

原 著

家兎眼毛様体，脈絡膜，網膜血流量測定における 水素クリアランス法の再現性

獨協医科大学越谷病院 眼科

武藤 哲也 松本 行弘 筑田 眞

サトウ眼科クリニック

佐藤 剛

要 旨

目的 水素クリアランス法による眼内組織の血流量の再現性を評価する。

方法 家兎を用いて毛様体，脈絡膜，網膜の血流量を水素クリアランス法により3回繰り返し測定し，再現性の指標である κ 係数 (Intraclass Correlation Coefficient) を求めた。

結果 毛様体の血流量は1回目 167.8 ± 70.0 ml/min/100 g, 2回目 170.5 ± 69.6 , 3回目 171.8 ± 70.2 であり，その κ の平均が0.874であった。脈絡膜の血流量は1回目 212.2 ± 78.8 , 2回目 213.7 ± 79.5 , 3回目 216.4 ± 80.5 であり， κ の平均が0.888であった。網膜の血流量は1回目 165.6 ± 70.1 , 2回目 165.3 ± 68.9 , 3回目 165.5 ± 68.4 であり， κ の平均が0.988であった。

結論 家兎眼の眼内組織の血流量測定において水素クリアランス法は再現性に優れた方法であることが確認された。

Key Words : 水素クリアランス法, 眼内血流量測定, 再現性

緒 言

臨床医学が進歩・発展した現在においても，眼微小循環の解明には実験モデルによる検討が重要である。人眼で測定可能な循環測定法は臨床上非常に重要であるが，血流量を絶対値として捕らえることは不可能で比較的大きな循環動態の解析に留まり，再現性が低いなどの問題点¹⁾もあり，動物モデルでの検討による成果が非常に重要である。なかでも，水素クリアランス法は局所の血流量を測定する方法の1つである。水素ガスは体内において不活で拡散性が高く，吸入により血液に溶解し組織に供給されると低濃度で飽和する。その後，水素ガスの供給を断つと組織中に蓄積された水素ガスが血流によって放出される。その際に減少する組織水素濃度の経時的変化から組織血流量を求めることができる^{2~4)}。1964年に

Auklandら²⁾はイヌに水素ガスを吸入させ，腎皮質，心筋，骨格筋の血流量を測定し，直接測定した静脈血灌流量との比がほぼ1で，両者がほぼ等しいと報告した。それ以来水素クリアランス法はイヌ^{5~7)}，家兎^{3,4,8~11)}，サル^{4,9,12~14)}，ネコ^{15,16)}などの動物実験において多く用いられ，脳⁶⁾，胃⁷⁾，毛様体^{8,13)}，視神経乳頭^{10,11,14)}，脈絡膜^{4,5,8,9,16)}，網膜^{8,12,15,16)}などでも報告されるようになった。

現在まで水素クリアランス法の信頼性については，Auklandら²⁾の報告の他に，直接測定したvenous out flowから換算した脳血流量と水素クリアランス法での測定値に高い相関があった⁶⁾との報告もある。眼科領域における再現性については，サル毛様体血流量測定において変動係数が7.8¹³⁾，サル網膜血流量測定において変動係数が7.9%であり¹²⁾，白色家兎視神経乳頭組織血流量測定における変動係数4.5%¹⁰⁾と比較的高い再現性であることが報告されている。また，Satoら⁸⁾は白色家兎に対する β 遮断薬点眼下での毛様体，脈絡膜，網膜血流量を水素クリアランス法で測定し，再現性の指標である κ 係数 (Intraclass Correlation Coefficient, 以下ICC)^{17,18)}を

平成20年12月4日受付，平成21年4月8日受理
別刷請求先：武藤哲也

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50
獨協医科大学越谷病院

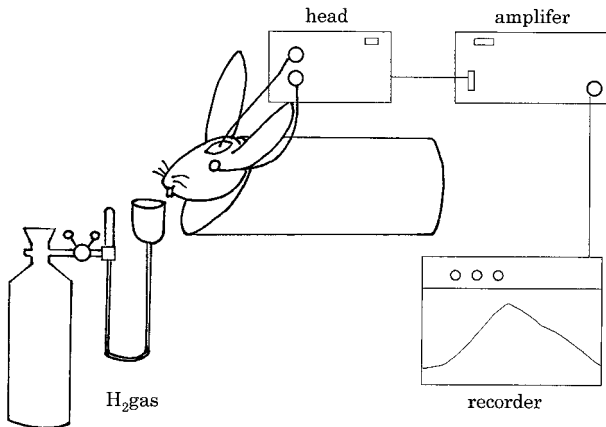


図1 水素クリアランス法による眼組織血流量測定の様式図

用いて検討している。薬剤を点眼しないで、水素クリアランス法で毛様体、脈絡膜、網膜血流量の κ 係数からその再現性を検討した報告は筆者らの知る限り存在しない。

また眼内血流量は灌流圧（平均動脈圧－眼圧）、血管抵抗、 PaO_2 、 PaCO_2 、pH等により影響される可能性が指摘されているため^{5,14)}、同時に血圧、脈拍数、 PaO_2 、 PaCO_2 、pH、眼圧の各パラメーターについても調べる必要がある。

