

蛍光眼底撮影に超高速度高感度カメラを応用した網膜血流解析システム

櫻井 寿也

奈良県立医科大学眼科学教室

要 約

超高速度高感度眼底カメラシステムを試作し、家兎およびサル（サル）の網膜血流の新しい解析方法を開発した。この装置は蛍光眼底カメラ（TRC-50, トプコン社）にリレーレンズを介して超高速度高感度カメラ（エクタプロテインシファイドイメジャー, KODAK 社）と高速度動作記録装置（エクタプロ EM, KODAK 社）を接続した。家兎の網膜血流速度は、血管中を前進する蛍光色素先端部

の2点間の時間差と距離を測定して求めた。サル（サル）の網膜血流速度は、ノイズとなる背景蛍光や血管蛇行などにより、家兎の手法は用いることができず、自己相関関数を利用した解析によって得た。（日眼会誌 99：778—783, 1995）

キーワード：眼底カメラ, 網膜血流, 家兎, サル

An Analyzing System for Fluorescein Angiography of Retinal Blood flow Using a High Speed, High Sensitivity Camera

Toshiya Sakurai

Department of Ophthalmology, Nara Medical University

Abstract

We constructed a speedy and sensitive fundus camera system, and developed a new method to analyze retinal blood flow in rabbits and monkeys. The system is composed of a fluorescein fundus camera (TRC-50X, Topcon), a relay lens, an image intensifier (Ektapro-intensified-imager, Kodak), a digital recorder (Ektapro-EM, Kodak), an S-VHS analogue recorder, a picture analyzer (IMAGenet, Topcon), and a CRT (cathode-ray tube) monitor. The speed of retinal blood flow in rabbits is calcu-

lated by measuring the time and distance between two points of an advancing illuminated fluorescein dye front in a vessel. The speed in monkeys is obtained by analysis using an autocorrelative function, instead of the method used with rabbits, because of background fluorescein noise and vessel tortuosity. (J Jpn Ophthalmol Soc : 778—783, 1995)

Key words: Fundus camera, Retinal blood flow, Rabbit, Monkey

I 緒 言

網膜血流動態の測定は網脈絡膜疾患の病態生理の解明や治療効果の判定、また眼圧疾患と全身疾患との関わり、さらに眼底疾患のスクリーニングなどの多くの情報を提供し、その重要性は眼科領域だけに留まらない。広範囲の網膜血流動態を測定し、それらに資することを目的に本研究を計画した。網膜血流測定法は、現在、蛍光眼底撮影法¹⁾、レーザードップラー法^{2)~4)}、blue field entoptic phenomenon 法⁵⁾、レーザースペックル法⁶⁾⁷⁾、走査レーザー検眼鏡 (scanning laser ophthalmoscope, 以下 SLO) による蛍光眼底撮影法⁸⁾などがある。そのいずれも

が広範囲の網膜血流動態、すなわち、網膜中心動脈の網膜内第一分岐から第二分岐、可能ならば第三分岐の各細動脈の相対血流速度を同時に測定する目的には合致しない。そこで、従来の蛍光眼底撮影法に、これまで産業分野で用いられてきた超高速度高感度カメラ⁹⁾を応用して時間分解能の向上を図るシステムを構築し、有色家兎およびサル眼を用い、新たな網膜血流動態の解析を試みた。

II 実験方法

1. 装 置

本装置全体の系統図を図1に示す。市販の蛍光眼底カメラ (TRC-50 X, トプコン社) (図1 A) の電源を交流か

別刷請求先：636 奈良県橿原市四条町 840 奈良県立医科大学眼科学教室 櫻井 寿也

(平成6年10月24日受付, 平成7年3月14日改訂受理)

Reprint requests to: Toshiya Sakurai, M.D. Department of Ophthalmology, Nara Medical University, 840 Shijocho, Kashihara-shi, Nara-ken 634, Japan

(Received October 24, 1994 and accepted in revised form March 14, 1995)

