

## 3次元内部構造顕微鏡を用いたマウス脳血管形状取得の検討

中村 佐紀子<sup>\*</sup>, 横田 秀夫<sup>\*†</sup>, 西村 将臣<sup>†</sup>, 姫野 龍太郎<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> 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

<sup>†</sup> 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  
V-CAT 開発チーム  
埼玉県和光市広沢 2-1

e-mail: sakiko@riken.jp, hyokota@riken.jp,  
masaominishimura@riken.jp, himeno@riken.jp

### 1. はじめに

生体形状の数値化およびデータベース構築研究では生体情報の取得、数値化、蓄積を図り、サイエンスの分野で用いられる標準データを作成することを目指している。このデータベースの構築にあたり、我々がこれまで開発を進めてきた3次元内部構造顕微鏡(3D-ISM)<sup>1)</sup>を用いて形状データの取得を行う。この装置はミクロン単位でセンチメートルの範囲の3次元構造を撮影可能であり、この3D-ISMにより得られた情報を数値化することにより、形態の数値化による新しい解剖学が可能となると考えている。現在マウスの脳血管形状に注目し、この血管形状により脳の形を記述し各系統間の比較を試みている。3D-ISMを用いてマウス脳血管の3次元形状情報の取得を試みたので報告する。

## 2. 3次元内部構造顕微鏡によるマウス脳血管形状の取得

### 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(図1)。また、撮影した各個の断層画像の座標軸および位置が明らかことから、得られた断面画像から3次元像を容易に構築することができる。

## 2-2 実験方法

3D-ISM 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。

### 2-2-1 試料作成

生体試料のマウス脳血管形状取得を目的としてマウス血管に血管鋳型剤を注入し、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）に検出能を高める為に蛍光色素 RITC（フナコシ）を添加し、血管への注入を行った。

麻酔をかけた対象試料（ICR マウス♀9 週齢）の胸壁を開いて心臓を露出させ、左心室に留置針を刺入しアロンアルファで止め、右心房を切開し生理食塩水（大塚）で十分に血球を洗い流したのちに蛍光標識メルコックスをゆっくり注入していく。このとき下行大動脈は結紮しておき樹脂を脳血管に重点的に注入するようにする。また注入後は心臓の上部を鉗子で挟み樹脂を重合させる。樹脂の重合後、脳を摘出し OCT コンパウンド（SAKURA）とともに $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結包埋した。尚、OCT コンパウンドは凍結すると白色になるので脳の色との色差をだし、下層の透けをキャンセルするためにポスターカラー（コバルトブルー：NICKER）混ぜて使用した。

### 2-2-2 観察条件

凍結した試料は $-45^{\circ}\text{C}$ に冷却した装置内でスライスした。切削はマイクローム替刃 C35（FEATHER）を用い、切削厚さ  $20\mu\text{m}$ 、ナイフ回転数 90rpm、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 HD カメラ（DXC-H10：SONY）を用いた。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。

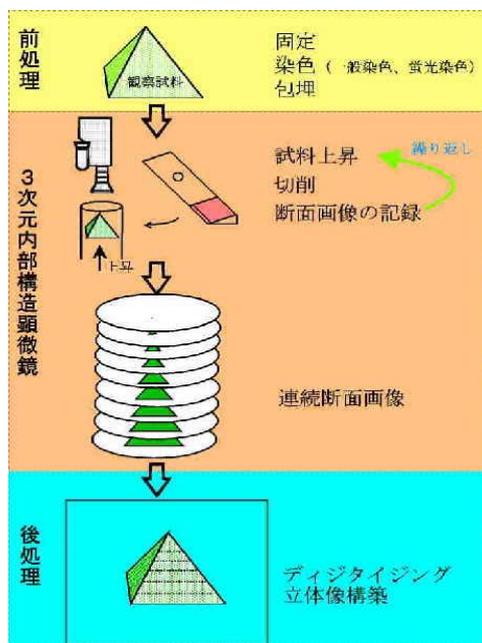


図1 システム模式図

### 2-3 観察結果

得られた観察断面は 899 枚、撮影時間は約 10 分と非常に高速であった。図 2 に観察結果を示す。a~d が白色観察で得られた断面画像、同断面を蛍光で観察した画像を e~h に示す。蛍光での観察の方が細かな血管がよく分かるが落射蛍光観察のため、下層が透けてしまい血管の境界が曖昧となっている。画像の分解能は切断の厚さ (Z 方向) は  $20\mu\text{m}$ 、撮影画像 (X・Y 方向) の分解能は  $12\mu\text{m}$  であり、分解能  $20\mu\text{m}$  のボリュームデータを得ることができた。

