

# リニアマイクロスライサを用いた生体内部観察システムの開発

工藤 謙一\*・木下 泰希\*・都 甲 洙\*\*  
内ヶ崎万蔵\*\*・佐藤 嘉兵\*\*\*・樋口 俊郎\*

## Development of an Internal Observation System for Biological Samples Using a Linear Micro-slicer

Ken-ichi KUDOH,\* Taiki KINOSHITA,\* Gab-Soo DO,\*\*  
Manzo UCHIGASAKI,\*\* Kahei SATO,\*\*\* Toshiro HIGUCHI\*

**Abstract** Recently, the construction of 3-dimensional internal structure images of biological samples has been used for vital observation. To construct the image, the sample is sliced into many sections with a machine such as a microtome. Then images of the sections are acquired by the system. By acquisition of the images, a 3-dimensional internal structure image of the sample can be created. To realize the mentioned observation system, we proposed a new type of micro-slicer image processing system with a direct translation blade and automatic sample feeding mechanism. An image scanner (contact image sensor) was attached in the system to obtain 2-dimensional images from the sliced sample, not from the sliced section. By using an image scanner called a micro-slicer image processing system instead of a CCD camera, which is used in conventional systems, line lighting of the image scanner enables uniform illumination on the cutting planes of the samples. Additionally, the characteristics of an image scanner, such as shallow depth of field, an oblique illuminating system, and one-dimensional array of light-sensitive elements, enable us to display hollow portions of the sample. As a result, the calibration process of the 2-dimensional images obtained from the sample, which was needed in the conventional system, is no longer necessary. So we achieved the automation of constructing high-definition 3-dimensional images. Furthermore, the miniaturization of equipment was realized because the CCD camera and optical systems became unnecessary.

**Keywords:** automation, image processing, internal constituents, 3D visualization.

### 1. はじめに

生体などの内部観察装置には、非破壊観察法を用いるものと、破壊観察法を用いるものと2つに大別することができる。非破壊観察法には磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging, MRI) [1], X線撮影[2]や超音波顕微鏡[3]を用いる方法などがあるが、これらの観察法では、色情報を取得することができない。色情報が取得できる非破壊観

察法には共焦点レーザー顕微鏡[4]を用いる方法があるが、試料の透明度に依存することから、試料表面から100 μm程度に限定されている。そのため被観察物の色情報を取得するには破壊観察法を用いるのが現状である。内部観察では、多くの場合一度の観察で得られる情報は2次元情報である。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。従って立体的複雑な形状を持っている場合、特定断面の2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。そこで、近年の生体観察では、1つの試料から切片を多量に作製し、これら切片の画像を取得し重ね合わせることで試料の内部構造を含んだ立体構造を観察する3次元画像構築の技術が用いられるようになった。しかし、この観察法を利用すると試料相互の位置決め精度や、切片作製時の試料の変形が大きな問題となる[5]。そこで、本研究において、回転刃と試料送り機構からなるマイクロスライサに、切片の画像ではなく、切られる試料本体側の切削断面画像を取得する装置により構成さ

生体医工学シンポジウム 2004 発表 (2004 年 9 月, 札幌)  
2004 年 8 月 10 日受付, 2004 年 11 月 23 日改訂  
Received August 10, 2004; revised November 23, 2004.

\* 東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学専攻  
Department of Precision Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo University

\*\* 日本大学生物資源科学部 生物環境工学科  
Department of Bioenvironmental and Agricultural Engineering, College of Bioresource Sciences, Nihon University

\*\*\* 日本大学生物資源科学部 応用生物科学科  
Department of Applied Biological Sciences, College of Bioresource Sciences, Nihon University

れる 3 次元内部構造顕微鏡 (3D-ism) を開発し、試料の切削断面の作製から切削断面の画像の取得までの工程の自動化を実現した[6-8]。

しかし、この 3 次元内部構造顕微鏡を用いての観察では、照明斑による切削断面と取得画像との色成分の偏差、空洞部での底面の写りこみにより高品位な 3 次元画像が得られないため、取得した 2 次元画像を 3 次元画像構築する工程において画像修正を余儀なくされている。この画像修正は、非常に時間を費やす作業であり、如何に高品位な 3 次元画像の構築に適した切削断面の 2 次元画像を取得できるかが、自動化のポイントとなっている。

