高精度画像計測法を用いた微小血管内の速度分布計測*

杉井 康彦^{*1}, 中野 厚史^{*2}
西尾 茂^{*3}, 南山 求^{*4}Blood Flow Velocity Measurement in Microcirculation Field
by Means of Highly Accurate Iterative PIVYasuhiko SUGII^{*5}, Atsushi NAKANO,
Shigeru NISHIO and Motomu MINAMIYAMA^{*5} Nuclear Engineering Research Lab., The University of Tokyo,
2-22 Shirakata-shirane, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki, 319-1188 Japan

Particle image velocimetry (PIV) has been the quantitative measurement method of instantaneous velocity fields in experimental fluid mechanics. The authors have proposed the adaptive PIV technique using the gradient-based sub-pixel analysis, in which a pixel unit displacement is obtained using the iterative cross-correlation method while a sub-pixel displacement is calculated by the use of the so-called spatio-temporal derivative method. The present method can achieve high accuracy of measurement and high spatial resolution compatibly. In this paper, the proposed method is applied to visualized images of the arteriole in the rat mesentery using the intravital-microscope and the high-speed digital video system. Time-series of the velocity profiles of the arteriole is obtained. Averaged velocity profiles show the blood flow volume is constant at five vessel cross-sections. The arteriole velocity profiles are blunt at the center region of the vessel cross-section and sharp profiles at near wall region, this suggests the shear stress on the vessel wall is higher than expected one. The results show that the proposed method is very useful to measure the blood flow velocity profiles with highly accuracy of measurement, and high temporal and spatial resolution.

Key Words: PIV, High-Resolution Method, Blood Flow, Microcirculation

1. 緒言

微小循環は、生体の内部環境を恒常的に維持するために血液と細胞との間で酸素や養分等の直接的な物質交換を行う領域のことであり、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いる。物質交換に関わる要因としては血管網の分布、血流量、圧力、血管内皮細胞の形態などがあげられる。微小血管の詳細な

血流速度分布の計測は、組織における物質交換や、血球間での応力・血管内皮細胞にかかる剪断応力などの影響を評価する上で重要である。

これまで微小血管での血流速度の計測には主に Dual Slit 法^{①②③}が用いられてきた。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が求められる。顕微鏡にセンサをつける方法では、時間的な高分解能を得る事は可能であるが、センサ位置の空間的自由度が限定される。テレビカメラを用いる場合には複数点での計測も容易ではあるが、時間分解能はTVレート(1/60sec)に制限される。顕微鏡内にレーザ光を入れ、赤血球によるドップラーシフトを利用したレーザドップラ流速計(LDV法)^{④⑤}による速度計測も行われている。これらの手法を応用した

* 原稿受付 2001年2月15日。

^{*1} 正員、東京大学大学院工学系研究科(〒319-1188 茨城県那珂郡東海村白方白根2-22)。^{*2} 正員、国立循環器病センター(〒565-8565 吹田市藤白台5-7-1)。^{*3} 正員、神戸商船大学(〒658-0022 神戸市東灘区深江南町5-1-1)。^{*4} 国立循環器病センター。

E-mail: sugii@tokai.tu.tokyo.ac.jp

血管内での多点計測も報告されているが、詳細な流速分布を得ることは困難である。

近年、流れをトレーサ粒子などで可視化した画像から流場の速度分布を求める、いわゆる PIV (Particle Image Velocimetry) ^⑥ は、同時に広範囲の速度分布を計測できるので、広い研究分野で用いられ、多くの成果が得られている。血流計測への応用として、代表的な手法である画像の相関係数から移動量を求める相関法を生体顕微鏡下で撮影された画像に適用し、速度分布が求められている ^{⑦⑧}。しかしながら、精度を保つためには大きな検査領域が必要であるため、得られる速度場の空間解像度が低く、流場の解析を行えるデータが十分に得られないなどの問題がある。

著者らは、階層的に相関法を繰返し用いて画素単位の移動量を求めるとともに、画素単位以下の移動量を求めるサブピクセル解析に時空間微分法を用いる画像計測法を提案し、振動翼周りの流れの可視化画像に適用している ^{⑨⑩}。提案する手法は、従来の画像計測法より計測精度が高く、小さな検査領域でも高精度を保てるため、高い空間解像度の速度分布を求める事ができる。本論文では、生体顕微鏡で観察された微小血管内の速度分布計測に提案手法を適用した。高速度カメラを用いて時間分解能をあげると共に、対物レンズなどの光学系を最適化し、高い計測精度でかつ高い空間分解能の速度分布を計測した結果について述べる。

