ビデオ螢光眼底造影と画像解析による網膜循環時間の測定

第2報—システムの再現性についての検討—(図8)

清　水　慶　一（岡山大学医学部眼科学教室）

Reproducibility in the Measurement of Retinal Mean Circulation Time Using Fluorescein Video Angiography and an Image Analysis System

Keiichi Shimizu

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

要　約

新しく開発したビデオ螢光眼底造影と画像解析による網膜循環時間の測定システムを用いて，正常眼10眼の測定可能な全ての網膜領域を対象に，異なった2通りの色素注入方法で，網膜平均循環時間の測定を各々2回行い，それぞれの再現性を評価した．1回目の測定値をx秒，2回目をy秒とすれば，連続した2回の注入により得られた網膜平均循環時間値は，$r=0.87$, $y=0.93x+0.22$ ($n=47$) という関係がみられ，$\{|x-y|/(x+y)\}\times100$ の平均は6.4%であった．日を変えて注入して得られた2回の網膜平均循環時間値は，$r=0.81$, $y=0.91x+0.15$ ($n=45$) という関係がみられ，$\{|x-y|/(x+y)\}\times100$ の平均は11.2%であった．また，各々の注入方法による1回目と2回目の測定値の間には有意差は認められなかった．以上よりこのシステムは，ほぼ満足できる再現性があり，網膜循環を臨床的に定量評価する一手段として，有用であると思われた．生食水による色素のフラッシュ注入，及び内部固視標の利用は，このシステムの再現性，測定精度の改善に効果的である．（日眼　92：687—693，1988）

キーワード：網膜循環，螢光眼底造影，再現性，ビデオ，画像解析

Abstract

Double determinations of retinal mean circulation time, using fluorescein video angiography and an image analysis system, were carried out in all measureable retinal vascular areas of 10 normal eyes at intervals of about 1 minute (Group 1), and on a different day (Group 2). No significant differences were found between the 1st and 2nd measurement of retinal mean circulation time. Linear regression function relating the 2nd to 1st measurement yielded the equation: $y=0.93x\times0.22$, $r=0.87$, $n=47$. (Group 1), $y=0.91x+0.15$, $r=0.81$, $n=45$. (Group 2). The averages of all the value derived from the formula: $\{|x-y|/(x+y)\}\times100$ was 6.4% (Group 1) and 11.2% (Group 2). From these results, this system was considered to have a satisfactory reproducibility as a clinical tool measuring retinal circulation. Flushing an injected dye bolus into the antecubital vein followed immediately by saline injection and use of an inner fixation target were effective in improving the accuracy and reproducibility of the measurement of retinal mean circulation time using this system. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 687—693, 1988)

Key words: Retinal circulation, Fluorescein angiography, Reproducibility, Video, Image analysis

別刷請求先：700　岡山市鹿田町2－5－1　岡山大学医学部眼科学教室　清水　慶一　（昭和62年11月26日受付）

Reprint requests to: Keiichi Shimizu, M.D.　Dept. of Ophthalmol., Okayama Univ. Medical School
2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan
(Accepted November 26, 1987)

緒　言

色素希釈法は，血管内に色素を注入し，その色素が血流により希釈される過程を記録することによって，循環動態を間接的に知る検査法である．この方法は，循環器科の領域では，心拍出量，循環時間，短絡，逆流の診断に応用されている[1]．

眼科領域では，血管内に螢光色素を注入し，眼底の螢光造影像で，網膜血管の螢光色素の希釈をとらえ，非観血的に網膜循環の定量化を行う試みがなされている[2)~11)]この様なシステムの精度，再現性が判れば，正常眼や網膜循環障害をもった眼の循環時間の評価に参考になるのみならず，更に，網膜循環時間を指標として，網膜循環障害の治療効果を判定したり，病期による循環状態を把握することで，治療を行う目安にすることもできる．しかし，この問題について検討した文献は少ない[3)10)11)]．しかも，現在までに色素希釈法の原理を応用した網膜平均循環時間の計測システムの再現性について検討した報告は，全て，フルオロフォトメトリーを利用したシステムについてのものであり[3)10)11)]，これらのシステムにない特長を備えたビデオ螢光眼底造影を利用したシステムの臨床的再現性についての検討例は見られない．