本研究では、このような問題を解決するため、従来の機構に変わり、照明斑が少なく、また、被写界深度が浅い密着光学系 (contact image sensor, CIS) 方式のイメージスキャナに着目し、直進運動刃と試料送り機構からなるマイクロスライサに切削断面画像を取得するイメージスキャナを付加した、従来の装置に比べ小型で、且つ画像修正の不要な生体内部観察システムを開発し、本システムの有効性を検証した。

## 2. 生体内部観察システム

### 2.1 従来の生体内部観察システム

従来の生体内部観察システムを図 1 に示す。従来のシステムでは、CCD カメラで画像を取得していた。そのため照明斑や、空洞部での底面の写りこみの問題があった。

照明に斑があると、切削断面と取得される切削断面画像

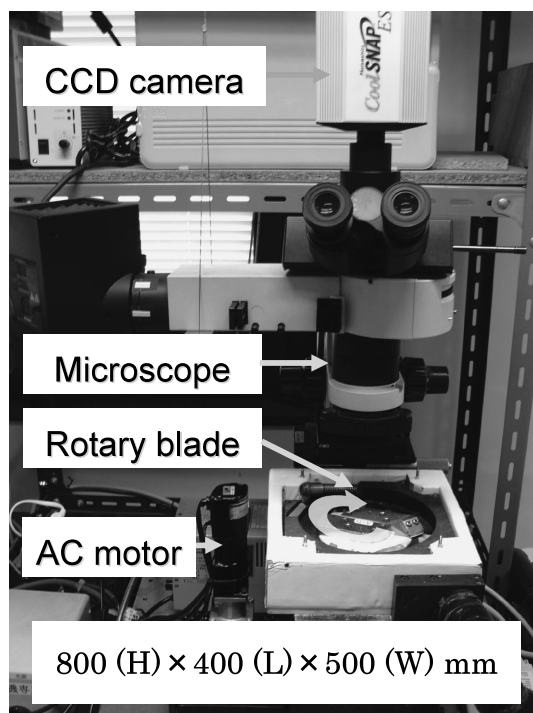


図 1 従来の生体内部観察システム

Fig. 1 The conventional internal observation system.

の色成分において照明斑に対応して偏差が生じる。従って、切削断面から構築される 3 次元画像も、実際の被観察物に対して色情報に関して偏差が生じる。そのため各断面で常に一定の照明で画像を取得する必要がある。

生体試料には魚の浮き袋のように内部に空洞が存在することや、また、試料を固定する包埋材に気泡が生じることもあり、空洞の底面の写りこみが多々見られる。3 次元画像では、各切断面は高さ方向に対して位置情報を持つため、切削断面画像に空洞の底面が写りこむと、切削断面と、空洞の底面が同じ高さに位置するという誤差が生じる。そのため、空洞の底面の写りこみを防ぐ必要がある。

### 2.2 CIS 方式イメージスキャナの採用

イメージスキャナでは、ラインライトで照射して走査するため、均一に対象物面を照射し、照明斑が改善できる。

一般的な画像取得装置では、対象物面がピントの合う位置では、対象物面で反射した光が受光素子 (フォトダイオード) でスポットを結び、受光素子に入射する光量は最大となる。対象物面がピントの合う位置から外れた位置では、反射した光は受光素子でスポットを結ばないため光量が落ちる。CCD カメラでは、2 次元に受光素子があるため、受光素子でスポットを結ばない場合、隣接する受光素子に光が入射し、不鮮明な画像となるだけで全体として光量はさほど変化しない。一方、イメージスキャナでは、一次元に受光素子が並んでいるため、全体として光量は減る。また、CCD 方式のイメージスキャナに比較して CIS 方式のイメージスキャナは被写界深度が浅く (1 mm 以下)、この効果は大きい。

