

組織透明化サンプル用の 3D 高速分子ラベリング技術

西尾 将人

1 はじめに

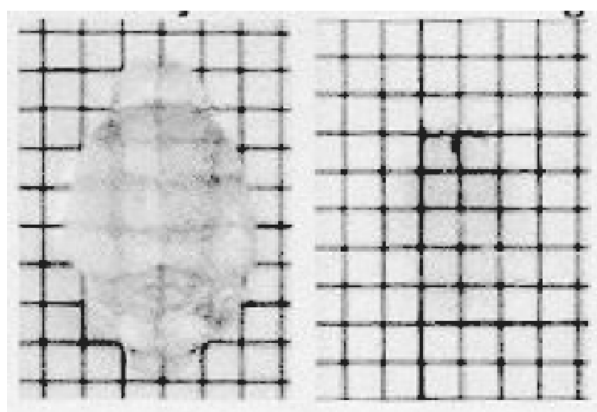
今日に至るまで組織観察の手法は、顕微鏡性能の向上や、トランスジェニックのように遺伝子操作を用い特定の部位に蛍光タンパク質（GFP, RFP など）を導入する技術によって飛躍的に発展し、日増しに鮮明な組織内部のイメージを正確に捉えることが可能になっている。特に 2 光子や多光子顕微鏡の登場は、今まで捉えることができなかった深部のイメージを局所的に映し出すツールとして汎用されている。しかし、従来の組織観察では、組織全体を立体的・多角的に捉えることが難しい。2 光子や多光子顕微鏡といえども組織の深さ 1 mm 程度しか光が届かないことから、これまでの組織観察では組織を薄くスライスし、各スライスの顕微鏡画像を重ね合わせて 1 枚の立体的な画像を取得するのが一般的である。そのため、断片的な画像をパズルのように張り合わせることから血管、神経のつなが目を正確に捉えることが困難であった。その点において、組織全体を透明化する技術は、組織観察の常識を超える発明であった。理化学研究所のグループが樹立した Sca/e¹ やウーン大学が発明した 3DISCO²⁾ は世の中に組織透明化技術を知らしめるきっかけとなった。マウス全脳の組織を特定の試薬に浸け込むことで丸ごと透明化し、組織全体の蛍光イメージングを成功させた事例（図 1）は神経科学分野に鮮烈な印象を与えた。

組織透明化により、2 光子顕微鏡の光がマウス全脳表層から 5 mm の深部まで届くようになった。さらに、巨大分子の抗体を用いる免疫染色（組織 3D イメージング）の技術が飛躍する第一歩として、2019 年マサチューセッツ工科大学のグループは eFLASH⁵⁾ と呼ばれる新規高速免疫染色技術を提案した。本稿ではこの eFLASH 法と、この技術を搭載する LifeCanvas Technologies 社の高速免疫染色システム SmartLabel について紹介する。

2 従来の組織免疫染色

摘出した組織を免疫染色する場合、パラホルムアルデヒド（PFA）等で固定し、その組織を数 10 μm オーダーに薄くスライスすることが一般的である。この理由は抗

(a)



(b)

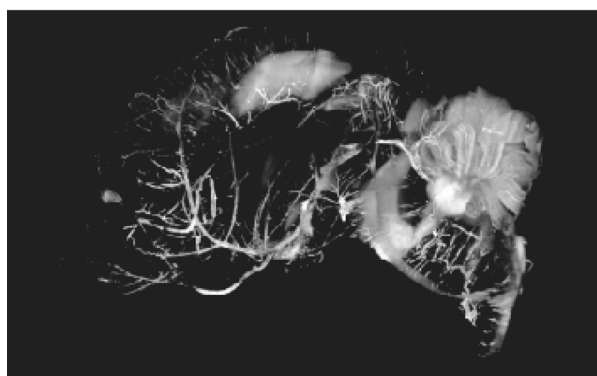


図 1 マウス透明化全脳 (a) と透明化サンプルのイメージング画像 (b)

