

## 透明化試薬を用いたカイコ胚の観察

酒井 弘貴・富田 秀一郎

### Hiroki SAKAI and Shuichiro TOMITA: Observation of Silkworm Embryos Using a Tissue-clearing Reagent\*

Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, 1–2Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305–8634, Japan  
E-mail: tomita@affrc.go.jp (ST)

カイコの胚発生は、養蚕業の蚕種保護取扱いにおける重要性から、古くから様々な研究がなされている(高見・北沢, 1960; 大槻・村上, 1968)。近年、光学技術の発展による顕微鏡の進歩に伴って、それに適した新しい組織標本の作成手法が開発されている。そこで我々はカイコの胚発生に関しても、それらの新しい手法によって作成された標本を観察することで、今まで観察できなかった形態学・組織学的な特徴を捉えることができるのではないかと考えた。

中でも目覚ましい進歩を遂げている観察手法の一つとして、組織の透明化(Kurihara et al., 2015; Tainaka et al., 2016)があげられる。組織を透明にすることで、これまで切片を作成する必要があった組織深部が簡単に観察でき、しかも組織内の三次元構造を正確に捉えることができる。多くの場合、組織の透明化は、観察組織から光吸収体や高屈折率成分の除去と、組織と溶媒の屈折率を近づけることによってなされる。この目的のために開発されている透明化試薬は、組織へのダメージを最小限

に抑えつつ透明化できるため、組織深部の微細な形態の三次元観察が可能になる。

本研究では、カイコ胚を観察する目的で、透明化技術であるCUBIC(Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis)法(Tainaka et al., 2014)に着目した。CUBIC法で使用されている透明化試薬には、尿素とアミノアルコールが含まれており、尿素には組織の屈折率を最適化する働きが、アミノアルコールには生体色素を除去する働きがある(Tainaka et al., 2014)。このCUBIC法は、哺乳類の組織に最適化されているが、CUBIC法とキレート剤や過酸化水素水処理を併用することで、昆虫(Kuroda and Kuroda, 2020)および甲殻類(Konno and Okazaki, 2018)の組織にも応用できることが報告されている。

我々は、卵殻を取り除いたカイコ卵に対して、透明化処理を行ったところ、様々なステージで透明化に成功した(Fig. 1)。次に、透明化に成功した卵に対して4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)で核染色を行い、

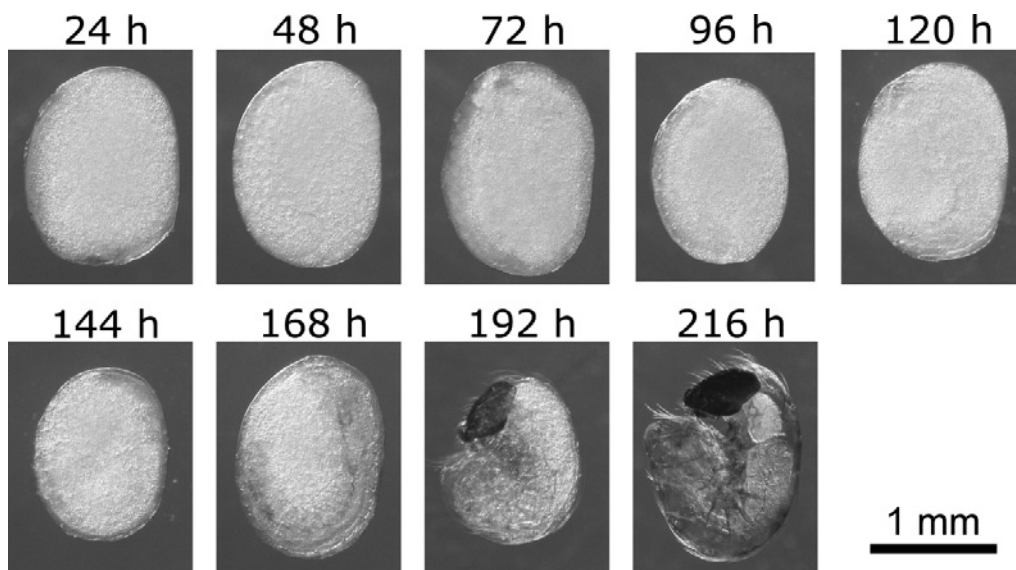


Fig. 1 Clearing of the *Bombyx mori* eggs at 24–216 h after egg-laying. Scale = 1 mm.

\* Abstract of paper read at the 57th Annual Meeting of the Arthropodan Embryological Society of Japan, July 9–10, 2021, Ushiku-numa, Ibaraki, Japan.

