微小血管における血流計測法*

Blood Flow Measurements in Microvessels

関 淳 二**

SEKI Junji

Abstract Blood flow rate in microvessels whose diameter is less than 100 μm is an important factor in determining mass transport of oxygen, nutrients etc. as well as in determining production of biologically active substances such as nitric oxide. Several flow measuring techniques used for experimental microcirculatory studies are reviewed. A dual-slit photometric method is a most widespread technique and has moderate temporal and spatial resolutions but it lacks a spatial resolution in the line-of-sight direction. A dual-window method using conventional video signals has a merit of simultaneous velocity measurements in multiple microvessels but its temporal resolution is inadequately low. A laser-Doppler method has sufficiently high temporal resolution to analyze pulsatile flow in small animals and fits for surface microcirculation of solid organs as well as transparent tissues. Image processing method of optical flow and a high-frequency pulsed-wave Doppler ultrasound method are promising in the near future.

Keywords : Microcirculation, Dual-Slit Method, Laser-Doppler Method, Red Blood Cell, Optical Flow, Pulsatile Flow

1. はじめに

血管は人の身体全体に張り巡らされ、心臓（左心室）から駆出された血液は、大動脈、動脈と、分岐を繰り返し次第に細くなる血管を通して、遂には赤血球よりも小さな直径 5 ミクロン程度の毛細血管に達し、各臓器組織を灌流した後、静脈を経て右心房へ戻る。これを体循環という。一方、各臓器内では、直径百ミクロン以下の微小な動脈（これを細動脈と呼ぶ）、それが分岐した毛細血管、そして毛細血管の血流を集める直径数十ミクロンの静脈（細静脈）はネットワークを形成しており、この領域で血液と組織との間の物質交換が行なわれている。これら微小血管系とその内部の

血液流れは総称して、微小循環（microcirculation）と呼ばれている。血液循環の役割は、生体組織が必要とする酸素、栄養物質や各種ホルモンを組織へと輸送し、二酸化炭素等の代謝産物を組織から運び去ることである。しかし、血管系はこのような輸送だけを行う単なる管路ではない。

生体組織、臓器が必要とする酸素や栄養物質の量は、状態によってさまざまに変化する。例えば、運動時には、他の臓器に比べ筋肉が最も酸素を必要とする。また、出血等の原因で体内の血液量あるいは血圧が減少した状況でも、脳には一定量の血液を送らなければならない。このような状態の変化に対応して、各臓器、組織に血液を効率的に

* 1998.10.16 受付

** 国立循環器病センター研究所生体工学部 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1
TEL(06)6833-5012(2432) FAX(06)6872-7485 E-mail: sekij@ri.ncvc.go.jp

分配することは生命活動の維持のために不可欠であり、これこそ血管が果たしている重要な生理的役割である。

血流分配の調節を担うのは、実は太い血管ではなく、各臓器内にある、直径百ミクロンから数十ミクロン程度の細動脈である。細動脈が血管径を変化させ、血管抵抗を変えることによって、心臓の拍出量や各臓器への血流分配量を調節している。更にこれらの微小血管は、中枢神経系やホルモンなど外からの刺激だけでなく、自らも能動的に径変化を起こして、血流を局所的にも調節していることが分かってきた。一例を挙げれば、血管壁の一番内側で血液に接している内皮細胞は、その局所の血流、特にずり応力の刺激によって一酸化窒素などの生体活性物質を産生する。これによって血管壁の平滑筋が弛緩、収縮して、血管径が変化し、局所血流量が増減し、血管壁に加わるずり応力を調節している。

このような微小血管系におけるダイナミックな血流調節機構および、血液と組織間の物質輸送を理解するためには、各微小血管の各瞬間、各状態における血流量を正確に測定する必要がある。本稿では、次節で血流の特徴を簡単に説明した後、3節で主として動物実験で用いられる微小血管における血流速度の計測法について紹介する。

