

画像相関法に基づいた対外循環時血液粘度推定法の研究

代表研究者 氏名 佐藤隆幸 首都大学東京 大学院理工学研究科 助教

1 はじめに

人工透析や人工心肺といった体外循環処置中の血液粘度モニタリング手法の構築への要望は強い。我々はこれまで、顕微鏡観察によって得られた時間差画像間に2次元相互相関処理を施すことによって、血液粘度の相関事象である赤血球凝集度を推定できることを示してきた。本研究では、我々のこれまでの研究で得られていた推定精度を向上させるため、相関領域を局所流速ベクトル分布の算出に基づいて設計し、観察対象の最尤化を試みた。

2 方法

2-1 測定装置

本研究で構成した測定装置を図1に示す。測定試料(2-2(1)で詳述)をタンクに満たし、赤血球の沈降が生じないようにミキサにより緩やかな攪拌を加える。タンク下部のバルブの開閉によって、タンクに接続された流路の流量調整が可能となる。この流路系は重力を駆動源とした自然吐出に基づいたものであり、測定時間として十分な2~3分間の安定流量の創出が可能である。流路の矩形管断面積は低濃度でのマイクロ粒子または赤血球の観察に適した1mm×10mmとした。正立顕微鏡で画像取得箇所より流水状態の試料表面を観察し、顕微鏡に接続されたCCDカメラによって画像取得され、パソコンに記録される。CCDカメラの設定は、画像取得速度を設定可能範囲の最大値である8フレーム/秒に設定し、画素数はその画像取得速度条件下での設定可能上限である520×680とした。凝集径測定のための静止画画像取得時を除き、相関処理を施す画像の全てに対してこの画素数が適用された。

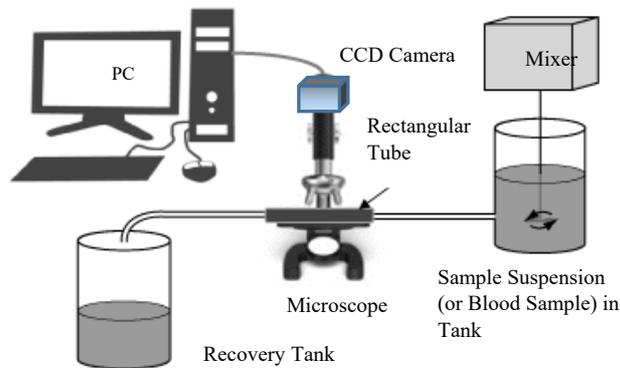


図1 アクリル粒子・赤血球凝集度測定装置[1]

2-2 局所流速ベクトル算出による相関領域の最尤化

(1) 試料調整

粒径 30 μm の真球に近いアクリル粒子(根上工業株式会社、アートパール GR-200)を測定試料とした。試料懸濁液内の粒子濃度は、個別の粒子及び凝集体の観察に適した1wt%とした。アクリル粒子の比重が約1.3であり、粒子の沈降を抑制するためにカルボキシメチルセルロース(以下、CMC)を増粘剤として加え、0.1wt%のCMC水溶液を流動媒として用いた。

(2) 顕微鏡観察による凝集径測定

アクリル粒子の凝集度制御に対しては、我々のこれまでの研究において有効性が確認されている高分子凝集剤を用いた。試料粘度の測定は音叉振動式粘度計を用いて定温条件下で測定した。ガラス製ビーカー容器

内の基準懸濁液に 0.1%凝集剤水溶液を付加・攪拌して作製した観察サンプルをシャーレに満たし、静水状態で凝集体を観察した。凝集径は生物分野でよく用いられているソフトウェア Image J を利用することで、閾値処理と短径及び長径の平均によって算出した。

(3) 画像相関処理

ある時刻に取得された画像 Image 1 及び、それより微小時間を隔てて取得された画像 Image 2 をグレースケール上で輝度値変換する。Image 1 上で参照領域を設け、Image 2 上で対応部位を最大相関位置の探索により決定する。相関係数は 2 次元相互相関式によって求めた。Image 1 上に設ける参照領域は 476×300 ピクセルの長方形型であるが、画像相関処理を施す対象領域の設計は以下の①～③の 3 通りとした。