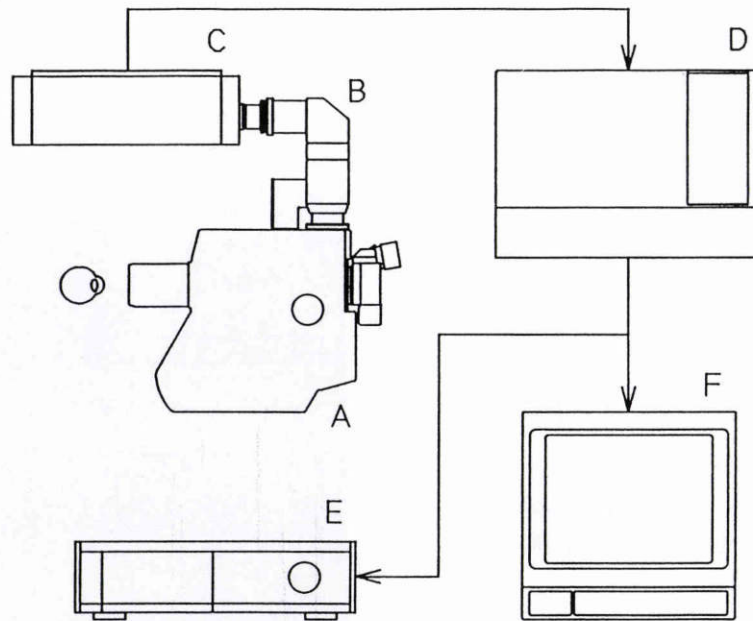


図 1 系統図.

A: 蛍光眼底カメラ, B: リレーレンズ, C: 超高速高感度カメラ, D: 動作記録装置, E: S-VHS ビデオテープレコーダー, F: TV モニター

ら直流に変えた。時間分解能の向上に備えて観察光源の安定性を得ることと、電圧の自由設定を可能にするためである。蛍光眼底カメラの本体部分にリレーレンズ（1 インチ TV カメラ用）（図 1 B）を介して超高速高感度カメラ（エクタプロテインシファイドイメージャー、KODAK 社）（図 1 C）を接続した。撮影した画像は高速動作記録装置（エクタプロ EM, KODAK 社）（図 1 D）にデジタル記録される。同時にアナログ像を記録するために S-VHS ビデオテープレコーダー（図 1 E）を接続した。撮影中の映像は TV モニター（図 1 F）によって監視される。

超高速高感度カメラ（図 1 C, 2 A）は光電子倍增管（イメージンテンシファイア）を内蔵し、通常の TV カメラと比較すると最高 800 倍程度の感度を有する。一方、高速動作記録装置（図 1 D, 2 B）は 2,500 フレーム/秒の取り込みを可能とし、最大記録量は 4,800 フレームである。この両者を組み合わせた性能は、例えば 5 ルックス程度の低照度下でも 1,000 フレーム/秒の録画ができる程度である。今回の実験では、転送速度の問題や画像の管理保存を考慮してアナログ出力を併用した。記録したデータは、画像解析装置（IMAGEnet, トプコン社）を用いて解析した。血流速度は、蛍光色素先端部の画素の座標値の移動距離から求めた。画素の蛍光輝度測定には、それぞれ血管径を考慮して、有色家兎では $3 \times 3 = 9$ 画素、サルでは $4 \times 4 = 16$ 画素の大きさの輝度測定枠を使用した。時間的に輝度値の変化を解析する場合、測定部位各画像における輝度測定枠の各画素の蛍光輝度濃淡度上位 4 画素の平均値をその部の輝度値とした。使用した画像解析装置は縦 512 画素、横 512 画素のもので、

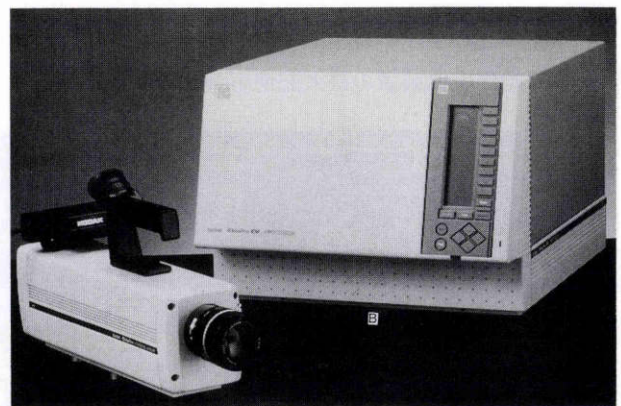


図 2 A: 超高速高感度カメラ, B: 高感度動作記録装置

1 画素あたりの白黒濃淡度の輝度解析は 256 階調である。超高速高感度カメラのシャッタースピードと、眼底の撮影画角は予備実験で均一な結像の範囲が得られ、動物種に最適な設定を用いた。

