

令和6年4月25日

蛍光顕微鏡画像を簡便に三次元観察可能に

～蛍光顕微鏡画像用にデザインされた「ボリュームレンダリングソフトウェア」を開発～

本研究成果のポイント

- 蛍光顕微鏡や組織透明化技術の進歩に伴い、蛍光情報を保ち組織・臓器・胚の全体を顕微鏡による観察が可能となりました。一方、顕微鏡から得られた断層像を用い、蛍光染色による断層画像から三次元的観察や解析を行う際、高性能なワークステーションや画像処理用演算プロセッサ（GPU）と専用のシステム導入には非常に高額なコストを要するため、多くの研究室の障壁となっていました。
- 本研究では、大容量のシステムメモリへ高速にアクセス可能な GPU を保有する Apple Silicon（Apple, Cupertino, CA, USA）の特性に着目し、**十分な処理速度と高い観察自由度を備えたボリュームレンダリング（三次元画像作成・解析）用のオープンソース・ソフトウェアを開発**しました。
- 本ソフトウェアにより、**ラップトップマシンにおいて高解像な顕微鏡画像の三次元観察を可能にし、幅広い生命科学分野での三次元的観察への応用が期待**されます。

京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学 教授 八代健太の研究グループは、蛍光顕微鏡画像用にデザインされた「ボリュームレンダリングソフトウェア」の開発に関する研究成果が科学雑誌『Development』に（2024年4月25日）付けでオンライン掲載されましたのでお知らせします。

本研究では、大容量のシステムメモリへ高速にアクセス可能な GPU を保有する Apple Silicon（Apple, Cupertino, CA, USA）の特性に着目し、十分な処理速度と高い観察自由度を備えたボリュームレンダリング（三次元画像作成・解析）用のオープンソース・ソフトウェアを開発しました。この研究から、**幅広い生命科学分野での三次元的観察への応用が期待**されます。

【論文基礎情報】

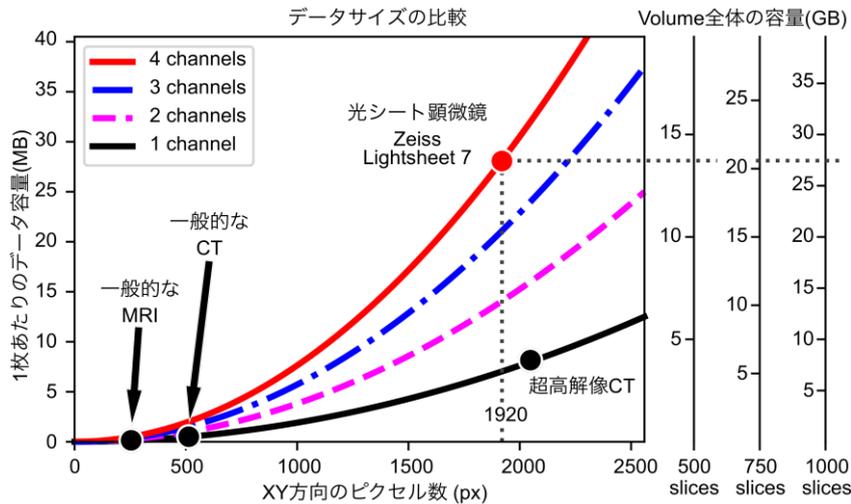
| | |
|-------|---|
| 掲載誌情報 | 雑誌名 Development (2024) 151 (8): dev202550. doi:10.1242/dev.202550 発表媒体 <input checked="" type="checkbox"/> オンライン速報版 <input type="checkbox"/> ペーパー発行 <input type="checkbox"/> その他 雑誌の発行元国 英国 オンライン閲覧 可 Acto3D: an open-source user-friendly volume rendering software for high-resolution |
|-------|---|

| | |
|------|---|
| | <p>3D fluorescence imaging in biology Development The Company of Biologists</p> <p>掲載日 2024年4月25日(木) 午前8時1分(日本時間)</p> |
| 論文情報 | <p>論文タイトル(英) Acto3D: an open source user-friendly volume rendering software for high-resolution 3D fluorescence imaging in biology</p> <p>代表著者 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学 八代健太</p> <p>共同著者 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学(同大学大学院医学研究科小児科学) 竹下直樹 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学(東京大学大学院医学系研究科 小児科学) 榎 真一郎 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学(同大学大学院医学研究科放射線診断治療学) 佐波理恵 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学(同大学大学院医学研究科小児科学) 井上 聡 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学(同大学大学院医学研究科小児科学) 西川幸祐 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学(大阪大学大学院医学系研究科 小児科学) 上山敦子 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学 中島由郎 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学 松尾和彦 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学 茂田昌樹 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学 小林大介 京都府立医科大学大学院医学研究科 放射線診断治療学 山崎秀哉 京都府立医科大学大学院医学研究科 放射線診断治療学 山田 恵 京都府立医科大学大学院医学研究科 小児科学 家原知子</p> |
| 研究情報 | <p>研究課題名(日) 心血管系の形態形成を支える多細胞間シグナルネットワークのダイナミクス</p> <p>代表研究者 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学 八代健太</p> <p>共同研究者 共同著者と同様</p> <p>資金的関与(獲得資金等) 基盤研究(B)JP23K27569, ABiS JP22H04926, 川野小児医学奨学財団研究助成, 宮田心臓病研究振興基金奨励金(八代健太:京都府立医科大学); JST 特別研究員(DC2)JP22J12994(竹下直樹:京都府立医科大学)</p> |