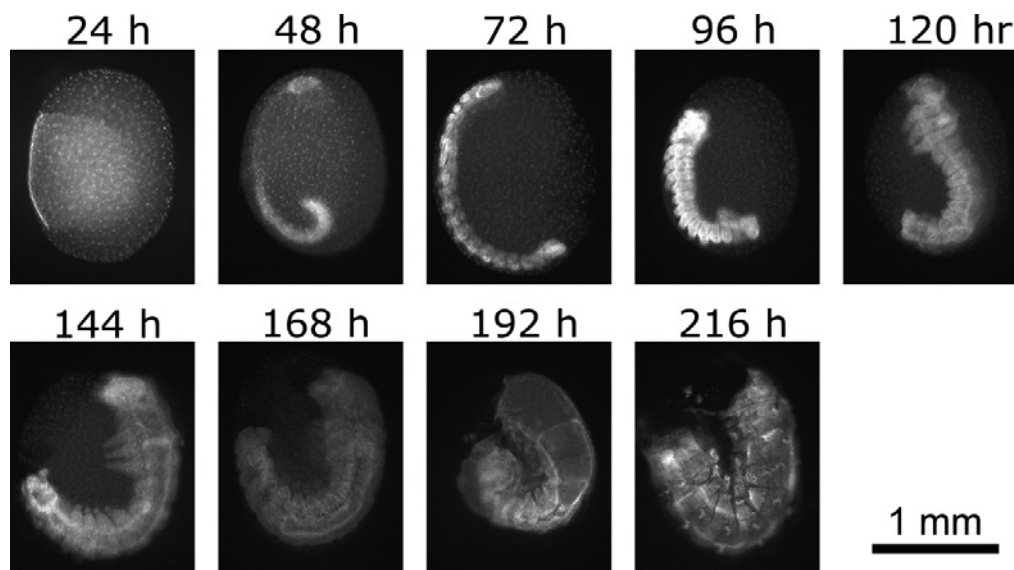


Fig. 2 DAPI staining of cleared *Bombyx mori* eggs at 24–216 h after egg-laying. Scale = 1 mm.

蛍光実体顕微鏡で、胚の形態を観察した (Fig. 2)。その結果、産卵後 24 h では胚帯が観察され、その後、産卵後 168 h で、胚全体が明瞭に観察できた。しかし、産卵後 192 h 以降は、ヘッドカプセルの脱色が不完全なため DAPI 染色による頭部内部の形態観察は難しかった。

続いて、この透明化手法を用いて、受精時期の核の挙動を観察したところ、卵核や精子核の挙動を明確に観察できた。透明化手法によってカイコ受精期の核の挙動を観察した本研究成果は、査読付き論文に受理された (Sakai et al., 2022)。

以上のことから、カイコ卵における透明化は、胚の観察において、非常に有効な方法であり、今後、この方法を用いることで、今まで捉えることができなかった形態学・組織学的な特徴を観察できることが期待される。

#### 引用文献

- Konno, A. and S. Okazaki (2018) Aqueous-based tissue clearing in crustaceans. *Zoological Letters*, **4**, 13.  
 Kurihara, D., Y. Mizuta, Y. Sato and T. Higashiyama (2015) ClearSee: A rapid optical clearing reagent for whole-plant

- fluorescence imaging. *Development*, **142**, 4168–4179.  
 Kuroda, M. and S. Kuroda (2020) Whole-body clearing of beetles by successive treatment with hydrogen peroxide and CUBIC reagents. *Entomological Science*, **23**, 311–315.  
 大槻良樹・村上昭雄 (1968) カイコ卵の発生初期における核分裂について. *動物学雑誌*, **77**, 383–387.  
 Sakai, H., T. Yokoyama and S. Tomita (2022) Observing silkworm embryos at the fertilization stage using a tissue clearing reagent. *Journal of Insect Physiology*, doi: 10.1016/j.jinsphys.2022.104386.  
 Tainaka, K., S.I. Kubota, T.Q. Suyama, E.A. Susaki, D. Perrin, M. Ukai-Tadenuma, H. Ukai and H.R. Ueda (2014) Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell*, **159**, 911–924.  
 Tainaka, K., A. Kuno, S.I. Kubota, T. Murakami and H.R. Ueda (2016) Chemical principles in tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **32**, 713–741.  
 高見丈夫・北沢敏男 (1960) 家蚕の胚発生段階表 I. 日122号, 日124号, 支122号, 支124号. *蚕糸試験場彙報*, **75**, 1–31.