

第 103 回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

眼内循環

レーザースペックル法による生体眼循環測定

—装置と眼科研究への応用—

新 家 眞

東京大学大学院医学系研究科眼科学教室

共同研究者

玉置 泰裕¹⁾, 永原 幸¹⁾, 富所 敦男¹⁾, 石井 清¹⁾, 富田 勲¹⁾菅野美貴子¹⁾, 高山 淳¹⁾, 長谷川智之¹⁾, 山東佐和子¹⁾, 江口秀一郎²⁾藤井 仁³⁾, 杉山 哲也⁴⁾, 牟田 憲二⁵⁾, 深谷 康博⁶⁾¹⁾東京大学大学院医学系研究科眼科学教室, ²⁾江口眼科病院³⁾九州工業大学情報工学部電子デバイス機器工学教室⁴⁾大阪医科大学眼科学教室⁵⁾ロート製薬株式会社生物臨床研究部生物研究科⁶⁾わかもと製薬株式会社相模研究所創薬研究グループ薬理研究室

研究協力: 東京光学株式会社電気事業部

要 約

レーザースペックル現象を利用して、生体眼において、虹彩、脈絡膜、網膜、視神経の末梢循環および網膜血管(主幹静脈)内の血流量を、非侵襲的にかつ簡便に測定、記録できる装置を試作した。レーザー光源としては、網膜末梢循環測定用にはアルゴンレーザーの青波長(488 nm)、他の組織には半導体レーザー(808 nm)を用いた。眼底カメラ(TRC-WT 3, Topcon)にレーザー管を組み込み、対象組織における血球運動により生じたスペックルの変動をエリアセンサーで受像、パーソナルコンピュータで解析し、組織血流速度の定量指標、normalized blur(NB)値ないしは square blur rate(SBR)値を算出した。NB 値は計算時間が短い、血流速度が早い場合は線型性が失われるため末梢組織循環測定、SBR 値は網膜主幹静脈血流測定用に用いた。生体眼における測定範囲は最大 1.06 × 1.06 mm であり、家兎眼における虹彩、脈絡膜、網膜および視神経乳頭の表在血管のみえない部位の NB 値の再現性指数はいずれも 10% 以下と良好であった。

家兎眼において、眼圧上昇により血流を変化させた場合、虹彩、脈絡膜および網膜 NB 値は同時に同一眼でマイクロスフェア法で測定した血流量と直線的な相関があり、視神経乳頭 NB 値は同条件下で水素ガスクリアランス法により測定した血流量と相関した。眼圧を段階的に

上昇させた場合、虹彩および脈絡膜 NB 値は眼圧と平均血圧の差で表される眼灌流圧上昇に並行にして低下したが、網膜および視神経乳頭 NB 値は眼灌流圧 50 mmHg 以上ではほぼ一定で、それ以下では眼灌流圧上昇に従い低下した。

家兎脈絡膜、および視神経乳頭循環の眼灌流圧変化に対する自動調節能の有無を 2 時間に渡り連続的に、脈絡膜または視神経乳頭 NB 値を測定することにより検討した。脈絡膜 NB 値は、眼灌流圧の上昇または低下と並行して変化、脈絡膜循環には自動調節能が 2 時間に渡りみられないことが確認された。一方、視神経乳頭循環は眼灌流圧上昇に対しても低下に対しても一時的な上昇および低下を示した後に前値に復するが、その時間経過は負荷眼圧により違うという自動調節能がみられ、その経過をレーザースペックル法で長時間に渡ってモニターすることができた。

血管拡張作用を持つ薬物(ifenprodil, betaxolol, nipradilol)の片眼連続点眼は点眼側でのみ視神経乳頭ないしは後部脈絡膜の循環を改善させ、その改善度は眼圧低下度と相関せず、点眼回数に相関しており、点眼薬の後眼部への直線侵透が推定された。また、カルシウム拮抗薬全身投与の眼循環に対する効果を nicardipine, nilvadipine,

別刷請求先: 113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大学院医学系研究科感覚運動機能医学講座眼科学教室 新家 眞
(平成 11 年 9 月 20 日受付, 平成 11 年 9 月 24 日改訂受理)

Reprint requests to: Makoto Araie, M.D. Department of Ophthalmology, The University of Tokyo Graduate School of Medicine. 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

(Received September 20, 1999 and accepted September 24, 1999)

pranidipine で検討したところ、脈絡膜、網膜ではいずれの薬物でも、視神経乳頭は後二者で循環改善がみられ、血圧への効果は pranidipine が最も強かった。Nilvadipine がヒトへの臨床応用の可能性が高いことが推定された。

動物眼用に試作した測定機のハードおよびソフトウェアを改良し、0.12 秒毎に連続測定、かつ人眼に臨床使用可能とした。本機による人眼視神経乳頭において、表在血管のみえない部位から測定した NB 値の再現性指数は約 10% であり、1.5 時間毎に 4 回測定した平均を用いた場合の再現性指数は約 5% であった。人眼における 0.5% timolol 1 日 2 回片眼 3 週間点眼は、実薬点眼側、基剤点眼側とも視神経乳頭循環を変化させなかった。一方、2% carteolol 1 日 2 回片眼 3 週間点眼は、実薬、基剤点眼側ともに視神経乳頭循環を約 15% 増加させ、全身吸収された carteolol の内皮依存性血管拡張作用によることが推定された。少数例の正常眼圧緑内障患者で nilvadipine (4 mg/日) 内服の視神経乳頭循環に及ぼす効果を検討したところ、血圧、眼圧に影響を与えることなく視神経乳頭循環を約 20% 増加させ、本剤が本疾患治療薬として可能性があることが推定された。

模擬人眼およびガラス毛細管を用いた実験の結果、網膜血管アナログとしてのガラス毛細管中を流れる血流速度を SBR 値から計算するためには、血管径、脈絡膜循環、網膜色素上皮反射および吸光度の補正が必須であることが明らかになった。模擬人眼を用いた実験から、人眼

における網膜主幹静脈血流速度を SBR 測定値から算出するためのノモグラムを作製、それを用いて正常有志者の網膜主幹静脈内血流速度を測定した。平均 146 μ m 径の静脈での血流速度は 18.4 ± 3.8 (平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=16$) mm/秒であり、従来の laser Doppler velocimetry による値とよく一致した。その再現性指数は 3.6%, 1 回の測定に要する時間は平均 60 秒であり、本法は十分臨床使用に耐え得る再現性、正確性かつ簡便性を備えていると考えられた。レーザースペckル法による網膜主幹静脈内血流速度と同一眼の color Doppler imaging (CDI) 法による網膜中心静脈平均血流速度を比較したところ、前者 19.6 ± 1.8 mm/秒 ($n=14$) に対し、後者は 35.5 ± 3.2 mm/秒であり、両者間の相関係数は 0.91 であった。切迫型網膜中心静脈または動脈閉塞症例の計 4 眼で治療開始前後の網膜主幹静脈血流速度と同中心静脈血流速度を比較したところ、両者とも治療開始後同様に増加した。レーザースペckル法と CDI 法による結果の良好な相関は、レーザースペckル法による網膜主幹静脈血流速度測定結果の妥当性を支持するものと考えられた。(日眼会誌 103: 871—909, 1999)

キーワード: レーザースペckル現象, 眼末梢組織循環, 網膜静脈血流速度, Normalized blur (NB), Square blur rate (SBR)

In vivo Measurement of Ocular Circulation with the Laser Speckle Method —Development of Apparatus and Application in Ophthalmological Research—

Makoto Araie

Department of Ophthalmology, The University of Tokyo Graduate School of Medicine

Abstract

We have developed an apparatus utilizing laser speckle phenomenon which can measure the peripheral circulation in the iris, choroid, retina and optic nerve head (ONH) and blood velocity through retinal vessels in the living eye non-invasively and quantitatively. A blue-component argon laser (wavelength 488 nm) was used for measurement of peripheral circulation in the retina and a diode laser (wavelength 808 nm) for measurements of peripheral circulation in the iris, posterior choroid and ONH, and measurement of centerline blood velocity through retinal vessels. A fundus camera (TRC-WT 3, Topcon) was equipped with a laser source and an image sensor where the speckle pattern from the fundus appears, and the data were analyzed with a personal computer to give a normalized blur (NB) value or a square blur rate (SBR) value, both quantitative indices of blood velocity. The NB value, whose computation requires much less time, was adopted to evaluate peripheral circulation because of non-linear cor-

relation between the NB and actual blood velocity in the range above 20 mm/sec. The SBR value, whose computation requires a longer time, was adopted for measurement of blood velocity through retinal vessels. Measurement field in the living eye was 1.06×1.06 mm at its maximum and reproducibility index of the *in vivo* measurement in the rabbit iris, choroid, retina, and ONH was approximately 10%.

When blood flow was changed by intraocular pressure (IOP) change in rabbit eyes, NB values obtained from the iris, choroid, and retina showed a significant correlation with the blood flow simultaneously determined with the colored microsphere technique in the same eye, and the NB obtained from the ONH also correlated with the blood flow determined with the H_2 gas clearance method. Stepwise reduction in the ocular perfusion pressure (OPP) by stepwise increment of IOP resulted in proportional reduction in the iris- and choroid-NB. On the other hand, the retina- or ONH-NB remained al-

most unaltered at OPP levels above 50 mmHg, and decreased along with OPP at levels less than 50 mmHg.

By monitoring NB values for 2 hours, presence or absence of autoregulatory mechanism against OPP change in the choroidal and ONH circulation was studied in rabbits. Throughout the experimental period of 2 hours, the choroidal NB was changed along with the OPP change, suggesting absence of blood flow autoregulation in this tissue. In the ONH, however, the NB returned to the baseline after its transient increase or decrease when the OPP was continuously increased or decreased, showing the presence of an autoregulatory mechanism in the ONH circulation. However, the time course of the NB resumption depended on the extent of OPP change. These results indicated that the laser speckle method can be useful in investigating the autoregulatory mechanism and processes of peripheral circulation in ocular tissues.

Unilateral instillation of drugs with vasodilative activity (ifenprodil, betaxolol or nipradilol) in rabbit eyes significantly increased ONH and/or choroidal circulation. The extent in change in the ONH and/or choroidal circulation correlated with the number of doses, but not with the extent of IOP reduction, which suggested that the observed effects were attributable to the drug which penetrated locally. Intravenous administration of a Ca^{2+} -antagonist (nicardipine, nilvadipine or pranidipine) significantly increased choroidal or retinal circulation in rabbits. The ONH circulation, however, was not affected by nicardipine, but affected by nilvadipine or pranidipine. Given the same effect on the ONH circulation, systemic hypotensive effect was stronger in pranidipine than in nilvadipine, which suggested that nilvadipine can be used in patients with ocular circulatory insufficiency.

A modification of the laser speckle apparatus used for animal experiments was devised so that the NB or SBR values could be measured in human eyes every 0.12 sec on a real-time basis. The NB measurements of an area in the temporal ONH free of visible surface vessels (NB_{ONH}) in human eyes showed a reproducibility index of approximately 10% and when the average of 4 NB measurements taken at intervals of 1.5 hours was adopted, it averaged approximately 5%. In young normal volunteers, unilateral twice-daily instillation of 0.5% timolol for 3 weeks showed no significant effects on the NB_{ONH} either on the timolol- or vehicle-treated side. On the other hand, unilateral twice-daily instillation of 2% carteolol for 3 weeks significantly increased the NB_{ONH} by about 15% both on the carteolol- and vehi-

cle-treated side, which was thought to be attributable to the effects of endothelium-dependent vasodilative activity of systemically absorbed carteolol. Oral administration of nilvadipine (4 mg/day) was found to significantly increase NB_{ONH} by about 20% in a small group of normal-tension glaucoma patients without influencing the IOP or blood pressure, which suggested a clinical potential for nilvadipine in the treatment of normal-tension glaucoma.

In vitro experiments carried out using a simple optical model for the human eye and glass capillary tubes as an analogue of a retinal vein showed that the diameter of the vein, choroidal circulation and reflectance and absorption by retinal pigment epithelial cell layer would influence SBR values taken from a retinal vein and that the effects of these factors must be corrected in calculating the actual blood velocity through a retinal vein from the SBR values taken from it. In order to calculate the actual blood velocity through a retinal vein from the SBR readings obtained *in vivo*, nomograms were made based on the results of the *in vitro* experiments using an optical model for the human eye. In normal human eyes, the blood velocity through large retinal veins (average diameter of 146 μm) was 18.4 ± 3.8 mm/sec (mean $\pm$ standard deviation, $n=16$), which agreed well with the results previously reported using the laser Doppler velocimetry system. The reproducibility index of the above the measurement averaged 3.6% and 60 seconds were needed for one measurement, which suggested clinical potential of the present method. Comparison of the blood velocity through large retinal veins determined by the present laser speckle method to that through the central retinal vein determined by color Doppler imaging (CDI) was carried out in the same eye of normal subjects. The blood velocity through large retinal veins averaged 19.6 ± 1.8 mm/sec ($n=14$), while that through the central retinal vein was 35.5 ± 3.2 mm/sec with a correlation coefficient between them of 0.91. In a total of 4 eyes with impending central retinal vein or artery occlusion, measurements by the laser speckle method and CDI method were carried out. The blood velocities measured by the both methods increased along with the treatment. A good correlation between the CDI results and the laser speckle results indicates validity and clinical potential of the present laser speckle method. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 871–909, 1999)

Key words: Laser speckle phenomenon, Ocular peripheral circulation, Blood velocity through large retinal vessel, Normalized blur (NB), Square blur rate (SBR)

第1部 レーザースペckル法による眼末梢循環の解析

I 緒 言

毛細血管は組織と接触し、血液・組織間の物質交換を行うが、この循環動態は末梢循環と呼ばれる。末梢循環は組織特異性を有し、また、その異常は組織の循環障害を惹き起こす。眼組織のうち、眼底に位置する脈絡膜、視神経乳頭および網膜はいずれも眼球の光受容器としての機能にとって重要な組織であり、その末梢循環動態は眼の生理学的機能や眼底疾患の病態を考える上で重要である。眼底末梢循環の非侵襲的、かつ定量的な解析が可能となれば、眼生理学上のみならず、眼科臨床上においても極めて有意義であると考えられる。従来、眼底末梢循環の定量的解析法として、microsphere 法¹⁾²⁾、アイソトープクリアランス法³⁾、水素クリアランス法⁴⁾、熱勾配法⁵⁾などが用いられてきた。しかし、これらはいずれも侵襲的方法のため動物実験のみに用いられており、その臨床応用は不可能であった。近年、laser Doppler 法の応用により生体眼における視神経乳頭^{6)~11)}、脈絡膜⁹⁾¹²⁾および網膜の末梢循環^{13)~15)}の非侵襲的解析が試みられている。しかし、この原理による従来の末梢循環解析は、その測定部位が直径約 180 μm というかなり小さな範囲に限られるか、または再現性の点での問題があった。Rizzo ら¹⁰⁾は、視神経乳頭組織においては、その耳側と鼻側で末梢血流速度が有意に異なると報告しているが、このような組織血流の場所によるばらつきは他の眼組織にも存在すると考えられる。よって、眼底末梢循環を解析する際に従来の laser Doppler 法より広い面積の解析が可能となれば、末梢循環の場所によるばらつきが二次元的に解析可能となるのみならず、測定部位のずれにより生じる測定誤差が軽減され、末梢循環の経時的変化をより正確に解析することが可能となると考えられる。

レーザーを散乱粒子の集団に照射すると、反射散乱光が観察面で干渉しあい、スペckルパターンと呼ばれるランダムな模様を形成する¹⁶⁾。生体組織にレーザーを照射した場合、多数の血球によって散乱されたレーザー光が観察面でスペckルパターンを形成し、そのパターンは組織内で血球が様々な方向に移動しているため、刻々形を変えていく。すなわち、観察視野内に血流の速い所があると、その領域から発生するスペckルの変動が速くなり、逆に血流の遅い所があると、その領域から発生するスペckルの変動が遅くなる¹⁷⁾¹⁸⁾。この現象を利用して、Ruth¹⁸⁾は皮膚血流の非接触かつ定量的解析法を開発し、このレーザースペckル法により皮膚から得られる血流の指標が、従来の laser Doppler 法による測定結果と良好な相関関係にあることを報告¹⁹⁾していた。また、Fercher ら²⁰⁾²¹⁾は He-Ne レーザーを眼底に照射して得られ

るスペckルパターンを写真に撮り、血流の速い所ほど露光時間内のパターンのぶれが速くなり、パターンのコントラストが低下することを利用して、眼底血流の二次元分布を最初に画像化し、報告した。しかし Fercher らの方法は、写真現像のため、その場で評価できないこと、コントラストの場所による違いが定量的に評価しにくいことなどの欠点があり、実用には至らなかった。

今回、我々は眼底のある範囲内のレーザースペckルパターンをエリアセンサーに結像させ、それを解析することにより、生体眼における虹彩、脈絡膜および視神経乳頭末梢循環の非侵襲的二次元解析を行う機器、および網膜末梢循環の非侵襲的二次元解析を行う機器を開発した。本装置の定量性を *in vitro* および *in vivo* で検討したうえで、いくつかの種類の薬物負荷による眼底末梢循環の経時的変化についても定量的検討を行い、本装置により生体眼における末梢循環動態が定量的、かつ非侵襲的に解析可能であることを確認した。さらに、前者の装置を改良することにより網膜大血管内血流量も生体眼で簡便に測定できる装置も開発した(第2部)。

II 方法と対象

1. レーザースペckル法の測定原理

レーザー光などの波長や位相の揃った光(コヒレント光)を散乱体に照射すると、反射散乱光に干渉が生じ、スペckルパターンと呼ばれるランダムな模様を形成する¹⁶⁾。スペckルパターンは、統計学的記述が可能であるという特性を有し、中でも時間平均したスペckル強度の時間変動の標準偏差(σ)は最も有用な指標である。完全なコヒレント光を理想的な散乱体に照射すると、理想的なスペckルパターンが生じ、 σ はスペckル強度の時間平均($\langle I \rangle$)に等しくなる²¹⁾。

$$\sigma = \langle I \rangle \quad (1)$$

一方、非理想的条件下では、 σ は $\langle I \rangle$ より小さい値となり、 $\sigma/\langle I \rangle$ をスペckルパターンのコントラストと呼ぶ。

$$0 \leq \sigma/\langle I \rangle \leq 1 \quad (2)$$

ここで、レーザーの照射時間を T 、スペckル強度の時間変動の相関時間を τ とすると、このスペckルパターンのコントラスト($\sigma/\langle I \rangle$)は次式により得られる²⁰⁾。

$$\sigma/\langle I \rangle = [(\tau/2T)\{1 - \exp(-2T/\tau)\}]^{1/2} \quad (3)$$

生体組織にレーザーを照射した際には、スペckルパターンには血流速度と照射時間に依存した blurring を生じる²¹⁾。この blurring の増加によりスペckルパターンのコントラスト($\sigma/\langle I \rangle$)は減少し、コントラストの逆数($\langle I \rangle/\sigma$)が blurring と相関すると考えられる。ここで、 $\langle I \rangle/\sigma$ を blurring の定量的指標とすると、レーザーの照射時間(T)が一定の時、 $\langle I \rangle/\sigma$ は生体組織から得られるスペッ

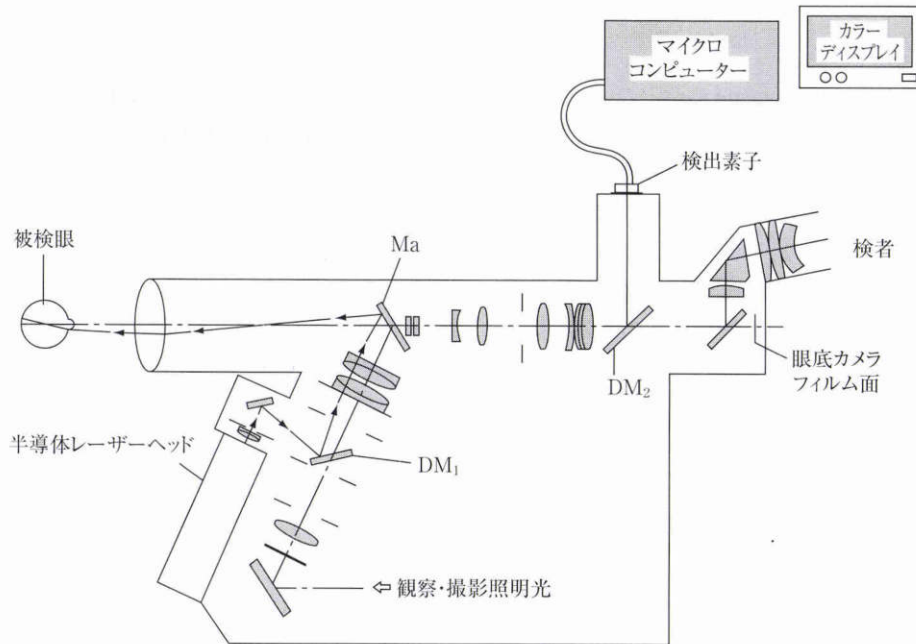


図 1 半導体レーザーによるレーザースペックル現象を利用した眼末梢循環解析試作機。

DM₁, DM₂: ダイクロイックミラー, Ma: リングミラー

クル強度の時間変動の相関時間の逆数($1/\tau$), すなわち血流速度と相関すると考えられる。まず, 眼底末梢循環を定量的に解析するため, 眼底組織にレーザーを照射した際に生じるスペックルパターンの blurring の定量的解析を行う装置を開発した。なお, 本装置の光学系の製作は株式会社トプコンの協力の下に行い, また, 後述するソフトウェアの開発は九州産業大学情報工学部教授藤居仁氏の協力の下に行った。

図 1 に光学系の模式図を示す。本機の光学系は, 半導体レーザー(波長 808 nm, 最大出力 50 mW, 06 DLD 003, Melles Griot, Colorado, 米国)およびエリアセンサー(縦 100×横 100 画素, BASIS 型, キヤノン)を装置した眼底カメラ(TRC-WT 3, トプコン)から成る。ハロゲンランプからの眼底照明光路にダイクロイックミラー(DM₁)を挿入し, 波長 808 nm の半導体レーザービームをダイクロイックミラー(DM₁), リングミラー(Ma)を介して眼底に照射する。0.88×0.88 mm のレーザー照射野のうち, 測定部位である 0.62×0.62 mm(画角 45°)あるいは 0.42×0.42 mm(画角 30°)の眼底領域(いずれも家兎眼での値, 人眼ではレーザー照射野 1.5×1.5 mm, 画角 45°の測定部位 1.06×1.06 mm, 画角 30°の測定部位 0.72×0.72 mm に相当)で散乱したレーザー光はリングミラー(Ma)の中心部を通り, ダイクロイックミラー(DM₂)で反射して, 100×100 画素のエリアセンサー上に結像する。センサー面上には, 眼底において散乱したレーザー光が干渉しあい, スペックルパターンが形成され, 血流の速い所ほどパターンのぶれが速くなり, パターンのコントラストが低下すると考えられる²⁰⁾²¹⁾。エリアセンサーは, 毎秒 540 フレームの高速走査が可能である。

ここで, エリアセンサー上で, 左端から x 番目, 上端から y 番目($x, y: x=1, 2, 3, \dots, 100, y=1, 2, 3, \dots, 100$)の画素の, 測定開始から k 番目($k: k=1, 2, 3, \dots, 540$)のフレームのレーザー光の反射光量レベルを $I(x, y, k)$ とする。ここで, エリアセンサーの 1 フレームの走査に要する時間を ΔT , 時間 t における反射光量レベルを $I(t)$ とすると,

$$I(x, y, k) = \int_0^{\Delta T} I(t) dt \quad (4)$$

と表される。左端から x 番目, 上端から y 番目の画素のレーザー光の反射光量レベルの N フレーム分の平均値を $I_{\text{mean}}(x, y)$ とすると,

$$I_{\text{mean}}(x, y) = \frac{\sum_{k=1}^N I(x, y, k)}{N} \quad (5)$$

と表される。この $I_{\text{mean}}(x, y)$ と, 各フレームにおける反射光量レベルとの偏差の絶対値の N フレーム分の平均値を $D_{\text{mean}}(x, y)$ とすると,

$$D_{\text{mean}}(x, y) = \frac{\sum_{k=1}^N |I_{\text{mean}}(x, y) - I(x, y, k)|}{N} \quad (6)$$

となる。ここで, 左端から x 番目, 上端から y 番目の画素におけるスペックルパターンの blurring の定量的指標(normalized blur: 以下, NB 値)を $NB(x, y)$ とし, 次式のように定義する。

$$NB(x, y) = I_{\text{mean}}(x, y) / D_{\text{mean}}(x, y) \quad (7)$$

NB 値の逆数 ($D_{\text{mean}}/I_{\text{mean}}$) は, Fercher ら²⁰⁾²¹⁾ の述べたスペックルパターンコントラストの定義式 ($\sigma/\langle I \rangle$) の分子に相当するスペックル強度の時間変動の標準偏差 (σ) を, その平均偏差 (D_{mean}) で近似した値である. ここでは, このスペックルパターンコントラストの逆数に相当する NB 値を blurring の定量的指標として用い, NB 値の分布を末梢血流速度分布としてカラーモニターテレビ上に二次元カラーマップで表示する. NB 値に応じて, 青色から赤色の段階カラー表示になっており, 赤色に近いほど NB 値が高い, すなわち末梢血流速度が速いことを示す. また, 任意の範囲を設定し, その領域の NB 値の平均値 (NB_{av} 値) を計算, 表示できるようになっている. 得られたデータおよびカラーマップは 3.5 インチフロッピーディスクまたは光磁気ディスクに保存される. 動物眼での測定では原則として N=98 としたので, 1 回の測定時間は 0.18 秒であった.

光源レーザーとして, 本装置では近赤外光である半導体レーザー (波長, 808 nm) を用いたが, 人眼網膜への一定時間のレーザー照射の許容量は, 波長が増すとともに指数関数的に増加するため²²⁾, 本装置による人眼における測定は, 従来の laser Doppler 装置より安全に行えるという利点がある. また, 被験者の羞明感もほとんどない.

測定中に眼球運動が起こると正しい測定が行えないため, 以下の方法でその有無を判定する²³⁾. エリアセンサーの水平走査線の上から 25, 50, 75 ラインを観測線とし, 血流による画像データを取り込んだ後, まず, この観測線上の時間 t , すなわち k_i 番目のフレームにおけるスペックルの変動率 (temporal difference: 以下, TD 値) を TD(t) とし, 次式のように定義し, その時間変動を解析しプロットする.

$$TD(t) = \sum_{x=1}^{100} |I(x, y, k_i) - I(x, y, k_i + 1)| / [I(x, y, k_i) + I(x, y, k_i + 1)] \quad (8)$$

($y = 25, 50, 75$)

測定中に眼球運動がなければ, 各線上の TD 値はほとんど変動しない. 眼球運動が生じた場合には, 各線とも同時に明らかに高い TD 値を示す. このグラフはカラーモニターテレビ上に表示され, 測定中の眼球運動の有無を容易に判断できる.

移動すりガラスによる光散乱信号のスペクトル分布は, 眼底から得られるスペックルのスペクトル分布に類似している²⁴⁾²⁵⁾. 両面砂打すりガラス板 (直径 90 mm, 厚さ 2 mm) を本装置の眼底カメラの合焦位置に置き, 電動モーターに接続して定速度で回転させ, NB_{av} 値の測定を行った. すりガラス板の移動速度が 2~130 mm/秒の間

では, 測定された NB_{av} 値とすりガラス板の移動速度の間には良好な直線関係が得られた.

