



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104956201 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201380071465. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 11. 20

G01N 1/30(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/00(2006. 01)

2013-012889 2013. 01. 28 JP

G01N 1/28(2006. 01)

PCT/JP2013/004369 2013. 07. 17 JP

G01N 21/64(2006. 01)

G02B 21/34(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 07. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/006811 2013. 11. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/115206 JA 2014. 07. 31

(71) 申请人 国立研究开发法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 小野寺宏

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 葛凡

权利要求书1页 说明书11页 附图14页

(54) 发明名称

组织透明化方法、组织透明化试剂及组织观察方法

(57) 摘要

本发明提供一种组织透明化方法,是不使用有毒或危险的有机溶剂而能够通过简便的操作、在不引起各种脏器的变化的情况下充分地对各种脏器进行透明化的技术。所述组织透明化方法包括在水溶性溶剂中浸渍组织的步骤,所述水溶性溶剂含有甘油及非离子性有机碘化合物中的至少一种、以及2,2'-硫代双乙醇。该组织透明化方法中,所述水溶性溶剂优选使用2,2'-硫代双乙醇、甘油和非离子性有机碘化合物水溶液的混合溶剂。

1. 一种组织透明化方法,其包括在水溶性溶剂中浸渍组织的步骤,
所述水溶性溶剂含有甘油及非离子性有机碘化合物中的至少一种、以及 2, 2' - 硫代双乙醇。
2. 如权利要求 1 所述的组织透明化方法,其中,
所述溶剂为 2, 2' - 硫代双乙醇、甘油和非离子性有机碘化合物水溶液的混合液, 2, 2' - 硫代双乙醇、甘油及碘含量为 40% 的非离子性有机碘化合物水溶液的体积比分别为 10 ~ 50%、1 ~ 20% 及 10 ~ 70%。
3. 如权利要求 1 所述的组织透明化方法,其中,
所述溶剂为 2, 2' - 硫代双乙醇与非离子性有机碘化合物水溶液的混合液, 2, 2' - 硫代双乙醇及碘含量为 40% 的非离子性有机碘化合物水溶液的体积比为 20 ~ 80%、80 ~ 20%。
4. 如权利要求 1 所述的组织透明化方法,其中,
所述溶剂为 2, 2' - 硫代双乙醇与甘油的混合液, 2, 2' - 硫代双乙醇及甘油的体积比为 70 ~ 95%、5 ~ 30%。
5. 如权利要求 1 所述的组织透明化方法,其中,
所述溶剂还含有蔗糖水溶液。
6. 如权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的组织透明化方法,其中,
所述溶剂的折射率为 1.4 ~ 1.7。
7. 如权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的组织透明化方法,其中,
所述组织为选自脑、脊髓、肝脏、肺、心脏、血管及癌组织中的一种以上。
8. 如权利要求 7 所述的组织透明化方法,其中
所述组织具有 1mm 以上的厚度。
9. 一种组织透明化试剂,其包含水溶性溶剂,所述水溶性溶剂含有甘油及非离子性有机碘化合物中的至少一种、以及 2, 2' - 硫代双乙醇。
10. 一种组织观察方法,其包括在水溶性溶剂中浸渍组织的透明化步骤,所述水溶性溶剂含有甘油及非离子性有机碘化合物中的至少一种、以及 2, 2' - 硫代双乙醇。
11. 如权利要求 10 所述的组织观察方法,其包括:
标记步骤,对所述组织进行荧光标记,
所述透明化步骤,在所述溶剂中浸渍荧光标记后的所述组织,和
检测步骤,检测由透明化后的组织中的所述荧光标记发出的荧光。
12. 如权利要求 10 所述的组织观察方法,其包括:
所述透明化步骤,在所述溶剂中浸渍所述组织,
标记步骤,对透明化后的组织进行荧光标记,和
检测步骤,检测由透明化及荧光标记后的组织中的所述荧光标记发出的荧光。
13. 如权利要求 11 或 12 所述的组织观察方法,其中,
所述检测步骤中,利用荧光显微镜、荧光立体显微镜、共聚焦显微镜或多光子显微镜观察所述荧光。

组织透明化方法、组织透明化试剂及组织观察方法

[0001] 技术分野

[0002] 本发明涉及组织透明化方法、组织透明化试剂及组织观察方法。更详细而言，本发明涉及能够在不引起组织变化的情况下简便且安全地对组织进行透明化的组织透明化方法等。

背景技术

[0003] 近年来，伴随转化技术及基因导入技术的进展，在各种脏器中，正在进行仅将特定的细胞用荧光蛋白标记并进行观察的操作。例如进行了如下尝试：对脑内各种神经回路进行选择性的荧光标记，以荧光为指标使神经回路 3 维可视化从而再构建。

[0004] 以往，脏器内部组织的观察通过如下方式进行：将固定、包埋后的脏器（或者脏器片）机械地切薄来制作组织切片，并在光学显微镜下进行观察。另外，近年来，通过利用共聚焦激光显微镜、多光子激发显微镜将脏器光学“切割”，从而能够得到内部组织的观察图像。

[0005] 在 3 维观察神经回路等组织结构的情况下，上述机械方法需要制作多个连续的组织切片、并将这些荧光图像累积，非常费力。另一方面，光学方法中，由于光在脏器内部发生散射，因此存在如下问题：随着要观察的部位距离脏器表面的深度的加大，越来越难以取得荧光图像（观察深度界限）。

[0006] 关于观察深度界限，通常认为：共聚焦激光显微镜为 0.15mm 左右，二光子激发显微镜最大为 4mm 左右。例如研究中通用的小鼠的脑的情况下，表层皮质的厚度为约 1mm，因此为了观察比皮质更靠脑的内侧的海马、视丘，需要将观察深度界限扩展至数毫米。

[0007] 因此，作为用于抑制脏器内部的光的散射来扩展观察深度界限的技术，正在研究使脏器透明化的技术。例如非专利文献 1 报道了如下方案：通过使用四氢呋喃的方法使脑脊髓透明化。另外，专利文献 1 及非专利文献 2 记载了如下方案：能够通过使用高浓度的尿素的方法（Scale 法）使脑透明化。

[0008] 非专利文献 4 记载了如下方案：能够通过使用 2, 2'- 硫代双乙醇来将蜻蜓的胸部神经节、乌贼的皮肤等组织透明化至 0.6mm 左右的厚度。另外，在此之前的非专利文献 5 记载了如下方案：使用 2, 2'- 硫代双乙醇作为封固剂。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献 1：日本特表 2013-522590 号

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献 1：“Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury.”Nature Medicine, 2011, Vol. 18, No. 1, pp. 166-71

[0014] 非专利文献 2：“Scale:a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain.”Nature Neuroscience, 2011, Vol. 14, No.

