

組織切片画像を基にした 広視野高解像度 3 次元再構築法

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻
新潟大学 医学部 顕微解剖学分野
准教授 三上 剛和

2023年11月7日

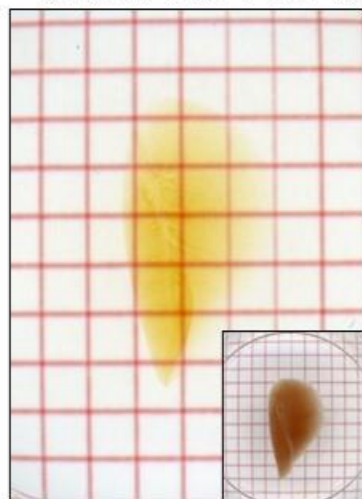
3次元構築の重要性

- 各組織、器官を3次元的に観察することによって、誰でも簡単にその形状を把握することができる。
- 組織の凹凸や血管、気管支の走行などは2次元画像では捉えにくい。
- 作成した3Dデータから標的となる構造や細胞集塊の体積や表面積を定量できる。

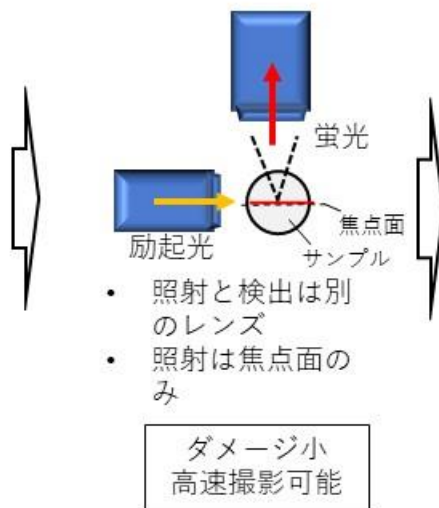
組織透明化による 3 次元構築の例



透明化したマウス肺

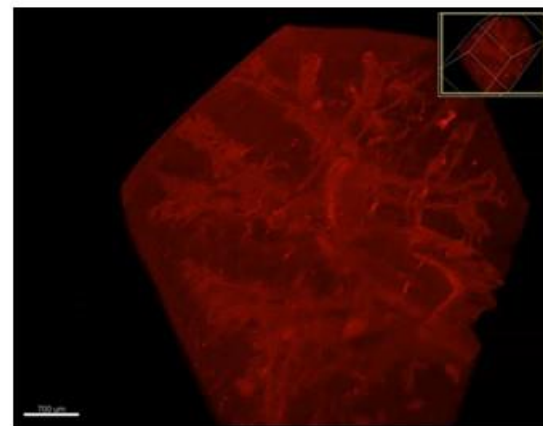


シート型蛍光顕微鏡



肺組織全体を標的とするような広視野3D構築に適している。

シート型蛍光顕微鏡画像を基に構築した3D画像（自家蛍光）



内部構造（気管支）を観察できる。蛍光標識した細胞を検出することも可能。

組織透明化による 3 次元構築の問題点

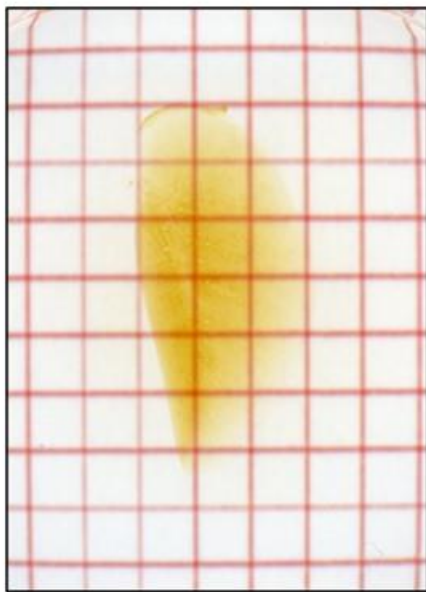
- 適応範囲が限定される！！

理由

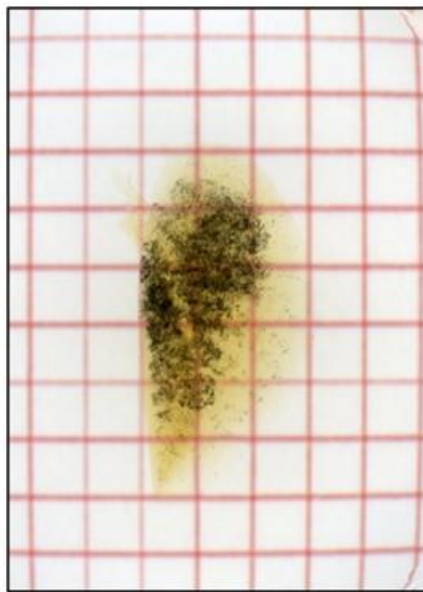
1. 特殊な顕微鏡が必要。
2. 蛍光を遮断する異物が存在すると撮影できない。
3. 解像度が低く、1 細胞レベルの局在は解析できない。