2. レーザースペックル法による脈絡膜および視神経乳頭 NB 値測定の再現性

以下, 家兎を用いた実験はすべて, the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Resolution on the Use of Animals in Research を遵守して行った.

体重 2.5~2.8 kg の成熟白色家兎 6 匹 12 眼を用いた. 白色家兎は網膜色素上皮層にレーザーの伝達を妨げる色素を持たず, また家兎網膜血管は有髄神経線維である髄翼上をほとんど水平に頭側, 尾側に向かって走行しており²⁶⁾, 髄翼以外の部分では網膜血管はみられず, 脈絡膜血管のみによるスペックルパターンを得ることができる. 固定機に家兎を固定後, ペントバルビタールナトリウム 25 mg/kg (ネンプタール® 0.5 ml/kg, ダイナボット) を耳介静脈から緩徐に注入し, 全身麻酔した. 0.5% 塩酸フエニレフリン+0.5% トロピカミド合薬 (ミドリリン P®, 参天製薬) 点眼による散瞳 20 分後に, 固定機に固定したままの状態では, 脈絡膜同一部位 (視神経乳頭の約 1 乳頭径下方) および視神経乳頭の表在血管のみえない部位の NB 値を 45° の画角 (測定面積 0.62×0.62 mm) で, 5 分間隔で二度測定した (図 2). 眼底写真を撮影し脈絡膜および視神経乳頭の測定部位を記録した後, 一度麻酔を覚醒させ, さらに 24 時間後に脈絡膜および視神経乳頭の同一部位の NB 値を同様に測定した. なお, ここでは 1 回目の測定値 (V_1) と 2 回目および 3 回目の測定値 (V_2, V_3) の変動

$$\frac{|V_1 - V_2|}{(V_1 + V_2)/2} \quad \frac{|V_1 - V_3|}{(V_1 + V_3)/2} \quad (9)$$

を, それぞれ再現性指数として用いた. この再現性指数を, 100×100 画素 (測定領域全体) の NB 値の平均値 (NB_{av} 値) と, 測定領域の中央の 10×10, 20×20, 30×30, 40×40, 50×50, 60×60, 70×70, 80×80, 90×90 画素から得られた NB 値の平均値についてそれぞれ算出した.

3. 脈絡膜 NB 値と microsphere 法による脈絡膜組織血流量測定値の比較

NB 値は, 理論的には血流量を直接示す指標ではなく, 血流速度 (赤血球の速度) を呈示する指標である. 本法により脈絡膜末梢循環の相対値を正確に定量的に解析するためには, 脈絡膜 NB 値, すなわち血流速度指標が脈絡膜血流量の変化に伴いどのように変化しているのかを知る必要がある.

体重 2.5~3.0 kg の成熟白色家兎 15 匹 15 眼を用い, 脈絡膜 NB 値と colored microsphere 法による脈絡膜組織血流量測定値の相関について検討した. 今回用いた colored microsphere 法による組織血流量測定値は, 心筋組織血流量の測定において radioactive microsphere 法

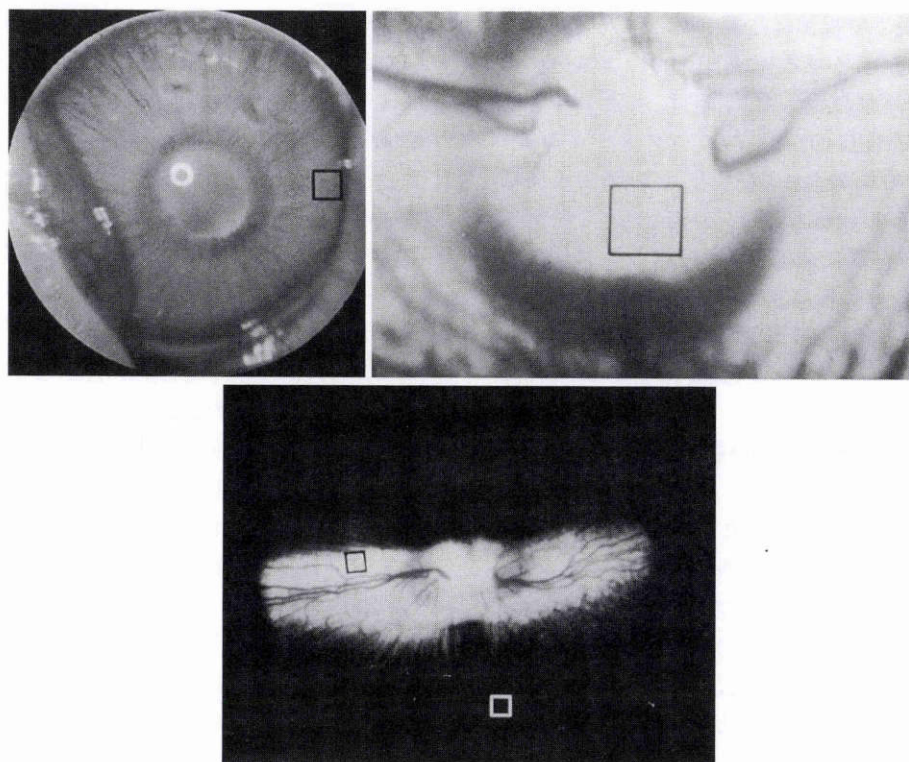


図2 家兎眼における測定部位.

左上図：虹彩，右上図，視神経乳頭，左下図：網膜（髄翼部）および脈絡膜（髄翼外部）

による測定値とはほぼ直線関係にあることが報告²⁷⁾されている。ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]）25 mg/kg を静注し全身麻酔した後、血液の凝固を防ぐためヘパリン 500 IU/kg を静注した。なお麻酔深度は、以後適宜少量のペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]）静注を追加することにより、注意深くできるだけ一定に保った。血圧測定および採血のため大腿動脈を切開してカニユーレを挿入し、圧力トランスデューサー（DTX, Spectramed, California, 米国）とひずみ圧力用アンプ（AP-601G, 日本光電）に接続し、卓上型ペンレコーダー（R-OX, 理化電機工業）で血圧変動を記録した。また、同側の内頸動脈から左心室にカニユーレを挿入した。0.5% 塩酸フェニレフリン-0.5% トロピカミド合薬および0.1% ジクロフェナックナトリウム（ジクロード点眼液，わかもと製薬）を点眼した後、2本の25 G 針を角膜輪部から前房内に刺入し、一方を上記の圧力トランスデューサーおよびひずみ圧力用アンプに、他方を眼内灌流液（オベガード MA, 千寿製薬）入りのリザーバーにそれぞれ接続し、眼圧を卓上型ペンレコーダーで記録しつつ、リザーバーの高さを変えることにより、眼圧を10→30 mmHg (n=4), 10→50 mmHg (n=4), 10→80 mmHg (n=4), 30→50 mmHg (n=1), 30→80 mmHg (n=1), 50→80 mmHg (n=1) のように各2段階に調節した。1段階目の眼圧に調節した5分後に、カニユーレ挿入と対側の眼の脈絡膜 NB 値（視神経乳頭の1乳頭径下方，図2）を3回測定し、その直後に colored microsphere（赤色）溶液

[15 ± 0.3 (平均値 $\pm$ 標準偏差) μm , E-Z TRAC, California, 米国) 0.15 ml を左心室内に注入した。Microsphere 注入時から60秒間、大腿動脈カテーテルから基準血液を採取した。その後、2段階目の眼圧に上昇させ、同様に脈絡膜 NB 値測定および microsphere（青色）注入を行った。なお、各眼圧における測定終了時に大腿動脈カニユーレから動脈血を採血し、全自動 pH/血液ガス分析装置（Model 170, Corning Glass, New York, 米国）を用いて、pH, Pco_2 , および Po_2 を測定した。室温を 20 ± 2 (平均値 $\pm$ 標準偏差) $^{\circ}\text{C}$ に保ち、直腸温をサーミスタ温度計（MGAIH-219 Y, 東芝）で測定した。致死量のペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]）を静注し屠殺後、NB 値測定側の眼球を摘出し、ホルマリン溶液で固定後、脈絡膜を切離した。Hale ら²⁷⁾と同様の方法を用いて、得られた脈絡膜および基準血液中の microsphere の数をカウントした。なお、各眼圧レベル時の microsphere は、その色により識別し、各眼圧レベル時における脈絡膜組織血流量を算出した。

4. 視神経乳頭 NB 値と水素ガスクリアランス法による視神経乳頭血流量測定値の比較

成熟白色家兎（体重 2.7~2.9 kg）を用いた。全身麻酔薬としてウレタンを静脈内投与（1 mg/kg），保定器で保定した。眼球をやや上転位に上下直筋に4-0絹糸をかけることにより固定した後、直径 100 μm の針状関電極（ON-96045, ユニークメディカル）を輪部から3 mm 後側の強膜から硝子体中に刺入し、さらにビトレクトミー

レンズを用いた直視下で視神経乳頭中央部付近へ刺入した(深度0.7 mm)。また、不感電極(UHE-001, ユニークメディカル)を頭部皮下に埋没した。測定は、水素クリアランス式組織血流計(MHG-D1-S1, ユニークメディカル)を使用した。眼圧のモニターおよび変化は実験(3)と同様方法で行い、眼圧を20 mmHgから60 mmHgに変化させ、変化前および15分後に水素ガスクリアランス法で測定を行った。また、全身状態パラメータの測定も実験(3)と同様に行った。別の動物で針状電極刺入以外はすべて同様条件で眼圧を変化させ、変化前、15分後に視神経乳頭NB値を測定した。

5. 眼圧上昇に伴う脈絡膜および視神経乳頭NB値の変化

体重2.5~2.8 kgの成熟白色家兎16匹16眼および体重1.8~2.3 kgの成熟有色家兎8匹8眼を用いた。ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)25 mg/kgを静注し全身麻酔した後、血圧および脈拍測定のため大腿動脈を切開し、カニューレを挿入、留置後、圧力トランスデューサー(DTX, Spectramed)とひずみ圧力用アンプ(AP-601 G, 日本光電)に接続し、卓上型ペンレコーダー(R-OX, 理化電機工業)で血圧変動を記録した。また、0.5%塩酸フェニレフリン-0.5%トロピカミド合薬およびジクロフェナクナトリウムを点眼した後、2本の25G針を角膜輪部から前房内に刺入し、一方を上記の圧力トランスデューサーおよびひずみ圧力用アンプに、他方を眼内灌流液(オベガードMA, 千寿製薬)入りのリザーバーに接続し、眼圧を卓上型ペンレコーダーで記録しつつ、リザーバーの高さを変えることにより眼圧を調節した。眼圧を10, 30, 50, 70, 80 mmHgと上昇させ、各眼圧レベルに上昇させた5分後に本機で眼底同一部位のNB値を1分間隔で3回ずつ測定し、その平均値を測定値とした。なお、白色家兎8匹8眼では各眼圧での視神経乳頭の約1乳頭径下方のNB値を測定し、有色家兎8匹8眼では各眼圧において視神経乳頭の約1乳頭径下方のNB値(髄翼外のNB値)を測定した後に、視神経乳頭の約1乳頭径耳側の髄翼上で網膜表在血管のみえない部位のNB値(髄翼上のNB値)を測定した。さらに、白色家兎8匹8眼では各眼圧において視神経乳頭同一部位のNB値を測定した。眼圧70 mmHgおよび80 mmHgの時には各々角膜混濁が生じたが、実際のNB値測定には影響を与えなかった。拡張期および収縮期の大腿動脈圧をそれぞれFABPd, FABPsとすると、平均大腿動脈(FABPm)は次式で表される。

$$\text{FABPm} = \text{FABPd} + 1/3(\text{FABPs} - \text{FABPd}) \quad (10)$$

ここで、眼圧をIOPとし、眼灌流圧(OPP)を次式のように定義した

$$\text{OPP} = \text{FABPm} - \text{IOP} - 14(\text{mmHg}) \quad (11)$$

この両式によるNB値測定時の眼灌流圧を算出した。

なお、各眼圧レベルにおける測定終了時に大腿動脈カニューレから動脈血を採血し、全自動pH/血液ガス分析装置(Model 170, Corning Glass)を用いて、pH, Pco_2 , および Po_2 を測定した。室温は $20 \pm 2^\circ\text{C}$ に保ち、直腸温をサーミスタ温度計(MGAIH-219 Y, 東芝)で測定した。

6. レーザースペckル法による網膜NB値測定

レーザースペckル法による網膜NB値測定には、半導体レーザーの替わりに選択的に網膜により散乱するアルゴン(青)レーザーを眼底に照射して生じるスペckルパターンを解析した。この方法により、網膜末梢循環を非侵襲的かつ二次元的に解析することは、原理的に半導体レーザーの場合と同様に可能のはずである。測定系はアルゴンレーザー(波長488 nm, 最大出力3 mW, 2002-3 SLL, Uniphase, California, 米国)およびエリアセンサー(縦100×横100画素, BASIS型, キヤノン)を装置した眼底カメラ(TRC-WT 3, トプコン)から成る。直径1.2 mmのレーザー照射野のうち、測定部位である 0.62×0.62 mm(画角 45°)の眼底領域(いずれも家兎眼での値、人眼ではレーザー照射野直径2.1 mm, 画角 45° での測定部位 1.06×1.06 mmに相当)で散乱したアルゴン(青)レーザー光を、100×100画素のエリアセンサー上に結像させた後の処理はすべて半導体レーザーを用いた場合と同様である(図3)。

(1)と同様に両面砂打すりガラス板(直径90 mm, 厚さ2 mm)を本装置の眼底カメラの合焦位置に置き、電動モーターに接続して定速度で回転させ、NB_v値の測定を行った。2~20 mm/秒の範囲では、測定されたNB_v値の3回の測定平均値とすりガラス板の移動速度の間には、良好な直線関係が得られた。

7. レーザースペckル法による網膜NB値測定の再現性

(2)に記したのと同様の麻酔条件下で、5分間隔で網膜同一部位(視神経乳頭の約1乳頭径耳側)のNB値を測定した(図2)。家兎網膜血管は、有髄神経線維である髄翼上をほとんど水平に頭側、尾側に向かって走行しており²⁶⁾、髄翼上の網膜表在血管のみえない部位から得られるスペckルパターンを解析した。眼底写真を撮影し網膜測定部位を記録した後、一度麻酔を覚醒させ、さらに24時間後に網膜同一部位のNB値を同様に測定した。1回目の測定値(V_1)と2回目および3回目の測定値(V_2 , V_3)の変動を式(9)により算出し、再現性指数として用いた。この再現性指数を、100×100画素(測定領域全体)のNB値の平均値(NB_v値)と、測定領域の中央の10×10, 20×20, 30×30, 40×40, 50×50, 60×60, 70×70, 80×80, 90×90画素の平均値について、それぞれ算出した。

8. 髄翼上および髄翼以外から得られるNB値の比較

アルゴンレーザー使用により得られたNB測定値が、実際に網膜血流のみを反映するかどうかを検討するため、

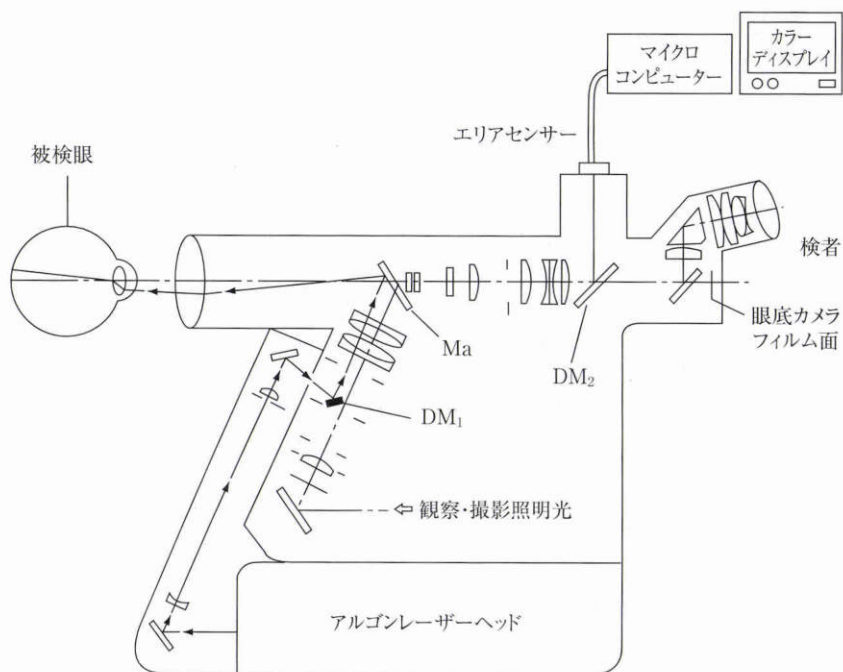


図3 アルゴンレーザー(青)によるレーザースペックル現象を利用した網膜末梢循環解析試作機。

髄翼上および髄翼外から得られるNB値を比較した。体重1.8~2.3 kgの成熟有色家兎6匹12眼を用いた。同様に麻酔、散瞳後、髄翼上の網膜表在血管のみえない部位（視神経乳頭の約1乳頭径耳側）のNB値を3回測定した後、同一眼の髄翼以外の部位（視神経乳頭の約1乳頭径下方）のNB値を3回測定した。家兎眼の髄翼以外の部分では網膜血管はみられず、網膜色素上皮下に脈絡膜血管が存在するのみである²⁶⁾。

9. 網膜NB値とmicrosphere法による網膜組織血流量測定値の比較

本装置により測定した網膜NB値と、網膜組織血流量の侵襲的測定法であるmicrosphere法による測定値を比較検討した。

体重2.0~2.5 kgの成熟有色家兎20匹20眼を用い、網膜NB値とcolored microsphere法による網膜組織血流量測定値の相関について検討した。(3)と同様に、全身麻酔した後、大腿動脈血圧および脈拍の連続モニターを行い、血圧測定側と同側の内頸動脈から左心室にカニューレを挿入した。(3)と同様方法により眼圧を10→50 mmHg (n=3), 10→65 mmHg (n=3), 10→80 mmHg (n=6), 50→65 mmHg (n=4), 50→80 mmHg (n=3), 65→80 mmHg (n=1)のように各2段階に調節した。眼圧65 mmHgおよび80 mmHgの時には角膜混濁が生じたが、NB値測定には影響を与えなかった。1段階目の眼圧に調整した5分後にカニューレ挿入と対側の眼の網膜NB値（視神経乳頭の1乳頭径耳側の表在血管のみえない部位）を3回測定し、その直後にcolored microsphere(赤色)溶液(15±0.3 μm, E-Z TRAC)0.15 mlを左心室内に注入した。Microsphere注入時から60秒間、大腿動脈カテ-

テルから基準血液を採取した。その後2段階目の眼圧に上昇させ、同様に網膜NB値測定およびmicrosphere(青色)注入を行った。なお、各眼圧における測定終了時に大腿動脈カニューレから動脈血を採血し、前述同様に血液パラメータをチェックした。致死量のペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)を静注し屠殺後、NB値測定側の眼球を摘出し、ホルマリン溶液で固定後、網膜を分離した。Haleら²⁷⁾と同様の方法を用いて、得られた網膜および基準血液中のmicrosphereの数をカウントした。各眼圧レベル時のmicrosphereは、その色により識別し、各眼圧レベル時における網膜組織血流量を算出した。

10. 眼圧上昇に伴う網膜NB値の変化

体重1.8~2.3 kgの成熟有色家兎8匹8眼を用いた。(5)同様に、全身麻酔した後、血圧および脈拍の連続モニターを行った。(5)と同様方法により眼圧を10, 30, 50, 70, 80 mmHgと上昇させ、各眼圧レベルに上昇した5分後に、網膜の表在血管のない同一部位（視神経乳頭の約1乳頭径耳側）のNB値を1分間隔で3回ずつ測定した。なお、各眼圧における測定終了時に大腿動脈血を採血し、前述同様に血液パラメータをチェックした。前述の式(10)および(11)により、NB測定時の眼灌流圧を算出した。

11. レーザースペックル法による虹彩NB値測定と再現性

半導体レーザーを組み込んだ装置を用い、その焦点距離を動かすことにより画角30°において虹彩面上1.07×1.07 mmの範囲の虹彩末梢循環を測定することも可能である。予備実験の結果は虹彩全幅の中央部が最も虹彩NB値の再現性が良好であったので、耳側中央部(左側では3時、右側では9時)(図2)で同一固体、同一測定個

所における,短時間(5分間)と長時間(24時間)の間隔を置いた場合の測定値の変動につき,麻酔,固定した,かつ散瞳を行わない有色家兎眼で,他組織(2),(7)におけると同様に検討した.なお,虹彩ではできるだけ広い範囲を平均するため,画角 30° で 1.07×1.07 mm(100×100 画策)の範囲のNBの平均(NB_{av})を虹彩NB値とした.

12. 虹彩NB値とmicrosphere法による虹彩組織血流量測定値の比較

組織血流量と虹彩NB値を同一固体において同時に測定し,両者の結果を比較した.有色家兎20匹を(3)と同様に麻酔後,マイクロスフェア実験用に動物を準備し(3)と同様方法で,ただし散瞳は行わないでそれぞれの家兎で, $20 \rightarrow 30$ mmHg ($n=4$), $20 \rightarrow 40$ mmHg ($n=4$), $20 \rightarrow 50$ mmHg ($n=2$), $30 \rightarrow 40$ mmHg ($n=4$), $30 \rightarrow 50$ mmHg ($n=4$), $40 \rightarrow 50$ mmHg ($n=2$)と眼圧を2段階に調整し,それぞれの眼圧調整後5分後に被実験眼の,耳側虹彩全幅中央部でNB値を測定した.NB値測定直後にマイクロスフェアを注入したその後,次の眼圧まで上昇させ同様にNB値測定およびマイクロスフェア注入を行った.なお,各眼圧における測定終了時に血液パラメータの測定を行ったのは前回同様である.致死量のペントバルビタールナトリウム(ネンブタール[®])静注による屠殺後,被実験眼を摘出し,ホルマリン溶液固定後,角膜輪部から約2 mm離れた位置で角膜輪部に平行に強膜を切開し前眼部と後眼部を分割後,毛様体を含んだまま虹彩を剥離し,手術用顕微鏡下で虹彩から毛様体を環状に切離した.虹彩突起は虹彩裏面に強固に付着し明瞭に剥離することが困難なため,特に剥離せず虹彩側に残した.以下,脈絡膜,網膜におけると同様にして虹彩と基準血液中のマイクロスフェアの数をカウントした.なお,各眼圧時のマイクロスフェアはその色により識別し,各眼圧における組織血流量を算出した.

13. 眼圧上昇に伴う虹彩NB値の変化

有色家兎を使用し実験(5)と同様に動物を準備した.ただし散瞳は行わなかった.眼圧を20 mmHgから30,40,50,60 mmHgまで段階的に上昇させ,眼圧に調整した5分後に虹彩NB値を耳側虹彩全幅中央部で測定した.

14. 脈絡膜および視神経乳頭微小循環の眼圧変化に対する自動調節能の検討

白色家兎をurethane(1 g/kg 静脈内注射)麻酔後,大腿動脈から血圧,脈拍のモニターおよび動脈血採取用のカニューレを挿入した.散瞳後,1眼に0.1%ジクロフェナックナトリウムを5分おきに3回点眼した後,1本の25 G針を角膜輪部から虹彩に接触しないよう前房中に挿入し,3方活栓を経て,一方を圧力トランスデューサ,ひずみ圧力アンプに接続し卓上ペンレコーダで眼圧を記録した.他方を眼内灌流液入りのリザーバーに接続し,リザーバーの高さを変えることにより眼圧を調節した.まず眼圧を25 mmHgに調整し,脈絡膜NB値を既に述べ

た部位で1分ごとに10分間測定した.その後,眼圧を15 mmHg($n=7$),40 mmHg($n=5$),60 mmHg($n=4$)のいずれかに急速に変化させ,その15分後までは1分ごと,15分後から2時間後までは5分ごとに測定を繰り返した.対照として,眼圧を25 mmHgのまま2時間以上同様に測定を行った群($n=6$)も設定した.各家兎の全身状態は既に記したごとくモニターし,脈絡膜NB値を視神経乳頭値から約1乳頭径離れた位置で(2)のごとく経時的に測定した.

別の白色家兎群を用い,同様な準備と実験プロトコルで測定位置を視神経乳頭上の表在血管のみられない範囲に設定し,(2)のごとく経時的に視神経乳頭NB値を測定した.

眼圧変化を示す指標として,以下の式で定義される normalized perfusion pressure(PP_{norm})²⁸⁾を用いた.

$$PP_{norm} = \frac{(FABP_s - 14) - IOP}{(FABP_s - 14) - IOP_{baseline}} \times 100(\%) \quad (12)$$

ここで,FABP_sは収縮期大腿動脈圧(systolic femoral arterial blood pressure),FABP_s-14は腹臥位の家兎での同眼動脈圧,IOP_{baseline}は実験開始時眼圧(25 mmHg)を表す. PP_{norm} は収縮期眼動脈圧から眼圧を引いた値の変化率を示すもので,実験開始時点では PP_{norm} は100%であり,仮に収縮期眼動脈圧と眼圧が等しくなると0%になる値である.

