

バイオフィーム透明化法 iCBiofilm の開発と 透明化ライブセルイメージングへの応用

杉本 真也^{1,2,3} 金城 雄樹^{1,2}

¹ 東京慈恵会医科大学細菌学講座

² 東京慈恵会医科大学先端医学推進拠点群バイオフィーム研究センター

³ 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センタープロジェクト研究部アミロイド制御研究室

DEVELOPMENT OF iCBIOFILM, A METHOD FOR INSTANTANEOUS CLEARING OF BIOFILM: AN OPTICAL APPROACH TO VISUALIZE BIOFILMS AND ITS APPLICATION FOR LIVE CELL IMAGING

Shinya SUGIMOTO^{1,2,3} and Yuki KINJO^{1,2}

¹Department of Bacteriology, The Jikei University School of Medicine

²Center for Biofilm Science and Technology, Centers of Advanced Medicine, The Jikei University School of Medicine

³Laboratory of Amyloid Regulation, Research Center for Medical Sciences, The Jikei University School of Medicine

Biofilms are highly organized microbial communities that form on abiotic or biotic surfaces and can be tolerant of antimicrobial agents and host defense systems. Therefore, biofilms cause various chronic human infectious diseases, such as catheter-related bloodstream infections, urinary tract infections, and endocarditis. To better understand the structures and functions of biofilms, including their interactions with hosts and other microbes and their responses to antimicrobials, strategies that enable rapid and efficient visualization must first be developed. Recently, we have developed a whole-biofilm clearing and fluorescent imaging method, termed instantaneous clearing of biofilm (iCBiofilm). This method is a rapid and efficient technique involving only immersion of biofilms in a refractive index-matching solution, enabling instant whole-biofilm imaging with fluorescent microscopy. iCBiofilm is broadly applicable for multicolor imaging of immunostained matrix components and fluorescence-labeled cells in biofilms with a thickness of several hundred micrometers. iCBiofilm is expandable from bacterial to fungal biofilms and can be used to analyze biofilm-neutrophil interactions. We have also developed nonfixing iCBiofilm, which enables live cell imaging of biofilm development and the actions of antimicrobials. Therefore, iCBiofilm represents an important advance for examining the dynamics and functions of biofilms. (Tokyo Jikeikai Medical Journal 2023;138:131-8)

Key words : Biofilms, Optical clearing method, iCBiofilm, live cell imaging, fluorescent microscopy

I. 緒 言

微生物は人工物や生体などの表面に付着して増殖し、バイオフィームと呼ばれる集合体を形成する。地球上に生息する微生物の大部分 (40~80%) はバイオフィームを形成していると考えられており、地表や地中、水圏、動物や昆虫の体表

と腸内、植物表面や根圏など、地球上の至るところに存在する¹⁾。バイオフィームは身近なところにも多く存在し、例えば、お風呂のバスタブや台所のシンクのヌメリ、あるいは歯垢などもバイオフィームの一種である。医療現場では、中心静脈カテーテルや人工関節、ペースメーカーなどの体内留置型医療デバイスにバイオフィームが形成さ

れると、その内部の細菌が抗菌薬やヒトの免疫による排除機能に抵抗性を示すようになり、難治性の感染症の原因となる²⁾³⁾。場合によっては、バイオフィームが付着した医療デバイスを外科的に除去する必要があり、患者への負担と医療費の拡大が問題となる。そのような事態を回避するためには、バイオフィームのことを科学的に正しく理解した上で、バイオフィームの形成を阻害したり、すでに形成されたバイオフィームを除去したり、部分的にバイオフィームを壊して抗菌薬が働きやすくなるなど、バイオフィームを人為的に制御する技術を開発することが必要である。バイオフィームはこのようなヒトの難治性感染症や齧蝕の例だけでなく、動植物の病気⁴⁾、水道管の詰まり⁵⁾、金属腐食⁶⁾ など多種多様な問題に関連している。一方、バイオフィームは発酵飲食物の製造や水の浄化など、ヒトの生活に有益な場合もある⁷⁾。このように、バイオフィームは医学や生命科学だけでなく、工学、環境問題、食糧生産など、幅広い分野において重要な研究対象である。