イメージスキャナでは、反射率の高い試料でも対象物面の色情報を読み取りが可能のように、対象物面に対して入射角をつけて照射し、正反射成分の受光を防ぐ仕組みになっている。入射角をつけて照射するため、対象物面が鉛直方向に位置ずれすると、照射位置が水平方向にずれ、対象物面での反射光が受光素子に入射されず、撮影面が暗くなる。以上 2 つの特性から被観察物の空洞部や、包埋材の気泡部分では底面の色情報が取得されず、空洞部が再現される。

本研究で開発する生体内部観察システムでは、上記の理由より、CIS 方式のイメージスキャナを採用した。

本研究で開発したシステムの概観を図 2 に示す。画像取得装置をイメージスキャナに変えたことにより、CCD カメラ、レンズの光学系が不要となり、装置の小型化を実現した。本システムを用いて、生体試料をスライスして断面画像を取得し、平面画像情報を多数積み重ね、3 次元画像として視覚化 (volume rendering) する。

イメージスキャナを用いた断面画像の取得方法は、パラフィン等を用いて固定した生体試料 (20[H] × 50[L] × 30[W] mm) をクロスローラ自動位置決めステージ (駿河精機 (株) 製, KS101-20, 分解能 1 μm) を用いて数 μm ~ 数

十  $\mu\text{m}$  上昇させる。そして、切削刃 (Feather 製, C35) とイメージスキャナ (富士通(株)製, RS-C40U, 表現色 1,677 万色, 解像度 600 dpi) が固定されているプレートをスライドレールに沿ってリニアモータ (日本トムソン(株)製, LT100CGS-200/10, 分解能  $1 \mu\text{m}$ , 最高速度 2 m/s) で往復運動させる。このとき、スライス方向において、上昇した生体試料の表面を切削刃で鉋のようにスライスし、生体試料の断面を露出させる。スキャン方向において、露出した生体試料の断面をイメージスキャナでスキャンし、生体試料の断面画像を取得する。このように、1 往復で切削刃によるスライス作業とイメージスキャナによるスキャン作業を行い、繰り返し駆動することによって生体の断面画像を連続的に取得する。

システムの構成を図 3 に示す。本システムを制御するために、制御ソフトウェアを開発し、リニアモータとステージ、及びイメージスキャナを制御した。

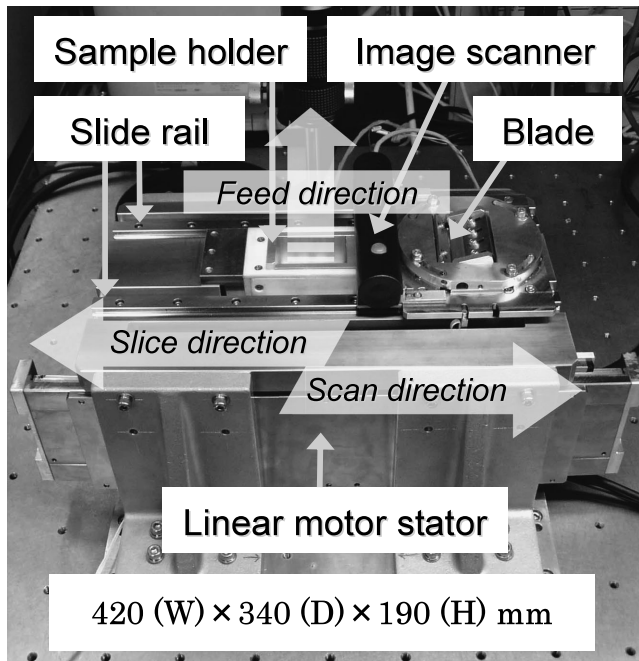


図 2 システムの概観

Fig. 2 Overview of the internal observation system.

