実験技術

脳透明化技術の現状と今後の発展
—ScaleS 法に焦点を当てて—日置 寛之¹⁾, 濱 裕²⁾, 孫 在隣^{1,3)}, 黄 晶媛¹⁾,
並木 香奈²⁾, 星田 哲志⁴⁾, 黒川 裕²⁾, 宮脇 敦史^{2,4)}

要約: 脳が、認知・思考・記憶・感情といった高次機能を実現する仕組みを解き明かすには、その構造的基盤である神経回路網の理解が必要不可欠である。「構造無き機能は無い」からである。国内外で続々と開発されている脳透明化技術は、高速かつ大規模な三次元構造解析を可能にする革新的技術であり、神経回路解析に新たなブレイクスルーをもたらすと期待される。透明化技術を比較する上で重要なポイントが「clearing-preservation spectrum」である。透明化能力 (clearing capability) の向上は散乱光の抑制につながり、深部まで安定して高精細な画像を取得するために大事である。一方で、透明化処理の影響によって組織の構築や標識シグナルの保持が悪くなるというトレードオフが厳存する。標識された構造物を再現よく定量的に観察するためには、構造や各種シグナルを適切に保存・維持する能力 (preservation capability) が重要である。このトレードオフ問題に真正面から取り組み、両者を高い次元で両立することに成功したのが、筆者らが開発した透明化技術 ScaleS 法である。透明化能力の向上はもちろんのこと、①蛍光タンパク質の蛍光の保持、②抗原性の保持、③超微細構造の保持、など標識シグナルの保持に優れている。特に、超微細構造が保持されることで、光学顕微鏡と電子顕微鏡とを繋ぐ「ズームイン」技術の発展が期待される。「かたちをよくみる」バイオイメーシングは、生命現象の真理を理解する上で非常に重要なステップであり、「標識」「観察」「解析」といった各要素において様々な技術が要求される。遺伝子工学技術等の発展により、「標識」技術は目覚ましい進展を遂げてきた。そして透明化技術の台

頭により「観察」「解析」が大きく進展すると期待され、バイオイメーシングは今まさに新たな時代を迎えようとしている。

1. はじめに

国内外で続々と開発されている透明化技術は、高速かつ大規模な三次元構造解析を可能にする革新的技術であり、組織の構造解析に新たなブレイクスルーをもたらすと期待されている。特に中枢神経系の回路構造解析において、その威力を発揮するものと考えられる。中枢神経系は凡そ 1000 億にも及ぶ神経細胞から構成され、それぞれの神経細胞は約 1 万のシナプス入力を受けていると言われており、非常に複雑な構造を呈するからである。

神経回路構造の解析は、19 世紀後半のゴルジ染色法の発見以来、免疫組織化学法や神経回路標識法 (各種トレーサー物質) など、常に先端技術の発展と共に歴史を刻んできたが、未だゴールが見えないのが現状である。現在は世界規模で神経回路構造のマッピング・包括的理解を目指すコネクトミクスが推進されており (1-3)、透明化技術の注目度はますます高くなっている。

しかし、透明化技術の究極的応用、すなわち、単一神経細胞レベル (cellular resolution) もしくは単一シナプスレベル (subcellular/synaptic resolution) で神経回路構造を三次元的に解析すべき実践的研究は、まだ始まったばかりある (4, 5)。これまでに蓄積されてきた神経解剖学の技術及び知識をもとに、透明化脳に特化した技術を基礎から開発・検証することが喫緊の課題であると考えている。本稿では、筆者らが開発し

キーワード: 透明化能力, 構造保持能力, 三次元構造解析, 脳, 神経回路

¹⁾ 京都大学 大学院医学研究科 高次脳形態学 (〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町)

国立研究開発法人理化学研究所 ²⁾ 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム,

⁴⁾ 光量子工学研究領域 エクストリームフォトリクス研究グループ 生命光学技術研究チーム (〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1)

³⁾ 自然科学研究機構 生理学研究所 基盤神経科学研究領域 大脳神経回路論研究部門 (〒444-8787 岡崎市明大寺町東山 5-1)

E-mail: hioki@mbs.med.kyoto-u.ac.jp 原稿受領日: 2017 年 1 月 5 日, 依頼原稿

Title: Application of tissue-clearing methods for dissecting brain structure

Author: Hiroyuki Hioki, Hiroshi Hama, Jaerin Sohn, Jung Won Hwang, Kana Namiki, Tetsushi Hoshida, Hiroshi Kurokawa, Atsushi Miyawaki

