

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-34297

(P2020-34297A)

(43) 公開日 令和2年3月5日(2020.3.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 1/30 (2006.01)	GO 1 N 1/30	2 G O 4 5
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 1/28 J	2 G O 5 2
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2018-158579 (P2018-158579)	(71) 出願人	000125370 学校法人東京理科大学 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地
(22) 出願日	平成30年8月27日 (2018. 8. 27)	(74) 代理人	100079049 弁理士 中島 淳
		(74) 代理人	100084995 弁理士 加藤 和詳
		(74) 代理人	100099025 弁理士 福田 浩志
		(72) 発明者	曾我 公平 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内
		(72) 発明者	梅澤 雅和 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内

最終頁に続く

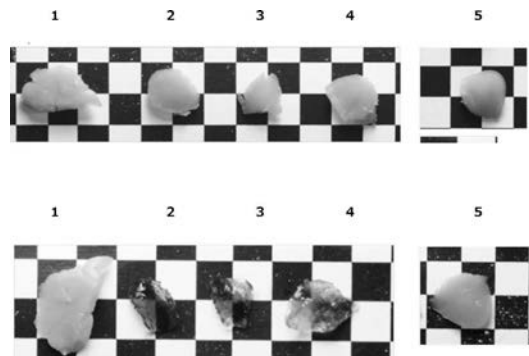
(54) 【発明の名称】 生体試料の透明化方法及び生体試料透明化剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】短時間で生体試料を透明化できる生体試料の透明化方法、及び短時間で生体試料を透明化できる生体試料透明化剤の提供。

【解決手段】リン酸の水溶液を用いて生体試料を透明化する工程を備える、生体試料の透明化方法。水溶液におけるリン酸の濃度が4.0 M以上である、生体試料の透明化方法。水溶液の屈折率が1.35以上である、生体試料の透明化方法。水溶液に生体試料を接触させる時間は5時間以下である、生体試料の透明化方法。

【選択図】図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

リン酸の水溶液を用いて生体試料を透明化する工程を備える、生体試料の透明化方法。

## 【請求項 2】

前記水溶液における前記リン酸の濃度が 4.0 M 以上である、請求項 1 に記載の生体試料の透明化方法。

## 【請求項 3】

前記水溶液の屈折率が 1.35 以上である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の生体試料の透明化方法。

## 【請求項 4】

前記水溶液に前記生体試料を接触させる時間は 5 時間以下である、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載の生体試料の透明化方法。

## 【請求項 5】

リン酸の水溶液である、生体試料透明化剤。

## 【請求項 6】

前記水溶液における前記リン酸の濃度が 4.0 M 以上である、請求項 5 に記載の生体試料透明化剤。

## 【請求項 7】

前記水溶液の屈折率が 1.35 以上である、請求項 5 又は請求項 6 に記載の生体試料透明化剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、生体試料の透明化方法及び生体試料透明化剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

動物、植物等の生体由来の試料を観察する際に、試料内部での光の散乱を抑制して深部の視認性を高める（透明化）方法が種々検討されている。例えば、特許文献 1 の実施例には、所定濃度の尿素と、非イオン性の界面活性剤と、グリセロールとを純水に溶解して得た透明化剤を用いてマウスの体組織を透明化する方法が記載されている。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0003】

【特許文献 1】国際公開第 2012 / 161143 号

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

特許文献 1 に記載された方法では、生体試料を十分に透明化するために数日から数週間の処理を要する。そこで、処理工程の効率化の観点から、より短時間で生体試料を透明化できる技術の開発が待たれている。

本発明は上記事情に鑑み、短時間で生体試料を透明化できる生体試料の透明化方法、及び短時間で生体試料を透明化できる生体試料透明化剤を提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