2. 血流の特徴

血液はニュートン流体である血漿 (plasma) に、赤血球などの固形成分が浮遊するサスペンションである。固形成分では赤血球が最も多量に存在し、体積分率 (ヘマトクリット) で 40-50% を占め、血液のレオロジー特性に大きな影響を与えている。

個々の赤血球は、静止状態で直径 6-8 ミクロン、厚さ 2 ミクロン程度の中央が窪んだ円盤状をしており、変形し易く直径 5 ミクロン程度の毛細血管をも容易に通過する。また剪断応力が小さい場合に、赤血球同士は可逆的に接着し連鎖状の集団 (rouleaux) を形成する。これが血液の非ニュートン性の原因となる。また流れの中で赤血球は血管の中心軸に集中する傾向が有り、血管壁近傍には血球成分が存在しない血漿層 (plasma layer) が形成される。血漿層の厚さは微小血管では血管径と比較して無視出来ないものとなる。このために赤血球の平均速度は血漿の平均速度より大きくなり、微小血管におけるヘマトクリット低下 (Fahraeus

効果) や見かけの粘度低下 (Fahraeus-Lindqvist 効果) の一因となる。血流速度計測には赤血球をトレーサーとして用いる事が多いから、赤血球速度と血漿速度あるいは血流速度との間に有意な違いがあることは注意を要する。

血球成分の大きさは数ミクロン、微小血管の内径は 5 から数 10 ミクロン程度と文字通り微小なため、微小循環が観察・計測できるようになったのは顕微鏡の発明以来である。Leeuwenhoek は 17 世紀に既に、毛細血管内を流れる赤血球を自作の顕微鏡で観察し、その速度を 2 mm/s 程度と推定している。彼は顕微鏡の視野内を動く赤血球の距離と時間とを測定したわけであるが、現在でも原理的には全く同じ手法が用いられている。

現在知られている微小血管内の血流速度は 0.1 から数 10 mm/s 程度である。これから微小血管における血流のレイノルズ数を見積もると、 10^{-3} - 10^{-1} 程度と 1 より十分小さい。また心拍動に伴う時間変動に対する周波数パラメータは 10^{-2} - 10^{-1} 程度と、これも 1 より十分小さい。従って、血球成分の影響が無視できるならば、微小血管における血液流れはポアズイユ分布を取りながら準定常的に時間変動していると推測される。

幾何学的な観点から見ると、動物実験で観察対象となる微小血管は多くの場合、光が透過し易い透明な膜状組織か臓器表面にあり、顕微鏡の焦点面内に 2 次元的に走行する微小血管である。血流の方向は血管の分岐部を除いて血管軸方向とほぼ平行しているので、血液の流れは血管に沿った 1 次元運動に近いという特徴をもつ。このような流れの特徴から、微小循環に特有な血流速度計測法が開発されている。

3. 微小血管における血流速度計測法

直径 10 ミクロン以下の毛細血管では、赤血球が中心軸上を単一もしくは rouleaux の形で流れる (一層流れ) か、交互に並んで流れる (二層流れ) ことが多く、流速も 1 mm/s 以下と小さいので、顕微鏡像から赤血球や血漿間隙を弁別し、その動きを追跡することは容易である。この直接的な血流計測法はまさに Leeuwenhoek が行ったことであり、近年でも顕微鏡像を映画やビデオに撮影し、フレーム毎に像を追跡する方法が用いられた。しかしこれを人の目で行うのは、時間と労力がかかり大量のデータを扱ったり、時間分解能を上げる

のは困難である。そのため、現在ではこの方法が採用されることは希である。

また少し太い、数十ミクロンの径の微小血管では、赤血球は速度の異なる多層で流れ、しかも中心流速が大きい。このため、特定の赤血球もしくは赤血球集団の像を追跡することは極めて困難で、この方法は使えない。

そこで現在では、微小血管における血流速度計測には大きく分けて、1) 相関法、2) ドップラ法、3) 画像から求める方法、の3つが用いられている。以下に、これらの方法を簡単に紹介し、その特徴を述べる。

