

# オンライン実習用のトウガラシ果実 を用いたデジタル観察教材の開発

杉山立志<sup>\*†</sup>

(令和4年6月2日受付/令和5年1月20日受理)

**要約:** 新型コロナウイルス感染症の拡大により、大学の閉鎖から講義の多くがオンライン教育へ変更された。しかし、生物の組織や細胞を学ぶ実習の場合、限られた組織の部位を特定の拡大率で示した顕微鏡写真を用いたオンライン教材では、学習者が自由に様々な角度から観察する実習と同等の学習効果を得ることは難しい。本研究では、オンラインでの果実形態学実習を想定し、トウガラシの果実を用いて果実の外観から拡大し続けると横断面へ、さらにはパラフィン切片画像へ切り替わるデジタル観察教材を開発した。開発した仕組みでは、果実や切片の観察したい場所を自由に拡大することを可能にした。使用感を評価するために学生によるオンラインでの使用体験とアンケートを実施した。その結果、開発した教材は、画像のスムーズな切り替えに対する課題が指摘されたものの、形態を理解する補助的な資料として一定の評価を得た。

**キーワード:** 教材開発, 凹凸, 観察, トウガラシ, 分泌

## 1. 緒 言

植物に限らず形態学分野では、研究や実習で実物を手にし、自ら組織を切り出し、顕微鏡観察用のプレパラートを作製することによって、顕微鏡観察部位と実物の組織の部位の関係性をしっかり理解できる。しかし新型コロナウイルスによる感染症の拡大により、直接、物を触って受け渡す、対面で議論しながら作業するということが困難になった。研究の国際化により、遠方にいる研究者との共同研究をするにあたって同様の問題がある。どの部位を、どのような方法で解析するのかというコミュニケーションは実物を目の前にして議論すれば、コミュニケーションミスは起きにくい。もしくは、それぞれの組織の名称が明確に定義されていれば、間違えることは少ない。しかし、モデル生物を除き、組織名称は細胞レベルになると統一的な定義が不足している。例えば表面の細胞は、葉であっても果実であっても「表皮細胞」という言葉しかない。実際に観察すると、表皮細胞は組織によって異なる形状を示している。また言葉の定義を明確にしても、誤解を生じることもある。本研究で事例としたトウガラシを例にすると、辛味成分カプサイシノイドの蓄積部位は「胎座」と呼ばれることが多い。この箇所は、初期の研究で「隔壁」であることが示されていた<sup>1)</sup>。その後、用語の誤解により隔壁と胎座を合わせて「胎座」と呼ばれてきた。そのため実際に「胎座」を観察してもカプサイシノイドを合成する細胞を見出すことができなかった<sup>2)</sup>。

実物を手に持って議論が出来ない場合の代替として、3次元構築をした画像データを用いて議論することは一つ手

段である。これまでの3次元構築画像は、外観を自由に動かすことが出来ても内部を見ることは出来なかった。例えば、アンモナイトの化石のように、外側のみを比較するのであれば、表面画像のみの立体構築は非常に有効である<sup>3)</sup>。また書籍としての図鑑の発展として、3次元画像があれば一歩進んだ理解には有効である<sup>4,5)</sup>。研究用途としては、3次元内部構造顕微鏡を用いた事例もある<sup>6,7)</sup>。3次元内部構造顕微鏡は内部のカラー画像を直接得られる点では優れているものの、細胞レベルを観察できるような画像は得られない。病理学分野の教育では、病理標本の高解像度画像を用いたVirtual microscopyやVirtual slideと呼ばれる仕組みがある<sup>8)</sup>。これらはいくまでも標本をデジタル化したものであり、標本由来となった生体組織とリンクした画像システムではない。

そこで本研究では、それぞれの組織観察に適した手法で個別に画像を構築し、それらをリンクさせた。そして、表面画像を拡大し続けるだけで、内部断面、パラフィン切片へ自動で切り替わるオンライン教材を構築することで、どの部位を観察すると生物顕微鏡観察において細胞がどのように観察できるのかわかるようにした。その後、構築した教材を学生へオンラインで開示し、アンケートによる教材としての有用性を検討した。

## 2. 実験方法

### (1) 実験材料

画像構築サンプルとして用いたトウガラシ「ハバネロ」(*Capsicum chinense*)は市販の園芸培土を用い鉢植えで東京農業大学厚木キャンパスにて栽培した。乾燥すると組織

