

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570076

研究課題名(和文) 情報欠落のない3次元再構成ソフトの生物トモグラフィへの応用

研究課題名(英文) Application of a unique 3-D reconstruction software unaffected by the missing data range to biological tomography

研究代表者

馬場 美鈴 (Baba, Misuzu)

工学院大学・付置研究所・研究員

研究者番号：80435528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：電子顕微鏡による細胞内の3次元膜形態解析に、電子線CTが有益な手段として使用されている。2次元で離れて見える構造体でも、3次元観察により、構造体の繋を把握することができるためである。現時点では、手動方式の海外ソフトが多様されている。しかし、多くの研究者が直面する問題として、作業過程を人為的に行うため、膨大なエネルギーと時間を必要とした。

本研究では、それらの問題を回避するための必要となる要素技術の開発を行った。自動化と高速化されたソフト開発に成功し、精度の向上、時間の短縮などが整備された。

研究成果の概要(英文)：Electron CT is widely used as an efficient technique for analyzing three-dimensional intracellular membrane structures using electron microscopy. This is because three-dimensional observation enables us to capture the connection among membrane structures even though they appear to be separated on the two-dimensional images. At the present, for this technique, manual control in the foreign-made software is widely used. However, such manually operated work process is a major problem for many researchers that enormous energy and time are spent. In this study, we developed a new elemental technology to avoid such a problem. We succeeded to develop a software that enables automation and increase in speed for Electron CT analysis, resulting in reducing time and improvement of accuracy of the work.

研究分野：微細形態

キーワード：電子顕微鏡 電子線CT 酵母 急速凍結置換法 画像処理 位置合わせ ニューラルネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 電子顕微鏡のための3次元トモグラフィ法は、生物構造体の包括的な膜動態、あるいは、生物現象に対応して起こった構造体の変化など、Z方向を含む細胞内の情報解析に非常に有効な手段である。しかし、再構成像から立体可視化する段階まで、様々な問題を有している。

(2) 生物試料の場合、3次元再構成像または、ポリゴン化モデルを作るために、一般的には海外ソフトが多用されている。この手法を応用する場合、自動化が進んでいないため、研究者が費やす時間、煩雑な労力の負担は膨大である。また、求める情報にもよるが、3次元再構成像は、生物系では、フィルター変換逆投影法(FBP)が主流であるため、根本的情報欠落の問題から再構成像の鮮明さが乏しい。従って、Z方向の解析やポリゴンモデル化に支障をきたす。このような状態が、3次元トモグラフィ法の現状である。

## 2. 研究の目的

(1) 連携研究者が、全く新しい考え方のアルゴリズムに成功し、情報欠落のない3次元再構成のためのソフトを整備、改良中である。金属材料に応用した例では、情報欠落がないため、精度の高い再構成像が得られている。しかし、生物系の切片に対する応用は、まだ、行われていなかった。そこで、新たなアルゴリズムのソフトを生物系の切片に適用して、どこまで動作可能か、どの様な構造体が3次元再構成可能であるかなどを検証することを目的とした。

(2) その過程において、電子顕微鏡で撮影する際に生じる、位置ずれ、倍率変動などを補正する要素技術が必要となった。これらの問題を解決するために、新しいソフト開発を行った。必要とされる要素技術は、多数の試料数を効率良くこなすために、自動化と高速化を基本的コンセプトとした。

(3) 生物系の切片の場合、階調数が多いため、構造体間の膜の連続性を検証することが必要となり、すでに開発されていたテクスチャ解析法を、さらに整備、発展させることを目的とした。

(4) 生物系では、画像の中から、必要な構造体を選別する必要があるため、機械学習(ニューラルネットワーク)を初めて、トモグラフィ法に導入し、どれだけ選別が可能であるかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 酵母細胞を急速凍結置換固定法により試料作製した切片から、新たに連続傾斜シリーズ像を取得した。または、すでに取得済みの連続傾斜シリーズ像も使用した。新しいアルゴリズムで作られたソフトの生物切片に対する稼働状況の確認を行った。

