

## レーザー-speckle現象を利用した網膜末梢循環の生体二次元解析

## —II. Microsphere 法による測定値との比較—

玉置 泰裕<sup>1)</sup>, 川本 英三<sup>2)</sup>, 新家 真<sup>3)</sup>, 江口秀一郎<sup>4)</sup>, 藤居 仁<sup>5)</sup><sup>1)</sup>東京都老人医療センター眼科, <sup>2)</sup>大宮赤十字病院眼科, <sup>3)</sup>東京大学医学部附属病院分院眼科,<sup>4)</sup>東京大学医学部眼科学教室, <sup>5)</sup>九州工業大学情報工学部

## 要 約

先に開発したレーザー-speckle現象を利用した網膜末梢循環の生体用二次元解析機の定量性および再現性を *in vivo* で検討した。本機は、眼底のアルゴンレーザー照射野内に生じたspeckleパターンをエリアセンサーに結像し、各画素におけるspeckle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、それを二元的カラーマップ表示する。有色家兎網膜の表在血管の見えない部位の NB 値測定の再現性指数は、5 分間隔で 8%、24 時間間隔で 13% であった。

有色家兎眼圧を変化させ、網膜 NB 値および **microsphere** 法により網膜組織血流量を測定した。網膜 NB 値は、**microsphere** 法による網膜組織血流量測定値と直線関係にあった。血流速度の指標として用いた NB 値が網膜組織血流量の定量的指標ともなり得ることが示された。(日眼会誌 98: 169—174, 1994)

キーワード: レーザー-speckle現象, 網膜, 組織血流量, **Microsphere** 法, 再現性

Noninvasive Two-dimensional Analysis of Retinal Microcirculation  
Using the Laser Speckle Phenomenon

## —II. Comparison of Results with those obtained with the Microsphere Technique—

Yasuhiro Tamaki<sup>1)</sup>, Eizo Kawamoto<sup>2)</sup>, Makoto Araie<sup>3)</sup>,  
Shuichiro Eguchi<sup>4)</sup> and Hitoshi Fujii<sup>5)</sup><sup>1)</sup>Eye Clinic, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital<sup>2)</sup>Eye Clinic, Ohmiya Red Cross Hospital<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, University of Tokyo Branch Hospital<sup>4)</sup>Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine<sup>5)</sup>Department of Computer Science and Electronics, Kyushu Institute of Technology

## Abstract

We have recently developed an apparatus for noninvasive two-dimensional analysis of the retinal microcirculation using the laser speckle phenomenon. The fundus is illuminated by an argon laser spot and its image speckle is detected by an area sensor. The difference between the average of output data and the output data for successive scanings of the image speckles at the sensor plane is calculated to give the value of normalized blur (NB), which is a quantitative index of tissue blood flow velocity. In pigmented rabbit eyes, the coefficient of reproducibility was 8% when the same area of retina was measured twice at 5-minute intervals and 13%

at 24-hour intervals. The NB values in the retina free of visible vessels were recorded under various levels of intraocular pressure ranging from 10 to 80 mmHg and the results were compared with the blood flow rate determined with the colored microsphere technique. A linear correlation was found between the former and the latter, which suggested that the NB value also parallels the tissue blood flow rate. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 169—174, 1994)

Key words: Laser speckle phenomenon, Retina, Blood flow rate, Microsphere technique, Reproducibility

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5年6月14日受付, 平成5年9月16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, Tokyo 173, Japan.

(Received June 14, 1993 and accepted in revised form September 16, 1993)

## I 緒 言

今日、網膜循環の解析法として、蛍光眼底撮影法<sup>1)</sup>、blue field entopic phenomenon 法<sup>2)</sup>、laser Doppler 法<sup>3)~7)</sup>などが臨床的に用いられている。なかでも laser Doppler 法は定量的かつ他覚的検査法であるという点で他の2法より優れた検査法であると考えられる。しかし、laser Doppler 法は網膜大血管の血流速度測定にのみ使用されており<sup>3)~7)</sup>、網膜の生理学的機能や病態の重要な指標となると考えられる網膜末梢循環動態の解析は現時点では行われていない。この網膜組織血流量の解析法としては、microsphere 法<sup>8)9)</sup>、アイソトープクリアランス法<sup>10)</sup>、iodoantipyrine 法<sup>11)</sup>などがあるが、いずれも侵襲的方法であり臨床応用は不可能である。