組織透明化の例（環境中微粒子曝露マウス肺）

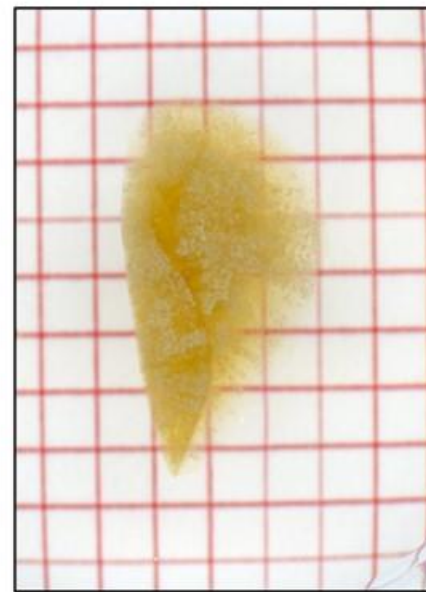
黄砂



ディーゼル排気粒子（DEP）



酸化チタン粒子（TiO₂）



DEPおよびTiO₂は肺組織内への沈着が著しく、シート型蛍光顕微鏡での撮影が困難

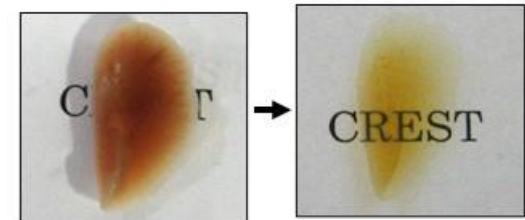
切片画像からの肺組織三次元再構築

これまでの課題

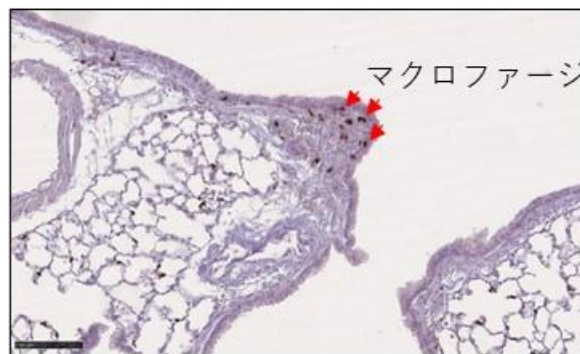
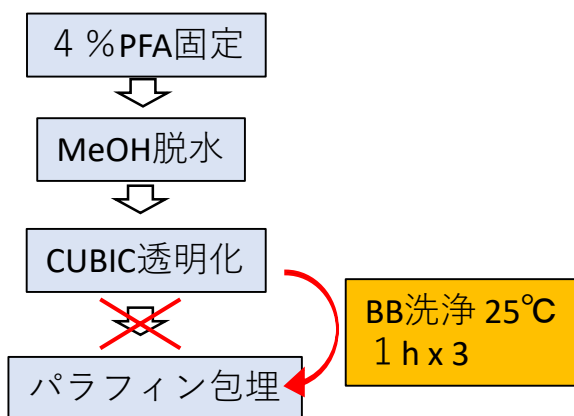
- 一般的な組織切片の画像の積算による三次元構築は、膨大な手間と時間がかかる（一つの肺の数週間が必要）。
- 肺組織全体を捉えた広視野画像では、解像度が悪く、1細胞レベルの局在は解析できない。

対策

- 組織透明化技術の応用
→バックグラウンドの軽減によってコンピューターショナルに標的細胞や構造を抽出
- 高解像度スキャナーの導入
→広視野高解像度画像の取得
- 三次元構築ソフトウェアの改良（AI技術の導入）
→より精細かつ簡便な三次元構築



透明化マウス肺の薄切と免疫組織化学染色 (DAB/ヘマトキシリン)

