

〔総説〕

## レーザーSpeckle血流計による血流動態のイメージング解析

新岡 丈治<sup>1</sup>, 石井 久淑<sup>2</sup>, 和泉 博之<sup>2</sup><sup>1</sup>北海道医療大学 薬学部 人間基礎科学講座  
<sup>2</sup>北海道医療大学 歯学部 口腔生物学系 生理学分野

## Imaging analysis of blood flow distribution with laser speckle flowmeter

Takeharu NIIOKA<sup>1</sup>, Hisayoshi ISHII<sup>2</sup> and Hiroshi IZUMI<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Integrated Human Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Japan<sup>2</sup>Division of Physiology, Department of Oral Biology, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

## Abstract

Monitoring of the blood flow has been used in basic and clinical research to elucidate details of the physiological and pathophysiological conditions of tissue. The blood flow measurement in biological tissue has employed drop counters, microspheres, hydrogen clearance, laser-Doppler flowmeters, and others. However, none of the devices are clearly superior or simply provide all the data necessary. For example, blood flow measurement by the microsphere method can determine the absolute value of the blood flow rate, but involves the use of radioisotopes. Blood flow measurement by the laser-Doppler flowmeter method can measure the blood flow non-invasively, but determines only relative values and observes only small areas. Thus, it is necessary to select the method of blood flow measurements considering the measurement site, measurement area, object of study, sampling interval, and other parameters. Advantages of non-invasive measurements, include ease of application, abundant information obtained from high-resolution sampling, and imaging analysis makes it possible to consider introduction of blood flow measurements in basic and clinical research. One such application is the laser speckle flowmeter which is increasing in use in basic and clinical investigations, since this instrument can non-invasively measure blood flow changes in broad areas as two-dimensional images with high-resolution sampling. This review focuses on i) the principles of blood flow measurements with the laser speckle flowmeter, ii) a comparison of the characteristics of laser speckle flowmeter and laser-Doppler flowmeter on the blood flow measurements, iii) the previous basic research with laser speckle flowmeter that has been reported by us, and iv) the application of laser speckle flowmeter in basic and clinical investigations.

**Key words** : Laser speckle flowmeter, Blood flow measurement, Imaging analysis, Hemodynamics

## 第一章 緒言

我々の体内を隈無く流れる血液は、ホルモン、血液ガス、栄養素、老廃物ならびに体熱を運搬することにより、全身の細胞のホメオスタシスに重要な役割を果たしている。したがって、血液循環系の異常は、組織障害やそれに伴う種々の疾患の要因となる。

そのため臨床の場では、血流あるいは血液をモニタリングすることによって、組織の健康状態や障害を確認するための検査が広く行われている。また一方で基礎研究の場でも、血流調節機序の解明や組織機能の解明に血流の測定が行われている。

血流の測定には、古くから様々な方法が開発され、臨床・基礎研究の場で用いられてきた。最も古い血流測定

受付：平成23年3月30日

は、1700年代に行われた方法で、馬の頸動脈に挿管し、流れ込んだ血液の高さから血圧や心拍出量を測定したものだと言われている。この様に体外に血液を漏出させてから血流を測定する方法が最初に開発され、後にdrop counter法へと改良され基礎研究に広く用いられた (Hilton & Lywood, 1954)。その後、体内の血流量を定量的に解析する手法として、microsphere法 (Hoffbrand & Forsyth, 1969; Levine et al., 1984)、アイソトープクリアランス法 (Love, 1964; Young & Hopewell, 1980)、水素クリアランス法 (Haining et al., 1968; Kobrine et al., 1974) などが開発されてきたが、これらの手法はいずれも測定対象に対して侵襲的な手法であるため、その使用が実験動物を対象とした基礎研究に偏っている。一方非侵襲性で臨床でも広く用いられているのが、超音波 (Reid & Spencer, 1972; Sequeira et al., 1976; Wells et al., 1977) やレーザー (Riva et al., 1972; Holloway & Watkins, 1977; Stern et al., 1977) のドップラーシフトを応用した血流計である。我々は、これらの血流計のうちレーザーのドップラーシフトを応用した血流計 (レーザー血流計) を用いて、自律神経性血流調節に関する検討を行ってきた (Izumi & Ito, 1998a; Izumi, 1999a; Izumi et al., 2004; Mizuta et al., 2006, 2007b; Koeda et al., 2009; Ishii et al., 2010, 2011)。

レーザー血流計は、レーザードップラー法、レーザードップラーイメージング法、並びにレーザースペックルイメージング法の三種類が主に使用されている。レーザードップラー法はこの中で最も早く開発された血流計であり、現在でも広く用いられている。測定対象にレーザーを照射し、測定対象からの散乱光のドップラーシフトを血流値に換算するという特徴を有し、血流変化を0.1秒間隔の高時間分解能でモニタリングすることが可能である。しかし、測定プローブの血流観測部位の大きさが約1 mm四方であるため、測定範囲が局所の一点に限られてしまう (図1)。そこで、この欠点を補うために開発されたのが、レーザードップラーイメージング法である。レーザードップラーイメージング法の基本原理はレーザードップラー法と同様であるが、測定プローブを縦および横方向に走査することで、比較的広範囲の二次元の血流マップを得ることができる。これによりレーザードップラー法の「測定範囲の局在化」という欠点を補うことに成功したが、測定プローブを走査させるため、血流マップを得るまでにある程度の時間が必要であり、「高時間分解能」という利点を生かし切れなくなってしまった。近年開発されたレーザースペックルイメージング法は、レーザードップラー法やレーザードップ

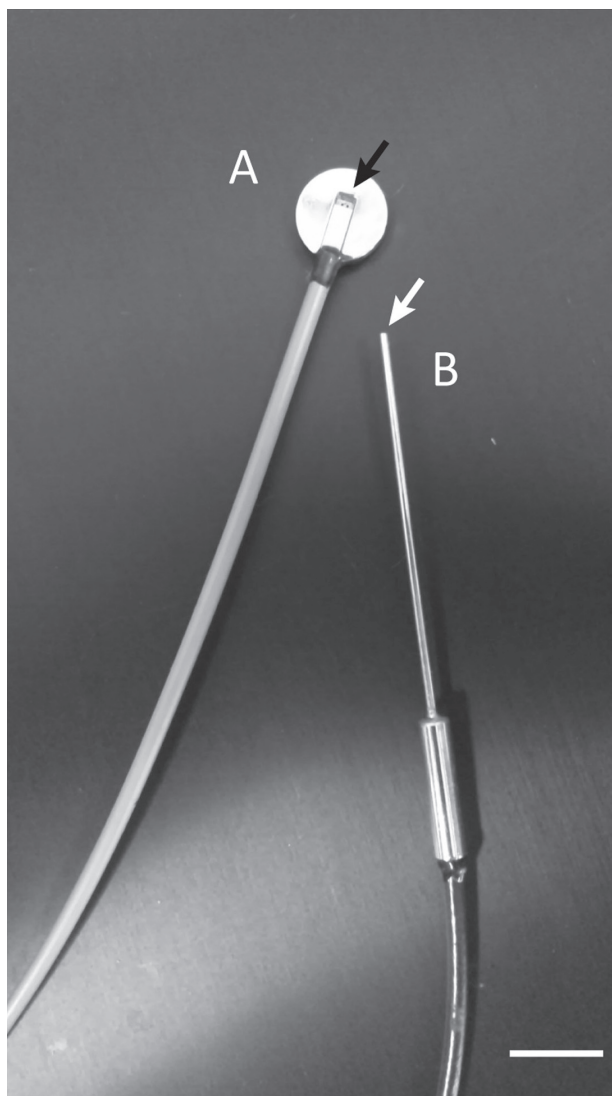


図1 レーザードップラー血流計の測定プローブ (A) DS型 (ディスクタイプ) 測定プローブ、(B) NS型 (ニードルタイプ) 測定プローブ。黒矢印および白矢印部分は、それぞれの血流測定部位 (レーザー照射および散乱波受光部位) を示す。測定プローブは、どちらもOMEGAWAVE Inc. から購入した。スケールバーは、10 mmを表す。

ラーイメージング法の欠点を改良し、一定範囲の血流動態を高時間分解能で測定できるという特徴を有している。

本稿では、我々がレーザースペックルイメージング血流計 (Omegazone OZ-01, OMEGAWAVE, 東京) を用いて行った基礎研究の結果を中心に、レーザースペックルイメージング法とレーザードップラー法との性能比較、そしてレーザースペックルイメージング法の原理からその臨床応用までの概要を紹介する。

## 第二章 レーザースペックルイメージング法の概要

我々が使用しているレーザースペックルイメージング血流計 (Omegazone OZ-01) では、測定サンプルから

およそ20–30 cm離れた光源から拡散させたレーザー光線（波長780 nm）を照射する．レーザー光線がサンプル表面に照射されると，そこに存在する多数の粒子にぶつかって散乱し，観察面で散乱波同士が干渉する．その散乱波をCCDカメラの様な複数の受光素子で収集すると，ランダムな斑点模様（スペックル）が検出される．サンプル表面に存在する粒子（主に赤血球）に動きが生じると，スペックルの発生パターン（検出強度や発生頻度）にも変化が生じる．このスペックル発生パターンの変化（ぶれ率）をForrester et al. (2002, 2004) のアルゴリズムに従いコンピューターで演算し，その結果を8

bitスケールの2次元画像（639×480）として出力させたものがスペックル画像となる（図2）．サンプルの測定範囲は，CCDカメラのズーム性能に依存するが，およそ0.01 mm四方の局所から150 mm四方の広範囲にいたる，任意の範囲の血流値を測定することができる．同時にサンプリング周波数も任意に設定することが可能であり，最短ではビデオレート（30フレーム／秒）でサンプリングすることができるので，ヒトの心周期に同期した血流変化等もモニタリングすることが可能である．またスペックル画像と同一視野のモノクロ画像も同様の条件でサンプリングしている．OZ-01を含めたレーザー