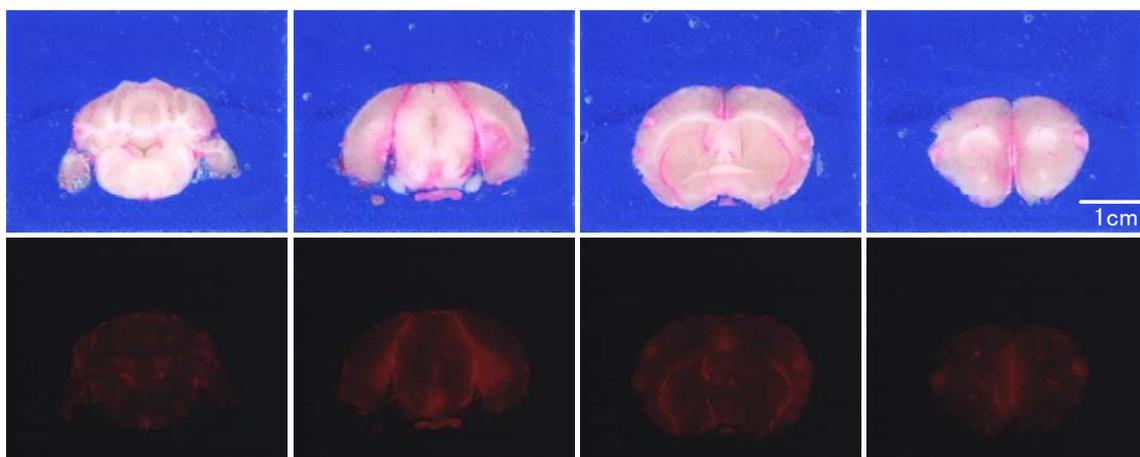


図2 血管染色マウス脳 連続断面画像(上段:白色光観察 下段:蛍光観察)

この得られた結果より 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。立体構築を行った結果を図 3 に示す。

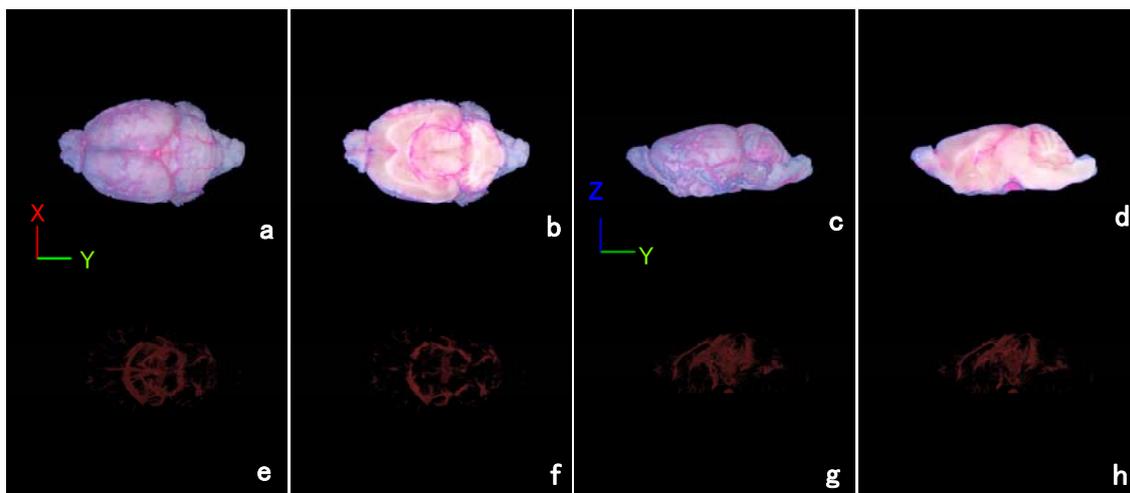


図3 血管染色マウス脳 立体構築画像  
上段:白色光観察 a:頭頂部よりの図 b:任意断面(coronal) c:側面図 d:任意断面(sagital)  
下段:蛍光観察(血管抽出) e:頭頂部よりの図 f:任意断面(coronal) g:側面図 h:任意断面(sagital)

