

4

微小血管動態撮影用顕微鏡の開発研究

株式会社 太洋製作所

報 告 要 旨

研究委託の名称	微小血管動態撮影用顕微鏡の開発研究
企 業 名	株式会社太洋製作所
研究委託の目標	
<p>小動物の脳表血管を近赤外、蛍光及びレーザードップラー装置を用いて同一部位を前記3種の方法で観測するための顕微鏡の開発を行なう。</p> <p>測定位置の再現性を1ミクロン程度と高精度化し、更にすべての機器が正確に複数箇所での計測が出来るようにコンピューター制御された位置決め機能を開発する。</p> <p>この位置決めは、計測される脳の場所に応じ座標系全体がチルトする必要があるため、チルトした状態においても座標系が管理できるシステムとする。</p> <p>この顕微鏡システムで収集した膨大なデータを処理するワークステーション及び、血流の変化の分布を測定するレーザードップラー血流計の開発も合わせて行い搭載するものとする。</p>	
実 施 項 目	
駆 動 台 開 発	当初計画では、駆動台を多関節（X・Y・Z・ θ_1 ・ θ_2 ）に動く構想で計画していたが重量がかさむことや、関節の先端部（顕微鏡）での揺れが収まらない状態になると判断し後述2分割方式とした。
光 路 開 発	対物レンズからの光をプリズムにより2分することにより、2つのCCDカメラによる同一光の同時計測を目的とした光計測顕微鏡ユニット（光路）の開発を行った。
ステレオ開発	既存のステレオではラットの頭部を固定するだけのものですが、新開発のステレオはX・Y・Z・ θ 軸を付加し駆動台の動きを補助しラット脳表をあらゆる角度から捕らえられるようにした。
光 源 開 発	脳表の反射光の光計測は、脳活動に伴うヘモグロビンの反射光の変化が10%のマイナス4乗以下の変化を測定対象にするため、照射する光源はそれ以下の安定性が必要であり更に、電気生理学的信号の測定に有害になるノイズの発生しない構造にする必要があった。
結 果	
<p>小動物の脳表の微小循環および反射光による光計測を、同一個体において同一条件で精度良い観察を可能にするためのミクロ駆動台を製作した。</p> <p>生きている動物脳表の血管の微小循環を観察するために動物を載せるステージ全体をxyz方向に操作する架台を製作し、全体の機械的振動を除くための除振台の上に設置した。最終的な測定位置の再現性は1ミクロン程度とした。</p> <p>また、主に測定対象になるラットの領域を任意に設定できるように、頭部の回転を自由</p>	

に出来るステレオ頭固定装置を開発した。

反射光による光計測の能活動に伴う変化量がわずかであるため、高いS / Nと10のマイナス4乗以下の揺らぎの安定性の高い光源で、さらに電気生理学的信号の測定に有害になるノイズの発生しない光源を開発した。

また、脳血流信号はレーザードップラー血流計を用いて脳表血流量を測定するが、プロープの設定位置などに依存するのを解決する方法として、2ユニット計測にして基準点に対する相対的定量測定が可能になった。

生理学的なわずかの特性の差を検出するために、2台の高感度のCCDを光軸系を一致させて設置し、2台のCCDの差分画像を測定できるようにした。

ビデオレートで収集される大容量画像データを処理するための十分な容量の画像を保存可能なディスク容量と、高速な処理と、画像表示の可能な速度とメモリーを備えたワークステーションを用意した。

取得物件の利用計画

1. 新技術の概要

1.1 研究委託の内容

小動物の脳表の微小循環および反射光による光計測を、同一個体において同一条件で精度良い観察を可能にするためのミクロ駆動台の作成を目的とする。

生きている動物脳表の血管の微小循環を観察するために動物を載せるステージ全体を xyz 方向に操作する架台を作成し、全体の機械的振動を除くための除振台の上に設置する。最終的な測定位置の再現性は1ミクロン程度とする。また、主に測定対象になるラットの領域を任意の設定できるように頭部の回転を自由に出来るステレオ頭部固定装置を開発する。

