

〔原著〕

新規組織透明化技術による歯および歯周組織の立体構造解析

石田 成美¹⁾, 関 有里²⁾, 根津 顕弘¹⁾, 谷村 明彦¹⁾

1) 北海道医療大学口腔生物学系薬理学分野

2) 北海道医療大学口腔構造機能発育学系歯科矯正学分野

Visualization of the three-dimensional structures of teeth and periodontal tissues with new tissue clearing technology

Narumi ISHIDA¹⁾, Yuri SEKI²⁾, Akihiro NEZU¹⁾, Akihiko TANIMURA¹⁾

1) Division of Pharmacology, Department of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

2) Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Science University of Hokkaido

Key words : tissue clearing, confocal microscopy, hard tissue

Abstract

Tissue clearing techniques are useful for visualizing the three-dimensional structure of many kinds of tissue, while the application of tissue-clearing techniques in dental research remains limited. In this study, we developed a method for clearing hard tissue including bones and teeth using a new clearing reagent, LUCID, and analyzed three-dimensional structures with confocal laser microscopy. We first examined the necessity for decalcification in clearing the mandible and parietal bone of GFP mice, and found that the mandible bone and parietal bone was cleared sufficiently without decalcification. However, uncleared parts remained in the incisors and molars, and the uncleared regions were larger in the undecalcified samples. The LUCID reagent does not contain components for decolorization, and the color of red blood cells remained in the dental pulp. Confocal laser scanning microscopy showed particularly strong GFP fluorescence in the periodontal ligament. In the molars and incisors, fluorescence was observed throughout the dental pulp except in the enamel. Higher magnification images showed tubular structures extending from the pulp toward the surface in incisors. Lacunae were clearly ob-

served in the parietal bone, and the fluorescence of osteocytes present in the bone was confirmed. Osteocyte processes could be clearly visualized by fluorescence images. Next, we observed the calcification of the parietal bone and femur of ddY mice to which calcein (CL) and alizarin red (AR) deposited in the calcified part had been administered at intervals of two days. These samples were cleared without decalcification, and showed CL and AL layers at the surface and bone marrow in the parietal bone, and a layer of AR and CL at the distal end of the femur. Observations of the fine structure of the femur, which cannot be brought into close contact with the cover glass surface, was achieved by using a water immersion lens having a large focal length and numerical aperture. The tissue clearing technique enables three-dimensional observation of samples without slicing. The present study shows that tissue clearing makes it possible to analyze the three-dimensional structure and calcification process of hard tissue by using both hard tissue clearing technology and confocal laser scanning microscopy.

緒 言

組織透明化技術は、組織サンプルの光学的特性を変化

させて、組織の深部構造を観察するための技術である。生体組織を透明化する試みは100年以上も前からなされているが、共焦点レーザーなどの新しい検出技術によっ

て組織や臓器の複雑な三次元構造を細胞レベルで解析する技術として注目されている。個体を三次元的に観察する技術としては、コンピュータトモグラフィー（CT）や磁気共鳴イメージング（MRI）、Positron Emission Tomography（PET）など様々な手法が開発されてきた。これらの技術は生体観察が可能であるといった長所があるが、細胞レベルの解像度での解析が原理的に困難である。また臓器をスライス切片にし、観察後に三次元再構築を行う手法であれば臓器を一細胞解像度で包括的に観察することができる。しかしこの手法は多大な時間と手間を必要とするため、複数のサンプルを比較検討する事は難しい。組織透明化技術は、組織を薄切することなく観察し、その三次元構造を容易に解析することを可能にする革新的技術として注目されている。

組織透明化においては、光散乱の減少が重要である。組織サンプルの主要な構成要素は、タンパク質、脂質、水であり、それらの屈折率の違いが光散乱の原因の1つとなっている（今井，2015；茂田ら，2017）。従って、組織透明化の過程には、組織から屈折率の高い脂質の除去や、屈折率の低い水を高屈折率の溶媒に置換する過程が含まれる。2011年にScaleが開発されて以来（Hama et al., 2011）、CUBIC（Kubota et al., 2017；Susaki et al., 2014；Tainaka et al., 2014）やCLARITY（Chung et al., 2013）等の様々な透明化法が開発され、中枢神経系の研究を中心に様々な軟組織の透明化に応用されている。これらの軟組織と異なり、骨の主成分はコラーゲンなどのタンパク質と無機物であるリン酸カルシウムであるため、最適な透明化には軟組織とは異なる技術が必要になる。

