

# 生体材料内 3 次元氷結晶構造計測法の開発

都 甲洙 Gabsoo-do

dogabsoo@iml.u-tokyo.ac.jp

## 1. はじめに

一般に生体材料は多様な物質を含む不均質多成分系として存在しているが、「水」は、大部分の凍結材料に共通して含まれる主要成分の一つである。生体の凍結は材料内に含まれる水の相変化現象であり、凍結に伴って氷結晶が生成される。凍結乾燥を施す食品においては最終製品の内部に発生する空隙が氷結晶の跡である。すなわち凍結により形成される氷結晶のサイズ・形状および分布は凍結乾燥特性および最終製品の品質、特に凍結材料のテクスチャに大きな影響を及ぼすことが知られている。

本研究の目的は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を立体的に観察し、さらに、氷結晶の構造、サイズおよびその材料内分布などについて定量的に計測する方法を開発することにある。具体的には供試材料に生牛肉を選び、その組織を蛍光染色することによって氷結晶と組織を識別し、マイクロスライサ画像処理システムにより冷凍食品内氷結晶を 3 次元的に観察する方法を開発した。

## 2. 実験装置

### 2.1 マイクロスライサ画像処理システム

本研究用に試作したマイクロスライサ画像処理システムのブロック図を図 1 に示す。本システムはパラフィンおよび凍結包埋した試料を連続的に切削、すなわちマルチスライシングして、その断面を露出させるマイクロスライサ部を含む 断面像作成装置、露出した二次元断面像を CCD カラーカメラで取り込む 断面画像取込装置、取り込んだ原画像をレーザーディスクに収録する 画像記録装置、記録した原画像の情報に基づきボリュームレンダリング法により 3 次元画像を再構築したり、実際には切断していない任意の試料断面画像を再構成して表示するなど、画像情報処理を行うワークステーションとしての機能を有する 3 次元画像構

築装置、マイクロコンピュータにより上記装置のスライスと の記録タイミングを同期させるための信号を発生する 信号発生器及び で撮像中の画像や に収録された原画像、さらに で得られた再構築画像を観察者に表示するための モニタで構成される。

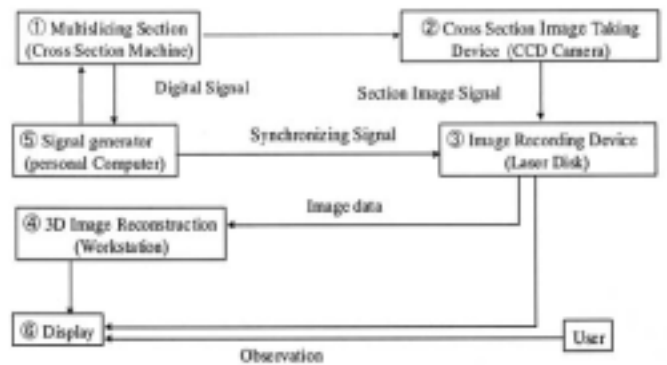


図 1 システムブロック図

### 2.2 スライサ部の構成と機能

本システムの特徴は図 2 に示したマイクロスライサ部における切削・撮像方式にある。すなわち、通常の顕微鏡観察等で行われるように試料から切り取った観察用切片の画像を取り込む方法を取らず、包埋剤で冷却固定化した試料をマイクロスライサによりマルチスライシングして得られる試料自体の露出断面像を順次撮像する方式を採用した点にある。この方式の採用により試料の変形を少なくし、また、固定試料の作成にも熟練を要しない等の利点が得られた。

断面像は CCD カメラと蛍光顕微鏡を組み合わせで撮像した。試料はライナアクチュエータモータで駆動する一軸ステージで間欠的に押し上げ、その上端を連続的に切削した。切削用ナイフには試料によりマイクローム、ダイヤモンド、ガラスナイフを選択して用い、回転数 90rpm で回転するスピンドル上端部に装着したカッティングアームの先端部分に取りつけられる。また、スピンドルは AC モータとタイミングベ

