

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-538569

(P2016-538569A)

(43) 公表日 平成28年12月8日(2016.12.8)

(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	2 G O 5 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	2 H O 5 2
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-544323 (P2016-544323)  
 (86) (22) 出願日 平成26年7月30日 (2014. 7. 30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年3月4日 (2016. 3. 4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/048985  
 (87) 国際公開番号 W02015/041755  
 (87) 国際公開日 平成27年3月26日 (2015. 3. 26)  
 (31) 優先権主張番号 61/880, 401  
 (32) 優先日 平成25年9月20日 (2013. 9. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/992, 103  
 (32) 優先日 平成26年5月12日 (2014. 5. 12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508032284  
 カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 1 2 5, パサデナ, イースト・カリフォルニア・ブールヴァード 1 2 0 0, エムシー 6-3 2  
 (74) 代理人 100147485  
 弁理士 杉村 憲司  
 (74) 代理人 100119530  
 弁理士 富田 和幸  
 (74) 代理人 100136858  
 弁理士 池田 浩

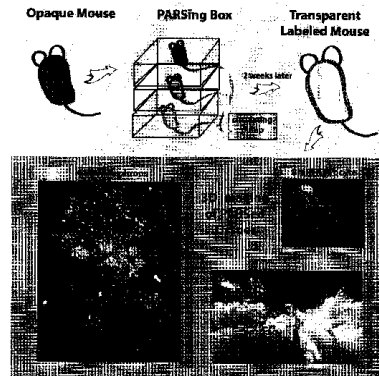
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無傷全組織の表現型分類のための方法

(57) 【要約】

様々な実施態様において、本出願は、組織クリアリングのための方法および組成物を教示し、そこでは、全体の器官および全身が、高分子透過性および光学的に透明にされ、それによって、無傷の接続性を有するそれらの細胞構造が露出される。いくつかの実施態様では、本出願は、PACT、受動的な組織クリアリングおよび無傷器官の免疫染色のためのプロトコルを教示する。他の実施態様において、本出願は、RIMS、厚い組織のイメージングのための屈折率マッチング媒体を教示する。さらに他の実施態様においては、本出願は、PARS、全身クリアリングおよび免疫標識のための方法を教示する。

FIG. 14



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組織の構造的および/または光学的な特性を修飾するにあたり、  
 パラホルムアルデヒド（PFA）が含まれる固定液を組織に適用することであり、それによって、固定された組織が形成されること、および  
 アクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液（PBS）が含まれるヒドロゲルモノマー溶液を、固定された組織に適用することであり、それによって、ヒドロゲル処置された組織が形成されること  
 を含む、方法。

## 【請求項 2】

さらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、固定された組織に適用されることが含まれる、請求項1の方法。

## 【請求項 3】

ヒドロゲルモノマー溶液には、1%から20%まででアクリルアミドが含まれる、請求項1の方法。

## 【請求項 4】

さらに、  
 ヒドロゲル処置された組織が実質気密なチャンパー中に配置されること、および  
 窒素が実質気密なチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された組織が形成されること  
 が含まれる、請求項3の方法。

## 【請求項 5】

さらに、脱気された組織が15 から60 まででインキュベーションされることが含まれ、それによって、インキュベーションされた組織が形成される、請求項4の方法。

## 【請求項 6】

さらに、インキュベーションされた組織がPBSを用いて洗浄されることが含まれ、それによって、洗浄され、かつ、インキュベーションされた組織が形成される、請求項5の方法。

## 【請求項 7】

さらに、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が含まれる清浄液が、洗浄され、かつ、インキュベーションされた組織に適用されることが含まれ、それによって、クリアにされた組織が形成される、請求項6の方法。

## 【請求項 8】

清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいて、1%から30%までのSDSが含まれる、請求項7の方法。

## 【請求項 9】

さらに、PBSが、クリアにされた組織に適用されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された組織が形成される、請求項8の方法。

## 【請求項 10】

さらに、イメージング媒体が、クリアにされ、かつ、洗浄された組織に適用されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：（1）1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、（2）ホスファート緩衝剤；（3）ツウィーン20；（4）アジ化ナトリウム；および随意に（5）水酸化ナトリウムが含まれる、請求項9の方法。

## 【請求項 11】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタ

10

20

30

40

50

ルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項10の方法。

【請求項12】

組織は生検から得られる、請求項11の方法。

【請求項13】

組織はがん性または前がん性である、請求項12の方法。

【請求項14】

組織を免疫染色するにあたり、一次抗体が含まれる溶液が、請求項9のクリアにされ、かつ、洗浄された組織に適用されることを含み、それによって、抗体結合組織が形成される、方法。

【請求項15】

さらに、緩衝剤溶液を用いて、抗体結合組織がリンスされることが含まれる、請求項14の方法。

【請求項16】

さらに、二次抗体が含まれる溶液が、前記緩衝剤溶液を用いて洗浄された抗体結合組織に適用されることが含まれ、そこでは、二次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される、請求項15の方法。

【請求項17】

視覚化可能なマーカーは蛍光性である、請求項16の方法。

【請求項18】

一次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される、請求項14の方法。

【請求項19】

視覚化可能なマーカーは蛍光性である、請求項18の方法。

【請求項20】

組織は生検から得られる、請求項14-18のいずれかの方法。

【請求項21】

免疫染色された組織を視覚化するにあたり、顕微鏡を、請求項16の方法に従って調製された免疫染色された組織を視覚化するために利用することを含む、方法。

【請求項22】

顕微鏡は、共焦点顕微鏡法、スピニングディスク顕微鏡法、落射蛍光顕微鏡法、光照射野顕微鏡法、ライトシート顕微鏡法、多光子顕微鏡法からなる群より選ばれる顕微鏡法の形態を履行するために利用される、請求項21の方法。

【請求項23】

組織の構造的および/または光学的な特性をイン・シトウーにて修飾するにあたり、パラホルムアルデヒド(PFA)が含まれる固定液が、対象の循環系中に導入されることであり、それによって、固定された組織が対象内に形成されること、およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液(PBS)が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象の循環系中に導入されることであり、それによって、ヒドロゲル処置された組織が対象内に形成されることを含む、方法。

【請求項24】

ヒドロゲルモノマー溶液には、1%から20%まででアクリルアミドが含まれる、請求項23の方法。

【請求項25】

さらに、PBSが含まれる溶液が、対象の循環系中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された組織が形成される、請求項24の方法。

【請求項26】

さらに、

実質気密なチャンパー中に対象が配置されること、および

窒素がチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された対象が形成さ

10

20

30

40

50

れること

が含まれる、請求項25の方法。

【請求項27】

さらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、脱気された対象の循環系中に導入されることが含まれる、請求項26の方法。

【請求項28】

さらに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が含まれる清浄液が、対象の循環系中に導入されることが含まれ、それによって、対象内にクリアにされた組織が形成される、請求項27の方法。

10

【請求項29】

清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいて、およそ1%から30%のSDSが含まれる、請求項28の方法。

【請求項30】

さらに、PBSが対象の循環系中に導入されることを含み、それによって、対象内にクリアにされ、かつ、洗浄された組織が形成される、請求項29の方法。

【請求項31】

さらに、イメージング媒体が対象の循環系中に導入されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：(1)1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2)ホスファート緩衝剤；(3)ツウィーン20；(4)アジ化ナトリウム；および随意に(5)水酸化ナトリウムが含まれる、請求項30の方法。

20

【請求項32】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項31の方法。

【請求項33】

組織には、脳組織が含まれる、請求項32の方法。

30

【請求項34】

組織には、脊髄組織が含まれる、請求項33の方法。

【請求項35】

(1)一以上の溶液は、ポンプに接続される第一チューブを通して対象の循環系中に導入され；(2)一以上の溶液は、一以上の溶液が収集されるリザーバと流体連通する第二チューブを通して対象の循環系から除去され；および随意に(3)ポンプは、リザーバから一以上の収集された溶液を抜き取り、および一以上の溶液を、第一チューブを通して対象の循環系中に導入する、請求項32の方法。

【請求項36】

組織をイン・シトゥーにて免疫染色するにあたり：

一次抗体が含まれる溶液が、請求項30の方法が適用された対象の循環系中に導入されることを含む、方法。

40

【請求項37】

さらに、対象の循環系中に緩衝剤溶液が導入されることが含まれる、請求項36の方法。

【請求項38】

さらに、二次抗体が含まれる溶液が、対象の循環系中に導入されることが含まれ、二次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される、請求項37の方法。

【請求項39】

視覚化可能なマーカーは蛍光性である、請求項38の方法。

50

## 【請求項40】

一次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される、請求項36の方法。

## 【請求項41】

視覚化可能なマーカーは蛍光性である、請求項39に記載の方法。

## 【請求項42】

免疫染色された組織をイン・シトウにて視覚化するにあたり：

請求項38の方法に従って調製された組織に係するマーカーを視覚化するために顕微鏡が利用されることを含む、方法。

## 【請求項43】

(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2) ホスファート緩衝剤；(3) ツウィーン20；(4) アジ化ナトリウム；および随意に(5) 水酸化ナトリウムが含まれる、組成物。

10

## 【請求項44】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項43の組成物。

## 【請求項45】

脳組織の構造的および/または光学的特性をイン・シトウにて修飾するにあたり：  
パラホルムアルデヒド(PFA)が含まれる固定液が、対象の脳脊髄液(CSF)中に導入されることであり、それによって、対象内に固定された脳組織が形成されること、および  
アクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液(PBS)が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象のCSF中に導入されることであり、それによって、ヒドロゲル処置された脳組織が対象内に形成されること  
を含む、方法。

20

## 【請求項46】

ヒドロゲルモノマー溶液には、1%から20%まででアクリルアミドが含まれる、請求項45の方法。

30

## 【請求項47】

さらに、PBSが含まれる溶液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された脳組織が形成される、請求項46の方法。

## 【請求項48】

さらに、  
実質気密なチャンパー中に対象または対象の脳が配置されること、および  
窒素がチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された対象が形成されること  
が含まれる、請求項47の方法。

## 【請求項49】

さらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、脱気された対象のCSF中に導入されることが含まれる、請求項48の方法。

40

## 【請求項50】

さらに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が含まれる清浄液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされた脳組織が対象内に形成される、請求項49の方法。

## 【請求項51】

清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいておよそ1%から30%のSDSが含まれる、請求項50の方法。

50

## 【請求項 5 2】

さらに、PBSが対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された脳組織が対象内に形成される、請求項51の方法。

## 【請求項 5 3】

さらに、イメージング媒体が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2) ホスファート緩衝剤；(3) ツウィーン20；(4) アジ化ナトリウム；および随意に(5) 水酸化ナトリウムが含まれる、請求項52の方法。

10

## 【請求項 5 4】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項53の方法。

## 【請求項 5 5】

一以上の溶液は頭蓋内の脳シャントを介して施与される、請求項45-54のいずれかの方法。

## 【請求項 5 6】

一以上の溶液は、嗅球の直接上の領域において硬膜下に挿入される頭蓋内の脳シャントを介して施与される、請求項45-54のいずれかの方法。

20

## 【請求項 5 7】

脊髄組織の構造的および/または光学的な特性をイン・シトウーにて修飾するにあたり

：  
パラホルムアルデヒド(PFA)が含まれる固定液が、対象の脳脊髄液(CSF)中に導入されることであり、それによって、固定された脊髄組織が対象内に形成されること；およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液(PBS)が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象のCSF中に導入されることであり、それによって、ヒドロゲル処置された脊髄組織が対象内に形成されること

30

を含む、方法。

## 【請求項 5 8】

ヒドロゲルモノマー溶液には、1%から20%まででアクリルアミドが含まれる、請求項57の方法。

## 【請求項 5 9】

さらに、PBSが含まれる溶液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された脊髄組織が形成される、請求項58の方法。

## 【請求項 6 0】

さらに、実質気密なチャンパー中に対象が配置されること、および窒素がチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された対象が形成されること  
が含まれる、請求項59の方法。

40

## 【請求項 6 1】

さらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、脱気された対象のCSF中に導入されることが含まれる、請求項60の方法。

## 【請求項 6 2】

さらに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が含まれる洗浄液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされた脊髄組織が対象内に形成される、請求項61の方法。

50

## 【請求項63】

清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいておよそ1%から30%のSDSが含まれる、請求項62の方法。

## 【請求項64】

さらに、PBSが対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された脊髄組織が対象内に形成される、請求項63の方法。

## 【請求項65】

さらに、イメージング媒体が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：(1)1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2)ホスファート緩衝剤；(3)ツウィーン-20；(4)アジ化ナトリウム；および随意に(5)水酸化ナトリウムが含まれる、請求項64の方法。

10

## 【請求項66】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項65の方法。

## 【請求項67】

一以上の溶液は頭蓋内の脳シャントを介して施与される、請求項57-66のいずれかの方法。

20

## 【請求項68】

一以上の溶液は、背側下丘の直接上に挿入される頭蓋内の脳シャントを介して施与される、請求項57-66のいずれかの方法。

## 【請求項69】

本明細書に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

政府の権利

この発明はNIHグラントIDP20D017782-01；1R01AG047664-01；およびR01HD075605の下に政府の支持により行われた。政府は本発明において一定の権利をもつ。

30

## 【0002】

関連出願の相互参照

この出願は、アメリカ合衆国法典第35巻-特許第119条(e)の下に2013年9月20日付け出願の米国仮出願第61/880401号；および2014年5月12日付け出願の米国仮出願第61/992103号からの優先権を主張し、それらの双方はここに参照することによってそれらの全体を組み込む。

## 【背景技術】

40

## 【0003】

本発明の分野

本発明は概して組織の調製および特徴付けの分野に関する。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

背景

以下の説明には、本発明を理解するのに有用でありうる情報が含まれる。ここに提供される情報のいずれも、今回特許請求される発明の先行技術または関連するものと認めるものではない。

50

## 【0005】

細胞、回路、および器官の広範囲での構造-機能の関係を理解することは、3Dの解剖および表現型マップを必要とし、種を超えた多くの器官について現在のところ利用することができない。この知識のギャップの根底にあるのは全体の器官のイメージングを可能にする方法が存在しないことである。そのために、組織クリアリング（組織透明化）の技術は大きな可能性を保有する。全体の器官および全身を高分子透過性および光学的に透明にするために使用することができる組成物および方法が技術的に必要であり、それによって、無傷の接続性を有するそれらの細胞構造が露出される。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明の概略

## 【0007】

様々な実施態様において、本発明は、組織の構造的および/または光学的な特性を修飾するための方法を教示する。いくつかの実施態様において、本方法には、パラホルムアルデヒド（PFA）が含まれる固定液（固定溶液）が組織に適用されることであり、それによって、固定された組織が形成されること、およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液（PBS）が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が固定された組織に適用されることであり、それによって、ヒドロゲル処置された組織が形成されることが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリド（dihydrochloride、二塩酸化合物、二塩酸塩）が含まれる光開始剤溶液が固定された組織に適用されることが含まれる。いくつかの実施態様において、ヒドロゲルモノマー溶液には、1%から20%までのアクリルアミドが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、ヒドロゲル処置された組織が実質気密なチャンパー中に配置されること、および窒素が実質気密なチャンパー中に導入されることであり、それによって脱気された組織が形成されることが含まれる。いくつかの実施態様において、本方法にはさらに、脱気された組織が15 から60 まででインキュベーションされることが含まれ、それによってインキュベーションされた組織が形成される。いくつかの実施態様においては、本方法にはさらに、インキュベーションされた組織が、PBSを用いて洗浄されることが含まれ、それによって、洗浄され、かつ、インキュベーションされた組織が形成される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が含まれる清浄液（detergent、洗浄溶液、界面活性剤溶液）が、洗浄され、かつ、インキュベーションされた組織に適用されることが含まれ、それによって、クリアにされた組織が形成される。一定の実施態様では、清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいて、1%から30%までのSDSが含まれる。いくつかの実施態様において、本方法にはさらに、PBSが、クリアにされた組織に適用されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された組織が形成される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、イメージング（画像形成）媒体が、クリアにされ、かつ、洗浄された組織に適用されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：（1）1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、（2）ホスファート緩衝剤；（3）tween（ツウィーン）-20；（4）アジ化ナトリウム；および随意に（5）水酸化ナトリウムが含まれる。いくつかの実施態様では、1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである。いくつかの実施態様では、組織は生検から得られる。一定の実施態様においては、組織はがん性または前がん性である。

## 【0008】

様々な実施態様において、本発明は組織を免疫染色するための方法を教示する。いくら

10

20

30

40

50

かの実施態様において、本方法には、一次抗体が含まれる溶液が、クリアにされ、かつ、洗浄された組織に適用されることが含まれ、それによって、抗体結合された組織が形成される。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、緩衝剤溶液を用いて、抗体結合組織がリンスされることが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、二次抗体が含まれる溶液を、前記緩衝剤溶液で洗浄された抗体結合組織に適用することが含まれ、そこでは、二次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される。一定の実施態様においては、視覚化可能なマーカーは蛍光性である。いくつかの実施態様では、一次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される。いくつかの実施態様では、視覚化可能なマーカーは蛍光性である。一定の実施態様において、ここに記載の方法における組織は生検から得られる。

10

#### 【0009】

様々な実施態様において、本発明は、免疫染色された組織が視覚化されるための方法を教示する。いくつかの実施態様において、本方法には、ここに記載の方法に従って調製される免疫染色された組織を視覚化するために顕微鏡が利用されることが含まれる。一定の実施態様では、顕微鏡は、共焦点（走査）顕微鏡法、スピニングディスク（回転盤）顕微鏡法、落射蛍光顕微鏡法（epi-fluorescence microscopy）、光照射野顕微鏡法（light field microscopy）、ライトシート顕微鏡法（light-sheet microscopy）、多光子顕微鏡法（multiphoton microscopy）からなる群より選ばれる顕微鏡法の形態を履行するために利用される。

20

#### 【0010】

様々な実施態様において、本発明は、組織の構造的および/または光学的特性をイン・シトゥ（in situ、インサイチュ）にて修飾（改変）するための方法を教示する。いくつかの実施態様において、本方法には、パラホルムアルデヒド（PFA）が含まれる固定液が、対象の循環系中に導入されることであり、それによって、固定された組織が形対象内に成されること；およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液（PBS）が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象の循環系中に導入されることであり、それによって、対象内にヒドロゲル処置された組織が形成されることが含まれる。一定の実施態様において、ヒドロゲルモノマー溶液には、1%から20%までのアクリルアミドが含まれる。種々の実施態様において、本方法にはさらに、PBSが含まれる溶液が対象の循環系中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された組織が形成される。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、実質気密なチャンパー中に対象が配置されること、および窒素がチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された対象が形成されることが含まれる。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、脱気された対象の循環系中に導入されることが含まれる。一定の実施態様では、本方法にはさらに、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が含まれる清浄液が、対象の循環系中に導入されることが含まれ、それによって、対象内にクリアにされた組織が形成される。一定の実施態様において、清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいておよそ1%から30%のSDSが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、PBSが、対象の循環系中に導入されることが含まれ、それによって、対象内にクリアにされ、かつ、洗浄された組織が形成される。一定の実施態様では、本発明方法にはさらに、イメージング媒体が対象の循環系中に導入されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：（1）1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリオードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリオード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、（2）ホスファート緩衝剤；（3）ツウィーン-20；（4）アジ化ナトリウム；および随意に（5）水酸化ナトリウムが含まれる。一定の実施態様では、1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリオードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリオード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%（w/v）

30

40

50

である。いくつかの実施態様では、組織には、脳組織が含まれる。いくつかの実施態様では、組織には、脊髄組織が含まれる。上記の方法の一定の実施態様では、(1)一またはそれよりも多く(一以上)の溶液は、ポンプに接続された第一チューブを通して対象の循環系中に導入され；(2)一以上の溶液は、一以上の溶液が収集されるリザーバと流体連通する第二チューブを通して対象の循環系から除去され；および随意に(3)ポンプは、リザーバから一以上の収集された溶液を抜き取り、および一以上の溶液を、第一チューブを通して対象の循環系中に導入する。

#### 【0011】

様々な実施態様において、本発明は、組織をイン・シトウにて免疫染色するための方法を教示する。いくつかの実施態様において、本方法には、一次抗体が含まれる溶液が、上述の方法が適用された対象の循環系中に導入されることが含まれる。いくつかの実施態様では、本方法には、緩衝剤溶液が、対象の循環系中に導入されることが含まれる。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、二次抗体が含まれる溶液が、対象の循環系中に導入されることが含まれ、そこでは、二次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される。いくつかの実施態様では、視覚化可能なマーカーは蛍光性である。一定の実施態様では、一次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される。一定の実施態様では、視覚化可能なマーカーが蛍光性である。

10

#### 【0012】

様々な実施態様において、本発明は、免疫染色された組織をイン・シトウにて視覚化するための方法を教示する。いくつかの実施態様では、本方法には、上記のイン・シトウ方法に従って調製された組織と関係したマーカーを視覚化するために顕微鏡が利用されることが含まれる。

20

#### 【0013】

一定の実施態様において、本発明は、(1)1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2)ホスファート緩衝剤；(3)ツウィーン-20；(4)アジ化ナトリウム；および随意に(5)水酸化ナトリウムが含まれる組成物を教示する。いくつかの実施態様では、1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである。

30

#### 【0014】

一定の実施態様において、本発明は、脳組織の構造的および/または光学的な特性をイン・シトウにて修飾するための方法を教示する。いくつかの実施態様では、本方法には、パラホルムアルデヒド(PFA)が含まれる固定液が対象の脳脊髄液(CSF)中に導入されることであり、それによって、対象内に固定された脳組織が形成されること；およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液(PBS)が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、対象内にヒドロゲル処置された脳組織が形成される。一定の実施態様において、ヒドロゲルモノマー溶液には、1%から20%までアクリルアミドが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、PBSが含まれる溶液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された脳組織が形成される。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、実質気密なチャンパー中に対象または対象の頭部が配置されること、および窒素がチャンパー中に導入されることが含まれ、これによって、脱気された対象が形成される。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる開始剤溶液が、脱気された対象のCSF中に導入されることが含まれる。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が含まれる清浄液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされ

40

50

た脳組織が対象内に形成される。一定の実施態様において、清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいておよそ1%から30%のSDSが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、PBSが対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された脳組織が対象内に形成される。いくらかの実施態様において、本方法にはさらに、イメージング媒体が対象のCSF中に導入されることが含まれ、イメージング媒体には：(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2) ホスファート緩衝剤；(3) ツウイーン-20；(4) アジ化ナトリウム；および随意に(5) 水酸化ナトリウムが含まれる。いくらかの実施態様では、1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである。いくらかの実施態様では、一以上の溶液は頭蓋内の脳シャントを介して施与される。一定の実施態様では、一以上の溶液は、嗅球の直接上の領域において硬膜下に挿入される頭蓋内の脳シャントを介して施与される。

#### 【0015】

様々な実施態様において、本発明は、脊髄組織の構造的および/または光学的な特性をイン・シトゥにて修飾するための方法を教示する。いくらかの実施態様において、本方法には、パラホルムアルデヒド(PFA)が含まれる固定液が、対象の脳脊髄液(CSF)中に導入されることがあり、それによって、固定された脊髄組織が対象内に形成されること；およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液(PBS)が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、対象内にヒドロゲル処置された脊髄組織が形成される。一定の実施態様において、ヒドロゲルモノマー溶液には、1%から20%までアクリルアミドが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、PBSが含まれる溶液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された脊髄組織が形成される。一定の実施態様では、本方法にはさらに、実質気密なチャンパー中に対象が配置されること、および窒素がチャンパー中に導入されることが含まれ、これによって、脱気された対象が形成される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、脱気された対象のCSF中に導入されることが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が含まれる清浄液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされた脊髄組織が対象内に形成される。一定の実施態様において、清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいておよそ1%から30%のSDSが含まれる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、PBSが対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された脊髄組織が対象内に形成される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、イメージング媒体が対象のCSF中に導入されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2) ホスファート緩衝剤；(3) ツウイーン-20；(4) アジ化ナトリウム；および随意に(5) 水酸化ナトリウムが含まれる。一定の実施態様では、1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである。一定の実施態様において、一以上の溶液は頭蓋内の脳シャントを介して施与される。いくらかの実施態様においては、一以上の溶液は背側下丘の直接上に挿入される頭蓋内の脳シャントを介して施与される。

#### 【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 6 】

模範的な実施態様を参照図面において例証する。ここに開示される実施態様および図面は、制限的と言うよりはむしろ例示とみなされるべきことが意図される。

【 図 1 - 1 】 図1は本発明の実施態様に従って、A4P0組織ヒドロゲルハイブリッドのPACTクリアリングが器官を横断して最適な透明性および免疫組織化学的適合性を実現することを示す。(A) 24時間および48時間の間クリアにされるA2P0、A4P0およびA4P4組織ヒドロゲルハイブリッドの3mmの成体マウスのサジタル(矢状方向)ブロックの光透過性の比較。(B) A4P0組織ヒドロゲルハイブリッドは、A4P4に比較して、より一層高速な抗体の浸透を示した(サンプルあたりn=6視野)。(C) 1mmのマウス脳スライスからのタンパク質損失の割合(各クリアリング条件についてn=6スライス);統計的有意性は各条件対A4P0 8% SDS(赤)について示す。(D) クリアにされていない、およびクリアにされた1mmのThy1-eYFPマウス脳スライスの任意単位(A.U.)での統合eYFP蛍光強度(n=6スライス)。(E) A4P4と比較して、A4P0ヒドロゲル組織ハイブリッドはクリアの後により一層高い組織伸展および重量増加を示した。(F-H) ニッスル(Nissl)を用いて染色したThy1-eYFPマウスのセクション(切片):(F) 1mmのクリアにした脳スライス、前頭前皮質(PFC)領域(左:z=1mmイメージングスタック深さ);(G) 1mmのクリアにしていない脳スライス、PFC(左:z=100 $\mu$ mのイメージングスタック深さ);(H) 1mmの脊髄スライス(z=500 $\mu$ m);(I) 抗チロシンヒドロキシラーゼ(TH)抗体を用いて染色された1mmのマウス脳スライスの黒質緻密部(SNc)(z=1mm)。(J) GFAP、マウスIgG、およびIba1に対する抗体を用いて染色された1mmの成体マウスの脳スライスのPFC(z=500 $\mu$ m)。(K) 抗インテグリン抗体、SYTO24、およびアクリジンオレンジを用いて染色されたマウス腎臓(z=150 $\mu$ m;アローヘッド(矢印)は糸球体を示す)、心臓(z=320 $\mu$ m)、肺(z=550 $\mu$ m)および腸(z=350 $\mu$ m)の1mmのセクション。(L) 基底細胞がん(BCC)からのPACT-クリアされたヒト組織生検は、内皮細胞およびDAPIを標識するために抗パン・サイトケラチン(AE1/AE3)アレクサフルオロ(Alexa Fluor) 488一次抗体を用いて染色した(700 $\mu$ mイメージングスタック深さ)。すべてのグラフは、平均 $\pm$ SEMの統計上の有意性において示され:対のサンプルについて:スチューデントの両側t検定(2-tailed Student's t test);多重比較のため:一元配置ANOVA(分散分析)次いでボンフェローニのポストホック(Bonferroni posthoc)が続く(\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*p<0.005、および\*\*\*\*p<0.0001)。すべての共焦点イメージング;目的について、メソッドの項を参照。また、図7-9および表1および表2を参照。

10

20

30

【 図 1 - 2 】 図1-1の説明を参照。

【 図 2 - 1 】 図2は本発明の実施態様に従い、smFISHによるPACT組織切片における個々のmRNA転写物の検出を示す。100 $\mu$ mの厚さのマウス脳スライスを、Alexafluor 594を用いて標識された $\alpha$ -アクチンmRNAに向けた二十四の20マーのオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせた。(A) PACTクリアにされたsmFISH脳スライス。上部のパネルは30 $\mu$ mの最大値投影法(maximum intensity projection)を示す。シングルのベータ-アクチンのmRNAs(赤)に対応する豊富な数(abundant number)の回折限界スポットが589nmの照明下で深さ30 $\mu$ mまで難なく検出された。明るいアモルファス顆粒(黄)は、589nm(赤)および532nmの自家蛍光(緑)のチャンネルの双方において見えるバックグラウンドのリポフスチン小胞であり、その一方、smFISHシグナル(信号)は赤チャンネルだけであることに注目される。(B) PACTクリアのスライスと比較して、クリアされていない脳スライスにおけるsmFISHは著しく減少したコントラストを示した。(AおよびBでの下側パネルは12 $\mu$ mの深さにて0.5 $\mu$ mの単一のスライスを示し、イメージ(画像)は同じコントラストスケールおよびガウスフィルタリングのラプラシアン(Laplacian of Gaussian filtering)を使用して生データから処理され;生データについては、図8Dが参照される)(C) 信号対雑音比は深さの関数として、PACTクリアリング組織が、サンプルの厚さ全体にわたってsmFISHの信号対雑音比を、クリアにされていない組織と比較して増大させることを示す。(D) smFISH強度は19のクリアにされていない組織およびPACT-クリアにされた組織の間にはほとんど差異を示さない。p=0.8722;スチューデントの両側t検定。(E) クリアにされて

40

50

いない組織およびPACT-クリアにされた組織の間のバックグラウンド強度の比較は、PACT-クリア組織におけるバックグラウンド蛍光の有意な減少を示す。p=0.0006；スチューデントの両側t検定。すべてのグラフは、平均±SEMにおいて示される。顕微鏡検査のためには、メソッドの項を参照。

