



ここ数回の AntiCancer Letter では、生体組織の深部情報が得にくいという蛍光イメージングの欠点を補う方法として近赤外 (NIR) プローブをいくつか(低酸素、低 pH などのマイクロ環境或いは血管・リンパ管のプロープなど)報告させて頂きました。

本 AntiCancer Letter17 では実験動物の個体・組織を透明化することで、透過光の散乱を少なくして従来の方法では観察出来ない情報を得る新しい方法を紹介致します。

理化学研究所脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チームは、生化学実験に使う Western Blotting 用の PVDF 膜などを尿素で処理すると水になじみやすくなることを利用して、組織の透明化に成功しました (1,2,3,4)。

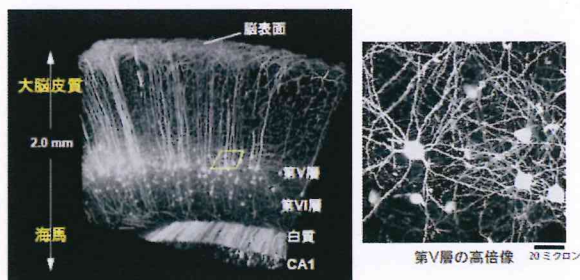
筆者らは尿素に様々な化合物を配合し、試行錯誤の結果、グリセロールと界面活性剤 (トライトン X-100) を配合した水溶性透明化試薬 **Scale** を完成しました。これにより、生体試料による光散乱を最小限に抑え、蛍光タンパク質の光学特性には変化が無いことを確認しています。

Scale A2 組成 : 4M 尿素、10(wt/vol)%グリセロール、0.1(wt/vol)%トライトン X-100

この試薬を用いて、マウス脳のさまざまな神経回路を選択的に蛍光タンパク質で標識して観察できます。標識した脳をホルマリンで固定し、蛍光を指標に 3 次元的に神経回路を可視化し再構築するという試みは世界的規模で行われており、神経細胞同士の連絡 (コネクション) を網羅的に調べることから「コネクトミクス (プロジェクト)」と呼ばれています。



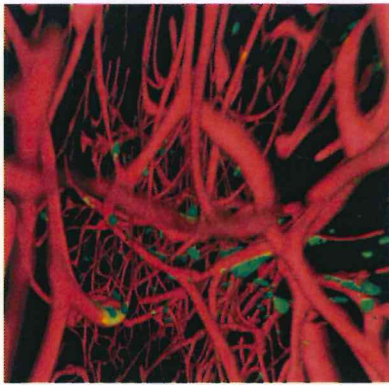
Scale を使って透明化したマウス胎児 (胎生 15 日) (文献 1 より引用)



二光子励起蛍光顕微鏡で観察したマウスの脳ある神経細胞集団を黄色蛍光タンパク質(YFP)の蛍光で標識した (文献 1 より引用)

ホルマリン固定後 **Scale A2** 試薬に 2 週間浸漬すると、胎児の全体が透明になり、肝臓の色素が確認できることから光の吸収は残存していることが判ります(1 ページ左の写真)。

又、神経細胞集団を YFP の蛍光で標識したトランスジェニックマウスをホルマリン固定し、その全脳を二光子励起蛍光顕微鏡(励起波長 920nm)で作動距離 2 ミリメートルの対物レンズで観察した写真を 1 ページ右に示します。写真は示しませんが、一光子励起蛍光顕微鏡(励起波長 514.5nm)でもほぼ同様に高精細に神経細胞を確認しています。



(文献 1 より引用)

細胞周期を可視化する蛍光プローブ **Fucci** を導入したマウスでは、生後間もない脳の海馬の中で細胞分裂に向かう神経幹細胞の核が緑色に見えます。このマウスの全身の血管を赤色蛍光色素(Texas Red conjugated lectin)で標識し、ホルマリン固定後に本試薬で透明化して二光子励起蛍光顕微鏡を使用して 2 色蛍光観察を行いました。その結果、海馬の歯状回で神経幹細胞の核が血管に寄り添う様子を観察出来ました。

