連続切片の自家蛍光観察によるダイズ種子の3次元内部構造

小川幸春, 宮下一成*, 清水 浩**, 杉山純一***[§]

米国農務省西部地域研究所

* 茨城大学大学院農学研究科

** 茨城大学農学部

*** 独立行政法人食品総合研究所

Three-dimensional Internal Structure of a Soybean Seed by Observation of Autofluorescence of Sequential Sections

Yukiharu Ogawa, Kazunari Miyashita*, Hiroshi Shimizu** and Junichi Sugiyama***[§]U.S. Department of Agriculture, ARS, Western Regional Research Center,
800 Buchanan St., Albany, CA 94710 U.S.A.

* Graduate School of Agriculture, Ibaraki University, 3-21-1 Chuo, Ami, Ibaraki 300-0393

** School of Agriculture, Ibaraki University, 3-21-1 Chuo, Ami, Ibaraki 300-0393

*** National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

An internal structure of a sample soybean seed (*Glycine max*) was represented by using a virtual three-dimensional (3D) visualizing method. This method is a combination of sequential sectioning, autofluorescence imaging in digital and displaying as a virtual representation model by the 3D accumulation of section images using a personal computer with volume rendering process. By the autofluorescence imaging, the distribution of fluorescent tissues was observed in each section. By using the virtual 3D visualizing method, the autofluorescent tissues were observed to form a spriggy 3D structure in the soybean seed. Comparison of the 3D location of hypocotyl with such distributions, indicates that autofluorescent tissues are tissues which will become vascular bundles of cotyledon after germination.

(Received May. 22, 2002 ; Accepted Feb. 18, 2003)

日本におけるダイズの需要量は2000年の統計によると年間485万トンで、そのうち95%以上を海外からの輸入に頼っている¹⁾。それら海外、特に輸入量の多い米国では、安定した収穫を可能にするために遺伝子組換えダイズの生産割合が拡大しており²⁾、同時に様々な機能を持つ品種の開発も続いている²⁾³⁾。しかし現状の商品化された遺伝子組換えダイズに対しては、食品としての危険性を指摘する報告もあり⁴⁾⁵⁾、何らかの対策が必要とされている。

現在、食品の安全性や品質に関する評価方法は、化学分析や表面あるいは断面の観察が主体である。しかし、遺伝子組換え作物などの場合、遺伝子の組換えによって合成された生化学物質の生体内での分布状態や内的な組織形態の変化などを明確にするためにも、これまでとは異なる評価法が必要である。もちろん上述のような構造体は立体的な

ものである。真の評価のためには立体のまま計測する必要がある。X線CTやMRIなどの断層再構成機能を利用すれば非破壊のまま立体的な計測が可能である。しかしX線の特性⁶⁾や核磁気共鳴の検出感度⁷⁾の問題から、多様な化学物質や組織形態の観察は困難である。このため、何らかの新しい計測法が望まれる。

一般に、さまざまな化学物質とその形態的な位置関係を究明するためには、切片化技術と組織化学染色法を利用した手法(組織化学的手法)が適用されている⁸⁾。これは対象物を切片化して断面を直接観察する破壊法ではあるが、目的とする化学物質を多様な方法で可視化できる。このため、断面上での組織形態とそれらを構成する化学物質の関係が観察可能である。さらに、切片の連続作製、染色等による成分分布の可視化・画像化、コンピュータ内での仮想再構成、による3次元計測法も開発されている⁹⁾。現在、それらの手法を利用して、米粒内の各種成分の立体分布状態が明らかにされつつある¹⁰⁾。また、この手法は内部の組織形態を立体的に観察することにも適用可能である¹¹⁾。

本報では、ダイズ種子内部の組織形態を立体的に観察す

800 Buchanan St., Albany, CA 94710 U.S.A.

* 〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

** 〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

*** 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

[§] 連絡先(Corresponding author), sugiyama@affrc.go.jp

るための最初の段階として、切片の自家蛍光状態に基づいた内部形態の 3 次元構造計測結果を報告する。

実験方法

1. 材料

供試材料として 1999 年茨城産の極小粒品種のダイズ種子(納豆小粒, *Glycine max*)を用いた。ダイズ種子を包埋するためのパラフィンには、液化温度が比較的低いパソプレップ 568 (和光純薬(株), m.p. 56–58°C)を用いた。連続画像の位置補正を行うための基準物として、市販の「ソーメン」(商品名: 揖保乃糸, 主な原材料: 小麦粉, 直径: 約 1 mm, 色: 白)を用いた。切片を連続して回収するため、光学的に透明な基材 (PET) とキシレンに対して耐性のあるアクリル系の粘着材を組み合わせた特別注文の粘着テープ (東芝機械(株))を用いた¹²⁾。

