

## 微弱励起光用眼底ビデオ録画装置

葛西 款\*, 鈴木 均\*\*, 玉井 信\*, 田崎 京二\*\*

\*東北大学医学部眼科学教室, \*\*東北大学医学部第二生理学教室

### 要 約

我々は、現在使用されている蛍光眼底撮影装置における光量を減らし、少量の蛍光色素を用いて初期の目的を達成し、かつ連続撮影するために、マイクロチャンネルプレート(MCP)を内臓した小型画像増強管(イメージ管)を利用し、次のような実験を行った。1) 蛍光色素(フルオレスセインナトリウム: Na-F)濃度と励起光および蛍光強度との関係を調べた結果、0.01mg/ml濃度の希釈水溶液が一番強い蛍光を発した。この水溶液を励起用フィルター $\lambda_{\max}=486\text{nm}$ の光で刺激したとき、一定の露光時間でイメージ管を装着することにより、装着しないときの1/300の励起光量で同じ明るさの像が得られた。2) ウシガエルに血中濃度が0.01mg/mlになるような量のNa-Fを直接心臓に注射し、蛍光眼底ビデオ録画を行ったところ、十分な明るさと解像度を持った写真が得られた。3) 10%Na-F 5mlをヒト正常者に静注し、蛍光眼底ビデオ録画を行ったところ、被検者は励起光に対し何の苦痛もなく全経過を記録できた。以上の結果より、マイクロチャンネルプレートを利用した小型画像増強管は励起光を減量し、かつ蛍光色素量を減量することによる被験者への苦痛の減少、網膜の光障害の減少とともに励起光のみで蛍光眼底ビデオ録画が可能であることが明らかとなった。この装置は蛍光眼底撮影の安全な施行と血液-網膜柵の検討に役立つ方法であると考えられる。(日眼会誌 94: 637-644, 1990)

キーワード: 蛍光眼底撮影法, マイクロチャンネルプレート, イメージ管, 蛍光眼底ビデオ録画, 血液-網膜柵

## Fundus Video Fluorescein Angiography with Low Steady Light

Makoto Kasai\*, Hitoshi Suzuki\*\*, Makoto Tamai\* and Kyouji Tasaki\*\*

\*Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

\*\*Department of Physiology, Tohoku University School of Medicine

### Abstract

To decrease both the intensity of the exciting light and the amount of sodium fluorescein, we attached a compact image intensifier incorporating a microchannel plate with a fundus photoscope and tried to record video-fluorescein angiography with low steady light. We preliminarily examined the relationships of exciting and emitted light intensity with various concentrations of sodium fluorescein. The strongest fluorescence was obtained with a concentration of 0.01mg/ml solution of sodium fluorescein. When the compact image intensifier was attached to the equipment, the exciting light intensity could be decreased to 1/300 with an exciting filter of  $\lambda_{\max}$  of 486nm. When sodium fluorescein of 0.01mg/ml solution was injected directly into the heart of *Rana catesbiana*, complete video-fluorescein angiography with sufficient brightness and resolution was possible. With the same

別刷請求先: 980 仙台市星陵町1-1 東北大学医学部眼科学教室 玉井 信

(平成元年9月5日受付, 平成2年1月9日改訂受理)

Reprint requests to: Makoto Tamai, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tohoku Univ., School of Med.

1-1 Seiryomachi, Aoba-Ku Sendai 980, Japan

(Received September 5, 1989 and accepted in revised form January 9, 1990)

machine, we recorded video-fluorescein angiography in a normal human subject with injection of 5ml of 10% sodium fluorescein. The ordinary observing light of the machine was strong enough for video-recording. This exciting light intensity caused no trouble and elicited no complaint from the examinee. These results showed that the use of a compact image intensifier incorporated microchannel plate with a fundus photoscope made it possible to record video-fluorescein angiography and to decrease exciting light intensity and the amount of fluorescein dye. This means that light damage to photoreceptors by exciting light and problems induced by allergic reaction with fluorescein dye might be decreased. These aspects might be very important to obtain information about both retinal circulation and disruption of the blood-retinal barrier and also to perform safe fluorescein angiography examination. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 637-644, 1990)

**Key words:** Fluorescein fundus angiography, Microchannel plate, Image intensifier, Blood-retinal barrier, Fluorescein fundus video recording