私達の教室では，ビデオ螢光眼底造影と画像解析によって，任意の網膜領域の平均循環時間を確実に求めることが出来るシステム[12)]を開発した．前報[13)]では，色素の注入方法に改良を加え，このシステムを用いて，正常眼の網膜平均循環時間の測定結果をまとめた．そこで，今回は，このシステムの再現性を検討し，システムの応用の可能性について考察を加えてみたので報告する．

方　法

肘静脈に20Gの留置針を用いて血管確保を行い，被検者に無理な姿勢を強いることがないように注意しながら，螢光眼底撮影装置(TRC-50VT，東京光学機械)に確実に頭部を固定し，肘を伸展させた．10%フルオレスセイン（フルオレサイト注射液1号®，アルコン）1ml(100mg)を，約20mlの生理的食塩水でフラッシュ注入した後(Fig. 1)，SIT管内臓の超高感度テレビカメラ（VC 7000，東京電子工業）を接続した螢光眼底撮影装置により撮影を行い，1/30秒間隔で3/4インチUマチックビデオテープレコーダー(VTR，CR-8200，日本ビクター）に記録した．この際，ビデオタイマー(VTG-33，朋栄）によって，静脈注射時を0とする1/100秒単位の時刻表示を同時に写し込んだ（Fig. 2)．

光源は，螢光眼底撮影装置の観察光を利用し，固視を確実にするために，内部固視標を使用した．被検者には，検査中，この固視標をみるように指示し，超高感度カメラの感度と螢光眼底撮影装置の観察光の照度

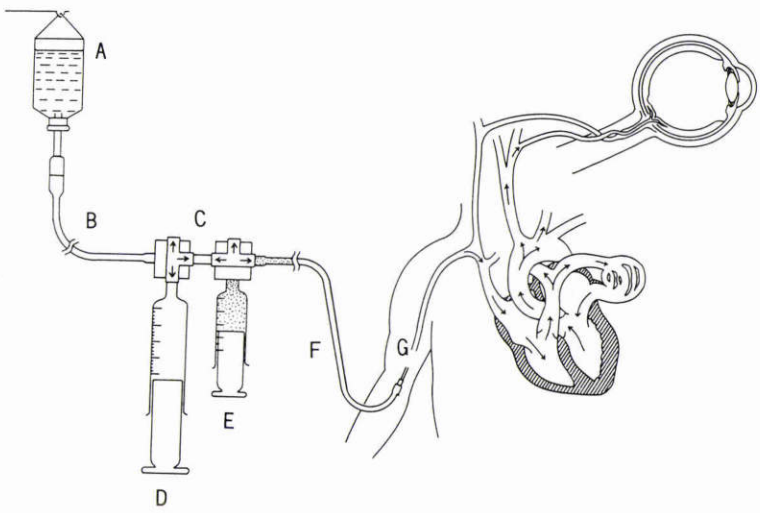

Fig. 1 Schematic drawing of injection method used for retinal circulation time measurement by dye-dilution. A: normal saline, B: infusion set, C: 3-way stopcocks, D: normal saline for flushing, E: 10% fluorescein Na, F: connecting tube, G: 20G indwelling needle

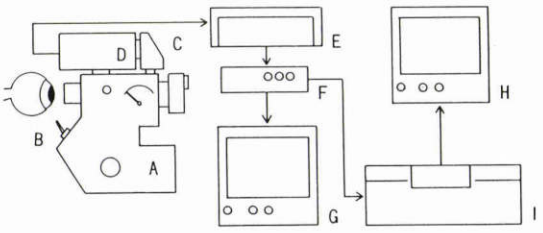

Fig. 2 Blockdiagram of the fluorescein video angiography subsystem. A: fundus camera, B: inner fixation target, C: relay lens, D: low-light TV camera, E: controller of TV camera, F: videotimer, G: TV camera monitor, H: videomonitor, I: VTR

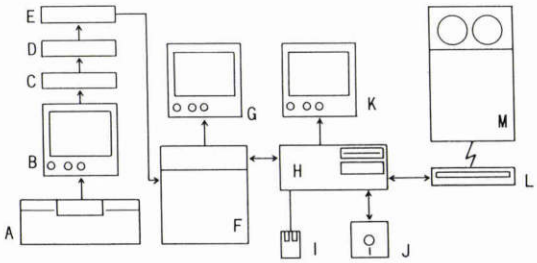

Fig. 3 Blockdiagram of the image analysis subsystem. A: VTR, B: videomonitor, C: digital time base corrector, D: decorder, E: input selector, F: image processor, G: image display, H: controller of image processor, I: cursor controller, J: floppy disk, K: controller display, L: modem, M: host computer

