

精密加工を用いた生体内部構造観察システムの開発

古城直道^{†*} 横田秀夫[∇] 中村佐紀子^{*} 山形 豊[◇]
小久保光典[‡] 大森 整[◇] 姫野龍太郎^{*} 樋口俊郎^{†*}

[†] 東京大学大学院 工学系研究科
東京都文京区本郷 7-3-1
[°] naof@intellect.pe.u-tokyo.ac.jp

^{*} 独立行政法人 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

[∇] 独立行政法人 理化学研究所 知的財産戦略センター VCAT 開発チーム
埼玉県和光市広沢 2-1

[◇] 独立行政法人 理化学研究所 大森素形材工学研究室
埼玉県和光市広沢 2-1

[‡] 東芝機械株式会社
静岡県沼津市大岡 2068-3

要旨

我々のグループでは、試料を薄く切断（薄切）した後の断面を撮影して得られた画像情報を元に、試料の立体像を構築するシステムの開発を行ってきた。しかし、骨や歯などの硬いものを薄切したり、多くの枚数を薄切する場合、刃が損耗し、試料表面にナイフマークが発生するという問題があった。そこで、我々は新たに、精密加工を用いて仕上げた試料断面を観察する生体内部構造観察システムを開発した。

1 はじめに

近年、MRI(Magnetic Resonance Imaging)、超音波及び X 線 CT(Computed Tomography)、共焦点レーザー顕微鏡などの進歩によって、生体内部構造のより詳細な観察が可能となってきた。しかし、これらの観察方法には以下の問題点がある。

- 微細な生物や細胞などの観察には、MRI や CT、超音波では分解能が不十分である。
- 共焦点レーザー顕微鏡は、観察範囲に制約があり厚みのある試料の観察には適さない。

そこで、我々のグループでは、試料を薄くスライスした後の断面を撮影して得られた画像情報を元に、試料の立体像を構築するシステムの開発を行ってきた [1, 2]。このシステムは破壊検査であるため、保存が必要な試料や、入手困難な試料を観察することができないという欠点がある。しかし、以下の利点がある。

- 切片が不要なため、短時間で試料全体の観察ができる。
- 観察時に試料の位置が変化しないため、立体像の再構築が容易である。
- 観察した断面画像を記録しておくことで、いつでも高品位な情報を再利用できる。

- 内部を実際に観察するため、光学顕微鏡での観察に近い色情報を得ることができる。

このシステムを用いることで、生物の内部構造の解析 [3, 4, 5, 6, 7, 8] やシミュレーションモデルの構築 [9, 10, 11, 12] が実現されている。

しかし、試料を薄く切断（薄切）する際に、薄いミクロトーム用替刃を用いるため、骨や歯などの硬いものを薄切したり、多くの枚数を薄切する場合、刃が損耗し、試料表面にナイフマークが発生するという問題がある。

そこで、我々は新たに、単結晶ダイヤモンドバイトを用い、正面フライス加工によって仕上げた試料断面を観察する、生体内部構造観察システムを開発した [13, 14, 15, 16]。

2 手法

図1に、生体内部構造観察システムの全体図を示す。本システムは、試料断面を精密加工する試料切削部、精密加工された断面を撮影する試料観察部、試料観察部からの画像を記録する画像記録装置、及びそれらを制御する制御装置で構成される。

本システムの主要操作は、以下の通りである。

試料包埋 生体軟組織は普通の状態では精密加工には適さない。そのため、樹脂内に試料を浸して硬化させたり、凍結包埋材内に試料を浸して凍結させたりして、試料を精密加工しやすい形状・硬さにする。詳細は2.1で述べる。

断面創成 包埋された試料を試料切削部に取り付け、単結晶ダイヤモンドバイトを回転させ、刃の軌道に対して切削したい厚さだけ試料を送り、突き出すことによって、試料断面を正面フライス加工する。詳細は2.2で述べる。

断面撮影 精密加工された試料断面を、試料観察部で撮影する。試料断面を撮影し、画像記録装置に記録する。詳細は2.3で述べる。

画像処理 記録された画像から、ボリュームレンダリングする（断面画像を積み重ねる）ことで、立体画像を再構築する。立体画像は、表面のみならず、内部の情報も有しており、任意断面の観察や、特定部分の抽出などが可能である。詳細は3.2で述べる。

2.1 試料

実験対象として、ブタ大腿骨皮質骨を用いた。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。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°Cの条件下で重合させた。図2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。



