

レーザースペックル現象を利用した脈絡膜末梢循環の 生体用二次元解析機の開発

玉置 泰裕¹⁾, 川本 英三²⁾, 江口秀一郎³⁾, 新家 真⁴⁾, 藤居 仁⁵⁾

¹⁾東京都老人医療センター眼科, ²⁾大宮赤十字病院眼科, ³⁾東京大学医学部眼科学教室

⁴⁾東京大学医学部附属病院分院眼科, ⁵⁾九州工業大学情報工学部

要 約

レーザースペックル現象を利用した脈絡膜末梢血流速度の生体用二次元解析機を開発し、同機の定量性および再現性を *in vitro* および *in vivo* で検討した。本機は、眼底の半導体レーザー照射野内に生じたスペックルパターンをエリアセンサーに結像し、各画素におけるスペックルパターンのぶれを表す値 (normalized blur ; 以下 NB 値) を血流速度の指標として、それを二次元カラーマップ表示する。回転スリガラス板のスペックルパターンより得られた NB 値とその移動速度は 2~130 mm/sec の間で直線関係にあった。白色家兎脈絡膜の NB 値測定の再現性は、再現性指数 6.9% であった。白色家兎眼圧を変化させ、脈絡膜 NB 値を測定した。眼灌流圧の低下に従って NB 値は減少した。本機は高い再現性で、脈絡膜末梢血流速度が非侵襲的かつ二次元的に測定可能であり、眼圧上昇による脈絡膜末梢血流速度の変化を定量的にとらえることができた。(日眼会誌 97: 602-609, 1993)

キーワード: レーザースペックル現象, 脈絡膜末梢血流速度, normalized blur, 二次元カラーマップ, 眼灌流圧

An Apparatus Using Laser Speckle Phenomenon for Noninvasive 2-dimensional Analysis of Choroidal Microcirculation

Yasuhiro Tamaki¹⁾, Eizo Kawamoto²⁾, Syuichiro Eguchi³⁾

Makoto Araie⁴⁾ and Hitoshi Fujii⁵⁾

¹⁾Eye Clinic, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

²⁾Eye Clinic Ohmiya Red Cross Hospital

³⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

⁴⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo Branch Hospital

⁵⁾Department of Computer Science and Electronics, Kyusyu Institute of Technology

Abstract

A new instrument using the laser speckle phenomenon for noninvasive 2-dimensional analysis of the choroidal microcirculation was developed. The fundus was illuminated with a diode laser spot and its image speckle was detected with an area sensor. The difference between the average of the output data (I-mean) and the output data from successive scanings of the image speckles at the sensor plane

別刷請求先: 173 東京都板橋区栄町 35-2 東京都老人医療センター眼科 玉置 泰裕
(平成 4 年 9 月 28 日受付, 平成 4 年 12 月 2 日改訂受理)

Reprint requests to: Yasuhiro Tamaki, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku 173, Japan

(Received September 28, 1992 and accepted in revised form December 28, 1992)

was calculated and integrated to give as D-mean, and I-mean/D-mean was defined as normalized blur (NB), which is a quantitative index of blood flow velocity. The results were displayed in color graphics showing the 2-dimensional variation of the NB level in the area of interest. The NB had good correlation with the speed measured on ground glass in the range between 2 and 130mm/sec. Using this instrument, the effect of intraocular pressure on the chroidal circulation of the rabbit was studied. The coefficient of reproducibility was 6.9% when measured in the same area twice at 5-minute intervals. A stepwise reduction in the ocular perfusion pressure was introduced by elevating the intraocular pressure manometrically. A linear correlation was found between the NB and the ocular perfusion pressure. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 602-609, 1993)

Key words: Laser speckle phenomenon, Choroidal microcirculation, Normalized blur, Two dimensional color mapping, Ocular perfusion pressure

