

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18416

研究課題名(和文)皮下挿入式顕微鏡で血管形状変化をとらえる血行モニタリングシステムの開発

研究課題名(英文) Research for a flap monitoring system which catches changes in the form of blood vessels under a subcutaneously inserted microscope.

研究代表者

倉林 孝之 (Kurabayashi, Takashi)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：60513231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では皮弁の裏面に小型顕微鏡を挿入して微細血管の形状変化をとらえることで血管閉塞を判定する皮下挿入式の新しいタイプの血行モニタリングデバイスの開発を目指しラットの皮弁裏面の微細血管像を顕微鏡で観察し皮弁を栄養する血管茎を閉塞させた前後における皮弁内血管の形状変化の特徴量の抽出を行った。血管閉塞の方法は3通りで1)動脈のみ、2)静脈のみ、3)動脈と静脈の同時閉塞とした。得られたデータを数理解析ソフトMATLABで処理し解析を行った。血管茎の閉塞に伴い、皮弁の血管形状は即座に変化し、その特徴を蛇行率として抽出することが有用で血行モニタリングへの応用に有用であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植医療の成否をわける重要な作業として血行モニタリングがある。移植は必要な組織を必要な場所に移し血管をつないで生かすはじめて成功といえる。血行モニタリングとはつないだ血管が通っていて組織にしっかりと血流が流れているかを確かめる作業であるが自動化されておらず、人の目に頼っている。コンピューターによる組織内血管の形状変化をとらえる血行モニタリング方法は疲れ知らずで連続観察できる。さらに血管の閉塞に即座に反応することから信頼性の高い血行モニタリング方法である。これにより医療者の労力の軽減のみならず、人の判断の過ちを排することで安定した移植医療を提供することができる。

研究成果の概要(英文)：We performed a fundamental study on free flap monitoring using subcutaneous microscopy to detect capillary transformation. In a microscope under white and infrared light, we observed the vascular shape changes in the rat groin flap in reaction to pedicle clumping. The flap pedicle vessels were clumped in three ways:1)arterial pedicle, 2)venous pedicle, 3)Arterial and venous pedicles were clumped. Image data were processed and analyzed by MATLAB. The flap vessels were transformed instantly to react with pedicle compromise. Several tendencies of the vascular shape transformation were observed. Venous pedicle clamping and venous and arterial pedicle clamping distorted the veins in the flaps. Arterial pedicle clamping loosed the tension of the arteries in the flaps and transformed them into relatively straight forms. Free flap monitoring using subcutaneous microscopy by detecting capillary transformation might allow the development of a new monitoring device.

研究分野：形成外科学(マイクロサージャリー)

キーワード：血行モニタリング 皮弁 赤外光 自然光 血管形状 MATLAB

1. 研究開始当初の背景

マイクロサージャリーの発展により、1970年代には必要とされる組織を必要とされる場所に自由自在に移植できるようになった。必要とされる組織のセットを皮弁と呼び、さらに皮弁の血管が切り離され、異なる場所で血管がつなぎなおされる場合は遊離皮弁と呼ばれる。遊離皮弁には皮膚、脂肪組織をはじめ筋肉組織、骨組織、神経などさまざまなものを含めることができ、まさに欠損部を再建するための最終兵器である。これにより適切な再建を行えるため、悪性腫瘍を必要な範囲で切除できることから外科学に革命的な進化をもたらした。

