

## 脳血管系の三次元的観察技法

### Three Dimensional Observation of the Vascular Networks in the Brain

橋本 尚詞<sup>a</sup>, 石川 博<sup>b</sup>, 日下部守昭<sup>c</sup>

Hisashi Hashimoto, Hiroshi Ishikawa, Moriaki Kusakabe

<sup>a</sup>東京慈恵会医科大学 解剖学講座

<sup>b</sup>日本歯科大学 生命歯学部 再生医科学研究室

<sup>c</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科 食の安全研究センター

**要 旨** 血管腔内を墨や樹脂、蛍光標識ゼラチンなどで満たした鋳型を作製すると、局所の血管系を三次元的に観察することができる。これを応用して、白墨液を加えたゼラチン溶液で脳血管系を満たして鋳型とし、脳全体を黒く着色したパラフィンに包埋した。パラフィンブロックを薄切しながら、その表面画像を連続的に取り込み、立体再構築したところ、マウスの脳全体の血管系を三次元的に解析することが可能となった。

キーワード：脳、血管系、三次元再構築、マウス

#### 1. はじめに

血管系のように三次元的な走行・分布をする構造物は、三次元的な観察を行うことによって、より容易に、また正確にその全体像を捉えることができる。そこで、器官内の血管系を観察するために、血管内に墨汁を注入し、数百  $\mu\text{m}$  の厚切り切片を作製して透明化し、光学顕微鏡で観察をしたり、アクリル樹脂で血管鋳型を作製して実体顕微鏡や走査型電子顕微鏡で観察したりする方法が行われてきた (図 1, 2)。最近のラットの神経系に関する成書でも、その血管系の項目は墨汁注入厚切り切片の所見に基づいて記載されている<sup>1)</sup>。しかし、墨汁注入厚切り切片では、顕微鏡の焦点面を移動させることで立体的な観察が可能であるが、あくまでも観察者の頭の中でできることであり、広く提示することは難しい。また、樹脂による血管鋳型の観察では、実体顕微鏡でも走査型電子顕微鏡でも立体的に観察することは可能であるが、原理的に表層付近を走行する血管しか観察できず、深部の血管系を観察するためには表層の構造を除去する必要がある。さらに、血管鋳型のみを残してそれ以外の構造物は除去されてしまうため、組織構造との関連性を捉えるのは困難である。

