

マイクロトモグラフィ法による生体軟組織の三次元構造解析

水谷 隆太*¹

Microtomographic Analysis of Three-Dimensional Structure of Biological Soft Tissues

by

Ryuta MIZUTANI*¹

Abstract

The transparency of biological soft tissue to hard x-rays enables radiographic analysis of tissue entrails. However, biological soft tissues are composed of light elements, which produce little contrast in a hard x-ray image. This paper describes three-dimensional structures of biological soft tissues determined by microtomographic analysis. Soft tissue structures were visualized by contrasting biological constituents with heavy element dyes. Efficient x-ray absorption by heavy elements facilitated the radiographic visualization of biological microstructures. The obtained structures were used for rapid prototyping, giving three-dimensional copies of biological structures.

Keywords: Microtomography, CT, Microcontrasting, 3D

1. まえがき

臨床医療では、生体の管腔構造をX線造影剤によって可視化することが頻繁に行われる。これらの造影剤は大きい元素番号をもったヨウ素やバリウムなどの重元素を含んでおり、X線を良く吸収することから用いられる。筆者らはこれに着想を得て、神経組織を重元素染色することにより、X線吸収像の上で個々の神経線維が観察できることを見出し、マイクロ造影法 (microcontrasting) として報告している (Mizutani *et al.*, 2007)。この方法を用いて細胞レベルで造影された生体組織を、近年開発が進んでいるマイクロCT法で解析することで、組織の微細な三次元構造を明らかにしてきた (Mizutani *et al.*, 2007, 2008a-e, 2009)。

そこで今回は、重元素染色によるマイクロCT解析をいくつかの生体軟組織に応用し、得られる三次元構造を人工的に再現する研究を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 ヒト大脳の組織標本

ヒト剖検脳の組織標本を用いた研究については、医学部臨床研究審査委員会による認可の内容に従って実施した。剖検脳標本より大脳前頭葉皮質を得て、10%パラホルムアルデヒド溶液で7日間固定した。固定標本を5mmの立方体状に細切し、銀化合物を用いた染色法であるゴルジ法による処理を行った (Mizutani *et al.*, 2008a)。得ら

れた染色標本をさらに細切し、0.3 mmの角柱状の測定標本を得た。

2.2 ショウジョウバエ標本

キロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の野生型系統 Canton-S をコーンミール培地で20°Cで飼育した。内臓を染色するため、コーンミール培地には1%(w/v)となるようにテトラクロロ白金(II)酸アンモニウムを加えた。この培地で成育した成体をホルムアルデヒド液で24時間固定した後、ボディアン鍍銀法により対染色を行った (Mizutani *et al.*, 2008b)。

2.3 マイクロCT解析

マイクロCT解析は放射光施設 SPring-8 のBL20B2およびBL20XUビームラインで行った。標本は真ちゅう製のフィッティングに取り付け、測定装置にマウントした。X線透過像はCCDを用いたX線撮像装置により記録した。再構成計算はconvolution back projection法により行った。金L_{III}吸収端と白金L_{III}吸収端を用いた元素特異的可視化は、吸収端付近での差分像により求めた。三次元構造の観察にはVG Studio MAX (Volume Graphics, Germany)を用いた。

3. 三次元構造

毛細血管は脳の機能維持に重要な役割を果たしている。既に、ヒト大脳皮質の三次元構造解析を報告してきており、新皮質に特徴的な層状構造とともに、その中を網目

*1 工学部生命化学科准教授

状に走る毛細血管の構造を明らかにしている (Mizutani *et al.*, 2008a). この三次元的な電子密度図から、毛細血管を含む部分を取り出し、樹脂モデルを製作した (Mizutani *et al.*, 2008b).

白金と金で染色したショウジョウバエの構造は、それぞれの元素吸収端での差分像を求めることにより解析した (Mizutani *et al.*, 2008b, 2009). 得られた三次元構造を図1に示す。白金の分布は、口吻と筋肉組織と思われる部分に観察された。金は、体表全体に非特異的に分布すると共に、神経組織から検出された。

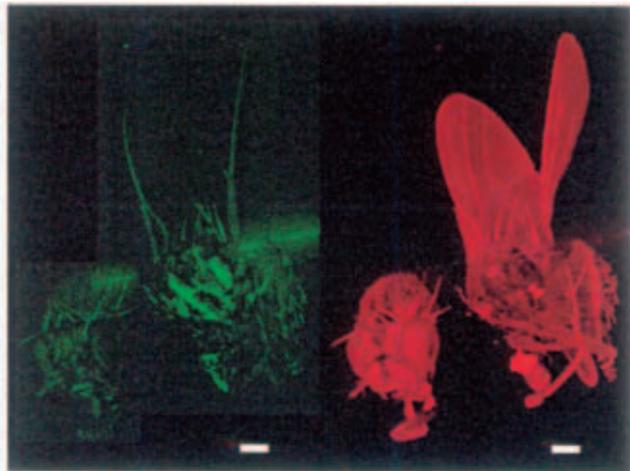


Fig. 1. Adult *Drosophila* structures analyzed at Pt L_{III} and Au L_{III} absorption edges. Platinum and gold distributions are colored green and red, respectively. The abdominal region was severed to show the visceral structure. (Mizutani *et al.*, 2008b, 2009).