\* 東京農業大学農学部植物園

† Corresponding author (E-mail: rs207428@nodai.ac.jp)

の状態がわかりにくくなるので、成熟し色がオレンジ色に変化した直後の果実を用いた。

### (2) 果実全体像、断面画像の撮影

果実全体の撮影、縦断面、横断面はミラーレス一眼レフカメラ Nikon Z7 (ニコン) を用いて、自動で焦点をずらした撮影を行った。得られた複数の画像を用いて画像解析ソフト Helicon Focus (Helicon Soft Ltd.) によって深度合成を行った。

### (3) 組織切片画像の撮影

組織切片観察のために、ハバネロから 5mm 前後の厚さの組織をカミソリで切り出し、ホルマリン固定液 (50% エタノール, 5% 酢酸, 3.7% ホルマリン) で一晩固定した。固定した組織はイソプロパノールを用いて脱水し、キシレンに置換したのちに、パラフィン (融点 58~60℃, 富士フィルム和光純薬) に包埋した。パラフィンブロックから滑走式ミクロトーム (エルマ販売) を用いて 10 $\mu$ m の薄層切片を作製した。組織染色はパラフィン除去する前に 0.5% サフランinを用いて行った。画像解析に適した組織であることを確認できたサンプルのみ、キシレンによって脱パラフィンを行い、封入剤 (HSR 液, シスメックス) で封入した。生物顕微鏡 BX-43 (オリンパス) を用いて観察し、デジタルカメラ (DP-22, オリンパス) を用いて、ステージをずらしながら組織全体を撮影した。撮影した画像は組織全体を 1 つのファイルとするために、Image Composite Editor (Microsoft Corporation) を用いて画像を結合させた。

### (4) 隔壁表皮の分泌状態を示す凹凸の測定

細胞とクチャラ間に分泌している辛味成分であるカプサイシノイドの分泌状態は、工業製品などの表面の凹凸を測定に用いられているワンショット 3D 形状測定機 (キーエンス) を用いて凹凸を画像化した。光を透過しやすい物質での測定が困難なため植物サンプルを直接測定できず、歯科用シリコンパテ (デントシリコーン, 松風) を用いて凹凸の逆になるレプリカを作製し、レプリカの凹凸を測定した。

### (5) 画像階層システムの構築

果実の外側からパラフィン切片までの画像をスムーズに切り替わる仕組みは、株式会社 GOCCO (大垣市) に委託して行った。

### (6) 学生による使用感に関するアンケート調査

2022 年 2 月 7 日から 10 日かけてオンラインで教材を公開し、将来実習で使用する対象となる学生のうち植物管理を行うサークル「厚木植物研究会」の学生にシステムの使用感や今後構築すべき生物種について Google フォームを用いてアンケート調査を行った。

## 3. 結果と考察

### (1) 果実外観と切断面の撮影

果実表皮などの観察には、実体顕微鏡が適している。そ

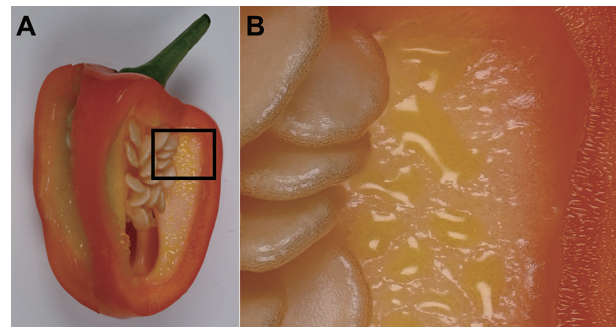


図 1 ハバネロ果実横断面の画像例

A 果皮の一部を切り取り隔壁表面を観察できるようにした。四角は B 図に相当する領域。B 隔壁部分をデジタル拡大したもの。

こで高解像度画像の構築にあたっては、実体顕微鏡 (M205 FA, ライカ) を用い、視野に入る範囲の深度合成を行った。異なる視野での深度合成を行い、画像をつなぎ合わせて広範囲の画像を作ることを試みた。しかし、実体顕微鏡から得られた画像を深度合成した結果、同じ条件で撮影したにも関わらず、画像をつなぎ合わせることができない視野があった。そこで、一眼レフカメラを用いたマクロ撮影による画像構築を行った。Nikon Z7 (ニコン) を用いて焦点をずらした撮影をし、深度合成した結果を図 1 に示す。図 1A は、果実の一部を除去して、隔壁を見えるようにした状態を示す。図 1B は隔壁部分の拡大図である。図 1B は図 1A をデジタル拡大したもので、カメラ撮影時に光学的に拡大して撮影したものではない。構築した果実全体像は図 1B のように、パソコン等でデジタル拡大することで細部を見ることができる。

