

# 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と人眼球の観察

横田 秀夫 (理化学研究所)

中村 佐紀子 (理化学研究所)

覚正信徳 (理化学研究所)

川口 龍平 (東邦大第2眼科、理化学研究所)

矢部 比呂夫 (東邦大第2眼科、理化学研究所)

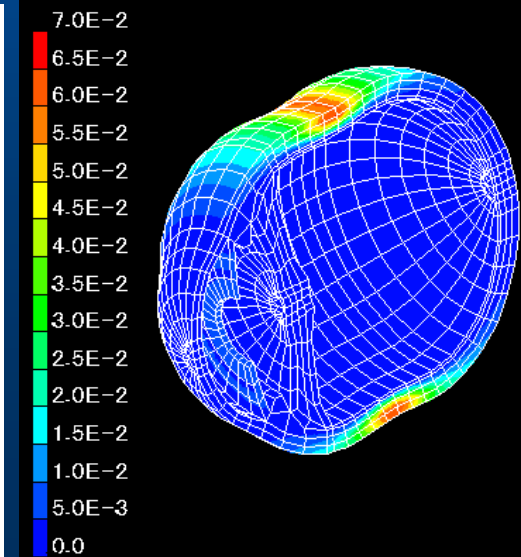
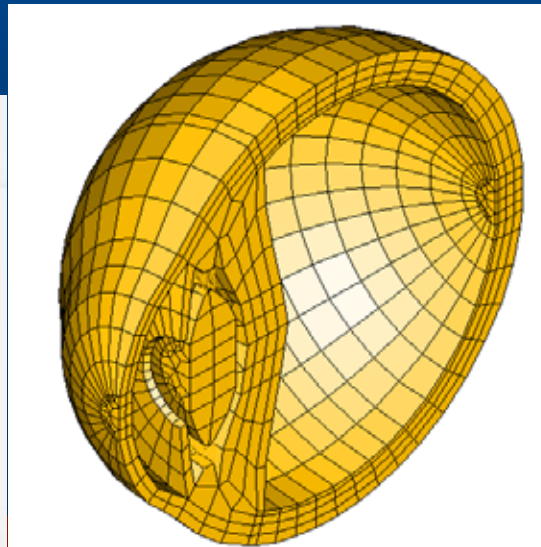
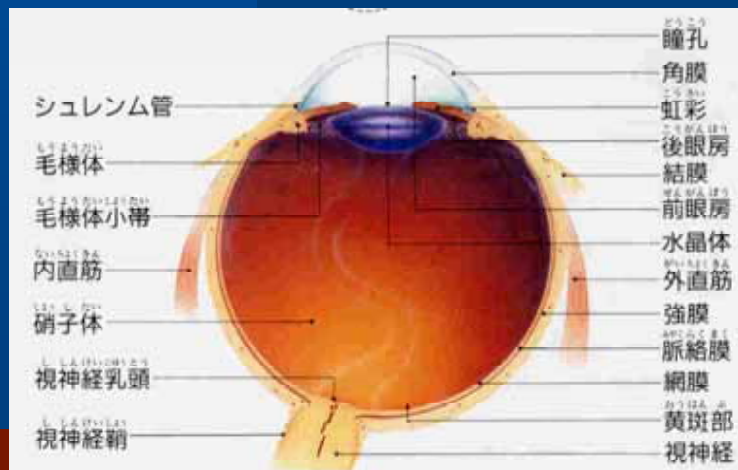
山形 豊 (理化学研究所)

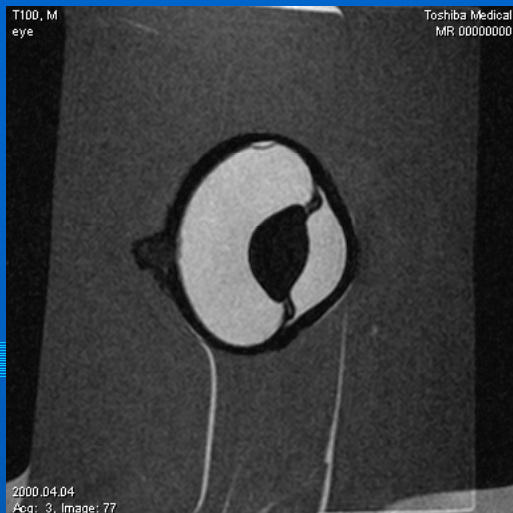
牧野内 昭武 (理化学研究所)

樋口 俊郎 (東大院工, 理化学研究所)

# 背景

- 我々は、眼球を対象としてFEMモデルを構築して、**現実に即した網膜剥離や眼球の外的損傷のシミュレーション**を目指した研究を進めている。
- このシミュレーションには生体の**形状情報が重要**であり、高精度のデジタル化手法が求められている。





豚眼のMRI画像



豚眼のCT画像

## 従来からの観察手法

観察方法	分解能	観察原理	問題点
MRI <sup>*A</sup>	mm	試料の核磁気	分解能, 高価
超音波CT <sup>*B</sup>	mm	超音波の反射率	分解能
X線CT <sup>*C</sup>	mm	X線透過率	分解能, 被爆
共焦点レーザー顕微鏡 <sup>*D</sup>	μm	試料中の蛍光	試料の透明度
Visible Human Project <sup>*E</sup>	mm	連続切片作製	切片間の位置

**BUT**



- ・試料の色情報が得られない。<sup>\*ABC</sup>  
(観察対象が1つのみである)
- ・観察の分解能が低い<sup>\*ABCE</sup>
- ・観察対象物の範囲が小さい<sup>\*D</sup>

