

3次元内部構造顕微鏡(3D-ISM)を用いた生体試料の観察に関する検討

中村佐紀子^{*}, 横田秀夫[†], 川口龍平[#], 矢部比呂夫[§], 牧野内 昭武[!], 姫野龍太郎^{**}

^{*} 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 e-mail: sakiko@riken.jp

[†] 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
ものづくり情報技術統合化研究プログラム

[#] 埼玉県和光市広沢 2 - 1 e-mail: hyokota@riken.jp
東邦大学医学部眼科学 2 講座

[§] 東京都目黒区大橋 2-17-6 e-mail: ryuhei@fr.catv.ne.jp
東邦大学医学部眼科学 2 講座

東京都目黒区大橋 2-17-6 e-mail: hiro@root.or.jp

[!] 理化学研究所 ものづくり情報技術統合化研究プログラム
埼玉県和光市広沢 2 - 1 e-mail: akitake@riken.jp

^{**} 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 e-mail: himeno@riken.jp

要旨

生体力学シミュレーション研究で目指している網膜剥離の 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ジタル化することは困難であった。そこで眼球の高精細デジタル化が可能な 3 次元内部構造顕微鏡 (3D-ISM) の開発を行いそれに伴いこの装置に適した眼球の観察法の検討を行った。また、この 3D-ISM の観察部に顕微鏡を組み込んだ装置を開発し、眼球のようなマクロな領域だけでなくミクロな領域での 3 次元形状の取得を試みた。このような生体試料の微細部位の観察を目的としてマウス腎臓の毛細血管の微細立体構造の観察法の検討を行った。

1. はじめに

我々は、人体の力学モデルをコンピューター内に構築する生体力学シミュレーション研究を進めてきており、眼球の網膜剥離に対する強膜内陥術の手術シミュレータの開発を行っている¹⁾。生体のシミュレーションモデル作成に置いてその基となる 3 次元形状データの取得に、独自に開発してきた 3D-ISM の適応を試みてきた²⁾。CT・MRI 等の既存の装置で生体を撮影して得られる 3 次元情報は生体を構成している成分が類似しているために境界が曖昧であり、眼球の詳細な構造を計測することはできない。しかし、3D-ISM は実際に試料をミクロン単位で切断し、その連続断面画像を観察する装置であるため、眼球の網膜の観察も可能な高分解能な画像が得られる。

我々は取り扱う生体試料毎に試料に適した観察法を検討し、マクロな領域で様々な3次元形状の取得を行ってきた。一方、ミクロな領域では近年血管の力学解析が進められ、その対象も太い血管から細い血管に移行してきている。しかし毛細血管での解析は用いる画像が2次元的なものが大多数であり3次元的なつながりのあるものではない。従来からの毛細血管などの立体の観察法としては走査型電子顕微鏡（SEM）観察が挙げられ、生体のミクロな領域での血管観察は血管内鋳型注入-SEM観察法などにより様々な高分解能な画像が得られている³⁾。しかしこの観察法は対象物の表面を観察する方法であり、画像の裏側や重なり合った部分の観察は不可能である。そのため、3次元構造が必要なシミュレーションモデルを造ることは出来ない。そこで我々はマクロ領域での観察に使用した3-DISMの観察系を顕微鏡にすることによりミクロな領域への対応を行った。この装置を用いて毛細血管の微細な3次元構造のデジタル化を目指し、その観察法の検討を行ったので報告する。

2. 3D-ISMによる人眼観察法の検討

2-1 装置概要

3D-ISMは破壊検査により試料内部の構造を明らかにする方法であり、立体構造を高精度かつ迅速に観察できるシステムである。観察対象物を切断し、残った断面画像の観察を繰り返し、ミクロン単位で連続画像を得ることが可能な装置である。（本装置についての詳細は横田を参照）

2-2 実験方法

2-2-1 人眼球試料の取り扱い留意点

眼球の形状の取得には米国アイバンクからの人眼入手し実験を行った。アイバンクにおいて提供者の血清学的検査（HIV及びB型肝炎）を行い、摘出直後に腐敗と感染防止の為に2.5%ホルマリン・1%グルタルアルデヒド混合液（PBS）にて固定した。現時点ではホルマリン固定により感染の大部分は防げるはずだが未知の感染症の可能性も想定し、実験にて取り扱った人眼は感染性試料として取り扱った。また人眼を実験で取扱う者はB型肝炎の予防接種及び血清の保存を行っている。3D-ISMでの観察時の取り扱い留意点としては、3D-ISMでスライスを行うことにより発生するエアロゾルとエアロゾルの