【図2-2】図2-1の説明を参照。

【図3-1】図3は本発明の実施態様に従い、PARS-CSF：イン・シトウーでの灌（かん）流補助剤放出（perfusion-assisted agent release、PARS）を用いる脳脊髄液経路（CSF）を介する迅速な全脳または脊髄のクリアリングおよび標識化のためのプロトコルを実証する。（A）CNS組織は、嗅球の直接上の領域における硬膜下（左）、または大槽中のいずれかに挿入され（または背側の下丘の直接上、右に配置され）る頭蓋内の脳シャントを介してCSF中へのすべてのPARS試薬の直接灌流によって透過性を光学的に透明にすることができる。カニューレは、かん流ラインに接続され、歯科用アクリルを用いてポジションに接合することができる。（B）全脳およびそれに対応する厚さ2mmのスライス（左）および全脊髄（右）は、4日間（脳）、または2週間（脊椎）、37℃でクリアにされたPARS-CSFラットからのものが示される。全脳のクリアリングの程度はカニューレに近接する脳組織に依存し：前頭葉は光学的に透明にされたが、その一方、ミッド-菱脳（mid-hind brain）は弱くしかクリアにされなかった（パネルの右側での2mmのスライスを参照）。RIMSにおける24時間のインキュベーションの後、PARS-CSFの脳スライスは、さらなるセクション（切片化）を行うことなく、イメージングのために十分にクリアにされた。C）イメージは、クリアリング6ヶ月前にAAV9：CAG-EGFPを用いてIV（静脈）注入を受けたマウスから調製した500 μmのPARS-CSFクリア冠状脳スライスにおいてネイティブなeGFP蛍光発光を示す。皮質および海馬の代表的な切片は、イメージボックス（右）においてより一層高い倍率で提示される。層V冠状ビュー（layer V coronal view）では、血管に隣接したAAV9形質導入eGFP発現グリア細胞およびeGFPニューロンがはっきりと見える。海馬（下部）において、eGFP発現CA1ニューロンのより一層微細な神経突起（finer neuronal process）は、高分解能で視覚化することができ、それはPARS-CSFが、細胞の形態に深刻な損傷を与えることなく完了しうることを示唆する。顕微鏡検査についてはメソッドの項を参照。また、図10も参照。

【図3-2】図3-1の説明を参照。

【図4-1】図4は本発明の実施態様に従い、PARSが全身のクリアリングを達成することを実証する。（A）PARSクリアリングおよび免疫染色の概略図。（B）PARSクリアリング前および後のマウスの脳および末梢器官の光学的透明性の比較。（C）PARSクリアリングの前（左から、第一ボックス）および2週間後（第二ボックス）の関連するマウスの脳サイズの代表的なイメージは、PARSがクリアリングプロセスの間のヒドロゲルの膨潤および脳組織の拡張を回避することを示す。脳組織は、RIMSにおいて浸漬した後、徐々に拡大し（第三ボックス）；この容量変化は、RIMSマウンティング（取り付け）前に一晚の4%PFAにおいて、後固定のPARSサンプルを介して軽減することができる（第四ボックス）。（D）PARSクリアリングの前（右）および4日後（左）の関連するラットの脳のサイズの代表的なイメージであり、PARSがどのようにスケラブル（測定可能）な方法であるかが示される。ラット全脳サンプルの冠状スライスは、グロス（肉眼的）組織の形態を示し、無髄領域がPARSベースのクリアリングの4日以内にクリアにされることが強調される。（E）PARSクリアリングのタンパク質損失は、他のクリアリング方法と比較し（n=各々4匹のマウス）；グラフは平均±s.e.m.を示し；一元配置分散分析に次いでボンフェローニのポストホック（事後）テストが続き、20からA4P0 8%SDSのPARSクリアリングと比較して統計的な有意性を定めるために使用された。\*はp<0.05を示し、および\*\*はp<0.01を示す。（B-D）についてのイメージは明視野カメラを用いて撮影された。また、図10、13、および9Eを参照。

【図4-2】図4-1の説明を参照、

【図5-1】図5は本発明の実施態様に従い、PARSが細胞内分解能を伴う広範かつ希薄な遺伝的にコードされた蛍光シグナルの全脳のマッピングを可能にすることを実証する。（

A) 全脳イメージ ( $z=6\text{mm}$ )、および (B) PARSの10日間のクリアリング後の成体Thy1-eYFPマウスの深部脳イメージング ( $z=4\text{mm}$ )。右側でのボックスは、示された領域の高倍率イメージを示す。(C) PARSの2週間の間のクリアリング後の成体Thy1-eYFPマウスの脊髄イメージ ( $z=2\text{mm}$ )。下側パネルは、示された領域での高倍率イメージを示す ( $z=1.2\text{mm}$ )。(D) イメージは、AAV9 : CAG-eGFPのIV注射を受けたPARSクリアされたマウスから調製される1mmの冠状脳スライス (左) および肝臓 (右) におけるネイティブeGFP蛍光を示す。各冠状脳イメージの右側に対するイメージカラムは直交ビューを示す ( $z=0.5\text{mm}$ )。(E) 肝臓を標的解除した (liver detargeted) バリエーション (変形物)、AAV9BD1 : CAG-eGFPにより注射したPARSクリアマウスから調製される1mmの冠状脳スライス (左) および肝臓 (右) におけるネイティブeGFP蛍光。各冠状脳イメージの右側に対するイメージカラムは直交ビューを示す ( $z=0.5\text{mm}$ )。顕微鏡検査法については、メソッドの項を参照。また、図11を参照。

10

【図5 - 2】図5-1の説明を参照。

【図6 - 1】図6は本発明の実施態様に従い、PARSが末梢器官の急速かつ均一なクリアリングおよび免疫標識を可能にすることを例証する。クリアリングおよび免疫組織化学的標識は、単独でPARSを通じてマウス全体において達成された。(A) PARS-クリアマウスの腸を、レクチン、メチレンブルー、およびDAPIを用いて染色し、および500  $\mu\text{m}$ の深さを通してイメージングした。下側パネルは、上記レンダリング (表現法) の最大値投影法 (maximum intensity projection)、 $z=50\text{ }\mu\text{m}$ を示す。 ( $z=500\text{ }\mu\text{m}$ )。(B) 厚さ1mmの腎臓セクションを、抗チューブリン抗体およびDRAQ5ラベリングのためにイメージングした (左) 20。右のパネルは、示された領域および糸球体の構造の高倍率イメージを示し、PARSが腎臓の全体にわたる抗体ベースのラベリングを可能にすることが実証される ( $z=1.2\text{mm}$ )。顕微鏡検査についてメソッドの項を参照。また、図12および13を参照。

20

【図6 - 2】図6-1の説明を参照。

【図7 - 1】図7は本発明の実施態様に従い (図1、3および4、および表2に関連して)、8% SDSを用いるPACTクリアA4P0組織ヒドロゲルハイブリッドが、優れた光学的透明性を示すことを実証する。すべてのサンプルは3日間PACTクリアされた。(A) SDSの異なる割合および10%のデオキシコール酸ナトリウムを用いてPACTクリアされた3mmのマウス脳の冠状ブロックの光透過性の比較 (矢印は不完全なクリアリングを示す)。(B) 種々のヒドロゲルの割合によりハイブリダイズした組織の孔を示す走査型電子顕微鏡 (SEM) イメージ 30。であり; 下のヒストグラムは、各条件についての細孔サイズの分布を示す。(C) A4P4に比べ、A4P0組織ヒドロゲルハイブリッドはより一層大きな組織の拡大および光透過性を示す (1mmのマウス脳スライス)。(B) および (C) のためのサンプルは、8% SDSにおいてPACTクリアされた。(A) および (C) についてのイメージは明視野カメラを用いて撮影した。

30

【図7 - 2】図7-1の説明を参照。

【図8 - 1】図8は本発明の実施態様に従い (図1および2に関連して)、PACTサンプルが、グロス組織病理学およびファイン (微細) 転写分析に適合することを示す。(A-C) ヒト基底細胞がん (BCC) 組織生検の3mm厚のセクションは、PACTを用いてクリアにされ、抗パン・サイトケラチン (AE1/AE3) 抗体を用いて免疫標識され、およびDAPIを用いて対比 40。染色された。(A) ヒトの基底細胞がん (BCC) 組織生検のクリアにされていない (上部) およびクリアにされた3mm厚のセクション (下部) の写真 (スケールバー=5mm)。(B) すべての細胞 (マゼンタ) の領域に関してアポトーシス組織のAE1/AE3陽性細胞およびケラチンフィラメントのレムナント (残部) (緑) の位置を示す低倍率 (5 $\times$ ) および (C) 高倍率 (25 $\times$ ) の3Dレンダリングおよび最大値投影法。(スケールバー=500  $\mu\text{m}$  および 100  $\mu\text{m}$ )。(D) PACTクリアにされた (上側パネル) およびクリアにされていない (下側パネル) smFISH脳スライスの前処理 (DAPIチャンネル上のバックグラウンド除去法を除き) (左および中央のパネル) および後処理 (右側パネル) のイメージのバックグラウンドの違い。左パネル: 30  $\mu\text{m}$  の最大値投影法 (MIP)。中央パネル: 3  $\mu\text{m}$  の深さでの単一の0.5  $\mu\text{m}$  のイメージ。右パネル: ガウスのラプラシアン (ラプラスの演算子) [LoG (ログ)] フィル 50

40

50

タリングされ、中央のパネルからコントラスト調節されたイメージを対比。すべてのイメージは、同一のコントラスト閾値、およびLoGフィルタリングパラメータを用いて処理された。顕微鏡検査についてメソッドの項を参照。

【図8-2】図8-1の説明を参照。

【図8-3】図8-1の説明を参照。

【図9-1】図9は本発明の実施態様に従い（図1および4、ならびに表2に関連して）、sRIMSおよびRIMSがクリアにされた組織ヒドロゲルハイブリッドの屈折率を一致させることによってより一層良好な光透過性を与え、および長期の保存およびイメージングを可能にすることを実証する。（A）異なる媒体において2週間マウントし、および貯蔵したPACTクリアの1mmのThy1-eYFPマウスの脳の冠状スライス（上部、明視野カメラ）および共焦点イメージ（下部）。80%グリセロールにおいてマウントされたサンプルの光透過性は非常に悪いが、RIMSおよびsRIMS、ソルビトール溶液ベースのマウンティング媒体（メソッドの項を参照）は、マウントされたサンプルの光透過性およびイメージング解像度深さ（imaging resolution depth）を高めた。本発明者らは、1日より長い間、グリセロールおよびFocusClear（フォーカスクリアー）TM（トレードマーク）においてマウントされた組織で、沈殿、おそらく溶解した塩を検出した。（B）Histodenz（ヒストデنز）TMの種々の濃度（ホスファート緩衝剤において希釈）を用いて調製されるRIMSの屈折率。（C）RIMSにおいて2ヶ月のインキュベーションの後、クリアにされていない全脳組織は、表面的に、不十分なミエリン化（有髄）領域において光学的に透明になる。このようにして、優れた解像度が厚くセクション化された（ $\sim 50\text{-}300\ \mu\text{m}$ ）組織スライスのために望ましいとき、RIMSの浸漬は、より一層穏やかな、より一層ゆっくりとではあるが、より一層複雑なクリアリングプロトコルの代替を提供する。（D）A4P0およびA4P4のヒドロゲル組織ハイブリッドのために1日間（ $n=4$ ブロック）、RIMSにおいてインキュベーション後、PACTクリア（3日）3mmのThy1-eYFPマウス脳の矢状ブロックの組織収縮の代表的なイメージ（明視野カメラ）およびパーセンテージの定量化。（E）クリアにされていないThy1-eYFP全脳およびRIMSにおいて3ヶ月間マウントされたPARSクリアのThy1-eYFP全脳（明視野カメラ）の間のサイズ比較、およびRI 1.43（60%Histodenz w/v）RIMSにおいて長期貯蔵後のeYFP蛍光シグナル（ $z=1\text{mm}$ ）。顕微鏡検査についてメソッドの項を参照。

10

20

【図9-2】図9-1の説明を参照。

【図10-1】図10は本発明の実施態様に従い（図3および4に関連して）、全身クリアリングのためのPARSシステムの開発を示す。（A）左：PARSはピペットボックスから調製した注文製の灌流チャンバーにおいて行った。左（心）室または上行大動脈に固定されたフィーディングニードル（送り針）を通して4%PFAにより灌流固定後、げっ歯類をピペットチップの格子の頂上に保つ。ピペットボックスは、それが右（心）房内の病変を通じてげっ歯類から出る灌流液で満たされるときに排出するように、カテーテルチューブの一端がピペット・チップ・ボックスの底部に固定される。チューピングは、その後、蠕動ポンプを通して進められ、そして反対側の端部はフィーディングニードルに接続される。このことによって、灌流液をピペット・ボックスから吸い出し、および心臓カテーテルを通して再循環することができ、げっ歯類の脈管構造を通してヒドロゲルモノマー、洗浄緩衝剤、クリアリング浄化剤、および組織学的染色の連続灌流が達成される。注目すべきことには、このPARSセットアップは、フィーディングニードルよりはむしろ頭蓋内カニューレに対してカテーテルチューブを取り付けることによって、PARS-CSFに適用することができる（図3Aを参照）。右：ヒドロゲル重合の直前に、全体の灌流チャンバーは（カテーテル接続された対象を伴い）、組織の脱ガスのためにジブロック・バッグ（ziplock bag）内に密封され、および全体のセットアップはPARSプロトコルの残りの部分にわたりこのバッグ内に残される。バックは、灌流チャンバーが浅い水浴中に配置されることを可能にし、-灌流チャンバーのフラッシング（出水）からの、または水浴を汚染することからのPARS試薬からの水を防止するためにバリアを形成する。（B）げっ歯類は、PARS試薬の灌流を介して全身の脈管構造のアクセス（利用）可能性を調査するために、Atto（アト）488コンジュゲート（結合）GFAPのナノボディ（左）およびAlexa Fluor（アレクサ・フルオロ

30

40

50

647コンジュゲート抗マウスIgG抗体(右)を用いて灌流された。具体的には、PARS試薬は、均一で、迅速なクリアリングおよび中枢および末梢器官の双方のラベリング、不十分にしか血管新生しない、および良好に血管新生した組織を問わずに実現するために、主要な血管ならびに組織の微小血管系の双方を通して循環することができなければならない。左：皮質における主要な血管の周囲のグリア細胞の大規模な集団。中間：血液脳関門の形成に關与する星状細胞エンドフィートを示す高倍率のボリュームレンダリング(ボリューム可視化)。右：クリアにされていない組織への免疫グロブリン全体の灌流ベースの配送を介して達成される1mmマウス脳セクション(皮質)の良好に保存された脈管構造。マウスの脈管構造の大規模なラベリングは、PARSの圧力勾配が、主要な血管を通して抗体溶液を動かすことができることを示唆する。顕微鏡検査について、メソッドの項を参照。

10

【図10-2】図10-1の説明を参照。

【図11-1】図11は本発明の実施態様に従い(図4および5に関連して)、組織保存および定量化が示される。(A)クリアにされていない(左上)、PARSクリア(右上)、PARSクリアおよび2週間のRIMS浸漬(左下)、ならびにPARSクリア、4%PFA後固定およびRIMSマウントのマウス脳セクションからの厚さ1mmのマウス脳スライス(明視野イメージ)。スライスが図4Cでの全脳からのものであることは注目される。(B)皮質、線条体および視床における細胞間の平均最近隣距離は、クリアにされていない、PARSクリアされ、およびPARSクリアされ、次いで後固定された脳スライスにおいて定量された。クリアにされていないコントロールと比較して、PARSクリア脳スライスは、脳の三つのすべての領域において細胞間隔での小さいが著しい増加および皮質および視床において細胞のサイズでの著しい増加を示し、その一方、PARSクリアされ、次いで後固定された脳スライスはそうでなかった。統計的有意性：対のサンプルについて：両側学生t検定；多重比較のため：一元配置ANOVA (\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.005$ 、および\*\*\*\* $p < 0.0005$ 、ns=有意差なし)。

20

【図11-2】図11-1の説明を参照。

【図12-1】図12は本発明の実施態様に従い(図6に関連して)、PARSが主要な末梢器官を光学的に透明にすることを実証する。PARSクリアリングおよび灌流ラベリングの1週間後、末梢器官を切り取り、1-2mmセクションに切断し、およびイメージングの前に24時間RIMSにおいて浸漬した。(A)PARSクリアおよび染色マウス肝臓サンプルの500 $\mu\text{m}$ のイメージングスタックで、PARS試薬が、肝臓組織の密度にかかわらず、全体の器官にアクセスすることができたことを示唆する拡散レクチンおよびDAPI染色を伴う。(B)PARSクリアおよび染色マウス肺サンプルの100 $\mu\text{m}$ のイメージングスタックおよび(C)PARSクリアのマウス膵臓サンプルの600 $\mu\text{m}$ の厚さのイメージングスタックで、双方は、高レベルのレクチン、ファロイジンおよびDAPI蛍光シグナルが全体を通して見られる。細胞構造の高分解能は、三つのすべての組織サンプルにて観察された。レクチン染色は、血管をマークし、他の小分子色素の蛍光シグナルと組み合わせ、染色された組織が組織の脈管構造のすぐ近くにあることを示す。末梢器官では、免疫標識は、脈管構造の循環および脈管構造の周囲の組織への灌流液リークの受動拡散の双方を介して生じる。(z=100 $\mu\text{m}$ 、スケールバー=100 $\mu\text{m}$ )。顕微鏡検査については、メソッドの項を参照。

30

【図12-2】図12-1の説明を参照。

【図13】本発明の実施態様に従い(図4に関連して)、PARSが全身クリアリングすることができることを実証する。8%SDSで、1週間のPARSクリア後全体のThy1-eYFPマウスの(A)背側および(B)腹側のビューは、全身の良好な光学的透明性を示した。(B)における矢印はクリアにされた腎臓を指す。(C)同じマウスについての脳のイメージ。イメージは明視野カメラを用いて撮影した。

40

【図14】本発明の実施態様に従い、PARSおよびその後の3Dイメージングの履行を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の説明

【0018】

ここに引用されるすべての参考文献は、その全体が完全に記載されているかのように参

50

考として組み込まれる。別に規定しない限り、ここに使用する技術的および科学的用語は、この発明が属する技術における通常の技量の者（当業者）によって普通に理解されるのと同じ意味をもつ。March（マーチ）、Advanced Organic Chemistry Reactions（アドバンスド・オーガニック・ケミストリー・リアクションズ）、Mechanisms and Structure 5<sup>th</sup> ed.（メカニズム・アンド・ストラクチャー第5版）；およびGuyton（ガイトン）およびHall（ホール）、Textbook of Medical Physiology 12<sup>th</sup> ed.（テキストブック・オブ・メディカル・フィジオロジ第12版）は、本出願において使用される用語の多くに対する一般的な指針を当業者に提供する。

【0019】

当業者は、本明細書に記載のものと類似または同等の多くの方法および材料を認識するであろうし、それらは本発明の実践に使用することができる。実際、本発明は、記載される方法および材料に決して限定されない。本発明の目的のため、一定の用語を以下に規定する。

10

【0020】

ここに用いるように、PACTは、受動的クラリティー技術（PASSive CLARITY Technique）についての頭字語である。

【0021】

ここに用いるように、PARSは灌流支援薬剤放出イン・シトゥー（Perfusion-assisted Agent Release in Situ）についての頭字語である。

20

【0022】

ここに用いるように、RIMSは屈折率マッチングソリューション（屈折率整合溶液）（Refractive Index Matching Solution）の頭字語である。

【0023】

「哺乳動物」は、ここにおいて用いるように、制限されないが、ヒトおよび非ヒト霊長類動物、たとえば、チンパンジーおよび他の類人猿およびモンキー種などのようなもの；家畜で、たとえば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマなどのようなもの；家畜化哺乳動物で、たとえば、イヌおよびネコなどのようなもの；実験動物で、げっ歯動物、たとえば、マウス、ラットおよびモルモットなどのようなもの、およびその他同種類のものなどを含むものが含まれる哺乳綱の部類の任意のメンバーに言及する。用語は、特定の年齢または性を意味しない。したがって、成体、新生仔対象、および雄性または雌性にかかわらず後世の対象が、この用語の範囲内に含まれることが意図される。

30

【0024】

「末梢器官」は、ここにおいて用いられるように、筋肉、心臓、肺、腎臓、大腸、消化管、腸、およびその他同種類のものを含むことができるが、決して少しも制限するものではない。

【0025】

追加的な背景として、無傷の組織への容易な、および生理学的に有益な光学的なアクセスは、長らく生物学者の目標であった。早くも1800年代には、Werner Spalteholz（ヴェルナー・シュパルテホルツ）などのような科学者の仕事は、解剖学的および生物医学的研究のために組織を光学的に透明にすることの有用性を明らかにした（Spalteholz, 1914）。Spalteholzの技術およびその変形物は、組織の完全性および形態に対して損傷を招くが、それらは1世紀後にまだ使用され〔Steinke（スタインク）およびWolff（ウルフ）、2001〕、より一層最近の組織クリアリング方法および近代的な顕微鏡技術の採用への障壁が強調される。別々の組織のクリアリングプロトコルは、アプリケーション特異的コンテキストに強みをもつが、その一方、どれも十分には、最もよく見られる課題：脳または胚以外の器官を横断する全身化の可能性の確認、実行における難しさ、および内因性の蛍光および/または事後の免疫組織化学との適合性を克服することできない（表1）。このようにして、組織のクリアリングプロトコルを改善するために、動機付けは、三つの主要な目的の周辺に維持され：1）中心的器官および末梢組織の双方の効率的なクリアリング；2）多器官タイプの細胞的および細胞内的な構造の保存；および3）内因性蛍光タンパク質の発

40

50

現およびDNA、RNA、およびタンパク質の事後検出との適合性である。

【0026】

そのような方法のペイオフ（報酬）は、大容量の組織にわたる光学的アクセスであり、保存された組織の形態との関連で細胞-対-細胞の空間的關係および長距離神経接続の研究が可能にされる〔Chung（チョン）およびDeisseroth（ダイサーロス）、2013；Chungら、2013；Kim（キム）ら、2013；Zhang（チャン）ら、2014〕。蛍光トレーサーに関連して、組織のクリアリングは、神経および脈管構造を体全体でのそれらの標的部位にて発散または収束することを含め、細胞構造を相互作用させることの識別を容易にする。標準的なタンパク質および核酸プローブを用いるクリアサンプルの微細なスケールの細胞内分析もまた、クリア組織との関連で達成することができる。

10

【0027】

上記の技術を進めるために、いくつかの実施態様では、本発明は、以前の技術、たとえば、クラリティー、スケール、SeeDB、ClearT、3DISCO、CUBIC、ジベンジルエーテル（DBE）、およびBABB〔Murray's Clear（マレーのクリア）〕などのようなものを踏まえつつ、全体の有機体のクリアリングについての方法論を教示する〔Becker（ベッカー）ら、2012；Chungら、2013；Dodt（ドッド）ら、2007；Erturk（エルターク）ら、2012；Hama（ハマ）ら、2011；Ke（ケ）ら、2013b；Kuwajima（クワジマ）ら、2013a；Susaki（スサキ）ら、2014b〕。これらのそれぞれは明確な貢献をした：ヒドロゲルは組織構造を安定化するために埋め込まれ（Chungら、2013）、蛍光タンパク質適合性クリアリグ試薬（Susakiら、2014b）、および大規模または挑戦的な組織サンプルのためのイメージングアプローチ〔Beckerら、2013；Tseng（ツェン）ら、2009〕。これらの技術に関するいくつかの特別に重要なポイントがある。第一にまず、これらの技術のそれぞれについての原理の元の証明において、詳細な方法および最適化されたプロトコルだけが脳組織をクリアするために、および時折、脊髄（Erturkら、2012；Zhangら、2014）または全胚（Dodtら、2007；Hamaら、2011）のために提示された。3DISCOは、現在までに、末梢組織でのクリアリング方法の最も完全な解明を表す。しかし、多くの以前のクリアリングプロトコル（表1）、3DISCOのクリアリング試薬（テトラヒドロフラン、DBE）の場合のように、実質的に組織サンプルにおいて蛍光シグナルを消光する（Erturkら、2012）。クラリティー（Chungら、2013）およびCUBIC（Susakiら、2014b）は、蛍光消光問題をバイパスするが、その元の形式におけるCLARITYは、大規模なサンプルから脂質を抽出するために、電気泳動組織のクリアリング（ETC）を使用し、それは履行のために挑戦することができ、およびエピトープおよび微細なプロセスダメージおよび加熱による組織褐変を含め、最終的な組織の品質のばらつきを引き起こす可能性がある。このことは、受動的な脂質抽出を用いるクラリティーの変動につながり〔Zhangら、2014、Tomer（トマー）ら、2014に詳細に記載されているプロトコルにより）、クリアリングの熱加速および改善されたイメージングを伴う。CUBICもまた、受動的なクリアリングのリン脂質によって組織の透明性を実現し、およびヒドロゲルの埋め込みに対応する。伝統的な受動的クリアリング方法の主な弱点は、それらの遅い速度であり、そのことは、大きな組織容量または生物全体をクリアリングすることについてそれらを不適切にする。

20

30

【0028】

ここに記載されるように、いくつかの実施態様では、本発明の方法論は、直接に清澄剤（clarifying agent）を送るために、循環系または脳脊髄液の経路を用いて高速な、全脳および全身のクリアリングを促進する。これらの方法を発展させることでは、最初のステップは、ヒドロゲルの埋め込み、クリアリング、およびイメージング試薬を改善することであり、それは、1-3mmの厚さの組織のより一層迅速な受動的脂質抽出のためのPACT〔PASSIVE（パッシブ）CLARITYテクニック〕をもたらした。PACT-クリア組織をイメージングするために、屈折率整合溶液（RIMS）を、FocusClear™に似た結果と共に、カスタムエコノミックレシピに開発した〔Chungら、2013；Moy（モイ）ら、2013；Tseng（ツェン）ら、2009〕。より一層詳細にここに説明するように、PACT試薬は、全脳および全体クリアリングおよびラベリングを達成するために、頭蓋内か、または脈管構造を介するかのいずれか

40

50

で送ることができる。後者は、灌流支援薬剤放出イン・シトウーのために、PARSと呼ばれる。PARSのためのすべてのステップは、保存、クリアリング、およびラベリングを含めて、組織抽出前にイン・シトウーにて実行される。以下に示すように、PARSは、RIMSと一緒に、不透明な、無傷の、全有機体を、慣習的な共焦点顕微鏡を用いる視覚化および細胞、細胞下、およびさらには単一分子転写産物レベルでの表現型分析のために、光学的に透明で、蛍光標識されたサンプルに変換する。

【0029】

上記の考えを考慮して、本出願の追加の具体的な実施態様を以下にここで説明する。

【0030】

様々な態様において、本発明は、組織の構造的および/または光学的な特徴を修飾するための方法を教示する。いくつかの実施態様において、本方法には、パラホルムアルデヒド (PFA) が含まれる固定液を組織に対して適用すること、それによって、固定された組織が形成され、および次いでアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液 (PBS) が含まれるヒドロゲルモノマー溶液を固定された組織に対して適用することが含まれ、それによって、ヒドロゲル処置された組織が形成される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリド (二塩酸塩) を含む光開始剤溶液を固定された組織に適用することが含まれる (0.01% - 10% (w/v))。当業者は代替りの光開始剤も用いることができることを容易に理解するであろう。単に非制限的な例として、水溶性アゾ開始剤の化学クラスのいずれかの化合物を使用することができる。用いることができる有効な化学物質には、決して制限されないが、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジスルファートデハイドラート (二硫酸塩無水物) ; 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)ジヒドロクロリド ; 2,2'-アゾビス[N-(2-カルボキシエチル)-2-メチル]ヒドラート (水和物) ; 2,2'-アゾビス{2-[1-(2-ヒドロキシエチル)-2-イミダゾリン-2-イル]プロパン}ジヒドロクロリド ; 2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン] ; 2,2'-アゾビス(1-イミノ-1-ピロリジノ-2-エチルプロパン)ジヒドロクロリド ; 2,2'-アゾビス{2-メチル-N-[1,1-ビス(ヒドロキシメチル)-2-ヒドロキシエチル (hydroxyethyl)]プロピオンアミド} ; 2,2'-アゾビス[2-メチル-N-(2-ヒドロキシエチル)プロピオンアミド] ; およびその他同種類のものが含まれる。いくつかの実施態様において、光開始剤溶液の濃度は0.05から10% (w/v) までである。一定の実施態様において、ヒドロゲルモノマー溶液には、PBSにおける1%から20%までのアクリルアミドが含まれる。好ましい実施態様において、ヒドロゲルモノマー溶液には、PBSにおける4%のアクリルアミドが含まれる。いくつかの実施態様において、ヒドロゲル溶液には、タンパク質ヒドロゲルが含まれる。いくつかの実施態様では、用いられるヒドロゲルは、Sun (サン) ら、PNAS Physical Sciences - Engineering - Biological Sciences - Biochemistry (PNAS・フィジカル・サイエンス-エンジニアリング-バイオリジカル・サイエンス-バイオケミストリー) : Synthesis of bioactive protein hydrogels by genetically encoded SpyTag-SpyCatcher chemistry (遺伝的にコードされたSpyTag-SpyCatcherの化学による生理活性タンパク質ヒドロゲルの合成) (2014) に記載されているように、ヒドロゲルであることができる。当業者は、PBSが、同様の特性を有する他の緩衝剤に置き換えることができることを容易に理解するであろう。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、実質的に気密なチャンパー中にヒドロゲルモノマー処置された組織を配置すること、および窒素を実質的に気密なチャンパー中に導入することが含まれ、それによって、脱気された組織が形成される。一定の実施態様では、窒素は、0.1から60分までの間にチャンパー中に導入される。当業者は、処理される組織を収容するために適切なサイズのチャンパーが、本方法のこの態様のために選定されるべきであることを容易に理解するであろう。単なる例として、実施例のセクションに記載のチャンパーを使用することができた。代替りの実施態様では、ガス移動に関する類似の特性を有するチャンパーを使用することができる。一定の実施態様において、本方法にはさらに、15から60分まで0.5から24時間までの時間の間、脱気された組織をインキュベーションすることが含まれ、それによって、インキュベーションされた組織が形成される。いくつかの実施態