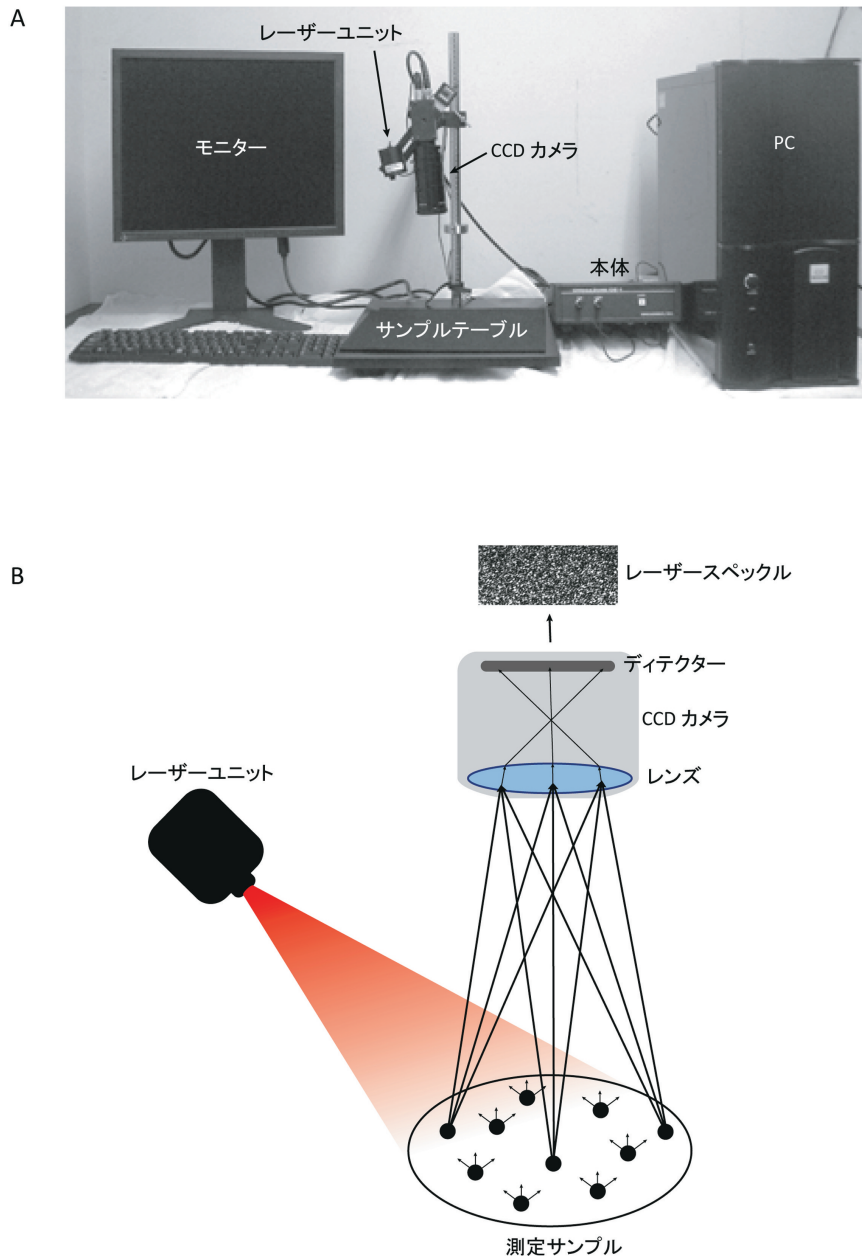


図2 レーザースペックル血流計（レーザースペックルイメージング法）の全体像とその原理

(A) Omegazone OZ-01の外観．本体では，レーザー光の出力およびCCDカメラで受信した信号の受容とPCへの出力を行う．PCでは，レーザースペックル変動の演算を行い，その結果をスペックル画像としてモニターに出力する．(B) OZ-01の測定原理．OZ-01では，測定サンプルからおよそ20–30 cm離れた光源から拡散させたレーザー光線（波長780 nm）を照射する．レーザー光線がサンプル表面に照射されると，そこに存在する多数の粒子にぶつかって散乱し，観察面で散乱波同士が干渉する．その状態をCCDカメラで撮影すると，ランダムな斑点模様（スペックル）が検出される．

スペckル血流計では、モニター上にスペckル画像を疑似カラー化して表示させるので血流変化がより直感的に伝わる。OZ-01には、付属の解析ソフトウェアもあるが、画像データが連続した複数枚のTIFF形式ファイルとして保存されているため、Image J (version 1.4, NIH, Maryland, MD, USA) 等のその他のソフトウェアで8 bitスケールのモノクロ画像として閲覧、解析することも可能である。モノクロのスペckル画像中では、血流量あるいは血流変化の大きな部位が高輝度で表現される(図3)。

以上の様に、レーザースペckル現象を応用した血流測定機器の最大の特徴・利点は、広範囲の血流動態を無侵襲・高時間分解能で連続的な画像データとして測定できるという点である。その一方で、サンプル表層の情報しか得ることができない、血流速度の絶対値を得ることができない、サンプルの動きが測定結果に影響してしまう等の欠点もあり、個々の特徴では他の測定機器の方が勝る場合もある。しかし、これまでに開発されてきた血流測定法の中では、レーザースペckルイメージング血流計は、最もバランスの取れた機器の一つであり、臨床・基礎研究の様々な分野に新しい情報をより多く提供してくれることが期待される。

### 第三章 レーザースペckルイメージング法とレーザードップラー法の比較

我々は、レーザードップラー法とレーザースペckルイメージング法を用いて(当研究室では、レーザードップラーイメージング法は導入していない)、両者の特性

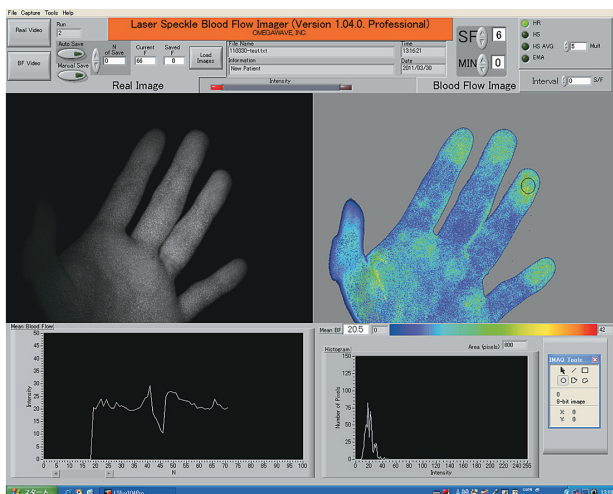


図3 Omegazone OZ-01の測定画面

OZ-01では、画面上部のコントロールパネルで収集条件を設定する。モニターには、グレースケールの実像(左側)と疑似カラー化したスペckル画像(右側)が任意のタイムスケールで連続表示される。また、画面下側には、任意に選択した部位の血流値とそのヒストグラムも連続して表示される。

の比較を行った(渡邊ら, 2006)。実験は、三叉神経-副交感神経反射で誘発されるラット下口唇の血流増加反応(図4A)およびヒトの寒冷試験に伴う血流減少反応(図4B)を観察した。三叉神経-副交感神経反射は、三叉神経刺激によって脳幹を介して頭部・顔面領域の副交感神経性血管拡張線維を反射的に活性化させる方法であり、和泉、刈田が開発した方法である(Izumi & Karita, 1992a)。副交感神経性血管拡張線維は、頭部・顔面領域を走行する血管周辺には広く分布しているが、体幹・四肢の皮膚や筋血管周辺には分布していない。三叉神経-副交感神経反射の詳細については、総説(Izumi, 1995; 和泉, 1995, 1999b, 2004a, b, 2005; Izumi et al., 2006; Ishii et al., 2007a; 石井, 和泉, 2010)やネコ(Izumi & Karita, 1992b, 1993, 1994a, b; Karita & Izumi, 1992, 1993; Izumi et al., 1997; Izumi & Ito, 1998b)、モルモット(Watanabe et al., 2008b)、ウサギ(Yasuda & Izumi, 2003)、ラット(Mizuta et al., 2000; Ishii et al., 2005, 2007b, 2009b; Niioka et al., 2009a; Sudo et al., 2009)を用いた原著論文を参照していただきたい。寒冷試験は、自律神経機能の検査に用いられている。手指を冷水に入れると、冷刺激が視床下部の体温調節中枢へと伝わり、熱放散抑制機序が働き、対側手指で交感神経性の血管収縮反応が認められる。この時の血流減少反応を観察する方法が寒冷試験である(Lewis, 1930; Samueloff et al., 1981; Shepherd et al., 1983)。