图 1 Overview of the System

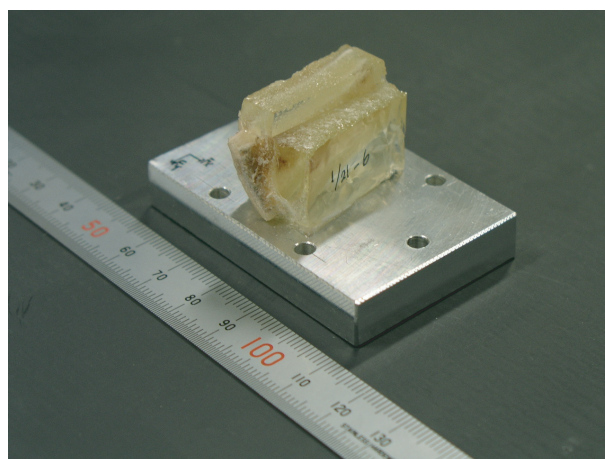


图 2 Embedded Porcine Cortical Bone

2.2 試料切削部

試料切削部は、3軸制御精密加工機(UVM-350(J):東芝機械)を基に開発した。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、表2に試料切削部の主な仕様を示す。

表1 Specifications of Cutting System(Stage)

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

表2 Specifications of Cutting System(Air Spindle)

	Air Spindle
Diameter	60mm
Velocity Range	3000~30000min ⁻¹

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30~100mm)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0.5mm、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った。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。

2.3 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、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)から構成される。

観察には、高感度3CCDカメラ(JK-TU52H:東芝)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、試料観察部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、最初に試料断面に焦点を合わせることで、以降切削によってピントがずれることはない。

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、

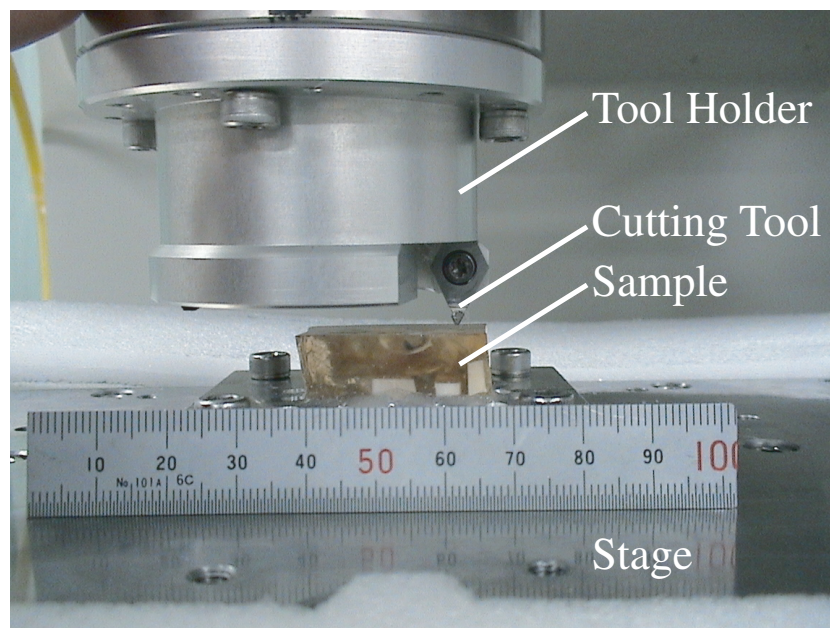


図 3 Appearance of Cutting

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．

3 実験結果

3.1 切削条件選定

切削条件の選定のために，包埋したブタ大腿骨皮質骨を切削した後，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:三鷹光器) を用いて測定した．

切削条件は，バイトの周速 $282.7/\text{min}$ (工具径 30mm ，スピンドル回転速度 3000min^{-1})，深さ方向切り込み量 $10\mu\text{m}$ ，試料送り速度 $15\sim 180\text{mm}/\text{min}$ (一刃当たり送り量 $5\sim 30\mu\text{m}/\text{rev}$) である．最大高さ粗さ R_z の測定結果を図 5 に示す．一刃当たり送り量 $10\mu\text{m}$ が最適条件であった．また，試料断面の観察画像から，選定切削条件において良好な切削が行われたことを確認した．

3.2 3次元可視化

選定した切削条件を用いて，試料を連続切削し，断面画像を記録した．観察には，明視野用超長作動距離対物レンズ (M Plan Apo $5\times$: ミットヨ) を使用した．断面全体を観察するために， 6×3 枚のマッピング観察を設定し，連続 300 断面において 5400 枚のフルカラー画像 (640×480 画素，24bit， $6.2\mu\text{m}/\text{画素}$) を自動取得した．マッピング画像から作成した断面全体画像のサイズは 2892×1398 画素 ($18\times 8.7\text{mm}$) であった．図 6 に第 75 断面全体画像を示す．図 7 に図 6 □ 枠部の他断面での画像を示す．切削の進行に伴い，断面が変化する様子が分かる．そこで，同 □ 枠部 ($4\times 3\text{mm}$) の 300 枚連続断面画像群から，ボ