(a) CLARITY 法によって透明化処理したマウス全脳。
(b) パルプアルブミンに YFP タグしたマウス透明化脳半球のライトシート顕微鏡画像。

体分子が組織の深部までアクセスすることが困難であるためである。また、スライス切片でなければ顕微鏡の光が細部まで届かないという問題があった。透明化手法の樹立により、2 光子顕微鏡を用いて、あらかじめ GCaMP₆ を発現させたマウスの透明化全脳の表層から 5 mm 以上の神経細胞の可視化を行なえるようになった³⁾。この報告例は、トランスジェニック技術と組織透明化技術を融合すれば、組織のスライス切片を作成する

ことなく全組織での3Dイメージングが可能であることを示している。組織透明化手法は、組織と浸潤させる溶液の屈折率を同程度にすることによって、視覚的に組織を透明に見せている。そのため、この溶液の浸潤性が組織を透明にするために重要であると考えられている。この浸潤性に大きく寄与しているのが、組織透明化工程の一つである組織の脱脂であり、東京大学のグループが開発したCUBIC³⁾やスタンフォード大学のKwanfunらが樹立したCLARITY⁴⁾が存在する。有機溶剤や界面活性剤を用いることで組織の細胞膜や脂肪組織を穏やかに除去することができる。この脱脂の効果は組織の免疫染色効率にも影響を与えるものと推察できる。免疫染色で一般的に用いられるIgG抗体は分子量150万ほどの巨大分子である。通常の組織では細胞膜を持つため、抗体は細胞内部へアクセスすることができない。しかし、透明化組織であれば抗体が組織深部へアクセスすることが容易である。そのため抗体染色を行い、透明化組織を観察する事例が近年報告されている⁶⁾⁷⁾。一方、透明化した全組織に対する抗体染色には二つの課題が示唆されている。一つは染色に必要な時間である。細胞膜を取り除いた組織といえどもマウスの全脳サイズで抗体が組織深部へ浸透する時間はおよそ2週間から1か月程度必要である。もう一方は、組織表層と深部における抗体濃度の不均一性である。深部の抗体量が極端に少なく、表層の抗体量が多く存在することになり、バックグラウンド蛍光を生みだすことが懸念されている。このような課題を一度に解決できる方法として提案されたのが2019年にYunらが報告した電気泳動を用いて抗体染色を行うeFLASH法⁵⁾である。

3 電気泳動技術を応用する新規免疫染色方法 eFLASH

3.1 eFLASH法の原理

eFLASH法は、全組織に対する免疫染色において、

免疫染色の早さと均一性を克服するものと期待される。この方法は組織に対して電気泳動を印加し、その推進力を利用して抗体を組織内部へ強制的に移動させることができる。電気泳動を行うことによって、従来の浸透法では長期間必要であった染色時間がおよそ24時間に短縮された(図2)⁵⁾⁸⁾。この電気泳動を用いて組織の深部へ抗体分子を効率的にアクセスするためにはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のようなイオン性界面活性剤の存在が不可欠である。しかし、SDS分子は、抗原抗体反応を阻害する効果があることが一般的に知られているため、通常のSDS-PAGEのようにSDS分子を移動媒体として利用することが難しい。上記の理由から、eFLASH法では陰イオン性界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウム(NaDC)を採用している。NaDCはpH依存的に抗体との親和性が変化する性質を有して

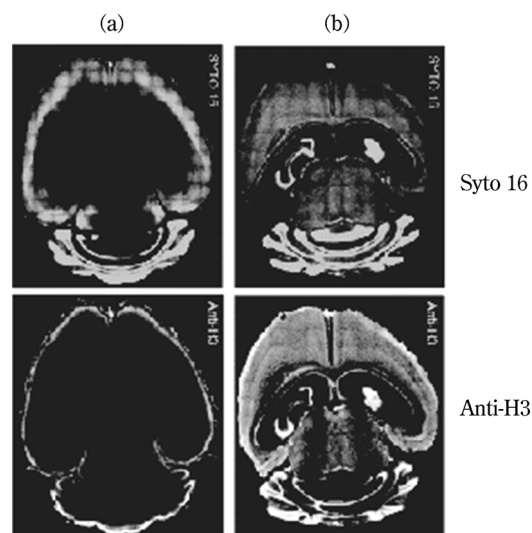


図2 浸透法と電気泳動の染色効率の比較
免疫染色は、核染色試薬であるSyto16(488nm)とHiston-3タンパク質を抗原とするanti-H3標識抗体(594nm)を用いて24時間染色工程を実施した。(a)浸透法(b)電気泳動法。

