

## 4.2 チャンバー型血管新生観察装置 (Type II)

### 4.2.1 設計概念

Type I の実験でわかった問題点を改善すべくチャンバー型血管新生観察装置 (Type II) の開発を行った。Type I では Scaffold の配置に問題があったため、新たに Scaffold チャンバーを設け、生体組織に安定に密着させられるように生体組織と水平になるようにチャンバーを配置した。

画質の改善に関しては、Type I で使用した 34 万画素 CCD 素子に換えて 35 万画素 CMOS 素子に換えた。CCD 素子は CMOS 素子に比べその受像原理からノイズの少ない良質な画像が得られる素子として知られていたが、製作上複雑な構造であるために広い受像面積の素子を作ることができないという問題があった。対して、CMOS 素子は CCD に比べ製造が容易で大型の受像面積の素子を製造することが可能であり、CCD よりも高い画素数の素子が開発されるようになった。また、CCD よりも受像ノイズが多いという問題はソフトウェアで処理することにより原理的に解決できることが証明されたため、近年 CCD に代わって CMOS 素子が飛躍的に成長している。そこで、CCD 素子に換えて CMOS 素子を用いたデバイスの開発を試みた。受像素子の画素数は大きく変わってはいないが、受像から体外のモニターまでの全ての信号をデジタル信号のまま処理することでシステム全体としてノイズへの耐性を向上させた。Type II では倍率を下げて、視野範囲を大きく設定した。これは一本の血管の血流を観察するのではなく、血管の分岐・走行・新生を観察する目的で視野の広さを優先したためである。

#### 4.2.2 デバイス

図 4-2-1 に、作製したチャンバー型血管新生観察装置 (Type II) の設計図を示す。Scaffold チャンバー、プリズムミラー、レンズ、CMOS ユニットから構成した。Scaffold チャンバーは生体面と水平になるように配置した。Scaffold をステージとカバーで挟み込んでチャンバーとした。Scaffold は、これまでと変更せず、第 3 章で選定したポリグリコール酸 (PGA) の不織布で作られた厚さ 0.3mm のもの (ネオベール NV-M-03G、グンゼ、京都) を用いた。プリズムミラーは透明度の高いアクリル樹脂を主材に形状を整え、反射面にアルミ蒸着を施すことで作製した (図 4-2-2)。レンズは CMOS に結像するメインレンズに加え、焦点距離を調節するためのコンバージョンレンズ (MPL-PX、ケンコー、東京) を加えた。CMOS ユニット (MCM-03SL、ロアス、大阪) の受像素子は 1/4 インチ、35 万画素の CMOS 素子を用いている。また USB2.0 インターフェースを備えた CMOS 制御基盤で PC と接続し、CMOS 素子の制御、画像の取得を行う事が可能である。メインレンズを含むユニットサイズは 17mm × 43mm × 25mm である (図 4-2-3)。光源には直径 φ 5mm の LED (SDL5N3PW、SANDER、台北) を用い、CMOS 制御基盤から電源を配線した。これらを組み合わせ (図 4-2-4)、生体適合性の向上と、防水のために医療用エポキシ樹脂で包埋し、動物実験用のチャンバー型血管新生観察装置 (Type II) を作製した (図 4-2-5)。樹脂包埋後のデバイスサイズは 45.0mm × 59.0mm × 20.6mm (ケーブルを除く) となった。

この観察装置は PC と接続することによって最大 640 × 480 (VGA) の解像度で

画像を出力することが可能であった。観察可能な視野範囲は、Type I では 1.6mm × 1.2mm だったが、Type II では 8.1mm × 6.2mm とした (図 4-2-6)。この倍率から得られる画像の、1 ピクセルあたりの大きさは約 13  $\mu$  m であった。

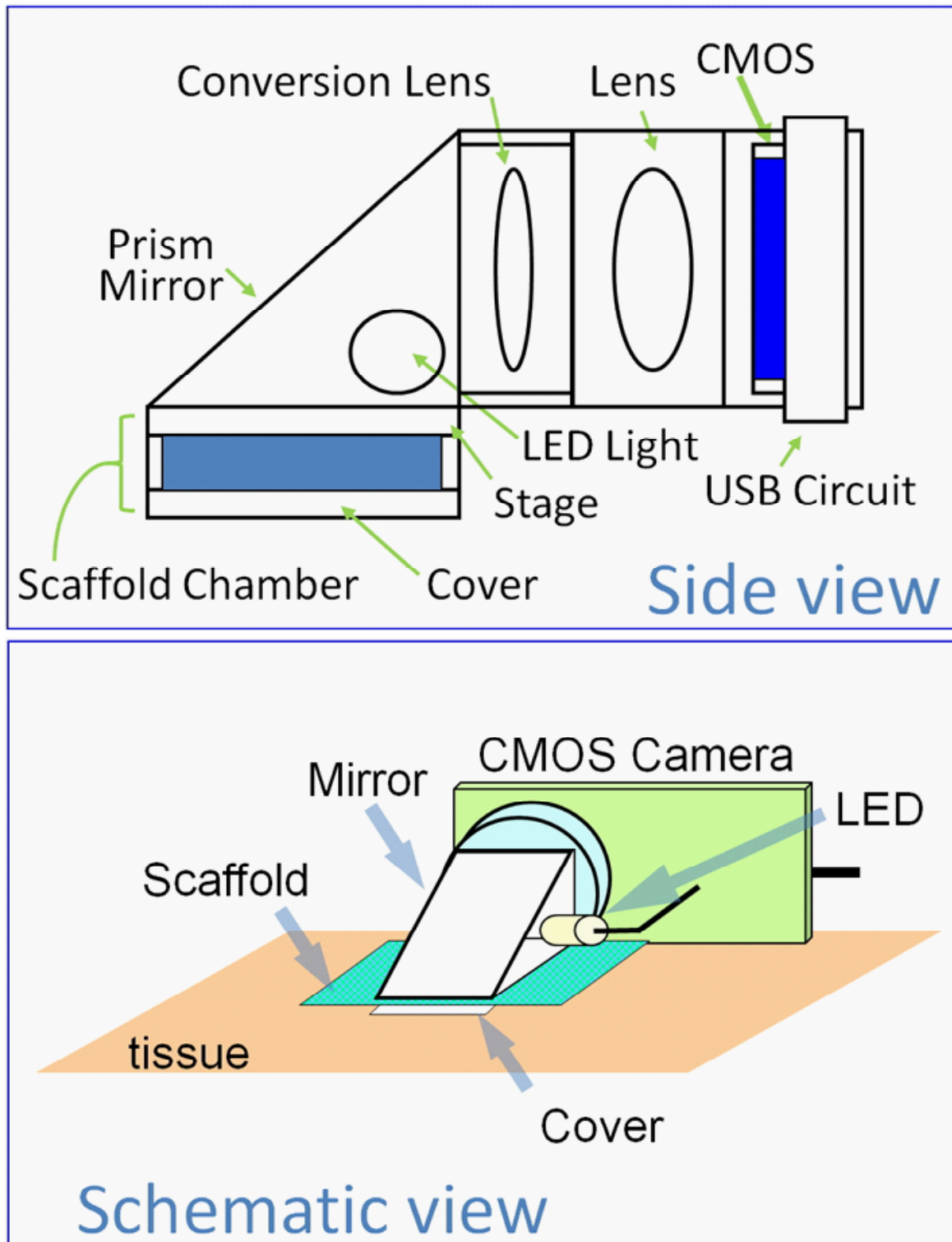


図 4-2-1 チャンバー型血管新生観察装置 (Type II) の設計概念図

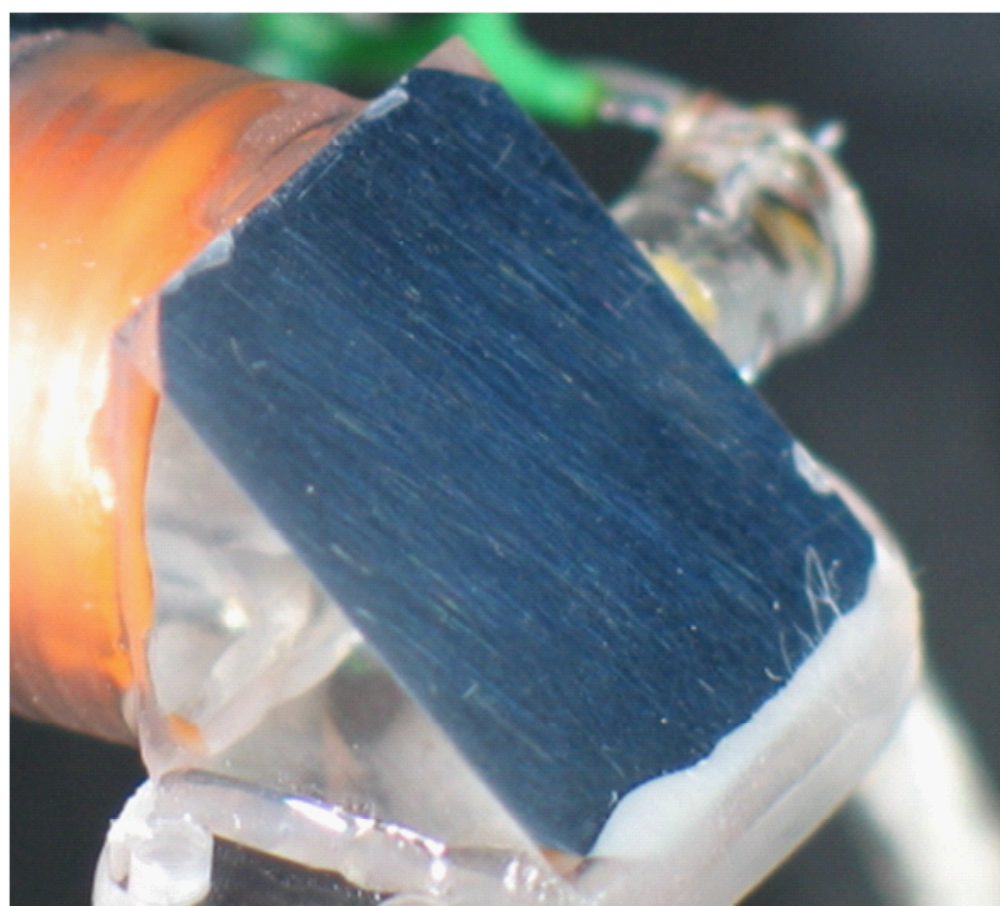
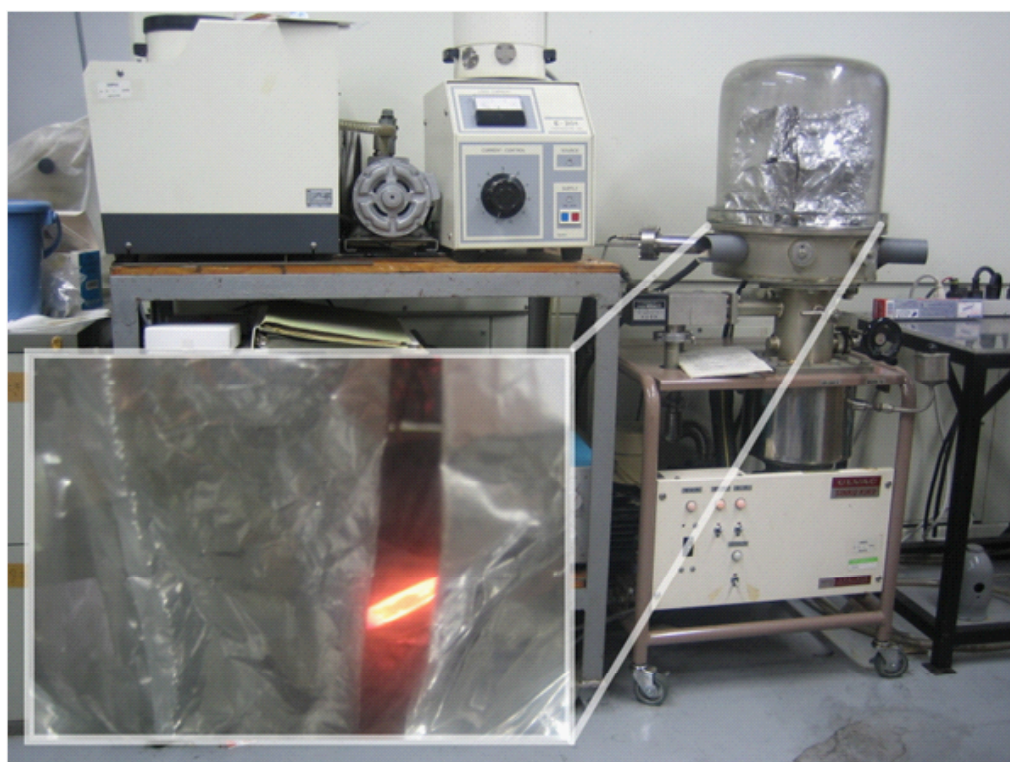