を調節しながら安定した固視が得られることを確認の上撮影を行った．この際，超高感度テレビカメラは，入射光と出力電圧が線形となる範囲（$+0.7V_{p-p}$）で使用し，この範囲ではVTRの入力電圧と出力電圧も線形となることを確認した[14]．励起フィルター（M2699，東京光学機械）及び濾過フィルター（M2702，東京光学機械）は螢光眼底撮影装置の標準仕様のものを用い，撮影画角は視神経乳頭を中心とする20度とした．

再生したビデオ螢光眼底造影像を，ビデオインターフェイスを通して，汎用画像処理解析装置（Luzex 5000，ニレコ）に取り込み，各血管の経時的な濃淡度を測定し記録した（Fig. 3）．

網膜血管の螢光強度の測定エリアを血管に内接する円とするならば，螢光強度と色素濃度との間には比例関係があると見なすことができる[15]ので，このように設定した円内の濃淡度の平均値を測定した（Fig. 4）．測定は，螢光色素が網膜動脈に出現する3～4秒前のビデオ画像から，0.2～0.3秒間隔で再循環が始まるまで行った（通常約30秒後）．

1本の血管のデータを，横軸に時間(t)，縦軸に濃淡度(I)をとってプロットすると典型的な色素希釈曲線を示す(Fig. 5)．再循環以前の値を最小二乗法を用いて色素希釈曲線の経験式[15][16]

$$I=k+I_pEXP(-\alpha \ln^2(t-t_o)/(t_p-t_o)) \quad (1)$$

k：螢光色素の網膜動脈出現前のVTR再像の濃淡度（背景濃淡度）

I_p：濃淡度の最大値

α：曲線の傾き

t_o：螢光色素が血管に出現した時間

t_p：濃淡度の最大値を与える時間

EXP：eを底とする指数

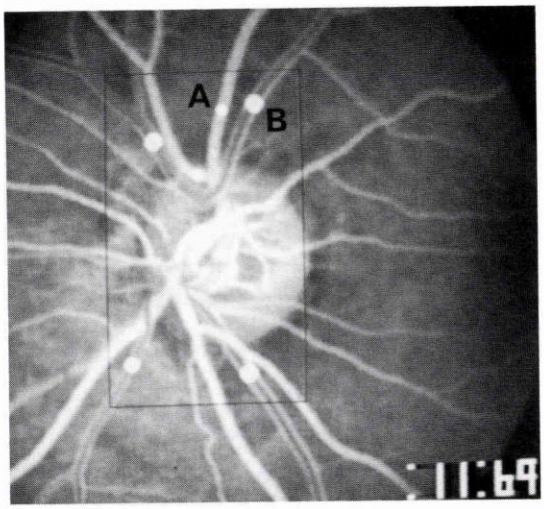

Fig. 4 The processing screen of the image analyser showing a fluorescein video angiogram of a left eye 11.69 seconds after dye injection. Analysed areas set on the temporal superior retinal artery (A), and corresponding vein (B).

ln：自然対数

に回帰し，

$$t_m=t_o+(t_p-t_o)EXP(3/4\alpha) \quad (2)$$

で与えられる，各網膜動静脈の腕網膜平均循環時間（動脈：t_{ma}，静脈：t_{mv}）を求めた[15][16]．この計算には，通信回線を使用し，大型汎用コンピューター（ACOS 1000，NEC）に移植されている最小二乗法プログラム（SALS）[17][18]を利用した（Fig. 3）．