生態試料の内部情報のデジタル化には不十分

### 3次元内部構造顕微鏡による生体試料のデジタル化

特徴：試料内部の形状データの取得が可能  
 最小 1 μm の高精度デジタル化が可能  
 色情報の取得が可能



# 3次元内部構造顕微鏡と従来からの観察法の比較

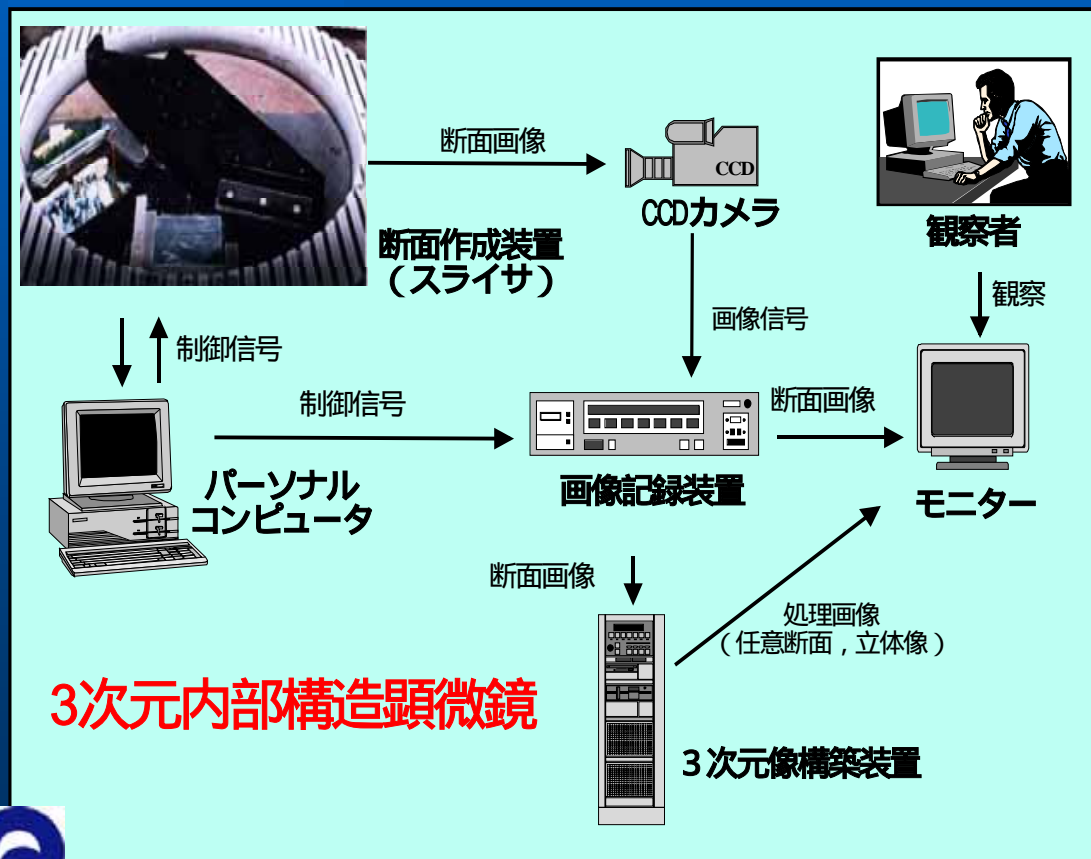
# 3次元内部構造顕微鏡 (3D-ISM) とは？

- 生体試料を固定した後、実際にその試料の上端を切断して、その断面画像を撮影する。その後切断したい量だけ試料を移動させる。この行程を繰り返すことにより、試料の内部情報を得る観察システムである。
- 得られた内部情報を元に画像処理により立体画像の構築が容易に可能である。
- 実際に試料を切断することから、高分解能での観察や、試料の複数の部位を判別することが容易である。

