

レーザースペckル現象を利用した網膜血管血流速度の測定

—第1報 第二分枝以後の網膜静脈血流速度の測定—

永原 幸¹⁾, 玉置 泰裕²⁾, 新家 真¹⁾, 藤居 仁³⁾

¹⁾東京大学医学部附属病院分院眼科, ²⁾東京都老人医療センター眼科, ³⁾九州工業大学情報工学部

要 約

レーザースペckル現象を利用した二次元解析装置を用いて、ヒト網膜静脈血管血流速度の定量測定を行った。末梢血流速度の定量指標として用いた *normalized blur* (NB) 値は、*in vitro* におけるガラス毛細管とヒト血液を用いた測定の結果、血流速度、ガラス毛細管の直径とその背景血流によって測定値が異なることがわかった。*In vitro* 実験で得られた結果を基に作製したノモグラムから、正常人(16眼)の第2分枝以後の網膜静脈(血管径約50 μm)の網膜静脈血流速度を算出した。測定に必要な時

間は一人平均63秒、再現性指数2.5%、平均血流速度 $11.1 \pm 0.6 \text{ mm/sec}$ (平均値 \pm 標準偏差, $n=16$)であった。結果は従来の報告とほぼ一致しているが、測定は従来のレーザードップラーまたは類似の方法より簡便に、かつ被験者の負担も軽く行えた。(日眼会誌 101: 173-179, 1997)

キーワード：血流速度、ヒト網膜静脈血管、レーザースペckル

Measurements of Blood Flow Velocity in Human Retinal Veins Using Laser Speckle Flowgraphy System

Miyuki Nagahara¹⁾, Yasuhiro Tamaki²⁾, Makoto Araie¹⁾ and Hitoshi Fujii³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo Branch Hospital

²⁾Eye Clinic, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

³⁾Department of Computer Science and Electronics Kyushu Institute of Technology

Abstract

We measured the blood flow velocity in human retinal veins using a laser speckle flowgraphy system. This system consists of a fundus camera, a diode laser, an image sensor and a personal computer system. The fundus is illuminated with a diode laser through a fundus camera and the laser speckle pattern is imaged onto the area sensor. From the time change of contrast of speckle pattern, *normalized blur* (NB) value, a quantitative index of tissue blood velocity, was calculated by means of a logistic board, and two-dimensional distribution of NB in the measurement field was displayed in a color display. In the *in vitro* experiment, the NB obtained from the blood flow in a glass capillary tube was

correlated with the diameter of the tube, background NB value and the blood flow rate actually measured. In the *in vivo* experiment, the blood velocity in human retinal veins of approximately 50 μm in diameter was estimated in 16 normal eyes using nomograms based on the results of the *in vitro* experiment. Velocity averaged $11.1 \pm 0.6 \text{ mm/sec}$ (mean \pm standard deviation, $n=16$) in retinal veins of $53 \pm 6 \mu\text{m}$ in diameter and the reproducibility index of the *in vivo* measurements was $2.5 \pm 0.9\%$. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 173-179, 1997)

Key words: Blood flow velocity, Human retinal veins, Laser speckle

I 緒 言

生体眼における網膜血管の血流速度測定法としては、

既にレーザードップラー法¹⁾⁻⁴⁾, またはそれに類似した方法、蛍光色素を利用した色素希釈法⁵⁾⁻⁸⁾, scanning laser ophthalmoscopy⁹⁾⁻¹¹⁾を利用した方法が報告され

別刷請求先: 112 東京都文京区目白台3-28-6 東京大学医学部附属病院分院眼科 永原 幸

(平成8年6月13日受付, 平成8年9月11日改訂受理)

Reprint requests to: Miyuki Nagahara, M.D. Department of Ophthalmology, University of Tokyo Branch Hospital, 3-28-6, Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan

(Received June 13, 1996 and accepted in revised form September 11, 1996)

ている。しかし、従来これらの方法では、測定範囲が狭いため位置の同定に時間がかかる、被検者の良好な固視が要求される、蛍光色素を静注する必要がある、いったん映像をビデオに落とし、改めて解析する必要があるなど、簡便に網膜末梢循環を解析するまでには至っていない。網膜循環は end artery 系であり、乳頭近傍の太い血管よりも第二分枝以降の血管系の変化が眼局所の生理、または病理をより忠実に反映すると考えられる。今回、我々は簡便により末梢側の網膜静脈血流速度を生体眼で測定することを目的とし、レーザースペckル現象を応用した方法の開発を試みた。