10

20

30

40

50

様では、本方法にはさらに、PBSを用いてインキュベーションした組織を洗浄することが含まれ、それによって、洗浄され、かつ、インキュベーションされた組織が形成される。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が含まれる清浄液を、洗浄され、かつ、インキュベーションされた組織に適用することが含まれ、それによって、クリアにされた組織が形成される。一定の実施態様では、清浄液は、6から10までのpHにて0.01から1MまでのPBSにおける0.5から30%までのSDS（w/v）を含む。一定の実施態様では、組織は、15から60 までにて0.1から60日までの間に清浄液においてインキュベーションされる。いくつかの実施態様では、組織はインキュベーションの間に振盪される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、0.1ないし76時間にわたってPBSを用いて一またはそれよりも多くの回数（一以上の回数）、クリアにされた組織を洗浄することが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された組織が形成される。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、イメージング媒体を、クリアにされ、かつ、洗浄された組織に適用することが含まれる。一定の実施態様では、イメージング媒体には：（1）1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、（2）ホスファート緩衝剤；（3）ツウィーン（Tween）-20；（4）アジ化ナトリウム；および随意に（5）水酸化ナトリウムが含まれる。一定の実施態様では、1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%（w/v）までである。一定の実施態様では、組織は生検から得られる。一定の実施態様では、組織はガン性または前ガン性である。一定の実施態様では、組織は哺乳動物組織である。いくつかの実施態様では、組織はヒト組織である。

#### 【0031】

様々な実施態様において、本発明は上記の方法に従って調製された組織を免疫染色するための方法を教示する。いくつかの実施態様において、本方法には、一次抗体を含む溶液を、上記の方法のクリアにされ、かつ、洗浄された組織に対して適用することが含まれ、それによって、抗体結合された組織が形成される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、緩衝剤溶液を用いて抗体結合された組織をリンスする（すすぐ）ことが含まれる。いくつかの実施態様において、緩衝剤溶液には、PBSが含まれる。当業者は、相当する特性を有する代替的な緩衝剤溶液がこのステップでPBSに置き換えることができることを容易に理解するであろう。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、二次抗体が含まれる溶液を、緩衝剤溶液を用いて洗浄された抗体結合組織に対して適用することが含まれ、そこでは、二次抗体は視覚化マーカーを用いて標識される。一定の実施態様では、視覚化マーカーは蛍光性である。当業者は、抗体を標識するために適切な視覚化マーカーの多数の任意のものが蛍光マーカーの代わりに用いることができることを認識するであろう。様々な実施態様では、一次抗体は視覚化マーカーを用いて標識される。一定の実施態様では、組織は生検から得られる。

#### 【0032】

様々な実施態様において、本発明は免疫染色された組織を視覚化するための方法を教示する。一定の実施態様において、本方法には、ここに記載の方法のいずれかに従って調製される免疫染色された組織を視覚化するために顕微鏡を利用することが含まれる。一定の実施態様では、顕微鏡は、ある形態の顕微鏡法を履行するために利用され、それには、制限されないが、落射蛍光顕微鏡法、共焦点顕微鏡法、多光子顕微鏡法、スピニング（回転）ディスク共焦点顕微鏡法、ライト-シート顕微鏡法、ライト-フィールド顕微鏡法、蛍光タルボット顕微鏡法（FTM）が含まれる。

#### 【0033】

抗体を用いて免疫標識することでの上述し、および以下に説明する実施態様は、当技術分野で知られる組織および細胞を調べるための多くの可能な技術の限られた例を示すにす

ぎない。様々なタイプの標識プローブを利用することを含め、多数の付加的な技術が特に実施例の項において記載されるが、それらは何ら制限することを意図するものではない。実際、組織、細胞、または細胞下の構造またはプロセスを視覚化するための任意の既知の方法は、標識または未標識を問わず、本発明の範囲内に含まれることが意図される。

#### 【0034】

様々な実施態様において、本発明は、イン・シトウにて組織の構造的および/または光学的な特性を修飾するための方法を教示する。いくつかの実施態様において、本方法には、パラホルムアルデヒド (PFA) が含まれる固定液を、対象の循環系に導入すること、それによって、対象内に固定された組織が形成され；およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液 (PBS) が含まれるヒドロゲルモノマー溶液を、対象の循環系に導入することを含み、それによって、対象内にヒドロゲル処置された組織が形成される。一定の実施態様では、本発明のこの態様において用いられる固定およびヒドロゲルモノマー溶液は、上記のセクションで（および実施例のセクションにおいて）説明される固定およびヒドロゲルモノマー溶液と同じである。いくつかの実施態様では、固定液は、0.1から48時間までの間に対象の循環系中に導入される。一定の実施態様において、ヒドロゲルモノマー溶液は、0.1から48時間までの期間にわたって、対象の循環系中に導入される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、その後、PBSが含まれる溶液を、0.1から48時間までの期間に対象の循環系中に導入することが含まれ、それによって、対象においてPBS洗浄された組織が形成される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、実質的に気密なチャンパー中に対象を配置すること、および窒素をチャンパー中に導入することが含まれ、これによって、脱気された対象が形成される。一定の実施態様では、窒素は0.5および120分の間の期間に導入される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液を、脱気された対象の循環系中に導入することが含まれる。いくつかの実施態様では、光開始剤溶液は、上記のセクションおよび実施例のセクションに記載されるように、組織を調製するために使用される光開始剤溶液と同じ特性をもつ。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が含まれる清浄液を、対象の循環系中に導入することが含まれ、それによって、対象内にクリアにされた組織が形成される。一定の実施態様では、清浄液には、0.01から1MまでのPBSにおけるおよそ0.5から30%までのSDSが含まれる。いくつかの実施態様では、清浄液は20から60日までで0.5から30日までの間に対象の循環系中に導入される。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、PBSを対象の循環系中に導入することが含まれ、それによって、対象内でクリアにされ、かつ、洗浄された組織が形成される。いくつかの実施態様では、PBSは0.5から30日までの間に導入される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、イメージング媒体を対象の循環系中に導入することが含まれる。一定の実施態様において、イメージング媒体には、(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2) ホスファート緩衝剤；(3) ツウィーン (Tween) -20；(4) アジ化ナトリウム；および随意に(5) 水酸化ナトリウムが含まれる。いくつかの実施態様では、1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100% (w/v) までである。いくつかの実施態様では、イメージング媒体は0.1から14日までの期間の間に導入される。一定の実施態様では、組織には、脳組織が含まれる。一定の実施態様では、組織には、脊髄組織が含まれる。いくつかの実施態様では、組織は哺乳動物の組織である。いくつかの実施態様では、組織はヒト組織である。

#### 【0035】

ここに記載する方法の種々の実施態様において、(1)ここに記載の一以上の溶液はポ

10

20

30

40

50

ンプに接続される第一チューブを通して対象の循環系中に導入され；(2)一以上の溶液は、一以上の溶液が収集されるリザーバと流体連通する第二チューブを通して対象の循環系から除去され；および随意に(3)ポンプは、リザーバからの一以上の収集された溶液を引き出し、および一以上の溶液を、第一チューブを通して対象の循環系中に導入する。

【0036】

様々な実施態様において、本発明はイン・シトゥーにて組織を免疫染色するための方法を教示する。いくつかの実施態様では、本方法には、一次抗体が含まれる溶液を、上述の任意の方法に従って処置された対象の循環系中に導入することが含まれる。いくつかの実施態様では、免疫染色はイメージング媒体を利用する前に行われる。いくつかの実施態様では、一次抗体が含まれる溶液は、0.5から14日までの間の期間に導入される。いくつかの実施態様では、本方法にはさらに、対象の循環系中に緩衝剤溶液を導入することが含まれる。いくつかの実施態様において、緩衝剤溶液はPBSである。いくつかの実施態様において、緩衝剤溶液は0.5および14日の間の期間の間に導入される。一定の実施態様において、本方法にはさらに、二次抗体が含まれる溶液を、対象の循環系中に導入することが含まれ、そこでは、二次抗体は視覚化マーカーを用いて標識される。いくつかの実施態様において、二次抗体を含む溶液は0.5から14日までの間の期間に導入される。一定の実施態様では、視覚化マーカーは蛍光性である。いくつかの実施態様では、一次抗体は視覚化マーカーを用いて標識される。いくつかの実施態様においては、組織は哺乳動物の組織である。

10

【0037】

いくつかの実施態様では、本発明は組成物を教示し、それには、(1)1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2)ホスファート緩衝剤；(3)ツウィーン(Tween)-20；(4)アジ化ナトリウム；および随意に(5)水酸化ナトリウムが含まれる。一定の実施態様では、1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100% (w/v) までである。

20

30

【0038】

PARS、PACT、およびここに記載の関連方法は、任意の動物に使用され、決してここに具体的に記載されるものの例に制限されない。さらに、ここに記載される方法は、胚から成体までの範囲に及ぶ生物体全体のために使用することができる。

【0039】

当業者は、本明細書に記載のものと同様または等価の多くの方法および材料を認識するであろうし、それらは本発明の実践において用いることができるであろう。実際、本発明は、ここに説明される方法および材料に決して制限されない。本発明のさらなる非限定的な実施態様は、以下の例において含まれる。

【実施例】

40

【0040】

例1

結果

【0041】

器官全体のパッシブクリアリングおよび免疫染色のための方法

【0042】

いくつかの実施態様では、厚い組織は三つの主要なステップにおいてイメージングのために光学的に透明にされる。まず最初に、組織は、生体高分子を安定化するために、ヒドロゲル単量体に架橋およびハイブリダイズされる。第二に、組織脂質はイオン性洗剤(イオン性界面活性剤)(群、複数可の意)を用いて組織-ヒドロゲルマトリクスから抽出さ

50

れる。第三に、クリアにされた組織は、イメージングのために、または長期保存のためにRIMSにおいて埋め込まれる。全身クリアリングは主な目的であったが、小さな、または特に脆弱な標本および器官の処理が、穏やかな、受動的なクリアリングプロトコルによって達成されることが最良であろうと認められた。PACTは、脳、脊髄、腎臓、心臓、肺、および腸、またはヒト組織生検を含め、齧歯類の器官全体、それらの1-3mmの厚さのセクションを透明にするために開発された。クリアリング速度は部分的には、界面活性剤ミセルによる脂質の溶媒和の速度、および組織における界面活性剤ミセルの拡散の速度に依存する〔Hoffman (ホフマン)、2002〕。しかし、加えられた力が、組織、たとえば、CLARITYのETCの電界などのようなものを通じてそれらの拡散を加速しない限り (Chungら、2013; Tomerら、2014)、大きなミセルによる脂質抽出は比較的遅い。異なる洗剤を、3日間のインキュベーションにわたって3mmの冠状マウス脳ブロックを受動的にクリアリングする能力について種々の濃度にてテストした。すべての濃度でのドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は、他の界面活性剤に関して脂質溶媒和および脳組織からの除去について優れ、およびさらにわずか8% SDSの濃度は、全体の3mmのブロックにわたって一様なクリアリングを達成した (図7A)。

10

#### 【0043】

組織ヒドロゲルの架橋密度における低下が、その後の免疫組織化学の間に、厚い、高度に有髄の、または線維性の組織への脂質抽出および高分子浸透の双方を促進するという仮説が立てられた。これを試験するため、3mm脳セクションは、ホルムアルデヒド、アクリルアミド、およびビス-アクリルアミドの様々な組合せ、および濃度を用いて注入し、脱気し、および37 で重合させた。組織クリアリングの効率 (図1A) および抗体浸透の深さ (図1B) は、ホルムアルデヒドおよびアクリルアミドのより一層低い濃度を使用するとき、およびビス-アクリルアミド、CLARITYで使用されるアクリルアミド架橋剤 (Tomerら、2014年) がヒドロゲルモノマーのカクテルから除外されたときに著しく増加した。より一層低いアクリルアミド濃度を用いて調製した組織ヒドロゲルにおける組織の透明性の質的な増加を観察する際 (図1A)、異なるPACT組織調製物を、最小限の架橋スキームが、組織形態および分子情報を保存するのに十分であったことを確かにするために、クリアリングの間にタンパク質の損失、組織の完全性、および体重および容量での変化についてアッセイした。SDSクリアリング緩衝剤中に組織から溶出されたタンパク質の量は、4% PFAで固定したもの、コントロールとしてPBSにおいてインキュベーションしたクリアにされていない組織サンプル (A0P4)、および4%のアクリルアミド (A4P0) を用いて、または4%アクリルアミドプラス4% PFA (A4P4) を用いて調製したそれらのクリア組織ヒドロゲルマトリクスとの間で統計的に区別できなかった (図1C)。注目すべきは、すべてのヒドロゲル包埋サンプルについて8% SDSクリアリング溶液に記録されるタンパク質の量は、4% PFAだけで保存され、およびPBS-0.1% トリトン (Triton) X-100、マイルド洗剤含有緩衝剤においてインキュベーションしたサンプルについてのタンパク質損失よりも少なかった (mg合計重量当たり $0.57 \pm 0.11$ mg)。このことは、ヒドロゲルモノマーが効果的に架橋し、および組織タンパク質を安定化させることを意味し、それはさらに未重合の、8% SDSにおいてインキュベーションされるPFA固定組織が乏しいタンパク質保持量を示した (mg合計重量当たり $0.63 \pm 0.02$ mgタンパク質損失) 知見によって支持される (図1C)。

20

30

40

#### 【0044】

PACT組織における分子含量の保存に関するこれらの結果を確認するために、ネイティブのeYFP蛍光の相対レベルを視覚化し、およびThy1-eYFPトランスジェニックマウスからのPACT脳サンプルで定量した。平均蛍光強度での減少は、双方のヒドロゲル調剤物 (A4P0、A2P0) の下で観察された一方、PACTサンプルは、一旦蛍光測定値が組織の膨張について正規化され (図7C)、クリアにされていない組織に関して匹敵する合計強度を示した (図1D)。実際、単独でアクリルアミドを用いて調製したヒドロゲル組織マトリックス (A4P0) はA4P4対応物上にそれぞれ、組織重量および容量の変化を、~174% および ~223% で示した (図1E)。しかし、クリアリング溶液からマウンティング媒体への組織サンプルの移動の際、PACTサンプルは数時間以内にその元のサイズに戻って縮小した (図9D)。この組織

50

の伸長-収縮は以前の脳クリアリングプロトコルにおいて記録されており (Chungら、2013 ; Hamaら、2011 ; Susakiら、2014b)、そこでは、これらのサイズの変化が、次善ではあるが、総体の組織形態または細胞構造に負の影響を与えると考えられないと結論された。組織の拡張を制限するように仮定されている組織ヒドロゲルマトリクスでの架橋密度におけるPFAの効果を実験化するために、PACTクリア脳スライスを、走査型電子顕微鏡 (SEM) を介して画像化した (図7B)。A2P0マトリクスが最大の細孔サイズをもち、次いでA4P0が続く、一方で、A4P4が最小の視覚化細孔サイズをもつことが注目された ; 細孔サイズは、より一層大きな細孔を有する組織ヒドロゲルマトリクスにおいて、より一層速い高分子拡散時間を伴う拡散速度に直接影響を与える。PACT処理およびマウンティングの間に組織の変形 (すなわち、伸縮) が、慣習的な組織学的処理に関して、サンプルの全体的な細胞の組織化またはタンパク質含量に影響を与えたと考えられなかった (図1F-1L)。したがって、A4P0は、クリアリング速度、タンパク質の保持、および中間細孔サイズの組織の間でPACTを与えるそのバランスについて選定し、それは組織学の間で巨大分子組織浸透に資する。

10

**【 0 0 4 5 】**

PACT試薬は組織学および内因性蛍光色素に適合する

**【 0 0 4 6 】**

遺伝子的にコードされた蛍光タンパク質からの信号強度がPACT処理全体に保存されたことを確認するために、厚さ1mmのThy1-eYFPの組織セクションを、A4P0ハイブリダイズし、PACT-クリアリングし、および共焦点顕微鏡法を用いてイメージ化した。PACTクリアリング、そして重要なことには、厚いサンプルについての遅いイメージ取得時間にもかかわらず、遺伝子的に発現されたeYFPがサンプルを通して容易に検出された (図1F、1H)。また、組織ヒドロゲルマトリクスは依然として、厚い、クリアにされたセクションの均一なニッスル (Nissl) 染色を許した (図1Fで、図1Gにおいてクリアにされていない80 μmのセクションに比べられる)。ニッスル染色 (赤) によって明らかにされたように、全体的な組織構造は、クリアにされた、およびクリアにされていないセクションの間で一定のままであったが、それは組織の連続的な腫脹、および次いで収縮が永久的な組織の変形を引き起こしたことの懸念を和らげる。

20

**【 0 0 4 7 】**

組織サンプルの構造的完全性を維持するものを含む自然なタンパク質が、クリアリングの間に組織ヒドロゲルマトリクスによって保持されるばかりでなく (図1C、1F、1H)、またクリアにされた組織ブロックは、様々な普通の組織学的マーカー (例は、抗体、小分子、mRNAのプロブ) を使って、ペプチドおよび核酸エピトープのラベリングを可能にするのに十分に高分子透過性であった。たとえば、ニッスル (Nissl) のほかに、マウスの脳および脊髄からの1mmのPACTセクションは、アンチチロシン (antityrosine) ヒドロキシラーゼ (TH) (図1I) ; グリア細胞繊維性酸性タンパク質 (GFAP)、ネズミ免疫グロブリンG (IgG)、およびイオン化カルシウム結合性アダプター分子1 (Iba1) (図1J) に対する抗体で免疫標識された。これらのターゲット部分は、多種多様な細胞位置 : 膜局在および細胞質ゾル、神経単位および非神経の抗原を占める抗原を表す。PACTのクリアリングは、すべてのラベルが単一光子蛍光イメージングの間に全体の1mmセクションを横切って簡単に分解されたように、組織サンプルにおいて光散乱を減少させた。

30

40

**【 0 0 4 8 】**

同様にPACT方法論が末梢組織に効果的であったことを確認するため、Thy1-eYFPマウスの腎臓、心臓、肺、および腸を切除し、クリアリングし、および抗インテグリン抗体、アクリジンオレンジ (AO)、および/またはSYTO24で標識した (図1K)。中央の器官サンプルにおいて観察されるように (図1F、1H-J)、小分子染料および抗体は等しく末梢器官の1-3mm厚のA4P0架橋し、およびPACT-クリアされたセクションを通して急速に拡散した。厚いセクションの完全な免疫標識のための時間は、組織タイプ、ヒドロゲル細孔サイズ (図7B)、および脂質の除去の程度 (図1A、7A) を含むいくつかの要因に依存する一方、均一な抗体の浸透は、PACTサンプルを通じて7-12日間のインキュベーションを伴って達成され

50

た。しかしながら、唯一に小分子蛍光染料でのラベリングを必要とする研究のために、一つは、単一の一晚中から3日間のそれぞれのインキュベーションにより1-3mmのPACT脳セクションの迅速な染色を得ることができる。いくらかの末梢組織は、さらに高速に染色され、そこでは、区分されていない(unsectioned)マウスの腸組織(~400um厚)における個々の核のAOラベリングは、1時間未満で達成された(図1K)。次の問題は、PACTが病理学的サンプルに適用できるかどうかを決定することであった。ヒトの皮膚がんの生検(図8A)は、クリアリングされ、そして腫瘍細胞を視覚化するために、パンサイトケラチン(pan-cytokeratin)を用いて染色した(図1L、図8B-C)。要するに、全体のPACT-クリア組織ブロックは、標準的な免疫組織化学的方法および慣習的な蛍光顕微鏡法を用い、分子照合(molecular interrogation)に対して細胞下レベルに至るまでアクセス可能であった。

10

#### 【0049】

PACTが、単一のmRNA転写産物を視覚化するために確立された手順に適合するかどうかを定めるために、PACT処理組織を単一分子蛍光イン・シトウーのハイブリダイゼーション、smFISHに供した〔Femino(フェミノ)ら、1998; Raj(ラジ)ら、2008〕。smFISHの方法論は、固定細胞における高い特異性を有する単一のRNA分子の検出が可能であり、そしてその高い感度は、RNA存在量および細胞内局在化の測定を許容する。しかし、組織セクションにおけるsmFISHは、組織の自家蛍光により生じるノイズ比に対する低い信号のために依然として課題のままである。ここでは、厚さ100µmのクリアマウス脳セクションにおけるアクチン転写物は、アクチンmRNAに向けて24のAlexa 594標識20マーのオリゴヌクレオチドプローブを用いて標識された。組織サンプルは、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を含有する培地においてスライドに取り付けられ、そして単一光子顕微鏡法を介してイメージ化した。アクチン転写物は、確かにPACTおよびsmFISH処理中の神経単位の細胞質において保持され、および蛍光の単一点は、細胞においてのアクチンの高コピー数およびイメージ化された脳セクションのかなりの厚さにもかかわらず、区別することができた〔Buxbaum(バクスボーム)ら、2014; Rajら、2008〕(図2A)。PACT組織は、クリアにされていない組織に関して組織を通じて回折限界スポットの著しく増加したコントラストを示した(図2C)。smFISH強度は、PACTクリアの、およびクリアにされていない組織の間にほとんど違いが認められなかったことが確認され、その一方では、バックグラウンド強度は著しく減少した(図2、A-B、2Dおよび2E、8D)。これらの知見は、PACTクリア組織において見られるノイズ比に対するsmFISHシグナルでの増加と一緒に、厚いサンプルにおけるバックグラウンド自己蛍光がクリアにされていない組織においてsmFISHシグナルを不明瞭にする主な要因であることを示唆する。

20

30

#### 【0050】

クリア組織のイメージングおよび長期貯蔵のための屈折率マッチング溶液のためのレシピ

#### 【0051】

効果的なイメージングは、異種組織内の屈折率(RI)の変動を低減し、そして組織、マウンティング媒体およびレンズ浸漬媒体インターフェースの間のRIミスマッチを軽減するマウンティング媒体におけるサンプルの浸漬に依存する。伝統的な生成物の法外なコストおよび制限された利用に応じて、より一層安価な代替物を処方し：屈折率マッチング溶液のために、RIMSを、組織イメージングのために適切なRI( $RI=1.38-1.49$ )、生物学的安全性、および組織保存のための生体適合性と共にした(補足的実験手順を参照)。RIMSをテストするために、PACT処理されたサンプルを、80%グリセロール、FocusClear、またはリム(RIMS)においてマウントし、そして次いで、同一の条件の下でイメージ化した(図9A)。RIMSは、蛍光顕微鏡法のために良好な光学的透明性を提供し(図9C)、および3ヶ月の期間にわたりeYFPシグナルの最小のクエンチング(消光)を引き起こした(図9E)。その性能はFocusClearと同等かそれよりも良好であるように思われ(図9A)、そしてそれはマウンティングコストの>10倍の減少を提供するので、RIMSはすべてのその後のPACTおよび8のPARSの実験のために採用された。正確なRIMSの調剤物は、組織サンプルのRIに対してケース特異的様式において最適化することができる(図9B)。

40

50

## 【0052】

成体げっ歯類での脈管構造を使用する全身のクリアリング

## 【0053】

PACTプロトコルは、最終的な組織ヒドロゲルを生成し、そしてタンパク質の保存、クリアリングの速さおよび容易さ、および光学的クラリティーの良好な組合せをもたらすために、4%アクリルアミドモノマー溶液を用いる。しかし、受動的拡散は、大容量または生物全体のクリアリングのために遅く、法外である。また、アクリルアミドヒドロゲルが洗浄剤クリアリングフェーズの間に著しく膨潤することが認められた(図1A、7C)。ほとんどのクリアリングプロトコルに共通する、これらの二つの欠点は、クリアリングを高速化するために、およびまた、クリアリングの間に組織の拡張を最小限にするために代替方法論の開発を促した。既存の脈管構造ネットワークは、心臓灌流固定において規則正しく行われるように[Gage(ゲージ)ら、2012; Jonkers(ジョンカーズ)ら、1984]、イン・シトゥーで全体固定およびクリアリング手順を実行することによって組織に直接に薬剤を導入するために、利用された。この方法は、イン・シトゥーでの灌流支援薬剤放出(Perfusion-Assisted Agent Release)(またはPARS)と呼ばれる。PARSは、ヒドロゲルモノマーおよびクリアリング溶液を直接注入するために、動物の無傷の脈管構造を利用し、それらは次いで関心がある組織全体に拡散する。主要な血管および全体の生物の微小脈管構造が灌流液によってアクセスされたかどうかの両方を調査するために[Leong(リョン)およびLing(リング)、1990; Li(リー)ら、2012]、マウス免疫グロブリンに対するAlexaFluor 647共役抗体(図10B、右)またはGFAPに対するAtto(アト)488共役ナノボディ(図10B、左)は、24時間の心臓カテーテルを通して灌流再循環された。マウス脳脈管構造は、広範に標識され、血管の灌流液に対するアクセス性を説明する(図10B)。エクストラ脈管構造(extravasculature)のGFAPラベリングによって示されるように(図10B)、灌流液はまた、周囲の組織に拡散することが観察された。

## 【0054】

PACT試薬を、脳のCSF中に、または全身の脈管構造を通して数日から数週間、再循環させるために、閉ループ灌流システムが開発された。このカスタムPARSチャンバーを使用して(図10A)、CSF中に8%SDSの連続的な頭蓋内灌流を、PARS-CSFと呼ばれる方法を介して(図3)、4日目に全脳(wholebrain)クリアリングを達成した(図3A-3B)。くも膜下槽(大槽)中、より一層尾側にカニューレを挿入することにより(図3A、右)、ラットの脊髄(図3B)の全長のクリアリングを与えた。次に、AAV9-eGFP注入した成体マウスを、嗅球の真上に挿入する硬膜下カニューレ(図3A、左側)を用いて、そして37℃にて8%SDSを再循環させることでの4日後に調製し、無髄鞘の、および密に有髄の双方のマウスの脳領域のCSF近くでの循環(皮質、視床下部の大部分、ベントリクル(脳室)および脊髄に近い領域)が透明化された。個々のニューロン、神経プロセス(神経突起)、およびグリア細胞のGFPラベリングは、脳を通じてはっきりと見えた(図3C)。

## 【0055】

PARS-CSFの同じ灌流クリアリング方法が、イン・シトゥーでの全体のクリアリングにまで拡張することができることが決定された。さらに、脂質抽出および抗体拡散の間の組織での圧力勾配の適用は、それぞれ、個々の切除した全器官のPACTベースのクリアリングに関するクリアリングおよび免疫ラベリングステップを加速する追加された利益を保持することができる。クリアリング試薬は、全身の脈管構造を通して循環され(タイムライン、図4A参照)、すべての末梢器官の、およびそれぞれ、1週間および2週間以内に達成される中枢神経系の完全なクリアリングを伴い、マウスおよびラットについて同様である(図4B-4D、13)。PARSの灌流液の最小のタンパク質含有量、およびA0P4注入されたマウスからの灌流液のより一層高いタンパク質含有量(図4E)は、全生物ヒドロゲル重合が総器官の構造および高分子含量を安定化するために必要かつ十分であることを示唆した。PARSが、多重の器官におけるまばらに標識された細胞において局在された蛍光タンパク質発現を視覚化することに適合性であったことを確認するために、GFP導入遺伝子を、アデノ随伴ウイルス(AAV)の全身投与により送った。AAV9:CAG-eGFP(図5D)またはAAV9BD1:CAG-eG

FP、AAV9の変形物でAAV9と同程度にCNSニューロンに形質導入を生じさせるが、減少したアストロサイト（星状細胞）および肝細胞の形質導入を見せるもの（図5E）は、成体マウスにおいて脈管構造を介して送られた。脳および肝臓の両方において、自然eGFP発現は容易に検出可能であり、およびAAV9に比べてAAV9BD1による肝細胞の減少した形質導入が容易に検出された（図5D対5E）。

#### 【0056】

PACTに比較して、PARSの処理中の組織の容量変化は、筋骨格構造、たとえば、頭蓋骨、脊柱、および筋肉の壁などのようなものは、組織の拡張を物理的に制約するので、減少するであろうことが予想された。確かに、げっ歯類の脳のPARSベースのクリアリング（図4C-4D、11A）は、クリアリング中に限られたヒドロゲルの膨潤および組織の拡張を達成した。PARS処理された脳は、PBSまたはRIMSにおいて頭蓋骨および配置からの抽出後、わずかに膨潤するが（図11A）、ニューロンの形態における総変化がPARS処理およびポストPARS拡張の結果として発生したことを示唆する証拠はなかった（図5B）。それにもかかわらず、RIMSにおいての組織膨潤の緩和はRIMSマウンティングに先立って一晚4%PFAにおいて後固定PARSサンプルを通して試みられた。全体的な組織構造が容量変化によって変わる程度を評価するために、クリアにされていない、PARS-クリアの、および後固定されたPARS-クリアサンプルの異なる脳領域内の細胞間の距離および平均細胞サイズ（皮質、線条体、視床）を測定した（図11B）。個々の領域がPARS処理またはRIMSのインキュベーションによって差動的（特異的）に影響を受けうることが予想され；たとえば、灌流関連頭蓋内圧から生じる任意の剪断力は、より一層少ない有髄組織にしかより一層大きな害を発揮させないか、またはベントリクル・コラプス（室虚脱）を引き起こしうる。固定後PARSサンプルは増加した細胞サイズおよびPARSサンプル全体で検出された細胞間の距離を著しく妨げた。アッセイしたすべての脳領域におけるクリアにされていない、および後固定したサンプルとの間の細胞サイズまたは細胞間の間隔に有意差はなかった（図11B）。

#### 【0057】

全-生物PARSはオルガン・パイ・オルガンファッションでの表現型検査（表現型分類）およびイメージングを可能にする

#### 【0058】

次いで全身PARS処理およびラベリング後、主要な器官を摘出し、厚切片にし、共焦点顕微鏡検査法を使用して画像化した（図5、6、12）。Thy1-eYFPマウスのPARS-クリア全脳（図5A-B）および脊髄（図5C）を画像化し、そして、PARS処理が、全器官を、細胞分解能（cellular resolution）と共に深部組織構造を視覚化することが可能であった範囲にまで、光学的に透明にすることが決定された。それぞれ、クリアにされた全脳（図5A-B）および腎臓（図6B）にわたる個々のニューロンおよびネフロンの可視化を通して、この光学的透明度は達成され、その一方、微細な細胞構造は、部分的には、組織構造を安定化させること、タンパク質含量および内因性蛍光を保存すること、および細胞内および細胞組織成分との間の空間的關係を維持することにおいてイン・シトゥー組織ヒドロゲル重合での成功により、無傷のままにされると考えられる（図5A-B）。たとえば、個々のネフロンの個々の蛍光標識された糸球体は、分離され、それは無傷の脈管構造を介して末梢器官にアクセスするPARSの能力を確立する（図6B、12）。