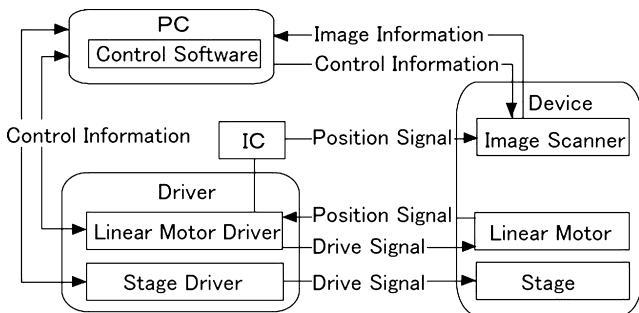


図 3 システム構成

Fig. 3 Construction of the system.

このシステムで縦横比の適切な切削断面画像を取得するため、リニアモータとイメージスキャナを同期させる。リニアモータに内蔵されているリニアエンコーダの位置信号をリニアモータドライバからマイクロコンピュータを介して、イメージスキャナに入力することにより同期させた。取得した切削断面画像は、パーソナルコンピュータにデジタル画像として保存した。

### 3. 実験および結果

#### 3・1 CCD カメラとスキャナ方式の比較

**3・1・1 照明の影響** 切削断面には切削刃により、スライス方向にカッターマークが生じる。試料送り  $30 \mu\text{m}$ , 切削速度  $300 \text{ mm/s}$  で切削した赤いクレパスの切削断面の表面粗さを長深度形状測定顕微鏡 ((株)キーエンス製, VK-8500) で測定した。図 4 にその結果を示す。

スライス方向は 1A-1B 方向である。1A-1B 間の算術平均粗さ ( $R_a$ ) は  $1.944 \mu\text{m}$ , 2A-2B 方向では  $3.584 \mu\text{m}$  であった。

CCD カメラで画像を取得する場合、照明の照射方法が問題となる。ここでは、照明を垂直に入射する場合と、偏射照明の場合について考察した。

試料に垂直に入射する場合 (図 4), 試料に対して照明斑が比較的少なくなるが、試料の正反射成分を取得することから、反射率の高い試料では色情報を取得できない。

図 5 (a) (b) は実体蛍光顕微鏡システム ((株)キーエンス製, G25/S20/S21/L10/L11) で取得した赤いクレパスの断面画像である。倍率 25 倍, 照明の入射角度を  $45^\circ$  で入射し, (a) では、カッターマークに対して平行に, (b) では、カッターマークに対して垂直に照射している。図 5 より偏射照明の場合は、カッターマークの影響を避けるため、カッターマークに垂直な光成分は除去する必要がある。また偏射照明では照明と被照射面との距離偏差が増え

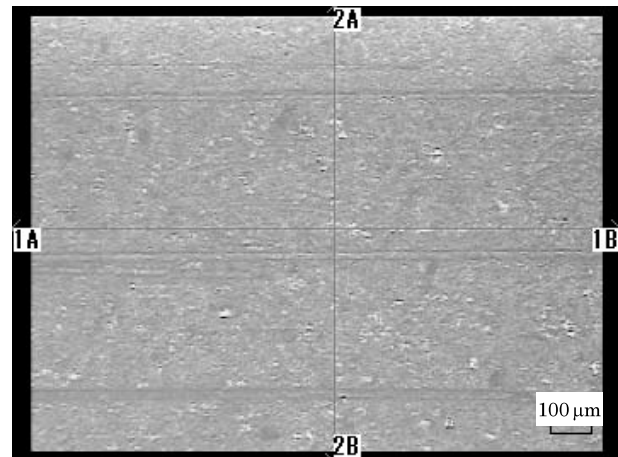
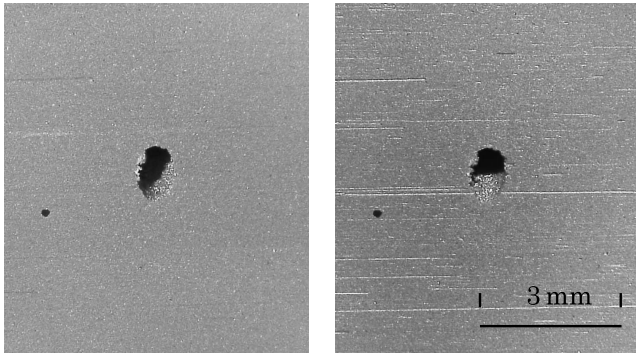


図 4 クレパスの切削断面

Fig. 4 Section of crayon pastel.



