三次元内部構造顕微鏡の開発*

小林賢知** 樋口俊郎***,† 青木 勇***,†† 工藤謙一***

Development of Microslicer Implementation of
3-Dimensional Internal Structure Microscope

Kenchi Kobayashi, Toshiro Higuchi, Isamu Aoki and Ken-ichi Kudoh

Three-dimensional internal structure microscope (3D-ism) using a microslicer has been developed. The 3D-ism consists of the microslicer, optical microscope, CCD camera, video recorder, PC for controlling the machine, and image processing workstation. The 3D-ism is the system that mechanically cross-sections a sample by microslicer, and observes the surface of the sample by reflecting optical microscope one by one, even in conventional way the sliced thin samples are observed by transmission optical microscope. The system reconstructs a 3D image from the obtained 2D image data. This paper describes the motivation for 3D-ism in such various fields as education of biology and cell inspections, and describes the construction of the system. This paper also presents ring-lighting to observe the colors of the sample, and an image-processing method to observe the top section data. Finally some of example 3D images of the samples are presented, such as liver and kidney of mouse, a dog tick, and a bud of broccoli.

Key words: microscope, microthome, computed tomography, 3-dimensional image, internal structure, volume rendering, slicing, 3D-ism.

1. 緒 言

物体の内部観察装置とは、物体内部の性状の異なる部分の形状・構造を、物体を構成するさまざまな物質の性質の差異を利用して可視化する装置である。

生物の観察において、肉眼で観察できる大きさのレベルではいわゆる解剖や非侵襲ではNMRやSQUID、X線撮影¹⁾や超音波エコー像などの数cmから数mmの大きさの内部観察も行われている。小さなところではミクロトームを用いて試料を切片にして各種の顕微鏡を用いた内部観察や、切片を作らずにレーザ顕微鏡²⁾や超音波顕微鏡³⁾などを用いた内部観察が行われている。

内部観察方法には非破壊の方法と、破壊して観察面を露出させる方法との二つがある。

近年発達してきたX線CT(Computed Tomography)などは非破壊での観察法であり、従来から行われてきた切片を作りスライドガラスの上で観察する方法は破壊観察法である。

このように現在までにさまざまな方法で内部観察が行われてきたが、多くの場合一度の観察で得られる情報は二次元情報である。しかし、物体内部の被観察物は、観察時に制約される特定の平面内や、その平面の方向に沿った形状をしているとは限られていない。従って立体的に複雑な形状を持っている場合、特定断面の二次元の画像だけでは物体内部の形状の把握には自ずと限界がある。

近年コンピュータ技術の進歩とメモリーの低価格化にともない、内部観察で得られた平面画像情報を多数枚積み重ね、三次元像として可視化する方法(Volume Rendering)が容易になって

きた。この方法を用いると、複雑な形状の被観察物であっても形状の把握が容易に行えるようになり、より効率的で正確な内部観察が期待できる。その結果、各種のCT画像をデータとして人体の三次元像の可視化が医療用として実用化されている。

多数の二次元情報を積み重ねて三次元像の再構築を行う可視化システムでは、多数の試料の観察を行うときの位置決め精度が重要な要素になる。ことに顕微観察を行う場合には試料相互間の厳しい位置決め精度が必要とされる。顕微鏡を用いた破壊観察で一般的に行われている、試料切片を作成し、それを観察する方法では、切片の観察法に染色などの多くの選択枝が選べ、分解能も高くできる。しかし三次元像の再構築にこの観察法を利用すると試料相互の位置決め精度や、切片作成時の試料の変形が大きな問題となる。一方、非破壊の顕微観察法で三次元像の可視化を実用化しているものとしては共焦点レーザ顕微鏡を用いる方法がある。しかし被観察物がその観察範囲において十分に透明でないと観察できないので、透明度の低い物の観察や観察物の表面から内部の奥深くまでの観察は行えないという欠点があった。そこで、筆者らは試料を次々に切削し、試料切片ではなく試料切断面を観察した画像情報を利用し、試料内部の立体構造を高精度で可視化するためのシステムを提案し、色情報などを得られる利点のある光学顕微鏡での観察が可能な試料切断面の作成を既に報告した⁴⁾。