3.1 相関法

画像を目で追跡するのでなく、同一血管の上下流2点における光強度変化の時間遅れ、もしくは血管に沿った光強度パターンの一定時間内の移動距離を相互相関により求め、これから流速を算出する方法である。どちらの方法も、微小血管における血液流れが血管に沿った一次元運動に近いこと、赤血球の空間分布が流れに伴ってあまり変化しないことを前提にしている。前者をデュアルスリット法、後者を空間相関法と呼んでいる。

デュアルスリット法の初期のシステムでは、Fig.1 に示すように顕微鏡によって微小血管の実像をスクリーンに投影し、スクリーンに開けた2つのスリット後方の光電変換素子によって、血管の上下流2点の透過光強度変化を捉える [1]。1967

Fig.1 Microscope system used for a dual-slit photometric method (Redrawn from Wayland and Johnson [1]).

年に開発された当初は、光信号をアナログテープに記録し、後にこれを A/D 変換し、コンピュータ上で2点の相互相関を取ることによって時間差を求めるオフライン処理であった。その後、自己追従型相関計を用いた実時間処理が可能なシステム [2]、ビデオ画像上に設定した2つのウィンドウ内の輝度情報から速度を計測するシステム（これを特にデュアルウィンドウ法と呼ぶこともある） [3] 等が開発された。これらのシステムは市販されるようになって広く普及し、現在最もよく使われる方法となっている。

デュアルスリット法によって計測される速度は、毛細血管のように赤血球が単層で流れる場合には目で追跡して得られる速度と同一になると期待される。しかし、赤血球が多層で流れている場合には以下に示すように単純な解釈は出来ない。

顕微鏡の像は、対物レンズによって決まるある厚みの層内に存在する物体にのみ焦点が合っている。この厚みを焦点深度と呼び、微小循環の観察に用いられる顕微鏡では一から十ミクロン程度である。通常、血管の中央に焦点を合わせて観察するので、像として見えるのは血管中心を含む焦点深度程度の厚みの層を通過する赤血球である。しかし血管の透過光強度信号には、焦点面から焦点深度以上離れた位置を通る赤血球からの寄与も含

Fig.2 Velocity profiles of red cell suspension flowing through a glass capillary with 72 μm in diameter measured by a dual-slit method (Redrawn from Baker and Wayland [2]). The velocity is normalized by the cross-sectional mean velocity, $\bar{V}$. Closed and open circles show the profiles along the line-of-sight diameter and across the tube diameter, respectively.

まれている。その結果、血管の上下流2点での光強度変化の相互相関には血管中心部を通る赤血球だけでなく、視線方向に存在する全ての赤血球が寄与することになる。実際、微小なガラス管に赤血球サスペンションを流したモデル実験を行い、デュアルスリット法によって赤血球速度を計測したところ、顕微鏡の焦点を管中心部に合わせた場合も、上下方向に管径以上ずらした場合も、同じ値が得られた (Fig.2 黒丸参照) [4]。そして、その値は断面内平均流速の1.6倍であった。この1.6という値は、デュアルスリット法で得られる速度と血管断面内平均流速とを結び付けるもので、変換係数と呼ばれている。Poiseuille 流れの場合に、速度を重み関数として視線方向に管直径に亘って速度を平均すると断面内平均流速の1.6倍となることを考慮すると、この変換係数の値は光強度変化の相互相関には焦点面からずれた赤血球からも焦点の合った赤血球と同等の寄与があることを示している [4]。

