

1つの生物標本から2D顕微鏡画像と3D画像を得る手法を開発

1つの生物標本から、2D顕微鏡画像と3D形態画像の両方を取得する新しい観察手法を開発したと、本学などの研究チームが発表しました。顕微鏡による観察では、標本を薄切したプレパラートを用いるのが一般的です。しかし、薄切標本は、標本本来のもつ立体的な情報を失います。開発した手法は、薄切標本の2D顕微鏡画像と標本本来の3D情報の両方を得て相関させられることにより、生物学研究における顕微鏡解析の信頼性を向上させるものと期待されます。論文は、2017年6月16日付（英国時間）のScientific Reports誌に掲載されました。

概要

医学・生物学の研究において、光学顕微鏡による観察法は、基本的かつ一般的な研究手法です。17世紀に顕微鏡が発明されて以来の歴史ある手法です。顕微鏡による観察は、細胞や組織の形態を解析したり、タンパク質などの目的分子の分布を解析するために行われます。その際、通常、生物標本はごく薄い切片にしてスライドガラスに貼り付け、プレパラートにします。しかしながら、切片から得られる情報は平面的であり、本来、標本が持っていた立体的な形状、3D情報は失われてしまうという悩みがありました。

そこで、群馬大学大学院医学系研究科 多鹿友喜講師などの研究者チームは、1つの生物標本から2D顕微鏡画像と3D形態画像の両方を取得する手法を開発しました（図1）。1つの標本で、切片を用いた2D顕微鏡画像と3D画像を相関させられる唯一の方法です。従来、切片だけを顕微鏡観察するときの悩みは、標本本来の立体的な形状情報が失われてしまうことでしたが、これが解消します。開発した手法は、生物学研究における顕微鏡解析の信頼性向上に寄与します。

図1 | 撮影装置の外観。クリオスタット（白い装置）の前に、一眼レフカメラを設置する。クリオスタットが標本を切削するごとに、カメラが標本の切削面を撮影していく。自動で連続撮影できるように、ハンドル位置を検出するセンサ、それに連動してカメラシャッターを押す制御装置を製作した。



さらなる利点として、既存の3D画像を取得する装置に比べて安価であることや、手順が簡便であることも挙げられます。近年、研究において生物標本の3D情報を必要とする場面が増えていきます。疾患モデルマウスの臓器の解析や、再生医療のための人工臓器の評価といった場面が挙げられます。現在、研究用の3D画像を取得する装置として、CTやMRI（注1）があります。これらは、医療用に広く利用されていますが、研究用CT、MRIが利用できるようになってきました。これらの装置で、生物標本から多数の断層像を得て、3Dで形状を解析します。また、抗体染色や遺伝子改変によって目的分子を標識（注2）した標本を、共焦点レーザー顕微鏡という特殊な顕微鏡で観察すると、タンパク質分子の分布を3Dで可視化することができます。しかしながら、これら既存の装置や手法には一長一短があります。CTやMRIは、形態を解析することは得意ですが、目的分子の分布を解析することはまだ不得手です。しかも高価な機器です。目的分子を標識する方法では、標識された分子以外は透明化してしまうため、標本本来の形態解析には不向きです。開発した装置は、これらの3D画像装置とあわせて、医学をふくめた生物学研究において、広い分野で普及する可能性をもっています。

資料

開発した装置は、クリオスタット（注3）、一眼レフカメラ、電子工作部品からなります（図1）。クリオスタットは、専用のカミソリ刃で、凍結した標本を薄切していく機器です。右にあるハンドルを回すと、標本が上下に動き、刃が薄切していきます。薄切した切片は、スライドガラスに貼り付けて、顕微鏡で観察します。

同時に、標本の切削面を一眼レフカメラで撮影します。クリオスタットのハンドル位置をセンサーが検知して、カメラのシャッターを押す装置を製作しました。薄切の途中で、標本が指定した位置に来ると、カメラが切削面を撮影します。ひとつの標本で500～1000枚ほど、切削面の写真を撮ります。切削面の連続写真は、コンピュータ上で3D画像として再構築されます。装置製作や撮影手順に関するすべての情報（設計図、部品、プログラム、手順）は、発表論文で公開され、だれでも利用することができます。

多種多様な生物標本を解析できます。ランの花の例は、図2に示しました。複雑な形状をしたランの花が、コンピュータ上で3D画像となり、どんな角度からでも観察できます。顕微鏡観察は、黒い面で示した位置を由来とする切片を使用しました。昆虫をおびきよせる分泌物を出す細胞です。図3は、イチゴを3D画像にした例です。

