

[原著論文]

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

1) (財) 神奈川科学技術アカデミー

2) 東京大学大学院工学系研究科

3) 東京大学大学院農学生命科学研究科

4) 日本大学大学院農学研究科

横田 秀夫¹⁾, 工藤 謙一¹⁾, 樋口 俊郎^{1) 2)},
相良 泰行³⁾, 都 甲 洙⁴⁾Observation and Measurement of Frozen Biological Sample by 3-Dimensional
Internal Structure MicroscopeHideo YOKOTA¹⁾, Ken-ichi KUDOH¹⁾, Toshiro HIGUCHI^{1) 2)}, Yasuyuki SAGARA³⁾, and Gab-Soo Do⁴⁾1) *Kanagawa Academy of Science and Technology, KSP Bldg, East 405-3-2-1**Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki, Kanagawa, 213-0012*2) *Department of Precision Machinery Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo*3) *Department of Global Agricultural Sciences, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo*4) *Department of Bioenvironmental and Agricultural Engineering, College of Bioresource Science, NIHON University*

Observation of internal structure of biological sample was carried out with newly developed 3-Dimensional Internal Structure Microscope (3D-ISM). A true colored 3-dimensional image of the sample with high resolution and high quality was obtained with this system compared with those image available with X-Ray CT, MRI or microtome used. The internal structure of a sample was obtained by observing each sliced side after each slicing, while the slicing and observing procedure was proceeded continuously. After repeatedly slicing a sample, the digital image data of the sectional views were transferred to a computer, where 3-dimensional image of the internal structure of the sample was reconstructed.

This report describes the observation and the measurement of the biological sample with a developed device.

(Received March 3; Accepted May 18, 1998)

1. 緒 言

[Key words: 3-Dimension internal structure, Image processing, Microscope, Measurement, Cutting ; 3次元内部構造, 画像処理, 顕微鏡, 計測, 切断]

植物や小動物の内部構造の観察や病理学における組織検査及び食品の内部の微細構造の観察は, その観察対象物をマイクロームなどを用いて切片にして

(2)

顕微鏡で観察していた。また、それらの立体標本の製作も同様な方法で行われていた。この手法では形状情報の質が観察切片作成の良否によって左右される。また、試料が大きい場合や情報の質を上げる場合、膨大な量の切片を製作しなければならず、非常に労力のかかる作業であった¹⁾。

近年、科学技術の発達により、MRI (Magnetic Resonance Imaging)、超音波、X線等を用いたCT (Computed Tomography) スキャナーが開発され、試料を破壊することなく、コンピュータ上で三次元像を構築して、正確な内部構造の観察を行うことができるようになった²⁾。しかし、微細な生物や細胞などの観察には上記のCTスキャナーなどの分解能では不十分である。また、微細な内部構造を非破壊で観察する方法として共焦点レーザー顕微鏡が開発されている³⁻⁶⁾。しかし、共焦点レーザー顕微鏡は試料が十分に透明でないと観察できないため、不透明な試料や大型の試料の観察には適さない。

我々は、試料を極薄くスライスして、スライスされた切片を観察するのではなく、スライスされる断面を観察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を考案して、種々の試料の観察を行ってきた⁷⁻¹⁰⁾。

本システムは、試料断面を観察することから、切片を作成する必要がなく、短時間に試料全体を観察することができる。また、観察時に試料の位置が変化しないため、立体像の構築も容易である。さらに、観察した断面画像をレーザーディスクに画像信号として記録しておくことにより、いつでも高品質な情報を取り出すことができる。但し、CTや共焦点レーザー顕微鏡などの非破壊検査とは異なり破壊検査であるため、試料の破壊を伴う。しかし、内部を実際に露見しながら観察を行うため、光学顕微鏡での観察に近い色情報を得ることができる利点がある。本研究では、開発したシステムを用いて生体試料の内部構造の観察と計測を試みたので報告する。

2. 実験装置

試作した3次元内部構造顕微鏡 (マイクロサイサ画像解析システム) は、Fig. 1 に示すように試料の断面を作成するマイクロサイサ、断面観察部、

画像記録装置、これらを統括する制御部、および画像処理部から構成されている。Fig. 2 に試作した小型 ($\phi 8 \times 20\text{mm}$) 試料用観察装置 (以下スライサ2号機) を示す。Fig. 3 にスライス部の構成を示す。試料は試料ホルダーに固定され、試料の下端をステッピングモータとボールネジを用いた直動機構により、下から押し上げられる。試料送りのストロークは22mm、送りの分解能は $0.1\mu\text{m}$ である。最少 $0.5\mu\text{m}$ の試料上端の送りを実現した。スライス用の刃は、マイクローム用ディスポーザブルナイフ、ダイヤモンドナイフ、または、ガラスナイフを用いる。各ナイフは、ACモータにより回転されるカッティングアームに装着され、試料上部をスライスする。観察試料に凍結試料を想定しているため、投げ込み式クーラーによりスライス部を -50°C まで冷却する。試

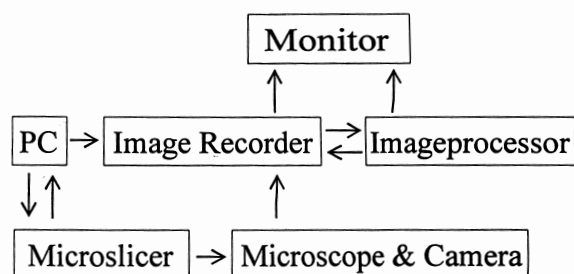


Fig.1. Block drawing of 3-dimensional internal structure microscope system.

