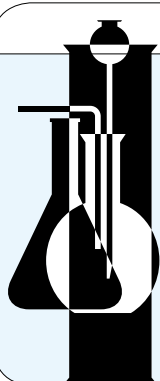


実験講座



descSPIM

ユーザーアフォードブルな DIY 透明化組織用小型ライトシート顕微鏡

野沢 裕貴 大友 康平 大村 鷹希 洲崎 悦生

Key words : 組織透明化, ライトシート顕微鏡, descSPIM, オープンソース, Do it yourself (DIY)

ギリシア語の接尾辞“すべて(ome)”と“学問(ics)”を組み合わせた“オミクス(omics)”は、ライフサイエンス分野において“生体分子全体の網羅的解析”を意味する造語である。そのなかでも筆者らが提案する全細胞網羅的な情報解析ワークフロー“セルオミクス”は、組織透明化、三次元組織染色、(細胞解像度の)三次元イメージング、三次元画像処理・解析など多くの要素技術により構成される^{1,2)}。本稿では、このうち三次元イメージング技術において、筆者らが開発した高速かつ低価格・低専門性で導入可能なユーザーアフォードブルな小型ライトシート顕微鏡「descSPIM」の位置づけとその展望について概説する。

I. 組織透明化とライトシート顕微鏡の現状

組織透明化とは、生体組織試料に化学処理を施し、標本中の光の散乱や吸収を抑制することによって光学的に透明にする技術である。この技術は、組織の物理的な切削・薄切を行わずとも、組織全体の三次元イメージング解析を可能にする方

法であり、主要なものは、①有機溶媒による透明化法、②水溶性試薬による透明化法、③組織をハイドロゲルに架橋する透明化法(HTC)に分類される。生体組織透明化の初の報告は19世紀のドイツ人解剖学者 Werner Spalteholz まで遡るが³⁾、現在の網羅的な組織透明化技術は1980年代に報告された古典的な有機溶媒である安息香酸ベンジル(BABB)ベースの手法⁴⁾に端緒をなしていると言える。特に2010年代に入ってから本法は加速度的な技術発展を遂げた。有機溶媒を用いた手法(3DISCO)⁵⁾、筆者らが開発した脳組織における高い透明度と蛍光保持性を持つアミノアルコールベースの透明化と画像解析法(CUBIC)^{6,7)}、ポリエチレングリコール(PEG)関連溶媒を用いた手法(PEGASOS)⁸⁾、微小ミセルによる効率的なヒト臓器透明化とラベリング法(SHANEL)⁹⁾、アクリルアミドベースのハイドロゲルと生体組織を重合させ界面活性剤で脂質を除去する手法(CLARITY)¹⁰⁾、分子内エポキシリンケージを通じて組織の安定化を図った手法(SHIELD)¹¹⁾などが、臓器・全身スケールの三次元生体イメージング目的に最適化され、現在では成熟した技術とし

descSPIM: a user-affordable and DIY-friendly light sheet microscopy for tissue clearing users

Nozawa Yuki : 順天堂大学医学部生化学第二講座(〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1)

Otomo Kohei : 順天堂大学医学部生化学第二講座, 順天堂大学大学院医学研究科生化学・システム医科学, 順天堂大学大学院医学研究科中谷生体空間オミクス医療解析拠点, 自然科学研究機構生理学研究所バイオフィotonics研究部門, 自然科学研究機構生命システム研究センターバイオフィotonics研究グループ

Omura Takaki : 順天堂大学大学院医学研究科生化学・システム医科学, 順天堂大学大学院医学研究科中谷生体空間オミクス医療解析拠点, 東京大学脳神経外科, 国立がんセンター中央病院脳脊髄腫瘍科

Susaki A. Etsuo : 順天堂大学医学部生化学第二講座, 順天堂大学大学院医学研究科生化学・システム医科学, 順天堂大学大学院医学研究科中谷生体空間オミクス医療解析拠点