1対の網膜動静脈の腕網膜平均循環時間の差 $t_{mv}-$

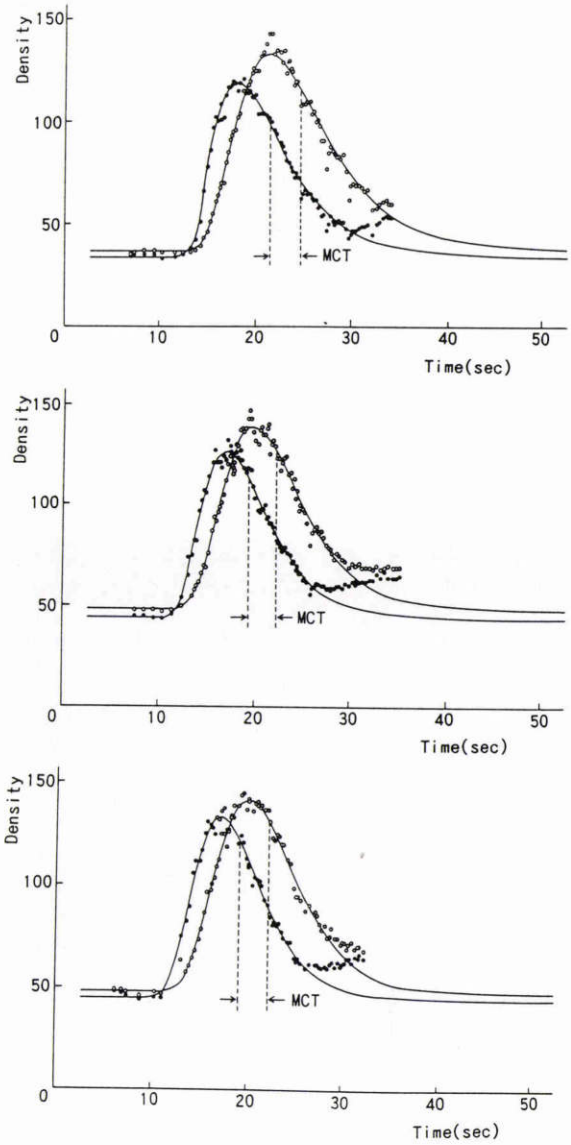

Fig. 5 Fluorescence densities of the nasal superior retinal artery (filled circles) and corresponding vein (open circles) with regression curves. Time is shown in seconds after the dye injection. The unit of density is arbitrary. Dashed vertical lines indicate mean transit times of the dye from the site of injection to the sites of measurement. MCT means mean circulation time of a retinal segment supplied by each vessels. Three paired curves were obtained from same retinal vascular segment of the same eye. Middle paired curves were obtained 2 days after top paired curves. Bottom paired curves were obtained about 1 minute after middle paired curves. Three paired curves were consistent in shape, with little variations in MCT (Top: 3.18sec, Middle: 2.78sec, Bottom: 3.07sec)

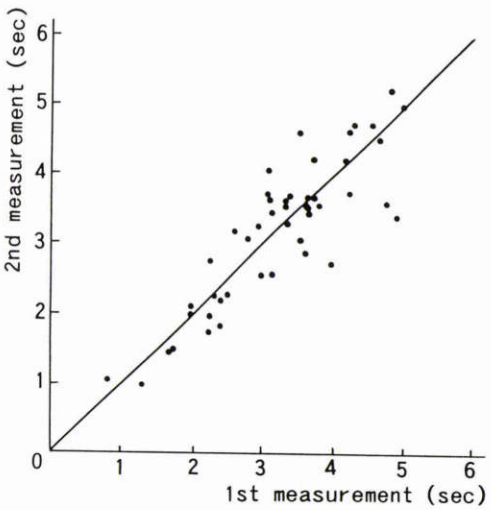

Fig. 6 Double determinations of MCT of 47 retinal segments of 10 normal eyes. The interval between the 1st and 2nd measurement was about 1 minute.

t_{ma}を，その動静脈で栄養されている網膜領域の網膜平均循環時間と考えた[2)5)15)]．

対象は，高血圧症，糖尿病等の全身的疾患がなく，また，検眼鏡的，蛍光眼底撮影上，網膜血管系に異常のない10眼とし，測定可能であった全ての領域の網膜平均循環時間を求めた．まず同一対象に於て，1ml ずつのフルオレスセインを約1分の間隔で2回注入し，上記の方法で網膜平均循環時間を求めた．また，日を変えて同様に注入し，網膜平均循環時間を求めた．即ち，2回連続して撮影した対象は，男性7人，女性3人で，年齢は10歳代から70歳代までに分布していた．測定可能であった領域は，4から6領域で，計47領域であった．日を変えて撮影した対象は，男性6人，女性3人で，この内，男性1人は，左右眼について各々2回撮影を行った．また，年齢は30歳代から70歳代までに分布していた．測定可能であった領域は，4から6領域で，計45領域であった．第1回目の撮影と第2回目の撮影の間隔は，2日から147日で，平均49.2日であった．日を変えて撮影した際の注入者が同じ対象は3眼，異なった対象は7眼であった．尚，両者の注入方法に共通した対象は3眼であった．