ここで移植医療の成否をわける重要な作業として血行モニタリングがある。移植は必要な組織を必要な場所に移し血管をつないで生かしてはじめて成功といえる。血行モニタリングとはつないだ血管が通っていて組織にしっかりと血流が流れているかを確認する作業である。実はこの作業が人の目に頼らざるをえず、いまだに自動化されていないままである。組織に血流が保たれているかはまず組織を見て触れて確かめる。動脈が通っていれば赤みがありやわらかく温かい。静脈がつまって血液の出口がなくなれば紫色になり硬くなる。さらに針で実際に刺して実際に血がでるかを確認する。これらは至極簡単な作業に思えるが、判断基準が曖昧で生身の人間が行うため、評価が不安定になる。このことが移植医療で常に問題となってきた。人は生き物であり当然ながら疲れる。長い手術の後は疲れており、再手術は避けたい願望がある。手術は成功していると信じたいという「甘さ」が判断を曇らせる。血管が詰まっているならばなるべく早くにつなぎ直しをしなければならぬが、血管は通っているに違いないという誤った評価のまま手遅れとなる失敗が常に起こりうる。にもかかわらず血行モニタリングが依然として人の目に頼るのには理由がある。ひとえに、信頼できる機器がない。この言葉に集約される。ここで“信頼できる”の定義は“血管の閉塞を遅滞なくリアルタイムに正確に検知できる”である。組織酸素飽和度、サーモグラフィなどの技術は血管が閉塞してから観測値に反応がでるまで時間がかかりすぎてしまう。マイクロサージャリーの学術分野ではさまざまな方法が試されてきているが、信頼できる自動血行モニタリングはいまだ実用化されていない。そこで我々は組織内血管の形状変化をとらえる新しい血行モニタリング方法を提案した(平成28年度～平成30年度科研費、若手研究)。皮弁内の血管の形状変化は数秒であらわれることから、血管閉塞を遅滞なく検知することが可能である。まさに理想といえる方法である。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を臨床応用するにあたり、カメラで体外から皮弁を観察した場合、患者が動かない特殊な状況でないかぎり、対象となる血管を常にとらえていることができないという課題が生じた。また、体表の皮膚を通して血管を外から観察する場合、ノイズが多く発生することも障壁となる。これらの問題はつきつめるとカメラが非接触式であることに起因する。であるならばカメラを“接触式”とすることが解となりうる。小型化したカメラを皮弁の裏に挿入し、皮下の血管を近接して観察する方式で血管形状判定による血行モニタリングを行えばよい。取得される画像は必然的に顕微鏡レベルとなるが、ミクロで血管の形状変化をとらえる研究がなされていない。すなわち、研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「顕微鏡カメラで皮弁裏面の血管を近接して観察することで血管閉塞を検知できるか」となる。すなわち本研究の目的は、カメラを皮弁の裏面に近接させて微細血管像を収集し、血管閉塞の検知に適した特徴変化を有するかを明らかにすることである。

血管の形状を的確にとらえるためには、カメラが皮弁の裏面に密着していなくてはならない。ゆえに目指すものは皮弁の裏面に留置する新しいタイプの血管モニタリングデバイスとなる。超音波検査で血流を調べる方法も考えられるが、超音波端子は高価なうえ小型化しにくい。一方、顕微鏡カメラはレンズ径を数mmまで小さくでき、材料としては数千円程度と安価である。手術創部に血液や浸出液が溜まらないように挿入する管をドレーンと呼ぶが、カプセル内視鏡のようなカメラを先端に配置したドレーン型の端子はコスト的にも採用されやすい。本研究がマイクロサージャリーの分野で悲願となる理想的な血管モニタリングデバイスの開発につながると思われる。

3. 研究の方法

本研究では顕微鏡で焦点距離の限界まで近接させて皮弁内血管を観察し、画像データを収集する。そして、皮弁を栄養する主要血管を閉塞させた前後における皮弁内血管の形状変化のパターンが血管閉塞を検知するに十分な特徴を有しているかを明らかにした。

(1) ラット腹壁皮弁の血管閉塞データ収集

ラットの腹壁皮弁内血管を顕微鏡で焦点距離の限界まで近接させて観察する実験系を確立させ画像データを収集した。

Wistar系ラットを用い、浅腹壁動静脈が支配領域となる腹部の島状皮弁を挙上した(図1)。浅腹壁動静脈の血管径は細いため、実際は浅腹壁動静脈を分枝する大腿動静脈を茎とする皮弁を挙上する。皮弁