## I 緒 言

蛍光眼底撮影法は網膜血管造影を目的とし、1961年 Novotony と Alvis<sup>1)</sup>によって開発された。これは蛍光色素であるフルオレスセインナトリウム(Na-F)を490 nmの青色光で励起し520nmの緑色の蛍光を発生させ、網膜血管を撮影したものである。開発当初はこの方法により、血管内腔の状態や網膜血流動態が調べられた<sup>2)</sup>。その後血管の透過性亢進や血液-網膜柵の破壊などがNa-F漏出現象として捉えられることが判明し<sup>3)</sup>、今日、眼科臨床における最も重要な検査法の一つとなっている。またこの方法により、眼底検査では観察することのできない毛細血管を鮮明に撮影できることから、主な病変が毛細血管にあらわれる糖尿病性網膜症をはじめとする各種眼底疾患の病態解明にも欠かすことができないものとなっている。

ところで蛍光眼底撮影法によって、網膜血流動態や色素の漏出現象などを調べるにあたって最も重要なことは、色素の血管内注入の時点から蛍光の発現、消滅に至るまでの時間経過を正確に、しかも連続的に把握することである。この目的に対して最初に試みられた方法は、高速度連続撮影<sup>4)-8)</sup>によって毎秒の記録コマ数を多くすることであったが、強い蛍光が必要であったため励起用の光源は強力にする必要があり、かつNa-Fの濃度が高い必要があった。すなわち、検査法として有用なこの方法も次のような諸問題を含んでいた。

1) 強力な励起光を照射すると当然視細胞が破壊される。正常者においては再生機構が存在するため短時間のうちにその機能が回復する<sup>12)</sup>。それに反し、網膜色素変性症等において視細胞外節の絶対量が減少してい

たり、再生機構に障害がある場合にはこのような励起光によって障害が残る<sup>13)</sup>可能性があったり、また元の状態に戻るのに正常者に比べて非常に長時間を必要とする。

2) 強い蛍光を得るために、高濃度のNa-Fを用いる必要がある。この蛍光色素は副作用の存在がよく知られており、時にはアナフィラキシーショックによる重篤な例も報告され、死亡例もある。この副作用はNa-Fの濃度に依存する<sup>14)</sup>。これらの問題は可能な限りNa-Fの濃度を低下させること、そしてできるだけ弱い励起光で得られる蛍光でも撮影することができれば問題は解決されると考えられる。そこで我々はこれらの問題を解決する目的で蛍光色素Na-Fの濃度と励起光の強度および蛍光量の関係を調べ、それを撮影するための二次元画像増強管<sup>16)</sup>を蛍光眼底撮影法に導入することを試みた。

## II 実験方法および結果

### 1. Na-Fの濃度と蛍光強度との関係

一般に一定の強さの励起光を照射したときに生ずる蛍光強度は蛍光色素の濃度の増大とともに強くなり、ある濃度を起えたと減弱する。本実験ではNa-F水溶液を10mg/mlから0.001mg/mlまでの10倍希釈液をつくり、蛍光の強さの濃度依存性を測定した。蛍光の強さは写真撮影によった。すなわち、各濃度のNa-F溶液から発する蛍光を使ってフィルムを感光させ、現像処理のフィルムについて透過度濃度を測定し、得られた値を蛍光強度とした。

図1に測定結果を示す。図の中の写真は、明るさの分布が空間的に同様であるような励起光の中に、5種類の濃度の溶液を並べて撮影したもので、明るい部分

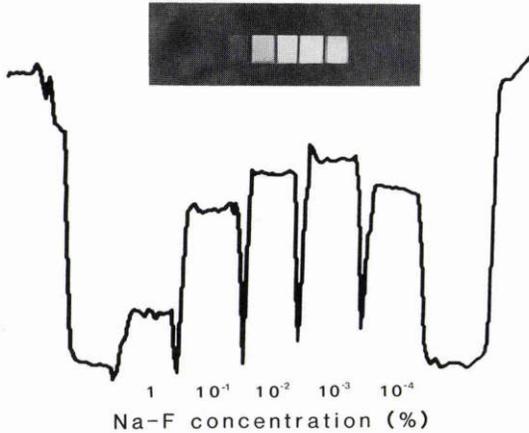


図1 Na-Fの濃度と蛍光強度との関係。10mg/mlから0.001mg/mlまでのNa-F希釈溶液の蛍光を写真撮影し(図中の挿入写真)、フィルム濃度を測定し、蛍光強度とした(実線)。明るいほど蛍光が強いことを示す。一番強い蛍光を発する濃度は0.01mg/mlである。