【論文概要】

1 研究分野の背景や問題点

蛍光顕微鏡の進歩や組織透明化技術の進歩に伴い、切片を作成せずとも組織片・臓器・胚の全体を抗体染色し、深部まで顕微鏡による観察が可能となり、得られた断層画像セットを用いて三次元立体画像を構築し、詳細な観察と解析が可能となってきています。しかしながら、組織の浅部～深部にかけて連続的に断面を撮像して得られた断層画像データは、MRIやCTと比較して巨大なデータセットとなりやすく（図1）、これらを三次元で観察するためには高性能なPC・画像処理用演算プロセッサ（GPU）・専用ソフトウェアが必要であり、特に大容量の専有メモリを備えたGPUと商用ベースの専用ソフトウェアは非常に高価のため、撮像した画像データも三次元空間で自由に観察・解析することは研究者にとって大きな障壁となっていました。臨床で使用されるCTやMRIによる断層画像データからの立体画像構築は現在では当たり前のように利用されており、病態の理解と診療に大きく貢献しています。このことから、顕微鏡で取得した組織・臓器・胚のデータも、断面画像から三次元画像を構築して解析することの重要性は明らかです。



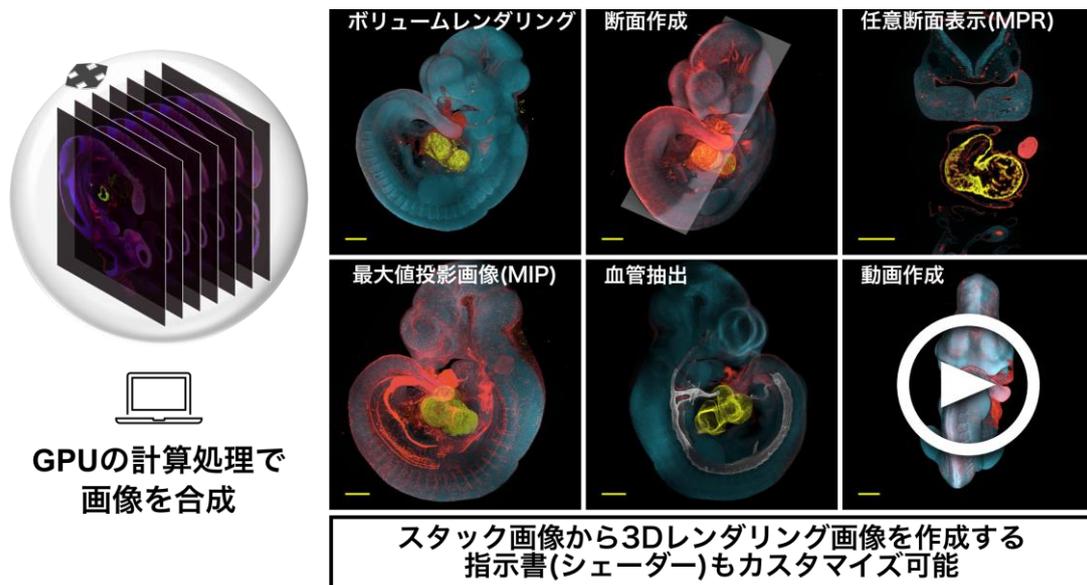
(図1). 蛍光顕微鏡画像と従来の放射線画像のデータサイズの比較.

2 研究の内容

我々は、Apple社 (Apple, Cupertino, CA, USA) が2020年に発表した、現在の市場で流通しているMacに一般的に装備されているApple Siliconが有するユニファイドメモリの設計に着目し、この特性を大いに活用した新規のボリュームレンダリングソフトウェア「Acto 3D」(Adaptive volume rendering software that allows users to freely adjust and customize color tones and transfer functions and provides for rich observation in 3D)を設計し開発しました。

ユニファイドメモリでは、従来の専用GPUと異なり、GPUからシステムメモリ領域へ直接的かつ高速にアクセス可能であることから、大容量の専有メモリを備えたGPUであると捉えることができます。この特性を利用し、蛍光顕微鏡での撮像データ全体をメモリ上へ展開し、ピクセル値を高い自由度で高速に合成することで、MacBook Proなどのラップトップマシンでも**高解像な顕微**