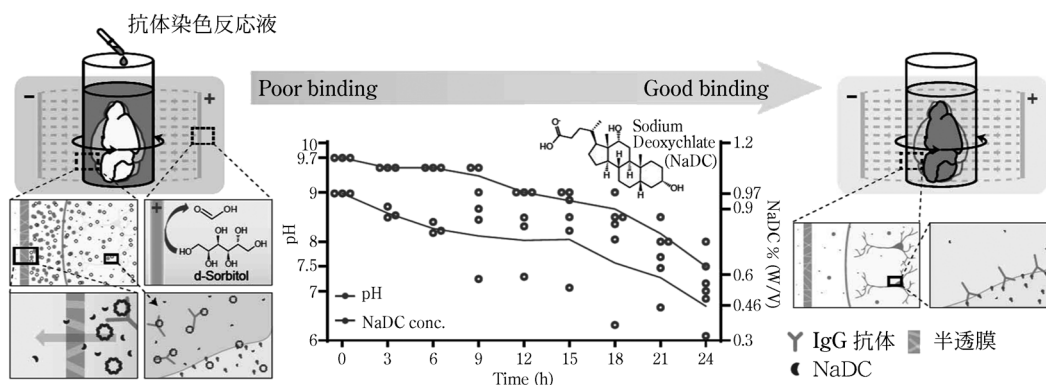


図3 eFLASH法の抗体染色の原理⁵⁾

陰イオン性界面活性剤であるNaDCのpH依存的な抗体との親和性変化を利用することによって、組織全体に抗体分子を拡散させる。pHの制御は反応液に含まれるd-Sorbitolの電気分解によるギ酸の生成によって行われる。※Kwanfunらの2019年の論文の図を引用しました。

いる (図 3)。高 pH 下では抗体と強くミセルを形成するのに対して、中性 pH 下ではその親和性が大きく低下する。この性質を利用するために eFLASH 法における反応溶液には、NaDC のほかに糖の一種である *d*-Sorbitol が含まれている。*d*-Sorbitol は電気泳動中に電気分解を起こし、ギ酸に変化する。これにより溶液の pH を意図的に下げることが可能になる。そのため、この電気泳動中の溶液の pH 変化を利用することによって、電気泳動初期では抗体が組織中の抗原とは反応せず抗体が組織全体に拡散される。電気泳動終期では、組織全体に拡散された抗体が抗原と反応するようになる。つまり、全組織の高速かつ均一性の高い免疫染色が実現できる。実際、eFLASH 法を利用することによって均一性の高い免疫染色結果が得られている⁵⁾。次の章では、この全組織に対して有効な新規免疫染色方法を活用したシステムの紹介をする。

3.2 高速免疫染色システム SmartLabel について

LifeCanvas Technologies 社の SmartLabel 高速免疫染色システム (図 4) は、Kwanfhun らが 2019 年に発表した eFLASH 法に基づき開発された。LifeCanvas 社は組織透明化に必要な工程を網羅できるように製品を取り揃えている。その中でも SmartLabel は、3D イメー

