

生体組織を透明化する革新的なアプローチ

# 組織透明化試薬

SCALEVIEW®-S

CUBIC

SeeDB2

CLARITY

ClearSee®



## はじめに

生体組織を透明化する歴史を遡ると100年以上も前になりますが、日本ではさまざまな透明化技術が報告されています。蛍光タンパク質観察及び抗体観察の普及と共に顕微鏡技術革新と同時に透明化技術開発も進み、目的に合わせた透明化技術を選択することが可能となつてきました。

当社では、日本発透明化技術をラインアップしており、サンプル・用途に合わせた透明化技術を紹介することが可能です。組織だけでなく、細胞・スフェロイド等の透明化アプリケーションも多数報告されており、透明化技術は新規解析ツールとして期待されています。

### 【透明化の原理】

組織透明化について、屈折率が重要であることがよく知られています。生体組織には屈折率の異なる様々な物質が存在しているため、光散乱が生じます。そのため、生体組織を透明にするには、組織から高屈折率成分を取り除いたり、溶媒を高屈折率液体に置き換えたり、若しくは両方を取り入れて、組織中の屈折率を均一にすることが必要となります。

透明化したサンプルを観察する場合、顕微鏡の浸液と透明化溶液の屈折率が違っていると、特にNAの高い対物は収差（球面収差）が生じて深部観察の妨げとなります。できるだけ透明化溶液の屈折率に近い浸液をもつ対物レンズを用い、補正環がある対物は補正環を回して球面収差を補正する必要があります。各透明化技術の屈折率に合った対物レンズを使用することで、深部観察、高解像度観察等が可能になります。

## 組織透明化技術 と オリンパス社製対物レンズ一覧表

SCALEVIEWは、オリンパス株式会社の登録商標です。SCALEVIEWの名称は、富士フィルム和光純薬株式会社がオリンパス株式会社より使用許諾を受けている登録商標です。

	SCALEVIEW®-S	CUBIC	SeeDB2	CLARITY	ClearSee®
屈折率	1.49(SMt) 1.47(S4)	1.49	1.46 1.52	1.45	1.41
どのような種類のイメージングを検討していますか？					
組織の厚さ(全脳)	✓	✓		✓	
組織の厚さ(脳サンプル2 mmまで)	✓	✓	✓	✓	
脳以外の組織(心臓、肝臓、脾臓等)		✓		✓	
骨	✓ (脱灰処理が必要です)	✓ (脱灰処理が必要です)		✓ (Bone CLARITY)	
魚類		✓			
節足動物		✓			
植物					✓
オルガノイド / スフェロイド	✓ (SCALEVIEW-S4)	✓	✓		
サンプルの長期イメージング(3ヶ月>)	✓		✓	✓	✓
どのタイプの顕微鏡が推奨されていますか？					
共焦点顕微鏡	✓	✓	✓	✓	✓
多光子顕微鏡	✓	✓	✓	✓	✓
光シート顕微鏡	✓	✓		✓	
超解像度顕微鏡			✓		
電子顕微鏡	✓				
共焦点顕微鏡を用いた場合、どのタイプの対物レンズが対応可能ですか？					
シリコーン浸対物レンズ	UPLSAPO30XS (S4)	UPLSAPO30XS	UPLSAPO30XS (1.46)	UPLSAPO30XS	UPLSAPO30XS
油浸対物レンズ	UPLXAPO40XO (SMt) UPLXAPO60XO (SMt)	UPLXAPO40XO UPLXAPO60XO	UPLXAPO40XO (1.52) UPLXAPO60XO (1.52) UPLXAPO100XO (1.52)		
水浸またはドライ対物レンズ	UPLXAPO10X (S4,SMt) UCPLFLN20X (S4,SMt)	UPLXAPO10X UCPLFLN20X	UPLXAPO10X (1.46, 1.52) UCPLFLN20X (1.46, 1.52)	UPLXAPO10X UCPLFLN20X	UPLXAPO10X UCPLFLN20X
多光子顕微鏡を用いた場合、どのタイプの対物レンズが対応可能ですか？					
対応対物レンズ	XLSLPLN25XGMP XLPLN10XSVMP	XLSLPLN25XGMP XLPLN10XSVMP	XLSLPLN25XGMP XLPLN10XSVMP	XLSLPLN25XGMP XLPLN10XSVMP	XLSLPLN25XGMP XLPLN10XSVMP
サンプルに使用する色素は観察可能ですか？					
蛍光タンパク質	✓	✓	✓	✓	✓
蛍光色素(DAPI 等)	✓	✓	✓	✓	✓
Alexa 等	✓	✓	✓ (褪色に注意が必要)	✓	✓

\*透明化試薬向けに開発されたものではないため、購入前にあらかじめデモにより、データ取得を推奨いたします。

\*購入前にあらかじめデモにより、データ取得を推奨いたします。

**ScaleS技術(SCALEVIEW®-S)**は、宮脇敦史博士、濱裕博士らにより開発された尿素とソルビトールを主成分とする組織透明化試薬群から構成されます。

SCALEVIEW®-Sは、蛍光タンパク質を含む生体標本を透明化するだけでなく、分厚い標本を抗体や蛍光色素で標識する工程にも威力を発揮し、とくに脳組織病理標本の解析ツールとして活躍することが期待されます。

SCALEVIEW®-S trial kitは、6成分(SCALEVIEW®-S0 - SMt)で構成されており、サンプルを各成分に順次浸漬することで透明化可能です。また、透明化工程中、別売のdeScaling Solutionが必要になります。

1) Hama,H.*et al.* : *Nature Neuroscience*, **14**, 1481(2011).

2) Hama,H.*et al.* : *Nature Neuroscience*, **18**, 1518(2015).

3) Hama,H.*et al.* : *Protocol Exchange* (2016), doi:10.1038/protex.2016.019

## SCALEVIEW®-S 細胞透明化プロトコル例

### 【固定】

- 1) マウスを4% paraformaldehyde (PFA) / PBS (pH 7.6~7.8) で灌流固定する。
- 2) 脳を取り出した後、4%PFA/PBSで固定 (4°C、18-72 hrs) する。
- 3) PBSで洗浄する。
- 4) ピブラトームを用いてスライスを作成する (必要に応じて0.2-3 mm 厚等)

### 【透明化: SCALEVIEW®-S処理】 (脳スライスサンプル (1-2 mm) の透明化例)

- 5) 5 ml のSCALEVIEW®-S0が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、30分間振とうする。
- 6) 5 ml のSCALEVIEW®-S1が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、30分間振とうする。
- 7) 5 ml のSCALEVIEW®-S2が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、30分間振とうする。
- 8) 5 ml のSCALEVIEW®-S3が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、30分間振とうする。
- 9) 5 ml のdeScale Solutionが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で4°C、30分間×2回振とうする。
- 10) 5 ml のSCALEVIEW-S4が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、12-24時間振とうする。
- 11) この時点で、組織が適度に透明化されていることを確認する。
- 12) 5 ml のSCALEVIEW®-SMtが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、1時間振とうする。

### 【観察】

- 13) SCALEVIEW®-S処理した脳サンプルをSCALEVIEW®-SMtに浸した状態で共焦点レーザー顕微鏡若しくは2光子励起顕微鏡を用いて観察する。

\*組織透明化プロトコルにおいてはサンプルサイズにより、使用する試薬量、処理時間が変わるので注意が必要です。また、サンプルはできるかぎり灌流固定後に摘出・再固定してください。

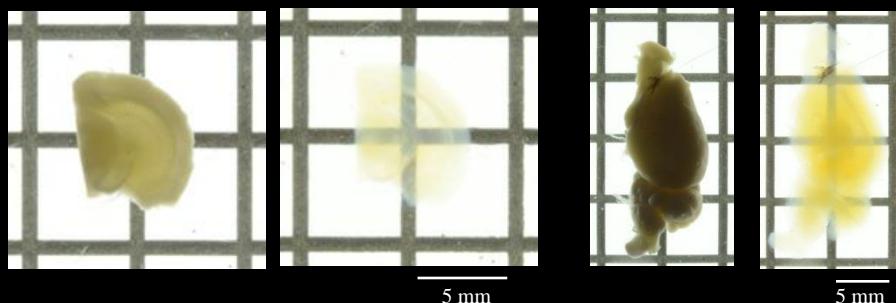


図1. SCALEVIEW®-Sを用いたマウス脳の透明化例

左から順に、マウス脳スライス (1 mm厚) のSCALEVIEW®-S処理前後、マウス脳半球のSCALEVIEW®-S処理前後

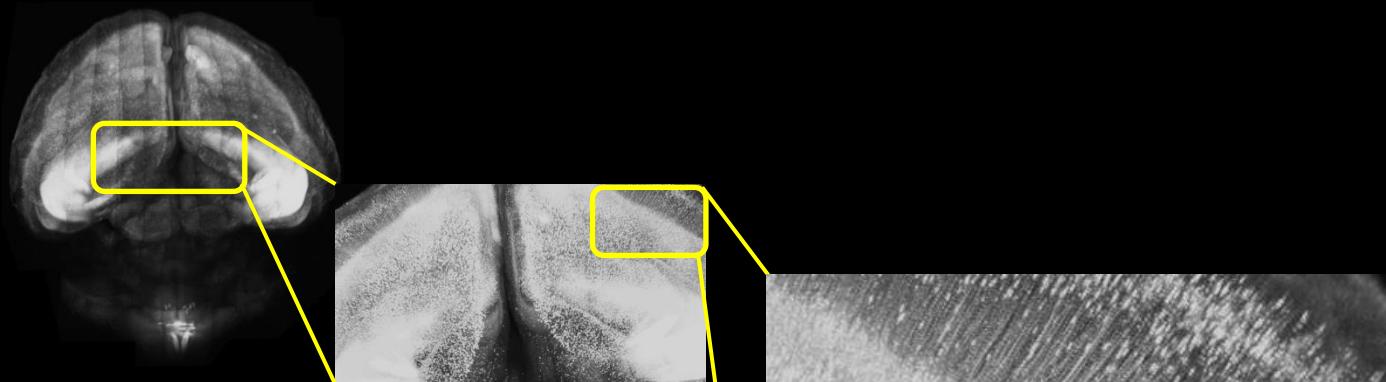


図2. YFP-H lineマウスの透明化全脳を2光子励起顕微鏡で観察  
---大脳基底核部位を段階的にズームイン---

Mouse	:Thy1-YFP-H line, 20W, ♂
Size	:Whole
Microscope	:Olympus FVMPE-RS
Objective lens	:XLPLN10XSVMP (NA 0.6)
Laser	:960 nm (for YFP),
Image size	:512 x 512, 170 tiles, Z=8000 μm, Z Step16 μm