前述したとおり、レーザードップラー血流計の測定プローブは、測定可能範囲が約1 mm四方の局所に限られる(図1)。そのため、レーザースペckルイメージング法との血流値の比較を行う際は、スペckル画像の画像解析で、レーザードップラー血流計のプローブの測定可能範囲と同一部位を指定して血流値を求めた。その結果、血流増加反応(図3Ac & Ad)、血流減少反応(図3Bc & Bd)のいずれにおいても、レーザードップラー法とレーザースペckルイメージング法は、ほぼ同様なパターンの血流変化を記録した。しかし、レーザースペckルイメージング法と比較してレーザードップラー法で検出した血流変化量の方が有意に大きな値を示した(図4Ae & Be)。レーザードップラー法とレーザースペckルイメージング法は、測定部位や範囲を同一に設定していることから、これらの結果の違いは、測定範囲や部位が影響しているのではなく、散乱波のドップラー変化を演算するレーザードップラー法に対して、スペckルの発生パターンを演算するレーザースペckルイメージング法の演算方法の違いに起因して生じているのではな

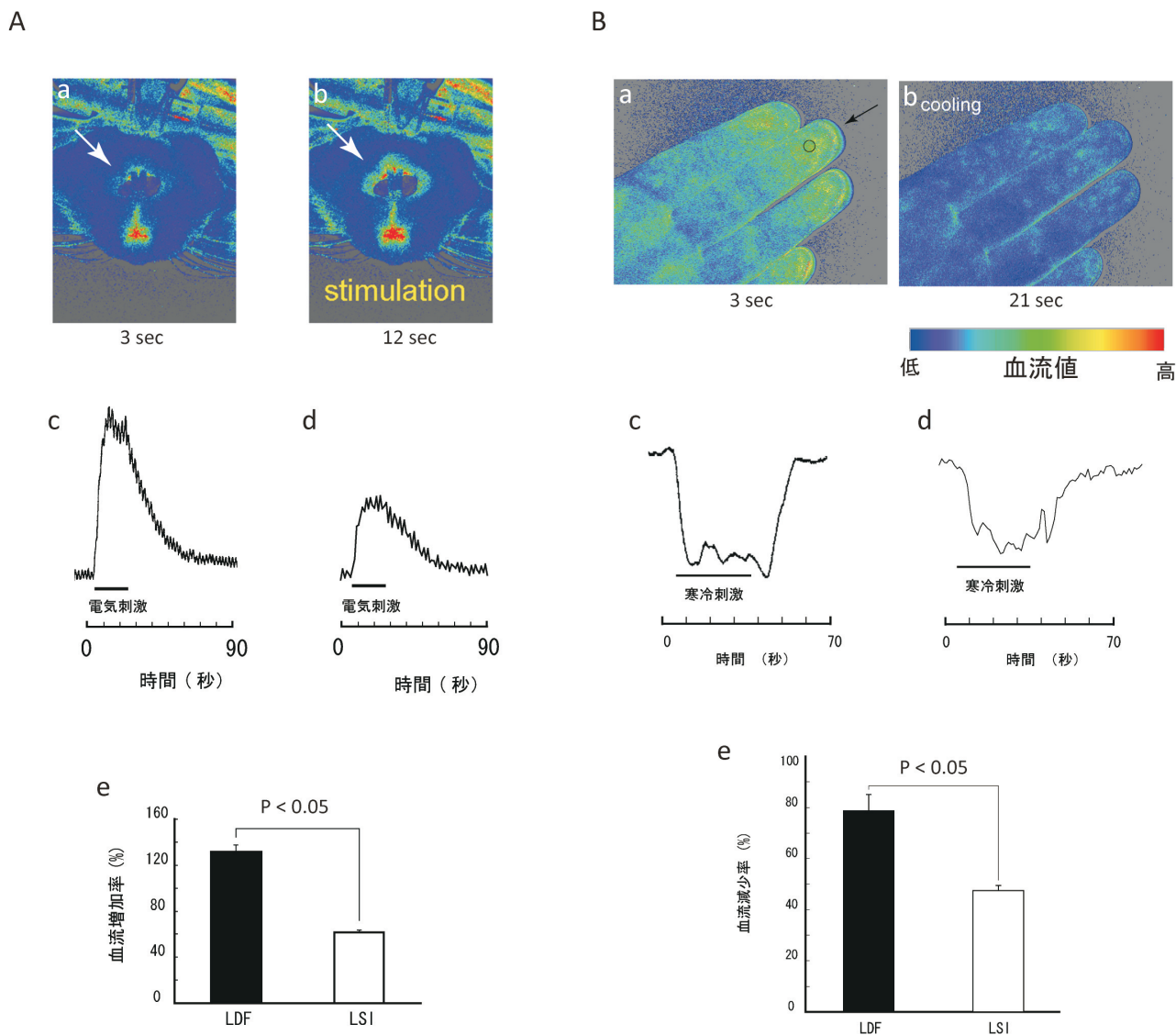


図4 レーザードップラー法とレーザースペックルイメージング法で測定した血流値の比較

(A) ラット下口唇の副交感神経性血管拡張反応に伴う血流増加反応をレーザードップラー法とレーザースペックルイメージング法の両者で測定し、その血流値を比較した。(Aa) 無刺激時および (Ab) 三叉神経 (舌神経) 刺激時のスペックル画像。(Ac) レーザードップラー法を用いて測定した時の血流変化。(Ad) レーザースペックルイメージング法を用いて収集した画像データからレーザードップラー法と同一部位を解析したときの血流変化。(Ae) レーザードップラー法とレーザースペックルイメージング法で測定した血流値 (ピーク時の血流増加率) の比較. n=4. (B) ヒトの寒冷試験に伴う血流減少反応をレーザードップラー法とレーザースペックルイメージング法の両者で測定し、その血流値を比較した。(Ba) 無刺激時および (Bb) 片側手指寒冷中のスペックル画像。(Bc) レーザードップラー法を用いて測定した時の血流変化。(Bd) レーザースペックルイメージング法を用いて収集した画像データからレーザードップラー法と同一部位を解析したときの血流変化。(Be) レーザードップラー法とレーザースペックルイメージング法で測定した血流値 (ピーク時の血流減少率) の比較. n=5. 矢印は、レーザードップラー法のプローブ設置部位をレーザースペックルイメージング法の画像中に示した. LDF; レーザードップラー法, LSI; レーザースペックルイメージング法.

いかと考察した。

また寒冷試験を行った際に、レーザースペックルイメージング法で得た画像データから、中指の末節骨部と中節骨部で血流変化を解析し、それらの血流値を比較した。その結果、末節骨部と中節骨部では、その血流値の変動および血流変化の最大値が有意に異なっていた (図 5)。この結果は、手指の中でも末節部の掌側が他の部位と比較して血管が豊富に分布しており、動静脈吻合が多数存在するという解剖学的な知見 (高木, 永坂, 1967) と一致する。この様にレーザースペックルイメー

ジング法では、全く同一条件下で、広範囲の血流を測定しているため、部位間での比較を容易に行うことができる。また一度画像データを取得すると、画像解析時に測定部位や範囲を任意に変更して血流値の再測定を行うことが可能である点もレーザースペックルイメージング法の利点の一つであるといえる。

#### 第四章 レーザースペックルイメージング法の基礎研究への導入

本章では、我々の報告を中心として、基礎研究の場で

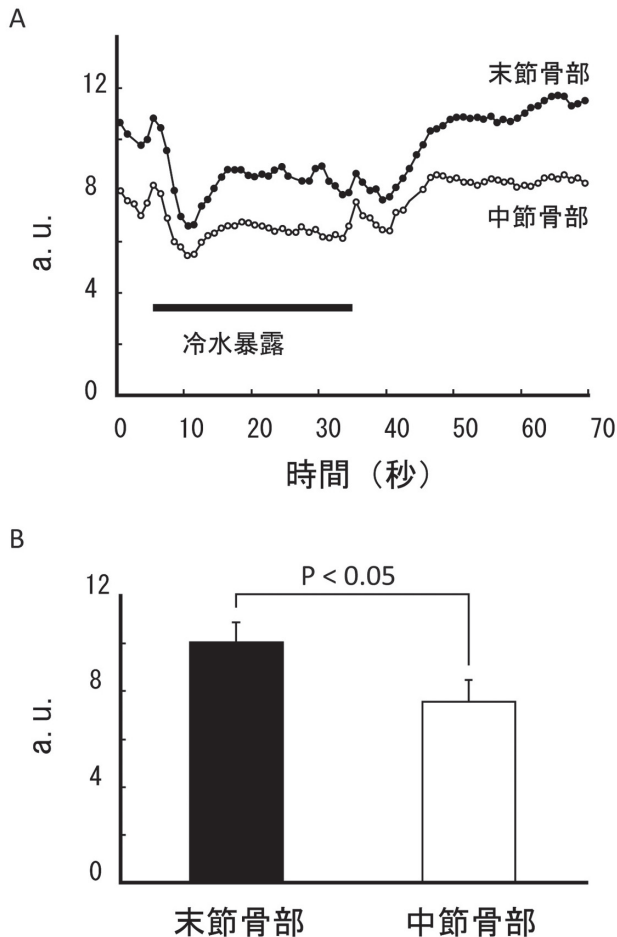


図5 寒冷試験に伴う血流減少反応の、同一手指中の部位差 (A) 図4Bに示したレーザースペックルイメージング法で取得したスペックル画像を用いて、中指の末節骨部と中節骨部の血流値を解析した時の血流変化。(B) 末節骨部および中節骨部における、無刺激時の血流値のまとめ。n=12, a.u., arbitrary units.