15. 点眼または全身投与薬物による家兎眼循環の変化

点眼薬または全身薬投与により眼循環の変化がみられるか否かをいくつかの薬物を使用して生体眼で本法により検討した.使用した薬物は,脳循環改善剤として長く使用されている, α -1遮断作用,パパペリン様血管平滑筋弛緩作用,血小板凝集抑制作用を持つifenprodil^{29)~31)}選択的 β -1遮断作用と Ca^{2+} -拮抗作用を持ち,既に抗緑内障薬として使用されているbetaxolol³²⁾³³⁾, α -1遮断作用, β -1および β -2遮断作用,ニトログリセリン様血管平滑筋弛緩作用を持ち,抗緑内障薬として新たに開発されたnipradilol^{34)~36)}である.Ifenprodil点眼実験では0.5%溶液を1眼に,基剤を他眼に30 μ lずつ点眼することとし,第1群の家兎では点眼前および1回点眼2時間後,同第2群では点眼前および1日2回12時間毎に点眼し,その3回目点眼(すなわち2日後)の2時間後,同第3群では点眼前および1日2回12時間毎に点眼し,その7回目点眼(すなわち4日後)の2時間後,同第4群では点眼前および1日2回12時間毎に点眼し,その41回目点眼(すなわち21日後)の2時間後に,測定を虹彩,後部脈絡膜および視神経乳頭で,各々既に述べた方法でペントバルビタールナトリウム(ネンブタール[®])15 mg/kg投与における軽麻酔下で行った.なお,点眼前の測定は点眼開始前日の点眼後測定を行う予定時間と同時刻に行った.また,すべての測定は,点眼剤→基剤点眼側の順に,マスクされた測

定者により行われ、眼圧は空気眼圧計により、レーザースペックル測定直前に行った。Betaxolol 点眼実験、nirpradilol 点眼実験では、視神経乳頭における測定のみを同様に 1 眼に 0.5% betaxolol または 0.25% nirpradilol 30 μ l 点眼、他眼に各々の基剤を 30 μ l 点眼前と、1 日 2 回の 12 時間毎の点眼を、前者では 3 週間、後者では 2 週間連続して行い、最後の点眼 2 時間後に行った。眼圧はレーザースペックル測定直前および点眼期間中は 5 日毎に行った。他の実験デザインはすべて ifenprodil 点眼実験と同様であった。

全身投与薬の実験に関しては、 Ca^{2+} -拮抗薬である nicardipine (山之内製薬)、nilvadipine (藤沢製薬) および pranidipine (大塚製薬) を検討した。全身麻酔、保定、および麻酔時の全身状態のモニターは既に (3)、(4) で述べたのと同様に行ったが、nicardipine 実験³⁷⁾では麻酔薬としては (3) と同様にペントバルビタールナトリウム (ネプタール[®]) を、nilvadipine^{38)~40)}、pranidipine^{41)~43)} 実験では (5) と同様にウレタンを用いた。測定は各々、40 μ g/kg、3.2 μ g/kg、および 5 μ g/kg を一度に静脈内注射し、(2)、(6) に記したと同様方法で脈絡膜、視神経乳頭は白色家兎で、網膜は有色家兎で測定した。対照群には各々の基剤を同容量ワンショットで静脈内注射した。測定は静注前および静注後 90 分に渡り適宜の時間間隔で行い、NB 値側定対側眼の眼圧を空気眼圧計で適宜測定した。なお、投与 Ca^{2+} -拮抗剤の濃度は他動物における実験効果と予備実験における家兎の血圧下降効果を参考として決定した。

16. 人眼における視神経乳頭 NB 値の測定

今まで述べてきた主として動物実験用に開発された装置は、98 フレーム分 (約 0.18 秒) の各画素におけるスペックル強度の時間平均と時間変動を積算して血流量の指標としていた。動物実験では麻酔下で測定することから、同一部位を複数回測定し、その平均値を採用することで心拍の影響を除外できるが、臨床における測定では被検者の負担が大きく簡便な測定は行えない。

そこで、連続測定可能な装置を開発するため、毎秒 540 フレームのエリアセンサーから送られてくる情報を 64 フレーム毎に解析できる高速演算回路を設け、解析用コンピュータの画面上で結果をリアルタイムに表示できる装置を開発した。

毎秒 540 フレームのエリアセンサーからの情報は右図のように解析され、64 フレーム毎に各画素に対応する平均強度と偏差が血流解析用コンピュータへ転送される。ここで、エリアセンサー上の左端から x 番目、上端から y 番目 ($x=1\sim100, y=1\sim100$) の画素の、測定開始から k 番目 ($k=1\sim64$) のフレームのスペックル強度 $I(x, y, k)$ は、エリアセンサーの 1 フレームの走査に要する時間を ΔT 、時間 t におけるスペックル強度を $I(t)$ とすると、

$$I(x, y, k) = \int_0^{\Delta T} I(t) dt \quad (13)$$

となる。左端から x 番目、上端から y 番目の画素の 64 フレーム分のスペックル強度の平均値を $I_{\text{mean}}(x, y)$ および D_{mean} は、(1) と同様に計算される。すなわち、

$$NB(x, y) = I_{\text{mean}}(x, y) / D_{\text{mean}}(x, y) \quad (14)$$

1 秒間に転送されるデータ量は画素数 (10000) $\times$ 2 バイト (平均強度と偏差) $\times$ フレーム数 (8 フレーム) で 160 KB/秒となり、計算に時間がかかりリアルタイム表示が行えない。そこで、血流解析用コンピュータでは予め平均強度と偏差に対応した NB 値の配列をメモリーに記憶させておき、転送されてくるデータに対応した NB 値が瞬時に得られるようにした。この NB 値はカラーコードにも対応しており、速度の速い部位は赤色、遅い部位は青色の縦 100 画素、横 100 画素の血流マップが 0.12 秒間隔で連続的に表示される。

動物実験用装置は検者が眼底を観察できるよう可視光を眼底に照射していたが、麻酔下動物ならぬ人眼では眩しいために被検者に負担がかかり固視が悪くなるなどの問題があった。また、測定のために眼内へ照射するレーザーは波長が 808 nm であることから照射部位を直接観察することができなかった。この問題を解決するために、観察光を 630 nm のバンドパスフィルタへ通し、赤い光を観察光とした。被検者は眩しくなくなるが、検者は眼底

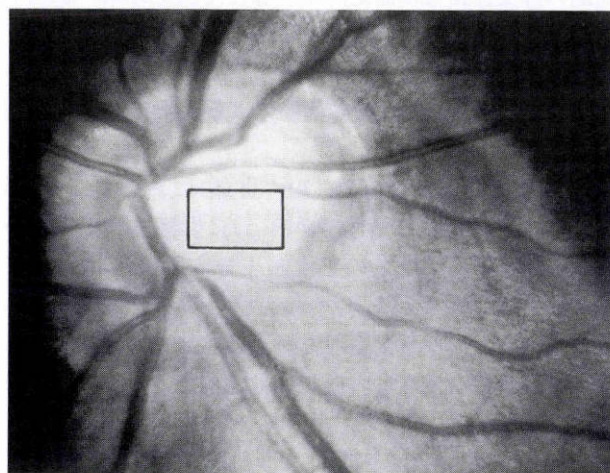
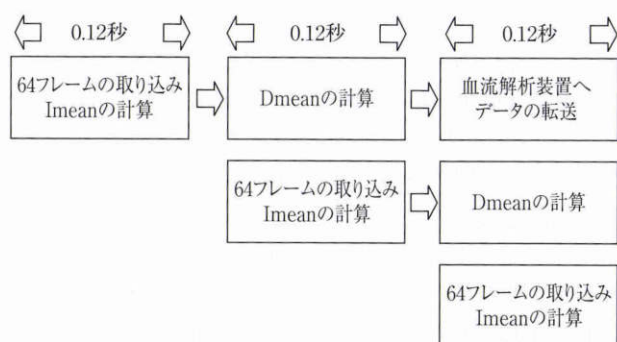


図 4 ヒト視神経乳頭測定部の 1 例。
表在血管のみえない部分を選択

の観察ができなくなる。このため 35 mm 眼底撮影用カメラを取り外し、高感度赤外線増幅器(NiteMate 1306, Intevac, California, 米国)と CCD カメラ(IK-C41 MF, 東芝)を設置し、眼底の観察とレーザーが照射されている測定部位を同時に観察できるように改良した。

17. 人眼視神経乳頭 NB 値測定の再現性

視神経乳頭 NB 値測定には画角 30° (人眼の場合測定領域 0.72×0.72 mm)を用いた、0.4% トロピカミド(ミドリン M[®], 参天製薬)点眼による散瞳 20 分後に、本装置で視神経乳頭耳側の表在血管のみえない部位の NB 値を測定した(図 4)。視神経乳頭については、カラーマップ上で、表在血管に相当する部位を含まない最大の矩形領域を設定し、その領域内の NB 値の平均値を測定値(NB_{ONH})とし、測定中は心電図モニターを同時に行った。全身的疾患および軽度近視以外の眼科的疾患を有さない正常若年者 6 名(20~34 歳)12 眼を対象とし、本装置で NB_{ONH} 測定した。測定に際し、すべての測定対象者から書面で同意を得た。なお、本研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得ている。心電図の収縮期に相当する最高の NB_{ONH} および拡張期に相当する最低の NB_{ONH} をそれぞれ sysNB_{ONH}, diaNB_{ONH} とし、NB_{ONH} の拍動成分 pNB_{ONH} を次式のように定義した。

$$pNB_{ONH} = sysNB_{ONH} - diaNB_{ONH} \quad (15)$$

また、7 秒間の測定時間中の 5 心拍分に相当する NB_{ONH} の平均値を meanNB_{ONH} とし、5 心拍分の pNB_{ONH} 平均値と meanNB_{ONH} の比をそれぞれ算出した。さらに、同じ正常若年者 6 名 12 眼を対象とし、本装置で meanNB_{ONH} を 1 分間隔で 2 回ずつ測定した。眼底写真を撮影し、測定部位を記録した後、24 時間後に同一部位の meanNB_{ONH} を再び測定した。1 回目の測定装置(V₁)と 2 回目および 3 回目の測定値(V₂, V₃)の変動を用いて再現性指数を算出した。なお、1 分間隔の再現性指数は主として測定誤差を含めた測定の再現性の指標となり、24 時間間隔の再現性指数は測定誤差に加えて測定対象の眼底末梢循環の生理的変動を含めた生体眼における測定値の安定性の指標となると考えられる。

18. 点眼または全身投与薬物による人眼視神経乳頭循環の変化

若年正常有志者計 22 名(20~34 歳)において、β-遮断剤の点眼が視神経乳頭循環(NB_{ONH})に影響を与え得るのかにつき検討し、12 名の正常眼圧緑内障患者において Ca²⁺-拮抗薬内服の NB_{ONH} への影響を検討した。なお、本研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得、かつ、すべての測定対象者からは書面で同意を得た。また、NB_{ONH} は 3 心拍分の NB_{ONH} を平均したものを使用した。実験は(1)3 週間の両眼基剤点眼実験、(2)3 週間の 1 眼チモロール(0.5%) (メルク 万有, 東京)1 日 2 回、他眼の基剤 1 日 2 回点眼実験および、(3)3 週間の 1 眼カルテオロール

(2%) (大塚製薬)1 日 2 回、他眼の基剤 1 日 2 回点眼実験の 3 つのシリーズから成る。

1) 9 例の正常有志者において(17)に記したごとく 9:30 に任意の眼をミドリン M[®]で散瞳した後、11:00 に散瞳眼の NB_{ONH} を(16)に述べた方法で測定した。直後に両眼に市販カルテオロール点眼液の基剤を両眼に 30 μl 点眼した。その 5 分後に再び両眼にミドリン M[®] (参天製薬)を点眼し、同様の測定および測定後 5 分のミドリン M[®]点眼を 12:30(1.5 時間)、14:00(3 時間)、および 15:30(4.5 時間)に行った。被験者は翌日から同基剤を 1 日 2 回、9:00 および 21:00 に点眼するよう指示された。21 日後、11:00、12:30、14:00、15:00 に全く同様にプロトコルで NB_{ONH} を同一眼同一部位で測定した。

2) 9 例の正常有志者において、9:30 に両眼をミドリン M[®]で散瞳、11:00 の両眼 NB_{ONH}、眼圧を(17)におけると同様に測定し、その直後に腕動脈血圧、脈拍を測定、両眼に市販カルテオロール基剤を 30 μl 点眼、さらに 5 分後両眼にミドリン M[®]を一滴点眼した。以後 12:30、14:00、15:30 に同様プロトコル測定を NB_{ONH}、眼圧、血圧および脈拍について行った。翌日 11:00 に任意の片眼に 0.5% チモロールを 30 μl、他眼に基剤を 30 μl 点眼し、以後被験者は同一眼に同一薬剤を 11:00 と 23:00 に 1 日 2 回 21 日間点眼するよう指示された。被験者は 7 日目と 14 日目に来院し 12:30 に両眼眼圧を測定された。21 日目の 9:30 に両眼にミドリン M[®]を点眼、以後 11:00、12:30、14:00、15:30 の同一眼同一部位の NB_{ONH}、眼圧、血圧、脈拍測定は第 1 日目と全く同様のプロトコルで行われた。なお、実薬投与眼側については被験者、検査者および NB 解析者ともマスクされていた。

3) 正常有志者 9 名(うち 5 名はチモロール実験にも参加)で上記の実験と全く同様のプロトコルで 2% カルテオロール 3 週間 1 日 2 回点眼の NB_{ONH}、眼圧、血圧、脈拍に及ぼす影響を検討した。ただし、実験最終日(21 日目)の 11:00、12:30、14:00、15:00 の測定後 2 ml の採血を行い、血中のカルテオロール濃度を GC/Ni/CI/HR/MS 法(Japan Electron Optic Laboratories)で行った。なお、人眼における眼灌流圧を、平均血圧を拡張長期血圧に収縮期血圧と拡張期血圧の差の 1/3 を加算したものとして、(2/3 平均血圧-眼圧)で計算した。

4) 正常眼圧緑内障患者(平均年齢 56 歳)で Ca²⁺-拮抗薬ニルバジピン^{38)~40)} (ニバジール[®], 藤沢)4 mg/1 日内服の NB_{ONH}、眼圧、血圧、脈拍に及ぼす影響を検討した。対象者は点眼薬および全身的降圧剤投与を受けていない、正常眼圧緑内障以外に眼、全身疾患のない 12 名であった。外来で、血圧、脈拍、眼圧測定後(17)の方法により両眼 NB_{ONH} を測定した。その後、無作為に 6 名を偽薬または 2 mg ニルバジピン 1 日 2 錠を朝夕に服用する群に分け、2, 4, 8 および 12 週間後になるべく同時刻に同様の測定を行った。NB_{ONH} は同一眼では同一部位で行い、両眼の

NB_{ONH}, 眼圧の平均値をその患者の結果として採用した. 眼注流圧の計算と前記と同様に行った. 測定, NB 解析はマスクされた研究者によるのは上記と同様である.

III 結 果

1. レーザースペックル法による脈絡膜および視神経乳頭 NB 値測定再現性

12 眼における脈絡膜および視神経乳頭の NB 値測定の再現性指数は, 5 分間隔で 7.0 ± 1.3 (平均値 $\pm$ 標準誤差) % および 7.5 ± 2.0 %, 24 時間間隔で 11.3 ± 2.5 % および 11.8 ± 3.1 % であった. 脈絡膜, 視神経乳頭ともに, V_1 , V_2 および V_3 の間に有意差はなかった. 5 分および 24 時間間隔の脈絡膜および視神経乳頭の NB 値測定の再現性指数と解析した画素数との関係をみると, 解析した範囲の画素数が 70×70 以下では画素数の増加とともに低下し, 70×70 以上ではほぼ一定であり, 30×30 以上では約 20% かそれ以上であった. 以下, 家兎眼における脈絡膜および視神経乳頭の測定は 45° 画角で, 0.42×0.42 mm (70×70 画素) の範囲の NB 値の平均 (NB_{av}) をもって脈絡膜および視神経乳頭 NB 値とした.

2. 脈絡膜 NB 値と microsphere 法による脈絡膜組織血流量測定値の比較

Microsphere 注入時における全身状態のパラメータは, いずれも健常家兎の正常域内の値であり^{44) 45)}, 各眼圧において有意な変化はみられなかった. 眼圧 80 mmHg の時には多少の角膜混濁は生じたが, 半導体レーザーの出力を適宜上昇させることにより, NB 値を測定することができた. NB 値は眼底からの反射光量の如何によらず, むしろその時間変動の割合により規定される [式 (7)] ので, 角膜混濁は実際の測定にはほとんど影響しないと考えられる. 脈絡膜 NB 値 (3 回の測定の平均値) と microsphere 法による測定値は, ほぼ直線関係にあった (図 5).

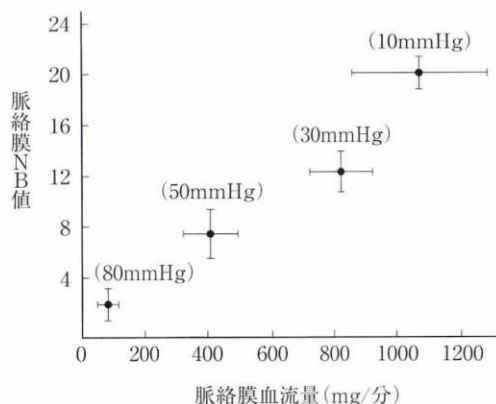


図5 脈絡膜normalized blur (NB) 値とマイクロスフェア法による脈絡膜血流量.
括弧内は測定時の眼圧を示す. パーは標準誤差 (SE) を示す.

3. 視神経乳頭 NB 値と水素ガスクリアランス法による視神経乳頭血流量測定値の比較

眼圧を 20 mmHg に保持下の NB 値は 8.93 ± 0.25 (平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=5$), 60 mmHg に 15 分保持下の同は 6.05 ± 0.69 であり, 後者は前者の $68 \pm 9\%$ であった. 一方, 水素ガスクリアランス法による組織血流量は, 眼圧 20 mmHg で 101.9 ± 25.2 ml/分/100g, (平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=5$), 同 60 mmHg で 36.4 ± 10.8 ml/分/100 g であり, 後者は前者の $37 \pm 9\%$ であった.

4. 眼圧上昇に伴う脈絡膜および視神経乳頭 NB 値の変化

脈絡膜 NB 値および視神経乳頭 NB 値測定時の, 大腿動脈平均血圧, 脈拍および大腿動脈血 pH, P_{CO_2} , P_{O_2} , 直腸温などの全身状態のパラメータは, いずれも健常家兎の

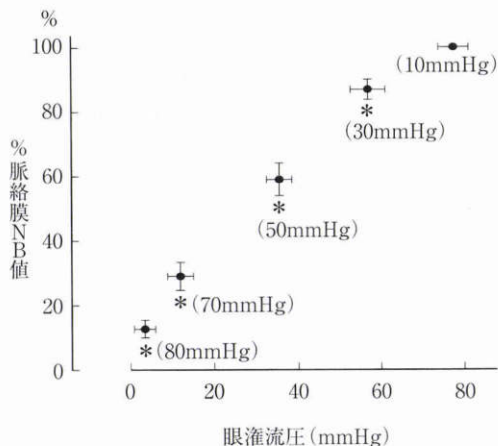


図6 眼注流圧と脈絡膜 NB 値.
括弧内は測定時眼圧. 猶脈絡膜 NB 値は眼圧 10 mmHg 時のものを 100% とした. パーは SE を示す.
*: Dunnet test, $p < 0.01$

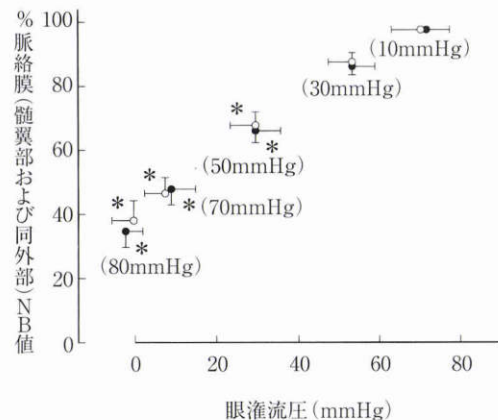


図7 有色家兎における眼注流圧と半導体レーザーによる髄翼部 (●) および髄翼外部 (○) NB 値.
括弧内は測定時の眼圧を示す. なお, 各 NB 値は眼圧 10 mmHg 時のものを 100% とした. パーは SE を示す.

* : Dunnet test, $p < 0.01$

正常域内の値であり⁴⁴⁾⁴⁵⁾, 実験中に有意な変化はみられなかった。

白色家兎脈絡膜 NB 値は眼灌流圧の低下に従って NB 値は減少し, 眼圧 50, 70 および 80 mmHg では, NB 値は初期値に比して, それぞれ平均 39.1, 70.9, 87.5% ($p < 0.01$, $n = 8$, Dunnet の多重比較) 減少した (図 6)。

有色家兎においても, 眼灌流圧の低下に従って髄翼上および髄翼外 NB 値は減少し, 眼圧 50, 70 および 80 mmHg では NB 値は初期値に比して髄翼上で平均 31.4, 53.2, 61.2%, 髄翼外で平均 33.1, 52.2, 65.0%, それぞれ減少した ($p < 0.01$, $n = 8$, Dunnet の多重比較), 各眼圧レベルでの髄翼上および髄翼外 NB 値の間に有意差はなかった (図 7)。

視神経乳頭 NB 値は眼灌流圧 40 mmHg 以上では, ほぼ一定であった。眼灌流圧 40 mmHg 以下では, 灌流圧低下に従って NB 値は減少し, 眼圧 70 および 80 mmHg では, NB 値は初期値に比して, それぞれ平均 29.5, 41.3% ($p < 0.01$, $n = 8$, Dunnet の多重比較) 減少した (図 8)。

5. レーザースペックル法による網膜 NB 値測定の再現性

12 眼における NB 値測定の再現性指数は 5 分間隔で 8.2 ± 1.8 (平均値 $\pm$ 標準誤差) %, 24 時間間隔で 13.0 ± 2.0 % であった。V₁, V₂ および V₃ の間に有意差はなかった。5 分および 24 時間間隔の測定の再現性指数と解析した画素数との関係をみてみると, 再現性指数は, 解析した範囲の画素数が 70×70 以下では画素数の増加とともに低下し, 70×70 以上ではほぼ一定であった。以後の家兎における網膜の測定では, 画角 45° で 0.24×0.42 mm (70×70 画素) の範囲の NB 値の平均 (NB) を網膜 NB 値とした。

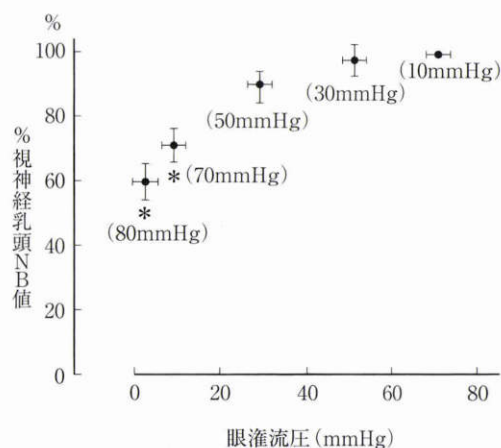


図 8 眼灌流圧と視神経乳頭 NB 値。

括弧内は測定時の眼圧を示す。なお, 視神経乳頭 NB 値は眼圧 10 mmHg 時のものを 100% とした。バーは SE を示す。

* : Dunnet test, $p < 0.01$

6. 髄翼上および髄翼以外から得られる NB 値の比較

髄翼上の網膜表在血管のみえない部位の NB 値は 14.1 ± 0.8 (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n = 12$) であった。一方, 髄翼以外の部位からは, 同条件ではスペックルパターンを記録できなかった。

7. 網膜 NB 値と microsphere 法による網膜組織血流量測定値の比較

Microsphere 注入時における大腿動脈平均血圧, 脈拍および大腿動脈血 pH, Pco₂, Po₂, 直腸温の平均値は, いずれも健常家兎の正常域内の値であり⁴⁴⁾⁴⁵⁾, 実験中に有意な変化はみられなかった。

10, 50, 65, 80 mmHg の時の, 網膜 NB 値と microsphere 法による測定値は, ほぼ直線関係にあった (図 9)。

8. 眼圧上昇に伴う網膜 NB 値の変化

実験中の大腿動脈平均血圧, 脈拍, 大腿動脈血 pH, Pco₂, Po₂, および直腸温の 8 匹の平均値はいずれも健常家兎の正常域内の値であり⁴⁴⁾⁴⁵⁾, 実験中に有意な変化

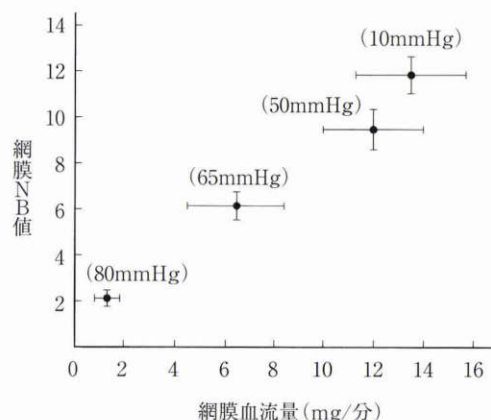


図 9 網膜 NB 値とマイクロスフェア法による網膜血流量。括弧内は測定時の眼圧を示す。バーは SE を示す。

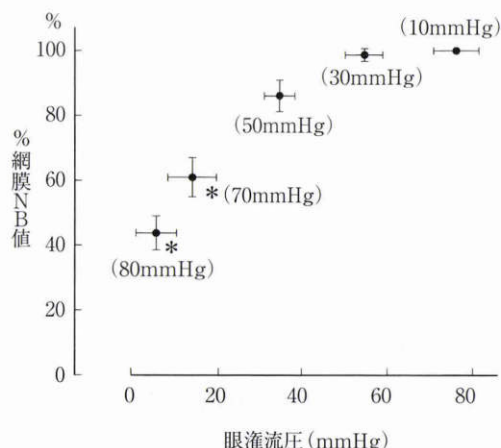


図 10 眼灌流圧と網膜 NB 値。

括弧内は測定時の眼圧を示す。なお, 網膜 NB 値は 10 mmHg 時のものを 100% とした。バーは SE を示す。

* : Dunnet test, $p < 0.01$

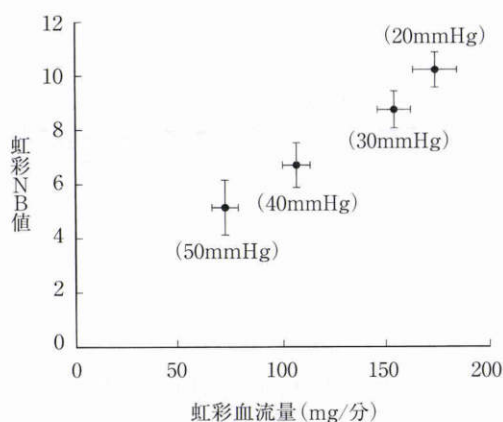


図 11 虹彩 NB 値とマイクロスフェア法による虹彩血流量。

括弧内は測定時の眼圧を示す。バーは SE を示す。

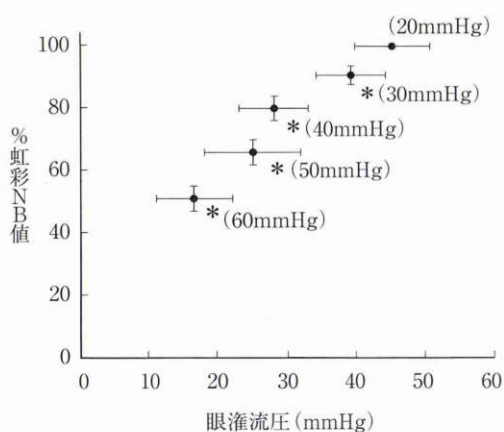


図 12 眼灌流圧と虹彩 NB 値。

括弧内は測定時の眼圧を示す。なお、虹彩 NB 値は眼圧 20 mmHg 時のものを 100% とした。バーは SE を示す。

* : Dunnet test, $p < 0.05$

はみられなかった。眼灌流圧 50 mmHg 以上では NB 値はほぼ一定であった。眼灌流圧 50 mmHg 以下では NB 値と眼灌流圧の低下に従って NB 値は減少し、眼圧 70 および 80 mmHg では、NB 値は初期値に比して、それぞれ平均 38.9, 55.8% ($p < 0.01$, $n = 8$, Dunnet の多重比較) 減少した (図 10)。

9. レーザースペックル法による虹彩 NB 値測定と再現性

再現性指数は 8 眼の平均で 5 分間隔で $8.8 \pm 2.0\%$ (平均値 $\pm$ 標準誤差) 24 時間間隔で $14.1 \pm 3.0\%$ であった。 V_1 , V_2 , V_3 間には有意差はなかった

10. 虹彩 NB 値と microsphere 法による虹彩組織血流量測定値の比較

有色家兎 20 匹のマイクロスフェア注入時の大腿動脈平均血圧、脈拍および大腿動脈血 pH, PO_2 , PCO_2 , 直腸温のそれぞれの平均値は健常家兎の正常域^{44) 45)}内にあり、実験中に有意な変化がみられなかった家兎を結果の解析に用いた。

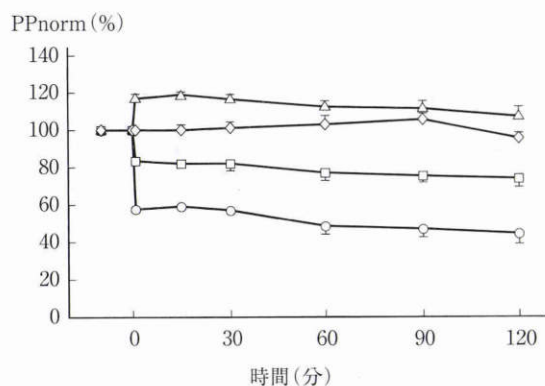


図 13 脈絡膜実験中の基準化眼灌流圧 (PP_{norm})。

25 → 10 mmHg ($\triangle$, $n = 7$), 25 mmHg ($\diamond$, $n = 6$), 40 mmHg ($\square$, $n = 5$), 60 mmHg ($\circ$, $n = 4$) に眼圧を変化させた家兎での平均および SE を示す。眼圧 25 mmHg 時のものを 100% とした。

