

近赤外分光イメージングによる生体材料内の 3次元氷結晶構造の可視化

Three-Dimensional Visualization of Ice Crystals in Frozen Materials by Near-Infrared Imaging Spectroscopy

都 甲洙*	蔦 瑞樹**、***	杉山 純一***
Gab-Soo DO	Mizuki TSUTA	Junichi SUGIYAMA
上野 茂昭**	相良 泰行**	
Shigeaki UENO	Yasuyuki SAGARA	

* 日本大学生物資源科学部 (252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

College of Bioresource Sciences Nihon University

(1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa, 252-8510)

** 東京大学大学院農学生命科学研究科 (113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

(1-1-1 Yayoi Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657)

*** 独立行政法人食品総合研究所 (305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12)

(National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642)

Summary

Micro Slicer Spectral Imaging System (MSSIS) has been applied to observe the three-dimensional (3-D) structure and distribution of ice crystals formed in biological materials. MSSIS is composed of a micro-slicer, near-infrared (NIR) illuminator and spectral imaging system. NIR Spectroscopic analysis using MSSIS confirmed that there are a water absorption band around 965 nm and an ice absorption band around 1025 nm. Spectroscopic images of a frozen agar gel and a piece of raw beef at 1,025 nm were obtained by the MSSIS. These images showed the ice crystals could be clearly distinguished from the other components by the different absorbance. The average area of ice crystals was $6,253 \mu\text{m}^2$, and the average distances of major and minor axis were 111 μm and 62 μm respectively. In addition, the 3-D re-constructed image of the ice crystal morphology revealed that they were formed along with the direction of heat transfer. The proposed method provided a novel tool to investigate the effects of freezing conditions on the size, morphology and distribution of ice crystals.

Key words: Ice crystal, 3 Dimensional measurement, Near-infrared spectroscopy, Micro-slicer, Visualization

1. はじめに

近年、次世代医療技術として注目されている再生医療、人工臓器、がん、ヒトの不妊などの治療法に用いるため、精子、卵子、生殖腺の摘出保存など、生体材料の保存に関する研究が様々な分野において行われている。凍結保存法は、生体材料を凍結し、低温で保持するのみの簡便な手法として、研究用細胞や精子・卵子の保存など、幅広く利用されている。しかしながら、凍結および長期間の凍結保存により、サイズの大きな氷結晶が形成され、細胞を破壊する現象が知られている^{1,2)}。そのため、氷結晶サイズやその形成・成長メカニズムの定量的な解析と、生体材料の凍結保存に最適な凍結・保存条件の解明が求められている。

従来行われてきた凍結材料内の氷結晶観察法は、直接観察法と間接観察法に大別される。直接観察法には、低温走査型電子顕微鏡 (Cryo-SEM)、冷凍顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡などがある^{3,6)}。間接観察には、試料の前処理により氷結晶を間接的に観察する凍結置換法、凍結固定法、凍結乾燥法などがある^{7,11)}。いずれの方法もミクロトームにより作成された凍結切片が対象であり、2次元の情報を得る観察手法である。しかしながら、氷結晶の成長は生体材料内で3次元的に起こるため、凍結や低温貯蔵に伴って生体材料内で起こる現象を、3次元的に観察する手法の開発が求められてきた。

そこで、都¹²⁾らはマイクロスライサ画像処理システムにより生牛肉試料内の3次元氷結晶構造計測手法を提案した。また、上野¹³⁾らは希薄溶液系材料内の氷結晶を3次元的に計測し、氷結晶断面形状 (長短径比)、体積などを定量化し、凍結速度との依存性を明らかにした。しかし、これらの方法は、試料の構成成分を蛍光染色など、試料の前処理を行う必要がある。蛍光観察法は、切片化された試料の観察が主な目的であり、立体試料における蛍光染色は困難である。また、氷結晶を直接に観察すると、氷結晶は無色透明であるため、氷結晶下部にその他の成分が存在する場合、試料表面が「透けて」観察される。このため、氷結晶とその他の成分の識別が困難であり、特に、その3次元構造の観察は困難であった。