2. 実験・解析方法

2.1 実験装置 計測対象である細動脈の管径は $10\text{--}40\mu\text{m}$ であり、赤血球の大きさは $5\mu\text{m}$ 、予備実験での Dual Slit 法で得られた赤血球速度が $5\text{--}10\text{mm/sec}$ であり、画像計測法のダイナミックレンジや特性を考慮すると、画像上の移動量が 10-30 画素/frame 程度である必要があり、レンズの光学倍率やカメラの撮影速度が制限される。つまり、対象が微小領域であるため光学倍率を上げると、相対的に画像上の移動量が増加し、計測が困難となる。逆に、倍率を下げると光学的な分解能が低下し、計測精度が低下する。そこで、本実験では、撮像速度は 1000 枚/秒、画像のサイズならびに輝度階調数は 512×512 画素、256 階調(8bit)である高速度カメラを用いた。撮像素子サイズは $1/2\text{inch}$ 、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得ることができる。また、対物レンズには開口数(Numerical Aperture:NA)が 0.55、40 倍の水浸レンズと、0.45 倍の CCD 用リレーレンズを用いた。得られる画像上での管径は 32-160 画素、赤血球の大きさは 16 画素、画像間の赤血

球の移動量は 16-32 画素となる。これらにより、高い分解能と計測精度の両立を図った。なお、照明には直流点灯をした 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。

また、血管断面は立体的であるため顕微鏡によって観察される像には、奥行き方向に赤血球像が重畳されて、コントラストが悪くなり誤ベクトルが発生しやすくなる。これには、レンズなどの光学系が大きく関与する。レンズの性能を表す解像度 R は、ごくわずかに離れた点あるいは線を分解できる能力を意味し、理論的に

$$R = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (1)$$

で表され、顕微鏡で試料を見たときに鮮明な像が得られる光軸方向の範囲を意味する焦点深度 δz は、

$$\delta z = \frac{\lambda}{NA^2} + \frac{e}{M \cdot NA} \quad (2)$$

により与えられる ⁽¹¹⁾。ここで、 M は撮影倍率、 λ は光の波長、 NA は開口数、 e はぼけ許容値である。

Table 1 Optimal conditions

Recorded region	$160\times 160\mu\text{m}$
Resolution	$0.31\mu\text{m/pixel}$
Resolving Power R	$0.61\mu\text{m}$
Depth of Focus δz	$0.91\mu\text{m}$

表 1 に本システムの光学パラメータを示す。なお、光の波長 λ として 550nm を用いた。本計測では、血管中央の厚さ $1\mu\text{m}$ 程度の空間内の赤血球の 3 次元の運動を 2 次元断面に投影したものが得られることになるが、NA が大きな対物レンズを用いて、焦点深度を約 $1\mu\text{m}$ と血管径に対して十分小さくしている。得られる速度は、焦点位置からのずれ量によってボケが発生し、輝度値が減少するため、粒子の輝度で重み付けした奥行き方向の速度の平均値となることが示されており ⁽¹²⁾、粒子の重なりや奥行き方向の速度勾配の影響を最小限に抑えることができる。さらに、水浸レンズを用いて屈折の影響を低減した。画素単位あたりの長さを意味する分解能がレンズの解像度 R より大きな値となっており、つまり、画素の大きさがレンズで分解できる最小長さより小さくなっていることがわかる。そのため厳密に焦点が合わず、若干のボケが生じる。しかし

ながらボケた画像でも画像の移動の情報は光学的に伝達されるので、赤血球速度への影響は少ないと考えられる。

2.2 動物実験 微小循環における血流速度の計測対象として、ラットの腸間膜を用いた。腸間膜は透過光照明によっても観察でき、比較的鮮明な画像を得ることができる。8週の雄のラット(310g)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。実験時のラットの血圧をモニターするために頸動脈にカニュレーションをし、血圧計を挿入した。図1に実験装置の概略、図2にラットの腸間膜の観察の様子を示す。