反射光による光計測の能活動に伴う変化量がわずかであるため高いS/Nと10のマイナス4乗以下の揺らぎの安定性の高い光源でさらに電気生理学的信号の測定に有害になるノイズの発生しない光源を開発する。また、脳血流信号はレーザードップラー血流計を用いて脳表血流量を測定するが、プローブの設定位置などに依存するのを解決する方法として2ユニット計測にして基準点に対する相対的定量測定を可能にする。

生理学的なわずかの特性の差を検出するために、2台の高感度の CCD を光軸系を一致して設置し2台の CCD の差分画像を測定できるようにする。

ビデオレートで収集される大容量画像データを処理するための十分な容量の画像を保存可能なディスク容量と高速な処理と画像表示の可能な速度とメモリーを備えたワークステーションを準備する。

2. 実施期間

平成8年1月16日～平成8年10月31日

3. 実施場所

株式会社太洋製作所

所在地：秋田県仙北郡角館町雲然字荒屋敷79-1

4. 実施経過

月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
項目											
仕様決め・構想										
設計										
組立・調整・試験					
まとめ										
報告書作成										

..... 計画 _____ 実行

5. 研究委託の結果

5-1 実施項目

(1) 研究の内容

小動物の脳表血管を近赤外、蛍光及びレーザードップラー装置を用いて同一部位を前記3種の方法で観測するための顕微鏡の開発を行なう。

測定位置の再現性を1ミクロン程度と高精度化し、更にすべての機器が正確に複数箇所の計測が出来るようにコンピューター制御された位置決め機能を開発する。

この位置決めは、計測される脳の場所に応じ座標系全体がチルトする必要があるため、チルトした状態においても座標系が管理できるシステムとする。

この顕微鏡システムで収集した膨大なデータを処理するワークステーション及び、血流の変化の分布を測定するレーザードップラー血流計の開発も合わせて行ない搭載するものとする。

(2) 研究の目的

座標軸のうちY軸が傾斜した状態においても、対象物に対し座標系を維持できるXYZの位置決め制御システムの開発を行なう。

ある範囲内の流体の流速の変化をマクロ的にとらえることのできるシステムにレーザードップラーを用いた装置の開発を行なう。

(3) 期待される効果

XYZの制御システムは位置再現性として1ミクロンが可能であり、同一個体の複数部位を同一条件で複数の観測手段での計測を可能とするものである。

また、レーザードップラー血流計については、あらゆる生体の部位の血流の変化を接触することなしに測定が可能であり、さらに生体のみならず様々な流体の観測の新しい手段として広範囲な応用が期待される。

5-2 実地結果

(1) 研究の内容

小動物の脳表の微小循環および反射光による光計測を、同一個体において同一条件で精度良い観測を可能にするためのミクロ駆動台を作成した。

生きている動物脳表の血管の微小循環を観察するために動物を載せるステージ全体をx y z方向に操作する架台を作成し、全体の機械的振動を除くための除振台の上に設置した。最終的な測定位置の再現性は1ミクロン程度とした。また、主に測定対象になるラットの領域を任意の設定できるように頭部の回転を自由に出来るステレオ頭部固定装置を開発した。

反射光による光計測の能活動に伴う変化量がわずかであるため高いS/Nと10のマイナス4乗以下の揺らぎの安定性の高い光源でさらに電気生理学的信号の測定に有害になるノイズの発生しない光源を開発した。また、脳血流信号はレーザードップラー血流計を用いて脳表血流量を測定するが、プローブの設定位置などに依存するのを解決する方法として2ユニット計測にして基準点に対する相対的定量測定を可能になった。

生理学的なわずかの特性の差を検出するために、2台の高感度のCCDを光軸系を一致して設置し、2台のCCDの差分画像を測定できるようにした。

ビデオレートで収集される大容量画像データを処理するための十分な容量の画像を保存可能なディスク容量と高速な処理と画像表示の可能な速度とメモリーを備えたワークステーションを用意した。