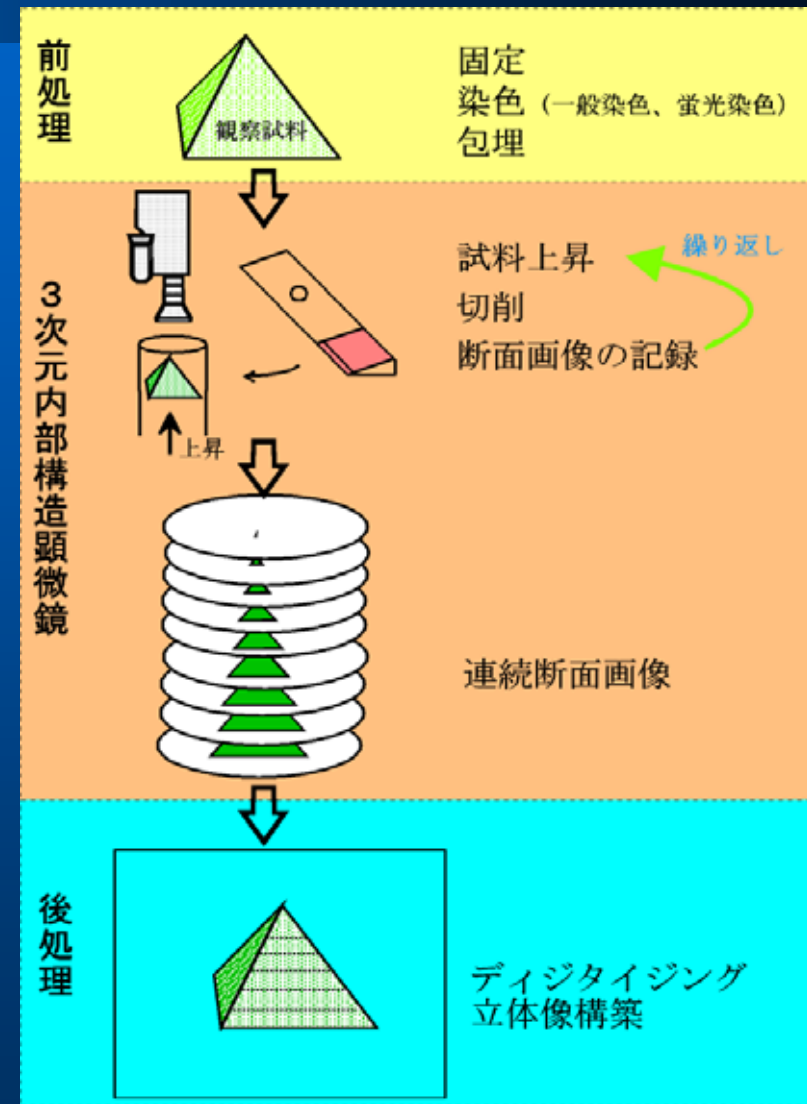
1991年東京大学樋口教授提案



# 3D - ISM



システムブロック図

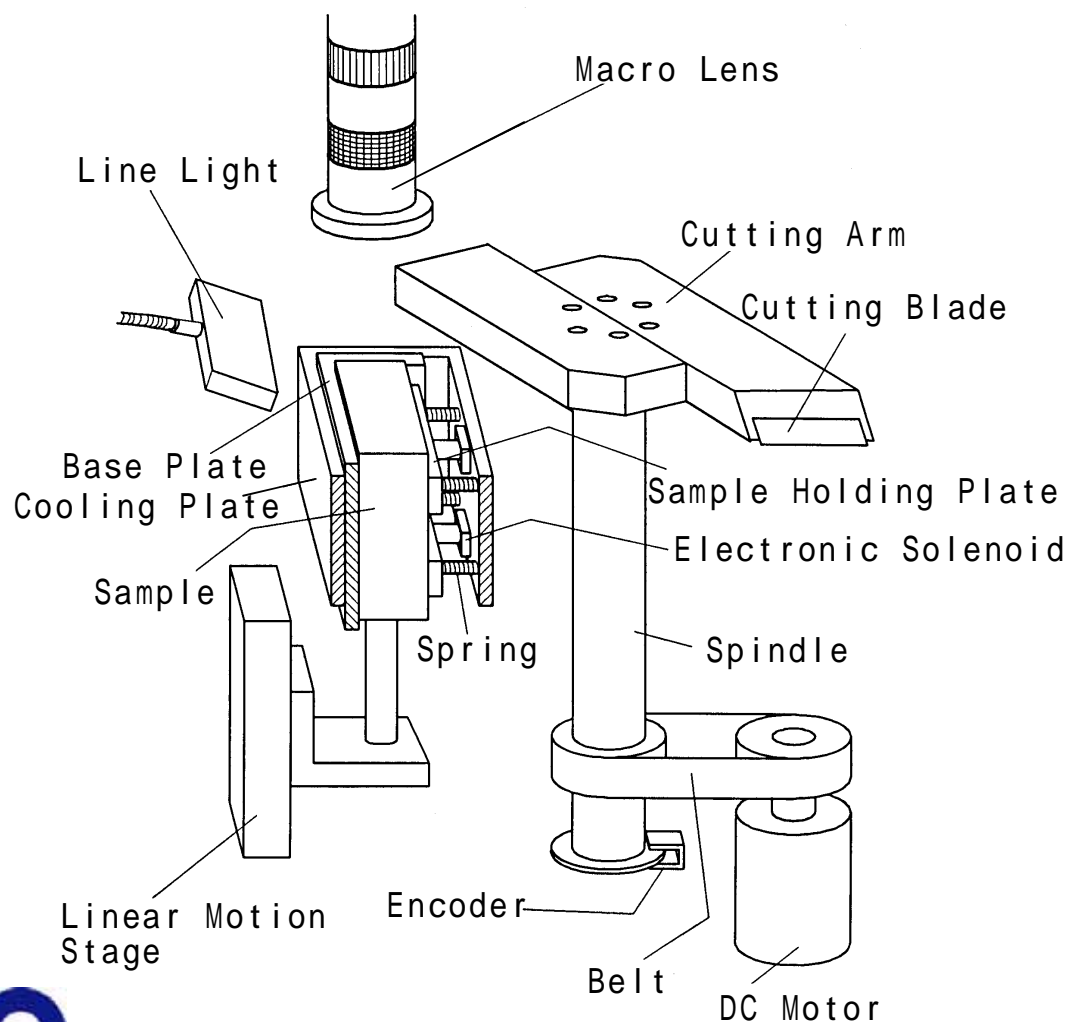


観察法の模式図

# 目的

- 超高精細な分解能を有する3次元内部構造顕微鏡の開発
  - 試料の送り分解能:  $10\ \mu\text{m}$
  - $34 \times 25\ \text{mm}$ の撮影範囲の観察分解能:  $20\ \mu\text{m}$
- 試作した装置を用いた人眼の観察
- 組織ごとに分別した人眼球のボクセルデータの生成