前記課題を達成するための手段には、以下の実施態様が含まれる。

< 1 > リン酸の水溶液を用いて生体試料を透明化する工程を備える、生体試料の透明化方法。

< 2 > 前記水溶液における前記リン酸の濃度が 4.0 以上である、< 1 > に記載の生体試料の透明化方法。

< 3 > 前記水溶液の屈折率が 1.35 以上である、< 1 > 又は < 2 > に記載の生体試料の

10

20

30

40

50

透明化方法。

< 4 > 前記水溶液に前記生体試料を接触させる時間は 5 時間以下である、< 1 > ~ < 3 > のいずれか 1 項に記載の生体試料の透明化方法。

< 5 > リン酸の水溶液である、生体試料透明化剤。

< 6 > 前記水溶液における前記リン酸の濃度 ( 2 5 ) が 4 . 0 M 以上である、< 5 > に記載の生体試料透明化剤。

< 7 > 前記水溶液の屈折率が 1 . 3 5 以上である、< 5 > 又は < 6 > に記載の生体試料透明化剤。

【発明の効果】

【 0 0 0 6 】

本発明によれば、短時間で生体試料を透明化できる生体試料の透明化方法、及び短時間で生体試料を透明化できる生体試料透明化剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 7 】

【図 1】透明化処理前後のマウス肝臓の写真である。

【図 2】透明化処理前後のマウス腎臓の写真である。

【図 3】透明化処理前後のマウス肺の写真である。

【図 4】透明化処理前後の C o l o n - 2 6 培養細胞の顕微鏡画像である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 8 】

以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。以下の実施形態において、その構成要素（要素ステップ等も含む）は、特に明示した場合を除き、必須ではない。数値及びその範囲についても同様であり、本発明を制限するものではない。

本明細書において「工程」との語には、他の工程から独立した工程に加え、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の目的が達成されれば、当該工程も含まれる。

【 0 0 0 9 】

< 生体試料の透明化方法 >

本開示の生体試料の透明化方法は、リン酸の水溶液を生体試料に接触させる工程（透明化工程）を備える。

【 0 0 1 0 】

本発明者らの検討の結果、リン酸 (  $H_3PO_4$  ) の水溶液を生体試料に接触させる工程を含む透明化方法は、他の方法に比べて短時間で生体試料を透明化できることがわかった。この理由としては、水溶液中のリン酸は分極の大きい 3 価の陰イオンとなって水の屈折率 ( 1 . 3 3 ) を高め、生体試料の細胞膜におけるリン脂質の屈折率 ( 1 . 4 5 程度 ) に近づけるように作用すること、及びリン酸の分子量が小さいために生体試料への浸透性に優れていることが考えられる。

【 0 0 1 1 】

本開示において生体試料の「透明化」とは、処理後の生体試料の可視光透過率が処理前に比べて上昇する現象を意味し、具体的には 4 0 0 n m ~ 8 0 0 n m の波長域の少なくとも一部において透過率が上昇していれば透明化したと判断する。すなわち生体試料の「透明化」には、生体試料に含まれる色素の減少又は消失が伴っていても、伴ってなくてもよい。

【 0 0 1 2 】

( 透明化工程 )

透明化工程を実施する方法は特に制限されず、一般的な手法で行うことができる。例えば、リン酸の水溶液に試料を接触（浸漬等）させた状態で、所望の透明度が得られるまで放置することで行うことができる。

【 0 0 1 3 】

10

20

30

40

50

リン酸の水溶液に含まれるリン酸の濃度は特に制限されず、透明化処理の対象となる生体試料の状態、所望の透明度等に応じて選択できる。リン酸の濃度が高いほど水溶液の屈折率が上昇する傾向にあり、処理後に高い透明度が得られる傾向にある。例えば、水溶液におけるリン酸の濃度は、4.0 M以上であってもよく、8.0 M以上であってもよく、10.0 M以上であってもよく、12.0 M以上であってもよい。水溶液におけるリン酸の濃度の上限は特に制限されないが、14.2 M程度が上限値（飽和濃度）である。

本開示において水溶液に含まれるリン酸の濃度は、25 における濃度とする。

リン酸の水溶液の屈折率は特に制限されず、透明化処理の対象となる生体試料の状態、所望の透明度等に応じて選択できる。例えば、リン酸の水溶液の屈折率は、1.35（リン酸濃度4.0 M程度での屈折率）以上であってもよく、1.40以上であってもよく、1.42以上であってもよい。

