

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K00981
 研究課題名(和文) 高精細3D再構築画像を用いたインタラクティブ電子教材の開発と生命科学教育への活用

研究課題名(英文) Development of web-based learning materials using high-definition 3D reconstruction images and the application in life science education on the university course

研究代表者
 小畑 秀一 (Obata, Shuichi)
 北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：10204273
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物胚の高精細な立体再構築画像を用い、高等教育における生命科学教育で利用可能なインタラクティブ電子教材を開発し、これを生命科学教育で活用する方法を検討した。3D再構築画像作成に必要な一連の過程(固定法、包埋樹脂、切片の厚さ、連続切片回収法、対物レンズの倍率、画像連結法、一括画像修正法、立体再構築用ソフト)の最適条件を決定した。この方法を用いて、脊椎動物胚の複数の発生段階の高精細3D再構築画像を作成した。これらを用いて、脊椎動物胚内部の複雑な構造および形態形成に伴う変化を学生に理解させるためには、3D再構築画像作成に用いたソフトウェアで作成した動画が有効であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した方法を用いて作成した高精細3D再構築画像は、複雑に変化する脊椎動物胚の形態形成過程を胚内部の構造も含めて大学生や大学院生に理解させるのに有効であることが分かった。この高精細3D再構築画像およびそれから作成した動画を、学生がいつでもアクセスできる状態でサーバー上に保存すれば、学生の学習時間の実質的増加につながる。さらに、この画像を一般公開できれば、今後その重要性が益々増加する生涯学習の教材としても利用できる。作成した3D再構築画像は光学顕微鏡レベルではあるものの高精細であるため、脊椎動物の椎骨形成過程の解明にも重要な役割を果たすことができた。

研究成果の概要(英文)：We established a method for development of web-based learning materials using high-definition 3D reconstruction images of vertebrate embryos and larvae, and investigated a better presentation method of them in a university education. A series of the established processes included fixation condition, resin for embedding, thickness of a section, effective collection of serial sections, optimum objective lens, image connection, batch image correction, software for making 3D reconstruction image. Using 1,000 serial sections (1 micrometer thickness of each section) of several stages of vertebrate embryos (or larvae) embedded in epoxy resin, we made high-definition 3D reconstruction images. Moreover, we considered several presentation method of 3D reconstruction images for the university students. The best method was to use movies which show the surface images by rotation and the inside structures by showing continuous changes from the surface to the inside at 3 axes.

研究分野：発生生物学

キーワード：デジタル教材 光学顕微鏡画像 立体再構築 科学教育 生命科学 動物胚

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中央教育審議会大学分科会大学教育部会審議まとめ(平成24年3月26日)によれば、「学士課程教育は、課題の発見や具体化からその解決へと向かう基礎力を身につけることを目指す能動的授業を中心とした教育へと質的に転換する必要がある、この質的転換を進める具体的行動を直ちに始める必要がある。・・・(途中省略)・・・このためには授業を担う教員がその重要性を自覚し、個々の授業をさらに質的に進化させることが必要である。」また、ICTを積極的に活用した教育の情報化により、いつでもどこでも受けられる教育の実現が求められている。「2020年代に向けた教育の情報化に関する懇談会」中間とりまとめ、H28.4.8)。これは、大学生の学習時間の実質的な増加と確保につながる。