I 緒 言

脈絡膜は眼内全血流の65~85%¹⁾が循環する血流の豊富な組織であり、網膜外層の栄養や眼内の温度調節などの重要な生理学的機能を有する²⁾。しかし、脈絡膜は網膜色素上皮と強膜との間に位置するため、その循環動態を観察することは非常に困難であった。脈絡膜循環動態の非侵襲的観察法として、蛍光眼底撮影法³⁾、indocyanine green (以下 ICG) を用いた赤外線吸収撮影法⁴⁾および ICG 蛍光眼底撮影法⁵⁾などが開発されたが、組織血流動態(微小循環)の解析には適しておらず、またその定量性には限界がある³⁾⁻⁵⁾。

我々は眼底のある範囲内のレーザー-speckle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、生体眼における眼底末梢血流速度の非侵襲的二次元解析を行う機器(laser speckle circulation analyser-I, 以下 LSCA-I)を開発し、同機により家兎視神経乳頭血流速度の眼圧上昇による変化が定量的に解析可能であることを、先に報告した⁶⁾。しかし、同機は解析可能速度域が0~8 mm/sec⁶⁾と狭いため、血流速度の極めて速い⁷⁾⁸⁾脈絡膜末梢血流の解析は不可能であった。今回我々は、LSCA-Iを改良し、より速い末梢血流速度の非侵襲的二次元解析の可能な機器(以下 LSCA-II)を開発し、更に同機の定量性および再現性を *in vitro* および *in vivo* で検討したのでここに報告する。

II 方 法

1. LSCA-II の測定原理

図1に LSCA-II の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, 出力 50 mW) およびエリアセンサー(縦 100×横 100 画素, BASIS 型, Canon)を装置した眼底カメラ(TRC-WT 3[®]、

Topcon)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、リングミラーを介して眼底に照射する。0.88×0.88 mm のレーザー照射野内のうち、測定部位である 0.42×0.42 mm の眼底領域で散乱したレーザー光はリングミラーの中心部を通り、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、speckleパターンが形成され、血流の速いところ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⁹⁾¹⁰⁾。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り、98 フレーム分の画像が連続的にメモリー記録され、これを 16 ビットマイクロコンピュータで読み出す。

ここで、エリアセンサー上で、左端より x 番目、上端より y 番目の画素の、測定開始より k 番目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(図2)。縦 2×横 2 画素を 1 pixel とし、左端より i 番目、上端より j 番目の pixel のレーザー光の反射光量レベルの 98 フレーム分の平均値を Imean(i, j) とすると、

$$I\text{mean}(i, j) = \frac{\sum_{k=1}^{98} \sum_{y=j}^{j+1} \sum_{x=i}^{i+1} I(x, y, k)}{392} \quad (1)$$

となる。さらに、Imean(i, j) と pixel 内の各画素の反射光量レベルとの偏差の絶対値の 98 フレーム分の平均値を Dmean(i, j) とすると、

$$D\text{mean}(i, j) = \frac{\sum_{k=1}^{98} \sum_{y=j}^{j+1} \sum_{x=i}^{i+1} |I\text{mean}(i, j) - I(x, y, k)|}{392} \quad (2)$$