10

リン酸の水溶液の屈折率の上限は特に制限されないが、1.43程度が上限値（リン酸の飽和濃度で得られる値）である。

本開示においてリン酸の水溶液の屈折率は、20 における波長589.29 nmの光線（ナトリウムD線）に対する屈折率とする。

#### 【0014】

リン酸の水溶液に試料を接触させる時間（処理時間）は特に制限されず、透明化処理の対象となる生体試料の状態、所望の透明度等に応じて選択できる。例えば、15分以上であってもよく、30分以上であってもよい。処理時間の上限値は特に制限されないが、生体試料に与えるダメージを抑制する観点からは5時間以下であってもよく、3時間以下であってもよく、1時間以下であってもよい。

20

#### 【0015】

リン酸の水溶液は、必要に応じ、リン酸以外の成分を含有してもよい。例えば、界面活性剤を添加して生体試料への浸透性や脱色効率を高めてもよい。その他、pH調整剤、粘度調整剤、酸化防止剤、防腐剤、保湿剤、脱色剤等の添加剤を必要に応じて含有してもよい。リン酸の水溶液は、リン酸をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解したものであってもよい。

#### 【0016】

本開示の方法は、透明化工程に加えて他の工程を備えていてもよい。例えば、生体試料を固定する工程（固定工程）を備えていてもよく、生体試料の色素を除去する工程（脱色工程）を備えていてもよい。

30

#### 【0017】

##### （固定工程）

固定工程を実施する方法は特に制限されず、一般的な手法で行うことができる。生体試料を固定することで、生体試料の劣化を抑制でき、物理的強度や化学的安定性を向上することができる。

#### 【0018】

固定に用いる固定剤の種類は特に制限されず、公知のものから選択できる。例えば、ホルムアルデヒド、ファーマー液（酢酸とエタノールの混合液）、グルタルアルデヒド、アセトン等が挙げられる。固定剤は、有効成分をPBS等の溶媒に溶解した状態であってもよい。

40

#### 【0019】

生体試料や生体試料中の蛍光タンパク質へのダメージを抑制する観点からは、固定剤としてはホルムアルデヒドを含むものが好ましい。ホルムアルデヒドを含む固定剤を用いて試料の固定を行う場合、固定剤中のホルムアルデヒドの濃度は特に制限されず、所望の透明度、試料の種類、処理条件等に応じて選択できる。例えば、固定剤全体の0.1質量%～10質量%の範囲内から選択してもよい。

#### 【0020】

##### （脱色工程）

脱色工程を実施する方法は特に制限されず、一般的な手法で行うことができる。脱色工

50

程を実施することで、透明化した生体試料の視認性をより高めることができる。

【0021】

脱色に用いる脱色剤の種類は特に制限されず、公知のものから選択できる。例えば、界面活性剤、有機溶剤等が挙げられる。脱色剤は、有効成分をPBS等の溶媒に溶解した状態であってもよい。

【0022】

(生体試料)

本開示の方法で処理される生体試料は特に制限されず、動物、植物、菌類等のあらゆる生物に由来する試料であってもよい。生体試料は遺伝子組み換え、化学処理等の加工がなされたものであってもよい。

10

【0023】

生体試料が動物に由来するものである場合、動物の種類は特に制限されない。例えば、哺乳類、爬虫類、鳥類、両生類、魚類等の脊椎動物であってもよく、貝類、昆虫類、甲殻類、線虫類等の無脊椎動物であってもよい。また、試料は動物の内臓、脳、骨、筋肉、神経、皮膚、胚、毛等の各種器官又は組織であってもよい。

【0024】

生体試料が植物に由来するものである場合、植物の種類は特に制限されない。例えば、被子植物及び裸子植物のいずれであってもよく、被子植物の場合、単子葉植物及び双子葉植物のいずれであってもよい。また、試料は植物の葉、根、茎、胚、花弁、果実、種子、表皮等の各種器官又は組織であってもよい。

20

【0025】

生体試料が菌類に由来するものである場合、菌類の種類は特に制限されない。例えば、キノコ類、カビ類等であってもよい。

【0026】

<生体試料透明化剤>

本開示の生体試料透明化剤(以下、透明化剤ともいう)は、リン酸の水溶液である。

本開示の透明化剤によれば、他の方法に比べて短時間で生体試料を透明化できる。また、有機溶媒等を用いて生体試料を透明化する方法に比べて試料を構成する細胞や蛍光タンパク質への影響が小さいため、処理後の試料を良好な状態に維持することができる。