#### 【0059】

重要なことには、これには、同様にすべての免疫組織化学的溶液で、ブロッキング（遮断）溶液、プライマリおよび蛍光標識二次抗体カクテル、または蛍光標識された小分子、および洗浄バッファーを含むものの提供が含まれる。PARSを用いる免疫標識は、標的特異的で、末梢器官全体に均一に分布し、そしてPARS処理マウス腎臓切片におけるチューブリンおよびDRAQ5標識によって（図5B）、およびレクチンを伴う肝臓、肺、膵臓、繊維状アクチンプロンプファロイジン、および核酸染色DAPIにおける血管の灌流ベースの標識によって（図12）示されるように、低いバックグラウンドを示した。

#### 【0060】

例2

10

20

30

40

50

## 論考

## 【0061】

いくらかの実施態様において、本発明は、PARS、蛍光およびタンパク質ベースの信号および組織構造を保ちながら、無傷の全生物を、単一細胞分解能を用いて画像化するために透明にする方法を教示する。出発点、CLARITY法（Chungら、2013）は、イン・トータル（in toto、全体として、）、3D細胞配置およびコネクトームを解明するための脳の処理プラットフォームを科学者に提供した。膨大な数の研究室がCLARITY前10年に新しいクリーニング試薬について以前に報告しているが、しかし、これらの試薬の多くは、非常に高度にアプリケーション特異的または組織特異的であった（表1にまとめる）。これとは対照的に、CLARITYは、組織保存（ヒドロゲル埋め込み）およびクリアリング効率（電気泳動的な組織のクリアリング、ETC）に関係する二つの広く適用可能な技術を導入し、そのどちらも、設計、または再設計に組み込まれ、他のクリアリング手法であることができた。

10

## 【0062】

伝統的に、組織を透明にすることは、他のクリアリングプロトコル（Hamaら、2011）で報告されているように、数週から数月（weeks-to-months）のオーダーでの溶媒インキュベーションを要求したプロセスであった。しかし、ETCは、組織クリアリングの速度だけが、急速に組織を可溶化するそれらの能力について、有機溶媒の大きなパネルをアッセイすることにより加速されることができたという一般的な見解に挑戦した。多くの場合、これらのスクリーンにおいて試験された候補溶媒は、急速な組織のクリアリングを達成したが、組織構造を損なう（Hamaら、2011）か、またはネイティブの蛍光を消した（Beckerら、2012；Erturkら、2012；Susakiら、2014b）。CLARITYによって導入された試薬は比較すると緩やかではあるが、高速クリアリングのために必要なETCのステップは実装が複雑であり、そしてサンプルの加熱からの組織劣化を引き起こす。これらの課題は、受動CLARITYの使用によってバイパスすることができる（Tomerら、2014）が、クリアリングの遅い速度は、スケールアップのために、または全身マッピングのために、その技術を非実用的にする。

20

## 【0063】

依然として、マイルド洗剤および蛍光ノンクエンチング試薬を、全体に使用しながら急速に生物全体をクリアすることを目標として、PARSはCLARITYの基本原則に基づき開発されたが、ETCについての必要性を回避することを目的とし、その一方、受動拡散を介するよりも速いクリアリングが維持された。まず最初に、クリアリング薬剤は、受動的CLARITYについてビスアクリルアミドを除去すること、および洗剤濃度を8% SDS（PACT試薬）まで増加させることによって改変した。組織クリアリングステップは、高速脂質抽出を駆動するCLARITYによって使用される電気泳動力が、灌流ベースの圧力勾配と交換されたように再設計した。無傷の組織血管系を通したPACT試薬の制御された流れは、最も末梢の器官を2-3日以内に光学的に透明な組織に変換し、その一方、全マウスおよび全ラットの脳は、1-2週間以内に透明にされる。また加えて、イン・シトウでのクリアリングの自己完結型の性質はまた、モノマー注入および脂質除去の間に組織拡大を減少させた。

30

## 【0064】

PARSは、全器官および全生物の高い表現型コンテンツを伴うマッピングを可能にする。このことを考慮して、大規模な組織ブロックの迅速な、低解像度のスキャンが、smFISHを含む、遅くて、高い表現型コンテンツの分析の価値がある制限区域へ研究者を向けることができ；長期的な蛍光マーカーを保存する方法は、この点で特に価値がある。双方のPACTおよびPARSの方法論は、元のCLARITYプロセスに関連してスケラブルで、費用対効果が高く、そして他のモデル生物またはヒト組織に対して伝達性（transferrable）であると思われる。確かに、PARSは、げっ歯類で心臓灌流を使用して描かれた一方で、全体的な方法論はまた、十分に大きな血管が灌流ルート、たとえば、分離されたヒト組織を含む、より一層大きな、より一層高等な哺乳動物において全器官の灌流などのようなものを作り出すために利用可能である事例にも適用することができた。PARSは、クリアリングの増加し

40

50

た速度および組織損傷を伴わない減少した膨張を達成する一方（表1）、本方法の別の重要な強さはその拡張性にある。データは、たとえば、PARSが、全身デリバリー後の複数の器官における細胞レベルでのAAV媒介性形質導入を評価するために用いることができることを実証する。

#### 【0065】

個々の組織をセクション（区画）する必要性を排除することによって、PARSのアプローチは、目的の細胞型における最適な発現のための膨大な数のAAV血清型および/または遺伝子調節エレメントをスクリーニングするための努力を促進する可能性がある。スクリーニングのスループットおよび速度を改善することに加えて、PARSベースの全身的な方法はまた、アンダーサンプリングエラーによる標的組織におけるAAV導入を過小評価する危険性を中和する可能性がある。同様に、PARSは、それらの標的全器官における末梢神経の理解を向上させることができる。たとえば、迷走神経などのような複雑な長距離繊維束の正確な地図〔George（ジョージ）ら、2000〕は、既存の治療法での情報改善を助け、またはたとえば、バイオエレクトロニクス薬〔Famm（ファム）、2013〕などのようなまったく新規な治療戦略の開発に拍車をかけることができる。PARSはまた、脳から体の相互接続において、オフターゲット（的外れの）およびオンターゲット（的確な）薬剤についての全身スクリーニング実験で、およびたとえば、腫瘍細胞または幹細胞などのような希薄な要素についての全器官マッピングで、生物医学研究を促進することができる。最後に、PARS方法は、細胞充填（cell-filling）内骨格構造と適合性である。PARSをTEMPEST、-CLARITYに対する前駆体と組み合わせることで〔DeisserothおよびGradinaru（グラディナル）、2014〕、興味のある集団内の長期にわたるケラチンフィラメントのイン・ビボ発現（それらは、形態学のロイヤルブループリントを維持しながら、細胞それら自体よりも長く残る）は、正確な事後の定量および脳中の長縮退細胞のマッピングを容易にすることができる。

#### 【0066】

ここで導入する方法は、固有の循環系を用いることによって、生物全体に組織のクリアリングおよび表現型を拡大するためにCLARITYにおいてブライアークワーク（事前の仕事）を構築する。血管網が均一ではないので、不均一な灌流の流れが導かれ、目的の器官は異なる速度でクリアにされる。

#### 【0067】

血液脳関門は、末梢に関連して、たとえば、脳に対する抗体〔150kDa（キロダルトン）〕などのような、特に大きな分子の効率的な灌流ベースのトランスポートへの課題を提示する可能性がある。いずれかの特定の理論に縛られることは望まないが、灌流効率を改善するために、一つの解決策は、おそらく、免疫標識のためのより一層小さな抗体の足場を開発（または既に利用可能なときには利用）することであろうが；これらには、免疫グロブリンのフラグメント-抗原結合形式（Fab~50kDa）、ナノボディ、ラクダ科の動物の抗体由来の単ドメイン抗体が含まれ、それらのより一層小さいサイズ（~12-15kDa）は組織透過性を促進する〔Harmsen（ハームセン）およびDe Haard（デ・ハード）、2007〕。

#### 【0068】

改良されたイメージングプラットフォームはまた、最近の組織のクリアリング研究を補完するであろう。〔Beckerら、2012；Chungら、2013；Dodtら、2007；Erturkら、2012；ErturkおよびBradke（ブラケ）、2013；Hamaら、2011；Keら、2013a；Kuwajimaら、2013b；Susakiら、2014a〕。厚いクリア組織における細胞および細胞内情報を取得するために、屈折率整合（refractive index matched）、長作動距離対物レンズを利用し、一方で、まだ、高い開口数が維持されることが重要である。スキャンスピードは、完全に画像化されるのに多くの日数を採用するクリア組織ブロックを伴う追加の障壁であり-共鳴スキャナまたは光シート顕微鏡（Tomerら、2014）は、高解像度データを保持しながらプロセスを加速することができる。

#### 【0069】

脳および末梢器官〔Birmingham（バーミンガム）ら、2014〕との間のリンクでの関心の

10

20

30

40

50

高まりを考えると、無傷のままの脳および末梢器官の間の構造的な接続と共に、全身の未分割ビューを持つことが重要である。PARSおよび実現技術（ナノボディ、イメージングプラットフォーム）の開発により、脳のコネクトームを作り出すための神経科学者の包括的な目標を容易にするためだけでなく、脳から体およびバックコネクトームならびに体内の他のすべての器官系の表現型、健康または病気のものへの説明を容易にすることも可能であろう。

【0070】

追加的適用

【0071】

この技術での熟練した者は、器官の拡大を制約する複数の方法があることを理解するであろう。単に、非制限的な例として、3D（三次元）プリンティング（印刷）によって簡単に製造することができるように、スロットまたはメッシュの成形チャンパーにおいて組織を包むことを介し、器官の拡大を強いることは、ハイブリッドPACT-PARSクリアリング手順の実行を可能にすることができた。

10

【0072】

さらに、そのようなチャンパーは、カバーガラスのグレードのガラス（cover-slip grade glass）または光ファイバーで作られた場合〔Willis（ウィリス）ら、2012〕、イメージングは、完全に囲いを除く必要性を伴わずに進めることができ、サンプルはその元の形状およびサイズを保持することができる。実際、PARSは、げっ歯類において心臓灌流を用いて、ここに説明したが、全体的な方法論はまた、分離されたヒト組織を含め、十分に大きな血管が、より一層大きな、より一層高次の哺乳類において、たとえば、全器官灌流などのような灌流ルートを作り出すために利用可能である例で適用することができる。

20

【0073】

さらに、技術の適用には、ウイルスの拡散マッピングおよび末梢神経系のマッピングが含まれる。

【0074】

別の重要な考慮事項は、高速パラレルクリアリング/標識のために、必要に応じてPARSチャンパーが何度でも複製することができるということである。

【0075】

PARSのためのプローブの開発

30

【0076】

灌流効率を向上させるために、一つの解決策は、免疫標識のためのより一層小さい抗体足場を開発すること（またはすでに利用可能なときには利用すること）である。これらには、免疫グロブリンのフラグメント-抗原結合形式（Fab~50kDa）、およびナノボディ（~12-15kDa）、ラクダ科動物の抗体に由来する単ドメイン抗体が含まれ、そのより一層小さなサイズは、組織透過性を促進する（HarmsenおよびDe Haard、2007）。生物医学的用途のために関連する人間のエピトープに対する大規模なナノ抗体ライブラリーを構築する研究者の現在の仕事は、研究が希薄なターゲットの敏感な標識に依存する科学者によるCLARITY、PARS、CUBIC、および他の同様な方法の採用を奨励する。当業者は、さらに、モノボディが、ここで記載する本発明の方法および組成物と組み合わせて使用することができることを理解するであろう。

40

【0077】

PARSおよびPACTによって唯一に可能にされた追加的なバイオメディカル応用

【0078】

PARSは、末梢神経のそれらの標的器官での本発明者らの理解を洗練させることができ、ならびに、脳-体の相互接続のマッピングが容易になる。前者に関し、たとえば、迷走神経などのような複雑な長距離繊維束の正確な地図（Georgeら、2000）は、既存の治療での情報改善を助け、またはまったく新規な治療上の戦略の、たとえば、バイオエレクトロニクス（生物電子工学）薬などのようなものための開発に拍車をかけることができる（Famm、2013）。ここでは、潜在的なアプリケーションには、どのようにして神経回路が末梢

50

器官での痛みを検出し〔Iyer (アイヤル)ら、2014〕、または周辺におけるがんアウトカム(がん転帰)を変調させるかの研究が含まれる〔Magnon (マグノン)ら、2013〕。後者に関し、神経活動はまた、周辺可塑性および運動機能に計り知れない影響をもちうる。たとえば、運動前野刺激はオリゴデンドロゲネシス(oligodendrogenesis)および髄鞘形成を誘発することが示されており、そしてこのナーブ(神経組織、nerve-)および神経可塑性は、対応する肢〔Gibson (ギブソン)ら2014〕の改良された運動機能と相関する。たとえば、脱髄障害(多発性硬化症、または外傷性脳損傷後の病変)などのような、識別可能な神経解剖学的病理学、または行動心理学的な病理学(自閉症)によって特徴付けられる疾患において、PARSは、たとえば、それぞれ、末梢神経脱髄〔Zoukos (ズークス)ら、1992〕または末梢免疫活性化(peripheral immunooactivation)〔Hsiao (シャオ)ら、2012〕; HsiaoおよびPatterson (パターソン)、2011; Lucas (ルーカス)ら、2006; Zoukosら、1992〕などのような、疾患の周辺症状のためにパンする(pan)のに使用することができる。神経発達に関連する脳と体の相互接続の他の最近の描写は、自閉症(Hsiaoら、2013)または不安〔Foster (フォスター)およびMcVey Neufeld (マクベイ・ノイフェルド)、2013〕の挙動についての胎盤-胎児接続(HsiaoおよびPatterson、2012)、脳-腸軸(brain-gut axis)、および腸内微生物叢〔Flight (フライト)、2014〕である。

10

## 【0079】

同様に、多くの周辺解剖学的マップは、全器官の枠組みの中で微細なスケールの分解能を欠いている。たとえば、研究では、バイオフィルムの形成は、中耳の感染症〔Hall-Stodley (ホール-ストッドレイ)ら、2006〕およびカテーテル関連尿路感染症〔Cole (コール)ら、2014〕のように、周囲の厚い細胞外重合体物質およびバイオフィルムにおける異なる層の高い複雑性のために、ヒトにおける多くの慢性感染症と関連していたことを示したが、組織内のバイオフィルムの構造を画像化するための方法はいまだに制限される〔Ramsey (ラムジー)およびWozniak (ウォズニアック)、2005; Tan (タン)ら、2014〕。しかしながら、そのような撮像能力は、非常に有益であろうが、人間の体内で有害な細菌感染を除去するために、抗生物質が容易にバイオフィルムに浸透することはできないことが報告された〔Georgeら、2009; Jain (ジェイン)ら、2008〕。加えて、末梢組織の構造情報の高解像度もまた、本発明者らが、たとえば、小腸陰窩において位置する腸管幹細胞の微小環境シグナル伝達調節のためのように、組織において時々まばらに埋め込まれる幹細胞ニッチを研究するのに役立つ〔Bach (バッハ)ら、2000; Barry (バリー)ら、2013〕。

20

30

## 【0080】

重要なことには、PARSはまた、オフターゲットおよびオンターゲット結合のために、ならびにそれらの薬物動態学-薬力学(PK/PD)特性の定性的な決定のための方法として投与された薬剤の体内分布を画像化するための治療学の全身スクリーニングを容易にすることができる。同様な線に沿って、ここに提示するデータは、PARSが、全身性の配送後の複数の器官における細胞レベルでのAAV媒介形質導入を評価するために使用することができることを実証する。個々の組織を用意し、およびセクションにする必要性を排除することによって、PARSのアプローチは、目的の細胞タイプにおける最適な発現のための多膨大な数のAAV血清型および/または遺伝子調節エレメントをスクリーニングするための努力を促進することができた。また、PARSを用いる全器官のスクリーニングは、このPK/PDスクリーニングのスループット(処理量)を向上させることができるだけでなく、アンダーサンプリング誤差による標的組織におけるAAV形質導入を過小評価する危険性を打ち消す可能性があった。

40

## 【0081】

迅速に全器官の表現型をクリアにする能力はまた、生物医学研究を進め、および組織病理学における変化を監視することによって、疾患の進行の研究を容易にすることができる。PARSの医学的に関連する使用は、たとえば、疾患や発達状態の間に起こる進行性の全身の生理学的変化、または腫瘍構造のマッピングの、それぞれのような、病理学的または診断目的のための全体の器官または全生物のマッピングへのその応用において蓄えられる(

50

Birminghamら、2014)。さまざまな3D腫瘍イメージングプラットフォームは、がん進行を  
 トラッキングすることについて報告された〔Colomba (コロンバ) およびRidley (リドリ  
 ー)、2014〕。これらの新しいプラットフォームにもかかわらず、および医学での解剖学  
 的病理学の実証済みの診断ユーティリティにもかかわらず〔たとえば、腫瘍マージン (Fu  
 kamachiら、2010)〕、新鮮で、そして凍結された生検試料の慣習的な組織学的処理およ  
 びセクション化は、コストおよび時間の制約があるので、標準のままである。ほとんどの  
 場合、セクションのある画分だけが、視覚化され、それは重要な特色および潜在的誤診の  
 アンダーサンプリングをもたらすことがある (Zarboら、2005)。上記で強調したように  
 、組織標本のPACT-またはPARS-ベースのクリアリングは、これらのリスクを相殺するのに  
 役立つことができた。さらに、PARSはまた、動物モデル、特に、組織レベルの血管新生に  
 おける全腫瘍の形態の、細胞およびサブセルラーの詳細において腫瘍全体での不均一性 ( 10  
 たとえば、マージン対コア)、および、重要なことに、生物全体にわたる転移巣の研究を  
 可能にすることができる。腫瘍クリアリング〔3DISCO (Erturkら、2012b)〕のための方法  
 は、以前に記載したが、使いやすさを有する全生物へのRIMS-2およびPARSのスケーラビ  
 リティにおける蛍光マーカーのための長寿命化は、PARSを好ましい代替性にする (表1)

#### 【0082】

最後に、PARSの方法は、細胞充填内骨格 (cell-filling endoskeletal) 構造に適合す  
 る。たとえば、目下の神経変性研究 (パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかん、脳  
 卒中) での一つのボトルネックは、ずっと以前に死んだ、およびマクロファージによって  
 取り払われたものを視覚化することは不可能なため、げっ歯類モデルにおいて縮退細胞 ( 20  
 変性細胞) の分布を正確にマッピングすることが困難である。さらに、また、アブレーシ  
 ョン (切除) 実験は、規定されたニューロン集団の間の因果関係 (コンパクトまたはまば  
 らに分布) および脳活動と行動を研究するための一般的な方法であり：毒素は、そのよう  
 な細胞を損傷するために使用されるが、ポスト定量化は、それがプラセボ処置脳と比較す  
 ることに依存し、およびアブレーションされた細胞の正確な分布を知ることは不可能であ  
 るので、まれにしか正確でない。PARSを、TEMPEST-CLARITYに対する前駆体 (Deisseroth  
 およびGradinaru、2014) -と組み合わせることによって、-興味がある集団内での長期的  
 なケラチンフィラメントのイン・ビボ発現 (形態学のロイヤルブループリント (忠実な青  
 写真) を維持しながら、細胞がそれら自体でより長く生き延びる) が、脳全体の長期縮退  
 細胞の正確な死後の定量化およびマッピングを容易にすることができる。 30

#### 【0083】

例3

メソッド

#### 【0084】

PACTクリアリング

#### 【0085】

4%パラホルムアルデヒド (PFA) -固定した組織切片を、0.25%の光開始剤2,2'-アゾビ  
 ス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロライド (二塩酸塩) を補充したヒ  
 ドロゲルモノマー溶液A4P0 (PBS中4%アクリルアミド)〔VA-044、Wako Chemical USA, I  
 nc, (ワコー・ケミカルUSA社)において一晩4 でインキュベーションした。A4P0注入さ  
 れた試料は、1-5分間窒素で脱気し、および次いで組織ヒドロゲルハイブリッド形成を開  
 始するために、37 で2-3時間インキュベーションした。短時間のPBS洗浄を介して過剰な  
 ヒドロゲルを除去した後、組織ヒドロゲルマトリクスを、0.1M PBS (pH7.5) 中の8%SDS  
 を含有する50mLのコニカルチューブに移し、および組織の大きさに応じて、37 で2-5日  
 間振とうしながらインキュベーションした。免疫染色のために、1-3mm厚のPACT-処理した  
 試料を、一日かけて4-5回バッファー (緩衝剤) の変換を含むPBSで洗浄し、そして次に、  
 小分子染料または一次抗体、次いで蛍光標識二次抗体〔1:200-400、2%正常口バ血清、0  
 .1%Triton-X-100および0.01%アジ化ナトリウムを含有するPBSにおいて) が含まれるバ  
 ッファーに移し、3-7日間または小分子染料を伴う1-3日間続けた。抗体または小分子染料 40  
 50

溶液は毎日交換する必要がある。非結合抗体を以前のように、PBS洗浄によって除去し、およびその後、サンプルを、二次抗体〔Fabフラグメント（Fab断片）の二次抗体が好ましく、1:200-400〕と共に2-5日間インキュベートし、そしてその後、イメージング媒体（RIMS）中でのインキュベーションの前に、PBSまたはリン酸緩衝液（PB）中で1日間洗浄した。すべての染色および取り付けのステップは、穏やかに振とうしながら室温で行った。

【0086】

ヒドロゲルモノマー特性

【0087】

特定のヒドロゲル組成物が、ここで行われる実験において用いられ報告される。固定剤/ヒドロゲル組成物には、任意の便利なヒドロゲルのサブユニットが含まれ、たとえば、制限されないが、ポリ（エチレングリコール）およびその誘導体〔例は、PEGジアクリレート（PEG-DA）、PEG-RGD〕、ポリ脂肪ポリウレタン、ポリエーテルポリウレタン、ポリエステルポリウレタン、ポリエチレンコポリマー（ポリエチレン共重合体）、ポリアミド、ポリビニルアルコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレンオキサイド、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリ（ヒドロキシエチルアクリレート）、およびポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、コラーゲン、ヒアルロン酸、キトサン、デキストラン、アガロース、ゼラチン、アルギナート（アルギン酸塩）、タンパク質ポリマー、メチルセルロースおよびその他同種類のものなどのようなものである。いくらかの例では、ヒドロゲルのサブユニットは、ヒドロゲルに固有の特性を追加するように修飾することができ、たとえば、ペプチド配列は、分解を誘導するために〔例は、West（ウエスト）およびHubbell（ハベル）、1999、Macromolecules（マクロモレキュルズ、高分子）、32:241参照〕、または細胞接着を修飾するために〔例は、Hem（ヘム）およびHubbell、1998、J. Biomed. Mater. Res.（ジャーナル・オブ・バイオメディカル・マテリアルズ・リサーチ）、39:266参照〕組み込むことができる。たとえば、親水性ナノ粒子のような薬剤、例は、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PLG）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）（PLGA）、ポリスチレン、ポリ（ジメチルシロキサン）（PDMS）、などのようなものは、パターン形成を維持しながら、ヒドロゲルの浸透性を向上させるために使用される〔例は、米国特許出願第13/065030号明細書；Lee（リー）W.ら、2010、Proc. Natl. Acad. Sci.（プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ）、107、20709-20714参照〕。たとえば、PEG、分解性PEO、ポリ（乳酸）（PLA）、および他の同様の材料のブロックコポリマーなどのような材料は、ヒドロゲルに固有のプロパティを追加するために使用することができる〔例は、Huh（ハー）およびBae（バー）、1999、Polymer（ポリマー）、40:6147参照〕。架橋剤（例は、ビス-アクリルアミド、ジアジリン、等）およびinitiators（開始剤）〔例は、アゾビスイソブチロニトリル（AIBN）、リボフラビン、L-アルギニン、等〕は、後の重合ステップにおいて巨大分子相互作用の間に共有結合を促進するために含まれてもよい。

【0088】

ヒドロゲルネットワークの特性

【0089】

典型的には、ヒドロゲルサブユニット（群）および変性剤の濃度および分子量は、選定されたポリマーおよび望ましい特長、例は、それらが重合されるヒドロゲルネットワークの細孔サイズ、膨潤性、導電性、弾性/剛性（ヤング率）、生分解性の指標などに依存する。たとえば、ヒドロゲルにとっては、高分子、例は、タンパク質、核酸、または小分子を、以下により一層詳細に記載するように、標本中に通過可能にするのに十分な大きさの孔を含むことが望ましい場合がある。当業者は、孔径が、大抵はヒドロゲルのサブユニットの濃度の増加に伴って減少し、そして概して、ヒドロゲルサブユニットの架橋剤に対する増加率と共に増加し、およびそのような高分子の通過を可能にするヒドロゲルのサブユニットの濃度が含まれる固定剤/ヒドロゲル組成物を調製するであろうことを認識する。別の例として、ヒドロゲルにとっては、特定の剛性、例は、包埋標本の処理に安定性を提

10

20

30

40

50

供するために、約2-70kN/m<sup>2</sup>での、たとえば、約2kN/m<sup>2</sup>、約4kN/m<sup>2</sup>、約7kN/m<sup>2</sup>、約10kN/m<sup>2</sup>、約15kN/m<sup>2</sup>、約20kN/m<sup>2</sup>、約40kN/m<sup>2</sup>であるが、典型的には、約70kN/m<sup>2</sup>を超えないヤング率をもつようにすることが望ましいかもしれない。当業者は、ヒドロゲルネットワークの弾力性が、ポリマーの分枝、ヒドロゲルサブユニットの濃度、および架橋度を含め、様々な要因によって影響を受ける可能性があることを知っているであろうし、およびそのような望ましい弾性を提供するために、ヒドロゲルサブユニットのある濃度が含まれる固定剤/ヒドロゲル組成物を調製するであろう。

【0090】

ヒドロゲルモノマー

【0091】

固定剤/ヒドロゲル組成物は、アクリルアミドモノマーを、約1%w/vから約20%w/vまで、例は、約2%から約15%まで、約3%から約10%まで、約4%から約8%までの濃度で、およびビス-アクリルアミド架橋剤を、約0.01%から約0.075%まで、例は、0.01%、0.02%、0.025%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、または0.075%の範囲での濃度の含んでいてもよく、またはたとえば、固定剤/ヒドロゲル組成物は、少なくとも約2.5Kから約50K、例は、2.5Kまたはそれよりも多く(2.5K以上)、3.5K以上、5K以上、7.5K以上、10K以上、15K以上、20K以上で、典型的には約50Kを超えない範囲の分子量をもつPEGプレポリマーを、約1%w/wから約50%w/wまでの、例は、1%以上、5%以上、7.5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、30%以上、40%以上、および通常は約50%を超えない範囲での濃度で含んでいてもよい。望ましいヒドロゲルの特長を提供するヒドロゲルサブユニットおよび改質剤の濃度は、この技術での方法によってか、または以下の実施例に記載されるように難なく決定することができる。

【0092】

固定剤/ヒドロゲル溶液は、任意の便利な方法、例は、灌流、注射、点滴、吸収、塗布、浸漬/水没などによって検体に送ることができる。検体は、典型的に、ヒドロゲルの存在下で、15分以上、たとえば、30分以上、1時間以上、2時間以上、4時間以上、6時間以上、12時間以上、いくつかの例では、16時間以上、20時間以上、または24時間以上で固定される。

【0093】

ヒドロゲル重合

【0094】

検体の固定の後、ヒドロゲルサブユニットは、重合され、すなわち、ヒドロゲルネットワークを形成するために、共有結合または物理的に架橋することができる。重合は、制限されないが、熱架橋、化学的架橋、物理的架橋、イオン架橋、光架橋、放射線的架橋(例は、X線、電子線)、およびその他同種類のものなどを含め、任意の方法によるものでよく、および使用するヒドロゲルの種類、当該技術の知識に基づいて選定されてもよい。たとえば、非重合または部分的に重合された樹脂の特定の架橋化学物質との混合は、架橋を形成する化学反応をもたらす。架橋は通常、たとえば、電子ビーム曝露、ガンマ線照射、またはUV光などのような放射線源への曝露を介して熱可塑性である材料に誘導することができる;たとえば、電子ビーム処理は、架橋ポリエチレンのCタイプを重合するために用いられる。架橋ポリエチレンの他のタイプは押出す間、過酸化物を添加することによって(タイプA)、または架橋剤(例えばビニルシラン)および押出しの間、触媒の添加、および次いで押出後の硬化を行うことによって作製される。

【0095】

フリーラジカル捕捉剤を介する重合の抑制

【0096】

多くのポリマーは、典型的には、大気中の酸素に曝露されたとき酸化架橋を受ける。いくつかの場合において、反応は望まれたものよりも迅速であり、そして従って重合反応は、酸化架橋の形成を遅らせるために抗酸化剤の使用を含むことができる。他の例では、たとえば、酸化による架橋のより一層迅速な形成が望ましいとき、たとえば、過酸化水素の

10

20

30

40

50

ような酸化剤は、プロセスをスピードアップするために用いることができる。重合のための時間の長さは、使用されるヒドロゲルサブユニットおよび選定された重合方法の種類に依存するが、しかし典型的には、たとえば、約15分ないし約48時間、たとえば、15分以上、1時間以上、2時間以上、3時間以上、4時間以上、6時間以上、12時間以上、16時間以上、24時間以上、またはいくらかの場合において、48時間であろう。試薬の最適時間および組合せは、当業者に知られているか、または経験的にか、もしくは多くの公的に利用可能なリソースから決定しうる〔例は、piercenet (ピアスネット).comでのワールドワイドウェブ上で、また、Macroporous Polymers (マクロポラス・ポリマー) : Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications. (生産プロパティおよびバイオメディカル/バイオテクノロジー用途)。Bo Mattiasson (ボー・マッティアソン) により編集、Ashok Kumar (アショク・クマール)、およびIgor Yu (イゴール・ユウ) . Ga leaev. CRC Press (ガレアブ・CRC・プレス) 2010 ; およびCrosslinking Reagents Technical Handbook (架橋試薬技術ハンドブック)、Pierce Biotechnology, Inc., (ピアス・バイオテクノロジー社)、2006参照〕。