11, pp. 1481-1488

[0015] 非专利文献 3: "Visual properties of transgenic ratsharboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the thy-1.2 promoter." PLoS ONE, 2009, Vol. 4, No. 11, e7679

[0016] 非专利文献 4: "Labeling and confocal imaging of neurons in thick invertebrate tissue samples." Cold Spring Harbor Protocol, 2013

[0017] 非专利文献 5: "2, 2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy." Microscopy Research and Technique, 2007, 70: 1-9

发明内容

[0018] 发明所要解决的问题

[0019] 非专利文献 1 中记载的透明化方法虽然透明化度优异,但是需要使用含有疑似具有致癌性的二氯甲烷的有机溶剂,从而存在如下的问题:有机溶剂的易燃性、废液管理的难度。另外,由于对固定后的脏器进行脱水的过程、透明化试剂本身的影响,存在如下的问题:脏器硬化,或者脏器中所标记的荧光蛋白的荧光信号消失或衰减。

[0020] 另一方面,非专利文献 2 中公开的透明化方法 (Scale 法) 由于能够使用不需要生物体材料脱水的水溶性试剂,因此能够解决非专利文献 1 中记载的方法的上述问题。但是,Scale 法中,用于透明化的处理需要长时间 (2 周左右),透明化度也不充分。另外,存在如下问题:脏器过度膨大、且脆弱化。

[0021] 另外,以往的使用 2, 2'-硫代双乙醇的方法中,能够透明化的组织的厚度只不过为 0.6mm 左右,观察深度不充分 (参照非专利文献 4)。另外,以 80 ~ 85% 以上的高浓度使用 2, 2'-硫代双乙醇时,GFP 等一部分荧光蛋白产生荧光信号的消失或衰减 (参照非专利文献 5)。

[0022] 鉴于这些现有技术中的问题,本发明的主要目的在于提供不使用有毒或危险的有机溶剂而能够通过简便的操作、在不引起各种脏器的变化的情况下充分地对各种脏器进行透明化的技术。

[0023] 解决问题的手段

[0024] 本发明提供一种组织透明化方法,该方法包括在折射率为 1.4 ~ 1.7 的水溶性溶剂中浸渍组织的步骤。

[0025] 该组织透明化方法中,所述水溶性溶剂适合使用 2, 2'-硫代双乙醇、甘油和非离子性有机碘化合物水溶液的混合液。该情况下,水性溶剂中的 2, 2'-硫代双乙醇、甘油及碘含量为 40% 的非离子性有机碘化合物水溶液的体积比分别为 10 ~ 50%、1 ~ 20% 及 10 ~ 70%。

[0026] 另外,作为所述水性溶剂,也可以使用 2, 2'-硫代双乙醇与非离子性有机碘化合物水溶液的混合液。该情况下,水性溶剂中的 2, 2'-硫代双乙醇及碘含量为 40% 的非离子性有机碘化合物水溶液的体积比为 20 ~ 80%、80 ~ 20%。

[0027] 另外,作为所述水性溶剂,可以使用 2, 2'-硫代双乙醇与甘油的混合液。该情况下,水性溶剂中的 2, 2'-硫代双乙醇及甘油的体积比为 70 ~ 95%、5 ~ 30%。

[0028] 为了抑制水性溶剂中的 2, 2' - 硫代双乙醇的浓度从而防止荧光蛋白的荧光信号的消失或衰减, 水性溶剂优选使用 2, 2' - 硫代双乙醇与非离子性有机碘化合物水溶液的混合液、或者在该混合液中加入有甘油的混合液。

[0029] 并且, 所述水溶性溶剂中, 根据对象脏器, 可以还含有蔗糖水溶液。

[0030] 另外, 本发明提供含有折射率为 1.4 ~ 1.7 的水溶性溶剂的组织透明化试剂。组织透明化试剂包含水溶性溶剂, 所述水溶性溶剂含有甘油及非离子性有机碘化合物中的至少一种、以及 2, 2' - 硫代双乙醇。组织透明化试剂根据对象脏器为 2, 2' - 硫代双乙醇与非离子性有机碘化合物水溶液的混合液、或者 2, 2' - 硫代双乙醇与甘油的混合液、更优选为 2, 2' - 硫代双乙醇、甘油和非离子性有机碘化合物水溶液的混合液。

[0031] 另外, 组织透明化试剂根据对象脏器可以还含有蔗糖水溶液。

[0032] 另外, 本发明还提供一种组织观察方法, 所述组织观察方法包括在折射率为 1.4 ~ 1.7 的水溶性溶剂中浸渍组织的透明化步骤。

[0033] 具体而言, 该组织观察方法可以包括: 标记步骤, 对所述组织进行荧光标记; 所述透明化步骤, 在所述溶剂中浸渍荧光标记后的所述组织; 和检测步骤, 检测由透明化后的组织中的所述荧光标记发出的荧光。

[0034] 另外, 该组织观察方法可以包括: 所述透明化步骤, 在所述溶剂中浸渍所述组织; 标记步骤, 对透明化后的组织进行荧光标记; 和检测步骤, 检测由透明化及荧光标记后的组织中的所述荧光标记发出的荧光。

[0035] 该组织观察方法中, 所述检测步骤中, 适合采用利用荧光显微镜、荧光立体显微镜、共聚焦显微镜或多光子显微镜进行的观察。

[0036] 本发明中, 术语“组织”与“脏器”含义相同, 广义指生物体组织。“组织(或者脏器)”没有特别限定地包括脑、脊髓、肝脏、脾脏、肾脏、肺、心脏、血管、皮肤、皮下组织、肠、脂肪组织、淋巴节、肌肉、肌腱及癌等。另外, 骨若为胎儿或新生儿的骨这样未进行钙沉淀的骨, 则也能够成为本发明所涉及的组织透明化方法等的对象。

[0037] 发明效果

[0038] 根据本发明, 提供不使用有毒或危险的有机溶剂而能够通过简便的操作、在不引起各种脏器的变化的情况下充分地对各种脏器进行透明化的技术。

附图说明

[0039] 图 1 是示出透明化后的大鼠脊髓的附图代用照片。

[0040] (A) 示出通过现有方法透明化后的脊髓;

[0041] (B) 示出通过本发明所涉及的方法透明化后的脊髓。

[0042] 图 2 是示出透明化后的大鼠脑的附图代用照片。

[0043] (A) 示出通过现有方法透明化后的脑;