今回我々は、白色家兎に対して水素クリアランス法を用いて、毛様体、脈絡膜、網膜血流量を繰り返し測定した。さらに κ 係数を算出し、その再現性を検討したので報告する。

方 法

実験動物には、重さ2.5～3.5kgの成熟白色家兎を雌雄の別なく使用した。押田式ウサギ固定器（KN-317、夏目製作所）に白色家兎を固定後、耳静脈に24Gエラストー針を挿入し、ウレタン（1.5g/kg）を静注した。塩酸オキシブプロカインで点眼麻酔も行った。

各組織の血流量測定には、頭部皮下に皿状不関電極（UHE-001、ユニークメディカル）を埋没固定し、片眼のみを用いた。角膜輪部から2mmに5-0糸を通糸し、27G針で穿通後、房水がもれないよう素早く27G針状関電極（ユニークメディカル）を毛様体にむけて刺入した。予め通糸してあった5-0糸で関電極を固定した後、毛様体血流量を測定した（ $n=135$ ）。上下眼瞼に牽引糸をかけ、上直筋に制御糸を通し、眼球を下転させ、結膜を輪部切開した。角膜輪部から5mmの部位に剃刀を用い強膜に切開を加え、眼球の接線方向に関電極（UHE100、ユニークメディカル）を脈絡膜中に留置した後、脈絡膜血流量を測定した（ $n=147$ ）。上下眼瞼に牽引糸をかけ、上

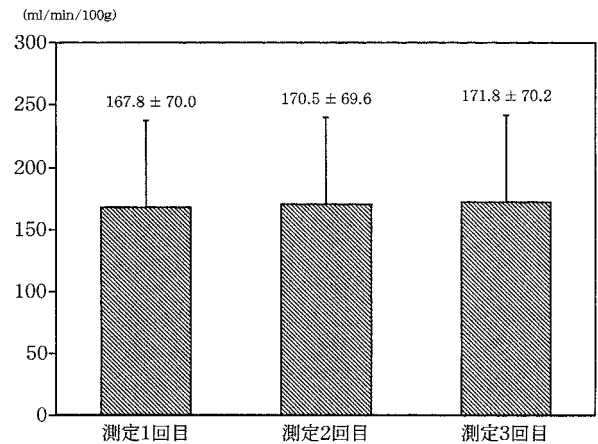


図2 毛様体血流量測定血流量

測定回数により有意な変化はなかった。 $n=135$ 。バーは標準偏差を示す。

直筋に制御糸を通し、眼球を下転させ、結膜を輪部切開した。10時あるいは2時方向の毛様体扁平部上に固定用プラグを設置し、視神経乳頭から約2乳頭径離れた網膜血管を避けた部位で網膜に接するように27G針状関電極を留置した後、網膜血流量を測定した（ $n=144$ ）。

血流量測定装置には、水素クリアランス組織血流量計（UHメーターUPS-400、データユニットDDU-101、ユニークメディカル）を用いた。各組織の血流量は卓上型自動平衡記録計（U-228、日本電子科学）で記録した（図1）。水素ガスを経鼻的に0.5l/min、約30秒間吸入させ、水素クリアランスカーブが頂点に達した時点で各組織の血流量測定を開始した。各組織ごとに、10分間隔で3回繰り返し血流量を測定した。

再現性の検討は、血流量測定について1回目と2回目、1回目と3回目、2回目と3回目の再現性の指標である κ 係数（ICC）を求め、さらにその平均を求めた。 κ 係数は繰り返しのない二元分散分析法を基礎として、次式で計算した^{8,17,18)}。

$$\kappa = (V_s - V_e) / (V_s + V_e + 2V_m)$$

（ V_s ：個体間分散、 V_e ：誤差分散、 V_m ：測定間分散）

眼内血流量は灌流圧（平均動脈圧－眼圧）、血管抵抗、 PaO_2 、 PaCO_2 、pH等により影響される可能性があるため^{5,14)}、血圧、脈拍数、 PaO_2 、 PaCO_2 、pH、眼圧の各パラメーターについて無作為に選択した白色家兎20羽でその変化を調べた。血流量測定と同時に、大腿動脈に24Gエラストー針を留置し、血流量測定前と3回の繰り返し血流量測定後、圧力トランスデューサー（MPU-0.5A、日本光電）とひずみ圧力アンプ（AP-620g型、日本光電）を用いて血圧、脈拍数を測定した（ $n=20$ ）。血圧、脈拍数測定時に動脈血を採取し、ABL300（Radiome-

