微小循環の可視化計測*

杉井 康彦**

Visualization of Microcirculation

Yasuhiko SUGII

1. 緒 論

生体の内部環境を恒常的に維持するために、血管系を血液が流れる血液循環によってガス（酸素と二酸化炭素）、栄養物と老廃物、生理活性物質（ホルモンなど）および熱が輸送されている。血管系は、心臓と血管からなり、管径が 20-32mm で平均流速が 630mm/s、レイノルズ数が 3,600-5,800 の大動脈から、管径が 5-10 μ m で平均流速が 0.5-1mm/s、レイノルズ数が 0.0007-0.003 の毛細血管までと大きなレンジを有している。この血液の流動特性を研究する学問分野を血液レオロジー（Blood rheology）あるいはヘモレオロジー（Hemorheology）と呼ばれこれまでに盛んに研究されてきている¹⁻³⁾。

管径が 100 μ m 以下の血管系は、微小血管系と呼ばれ、細動脈・毛細血管・細静脈などの微小血管網、毛細リンパ管などのリンパ系および細胞組織間で構成されており、ここを流れる血液は、微小循環と呼ばれる。血液は、液体成分である血漿中に、体積率 40-45% の中央がくぼんだ両凹円板形の赤血球（直径は約 8 μ m）、0.5% 以下の白血球、血小板（直径は 2-3 μ m）が浮遊している懸濁液であり、固液 2 相流となり、血管系が小さい微小循環ではその影響が顕著になる。血液は、高せん断速度域では赤血球が変形するため粘性が減少し、低せん断速度域では赤血球が集合するため粘性が増加するといった非ニュートン流体となる。微小な血管では、せん断応力によって管壁近くの赤血球は回転しながら管軸方向へと移動して管の中心に赤血球が集まり（軸集中）、壁面近傍に赤血球の存在しない数 μ m の血漿層ができる等、血液の特異なレオロジー現象が良く知られている。また、動脈では、心拍に同期した拍動流であり、微小循環ではほぼ連続流となる。

微小循環の可視化計測として、Dual Slit 法⁴⁻⁹⁾、レーザドップラ流速計測法（LDV: Laser Doppler Velocimeter 法）¹⁰⁻¹⁴⁾、超音波ドップラ流速計測法¹⁵⁻¹⁸⁾、画像計測法（Capillaroscopy, レーザースペックル法、

PIV (Particle Image Velocimetry) 法)¹⁹⁻⁶⁴⁾、OCT (Optical Coherence Tomography) 法⁶⁵⁻⁷⁴⁾などが開発されている。これらは主として赤血球の速度を求めるものである。また、微小循環と同等な大きさのガラス管やマイクロ流路を用いてモデル実験方法が提案されている⁷⁹⁻¹⁰¹⁾。血液の液体成分の速度計測法として、蛍光消光法¹⁰²⁻¹⁰⁵⁾やマイクロ PIV 法¹⁰⁷⁻¹¹⁸⁾が応用されている。

本稿では、微小循環の可視化計測法について、紹介する。

2. 血球の運動の可視化計測

2.1 *in vivo* 計測

レーザドップラ流速計測法、超音波ドップラ流速計測法、画像計測法（レーザースペックル法、PIV 法など）、OCT 法は、眼球（視神経乳頭、網膜、脈絡膜など）・爪・皮膚・耳たぶなどの部位の微小循環の赤血球の運動を、非侵襲・低侵襲で計測可能であるため、血流のモニターといった臨床応用が行われている。しかしながら、空間解像度が低いため、血管内の詳細な速度分布を求めることが難しい。そのため、血液レオロジーの研究のためには、主としてラットやウサギなどの動物の腸間膜や脳などを開腹・開頭し、生体顕微鏡下で還流させて、Dual Slit 法や画像計測法計測が適用されている。Dual Slit 法は、生体顕微鏡に取り付けた 1 組の光センサ、またはテレビカメラで、撮影した血管像上の隣接した 2 点間での赤血球の通過に伴う輝度の時間変化の遅れと 2 点間距離より、平均的な赤血球速度を求める方法であり、流量の計測に多く用いられている。

腸間膜は透過光照明によって観察でき、比較的鮮明な微小循環の画像を得ることができる。Fig. 1 にラットの腸間膜の微小循環の計測実験の例を示す。8 週の雄のラットをチオブタバルビタールナトリウム（100mg/Kg）で麻酔し、開腹して小腸の一部を露出して、生体顕微鏡のステージに置いた灌流恒温槽内に腸間膜を広げた^{40,42,43)}。連続的にタイロード液を滴下するとともにステージを 37 度に加熱し、生体へのダメージを低減させている。

1986 年に Tangelder らが腸間膜の内径 17-32 μ m の細動脈内の詳細な速度分布を初めて画像計測法により求めた²⁹⁾。蛍光染色した血小板と赤血球を 2 台のキセノン

* 原稿受付 2004 年 4 月 15 日

** 正会員 東京大学 大学院工学系研究科
(〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1,
E-mail: tsugii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

フラッシュランプとアナログカメラ（NTSC 信号）とを同期させて1枚の画像に2重露光してビデオテープに記録し、画像を目視により解析して速度を求めた。血小板を励起波長 525nm, 蛍光波長 625nm のアクリジンレッドで、赤血球を励起波長 490nm, 蛍光波長 525nm のフルオレセインで染色し、100 倍の水浸レンズ（開口数：NA=1.20）を用いた。得られた血小板と赤血球の断面速度分布に大きな差は見られず、層流の理論解である2次曲線からはずれたなまった（blunt）分布となった。このなまりを示す指標として、以下の関数に

$$V(r) = V_{\max} \left(1 - \left| \frac{r}{R} \right|^K \right), -1 \leq \frac{r}{R} \leq +1 \quad (1),$$

$$V(r) = V_{\max} \left(1 - \left| a \left(\frac{r}{R} \right) + b \right|^K \right), a > 0 \quad (2)$$