生命科学の教育現場におけるICTの活用では、動画と3D再構築画像が良く利用されている。これらにはそれぞれ長所と短所がある(表1)。動画は時間と共に変化する生命現象を、肉眼レベルから顕微鏡レベルに至るまで学生にイメージさせるのに非常に有効な方法である。しかし、多くの場合、奥に隠れて見えない構造の変化を見せるにはこの方法は適していない。表面からは見えない部位の構造を理解させるためには、薄く切ったスライスを多数作成し、3D再構築した後、必要な部位の断面を見せれば良い。医療現場では、この方法はCTやMRIを用いた検査と診断で日常的に利用されており、肉眼レベルの構造ならば世界中に教材として利用可能なものが多数存在する。しかし、光学顕微鏡写真を用いた細胞レベルの構造となると、利用可能なものはほとんど存在しない。その主な理由は、(1)3D再構築画像作成用ソフトウェアが高価格であること、(2)コンピュータの性能不足、(3)連続スライス(連続切片)の作成と回収の難しさの3点に集約できる。コンピュータ関連技術は近年急速に進歩しており、上記の(1)と(2)はかなり解消されたと言っても過言ではない。すなわち、優れたフリーソフトがオープンソースで公開されるようになると共に、パソコンの処理速度が飛躍的に進歩したからである。残る技術的問題は、①数千枚にのぼる連続切片を1枚も失うことなく効率よく回収する方法の確立、および、②作成過程で用いる複数のフリーソフトの最適な組み合わせの選定である。

表1. 生命科学教育で用いられる2種類のICT教材の比較

動画	3D再構築画像
長所:動きがあり、変化が直接見える。 短所:隠れた部位の変化が見えない。 現状:多くの動画が教材として利用可能	長所:表面だけでなく、隠れた部位の構造も見える。 短所:動きがなく、変化が直接見えない。 現状:教材として利用可能なものはほとんど無い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1,000枚から数千枚の光学顕微鏡連続切片を撮影した光学顕微鏡写真をもとに、可能な限りフリーソフトを利用して3D再構築画像を作成し、実際の授業における効果的活用方法を検討することである。具体的には、学生にとって極めて理解しにくい現象として、主として「脊椎動物の形づくり」(胚の内部構造が見えない)を取り上げ、脊椎動物胚の形づくりの諸過程(神経管形成、脊索形成、体節形成)の3D再構築画像を作成し、授業での活用法(学生への画像の提示方法など)を検討する。

3. 研究の方法

本研究は連続切片回収までのwet実験系と、それ以降のdry実験系からなり、それぞれの実験系において、以下の各点を検討し、最適な方法を確立した。具体的には、(1)wet実験系では、①胚内部の構造までできる限り生きている状態に近い状態の構造を保存するための固定法、②固定試料を包埋する樹脂、③連続切片の回収法、④1枚の切片の厚さについて検討し、(2)dry実験系では、⑤光学顕微鏡写真の撮影条件(使用する対物レンズの倍率)、⑥複数の顕微鏡写真の連結法、⑦画像の圧縮形式、⑧全画像の一括画像修正法、⑨高精細3D再構築画像(ボリュームレンダリング像)の作成に使用するソフトウェア、⑩学生への提示法(アナグリフ法による立体視、動画による提示、3D pdfによる操作と提示)について検討し、それぞれでベストと考えられる方法を決定した。なお、dry実験系ではできるだけ安上がりで高品質の結果が得られる方法を確立することを心がけた。

3D再構築画像作成にむけて、脊椎動物の形づくりとして、イモリ胚および幼生(stages 12, 21, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 60)、ニワトリ胚(前発生段階)の樹脂包埋試料を作成した。さらに、無脊椎動物の形づくりとして、アカウニ(胞胚~プリズム幼生)の樹脂包埋試料を作成した。

4. 研究成果

①:最適な固定法としては、half Karnovsky固定液とマイクロウエーブの併用による前固定および1%四酸化オスミウムによる後固定の2重固定が最適であった。特に、丈夫な脊索鞘に囲まれ、内部に大きな液胞を持つ脊索細胞では、マイクロウエーブ使用の効果は大きかった。

②:包埋樹脂としてはTechnovit7100とepoxy樹脂を比較した。Technovit樹脂はガラスナイフを用いて1μm厚の切片を大量に切ることができ、複数の染色法が選択できるという利点がある。