図 4-2-2 熱蒸着装置を用いてアルミニウムを蒸着して作製したプリズムミラー

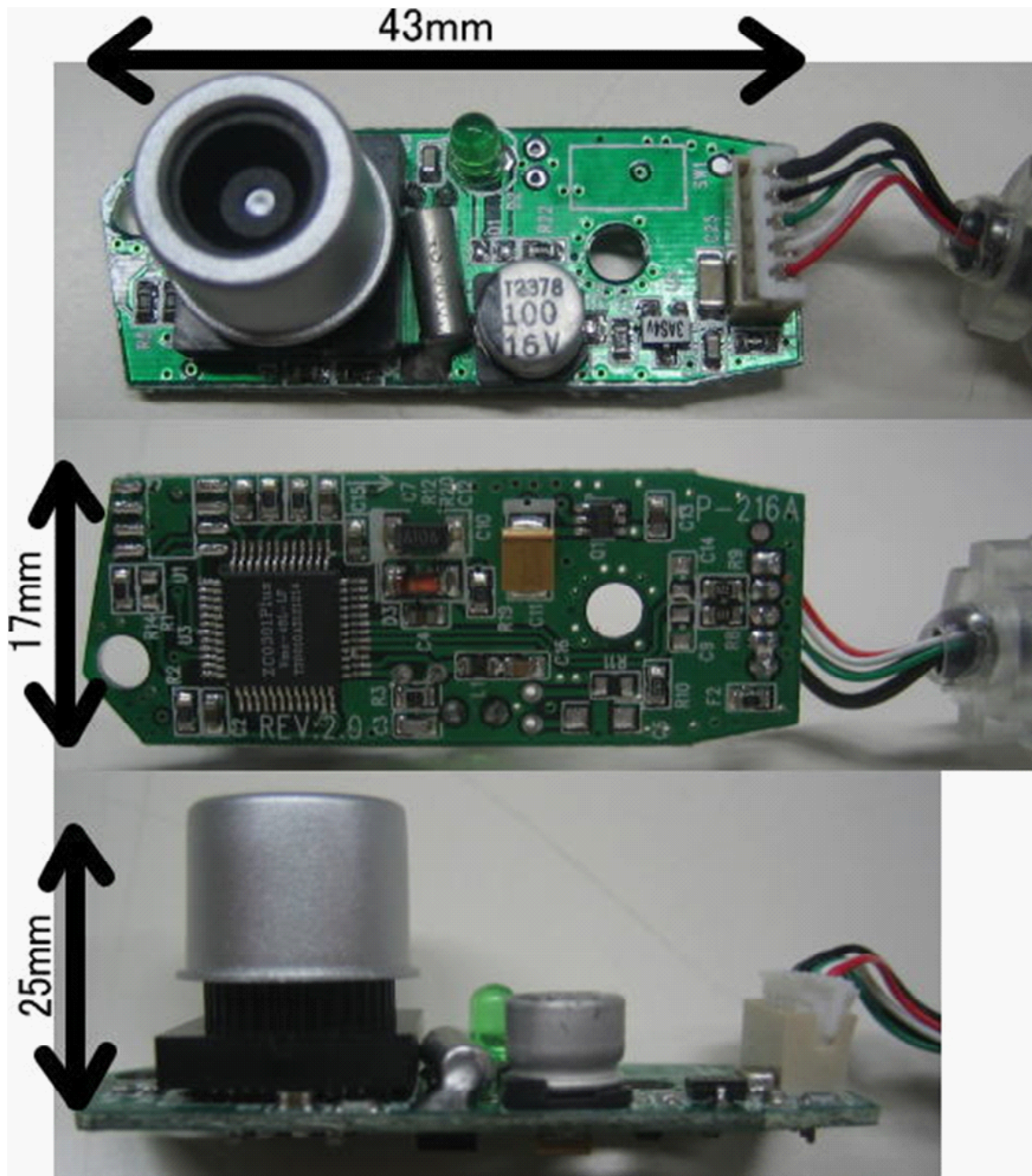


図 4-2-3 使用した CMOS ユニット

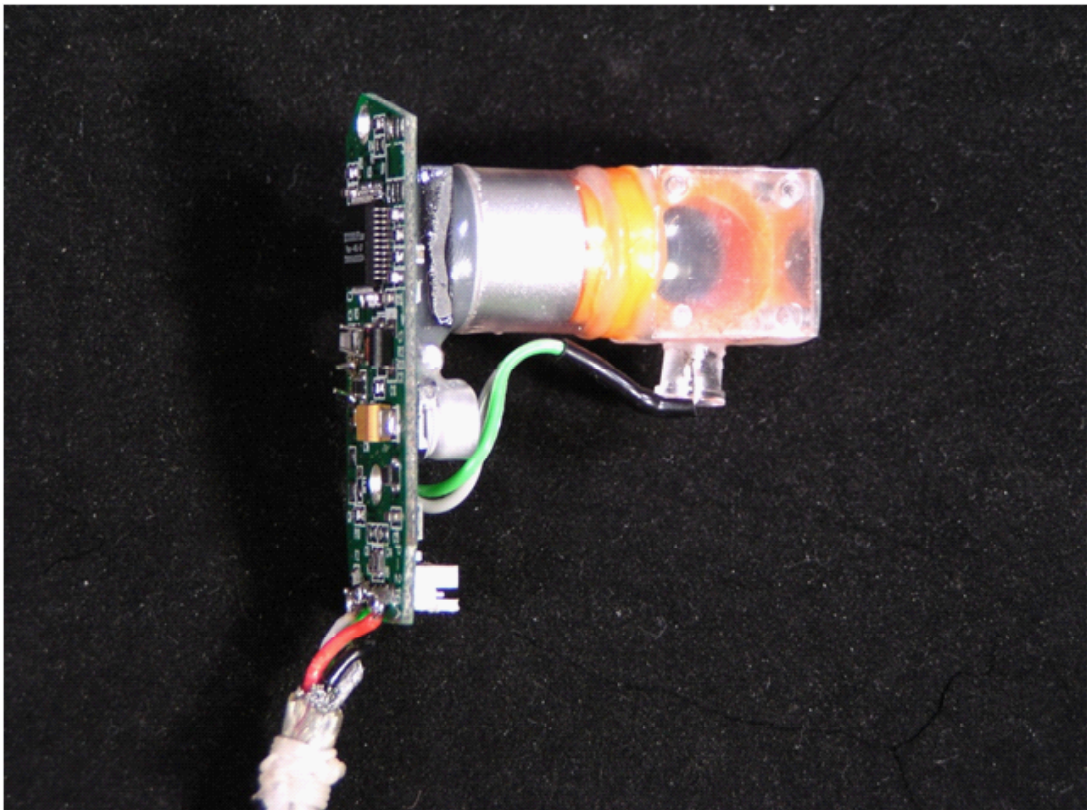
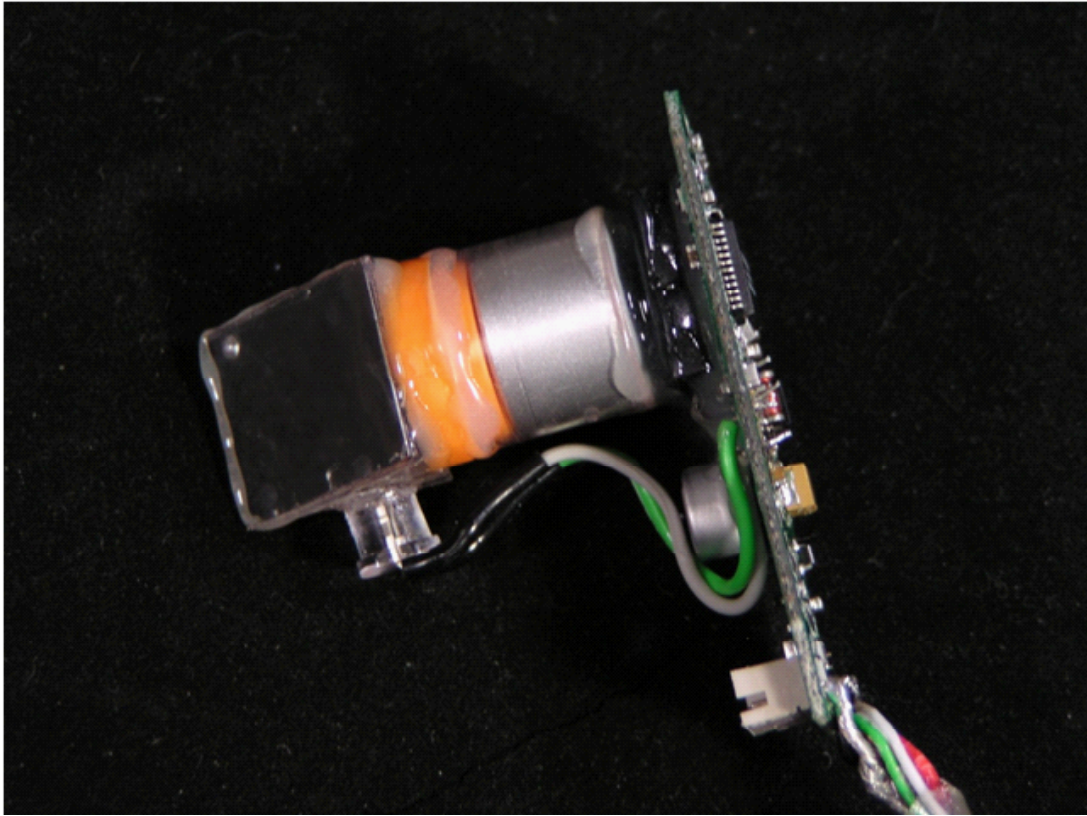