作品集



3Dデータ、動画あります。

<http://pandora.med.gunma-u.ac.jp/portfolio/>

（注1）CT、MRI：X線CT（コンピュータ断層撮像法）やMRI（磁気共鳴画像法）は、注釈透過X線や磁気を利用して、体の断面を画像化する方法。

（注2）分子の標識：抗体の特異的な結合能を利用して、特定のタンパク質を標識する。または遺伝子改変技術によって、特定のタンパク質に標識となる別のタンパク質を融合させる。

（注3）クリオスタット：生物標本を薄切する装置をマイクロームと総称し、クリオスタットは凍結した標本を薄切するマイクロームである。

図 2 | 新開発の手法で、3D画像と2D顕微鏡画像を相関させることができる。左：生物標本の一例、オンシジウム。右：連続断面像から再構築した3D画像。下：薄い切片を顕微鏡で観察した画像。乳頭細胞は油分を分泌して虫を誘う。3D画像内の黒い面は切片の由来位置を示しており、カルスと呼ばれる膨らみを顕微鏡観察していることが分かる。

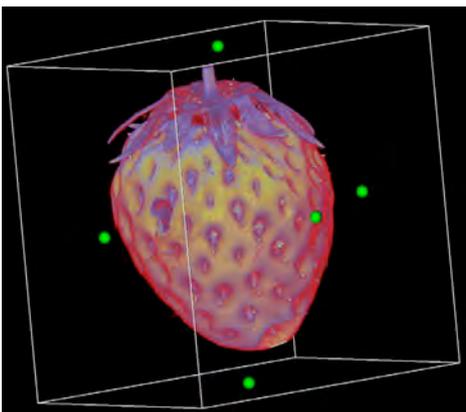
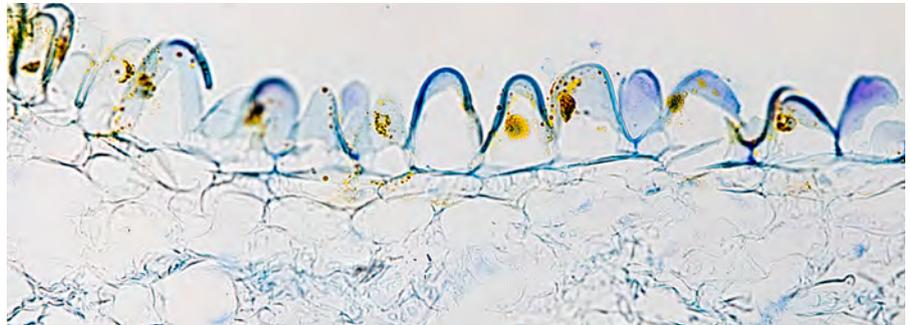
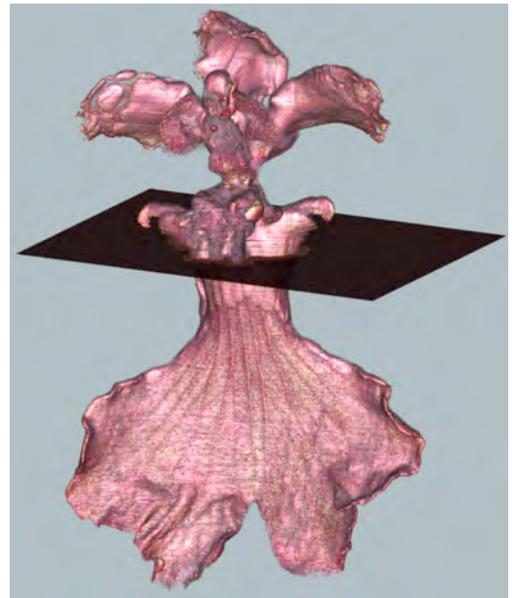


図 3 | イチゴは群馬県の主要な農産物のひとつである（左上）。イチゴを凍結し、クリオスタットで薄切した。横断した切削面の一例を示す（右上）。果肉の表面（果皮）が赤く熟し、くぼみに果実が配置される。合計 1480 枚の切削面写真から、3D 画像に再構築した。ポリウムレンダリングという手法で、コンピュータ上で動かしたり、切断したりできる（左下）。多平面再構築法という手法を使うと、自在に断面をつくって内部を観察することができる（右下）。果実に向かって、白い組織（維管束）が伸びている様子が分かる。

発表論文では、植物以外の標本を解析しています。マウスは、生物学研究でもっともよく利用される動物の一つです(図4)。クワガタムシは、子供から大人までをも魅了する昆虫です。(図5)。研究者も、複雑で多様な形態をもつ昆虫に魅了され、形態形成の仕組みを研究しています。また、ヒトの脳も解析しました(発表論文参照)。脳の3D微小解剖学を明らかにでき、脳の外科手術の基本情報として役立てられます。

