

## 第6回 透明化の先にみえるもの その2

### (1) 2014年当時の状況

透明化を実現するために、2つの戦略があることをお話しました。1つ目は光の吸収を抑えるために色素を取り除いてく戦略で、2つ目は光が曲がるのを防ぐために「光のスピード」を調節する戦略でした。後者の物質を通る「光のスピード」を表す指標は、屈折率という言葉で表されます。真空中の光のスピードが1、水は真空中を進むよりも1.3倍ぐらい遅くなるので屈折率は約1.3です。脂質中ではさらに遅くて約1.4、タンパク質中では約1.5、骨では1.6以上です。身体の中にはタンパク質がたくさん含まれていますから、屈折率をタンパク質ぐらい(約1.5)に揃えてやれば体は透明になるはずだ、というわけです。ところが、言うは易しで、どうやって実現できるか、実はシュバルテホルツの発見から100年経った今でもうまく理解できていないのです。

前者の色素を取り除く方法に関して言えば、これまでにだいぶ強引な方法、例えば血の色を抜くために赤血球を全部取り除く方法がありました。しかし毛細血管の赤血球まではなかなかのぞけなかった。過酸化水素水を使って壊してしまえば良いのではないかというものもありましたが、過酸化水素水は激しく組織を痛めてしまい、タンパク質が壊れてしまいました。私たちがいろいろな物質を探す中で、脂質を取り除くアミノアルコールを見つけ、それが偶然にも血の色を作り出している色素をうまく抜くことができると言うことも見つけました。「(生体組織に優しい)マイルドな条件でも色素を抜ける」ことを初めて発見したのです(Tainaka et al., Cell, 2014)。しかし、なぜマイルドな条件で(色素が)抜けるかという理由は、まだ分かっていませんでした。脂質を上手く除ける一連の物質が見つかったのですが、化学的な理解が進んでいないという状態だったのです。他の生体物質と比べて水の中では屈折率が低いので、屈折率を高めるために様々な物質を混ぜ込むのですが、どのような性質があれば水の光のスピードを遅くできるのかという共通理解がまだないというような状況でした。もう1つ、2014年当時、全身の透明化といっても骨がまだ透明にならずに残っていました。骨を透明にできれば、例えば脊椎の中の脊髄の様子を観察する、大腿骨野中の骨髄の様子を観察する、ガン細胞の骨転移を観察するといった様々な有用な応用が期待できます。あるいは動物モデルを使ってインフルエンザや、COVID-19などの病原性ウィルスの感染が、全身レベルでどのような機序でどんな細胞に進むのかを研究する上で、鼻腔内でどのように感染が進むのか、咽喉ではどのように感染していくのかを調べたいというニーズもあるでしょう。鼻や喉は非常に複雑な組織で丸ごと観察したくても、骨が邪魔でできないというような問題点がありました。また、透明化の技術開発の進む中で経験的にわかってきたことですが、透明度は対象が膨らむことで上がります。これは当然のように思われるかもしれませんが、ちょっと不思議なことなのです。どんな原理原則で膨らむと透明になるのか、これがよく分かっていないというわけでした。

### (2)「透明化」の化学

2014年当時、透明化の基本原則は100年以上前から提唱されてきました。しかし透明化を実現するための化学的な基盤がなかったために高度な透明化の実現に問題があり、透明化ができないから細胞のカタログも進まない、という状況でした。私たちは、2014年には100ぐらいの化学物質を試して透明化できるものを探していました。透明化の化学的基盤を築くために、それを今度は1桁あげて約1600個の化合物を対象に透明化にまつわる5つの基本的性質について系統的に調べていきました。つまり、次の5つです。