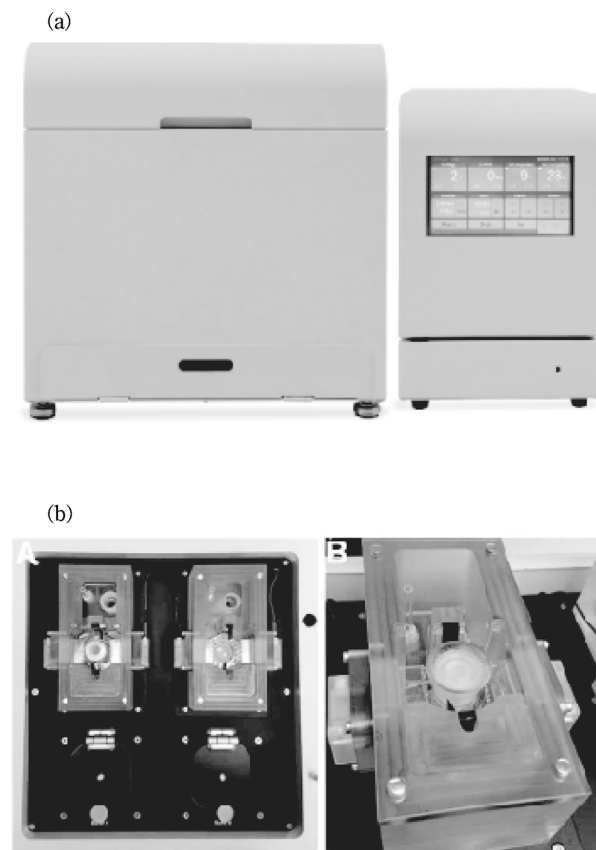


図 4 SmartLabel システム外観 (a) と内部構造 (b)
(a) SmartLabel 本体とタッチパネル制御モジュール。(b) 2ch 灌流チャンバーとリザーバーポート。

ジングの品質性を向上させる役割を担う。SmartLabel の構造は、灌流チャンバーと灌流溶液を入れるポート、また内部には冷却ファンが搭載されている。灌流チャンバーには左右に電極が配置されており、その中央部分に組織を保持するためのサンプルカップを置くことができる。このサンプルカップは半透膜で区切られており、半透膜で区切られた内部にサンプルと抗体、反応溶液を入れることになる。半透膜で区切ることによって、電気泳動による抗体分子の移動が半透膜内に限られる。抗体の均一性を確保するためにサンプルカップの底面にはスターラーバーが置かれている。灌流チャンバーにはマグネティックスターラーが内蔵しているため、抗体反応溶液を常時攪拌することができる。また、灌流チャンバーにはサンプルカップを回転する機構も備えており、電気泳動の電子線が組織に部分的に暴露されることを防ぐ。すなわちサンプルが回転することで染色のムラを抑えることが可能になる。電気泳動に伴う強力な発熱もピエゾ素子の冷却ファンを利用することで安定した温度制御が実現している。

3.3 SmartLabel によって染色した透明化組織の観察

このような eFLASH 技術に基づく SmartLabel システムによって、標識抗体やタンパク質、核染色分子と

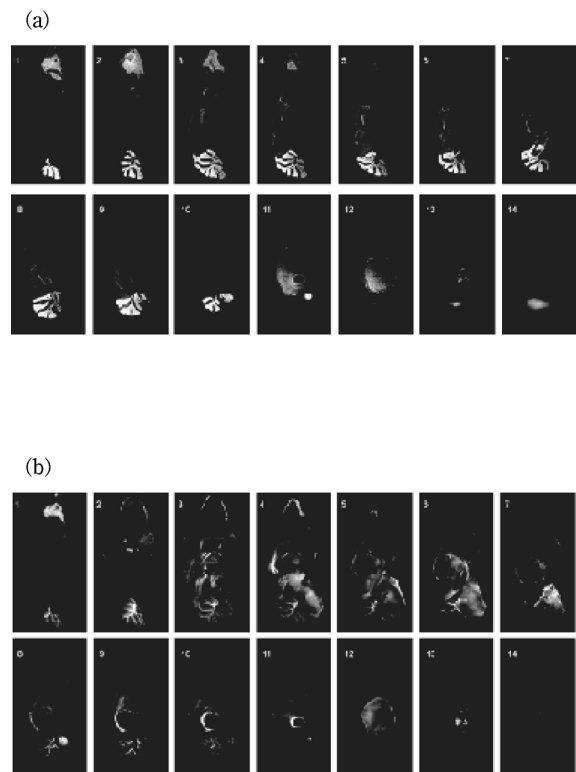


図 5 SmartLabel で染色したマウス透明化脳半球のライトシート顕微鏡画像
(a) 核染色である Syto16 (488 nm) を用いて細胞核を染色した。(b) Alexa594 を標識した anti-TH (594 nm) を用いて、Gaba ニューロンを染色した。