図 4-2-4 作製したチャンバー型血管新生観察装置（樹脂包埋前）

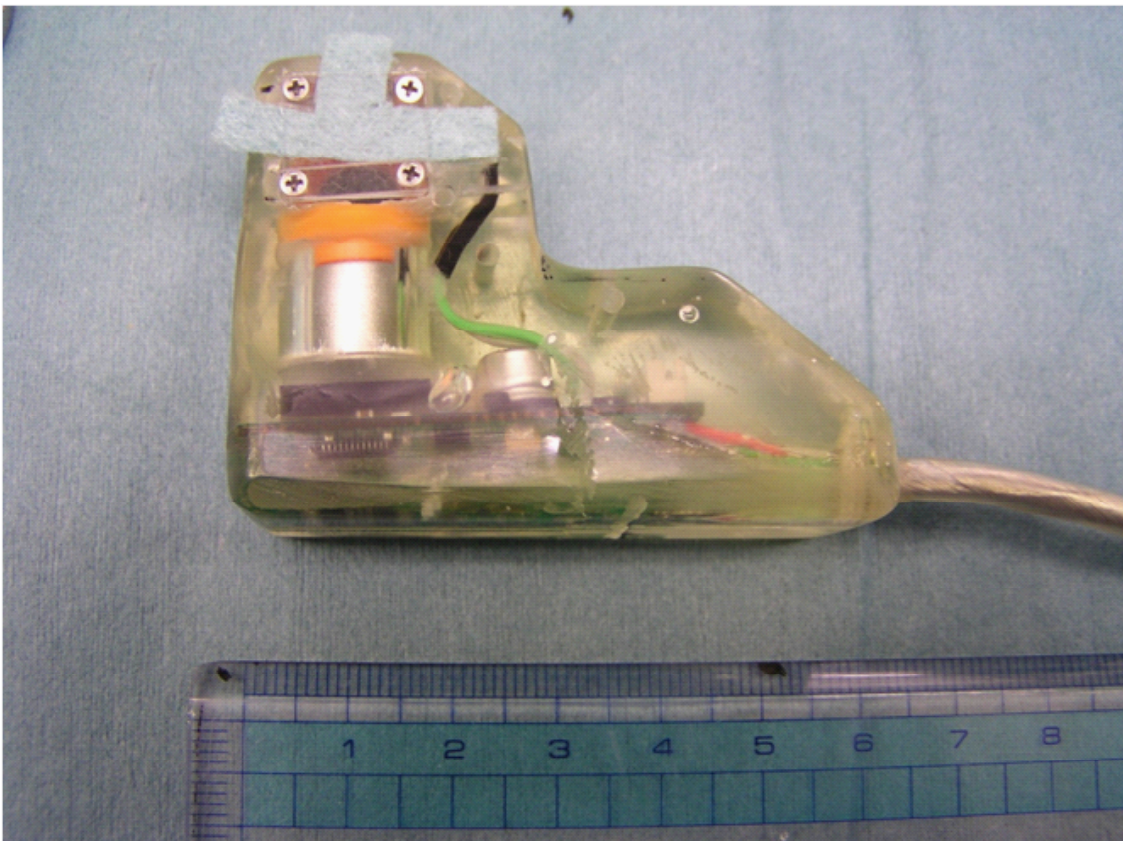
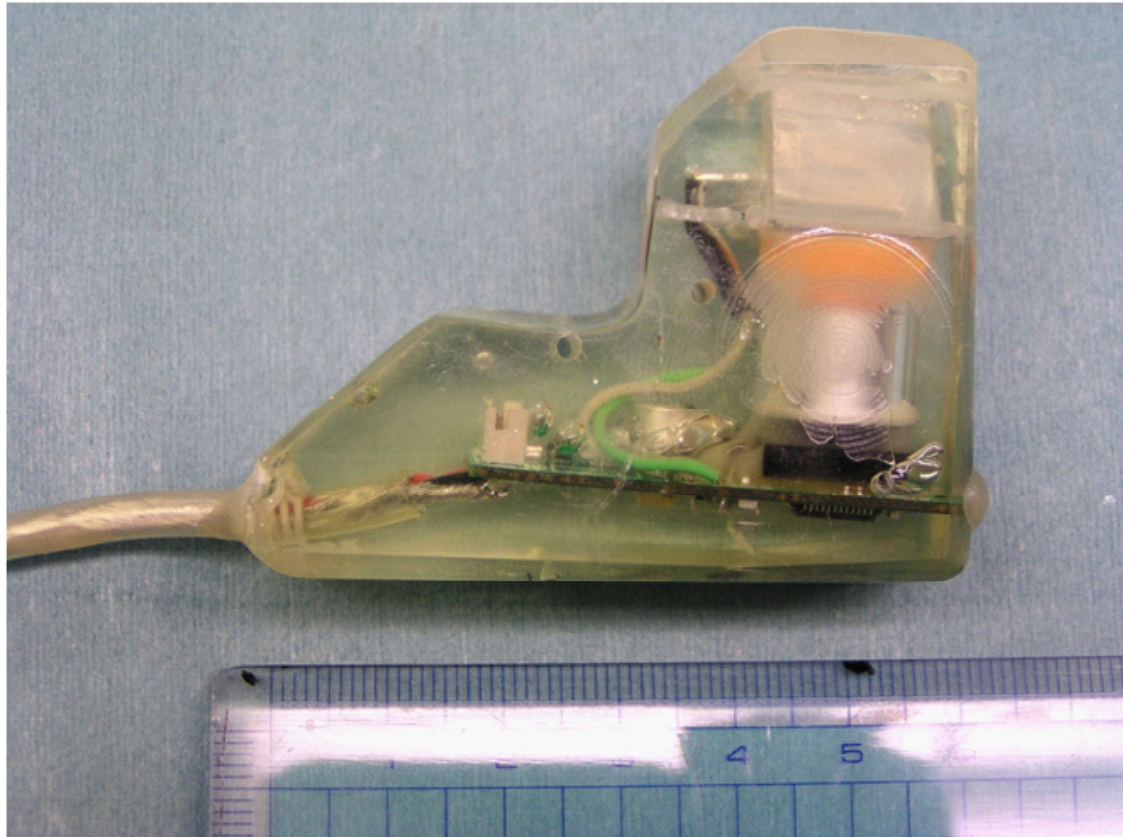


図 4-2-5 作製したチャンバー型血管新生観察装置（樹脂包埋後）

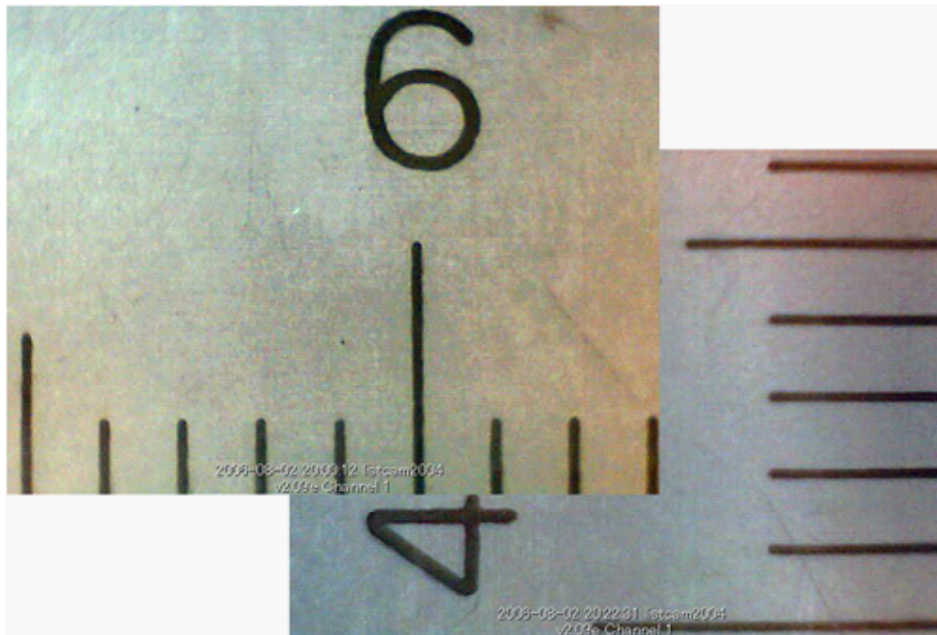


図 4-2-6 チャンバー型血管新生観察装置 (Type II) の視野範囲



#### 4.2.3 動物実験方法

3.3.2 項と同様な実験方法で、開発したチャンバー型血管新生観察装置 (Type II) を、成ヤギ (45kg、メス、ザーネン種) の皮下 (広背筋近傍) に埋込んだ。観察装置は縫合糸を用いて、広背筋に4点で固定を行った。観察装置の足場に血管が新生する様子を長期間観察した。図4-2-7に埋込の様子を示す。画像の取得はコンピュータで行った。ホワイトバランス等のカメラ設定は固定し同一条件で画像を取得するように制御した。実験は44日間継続し、実験終了後はチャンバー型血管新生観察装置 (Type II) を摘出し、Scaffoldに新生した血管・組織の確認を行った。また摘出後の新生組織をH.E.染色し、組織学的に評価を行った。

