

精密加工装置を用いた生体試料内部構造観察装置の開発

古城直道^{*1}, 横田秀夫^{*2*3}, 中村佐紀子^{*2}, 山形 豊^{*4},
大森 整^{*4}, 姫野龍太郎^{*2}, 樋口俊郎^{*1*2}

^{*1} 東京大学大学院工学系研究科

^{*2} 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

^{*3} 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

^{*4} 理化学研究所 大森素形材工学研究室

要旨

生体試料内部の 3 次元構造の解析が進む中、同時に生体内における筋肉などの軟組織と骨などの硬組織から成る複雑な構造を、微細かつ高精度に観察することが可能な手法が求められている。そこで我々は、生体硬組織を含む生体試料の観察が可能な生体試料内部構造観察装置を開発した。この装置は 4 軸制御精密加工機を基にしている。開発した装置を用いて、アクリル包埋および凍結包埋したマウス頭部試料を切削し、内部構造の観察が可能であった。さらに、切削した試料断面をより高精度に観察するためには表面粗さを改善することが必要である。本稿では、単結晶ダイヤモンドバイトによって骨の切削加工をおこない、切削した試料断面の表面粗さから切削条件を検討した。

1. 緒言

生体試料の 3 次元構造のディジタイジングは、非破壊、破壊の数々の方法によっておこなわれている。非破壊検査法としては、主に X 線 CT, MRI, 超音波が用いられている¹⁾。しかし、これらの方法は、一般に精度がミリメートル単位¹⁾と粗く、試料の色等の複数の情報を得ることは困難である。また、非破壊でミクロンの精度での観察を目的とする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 μm 程度¹⁾と非常に狭い。一方、破壊検査としては、連続切片を作製する方法があるが、連続切片の作製に労力を必要とし、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 Project もおこなわれているが、その観察の精度は高くない。そこで我々のグループは、試料を連続切削し、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 (3D - ISM) を考案した²⁾。この方法は、高速かつ高精度に試料の内部情報を得ることが可能であり、観察した断面画像の位置情報も規定されているため、立体像の構築も容易である。現在、このシステムを用いて、生物の内部構造の解析^{4)~8)}やシミュレーションモデルの構築^{9)~11)}をおこなっている。しかしながら、対象とする生体試料内部は、筋肉などの軟組織だけではなく、骨などの硬組織が複雑に入り組んだ構造から成り立っている。これまでの 3D - ISM では、薄いカミソリの刃状の平刃を用いて試料を切断していたために、骨などの硬組織を切断することは困難であった。そこで本研究では、硬組織試料断面を高精度に観察するために、精密切削が可能な生体試料内部構造観察装置の開発を目的とする。具体的には、単結晶ダイヤモンドバイトによって骨の切削加工をおこない、切削した試料断面の表面粗さから切削条件を検討した。