ルトにより駆動する機構となっている。この機構による試料の最小切削厚さは、押し上げストローク 20mm に対し  $1\mu\text{m}$  である。試料の押し上げと断面画像の記録のタイミング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。試料断面像は光学あるいは蛍光顕微鏡と CCD カメラおよび超長焦点距離の対物レンズ (M Plan Apo: Mitutoyo) を用い 100 倍まで観察可能である。

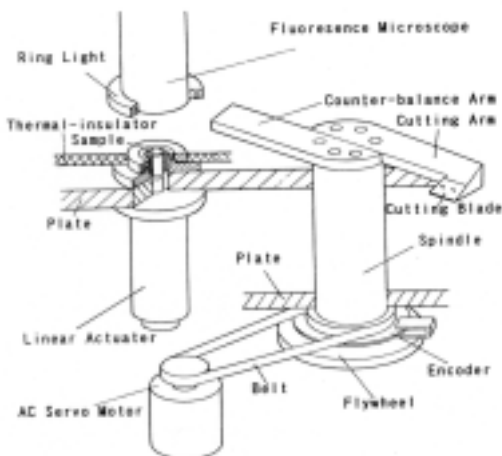


図2 マイクロスライサ部構成

### 2.3 システムの料送り精度と3次元構築法

3次元再構築において最も重要なことは切削厚さである。その精度は過電流式センサであるマイクロセンスを用い、真鍮製の土台上部の変異量を非接触で計測した。試料の送りは  $0.5\sim 50\mu\text{m}$  まで可能であり、ライナアクチュエータモータは連続的に安定した送り動作を行っていることを確認した。

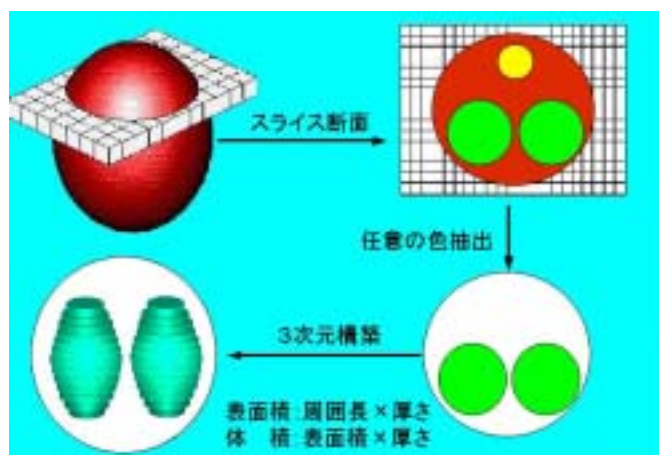


図3 3次元再構築概念図

一時記録した断面画像を利用して立体像を再構築する方法として、ワイヤーフレーム法やサーフェス法などの画像処理法があるが、表面データのみでの立体像ではなく、内部情報の観察が可能なボリュームレンダリング法を採用した。図3に示したようにスライスして得られた断面画像を二値化処理を行い、これらを積み上げるにより3次元立体を構築する。また、材料の表面積と体積は切削厚さにそれぞれ断面画像の周囲長と面積を乗じることにより求められる。

## 3. 供試試料および方法

### 3.1 試料の準備

供試試料に生牛肉を選び、筋繊維の方向に沿って切り出し、これを濃度  $10\mu\text{M}$  の蛍光試薬 (CellTracker™ Blue CMF<sub>2</sub>HC, Molecular Probes) 溶液に約3時間浸漬して染色した。この試料を  $-30^\circ\text{C}$  で3時間凍結した後、厚さ  $20\mu\text{m}$  で切削し、蛍光顕微鏡により観察を行った。蛍光試薬により染色された筋繊維を図4に示す。生牛肉細胞内に取り込まれた蛍光性のクロロメチル誘導体はタンパク質と結合し蛍光標識体を形成した。これにより牛肉細胞と凍結によって生成される氷結晶の識別が可能となった。