一方、Sugiyama¹⁴⁾は、近赤外分光イメージングによりメロンの糖度分布を可視化した。近赤外分光イメージングは従来の1つの受光部によるポイント

測定であった近赤外分光法を2次元・3次元計測に拡張し、CCDカメラの各画素を分光器の受光部として扱うことにより、対象成分の定量・定性分析及びその分布の可視化を行う手法である。近赤外域における光の吸収は、分子構造の官能基の違いにより異なる波長で起こる。したがって、氷結晶には特有の吸収波長帯があり、その近傍では氷による光吸収とその他の成分による光吸収の強度が異なる。一方、水が氷に相変化する際、水を氷として折出させ純粋な水のみが氷結晶を形成し、その他の成分が氷結晶の外に分離される凍結濃縮・再結晶現象が起こる。したがって、凍結材料において、氷結晶の中には水分子しか含まれず、氷結晶とその他の成分に分離されている。

そこで本研究では、上述した近赤外分光イメージングを氷結晶計測に応用し、氷の吸収波長帯で凍結試料を観察することにより、水分子のみで形成される氷結晶とその他の成分の吸光度の違いを可視化することを着想した。具体的には、氷の吸収帯においては、吸光度の大きい氷結晶は暗く、その他の成分は明るく観察されるので、画像の暗い部分を抽出することにより、氷結晶構造を可視化することが可能であると考えられた。さらに、凍結試料の連続断面を以上の手法で観察することにより、氷結晶の3次元構造を明らかにすることが可能になると考えられた。

本研究の目的は、凍結試料の連続断面を近赤外分光イメージングにより観察し、得られた断面画像を3次元的に再構築する「マイクロスライサスペクトルイメージングシステム」を構築し、これを用いて希薄溶液系材料および生牛肉材料内の3次元氷結晶構造を可視化することにある。

2. 実験装置

2.1 マイクロスライサスペクトルイメージングシステム¹⁵⁻¹⁷⁾

本研究用に試作したマイクロスライサスペクトルイメージングシステム (Micro Slicer Spectral Imaging System: MSSIS) は、近赤外照明部、分光観察部、マイクロスライサ部から構成される (Fig. 1)。近赤外照射装置 (LA-100IR, 林時計工業社) は、近赤外線反射ミラー付ハロゲンランプと可視カットフィルタ (800 nm 以上透過) を内蔵し、近赤

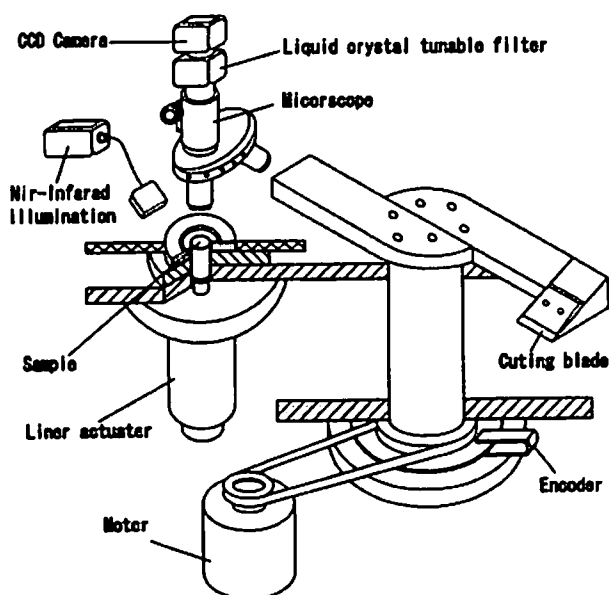


Fig. 1. Micro Slicer Spectral Imaging System

外領域の光で試料を照射する。分光観察部は顕微鏡 (BX-FLA, オリンパス社) および液晶チューナブルフィルタ (VS-NIR1-10-LC-20, Cambridge Research & Instrumentation, Inc, アメリカ) と CCDカメラ (Cool Snap ES, 日本ローパー社) で構成され 700~1,100 nm の範囲の分光画像を撮影する。マイクロスライサ部は, 試料をステップモータで駆動する一軸ステージで間欠的に押し上げ, その上端を回転刃により最小切削厚さ 1 μm, 最大 90 rpm で連続的に切削する。マイクロスライサ部により切削された試料の露出断面は分光観察部により順次撮影される。得られた一連の 2 次元分光画像情報にボリュームレンダリング法を適用することにより 3 次元像を再構築することが可能である。なお, 切削中の試料の融解を防止するために, マイクロスライサ部を冷却することにより試料の温度は -20°C に維持される。