a~d が白色光観察で得られた結果からの立体構築画像である。e~f は同じ断面から得られた蛍光観察による立体構築画像である。ボクセルとしてデータを持っているので b、d、f、h のように任意の角度で内部を見ることも可能である。e~h は HSV を用いて血管部のみの抽出を試みたが透けの部分の除去がうまくいかず全体的に血管がふくらんだ画像となった。この状態の画像から血管のみの抽出を行うことは難しい。そこで下層の透けをキャンセルするために LSM 組込型 3 次元内部構造顕微鏡でマウスの脳の観察を行った。

### 3. LSM 組込型 3 次元内部構造顕微鏡によるマウス脳血管観察

3 次元内部構造顕微鏡に顕微鏡を組み込むことによりマイクロな領域での観察も可能となっている。LSM 組込型 3D-ISM を用いてマウスの脳血管形状の取得を試みた。

#### 3-1 装置概要

装置外観図を図 4 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<sup>2)3)</sup>。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。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 VB-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 5 に 3D-ISM に取り付けられた 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で CSU-10 (YOKOGAWA) を使用し、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。

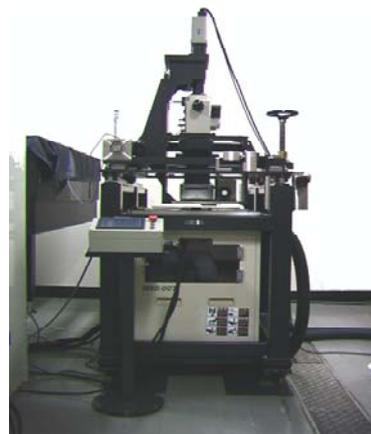


図 4 装置外観

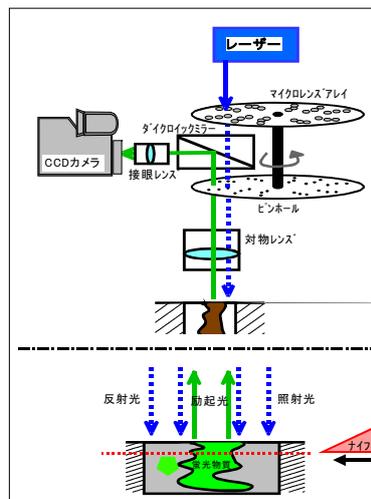


図 5 観察模式図

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 試料作成

試料作成の手順は 2-2-1 と同手順である

### 3-2-2 観察条件

凍結した試料は $-45^{\circ}\text{C}$ に冷却した装置内でスライスした。切削は脳全体を観察したマクロ観察型 3D-ISM と同様にミクロトーム替刃 C35 (FEATHER) を用い、切削厚さ  $5\mu\text{m}$ 、ナイフ回転数 90rpm、白色・蛍光での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。LSM での観察ではレーザー波長は  $568\text{nm}$  で  $150\text{mW}$  の Ar ガスレーザを用い、DM は  $460\text{nm} \cdot 520\text{nm} \cdot 600\text{nm}$  の 3 波長透過型で EM は中心波長： $615\text{nm}$ 、半値幅： $30\text{nm}$  (OMEGA) に設定した。観察には 2 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 観察結果

図 6 に観察結果を示す。a は白色、b は蛍光、c は白色光と蛍光を同時に当てたもの、d は LSM での観察画像である。白色光で判別し難い細かな血管が蛍光観察および LSM 観察では見ることが可能である。また LSM の画像は下層の透けが多少は除去され蛍光観察画像よりも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  $\text{XY}:7\mu\text{m}$ 、 $\text{Z}:5\mu\text{m}$  と高精細であり、観察断面は 1300 枚、観察時間は約 15 分と非常に高速であった。これは LSM 単体では観察不可能な厚さであり、実際に試料を切断し、断面画像を取得できる 3D-ISM だからこそ取得可能な連続画像群である。