2. 家兎の実験

成熟有色家兎 2 眼を用い、塩酸ケタミン（ケタラール®）10 mg/kg とキシラジン塩酸塩（セラクター®）1 mg/kg を筋注し、全身麻酔した。蛍光色素は 10% フルオレセインナトリウム（フルオレサイト®）7 mg/kg を使用し、予め確保した耳介静脈に直接蛍光色素の入った注射器を接続し色素を注入する方法を行った。観察光源の電圧は 9.5 V に設定、シャッタースピードは毎秒 250 フレーム、撮影画角は 35 度、撮影時間は蛍光物質が視神経乳頭に出現後 5 秒間記録した。

3. サルの実験

成熟日本ザル3匹3眼を用い、塩酸ケタミン(ケタラル®) 10mg/kgとキシラジン塩酸塩(セラクター®) 1mg/kgを筋注し、全身麻酔した。蛍光色素は10%フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®) 7mg/kgを使用し、予め確保した大腿静脈から有色家兎と同様に色素を注入した。観察光源の電圧は9.5Vに設定、シャッタースピードは毎秒250フレーム、撮影画角は50度、撮影時間は蛍光物質が視神経乳頭に出現後3秒間記録した。蛍光輝度と色素濃度の間には比例関係があるとみなすことができるので¹⁰⁾、上耳側網膜動脈上に測定部位を数か所決定し、蛍光輝度値の時間的変化を測定した。被実験動物の屈折度および眼軸長の測定にはオートレフラクトメーター(ARK 2000, ニデック社)、超音波眼軸長測定装置(US 2000, ニデック社)を使用した。蛍光色素の移動距離および速度の算出には、1画素当たりの絶対的長さは、予め理論的模型眼から得られている校正値から、被実験動物の撮影画角、屈折度、眼軸長を入力して実測値を算出した。

III 結果

1. 装置

高速度動作記録装置の最大記憶容量が4,800フレーム

なので、単位時間の記憶容量と記録時間の積は一定となる。しかし、最大記憶容量を超えて入力したときは、記録がいわゆる上書きされるので、視神経乳頭の蛍光色素出現から単位時間記録容量を考慮しながら撮影時間を設



図3 サル3の蛍光眼底撮影像。

白四角部分は蛍光輝度測定枠を示す(蛍光輝度測定枠の位置を示すのに、実際の測定に使用した4×4=16画素の大きさでは、血管像と重複し判別し難くなるので、6×6=36画素の大きさに示してある)。