2回の注入により撮影した同一対象眼，同一領域の1回目の網膜平均循環時間値をx秒，2回目の値をy秒として線形に回帰させた(Fig. 6, 7)．更に，1回目と2回目の測定値が，全く一致し，完全な再現性が有

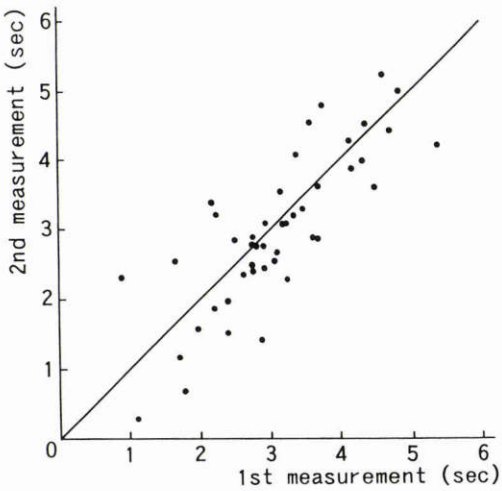

Fig. 7 Double determinations of MCT of 45 retinal segments of 10 normal eyes. The 1st and 2nd measurement was performed another day.

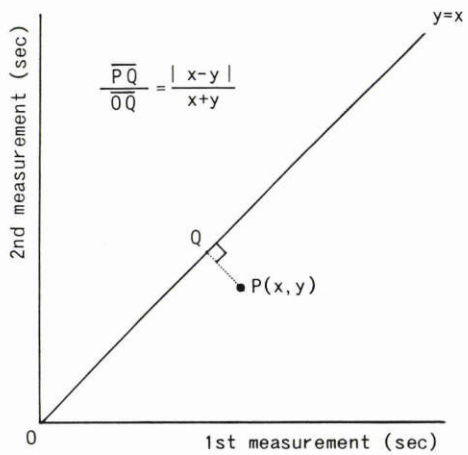

Fig. 8 Supposing that each pair of the MCT value obtained by 1st and 2nd measurerment is x and y seconds, the average of all the value derived from the formula: $|x-y|/(x+y)$ is thought to indicate the amplitude of an error in measuring.

れば，点P(x, y)の集合は直線y=x上に並ぶはずであるから，点P(x, y)から直線y=xへ垂直に下した点をQとして，距離OQに対する距離PQの百分比(Fig. 8)

$$\{|x-y|/(x+y)\}\times 100$$

を各点について計算し，全ての点の平均値をもって各々の注入法の再現性の指標とした．

結　果

連続した2回の注入により得られた網膜平均循環時間値は，r=0.87，y=0.93x+0.22（n=47）という関係がみられ，$\{|x-y|/(x+y)\}\times 100$の平均は6.4%であった(Fig. 6)．日を変えて注入して得られた2回の網膜平均循環時間値は，r=0.81，y=0.91x+0.15（n=45）という関係がみられ，$\{|x-y|/(x+y)\}\times 100$の平均は11.2%であった(Fig. 7)．また，各々の注入方法による1回目と2回目の測定値の間には有意差は認められなかった．

考　按

現在までに，螢光眼底造影法に色素希釈法の原理を応用して網膜循環時間の測定を行うシステムの再現性を検討した報告は，いくつか見られる[3)10)11)]．例えば，Rivaら[10)]は，5人の健康成人を対象に，肘静脈から中心静脈までの10カ所の部位で20mg（0.3ml）のフルオレンスセインを注入し，網膜動脈から得られた色素希釈曲線を検討している．その結果，中心静脈から注入したものは，色素出現時間，最高色素濃度時間のばらつきは，共に±5%未満であったが，肘静脈から注入したものでは大きなばらつきが見られたと述べている．また，Eberliら[11)]は，0.02mgの色素を1mlの生食水によるフラッシュで麻酔下の猿の大腿静脈から注入し，網膜の同一血管象限での平均循環時間の測定を5回繰り返し，連続した2回の測定値差の平均は0.27秒，変異係数は10%から22%であったと報告し，これは，記録とlog-normal関数への回帰計算の誤差精度から理論的に期待できる範囲内であると解釈している．