バイオフィームの内部では、菌体外マトリクスによって微生物の塊が覆われることで、様々な外的なストレス（温度、乾燥、pH、抗菌薬、宿主免疫系の抗菌作用など）に対して抵抗性を示すと考えられている⁸⁾。菌体外マトリクスは、主に微生物自身が菌体外に産生する細胞外高分子物質（EPS, extracellular polymeric substances）によって構成されるが、代表的なEPSは多糖、タンパク質、および核酸（DNA）などである（Fig.1）。EPSは

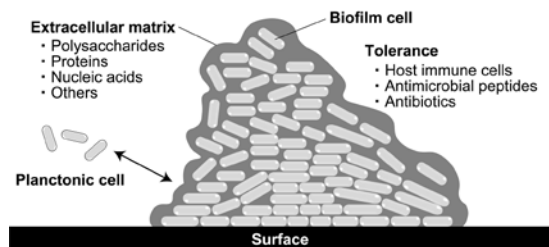


Fig.1. Schematic illustration of a biofilm. Biofilms are highly organized microbial communities formed on abiotic or biotic surfaces. Within a biofilm, microbial cells are embedded in the extracellular matrix composed of polysaccharides, proteins, nucleic acids, and others. The biofilm cells can be tolerant to antimicrobial agents and host defense systems. Biofilm formation starts from the attachment of planktonic cells to a surface. During and after biofilm maturation, planktonic cells can be released from the biofilm.

微生物細胞同士の接着や微生物細胞の固体表面への付着に重要な役割を果たすが、EPSの組成や量はバイオフィームの性質（形成量や頑強性）と深く関わっており、菌種だけでなく菌株レベルで大きく異なる。EPSの中で特にDNAは、様々な菌種のバイオフィームの形成に利用されている普遍的な成分である⁹⁾¹⁰⁾。バイオフィームの形成メカニズムやバイオフィームの生理機能（抗菌物質や免疫に対する抵抗性など）を理解するためには、バイオフィームの構造やその内部の微生物の生理状態、遺伝子発現の変動、EPSの種類や動態などを詳しく解析することが重要である。

II. 従来のバイオフィームの観察技術とその問題

1. 共焦点レーザー顕微鏡

生命現象を理解する上で、顕微鏡を使って対象とする生物を観察することは最も基本的かつ重要な手法である。これまでバイオフィームの観察に最も頻繁に使用されてきた顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡である¹¹⁾¹²⁾。小さく絞ったレーザー光で試料を走査して画像を取得し、蛍光シグナルを検出する際に焦点位置以外の光をピンホールで除去することで深さ方向に分解能が生じ、光学的断層像を得ることができる。そのため、光を全面に照射する一般の顕微鏡と違って、厚い試料でも焦点を合わせた蛍光像を取得することが可能である。そして、焦点面を上下させて取得した二次元画像をもとにバイオフィームの立体的な三次元像をコンピューター上で再構成することができる。微生物細胞やEPSに特異的に結合する蛍光プローブや蛍光標識抗体などを用いれば、バイオフィームの全体構造だけでなく、内部の微生物細胞やEPSの局在を可視化できることも大きな利点である。また、緑色蛍光タンパク質のような蛍光タンパク質を利用することで、バイオフィーム内部の微生物の遺伝子発現や生理状態のバラツキを1細胞レベルでモニターすることも可能である。

2. 超解像顕微鏡

光学顕微鏡で観察できる空間分解能は理論上、観察に用いる光の波長の半分程度（約200 nm）

であることが示されている。これまでに、この光の回折限界を超えるイメージング法が考案され、超解像顕微鏡法と呼ばれている。例えば、誘導放出抑制顕微鏡法 (STED: Stimulated Emission Depletion Microscopy)¹³⁾、確率的光学再構築顕微鏡 (STORM: Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)¹⁴⁾¹⁵⁾、光活性化局在性顕微鏡法 (PALM: Photo-Activated Localization Microscopy)¹⁶⁾、構造化照明顕微鏡法 (SIM: Structured Illumination Microscopy)¹⁷⁾などが超解像顕微鏡法の代表例である。これらの超解像顕微鏡法では、場合によっては数nm程度の解像度を達成できる。バイオフィームの研究分野では、コレラ菌のバイオフィームにおける複数の細胞外マトリクス成分の局在がSTORMを用いてマルチカラーとして可視化されている¹⁸⁾。