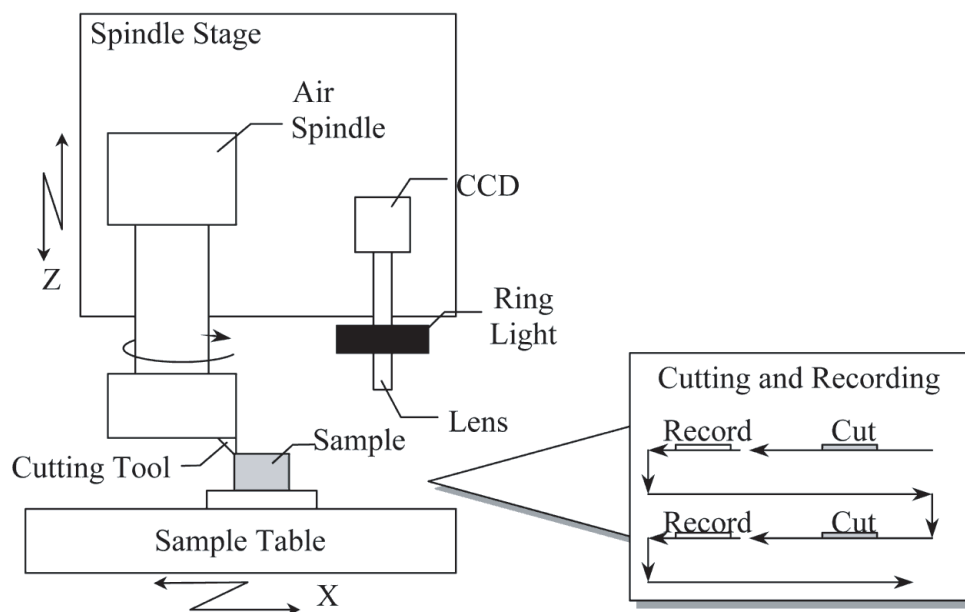


图 4 Schema of Experimental Path

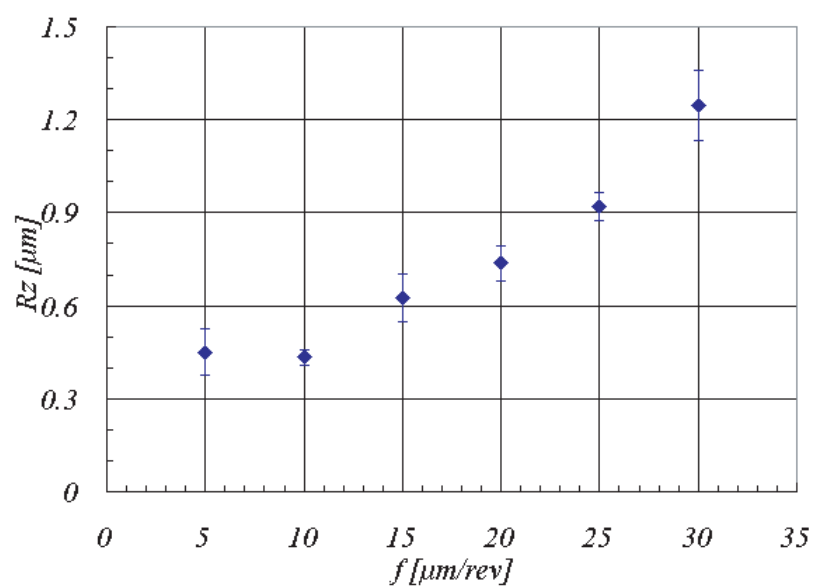


图 5 Maximum Height Roughness of Bone Surface after Cutting

リウムレンダリング法によってフルカラー立体像および任意断面を構築した．図8に試料内部構造の3次元可視化像を示す．立体像からは，骨軸方向(図8縦方向)に平行に並んで走行する複数のハバース管，および骨軸垂直方向(図8横方向)に走行し，ハバース管同士を接続するフォルクマン管の抽出が可能であった．