Fig.1 Schematic view of experimental set up

Fig.2 Observation of the rat mesentery under intravital microscope

2.3 高精度画像計測法 代表的な画像計測法である相関法では、連続する2枚の画像の相関係数を求め、その最大値を与える位置から移動量を求める。空間解像度の向上を目的として小さな検査領域を用い

た場合、情報量の不足などが原因で誤ベクトルが多数発生するため、通常では 32×32 画素程度の比較的大きなサイズの検査領域が用いられる。その結果、計測対象によっては目的とする速度分布に必要な空間解像度が得られない場合がある。そこで、誤ベクトルの発生を低く抑えて、同時に空間解像度の向上を目指した階層的相関法⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾が提案されている。これは、比較的大きなサイズの検査領域を用いて速度場の概略を低い誤ベクトル発生率で求め、検査領域を徐々に小さくしながら相関法を繰返して解像度の改善を図るという方法で、サブピクセル解析と呼ばれる画素単位以下の移動量を求める手法と組み合わせて使われている。一般に、サブピクセル解析として相関係数をガウス関数で近似するガウシアンフィットが用いられる⁽¹⁶⁾。しかしながら、この手法では、速度ベクトルの精度の上限がたかだか0.1画素程度であり、その精度のためには大きな検査領域が必要である⁽¹⁷⁾。そのため、空間解像度とサブピクセル精度の両立が困難であるという問題が残っていた。

著者らが提案している高精度画像計測法⁽¹⁸⁾では、同じ階層法でも探索領域などの解析パラメタを再帰的に最適化する方法を取り、画素単位での画像移動量推定を低誤対応率で行うことができる。さらに、サブピクセル解析には、輝度のラグランジェ微分を用いた拘束式で表される時空間微分法を応用した手法を用いる。この方法は、相関係数を関数近似するのではなく、輝度の時間・空間微分値を用いた画像の支配方程式を直接求めるため、近似に用いる関数自体の問題が無い上に残差が少なく、狭い領域への適用が原理的に可能なことと輝度の微分値に基づいていることから、空間解像度と計測精度を両立させることができる。これまでに、人工画像を用いて定量的な誤差評価を行い、小さな検査領域でもRMS誤差が0.01画素程度であることを確認している。これらにより、従来の手法では困難だった空間解像度とサブピクセル精度とを両立することができ、その結果、従来の手法に比べダイナミックレンジを大幅に向上できる。

3. 実験結果

3.1 細動脈の高速度撮影 ラット腸間膜の細動脈の高速度カメラによって撮影された1例を図3に示す。図中の矢印は血流の方向を示す。右下から左上に向かって流れる内径約 $30 \mu\text{m}$ の細動脈と、曲がり部より分岐する内径約 $10 \mu\text{m}$ の細動脈が見られる。血管内には赤血球が見られるが、本実験の撮影条件下では、赤血球は静止せず流れたように記録された。管

径 $30\mu\text{m}$ の血管が約 100 画素、分岐枝は約 30 画素である。特に、血流速度の速い収縮期における画像では、赤血球が流れにより流れ方向にひきのばされ、図の中心付近で 6×25 画素程度(約 $2\times 8\mu\text{m}$)の楕円状として観察された。また、顕微鏡の振動や動物の呼吸、血管運動などを原因とする画像の全体の動きが計測精度を低下させる原因であるが、2秒間での膜の動きは $1\mu\text{m}$ 以下に抑えられており、影響が少ないと思われる。

Fig.3 Visualized image on blood flow in arteriole

3. 2 高精度画像計測法による解析 階層的な処理を行わない通常の相関法と高精度画像計測法で求めたある瞬間の速度分布を図4および図5に示す。相関法では、小さな検査領域を用いると誤ベクトルが増大するが、逆に大きくすると解像度が下がるため、 16×16 画素の比較的小さな検査領域を用いた。計測点数が 40×40 、内径 $30\mu\text{m}$ の細動脈では断面方向に7点程度の速度ベクトルしか得られておらず、特に壁面近傍の挙動を調べるためには十分な解像度ではない。さらに、内径 $30\mu\text{m}$ の細動脈の上流部付近や分岐部付近などに、流れに対し不自然な方向や大きさを持ったベクトルが見られ、解析によって発生した誤ベクトルと考えられる。