0370-9531/12/¥500/論文/JCOPY

て多くの生物学・医学応用例が存在する¹²⁻¹⁵⁾。

ライトシート蛍光顕微鏡 (LSFM)¹⁶⁾ とは、試料に対してシート状の励起光を照射し、光学断層像を得る手法である。シート状の照明を用いた光学顕微鏡は 20 世紀初頭、現オーストリア出身の化学者 Richard Adolf Zsigmondy が微小な金粒子観察に用いた微粒子顕微鏡にまで遡るが¹⁷⁾、2004 年に欧州分子生物学研究所の Ernst H. K. Stelzer らの研究グループにより蛍光イメージング技術が応用されたことが、今日の技術展開につながっている¹⁸⁾。黎明期において Stelzer らは、選択的平面照明顕微鏡 (SPIM)¹⁸⁾ とデジタル走査ライトシート顕微鏡 (DSLM)¹⁹⁾ の 2 種類のライトシート蛍光顕微鏡を報告した。SPIM はシリンドリカルレンズを使用して静的励起光シートを生成するのに対し、DSLM は、ガルバノメーターミラーを使用して軸方向に狭く焦点を当てたレーザー光を走査してライトシートを生成する。これらは、2010 年代に組織透明化技術が活発に開発される前に提案された概念であり、当初の目的はハエの胚や魚の幼生のような小型で半透明な標本を生きたまま 3D (xyz) や 4D (xyzt) でイメージングすることであった^{18, 19)}。

これらの手法で生成される励起ライトシートは、軸方向の空間分解能と有効視野 (effective FOV; eFOV) の間にトレードオフの関係が生じる²⁰⁾。この問題は、ライトシートで空間的に小領域(タイル)に分割し撮影するタイリングという手法によって視野を拡張する tiling LSFM²¹⁾ や、軸方向にわたって連続的に焦点を移動させて画像を撮影する手法である axial sweep 法²²⁾ により解決され、空間分解能を損なわず eFOV を拡張する方法が報告されている。ほかにも目的別に最適化された例がいくつか報告されている。まずは、ガルバノメーターミラーの周期と視野上側から順に走査的に撮像するローリングシャッターを同期させることによるノイズ低減^{23, 24)} 法であり、DSLM ベースの手法として提案された。ほかにも、高時空間分解能で組織深部を観察する目的で、非回折ビームベースのライトシートを利用したアプローチが報告されており、ベッセルビーム²⁵⁻²⁷⁾、エアリービーム²⁸⁾、格子状光シート²⁹⁾ などの活用の有効性

が示されている。

組織透明化技術とライトシート蛍光顕微鏡法の有機的融合は、2007 年に Hans-Ulrich Dodt らにより実現された。低開口数 (numerical aperture; NA) のライトシート蛍光顕微鏡によって、透明化したマウス脳やショウジョウバエ個体の網羅的 3D 撮像が行われたことは、今日の普及における概念証明であった¹⁶⁾。実装が現実化したことを受け、これらの比較的低い NA の光学系は対象試料に合わせた最適化が進んだ³⁰⁻³³⁾。初期に報告された透明化試薬の多くは、組織の透明度向上とシグナル保持性がトレードオフの関係にあったが、2010 年以降の組織透明化技術の発展は、ライトシート顕微鏡観察を 1 つの主眼としており、最適化が進んだ。現在では Zeiss 社や Miltenyi Biotec 社らに代表される市販機から、オープンソースプロジェクトの mesoSPIM など³¹⁾ のライトシート顕微鏡が透明化組織用に実用化されており、多くの生物学・医学研究成果が報告されている。

II. ユーザーアフォーダブルな ライトシート顕微鏡の開発

組織透明化技術は既に実用化が進んでおり、詳細なプロトコルや製品として多くのエンドユーザーが容易にアクセス可能となっている。前述のライトシート顕微鏡の技術展開は、本法に対する生物学・医学研究者からの強いニーズを反映している。しかし、ライトシート顕微鏡はいまだエンドユーザーにまで普及が及んでいない状況である (図 1)。ライトシート顕微鏡は高度な顕微鏡システムとして市販化されているものの、その価格帯は 5,000 万円を上回り、導入費用面において障壁が存在する。また、現在もライトシート顕微鏡は技術革新が進んでおり、様々な新規方法論が報告されているが、真に生体組織の三次元観察を切望する生物学・医学研究者が自身で構築・運用することは極めて困難である。