① 長方形型相関領域

Image 1 内で 476×300 ピクセルの参照領域を決定し (図 2 (a))、流速及びフレーム間隔より予測される Image 2 内での対応位置を中心としてその前後に参照領域と同サイズの矩形サンプルフレームを数点設ける (図 2 (b))。参照領域とサンプルフレーム間で相関窓を 2 次元方向に走査して画像相関処理を行う。

② 放物線型相関領域

放物線型相関領域の場合、長方形型相関領域の場合と同様に Image 1 において参照領域を決定する。矩形管内の流速分布は 6 次関数で近似できるため [2]、観察される管内流れ表面の中央流速を測定し、この値が最大流速となるように 6 次関数の次数を最適調整することにより放物線型相関領域の形状及び Image 2 内での相関計算範囲を決定した (図 2 (c))。

③ 局所ベクトル算出による相関領域設計

局所流速ベクトルは参照領域内における微小領域 (以下、サブセット) の移動量を算出することで求める。Image 1 における点 A を中心としたサブセットを考える。微小時間後の画像 Image 2 中に存在する移動後の点 A' を、移動前のサブセットと Image 2 内の任意のサブセットの間でテンプレートマッチングと呼ばれる画像処理を行い探索する。ここでは、点 A を中心としたサブセットをテンプレート画像として用い、最もテンプレート画像と高い相関性を示したサブセット、つまり、最も 2 次元相互相関値の高いサブセットの中心を移動後の点 A' に決定することで点 A の移動量と移動方向を算出した。この処理を参照領域内の全ピクセルをそれぞれ中心としたサブセットについて行い、それによって得られた全ての点 A' を包含するサブセットの合成範囲を Image 2 内の相関領域として決定した (図 2 (d))。

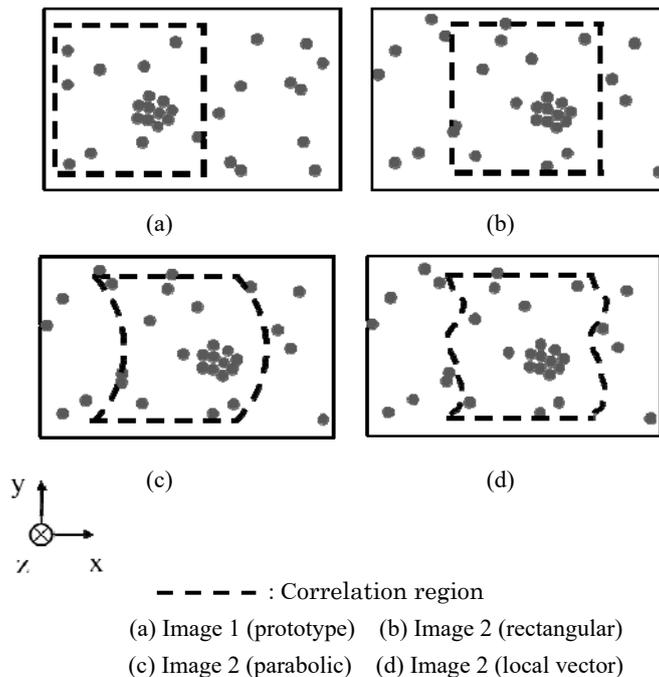


図 2 3 種相関領域の概念図. [1]

2-3 画像相関法の実血液試料への適用

血液試料としては、赤血球サイズ及び赤血球凝集性がヒト血液に近いブタ血液を用いた。懸濁液内の凝集体を顕微鏡観察する場合、粒子成分を高濃度で含む試料では凝集体同士が近接または重畳して凝集体間の境界が不鮮明となり、正確な凝集径測定が困難となる。このため、原試料の Hct の測定を経て生理食塩水で希釈し、Hct=5%のブタ血液試料を作製して用いることとした。