変換係数の値は血管径によっても、照明法によっても変化する。管直径が小さくなると、赤血球の速度分布が放物線分布を表さなくなるため、直径10ミクロン以下ではこの変換係数が1.3程度、更に赤血球と同程度の直径の毛細管では1に近づくと思われている [5]。また臓器表面の微小血管は透過光照明では観察出来ないため、落射照明や落射蛍光法が用いられる。これら照明法のもとでは後方散乱光を解析に用いるが、深い位置からの散乱光強度は手前にある赤血球の吸収散乱によって大きく減衰する。このため、視線方向に浅い位置を通過する赤血球からの寄与が大きくなり、上記のような一定の変換係数を用いる事が出来ず、血管径とヘマトクリットに応じた係数を用いる必要がある [6]。このように、必ずしも値が確定していない変換係数を用いる必要性は、デュアルスリット法の大きな欠点と言えよう。

デュアルスリット法の他の制約は時間分解能である。自己追従型相関計を用いた実時間処理システムにおける周波数応答特性は、3 Hz 程度である [7]。ラット等の小動物では心拍数が5-6 Hz になるので、心拍動に伴う速度変動を捉えるには無理がある。高速の光電変換器を用いて光信号をデータレコーダに保存し、これを低速で再生してオフライン処理することにより周波数応答特性を上げることが出来るが、デュアルスリット法では本質的

にスリット間隔を通過するのに要する時間内の速度変動に追従することは出来ない。ビデオの輝度情報から計測するシステムは、テープを再生することによって多点での同時速度計測が可能となる利点があるが、ビデオのフレームレートによって制限を受けるので、相関を計算する積分長にもよるが最高でも1秒程度の時間分解能となる。また良好な相関を得るためにはスリット間隔をあまり大きく出来ないで、計測可能な速度範囲もフレームレートによって制限され最大2-3 mm/s までである。

空間相関法は、ビデオ信号や CCD line sensor の出力から血管に沿った光強度パターンを求め、異なる2時刻のパターンの相互相関よりこの間の移動距離を求めて、速度に換算する。ビデオ信号を用いる場合にはデュアルウィンドウ法と同様ビデオのフレームレートによる制限を受けるため、計測可能な血管は毛細血管もしくは速度の小さな細静脈に限られる。空間相関法を適用する場合、赤血球の運動による像の流れを防ぎコントラストを上げるためにビデオに同期した短パルスのストロボ照明を用いる必要がある。計測可能な速度の上限を上げるために、2台のカメラをわずかに同期をずらして動作させる方法 [8]や、CCD カメラを用いて最小1.5 ms の間隔をおいた2画面を記録する方法 [9]等が考案されている。空間相関法は速度の上限はあるが、逆に下限は無く逆流でも計測可能であるために、速度が1 mm/s 以下の毛細管での血流計測に適している。

3.2 ドップラ法

レーザドップラ法は1974年にMishina 達 [10]とEinav 達 [11]によって微小循環計測に応用されて以来、現在まで発展使用されている。一方、超音波ドップラ法は大きな動脈や心室内血流の非侵襲計測に臨床応用されて久しいが、空間分解能が低く微小血管への応用には至らなかった。しかし最近、高周波数の超音波ドップラ法が開発され、微小循環計測に応用されつつある。

レーザドップラ法が微小循環計測に応用された初期の頃には、参照光モード、フリンジモード、光ファイバを血管内に挿入するタイプ等、数多くの試みが為された [12]。Mishina 達 [10]のシステム (Fig.3) では、レーザ光をビームスプリッタによって2本の可干渉なビームに分け、これを集束レンズにより交差させ血管上に干渉縞 (フリンジ)

Fig.3 Laser-Doppler microscope system (Redrawn from Koyama, Mishina et al. [13]).