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

* 原稿受付 平成6年5月2日

** 正会員 東京大学大学院(現、東京ガス(株)インフォメーションテクノロジー研究所;千葉市美浜区中瀬2-3 東京ガス幕張ビル9F)

*** 正会員 (財)神奈川科学技術アカデミー(川崎市高津区坂戸3-2-1 KSP東棟405)

† 正会員 東京大学工学部(東京都文京区本郷7-3-1)

†† 正会員 神奈川大学工学部(横浜市神奈川区六角橋3-27-1)

Fig.2 Outlook of the microslicer

Fig.3 Structural drawing of the microslicer

本研究の目的は、CTとは異なり試料の破壊を伴うが、一方従来の光学顕微鏡での観察に近い色情報の得られる、試料切断面像からの三次元像再構築(Volume Rendering)に適するマイクロスライサを用いた三次元内部構造顕微鏡を提案し、試作、実証することである。

2. マイクロスライサを用いた三次元内部構造顕微鏡の構成

試作したマイクロスライサを用いた三次元内部構造顕微鏡は、図1に示すように試料断面作成装置としてのマイクロスライサとその冷却装置、切断面観察装置、切断面情報記録装置、以上の機構部の制御装置、画像処理装置、及び三次元像可視化装置から構成されている。

試料断面作成装置(マイクロスライサ)と落射光学顕微鏡及びその照明系を図2、図3に示す。マイクロスライサの構成は、試料ホルダ、試料送りアクチュエータ(ピエゾを用いたインチワームアクチュエータ)、切削用の回転刃とそれをベルトで駆動するACサーボモータである。試料ホルダは、図4のようにア

Fig.4 Sample holder and sample feeding mechanism

Fig.5 Capsule for making frozen sample

ルミニウム製の円筒状の試料作成容器を、コレットナットでくわえることにより試料と試料作成容器の間に生ずるすきまを抑制した。また、凍結試料を観察するときには、断熱材で囲まれた切削部及び試料周辺に投込み式冷却器の冷却パイプを通すことで -20°C にまで冷却する。凍結試料と試料作成容器の凝着を回避するために、図5のようにパラフィン試料ブロックの中に穴をあけて、その穴の中に凍結試料包埋用のゼリー状のコンパウンドと試料を注入した後 -20°C で凍結する。

試料の送りは、試料作成容器を試料送りのガイドとして用い、下端から押棒を介して、ピエゾを用いたインチワームアクチュエータで所定の寸法ごとに押し上げる。インチワームアクチュエータ(東陶機器製)を用いることにより、ストローク22mm、送りの最小分解能 $0.05\mu\text{m}$ の試料送りが可能である。

試料の除去加工は、転写性の良い平刃による切削とした。刃は、ミクローム用のスチール刃、ガラスナイフ、ダイヤモンドナイフ等が利用可能である。

試料の観察には、落射光学顕微鏡を用いる。顕微鏡の対物レンズと試料の間を回転刃が通過できるようにするために、対物レンズには超長作動距離(100倍で13mm)の対物レンズ(ミットヨ製)を用いた。また高倍率での色観察を行うために、最低被写体照度0.1lxのカラー固体ビデオカメラを顕微鏡のCマウントに取り付けた。

インチワームアクチュエータの送り、及び録画は回転刃の主軸に取り付けられたエンコーダからのトリガ信号を同期信号として動作させた。

(a) Normal lighting (b) Side lighting
Fig.6 Cut surface observation by optical microscope

録画は追記型レーザーディスクにアナログデータとして一次記憶し、ビデオ入力ボードを介してワークステーションの5inch M0に1画面640×480ピクセルでフルカラーデジタル記録した。レーザーディスクに一次記録する理由は、毎秒数フレームでのカラー画像のデジタル録画を数百から数千フレーム行う装置は、現時点では高価なためであり、将来的には直接デジタル記録が可能である。今回画像処理、三次元像の可視化にはワークステーションはSun IPX, ソフトはSUN VISION 1.1のSun Ip, およびSun Voxelを用いた。二次元像はフルカラー処理を行い、三次元像の表示は、ボクセルデータを用いたボリュームレンダリングでモノクロ256階調または16色までの疑似カラー表示が行える。