2. 手法

図 1 は開発した生体試料内部構造観察装置試料切削部の外観である。図 2 はこの装置の構成を示している。

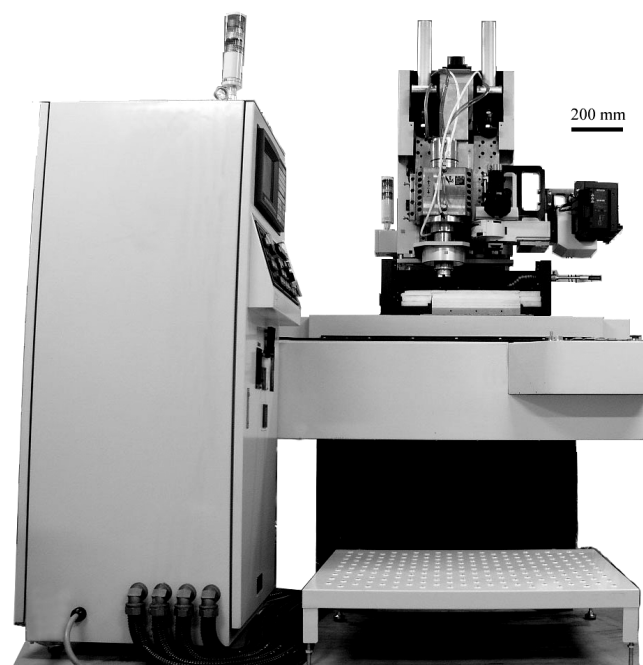


Fig. 1. Overview of Cutting System

2.1. 試料切削部

試料切削部は、4 軸制御精密加工機（UVM - 350（J）：TOSHIBA MACHINE）を基に開発した。図 2 のスピンドル（Air Spindle）、スピンドル移動ステージ（Spindle Stage）、試料移動ステージ（Sample Stage）、切削工具（Cutting Tool）が試料切削部である。より大きな径のスピンドルを選択することで、より長い工具径での切削が可能となった。また、スピンドル移動ステージを定盤化し、スピンドルの取り付け位置を移動させることで、試料観察部の設置を実現した。表 1 に試料切削部の主な仕様を示す。

Table 1. Specifications of Cutting System

	X-axis	Y-axis	Z-axis
Motion Range	0 ~ 400 mm	0 ~ 220 mm	0 ~ 150 mm
Motion Resolution	0.1 μm	0.1 μm	0.1 μm
Velocity Range	0 ~ 10000 mm/min	0 ~ 10000 mm/min	0 ~ 2000 mm/min

	Air Spindle
Diameter	60 mm
Velocity Range	3000 ~ 30000 min^{-1}

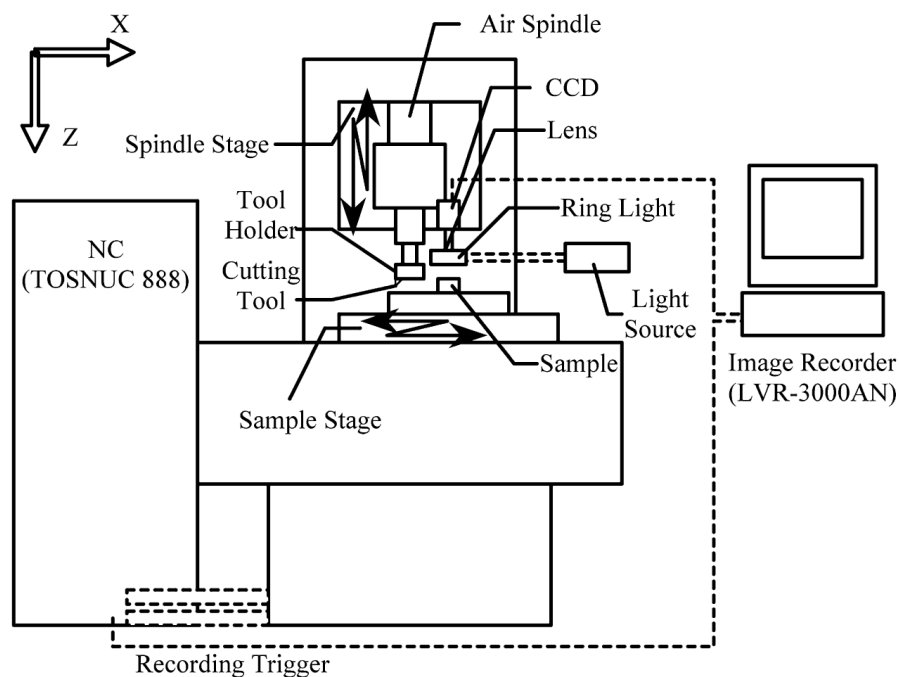


Fig. 2. Structural Drawing of System

観察試料を X, Y 方向に移動する試料移動ステージに固定して, スピンドルにバイトホルダ (直径 30 ~ 100 mm) と共に単結晶ダイヤモンドバイト (ニューディバイト CL - 305 : アライドマテリアル) を取り付け, 切削加工をおこなった. バイトの先端半径は 0.5 mm, すくい角 0° , 逃げ角 7° である. 切削加工はドライカットでおこなう. 試料表面にエアーを吹き付けて切り屑を除去し, 試料を冷却した. また, エアー吹き出し口に対向する位置に排気口を取り付け, 切り屑を吸い取った. 図 3 に切削加工中のダイヤモンドバイトと試料の配置を示す. 試料の冷却は試料周辺空間を断熱し, 冷媒を試料底部プレート内に循環させることでおこなった.