## SCALEVIEW®-S 免疫組織染色 AbScaleプロトコル

### 【固定】

前項 1) - 4) と同条件。

#### 【前処理】（脳スライスサンプル（1-2 mm）の免疫組織染色の場合）

- 5) 10 ml のSCALEVIEW®-S0が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、4時間振とうする。
- 6) 10 ml のSCALEVIEW®-A2が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、4時間振とうする。
- 7) 10 ml の8M Urea Solutionが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、12時間振とうする。
- 8) 10 ml のSCALEVIEW®-A2が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、4時間振とうする。
- 9) 10 ml のdeScale Solutionが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で4°C、6時間振とうする。

### 【抗体染色】

- 10) 1% Blocking Reagent(Roche)/PBS(-)5 ml が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で室温、2時間振とうする（ブロッキング）。
- 11) AbScale solution / Fluorescently-labeled primary Antibody 1.5mlが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、24 - 48時間振とうする（抗体染色）。
- 12) 10 ml のAbScale solutionが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で室温、2時間振とうする。
- 13) 10 ml のAbScale solutionが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で室温、1時間振とうする。
- 14) 4% paraformaldehyde (PFA) / PBS (pH 7.6~7.8) で室温、1時間で再固定する。

\*AbScale Solution:0.33 M 尿素、0.1 % (wt/vol) Triton X-100を含むPBS(-)溶液

### 【透明化】

- 15) 10 ml のSCALEVIEW®-S4が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、6 - 8時間振とうする。透明度を上げたいときは、SCALEVIEW®-SMt処理を同条件で検討して下さい。

### 【観察】

- 16) SCALEVIEW®-S4処理した脳サンプルを新しいSCALEVIEW-S4に浸した状態で共焦点レーザー顕微鏡若しくは2光子励起顕微鏡を用いて観察する。SCALEVIEW®-SMtで透明化処理した場合は、SCALEVIEW®-SMtでマウントし観察して下さい。

## SCALEVIEW®-S 蛍光色素染色 ChemScaleプロトコル

### 【固定】 【前処理】

免疫染色プロトコル 1) - 9) と同条件。

### 【蛍光色素染色】

- 10) SCALEVIEW-A2 / Fluorescent Dye(e.g. for nuclei staining:SYTO61(125 nM) or DAPI (500 nM) or PI(1 µg / ml)) 8mlが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、6 - 8時間振とうする（蛍光色素染色）。
- 11) 10 ml のSCALEVIEW®-A2が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、2時間振とうする。
- 13) 10 ml のSCALEVIEW®-A2が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、1時間振とうする。
- 14) 10 ml のdeScale Solutionが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で4°C、3時間振とうする。

### 【透明化】

- 15) 10 ml のSCALEVIEW®-S4が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で37°C、6 - 8時間振とうする。透明度を上げたいときは、SCALEVIEW®-SMt処理を同条件で検討して下さい。

### 【観察】

- 16) SCALEVIEW-S4処理した脳サンプルを新しいSCALEVIEW®-S4に浸した状態で共焦点レーザー顕微鏡若しくは2光子励起顕微鏡を用いて観察する。SCALEVIEW®-SMtで透明化処理した場合は、SCALEVIEW®-SMtでマウントし観察して下さい。

## SCALEVIEW®-S Neurosphereプロトコル

### 【固定】 【前処理】

免疫染色プロトコル 1) - 16) と同条件。

各試薬使用量は調整下さい。

透明化工程：SCALEVIEW®-S4処理時、スフェロイドが浮きやすくなるため、遠心分離等を検討して下さい。  
または、透明化後、1.5 % (wt / vol) アガロースを用いて包埋し不動化を検討して下さい。

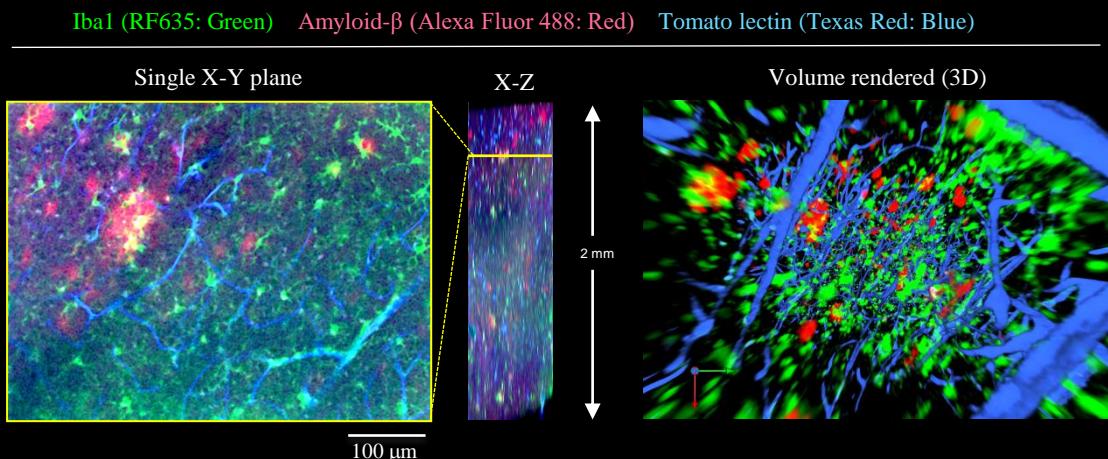


図3. アルツハイマーモデルマウス(17ヶ月齢)脳スライス(2 mm厚)のAbScale法による免疫組織染色画像例

Microscope (CLSM) :Olympus FV1200  
Objective lens :XLPLN10XSVMP (NA 0.60)

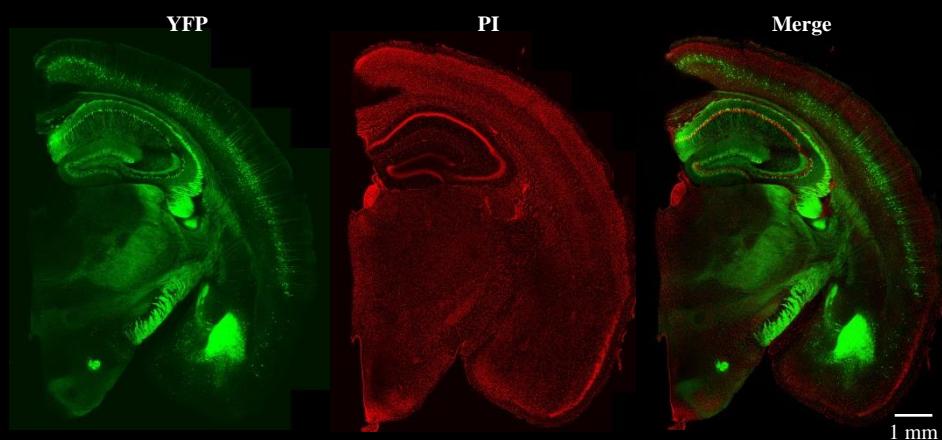


図4. ChemScale処理(PI染色)したYFP-H lineマウスの脳半球スライス (2 mm厚) を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (倒立) を用いて観察

Mouse Size	:Thy1-YFP-H line, 42W, ♂	Microscope (CLSM) :Olympus FV3000 (Inverted)
	:Coronal Slice (2 mm)	Objective lens :UPLSAPO10x2 (NA 0.40)
		Laser :488 nm (for YFP), 561 nm (for PI )

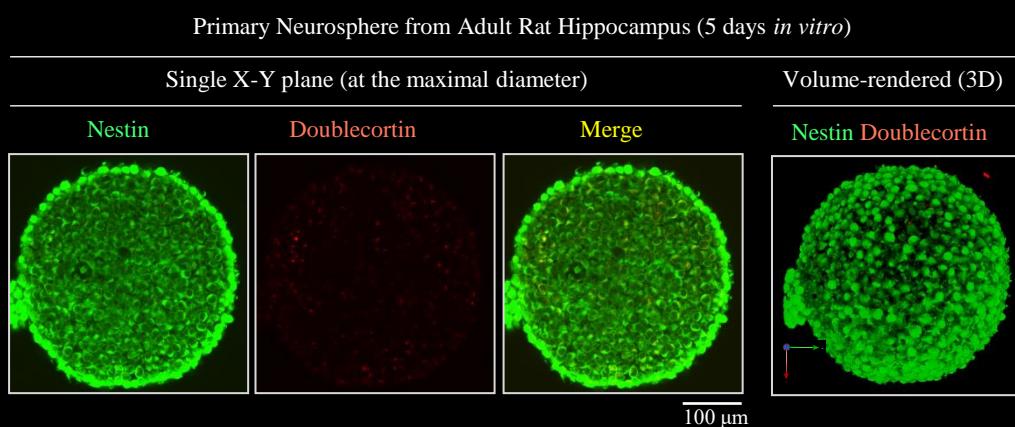


図5.アダルトラットの海馬から調製した神経幹細胞のNeurosphereの3次元免疫染色 -AbScale法を使用-

Microscope (CLSM) :Olympus FV1000  
Objective lens :UMPLFLN10XW (NA 0.3)

## SCALEVIEW®-S4 を用いたT47D細胞スフェロイド透明化アプリケーション

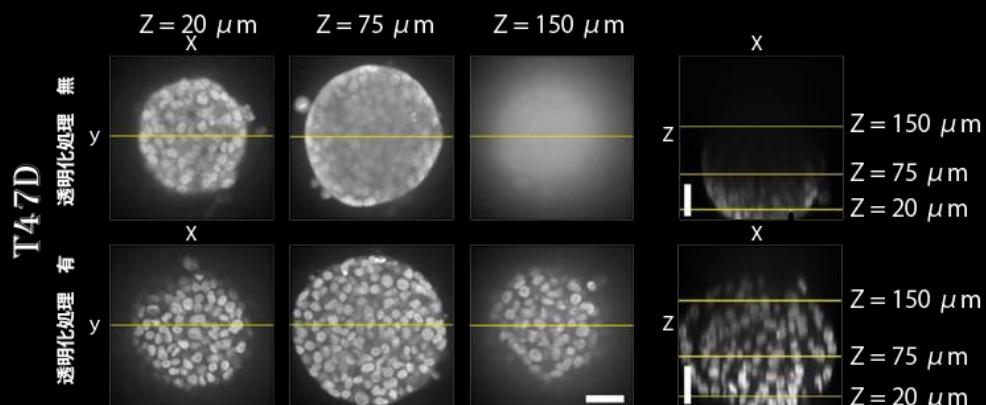


図1. T47D細胞スフェロイドのSCALEVIEW®-S4による透明化画像例(核はHoechstを用いて染色<sup>4)</sup>)  
共焦点顕微鏡を用いてZ STACKで、スフェロイド画像を取得。

Data by Molly E. Boutin, et al.: *Scientific Reports*, **8**, 11135 (2018).