レーザースペックル血流計を用いて明らかにされた結果を紹介する。

我々は、頭部・顔面領域に分布する血管の自律神経性血流調節に関して、副交感神経性血管拡張線維の選択的な活性化 (Izumi & Karita, 1992a,b), 皮膚 (Izumi & Karita, 1993), 舌 (Izumi & Karita, 1994b), 骨格筋 (Ishii et al., 2005, 2009a,b, 2010, 2011; Niioka et al., 2009a) および唾液腺血管 (Izumi & Karita, 1994a; Izumi et al., 1995) の副交感神経性血管拡張反応, 副交感神経性血管拡張線維に対する交感神経活動の影響 (Izumi & Ito, 1998b; Izumi, 1999a; Ishii et al., 2007b), 副交感神経性血管拡張線維の作用に対する麻酔薬の影響 (Izumi et al., 1997) など, 様々な報告を行ってきた。これらの報告の大部分は、レーザードップラー血流計を用いて、粘膜, 皮膚, あるいは骨格筋の血流を測定したものであるが、レーザードップラー血流計は、先にも述べた通り, その血流測定範囲が局所に限られてしまうため, 広範囲の血流測定や血流変化の部位間での比較には不向きであ

る。従って近年では、咬筋全体の血流動態を把握し, その部位間での比較を行うために, レーザースペックルイメージング法を導入した研究も並行して行っている。

咬筋では, 筋電図活動や筋ファイバーの組成などが部位毎に異なる事が報告されている (Eriksson & Thornell, 1983; Blanksma et al., 1992; Van Eijden & Raadsheer, 1992)。これらの報告は, 咬筋では, 複雑な顎運動を可能にするために, 筋線維が部位毎に独立して活動を行っていることを示唆している。筋細胞の恒常性や生理的な筋活動を維持するためには, 筋組織内を流れる血流が酸素や栄養素の供給や筋代謝に重要な役割を演じている。しかしながら, 筋活動の部位差に対応する血流動態の部位差に関する報告は殆ど無い。そこで我々は, ラット浅部咬筋表層全体の血流変化をレーザースペックルイメージング法で観察し, 無刺激時, 交感神経活動時ならびに副交感神経活動時の血流動態を観察し, さらにそれぞれの血流変化に浅部咬筋内での部位差が有るかどうかを検討した (Niioka et al., 2009b)。

ウレタン麻酔・パンクロニウムブロマイドによる非動化処理を施したラットを人工呼吸下で維持し, 皮膚切開により露出させた浅部咬筋表層の血流変化をレーザースペックルイメージング法で観察した。交感神経性血管収縮反応は, 頸部交感神経幹を末梢性に電気刺激することにより誘発し, 副交感神経性血管拡張反応は, 三叉神経の枝である舌神経を中枢性に電気刺激することにより, 反射的に誘発 (三叉神経-副交感神経反射) させた。

レーザースペックルイメージング法では, 咬筋表層の実像と同一視野のスペックル画像が得られるが, 実像では, 咬筋表層を走行する顔面神経幹が高輝度で検出されているのに対して (図6A & B), スペックル画像では, 咬筋に下側から血液を供給する顔面動脈の咬筋枝および上側から血液を供給する外頸動脈の咬筋枝, ならびに顔面神経幹に伴行する神経栄養血管が複雑に分岐する様子が高輝度で鮮明に検出された (図6C)。この様にレーザースペックルイメージング法を用いることにより, カラーあるいはモノクロの映像では検出しにくい血管網の様子を鮮明に観察することができるため, 血管網の発達を観察するような解剖学領域でも活躍することが期待される。

ラット浅部咬筋中を流れる血液は, 無刺激状態でもその量や分布が異なり, 浅部咬筋の筋腹上側や下側では中央部や吻側・尾側部に比べて高い血流値を示した (図7)。舌神経を電気刺激して, 反射的に副交感神経性血管拡張線維を活性化させた際には, 浅部咬筋表面の広い範囲で血流が有意に増加したが, その大きさには部位差

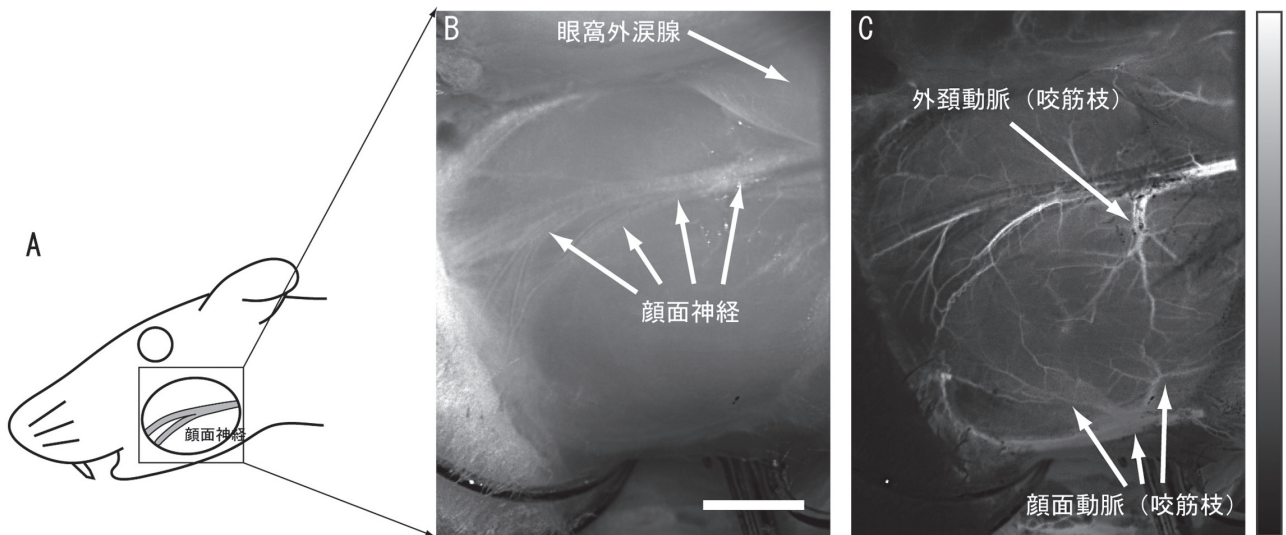


図6 ラット咬筋とその周辺組織の実像とスペックル画像

(A) ラット頭部の模式図。(B) レーザースペックルイメージング血流計を用いて取得したラット咬筋表面の実像。(C) Bと同一部位のスペックル画像。スペックル画像では、血流量もしくは血流変化が大きい部位が高輝度で表される。スケールバーは、5 mmを示す。

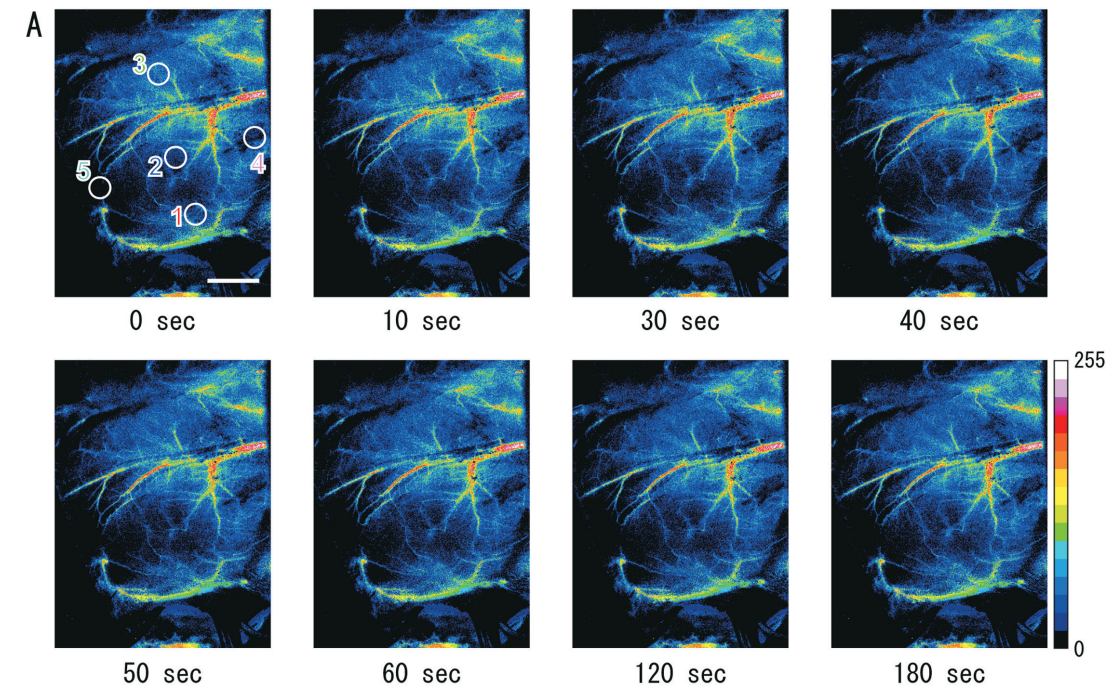


図7 ラット咬筋の無刺激時の血流値

(A) スペックル画像の経時変化 (8 bit階調で疑似カラー表示)。スケールバーは、5 mmを示す。(B) ラット咬筋筋腹 (下側①, 中央②, 上側③, 尾側④, 吻側⑤) の血流値の経時変化。(C) 各部位の血流値 (10~50秒までの血流値の平均) のまとめ。n=11. \*P<0.01, \*\*P<0.001.