実体顕微鏡は肉眼での観察に適した立体視できる特徴があるが、広い範囲を画像化するには高画質のカメラを用いたマクロ撮影が適しているとわかった。また、電動で XY 方向のステージと連動した実体顕微鏡もあり、XY 軸方向の合成後に、深度合成をするなどの手法を検討すれば、実体顕微鏡を用い、より高解像度の画像構築も可能であろう。深度の表現をどこまで必要とするのか、対象とする生物の大きさなどを含めて必要とされる技術は異なる。昆虫などでは足、触角など細部の表示が必要であるが、本研究で用いたハバネロにおいては、一眼レフカメラのマクロ撮影でサンプルの形態を表現することができた。

### (2) 分泌状態の凹凸の可視化

肉眼での実体顕微鏡を用いた観察では、観察者が自由にサンプルの向きを変えることができるため、自ら見やすい角度を選ぶことができる。トウガラシの辛味成分を分泌している隔壁表皮細胞は透明度が高く、写真として撮影しにくい。加えて照明が反射しやすく表面に照明が映し出される。図 1B の隔壁拡大図に示したように、白い光の反射が組織の色や形をわかりにくくしている。透明度の高い場合、肉眼でも凹凸を理解しにくいことがある。そこで、凹凸状態を測定し、測定値を画像化することで、照明の影響を受けない画像の作製を試みた。

金属やプラスチック等の工業製品の凹凸測定機器としてワンショット3D形状測定機 VR-3200 (キーエンス)がある。この測定機器を生物に用いた事例はなかった。透明度の高いサンプルでは測定できないのがその理由である。上述の通り、観察対象であるハバネロの隔壁表皮細胞は透明度が高いので、そのままでは測定できない。植物の表皮細胞を観察する一般的な方法として、植物の気孔の観察では古くからレプリカ法が知られている<sup>9)</sup>。レプリカ法は主にマニユキアなどを用いられるが、他の素材として歯科用のパテがある。マニユキアの場合、薄く塗布するため、凹凸の差の大きい形状を保持するだけの強度を持っていない。一方、歯科用のパテはシリコン素材であり、口腔内の形をすべて保持できる強度を持つ。そこで歯科用パテを用いてハバネロ隔壁のレプリカ作製を試みた(図2A)。歯科用パテはキャタリストとベースを混合練和することで、固化が始まる。固化速度が早いので、混合には熟練が必要で混合する際に気泡が入ると、その部分のレプリカは使用できなくなる。気泡の形成を避けられなかったので、異なる果実の隔壁からのレプリカ作製を複数回行い、得られたレプリカのうち気泡の含まれないものを解析に使用した(図2B)。気泡を含まないレプリカを用いてワンショット3D形状測定機で表面の凹凸を測定し、画像化した(図2C)。歯科用パテを活用した場合、レプリカであるため測定される表皮は凹凸が逆になるが、使用したサンプルを他の解析にも使用できる利点がある。例えば隔壁をパラフィン切片の作製や成分分析に用いることができる。図2Cは、図2Bに示したレプリカよりも凹凸を視覚化しやすくなった。しかし画像解析ソフトによる影の表現の制約により、見る角度によっては凹面に見える箇所も存在する。また、シリコンによる転写レプリカから歯型を作るように凸面の再現も検討する必要があり、今後は凹凸をよりわかりやすく表現できるようにしたい。測定データはCADデータにも変換できるので、分泌度合いの数値化や、よりわかりやすい表示方法について検討できる。隔壁表皮は分泌していない状態でも平らではなく、分泌状態も多様であり複雑な形状をしているので、測定手法について検討が必要である。

