

反射電子像を用いた画像解析の試み

小笠原 勝利、花坂 智人、石山 絵里、野崎 貴介、石田 欣二
(岩手医科大学 医歯薬総合研究所 生命科学研究技術支援センター)

OGASAWARA Katsutoshi : Preliminary report of the image processing for montage data and three-dimensional analysis of back scattered images (BSI).

To analyze large-scale (LS) and three-dimensional (3D) information from back scattered images (BSI) detected by FE-SEM, we tried to find suitable processing methods using available image-processing software (Fiji & NDP.view2 & Microscopy Image Browser). Here we report preliminary results of a montage of 88 BSI which covered large area (254 μm by 142 μm) with high-resolution of 25,564 \times 14,360 pixels and reconstructed 3D images from more than 50 BSI of serial ultrathin sections.

1. 目的

近年、反射電子像による超薄切片の画像解析が報告されている。この報告をヒントに、私達は、樹脂包埋した試料を TEM 観察に加え、SEM を用いた反射電子像による超微形態解析を行っている。この方法は、TEM と同等の解像度の画像を得ることができ、スライドガラスに大型切片や連続切片を回収して観察することができるので、広領域観察と効率のよい連続切片画像の取得が可能である (図 1、2)。今回は、①広領域画像の取得～解析と②連続切片の 3 次元画像解析について、画像解析ソフトウェアを用いて検討した。

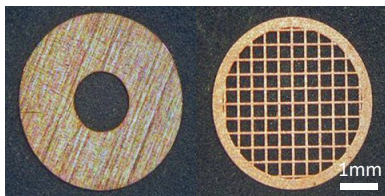


図 1. TEM 用グリッド

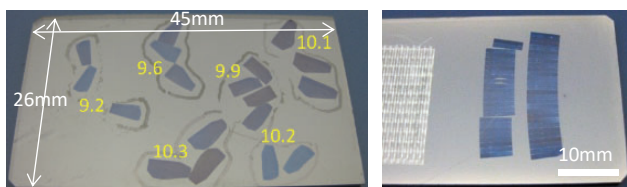


図 2. スライドガラスに回収した切片

2. 方法

①広領域画像解析は次の(1)～(3)の手順で進めた。

(1) 反射電子像の撮影 (タイリング)

電界放出形走査電子顕微鏡 (SU8010 HITACHI) を用いて、加速電圧 1.5kV、WD 2mm の条件で反射電子像の撮影を行った。

(2) 画像のつなぎ合わせ

Fiji (Fiji Is Just Image) Plugins : Grid / Collection

stitching を用いて、自動でつなぎ合わせを実施した。

つなぎ合わせがうまくいかない画像は、Photoshop (Adobe) を使って手動で行った。

(3) 広領域画像の観察・計測

つなぎ合わせた画像は、画像閲覧ソフトウェア NDP.view2 (Hamamatsu Photonics K.K.) を用いて観察した。Viewer 内でフリーハンドのアノテーションを用いて、長さや面積を計測して結果を Excel に出力した。

②3 次元画像解析は次の(1)～(5)の手順で進めた。

(1) 反射電子像の撮影 (連続切片)

タイリング撮影の時と同じ条件で実施した。

(2) 画像の明るさ調整

Fiji Plugins : Stack Contrast Adjustment を用いて、自動で明るさ調整をした。

(3) 画像のアライメント

Fiji Plugins : Register Virtual Stack Slices あるいは StackReg を使用して、自動でアライメントを実施した。アライメントがうまくいかない画像は、Fiji Plugins : TrakEM2 を用いて手動で位置合わせをした。

(4) セグメンテーション

Microscopy Image Browser (MIB、University of Helsinki) を使用して、自動と手動を組み合わせで実施した。

(5) 3 次元再構成・計測

3DSlicer (The Slicer Community) を使って、3 次元再構成を行った。また、TrakEM2 を用いて体積と表面積の計測をした。

3. 結果

広領域画像解析では、図3のように培養細胞の試料のタイリング撮影～計測を行った。つなぎ合わせ画像の中から20個細胞を選び、細胞内のミトコンドリアを手動で計測した(タイリング画像数 WT:3、KO:3 ⇒ 計測した細胞数 WT:60、KO:60)。ミトコンドリアの総数は、WT:1,629、KO:2,036であった。WTとKOを比較すると、WTのミトコンドリアが大きいことは画像を見て明らかであったが、実際に計測をすること