我々は選択的に網膜から散乱するアルゴンレーザーを眼底のある範囲に照射し、そこに生じるスペックルパターンを解析することにより、生体眼における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、同機により家兎網膜末梢血流速度の眼圧上昇に伴う変化を定量的に解析可能であることを先に報告した<sup>12)</sup>。今回我々は、本法の測定の再現性についてさらに検討した上で、本法および侵襲的組織血流量測定法である microsphere 法による網膜末梢循環の測定値の相関について検討したので報告する。

## II 方 法

## 1. 測定原理

本機の測定原理については前報<sup>12)</sup>で記述したので概要のみを述べる。図1に本機の光学系の模式図を示す。本機の光学系はアルゴンレーザー（波長 488 nm）およびエリアセンサー（縦 100×横 100 画素、BASIS 型、キャノン）を装置した眼底カメラ（TRC-WT 3<sup>®</sup>、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（DM<sub>1</sub>）を挿入し、アルゴンレーザーを眼底に照射する。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 の眼底領域（家兎眼での値、人眼では 1.06×1.06 mm に相当）で散乱したレーザー光は、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がぶれが大きくなると考えられる<sup>13)14)</sup>。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 フレームの画像が連続的にメモリーに記録され、これをマイクロコンピュータで読み出す。ここで、各画素におけるスペックルパターンのぶれを表す値（NB 値）を血流速度の指標とし、この 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。98 フレーム分の画像の記録に 0.18 秒、データ解析に約 10 秒を要するため、約 15 秒毎の測定が可能である。なお、今回は 100×100 画素全体の NB 値の平均値を測定値として用いた。

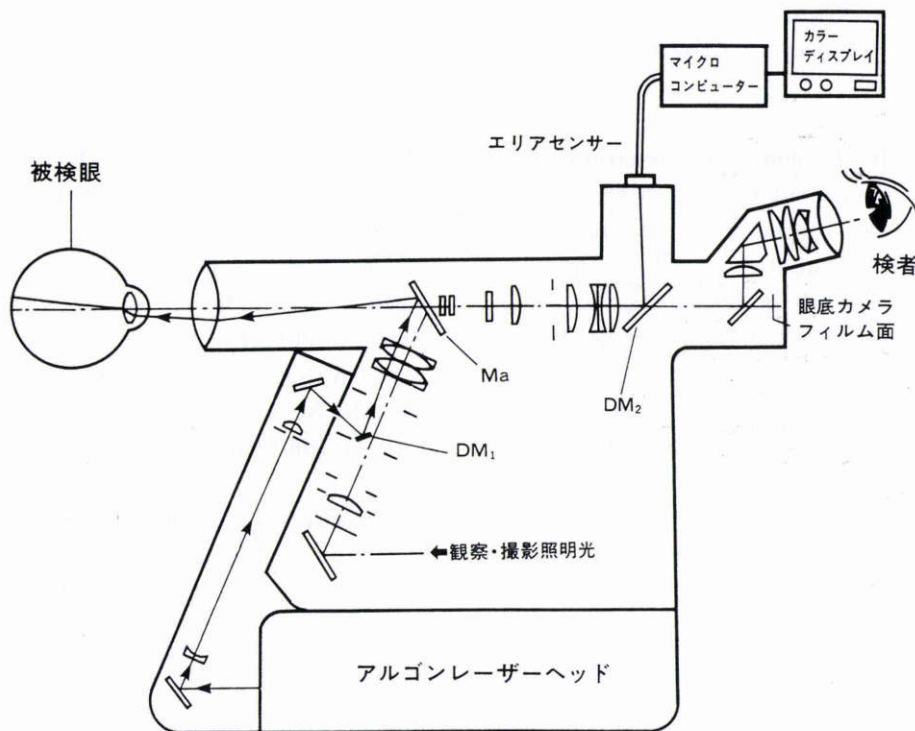


図1 網膜末梢循環解析機の光学系の模式図。

DM<sub>1</sub>, DM<sub>2</sub>: ダイクロイックミラー, Ma: リングミラー

## 2. 実験方法

### 実験1：網膜NB値測定の再現性

体重2.0~2.5 kgの成熟有色家兎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25 mg/kg(ネンブター® 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%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、固定機に固定したままの状態、本機にて5分間隔で網膜同一部位(視神経乳頭の約1乳頭径耳側, 図2)のNB値を測定した。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<sup>16)</sup>, 髄翼上の網膜表在血管の見えない部分から得られるスペック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時間後に本機網膜同一部位の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

$$\frac{|V_1 - V_2|}{(V_1 + V_2)/2}, \frac{|V_1 - V_3|}{(V_1 + V_3)/2} \quad (1)$$