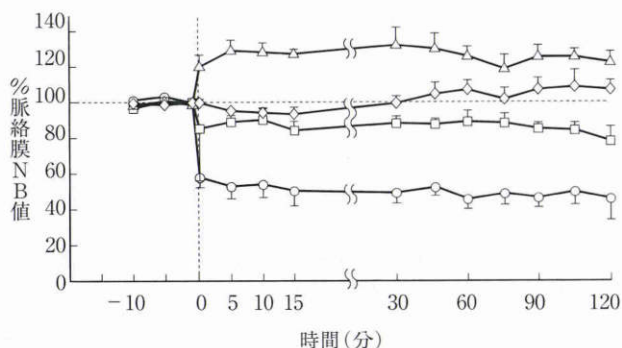


図 14 脈絡膜 NB 値の変化。

眼圧 25 mmHg 時のものを 100% とした。 $\triangle$, $\diamond$, $\square$, $\circ$, およびバーに関しては図 13 の説明参照。

各々の眼圧値における虹彩 NB 値と組織血流量は直線的相関を示した (図 11)。なお、虹彩実験中に瞳孔径の有意な変化はなかった。眼圧の上昇に伴い虹彩 NB 値、虹彩組織血流量ともに減少した。

11. 眼圧上昇に伴う虹彩 NB 値の変化

虹彩の実験中に瞳孔径に有意な変化はなかった。眼圧を 50 mmHg 以上に上昇させた場合、角膜に僅かに混濁を生じた家兎もあったが、NB 値の算出はレーザー強度でなくスペックルパターンの変動に基づくことに加え、照明系および観察系は角膜でなく虹彩または眼底に焦点を調整されているので、角膜混濁による影響は少ないと考えられた。眼圧 30, 40, 50, 60 mmHg での虹彩 NB 値は、それぞれ 9.1, 19.9, 33.8, 48.9% 減少し、それぞれ眼圧 20 mmHg での値より有意に小さかった ($p < 0.05$, $n = 9$, Dunnet の多重比較) (図 12)。

12. 脈絡膜および視神経乳頭微小循環の眼灌流圧変化に対する自動調節能の検討

脈絡膜の実験における PP_{norm} および脈絡膜 NB 値の変化を図 13, 14 に示す。PP_{norm} は設定された眼圧変化に応じてそれぞれ変化した後、血圧の変動に基づく若干の変

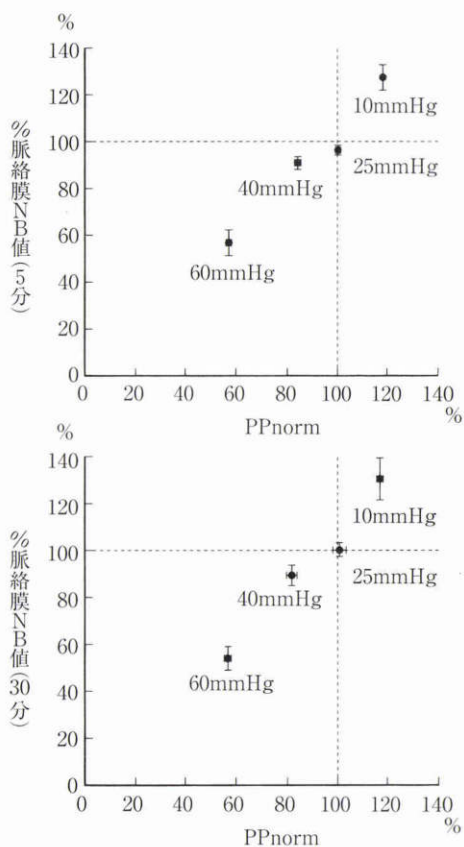


図 15 基準化眼圧流圧(PP_{norm})と、脈絡膜 NB 値の眼圧変化 5 および 30 分後の関係。

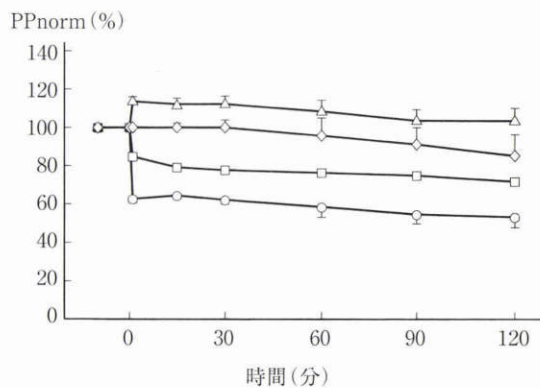


図 16 視神経乳頭実験中の基準化眼圧流圧(PP_{norm}). 25→10 mmHg ($\triangle$, $n=6$), 25 mmHg ($\diamond$, $n=5$), 40 mmHg ($\square$, $n=5$), 60 mmHg ($\circ$, $n=5$) に眼圧を変化させた家兎での平均および SE を示す。眼圧 25 mmHg 時のものを 100% とした。

動があったものの、2 時間に渡りほぼ一定に保たれた。脈絡膜 NB 値の経時変化は PP_{norm} の変化と同様に眼圧変化後に変化した後には 2 時間の間はほぼ一定の値を示した。次に PP_{norm} と脈絡膜 NB 値との相関を眼圧変化の 5 分後と 30 分後のそれぞれについて検討した(図 15)。 PP_{norm} 、脈絡膜 NB 値をそれぞれ初期値からの変化率で表示した。5, 30 分後ともに PP_{norm} と脈絡膜 NB 値のそれぞれの変化率は有意な正の相関がみられた(5 分後：相関係数

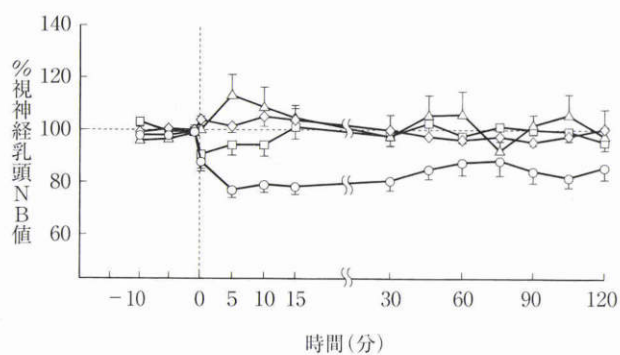


図 17 視神経乳頭 NB 値の変化。

眼圧 25 mmHg 時のものを 100% とした。 $\triangle$, $\diamond$, $\square$, $\circ$ およびバーに関しては図 16 の説明参照。

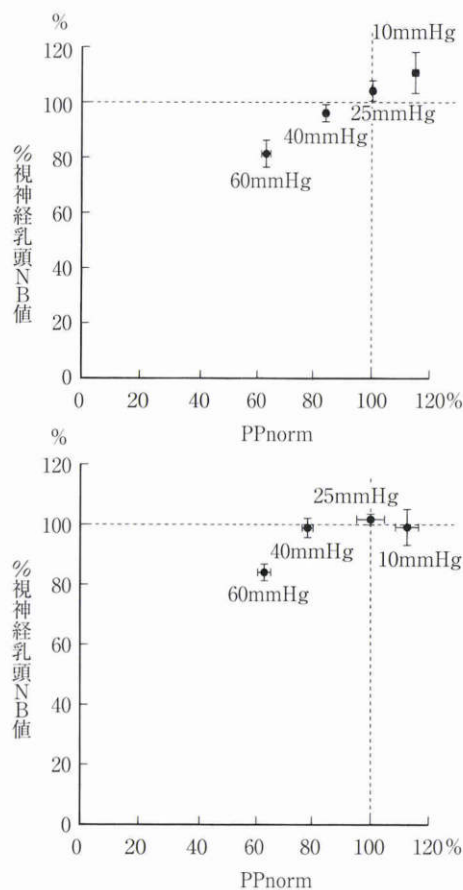


図 18 基準化眼圧流圧(PP_{norm})と、視神経乳頭 NB 値の眼圧変化 5 および 30 分後の関係。

$=0.975$, $p=0.0251$, 30 分後：相関係数 $=0.986$, $p=0.0135$).

視神経乳頭の実験における PP_{norm} および視神経乳頭 NB 値の変化を図 16, 17 に示す。脈絡膜の実験と同様に、眼圧変化によりそれぞれ変化した後、 PP_{norm} は 2 時間に渡りほぼ一定に保たれていた。眼圧を 25 mmHg に維持した群では視神経乳頭 NB 値は 2 時間ほぼ一定に保たれたのに対し、眼圧を 10 mmHg に低下させた群では視神経乳頭 NB 値は 5 分後に一時的に $113.0 \pm 8.6\%$ (平均値

±標準誤差)まで増加したものの、その後減少し、約 15 分後にはほぼ初期値レベルに戻った。眼圧を 40 mmHg に上昇させた群では視神経乳頭 NB 値は眼圧上昇の直後に $90.3 \pm 5.7\%$ まで減少したものの、その直後の短時間である程度回復を示し、その後は緩やかに増加し約 15 分後にはほぼ初期値まで上昇した。眼圧を 60 mmHg まで上げた群では視神経乳頭 NB 値は $77.2 \pm 2.7\%$ まで低下し、短時間での回復はなかったが、眼圧変化の 30 分後から緩やかな増加傾向があり、最終的に初期値に比べ $86.3 \pm 4.1\%$ まで回復した。PP_{norm} と視神経乳頭 NB 値との相関を眼圧変化の 5 分後と 30 分後のそれぞれについて検討したところ、5 分後では各プロットはグラフの原点を明らかに通らない直線上にはほぼ位置した。30 分後では眼圧 60 mmHg のプロットを除き視神経乳頭 NB 値はほぼ水平に並び、眼圧変化前とほぼ等しい値を取っていた(図 18)。

13. 点眼または全身投与薬物による家兎眼循環の変化

1) Ifenprodil 点眼実験

いずれのグループ(1~4 群)においても、眼圧、虹彩、脈絡膜、視神経乳頭 NB 値は基剤点眼側では前値と比べて有意の変化を示さなかった。眼圧はいずれのグループにおいても、すなわち 1 回点眼後、3 回点眼(2 日)後、7 回点眼(4 日)後、41 回点眼(21 日)後、すべての時点において ifenprodil 点眼側で平均約 2.5 mmHg 有意の低下(paired t-test $p < 0.01$, $n = 12 \sim 13$)していた。虹彩、脈絡膜および視神経乳頭 NB 値は ifenprodil 点眼側で同基剤点眼側に比べ点眼回数が増加するにつれ増加傾向がみられ、その ifenprodil 点眼側—基剤点眼側差は虹彩では 7 回点眼(4 日)後以降、脈絡膜、視神経乳頭では 41 回点眼(21 日)後で有意(paired t-test, $p < 0.01$, Bonferroni の補正による多重比較の補正後 $p < 0.05$)となった(図 19)。

2) Betaxolol 点眼実験

基剤点眼側では眼圧は実験期間中有意の変化がみられなかったが、0.5% betaxolol 点眼側では眼圧は前値に比べ平均 2.5~3.4 mmHg 低下し、その betaxolol 点眼側—基剤点眼側差は点眼 10 日目以降で有意であった(paired t-test $p < 0.01$)。視神経乳頭 NB 値は、基剤点眼側では点眼開始 20 日後も有意の変化がみられなかったが、0.5% betaxolol 点眼側では $5.5 \pm 9.6\%$ (平均値±標準偏差, $n = 31$)と有意に($p < 0.02$)に増加していた。

3) Nipradilol 点眼実験

基剤点眼側では、眼圧は 5 日目以降で約 1.0 mmHg, 0.25% nipradilol 点眼側では同約 4.0 mmHg 前値に比べて低下していた。視神経乳頭 NB 値は、基剤点眼側では 14 日後も有意の変化がみられなかったが、0.25% nipradilol 点眼側では $13 \pm 14\%$ (平均値±標準偏差, $n = 16$)有意(paired t-test $p < 0.01$)の増加がみられた。

4) Nicadipine 静脈内投与実験

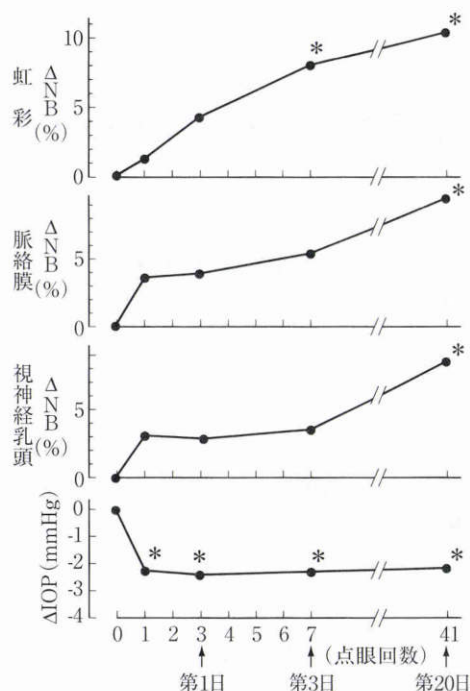


図 19 Ifenprodil 点眼実験における虹彩、脈絡膜、視神経乳頭 NB 値を前値を 100% として基準化したものの、実験眼側—基剤投与眼側差。

いずれも $n = 12 \sim 13$ の平均値を示す。

* : Bonferroni の補正後 $p < 0.05$

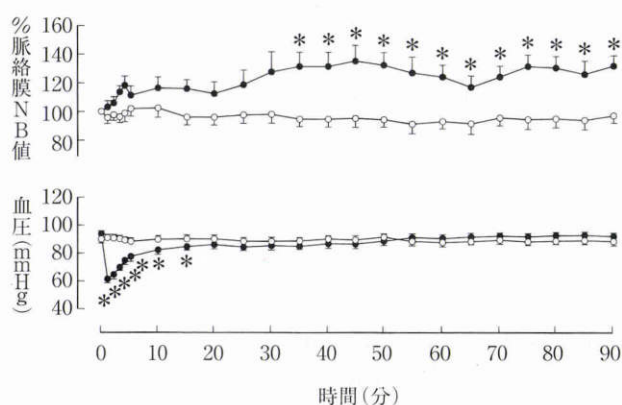


図 20 ニカルジピン実験における平均血圧および前値を 100% とした脈絡膜 NB 値。

○ : 溶剤投与群, ● : ニカルジピン 40 μg/kg 投与群,

* : 対照に比べて $p < 0.05$ バーは 10 例の SE

以下の実験では、実験中血圧以外の全身のパラメータが正常家兎の範囲外⁴⁴⁾⁴⁵⁾に変化したものはすべて結果から除外した。同容量の基剤静注群(対照群)では、血圧、脈絡膜、視神経および網膜 NB 値とも実験期間中(90 分間)は変化がみられなかった。一方, nicardipine 40 μg/kg 投与群では血圧は一時的に 15~20 分後までは低下がみられたが、後前値と有意差がみられなくなった。脈絡膜 NB 値は徐々に対照群のそれに比べて増加していき、静注後 30~90 分間では平均 $127 \pm 3\%$ (平均値±標準誤差, $n =$

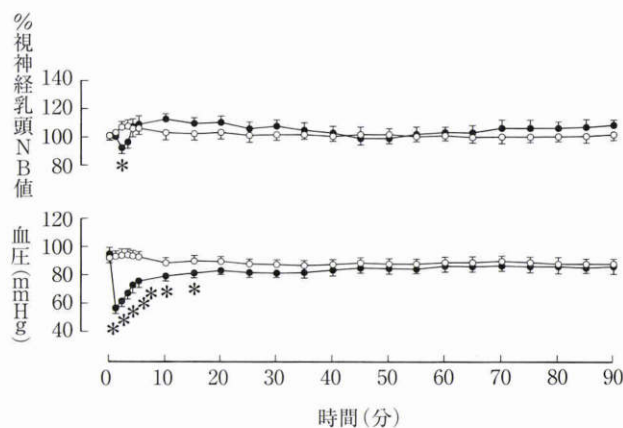


図 21 ニカルジピン実験における平均血圧および前値を 100% とした視神経乳頭 NB 値.

○, ●, * およびバーについては図 20 の説明参照.

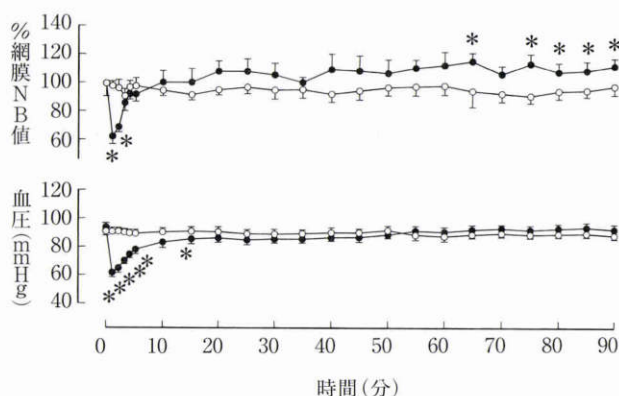


図 22 ニカルジピン実験における平均血圧および前値を 100% とした網膜 NB 値.

○, ●, * およびバーについては図 20 の説明参照.

10)の増加がみられた.一方,視神経乳頭NB値は血圧の低下の低下に伴い一時的に低下がみられたものの,以後は前値に復し,その時間経過は対照群に比べ差がみられなかった.網膜NB値は血圧の低下に伴い5分後までは有意に低下したが,その後,血圧の回復に先立って前値に復した後,徐々に増加60分以後は対照群に比べて有意に($p < 0.01 \sim 0.05$ unpaired t-test)増加していた(図20~22).

5) Nilvadipine および pranidipine 静脈内投与実験

同容量の基剤静注群(対照群)では血圧を含むいずれのパラメータも90分の実験期間中有意の変化はみられなかった.一方, nilvadipine, pranidipine 群とも脈絡膜,視神経乳頭,網膜NB値ともに対照群に比べて増加がみられたが,血圧に対する効果は家兎では $3.2 \mu\text{g/kg}$ nilvadipine より $5.0 \mu\text{g/kg}$ pranidipine の方が強い傾向にあった.いずれの薬剤でも視神経乳頭に対するNB値増加効果は,脈絡膜,網膜より強かった(図23,24).

14. 人眼視神経乳頭NB値測定の再現性

図25に人眼視神経乳頭NB値の1秒間連続測定結果

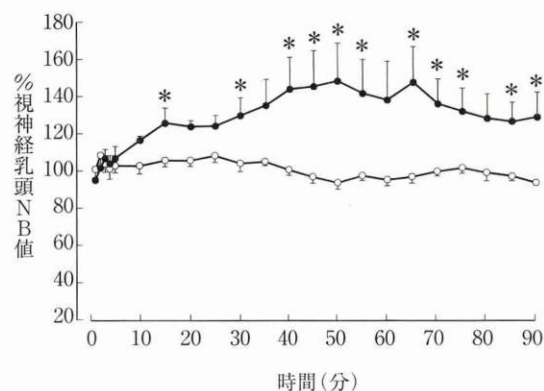


図 23 ニルバジピン実験における平均血圧および前値を 100% とした視神経乳頭 NB 値.

○: 溶剤投与群, ●: ニルバジピン $3.2 \mu\text{g/kg}$

投与群, *: 対照に比べて $p < 0.05$, バーは 10 例の SE

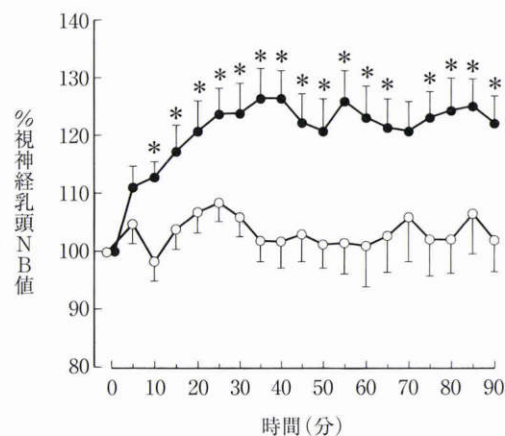


図 24 プラニジピン実験における平均血圧および前値を 100% とした視神経乳頭 NB 値.

○: 溶剤投与群, ●: プラニジピン $5.0 \mu\text{g/kg}$ 投与群, *: 対照に比べて $p < 0.05$ バーは 10 例の SE

の 1 例を示す.心拍と同期した周期性をもった波形を示し,拍動成分と平均値の比は $38.4 \pm 8.9\%$ (平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=12$)であった.人眼視神経乳頭NB値の1分および24時間間隔の測定の再現性指数は,各々 11.7 ± 3.3 , $13.0 \pm 3.0\%$ (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=12$)であった.

15. 点眼薬物または全身投与による人眼視神経乳頭循環の変化

1) 3 週間の測定間隔における再現性

3 週間の期間をおいた同一眼同一部位での測定の結果は 11:00 の測定で前後各々 15.2 ± 3.1 (平均値 $\pm$ 標準誤差), 15.5 ± 1.7 , 12:30 の測定で各々 14.1 ± 2.5 , 14.0 ± 1.9 , 14:00 の測定で各々 14.2 ± 3.2 , 14.1 ± 2.2 , 15:30 の測定で各々 15.3 ± 2.7 , 15.8 ± 2.6 であり, 3 週間の期間をおいた測定の差は 11:00, 12:30, 14:00 および 15:30 の順に 1.7 ± 1.3 , 1.1 ± 0.8 , 1.5 ± 1.0 , 1.5 ± 1.5 ($n=9$)であった.再現性指数は各々の時刻では 8~18%, 全 4 回の測定の平均を使用すると,上記同様の順で 14.7 ± 2.1 .

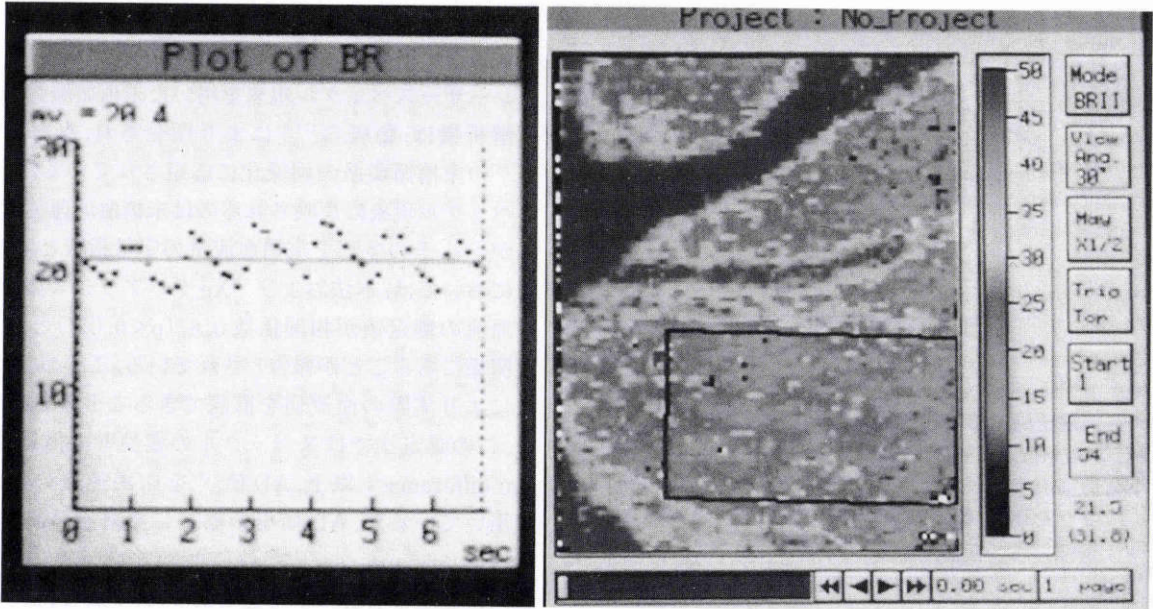


図 25 人眼視神経乳頭測定結果のディスプレイ結果。

左は 0.12 秒毎にとられた NB 値の拍動(5 心拍分)を示し、右はカラーマップを示す。赤は乳頭表面の血管、矩形は、NB 測定フィールドを示す。

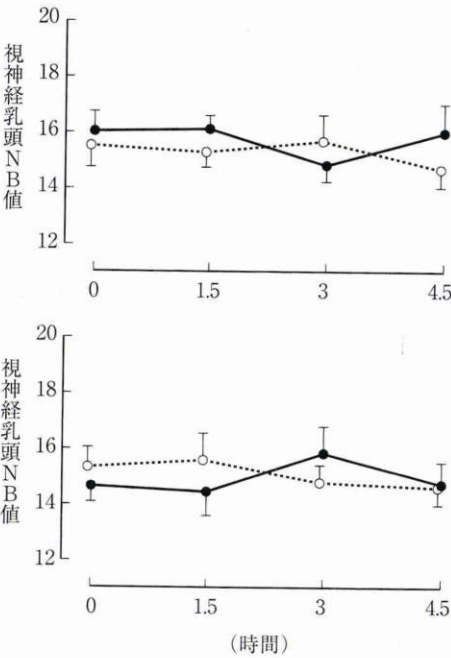


図 26 チモロール 0.5% 1 日 2 回 21 日間片眼点眼後の視神経乳頭 NB 値。

上図：基剤点眼側，下図：実薬点眼側，○は第 1 日，●は第 21 日の結果 パーは 9 例の SE

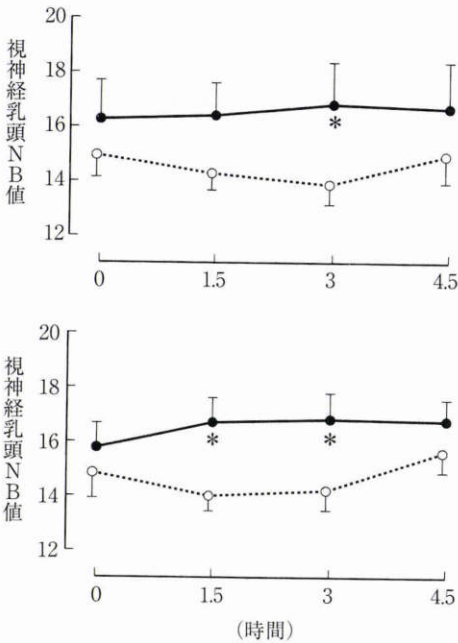


図 27 カルテオロール 2% 1 日 2 回 21 日間片眼点眼後の視神経乳頭 NB 値。

上図：基剤点眼側，下図：実薬点眼側，○は第 1 日，●は第 21 日の結果 *：基剤点眼側に比べて $p < 0.05$ パーは 9 例の SE

2, 14.8 ± 1.8 および 0.7 ± 0.8 ($n=9$) となり、再現性指数は $5.0 \pm 1.4\%$ であった。

2) Timolol 点眼実験

12:30 に測定された眼圧は timolol 点眼側でのみ、点眼開始 1 および 2 週後に有意に前値に比べて低下していた。第 1 日(両眼基剤点眼日)に比べて第 21 日(20 日間片眼 0.5% timolol, 片眼基剤 1 日 2 回点眼後、最後の点眼を

11:00 に行った日)の平均血圧、脈拍、平均血圧 $\times 2/3$ から眼圧を差引いた眼灌流圧は、timolol 点眼側、基剤点眼側とも、いかなる時点でも有意差がなかった。最後の(第 21 日 11:00)点眼後の眼圧は timolol 点眼側でより低下したが、視神経乳頭 NB 値は timolol 点眼側、基剤点眼側ともいかなる時点においても、第 1 日のそれと比べて差

