# 生体を対象としたディジタイジングのための

# 3次元内部構造顕微鏡の開発

横田 秀夫\*!, 中村 佐紀子\*, 山形 豊\*, 樋口 俊郎\*\*, 牧野内 昭武!

\*理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット 埼玉県和光市広沢2-1 理化学研究所 もの作り V-CAD プログラム #理化学研究所 素形材工学研究室

\*東京大学大学院 工学系研究科

e-mail:hyokota@riken.go.jp,ryuhei@fr.catv.ne.jp,sakiko@riken.go.jp, Hiro075834@aol.com,akitake@riken.go.jp,higuchi@intellect.pe.u-tokyo.ac.jp

### 1.はじめに

現在、我々は眼球の詳細な立体構造とその力学的特性を収集して力学的なモデルを 構築し、有限要素法(FEM)を用いて眼球の損傷の様子や、治療の術前シミュレーションについ て研究を進めている。このFEMシミュレーションの結果はFEMメッシュに左右されることから、高精 度で実際の形状に即したメッシュが必要である。眼球は複数の層状の組織が積み重な り、球状の形状をしている。これらの組織は色の違いはあるものの、類似した組成 から構成されている。また、微細な構造を有し、特に網膜は厚さ100 μ m と薄く、 ディジタイジングの精度が要求される。生体試料のディジタイジングには非破壊・破壊検 査法を合わせて種々の観察法が用いられている(Table 1)。非破壊の観察法として、X 線、MRI、超音波などを利用したCTが用いられている。しかし、これらの方法ではミリ メートル以下の精度での測定は困難である<sup>1)</sup>(図1,図2)。また、ミクロンの精度での 観察を目的として走査型共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)が開発されているが、試料 の観察範囲は上端から100μm程度と非常に狭い。一方、破壊検査としては、連続切 片を作製する方法があるが、連続切片を作製することは非常に困難であり、作製し た各切片間の位置情報も失われているため立体像を構築することは困難である。ま た、人体を対象としたVisible Human Project<sup>2)</sup>も行われているが、そのデータの分解 能は高くない。そこで我々は、試料を連続切断し、その断面を観察する事を繰り返 して、得られた画像をコンピュータ内に再構築する3次元内部構造顕微鏡を考案し た<sup>3)4)</sup>。3D-ISMは、観察対象物の切断・断面観察を繰り返し、試料内部の断層画像を 観察して、試料内部の3次元構造を再構築する装置である(図3)。この装置は試 料を破壊する欠点があるが、試料の内部の色情報を得ることが可能であり、観察の

Transparency

Destract

Resolution

Observation Method	Resolution	Principle	Week Point	
MRI	~ mm	Nuclear Magunetic	Resolution	
Ultræonic Corputed Torography	~ mm	Ultrænic	Resolution	
X-ray Corputed Torography	~ mm	X-ray Transparency	Exposure	

~ µm

~ µm

Fluorescence

Reflecting Light

~ mm Continues thin slice

Confocal Laser Scanning Microscope

3D-ism

Visible Huran Project

Table 1 生体試料のディジタイズ法

_	and the second second	
-		
_		
	from the second second	
		100



Fig.1

眼球のMRI像 Fig.2 眼球のCT像



Fig.4 システムブロック図

原理的な分解能には制限がない。これま でに、本装置を用いて豚眼や手々の試料 のディジタイジングに成功してきた<sup>5)6)</sup>。 しかし、生体力学シミュレーション研究 で目指す網膜剥離のFEMシミュレーション では対象とする網膜が非常に薄く、これ までの装置ではその形状を詳細にディジ タイズすることは難しい。そこで、眼球 の高精細ディジタイジングを目指したマ クロ観察装置の開発を行い、その評価を 行った。さらに、生体内部の細胞を単位 とした微細な構造の観察を目的に、ミク ロ観察装置を開発した。本稿では、開発 した2つの装置について報告する。

## 2.実験装置

試作した3次元内部構造顕微鏡は、図 4に示すように試料の断面を作成するマ イクロスライサ、断面画像観察部、画像 記録装置、機械部制御装置、および画像 処理装置で構成されている。今回、広い 範囲を高分解能で観察するマクロ観察装 置、微細な領域を精細に観察するミクロ 観察装置の開発に際して、マイクロスラ イス部と断面観察部、制御部をそれぞれ 開発した。以下、各装置ごとに述べる。