近年、小野寺らは、新規透明化試薬LUCIDを使って、骨を含む様々な組織の透明化について報告した（小野寺，2015）。本研究では、LUCIDを使ってGFPマウスの下顎および頭頂骨を透明化し、歯と骨の観察を行った。またCalcein（CL）やAlizarin Red（AR）を動物に投与すると、石灰化部位に蓄積することが知られている。この特徴を利用して、骨の形成過程を可視化する事ができる。本研究では、未脱灰の頭頂骨および大腿骨を透明化してCLやARの蛍光を指標にした骨形成過程の解析への有用性を検討した。

材料と方法

試薬

石灰化の検出用蛍光試薬としてCalcein（CL；Dojindo）とAlizarin Red（AR；和光純薬工業）、透明化液の作成にチオジエタノール（和光純薬工業）、グリセ

ロール（和光純薬工業）、スクロース（和光純薬工業）、イオメロン400（エーザイ）を用いた。実験に用いた透明化試薬LUCID 1とLUCID 2はニコインステック社から供与された。一部の実験ではLUCID 1としてチオジエタノール：グリセロール：30%スクロース＝20：40：40の溶液、LUCID 2としてチオジエタノール：グリセロール：イオメロン400（ヨウ素含有量40%の非イオン性有機ヨウ素化合物水溶液）＝45：5：50の溶液を使用した。

実験動物

C57BL/6-Tg（CAG-EGFP）マウス（GFPマウス）およびddyマウスは三協ラボラトリー（札幌）から購入した。GFPマウス（5-6週齢）に1 g/kgのウレタンを投与し、意識消失後に心臓を切開して放血死させ、下顎骨、頭頂骨および大腿骨を摘出した。ddyマウス（5-6週齢）にCLを腹腔内投与（20mg/kg）し、その2日後にARを腹腔内投与（40mg/kg）した。その翌日にGFPマウスと同様の方法で下顎骨、頭頂骨および大腿骨を摘出した。動物実験は「北海道医療大学動物実験規定」に基づき、「北海道医療大学動物実験委員会」の審査を経て、北海道医療大学長の承認を得て行った（承認番号：第083号および135号）。

サンプルの調製

マウスから組織を摘出し、生理食塩水で洗浄後に4%パラホルムアルデヒドで1-2日間固定した後、生理食塩水中で4℃で保存した。一部のサンプルは、マイルド脱灰液OSTEOSOFT（Sigma-Aldrich）の方法に従って10%EDTA液に3日間に浸漬して脱灰した。組織透明化はサンプルを4℃で一晩蒸留水に浸漬した後、LUCID 1に室温で1日浸漬した。その後、LUCID 2に室温で1日浸漬した後、新しいLUCID 2に浸漬して室温・暗所に保存した。

共焦点レーザー顕微鏡観察

シリコンパテ（アズワン社製、AZP601）あるいは1-5 mmのBioplast（松風社製）をカバーガラスに接着して作成した観察用チャンバーに透明化液（LUCID 2）を満たし、その中に透明化した組織を入れ、さらにカバーガラスを被せた。この透明化組織を含むチャンバーを共焦点レーザー顕微鏡システム（Nikon, C1）の倒立顕微鏡にセットして観察を行った。GFP蛍光およびCL蛍光の観察には488nmの励起光を用い、515nmのバンドパスフィルター（半値幅30nm）で蛍光を取得した。AR

蛍光の観察には542nmの励起光を用い、570nmのロングパスフィルターで蛍光を取得した。これらと同時に微分干渉像を取得した。取得した画像の解析および三次元画像の構築には、画像解析ソフトウェアNIC-Elements (Nikon) を用いた。使用したレンズとそれらの開口数 (NA)、焦点距離 (WD) は下記のとおりである。