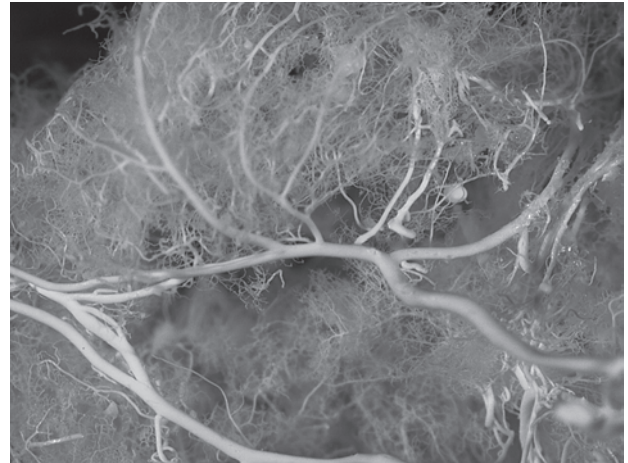


図1 メルコックス (アクリル樹脂) によるマウス脳の血管の鋳型。

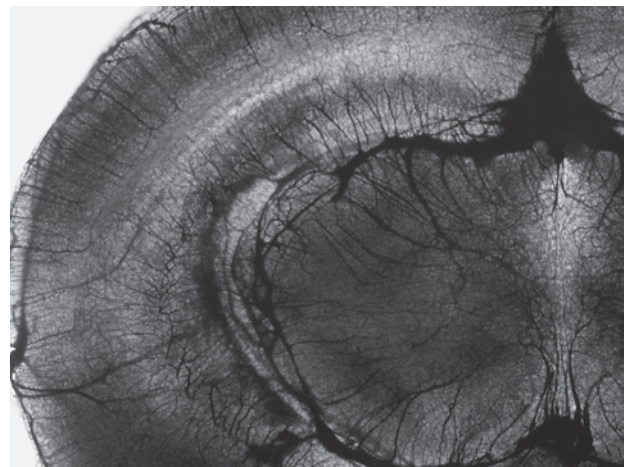


図2 樹脂包埋した脳の墨汁注入厚切り切片。末梢の毛細血管網まで墨汁が満たし、詳細に観察可能であるが、立体的に把握するためには観察者が顕微鏡の焦点面を移動させる必要がある。

#### 2. 蛍光標識ゼラチン法

これまで、我々は共焦点レーザー顕微鏡を用いて血管系を三次元的に捉えるために、種々の方法を試みてきた。共焦点レーザー顕微鏡で画像を得るためには、何らかの方法で対象とするものを蛍光標識する必要がある。血管系を観察するためには、例えば内皮細胞を特異的なマーカーで免疫蛍光染色したり、血管の基底膜を蛍光染色したりする方法が考えられるが、対象とする器官の厚切りの切片を作製してから染色する方法では、全体を均一に染色するのは容易ではない。そこで、血管が管であることを利用し、内腔側から血管を蛍光染色すれば、均一に血管系を染色できるであろうと考え、蛍光色素で標識したゼラチンで血管内を充填する方法を開発した<sup>2-4)</sup>。この蛍光標識ゼラチン法では、Bloom 数の高い、比較的強固でゲル化温度の高いゼラチンを、FITC や RITC などの蛍光色素で標識しておく。この標識は抗体に蛍光色素を

〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8  
TEL: 03-3433-1111  
2008年7月22日受付

結合させるのと同様の反応で行うことができる。この蛍光標識ゼラチンを加温溶解した状態で、実験動物の血管内を還流して充満させ、還流終了後に全身を氷温で冷却して蛍光標識ゼラチンをゲル化させ、固定液でゲル化したゼラチンを硬化させる。その後、厚切りの凍結切片を作製し、封入して共焦点レーザー顕微鏡で観察を行う。本法を用いると、容易に全身の毛細血管網まで蛍光標識ゼラチンで満たされ、臓器内の毛細血管網を観察することが可能である上に、組織構成成分を除去する必要がないため、他の免疫蛍光染色と重染色可能で、血管系と他の構造物との関連性を立体的に把握することが可能となる。また、加温しておけばゼラチンはゲル化することがないために作業時間に余裕があり、胎仔などへの応用も困難ではない<sup>5,6)</sup>。さらに、2種類の異なる蛍光波長の蛍光色素で標識したゼラチンを連続的に還流・充填することで、大まかではあるが、動脈系と静脈系を異なる色で染め分けることが可能である（参考文献3,4の図参照）。

しかしながら、この蛍光標識ゼラチン法も共焦点レーザー顕微鏡で観察することから、種々の制限や欠点がある。その第一は厚さであり、厚切り切片を光透過度の高いポリエステル樹脂に包埋しても、立体像を観察できるのは500 $\mu\text{m}$ が限度である。また、低倍の対物レンズで観察すると、開口数が低いために半値幅が大きくなり、xyの解像度に比べてz軸の解像度が極端に悪くなる。そのため、z軸に平行な方向ではステレオペア画像等で立体的な観察が可能であるが、z軸からの観察角度が大きくなるにつれて解像度が悪くなり、任意の方向から三次元的に観察するのは不可能である（図3）。

