

脱脂による高度な全脳透明化と三次元イメージング

東京大学大学院医学系研究科システムズ薬理学教室 講師
科学技術振興機構さきがけ
理化学研究所生命システム研究センター合成生物学研究グループ
洲崎 悦生

組織透明化とは

生体臓器は単位となる細胞より構成され、三次元的な構造をもつため、臓器全体を三次元的に細胞解像度で観察したいという発想はごく自然である。しかしながら、長い解剖学・組織学の歴史上でもこのようなアイデアは実現が困難であり、2007年のDodtらの論文¹⁾を皮切りにした近年の高度な組織透明化技術と光学顕微鏡による細胞解像度の三次元観察により、ようやく実現の端緒を得た。組織透明化は①組織内の光散乱の減少、②組織内の光吸収の減少の2点を達成することにより実現する(図①)²⁾。特に、脳のような脂質が豊富で色素が比較的少ない臓器では、主に①のメカニズムにより透明化が達成されると考えられる。

脂質は周囲の蛋白質などの生体構成成分に比べその屈折率が高く、また組織中で小胞など光と強く干渉する構造をとるため、組織中の主要な光散乱体となる。このため、全脳観察に必要な高度な組織透明化を達成するプロトコルは、有機溶剤^{1,3,4)}、界面活性剤^{5,6)}、電気泳動⁷⁾などによる脱脂過程を含む(表)。さらに、脱脂後の組織成分(主に蛋白質)と光学特性の近い溶媒(屈折率調整剤)を加えることにより、組織中の光の散乱が最小限に抑えられることで組織透明化が完了する(図②)。

組織透明化による全脳三次元イメージング

透明化した組織は光学顕微鏡、特に蛍光三次元イメージングに使用される共焦点顕微鏡、多光子顕微鏡、ライトシート顕微鏡などによって三次元観察が可能である(図③)。なかでも、臓器全体の観察を行う場合にはイメージング速度が問題となるため、三次元観察を高速に行うことが可能なライトシート顕微鏡の適応が顕著である。ライトシート顕微鏡は透明体の側方からシート状に広げた励起光を照射し、透明体内部の特定のz位置に「光学切片」を作製する。この断面を90度方向からCCDカメラやCMOSカメラなどで二次元写真として撮影することで、高速な画像取得を可能とする(図③)。すでに高度な組織透明化とライトシート顕微鏡を組み合わせたげっ歯類全脳、あるいは霊長類半脳のイメージング例が報告されている(図③)。透明化組織に使用できるライトシート顕微鏡としてはLaVision BioTecのUltramicroscopyやCarl Zeiss MicroscopyのLightsheet Z.1などが市販されているほか、独自にカスタム顕微鏡をつくることも可能である⁸⁾。透明化組織とライトシート顕微鏡による全脳イメージング適応例には大規模なサンプル数を対象とした全脳神経活動⁹⁾(後