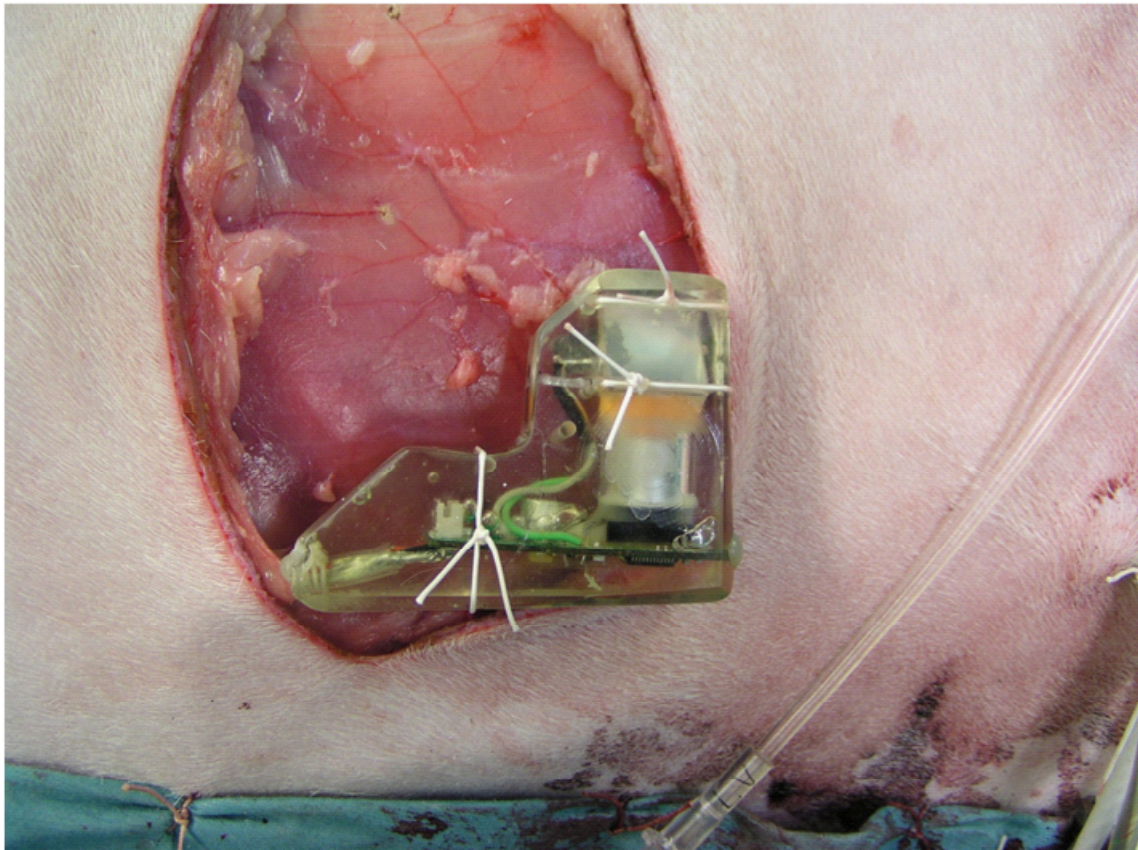


図4-2-7 動物実験時の埋め込みの様子

#### 4.2.4 動物実験結果

チャンバー型血管新生観察装置 (Type II) は、ヤギに埋め込み 44 日間正常に動作し、Scaffold を加水分解しながら血管や組織が新生する様子を観察することができた。

図 4-2-8 に、経時的に Scaffold に血管と組織が新生する様子を示す。図では、A から H まで 8 枚の画像を選択的に表示した。また図中のバー (—) は 1mm を表す。埋込直後 (A) は、PGA Scaffold の繊維が鮮明に撮影された。埋込後 24 日目 (B) では、画面左から伸長する血管が観察された。画面右にも (A) から比べて変化が確認されるが不鮮明で詳細を判別できない。26 日後 (C) には、(B) からさらに伸びた血管が確認され、細い血管が太く成長していることも観察される。また右側からも血管が伸びていることが観察される。その結果中央部に見える青く映る Scaffold の面積が減少しているのが確認できる。30 日後 (D) では、画面左側で上下に伸びる太い血管から画面右へと分岐するいくつもの血管が確認できる。またその血管からさらに細分化された血管が分岐する様子が確認できる。左右の血管がさらに伸長し、Scaffold の領域が徐々に小さくなる様子が確認できる。33 日後 (E) では、血管や組織の新生により Scaffold はわずかに中心部に残るのみである。36 日後 (F) では、左右からの血管が中央部で結合した。観察領域全域が血管と組織で覆われ、完全に Scaffold は加水分解されて消失した。また画面左で上下にのびる太い血管から左右に分岐した血管のいくつかは消失し、いくつかの

より太い血管だけが残った。36日後 (G) では、さらに血管の分岐が少なくなり、より太い血管が選択的に残っている様子が観察された。特に画面右から走行していた血管は小さく細く変化した。43日後 (H) には、画面左に縦に走っていた太い血管も急激に細くなり、画面下に行くほど細く分岐も消失している様子を観察した。

44日後に観察デバイスを生体から摘出した。埋込部周囲に感染や拒絶反応は見られず、良好な結果を得た。図 4-2-9 に摘出後のチャンバー型血管新生観察装置 (Type II) を示す。摘出後の新生組織をヘマトキシリンエオジン (HE) 染色した結果を図 4-2-10 に示す。図中のバー (—) は  $50 \mu\text{m}$  を表す。図 4-2-10 (A) は新生組織面に対して水平にスライスした組織像で、図 4-2-10 (B) は垂直にスライスした組織像である。(A) では横行する血管が確認できた。血管内には赤血球が多数観察でき、血管周囲には血管内皮細胞と思われる核が観察された。(B) では血管断面を観察することができた。血管内には多数の赤血球が確認でき、血管壁には細胞核がみられた。PGA Scaffold は確認されなかった。

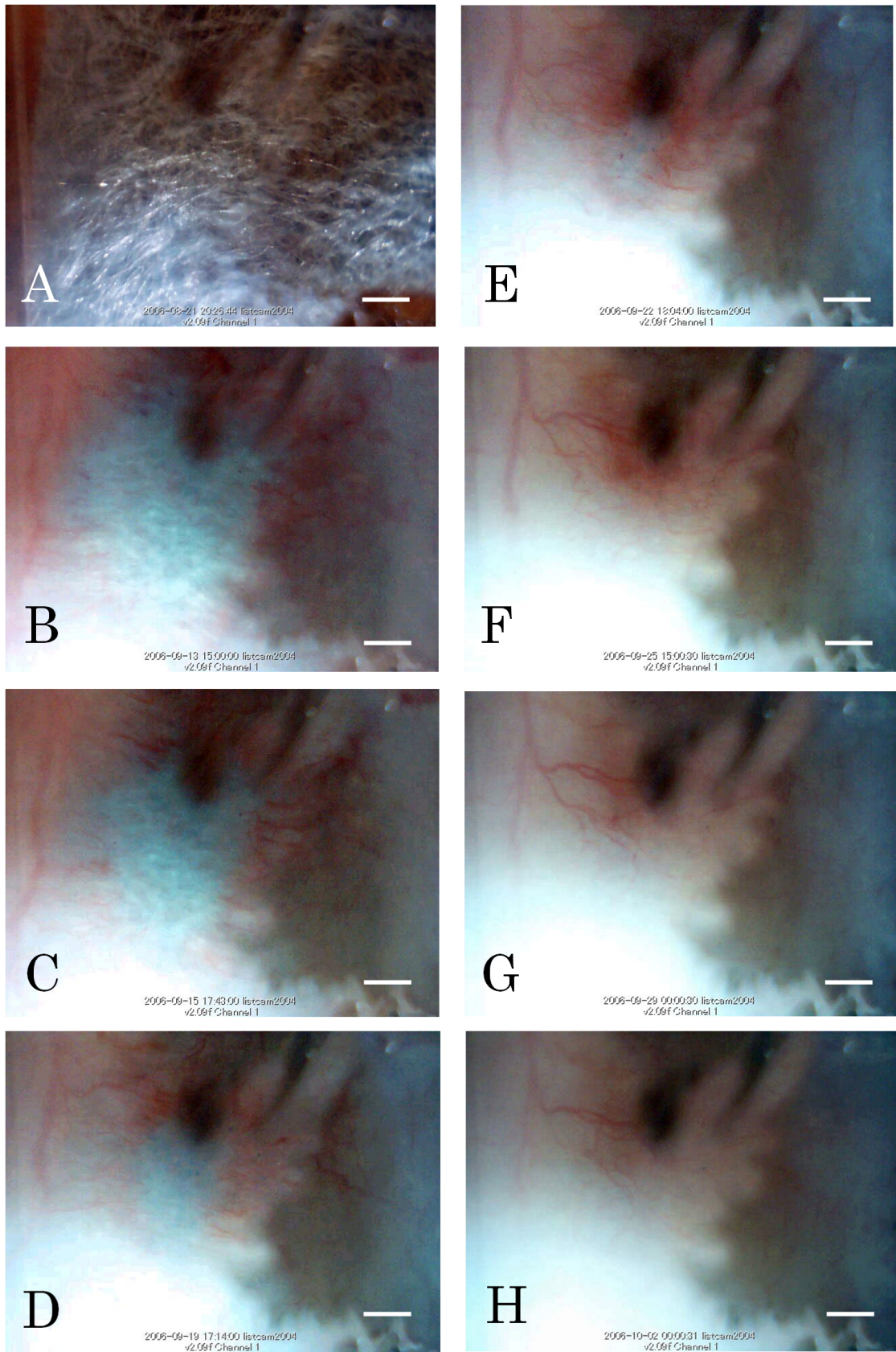


图 4-2-8 血管新生画像  
 (埋込日数 A:0 B:24 C:26 D:30 E:33 F:36 G:40 H:43)