- ① 脂質を取り除く
- ② 色素を取り除く
- ③ 骨を除く
- ④ 組織を膨らませる
- ⑤ 水の屈折率を上げる（水の中の光のスピードを遅くする）

1600個の試薬を溶かすだけでも一週間はかかり、しかも5つも検査をするので、これを何度も繰り返さないといけない、実に大変な実験でした。この結果どんなことがわかってきたかという、約1600個の中で、最も優れた（透明化の目的に合致した）化合物が分かり、中間の成績の化合物、かなり悪い成績の化合物が分かってきました。そこから、どんな顔つき（化合物の構造）であれば脂質を、色素を、骨を取り除けるのか、組織を膨らませられるのか、あるいは水に加えたときに屈折率を上げられるのか、が見えてきました。こういう化合物の「顔つき」を調べていって、「透明化の化学」を深く理解していった結果、「透明化するための薬の作り方」みたいなものがだいぶ分かってきたのです（Tainaka et al., Cell Rep, 2018）。

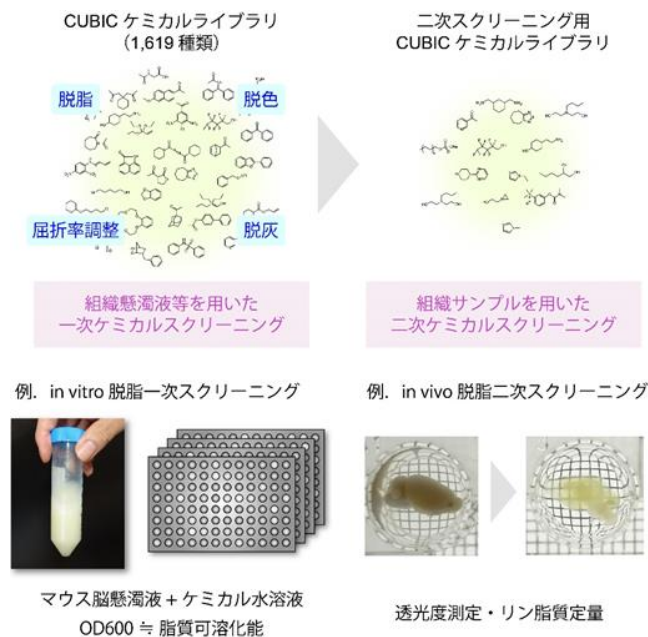


図1. 図1 組織透明化に向けた水溶性化合物の「包括的ケミカルプロファイリング」。

約 1,600 種類の水溶性化合物と組織懸濁液などを用いて、脱脂・脱色・屈折率調整・脱灰の透明化パラメータを評価するための *in vitro* ケミカルスクリーニングを行った(左)。その後、これらの結果が生物組織に適用できるかを検証するために、実際の組織サンプルを用いた二次スクリーニングを実施した(右)。AMED プレスリリースから転載(\*1)。

\*1 [https://www.amed.go.jp/news/release\\_20180822-01.html](https://www.amed.go.jp/news/release_20180822-01.html)

### (3) できるようになったこと

高度な透明化が達成できると、例えばこんなことが可能になります。腎臓は体内で尿を作り体外に老廃物を排出しています。腎臓にはネフロン(糸球体+尿細管)という機能単位があって尿を作っています。腎機能が低下すると健康へのダメージが非常に大きいので、腎不全をいかに防ぐかが医学的に重要な問題になっています。透明化技術を使うと、糸球体の状態を全て観察することができるようになるのです。実際に、動物ではありますが腎臓まるごとの観察もできるようになってきました(Hasegawa et al., *Kidney Int.* 2019)。

なかなか難しかった骨の透明化もできるようになってきました。骨はリン酸カルシウムでできているので、リン酸カルシウムの結晶に 1600 個の化合物を一個一個加えて、骨を溶かせるかどうか観察しました。その結果 EDTA というカルシウムキレート(カルシウムを「くわえて」くれるような物質)が見つかってきました。EDTA は既に骨を溶かすことが知られていた物質なので新しい物質を発見したということではなかったのですが、リン酸基の状態をうまく変えるような新しい物質を見つけることもできたので、その 2 つを組み合わせると骨の高度な透明化が実現できるようになってきました(Tainaka et al., *Cell Rep.* 2018)。

サルは全身解析の場合ある程度は透明になるのですが、なかなか奥深いところまで透明にすることは難しかったのです。しかし骨の透明化を進めていくことで、小型のサル(マーモセット)の新生仔を、目の色、毛の色以外かなり透明にできるようになってきました(Susaki et al., *Nat Commun.* 2020)。いま私たちは大人のサルの脳を透明化して、脳に含まれる「細胞のカatalog」を作ろうとしています。サルの脳はマウスの脳よりだいぶ大きいのですが、サルで実験をすることでマウスでは分からなかった様々な高次脳機能の解明に繋がっていくと期待でき、サルの脳「細胞のカatalog」をつくることはとても重要です。