II 方法

1. 機器

既に報告¹²⁾¹³⁾した半導体レーザーによる眼底末梢循環測定装置を利用した。レーザー光を物体に対し照射すると観察面で干渉し、スペckルパターンというランダムな模様形成され¹⁴⁾、生体組織では血流速度と照射時間に依存したコントラストの変化として捕える。このコントラストの変化を 100×100 ピクセルで毎秒 540 フレーム撮像可能な素子を用いたエリアセンサー (Base-stored image sensor, Canon) で定量的に測定し、normalized blur (NB) 値を血流速度の定量指標として用いた¹²⁾¹³⁾。解析画面では 1 ピクセル毎に算出された NB 値を 100×100 ピクセルの二次元カラーマップで表示し、血流速度の分布を視覚的に捕えることができる。

2. モデル実験におけるレーザー出力、ヘマトクリット、背景反射率、吸光度および NB 値の関係

作動距離 45 mm の位置でのレーザー出力をレーザー出力計測器 (OPM-370 L, Sanwa) を用いて測定し、出力特性を検討した。

両面砂打ちすりガラス回転板 (直径 90 mm, 厚さ 2 mm) を作動距離 45 mm の位置に設置、回転速度を変化させ 0.125 秒間隔で 5.5 秒間、3 回測定し、その平均値を測定値とした。また、一定速度で回転させレーザー出力の変化に対する NB 値の測定を行った。

ガラス毛細管 (内径 $160 \mu\text{m}$) を閉鎖循環回路とし、噴出精度 1% 以内のペリスタルティックポンプ (PST-100, Iwaki) を用いてヒト血液 (赤血球数 $444 \text{ 万}/\mu\text{l}$ 、ヘマトクリット 44%) を一定速度 (10 mm/sec) で循環させ、さらに、水晶体後面から網膜までの距離を 16 mm、また、角膜と水晶体の屈折を 60 D と仮定し、前記装置におけるガラス毛細管の前方 16 mm の所に 60 D の非球面レンズ (60 DCC, Nikon) を設置した装置を試作した (図 1)。レーザー出力 (1.5~4.0 mW) を変化させ、測定は各レーザー出力において 0.125 秒間隔で 5.5 秒間、同一部位で 3 回行い、その平均値を測定値としガラス毛細管の幅 1 ピクセル毎の NB 値の解析を行った。NB 値はガラス毛細管の中央で最も高くなったことから (図 2)、基準とす

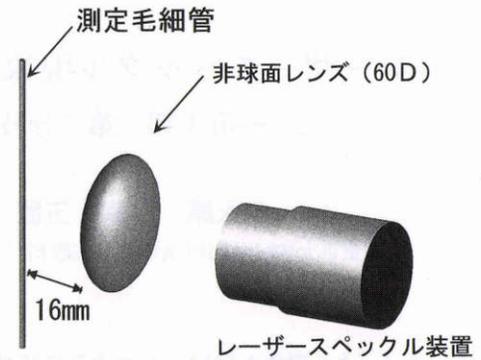


図 1 実験装置の模式図。

スペckル装置の測定特性を得るため、血管モデルを試作した。

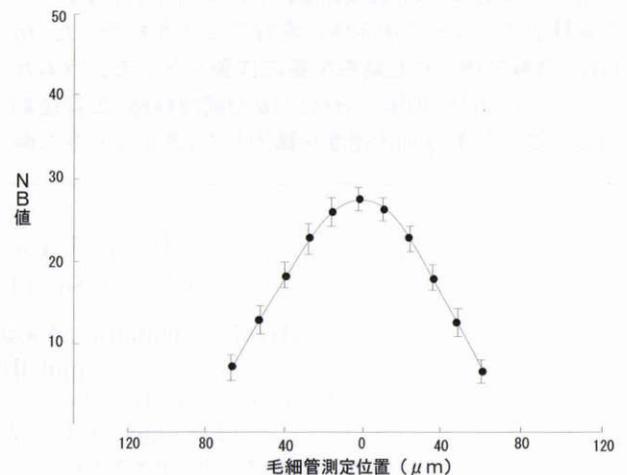


図 2 ガラス毛細管の測定位置と normalized blur (NB) 値 (レーザー出力: 2 mW)。

NB 値は測定位置により速度と容量に依存して変化する。

る測定部位をガラス毛細管中央の 1 ピクセル (標準眼で $10 \times 10 \mu\text{m}$) 領域とし、レーザー出力による NB 値の変化を測定した。