凝集体の近接や重畳を避けるため、血液の希釈に加えて薄層試料を作製する必要がある。このため、wedge 法（引きガラス法）を用い、血中細胞の診断に広く用いられている塗抹標本を作製し、明視野×500倍で観察した。ブタ血液は赤血球体積濃度（ヘマトクリット値、以下 Hct）においてもヒト血液に近く、40%程度の数値を有する。赤血球凝集度を制御するための凝集剤として、デキストラン 70（以下、DEX70）を用いた。我々の過去の研究によって DEX70 をブタ血液の赤血球制御に用いた場合、2.0wt%とした時に凝集度が最大になることが分かっている[3]。ここでは 0~2.0wt%の範囲で DEX70 濃度を 5 段階に変化させた。

3 結果

3-1 顕微鏡観察によるアクリル粒子凝集径測定結果

本報告書 2-2 (1) で述べた方法に従って、シャーレ上の試料液面に設定した 5 カ所より 500 個以上のサンプルより凝集体画像を取得した（図 3）。凝集剤濃度 0%ではアクリル粒子はほぼ単独で液内に分散していた。凝集剤濃度の上昇に従って平均凝集径及びバラツキが増大するという結果が得られた。試料粘度は概ね平均凝集径と一致して変化した（図 4）。

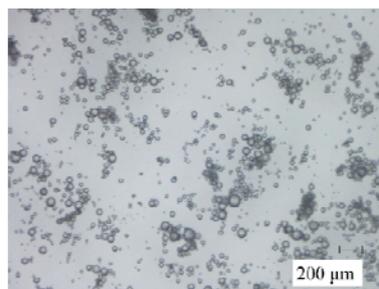


図 3 取得されたアクリル粒子凝集体の顕微鏡画像（×100 倍，凝集剤濃度 0.1 wt%）. [1]

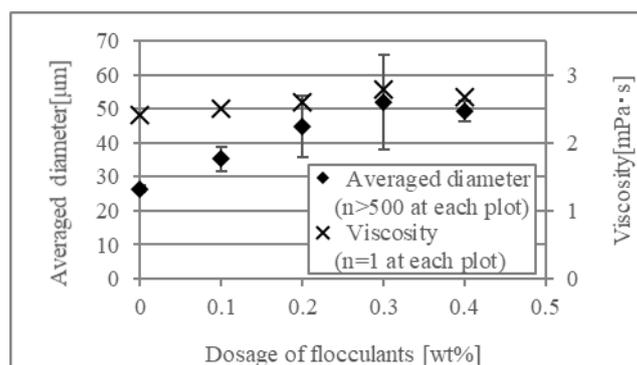


図 4 凝集剤濃度変化によるアクリル粒子の凝集サイズ及び懸濁液粘度の変化. [1]

3-2 3 種相関領域形状の画像相関法への適用結果

凝集剤濃度が 0.3wt%の時に平均凝集径が最大であり、またこの時の粘度も流水実験に支障のないものであったため、相関領域設計の評価用には凝集剤濃度 0.3wt%の試料を用いることとした。時間差 0.125msec

を持つ5組の Image 1 及び Image 2 (即ち試行回数5回) に対して、3種の相関領域設計法を適用した。この評価実験の信頼性を高めるため、同一条件のみとせず、流路における平均流量を約 10 mm³/sec 及び約 30 mm³/sec とした。実験結果では全ての試行において画像相関平均値の大小関係が長方形型<放物線型<局所ベクトルとなり、図5 (a)及び(b)の結果はこれらを反映した大小関係を示した。このことは局所ベクトルの算出により設計された相関領域が従来法と比較して測定の尤度を改善し、加えて流速によらない解析優位性を示すものであると言える。

図5 (a)及び(b)の比較から、本実験系ではほぼ高流速を意味する高流量条件においては平均相関値が低下している。この要因としては、高流速となるほどz方向を含めた観察範囲内の流速差が大きくなり、Image 1上の参照領域に含まれる粒子をImage 2上の対象領域で網羅することが困難になることが考え得る。この結果より、臨床応用時では低流速での測定実施が望ましいと考えられる。