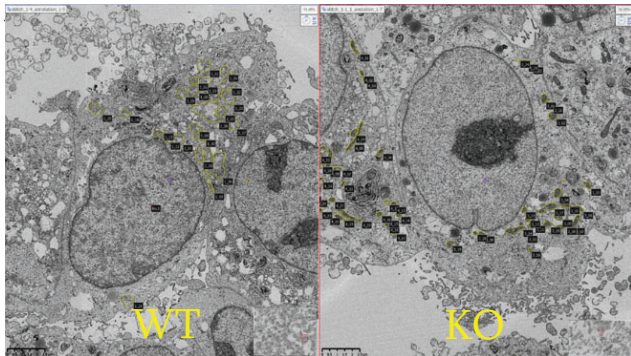


図3 培養細胞内のミトコンドリア 計測結果(面積)

3次元画像解析では、これまでに胸膜(反応性)中皮細胞の3次元再構成・計測を進めてきた。その中で、図4のような微小管様構造を確認したので、今回はこの構造に着目して3次元画像解析を行った。微小管様構造の直径は約35nmであった(微小管:約25nmの管状の構造)。この構造をもつ細胞が他にも存在するかどうかを確認するために、連続切片の中間にある切片の赤枠内(図5①、②)をタイリング撮影した(切片厚:200nm)。つなぎ合わせた画像を観察すると、微小管様構造をもつ細胞は、①:3/91個(3.3%)、②:3/82個(3.7%)であった。この中でセグメンテーション、3次元再構成・計測をした一例を図6に示す。

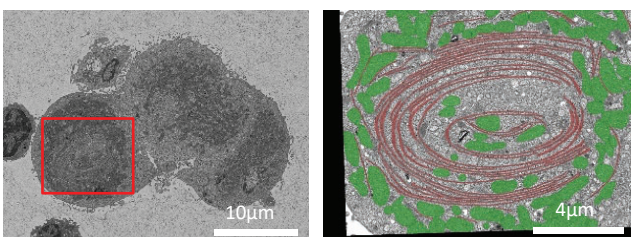


図4 胸膜(反応性)中皮細胞内にある微小管様構造

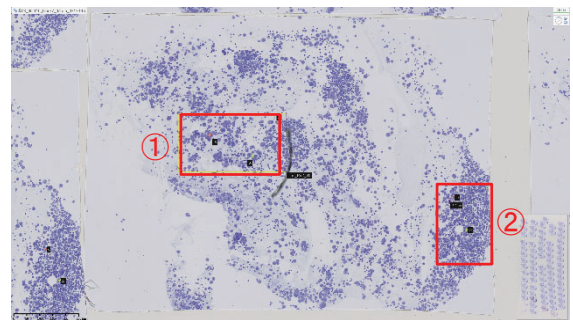


図5 胸膜中皮細胞の連続切片(バーチャルスライド)

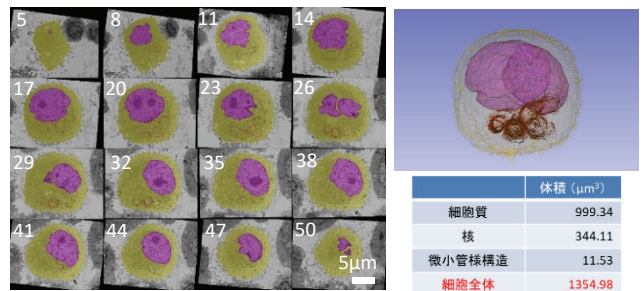


図6 セグメンテーション、3D・計測結果(胸膜中皮細胞)

4. 考察

つなぎ合わせ画像は、汎用のPCで時間をかけて観察できる。電顕観察時に見落とししていることが、後で見返して気づくことは多い。また、複数の人とデータ共有することで、ディスカッションや追加撮影を効率的に進めることができる。今回は計測を全て手動で行ったが、自動化できる部分があれば検討していきたい。

3次元画像解析では、セグメンテーションに時間がかかっているの、いかに短縮できるかが今後の課題である。図5のようにバーチャルスライド上(光顕)の同一切片をSEM(反射電子像)で観察できるので、目的の細胞を2次元で探索し、その後に連続切片画像を取得して3次元画像解析をすることができる。

今回は、FijiやMIBなどのオープンソース、フリーウェアを使用した。他にも多くのソフトウェアがあり、AIや機械学習を取り入れながら日々進化している。今後は、ソフトウェアの中身も理解しながら、画像解析の知識習得と経験を継続して積んでいきたい。

謝辞

今回の報告に用いた反射電子像の取得・計測の機会を頂いた、岩手医科大学 薬理学講座 病態制御学分野 小笠原正人 教授に感謝いたします。

参考文献

1) Micheva, KD and Smith SJ: Array Tomography: A New Tool for Imaging the Molecular Architecture and Ultrastructure of Neural Circuits. Neuron (2007) 55: 25-36