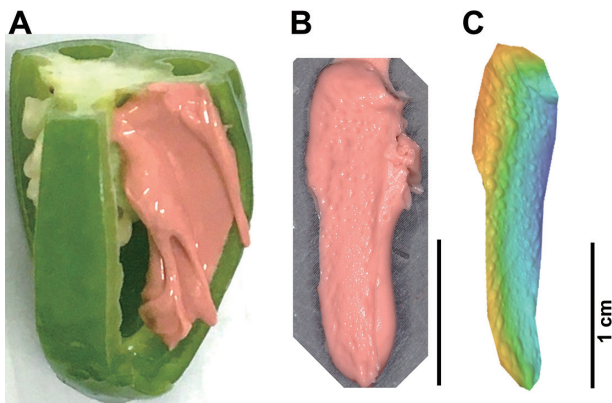


図2 歯科用パテを用いたハバネロ隔壁のレプリカ  
A 果実への歯科用パテの塗布状況 (Bのレプリカとは異なる果実の例)。B 画像解析に用いたシリコンレプリカ。  
C 凹凸を表現した画像例。スケールバーは1cm。

### (3) 組織切片の結合による広範囲切片画像の作製

図3にハバネロのパラフィン切片画像を結合して広範囲を観察できるようにした例を示す。ハバネロの分泌細胞を観察するためには、10倍の対物レンズを使用して中間レンズとして0.5倍レンズを使用して撮影すると横幅1.4mm程度となる(図3B)。そのため、隔壁の一部しか撮影する事ができない。ハバネロの隔壁の横方向の長さは、幅広い部位では1cm程度ある。オンライン学習教材として、高画質で広範囲の組織を観る事ができるようにするには、高倍率で撮影した画像を結合する必要がある。ハバネロの隔壁の場合、12枚の画像を連結して隔壁表皮全体を示した(図3A)。同様に、胎座(図3C)、果皮についても連結画像を作製した。連続した組織を見ることができると、拡大したときに観察される細胞が、組織上のどの位置を観察しているのか理解しやすい画像となった。本研究では果実サイズが4cm前後となるハバネロを使用した。そのため全体を組織固定するのは難しかった。5mm程度の小型のトウガラシ<sup>10)</sup>を用いれば組織で横断面、縦断面の全体をパラフィン切片として作る事ができる。しかし、果実内に空隙がほとんど無く隔壁と種子と果皮が接している。そのため、初学者には各組織を傷付けずに果実を解体することは難しく、対面での実習には適していない。トウガラシ果実は形態に多様性があるので、学習方法や学習目的に合わせて異なる形態の果実を効果的に使用することができる。

### (4) 果実外観からパラフィン切片画像へのリンクの構築

ハバネロの果実外観、果皮を除いて隔壁を見えるようにした画像、果実の縦断面、隔壁表皮の凹凸の画像化、隔壁横断面のパラフィン切片、胎座横断面のパラフィン切片、果皮横断面のパラフィン切片の合計7つの高解像度画像を作製した。これらを果実外観→断面→パラフィン切片という順序に、肉眼による観察→実体顕微鏡による観察→生物顕微鏡による組織切片の観察という順序で、実物を観察する流れにあわせた画像のリンクを構築した。仕組みの構築は株式会社GOCCOに委託した。構築した仕組みのイメージとしてはGoogleマップのように地球(果実全体に相当)から住宅(細胞に相当)までを拡大できるようなものを目

