

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

横田 秀夫* , 覚正信徳* , 川口 龍平#* , 中村 佐紀子*
矢部比呂夫#* , 牧野内 昭武! , 樋口 俊郎%*

* 理化学研究所 情報環境室
埼玉県和光市広沢 2 - 1
東邦大学第 2 眼科

! 理化学研究所 もの作り V - C A D プログラム

% 東京大学大学院 工学系研究科

e-mail: hyokota@riken.go.jp, kakusho@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、我々は網膜剥離手術の術前シミュレータの構築を目指した研究を進めている。このシミュレータでは、手術の前に最適な手術計画や手術道具の選定をすることを目標としている。実際に臨床で役に立つシミュレータの開発を目指していることから、シミュレーションの結果は実物の眼球の挙動を忠実に再現する必要がある。そこで、生体の挙動を忠実に再現するために有限要素法 (FEM) を用いたシミュレータの開発を行っている。現在、我々のグループではFEM解析手法の開発、立体構造の測定、眼球の機械的特性の測定、F E M メッシュ作成法について研究を進めている。その中でも、有限要素法では、そのFEMメッシュに解析結果が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。

図 1 に眼球の構造を示す。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、デジタル化の精度が要求される。生体試料のデジタル化には非破壊・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1) (図 2 , 図 3)。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100 μ m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

Table 1 生体試料のデジタル化法

Observation Method	Resolution	Principle	Weak Point
MRI	~ mm	Nuclear Magnetic	Resolution
Ultrasonic Computed Tomography	~ mm	Ultrasonic	Resolution
X-ray Computed Tomography	~ mm	X-ray Transparency	Exposure
Confocal Laser Scanning Microscope	~ μ m	Fluorescence	Transparency
3D-ism	~ μ m	Reflecting Light	Destruct
Visible Hutan Project	~ mm	Continuous thin slice	Resolution

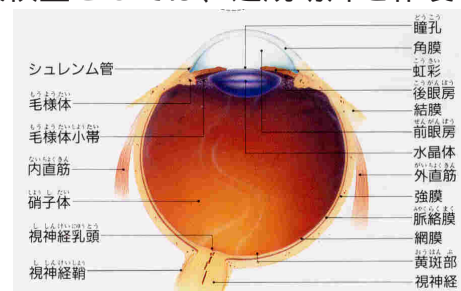


Fig.1 眼球の構造

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 Project2)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3)4)。3D-ISMは、観察対象物の切断・断面観察を繰り返し、試料内部の断面画像を観察して、試料内部の3次元構造を再構築する装置である(図4)。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、観察の分解能はミクロンオーダーである。これまでに、本装置を用いて豚眼や手々の試料のデジタル化に成功してきた5)6)。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ジタル化することは難しい。そこで、眼球の高精細デジタル化を目指した装置の開発を行い、その評価を行った。合わせて、開発した装置を用いて眼球の詳細な3次元構造のデジタル化を行い、得られた断面画像群より、眼球を構成する組織を抽出したので報告する。

2. 実験装置

試作した3次元内部構造顕微鏡は、図5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、高精度の観察を目指し、マイクロスライサ部と断面観察部を高分解能に対応できるようにした。