た透明化技術 ScaleS 法(6) について他の透明化技術と比較しながら, その特徴について議論したい。

2. ScaleS 法の特徴

2002 年に発表された FocusClear™ 法(7) は, 非常に限られた分野, 特に昆虫脳の構造解析で使用されてきた。2007 年には BABB 法(8) が出現したが, 蛍光タンパク質の蛍光を消失させるという欠点があり, 遺伝的蛍光標識の波に乗れなかった。2011 年の Scale 技術の発表以降, 実に多くの透明化技術が出現してきた。透明化技術全般については Susaki ら(9) や Richardson ら(10) の総説が詳しいが, 後者の総説にはいくぶんの間違いが含まれており, 注意が必要である。

多くの透明化技術は水溶性の試薬を用いており, 筆者らが開発してきた Scale 法(6, 11) に加えて, FocusClear™ 法(7), CUBIC 法(12, 13), SeeDB 法(14, 15), Clear^T 法(16), Economo らの方法(5) 等が挙げられる。また, 特殊な固定法により (アクリルアミド-ビスアクリルアミドアクリルアミド, もしくはアクリルアミドアミド単体を重合), 組織内にハイドロジェルを形成することでタンパク質をその場に留めさせ, その後水溶性試薬で透明化を行う CLARITY 法(17, 18) やその簡易版の PACT/PARS 法(19) 等がある。一方, 有機溶媒を用いた透明化技術としては, BABB 法(8), 3DISCO 法(20) やその改変法である iDISCO 法(21) や uDISCO 法(22) 等がある。

個々の透明化技術は異なる目的やアプローチから開発されたものであり, どの透明化技術を実際に採用するかは難しい問題である。研究者が自身の目的に応じた手法を選択することが望ましい。筆者らが実際に試した幾つかの透明化技術について, 努めて公正な視点から比較表を作っているので参考にできれば幸いである(6)。

透明化技術を比較する上で重要なポイントが「clearing-preservation spectrum」である。透明化能力 (clearing capability) の向上は, 散乱光の抑制につながり, 深部まで高精細な画像を取得するために大事である。しかし一方で, 透明化処理の影響によって組織の構築や標識シグナルの保持が悪くなるというトレードオフが厳存する。透明化を行う最大の目的は, 標識された構造物を再現よく定量的に観察することであり, 構造や各種シグナルを適切に保存・維持する能力 (preservation capability) も重要である。このトレードオフ問題に真正面から取り組み, 両者を高い次元で両立することに成功したのが ScaleS 法である (図 1)。

CLARITY 法や PACT/PARS 法では 4%~8% の SDS

図 1 各透明化技術の透明化能力と構造保持能力 (clearing-preservation spectrum)

透明化技術の特性について, 筆者らの実験結果をもとに簡単ながら分類した。なお, SeeDB 法は, 幼齢動物の組織に対する透明化能力は高いが, 成熟~加齢動物については透明化の程度が若干低いいため, このよう

に分類を行った。

が, CUBIC 法では 15% もの Triton X-100 が含まれている。散乱光を発する主な原因は, 細胞膜に含まれる脂質成分や細胞外基質であり, これらを取り除いて透明度を高めるために, 多くの透明化試薬には高濃度の界面活性剤が添加されている。透明化能力は優れているが, 組織に相応のダメージが生じると推測される。一方, ScaleS 試薬は界面活性剤を必要最低限しか含んでいない。最大でも 0.2% の Triton X-100 が含まれるのみである。界面活性剤によって積極的に脂質を除去するのではなく, 試薬中の尿素とソルビトールの作用によって透明化を実現している。これにより, 他の透明化技術よりも構造や各種シグナルを良好に保持することに成功している。また, SeeDB 試薬は界面活性剤を含まないことから, 組織へのダメージは少ないと思われる。しかし, 若齢動物組織に対する透明化の程度は高いものの, 成熟~加齢動物組織に対する透明化の程度は若干低い点に注意されたい。

まずは ScaleS 法の実際の手順について簡単に述べた後, ScaleS 法の特徴である①蛍光シグナルの保持, ②抗原性の保持, ③超微細構造の保持について説明する。