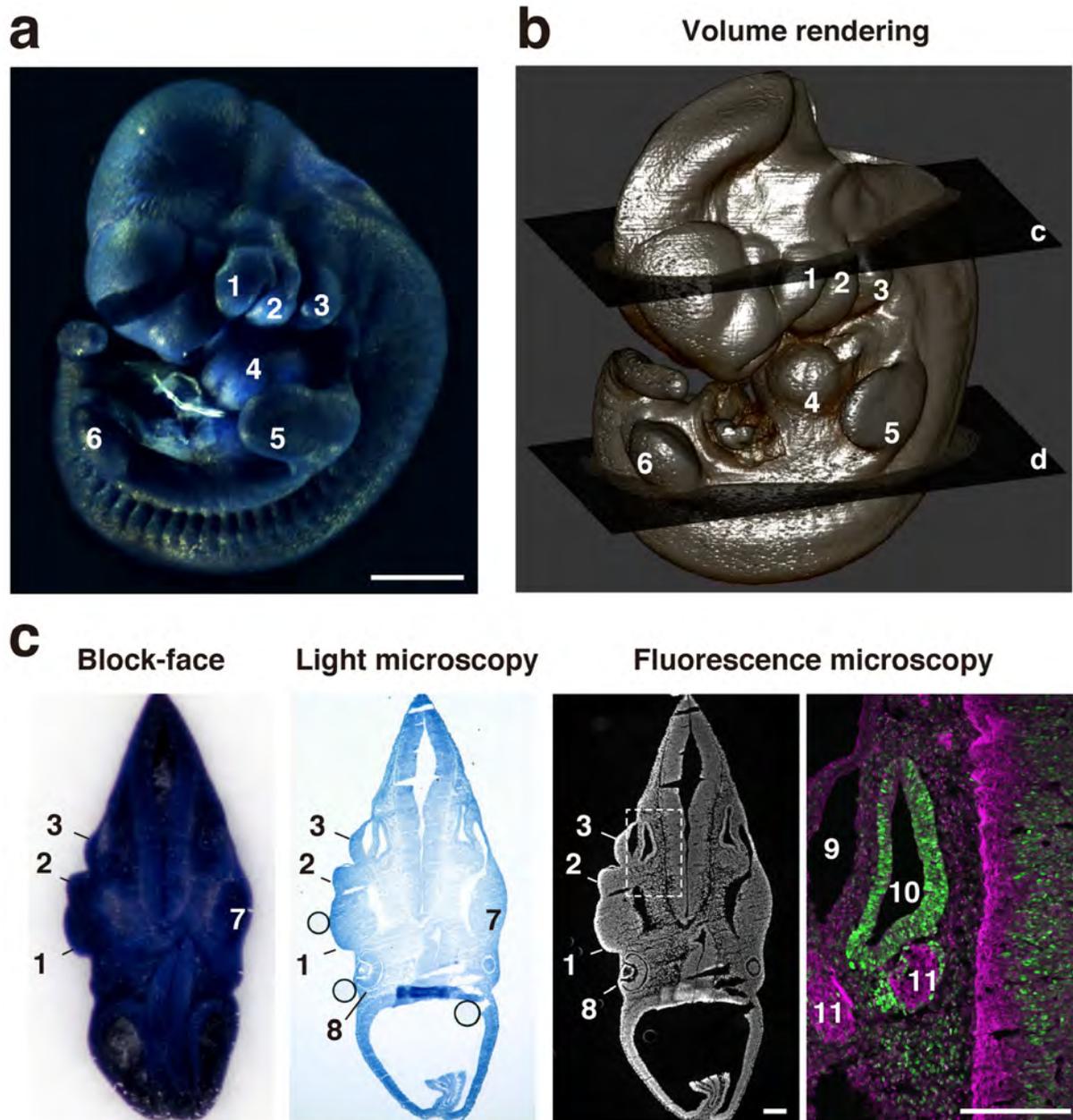


図4 | マウスの発生過程を解析した例。a: 胎生10日目。b: 3D画像を構築。c: 3D画像内に示した平面cの場所で、切片を採取した。左から、切削面、切片、標識した切片。標識は、神経と耳原基を、紫色と緑色で示す。(発表論文より引用)