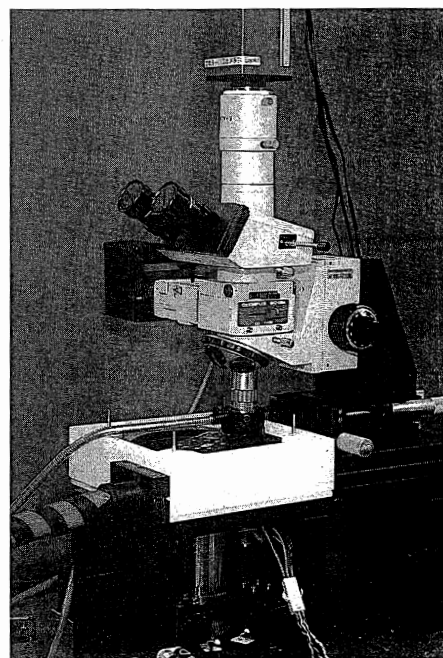


Fig.2. Outlook of the micro slicer (For the small sample).

料の切削断面の観察には落射光学顕微鏡 (BH2:OLYMPUS) と高倍率の観察のために高感度 CCDカメラ (ICD-880:Ikegami) を用いる。また、対物レンズと試料の間を回転するナイフが通過できるようにするために、超長焦点距離 (100倍で13mm) の対物レンズ (M Plan Apo:Mitutoyo) を用いる。

Fig. 4 に大型の試料用観察装置 (以下スライサ 4 号機) を示す。Fig. 5 にスライス部の構成を示す。大型の試料の観察に対する要求に応じるために観察可能な試料サイズを $56 \times 46 \times 100$ mmに設定した。試料の送り機構にはステップモータ駆動の精密ステージを利用して、送りのストローク100mm, 送りの分解能は $10 \mu\text{m}$ を可能としている。スライス用のナイフはマイクロトーム用ディスプレイブルナイフまたは、超硬合金製のナイフを用いる。凍結試料の観察のために装置内部に冷却した冷媒を循環させ、試料を -25°C まで冷却する。試料断面の観察にはCCDカメラ (DXC-930:SONY) とレンズ (マクロレンズ PH7 \times 10BM:Canon, クローズアップレンズ CL-UP67

-240:Canon) を用いる。各装置の試料送りと断面画像の記録は回転刃の主軸に取り付けたエンコーダからのトリガ信号により制御する。CCDカメラからの断面画像は追記型レーザービデオディスクレコーダ (LVR-3000AN:SONY) にアナログデータとして記録した。記録したデータはビデオ入力ボードを通してグラフィックワークステーション (TITAN2-900:クボタコンピュータ) により、デジタルデータとして、MO (光磁気ディスク) に記録する。

3. 立体画像の構築

記録した断面画像を元に立体像を構築する場合、ワイヤーフレーム法やサーフェース法など、様々の画像処理方法がある^{12,13)}。本システムでは試料の内部を観察するために、表面データのみの立体像ではなく、中身の詰まった立体像をボリュームレンダリング法を用いて構築した。一般にボリュームレンダリング法によって構築する対象はX線CTやMRIのデータであり、これらはモノクロである¹³⁾。そのため、