に速度分布をフィッティングして得られる K で評価することが多い。なお、円管の層流の理論値では、K=2 となる。管径が小さくなるにつれて、なまり（K が大きく）が大きくなった。

CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) 素子による高解像度・高速度カメラや高速共焦点スキャナー、イメージ・インテンシファイア（2次元光電子増倍管）などの高感度デバイスなどの撮影機器の発展と共に、空間分解能や計測精度が改善されている³⁰⁻⁵⁵。例えば、従来のアナログカメラでは 640 × 480 画素・30 枚/秒であったが、近年、1024 × 1024 画素・10,000 枚/秒以上の高解像度・高速度カメラが開発されている。杉井らは、高解像度・高速度のデジタル CCD (Charge Coupled Device) カメラを用いて、細動脈内の血流を可視化し、階層的相互相関法⁷⁵)により高い空間分解能の速度分布を計測した^{40,42,43}。Fig. 2 に撮影された細動脈内の血流画像を示す。観察領域は、136 × 136 μm であり、分解能は、0.27 μm/画素である。図中央に、左から右に流れる細動脈があり、画像から推定される細動脈の管径は約 24-26 μm である。x=50 μm 付近に、血管の曲がり部が観察されるが、ほぼ直管となっている。撮像速度は 1,000 枚/秒、画像のサイズならびに輝度階調数が 512 × 512 画素、256 階調（8 bit）である高速度カメラを用いた。約 2 秒間（2048 枚、512MB）のデジタル画像データをコンピュータ上に保存することができる。また、対物レンズには、40 倍の水浸レンズ（NA=0.55）と、0.45 倍の CCD 用リレーレンズを用いた。照明には 100W のハロゲンライトによる透過光を用い、赤血球のコントラストをあげるために光学フィルタ（550nm 付近を透過）を用いた。Fig. 3 に得られた約 2 秒間、2048 枚の時間平均速度分布を示す。PIV 法における検査領域の大きさを 7 × 7 画素、計測点の間隔は 50% の重複率を許して求めた。ただし、表示のためにベクトルを x 方向に間引いている。血管の中心付近で最大値をとっており、約 11.0 画素/枚、3.0mm/sec であり、層流の管内流の速度分布を示している。また、血管壁近傍まで速

Fig. 1 Observation of the rat mesentery under intravital-microscope⁴²⁾.

Fig. 2 Blood flow image in arteriole of the rat mesentery⁴²⁾.

Fig. 3 Temporal-averaged velocity distribution on blood flow in arteriole⁴²⁾.

度が求められており、壁に垂直な速度成分は0になっている。さらに、特に $x=70-90, 100-120\mu\text{m}$ 付近の下壁近傍に血漿層が原因と思われる小さな流速の領域が確認できた。また、得られた速度分布は、管中央付近の速度勾配がなまった傾向を示した。血漿層の厚みが血管形状によって変化し、それに伴って断面速度分布や壁面せん断速度が変化することが確認できた。

透過照明による観察の代わりに、蛍光染色した赤血球をトレーサとして蛍光観察する可視化法も開発されている³²⁾。動物から採取した血液を遠心分離し、血球と血漿とを分け、血球を染色後、血管に注入する。赤血球の染色には、549nmの緑の光を吸収し、565nm付近の黄色の光を発する染料 (DiIC16 (3)) (1,1'-Dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) が良く使われている。この染料は、赤血球膜を構成するリポ蛋白質に浸透して初めて強い染色効果を表す。この場合、微小循環を流れる蛍光染色された血球の密度が少なく、得られる速度ベクトル数が少なくなる。

赤血球は、その径より小さな毛細血管内を変形しながら通過することが知られており、その変形能は血液の粘度などに大きく影響する。毛細血管内を変形しながら流れる赤血球の形状とその速度、毛細血管の径を計測し、それらの関係が調べられている^{56,57)}。Jeongらは、内径 $6.2\mu\text{m}$ の毛細血管内を変形しながら運動する赤血球を2,000枚/秒の高速度カメラで撮影し、その変形と速度、管径との関係を調べた⁵⁷⁾。赤血球の平均流速は、1.85mm/sであり、DI (Deformation index) の平均値は1.55であった。なお、DIは、変形した赤血球の長さとの比である。管径が小さくなるに連れ、速度とDIが大きくなり、長細く変形した。

赤血球だけでなく、白血球の運動^{58,59)}、リンパ球の運動⁶⁰⁾、代表的なドラッグデリバリーシステム (DDS: Drug Delivery System) であるリボソームの運動⁶¹⁾の可視化計測法が開発されている。また、レーザ誘起蛍光法 (LIF: Laser Induced Fluorescence) 法を用いた酸素濃度の計測法も開発されており、赤血球の運動と酸素濃度の同時計測も行われている⁶²⁻⁶⁴⁾。

血球の速度の計測精度は、観察方法やトレーサの大きさ、焦点深度などに影響される。そこで、明視野と蛍光との違いの影響⁷⁶⁾や得られる速度に対する焦点深度の影響^{77,78)}が検討されている。