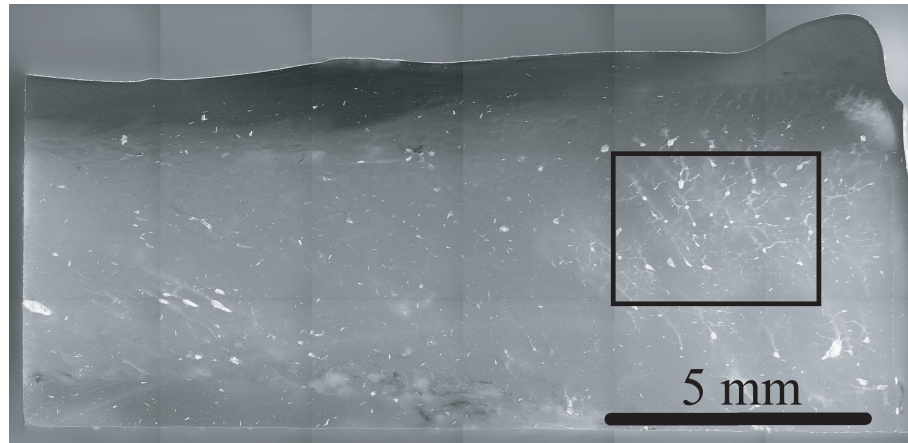


図6 A Sectional Image of Porcine Cortical Bone

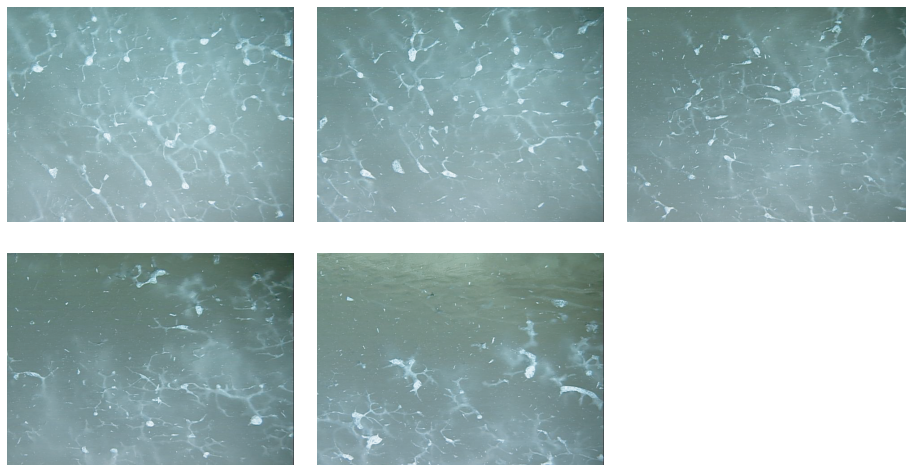


図7 Sectional Images of Porcine Cortical Bone

4 結言

生体硬組織を含む生体試料の観察が可能な生体内部構造観察システムを開発した．開発したシステムを用いて，骨試料に対し至適切削条件を見出すことができた．選定した切削条件における試料断面性状は，光学顕微鏡での観察には十分であることを確認した．

選定した切削条件を用いて， $18 \times 8.7 \times 3 \text{ mm}$ の試料全体を， $6.2 \times 6.2 \times 10 \mu$ の分解能で観察可能であった．この精度での観察は，他に類を見ない．所要時間は6時間，総データサイズは約3.4GBであり，自動的かつ連続的に大規模な内部情報の取得が可能であった．また，注目した $4 \times 3 \times 3 \text{ mm}$ の領域に対し，連続断面画像から立体像を再構築し，任意断面を作成することで，試料の3次元内部構造の観察が可能であった．