(2) 研究の目的

脳活動に伴う二次信号を裏付けるためには、これまでの脳循環の測定から推

定されている脳機能と脳血流量との関係を微小循環の立場からレーザードップラー血流計による脳表血流とそのとき連動する酸素消費に伴うヘモグロビンの酸化還元の状態を把握する事が必要である。これらの二次信号を測定するための測定装置を備えた小動物用脳表実験の顕微鏡架台は本体研究に不可欠の装置である。

さらに顕微鏡架台は電気信号のノイズの排除に留意しており電気生理学的信号も同時に測定することを目的としている本体研究にもっとも重要な特徴を備えている。大量のビデオ画像を解析できる画像処理システムもデータを裏付けるために極めて本質的である。

(3) 期待される効果

本顕微鏡マイクロ駆動台でミクロン精度の顕微鏡架台が使えることで、脳表の細かい構造を観察するのに重要な信号が測定可能になる。

反射光の光計測とレーザードップラー血流計の同時測定は脳活動の解明に新たな情報をもたらすと期待できる。レーザードップラー血流計測の2チャンネル計測はこの方法の測定の信頼性をあげるのに非常に有用である。

さらに、実験動物自身の固定の方法も頭部角度を自由に出来ることで実験のセットアップを自由にでき、実験が効率的に出来る。また、安定した光源を備えた反射光の光計測によりS/Nの高い脳賦活マップを測定できる。

このような顕微鏡架台は脳の基礎研究に大きく貢献していくと思われる。

《開発装置概要》

駆動台開発

顕微鏡ユニット（光路）開発

ラット固定用ステレオ開発

光源開発

駆動台開発（性能・設計思想）

当初計画では、駆動台を多関節（X・Y・Z・ θ_1 ・ θ_2 ）に動く構造で計画していたが重量がかさむことや、関節の先端部（顕微鏡）での揺れが収まらない状態になると判断し後述する2分割方式とした。

2分割方式とは、駆動台及びラット用ステレオの両方にX・Y・Z・ θ 軸を組み込むことで被検物まで到達させる方法である。

これによって、駆動台側は多関節から単純なX・Y・Z・ θ 軸となり次のような構造となった。

- (1) X軸・Y軸はボールプッシュにシャフトを通し任意の場所でクランプする構造。
- (2) X方向及びY方向の θ はシャフトをクランプする簡易方式とした。
- (3) Z軸は、粗動及び微動（MIN0.05 mm）の両方を備えたものを採用した。
- (4) ラット用ステレオには粗微動の付いたX軸・Y軸・回転角 $\pm 20^\circ$ の傾斜ステージを使用しZ軸は一般的なネジ方式を採用した。

設計上の留意点

- ・現状のニコン顕微鏡を同装置に組み込み活用できるタイプとした。
- ・CCDカメラ回りの θ 軸と軽量化

被検物の近くまでレンズが近づくため、ラット用ステレオに付属するアタッチメントが θ 軸と干渉しないよう、極力肉厚を薄くすると同時に20 kgのレンズユニットを支える構造とすることで苦慮した。