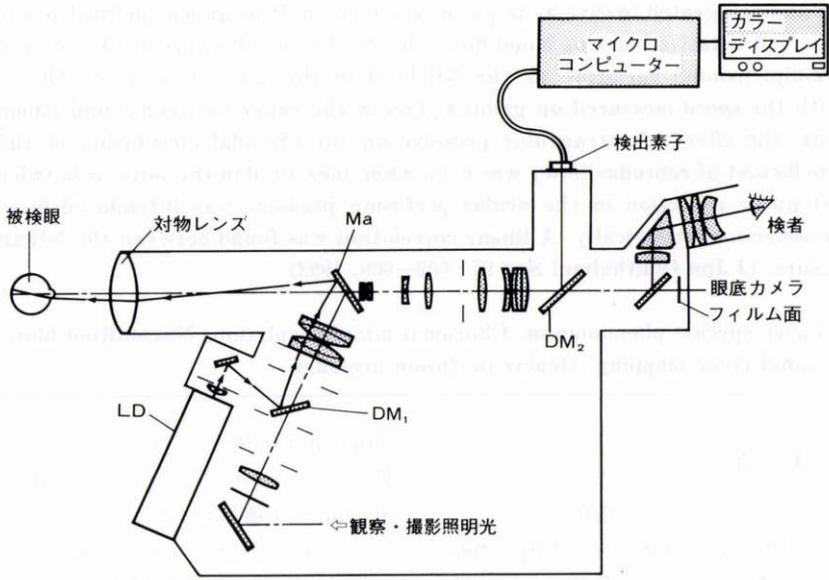


図1 Laser speckle circulation analyser-IIの光学系の模式図。

LD:半導体レーザーヘッド, DM₁, DM₂:ダイクロイックミラー, Ma:リングミラー

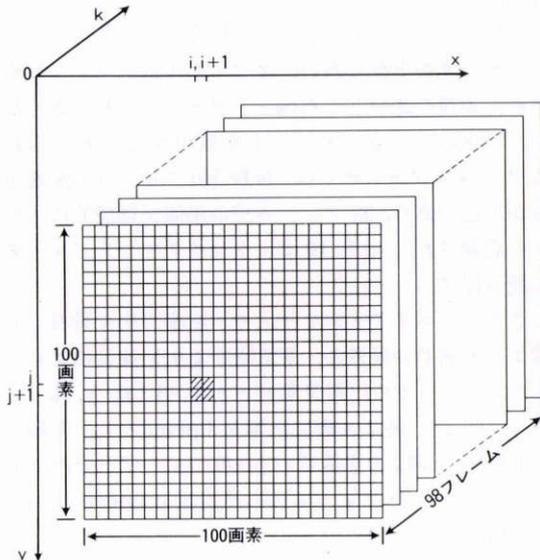


図2 エリアセンサーにおける pixel の設定。

エリアセンサー上で、左端より x 番目、上端より y 番目の画素の、測定開始より k 番目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。縦 2 × 横 2 画素を 1 pixel とし、左端より i 番目、上端より j 番目の pixel (斜線部分) のレーザー光の反射光量レベルの 98 フレーム分の平均値 $I_{mean}(i, j)$ 、および $I_{mean}(i, j)$ と pixel 内の各画素の反射光量レベルとの偏差の絶対値の 98 フレーム分の平均値 $D_{mean}(i, j)$ を算出する。

となる。ここで、左端より i 番目、上端より j 番目の画素におけるスペックルパターンのぶれ(すなわち血流の指標)を表す値(normalized blur; 以下 NB 値)を $NB(i, j)$ とし、次式のように定義する。

$$NB(i, j) = I_{mean}(i, j) / D_{mean}(i, j) \quad (3)$$

NB 値は Fercher ら⁹⁾¹⁰⁾の述べた blurring を定量化した値であり、 D_{mean}/I_{mean} は contrast に相当すると考えられる。この NB 値の分布を、末梢血流速度分布として 9 インチ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。図 3 に家兎眼底のカラーマップの一例を示す。NB 値に応じて、灰色から赤色の 25 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、即ち末梢血流速度が高いことを示す。図の赤色の領域は血管に相当する。また、任意の範囲を設定し、その領域の NB 値の平均を計算、表示できるようになっている。なお今回は、画面全体の NB 値の平均値を測定値として用いた。98 フレーム分の記録に 0.18 秒、その後データ解析およびカラーマップ表示に約 50 秒を要するため、約 1 分毎の測定が可能である。なお、LSCA-II では各画素におけるスペックルの変動率を積算した値(average difference; 以下 AD 値)⁶⁾も同時に測定可能であり、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に保存される。

測定中に眼球運動が起こると、それによる移動分も

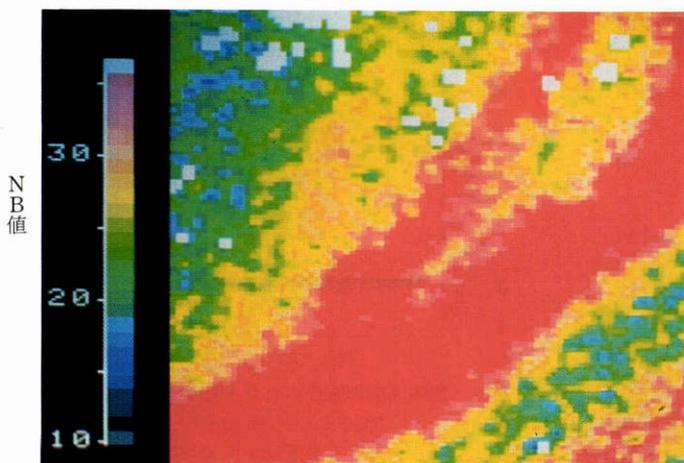


図3 家兎眼底のカラーマップの1例.