認できたが、スライドグラス上に載せた水滴の上で伸展・乾燥させたとき、均一に伸展させられなかった。これは3D再構築画像作成にあたり致命傷となった。結論として、光学顕微鏡切片作成用ダイヤモンドナイフを使用して、epoxy樹脂に包埋したブロックから連続切片を作成し、トルイジンブルー染色する方法が最適であった。なお、切片を貼り付けるスライドグラスとしては、疎水性接着剤をコーティングしたものよりも親水性接着剤をコーティングしたものを使用したほうが、どの方向にも均一に切片を伸展させることができた。

③:連続切片回収法として、複数枚の切片がリボン状に連結したものを一気に回収する方法をいろいろ模索したが、どれも一長一短あり、結果的に、アイラッシュを用いて切片を1枚ずつ手動で拾う方法に落ち着いた。

④:1枚の切片の厚さは⑤光学顕微鏡写真撮影条件とも関連する内容であるため、両者をまとめて記述する。試料のx, y, z軸において、どれか1つの分解能だけが高くても、高精細3D再構築画像の作成はできない。3軸全てにおいてほぼ同じ分解能を持つように設定することが求められる。理想を追求すれば、高い開口数(NA)をもつ対物レンズ(例えば、NA = 1.4の60倍対物レンズ)を使用し、可能な限り薄い切片を作成すれば良い。しかし、切片の厚みを薄くすることは、同時に染色強度が弱くなることを意味する。さらに、作成する連続切片の枚数が飛躍的に増加する。これら全てを考慮した現実的な値は、各切片の厚さは1 μm 、写真撮影にはNAが0.3または0.4の10倍の対物レンズを用いることであった。レイリーの分解能の式に従えば、光軸に垂直な面(すなわちx軸とy軸)の分解能は、NA = 0.3の対物レンズならば1,017 nm、NA = 0.4ならば763 nmであり、z軸方向の分解能である切片の厚さとほぼ同じ値になる。

⑥および⑦:上記の条件で光学顕微鏡写真を撮影すると、イモリのステージ50前後の幼生の頭尾軸に直交する断面は2枚の写真でカバーでき(個々の写真は非圧縮保存形式であるbitmapまたはtiff形式で保存した)、これを連結するためにImage Composite Editor(Microsoft社のフリーソフト)を使用した。後に述べる3D再構築画像作成のためのソフトウェアとして何を用いるかによるが、圧縮が必要な場合には、ブロックノイズによる画質の劣化が目立たないjpeg2000形式で圧縮して保存した。なお、3D再構築画像作成のために市販のソフトウェアを使用した場合、1枚の切片を2枚の写真でカバーする程度であれば、画像の圧縮は不要であった。このようにして作成した一連の画像はそのままで3D再構築画像作成には使用することは難しく、次の⑧で述べるように、さらに何段階かの画像処理が必要であった。

⑧:実際には、カラー画像から白黒画像への変換、白黒画像の反転、コントラスト強調、および画像の整列を行う必要があった。特に、切片を1枚ずつ回収したため、各切片の向きはばらばらであり、画像の整列は重要なステップであった。これら一連の画像処理はすべてImage Jを用いて行うことができた。できるだけ全データセットを一括で処理しよう心がけたが、それができない場合には、いくつかのセットに分けて実施した。