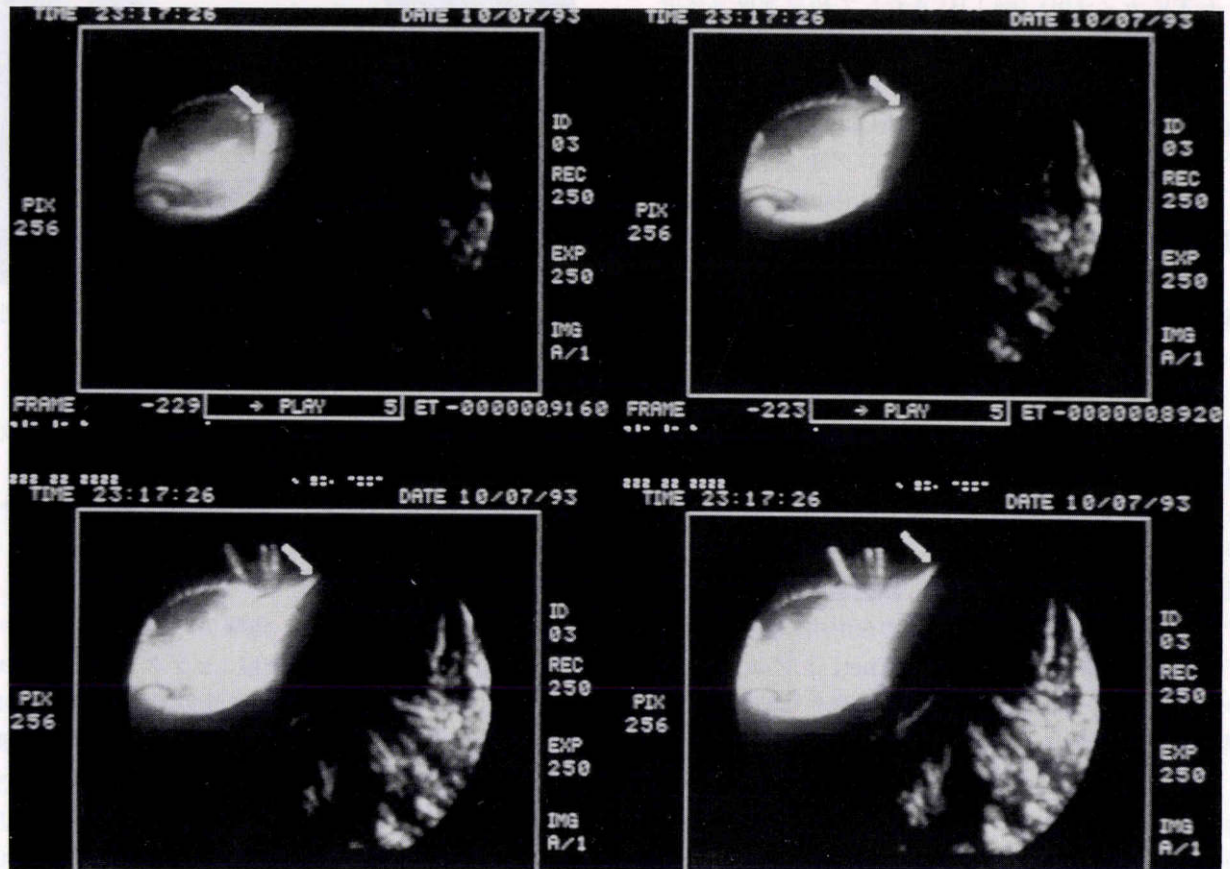


図4 有色家兎蛍光眼底撮影像。

左上から順に横へ進行し、それぞれ0.024秒間隔で蛍光色素の先端部を矢印で示した。図左上の視神経乳頭から、右上に向かって伸びる網膜中心動脈の中を蛍光色素が充滿している様子がわかる。

定するのは比較的容易であった。

2. 家 兎

視神経乳頭に蛍光色素が出現して血管内に蛍光色素の先端が進行する状態を図4に示す。画像は250フレーム毎秒で高速度動作記録装置(エクタブロEM)にデジタル録画した。それを0.024秒間隔で蛍光色素の先端部を矢印で示した(図4)。家兎Aの平均移動距離は3.47画

素/フレーム、家兎Bは3.17画素/フレームであった。家兎Aを0D($f=17.05\text{ mm}$)と仮定すれば、その血流速度は 21.87 mm/sec となる。撮影画角、被験眼屈折値、眼軸長1画素当たりの長さを求め換算すると、平均速度は家兎Aでは 20.7 mm/sec であった。同様に、家兎Bでは 19.9 mm/sec となった(表1)。この平均速度は網膜中心動脈内に蛍光色素が乳頭縁に達してから0.072秒間の測

