119 顕微鏡画像の画像解析による 血管回路内流量分布のリアルタイム計測

広島国際大学保健医療学部 二宮伸治[○], 焼廣益秀, 石井洋三, 鍵山光庸

Measurement of the velocity distribution of the capillary net by using real-time processing of microscopic images

Shinji Ninomiya, Masuhide Yakehiro, Yozo Ishii, Mitsuyasu Kagiya

ABSTRACT

The study of the detailed information of precapillary circulation is very important to examine the control method for a total artificial heart or lung. We developed a new system to analyze visualized capillary image on real-time operation with a microscopic CCD and machine vision system.

On the present system, in the case of narrow capillary, discrete images are extracted by using partial derivatives of a Gaussian smoothing kernel, and line structures are detected according to parameters of the polynomial. The diameter of the capillary was defined from the parameter of them. In the case of relatively bold capillary or arteriola, ROI was defined by using threshold process. The diameter was detected from the smallest surrounding rectangle of the thresholded region. Template matching technique with sub-pixel accuracy was used to determine the velocity profile. Parameters for template matching were defined from the detected diameter and center of line contour profile.

The present method was applied to the measurement of mesentery of a bull frog, and the validity of this system was discussed.

Keywords: microscopic imaging, real-time processing, precapillary circulation, machine vision

1. はじめに

人工心臓をはじめとする体外循環装置、補助循環装置は、近年の技術革新に支えられハードウェア上の問題を急速に解決させつつあるが、一方で、制御方法などのソフトウェア上の問題が多く積み残されている。

特に、循環制御の問題は、制御系の中に未知の部分が多い生体があるため、人工心臓の目標心拍出量の決定方法をはじめとした、未解決の課題が数多くあることが知られている。^{1) 2)}

末梢血管部の抵抗は、目標心拍出量の最適値と深く関連しているといわれているが、より詳細な理解のためには、生体が末梢部でどのように血管抵抗を制御しているのかについて直接計測することが望ましいと思われる。

本研究では、動物実験において末梢血管回路網の流量分布の変動を直接計測することで、人工的な循環による心拍出量の変動が、生体が行っている末梢血管抵抗の調整機構とどのように関連しているかを調べる方法として、末梢部の微小循環を顕微鏡の画像を実時間で解析するシステムを構築し、その手法の妥当性を評価することを目

的とする。

末梢血管抵抗は、よく知られているようにメタ細動脈から毛細血管への流量が前毛細血管括約筋により交換範囲が調節されることで能動的に変化するが、これらの現象を総合的に把握するには、赤血球が個別に識別できる程度の太さの細い血管と、それに比べてかなり太い細動脈、細静脈の流量を同時に計測しなければならない。

また、循環制御と関連づける場合には、微小循環動態の変化を直接制御系にフィードバックすることが有効であると考えられることから、実時間計測が要望される。

微小循環動態の可視化解析については、これまでも多くの試みがなされ、成果があげられている。^{3) 4)}

その多くは、実時間計測のための専用ハードウェアを導入するか、または媒体に収録された画像の再生により手動あるいは自動的に解析している。

一方、パーソナルコンピュータの性能の飛躍的進歩に伴い、パソコンベースの汎用マシンビジョンシステムでも、これまで専用ハードウェアを必要としていた実時間計測が可能となってきた。

本研究では、複雑な特徴をもつ血管画像に柔軟に対応するため、マシンビジョンシステムを導入し、血管画像の特徴に適合する解析アルゴリズムを構築した。

また、ウシガエル腸間膜付近の血管回路網の可視化解析に適用することで、本システムの妥当性を検討した。

2. 実験装置・方法

本研究で構築したシステムの概要を、Fig. 1 に示す。

供試体としては、予備的な実験ということでもあることから、学生実習に供されるために解剖されたウシガエルを、実習前に借り受けて撮影した。解剖に先立ち、腹腔内にウレタン麻酔液 1cc(ウレタン 0.35g を希釈)を注入し、麻酔の効果を確認した後、解剖を行った。

撮影のための顕微鏡としては、ライカ製実体顕微鏡 (LEICA MZ-APO: 対物レンズ PLAN APO 1.0X:55mm) を用いた。観測部の照明光源としては、ライカ製ファイバーライト落射照明装置 (LEICA intralux 5000-1、150W) を用いた。