[0044] (B) 示出通过本发明所涉及的方法透明化后的脑。

[0045] 图 3 是示出对将神经轴突进行荧光标记后的大鼠脊髓进行透明化而取得的荧光图像的附图代用照片。

[0046] 图 4 是示出透明化后的大鼠损伤脊髓的附图代用照片。

[0047] 图 5 是示出透明化后的大鼠损伤脊髓的 3 维荧光图像的附图代用照片。

- [0048] 图 6 是示出透明化后的小鼠脊髓 (A) 和脑 (B) 的炎症部位的观察图像的附图代用照片。
- [0049] 图 7 是示出透明化后的小鼠炎症脑的 3 维荧光图像的附图代用照片。
- [0050] 图 8 是示出透明化小鼠肺的炎症部位的观察图像的附图代用照片 (A)、和其色调反转照片 (B)。
- [0051] 图 9 是示出透明化后的小鼠炎症肺的肺泡血管的 3 维结构图像的附图代用照片。
- [0052] 图 10 是示出透明化后的癌的附图代用照片。
- [0053] 图 11 是示出透明化后的癌的 3 维荧光图像的附图代用照片。
- [0054] (A) 示出通过本发明所涉及的方法透明化后的癌；
- [0055] (B) 示出通过现有方法透明化后的癌。
- [0056] 图 12 是示出透明化后的大鼠心脏的附图代用照片。
- [0057] 图 13 是示出透明化后的小鼠肝脏的附图代用照片。
- [0058] 图 14 是示出透明化后的大鼠脑的免疫染色图像的附图代用照片。
- [0059] 图 15 是示出透明化后的大鼠脑的脂肪染色图像的附图代用照片。
- [0060] 图 16 是示出透明化后的大鼠脑的核染色图像的附图代用照片。
- [0061] 图 17 是示出透明化后的大鼠脑的尼氏染色图像的附图代用照片。
- [0062] 图 18 是示出透明化后的大鼠个体的附图代用照片。
- [0063] 图 19 是示出通过含有非离子性有机碘化合物的组织透明化试剂透明化后的癌的附图代用照片。
- [0064] 图 20 是示出透明化后的小鼠脑的附图代用照片。
- [0065] 图 21 是示出对将脑血管进行荧光标记后的小鼠脑透明化而取得的荧光图像的附图代用照片。
- [0066] 图 22 是示出用于比较的在仅硫代双乙醇的溶液中浸渍大鼠脑的结果的附图代用照片。

具体实施方式

[0067] 以下对用于实施本发明所涉及的组织透明化方法、及包括该组织透明化方法作为一个步骤的组织观察方法的适合方式进行说明。需要说明的是,以下说明的实施方式示出本发明的代表性实施方式的一个例子,而不是基于其狭窄地解释本发明的范围。

[0068] (1) 组织透明化步骤 (组织透明化方法)

[0069] 本发明所涉及的组织透明化方法及组织观察方法的特征在于,包括在折射率为 1.4 ~ 1.7 的水溶性溶剂 (组织透明化试剂) 中浸渍组织的透明化步骤。水溶性溶剂的折射率更优选为 1.50 ~ 1.52。

[0070] [对象脏器]

[0071] 本发明所涉及的组织透明化方法及组织观察方法中,对象脏器 (或者脏器片) 没有特别限定,为脑、脊髓、肝脏、脾脏、肾脏、肺、心脏、血管、皮肤、皮下组织、肠、脂肪组织、淋巴节、肌肉、肌腱及癌、以及骨等。首次探明,本发明中,通过将 2, 2' - 硫代双乙醇 (以下简称“硫代双乙醇”) 与甘油组合使用,由此即使是 1mm 以上的厚度的组织、具体地 1mm ~ 2cm 左右的厚度的组织,也能够透明化。

[0072] [组织透明化试剂]

[0073] 水溶性溶剂（以下也称为“组织透明化试剂”）的折射率可以根据对象脏器在上述数值范围内适当设定。作为满足上述折射率的组织透明化试剂的适合例，可举出：硫代双乙醇（折射率 1.52）与非离子性有机碘化合物水溶液（碘含量为 40% 的水溶液的折射率为约 1.51）的混合液、或者硫代双乙醇与甘油（折射率 1.474）的混合液，更优选举出：硫代双乙醇、甘油和非离子性有机碘化合物水溶液的混合液。另外，组织透明化试剂可以根据对象脏器按照期望还含有蔗糖水溶液。

[0074] 硫代双乙醇、甘油和非离子性有机碘化合物水溶液的混合液的情况下，水性溶剂中的硫代双乙醇、甘油及碘含量为 40% 的非离子性有机碘化合物水溶液的体积比分别为 10 ~ 50%、1 ~ 20% 及 10 ~ 70%。

[0075] 另外，使用硫代双乙醇与非离子性有机碘化合物水溶液的混合液的情况下，水性溶剂中的硫代双乙醇及碘含量为 40% 的非离子性有机碘化合物水溶液的体积比为 20 ~ 80%、80 ~ 20%。

[0076] 另外，使用硫代双乙醇与甘油的混合液的情况下，水性溶剂中的硫代双乙醇及甘油的体积比为 70 ~ 95%、5 ~ 30%。

[0077] 添加蔗糖水溶液的情况下，可以根据蔗糖水溶液的添加体积而减少硫代双乙醇、甘油及非离子性有机碘化合物水溶液中的任一种以上的添加体积。

[0078] 关于组织透明化试剂中的硫代双乙醇、甘油、非离子性有机碘化合物水溶液及蔗糖水溶液的体积比，可以根据对于对象脏器期望的透明化度的程度在较宽的范围内进行调整。

[0079] 通过在组织透明化试剂中增加硫代双乙醇的体积，能够进一步提高脏器的透明化度。例如在对象脏器为肺的情况下，若使用硫代双乙醇：甘油 = 70:30 的混合溶剂，则能够以可辨识的状态使较粗的支气管残留，实现了不使较粗的支气管完全透明化。另一方面，若使用硫代双乙醇：甘油 = 85:15 的混合溶剂，则能够使支气管的透明化度提高，从而使整个肺充分地透明化。

[0080] 如上所述，组织透明化试剂可以使用硫代双乙醇与非离子性有机碘化合物水溶液的混合液，但为了得到高透明化度及荧光蛋白的荧光信号的高保持性，最优选使用在硫代双乙醇和非离子性有机碘化合物水溶液中加入有甘油的试剂。另外，使用硫代双乙醇与甘油的混合液作为组织透明化试剂的情况下，通过加入甘油，由此即使在较高的硫代双乙醇浓度（大于 80% 的体积比）的条件下，也能够抑制荧光蛋白的荧光信号的消失或衰减的同时将脏器透明化。

[0081] 另外，通过在组织透明化试剂中加入具有符合上述折射率范围（1.4 ~ 1.7）的折射率（碘含量为 40% 的水溶液的折射率为约 1.51）的非离子性有机碘化合物水溶液，由此能够将硫代双乙醇的使用量减少至 10 ~ 50% 左右、优选减少至 20 ~ 50% 左右。由此，即使在透明化后也能够将荧光蛋白的荧光信号保持在良好的水平。

[0082] 在组织透明化试剂中添加非离子性有机碘化合物的情况下，例如在碘含量为 40% 的水溶液的情况下，以体积比计优选 10 ~ 80%。碘含量（质量 / 体积%）能够由碘原子在非离子性有机碘化合物的整体质量中所占的质量比、与水溶液中的非离子性有机碘化合物的浓度（质量 / 体积%）算出。需要说明的是，非离子性有机碘化合物水溶液的碘含量能