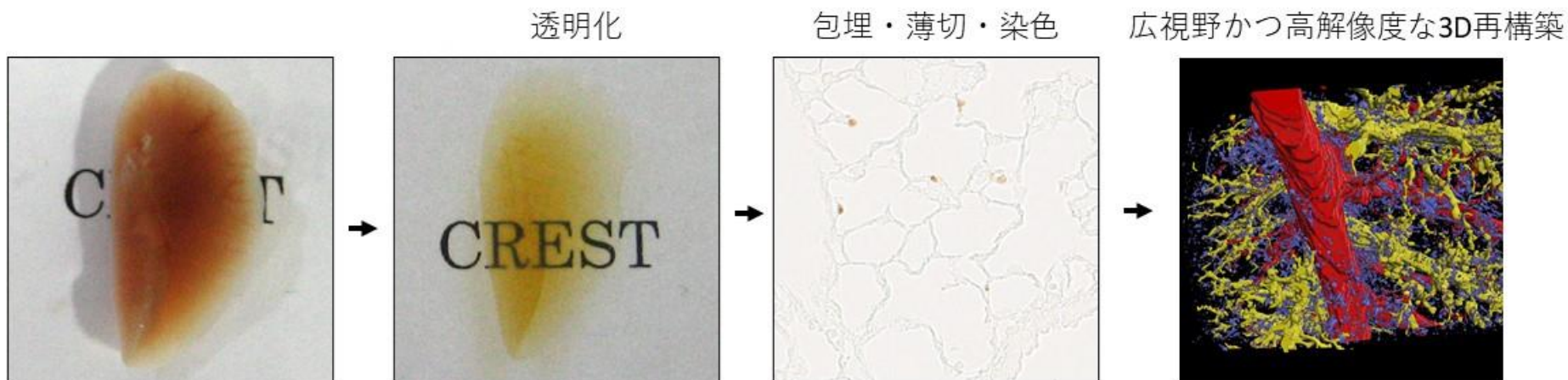


透明化→Benzyl Benzoate (BB)置換
→パラフィン包埋→薄切→免疫染色

透明化組織をBB置換することで、パラフィン包埋が可能

透明化した組織の切片画像から3D構築

透明化試料の連続切片を用いた三次元再構築法



黄砂（ASD）とアレルゲン（OVA）曝露マウス肺解析

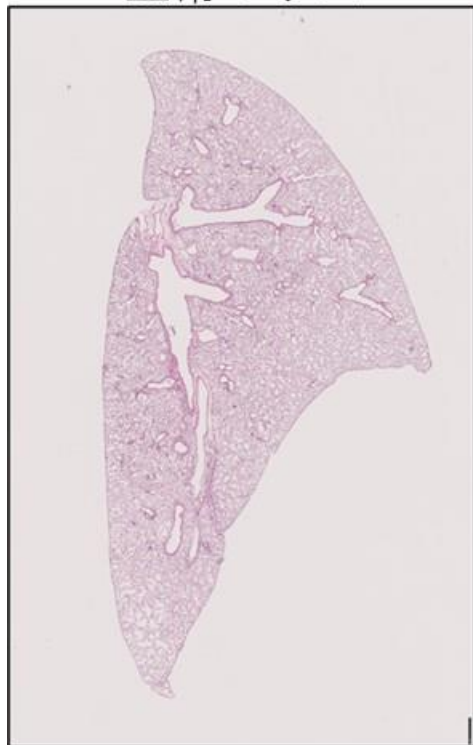
気管内投与

気管内投与

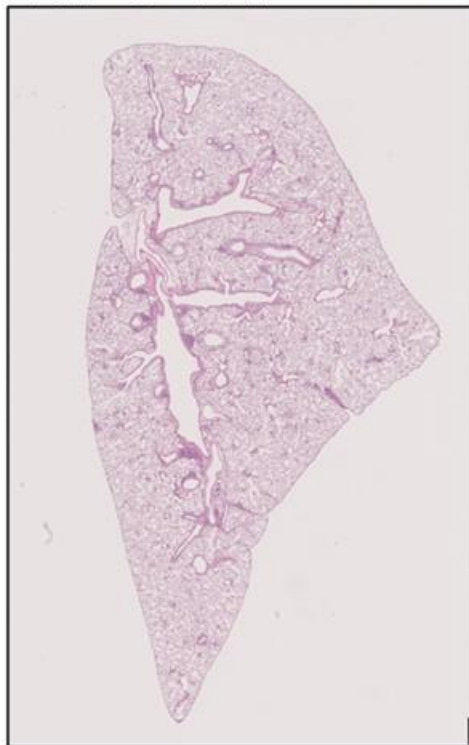
気管内投与

気管内投与

