

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 4 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2012

課題番号：21611009

研究課題名（和文） マイクロ造影法による生体組織解析

研究課題名（英文） Microtomographic analysis of biological tissues

研究代表者

水谷 隆太 (MIZUTANI RYUTA)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：70272482

研究成果の概要（和文）：コンピュータ断層法（CT法）は三次元構造を非侵襲的に可視化する方法である。測定対象を様々な方向から撮像し、これを再構成計算することにより、スライス毎の断層像が得られる。近年、このCT解析をX線顕微法と組み合わせることにより、微細な三次元構造の解析が実現されており、マイクロトモグラフィ法と呼ばれている。研究代表者らは、この方法を生体組織の構造研究へ適用し、重元素標識したヒト大脳皮質の三次元構造を明らかにした。得られた構造では、細胞あるいは細胞内小器官が可視化されており、神経細胞のネットワークや毛細血管の管腔構造などが三次元的なX線吸収係数の密度分布として解析された。この毛細血管の密度分布をテンプレート構造として利用することにより、血管の樹脂モデルを作成することができた。これらの結果は、X線マイクロトモグラフィ法が様々なヒト組織構造の解析に適用可能であることを示している。

研究成果の概要（英文）：Computed tomography (CT) is a noninvasive technique for visualizing three-dimensional structures. Tomographic slices are reconstructed from a series of projection images acquired by a rotational scan. The application of x-ray microscopic approaches to CT analysis has led to the visualization of the three-dimensional microstructures of biological samples. We determined three-dimensional cellular and subcellular structure of human cerebral cortex stained with high atomic-number probes. The obtained structure indicated that the neuronal networks and capillary vessel architectures were visualized as the three-dimensional distribution of x-ray absorption coefficients. The capillary microstructures were used as a template to fabricate a resin model of capillary blood vessels. These results indicated that x-ray microtomography is a potential method of visualizing human tissue structures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医学物理学・放射線技術学

科研費の分科・細目：医学物理学・放射線技術学

キーワード：生体組織，三次元構造，マイクロトモグラフィ，神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロトモグラフィ法は、CTスキャンの原理により三次元微細構造を明らかにする手法である。生体組織の三次元解析法としては、共焦点顕微鏡などの光学的手法による研究が多く報告されてきているが [e.g., Dodt *et al.*, *Nat. Methods* **4**, 331 (2007)], 蛍光色素の特異的発現や結合を前提としており、ヒト組織への応用は難しい。また、可視光等を使用する限り、不透明な生体組織の三次元構造は解析できない。

一方、X線は生体を容易に透過するため、組織内部の観察が可能である。このことは、レントゲン写真により人体内部が観察できることからわかる。従って、生体組織にマイクロトモグラフィ法を適用すれば、組織の微細な三次元構造を明らかにすることができる。

マイクロトモグラフィ法では、X線像をもとに三次元構造解析を行う。そのためには、十分なコントラストのあるX線像を得ることが必須である。しかし、生体組織は軽元素からなっており、そのままではコントラストは微弱である。これまで、軟組織に吸収されやすい軟X線を用いる手法や、位相によりコントラストを強調する手法などが用いられてきたが、これらの手法は試料の電子密度そのものを観測している。従って、構造と生体機能を関連付けて議論することが困難である。

研究代表者は、物理的な原理に依拠してコントラスト強調を行うのではなく、試料をX線観察に適した方法で標識して構造解析することを着想し、生体組織に適用できる方法論を開拓してきた。この方法はごく簡単な原理に基づくが、試みてこれられなかった手法である。既に、組織選択的な重元素染色により、160 nm分解能での解析像が得られることを見出し、「マイクロ造影法 microcontrasting」として報告している [Mizutani *et al.*, *J. Synchrotron Radiat.* **14**, 282 (2007)]。

## 2. 研究の目的

上述の背景から、本研究では、マイクロトモグラフィ法により生体組織の三次元構造を細胞～細胞内小器官スケールで明らかにすることを目的とした。対象としては、主にヒトの組織検体を用いた。それぞれの組織の三次元構造を解析することにより、生体機能を担うメカニズムを明らかにすることを目指した。主に、脳組織を対象とした研究を進め、神経ネットワークを解析し、その回路を決定した。