够适当变更,并不限于 40%。组织透明化试剂中的非离子性有机碘化合物水溶液的体积比也能够根据碘含量来适当调整。

[0083] 作为非离子性有机碘化合物,例如可以使用对以高浓度含有碘原子的有机化合物赋予了亲水性的非离子性碘造影剂。非离子性碘造影剂可举出:泛影酸盐(ジアトリゾ酸)、泛影酸(アミドトリゾ酸)、碘克酸、碘西兰、碘酞酸、碘托葡胺、碘曲仑、碘番酸、碘异酞醇、碘普罗美、碘海醇、碘美普尔、碘泊酸钠、甲泛影酸、碘达明、碘氧胺酸、碘化罂粟油脂肪酸乙基酯等现有公知的造影剂。

[0084] 在组织透明化试剂中添加蔗糖的情况下,以 30%蔗糖水溶液的体积比计优选 2~10%。通过加入蔗糖水溶液,能够提高组织透明化试剂的渗透度,从而提高脏器的透明化度。其原因可推测为:通过添加蔗糖,由此能够防止组织的过度固定所致的细胞膜、细胞质的,但其原因并不受任何理论约束。

[0085] 作为组织透明试剂的组成的适合例,可举出:硫代双乙醇、甘油及碘含量为 40%的非离子性有机碘化合物水溶液的体积比为 45:5:50 的混合液。

[0086] 组织透明化试剂中可以添加二甲亚砜(DMSO)。DMSO 有助于提高组织透明化试剂的渗透度,从而提高脏器的透明化度。DMSO 的添加浓度例如为 0.1~10%。添加 DMSO 的情况下,可以根据 DMSO 的添加体积来减少硫代双乙醇、甘油、非离子性有机碘化合物水溶液及蔗糖水溶液中的任意一种以上的添加体积。

[0087] 需要说明的是,作为满足折射率 1.4~1.7 的水溶性溶剂,除上述的混合溶剂以外,也有时能够使用多元醇类、多元醇类衍生物、含氮溶剂、醇类、含硫溶剂及它们的混合溶剂等。另外,也有时能够在水溶性溶剂中添加蔗糖以外的其他单糖类和/或多糖类,但认为从在水中的溶解度高的观点出发,优选蔗糖。

[0088] [浸渍]

[0089] 脏器通过在组织透明化试剂中浸渍规定时间而被透明化。浸渍优选在 4~60℃左右进行,特别优选在 20~42℃左右进行。通过将试剂加温至室温以上,试剂的粘性下降,在脏器内的渗透度提高。为了防止蔗糖在低温下析出,蔗糖水溶液优选使用 30%左右的浓度的水溶液。浸渍时间根据对象脏器而不同,但例如为 24 小时~6 天。作为一例,在对象脏器为脑、脊髓、心脏、皮肤或肌肉的情况下,进行 4~6 天左右浸渍。另外,在对象脏器为肝脏、肾脏、肺、血管、淋巴节或癌的情况下,优选 24 小时~3 天的浸渍。

[0090] 在组织透明化试剂中浸渍脏器时,作为在硫代双乙醇、甘油和/或非离子性有机碘化合物水溶液、以及根据需要的蔗糖水溶液以上述体积比混合而成的最终溶液中浸渍之前的步骤,可以在硫代双乙醇的体积比更小的前处理溶液中进行浸渍。

[0091] 前处理溶液可以使用硫代双乙醇的体积比不同的多个溶液,该情况下,从硫代双乙醇的体积比更小的前处理溶液开始依次将脏器浸渍一定时间。在进行阶段性浸渍的情况下,可以在前一步骤中使用含有蔗糖的处理溶液,并最终使用不含有蔗糖的处理溶液。这在蔗糖的析出成为问题的情况下是有效的。需要说明的是,关于这样的多阶段(2 阶段以上)的前处理,在以硫代双乙醇及甘油以及根据需要的蔗糖水溶液的混合液作为组织透明化试剂的最终溶液的情况下特别有效,在使用含有非离子性有机碘化合物水溶液的混合液作为最终溶液的情况下,并不是必要的。

[0092] 作为使用不含有非离子性有机碘化合物水溶液的组织透明化试剂的情况下

多阶段前处理的一例,在对象脏器为脑或脊髓时,依次在硫代双乙醇:甘油:30%蔗糖=20:40:40的溶液、50:40:10的溶液、70:25:5的溶液的各前处理溶液中分别浸渍24小时后,进行最终溶液(90:5:5)中的浸渍(24小时)。另外,若为其他脏器,则例如依次在硫代双乙醇:甘油=20:80的溶液、50:50的溶液、70:30的溶液的各前处理溶液中分别浸渍24小时后,进行最终溶液(85:15)中的浸渍(24小时)。

[0093] 在使用含有非离子性有机碘化合物水溶液的组织透明化试剂的情况下,通过一个阶段的前处理,能够在3~4天左右将脑透明化,能够在2天左右将不包括骨的其他全部组织透明化。该情况下,例如前处理液使用硫代双乙醇:甘油:30%蔗糖=20:40:40的溶液,最终溶液(组织透明化试剂)使用硫代双乙醇:甘油:碘含量为40%的非离子性有机碘化合物水溶液:=45:5:50的溶液。例如在4°C~25°C在前处理液中浸渍24小时,例如在4°C~25°C在最终溶液中浸渍24~48小时。

[0094] 本发明所涉及的组织透明化方法与现有方法相比,能够以短时间的操作得到充分的脏器的透明化度。另外,本发明所涉及的组织透明化方法不使用有毒或危险的有机溶剂而能够通过在水溶性溶剂中的浸渍将脏器透明化(参照后述的实施例)。因此,本发明所涉及的组织透明化方法不存在有机溶剂的易燃性、废液管理的难度这样的问题,安全性高。

[0095] 另外,本发明所涉及的组织透明化方法不使用有机溶剂,因此不会由于对固定后的脏器进行脱水的过程、透明化试剂本身的影响,而使脏器中标记的荧光蛋白的荧光信号消失或衰减,可保持大致全部荧光标记的荧光。另外,本发明所涉及的组织透明化方法通过添加到水溶性溶剂中的甘油,也可得到防止荧光蛋白的劣化(退色)的效果。

[0096] (2) 固定化步骤

[0097] 本发明所涉及的组织透明化方法及组织观察方法中,也可以在上述组织透明化步骤之前,基于现有公知的病理组织学的方法进行固定化步骤。另外,固定化步骤中可以根据需要组合现有公知的脱脂处理等。

[0098] 固定化步骤可以采用如下的方法:用福尔马林溶液(10%中性福尔马林溶液、4%多聚甲醛缓冲液)灌流固定脏器后,摘取脏器,然后在该溶液中浸渍24小时左右或更长的时间。或者也可以采用如下的方法:将不进行灌流固定而摘取的脏器在福尔马林溶液中浸渍48小时左右或更长的时间。优选在固定化后除去福尔马林环境,进行组织透明化步骤。

[0099] (3) 标记步骤、检测步骤

[0100] [透明化前的荧光标记]