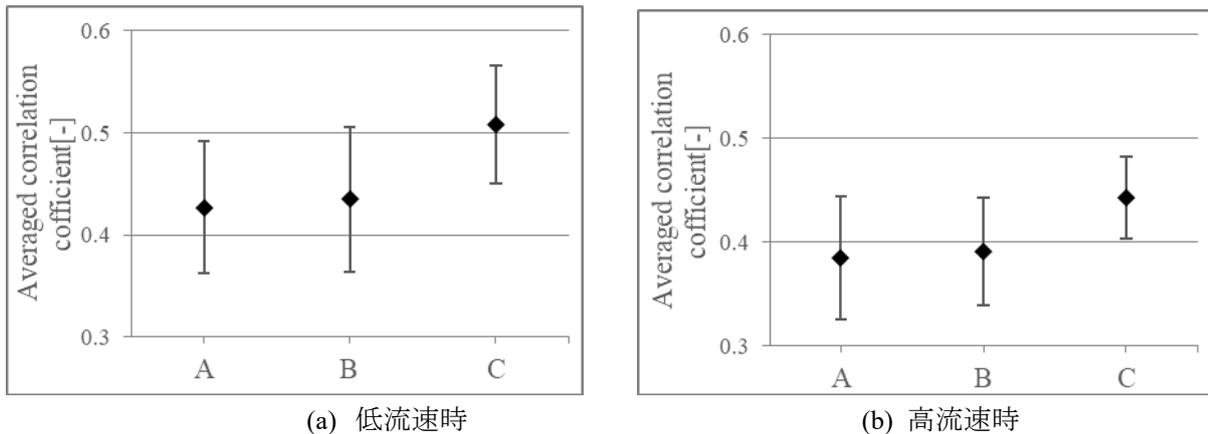


図5 アクリル懸濁液を用いた場合の3種相関領域による平均相関係数の比較. [1]
A: 長方形型相関領域, B: 放物線型相関領域, C: 局所ベクトル型相関領域.

平均相関値が最大となった局所ベクトル相関領域をテンプレートとした時の3種相関領域の面積重複度を求め、図5 (a)に示すそれぞれの相関領域の平均相関値との対応関係を示したものが図6である。5回の試行それぞれにおいて局所ベクトル相関領域の形状を基準としているため、図中での局所ベクトルの重複度は1の値をとり、かつバラツキはない。平均相関値の算出過程において、Image 1上でのある相関窓とそれに対応するImage 2上での相関窓で、共に粒子の占める面積が小さい場合が偶発的かつ一定頻度で発生し、これが平均相関値を押し下げ、測定安定性を低下させる。このことが図5 (a)及び(b)で長方形型と放物線型の平均相関値差が僅少であった要因であると考えられるが、図6に示される重複度では明瞭な差が得られており、これら2つのうちでは放物線型の方がより尤度の高い形状を有していると判断される。

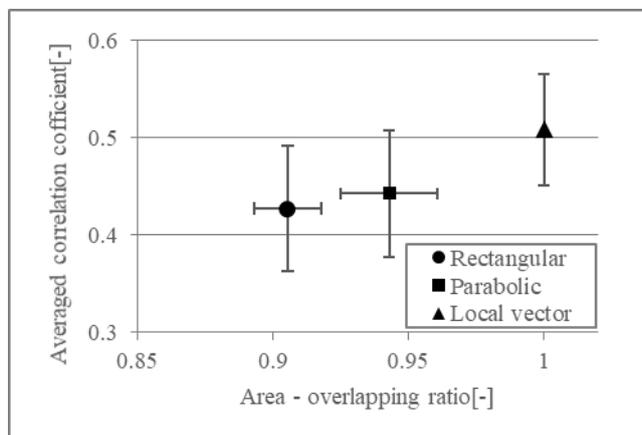


図6 局所ベクトル型相関領域との面積重複率と平均画像相関値の関係. [1]