さらに、同装置を用いて測定対象となるヒト血液のヘマトクリット、レーザー反射率 (背景反射率) や吸光度の NB 値への影響について検討した。ガラス毛細管 (内径 $160 \mu\text{m}$) にヒト血液 (赤血球数 $344, 409, 534 \text{ 万}/\mu\text{l}$ 、ヘマトクリット 31.0, 37.0, 47.9%) を一定速度 (10 mm/sec) で循環させた状態で、2 mW のレーザー出力において 0.125 秒間隔で 5.5 秒間、同一部位で 3 回、ヘマトクリットによる NB 値の変化を測定した。背景反射率の影響は、ガラス毛細管 (内径 $160 \mu\text{m}$ 、血流速度 10 mm/sec) の背後に 5 種類 (2.0, 4.0, 6.6, 7.4, 12.8%) の反射率を持つチャート紙 (顔料反射率紙, 村上色彩技術研究所) を挿入し、また、吸光度の影響はガラス毛細管 (内径 $300 \mu\text{m}$ 、血流速度 10 mm/sec) の前面に 3 種類 (20, 40, 60%) の吸光度を持つフィルム (Ektachrome, Kodak, 米国) を挿入して 0.125 秒間隔で 5.5 秒間、同一部位で 3 回測定した。

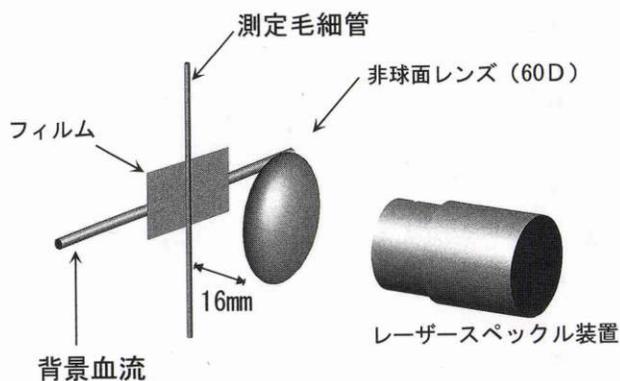


図3 実験装置の模式図.

背景血流と測定ガラス毛細管の間に網膜,色素上皮を想定したフィルムを挿入した.

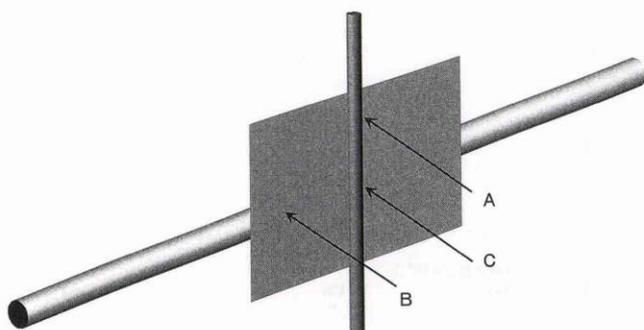


図4 モデル実験における測定方法.

測定値はA, B, C点すべて管中央の1ピクセルの平均値とした.

A: 測定毛細管, B: 背景血流, C: 交差部位

3. ガラス毛細管を用いた *in vitro* における血流速度の測定

測定毛細管(内径50~300 μm)の後ろに背景血流(内径300 μm)を接触させて設置し,さらに,水晶体後面から網膜までの距離を16mm,また,角膜と水晶体の屈折を60Dと仮定し,前記装置におけるガラス毛細管の前方16mmの所に60Dの非球面レンズ(60DCC, Nikon)を設置した.ガラス毛細管は閉鎖循環回路とし,噴出精度1%以内のペリスタルティックポンプ(PST-100, Iwaki)を用いて,ヒト血液を循環させる装置(図3)を試作した.血流速度は閉鎖循環回路内に0.05mlの空気を混入させ,空気が測定毛細管の中を流れる時間を測定し算出した.

測定毛細管と背景血流の間には網膜,網膜色素上皮を想定した,反射率8%,吸光度20%のフィルム(Ektachrome, Kodak, 米国)を挿入した.測定位置として測定毛細管,背景血流とその交差部位の3か所を設定し(図4),各々0.125秒間隔で5.5秒間,3回測定し,その平均値を測定値とした.前述したように,測定毛細管のNB値は測定部位によっても異なるため,解析では測定毛細管中央の1ピクセル領域のNB値を用いた.なお,レー

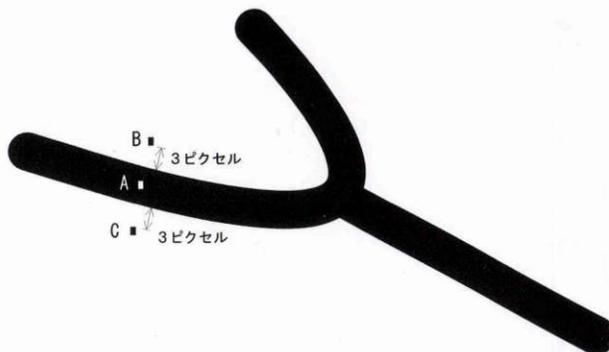


図5 人眼における測定方法.