今までこういうカatalogを作ることはなかなか現実的ではありませんでした。しかし、透明化の技術によって光を奥底まで届けることができるようになりました。また、透明化の処理をするときに細胞を包んでいる脂質を取り除いていくので、障壁(バリア)が薄くなっていきます。そうすると、外から加えた物質が組織の奥底まで浸透できるようになり、物質が浸透するようになると脳全体を染められるようになります。染色ができるようになると、細胞の状態をつぶさに観察することができるようになっていきました。

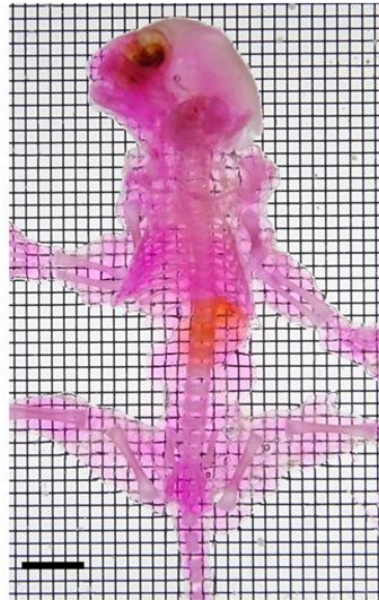


図2. マーモセット幼獣の全身透明化像。細胞の核を染める PI 染色をほどこしているため、全身にピンク色を帯びている。(Susaki et al., Nat Commun. 2020 Fig.2F を転載)

#### (4) ヒトの組織の透明化

ヒトの臓器の透明化の場合はどうかと言うと、ヒトの臓器の場合も 1600 の化合物を 1 つ 1 つ調べていくことで透明にできるようになっていきました。マウスとほぼ同じ体の仕組みを持っているので、マウスの透明化試薬がそのまま使えるだろうと思われる方もいるかもしれませんが、やってみると案外難しく、ヒト組織の場合には脂質がだいぶ多いことが分かってきました。そのために、高度な透明化を実現するためにはもう一度ヒト組織で 1600 個の化合物を試す必要がありました。その結果、ヒトの心臓、肝臓、脾臓、腎臓、脳、肺といった組織の数センチぐらいのブロックを透明にできるようになってきました (Tainaka et al., Cell Rep. 2018)。いま、ヒト臓器のブロックの透明化が可能になってきたので、次のステップとして、例えばヒトの腎臓まるごと、脳まるごとの透明化と、そこに含まれるすべての細胞を観察するということが視野に入ってきました。実はこういう研究は予想を超えて広がっています。今まで医師は、ガンの転移の起きているかもしれないリンパ節を取ってきて、そのリンパ節の一番大きく切れる (割面がとれる) ところで二つに切って、そこにガンが含まれているかを検査していました。しかしその場合、切断面にガンがないと見逃してしまうという危険がありました。透明化技術のような 3 次元で観察する方法であれば検査試料に含まれる全ての細胞を観察しますので、見逃しがかなり少なくなると期待できます。私たちは大阪大学の病理学の森井英一先生と透明化による「全細胞」解析を試みました。この結果、予想通り、「見逃し」を少なくできたという結果を得ました (Nojima et al., Sci Rep, 2017)。