【0027】

本開示の透明化剤は、上述した生体試料の透明化方法に用いるものであってもよい。透明化剤の詳細及び好ましい態様は、上述した透明化方法で使用する透明化剤の詳細及び好ましい態様と同様である。

30

【0028】

透明化剤は、透明化方法に使用する他の試薬(固定剤、脱色剤等)と組み合わせたキットの状態であってもよい。また、透明化剤の状態は特に限定されず、液状、ゲル状等から選択できる。

【実施例】

【0029】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。ただし、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

40

【0030】

<実施例1 マウス肝臓の透明化処理>

マウス(ICR、10~30週齢)の肝臓を4質量%ホルムアルデヒドのPBS溶液に48時間浸漬(25℃)して固定し、PBSで洗浄した。

【0031】

洗浄後の試験片を、PBS、14.2Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.43)、11.4Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.42)、8.5Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.40)、及び比較用の透明化剤として尿素を4M、グリセロールを10%(w/v)、Triton X-100を10%(w/v)含む水溶液(国際公開第2012/1

50

6 1 1 4 3号に記載された透明化剤)にそれぞれ60分間浸漬(25)した。

【0032】

浸漬前と浸漬後の試験片の写真を図1に示す。図1において上段は浸漬前の試験片の写真、下段は浸漬後の試験片の写真であり、左から順にPBS(1)、14.2Mリン酸のPBS溶液(2)、11.4Mリン酸のPBS溶液(3)、8.5Mリン酸のPBS溶液(4)、比較用の透明化剤(5)に浸漬する前と浸漬した後の試験片である。

【0033】

図1に示すように、リン酸のPBS溶液で処理した試験片は60分間の浸漬で透明化し、背後のチェッカーパターン(4mm×4mm)が透けて見えた。これに対して比較用の透明化剤で処理した試験片は十分に透明化が進まなかった。

10

【0034】

<実施例2 マウス腎臓の透明化処理>

マウス(ICR、10~30週齢)の腎臓を4質量%ホルムアルデヒドのPBS溶液に48時間浸漬(25)して固定し、PBSで洗浄して試験片を作製した。

【0035】

洗浄後の試験片を、PBS、14.2Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.43)、11.4Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.42)、8.5Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.40)、及び比較用の透明化剤として尿素を4M、グリセロールを10%(w/v)、Triton X-100を10%(w/v)含む水溶液(国際公開第2012/161143号に記載された透明化剤)にそれぞれ60分間浸漬(25)した。

20

【0036】

浸漬前と浸漬後の試験片の写真を図1に示す。図1において上段は浸漬前の試験片の写真、下段は浸漬後の試験片の写真であり、左から順にPBS(1)、14.2Mリン酸のPBS溶液(2)、11.4Mリン酸のPBS溶液(3)、8.5Mリン酸のPBS溶液(4)、比較用の透明化剤(5)に浸漬する前と浸漬した後の試験片である。

【0037】

図2に示すように、リン酸のPBS溶液で処理した試験片は60分間の浸漬で透明化し、背後のチェッカーパターン(4mm×4mm)が透けて見えた。これに対して比較用の透明化剤で処理した試験片は十分に透明化が進まなかった。

【0038】

<実施例3 マウス肺の透明化処理>

マウス(ICR、10~30週齢)の肺を4質量%ホルムアルデヒドのPBS溶液に48時間浸漬(25)して固定し、PBSで洗浄して試験片を作製した。

【0039】

洗浄後の試験片を、PBS、14.2Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.43)、11.4Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.42)、8.5Mリン酸のPBS溶液(屈折率:1.40)、及び比較用の透明化剤として尿素を4M、グリセロールを10%(w/v)、Triton X-100を10%(w/v)含む水溶液(国際公開第2012/161143号に記載された透明化剤)にそれぞれ60分間浸漬(25)した。