これらの一部は、その導入を助けるオープンソース化がなされており、費用としては市販機の数分の 1 程度で導入可能ではあるものの、構築に際して高度な光学専門知識を要する。mesoSPIM³¹⁾ や、その最新機 Benchtop mesoSPIM³³⁾ ではその

障壁がある程度軽減されているが、その導入対象は専門家やイメージング施設などに限られているのが現状である。ほかにも初期のオープンソースプロジェクトとして OpenSPIM³⁴⁾ や OpenSpin microscopy³⁵⁾ が存在するが、現代の透明化試料観察への最適化はされていない。また、費用対効果を高めた例としては LEGO® ベースの LEGOlsh, ポケットレーザープロジェクターベースの投影型ライトシート顕微鏡 (pLSM)³⁶⁾ などが報告されているが、ルーチン実験に耐え得る性能であるかには議論の余地が残る。

筆者らはこれらの現状を鑑み、ユーザーアフォーダブルな DIY 透明化組織用小型ライトシート顕微鏡 descSPIM を開発した (図 2)³⁷⁾。descSPIM は低価格 (2 万ドル～), 低専門性で構築可能な、文字どおり“デスク”サイドの広さでの運用が可能な小型ライトシート顕微鏡である。設計難易度は非専門家レベルまで最適化され、誰もがブロックトイのように構築が可能である。30×45 cm ブレッドボード上に 90 個程度の部品を配置し、ネジ止めするのみで実現できる最小限の SPIM セットアップである。レーザー光源以外の部品はすべて単一のメーカー (Thorlabs 社) から購入可能で、導入時の利便性が高い。手動の粗微動 x , y 軸, 粗動 θ 軸を備えた試料ステージと検出光学系には 2 台の z 軸電動モーターを配置し、これらをライトシートに対して同期スキャンすることによって三次元像を取得する。試料ステージの z 軸方向のスキャンに対し、検出光学系を追従させることで、四面透過キュベット (ガラスまたはプラスチック) に試料を封入した空浸系での撮像が可能である。これは、一般的なオイルチャンバーを利用する系に比べて小型であり、ハンドリングに優れる。取得画像の xy 軸方向の解像度と視野は検出光学系に依存し、 xy 軸方向解像度は $\sim 4 \mu\text{m}$, 視野は x 軸方向に $\sim 7.5 \text{ mm}$, y 軸方向に $\sim 14 \text{ mm}$ であった。

ここで、実際の蛍光イメージングにおける有効視野は、ライトシートの照射条件によって異なることに留意が必要である。ライトシートの生成に用いるシリンダカルレンズは、焦点距離の異なる 2 種類を準備し ($f=150 \text{ mm}$, $f=500 \text{ mm}$), そ