マウス以外の実験動物、脳以外の器官・組織、更にヒトの病理標本への適用が検討されています。

この様にシンプルな組成で大変に使い勝手の良い試薬ですが、試料に合わせて試薬の組成の変更が可能です。

Scale A2 試薬 (基本の処方)

4M 尿素、10(wt/vol)%グリセロール、0.1(wt/vol)%トライトン X-100

Scale U2 試薬 (透明化の際の試料の膨張を抑える処方)

4M 尿素、30(wt/vol)%グリセロール、0.1(wt/vol)%トライトン X-100

Scale B4 試薬 (透明化に要する時間を短縮する処方)

8M 尿素、0.1(wt/vol)%トライトン X-100

尚、**Scale A2** 試薬(定価 19,000 円/1L)および多光子専用対物レンズはオリンパス (株) から販売されています(5)。

本試薬は組織を表面から深く、そして高精細に観察できます。電子顕微鏡や光学顕微鏡による観察は、高精細でもそのサイズは大きくても 1 mm 角の組織片内に限られます。一方、MRI（核磁気共鳴画像装置）や PET（陽電子放射断面撮影法）による観察は、粗くてもその規模が個体丸ごとです。**Scale** 試薬による観察はそのギャップを埋める方法と位置付けられます。

本試薬と同様に組織の透明化には **BABB 試薬**（ベンジルアルコール・安息香酸ベンジル混合液）がありますが、透明化試薬の影響で蛍光シグナルが消失してしまうという問題があります。市販の透明化試薬 **FocusClear** は蛍光シグナルの維持は問題ありませんが、価格が高価で、組成が明らかにされていないために組織に適した条件への変更が難しいと言われています（6）。

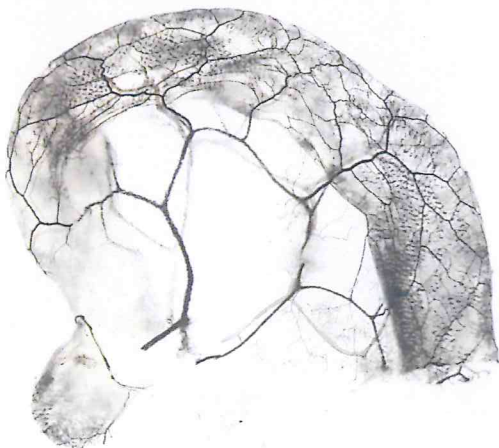
金沢医科大学解剖学講座では詳細な試薬組成・条件は明らかにされていませんが、本試薬とほぼ同様、あるいはより短時間で透明化する方法を持っているようです（7）。



魚や両性類は固定後 1 日で透明に



金魚では固定後 1 日で骨染色が可能
(アリザリンレッド S 使用)



マウス小腸（いずれも文献 7 から引用）

標識した蛍光シグナルへの影響等の更なる研究成果が期待されます。

従来はマウスの個体・組織の影響を受ける不満足な蛍光イメージングを行っていましたが、小動物の個体・組織を透明化することにより、光の散乱を抑えてより鮮明なイメージングが可能になりました。今後の使用例の増加や有用なデータの集積により光イメージングの更なる発展に期待しています。

文献

1. Hiroshi Hama, et al. nature neuroscience 14. 1481-1490(2011)
2. <http://www.dojindo.co.jp/letterj/143/review/02.html>
3. <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20110830-2/index.html>
4. http://www.riken.jp/r-world/info/release/news/2011/oct/spo_01.html
5. <http://www.olympus.co.jp/jp/news/2011b/nr111026scaleviewj.cfm>
6. http://www.cosmobio.co.jp/product/koutai_assei/cat422/cat992/01430007.asp?entry_id=2942
7. <http://www.jstshingi.jp/abst/p/12/1235/igakubu07.pdf#search='%E7%B5%84%E7%B9%94%E3%81%AE%E9%80%8F%E6%98%8E%E5%8C%96'>

(文責：三須)