

3次元内部構造顕微鏡による 微細血管構造観察への挑戦

中村佐紀子(理化学研究所)

横田秀夫(理化学研究所)

島井博行(電気通信大学)

牧野内昭武(理化学研究所)

三島健稔(埼玉大学)

背景

マクロ領域でのシミュレーションが可能



ミクロな領域のシミュレーション



ミクロな3次元形状情報の取得が必要

SEMなどでは表面形状の観察のみ

→ 3次元内部構造顕微鏡(3D-ISM)を用いた微細構造の観察法を検討

目的

- 生体内の微細構造の3次元構造情報の取得

3D-ISMを用いた微細領域での

3次元構造収集への挑戦

具体的対象：ラット腎臓の微細構造血管の観察

(直径5 μm 程度の毛細血管)

装置概要

3次元内部構造顕微鏡

(Three-Dimensional Internal Structure
Microscope: 3D-ISM)

対象物を切断し、残った断面画像の観察を
繰り返し連続画像を得る装置
座標軸が得られる

利点: 深さ方向の観察範囲制限なし
欠点: 深さ方向の分解能なし

共焦点レーザースキャン顕微鏡

(Conforcal Laser Scan Microscope: CLSM)

光学切片として試料が得られる
実際に試料を切断せずに立体構造観察可能
1 μm 以下の観察も可能

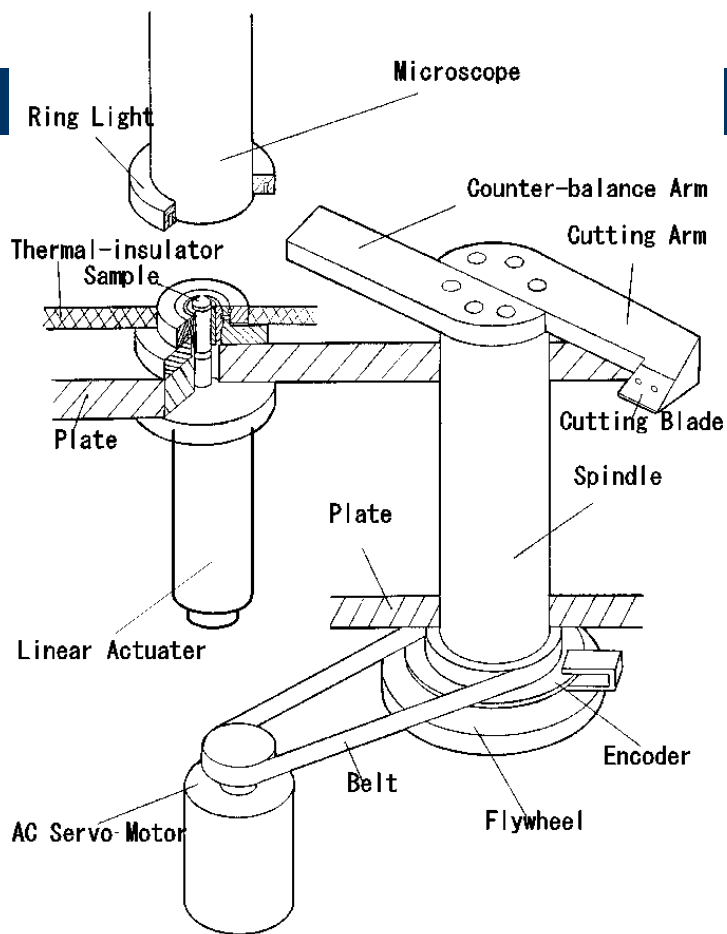
利点: 平面方向・深さ方向に高分解能
欠点: 観察範囲が試料上方より100 μm