3. ScaleS 法による脳組織の透明化

ScaleS 法による透明化は, 基本的に液交換を主とする工程から成り, 誰でも簡単にできる技術である。4% (w/v) パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定を行った後, 同固定液を用いて後固定を 4°C で 3 日間行う。最初の固定を徹底することが, 各種構造の保持に重要である。その後, 組織を ScaleS0 液→ScaleS1 液→ScaleS2 液→ScaleS3 液と順番に, 37°C で 12 時間

表1 ScaleS 法による透明化の手順

処理内容	試薬・操作
灌流固定	4% PFA in PBS(-) ¹⁾
後固定	4% PFA in PBS(-) (3 日間, 4°C) ^{1,2)}
前処理	ScaleS0 (12 時間, 37°C) ³⁾
浸透化	ScaleS1 (12 時間, 37°C)
	ScaleS2 (12 時間, 37°C)
	ScaleS3 (12 時間, 37°C) ⁴⁾
deScaling	PBS(-) (6 時間以上, 4°C)
透明化	ScaleS4 (12 時間以上, 37°C)
マウント	ScaleS4 (室温)

¹⁾ 灌流固定と後固定には、通常の PBS を用いても問題無い、その際は、ScaleS0 液に浸す前に、PBS(-) で数時間 wash すること。

²⁾ 灌流固定がきちんと行われていれば、後固定はオーバーナイトでも問題無い。

³⁾ ここでは全脳もしくは脳半球の例を挙げているが、厚さが 1~2 mm 程度のスライスであれば、インキュベーションを各ステップで 3 分の 1 程度に短縮できる。対象とする組織によって、インキュベーション時間を考慮されたい。

⁴⁾ 各ステップでインキュベーション時間が多少前後しても問題無いが、ScaleS3 液では組織が膨張するため、インキュベーション時間は長くしない方がよい。

程度インキュベーションを行う (表1)。このステップで組織を収縮・伸展させることで、最終透明化液 ScaleS4 に含まれる成分の浸透向上を図っている。なお、これは脳半球もしくは全脳を対象としたインキュベーション時間であり、組織のサイズや性質によって短縮可能である。例えばビブラトームで作製した 1~2 mm 厚の前脳スライス標本の場合、4 時間程度のインキュベーションで十分である。その後、PBS(-) に浸して組織の体積を安定化させ (deScaling)、ScaleS4 液で透明化を行い、観察時にもこの ScaleS4 液を組織の浸漬液として用いる。

透明化した組織を共焦点レーザー顕微鏡や 2 光子励起顕微鏡で観察する際、屈折率のマッチングが重要なポイントになる。観察用の浸漬液に用いる ScaleS4 液の屈折率は 1.47 であり、それに対応した対物レンズを使用することが必要である。特に開口数の高い対物レンズを用いる場合 (高解像度)、屈折率のミスマッチが存在すると、サンプル表面からの深さに応じて画像の劣化が顕著となる。

各溶液の作製法から撮像に至るまで、Protocol Exchange にその詳細を記載しているので、参考になれば幸いである (23)。

4. 蛍光シグナルの保持

神経細胞が YFP を発現する遺伝子改変マウス (YFP-H) (24) の脳半球を用い、ScaleS 法、CUBIC 法、3DISCO 法、SeeDB 法にて透明化を行った (図 2a, b)。

写真とグラフからも分かる通り、透明度は 3DISCO 法 > CUBIC 法 > ScaleS 法 > SeeDB 法の順となり、ScaleS 法が透明化能力 (clearing capability) に特別長けているというわけではない。また、厚さ 2 mm のスライス標本を対象に PACT 法との比較を行ったが、ScaleS 法よりも PACT 法の方が透明度は高かった。

次に蛍光シグナルの測定を行った (図 2c, d)。明らかに、3DISCO 法で蛍光シグナルが大きく減弱してしまっている。透明化処理に有機溶媒を使用することで、蛍光タンパク質の β バレル構造がダメージを受けてしまったと考えられる。一方 ScaleS 法では、他の手法よりも強い蛍光シグナルを観察することができた。