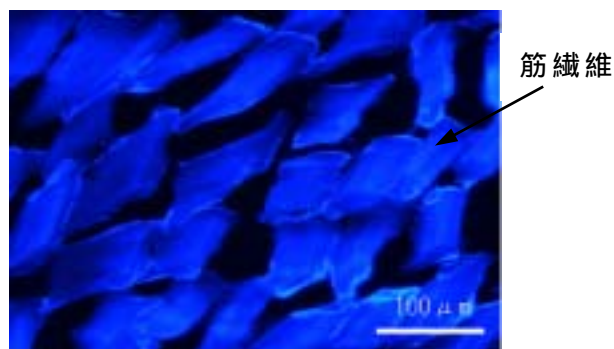


図4 蛍光試薬により染色された筋繊維

### 3.2 計測法

図5にパラフィン製のサンプルホルダおよび試料の固定状態を示す。供試材料である牛もも肉を円筒形 ( $4\times 15\text{mm}$ ) に切り出し、染色した後、図5に示すパラフィン製サンプルホルダに充填した。試料凍結中の熱流速を計測するために、試料底部に銅柱を挿入、さらにサンプル

ルホルダの外周囲を発泡スチロールで断熱した。また、サンプルホルダ下部から5mm間隔で熱電対を挿入し、凍結プロセスにおける温度分布の経時変化を測定した。液体窒素ガスを冷媒とするフリーザー上面部に設けた冷却銅板は一定温度に制御され、この冷却版により試料底面より冷却される。凍結食品中に生成する氷結晶の大きさは最大氷結晶生成帯(0 ~ -5)通過時間に影響されるため、試料の凍結は氷結晶が大きくなる緩慢凍結(-15)と氷結晶が小さくなる急速凍結(-120)をそれぞれ2時間行った。凍結した試料は蛍光顕微鏡を用い、切削回転数60rpm、切削厚さ5μmで連続的にスライスし、画像を記録した。

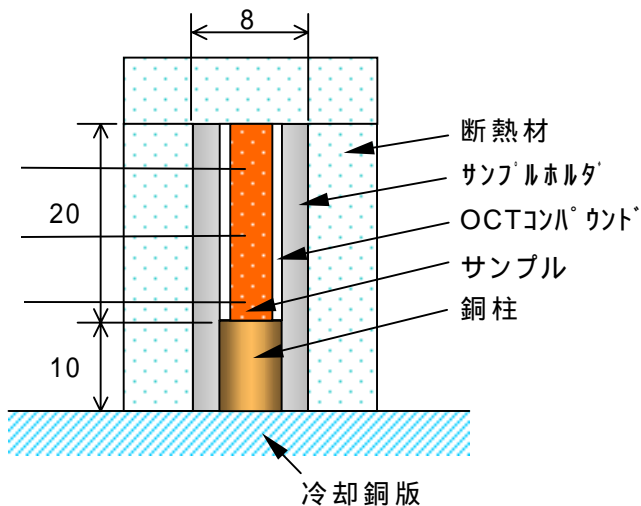


図5 サンプルホルダと試料の凍結固定

#### 4. 結果及び考察

##### 4.1 凍結牛肉中の氷結晶観察

図6と7に蛍光染色した試料を設定温度-15 (Slow freezing:S)、-120 (Quick freezing:Q)でそれぞれ2時間凍結した試料の断面画像と3次元構築像を示す。3次元構築像は図5に示した温度測定箇所を中心し厚さ1mm(上下0.5mm)範囲の断面画像から再構築した。断面画像は再構築した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、蛍光染色により蛍光を発している組織と発していない氷結晶が明確に識別されている。