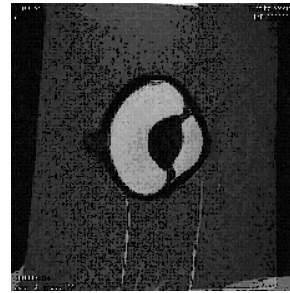


Fig. 2 眼球のMRI像

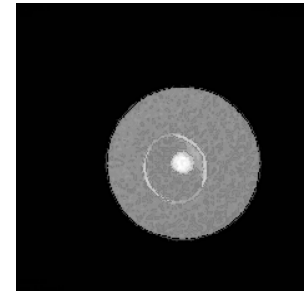


Fig. 3 眼球のCT像

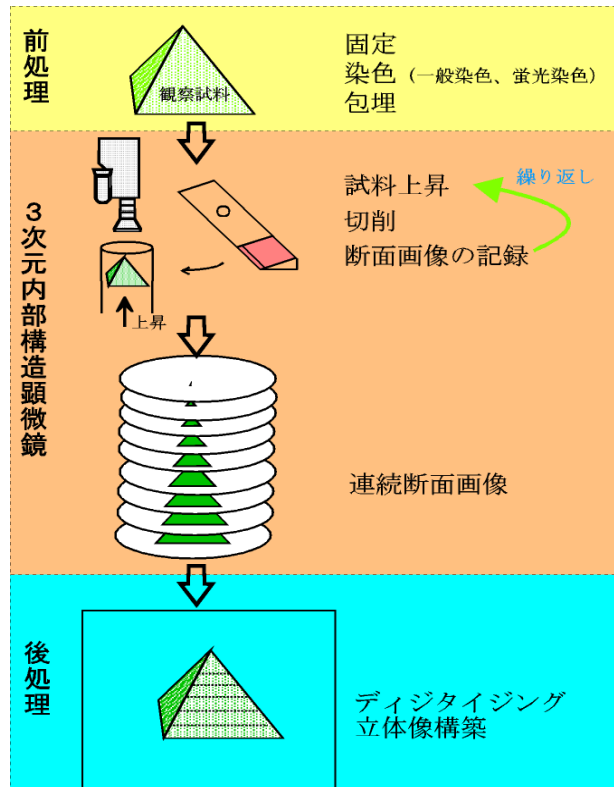


Fig. 4 観察法の模式図

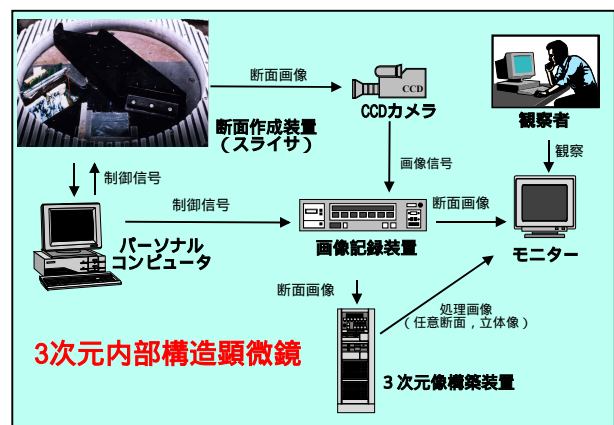


Fig. 5 システムブロック図

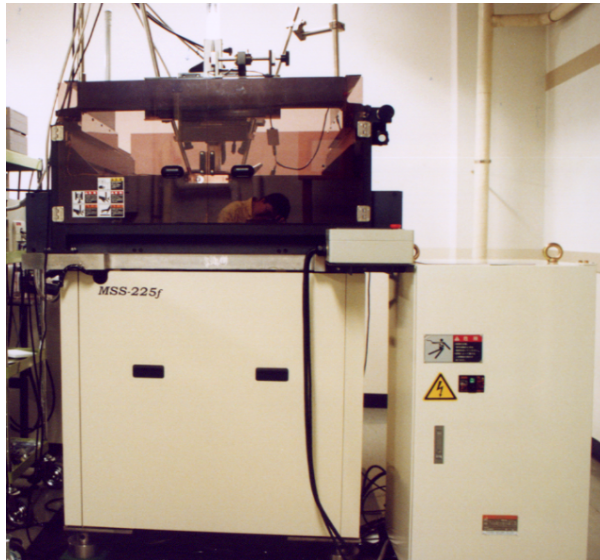


Fig. 6 試料切断部の外観

2.1 マイクロスライス部

図6に試作したマイクロスライス部の外観を、図7に装置模式図を示す。切断される試料は $15 \times 12 \times 100\text{mm} \sim 180 \times 135 \times 200\text{mm}$ 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、上端を回転するスピ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 $5 \mu\text{m}$ とし、試料切削時に試料を保持し、試料送り時には試料を解放するクランプ機構を設けた。図8に指令値 $5 \mu\text{m}$ 時のステージ上端の動きを示す。指令値と一致する試料送りを実現した。試料の切断はマイクロ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 $0.2 \mu\text{m}$ ）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 -45 に冷却した状態で観察することが可能である