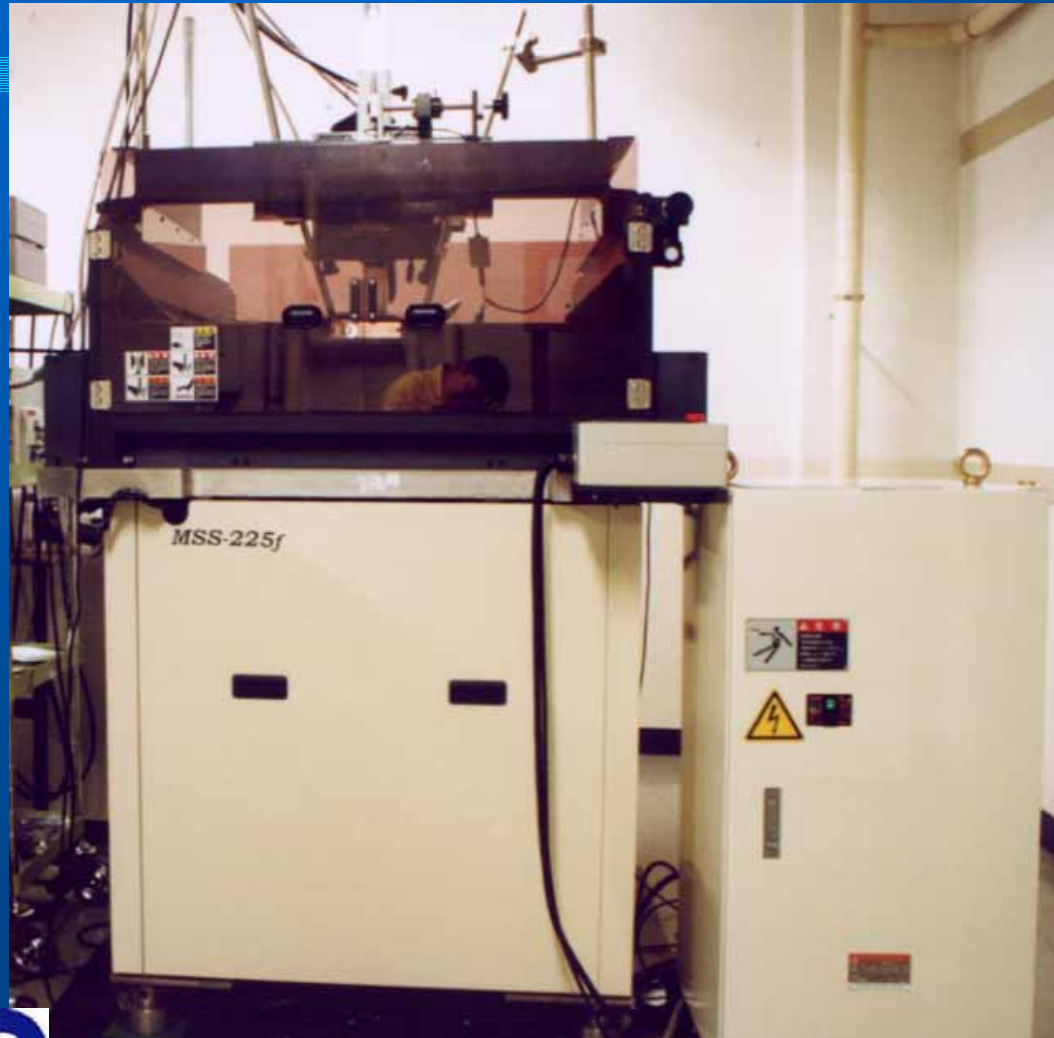
# 試作装置模式図と仕様



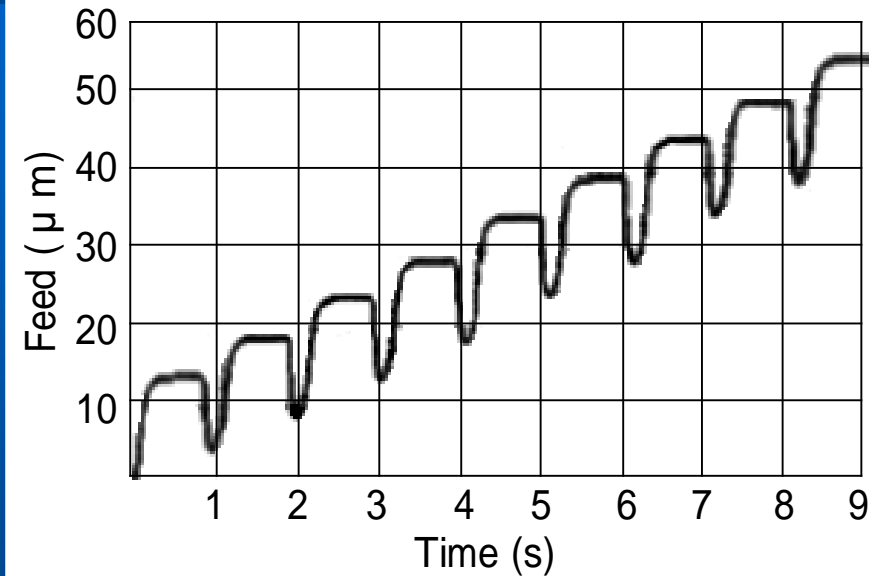
スライス部の模式図

- 試料サイズ  
最大：180 × 135 × 200 mm  
最小：15 × 12 × 100 mm
- 試料温度：-45 （凍結包埋可）
- 試料送り：最小 10 μm  
総送り量 220 mm  
最大速度 20 mm / s
- 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
- ナイフの回転数：30 ~ 90 rpm
- 切断面撮影：NTSC-CCDカメラ  
35mm銀塩カメラ(ペンタム)  
ハビジョンCCDカメラ(1980\*1025)
- 断面記録：追記型NTSCレーザーディスク  
書換型NTSCレーザーディスク  
追記型ハビジョンレーザーディスク  
35mm銀塩フィルム
- 観察光源：白色光, 蛍光(UV, B, G)

# 装置外観と装置性能



スライス部の外観



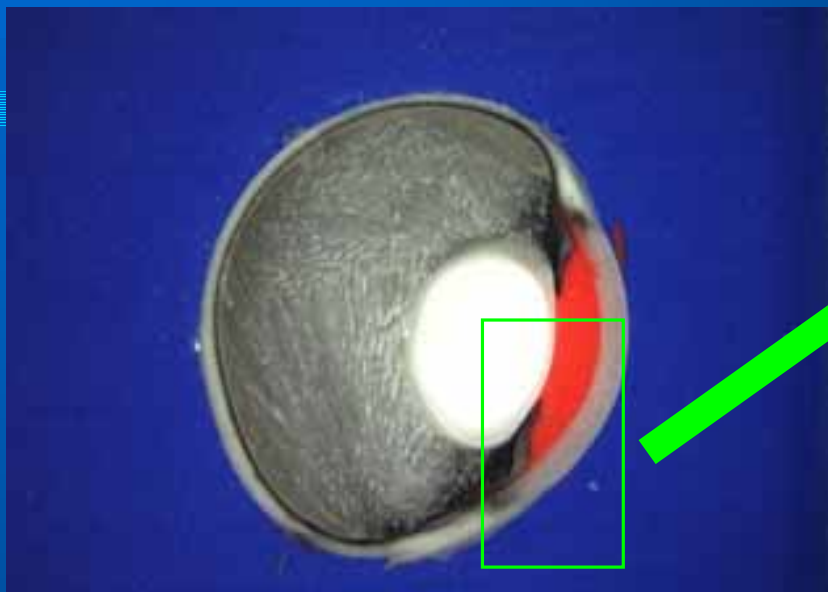
## 試料送り量

試料を移動させた際の試料上端部の移動量。

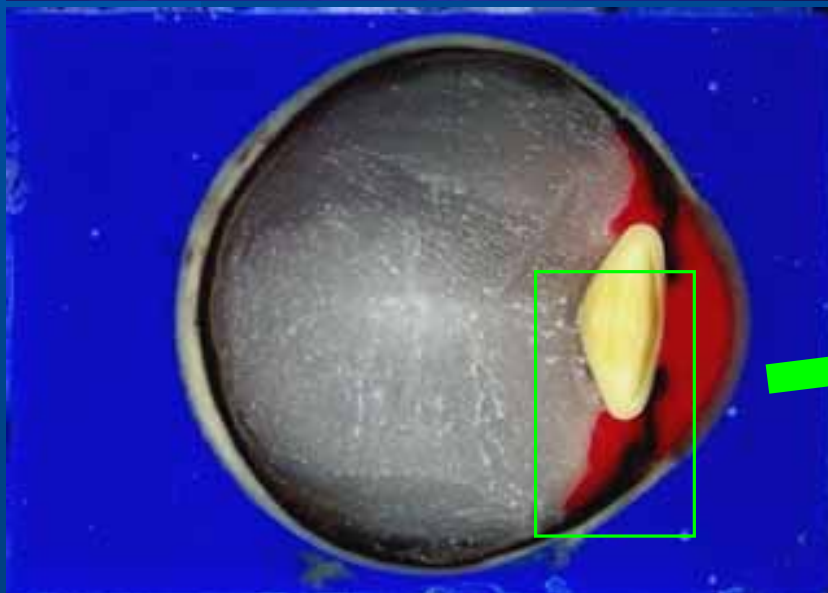
指令値  $5 \mu\text{m}$  とほぼ同一の移動量を示した (試料送り時の試料の落ち込みは試料送り時に試料の固定を開放することに起因する)。