2.2 *in vitro* 計測

in vivo に比べ *in vitro* 計測は、その容易さから古くから行われている^{5,79-97)}。1970年にGaetgensらは、Dual Slit法を用いてヘマトクリットおよび流量を変化させて、内径 $30-130\mu\text{m}$ のガラス管内の赤血球の速度分布を計測し、円管内の層流の理論解である2次曲線からずれることを示した⁷⁹⁾。1974年にBakerとWaylandは、空間分解能を改善させるため、直径27.0, 44.9, 71.9, 142.5 μm のガラス管内の赤血球の運動を100倍の油浸

対物レンズ (NA=1.3) を用いて拡大した像をスクリーンに投影し、フォトトランジスタのアレイで検知して、半径当たり7点の速度分布を求めるDual Slit法を開発した⁵⁾。

従来、ガラス管をバーナーで熱し引っ張ることにより細管を作成していたが、近年の微細加工技術の発展に伴い、ガラス製やPDMS (polydimethylsiloxane) 製のマイクロ流路が用いられている。流路断面形状が矩形となり、血管とは形状が異なるが、ガラス管壁面による屈折の影響を低減でき、計測精度や壁面近傍の空間分解能が向上した⁸²⁾。また、CMOS素子による高解像度・高速度カメラや高速共焦点スキャナー、イメージ・インテンシファイアなどの高感度デバイスなどの撮影機器の発展と共に、空間分解能や計測精度が改善されている⁸³⁻⁸⁶⁾。

古くから流れによるせん断応力と流路壁面の作用による赤血球の変形の可視化計測が行われている⁸⁷⁻¹⁰¹⁾。1970年にガラス管内の赤血球の変形が観察された⁸⁷⁾。内径 $4-10\mu\text{m}$ のガラス管内の赤血球の運動 (赤血球の速度: $0-1\text{mm/s}$) をキセノンランプの照明を油浸コンデンサーを用いて透過照明し、63倍 (NA=1.25) の油浸対物レンズを通して、16mmフィルムを用いたロータリープリズム式の高速度カメラ (Red Lake Lab., Hycam) にシャッター速度 $1/3000, 1/6000$ で300, 600枚/秒の画像を撮影した。得られた画像を目視により解析し、赤血球の速度、毛細管の内径、管壁と赤血球の隙間 (血漿層)、赤血球の形状を調べた。1995年に微細加工技術により作成したシリコン製マイクロ流路を用いて手法が提案され⁹¹⁾、その後、マイクロ流路を用いた赤血球の変形能の可視化計測法が多く提案されている⁹²⁻¹⁰¹⁾。

3. 液体成分の流動の可視化計測

1989年に *in vivo* 実験において、蛍光消光 (Fluorescence Photobleaching) 法を用いて、血流の液体成分の速度計測法が開発され¹⁰²⁾、種々の血管に適用されている¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。蛍光顕微鏡を用いて蛍光染料を混入した微小循環に強い光源を照射して蛍光を消光させ、それをトレーサとして速度を計測する方法である。しかしながら、微小循環では空間分解能が不足しているため、流量の計測に留まっている。微小な蛍光粒子をトレーサとしてマイクロスケールの空間分解能を有する速度分布を計測できるマイクロPIV法が開発され¹⁰⁶⁾、微小循環に適用されている¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾。

Smithらは、粒子径 $0.47\mu\text{m}$ の蛍光粒子を内径 $21-41\mu\text{m}$ のマウスの精巣挙筋の細静脈内に流し、ダブルフラッシュ照明 (時間間隔: $5-16.67\text{ms}$) と100倍 (NA=1.0) の水浸レンズを用いてCCDカメラで撮影し、ビデオ (S-VHS) に記録して、血管壁面近傍の血漿層の速度を可視化計測した¹⁰⁷⁾。

Sugiiらは2005年に *in vitro* 実験において、蛍光染色した赤血球と蛍光粒子の速度を同時に計測する手法を対

案した¹¹¹⁾。Fig. 4 に計測システムを示す。照明光源に水銀ランプを用い、観察対象に上方から光を入射させる落射照明によって流れ場の可視化を行った。427nm の紫の波長で励起し 468nm と青い波長の蛍光を発する粒子径 $1\mu\text{m}$ の蛍光粒子を血漿に混入し、549nm の緑の光を吸収し 565nm 付近の黄色の光を発する DiIC16 (3) 染料で赤血球を染色して、光学フィルタを用いることにより、赤血球の運動と血漿の流動とを分離した。512 × 512 画素、8bit 階調、最大 6,000 枚/秒のイメージ・インテンシファイア付き高感度・高速度カメラを用いて蛍光画像を取得した。細動脈のモデルとして、内径 $100\mu\text{m}$ 、外径 $300\mu\text{m}$ の断面形状が真円のマイクロチューブを用いた。水の屈折率 1.33 とほぼ同じ 1.338 の屈折率を持つ FEP (Fluorinated Ethylene Polymer) 製マイクロチューブを水中に沈め、60 倍水浸レンズ (開口数: 0.9, 作動距離: 2.0mm) を用いて屈折率の違いによる影響の低減を図った。マイクロチューブを $100\mu\text{L}$ のマイクロシリンジに接続し、シリンジポンプを用いて $100\mu\text{L}/\text{h}$ の一定流量で駆動させた。レイノルズ数は 1.1×10^{-1} である。Fig. 5 にヘマトクリットが 21% の血液の軸方向の時間平均速度分布とその標準偏差を示す。赤血球速度を△, 血漿速度を□, それぞれの標準偏差を点線で示す。管内層流の理論解であるポアズイユ流では、平均流速が $3.5\text{mm}/\text{sec}$ 、最大値が $7.0\text{mm}/\text{sec}$ となり、実線で示している。計測された最大流速は、赤血球流れの場合 $6.9\text{mm}/\text{sec}$ 、血漿流れの場合 $7.0\text{mm}/\text{sec}$ となる。得られた軸方向速度分布は、ほぼ左右対称となり、赤血球流れ、血漿流れともに層流の理論解とよく一致している。