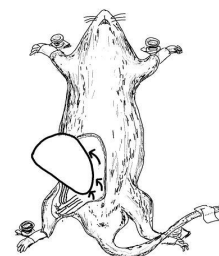


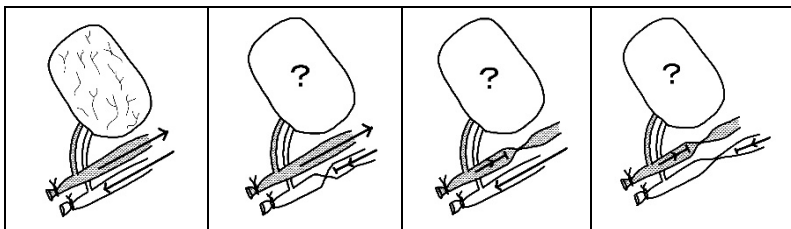
図1: ラット腹壁皮弁

を反転し、裏面を観察対象とした。

顕微鏡カメラからなる観測器材の組立とシステムを確立した。画像観測には反射光方式を採用した。照射光は自然光と赤外光の2種類を採用した。

大腿動脈、大腿静脈のそれぞれを血管クリップで摘み(クランプ)血管を閉塞させた状態を作った。血管閉塞のパターンは動脈のみの閉塞、静脈のみの閉塞、動脈及び静脈の同時閉塞の3パターンとした(表1)。血管の閉塞の前後で皮弁内血管の観察を行い、画像データを収集した。

表1: 血管閉塞のパターン



(2) 画像データの加工と解析

画像データを MathWorks 社の数理解析ソフトウェアである Matlab で処理し、血管閉塞を捉える適切な画像処理の方法を模索した。まず、収集されたデータの血管描出部位の区画抽出を行い、ノイズ除去と画像の鮮明化を行った。次に、特徴点及び特徴量を取り出すために適した画像処理法の開発を行った。

3) 血管閉塞検知プログラムの確立と有効性の検討

血管閉塞前後の画像の特徴量を数値化して抽出し比較検討することで血管閉塞を認識するためのアルゴリズムを考案した。

4. 研究成果

- (1) 動静脈の閉塞によるラット皮弁内の血管の顕微鏡下での特徴的な変化が以下のように明らかとなった。静脈のみの閉塞では皮弁の血管は蛇行する。動脈のみの閉塞では、蛇行が和らぎ直線的となる。動脈及び静脈の閉塞では血管は静脈のみの閉塞と同様に蛇行する。
- (2) コンピューターの目 (Computer Vision) に血管の特徴量をとらえさせることを目指し、数理解析ソフトウェアである MathWorks®社の Matlab で画像の鮮明化及び画像の特徴量抽出のプログラム開発を行った。

画像の鮮明化

以前の研究で弱拡大の画像で行った Ridler and Calvardらのバックグラウンドを除去する方法を利用した Coyeの網膜血管鮮明化プログラム⁽¹⁾を採用したところ、血管を鮮明に描出できた。次にこの画像をスケルトナイズ(細線化)して、小さい枝を取り除いた。(図2)。なお赤外光の映り込み(グレア)は一定以上の輝度をグレア周囲の低い輝度となじませるプログラムで事前処理した。

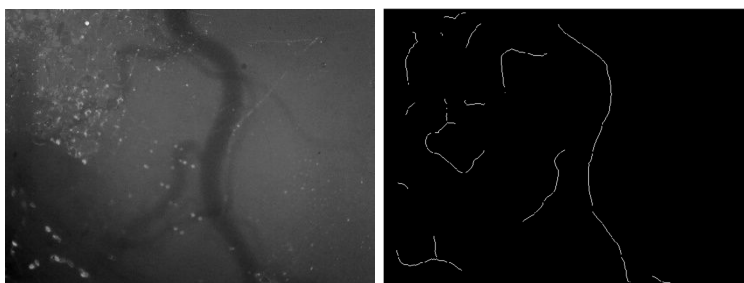
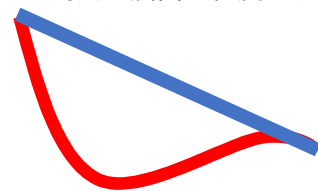


図2 血管閉塞前の赤外線画像(左)と血管の鮮明化画像(右)

画像の特徴量抽出

血管の特徴的な変化をコンピューターで認識させるためには、血管の形状変化を数値化する必要がある。以前の我々の研究で形状の特徴抽出に有用であった河川の屈曲の程度を表す、蛇行率(図3)を採用した。算出プログラムでは Matlab の蛇行率に関するインストラクションを参考とした。血管の分岐点で分断を行い、ノイズ除去を行った。断片化された曲線の端点間の距離をユークリッド距離で、曲線の全長を準ユークリッド距離で求め、蛇行率(全長/直線距離)を算出した(図4)。具体的には、まず画像を細線化処理して血管を鮮明化させ、分岐点を検出し、分岐点で分断した。さらに小さい線分はノイズとして排除し、分断された曲線のそれぞれの蛇行率を計算し、平均値を算出した。Pixel 画像の距離の計測には、二点間の直線距離はピタゴラスの定理によるユークリッド距離を、曲線に沿った距離の計測には準ユークリッド距離(縦横方向には1を、斜め方向には2を積算する算出方法)を採用した。ここで強拡大下の顕微鏡画像で蛇行率の平均を計算するにあたり、赤外光下の弱拡大の画像では生じなかった問題点が明らかとなった。弱拡大