[0101] 本发明所涉及的组织观察方法中,能够在对组织进行荧光标记后进行上述透明化步骤,检测由透明化后的组织中的荧光标记发出的荧光。如上所述,本发明所涉及的组织透明化方法能够保持大致全部荧光标记的荧光,且能够防止荧光蛋白的劣化(退色),因此也适于使用了多个荧光标记的多重染色的组织观察。

[0102] 标记步骤可以通过如下等现有公知的方法进行:通过基因导入而使组织(例如神经纤维)表达荧光蛋白的方法、在脏器(例如血管)中注入荧光蛋白或荧光色素的方法、使标记有荧光蛋白或荧光色素后的抗体与细胞结合的方法。需要说明的是,在此,荧光色素是指分子量比GFP等荧光蛋白小的低分子量化合物(例如荧光素等)。荧光蛋白及荧光色素可以使用现有公知的物质。

[0103] 由透明化后的组织中的荧光标记发出的荧光的检测步骤也可以不特别限定地使

用利用荧光显微镜、荧光立体显微镜、共聚焦显微镜或多光子显微镜进行的观察等现有公知的荧光检测手段来进行。通过本发明所涉及的组织透明化方法,能够实现脏器的高透明度,因此能够将共聚焦显微镜或多光子显微镜的观察深度界限扩展至数毫米。

[0104] 本发明所涉及的组织观察方法中,能够通过组织透明化步骤使各种脏器在不发生硬化、膨大及脆弱化的情况下透明化(参照后述的实施例)。因此,与 Scale 法等现有方法不同,能够在保持所摘取的脏器的状态的情况下进行观察。另外,由于在透明化后也能够用刀等简单地将脏器切薄,因此也可以在透明化后进行组织染色来观察。

[0105] 另外,本发明所涉及的组织观察方法中,如上所述,由于脏器中标记的荧光蛋白的荧光信号不会消失或衰减,因此能够实现高精度的荧光观察。特别地,本发明所涉及的组织观察方法,在使用多光子显微镜以非常弱的激发能量观察脏器深部时,可发挥出效果。

[0106] [透明化后的荧光标记]

[0107] 另外,本发明所涉及的组织观察方法中,也能够在进行上述透明化步骤后,对透明化后的组织进行荧光标记,检测由透明化后的组织中的荧光标记发出的荧光。

[0108] 本发明所涉及的组织透明化方法能够在不使脏器过度膨大、脆弱化的情况下将其透明化,因此透明化后的脏器能够进行切薄。因此,若将透明化后切薄的脏器片通过使用了荧光标记抗体的免疫组织化学方法进行染色,则能够对透明化后的组织进行荧光标记。

[0109] 另外,透明化后的脏器或者脏器片也能够使用各种染色液进行现有公知的病理组织学染色。特别地,本发明所涉及的组织透明化方法能够在保持脂肪的情况下将脏器透明化,因此也能够进行苏丹 III 染色、油红染色、苏丹黑染色等脂肪染色。

[0110] 另外,也能够进行如下应用:通过基因导入而对组织进行荧光标记后,摘取脏器,进行透明化,然后通过免疫染色对透明化后的组织进一步进行荧光标记,检测透明化后的组织中的 2 种以上的荧光标记所发出的荧光。

[0111] 实施例

[0112] < 实施例 1:大鼠脊髓的透明化 >

[0113] 用 4% 多聚甲醛缓冲液灌流固定后,摘取大鼠脊髓,然后在该溶液中浸渍 24 小时,进行固定。将固定后的脊髓(直径 3mm)依次在硫代双乙醇:甘油:蔗糖 = 20:40:40 的溶液、50:40:10 的溶液、70:25:5 的溶液的各前处理溶液中分别浸渍 24 小时后,在 90:5:5 的最终溶液中浸渍 24 小时,进行透明化。

[0114] 结果如图 1B 所示。需要说明的是,A 示出基于非专利文献 2 记载的 Scale 法的结果。本发明所涉及的组织透明化方法(B)与 Scale 法(A)相比,能够透明度更高地将脊髓透明化。另外,Scale 法(A)存在脊髓膨大至 2 倍的问题,与此相对,本发明所涉及的组织透明化方法(B)未产生这样的问题。

[0115] < 实施例 2:大鼠脑的透明化 >

[0116] 以实施例 1 中记载的步骤将大鼠脑(组织厚 6mm)固定并透明化。

[0117] 结果如图 2B 所示。需要说明的是,A 示出基于非专利文献 2 记载的 Scale 法的结果。本发明所涉及的组织透明化方法(B)与 Scale 法(A)相比,能够透明度更高地将脑透明化。另外,Scale 法(A)存在脑显著膨胀、用手指按压时容易崩塌的问题,与此相对,本发明所涉及的组织透明化方法(B)未产生膨大及脆弱化。

[0118] < 实施例 3:大鼠脊髓的荧光观察 >

[0119] 制备在神经轴突中表达荧光蛋白 VENUS 的转基因大鼠。转基因大鼠的制备通过非专利文献 3 (“Visual properties of transgenic rats harboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the thy-1.2 promoter.” PLoS ONE, 2009, Vol. 4, No. 11, e7679) 记载的方法进行。利用共聚焦显微镜 (Zeiss, LSA-700) 观察以实施例 1 中记载的步骤固定并透明化后的脊髓。

[0120] 取得的荧光图像如图 3A 所示。B 是 A 中由虚线围成的区域的放大图像。通过本发明所涉及的组织观察方法,能够高精度地观察神经轴突。另外,即使是较高的硫代双乙醇浓度 (体积比 90%) 的条件,也能够抑制荧光蛋白的荧光信号的消失或衰减。

[0121] < 实施例 4 :大鼠损伤脊髓的观察 >

[0122] 用锐利的剪刀将上述转基因大鼠第 12 胸髓的背侧半切而损坏脊髓后,闭合伤口。4 周后,以实施例 1 中记载的步骤将脊髓固定并透明化。利用多光子激发显微镜 (Nikon, A1MP) 观察透明化后的脊髓。

[0123] 如图 4 所示,透明化后的脊髓能够从外部透视损坏的部位。损坏部位通过基于血铁黄素的着色而观察为茶色。取得的 3 维荧光图像如图 5 所示。图像中,绿色表示来自神经轴突的信号,蓝色表示二次谐波发生 (Second harmonic generation :SHG) 的信号。在损坏部位观察到来自胶原蛋白的 SHG 的荧光,确认在该部位发生胶原蛋白增生,产生了纤维化。

[0124] < 实施例 5 :小鼠脑脊髓炎的观察 >

[0125] 对小鼠诱发实验性脑脊髓炎。在小鼠尾根部皮下注射炎症诱发 MOG 肽乳液,30 天后用 4% 多聚甲醛缓冲液灌流固定后摘取脑脊髓,然后在该溶液中浸渍 24 小时,进行固定。将固定后的脑脊髓依次在硫代双乙醇 : 甘油 = 20:80 的溶液、50:50 的溶液、70:30 的溶液的各前处理溶液中分别浸渍 24 小时后,在 90:10 的最终溶液中浸渍 24 小时,进行透明化。利用多光子激发显微镜观察透明化后的脑脊髓。