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)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画素について算出した。

### 実験2：網膜NB値とmicrosphere法による網膜組織血流量測定値の比較

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。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法による測定値とほぼ直線関係にあることが報告されている<sup>17)</sup>。

実験1と同様に全身麻酔した後、血流の凝固を防ぐためヘパリン500 IU/kgを静注した。血圧測定および採血のため大腿動脈を切開してカニューレを挿入し、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)にて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ューレを挿入した。カニューレ挿入と対側の眼に0.5%トロピカミドおよび0.1%ジクロフェナックナトリウムを点眼した後、2本の25 G針を角膜輪部から前房内に刺入し、一方を上記と同型の圧力トランスデューサーに、他方を眼内灌流液(オペガード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。眼圧を10→50 mmHg (n=3), 10→65 mmHg (n=3), 10→80 mmHg (n=6), 50→65 mmHg (n=

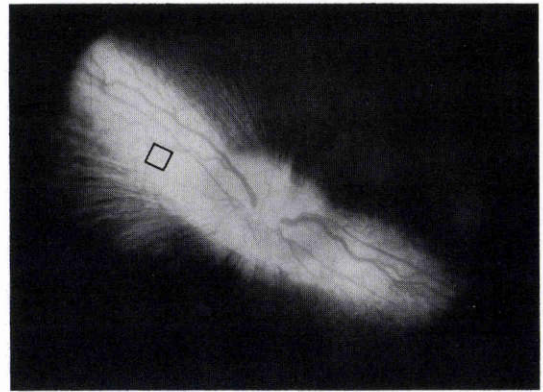


図2 網膜末梢血流速度解析部位。

家兎視神経乳頭の約1乳頭径耳側(四角部分)を本装置を用いて解析した。

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段階目の眼圧に調節した5分後に網膜NB値(視神経乳頭の一乳頭径耳側, 図2)を3回測定し、その直後にcolored microsphere(赤色)溶液( $15 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , 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、全自動pH/血液ガス分析装置(Model 170, Corning)を用いて、pH,  $\text{Po}_2$ , および $\text{Pco}_2$ を測定した。室温を $20 \pm 2^\circ\text{C}$ に保ち直腸温をサーミスタ温度計(MGAIM-219 Y, 芝浦電気製作所)で測定した。致死量のペントバルビタールを静注し屠殺後、NB値測定側の眼球を摘出し、網膜を切離した。Haleら<sup>17)</sup>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。

## III 結 果

### 実験1：網膜NB値測定の再現性

12眼における測定の再現性指数は5分間隔で $8.2 \pm 1.8\%$ , 24時間間隔で $13.0 \pm 2.0\%$ (平均値±標準誤差)であった。 $V_1$ ,  $V_2$ および $V_3$ の間に有意差はなかった。5分および24時間間隔の測定の再現性指数と解析した画素数との関係を図3に示す。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。

### 実験2：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

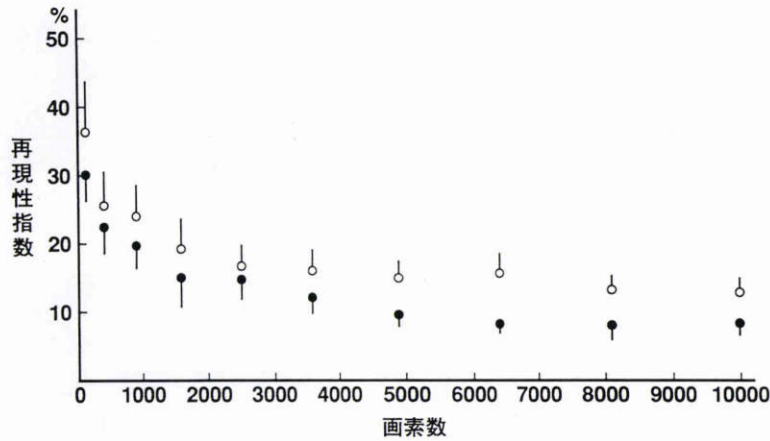


図3 家兎網膜 normalized blur (NB値) 測定の再現性指数と解析した範囲の画素数との関係。黒丸は5分間隔、白丸は24時間間隔の測定の再現性指数の平均値±標準誤差 (n=12) をそれぞれ表す。