(a) (b)

図 5 偏射照明によるクレパスの切削断面画像  
(a) カッターマークに平行, (b) カッターマークに垂直.

Fig. 5 Sections of crayon pastel by oblique illumination.  
(a) Parallel to knife wound, (b) perpendicular to knife wound.

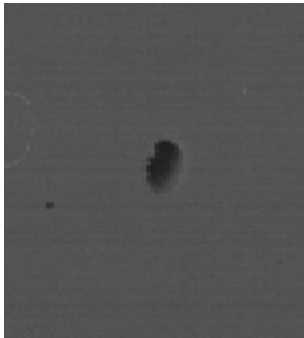


図 6 イメージスキャナで取得したクレパスの切削断面  
Fig. 6 Section of crayon pastel by image scanner.

るため照明斑が多くなる。

イメージスキャナの照明は偏射であり, 正反射成分を読み込まない。また, 照明方向がナイフマークと平行であるため, ナイフマークによる影響が小さい。イメージスキャナで取得した画像を図 6 に示す。

**3・1・2 空洞部に対する影響** 開発したシステムに, 高感度冷却 CCD カラーカメラ, 被写界深度ズームレンズ, 落射照明ユニット ((株)キーエンス製, VB-6010 / G25 / L11) を取り付け, CCD カメラとイメージスキャナで切削断面画像をそれぞれ取得し, その断面画像を 3 次元画像構築し, 比較評価を行った。CCD カメラでの撮影では, ズームレンズの倍率を 25 倍, 照明は入射角  $45^\circ$  で, カッターマークに対して垂直に照射した。

固定剤であるパラフィン (融点  $60 \sim 62^\circ\text{C}$ ) に, パラフィンの不透明度を上げるために顔料 (カーボンブラック) を, またパラフィンの気泡を除去し, 顔料の発色を良くするためにステアリン酸を混合した。赤いクレパスを底面に垂直に設置した後, 溶解させた固定剤を型に流し込み固定した。観察対象物に空洞がある場合を想定して, クレパス

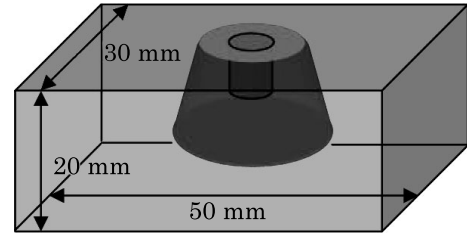


図 7 試料の模式図  
Fig. 7 Pattern diagrams of the sample.

の表面部に対してボール盤で深さ 2.2 mm, 直径 2.4 mm の穴を加工した。図 7 に試料の模式図を示す。

実験条件は, 試料をスライスする厚さを  $42 \mu\text{m}$ , スライス時の切削刃 (すくい角  $50^\circ$ , 逃げ角  $15^\circ$ , 引き角  $30^\circ$ ) の速度を  $300 \text{ mm/s}$ , イメージスキャナのスキャン速度を  $10 \text{ mm/s}$  で行った。

得られた断面画像 120 枚から高速 3 次元解析ソフトウェア (3D ポリウム, ラトックシステムエンジニアリング製) を用いて, 3 次元画像を構築した。CCD カメラの画像では 1 ピクセルを  $9.2 \mu\text{m}$ , イメージスキャナの画像では 1 ピクセルを  $42.3 \mu\text{m}$  で設定した。ソフトウェア上で全体的な明るさ, コントラスト, 及びガンマの調整を行った。

図 8 (a) (b) に CCD カメラで取得した断面画像から構築した 3 次元画像, 及び空洞部付近を切り出した画像, (c) (d) にイメージスキャナで取得した断面画像から構築した 3 次元画像, 及び空洞部付近を切り出した画像をそれぞれ示す。