## SCALEVIEW®-S4 を用いたF-PDO®透明化アプリケーション

データ提供元：福島県立医科大学 高木 基樹先生  
協力：オリンパス株式会社

1) Takahashi N, et al.: *Cells*, **8**, 481 (2019).

F-PDO®はがん組織由来培養細胞です。抗がん剤の評価や抗体医薬品の薬効評価に活用可能です。

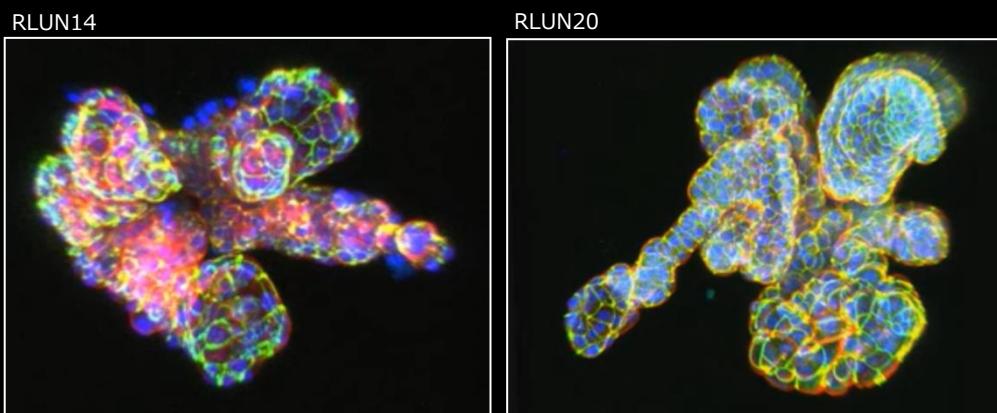


図2.  
抗体 : ZO-1-Alexa488 conjugate  
色素 : Actinstain670 (ファロイジン)  
DAPI  
顕微鏡 : FV3000  
対物レンズ : UPLSAPO30×S

## iCell® Hepatocytes2.0によるスフェロイド作製のコツと透明化

詳しくは WEB で

スフェロイド作製は細胞種にもよりますが、住友ベークライト社製PrimeSurface®スリットウェルプレートが便利です。  
培地交換が簡単で、スフェロイド作製が簡単に可能です。

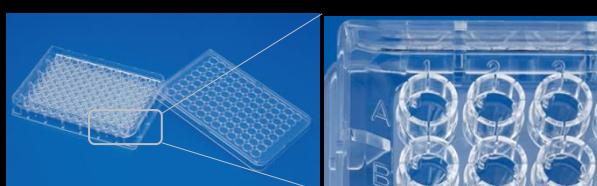


図1.住友ベークライト社製PrimeSurface®スリットウェルプレート

図2. 培地交換の様子



図3. iCell® Hepatocytes2.0のスフェロイド作製から透明化処理の様子  
左からiCell® Hepatocytes2.0を平面成熟化、スフェロイド作製、透明化処理後のサンプル

## SCALEVIEW®-S 血管染色アプリケーション

### 【試薬】

- 1) Heparin -Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 滅菌は不要) (pH 7.4)  
HBSS 500 mlに対してHeparin (Novo-Heparin, Heparin注射液, 5,000単位/ 5 ml) を2 ml (2,000単位)加えてよく混和後、氷冷する。アダルトマウス1匹当たり20 mlを使用する
- 2) Lectin- Texas Red (Vector Labs社 DL-1176)(400~500 ml)を7 mlのHBSSで希釈し氷冷する。  
この全量をアダルトマウス1匹に用いる。
- 3) 4% (w/v) PFA/PBS(-) (pH 7.6-7.8), (氷冷)。アダルトマウス1匹当たり40 mlを使用する。

### 【固定/染色】

- 1) マウスを麻酔後、保定・開胸を行う。
- 2) 右心房に割を入れ、左心室からHeparin-HBSS 30 mlを10 mlずつ注入し、血液を除くとともに血管内を洗浄する (23ゲージ注射針を付けた10 ml用シリングでHBSSを注入する。注入速度は毎分 約10 ml)
- 3) Lectin-Texas Red/ Heparin-HBSS全量 (7.4 ml)を同様にして注入する。注入速度は毎分約5 ml。注入後、約40秒間室温でマウスを静地する。
- 4) 4% (w/v) PFA/PBS(-) (pH 7.6-7.8) 40 mlを10 mlずつ同様にして注入し、全身を固定する。  
注入速度は毎分10 ml程度。
- 5) 目的臓器を摘出4% (w/v) PFA/PBS(-) (pH 7.6-7.8)中に4 °C, 12~72時間で浸漬。
- 6) PBSで洗浄する。
- 7) ビブロトームを用いてスライスを作成する (必要に応じて0.2-3 mm 厚等)。

### 【透明化: SCALEVIEW®-S処理】 (脳スライスサンプル (1-2 mm) の透明化例)

- 1) 5 ml のSCALEVIEW®-S0が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、30分間振とうする。
- 2) 5 ml のSCALEVIEW®-S1が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、30分間振とうする。
- 3) 5 ml のSCALEVIEW®-S2が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、30分間振とうする。
- 4) 5 ml のSCALEVIEW®-S3が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、30分間振とうする。
- 5) 5 ml のdeScale Solutionが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で4°C、30分間×2回振とうする。
- 6) 5 ml のSCALEVIEW-S4が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、12-24時間振とうする。
- 7) この時点で、組織が適度に透明化されていることを確認する。
- 8) 5 ml のSCALEVIEW®-SMTが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で37°C、1時間振とうする。

### 【観察】

- 9) SCALEVIEW®-S処理した脳サンプルをSCALEVIEW®-SMTに浸した状態で共焦点レーザー顕微鏡若しくは2光子励起顕微鏡を用いて観察する。

### 〈注意、ポイント〉

本法は新生仔からアダルトまでのマウス全身の血管をTomato Lectin-Fluorescent Dyeによって蛍光染色する簡単な方法になります。手持ちの顕微鏡のlaser lineの種類（波長）と多重染色の際の色の組合せを考えた上で目的とする色を選択して使い分ける必要があります。特に各色素の蛍光のスペクトルをよくチェックして蛍光物質間のcrosstalkが生じないように注意し、蛍光フィルターの選択を慎重に行う必要があります。

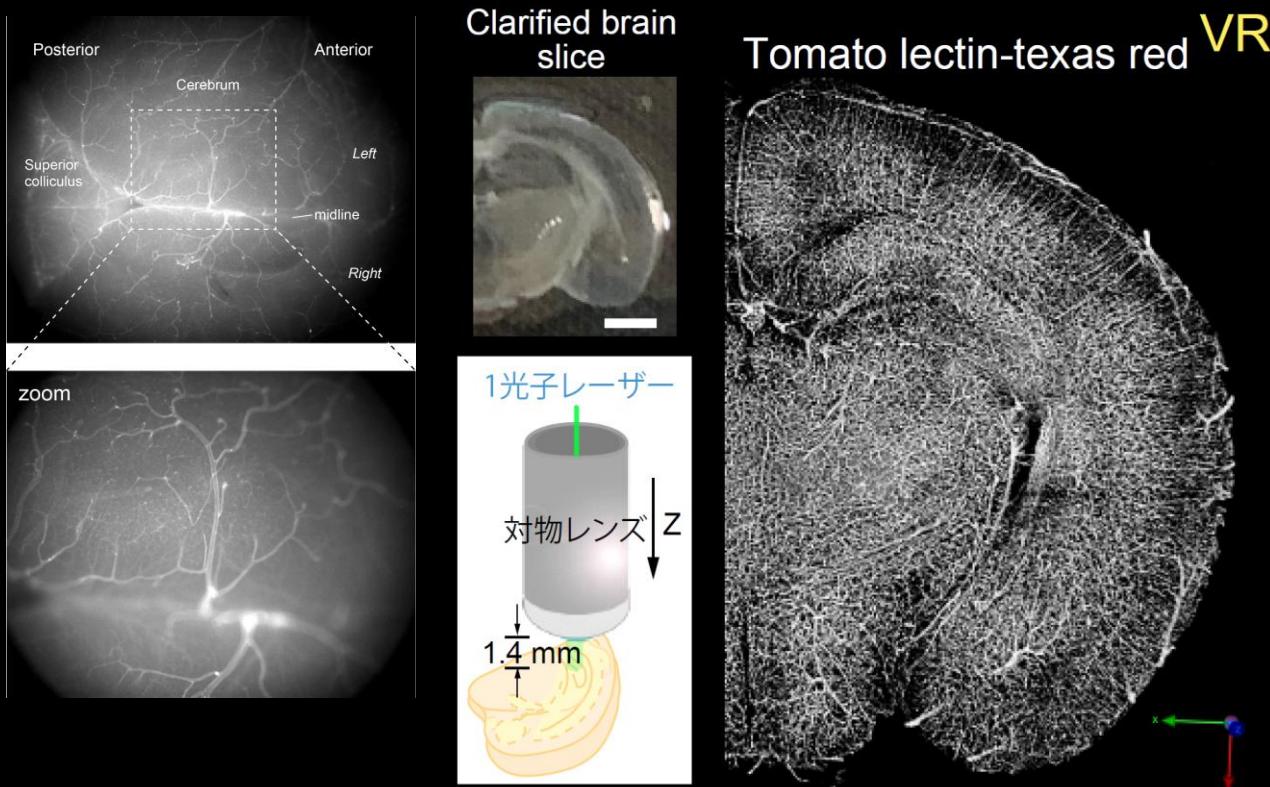


図1. 染色後のマウス大脳を蛍光実態顕微鏡により観察例 (左図)

Tomato lectin-texas redで血管染色を行った新生仔マウス(C57BL6/J、生後10.5日)大脳の冠状断スライス(厚さ1.2 mm)(真中上)を透明化し、正立共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)で観察(真中下)したVR画像(右)

CUBIC (clear, unobstructed brain / body imaging cocktails and computational analysis)は、上田泰己博士らにより開発された、組織透明化・3次元イメージング・画像解析の組み合わせによる網羅的細胞解析技術です。CUBICで使用する組織透明化試薬 (Scale/eCUBIC試薬) は尿素にアミノアルコールを加えた水溶性透明化試薬であり、サンプルを試薬に浸すだけの簡便かつ効果的で再現性の良い手法になります。CUBICは動物等の全身・臓器丸ごと透明化することが可能です。さらに、シート照明型蛍光顕微鏡(LSFM)を用いることで、全身の細胞を1細胞解像度で3次元イメージとして取得することができます。

CUBICは、1個体の生命現象とその原理を解明できることから、生物学だけなく、多くの分野においても大きな貢献が期待できます。

本キットは、1) Scale/eCUBIC-1 Solution、2) Scale/eCUBIC-2 Solution、3) Mounting Solution 1、4) Mounting Solution 2 の4成分で構成されております。キット成分を調整し、透明化を行うことが可能です。

- 1) E. A. Susaki, et al. : *Cell*, **157**(3), 726 (2014).
- 2) K. Tainaka, et al. : *Cell*, **159**(4), 911 (2014).
- 3) E. A. Susaki, et al. : *Nature Protocols*, **10**, 1709 (2015).