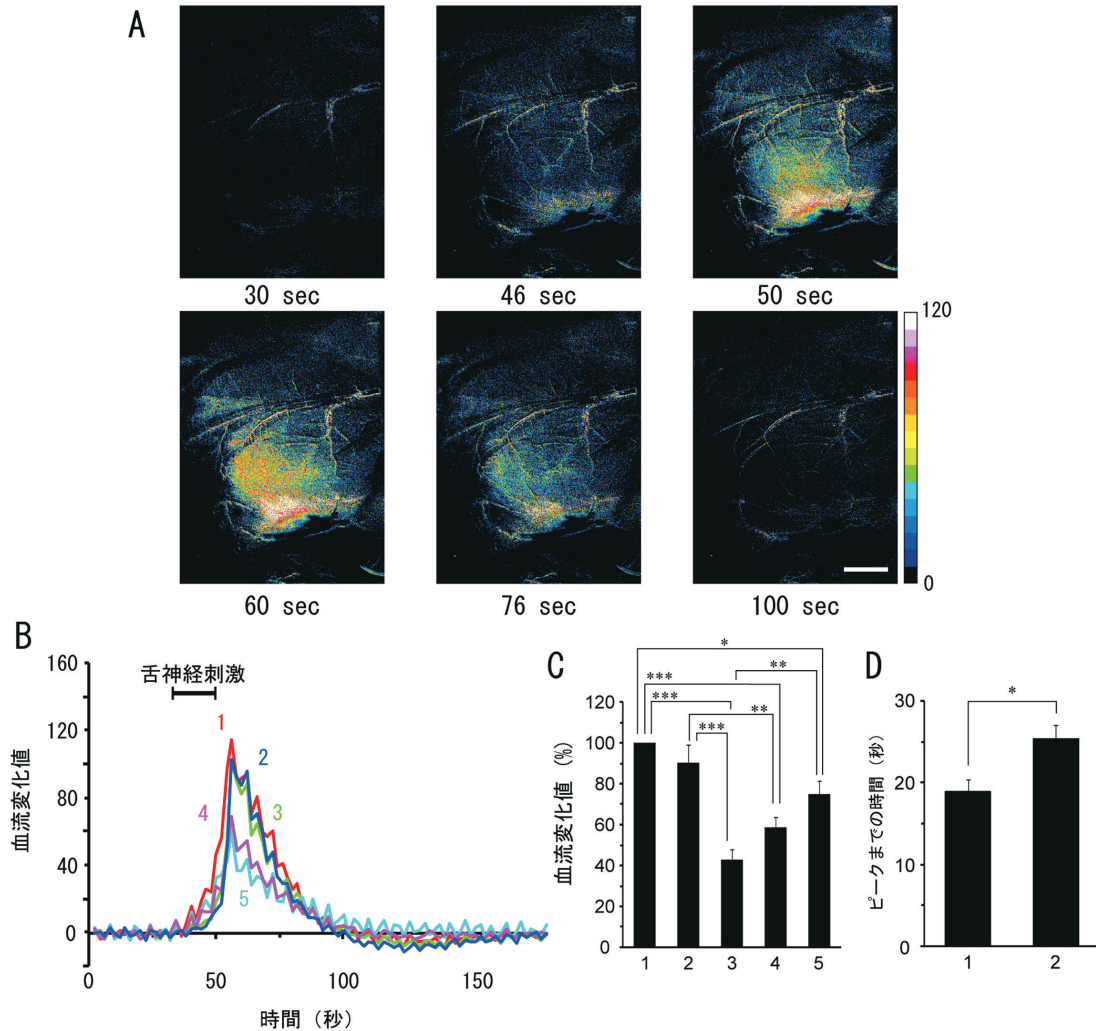


図8 ラット咬筋の副交感神経性血管拡張反応

(A) スペックル画像(各々のピクセルから刺激前の血流値を差し引いた物)の経時変化(8 bit階調で疑似カラー表示). スケールバーは, 5 mmを示す. (B) ラット咬筋筋腹(下側①, 中央②, 上側③, 尾側部④, 吻側部⑤)の血流変化値の経時変化. (C) 各部位の血流変化値(ピーク値)のまとめ. (D) 下側①と中央部②における刺激開始時間からのピーク到達時間のまとめ.  $n=7$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

が認められた(図8). 特に, 浅部咬筋下側を走行する顔面動脈の咬筋枝から筋腹下側, さらに中央部へと血流が拡散する様子が観察された(図8A). この結果は, 浅部咬筋に対する血液の大部分が顔面動脈の咬筋枝から供給される事を示すものであり, 外頸動脈の咬筋枝は深部に分布し, 顔面動脈の咬筋枝が浅部に分布するという解剖学的な知見(Suzuki, 1989)と一致する. 同様に交感神経性血管収縮反応時に認められる血流減少反応にも部位差が認められた(図9). 無刺激時の血流値が高値を示す部位(筋腹上側や下側)では, その他の部位と比較してより大きな血流減少反応が認められ(図7C & 9C), 一方で, 無刺激時の血流値が低値を示す部位(中央部や吻側部)では, 大きな血流増加反応が認められた(図7C & 8C). これらの結果は, 血流変動の大きさには, 静止時の血流量が影響することを示唆している. 骨格筋の筋線維は, 酵素組織化学的方法によりI線維, IIA線維およびIIB線維に分類されており(Brooke & Kaiser,

1970), それぞれの線維間で, その酸素要求性や張力発生の持久力などが異なる. これらの筋線維は, ラット咬筋中にもその存在が確認されており(Kiliaridis et al., 1988), 浅部咬筋では, 酸素要求性が高いIIA線維の割合が尾側部と比較して吻側部で多いと報告されている(Sano et al., 2007). 我々の血流動態観察の結果では, 吻側部では, 尾側部と比較してより大きな血流増加反応が認められたため, この結果から, 筋線維タイプの分布の違い, 特にその酸素要求性と血流増加反応との関連が示唆された.

今回の実験から, レーザースペックルイメージング法を用いることによって, ラット浅部咬筋では, 無刺激時, 血管拡張反応時ならびに血管収縮反応時の何れにおいても血流動態に部位差が有ることが判明した. これまでに松尾ら(1995)は, レーザードップラー血流計と2本の測定プローブを用いて, ラット浅部咬筋の吻側部と尾側部の血流動態に差が有ることを報告しているが, 筋