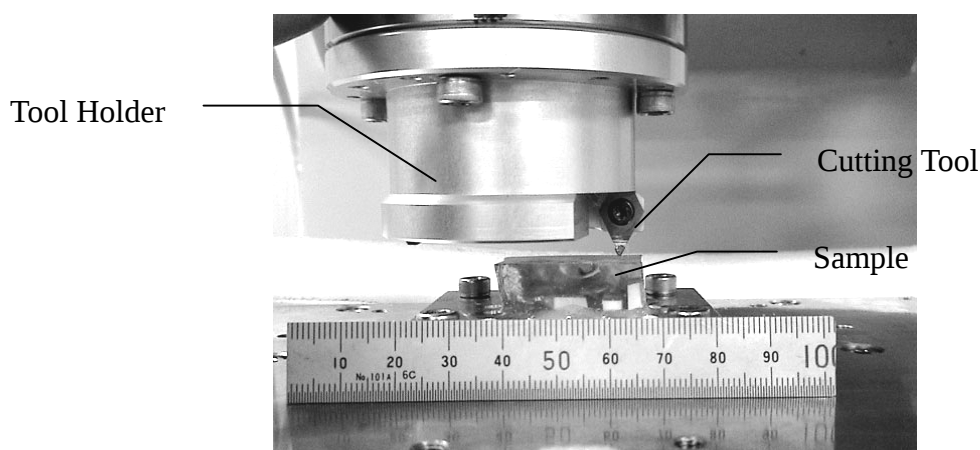


Fig. 3. Appearance of Cutting

2.2. 試料観察部

試料観察部は、スピンドル移動ステージに取り付けられ、CCD カメラ (CCD)、レンズ (Lens)、リングライト照明 (Ring Light) および光源 (Light Source) から成る。観察には、高感度 3CCD カメラ (JK - TU52H : TOSHIBA) を用い、試料の色情報を取得した。照明には光ファイバー製リングライトを用い、ハロゲン光をレンズの周囲から偏射照明することによって試料断面を照射した。なお、撮影系はスピンドルと同じくスピンドル移動ステージに取り付けられているため、切削面のピント距離がずれることはない。

2.3. 画像記録部

画像記録部は、画像記録装置 (Image Recorder) および NC から出される撮影トリガ信号 (Recording Trigger) から成り、撮影トリガ信号時に、試料観察部から得られた試料断面の記録を画像記録部におこなう。試料観察部を追記型レーザーディスク (LVR - 3000N : SONY) に接続し、撮影トリガ信号によって、1 コマずつ静止画の状態を撮影した。さらに、撮影時のステージの位置を制御することによって複数の部位の連続断面画像を撮影することが可能である。

2.4. 制御部

NC (TOSNUC 888) によってスピンドル回転速度、スピンドル移動ステージ送り速度、試料移動ステージ送り速度および切り込み深さ、切削時のエアーの吹き付けおよび撮影トリガ信号を制御する。G コードによって観察の工程を指定して、自動的に撮影をおこなった。図4に切削と撮影の工程を示す。はじめにスピンドルを回転させ、ステージを移動 (-X 方向) することによって試料上端を切削する。次に観察部の下まで試料を移動させ、断面画像を撮影・記録する。その後、試料を初期の X 位置に移動させ、スピンドル移動ステージを試料側 (Z 方向) に移動する。この工程を任意の回数繰り返して、試料上部から下部までのすべての断面画像を自動的に撮影する。