2.2 プログラムフリーザ

プログラムフリーザは, フリーザ, プログラムコントローラ, 液体窒素ボンベおよび温度記録計により構成される。フリーザ上面部に設けた冷却銅板の温度は, 液体窒素の流量と電熱ヒータにより, 室温から -150°C の範囲で温度変動幅 ±0.5°C で一定値に制御可能である。本装置を用いることにより, 冷却銅板上の試料を任意の凍結条件にて凍結することが可能である。

3. 水および氷結晶の吸収スペクトル計測

3.1 分光画像の取得

MSSIS により近赤外分光における吸収スペクトルの取得が可能であることを確認するため, 透過法による水および氷結晶の吸収スペクトル¹⁰⁾計測を行った。まず, φ6×高さ 9 mm の円柱状のサンプルホルダを用意し, 水温 25°C の水を高さ 3,6,9 mm になるように注入した。それぞれのサンプルホルダの下から近赤外線を照射し, 液晶チューナブルフィルタの透過波長を連続的に変えることにより, それぞれの分光画像を 900 nm~1,100 nm の範囲で, 5 nm おきに撮像した。画像サイズは 1,392×1,040 ピクセル, 画像の階調度は 12bit (4,096 階調) であった。

3.2 分光画像処理

得られた分光画像には①暗電流ノイズ, ②バイアス電圧, ③各ピクセル感度ムラ, ④不均一な照明ムラが含まれているので, 天体観測における画像補正手法¹⁰⁾および Sugiyama¹⁰⁾の手法に準じ, ダーク処理及びフラット処理を行った後, これに標準白色板の平均輝度値を乗じることにより, ①~④を補正(補正画像)した。さらに, 吸光度の定義に従い, 以下のように補正画像の各ピクセルの輝度値を吸光度 (A) に変換した。

$$A = -\log\left(\frac{[\text{補正画像}]}{M}\right) = \log\left(\frac{M}{R}\right)$$

M: 標準白色板の平均輝度値

R: 補正画像の各画像における輝度値

3.3 水と氷の吸収スペクトル

以上の画像処理を行った後, 各計測波長ごとの分光画像における水部分の平均吸光度を求め, 連続的な吸収スペクトルを得た。さらに, スペクトルの加算的・乗算的な変動の影響を軽減し, 吸光ピークを強調するため得られたスペクトルを波長で 2 次微分した¹⁰⁾。2 次微分スペクトルにおいては, 原スペクトルの正の吸光ピークが負の吸光ピークに変換されることが知られており, Fig. 2 に示すように水の吸光ピークが 965 nm であることが分かった。この値