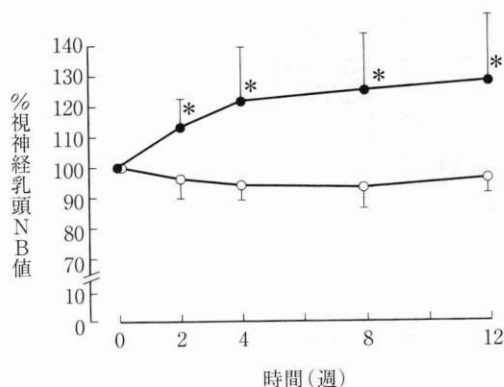


図28 正常眼圧緑内障視神経乳頭循環に対するニルバジピン(4 mg/日)内服の効果。

NB値は前値を100%として表した。

○：プラセボ群，●：ニルバジピン群

*：前値に比べて $p < 0.05$ バーは6例のSD

がなかった(図26)。

3) Carteolol 点眼実験

12:30 p.m.に測定された眼圧は, carteolol 点眼側, 基剤点眼側ともに, 点眼開始1および2週後に有意に前値に比べて低下しており, かつ, その低下幅には両眼間に差がなかった。第1日(両眼基剤点眼日)に比べて第21日(20日間片眼2.0% carteolol, 片眼基剤1日2回点眼後, 最後の点眼を11:00に行った日)の平均血圧, 脈拍, 眼圧, 眼圧は carteolol 点眼側, 基剤点眼側とも, いかなる時点でも有意差がなかった。最後の点眼後の眼圧は carteolol 点眼側, 基剤点眼側とも第1日のそれに比べて有意($p < 0.05$, paired t-test)に低下しており, その程度は両眼間で差がなかった。第21日の視神経乳頭NB値は, carteolol 点眼側, 基剤点眼側とも第1日に比べて, 4測定時点の平均で約15%増加がみられた(図27)。第21日に測定した血漿中未変化型 carteolol 濃度は, 11:00~15:30の平均で 1.1 ± 0.6 ng/ml(平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=9$)であった。

4) Nilvadipine 投与実験

Nilvadipine 2 mg 1日2回投与および偽薬1日2回投与に割り付けられた患者の年齢, mean deviation (dB), 眼圧, 平均血圧, および投与前眼圧, 眼圧は各々 53 ± 15 歳, -9.3 ± 6.4 dB, 13.5 ± 2.4 , 92 ± 14 , 50 ± 10 mmHg(平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=6$)に対して 58 ± 13 歳, -7.7 ± 1.7 dB, 14.7 ± 2.6 , 95 ± 17 , 47 ± 10 mmHgと両群間に有意差をみなかった。実験期間中の眼圧, 血圧, 眼圧, 眼圧は両群ともに前値と比べて有意差がなかったが, 視神経乳頭NB値は nilvadipine 群で約平均20%有意($p < 0.05 \sim 0.02$, paired t-test)に増加したのに対し, 偽薬群では有意の変化を示さず, nilvadipine 群と偽薬群間でもその経時変化に有意差(ANOVA, $p < 0.01$)があった(図28)。

IV 考 按

レーザースペckル現象を用いた末梢循環動態の二次元解析機は, 藤居ら¹⁷⁾⁴⁶⁾により開発され, 皮膚⁴⁷⁾や胃粘膜⁴⁸⁾の末梢循環系の画像化に応用されている。レーザースペckル現象に反映されるのは末梢血球運動速度であるが¹⁷⁾⁴⁶⁾, その多寡を末梢血流量の定量指数とすると, 皮膚においては, 本法および¹³³Xe クリアランス法による皮膚血流の測定値が相関係数 0.87 ($p < 0.001$)と良好な相関関係にあることが報告⁴⁹⁾されている。この事実は, 本方法により実際の血流値を直読できることを推定している。この測定法ではスペckルの変動率の積算値(average difference: 以下, AD 値)¹⁷⁾を血流速度の指標として用いているが, AD 値を指標とした測定の解析可能速度域は $0 \sim 5$ mm/sec²³⁾と狭いため, 血流速度の速い脈絡膜末梢血流の解析は不可能であった。そこで, より速い速度まで解析可能な速度指標であるNB値を眼底末梢循環測定に応用した。

1. 家兎眼における脈絡膜および視神経乳頭NB値測定

レーザースペckル現象を利用した本装置では, 最大測定面積が家兎眼底で 0.62×0.62 mm, 人眼眼底で 1.06×1.06 mmであり, これはlaser Doppler flowmetry⁹⁾¹¹⁾¹²⁾の測定面積の約40倍に相当し, ある範囲の末梢循環動態を二次元的に解析できるという利点がある。

本装置による測定の再現性と解析した範囲の画素数との関係を, 5分間隔および24時間間隔の測定のそれぞれについて検討した。両者ともに解析した範囲の画素数が 70×70 以下では画素数の増加とともに低下し, 70×70 以上(家兎眼底の約 0.42×0.42 mm以上に相当)では, ほぼ一定であった。よって, 脈絡膜または視神経乳頭組織血流量のごく局所的なばらつきは, 0.42×0.42 mm以上の測定野での平均をとる際に相殺され, より安定した結果が得られたと考えられる。よって, 本装置による末梢循環解析は, 種々の治療法の脈絡膜または視神経乳頭循環に及ぼす影響を検討する際, その変化を検出する感度を向上させ得ると考えられる。

半導体レーザーの眼底組織深達度に関しては, 動物眼での半導体レーザー照射後の病理組織学的検索がなされており, 半導体レーザーは脈絡膜全層および強膜内層まで深達することが報告^{50)~52)}されている。強膜の血流量は脈絡膜よりはるかに少ないため¹⁾, 強膜からの反射光のNB値への影響は非常に小さいと考えられる。また, 本装置を臨床応用する際に, レーザーの安全性が問題となる。半導体レーザーの網膜最大許容露光量は, 10秒の連続照射で 460 mW/cm²と報告²²⁾⁵³⁾されている。本装置の半導体レーザーの最大出力は 50 mWであるが, 実際の測定に要した出力は約 2 mW, 網膜照射量は約 90 mW/cm²であり, 数回の測定における照射時間は約 5 秒で

あった。したがって、本装置の測定により網脈絡膜に機能障害を与える可能性は低く、臨床応用は可能であると考えられる。

半導体レーザーの視神経乳頭組織への深達度に関する報告はない。Sharphedinsson ら⁵⁴⁾は水素クリアランス法および laser Doppler flowmetry による脳血流量測定値を比較し、ラット脳皮質における He-Ne レーザーの深達度は 1 mm 以上であることを報告している。また、波長 700~900 nm の範囲では灰白質および白質の組織深達度は同程度であり、これは He-Ne レーザーに比して約 30% 大きいことが報告⁵⁵⁾されている。よって、本装置による視神経乳頭組織の深達度は 1 mm より大きく、視神経乳頭 NB 値は前部視神経乳頭および強膜部の血流に加えて、後強膜部(人眼における後篩板部)の血流をも一部反映していると考えられる。

レーザー-speckle 現象を組織血流測定に利用する際、レーザーの散乱特性の組織の部位によるばらつきに留意する必要がある。すなわち、視神経乳頭上では表在血管のみ見える部位およびみえない部位から得られた NB 値のように、異なる部位から得られた NB 値を単純に比較することはできない。むしろ、別々の部位から得られる NB 値は二次元カラーマップ上で容易に識別可能であるので、これを利用して経時的測定の際の測定部位のずれを認識し、同一部位の NB 値の経時変化を正確にとらえる一助とすることが可能である。

本実験で用いた colored microsphere 法は、従来の radioactive microsphere 法を代用する方法として開発され、両者の測定値が直線関係にあることが既に報告²⁷⁾されている。本実験で得られた colored microsphere 法による眼圧 10 mmHg の時の脈絡膜組織血流量の測定値は、過去に報告された radioactive microsphere 法による家兎脈絡膜組織血流量の値^{56) 57)}とよく一致していた。脈絡膜組織血流量測定値と測定領域全体の NB 値の平均値は、眼圧 10~80 mmHg の範囲では良好な相関関係にあった。眼圧変化の脈絡膜循環に及ぼす影響が均一であると仮定すると、これらの結果は、血流速度の指標として用いた脈絡膜 NB 値が、脈絡膜組織血流量の定量的指標としても用い得ることを示していると考えられる。

今回、侵襲的視神経乳頭血流法として用いた水素クリアランス法は古典的な組織血流測定法であり、その定量性が確立されている。また、その再現性が高いことは既に同じ家兎視神経乳頭で報告⁵⁸⁾されている。今回、視神経乳頭血流測定に用いた電極は、直径が 100 μm と細いので組織侵襲を極力抑えられ、視神経乳頭内 0.7 mm に一定に保てるよう改良されたものである。眼圧上昇時の視神経乳頭 NB 値と水素ガスクリアランス法による組織血流量は結果に示したごとくよく相関したが、上記脈絡膜ではその回帰直線が大体 0 点近くを通ったのに対して、視神経乳頭では水素ガスクリアランス法による組織血流量

に対して NB 値は血流量減少幅をかなり過小評価している可能性が考えられた。レーザー-speckle 現象は組織のレーザー反射率や吸収率により影響されることが知られている。60 mmHg に眼圧上昇下の視神経乳頭は肉眼的にも色調がかなり蒼白となったが、これにより、ぶどう膜組織における高眼圧による変化以上に、レーザーの反射率が変化し、最終的に NB 値が影響された可能性が考えられた。

家兎眼における脈絡膜 NB 値は、眼灌流圧の低下とともに減少し、家兎眼において脈絡膜末梢循環に自動調節機能が存在しないことが推定された。脈絡膜血流量の眼灌流圧低下に伴う減少は、家兎眼(熱勾配法⁵⁹⁾)、ネコ眼(microsphere 法^{60) 61)})、アイソトープクリアランス法⁶²⁾)、熱勾配法⁶²⁾)、laser Doppler 法⁶³⁾)、サル眼(microsphere 法⁶⁴⁾)において報告されている。これらの報告は今回の結果とよく一致しており、今回測定した NB 値が脈絡膜血流量を定量的に測定していることを再確認するとともに、本法により、脈絡膜循環に影響を与える因子について生体眼で研究できることを示すものである。

人眼では白色家兎と異なり、脈絡膜はレーザーの伝達に影響を与えるメラニン色素を含有する網膜色素上皮下に存在している。有色家兎を用いた実験では、白色家兎と同様の測定部位で測定した NB 値(髄翼外 NB 値)と眼灌流圧の関係は、白色家兎を用いた実験とほぼ同様の結果であった。これは網膜色素上皮の有無にかかわらず、本装置を用いて脈絡膜血流量が定量的に測定可能であることを推定している。

家兎網膜血管は、有髄神経線維である髄翼上をほとんど水平に頭側、尾側に向かって走行しており²⁹⁾、髄翼以外の部分では網膜血管はみられない。よって、NB 値の測定領域を髄翼外に設定した場合、網膜血流が脈絡膜 NB 値に及ぼす影響は無視できる。しかし、人眼や他の高等動物においては、眼底後極部から測定した NB 値は網膜血流と脈絡膜血流の両者を反映する可能性がある。網膜血流量は脈絡膜血流量の 5% 程度にすぎないため⁶⁴⁾、高等動物においても眼底後極部から得られる NB 値に対する影響は大きくないことが予想され、本装置は人眼や他の高等動物においても脈絡膜循環解析に用い得ると思われる。有色家兎を用いた実験においても、網膜血管を有する髄翼上および網膜血管を有さない髄翼外から得られた NB 値が各眼圧レベルで有意差がなかったことは、網膜血流が NB 値(すなわち脈絡膜血流量の指標)の変化にほとんど影響しないということを、さらに支持するものである。

一方、家兎眼における視神経乳頭 NB 値は、眼灌流圧 40 mmHg 以上ではほぼ一定で、眼灌流圧 40 mmHg 以下では灌流圧低下に従って低下した。Geijer ら²⁾は microsphere 法を用いて、サル眼における視神経乳頭前篩板部血流量が眼灌流圧 30 mmHg 以上ではほぼ一定であり、

眼灌流圧 30 mmHg 以下では灌流圧低下に従って低下すると報告している。ネコ眼においても,iodoantipyrine 法を用いて同様の報告⁶⁵⁾がある。これらの報告は今回の結果とよく一致しており,今回測定した NB 値が,視神経乳頭末梢血流に対する種々の要因の効果を検討するに当たっての定量指標となり得ることを,支持するものである。

2. 家兎眼における網膜 NB 値測定

本装置の測定面積も人眼では 1.06×1.06 mm に相当し,これは laser Doppler 法による末梢循環の測定面積(直径約 0.18 mm)^{61)~12)}の約 40 倍に相当し,二次元解析が可能であるのみならず,経時的測定における測定部位のずれによる誤差を軽減し得ると考えられる。本装置による測定の再現性と解析した範囲の画素数との関係を,5 分間隔および 24 時間間隔の測定のそれぞれについて検討したところ,両者ともに解析した範囲の画素数が 70×70 以下では画素数の増加とともに低下し, 70×70 以上(家兎眼底の約 0.42×0.42 mm 以上に相当)ではほぼ一定であった。よって,網膜組織血流量の局所的なばらつきは, 0.42×0.42 mm 以上の測定野での平均をとる際に相殺され,より安定した結果が得られたと考えられる。本装置による末梢循環二次元解析は,組織の同一部位を長時間の間隔で繰り返し測定するのに有用であり,網膜末梢循環の経時変化を検討する際,その変化を検出する感度を向上させ得ると考えられる。家兎の感覚網膜では,波長が長くなるに従い透過性は徐々に上昇し,また網膜色素上皮と脈絡膜では波長 600 nm 以上で透過性が良くなり,逆に吸光性は悪くなることが知られている⁶⁶⁾。この結果,アルゴン(青)レーザーと半導体レーザーでは,感覚網膜で約 10%,網膜色素上皮と脈絡膜で約 30% の吸光度の差が存在することになる。さらに,Brancato ら⁵⁰⁾は有色家兎眼底にレーザーを経瞳孔的に照射した際の病理組織学的検索により,アルゴンレーザー(出力 120 mW,照射野直径 350 μ m)では網膜内層および外層に,半導体レーザー(出力 120 mW,照射野 200×500 μ m)では網膜外層および脈絡膜に変化がみられたと報告している。故に本装置により照射されたアルゴンレーザー(最大出力 3 mW,照射野直径 1.2 mm)は,脈絡膜にはほとんど深達していないと考えられる。家兎網膜血管は,有髄神経線維である髄翼上をほとんど水平に頭側,尾側に向かって走行しており,髄翼以外の部分では網膜血管はみられず,網膜色素上皮下に脈絡膜血管が存在するのみである²⁶⁾。今回の結果でも,髄翼上から得られる NB 値が平均 14.1 であったのに対し,髄翼以外の部位からは,同条件ではスペckルパターンを記録できなかった。これは本装置により得られる NB 値が網膜末梢循環を反映しており,脈絡膜からのスペckルパターンをほとんど受信していないことを示している。

本装置を実際に臨床応用する際に,レーザーの安全性が問題となる。波長 488 nm のアルゴンレーザーの網膜

最大許容露光量は,10 秒の連続照射で 280 mW/cm^2 と報告²²⁾⁵³⁾されている。本装置のアルゴンレーザーの最大出力は 3 mW であるが,実際の測定に要した出力は約 0.2 mW,網膜照射量は約 6 mW/cm^2 であり,数回の測定における照射時間は約 5 秒であった。したがって,本装置の測定により網脈絡膜に機能障害を与えた可能性は低いと考えられるが,人眼への応用は慎重を要する。

眼灌流圧を変化させた時の,網膜 NB 値と microsphere 法による網膜組織血流量を同一眼で同時に測定し,両者の相関について検討したところ,colored microsphere 法による眼圧 10 mmHg の時の網膜組織血流量の測定値は,過去に報告された radioactive microsphere 法による家兎網膜組織血流量⁵⁶⁾の値とよく一致していた。眼灌流圧を変化させた時の,測定領域全体の NB 値の平均値(NB_{av} 値)と colored microsphere 法による網膜組織血流量の測定値は,眼圧 10~80 mmHg の範囲では良好な相関関係にあった。眼圧変化の網膜循環に及ぼす影響が均一であると仮定すると,これらの結果は,血流速度の指標として用いた網膜 NB 値が,網膜組織血流量の定量的指標として用い得ることを示していると考えられる。

白色家兎脈絡膜から得られる NB 値は,眼圧が 30 mmHg および 50 mmHg では,眼圧 10 mmHg の時の NB 値に比してそれぞれ 11.2, 39.1% 減少していることを既に述べた。家兎脈絡膜血流量は網膜血流量の約 100 倍であり⁵⁶⁾,さらに,今回得られた網膜 NB 値が眼圧 50 mmHg まではほぼ一定であったことは,今回得られた NB 値は脈絡膜末梢循環ではなく,網膜末梢循環を反映していたことを示す。家兎眼における網膜 NB 値は,眼灌流圧 50 mmHg 以上ではほぼ一定で,眼灌流圧 50 mmHg 以下では眼灌流圧の低下に従って低下し,家兎網膜における自動調節機構の存在が推定された。網膜血流量の眼灌流圧変化については,ネコ眼(微小電極による酸素濃度測定⁶⁷⁾⁶⁸⁾で眼灌流圧 40 mmHg 以上,microsphere 法⁶⁹⁾で 75 mmHg 以上),サル眼(microsphere 法で眼灌流圧 60 mmHg⁶⁴⁾ および 30 mmHg⁷²⁾ 以上),人眼(laser Doppler 法⁶⁹⁾で眼灌流圧 40 mmHg 以上,blue field entopic phenomenon 法で 40 mmHg⁷⁰⁾ および 50 mmHg 以上⁷¹⁾)において自動調節機構が存在することが報告されている。これらの報告は今回の結果とよく一致していた。

3. 家兎眼における虹彩 NB 値測定

5 分間隔,24 時間間隔の虹彩 NB 値の再現性指数は 8.8, 14.1%,と良好な値を示した。上述の各再現性指数は実用上十分に小さく,虹彩の微小循環に関して,本法により信頼性の高い解析が可能であるといえる。本測定機の測定範囲は虹彩で 1.07×1.07 mm,他の眼循環測定装置に比べ広範囲であるため測定位置の微細な変動に影響を受けにくいことに加え,正常家兎の心拍数は約 300/分(0.2 秒/1 心拍)であり,拍動性変動が連続 0.5 秒間の測

定時間中に平均化されることも良好な再現性に寄与したと考えられる。

前房内に接続した灌流液入りリザーバーにより眼圧を変化させる実験では、虹彩 NB 値は microsphere 法による組織血流量とよく相関した ($r=0.61$)。各眼圧での組織血流量と NB 値の平均値を比較すると、相関係数は 0.99 となった。これらの結果から、本来血流速度の定量的指標である NB 値が、虹彩においても組織血流量を反映する指標として用い得ることが推定された。今回、大腿動脈圧などをモニターした家兎の眼圧を数段階に変更することにより眼灌流圧を変化させたところ、虹彩 NB 値は眼灌流圧の低下とともに減少した。NB 値と眼灌流圧の間には有意な正の相関がみられ、その回帰直線はほぼ原点を通ることから、家兎の虹彩および血流速度は眼灌流圧の変化に対して明らかな自動調節能を顕わさないことが示された。ネコ⁶⁰⁾の虹彩で眼圧の変動後の血流量の変化は僅かである一方、サル⁶⁴⁾では脈絡膜と同傾向の血流量の変化がみられ、家兎のそれと相似している。虹彩血流の眼圧に対する変化には種差があることが推定された。

4. 脈絡膜および視神経乳頭微小循環の眼灌流圧変化に対する自動調節能の検討

今回、脈絡膜と視神経において、これまでに検討されたことがなかった 2 時間という長時間における自動調節能の発現に関して検討したところ、脈絡膜においては眼圧変化の 1 分後から 2 時間後まで、NB 値の変動は灌流圧の変化によく一致した。また、眼圧変化の 5 分後と 30 分後で灌流圧と NB 値の相関を検討したところ、両者は原点を通る直線上にほぼ分布し、今回採用した眼圧変動幅においては、脈絡膜の血流速度に明らかな自動調節能が存在しないことが推定された。虹彩でも、同様な実験を試みたが、眼圧変化後、2 時間という長時間の測定中に瞳孔径が有意に変化する家兎が多く、断念した。虹彩と同じく脈絡膜においても、眼圧変化時の NB 値は microsphere 法により測定された組織血流量と良好な相関が確かめられているので、今回の結果は脈絡膜の組織血流に自動調節能が存在しないことを推定するものである。これは過去の microsphere 法などで得られた結果に矛盾しない。そればかりか、その傾向は眼圧変化後 2 時間という長時間においても変わらないことが今回の検討の結果、初めて明らかになった。しかし、Kiel ら⁷²⁾は血圧を一定にし眼圧を連続的に上昇させた場合、眼灌流圧が約 40 mmHg 以上で自動調節能がみられることを報告している。眼圧を低下させた場合を除くと、今回の検討では眼灌流圧 40 mmHg 以上に相当するのは眼圧 25 mmHg の全ポイントと 40 mmHg の一部のポイントに相当するのみなので、今回の結果からはほぼ正常の範囲内での眼灌流圧の僅かな変化に対する脈絡膜の自動調節能の存在をも否定することはできず、今後、より詳細な検討が必要である。

視神経乳頭の NB 値は眼圧を 25 mmHg から 15 mmHg

に低下させた場合、眼圧変化直後に一時的に増加し、その後緩やかな低下をし約 15 分後に眼圧変化前のレベルに戻ったのに対し、40 mmHg に増加させると眼圧変化直後の一時的な低下の後すぐにある程度の増加があり、その後にゆっくりと増加し約 15 分後に眼圧変化前のレベルまでほぼ回復した。これに対し、眼圧を 60 mmHg まで上昇させると、直後の回復はほとんどみられなかったものの、30 分後から緩やかな NB 値の回復傾向がみられた。眼圧変化の 5 分後と 30 分後の眼灌流圧と視神経 NB 値の相関を検討した結果、5 分後では各プロットは原点を通らない直線上にほぼ位置し、不完全ながら自動調節能が発現していることを示した。30 分後では、眼圧 60 mmHg のプロットを除く各プロットは眼圧変化前のとほぼ等しいレベルに位置し、自動調節能によるほぼ完全な代償反応がみられた。

末梢循環動態には動物の全身状態、特に P_{CO_2} や麻酔深度などが関与することが知られており、今回の NB 値の長時間における変動に影響を及ぼしたことは否定できないが、 P_{CO_2} は実験中に家兎の正常範囲とされる値にあり、かつ著明な変動はなく、また眼圧を 25 mmHg のまま 2 時間保った群では NB 値の変動がほとんどみられなかったことを考えれば、各眼圧変化群でみられた NB 値の変化は眼局所における血管の反応が主だった要因であったと思われる。今回の結果だけで視神経乳頭の自動調節能に関与する機序を特定することは難しいとはいえ、これらの時間経過の異なるいくつかの反応がみられたことは、それに複数の機序が関与していることを示すものといえよう。

5. 点眼または全身投与薬物による眼循環の変化

1) Ifenprodil 点眼

今回の結果は、0.5% ifenprodil の点眼は、家兎眼で虹彩、後部脈絡膜および視神経乳頭の微小循環を有意に促進することを示した。基剤投与対側眼の NB 値はいかなる時点でも変化がなかったことから、全身吸収された ifenprodil が上記効果に関連する可能性は少ない。眼圧下降による二次的な眼灌流圧上昇は、各組織 NB 値がいずれも点眼回数が増えるにつれ増加していったのに対し、眼圧は点眼回数によらず、約 2.5 mmHg と一定の低下を示していたことにより、やはり直接的な関連の可能性が薄い。局所に浸透した点眼薬物 ifenprodil の直接的な血管に対する作用である可能性が高いと考えられる。 α -遮断作用とパバベリン様直接的血管平滑筋作用により、本剤は約 10^{-7} M 以上の濃度で血管拡張作用^{29)~31)}を示すことが知られている。本剤の点眼後眼内移行に関してのデータはないが、緑内障治療に使用される β -遮断剤に関しては詳しい点眼後の眼内移行データが既に発表されており^{73)~77)}、本剤が点眼後虹彩で $10^{-7} \sim 10^{-6}$ M 以上の濃度に達することはほぼ確実とみてよい。問題は本剤が薬理濃度で後部脈絡膜および視神経乳頭部まで果たして達し

得たかというところにある。従来の報告を統合すると^{73)75)~77)}, 10^{-8} M 程度の濃度で達し得る可能性は否定できないが、この濃度では ifenprodil の血管拡張作用は期待し難い。一方、後部脈絡膜および視神経乳頭を環流する血管は、家兎ではヒトと同じく主に短後毛様動脈系であり、それらは視神経の回りで強膜を貫き脈絡膜へ交通している⁷⁸⁾。もし、ifenprodil が眼球壁に沿ったテノン嚢を介して拡散すれば⁷⁹⁾、比較的容易に眼球後壁近くに到達し得ると考えられる。今回の後部脈絡膜および視神経乳頭 NB 値、すなわち末梢血流が点眼回数が増えるに従って増加したという事実は、どのような経路をとるかにせよ長期に点眼された薬物が薬理学的濃度で眼球後壁部にまで達し得ることを推定しており、臨床的にも興味深い。さらに組織内濃度が遥かに後眼部よりは高いにもかかわらず、虹彩 NB 値の増加度が後眼部におけるそれと大差ないことは、ifenprodil の効果が虹彩血管系では余り強くないこと、またはその血管拡張作用は 10% 弱の血流増加程度で容易に飽和してしまうものであることが推定される。

2) Betaxolol 点眼

0.5 betaxolol 1 日 2 回片眼点眼で、点眼側のみで視神経乳頭 NB 値は有意に増加した。Betaxolol は既に緑内障治療薬として使用されている β -1 受容体選択性 β 遮断剤で、かつ Ca^{2+} -拮抗作用による血管拡張作用を 10^{-7} M 以上の濃度で示すことが知られている³²⁾³³⁾。Betaxolol は非選択性 β -遮断剤 timolol に比べて眼圧下降効果は劣るものの、視野保全効果ではむしろ優ることを推定する臨床報告^{80)~82)}が欧州を中心にいくつかあり、その作用メカニズムとして betaxolol の血管拡張作用が論じられている。今回の結果は、betaxolol 点眼が実際に視神経乳頭で血流改善作用をし得ることを始めて生体眼で示したものである。Betaxolol 点眼側では視神経乳頭 NB 値増加とともに眼圧も低下していた。しかし、前記 ifenprodil での結果を考慮すると、眼圧下降(眼注流圧上昇)による二次効果により視神経乳頭 NB 値が増加した可能性は低く、ifenprodil 同様 betaxolol の局所侵透による直接作用である可能性が高い。緑内障でも betaxolol 0.25% 懸濁液長期点眼で、球後短後毛様動脈系末梢の抵抗性指数が低下することが報告⁸³⁾されており、人眼でも全身吸収によるよりはむしろ局所侵透によるメカニズムが推定されている。

3) Nipradilol 点眼

Nipradilol は、非選択性 β -遮断作用と弱い α -1 遮断作用、および NO-donor としての作用をもつ薬剤で、その β 遮断作用は *in vitro* 系では timolol の 1/5~1/10 と弱い^{34)~36)}。0.25% の本剤点眼は動物眼、人眼で timolol と同等の眼圧下降作用を示すことが知られており^{84)~86)}、全身的 β -遮断作用が timolol のそれに比べて遥かに弱いことにより、新しい世代の点眼用 β -遮断剤としての可能性が