## CUBIC 組織透明化プロトコル例

### 【固定】

- 1) 麻酔下マウスにヘパリン (10 U/mL) を添加し冷却したPBSを10 mL 以上流し脱血する。その後、冷却し4%paraformaldehyde (PFA) / PBS (pH 7.4) を20 mL以上流し、灌流固定する。
- 2) 臓器を取り出した後、4%PFA/PBSで固定 (4°C、18-24 時間) する。
- 3) PBSで洗浄する。
- 4) ピブラトーム用いてスライスを作成する (必要に応じて2 mm厚以上等)。

### 【脱脂・脱色】 (脳スライスサンプル (臓器丸ごと)の透明化例)

#### (試薬調製)

1. 50% Scale/eCUBIC-1 Solution (1:1 mixture) Scale/eCUBIC-1 SolutionをDWで1:1の比率で溶解します。
2. 50% Scale/eCUBIC-2 Solution (1:1 mixture) Scale/eCUBIC-2 SolutionをDWで1:1の比率で溶解します。
- 5) 12-15 mLの50% Scale/eCUBIC-1 Solutionが入った30mLチューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温、1日間振とうする。
- 6) 12-15 mLのScale/eCUBIC-1 Solutionが入った30mLチューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で37°C、2日間振とうする。
- 7) 12-15 mLのScale/eCUBIC-1 Solutionが入った30 mLチューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で37 °C、6-8日間振とうする。サンプルサイズ、組織により、透明になるまで時間を要する場合があります。2日に1回新しいScale/eCUBIC-1 Solutionに置換して下さい。
- 8) 約50 mLのPBSが入った50 mLチューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温から37°Cの間で、2時間×3回振とうする。2時間振とう、1晩振とう、さらに2時間振とうすることを推奨します。
- 9) 12-15 mLの50% Scale/eCUBIC-2 Solutionが入った30 mLチューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温、1日間振とうする。\*この工程で、サンプルサイズが一時的に膨張します。

### 【屈折率調整】

- 10) 12-15 mLのScale/eCUBIC-2 Solutionが入った30 mLチューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温から37°Cの間で、2日間振とうする。Scale/eCUBIC-2 Solutionは非常に粘性が高い為、工程中、サンプルの入ったチューブを反転する必要があります。\*\*この工程で、サンプルサイズは元の大きさに戻ります

### 【観察】

- 11) 屈折率調整したサンプルをMounting Solution 1とMounting Solution 2の混合マウント溶液で浸漬する。マウント溶液に浸した状態で蛍光顕微鏡用いて観察する。

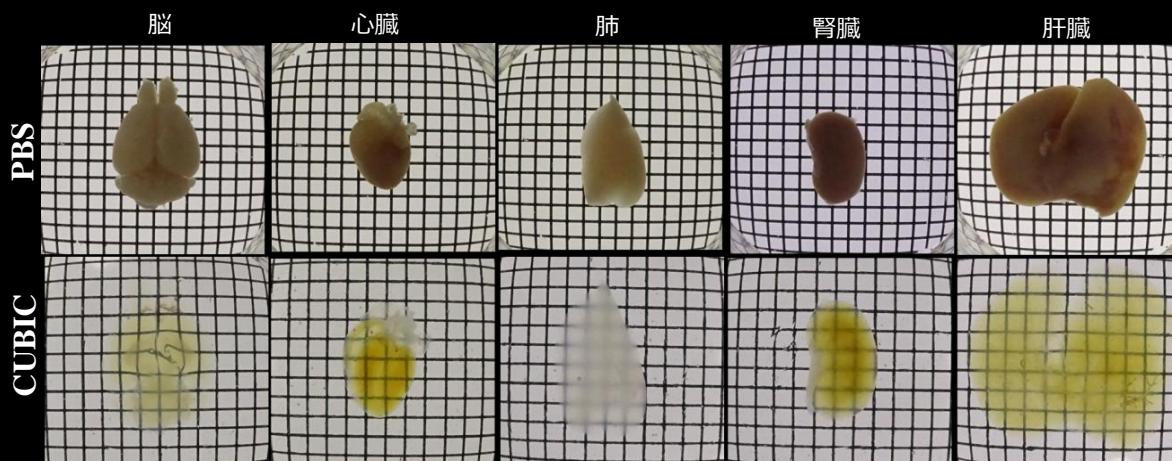


図1. CUBICを用いたマウス臓器丸ごとの透明化例

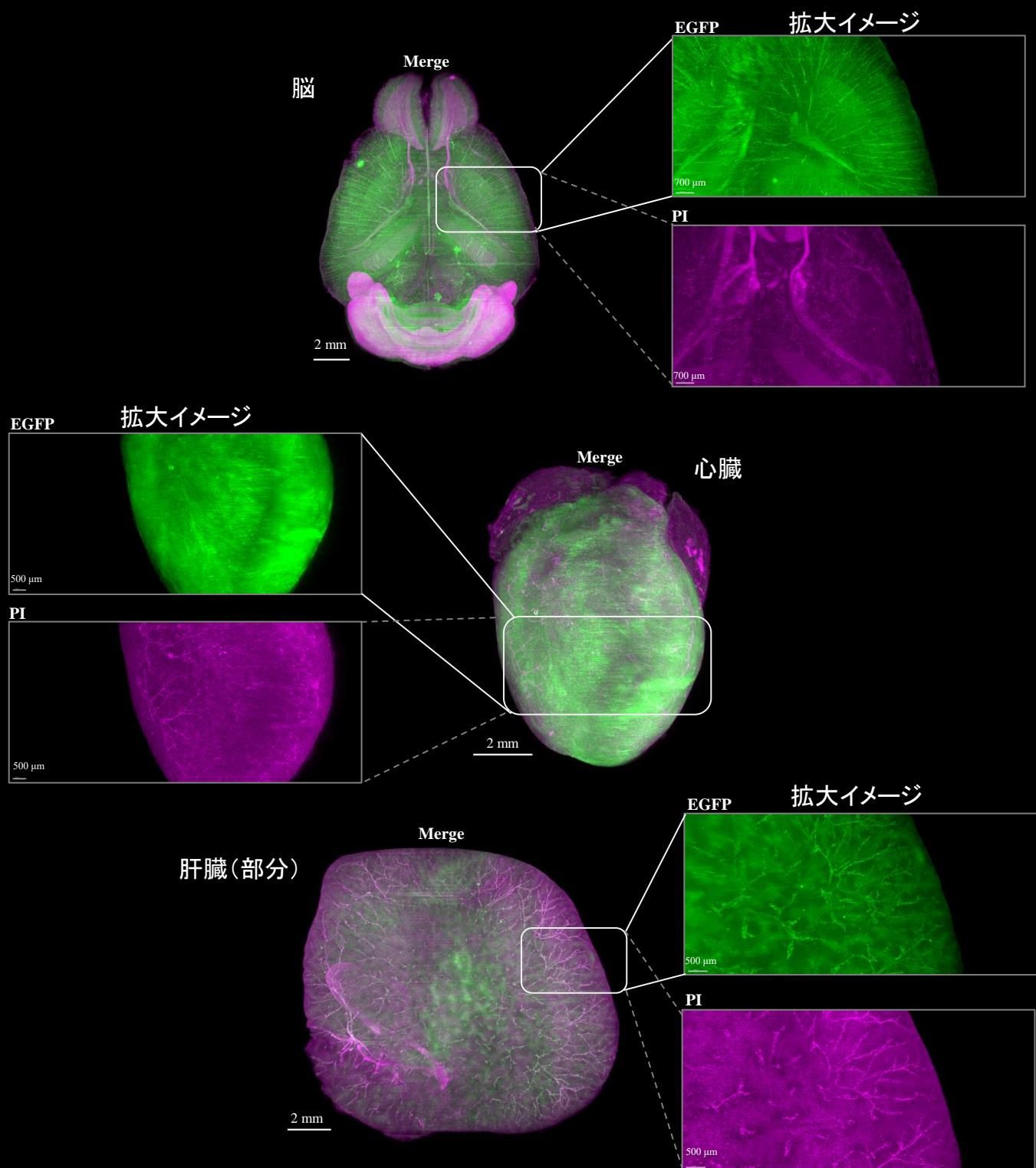


図2. CUBIC処理(PI染色)したCAG-EGFP Tg マウスをLSFMを用いて臓器まるごと観察

## CUBIC 病理学的手法を合わせたアプリケーション1

Data by  
S. Nojima et al. : *Scientific Reports*, 7,9269 (2017) / Adapted.

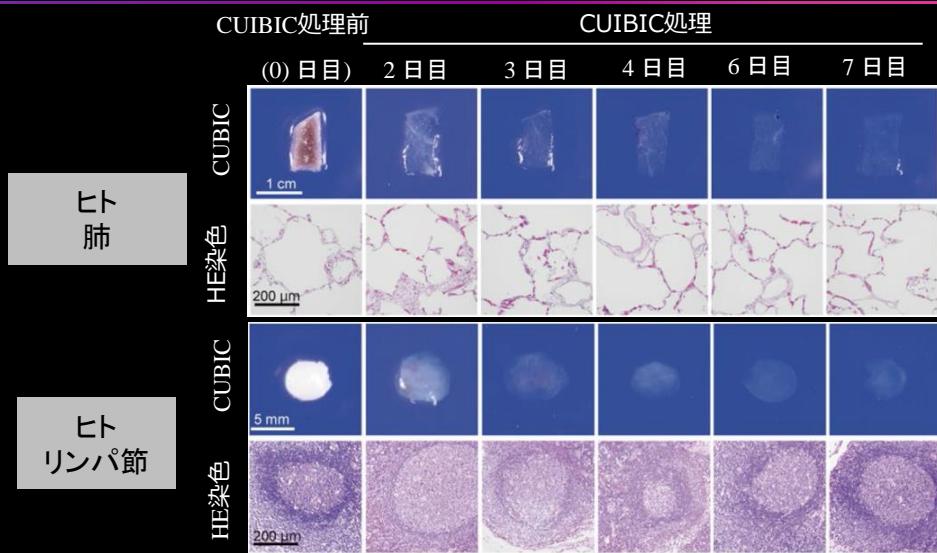


図1. CUBIC処理したヒト臓器片例  
- CUBIC処理後、パラフィン包埋、薄切、HE染色が可能 -

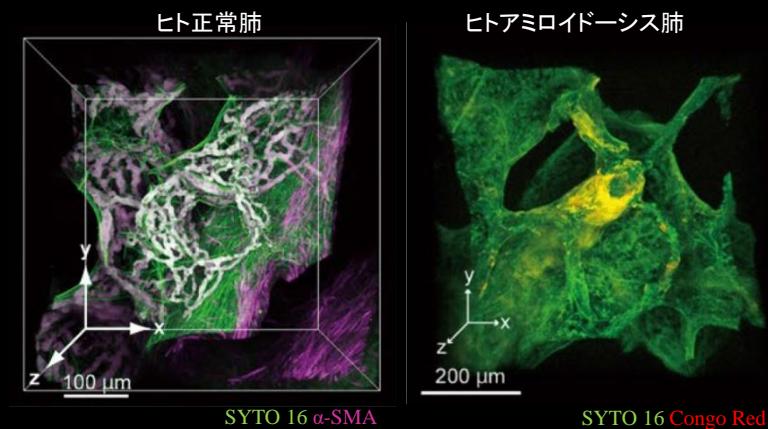


図2. CUBIC処理したヒト病理組織検体を共焦点顕微鏡で観察

## CUBIC 病理学的手法を合わせたアプリケーション2

Data by  
Kathlijn. Vints et al. : *Scientific Reports*, 9,130 (2019) / Adapted.