図1 マクロ装置外観

粘膜への付着予防といったことがあげられる。粘膜は皮膚に比べると感染経路となる危険が高いため、感染性試料の付着及びエアロゾルの吸入を防ぐ為に防護服・手袋・マスク・保護メガネを着用し、実験を行った。また実験室のエアロゾル対策としては3D-ISMをフードで覆い装置内と実験室の区分を行った。図1に装置の外観を示す。実験時はフードを全ておろし閉鎖空間とした。装置内は陰圧汚染区域としてHEPAフィルターを通して空気を浄化し実験室内（汚染区域外）へ排気を行う。フード内はUVランプをつけ、実験中は実験関係者以外の立ち入りを禁じた。また実験室、実験機器は特定し、第三者が不用意に使用することがないようにするとともに取り扱った器具類は全て消毒・滅菌を行った。実験終了後の処置として3D-ISMには0.5%グルタールアルデヒドの噴霧を行い使用した実験機器は0.5%グルタールアルデヒドに1day浸漬後洗浄した。実験中・終了後共にUVランプを点灯させ滅菌を行い、実験で出た廃棄物はオートクレーブ（120℃ 1時間）後、感染性廃棄物として廃棄した。試料の固定と実験器具の消毒に用いたグルタールアルデヒドは抗菌スペクトルが広く、効果発現が早く作用が持続的であること、環境条件下（有機物の存在など）によって効力の低下をきたさないものである。

2-2-2 試料作成

2.5%ホルマリン・1%グルタールアルデヒド混合液（PBS）にて固定した眼球をPBSで洗浄した。固定液が残存していると凍結包埋時に眼球の凝固点が上昇してしまい均一に凍結された試料が得られないので洗浄は念入りに行う。洗浄後、眼球の各部位を判別するために眼球の前房水に赤色の染色液（ポスターカラー赤：NICKER）を注入して着色を行った。眼球の外層である強膜は白色であり、のち画像抽出において眼球の各部位と包埋剤とを判別するため生体内では存在しない青色（ポスターカラーコバルトブルー：NICKER）を用いてOCTコンパウンド（SAKURA）を着色し、-80℃にて凍結包埋した。

2-2-3 観察条件

凍結した試料は-45℃に冷却した装置内でスライスした。切削は超微粉末超硬合金製ナイフを用い、切削厚さ10μm、ナイフ回転数90rpm、撮影にはHDカメラ（DXC-H10:SONY）を使用し、観察断面画像は追記型レーザー（WHD-3AAO:SONY）により静止画像として記録した。

2-3 観察結果・眼球抽出

得られた観察断面は3300枚、撮影時間は約1時間であった。レーザーディスクに記録した画像をPCに取り込み、連続断面画像に変換した。図2に実際に切断して得られた画像のうちの15枚を示す。