3. 色情報の観察と一断面像の抽出

3.1 色情報の取込み

試料切断面を光学顕微鏡で観察するには落射光学系が適している。しかし生体試料などの透明試料の断面を落射観察すると、図6(a), 図8(a)に示すように試料表面の直接反射光により、切片の透過観察時には観察可能である試料の色情報が観察できない(カラー写真については後に一括掲載する)。そこで落射照明の試料表面での直接反射光ではなく、図6(b), 図8(b)のように試料内部にまで入射した散乱光が物体内部を透過する際に、透明試料の透過色情報を得られるようにした。実際には顕微鏡の対物レンズにリングライトを装着し直接反射光が対物レンズに入射しないようにした。このとき平刃での切削による条痕等の表面粗さが、回折格子として作用し、偏射光学系を構成する⁵⁾。その結果、図7(a)のように直接反射光ではなく、表面での回折光を観察することになる。そこで図7(b), 図8(c)のように条痕と直行する方向からの照明を絞りをういて遮断することにより、試料の色情報を取り込みながら、条痕等の切削による試料表面の性状の影響を排除することができた。

3.2 一断面像の抽出

3.1節の方法では、色情報を得つつ試料表面の性状の影響を受けにくい、試料切断面のごく表層の一層のみの情報ではなく試料内部も観察されてしまい、深さ方向のセクショニングは切片観察時より劣り、光学系の焦点外情報の混入も一般の落射光学顕微鏡よりも深いところからの影響が生ずるため、一層のみの情報を得ることは困難となる。従来、深さ方向のセクショニングは焦点深度の浅いレーザー顕微鏡や、試料すべての情報を利用してFFTを用いて演算する方法が一般に行われてきた^{6) 7)}。しかし、レーザー顕微鏡は高価であり、一方従来の画像処理法は

(a) Light direction of stressing cutting mark (b) Light direction of not stressing cutting mark
Fig.7 Side lighting effect by ring light

Fig.9 Simulation model for transmission, reflection, absorbing of light in surface

非常に長い処理時間が必要である。そこで試料表面を次々に除去するという本システムの特徴を活かし、上記の照明系で色情報を観察しつつ、観察したい切断面の像とその次の切断面の像の2枚から、画像処理により、除去された一層を透過光学顕微鏡で観察したときの像に近い画像を抽出する画像処理法を開発した。

まず観察したい試料表面を落射光学顕微鏡で観察する。次に試料を切削し、再び同様に観察する。このときの光の透過、反射、減衰を簡略化した模式図を図9に示す。ここで反射係数 r 、吸収係数 k 、透過係数 $t=1-k-r$ と置く。添数字は何層目かを示し、 I_0 は入射光を示す。像に現れるすべての出射光の和を、切断前は IM_a 、切断後は IM_b で表す。また2度以上の反射の影響を無視する($r < 1$)。なお簡便のために各層は光学顕微鏡の焦点深度の中にあるとした。

$$IM_a = I_0 \cdot r_1 + I_0 \cdot t_1^2 \cdot r_2 + I_0 \cdot t_1^2 \cdot t_2^2 \cdot r_3 + \dots \quad (1)$$

$$IM_b = I_0 \cdot r_2 + I_0 \cdot t_2^2 \cdot r_3 + \dots \quad (2)$$

二つの画像の引き算(2)-(1)を行う。

$$IM_b - IM_a = r_1 \cdot \{((1 - t_1^2)/r_1) \cdot IM_b - I_0\} \quad (3)$$

仮定より

$$t_1 = 1 - k_1 - r_1 \\ \therefore (1 - t_1^2)/r_1 = 2 - r_1 - 2 \cdot k_1 + k_1 \cdot (1 - k_1) \cdot r_1 \quad (4)$$

ここで反射率 $r_1 < 1$ で、減衰率 k_1 が r_1 より十分に小さいとすると(つまり透明であれば)

$$(1 - t_1^2)/r_1 = 2 \quad (5)$$

(5)を(4)に代入し、透過光観察に近い像(6)を得る。

$$I_0 \cdot t_1 = I_0 \cdot (1 - r_1) \\ = I_0 [1 - (IM_b - IM_a)/(2 \cdot IM_b - I_0)] \quad (6)$$