血管内測定値は血管中央の1ピクセルの平均値とした.また,脈絡膜は血管から3ピクセル離れた位置で測定した.

A: 網膜静脈血管, B, C: 脈絡膜

ザー出力は2mWに設定した.

4. 人眼における網膜静脈血管(第二分枝以降)の血流速度の測定

眼,全身ともに正常な若年有志者男性10名16眼を対象にミドリン[®](参天)で散瞳後に第二分枝以降(血管径約50 μm)の網膜静脈血管および,その左右の脈絡膜のNB値を測定した(図5).なお,血管内の測定値は血管中央の1ピクセルとし,レーザー出力は2mWに設定した.

測定は0.125秒間隔で5.5秒間,同一部位で2回行い,1回目と2回目の測定の間(2分),被検者はいったん顔をはずして待機した.

最後に血管径の測定のため,単色光35mmフィルム(Tri-X, Kodak, 米国)を用いて眼底を眼底カメラ(興和PROI, 興和)により撮影した.35mmフィルム上の像からLittemann³⁴⁾のノモグラムを用いて,血管径を算出した.

III 結果

1. モデル実験におけるレーザー出力およびNB値の関係

作動距離におけるレーザー出力は,出力表示に対し良好な直線関係が得られた(図6).すりガラス回転板を用いた場合,回転速度に対しNB値は直線的に変化したが(図7),レーザー出力の変化に対してはほとんど変化しなかった(図8).一方,ガラス毛細管中を流れるヒト血液の場合,血流速度が一定でもNB値はレーザー出力1mWの上昇に対し12%の割合で増加したが(図9),ヘマトクリットによる影響は生理的な範囲ではほとんどないことがわかった(図10).また,測定毛細管の背景レーザー反射率によっても測定値が異なり,反射率が8%を超えると測定NB値に対する影響が平坦化すること,さらに,吸光度10%増加に対してNB値は約3%の割合で低くなることがわかった(図11,12).