一方、高精度画像計測法では検査領域の大きさを 7×7 画素と相関法の半分以下とし、計測点の間隔は50%の重複率を許して5画素(約 $1.5\mu\text{m}$)とした。計測点数は 88×88 となり、内径 $30\mu\text{m}$ の細動脈では断面方向に20点程度の速度ベクトルが得られた。相関法より小さな検査領域にもかかわらず、流れに対し不自然なベクトルが見られず、誤ベクトルは発生していない。本手法の結果では、管中心付近の画像間の移

動量が25画素、流速が約 7.8mm/sec に相当し、従来報告されているラットの細動脈での血流速度と一致している。分岐している内径 $10\mu\text{m}$ の細動脈の断面中心流速は約 0.9mm/sec で、画像間の移動量は3画素と非常に小さい。解析に要する時間(CPU: Pentium II 400MHz)は42sec/枚であり、2047枚で25時間弱である。これは、計測点数が多くなっているにもかかわらず小さな検査領域を用いているため演算量が減少しているためで、従来の相関法の場合と同程度となっている。

Fig.4 Instantaneous velocity distribution on blood flow in arteriole obtained by the cross correlation method

Fig.5 Instantaneous velocity distribution on blood flow in arteriole obtained by the present method

4. 解析結果及び考察

4.1 平均速度分布 図6に約2秒間(2047

枚): 12-13心拍分の時間平均速度分布を示す. 内径 $30\mu\text{m}$ の細動脈の流速分布では, 管路に沿った速度ベクトルが得られており目立った誤ベクトルは見られない. 一方, 分岐した細動脈の流速は非常に小さく, 逆流も観察された. また解析上も, 焦点面の相違や血管が大きく曲がっていることなどの影響によって, 画像の相関が低く, 誤ベクトルも観察された. そのため時間平均を示した図6では, 内径 $10\mu\text{m}$ の血管側の速度が非常に小さな値になっているため, 図ではベクトルが見られない. そこで, 本論文では内径 $30\mu\text{m}$ の細動脈の速度分布を検討する.

Fig.6 Averaged velocity distribution on blood flow in arteriole

4.2 時系列解析

図6の平均ベクトル図中に示した断面①～⑤の中央の時系列の速度データに対し, 20msecの幅を持つ窓関数を用いて平滑化を行ったものを示す. なお, ①(356,40)などの値は, 各断面に付与した番号と中央の画像上の座標値である. 微小血管においても, 大動脈などと同様に心拍に対応した周期の拍動性が流速変化に見られることが知られており, 本手法の結果でも血流の拍動性が明確にとらえられている. さらに, 細動脈の特徴的な流速変化も観察され, すなわち流速が急速に立ち上がり最大値の後急激に減少し, その後緩やかに減少している. しかしながら, 断面②～⑤では平均流速, 分散ともにほぼ同じ値となっている. しかしながら, 最上流である断面①の平均流速が最大であり, 脈動の変動幅は小さく, 血流の拍動性が弱く計測されている. この原因として, 物理的に拍動性が変化しているとは考えにくく, 血管の3次

元的な運動による焦点のずれなどによって生じた誤ベクトルのためと思われる. よって, これ以降, 断面②～⑤についてのみ検討を行う.

図8に断面②～⑤での中央の点における血流速度の時間変化のスペクトル解析を行った結果を示す. 断面②～⑤の断面で 6.8Hz にピークが現れており, 血圧計により観察していたラットの心拍数とほぼ一致している. このことから, 従来の研究で言われている細動脈でも速度変動が主として心拍数に対応した成分が支配的であるということが確認できる.