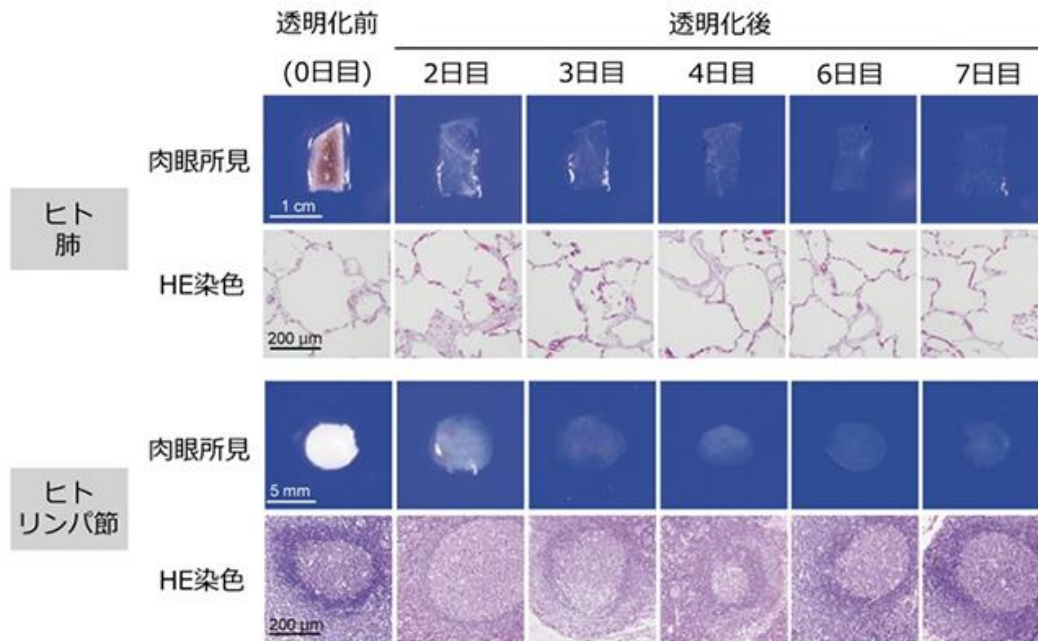


図3. ヒト臓器片の透明化。CUBIC 試薬でヒトの肺、リンパ節の臓器片を透明化処理したところ、3日目～4日目にはほぼ完全に透明化した。理研プレスリリースから転載(\*2)。

\*2 [https://www.riken.jp/press/2017/20170830\\_1/](https://www.riken.jp/press/2017/20170830_1/)

#### (5) 透明化技術の応用

私たちの透明化試薬は2017年に市販されました。そうすると私たちが予想もしていなかった応用例が報告されてきました。例えば浜松医科大学の紺野在先生、岡崎茂俊先生の研究ですが、家の庭にいるようなダンゴムシを対象に、私たちの透明化試薬をちょっと改変して、「透明ダンゴムシ」を準備してダンゴムシに含まれている細胞を観察できるようにしました。また同じように硬い殻で覆われていて観察が難しいカニを透明にした「透明カニ」もできるようになり、こちらにも体の中に含まれる様々な細胞を観察できるようになったそうです (Konno and Okazaki, *Zoological Lett.* 2018)。その他、カブトムシの透明化を報告した高校生の例もあります。

#### (6) 組織の膨潤と透明化

透明化した脳をつぶさに観察するに際して、どうしても光学的な限界があります。2015年に米国のエドワード・ボイデンらによって、レンズで拡大するのではなく対象そのものを拡大すればいいだろうという提案がされました (Chen et al., *Science*, 2015)。彼らは紙おむつに使われるポリマーのようなもので組織を拡大するやり方を使ったのですが、私たちは、実は研究をすすめていく過程で、私たちの体そのものが紙おむつのように伸縮自在である、ということが分かってきました。そうだとするとポリマーを使わなくても、組織を化合

