屈折率調整	フルクトース、 $\alpha$ -チオグリセロール、水
透明化後の屈折率（水は 1.33）	1.54-1.56	1.38	1.45-1.46	1.49-1.50
透明度	非常に高い	高い	非常に高い	高い
処理時間	3 日	2-3 週間	1-2 週間	3 日
手間	簡単	簡単	煩雑	簡単
コスト	比較的安い	安い	高い	安い
サンプルのサイズ・形態変化	50%程度まで収縮	150%程度まで膨潤	一時的に膨潤	ほぼ一定
蛍光タンパク質	短時間で消光	安定	安定	安定
脂溶性色素	不可	不可	不可	可
ホールマウント 抗体染色	可	可	深部まで可	可

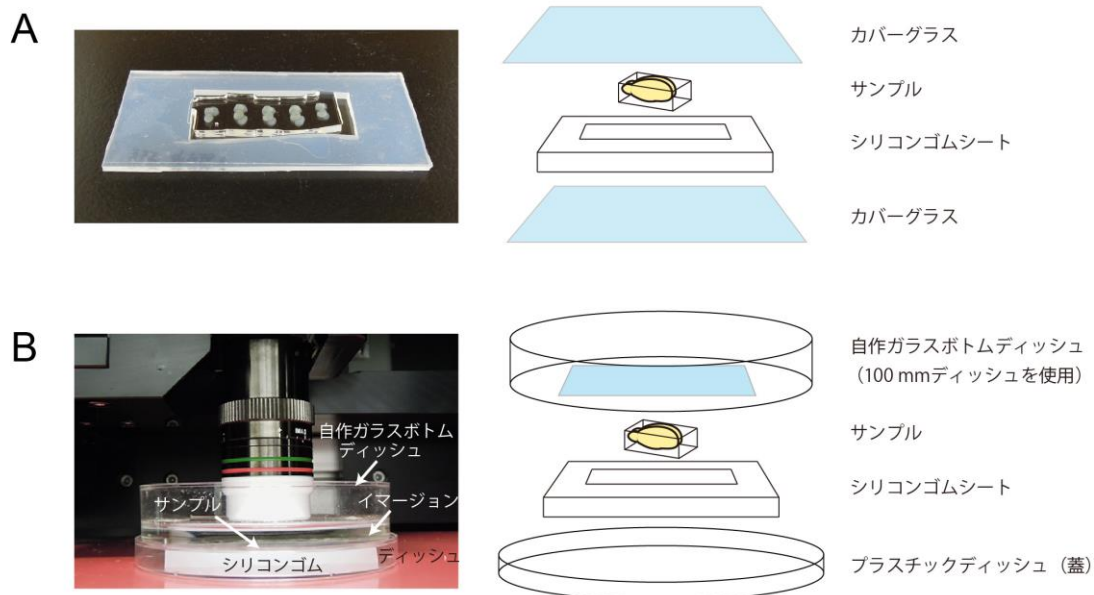


図1 イメージングチャンバー

A) シリコンゴムシートをくりぬいてその部分にサンプルを入れ、カバーガラスで封入する。シリコンゴムは接着剤を使わなくてもプラスチックディッシュやカバーガラスにぴったりと貼り付く。写真はアガロースに包埋した脳スライス。B) 長時間イメージングする場合や、長作動距離対物レンズを用いる場合は、サンプルをガラスボトムディッシュの底でシールし、十分量のイメージジョン液をのせる。

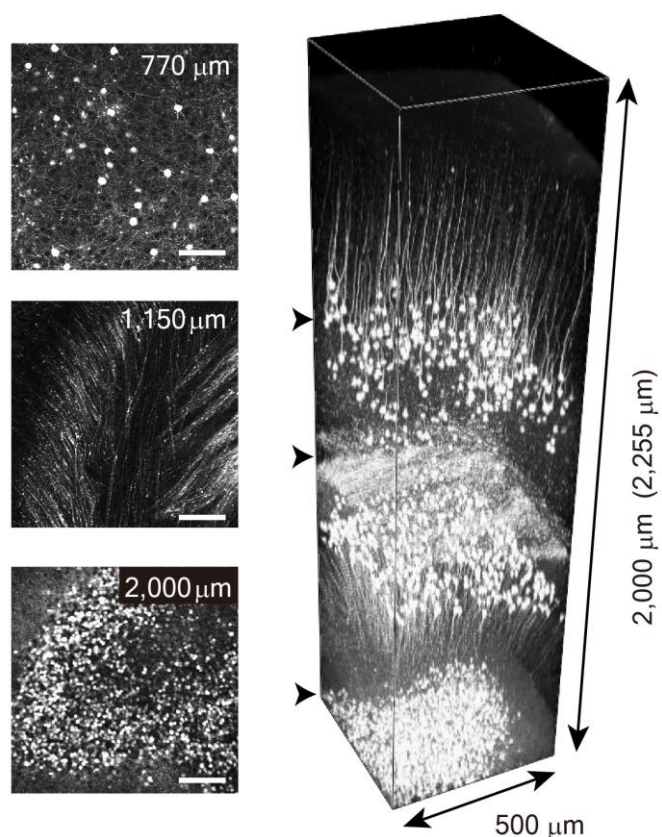


図2 2光子励起顕微鏡を用いて取得した Thy1-YFP-H マウス (10 週齢) の脳の蛍光像  
脳を正中線に沿って二分割したのち SeeDB37 で透明化し、2光子励起顕微鏡と市販の水浸  
対物レンズ (オリンパス社, XLPLN25XWMP, 25x, NA = 1.05) を用いて作動距離 (2 mm)  
の深さまで画像取得した (補正後の深さは 2.255 mm)。大脳皮質表面から海馬まで明瞭な  
蛍光像を得ることができる。より深くまで高解像度の画像を得るには、SeeDB 専用  
の長作動距離対物レンズが必要である。スケールバー = 100μm。

### 著者プロフィール

柯 孟岑 (カ モウシン) : 台湾国立中央大学大学院修士課程を修了後、2011 年より京都大学大学院生命科学研究科博士課程在籍中。理化学研究所ジュニアリサーチアソシエイト。

今井 猛 : 2006 年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了。同博士研究員などを経て、2010 年より現所属チームリーダー。JST さきがけ研究員、京都大学大学院生命科学研究科客員准教授を兼任。マウス嗅覚系をモデルに、感覚情報処理の神経回路基盤と回路形成の研究を行っている。