

—特集 [生命の階層を可視化・操作する最先端技術：
神経科学が切り拓くバイオイメージングと疾患研究の新展開 (5)]—

組織透明化技術を活用したマルチスケールイメージング



日置 寛之¹ 山内 健太¹ 古田 貴寛²

¹ 順天堂大学大学院医学研究科脳回路形態学

² 大阪大学大学院歯学研究科系統・神経解剖学講座

1. はじめに

生体は、分子、細胞小器官、細胞、組織、臓器といった複数の階層から構成されており、その機能や病態は、これら階層構造の相互作用として発現する。このため、生命現象を理解するためには、単一の空間スケールに限定した解析では不十分であり、異なる階層を結び付けて捉えるマルチスケール解析が重要となる。

従来の形態学的研究では、化学固定した標本から薄切切片を作製して、二次元的観察による解析が広く行われてきた。この方法は、細胞構築や微細構造を高解像度で解析できる一方で、標本全体における位置関係や三次元的構築を把握しにくいという制約がある。特に脳のように広がりをもつ臓器では、観察した構造が全体の中でどこに位置するのかを把握しにくく、その知見を機能や病態と結び付けることが難しい場合がある。

近年、光学顕微鏡技術や蛍光プローブ、画像解析手法の進展に加え、組織透明化技術の発展により、厚みのある標本を三次元的に観察することが可能となった。これにより、臓器全体を俯瞰しつつ、関心のある構造へと段階的にズームインする解析が現実的となりつつある。神経科学の分野では、全脳レベルでの回路構築と、シナプスなどの超微細構造との関係を結び付けて理解する必要性が高く、こうした要請を背景としてマルチスケールイメージング技術の開発が進められてきた。

ただし、標本を透明化して三次元的に観察できるだけでは、マルチスケール解析としては不十分である。全体構造を把握した上で、細胞レベル、さらに電子顕微鏡によるナノスケール解析へと無理なく接続できることが重要となる。本総説では、このような観点から、光学顕微鏡と電子顕微鏡の両立を志向して開発された組織透明化法 Scale 技術を中心に、その背景と特徴、ならびにマクロからナノへと至るマルチスケールイメージングの実例について概説する。

2. 組織透明化技術

生体組織が不透明に見える主な原因は、組織内部で生じる光の散乱および吸収にある。とくに細胞膜に含まれる脂質成分は光散乱の大きな要因であり、厚みのある標本では深部からの光の透過が著しく制限される。このため、従来の光学顕微鏡観察では、組織を薄切して観察する方法が一般的に用いられてきた。

組織透明化技術は、このような光学的制約を克服するために開発された手法である。脂質の除去や屈折率の均一化によって光散乱を低減し、厚みのある標本を切片化することなく三次元的に観察可能な状態にすることを目的としている。これにより、組織全体の構築を保持したまま、三次元構造を観察することが可能となった。これまでに様々な組織透明化技術が開発されてきたが、それらは概ね、①水溶性試薬を用いる手法、②ハイドロゲルを用いる手法、③有機溶媒を用いる手法に分類することができる。各手法は、透明化能力 (clearing) と構造や各種シグナル保持能力 (preservation) のバランスにおいて、それぞれ異なる特性を示す。

水溶性試薬を用いる手法として CUBIC 法が挙げられる^{1,4}。CUBIC 法は、組織中の光散乱や光吸収物質を除去するとともに、屈折率を調整することで透明化を行う手法であり、大型の標本にも適用可能である。全脳レベルでの三次元観察に広く用いられている一方、脂質除去の影響により膜構造の保持には限界があり、電子顕微鏡観察との併用には制約が残る。

同じく水溶性試薬を用いる手法として SeeDB 法がある^{5,6}。SeeDB 法は、高屈折率溶液を用いて組織の屈折率を均一化する手法であり、脂質を強く除去しない点に特徴がある。このため、組織構造や蛍光シグナルの保持に優れる一方で、大型標本への適用は難しい場合がある。