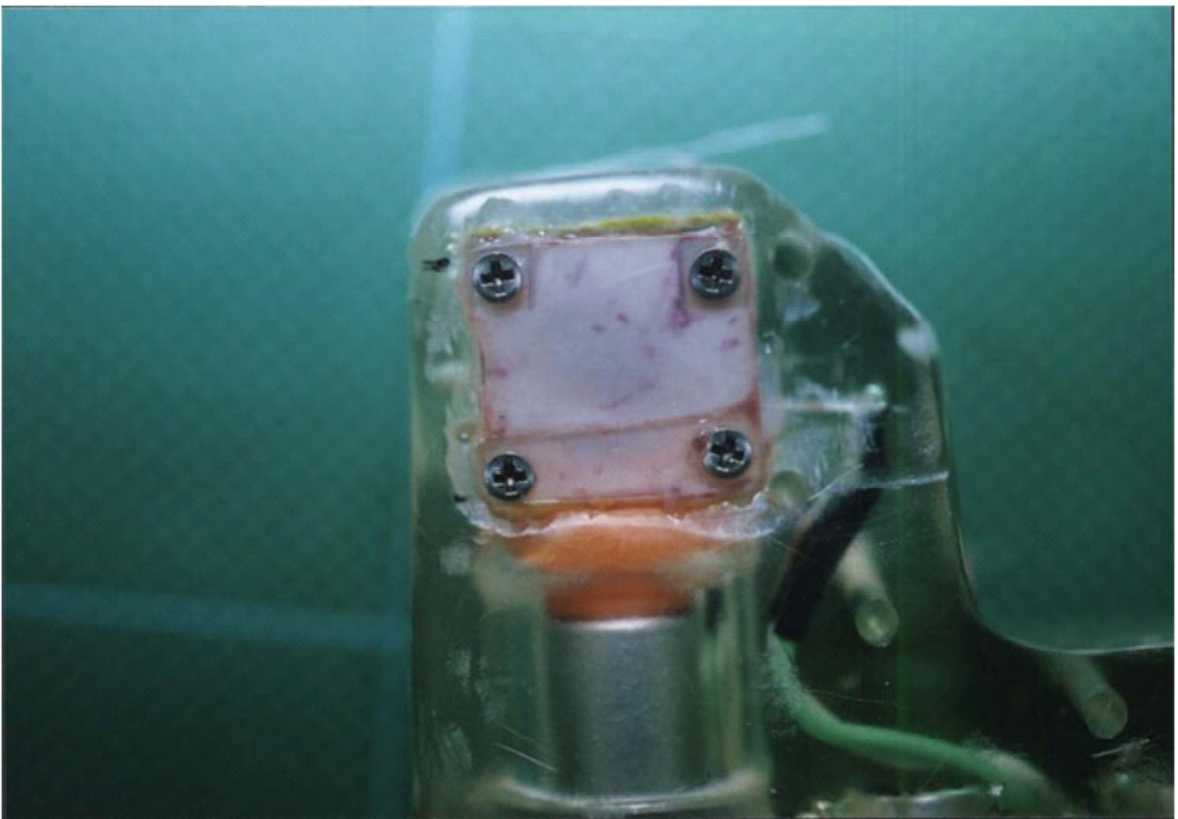
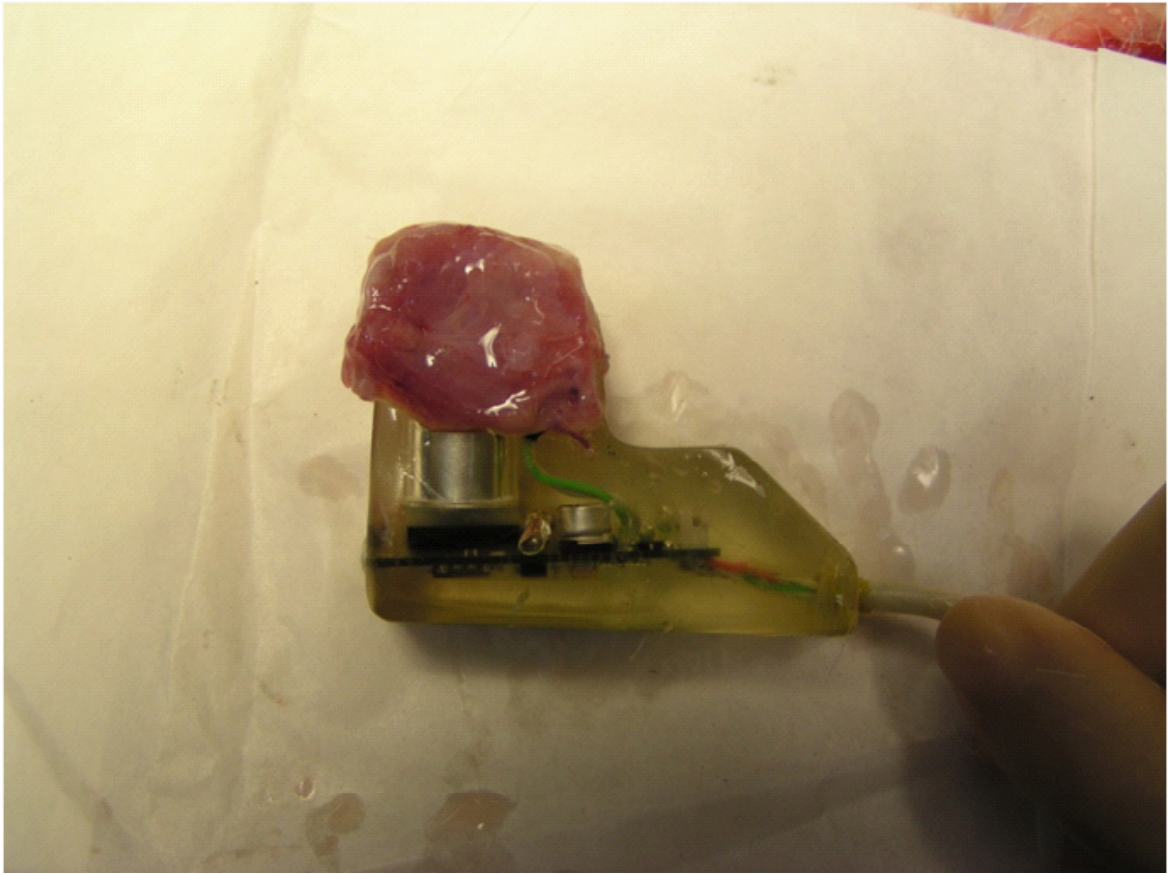


図 4-2-9 摘出後のチャンバー型血管新生観察装置 (Type II)  
(上：取り出し直後 下：足場部のみを残しトリミング)

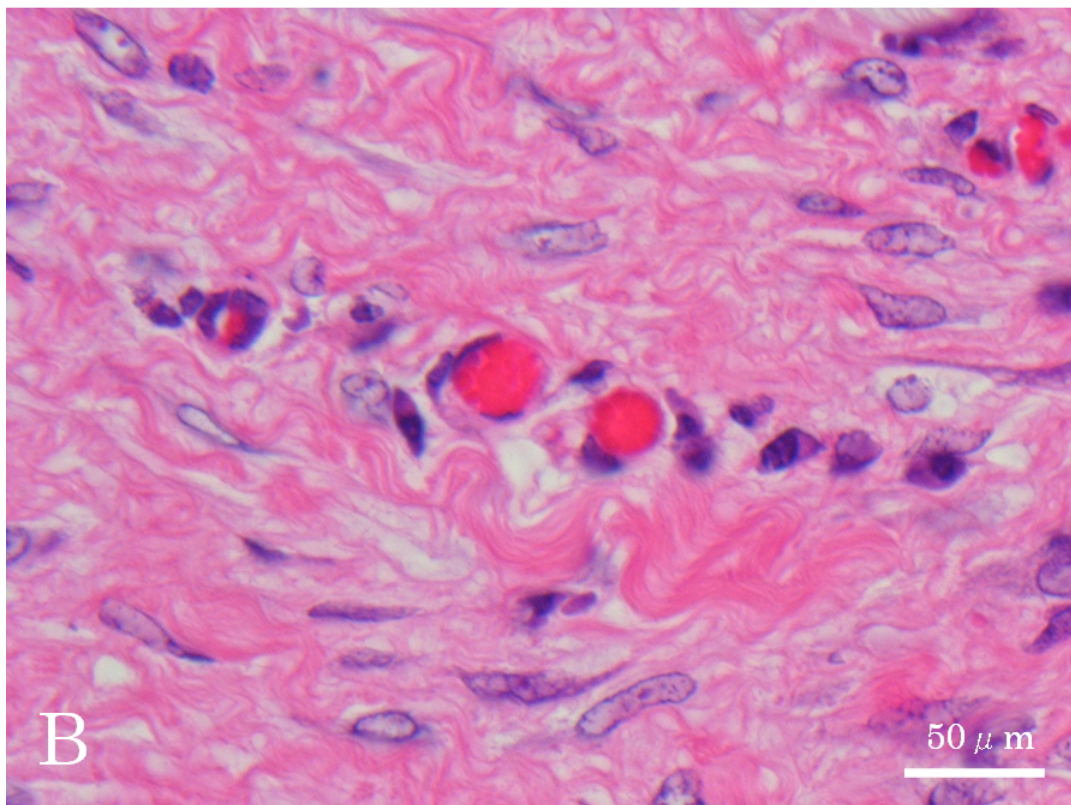
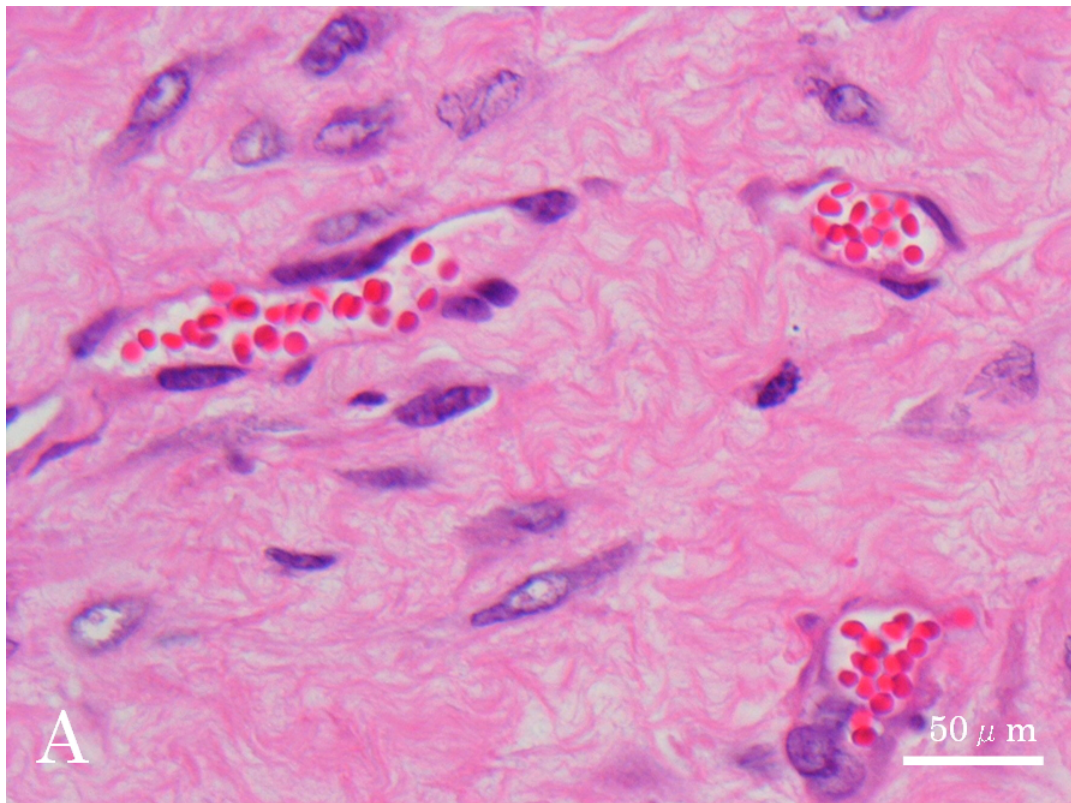


