レーザーノート 2

レーザードップラー顕微鏡とその応用
—毛細血管内血流測定への応用—

三 品 博 達*

Laser Doppler Microscope and its Applications
—Measurement of Blood Flow in the Capillary—

Hiromichi MISHINA*

1. はじめに

レーザードップラー速度計のもつ最大の特徴は、機械的な探測子を被測定流体中に挿入する必要のないことである。このため被測定流体を物理的に乱すことがなく、非常に小さな領域での流速測定が可能となる。この特色がレーザードップラー速度計の誕生以来注目され、主に流体力学の分野の人々の興味をひき、技術的改良が加えられてきた。この傾向は現在でも続いており、レーザードップラー速度計に関する報文の大部分はこの分野に関連した所から出ている。報告文献の主要なものは「光学」の主要文献題目集¹⁾に整理したので合わせて参考にして頂ければ幸である。

ここでは流体力学の分野を少しはなれて、近年総合科学の一つとして大きな発展をしつつある生命現象の解析の一助とするため私達の研究室で開発に取り組んできたレーザードップラー顕微鏡の紹介を含め実際の面を述べてみたい。

2. 生体内流動測定のニーズについて

生体系統動現象は外部から生体内部へ生命維持のための物質（栄養物質、酸素等）の取り込みと、これらの消費廃棄物の搬出のため重要で

ある。この物質代謝を円滑に行う媒体となるものが血液であり、これらの物質交換、ガス交換は主として末端毛細血管部で行われる。この末端部における血管の太さは、ガス交換にあずかる赤血球の大きさ程度となっており、多くの動物でほぼ 10μ 内外の太さである。この部分での物質交換、ガス交換にあずかる機構の解明は分子生物学的な見地から現在大きな進展をみせている。一方これを生体系としてながめたとき、個々の分子レベルでの交換を円滑に行うための種々の制御機構が働いておりこのような制御機構を明らかにしてゆくことはまた分子レベルでの解明への手がかりを与えることにもなる。末端血流の測定はこの制御機構および物質、ガス等の交換機構の解明に多くの情報を提供する。すなわち末端血管部における種々のパラメータ（例えば種々のガス分圧、血液構成要素の変化等）の一つとして流速は重要なパラメータである。私共が末端血流測定に大きな興味をよせる理由は上述のようなものである。

3. レーザードップラー顕微鏡の開発に伴う問題点

前述のように末端部での血流を測定するにあたっては、 10μ 程度の高い空間分解能が要求さ

*北海道大学応用電気研究所（060 札幌市北区北12条西6丁目）

*Research Institute of Applied Electricity, Hokkaido University (Sapporo, Hokkaido 060)

れる。高い空間分解能をもつレーザードップラー速度計を構成するにあたっては通常のドップラー速度計であまり考慮する必要のない点に注意を払う必要が生じる。

まず第1にドップラー周波数偏移の性質上周波数偏移量が観測方向によって異なることが挙げられる。光学的に高い分解能を得ようとするとき必然的に集光開口、すなわち受光角、を大きくする必要にせまられる。従って観測系の集光開口の大きさ、すなわち空間分解能と検出されるドップラー周波数の拡がり、すなわち速度決定の確度が相反関係となり空間分解能をあげる上で大きな制約となる。この点はドップラービートを検出するための系として差動型の光学系を利用することで克服できる²⁾

第2に高い空間分解能の測定では、微小な領域を散乱粒子が通過する間しかビート信号が得られず、このためビート信号は切れ切れのburst状となる。このため領域の大きさと速度決定の不確定性の関係が生じる。この不確定巾の大きさを通常ambiguity noiseと呼び、これに起因する不確定巾は測定領域の大きさに逆比例して大きくなり、測定領域の大きさが 10μ 程度のときは中心周波数の10%近くに達する³⁾この効果は周期測定系を用いることにより若干の改善を加えることができる場合がある⁴⁾