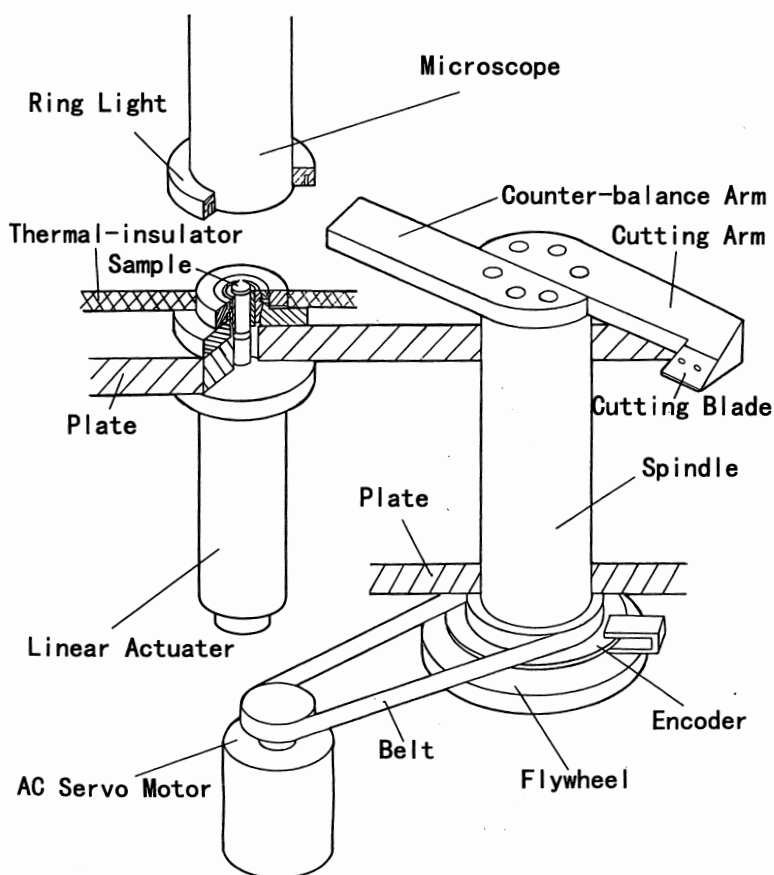


Fig.3. Structural drawing of the microslicer (For the small sample).

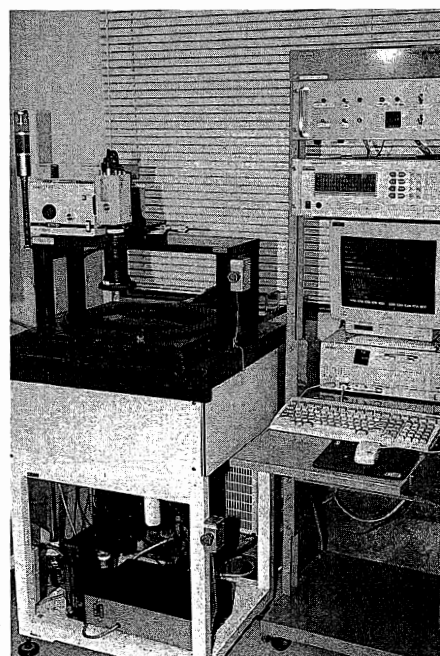


Fig.4. Outlook of the microslicer (For the large sample).

(4)

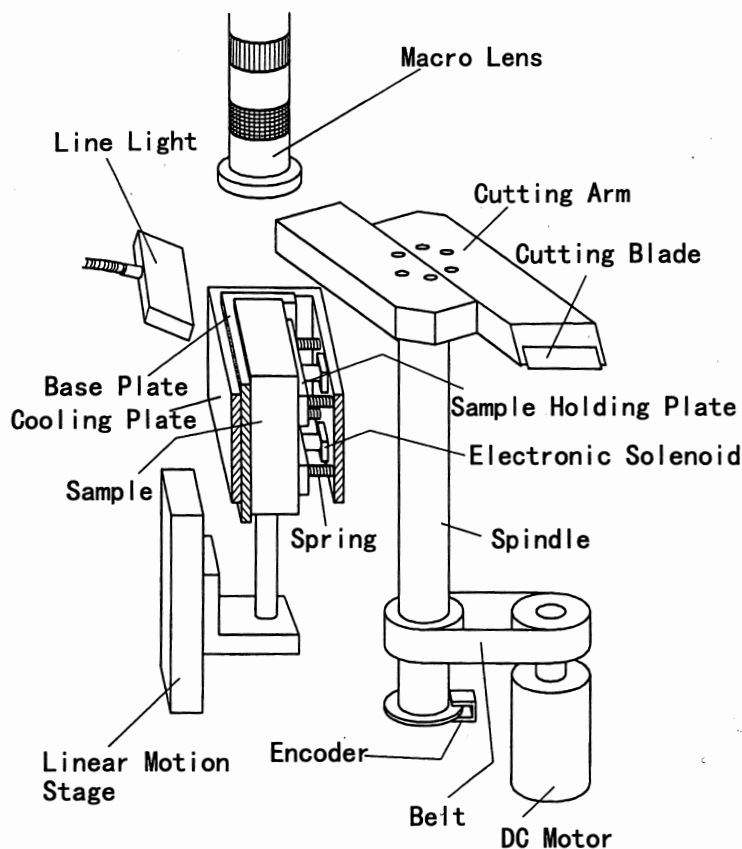


Fig.5. Structural drawing of the microslicer (For the large sample).

一般的におこなわれている多値化処理ではカラーの情報を扱うことができない。この問題を解決する方法としてR.G.B. (Red, Green, Blue) の三原色それぞれの値を多値化して、その色立体に含まれるか否かで判断する方法が開発され、疑似カラーの立体像の構築が可能となった⁷⁾。今回、さらに画像処理に改良を加え、断面画像内の試料の持つ色情報全てを利用し、フルカラーの立体画像を構築した。Fig.6にその手順を示す。レーザーディスクに取り込んだ情報をワークステーション上で断面像として重ねあわせることで三次元像が構築される。フルカラーのボリュームレンダリング法を用いて立体像を作成する為には、RGBという色情報だけでなく、 α という透明度の情報が必要である。しかし断面の画像はRGBの画像情報しか持っていない。そこで、観察した画像のRGBの情報のいずれかの値を透明度 α に設定し、包埋剤を除去して試料のみの立体画像を構築した。また、この透明度を利用して不必要な部分を透明にして立体像を構築することで、実際には切断していない断面の情報を得ることが可能である。