蛇行率=全長/直線距離

図3 蛇行率の計算方法

下では主に皮弁の大きな静脈のみが描出されるが、顕微鏡の強拡大下では静脈と動脈ともに描出される血管及び、枝の分岐点が増加することで蛇行度の変化がみられる成分（有効成分）が、蛇行の変化が少ない成分（無効成分）に埋もれてしまい、全体として有意な蛇行率平均の変化を生まない。

A) 静脈閉塞及び動脈及び静脈の同時閉塞

動脈の閉塞に関わらず、静脈の閉塞があると皮弁内の血管、特に静脈の蛇行率は上昇する。人の目で静脈をトレースした場合はほぼ確実に形状変化をとらえることは可能である。Computer Visionへつなげるためにも静脈のみを抽出するプログラムの開発を行った。動脈などの細かい成分を可及的に除去して皮弁静脈の蛇行率を計算した（図5）。しかし、様々な画像の全てには対応できず、静脈閉塞に伴う普遍的な変化の検出にはさらなるプログラムの洗練が必要である。

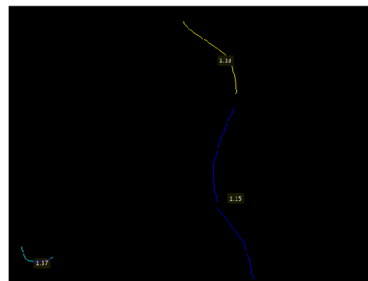


図4 血管断片の蛇行率

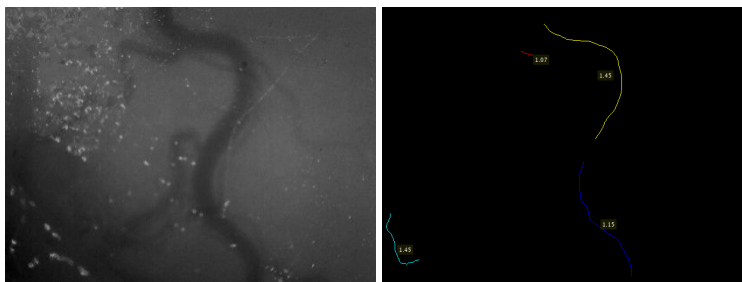


図5 赤外光の静脈閉塞時画像（左）と蛇行率計算の処理画像（右）

B) 動脈閉塞

動脈の閉塞があると、皮弁内の血管、特に動脈の蛇行度が低下する。こちらも人の目で皮弁内の動脈をトレースすれば確実にその変化を検出できる。動脈閉塞を蛇行率の平均値で検出するためには、いかに皮弁内の動脈と静脈を分離するかという課題を克服する必要がある。我々は以下の3種類の方法で動脈と静脈の分離を試みた。

i. 二階偏導関数よりなる Hesse 行列

Hesse 行列 $H(f)_{ij}(x) = \nabla_i \nabla_j f(x)$ を利用して周囲との明るさとの対比で静脈の検出を試み、静脈成分の除去を行った（図6）。高輝度となる部分を除去すると大きな静脈成分を削ることができた。しかし、蛇行率の変化を検出するには不十分な分離能力であった。しかし、Hesse 行列による血管の描出能力は高く、以後の血管検出のプログラムに組み込んだ。