マイクロトモグラフィ測定で得られる三次元データは膨大であり、テラバイト単位のものとなる。このような画像データを解釈す

るための方法論も、構造解析では重要なポイントとなる。そこで本計画では、そのような解析手法を確立することも含めて研究を進めた。

## 3. 研究の方法

マイクロトモグラフィ法によるヒト組織の三次元構造解析は、概略としては以下の段階を経て行った。その詳細については、項目5の各種論文等で公表している。

ヒト組織の取り扱いにあたっては、連携する医療機関での臨床研究に関する倫理審査等の他、所属機関での各種審査を経て、認められた条件に従って実施した。

- (1). 病理解剖により摘出されたヒト組織をホルムアルデヒド固定した。この段階は提携する医療機関の協力を得て行った。これら検体から、それぞれ切片を切り出したのち、重元素標識を施した。これまでに経験のある方法を改変し、金・白金・オスミウムなどの重元素化合物による標識を行った。これら重元素標識法の基本的なプロトコルは検討済みであるが、より精細な標識像を得るため、重元素化合物による処理条件等について検討した。
- (2). 得られた組織検体を細切し、適切な大きさの試料とした。放射光X線は迅速な測定を可能にする反面、試料へのエネルギー照射量が大きい。これに耐えられるよう、エポキシ樹脂に浸漬した後に樹脂包埋し、測定試料とした。
- (3). 研究代表者は、大型放射光施設 SPring-8 において2011年度より3年間の長期利用課題の実施が認められ、本研究も当該課題と連動して実施した。マイクロトモグラフィ法の光学系としては、投影型と結像型の2つの方法を適用した。投影型は、分解能としてはマイクロメータースケールであるが広視野を短時間で可視化できることから、全体像の解析に用いた。この投影型トモグラフィ法により得られる結果に基づいて、結像型での高分解能解析を行い、生体組織の三次元構造を明らかにした。

## 4. 研究成果

平成21年度は、マイクロトモグラフィ法による生体組織の三次元構造解析法を確立することを主要な課題とした。

放射光施設でのマイクロトモグラフィ測定では、光学系として投影型を用いて、重元素標識状態の検討を行った。空間分解能の検定のための標準試料も作成し、測定に用いた。得られたX線像を用いてトモグラフィ再構成計算を行い、三次元構造を求めた。電子密度の分布をトレースすることにより、ヒト大

脳の神経ネットワークの構造が解析可能であることを示した。また、構造を三次元プリンタで再現することにより血管モデルを製作した。

平成22年度は、マイクロトモグラフィ法による生体組織の三次元構造解析を恒常的に行うため、組織固定・重元素標識・測定試料調製法をさらに検討し、様々な状態の検体から構造解析に適した試料を作成することを主要な課題とした。

前年度に検討した条件に基づいて、精細な解析像が得られる条件で重元素標識を行い、細切して適切な大きさの試料とした。放射光X線は迅速な測定を可能にする反面、試料へのエネルギー照射量が大きい。これに耐えられるよう、エポキシ樹脂に浸漬した後に樹脂包埋し、測定試料とした。樹脂の十分な硬度を確保するために、溶媒から樹脂液への置換時に十分な浸透が得られる条件を確立し、高分解能解析が可能な試料を得た。

また、前年度までに測定したデータの再構成計算や各種の画像処理を行い、大容量データの取り扱い方法を確立した。空間分解能の検定のための標準試料を用いて、分解能評価もあわせて行った。

平成23年度は、マイクロトモグラフィ法による生体組織の三次元構造解析法をヒト脳組織に応用するため、これまでに確立してきた重元素標識法を応用することを主要な課題とした。

既に有効性を確認しているプロトコルに従って、標識試料をエポキシ樹脂に浸漬した後に樹脂包埋し、測定試料とした。複数の症例から測定試料を得ることが可能になり、組織構造を比較・検討するための基盤が確立できた。

平成24年度は、症例・部位を変えて試料を調製し、実際の測定を行った。また、得られる構造の解析にも重点をおいて、研究を進めた。三次元像の再構成では、超並列計算環境を用いた計算プログラムを開発し、迅速な画像処理を可能とした。また、組織構造の解析では、神経ネットワークなどの複雑多様な構造要素を自動的に認識するアルゴリズムを開発した。