3. 二光子顕微鏡

組織や臓器のような生体試料は厚みがあり、これらの深部観察は従来の光学顕微鏡法では困難である。この問題に対する一つの解決策が二光子顕微鏡法である。特殊な赤外光パルスレーザーを用いることで、焦点の合った深度でだけ蛍光色素を光らせることができるため、より鮮明な像を得ることができ、深さを少しずつ変えながら撮像していくことで三次元蛍光画像を得ることができる。共焦点レーザー顕微鏡に比べると、光散乱の影響を受けにくい長波長のレーザーを使うため、より深くまで可視化することが可能である。しかし、空間分解能は共焦点レーザー顕微鏡に若干劣るといわれている。バイオフィームの研究分野でも二光子顕微鏡を用いた観察例が報告されており、10種類の口腔細菌からなる混合菌種のバイオフィームにおいて二光子顕微鏡のほうが共焦点レーザー顕微鏡よりも4倍の深さまで観察できると報告されている。しかし、深さが25 μm を超えると蛍光強度が20%以下まで低下するため、二光子顕微鏡といえども分厚いバイオフィームの深部観察は困難である¹²⁾。

4. ライトシート顕微鏡

ライトシート顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡や二光子顕微鏡と同じく、光学切片を得ることで三

次元(XYZ)あるいは時間軸を含め四次元(XYZT)の蛍光像を撮影できる蛍光顕微鏡法である¹⁹⁾。ライトシート顕微鏡では、照射用と検出用の対物レンズが直角に配置されており、検出用対物レンズの焦点面に向かってシート状に整形された光(ライトシート)が照射されることで光学切片を取得する。共焦点レーザー顕微鏡は点でスキャンするのに対して、ライトシート顕微鏡は面で撮影する。よって、ライトシート顕微鏡では観察したい平面にしか励起光を当ててないため、高速かつ励起光による試料ダメージが少ないというメリットがある。この特徴を活用することで、非常に高速な生命現象を捉えることが可能になってきている。一方、検出用対物レンズの開口数を上げられないため、空間分解能については共焦点レーザー顕微鏡に比べて若干劣る。また、同一平面内でも照射光がサンプルに入る部分では鮮明な画像が得られるのに対し、反対側では背景光の増加や縞状の影が発生して画質は劣化するといったデメリットもある。これまでに、コレラ菌のバイオフィーム形成の初期過程がライトシート顕微鏡を用いて解析されている²⁰⁾。

5. 分厚いバイオフィームの観察における従来の蛍光顕微鏡法の問題点

上述の通り、様々な光学顕微鏡がバイオフィームの観察に利用されてきたが、20 μm を超えるような分厚いバイオフィームの場合は、表面から入射した光が深部まで透過しにくいいため、従来の光学顕微鏡法ではバイオフィームを隅々まで観察することは困難であった。上記の通り、共焦点レーザー顕微鏡や深部観察を得意とする二光子顕微鏡であっても厚みのあるバイオフィームを隅々まで詳しく観察することは困難である¹²⁾。そのため、分厚いバイオフィームの形状や内部の微生物細胞およびEPSを、空間配置変化させずに、鮮明に観察することが可能な革新的な技術の創出が求められている。そこで筆者は、主に動物の組織や臓器の観察において、近年目覚ましい発展を遂げてきた組織透明化法に着目し、バイオフィームの観察への応用を考えた。

III. バイオフィルムを瞬時に透明化する技術 (iCBiofilm法) の開発

1. 組織透明化の原理

生体組織や臓器が不透明であることの原因は、光の散乱や屈折、吸収が生じることにより、直進する透過光が大きく減弱してしまうことにある。生体試料では、細胞膜に含まれる脂質成分やコラーゲン線維などの細胞外基質・結合組織などに起因する光散乱の影響が大きく、透明度が低いことが分かっている。そのため、生体試料の透明化には、「観察対象とその周囲の屈折率を合わせる」ことが必須であり、脂質などの生体内光散乱物質の除去（脱脂）と高屈折率溶媒の浸透（屈折率調整）という二つの工程が必要である。