Normalized blur (NB 値) に応じて、灰色から赤色の 25 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、即ち末梢血流速度が高いことを示す。図の赤色の領域は血管に相当する。



図4 脈絡膜末梢血流速度解析部位.

家兎視神経乳頭の約1乳頭径下方を本装置を用いて解析した。

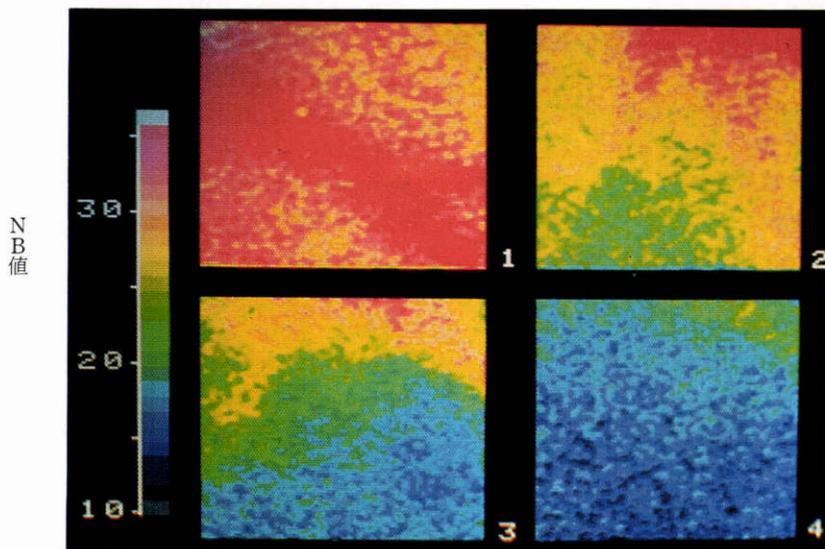


図7 眼圧上昇に伴う脈絡膜末梢血流速度の変化.

図中の1～4は、それぞれ眼圧が10, 30, 50, 70 mmHgの時の脈絡膜測定部位のカラーマップの一例を示す。

NB値に含まれるため正しい測定が行えない。故に、前報に述べたように⁹⁾エ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スペックルの変動率の時間変動を解析してプロットし、その変動により測定中の眼球運動の有無を判断している。

2. 実験方法

実験1；LSCA-IIの定量性 (*in vitro*)

眼底よりのスペックルのスペクトル分布は移動スリガラスによる光散乱信号のスペクトル分布に類似している¹¹⁾。両面砂打スリガラス板を本機の眼底カメラの合焦位置に置き、定速度で回転させ、移動速度とNB値およびAD値の相関を検討した。

実験2；LSCA-IIの再現性 (*in vivo*)

体重2.5~2.8kgの成熟白色家兎6匹12眼を用いた。押田式固定機(KN-317, 夏目製作所)に家兎を固定後、ペントバルビタールナトリウム25mg/kg(ネンブタール®0.5ml/kg)を耳介静脈より緩徐に注入し、全身麻酔した。ミドリンP®点眼による散瞳20分後に、固定機に固定したままの状態、LSCA-IIにて5分間隔で眼底同一部位(視神経乳頭の約1乳頭径下方、図4)を2度測定し、測定の再現性を検討した。家兎網膜血管は、有髄神経線維である髄翼上を殆ど水平に頭側、尾側に向かって走行しており¹²⁾、髄翼以外の部分では網膜血管は認められず、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。