この顕微鏡装置は、CCDカメラヘッド (浜松ホトニクス製 C5403、1/2inch CCD、明視野照明用) に接続される。映像信号は、CCDヘッドからカメラコントロールユニット (浜松ホトニクス製 C2400-60、ゲインコントロール、シェーディング補正機能付) を経て、マシンビジョンシステムに入力される。

マシンビジョンシステムとしては、汎用画像解析ソフトウェア (MVTec 社製 HALCON Ver.5.1) を AT 互換機 (自作機: Pentium II 500MHz) にインストールしたものを用いた。画像入力装置としては、PCI 接続のフレームグラバード (LinX 社製: GINGA GR-1) を用いた。これらの組み合わせにより、理論上は、最高 30 frame/sec のリアルタイム処理が可能となる。

腹直筋表面、壁側腹膜近傍の腸間膜、足ひれの3つの部位を、落射照明のもとで顕微鏡撮影した。足ひれについては、落射照明では明瞭に可視化できなかったが、筋表面、腸間膜については、赤血球の動きを明瞭に撮影できることを確認した。

3. 解析方法

得られた血管画像から、太い血管と、細い血管では、画像の特徴がかなり異なることがわかった。画像の特徴により、適切な処理技法は大きく異なる。本研究では、それぞれに適した方法を試行錯誤により探索し、適用した。

直径 $100\mu\text{m}$ 程度の、比較的太い血管に対する特徴抽出手順の概略を、Fig. 2 に示す。このサイズの血管画像は、血球が重なりあっているため血管と背景領域の境界が明瞭である。したがって、2値化による特徴抽出をベースとした手法が適している。

まず、予め設定された関心領域の中で、局所的な2値化処理を行い、血管部分を抽出する。一般に、関心領域と血管はある角度をもって交差するので、直径の計算に

Fig.1 : Experimental apparatus

Fig.2 : Methods of estimation of the diameter and location of vessels (The case of a bold vessel)

Fig.3 : Methods of estimation of the diameter and location of vessels (The case of a narrow vessel)

は、抽出された血管部分の輪郭に外接する最小の矩形を検索し、その矩形の幅を血管幅とした。こうすることにより、計測中に血管の位置や角度が大きく変化しても正

確に幅を抽出することが可能になった。

流速は、検索された矩形の重心を中心とした矩形の半幅の領域をテンプレートとして、前の時刻の画像からの移動距離をテンプレートマッチングにより求めた。

このテンプレートマッチングは、HALCON に実装されている、サブピクセル精度(最小分解能 0.03 pixel)のテンプレートマッチング機能をそのまま適用した。一般にサブピクセル精度の探索は多大な時間を消費するが、ピラミッド検索手法を適用することにより、劇的に高速化された。

直径 $50\mu\text{m}$ 以下の比較的細い血管に対する特徴抽出手順の概略を、Fig.3 に示す。

このサイズになると、血球の大きさに比べて血管幅が十分な大きさとならないため、Fig.3(a)に示すような、血球の形状が明瞭にわかるテクスチャ性の高い画像となる。

ここでは、やはり HALCON に実装されているロバストな骨格線抽出機能を用いる。この処理では、まず関心領域に対して、ガウシアンフィルタリング処理を行い、

Fig.4 : Original image of the capillary of mesentery

Fig.5 : The way to find the diameter and the location of template

得られた輝度分布を、Fig.3(b)に示すように局所的な双曲線関数で近似して、骨格線を抽出する。血管幅は、近似された双曲線関数のパラメータから推定する。

こうすることにより、ガウシアンフィルタリングにより境界が不明瞭になった画像から、客観的に骨格線と幅を検出することができる。

この方法の欠点としては、線幅が大きくなるとガウシアンフィルタリング処理に時間がかかることがあげられる。したがって、太い血管の場合には、前述の 2 値化処理の方が適している。

流速計測に用いるテンプレートの位置は、線図形の重心とし、テンプレートの領域は、推定された血管幅を有する矩形領域とした。

3. 結果

Fig.4 に、得られたウシガエル腸間膜の顕微鏡画像の一例を示す。比較的太い血管と細い血管が交差する部分を選択した。体動や拍動による動きはなかったが、固定が難しいため、実際には視野内で血管位置は変動する。簡便な落射照明を用いたが、比較的明瞭に血管画像を捉えることができた。