10

## 【0097】

クリアリング

## 【0098】

一旦重合すれば、ヒドロゲル包埋(すなわち、ヒドロゲルハイブリダイズ)検体をクリアにすることができる。検体を「クリアリング」することによって、検体が光に実質的に透明な、すなわち、透過性にするを意味する。換言すれば、検体を明るくするのに用いられる約70%以上の視覚的(即ち、白色)光、紫外光または赤外光は、検体を通過し、そしてその中の選定された細胞成分だけを照明するために、例は、光の75%以上、光の80%以上、光の85%以上、またはいくらかの例では、光の90%以上、光の95%以上、光の98%以上、例は、光の100%は、試料を通過することになる。検体の光学的性質での変化は、組織内部の細胞および細胞内構造の視覚化を提供する。

20

## 【0099】

細胞成分、例は、脂質を、検体から締め出すか、細胞成分、例は、脂質を、検体から取り出すか、または細胞成分、例は、脂質を、破壊させる、すなわち、検体内で溶解させる任意の処理は、検体をクリアにするため、制限されないが、たとえば、キシレン、エタノールまたはメタノールなどのような有機溶媒への曝露、たとえば、サポニン、Triton X-100およびTween (ツイーン)-20などのような洗浄剤への曝露、イオン性界面活性剤、例は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)への曝露を含め、ここに記載されるように、特に、電気泳動、動圧、超音波振動、溶質コントラスト、マイクロ波放射、血管の循環などに使用することができる。若干の例では、クリアリングは、蛍光タンパク質を消光しない溶媒の使用により行われる。蛍光タンパク質を消光することが知られる有機溶媒の例には、テトラヒドロフラン、ヘキサン、ベンジルアルコール/安息香酸ベンジル(BABB)、およびジベンジルエーテルが含まれる。したがって、種々のタンパク質の蛍光を保存するために、いくらかの実施形態では、クリアリングは、たとえば、上記のもの以外の溶媒を用いて行われ、例は、非有機溶媒を用いて行われる。

30

## 【0100】

RIMSイメージングメディア(RI 1.46)

## 【0101】

Sigma (シグマ) D2158 [Histodenz (ヒストデンツ) の40g は、0.02M PBの30mlにおいて、0.1%のTween-20および0.01%アジ化ナトリウムを伴い、NaOHで7.5までのpHにされ-それは、88%Histodenz重量/容量の最終濃度をもたらす。サンプルは透明になるまでRIMSにおいてインキュベーションされ(PACTサンプルについて~1日、PARSクリア脳のために1週間まで)、次いで新鮮なRIMSにおいてマウントされる。

40

## 【0102】

smFISH

## 【0103】

50

100  $\mu$ mのPACTセクションは、エタノール透過処理し、B-アクチンに向けた24のAlexa 594標識の20merのオリゴプローブで標識し(37 で一晚インキュベーション)、公表されたプロトコル〔Buxbaumら、2014 ; Lyubimova (リュビーモヴァ)ら、2013〕に従って、Slow fade (スローフェード) Gold (ゴールド)+DAPIで洗浄し、そしてカバーガラスをかけた (coverslipped)。3の半径を有するガウシアンフィルタのラプラシアン (Laplacian of Gaussian filtering) をクリアおよび未クリアの双方のサンプル中の転写産物を可視化するために適用した。

【 0 1 0 4 】

PARSプロトコル

【 0 1 0 5 】

4%PFA (PBS、pH7.4中)での標準心臓灌流のすぐ後に、固定げっ歯類を灌流チャンバー (図10A) 上に移し、それは以降のすべてのPACTおよび免疫標識試薬 (上記のようなもの) を、連続 (1ml/分) して、蠕動ポンプを介してげっ歯類の血管系を通して再循環した。灌流チューブは、チャンバーを、大動脈中に左心室を介して挿入される送り針に接続され、および適切な場所にゆるく縫合される。齧歯類は、1時間、4%PFAで後固定し、および次いで、PBSで1時間灌流洗浄した。A4P0モノマーは、一晚血管系を通して循環させ、次いで2時間、PBS灌流洗浄を続けた。重合前および灌流ラインを切断することなく、灌流チャンバーは、ジブロック・バッグ (図10A) に入れ、そしてげっ歯類を伴うチャンバーを含むバッグを、窒素ガス下で2分間脱気した。重合は2-3時間、37 で、PBSにおいて0.25%のVA-044開始剤の200mLの灌流の再循環を介して開始した。全身を、37-42 でPBS、pHが7.5で、8%SDSにより 2週間の灌流を通じてクリアにし、次いで2-3日かけて大規模なPBS灌流洗浄を続けた。抗体および小分子染料 (PACTにおいて上記のように) は、その後3日間の灌流および1日の洗浄を介して送られた。脳または脊髄クリアリングのPARS-CSFの変動 (図3A-B) について、経心的に固定された (transcardially-fixed) げっ歯動物を断頭し、および硬膜下カニューレを、関心がある領域上に挿入し、そして頭蓋骨に接合した。すべてのPACT試薬は、1ml/分でPARSと同じ順序および時間枠で送られる

【 0 1 0 6 】

AAVの生産および全身デリバリー

【 0 1 0 7 】

一本鎖ssAAV-CAG-EGFPベクターがAAV9またはAAV9パリアントカプシドにパッケージされ、AAV2/9BD1が生成され、および記載されているように精製された〔Lock (ロック)ら、2010〕。AAV2/9BD1カプシドは、AAV2/9〔U. Penn (ペン)〕から、とりわけ、N498Y変異を伴い、肝伝達を低減するために、修飾された〔Pulicherla (ピュリチャーラ)ら、2011〕。いずれかのウイルスの $1 \times 10^{12}$ ベクターゲノム (vg) を、マウス中に静脈内で送られ、および組織をネイティブeGFP蛍光のためのPARSによって6ヶ月後に評価した。

【 0 1 0 8 】

蛍光顕微鏡

【 0 1 0 9 】

クリア組織試料をサンプルの厚さに応じて0.5mm-7mmからのスペーサーを使用して室温でRIMSにおいて取り付け〔iSpacer (アイスペーサー)、SunJin Lab Co. (ソンジン・ラボ株式会社) ; Silicone Isolator (シリコーン・アイソレータ)、Electron Microscopy Sciences (エレクトロン・マイクロコピー・サイエンス)、PA〕、およびカバーガラスを付した。図3Bについては、サンプルは、Leica (ライカ) HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORRオブジェクト (対物レンズ) を有するLeica TCS SP8二光子顕微鏡を用いて、Leica Microsystems (ライカ・マイクロシステムズ) によって画像化した (作動距離、w.d.6.0mm)。他のイメージは、Zeiss (ツァイス) LSM 780顕微鏡を、Fluar 5x/0.25 M27 乾燥対物レンズ (w.d. 12.5mm)、Plan-Apochromat (プラン-アポクロマート) 10x/0.45 M27エア対物レンズ (w.d. 2.0mm)、LD SCのPlan-Apochromat 20x/1.0 Corr M32 85mmスケール浸漬対物レンズ (w.d. 5.6mm)、またはLD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Cor r (イム・コアー) DIC M27マルチ浸漬対物レンズ (w.d. 0.57mm) のどれかと共に用いて

10

20

30

40

50

撮影した。イメージ再構成は、Imaris (イマリス) イメージングソフトウェア [Bitplane (ビットプレーン)] を用いて行った。イメージング後、サンプルを室温でRIMSにおいて貯蔵した。

【 0 1 1 0 】

拡張した補足手法 & 追加試薬およびバッファー

【 0 1 1 1 】

【表 1 - 1】

この数十年の主要なクリアリングプロトコルの方法論的考察

技術	全脳のためのクリアリング時間	完全な透明性	蛍光クエンチング	検証組織	視野への著しい貢献	欠点
<i>BABB</i> , <i>THF</i> , <i>DBE</i> (Becker ら, 2012; Dodt ら, 2007)	数時間-数日	有り、しかし組織収縮	有り (Ertürk ら, 2012; Ke ら, 2013)	げっ歯類脳, 脊髄, 末梢組織	最初のクリアリング試薬	強すぎる試薬 (Ke ら, 2013), IHC
<i>ClearT2</i> (Kuwajima ら, 2013)	数日	無し	無し-部分的(Ke ら, 2013)	げっ歯類脳および胚	BABB より少ないクエンチング; 新規試薬	IHC: 免疫標識 120 um を通してだけ
<i>Scale</i> ( <i>A2</i> , <i>U2</i> )(Hama ら, 2011)	数周-数月 (最も遅い)	有り、しかし組織膨張(Chung ら, 2013; Ke ら, 2013; Kuwajima ら, 2013)	無し-最小 (Ke ら, 2013; Kuwajima ら, 2013)	マウス脳, 胚 (Hama ら, 2011)	クエンチングを伴わない透明性; IHC/F	緩徐; 組織変形; クリアリングでの潜在的タンパク質損失 (Ke ら, 2013)
<i>3DISCO</i> (Ertürk ら, 2012; Ertürk および Bradke, 2013)	<週	有り	無し、しかし数日内でシグナル減衰 (Ertürk ら, 2012; Ertürk および Bradke, 2013)	末梢/中心的器官, 胚, 腫瘍 (Ertürk および Bradke, 2013); 中心 (Ertürk ら, 2012) および末梢 [Jung(ユンク)] ら, 2014) 神経	クリア組織の速さおよび質の間のバランス; イメージングプロトコル	迅速なサンプルイメージングが必要; IHC-極めて制限される

10

20

30

40

【表 1 - 2】

CLARITY(Chung および Deisseroth, 2013; Chung ら, 2013; Kim ら, 2013)	10 日	有り	無し	げっ歯類, ヒト および 非ヒト 霊長類 脳, 脊髄, ゼブラ フィッシュ (Zhang ら, 2014)	ヒドロゲル-包埋; 正しく 実行すると き裁量の組 織品質; IHC/F	ETC 困 難, 特 注装置, 高価 (Chung ら, 2013)	10
アドバンスド CLARITY(Tomer ら, 2014; Zhang ら, 2014)	3 週	有り	無し	全マウ ス脳	ETC-受動熱 的 CLARITY, COLM 無し, CLARITY オ ブジェクテ ィブ, 迅速イ メージング プロトコー ル	COLM セット アップ を必要	20
SeeDB(Ke ら, 2013; Ke およ び Imai, 2014)	数日 (最も 迅速)	無し	無し	ヤング げっ歯 類脳(Ke ら, 2013)	組織変形無 し, 迅速	組織褐 色化, 不 完全ク リアリ ング IHC	30
CUBIC(Susaki ら, 2014)	2 週	大部分で- 有り	無し	げっ歯 類およ び非ヒ ト霊長 類脳	CUBIC イン フォーマテ ィックス, 至 適化スケー ル(Susaki ら, 2014)	脳だけ; クリア リング 中に潜 在的な タンパ ク質損 失	40

【表 1 - 3】

<i>PACT, PARS</i>	数日- 数週	有り	無し	すべての 主要な げっ歯 類器官; 全身 クリア リング	至適化/簡易 化 CLARITY; 長期間組織 貯蔵可能; IHC/F	3DISCO よりも 緩徐
<p>IHC:免疫組織化学に適合性  IHC/F:免疫組織化学,免疫蛍光標識に適合性; (&gt; 0.5 mm)の抗体浸透の深さについて検証  IHC: IHC-不適合, IHC-未検証,または貯蔵制限,たとえば脂溶性組織染料にだけ適合性,または低い抗体浸透性(&lt;&lt; 0.5 mm)  COLM: CLARITY-至適化光シート顕微鏡; CLARITY 対物レンズは数ミリメートルの作動距離を備え,それは全脳または厚いスライスイメージングを可能にする。COLM セットアップは迅速なサンプルイメージングを許し,そして従って全脳分析のスループットを向上させる。しかし,イメージング手法に関係なく,以下の,たとえば, COLM, 3DISCO および CUBIC プロトコルにおいて提供されるようなものが続き,全脳および大きなサンプルイメージングは特殊で,高価な顕微鏡セットアップを必要とする。</p>						

10

20

【 0 1 1 2 】

【表 2 - 1】

PACT、PARS および RIMS のための模範的試薬

試薬	配合および/または供給者
0.1 M リン酸緩衝塩類溶液(PBS)	すべての洗浄ステップおよびPBSにおいて調製される希釈物について、断りのない限り、蒸留した H <sub>2</sub> O (dH <sub>2</sub> O)において 1L の合計容量に; pH が 7.4 までに、8g NaCl, 0.2g KCl, 1.42g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.245g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> を組み合わせ、滅菌ろ過し、および 4°C で貯蔵する。
0.1 M リン酸緩衝剤(PB)	dH <sub>2</sub> O において pH 7.4 で 1L の合計容量まで、3.1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (一水和物)および 10.9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (無水物)を加え、滅菌ろ過および 4°C で貯蔵する。
心かん流-固定用	
4%パラホルムアルデヒド(PFA)	終濃度 0.1 M PBS において 32% (wt/vol) PFA ストックを 4% PFA まで希釈する。
PBS フラッシュ	0.5%硝酸ナトリウム(wt/vol)および 10 単位/ml のヘパリンを有する 0.1 M PBS を調製する。
ヒドロゲルモノマー溶液	
A2PO	0.1 M PBS 中 2%アクリルアミド, 0% PFA 200ml 用, 40% (wt/vol) アクリルアミド 10ml を 0.2 M PBS の 100ml および 90 ml dH <sub>2</sub> O に加える
A4PO	0.1 M PBS 中 4%アクリルアミド, 0% PFA 200ml 用, 40% (wt/vol)アクリルアミドの 20ml を 0.2 M PBS の 100ml および 80 ml dH <sub>2</sub> O に加える
A4P4	0.1 M PBS 中 4%アクリルアミド, 4% PFA 200ml 用, 40% (wt/vol)アクリルアミドの 20ml および 32% (wt/vol) PFA の 25ml を 0.2 M PBS の 100ml および 55 ml dH <sub>2</sub> O に加える
A0P4	0.1 M PBS 中 4% PFA 200ml 用, 32% (wt/vol) PFA の 25ml を 0.2 M PBS の 100ml および 75 ml dH <sub>2</sub> O に加える

10

20

30

【表 2 - 2】

0.25% VA-044 開始剤	2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリド(VA-044, Wako Chemicals USA, Inc.) <ul style="list-style-type: none"> <li>100mg を使用直前に 50ml のコニカル(円錐体)において 40ml ヒドロゲルモノマー溶液に加える(PACT)</li> <li>Add 0.5g を使用直前に 200ml 0.1 M PBS に加える(PARS)</li> </ul>	
N <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PACT: 長い針 [22 G x 4-インチの皮下注射針, Air-Tite (エア・タイト) (#N224) Virginia Beach (ヴァージニア・ビーチ), VA (バージニア州)] をガス源(レギュレータおよびホースを有する N<sub>2</sub>タンク)に,下部ニードルをヒドロゲルモノマーおよび組織を含むバキュテナー(vacutainer)またはコニカルの下部に取り付け,およびヒドロゲル溶液を通してガスを 1+分間泡立たせ;直ちにヒドロゲル重合ステップを続ける</li> <li>PARS: チューブを N<sub>2</sub>タンクレギュレータ/ホースに取り付け, および反対側の端部をジブロック・バッグに挿入し; 過剰なガスを逃がすことができるようにジブロック・バッグをチューブの周りにゆるくシールし; 灌流チャンバーおよびジブロックを充填するために N<sub>2</sub>ガスを流し; 雰囲気を 2 分間、交換させ; さらに、灌流チャンバーボックスにおいて灌流液が再循環されるとき PBS を通して N<sub>2</sub>をバブルさせ;直ちにヒドロゲル重合ステップに進む</li> </ul>	10 20
<b>PACT および PARS 洗浄剤</b>		
0.1% tritonX-100 (vol/vol) PBS 中	1ml tritonX-100 を 0.1M PBS に加え、合計容量 1L, pH 7.5 とする	
4%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)	40g SDS を 0.1M PBS に加え、合計容量 1L, pH 7.5 とする	30
8% SDS	80g SDS を 0.1M PBS に加え、合計容量 1L, pH 7.5 とする	
20% SDS	200g SDS を 0.1M PBS に加え、合計容量 1L, pH 7.5 とする	
10%デオキシコラート	100g デオキシコロール酸ナトリウムを 0.1M PBS に加え、合計容量 1L, pH 7.5 とする	
<b>PARS チャンバー</b>		
C&B Metabond (メタボンド)	Parkell Inc. (パーケル社) (#S380) Edgewood (エッジウッド), NY	40

【表 2 - 3】

再利用可能なフ ィーディングニ ードル	Fine Science Tools (ファイン・サイエンス・ツールズ社) , Foster City (フォスターシティ) , CA	
カニューレ (Cannula) ,チュ ービング	PlasticsOne (プラスチックワン) , Roanoke (ロアノーク) , VA	
PARS チャンバー	Pipette tip boxes (ピペット・チップ・ボックス) (マウス,ラット用 用類別サイズ), PTFE チュービング, peristaltic pump (ペリスタリ ック・ポンプ) ,ジプロック・バッグ	10
ヒストロジーおよびイメージング		
抗体インキュベ ーション・バッ ファー	すべての抗体 (~1:200-400)および/または染色試薬を 0.1M PBS で2%正常ロバ血清, 0.1% TritonX-100 および 0.01% (wt/vol)アジ 化ナトリウム含有において希釈する	
RIMS	40 g Histodenz™[Sigma-Aldrich (オールドリッチ) # D2158]30mL の 0.02M ホスファートバッファーで 0.01%アジ化ナトリウムを 含み, NaOH を用いて pH 7.5 にされたものにおいて ; 正味費用 \$3/ml	20
sRIMS	70%ソルビトール(w/v) (Sigma-Aldrich #S1876) 0.02M ホスファート バッファーで 0.01%アジ化ナトリウムを含み, NaOH を用いて pH 7.5 にされたものにおいて ; 正味費用\$0.2/ml	
80-90%グリセロ ール	80-90% (vol/vol)グリセロール(Sigma-Aldrich #G5516)を dH <sub>2</sub> O にお いて調製する	
FocusClear (フォー ーカスクリアー ト)™	CelExplorer Labs (セルエクスプローラー) , Taiwan (台湾) \$36/ml	30
ヒストロジー用抗体および小分子染料		
DAPI (4',6-ジアミジノ- 2-フェニルインド ール,ジヒドロク ロライド)	Life technologies (ライフ・テクノロジーズ社) (#D-1306), Grand Island (グランドアイランド) , NY 0.1-10 µg/ml	40

【表 2 - 4】

<p>抗パン-サイトケ ラチン(AE1/AE3) Alexa Fluor (アレ クサ・フルー ア) 488 一次抗 体</p>	<p>eBiosciences (イーバイオサイエンシーズ) (#53-9003) San Diego (サンディエゴ) ,CA  1:100 希釈</p>	10
<p>Atto (アトー) 488-コンジュゲー ト (conjugated) 抗 GFAP ナノボ ディ</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GFAP ナノボディ、出版された方法に従い生成 [Li ら, 2012; Perruchini (ペリュチーニー) ら, 2009]</li> <li>• 精製 GFAP ナノボディを Atto 488 (Sigma-Aldrich) にコンジュゲートし, dH<sub>2</sub>O において 1mg/ml ストックに希釈した</li> <li>• 1:100 希釈</li> </ul>	20
<p>チキン抗チロシ ンヒドロキシラ ーゼ(TH) IgY</p>	<p>Aves Labs (アベス・ラブズ) (#TYH) Tigard (タイガード) ,OR  1:400 希釈</p>	30
<p>チキン抗グリア 細胞繊維性酸性 タンパク質 (GFAP) IgY</p>	<p>Aves Labs (#GFAP) Tigard, OR  1:400 希釈</p>	40
<p>ラビット抗-カル シウムイオン結 合アダプター分 子 (ionized calcium-binding adapter molecule) 1 (Iba1) IgG</p>	<p>Biocare medical (バイオケア・メディカル社) (#CP 290A) Concord (コンコード) ,CA  1:200 希釈</p>	10
<p>ラビット抗-イン テグリンβ4 およ び抗-インテグリ ンβ5 IgGs</p>	<p>Santa Cruz Biotechnology (サンタ・クルス・バイオテクノロジー社) (β4: sc-9090, β5: sc-14010) Dallas (ダラス) , Texas (テキサス)  1:200 希釈</p>	40

【表 2 - 5】

ラビット抗- $\beta$ チューブリン IgG	Santa Cruz Biotechnology (#sc-9104) Dallas, Texas 1:200 希釈	
Alexa Fluor 647 コンジュゲート・ロバ抗-マウス IgG	Jackson ImmunoResearch (ジャクソン・イムノリサーチ社) (#715-606-150) West Grove (ウエスト・グローブ) , PA 1:200 希釈	10
NeuroTrace (ニューロトレース) 530 / 615 赤色蛍光ニッスル染色 (Red Fluorescent Nissl Stain)	Life Technologies (#N-21482), Grand Island, NY 1:50 希釈	
SYSTO 24	Life technologies (#S-7559), Grand Island, NY 1:200 希釈	20
アクリジンオレンジ	Life technologies (#A-1301), Grand Island, NY 100 $\mu$ g/ml 希釈	
レクチン	Vector laboratories (ベクター・ラボラトリーズ社) (#L-1174), Burlingame (バーリンゲーム) , CA 1:100 希釈	30
メチレンブルー	Sigma-Aldrich (#66720) St. Louis (セントルイス) , MO 1 $\mu$ g/ml	
DRAQ5	Cell signaling (セル・シグナリング社) (#4084) Danvers (ダンヴァーズ) , MA 1:200 希釈	40

【表 2 - 6】

Atto-565 コンジ ュゲート Phalloidin (ファ ロイジン)	Sigma-Aldrich (#94072) St. Louis, MO 1:100 希釈
7.0 mm または 3.0 mm スペーサーま たは	iSpacer, SunJin Lab Co. (アイスペーサー, サンジン・ラボ社)
0.5 mm または 2.5 mm スペーサー	Silicone Isolator, Electron Microscopy Sciences (シリコーン・アイ ソレーター, エレクトロン・マイクロコピー・サイエンシーズ 社) , PA
<b>smFISH</b>	
エタノール	段階希釈エタノール: 100%, 95%, 70%エタノール、RNase フリ ー殺菌 H <sub>2</sub> O により調製
透過処理バッフ ァー	0.5%ナトリウムボロハイドライド(wt/vol)70%エタノール溶液中
ハイブリダイゼ ーションバッフ ァー	10%デキストラン硫酸(wt/vol, Sigma D8906), 10%ホルムアミド (vol/vol), 2X SSC
20mer (マー) オ リゴプローブ、β- アクチン向け	1nM 毎各 24 Alexa 594 ラベル 20mer オリゴプローブ、ハイブリ ダイゼーションバッファーにおいて調製したβ-アクチン向け
2X SSC, 塩類溶液 クエン酸バッフ ァー (Saline sodium citrate buffer)	20X SSC ストックについて, 175.3 g NaCl および 88.2 g クエン酸 ナトリウムを 800ml dH <sub>2</sub> O に溶解し, pH 7.0 にし, および合計容 量 1L とする。殺菌するためオートクレーブ処理する  2X SSC について, 100mL 20X SSC を 850 ml dH <sub>2</sub> O と組み合わせ, pH 7.0 にし, 次いで dH <sub>2</sub> O を合計容量 1L にまで加える

10

20

30

40

【表 2 - 7】

30%ホルムアミド 2X SSC	500ml について, 150ml ホルムアミドを 50ml 20X SSC および 300ml dH <sub>2</sub> O と組み合わせ, pH 7.0 にする
Slowfade Gold (スローフェード・ゴールド) + DAPI	Life technologies (#S-36938), Grand Island, NY smFISH サンプルのためのマウンティング媒体
アミノシラン処 置カバーガラス	カバースリッパを連続して三つの溶液間で移し、および超音波 処理した：最初に 1M NaOH, 次いで 100% EtOH, および最後にア セトン。清浄カバースリッパを直ちに、(3-アミノプロピル)トリ エトキシシランの 2% 溶液(Sigma 440140)アセトン中に二分間浸 漬した。アミンで修飾したカバースリッパをリンスし、および 超純水中室温で貯蔵した。[Lubeck (リューベック) ら, 2014]

10

【 0 1 1 3】

20

【表 3 - 1】

## PARS および PACT の生物医学的応用

応用	クリア組織	追加情報
末梢性免疫活性化：認知および健康での効果	全身, IHC による、サイトカイン, 炎症, および神経マーカー	(Hsiao ら, 2012; Hsiao および Patterson, 2011; Lucas ら, 2006)
生涯にわたる髄鞘形成の軌跡；脱髄障害（自閉症、外傷性脳損傷、多発性硬化症）：生理的症状および神経病理学	全身クリアリング(脚注 <sup>1</sup> 参照)	(Gibson ら, 2014; Hsiao ら, 2012; Hsiao および Patterson, 2011; Kaya ら, 2012; Zoukos ら, 1992)
神経発生：神経幹細胞, 神経/軸索再生のマッピング集団	全身クリアリング	[Bartzokis(バートゾキス) ら, 2012; Erturk ら, 2012; Gibson ら, 2014; Jung ら, 2014]
トレーシング複合体長期線維束, たとえば、迷走神経についてのもの	全身クリアリング, 末梢および脊髄への集中	[Berthoud (バーサウド) および Neuhuber (ノイフバー), 2000; Birmingham ら, 2014; George ら, 2000)

10

20

30

40

【表 3 - 2】

脳-腸接続 (Brain-gut connection) , マイクロバイオーム	全身クリアリング	(Hsiao ら, 2013)	
卒中 (ストローク)	PARS の脈管構造固定, 免疫標識について, 全身クリアリングで、特定の器官/組織内での脈管構造を視覚化する		
マッピング腫瘍構築 (Mapping tumor architecture)	げっ歯類がんもでのについての腫瘍生検, PARS の PACT	(Colomba および Ridley, 2014; Fukamachi ら, 2010; Magnon et al., 2013; Vakoc et al., 2009)	10
バイオフィーム: バイオフィーム構造の特徴付け, および異なる層間の調節および相互作用	組織/バイオフィームサンプルの PACT	(Ernst et al., 1999; Singh et al., 2000)	20
拡散テンソルイメージング (Diffusion Tensor Imaging) (DTI)	(脚注 <sup>2</sup> 参照)	[Alexander (アレクサンダー) ら, 2007; Bartzokis ら, 2012; Huppi (ヒュッピ) ら, 1998; Schain (シェイン) ら, 2014]	30

## 【 0 1 1 4 】

<sup>1</sup> 中枢および末梢神経系の双方において、ミエリンは、主に脂質（乾燥重量で75-80%）から構成されている〔Morell（モレル）およびQuarles（クォールズ）、1999〕。ミエリン塩基性タンパク質（MBP）は、ミエリン鞘のはるかに最も豊富なタンパク質であり、種に応じて、合計タンパク質含有量の概略で60-80%を占める。MBPとは異なって、他のミエリンタンパク質は、概して、水溶液中で不溶性であり、そして従って容易に抽出されない。しかし、これらは、MBPと共に、膜タンパク質の分離のための標準プロトコルを使用するSDSを用いて抽出することができる。それゆえ、クリアリングプロトコルの主要な関心事は、組織試料中のミエリンタンパク質を安定化するために不適切なPFAおよび/またはヒドロゲルモノマーの架橋である。ミエリン関連タンパク質〔MAPs（マップ）〕のための免疫標識がまだ、描写するために、たとえば、クリア組織における軸索または神経線維について、クリアにされたヒト組織に示されたように（Chungら、2013）実行可能でありうるのに対し、脱髄および再ミエリン化での定量的な研究を、いくらかのミエリン成分が潜在的にクリアリング中に洗い流されるところのPACT/PARS処理組織において、正確に評

10

20

30

40

50

価することができるかどうかは依然として不透明なままである。実際、何人かの著者は、特に、髄鞘形成での彼らの研究において、脂質の多いミエリン鞘の可溶化および除去というこの懸念のため、組織のクリアリングを回避することを報告している (Jungら、2014)。様々な刊行されたクリアリングプロトコルのうち、SeeDB、CLARITYおよびPACT/PARSは、無傷の一定のミエリン構造的要素を残すために最も大きな可能性を秘めている。すなわち、SeeDB (Keら、2013) は、親油性染料との適合性を実証され、その一方、CLARITY/PACT/PARSはすべてSDSでのクリアリング中にミエリタンパク質の損失を防止することが期待されるヒドロゲル組織埋込みステップを含む。最後に、ミエロアーキテクチャー (myeloarchitecture) を再構成するために、光学クリアランス顕微鏡 (optical clearance microscopy) の使用が研究された調査において、脳サンプルは、光学的にクリアされ、およびOCMの前にScaleA2を搭載された [Leahy (リーイ) ら、2013]。しかし、著者は彼らのクリアリング方法について詳細を提供しなかったので、組織がScaleA2において広範囲にクリアにされたかどうか、またはScaleA2が主に屈折率の実装メディアとして使用され、そこではミエリン損失のリスクが最小限になるかどうかを評価することはできない。<sup>2</sup> 近年、スペクトル共焦点反射顕微鏡での有髄軸索のラベルフリーのイン・ビボのイメージングのための方法 [SCoRe (スコア)] が、拡散テンソルイメージング (DTI) に対して、より容易に実現される代替物として報告された (Schainら、2014)。脂質が豊富なミエリンの高屈折率から利益を得ることで、SCoRe法は、慣習的なレーザー走査共焦点顕微鏡だけの軸索髄鞘形成での変化の微細なスケールのイメージングを可能にする。エクス・ビボ (ex vivo) イメージングへの新しいアプローチが、PARS-処理され、および免疫標識されたサンプルにおいて物質の全生物のPARSベースの転送を伴う生きた有機体における物質の拡散を置き換えることを実行することができることは明らかである。