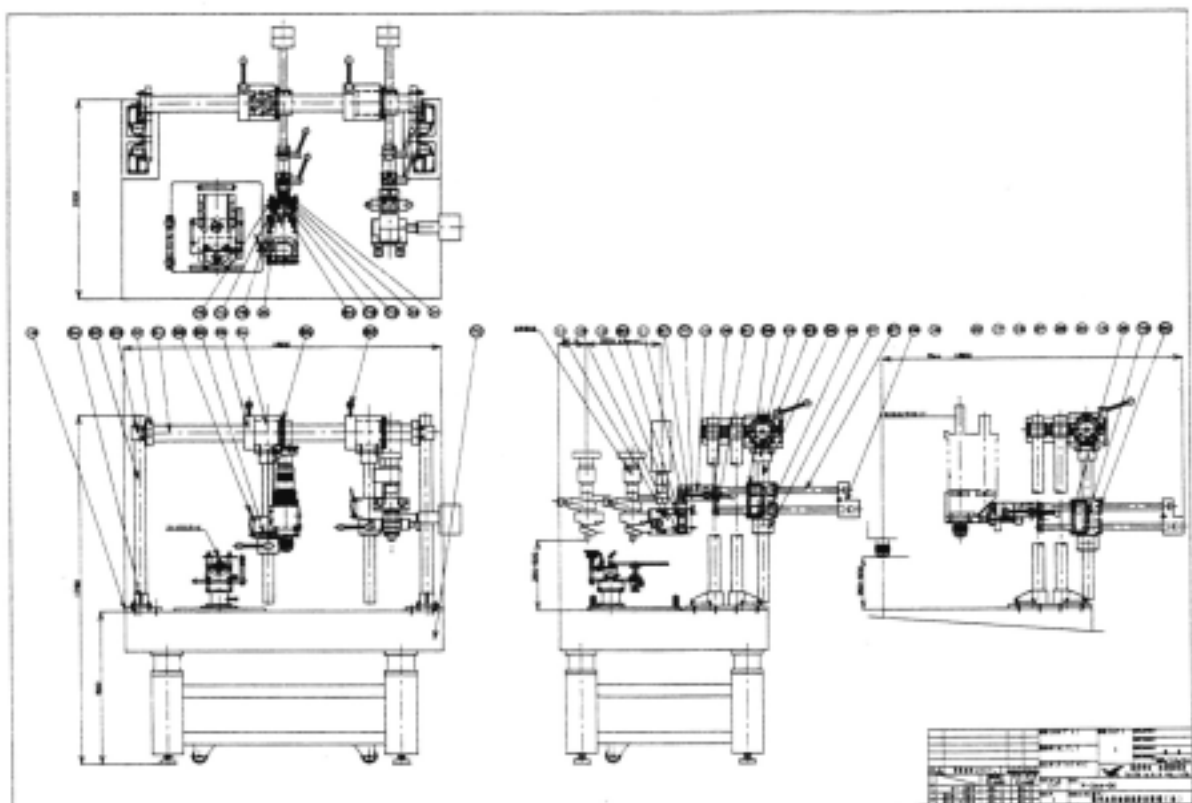
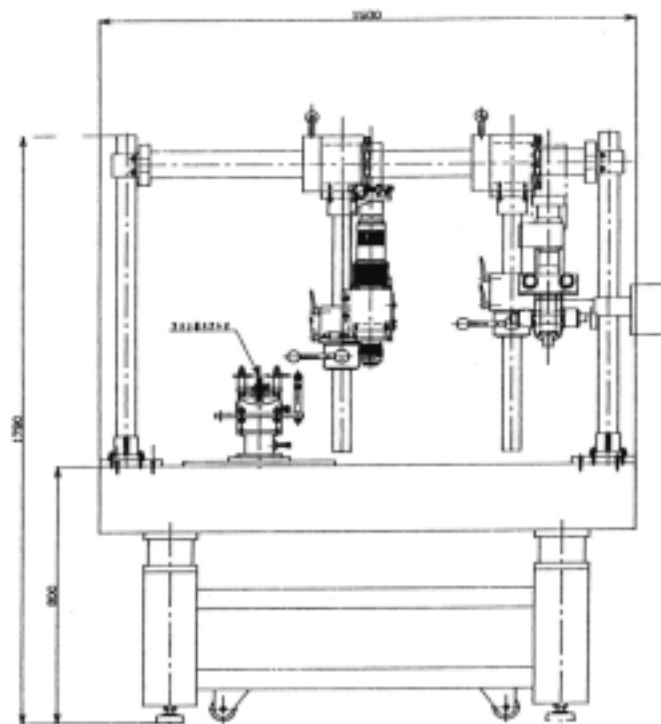
構造としては、ベアリングを使用せず、すり合わせタイプの滑り方式を採用することによって軽量コンパクトの形になった。