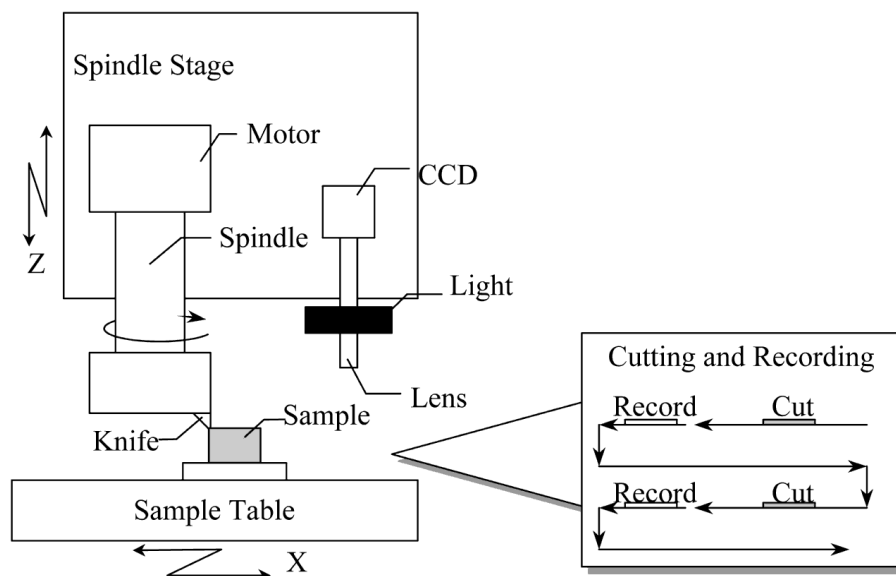


Fig. 4. Schema of Experimental Path

3. 試料

実験対象として、無酸素銅、アクリル、アクリルに包埋したブタ大腿骨皮質骨およびマウス頭部を用いた。切削条件の設定には、無酸素銅、アクリル、アクリルに包埋したブタ大腿骨皮質骨試料およびマウス頭部試料を、3次元可視化のために凍結包埋したマウス頭部試料を用いた。アクリル包埋したブタ大腿骨皮質骨試料は、ブタ大腿骨から皮質骨を摘出の後、ホルマリンで固定した。また、アクリル包埋したマウス頭部試料は、頭部を摘出の後、皮膚を剥離してホルマリンに固定した。固定後、PBSにて3日間洗浄し、アルコール上昇脱水系列によって試料内部を脱水し、アクリルと同様のメタクリレート系樹脂 (Technovit - 7100 : Kulzer) に包埋した。包埋は予備浸漬液に3日浸漬した後、硬化剤を混合した溶液に入れ替えて4 条件で重合させた。図5に完成した試料を示す。完成した試料はエポキシ系接着剤によって固定した。凍結包埋した試料は、血管を観察するために、血管内に血管用鋳型剤 (メルコックス : 大日本インク) を注入し、重合の後に凍結包埋剤 (OCT コンパウンド : サクラ) と共に - 45 下で凍結した。

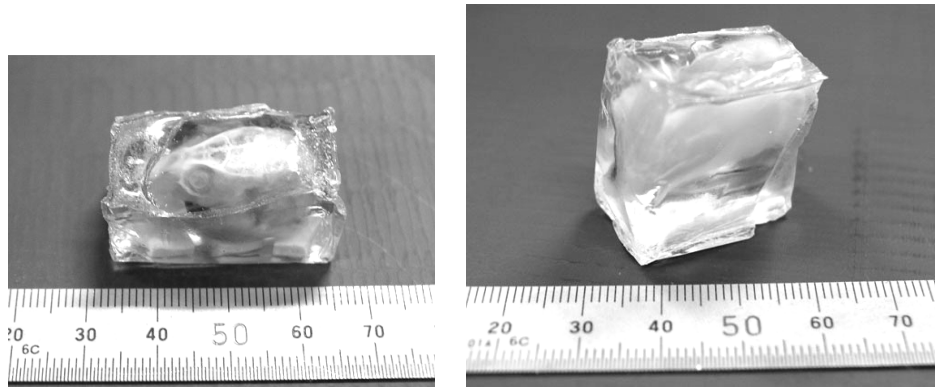


Fig. 5. Object Sample (Left: Mouse Head, Right: Porcine Cortical Bone)

4. 実験結果

切削条件の設定のために、無酸素銅、アクリル、アクリルに包埋したブタ大腿骨皮質骨およびマウスの頭骨を切削した後、それぞれの切削した試料断面の表面粗さを、非接触レーザープローブ三次元測定器 (NH - 3N : 三鷹光機) を用いて測定した。

無酸素銅試料およびアクリルの切削断面の算術平均粗さ R_a は、最小 $0.005 \mu\text{m}$ および $0.02 \mu\text{m}$ であり、切削条件は、バイトの周速 : 21 m/s (工具径 100 mm , スピンドル回転速度 4000 min^{-1}) , 深さ方向切り込み量 : $5 \mu\text{m}$, 試料送り速度 : 20 mm/min (一刃あたり送り量 : $5 \mu\text{m/rev}$) であった。図6に一刃あたりの試料送り量に対する理論最大高さ R_z と、無酸素銅試料の切削条件に対する切削断面の最大高さ R_z の測定結果を示す。無酸素銅試料の切削が、ほぼ理論通りにおこなわれていることがわかる。