また、本解析もそうであるが、多くの透明化技術論文で YFP-H マウスが使用されていることに注意しなければいけない。この系統は YFP を極端に強く発現することが知られており、透明化処理によって蛍光シグナルが減弱しても、撮影する設備と技術でカバーできると思われる。実際の研究・解析においては、蛍光タンパク質のシグナルを保持する ScaleS 法が活躍すると期待される。

なお、各透明化手法は常に進化を続けており、SeeDB2 法では透明度 (光透過性) が改善している (15)。蛍光シグナルの保持についても、uDISCO 法 (22) や SeeDB2 法 (15) で向上が図られており、さらに CUBIC 法もリソースサイトで蛍光の減弱を抑えた最新のプロトコルが公開されている (<http://cubic.riken.jp>)。詳しくは原著論文、リソースサイトを参照されたい。

5. 抗原性の保持

全脳やスライス標本など厚みのある脳組織に対し、充分に免疫染色を行うことは回路構造を包括的に解析する上で重要な技術である (三次元免疫組織化学法)。筆者らは、蛍光標識一次抗体を用いる直接法、蛍光標識二次抗体を用いる間接法について、三次元免疫組織化学法「AbScale 法」を開発している。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) や propidium iodide (PI) などの色素で染色する「ChemScale 法」も開発してきたが、その内容は他稿に譲る (6, 23, 25)。ここでは、透明化処理した組織の抗原性について考えてみたい。

免疫組織化学法においては、組織内の抗体の浸透性および抗原結合反応の向上を図る目的で、Triton X-100 や Tween-20 等の非イオン性界面活性剤がよく用いられる。筆者らが開発した ScaleS 法に含まれる界面活性剤は 0.2% Triton X-100 であり、通常の免疫組織化学法と同程度の条件である。抗原性の保持を確

図2 透明化処理後の蛍光シグナル

(a, b) YFP-H マウスの脳半球を ScaleS 法, CUBIC 法, 3DISCO 法, SeeDB 法で透明化し, 透明度と蛍光シグナルを解析した. ScaleS 法の透明化能力は特に優れているとは言えないが, 蛍光シグナルの保持は非常に良いことが分かる. (c, d) YFP-H マウスの脳から厚さ 2 mm のスライスを作製した後, ScaleS 法, PACT 法にて透明化を行った. 脳半球の結果と同じく, ScaleS 法は蛍光シグナルの保持に優れている. Scale bar=5 mm. (文献 6 から改変して転載)

かめる目的で, 次の検討を行った. まずは, 脳半球を ScaleS 法で透明化し, その後に PBS(-) に戻す. そして厚さ 40 μ m の凍結切片を作成し, 種々の抗体で免疫染色を行った (図 3). ScaleS 法で処理した切片は, コントロール切片と変わらない染色像を呈した.

CLARITY 法や PACT/PARS 法では, 透明化処理の過程で 4%~8% の SDS が用いられるが, アニオン性界面活性剤である SDS は強いタンパク質変性作用を持つことが知られている. 組織内のタンパク質はハイドロジェルによって強固に架橋されているが, SDS によって抗原分子がどの程度変性・流出してしまっているのかについて常に検証が必要である. また, CUBIC 法には 15% Triton X-100 が含まれており, 脂質成分が除去される際に, 標的とするタンパク質も同時に除去

されてしまう可能性も考えられる.

ただし「抗原性の保持」や「染色性」については, 用いる抗体の種類や組織学的処理 (透明化処理だけでなく, 固定法や切片作製法など一般的な組織学的処理を含む) との組み合わせによって変わりうるため, 特定の抗体での染色性のみで透明化技術間の比較を行うことは難しい. 実際, Lee らは CLARITY 法の改変版 (ACT-PREST 法) や CUBIC 法を用い, 多くの抗体が使用可能であることを示しており (26), 今後も「抗原性の保持」や「染色性」について慎重に検討していかなければならない.