2012 年に Ha らは、ラットの腸間膜の内径 $50\text{--}100\mu\text{m}$ の細静脈内の赤血球の速度と液体成分の速度を計測した¹¹²⁾。粒子径 $0.52\mu\text{m}$ の蛍光粒子を動脈から注入し、レーザー照明により蛍光粒子を、ハロゲンランプによる透過照明により赤血球を可視化し、60 倍の水浸レンズ (NA=1.0) と高速度カメラを用いて、撮影した。得られた画像の輝度値から、蛍光粒子と赤血球を分離し、PTV 法により蛍光粒子の速度を、PIV 法により赤血球の速度を求めた。

in vitro 実験として、微細加工法により作成したマイクロ流路内の血流に、マイクロ PIV 法や共焦点マイクロ PIV 法を適用し、液体成分の速度分布が計測されている¹¹³⁻¹¹⁷⁾。さらに、マイクロ流路内のタンクトレッド運動と呼ばれる赤血球の膜の回転運動とその周りの液体成分の速度分布を計測する手法が開発されている¹¹⁸⁾。

近年、マイクロ流路内で血管内皮細胞を培養する技術が開発され^{119,120)}、細胞近傍の速度分布の計測法が提案されている¹²¹⁾。マイクロ流路内での培養は、微小空間であるために培養液を充填しただけでは、細胞に対して培養液の量が少なく栄養や酸素が不足し、さらに老廃物が滞留するために、細胞を育てることが出来ない。その

ため、新鮮な培養液を細胞に連続的に供給する必要があるが、灌流の際の気泡の混入や汚染、灌流による細胞の剥がれなどの問題などがあり、非常に困難である。そこで、流路壁面の細胞外マトリックスによる修飾や灌流方法の最適化によって、 0.1Pa と大きな壁面せん断応力を負荷しながら細胞を培養する方法を確立した。これによって、壁面の違いによる流動への影響だけでなく、流れによる細胞への影響を評価することが可能となった。さらに、血液の分析デバイスの開発のため、血流の知見をもとに設計したマイクロ流路を用いて、血球と血漿とを分離するデバイスも提案されている¹²²⁾。

Fig. 4 Schematic view of experimental setup¹¹¹⁾

Fig. 5 Time-averaged axial velocity profiles of blood flow through micro round tube¹¹¹⁾

4. 結論

本稿では、微小循環の可視化計測法について、紹介した。 *in vivo* および *in vitro* 実験における赤血球の運動やその変形、血液の液体成分の可視化計測法について述べた。近年の急速な各種装置の発展に伴い、高解像度化・高精度化が図られ、多くの新しい知見が得られた。しかしながら、微小空間における変形する固体と液体から固

液 2 相流の流動には、まだ多くの不明な点が残されている。今後、診断などの臨床応用のためには、たんぱく質や血漿に含まれる各種生理物質や薬剤による流動への影響を調べるのが重要となる。また、血液と細胞間での熱・物質輸送現象を把握するため、さらなる高分解能な可視化計測法の開発が望まれている。