- ・顕微鏡ユニット及び光路ユニット取り付け部

顕微鏡及びCCDカメラをX・Y・Z軸の先端部へ取り付ける場合に顕微鏡側はCCDカメラ側にくらべると10 kg以上は軽いいため強度的に余裕がありますが、CCDカメラ側にはZ θ 軸（粗微動付き）が付加された為、軸からの距離が長くなり振動に対し揺れが収まらない状態となる傾向があり補強を工夫した。

< 顕微鏡 >

正面図



駆動台写真

全体写真



顕微鏡ユニット（光路）開発

対物レンズからの光をプリズムにより2分することにより、2つの CCD カメラによる同一光の同時計測を目的とした光計測顕微鏡ユニット（光路）の開発を行った。

当該ユニットには、この2つの CCD カメラのイメージを完全に一致させうる X・Y 及び Z の微動機構が設けられており、また、各々についてフィルター挿入が可能なため、ひいては2波長の同時計測が行えるものである。

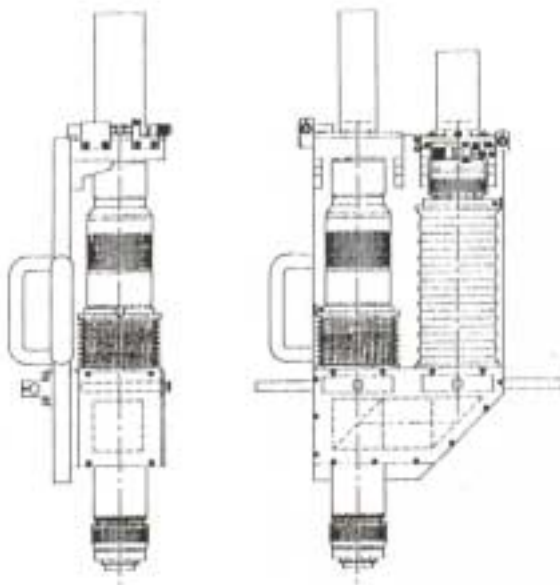
当該ユニットの設計にあたっては、下記次項に配慮した。

- ・ ユニット重量の軽減を目的に、ユニットベースを含む主要部材にジュラルミンを採用、強度/重量比を高めている。
- ・ 光を2分するプリズムは、ハーフ及び反射プリズムをガラスブロックにより接合することにより空気-ガラスの境界面を排除し光のロスを最小限とした。
- ・ ユニットは接眼レンズ側に 180 mm + 2倍テレコンバーター < 35 mm スチルカメラ用レンズ > を装着可能なものとし、最大 10 倍強という高倍率を実現した。