第3に微小域の測定においては散乱粒子の大きさが無視できなくなり、大きさのある散乱粒子による散乱過程を考える必要がでてくる。散乱粒子に拡りのある場合は得られるビート周波数に若干の誤差が伴うことが明らかになっている⁵⁾

第4に光学系を構成する際に要求される精度の問題が挙げられる。入射ビームの測定領域への調整誤差は、出力の信号対雑音比に大きな影響を及ぼす。この点の詳細な解析に従えば測定領域の大きさの $\frac{1}{10}$ 以下であることが望ましく³⁾測定領域の大きさ 10μ とすると要求されるビームの位置精度は 1μ 以下となる。

第5にビート信号処理上の問題として、ビート信号に附随して表われる直流成分(通常ペデ

スタル信号と呼ばれる)を除去するためのフィルターの設計上の問題が挙げられる。測定領域 50μ 以上の大きさの通常のドップラービートでは信号成分とペデスタル成分は帯域的にかなりはなれており、ペデスタルの除去に然程の困難を伴うことがないが、微小域ではこの点が大きな問題となる⁶⁾

第6として生体系等にドップラー系を用いるときは表皮、血管等による入射光の位相のみたれの問題があり、この点に関する検討が重要となる。

4. レーザードップラー顕微鏡の光学系

前章の1および4の問題点を考慮した上で設計、製作および調整、さらに生体計測への適用を容易とするため、試作機⁷⁾で生じた問題点をもとにFig. 1に示したような系を新たに製作し

Fig. 1 Photograph of the laser Doppler microscope.

た。原理的には試作器の系と同一であるが、この系ではまずビームスプリッター部(Fig. 2)を入射光の光軸を中心として回転可能なものとし、血流方向との調整を容易とした。さらに広い用途に対応出来るようにするため、検出部は測定領域を中心として回転できる台に載せられ、任意角度の反射型から透過型まですべて任意に選べるようになっている。

光学系のうち主要な部分であるビームスプリッターには Koester プリズムを用いており、レーザーから測定領域までの光路差が生じないように考慮されている。このような光路長の調整

Fig. 2 (a) Schematic diagram and (b) photograph of the beam splitter.

はビート信号のS/N比の上昇をはかるためと、入射ビームを縮小する際、2つの入射ビームのビーム径と波面の曲率に差が生じないようにするために、レーザードップラー顕微鏡では特に重要である。

受光顕微鏡系は通常の顕微鏡系に顕微鏡写真

撮影アダプターを改造したものを利用し、フィルム面に相当する部分に移動可能なピンホールアダプターを取りつけ、任意の大きさのピンホールで測定域を制限できるようにした。ピンホール径は探測領域以外の部分からの光をさえぎるような大きさのものを顕微鏡倍率に応じて用いている。撮影装置のモニター用のビューにより測定領域の像とピンホールの位置合わせは容易に行なえる。また顕微鏡対物レンズは長作動距離レンズを使用し、資料の自由度を大きくしてある。

Fig. 3 にビューア内の実視写真が示してある。(a)はビューア内の全景を示し、2つのビームの交叉している様子を示しており、この交叉部分が探測領域となる。(b)は探測領域部分からの散乱光のみを倍率を上げて撮影したものであるが、粒子が明暗の輝点となりながら探測域を横切ってゆく様子をはっきり示している。このような明暗の点滅をくり返ししながら探測域を通過するのに要する時間は探測域を 10μ 、流速を 1 mm/sec としても 100 秒程度となり、外部から顕微鏡系に加わる振動の影響も 100 Hz 以下のものは探測域を大巾にずらしてしまうような効果を生じるものでない限り実際の測定にあまり重要な影

Fig. 3 (a) Wide view and (b) narrow view at the probing area through the viewer of laser Doppler microscope.