参 考 文 献

- 1) 岡小天：バイオレオロジー，裳華房，第4章，第8章（1984）
- 2) Maeda, N. : Erythrocyte rheology in microcirculation, *Jpn. J. Physiol.*, Vol.46 (1996) pp.129-134.
- 3) Goldsmith, H. L. : The microrheology of human blood, *Microvasc. Res.*, Vol.31 (1986) pp.121-142.
- 4) Wayland, H., et al. : Erythrocyte velocity measurement in microvessels by two-slit photometric method, *J. Appl. Physiol.*, Vol.22 (1967) pp.333-337.
- 5) Baker, M., Wayland, H. : On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels, *Microvasc. Res.*, Vol.7, No.1 (1974) pp.131-143.
- 6) Intaglietta, M., et al. : Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods, *Microvasc. Res.*, Vol.10 (1975) pp.165-179.
- 7) Lee, T. Q., et al. : The application of an improved dual-slit photometric analyzer for volumetric flow rate measurements in microvessels, *Microvasc. Res.*, Vol.26 (1983) pp.351-361.
- 8) 南山求：微小血管の血流量測定，日本バイオレオロジー学会誌，Vol.2, No.1 (1988) pp.9-22.
- 9) Cokelet, G. R., et al. : Observations on the accuracy of photometric techniques used to measure some in vivo microvascular blood flow parameters, *Microcirc.*, Vol.5 (1998) pp.61-70.
- 10) Einav, S., et al. : Measurement of blood flow in vivo by Laser Doppler Anemometry through a microscope, *Biorheology*, Vol.12, No.3-4 (1975) 203-205.
- 11) Cochrane, T., et al. : Laser Doppler Measurement of Blood Velocity in Microvessels, *Med. Biol. Eng. Comput.*, Vol.19, No. 15 (1981) pp.589-596.
- 12) Seki, J., et al. : Fiber-optic laser-Doppler anemometer microscope applied to the cerebral microcirculation in rats, *Biorheology*, Vol.33 (1996) pp.463-470.
- 13) Linden, M., et al. : Evaluation of enhanced high-resolution laser Doppler imaging in an in vitro tube model with the aim of assessing blood flow in separate microvessels, *Microvasc. Res.*, Vol.56 (1998) pp.261-270.
- 14) Golster, H., et al. : Red blood cell velocity and volumetric flow assessment by enhanced high-resolution laser Doppler imaging in separate vessels of the hamster cheek pouch microcirculation, *Microvasc. Res.*, Vol. 58, No. 1 (1999) pp. 62-73.
- 15) Kruse, D. E., et al. : A swept-scanning mode for estimation of blood velocity in the microvasculature, *Ultrasonics, IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, Vol. 45, No. 6 (1998) pp.1437-1440.
- 16) Goertz, D. E., et al. : High-frequency color flow imaging of the microcirculation, *Ultrasound Med. Biol.*, Vol.26, No.1 (2000) pp.63-71.
- 17) Goertz, D. E., et al. : High-frequency 3-D color-flow imaging of the microcirculation, *Ultrasound Med. Biol.*, Vol.29, No.1 (2003) pp.39-51.
- 18) Chérin, E., et al. : Ultrahigh frame rate retrospective ultrasound microimaging and blood flow visualization in mice in vivo, *Ultrasound Med. Biol.*, Vol.32, No.5 (2006) pp.683-691.
- 19) Fagrell, B., et al. : A microscope-television system for studying flow velocity in human skin capillaries, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol.233, No.2 (1977) pp.H318-321.
- 20) Ctol, M., et al. : Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis, *Rheumatology*, Vol.43 (2004) pp.716-719.
- 21) Anderson, M. E., et al. : Computerized nailfold video capillaroscopy-A new tool for assessment of Raynaud's phenomenon, *J. Rheumatology*, Vol.32, No.5 (2005) pp.841-848.
- 22) Awan, Z. A., et al. : Human microvascular imaging : A review of skin and tongue videomicroscopy techniques and analysing variables, *Clin. Physiol. Funct. Imaging*, Vol.30, No.2 (2010) pp. 79-88.
- 23) Hou, M. C., et al. : A computerized system of nail-fold capillaroscopy for dry eye disease diagnosis. *Multidimensional Systems and Signal Processing*, Vol. 23, No. 4 (2012) pp. 515-524.
- 24) Briers, J. D., Webster, S. : Laser Speckle contrast analysis (LASCA) : a nonscanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow, *J. Biomed. Opt.*, Vol.1 (1996) pp.174-179.
- 25) Yaoeda, K., et al. : Measurement of microcirculation in the optic nerve head by laser speckle flowgraphy and scanning laser Doppler flowmetry, *Am. J. Ophthalmol.*, Vol.129 (2000) pp.734-739.
- 26) Cheng, H., et al. : Laser speckle imaging of blood flow in microcirculation, *Phys. Med. Biol.*, Vol.49 (2004) pp.1347-57.
- 27) Meisner, J. K., et al. : Laser speckle flowmetry method for measuring spatial and temporal hemodynamic alterations throughout large microvascular networks, *Microcirc.*, Vol.19, No.7 (2012) pp.619-631.
- 28) Basak, K., et al. : Review of laser speckle-based analysis in medical imaging, *Med. Biol. Eng. Comput.*, Vol.50, No.6 (2012) pp.547-558.
- 29) Tangelder, G. J., et al. : Velocity profiles of blood platelets and red blood cells flowing in arterioles of the rabbit mesentery, *Circ. Res.*, Vol.59 (1986) pp.505-514.
- 30) Pries, A. R. : A versatile video image analysis system for microcirculatory research, *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, Vol.7 (1988) pp.327-345.
- 31) Watanabe, M., et al. : The time-space correlation method for measurement of erythrocyte velocity in microvessels using a CCD linear image sensor, *Microvasc. Res.*, Vol.41 (1991) pp. 41-46.
- 32) Unthank, J. L., et al. : Evaluation of carbocyanine-labeled erythrocytes for microvascular measurements, *Microvasc. Res.*, Vol.45 (1993) pp.193-210.
- 33) Villringer, A., et al. : Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study, *Circul research*, Vol.75, No.1 (1994) pp.55-62.
- 34) Alonso, C., et al. : Transient rheological behaviour of blood in low-shear tube flow - velocity profiles and effective viscosity, *Am. J. Physiol.*, Vol.268 (1995) H25-H32.
- 35) Ishikawa, M., et al. : Measurement of RBC velocities in the rat pial arteries with an image-intensified high-speed video camera system, *Microvasc. Res.*, Vol.56 (1998) pp.166-172.
- 36) Parthasarahi, A. A., et al. : Determination of red blood cell velocity by shuttering and image analysis, *Ann. Biomed. Eng.*, Vol.27 (1999) pp.313-325.
- 37) Seylaz, J., et al. : Dynamic in vivo measurement of erythro-