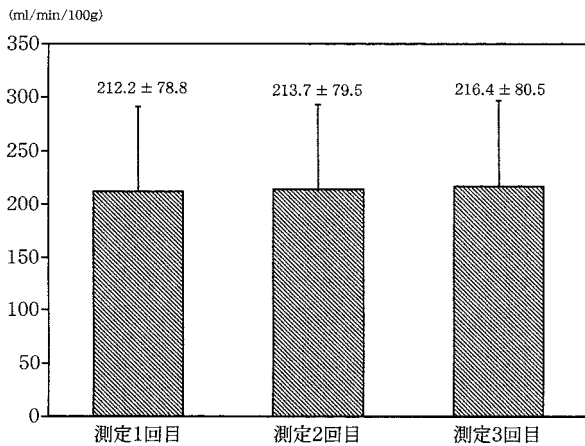


図3 脈絡膜血流量測定

血流量測定回数により有意な変化はなかった. $n=147$.
バーは標準偏差を示す.

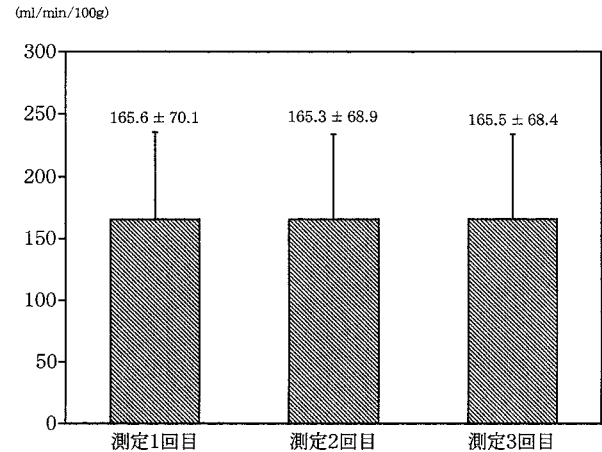


図4 網膜血流量測定

血流量測定回数により有意な変化はなかった. $n=144$.
バーは標準偏差を示す.

表1 各組織のκ係数 (Intraclass Correlation Coefficient)

	毛様体	脈絡膜	網膜
1回目と2回目	0.877	0.956	0.988
1回目と3回目	0.790	0.803	0.989
2回目と3回目	0.955	0.904	0.988
平均	0.874	0.888	0.988

表2 各パラメーターの変化

	血流量測定前	血流量測定後
血圧 (mmHg)	100.4 ± 15.8	98.8 ± 15.1
脈拍数 (/mm)	273.5 ± 65.4	272.2 ± 68.3
PaO ₂ (mmHg)	99.2 ± 31.6	97.5 ± 29.5
PaCO ₂ (mmHg)	31.1 ± 9.2	29.9 ± 8.1
pH	7.33 ± 0.17	7.31 ± 0.18
眼圧 (mmHg)	13.0 ± 3.7	12.5 ± 3.8

平均値 ± 標準偏差

ter社)を用いてPaO₂, PaCO₂, pHを測定した ($n=20$).
血流量測定時にpneumatometer (Model 30 Classic,
Mentor)を用いて血流量測定前と3回の繰り返し血流量
測定後, 眼圧を測定した. 眼圧測定時に関電極の固定に
影響を与えないよう細心の注意を払った ($n=20$).

なお動物愛護の立場から適切な実験計画を立て, 全実
験期間を通じて飼養および保管に配慮した.

結 果

1. 各組織の血流量測定

毛様体血流量は測定1回目 167.8 ± 70.0 (平均値 ± 標準
偏差) ml/min/100 g, 測定2回目 170.5 ± 69.6 ml/min/
100 g, 測定3回目 171.8 ± 70.2 ml/min/100 gであり, 測
定回数による有意な変化はなかった (Scheffe, 図2). 脈
絡膜血流量は測定1回目 212.2 ± 78.8 (平均値 ± 標準偏
差) ml/min/100 g, 測定2回目 213.7 ± 79.5 ml/min/
100 g, 測定3回目 216.4 ± 80.5 ml/min/100 gであり, 測
定回数による有意な変化はなかった (Scheffe, 図3).