推定されている。本剤の timolol に対するもう一つの利点は、その α -1 遮断および NO-donor 作用による 10^{-7} M 濃度により発現が期待される血管拡張作用であろう^{34)~36)}。この点では、nipradilol は緑内障治療薬としては timolol よりむしろ前記 betaxolol と同じ範疇に入ると考えられる。実際に今回の家兎眼の実験でも 0.25% nipradilol 1 日 2 回 2 週間点眼は点眼側のみで、視神経乳頭 NB 値を約 15% 増加させ、その効果は ifenprodil, betaxolol よりもむしろ強い位であった。作用メカニズムとしては前述 2 剤と同様、対側眼に全く効果ないことにより、局所効果が最も考えられ、もし、同様の所見が人眼でも証明されれば、nipradilol の緑内障治療薬としての一つの利点となると考えられる。今回の一連の実験は、ifenprodil, betaxolol, nipradilol、いずれも点眼でも眼球後部に薬理濃度の薬物が移行し得る可能性のあることを、視神経乳頭循環に対する効果をパラメータとして推定したものである。点眼薬物の眼内移行は従来は前眼部中心に検討されてきており^{73)~75)}、後眼部への移行はついでに測定されているに過ぎず、その精度も余り高いものではない。眼球摘出は薬物濃度の高い眼瞼または結膜嚢を介して行わざるを得ないため、視神経、後部強膜などではそのコンタミネーションの可能性が否定しきれないという問題もある。点眼薬物の後眼部への移行を正確に測定する組織分割および眼球摘出法、あるいはもし、移行するとしたらその経路などの説明は今後の眼科における薬物治療を考える上で興味あるポイントとなろう。

4) Ca^{2+} -拮抗薬の眼循環への効果

Ca^{2+} -拮抗薬は、血管平滑筋細胞の細胞膜を介する Ca^{2+} 流入を抑制することにより、末梢血管拡張作用を有する薬剤である⁸⁷⁾。本剤は降圧作用の他に、脳などの臓器において末梢血流増加作用を有することが報告^{88)~90)}されており、脳循環改善剤としても用いられている⁹¹⁾。眼科領域においても本剤の低眼圧緑内障に対する投与が試みられ、一部の症例で視野の改善がみられたと報告⁹²⁾⁹³⁾されており、眼循環障害に起因する疾患に対する治療薬として期待されている。しかし、 Ca^{2+} -拮抗薬の眼循環に及ぼす影響について系統的に検討した報告は少なく、過去の報告はいずれも侵襲的方法である水素クリアランス法を用いたものである⁹⁴⁾⁹⁵⁾。本実験では、 Ca^{2+} -拮抗薬投与の家兎眼循環の時間変化をレーザースペックル法を用いて測定し、 Ca^{2+} -拮抗薬の眼循環に及ぼす影響を初めて非侵襲的に解析したものである。

Ca^{2+} -拮抗薬は家兎⁹⁴⁾、猿⁹⁵⁾を用いた実験で、水素クリアランス法により脈絡膜組織血流量を増加させることが報告されており、今回の検討でも nicardipine は脈絡膜 NB 値の増加を来した。今回の結果と従来の侵襲的方法による血流量測定結果の一致は、レーザースペックル法が生体眼で正確に脈絡膜末梢血流量を経時的にモニターできていたことを示すものと考えられる。

一般に、ある組織の灌流圧を P 、血管抵抗を R とすると、組織血流量 (BF) は次式で表される⁹⁶⁾。

$$BF = P/R \quad (13)$$

Ca^{2+} -拮抗薬は、血管平滑筋細胞の細胞膜を介する Ca^{2+} 流入を抑制することにより、血管平滑筋を弛緩させ、血管末梢抵抗を下げると考えられているため、脈絡膜末梢血管抵抗 (R) も低下していると考えられる。脈絡膜灌流圧を大腿動脈平均血圧と眼圧の差とすると、 Ca^{2+} -拮抗薬静注後、平均血圧が低下している間は、脈絡膜灌流圧 (P) も低下する。その後、全身血圧の低下により交感神経系からノルアドレナリンが分泌され全身血圧が上昇し、脈絡膜灌流圧 (P) も上昇する。ここで、 Ca^{2+} -拮抗薬はノルアドレナリンによる血管収縮作用を抑制するため⁸⁷⁾、脈絡膜末梢血管抵抗 (R) の上昇が抑制され、脈絡膜末梢血流量 (BF) が増加すると考えられる。これは、今回の検討で Ca^{2+} -拮抗薬静注後、まず大腿動脈血圧が低下し、これが徐々に回復するとともに、脈絡膜 NB 値が増加したこととよく一致していた。

高塚ら⁹⁷⁾は intra-vital microscope 法を用いて、家兎網膜細動脈径が塩酸 nifedipine 投与後 3.2~22.2% 拡張すると報告している。これは家兎網膜細動脈壁には平滑筋層が存在するため⁹⁸⁾、 Ca^{2+} -拮抗薬が家兎網膜細動脈に直接作用することによると考えられ、また、その結果として網膜末梢血管抵抗 (R) も低下していると考えられる。今回の実験では、実験を通じて眼圧 (IOP) は変化しなかった。 Ca^{2+} -拮抗薬静注後、平均血圧が低下したため、網膜灌流圧は低下していたと考えられる。既に述べたように家兎網膜循環には眼灌流圧の変化に対し自動調節機構が存在していると考えられるが、自動調節機能が機能するには人眼で 1~2 分を要することが報告⁹⁹⁾されている。 Ca^{2+} -拮抗薬投与 2 分後までは急激な血圧の低下に伴い網膜 NB 値は有意に低下したが、その後、血圧の回復に先立って網膜 NB 値が前値に回復したことには、自動調節機構が関与していると考えられる。さらに、全身血圧の低下により交感神経系からノルアドレナリンが分泌され全身血圧が上昇し、これに伴い網膜灌流圧も上昇する。ここで、既に述べたメカニズムにより、網膜末梢血管抵抗 (R) の上昇が抑制され、網膜末梢血流量 (BF) が増加すると考えられる。これは、今回の検討で大腿動脈血圧が徐々に回復した後、網膜 NB 値が増加したこととよく一致している。

Harino ら⁹⁹⁾はネコに塩酸 nifedipine を 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 静注し、laser Doppler 法を用いて視神経乳頭血流量は増加するが、網膜血流量は増加しないと報告しており、今回の実験結果と異なっている。この原因の一つとして、今回の検討では網膜末梢循環を測定したのに対し、彼らは網膜大血管の血流量を測定していることがあげられる。すなわち、家兎網膜大血管は数層の平滑

筋層に囲まれているのに対し、細動脈では一層の平滑筋層しか持たないこと、また動脈径が小さくなるほど存在する交感神経終末が少なくなることが報告⁹⁸⁾されており、このような解剖学的相違により、網膜大血管と末梢領域で、同一薬剤に対する反応が異なる可能性が考えられる。これに実験動物の種の違い、薬剤投与量の違いなどがさらに加わり、異なった結果となったと考えられる。

一方、視神経乳頭 NB 値は脈絡膜、網膜のそれと違い、ほとんど変化がなかった。家兎では視神経乳頭への血流は網膜とは違い、脈絡膜と同じ短後毛様動脈系によっている⁷⁸⁾。ただし、より末梢において Ca^{2+} -拮抗剤への反応性が違っていた可能性は否定できない。実際、 Ca^{2+} -拮抗剤 nifedipine はラットの腎血管ではその部位により違った効果を示すことが報告¹⁰⁰⁾されている。もう一つの説明として、水溶性の nicardipine³⁷⁾ は blood-neural barrier^{101) 102)}を通過しにくく、それが網膜血管系よりは nicardipine に対して反応性のもとと弱かった視神経乳頭血管系での不十分な血管拡張に結びついたという可能性がある。脈絡膜血管系は barrier がなく、簡単に nicardipine は組織間に拡散できるので、この仮説は nicardipine が脈絡膜で最も効果があったという事実とも矛盾しない。もし、この仮説が正しいならば、より脂溶性の強い Ca^{2+} -拮抗剤なら視神経乳頭でも血流増加が期待でき、より眼科的応用の可能性が強いことが予想される。以上の理由により、我々はさらに脂溶性の強い Ca^{2+} -拮抗剤 nilvadipine^{38)~40)}、pranidipine^{41)~43)}を nicardipine と同様なプロトコルにより検討した。Nilvadipine、pranidipine の脈絡膜循環への効果は nicardipine のそれと時間経過、変化幅ともほぼ相似していたが、網膜での血流増加効果は両剤とも nicardipine のそれに比べ大きい傾向があった。最も nicardipine との違いが顕著だったのは視神経乳頭における効果で、両剤とも 90 分間の平均で約 15~20% に血流増加作用がみられた。Nicardipine との違いのメカニズムは明らかではないが、両剤とも脂溶性が強く、より blood-neural barrier を通過しやすかったという因子は無視できないと考えられる。今回、家兎眼において調べた限りでは、nilvadipine が眼における視神経組織—網膜、視神経—への効果が最も顕著であった。Nilvadipine は既に血圧降下剤として本邦で長い使用経験を持っており、比較的脳循環改善作用が強く¹⁰³⁾、一方で正常血圧に対する効果は弱いことが知られている¹⁰⁴⁾。眼疾患に対し、もし、 Ca^{2+} -拮抗剤を処方するとすれば眼循環に対する効果が確実なことは当然として、全身副作用が少ないものが望ましいことは論を待たない。レーザースペックル法は眼科臨床使用により適した Ca^{2+} -拮抗剤をスクリーニングするためにも有用であると考えられる。

6. 人眼における視神経乳頭 NB 値測定

動物用解析機の 1 回の NB 値測定時間は 0.18 秒で

あったが、ソフトウェアによる解析に、さらに約 10 秒を要した。これは laser Doppler flowmeter⁶¹⁾による時間分解能より遥かに劣っていた。また、人の心拍数は 65~85/分であり、従来の装置では心拍による血流経時変化の測定は不可能であったため、人眼の眼底末梢循環の解析は困難であった。新たに開発した装置では、0.12 秒間隔で 7 秒間の NB 値連続測定が可能であり、人眼眼底の心拍による組織血流変化が測定可能となった。NB_{ONH} の 1 分および 24 時間間隔の測定の再現性指数は、測定誤差に加えて測定対象の末梢循環の生理的変動を表す指標と考えられるが、1 分間隔では主として前者を、24 時間間隔では後者も大きく反映すると考えられる。今回得られた結果は、長期における測定値の安定性を示すものであり、本装置により長期間にわたり視神経末梢循環を follow up し得ることが推定された。人眼視神経乳頭末梢血流は、心拍に同期した拍動を有していた。これは、ネコ眼¹⁰⁵⁾およびブタ眼⁹⁾における脈絡膜血流にも拍動が存在することと類似している。Koelle ら¹⁰⁶⁾は半導体レーザー(波長 811 nm)のネコ眼視神経組織における深達度は 1 mm 以上であると報告している。よって、今回の装置の視神経乳頭測定時における測定深度も 1 mm 以上であり、前篩板部のみならず後篩板部の血流も関与していると考えられる。前記 0.7 mm で刺入した水素電極による水素ガスクリアランス法と視神経乳頭 NB 値が家兎眼でよく相関したこともこの考案を支持する。NB_{ONH} の拍動成分平均値の比は約 38% であり、これらの値は超音波 color Doppler 法により測定した人眼眼動脈での値(約 120¹⁰⁷⁾~150%¹⁰⁸⁾よりかなり小さな値となっているが、これは今回測定した NB 値がより微小循環に近い末梢血流動態を反映していることによる可能性がある。

臨床応用に際しては、レーザーの安全性が問題となる。American National Standard Institute (ANSI)²³⁾によると、半導体レーザーの網膜最大照射許容量は 10 秒間の連続照射量は約 460 mW/cm² である。今回の測定における網膜照射量は約 90 mW/cm² であり、照射時間は約 10 秒であった。したがって、本装置の測定は ANSI の安全基準を十分満たしていると考えられた。

今回の 9 名における 3 週間の間隔をおいた測定の再現性結果から、 $\alpha=0.05$, $\beta=0.8$ とすれば $N=9$ で、個々の測定時間では約 9~15%、4 回の測定の平均をとれば約 3% 位の視神経乳頭 NB 値の違いは検出できることがわかった。ヒトでの実験結果によれば、両眼に 0.25% チモロール 40 μ l を 1 回ずつ点眼後の血漿中チモロール濃度は 0.3 ng/ml、すなわち β -1 および β -2 受容体を 38 および 64% 占有するに足る濃度とされている⁷⁴⁾。今回の timolol 実験対象者では血漿中 timolol 濃度は測定していないが、上記の結果を考慮すると 0.5% timolol 3 週間連続点眼では、十分全身的 β 遮断作用を呈するに足る血漿中濃度に達していたと考えられる。このことは、対側基

点眼眼の眼圧低下がみられたことでも裏付けされよう。全身的 β -2 遮断は末梢血管を収縮させること^{109)~111)}が知られており、事実 timolol 内服で脈絡膜血管抵抗が上昇すること¹¹²⁾が報告されている。しかし、今回の結果では視神経乳頭循環には全く変化(点眼側、対側眼ともに)がみられなかった。この説明としては、以下の 2 通りが考えられる。まず、視神経乳頭血管系には、生理学的に作用を有する β -2 受容体がない可能性である。次に timolol は別のメカニズムで血流増加作用があり、その効果が β -2 受容体遮断による血管収縮作用と打ち消しあったという可能性である。実際、そのメカニズムは明らかではないものの、timolol 点眼が人眼球後血流速度¹¹³⁾¹¹⁴⁾、または網膜大血管血流速度¹¹⁵⁾¹¹⁶⁾を上昇させるという報告がある。いずれにせよ、timolol 長期点眼でヒト視神経乳頭循環が影響されないということは臨床上の意義なしとはし得ないであろう。

一方 carteolol 長期点眼後には、点眼側のみならず、対側眼でも視神経乳頭 NB 値の増加がみられた。これは、第一義的に carteolol 全身吸収の結果と考えられるが、既に述べたごとく、 β 遮断作用では説明が困難である。Carteolol には β -遮断作用以外に、内因性交感神経刺激作用¹¹⁷⁾¹¹⁸⁾および内皮依存血管拡張作用¹¹⁹⁾が存在する。しかし、今回の測定された血漿中濃度は上記いずれの作用が発現するにしても低すぎると考えられる。ヒト組織では *in vitro* 系での報告と違い、より低濃度で carteolol の血管拡張作用が発現する、または両眼の眼圧低下による眼環流圧上昇が人眼では大きな効果を持つなどの可能性が考えられるが、その解明は将来の問題であろう。いずれにせよ carteolol 点眼がヒト視神経乳頭循環に好影響を呈し得るということは、緑内障治療上注意するに足ると考えられる。

正常眼圧緑内障例に低容量の nilvadipine の投与を行ったところ、眼圧、血圧には有意の変化はみられず、視神経乳頭 NB 値は投与中約 20% の増加がみられた。これは前記家兎眼での結果と一致しており、Ca²⁺-拮抗剤のスクリーニングとして家兎眼モデルが有用であったことを示している。正常眼圧緑内障は本邦における全緑内障患者の 60% 以上を占め、眼圧以外の因子の関与が他の緑内障の病型に比べて高いことが推定されている¹²⁰⁾。最近、nifedipine などの Ca²⁺-拮抗剤投与が一部の正常眼圧緑内障、または開放隅角緑内障の視野障害進行に効果のあることが報告^{121)~124)}されている。作用機序は必ずしも明らかではないが、寒冷暴露後の皮膚温度回復の悪い患者では Ca²⁺-拮抗剤の効果がよりはっきりしている¹²¹⁾¹²⁴⁾という報告もあり、vasospasm に対する本剤の血管拡張効果が視野障害進行に対して有効であるかも知れない。今回の nilvadipine 投与の結果は、患眼視神経乳頭で実際に本剤が血管拡張作用を呈し得ることを示していた。この結果は、本剤が正常血圧に対して効果が少ないこ

と¹⁰⁴⁾、脳循環改善作用を有すること¹⁰³⁾などとあいまって、nilvadipine 低容量を正常眼圧緑内障患者に用いて、その視野に対する効果を検討することが意義あることを推定する。

V ま と め

虹彩、脈絡膜、視神経乳頭および網膜はいずれも眼球の光受容器としての機能にとって重要な組織であり、その末梢循環動態は眼球の生理学的機能や眼底疾患の病態を考える上で重要である。今回開発した半導体レーザーによるspeckle現象を利用した末梢循環解析機は、laser Doppler 法の約 40 倍の領域の測定が可能である。また、血流速度の指標として用いた NB 値の、測定野全体の平均値が、虹彩、脈絡膜および視神経乳頭の組織血流量の定量的指標となり得ることが示された。さらに、眼圧上昇時のこれら NB 値の変化は、過去の侵襲的方法による血流量測定結果とよく一致していた。一方、網膜末梢循環に関しては、アルゴンレーザーによるspeckle現象を利用した末梢循環解析機を開発した。本装置においても、NB 値が網膜組織血流量の定量的指標となり得ることが示され、また眼圧上昇時の NB 値の変化は過去の報告結果とよく一致していた。さらに、半導体レーザーによる装置を改良し、人眼視神経乳頭でも測定できるようにし、良好な再現性を得た。上記三機種を用いた実験により、生体眼における眼循環の種々の点眼薬物、内服薬 (Ca^{2+} -拮抗剤) による変化を非侵襲的にモニターすることができ、本法が生体眼における循環の薬理、生理および病理を研究する上で極めて有用であることが示された。

本装置の応用範囲は広く、緑内障、網膜の疾患などへの臨床応用が可能であると考えられる。緑内障は視神経の障害により失明に至り得る、眼科臨床上非常に重要な疾患であるが、抗緑内障薬物療法や手術療法の、視神経乳頭循環への治療効果の定量的判定が可能となれば、眼科臨床上極めてその意義は大きいと考えられる。人眼に本装置を応用するに当たり、人眼眼底組織から得られる NB 値と人眼組織血流量との比較が問題となる。本装置では組織血流量の相対値 (NB 値) の測定が可能であるが、絶対値の測定は不可能であるため、個体間の比較に問題が残る。この点に関し、高等動物であるサル眼での眼底組織血流量と NB 値との比較、多数の正常人眼での NB 値測定による基礎データの蓄積などが今後必要となると考えられる。

以上、レーザー-speckle 法により眼底末梢組織血流量を非侵襲的に定量できることが明らかとなり、今後の眼生理学および眼底疾患の病態の研究に寄与することが期待された。

第 2 部 レーザー-speckle 法による網膜血管血流量の解析

I 緒 言

網膜血管は視神経乳頭からでる網膜中心動脈および静脈とそれらの分枝であり、主に網膜の脳層 (内顆粒層まで) の栄養血管である。視神経乳頭近傍の網膜動脈は直径 170 μm ほどで内弾力板と十分な筋線維層を備えているが、眼底に入って第一または第二分枝を越えた所で内弾力板は消失することから、視神経乳頭近傍の網膜血管と第二分枝以降の網膜血管では異なる循環調節の役割を果たしていると考えられる。網膜毛細管は直径 3.5 μm ~ 6 μm で、一層の内皮細胞と基底膜から成る、微小循環の最も重要な機能的単位である。網膜静脈は静脈性毛細管から静脈性前毛細管を経て網膜中心静脈へ入るが、視神経乳頭近傍では直径 200 μm ほどで筋線維層を備えており、静脈圧の変化を形態的に捕えられることもある。

眼底は直接血管が観察できることから、眼底検査は高血圧や糖尿病などの血管病変が生じる全身疾患の評価に用いられてきた。眼底検査は検眼鏡的に行われることから、形態的な変化を捕らえることはできるが、それによる網膜血管循環動態の変化は定性的であり、微小な変化を捕らえることはできない。網膜血管循環動態の変化を定量的に捕らえることができれば、眼生理、眼薬理学的にその意義は大きい。特に網膜静脈は循環動態の悪化で形態的に変化することから、血流速度の変化と形態的变化を同時に測定、観察する上で適している。

これまで人眼における網膜血管循環動態の変化を捕らえる幾つかの方法が報告されているが、定量的に測定することは、決して容易ではなく、臨床に応用できる方法が確立されたとはいえない。例えば、蛍光色素であるフルオレセイン^{125) ~ 129)}またはインドシアニングリーン^{130) ~ 132)}を静脈内へ注入する方法では蛍光色素を体内へ注入しなければならないこと、血流速度を測定する場合、蛍光色素の先端部を決定することが困難であること、scanning laser ophthalmoscopy^{133) ~ 137)}では微小単位時間で得られた映像を解析しなければならないため、その解析に時間を要するなど、現状においては侵襲的であり、また簡便に測定、解析することはできないという問題がある。

He-Ne などのレーザーを網膜血管に照射し、その血管を流れる赤血球により反射された光と血管壁により反射された光の波長の差を赤血球の移動速度による Doppler シフトと考え、その速度を求めようとする laser Doppler velocimetry では^{138) ~ 143)}原理的に網膜血流速度の絶対値が測定できる可能性があるが、基本仮定である 1 回散乱モデルに対して実際には血管内では多重散乱となっているはずであり、またレーザーは確実に網膜血管中心部に照射されていないため、被検者にとってそ

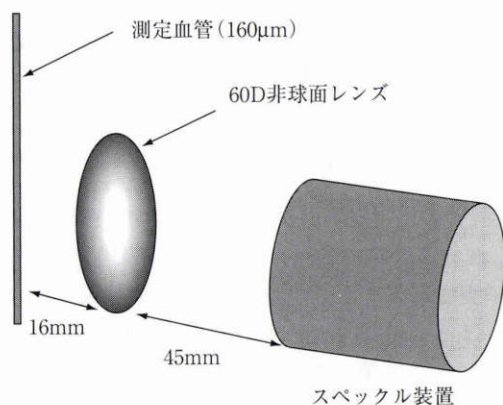


図 29 模擬人眼を用いた実験概略図。

の頭部および眼球運動の厳密な固定が要求され測定には苦痛を伴う。

本研究の目的はレーザースペckル現象を応用して網膜静脈血流速度の変化を簡便に、かつ定量的に測定し、薬物治療や手術治療による眼循環動態を解析しようというものである。

II 方法と対象

1. Square blur rate (SBR)

網膜血管アナログとしての径約 200 μ のガラス毛细管中にヒト血液を 0~3 cm/秒で流したものを測定した予備実験では、第一部で採用した NB 値が高速域では実際の流速に対して一次よりむしろ二次の相関を示すことが明らかとなり、網膜血管内血流速度測定のためのスペckルパターンの指標としては適当ではないことがわかった。Fercher ら²¹⁾のスペckルパターンのコントラストの逆数は $\langle I \rangle / \sigma$ で表されるが、 $\langle \langle I \rangle / \sigma \rangle^2$ は理論的には測定時間内に生じるずれの平均数である。すなわち、以下の解析では SBR 値を式(16)のごとく定義して、その値を網膜(大)血管内血流速度の指標とした。すなわち、

$$SBR = \{I_{\text{mean}}(x, y)\}^2 / [\sum \{I(x, y, k)\}^2 / N - \{I_{\text{mean}}(x, y)\}^2] \quad (16)$$

すりガラス回転板を用いた実験では SBR 値は回転速度 0~300 mm/sec の範囲で SBR と回転速度は直線的比例関係を示した。なお、機器は第一部で人眼視神経乳頭測定用に開発したものを使用した。

2. 模擬人眼における実験

ガラス毛细管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 N, Iwaki Glass)を用いて人血液(赤血球数 444 万/ μ l, ヘマトクリット 44%)を一定速度で温度を恒温槽を用いて一定(37℃)に保ちながら循環させ、さらに Gullstrand の模型眼に従って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细管の前方 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 29)。

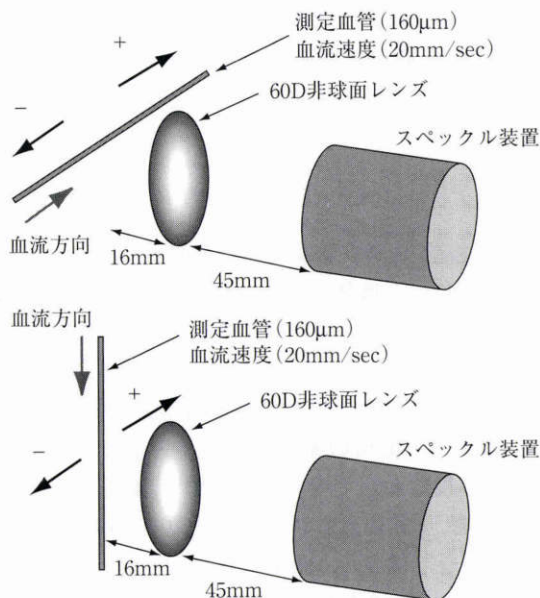


図 30 血管移動の Square blur rate 値への影響実験概略図。

ガラス毛细管は(Micro Capillaries, Nippon Electric Glass)のものと一部工作したものを使用し、ガラス毛细管内径はマイクロゲージ付き顕微鏡(VIA-100, Beckeler, California, 米国)で測定した。ヒト血液に対する抗凝固剤としてヘパリンナトリウム(5 単位/ml)を使用し、ガラス毛细管内の血流速度は閉鎖回路へ血液を充満させる際に、血液が測定部位を通過する時間を実測し算出した。

1) 測定位置と SBR 値の変化

血管内の血液の流れは血管壁に近いほど流れに対する抵抗が大きくなることから、中央が速く流れ、血管壁に近いほどゆっくり流れている。血管内の測定部位で測定値が異なる場合は、解析に当たって測定位置を統一する必要があることから、0.12 秒間隔で 5.5 秒間、同一部位で 3 回、1 ピクセル(標準眼で 10×10 μ m の領域)ごとに測定血管内の SBR 値を算出した。なお、ガラス毛细管の径は 160 μ , 血流速度は 20 mm/秒とした。

2) 血流速度に対する SBR 値の変化

血流速度(0~40 mm/sec)を変化させ、0.12 秒間隔で 5.5 秒間、同一部位で 3 回、一定のレーザー出力で SBR 値の変化を測定した。

3) レーザー出力に対する SBR 値の変化

レーザー出力(1.5~4.0 mW)を変化させ、0.12 秒間隔で 5.5 秒間、同一部位で 3 回、レーザー出力による SBR 値の変化を測定した。

4) 背景反射率に対する SBR 値の変化

背景反射率の影響は、ガラス毛细管の背後に 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)を設置し、2 mW のレーザー出力において 0.12 秒間隔で 5.5 秒間、同一部位で 3 回、背景反射率による SBR 値の変化を測定した。

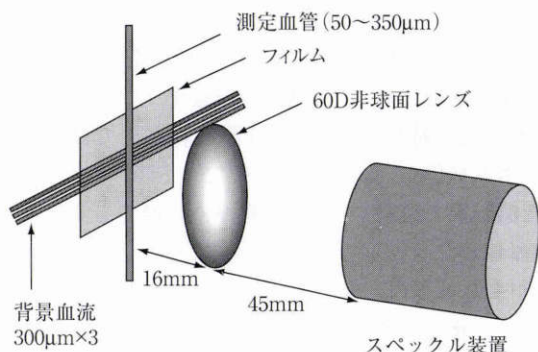


図 31 背景因子の Square blur rate 値への影響実験概略図。

5) ヘマトクリットに対する SBR 値の変化

ガラス毛細管にヒト血液(赤血球数 344, 409, 534 万/ μl , ヘマトクリット 31.0, 37.0, 47.9%)を循環(20 mm/sec)させた状態で, 2 mW のレーザー出力において 0.12 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 SBR 値の変化をガラス毛細管の中央で測定した。