- cyte velocity and flow in capillaries and of microvessel diameter in the rat brain by confocal laser microscopy, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, Vol.19, No.8 (1999) pp.863-870.
- 38) Tsukada, K., et al. : Image correlation method for measuring blood flow velocity in microcirculation : correlation 'window' simulation and in vivo image analysis, *Physiol. Meas.*, Vol.21 (2000) pp.459-471.
  - 39) Ogasawara, Y., et al. : Quantitative blood velocity mapping in glomerular capillaries by in vivo observation with an intravital videomicroscope, *Methods Inf. Med.*, Vol.39, No.2 (2000) pp.175-178.
  - 40) 杉井康彦他 : 高精度画像計測法を用いた微小血管内の速度分布計測, 日本機械学会論文集(B編), Vol.67, No.662 (2001) pp.2431-2436.
  - 41) Bishop, J. J., et al. : Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol.280 No.1 (2001) pp.H222-36.
  - 42) Sugii, Y., et al. : In Vivo PIV Measurement of Red Blood Cell Velocity Field in Microvessels Considering Mesentery Motion, *Physiol. Meas.*, Vol.23 (2002) pp.403-416.
  - 43) Sugii, Y., et al. : Measurement of a Velocity Field in Microvessels Using High-Resolution PIV Technique, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol.972 (2002) pp.331-336.
  - 44) Yamamoto, T., et al. : Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, Vol.282, No.6 (2002) pp.F1150-F1155.
  - 45) Nakano, A., Sugii, Y., et al. : Measurement of red cell velocity in microvessels using particle image velocimetry (PIV), *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, Vol.29 (2003) pp.445-455.
  - 46) 杉井康彦他 : 高精度画像計測法を用いた微小血管内の速度分布計測 (第2報 ラット腸間膜細動脈のアンサンブル流速平均解析), 日本機械学会論文集(B編), Vol.70, No.691 (2004) pp.701-706.
  - 47) Koutsiaris, A. G., Pogiati, A. : Velocity pulse measurements in the mesenteric arterioles of rabbits, *Physiol. Meas.*, Vol.25 (2004) pp.15-25.
  - 48) Nakano, A., Sugii, Y., et al. : Velocity profiles of pulsatile blood flow in arterioles with bifurcation and confluence in Rat mesentery measured by particle image velocimetry, *JSME Int. J. Ser. C*, Vol.48, No.4 (2005) pp.444-452.
  - 49) Sourice, A., et al. : Red blood cell velocity estimation in microvessels using the spatiotemporal autocorrelation, *Meas. Sci. Technol.*, Vol.16 (2005) pp.2229-2240.
  - 50) Lee, J. Y., et al. : Micro-PIV measurements of blood flow in extraembryonic blood vessels of chicken Embryos, *Physiol. Meas.*, Vol.28 (2007) pp.1149-1162.
  - 51) Reyes - Aldasoro, C. C., et al. : Measuring the velocity of fluorescently labelled red blood cells with a keyhole tracking algorithm, *J. Microscopy*, Vol.229, No.1 (2008) pp.162-173.
  - 52) Tomita, M., et al. : Automated Method for Tracking Vast Numbers of FITC-Labeled RBCs in Microvessels of Rat Brain In Vivo Using a High - Speed Confocal Microscope System, *Microcirc.*, Vol.15, No.2 (2008) pp.163-174.
  - 53) Dobbe, J., et al. : Measurement of functional microcirculatory geometry and velocity distributions using automated image analysis, *Med. Biol. Eng. Comput.*, Vol.46 (2008) pp.659-670.
  - 54) Chen, Y., et al. : Automatic tracking and measurement of the motion of blood cells in microvessels based on analysis of multiple spatiotemporal images, *Meas. Sci. Technol.*, Vol.22, No.4 (2011) pp.045803.
  - 55) Al - Khazrji, B. K., et al. : A simple "streak length method" for quantifying and characterizing red blood cell velocity profiles and blood flow in rat skeletal muscle arterioles, *Microcirc.*, Vol.19, No.4 (2012) pp.327-335.
  - 56) Skalak, R., Branemark, P. I. : Deformation of RBCs in capillaries, *Science*, Vol.164 (1969) pp.717-719.
  - 57) Jeong, J. H., Sugii, Y., et al. : Measurement of RBC Deformation and Velocity in Capillaries in vivo, *Microvasc. Res.*, Vol.71, No.3 (2006) pp.212-217.
  - 58) Sato, Y., et al. : Automatic extraction and measurement of leukocyte motion in microvessels using spatiotemporal image analysis, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, Vol.44 (1997) pp.225-36.
  - 59) Ray, N., Acton, S. : Data acceptance for automated leukocyte tracking through segmentation of spatiotemporal images, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, Vol.52 (2005) pp.1702-1712.
  - 60) Dixon, J. B., et al. : Image correlation algorithm for measuring lymphocyte velocity and diameter changes in contracting microlymphatics, *Ann. Biomed. Eng.*, Vol.35 (2007) pp.387-396.
  - 61) Jeong, J. H., Sugii, Y., et al. : Interaction between liposomes and RBC in microvessels in vivo, *Microvasc. Res.*, Vol.73, No.1 (2007) pp.39-47.
  - 62) Japee, S. A., et al. : Automated method for tracking individual red blood cells within capillaries to compute velocity and oxygen saturation, *Microcirc.*, Vol.12, No.6, (2005) pp.507-515.
  - 63) Japee, S. A., et al. : A new video image analysis system to study red blood cell dynamics and oxygenation in capillary networks, *Microcirc.*, Vol.12, No.6 (2005) pp.489-506.
  - 64) Hanna, G., et al. : Automated measurement of blood flow velocity and direction and hemoglobin oxygen saturation in the rat lung using intravital microscopy, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, Vol.304, No.2 (2013) pp.L86-L91.
  - 65) Chen, Z., et al. : Noninvasive imaging of in vivo blood flow velocity using optical Doppler tomography, *Opt. Lett.*, Vol.22, No.14 (1997) pp.1119-1121.
  - 66) Zhao Y, et al. : Phase-resolved optical coherence tomography and optical Doppler tomography for imaging blood flow in human skin with fast scanning speed and high velocity sensitivity, *Opt. Lett.*, Vol.25 (2000) pp.114-116.
  - 67) Szkulmowska, A., et al. : Three-dimensional quantitative imaging of retinal and choroidal blood flow velocity using joint spectral and time domain optical coherence tomography, *Opt. Express*, Vol.17, No.13 (2009) pp.10584-10598.
  - 68) Grulkowski, I., et al. : Scanning protocols dedicated to smart velocity ranging in Spectral OCT, *Opt. Express*, Vol.17, No.26 (2009) pp.23736-23754.
  - 69) Wojtkowski, M. : High-speed optical coherence tomography : basics and applications, *Appl. Opt.*, Vol.49, No.16 (2010) pp. D30-D61.
  - 70) Wang, Y., Wang, R. : Autocorrelation optical coherence tomography for mapping transverse particle-flow velocity, *Opt. Lett.*, Vol.35, No.21 (2010) pp.3538-3540.
  - 71) Srinivasan, V.J., et al. : Quantitative cerebral blood flow with optical coherence tomography, *Opt. Express*, Vol.18, No.3 (2010) pp.2477-2494.
  - 72) Srinivasan, V. J., et al. : OCT methods for capillary velocimetry, *Biomed. Opt. Express*, Vol.3, No.3 (2012) pp.612-629.
  - 73) Bukowska, D. M., et al. : Assessment of the flow velocity of blood cells in a microfluidic device using joint spectral and time domain optical coherence tomography, *Opt. Express*, Vol.21, No.20 (2013) pp.24025-24038.
  - 74) Chen, C. Y., et al. : Time-resolved OCT- μ PIV : a new microscopic PIV technique for noninvasive depth-resolved pulsatile flow profile acquisition, *Exp. fluids*, Vol.54, No.1