2. 切片化

パラフィンを利用した一般的な包埋法によってダイズ種子を固定し、切片化した。

ダイズ種子はそのままではパラフィンになじまないため、アルコール上昇系の脱水置換法により脱水した。脱水方法としては 60, 70, 80, 90, 95, 100% 濃度のエタノールに各々室温で 2 時間浸漬したのち、キシレン (室温, 2 時間), 液状パラフィン (60°C, 2 時間) に浸漬する手順を採用した。パラフィン浸漬ののち、液状パラフィンごとダイズ種子を包埋皿に移し替え、室温で固化、包埋した。このとき、「ソーメン」2 本を包埋皿の底面に対して垂直になるようにダイズ種子の近くに配置し、ダイズ種子と同時に包埋した。

パラフィン包埋された試料は組織観察用薄片作製システム (東芝機械(株))を用いて切片化した。得られた切片は、粘着テープ上に連続して回収した。本報告では切片厚を 30 μm に設定した。ブレードナイフには Feather 社製ミクロトームブレード (S35 type) を一連の連続切片作製ごとに 1 枚の割合で用いた。

粘着テープ上に回収された切片には、ダイズ種子、ソーメンのほかにパラフィンの切片も含まれる。ダイズ切片の白色光観察時、パラフィンの切片が光学的なノイズ成分となるため、本報告では粘着テープ上に回収された切片を粘着テープごとキシレンに浸漬し (室温, 10 分) パラフィンを溶解させて除去した。なお、粘着テープに回収した切片は、切片面を上にして粘着テープごとスライドガラス上に固定し、容易に顕微鏡観察可能となるようにした。

3. 画像化

得られた切片は、蛍光観察可能な実体顕微鏡 (MZ-III, ライカマイクロシステムズ(株))に微弱発光用冷却 CCD カメラ (BS30-L, ビットラン(株))をマウントさせたシステムを用いて観察し、切片の自家蛍光状態をモノクロのデジタル画像 (画像サイズ: 640×480 ピクセル) としてコン

ピュータに取り込んだ。蛍光観察用のフィルタには、予備試験の結果から励起波長 425 nm, 観察波長 475 nm のフィルタを採用した。取り込んだ画像の 1 ピクセルのサイズは、スケールを実測した結果 18.8 μm ×18.8 μm であった。

コンピュータに取り込んだ各切片のデジタル画像は、ダイズ種子の切片と同時に粘着テープ上に回収されたソーメンの切片位置を基準とし、画像処理ソフト (Adobe photoshop Ver.5, アドビシステムズ(株))を利用してソフトウェア的に各々の相対的な位置を補正した。

位置補正済みの各画像は、ボリュウムレンダリング法を組み込んだソフトウェア (Voxel Viewer, 東芝機械(株))によって仮想立体モデルとして 3 次元再構成したのち、2 次元画像に投影して紙面に表示した。本ソフトウェアは、切片厚および各 2 次元画像の 1 ピクセルで占める範囲を 1 ボクセルとし、各ボクセルの不透明度を設定することで再構成画像を立体的に表現することができる。本報告における立体モデルの 1 ボクセルサイズは、切片厚とピクセルサイズより、30 μm ×18.8 μm ×18.8 μm となる。

実験結果および考察

1. ダイズ種子の切片と自家蛍光

Fig. 1 は、粘着テープ上に得られた切片の白色光による観察例である。この図の場合、容易に切片の観察ができるよう黒色の布上に設置してある。図に見られるとおり、ダイズ種子切片の子葉部分では、切片化時の物理的な衝撃もしくは乾燥のために部分的なひび割れが生じていたが、胚軸、種皮などはそれぞれの形状をとどめていた。このことから、粘着テープを利用することによって全体の観察ができる程度の質を保ったままダイズを切片化できることが確認された。Fig. 1 はモノクロ画像であるが、実際の色は、

Fig. 1 A sample image of a soybean section and two sliced "somen", which are adhered on an adhesive tape

Although some cracks are shown in the cotyledon, the formation of seed coat and hypocotyl is preserved. Embedded paraffin materials were removed for the better observation of sections.

子葉部分が全体的に白色系統、胚軸部分が茶色系統、種皮部分が薄い茶色であった。また、切片化されたソーメンの薄片も包埋時と同じようにダイズ切片の近傍にあることが確認された。これらダイズとソーメンの切片は粘着テープ上に貼り付けられることで固定されている。すなわち、ダイズ種子の切片とソーメンの薄片の相対的な位置関係は、パラフィンに埋め込んだ状態そのままを保っていることとなる。なお、ダイズ種子などとともに切片化された包埋剤のパラフィンは、キシレン浸漬によって溶解、除去されている。

Fig. 2 は、Fig. 1 に示された切片の自家蛍光状態を観察

Fig. 2 A sample autofluorescence image of a soybean section

Brighter parts, such as along the seed coat and some inner parts in the cotyledon, show characteristic tissues which have fluorescent property. It is also shown that they have no relation with cracks.