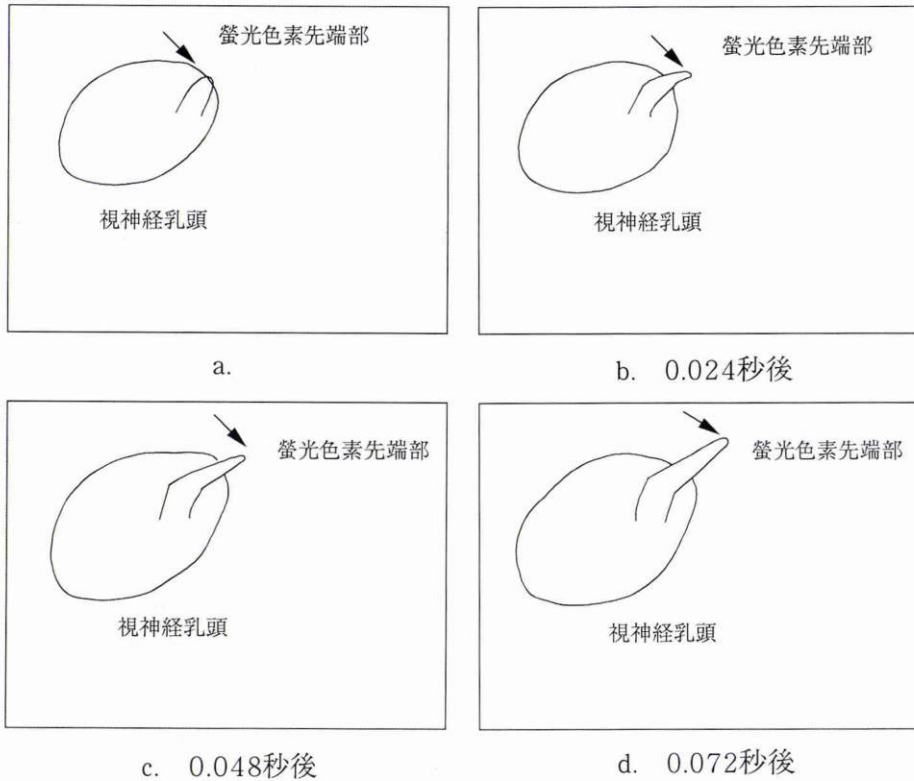


図5 図4の略図.

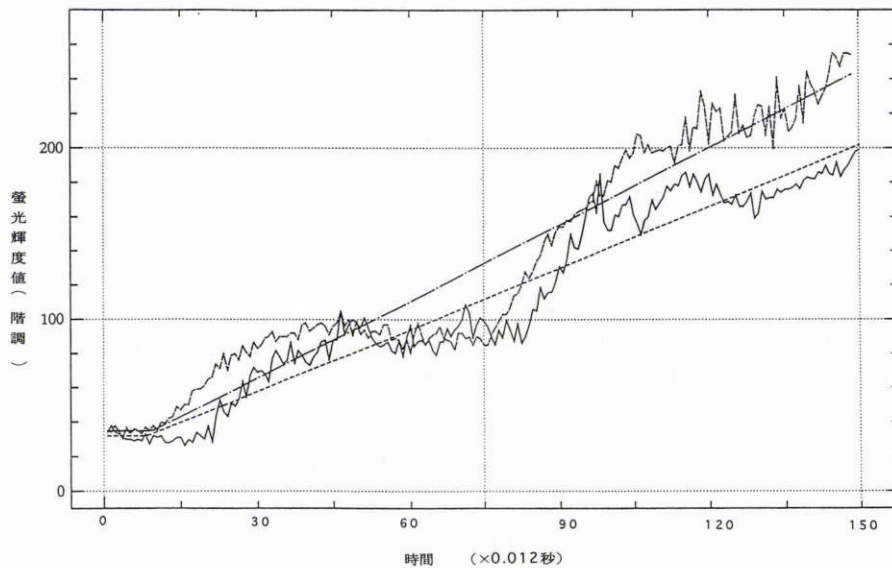


図6 蛍光輝度曲線.