これを用いて画像処理した結果を図10に示す。サンプルはカー硝子上にOHP用のペンで描いた図形である。(a)は二層重ねて観察した例、(b)は上の層を除去した後、(c)はその2枚から計算によって得られた上の層のみの推定画像である。

Fig.11 Stability of sample feeding

3.3 色情報の簡易表示

三次元像を透過像として観察する場合⁸⁾に、一般に多値化を行ってから可視化する。しかしカラー画像をモノクロにしてから多値化を行うと、色情報が欠落してしまうため、同じ明るさの部分は同じ値として出力されてしまう。そこで赤、緑、青の三原色それぞれで多値化し、その色立体（カラーボックス）の範囲に含まれるか否かで多値化を行う。これにより色情報を含んだ多値化が容易に行えるようになる。また疑似カラー表示を行うときにも、カラーボックスの重心の値をそのカラーボックス全体の代表値として疑似カラーを与えることにより、わずかな色表示で原画像に近い疑似カラー表示が可能となった。

4. マイクロスライサの試料送り精度

三次元像構築において最も重要なことは、試料の断面像相互の位置決め精度と、試料送りの再現性である。そこで試作したマイクロスライサでの試料切断面観察の精度を以下の二つの方法で評価した。

一つは試料送り用のインチワームアクチュエータの下端に取り付けたギャップセンサによる、インチワームアクチュエータの送り量測定である。試料送りは回転刃の軸に取り付けられたエンコーダからのトリガ信号により、間欠的に行われている。図11では回転刃の軸は1rpsなので、送りは150回行われ、平均の1回送り量は、 $0.94 \mu\text{m}$ にあたる。図11からインチワームアクチュエータが連続的に安定した送り動作を示し、ドリフトが少ないことがわかる。

試料送りに求められるのは上記の試料押し上げ方向の送り量の再現性と、試料送り時に試料が送り方向を軸として回転しないことである。さらにマイクロスライサの繰返し切削性能が悪い場合、試料送り精度が高くても等間隔での断面作成は保証されない。これらの性能を評価するために、試料断面観察の評価の二つ目の実験として形状のはっきりわかっている被観察物を実際に断面作成および観察し、このデータを基にワークステーション上で三次元像として可視化した。

形状のはっきりわかっている被観察物としてパラフィンに包埋された $\phi 0.3\text{mm}$ のシャープペンシルの芯を用いて可視化したものが図12である。試料送りは $0.7 \mu\text{m}$ である。一層抽出は式(6)に基づいて行った。表示分解能は約 $10 \mu\text{m}$ である。二つの円柱のそれぞれの軸方向から観察した場合にその断面形状が円になっている。またその側面は真直であるため、試料送り時に試

(a) Semi-transparent image of leads ($\phi 0.3\text{mm}$) for automatic-pencil

(b) Semi-transparent image observed from one of the axial direction of lead

(c) Semi-transparent image observed from the other axial direction of lead

Fig.12 3-dimensional images of leads from different points of view

料が送り方向を軸として回転していない。従って正確な試料送りと、切削が行われていることがわかる。

5. 実際の生体組織試料での観察例

実際の観察例として、マウスの腎臓、肝臓の組織を観察した

例を図13, 図14に示す。試料はブアン固定をされた後, パラフィン包埋されたものである^{9)~13)}。これらの試料は十分不透明であるため, 一層抽出は行っていない。三次元像にした結果, 複雑に入り組んだ腎臓組織の立体的な形状が, より容易に正確に観察可能となった。

図15, 図16に微小動物の観察例としてダニの凍結試料の観察例を示す¹⁴⁾。図15では一層抽出により試料内部からの情報の混入のない明りょうな三次元像情報が得られることがわかる。またダニの画像から, 多値化を行い疑似カラー処理を行った透過像の図16では, 外殻と内臓が明瞭に観察される。

図17に植物の観察例として, ブロッコリーのつぼみの観察例を示す¹⁵⁾。この例ではカラーボックスを用いた多値化を行い, 透過像として可視化している。凍結試料の作成時につぼみの中の空間には包埋剤が染み込まないが, 切削, 観察に影響はない。