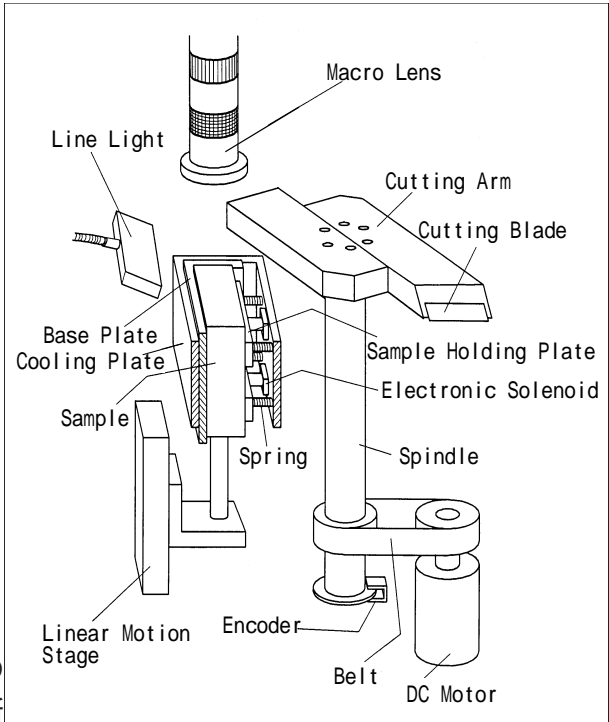


Fig7 スライス部の模式図

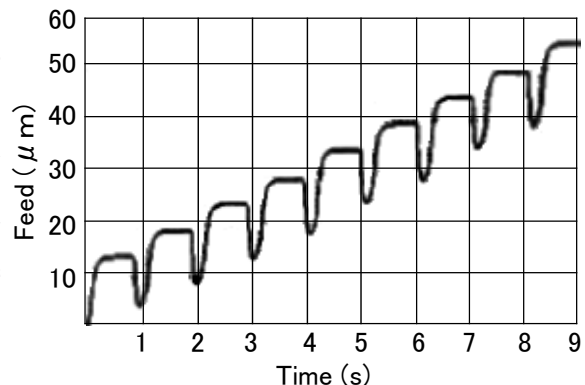


Fig.8 試料送り量

2.2 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。撮影カメラはハイビジョン3 CCD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ハイビジョンレーザービデオディスクレコーダ(HDL-5800:SONY)に記録した。すべての試料を切断・観察した後、記録した画像をPCに取り込み 1980×1025 ピクセルのイメージデータに変換した。

2.3 画像処理とセグメンテーション

観察により得られる画像はフルカラーの連続断面画像である。この画像は周囲に包埋剤を含むため、そのままの画像を可視化することは出来ない。それは、試料が包埋剤に埋まっていること、対象とする部位のみに分別できていないことによる。そのために、試料の特定の部分を可視化するためには、連続画像の中から任意の部位のみを抽出する（セグメンテーション）することが必要である。これに対して我々は、試料の色情報や位置情報を利用した元にした自動抽出法を開発している（後述：竹本ら）。しかしながら、すべての対象物に対して特定の部位を抽出することは成功していない。そこで、手により抽出を行った。対象は、レーザーディスクから取り込んだbmp形式の画像ファイルを640x480画素に、Z方向にも2 3 5断面に間引いた画像でおこなった。抽出には画像処理ソフト(Photoshop 6.0:Adobe)を用い、領域抽出には液晶タブレット(CINTIQ C-1800SX:WACOM)と補助コントローラー(Smart Scroll:WACOM)を用いた。領域の指定は操作者の解剖学的知識に基づいておこない、前後の断面画像を表示しながら、抽出領域が途切れることがないように作業を繰り返した。切断面方向(Z軸)の抽出作業が終了した後に立体画像の構築を行い、断面画像間の抽出領域の違いが見られた場合(段差が見られた場合)には、X, Y方向の断面画像を生成して、領域抽出を再度行い、抽出領域辺縁が滑らかになるように補正した。抽出作業終了後、抽出領域毎に特定の値をつけたボクセルデータを作成した。セグメンテーションして領域ごとに分けたデータを基に立体画像を構築した。立体画像構築にはワークステーション(AlphaStation:COMPAQ)と画像可視化ソフトウェア(AVS5)を用い、ボリュームレンダリング:レイキャスティング法を用いてボリュームデータの可視化を行った。可視化の際には、断面観察により得られたフルカラーのボリュームデータに加えて、抽出領域に特定の値をつけたボリュームデータを不透明度の情報に変換して立体画像を構築し、抽出領域の確認を行った。さらに、セグメンテーションにより特定の値をつけたボリュームデータを基に疑似カラーによる立体画像を構築と、FEM解析モデルの構築を行った。