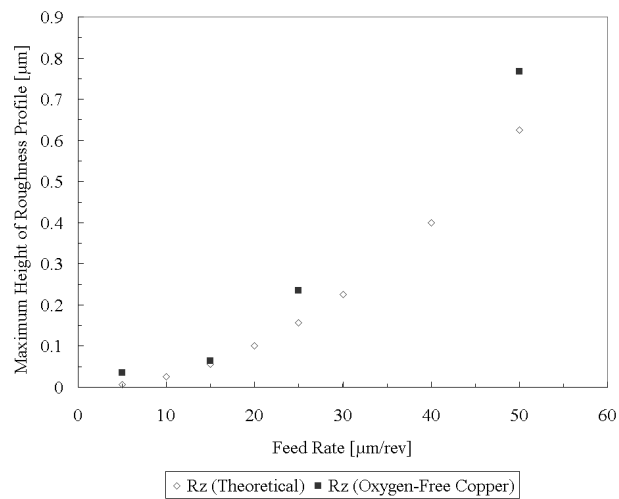


Fig. 6. Maximum Height Roughness of Oxygen-Free Copper Surface

アクリルに包埋したブタ大腿骨皮質骨試料切削断面の算術平均粗さ R_a は、アクリル部において $0.02 \mu\text{m}$ ，骨部において $0.04 \mu\text{m}$ ，最大高さ R_z は、アクリル部において $0.26 \mu\text{m}$ ，骨部において $0.89 \mu\text{m}$ であり，切削条件はバイトの周速： 4.7 m/s （工具径 30 mm ，スピンドル回転速度 3000 min^{-1} ），深さ方向切り込み量： $10 \mu\text{m}$ ，試料送り速度： 30 mm/min （一刀あたり送り量： $10 \mu\text{m/rev}$ ）であった．また，試料切削断面全体（ $6 \times 15 \text{ mm}$ ）においては，算術平均粗さ R_a ： $0.06 \mu\text{m}$ ，最大高さ R_z ： $1.05 \mu\text{m}$ であり，光学顕微鏡で観察をする場合には支障がないと考える．図 7 に試料の切削断面を，図 8 に試料切削面全体の測定結果を示す．

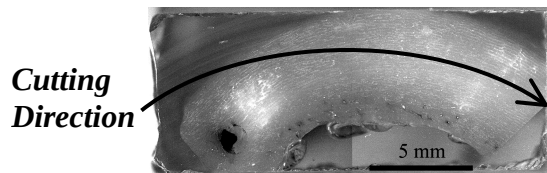


Fig. 7. Sectional Image of Porcine Cortical Bone

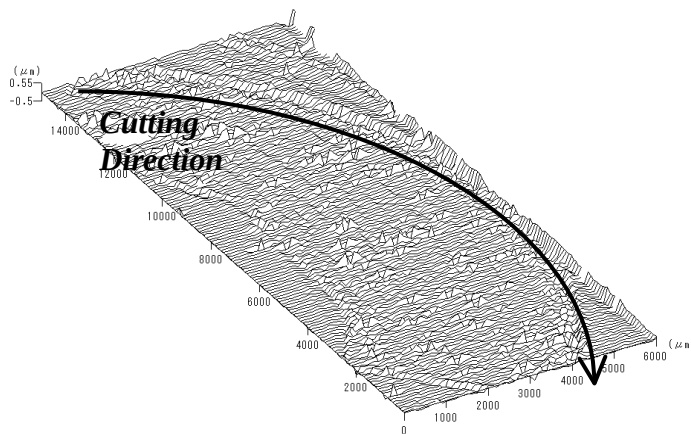


Fig. 8. Roughness of Porcine Femur Cortical Bone Surface

アクリルに包埋したマウス頭部試料の切削断面の算術平均粗さ R_a は、アクリル部において $0.01\mu\text{m}$ 、骨部において $0.04\mu\text{m}$ 、最大高さ R_z は、アクリル部において $0.08\mu\text{m}$ 、骨部において $0.18\mu\text{m}$ であり、切削条件は、バイトの周速： 21 m/s （工具径 40 mm ，スピンドル回転速度 10000 min^{-1} ），試料送り速度： 100 mm/min （一刃あたり送り量： $10\mu\text{m/rev}$ ），切り込み深さ： $10\mu\text{m}$ であった．図 9 にアクリル部分の切削断面の粗さ曲線を示す．