### 3 マクロ観察装置

マクロ観察装置では、眼球および心臓と 大動脈弓部を観察対象に設定し、眼球の 観察分解能25ミクロンを目標にして設

計を行った。観察装置には、高分解能の観察のためにハイビジョンシステムを導入 し、切削部は最小10µmの切削を実現した。また、観察対象がヒト由来の試料で あることから、感染性の危険がある。そのために、観察に当たっては、感染性試料 と見なして操作を行う必要がある。そこで、装置の開発に当たっては殺菌のための 消毒剤の使用、紫外線の使用に耐えられる構造とし、装置外側に隔離用のビニール チャンバーとHEPAフィルターを設置し、その外部から遠隔操作することにより切削 した試料からの粉塵を遮断して観察ができるようにした。

3.1 マイクロスライス部

図5に試作したマイクロスライス部の外観を、図6に装置模式図を示す。切断さ



Fig. 5 試料切断部の外観

れる試料は15×12×100mm~180×135×
200mmである。試料はサーボモータとボールネジを
用いた直動機構により上方に送り、上端
を回転するル<sup>2</sup>ンドルに取り付けたナイフで切削
する。高解像度での観察のために試料送
りは最小5 µm とし、試料切削時に試料を
(年持し、試料送り時には試料を解放するり (40
50
(元子の動きを示す。指令値と一 20
30
のステージ上端の動きを示す。指令値と一 20
30
のステージ上端の動きを示す。指令値と一 20
31
10
マコトーム用ディスポーザブルナイ
フまたは,超微粉末超硬合金製のナイフ
(粒子径0.2µm)を用いる.装置は外部
に設置した冷凍機により冷却され試料周
辺は - 4 5 まで冷却することが可能である。



### 3.2 断面画像観察部・画像記録部

試料断面はハロゲン光源からの白色光をラインタイプライトガイドを用いて試料 の斜め上方から対向するように照射した。その断面をマクロレンズとカラーCCDカメ ラを用いて撮影する。撮影カメラはNTSCの3CCDカメラ(DXC950:SONY)に加え高解像度 のハイビジョン3CCDカメラ(DXC-H10:SONY)を使用可能とした。画像の記録は、機械 制御部からのトリガ信号により、ナイフが試料断面を切削した後にレーザービデオ ディスクレコーダ(NTSC:LVR-3000AN,HD:HDL-5800:SONY)に記録した。すべての試料を 切断・観察した後、記録したデータをPCに取り込みデジタルデータに変換した。 NTSC信号は640×480ピクセル、ハイビジョン信号は1980×1025ピクセルで取り込む。 図8にNTSCカメラとハイビジョンCCDカメラにより撮影した眼球の断面画像を示す。







Fig.8 画像解像度の検証

b.人眼

拡大画像を比較するとNTSC画像では眼球と包埋剤の界面に解像度の限界と思われる ボケが見られる。また、ハイビジョン画像では虹彩の形状を鮮明に見ることができ た。記録した断面画像を元に、ワークステーション(AlphaStation:COMPAQ)と画像可 視化ソフトウエア(AVS)により画像処理を行い、ボリュームレンダリング法を用いて立体画像 の構築を行なう。

## 3.3 実験結果

実験にはアイバンクから提供頂いた人の眼球を用いた。実験方法等については、 本報告書"中村"、"覚正"の項を参照頂きたい。

試料切断枚数は3300枚、撮影時間は約1時間であった。図9に実際に切断して得 られた断面画像のうちの15枚を示す。青色の部分が包埋剤である。眼球の網膜、 強膜、水晶体、光彩、角膜を確認することができた。また、赤色に着色された部分 が眼球の前房であり、それ以外の部分が硝子体である。これらの断面画像を元に立 体画像を構築した。図10に眼球の立体画像を示す。図10a~cは眼球全体の立 体画像であり、それぞれ眼球前面、側面、後面を示す。眼球と視神経の付着部位な どを見ることができる。dは眼球の角膜のみを抽出して表示した画像である。ま た、eは眼球の水晶体のみを抽出した画像である。本装置により撮影したフルカ ラーの断面画像から色情報を元に眼球内部の組織を抽出することが出来た。なお、 本研究は米国アイバンクを通じて、基礎研究への献体の同意を得た眼球を用いた。 また、東邦大学および理化学研究所倫理委員会の承認を得て行った。