Scale 法も水溶性試薬を用いた組織透明化手法の一つであり、尿素を含む試薬によって組織を親水化し、

光散乱を低減する点に特徴がある⁷⁻⁹。比較的穏やかな処理条件により、細胞形態や微細構造の保持に優れており、光学顕微鏡観察に加えて電子顕微鏡観察にも対応可能である点が大きな特徴である。

ハイドロゲルを用いる CLARITY 法では、組織成分をポリマー骨格に固定した後に脂質を除去することで高い透明度を実現する^{10,11}。一方で、処理工程が比較的複雑であり、また高濃度の界面活性剤を使用するため、膜構造や微細構造の保持は難しいと考えられる。

有機溶媒を用いる手法の代表例が DISCO 法である¹²⁻¹⁴。DISCO 法は、強力な脱脂および屈折率調整によって極めて高い透明度を実現できる点に特徴があり、全脳や全臓器レベルでの三次元観察に適している。一方で、構造や各種シグナルの保持が困難となることが多く、蛍光タンパクのシグナル減弱や微細構造の破壊などが生じると考えられる。

このように、各透明化技術にはそれぞれ特徴があり、透明度の高さと構造保持能力の間にはトレードオフが存在する (clearing-preservation spectrum)⁸。とくに、三次元構造解析を行った後に、電子顕微鏡観察によるナノスケール解析へと進むマルチスケールイメージングを志向する場合には、透明化能力のみならず、構造保持能力を考慮した手法選択が重要となる。次章では、これらの要件を高いレベルで両立する組織透明化法として、Scale 技術について詳述する。

3. ScaleS 法について

Scale 技術は、生体組織を透明化する尿素含有試薬 ScaleA2 の開発⁷を起点として確立された組織透明化技術である。ScaleA2 試薬に浸すことで組織標本を透明化でき、表面から数ミリメートルの深部までを三次元的に観察することが可能となった。一方で、透明化処理に長時間を要することや、組織の膨潤が生じやすいといった課題もあった。これらの課題を踏まえ、尿素に糖アルコールであるソルビトールを組み合わせた透明化試薬 ScaleS が開発され⁸、より迅速に、また構造を良好に保ったまま透明化することが可能となった。

ScaleS 法は、透明化能力の向上に加え、蛍光タンパク質の蛍光保持、抗原性の保持、さらには微細構造の保持に優れる点を特徴とする。とくに、微細構造が良好に保持される点は ScaleS 法の大きな利点であり、光学顕微鏡と電子顕微鏡とをつなぐマルチスケールイメージングの発展が期待される。光学顕微鏡は超解像技術の進展により観察分解能を高めつつあるが、微細構造を正確に同定するためには、依然として電子顕微鏡観察が不可欠である。とりわけシナプス構造は、電

子顕微鏡観察を通じて初めて同定可能な代表的構造である。

ScaleS 法の特徴を生かし、全脳レベルの三次元構造から微細構造へと段階的にズームインするマルチスケール解析の一例を図 1 に示す。アルツハイマー病モデルマウス (14 カ月齢) の脳半球に対して三次元免疫組織学法 (AbScale 法) を行い、緑色蛍光色素 (Alexa Fluor 488) で標識した抗体を用いてアミロイド斑を可視化した。透明化した状態のまま約 2 mm 厚のスライス標本作製し、蛍光実体顕微鏡で観察することで、脳半球全体におけるアミロイド斑の分布を把握した (図 1a, b)。その中から一つのアミロイド斑を標的として選択し (図 1c)、同一標本を PBS に戻した後、50 μ m 厚の切片を作製して共焦点レーザー顕微鏡による観察を行い、標的アミロイド斑を再度観察した (図 1d)。ABC 法により 3,3'-diaminobenzidine (DAB) を沈着させ、切片を樹脂包埋したのち (図 1e)、厚さ 70 nm の超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察を行った (図 1f)。このように、マクロレベルからナノレベルへと連続的にズームインするマルチスケールイメージングを実現できることが、ScaleS 法の大きな利点である。