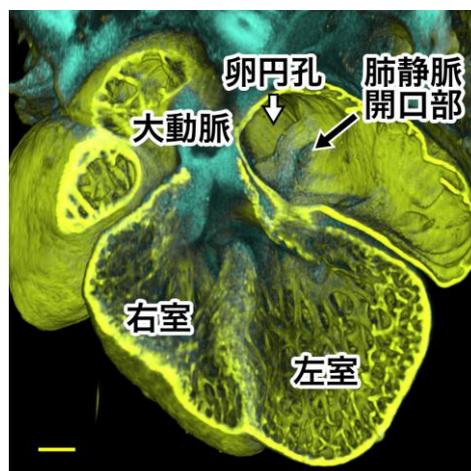
鏡画像の三次元観察を可能としました (図 2)。Acto 3D は Mac に特別な環境構築を行う必要がなく、撮像したデータセットを容易に空間上で任意の視点から観察可能です。



(図 2). Acto 3D による多彩な描画.

【マウス組織での三次元観察】

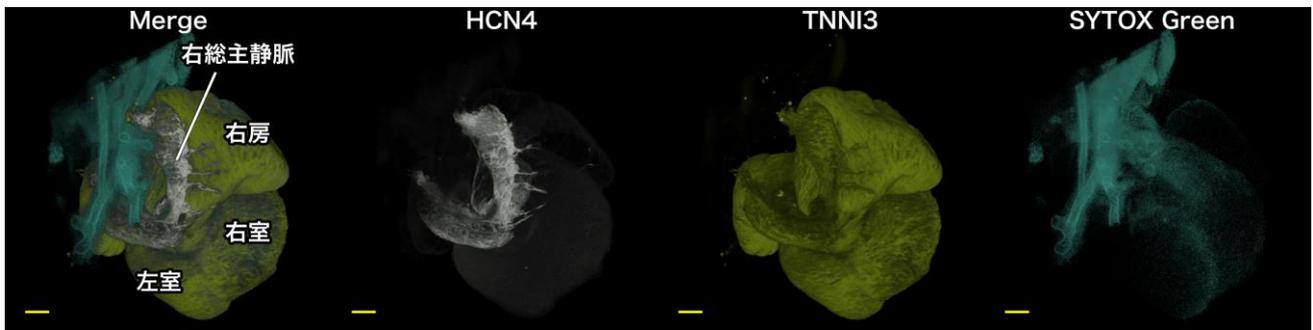
実際のマウスの受精後 12.5 日目 (E12.5) の胚の心臓，心筋タンパクに対する抗体 (TNNI 3 抗体)，刺激伝導路を構成する HCN4 に対する抗体と核を染色し，CUBIC 法 (Susaki, E. A. *et al. Cell* 2014, 157, 726) と呼ばれる組織透明化法を用いて心臓そのものを透明化し，光シート顕微鏡で画像を取得しました．これらのデータを Acto 3D で立体画像構築したところ，従来から立体画像解析に使用されていた *episcopic microscopy* (Curr Opin Genet Dev. 2011; 21:573-8) と比較し，①高精細，②自由な観察断面が得られる，③特定のタンパク染色像を抽出できる，④切片作成が不要で組織の非可逆的な損傷が避けられる，などの利点を得ることができました (図 3,4).