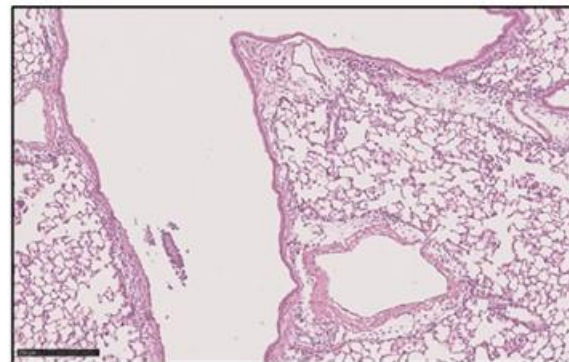
正常マウス



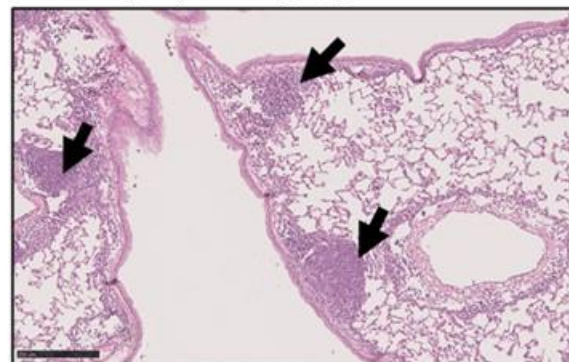
微粒子曝露マウス



正常マウス



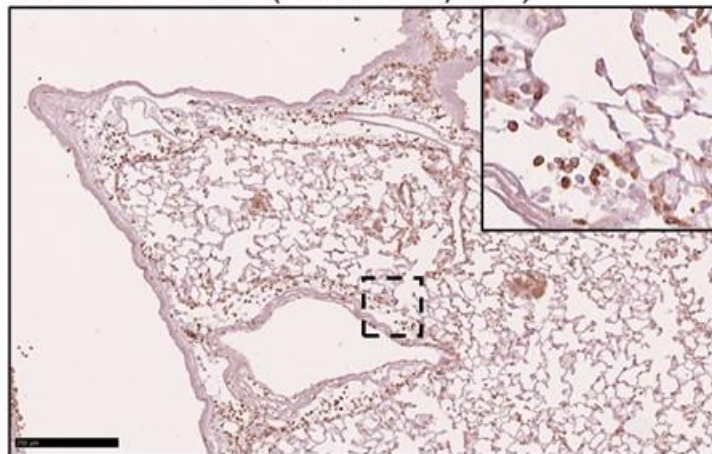
微粒子曝露マウス



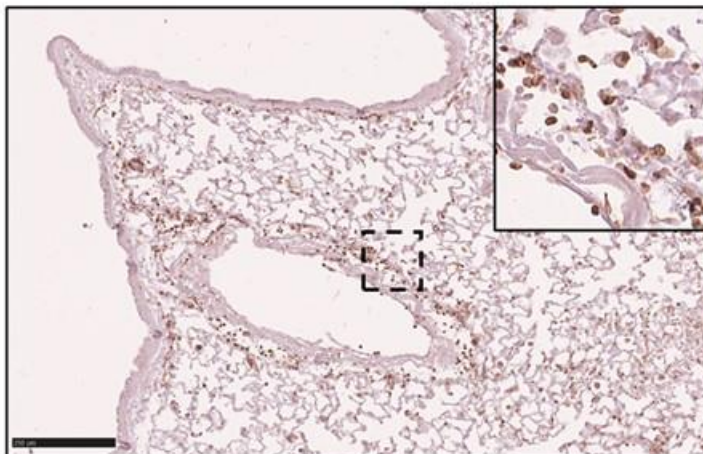
微粒子曝露マウスでは、矢印で示す細胞の集塊が顕著に認められる。

黄砂 (ASD) とアレルゲン (OVA) 曝露マウス肺解析

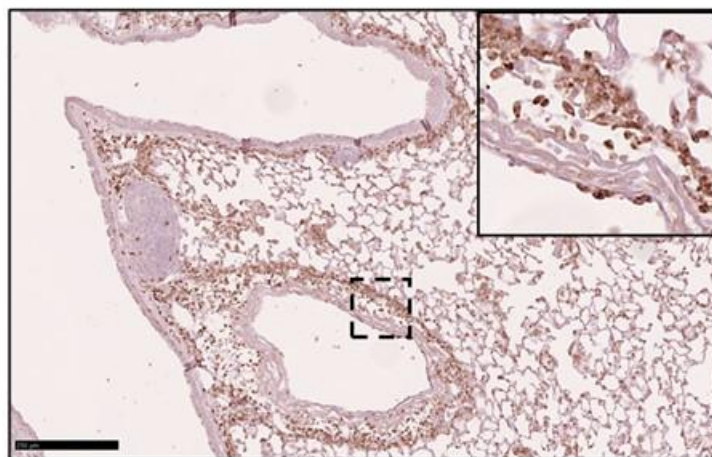
OVA+ASD (anti-F4/80)