Nikon社製, Plan APO 2x (NA=0.1, WD=8.5mm), Plan APO 4x (NA=0.2, WD=15.7mm), Plan APO 10x (NA=0.45, WD=4.0mm), Plan APO 20x (NA=0.75, WD=1.0mm), Plan Apo LWD 25x (NA=1.10, WD=2.0mm), Plan Apo TIRF 60x (NA=1.45, WD=0.22)。

結 果

1. 下顎の透明化

図1に未処理の下顎 (図1A), 未脱灰で透明化した下顎 (図1B), 脱灰してから透明化した下顎 (図1C) の外観を示す。脱灰処理をせずに透明化した下顎では、下顎骨は脱灰した下顎と同等に透明化されたが、脱灰したものと比較して切歯や臼歯に透明化されない部分が大きく残存した。脱灰後に透明化した下顎骨はほぼ完全に透明になり、背景の格子がはっきりと確認できた。臼歯と切歯はかなり高い透明度を示したが、切歯や臼歯の中心部に透明化されない部分が認められた。またLUCIDは、ヘム等を脱色する成分を含まないため、歯髄に含まれる血球が認められた (図1B, 1C)。

脱灰後に透明化したGFPマウス下顎の共焦点レーザー顕微鏡観察の結果を図2に示す。強いGFP蛍光が、歯と歯槽骨の間に存在する歯根膜で認められた (図2A, 2B, 2C)。臼歯部では、歯髄に強い蛍光が観察された (図2D, 2E, 2F)。切歯部では透過像によって歯髄からエナメル象牙境に向かって伸びる象牙細管と思われる構造が確認できた (図2G, 2H, 2I)。また蛍光像か

らこの細管状構造が歯髄から伸びる細胞性の突起を含むことが確認された。外観からは切歯や臼歯の象牙質の透過性が比較的低いが (図1C), 象牙細管中の細胞が確認できる程度の透明度であった (図2H)。

2. 頭頂骨の透明化

GFPマウスの未処理の頭頂骨 (図3A) と未脱灰で透明化した頭頂骨 (図3B) を比較すると、頭頂骨は脱灰をしなくても十分に透明化された。共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、透過像によって骨小腔が明瞭に観察でき、その中に存在する骨細胞の蛍光が確認されたが (図3C, 3D, 3E), GFP蛍光で骨細胞の突起の観察は困難であった。NA=1.45の全反射顕微鏡 (TIRF) 用60倍レンズで観察すると、透過像および蛍光像で骨細胞の突起を明瞭に観察できた (図3F, 3G, 3H)。

3. CLやARによる石灰化の観察

図4はCLを投与し、その2日後にARを投与したddyマウスの頭頂骨の微分干渉像 (図4A) と、その骨髄部分を拡大して100 μm 程度の深度から表面までを1 μm 間隔で取得した微分干渉像と蛍光像である (図4B-G)。それらの画像を重ねて三次元構造を構築した (図4H)。頭頂骨の表面にCLとALの層が観察され、また骨髄では、CLの内側にARのラベリングが観察された。さらにこの透過像を含む三次元構造 (図4H) から蛍光像を抜き出す事によって、骨髄および骨表面の立体構造を明瞭に観察する事ができた (図4I, 4J, 4K)。図4Jと4Kに示すように、先に投与したCLの緑ラベリングのより表層にARのラベリングが観察された。また骨髄ではCLの内側にARのラベリングが観察された。これにより、頭頂骨が表面や骨髄の内側に向かって成長する時間経過を容易に解析できることが示された。