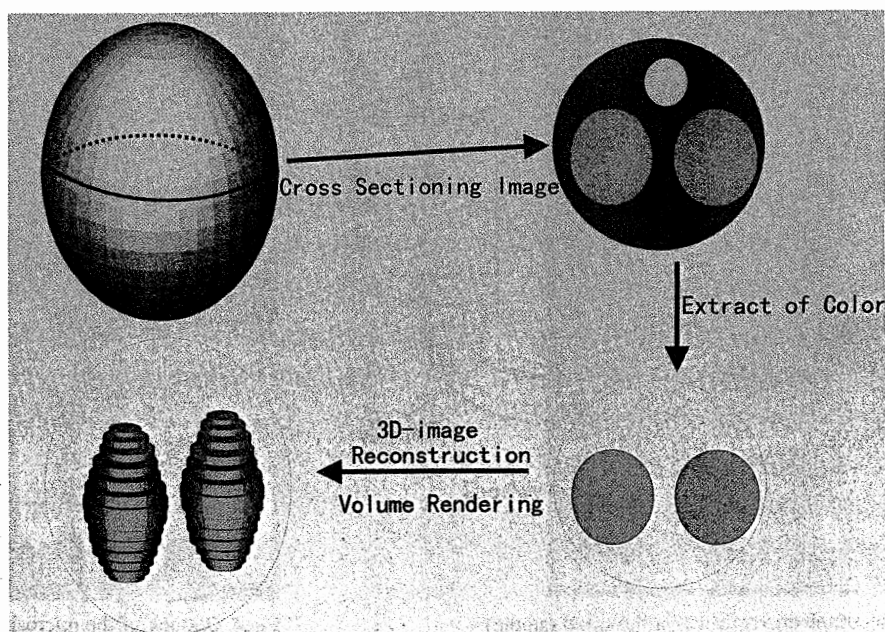


Fig.6. Schema of 3D-image reconstruction.

立体像の構築は、先に述べたグラフィックワークステーションと画像可視化ソフト (AVS:AVS) をベースに新たに開発したフルカラー処理が可能なモジュールを組み合わせて行った。構築したフルカラーの立体像は試料の持っていた色をそのまま持つために、試料内の色の変化を詳細に観察することができる。

4. 観察結果

微小な試料の観察例としてブロッコリの観察を試みた。Fig. 7 (a) にスライサ 2号機で観察したブロッコリーの花芽 (先端部) の断面像を示す。柔軟な試料をミクロンオーダーで切削するために凍結包埋を行った。試料を凍結包埋剤 (OCT コンパウンド: Miles) に包埋して -35°C で凍結した後、 $2\mu\text{m}$ の厚さでスライスした。切削枚数は1500枚、観察に要した時間は約20分であった。Fig. 7 (b) に構築した立体像を示す。試料の持つ色をそのまま表示することができる。Fig. 7 (c) に構築した立体像の任意断面を示す。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可能であった。

昆虫の観察例として蚕の繭と蛹の観察を試みた。試料は繭を造り2日後の蚕を用いた。観察対象を黒色に着色した凍結包埋剤 (ズダンブラック0.5%添加 OCTコンパウンド) に包埋して -35°C で凍結した後、スライサ 4号機で観察した。包埋時には繭内部に凍結包埋剤を浸透させるために、繭に18Gの注射針で穴を空けて包埋剤を注入した。切削条件はスライスの厚さ $30\mu\text{m}$ 、ナイフの回転数 90rpm、切削枚数1400枚、観察に要した時間は約15分であった。Fig. 8 (a) に観察した蚕とその繭の断面画像を示す。断面画像の円を示す部分が繭であり、その内部に蚕の蛹が認められる。Fig. 8 (b) に断面像を元に構築した立体像を示す。繭を再構築することが出来た。Fig. 8 (c) に実際には切断していない任意切断像を示す。蚕と繭を切断したように画像処理を行った。繭の内部に蛹が入っていることが分かる。また、蛹体内の様子も観察することが出来た。