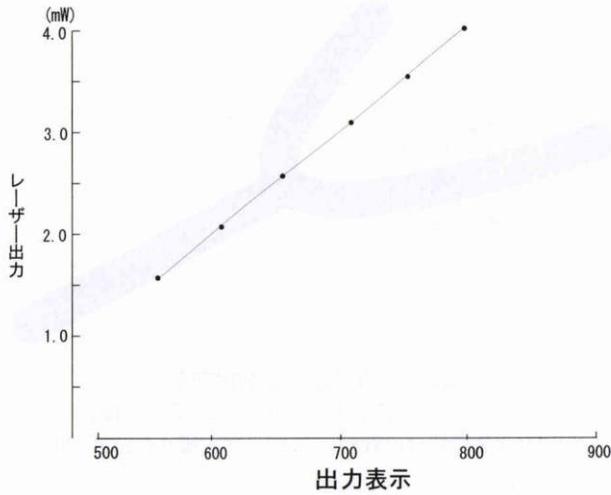


図6 出力表示とレーザー出力。

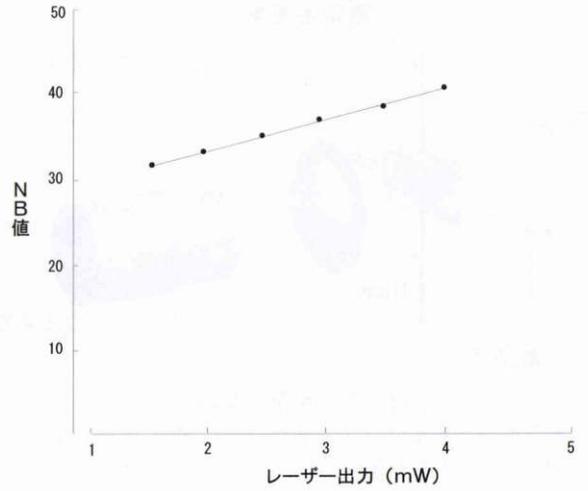


図9 ヒト血液を用いたレーザー出力とNB値の相関。

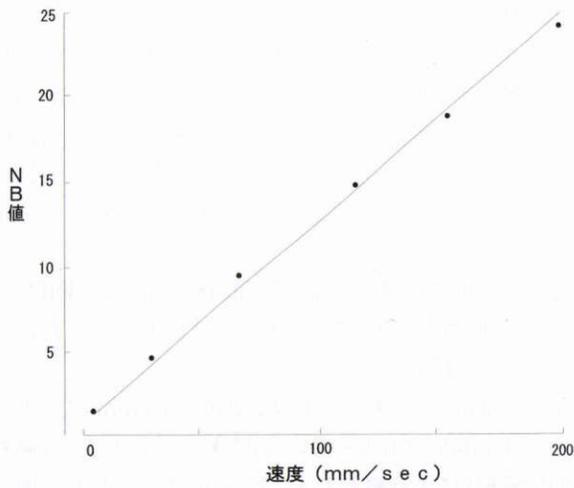


図7 すりガラス回転板を用いた回転速度とNB値の相関。

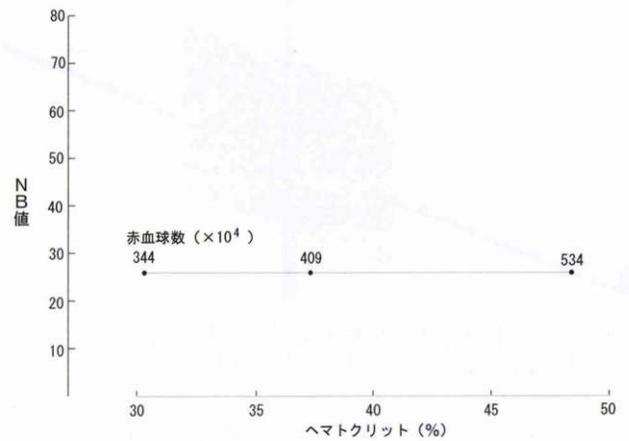


図10 ヘマトクリットに対するNB値の相関。

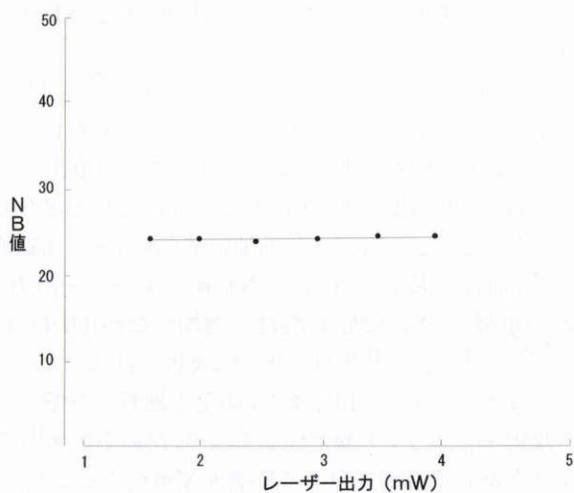


図8 すりガラス回転板を用いたレーザー出力とNB値の相関。

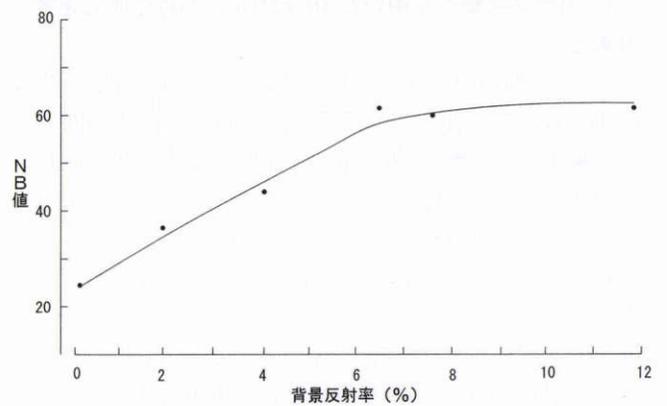


図11 背景反射率とNB値の相関。

2. ガラス毛細管を用いた *in vitro* における血流速度の測定

同一速度でもガラス毛細管径によってNB値が異なった(図13)。また、NB値と血流速度の相関は、血流速度が低い範囲では直線的であったが、血流速度が速くなるほど平坦化する傾向にあり、二次多項式を用いて良好に近似できた。