これまでに、実に多彩な組織透明化技術が開発されてきた²¹⁾。組織透明化研究の歴史は意外にも古く、1911年にドイツの解剖学者であるWerner Spalteholz博士が有機溶媒を用いた方法を報告している²²⁾。その後、有機溶媒を使った組織透明化法はBABB・3DISCOといった手法へと発展を遂げており、高度な透明化が達成されている²³⁾。しかし、このような有機溶媒を用いた方法は、短時間で組織を透明化することができるが、サンプルが収縮してしまい、試薬が実験者や顕微鏡にとって必ずしも安全ではなく、今や蛍光イメージングに欠かせない蛍光タンパク質が退色しやすいという問題があった。そのため、有機溶媒に代わって、生体への毒性が低く、蛍光タンパク質の安定性を維持する面で優れた水溶性化合物を用いた組織透明化法の開発が試みられた。理化学研究所の宮脇敦史博士らによって開発されたScale²⁴⁾は尿素とグリセロール、および界面活性剤を組み合わせることで生体組織の光散乱を減らし、透明度を上げることが可能である。この方法は、水溶性化合物を用いて生体組織の透明化と三次元蛍光イメージングを両立させた点でブレイクスルーとなり、SeeDB²⁵⁾やScaleの改良版ともいえるCUBIC²⁶⁾などの革新的な技術が開発されてきた。また、CLARITY²⁷⁾のようにアクリルアミドゲルによって組織内のタンパク質や核酸を空間的に固定し、電気泳動で強力な脱脂を行う方法も報告されている。しかし、上記の水溶性化合物を用いた方法に

比べると操作が煩雑であり、スループットが低い。

2. 東京慈恵会医科大学オリジナルのバイオフィルム透明化技術の開発

まず、本邦で市販されている組織透明化試薬（CUBIC²⁶⁾、ScaleS²⁸⁾、SeeDB2²⁹⁾）を用いて、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA: methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*）のバイオフィルムの透明化を試みた。予想通り、これらの透明化試薬を用いることでMRSAのバイオフィルムの透明化が可能であった。しかし、これらの方法ではバイオフィルムの透明度が不十分であり、透明化処理の過程でバイオフィルムの構造が部分的に壊れ、透明化処理に数日から数週間の時間を要するという課題があった。そこで筆者は、独自にバイオフィルムに特化した透明化法を開発することを決意した。

上記の予備検討の過程で、筆者はSeeDB2に含まれる「イオヘキソール」という化合物を含む水溶液にMRSAのバイオフィルムを浸漬するだけで、瞬時に透明になることを発見した。イオヘキソールはX線の造影剤として臨床で使用されており、水に良く溶け、屈折率が極めて高いという特徴を持つ。そして、その濃度を変えることで屈折率を自在に調整できる。そこで筆者は、イオヘキソールとMRSAのバイオフィルム（パラホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドで固定したもの）を用いて、透明度が高く、バイオフィルムの構造安定性を保つ条件を決めた。その結果、20 μm を超えるような分厚いバイオフィルムでも数秒以内に透明にできるiCBiofilm (instantaneous Clearing of Biofilm: アイ・シー・バイオフィルムと読む) 法を開発することができた³⁰⁾。

従来の組織透明化法では、生体の組織や臓器に含まれる光の散乱や吸収の原因となる物質（繊維状タンパク質、脂質、色素など）を除去し、試料の周囲の屈折率を観察対象の屈折率に近づける工程で長い処理時間を必要とする（数日から数週間、場合によっては1カ月以上）。一方、iCBiofilm法では微生物細胞に近い屈折率（1.38~1.42程度）を持つ溶液にバイオフィルムを浸漬するだけで数秒以内に透明化を達成できる³⁰⁾。そして、CUBIC、ScaleS、SeeDB2などの従来の組織透明

化法に比べて透明度が高く、より深部まで鮮明な蛍光像を取得できることがわかった (Fig.2). 微生物細胞の細胞膜に親和性を持つ蛍光色素やEPSに特異的に結合する蛍光標識抗体や蛍光標識レクチンでバイオフィルムを染色した後、iCBiofilm法を用いて透明にすれば、バイオフィルム内部の微生物細胞やEPS (多糖, タンパク質, 核酸)の形態や局在を共焦点レーザー顕微鏡などで詳しく観察することが可能である³⁰⁾. また、iCBiofilm法はMRSAだけでなく、様々なグラム陽性菌 (表皮ブドウ球菌, 腸球菌, 枯草菌など), グラム陰性菌 (大腸菌, 緑膿菌, コレラ菌など), および真菌 (カンジダ菌など) のバイオフィルムの観察にも有効であった³⁰⁾. 特に、カンジダ菌の場合、500 μm を超える非常に分厚いバイオフィルムでも隅々まで観察することが可能であった (Fig.3). さらに、iCBiofilm法はバイオフィルム内部へと侵食し、菌を貪食するマウスの好中球の様子を観