植物の観察例として接ぎ木したキュウリの接ぎ木部の観察を試みた。キュウリの接ぎ木の根より色素

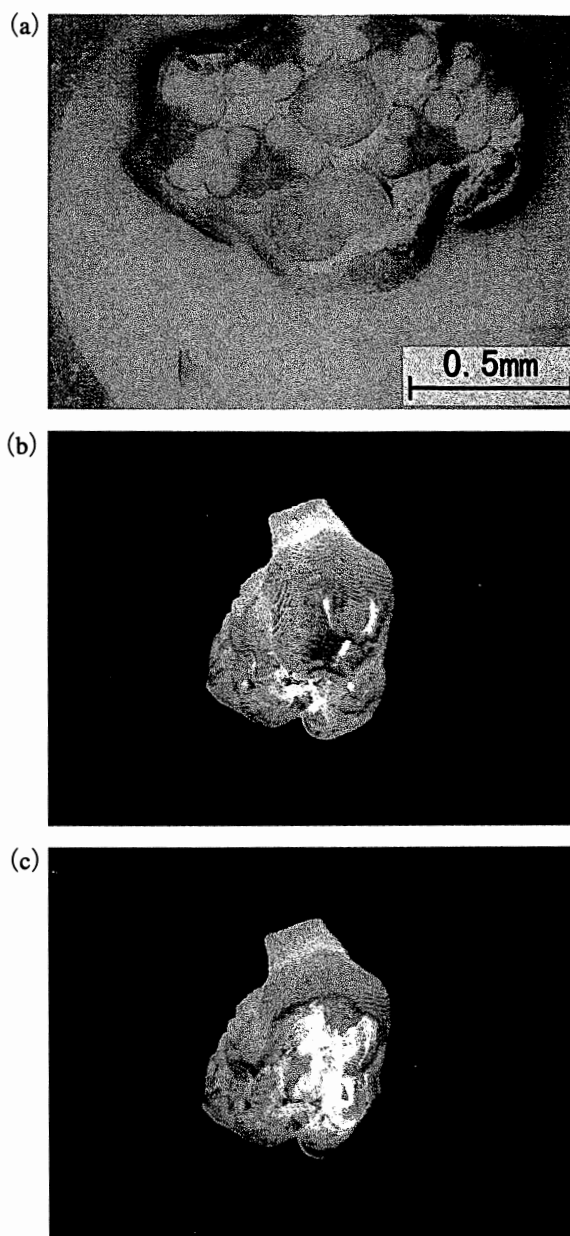


Fig.7. Broccoli

(a)Sectional image of broccoli (b)3-dimensional image of broccoli (c)Alternate view angle of broccoli 3-dimensional image.

を吸引させ、接ぎ木の導管を染色した。色素には2%食品添加物色素赤色3号を用いた。染色後、接ぎ木部のみを切り出し、凍結包埋剤に包埋して -35°C で凍結した。凍結した試料は厚さ $30\mu\text{m}$ 、ナイフの回転数90rpmでスライスした。切削枚数1000枚、観察に要した時間は20分であった。Fig. 9 (a) にスライサ 4号機で観察した接ぎ木したキュウリの断面像を示す。茎内部の黒色の部分 (元絵は赤色) が導管の部分である。Fig. 9 (b) に構築した立体像を示す。Fig. 9 (c) に導管部のみを色抽出して構築した

(6)

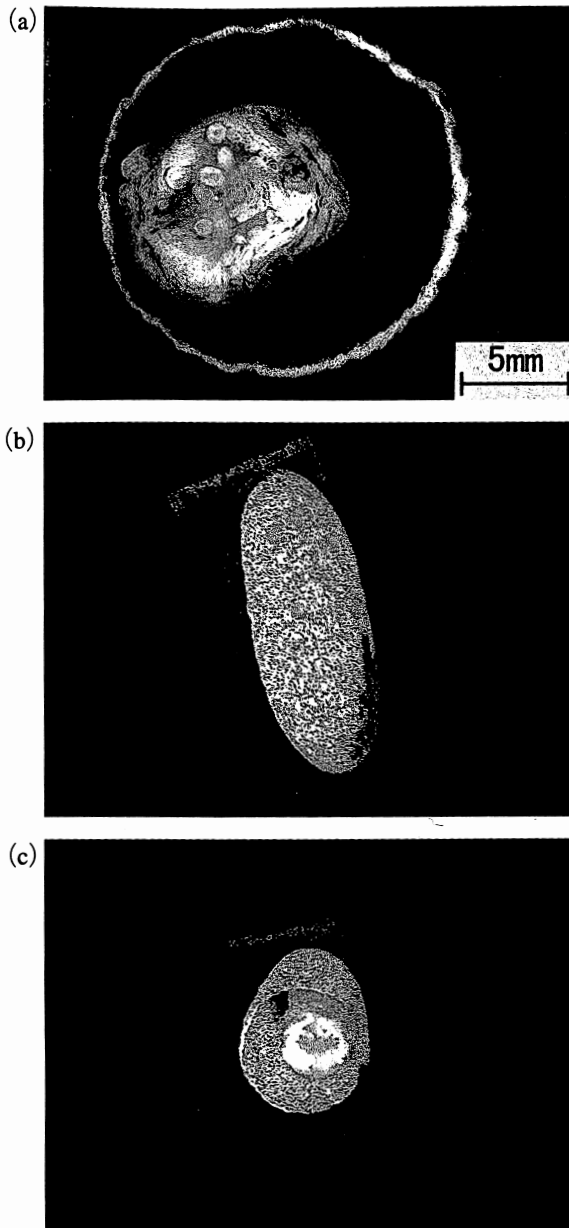


Fig.8. Silkworm and Cocoon

(a)Sectional image of silkworm and cocoon (b)3-dimensional image of silkworm and cocoon (c)Alternate view angle of silkworm and cocoon 3 dimensional image.