3-3 顕微鏡観察による赤血球凝集径測定結果

シャーレ上の塗抹標本を顕微鏡観察した一例を図7に、またこれらの画像中の計500個以上のサンプルより集計した平均凝集径の結果を図8に示す。アクリル粒子の場合とは異なり、赤血球の場合の凝集剤であるDEX70の濃度が0%である時にもわずかな凝集が見られ、平均凝集径は7.08 μm となった。これは試料が入手された時点で持ち合わせた凝集能であり、過去の研究と一致している[4]。DEX70濃度を1.5%とした場合の図7では赤血球凝集体の形成が観察される。アクリル粒子の結果(図5)と同様にDEX70濃度の増加に従って平均凝集径及びバラツキが大きくなった。

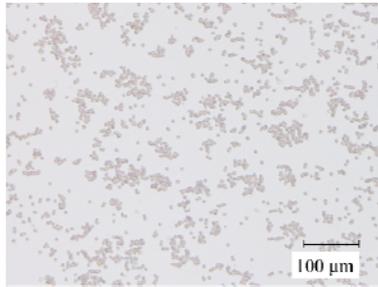


図7 赤血球凝集の顕微鏡画像例 ($\times 500$ 倍, DEX 70濃度 1.5 wt%). [1]

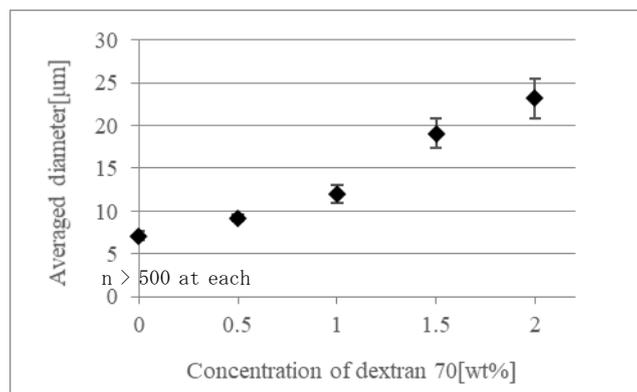


図8 凝集剤投与量に対する凝集径の変化. [1]

3-4 画像相関法の実血液試料への適用

同一試料及び同一装置によって得た5組のImage 1及びImage 2に対し、3種の相関領域を適用したところ図9に示す結果を得た。流路における平均流量を $2.46 \pm 0.11 \text{ mm}^3/\text{sec}$ とした。図9において、平均相関値は長方形型<放物線型<局所ベクトル型となり、新手法の優位性が実際の血液を対象とした実験においても確認された。

画像相関とは模様近似度であるため、本研究の実験系において観察対象となる粒子のサイズ及び形状は、結果として得られる画像相関値に対して影響を及ぼす因子となる。即ち、具体的にはアクリル粒子と赤血球のサイズ及び形状の相違に起因した差異が存在する可能性がある。赤血球は中央がくぼんだ扁平円盤であり、この形状によって生ずる1個の赤血球内での陰影は、画像取得系の空間分解能が高くなるにつれて画像相関値への影響を高める。本研究の実用化段階においては演算量という要素も含めた分解能設定の最適化検討が必要となろう。

血液を用いた実験では、①主たる観察対象が単独赤血球でなくそれよりも面積の大きい凝集体であること、②単独赤血球であってもせん断応力により観察方向に対して最大面積をとるように配向すること、などが観察された。これらの点は、画素サイズが1個の赤血球と同等サイズであることから予測される相関水準の低下を緩和する効果を与えられと考えられる。しかしながら、図9に示される相関レベルは、アクリル粒子を用いた場合に得た結果と比べて相関レベルが明らかに低下した。

3-5 画像相関法の実血液試料への適用

本研究で提案している局所ベクトルによる相関領域設計が凝集度評価に対していかほどの効果をもたらすかを評価する。本報告書 2-2(2) で述べた実験条件下に平均流量 $14.2 \pm 0.9 \text{ mm}^3/\text{sec}$ 凝集剤投与量を $0 \sim 0.3 \text{ wt}\%$ の間で $0.5 \text{ wt}\%$ 刻みとし、その際に 3 種の相関領域を適用して画像相関平均値を求めたところ表 1 に示す結果を得た。表内の平均凝集径は図 4 に示す結果である。局所ベクトル相関領域の比較対象を放物線型相関領域とし、表 1 内での数値を図 10 にプロットする。