図3の測定部位(1と4)における蛍光輝度の時間的変化と近似直線を示す。

実線：図3中の輝度測定枠4の測定値，破線：上記に最小2乗法を適用した近似直線，長破線：図3中の輝度測定枠1の測定値，実線中点：上記に最小2乗法を適用した近似直線

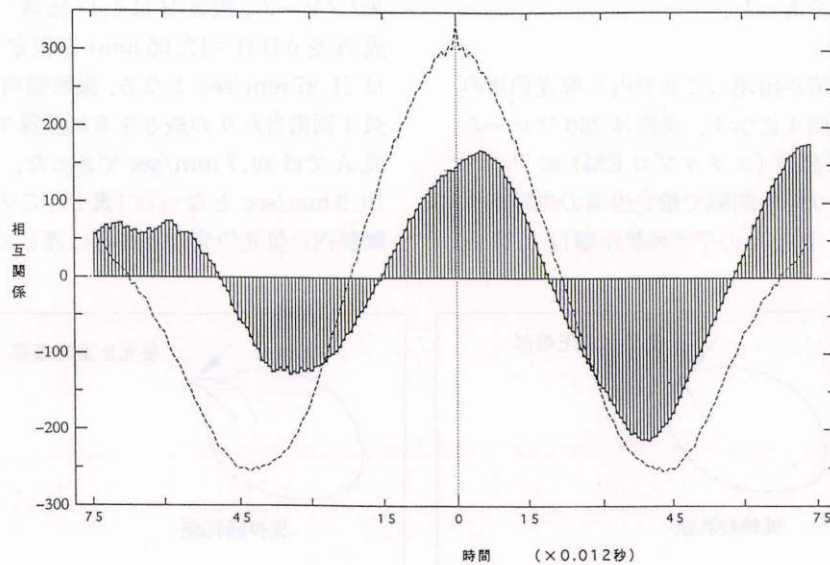


図7 自己相関関数および相互相関関数.

図3の2つの測定部位(1と4)での相互相関関数において時間的ずれが生じている。実線：4-1 相互相関関数，破線：1-1 自己相関関数

表1 解析結果

家兔	平均移動速度 (mm/s)	サル	測定部位	速度(mm/s)
A	20.7	1	a	47.6
			b	45.9
B	19.9	2	a	51.3
			b	43.1
		3	a	45.0
			b	32.9

aは上耳側網膜動脈の第1分岐部まで，
bは第1分岐前から分岐後までを示す。

定である。

3. サル

蛍光輝度測定部位は図3に示すように上耳側網膜動脈の乳頭縁付近と1回分岐前，そして1回分岐後の部位とした。各部位の輝度値の時間的変化を解析した。サル眼では網膜動脈上の各測定部位において，脈波によって変動する蛍光輝度曲線が得られた(図5)。図5の蛍光輝度と測定時間の関係から，近似直線および測定値と近似直線との差の相関関数による解析を行った。近似直線は，最小2乗法を使って決定し，図5のような水平直線および傾きを持った直線の2直線で近似した。測定値 $Y_j(i)$ と近似直線関数の値を $y_j(i)$ ，両者の差を $d_j(i) = Y_j(i) - y_j(i)$ とする。 $d_j(i)$ に関する自己相関関数を作るとピークは時間 $i=0$ の所にあり，山から山，谷から谷が波形の周期となり，また，他の測定部位 n における $d_n(i)$ との相互相関関数を作ると図6のように全体として自己相関関数に比べ遅れがみられ，この遅れがその2点間の距離に関係している。そこで2点間の距離を求めれば，血流速度が算出され表1の結果を得た。距離の算出には有色家

兎同様に撮影画角，被検眼屈折値，眼軸長により補正を行った。表1の測定部位はaが上耳側網膜動脈の分岐前までの範囲，bは分岐前から分岐後までの範囲を示す。つまり図3では，表1のaは1→2，bは2→3または4までの平均速度となる。結果は，それぞれ1回，3秒間の上耳側網膜中心動脈での測定である。1例の解析に約20分を要した。

IV 考 按

網膜血管は，生体内で唯一，非観血的に細動脈の血管性状を観察することが可能な血管であり，網膜血流動態を測定する様々な手法が試みられている。レーザードップラー法は，目的とする血管レーザー光を当て，血流速度の絶対値を測定する方法である。この方法は，計測時間が50~100 msecと短い利点は有するものの，一回の検査で1地点しか測定できない。さらに，60~180 μm の太さの血管に限定され，固視微動の影響も受ける。レーザースペックル法は，非侵襲的で，計測時間が約15秒である。しかし，一回の測定では1地点1.06×1.06 mmの面積に限られ，540フレーム/秒でレーザー光を走査するため，網膜末梢循環に限られ，複数の血管の平均値になり，定性的な評価⁷⁾にならざるを得ない。SLOを用いた蛍光眼底撮影法は，レーザー光を走査するため時間分解能が30フレーム/秒と低く，したがって，静止再現画像の解像度が良くない。比較的流速の遅い黄斑部毛細血管の血流速度測定には利用可能であるが，デジタル処理できないことと相まって我々の目的には適さない。したがって，以上の方法では，我々の目的には適さない。