また、背景血流がある場合のNB値は、同じ血流速度

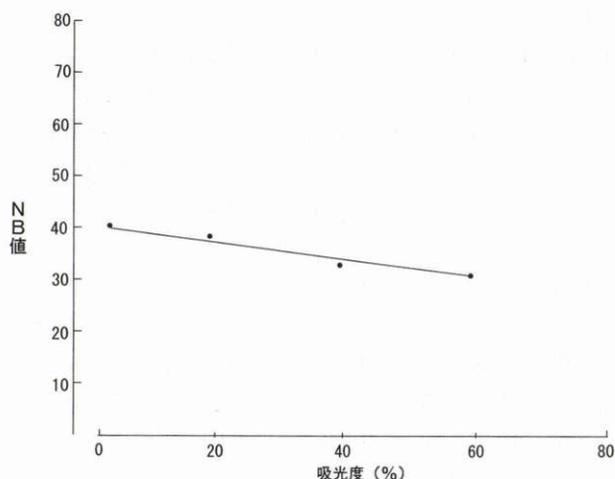


図12 吸光度とNB値の相関。

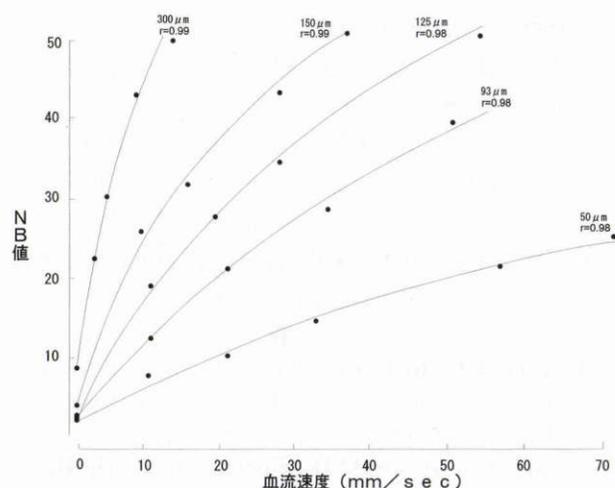


図13 ヒト血液, ガラス毛細管を用いた血流速度, 毛細管径とNB値の相関。

背景の影響がない状態の測定値. 同一速度でも毛細管径によってNB値は異なる。

でも背景血流がない場合と比較して高くなった。さらに、その割合はガラス毛細管が細いほど高かった(図14)。以上の結果から、背景血流のNB値とガラス毛細管径およびそこから得られたNB値から、当該ガラス毛細管中を流れるヒト血液血流速度を推定するノモグラムをガラス毛細管径50~150 μmの間で10 μm刻みに作製した(図15)。

3. 人眼における網膜静脈血管(第二分枝以降)の血流速度の測定

測定した網膜静脈の平均血管径は $53 \pm 6 \mu\text{m}$ (47~63 μm, n=16)であった。測定血管中央1ピクセルの1.0秒または5.5秒にわたる平均NB値を測定値とし、背景血流は測定血管近傍の脈絡膜の1.0秒または5.5秒にわたる平均NB値を用いて *in vitro* 実験で得られた結果を基に作製したノモグラムから、網膜静脈血流速度を算出した。

さらに、 $|X1 - X2| / (X1 + X2) / 2$ (X1は1回目、

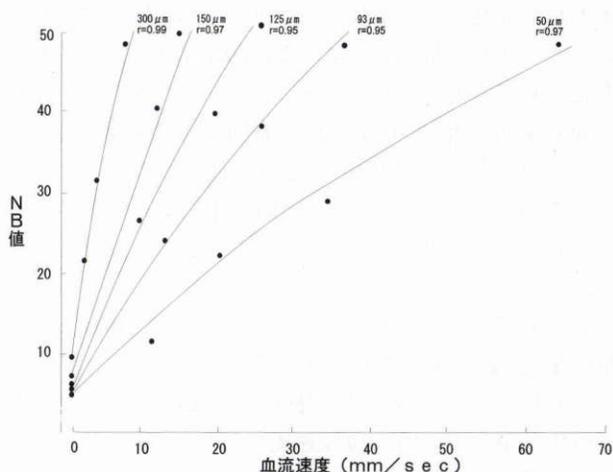


図14 ヒト血液, ガラス毛細管を用いた背景血流の影響。長波長のレーザーは背景血流の影響を大きく受ける。背景血流10 mm/secの場合を示した。

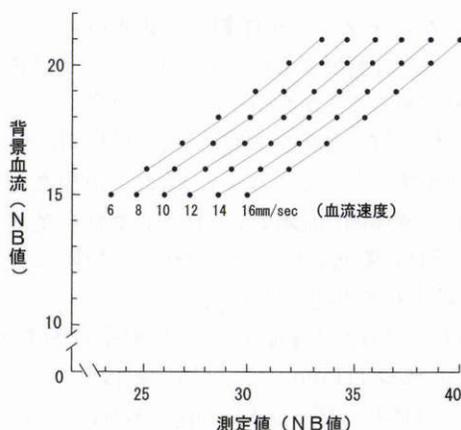


図15 ガラス毛細管と背景血流のNB値から作製した毛細管径50 μmのノモグラム。

X2は2回目の測定値)から再現性指数を測定時間1.0秒と5.5秒について算出した。なお、被験者のヘマトクリット値は正常値、すなわち *in vitro* 実験と同様の44%を仮定した。