ほど蛍光が強いことを示している。実線はフィルムの透過度測定から得られたもので、縦軸は相対蛍光強度である。5種類の溶液のうち、0.01mg/mlのものが最も強い蛍光を発した。そこで、以後の実験においては血中濃度が0.01mg/mlになるようにした。

2. 励起および濾過フィルター

Na-Fの最大吸収波長は、490nmで、最大蛍光波長の520nmに非常に接近している。したがって、蛍光を効率的に透過させるフィルターを用いると角膜や水晶体などから反射した励起光の一部も濾過フィルターを透過してしまう。この反射光も後に述べるイメージ管によって増強されるので背景が非常に明るくなり、画像のコントラストが低下する。そこで本装置においては、フィルターの選択も重要であり、我々は励起および濾過フィルターとして二重干渉フィルターを用いた。後述するごとく、本システムに使用したイメージ管は十分な光増強能力を持つので、必ずしもNa-Fの最大吸収波長および最大蛍光波長に一致するようなフィルターを使用する必要はなかった。我々は感度を多少犠牲にしても、コントラストが最も大きくなるようなフィルターの $\lambda_{max}$ を決定した。最終的には励起用フィルターとして $\lambda_{max}=480nm$ 、半値幅7.1nmのもの、濾過フィルターは $\lambda_{max}=530nm$ 、半値幅8.5nmのものを使用した。

3. イメージ管導入による録画装置

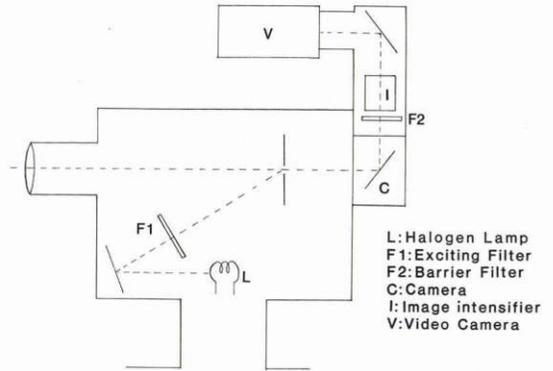


図2 本装置の原理図。眼底から放射される蛍光と眼球内の各部で反射される励起光はともに蛍光眼底撮影装置にはいる。濾過フィルター(F2)によって、蛍光だけがイメージ管(I)に入り、そこで増強された像が、ビデオカメラ(V)により撮影される。

眼底カメラを使用して、弱い励起光によって造られた蛍光眼底像を画像増強管の受光部に結像させ、明るさが増強させた出力像をビデオ録画する。そのため我々は、MCPを内蔵した画像増強管(浜松ホトニクス製 Model V1329P)を用いた。同時に、写真フィルムの上にも結像させて任意の時点で1枚どりの写真も撮影できるようにした。図2は本装置の原理を示す。

4. イメージ管装着による画像増強効果の検討

一定の明るさを持つ蛍光の写真を撮るにあたって、イメージ管を使用しないときに比べ、どれだけ露光時間が短縮でき、また励起光量を減弱できるのかを図3上段に示す装置で検討した。

1) 定強度励起光に対する露光時間の影響:

蛍光発光効率のもっとも高い0.01mg/mlのNa-F溶液をガラス容器に入れ、小円孔をあけた黒い紙で容器の周囲を覆い、上方から励起光を照射した。このとき小円孔から出てくる蛍光を、露光時間を変えて写真撮影をした。イメージ管を装着して1/15秒間露光したとき(図3、下段B)の小円孔の写真は、装着しないときに30秒間露光することによって得られた写真(図3、下段A)と同じ明るさである。すなわち露光時間を1/450に短縮できた。

2) 定露光時間に対する励起光強度の影響:

露光時間を1/15秒に固定し、同じ明るさの写真を得るための励起光強度に対するイメージ管の効果を検討した。光強度は中性濃度(ND)フィルターを使って調節した。イメージ管を装着したとき(図3、下段D)励起光を2.4対数単位減光して得られた写真と、装着し

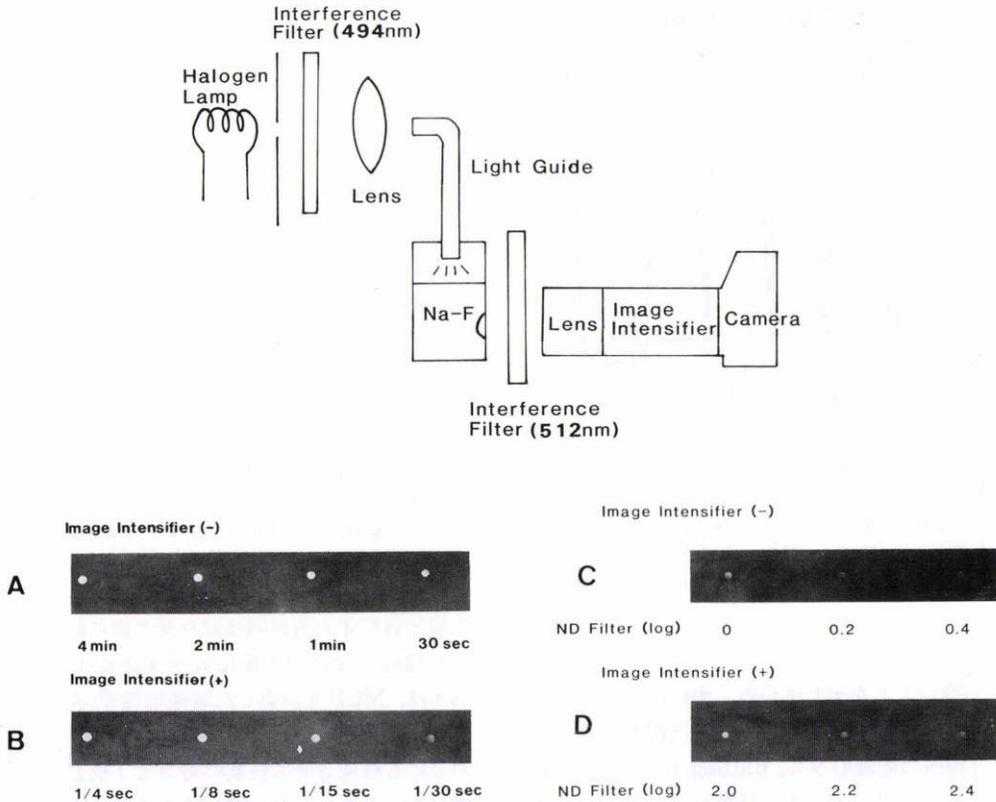


図3 写真撮影のための各要素の配置図およびイメージ管装着による画像増強効果の例。図上は写真撮影の方法を示す。図の下半分に示した4枚の写真のうち、左の2枚は定励起光の条件下で撮影されたものである。

ないとき(図3, 下段C)に励起光を0.2対数単位だけ減光して得られた写真とが同じ明るさである。このことから2.2対数単位すなわち約1/300に励起光を減光できることが明らかとなった。

##### 5. カエルの連続蛍光眼底撮影

イメージ管を装着すると従来眼底観察用に用いられている光源だけで連続蛍光眼底撮影が可能か否かをカエルを用いて検討した。ウシガエル (*Rana catesbiana*) を筋弛緩剤(サクシニルコリン: 2mg/kg) で非動化し, 散瞳剤(ミドリンP) を点眼して, 眼底カメラの撮影位置に固定した。各種濃度のNa-Fを心臓に直接注入した。ヒトの血中濃度はNa-F, 10%液, 5mlを注入する場合, 循環血液量を5lと仮定すると, 血中濃度は, 0.01%すなわち0.1mg/mlとなる。そこでカエルの場合, Na-Fの血中濃度を0.1mg/ml, 0.05mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/mlになるような条件で, 眼底観察光のみを用いて蛍光眼底像を撮影し