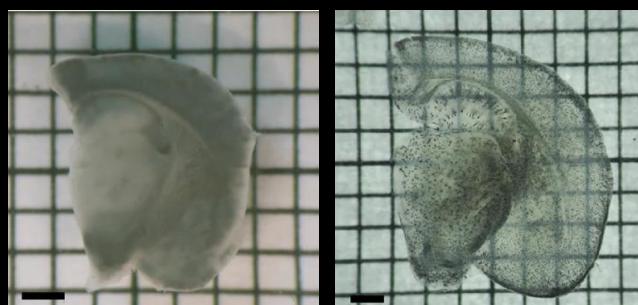


図1. Golgi-Cox染色したマウス脳のCUBIC処理例

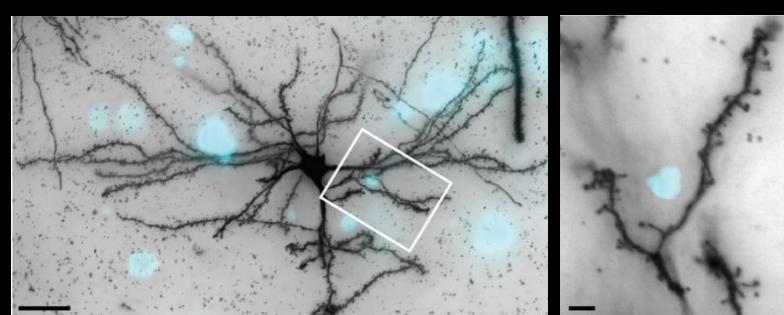


図2. アルツハイマーモデルマウス(18ヶ月齢)脳スライス(200 μm厚)のGolgi-Cox染色とチオフラビンS染色(シアニン色)後のCUBIC処理例

## CUBIC 魚類アプリケーション

データ提供元：東京海洋大学 海洋生物資源学部門  
二見邦彦先生

1) S. Ohnuma, et al.: *Fish Pathology*, 52(2), 96(2017).

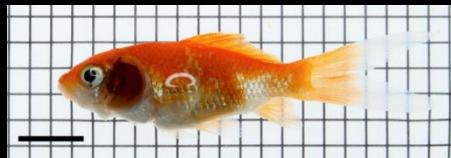


図1. CUBIC処理した魚類透明化例

スケールバー : 1 cm

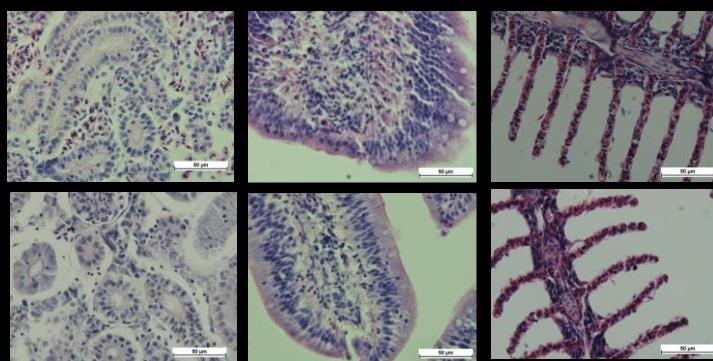


図2. CUBIC処理した魚類臓器切片例  
- CUBIC処理後、5  $\mu\text{m}$ で薄切りし、HE染色が可能 -  
スケールバー : 50  $\mu\text{m}$

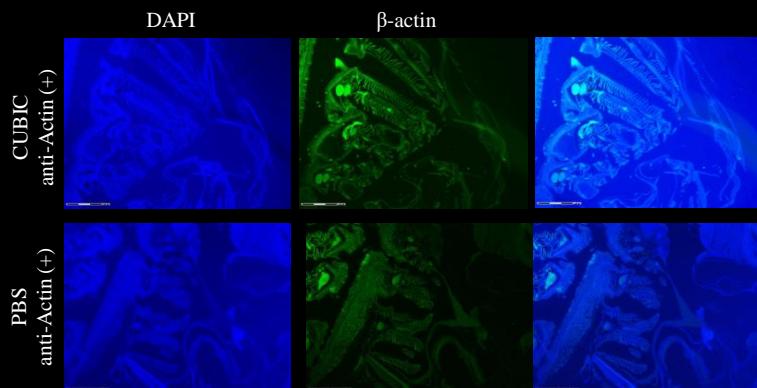


図3. CUBIC処理した魚類臓器切片例  
- CUBIC処理後、5  $\mu\text{m}$ で薄切りし、HE染色が可能 -  
スケールバー : 300  $\mu\text{m}$

## CUBIC 甲殻類(カニ・ダンゴムシ)アプリケーション

データ提供元：浜松医科大学 医学分光応用寄附研究室  
紺野在先生、岡崎茂俊先生

1) A. Konno and S. Okazaki.: *Zoological Letters*, 4:13(2018).



図1. CUBIC処理した甲殻類(カニ)透明化例

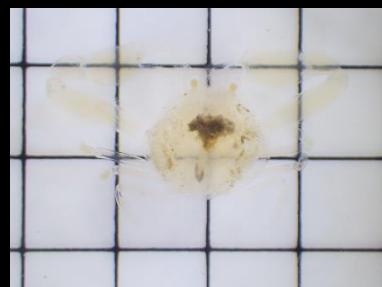


図2. CUBIC処理(PI染色)した甲殻類(カニ)を丸ごと観察透明化例



図3. CUBIC処理した甲殻類(ダンゴムシ)透明化例

図4. CUBIC処理(PI染色)した甲殻類(ダンゴムシ)を丸ごと観察透明化例

## SeeDB2 概略

データ提供元：  
国立大学法人 九州大学医学研究院  
坂口理智先生、今井猛先生  
国立研究開発法人理化学研究所 柯孟岑先生

SeeDB2は柯孟岑、今井猛博士らにより開発された新しいタイプの組織透明化試薬です。SeeDB2は特に蛍光タンパク質によって標識されたサンプルの3次元高解像イメージングに最適です。SeeDB2Gはグリセリンの屈折率（1.46）に、SeeDB2Sはオイルの屈折率（1.52）に合わせてあり、それぞれグリセリン浸レンズ、油浸レンズを用いた観察において、深部でも球面収差によるボケ（分解能の低下）が生じないように最適化されています。

また、特筆すべき点として、SeeDB2においては蛍光タンパク質の蛍光が非常に安定に保持されており、PBSや他の市販のマウント剤よりも優れています。このため、SeeDB2は蛍光タンパク質で標識されたサンプルのマウント剤としても最適です。厚みのあるサンプルだけでなく、細胞生物学用の薄いサンプルや組織切片のマウントにも使用可能です。

本キットは1) サポニン、2) SeeDB2G solution、3) SeeDB2S solution、4) PBSの4成分で構成されております。Permeabilization solution、Clearing Solutionの各種試薬を調整し、透明化を行うことが可能なキットになります。

- 1) Ke et al.: *Cell Reports* **14**, 2718(2016)
- 2) SeeDB Resources (<https://sites.google.com/site/seedbresources/>): updated information and technical TIPs from the authors.
- 3) Sakaguchi et al.: *eLife* **7**, e40350(2018).

## SeeDB2 組織透明化プロトコル例

### 【固定】

- 1) 取り出した脳サンプルを、4%PFA/PBSで固定（4℃、1晩）する。
- 2) PBSで洗浄する。
- 3) ビブロームを用いてスライスを作成する（必要に応じて0.2 – 2mm 厚）。

### 【透明化】（脳スライスサンプル（臓器丸ごと）の透明化例） (試薬調製) 5 mLチューブを用いて3 mLスケールで行う場合)

#### 1. 20% saponin stock solution

0.6g Saponin を3 mL の超純水に溶解する。試薬を長期保存する場合にはフィルター滅菌する。

#### 2. Permeabilization solution :

300μL 20% saponin に2700μL PBS を加え溶解する。

#### 3. Clearing solution 1 ( 2:1 mixture ) :

300μL 20% saponin に1700μL 超純水、1000μL SeeDB2G solutionを加え溶解する。

#### 4. Clearing solution 2 ( 1:1 mixture ) :

300μL 20% saponin に1200μL 超純水、1500μL SeeDB2G solutionを加え溶解する。

#### 5. Clearing solution 3 ( for SeeDB2G ) :

60mg saponin を3 mL SeeDB2G solution に溶解する。

#### 6. Clearing solution 4 ( for SeeDB2S, optional ) :

60mg saponin を3 mL SeeDB2S solution に溶解する。

- 4) 3 mL のPermeabilization solution が入ったチューブにサンプルを移し、チューブローター（~4 rpm）で室温12-16時間転倒回転する。
- 5) 3 mLのClearing solution 1が入った新しいチューブにサンプルを移し、チューブローター（~ 4 rpm）で室温6-10 時間転倒回転する。
- 6) 3 mLのClearing solution 2が入った新しいチューブにサンプルを移し、チューブローター（~ 4 rpm）で室温6-10 時間転倒回転する。
- 7) 3 mLのClearing solution 3が入った新しいチューブにサンプルを移し、チューブローター（~ 4 rpm）で室温12 時間以上転倒回転する。
- 8 ( optional for SeeDB2S ) 3 mL の clearing solution 4 が入った新しいチューブにサンプルを移し、チューブローター（~ 4 rpm）で室温12 時間以上転倒回転する。
- 9) 3 mL の SeeDB2G solution ( step 7 より) もしくはSeeDB2S solution ( step 8 より) が入った新しいチューブにサンプルを移す。