図6のS-U,C,Lに示す設定温度-15の試料断面画像に観察された氷結晶は、直径70~150μmの丸みを帯びた不定形な形状であり、筋織

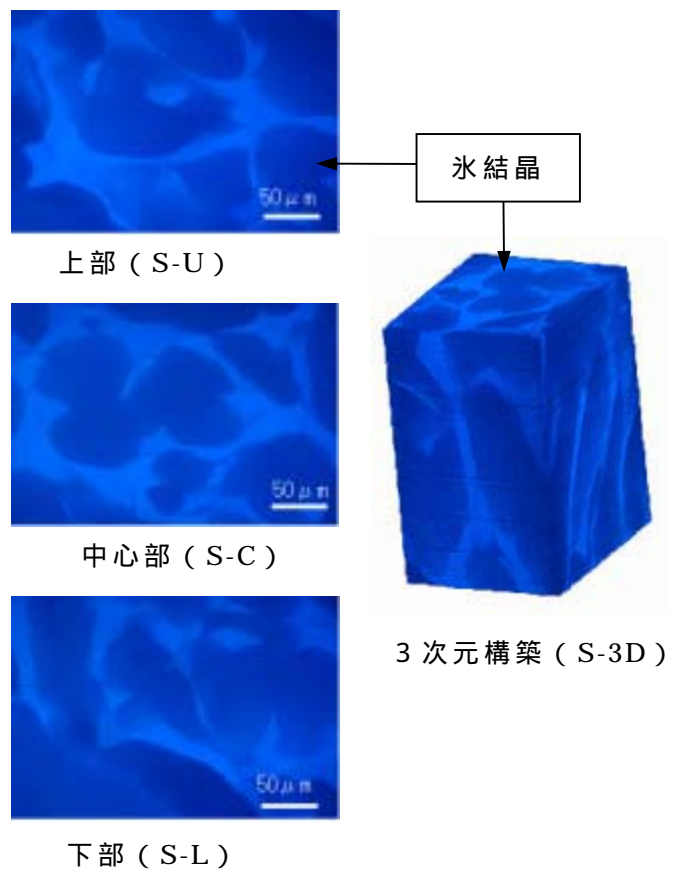


図6 断面画像と3次元構築像(-15)

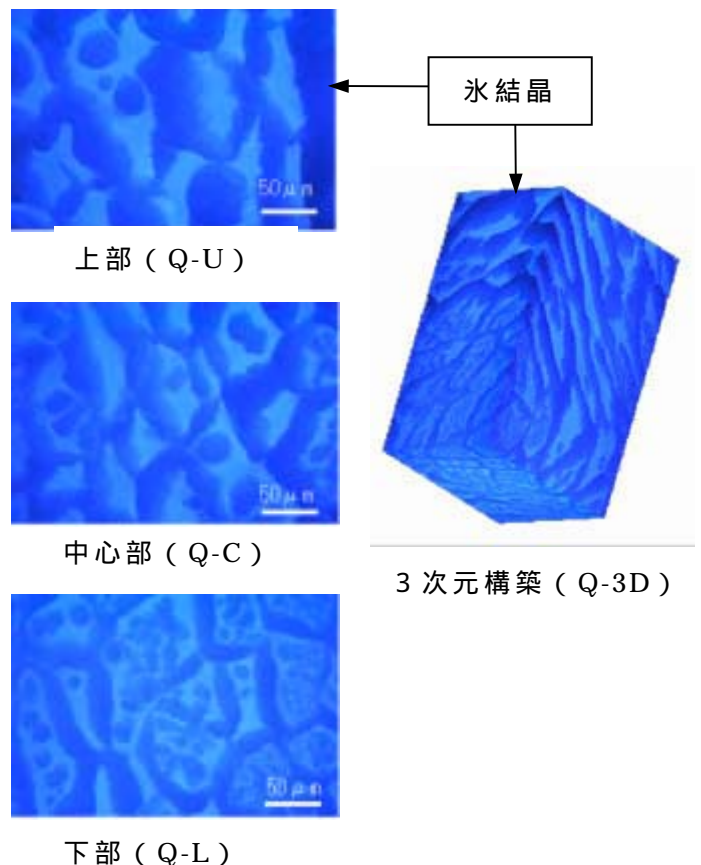


図7 断面画像と3次元構築像(-120)