三次元免疫組織化学法については, 具体的には以下のような実験が現実的であると筆者らは考えている. 遺伝子改変動物やウイルスベクターによって目的の構

図3 透明化処理後の抗原性

野生型マウスの脳半球を ScaleS 法で透明化処理を行った後、凍結切片を作製した。各種抗体を用いて、通常の免疫染色法を行った。CA3: cornu ammonis 3, MF: mossy fiber, SO: stratum oriens, SR: stratum radiatum. Scale bar=100 μ m. (文献6から改変して転載)

造物を標識し、全脳や脳半球を透明化して、まず大規模に低解像イメージングを行う。標識部位を同定し、実験目的に合わせて照準を定め、そこを含む切片を作製して高解像の免疫染色イメージングを行う。初めから全脳や脳半球に対して三次元免疫染色を行うことも一つの選択肢ではあるが、①使用する抗体の量が非常に多くなる、②取得した画像ファイルのサイズが大きくなり、膨大なデータ処理と保存が必要となる、③抗体によっては組織の奥まで浸透しにくいために各種検討が必要となる、などの現実的問題がある。それぞれの解析目的や状況に応じ、最適なプロトコルを選択すべきである。

6. 超微細構造の保持

光学顕微鏡は、光の回折限界を超えて超解像観察を可能にしつつある。しかしシナプス構造などの超微細構造を正確に捉えるには、やはり電子顕微鏡が必要不可欠である。シナプス構造は電子顕微鏡による観察を通じて初めて同定されるものである。かつて、ゴルジ博士が「神経は網状に連続的に繋がっている」という「網状説」を唱え、カハール博士は「ニューロンという基本単位がシナプスによって互いに連絡する」という「ニューロン説」を提唱して大論争を巻き起こし、最終的には電子顕微鏡観察によって決着がついたという歴史を想起したい(27, 28)。

電子顕微鏡観察においては、膜構造をきちんと保持した状態でサンプルを作製することが重要である。長年に渡る技術開発と知見の蓄積により、固定法から樹脂への包埋に至るまで、優れたプロトコルが確立されてきた。膜構造を保持するためには、①固定後すぐにサンプル作成に取りかかる(日数をおかない)、②界面活性剤はできる限り使用しない、③樹脂への包埋が完了するまで低温(4°C)で作業する、などといった細かい気配りが必要とされる。これら全てが透明化処理過程において障壁となり得る。例えば CLARITY 法や PACT/PARS 法では高濃度の SDS を用いており、膜構造の保持は困難であると思われる。実際、オリジナル論文の中で、固定法を改変した上で電子顕微鏡観察像を Supplementary Figure 4 で呈示しているが、膜構造のかなりのダメージが見て取れる(17)。

そこで筆者らは、野生型マウスの脳半球を ScaleS 法、CUBIC 法、3DISCO 法、厚さ 2 mm のスライス標本を PACT 法で透明化した後、透過型電子顕微鏡(TEM)で観察し、超微細構造の比較を行った(図4)。界面活性剤が多く含まれる CUBIC 法と PACT 法では、シナプス後膜はかろうじて観察されたものの、膜構造の大部分については破壊・溶解が認められた。有機溶媒を用いる 3DISCO 法でも同様の結果が得られ、TEM 観察には適さないと考えられる。一方で ScaleS 法の場合、界面活性剤が最低限に抑えられているためか、シナプス後膜だけでなく、シナプス前膜やシナプス小胞も観察でき、コントロールと比較しても十分に膜構造は保持されていた。ただし、ScaleS4 液に 4°C で数ヶ月浸したサンプルを観察したところ、膜構造がかなり破壊されていたことから、透明化処理後はできるだけ早くに TEM 観察を行うことが好ましいと思われる。

7. マクロからミクロへのズームイン

これまでに述べた ScaleS 法の特徴を生かし、高齢(14ヵ月)のアルツハイマー病モデルマウス(29)を用いて、全脳レベルの光学顕微鏡観察から超薄切片レベルの電子顕微鏡観察までのズームインに挑戦した。まずは脳半球で AbScale 法を行い、Alexa488 で標識されたマウスモノクローナル抗体(6E10)でアミロイド斑を標識した(図5a, b)。ScaleS 法は透明な状態のままスライシングできる利点があり、本解析では厚さ 2 mm のスライスを透明な状態のまま作製した。そして、蛍光実体顕微鏡で観察を行い、一つのアミロイド斑に標的を定めた(図5b, c)。PBS(-)に浸した後(deScaling)、ビブラトームにて厚さ 50 μ m の切片を作製し、標的アミロイド斑を共焦点レーザー顕微鏡で再