40

【0040】

浸漬前と浸漬後の試験片の写真を図1に示す。図1において上段は浸漬前の試験片の写真、下段は浸漬後の試験片の写真であり、左から順にPBS(1)、14.2Mリン酸のPBS溶液(2)、11.4Mリン酸のPBS溶液(3)、8.5Mリン酸のPBS溶液(4)、比較用の透明化剤(5)に浸漬する前と浸漬した後の試験片である。

【0041】

図3に示すように、リン酸のPBS溶液で処理した試験片は60分間の浸漬で透明化し、背後のチェッカーパターン(4mm×4mm)が透けて見えた。比較用の透明化剤で処理した試験片もある程度透明化処理が進んでいた。

【0042】

実施例1~3の結果に示すように、本開示の透明化剤によれば短時間で生体試料を透明

50

化できることがわかった。比較用の透明化剤では、生体試料の種類によって短時間で十分に透明化できない場合があった。

【0043】

<実施例4 Colon-26培養細胞の透明化処理>

CellMask Orange (Thermo Fisher Scientific、登録商標)で染色したColon-26培養細胞を4質量%ホルムアルデヒドのPBS溶液に48時間浸漬(25℃)して固定し、PBSで洗浄して試験片を作製した。

【0044】

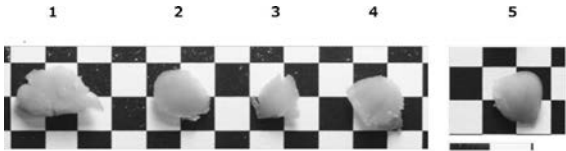
洗浄後のColon-26培養細胞を、14.2Mリン酸のPBS溶液に浸漬(25℃)した。浸漬直前(0h)、浸漬から18時間後(18h)、浸漬から24時間後(24h)、及び浸漬から48時間後(48h)に、Colon-26培養細胞の細胞膜を蛍光顕微鏡で観察した。結果を図4に示す。図中のバーは50µmである。

10

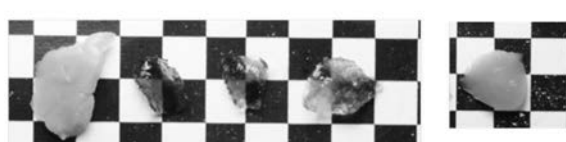
【0045】

図4の蛍光画像(上段)に示すように、リン酸のPBS溶液で処理した後も細胞の輪郭が確認された。一方、同じ細胞膜を明視野で観察(下段)すると、細胞がほとんど視認できなかった。以上の結果から、本発明の透明化方法では細胞の形状を維持しながら生体試料を透明化できることがわかった。

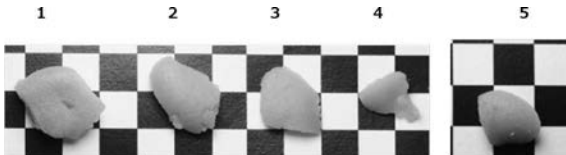
【図1】



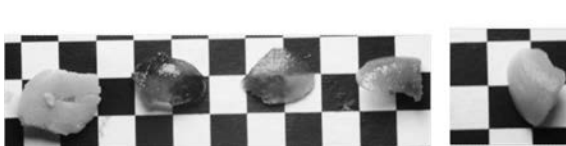
【図2】



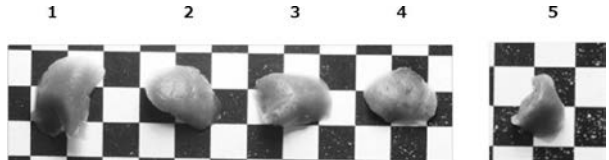
【図3】



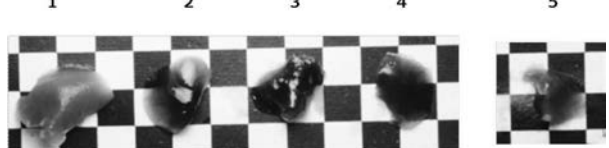
【図4】



【図3】



【図4】



	0 h	18 h	24 h	48 h
Fluorescence Image				
Bright Field				

フロントページの続き

(72)発明者 春口 真祐

東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内

Fターム(参考) 2G045 BB27 CB01

2G052 AA28 FA09 HC24 HC38 JA07