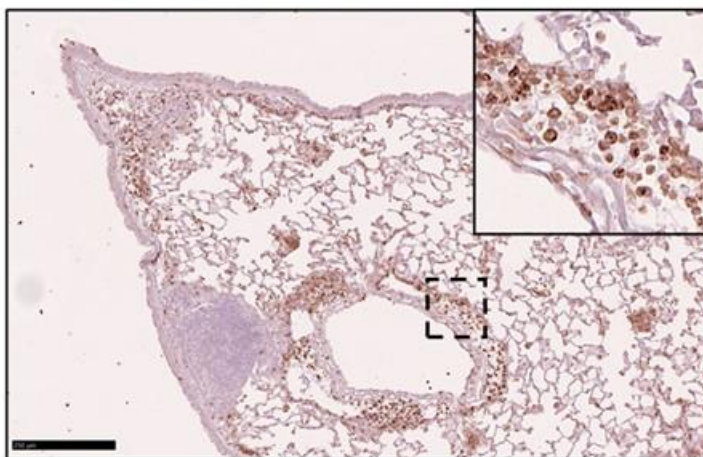
1回目



2回目



3回目

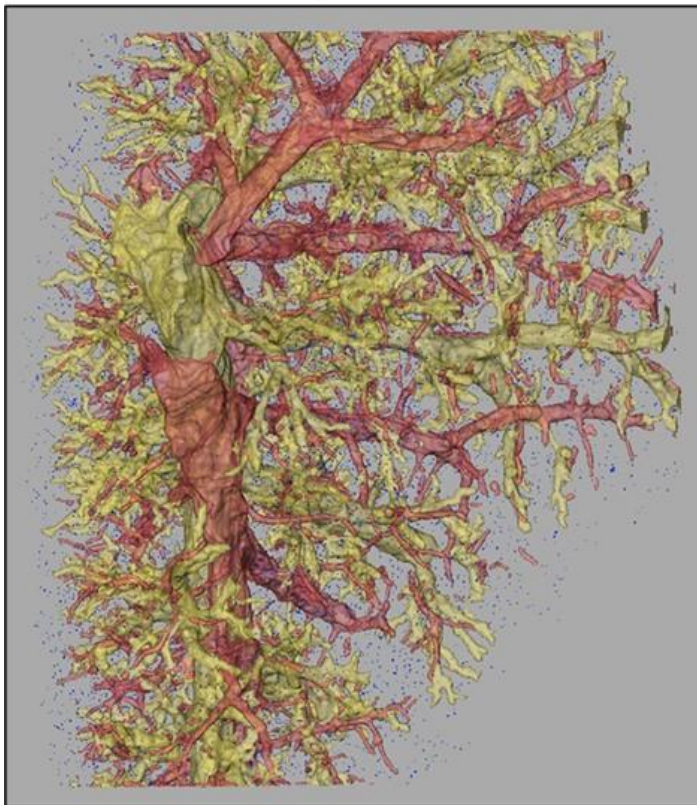


4回目

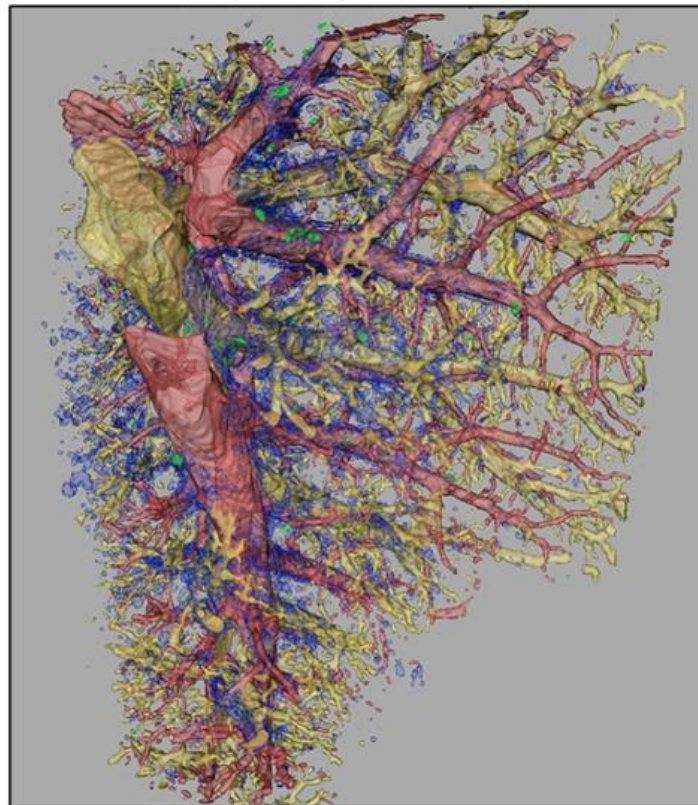
曝露回数が増えるに伴い、マクロファージの血管や気管支周辺への浸潤が増加する。

黄砂（ASD）とアレルゲン（OVA）曝露マウス肺解析

正常マウス



微粒子曝露マウス

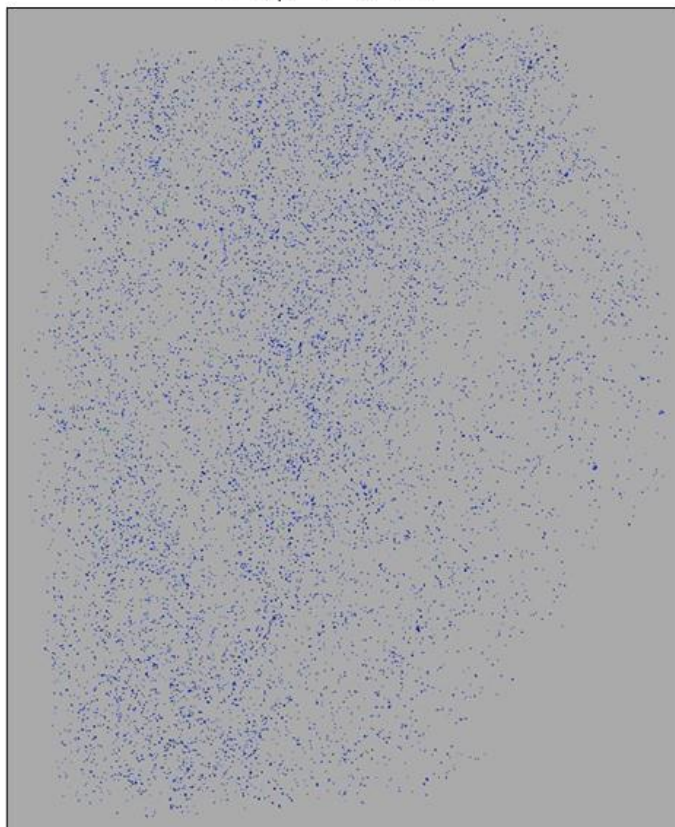


■ 気管支 ■ 血管 ■ B細胞 ■ マクロファージ

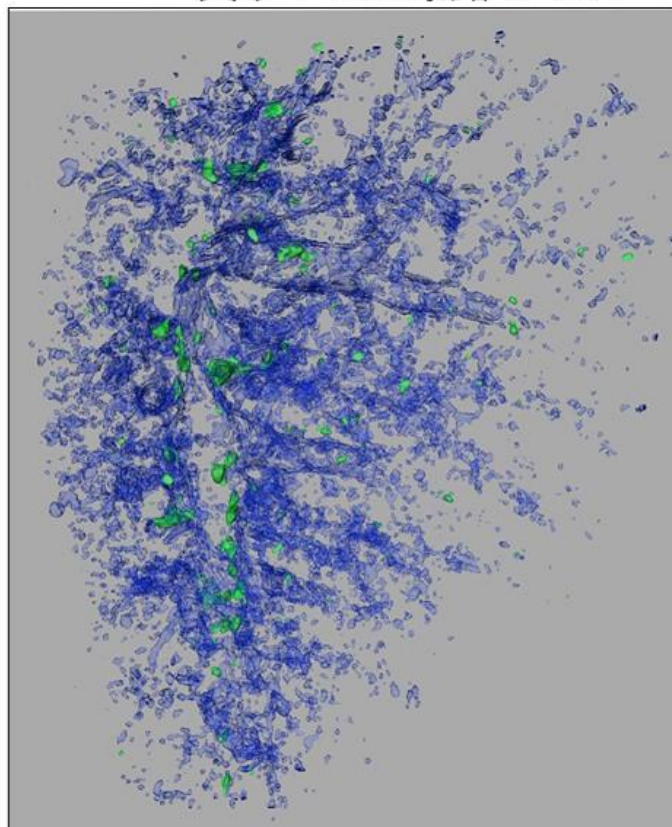
環境中微粒子を曝露されたマウスではマクロファージが血管や気管支を鞘状に取り囲んでいる。また、血管や気管支に付随したB細胞の集塊も確認できる。