響をすることはない。 1μ 程度の高精度な系を構成している割に測定が容易である理由の一端がこの安定度を保証する時間が短時間で良いことにあり、測定に有利さを増している。

5. ビート信号の処理系

上記のような光学系から得られたドップラービート信号を適当なバンドパス・フィルター(BPF)により処理すると、散乱粒子密度の状態により、Fig. 4のようなburstした信号が得られる。この信号の周波数を測定することによ

(a)

(b)

Fig. 4 Typical output signal after passing through the band pass filter; (a) single and (b) many scattering particle case.

って流速を知ることができる。このとき使用するBPFの低周波側カットオフ周波数はレーザードップラー顕微鏡の場合ドップラービートの中心周波数から、この周波数の $\frac{1}{2}$ 程度までの範囲に設定することが望ましく、⁸⁾高周波側カットオフはショットノイズを除去するためビート周波数の2倍程度が適当である。従ってBPFは2～3オクターブの通過帯をもち、可変のものを使用する必要がある。さらに通過帯域の中心周波数はビート周波数であり、未知量であることを考えると、自動追従形のフィルターであることが望ましい。自動追従フィルターの製作にあたっては信号のburst outに十分の注意をはらう必要があり、特にドップラー顕微鏡よりのビート信号の信号持続時間が短いため信号周波数を出来るだけ短時間で測定し、この測定結果ですみやかに設定周波数を移動でき、ビート信号の現われない時には以前の設定値を保持している必要がある。この目的のために設計されたフィルター系のシステムの概略をFig. 5に示す。⁹⁾

光電管出力は、入力バッファアンプを通過して3つのフィルターに加えられる。それぞれのフィルターからの出力は適当な電圧まで増巾されて、アナログスイッチに加えられる。アナログスイッチにより適当なフィルターを選択してビート信号成分を分離したのち、さらに増幅、振巾制限され、相続く立上りの時間々隔を時間波高変換した後逆数パルス発生回路を用いて周波数に比例した波高値のパルスに変換しこれを出力とする。フィルターのレンジ選択のためパルス波高に変換された出力はA-D変換され、アナログスイッチの選択codeに適合するようcode変換される。この選択信号はラッチに記憶され、

Fig. 5 Schematic diagram of tracking filter by means of range switching⁹⁾

信号の現われないburst out 期間中、選択された測定レンジを保持する。実際にはフィルターの切換時の急激な位相変動に伴うビート周期の読み取り誤差や、ビート信号のburst 相互間の時間といった誤動作が含まれる可能性があるため、読取った周期を直接レンジ切換に使用せず、直前に読み取った周期と比較し誤動作信号を除去している。

さらに実際の測定に際しては生体表面、血管壁等による入射光の微小な位相変動は避けがたく、測定された個々の値はこの位相変動に伴ったゆらぎを生じるため正確な流速を算定することが困難となってくる。この困難を克服するため、測定量を一定時間累積することにより、統計的に位相変動誤差を取り除いている。すなわち、ビート周期ごとに測定した値を直接使用することを避け、測定値の分布関数を測定しその分布関数から最確値を求める。このためビートの1周期ごとに測定された周期をデジタル表示しこれをメモリーのアドレスとして1つ測定が完了するごとにアドレス指定されたメモリーの内容に+1の演算を行うことで流速の分布関数を得ている。この目的のために使用されるメモリーは測定精度 0.4%としても256アドレス相当となり、個々のアドレスの積算量を4000程度とすると12bit/wordのメモリー256必要となり3072bit程度のメモリーを用意すればよい。現在は比較的安価なICメモリーを入手することが