一方で、より良好な微細構造保持と電子顕微鏡観察を実現するためには、処理工程時間のさらなる短縮や化学固定条件の改善など、なお検討の余地が残されている。この課題意識を背景として、次章で述べる ScaleSF 法の開発へとつながっていく。

4. ScaleSF 法について

ScaleSF 法では、ScaleS 法で確立された透明化プロセスを基盤としつつ、透明化に必要な工程を精査することで、処理全体の簡略化と時間短縮を図っている (図 2a)¹⁵⁻¹⁷。灌流固定後に作製したスライス標本に対して、溶液交換を中心とした簡便な手順で透明化を行う構成となっており、組織の膨張や収縮をほとんど伴うことなく、約半日で透明化を完了することが可能である (図 2b)。この処理時間の短縮により、ScaleSF 法は日常的な実験フローの中でも扱いやすい手法となっている。また、図 2c に示すように、透明化後の標本は安定した状態でマウント可能であり、長時間の光学顕微鏡観察にも適している。さらに、固定条件についても再検討を行い、パラホルムアルデヒドに加えてグルタルアルデヒドを含む化学固定法との併用が可能である。十分な透明度が維持され、従来の透明化法と比較してシナプスなどの微細構造が格段に保持されていることが示された (図 2d)。これにより、透明化標本内にお