図4 透明化処理後の超微細構造

野生型マウスの脳半球をScaleS法(a~c), CUBIC法(d~f), 3DISCO法(j~l)で、厚さ2mmの脳スライスをPACT法(g~i)で透明化処理した後にPBS(-)に浸し、1mmの立方体を各サンプルから切り出した。エポキシ樹脂に包埋した後、厚さ70nmの超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で観察を行った。コントロールとして、透明化処理をしていないサンプルも観察した(m~o)。矢頭はシナプス部位を示す。Scale bar=400 nm。(文献6から改変して転載)

度観察した(図5d)。ABC法にて3,3'-diaminobenzidine (DAB)をアミロイド班に沈着させ、さらにエポキシ樹脂に切片を包埋した後(図5e), 厚さ70nmの超薄切片を作製してTEMで観察を行った(図5f)。このようにして、全脳レベルから超微細構造レベルへのズームインに成功した。

このズームインの成功には、実はタネがある。本解析で標的としたアミロイド班の右上に大きな血管が存在し、この血管を目印としてズームインを行ったのである。しかし毎回運良くこのような目印が存在するとは限らない。そこで現在は、狙った構造物を物理的・化学的にマーキングして目的地をセットし、マクロからミクロに至る経路を最適化することで、スムーズなズームインを実現する技術(ズームインナビゲーション)に取り組んでいる。透明化処理された脳に対して光学顕微鏡的イメージングを行った後、必要な部位を電子顕微鏡で観察することで、光学顕微鏡と電子顕微鏡の対応(LM-EM correlation)を効率的に行う技術を確認し、二つの観察法にまたがる「究極のズームイン」を目指している。

8. 今後の展望

「かたちをよくみる」バイオイメージングは、生命現象の真理を理解する上で非常に重要なステップであり、「標識」「観察」「解析」といった各要素において様々な技術が要求される。遺伝子工学技術等の発展により、「標識」技術は目覚ましい進歩を遂げてきた(30)。そして本稿で取り上げた透明化技術の台頭により、「観察」「解析」に新たなブレイクスルーをもたらすと期待され、バイオイメージングは今まさに新たな時代を迎えようとしている。これまでの、ミクロトーム等で作製した薄切切片(20~50μm程度)を観察し、可視化された構造物の形態学的特徴・回路構造の解析を地道に行うことがスタンダードであった(31, 32)。しかしその解析プロセスは莫大な時間と労力を要し重大な律速段階となっている。透明化技術はこれら量的問題を解決するだけでなく、従来見えなかったものを見るという質的变化を促すものである。その技術的インパクトから世界中の研究者が注目しているところである。

しかし、透明化された脳組織を活用して、単一神経細胞レベル(cellular resolution)もしくは単一シナプスレベル(subcellular/synaptic resolution)で神経回路構造を三次元的に解析する「真の応用」はまだ始まったばかりである。①個々の研究者の目的に応じた透明化技術、②厚みのある組織に対してムラなく染め上げる三次元免疫組織化学(3D-IHC)、③対象とする構造物をきちんと捉える光学顕微鏡技術(対物レンズ・検出器・撮影法など)、④得られた撮像データを処理するソフトウェア群と膨大データを効率的に管理する方法、⑤光学顕微鏡の枠を超え、超微細構造解析を目的とした電子顕微鏡イメージングまで拡張し、「マクロ-メゾ-ミクロ」の各階層をシームレスに解析する

図5 アミロイド斑を全脳レベルから電子顕微鏡レベルにズームイン

(a~c) ヒトのアルツハイマー病患者の病理を忠実に再現するモデルマウス (14 ヶ月齢) の脳半球で AbScale 法を行い, Alexa488 で標識されたマウスモノクローナル抗体 (Alexa488-6E10) でアミロイド斑を可視化した。透明な状態のままスライサーで 2 mm 厚のスライスを作製し, 蛍光実体顕微鏡で, ある特定のアミロイド斑に注目した。(d, e) PBS(-) で復元処理を行った後に再固定し, ピプラトームで厚さ 50 μm の切片を作製した。共焦点レーザー顕微鏡で, 注目しているアミロイド斑を観察した後, ABC 反応を通じて DAB を沈着させ, 切片をエポン樹脂に包埋した。(f) 厚さ 70 nm の超薄切片を作製し, 透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。なお, アミロイド斑が形成されている部位には, シナプスがほとんど観察されなかった。(文献 6 から改変して転載)