3. 実験方法

実験には摘出直後に2.5%ホルマリン・1%グルタルアルデヒド混合液(PBS)にて固定した人の眼球を用いた。眼球の各部位を判別する為に眼球の前房内に赤色の染色液(ポストカー-赤:NICKER)を注入して染色を行った。染色終了後、PBSにて置換した後、青色に着色(ポストカー-青:NICKER)した凍結包埋剤(OCTコパウンド:SAKURA)に包埋し、-80にて凍結包埋した。凍結した試料を3D-ISMに装着して観察を行った。切削は、超微粉末超硬合金製ナイフを用い、厚さ10 μ m、ナイフの回転数60rpmで行った。

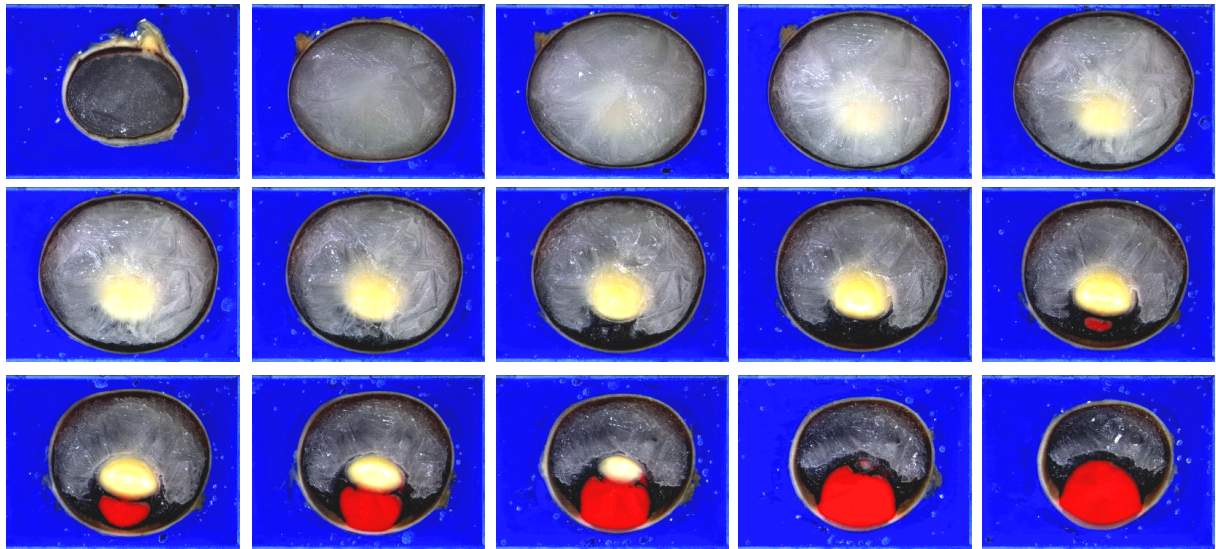


Fig9 人眼球の連続断面画像

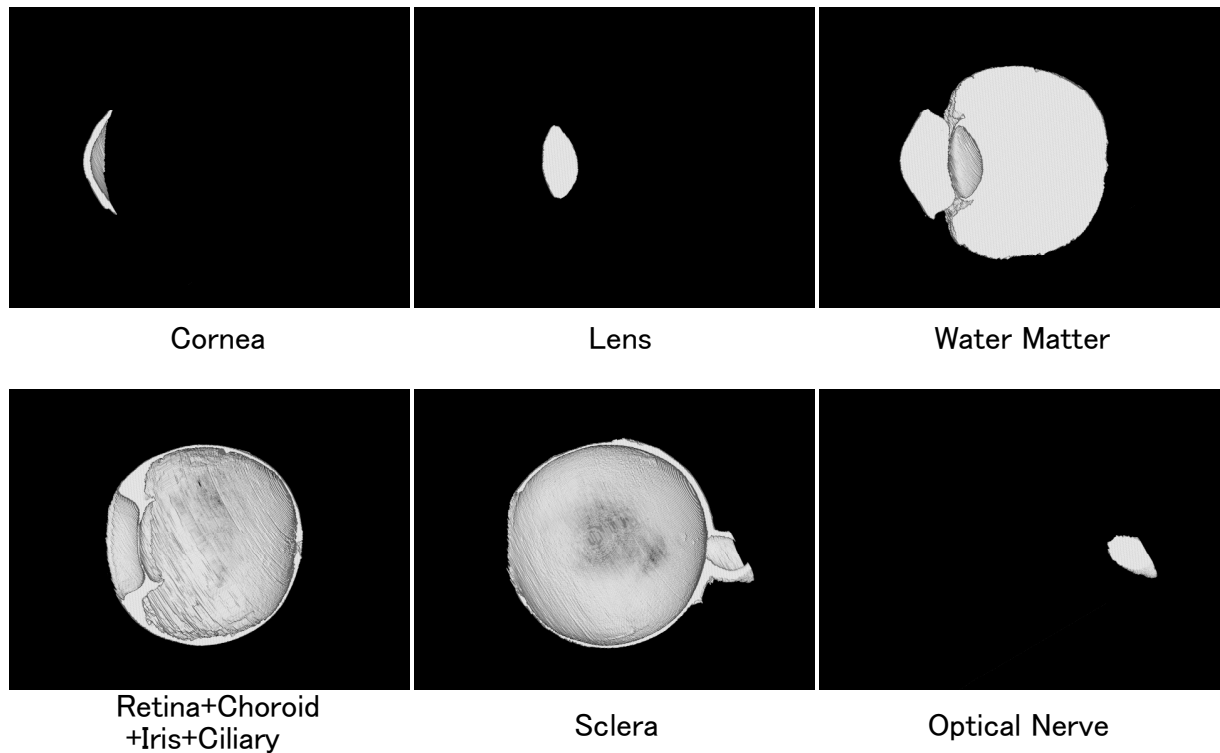


Fig10 構成組織ごとに分離して構築した眼球の断面画像

4 . 結果と考察

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から抜き出した15枚を示す。青色の部分包埋剤である。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。これらの断面画像の画像内の分解能は25 μmであった。図10にセグメンテーションした各領域の断面画像群から構築した任意断面画像を示す。各組織毎に、モノクロの画像としてボリュームレンダリングした。角膜、水晶体、房水+硝子体、網膜+脈絡膜+毛様体