平均血流速度 $11.1 \pm 0.6 \text{ mm/sec}$ (10.4~11.9 mm/sec, n=16), 再現性指数は $2.3 \pm 0.7\%$ (測定時間1.0秒, n=16), $2.5 \pm 0.9\%$ (測定時間5.5秒, n=16)であり、一被験者の一連の測定に要した平均時間は 63 ± 15 秒 (n=16)であった。

IV 考 按

In vitro 実験で装置の測定特性を明らかにした。散乱粒子が理想的に配列したすりガラス回転板では、NB値は回転速度の上昇に対して良好な直線関係が得られた。また、すりガラス回転板は、散乱粒子が表面にしか存在しないため、NB値はレーザー出力に対し変化を示さなかったと考えられる。

一方、ヒト血液の流速とNB値は直線関係ではなく、速くなるほど平坦化する傾向にあった。血球の動きは固

体表面の散乱粒子とは異なるため、流速の変化に対しコントラスト変化が一定でないこと、また、コントラストの変化を捕えるエリアセンサーのパワースペクトル特性が高周波領域で低下することが原因と考えられる。レーザー出力に対するNB値の変化は血液へのレーザー出力の増加に伴いレーザー到達距離が伸び、より多くの血球を捕えることから、NB値は上昇したものと考えられる。

モデル実験では、NB値に対するガラス毛細管の太さ、血流速度、また、背景血流の影響を明らかにした。同一速度で流れていてもガラス毛細管径10 μm の変化でNB値が9%異なり、また、血流速度に対して、速くなるほど両者の関係は平坦化する傾向にあった。背景血流の影響は、ガラス毛細管径とその中を流れる血流速度によっても異なっていた。したがって、眼底における血流速度の定量的測定には、血管径、背景血流の影響を考慮して、血管径に応じたノモグラムを作製する必要があることがわかった。さらに、照射するレーザー出力も一定状態で測定する必要があることがわかった。

同一個体の同一部位における血流速度の比較は、これらの条件がすべて一定となるため、高い再現性が得られる。しかし、個体間の比較は、これらの条件の他に個々の被験眼の屈折、眼底のレーザー反射率の微妙な違いなどのため、必ずしも単純ではない。

Norrenら¹⁶⁾はヒト網膜の平均反射率は波長664nmで5.82%、波長711nmで7.73%と報告している。今回用いた半導体レーザーは808nmであり、ヒト網膜の反射率はそれ以上あると考えられる。レーザースペックル現象を応用した実験で、鈴木ら⁷⁾は背景反射率が8%以上の場合、測定値にはほとんど影響されないと報告しており、我々の実験と一致している。

一方、網膜色素上皮の吸光度に関しては人種によっても、個人によっても差があると考えられ、その値も網膜色素上皮と脈絡膜の分離が難しいことから、単独の吸光度を求めるには至っていない。阿部ら¹⁷⁾はサル¹⁷⁾の網膜色素上皮を含んだ脈絡膜の吸光度が約80%と報告しており、網膜色素上皮単独ではそれより遥かに下回ると考えられる。フィルムを用いた実験でも、NB値に対し吸光度が余り大きな影響を与えないことから、網膜色素上皮の吸光度の差による影響は少ないものと考えられた。今回のモデル実験ではヒト網膜でのレーザー反射率(8%)に、ヒト網膜色素上皮の吸光度を20%と仮定したノモグラムを作製した。

レーザードップラー法または類似の方法により、Rivara²⁾は64~177 μm 径のヒト網膜静脈を対象に血流速度の測定を行い、毎秒8~26mm/sec、また鈴木ら⁴⁾は52~206 μm 径のヒト網膜静脈を対象に血流速度の測定を行い、毎秒8~21mm/secを得た。両者とも約70 μm 以下の部位では8~16mm/secという値を出しており、

今回の値、血管径約50 μm で平均血流速度11.1mm/secは、ほぼ従来の方法での同一径静脈で得られた値に一致していた。今回の測定は、平均約1分と比較的短時間に行え、原理的に固視も5.5秒間のみ一定していればよい。従来、従来のレーザードップラー法または類似の方法より遥かに簡便に、かつ被験者の負担も軽く行えたと考えられる。