物につけておくだけで自然に膨らむだろうと考えました。脳を10倍以上に膨らませてしまえば、そこに含まれる観察しにくいものもみられるようになるのではないかと、ということです。例えば「記憶」の本質は神経細胞のつながり（シナプス）にあると言われますが、「記憶」そのものを脳全体で見たり、細胞と細胞の配線（神経ネットワーク）を見たり、そういうことができるようになると「意識とは何か」とか「知性とは何か」といったことに展開できます。全脳レベルですべてのシナプスを見ることを目指し、マウスの脳を透明化試薬で処理してみると、マウスの脳を膨らませられることが分かってきました。この実験をしていた大学院生の村上達哉さんや学部学生だった真野智之さんらが協力し、自分たちで顕微鏡を組んで、脳に含まれるすべての細胞を見ることができるようになってきたのです。彼らは全脳の観察が可能のように、レンズやミラーを買って揃えて、自分たちで顕微鏡を組み上げました。観察は10倍のレンズを使って拡大して行うので一視野に脳全体が収まりきらない。1回の観察で脳の1断面の1/400ぐらいを観察してそれを奥行き方向に3200枚ぐらい撮影する。これを400回繰り返す。全部で130万枚ぐらいの画像を取って貼り合わせると3次元の脳の全体像が再構成できます。1つの脳で約14テラバイト（10<sup>12</sup>バイト）にもなるデータが得られ、そこに含まれる細胞を1個1個観察することもできるようになりました。観察結果から、1億12万98個の細胞がこのマウスの脳に含まれることが分かってきました（Murakami et al., Nat Neurosci, 2018）。こういうことができるようになると、ジョルジュ・スーラの点描画のようなものを実際のマウスの組織で描けるようになります。点描画は色々な色の点で構成されていましたが、脳の「点描画」では1億もの細胞の点で表されています。様々な脳の領域には名前が付いているのですが、名前ごとに色を変えて表現することもできる、そんなビューアーを作ることもできてきてきました（CUBIC-Atlas）。



図4. 1細胞解像度マウス脳アトラス(CUBIC-Atlas)。マウス脳に含まれる全細胞を検出し、それぞれの細胞がどの脳領域に含まれるのかを示している。それぞれの色は脳領域を表す。図は細胞を表す点で構成されており、まるで点描画の様な表現になる。IRCN 記者発表資料より転載(\*3)。

\* 3 <https://ircn.jp/pressrelease/cubic-x-a-new-method-to-implement-single-cell-based-whole-brain-imaging>

脳は領域ごとに様々な機能を持っていますので、どの場所が働いているのか(活性化しているのか)が分かると、その個体がどういう状態かを推し量ることができます。また病気の時にどの場所の細胞がおかしくなるかが分かれば、病気の深い理解につながり、治療法・治療薬の開発につながります。透明化技術の研究を進めることで、臓器の中の「細胞のカatalog」を作って点描画のように表現し、次のステップにつなげていくことができます。私たちは「脳の点描画」を完成させたので、次は全身の点描画を作ろうとしています。骨の透明化ができ、透明化の精度も上がり、顕微鏡の精度の向上により対象を膨らませなくても観察ができるようになりました。こういう技術を駆使して、生後すぐのマウスの「全身の点描画」を描くことが現実的になっていて、生まれたてのマウスの身体に何億個の細胞があるか、その細胞のカatalogも、だんだん揃いつつあります。

「透明化の化学」を研究していく中で、私たちの体はどうやら紙おむつのようなゲル状のものだということが分かってきました。そのことで、以前から知られているゲルの性質を記述する式を使い、私たちの組織の光学的な物性を推し量ることができるようになりました。物性を推量できると、これまで「脂質や骨を取り除こう」といっていたものを、「ゲルを構成する単位、部品の光の性質を変える」と言い換えることができます。そうすると、「組織を膨らませるとなぜ透明になるか」が、その部品の体積を押し広げることになるので全体として屈折率を押し下げる性質があると説明できるようになります。この様に組織の光特性がわかってくれば、それに対して水の屈折率、光特性を合わせれば良いと言うことがわかってきます。また、光の吸収を抑えるにはどうしたらいいかを考えると、それぞれの性質に対して「どんな顔つきをもった化学物質がどんな特性を与えられるか」が分かってきた。ようやく組織透明化の化学が立ち上がりつつあって、こうした基盤の上に先ほどの「全身の全細胞解析」や「全身のアトラス(地図帳)」を作れるようになってきたわけです。

透明化技術を発展させることで、私たちは体を構成する全ての細胞(基本的な「部品」)をつぶさに観察できるようになってきました。天文学では望遠鏡を使った観察によって物質やエネルギーの法則、原理みたいなものに迫っていますが、生命科学では透明化技術を推し進め全細胞顕微鏡を作って観察することで、「意識」や「知性」、「健康」といった多細胞生物になって初めて出てくるような重要な課題に迫っていけるのではないかと考えています。