Fig.7 Moving averaged time series of blood velocity

Fig.8 Power spectrum

4.3 断面速度分布

図9に図6の下流から上流に向かって②～⑤の4断面における2秒間の平均速度分布を示す. 横軸は流れに垂直な断面であり, 図中の破線は断面③～⑤での流速が 0.0mm/sec を示す. 断面速度分布を積分して比較すると, ほぼ同じ値を示し, 血流量が保存されていることが確認できる. また, 管

路が左に曲がっているため、遠心力の影響による断面分布が全体的に右へ偏っている。一般的なニュートン流体の流速分布と異なり、断面中央付近がややなまった傾向を示す非ニュートン流体の特徴が表れている。血管の半径方向 $8\text{--}12\mu\text{m}$ の領域ではせん断応力は大きくなっているが、壁面のごく近傍で分布が再度緩やかになるのは、赤血球がほとんど通過しないプラズマ層の影響、及び血管運動や腸間膜の移動の影響などが中心部より大きく現れるためと考えられる。

Fig.9 Cross sectional velocity profile

5. 結言

ラット腸間膜の微小血管網を生体顕微鏡と高速度カメラを用いて撮影を行い、血管内の速度分布計測を行った。高精度で高い空間解像度の速度分布を求めるために、光学系を検討するとともに、高精度画像計測法を適用した。本手法が持つ高解像度ならびに高精度な解析能力から、管径約 $30\mu\text{m}$ の微細な血管内の速度分布を十分にとらえることが可能となり、従来の結果より詳細な断面速度分布ならびにその時間変動を検討することができた。

平均速度分布より軸方向での血流量が保存されていること、曲率の影響による速度分布の偏りを捉えることができた。また、血流変動ならびに断面速度分布の時間的な変化も計測でき、心拍による大動脈などと同様に心拍に対応した周期の拍動性が計測できた。さらに、管中央付近の速度勾配がなまった傾向を示しており非ニュートン流体の特徴も捉えられている。

本稿を終えるにあたり、数々の有益なご助言をいただいた東京大学工学系研究科の岡本孝司助教授に感謝の意を表す。また、実験に使用した高速度デジタル

ビデオカメラは大沢商会からの貸与をいただいたことを記し、関係各位に感謝するものである。

文 献

- (1) 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, 21(1988), 9-22
- (2) Wayland, H., et al, Erythrocyte velocity measurement in microvessels by two-slit photometric method, *J. Appl. Physiol.*, 22(1967), 333-337
- (3) Nakano, A., et al, The regulation mechanism between the red blood cell velocity and the skin blood flow during the vasomotion in the rabbit ear chamber, *6th World Congress for Microcirculation*(1996), 833-837.
- (4) Cochrane, T., et al, Laser Doppler Measurement of Blood Velocity in Microvessels, *Med. & Biol. Eng. & Comput.*, 19-15(1981), 589-596.
- (5) Seki, J., Pulse wave propagation in microvessels studied by a dual laser Doppler anemometer microscope, *Microcirc. Ann.*, 15(1999), 37-38
- (6) Raffel, M., et al, Particle image velocimetry, *Springer*(1998).
- (7) 阿川雄資他, 相関法を用いた微小循環血流の速度分布計測, 信学論(D-II), 76-D-II-2(1993), 397-405.
- (8) 二宮伸治他, 顕微鏡画像の画像計測による血管回路内流量分布のリアルタイム計測, 可視化情報学会誌, 19, Suppl. 1(1999), 153-156.
- (9) 西尾茂他, 多関節翼まわりの流れの可視化(第3報) —運動モードの検討—, 可視化情報学会誌, 19, Suppl. 2(1999), 133-136.
- (10) Sugii, Y., et al, A highly accurate iterative PIV technique using gradient method, *Meas. Sci. Technol.*, 11(2000), 1666-1673.
- (11) Born, M., et al, E., Principles of optics, Oxford, *Pergamon Press*(1997).
- (12) Olsen, M. G. et al, Out-of-focus effects on particle image visibility and correlation in microscopic particle image velocimetry, *Exp. Fluids Suppl.*, (2000), 166-174.
- (13) Westerweel, J. et al, The effect of a discrete window offset on the accuracy of cross-correlation analysis of digital PIV recordings, *Exp. Fluids*, 23(1997), 20-28.
- (14) Scarano, F. et al, Interactive multigrid approach in PIV image processing with discrete window offset, *Exp. Fluids*, 26(1999), 513-523
- (15) Hart, D. P., Super-resolution PIV by recursive local correlation, *J. Vis.*, 3-2(2000), 187-194.
- (16) Willert, C. E. et al, Digital particle velocimetry, *Exp. Fluids*, 10(1991), 181-193.
- (17) Westerweel, J., Theoretical analysis of the measurement precision and reliability in PIV, *Proc. 3rd Int. Workshop on PIV'99*(1999), 9-14.