(a) では落斜照明は図の左方から入射角  $45^\circ$  で照射した。(c) ではイメージスキャナは左から右に走査した。

図 8 より CCD カメラで取得した断面画像から構築した画像では, 空洞の底面に照明が届くと, 切削断面だけでなく空洞の底面の画像も取得されてしまい, 構築された 3 次元画像では, 本来ならば空洞である部分が再現されない。照明が届かない部分では, 空洞部分が再現されていることが分かる。

一方, イメージスキャナで取得した断面画像では, 輪郭は多少不鮮明になるものの空洞部分が再現されていることが分かる。

切削断面画像の空洞部分の最深部近傍  $10 \times 10$  ピクセル ( $420 \times 420 \mu\text{m}$ ) を抽出し, 各断面での輝度の平均値を測定した。また空洞の深さは各断面の間隔が  $42 \mu\text{m}$  であることから算出した。図 9 に結果を示す。イメージスキャナで取得した画像では輝度が急激に落ちることにより, 空洞部の再現が可能となった。

**3・1・3 考察** 前項より, CCD カメラで空洞部を再現するためには, 空洞の底面に照明が届かないように入射角度を大きくする必要がある。しかし, 入射角度を大きくすると照明斑が多くなる。解像度の面では CCD カメラの方

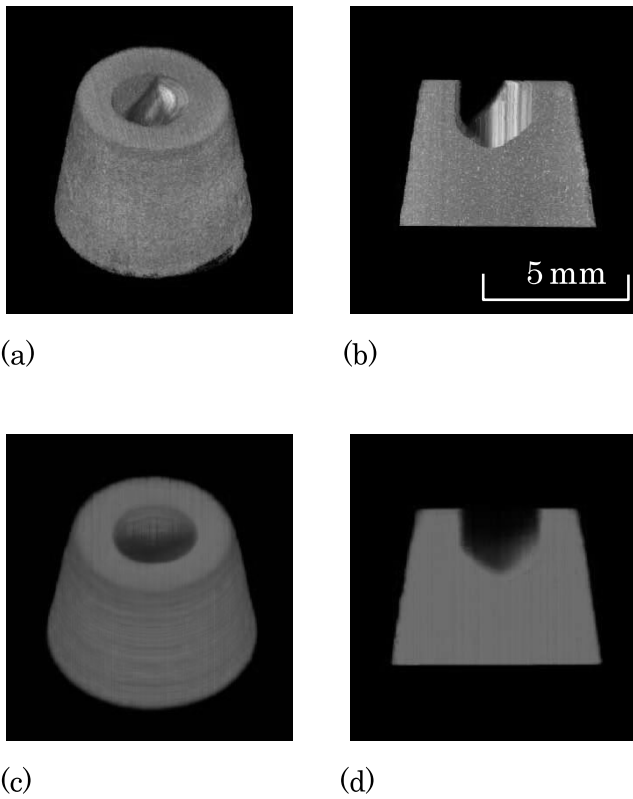


図8 CCDカメラとイメージスキャナで取得した画像から構築したクレパスの3次元画像  
(a) CCDカメラ, (b) CCDカメラ, 空洞部, (c) イメージスキャナ, (d) イメージスキャナ, 空洞部.

Fig. 8 3D images of a crayon pastel taken by CCD camera and image scanner.  
(a) CCD camera, (b) CCD camera, hollow portion, (c) image scanner, (d) image scanner, hollow portion.

が現状では優れているが、近年イメージスキャナの高解像度化が進んでいる。また、観察試料が大きければ解像度に大差はなくなる。従って試料サイズが大きければ、ディストーションも起こらないイメージスキャナが最適な画像取得装置であるといえる。

3・2 生体試料の3次元画像構築

本システムを用いて、背黒いわしの3次元画像構築を行った。背黒いわしは水分を含むため、パラフィン置換を行いにくく、そのため生体試料を冷凍包埋した。本実験で用いた凍結包埋剤 (Tissue Tek 製, OCT コンパウンド) の不透明度を上げるため、黄色のポスターカラーで着色した。OCT コンパウンドを気泡が入らないように注意しながら流し込み、試料を-30℃の雰囲気中に放置し冷凍した。