黄砂（ASD）とアレルギー（OVA）曝露マウス肺解析

正常マウス



黄砂 + OVA曝露マウス

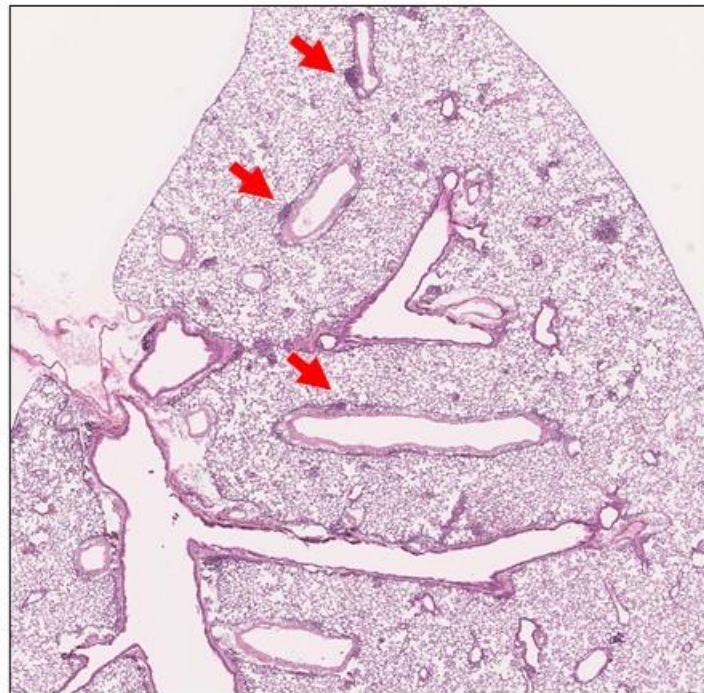


■ B細胞 ■ マクロファージ

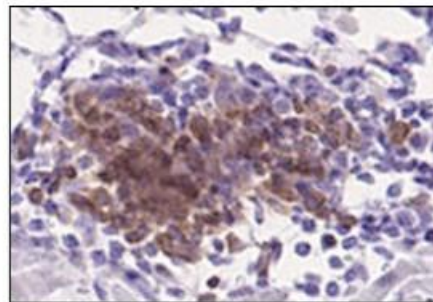
マクロファージとB細胞のみを抽出した3次元画像。正常マウスでは肺全体に散らばっていたマクロファージが、微粒子曝露マウスでは血管や気管支を鞘状に取り囲んでいる。

3次元解析例1：黄砂曝露マウス肺深部の血管に付随した誘導性血管周囲リンパ組織inducible Perivascular lymphoid Tissue：iPLT）