図5は同様にCLの投与2日後にARを投与し、その翌

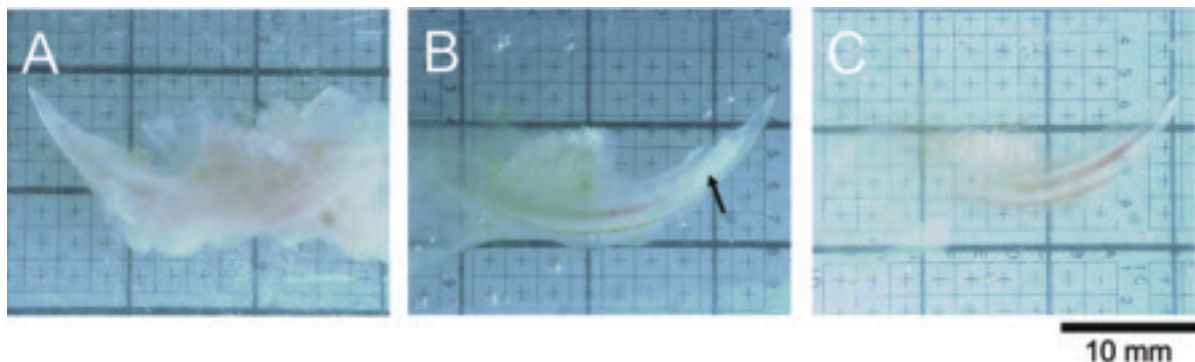


図1 GFPマウス下顎の透明化

未処理の下顎 (A), 未脱灰で透明化処理した下顎 (B), 10%EDTAで脱灰後に透明化処理した下顎 (C) の外観。矢印: 不透明化領域の残存。

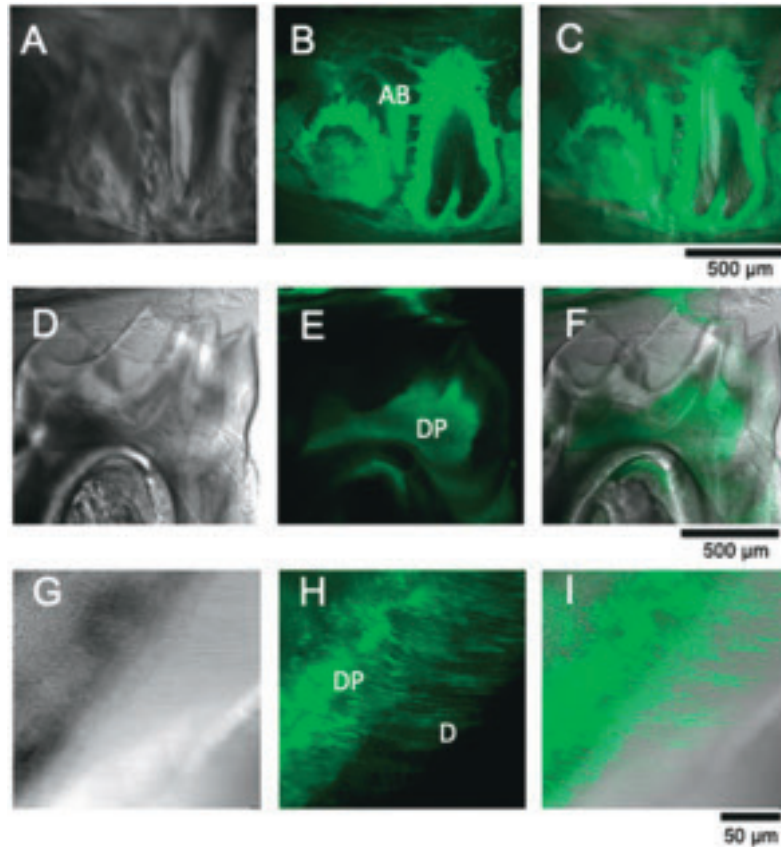


図2 透明化した下顎のGFP蛍光

共焦点レーザー顕微鏡で観察した歯根部 (A–C), 臼歯 (D–F), 切歯 (G–H) の微分干渉像 (A, D, G) とGFP蛍光 (B, E, H), およびそれらのマージ画像 (C, F, I). 観察にはPlan Apo 10x (A, B, D, E) とPlan Apo 20x (G, H) を使用した. AB: 歯槽骨, DP: 歯髄, D: 象牙質 (D).

日に固定したddyマウスの大腿骨である. 大腿骨の遠位端では, CLラベリングの領域の外側にARラベリングの層がみられた (図5A). 図5Bは大腿骨遠位端の骨端部を拡大したものである. 骨端部では肥大軟骨細胞層と思われる部位に柱状のARラベリングが確認できた.