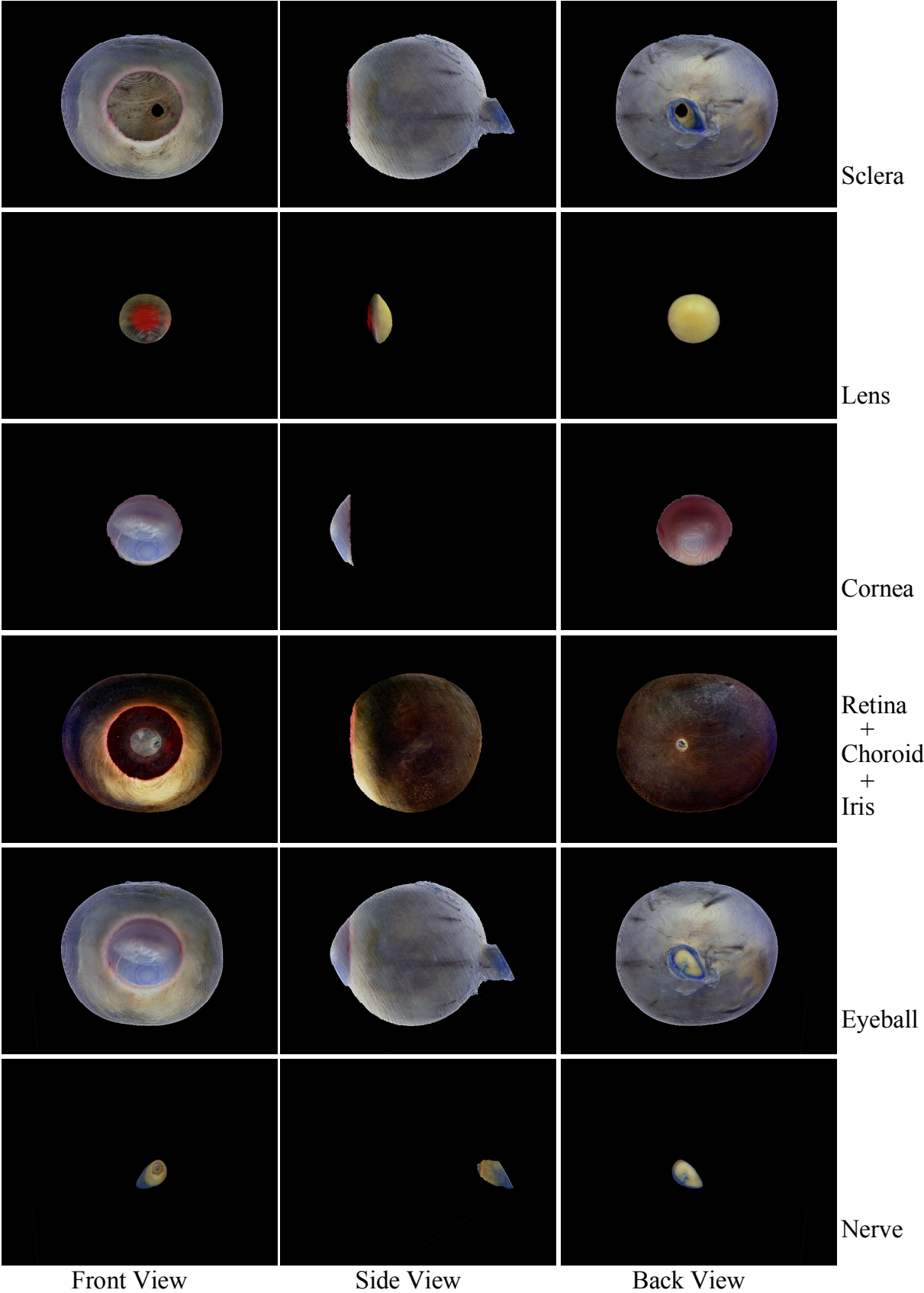
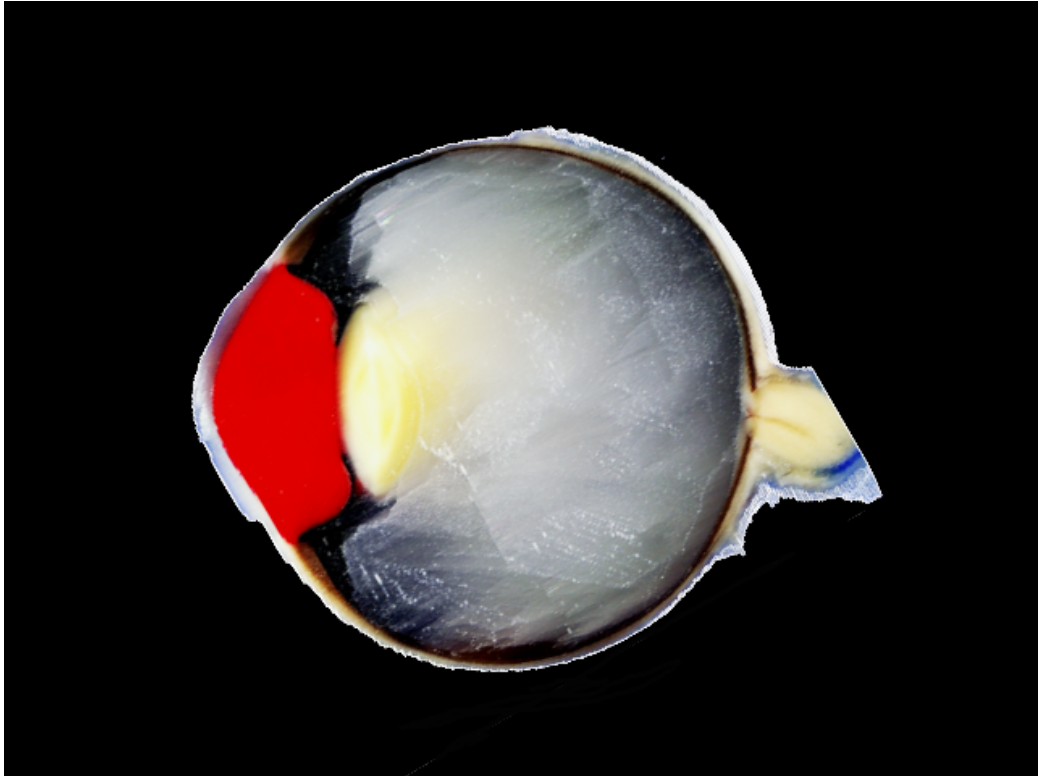