立体像を示す。キュウリの接ぎ木部分の導管の走行が明らかになった。以上のように、試料内部の特定の部分のみを抽出し、その構造を観察することも可能であった。

5. 試料内部の計測

3次元内部構造顕微鏡を用いて記録した断面画像は画像情報だけではなく、試料の相対的な大きさの情報も有している。また、試料の切削時の厚さは一定であることから、試料内部の大きさの計測が可能

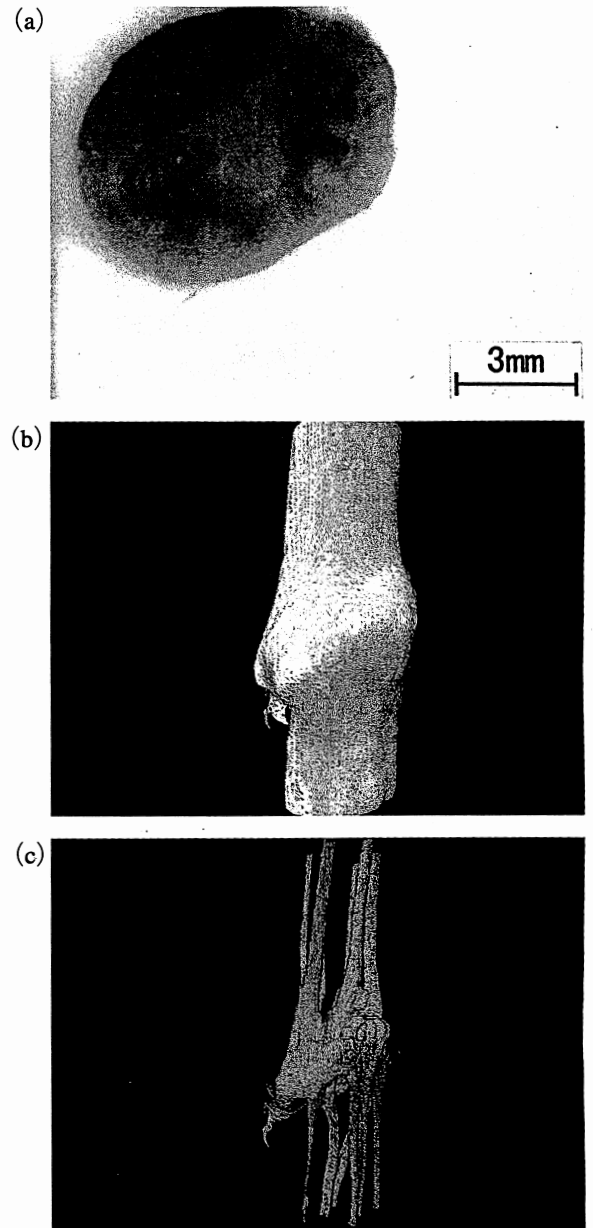


Fig.9. Grafting of Cucumber

(a)Sectional image of grafting of cucumber (b)3-dimensional image of grafting of cucumber (c)Extracted capillary tube of grafting of cucumber.

である¹⁴⁾。そこで、3次元内部構造顕微鏡と画像計測装置(汎用画像処理装置 SPICCA II:日本アビオニクス)を用いて試料内部の計測をおこなった。試料断面内の計測希望部を色抽出(HSV表色法)し、その面積、周囲長を測定した。切削切片(実際には切片は存在しないが)の厚さ内の試料の大きさは同じと仮定して、試料の体積、表面積を求めた。

5.1 計測精度の検討

試料の計測に先立ち、計測精度の検討をおこなった。Fig.10にその手順を示す。検討には円錐型のテ

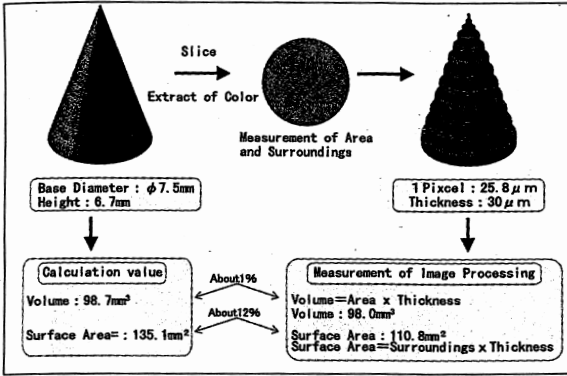


Fig.10. Verification of measurement accuracy.

ストピース (φ7.5mm 高さ6.7mm) を用い、ノギスを用いて測定した値と3次元内構造顕微鏡に画像処理装置を組み合わせた計測値の比較をおこなった。スライスは、試料を凍結包埋剤で包埋し、 -35°C で凍結した後にスライサ4号機を用いておこなった。切削条件は切削の長さ $30\mu\text{m}$ 、ナイフの回転数90rpm、超合金製ナイフを用いた。試料をスライスした後、画像処理装置を用いてすべての断面画像内の試料の面積、周囲長を計測して、体積、表面積を求めた。断面画像の1画素(分解能)は $25.8\mu\text{m}$ であった。試料の円周と高さから求めた体積は 98.6mm^3 、3次元内部構造顕微鏡と画像処理装置を用いて計測した体積は 97.6mm^3 、両者の測定の差は約1%であった (Fig.10)。試料の円周と高さから求めた表面積は 135.1mm^2 、3次元内部構造顕微鏡と画像処理装置を用いて計測した表面積は 145.5mm^2 、両者の測定の差は約8%であった (Fig.10)。次に、計測の分解能と測定値の精度について検討を行った。測定分解能を変化し、その際の計測値と実際の体積表面積を比較した。Fig.11に実測値を100%とし