アルツハイマーモデルマウス (14ヶ月齢)
Alexa488-6E10 DAB-6E10

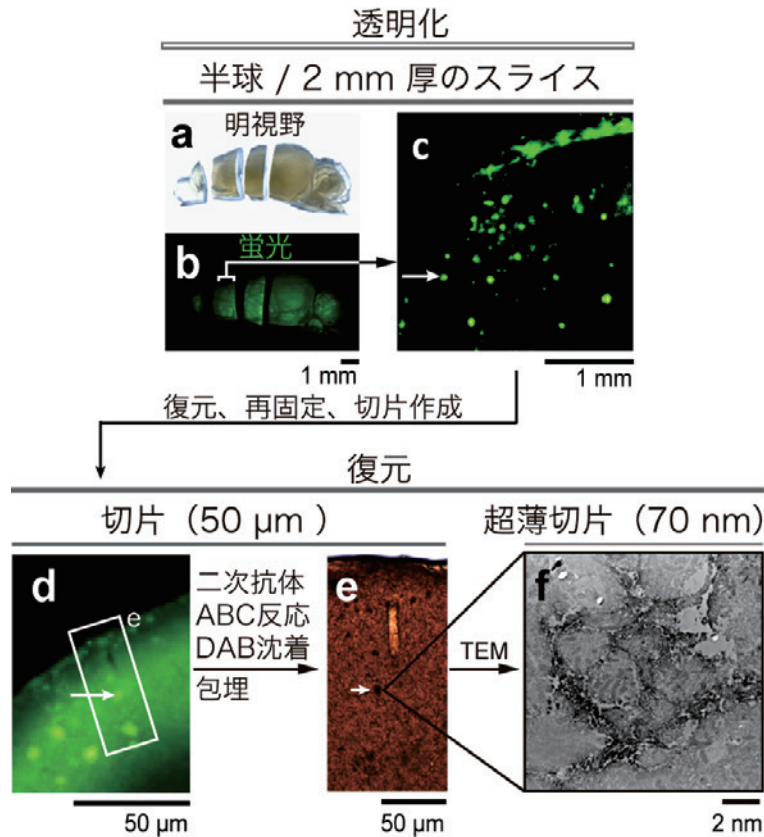


図1 ScaleS法を用いたマルチスケールイメージングの実例
(a~c) ヒトのアルツハイマー病病理を再現するモデルマウス (14ヶ月齢)の脳半球に対して三次元免疫組織学法 (AbScale法) を適用し, Alexa488で標識したマウスモノクローナル抗体 (6E10) によりアミロイド斑を可視化した. 透明化した状態のままスライサーにより約2 mm厚のスライスを作製し, 蛍光実体顕微鏡下で特定のアミロイド斑を選択した. (d, e) 標本をPBS (-) 中で復元後に再固定し, ビプラトームにより50 μm 厚の切片を作製した. 共焦点レーザー顕微鏡によって同一アミロイド斑を再観察した後, ABC反応によりDABを沈着させ, エポキシ樹脂に包埋した. (f) 作製した70 nm厚の超薄切片を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した. アミロイド斑形成部位では, シナプス構造が著しく減少している様子が確認された.

る光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察との両立が可能となり, 全脳構造からシナプス構造までのシームレスなマルチスケールイメージングが実現する.

ScaleSF法を用いたマルチスケールイメージングの例を図3に示す. まず, アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて, 大脳新皮質の神経細胞を緑色蛍光タンパク質および赤色蛍光タンパク質で標識した. 灌流固定後に作製したスライス標本を透明化处理し, 共焦点レーザー顕微鏡による三次元観察を行うことで, 大脳新皮質内に分布する神経細胞および神経突起 (樹状突起や軸索) を含む全体構築を俯瞰する (図3a~c). これにより, 広い範囲を観察しながら, 詳細な解

析を行う部位を効率よく選別することができる. 次に, 同一標本について観察条件を変更して高解像イメージングを行い, 軸索 (緑色) と樹状突起 (赤色) の関係を三次元的に解析した (図3d, e). とくに, 軸索が樹状突起に接触している部位に着目し (図3f), 当該領域を集束イオンビーム走査電子顕微鏡 (FIB-SEM) で観察することで, ナノスケールの微細構造解析を行った. その結果, 軸索と樹状突起がシナプスを形成していることが確認された (図3g~i).