図 4-2-10 新生組織の H.E. 染色結果 (A : 水平スライス B : 垂直スライス)

#### 4.2.5 考察

チャンバー型血管新生観察装置 (Type II) は、Type I の問題点をもとに改良したものであるが、撮影画像の画質については、Type I と同様に組織の新生により Scaffold が加水分解され始めると焦点深度が変化し、血管画像は先鋭度の低い画像しか得られなかった。この問題を解決するためには、小さな径のレンズを使用するか、絞り機構を備えて焦点深度を長くするか、オートフォーカス機構を備えるかのどちらかで解決可能である。

画面右側の黒い影が写り込んだ問題に関しては、これは製作上の問題で、樹脂包埋の際に導光路に樹脂が流れ込み、意図しない光の屈折が影響を及ぼしたものであると考えられる。これは原理的な問題ではなく、解決可能な問題である。

画面下のハレーションに関しては光源の設置位置に起因するもので、Scaffold だけを事前に観察していた場合は問題にはならなかったが、画面のコントラストやホワイトバランスが崩れたために光源に近い位置でハレーションを起こしたものであると考えられる。この問題に関しては、LED 1 点を光源とするのではなく、一様に光を当てることで解決可能である。

Type I の CCD ユニットでは、受像信号をアナログ信号で伝送し、外部のモニター PC でデジタル化する手法をとっていたが、Type II では、受光から PC で画像を受信するまで全てデジタル信号のまま処理している。そのため伝送中のノイズ混入や、デジタル信号変換時のノイズなどは生じなかった。

結果的には、血管新生のメカニズムを観察するための画像としては、多少画質が低いものの、Type I に比べて Type II では血管の分岐や走行を観察可能な程度には向上した。

Type I の観察装置では、埋込後 56 日が経過しても Scaffold は完全に加水分解されず、一部が組織中に残るという結果であったが、Type II の観察装置では、44 日間の埋め込みで完全に Scaffold が加水分解された。その原因としては、Type I の観察装置では、生体組織面と Scaffold を直交に配置したために、生体組織と Scaffold の接触面積が小さく、また接触面も不安定であったが、Type II の観察装置では、生体組織面と Scaffold を平行に配置し、接触面積と安定性の両者を向上させることで、血管や組織の新生速度が早かったからであろうと考えられた。

使用した PGA Scaffold は体外であっても水中で加水分解されるが、本実験では血管・組織が新生し、観察され始めたと同時に Scaffold も分解し、面積が縮小していった。Scaffold 面積の縮小のみが先行することはなかった。

また、今回は、新生組織を組織学的に観察した。その結果でも Scaffold の残存は認められず、また赤血球や血管も確認できたため、Scaffold に確かに血管が新生していることを確かめることができた。



### 4.3 長期動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III)

#### 4.3.1 設計概念

これまでに試作した Type I および Type II での問題点を改善し動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III) を設計した。基本的なコンセプトは Type II を踏襲し、Scaffold チャンバーを生体組織と水平に配置した。Type II の主な問題点は撮影時の画質に関するものであった。そこで Type II で使用していたものよりも解像度の高い CMOS 素子を採用した。また Type I、Type II 共に課題であった加水分解による焦点ずれを改善するため、Type III ではオートフォーカス機構を導入した。Type II の課題であったハレーションに関しては、LED の数を 1 個から 2 個へと変更した上で、LED に拡散キャップを取り付け均一に対象に照らされるように改善した。デバイスサイズの問題については、小型の CMOS 制御基盤を使用し、樹脂包埋時の形状を最適化することで全体のデバイスサイズを縮小化した。

#### 4.3.2 デバイス

図 4-3-1 に作製した長期動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III) の設計図および概念図を示す。Scaffold チャンバー、プリズムミラー、コンバージョンレンズ、オートフォーカスレンズ、CMOS ユニット、光源から構成した。Scaffold チャンバーは Type II と同様の構造で設計し、Scaffold をステージとカバーで挟み込んでチャンバーとした。Scaffold も第 3 章で選定した厚さ 0.3mm の PGA の不織布 (ネオベール NV-M-03G、グンゼ (株)、京都) を用いた。プリズム

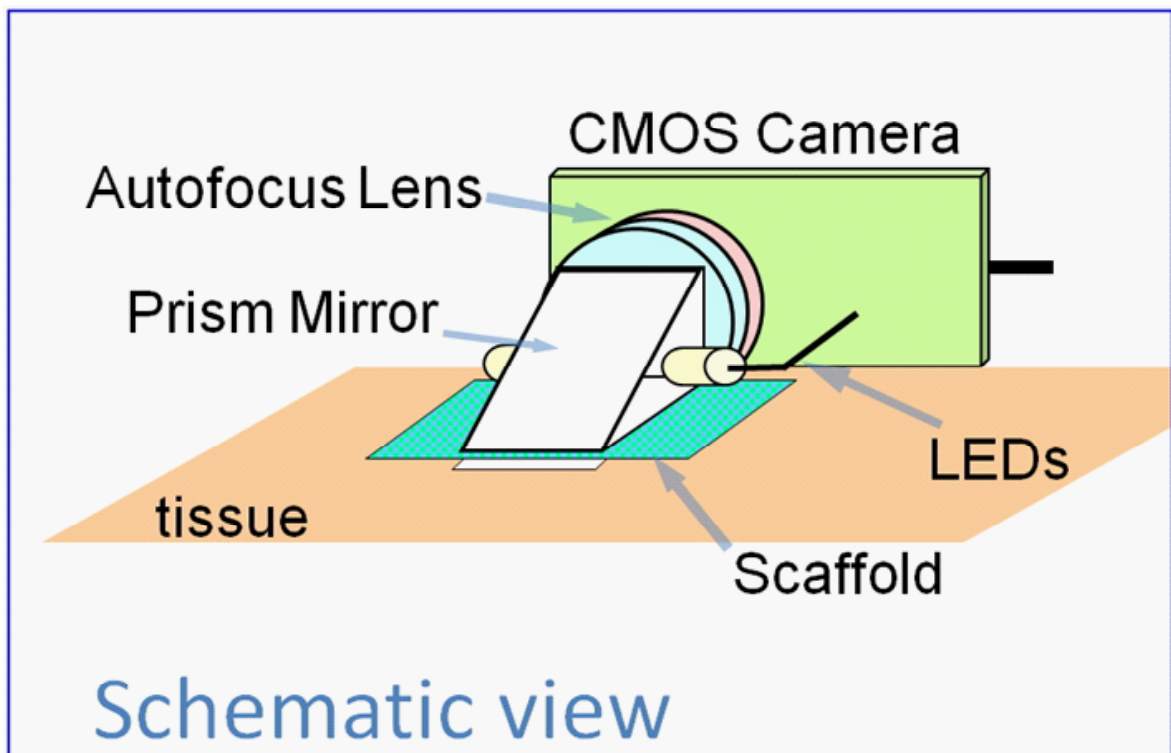
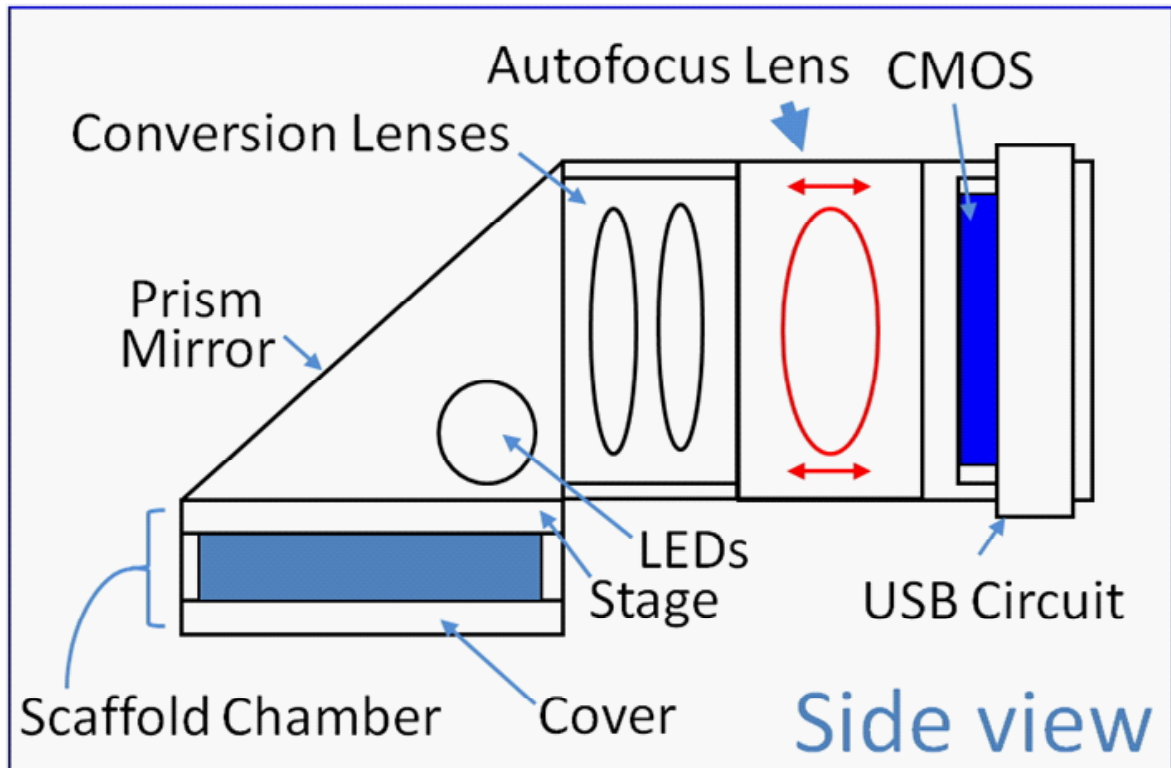