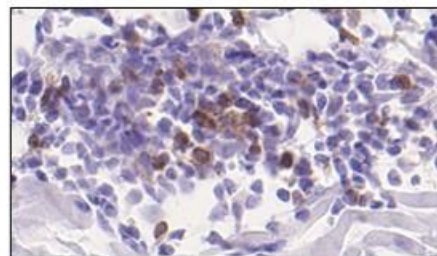
黄砂 + OVA曝露マウス肺（HE染色）



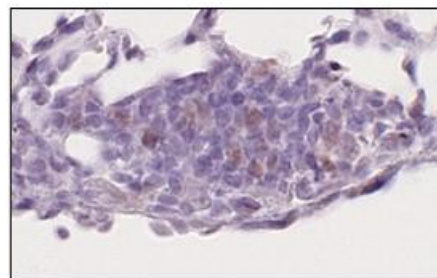
B細胞（CD19）



T細胞（CD3）



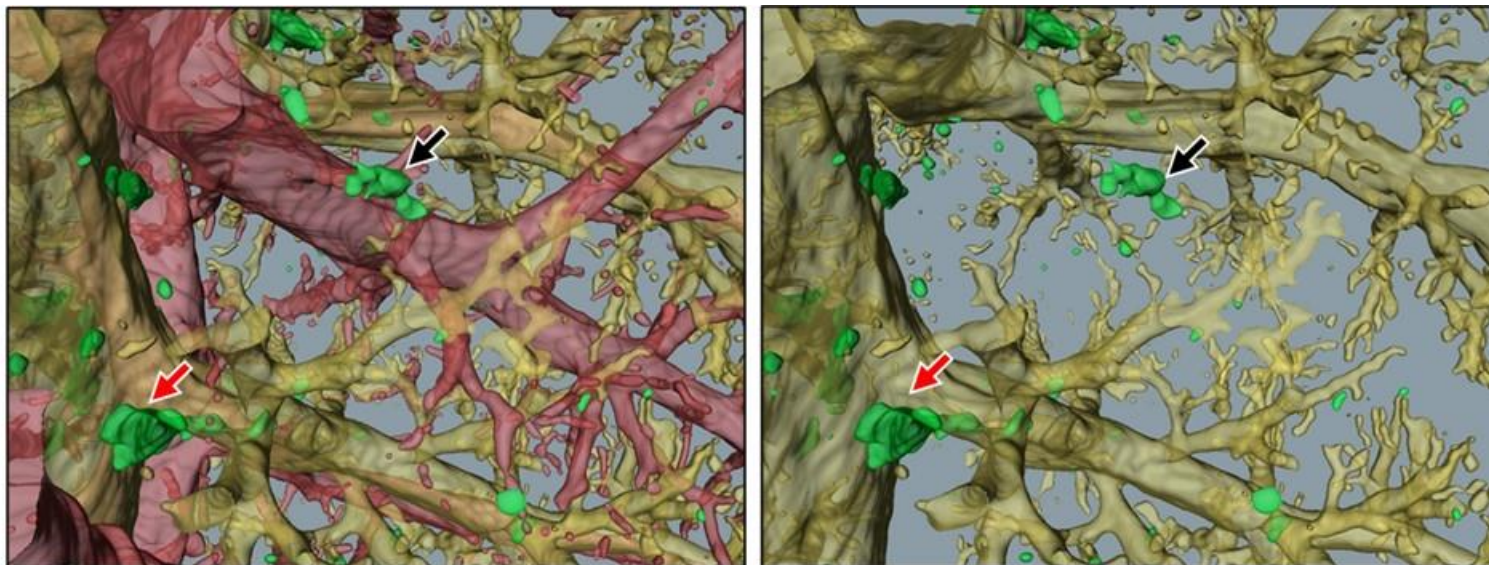
増殖細胞（Ki67）



矢印で示すiPLT構造では、T細胞とB細胞の区画化が不完全であり、活発な細胞増殖は認められない。また、気管支に付随していない...

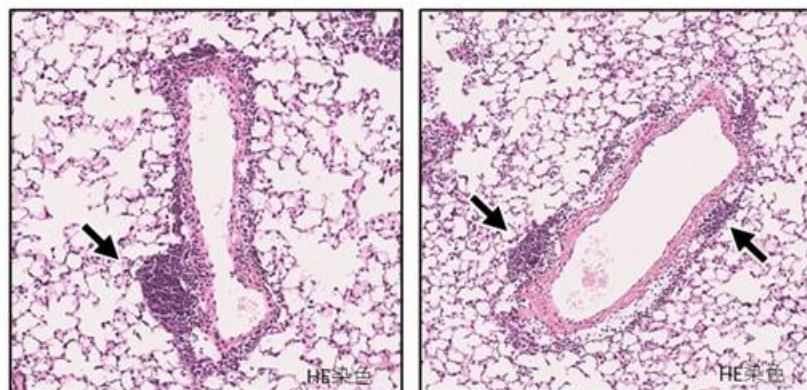
3次元解析でiBATとiPLTの識別が可能！？

3次元解析例1：黄砂曝露マウス肺深部の血管に付随した誘導性血管周囲リンパ組織(inducible Perivascular lymphoid Tissue：iPLT)