Fig9 人眼連続断面画像



### 4. ミクロ観察装置

ミクロ観察装置はより微細な対象を観察することを目指して開発を行った。観察 装置として、白色光の偏射照明を用いた観察と落射蛍光観察に加えて共焦点観察を 可能とするために共焦点レーザー顕微鏡を組み込み、それぞれの観察を同時または 切り替えて行えるように光学系を新規に設計した。

# 4.1 マイクロスライス部

マイクロスライス部はマクロ観察装置と基本的な配置は同様である。微細な試料 の観察に対応させるために、試料の最薄切削厚さを0.5µmとした。また、また、切 削に用いるナイフは、ダイヤモンドナイフ、超硬合金製ナイフと、ミクロトーム用 替え刃を使用可能とした。装置の震動を極力低減するために、土台となる架台は鋳 鉄製とし、サブミクロンの切削を実現した。図11にLSMを組み込んで試作した3D-ISMの外観を示す。

### 4.2 断面画像観察部・画像記録部

観察部には市販の落射蛍光顕微鏡(BX60:OLYMPUS)をベースに改造を行った。対物レン ズには超長作動焦点距離の対物レンズ(M Plan ApoSL:ミットヨ)2~80倍を用い、アダプ ターを介してシステムに組み込んだ。最小分解能0.2ミクロンの観察を実現した。

図12に3D-ISMに採用したLSMの観察法の模式図を示す。LSM観察には高速に画像を得ることが可能なマイクロレンズアレイを用いたニポウディスク方式(CSU-10:YOKOGAWA)を採用し、488,568,633nmのレーザーとカメラ前部にフィルターホイールを設置した。また、微弱光に対応するためにイメージインテンシファイアーを装備したICCDカメラ(ICCD-300/DFR:浜松ホトニクス)を採用した。

LSM観察により試料上端の1層を観察することが可能となり、下層の透けを除去する ことをねらった。また、蛍光観察には水銀粒/ン光源と光ファイバーにより落射蛍光



顕微鏡に導光し、VBGのト リプルバンド励起フィル ターセットと高感度3CCDか パ(JK-TU52H:Toshiba) を用いておこなった。各 画像は追記型レーザーディスク (LVR3000AN:SONY)に記録 した。記録したデーターは立 体画像構築ソフトウエア (VoxcelView: ToshibaMachine)を用いて 立体画像を構築した。

Fig11 ミクロ観察装置外観

Fig12 観察部模式図

## 4.3 実験方法

本装置を用いて、装置の検証を行った。図13に蛍光ビーズを3D-ISMで切断し て、落射蛍光とLSMで観察した画像に対して、実際には切断していないX-Z断面を構 築した、画像の透けの影響を調べた結果である。落射蛍光観察では、35µmほど上 方に蛍光が広がっており、下層の透けの影響が認められた。一方、LSM観察では、透 けの影響は2µm程度であった。また、LSMの透けの影響は、ビーズのある部分と透 けの部分で明らかに輝度が異なることから、画像処理により透けを除去できること が判断できる。



Fig13 下層の透けの影響の検討

この装置を用いて微細な生物構造の観察を試みた。最初の試料として、蛍光色素を 添加した樹脂を血管内に注入して、毛細血管の構造を観察した。本内容に付いて は、本報告書"中村"の項を参照頂きたい。毛細血管の微細構造を観察することに 成功したので、次に細胞を最小単位とした臓器内での細胞の配置の観察を試みた。 実験にはアクチンプロモータにEGFPを連結して遺伝子組み換えをおこなったGreenMice (C57BL/6TgN(act-EGFP)0sbC14-Y01-FM131)<sup>7)</sup>とBALB / Cの産仔を対象に観察を行っ た。対象臓器は、心臓に設定し、心筋細胞の配置について観察を試みた。摘出臓器 は2%PFA固定して観察まで保存した。保存した臓器を3日間PBS洗浄し、観察対象 領域をトリミングした後、凍結包埋剤(0CTコンパウンド:SAKURA)と共に金型に入 れ、-80 にて凍結包埋した。凍結包埋した試料はLSM-3D-1SMを用いてLSM観察と 落射蛍光観察を行った。対象とする臓器は、アクチンを多く有する左心室壁とアク チンが少量存在するであろう肝臓に設定した。観察条件は、試料切削の厚さ2µm、 ナイフの回転数90rpm、試料温度-45 、ミクロトーム用ナイフ(C35:FEATHER)で切削 した。観察用対物レンズは5倍と20倍を用い、照射光として488nmのレーザーを出力 調整して(出力75-200mw)切断面を観察した。