察する上でも有効であった³⁰⁾. つまり、iCBiofilm法は従来の組織透明化法に比べて、処理時間の短さ、高い透明度、試料の構造の保持、幅広い汎用性という点において極めて優れたバイオフィルムの透明化法である。

IV. iCBiofilm法を用いたバイオフィルムのライブセルイメージング

従来の組織透明化法では、試料を固定して数日から数週間の時間をかけて透明化を行うため、観察対象を生きたままの状態を観察することは困難である。一方、iCBiofilm法は、透明化と微生物細胞の染色に使用する試薬の種類と濃度を最適化することで、バイオフィルム内部の微生物を生きたままの状態で見ながら三次元で観察することが可能になると予想された。バイオフィルムの透明化に用いるイオヘキソールは未固定のバイオフィルムの構造を破壊することが判明し、ライブセルイメージングには適しないことがわかった。そこで、イオヘキソールに代わって、微生物の細胞分裂や形態、およびバイオフィルムの構造

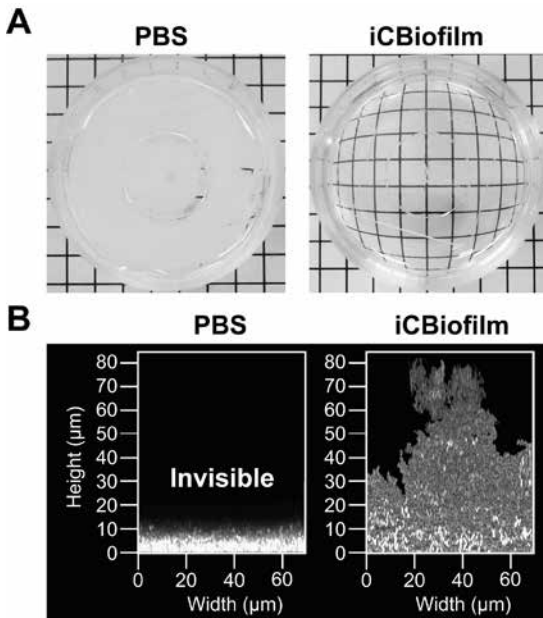


Fig.2. Optical clearing and imaging of bacterial biofilms using the iCBiofilm method. (A) Photographs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms on a grid pattern-printed paper as a background were obtained using ImageQuant for transmission (Cytiva). The biofilms were soaked in phosphate-buffered saline (PBS) or the iCBiofilm reagent. PBS was used as the control. (B) Typical side-views of the MRSA biofilms stained with thioflavin T (ThT). An LSM880 confocal laser scanning microscope with a 40 \times oil immersion objective lens and an Airyscan super-resolution unit (Carl Zeiss) was used to acquire z-stacks of the stained biofilms every 0.22 μm .

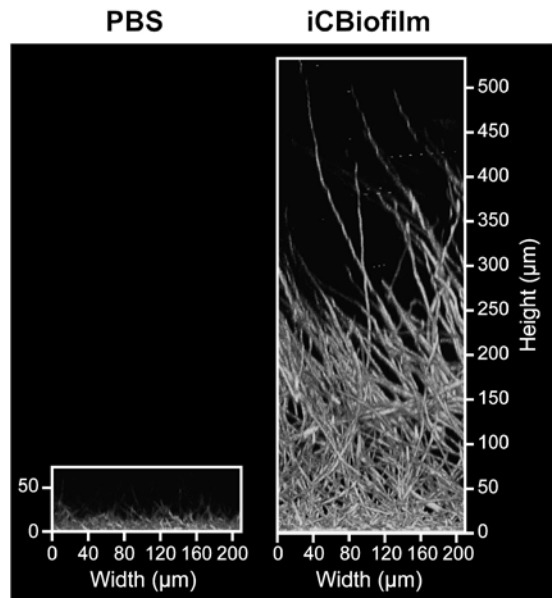


Fig.3. Observation of a fungal biofilm using the iCBiofilm method. *Candida albicans* biofilms were stained with Alexa Fluor 594-conjugated Concanavalin A. After soaking the biofilms in PBS or the iCBiofilm reagent, the biofilms were observed using an LSM880 microscope with a 20 \times objective lens. Side views of the biofilms are shown.