10

20

30

40

50

【0115】

動物

【0116】

野生型マウス (C57BL/6NおよびFVB/N、両方の雄性および雌性)、Thy1-YFPマウス (ラインH)、およびTh-cre (1Tmd/J) マウスは、新規なクリアリングプロトコルおよびクリアリング試薬の開発およびテストに使用した。Thy1-YFPマウスは、マルチウィーククリアリングステップの全体およびRIMS (リムス) の長期的サンプル貯蔵下での内因性蛍光シグナルの維持を評価した。ペリアドレッセント (Periadolescent、若年付近) から成体の野生型ラット [Long-Evans (ロングエバンス) およびWistar (ウイスター系)、雄性および雌性] は、より一層大きな組織サンプルのためのクリアリングプロトコルを最適化し、および冗長なかん流ベースのクリアリングおよび抗体染色ステップの間に脈管構造の保存を描写するために使用された。経心腔的 (transcardial) かん流のために、対象は、Euthazol (ユーザソル) (100mg/kgのIP注射) の過剰摂取で、0.5%のNaNO<sub>2</sub> (亜硝酸ナトリウム) を含むヘパリン化PBS (10U/mLヘパリン0.1M PBS中) での最初の心臓内かん流前に、次いで4%PFAで深く麻酔した。PACTについて、脳および/または望ましい器官を摘出し、およびヒドロゲルモノマー注入およびクリアリングステップに先立ち、数時間、4%PFAにおいて後固定した。PARSベースの全身クリアリングについて、心臓カテーテルはちょうど大動脈弁を越えて延びる左心室に挿入され、縫合糸の緩いループにより大動脈の内側に安定化された。PARSベースの全脳をクリアリングについて、下行大動脈はマイクロクランプ (microclamp) と連結した。AAV9-CAG-eGFP形質導入した細胞の視覚化を含む実験のために、若い成体雌性C57BL/6マウスに、後眼窩を介してウイルスを注射し、およびウイルス形質導入およびeGFP発現のために6ヶ月の遅延の後、マウスをPACTおよびPARS研究のために安楽死させた。

【0117】

AAV生産および全身デリバリー

【0118】

蛍光標識された導入遺伝子を運ぶアデノ随伴ウイルスベクターをマウスに注射することで、PARS処理の、Thy1プロモーターによって駆動されるものよりもスパーサク (まばらな

)、ローカライズされた蛍光標識を有するRIMSマウンティングとの適合性を観察することが可能であった(図5A-C対図5D-E)。特定の神経細胞の種類およびグリアのスパース標識、ならびに別個の器官での局所的eGFP発現(例は、肝臓および海馬の図5D-E)がはっきりと見えた。AAV9またはAAV9変異キャプシド、AAV9BD1中にパッケージ化された一本鎖ssAAV-CAG-eGFPベクターは、生成され、そして記載されるように精製された(Lockら、2010)。AAV9BD1キャプシドは、以下の変異(VP1ナンバリング)を有するAAV9[U. Penn(ペン)]から修飾された:1)N498Y変異は肝臓形質導入を低減するためになされ(Pulicherlaら、2011)、2)アミノ酸配列AAADSPAHP(S) (Chenら、2009)はAA588-589の間に挿入され、および3)Y731F変異は作成された(Pulicherlaら、2011)。いずれかのウイルスの $1 \times 10^{12}$ ベクターゲノム(vg)は、後眼窩洞を介して、若い成体雌性C57BL/6マウス中に静脈内デリバリーされ、およびマウスはPARSによるネイティブeGFP蛍光の評価のために6ヶ月後に安楽死させた。AAV9-注入マウスからのPARS脳および肝臓組織のすべてのイメージングは、RIMSにおいて2週間の組織貯蔵後に実行された。

10

20

30

40

50

#### 【0119】

PACTおよびPARS試薬の選定

#### 【0120】

異なるヒドロゲルモノマー調剤物およびクリアリング条件をスクリーニングするために、いくつかの成体C57およびThy-1のeYFPマウス(Jackson)を、Euthasolの過剰投与(100 mg/kg、IP注射)により麻酔し、および最初に、0.5%NaNO<sub>2</sub>および10U/mLヘパリンを含有するPBSで、および次いでPBS中の4%パラホルムアルデヒド(PFA)で経心的に灌流した。切り取った全脳を、1mmおよび3mmの矢状(sagittal)断面および冠状切片(coronal sections)にスライスし、2-6時間、室温で4%PFAにおいて後固定し(定着後の全脳および切片の4 での一晩も有効なオプションであった)、および次いで、切片を一晩A2P0(2%アクリルアミドおよび0%パラホルムアルデヒド、PBS中)、A4P0 PBS(4%アクリルアミドおよび0%パラホルムアルデヒド、PBS中)、またはA4P4(4%アクリルアミドおよび4%パラホルムアルデヒド、PBS中)ヒドロゲルモノマー溶液で、それぞれが0.25%の光開始剤2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリド(VA-044、Wako Chemical USA社)を含むものにて4 中でインキュベートした。まだヒドロゲルモノマーに浸漬しながら、ヒドロゲル注入サンプルを1分間、バキュテナーまたは5mLのエップンドルフチューブにおいてサンプル-ヒドロゲル溶液を通して窒素をバブリングすることにより脱気した。オリジナルおよび高度なCLARITYプロトコルで必要と判断されるように、不活性ガスで酸素雰囲気を変換するいくつかの、より一層厳密な方法が実験されたことに留意すべきである(Chungら、2013; Tomerら、2014)(例は、1.氷上でサンプルを含むバキュテナーを配置すること; 2.穏やかに数分間ボルテックスしながらハウスバキュームライン(house vacuum line)を用いてバキュテナーを脱気すること; 3.氷からサンプルを取り除くこと、および数分間ヒドロゲルモノマー溶液に窒素をバブリングすること; 4.ステップ1-3を数回繰り返すことである)。しかし、窒素のための酸素の短い1分間の交換が適切な重合をサポートすることを決定し: 残留酸素は組織およびアクリルアミドモノマーの間の完全なハイブリダイゼーションを妨げたかもしれないが、組織-ヒドロゲルマトリクスは、組織構造およびタンパク質含量を維持するのに十分であった。ヒドロゲル-組織マトリクスを重合するために、サンプルを37 の水浴またはヒーティングブロックに移し、そしてこの高められた温度で2-3時間インキュベートした。重合したサンプルを、過剰なヒドロゲルを除去するためにPBSで簡単に洗浄し、50mLのコニカルチューブに移し、PBS、PBS中0.1%トリトンX-100、またはクリアリング溶液: 4%SDS、8%SDS、20%SDS、10%デオキシコール酸、すべては0.1M PBS、pH7.5において調製したものであり、それらのいずれかにおいて振盪しながら、37 中で2-5日間インキュベートした。3mmの脳切片の画像は、低いPFA濃度で調製した組織ヒドロゲルマトリクスについてのより一層大きな組織膨潤および高PFA(およびアクリルアミド)濃度で調製した組織ヒドロゲルマトリクスについてのより一層遅い組織クリアリングの間のトレードオフ(交換)を示すために、24時間および48時間で採取し(図1A); A4P0ヒドロゲル調剤物はその後のPACTおよびPARS実験における

一般的な使用のために選定した。8%SDSクリアリング溶液中の脳切片の72時間のインキュベーションは、優れた組織のクリアリングをもたらした(図7A)、それゆえ8%のクリアリング溶液はその後のPACTおよびPARSの実験のために選定した。クリアリング時間に関しては、このパラメータは、ケース固有の方法で最適化されなければならない。24時間のクリアリングは、小さな組織サンプルまたは高度に多孔質な組織に十分でありうるが、その一方、より一層大きく、高度に有髄の(myelinated)、または高濃度組織切片および器官全体は>96時間を必要とする場合がある。サンプルが長期に貯蔵される場合、膨張が長期的にはヒドロゲル軟化および崩壊、サンプル損失の危険に寄与するので、サンプルをオーバークリア(overclear)しないように、およびまた過度の膨張について定期的にチェックするように注意しなければならない。このことは、サンプルの調製および取扱いの間、高温および機械的応力によって促進される。組織ヒドロゲルサンプルの穏やかな処置およびインキュベーション溶液への抗生剤の添加は、ヒドロゲルが、最大で二週間まで安定を維持させることを可能にする。また、クリアリング後の1-2%のPFAでの組織架橋または組織ヒドロゲル再重合の追加のラウンドが封入媒体(mounting media)における組織膨張および組織崩壊の双方を打ち消すのに有益であることが決定された。

10

20

30

40

50

#### 【0121】

PACT免疫組織化学

#### 【0122】

PACT加工組織を免疫染色するため、クリアサンプルは、残留SDSを除去するのに、1日かけてPBSの4-5回の変更により洗浄した。次に、サンプルを、2%正常ロバ血清、0.1%トリトンX-100および0.01%アジ化ナトリウムを含むPBS中で一次抗体(1:200-400)と共に、3-7日間振とうしながら室温でインキュベーションした。六つのA4P0重合および六つのA4P4重合の3mmの矢状切片を、クリアした組織においてIgGの侵入深さを測定するために24時間、48時間および72時間にて、これらの抗体のインキュベーションから取り出した(図1B参照)。残りのセクションについて、未結合の一次抗体を1日にわたって4-5回のPBS緩衝剤交換におけるセクション洗浄を介して除去した。次に、サンプルを、二次抗体(Fabフラグメント二次抗体が好ましく、1:200-400)と、2%正常ロバ血清、0.1%トリトンX-100および0.01%アジ化ナトリウムを含むPBSにおいて、2-5日の間、振とうしながら室温で共にインキュベートした。1日にわたるPBSの4-5回の変更による洗浄の後、サンプルを、RIMS溶液において[0.01%アジ化ナトリウムを伴い、NaOHでpHを7.5にした0.02Mリン酸緩衝剤の30mLにおけるSigma D2158(Histodenz™)の40g、-これは結果として88%Histodenz、v/wの最終濃度をもたらした)、それらが透明になるまで室温でインキュベートした。抗体、小分子染色、またはRIMSにおける組織の長いインキュベーション(>4日)の間、溶液はインキュベーションの途中で新鮮なものに交換した。特別な予防策として、および細菌の増殖を防ぐため、組織は、すべての緩衝剤交換と共に新鮮な50mlコニカルチューブまたは染色ジャーに移すことができる。RIMSインキュベーションおよび封入を、クリーンな環境で実行すること、-細菌汚染を最小限にするためにフードにおいて、または炎の上に新鮮なコニカル中にRIMSをデカントすることによるのいずれか、が示唆された。

#### 【0123】

受動的な染色のために使用される一次抗体は、ニワトリ抗チロシンヒドロキシラーゼ(TH)のIgY、ニワトリ抗グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)のIgY[Aves Labs(鳥類研究所)、Tigard(タイガード)、OR]、ラビット抗イオン化カルシウム結合アダプター分子1(Iba1)のIgG[Biocare Medical(バイオケア・メディカル)、Concord(コンコード)、CA]、ラビット抗インテグリンb4、b5のIgG、およびラビットアンチベータ(antibeta)チューブリンのIgG[Santa Cruz Biotechnology(サンタ・クルズ・バイオテクノロジー社)、Dallas(ダラス)、Texas(テキサス州)]である。AlexaFluor 647結合ロバ抗マウスIgG(Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA)は、抗体の浸透実験のために使用した(図1B)。Nissl(ニッスル)染色はNeuroTrace 530/615のRed Fluorescent Nissl Stain(赤色蛍光ニッスル染色)(PBSにおいて1:50、Life Technologies社、グランドアイランド、ニューヨーク州により実行し;サンプルをRT(室温)で一晩インキュベートし

、次いで、実装前にPBSで洗浄した。アクリジンオレンジを用いる小分子染色のために、サンプルを10分間、アクリジンオレンジの100 µg/mLの溶液中に配置し、次いで一時間PBSでの洗浄を続けた。組織を次にイメージングに先立ち4時間RIMS溶液に配置した。全てのステップは室温で行った。

#### 【0124】

PARSチャンバーの設計

#### 【0125】

クリアリングおよび免疫標識のステップ用に血管系を介するPARS試薬をかん流するため、脂質抽出および抗体拡散中、数日から数週間の間、組織への継続的な圧力勾配と共に試薬を再循環するための簡単な装置の製造を必要とした。そのため、配送方法として、伝統的な心臓かん流固定技術を用いて (Gageら2012; Jonkersら、1984)、PARSチャンバーを、以下の要素からなるよう考案した：1) 対象の左心室内の定位置にクランプされる供給針カテーテル (feeding needle catheter)、2) 病変右心房を通して脈管系を出る循環試薬をキャッチするためのかん流液収集ウェル (ピペットボックス)、および3) その収集からの再循環試薬を蠕動ポンプによってその通過を介して対象の脈管系中に十分に後ろ向きに移すカテーテルチューブ (PTFEチューブ) (図10A)。このセットアップが全生物のクリアリングのために機能的であることを確認するために、いくつかの異なるパーセンテージでのSDS、様々な濃度で、ナトリウムラウリルサルコシン、およびデオキシコール酸ナトリウムを含む、いくつかの異なる洗浄剤は、連続的に、頸動脈を介して、最大2週間まで全体のマウスおよびラットを通してかん流した。PACT (図7A) のように、単にSDSは、効果的に光学イメージングのために組織を透明にすることができる。同様に、PARSチャンバーのセットアップを用いて送られたとき、8% SDSが効率的に深部組織で脂質を溶媒和し、および大規模組織サンプルの均一なクリアを達成することができた。このように、PARSチャンバーのセットアップは、その後のPARS実験のために採用された。

10

20

#### 【0126】

PARSクリアリングおよび染色

#### 【0127】

成体マウスまたはラットの経心腔的かん流 (transcardial perfusion) 固定について、供給針が左心室を通っておよび大動脈に挿入し、および大動脈弓のレベルで血管に所定の位置でゆるく縫合された。PACTのために要約されるように、PBSおよび4% PFAでのかん流に続いて、固定された全体のげっ歯類はカスタムビルドかん流チャンバーに移され、ここでは、チャンバー内の溶液がげっ歯類中にかん流され、および蠕動ポンプを介して再循環される。げっ歯類は、室温で1-2時間、1mL/分の流速で、大動脈中に同じ供給針を介して4% PFAで後固定した。ラットの脳および脊髄のクリアリングのために、動脈循環を体系的に連結し、頸動脈を無傷のままにし、およびこれらの血管によって直接かん流していない組織を除去した。PFAがアクリルアミドモノマーを架橋することを防ぐために、PBSを、残留PFAを洗い落とすために、RTで2時間かん流し、および4% アクリルアミド (A4P0) を一晩RTでPBSに注入した。翌日、PBSを再び脈管系において任意の残りのPFA/アクリルアミドポリマー/モノマーを除去するためにかん流した。重合前に、およびかん流ラインを切断することなく、かん流チャンバーは、ジブロック・バッグに入れられ、サンプルを脱ガスするため別の接続通してかん流チャンバー中に窒素ガスが注入された。重合プロセスは、PBSを伴う0.25%のVA-044開始剤の200mLを添加すること、および2-3時間37-42 °Cの水浴中で脱気かん流チャンバーを浸漬することによって開始した。鉛の重りは、かん流チャンバーの上に、その傾斜を防止するために置いた。重合後、溶液を0.1MのPBS、pH7.5のクリアリングバッファ中の8% SDSにより置換し、およびマウス/ラットは、最大2週間までかん流した。PARS IHCのため、クリアマウス/ラットは、まず、残差SDSを除去するために、2日間にわたり200mLのPBSの8回のバッファー変更によりかん流した。そして、PACTプロトコルにおいて説明したのと同じ抗体調剤物を使用して、一次抗体カクテルでの3日のかん流、PBS洗浄での1日のかん流、二次抗体カクテルでの3日間のかん流、および1日のPBS洗浄を、クリアマウス/ラットの末梢器官を染色するために行った。

30

40

50

## 【0128】

脳および脊髄クリアリングのためのPARS-CSFの方法論

## 【0129】

脳および脊髄のマッピングに制限された適用のために、頭骨内 (within-skull) PARS戦略を開発し、それは頭蓋内脳シャントを介してCSF中へのハイドロゲルモノマーおよびクリアリング試薬の直接注入によって全脳および全脊髄の完全クリアリングを通して付与される。特定の状況〔例は、対象におけるガイドカニューレのイン・ビボでの薬理的、神経生物学的、または光遺伝学的 (オプトジェネティック) な研究からの既存の可用性〕の下では、PARS-CSFは、全脳クリアリングおよび組織学を可能にし、それは自動的に既存のカニューレの近くの領域のために最適化され、およびそれは同等の器官全体のPACT手順としてより一層少ない時間および試薬しか必要としない。ここで、PARS試薬の頭蓋内配送のための二つのルートが確認された。脊髄をクリアにするためには、カニューレは、大槽 (cisterna magna) 中に、または頭骨を介して低下して (関心領域に孔をあけること、および硬膜において開口部を作成するためにピンセットを使用することによって) のいずれかで、くも膜下腔のレベルまで、直接背側下丘の上に挿入することができる (図3A参照)。PARS-CSFが高温で、クリアリングの長い期間実行されたとき、ラットの脊髄サンプル (右) はクリアにすることができる。脳全体をクリアするには、カニューレは、頭蓋骨を介して低下され、硬膜を貫通し、そして直接嗅球の上の領域に配置することができる (図3B参照)。カニューレ (21G、PlasticsOne) は、歯科用アクリル [C&B-Metabond (メタボンド)、Parkell Inc. (パーケル社)] を用いて頭骨の表面に定位置 (インプレース) で接合される。PARS手順は、次に、この頭蓋内製剤に適用された: カテーテルチューブは、心臓栄養チューブ (cardiac feeding tube) とは対照的に、硬膜下カニューレに接続され、そしてすべてのPACT試薬は1ml/分でPARSにおけるのと同じ順序および時間枠を使用して注入された。全脳クリアリングのため、対象は、経心腔的かん流で固定され、および断頭され、頭部だけがPARSチャンバーに移され、および注入 (輸液) ラインに接続された。ピペットボックスおよびカテーテルラインは、4%アクリルアミドモノマー溶液 (A4P0) を用い予め充填し、チューブをカニューレに接続し、および一晩室温にて1ml/分の流速でA4P0を頭蓋内に注入した (図10A、左)。未結合PFAおよびアクリルアミドモノマーの脳をフラッシュした後 (PBSの2時間注入)、それは脈管構造が未重合のままであることを確実にするために非常に重要であり、全脳はPARSチャンバーからジブロック・バッグへの移送および二分間の不活性雰囲気 (N<sub>2</sub>) 下に置くことを介して脱気した (図10A、右)。バッグド-PARSチャンバー (bagged-PARS chamber) はその後37-42 °Cの水浴に移し、そして熱開始剤補充した脱気PBSを、全体で2-3時間のインキュベーションのために脳を介して注入した。この全脳-ハイドロゲルマトリクスの形成後に、頭骨内組織クリアリングは、PARSチャンバーを全体のプロセスについて37-42 °Cの水浴中に残存させると共に、4日間カニューレを通して8% SDSの一定のかん流循環を介して達成された。最後に、大規模なPBS洗浄 (2-3日) の後、カテーテルラインを切断し、そして脳を取り出し、切片にし、およびイメージングのためのRIMSにマウントした (図3B)。

## 【0130】

AAV9-eGFPを用いIV-注射したマウスを使用し、全器官クリアリングのためのPARS-CSFの手順は、以下の条件に関して確認した: 1) カニューレの配置に関しどれだけ十分な領域をクリアにするかでのほんの少しのバイアス、2) 高すぎる流速またはかん流液の不十分な排出で、高い頭蓋内圧が引き起こされるもののいずれかからの過剰な流体圧力によるカニューレに近い領域での構造的な損傷の不存在、3) 細胞内構造形態の保存、および4) まばらに標識された細胞集団および蛍光の良好な視覚化。それは、すでに脳内 (IC) または脳室内 (ICV) でのカニューレ装着マウスまたはラットの対象の使用を伴い、および各対象について死後の脳組織学を必要とする研究を行う科学者への特定の関連性を有することがある。

## 【0131】

抗体の浸透

## 【0132】

四体の経心的にかん流し、および4%PFAポスト固定した成体マウス(4-12週齢)の脳を2mmの矢状スライスに切断し、およびこれらのスライスをPACT処理した。具体的には、各PFA固定した脳の一方の半分は、A4P4ヒドロゲルとハイブリダイズさせ、その一方、他の半分は4A0Pヒドロゲルにおいてハイブリダイズした。PACTプロトコルに記載されるように、すべてのサンプルは、PBSにおいて8%SDSを用いて受動的にクリアし、そして残留SDSを1日間PBS洗浄によって除去した。サンプルを、次いで一次抗体カクテル(ロバ抗マウスIgG抗体、1:200、PBSにおいて2%正常ロバ血清、0.1%のTriton-X100および0.01%アジ化ナトリウムを含む)において24-72時間に及ぶ、時間期間の範囲についてインキュベートした。次に、サンプルを1日かけて0.1MのPBSの4-5回の緩衝剤交換で洗浄し、そしてRIMS溶液においてマウントした。画像は、W Plan-Apochromat(Wプラン-アポクロマート)20x/1.0 DIC M27(作動距離1.8mm)を使用したZeiss(ツァイス)LSM 780共焦点顕微鏡を用いて撮影した。抗体の浸透の深さ(図1B)はReslice(リスライス)およびZプロジェクト・プラグイン(Z project plugins)を有するFiji(フィジー)を使用して、y-z投影像にて概説した。

10

## 【0133】

PACTおよびPARSサンプルのRIMS(屈折率マッチング溶液)

## 【0134】

イメージングのための組織の準備の最終段階として、サンプルマウンティングは、対物レンズ、レンズ浸漬媒体、および組織の屈折率を調整するのに役立つ媒質において組織切片を浸漬することが含まれ、それはより一層高い解像度およびイメージングの深さを与える。PACTおよびPARSのマウンティングにおいて、FocusClear™(フォーカスクリアー™)、極めて高価な試薬の使用を回避するため、代替の新しいマウンティング溶液を処方した。組織の光学的クリアリングの原則に基づいて、化学物質の二つの主要なグループ(糖アルコールおよび放射線造影剤)が合理的にスクリーニングされ、それは、光学的クリアリング剤の以下の望ましい特性を持つ(高い水溶性、低粘度、高密度、低浸透圧、低自家蛍光、非蛍光団の消光、生体適合性、低コストである。ソルビトール、糖アルコールは、手頃な価格で、広く利用可能であると認識された。70-80%(w/v)溶液にて、ソルビトールは、200μmの厚さのクリアでないものおよび1mmの厚いPACTクリアの脳切片を、蛍光をほとんど消光せず実際上クリアにすることができる。調剤物(sRIMSと称し、説明については以下を参照)は、後に0.02-0.05Mリン酸塩バッファー(pHの維持)、0.1%のtween-20(組織の浸透を促進する)、およびアジ化ナトリウム(細菌の増殖を抑制するための防腐剤)を含むように修飾された。糖アルコールに加えて、放射線造影剤はまた、評価され、特に、血管内に送られた非イオン性ヨウ素化造影剤(また、密度勾配媒体として使用するために認可される)は、それらの物理的および化学的特性として、理想的な屈折率整合媒体のそれと密接に一致する。コストおよび利用可能性に基づき、イオジキサノール〔Optiprep(オプティプレップ)〕およびそのモノマイオヘキソール〔Nycodenz(ナイコデンツ)、Histodenz™、イオヘキソールの誘導体なども利用可能〕を試験し、およびイオヘキソールがはるかに大きいPARSクリアサンプルに一致するインデックスにおいてソルビトールよりも優れていることが判明した。

20

30

40

## 【0135】

次に、サイドバイサイドの比較(図9A参照)は、一般的に使用される/商業上入手可能なマウンティングオプションの間で行われ:80-90%のグリセロールおよびFocusClear™、およびここに記載されるメディアマウンティング媒体調剤物:sRIMSおよびRIMS、マウンティング媒体は、標準的な共焦点顕微鏡による本発明者らのイメージングセットアップのために最適化される。RIMS溶液を、30mLの合計容量について、0.01%アジ化ナトリウムを有する0.02Mリン酸バッファーにおいてHistodenz™〔Sigma(シグマ)D2158〕の40gを溶解すること、NaOHでpHを7.5にすることによって調製し、それはRI=1.46を有する88%の終濃度のHistodenz(w/v)をもたらす(特に断りのない限り、この研究を通じて使用される)。

50

## 【 0 1 3 6 】

また、RIMSの屈折率 (RI) が、特定の組織/イメージングシステムと一致するように調整されうることが注目に値し：RIMS RIが、非常に良好なサンプル分解能を得るために、1.38 (30%Histodenz w/v) から1.48 (95%Histodenz w/v) の範囲であってもよいことが予想される。RIMSでの光透過率 (図9B) は、Reichert (ライヘルト) AR200 Refractometer (屈折計) で測定した。RIMSマウンティングについて、サンプルをそれらが透明になるまで、まず室温でRIMSに沈めた。この期間中、クリア組織は初期に最初の数時間収縮する (図3B、9Dを参照)。RIMSの継続的なインキュベーションは、RIMSが十分に組織を貫通するまで時間をかけて緩やかな組織の拡大につながり (図4C、11Aを参照)；最大のサンプル (例は、ラット全脳) は、RIMS-浸漬の一週間以内に透明になり、その後それらの拡大が止まったことが観察された。しかし、組織拡大は、4%PFAにおいてクリアにして染色したサンプルを、室温で1-2時間 (少量のサンプル) または一晩まで (大きなサンプル) をポスト定着することによって、RIMSのインキュベーションに進む前に好首尾に制限された (図4C、右のボックス；図11A、右下のボックスを参照ください)。ポスト固定PARS組織は緩やかな組織容量膨張を削減するが (図9)、追加的な架橋はまた、組織透過性のわずかな減少を引き起こした (図11A)。しかし、蛍光強度、細胞表現型、またはイメージングの解像性の深さは悪影響を受けなかった。

10

## 【 0 1 3 7 】

sRIMS：RIMSに対する費用対効果の高いソルビトール系代替物

## 【 0 1 3 8 】

0.01%アジ化ナトリウムを有する0.02Mリン酸バッファーにおける70%のソルビトール (w/v) (Sigma S1876) を、NaOHでpHを7.5にし；\$ 0.2/mlの純費用である。RIMSが、行われた一定の実験においてsRIMSを上回ったが、解決可能イメージング深さの点では、ソルビトールは、科学研究室全体で一般に入手可能な化学物質であり、そしてそれゆえにグリセロールベースのマウンティング溶液に対して便利な、費用対効果の高い、優れた代替手段を提供する。

20

## 【 0 1 3 9 】

血管系の保全

## 【 0 1 4 0 】

ラットを、ヘパリン化PBS、4%PFAを用いて経心的にかん流し、そして最後に追加のPBSで洗浄した。次に、PARSでのように任意のヒドロゲルモノマー注入またはクリアリングする前に、ラットを100 mLのAtto (アト) 488結合抗GFAPナノボディ (PBS中1:100) を用いる大動脈内カテーテルを介して室温で一晩かん流した。GFAPのナノボディは、出版された方法に従って調製した (Liら、2012)。それを使用前にAtto (アト) 488蛍光色素に結合させた。脳を頭蓋骨から取り出し、およびナノボディを架橋するために一晩4% PFAにおいてインキュベートした。脳はその後、ヒドロゲルモノマー注入、ハイブリダイゼーション、および0.1MのPBS、pH7.5中8%SDSにおける3日間37°Cにて、受動サンプルクリアリングを含む標準PACTプロトコルに従って1mmの冠状スライスに切断し、および加工した。クリアにされたサンプルは、一日間RIMS溶液中でインキュベートし、そしてイメージング用のRIMS溶液においてマウントした。画像はLD LCI Plan-Apochromat (プラン-アポクロマト) 25x/0.8 Imm Corr (イム・コアー) DIC M27マルチ液浸対物レンズを有するZeiss LSM 780共焦点顕微鏡を用いて撮影した。上記の方法は、Alexa Fluor (アレクサ・フルオロ) 647結合 (コンジュゲート) 抗マウスIgGを用いる血管系の標識のためにマウスにおいて繰り返した。簡単に言えば、4%PFAで固定したマウスは、Alexa Fluor (アレクサ・フルオロ) 647結合抗マウスIgGを一晩、4%PFA固定のために設置されたのと同じ大動脈内カテーテルを用いて経心的にかん流させた。脳は切り出し、4% PFAで一晩4%PFAで後固定し、1mmの冠状スライスに切断し、およびPACTは3日間37°Cで、0.1MのPBS、pH7.5において8%SDSにてクリアリングした。クリアにされたサンプルは、一日間RIMS溶液中でインキュベートし、およびイメージングのためのRIMS溶液中でマウントした。

30

40

## 【 0 1 4 1 】

50

スライスされた組織の拡大および体重増加測定

【0142】

PFA固定成体マウス(4-12週齢)の脳は、六つの1mm厚の冠状スライスに切断した。脳の一方の半分からのスライスを、PBS中に貯蔵し、その一方、脳の他の半分からのスライスは4日間PACT-クリアにした。スライスを秤量し、そしてクリアリング前後で、慣習的なカメラを用いて撮像した。スライスのサイズはImage J(イメージJ)を用いて概説し、および算出しました。組織の拡大および重量増加を、クリアリング前後にスライスのサイズおよび重量の変化を計算することによって(図1E)、およびpre(プレ)PACT測定に対してそれらを正規化することによって決定された。

【0143】

タンパク質損失測定

【0144】

各サンプルについてのタンパク質損失の割合(図1C、2E)は、PACTまたはPARSクリアリングから、それぞれの溶液を用いてブランクにしたNanoDrop(ナノドロップ)により収集したクリアリング溶液において合計タンパク質の量を測定することにより得られ、およびマウスの重量(PARS用)またはクリアリングの前にスライス(PACT用)に対して正規化した。