なお、ここでは前報⁹⁾と同様に二回の測定値の変動を再現性指数として用いた。

実験3；眼圧上昇に伴うNB値の変化

体重2.5~2.8kgの成熟白色家兎8匹8眼を用いた。実験2と同様に全身麻酔した後、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 Inc.)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)にて血圧変動を記録した。また、ミドリンP®およびジクロフェナックナトリウム(ジクロード点眼液®)を点眼した後、25G針を9時部の角膜輪部より前房内に刺入し、上記と同型の圧力トランスデューサー、ひずみ圧力用アンプおよび眼内灌流液(オベガードMA®)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にて記録しつつ、リザーバーの高さを変えることにより眼圧を調整した。眼底を10, 30, 50, 70, 80mmHgと上昇させ(図5)、各眼圧に上昇5分後に、

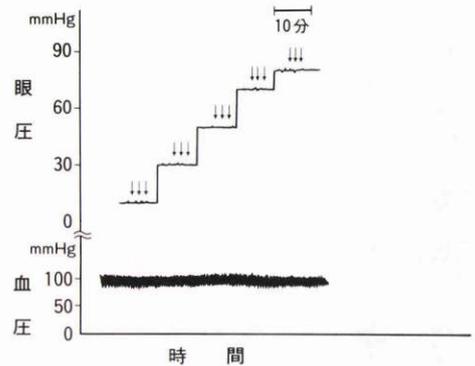


図5 実験3中の眼圧および大腿動脈血圧の1例。家兎眼圧を10, 30, 50, 70, 80mmHgと上昇させ、各眼圧に上昇5分後に本装置にて脈絡膜同一部位を1分間隔で三回ずつ(矢印)測定した。

LSCA-IIにて眼底同一部位(視神経乳頭の約1乳頭径下方、図4)を1分間隔で三回ずつ測定した。実験を通じて、角膜混濁は生じなかった。

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、平均大腿動脈圧FABPmは、次式で表される。

$$FABPm = FABPd + 1/3 (FABPs - FABPd) \quad (4)$$

ここで、眼圧をIOPとし、眼灌流圧Pmを次式のよりに定義した。

$$Pm = FABPm - IOP \quad (5)$$

なお、測定開始時および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)を用いて、pH, pO₂, およびpCO₂を測定した。室温は18~24℃に保ち、直腸温をthermistor thermometer(MGAIH-219 Y, 芝浦電気製作所)で測定した。

III 結果

実験1；LSCA-IIの定量性 (*in vitro*)

図6にスリガラス板の移動速度と、NB値およびAD値の関係を示す。NB値は、スリガラス板の移動速度が2~130mm/secでは直線関係にあった。AD値は、スリガラス板の移動速度が0~8mm/secでは正の相関を示し、0~3mm/secではほぼ直線関係にあった。8mm/sec以上では、移動速度の増加に伴い、AD値は漸減した。

実験2；LSCA-IIの再現性 (*in vivo*)

12眼における測定の再現性指数は6.9±1.9%(平均

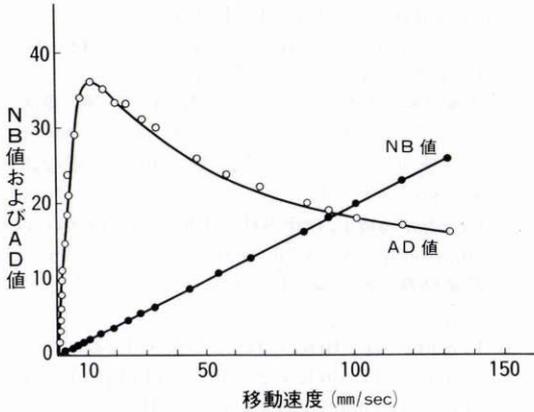


図6 スリガラス板の移動速度と normalized blur (NB値) および average difference (AD値).

● : NB 値, ○ : AD 値の測定値をそれぞれ示す.