実験条件は、生体試料をスライスする厚さを 42 μm, スライス時の切削刃 (すくい角 50°, 逃げ角 15°, 引き角 30°) の速度を 500 mm/s, イメージスキャナのスキャン速度を 30 mm/s で行った。

得られたスライス断面画像から、色補正などの画像修正

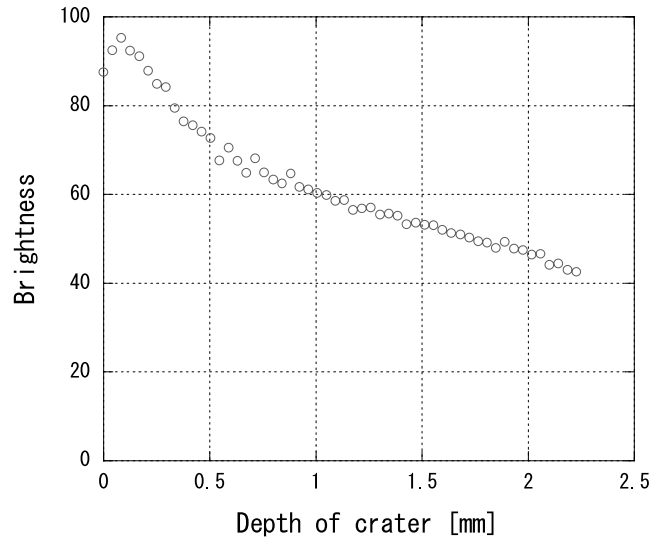


図9 イメージスキャナでの空洞の深さと輝度の関係  
Fig. 9 Relation of depth of crater to brightness.



図10 背黒いわしの3D画像  
Fig. 10 3D image of a sardine.

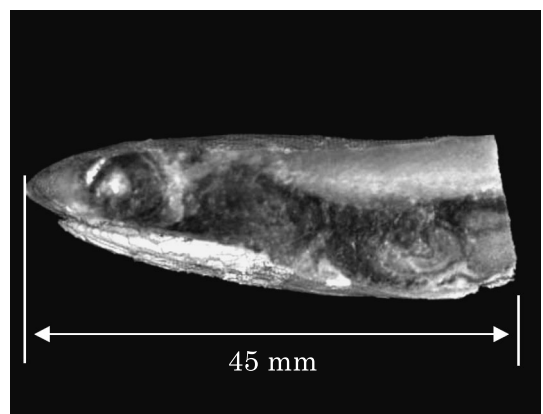


図11 背黒いわしの内部画像  
Fig. 11 3D internal image of a sardine.

を行わずに、高速3次元解析ソフトウェアを用いて、3次元画像を構築した。図10に背黒いわしの3次元画像を示す。図11に背黒いわしの内部の画像を示す。

## 4. お わ り に

従来の回転刃機構の3次元内部構造顕微鏡に変わり、直動刃機構のマイクロスライサに断面画像取得装置としてイメージスキャナを用いて、生体試料のスライスからスライス断面画像取得までの一連の連続作業を自動的に行うことのできる、従来に比べ小型の生体内部観察システムを開発した。

本研究で開発したシステムを用いて、イメージスキャナの有効性を示した。また、背黒いわしのスライス断面画像を取得した。これよりスライスから高品位な3次元画像の構築までの自動化が可能となった。

**謝辞** 本研究は、日本学術振興会科学研究費基盤研究 A (課題番号 14205036) の助成を受けて行った。また一部は、文部科学省「都市エリア産学官連携促進事業」可能性試験 (中核機関、財団法人神奈川科学技術アカデミー) より研究助成を頂いた。記して感謝する。