【0145】

全脳組織形態保存および定量化

【0146】

脳容量でのPARSプロセスおよびRIMSマウントの効果を観察するために、PFA固定成体マウスの脳を、直ちに抽出するか(クリアにされないコントロール)またはPARS処理するかのいずれかをし;そしてこれら二つのグループからの脳を、次の条件のいずれか一つに従って処置した:1日間PBS中でインキュベートし、1週間PBS中でインキュベートし、1日のRIMSにおいてマウントされ、2週間RIMSにおいてマウントされ、または後固定および2週間RIMSにおいてマウントされた。すべての条件からの、クリアにされ、およびクリアにされていない脳は、その後、それらの相対的な寸法変化を推定するために撮影し(図4C)、クリアリングの深さを視覚化するために切片に切断し(図11A)、スライドに取り付けられ、および組織構造における総変化を評価するために共焦点顕微鏡を介して画像化した(例は、主要脳領域、心室および血管系の構造の整合性の形態学的変形)(図11B)。各サンプル(図1C、2E)についてのタンパク質損失の割合は、NanoDrop(ナノドロップ)を介して組織のPACTまたはPARSプロセス後に集収したクリアリング溶液のアリコート濃度を測定することによって求めた。純タンパク質の損失は、次にこの濃度、および処理中に使用されるクリアリング溶液の既知の合計容量に基づいて推定することができる。各サンプルによって失われたタンパク質の量は、マウスの重量(PARS用)またはクリアリング前に組織スライス(PACT用)に対して正規化され、その結果、サンプルを横切る、および組織処理条件にわたるタンパク質の損失を比較することができた。

【0147】

単一分子のRNA FISH

【0148】

組織サンプルを、光真空下(under light vacuum)で1時間脱水することによりアミノシラン処理したカバースリップに対して付着させた。サンプルは、以下のプロトコルに従ってハイブリダイゼーション前に透過処理した(permeabilized):最初に、サンプルを室温で10分間100%エタノールにおいて二回洗浄した。次に、サンプルを室温で10分間95%エタノールにおいて洗浄しました。次いで、サンプルを4で2時間70%エタノールにおいてインキュベートした。インキュベーション後、組織を、0.5%の水素化ホウ素ナトリウム(w/v)の70%エタノール溶液に室温で10分間配置した。最後に、組織は、PBSの3回の洗浄により再水和させた。ハイブリダイゼーションは、24のAlexa 594標識したB-アクチンに向かう20マーのオリゴプローブの各々当たり1nMを含む10%ホルムアミド(v/v)、2×SSC、10%硫酸デキストラン(w/v、Sigma D8906)からなるハイブリダイゼーションバ

10

20

30

40

50

ッファーにおいて37℃で一晩行った。翌日、サンプルを室温で30分間、30%ホルムアミド、2×SSC中で洗浄し、次いで2×SSCで4回洗浄を続けた。洗浄後、サンプルはSlowfade Gold (スローフェード・ゴールド)+DAPI [Life (ライフ) S36938] を有する二つのカバースリップの間にマウントした。サンプルは、Andor Ikon-M (アンドール・イコン-M) カメラおよび追加の1.5×の倍率を有する60X/1.4NA Plan Apo (プラン・アポ) 対物レンズによるNikon (ニコン) のTi Eclipse (エクリプス) 顕微鏡にてイメージ化した。画像は30μmを超える0.5μmのステップサイズを伴うZ-stacks (Z-スタック) として取得した。サンプルは589nm (SDL-589-XXXT)、532nm (SDL-532-200TG) およびShangbhai Dream Laser (シャンハイ・ドリーム・レーザー) 製の405nm (SDL-405-LM-030) レーザーによって励起した。

10

## 【0149】

smFISHイメージ (図2) は、MATLABにおいて書き込まれた画像解析スクリプトを使用して分析した。サンプルの平均バックグラウンドを決定するために、イメージは、50×50ピクセルのカーネルを用いてメジアンフィルターし (median filtered)、そしてセンター200×200ピクセルのサブ画像の平均ピクセル強度を、画像の平均バックグラウンド値として使用した。smFISHドットは、Gaussian (ガウシアン) フィルタのLaplacian (ラプラシアン) を適用すること、平均バックグラウンド値に基づいて画像を閾値処理すること、および極大値を見つけるために、得られる画像を横に拡がった画像と比較することによって見出した。エラーバーは、得られる測定値の標準偏差を用いて算出した。

20

## 【0150】

ヒト組織生検の調製

## 【0151】

ヒト基底細胞がんの皮膚組織サンプルは、適切なインフォームドコンセントの後およびUCLA IRB # 12-01195の承認の下でそれらのがんの切除を受けた患者から取得した。組織サンプルは、診断またはマージン制御目的が必要でない腫瘍の切片から取得し、および元の皮膚がんの大きさに応じて大きさが変動した。生検された腫瘍試料は、固定された組織のためのヒドロゲル支持マトリクスを生成するために、4%アクリルアミド溶液 (A4P0) を使用して、げっ歯類の組織について記載されるようにPACTの方法論を利用して処理した。重合した組織ヒドロゲルマトリクスは、その後、37℃の8%SDS中で2-7日間 (すなわち、組織の厚さに応じて) 受動的にクリアにした。一般的には、厚さ3mmのヒト皮膚切片は、3-4

30

## 【0152】

PACT-処理されたサンプルを、抗パン・サイトケラチン (AE1/AE3) Alexa Fluor (アレクサ・フルオロ) 488の一次抗体 (eBiosciences) の1:100希釈を用いて2日間免疫標識し、次いでPBSにおいて1日の洗浄を続けた。すべての標識および洗浄ステップは室温で実行し、および最終的PACT処理生検サンプルは、RIMSにマウントした。イメージングは、上述のように、20×長い作動距離の対物レンズを有するZeiss (ツァイス) 780共焦点顕微鏡にて行った。組織ヒドロゲルのサンプルについてクリアリング時間 (8%SDSにおいて2-7日) の範囲をテストするにもかかわらず、皮下層 (主に脂肪細胞からなる) は、脂肪細胞でのすべてのバックされた脂質の不完全なミセル溶媒和により、一貫したクリアリングに抵抗した (黄色組織、図8A)。

40

## 【0153】

走査電子顕微鏡

## 【0154】

サンプルは、ESEMモードでのFEI Quanta (クワンタ) 200F環境走査型電子顕微鏡 (ESEM) にて画像化した。PACT処理脳組織の薄いスライスを、チャンパーにおいてサンプルホルダ上に配置し、および5kV (キロボルト) の電圧および3または4のスポットサイズを有する7.7-8.3mmの間の作動距離にて、気体の二次電子検出器を使用して、撮像した (GSED)。切断/SEMプロセス中に延伸することが、組織ヒドロゲルハイブリッドの細孔をより大きくすることに注目される。SEMイメージの実際の有効孔径は、ここに提示されているも

50

のよりも小さくなければならない。

【0155】

定量法

【0156】

平均最近隣距離 (NND) : 1mm厚の冠状スライスを、DAPIを用いて染色し、w/10×0.45N.A. plan-apo対物レンズを画像化した。24 3 μmの厚さの画像は、皮質視床 (cortex thalamus) および線条体の異なる領域から採取した。30ピクセルローリングボール半径減算フィルタは、バックグラウンドを除去するために使用した。すべてのイメージは、個別に閾値化され (thresholded)、および二値画像に変換される。バイナリ流域セグメンテーション (binary watershed segmentation) は、一緒にクラスタ化される細胞を分けるために適用した。結果として得られる画像はImage (イメージ) J上での分析粒子オブションを使用して定量化した。各細胞の重心は、測定で確認され、NNDはImageJ上の「NND」プラグインを適用することにより算出した。

10

【0157】

GFPサイズ定量化 : マウスの脳に注入されるAAV9-eGFP IVの1mm (ミリメートル) 厚の冠状スライスを、5×0.25N.A. Fluar対物レンズを用いて画像化した。Zスタックの最大投影を定量化のために使用した。各GFP陽性ニューロンのエリアを分離し、およびImageJ上の分析粒子オブションを使用して定量化した。

【0158】

双方の最近隣距離測定およびGFPサイズの計算は、三つの脳領域について実行した : 皮質、線条体、および視床 ; クリアにされないで、PARSクリア、およびPARSクリアでその後ポスト固定したマウス脳スライス (データ結果のための代表的な脳スライスのための図11Aおよび図11Bを参照)。すべての計数した細胞の平均細胞サイズおよび平均NNDは、各領域についてコンピュータにより計算し、およびデータを領域間の細胞サイズにおける、またはNNDにおける統計的有意差について分析した。

20

【0159】

蛍光顕微鏡

【0160】

クリア組織サンプルを一日間RIMS溶液中でインキュベートした。次いで、サンプルを、カバーガラスにより、7.0mmまたは3.0mmのスペーサー [ iSpacer (アイスペーサー)、Sun Jin Lab Co. (ソンジン・ラボ社) ]、または0.5mmもしくは2.5mmのスペーサー [ Silicone Isolator, Electron Microscopy Sciences (シリコン・アイソレーター、エレクトロン・マイクロコピー・サイエンス)、PA] を用いて、各溶液においてマウントした。カバーガラス付き (Coverslipped) サンプルは室温で貯蔵し、およびイメージングに先立ち遮光した。注目すべきは、ほとんどの蛍光イメージおよび初期サンプルの視覚化は、慣習的な顕微鏡 (Zeiss LSM 780) にて、いずれかのFluar 5×/0.25 M27ドライ対物レンズ (作動距離12.5ミリメートル)、Plan-Apochromat (プラン-アポクロマート) 10×/0.45 M27空気対物レンズ (作動距離2.0ミリメートル)、LD SC Plan-Apochromat 20×/1.0 Corr (コアー) M32 85mmスケール浸漬対物レンズ (作動距離5.6ミリメートル)、またはLD LCIプラン-アポクロマート25×/0.8 Imm Corr (イム・コアー) DIC M27マルチ浸漬対物レンズ (作動距離0.57ミリメートル) で実行した。唯一の例外は、Andor Ikon-M (アンドール・イコン-M) カメラおよび60X/1.4NA Plan Apo I対物レンズを有するNikon (ニコン) Ti Eclipseの顕微鏡を使用するsmFISH実験についての、およびサンプルがLeica (ライカ) HC FLUOTAR L 25×/1.00 IMM CORR対物レンズ (作動距離6.0ミリメートル) を有するLeica (ライカ) TCS SP8二光子顕微鏡を用いるLeica Microsystems (ライカ・マイクロシステムズ) によって撮像される、図3Cに提示されるイメージの取得のためのものであった。イメージ再構成は、Imaris (イマリス) イメージングソフトウェア [ Bitplane (ビットプレーン) ] を用いて実行した。イメージング後、サンプルを貯蔵のため、室温でRIMSに包埋した。

30

40

【0161】

50

すべての共焦点イメージングのために使用する対物レンズの概要：

【 0 1 6 2 】

図1：(F左)Fluar 5x/0.25 M27ドライ対物レンズ；(F右；G；H；K)LD LCIプラン-アポクロマート25x/0.8イム・コア-DIC M27マルチ浸漬対物レンズ；(I、J)LD SCプラン-アポクロマート20x/1.0コア-M32 85ミリメートルスケール浸漬対物レンズ。(L)ツァイス・プラン-アポクロマート10x/0.45エアー対物レンズ。

【 0 1 6 3 】

図2：(A-B)サンプルは、アンドール・イコン-Mカメラおよび追加の1.5xの倍率を有する60X/1.4NAプラン・アポI対物レンズを用いる、Nikon(ニコン)Ti Eclipse(エクリプス)顕微鏡で撮像された。イメージは、30 $\mu$ mにわたり0.5 $\mu$ mのステップサイズを伴うZスタックとして取得された。サンプルは640nmのCoherent Cube(コヒーレント・キューブ)、および532nm(SDL-532-200TG)および405nm(SDL-405-LM-030)レーザーによって励起した。

【 0 1 6 4 】

図3：(C)Leica(ライカ)HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORR対物レンズ。図5：(A)Fluar 5x/0.25 M27ドライ対物レンズ；(B)ライカHC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORR対物レンズ6.0ミリメートルの作動距離；(C)Top(トップ)：Fluar 5x/0.25 M27ドライ対物レンズおよびBottom(ボトム)(挿入)：LD LCIプラン-アポクロマート25x/0.8イム・コア-DIC M27マルチ浸漬対物レンズ；(D)ライカHC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORR対物レンズ；(E)LD LCIプラン-アポクロマート25x/0.8イム・コア-DIC M27マルチ浸漬対物レンズ。図6：(A)10x0.45 N.A.プラン-アポクロマートを有するツァイスLSM 780共焦点顕微鏡；(B)LD SCプラン-アポクロマート20x/1.0コア-M32 85ミリメートルスケール浸漬対物レンズ(作動距離5.6ミリメートル、ツァイス)。

【 0 1 6 5 】

図8：(B-C)ツァイス5x 0.25 N.A. Fluar対物レンズおよびLD LCIプラン-アポクロマート25x/0.8 N.A. マルチ浸漬対物レンズを有するツァイス780共焦点顕微鏡。(D)smFISHサンプルは、アンドール・イコン-Mカメラおよび追加の1.5xの倍率を有する60X/1.4NAプラン・アポI対物レンズを用い、ニコンTiエクリプス顕微鏡で画像化した。

【 0 1 6 6 】

図9：(A)LD LCIプラン-アポクロマート25x/0.8イム・コア-DIC M27マルチ浸漬対物レンズ。(E)Fluar 5x/0.25 M27ドライ対物レンズ。

【 0 1 6 7 】

図10：(B)左：LD LCIプラン-アポクロマート25x/0.8イム・コア-DIC M27マルチ浸漬対物レンズ；右：10x0.45 N.A.プラン-アポクロマートを有するツァイスLSM 780共焦点顕微鏡。

【 0 1 6 8 】

図12：10x 0.45 N.A.プラン-アポクロマートを有するツァイスLSM 780共焦点顕微鏡。

【 0 1 6 9 】

上述の種々の方法および技術は、本発明を遂行するための多数の方法を提供する。もちろん、必ずしも説明したすべての目的または利点がここに記載の任意の特定の実施態様に従って達成できるわけではないことを理解すべきである。したがって、たとえば、この技術での熟練した者は、本方法が、ここに教示され、または示唆されるように、必ずしも他の目的または利点を達成することなく、ここに教示されるような利点の一つの利点またはグループを達成または最適化する様式で実行されることができるとを認識するであろう。様々な選択肢がここに言及される。いくらかの好ましい実施態様は、特に、一つの、別の、またはいくつかの特色を含む一方、他のものは具体的に、一つの、別の、またはいくつかの特色を除外し、その一方、さらに他には、一つの、別の、またはいくつかの有利な特色を含むことによって特定の特色を軽減すると理解されるべきである。

【 0 1 7 0 】

さらに、熟練者は異なる実施態様から様々な特色の適用可能性を認識する。同様に、上

述されたように、様々な要素、特色、およびステップ、ならびに各々のそのような要素、特色またはステップについての他の知られた等価物は、ここに記載される原理に従って方法を実行するために、様々な組合せにおいて、この技術における通常の技量の者によって使用することができる。様々な要素、特色、およびステップの中で、いくらかのものは、多様な実施態様において、具体的に含まれ、および他のものは具体的に除外される。

【0171】

本出願は、一定の実施態様および例との関係で開示されるが、本出願の実施態様が、特に開示された実施形態を越えて他の代替実施態様および/または使用およびそれらの修飾および等価物にまで広がることは、この技術における熟練した者によって理解されるであろう。

【0172】

いくらかの実施態様において、用語「a(一の、不定冠詞)」および「an(前記“a”の母音の前形態)」および「the(その、定冠詞)」および本出願の特定の実施態様を説明する文脈において使用される類似の参照は(特に、以下の一定の請求の範囲との関係において)単数および複数の双方をカバーすると解釈することができる。ここでは、値の範囲の列挙は、単に、その範囲内に入るそれぞれ別個の値に個々に言及する簡単な方法として役立つことを意図する。ここにおいて他に示されない限り、各個別の値は、それが個々にこの中に規定されているかのように、本明細書中に組み込まれる。そうでなければここに示され、またはそうでなければ文脈によって明らかに矛盾するものでない限り、ここに記載のすべての方法は、任意の適切な順序で実行することができる。ここでの一定の実施態様に関して提供される、任意の、およびすべての例の使用、または例示的な言語(たとえば、「などのような」)は、より一層良好にアプリケーションを照明するようにだけ単に意図され、および他の方法でクレームする本出願の範囲に制限をもたらすものではない。本明細書中のいかなる用語も、本出願の実践に不可欠な任意の非請求的要素(any non-claimed element)を示すものとして解釈されるべきではない。

【0173】

本出願の好ましい実施態様は、本出願を遂行するために本発明者に知られる最良の形態を含め、ここに記載される。それらの好適な実施態様の変形(バリエーション)は、前述の説明を読めばこの技術において熟練した者に明らかになるであろう。熟練者が適宜そのような変形を採用することができることが考えられ、本適用(アプリケーション)が具体的にここに記載される以外の方法で実践することができる。したがって、本出願の多くの実施態様は、適用法令により許可されるような、添付の請求の範囲に規定する主題のすべての修飾および均等物を含む。また、すべての可能な変形における上記される要素の任意の組合せは、さもなければここに示され、またはそうでなければ文脈によって明らかに矛盾しない限り、本出願によって包含される。

【0174】

すべての特許、特許出願、特許出願の刊行物、および他の材料で、たとえば、ここにおいて参照される、そのような記事、書籍、仕様書、出版物、文書、物事、および/またはその種の他のものなどは、この参照によりここにその全体が、すべての目的で組み込まれるが、同じもの、または任意の同じもので、それが提示書類と矛盾するか、または抵触するもの、または任意の同じもので、目下の、またはその後提示書類と関係する請求の範囲の最も広い範囲に関して制限する影響をもつことがあるものと関連付けられる任意の訴追ファイル経過は除かれる。一例として、組み込まれた材料のいずれかと関連付けられる説明、定義、および/または用語の使用および提示書類に関連したものの間の任意の矛盾または抵触が存在するなら、提示書類における説明、定義、および/または用語の使用が優先すべきである。

【0175】

最後に、ここに開示される適用の実施態様が、適用の実施態様の原理の例示であることを理解すべきである。採用することができる他の修飾は、本出願の範囲の内にあることができる。それ故、一例として、しかし制限されないが、本出願の実施態様の代わりの構成

10

20

30

40

50

は、ここでの教示に従って利用することができる。したがって、本出願の実施態様は、厳密に図示して説明したようなものに制限されない。

【 0 1 7 6 】

参考文献

- Becker, K., Jahrling, N., Saghafi, S., Weiler, R., and Dodt, H.U. (2012). Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS ONE* 7, e33916.
- Becker, K., Jahrling, N., Saghafi, S., and Dodt, H.U. (2013). Ultramicroscopy: light-sheet-based microscopy for imaging centimeter-sized objects with micrometer resolution. *Cold Spring Harbor protocols* 2013, 704-713. 10
- Buxbaum, A.R., Wu, B., and Singer, R.H. (2014). Single b-actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science* 343, 419-422.
- Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). CLARITY for mapping the nervous system. *Nat. Methods* 10, 508-513.
- Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., et al. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332-337.
- Deisseroth, K.A., and Gradinaru, V. (2014). Functional Targeted Brain Endoskeletonization. U.S.patent US2014030192. 20
- Dodt, H.-U., Leischner, U., Schierloh, A., Jahrling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgansberger, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat. Methods* 4, 331-336.
- Erturk, A., and Bradke, F. (2013). High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). *Exp. Neurol.* 242, 57-64.
- Erturk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.-U. (2012a). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* 7, 1983-1995. 30
- Famm, K., Litt, B., Tracey, K.J., Boyden, E.S., and Slaoui, M. (2013). Drug discovery: a jump-start for electroceuticals. *Nature* 496, 159-161.
- Femino, A.M., Fay, F.S., Fogarty, K., and Singer, R.H. (1998). Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* 280, 585-590.
- Gage, G.J., Kipke, D.R., and Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J. Vis. Exp.* 65, 3564.
- George, M.S., Sackeim, H.A., Rush, A.J., Marangell, L.B., Nahas, Z., Husain, M.M., Lisanby, S., Burt, T., Goldman, J., and Ballenger, J.C. (2000). Vagus nerve stimulation: a new tool for brain research and therapy. *Biol. Psychiatry* 47, 287-295. 40
- Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* 14, 1481-1488.
- Harmsen, M.M., and De Haard, H.J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 13-22.
- Hoffman, A.S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 3-12. 50

- Jonkers, B.W., Sterk, J.C., and Wouterlood, F.G. (1984). Transcardial perfusion fixation of the CNS by means of a compressed-air-driven device. *J. Neurosci. Methods* 12, 141-149.
- Ke, M.-T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci.* 16, 1154-1161.
- Kim, S.Y., Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). Light microscopy mapping of connections in the intact brain. *Trends Cogn. Sci.* 17, 596-599.
- Kuwajima, T., Sitko, A.A., Bhansali, P., Jurgens, C., Guido, W., and Mason, C. (2013). ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development* 140, 1364-1368. 10
- Leong, S.K., and Ling, E.A. (1990). Labelling neurons with fluorescent dyes administered via intravenous, subcutaneous or intraperitoneal route. *J. Neurosci. Methods* 32, 15-23.
- Li, T., Bourgeois, J.P., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A.M., Mecheri, S., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.O., Rougeon, F., and Lafaye, P. (2012). Cell penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J.* 26, 3969-3979. 20
- Lock, M., Alvira, M., Vandenberghe, L.H., Samanta, A., Toelen, J., Debyser, Z., and Wilson, J.M. (2010). Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Hum. Gene Ther.* 21, 1259-1271.
- Lyubimova, A., Itzkovitz, S., Junker, J.P., Fan, Z.P., Wu, X., and van Oudenaarden, A. (2013). Single-molecule mRNA detection and counting in mammalian tissue. *Nat. Protoc.* 8, 1743-1758.
- Moy, A.J., Wiersma, M.P., and Choi, B. (2013). Optical histology: a method to visualize microvasculature in thick tissue sections of mouse brain. *PLoS ONE* 8, e53753.
- Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje-Kenna, M., and Asokan, A. (2011). Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. *Mol. Ther.* 19, 1070-1078. 30
- Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S.A., van Oudenaarden, A., and Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat. Methods* 5, 877-879.
- Spalteholz, W. (1914). *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten* (Leipzig: S. Hierzel).
- Steinke, H., and Wolff, W. (2001). A modified Spalteholz technique with preservation of the histology. *Ann. Anat.* 183, 91-95.
- Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., et al. (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157, 726-739. 40
- Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B., and Deisseroth, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat. Protoc.* 9, 1682-1697.
- Tseng, S.J., Lee, Y.H., Chen, Z.H., Lin, H.H., Lin, C.Y., and Tang, S.C. (2009). Integration of optical clearing and optical sectioning microscopy for three dimensional imaging of natural biomaterial scaffolds in thin sections. *J. Biomed. Opt.* 14, 044004.
- Zhang, M.D., Tortoriello, G., Hsueh, B., Tomer, R., Ye, L., Mitsios, N., Borgius, L., Grant, G., Kiehn, O., Watanabe, M., et al. (2014). Neuronal calcium-binding 50

ing proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, E1149-E1158.

【 0 1 7 7 】

補足参考文献

Becker, K., Jahrling, N., Saghafi, S., Weiler, R., and Dodt, H.-U. (2012). Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS one* 7, e33916.

Chen, Y.H., Chang, M., and Davidson, B.L. (2009). Molecular signatures of disease brain endothelia provide new sites for CNS-directed enzyme therapy. *Nature medicine* 15, 1215-1218.

Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). CLARITY for mapping the nervous system. *Nature methods* 10, 508-513.

Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., et al. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332-337.

Dodt, H.-U., Leischner, U., Schierloh, A., Jahrling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgansberger, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature methods* 4, 331-336.

Erturk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.-U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nature protocols* 7, 1983-1995.

Erturk, A., and Bradke, F. (2013). High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). *Experimental neurology* 242, 57-64.

Erturk, A., Mauch, C.P., Hellal, F., Forstner, F., Keck, T., Becker, K., Jahrling, N., Steffens, H., Richter, M., Hubener, M., et al. (2012). Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nature medicine* 18, 166-171.

Gage, G.J., Kipke, D.R., and Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature neuroscience* 14, 1481-1488.

Jonkers, B., Sterk, J., and Wouterlood, F. (1984). Transcardial perfusion fixation of the CNS by means of a compressed-air-driven device. *Journal of neuroscience methods* 12, 141-149.

Jung, Y., Ng, J.H., Keating, C.P., Senthil-Kumar, P., Zhao, J., Randolph, M.A., Winograd, J.M., and Evans, C.L. (2014). Comprehensive Evaluation of Peripheral Nerve Regeneration in the Acute Healing Phase Using Tissue Clearing and Optical Microscopy in a Rodent Model. *PLoS ONE* 9, e94054.

Ke, M.-T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature neuroscience* 16, 1154-1161.

Ke, M.T., and Imai, T. (2014). Optical clearing of fixed brain samples using SeeDB. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley [et al]* 66, Unit 2.22.

Kim, S.Y., Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). Light microscopy mapping of c

10

20

30

40

50

connections in the intact brain. *Trends in Cognitive Sciences* 17, 596-599.

Kuwajima, T., Sitko, A.A., Bhansali, P., Jurgens, C., Guido, W., and Mason, C. (2013). ClearT: a detergent-and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development* 140, 1364-1368.

Li, T., Bourgeois, J.P., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A.M., Mecheri, S., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.O., Rougeon, F., et al. (2012). Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 3969-3979. 10

Lock, M., Alvira, M., Vandenberghe, L.H., Samanta, A., Toelen, J., Debyser, Z., and Wilson, J.M. (2010). Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Hum Gene Ther* 21, 1259-1271.

Lubeck, E., Coskun, A.F., Zhiyentayev, T., Ahmad, M., and Cai, L. (2014). Single-cell in situ RNA profiling by sequential hybridization. *Nat Meth* 11, 360-361.

Perruchini, C., Pecorari, F., Bourgeois, J.P., Duyckaerts, C., Rougeon, F., and Lafaye, P. (2009). Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. *Acta neuropathologica* 118, 685-695.

Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Asokan, A. (2011). Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 1070-1078. 20

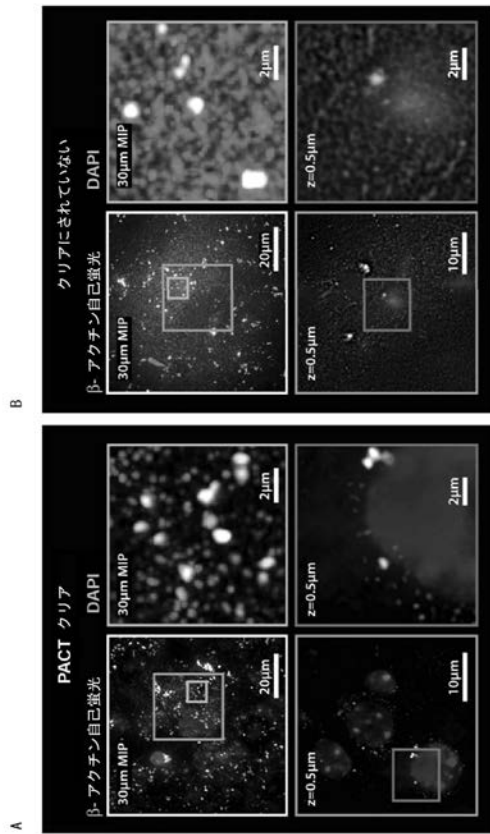
Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., and Yamaguchi, S. (2014). Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *Cell*.

Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B., and Deisseroth, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nature protocols* 9, 1682-1697. 30

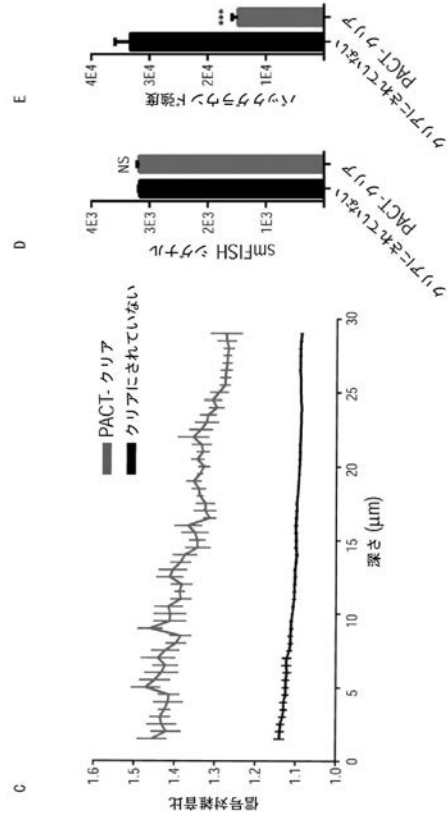
Zhang, M.D., Tortoriello, G., Hsueh, B., Tomer, R., Ye, L., Mitsios, N., Borgius, L., Grant, G., Kiehn, O., Watanabe, M., et al. (2014). Neuronal calcium-binding proteins  $\frac{1}{2}$  localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E1149-1158.