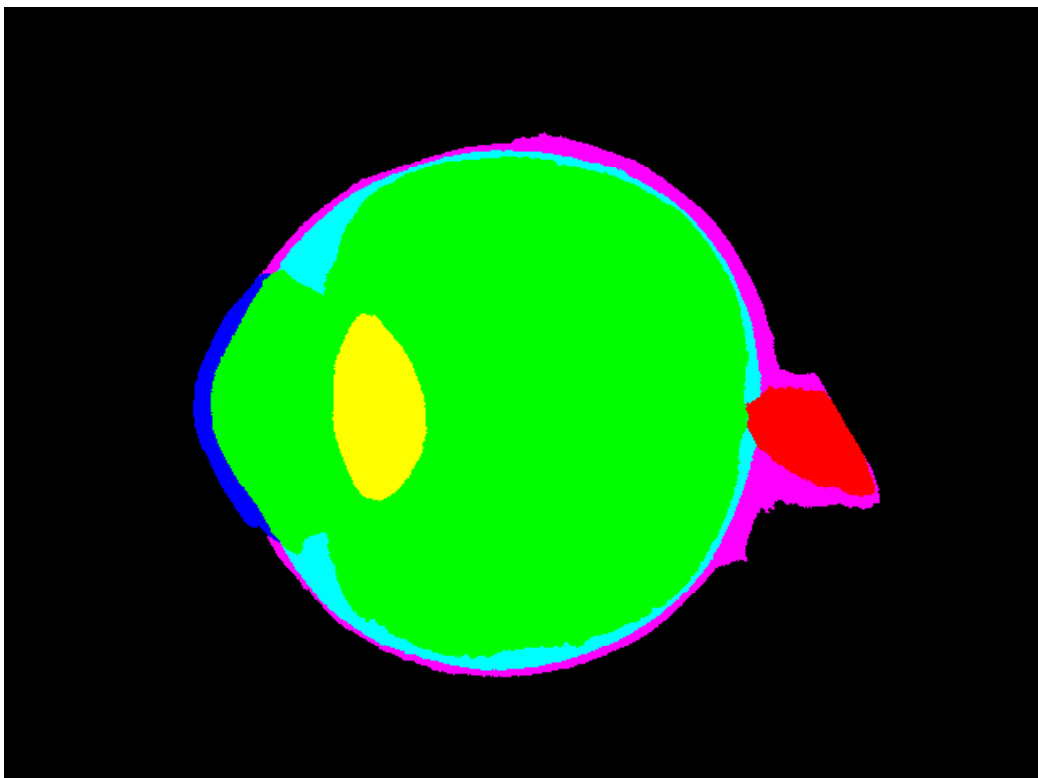