### 3. 全脳血管系の三次元的観察

ところで、近年のコンピューター的发展に伴って、連続画像から容易に三次元再構築することができるようになったが、その元になる連続画像の取得法に関しては、あまり進歩していない。確かに共焦点レーザー顕微鏡は厚い組織切片より容易に歪みやずれのない光学的断層像を取得できる最新の技法であるが、上記のように厚さの限界やz軸上の分解能の問題を避けることができない。厚さの限界やz軸上の分解能の問題を克服するためには、ミクロトームで薄切した連続切片より連続画像を取り込むのが一般的な方法であるが、この方法では個々の画像の歪みと画像間のずれを避けることができず、この調整と対象とする構造物の抽出に莫大な労力を必要とする。これらを避けて、ずれや歪みのない連続画像を得るための一法として、パラフィンや樹脂ブロックの表面像を取り込むことが試みられており、理研の横田らはこの方法を発展させて、コンパウンドに包埋して凍結した試料から高速に切削しながらその表面像を取り込む装置を開発し、三次元構築を行っている。しかし、切削しただけの表面から取り込まれた表面像は鮮明ではなく、表面像のS/N比を向上させるために、骨を包埋した黒色樹脂の表面をミネラル油で被覆して画像を取り込んだり、予め染色した試料の特定の波長の反射光のみの画像を取り込んだりといった工夫がなされている<sup>7-9)</sup>。

これらの方法を参考にし、また種々の条件を考慮して、脳全体の血管系の連続画像を取り込む方法の開発を試みた<sup>10)</sup>。以下にその技法について紹介する。まず、設備の面や取り扱

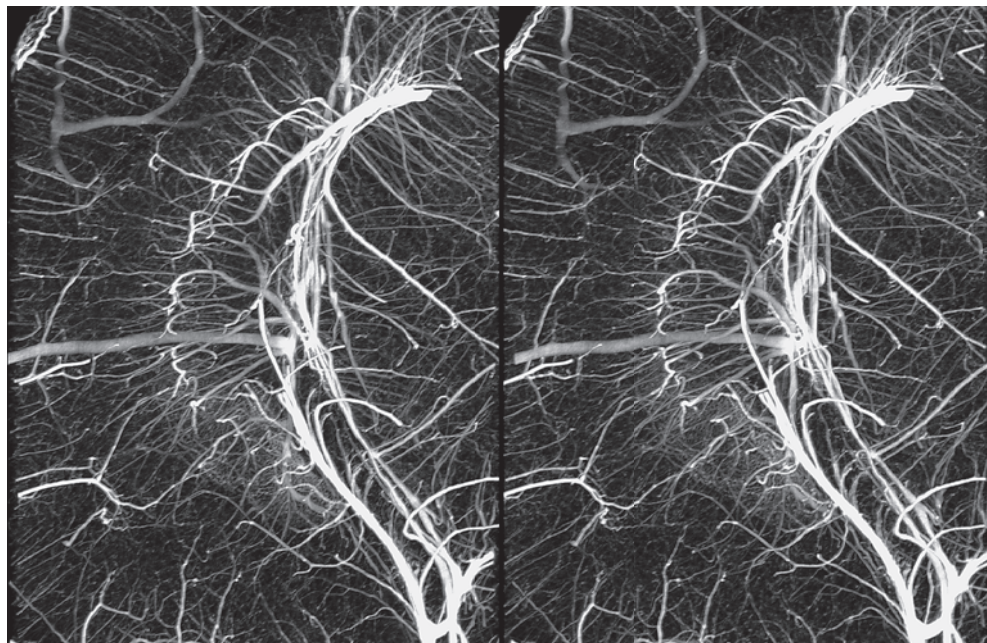


図3 蛍光標識ゼラチンを注入した脳の血管系のステレオ画像。血管内に蛍光標識ゼラチンを注入した脳（海馬付近）の厚切り切片を樹脂に包埋し、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ステレオ画像とした。毛細血管網に至るまで三次元的に観察可能であるが、脳全体の血管系は捉えることができない。