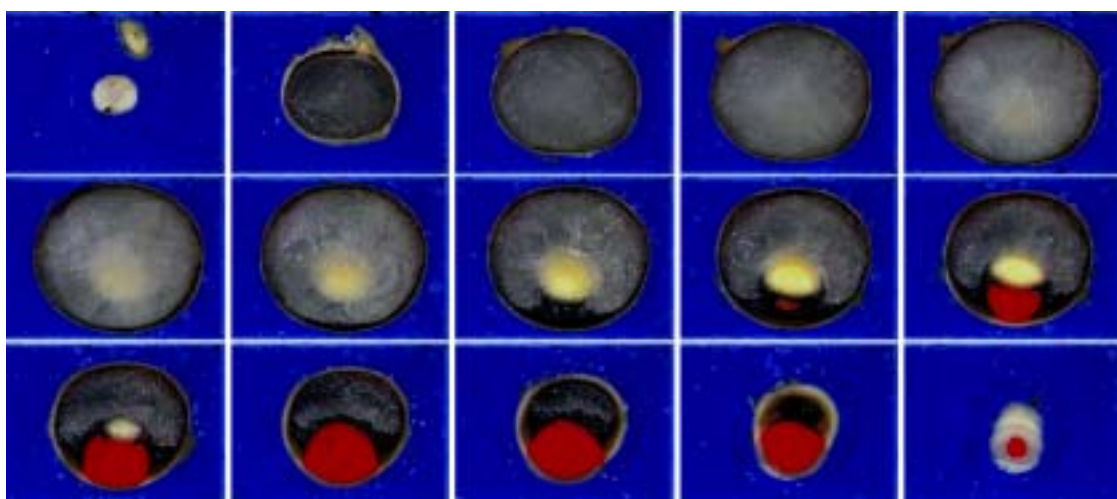


図2 眼球の連続断面画像

青色の部分が包埋剤である。眼球の網膜・強膜・水晶体・虹彩・角膜を確認することができた。赤色に着色された部位が前房であり、それ以外の部分が硝子体である。また、得られた画像からは通常の観察法では分離して見ることはできなかった眼球の3層構造（強膜+脈絡膜+網膜）の確認ができる。画像の分解能は切断の厚さ（Z方向）は $10\mu\text{m}$ 、撮影画像（X・Y方向）の分解能は $25\mu\text{m}$ であり、分解能 $25\mu\text{m}$ のボリュームデータを得ることができた。この解像度は厚さ $100\mu\text{m}$ の網膜のデジタル化には十分なものであり、得られた画像から眼球全体、水晶体、角膜等の立体画像や任意断面画像を構築することに成功した。また眼球の各部位についての抽出を行い得られたデータを元に形状モデルを作成し、6面体FEMメッシュモデルを構築した⁴⁾。（抽出手法についての詳細は覚正、メッシュモデル構築についての詳細は平田参照）

2-4 結言

実験に用いた人眼は感染性試料として取り扱い、物理的・化学的に封じ込めを行い実験を行った。物理的封じ込め的手段としては汚染区域を装置のフード内とし、排気はHEPAフィルターで処理した。化学的な封じ込めとして各種細菌・他の消毒剤では殺菌困難な細菌芽胞・ウイルスにも有効なグルタルアルデヒドを使用した。また、3D-ISMにより得られた断面画像によりシミュレーションに耐えうる高精細な形状データの取得が可能であった。眼球観察時に眼球の特定部位や包埋剤を着色することによりデジタルデータ化後の眼球の各部位の抽出を可能とした。得られたデータを元に形状モデルを作成し、6面体FEMメッシュモデルを構築した。

なお、本研究は米国アイバンクより基礎研究への献体の同意を得た眼球を用い東邦大学の倫理委員会の承認を得て行った。

3. 小動物を用いた毛細血管観察法の検討

3-1 装置概要

眼球のデジタル化に用いた 3D-ISM は観察対象がマクロな領域であり、ミクロな領域の観察を行うことはできない。そこで 3D-ISM の観察部に顕微鏡を取り付けミクロな領域での観察を行った。装置外観図を図 3 に示す。下部が試料作成部、上部が観察部となっており、観察部に蛍光顕微鏡及び共焦点レーザ顕微鏡 (LSM) を組み込んだ。3D-ISM は実際に試料を切断するので深さ方向の制限はないが画像の検出能は低い^{5) 6)}。一方 LSM は光学切片より深さ方向に高分解能であるが観察範囲が数百ミクロンと限られている。このことにより、3D-ISM に LSM を組み込むことによりお互いの欠点を補って深さ方向の制限なしの高分解能な画像取得が可能となる。蛍光観察部は市販の落射蛍光顕微鏡ユニット (BX シリーズ OLYMPUS) を使用した。蛍光観察には水銀キセノン光源と光ファイバーおよび V-B-G のトリプルバンドフィルターセットと高感度 3CCD カメラ (JK-TU52H:Toshiba) を用いた。図 4 に 3D-ISM に取り付けた LSM 観察時の模式図を示す。LSM はリアルタイムで画像取得が可能な CSU-10 (YOKOGAWA) を使用し、光源はアルゴンレーザ 488・568・633nm の 3 波長観察が可能であり、対物レンズを用いて ICCD カメラ (ICCD-300/DF:浜松フォトニクス) で撮影した。観察断面画像は追記型レーザ (LVR3000AN:SONY) により静止画像として記録した。