以上の結果については、以下の項目5のリストのとおり、学術誌等でさらに詳細に発表している[Mizutani *et al.*, *Cereb. Cortex* **20**, 1739 (2010)他]。右図1には、解析した三次元構造の一例を示す。

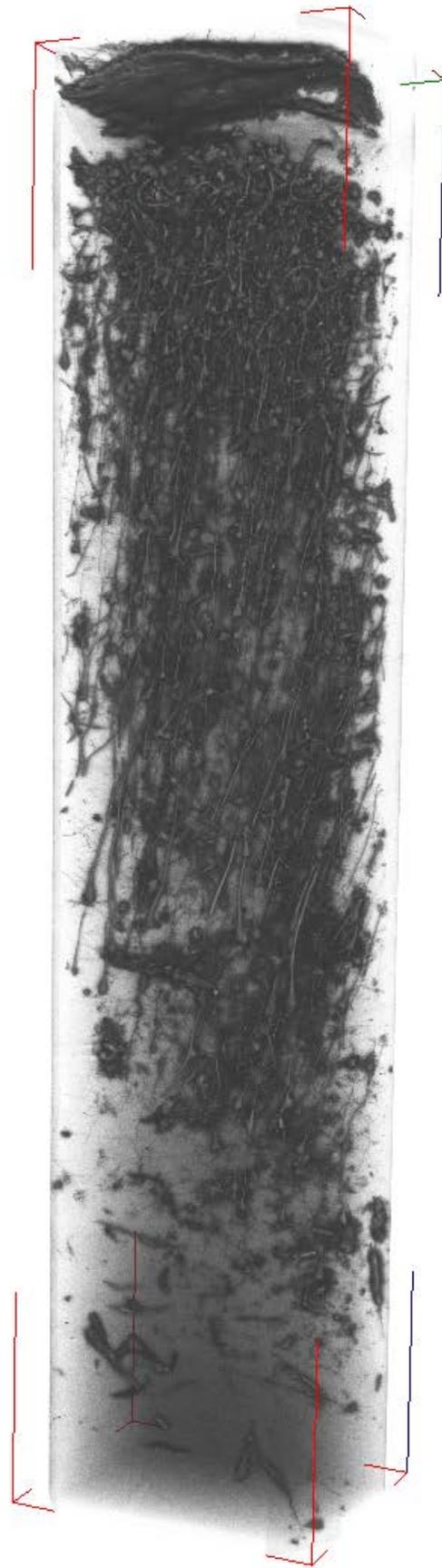


図1. ゴルジ法によるヒト大脳皮質の三次元構造の解析例。上が脳表。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

全て査読有。\*Corresponding author.

1. \*Ryuta Mizutani, Keisuke Taguchi, Masato Ohtsuka, Minoru Kimura, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki (2013). X-ray microtomographic visualization of Escherichia coli by metalloprotein overexpression. *J. Synchrotron Radiation*, in press.
2. \*Hideshi Yokoyama, Ryuta Mizutani, Yoshinori Satow (2013). Structure of a double-stranded DNA (6-4) photoproduct in complex with the 64M-5 antibody Fab. *Acta Crystallographica D69*, 504-512.
3. \*Yosuke Masuda, Yasushi Nitani, Ryuta Mizutani, Shuji Noguchi (2013). Crystal structure of 6-guanidinohexanoyl trypsin near the optimum pH reveals the acyl-enzyme intermediate to be deacylated. *Proteins* **81**, 526-530.
4. \*Hideshi Yokoyama, Ryuta Mizutani, Yoshinori Satow, Kousuke Sato, Yasuo Komatsu, Eiko Ohtsuka, Osamu Nikaido (2012). Structure of the DNA (6-4) photoproduct dTT(6-4)TT in complex with the 64M-2 antibody Fab fragment implies increased antibody-binding affinity by the flanking nucleotides. *Acta Crystallographica D68*, 232-238.
5. \*Ryuta Mizutani, Yoshio Suzuki (2012). X-ray microtomography in biology. *Micron* 43(2-3), 104-115. 依頼による総説.
6. \*Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Susumu Takekoshi, Naoya Nakamura, Yoshio Suzuki (2011). Building human brain network in 3D coefficient map determined by X-ray microtomography. *AIP Conf. Proc.* 1365, 403-406.
7. \*Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura, Yoshio Suzuki (2010). Microtomographic analysis of neuronal circuits of human brain. *Cerebral Cortex* **20(7)**, 1739-1748.
8. \*Ryuta Mizutani, Keisuke Taguchi, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki (2010). Estimation of presampling modulation transfer function in synchrotron radiation microtomography. *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research A* **621(1-3)**, 615-619.
9. \*Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, R. Yoshiyuki Osamura, Susumu Takekoshi, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki (2010). Submicrometer tomographic resolution examined using a micro-fabricated test object. *Micron* **41(1)**, 90-95.
10. \*Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki (2009). Three-dimensional cellular and subcellular structures of human brain tissue determined by microtomography. *Journal of Physics: Conference Series* **186**, 012108.