考 察

本研究では新規透明化試薬であるLUCIDを使って, 歯を含む下顎, 頭頂骨, 大腿骨を透明化し, GFP蛍光を使って硬組織の周囲の結合組織や硬組織内の細胞の観察が可能であることを明らかにした. また頭頂骨においては, 脱灰操作無しに透明化できることから, 石灰化部に沈着するCLやARを使った石灰化部の可視化にも利用できることが示された. 共焦点レーザー顕微鏡の使用によって, 切片を作成することなくサンプルの直接観察だけで三次元構造の解析が可能であった. この技術を利用し, 2日間の間隔を空けて投与したCLとARの蛍光の三次元構造から, 頭頂骨や大腿骨の成長量を容易に計測することができることが示された. 石灰化部に沈着する蛍光色素には, 今回用いたCL (Calcein Green) やAR

(Red)に加えて, Calcein Blue, Calcein violetが知られており, これらを利用することによって, 骨形成のより詳細な解析が可能になると期待される.

硬組織を薄切せずに観察する方法では, 微細構造の観察に使用するレンズの選択が重要になる. 微細構造の観察には, 開口数が多いレンズが必要である. 一般的に用いられている40–100倍の油浸レンズは, 開口数が1.3–1.4で解像度は高いが焦点距離が0.2–0.3mmと短い. 比較的に変形し易い軟組織は, 容易にカバーガラス面に密着させることができるが, 硬組織の場合は, カバーガラスに接触する一部の領域しか観察ができない. 比較的に変形し易く扁平な頭頂骨であれば, 焦点距離の短いレンズを使った観察が可能であるが, 焦点距離を超える深部の観察はできない点は注意が必要である. 一方, 焦点距離が1.0mmを超えるドライタイプのレンズを使用すれば深部観察が可能であるが, 開口数が0.7程度のレンズでは, 微細構造の可視化が困難であった.

本研究では, これらの問題を解決する方法として25倍水浸レンズPlan Apo LWD25x (NA = 1.10, WD = 2.0 mm)を使用した. 水浸レンズは, 本来はパッチクラン