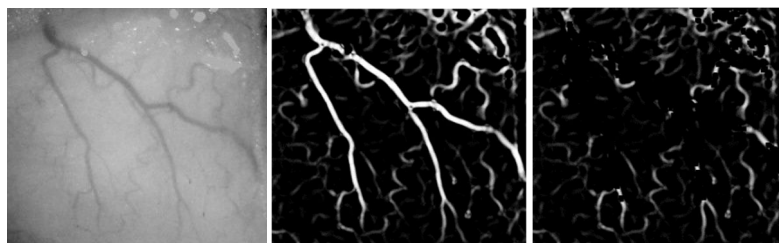


図6 Hesse 行列を用いた静脈除去

ii. L*a*b* 色空間

動脈を静脈から分離するためにはやはり色で分離するのが合理的と考えられた。しかし、血管の色の識別は人の目では可能であるが、Computer Visionでは工夫が必要となる。色の違いを距離で数値化できる L*a*b*色空間を利用することとした。L*a*b*色空間の人の視覚を近似した架空の色空間で色を数値化できる。なお、L*a*b*色空間内の「色」の大部分は人間の視覚の色域外となる。L*は明度、a*とb*は色度レイヤーを表し、a*は赤-緑軸方向、b*は青-黄軸方向である。本研究のプログラムでは図7のように青、黄、赤、緑の配色（図7中）はa*（図7上）b*（図7下）と変換される。血管は赤が基本色となるため、動脈と静脈の違いはa*は赤-緑軸方向ではなくb*の青-黄軸方向が有用と考えられた。しかし、数値差が小さく、動脈と静脈の分離には不十分であった（図8）。しかし、動脈閉塞時にb*方向で皮弁内の血管全体が暗くなる傾向の見られる画像があり、色空間への変換のパラメータなどの調整によっては動脈閉塞の検知に利用できる可能性がある。

左：元画像、中：Hesse 行列による血管描出、右：静脈除去画像

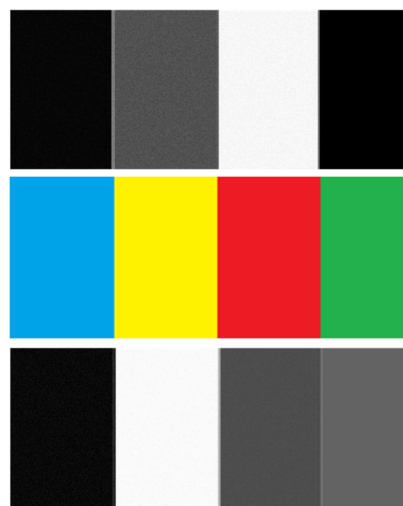


図7 L*a*b*色空間

iii. 自然光と赤外光の同時撮影

赤外光では主に静脈が描出されるため、赤外光で静脈を検出し、それをマスクとして自然光画像から静脈成分を引き算して動脈成分を描画し、蛇行率を計算した(図9)。プログラムの試行錯誤を繰り返したが、動脈閉塞時に蛇行率の変化をとらえる程度までの十分な精度には至らなかった。

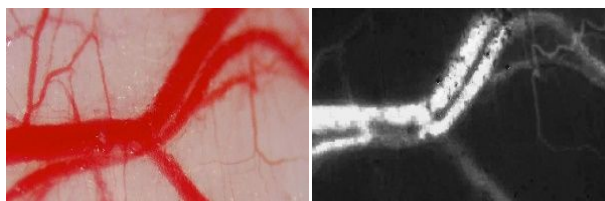


図8 閉塞前の自然光画像(左)とb*画像(右)



図9 赤外光画像(左)の静脈画像を自然光画像(中)から引き算し、動脈の蛇行率を計算した(右)

(3)本研究による血行モニタリングは、血管の形状という高次の次元(2次元行列)を反映する値で血管閉塞を判定する点で、1つの対象変数(1次元)で血管閉塞の判定を行う酸素飽和度などを用いる方法よりも信頼性の高い方法となりうる。また血管閉塞時の皮弁内の血管形状の反応は即時的であり、マイクロサージャリーで悲願である移植組織の血行の連続モニタリングデバイスの実現にとどまらず、組織の血流の評価が必要となる他の臨床分野への貢献が期待できる。Computer Vision へ向けてはまだ課題が残るが、人の目で捉えられる現象は必ず Computer Vision へ翻訳できると考えられるため、動脈と静脈の分離、細い成分の除去の方法をさらに洗練させれば、血管形状変化を検出する方法は有望である。

<引用文献>

- (1) Tyler L. Coye の公開 Matlab プログラム : Computer Assisted Retinal Blood Vessel Segmentation Algorithm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 倉林孝之、朝戸裕貴、鈴木康俊、曾根田寛幸、横井公一、竹口修平
2. 発表標題 皮下挿入式顕微鏡による血行モニタリングシステムの開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Kurabayashi, Hiroataka Asato, Yasutoshi Suzuki
2. 発表標題 Free flap monitoring using subcutaneous microscopy by detecting capillary transformation
3. 学会等名 15th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------