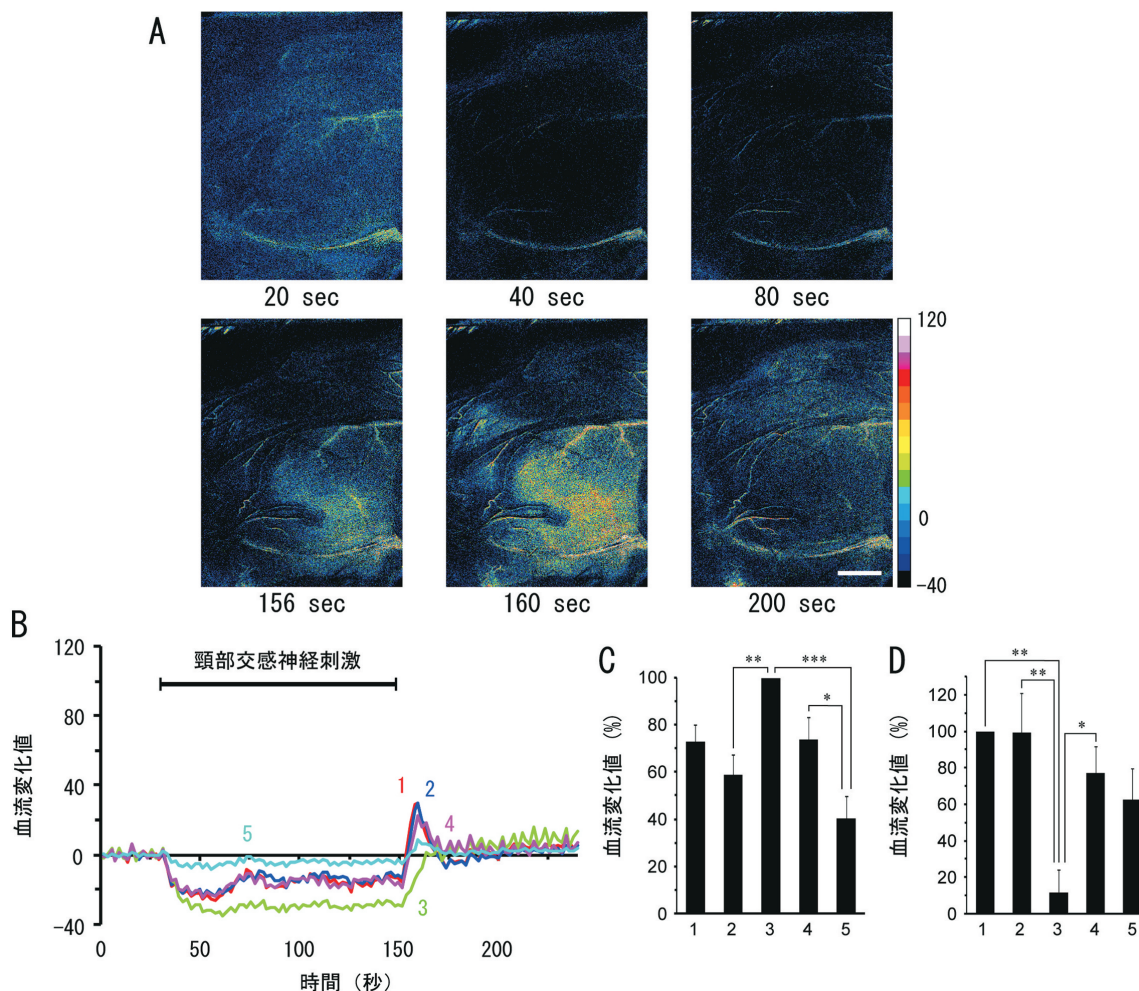


図9 ラット咬筋の交感神経性血管収縮反応

(A) スペックル画像 (各々のピクセルから刺激前の血流値を差し引いた物) の経時変化 (8 bit階調で疑似カラー表示). スケールバーは, 5 mmを示す. (B) ラット咬筋筋腹 (下側①, 中央②, 上側③, 尾側部④, 吻側部⑤) の血流変化値の経時変化. (C) 各部位の血流変化値 (ピーク値) のまとめ. (D) 血流回復層 (152-180秒) における各部位の血流変化値 (ピーク値) のまとめ. n=5. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

腹全体の血流動態の部位差ならびに血管拡張反応時に血液が供給されていく過程を観察したのは我々の報告 (Niioaka et al., 2009b) が初めてであり, レーザースペックルイメージング法の利点・特徴を十分に生かして得られた結果である.

また我々は近年, 顔面神経幹に伴行する神経栄養血管の血流動態および血流調節機序の解明を目的として, 同様にレーザースペックルイメージング法を用いた血流動態の観察を行った. 顔面神経栄養血管は, 太い部分でもその直径が約100 μmであり走行途中で複雑に分岐を繰り返す (図10). この様な血管の血流動態を分岐間で比較するといった様な詳細な解析も, レーザースペックルイメージング法を用いることで容易に行うことができると考えられる.

またレーザースペックルイメージング法は, 眼底血管 (Fujii, 1994; Shimazawa et al., 1999; Tomita et al., 1999; Hirose et al., 2008; Watanabe et al., 2008a), 脳血管 (Sakata et al., 2009; Tsukuda et al., 2009; Guo et al.,

2010; Iwanami et al., 2010; Nishio et al., 2010), 皮膚血流 (Yamamoto et al., 1993, 1995; Tawa et al., 2010), 腎単一ネフロンでの血流測定 (Holstein-Rathlou et al., 2011) 等, 様々な領域における基礎研究での血流測定にも導入されている.

さらに近年では, レーザースペックル現象を顕微鏡下で高倍率の対物レンズを使用して観察することによって, 植物あるいは動物の単一細胞における細胞質の流動を観察する試みがなされている (平川, 2007). 現在単一細胞の細胞動態の観察には, レーザー走査型蛍光顕微鏡が広く用いられている. これは, 細胞に蛍光指示薬あるいは, 遺伝子操作によって蛍光タンパク質を導入し, 特定波長のレーザー光により励起された蛍光を観察する手法であり, 特定分子群 (時には単一分子) の挙動を高時間分解能で画像データとして検出することが可能な手法である (顕微鏡コースブック, 2007). 蛍光タンパク質 (Green fluorescence protein, GFP) の発見は, 2008年に日本人 (下村脩) を含む研究グループがノーベル化学賞

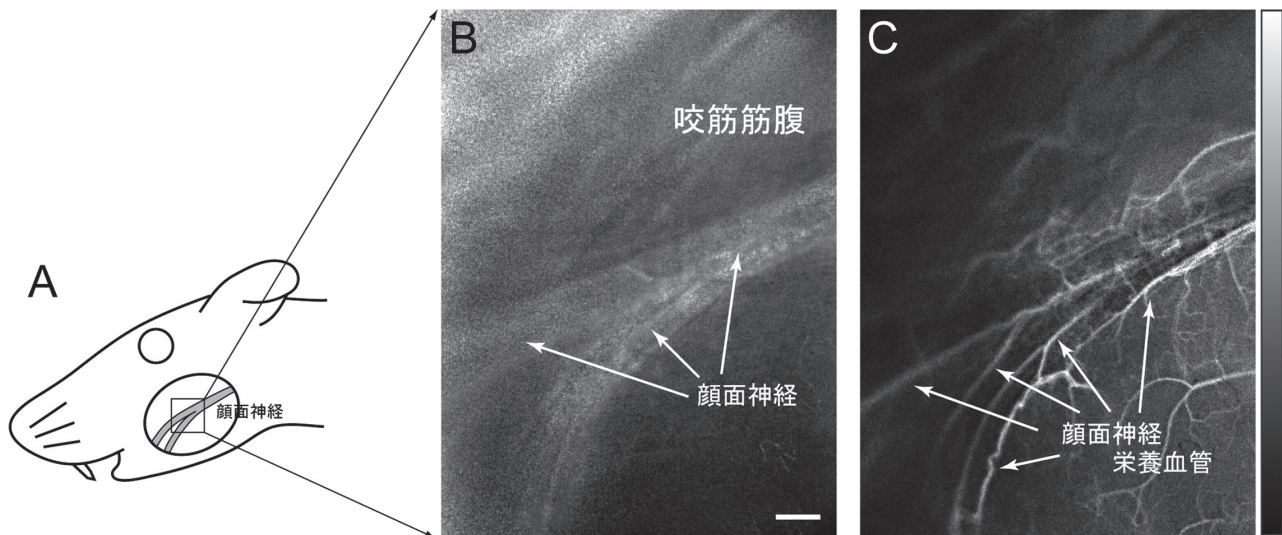


図10 ラット左側顔面神経とその栄養血管の実像とスペックル画像

(A) ラット頭部の模式図。(B) レーザースペックルイメージング血流計を用いて取得した顔面神経とその周囲の実像。(C) Bと同一部位のスペックル画像。スペックル画像では、血流量もしくは血流変化が大きい部位が高輝度で表される。スケールバーは、1 mmを示す。

を受賞したというニュースが記憶に新しく、世界中に多大な貢献をした。しかしその一方で、蛍光タンパク質や蛍光指示薬は比較的分子量が大きいので、蛍光物質で標識することが分子本来の挙動に与える影響を無視することはできない。現状では、単一細胞から検出されるレーザースペックルの変動が、どの分子に由来する物なのかを特定するには至っていないが、蛍光を検出する単一細胞の観察と比較して、細胞に対する処理を一切必要としない点が大きな利点であると言える。この例は、細胞質の流動を観察したものであったが、レーザースペックルイメージング法は対物レンズと組み合わせることも可能である。極端に高倍率にしてしまうと「広範囲の血流を観察できる」という利点を縮小してしまうが、適切な観察部位と倍率を選択することによって、血流測定範囲が広がることになるのではないだろうか。

## 第五章 レーザースペックルイメージング法の臨床応用

レーザースペックルイメージング法では、レーザー光を線状あるいは放射状に拡散させて組織に照射するため、レーザー光が網膜などの細胞に与える傷害性を無視できるレベルまで軽減することが可能である。加えて先に述べた広範囲の血流動態を高時間分解能で観察できるといった利点から、レーザースペックルイメージング法が最も臨床の場に導入されているのは、眼科領域である(鳥井ら, 1992; 前田ら, 2006; 廣石ら, 2008)。眼組織のうち、眼底に位置する脈絡膜、視神経乳頭ならびに網膜は、どれも眼球の光受容に重要な組織であり、その血液循環は、眼の生理的・病態生理的機能を考える上で非

常に重要である。臨床においては、血流測定方法が非侵襲的というのが最も重要な条件の一つであり、またある程度の範囲の血流を測定する必要もあるため、レーザースペックル原理の応用がいち早く進められ、国内でも眼底血管測定専用のレーザースペックル血流計が医療機器として認証を受けている (Softcare., Ltd; LSPG-NAVI)。臨床領域での眼科用レーザースペックルイメージング法の導入により、緑内障治療薬として用いられている交感神経遮断薬や脳血流の改善などに用いられているカルシウム拮抗薬が網膜、脈絡膜および視神経乳頭末梢循環に及ぼす影響などが報告され (Tamaki et al., 1996 a,b; 1997)、眼科臨床に興味深い情報を提供している。

また眼科領域以外では、もやもや病の患者や脳血管に動脈瘤を有する患者にバイパス手術を行う際に、術中の一時的な虚血や術後の血流回復を、簡便に、迅速に、そして非侵襲性に確認できるメリットからレーザースペックルイメージング法が使用されている (Hecht et al., 2009)。

## 第六章 レーザースペックルイメージング法の歯科領域への導入

歯科補綴領域では、義歯床下粘膜の血流動態の解明とこれを指標とした義歯の治療評価法の確立を目指して、レーザースペックルイメージング法を改良して歯科領域に適用し、予備実験として局所麻酔前後の口蓋粘膜の血流動態を測定した例が報告されている (大久保ら, 1998)。その結果、局所麻酔薬に含まれるエピネフリンの作用により、局所麻酔薬投与後の口蓋粘膜の血流が投与前と比較して有意に減少する様子を観察するのに成功