に悪影響を及ぼさない化合物を探索した。その結果、イोजキサノールがバイオフィルムのライブセルイメージングに適していることを見出すことができた。イोजキサノールを培地の中に適切な濃度となるように添加し、さらに微生物細胞のライブセルイメージングに適した蛍光プローブ（チオフラビンT³¹⁾やマイトトラッカーなどで染色することで、バイオフィルムの形成過程の透明化ライブセルイメージングが可能になった (Fig.4)³⁰⁾。この技術を応用することで、分厚いMRSAのバイオフィルムが乳酸菌によって産生されるナイシンAという抗菌ペプチドによって殺菌されていく様子も観察できるようになった³⁰⁾。

以上より、iCBiofilmを応用することで、バイオフィルムの形成過程だけでなく、バイオフィルム内部の微生物に対する抗菌剤やバイオフィルム破壊剤の作用を高い時間・空間分解能で可視化できるようになった。

V. 今後の展望

本稿では、筆者が開発したiCBiofilm法について紹介した。iCBiofilm法は、様々な光学顕微鏡法（超解像顕微鏡、二光子顕微鏡、ライトシート顕微鏡、ラマンスペクトル顕微鏡、自家蛍光顕微鏡、ホログラフィック顕微鏡など）と組み合わせることが可能である。それによって、バイオフィルムの詳細な構造情報に加え、バイオフィルムの内部での個々の微生物細胞の生理状態や代謝物の分布などの情報がこれまで以上の高い精度で得ら

れると考えられる。バイオフィルムの構造や機能を深く理解できれば、バイオフィルムが原因となる様々な問題（難治性細菌感染症、水浄化システムの濾過膜の目詰まり、金属腐食など）の解決にも繋がる可能性がある。現在、iCBiofilm法に基づいたバイオフィルム透明化試薬が東京化成工業株式会社から製品化されており、今後、この技術が様々な分野で応用されることに期待したい。

VI. 謝 辞

本稿で紹介したiCBiofilm法は、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学」(22H04889)、基盤研究 (B) (20H02904)、国際共同研究強化 (A) (18KK0429)、科学技術振興機構 ERATO野村集団微生物制御プロジェクト (JPMJER1502)、東京慈恵会医科大学 戦略的重点配分研究費、および住友科学財団研究助成金の支援を受けて開発されたものである。本研究と本稿の執筆にご協力いただいた本学 細菌学講座の奥田 賢一 講師（現福岡工業大学准教授）、林崎 浩史 助教、原 慧一郎 氏、重盛 林太郎 氏、戸田 尚子 氏をはじめとする共同研究者の方々に感謝したい。

著者の利益相反 (conflict of interest : COI) 開示：
本論文の研究内容に関連して特に申告なし

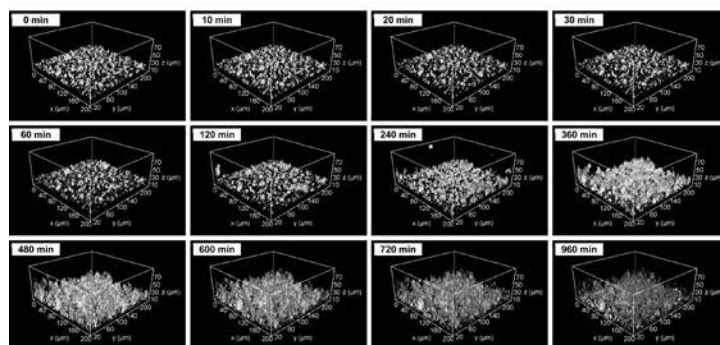


Fig.4. Live-cell imaging of MRSA biofilm formation using the iCBiofilm method. Live-cell clearing imaging for biofilm formation of MRSA in brain heart infusion medium supplemented with 1% glucose, 30.0% (w/v) iodixanol, and MitoTracker DeepRed in a glass-bottomed dish. The three-dimensional images of the biofilm were taken every 10 min using Thunder Imaging System (Leica).