た。ちなみにカエルの全血量は体重の6.3%とした<sup>17)</sup>。

図4は, Na-Fの平均血中濃度が0.05mg/mlとした場合, 注入後の各時点においてビデオ撮影された蛍光眼底像を示している。このようにNa-Fの濃度を通常ヒトに用いられるものの約1/2に低下させても図に示すようなビデオ再生像を観察光のみで撮影できた。Na-F注入後, 6ないし20秒にわたって最も明るい蛍光が維持された。図5は濃度を変え, 最大の蛍光強度を示すときに露光時間を一定にして撮影したカエルの蛍光眼底像である。Na-F濃度が0.01mg/ml, すなわち通常ヒトに注入した場合の1/10の濃度(図5, B2)でも, 十分な明るさと解像度を持った像が得られた。

##### 6. ヒトの連続蛍光眼底撮影

実際に患者に対して本法を試みる前の予備実験として, 著者らを被検者にヒト正常眼の連続蛍光眼底撮影を観察光のみを用いて行った。十分に散瞳したのち, 5mlの10%Na-F溶液を肘静脈より注入し, 注入開始

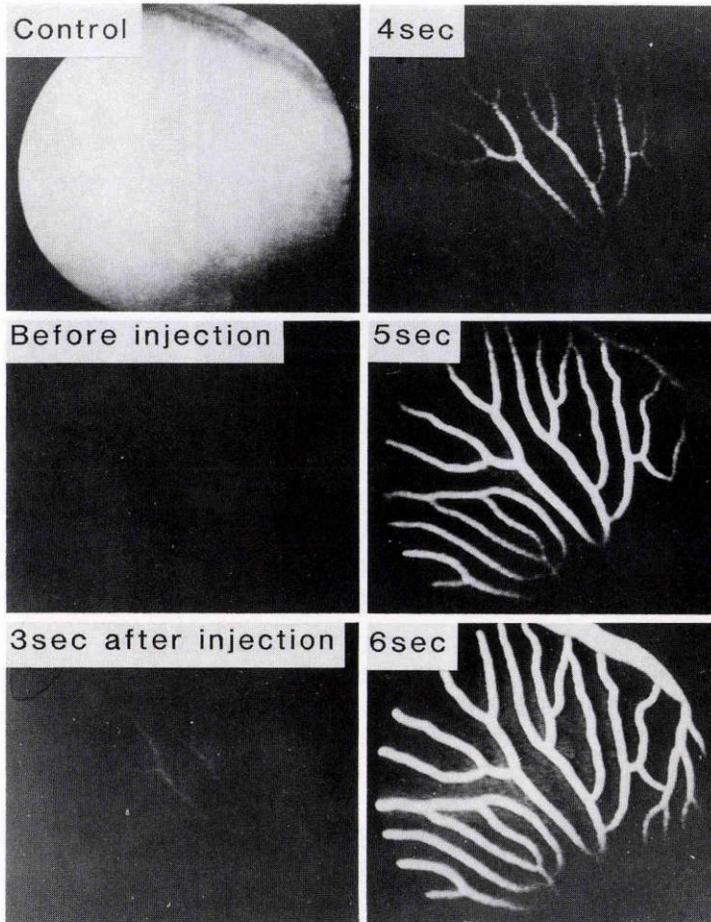


図4 Na-F注入後の各時間における蛍光眼底像。30 $\mu$ lの10%Na-Fをカエルの心臓より注入した。この時のNa-Fの血中濃度は、普通ヒトに用いる場合の約1/2である。Control：励起フィルターを除いて撮影した眼底像。Na-Fはない。右上に太い静脈が見える。Before injection：Controlの状態では励起フィルターを挿入すると、角膜や眼底からの反射は濾過フィルターによって除かれるために暗黒になる。3 sec after injection：Na-F注入後3秒で血管内に蛍光が現れ始める。4 sec：像が明確になり始める。5 sec：視野内の全静脈にNa-Fが充満する。6 sec：太い静脈に毛細血管からのNa-Fが集合する。

時よりビデオ録画を行った。図6はビデオ再生像を経時的に撮影した蛍光眼底像である。動脈層と静脈層とが明らかに示されている。眼底動脈に流入した時を0秒とすると、0秒から5秒までは動脈のみ蛍光を発している。この時間中は、3秒後の像に典型的にみられるように、静脈が黒い影として見えている。5秒後には動脈は明るく輝き(矢印)、静脈内には層流が見え始める。7秒から9秒の間は動脈、静脈が同程度に輝くが、それ以降は静脈の蛍光が優勢になり、動脈の蛍光は減弱する(12秒、矢印)。この間室内は被検者の様子を十