[学会発表] (計 9 件)

1. 雑賀里乃, 伊藤安希, 竹腰進, 中村直哉, 新井誠, 大島健一, 糸川昌成, 竹内晃久, 上杉健太郎, 鈴木芳生, 水谷隆太. X線マイクロトモグラフィ法によるヒト大脳皮質の三次元構造解析. 第85回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, 2012年12月15日.
2. 水谷隆太. X線マイクロトモグラフィ法によるヒト大脳皮質の三次元構造解析. SPring-8シンポジウム2012, 大阪大学コンベンションセンター, 2012年08月25日. 依頼による.
3. 田口恵介, 水谷隆太. フェリチンの過剰発現による生物試料の重元素標識化. 第84回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 2011年9月23日.
4. 坂本康太, 福本瞳, 佐藤由子, 水谷隆太, 佐多徹太郎, 片野晴隆. ヒトヘルペスウイルス8関連疾患におけるウイルスmicro RNAの発現. 第58回日本ウイ

ルス学会学術集会, 徳島県郷土文化会館, 2010年11月7日.

5. Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura and Yoshio Suzuki. Microtomographic Analysis of Human Brain Circuits. *10<sup>th</sup> International Conference on X-Ray Microscopy*, Chicago, 2010年8月19日.
6. 田口恵介, 水谷隆太. 三次元テストパターンを用いたマイクロトモグラフィ装置の分解能評価. 日本顕微鏡学会第66回学術講演会, 名古屋国際会議場, 2010年5月.
7. 水谷隆太, 竹内晃久, 上杉健太郎, 竹腰進, 長村義之, 鈴木芳生. X線マイクロCT法による脳組織の三次元構造解析. 日本顕微鏡学会第66回学術講演会, 名古屋国際会議場, 2010年5月25日. 依頼による.
8. 水谷隆太. 放射光X線マイクロCT法による生体軟組織の三次元構造解析. 第10回X線結像光学シンポジウム, つくば国際会議場, 2009年11月7日. 依頼による.
9. 坂本康太, 浅沼秀樹, 中村智之, 菅野隆行, 水谷隆太, 佐多徹太郎, 片野晴隆. KSHVのワクチン開発に関する基礎研究—KSHV粘膜ワクチン開発の可能性. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 都市センターホテル (東京都), 2009年10月25日.

[図書] (計3件)

\*Corresponding author.

1. \*Ryuta Mizutani (2010). Revealing Human Brain Circuits by Microtomography. *SPRING-8 Research Frontiers 2009*, 42-43. 依頼による.
2. \*Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura and Yoshio Suzuki (2010). Unveiling 3D Biological Structures by X-ray Microtomography. In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, eds. Méndez-Vilas, A. & Díaz Alvarez, J., pp. 379-386, Badajoz, Formatex Research Centre. 依頼による.

3. \*Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura and Yoshio Suzuki (2009). Three-dimensional microstructural analysis of human brain tissue by using synchrotron radiation microtomographs. In *Handbook on White Matter*, eds. Westland, T.B. & Calton, R.N., (pp. 247-277), New York, Nova Science Publishers. 依頼による.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.el.u-tokai.ac.jp/ryuta/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 隆太 (MIZUTANI RYUTA)

東海大学・工学部・教授

研究者番号 : 70272482