した。大久保らは、この口腔領域用に改良したレーザースペックルイメージング法が、義歯床下の広範囲にわたる口蓋粘膜の血流を二次元の画像データから視覚的に測定する事ができ、しかも部位間で血流値を比較しての評価ができることから、床下粘膜さらには義歯の評価に臨床応用することが可能であると考えている。

## 第七章 おわりに

本稿では、近年開発されたレーザースペックル血流計に関して、その原理の概要と基礎研究ならびに臨床の場での応用を紹介してきた。レーザースペックル血流計の最大の特徴・利点は、広範囲の血流動態を無侵襲・高時間分解能で連続的な画像データとして測定できるという点であり、様々な基礎研究の場や臨床の場（特に眼科領域）で用いられている。その一方で、サンプル表層の情報しか得ることができない、血流速度の絶対値を得ることができない、サンプルの動きが測定結果に影響してしまう等の欠点もあり、個々の特徴的には他の血流測定機器の方が勝る部分もある。そのため、必要に応じて最適な血流測定機器を選択することが最も重要であるが、これまでに開発されてきた血流測定法の中では、レーザースペックルイメージング血流計は、最もバランスの取れた機器の一つであり、今後も基礎研究および臨床、特に歯科領域にも新たな興味深いデータを提供することが予想される。

## 参考文献

- Blanksma NG, Van Eijden TM & Weijs WA. Electromyographic heterogeneity in the human masseter muscle. *J Dent Res* 71: 47–52, 1992.
- Brooke MH & Kaiser KK. Muscle fiber types : how many and what kind? *Arch Neurol* 23: 369–379, 1970.
- Eriksson PO & Thornell LE. Histochemical and morphological muscle fibre characteristics of the human masseter, the medial pterygoid and the temporal muscles. *Arch Oral Biol* 28: 781–795, 1983.
- Forrester KR, Stewart C, Tulip J, Leonard C & Bray RC. Comparison of laser speckle and laser Doppler perfusion imaging : measurement in human skin and rabbit articular tissue. *Med Biol Eng Comput* 40: 687–697, 2002.
- Forrester KR, Tulip J, Leonard C, Stewart C & Bray RC. A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion. *IEEE Trans Biomed Eng* 51: 2074–2084, 2004.
- Fujii H. Visualisation of retinal blood flow by laser speckle flow-graphy. *Med Biol Eng Comput* 32: 302–304, 1994.
- Guo Q, Wang G & Namura S. Fenofibrate improves cerebral blood flow after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 70–78, 2010.
- Haining JL, Turner MD & Pantall RM. Measurement of local cerebral blood flow in the unanesthetized rat using a hydrogen clearance method. *Circ Res* 23: 313–324, 1968.
- Hecht N, Woitzik J, Dreier JP & Vajkoczy P. Intraoperative monitoring of cerebral blood flow by laser speckle contrast analysis. *Neurosurg Focus* 27: E11, 2009.
- 平川靖之. レーザースペックル顕微鏡による生体細胞・組織活動のイメージング. *日本レーザー医学会誌* 28: 129–135, 2007.
- Hilton SM & Lywood DW. A photoelectric drop-counter. *J Physiol* 123: 64–66, 1954.
- 廣石悟朗, 廣石雄二郎, 長谷川裕平, 藤居 仁, 石橋達朗. 炭酸脱水酵素阻害点眼薬による視神経乳頭循環への影響. *臨床眼科* 62: 733–737, 2008.
- Hirose S, Saito W, Yoshida K, Saito M, Dong Z, Namba K, et al. Elevated choroidal blood flow velocity during systemic corticosteroid therapy in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Acta Ophthalmol* 86: 902–907, 2008.
- Hoffbrand BI & Forsyth RP. Validity studies of the radioactive microsphere method for the study of the distribution of cardiac output, orn blood flow, and resistance in the conscious rhesus monkey. *Cardiovasc Res* 3: 426–432, 1969.
- Holloway GA, Jr. & Watkins DW. Laser Doppler measurement of cutaneous blood flow. *J Invest Dermatol* 69: 306–309, 1977.
- Holstein-Rathlou NH, Sosnovtseva OV, Pavlov AN, Cupples WA, Sorensen CM & Marsh DJ. Nephron blood flow dynamics measured by laser speckle contrast imaging. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F319–F329, 2011.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Parasympathetic Vasodilator Fibers in Masseter Muscle. *Journal of Oral Biosciences* 49: 163–172, 2007a.
- Ishii H, Niioka T, Watanabe H & Izumi H. Inhibitory effects of excess sympathetic activity on parasympathetic vasodilation in the rat masseter muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R729–R736, 2007b.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Circulating adrenaline released by sympathoadrenal activation elicits acute vasodilatation in the rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 486–494, 2009a.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Difference between male and female rats in cholinergic activity of parasympathetic vasodilatation in the masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 533–542, 2009b.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Vagal visceral inputs to the nucleus of the solitary tract : involvement in a parasympathetic reflex vasodilator pathway in the rat masseter muscle. *Brain Res* 1312: 41–53, 2010.
- 石井久淑, 和泉博之. 咀嚼筋の自律神経系を介する血管拡張反応 骨格筋における新たな血流増加機構. *北海道医療大学歯学雑誌* 29: 1–22, 2010.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Parasympathetic reflex vasodilatation in the masseter muscle compensates for carotid hypoperfusion during the vagus-mediated depressor response. *Brain Res* 1370: 145–153, 2011.
- Ishii H, Niioka T, Sudo E & Izumi H. Evidence for parasympathetic vasodilator fibres in the rat masseter muscle. *J Physiol* 569: 617–629, 2005.
- Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Min LJ, Sakata A, Jing F, et al. Low dose of telmisartan prevents ischemic brain damage with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in diabetic mice. *J Hypertens* 28: 1730–1737, 2010.
- Izumi H & Karita K. Selective excitation of parasympathetic nerve fibers to elicit the vasodilatation in cat lip. *J Auton Nerv Syst* 37: 99–107, 1992a.