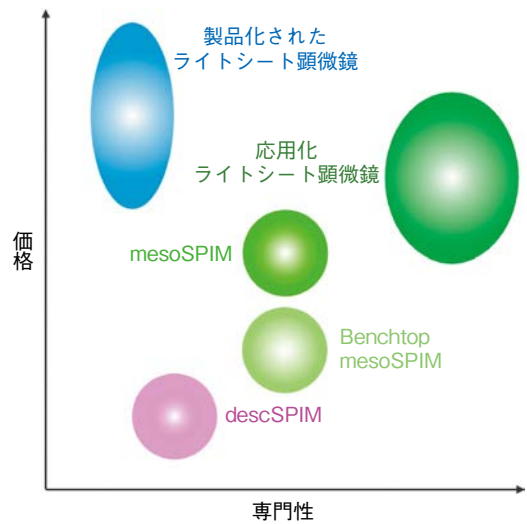


図 1 透明化組織用ライトシート顕微鏡の導入に要する費用と顕微光学に関する専門性

れぞれ z 軸方向解像度を高めた fine axial (FA) モード (z 軸方向解像度: $7.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$, x 軸方向有効視野: $889 \mu\text{m}$) と広視野の full FOV (FF) モード (z 軸方向解像度: $25.1 \pm 0.0 \mu\text{m}$, x 軸方向有効視野: 11.0 mm) の 2 種類のイメージングモードを、簡易なレンズ交換によって実現できる仕様とした。搭載励起レーザー光の本数は導入者が自由に選択可能であり、筆者らは 4 色 (Cobolt, Skyra, 488 nm/50 mW, 515 nm/50 mW, 561 nm/50 mW, and 647 nm/50 mW) を利用した。レーザー光はガウス分布で出射されるため、シリンダカルレンズによる影響を受けない y 軸方向の有効視野は、この強度分布を反映したものとなる。蛍光輝度の不均一性を補償するために、蛍光色素溶液を同一条件で撮像し、これを参照に輝度補正を行うフラットフィールド補正 (FFC) 法を導入した。

descSPIM は、メーカーが提供する CMOS カメラ、アクチュエーター専用 GUI (Thorlabs 社: ThorCamTM, Kinesis[®]) をそれぞれ独立に操作することによって三次元像を取得可能である。本方法論が最も簡易であることから第一選択肢として提案したが、本法は繰り返し測定の際の位置再現性に問題があった。このことから、新たに制御ソフトウェアも開発し、GitHub においてオープンソース化した (<https://github.com/dbsb-juntendo/>)

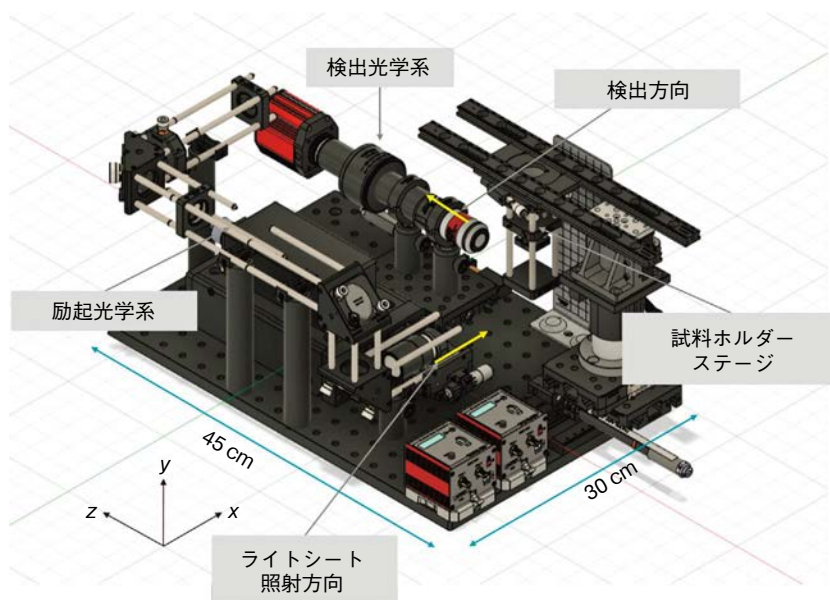
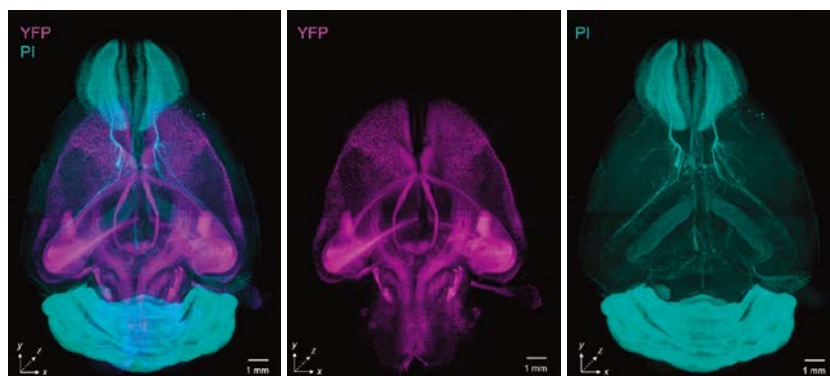