分に観察できる程度に照明光は点灯されたままであった。

### III 考 按

#### 1. 微弱励起光蛍光眼底撮影装置について

理想的な蛍光眼底撮影は、蛍光色素の注入から眼底血管への流入による造影、さらに消滅までの全経過を連続的に捉えることである。この目的のため、1959年Flockら<sup>18)</sup>がアーク灯を光源に用い、ネコの蛍光眼底映画撮影を行っている。その後ヒトについての報

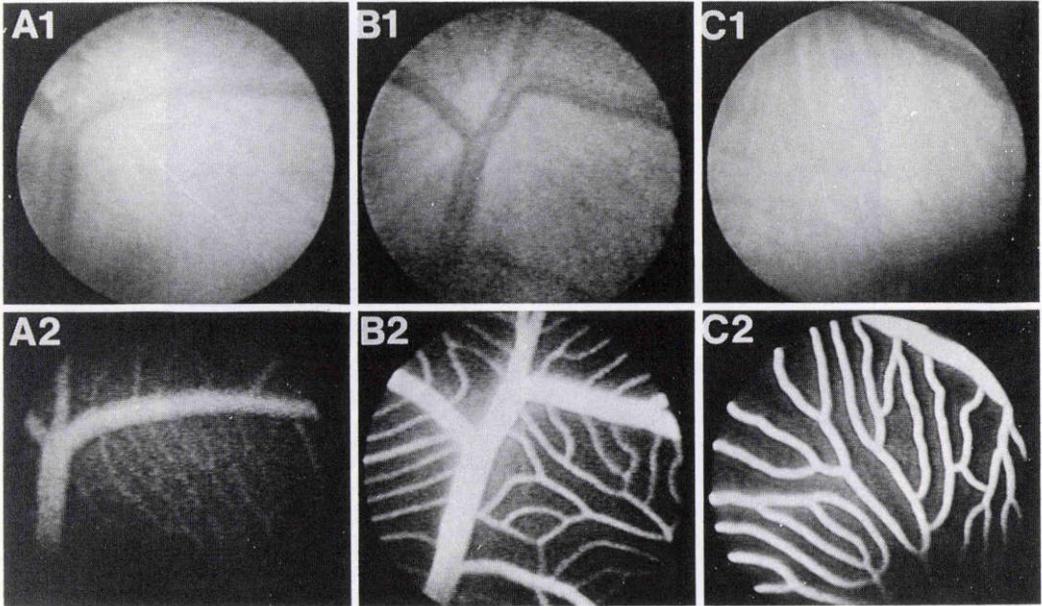


図5 Na-F 血中濃度と蛍光眼底像の関係

A1, B1, C1: Na-F 注入前, A2, B2, C2: Na-F 血中濃度がそれぞれ0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml 時の蛍光眼底像, 0.01mg/ml でも充分な明るさの像が得られている. これは普通ヒトに用いる場合の1/10の Na-F 血中濃度である.