### （観察）

- 10) リングピンセットもしくは絵筆を用いて透明化されたサンプルを拾い、イメージングチャンバー（SeeThrough Chamber）もしくはスライドガラス（薄いサンプルの場合）にマウントする。適量のSeeDB2G solution もしくはSeeDB2S solution を滴下し、カバーガラスでシールする。カバーガラスの端からはみ出たSeeDB2G/Ssolution は数分で固化する。
- 11) 蛍光顕微鏡を用いて透明化されたサンプルの観察を行う。SeeDB2Gでマウントした標本はグリセリンでイマージョンし、グリセリン浸レンズで観察する。SeeDB2S でマウントしたサンプルはイマージョンオイルでイマージョンし、油浸レンズで観察する。



図1. SeeDB2を用いたマウス脳の透明化例

マウス脳スライス（1.5 mm厚）のSeeDB2処理前後

## SeeDB2 アプリケーション

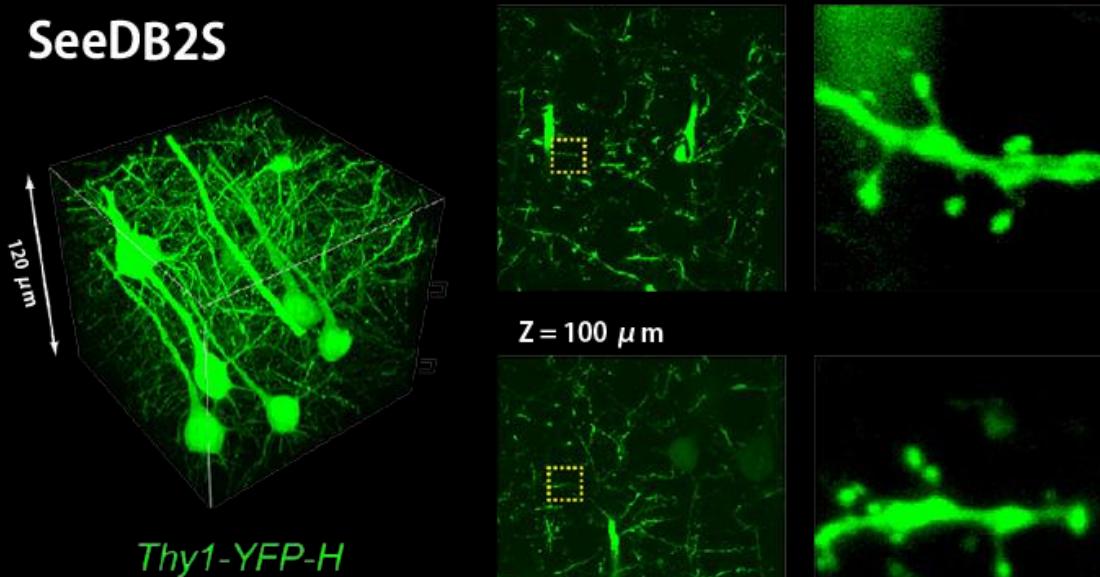
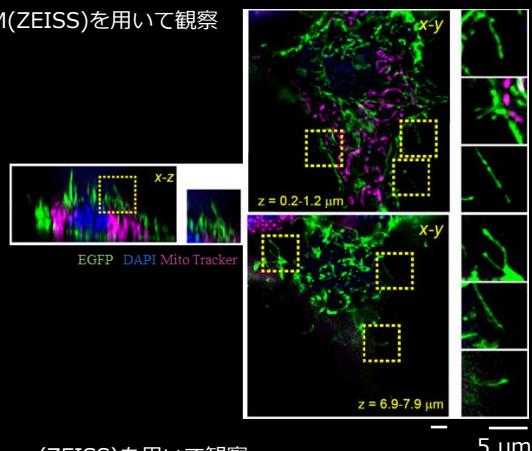


図2. Thy1-YFP H lineマウス脳スライスを共焦点顕微鏡で観察

NA 1.4の油浸レンズを使用。レーザーパワーを変えなくても、上から下までほぼ一定の輝度が得られる。スケールバーは2  $\mu\text{m}$ 。

### A. SR-SIM(ZEISS)を用いて観察



### B. Airyscan(ZEISS)を用いて観察

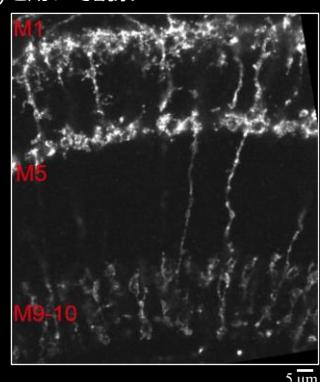


図3. SeeDB2 / Super Clear Mountを使用し、超解像度顕微鏡を用いて観察

(A) 細胞膜からのフィロボディア伸展を超解像度顕微鏡を用いて観察  
HEK293T細胞の細胞膜にEGFPを発現させた後、核染色試薬、ミトコンドリア染色試薬を用いて観察。  
細胞膜からのフィロボディア伸展を高解像度データが取得可能です。  
(B) ショウジョウワニ脳を超解像度顕微鏡を用いて観察  
ショウジョウワニ脳のメタラ神経節にある神経細胞:M1を蛍光タンパク質(GFP)で標識し、超解像度観察(深さ約100  $\mu\text{m}$ )。深部超解像イメージングを実現可能です。

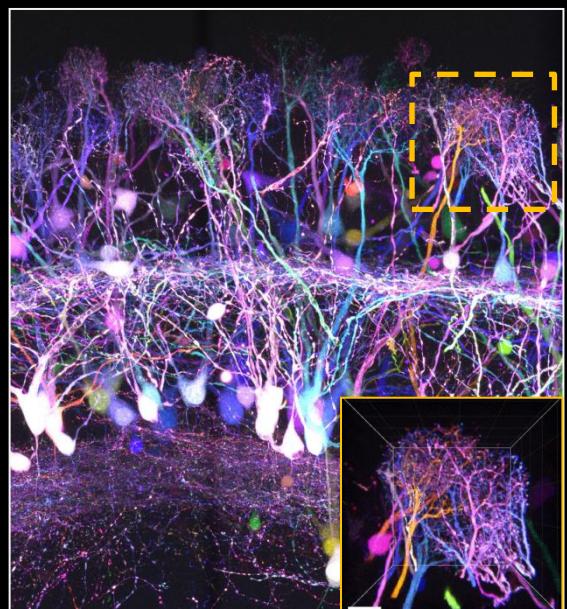


図4. SeeDB2を用いたTetbowによる神経細胞の多色蛍光イメージング  
マウス嗅球傍帽細胞・房飾細胞を Tetbow 法で標識したデータ。  
スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

ClearSee®は栗原大輔博士らにより、蛍光タンパク質を壊すことなく、植物生体試料の組織構造を保持したままクロロフィルを取り除き、簡便に丸ごと透明化することのできる植物生体試料用透明化試薬です。

これまで植物組織の内部構造を観察するためには、切片などを作製する必要がありました。ClearSee®により透明化した植物生体試料は、切片などを作製することもなく、内部の構造を●おごと蛍光顕微鏡観察することが可能です。

洗浄、透明化の3ステップで透明化処理を行うことが可能であり、植物科学研究のツールとして、細胞レベルの現象と個体全体をつなぐシステムの解明などが期待されます。

1) Kurihara, D. et al.: *Development*, 142, 4168-4179 (2015).

## ClearSee® プロトコル例

### 【固定】(シロイヌナズナ葉の場合)

- 1) 4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて、サンプルを固定する。
- 2) デシケーターにサンプルを入れ、真空ポンプにより減圧し、室温で30分、静置し、固定する。この作業を2回繰り返す。
- 3) 固定液を除き、1x PBSを1 mL加えて1分間静置する。PBSは新しいものに変えて、この作業を2回繰り返す。

### 【透明化】

- 4) 1x PBSを除き、ClearSee®を1.3 mL加える。
  - 5) マイクロチューブのフタを開けたままパラフィンフィルムで密封し、針で通気穴を数ヶ所開ける。デシケーターに入れ、真空ポンプにより減圧し、室温で1時間、静置する。パラフィンフィルムを外し、マイクロチューブのフタを閉め、遮光して室温で静置し、透明化する。必要に応じて、新しいClearSee®で置換する。
- シロイヌナズナの葉の場合、3 – 5日で透明化が完了する。

### (観察)

- 6) スライドガラスの上にワセリンやグリースなどで囲いを作り、ClearSee®を適量のせる。ピンセットで植物試料を移し、カバーガラスのせて、蛍光顕微鏡下で観察する。ClearSee®は乾燥してしまうと析出するので、ワセリンやグリースなどで乾燥を防ぐ。観察後は、ClearSee®が入ったマイクロチューブに植物試料を戻すと、保存することができる。
- また、ClearSee®で透明化した植物試料は、蛍光色素で染色することも可能。細胞核を染色するときはビスベンズイミドH33258三塩酸塩、ビスベンズイミドH33342やDAPIを終濃度10µg/mL、細胞壁を染色するときは終濃度1mg/mLになるようにClearSee®の中に加えて、1時間静置後、新しいClearSee®に置換して、1時間静置後に、蛍光顕微鏡下で観察する。

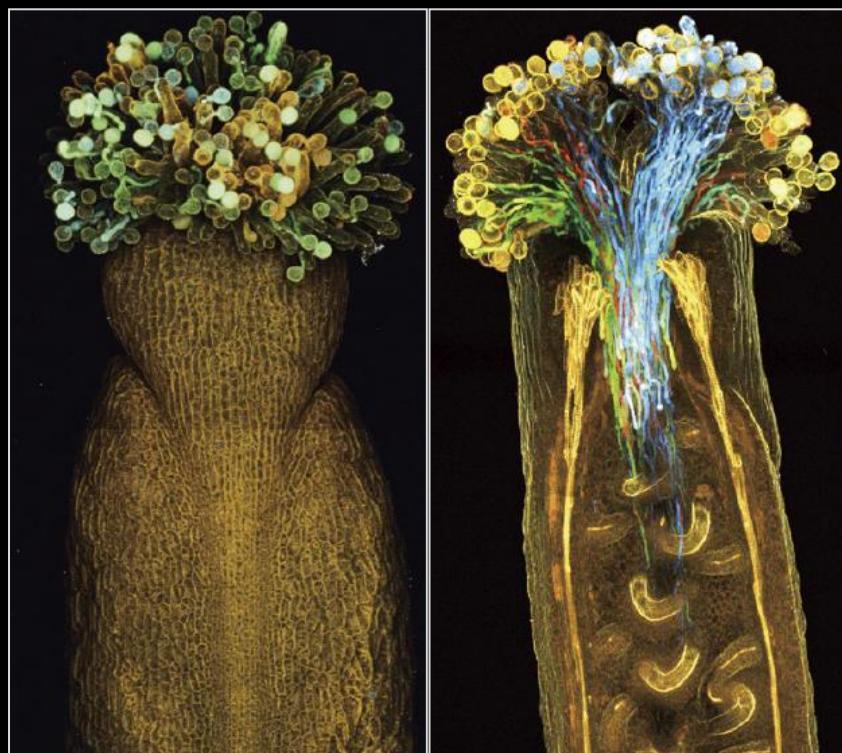


図1. ClearSee®により透明化しためしべを丸ごと蛍光観察  
花粉管を4色の蛍光タンパク質で(青色、緑色、黄色、赤色)で  
目印をつけている。  
参考文献より改変して転載。

