

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^{*}, 横田秀夫[†], 牧野内 昭武[#]

^{*} 理化学研究所 情報基盤研究部

埼玉県和光市広沢 2 - 1

e-mail: ebisu@postman.riken.go.jp

[†] 理化学研究所 情報環境室

埼玉県和光市広沢 2 - 1

e-mail: hyokota@postman.riken.go.jp

[#] 理化学研究所 もの作り V - C A D

埼玉県和光市広沢 2 - 1

e-mail: akitake@postman.riken.go.jp

要旨

我々は試料の立体構造を高精度かつ迅速に観察する3次元内部構造顕微鏡の開発を行ってきた。さらなる高分解能観察の為に観察部に共焦点レーザー顕微鏡(LSM)を組み込んだ装置の開発を行い、走査型電子顕微鏡の画像にせまる微細な血管の3次元構造の解明を目指した。観察対象としてラット腎臓の糸球体を設定し、微細血管構造の観察を行ったので報告する。

1.はじめに

我々は生体力学シミュレーション研究においてディジタイジングの手法、3次元形状モデリングの開発、生体組織の力学データ取得手法の確立などを色々行ってきた。3次元内部構造顕微鏡は対象物を切断し、残った断面画像の観察を繰り返して連続画像を得る装置であり、対象物のミクロン単位での断面画像の取得が可能である。生体力学シミュレーション研究では眼球の網膜などを対象にこの装置を用いて3次元形状の取得し、マクロな領域での観察を行ってきた。一方、ミクロな毛細血管レベルでのシミュレーションも始まっている。これに対して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が、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。そのために、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。そこで我々は毛細血管での血流解析などを目指して微細な血管の観察法の検討を行った。

2.装置概要

装置外観図を図1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LSMを組み込んだ。3次元内部構造顕微鏡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¹⁾²⁾。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マイクロンと限られている³⁾。このことにより、3次元内部構造顕微鏡に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2に3次元内部構造顕微鏡に取り付けた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ー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:浜松フオトニクス）で撮影した。観察断面画像は追記型レーザー（LVR3000AN:SONY）により静止画像として記録した。

3.実験方法

3次元内部構造顕微鏡はカラー画像が得られる装置であり、取得画像より色抽出を行い目的部位を抜き出すことが可能である。色抽出を行うためには観察対象物に色差が必要となり、我々は蛍光色素を用い観察対象のみを光らせることにより検出能を高めている。

本装置は蛍光観察、LSM観察ともにそれぞれ3波長ずつの観察が可能であるので、試料を多重染色することにより複数の対象物の観察も行うことができる。本報告では腎臓の糸球体とその周辺の血管を微細な血管構造の観察対象として設定した。

3-1.試料作成

SEM用に開発された血管鋳型注入剤（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を添加した溶液を用いて血管の鋳型を作成した。麻酔を



図1 装置外観

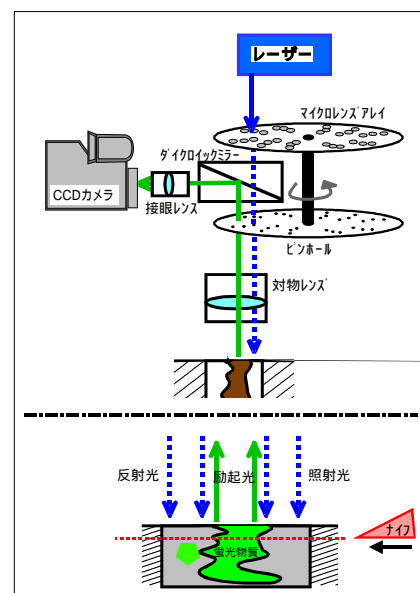


図2 観察模式図

かけた対象試料（SD ラット 9 週齢）に、RITC 添加メルコックスを下行大動脈より環流した。樹脂の重合後、腎臓を摘出しトリミングしたのちに OCT コンパウンド（SAKURA）と共に-80 にて凍結包埋した。

3-2 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 $1\mu\text{m}$ 、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 は中心波長：615nm、半値幅：30nm（OMEGA）に設定した。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。

4. 結果

4-1. 観察結果

図 3 に 20 倍の対物レンズを用いて蛍光観察をした画像を示す。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。