3D-ISM + CLSM

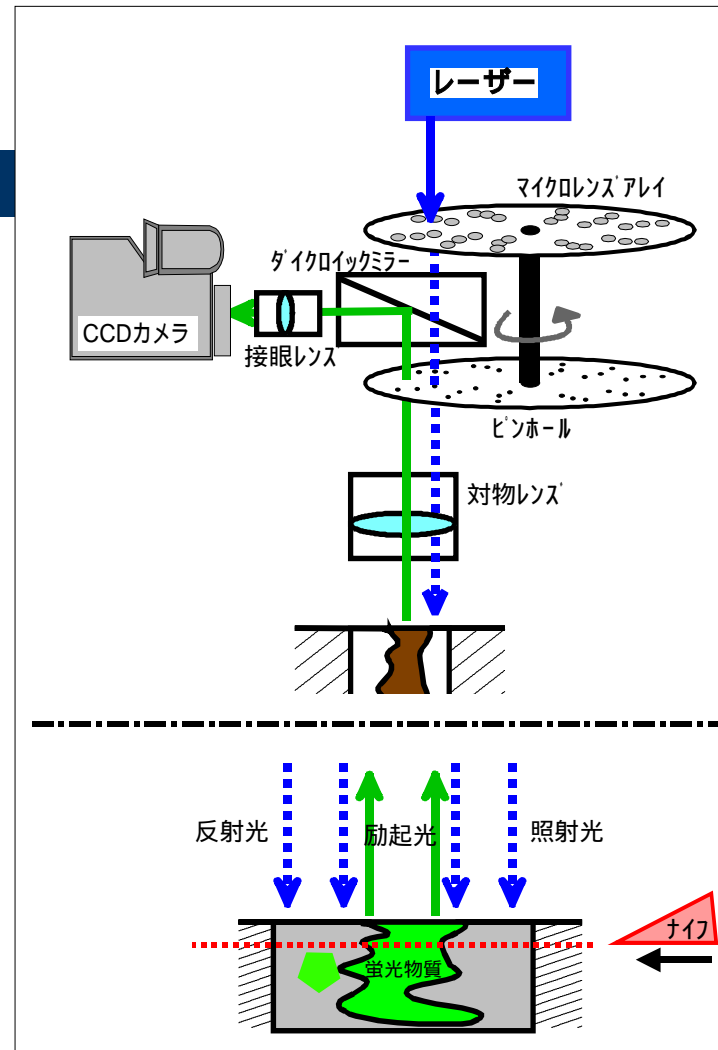
深さ方向制限なし・高分解能な画像取得可能

(1 μm 分解能が可能)

LSM + 3D-ISM



装置模式図



共焦点レーザー光学系

マイクロスライサ



装置外観

試料サイズ

最大：8×8×20mm

最小：3×3×5mm

- 試料温度：-45 以下（凍結包埋）
- 試料切削用ナイフ：超硬合金製ナイフ
マイクローム用ナイフ
ダイヤモンドナイフ
- ナイフの回転数：30～90rpm
- 切削厚さ：0.5～10μm
- 落射蛍光光学系
システム：BX-30(OLYMPUS)
光源：水銀光源
- CLSM光学系
システム：BX-30+CSU-10 (YOKOGAWA)
光源：568nm Arガスレーザー(150mW)
488nm Arガスレーザー(75mW)
633nm Arガスレーザー(75mW)

対物レンズ:

超長作動距離対物レンズ M PLAN ApoSL
x2～x80 (MITUTOYO)

試料作成

- 蛍光染色

3D-ISMは色情報が取得可能な装置

- ・観察対象物に色差が必要

蛍光色素を用い観察対象のみ光らせることにより検出能を高めることができる

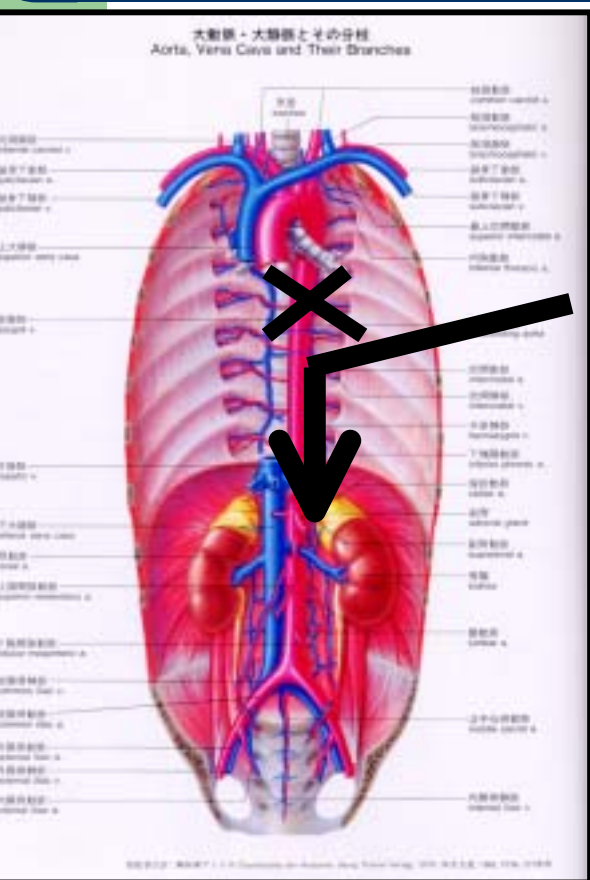
- 血管鑄型注入剤メルコックス(メタクリレート系樹脂)