「ズームイン・ズームアウト」技術等, 透明化脳解析に特化した各技術項目を, 基礎から開発・検証していきたいと考えている。

また, これまで形態学的解析を積極的に行っていなかった実験系にこそ, 透明化技術の威力が発揮されるのではないかと期待している。例えば, 急性スライス標本で電気生理学的記録を行う際, 細胞内に蛍光色素を注入しておけば, 透明化処理後に光学顕微鏡で観察することにより, 三次元構造情報をそのままデータ化することができる。本稿では誌面の都合上で取り上げなかったが, ライトシート顕微鏡やスピニングディスク顕微鏡を用いれば, 高精細な画像データを高速に得ることができ, これまでは時間や労力の都合で行っていなかった形態解析が簡単に遂行できるようになる。また別の機会に, 神経生理学との融合を展望したい。

透明化技術を取り巻く環境はまだ発展途上にあるが, 多くの研究者が早期に参画されることを願っている。気軽に質問や意見をいただければ幸いである。透明化およびそれに関連する技術において浮かび上がってくる課題に取り組みながら, 次世代の「形態解析学」を創り上げていきたい。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Glasser MF, et al. Nat Neurosci. 2016;19:1175-1187.
- 2) Lichtman JW, et al. Nat Neurosci. 2014;17:1448-1454.
- 3) Pastrana E. Nat Methods. 2013;10:481.
- 4) Ye L, et al. Cell. 2016;165:1776-1788.
- 5) Economo MN, et al. eLife. 2016;5:e10566.
- 6) Hama H, et al. Nat Neurosci. 2015;18:1518-1529.
- 7) Chiang AS, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:37-42.

- 8) Dodt HU, et al. Nat Methods. 2007;4:331-336.
- 9) Susaki EA, et al. Cell Chem Biol. 2016;23:137-157.
- 10) Richardson DS, et al. Cell. 2015;162:246-257.
- 11) Hama H, et al. Nat Neurosci. 2011;14:1481-1488.
- 12) Susaki EA, et al. Cell. 2014;157:726-739.
- 13) Tainaka K, et al. Cell. 2014;159:911-924.
- 14) Ke MT, et al. Nat Neurosci. 2013;16:1154-1161.
- 15) Ke MT, et al. Cell Rep. 2016;14:2718-2732.
- 16) Kuwajima T, et al. Development. 2013;140:1364-1368.
- 17) Chung K, et al. Nature. 2013;497:332-337.
- 18) Tomer R, et al. Nat Protoc. 2014;9:1682-1697.
- 19) Yang B, et al. Cell. 2014;158:945-958.
- 20) Erturk A, et al. Nat Protoc. 2012;7:1983-1995.
- 21) Renier N, et al. Cell. 2014;159:896-910.
- 22) Pan C, et al. Nat Methods. 2016;13:859-867.
- 23) Hama H, et al. Protocol Exchange. 2016. doi:10.1038/protex.2016.019.
- 24) Feng G, et al. Neuron. 2000;28:41-51.
- 25) 濱 裕, 他. 生体の科学. 2017;68:85-93.
- 26) Lee E, et al. Sci Rep. 2016;6:18631.
- 27) De Robertis ED, et al. J Biophys Biochem Cytol. 1955;1:47-58.
- 28) Rebhun LI. J Biophys Biochem Cytol. 1956;2:93-104.
- 29) Saito T, et al. Nat Neurosci. 2014;17:661-663.
- 30) Hioki H. Anat Sci Int. 2015;90:7-21.
- 31) 中村 悠, 他. 細胞. 2015;47:206-209.
- 32) 倉本 恵, 他. 顕微鏡. 2011;46:125-131.

著者プロフィール

日置 寛之 (ひろき ひろゆき)

京都大学 大学院医学研究科 高次脳形態学, 助教, 博士 (医学) (京都大学)。

◇研究テーマ：『構造無き機能は無い』という旗標を掲げ, 脳が認知・思考・記憶・感情といった高次機能を実現する仕組みの謎に, 形態学的視点から挑みます。皮質構

築のグランドデザインを解説し, 新たなコンセプトを打ち建てます。また, 形態解析で得られた知見をもとに, 分子生物学・生理学・理論神経科学などへと分野横断的に研究を展開する『攻めの形態学』を推進します。形態解析を基点とした研究体系を創成し, 高次機能を実現する大脳新皮質の動作原理解明を目指しています。