維は氷結晶の生成、成長に圧迫されて多大なストレスを受けていることが観察された。また、比較的凍結速度の速い試料下部では筋繊維周囲に氷結晶が生成し、凍結速度が遅くなるにしたがって、上部断面画像に示されるように、氷結晶は筋繊維を圧迫して、取りまくように発達し、球形に近い形状を示すことが分かった。

設定温度 - 120 で凍結した断面画像を図 7-QU,C,L に示す。試料の下部 (Q-L) では細胞内に単体として球形の氷結晶が形成され、その直径は 10 ~ 20  $\mu\text{m}$  である。中部 (Q-C) では細胞の形状が消失し、氷結晶のサイズは直径 30  $\mu\text{m}$  程度であり、上部 (Q-U) では直径 50  $\mu\text{m}$  程度の氷結晶が連なって筋繊維を取り囲んで生成していることが観察された。

これらの図に示すように凍結により生成される氷結晶のサイズ、分布、構造は冷却速度に影響されることが確認された。すなわち、従来指摘されてきた「緩慢凍結において氷結晶は細胞外に生成し、その大きさは細胞間の水分を吸収して大きくなり、急速凍結では氷結晶が細胞内に生成し、その大きさは小さくなる」という定説が定量的に裏付けられた。

#### 4.2 凍結牛肉中の氷結晶の3次元構造

図 6 (S-3D) と図 7 (Q-3D) に設定温度 - 15 、 - 120 で凍結した試料の 3 次元構築画像をそれぞれ示す。これらの画像より本システムは凍結材料内の 3 次元内部構造の観察に有効であることが確認された。いずれの設定温度条件でも氷結晶は筋繊維の方向に沿って生成し、氷柱を形成していることが分かる。また、筋繊維にゆがみや屈折が存在すると、筋繊維の方向に沿いながらも氷柱は組織を押し分けながら上方へ成長する傾向が観られた。しかし、設定温度が低くなるに伴って細胞内に球状の氷結晶が存在し、氷柱サイズおよび氷柱高さが小さくなる傾向が観察された。これは凍結速度の向上によって氷結晶のサイズが小さくなり、このために氷柱形成能力が組織構造に対し相対的に弱くなり、氷結晶が垂直方向へ連なって形成される氷柱形成能力が低下し、その連続柱が失われるためであると考えられる。

## 5 . 摘 要

生体の凍結プロセスにおいて凍結材料内に形成される氷結晶を立体的に観察し、さらに、氷結晶の構造、サイズおよびその材料内分布などについて定量的に計測する方法を開発した。具体的には供試材料に生牛肉を選び、その組織を蛍光染色することによって氷結晶を 3 次元的に観察する方法を提唱した。

得られた断面画像により「急速凍結では細胞内凍結で、氷結晶が小さく、緩慢凍結では細胞外に氷結晶が生成し、そのサイズは大きくなる」という定説が裏付けられた。また、氷柱は筋繊維の構造に拘束されて生成していき、凍結速度の向上に伴って氷柱形成能力が組織構造に対し相対的に弱くなり、氷結晶が垂直方向へ連なって形成される氷柱形成能力が低下し、その連続柱が失われた。

本研究により開発したシステムは、従来不可能であった凍結速度が氷結晶の立体的サイズやその材料内分布に及ぼす影響を定量的に計測するツールとして有効であることが検証された。また、本研究で提唱した方法は従来の氷結晶計測方法、いわゆる、試料を凍結乾燥し、蒸発した氷結晶の跡を顕微鏡で間接的に観察する方法などとは異なり、氷結晶を直接に観察できることに大きな意味がある。今後、この手法は氷結晶生成メカニズム解明、冷凍食品の品質や解凍後の品質評価、さらには生体組織・血液の活性維持などのための最適凍結法の研究開発ツールとして有効利用されることが期待されている。

## 謝 辞

本研究は日本学術振興会外国人特別研究院の Gab-Soo, D0 の課題 ( 課題番号 P00199 ) の一部であり、文部省科学研究費の補助を受けた成果である。ここに感謝の意を示す。

## 参考文献

1. 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の表面積および体積の計測, 農業施設, 28 ( 1 ), pp.21-29, ( 1997 )