いの容易さからパラフィンブロックの表面の画像を取り込むこととした。パラフィンブロックから切片を作製するためのマイクロームには、滑走式と回転式があるが、回転式はブロックが移動するため、同じ位置で画像を取り込むのは困難である。また、滑走式マイクロームにはパラフィンブロックを固定した試料台がレール上で斜め前方に移動していくユング型（大和光機やサクラ精機製のマイクロームはこの型である）と試料台が上下のみに移動するハイデルベルク型（最近の製品では、ライカ社やマイクローム社のマイクローム）がある。ユング型は切片を切るたびに試料台が前方に移動していくため、これも好ましくない。試料台の下に長いねじが切っており、試料が上下方向のみに動くハイデルベルク型は、メスが移動する平面に対して、常に同じ位置にパラフィンブロックの表面がくるため、切片を薄切していった試料台が上がっても、ブロックの薄切面の位置は変化しない。この部位にマクロレンズやマクロスコープの焦点を合わせておくと、切片を薄切していても常に薄切面の位置は一定であり、z軸が固定された連続画像を取り込むことができる。また、ブロックの表面をデジタルカメラで撮影するために、カメラに直接マクロレンズを装着してカメラを固定しておくか、一軸のマクロスコープにカメラを装着しておく。通常の実体顕微鏡だと、カメラで取り込める画像は右目か左目で観察している画像であり、どちらにしても実体顕微鏡のレンズに対して光軸が斜め方向になるため、画像が歪んでしまう。この目的にかなったマクロスコープは、かつてはウィルド社（ライカ社）のみで製造されていたが、最近ではオリンパス社でも製造されている。これらのハイデルベルク型の滑走式マイクロームとウィ

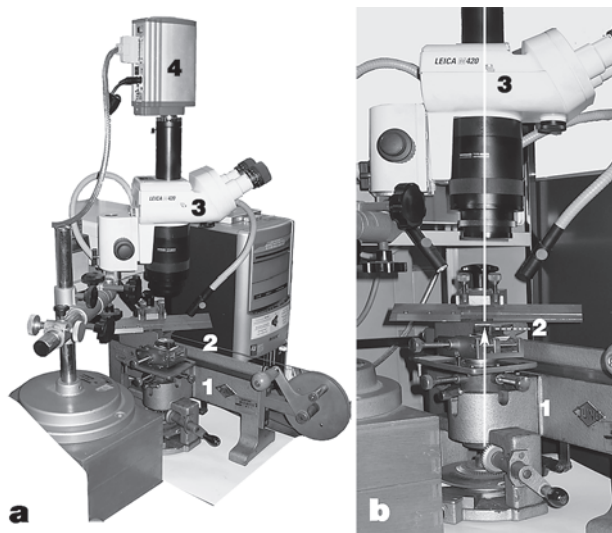


図4 パラフィンブロックの表面画像を取り込む装置（文献10より引用 Copyright ©2007 John Wiley & Sons, Inc.）。1：ハイデルベルク型滑走式マイクローム、2：パラフィンブロック、3：マクロスコープ、4：デジタルカメラ。滑走式マイクロームの試料が上下する軸をマクロスコープの光軸と一致させておく。パラフィンブロックをメスで切っていくと、メスが通過する平面が一定であるので、マクロスコープの焦点面は変化しない。

ルドのマクロスコープ、デジタルカメラをセットしたのが図4である。

次に試料であるが、脳の血管系を対象としているので、血管系と周囲の組織とのコントラストを強くつけてやれば、血管系のみを取り込むことが容易になる。そこで墨汁とゼラチンの混合液で脳の血管系を還流・充填し、血管系のみを黒色に標識した。この脳全体を脱水し、パラフィンに包埋して、その表面画像を観察してみた。

鋭利な替え刃メスで切削されたパラフィンブロックの表面は、滑らかなように見えてもマクロスコープで拡大すると微細な凹凸があり、光が乱反射して鮮明な像を得ることはできない。墨汁を含んだゼラチン溶液で還流した脳をパラフィンに包埋し、面出しをしてブロック表面の画像を取り込んでも、光の乱反射のため血管の局在さえも観察することが困難である。しかし、このパラフィンブロックの表面の凹凸を埋めるために、液体パラフィンを滴下し、表面を覆ってみると、画質は劇的に改善され、血管の走行を詳細に観察することが可能である。但し、パラフィンブロック表面に露出した血管だけでなく、より深部を走行する血管も観察される（図5）。