表1 実験2中の全身状態のパラメーターの変化

| 眼圧 (mmHg)                 | 10        | 50        | 65        | 80        |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 眼数                        | 12        | 10        | 8         | 10        |
| 大腿動脈平均血圧 (mmHg)           | 97.4±3.2  | 98.2±4.8  | 97.1±6.2  | 96.3±7.1  |
| 脈拍 (拍/分)                  | 296±9     | 297±11    | 298±10    | 297±11    |
| pH*                       | 7.39±0.02 | 7.40±0.02 | 7.40±0.03 | 7.39±0.03 |
| Pco <sub>2</sub> * (mmHg) | 36.7±1.2  | 36.4±3.8  | 34.5±2.5  | 33.4±1.1  |
| Po <sub>2</sub> * (mmHg)  | 82.2±3.9  | 86.5±7.4  | 84.6±5.2  | 85.1±4.4  |
| 直腸温 (°C)                  | 37.8±0.3  | 37.6±0.3  | 37.4±0.7  | 37.1±0.8  |

\* : 大腿動脈血にて測定した。

平均値±標準誤差 (n=12, 10, 8, 10)

および大腿動脈血 pH, Pco<sub>2</sub>, Po<sub>2</sub>, 直腸温の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<sup>18)19)</sup>, 実験中に有意な変化は認められなかった。

網膜 NB 値 (3回の測定の平均値) と microsphere 法による網膜組織血流量測定値の関係を図4に示す。各プロットはそれぞれ眼圧が 10, 50, 65, 80 mmHg の時の、網膜 NB 値および microsphere 法による網膜組織血流量測定値の平均値を示す。網膜 NB 値と microsphere 法による測定値はほぼ直線関係にあり、両者の相関係数は 0.59 (p<0.001) であった。

#### IV 考 按

網膜循環動態の定量的解析法として、蛍光眼底撮影法<sup>1)</sup>, blue field entopic phenomenon 法<sup>2)</sup>, laser Doppler 法<sup>3)~7)</sup>などが臨床的に用いられている。蛍光眼底撮影法<sup>1)</sup>および laser Doppler 法<sup>3)~7)</sup>は網膜大血管を対象として、それぞれ網膜循環時間あるいは網膜大血管血流速度を測定する方法で、網膜末梢循環の定量的解析は行われていない。Blue field entopic phenomenon 法<sup>2)</sup>は測定対象が黄斑部毛細血管に限られ、かつ自覚的応答に頼らざるを得ないという欠点を有し、やはり網膜末梢循環を解析するには十分であるとはいえない。よって、本機は現時点では、網膜末梢循環動態を生体眼で非侵襲的、客観的か

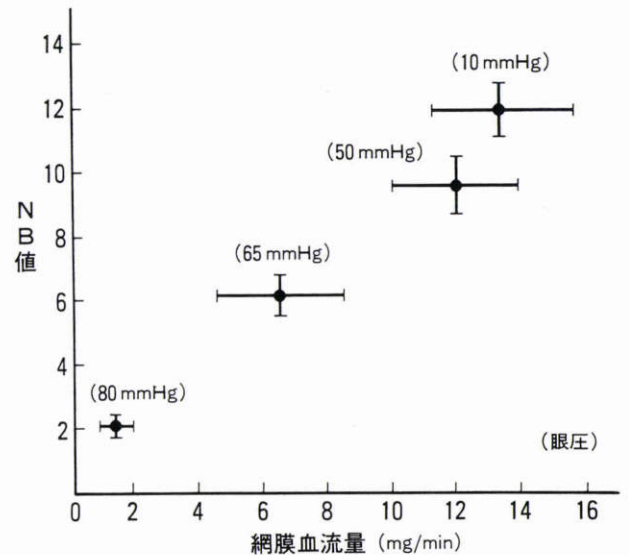


図4 網膜 normalized blur (NB値) と microsphere 法による網膜組織血流量の関係。

各プロットは各眼圧における網膜 NB 値と microsphere 法による網膜組織血流量の平均値±標準誤差 (n=12, 10, 8, 10) を表す。相関係数 r=0.59 (p<0.001, n=40)。

つ定量的に解析し得る唯一の機器であるといえる。

実験1では、本機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以上ではほぼ一定であった。本機による眼底末梢循環の測定面積は、人眼では1.06×1.06 mmに相当し、これは従来のlaser Doppler法による視神経乳頭末梢循環の測定面積（直径約180 μm）<sup>20)~22)</sup>の約44倍に相当する。よって、網膜組織血流量のごく局所的なばらつきは全側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ると考えられる。よって、種々の治療法の網膜循環に及ぼす影響を検討する際、網膜循環の変化を検出する感度を向上させ得ると考えられる。