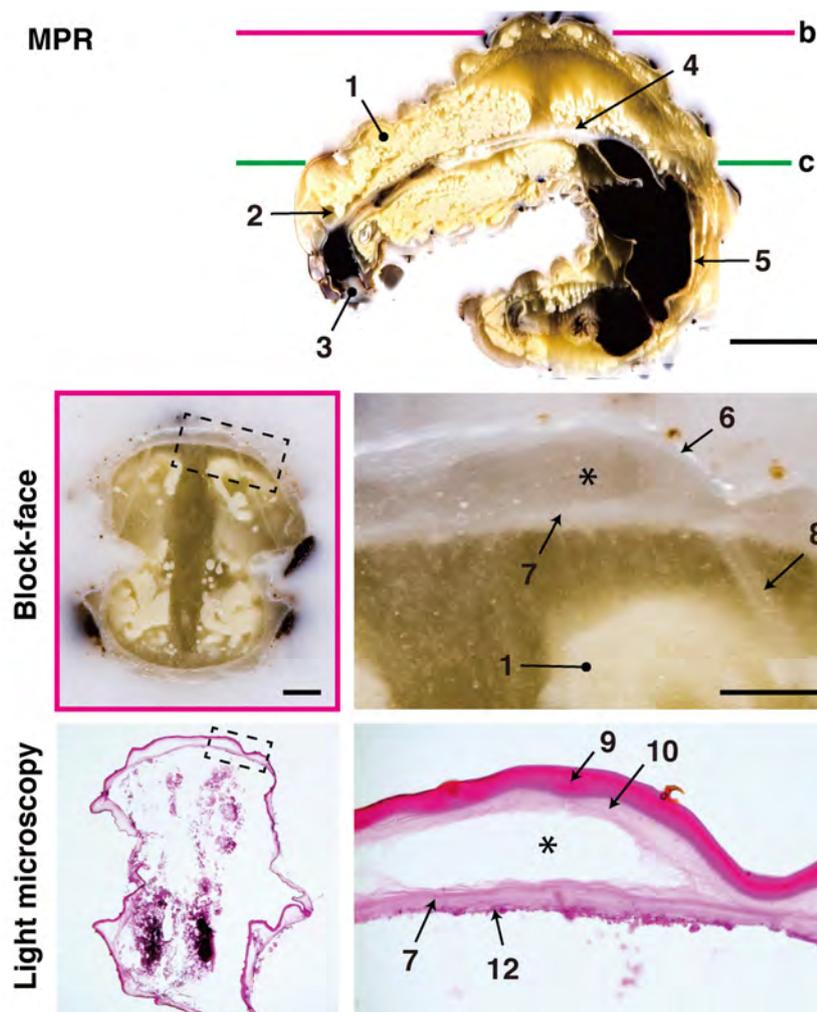


図5 | クワガタムシの幼虫。幼虫がサナギになる直前の時期を解析した。この時期、幼虫は体内構造を酵素分解してしまい、解剖して体内を観察することが難しい。開発した手法で、内部構造（上・中）も切片を用いた顕微鏡解析（下）もできる。（発表論文より引用）

展望

- ✓ 顕微鏡観察は、薄切標本をもちいた平面観察が基本でしたが、開発した手法で立体観察も行い、研究データの信頼性を向上させます。
- ✓ 多種多様な生物試料を立体観察できるので、幅広い研究分野で役立ちます。
- ✓ 装置製作や撮影手順に関する必要な情報は、すべて公開しました。より多くの研究者が利用できます。

発表論文

表題： A novel imaging method for correlating 2D light microscopic data and 3D volume data based on block-face imaging

著者： Tajika Y, Murakami T, Iijima K, Gotoh H, Takahashi-Ikezawa M, Ueno H, Yoshimoto Y, Yorifuji H

雑誌： **Scientific Reports** 7, 3645 (2017) doi:10.1038/s41598-017-03900-9

公開日時： 2017年6月16日午前10時、英国時間

掲載サイト： <https://www.nature.com/articles/s41598-017-03900-9>

研究グループ

群馬大学大学院医学系研究科 機能形態学分野

講師 多鹿 友喜

准教授 村上 徹

助教 上野 仁之

教授 依藤 宏

群馬大学大学院医学系研究科 脳神経外科学分野

大学院生 飯島 圭哉

教授 好本 裕平

名古屋大学大学院生命農学研究科 資源昆虫学研究分野

特任助教 後藤 寛貴

群馬大学大学院保健学系研究科 リハビリテーション学講座

助教 高橋 - 池澤麻衣子

オンライン資料

下記のサイトで3Dデータや動画を公開しています。

群馬大学大学院医学系研究科 機能形態学分野が運用する作品集サイト

<http://pandora.med.gunma-u.ac.jp/portfolio/>

研究内容に関するお問い合わせ

群馬大学大学院医学系研究科 機能形態学分野 講師 多鹿 友喜 (たじか ゆうき)

取材に関するお問い合わせ

群馬大学 昭和地区事務部 総務課 広報係 田原 美粧 (たはら みさ)

E-mail: m-koho@jimu.gunma-u.ac.jp

〒371-8511 前橋市昭和町三丁目 39 番 22 号 TEL: 027-220-7895, FAX: 027-220-7720