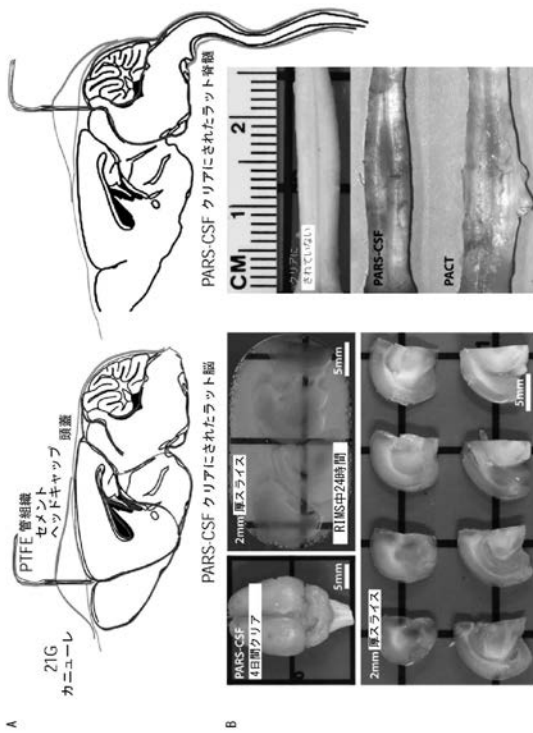
【 図 2 - 1 】



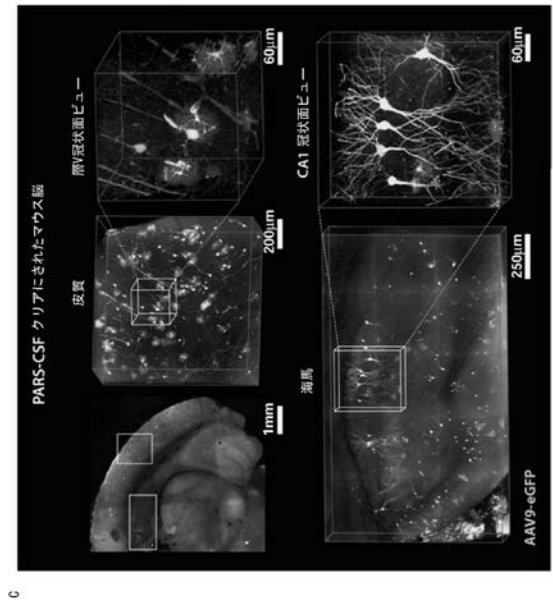
【 図 2 - 2 】



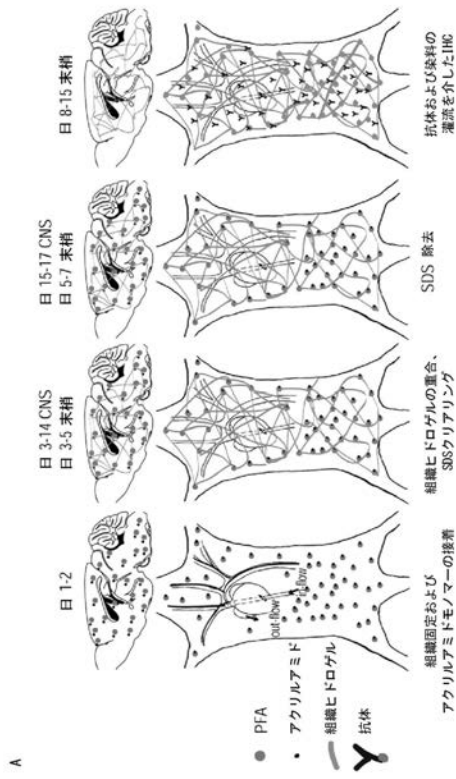
【 図 3 - 1 】



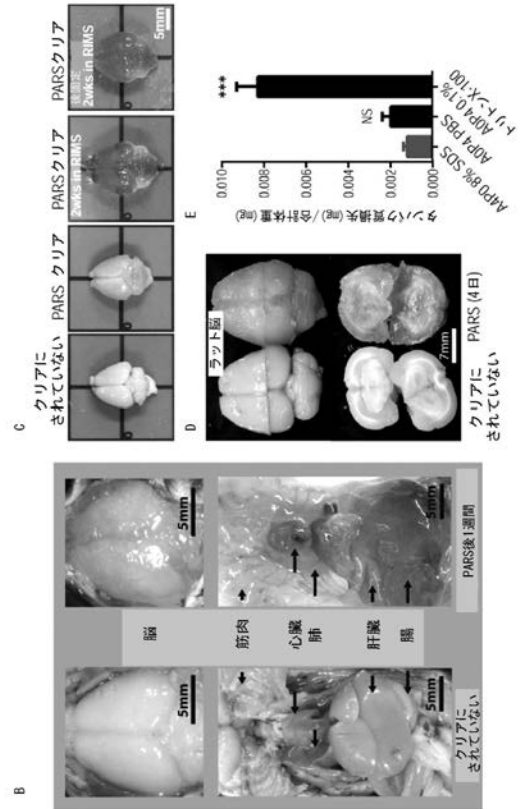
【 図 3 - 2 】



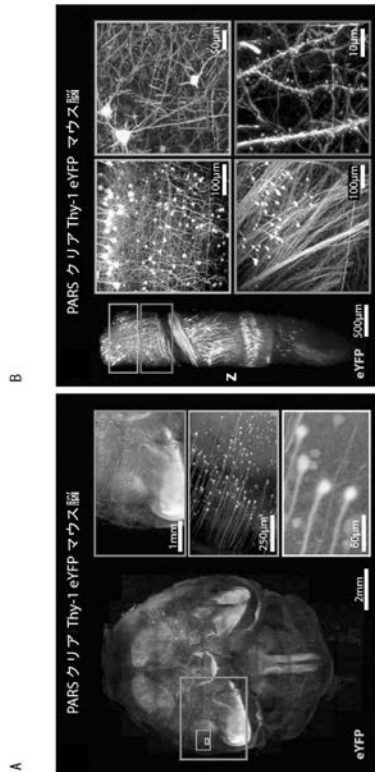
【 図 4 - 1 】



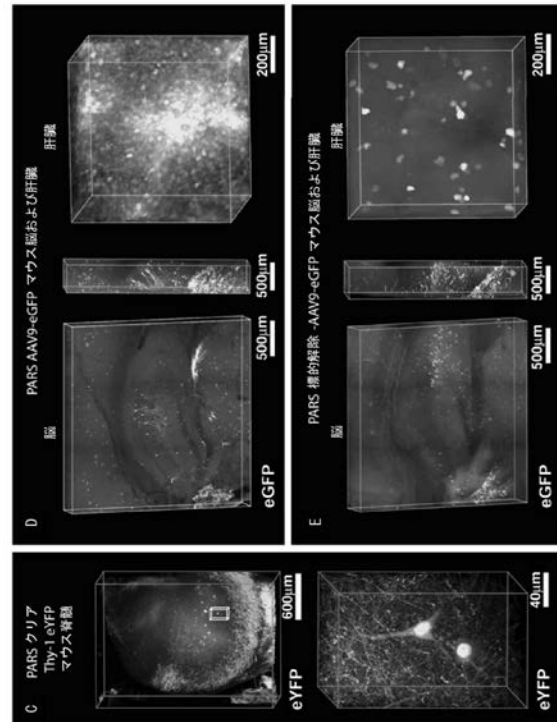
【 図 4 - 2 】



【 図 5 - 1 】



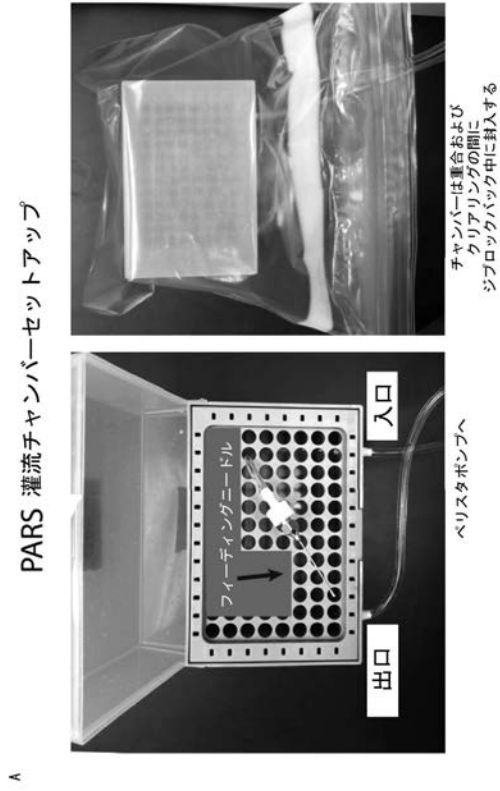
【 図 5 - 2 】



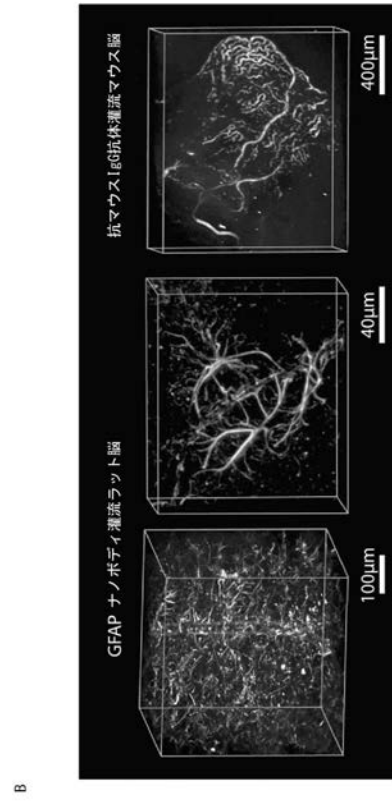




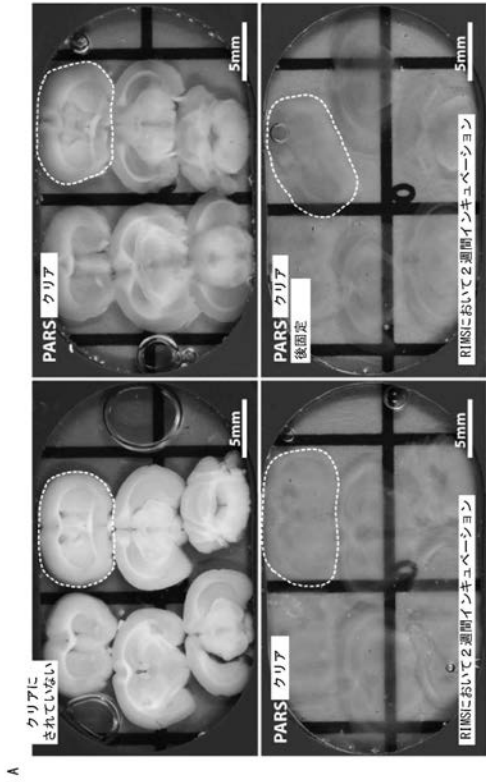
【 図 1 0 - 1 】



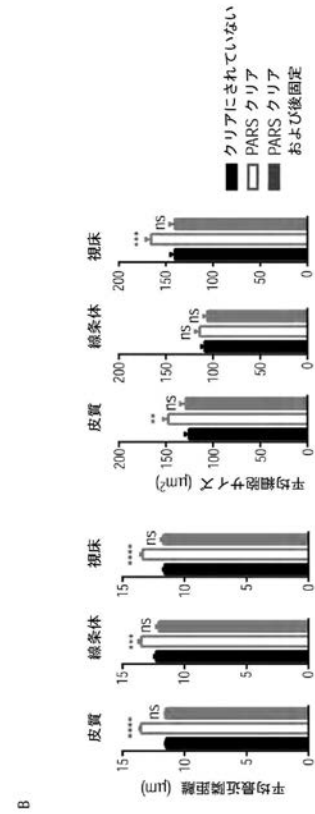
【 図 1 0 - 2 】



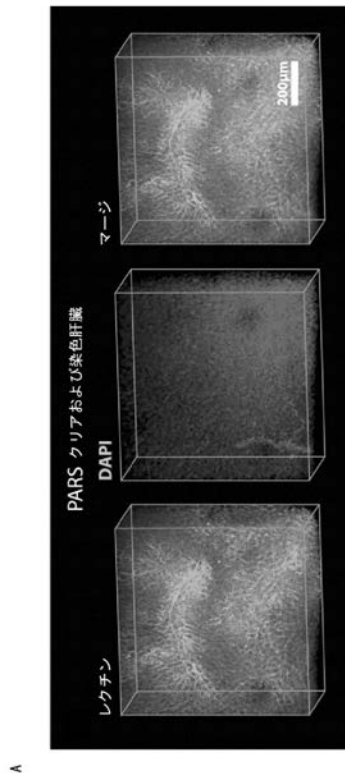
【 図 1 1 - 1 】



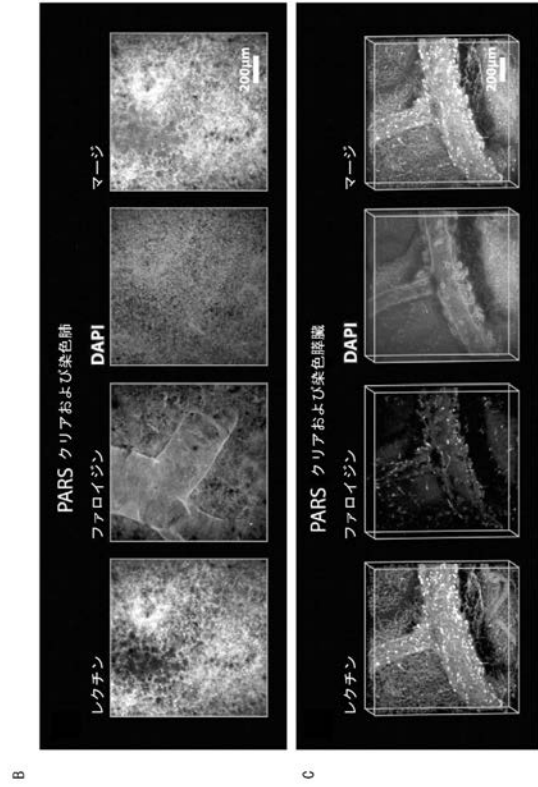
【 図 1 1 - 2 】



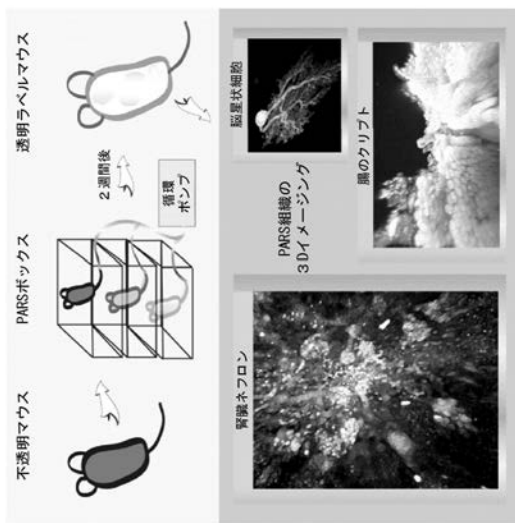
【 図 1 2 - 1 】



【 図 1 2 - 2 】



【 図 1 4 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成28年4月22日(2016.4.22)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

組織の構造的および/または光学的な特性を修飾するにあたり、パラホルムアルデヒド(PFA)が含まれる固定液を組織に適用することであり、それによって、固定された組織が形成されること、およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液(PBS)が含まれるヒドロゲルモノマー溶液を、固定された組織に適用することであり、それによって、ヒドロゲル処置された組織が形成されることを含む(生きた人間を除く)方法。

【請求項2】

さらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、固定された組織に適用されることが含まれる、請求項1の方法。

【請求項3】

ヒドロゲルモノマー溶液には、1% (w/v) から20% (w/v) まででアクリルアミドが含まれる、請求項1の方法。

【請求項4】

さらに、ヒドロゲル処置された組織が実質気密なチャンパー中に配置されること、および窒素が実質気密なチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された組織が形成されることが含まれる、請求項3の方法。

【請求項5】

さらに、脱気された組織が15 から60 まででインキュベーションされることが含まれ、それによって、インキュベーションされた組織が形成される、請求項4の方法。

【請求項6】

さらに、インキュベーションされた組織がPBSを用いて洗浄されることが含まれ、それによって、洗浄され、かつ、インキュベーションされた組織が形成される、請求項5の方法。

【請求項7】

さらに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が含まれる清浄液が、洗浄され、かつ、インキュベーションされた組織に適用されることが含まれ、それによって、クリアにされた組織が形成される、請求項6の方法。

【請求項8】

清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいて、1% (w/v) から30% (w/v) までのSDSが含まれる、請求項7の方法。

【請求項9】

さらに、PBSが、クリアにされた組織に適用されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された組織が形成される、請求項8の方法。

【請求項10】

さらに、イメージング媒体が、クリアにされ、かつ、洗浄された組織に適用されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨー

ド-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2)ホスファート緩衝剤；(3)ツウィーン20；(4)アジ化ナトリウム；および随意に(5)水酸化ナトリウムが含まれる、請求項9の方法。

【請求項11】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項10の方法。

【請求項12】

組織は生検から得られる、請求項11の方法。

【請求項13】

組織はがん性または前がん性である、請求項12の方法。

【請求項14】

組織を免疫染色するにあたり、一次抗体が含まれる溶液が、請求項9のクリアにされ、かつ、洗浄された組織に適用されることを含み、それによって、抗体結合組織が形成される(生きた人間を除く)方法。

【請求項15】

さらに、緩衝剤溶液を用いて、抗体結合組織がリンスされることが含まれる、請求項14の方法。

【請求項16】

さらに、二次抗体が含まれる溶液が、前記緩衝剤溶液を用いて洗浄された抗体結合組織に適用されることが含まれ、そこでは、二次抗体は視覚化可能なマーカを用いて標識される、請求項15の方法。

【請求項17】

視覚化可能なマーカは蛍光性である、請求項16の方法。

【請求項18】

一次抗体は視覚化可能なマーカを用いて標識される、請求項14の方法。

【請求項19】

視覚化可能なマーカは蛍光性である、請求項18の方法。

【請求項20】

組織は生検から得られる、請求項14-18のいずれかの方法。

【請求項21】

免疫染色された組織を視覚化するにあたり、顕微鏡を、請求項16の方法に従って調製された免疫染色された組織を視覚化するために利用することを含み(生きた人間を除く)方法。

【請求項22】

顕微鏡は、共焦点顕微鏡法、スピニングディスク顕微鏡法、落射蛍光顕微鏡法、光照射野顕微鏡法、ライトシート顕微鏡法、多光子顕微鏡法からなる群より選ばれる顕微鏡法の形態を履行するために利用される、請求項21の方法。

【請求項23】

組織の構造的および/または光学的な特性をイン・シトゥーにて修飾するにあたり、パラホルムアルデヒド(PFA)が含まれる固定液が、対象の循環系中に導入されることであり、それによって、固定された組織が対象内に形成されること、およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液(PBS)が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象の循環系中に導入されることであり、それによって、ヒドロゲル処置された組織が対象内に形成されることを含む(生きた人間を除く)方法。

【請求項24】

ヒドロゲルモノマー溶液には、1% (w/v) から20% (w/v) まででアクリルアミドが含まれる、請求項23の方法。

## 【請求項 25】

さらに、PBSが含まれる溶液が、対象の循環系中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された組織が形成される、請求項24の方法。

## 【請求項 26】

さらに、  
実質気密なチャンパー中に対象が配置されること、および  
窒素がチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された対象が形成されること  
が含まれる、請求項25の方法。

## 【請求項 27】

さらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、脱気された対象の循環系中に導入されることが含まれる、請求項26の方法。

## 【請求項 28】

さらに、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が含まれる洗浄液が、対象の循環系中に導入されることが含まれ、それによって、対象内にクリアにされた組織が形成される、請求項27の方法。

## 【請求項 29】

洗浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいて、およそ1% (w/v) から30% (w/v) のSDSが含まれる、請求項28の方法。

## 【請求項 30】

さらに、PBSが対象の循環系中に導入されることを含み、それによって、対象内にクリアにされ、かつ、洗浄された組織が形成される、請求項29の方法。

## 【請求項 31】

さらに、イメージング媒体が対象の循環系中に導入されることが含まれ、ここでは、イメージング媒体には：(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2) ホスファート緩衝剤；(3) ツウィーン20；(4) アジ化ナトリウム；および随意に(5) 水酸化ナトリウムが含まれる、請求項30の方法。

## 【請求項 32】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項31の方法。

## 【請求項 33】

組織には、脳組織が含まれる、請求項32の方法。

## 【請求項 34】

組織には、脊髄組織が含まれる、請求項33の方法。

## 【請求項 35】

(1) 一以上の溶液は、ポンプに接続される第一チューブを通して対象の循環系中に導入され；(2) 一以上の溶液は、一以上の溶液が収集されるリザーバと流体連通する第二チューブを通して対象の循環系から除去され；および随意に(3) ポンプは、リザーバから一以上の収集された溶液を抜き取り、および一以上の溶液を、第一チューブを通して対象の循環系中に導入する、請求項32の方法。

## 【請求項 36】

組織をイン・シトゥーにて免疫染色するにあたり：

一次抗体が含まれる溶液が、請求項30の方法が適用された対象の循環系中に導入されることを含む (生きた人間を除く) 方法。

## 【請求項37】

さらに、対象の循環系中に緩衝剤溶液が導入されることが含まれる、請求項36の方法。

## 【請求項38】

さらに、二次抗体が含まれる溶液が、対象の循環系中に導入されることが含まれ、二次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される、請求項37の方法。

## 【請求項39】

視覚化可能なマーカーは蛍光性である、請求項38の方法。

## 【請求項40】

一次抗体は視覚化可能なマーカーを用いて標識される、請求項36の方法。

## 【請求項41】

視覚化可能なマーカーは蛍光性である、請求項40に記載の方法。

## 【請求項42】

免疫染色された組織をイン・シトウにて視覚化するにあたり：

請求項38の方法に従って調製された組織に係するマーカーを視覚化するために顕微鏡が利用されることを含む（生きた人間を除く）方法。

## 【請求項43】

(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2) ホスファート緩衝剤；(3) ツウィーン20；(4) アジ化ナトリウム；および随意に(5) 水酸化ナトリウムが含まれる、組成物。

## 【請求項44】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項43の組成物。

## 【請求項45】

脳組織の構造的および/または光学的特性をイン・シトウにて修飾するにあたり：

パラホルムアルデヒド(PFA)が含まれる固定液が、対象の脳脊髄液(CSF)中に導入されることであり、それによって、対象内に固定された脳組織が形成されること、およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液(PBS)が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象のCSF中に導入されることであり、それによって、ヒドロゲル処置された脳組織が対象内に形成されること  
を含む（生きた人間を除く）方法。

## 【請求項46】

ヒドロゲルモノマー溶液には、1% (w/v) から20% (w/v) まででアクリルアミドが含まれる、請求項45の方法。

## 【請求項47】

さらに、PBSが含まれる溶液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された脳組織が形成される、請求項46の方法。

## 【請求項48】

さらに、

実質気密なチャンパー中に対象または対象の脳が配置されること、および

窒素がチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された対象が形成されること  
が含まれる、請求項47の方法。

## 【請求項49】

さらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、脱気された対象のCSF中に導入されることが含まれる、請求項48の方法。

## 【請求項50】

さらに、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が含まれる清浄液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされた脳組織が対象内に形成される、請求項49の方法。

## 【請求項51】

清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいておよそ1% (w/v) から30% (w/v) のSDSが含まれる、請求項50の方法。

## 【請求項52】

さらに、PBSが対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された脳組織が対象内に形成される、請求項51の方法。

## 【請求項53】

さらに、イメージング媒体が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：（1）1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、（2）ホスファート緩衝剤；（3）ツウィーン-20；（4）アジ化ナトリウム；および随意に（5）水酸化ナトリウムが含まれる、請求項52の方法。

## 【請求項54】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項53の方法。

## 【請求項55】

一以上の溶液は頭蓋内の脳シャントを介して施与される、請求項45-54のいずれかの方法。

## 【請求項56】

一以上の溶液は、嗅球の直接上の領域において硬膜下に挿入される頭蓋内の脳シャントを介して施与される、請求項45-54のいずれかの方法。

## 【請求項57】

脊髄組織の構造的および/または光学的な特性をイン・シトゥーにて修飾するにあたり

：  
 パラホルムアルデヒド（PFA）が含まれる固定液が、対象の脳脊髄液（CSF）中に導入されることであり、それによって、固定された脊髄組織が対象内に形成されること；およびアクリルアミドおよびホスファート緩衝塩類溶液（PBS）が含まれるヒドロゲルモノマー溶液が、対象のCSF中に導入されることであり、それによって、ヒドロゲル処置された脊髄組織が対象内に形成されること  
 を含む（生きた人間を除く）方法。

## 【請求項58】

ヒドロゲルモノマー溶液には、1% (w/v) から20% (w/v) まででアクリルアミドが含まれる、請求項57の方法。

## 【請求項59】

さらに、PBSが含まれる溶液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、PBS洗浄された脊髄組織が形成される、請求項58の方法。

## 【請求項60】

さらに、実質気密なチャンパー中に対象が配置されること、および窒素がチャンパー中に導入されることであり、それによって、脱気された対象が形成されること  
 が含まれる、請求項59の方法。

## 【請求項61】

さらに、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリドが含まれる光開始剤溶液が、脱気された対象のCSF中に導入されることが含まれる、請求項60の方法。

【請求項62】

さらに、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が含まれる清浄液が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされた脊髄組織が対象内に形成される、請求項61の方法。

【請求項63】

清浄液には、0.01Mから1MまでのPBSにおいておよそ1% (w/v) から30% (w/v) のSDSが含まれる、請求項62の方法。

【請求項64】

さらに、PBSが対象のCSF中に導入されることが含まれ、それによって、クリアにされ、かつ、洗浄された脊髄組織が対象内に形成される、請求項63の方法。

【請求項65】

さらに、イメージング媒体が、対象のCSF中に導入されることが含まれ、そこでは、イメージング媒体には：(1) 1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミド、(2) ホスファート緩衝剤；(3) ツウィーン-20；(4) アジ化ナトリウム；および随意に(5) 水酸化ナトリウムが含まれる、請求項64の方法。

【請求項66】

1-N,3-N-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-5-[N-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アセトアミド]-2,4,6-トリヨードベンゼン-1,3-ジカルボキサミドまたは5-(N-2,3-ジヒドロキシプロピルアセトアミド)-2,4,6-トリヨード-N,N'-ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)イソフタルアミドの濃度は、10から100%w/vまでである、請求項65の方法。



【請求項67】

一以上の溶液は頭蓋内の脳シャントを介して施与される、請求項57-66のいずれかの方法。

【請求項68】

一以上の溶液は、背側下丘の直接上に挿入される頭蓋内の脳シャントを介して施与される、請求項57-66のいずれかの方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2014/048985</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>G01N 33/533(2006.01)i</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/533		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: CLARITY, microspic, hydrogel, acylamide, cell fixing, immunostaining, tissue clearing, optically-transparent, paraformaldehyde, whole organ, intact organ, cellular structure		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHUNG, K. et al., `Structural and molecular interrogation of intact biological systems`, Nature, 16 May 2013, Vol. 497, pp. 332-337 See abstract, methods, and pages 334, 335, 337.	1-68
A	LU, T. et al., `Modeling of two-phase polymerization of acrylamide in aqueous poly(ethylene glycol) solution`, AIChE Journal, 2011, Vol. 57, No. 9, pp. 2493-2504 See abstract.	1-68
A	ALBRECHT, D. R. et al., `Photo- and electropatterning of hydrogel-encapsulated living cell arrays`, Lab Chip, 2005, Vol. 5, pp. 111-118 See abstract and pages 111-112.	1-68
A	ERTURK, A. et al., `Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury`, Nature Medicine, 2012, Vol. 18, No. 1, pp. 166-171 See abstract.	1-68
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 November 2014 (25.11.2014)		Date of mailing of the international search report <b>25 November 2014 (25.11.2014)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer CHOI, Sung Hee  Telephone No. +82-42-481-8740

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. <b>PCT/US2014/048985</b>
---

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 69  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claim 69 is so unclear and insufficiently disclosed that it is not possible to carry out a meaningful search thereon (PCT Article 6).
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2014/048985**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BREDE, C. et al., 'Mapping immune processes in intact tissues at cellular resolution', The Journal of Clinical Investigation, 2012, Vol. 122, No. 12, pp. 4439-4446 See abstract.	1-68

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2014/048985**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
None			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
**G 0 2 B 21/34 (2006.01) G 0 2 B 21/34**

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ヴィヴィアナ グラディナル  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 1 1 ラ カナダ フリントリッジ パーム ドライブ 5 3 0 6

(72)発明者 ビン ヤン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 1 2 5 パサデナ イー カリフォルニア ブルーバード 1 2 0 0

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA26 AA29 BA14 BB22 BB23 BB24 CB01 FA16 FB12  
 2G052 AA35 AB18 AD14 AD34 AD54 FA02 FA09 GA32  
 2G054 AA08 AB05 BB20 CE02 EA03 EB02 GA04 GA05 JA02 JA10  
 2H052 AA08 AA09 AE07 AE13

专利名称(译)	完整组织的表型分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016538569A</a>	公开(公告)日	2016-12-08
申请号	JP2016544323	申请日	2014-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	加州理工学院		
申请(专利权)人(译)	加州理工学院		
[标]发明人	ヴィヴィアナグラディナル ビンヤン		
发明人	ヴィヴィアナ グラディナル ビン ヤン		
IPC分类号	G01N1/30 G01N1/28 G01N33/48 G01N33/53 G01N21/78 G02B21/34		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/57492 G01N2001/302 G01N2001/305		
FI分类号	G01N1/30 G01N1/28.J G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N21/78.C G02B21/34		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/BA14 2G045/BB22 2G045/BB23 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB12 2G052/AA35 2G052/AB18 2G052/AD14 2G052/AD34 2G052/AD54 2G052/FA02 2G052/FA09 2G052/GA32 2G054/AA08 2G054/AB05 2G054/BB20 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EB02 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/JA02 2G054/JA10 2H052/AA08 2H052/AA09 2H052/AE07 2H052/AE13		
代理人(译)	杉村健二 池田 浩		
优先权	61/880401 2013-09-20 US 61/992103 2014-05-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

在各种实施方案中，本申请教导了用于组织清除的方法和组合物，其中整个器官和身体被赋予大分子可透过性和光学透明性，从而暴露其具有完整连通性的细胞结构。在一些实施方案中，本申请教导PACT，用于完整器官的被动组织清除和免疫染色的方案。在其他实施例中，本申请教导了RIMS，用于对厚组织成像的折射率匹配介质。在其他实施方案中，本申请教导了PARS，一种用于全身清除和免疫标记的方法。

FIG. 14