図 2 descSPIM 3D 図面

図 3 透明化した *Thy1-YFP-H* Tg マウス全脳の descSPIM による三次元イメージ

descSPIM)。ユーザーガイドに従ったインストールによって graphical user interface (GUI) ベースのソフトウェアを導入可能であり、ほぼ全自動の三次元スタック撮像が可能となる。すべて Python とオープンソースの顕微鏡用ソフトウェアパッケージである μ Manager を利用して作成されており、ユーザーが使用目的に合わせてコードを追加、改変 (Python, μ Manager における macro) することが容易である。

descSPIM は簡易的に透明化標本の細胞解像度の三次元撮像を実現するが、本稿ではこのうち、高度なアプリケーション作例を紹介したい。ま

ず、図 3 に透明化した *Thy1-YFP-H* トランスジェニック (Tg) マウス³⁸⁾ 全脳に対し、propidium iodide (PI) によって核染色を施した試料の 2 色三次元イメージを示す。マウス全脳の水平面は descSPIM の有効視野よりも大きいことから、4 領域に分割して三次元撮像を行った (励起波長: 488 nm, 561 nm)。4 つの三次元像のレジストレーションを実現するために、筆者らは Python, オープンソースツールキット advanced normalization tools (ANTs)³⁹⁾ および ImageJ/FIJI 上の BigStitcher⁴⁰⁾ を用いた半自動レジストレーション・領域結合ワークフローを開発した。本法につ