放物線型相関領域を用いた場合の凝集剤 $0 \sim 0.3 \text{ wt}\%$ での測定データ 4 点から線形近似式を導き (図 10)、局所ベクトル相関領域を用いた場合での凝集剤 $0 \text{ wt}\%$ での値との比較を行う。

凝集径が $26.5 \mu\text{m}$ の時、局所ベクトル型での画像相関平均値は、放物線型に対しては 0.054 の上昇を得た。凝集径を D 、画像相関平均値を ρ とすれば、放物線型の相関値算出結果は図 10 に示すような線形近似により $\rho = 0.00160D + 0.403$ のように表せる。局所ベクトル型相関領域を基準とすれば、放物線型の算出結果に対して $\Delta \rho = -0.054$ の誤差が見込まれる。局所ベクトル型での画像相関平均値 $\rho = 0.502$ における凝集径を近似式から求めると、 $D = 61.9 \mu\text{m}$ となる。 $26.5 \mu\text{m}$ との差 $\Delta D = 38.76 \mu\text{m}$ が推定補正量となり、この補正分が局所ベクトル相関領域の導入による凝集度評価への効果であると言える。

表 1 凝集剤濃度に対するアクリル粒子凝集径と平均相関係数の関係 [1]
(平均径の値は図 4 より)

Dosage of flocculants [wt%]	0	0.1	0.2	0.3
Averaged diameter [μm]	26.5	35.3	44.8	51.9
Average correlation coefficient	Rectangular	0.435	0.451	0.467
	Parabolic	0.448	0.454	0.475
	Local vector	0.502	0.507	0.524

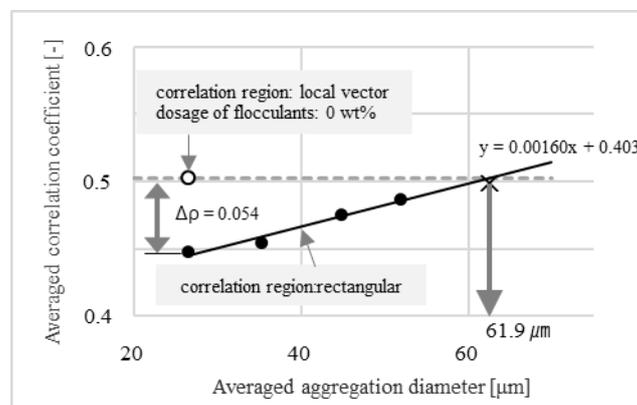


図 10 局所ベクトルによって設計された相関領域を用いた場合の予測補正法. [1]

【参考文献】

- [1] 佐藤 隆幸: “超音波スペクトルピーク周波数による In vivo 赤血球凝集度測定”, 電気学会論文誌 C 分冊, Vol. 137, No. 7, pp.871-876, 2018.
- [2] 渡辺敬三: 「流体力学-流れと損失-」, 丸善, 2002.
- [3] 渡邊 祥, 花田 洋輔, 佐藤 隆幸: “超音波スペクトルピーク周波数による In vivo 赤血球凝集度測定”, 電気学会論文誌 C 分冊, Vol. 137, No. 7, pp.871-876, 2016.

[4] T. Sato, H. Tojo, and Y. Watanabe: “Highly Sensitive Detection of Red Blood Cell Aggregation with Ultrasonic Peak Frequency”, 07HF18-07HF18-6, Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 52 no. 7, 2013.

〈発 表 資 料〉

題 名	掲載誌・学会名等	発表年月
体外循環処置時における赤血球凝集度と画像相関値の関係	電気学会 C 部門大会	2016 年 8 月
画像相関法に基づいた体外循環時の赤血球凝集度評価方法に関する検討	電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌) Vol. 136, No. 10, pp. 1437-1444	2016 年 10 月
血液回路内血流の局所流速ベクトル算出による赤血球凝集度推定の最尤化	電気学会 C 部門大会	2017 年 9 月
血液回路内血流の局所流速ベクトル算出による赤血球凝集度推定の最尤化	電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌) Vol. 138 No. 6 pp. 655-661	2018 年 6 月