しかしこれらは全て，フルオロフォトメトリーを利用したシステムのものであり，ビデオ螢光眼底撮影を利用したシステムの臨床的再現性検討の報告はみられない．再現性の点から両者を比べると，前者は後者に比べ少量の色素で希釈曲線が得られるため[3)10)11)]，注入部から検出部までの循環路の途中で色素塊が修飾を受けることが少ない点で優れ，後者は前者に比べ眼底の微小領域の螢光強度をより正確に測定できる点で優れているが，更に，後者は前者にない多くの特長を備えている．

私達の教室で開発したビデオ螢光眼底造影と画像解析による網膜循環時間の計測システム[12)13)]は後者のシステムであるが，測定精度と再現性の改善のために，次のような工夫を行っている．

螢光眼底撮影装置の照明，撮像管の感度，VTRの記録，再生系の安定性，画像処理解析装置への画像入力の安定性，測定領域の設定及び追従作業の正確さ等はシステムの再現性に影響する．このため，ビデオ螢光眼底撮影と，画像解析時のビデオ画像の再生に際して，各々の機器のウォーミングアップの時間を少なくとも30分は取るようにした．また，VTRの再生に際しては，濃淡度測定中は一貫して，テープを再生ヘッドから離さないようにした．また，画像入力時のばらつきに関しては，16回の平均化入力を行って小さくなるように努めた．また，測定領域の追従に関しては，画像の回転方向のずれについても可能な限り補正し，精確な追従に努めた．

ビデオ螢光眼底撮影において，不十分な散瞳，頭部のずれによる撮影装置と検眼のずれ，固視不良，羞明による瞬目過多等は，螢光眼底造影像の質を悪化させ，再現性の低下をきたす．中でも，固視の安定化は大切であり，内部固視標は可能な限り使用すべきものと考えている．これは，固視標の黒い陰を見ることによって，被検者の網膜中心窩は強い照明光から保護され，固視状態の改善と同時に羞明による瞬目を減少させる効果があるからである．

色素注入と同時に生食水でフラッシュすることは，末梢静脈血流量を人為的に大きくして，色素が急速に中心血流に移行することを狙ったものである．これについては，前報[11]でも触れたが，生食水によるフラッシュを行わなければ，色素希釈曲線に大きな変形がみられ，再現性の評価は不可能になり，得られた値も信頼性に乏しいものになる．これは，注入部位から網膜血管までの間に色素が捕捉されるような抵抗があると，色素が一塊となって網膜血管まで到達しないため，色素希釈曲線の変形がみられるか，或は，最高色素濃度（最高濃淡度）は低くなり，下降脚の勾配はゆるやかになる[19]．従って，腕網膜平均循環時間は遅延して計算され，1対の網膜動静脈までの腕網膜平均循環時間の差として求めた網膜平均循環時間は，両者の誤差の影響を受ける．また，色素希釈曲線の下降脚の勾配がゆるやかになれば，最初の循環を表すと考えられる部分の抽出が困難となり，再循環曲線の切捨て操作にともなう誤差が大きくなる．

今回行った2通りの注入法，即ち，連続した2回の注入と，日を変えての2回の注入で，後者の方のばらつきが大きくなったのは，後者は個体の生理的変化をも反映しているからである．即ち，心拍数の変化[11]，呼吸による静脈還流の変化[20][21]，血色素量の変化[15]等は色素希釈曲線に影響を及ぼす．また，連続した2回の注入では，注入は同一人によるフラッシュ注入で，注入速度はほぼ一定であり，針の肘静脈内での留置状態も同じであるのに対して，日を変えての注入は，同一人による注入例は少数で，これらの条件が異なるからである．連続した2回の注入の場合，1回目と2回目の注入間隔を約1分としたが，これは，約1分後には基線はほぼ平行なっており，1回目の注入による全身の色素の分布は，ほぼ均一化され，2回目の注入による色素希釈曲線に，1回目に注入した色素が及ぼす影響は，殆ど無視できるものと考えられるからである．この間隔は，長くなればその分だけ基線は安定化すると思われるが，その反面，個体の生理的変動の影響を受け易くなると考えられるので，可能な限り短い時間が，再現性の検討には適当と考えた．

今回の再現性の評価の結果から，このシステムは，ほぼ満足できる再現性をもち，網膜循環を臨床的に定量評価する一手段として，有用であると思われる．即ち，最初の撮影結果をモニターとして，ひき続いて注入を行い，2回目の撮影から得られた循環時間値の信頼性の評価が可能となり，これによって，ほぼ全ての対象について網膜循環時間の測定ができるようになった．また，繰り返し色素希釈曲線が得られることから，網膜循環に影響を及ぼすと考えられる種々の因子の検討が可能になった．更に，網膜循環障害の病期による循環時間の違いが明らかになれば，治療時期の決定に定量的評価基準を設けることも可能であり，治療に対する効果の定量的判定にも役立つと思われる．