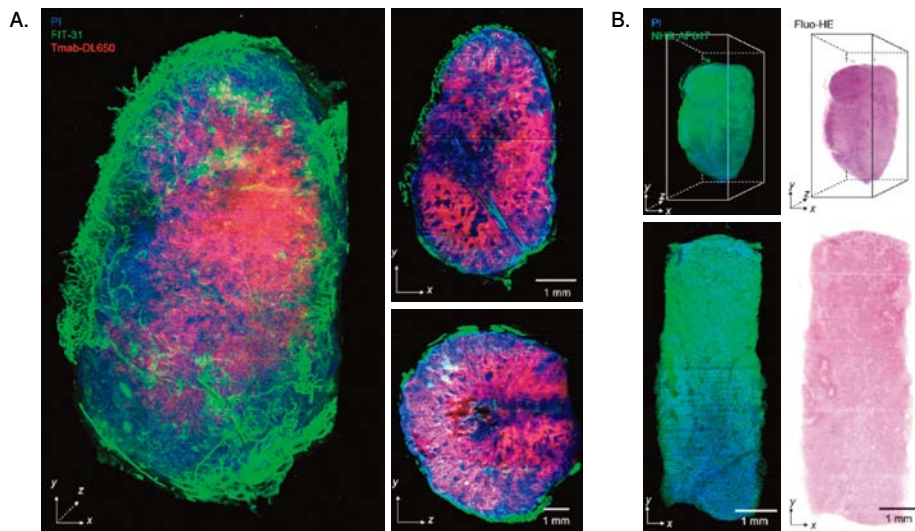


図 4 透明化 CDX モデルマウスのヒト乳がん細胞株 BT-474 由来腫瘍における三次元血管・抗がん剤分布および細胞核標識像

いても、GitHub においてオープンソース化した (<https://github.com/dbsb-juntendo/descSPIM>)。

更に、図 4A にはヒト乳がん細胞株 BT-474 のがん細胞由来異種移植片 (CDX) における血管、抗がん剤の三次元分布イメージを示す。CDX モデルマウスにあらかじめ蛍光色素 DyLight™650 で標識した抗がん剤トラスツズマブ (抗 *HER2* 抗体分子標的薬) と蛍光色素 FITC で標識した血管マーカー *CD31* 抗体を投与したのち、摘出して、PI による細胞核標識を行い、透明化した腫瘍全体を撮像した (励起波長: 488 nm, 515 nm, 647 nm)。これにより、腫瘍中の抗がん剤と微小血管ネットワークの三次元分布の定量解析を可能とした。また、近年の病理学における最先端トレンドであるデジタル化・三次元化のデモンストレーションにも成功した。CDX モデルマウスから摘出した腫瘍塊を 2 mm 厚のスライスとし、透明化すると共に細胞核と細胞質を蛍光標識し、イメージングを行った。この標識対象は病理解析のゴールドスタンダードであるヘマトキシリン&エオシン (HE) 染色が標識しているものとはほぼ同等であり、擬似カラーを HE 染色標本と同じ色調に変換することによって、三次元的な病理標本イメージを得ることに成功した (図 4B)。デスクサイ

ド観察のコンセプトを崩さずに、本技術を病理学分野に受け入れられるクオリティまで高められれば、診断の効率化への多大な貢献が期待できる。

これらの結果は、descSPIM の生物学・医学研究の現場における即戦力としてのポテンシャルを示すものである。臓器レベルの巨大な試料の、細胞解像度三次元撮像・解析のハードルを下げることは、基礎科学研究のみならず、臨床医学研究も含めた幅広い分野に貢献することが期待される。

これまで、descSPIM は従来のライトシート顕微鏡における費用、専門知識、解像度など両立の難しいトレードオフに対し、一定の成果を挙げたことを議論してきた。本機は、ライトシート顕微鏡導入の足がかりとして重要な役割を期待できるものの、現状の基本システムデザインにおいては、descSPIM のコンセプトである DIY 精神に基づき、目的別の改変をハードウェアに対して加えることが解決方策となり得る。具体的には、ガルバノメーターミラーを追加することによる Multidirectional-SPIM 機構⁴¹⁾ の導入 (DSLM 化は、ライトシート固有の問題である縞状アーティファクトの発生を抑え、*z* 軸方向の解像度の向上に寄与する)、また単に高倍・高開口数のレンズや広視野カメラへの代替によっても、*xy* 軸方向の高解像度化や広視野化が期待できる。更に、他

チャンネル分光検出系の導入に、線形アンミキシング計算処理の併用は、搭載励起レーザー光本数を超える多色の同時観察⁴²⁾を可能とすると考えられる。これらは、筆者らの研究グループのみならず、descSPIM を導入済みの研究グループのうち幾つかが、自身の興味対象に合わせてシステムを様々な方向に高度化している事例であり、今後も更なる展開が期待される。

おわりに

descSPIM は、従来のライトシート顕微鏡において両立し難いトレードオフである導入コストと専門知識の双方の問題を解決し、更にサブ細胞レベルの三次元解像度を実現する透明化組織用ライトシート顕微鏡である。本機のようなエンドユーザー向けのライトシート顕微鏡の“一家に 1 台”ならぬ、“一研究者に 1 台”レベルでの普及は、組織透明化が多くの研究者の手の届くものとなった今、セルオミクスのワークフローによる三次元組織の全細胞網羅的解析を更に普及させる足がかりになることが期待される。