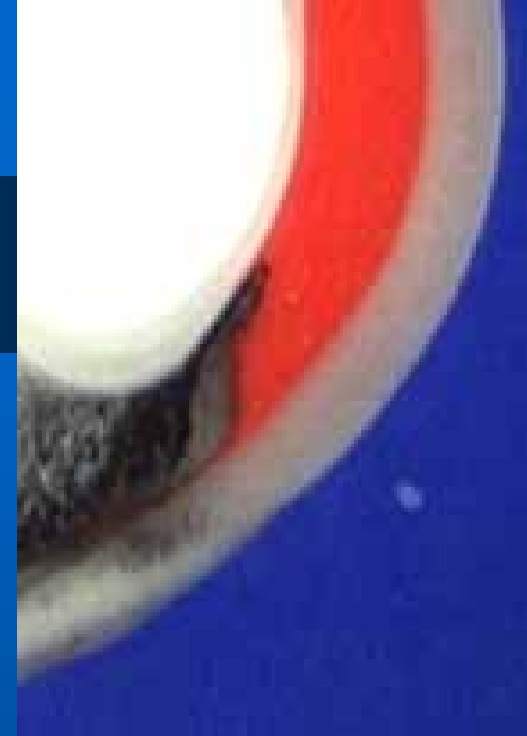
# 撮影分解能



NTSCカメラ: 豚眼  
40  $\mu\text{m}$ /pixel  
(640x480ピクセル)



ハイビジョンカメラ: 人眼  
20  $\mu\text{m}$ /pixel  
(1980x1025ピクセル)



# 人由来試料への対応(バイオハザード)

## ● 消毒への対応

- チャンバー内: グルタルアルデヒド噴霧可能  
腐食対策のためステンレス鋼の使用

## ● エアロゾルへの対応

- 切削部: 飛散防止版により切削時の切屑の飛散を防止  
観察時にレンズとチャンバーを閉鎖空間とする
- 装置空間: 装置全体をビニールシートにより閉鎖  
閉鎖空間をHEPAフィルタを用いた排気装置により  
陰圧に維持  
装置稼働中は紫外線灯により空間を滅菌

## ● 清掃

- 観察終了後、グルタルアルデヒドにより装置、空間を滅菌
- 切り屑、清掃用具はオートクレーブ、乾熱滅菌器により滅菌

# 試料処理

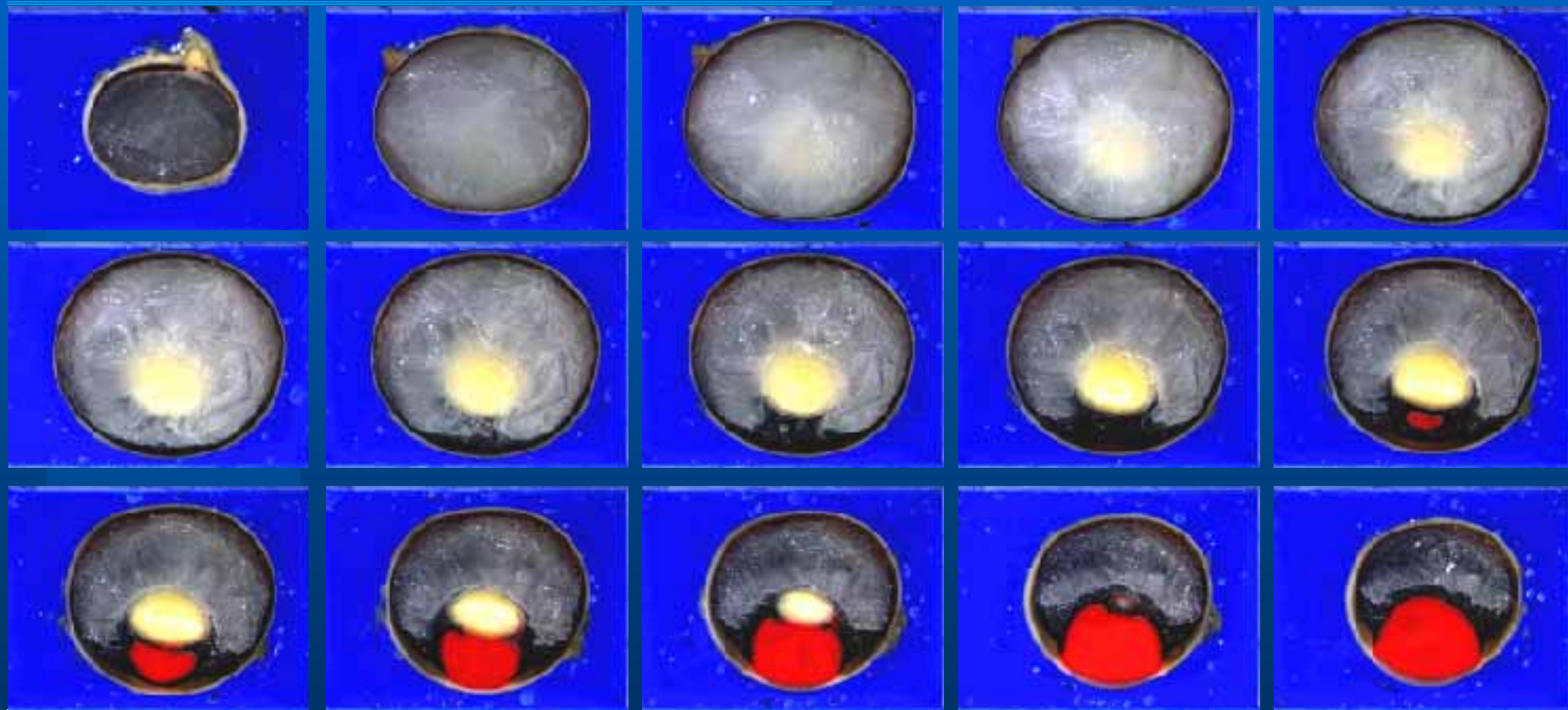
- 供試試料: 人眼球 (倫理委員会にて承認)
  - 新鮮人眼を摘出後直ちにホルマリン・グルタルアルデヒド溶液にて固定
  - 固定後日本に空輸、外観、MRI撮影
  - PBSにて3日間洗浄
  - 眼球前房内に色素注入
  - 着色凍結包埋剤を用いて金型内にて $-35^{\circ}\text{C}$ で凍結包埋
- 観察条件
  - 試料切削厚さ:  $10\ \mu\text{m}$
  - ナイフ回転数:  $90\ \text{rpm}$
  - 観察分解能:  $20\ \mu\text{m}$
  - 切削用ナイフ: 超硬合金製ナイフ
  - 撮影断面数: 3000断面
  - 撮影時間: 30分間