⑨:高精細3D再構築画像(ボリュームレンダリング像)の作成には2つのフリーソフトと1つの市販ソフトを使用し、比較検討した。フリーソフトとして使用したのはSSC DICOM 3D VIEWER(有限会社サイネン・システム)とImage Jであり、市販ソフトとしてはExpert INTAGE(サイバネット株式会社)を使用した。SSC DICOM 3D VIEWERの使用法はExpert INTAGEととてもよく似ており、使い勝手は良かった。しかし残念なことに、2GBを超える大容量のデータセット(厚さ1 mmの3D再構築画像を作成するためには、厚さ1 μm の連続切片を1,000枚作成することになり、これを非圧縮形式で用いると2GBを超えた)を用いると、SSC DICOM 3D VIEWERで3D再構築画像を作成することはできなかった。また、Image Jは3D再構築画像の表示方法に難があり、説得力のある画像を提示できなかった。一方、Expert INTAGE(市販ソフト)を用いれば、これらの問題は起こらなかった。さらに、抽出(一般にはセグメンテーションとよぶ)機能をオプションとして購入し、特定の構造のみをサーフィスレンダリング像として書き出した。1,000枚の連続切片(1枚の切片の厚みは1 μm)をもとに、Expert INTAGEを用いて作成した3D再構築画像(stage 58のイモリ幼生の腰部)を図1に示す。ここでは、白黒画像として示したが、実際は疑似カラー表示である。脊索が中心の図であるが、分節化した筋節をその向きも含めて示すことができた。また、この時期の幼生では、脊索の周囲が骨化していたが、骨化した領域のみを抽出したサーフィスレンダリング像が図2である。この向きではわかりにくいですが、真横から見ると周期的に太さが変化している様子が分かり、脊索の分節化も示すことができた。

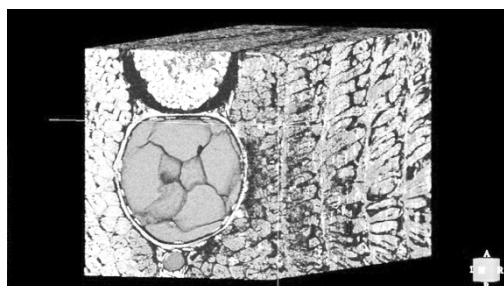


図1. Stage 58のイモリ幼生の腰部の3D再構築画像

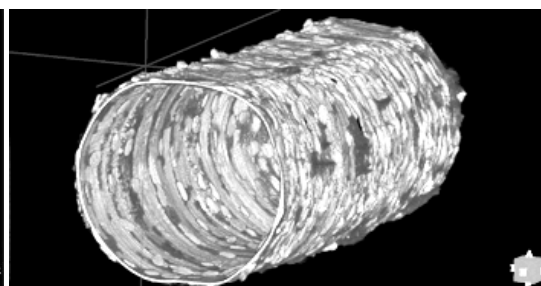


図2. 左の図1からの骨化領域のみを抽出した像

⑩:立体像の学生への提示方法として、アナグリフ法、Expert INTAGEを用いて作成した動画、

3D pdf の3種類を試行した。アナグリフ法に使用する画像を作成するのは簡便であった。しかし、この方法による立体視は、教室内に設置されたスクリーンの正面中央では有効であったが、スクリーンを斜めから見る位置ではあまり有効でなかった。一方、Expert INTAGE を用いて、3D再構築画像を回転させたり、3つの断面について、その位置を変化させる動画を作成して提示する方法は、学生の要望にその場で応えることはできなかったが、おおむね好評であった。特に注目してもらいたい位置や構造については、動画再生時の一時停止機能を用いることで、じっくり見せることも有効であった。当初、3D pdf による提示が最も効果的であると期待して開始したが、うまく3D pdf 化することができず、その効果は検証できなかった。

本研究開始時には、約1,000枚からなる全連続切片を60倍の水浸対物レンズ (NA = 1.0) を用いて写真撮影すれば、高精細なバーチャルスライドと3D再構築画像を共に作成可能なデータセットを手にするできると考えていた。しかし、これは浅はかであった。上記の対物レンズを用いると、1枚の切片につき、最低でも200枚程度(切片の大きさによっては2,000枚以上)の写真を撮影しなければならない。これを約1,000枚からなる連続切片全てについて手動で実施するのは非現実的であり、この方法は早々に断念せざるを得なかった。将来的には、電動ステージと自動撮影ソフトを搭載した光学顕微鏡を導入し再挑戦するつもりである。本研究で実際に実施したのは、イモリ胚の最も良くできた少数の切片について、上記の対物レンズを用いて手動で写真撮影し、bitmap形式またはtiff形式の非圧縮形式で保存した後、jpeg2000形式で圧縮保存し直し、Image Composite Editorを用いて連結することにより、高精細なバーチャルスライドを少ない種類ではあるが作成した。