図 3 装置外観

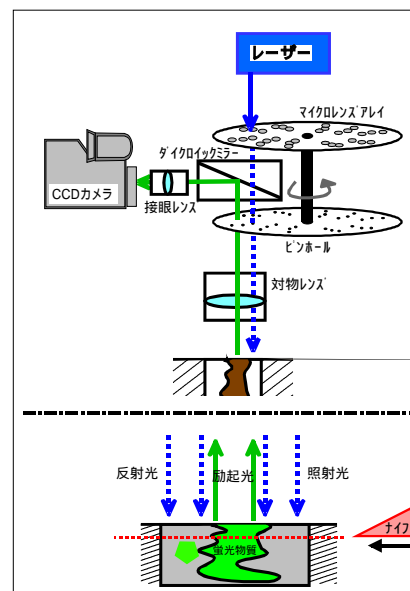


図 4 観察模式図

3-2 実験方法

3-2-1 試料作成

生体試料の微細部位の観察を目的としてマウス腎臓の微細血管に血管鑄型剤をそれぞれ常圧(120mmHg)、低圧(60mmHg)で注入し、微細立体構造の観察を行った。SEM 用に開発された血管鑄型注入剤(メルコックス:大日本インキ)に検出能を高めるために蛍光色素 RITC(フナコシ)を添加し、血管への注入を行った。低圧での注入は注入時間に時間がかかるため操作時間を延長させるのと粘度を下げる為にメルコックスにメチルメタクリレートモノマーを添加して実験を行った。麻酔をかけた対象試料(ICR マウス 9 週齢)の下行大動脈を確保、静脈系を開放にし、ヘパリンを添加した生食で十分に灌流脱血を行った。血球を十分に洗い流したのち、RITC 添加メルコックスを下行大動脈より注入(注入圧:常圧モデル 120mmHg、低圧モデル:60mmHg)し、樹脂を重合させた。樹脂の重合後、腎臓を摘出し、トリミングした後 OCT コンパウンド(SAKURA)と共に-80℃にて凍結包埋した。

3-2-2 観察条件

凍結した試料は-45℃に冷却した装置内でスライスした。切削厚さ 1 μm、ナイフ回転数 90rpm、レーザ波長は 568nm で 150mW の Ar ガスレーザを用い、DM は 460nm・520nm・600nm の 3 波長透過型で EM フィルターは中心波長:615nm、半値幅:30nm (OMEGA)を用いた。観察には 20 倍の超長作動距離レンズ(M PLAN ApoSL MITUTOYO)を使用し、ICCD カメラを用いて微弱光を撮像した。

3-3 結果

3-3-1 観察結果

蛍光観察により得られた画像は落射蛍光法により断面を観察しているために観察試料の下層が透けてしまい、血管の境界が曖昧であるが LSM 観察画像では、下層の透けが除去され微細な血管の判別が可能であった(図 5)。この観察により得られた画像は分解能 XY:0.7 μm、Z:1.0 μm と高精細であり、観察断面は 500 枚、観察時間は 5 分と高速であった。

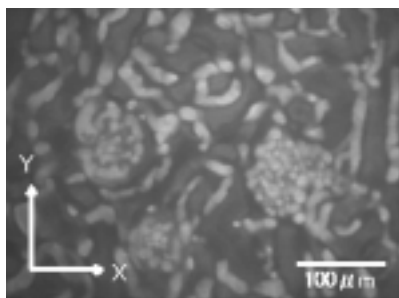


図 5 マウス腎臓系球体

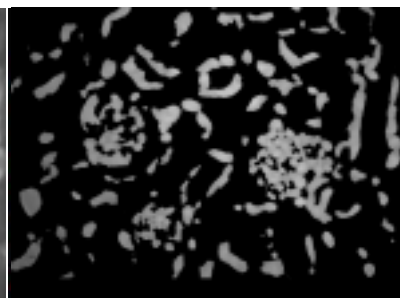


図 6 血管抽出結果(常圧)

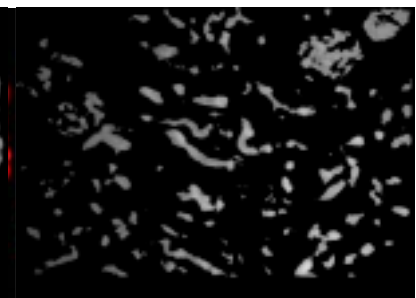


図 7 血管抽出結果(低圧)