網膜循環はend artery系となっており、第二分枝以後の径50 μm 位の網膜静脈血流は、局所の病変をより忠実に反映し得ると考えられる。今回、同一眼、同一部位での測定の再現性は5.5秒の平均結果を用いた場合、2.5%と非常に良好であった。また、同じデータから1秒の平均結果での再現性も計算できるが、それも2.3%と良好であった。故に網膜局所病変の経時変化を血流動態の変化として、経時的に捕えることが可能であり、本法は臨床的にも有用であると考えられた。

網膜血管血流速度の測定に際しては、太い血管ほど脈絡膜血流の影響を受け難いことがわかった(図13,14)。しかし、血管が太くなるほど、速い血流速度領域でNB値の測定は、速やかにレンジアウトしてしまい、現方法では太い網膜血管の血流速度測定には適していないことがわかった。今後、より太い網膜血管内血流速度の測定も行えるよう解析方法の改良が必要であろう。

文 献

- 1) Feke GT, Riva CE: Laser Doppler measurements of blood velocity in human retinal vessels. *J Opt Soc Am* 68: 526-531, 1978.
- 2) Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH, Petrig BL: Blood velocity and volumetric flow rate in human retinal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1124-1132, 1985.
- 3) Feke GT, Tagawa H, Deupree DM, Goger DG, Sebag J, Weiter JJ: Blood flow in the normal human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 58-65, 1989.
- 4) Suzuki Y, Masuda K, Ogino K, Sugita T, Aizu Y, Asakura T: Measurement of blood flow velocity in retinal vessels utilizing laser speckle phenomenon. *Jpn J Ophthalmol* 35: 4-15, 1991.
- 5) 櫻井寿也: 蛍光眼底撮影に超高速度高感度カメラを応用した網膜血流解析システム. *日眼会誌* 99: 778-783, 1995.
- 6) Preussner PR, Richard G: Determination of the circulation in the human retina using image analysis of video angiograms. *Fortschr Ophthalmol* 86: 111-114, 1989.
- 7) Preussner PR, Richard G, Darrelmann O, Weber J, Kreissig I: Quantitative measurement of retinal blood flow in human beings by application of digital image processing methods to television fluorescein angiograms. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 221: 110-112, 1983.
- 8) Van Heuven WA, Malik AB, Schaffer CA, Cohen D, Mehu M: Retinal blood flow derived from

- dye dilution curves: Televised fluorescein angiography. *Arch Ophthalmol* 95: 297-301, 1977.
- 9) **Wolf S, Arend O, Reim M**: Measurement of retinal hemodynamics with scanning laser ophthalmoscopy: Reference values and variation. *Surv Ophthalmol* 38: 95-100, 1994.
 - 10) **Harris A, Arend O, Kopecky K, Caldemeyer K, Wolf S, Sponsel W**, et al: Physiological perturbation of ocular and cerebral blood flow as measured by scanning laser ophthalmoscopy and color Doppler imaging. *Surv Ophthalmol* 38: 81-86, 1994.
 - 11) **Ohnishi Y, Fujisawa K, Ishibashi T, Kojima H**: Capillary blood flow velocity measurements in cystoid macular edema with the scanning laser ophthalmoscope. *Am J Ophthalmol* 117: 24-29, 1994.
 - 12) 玉置泰裕, 川本英三, 江口秀一郎, 新家 真, 藤居仁: レーザースペックル現象を利用した網膜末梢循環の生体用二次元解析機の開発. *日眼会誌* 98: 47-54, 1994.
 - 13) 玉置泰裕, 川本英三, 江口秀一郎, 新家 真, 藤居仁: レーザースペックル現象を利用した網膜末梢循環の生体用二次元解析 - 2. Microsphere 法による測定値との比較-. *日眼会誌* 98: 169-174, 1994.
 - 14) **Goodman JW**: Statical properties of laser speckle patterns, In: Dainty JC (Ed): *Laser Speckle and Related Phenomena*, New York, Springer Verlag, 9-75, 1975.
 - 15) **Littman H**: Zur Bestimmung der wahren Grobe eines Objektes auf dem Hintergrund des lebenden Auges. *Klin Mbl Augenheilk* 180: 286-289, 1982.
 - 16) **Norren D van, Tiemeijer LF**: Spectral reflectance of the human eye. *Vision Res* 26: 313-326, 1986.
 - 17) 阿部友厚, 米谷 新, 飯田知弘, 森 圭介, 林 直樹, 磯野博明, 他: 眼球組織の吸光特性. *日眼会誌* 96: 1387-1393, 1992.