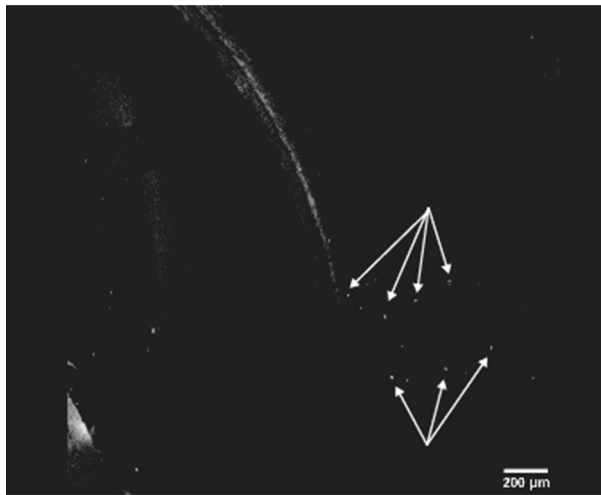


図6 マウス透明化全脳における c-fos タンパク質の染色
anti-c-fos 抗体と Alexa 標識二次抗体 (594 nm) を用
いて SmartLabel でマウス透明化全脳にタグした。

いった様々な分子に適用することができる。LifeCanvas Technologies 社では独自で開発したライトシート顕微鏡 SmartSPIM を取り扱っている。ライトシート顕微鏡とは、励起光をサンプル面に対してシート状に当て、蛍光を取得することができる顕微鏡である。このような顕微鏡を活用することで全組織の 3D イメージングのデータ品質を飛躍させることができる。図5は、SmartLabel を用いてマウスの透明化脳半球に細胞核を染める Syto16 と GABA ニューロンと特異的に結合する anti-Tyrosine Hydroxylase (anti-TH) を利用して得られたイメージングデータである。両方の染色試薬で表層から深部に至るまで特定の細胞が染まっていることが示されている。また、直前の神経細胞の活動をモニターしているとして、注目を集めている c-Fos タンパク質の検出のため、マウスの透明化全脳に anti-c-fos 抗体を導入した結果を図6に示した。このことは、細胞の成熟期や活動期の初期にしか発現しないようなバイオマーカーに対しても SmartLabel システムが有効であることを示している。

4 おわりに

高速免疫染色システム SmartLabel は、電気泳動を利用する新規免疫染色方法 eFLASH の原理をベースとしている。組織全体に電気泳動を印加することで抗体分子を高速に組織深部内へ送ることができる。また、NaDC と抗体との親和性を pH 制御することで抗体が組織全体に均一に分布させることを可能にしている。このような

テクノロジーとライトシート顕微鏡の技術が合わさることで全組織のまま空間分解能の高いイメージングデータが得られることが期待される。組織透明化技術は、いまだ発展途上の部分が多い。通常行われるスライス切片での免疫染色とは異なり、透明化組織はその抗原性が異なることが示唆されている。そのため、使用できる抗体のライブラリー作成や組織の新たな固定方法の確立が急務であると考えられる。当社では、これから全組織イメージングの需要が高まっていく中で研究者に提供できるよう有用なデータベースを構築していく所存である。