- (2013) pp.1-9.
- 75) Sugii, Y., et al. : A highly accurate iterative PIV technique using gradient method, *Meas. Sci. Technol.*, Vol.11 (2000) pp.1666-1673.
  - 76) Gretz, J. E., et al. : Measurement uncertainties associated with the use of bright field and fluorescence microscopy in the microcirculation, *Microvasc. Res.*, Vol.49 (1995) pp.134-140.
  - 77) Bitsch, L., et al. : Micro particle-image velocimetry of bead suspensions and blood flows, *Exp. Fluids*, Vol.39 (2005) pp.507-513.
  - 78) Chayer, B., et al. : Velocity measurement accuracy in optical microhemodynamics : experiment and simulation, *Physiol. Meas.*, Vol.33, No.10 (2012) pp.1585-602.
  - 79) Gaetgens, P., et al. : Velocity profiles of human blood at normal and reduced hematocrit in glass tubes up to 130 μ diameter, *Microvasc. Res.*, Vol.2, No.1 (1970) pp.13-23.
  - 80) Goldsmith, H. L. : Red cell motions and wall interactions in tube flow, In *Federation Proc.*, Vol.30, No.5 (1971) pp.1578.
  - 81) Lima, R., et al. : Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries : Role of Hematocrit and geometry, *J. Biomech.*, Vol.41 (2008) pp.2188-2196.
  - 82) Fujiwara, H., et al. : Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel, *J. Biomech.*, Vol.42 (2009) pp.838-843.
  - 83) Lima, R., et al. : Measurement of individual red blood cell motions under high hematocrit conditions using a confocal micro-PTV system, *Ann. Biomed. Eng.*, Vol.37, (2009) pp.1546-1559.
  - 84) Choi, Y. S., Lee, S. J. : Three-dimensional volumetric measurement of red blood cell motion using digital holographic microscopy, *Appl. Opt.*, Vol.48, No.16 (2009) pp.2983-2990.
  - 85) Kamoun, W. S., et al. : Simultaneous measurement of RBC velocity, flux, hematocrit and shear rate in vascular networks, *Nature methods*, Vol.7, No.8 (2010) pp.655-660.
  - 86) Pinho, D., et al. : Automatic tracking of labeled red blood cells in microchannels, *Int. J. Numer. Meth. Biomed. Eng.*, Vol.29 (2013) pp.977-987.
  - 87) Hochmuth, R. M., et al. : Capillary blood flow : I. Erythrocyte deformation in glass capillaries, *Microvasc. Res.*, Vol.2 (1970) pp.409-419.
  - 88) Goldsmith, H. L. : Deformation of human red cells in tube flow, *Biorheology*, Vol.7, No.4 (1971) pp.235.
  - 89) Bagge, U., et al. : Three-dimensional observations of red blood cell deformation in capillaries, *Blood Cells*, Vol.6 (1980) pp.231-237.
  - 90) Gaetgens, P., et al. : Motion, deformation and interaction of blood cells and plasma during flow through narrow capillary tubes, *Blood Cells*, Vol.6 (1980) pp.799-812.
  - 91) Tracey, M. C., et al. : A silicon micromachined device for use in blood cell deformability studies, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, Vol.42, No.8 (1995) pp.751-761.
  - 92) Sutton, N., et al. : A novel instrument for studying the flow behaviour of erythrocytes through microchannels simulating human blood capillaries, *Microvasc. Res.*, Vol.53 (1997) pp.272-281.
  - 93) Tsukada, K., et al. : Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with a transparent micro-channel capillary model and high-speed video camera system, *Microvasc. Res.*, Vol.61 (2001) pp.231-239.
  - 94) Shelby, J. P., et al. : A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.100, No.25 (2003) pp.14618-14622.
  - 95) 田地川勉他 : マイクロチャンネルアレイを用いた毛細血管中の赤血球の挙動と変形能に関する生体外実験, 可視化情報学会論文集, Vol.25, No.12 (2005) pp.84-91.
  - 96) Shevkoplyas, S. S., et al. : Direct measurement of the impact of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device, *Lab Chip*, Vol.6, No.7 (2006) pp.914-920.
  - 97) Tomaiuolo, G., et al. : Red blood cell deformation in microconfined flow, *Soft Matter* Vol.5, No.19 (2009) pp.3736-3740.
  - 98) Kase, A., et al. : Effects of inner solution viscosity and membrane stiffness on erythrocyte deformability on passing through a microchannel : prediction by two-dimensional simulation, *J. Biorheology*, Vol.25 (2011) pp.36-42.
  - 99) Tajikawa, T., et al. : Measurement and analysis of shape recovery process of each erythrocyte for estimation of its deformability by using micro-channel technique -Influence of softness of cell membrane and viscosity of hemoglobin solution inside cell-, *J. Biorheology*, Vol.27, No.1-2 (2012) pp.1-8.
  - 100) Yaginuma, T., et al. : Behavior of red blood cells in a hyperbolic microchannel : the extensional flow effect, *Biomicrofluidics*, Vol.7 (2013) pp.054110.
  - 101) Zheng, Y., et al. : Characterization of red blood cell deformability change during blood storage, *Lab Chip*, Vol.14, No.3 (2014) pp.577-583.
  - 102) Chary, S. R., Jain, R. K. : Direct measurement of interstitial convection and diffusion of albumin in normal and neoplastic tissues by fluorescence photobleaching, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.86, No.14 (1989) pp.5385-5389.
  - 103) Flamion, B., et al. : Flow rate measurements in isolated perfused kidney tubules by fluorescence photobleaching recovery, *Biophys. J.*, Vol.60, No.5 (1991) pp.1229-1242.
  - 104) Wieringa, P. A., et al. : A technique for the estimation of plasma flow in single capillaries using photobleached dyes, *Microvasc. Res.*, Vol.46, No.3 (1993) pp.263-282.
  - 105) Berk, D. A., et al. : Transport in lymphatic capillaries. II. Microscopic velocity measurement with fluorescence photobleaching, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol.270, No.1 (1996) pp.H330-H337.
  - 106) Santiago, J. G., et al. : A particle image velocimetry system for microfluidics, *Exp. Fluids*, Vol.25 (1998), pp.316-319.
  - 107) Smith, M. L., et al. : Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo, *Biophys. J.*, Vol.85 (2003) pp.637-45.
  - 108) Vennemann, P., et al. : In vivo micro particle image velocimetry measurements of blood-plasma in the embryonic avian heart, *J. Biomech.*, Vol.39 (2006) pp.1191-200.
  - 109) Poelma, C., et al. : In vivo blood flow and wall shear stress measurements in the vitelline network, *Exp. Fluids*, Vol.45 (2008) pp.703-13.
  - 110) Poelma, C., et al. : Measurements of the wall shear stress distribution in the outflow tract of an embryonic chicken heart, *J. R. Soc. Interface*, Vol.7 (2010) pp.91-103.
  - 111) Sugii, Y., et al. : Velocity measurement of both red blood cells and plasma of in vitro blood flow using a high-speed micro PIV technique, *Meas. Sci. Technol.*, Vol.16 (2005) pp.1126-1130.
  - 112) Ha, H., et al. : Hybrid PIV-PTV technique for measuring blood flow in rat mesenteric vessels, *Microvasc. Res.*, Vol.84, No.3 (2012) pp.242-248.
  - 113) Lima, R., et al. : Confocal micro-PIV measurements of