微細な血管内に注入可能で、SEM観察に使用

着色されている樹脂ではあるが、蛍光観察できない

→ **メルコックスに蛍光色素を添加して使用**

標本作成手順



作成手順

試料:SDラット

9週齢

麻醉下にて開胸



下行大動脈を確保し、翼状針刺入



PBSにて灌流(右心房を切開)



(シリンジにより加圧)

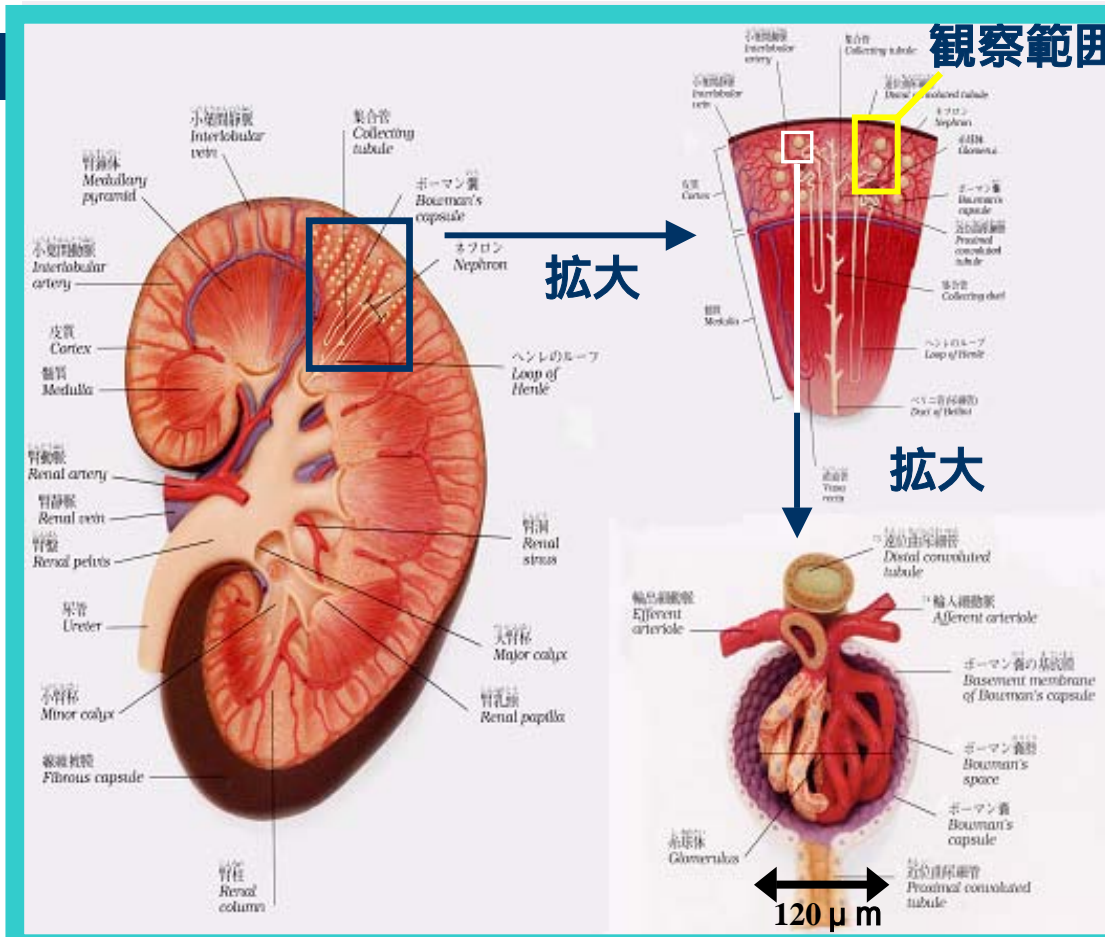
蛍光色素添加メルコックス注入



(メルコックス:40ml 硬化剤:0.5g 蛍光色素:50mg)

注入後動脈・心臓上部を鉗子で挟み重合

観察対象部位：腎臓について



観察範囲

拡大

拡大

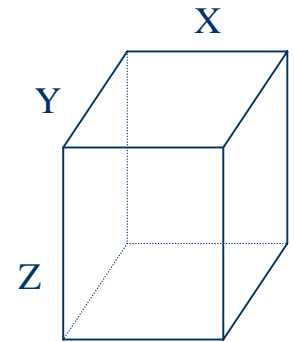
120 μm

観察部位(腎臓)の模式図

CLSMによるラット腎臓血管観察

観察条件