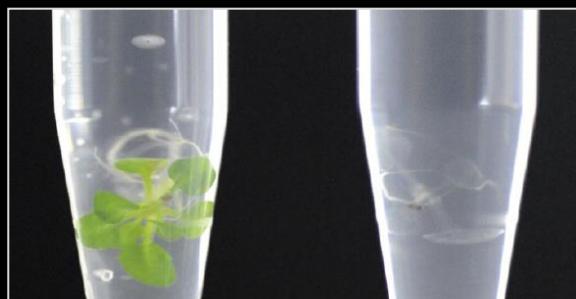


図2. ClearSee®により透明化したシロイヌナズナの葉

## ClearSee アプリケーション

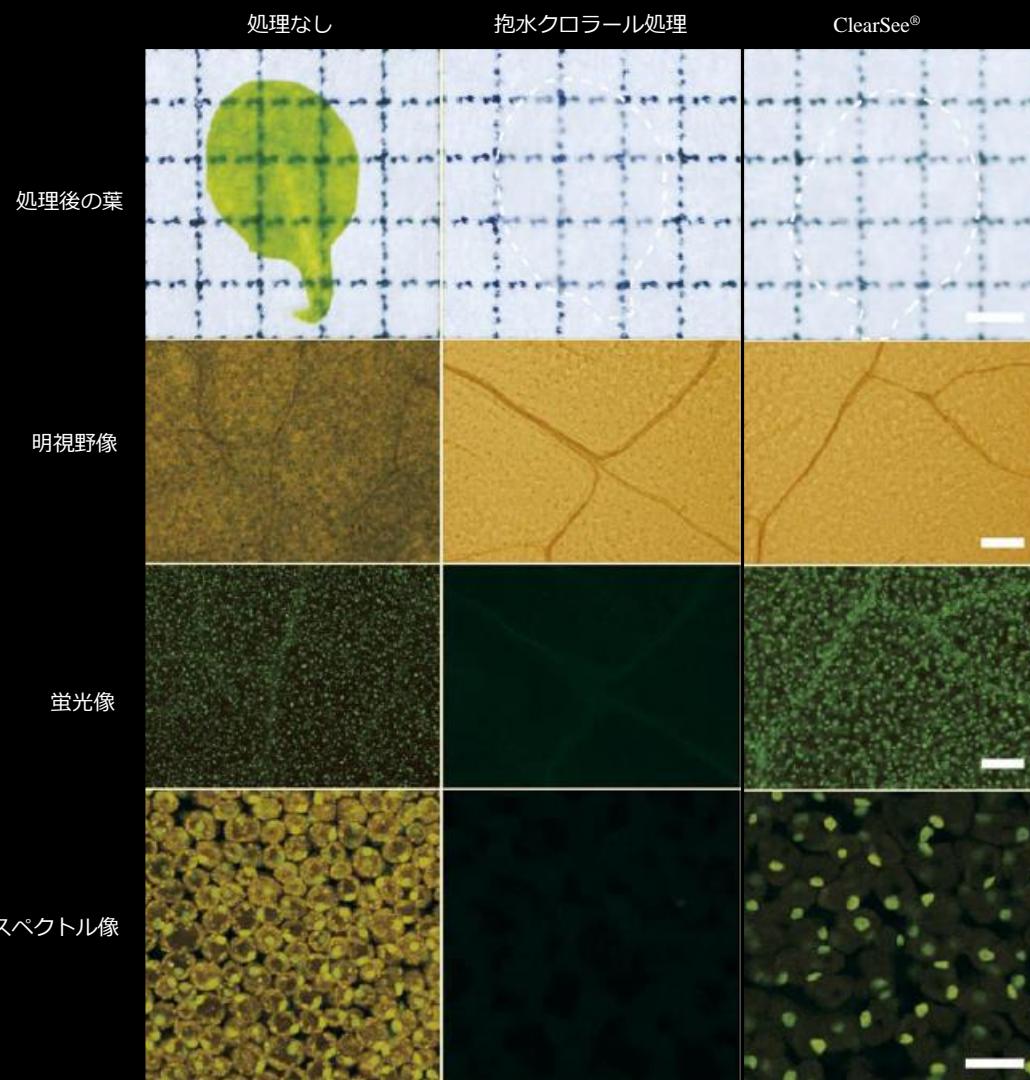


図3. ClearSee®により4日間処理したシロイスナズナの葉  
処理後の葉と明視野像で緑色に見えているのがクロロフィル。蛍光像では、細胞核を蛍光タンパク質で標識しているため、粒状に観察される。スペクトル像で橙色に見えているのがクロロフィルの自家蛍光。  
(スケールバーは上段: 1 mm、中・下段: 30 μm) 参考文献より改変して転載。



図4. ClearSee®により4日間処理したシロイスナズナの根  
オーキシン応答細胞の核を緑色、全身の細胞核を紫色で示す。  
参考文献より改変して転載。スケールバーは30 μm。

CLARITYは新規組織透明化方法として、スタンフォード大学のKarl Deisseroth博士らより*Nature*誌で2013年3月に発表されました。CLARITYは、蛍光タンパク質や抗体を用いた免疫染色が可能であることから、脳神経回路の解析に有用なツールであることが期待されています。現在、様々な改変方法が報告されており、詳しい情報は論文で確認してください(Chung,K et al. : *Nature*, 497, 332(2013). 他)。

VA-044は、論文プロトコルの透明化工程で使用される試薬になります。

他試薬が多数必要になりますので、詳しくは論文又は当社ウェブサイトを参考にして下さい。

## CLARITY アプリケーション

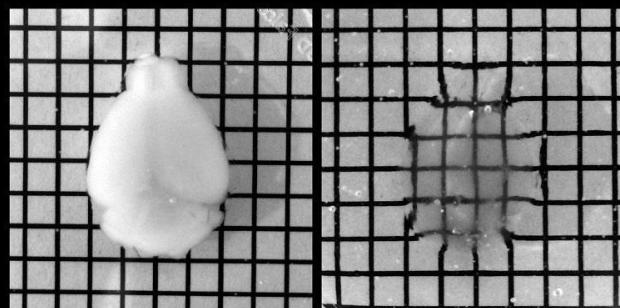


図1 左:CLARITY処理前のマウス脳 右:CLARITY処理後のマウス脳

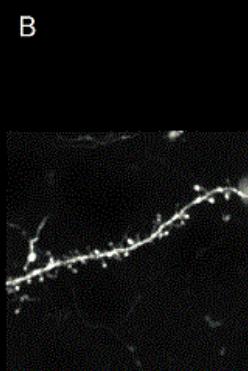
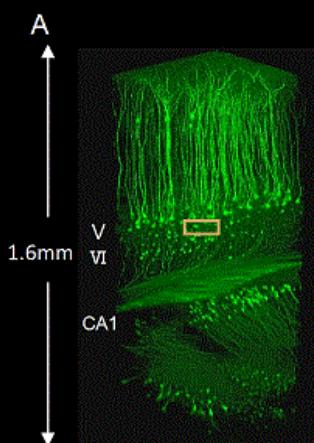


図2. CLARITY処理したThy1-YFP(H Line) マウス大脳の蛍光観察  
(A) 脳皮質から海馬までの3-D観察画像  
(B) 大脳皮質V層の錐体細胞の樹状突起画像

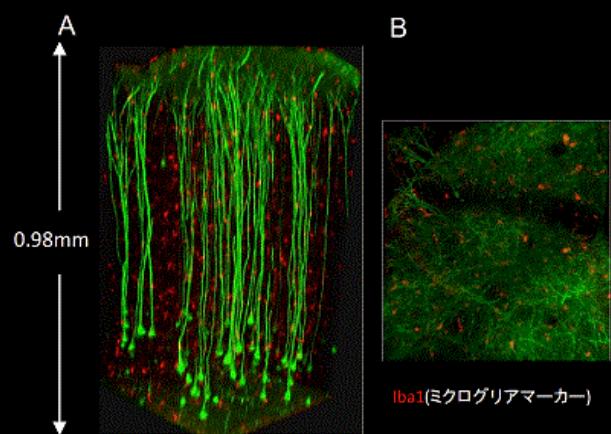


図3. CLARITY処理後、Iba1抗体で染色したThy1-YFP(H Line) マウス大脳の蛍光観察  
(A) 脳皮質中のマイクログリア細胞3-D観察画像  
(B) 皮質I層を表層から観察した画像

## 関連製品 抗Iba1, ウサギ, 赤色蛍光色素(635)結合 と 透明化技術を用いた抗体染色ノウハウ



各透明化技術を用いて抗体染色を行う場合、抗体性能と蛍光色素が染色に影響する場合があります。そのため、透明化技術を本格的に導入する前に透明化技術に使用できる抗体の性能チェックを推奨いたします。一例として、50 μmの厚めの凍結切片を準備し、各透明化技術を用いて、目的とする抗体を用いて染色を行います。共焦点顕微鏡で切片をxyz観察し、xz断面またはyz断面を見て内部が染色されているかを確認して下さい。内部の様子を確認できた場合、透明化技術に使用できる抗体の可能性が高いです。

また、抗体が使用可能と判断できた場合、1次抗体に蛍光色素を標識して使用することを推奨いたします。理由としては、透明化技術を用いたサンプルは組織切片が厚くなるため、抗体処理時間が長くなるためです。

左図に示した抗Iba1, ウサギ, 赤色蛍光色素(635)結合(013-26471)は各透明化技術との相性もよく、脳神経科学分野ではお勧めの商品です。

## 蛍光タンパク質用封入剤：Super Clear Mount

**Super Clear Mount (RI:1.52)**は、屈折率(RI)を浸漬オイル(RI:1.52)およびカバーガラス(RI:1.52)と完全に同じに調整した製品です。

従来のマウント剤と比較すると、深部での分解能が向上するため、より高解像な解析に使用することが可能です。また、油浸レンズで観察した場合、深部でも明るさが一定、分解能（特にz分解能）が一定であり、超解像のアプリケーションにも使用することができます。