図 4-3-1 長期動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III) の設計図

ミラーは市販のガラス基材でアルミコートされた直角プリズム（32333-L、エドモンドオプティクス、東京）を用いた。レンズはオートフォーカス機構を備えたメインレンズと焦点距離調整用のコンバージョンレンズの2種類を組み込んだ。メインレンズのオートフォーカス機構は体外に接続されたコンピュータによって自動的に調節される。またマニュアルモードにして任意の焦点に固定することも可能で、32階調のフォーカスレンジがある。メインレンズは、ステージからの焦点距離が60mmから無限大まで合うように設計されているが、コンバージョンレンズ（MPL-PX、ケンコー（株）、東京）を2枚用いて、ステージからの焦点距離を0mm～0.5mmまで短縮した。Type IIでは35万画素1/4インチのCMOS素子を用いたが、Type IIIでは130万画素1/3インチのCMOS素子を使用した。図4-3-2に使用したCMOSユニットを示す。CMOSユニットの裏面には、オートフォーカスやホワイトバランスなどの制御と、外部PCとの接続をするための制御用ICチップが組み込まれている。外部PCとはUSBインターフェースを用いて接続を行った。

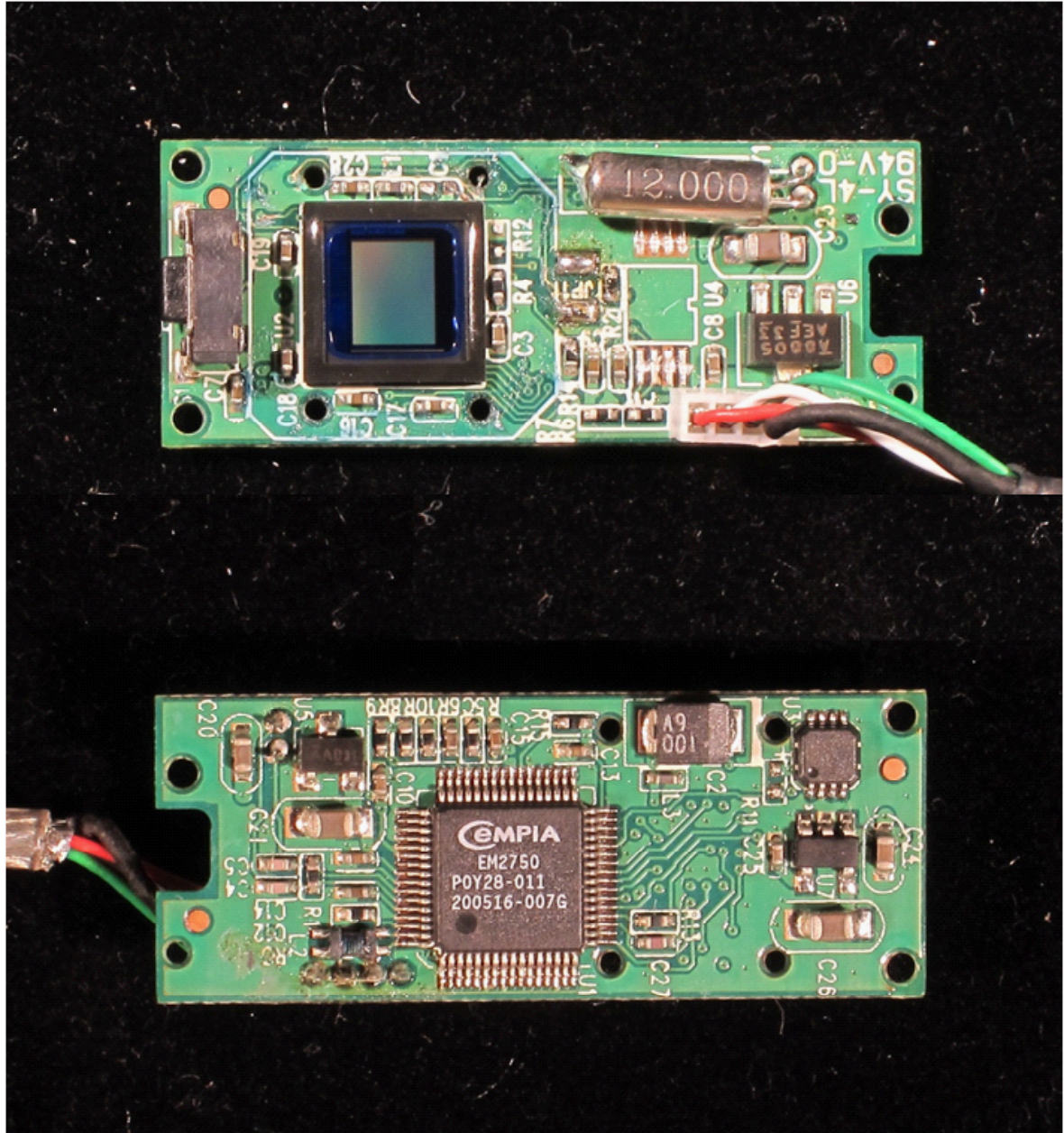


図 4-3-2 使用した CMOS ユニット  
(上：CMOS 素子面 下：制御用 IC 面)

Type II でハレーションの問題が生じた光源に関しては、これまで1個のLEDを使用していたために対象への光量が一様でなく、ハレーションが生じていた、そこで2個のLED（OSPW5111B-QR, Opto Supply, 香港）に拡散キャップ（I-01120、OptoSupply、香港）を取り付け、均一に対象を照らすよう改善を行った（図4-3-3）。