できこの程度の処理は容易である。

末端毛細血管部では血流は時間的に変化しない定常流となっているが、細動脈部の測定においては心臓鼓動に応じて脈動的となり、この様な部所での測定に対しては瞬時値が変化する。このため上記の積算を行うと測定された流速分布関数が極度に広がるとともに正確な値を与えなくなる。このような難点を克服するために、上記のメモリーブロックを多数用意して心電図に同期したトリガ信号でこのメモリーブロックの各々に別の時刻の解析結果を格納することにより、時間的な変化を同時に測定することができ、いわゆる時分割処理も容易に行える。私共の所ではこの目的のために4 K wordメモリーを16ブロックに分けて利用し脈動現象に対して良好な結果を得ている。¹⁰⁾ また、このメモリー内容をミニコンピューターとメモリーベースで結合することにより得られた速度分布関数より流速の平均値、分散等を容易に求めることもできる。この解析系のハード的、ソフト的詳細については別に報告するのでここでは概略を述べるにとどめる。

6. 測定側

ここではドップラー顕微鏡を利用して行ったカエルの水かき部の毛細血管の血流測定の例を示してみよう。上記光学系から明かなように現在の装置では深層部での血流測定はできない

Fig. 6 Schematic diagram of whole experimental set up for measuring the blood flow¹¹⁾

Fig. 7 Probability distributions of the blood flow velocity in the vein over the web of frog ($70\mu\text{m}$ diam.)¹¹⁾

Fig. 8 A profile of the blood flow velocity in the venule. Peak velocity, obtained from Fig. 7, on the abscissa against the distance of the probing point from the center of the flow. The broken line indicates a parabolic flow for the flow rate estimated from the flow profile experimentally obtained¹¹⁾

ので表面に露出したものを対象とした。Fig. 6はカエルを測定のために固定した状態を測定系を含めて示している。カエル水かき部の太さ 70μ 程度の血管内の血管断面方向での流速分布の測定例をFig. 7に、これをもとにして算出した速度分布がFig. 8に示してある。この図から明らかなように、この程度の太さの血管内での血流速度分布は粘性流体の層流から予想されるニュートン流と少し異なったふるまいをすることがわかる。¹¹⁾

またFig. 9にはFig. 6で示したビニールバッグ内に種々のガスを充満したとき、すなわち水かき部の雰囲気を変化したときの太さ 10μ 程度の末端部の毛細血管内血流の流速変化をしらべたものであるが、雰囲気の変化が末端血流の変

Fig. 9 Probability distributions of the blood flow velocity in the capillary under the six different conditions.

化に敏感に反応していることが明らかであり、これをもとにこのような測定を通じ先に述べたような生体制御機構を解明する一助となり得る

可能性を示している。ここで示した測定例はすべて試験的に製作された前報告ずみの系を利用して得たものであるが、ここで紹介した新しい

系では光学系，信号処理系に一段の改良がほどこされ，現在装置の最終的調整段階を迎えているので今後実際面での利用が可能となり生体解析に大きな力を発揮することを期待している。

参 考 文 献

- 1) 三品博達：光学 **5** (1976) (4号に記載決定)
- 2) H. Mishina and T. Asakura: Opto-electronics **4** 399 (1972).
- 3) H. Mishina and T. Asakura: Opto-electronics **5** 517 (1973).
- 4) H. Mishina and T. Asakura: Applied Physics **5** 351 (1975).
- 5) H. Mishina, Y. Kawase and T. Asakura: Jap. J. Appl. Phys. **15** 633 (1976).
- 6) H. Mishina, T. Ushizaka and T. Asakura: Optics and Laser Tech. **8** 121 (1976).
- 7) H. Mishina, T. Asakura and S. Nagai: Optics Commu. **11** 99 (1974).
- 8) 牛坂 健，三品博達，朝倉利光：第36回応用物理学会学術講演会予稿集 p. 225 (1975).
- 9) 牛坂 健，三品博達，朝倉利光：第22回応用物理学関係連合講演会予稿集 p. 133 (1975).
- 10) 三品博達：第23回応用物理学関係連合講演会予稿集 p. 150 (1976).
- 11) T. Koyama, H. Mishina and T. Asakura: Experienta **31** 1420 (1975).