図6 血管染色マウス脳 断面観察  
(a:白色光観察 b:蛍光観察 c:白色蛍光観察 d:LSM観察)

### 3-4 血管形状の抽出

血管形状を可視化するためには得られたボリュームデータから関心領域の抽出しなくてはならない。すでに腎臓系球体の血管網の抽出には成功している<sup>3)</sup>。用いた抽出法は拡張 **Region Growing** 法であり、停止条件を可変させ、停止条件の局所判定を行うことにより、注目点における閾値を自動的に設定するものである。この抽出は3次元処理ができるので連続した血管を閾値変化により抜いていくことが可能であり、今回も同手法を用いての抽出を試みた。しかし低倍率で得られた観察画像では血管部のみの抜き出しはうまくいかなかった。一方腎臓系球体観察時と同様の観察倍率 ( $20\times$  M PLAN ApoSLMITUTOYO) で得られた画像からは血管部のみの抽出が可能であった。3D-ISMにより得られた結果を図7 (分解能 XY: $0.7\mu\text{m}$ 、Z: $2\mu\text{m}$ 、断面枚数 173 枚) に示す。図8は閾値処理による2値化によって図7から抽出された結果に濃淡情報を再付加した画像である。目的の血管部位のみの抽出が可能であり、背後の非血管部位は抽出されていない。この結果をもとに、ものづくり情報技術統合化研究プログラム V-CAT 開発チームにより開発されたRVエディター ([http://www.riken.go.jp/lab-www/V-CAD/katsudo/vcat\\_team/rveditor/index.html](http://www.riken.go.jp/lab-www/V-CAD/katsudo/vcat_team/rveditor/index.html)) を用いて作成したボリュームレンダリング像を図9に示す。このように血管部を抽出し、立体再構築を行うと血管の3次元的なつながりがよくわかる。また同ソフトを用いてSTLを作成し、表面を平滑化した画像を図10に示す。以上のことより現時点ではある特定の領域を局所的に抜き出すことは可能である。