[0126] 图 6 示出透明化后的脊髓 (A) 和脑 (B)。本实施例中,通过使用含有硫代双乙醇及甘油、且不含有蔗糖水溶液的水溶性溶剂作为组织透明化试剂,由此特意地抑制最终的脏器的透明化度。由此,如图 6 (B) 所示,能够确认病变为脑干内的混浊部位。另外,图 7 示出取得的 3 维荧光图像。图像中,红色为血管,绿色为来自骨髓的细胞的荧光图像。血管的荧光标记通过将结合有荧光试剂的番茄凝集素注入动物血管来实施。另外,来自骨髓的细胞的荧光标记通过使用荧光标记的抗 F4/80 抗体来进行。

[0127] < 实施例 6 :小鼠肺的观察 >

[0128] 以实施例 1 中记载的步骤将小鼠肺 (下叶、纵 : 横 : 厚度 = 7mm:5mm:5mm) 固定并透明化。利用多光子激发显微镜观察透明化后的肺,构建肺泡血管的 3 维结构。

[0129] 透明化后的肺如图 8A 所示。B 为使 A 的图像色调反转后的图像。如图 8 所示,透明化后的肺能够从外部透视支气管。另外,图 9 示出取得的肺泡血管的 3 维图像。

[0130] < 实施例 7 :癌的观察 >

[0131] 将导入有 GFP 基因的人肺癌细胞移植到裸小鼠的皮下,60 天后摘取癌组织 (5mm 见方),在 4% 多聚甲醛缓冲液中浸渍 24 小时,进行固定。通过实施例 1 中记载的步骤进行透明化。利用多光子激发显微镜观察透明化后的癌。

[0132] 透明化后的癌如图 10 所示。另外,癌的 3 维荧光图像如图 11A 所示。需要说明的是,图 11B 是通过 Scale 法进行透明化后的癌的荧光观察图像。基于 Scale 法 (B) 的观察

中,观察深度界限为 100 μm 左右,肿瘤血管无法绘出,肿瘤细胞(图像中为绿色)的分布不明确。另一方面,基于本发明所涉及的组织透明化方法(A)的观察中,观察深度界限为 1000 μm 以上,肿瘤血管(图像中为红色)能够绘出,也能够确认肿瘤细胞的分布。另外可知,也良好地保持了 GFP 的荧光信号。

[0133] < 实施例 8 :大鼠心脏、小鼠肝脏的透明化 >

[0134] 以实施例 1 中记载的步骤将大鼠的心脏(1.2cm 见方)及小鼠的肝脏(纵:横:厚度 = 1cm:1cm:6mm)固定并透明化。结果如图 12、图 13 所示。图 12 中的箭头表示大动脉。图 13 中的箭头表示门静脉。

[0135] < 实施例 9 :透明化后的染色 >

[0136] 将实施例 2 中透明化后的大鼠脑切薄,进行针对神经胶质细胞纤维酸性蛋白(GFAP)的免疫染色、脂肪染色、核染色及尼氏染色。

[0137] 免疫染色使用利用了抗 GFAP 抗体、酶(过氧化物酶)和色素(二氨基联苯胺四盐酸盐)的市售检测试剂盒来进行。脂肪染色使用苏丹 III。核染色使用 DAPI。尼氏染色使用甲苯胺蓝。

[0138] 结果如图 14 ~ 图 17 所示。图 14 示出显示 GFAP 阳性的小脑贝格曼神经胶质细胞的免疫染色图像,图 15 示出脂肪染色的结果,图 16 示出核染色结果,图 17 示出尼氏染色的结果。图 14 中,通过透明化实现了优异的深部绘出性。另外,脂肪染色、核染色及尼氏染色中也可以确认,作为各自的目标的小脑白质、细胞核及神经细胞均被染色。

[0139] < 实施例 10 :大鼠个体的透明化 >

[0140] 将 4 天龄的大鼠个体在前处理液(硫代双乙醇:30%蔗糖 = 20:80)中在 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸渍 24 小时,在最终溶液(硫代双乙醇:甘油:30%蔗糖 = 90:5:5)中在 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸渍 48 小时,进行透明化。结果如图 18 所示。可以确认,能够将整个大鼠个体透明化。

[0141] < 实施例 11 :有机碘化合物的研究 >

[0142] 将导入有 GFP 基因的人肺癌细胞移植到裸小鼠的皮下,使其生长 4 周。将结合有荧光试剂的番茄凝集素注入动物血管后,用 4% 多聚甲醛缓冲液灌流固定。摘取癌组织,在 4% 多聚甲醛缓冲液中浸渍 24 小时,进行固定。

[0143] 将固定后的癌组织在前处理液(硫代双乙醇:30%蔗糖 = 20:80)中在 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸渍 24 小时,在最终溶液(硫代双乙醇:甘油:碘美普尔 = 50:5:45)中在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中浸渍 24 小时,进行透明化。结果如图 19B 所示。需要说明的是,碘美普尔使用 Eisai 公司的 Tomeron(注册商标)。Tomeron(注册商标)400 的碘含量为 40%,折射率为 1.51。

[0144] A 示出用 4% 多聚甲醛缓冲液固定后的癌组织。C 示出在前处理液(硫代双乙醇:30%蔗糖 = 20:80)中在 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸渍 24 小时、在最终溶液(硫代双乙醇:甘油 = 90:10)中在 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸渍 24 小时而透明化后的癌组织。使用了有机碘化合物的 B 中得到了最高的透明度。

[0145] 利用多光子激发显微镜在透明化后的癌组织中观察被番茄凝集素荧光标记的血管。A 所示的固定后的癌组织中,由于癌组织表面结缔组织被膜(結合織被膜),因此完全无法观察到内部。C 所示的透明化后的癌组织中,观察深度界限为约 800 μm 。B 所示的透明化后的癌组织中,超过了显微镜的检测界限即约 1800 μm ,从而能够绘出肿瘤血管,并且也未看到来自癌细胞的 GFP 的荧光信号减弱。从该结果可知,通过使用加入有非离子性有机

碘化合物水溶液的最终溶液,可得到高透明化度,显示出通过抑制硫代双乙醇的使用量能够更良好地保持 GFP 的荧光信号。

[0146] < 实施例 12 :小鼠脑的透明化 2 >

[0147] 用 4%多聚甲醛缓冲液灌流固定后,摘取小鼠脑,然后在该溶液中浸渍 24 小时,进行固定。将固定后的脑(组织厚 6mm)在硫代双乙醇:碘美普尔=50:50 的溶液在 25℃ 浸渍 48 小时。结果如图 20A 所示。