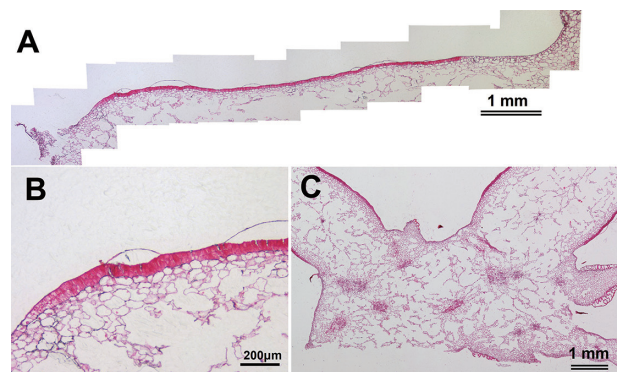


図3 ハバネロのパラフィン切片の画像結合  
A 隔壁表皮細胞。B 隔壁表皮拡大図。C 胎座。スケールバー A, Cは1mm, Bは200μm。

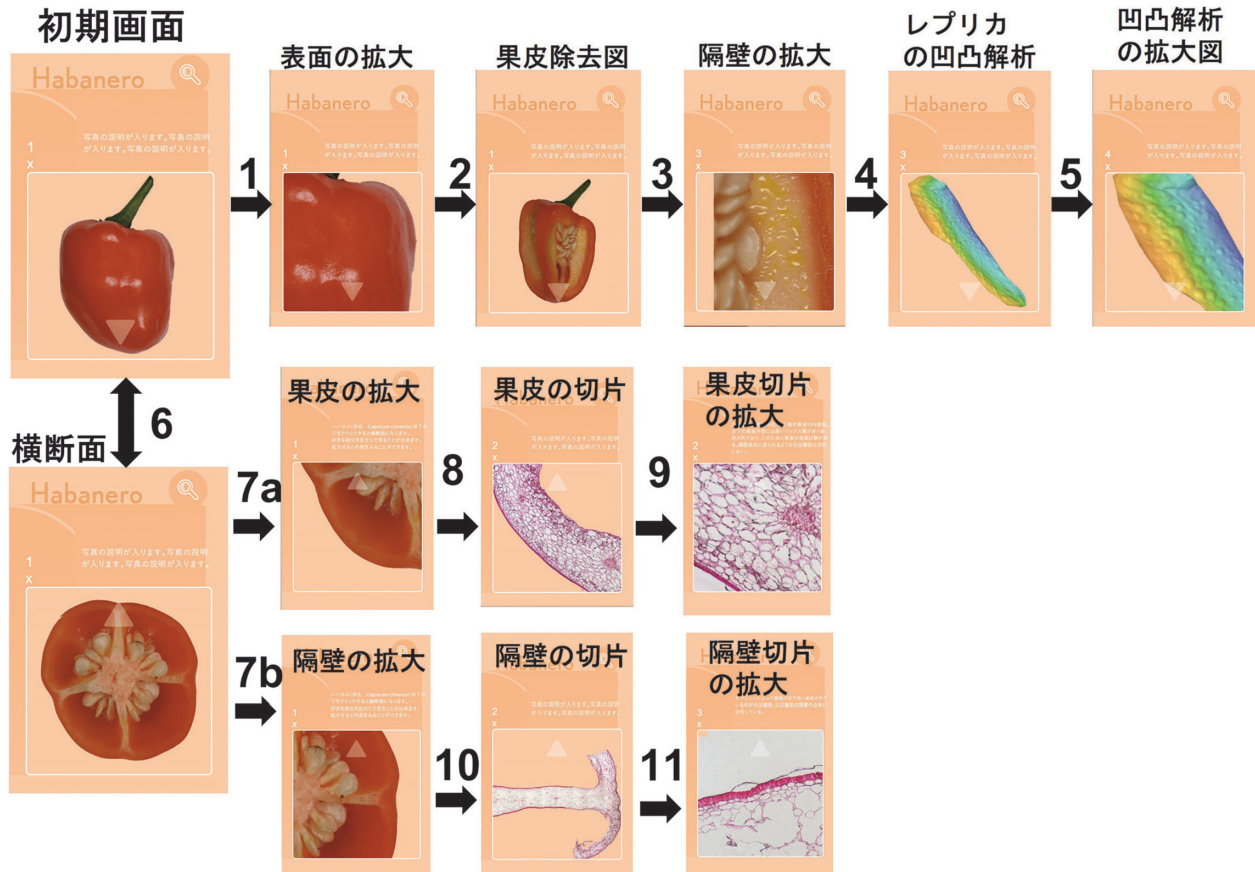


図 4 ハバネロを用いて構築した仕組みの模式図

1 果実の任意の場所を拡大できる。2 拡大し続けると内部の写真に切り替わる。3 任意の場所を拡大できる。4 隔壁を拡大しつづけると凹凸解析図に切り替わる。5 任意の場所を拡大できる。6 果実外観と横断面は相互に切り替える事ができる。7 任意の場所を拡大できる (7a は果皮を拡大した場合、7b は隔壁部分を拡大した場合)。8 果皮を拡大すると果皮のパラフィン切片に切り替わる。9 果皮の任意の場所を拡大できる。10 隔壁を拡大すると隔壁のパラフィン切片に切り替わる。11 切片を拡大しつづけると隔壁表皮細胞のパラフィン切片に切り替わる。