3-3-2 血管抽出

次に我々は得られた画像から血管抽出を行った。LSM 観察で得られた画像は左右の明るさが均一ではなく、S/N 比が悪いために閾値を用いた抽出法では血管のみを抽出することはできなかった。そこで我々は血管の自動抽出法を開発した⁷⁾。用いた抽出法は3次元の拡張領域法を基にしたもので、対象領域の内外の抽出情報と局所領域情報を用いることにより、注目点における閾値を自動的に設定するものである。閾値処理による2値化によって得られた画像は目的の血管部位のみの抽出が可能であり、背後の非血管部は抽出されていない。この抽出画像に元画像の濃淡情報を再付加し断面画像とした。得られた結果より一断面を示す。図6が常圧注入血管抽出画像、図7が低圧注入血管抽出画像である。この画像からも分かるように低圧注入時の画像の方が血管径が細く、血管の集合も粗になっていることが分かる。血管径の計測を動脈からの分岐点である小葉間動脈、糸球体に入っていく輸入細動脈、糸球体周辺毛細血管の各部位で行った。計測結果を表1に示す。糸球体周辺の毛細血管では変化があまりないのに対し、血管径が太くなるほど変化の割合が高くなることが分かった。

表1 注入圧の変化による血管径の変化

観察部位	注入圧:120mmHg 平均血管径	注入圧:60mmHg 平均血管径	低圧/常圧
小葉間動脈	48.3 μm (N=7)	35.8 μm (N=3)	70%
輸入細動脈	17.7 μm (N=11)	14.7 μm (N=7)	80%
糸球体周辺毛細血管	9.7 μm (N=9)	9.1 μm (N=7)	90%

3-3-3 血管構造の可視化

血管抽出により得られた画像から立体構築を行った。画像の立体構築には3次元可視化ソフトウェア (Voxel Viewer: Toshiba Machine) を用いてレイキャスティング法により可視化した。図8に常圧で図10に低圧で注入し、抽出した血管を立体再構築した画像を示す。密な血管構造の中に血管が球状に集まっている糸球体が確認できる。図9は図8の画像から、図11は図10の画像からそれぞれ X:20° Y:-30° Z:5° 回転させた画像であり、立体の右上部を切り取り内部を可視化したものである。径の太い血管は小葉間動脈であり、糸球体が房のようについていることも確認できる。図8・図9と図10・11を比較すると3次元に立体構築した画像からも低圧で作成したモデルの方が血管径が細いということが確認できる。また、従来の手法である血管内鑄型注入-SEM 観察法と同様に、輸入細動脈が糸球体に侵入直後、大きく二股に分かれ、輸出細動脈はこの股の間からでてくることを観察できた。