このように, 光学顕微鏡観察による三次元情報を手掛かりとして観察対象を見失うことなく電子顕微鏡解析へとズームインできる点が, 本手法の大きな特徴で

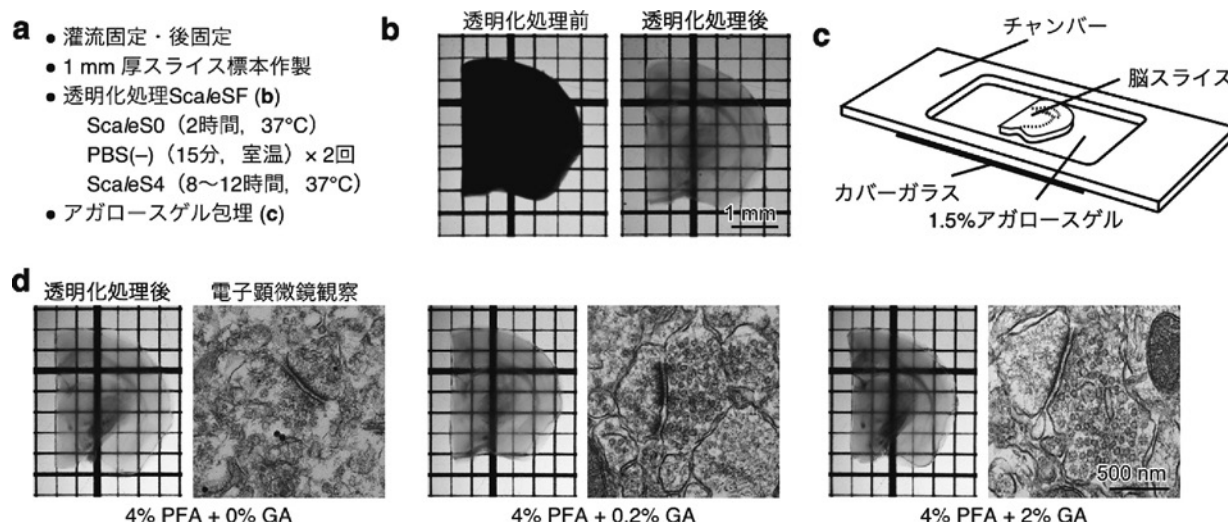


図2 ScaleSF法の概要と特性

(a) ScaleSF法における透明化処理の作業工程。(b) 透明化処理前後における1 mm厚脳スライス標本の透過像。(c) イメージングチャンバーの模式図。脳スライス標本を1.5%アガロースゲルに包埋し、安定した状態で光学顕微鏡観察を行う。(d) 固定液にグルタルアルデヒドを添加した条件における1 mm厚脳スライス標本の透過像および電子顕微鏡像。グルタルアルデヒドを併用しても透明度は維持され、シナプスなどの微細構造の保持が大きく向上していることが示されている。

ある。ScaleSF法は、全体構造の把握からシナプスレベルの微細構造解析までを同一標本内で連続的に行うことを可能にし、マルチスケールイメージングを実用的な解析手法として確立するうえで有用であると考えられる。一方で、ズームイン解析には一定の労力を要するなど、なお改良の余地も残されており、標識技術を含めたバイオイメージング技術のさらなる発展が期待される。

5. 今後の展望

本稿で紹介したScaleSF法を基盤とするマルチスケールイメージングは、「全体構造から微細構造へと連続的につなぐ」解析を同一標本内で実現する点に本質的な意義がある。従来、光学顕微鏡による広域観察と電子顕微鏡による微細構造解析は、標本作製や観察条件の違いから、同一標本で行うことは困難であった。ScaleSF法は、この分断を技術的に埋めることで、構造情報を階層横断的に理解するための実用的な解析基盤を提供するものである。

神経科学分野においては、とくに神経疾患研究への応用が期待される。アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患では、脳内における病変の分布と、シナプス障害などの微細構造変化とが密接に関連していると考えられている。しかし、これらを同一標本内で連続的に解析することは従来困難であった。マルチスケールイメージング技術を活用することで、病変の空

間分布を三次元的に網羅的に把握した上で、特定の病変部位や神経細胞に着目し、シナプスレベルの異常へと段階的にズームインする解析が可能となる。このような解析は、疾患進行の空間的・構造的理解を深める上で有用であり、病態解釈に新たな視点を与える可能性がある。また、この解析技術は神経系に特有のものではなく、他臓器研究への展開も十分に見込まれる。臓器全体の構築と微細構造との関係を一貫して捉えることは重要であり、ScaleSF法のように、臓器レベルで広範囲を観察した後、特定部位の微細構造へとズームインすることが可能となることは、組織構造を多階層的に理解するための汎用的なアプローチとなり得るものである。

一方で、マルチスケールイメージングを実際の解析手法として広く運用するためには、いくつかの課題も残されている。解析対象を絞り込む過程では、広範な三次元データの取得とスクリーニングが必要となり、作業負担や解析効率の点で改善の余地がある。また、取得されるデータ量は膨大であり、定量解析やデータ管理に関する技術的課題も無視できない。

今後は、標識技術、観察技術、解析技術の進展が相互に連携することで、マルチスケールイメージングの実用性はさらに高まると期待される。とくに、特定の構造を効率よく標識する手法や、自動化・半自動化された解析手法との組み合わせにより、本手法はより革新的な解析手段へと発展していく可能性がある。マル