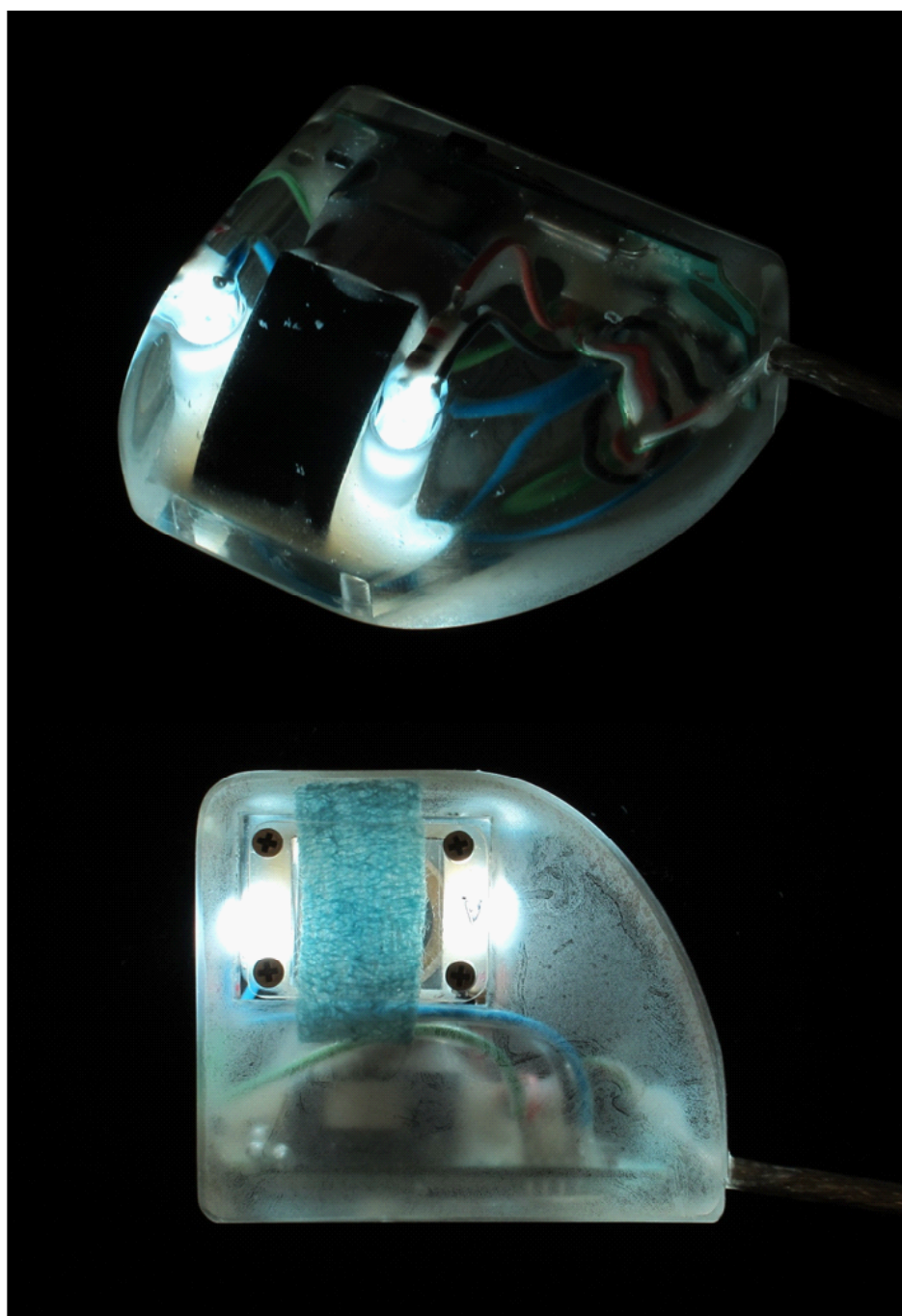


図 4-3-3 ハレーション防止を目的として改善した光源

これらを組み合わせ、生体適合性の向上と防水を目的に医療用エポキシ樹脂で包埋し、長期動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III) を作製した (図 4-3-4)。樹脂包埋後のデバイスサイズは 37.4mm × 42.3mm × 19.7mm (ケーブルを除く) となった。これまで作製した観察装置の中で最も小型になり、生体へ与える影響を小さくできた。この観察装置は外部コンピュータと接続することによって最大 1280 × 1024 (SVGA) の解像度 (図 4-3-5) で画像を静止画および動画を出力でき、動画では最大 30fps で記録することが可能である。観察可能な視野範囲は 11.9mm × 9.6mm でこれは 1 ピクセルあたり約 9.3  $\mu$ m の大きさを表しており、視野の広さと解像度は最も高くなった。表 4-3-1 にこれまでに作製した 3 つのタイプの血管新生観察装置の仕様をまとめた表を示す。

第 5 章では本章で開発した長期動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III) を用いて、動物実験を行い血管新生の長期観察した結果を記す。

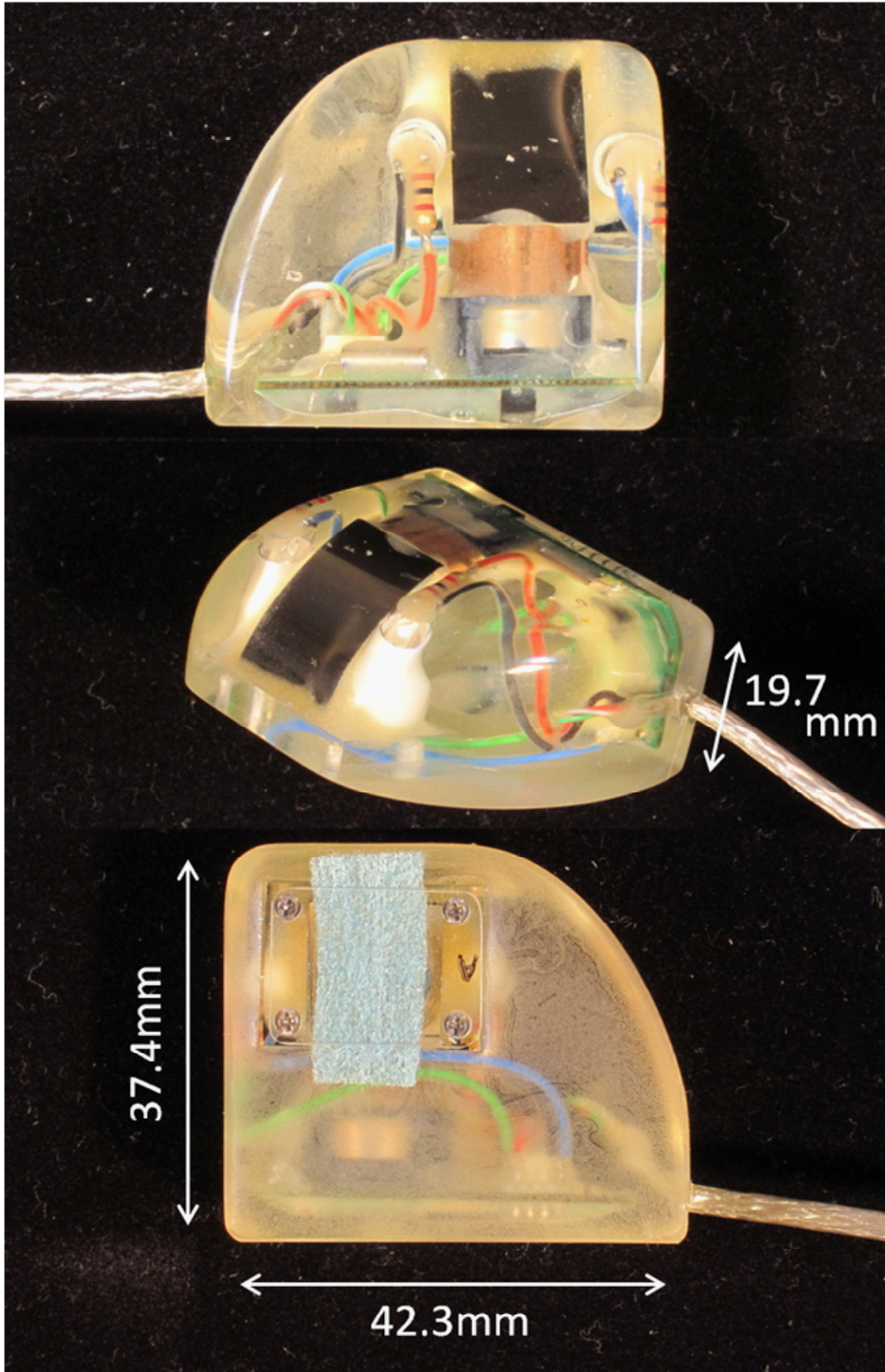


図 4-3-4 長期動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III)

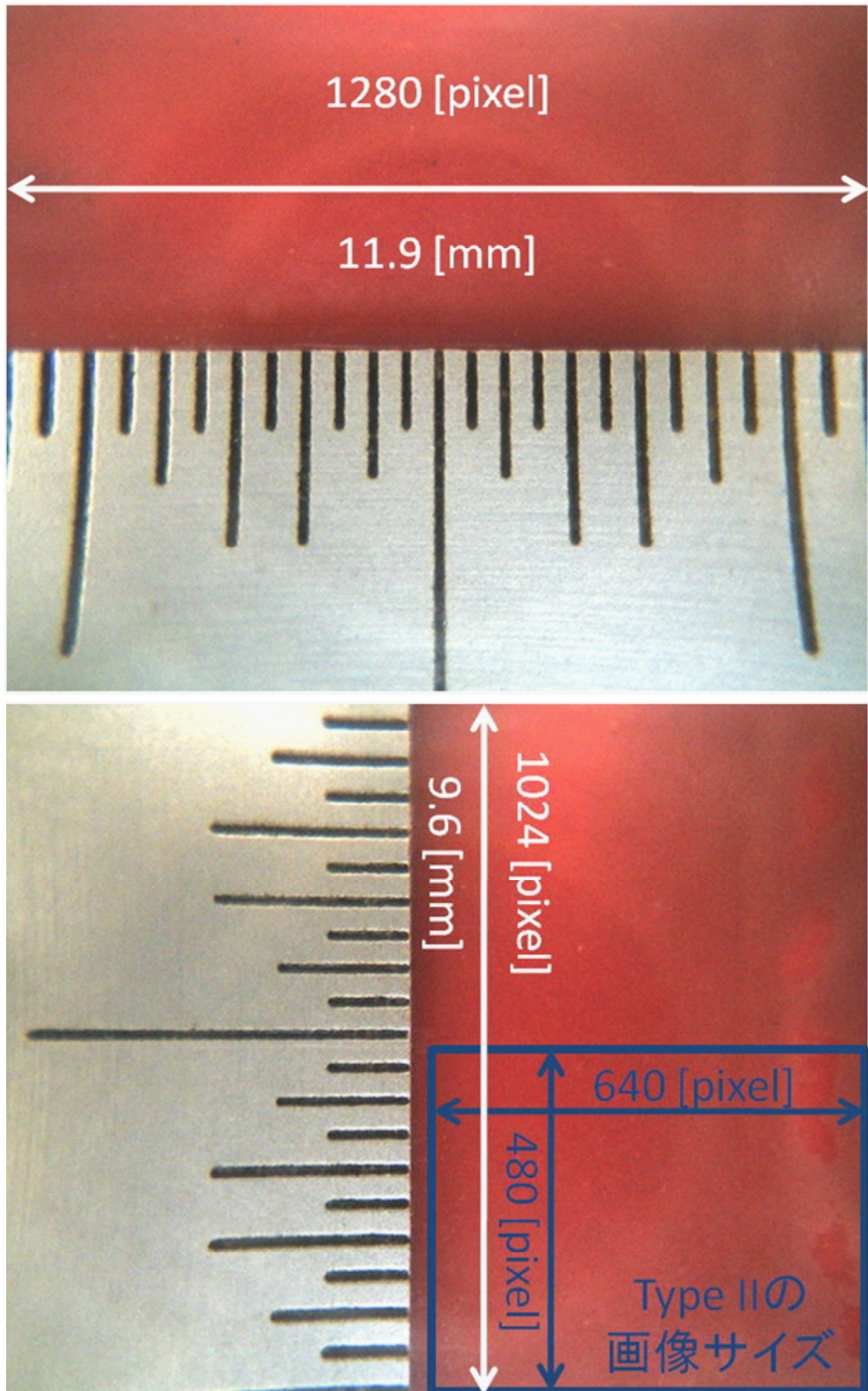


図 4-3-5 開発した観察装置の撮影可能視野範囲と解像度



表 4-3-1 作製した血管新生観察装置の仕様

		Type I	Type II	Type III
撮像素子	タイプ	CCD	CMOS	CMOS
	画素数	34万	35万	130万
	サイズ [inch]	1/4	1/4	1/3
オートフォーカス機能		×	×	○
光源		LED+拡散板	LED	(LED+拡散膜) × 2
Scaffold	種類	PGA	PGA	PGA
	厚み [mm]	0.3	0.3	0.3
	配置方向	垂直	水平	水平
サイズ [mm]		φ12.0×60.0	45.0×59.0×20.6	37.4×42.3×19.7
視野範囲 [mm]		1.6×1.2	8.1×6.2	11.9×9.6
画像解像度 [pixel]		720×480	640×480 (VGA)	1280×1024 (SVGA)
1pixelの長さ [μm]		2.4	13	9.3