値±標準誤差)であった。

実験3 ; NB 値の眼圧上昇に伴う変化

実験中の大腿動脈平均血圧, 脈拍および大腿動脈血 pH, pCO₂, pO₂, 直腸の8匹の平均値を表1に示す。これら全身状態のパラメーターは、いずれも健常家兎の正常域内の値であり¹³⁾¹⁴⁾, 実験中に有意な変化は認められなかった。

眼圧がそれぞれ 10, 30, 50, 70 mmHg の時の眼底測定部位のカラーマップの一例を図7に示す。眼圧上昇に伴い、画面の色調が全体として赤色から青色に変化しており、これは眼底測定部位の NB 値, すなわち血流速度が低下したことを示す。

眼灌流圧と NB 値の関係を図8に示す。各プロットはそれぞれ眼圧が 10, 30, 50, 70, 80 mmHg の時の、眼灌流圧および NB 値の8眼の平均値を示す。NB 値は眼圧 10 mmHg の測定値に対する百分率で示した。眼灌流圧の低下に従って NB 値は減少し、眼圧 30, 50, 70 および 80 mmHg では NB 値は初期値に比してそ

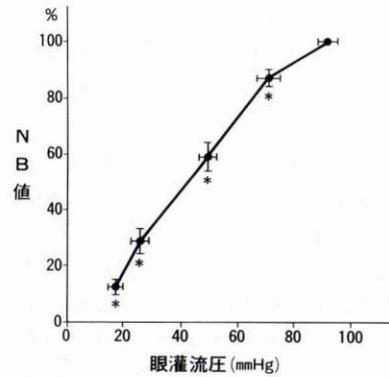


図8 眼灌流圧と脈絡膜 normalized blur (NB 値).

各プロットは、それぞれ眼圧が 10, 30, 50, 70, 80 mmHg の時の、眼灌流圧および脈絡膜測定部位の NB 値の 8 眼の平均値を示す。NB 値は眼圧 10 mmHg の測定値に対する百分率で示した。

平均値±標準誤差 (n=8), * : p<0.01 (一元配置分散分析)

れぞれ平均 11.2%, 39.1%, 70.9%, 87.5% (p<0.01, n=8, 一元配置分散分析) 減少した。

IV 考 按

脈絡膜循環動態の非侵襲的解析法として、蛍光眼底撮影法³⁾, ICG を用いた赤外線吸収撮影法⁴⁾, ICG 蛍光眼底撮影法⁵⁾および laser Doppler flowmetry (LDF)¹⁵⁾¹⁶⁾などが用いられてきた。前三者の撮影法では組織血流の定量的解析は不可能であり、また短時間に頻回の測定を行うことはできない³⁾⁻⁵⁾。レーザー組織血流計を用いた LDF は、組織接触式であるため動物実験にのみ用いられており、レーザー光が組織のメラニン色素の影響を受けやすく、また眼球運動の影響も受けやすい¹⁵⁾。また、眼底カメラを用いた LDF による脈絡膜末梢循環測定も試みられている¹⁶⁾が、測定部位が直径 160 μm の 1 点に限られるという欠点があ

表1 実験3中の全身状態のパラメーターの変化

眼圧 (mmHg)	10	30	50	70	80
大腿動脈平均血圧 (mmHg)	97.8±7.2	97.0±6.2	94.1±6.1	92.4±5.9	91.9±5.5
脈拍 (拍/分)	299±12	299±11	296±10	294±10	291±10
pH*	7.37±0.02	7.38±0.01	7.39±0.01	7.39±0.02	7.41±0.01
PCO ₂ * (mmHg)	37.6±1.8	38.0±1.5	37.7±1.7	39.2±2.1	37.7±2.3
PO ₂ * (mmHg)	70.7±4.6	74.0±5.1	76.8±4.9	75.9±4.9	81.5±5.6
直腸温 (°C)	38.4±0.2	38.3±0.2	38.0±0.3	37.9±0.03	38.2±0.2

* : 大腿動脈血にて測定した。

平均値±標準誤差 (n=8)

る。これらに対し、LSCA-IIでは、測定面積が人眼では 0.72×0.72 mmに相当し、これはLDFの約20倍と広く、眼底のある範囲の末梢循環動態を二次元的に測定結果を解析できるという利点がある。