6. 結言と展望

本論文では, 生体観察時に試料の染色を行っていない。今後生体の観察で最も一般的に利用されているHE染色を施した試料の観察を予定している。この場合染色が試料の内部まで良好に行えるかが問題となる。また観察用のCCDカメラをハイビジョン対応にすることや, より高感度にすることも検討されている。

観察されたデータの表示法の今後の展望として, フルカラーでの三次元像再構築, 立体ディスプレイの利用, 光造形法等の樹脂によるモデリングが挙げられる。フルカラーでの表示はメモリー量が膨大になる欠点があるが, ほかの三次元像CTでは得られない色情報が表示できるようになるので重要な要素である。立体ディスプレイでの表示は多人数で同時に評価, 観察が可能になる点で有効である。樹脂による立体造形はデータが得られているので容易に実現可能である。

またデータから物体の体積や表面積などの計算も従来より正確に行えるようになるため, 被観察物を生体や食品^{15)~17)}に限らず, 金属, 樹脂等の材料系の観察や, 素材加工の評価装置としての利用も可能である。

参 考 文 献

- 1) 戸川達夫：生体計測の将来, 計測と制御, 31, 1(1992) 204.
- 2) 増田道隆, 花井荘太郎：生物試料の深さ計測における諸問題, レーザ顕微鏡研究会第9回講演会論文集, (1992) 48.
- 3) 特集 最近の顕微鏡, 精密工学会誌, 57, 7 (1991) 1141.
- 4) 小林賢知, 樋口俊郎, 工藤謙一：生体試料断面からの三次元像構築装置(第3報), 1993年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集, (1993) 517.
- 5) 石沢政男, 田中克己：顕微鏡の使い方(第5版), 裳華房, (1960).
- 6) 宝谷紘一, 木下一彦編：限界を越える生物顕微鏡 見えないものを見る, 学会出版センター, (1991) 71.
- 7) 平岡 泰：コンピュータ画像処理による高解像三次元光学顕微鏡法, レーザ顕微鏡研究会第8回講演会論文集, (1991) 29.
- 8) 内川恵二：色の計測原理と色の見え, 計測と制御 31, 10 (1992) 1075.
- 9) 染色法のすべて; MEDICAL TECHNOLOGY 別冊, 医歯薬出版, (1988).
- 10) 田所 衛監修：実践：病理組織細胞学カラー図鑑[肉眼像・組織像・細胞像], H B J 出版局, (1990).
- 11) 飯高和成, 五月女茂：一般的標本作成(固定, 脱灰, 迅速標本も含めて), 臨床病理, 23特別増刊 (1975) 1.
- 12) 太田邦夫, 畠山茂：病理顕微鏡標本の作り方, 南山堂, (1969).
- 13) 影山圭三監修：病理組織標本の作り方, 医学書院, (1977).
- 14) 鈴木 裕：凍結切片標本作成法, 臨床病理, 23特別増刊, (1975) 27.
- 15) 樋口俊郎, 工藤謙一, 横田秀夫, 李煥平：生体試料断面からの三次元像構築装置の開発, 日本植物工場学会平成5年度大会学術講演要旨集, (1993) 64.
- 16) 樋口俊郎, 工藤謙一, 小林賢知：超精密スライサーを用いた食品内部の観察, 日本食品工業学会第40回大会講演集, (1993) 139.
- 17) 樋口俊郎, 工藤謙一, 小林賢知：生体試料断面からの立体情報画像化装置の開発, 第52回農業機械学会年次大会講演要旨, (1993) 60.

(a) Image observed by conventional microscope

(b) Image observed with ring light and without iris

100 μ m

(c) Image observed with ring light and with iris

Fig.8 Observed images in different lighting conditions
Sample:Liver of mouse

Fig.10 Sectional image separation by image processing

Fig.13 3-dimensional image of mouse liver

Fig.14 3-dimensional image of mouse kidney

(a) Sections not separated

(b) Sections separated

Fig.15 A slice of 3-dimensional image of a dog tick

Fig.16 Semi-transparent image of a dog tick

(a) Whole image of a broccoli bud

(b) Top end cut image of a broccoli bud

(c) Side cut image of a broccoli bud

Fig.17 Semi-transparent image of broccoli color classified by color box method