墨汁含有ゼラチン溶液で還流した脳血管系の連続画像を取

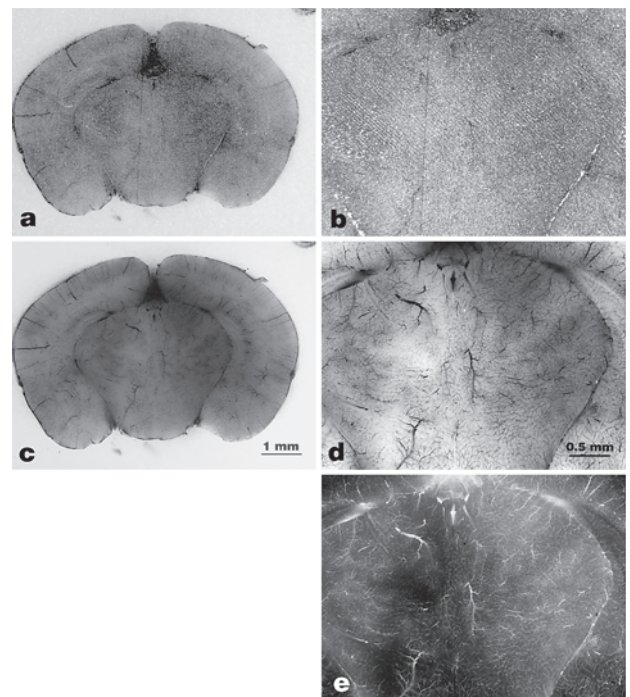


図5 パラフィンブロック表面像に対する液体パラフィンの効果（文献10より引用 Copyright ©2007 John Wiley & Sons, Inc.）。a, b: 切削しただけのパラフィンブロック表面、c, d: 液体パラフィンで被覆したブロック表面像、e: dの白黒反転画像。どんなに鋭いメスで切削したとしてもパラフィンブロックの表面には微細な凹凸がある。その表面を液体パラフィンで覆うとこれらの凹凸が埋められ、表面像の画質は劇的に向上する。このようにして取り込んだ画像の白黒を反転させると蛍光画像のようになり、共焦点レーザー顕微鏡用の三次元再構築ソフトのデータとして三次元再構築が可能である。

り込み、三次元再構築ソフトの Imaris (Bitplane AG) を用いて再構築を行った。その結果、z 軸方向より観察する場合は問題ないが、回転させて側方から観察しようとする、太い血管の影が z 軸方向に広がっていた。これは液体パラフィンで覆われたパラフィンブロックの透過性が向上した結果、ブロック表面には存在していない、より深部の血管の像が取り込まれたことによるものである。三次元像を z 軸方向で切断し、影の長さを測定すると、広いものでは 1 mm 以上あった。この影は連続画像を画像処理することで低減あるいは削除可能と考えられるが、このような処理を行うと、太い血管に隠れた微細な血管の像も同時に消去してしまう恐れもあり、また、元画像に処理を加えるよりは、画像の取り込み法を改善すべきと考える。