(図 3). マウス胎児 (E12.5) の心臓の TNNI 3 抗体 (黄)・SYTOX Green (薄緑) の断面

TNNI3 染色により，心室内の豊富な肉柱形成が鮮明に観察可能である。

TNNI3 陰性の流出路組織と明瞭に区別可能である。



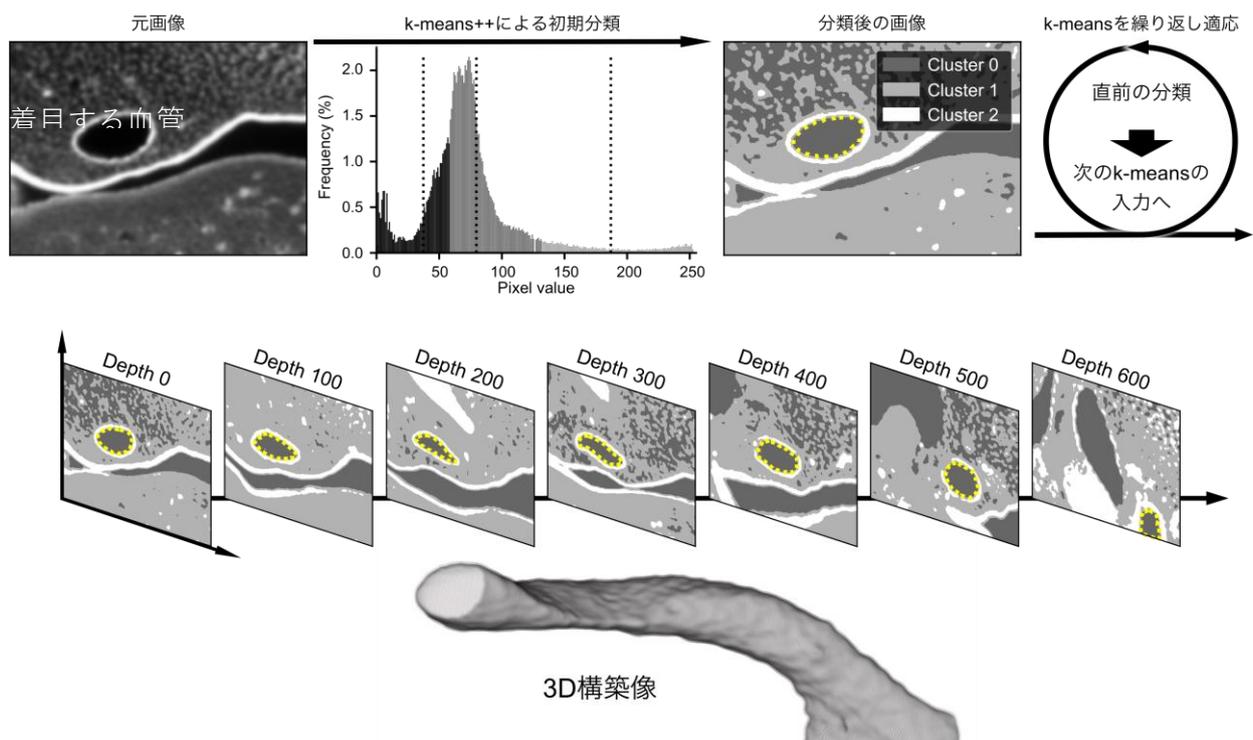
(図 4). マウス胎児 (E12.5) の TNNI3 抗体 (黄)・HCN4 抗体 (白), SYTOX Green (薄緑)の
三次元構築像

抗体染色を元に特定のタンパク発現部位を詳細に観察することが可能である。

従来の episcopic microscopy は高解像ではあるが全体の構造観察しかできなかった。

【管腔構造の抽出】

さらに三次元画像解析の例として，教師なし機械学習の手法の 1 つである k-means++/k-means を応用して，空間画像データセット上での管腔構造の抽出アルゴリズムを提唱し，**複雑なマウスの大血管の立体構造を抽出することに成功**しました。本手法は，空間上の任意の観察領域に対して k-means++を利用して画像を輝度値で分類し，得られた中心点を続く k-means の初期点へ代入していくことを繰り返すことで，分類の傾向を下流へ（奥の画像へ）伝達させることが可能となり，奥に行くにしたがって輝度値のむらが生じやすい z-stack 画像での血管内腔の抽出を容易にしました (図 5)。



(図 5). 本手法の概略

k-means++手法で最初の画像でクラスタリングを決定した後は、
得られた中心点を、続く k-means の初期点として使用することにより、
奥の画像でも分類の傾向を保ちやすくなる。

このように構築した咽頭弓動脈のモデルは従来の連続切片を手動でトレースする方法に比べると、正確かつ高精細であり、他の抗体染色と組み合わせることで周辺の組織構造と関連付けて観察することが可能です (図 6).



(図 6). マウス胎児 (E10.0)の咽頭弓動脈 (左) と周辺組織との合成像 (右).
複雑な咽頭弓動脈の形態を三次元で観察することができ、他の抗体染色と組み合わせることで、
どの部位に血管が位置しているのか視覚的に容易に把握できるようになる。

左図における 2nd~6th は咽頭弓動脈の番号を示す。

3 今後の展開と社会へのアピールポイント

これまで巨大なデータセットを三次元で観察して理解することは、限られたリソースが利用可能な一部の研究者・研究室に限られていました。Acto 3 DはmacOS限定ではありますが、Apple Siliconの利点を最大限に活用することで、手持ちのMシリーズのMacで動作するため、新規の投資を最小限に抑えつつ、多くの研究者に空間観察・解析のリソースを提供します。本論文では主に光シート顕微鏡での画像を使用しましたが、共焦点顕微鏡や多光子顕微鏡など多くの顕微鏡に応用可能で、幅広い生命科学分野での三次元的観察への応用が期待されます。

| 研究に関すること | 広報に関すること |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 生体機能形態科学 教授 八代健太 | 事務局企画広報課 担当：堤 |
| 電話：075 - 251 - 5302 | 電話：075 - 251 - 5804 |
| E-mail: kyashiro@koto.kpu-m.ac.jp | E-mail:kouhou@koto.kpu-m.ac.jp |