を作る。フリンジを通過する赤血球からの散乱光は赤血球の速度に比例する周波数で強度変化を起こすので、この散乱光を顕微鏡に取り付けたフォトマルで測光解析することにより赤血球速度が得られる。彼らはこのシステムを、蛙の水掻きや肺、猫の脳の直径 10 から 100 ミクロン程度の微小血管の血流計測に応用した。しかしこれら初期のシステムは、観察のための顕微鏡とレーザドップラ計測のための光学系とが独立していたため、測定点の設定や光学系の調整が困難であり、一般に普及するには至らなかった。

これらの問題の解決法として、現在では、レー

ザビームを顕微鏡筒に入射し対物レンズを結像と同時にレーザの集束レンズとして用いることによって、顕微鏡の焦点面とレーザ流速計の測定体積を一致させるシステムが採用されている。一例として我々が開発したシステムを Fig.4 に示す [12]。このシステムはレーザ流速計 (KANOMAX, FLV) を光ファイバを介して顕微鏡 (OLYMPUS, STM-5) の写真鏡筒に接続し、フリンジモード後方散乱型のレーザドップラ流速計を構成している。ビームスプリッタによって分けられた 2 本のビームは、中間レンズを介して顕微鏡筒に入射し、対物レンズによって標本面上に測定体積を形成する。赤血

Fig.4 Fiber-optic laser-Doppler anemometer microscope for the in vivo measurement of red cell velocity in microvessels [12].

球からの後方散乱光は同じ対物レンズによって集光され、フォトマルで電気信号に変換される。Fig.5 に動物実験で得られた赤血球速度波形の例を示す。細動脈 (arteriole)、毛細血管 (capillary) では心拍に同期した時間変動が顕著であるのに対して、細静脈 (venule) ではランダムな変動が見られる。

レーザドップラ法の測定体積は用いる光学系によって変化する。上記システムで 20 倍の対物レンズを用いた場合、測定体積は直径 44 ミクロン、深さ 190 ミクロン程度の楕円体であり、その大きさは対物レンズの倍率にほぼ反比例する。そこで低倍率の対物レンズを用いて測定体積を大きくし血管断面内の平均速度を計測することも、また高倍率の対物レンズを用いたり、顕微鏡の実像面上にピンホールを置くことで、測定体積を小さくすることによって血管断面内速度分布の計測も可能となる[14]。

血管内で散乱粒子となる赤血球は非常に高密度に存在するため、ドップラ信号は常に存在し連続的にサンプリング可能である。従って、レーザドップラ法の時間分解能の理論的上限となるのは、フリンジ間隔と流速との比と考えられる。即ち、フリンジ間隔を 1 ミクロン程度、流速を 1 mm/s と

すると、1 ms 程度が上限となる。上記のシステムでは、FFT のデータ長 (512 点) と A/D 変換のサンプリング周期 (最小 0.01 ms) との積、5.12 ms が時間分解能の上限になる。しかし A/D 変換器は年々高速の機種が表れ、現在使用しているもので既に 5 倍高速になっているので、時間分解能は理論的上限に近づきつつある。Fig.5 に見られるように、ラット微小血管血流の拍動波形に十分追従している。本システムは後方散乱型であり、レーザ光源は通常の照明光と比較して強度が高いことから、透明な組織中の微小血管ばかりでなく脳などの臓器表面の微小血管への応用も容易である (Fig.5 (b)参照)。

現在臨床で用いられているレーザドップラ組織血流計は、レーザを皮膚表面から投射し戻ってきた散乱光の平均ドップラ周波数から平均血流速度を、そしてドップラ信号の振幅から血液量を推定し、皮下の 1 mm³ 程度の領域を通過する血流量を表示する装置である。皮下には数多くの微小血管がランダムな方向で走行しているから、本方法には定量性はなく、単一の微小血管の計測は不可能であり、ここで述べたシステムとは全く異なる。

超音波ドップラ法は、発振子からの超音波を細いビームにして血管に向けて送信し、赤血球から

Fig.5 Examples of red cell velocity waveforms measured by a fiber-optic laser-Doppler anemometer microscope [12] in (a) mesentery microvessels and (b) brain pial microvessels of the rat. The regular pulsation seen in arterioles and capillaries originate from heart beats.