6) 血管の動きに対する SBR 値の変化

図 30 に示すように測定血管を移動させ, 0.12 秒間隔で 5.5 秒間, 同一部位で 3 回, 測定血管の移動による SBR 値の変化を測定した。図 30(上)の測定血管の移動速度は 1.0, 1.5 mm/sec(+と-の両方向), 図 30(下)の測定血管の移動速度は 0.15, 0.4, 0.65, 1.0 mm/sec(+と-の両方向)である。測定血管の移動は測定血管の固定台と可変速モーターで回転するスクリーブランジャーを連結することで, 固定台を一定速度で移動させた。

7) 血管内径に対する SBR 値の変化

内径が 50, 75, 100, 125, 150, 200, 350 μm の測定血管にヒト血液を循環させ測定血管の血流速度を段階的に変え, 0.12 秒間隔で 5.5 秒間, 同一部位で 3 回, 血流方向による SBR 値の変化を測定した。

8) 背景要因の影響の検討

生体眼では網膜血管の後ろに網膜色素上皮と脈絡膜が存在する。測定血管単独では血管内径に対応した直線回帰式で血流速度が算出できるが, 生体眼の測定では本装置の測定用レーザー(波長 808 nm)は脈絡膜まで透過してしまうことから, 人眼における網膜血管血流測定には脈絡膜血流の影響が無視できない。

図 31 に示す実験モデルを作製した。測定毛細管(内径 50~350 μm)の後ろに脈絡膜血流を想定した背景血流として内径 300 μm の毛細管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 16 mm, また角膜と水晶体の屈折を 60 D と仮定し, 測定血管の前方 16 mm の所に 60 D の非球面レンズ(60 DCC, Nikon)を設置した。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 N, Iwaki Glass)を用いて, ヒト血液(赤血球数 464 万/ μl , ヘマトクリット

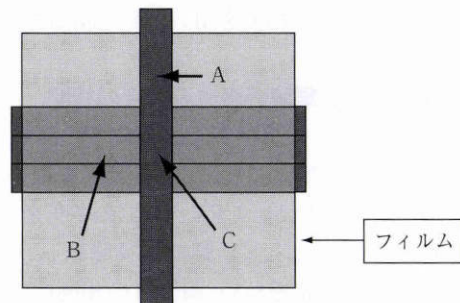


図 32 背景血流の影響実験。

A: 非交叉部の網膜血管アナログ

B: 脈絡膜血管アナログ

C: 網膜, 脈絡膜血管交叉部, アナログ(実際の人眼での網膜血管測定モデル)

フィルムは網膜色素上皮アナログとして用いた

45%)を循環させた。測定毛細管と背景血流の間には網膜および網膜色素上皮を想定したフィルム(Ektachrome, Kodak, 米国)を挿入した。

測定位置として測定毛細管(A), 背景血流(B: 3本のうち, 中央のガラス毛細管)とその交差部位における測定毛細管(C)の3か所を設定し(図 32), 解析ではガラス毛細管中央の1ピクセル(標準眼で $10 \times 10 \mu\text{m}$ の領域)のSBR値を用いた。なおレーザー出力は, 2 mW に設定した。

まず, フィルムの吸光度を段階的に変化させ, 背景血流(血流速度: 10 mm/sec)の SBR 値に対する吸光度の影響を測定した。0.12 秒間隔で 5.5 秒間, 測定部位(B)で 3 回, 吸光度による SBR 値の変化を測定した。

さらに, 背景血流の速度を段階的に変化させ, 測定血管(血流速度: 12 mm/sec, 20 mm/sec)の SBR 値に対する背景血流の影響を測定した。0.12 秒間隔で 5.5 秒間, 交差部(C)で3回, 背景血流によるSBR値の変化を測定した。

3. 正常人における網膜静脈血流速度の測定

2. の実験で得られたノモグラムを基に正常人の網膜静脈血流速度を測定し, 本装置の人眼における定量性と再現性について検討した。

眼, 全身ともに正常な若年有志者, 男性 8 名 16 眼を対象に 0.5% トロピカミド(ミドリン M[®], 参天製薬)で散瞳後に乳頭近傍の網膜静脈血管を含む領域(標準眼で $1.07 \times 1.07 \text{ mm}$)を 0.12 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。測定データを光磁気ディスクへ保存した後, 網膜静脈血管の中央部, およびその血管から 3 ピクセル離れた左右の脈絡膜の 1 ピクセル(標準眼で $10 \times 10 \mu\text{m}$ の領域)の SBR 値を解析画面上で算出した。血流速度の算出には連続する 2 心拍の SBR 値の平均値を用い, 脈絡膜部は同様にして算出した SBR 値を平均した値を用いた。なお, 測定時のレーザー出力は 2 mW に設定した。

1 回目と 2 回目の再現性指数は, 同一部位における連

続する2心拍のSBR平均値を用い、第一部におけると全く同様に算出した。

4. 網膜中心静脈と網膜静脈血流速度の相関

今回、正常有志者と切迫型網膜中心動脈・静脈閉塞症患者を対象に超音波カラードップラー装置を用い網膜中心静脈 central retinal vein (CRV) の血流速度を測定、同時に本装置を用いて上・下耳側の網膜静脈 retinal vein (RV) の血流速度の測定を行い、両装置の相関性について検討した。

正常有志者5名10眼(男性5名,平均年齢24歳),切迫型網膜中心動脈閉塞症(男性1例1眼,女性1例1眼),切迫型網膜中心静脈閉塞症(男性2例2眼)を対象に網膜中心静脈血流速度と網膜静脈血流速度を測定した。網膜中心静脈閉塞症の患者に関しては、網膜毛細血管床の閉塞部位がないことを蛍光眼底撮影法で確認し、切迫型と診断した。

坐位で視力,眼圧,血圧を測定後0.5%トロピカミド(ミドリンM[®],参天製薬)で散瞳し,血流測定を行った。

CDI(東芝超音波診断装置 PowerVision SSA-380A, 東芝)による血流測定は7.5 MHzのセクタ式電子スキャンプローブを用い,坐位で眼瞼上からプローブ先端を当てた。プローブに対し視神経が平行になるように瞼眼を外固視標で誘導し,パルスドップラー波が2心拍以上安定した状態で測定できた,1心拍分の網膜中心静脈平均血流速度を算出した。

装置による血流測定は乳頭近傍の網膜静脈血管(上・下耳側)を含む領域(標準眼で 1.07×1.07 mm)を0.12秒間隔で5.5秒間行った。測定データを光磁気ディスクへ保存した後,網膜静脈血管の中央部,およびその血管から3ピクセル離れた左右の脈絡膜の1ピクセル(標準眼で $10 \times 10 \mu\text{m}$ の領域)のSBR値を解析画面上で算出した。血流速度の算出には連続する2心拍のSBR値の平均値を用い,脈絡膜部は同様にして算出したSBR値を平均した値を用い,さらに上耳側と下耳側部血流速度の平均値を採用した。なお,測定時のレーザー出力は2 mWに設定した。

レーザーSpeckle測定終了後,血管径の測定のため単色光35 mm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,35 mmフィルム上の像からLittemann¹⁴⁴⁾のノモグラムに従って被検者の屈折と眼軸長により補正を行い,血管径を算出した。

III 結 果

1. 模擬人眼における実験

1) 測定位置とSBR値の変化

SBR値は測定血管の中央で一番高く,壁に近いほど低くなった。測定位置によって測定値が明らかに異なることから,血流速度を算出する場合は血管の同一部位を測

る必要がある。今後の測定では血管中央部の1ピクセル(標準眼で $10 \times 10 \mu\text{m}$ の領域)でSBR値を算出した。

2) 血流速度に対するSBR値の変化

血流速度に対して,SBR値は測定範囲内では直線相関した。ポンプ停止(血流停止)状態でもSBR値は約2を示した。顕微鏡で観察すると,血流停止状態でも測定血管内で赤血球がランダムな小運動を示しており,レーザー光の散乱が生じる原因になっていると考えられた。

3) レーザー出力に対するSBR値の変化

すりガラス板とは異なり,レーザー出力によってSBR値が変化した。表面に固定された散乱体とは異なり,血管内の散乱体(赤血球)は容積があることからレーザー出力が上昇すると,より多くの散乱体を捕らえてSpeckle強度のぶれが増えSBR値が上昇するものと考えられた。

4) 背景反射率に対するSBR値の変化

背景反射率の変化によってSBR値は変化した。これは背景反射が増えた場合,エリアセンサーで捕らえるSpeckle強度が高くなる結果,SBR値が上昇するものと考えられる。また,背景反射率の変化に対しSBR値が直線的に相関したことは,反射率に対して値の補正が可能になる。正常人の網膜反射率は約8%と報告されているが¹⁴⁵⁾,眼底組織に変性を有する対象では反射率が異なると考えられ,実際の血流速度を今回の*in vitro*実験から正確に推定することは困難と考えられた。

5) ヘマトクリットに対するSBR値の変化

ヘマトクリットが生理的範囲内であれば,SBR値には影響がないことが明らかになった。今回の結果から,臨床における測定ではヘマトクリット値は影響がないと考える。

6) 血管の動きに対するSBR値の変化

本装置はエリアセンサーが毎秒540フレーム撮像中に64フレーム間隔で積算を行い,SBR値を算出している。64フレーム積算中に動きが生じると,測定位置とエリアセンサーの各ピクセルの対応が変わるため,測定値に誤差が生じることが予想される。この実験で,血管が走行する方向に沿った動きであれば速度に相関した変化がみられるが,血管が走行する方向に対して横に動く場合は測定が不能なることがわかった。すなわち,実際の測定で眼球運動のある場合には,SBR値の信頼性は著しく損なわれることが示された。

7) 血管内径に対するSBR値の変化

血管内を流れる血液が同じ速度で流れていても,血管の内径によってSBR値は異なった。これは測定範囲の容積が増え,捕らえる赤血球数が増えることによるものと考えられる。血流速度に対しては直線相関することから,血管内径に対応した回帰式があれば血流速度が算出できることが明らかになった。

8) 背景要因の影響の検討

吸光度が高くなるとSBR値は低下し,この関係は直線

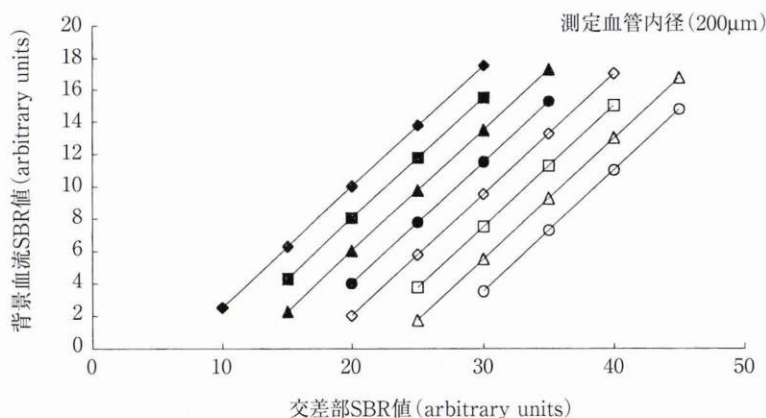


図 33 網膜血管(静脈)内血流速度算出のための、モグラムの 1 例. 血管径 200 μ m のものを示す.

◆ : 6 mm/sec ■ : 8 mm/sec ▲ : 10 mm/sec ● : 12 mm/sec ◇ : 14 mm/sec □ : 16 mm/sec
△ : 18 mm/sec ○ : 20 mm/sec

相関することがわかった. これはレーザー光がフィルムで吸収され背景血流に照射される強度が弱くなること, 反射されるレーザー光もフィルムに吸収され, スペックル強度が低下した結果と考えられる. 人眼の網膜色素上皮単独の吸光度は人種により差があり, 800 nm の波長では白人で約 5%, 黒人で約 30%¹⁴⁶⁾, また, 人種による差がないと考えられる網膜の反射率は約 8%¹⁴⁶⁾と報告されている. 本邦における網膜色素上皮の吸光度の報告はなく, したがって, 以下の実験に用いるフィルムの吸光度は 20% (推定値), 反射率は 8% (推定値) とした.

さらに, 脈絡膜血流のモデルとしての背景血流の影響を検討したところ, 測定血管の SBR 値に対し背景血流が影響することがわかった. 本装置の測定用レーザーは測定血管だけでなく, その背景血管も照射しているため, 測定血管から得られたスペックルは背景血管中の赤血球運動の影響を受けることから, 人眼における網膜血管血流の測定 SBR 値は脈絡膜血流の影響を受けていることを示す. 背景血流の影響は測定血管の血流速度が変わっても直線相関し, その傾きも同様であることから, 測定血管の交差部の SBR 値と背景血流の SBR 値から測定血管内血流のみによる SBR 値を算出するノモグラムを作製することができる. 実験 (2~9) で明らかのように, 測定血管の内径によって回帰直線の傾きが異なることから, 各血管内径に対応したノモグラムを作製した (図 33).

2. 正常人における網膜静脈血流速度の測定

測定した網膜静脈の平均血管径は $146 \pm 6 \mu\text{m}$ (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=16$) ($112 \sim 162 \mu\text{m}$) であった. *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, 網膜静脈血流速度を算出した. 平均血流速度は $18.4 \pm 3.8 \text{ mm/sec}$ ($11.7 \sim 22.5 \text{ mm/sec}$), 再現性指数は $3.6 \pm 0.9\%$ であり, 一被験者の一連の測定に要した平均時間は 60 ± 11 秒であった.

3. 網膜中心静脈と網膜静脈血流速度の相関

正常有志者の網膜静脈の平均血管径は $153 \pm 2 \mu\text{m}$ (平

均値 $\pm$ 標準誤差, $n=20$) ($145 \sim 161 \mu\text{m}$) であった. CDI で測定した網膜中心静脈の平均血流速度は $3.53 \pm 0.11 \text{ cm/sec}$ (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=10$) ($3.2 \sim 4.2 \text{ cm/sec}$), *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算出した平均網膜血流速度は $19.6 \pm 1.0 \text{ mm/sec}$ ($17.3 \sim 22.5 \text{ mm/sec}$) であり, 両者間の相関係数は 0.91 ($p < 0.01$) であった.

動脈閉塞, 静脈閉塞症ともに治療によって血流の改善がみられたが, 各症例で網膜中心静脈と網膜静脈の血流速度は同時に改善がみられた.

IV 考 按

1. 模擬人眼における実験

ガラス毛細管を用いた *in vitro* 実験で, 本装置の測定特性を明らかにした. レーザースペックル現象を応用した血流速度の測定は種々の要因で影響を受けることが明らかになったが, 逆に, これらの影響を補正すれば, 絶対血流速度の算出が可能になったことがわかった. 人眼の網膜血管血流速度は実験で作製したノモグラムを基に算出するが, 以下の影響要因を踏まえた上で測定を行うことで, 再現性の高い結果が得られると考える. すなわち, ①レーザー出力, ②網膜の反射率, ③網膜色素上皮および脈絡膜の吸光度, ④眼球運動, ⑤血管内径, ⑥脈絡膜血流である. 人眼測定時には網膜反射率, 網膜色素上皮および脈絡膜の吸光度は仮定せざるを得ない. 個々の対象眼の値は現時点では補正できないが, 将来的に反射率と吸光度が測定可能になれば, これらに対し SBR 値は直線相関することから値の補正は可能になると考える. 眼球運動による影響の補正は困難なことがわかった. 同一方向から固視が良好な時点でのみ測定する必要がある. 血管内径は眼底写真から測定し, 内径に応じたノモグラムを用いることで, 脈絡膜血流はその SBR を測定し, 同様にノモグラムを用いることで, その影響を取り除いた網膜血管血流速度が算出される.

レーザー出力 (2 mW) を一定に保ち、血管上の測定部位を血管中央部とし、かつレーザー照射軸に対して眼底測定部位が常に垂直となるようにし、かつカメラと被検者の眼の距離を一定に保ち、固視が良好な時点のみで測定すれば、人眼網膜血管内血流速度の絶対値を SBR 値から算出可能であると考えられた。

2. 正常人における網膜静脈血流速度

laser Doppler 法または類似の方法により、Riva ら¹⁴¹⁾は 64~177 μm 径の人網膜静脈を対象に血流速度の測定を行い、毎秒 8~26 mm/sec、また鈴木ら¹⁴⁷⁾は 52~206 μm 径の人網膜静脈を対象に血流速度の測定を行い、毎秒 8~21 mm/sec を得た。今回の値、平均血管内径 146 μm で平均血流速度 18.4 mm/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。測定に要した時間は、平均約 1 分と比較的短時間に行え、原理的には固視が 5.5 秒間のうち、約 2 秒 (2 心拍) のみ一定していればよい。従来、laser Doppler または類似の方法によるよりも遥かに簡便に、かつ被検者の負担も軽く行えたと考えられる。

今回、同一眼、同一部位での測定の再現性は 5.5 秒測定した中の連続した 2 心拍の SBR 値の平均を用いた結果、再現性指数は 3.6% の値が得られた。同一個体の同一部位における血流速度の比較は、血管内径、網膜のレーザー反射率や網膜色素上皮の吸光度など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、レーザー反射率や吸光度の微妙な違いなどのため、必ずしも単純ではない。

Norren ら¹⁴⁵⁾は人網膜の平均反射率は、波長 664 nm で 5.82%、波長 711 nm で 7.73% と報告している。今回用いた半導体レーザーは 808 nm であり、ヒト網膜の反射率はそれ以上あると考えられる。網膜の反射率に関しては、網膜色素上皮のような人種による差はないと考えられる。SBR 値は反射率の変化に対して直線的に相関することから、反射率の影響を補正することは可能であるが、今のところ生体眼の反射率測定はできないことから、今回は 8% (推定値) に設定し実験を行った。

一方、網膜色素上皮の吸光度に関しては、人種によって差があると考えられる。Geerates ら¹⁴⁶⁾は網膜色素上皮の吸光度について、波長 800 nm では白人で 5% 程度、黒人で 30% 程度と報告している。また、同じ人種でも個人によって網膜色素上皮の吸光度に差があると考えられ、吸光度による影響についても検討を行った結果、吸光度 60% の状態で SBR 値は 37% の低下することがわかった。吸光度が高くなれば背景血流の SBR 値が低くなり、交差部の SBR 値も低下する。SBR 値は吸光度や背景血流の変化に対しても直線的に相関することから、吸光度に対する影響を補正することは可能であるが、今のところ生体眼の吸光度測定はできないことから、今回は 20%

(推定値) に設定し実験を行った。仮に吸光度が 10% 変化した場合、ノモグラムから算出される血流速度は内径によって若干差はあるが、約 1 mm/sec であった。

網膜静脈の拍動はほとんどないといわれている¹⁴⁸⁾¹⁴⁹⁾。本装置による測定では、脈絡膜血流の影響を受けることから、血管上の測定点では心電図に同期した拍動がみられる。しかし、脈絡膜血流の値を引くことで、その波形はほぼ平坦になることから、両者を平均したそれぞれの値をノモグラムに適応することで、絶対速度に近い値が算出できたと考える。

今回の模擬眼の実験では人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、ノモグラムを作製した。このノモグラムから算出された血流の絶対速度は、血管内径、網膜の反射率、網膜色素上皮の吸光度によって変化し得ることに留意しておかなければならないが、今回の正常人を対象とした網膜静脈血流速度の測定結果は過去の報告と良く一致しており、再現性も高く、測定も簡便に行えることから、種々の疾患における循環動態の変化を経時的に捕らえることができる装置として、臨床的にも有用であると考えられた。

3. 網膜中心静脈と網膜静脈血流速度の相関

CDI による正常者の網膜中心静脈血流速度としては Michelson ら¹⁵⁰⁾が $3.3 \pm 1.2 (\text{cm/sec})$ と報告しており、我々の結果と一致する。CDI は非侵襲的に網膜中心動脈¹⁵¹⁾¹⁵²⁾・静脈¹⁵⁰⁾¹⁵³⁾血流異常を診断できるだけでなく、正常眼圧緑内障など循環障害が推定されている疾病の解明に有用な装置として報告^{154)~160)}されている。網膜中心静脈閉塞症を対象とした laser Doppler 法¹⁶¹⁾を用いた検討では、血流速度の改善と静脈血管内径の正常化が報告されており、今回の症例の結果とも一致している。

今回の CDI による測定は、超音波プローブをプローブアダプターに固定することで坐位状態で測定を可能にした。従来の測定方法はベット上で被検者が仰臥位で測定していたため、坐位で測定する他の循環検査 (例えば本法) との直接比較は解釈に注意を要したが、さらに外部固視標を用いて被検者の眼位を定めることで、安定した測定と良好な再現性が得られるようになった。この測定方法を用いることで、視神経を超音波プローブの測定範囲の中心に位置させ、さらに視神経の走行とパルスウェーブの発振方向が平行になるよう、網膜中心静脈血流の絶対速度を測定する設定が確実に行えるようになった。測定時間の短縮で患者への負担が軽減するとともに坐位で行う他の方法との結果の比較が容易になった。

本装置による正常人の網膜静脈血流速度の測定は従来の報告と一致した値が得られ、CDI で測定した網膜中心静脈血流速度と高い相関を示した。また、疾病眼においても循環動態の改善に伴う血流速度の変化を捕らえることができ、CDI による測定値に対して高い相関を示した。本装置による網膜静脈血流速度の算出は、いくつかの仮

定を基に *in vitro* 実験で得られた結果から作製したノモグラムから算出した値であるが、正常人眼および疾病眼において CDI の測定値と高い相関が得られたことは、本装置によって捕らえられる血流速度の値の信頼性を支持するものと考えられる。

臨床では、絶対速度の算出も重要であるが、その変化を高い再現性で捕らえることが要求される。可及的、かつ速やかに治療が必要となる、網膜中心動脈・静脈閉塞症の初期においても本装置によってその変化を捕らえることができ、さらに薬物治療による血流改善効果を定量的に捕らえることができた。

これまでの本疾患に対する経過観察の方法としては、眼底写真や検査で形態の変化から効果を判定したり、数か月に 1 回、蛍光造影検査で循環動態を確認するなど、定性的なものであった。本装置は眼底カメラを改造したもので、眼底写真撮影と同時に血流測定が行え、循環障害の診断や治療による改善効果を経時的、かつ定量的に測定できることから、臨床上有用な装置であると考えられる。

V ま と め

レーザースペックル現象を応用した網膜血管血流速度測定解析装置を改良し、臨床応用可能な装置を開発した。血流マップがリアルタイムで表示され、眼底の観察や測定部位がモニター上で確認できることから、測定が簡便で高い再現性が得られるようになった。また、測定時間が短く、被検者に対しても負担が少なく、解析も簡便で光磁気ディスクへ保存した測定データを後から解析することもできる。

実験では網膜静脈の絶対血流速度の算出を目的とし、いくつかの仮定を基にしたノモグラムを作製した。また、本装置の測定に影響する要因と安全性について検討し、実験の結果を踏まえた上で測定を行うことで、さらに高い再現性が得られた。血流速度の指標となる SBR 値は主に太い血管の測定に適しており、低速から高速まで速度変化に対して直線的に相関する。臨床応用として、閉塞性疾患に対する治療効果、超音波カラードプラー法により測定した網膜中心静脈血流速度との相関など、循環障害や改善の変化を簡便に捕らえることができた。本装置は眼底カメラと一体化しており、疾病眼の撮影と血流測定が同時に可能となることから、临床上、非常に有用な装置と考えられる。

残された問題点としては、レーザーの反射率と吸光度の補正、眼球運動に対して追従できない(値が影響を受ける)、血管内径の測定を写真で行っているなどがあるが、これらの問題点について現在も検討を重ねている。本装置は網膜血管の血流速度だけでなく、視神経乳頭や脈絡膜の組織血流の測定もできるが、網膜血管とは異なり、現在のところ絶対値の算出は難しく、NB 値を指標とした相対的な変化として循環動態の変化を捕らえるに止まっ

ている。

以上、本研究はレーザースペックル現象を応用した網膜血管血流速度測定装置の開発を目的として行い、臨床応用可能な条件である安全性、簡便性、再現性と定量性を十分に備えた、臨床上有用な装置の開発が行えたと考える。今後、眼生理学および眼疾病の循環動態などの研究に寄与することが期待される。

文 献

- 1) O' Day DM, Fish MB, Aronson SB, Pollycove M, Coon A : Ocular blood flow measurements by nuclide labelled microspheres. Arch Ophthalmol 86 : 205—209, 1971.
- 2) Geijer C, Bill A : Effects of raised intraocular pressure on retinal, prelaminar, laminar, and retrolaminar optic nerve blood flow in monkeys. Invest Ophthalmol Vis Sci 18 : 1030—1042, 1979.
- 3) Friedmann E, Kopald HH, Smith TR : Retinal and choroidal blood flow determined with krypton-85 in anesthetized animals. Invest Ophthalmol 3 : 539—547, 1964.
- 4) Kimura Y, Nitta A, Takayama H, Shimizu R : The effect of raised intraocular pressure on blood flow in the optic nerve head in the monkeys. Chibrt Int J Ophthalmol 5 : 24—31, 1989.
- 5) Armaly MF, Araki M : Optic nerve circulation and ocular pressure. Invest Ophthalmol 14 : 724—731, 1975.
- 6) Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH : Laser Doppler measurement of relative blood velocity in the human optic nerve head. Invest Ophthalmol Vis Sci 22 : 241—248, 1982.
- 7) Sebag J, Feke GT, Delori FC, Weiter JJ : Anterior optic nerve blood flow in experimental optic atrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 26 : 1415—1422, 1985.
- 8) Sebag J, Delori FC, Feke GT, Goger D, Fitch K, Tagawa H, et al : Anterior optic nerve blood flow decreases in clinical neurogenic optic atrophy. Ophthalmology 93 : 858—865, 1986.
- 9) Riva CE, Pournaras CJ, Poitry-Yamate CL, Petrig BL : Rhythmic changes in velocity, volume, and flow of blood in the optic nerve head tissue. Microvasc Res 40 : 36—45, 1990.
- 10) Rizzo JF III, Feke GT, Goger DG, Ogasawara H, Weiter JJ : Optic nerve head blood speed as a function of age in normal human subjects. Invest Ophthalmol Vis Sci 32 : 3263—3272, 1991.
- 11) Riva CE, Harino S, Petrig BL, Shonat RD : Laser Doppler flowmetry in the optic nerve. Exp Eye Res 55 : 499—506, 1992.
- 12) Riva CE, Mann RM, Koelle J, Petrig BL, Cranston SD : Choroidal blood flow (chBF) in cats by laser Doppler flowmetry (LDF). Invest Ophthalmol