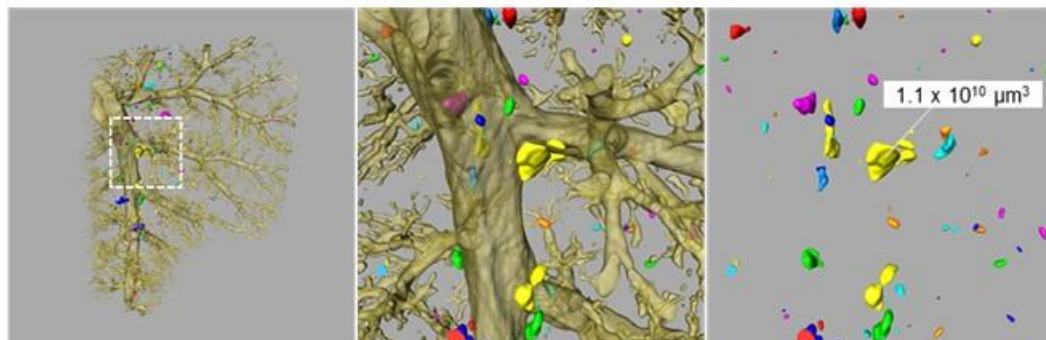
赤矢印：iBALT、黒矢印：iPLT

三次元画像では、黒矢印で示すiPLTが気管支には付随していないことがよく分かる。

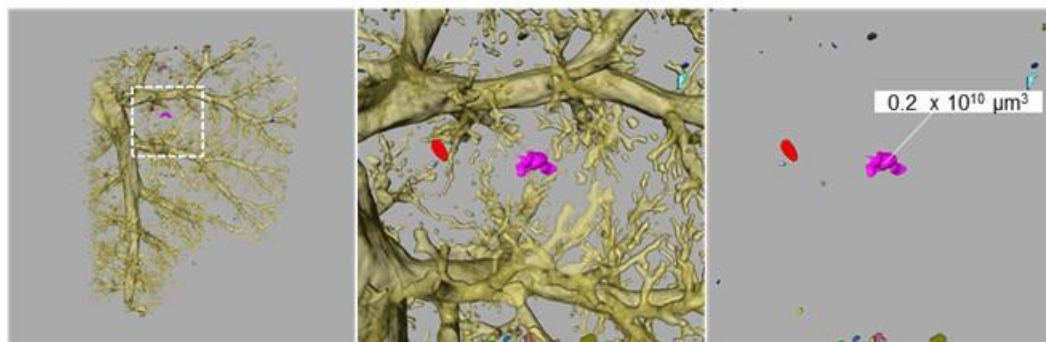


黄砂 + OVA曝露マウス肺三次元画像によるiBALTおよびiPLTの定量解析

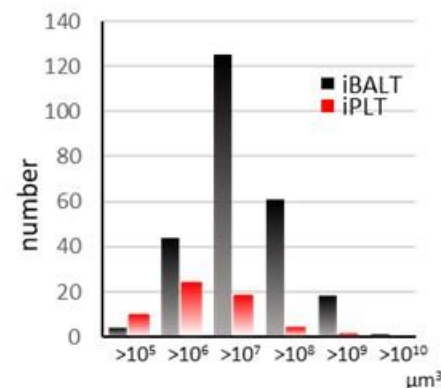
iBALT + iPLT



iPLT



Distribution of volume of iBALT + iPLT

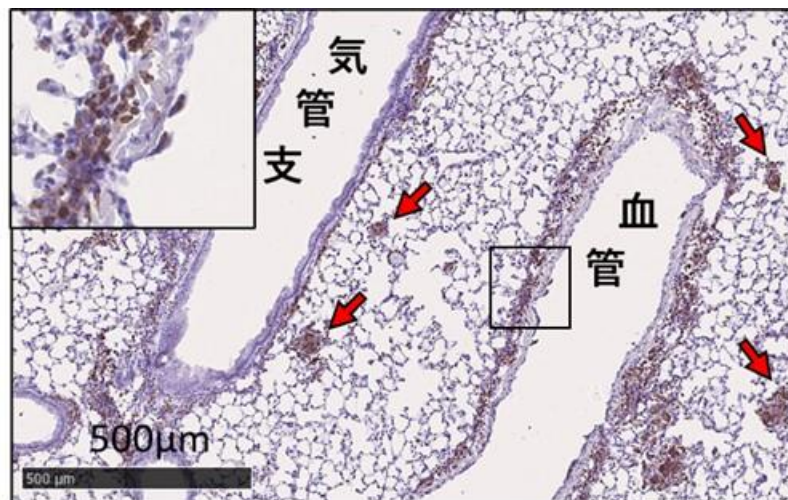


Meristic characters

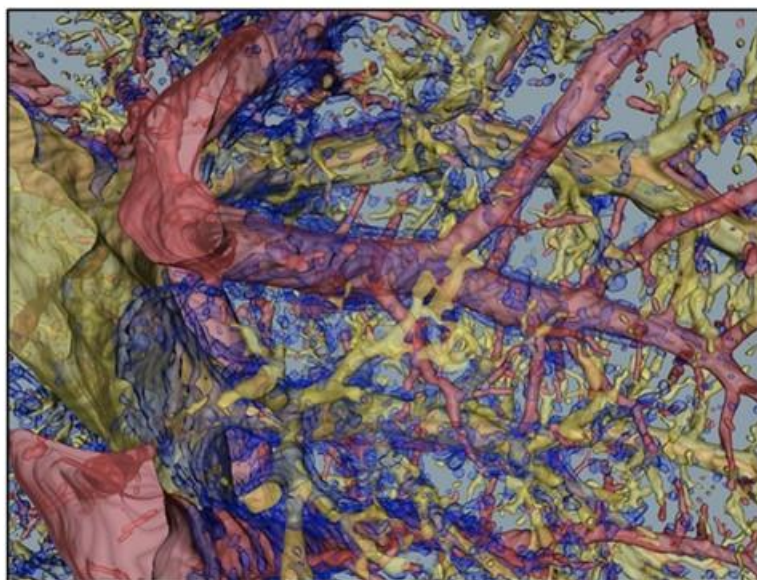
	iBALT	iPLT
Total number	252	57
Volume average μm^3	6.1×10^7	1.1×10^7

B細胞マーカー（B220）抗体のシグナルでiBALTおよびiBALTを抽出し、体積別に色分けを行った。iBALTとiPLTの識別は最寄りの気管支への距離を測定し、200 μm 以上離れているものをiPLTとした（ $10^4 \mu\text{m}^3$ 以下のものは除外）。iBALTと比較してiPLTが小型であることが分かる。

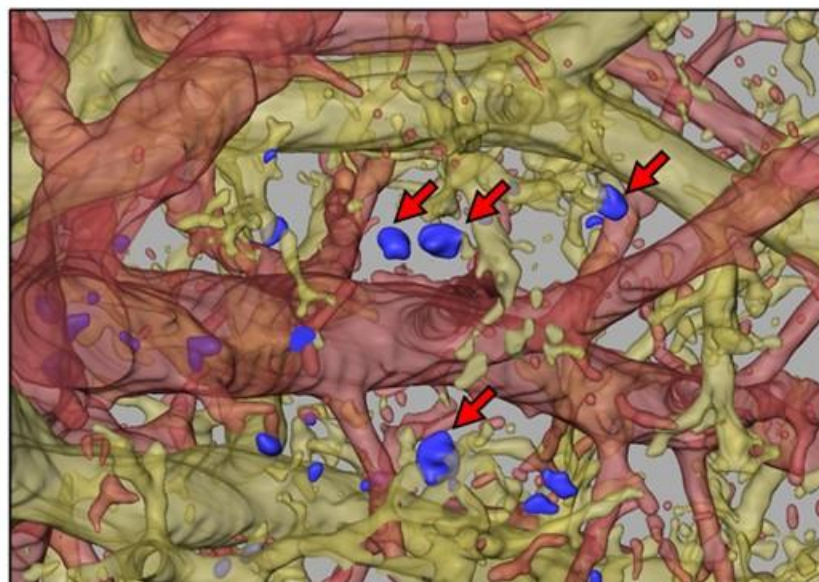
3次元解析例2：マクロファージ集塊



3D構築に使用した切片画像
(免疫染色：抗F4/80抗体)



多くのマクロファージが血管や気管支を鞘のように覆っている。



下図内に矢印で示す血管や気管支周辺以外にあるマクロファージ集塊のみを抽出することも可能。

マウス肺組織 3次元構築概要



本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：三次元再構築システムおよび
三次元再構築方法
- 出願番号：特願2022-161670
- 出願人：新潟大学
- 発明者：三上剛和、早津学

お問い合わせ先

新潟大学 社会連携推進機構

T E L 025-262 - 7554

F A X 025-262 - 7513

e-mail onestop@adm.niigata-u.ac.jp