マウス頭部の骨の部分および脳の部分と同様に切削することが可能であった．図 10 に切削したマウス頭部試料の断面の観察画像を示す．画像サイズは 640×480 ピクセル，観察領域は $14.4\text{ mm} \times 10.8\text{ mm}$ である．画像上部の 2 つの球状の部位が眼球であり，画像の下方が鼻側，上方が後頭部側である．

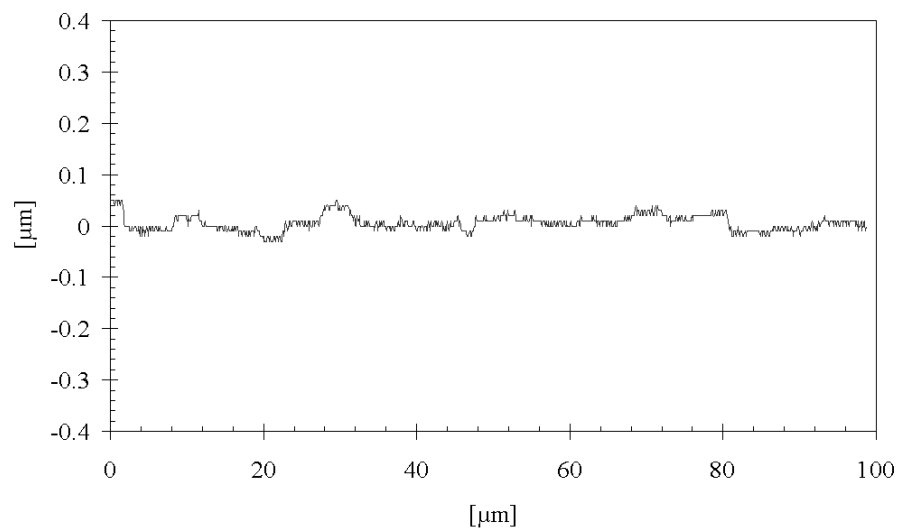


Fig. 9. Arithmetic Average Roughness

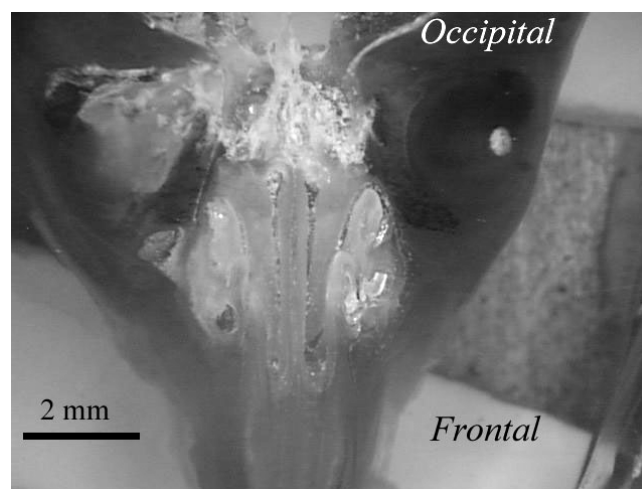


Fig. 10. Sectional Image of Mouse Head

アクリル包埋した試料では試料下層が透けて見えることから、立体像を構築することは困難である。そこで凍結包埋したマウス頭部試料の切削および観察をおこなった。図 11 に切削後の試料断面を示す。切削条件は、バイトの周速:13 m/s (工具径 40 mm, スピンドル回転速度 6000 min⁻¹) , 試料送り速度:120 mm/min (一刃あたり送り量:20 μm/rev) , 切り込み深さ:10μm であり、47 枚の連続断面画像を取得した。図 12 に取得した断面画像を示す。画像サイズは 640×480 ピクセル、観察領域は 11.8 mm×8.9 mm である。画像上部の濃い灰色の円弧状の部分、および中央下部の線状の部分が血管内に注入した樹脂である。取得した断面画像群から、フルカラーのボリュームレンダリング法によって、立体像と任意断面を構築した。ボリュームレンダリングには Voxel Viewer (TOSHIBA MACHINE) を用いた。図 13 および図 14 に構築した画像を示す。血管が分岐している様子が観察できる。