指した。構築した画像のリンク構造を図 4 に示した。これらはインターネット上で閲覧できるようにし、対象とする閲覧端末は iPad (アップル社) とした (サーバー維持費の関係で、現在は閲覧できない)。画面上で拡大操作をするだけで、果実画像からパラフィン切片に切り替わる仕組みを作ることができた。果皮の部分拡大すると果皮のパラフィン切片画像に切り替わり (図 4-7a)、隔壁を拡大すると隔壁のパラフィン切片画像に切り替わる (図 4-7b)。隔壁に関しては分泌を示す表皮の部分拡大すると、細胞を見分けることができる画像に切り替わり、隔壁表皮に沿って分泌状態を見ることができるようにした (図 4-11)。

果実、隔壁凹凸測定、パラフィン切片画像の構築を別々に検討したため、同一サンプルでの画像を使うことができなかった。そのため、画像が切り替わるものの、異なるサンプルによるズレが生じた。本研究によって、教材構築法を確立できたので、同一のサンプルを使ってズレのない画像を構築すれば、よりわかりやすいデジタル教材となる。

#### (5) 学生による使用感の評価

オンライン教材としての使用感や今後構築すべき生物種について、植物管理を行うサークル「厚木植物研究会」の

学生を対象にアンケート調査を行った。アンケートは無記名で行った。有効回答数は 10 (回答率 23.8%) で、男性 6 名、女性 3 名 (性別未記入 1 名)、学年別では 1 年生 4 名、2 年生 4 名、3 年生 2 名であった。

統計的処理ができる回答数ではないので、アンケートの回答から教材に求められる次の 3 点について整理した。

使用感の良い評価と悪い評価があった。教材は iPad で使用することを想定して作製したが、アンケートによると使用者はスマートフォンやパソコンなど多様な環境で使用していた。その結果、画面の大きさや縦横比の違いによって使用感が異なったようだ。これは実際の使用でも想定されることで、異なる環境で使用できる仕組みへ改善する必要がある。特に問題と感じられたのは、初期画面の上部に説明文が表示され、その下に画像があることであった (図 4)。このことで、スマートフォンの小さい画面やパソコンモニタの横向きの画面では、画像の上部しか表示されなく、拡大操作すべき画像の全体が表示されていなかった。説明文を分けて、最初に明示し、画像は全面に表示するなどの改善の必要がある。

自由記述から推定される資料の理解に関する内容では、実物の断面写真からパラフィン切片に切り替わったときの

画像の理解に戸惑っている様子が伺えた。アンケート調査では、使用感を確認するために、自由な場所を拡大できる教材であること以外は事前に詳細な説明をしなかった。学生の大部分は、パラフィン切片がどのようなものであるか知識が不足しているため、パラフィン切片を見た時に、どのようにして観察された画像であるか理解するのに時間がかかったようである。実際に実習に用いるときにも、専門知識を必要とするパラフィン切片画像に関しては、固定方法から染色方法まで実験の内容を十分に伝える必要があることがわかった。

今後教材化を期待する植物として、ダイコン、リンゴ、ハエトリソウ、コケ、シダの提案があった。ダイコンとリンゴは内部構造が均一に見えるが、パラフィン切片で異なる部位を観てみたいという要望と考えられる。またダイコンは横断面を観ることはあっても、縦方向に観る機会が少ないのでデジタル教材として自由に観察したいとの希望であろう。ハエトリソウ、コケ、シダでは、様々な形態を示す組織を持っているため、拡大して観察したり、別の方向からも観察してみたいという理由が背景にあると推定した。今後これらの植物を用いた画像の構築を検討する。

#### 4. 結 論

オンライン学習教材としてトウガラシの一種であるハバネロを用いて果実外観から、切片写真まで画像をリンクさせた仕組みを構築した。果実外観は実物の肉眼観察、果実断面は実体顕微鏡観察、パラフィン切片は生物顕微鏡観察を模した仕組みとして、実習の補助資料として使用できる。すべてのオンライン端末に対応した仕組みではなかったが、iPadでは十分に操作性もよく見やすいものを構築できた。Google マップでは、地図や航空写真をスムーズにつなげ<sup>11)</sup>、更にはストリートビューに画面が切り替わる。本教材でも、パラフィン切片への切り替えに課題を残したものの、果実の拡大はスムーズに達成することができた。

本研究では果実外観写真とパラフィン切片写真では異なるサンプルを使用したため、形状の違いからズレを生じた。実体顕微鏡の使用や生物顕微鏡の使用に関する学習を完全に代替するのではなく、補完教材であると考え、必ずしも果実外観からパラフィン切片に連続的に切り替わることにこだわる必要はない。また、対面実習で使用する補助