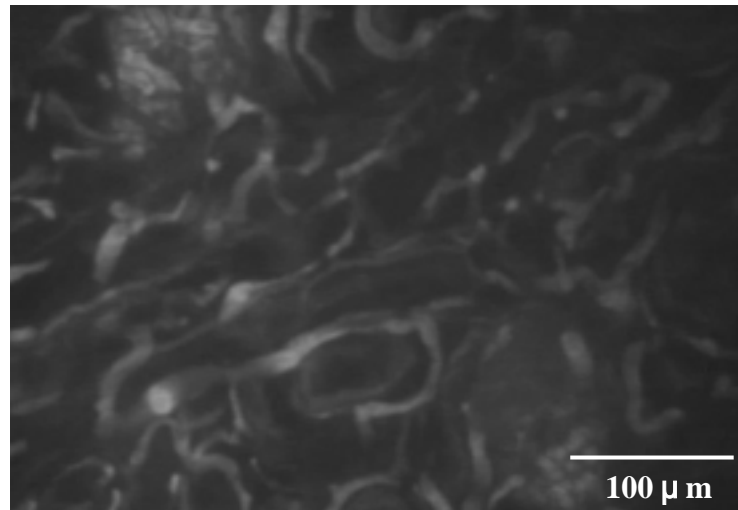
- レーザ波長: 568nm (Arガスレーザー) 出力: 150mW
- DM: 460nm 520nm 600nm (3波長透過)
- EM: 中心波長: 615nm 半値幅: 30nm (OMEGA)
- ナイフ: ディスポーザブルナイフ C35 (FEATHER)
- スライス厚さ: 1.0 μm
- ナイフ回転速度: 90rpm
- 撮像カメラ: ICCD (浜ホト ICP300-DF)
- 対物レンズ: 超長作動距離対物レンズ M PLAN ApoSL x20 (MITUTOYO)
- 分解能: XY: 0.7 μm Z: 1.0 μm



蛍光・CLSMによる腎臓血管観察

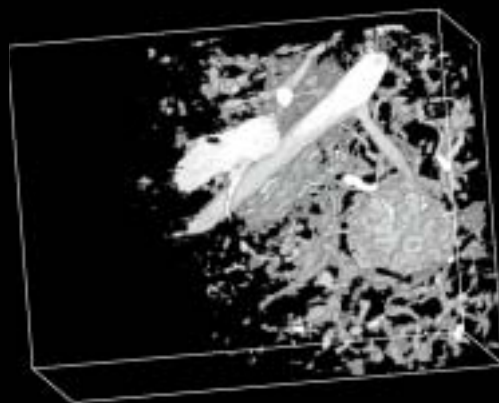
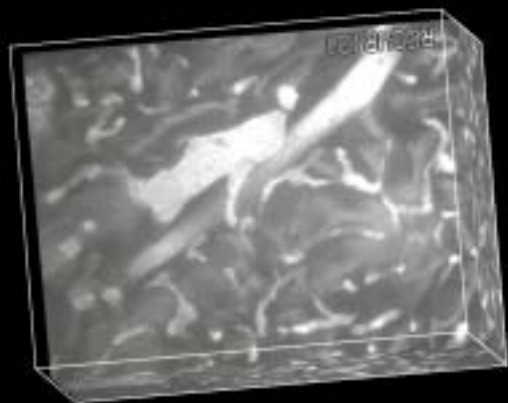