# 観察結果



人眼の断面画像(連続再生)

# 観察結果



人眼の断面画像

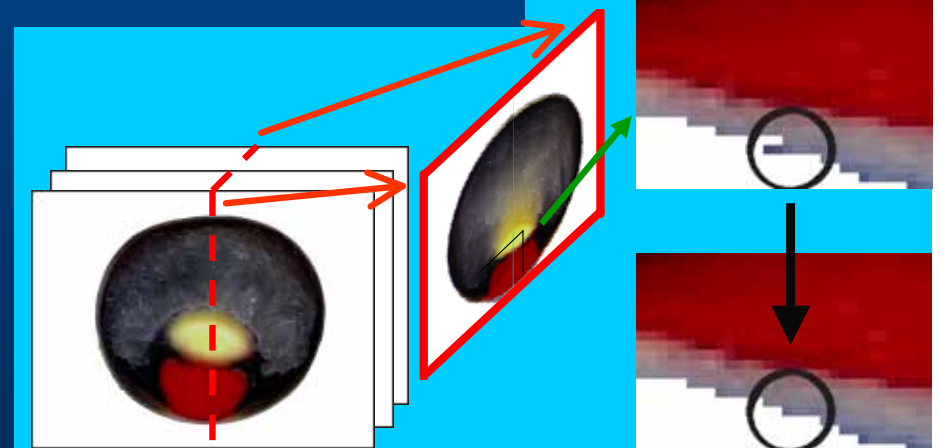
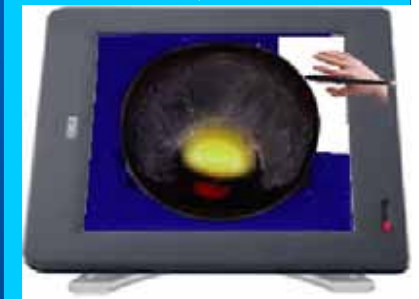
# 組織のセグメンテーション

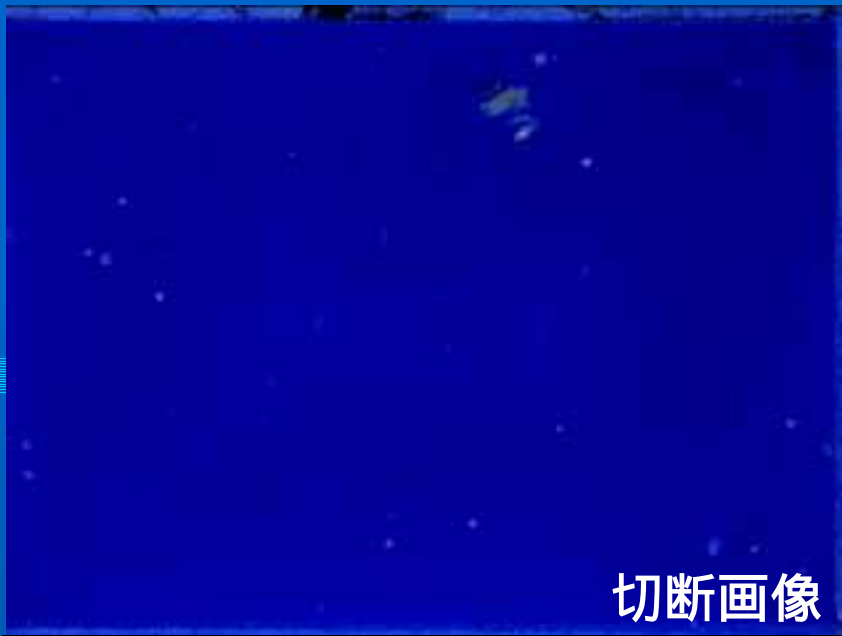
## ● 方法

- 断面画像群に対して2次元イメージとしてデジタルデータに変換
- 2次元のイメージデータに対して、1枚ずつ1画素単位でヒトの判断(解剖学的知識に基づいた)により領域を設定
- 抽出組織: 水晶体、角膜、強膜、網膜・脈絡膜・虹彩・毛様体、視神経、硝子体・前房水を設定
- 実切断面方向の抽出作業終了後、別の断面(X,Y)を作成して断面画像間の抽出領域を確認・修正
- 立体画像を構築して、組織の連続性を確認