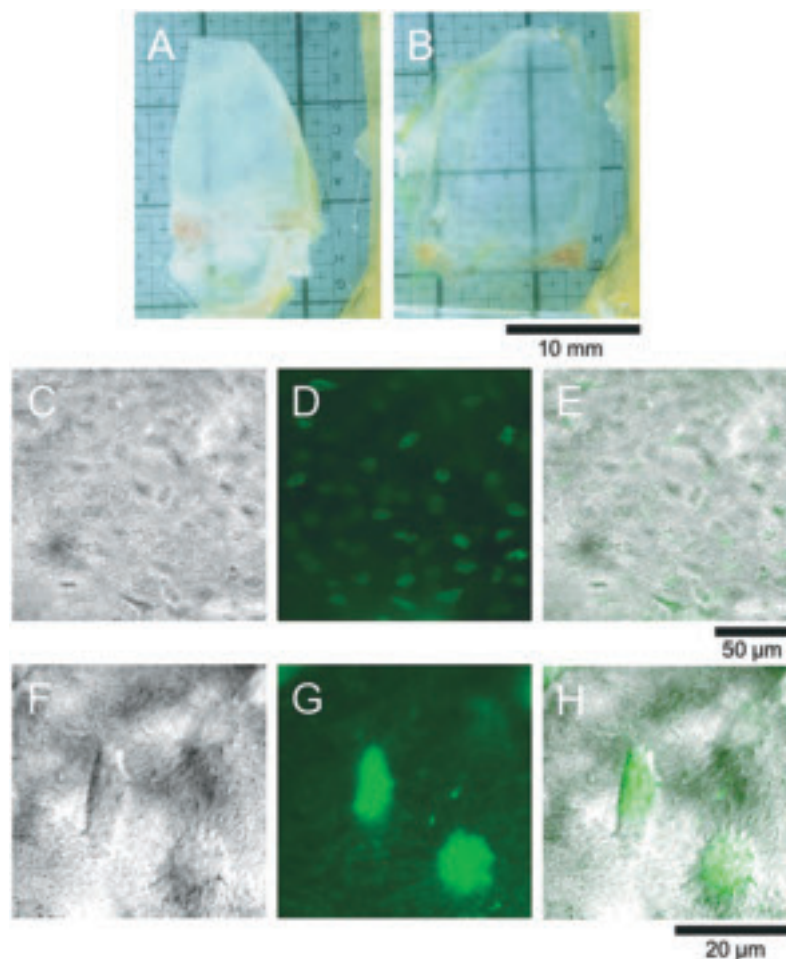


図3 GFPマウス頭頂骨の透明化

未処理の頭頂骨 (A), 未脱灰で透明化処理した頭頂骨 (B) の外観。

骨表面から共焦点レーザー顕微鏡で観察した骨小腔と骨細胞 (C-E) とその拡大 (F-H) の微分干渉像 (C, F) とGFP蛍光 (D, G), およびそれらのマージ画像 (E, H)。観察にはPlan Apo 20x (C, D) とPlan Apo 60x (F, G) を使用した。

ブなどの電気生理学的な解析に用いられるレンズである。開口数が比較的大きいが、ガラス電極を使用するために焦点距離が2 mm程度に設計されている。特に、今回用いたレンズは、開口数が1.1と大きく設計されており、通常のレンズより一回り大きいため、使用する場合はステージを高くするアダプターが必要である。このレンズを用いることにより、関節部における石灰化の三次元構造を高解像度で可視化が可能になった。

現在使われている組織透明化技術には、日本で開発されたScale (Hama et al., 2011; 日置ら, 2017) やCUBIC (Susaki et al., 2014) に加えて、BABB (Dent et al., 1989), 3 DISCO (Becker et al., 2012), SeeDB (Ke et al., 2013), CLARITY (Chung et al., 2013) やSWITCH (Murray et al., 2015) などの方法が知られている。Scale やCUBICには水溶性化合物が用いられており、比較的簡便で蛍光タンパク質の褪色も少ないことが特徴である。本研究で使用したLUCIDは、チオジエタノール、

グリセロール、スクロースを主成分とする透明化液である。市販されているCUBICと比較すると短時間 (2 - 3 日) での透明化が可能であり、Triton等の界面活性剤を使用しないため組織の膨潤などが起こり難い利点を有する。

近年、BABB法を改変したmodified Murray's法やPEGASOS法を使って硬組織を透明化した研究が報告されている (Hong et al., 2019; Jing et al., 2019)。これらの方法では有機溶媒を使用することで比較的高い透過性を実現できる反面、サンプルの収縮、脱色による蛍光タンパク質の褪色、試薬の安全性などの欠点が指摘されている。またPEGASOS法では、20% EDTAによる脱灰が必要であるため、CLやARを使った実験には不向きである。一方、水溶性の利点に加えて優れた脱色能を持つCUBICでは、骨の透明化はできないと言われているが、実際にはある程度の透明化は可能である。近年、硬組織透明化が注目され、様々な透明化法を比較した研究