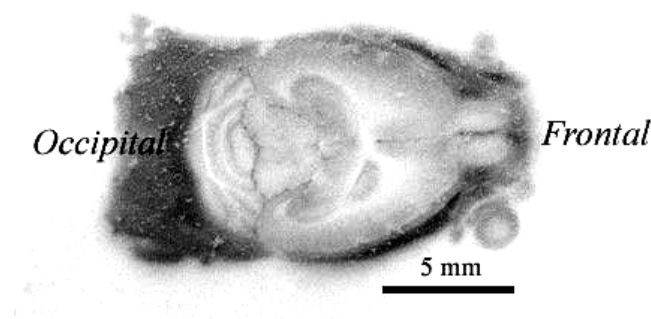


Fig. 11. Frozen Mouse Head Sample after Cutting

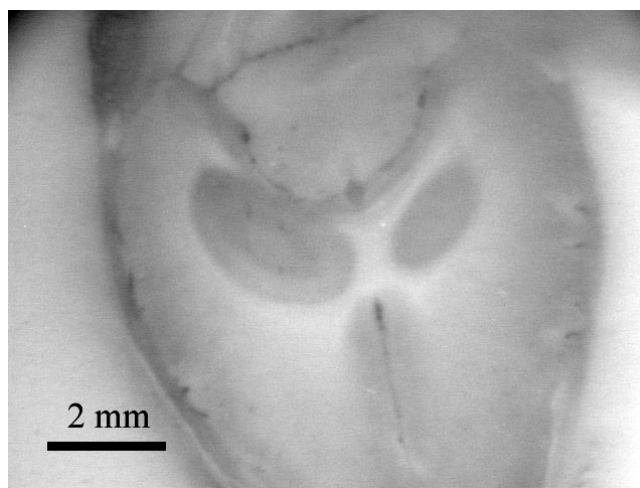


Fig. 12. Sectional Image of Frozen Mouse Head

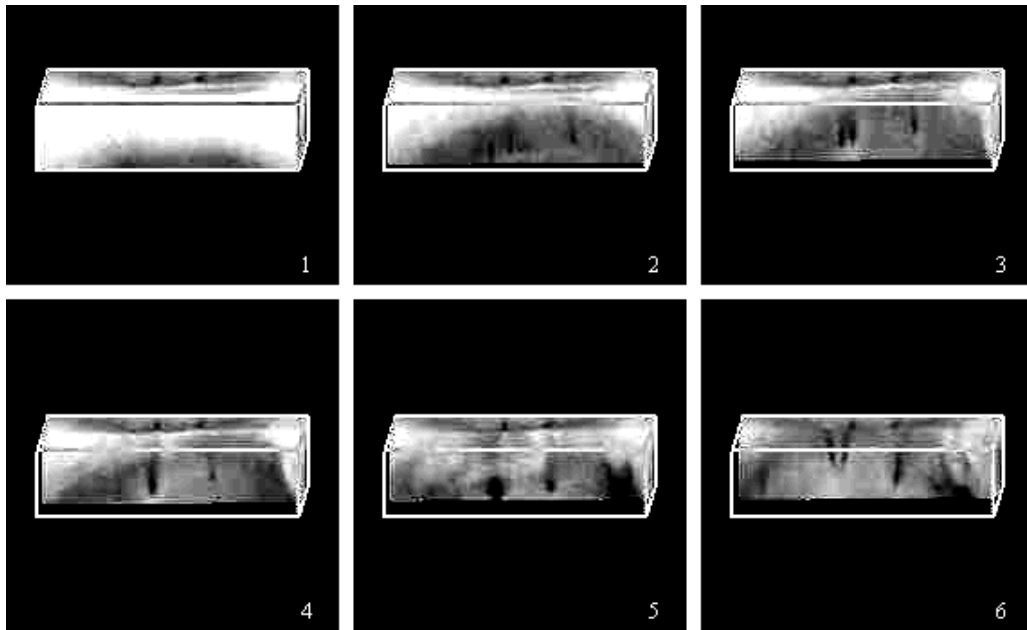


Fig. 13. Reconstructed Frozen Mouse Head Images



Fig. 14. Reconstructed Blood Vessels of Mouse Head

5. 考察

従来、硬組織および軟組織を含む生体試料の、高精度かつ微細な観察は困難であった。本研究では、精密切削機構および切削断面観察装置が組み込まれたシステムを開発することで、この問題の解決を試みた。開発したシステムを用いて、生体硬組織試料の鏡面加工が可能であり、凍結試料の連続切削断面画像から、立体像および任意断面の構築を実現した。