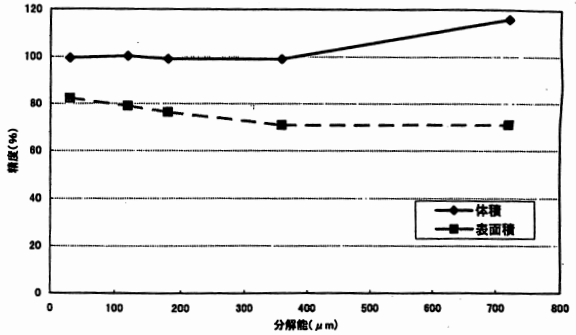


Fig.11. Verification of resolution and measurement accuracy.

た際の分解能と精度の関係を示す。その結果、体積の計測では1画素 $360\mu\text{m}$ 以下の分解能で計測値が収束していた。この事は、検証に用いたストピースの測定には最大 $360\mu\text{m}$ の分解能で十分であることを示している。一方、表面積の計測は、今回の分解能では計測値が収束せずより高い分解能が必要であることが分かった。

6. 計測結果

果実の種子の大きさの測定をおこなった。アメリカンチェリーと佐藤錦を凍結包埋剤に包埋して、 -35°C で凍結した。凍結した試料をスライサ4号機に装着して切削の厚さ $30\mu\text{m}$ 、ナイフの回転数90rpmの条件で観察した。切削枚数2000枚、観察に要した時間は約20分であった。観察した断面画像を元に画像処理をおこない、果実とその種子の体積を計測した。

Fig.12 (a) に佐藤錦断面画像を、Fig.12 (b) にアメリカンチェリーの断面画像を示す。Fig.13 (a)、(b) に断面画像中の種と思われる部分を抽出した2値化画像を示す。全ての観察画像の2値化した部分の

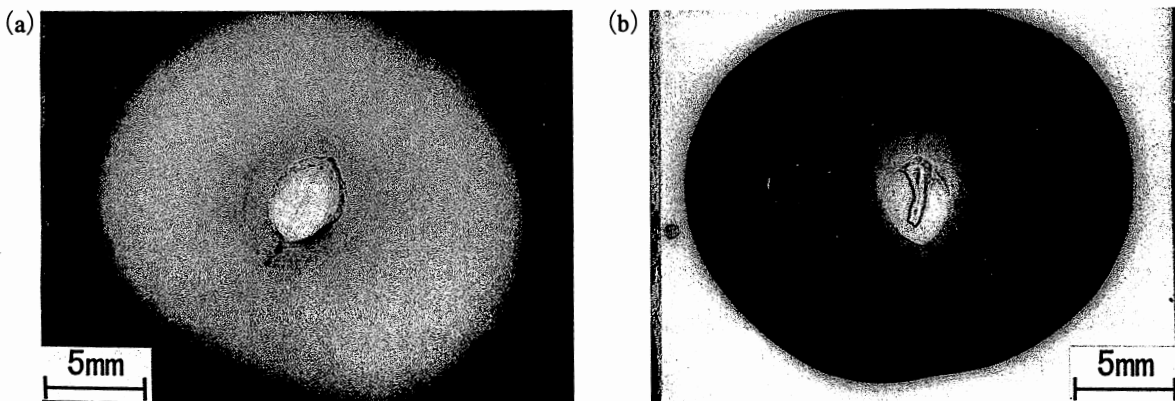


Fig.12. Cherry

(a) Sectional image of Japanese cherry (satounisiki) (b) Sectional image of American cherry.

(8)

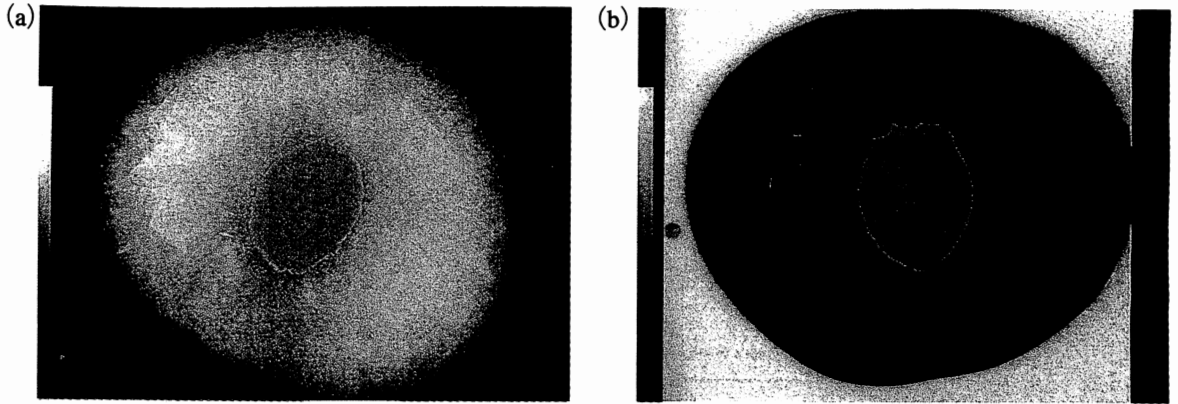


Fig.13. Extracted stone of cherry
(a) Japanese cherry (b) American cherry.