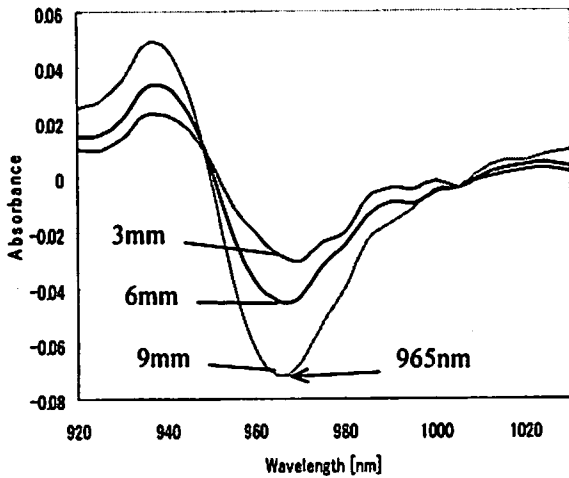


Fig. 2. Second-derivative absorbance spectra of water

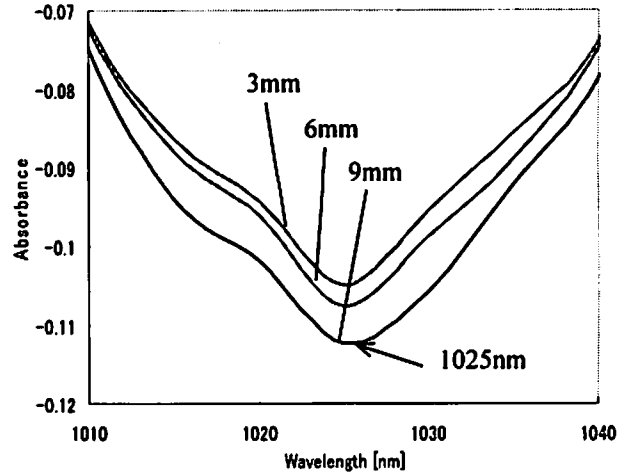


Fig. 3. Second-derivative absorbance spectra of ice crystals

は、阿部ら²⁰⁾により計測された水の吸収波長帯の範囲であることが確認された。

次に、本研究の計測対象である氷結晶の吸収スペクトルを計測するため、水の場合と同様のサンプルホルダを用意し、冷却温度 -15°C において、高さ3,6,9 mm になるように氷結晶を作成した。上述した手順と同様に、分光画像の取得、画像処理、吸収スペクトルの作成しを行った結果、Fig. 3に示すように氷結晶の吸収スペクトルを得た。また、氷結晶の吸光ピークは1,025 nm であり、これは阿部ら²⁾により計測された氷結晶の吸収波長帯の範囲であることが確認された。

以上のように、試作した装置により、生体材料の主な成分である水および氷の吸収スペクトルを取得可能であることが検証された。

4. 生体材料中の氷結晶計測

4.1 供試材料

氷結晶観察の供試材料として、モデル試料と食肉の2種類を用意した。モデル試料には、蒸留水に寒天1wt%を添加した希薄溶液を、生体材料には生牛肉を選び、生牛肉については筋繊維の方向に沿って切り出した。

4.2 計測法

Fig. 4にパラフィン製のサンプルホルダ($\phi 8 \times$ 高さ30 mm)および試料の固定状態を示す。サンプルホルダ下部に、安定した熱流束を得るために銅柱(ϕ

4 mm \times 高さ10 mm)を挿入し、その上部にモデル試料である希薄溶液を注入した。生牛肉の場合は、筋繊維を円筒形に切り出し、凍結包埋材であるOCT(Optimal Cutting Temperature)コンパウンドと共に銅柱の上に充填した。さらに、試料を一次元的に凍結するために、サンプルホルダ周囲を断熱し、プログラムフリーザを用いて試料を底面より冷却した。試料の凍結条件は、氷結晶を容易に観察するため、氷結晶サイズが大きくなる凍結法である緩慢凍結法を採用して、冷却銅板温度を -15°C に保ち、凍結開始から2時間後の試料を観察に供した。凍結した試料は、切削厚さ $5 \mu\text{m}$ にて連続的に切削し、液晶チューナブルフィルタの透過波長を氷の吸光ピークである1,025 nm に設定した。さらに、マイクロ

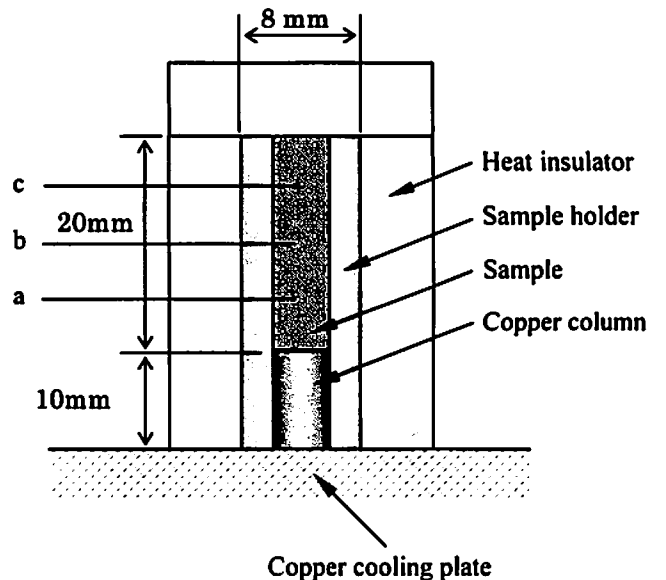


Fig. 4. Sample fixed in sample holder

スライサ部により切削，露出された試料表面の情報を得るために，試料の側面から近赤外線を照射し，冷却 CCD カメラで分光画像を順次撮像した。

モデル試料の断面画像は，画像解析ソフト (Image-Pro, Planetron, Inc, アメリカ) を用い，霜 (丸い白い領域：モデルと食肉試料) を除去し，2 値化処理を行った。さらに，2 値化画像を用い氷結晶の面積 (A)，相当楕円の長軸 (MA)，短軸 (MI)，長短軸比 (MA / MI) の計測を行った (Fig. 6)。