文 献

- 1) H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki : *Nat. Neurosci*, **14**, 1481 (2011).
- 2) A. Ertürk, K. Becker, N. Jahrling, CP. Mauch, CD. Hojer, JG. Egen, F. Hellal, F. Bradke, M. Sheng, HU. Dodt : *Nat. Protoc*, **11**, 1983 (2012).
- 3) K. Tainaka, S. I. Kubota, T. Q. Suyama, E. A. Susaki, D. Perrin, M. Ukai-Tadenuma, H. Ukai, H. R. Ueda : *Cell*, **159**, 911 (2014).
- 4) K. Chung, J. Wallace, SY. Kim, S. Kalyanasundaram, AS. Andalman, TJ. Davidson, JJ. Mirzabekov, KA. Zalocusky, J. Mattis, AK. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grose, V. Gradinaru, K. Deisseroth : *Nature*, **497**, 332 (2013).
- 5) D. H. Yun, Y-G. Park, J. H. Cho, L. Kametsky, NB. Evans, A. Albanese, K. Xie, J. Swaney, C. H. Sohn, Y. Tian, Q. Zhang, G. Drummond, W. Guan, N. DiNapoli, H. Choi, H-Y. Jung, L. Ruelas, G. Feng, K. Chung : *bioRxiv*, (2019).
- 6) E. Lee, J. Choi, Y. Jo, J. Y. Kim, Y. J. Jang, H. M. Lee, S. Y. Kim, H-J. Lee, K. Cho, N. Jung, E. M. Hur, S. J. Jeong, C. Moon, Y. Choe, I. J. Rhyu, H. Kim, W. Sun : *Sci Rep*, **6**, 18631 (2015).
- 7) K. Tainaka, T. C. Murakami, E. A. Susaki, C. Shimizu, R. Saito, K. Takahashi, A. Hayashi-Takagi, H. Sekiya, Y. Arima, S. Nojima, M. Ikemura, T. Ushiku, Y. Shimizu, M. Murakami, K. F. Tanaka, M. Iino, H. Kasai, T. Sasaoka, K. Kobayashi, K. Miyazono, E. Morii, T. Isa, M. Fukayama, A. Kakita, H. R. Ueda : *Cell Rep*, **24**, 2196 (2018).
- 8) S-Y. Kim, J. H. Cho, E. Murray, N. Bakh, H. Choi, K. Ohn, L. Ruelas, A. Hubbert, M. McCue, S. L. Vassallo, P. J. Keller, K. Chung : *PNAS*, **11**, E6274.



西尾将人 (Masato NISHIO)

バイオリサーチセンター株式会社 (〒101-0032 東京都千代田区岩本町 1-7-1 瀬木ビル 2F)。東京薬科大学大学院薬学研究科薬学専攻博士後期課程修了。博士(薬学)。
《趣味》水泳・オープンウォーター。
E-mail : nishio@brck.co.jp

バイオリサーチセンター株式会社企業 HP :

<http://www.brck.co.jp>

バイオリサーチセンター株式会社 SmartLabel 製品ページ :