した画像である。白色で表される高輝度の部位は、自家蛍光の蛍光強度が大きい部位である。図に見られるように、胚軸の部位はそれほど蛍光を発していないが、子葉の種皮に沿う外周部位あるいは内部の一部などが蛍光を発する部位として観察された。特に、子葉内部における自家蛍光状態は特異的である。これら自家蛍光を発する部位はひび割れなどの物理的な切片の状態変化とは無関係に存在しているため（図中 crack 部分参照）、計測上のアーティファクトではない。したがって、それらは自家蛍光を発する組織の分布状態を示していると考えられる。

普通、生化学物質中には蛍光性のものや蛍光性物質に容易に変化しうるものが多く存在する。例えば、フェノール化合物を多く含む組織は短波長の照射光に対して自家蛍光を発する特性がある¹³⁾。このため、Fig. 2 のように単純な切断面の蛍光画像計測だけでは、自家蛍光を発する物質の同定は困難である。また、それらの分布状態と内的な組織形態の関連も判別できない。なお、蛍光観察する場合、そのままではソーメンの位置がわからないため、ソーメンの薄片に蛍光ペンで少し大きめに色付けした。その結果、Fig. 2 の左側部分に高輝度の部分が2ヶ所現われている。

2. 連続切片画像と3次元再構成

Fig. 3 は、連続して得られた切片の自家蛍光画像を7枚ごとに並べて表示した画像である。1枚あたりの切片厚が30 μ m であるので、210 μ m ごとにダイズ種子の断面を表していることになる。なお、各画像の順序を明示するため、便宜上、それぞれの画像に連続して数字を割り振っている。Fig. 1 および Fig. 2 に例として示した切片画像は、Fig. 3 では6から7の間の画像である。各々の画像中には、ソーメンの薄片が左端に2つずつ写っている。前述の

Fig. 3 Sample autofluorescence images of soybean section, which are selected from a set of sequential section images

These images were aligned at their relative positions referred by the location of somen slices so-called "position alignment markers". The distribution of the fluorescent tissues in the section images has variable location in each.

ように、ダイズ種子の切片とソーメンの薄片はテープに貼り付けられており、それぞれの相対位置が単一切片上で固定されている。加えて、各切片の画像中におけるソーメンの薄片は、切片化される前のソーメンが棒状でありかつ平行に包埋されていることから、どの切片上においても同じ位置に存在することになる。したがって、2ヶ所あるソーメンの薄片の位置を基準にすれば、各連続切片上にあるダイズ種子切片の相対位置を補正できる。Fig. 3 に示される各切片の自家蛍光画像は、それぞれの位置関係をソフトウェア的な処理によって補正済みである。

ダイズ種子の切片に目を転じると、自家蛍光を発する組織の分布状態が各切片で異なっている様子が示されている。画像中3から4にかけては子葉中央部に線状に分布している。5から8にかけては枝状に細かく分岐するような状態で分布している。9から11にかけては切片内で偏ったような分布を示し、12から15にかけては子葉全体における自家蛍光組織の分布が縮小していくように観察される。これは5から8にかけて観察された分布状態と順序的に逆になっている。以上の連続切片の自家蛍光画像は、前述のようにそれぞれの相対位置を補正済みである。したがって、3次元再構成アルゴリズムを組み込んだソフトウェアを用いれば、コンピュータ内で仮想的に重ねあわせて3次元に再構成することが可能である。

Fig. 4 は3次元に再構成した結果である。内部の状態をより観察しやすくするため、各切片画像中の種皮付近の高輝度部分をソフトウェア的な処理によって取り除き (Fig. 4 右図)、子葉内部の自家蛍光を発する組織の分布状態だけが強調されるようにして3次元再構成した (Fig. 4 左図)。なお、立体的な内部の状態を表現するために3次元再構成データの不透明度は10%に設定した。3次元に再構成した

結果、自家蛍光を発する組織がダイズ種子内部で枝状に規則性をもって分布している様子を確認できた。

Fig. 4 の3次元再構成モデルでは、子葉内部のみを強調処理しているため胚軸に相当する部分が消去されている。しかし、各切片画像上の胚軸に相当する部分を強調表示すれば、自家蛍光を発する組織と胚軸の相対的な立体位置関係を確認することができる。Fig. 5 に Fig. 4 右図で示した処理画像 (Fig. 5 左図) に対して、胚軸部分を強調表示した処理画像 (Fig. 5 右図) の一例を示す。さらに、画像処理後の連続切片画像を再構成した3次元再構成モデル (左図: 胚軸なし, 右図: 胚軸を強調表示) を Fig. 6 に示す。自家蛍光を発する組織と胚軸の位置関係とが確認できるように、胚軸を手前 (左) 下寄りに表している。図に示されるように、自家蛍光を発する組織は胚軸を中心に対称的な位置に分布していた (矢印参照)。