本研究で確立した方法を用いることにより、高精細3D再構築画像を作成することが可能であったが、問題点も見つかった。ここに記した方法では、細胞の境界を明瞭に示すことができないため、一つ一つの細胞を細部に至るまで正確に抽出することができないことである。個々の細胞の間に隙間がある場合はその限りではないが、そのような例はそう多くない。この問題点を解消するための方法のひとつは電子顕微鏡を用いた電子顕微鏡ボリュームイメージング法を適用することである。電子顕微鏡観察を行うためには重金属などで細胞膜などの生体膜を電子染色する必要があり、細胞の境界のみならず、細胞内の膜性構造の微細構造も可視化することができる。

高等教育における高精細3D再構築教材も、光学顕微鏡レベルのものに留まらず、電子顕微鏡レベルのものを作成する必要がある。多くの生化学反応は細胞膜や細胞小器官の膜上もしくはその膜によって囲まれた空間で行われるからである。電子顕微鏡観察に用いる非常に薄い切片(本研究で用いた切片の約1/20である50~70 nm)から得られる形態情報を正しく理解するためには、これまでのように多くの電子顕微鏡写真を根気よく観察する方法はもはや時代遅れである。最善の方法は、立体構造の中で理解することであり、そのためにも電子顕微鏡レベルでの3D再構築画像作成が必須である。このような視点に立ち、本研究をさらに進展させる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Casco-Robles Roman M., Watanabe Akihiko, Eto Ko, Takeshima Kazuhito, Obata Shuichi, Kinoshita Tsutomu, Ariizumi Takashi, nakatani Kei, Nakada Tomoaki, Tsonis Panagiotis A., Casco-Robles Martin M., Sakurai Keisuke, Yahata Kensuke, Maruo Fumiaki, Toyama Fubito, Chiba Chikafumi,	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel erythrocyte clumps revealed by an orphan gene <i>Newtic1</i> in circulating blood and regenerating limbs of the adult newt	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 7455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25867-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ryunosuke Yanaka, Yuichi Kadoya, Shuichi Obata	4. 巻 236 (S1)
2. 論文標題 Ossification and morphogenesis of vertebra in Japanese newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryunosuke Yanaka, Yuichi Kadoya, Shuichi Obata
2. 発表標題 Ossification and morphogenesis of vertebra in Japanese newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i>
3. 学会等名 The 19th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷中竜之介, 門谷裕一, 小畑秀一
2. 発表標題 アカハライモリの胚発生過程における椎骨形成
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野和敬, 増本三香, 小畑秀一, 浅島 誠, 永島雅文
2. 発表標題 原腸胚形成における細胞骨格の再構築による胚細胞運動の制御
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷中竜之介, 門谷裕一, 小畑秀一
2. 発表標題 有尾両生類の胚発生過程における椎骨形成
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野和敬, 小畑秀一, 増本三香, 浅島 誠, 永島雅文
2. 発表標題 原腸胚形成における胚葉特異的な細胞運動の制御機構
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 徹, 門谷裕一
2. 発表標題 胎仔マウス顎下腺の脱メチル化シトシンとDNA脱メチル化酵素の発現解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野和敬, 小畑秀一, 増本三香, 浅島 誠, 永島雅文
2. 発表標題 原腸胚形成における胚細胞の自律的な運動のしくみとその役割
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 徹, 門谷裕一
2. 発表標題 胎仔マウス顎下腺の発生における脱メチル化制御機構
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	門谷 裕一 (Kadoya Yuichi) (10185887)	北里大学・医療衛生学部・教授 (32607)	
研究分担者	林 徹 (Hayashi Toru) (10454266)	北里大学・医療衛生学部・講師 (32607)	
研究分担者	木村 武俊 (Kimura Taketoshi) (80327444)	北里大学・医療衛生学部・助教 (32607)	