の散乱波を受信してそのドップラ周波数を求める。連続波を用いる限り、深さ方向の空間分解は難しいが、超音波をパルス発振し、ある一定時間後に反射波を受信することによって特定の深さ位置での流速が計測可能となる。パルスを受信する際のゲートを開く時間で深さ方向の空間分解能が決まり、パルスの繰り返し周波数が時間分解能になる。高い周波数の超音波を用いるほどこれら分解能は向上し、またビームの拡散を小さくできるため横方向の空間分解能も向上させる事が出来る。超音波は周波数が高いほど生体組織での減衰が大きくなり雑音が大きくなること、計測可能な速度の上限が低下すること、計測可能な深さが減少することなどの不利な点もあるが、皮膚の浅い位置での微小血管に対しては利点の方が多い。Christopher 達 [16]は、20-200 MHz の発振が可能なパルス超音波ドップラのシステムを開発し、50 MHz 動作で、横方向 70 ミクロン、深さ方向 90-900 ミクロンの空間分解能を達成し、マウスの耳の最小 20 ミクロン直径の細動脈で血流計測が可能であったと報告している。光と違って、顕微鏡下で測定点を確認する事ができないので、超音波による微小血管の画像化が必要であろう。

ドップラ法の範疇には入らないが、フリンジモードのレーザドップラ法に似た空間フィルタ法について触れておく。最も簡単なシステムは、顕微鏡の実像面上に格子を置き、その後方に集光レンズを介してフォトセンサーを置くタイプである。フォトセンサーから見ると、赤血球の像が格子の透明な帯部分を通過する時のみ赤血球からの信号が入る。従って、フリンジモードのレーザ流速計と同様に、光信号は赤血球速度と格子間隔との比の周波数で強度変化を起こし、これから赤血球速度を求める事が出来る。ただ格子を用いる場合、鋭い格子端の影響で高調波が生じることは注意を要する。そこで、プリズム格子と複数のフォトセンサーを用いて光信号を差し引きすることにより、高調波成分を除去したり、流れ方向を識別できるシステムが開発されている [15]。

3.3 画像から求める方法

初めに記したように、毛細血管以外では赤血球を目で追跡するのは困難である。蛍光でラベルした赤血球もしくはトレーサ粒子を血中に投与すれば、これら蛍光粒子を追跡することは容易になる。しかしこれをフレーム毎に目で追跡するのはやは

り大変な仕事である。そこで励起光をフラッシュ状に高速で点滅させ、ビデオの 1 フレーム内に同一蛍光粒子を複数点撮像し、その点間距離から速度を求める方法が用いられている。この方法で、マウス脳表の直径 6 から 100 ミクロン程度の細動脈の最高血流速度を計測した例がある [17]。

また最近のコンピュータの高速化、大容量化に伴って、顕微鏡の画像を数値処理することによって微小血管の血流を求める試みが現れてきた [18]。これは近接した 2 時刻での微小血管の顕微鏡画像をそれぞれデジタル化し、各ピクセルでの像の流れ (optical flow) を数値的に導く方法である。この方法では、個々の赤血球が光学的に分解されている必要は無く、像の濃淡があれば計測可能である。更に画面内の全ての血管における同時刻の速度が、ベクトルとして捉えられることは大きな利点である。実際への応用に際しては、デュアルスリット法による血管中心流速と断面内平均流速との関係に見られるように、optical flow と実際の赤血球 (血流) 速度との関係を明らかにしておく必要がある。またビデオ画像を使用する限り、速度の小さな毛細血管もしくは細静脈への応用に限られるが、空間相関法でも述べたように、画像の撮り方を工夫すれば速度の上限を増大させることは可能であろう。ただ、この方法の限界として、実時間で用いることは出来ない。

4. おわりに

本稿では、動物を用いた微小循環研究に使用されている血流速度計測法について、特にデュアルスリット法とレーザドップラ法を中心に述べた。これらの手法を人に応用する場合、侵襲が無く顕微鏡での観察が可能な部位という制限のために、眼底結膜や爪床部皮膚等に限定される。これらの部位ではデュアルスリット法が既に人に応用されている。眼底結膜の場合、低出力のレーザを用いればレーザドップラ法の応用も可能であろう。また、超音波ドップラ法の分解能が更に向上すれば、人への応用が最も容易な手法となろう。