ここで、本法でのNB値は理論的には組織血流速度の指標である。前報<sup>12)</sup>では実験2と同様の方法で眼灌流圧を変化させた時の網膜NB値の変化が、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伴って網膜NB値が低下し、これはmicrosphere法などによる網膜血流量と眼灌流圧の関係についての過去の報告<sup>23)~26)</sup>とよく一致していたことを示した。これはNB値が組織血流量の定量指標としても使用できることを示唆する。そこで、本研究では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、測定値の関係について検討した。実験2で得られた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<sup>8)9)</sup>されたradioactive microsphere法による家兎網膜組織血流量の値とよく一致していた。眼灌流圧を変化させた時の正常有色家兎の網膜NB値とcolored microsphere法による網膜組織血流量の測定値が良好な直線関係にあったことから、正常動物においては網膜NB値は網膜組織血流量の定量的指標としても使用し得ることが示された。本機は生体眼における網膜末梢循環を非侵襲的かつ定量的に測定可能であり、網膜末梢循環動態の生理学的研究に大きく寄与し得ると考える。しかし、血管閉塞などの循環異常がある場合には、必ずしもNB値と網膜組織血流量に直線関係が成立するとは限らず、今後の検討を要する。

#### 文 献

- 1) Riva CE, Feke GT, Ben-Sira I: Fluorescein dye-dilution technique and retinal circulation. *Am J Physiol* 234: H315—H322, 1978.
- 2) Riva CE, Petrig B: Blue field entopic phenomenon and blood velocity in retinal capillaries. *J Opt Soc Am* 70: 1234—1238, 1980.
- 3) Feke GT, Riva CE: Laser Doppler measurements of blood velocity in human retinal vessels. *J Opt Soc Am* 68: 526—531, 1978.
- 4) Riva CE, Feke GT, Eberli B, Benary V: Bidirectional LDV system for absolute measurement of blood speed in retinal vessels. *Appl Opt* 18: 2301—2306, 1979.
- 5) Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH, O'Keefe K: Fundus camera based retinal LDV. *Appl Opt* 20: 117—120, 1981.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Stjernschantz J, Bill A: Effect of intracranial stimulation of the oculomotor nerve on ocular blood flow in the monkey, cat, and rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 99—103, 1979.
- 9) Sakai Y, Araie M, Takase M, Shirasawa H, Ishii Y: Effects of topical befunolol, a beta-adrenergic blocking agent, on blood flow in the rabbit eye. *Jpn J Ophthalmol* 25: 299—305, 1981.
- 10) Friedmann E, Kopald HH, Smith TR: Retinal and choroidal blood flow determined with krypton-85 in anesthetized animals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 3: 539—547, 1964.
- 11) Sossi N, Anderson DR: Effect of elevated intraocular pressure on blood flow. Occurrence in cat optic nerve head studied with iodoantipyrine I 125. *Arch Ophthalmol* 101: 98—101, 1983.
- 12) 玉置泰裕, 川本英三, 江口秀一郎, 新家 真, 藤居仁: レーザー-speckle現象を利用した網膜末梢循環の生体用二次元解析機の開発. *日眼会誌*(印刷中).
- 13) Fercher AF, Briers JD: Flow visualization by means of single-exposure speckle photography. *Opt Commun* 37: 326—330, 1981.
- 14) Briers JD, Fercher AF: Retinal blood-flow visualization by means of laser speckle photography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 255—259, 1982.
- 15) Tamaki Y, Kawamoto E, Araie M, Eguchi S, Fujii H: An application of laser speckle phenomenon for noninvasive two-dimensional evaluation of microcirculation in ocular fundus. A preliminary report. *Jpn J Ophthalmol* 37: 178—186, 1993.
- 16) Ruskell GL: Blood vessels of the orbit and globe. In: Prince JH (Ed): *The Rabbit in Eye Research*, Springfield, Illinois, 514—553, 1964.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.

- 20) **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.
  - 21) **Rizzo JF III, Fekete 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.
  - 22) **Riva CE, Harino S, Petrig BL, Shonat RD**: Laser Doppler flowmetry in the optic nerve. *Exp Eye Res* 55: 499-506, 1992.
  - 23) **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.
  - 24) **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* 15: 724-731, 1975.
  - 25) **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.
  - 26) **Riva CE, Loebl M**: Autoregulation of blood flow in the capillaries of the human macula. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 568-571, 1977.
-