## 文 献

1. Lauterbur PC: Image formation by induced local interactions; examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*. **242**: 190-191, 1973.
2. 戸田達夫: 生体計測の将来. 計測と制御. **31**(1): 204-207, 1992.
3. 特集: 最近の顕微鏡. 精密機械工学会誌. **57**(7): 1141-1144, 1991.
4. 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, pp. 48.
5. 神沼二真, 南川玲子: 3次元像の再構築法とその応用. 神沼二真編, バイオテクノロジーとコンピュータ利用, シーエムシー, 東京, 1985, pp. 165-177.
6. 小林賢知, 樋口俊郎, 工藤謙一, 青木 勇: 三次元内部構造顕微鏡の開発. 精密工学会誌. **61**(1): 100-106, 1995.
7. 都 甲珠, 相良泰行, 樋口俊郎, 工藤謙一, 横田秀夫: 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 (*Brassica oleracea* l. var. *italica*. PLEN.) の表面積及び体積の計測. 農業施設. **28**(1): 21-29, 1997.
8. Ogawa Y, Ohtani T, Sugiyama J, Hagiwara S, Kokubo M, Kudoh K, Higuchi T: Three dimensional visualization of internal constituents in a rice grain. Proc of 1999 ASAE/CSAE-SCGR Ann Int. Meeting. Toronto, 1999, ASAE Paper No. 993059.

## 工藤 謙一 (クドウ ケンイチ)

1985年日本大学農学研究科農業工学専攻修士課程修了。1985年ブリマム中央研究所研究員, 1991年(財)神奈川科学技術アカデミー専任研究員, 1999年東京大学大学院工学系研究科助手, 現在に至る。博士(工学)。専門研究分野: バイオメカトロニクス, 生体情報工学。



日本エム・イー学会, 精密工学会, 自動計測制御学会, 農業

機械学会, 農業施設学会, 日本食品科学工学会, 日本食品工学会, 植物工場学会の会員。

## 木下 泰希 (キノシタ タイキ)

平成16年京都大学工学部物理工学科卒業。東京大学大学院工学系研究科修士課程に進学, 現在に至る。専門研究分野: バイオメカトロニクス, 生体情報工学。



## 都 甲珠 (ト カブスー)

平成11年日本大学大学院農学研究科工学専攻修了, 博士(農学)取得。同年東京大学インテリジェント・モデリング・ラボラトリー(IML)研究員。平成12年東京大学農学生命科学研究科日本学術振興会外国人特別研究員。平成14年独立行政法人食品総合研究所非常勤研究員。平成16年日本大学生物資源科学部助手, 現在に至る。



農業施設学会, 農業機械学会, 日本冷凍空調学会, 低温生物工学会, 日本食品工学会の会員。

## 内ヶ崎 万蔵 (ウチガサキ マンゾウ)

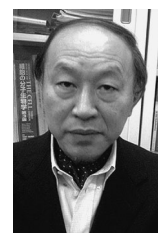
1991年ピソウザ連邦大学農学部農業工学科卒業(ブラジル)。1995年東京農工大学農学部農業工学科専攻修士課程修了。同年日本大学生物資源科学部生物環境工学科助手。2001年動専任講師, 現在に至る。博士(農学)。専門研究分野: 種苗の品質計測法・自動化, 植物のバイオメカニクス, 酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)光触媒の応用技術。



農業機械学会, 農業施設学会, 植物工場学会, アメリカ農業工学会(ASAE), ブラジル農業工学会(SBEA)の会員。

## 佐藤 嘉兵 (サトウ カヘイ)

昭和43年東京農工大学大学院農学研究科農学専攻修士課程修了。1986年日本大学農獣医学部助教授。1993年同大学農獣医学部(現生物資源科学部)教授, 現在に至る。農学博士。専門研究分野: 細胞生物学, 発生工学。



日本エム・イー学会, 日本哺乳動物卵子学会, 日本受精着床学会, 日本不妊学会, 日本生殖免疫学会, 日本ヒト細胞学会, 日本内分泌学会などの会員。

## 樋口 俊郎 (ヒグチ トシロウ)

昭和52年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了。同年同大学生産技術研究所講師。昭和53年同助教授。平成3年同大学工学部精密機械工学科教授, 現在に至る。専門研究分野: 磁気軸受, 静電モータ, 圧電アクチュエータ, 超精密位置決め, 弾性表面波応用, 超精密加工等, メカトロニクスに関する研究に従事。



日本エム・イー学会, 精密工学会, 日本機械学会, IEEEなどの会員。