5. 結果および考察

5.1 氷結晶の可視化および3次元構造

Fig. 5 と 7 にモデル試料および生牛肉試料の断面画像および3次元再構築像をそれぞれ示す。3次元像は，銅柱からの高さ 5 mm を中心 (Fig. 4 :a) に上下の厚さ 0.8 mm 範囲の断面画像から再構築した。断面像は，再構築した3次元像における上部，中心部，下部に相当する。これらの画像は，氷結晶特有

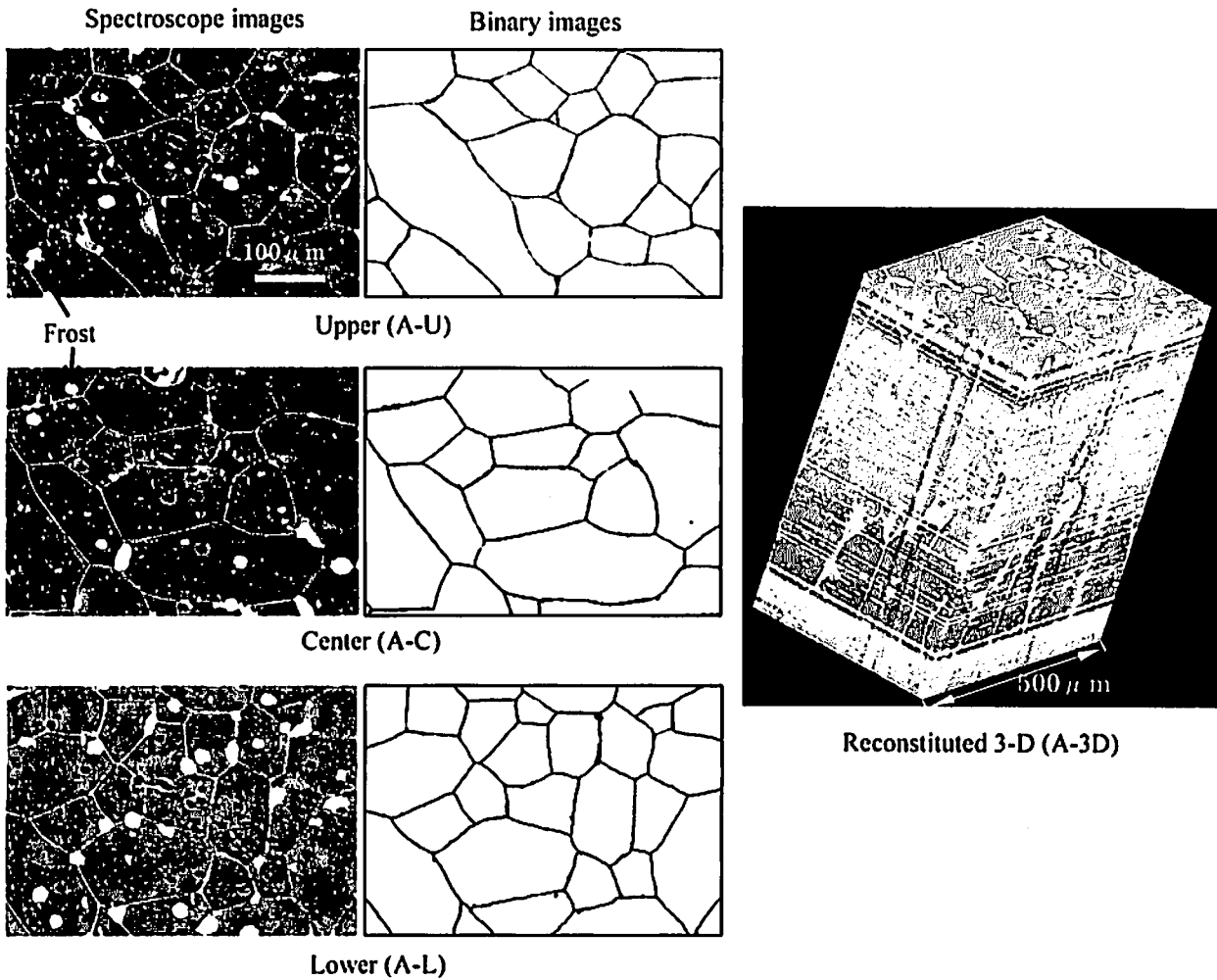
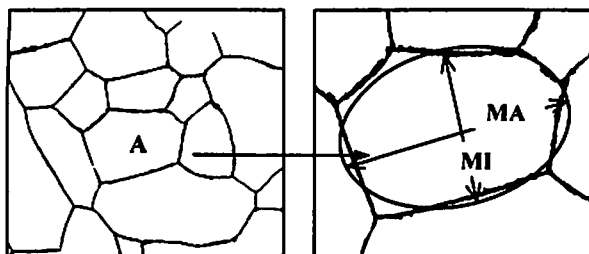