実験1では、NB値はスリガラス板の移動速度が2~130 mm/secでは直線関係にあったが、AD値は移動速度が0~8 mm/secでは正の相関を示し、8 mm/sec以上では移動速度の増加に伴い、AD値は漸減した。これは、AD値による解析方法は、血流速度の遅い領域の解析には適するが、血流速度の速い領域の解析には適さず、NB値による解析方法は、より血流速度の速い領域の解析が可能であることを示唆する。故に今回の *in vivo* 測定では、NB値を用いて、血流速度が速いと考えられる⁷⁾⁸⁾脈絡膜末梢循環を解析した。

実験3では、家兎眼における脈絡膜末梢血流速度は、眼灌流圧低下に従って血流速度が低下し、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示唆された。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¹⁷⁾)猫眼(microsphere法¹⁸⁾¹⁹⁾アイトープクリアランス法²⁰⁾、熱勾配法¹⁷⁾、laser Doppler法¹⁵⁾、猿眼(microsphere法²¹⁾)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値が脈絡膜末梢血流の定量的指標となりうることを強く支持するものである。

以上、レーザースペckル現象を利用した脈絡膜末梢血流速度の生体用二次元解析機を開発した。本機は再現性指数約7%で、脈絡膜末梢血流速度が非侵襲的かつ二次元的に測定可能であり、本機により測定された眼圧上昇時の脈絡膜末梢血流速度の変化は、従来の方法による結果とよく一致していた。

文 献

- O'Day DM, Fish MB, Aronson SB: Ocular blood flow measurement by nuclide labelled microspheres. Arch Ophthalmol 86: 205-209, 1971.
- Bill A, Sperber G, Ujije K: Physiology of the choroidal vascular bed. Int Ophthalmol 6: 101-107, 1983.
- Hyvarinen L, Maumenee AE, George T, Weinstein GW: Fluorescein angiography of the choriocapillaris. Am J Ophthalmol 67: 653-666, 1969.
- Flower RW, Hockheimer BF: A clinical technique and apparatus for simultaneous angiography of the separate retinal and choroidal circulations. Invest Ophthalmol 12: 248-261, 1973.
- Craandijk A, Van Beck CA: Indocyanine green fluorescein angiography of the choroid. Br J Ophthalmol 60: 377-385, 1976.
- 玉置泰裕, 川本英三, 江口秀一郎, 新家 真, 藤居仁: レーザースペckル現象を利用した視神経乳頭循環の生体用二次元解析機の開発. 日眼会誌 97: 501-508, 1993.
- Friedenwald E, Oak SM: Choroidal microcirculation in vivo. Bibl Anat 7: 129-132, 1965.
- 松尾信彦: 脈絡膜循環の特異性. 日眼会誌 84: 2147-2206, 1980.
- Fercher AF, Briers JD: Flow visualization by means of single-exposure speckle photography. Opt Commun 37: 326-330, 1981.
- Briers JD, Fercher AF: Retinal blood-flow visualization by means of laser speckle photography. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 255-259, 1982.
- 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, Ladoan, Lisbon, 55-68, 1988.
- Ruskell GL: Blood vessels of the orbit and globe. In: Prince JH (Ed): The rabbit in eye research, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 514-553, 1964.
- 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.
- 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.
- Gherzhgiher 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.
- Rive CE, Pournaras CJ, Poitry-Yamate CL, Petrig BL: Rhythmic changes in velocity, volume, and flow of blood in the optic nerve head tissue. Microvascular Research 40: 36-45, 1990.
- Bill A: Intraocular pressure and blood flow through the uvea. Arch Ophthalmol 67: 336-348, 1962.
- 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.
- 19) **Weiter JJ, Schachar RA, Ernest JT**: Control of intraocular blood flow. I. Intraocular pressure. *Invest Ophthalmol* 12: 327-331, 1973.
- 20) **Friedman E**: Choroidal blood flow. Pressure-flow relationships. *Arch Ophthalmol* 83: 95-99, 1970.
- 21) **Alm A, Bill A**: Ocular and optic nerve flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labeled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp Eye Res* 15: 15-29, 1973.
-