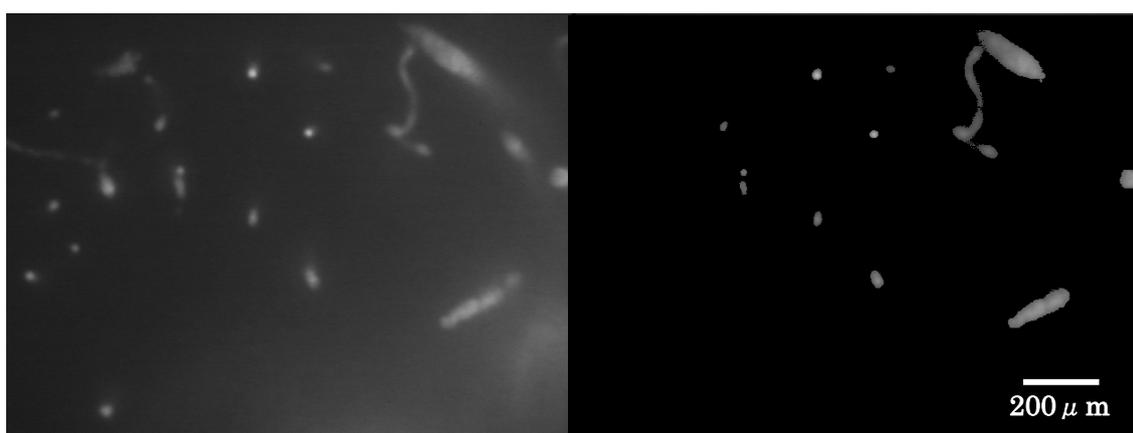


図7 血管染色マウス脳断面画像

図8 血管抽出結果

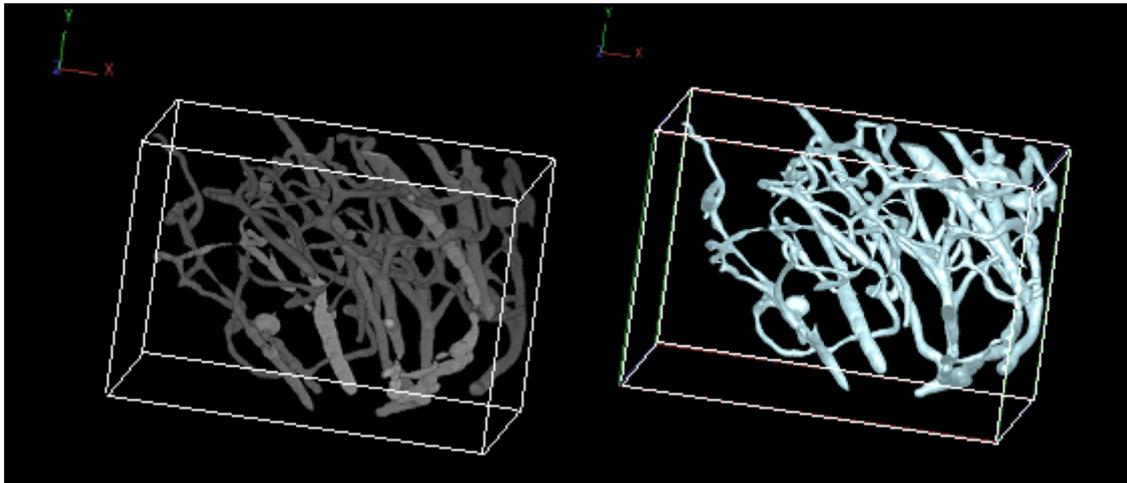


図 9 脳血管立体構築画

図 10 脳血管 STL 画像

#### 4. まとめ

マウスの脳血管を対象に 3D-ISM を用いた 3 次元形状の取得について検討を行った。マクロな領域での観察では脳全体の観察を行い、得られた画像の分解能は  $20\mu\text{m}$ 、観察対象範囲は  $17\text{mm}$  であった。また、画像処理を行うことにより任意の断面・角度から脳の形状を観察することができた。ミクロな領域での観察には LSM 組込型 3D-ISM を使用し、観察した画像の分解能は弱拡大では  $7\mu\text{m}$ 、観察対象範囲は  $6500\mu\text{m}$ 、高拡大での画像分解能は  $2\mu\text{m}$ 、観察対象範囲  $350\mu\text{m}$  であった。LSM での観察は落射蛍光観察に比べ下層の透けの少ない画像が得られ、細かな血管をより鮮明に得ることができた。また、この装置での観察範囲は LSM 単独では観察不可能な範囲であり、本手法により初めて観察することが可能となった。血管観察は血管内鑄型注入-SEM 観察法などにより高分解能な画像が得られている。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。一方、本提案手法では任意断面・角度で試料内部の立体構造の観察が可能であり、血管抽出を行うことにより血管を 3 次元的に観察することができる。血管抽出において、マクロな領域での脳全体の観察画像、及び LSM 組込型 3D-ISM の弱拡大での観察画像からは自動的に関心領域を抜き出すことが難しく、この画像群からの血管抽出法は今後の検討課題である。高拡大で得られた画像群からは半自動的に血管部を抽出することが可能であった。これにより STL データを作成し、直径十数ミクロンの脳血管を再現することができた。今後抽出されたデータをもとに形状を細線化し、血管分岐を記述し、系統間での比較を行う予定である。

#### 参考文献

- 1) 横田, 他 5 名, "3次元内腔構造顕微鏡による生体の侵襲的イメージング," *Med Imag Tech* 20(6), pp.660-665, 2002
- 2) 横田, 他 4 名, 3次元内腔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)
- 3) 横田, 他 3 名, 発現遺伝子観察用 3次元内腔構造顕微鏡の開発, *医用電子と生体工学* 36, 3 (1998) 244-251
- 4) Hiroyuki SHIMAI, et...al., Extracriation Method of The Interest Region With Intensity Change from Biological Volume Data Computational Biomechanics RIKEN Symposium, p33-44(2002)