蛍光観察画像

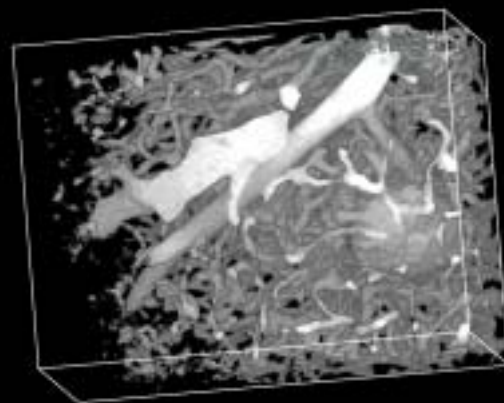


CLSM観察画像

血管系の抽出—立体表示—



Opacity:255
Hue:0-255
Saturation:0-255
Intensity:110-255

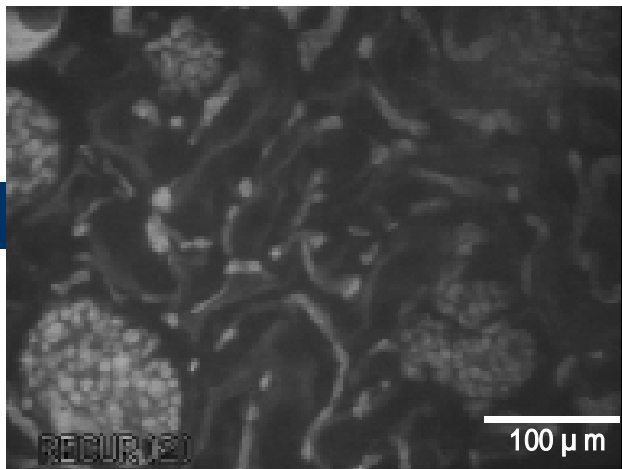


Opacity:255
Hue:0-255
Saturation:0-255
Intensity:76-255

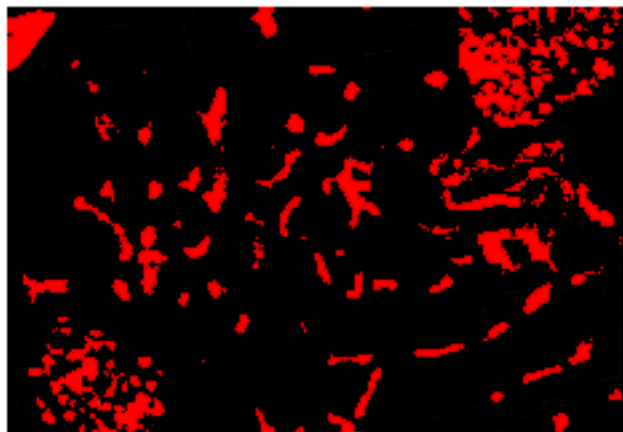
立体表示画像

血管抽出画像

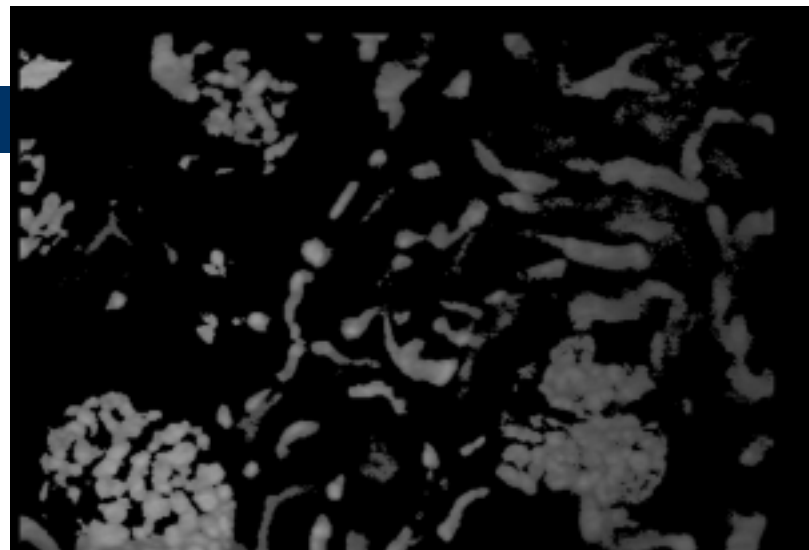
観察結果・及び血管系の抽出



元画像(ラット腎臓)



2値化 領域抽出



2値化領域の抽出及び濃淡情報の再付加
血管抽出画像

拡張Region Growing

停止条件を可変

停止条件の局所判定

3次元処理