[0148] 另外,将固定后的脑在硫代双乙醇:碘美普尔:甘油=50:44.5:5.5 的溶液在 20℃ 浸渍 48 小时。结果如图 20B 所示。

[0149] 如图所示,通过使用碘美普尔,能够在将硫代双乙醇的体积比抑制为 50%的同时将脑透明化。另外,加入有甘油的情况(B)与未加入甘油的情况(A)相比,透明化度显著提高。通过同样的步骤,也能够将胃、肾脏、子宫透明化(省略图示)。

[0150] < 实施例 13 :小鼠脑血管的荧光观察 >

[0151] 使用表达 EGFP 的逆转录病毒载体使小鼠的脑血管表达 EGFP。利用共聚焦显微镜(Zeiss、LSA-700)观察通过与实施例 12 同样的步骤固定并透明化后的脑。

[0152] 取得的荧光图像如图 21 所示。使用了碘美普尔的情况下,能够高精度地观察到被 EGFP 荧光标记的脑血管。

[0153] < 比较例 :仅硫代双乙醇的溶液的研究 >

[0154] 用 4%多聚甲醛缓冲液灌流固定后,摘取大鼠脑,然后在该溶液中浸渍 24 小时,进行固定。将固定后的脑(组织厚 4mm)在硫代双乙醇中浸渍 3 天。

[0155] 结果如图 22 所示。A 示出用 4%多聚甲醛缓冲液固定后的脑。B 示出在仅硫代双乙醇的溶液中浸渍后的脑。C 示出在前处理液(硫代双乙醇:30%蔗糖=20:80)中在 4℃ 浸渍 24 小时、在最终溶液(硫代双乙醇:甘油=90:10)中在 4℃ 浸渍 48 小时从而进行透明化后的脑。在仅硫代双乙醇的溶液中的浸渍中,无法将厚的脑组织透明化。

[0156] 产业实用性

[0157] 通过本发明所涉及的组织透明化方法,不使用有毒或危险的有机溶剂而能够通过简便的操作、在不引起各种脏器的变化的情况下对各种脏器充分地进行透明化。因此,本发明所涉及的组织透明化方法,能够在病态分析、药效评价、癌转移筛选等各领域,在不进行费事的组织切片制备的情况下用于脏器内部组织的观察。