図 4 に LSM 観察した画像を示す。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。この観察により得られた画像は分解能 XY: $0.7\mu\text{m}$ 、Z: $1.0\mu\text{m}$ と高精細であり、観察断面は 500 枚、観察時間は 5 分と非常に高速であった。

4-2-1. 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色差が少ないこともあり、従来の HSV や RGB 色空間を利用した抽出法では血管のみの細かな抽出を行うことはできなかった。よって我々は新たに開発した抽出法を用いて血管の抽出を行った。この抽出法は 3 次元拡張領域法を基に全体の局所停止条件を設定した手法⁴⁾である。この抽出法にて画像の 2 値化を行い領域抽出後濃淡情報を再付加したのち画像の立体構築を行った。

図 5 に血管領域を抽出した画像を示す。赤色部分が抽出された血管部であり、微細な血管の目的部位のみを抽出することができた。



図 3 蛍光観察画

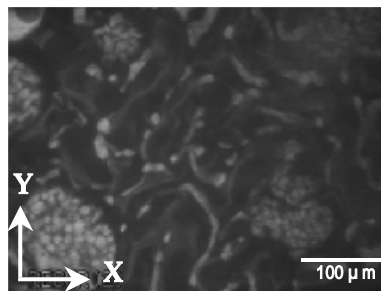


図 4 LSM 観察

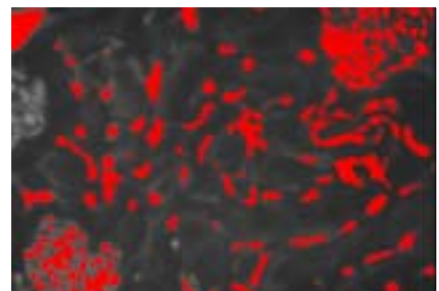


図 5 血管領域抽出画像

4-2-2.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) を用いてボリュームレンダリング法により可視化した。

図6に抽出した血管を立体再構築した画像 (画像角度 $X = -5$ 、 $Y = -10$ 、 $Z = 5$) 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7は図6の画像を任意の断面で切断した画像である。これにより図6では観察不可能であった糸球体に連なる血管の走行を見ることができた。画像右上から左下斜めに小葉間動脈が走っており、右奥の糸球体に繋がっている輸入細動脈を観察できた。図8も同様な任意断面立体構築画像 (画像角度 $X = 5$ 、 $Y = 5$ 、 $Z = -175$) であり、図7の画像を X 軸に 180° Z 軸に 180° 回転させた画像である。図7とは別の角度で同じ糸球体の糸球体とその周辺の血管走行を確認できた。図9の任意断面立体構築画像 (画像角度 $X = 30$ 、 $Y = -175$ 、 $Z = -150$) は $X-Z$ 面から Y 軸方向に斜めに切断した画像である。糸球体が小葉間動脈から分岐し房のようについていることが確認できる。