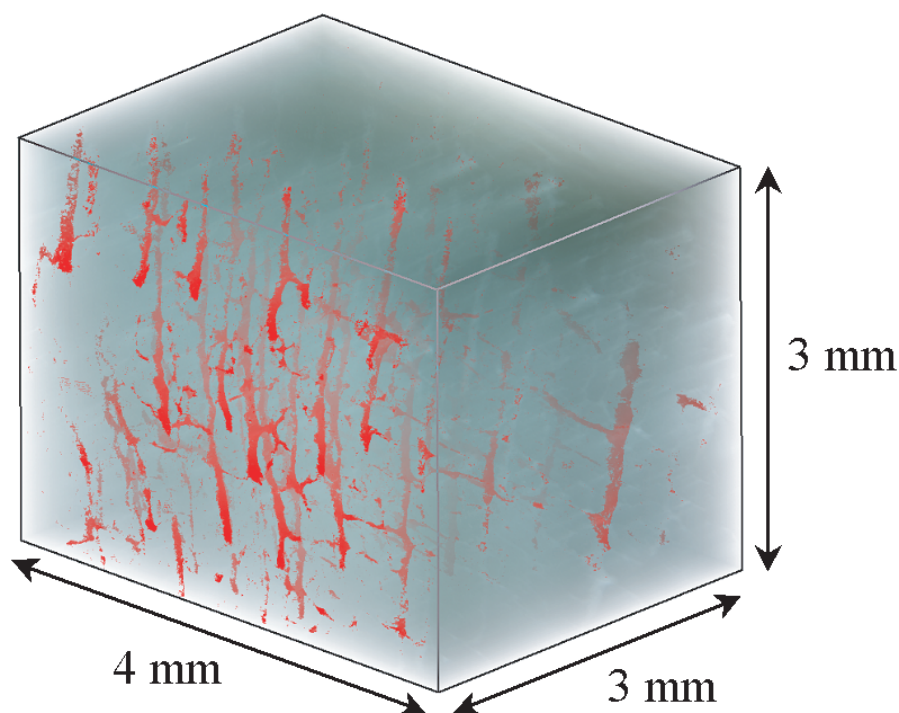


図 8 Reconstructed Porcine Cortical Bone

本提案手法は硬組織を含む、複雑な構造を有する生体内部を高分解能かつ高精度に観察することを可能とした。また、従来困難であった大きな対象領域に対しても、連続断面画像の自動取得が可能であり、生物の内部構造観察に新たな道を切り拓いたと考える。

参考文献

- [1] K. Kobayashi, T. Higuchi, I. Aoki and K. Kudoh: Development of Microslicer Implementation of 3-Dimensional Internal Structure Microscope, *Journal of the Japan Society for Precision Engineering*, **61**, 1, (1995) 100–106.
- [2] 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.
- [3] G.S. Do, Y. Sagara, K. Kudoh, H. Yokota and T. Higuchi: Surface Area and Volume Measurement of a Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* PLEN.) with a Microslicer-Image Data Processing System, *Journal of the Society of Agricultural Structures*, **28**, 1, (1997) 21–29.
- [4] H. Yokota, K. Kudoh, T. Higuchi, Y. Sagara and G.S. Do: Observation and Measurement of Frozen Biological Sample by 3-Dimensional Internal Structure Microscope (3D-ISM), *Cryobiology and Cryotechnology*, **44**, 1, (1998) 1–9.
- [5] 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.

- [6] J. Kimura, A. Tsukise, H. Yokota, Y. Nambo and T. Higuchi: The Application of Three-Dimensional Internal Structure Microscopy in the Observation of Mare Ovary, *Anatomia Histologia Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, **30**, 5, (2001) 309–312.
- [7] J. Kimura, Y. Hirano, S. Takemoto, Y. Nambo, T. Ishinazaka, R. Himeno, T. Mishima, S. Tsumagari and H. Yokota: Three-Dimensional Reconstruction of the Equine Ovary, *Anatomia Histologia Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, **34**, 1, (2005) 48–51.
- [8] 竹本 智子, 平野 悠子, 横田 秀夫, 中村 佐紀子, 木村 順平, 南保 泰雄, 津曲 茂久, 姫野 龍太郎, 三島 健稔: 生体フルカラー連続断面画像からの組織抽出法の検討, *画像電子学会誌*, **34**, 6, (2005) 770–777.
- [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.
- [12] 横田 秀夫, 平田 忍, 川口 龍平, 中村 佐紀子, 牧野内 昭武, 姫野 龍太郎, 矢部 比呂夫, 樋口 俊郎: 3 次元内部構造顕微鏡を用いた生体軟組織の半自動 FEM 解析メッシュ生成, *日本機械学会論文集 A 編*, **71**, 702, (2005) 219–224.
- [13] 古城 直道, 横田 秀夫, 中村 佐紀子, 山形 豊, 大森 整, 姫野 龍太郎, 樋口 俊郎: 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, *理研シンポジウム—生体形状情報の数値化及びデータベース構築研究*, (2005) 23–32.
- [14] 古城 直道, 横田 秀夫, 中村 佐紀子, 山形 豊, 大森 整, 姫野 龍太郎, 樋口 俊郎: 精密切削加工による生体試料内部構造の観察 —骨切削条件の選定—, *2005 年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集*, (2005) 765–766.
- [15] 古城 直道, 横田 秀夫, 中村 佐紀子, 山形 豊, 大森 整, 姫野 龍太郎, 樋口 俊郎: 精密加工装置を用いた生体試料内部構造観察システムの開発 —骨切削力の測定—, *2005 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集*, (2005) 445–446.
- [16] 古城 直道, 横田 秀夫, 中村 佐紀子, 山形 豊, 小久保 光典, 大森 整, 姫野 龍太郎, 樋口 俊郎: 精密切削による生体試料内部構造観察システムの開発, *第 6 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会論文集*, (2005) 117–118.