本研究は文部省科学研究費補助金（課題番号60870061，研究代表者松尾信彦）の補助を受けた．付記して感謝の意を表する．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲頂きました松尾信彦教授に深謝致します．

また，御教示頂きました小山鉄郎講師，御協力頂きました教室の方々に感謝致します．

尚，本論文の要旨は第53回日本中部眼科学会にて報告した．

文　献

1）**香取　瞭**：心機能検査としての色素希釈法．臨床検査　20：679—687，1976.

2）**Hickam JB, Frayser R**：A photographic method for measuring the mean retinal circulation time using fluorescein. Invest Ophthalmol 4：876—884，1965.

3) **Eberli B, Riva CE, Feke GT:** Mean circulation time of fluorescein in retinal vascular segments. Arch Ophthalmol 97 : 145—148, 1979.
4) **Evans PY:** Retinal circulation time : Proceedings of the International Symposium on Fluorescein Angiography, Albi 1969, Basel, Karger, 463—469, 1971.
5) **Bulpitt CJ, Dollery CT:** Estimation of retinal blood flow by measurement of the mean circulation time. Cardiovasc Res 5 : 406—412, 1971.
6) **van Heuven WAJ, Malik AB, Schaffer CA,** et al: Retinal blood flow derived from dye dilution curves. Arch Ophthalmol 95 : 297—301, 1977.
7) **Fonda S, Bagolini B:** Relative photometric measurement of retinal circulation (Dromofluorograms). A television technique. Arch Ophthalmol 95 : 302—307, 1977.
8) **Jung F, Kiesewetter H, Körber N,** et al: Quantification of characteristic blood-flow parameters in the vessels of the retina with a picture analysis system for video-fluorescence angiograms : Initial findings. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 221 : 133—136, 1983.
9) **松生俊和, 新家　真, 高橋正弥**：蛍光希釈曲線による網膜血流動態の研究. 第1報. 蛍光録画装置の試作及び家兎, 正常有志者に対する応用. 日眼　87 : 713—721, 1983.
10) **Ben-Sira I, Riva CE:** Fluorophotometric recording of fluorescein dilution curves in human retinal vessels. Invest Ophthalmol 12 : 310—313, 1973.
11) **Riva CE, Ben-Sira I:** Injection method for ocular hemodynamic studies in man. Invest Ophthalmol 13 : 77—79, 1974.
12) **小山鉄郎, 松尾信彦, 清水慶一**他：ビデオ蛍光血管造影と画像解析による網膜平均循環時間の測定システム. Ther Res 5 : 685—690, 1986.
13) **清水慶一**：ビデオ蛍光眼底造影と画像解析による網膜循環時間の測定. 第1報. 正常眼での網膜平均循環時間の検討. 日眼　91 : 956—961, 1987.
14) **二宮輝雄, 長谷川伸, 和久井孝太郎**：画像エレクトロニクス講座. 撮影工学(増補版), 東京, コロナ社, 24—25, 1984.
15) **Riva CE, Feke GT, Ben-Sira I:** Fluorecin dye-dilution technique and retinal circulaton. Am J Physiol 234 : 315—322, 1978.
16) **Stow RW, Hetzel PS:** An empirical formula for indicator-dilution curves as obtained in human beings. J Appl Physiol 7 : 161—167, 1954.
17) **中川　徹, 小柳義夫**：最小二乗法による実験データ解析プログラムSALS. 東京, 東京大学出版会, 1982.
18) **小柳義夫**：最小二乗法標準プログラムSALS利用の手引き. 東京, 東京大学大型計算機センター, 1983.
19) **香取　瞭, 白土邦男, 村井雅夫**他：指示薬希釈法における末梢注入部位の検討. 心臓　6 : 998—1002, 1974.
20) **Flower RW:** Injection technique for indocyanine green and sodium fluorescein dye angiography of the eye. Invest Ophthalmol 12 : 881—895, 1973.
21) **新谷富士雄**：図説色素希釈法. 心機能のみかた. 東京, 南山堂, 12—13, 1986.