- three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel, *Meas. Sci. Technol.*, Vol.17 (2006) pp.797-808.
- 114) Lima, R., et al. : In vitro confocal micro-PIV measurements of blood flow in a square microchannel : the effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles, *J. Biomech.*, Vol.40 (2007) pp.2752-2757.
- 115) Lima, R., et al. : In vitro blood flow in a rectangular PDMS microchannel : experimental observations using a confocal micro-PIV system, *Biomed. Microdevices*, Vol.10 (2008) pp. 153-167.
- 116) Leble, V., et al. : Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation, *Biomicrofluidics*, Vol.5 (2011) pp.044120.
- 117) Pitts, K. L., Fenech, M. : An Analytic Study on the Effect of Alginate on the Velocity Profiles of Blood in Rectangular Microchannels Using Microparticle Image Velocimetry, *PloS one*, Vol.8, No.8 (2013) pp.e72909.
- 118) Oishi, M., et al. : Continuous and simultaneous measurement of the tank-treading motion of red blood cells and surrounding flow using translational confocal micro-particle image velocimetry (micro-PIV) with sub-micron resolution, *Meas. Sci. Technol.*, Vol.23 (2012) pp.035301.
- 119) Tanaka, Y., Kikukawa, Y., Sato, K., Sugii, Y., Kitamori, T. : Culture and leukocyte adhesion assay of human arterial endothelial cells in a glass microchip, *Anal. Sci.*, Vol.23, No.3 (2007) pp.261-266.
- 120) 杉井康彦 : セン断応力負荷下で内皮細胞を培養した疑似血管マイクロデバイスの開発と形態変化の計測, *日本機械学会論文集(B編)*, Vol.75, No.759 (2009) pp.2233-2238.
- 121) Sugii, Y. : Simultaneous Measurement of Wall Shear Stress Distribution and Three-Dimensional Shape of Living Endothelial Cells Cultured in Microchannel, *J. Biomech. Sci. Eng.*, Vol.5 (2010) pp.625-634.
- 122) Aota, A., Takahashi, S., Mawatari, K., Tanaka, Y., Sugii, Y., Kitamori, T. : Microchip-based Plasma Separation from Whole Blood via Axial Migration of Blood Cells, *Anal. Sci.*, Vol. 27, No.12 (2011) pp.1173-1178.