- Izumi H & Karita K. Somatosensory stimulation causes autonomic vasodilatation in cat lip. *J Physiol* 450: 191–202, 1992b.
- Izumi H & Karita K. Innervation of the cat lip by two groups of parasympathetic vasodilator fibres. *J Physiol* 465: 501–512, 1993.
- Izumi H & Karita K. Parasympathetic-mediated reflex salivation and vasodilatation in the cat submandibular gland. *Am J Physiol* 267: R 747–R753, 1994a.
- Izumi H & Karita K. The parasympathetic vasodilator fibers in the trigeminal portion of the distal lingual nerve in the cat tongue. *Am J Physiol* 266: R1517–R1522, 1994b.
- Izumi H. Reflex parasympathetic vasodilatation in facial skin. *Gen Pharmacol* 26: 237–244, 1995.
- Izumi H, Nakamura I & Karita K. Effects of clonidine and yohimbine on parasympathetic reflex salivation and vasodilatation in cat SMG. *Am J Physiol* 268: R1196–R1202, 1995.
- 和泉博之. 顔面領域での反射性副交感神経を介した血管拡張反応について. *循環制御* 16: 322–330, 1995.
- Izumi H, Ito Y, Sato M, Karita K & Iwatsuki N. Effects of inhalation anesthetics on parasympathetic reflex vasodilation in the lower lip and palate of the cat. *Am J Physiol* 273: R168–R174, 1997.
- Izumi H & Ito Y. Sympathetic attenuation of parasympathetic vasodilatation in oro-facial areas in the cat. *J Physiol* 510: 915–921, 1998a.
- Izumi H & Ito Y. Sympathetic attenuation of parasympathetic vasodilatation in oro-facial areas in the cat. *J Physiol* 510: 915–921, 1998b.
- Izumi H. Functional roles played by the sympathetic supply to lip blood vessels in the cat. *Am J Physiol* 277: R682–R689, 1999a.
- Izumi H. Nervous control of blood flow in the orofacial region. *Pharmacol Ther* 81: 141–161, 1999b.
- Izumi H, Nakamura I & Ishii H. Suppression of inferior alveolar nerve-induced vasoconstrictor response by ongoing cervical sympathetic nerve activity in cat. *Arch Oral Biol* 49: 1035–1041, 2004.
- 和泉博之. 顔面口腔領域での血管運動神経. *東日本歯学雑誌* 23: 153–174, 2004a.
- 和泉博之. 顔面口腔領域での副交感性血管拡張反応について. *東北大学歯学雑誌* 23: 11–25, 2004b.
- 和泉博之. 【三叉神経と顔面神経 update】機能解剖学 三叉神経—自律神経反射. *Clinical Neuroscience* 23: 988–989, 2005.
- Izumi H, Ishii H & Niioka T. Parasympathetic Vasodilator Fibers in the Orofacial Region. *Journal of Oral Biosciences* 48: 30–41, 2006.
- Karita K & Izumi H. Somatosensory afferents in the parasympathetic vasodilator reflex in cat lip. *J Auton Nerv Syst* 39: 229–234, 1992.
- Karita K & Izumi H. Dual afferent pathways of vasodilator reflex induced by lingual stimulation in the cat. *J Auton Nerv Syst* 45: 235–240, 1993.
- 顕微鏡コースブック 阪北. 講義と実習 生細胞蛍光イメージング, 原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰, 編: 共立出版株式会社, 2007.
- Kiliaridis S, Engstrom C & Thilander B. Histochemical analysis of masticatory muscle in the growing rat after prolonged alteration in the consistency of the diet. *Arch Oral Biol* 33: 187–193, 1988.
- Kobrine AI, Doyle TF & Martins AN. Spinal cord blood flow in the rhesus monkey by the hydrogen clearance method. *Surg Neurol* 2: 197–200, 1974.
- Koeda S, Ishii H, Kuchiiwa S & Izumi H. Role of the spinal trigeminal nucleus in the rat autonomic reflex. *Arch Oral Biol* 54: 1136–1142, 2009.
- Levine BA, Sirinek KR & Gaskill HV, 3rd. The radiolabeled microsphere technique in gut blood flow measurement—current practice. *J Surg Res* 37: 241–255, 1984.
- Lewis T. Observations upon the reactions of the vessels of the human skin to cold. *Heart* 15: 177–208, 1930.
- Love WD. Isotope Clearance and Myocardial Blood Flow. *Am Heart J* 67: 579–582, 1964.
- 前田祥恵, 今野伸介, 松本奈緒美, 大塚賢二. CCDカメラを用いた新しいレーザースペckルフローグラフィーによる健康人における視神経乳頭および網脈絡膜組織血流測定. *眼科* 48: 129–133, 2006.
- Matsuo R, Ikehara A, Nokubi T & Morimoto T. Inhibitory effect of sympathetic stimulation on activities of masseter muscle spindles and the jaw jerk reflex in rats. *J Physiol* 483: 239–250, 1995.
- Mizuta K, Karita K & Izumi H. Parasympathetic reflex vasodilatation in rat submandibular gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R677–R683, 2000.
- Mizuta K, Mizuta F, Takahashi M, Ishii H, Niioka T & Izumi H. Effects of isoflurane on parasympathetic vasodilatation in the rat submandibular gland. *J Dent Res* 85: 379–383, 2006.
- Niioka T, Ishii H & Izumi H. Involvement of vasoactive intestinal polypeptide in the parasympathetic vasodilatation of the rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 909–916, 2009a.
- Niioka T, Ishii H & Izumi H. Regional differences in blood flow variation in rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 1022–1028, 2009b.
- Nishio K, Ihara M, Yamasaki N, Kalaria RN, Maki T, Fujita Y, et al. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* 41: 1278–1284, 2010.
- 大久保昌和, 松本敏彦, 成田紀之, 飯島守雄, 小林久純, 伊藤誠康, 中庭敏博, 藤井 居. 歯科用血流画像化装置の開発. *日本補綴歯科学会雑誌* 42: 754–759, 1998.
- Reid JM & Spencer MP. Ultrasonic Doppler technique for imaging blood vessels. *Science* 176: 1235–1236, 1972.
- Riva C, Ross B & Benedek GB. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 11: 936–944, 1972.
- Sakata A, Mogi M, Iwanami J, Tsukuda K, Min LJ, Fujita T, et al. Sex-different effect of angiotensin II type 2 receptor on ischemic brain injury and cognitive function. *Brain Res* 1300: 14–23, 2009.
- Samueloff S, Miday R, Wasserman D, Behrens V, Hornung R, Asbury W, et al. A peripheral vascular insufficiency test using photo-cell plethysmography. *J Occup Med* 23: 643–646, 1981.
- Sano R, Tanaka E, Korfage JA, Langenbach GE, Kawai N, van Eijden TM, et al. Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. *J Anat* 211: 464–470, 2007.
- Sequeira RF, Light LH, Cross G & Raftery EB. Transcutaneous aortovelography. A quantitative evaluation. *Br Heart J* 38: 443–450, 1976.
- Shepherd JT, Rusch NJ & Vanhoutte PM. Effect of cold on the blood vessel wall. *Gen Pharmacol* 14: 61–64, 1983.
- Shimazawa M, Sugiyama T, Azuma I, Araie M, Iwakura Y, Watari M, et al. Effect of lomerizine, a new Ca<sup>2+</sup> channel blocker, on the microcirculation in the optic nerve head in conscious rabbits: a study using a laser speckle technique. *Exp Eye Res* 69: 185–193, 1999.
- Stern MD, Lappe DL, Bowen PD, Chimosky JE, Holloway GA, Jr., Keiser HR, et al. Continuous measurement of tissue blood flow by laser-Doppler spectroscopy. *Am J Physiol* 232: H441–H448, 1977.

- Sudo E, Ishii H, Niioka T, Hirai T & Izumi H. Parasympathetic vasodilator fibers in rat digastric muscle. *Brain Res* 1302: 125–131, 2009.
- Suzuki T. Arterial supply to the masseter muscle in the rat. *Kaibogaku Zasshi* 64: 8–17, 1989.
- 高木健太郎, 永坂鉄夫. 末梢循環とその病態生理, 末梢循環研究会, 編VII 皮膚: 東京大学出版会, 1967, 241–257.
- Tamaki Y, Araie M, Tomita K & Tomidokoro A. Time-course of changes in nicardipine effects on microcirculation in retina and optic nerve head in living rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol* 40: 202–211, 1996a.
- Tamaki Y, Araie M, Tomita K & Tomidokoro A. Time change of nicardipine effect on choroidal circulation in rabbit eyes. *Curr Eye Res* 15: 543–548, 1996b.
- Tamaki Y, Araie M, Tomita K, Tomidokoro A & Nagahara M. Effects of topical adrenergic agents on tissue circulation in rabbit and human optic nerve head evaluated with laser speckle tissue circulation analyzer. *Surv Ophthalmol* 42: S52–S63, 1997.
- Tawa H, Rikitake Y, Takahashi M, Amano H, Miyata M, Satomi-Kobayashi S, et al. Role of afadin in vascular endothelial growth factor- and sphingosine 1-phosphate-induced angiogenesis. *Circ Res* 106: 1731–1742, 2010.
- Tomita K, Araie M, Tamaki Y, Nagahara M & Sugiyama T. Effects of nilvadipine, a calcium antagonist, on rabbit ocular circulation and optic nerve head circulation in NTG subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1144–1151, 1999.
- 鳥井秀雄, 中村隆平, 藤居 仁, 他. 網膜剥離眼におけるレーザーバックル法による眼底血流画像化. *眼科臨床医報* 86: 1957–1962, 1992.
- Tsukuda K, Mogi M, Iwanami J, Min LJ, Sakata A, Jing F, et al. Cognitive deficit in amyloid-beta-injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Hypertension* 54: 782–787, 2009.
- Van Eijden TM & Raadsheer MC. Heterogeneity of fiber and sarcomere length in the human masseter muscle. *Anat Rec* 232: 78–84, 1992.
- Watanabe G, Fujii H & Kishi S. Imaging of choroidal hemodynamics in eyes with polypoidal choroidal vasculopathy using laser speckle phenomenon. *Jpn J Ophthalmol* 52: 175–181, 2008a.
- 渡邊秀和, 新潟丈治, 石井久淑, 和泉博之. 二次元レーザー血流計を用いた血流測定の特徴. *北海道医療大学歯学雑誌* 25: 109–117, 2006.
- Watanabe H, Ishii H, Niioka T, Yamamuro M & Izumi H. Occurrence of parasympathetic vasodilator fibers in the lower lip of the guinea-pig. *J Comp Physiol B* 178: 297–305, 2008b.
- Wells PT, Halliwell M, Skidmore R, Webb AJ & Woodcock JP. Tumour detection by ultrasonic Doppler blood-flow signals. *Ultrasonics* 15: 231–232, 1977.
- Yamamoto Y, Ohura T, Nohira K, Sugihara T & Fujii H. Two-dimensional analysis of hemodynamic changes in axial and random pattern flaps. *J Reconstr Microsurg* 11: 333–337; discussion 338, 1995.
- Yamamoto Y, Ohura T, Nohira K, Sugihara T, Minakawa H, Igawa H, et al. Laserflowgraphy: a new visual blood flow meter utilizing a dynamic laser speckle effect. *Plast Reconstr Surg* 91: 884–894, 1993.
- Yasuda M & Izumi H. Trigeminal nerve-mediated reflex arterial blood pressure decrease and vasodilatation in lower lip of the rabbit. *Brain Res* 987: 59–66, 2003.
- Young CM & Hopewell JW. The evaluation of an isotope clearance technique in the dermis of pig skin: a correlation of functional and morphological parameters. *Microvasc Res* 20: 182–194, 1980.



新潟 丈治  
北海道医療大学 薬学部 人間基礎科学講座 (生物学)

略歴

平成12年3月 昭和大学 薬学部 卒業  
 平成12年4月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士前期課程入学  
 平成14年3月 同 修了  
 平成14年3月 学位取得 (薬学修士 昭和大学第566号)  
 平成14年4月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士後期課程入学  
 平成16年4月 北海道医療大学 歯学部 口腔生理学講座 助手  
 平成17年3月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士後期課程修了  
 平成17年3月 学位取得 (薬学博士 昭和大学第1898号)  
 平成19年4月 北海道医療大学 歯学部 口腔生物学系 生理学分野 助教 (名称変更)  
 平成23年4月 北海道医療大学 薬学部 人間基礎科学講座 (生物学) 講師  
 現在に至る