Fig11 眼球とその組織の立体構築像



眼球の任意断面像



領域分割した眼球組織の任意断面像

Fig12 再構築した眼球の立体画像

+ 虹彩、強膜、視神経の6つに領域分けした。図11に領域分けした組織毎に、フルカラーの色情報と共に構築した立体画像を示す。上部より、強膜、水晶体、角膜、網膜+脈絡膜+毛様体、眼球全体、視神経である。各画像ともに左より眼球の水晶体側からの正面画像、側面画像、背面画像を示す。強膜の正面画像からは強膜後側の内面が、網膜+脈絡膜+毛様体+虹彩の正面画像からは虹彩前面が観察できる。いずれの画像も、座標軸はすべて同一である。各組織の配置、大きさを比較することが可能である。本手法により、撮影した断面画像から眼球内部の組織を抽出することが出来た。さらに、構築した立体像は表面の情報だけでなく内部の情報を持つために、実際には切断していない断面を観察することができる。図13に実際には切断していない任意断面画像を示す。上部がフルカラー画像と領域分けしたデータから構築した断面画像である。眼球の眼軸に垂直な方向に切断した。下部に領域分けしたデータから、各組織毎に任意の値を設定して構築した疑似カラーの任意断面画像を示す。眼球内の角膜、強膜、前房、網膜、視神経乳頭、硝子体、視神経等の位置と形状を確認することができる。

5. まとめ

人の眼球のデジタル化を目的とした高精度デジタルの開発を行った。開発した装置の分解能は切断の厚さ(Z方向)10 μ m、撮影画像(X・Y方向)の分解能20 μ mを達成した。また、人の眼球のデジタルを試み、厚さ10 μ m、分解能25 μ m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全体、角膜、強膜、水晶体、角膜、房水+硝子体、網膜+脈絡膜+毛様体+虹彩、視神経の7つの部位を選別したボリュームデータを構築した。構築したボリュームデータより、疑似カラーと実際の組織の色に基づくフルカラーの立体画像や任意断面画像を構築することに成功した。

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、東邦大学倫理委員会の承認を得て行った。

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