Fig. 5. Observation of ice crystals morphology (agar : 1wt%)



A : Area, MA : Major axis, MI : Minor axis

Fig. 6. Measurement of morphological properties

の吸収帯である 1,025 nm において，氷結晶とその他成分との輝度値の違いが明確に識別されることを示している。得られた断面画像の輝度は氷結晶部分が低く (暗く)，濃縮された寒天や氷結晶によって破壊された筋繊維細胞部分は高く (明るく) 観察され，氷結晶の可視化が可能となった。

5.2 氷結晶形態の計測

Fig. 5 にモデル試料の断面画像および2値化処理画像を示す。これらの断面画像において反転、収縮、膨張、穴埋めなどの処理を行うことにより2値化画像が得られた。Table 1 に160枚の2値化画像から得られた4,323個の氷結晶の形態特性を示す。氷結晶の平均面積は、 $6,253\mu\text{m}^2$ で、相当楕円長軸が $111\mu\text{m}$ であり、短軸が $62\mu\text{m}$ であることが分かった。また、氷結晶の大きさは、比較的に凍結速度が速い試料の下部 (Fig. 5:A-L) が小さく、凍結速度が遅い上部 (A-U) が大きく観察された。生牛肉の氷結

晶は、直径 $60\sim 150\mu\text{m}$ の不定形な形状であり、下部 (Fig. 7:B-L) では筋繊維との間に小さい氷結晶が生成し、上部 (B-U) は、氷結晶の成長により筋繊維が圧迫されていることが観察された。

再構築された3次元像 (Fig. 5:A-3D, Fig. 7:B-3D) から氷結晶の性状は熱流束方向に平行な連続的氷柱であることが分かった。これらの画像により、MSSISは、生体材料内3次元氷結晶構造の観察に有効であることが確認された。

6. 摘要

近赤外分光イメージングにより生体の凍結プロセスにおいて材料内に形成される氷結晶の3次元観察法を開発した。具体的には、従来のマイクロスライサ部に、近赤外分光イメージング法を応用することにより、「マイクロスライサスペクトルイメージングシステム:MSSIS」を構築し、これを用いて希薄溶液系材料および生牛肉材料内の氷結晶構造を3次元的に可視化した。

MSSISにより、水および氷結晶の吸収波長はそれぞれ 965nm 、 1025nm であることが確認された。

得られた分光画像の輝度は、氷結晶部分が低く、それ以外の部分が高く観察され、氷結晶の可視化が可能となった。また、モデル試料における氷結晶の形態特性を定量化した。さらに、これらの分光画像をボリュームレンダリング法により再構築することで、生体材料内3次元氷結晶構造の観察がされた。