(2) 3次元再構成像を作るため、連続傾斜画像の位置ずれを補正するためのソフトの開発を行った。そのソフトの改良を随時行い、自動化と高速化の実現を試みた。

(3) 生物切片から、必要となる構造体、あるいは不必要となる構造体の自動選別を行うための機械学習(ニューラルネットワーク)を導入することを試みた。そのソフトの改良を随時行い、自動化と高速化の実現を試みた。

(4) 生物試料において、膜の繋がりを示すため検証方法としてテクスチャ解析を導入し、そのソフト開発と改良を行った。

## 4. 研究成果

(1) 連続傾斜シリーズ像は、電子顕微鏡の特性から、画像の位置ずれ、倍率変動などが含まれる。これらは、極微小な変動であっても、再構成像の精度に非常に大きく影響することが、実験中に判った。そこで、最初に位置合わせ法に関して、全く新規の考え方で、アルゴリズムを考案し、精度の高い手法とその高速化を実現したソフトを確立した。この成果は、2報の論文として発表した。

(2) 120枚の連続断層像を、海外ソフトでは、従来数日かかって位置合わせをしていたが、(1)で開発されたソフトは、わずか10分程度で完全な解にたどり着き、その位置合わせの精度は非常に高い。その新規性から一件の特許申請を行った。国内で開発されたソフトである点は重要である。現時点では、特許により制約があるが、GUIなどの整備も行い、誰でも比較的簡単に操作可能である。

(3) 生物学的に必要な、あるいは不必要な画像の選別法として、機械学習(ニューラルネットワーク)を導入し、再構成断層像に初めて適用した。特徴は、一枚の断層画像ごとでなく、全断層像を一括して処理可能なことである。ソフトの改良と高速化などの整備を行い、精度の向上がみられた。比較的単純な生物画像において、構造体を自動選別することが可能となった。

(4) 生物試料において、膜の繋がりを示すための研究は多い。ポリゴン化モデルを作製する場合、別の方法で、連続性を検証することが、ソフトの開発上必要であった。この膜内腔をもつ細胞内小器官の繋がりは、テクスチャ解析法が有効であることが判明した。この手法を3次元再構成画像に導入することを試みた。一断層のみでなく、全断層像において動作可能な状態まで、ソフトの精度が向上した。実際に、生物画像に応用し、連続性を示す良い証明方法として、頻用している。

(5) 情報欠落のない、新しい考え方のアルゴリズムに基づいて作られたソフトを、生物切片に対して適用を試みた。一般の、生物組織の電子顕微鏡画像は、最初の試みとしては複雑であるため、単細胞生物である酵母を材料とし、構造体の重なりのないような領域にて試みた。最終像は、まだ収束条件が適格ではないが、今後のソフトの改良により、確実に応用可能であることが判った。

(6) 以上のように、3次元再構成像からポリゴンモデル、または volume rendering モデルまでを作るにあたって必要となった、

新たな要素技術を着実に創出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Tomonaga S, Baba M, Baba N. Alternative automatic alignment method for specimen tilt-series images based on back-projected volume data cross-correlations. *Microscopy*. 査読有 2014, August 63 (4): 279-294. doi:10.1093/jmicro/dfu014

Tomonaga S, Baba M, Yamazaki S, Baba N. A new field-of-view autotracking method for online tomography reconstruction based on *back-projected ray image* cross-correlation. 査読有 *Microscopy*. 2014, October 63 (5): 357-369. doi:10.1093/jmicro/dfu021

Klionsky DJ 他 Baba M 43 人目 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 査読有 2012 May 1;8(5):445-544. doi.org/10.4161/auto.19496