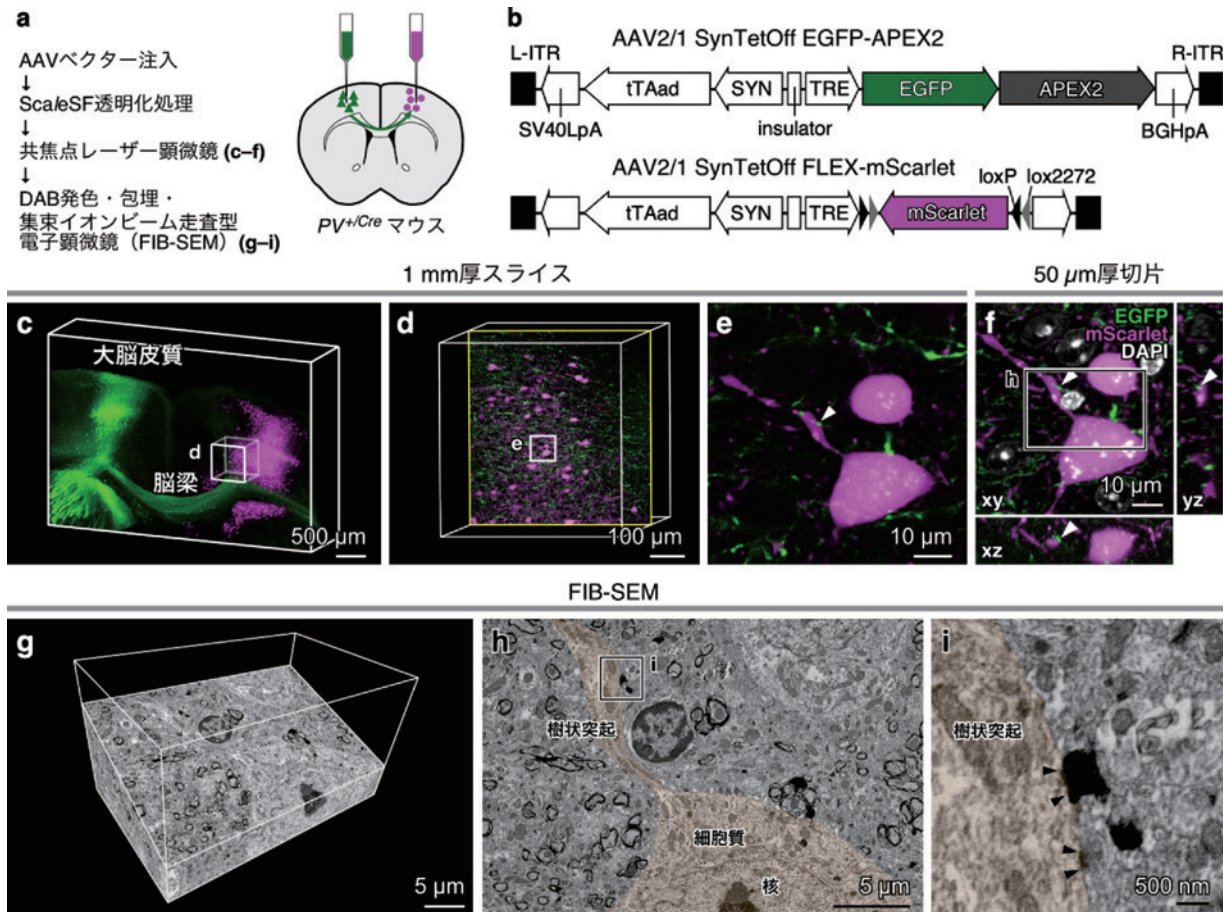


図3 ScaleSF法を用いたマルチスケールイメージングの例

(a) 実験全体の概略。パルブアルブミン (PV) 陽性 GABA 作動性ニューロンにおいて Cre recombinase を発現するノックインマウスを用いた。(b) 使用したアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの模式図。AAV2/1-SynTetOff-EGFP-APEX2 により神経細胞の軸索を EGFP および APEX2 で標識し、AAV2/1-SynTetOff-FLEX-mScarlet により Cre 発現細胞 (PV 陽性ニューロン) の樹状突起を mScarlet で標識した。(c~e) ScaleSF 法により透明化した 1 mm 厚脳スライス標本の共焦点レーザー顕微鏡像。EGFP で標識された軸索が、mScarlet で標識された GABA 作動性ニューロンの樹状突起に近接する部位を矢頭で示す。(f) 同一標本から作製した 50 μm 厚切片の共焦点レーザー顕微鏡像。(g~i) APEX2 のペルオキシダーゼ活性を利用して DAB を沈着させた後、集束イオンビーム走査電子顕微鏡 (FIB-SEM) により観察した超微細構造像。矢頭は軸索と樹状突起間に形成されたシナプス構造を示す。