#### 4.4 実験結果

マウス心臓の左心室壁の観察結果を図14に示す。撮影には5倍の対物レンズを用 い、観察範囲を広げるために、画像内の2つの場所で撮影した画像を画像処理によ リつなぎ合わせて表示した。画像左側が内層、内腔側、右側が外層である。a)は3D-ISMで切断して白色光で蛍光を同時観察した心室壁の断面画像である。心筋の3層構 造が蛍光の有無で確認できる。落射蛍光では下層の透けが有るためにGFP発現部 位がぼやけており、大まかな局在は分かるが、詳細な局在を観察することはできな い。b)に同一部位をLSM観察した画像を示す。a)と同様に心筋の3層を確認すること が出来た。蛍光観察画像と比較して、下層の透けが無く、ボケのない鮮明な画像で ある。図15にLSMで観察した断面画像53枚から構築した立体画像を示す。右手前の部 分を切断した任意断面画像である。心筋の走行と同様な層状の蛍光が確認できた。

### 5.考察

生物試料の内部構造の観察、ディジタイジングを目指して、ミクロ、マクロ観察 装置の開発を試みた。

マクロ観察装置は、人の眼球のディジタイジングを目的とした高精度ディジタイ ザの開発を行った。開発した装置の分解能は切断の厚さ10µm、撮影画像内20 µmの分解能を達成した。この解像度は厚さ100µmの網膜のディジタイズには 十分であった。また、開発した装置を用いて人眼のディジタイズを試み、厚さ10 µm、分解能20µmのボリュームデータを得ることに成功した。得られた断面画 像から眼球の立体画像や任意断面画像を構築することに成功した。これらのことか ら、本装置は眼球の高精細ディジタイジングに適していると考える。

次に、ミクロ観察装置では、LSMを組み込んだ3D-ISMを用いて、生体内でのGFPの 3次元局在を観察することに成功した。この結果はLSMの下層の透けの無い観察と、 3D-ISMの深さ方向の制限のない観察の利点を併せ持って初めて明らかにすることが できた。心臓の観察結果は、従来の切片観察法と矛盾せず、容易にその3次元構造 を観察できる利点があった。GFP組み換え体とLSM-3D-ISMを用いる提案手法により、 生体内の発現遺伝子の3次元局在を細胞を単位として明らかにすることが出来たと 考える。



今後、これらの手法を用いて生体力学第2期において心筋のシミュレーション、 生理学的な反応を考慮したシミュレータの開発につなげたいと考えている。

a)落射蛍光 b)LSM Fig14 心臓の断面画像

Fig15 心壁の立体構築画像

## 謝辞

本報告内の生物試料の観察では、下記の研究者との共同研究、協力をいただきた。 ここに記して謝意を表します。

人眼の観察:東邦大学第2眼科 矢部比呂夫、川口龍平 GFPマウスの観察:理化学研究所バイオリソースセンター 吉木淳 本研究に用いた遺伝子組換えマウスは大阪大学岡部教授より分与いただきました。

# 参考文献

1)特集 最近の顕微鏡,精密工学会誌, 57,7(1991),1141.

- 2) http://www.nlm.nih.gov/research/visible/visible\_human.html
- 3) 横田,他4名,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(1998),1
- 4) 横田,他3名,発現遺伝子観察用3次元内部構造顕微鏡の開発,医用電子と生体 工学,36,3(1998),244
- 5)川口,他5名,三次元内部構造顕微鏡による豚眼球三次元モデルの構築,あたらしい眼科,16,10(1999),1437
- 6) 横田,他5名,3次元内部構造顕微鏡による生体の侵襲的イメージング, Medical Imaging Technology, 20,6, (2002), 660
- 7 ) Ikawa et.al.FEBS Lett,430,(1998)83-87