蛍光眼底撮影法は，網脈絡膜疾患の一般的な検査法として広く普及している。しかし，この方法による従来か

らの血流速度の測定は、時間分解能の低さから蛍光色素の先端部の決定が困難なことであった。そこで、今回蛍光眼底撮影法に超高速度高感度カメラを用いることにより、時間分解能を向上させた。蛍光色素先端部の決定は、高速撮影された画像を、1画素ごとに蛍光輝度の測定を行うことで可能となった。今回の有色家兎の結果からも明らかのように、眼底の2点間の距離を測定算出に用いる場合、屈折度、眼軸長など中間透光体の光学的屈折要素の影響を受ける。

サル眼では、背景蛍光の処理が問題となる。今回の結果には、この背景蛍光が混乱要因(ノイズ)として含まれている可能性がある。蛍光眼底撮影の解析に多く用いられる色素希釈法は、希釈曲線の下降脚に相当する部分を解析することにより、網膜循環が完全な閉鎖回路でないこと、末梢静脈により希釈されることで定量化が困難となる。それを避けるために、今回は蛍光色素の希釈曲線の立ち上がり部分、すなわち、網膜動脈相の解析に限定した。

家兎眼乳頭縁近傍の網膜血管のように背景蛍光が遮断され、血管が比較的直線性を保っている部位では、2点間の蛍光先端の時間差と距離から血流速度の算出は可能である。この場合、光学的屈折要素の測定精度が結果を左右する。サル眼、さらには最終目標である人眼では、背景蛍光、血管の蛇行から家兎眼とは異なる解析方法が要求される。本論文で行った相関関数による解析は一つの方向づけを示すものである。

網膜血流速度の測定は、個々の測定方法の原理の違いにより、測定結果を単純に比較できない。今回の目的には、蛍光眼底撮影法が最も有用と考える。我々の目的とする、同時に広範囲の網膜血流動態の情報を得ることに関しては、速度の瞬間的変動を捕えることによって達成できる目処はついたが、網膜上の複数地点の相対的血流速度そのものはまだ得られなかった。眼底網膜動脈の第一分岐、第二分岐、第三分岐の範囲の相対的血流速度を得ることを目標にさらに改善をはかる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲頂きました西信元嗣教授に深謝いたします。また、御教示頂きました奈良県立医科大

学物理学教室伊藤善将教授、奈良県立医科大学眼科学教室魚里博講師に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第98回日本眼科学会総会で報告した。

文 献

- 1) Dollery CT: Dynamic aspects of the retinal microcirculation. Arch Ophthalmol 79: 536—539, 1968.
- 2) Riva CE, Ross B, Bnedek G: Laser Doppler measurement of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. Invest Ophthalmol 11: 936—944, 1972.
- 3) Feke GT, Goqer DG, Tagawa H, Delori FC: Laser Doppler technique for absolute measurement of blood speed in retinal vessels. IEEE Transactions Biomedical Engineering 34: 673—680, 1987.
- 4) Rive CE, Grunwald JE, Sinclair SH, Petriq BL: Blood velocity and volumetric flow rate in human retinal vessels. Invest Ophthalmol Vis Sic 26: 1124—1132, 1985.
- 5) Riva CE, Petriq BL: Blue field entoptic phenomenon and blood velocity in the retinal capillaries. J Opt Soc Am 70: 1234—1238, 1980.
- 6) 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.
- 7) 玉置泰裕, 川本英三, 新家 真, 江口秀一郎, 藤居仁: レーザースペックル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 98: 47—54, 1994.
- 8) Sebastian W, Oliver A, Horst T, Dipl E, Bernd B, Friedrich J, et al: Retinal capillary blood flow measurement with a scanning laser ophthalmoscope. Ophthalmology 98: 996—1000, 1991.
- 9) 堀越 力, 南谷晴之, 湯澤史佳, 大塩 力, 土屋雅春: 動画像処理によるリンパ流速の自動計測. 電子情報通信学会論文誌 5: 917—925, 1988.
- 10) Riva CE, Feke GT, Ben-Sira I: Fluorescein dye-dilution technique and retinal circulation. Am J Physiol 234: 315—322, 1978.