上記の深部の太い血管の影を消すためには、パラフィンの透明度を低下させ、白色に染めてしまえばよいのであるが、絵の具等で白色に使用されているのは、炭酸カルシウム、酸化鉛、酸化チタンなどであり、これらはパラフィンと混合しても溶解するのではなく、懸濁するのみであり、ましてや脳の実質を白色に染めることは不可能であった。そこで、パラフィンの白と血管の黒を反転させ、血管を白く、パラフィンを黒くする方法を試みた。酸化チタン分子はゼラチンと混合しても、懸濁するだけで時間が経過すると沈殿となってしまう。ところが、墨を作製するのと同じ方法で作られた白墨(しろずみ)は酸化チタンをゼラチンでコロイド化したものであり、市販の白墨液はゼラチン溶液と容易に混合できる。そこで、この白墨液含有ゼラチン溶液で脳の血管を還流した。次に、パラフィンを黒色にする方法であるが、パラフィンは疎水性の物質であることから脂肪染色に用いる色素は容易に溶解する。赤色のズダンⅢや黒色のズダン黒を溶解したパラフィンに加えると、均一に溶解し、パラフィンそのものを着色することができる。さらに、脳の実質も脂質が多く、アルコール脱水やキシレンで透徹しても、ズダン黒が浸透し、脳全体を黒色にすることができる。そこで、白墨含有ゼラチン溶液で脳の血管を還流・充填し、アルコール脱水を行ったあと、ズダン黒を添加したキシレンで透徹し、ズダン黒添加パラフィンに包埋した。そうすると、パラフィンは黒色で脳がどこに位置しているのかの判定も困難であったが、血管内の白墨含有ゼラチンが確認できるところまで切削して面出しし、その表面を液体パラフィンで覆ってその画像を取り込むと、深部の血管は隠され、ブロック表面に露出した血管の像のみを取り込むことが可能であった。このようにして取得した連続画像の z 軸方向での切断像を用いて、z 軸の分解能を確認すると、5 μm 毎の画像でも像の重複が認められず、分解能は 5 μm 以下と考えられた。このような連続画像より Imaris を用いて三次元再構築したところ、余分な影のない鮮明な三次元像を任意の方向から観察することが可能であった(図 6)。

今回の一連の実験により、マウスの血管系に白墨液を加えたゼラチン溶液を充たし、ズダン黒で着色したパラフィンに

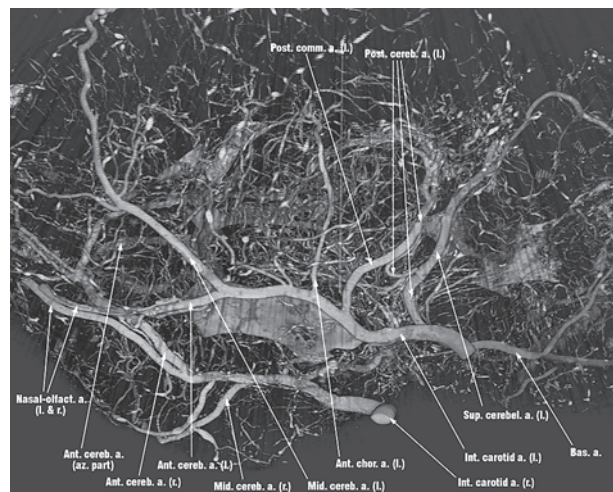


図 6 白墨液を添加したゼラチンで満たした脳血管系の三次元像(文献 10 より引用 Copyright ©2007 John Wiley & Sons, Inc.)。脳の血管系に白墨液を添加したゼラチンを注入し、ズダン黒で着色したパラフィンブロックに包埋した。パラフィンブロックの表面より連続画像を取り込み、三次元再構築ソフトで再構築した。この図は図 1 と同じ方向から観察しているが、一旦三次元再構築すれば、任意に回転、拡大、縮小が可能であり、あらゆる方向から脳の血管系を観察することができる。

包埋し、パラフィンブロックの表面を液体パラフィンで覆ってから表面像を取り込むことにより、ずれや歪みのない鮮明な連続画像を取り込むことができた。そして、この連続画像を三次元再構築することで、マウスの脳血管系の全体像を立体的に観察することが可能となった。

#### 4. 終わりに

組織などを包埋したブロックを一定の厚さで削りながら、その表面の画像を連続的に取り込んでいく方法は、これまでにもなされてきている。その代表的なものは米国 National Library of Medicine の The visible human project である。組織・器官レベルでは理研の 3 次元内部構造顕微鏡プロジェクトがある。理研のシステムでは短時間で膨大な連続像を取り込むことができるが、高額な専用の装置を必要とし、メスで切削したそのままの表面像を取り込むため、個々の像の画質は十分ではなく、三次元像も満足のいくレベルのものではない。また、近年 μCT やより高解像度のシンクロトロン放射 μCT が実用化され、脳血管系の三次元的観察に応用されつつある<sup>11)</sup>が、まだまだ高額で普及しておらず、試料作製法としても確立されたものがない。