<https://product.brck.co.jp/index.php/maker/l/lifecanvastechologies/smartlabel>

日本分析化学会研究懇談会の御案内

日本分析化学会の研究懇談会に入会御希望の方は下記に照会ください。

- ① ガスクロマトグラフィー研究懇談会
 - ② 高分子分析研究懇談会
 - ③ X線分析研究懇談会
 - ④ 液体クロマトグラフィー研究懇談会
 - ⑤ 分析試薬研究懇談会
 - ⑥ 有機微量分析研究懇談会
 - ⑦ 溶液界面研究懇談会
 - ⑧ 化学センサー研究懇談会
 - ⑨ 電気泳動分析研究懇談会
 - ⑩ イオンクロマトグラフィー研究懇談会
 - ⑪ フローインジェクション分析研究懇談会
 - ⑫ 環境分析研究懇談会
 - ⑬ 表示・起源分析技術研究懇談会
 - ⑭ 熱分析研究懇談会
 - ⑮ レアメタル分析研究懇談会
 - ⑯ 溶液反応化学研究懇談会
 - ⑰ 受託分析研究懇談会
 - ⑱ 電気分析化学研究懇談会
 - ⑲ ナノ・マイクロ化学分析研究懇談会
 - ⑳ バイオ分析研究懇談会
 - ㉑ スクリーニング分析研究懇談会
- ◇照会先
- ① : 〒859-3298 佐世保市ハウステンボス町 2825-7 長崎国際大学薬学部薬学科 佐藤 博 [TEL・FAX : 0956-20-5668, E-mail : satoh@niu.ac.jp]
 - ② : [E-mail : infopacd.jp]
 - ③ : 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138 大阪市立大学大学院工学研究科 辻 幸一 [TEL・FAX : 06-6605-3080, E-mail : tsuji@a-chem.eng.osaka-cu.ac.jp]
 - ④ : 中村 洋 [TEL : 03-3490-3351, E-mail : nakamura@jsac.or.jp]
 - ⑤ : 〒102-8554 東京都千代田区紀尾井町 7-1 上智大学理工学部物質生命理工学科分析化学研究室内 [TEL : 03-3238-3370, FAX : 03-3238-3361, E-mail : ta-hayas@sophia.ac.jp]
 - ⑥ : 〒263-8522 千葉県稲毛区弥生町 1-33 千葉大学共用機器センター 榎 飛雄真 [TEL : 043-290-3810, E-mail : masu@faculty.chiba-u.jp]
 - ⑦ : 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1 大阪大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室 塚原 聡 [TEL : 06-6850-5411, E-mail : sxt@chem.sci.osaka-u.ac.jp]
 - ⑧ : 〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1 大阪府立大学大学院工学研究科 久本秀明 [TEL : 072-254-9285, E-mail : hisamoto@chem.osakafu-u.ac.jp]
 - ⑨ : 〒501-1196 岐阜市大学西 1-25-4 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬品分析化学研究室 江坂幸宏 [TEL : 058-230-8100 (内線3640), E-mail : esaka@gifu-pu.ac.jp]
 - ⑩ : 〒780-8520 高知市曙町 2-5-1 高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門 [TEL : 088-844-8306, E-mail : IC@jsac.jp]
 - ⑪ : 〒470-0392 豊田市八草町八千草 1247 愛知工業大学工学部応用化学科 村上博哉 [TEL : 0565-48-8121, E-mail : jafia@aitech.ac.jp]
 - ⑫ : 〒192-0392 八王子市堀之内 1432-1 東京薬科大学生命科学部 熊田英峰 [E-mail : kumata@ls.toyaku.ac.jp]
 - ⑬ : 〒120-8551 東京都足立区千住旭町 5 東京電機大学工学部環境化学科内 保倉明子 [TEL : 03-5284-5445, E-mail : kigen@jsac.jp]
 - ⑭ : 〒259-1293 平塚市土屋 2946 神奈川大学理学部 西本研究室 [TEL : 0463-59-4111, E-mail : y24moto@kanagawa-u.ac.jp]
 - ⑮ : 〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2 五反田サンハイツ 304 号 (公社)日本分析化学会事務局 [TEL : 03-3490-3351, E-mail : rare_metals@jsac.or.jp]
 - ⑯ : 〒950-2181 新潟市西区五十嵐 2 の町 8050 新潟大学教育研究院自然科学系 梅林泰宏 [TEL : 025-262-6265, E-mail : yumescc@chem.sc.niigata-u.ac.jp]
 - ⑰ : 〒590-0984 大阪府堺市堺区神南辺町 1-4-6 (株)総合水研究所 中田邦彦 [TEL : 072-224-3532, E-mail : k_nakata@mizuken.com]
 - ⑱ : 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町 1 京都工芸繊維大学大学院 前田耕治 [TEL : 075-724-7523, E-mail : maedak@kit.ac.jp]
 - ⑲ : 〒060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目 北海道大学大学院工学研究院 渡慶次 学 [TEL : 011-706-6744, E-mail : tokeshi@eng.hokudai.ac.jp]
 - ⑳ : 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1 東京大学大学院総合文化研究科 吉本敬太郎 [TEL : 03-5454-6591, E-mail : keitaro@yoshimotolab.c.u-tokyo.ac.jp]
 - ㉑ : 〒110-0015 台東区東上野 4-10-3 ASANO ビル 1 階 101 号室 (株)神戸工業試験場生産本部技術開発部 三島有二 [TEL : 03-3843-5691, E-mail : scr-info@jsac.jp]