面積を元に体積を算出した。佐藤錦の果実は 5.44cm^3 、種子の体積は 0.26cm^3 であった。アメリカンチェリーの体積は 5.64cm^3 、種子の体積は 0.32cm^3 であった。この測定値が妥当であるか、測定精度の検証を行った。検討には分解能の影響を受けやすい小型の試料であるアメリカンチェリーの種子を用い、計測の分解能を変化させて行った。Fig.14に計測の分解能と計測値の関係を示す。分解能 $360\mu\text{m}$ 以下で計測値が安定していた。この計測は、観察の分解能は、厚さ $30\mu\text{m}$ 、水平方向 $90\mu\text{m}$ であった。この事より、今回の計測結果が妥当であると判断できた。

佐藤錦とアメリカンチェリーの計測結果から、それぞれの種子の占める割合を比較した。種子の占める割合は、佐藤錦は 4.8% 、アメリカンチェリーは 5.7% であった。以上の比較より、アメリカンチェリーに比べて佐藤錦は果肉の占める割合(可食部)が大きいことが明らかとなった。

7. 考 察

試料をスライスすることにより正確な内部情報を取り出し、そのスライス断面から立体像を構築し、試料の内部構造を観察することができた。また、一度観察した断面画像を元に、実際には切断していない面や、内部の色情報から特定の部分を抜き出して観察することも可能であった。観察に要する時間は数時間であり、連続切片を作成する方法に比べて非常に短時間であった。また、熟練した技術や特殊な能力を必要とせず、試料内部の観察を容易に行うことが可能であった。さらに、構築した立体像から試料の表面積、体積を求めることも可能であった。こ

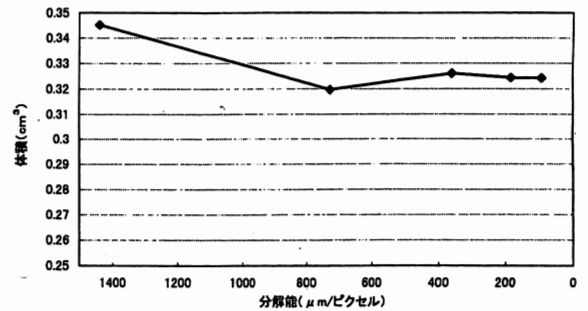


Fig.14. Verification of measurement accuracy (Sample:cherry stone).

の計測には対象物に適した分解能が必要である事が分かった。

今回採用した画像処理法は、表示していない部分の画像情報も用いるためにデータ量が多くなる。そのため、高い処理能力を有するコンピュータが必要である。しかし、コンピュータの能力は急速に向上していることから、近い将来にはパソコンによる処理が可能になると思われる。

本観察法により、従来困難であった試料の内部や複雑な形状の観察と計測が可能となった。我々が開発した装置により、生物学、医学、農学、食品分析学などの多岐の分野に新たな発見をもたらすと思われる。

参考文献

- 1) 神沼, 南川: 「バイオテクノロジーとコンピュータ利用」 神沼編, シーエムシー, 東京, p.165, (1985).
- 2) 戸川: 計測と制御, 31-1, 204 (1992).
- 3) 石川: 細胞, 23, 72 (1991).
- 4) 増田, 花井: レーザ顕微鏡研究会第9回講演会論文集, 48, 東京 (1992).

- 5) 加藤, 狩野, 藤原: 細胞工学, **15-4**, 512 (1996).
- 6) 加藤, 村上: 細胞, **23**, 76, (1991).
- 7) 小林, 樋口, 青木, 工藤: 精密工学会誌, **61-1**, 100 (1995).
- 8) 工藤, 樋口, 横田, 佐藤: 第33回日本エム・イー学会大会論文集, 323 (1994).
- 9) 横田, 樋口, 工藤, 佐藤: 第34回日本エム・イー学会大会論文集, 181 (1995).
- 10) Yokota, H. Kudoh, K. and T. Higuchi: Proc. of International Conference on Agricultural Engineering., Vol. 2, 833, Spanish Association of Agricultural Engineering, Madrid (1996).
- 11) Yokota, H. Kudoh, K. Sato, K. and T. Higuchi: Proc. of Microscopy & Microanalysis '97, **3-2**, 243, Microscopy Society of America, New York (1997).
- 12) Kaufman Arie (藤代訳): PIXCEL, **116**,146 (1992).
- 13) 周藤: 可視化技術, **12-45**,13 (1992).
- 14) 都, 相良, 工藤, 横田, 樋口: 農業施設学会誌, **28**,1,21 (1997).