图 1

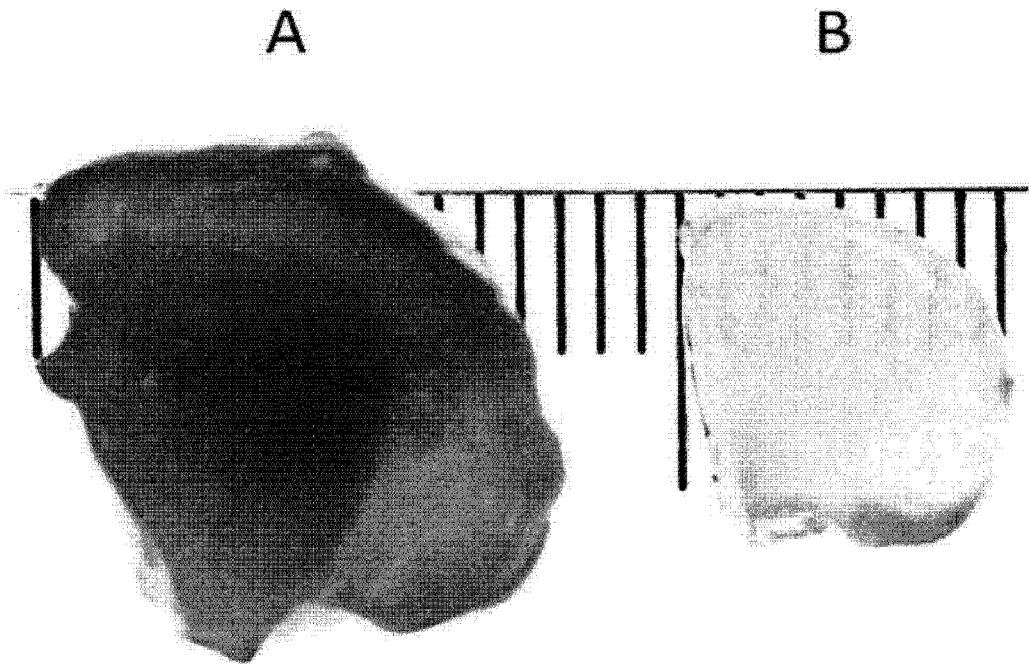


图 2

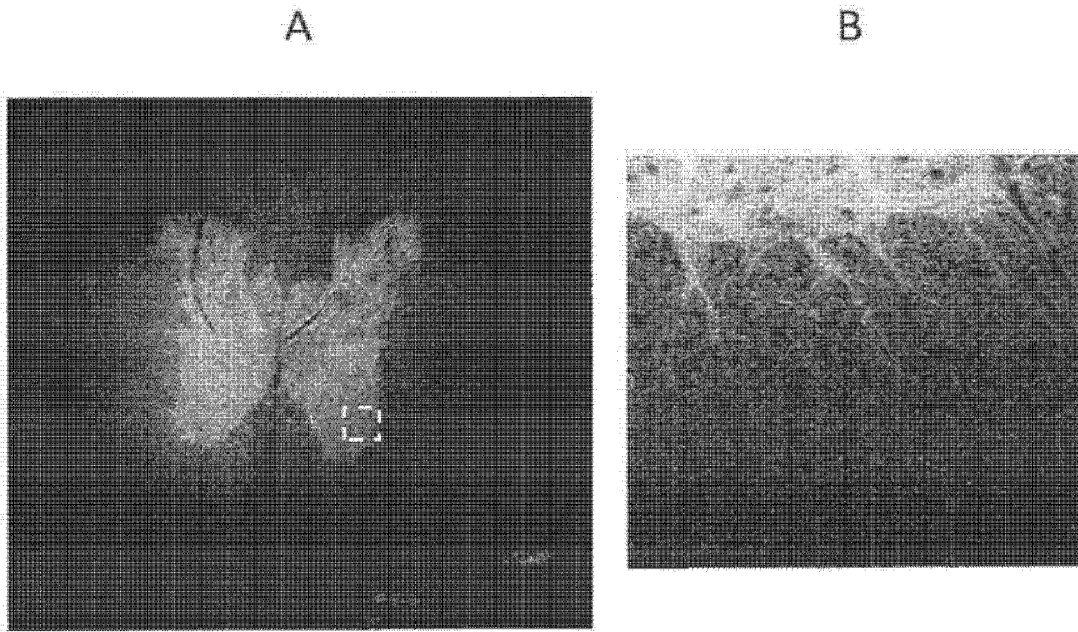


图 3



图 4

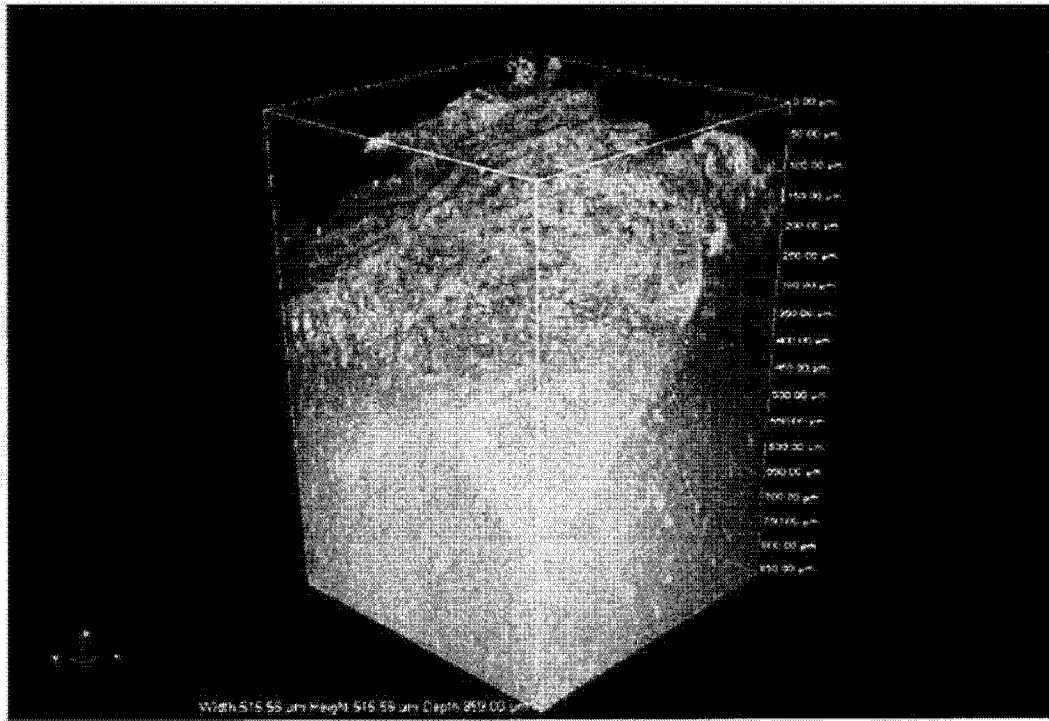


图 5

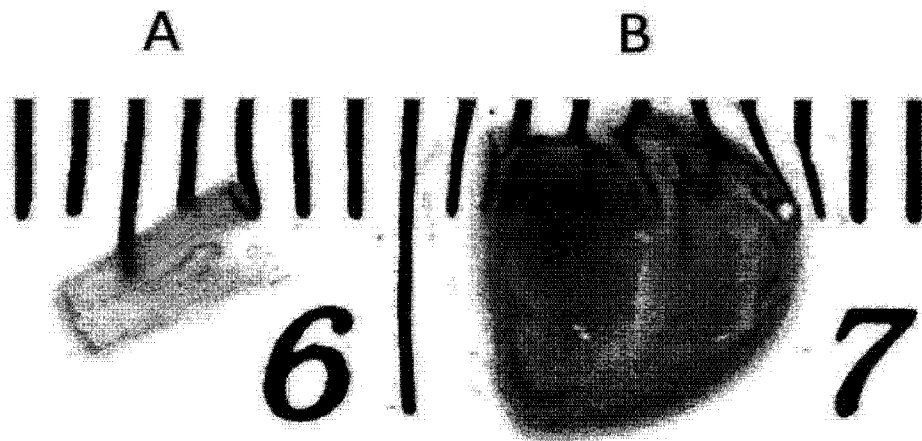


图 6

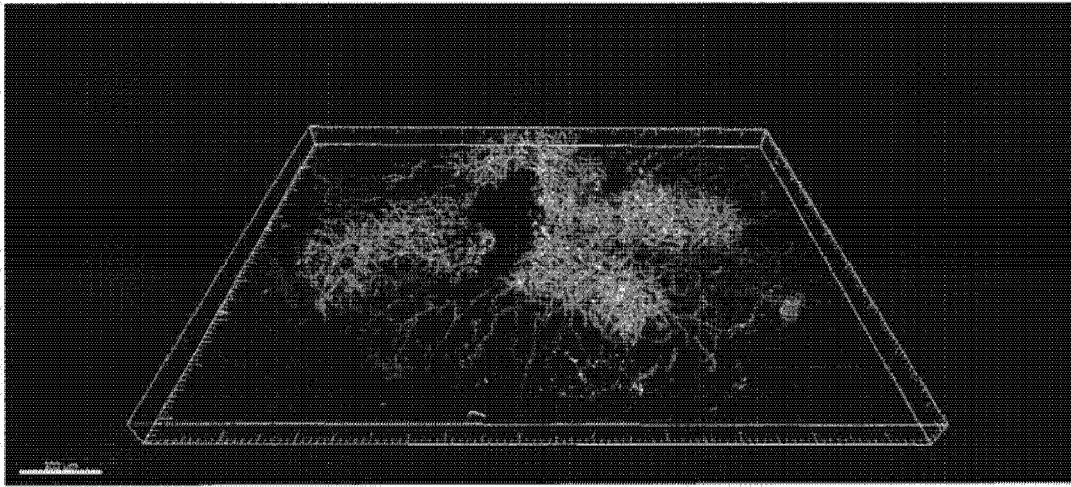


图 7

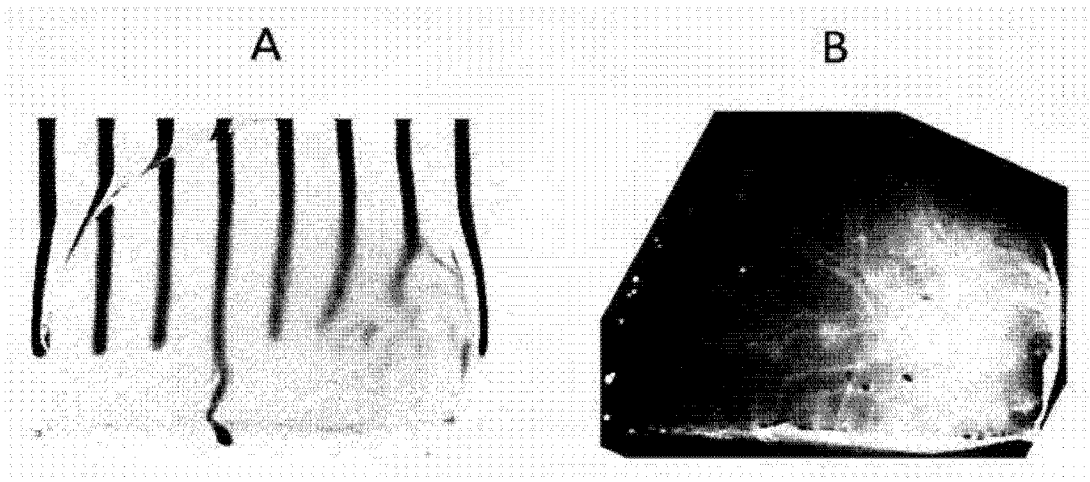


图 8