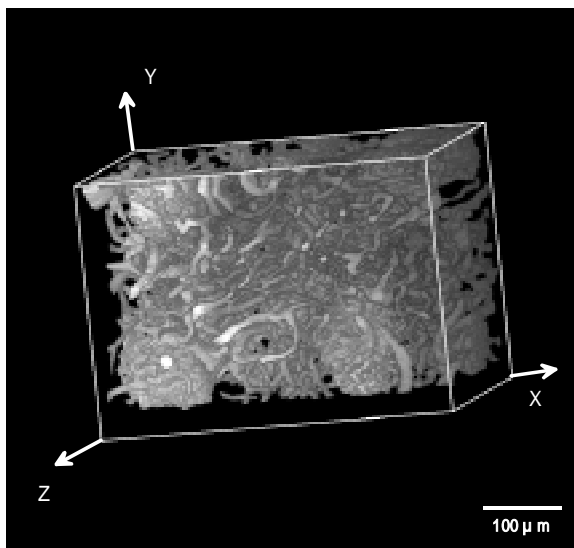


図6 立体構築画像

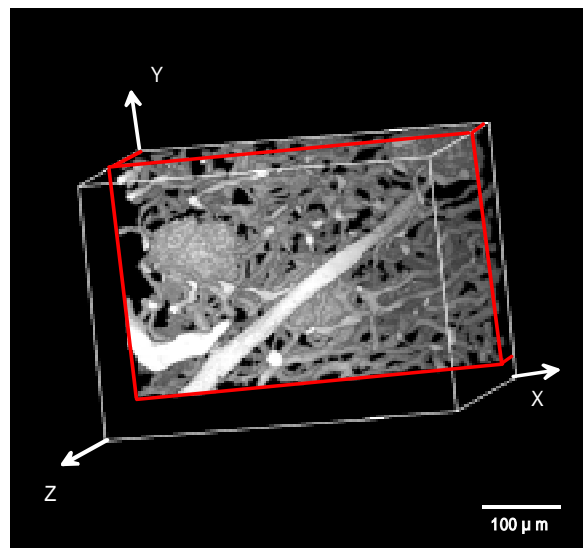


図7 任意断面立体構築画像

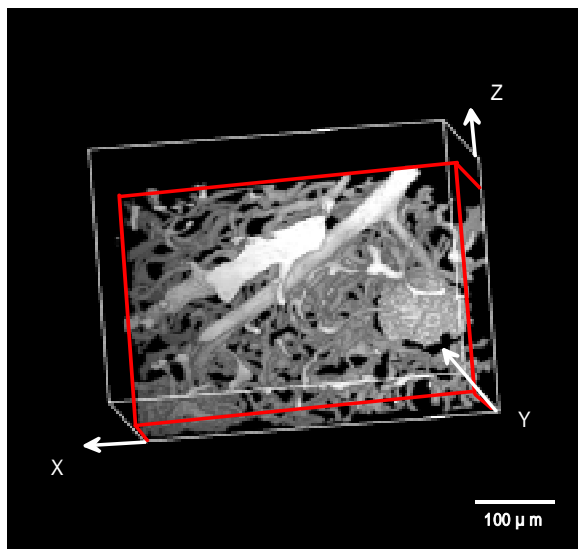


図 8 任意断面立体構築画像

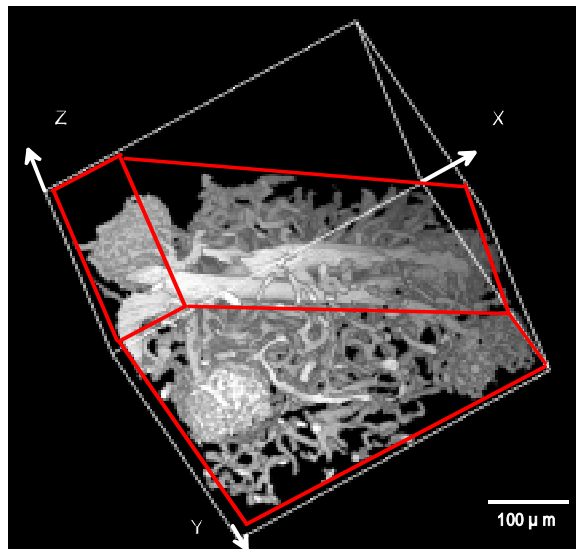


図 9 任意断面立体構築画像

5.まとめ

ボリュームレンダリング法により得られた系球体の立体構築画像及び任意断面立体構築画像（図 6～9）より、様々な任意の角度・断面画像から系球体とその周辺の血管の走行、3次元的なつながりを確認することが可能であった。

以上のことより、蛍光観察画像では血管の境界が曖昧であり3次元的に捉えることは出来ないが、LSMを組み込んだ3次元内部構造顕微鏡では、生体内の微細構造を3次元的に捉えることが可能であった。本法はLSMの深さ方向の欠点を補うことが可能であり、また、従来の鋳型注入SEM観察法に比較しても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次元構造を観察することができた。よってこの観察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といえる。この観察法を用いて血管疾患モデル動物等の微細な血管構造解析を行い実験動物の血流モデルを作成するといったことも可能である。

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る。この3次元内部構造顕微鏡観察はこのような観察にも用いることができるであろう。

参考文献

- 1) 横田 他4名, 3次元内部構造顕微鏡による凍結球体の観察と計測, 低温生物工学会誌, 44, 1 (1998) 1
- 2) 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
- 3) 特集 最近の顕微鏡精密工学会誌, 57, 7 (1991) 1141
- 4) Hiroyuki SHIMAI, et. al, EXTRACRION METHOD OF THE INTEREST REGION WITH INTENSITY CHANGE FROM BIOLOGICAL VOLUME DATA, COMPUTATIONAL BIOMECHANICS RIKEN SYMPOSIUM, p33-44 (2002)