上記次項に伴って、CCD カメラ/接眼レンズはベースプレートに固定されている専用マウントに取り付ける構造とし、強度及び精度の飛躍的な向上を実現している。

< 光路 >

光路写真

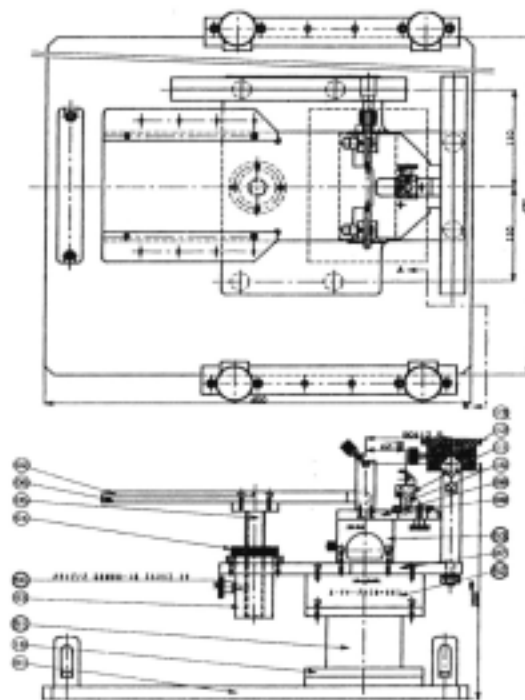


ラット固定用ステレオ開発

既存のステレオではラットの頭部を固定するだけのものでしたが、新開発のステレオはX・Y・Z・ 軸を付加し駆動台の動きを補助しラット脳表をあらゆる角度から捕らえられるようにした。

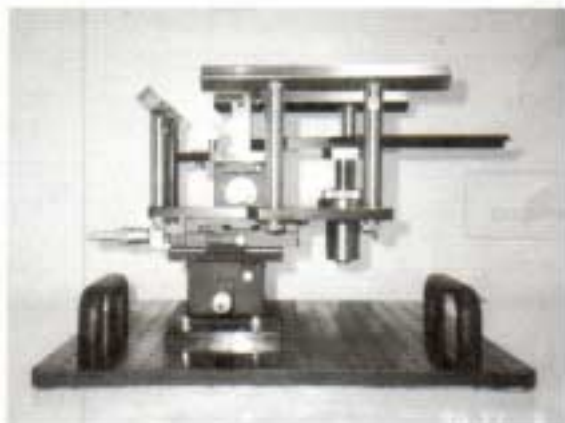
構造的にはX・Yテーブル上に 軸（回転角 $\pm 20^\circ$ ）及びZ軸を付加し、その上にテーブルを乗せるという形であり設計上の問題として高さを極限まで低くした。（作業性考慮）

<ステレオ>



ラット固定用ステレオ

ステレオ写真



光源開発

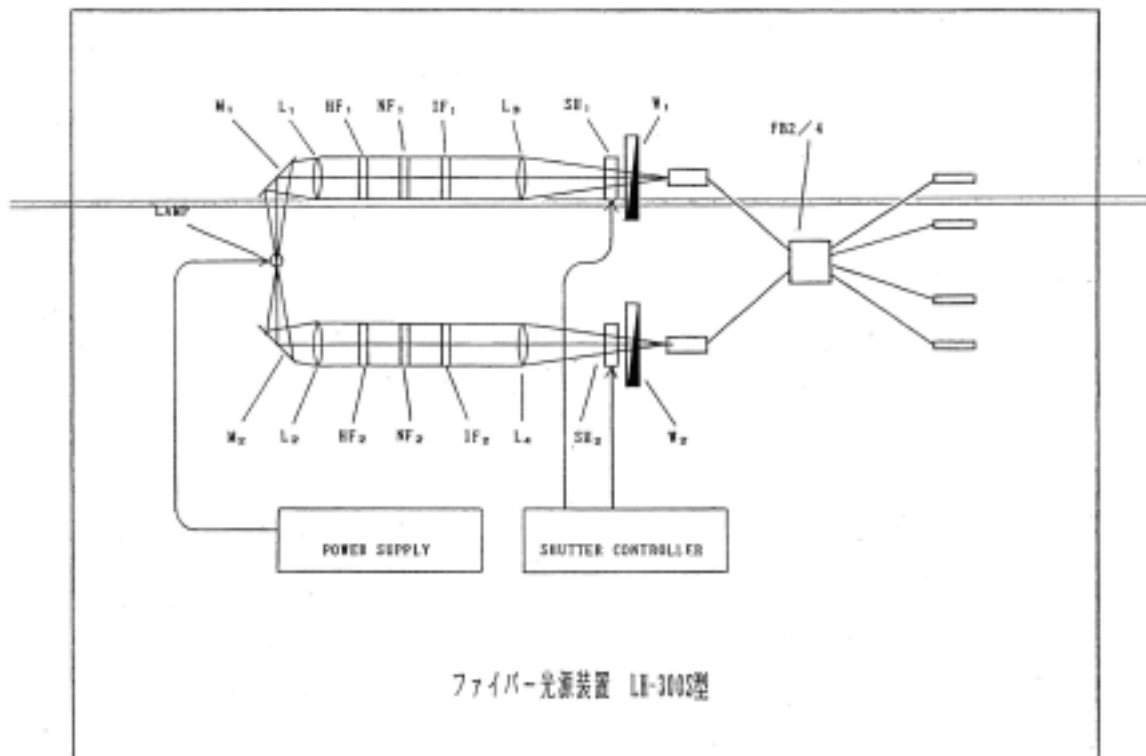
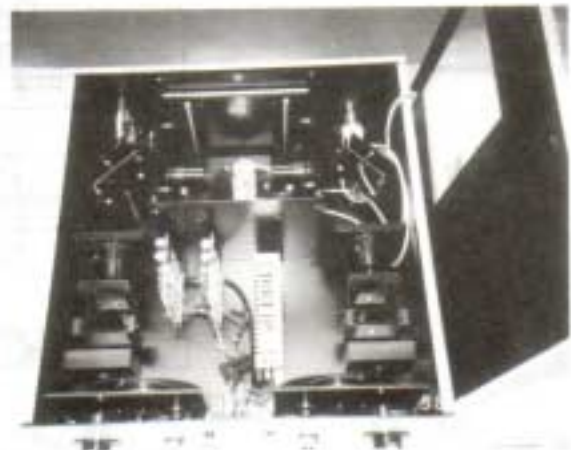
脳表の反射光の光計測は、脳活動に伴うヘモグロビンの反射光の変化が10のマイナス4乗以下の変化を測定対象にするため、照射する光源はそれ以下の安定性が必要であり更に、電気生理学的信号の測定に有害になるノイズの発生しない構造にする必要があった。