本研究で開発した手法により、従来の氷結晶観察のような凍結乾燥、凍結置換、材料構成成分の染色などの試料の前処理

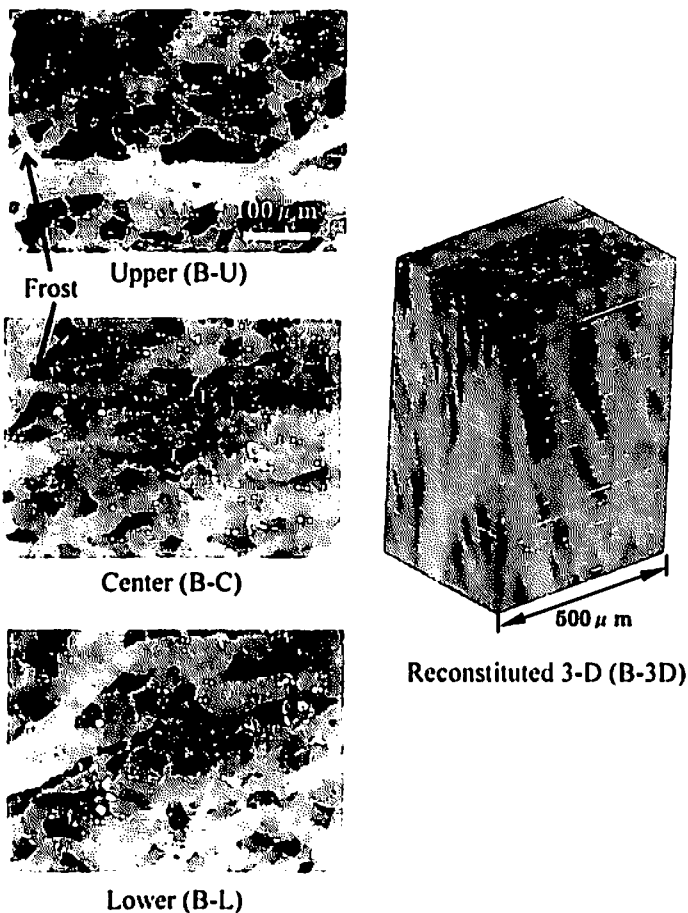


Fig. 7. Observation of ice crystals morphology (Raw beef)

Table 1 The morphological properties of ice crystals of agar dilute solution following freezing at -15°C

	Area [μm^2]	Major axis(MA) [μm]	Minor axis(MI) [μm]	Ratio (MA/MI)
Maximum	31,430	368	158	14
Minimum	17	6	3	1
Average	6,253	111	62	2
Standard deviation	5,654	58	30	1

が不要となり、かつ、材料の構成物質を直接に観察できること、さらに、材料内の成分情報の観察に応用出来る大きな特色がある。

本研究の手法は、氷結晶サイズやその形成・成長メカニズムの定量的な解析と、生体材料の凍結保存に最適な凍結・保存条件の解明の基礎研究として、今後、①生体材料内3次元情報解析、②人体組織臓器移植・齊帯血保存などの合理的冷凍操作法および装置開発の設計法、③医用臓器の最適凍結保存法により、自身の精巣組織あるいは卵巣組織の保存などに応用されると考えられる。

参考文献

- 1) 小島敏之, 相馬 正, 小栗紀彦:凍結及び乾燥研究会会誌, 34, 93(1998).
- 2) 葛西孫三郎:産婦人科の世界, 52, 913(2000).
- 3) B. Russell, E. Cheney and D. Wantling : J. Food Engineering, 39(2), 179(1996).
- 4) R. Donhowe, W. Hartel and L. Bradley : J. Dairy Science, 74(10), 3334(1991).
- 5) T. Kojima, N. Oguri, K. Shimada and H. Souzu : Cryo-Letters, 9(5), 348(1998).
- 6) A. Williamson, A. Lips, A. Clark and D. Hall : Powder Technology, 121(1), 74(2001).
- 7) D. Chevalier, A. Le Bail and M. Ghouil : J. Food Eng., 46(4), 277(2000).
- 8) J. Evans, J. Adler, J. Mitchell, J. Blanshard and G. Rodger : Cryobiology, 33(1), 27(1996).
- 9) T. Hagiwara, H. Wang, T. Suzuki and R. Takai : J Agricultural and Food Chemistry, 50(11), 3085(2002).
- 10) S. Bae, O. Miyawaki and Y. Yano : Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 57(10), 1624(1993).
- 11) H. Kang, Y. Tabata and Y. Ikada : Biomaterials, 50(11), 1339(2002).
- 12) 都 甲洙, 相良泰行, 田畑みづほ, 工藤謙一, 樋口俊郎:冷凍, 19(4), 375 (2002).
- 13) 上野茂昭, 都 甲洙, 相良泰行, 工藤謙一, 樋口俊郎:冷凍, 19(4), 381(2002).
- 14) J. Sugiyama : J.Agricultural and Food Chemistry, 37, 33 (1999).
- 15) 横田秀夫, 工藤謙一, 樋口俊郎, 相良泰行, 都甲洙:低温生物学, 44(1), 1(1997).
- 16) 都 甲洙, 相良泰行, 工藤謙一, 横田秀夫, 樋口俊郎:農業施設, 28(1), 21(1997).
- 17) 小林賢知, 樋口俊郎, 青木 勇, 工藤謙一:精密工学会誌, 61(1), 99, (1995).
- 18) 岩本睦夫, 河野澄夫, 魚住純:「近赤外分光法入門」, pp. 46-51, pp. 70-72, 幸書房, 東京(1994).
- 19) 福島英雄:「天文アマチュアのための冷却 CCD 入門」, pp. 133-188, 誠文堂新光社, 東京(1996).
- 20) 阿部英幸, 草間豊子, 河野澄夫, 岩本睦夫:分光研究, 44(5), 247 (1995).