## ● 対象画像群

- 断面画像
  - 1920x1035ピクセル X 3000断面
- 抽出画像
  - 640x480ピクセル X 235断面





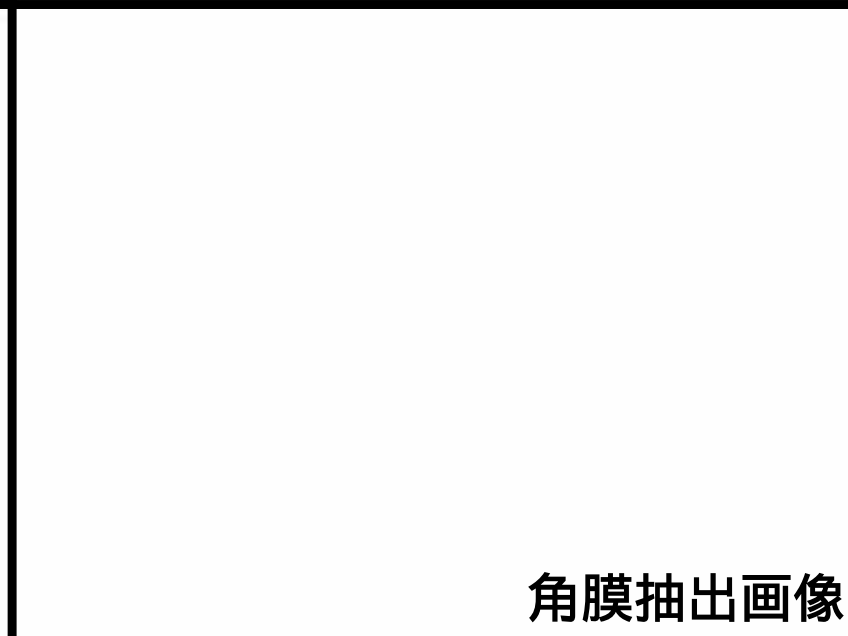
切断画像



眼球抽出画像



水晶体抽出画像



角膜抽出画像

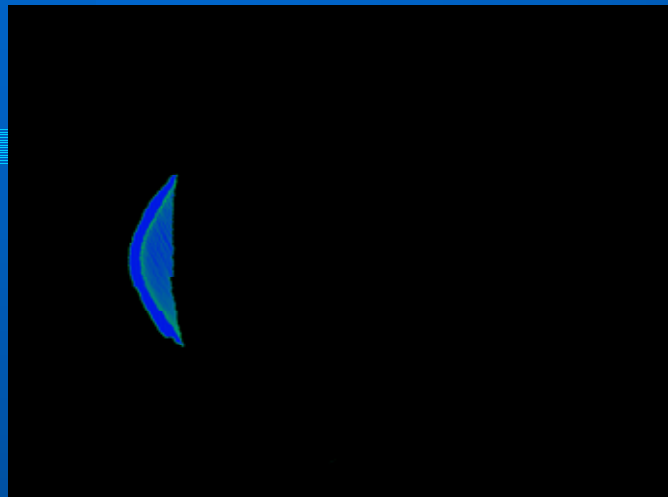
## 人眼の断面画像および角膜と水晶体抽出画像 (連続再生)

抽出法: 人の判断、抽出時間: 3ヶ月

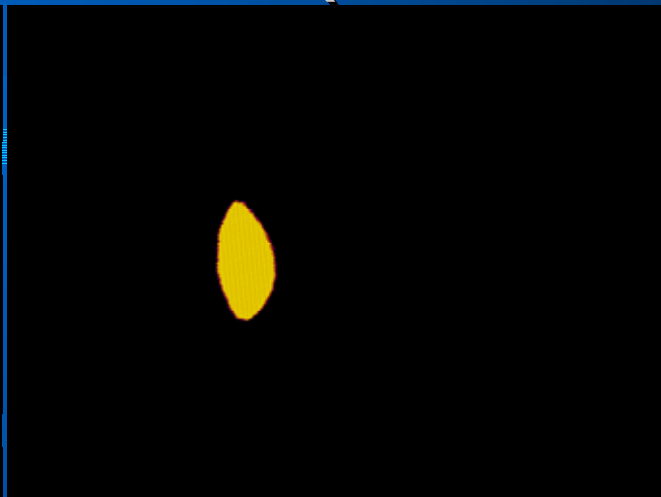
Pixel: 640x480, Resolution: 54um

Slice: 235, Thickness: 120um

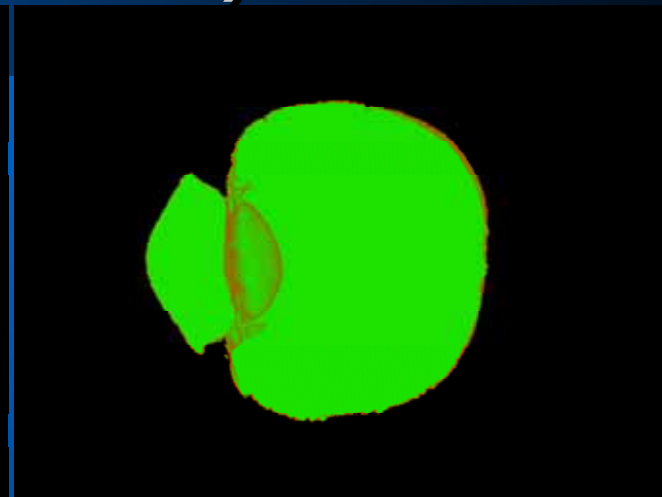
# 領域別立体画像 (任意断面)