Fig. 5 Sample images of a processed section image and a processed image for the representation of the hypocotyl location

Fig. 4 A three-dimensional image of virtually reconstructed soybean seed in which was produced from a set of autofluorescence sequential section images through image processing as shown in the images of right side

The formation of the fluorescent tissues in the image of three-dimensional model is looked like a spriggy.

Fig. 6 Images of the three-dimensional reconstruction model for the representation of a relationship between location of the hypocotyl and three-dimensional location of the fluorescent tissues in the cotyledon

h: location of the hypocotyl, arrows: fluorescent tissues

ダイズの子葉は、その発芽段階において胚軸を中心として対称的に二分割され、展開する¹⁴⁾。この現象と本実験の結果より、ダイズ種子内の子葉部分で観察された自家蛍光を発する組織は、その分布形状から発芽後に維管束となる部分であるものと推察された。今後、発芽過程での内部構造変化を立体的に観察することで、自家蛍光を発する組織の分布とダイズ種子の形態的な関係を明らかにする予定である。

要 約

ダイズ種子を連続して切片化し、それらの自家蛍光状態を画像化したのち、コンピュータ内で仮想的に3次元再構成した。

(1) 切片を蛍光観察すると、子葉の種皮に沿う外周部位や内部の一部で自家蛍光が見られた。特に、子葉内部における自家蛍光組織の分布状態は特異的であった。

(2) 連続切片の自家蛍光画像を3次元再構成することで、自家蛍光を発する組織がダイズ種子内部で枝状に規則性をもって分布している様子を確認できた。

(3) ダイズ種子の胚軸との位置関係を立体的に比較した結果、自家蛍光を発する組織はその分布形状から発芽後に維管束となる部分であるものと推察された。

文 献

- 1) <http://www.kanbou.maff.go.jp/www/anpo/index.htm>
- 2) <http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/TransgenicCrops/current.html>
- 3) Gasser, C.S. and Fraley, R.T., Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*, **244**, 1293-1299 (1989).
- 4) Editorial, Health risks of genetically modified foods. *The Lancet*, **353**, 1811 (1999).
- 5) Horton, R., Genetically modified foods: "absurd" concern or welcome dialogue? *The Lancet*, **354**, 1314-1315 (1999).
- 6) Ogawa, Y., Morita, K., Tanaka, S., Setoguchi, M. and Thai, C.N., Application of X-ray CT for detection of physical foreign materials in foods. *Transactions of the ASAE*, **41**, 157-162 (1998).
- 7) Becker, E.D., Chemical shifts. In "High resolution NMR, Theory and chemical applications," 2nd ed., (Academic Press.), pp. 55-84 (1980).
- 8) 山田和順, 組織化学, 第1版 (南江堂, 東京), pp. 1-202 (1987).
- 9) Ogawa, Y., Sugiyama, J., Kuensting, H., Ohtani, T., Hagiwara, S., Liu, X.Q., Kokubo, M., Yamamoto, A., Kudoh, K. and Higuchi, T., Advanced technique for three-dimensional visualization of compound distributions in a rice kernel. *J. Agri. Food Chem.*, **49**, 736-740 (2001).
- 10) Ogawa, Y., Kuensting, H., Nakao, H. and Sugiyama, J., Three-dimensional lipid distribution of a brown rice kernel. *J. Food Sci.*, **67** (7), 2596-2599 (2002).
- 11) Ogawa, Y., Kuensting, H., Sugiyama, J., Ohtani, T., Liu, X.Q., Kokubo, M., Kudoh, K. and Higuchi, T., Structure of a rice grain represented by a new three-dimensional visualization technique. *J. Cereal Sci.*, **36** (1), 1-7 (2002).
- 12) Kokubo, M., Higuchi, T., Kudoh, K., Fukuda, Y. and Nanto, H., The automatic thin sectioning and staining for light microscopy, The tests by two trial products. *Acta Histochemica et Cytochemica*, **32**, 223-228 (1999).
- 13) Fulcher, R.G., Fluorescence microscopy of cereals. *Food Microstructure*, **1**, 167-175 (1982).
- 14) 星川清親, 食用作物, 第2版, (養賢堂, 東京), pp. 410-451 (1981).

(平成14年5月22日受付, 平成15年2月18日受理)