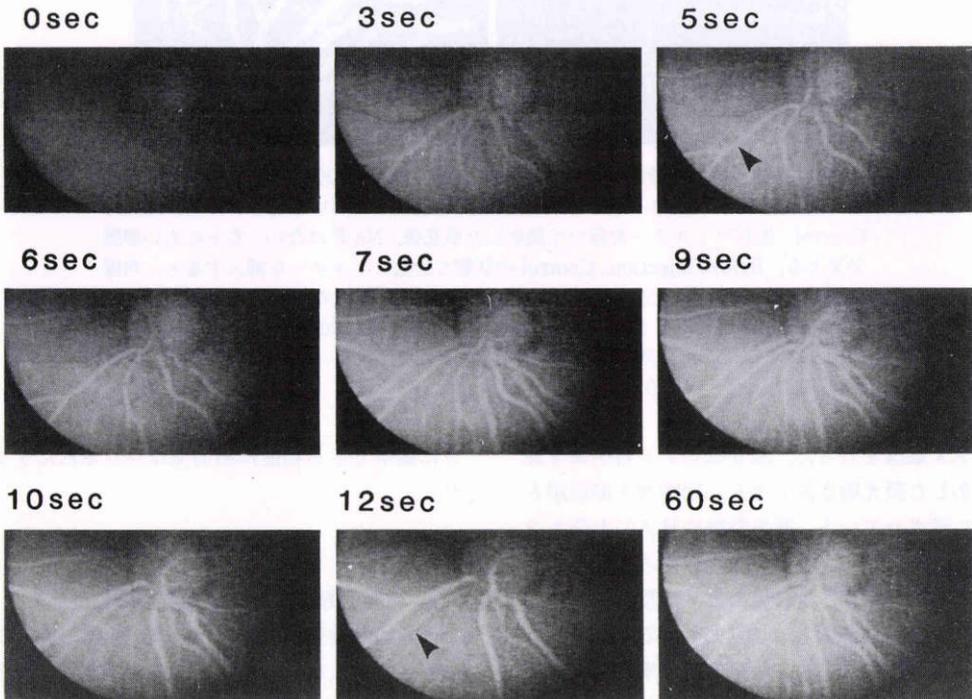


図6 ヒトの蛍光眼底撮影像. 10%Na-F 液5ml を正常被験者に注入し, 本装置で録画した蛍光眼底像を再生し, それぞれの時間で映画を静止させて写真を撮った. 両面にざらつきが多いが, 動脈相, 静脈相がはっきり識別できる. 各々の写真の左上に記した時間は蛍光が見え始めた時点を基準にして計った.

告<sup>4)~8)</sup>もあり、さらに最近はビデオ録画法<sup>9)~11)15)</sup>が導入されるようになった。しかし必然的に次第に強力な励起光が必要となり、患者の受ける苦痛はますます増大し、さらに、視細胞の破壊を生じる<sup>13)</sup>に至った。特に眼底疾患を有する場合、患者は長らく視力の回復が得られない場合もあり得る。本研究においては、連続録画と微弱励起光使用という、従来の考え方から相入れることのできない二つの目的を高感度イメージ管を導入することによって実現しようとした。MCPを用いたイメージ管は、現在のところ感度において最も優れたものである。

患者に対して試みる前の予備実験として、正常被験者5名について、ビデオ録画による蛍光眼底撮影を試みた。その結果通常量のNa-Fに対しては、励起光として通常眼底カメラの観察光を用い、全く苦痛を与えないまでに弱めて撮影することができた。一方、ウシガエルを用いた実験では0.01mg/mlで明るい眼底像が得られた。これはヒトの場合、血液と均一に混合したときの1/10の濃度に相当する。カエルの眼球の直径をヒトのそれの1/2以下とすれば、同じ強度の励起光を使用した場合、ヒトの網膜照度はカエルのそれの1/4以下になるであろう。ところが、ヒトにおける蛍光眼底撮影の場合には、5mlの蛍光色素をone shotで肘静脈より注入し、高濃度のNa-Fが急速に眼底動脈に流入することを考えれば、撮影に必要な蛍光色素の量はさらに薄くすることができることを示している。低濃度のNa-Fは副作用の軽減にもつながるので、その利点は大きい。

## 2. 本装置の問題点

MCP内臓イメージ管を蛍光眼底撮影に導入することは、本研究において初めて試みられたもので、未解決の問題が少なからず残されている。現在のMCPを用いる限り避けられない問題は、空間分解能の低さである。直径10 $\mu$ mのガラス管の集まりからなるMCPは、高感度の達成のため、空間分解能が犠牲にされているからである。ただし、現状のままでも血球の動きを検出できる。すなわち空間分解能はかなり良いことは明らかにしている。また、現在使用しているMCPは、眼底の色情報を変換する能力に欠ける。したがって視神経乳頭や血管、病変部のコントラストが低下する。そのために焦点合わせが困難になるという問題も付随的に起きてくる。しかしこれは、自動焦点合わせの機構を加えることによって解決できよう。これらの問題はMCPを用いる限り、避けることはできないが、

技術的に改善され得るものである。例えば、蛍光眼底像に色情報が含まれないため、病変部を色の違いによって区別することができない、という問題はイメージ管の前に光路を分け、カラー写真をコマ取りすることで解決されると考えられる。