実験技術としての微小血管血流計測法の今後の発展という点から見ると、微小血管を単一の血管でなくネットワークを構成する要素と見ていく必要から、多点での血流速度の同時計測を可能にすることがまず挙げられる。そして脈波の解析のための時間分解能の向上、及び従来の手法では困難

であった 100 ミクロンから 1 mm 程度の直径の微小血管における血流計測法の開発、等が今後の課題であろう。

参考文献

- [1] Wayland, H. and Johnson, P. C., Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method, *J. Appl. Physiol.*, **22**, 333-337 (1967).
- [2] Tompkins, W. R., Monti, R. and Intaglietta, M., Velocity measurements by self-tracking correlator, *Rev. Sci. Instrum.*, **45**, 647-649 (1974).
- [3] Intaglietta, M., Silverman, N. R. and Tompkins, W. R., Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods, *Microvasc. Res.*, **10**, 165-179 (1975).
- [4] Baker, M. and Wayland, H., On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels, *Microvasc. Res.*, **7**, 131-143 (1974).
- [5] Lipowsky, H. H., and Zweifach, B. W., Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates, *Microvasc. Res.*, **15**, 93-101 (1978).
- [6] Seki, J. and Lipowsky, H. H., *In vivo* and *in vitro* measurements of red cell velocity under epifluorescence microscopy, *Microvasc. Res.*, **38**, 110-124 (1989).
- [7] Lee, T. Q., Schmid-Schonbein, G. W. and Zweifach, B. W., The application of an improved dual-slit photometric analyzer for volumetric flow rate measurements in microvessels, *Microvasc. Res.*, **26**, 351-356 (1983).
- [8] Anliker, M., et al., Noninvasive measurement of blood flow, in *Cardiovascular Flow Dynamics and Measurements*, N. H. C. Hwang and N. A. Norman (eds.), University Park Press, Baltimore, 43-88 (1977).
- [9] Slaaf, D. W., et al., The use of a CCD-camera for red cell velocity measurements based on spatial correlation, *Microvasc. Res.*, **29**, 251 (1985).
- [10] Mishina, H., Asakura, T. and Nagai, S., A laser-Doppler microscope, *Optics Comm.*, **11**, 99-102 (1974).
- [11] Einav, S., et al., Measurement of blood flow in vivo by laser Doppler anemometry through a microscope, *Biorheology*, **12**, 203-205 (1974).
- [12] Seki, J., Fiber-optic laser-Doppler anemometer microscope developed for the measurement of microvascular red cell velocity, *Microvasc. Res.*, **40**, 302-316 (1990).
- [13] Koyama, T., Mishina, H., et al., Measurements of blood flow velocity by means of a laser Doppler microscope, *Optik*, **61**, 411-426 (1982).
- [14] 関淳二, レーザ流速計による微小循環計測, 流れの計測, **13**, 31-41 (1996).
- [15] Slaaf, D. W., et al., A bidirectional optical (BDO) three-stage prism grating system for on-line measurement of red blood cell velocity in microvessels, *Microvasc. Res.*, **22**, 110-122 (1981).
- [16] Christopher, D. A., et al., A high-frequency pulsed-wave Doppler ultrasound system for the detection and imaging of blood flow in the microcirculation, *Ultrasound in Med. & Biol.*, **23**, 997-1015 (1997).
- [17] Rovainen, C. M., Wang, D. B. and Woolsey, T. A., Strobe epi-illumination of fluorescent beads indicates similar velocities and wall shear rates in brain arterioles of newborn and adult mice, *Microvasc. Res.*, **43**, 235-239 (1992).
- [18] Hill, G. L., et al., A new method for blood velocimetry in the microcirculation, *Microcirc.*, **3**, 259-263 (1996).