文 献

- 1) Flemming HC, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17: 247–60.
- 2) Hall–Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 95–108.
- 3) Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20: 621–35.
- 4) Wiesmann CL, Wang NR, Zhang Y, Liu Z, Haney CH. Origins of symbiosis: shared mechanisms underlying microbial pathogenesis, commensalism and mutualism of plants and animals. *FEMS Microbiol Rev.* 2023; 47: fuac048.
- 5) Proctor CR, Hammes F. Drinking water microbiology—from measurement to management. *Curr Opin Biotechnol.* 2015; 33: 87–94.
- 6) Xu D, Gu T, Lovley DR. Microbially mediated metal corrosion. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21: 705–18.
- 7) Guéneau V, Plateau–Gonthier J, Arnaud L, Piard JC, Castex M, Briandet R. Positive biofilms to guide surface microbial ecology in livestock buildings. *Biofilm.* 2022; 4: 100075.
- 8) Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21: 70–86.
- 9) Whitchurch CB, Tolker–Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002; 295: 1487.
- 10) Sugimoto S, Sato F, Miyakawa R, Chiba A, Onodera S, Hori S, et al. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep.* 2018; 8: 2254.
- 11) Yonemoto K, Chiba A, Sugimoto S, Sato C, Saito M, Kinjo Y, et al. Redundant and distinct roles of secreted protein eap and cell wall–anchored protein SasG in biofilm formation and pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2019; 87: e00894–18.
- 12) Vroom JM, De Grauw KJ, Gerritsen HC, Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, et al. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two–photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 3502–11.
- 13) Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated–emission–depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett.* 1994; 19: 780–2.
- 14) Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science.* 2006; 313: 1642–5.
- 15) Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub–diffraction–limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods.* 2006; 3: 793–5.
- 16) Hess ST, Girirajan TP, Mason MD. Ultra–high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J.* 2006; 91: 4258–72.
- 17) Gustafsson MG. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc.* 2000; 198: 82–7.
- 18) Berk V, Fong JC, Dempsey GT, Develioglu ON, Zhuang X, Liphardt J, et al. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science.* 2012; 337: 236–9.
- 19) Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer EH. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science.* 2004; 305: 1007–9.
- 20) Qin B, Fei C, Bridges AA, Mashruwala AA, Stone HA, Wingreen NS, et al. Cell position fates and collective fountain flow in bacterial biofilms revealed by light–sheet microscopy. *Science.* 2020; 369: 71–77.
- 21) Ueda HR, Dodt HU, Osten P, Economo MN, Chandrashekar J, Keller PJ. Whole–brain profiling of cells and circuits in mammals by tissue clearing and light–sheet microscopy. *Neuron.* 2020; 106: 369–87.
- 22) Spalteholz W. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten, nebst Anhang, Über Knochenfärbung. Leipzig: Verlag von S. Hirzel; 1911.
- 23) Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, et al. Three–dimensional imaging of solvent–cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc.* 2012; 7: 1983–95.
- 24) Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, et al. Sca/e: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci.* 2011; 14: 1481–8.
- 25) Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology–preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci.* 2013; 16: 1154–61.
- 26) Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, et al. Whole–brain imaging with single–cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell.* 2014; 157: 726–39.
- 27) Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S,

- Andalman AS, Davidson TJ, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. 2013; 497: 332–7.
- 28) Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, et al. *ScaleS*: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*. 2015; 18: 1518–29.
- 29) Ke MT, Nakai Y, Fujimoto S, Takayama R, Yoshida S, Kitajima TS, et al. Super-resolution mapping of neuronal circuitry with an index-optimized clearing agent. *Cell Rep*. 2016; 14: 2718–32.
- 30) Sugimoto S, Kinjo, Y. Instantaneous Clearing of Biofilm (iCBiofilm): an optical approach to revisit bacterial and fungal biofilm imaging. *Commun Biol*. 2023; 6: 38.
- 31) Sugimoto S, Arita-Morioka K, Mizunoe Y, Yamanaka K, Ogura T. Thioflavin T as a fluorescence probe for monitoring RNA metabolism at molecular and cellular levels. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: e92.