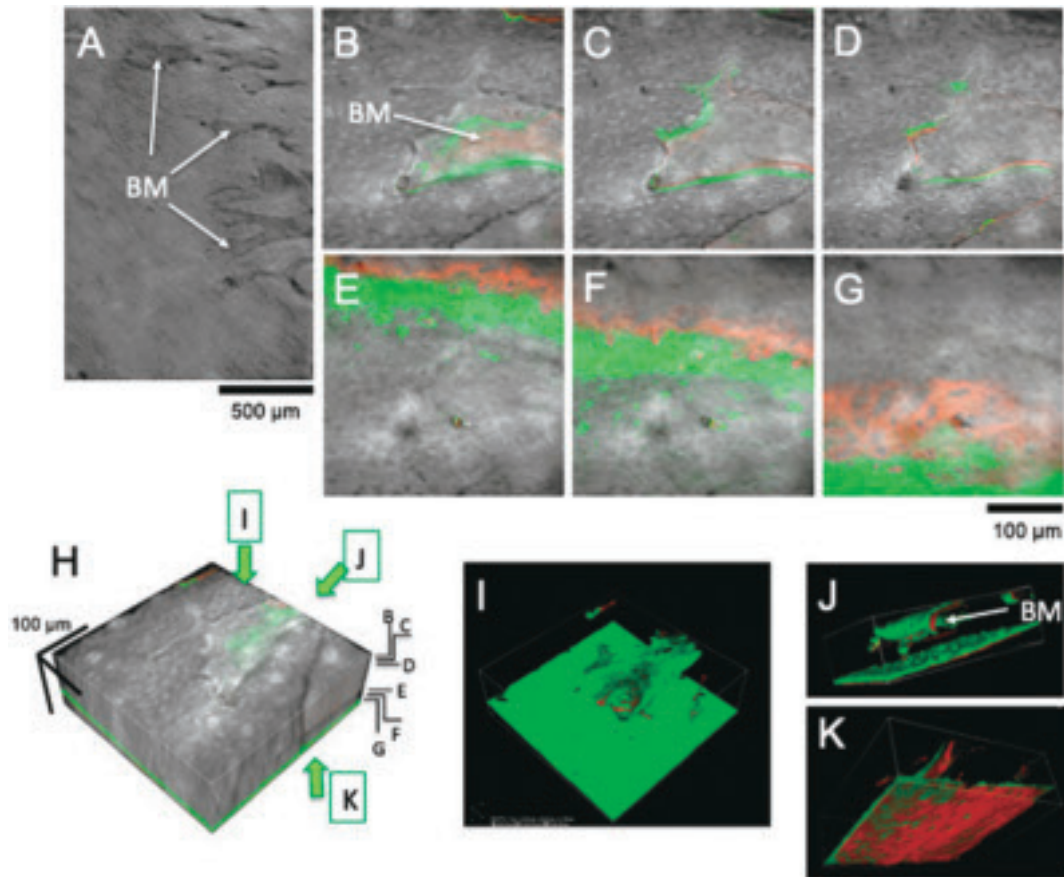


図4 ddyマウス頭頂骨のCalceinとAlizarin Redの蛍光
Calcein (CL) 投与2日後にAlizarin Red (AR) を投与し、その翌日に固定したddyマウスの頭頂骨の微分干渉像 (A)．頭頂骨の表面から約100μmの深部までの領域の微分干渉像と蛍光像を1μm間隔で取得したマージ画像 (B-G) を使って三次元画像 (H) を構築した．パネルB-Gは、パネルHの最上部から、10μm (B)、20μm (C)、30μm (D)、60μm (E)、75μm (F)、90μm (G) の部位の画像を示す．Hから微分干渉像を消去した蛍光像 (I) と、それを回転させて矢印の方向から見た三次元画像 (I, J, K)．観察にはPlan Apo 10x (A) とPlan Apo TIRF 60x (B-F) を使用した．AB：骨髓

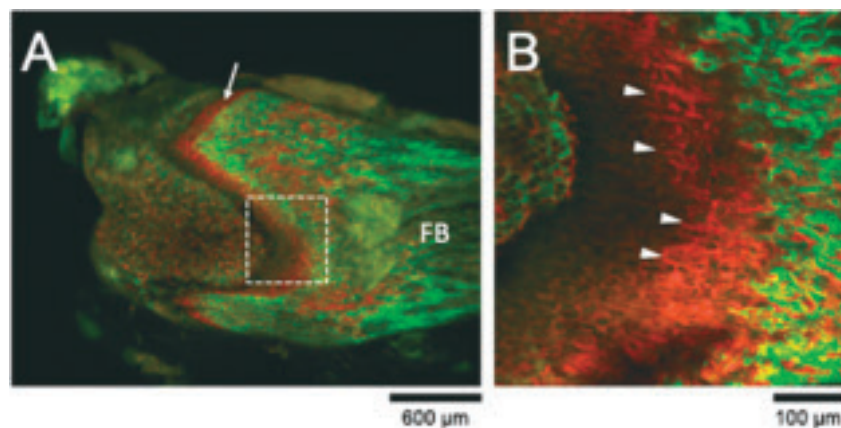


図5 マウス大腿骨のCalceinとAlizarin Redの蛍光
Calcein (CL) 投与2日後にAlizarin Red (AR) を投与し、その翌日に固定したマウスの大腿骨 (FB) 遠位端の表面から約1.5mmの深部までの領域の蛍光像を10μm間隔で取得し、それらを使って構築した三次元画像 (A)．Aの白枠部分の表面から約200μmの領域の蛍光像を5μm間隔で取得し、それらを使って構築した三次元画像 (B)．矢印：骨端部のARラベリング層、矢頭：肥大軟骨細胞層と思われる柱状のARラベリング．観察にはPlan Apo 2x (A) とPlan Apo LWD 25x (B) を使用した．