次に、Na-Fの最大吸収波長(490nm)が最大蛍光波長(520nm)に近いので、励起光の一部が眼球の様々な部位から反射し、濾過フィルターを通過してしまうという問題がある。本研究においては、励起フィルターと濾過フィルターとして狭帯域干渉フィルターを用いること、および励起フィルターの $\lambda_{\text{max}}$ をNa-Fの励起スペクトルのそれよりも短波長側に、また濾過フィルターの $\lambda_{\text{max}}$ を蛍光スペクトルのそれよりも長波長側に設定することにより、この問題を軽減しようとした。イメージ管の能力はまだまだ大きなものがあり、490nmより長い波長の光を完全に通さない励起フィルターと520nmより長波長の光だけを通す濾過フィルターを使用しても十分増幅することができると考えられる。これらのことにより、高いコントラストを持つ像を、より弱い励起光およびより低濃度のNa-Fによって得ることが可能になった。このことは蛍光眼底撮影そのものだけでなく、検査室をかなりの明るさの照明のもとで、被検者を観察しながら本検査を施行することができることを意味しており、検査の安全性の面で大きな利点であろう。

本研究は文部省科学研究費(試験研究:63870070)によって行われた<sup>19)</sup>。本論文の要旨は昭和62年度日本眼科学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Novotony HR, Alvis DI: Methods of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation* 24: 82-86, 1961.
- 2) Flocks M, Miller J, Chao P: Retinal circulation time with the aid of fundus cinephotography. *Am J Ophthalmol* 48: 3-10, 1959.
- 3) 藤沢洋次: 蛍光眼底撮影法による網脈絡膜疾患の臨床的研究. *日眼会誌* 69: 1317-1328, 1965.
- 4) Hart LM, Heyman A, Linhart JW, et al: Fluorescence motion picture photography of the retinal circulation. *J Lab Clin Med* 62: 703-709, 1963.
- 5) Linhart JW, McIntosh, HD, Heyman A, et al: Clinical experience with fluorescence retinal cinematography. *Circulation* 29: 577-582, 1964.
- 6) Oberhoff P, Evans PY, Delaney JF: Cinematographic documentation of retinal circulation times. *Arch Ophthalmol* 74: 77-80,

- 1965.
- 7) **Evans P**, et al: HV Excepta Med (Ophthalmol) 114: 86, 1966. (谷 道之: 蛍光眼底撮影. 日眼会誌 74: 1360—1375, 1970.より引用).
  - 8) 藤沢洋次, 谷 道之, 足立興一, 他: 蛍光眼底映画撮影機の試作. 臨眼 9: 44—45, 1969.
  - 9) 滝沢志郎, 油 大作, 加藤康夫, 他: 超感度撮影管を用いた蛍光眼底テレビ装置. 臨眼 27: 377—380, 1973.
  - 10) **Haining WM**: Video Funduscopy and Fluoroscropy. Br J Ophthalmol 65: 702—706, 1981.
  - 11) **Roxburgh STD, Haining WM**: Videofluoroscropy in macular disease. Eye 1: 391—396, 1987.
  - 12) **Gorn RA, Kuwabara T**: Retinal damage by visible light. Arch Ophthalmol 77: 115—118, 1967.
  - 13) 所 敬: 光による網膜障害. 眼科 23: 1365, 1981.
  - 14) 宇山昌延, 馬嶋昭生, 松井瑞夫, 他: フルオレセインの副作用と安全性. 日眼会誌 87: 300—305, 1983.
  - 15) 真鍋禮三, 水川 孝, 鈴木達朗, 他: イメージ管を用いた蛍光眼底映画撮影装置. 臨眼 24: 663—666, 1970.
  - 16) **Lampton M**: The microchannel image intensifier. Sci Am 245: 46—55, 1981.
  - 17) 田坂義雄: 蕁ノ全血量竝ニ瀉血後後護食塩水ノ注射ニ就イテ. 大阪医学会雑誌 30: 405—412, 1931.
  - 18) **Chao P, Flocks M**: The retinal circulation time. Am J Ophthalmol 46: 8—10, 1958.
  - 19) 田崎京二: 超短時間定量的オートラジオグラフィの実現. 昭和61年度科学研究費補助金(試験研究-2)研究成果報告書, 研究課題番号59870007.