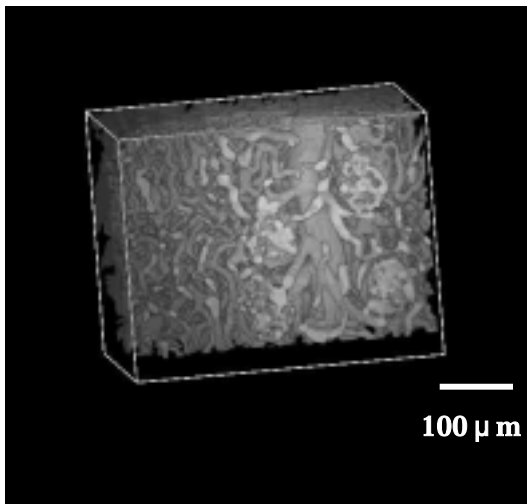


図 8 系球体立体構築画像（常圧）

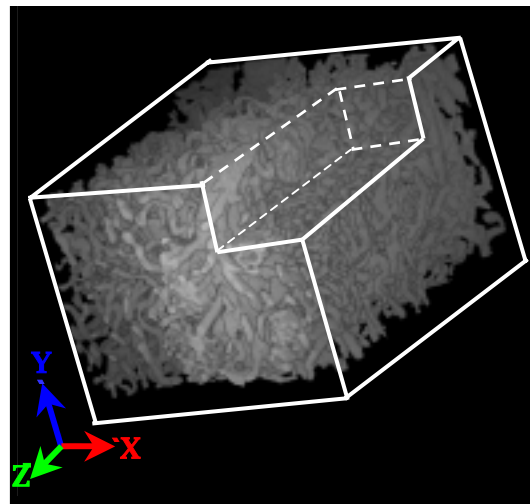


図 9 系球体任意断面立体構築画像（常圧）

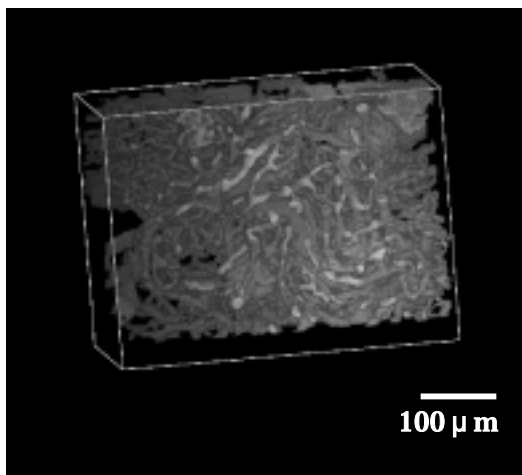


図 10 系球体立体構築画像（低圧）

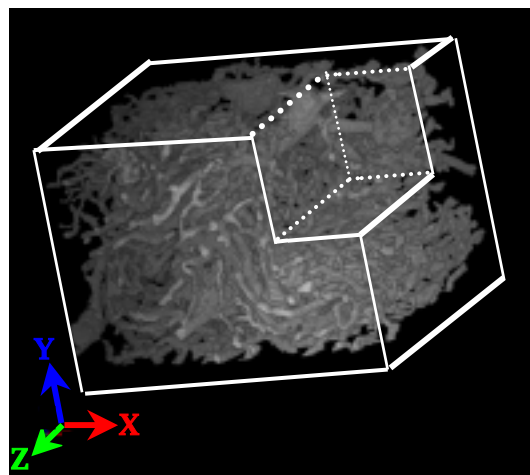


図 11 系球体任意断面立体構築画像（低圧）

3-4 結言

LSM を組み込んだ 3D-ISM では、LSM 単独では観察が不可能な深さ $500\ \mu\text{m}$ までの観察が可能であった。また、検討した観察法により生体内の微細構造を 3 次的に捉えることも可能であり従来の鋳型注入 SEM 観察法と同様の構造を観察することができた。さらに試料内部の任意の角度、断面画像を作成することにより血管の 3 次的構造を $1\ \mu\text{m}$ の精度で観察することができた。3D-ISM より断面画像が得られるため血管径の計測が可能となった。また圧力変化における微細な血管形状の変化を観察することが可能であり、血管径の部位により圧力による影響が異なることが分かった。SEM の観察の場合、試料の切断等の作業は SEM 下で行うことが難しく、観察対象部位の選択は困難である。しかし本手法では一度画像として取り込んでしまえば何度でも容易に立体構造の観察を行うことができた。さらに、血管抽出を行うことによりシミュレーションも可能な 3 次的なつながりのある微細血管構造データを得るこ

とができた。

4. おわりに

3D-ISMを用い各々の試料に適した観察法で試料を観察することによりマクロな領域からミクロな領域まで様々な試料のデジタル化を行うことが可能であった。得られたデータは3次元の情報を持っているためシミュレーションにも応用が可能である。また近年分子生物学の分野では発現遺伝子やプロテオーム研究が盛んに行われている。その中でも発現遺伝子の3次元局在と生体の構造の関係が重要な課題であり、我々が開発した3次元内部構造顕微鏡はその解析ツールとしても有用であろう。

参考文献

- 1)孫、他2名、実用化に向けての眼球網膜剥離手術数値シミュレーションのためのFEMプログラムの開発、理研シンポジウム 27,28May,p123-135 (2003)
- 2)横田、他6名、スライスによるデジタル化装置の開発と眼球組織のデジタル化理研シンポジウム 27,28May,p92-99 (2003)
- 3)Motta PM,Murakami T,Fujita H (eds),Scanning electron microscopy of vascular casts,methods and applications. Kluwer Academic Publ,Boston, (1992)
- 4)平田、他2名、フルカラー生体断面画像を用いた六面体有限要素作成手法の検討、理研シンポジウム 27,28May,p115-122 (2003)
- 5)横田、他4名、3次元内部構造顕微鏡による凍結試料の観察と計測、低温生物工学会誌、44、1 (1998)
- 6)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) 244-251
- 7)Hiroyuki SHIMAI, et.. al., EXTRACRION METHOD OF THE INTEREST REGION WITH INTENSITY CHANGE FROM BIOLOGICAL VOLUME DATA, COMPUTATIONAL BIOMECHANICS RIKEN SYMPOSIUM,p33-44(2002)