さらに高精度かつ微細に観察するためには、切削断面の表面精度を高める必要がある。これまでに、生体試料には、表面高精度化の指標となる切削加工条件に関する報告がなされていない。そこで、我々は開発した装置を用いて、任意の切削条件で切削加工をおこない、創成した切削断面の表面粗さを測定して、生体試料の切削加工の基礎データとした。この切削加工データを指標とすることで、実際の生体試料においても、高精度かつ微細な観察が実現可能であると考えられる。また、実際の観察に際し

ては、高精度化だけではなく、観察時間の短縮も重要である。高速化についても、観察部の焦点深度に応じて、必要な表面精度を実現する切削条件を選択することで、実現可能であると期待される。

6. 結論

精密加工機を基本とした、生体試料内部構造観察装置の開発をおこなった。開発した装置を用いて、アクリル樹脂に包埋した硬組織試料の切削加工をおこない、切削断面がほぼ鏡面となる切削条件を見いだした。切削断面の表面粗さは、光学顕微鏡の観察に必要な精度を満たしていた。また、硬組織と軟組織を含む生体試料を切削加工し、その切削断面を観察することに成功した。さらに、凍結包埋した生体試料に対しても、切削加工をおこない、記録した画像群から立体像の再構築をおこなった。これにより、生体試料内部の 3 次元構造を観察することが可能であった。今後は、切削反力と切削表面の関係を明らかにすると共に、高速観察に向けた条件設定を行う予定である。

参考文献

- 1) 石川春律, 鈴木和男, 中西 守, 猪飼 篤 (編): 見る技術 - 分子・細胞のバイオイメージング, 共立出版, 東京, (1998) .
- 2) K. Kobayashi, T. Higuchi, I. Aoki, K. Kudoh : Development of Microslicer Implementation of 3-Dimensional Internal Structure Microscope, Journal of Japan Society for Precision Engineering, 61, 1 (1995) 100-106 .
- 3) 都 甲洙, 相良泰行, 工藤謙一, 横田秀夫, 樋口俊郎: マイクロスライサ画像処理システムによるブロッコリー (*Brassica oleracea* L. var. *italica* PLEN.) の表面積および体積の計測, 農業施設学会誌, 28, 1 (1997) 21-29 .
- 4) H. Yokota, K. Kudoh, T. Higuchi, Y. Sagara, and G. S. Do : Observation and Measurement of Freezed Biological Sample by 3-Dimensional Internal Structure Microscope (3D-ISM), Cryobiology and Cryotechnology, 44, 1(1998) 1-9 .
- 5) 横田秀夫, 工藤謙一, 樋口俊郎, 佐藤嘉兵: 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 .
- 6) 横田秀夫, 中村佐紀子, 川口龍平, 牧野内昭武, 矢部比呂夫, 樋口俊郎: 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) 660-665 .
- 7) G. S. Do, Y. Sagara, M. Tabata, K. Kudoh, and T. Higuchi : Three-dimensional Measurement of Ice Crystals in Frozen Beef with a Micro-Slicer Image Processing System, International Journal of Refrigeration, 27, 2 (2004) 184-190 .
- 8) S. Ueno, G. S. Do, Y. Sagara, K. Kudoh, and T. Higuchi : Three-dimensional Measurement of Ice Crystals in Frozen Dilute Solution, International Journal of Refrigeration, 27, 3(2004) 302-308 .
- 9) 川口龍平, 横田秀夫, 山形 豊, 牧野内昭武, 樋口俊郎, 矢部比呂夫: 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), 1437-1441 .
- 10) 孫 智剛, 牧野内昭武: 超弾性体と静止液体の連成解析 FEM プログラムの開発及び眼球網膜剥離手術のシミュレーションへの応用, 日本機械学会論文集 A 編, 68, 666(2002) 357-363 .
- 11) 孫 智剛, 牧野内昭武, 矢部比呂夫: 眼球網膜剥離手術数値シミュレーションのための 3 次元 FEM プログラムの開発, 日本機械学会論文集 A 編, 69, 688(2003) 1775-1781 .