●文 献

- 1) 洲崎悦生 : 生化学, **94** : 26-36, 2022
- 2) Mitani TT, Susaki EA, Matsumoto K, Ueda HR : *Nat Methods*. **21** : 1138-1142, 2024
- 3) Spalteholz W : On the transparency of human and animal specimens, S. Hirzel, Leipzig, 1911
- 4) Dent JA, Polson AG, Klymkowsky MW : *Development*. **105** : 61-74, 1989
- 5) Ertürk A, Becker K, Jährling N et al : *Nat Protoc*. **7** : 1983-1995, 2012
- 6) Susaki EA, Tainaka K, Perrin D et al : *Cell*. **157** : 726-739, 2014
- 7) Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA et al : *Cell Rep*. **24** : 2196-2210, 2018
- 8) Jing D, Zhang S, Luo W et al : *Cell Res*. **28** : 803-818, 2018
- 9) Zhao S, Todorov MI, Cai R et al : *Cell*. **180** : 796-812, 2020
- 10) Chung K, Wallace J, Kim SY et al : *Nature*. **497** : 332-337, 2013
- 11) Park YG, Sohn CH, Chen R et al : *Nat Biotechnol*. **37** : 73-83, 2018
- 12) Ueda HR, Dodt HU, Osten P et al : *Neuron*. **106** : 369-387, 2020
- 13) Ueda HR, Ertürk A, Chung K et al : *Nat Rev Neurosci*. **21** : 61-79, 2020
- 14) Richardson DS, Guan W, Matsumoto K et al : *Nat Rev Methods Primers*. **1** : 84, 2021
- 15) Susaki EA, Takasato M : *Front Cell Dev Biol*. **9** : 679226, 2021
- 16) Dodt HU, Leischner U, Schierloh A et al : *Nat Methods*. **4** : 331-336, 2007
- 17) Zsigmondy R, Siedentopf H : *Ann Phys*. **10** : 1-39, 1903
- 18) Huisken J, Swoger J, Del Bene F et al : *Science*. **305** : 1007-1009, 2004
- 19) Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EH : *Science*. **322** : 1065-1069, 2008
- 20) Stelzer EHK, Strobl F, Chang BJ et al : *Nat Rev Method Prim*. **1** : 73, 2021
- 21) Gao L : *Opt Express*. **23** : 6102-6111, 2015
- 22) Dean KM, Fiolka R : *Opt Express*. **22** : 26141-26152, 2014
- 23) Baumgart E, Kubitscheck U : *Opt Express*. **20** : 21805-21814, 2012
- 24) de Medeiros G, Norlin N, Gunther S et al : *Nat Commun*. **6** : 8881, 2015
- 25) Fahrbach FO, Rohrbach A : *Opt Express*. **18** : 24229-24244, 2010
- 26) Gao L, Shao L, Chen BC, Betzig E : *Nat Protoc*. **9** : 1083-1101, 2014
- 27) Takanezawa S, Saitou T, Imamura T : *Nat Commun*. **12** : 2979, 2021
- 28) Vettenburg T, Dalgarno HI, Nyk J et al : *Nat Methods*. **11** : 541-544, 2014
- 29) Chen BC, Legant WR, Wang K et al : *Science*. **346** : 1257998, 2014
- 30) Stefaniuk M, Gualda EJ, Pawlowska M et al : *Sci Rep*. **6** : 28209, 2016
- 31) Voigt FF, Kirschenbaum D, Platonova E et al : *Nat Methods*. **16** : 1105-1108, 2019
- 32) Susaki EA, Shimizu C, Kuno A et al : *Nat Commun*. **11** : 1982, 2020
- 33) Vladimirov N, Voigt FF, Naert T et al : *bioRxiv*. June 21, 2023. doi : <https://doi.org/10.1101/2023.06.16.545256>
- 34) Pittrone PG, Schindelin J, Stuyvenberg L et al : *Nat Methods*. **10** : 598-599, 2013
- 35) Gualda EJ, Vale T, Almada P et al : *Nat Methods*. **10** : 599-600, 2013
- 36) Chen Y, Chauhan S, Gong C et al : *bioRxiv*. July 18, 2023. doi : <https://doi.org/10.1101/2023.05.31.543173>
- 37) Otomo K, Omura T, Nozawa Y et al : *Nat Commun*. **15** : 4941, 2024
- 38) Feng G, Mellor RH, Bernstein M et al : *Neuron*. **28** : 41-51, 2000
- 39) Avants BB, Epstein CL, Grossman M, Gee JC : *Med Image Anal*. **12** : 26-41, 2008
- 40) Hörl D, Rojas Rusak F, Preusser F et al : *Nat Methods*. **16** : 870-874, 2019
- 41) Huisken J, Stainier DY : *Development*. **136** : 1963-1975, 2009
- 42) Jahr W, Schmid B, Schmied C et al : *Nat Commun*. **6** : 7990, 2015