

## 組織の透明化技術

田村 直輝

一昨年、東京大学のグループが全身透明化したマウスを作製し世間に衝撃を与えた。このグループはCUBIC (clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis) という方法でマウスの全身の透明化に成功し<sup>1)</sup>、また同じ技術を用いてマウスの脳の透明化も発表している<sup>2)</sup>。これらの論文に関しては、研究を行ったグループが和文解説を投稿されているのでそちらを参照していただきたい<sup>3)</sup>。ここでは、全般的な組織の透明化技術とその背景を簡単に紹介したい。

今まで、組織の解析といえば、薄切した切片を用意することが中心に行われてきた。従来の方法では、組織を凍結、あるいはパラフィンなどに包埋したものをマイクロトームと呼ばれる刃物が付いた台上で薄切し、厚さ3~10 μmの切片をスライドガラス上に作り各種染色や免疫反応へと供する。もし組織全体などの3次元的情報が欲しければ、マイクロトームで隙間なく連続した切片(連続切片)を作り、顕微鏡で取り込んだ各切片の情報をコンピューター上で統合すれば取得可能である<sup>4)</sup>。しかし、これには多大な労力が必要とされ、また連続切片を作製中に切片が損傷するリスクも高い。そこで、組織の切片を作らずに解析する方法が望まれたのである。

我々ヒトも含んだ脊椎動物の組織は不透明であり、組織を切らずに解析するために透明化が必要となるのは自然な流れだろう。透明化技術の紹介に入る前に、なぜ脊椎動物の組織は“不透明”なのかについて触れておきたい。理由はいくつかあるが、第一に可視光を吸光する色素が存在することである。代表例は、ヘモグロビン、ミオグロビン、そしてメラニンである。第二に、光を散乱する物質が細胞や細胞内小器官に含まれることである。主に脂質が関与しているとされ、大きな組織の透明化には脂質の除去が必要となる。また、NADPHやコラーゲンなどの自家蛍光物質も蛍光ラベルした物質の可視化を妨げる。これらを如何に抑えるかが組織透明化のカギとなる<sup>5)</sup>。

透明化技術は大きく二つに分かれる<sup>5)</sup>。一つは有機溶媒による脱水過程をふくんだ solvent-based clearing 法であり、もう一つは水溶性物質を主体にした方法である。後者はさらにいくつかに分かれるので次の段落で解説する。Solvent-based clearing 法はもっとも古典的な方法

で、ベンジルアルコールなどの有機溶媒中で脱水・透明化処理を行う。さまざまな組織で用いられた実績があるが、毒性のある有機溶媒を使用すること、またGFPなどの蛍光物質が消光してしまうことが大きな欠点としてあげられる。

水溶性物質による透明化はこれらの点が改善されている。主にi) simple immersion法、ii) hyperhydration法、そしてiii) hydrogel embedding法の三つに分けられる。i) は高濃度のスクロースやグリセロールなどを浸透させる方法で、試薬が安価で脂質が保持されるという長所を持つが、逆に脂質が残ってしまうことで(前述の理由から)比較的大きい切片には向かない。ii) は界面活性剤と尿素で脂質を除去しながら脱水を行う方法でCUBIC法はここに含まれる。CUBICの場合、試薬に含まれるアミノアルコールに組織不透明性の原因色素であるヘムを効率的に除去する性質があり、より一層の透明化をもたらしている。Hyperhydration法の欠点は数週間から数か月近くの時間がかかることであるが、CUBIC法では改善されている。iii) は組織を界面活性剤を含んだゲル内に埋め電気泳動によって脂質を除去する方法である。迅速な実験系が利点だが、専用の設備を必要とすることとパラメーター調整に労力があることが欠点になる。以上が簡単な透明化技術の紹介になるが、最新技術では組織によって1細胞レベルの解像度が得られるようになった<sup>1,2)</sup>。この分野は日進月歩であり、近いうちに新しい手法が生み出されることは間違いない。

最後に、透明化技術だけでなく、顕微鏡の技術革新もこの分野にとって重要であることを付け加えておく。共焦点顕微鏡、2光子励起顕微鏡、さらにライトシート蛍光顕微鏡(LSFM)などによる画像取得があって初めて透明化した組織から情報を得ることができる。透明化技術だけでなく顕微鏡技術の進歩にも大きな期待を寄せたい。

- 1) Tainaka, K. *et al.*: *Cell*, **159**, 911 (2014).
- 2) Susaki, A. E. *et al.*: *Cell*, **157**, 726 (2014).
- 3) 久野朗広ら: 化学と生物, **53**, 737 (2015).
- 4) 藤田恒夫, 藤田尚男: 標準組織学総論, 医学書院.
- 5) Richardson, D. S. and Lichtman, J. W.: *Cell*, **162**, 246 (2015).