顕微鏡の拡大倍率は、32 倍とした。実際の拡大率は、同じ倍率で微小な格子板を撮影することにより決定した。

血管幅抽出処理時の画像の一例を Fig.5 に示す。濃灰色で示す領域が血管幅として抽出された領域、浅灰色で示す領域が、テンプレートマッチングのための領域として決定された部分である。図中(1)に示す太い血管では、ほとんど誤解析は発生しなかったが、図中(2)に示す細い血管の場合には、頻繁に誤解析が発生した。

これは、血球の有無によって画像の特徴が大きく変化するからだと推定される。Fig.6 に誤解析が発生した時の画像の一例を示す。左下に拡大像を示すが、抽出された血管中心位置を示す白い領域が、実際の血管位置から大きくシフトしていることがわかる。

本研究では、リアルタイム計測を目標としているが、アルゴリズムを評価するためには、メモリ上に画像を再配置し、繰り返し適用する方が便利である。本解析では、

Fig.6 : The typical case of error estimation

Fig.7: Variation of diameter of microvessels

メモリ上に配置された画像の処理時間を計測することで、リアルタイム計測への適用性を検討した。150 枚の処理に要した時間は、ほぼ 10~15 秒前後であることから、本システムがリアルタイム計測に適用できることが確認された。

計測された血管幅および血流速度の 10 秒間の変化をそれぞれ Fig.7 および Fig.8 に示す。Template 1 は太い血管(Fig.5 における[1]の部位)、Template 2 は、細い血管(Fig.5 における[2]の部位)を示している。実際の流れを観察すると、血管幅の変化はほとんどないことから、計測結果は観察とよく対応している。血流速度の変化については、Template 1 は良好な結果が得られたが、Template 2 では、誤解析によるとと思われる変動成分が非常に大きくなった。

4. おわりに

時系列で位置が移動する血管回路網の複数の部位における血流速度と血管幅をリアルタイムで同時に計測するシステムを開発した。

血管画像計測に、汎用マシンビジョンシステムを適用した結果、専用ハードウェアを用いる場合よりも、柔軟に対応できることを確認した。また、複雑な処理にもかかわらず、リアルタイム処理に十分な速度を得ることができた。

比較的太い血管の場合には、血管位置が変動しているにも関わらず、線幅、流速共に安定して計測できたが、細い血管の場合には、赤血球の有無によってテンプレートの特徴量が著しく異なるため、必ずしも安定して計測できないことが明らかになった。

もっとも、線成分として血管位置を抽出していることから、その特徴量を評価することにより、客観的に過誤ベクトルを棄却することが可能である。今後は特徴量に着目した過誤ベクトルの客観的棄却方法を検討したい。

マシンビジョンシステムとしてはかなり複雑な処理を 2 点に対して同時に実施したにもかかわらず、テンプレートサイズにも依存するが、平均して 10~15 frame/sec の処理速度を得ることができ、本システムの有用性が検

Fig.8 : Variation of local blood velocity

証された。

可視化方法としては、最も簡便な、高輝度ファイバースコープ照明装置による落射照明を適用したが、動脈側は血管の厚みがあるため、良好な画像が得られなかった。強力な透過光源を用いるなど、可視化方法に工夫が必要である。

今後は、誤解析を減少させるよう解析アルゴリズムを改良し、ラットやウサギなどを用いた動物実験への適用を実施したい。

参考文献

- 1) 吉澤 誠, 田中 明, 阿部 健一, 竹田 宏, 山家 智之, 仁田 新一, 阿部 裕輔, 井街 宏: 人工心臓の制御 — 循環制御系の制御工学的設計 —, BME, Vol.10, No.10, pp.21-28(1996)
- 2) 山家 智之, 菌部 太郎, 仁田 新一, 吉澤 誠: 人工心臓の生理学, BME, Vol.10, No.10, pp.60-69(1996)
- 3) 千葉 容子: ニードル型 CCD 生体顕微鏡によるヒト舌下部微小血管の可視化 — ニトログリセリン効果の評価への応用 —, 医用電子と生体工学, Vol.10, No.12, pp.45-52(1996)
- 4) 梶谷文彦: 心循環系における新技術, BME, Vol.11, No.2, pp.8-15(1997)
- 5) Carsten Steger, Kerjin.J.Bowyer, P. Jonathan Phillips: Analytical and Empirical Performance Evaluation of Subpixel Line and Edge Detection, IEEE Computer Society Press (1998)
- 6) Carsten Steger : An Unbiased Detector of Curvilinear Structures, Technical Report FGBV-96-3 (1996)