光源装置

装置正面



装置内部



株式会社 三双製作所製

ファイバー光源装置 LH-300S 型

仕 様 書

ランプハウス	ファンによる強制空冷方式 材質 軽合金及び鋼板製 仕上 焼きつけ塗装仕上
光源ランプ	24V 300W ハロゲンランプ (電球負荷ハロゲン用)
レンズ L _{1,2}	耐熱材製コリメートレンズ
L _{3,4}	集光レンズ
表面鏡 M _{1,2}	平面コールドミラー 寸法 100 mm × 70 mm 角度、傾斜調製ネジ付
防熱フィルター HF _{1,2}	耐熱型 可視透過赤外カットフィルター 挿入フィルター寸法 50 mm × 50 mm以下
中性減光フィルター NF _{1,2}	1 OD 2 OD 各1枚 計4枚付
干渉フィルター枠 IF _{1,2}	挿入フィルター寸法 50 mm × 50 mm以下
干渉フィルター	標準付属フィルター 2枚付 金属多層膜フィルター 寸法 枠付 30 カットフィルター付 波長は 400-700nm の範囲で指定による。 半値幅 約 10nm
シャッター SH _{1,2}	電子制御型機械式 口径 24 mm 最小動作時間 約 8 msec 最大動作時間
シャッター制御装置	制御入力信号 TTL レベル 2入力 駆動出力 2出力 電源入力 交流 100V 10AV
オプチカルウエッジ W _{1,2}	最大濃度 約 2 OD 濃度変化特性 対数直線変化に近似 操作 手動 目盛 0-2 OD 間 200 等分割 材質 光学研磨 石英製 クロム金属膜蒸着加工
オプチカルファイバー FB2/4	2入口 4出口 ランダム バンドル型 寸法 長さ 2000 mm 出口 5 × 4
ランプ電流	直流 24V 15A 安定化電源 但し付属せず。

以上の仕様は、改良のため多少変更することがあります。

株式会社 三双製作所

東京都千代田区飯田橋 3 - 11 - 4 セブンセントラルビル 20

〒102 電話 03 - 3262 - 3510