- mol Vis Sci 34(Supple) : 1393, 1993.
- 13) **Michelson G, Langhans MJ, Groh MJ** : Clinical investigation of the combination of a scanning laser ophthalmoscope and laser Doppler flowmeter. *Ger J Ophthalmol* 4 : 342—349, 1995.
 - 14) **Michelson G, Schmauss B** : Two dimensional mapping of the perfusion of the retina and optic nerve head. *Br J Ophthalmol* 79 : 1126—1132, 1995.
 - 15) **Michelson G, Schmauss B, Langhans MJ, Hara-zny J, Groh MJ** : Principle, validity, and reliability of scanning laser Doppler flowmetry. *J Glaucoma* 5 : 99—105, 1996.
 - 16) **Goodman JW** : Static properties of laser speckle patterns. In : Dainty JC (Ed) : *Laser Speckle and Related Phenomena*. New York, Springer-Verlag, 9—75, 1975.
 - 17) **Fujii H, Nohira K, Yamamoto Y, Ikkawa H, Ohura T** : Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing, part 1. *Applied Optics* 26 : 5321—5325, 1987.
 - 18) **Ruth B** : Non-contact blood flow determination using a laser speckle method. *Opt Laser Technol* 20 : 309—316, 1988.
 - 19) **Ruth B** : Blood flow determination by the laser speckle method. *Int J Microcirc : Clinic Exp* 9 : 21—45, 1990.
 - 20) **Fercher AF, Briers JD** : Flow visualization by means of single-exposure speckle photography. *Opt Commun* 37 : 326—330, 1981.
 - 21) **Briers JD, Fercher AF** : Retinal blood-flow visualization by means of laser speckle photography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22 : 255—259, 1982.
 - 22) **ANSI Z136.1**, American National Standards Institute, Inc., 1436 Broadway, New York, NY : 10018, 1986.
 - 23) **Tamaki Y, Kawamoto E, Araie M, Eguchi S, Fujii H** : An application of laser speckle phenomenon for noninvasive 2-dimensional evaluation of microcirculation in ocular fundus. A preliminary report. *Jpn J Ophthalmol* 37 : 178—186, 1993.
 - 24) **相津佳永, 荻野浩二, 小山富康, 高井信勝, 朝倉利光** : レーザースペckル現象を用いた眼底血流測定. *日本レーザー医学会誌* 8 : 89—90, 1987.
 - 25) **Aizu Y, Ogino K, Koyama T, Takai N, Asakura T** : Evaluation of retinal blood flow using time-varying laser speckle. In : Adrian RJ (Ed) : *Laser Anemometry in Fluid Mechanics*. Lisbon, Ladoan, 55—68, 1988.
 - 26) **Ruskell GL** : Blood vessels of the orbit and globe. In : Prince JH (Ed) : *The Rabbit Eye Research*. Springfield, Illinois, 514—553, 1964.
 - 27) **Hale SL, Alker KJ, Kloner RA** : Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 78 : 428—434, 1988.
 - 28) **Riva CE, Tize P, Hero M, Petrig BL** : Effect of acute decreases of perfusion pressure on choroidal blood flow in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 1752—1760, 1997.
 - 29) **Otomo E, Kodama R** : Double blind study of FX-505 (ifenprodil) on cerebrovascular disease. *Clin Eval* 4 : 419—458, 1976.
 - 30) **Mizusawa H, Sakakibara E** : Effects of ifenprodil tartate on the cardiovascular system. *Folia Pharmacol Japon* 71 : 597—608, 1975.
 - 31) **Irino O, Saito K, Hayashi T, Ohkubo K** : Inhibitory mechanism of ifenprodil tartrate on rabbit platelet aggregation. *Folia Pharmacol Japon* 85 : 379—385, 1985.
 - 32) **Bessho H, Suzuki J, Tobe A** : Vascular effects of betaxolol, a cardioselective β -adrenoreceptor antagonist, in isolated rat arteries. *Jpn J Pharmacol* 55 : 351—358, 1991.
 - 33) **Hoste AM, Sys SU** : The relaxant action of betaxolol on isolated bovine retinal microarteries. *Curr Eye Res* 13 : 483—487, 1994.
 - 34) **Uchida Y, Nakamura M, Shimizu S, Shirasawa Y, Fujii M** : Vasoactive, and β adrenoreceptor blocking properties of 3, 4-dihydro-8(2-hydroxy-3-isopropylamino)propoxy-3-nitroxy-2 H-1-benzopyran (K-351), a new antihypertensive agent. *Arch Int Pharmacodyn* 262 : 132—149, 1983.
 - 35) **Ohira A, Wada Y, Fujii M, Nakamura M, Kasuya Y, Hamada Y, et al** : Effects of nipradilol (K-351) on α -adrenoreceptor mediated responses in various isolated tissues. *Arch Int Pharmacodyn* 278 : 61—71, 1985.
 - 36) **Shirasawa Y, Fujii M, Nakamura M** : Vasodilating action of nipradilol (K-351) in the pithed rat pretreated with dihydroergotamine (in Japanese). *Jpn J Pharmacol* 39 : 77—82, 1989.
 - 37) **Takenaka T, Handa J** : Cerebrovascular effects of YC-93, a new vasodilator, in dogs, monkeys and human patients. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 17 : 1—11, 1979.
 - 38) **Ohtsuka M, Ono T, Hiroi J, Esumi K, Kikuchi H, Kumadam S** : Comparison of the cardiovascular effect of FR 34235, a new dihydropyridine, with other calcium antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol* 5 : 1074—1082, 1983.
 - 39) **Ohtsuka M, Koibuchi Y, Sakai S, Tsujioka K, Fujiwara Y, Ozaki T, et al** : Effects of nilvadipine on the cardiovascular system in experimental animals. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 38 : 1605—1618, 1988.
 - 40) **Ohtsuka M, Ono T, Shibayama F** : Nilvadipine. *Cardiovasc Drug Rev* 6 : 97—115, 1988.
 - 41) **Nakayama N, Ikezono K, Mori T, Yamashita S, Nakayama S, Tanaka Y, et al** : Antihypertensive activity of OPC-13340, a new potent and long-

- acting dihydropyridine calcium antagonist, in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 15: 836—844, 1990.
- 42) Mori T, Nakayama N, Ohura M, Ikezono K, Kinoshita S, Kamata M, et al.: Cardiovascular effects of OPC-13340, a potent, long-acting 1,4-dihydropyridine calcium channel blocker, in dogs. *Arch Int Pharmacol Ther* 321: 41—56, 1993.
 - 43) Nakayama N, Ikezono K, Fujio N, Sasabe H, Kitaura K, Tamada S, et al.: OPC-13340, a new potent and long-acting dihydropyridine calcium antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 9: 147—157, 1991.
 - 44) Kozuma C, Macklin W, Cummins LM, Mauer R: Anatomy, physiology, and biochemistry of the rabbit. In: Weisbroth SH, et al (Eds): *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Academic Press, New York, 50—72, 1974.
 - 45) Neutze JM, Wyler F, Rudolph AM: Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits. *Am J Physiol* 215: 486—495, 1968.
 - 46) Fujii H, Asakura T, Nohira K, Shintomi Y, Ohura T: Blood flow observed by time-varying laser speckle. *Optics Letters* 10: 104—106, 1985.
 - 47) 藤居 仁, 山本有平, 野平久仁彦, 大浦武彦, 対馬健祐, 櫻村博正, 他: レーザー-speckle 法による末梢循環系の画像化(III). *日本レーザー医学会誌* 9: 135—138, 1988.
 - 48) 対馬健祐, 中原 朗, 櫻村博正, 福富久之, 大菅俊明, 藤居 仁: レーザー-speckle 法による末梢循環系の画像化(IV). *日本レーザー医学会誌* 9: 511—514, 1988.
 - 49) 山本有平, 大浦武彦, 杉原平樹, 井川浩晴, 桑原広昌, 築島 健, 他: レーザー画像血流計の開発—133 Xe クリアランス法との比較実験—. *形成外科* 33: 887—895, 1990.
 - 50) Brancato R, Pratesi R, Leoni G, Trbucchi G, Vanni U: Histopathology of diode and argon laser lesions in rabbit retina. A comparative study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1504—1510, 1989.
 - 51) Wallow IHL, Spomsl WE, Stevens TS: Clinicopathologic correlation of diode laser burns in monkeys. *Arch Ophthalmol* 109: 648—653, 1991.
 - 52) Benner JD, Huang M, Morse LS, Hjelmeland LM, Landers III MB: Comparison of photocoagulation with the argon, krypton, and diode laser indirect ophthalmoscopes in rabbit eyes. *Ophthalmology* 99: 1554—1563, 1992.
 - 53) Sliney DH, Wolbarsht MV: Effect of optical radiation on the eye. In: Sliney DH, et al (Eds): *Safety with lasers and other optical sources*, Plenum Press, New York and London, 134—138, 1980.
 - 54) Skarphedinsson JO, Harding H, Thoren P: Repeated measurements of cerebral blood flow in rats. Comparison between the hydrogen clearance method and laser Doppler flowmetry. *Acta Physiol Scand* 134: 133—142, 1988.
 - 55) Sterenborg HJCM, van Gemert MJC, Kamphorst W, Wolbers JG, Hogervorst W: The spectral dependence of the optical properties of human brain. *Lasers Med Sci* 4: 221—227, 1989.
 - 56) Bill A: Effects of acetazolamide and carotid occlusion on the ocular blood flow in unanesthetized rabbits. *Invest Ophthalmol* 13: 954—958, 1974.
 - 57) Bill A, Stjernschantz J, Alm A: Effects of hexamethonium, biperiden, and phentolamine on vasoconstrictive effects of oculomotor nerve stimulation in rabbits. *Exp Eye Res* 23: 615—622, 1976.
 - 58) Sugiyama T, Utsumi T, Azuma I, Fujii H: Measurement of optic nerve head circulation: comparison of laser speckle and hydrogen clearance methods. *Jpn J Ophthalmol* 40: 399—343, 1996.
 - 59) Bill A: Intraocular pressure and blood flow through the uvea. *Arch Ophthalmol* 67: 336—348, 1962.
 - 60) Alm A, Bill A: The oxygen supply to the retina. II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. *Acta physiol Scand* 84: 306—319, 1972.
 - 61) Weiter JJ, Schachar RA, Ernest JT: Control of intraocular blood flow I. Intraocular pressure. *Invest Ophthalmol* 12: 327—331, 1973.
 - 62) Friedman E: Choroidal blood flow. Pressure-flow relationships. *Arch Ophthalmol* 83: 95—99, 1970.
 - 63) Gherzghiher T, Okubo H, Koss MC: Choroidal and ciliary body blood flow analysis: Application of laser Doppler flowmetry in experimental animals. *Exp Eye Res* 53: 151—156, 1991.
 - 64) Alm A, Bill A: Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp Eye Res* 15: 15—29, 1973.
 - 65) Sossi N, Anderson DR: Effect of elevated intraocular pressure on blood flow. Occurrence in cat optic nerve head studied with iodoantipyrine I¹²⁵. *Arch Ophthalmol* 101: 98—101, 1983.
 - 66) 阿部友厚, 米谷 新, 飯田知弘, 森 圭介, 林 直樹, 磯野博昭, 他: 眼球組織の吸光特性. *日眼会誌* 96: 1387—1393, 1992.
 - 67) Alm A, Bill A: The oxygen supply to the retina. I. Effects of changes in intra-ocular and arterial blood pressures and in arterial PO₂ and PCO₂ on the oxygen tension in the vitreous body of the cat. *Acta Physiol Scand* 84: 261—274, 1972.
 - 68) Yancey CM, Linsenmeier RA: Oxygen distribution and consumption in the cat retina at in-

- creased intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:600—611, 1989.
- 69) **Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL**: Autoregulation of human retinal blood flow. An investigation with laser Doppler velocimetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:1706—1712, 1986.
 - 70) **Riva CE, Loebl M**: Autoregulation of blood flow in the capillaries of the human macula. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16:568—571, 1977.
 - 71) 中橋康治, 浅井利通, 大久保潔, 山本 節: 内視現象に基づく網膜循環動態の解析. 2. 自動調節機構の解析. *日眼会誌* 94:519—526, 1990.
 - 72) **Kiel JW, van Heuven WA**: Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:579—585, 1995.
 - 73) **Araie M, Tasase M, Sakai Y, Ishii Y, Yokoyama Y, Kitagawa M**: Beta-adrenergic blockers. Ocular penetration and binding to the uveal pigment. *Jpn J Ophthalmol* 26:248—263, 1982.
 - 74) **Vuori ML, Ali-Melkkila T, Kaila T, et al**: Plasma and aqueous humor concentrations and systemic effects of topical betaxolol and timolol in man. *Acta Ophthalmol* 71:201—206, 1993.
 - 75) **Fujino N, Odomi M, Kusumoto N**: Ocular distribution of carteolol after single and repeated ocular instillation in pigmented rabbits. *Acta Ophthalmol* 72:688—693, 1994.
 - 76) **Desantis L, Dahlin D, Baranes G**: A role for the calcium channel blocking action of betaxolol for providing therapeutic benefit to glaucoma patients. In: Drance SM (Ed). *Update to glaucoma, ocular blood flow and drug treatment*. Kulger Publications, New York, 137—143, 1995.
 - 77) **Acheampong AA, Breau A, Shackleton M, Luo W, Lam S, Tang-Liu DDS**: Comparison of concentrations-time profiles of levobunolol and timolol in anterior and posterior ocular tissues of albino rabbits. *J Ocul Pharmacol* 11:489—502, 1995.
 - 78) **Sugiyama K, Bacon DR, Morrison JC, Van Buskirk M**: Optic nerve head microvasculature of the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:2251—2261, 1992.
 - 79) **Khuu HD, Lam KW, Sponsel WE**: Trans conjunctival diffusion of timolol and betaxolol. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(Suppl):1101, 1996.
 - 80) **Messer C, Flammer J, Stämpfig D**: Influence of betaxolol and timolol on the visual fields of patients with glaucoma. *Am J Ophthalmol* 112:678—681, 1991.
 - 81) **Kaiser HJ, Flammer J, Stämpfig D, Hendrickson P**: Longterm visual field follow-up of glaucoma patients treated with beta-blockers. *Surv Ophthalmol* 38:156—160, 1994.
 - 82) **Collignon-Brach J**: Long-term effect of topical beta blockers on intraocular pressure and visual field sensitivity in ocular hypertension and chronic open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol* 38:149—155, 1994.
 - 83) **Harris A, Spaeth GL, Sergott RC, Katz LJ, Cantor LB, Martin BJ**: Retrobulbar arterial hemodynamic effects of betaxolol and timolol in normal tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 120:168—175, 1995.
 - 84) 菅野美貴子, 新家 眞: Nipradilol 点眼液の家兎眼における眼圧下降機序. *眼臨* 90:1569—1573, 1996.
 - 85) 新家 眞, 大鹿哲郎, 森 樹郎, 櫻井真彦, 加藤 聡, 浦江隆次, 他: KT-210(Nipradilol 点眼液)の第I相試験(第1報). *薬理と治療* 24:77—92, 1996.
 - 86) 新家 眞, 大鹿哲郎, 森 樹郎, 櫻井真彦, 加藤 聡, 浦江隆次, 他: KT-210(Nipradilol 点眼液)の第I相試験(第2報). *薬理と治療* 24:93—108, 1996.
 - 87) 口井正人, 西尾一郎, 津田和志, 中村吉成, 中谷俊生, 増山善明: 高血圧とCa拮抗薬. *循環器科* 16:140—150, 1984.
 - 88) 竹中登一: 2,6-dimethyl-4(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylic acid 3[2-(N-benzyl-N-methylamino)]-ethyl ester 5-methyl ester hydrochloride (YC-93)の脳循環に対する作用. *基礎と臨床* 8:51—64, 1974.
 - 89) **McCalden TA, Nath RG, Thiel BS**: The effect of a calcium antagonist (nimodipine) on basal cerebral blood flow and reactivity to various agonists. *Stroke* 15:527—530, 1984.
 - 90) **Hof RP**: Calcium antagonist and the peripheral circulation: differences and similarities between PY 108-068, nicardipine, verapamil and diltiazem. *Br J Pharmacol* 78:375—394, 1983.
 - 91) 大友英一: 各種脳血管障害に対するYC-93(塩酸ニカルジピン)の臨床効果. *基礎と臨床* 13:63—69, 1979.
 - 92) **Flammer J, Guthauser U, Mahler F**: Do ocular vasospasms help cause low tension glaucoma? *Doc Ophthalmol Proc Series* 49:397—399, 1986.
 - 93) 白井久行, 浅野紀美江, 北澤克明, 呉 輔仁: Ca²⁺拮抗剤の低眼圧緑内障視野変化に及ぼす影響. *日眼会誌* 92:792—797, 1988.
 - 94) 三好輝行: 脈絡膜循環に及ぼすnifedipineの影響. 第1報. 成熟家兎における脈絡膜血流量の変化. *眼紀* 35:664—670, 1984.
 - 95) 三好輝行: 脈絡膜循環に及ぼすnifedipineの影響. 第2報. 猿眼における脈絡膜血流量の変化. *眼紀* 35:1571—1575, 1985.
 - 96) **Alm A**: Ocular circulation. In: Moses RA, et al (Eds): *Adler's Physiology of the Eye* (9th ed). CV Mosby, St Louis, 198—227, 1992.
 - 97) 高塚忠宏: 塩酸ニカルジピンの家兎網膜微小循環動態に及ぼす影響について. *眼紀* 35:877—882, 1984.
 - 98) **Furukawa H**: Autonomic innervation of prereti-

- nal blood vessels of the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1752—1760, 1987.
- 99) **Harino S, Riva CE, Petrig BL**: Intravenous nicardipine in cats increases optic nerve head but not retinal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2885—2890, 1992.
 - 100) **Loutzenhiser R, Hayashi K, Epstein M**: Divergent effects of KCl-induced depolarization on afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol* 267: F 561—564, 1989.
 - 101) **Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N**: Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I On the existence, development, and site of a blood retinal barrier. *Br J Ophthalmol* 50: 441—453, 1966.
 - 102) **Olsson Y, Kristensson K**: Permeability of blood vessels and connective tissue sheaths in retina and optic nerve. *Acta Neuropathol* 26: 147—156, 1973.
 - 103) **Shimamoto H, Shimamoto Y**: Nilvadipine increases cerebral blood flow in elderly hypertensives: comparison with nifedipine. *J Hum Hypertens* 9: 271—279, 1995.
 - 104) **Imai J, Omata K, Kamizuki M, et al**: Antihypertensive effects of nilvadipine determined by ambulatory blood pressure monitoring. *Ther Res* 17: 1847—1856, 1996.
 - 105) **Riva CE, Cranstoun SD, Mann RM, Barnes GE**: Local choroidal blood flow in the cat by laser Doppler flowmetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 608—618, 1994.
 - 106) **Koelle JS, Riva CE, Petrig BL, Cranstoun SD**: Depth of tissue sampling in the optic nerve head using laser Doppler flowmetry. *Lasers Med Sci* 8: 49—54, 1993.
 - 107) **Tamaki Y, Nagahara M, Yamashita H, Kiuchi M**: Blood velocity in the ophthalmic artery determined by color Doppler imaging in normal subjects and diabetics. *Jpn J Ophthalmol* 37: 385—392, 1993.
 - 108) **Guthoff RF, Berger RW, Winkler P, Helmke K, Chumbley LC**: Doppler ultrasonography of the ophthalmic and central retinal vessels. *Arch Ophthalmol* 109: 532—536, 1991.
 - 109) **Nies AS, Evans GH, Schand DG**: Regional hemodynamic effects of beta-adrenergic blockade with propranolol in the unanesthetized primate. *Am Heart J* 85: 97—102, 1973.
 - 110) **Cruickshank JM**: The clinical importance of cardioselectivity and lipophilicity in beta blockers. *Am Heart J* 100: 160—178, 1980.
 - 111) **McSorley PD, Warren DJ**: Effects of propranolol and metoprolol in the peripheral circulation. *Br Med J* 2: 1598—1600, 1978.
 - 112) **Grajewski AL, Ferrari-dileo G, Feuer WJE, Anderson DR**: Beta-adrenergic responsiveness of choroidal vasculature. *Ophthalmology* 98: 989—995, 1991.
 - 113) **Grunwald JE, Furubayshi C**: Effect of topical timolol maleate on the ophthalmic artery blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1095—1100, 1989.
 - 114) **Baxter GM, Williamson TH, McKillop G, Dutton GM**: Color Doppler ultrasound of orbital and optic nerve blood flow: Effects of posture and timolol 0.5%. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 604—610, 1992.
 - 115) **Grunwald JE**: Effect of timolol maleate on the retinal circulation of human eyes with ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 521—526, 1990.
 - 116) **Grunwald JE**: Effects of two weeks of timolol maleate treatment on the normal retinal circulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 39—45, 1991.
 - 117) **Yabuuchi Y, Kinoshita D**: Cardiovascular studies of 5-(3-tert-butylamino-2-hydroxy)propoxy-3,4-dihydrocarbostyryl hydrochloride (OPC-1085), a new potent beta adrenergic blocking agent. *Jpn J Pharmacol* 24: 853—861, 1974.
 - 118) **Man In't Veld AJ, Schalekamp MADH**: How intrinsic sympathomimetic activity modulates the haemodynamic responses to beta-adrenoreceptor antagonists: A clue to the nature of their antihypertensive mechanism. *Br J Clin Pharmacol* 13: 245 S—257 S, 1982.
 - 119) **Janczewski P, Boulanger C, Iqbal A, Vanhoutte PM**: Endothelium-dependent effects of carteolol. *J Pharmacol Exp Ther* 247: 590—595, 1988.
 - 120) **Shiose Y, Kitazawa Y, Tukahara S, et al**: Epidemiology of glaucoma in Japan - a nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol* 35: 133—155, 1991.
 - 121) **Kitazawa Y, Shirai H, Go FJ**: The effects of Ca^{2+} -antagonist on visual field in low-tension glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227: 408—412, 1989.
 - 122) **Netland PA, Chaturvedi N, Dreyer EB**: Calcium channel blocker in the management of low-tension and open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 115: 608—613, 1993.
 - 123) **Bose S, Piltz JR, Breton ME**: Nimodipine, a centrally active calcium antagonist, exerts a beneficial effect on contrast sensitivity in patients with normal-tension glaucoma. *Ophthalmology* 102: 1236—1241, 1995.
 - 124) **Sawada A, Kitazawa Y, Yamamoto T, Okabe I, Ichien K**: Prevention of visual field defect progression with brovincamine in eyes with normal-tension glaucoma. *Ophthalmology* 103: 283—288, 1996.

- 125) **van Heuven WA, Malik AB, Schaffer CA, Cohen D, Mehu M**: Retinal blood flow derived from eye dilution curves: Televised fluorescein angiography. *Arch Ophthalmol* 95: 297—301, 1977.
- 126) **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.
- 127) **Richard G**: Effect of arterial blood pressure on retinal hemodynamics-a videoangiography study on the problem of autoregulation of blood supply to the retina. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 187: 191—194, 1985.
- 128) **Favilla I, Barry WR, Turner IJ**: Video and digital fluorescein angiography. *Aust NZ J Ophthalmol* 14: 229—234, 1986.
- 129) **櫻井寿也**: 蛍光眼底撮影に超高速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.
- 130) **Bischoff PM, Flower RW**: Ten years experience with choroidal angiography using indocyanine green dye: A new routine examination or an epilogue? *Doc Ophthalmol* 60: 235—291, 1985.
- 131) **Flower RW, Klein GJ**: Pulsatile flow in the choroidal circulation: A preliminary investigation. *Eye* 4: 310—318, 1990.
- 132) **Klein GJ, Baumgartner RH, Flower RW**: An image processing approach to characterizing choroidal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 629—637, 1990.
- 133) **Arend O, Harris A, Martin BJ, Holin M, Wolf S**: Retinal blood velocities during carbogen breathing using scanning laser ophthalmoscopy. *Acta Ophthalmol* 72: 332—336, 1994.
- 134) **Wolf S, Arend O, Reim M**: Measurement of retinal hemodynamics with scanning laser ophthalmoscopy: Reference values and variation. *Surv Ophthalmol* 38: 95—100, 1994.
- 135) **Harris A, Arend O, Kopecky K, Caldemeyer K, Wolf S, Sponsel W, Martin B**: Physiological perturbation of ocular and cerebral blood flow as measured by scanning laser ophthalmoscopy and color Doppler imaging. *Surv Ophthalmol* 38: 81—86, 1994.
- 136) **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.
- 137) **Toonen H, Wolf S, Jung F, Meyer Ebrecht D, Reim M**: Movement correction of digital sequence angiographies of the retina. *Biomed Tech Berlin* 37: 131—136, 1992.
- 138) **Feke GT, Riva CE**: Laser Doppler measurements of blood velocity in human retinal vessels. *J Opt Soc Am* 68: 526—531, 1978.
- 139) **Riva CE, Feke GT, Eberli B, Benary V**: Bidirectional LDV system for absolute measurement of blood speed in retinal vessels. *Applied Optics* 18: 2301—2306, 1979.
- 140) **Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH, O'Keefe K**: Fundus camera based retinal LDV. *Applied Optics* 20: 117—120, 1981.
- 141) **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.
- 142) **Feke GT, Goger DG, Tagawa H, Delori FC**: Laser Doppler technique for absolute measurement of blood speed in retinal vessels. *IEEE Trans Biomed Eng* 34: 673—680, 1987.
- 143) **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.
- 144) **Littmann H**: Zur Bestimmung der wahren Grobe eines Objectes auf dem Hintergrund des lebenden Auges. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 180: 286—289, 1982.
- 145) **Norren D van, Tiemeijer LF**: Spectral reflectance of the human eye. *Vision Res* 26: 313—320, 1986.
- 146) **Geerates WJ, Williams RC, Chan G, Ham WT, Guerry D**: The relative absorption of thermal energy in retina and choroid. *Invest Ophthalmol* 1: 340—347, 1962.
- 147) **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.
- 148) **Michelson G, Grundler A, Steinmeier R, Sigwanz U**: Simultaneous measurement of ocular micro and macrocirculation, intraocular pressure, and systemic functions. *Ger J Ophthalmol* 3: 48—53, 1994.
- 149) **Michelson G, Harazny J**: Relationship between ocular pulse pressures and retinal vessel velocities. *Ophthalmology* 104: 664—671, 1997.
- 150) **Michelson G, Harazny J**: Increased vascular resistance for venous outflow in central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 104: 659—663, 1997.
- 151) **Knapp ME, Flaharty PM, Sergott RC, Savino PJ, Mazzoli RA, Flanagan JC**: Gaze-induced amaurosis from central retinal artery compression. *Ophthalmology* 99: 238—40, 1992.
- 152) **Sergott RC, Flaharty PM, Lieb WE Jr, Ho AC, Kay MD, Mittra RA, et al**: Color Doppler imaging identifies four syndromes of the retrobulbar

- circulation in patients with amaurosis fugax and central retinal artery occlusions. *Trans Am Ophthalmol Soc* 90:383—398, 1992.
- 153) **Williamson TH, Baxter GM**: Central retinal vein occlusion, an investigation by color Doppler imaging. Blood velocity characteristics and prediction of iris neovascularization. *Ophthalmology* 101:1362—1372, 1994.
- 154) **Ho AC, Lieb WE, Flaharty PM, Sergott RC, Brown GC, Bosley TM, Savino PJ**: Color Doppler imaging of the ocular ischemic syndrome. *Ophthalmology* 99:1453—1462, 1992.
- 155) **Keyser BJ, Flaharty PM, Sergott RC, Brown GC, Lieb WE, Annesley WH Jr**: Color Doppler imaging of arterial blood flow in central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 101:1357—1361, 1994.
- 156) **Nicolela MT, Drance SM, Rankin SJ, Buckley AR, Walman BE**: Color Doppler imaging in patients with asymmetric glaucoma and unilateral visual field loss. *Am J Ophthalmol* 121:502—510, 1996.
- 157) **Rankin SJ, Drance SM, Buckley AR, Walman BE**: Visual field correlations with color Doppler studies in open angle glaucoma. *J Glaucoma* 5:15—21, 1996.
- 158) **Kaiser HJ, Schoetzau A, Stümpfig D, Flammer J**: Blood-flow velocities of the extraocular vessels in patients with high-tension and normal-tension primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 123:320—327, 1997.
- 159) **Butt Z, O'Brien C, McKillop G, Aspinall P, Allan P**: Color Doppler imaging in untreated high and normal-pressure open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:690—696, 1997.
- 160) **Harris A, Evans DW, Cantor LB, Martin B**: Hemodynamic and visual function effects of oral nifedipine in patients with normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 124:296—302, 1997.
- 161) **Chen HC, Gupta A, Wiek J, Kohner EM**: Retinal blood flow in nonischemic central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 105:772—775, 1998.
-