Nair U, Yen WL, Mari M, Cao Y, Xie Z, Baba M, Reggiori F, Klionsky DJ. A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy*. 査読有 2012 May 1;8(5):780-93. doi: 10.4161/auto.19385

〔学会発表〕(計 11 件)

杉本健太, 友永祥彦, 馬場美鈴, 馬場則男. 逆投影線像 3 次元相互相関法による投影像シリーズの倍率補正. 日本顕微鏡学会第 39 回関東支部講演会. 2015 年 2 月 28 日, 工学院大学

Sachihiko Tomonaga, Misuzu Baba and Norio Baba. A new field-of-view autotracking method based on back-projected ray image cross-correlation for online tomography reconstruction. 日本顕微鏡学会第 58 回シンポジウム, 2014 年 11 月 16~17 日九州大学医学部百年講堂

S. Tomonaga, D. Kato, M. Baba and N. Baba. An Alternative Image Alignment Method Based on Reconstructed Cross-section Image Correlations. Indiana convention center. 5th Aug 2013

友永祥彦, 馬場美鈴, 馬場則男. 従来法に代わる 3 次元断層データ相関法に基づく投影像の位置合わせ法. 日本顕微鏡学会、第 70 回記念学術講演会 2014 年 5 月 12 日, 幕張メッセ

杉本健太, 友永祥彦, 馬場美鈴, 馬場則男. 高精細位相シフト PCM による倍率等の投影像シリーズ画像補正の自動化応用. 第 70 回記念学術講演会 2014 年 5 月 12 日, 幕張メッセ

馬場美鈴, 友永祥彦, 鈴木雅斗, 加藤大貴, 馬場則男, 酵母細胞の phagophore

膜形成に關与する新規膜構造体の検出, 日本顕微鏡学会、第 69 回記念学術講演会, 2013 年 5 月 20 日~5 月 22 日, ホテル阪急エキスポパーク

友永祥彦, 鈴木雅斗, 加藤大貴, 馬場美鈴, 馬場則男, 従来法に代わる断層像相関法に基づく投影像の位置合わせ法, 日本顕微鏡学会、第 69 回記念学術講演会, 2013 年 5 月 20 日~5 月 22 日, ホテル阪急エキスポパーク

鈴木雅斗, 馬場美鈴, 馬場則男, テクスチャ解析とスネーク法の改良による電子線 CT セグメンテーション法, 第 69 回記念学術講演会, 2013 年 5 月 20 日~5 月 22 日, ホテル阪急エキスポパーク

Baba M, Suzuki M, Tomonaga S, Ogasawara M, Kamada Y, Baba N. Morphological analysis of the intracellular structures in *atg* mutants. The 6<sup>th</sup> International symposium on Autophagy. 2012.10 月 28 日~11 月 1 日, Okinawa. Bankoku Shinryokan

鈴木雅斗, 馬場美鈴, 馬場則男, 動的閾値処理による電子線 CT セグメンテーション法, 第 68 回記念学術講演会, 2012 年 5 月 14 日~5 月 16 日, つくば国際会議場

友永祥彦, 鈴木雅斗, 加藤大貴, 馬場美鈴, 馬場則男, 従来法に代わる断層像画質評価に基づく投影像の位置合わせ法, 日本顕微鏡学会、第 68 回記念学術講演会, 2012 年 5 月 14 日~5 月 16 日, つくば国際会議場

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 荷電粒子線装置、三次元画像の再構成画像処理システム、方法

発明者: 馬場則男, 友永祥彦, 馬場美鈴, 橋本隆仁, 四辻貴文

権利者: (株)日立ハイテクノロジーズ

種類: 特許出願

番号: JP2014 - 119250

出願年月日: 2014 年 6 月 10

国内外の別: 国内

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場美鈴 (BABA Misuzu)

工学院大学付置研究所・研究員

研究者番号：80435528

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

馬場則男 (BABA Norio)

工学院大学情報学部・教授

研究者番号：80164896