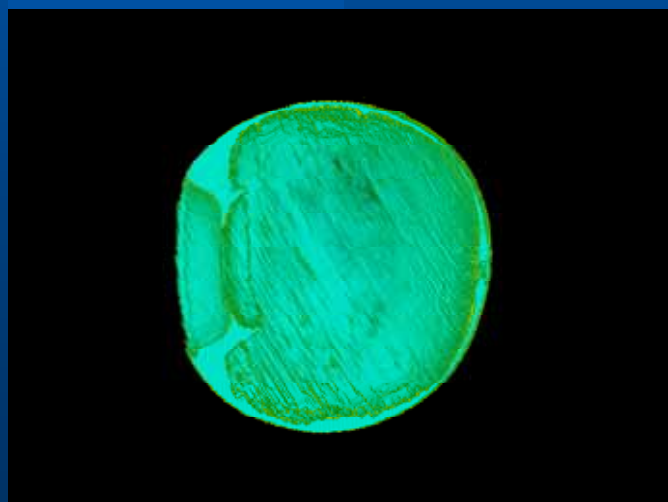
Cornea



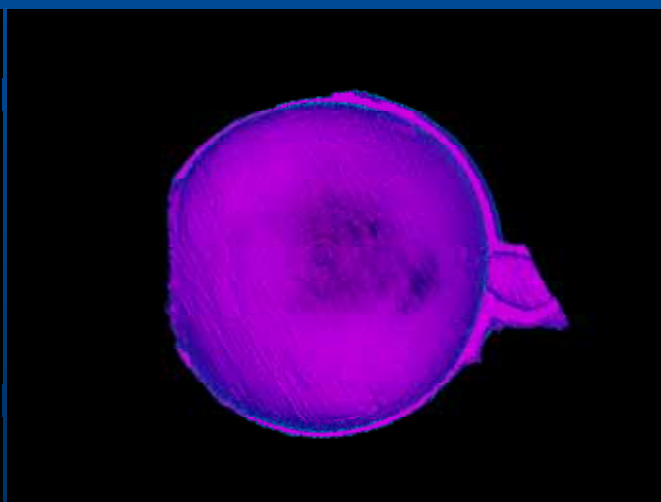
Lens



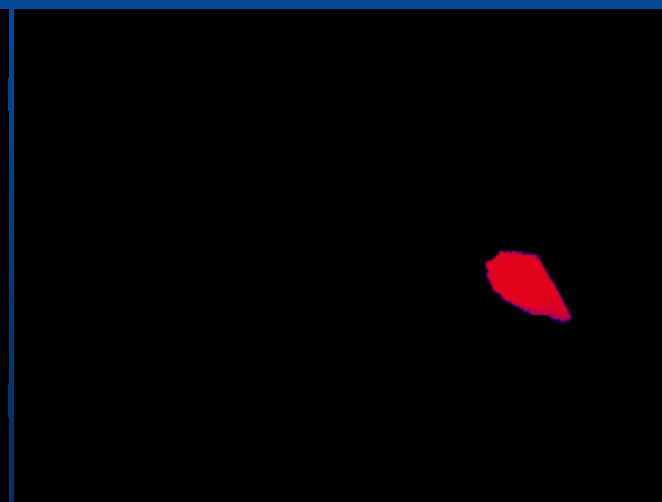
Water Matter



Retina+Choroid  
+Iris+Ciliary



Sclera



Optical Nerve



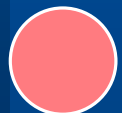
# 領域別立体画像



Sclera



Lens



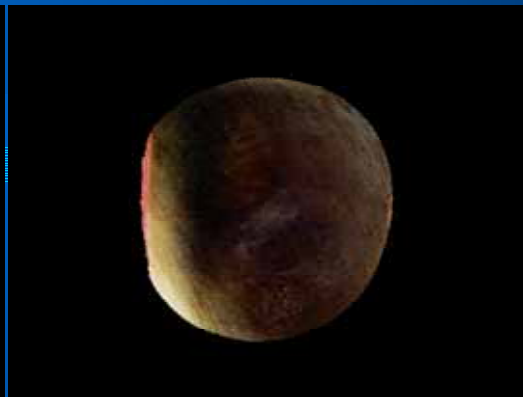
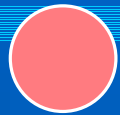
Cornea

Front View

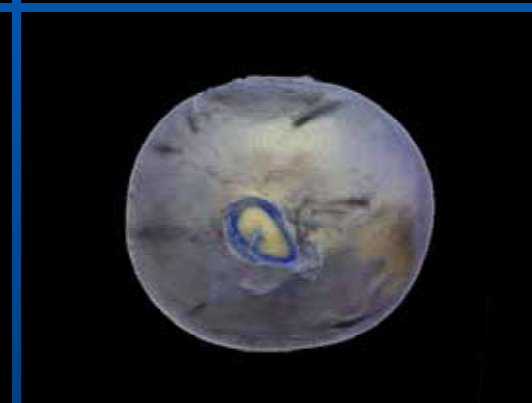
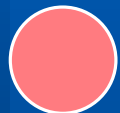
Side View

Back View

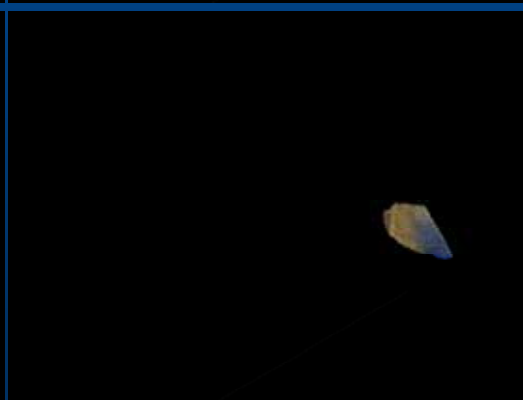
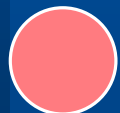
# 領域別立体画像



Retina  
+  
Choroid  
+  
Iris



Eyeball



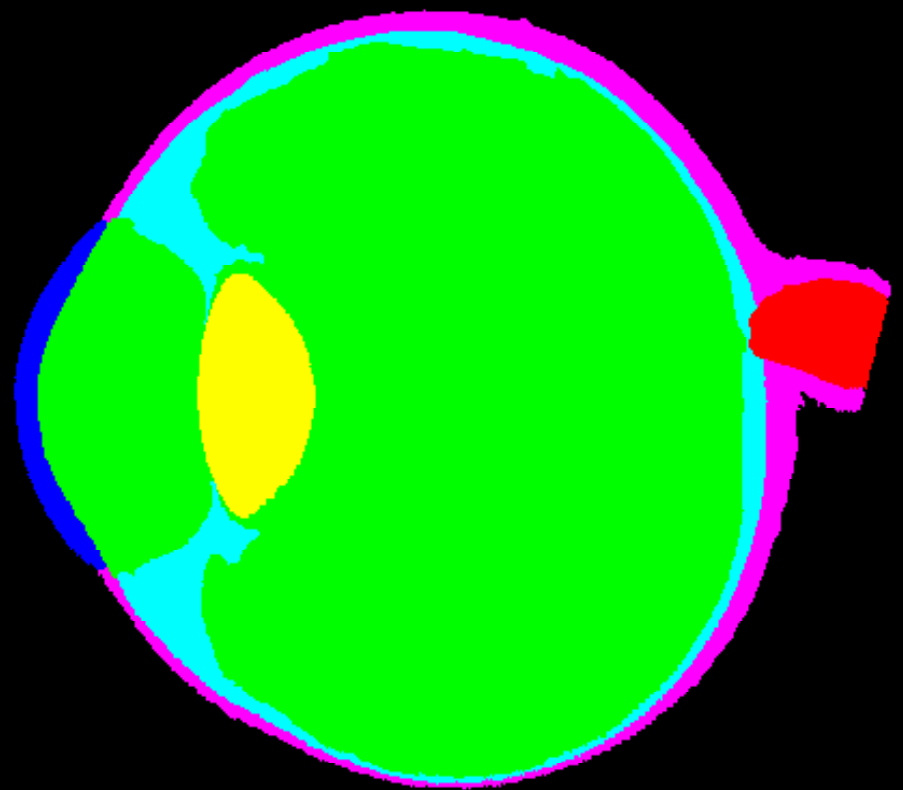
Nerve

Front View

Side View

Back View

# 任意断面画像



Original Color Image

Segmented Image

# まとめ

- 高精度・広範囲観察が可能な3次元内部構造顕微鏡を開発
- 観察分解能は試料送り10  $\mu\text{m}$ 、横方向20  $\mu\text{m}$  (視野34x25mm時)
- 試作した装置を用いて人眼球の観察を行った。
- 断面画像を元に水晶体、角膜、強膜、網膜・脈絡膜・虹彩・毛様体、視神経、硝子体・前房水を抽出
- 得られた断面画像を元にフルカラーの立体画像を構築

# 人眼球について

- 東邦大学医学部ならびに理化学研究所倫理委員会承認実験
- 献体眼球は米国Lions Eye Bank Oregonに提供された、基礎科学研究への使用を希望する眼球を入手した

提供者ならびに遺族の方に謝意を表する