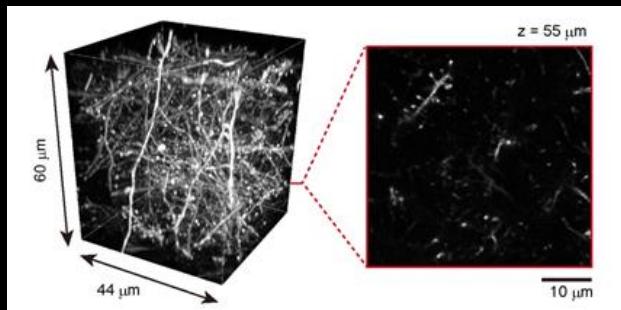
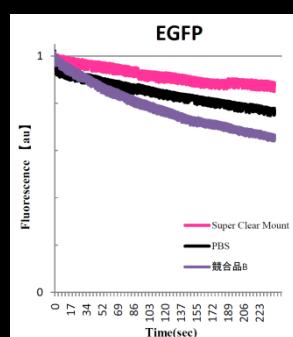


図1. Super Clear MountでマウントしたYFP-H lineマウス脳スライス (220  $\mu\text{m}$ 厚) を共焦点顕微鏡を用いて観察  
深部まで高解像画像取得可能であることを確認しています。



FP	Ex / Em (nm)	Brightness
TagBFP2	399 / 454	+++
ECFP	433 / 475	+++
mTurquoise2	434 / 474	+++
EGFP	488 / 509	+++
EYFP	513 / 527	+++
tdTomato	554 / 581	+++
tdKatushka2	588 / 633	+++
CyOFP	497 / 589	+++

図2. Super Clear Mount を用いた蛍光タンパク質褪色防止データ

- (A) 蛍光タンパク質(EGFP)光褪色曲線例  
HEK293 細胞に蛍光タンパク質を発現させた後、Super Clear Mount、PBS、他社市販(蛍光タンパク質対応)でマウント。水銀ランプで照射し続けながら蛍光輝度変化を測定した。対物レンズは 20×ドライ(NA 0.4)。照射開始時の蛍光輝度を 1 としている。  
(B) 各蛍光タンパク質の蛍光輝度安定性

## 透明化組織サンプル用観察容器：See Through Chamber

See Through Chamberは、厚みのある透明化サンプルを顕微鏡で観察する際に使用する観察容器です。

観察容器は、透明化サンプルを観察し易くするために加工したシリコンゴムシート、カバーガラス、スライドガラスの10セット構成になります。

スペーサーとなるシリコンゴムのシート厚は0.3 mm、0.5 mm、1.0 mm、2.0 mm、3.0 mmの計5種類を用意しており、サンプルの厚さに応じて最適なサイズを選んで使用することができます。

シリコンゴムシートは両面に保護シートが貼付しており、使用時に剥がすことで、スライドガラス、カバーガラスと密着した状態で使用することができます。



コード No.	品名	規格	容 量	希望納入価格(円)
294-35631	See Through Chamber, 0.3mm thick	組織透明化用	10set	7,500
291-35641	See Through Chamber, 0.5mm thick	組織透明化用	10set	7,500
295-35661	See Through Chamber, 1.0mm thick	組織透明化用	10set	7,500
292-35671	See Through Chamber, 2.0mm thick	組織透明化用	10set	7,500
299-35681	See Through Chamber, 3.0mm thick	組織透明化用	10set	7,500

## オリンパス社製対物レンズ一覧表 【多光子専用対物レンズ】

焦点からのみ蛍光を発する特性により、高精細な3次元画像を得ることができる多光子励起レーザー走査型顕微鏡専用の対物レンズです。標本透明化液と合わせて使用することで、生体組織を傷つけることなく、表面から深部まで高解像の3次元画像を観察することができます。

「XLPLN10XSVMP」：低倍率のため、広い視野でより効率的な深部観察が可能  
生体組織の表面からの深部観察で、広い範囲を対象に、より効率よく明るい観察を行うことができます。近年開発された、高屈折率の液体を用いた標本透明化技術にも対応しています。

「XSLPLN25XGMP」：最深8mmまで高解像の深部観察が可能で、各種標本透明化技術にも対応  
生体組織を傷つけることなく表面から最大8mmの深さまで、明るく高精細な3次元画像を観察することができます。マウスの脳表面から、記憶をつかさどる重要な組織である海馬、さらに深部に至るまでの観察が可能です。このほか、高屈折率の液体を用いた標本透明化技術にも対応しています。

本ページ掲載製品について、購入前にあらかじめデモにより、データ取得して確認することを推奨いたします。



XLPLN10XSVMP



XLPLN25XSVMP2



XSLPLN25XSVMP2



XSLPLN25XGMP

製品名	XLPLN10XSVMP	XLPLN25XSVMP2	XSLPLN25XSVMP2	XSLPLN25XGMP
倍率	10	25	25	25
開口数 NA	0.60	1.00	0.95	1.00
作動距離 W.D.(mm)	8	4	8	8
対物視野数 (mm)	18	18	18	18
カバーガラス厚(mm)	0 - 0.23	0 - 0.23	0 - 0.23	0 - 0.23
浸液	SCALEVIEW-A2 水浸または、屈折率1.33-1.52の透明化液	水浸または、屈折率1.33-1.40の透明化液	水浸または、屈折率1.33-1.40の透明化液	80%グリセリン または、屈折率1.41-1.52の透明化液
補正環	あり	あり	あり	あり

●仕様・外観については、予告なしに変更する場合があります。あらかじめご了承ください。

## 【共焦点顕微鏡用 シリコーンオイル浸、油浸、水浸またはドライ対物レンズ】

本ページ掲載製品について、透明化試薬向けに開発されたものではないため、購入前にあらかじめデモにより、データ取得して確認することを推奨いたします。



UPLXAPO40XO



UPLXAPO60XO



UPLXAPO100XO

製品名	UPLXAPO40XO	UPLXAPO60XO	UPLXAPO100XO
倍率	40	60	100
開口数 NA	1.40	1.42	1.45
作動距離 W.D.(mm)	0.13	0.15	0.13
対物視野数 (mm)	26.5	26.5	26.5
カバーガラス厚(mm)	0.17	0.17	0.17
浸液	油浸	油浸	油浸

●仕様・外観については、予告なしに変更する場合があります。あらかじめご了承ください。



UPLXAPO10X



UCPLFLN20X



UPLSAPO30XS

製品名	UPLXAPO10X	UCPLFLN20X	UPLSAPO30XS
倍率	10	20	30
開口数 NA	0.40	0.70	1.05
作動距離 W.D.(mm)	3.1	0.8 - 1.80	0.8
対物視野数 (mm)	26.5	22	22
カバーガラス厚(mm)	0.17	0 - 1.60	0.13 - 0.19
浸液	空気(乾燥)	空気(乾燥)	シリコーンオイル浸
補正環	なし	あり	あり

●仕様・外観については、予告なしに変更する場合があります。あらかじめご了承ください。

## 透明化試薬一覧表

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
193-18455	SCALEVIEW-A2	組織透明化用	500mL	10,000
196-18521	SCALEVIEW-S0	組織透明化用	250mL	12,000
194-18561	SCALEVIEW-S4	組織透明化用	250mL	12,000
191-18571	SCALEVIEW-SM1	組織透明化用	250mL	15,000
041-34425	deScale Solution	組織透明化用	500mL	12,000
299-79901	SCALEVIEW-S Trial Kit	組織透明化用	1kit	45,000
290-80801	CUBIC Trial Kit	組織透明化用	1kit	45,000
294-80701	SeeDB2 Trial Kit	組織透明化用	1kit	55,000
190-18661	Super Clear Mount	細胞生物学用	10mL	19,000
223-02112	VA-044	細胞生物学用	25g 100g	9,800 23,000
031-25151	ClearSee®	植物透明化用	50mL	20,000

## 関連製品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
193-18455	Anti Iba1, Rabbit, Red Fluorochrome(635)-conjugated	免疫化学用	100μl	48,500
196-18521	Anti Amyloid β, Monoclonal Antibody(2C8)	免疫化学用	50μl	35,000
634-37511	PrimeSurface® 96スリットウェルプレート		20個	90,000
631-21031	PrimeSurface® 96Uプレート		20枚	30,000

## オリンパス社製対物レンズ一覧表

品名	容量	希望納入価格(円)
UPLXAPO10X	1本	146,000
UCPLFLN20X	1本	361,000
UPLSAPO30XS	1本	1,00,000
UPLXAPO40XO	1本	450,000
UPLXAPO60XO	1本	328,000
UPLXAPO100XO	1本	292,000
XLPLN10XSVMP	1本	2,000,000
XLPLN25XSVMP2	1本	2,500,000
XSLPLN25XSVMP2	1本	2,500,000
XSLPLN25XGMP	1本	2,500,000

Ref … 2～10°C保存 F … -20°C保存 B … -80°C保存 表示が無い場合は室温保存です。  
 特定毒物 I … 特定毒物 II … 毒物 III … 劇毒 IV … 効物 V … 毒薬 VI … 効薬 VII … 危険物 VIII … 向精神薬 IX … 特定麻薬向精神薬原形 X … カルタヘナ法  
 第一種指定物質 1 … 化審法 第二種特定化学物質 2 … 第二種化審法 第二種特定化学物質 3 … 化兵1 … 化学兵器禁止法 第一種指定物質 4 … 化兵2 … 化学兵器禁止法 第二種指定物質  
 覚せい剤取締法…「覚せい剤原料研究者又は取扱者」の免許を取得して、ご購入に際しては、譲受証及び譲渡証による受け渡しが必要となります。覚  
 国民保護法…生物・毒素兵器の製造、使用防止のため、「毒素等」を試験研究用に使用することを確認する証を頂戴しております。毒素等  
 上記以外の法律及び最新情報は、弊社試薬サイト (<https://labchem-wako.fujifilm.com>) をご参照下さい。

- 本文に収載しております試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「医療品」、「食品」、「生活用品」などとして使用できません。
- 希望納入価格には消費税等が含まれておません。

## 富士フィルム 和光純薬株式会社

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL 06-6203-3741 (代表)  
 東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL 03-3270-8571 (代表)

- 九州 営業所 ● 中國 営業所
- 東海 営業所 ● 横浜 営業所
- 筑波 営業所 ● 東北 営業所
- 北海道 営業所



フリーダイヤル 0120-052-099

試薬URL : <https://labchem-wako.fujifilm.com>

■ FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation  
 1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA  
 TEL:+1-804-714-1920 FAX:+1-804-271-7791

■ FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH  
 Fuggerstr 12, 41468 Neuss, Germany  
 TEL:+49-2131-311-0 FAX:+49-2131-311-100