資料であれば、「実体顕微鏡観察の例」「生物顕微鏡観察の例」と分けて活用もできる。しかし、果実写真とパラフィン切片写真を個別の仕組みにする場合、パラフィン切片でどの部分の組織を使用したかがわかるようなイラストを用いるなど、両者の間の繋がりを示す説明が必要である。

異なる生物についても同じような仕組みを使えるように、画像を自由に置き換えられる仕組みを構築すれば汎用性が高く、多くの教育の場で使用できる仕組みになる。

謝辞：本研究は、日本科学協会の笹川科学研究助成による助成を受けたものです。

#### 参考文献

- 1) 古谷 力, 橋本かず (1954) 蕃椒の研究 (第2報) Capsaicinの分泌器官について. 薬学雑誌 7 : 771-772.
- 2) 杉山立志 (2018) トウガラシ (*Capsicum baccatum*) 果実の早期成熟による内部組織の変化. 日本植物学会第82回大会. 広島. 2018年9月.
- 3) 河野里奈, 芝原暁彦, 村瀬雅之 (2021) 写真測量を利用したアンモナイト類の地学基礎用3Dモデル教材作成の試み. 教師教育と実践知 6 : 39-53.
- 4) 日本放送協会, ものすごい図鑑, <<https://www.nhk.or.jp/school/sukudo/zukan/>> (最終アクセス 2022年4月4日)
- 5) 理化学研究所, なかみが見える! 3D生物図鑑, <<https://www.riken.jp/pr/fun/3d/index.htm>> (最終アクセス 2021年4月4日)
- 6) 横田秀夫, 工藤謙一, 樋口俊郎, 相良泰行, 都甲洙 (1998) 3次元内部構造顕微鏡による凍結生体試料の観察と計測. 低温生物工学会誌 44 : 1-9.
- 7) 杉山立志, 志手真人, 藤野廣春, 辰尾良秋, 中村佐紀子, 寛正信徳, 伊藤昌夫, 横田秀夫, 加瀬 究, 黒崎文也 (2006) カプサイシン含有率と隔壁表面積計測によるトウガラシ果実におけるカプサイシン生合成能の評価. *Plant Morphol.* 18 : 75-82.
- 8) LUNDIN M, LUNDIN J, HELIN H, ISOLA J (2004) A digital atlas of breast histopathology : an application of web based virtual microscopy. *J. Clin. Pathol.* 57 : 1288-1291.
- 9) 細谷夏実, 齋藤弥夕 (2016) 植物の気孔観察に用いられる複数レプリカ法の比較検討. 大妻女子大学紀要 25 : 61-70.
- 10) SUGIYAMA R (2019) Stable capsaicinoid biosynthesis during the fruit development stage of *Capsicum baccatum*. *Cytologia* 84 : 309-312.
- 11) [https://www.opengis.co.jp/techguidej/76googleMapsStruc\\_.J.pdf](https://www.opengis.co.jp/techguidej/76googleMapsStruc_.J.pdf) (最終アクセス 2022年4月28日)

# Development of Digital Image Teaching Material for Online Hands-on Practical Training Using *Capsicum* Fruit

By

Ryuji SUGIYAMA\*<sup>†</sup>

(Received June 2, 2022/Accepted January 20, 2023)

**Summary** : The COVID-19 pandemic has forced full or partial school closures. Online classes have been established as an alternative way of learning in a classroom. However, in the case of hands-on training in the study of biological tissues and cells, it is difficult to achieve the same learning effect from online teaching materials that use micrographs showing a limited number of tissue sections at a specific magnification as from hands-on training where learners are free to observe from different angles. Digital images of *Capsicum* fruit were made for online hands-on practical training. These images are produced by external appearance of the fruit, longitudinal and transversal sections of fruit, and virtual microscopy images of tissue sections of the placental septum and pericarp. These images are connected so that they can be switched as users continue to enlarge on the screen displays just like Google Maps. Constructed images in this report enables viewing of any part of a fruit or specimen at any magnification. To evaluate the usability, an online experience by students and a questionnaire were conducted. The developed teaching materials received a certain evaluation as supplementary materials for understanding fruit morphology, although some issues were pointed out in operability for smooth change of each image.

**Key words** : Chili pepper, roughness, secretion, teaching material, virtual microscopy

---

\* Botanical Garden, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

<sup>†</sup> Corresponding author (E-mail : rs207428@nodai.ac.jp)