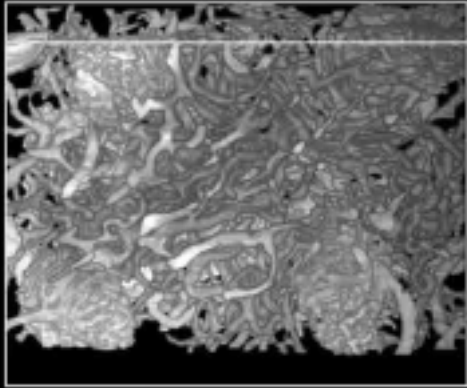
Initial value

Size of local area : 29x29
: 30

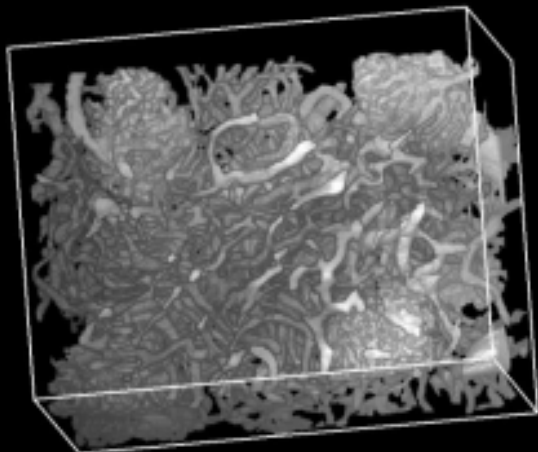
inner area : 9 points

outside area : 15 points

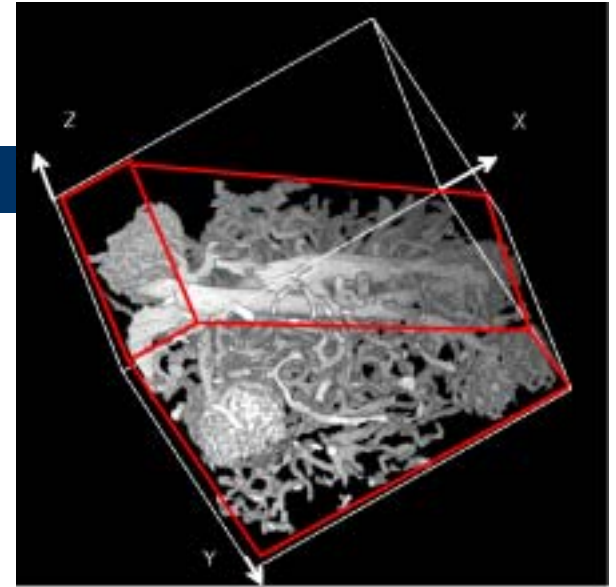
血管系の抽出 -立体表示-



視点回転



任意断面連続再生



任意断面画像

Area
X:448 μ m
Y:336 μ m
Z:500 μ m

Resolution
X:0.7 μ m
Y:0.7 μ m
Z:1 μ m

まとめ

- CLSMと3D-ISMを組み合わせた装置により生体内部の微細3次元構造を観察することができた
- 形状データは3次元の座標を持っているためシミュレーションへの応用も可能



提案手法は生物を対象とした微細な3次元構造の解析に有用である