生体組織の三次元構造がその機能部位ごとに明らかにされたことは、生体構造の各部分の構成を示した設計図を手に入れたことを意味する。それぞれの構成成分を考慮して三次元構造を人工的に再現すれば、機能を持った生体組織の作成が可能になると考えている。

4. 展望

ここで報告した重元素染色による三次元構造解析法は、どのような生物試料にも適用可能である。金属元素を用いた組織染色法には様々な方法が知られている。方法ごとの染色特異性を利用すれば、特定の組織の三次元構造を解析することができる。また、三次元解析に向けた組織染色では、一様かつ精細に染色することが重要である。そのような観点からも、今後、様々な染色技術を開発していく必要がある。

マイクロCT解析を神経組織に適用することにより、神経細胞(ニューロン)の構造解析が可能である (Mizutani *et al.*, 2007). 脳組織の三次元構造には、ニューロンの三次元的なネットワーク構造が埋め込まれている。脳の染色標本をマイクロCT解析すれば、その回路図を解析することができる。ヒト脳の全回路図を解明できれば、その神経回路をシミュレーションすることにつながる。その先には、「創造」や「感性」などの高次脳機能をコンピ

ュータ上で再現することも視野に入ってくることとなる。

幹細胞技術の研究は飛躍的に進んできており、細胞を人体に移植することが検討されている。しかし現在のところ製作される組織構造は、二次元的なシート状のものが主である。三次元的な構造をもった組織・臓器の構築は、形状の構成や酸素・栄養の補給等の問題があり、困難とされている。マイクロCT法により得られる生体組織の三次元構造は、そのような組織構造のテンプレートとして利用可能であり、将来的には再生医療に用いられる臓器製造の際の設計図として用いることができる。細胞を三次元的に配列する技術が開発されれば、マイクロCT法で明らかにできる生体構造を模倣することで、組織や臓器の複製が可能となる。

遠い将来には、組織・臓器にとどまらず、ここで示したショウジョウバエのように生命体全体のマイクロCT解析が実現されると想像され、生命体のデータ化や生命体の複製が行われる可能性がある。その際には十分に倫理的な配慮をすることが必要であるが、この技術を応用すれば、例えば、時間や空間を超えて生命体を電送することが可能になる。これらは「タイムマシン」技術、あるいは「どこでもドア」技術に相当する。このようなことも含めて、様々な分野での基礎技術として、マイクロCT解析の重要性は今後増していくものと考えられる。

[参考文献] *Corresponding author.

- 1) *R Mizutani *et al.* (2007). *J. Synchrotron Radiat.* **14**, 282 - 287.
- 2) *R Mizutani *et al.* (2008a). *Brain Res.* **1199**, 53-61.
- 3) *R Mizutani *et al.* (2008b). *Tissue Eng. Part C* **14**, 359-363.
- 4) *R Mizutani *et al.* (2008c). *J. Synchrotron Radiat.* **15**, 648-654.
- 5) *R Mizutani *et al.* (2008d). *J. Synchrotron Radiat.* **15**, 374-377.
- 6) *R Mizutani *et al.* (2008e). *9th International Conference on X-Ray Microscopy*, Zurich, 21 Jul - 25 Jul.
- 7) *R Mizutani *et al.* (2009). Three-dimensional microstructural analysis of human brain tissue by using synchrotron radiation microtomographs. In *Handbook on White Matter*, eds. TB Westland. & RN Calton, New York, Nova Science Publishers. pp.247-277.

[謝辞]

本研究は、研究支援・知的財産本部技術共同管理室の宮本泰男氏と平賀清氏、伊勢原教育・研究支援センター河邊昇氏の協力を得て実施した。

本研究の一部は、臨床研究(医学部臨審委(受)第07R-018号)として実施した。

本研究の一部は、大型放射光施設 SPring-8 において利用研究課題 2006B1716, 2007A1844, 2007A2072, 2007B1102, 2007B1894, 2008A1190, 2008B1261, 2009A1113 として実施した。