実験講座

# descSPIM
## 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

野沢　裕貴　大友　康平　大村　鷹希　洲﨑　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ダ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共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ォトニクス研究部門，自然科学研究機構生命システム研究センターバイオフォトニクス研究グループ
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

©THE ICHIRO KANEHARA FOUNDATION 2024

2026/11/11 09:26:01

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 LSFM[21]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幾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]などの活用の有用性が示されている。

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るとは言えない状況である（**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。mesoSPIM[31]や，その最新機Benchtop mesoSPIM[33]ではその

2026/11/11 09:26:01

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OpenSPIM[34]やOpenSpin microscopy[35]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LEGOlish，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$\theta$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～4 $\mu$m，視野は$x$軸方向に～7.5 mm，$y$軸方向に～14 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ドリカルレンズは，焦点距離の異なる2種類を準備し（$f$=150 mm，$f$=500 mm），それぞれ$z$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±0.3 $\mu$m，$x$軸方向有効視野：889 $\mu$m）と広視野のfull FOV（FF）モード（$z$軸方向解像度：25.1±0.0 $\mu$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，シリンドリ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。

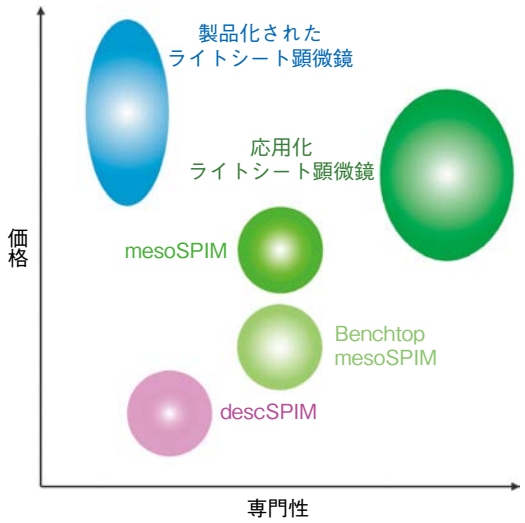



**図1　透明化組織用ライトシート顕微鏡の導入に要する費用と顕微光学に関する専門性**

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：ThorCam™, 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/

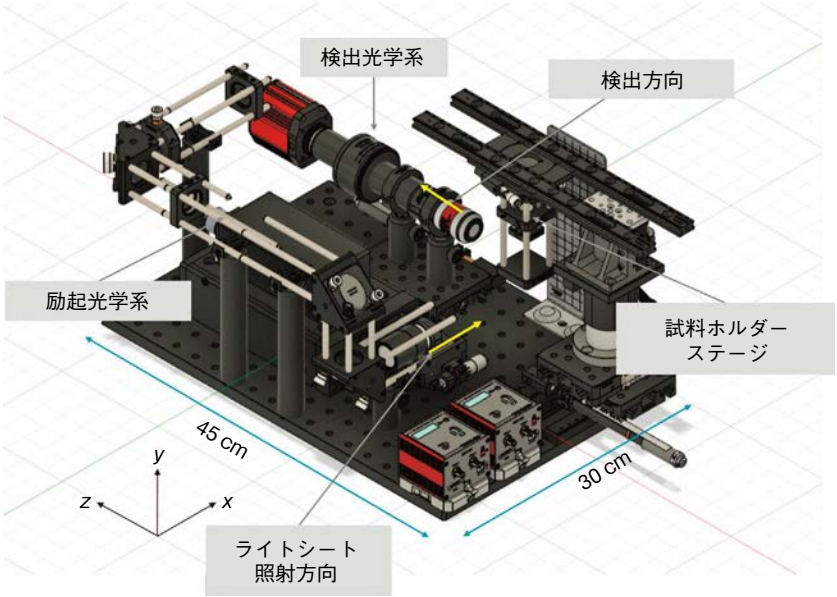



**図 2　descSPIM 3D 図面**

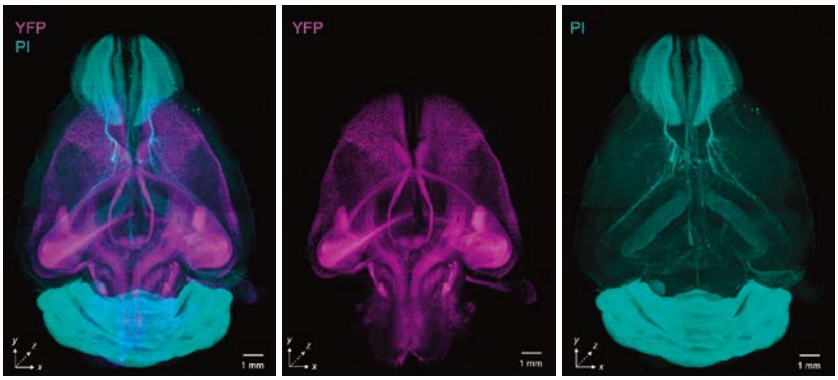



**図 3　透明化した *Thy1-YFP-H* Tg マウス全脳の descSPIM による三次元イメージ**

descSPIM)。ユーザーガイドに従ったインストレーションによって 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 μManager 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，μManager 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 BigStitcher[40] 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

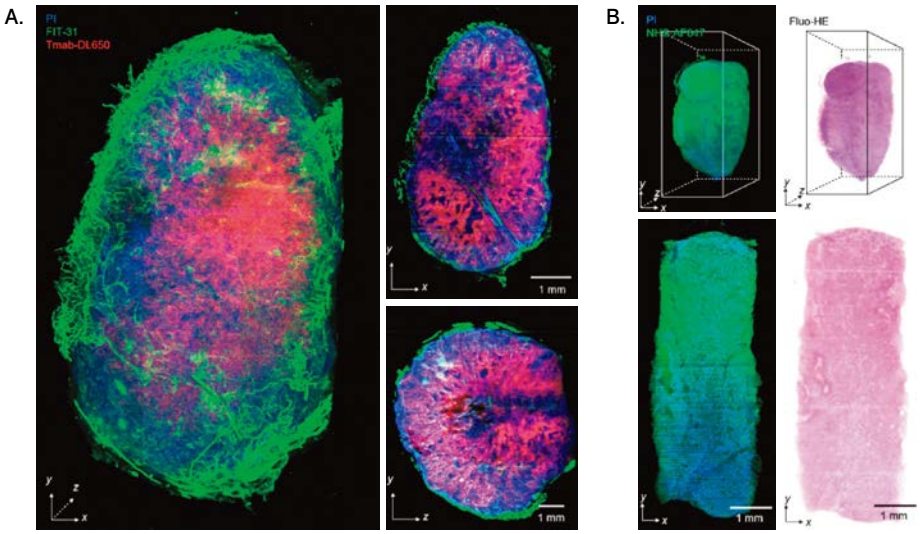



**図 4　透明化 CDX モデルマウスのヒト乳がん細胞株 BT-474 由来腫瘍における三次元血管・抗がん剤分布および細胞核標識像**

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$^{TM}$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少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) 洲﨑悦生：*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. e19, 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, Nylk 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) Pitrone 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


2026/11/11 09:26:01