(Berke et al., 2016) や総説 (Jing et al., 2019) が発表されている。硬組織の透明化は近年始まったばかりで、さらなる発展が期待される技術である。目的に応じて適した透明化法および光学系を選択することが必要である。

謝 辞

本研究において骨代謝および骨の構造に関するアドバイスを頂いた入江一元教授と荒川俊哉教授に感謝します。また本研究の一部は、北海道医療大学個性健康科学研究助成金 (2017–2018) 及び科研費新学術領域研究レゾナンスバイオ (課題番号16H01433; 谷村明彦) の助成を受けて行われた。

利益相反 (COI) について

申告すべきCOI状態はない

文 献

- Becker K, Jahrling N, Saghati S, Weiler R & Dodt HU. Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS One*, 7(3), e33916, 2012.
- Berke IM, Miola JP, David MA, Smith MK & Price C. Seeing through Musculoskeletal Tissues : Improving In Situ Imaging of Bone and the Lacunar Canalicular System through Optical Clearing. *PLoS One*, 11(3), e0150268, 2016.
- Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V & Deisseroth K. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497(7449), 332–337, 2013.
- Dent JA, Polson AG & Klymkowsky MW. A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development*, 105(1), 61–74, 1989.
- Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A & Miyawaki A. Scale : a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, 14(11), 1481–1488, 2011.
- Hong S, Lee J, Kim JM, Kim SY, Kim HR & Kim P. 3D cellular visualization of intact mouse tooth using optical clearing without decalcification. *Int J Oral Sci*, 11(3), 25, 2019.
- Jing D, Yi Y, Luo W, Zhang S, Yuan Q, Wang J, Lachika E, Zhao Z & Zhao H. Tissue Clearing and Its Application to Bone and Dental Tissues. *J Dent Res*, 98(6), 621–631, 2019.
- Ke MT, Fujimoto S & Imai T. SeeDB : a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*, 16(8), 1154–1161, 2013.
- Kubota SI, Takahashi K, Nishida J, Morishita Y, Ehata S, Tainaka K, Miyazono K & Ueda HR. Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. *Cell Rep*, 20(1), 236–250, 2017.
- Murray E, Cho JH, Goodwin D, Ku T, Swaney J, Kim SY, Choi H, Park YG, Park JY, Hubbert A, McCue M, Vassallo S, Bakh N, Frosch MP, Wedeen VJ, Seung HS & Chung K. Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. *Cell*, 163(6), 1500–1514, 2015.
- Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H & Ueda HR. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*, 157(3), 726–739, 2014.
- Tainaka K, Kubota SI, Suyama TQ, Susaki EA, Perrin D, Ukai-Tadenuma M, Ukai H & Ueda HR. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell*, 159(4), 911–924, 2014.
- 小野寺 宏. 臓器透明化技術LUCID. 臨床免疫・アレルギー科, 64 (2), 200–204, 2015.
- 今井 猛. 組織透明化試薬を用いた3D蛍光イメージングのすすめ. 生化学, 87, 225–229, 2015.
- 茂田 大地, 洲崎 悦生, 上田 泰己. 組織透明化法による3次元臓器サンプルの全細胞解析. 比較内分泌学 テクニカルノート, 2017.
- 日置 寛之, 濱 裕, 孫 在隣, 黄 品愛, 並木 香奈, 星田 哲志, 黒川 裕, 宮脇 敦史. 脳組織透明化技術の現状と今後の発展—ScaleS法に焦点を当てて—. 日薬理誌, 149, 173–179, 2017.

石田 成美

北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野 大学院在学中

平成30年 3 月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業

平成30年10月 北海道医療大学大学院歯学研究科 入学

現在に至る