チスケールイメージングは、構造情報に基づいた脳機能理解や疾患病態理解を深化させるとともに、生体組織解析の新たな標準技術の一つとして位置付けられることを期待している。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

文献

- Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, et al.: Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 2014; 157: 726-739. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.042. PubMed PMID: 24746791
- Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, et al.: Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep* 2018; 24: 2196-2210 e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.056. PubMed PMID: 30134179
- Tainaka K, Kubota SI, Suyama TQ, et al.: Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* 2014; 159: 911-924. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.034. PubMed PMID: 25417165
- Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, et al.: Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. *Nat Commun* 2020; 11: 1982. Epub 20200427. doi: 10.1038/s41467-020-15906-5. PubMed PMID: 32341345; PubMed Central PMCID: PMC7184626
- Ke MT, Fujimoto S, Imai T: SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 2013; 16: 1154-1161. doi: 10.1038/nn.3447. PubMed PMID: 23792946
- Ke MT, Nakai Y, Fujimoto S, et al.: Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. *Cell Rep* 2016; 14:

- 2718–2732. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.057. PubMed PMID: 26972009
7. Hama H, Kurokawa H, Kawano H, et al.: Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1481–1488. doi: 10.1038/nn.2928. PubMed PMID: 21878933
 8. Hama H, Hioki H, Namiki K, et al.: ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci* 2015; 18: 1518–1529. doi: 10.1038/nn.4107. PubMed PMID: 26368944
 9. Miyawaki A, Hama H, Hioki H, et al.: Deep Imaging of Cleared Brain by Confocal Laser-Scanning Microscopy. *Protocol Exchange* 2016. doi: 10.1038/protex.2016.019
 10. Chung K, Wallace J, Kim SY, et al.: Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 2013; 497: 332–337. doi: 10.1038/nature12107. PubMed PMID: 23575631; PubMed Central PMCID: PMC4092167
 11. Tomer R, Ye L, Hsueh B, et al.: Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc* 2014; 9: 1682–1697. doi: 10.1038/nprot.2014.123. PubMed PMID: 24945384; PubMed Central PMCID: PMC4096681
 12. Erturk A, Becker K, Jahrling N, et al.: Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* 2012; 7: 1983–1995. doi: 10.1038/nprot.2012.119. PubMed PMID: 23060243
 13. Renier N, Wu Z, Simon DJ, et al.: iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 2014; 159: 896–910. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.010. PubMed PMID: 25417164
 14. Pan C, Cai R, Quacquarelli FP, et al.: Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods* 2016; 13: 859–867. doi: 10.1038/nmeth.3964. PubMed PMID: 27548807
 15. Furuta T, Yamauchi K, Okamoto S, et al.: Multi-scale light microscopy/electron microscopy neuronal imaging from brain to synapse with a tissue clearing method, ScaleSF. *iScience* 2022; 25: 103601. Epub 20211227. doi: 10.1016/j.isci.2021.103601. PubMed PMID: 35106459; PubMed Central PMCID: PMC8786651
 16. Yamauchi K, Furuta T, Okamoto S, et al.: Protocol for multi-scale light microscopy/electron microscopy neuronal imaging in mouse brain tissue. *STAR Protoc* 2022; 3: 101508. Epub 20220818. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101508. PubMed PMID: 36035789; PubMed Central PMCID: PMC9405099
 17. Yamauchi K, Okamoto S, Takahashi M, et al.: A Tissue Clearing Method for Neuronal Imaging from Mesoscopic to Microscopic Scales. *J Vis Exp* 2022. 183: Epub 20220510. doi: 10.3791/63941. PubMed PMID: 35635469

(受付：2026年2月10日)

(受理：2026年2月10日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的の場合、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。