それに対して、今回開発した方法は、1) 研究室の通常の設備を用いており、特殊な装置を必要としない。2) ブロックの表面を液体パラフィンで覆う手間はありますが、それによって画質が劇的に改善される。3) 画像の取り込みは 1 時間に 100 枚程度可能であり、1 日で一つの脳の連続画像を取り込むことができる。4) 共焦点レーザー顕微鏡よりもはるかに z 軸上の解像度が高い。5) 酸化チタンのコロイドは EDTA

による脱灰の影響を受けないため、脳だけではなく脱灰した頭部全体を試料とし、その全体の血管系の連続画像を取り込んで立体再構築を行うことも可能、といった特徴がある。但し、今回この方法を用いて作製した三次元像には二種類のノイズが認められた。一つはデジタルカメラの画素欠陥によるものと考えられ、連続画像の同一部位の画素に表れるため、三次元再構築すると、z軸方向に走る直線として認められた。もう一つは液体パラフィン中の微小な気泡によるものと考えられた。

本法によって、各系統マウスの脳血管系の連続画像を取り込み、三次元像を作製しておけば、任意の方向から血管系を観察することが可能であり、マウスの系統間における脳血管系の違い、脳の発生過程における血管系の発達、遺伝子改変マウスや突然変異マウス、疾患モデルマウスの脳血管系の変化などを調べていく際の基礎的データを提供することができるであろう。

#### 文 献

- 1) Scremin O.U.: Cerebral vascular system. In: The rat nervous system, 3rd ed. (George Paxinos, Ed.), Academic Pr., San Diego, CA, USA. pp. 1167–1202 (2004)
- 2) 橋本尚詞, 日下部守昭: 毛細血管網の3次元観察法. 細胞工学, 15, 660–670 (1996)
- 3) Hashimoto H., Ishikawa H., Kusakabe M.: Three-dimensional investigation of vascular nets by fluorochrome-labeled angiography. *Microvasc. Res.*, 55, 179–183 (1998)
- 4) Hashimoto H., Ishikawa H., Kusakabe M.: Preparation of whole mounts and thick sections for confocal microscopy. *Methods Enzymol.*, 307, 84–107 (1999)
- 5) Hashimoto H., Ishikawa H., Kusakabe M.: Three-dimensional analysis of the developing pituitary gland in the mouse. *Dev. Dynamics*, 212, 157–166 (1998)
- 6) Hashimoto H., Ishikawa H., Kusakabe M.: Development of vascular networks during the morphogenesis of intestinal villi in the fetal mouse. *Acta Anat. Nippon*, 74, 567–576 (1999)
- 7) Laan A.C., Lamers W.H., Huijsmans D.P., Kortschot A.T., Smith J., Strackee J., Los J.A.: Deformation-corrected computer-aided three-dimensional reconstruction of immunohistochemically stained organs: Application to the rat heart during early organogenesis. *Anat. Rec.*, 224, 443–457 (1989)
- 8) Odgaard A., Andersen K., Melsen F., Gundersen H.J.G.: A direct method for fast three-dimensional serial reconstruction. *J. Microsc.*, 159, 335–342 (1990)
- 9) Yokota H., Kudoh K., Sato K., Higuchi T.: Development of a 3-dimensional internal structure microscope (3D-ism) for the observation to biological organism. In: Proceedings of Microscopy and Microanalysis, vol. 3, (Bailey GW ed.). New York. Microscopy Society of America, pp. 243–244 (1997)
- 10) Hashimoto H., Kusakabe M., Ishikawa H.: A novel method for three-dimensional observation of the vascular networks in the whole mouse brain. *Microsc. Res. Tech.*, 71, 51–59 (2008)
- 11) Heinzer S., Krucker T., Stampanoni M., Abela R., Meyer E.P., Schuler A., Schneider P., Müller R.: Hierarchical microimaging for multiscale analysis of large vascular networks. *Neuroimage*, 32, 626–636 (2006)