網膜血流量は測定1回目 165.6 ± 70.1 (平均値 ± 標準偏
差) ml/min/100 g, 測定2回目 165.3 ± 68.9 ml/min/
100 g, 測定3回目 165.5 ± 68.4 ml/min/100 gであり, 測
定回数による有意な変化はなかった (Scheffe, 図4).

2. 再現性についての検討

毛様体血流量測定について1回目と2回目のκ係数は
0.877, 1回目と3回目のκ係数は0.790, 2回目と3回目
間のκ係数は0.955であり, 各々の平均を求めると0.874
で良好な値であった. 脈絡膜血流量測定について, 同様
に1回目と2回目のκ係数は0.956, 1回目と3回目のκ係
数は0.803, 2回目と3回目間のκ係数は0.904であり
各々の平均を求めると0.888で良好な値であった.

網膜血流量測定について, 同様に1回目と2回目のκ係
数は0.988, 1回目と3回目のκ係数は0.989, 2回目と3回
目間のκ係数は0.988であり各々の平均を求めると0.988
で良好な値であった (表1).

3. 血圧, 脈拍数測定

血流量測定前と3回の繰り返し血流量測定後で血圧,
脈拍数は減少傾向にあったが, 有意差はなかった (対応
のあるt-test, 表2).

4. 動脈血分析

血流量測定前と3回の繰り返し血流量測定後でPaO₂,

PaCO₂, pHは有意差はなかった(対応のあるt-test, 表2).

5. 眼圧測定

血流量測定前と3回の繰り返し血流量測定後で眼圧は減少傾向にあったが, 有意差はなかった(対応のあるt-test, 表2).

6. 関電極の確認

測定終了後, 毛様体血流量測定において全例に対し, 角膜, 虹彩を切開して関電極が毛様体に留置してあるか確認した. 同様に脈絡膜血流量測定において全例に対し, 強膜を切開して関電極が脈絡膜上に留置してあるか確認した. 同様に網膜血流量測定において全例に対し, 倒像鏡で関電極が視神経乳頭から約2乳頭径離れた網膜血管を避けた部位に留置してあるか確認することができた.

考 察

水素クリアランス法は, 動物実験では同一個体において繰り返し測定が可能であり, 複数の電極を使用し同時に多数の個所の局所血流を絶対値として容易に算出できる⁶⁾. 僅かの変化を捉えるのに都合がよく, 電極周囲の極めて狭い範囲の血流を測定できるという特色を持つ⁵⁾. しかしながら, 関電極の刺入や安定などが容易でないこと, 血流測定範囲が厳密には限定できないこと¹²⁾, 水素ガスを用いるため危険なこと, 侵襲的で臨床応用には困難であること³⁾などの問題点も知られている. 動物実験で眼内血流を測定する方法としては, 水素クリアランス法の他にradiolabelled microspheres法¹⁹⁾があるが, 血管内に注入するmicrosphereの数が少ないと正確性に欠け, 95%の信頼性を得るためには最低400以上のmicrosphereが必要であるとされる. 眼科臨床においては, 非侵襲的であるカラードップラー法²⁰⁾, レーザードップラー法^{18,20,21)}, レーザースペックル法^{10,20)}, スキャンニングレーザードップラーフローメトリー法²⁰⁾などが行われている. 近年この分野の測定機器の進歩が目覚ましく, 眼微小循環の解明に多いに貢献してきたのはよく知られているところである. Schmettererらはレーザードップラー法¹⁸⁾により健常人の血流速度を測定し, 短期間での再現性をκ係数により検討している. その結果0.66-0.99と良好な再現性であったと報告している. 杉山らはレーザースペックル法¹⁰⁾により血流速度の指標と考えられているNB値²⁰⁾を求め, 変動係数が7.5%であったと報告している. しかしいずれの方法も血流量を絶対値として表すことができない.

高橋⁹⁾は白色家兎と日本サルに水素クリアランス法を

施行し, 脈絡膜血流量は腎臓のそれとほぼ等しく, 脳の約3~4倍, 肝臓の約2倍であったと報告している. また白色家兎の脈絡膜血流量は197.1 ± 49.3 ml/min/100 gであり⁹⁾, 我々の結果とほぼ等しい. 岩澤ら¹⁶⁾は幼若ネコに対して電気分解による水素クリアランス法を行い, 脈絡膜血流量は網膜血流量より約30%多かったとしている. 今回の我々の結果においても脈絡膜血流量は毛様体の約1.23倍, 網膜の約1.23倍で, 岩澤らの報告¹⁶⁾とほぼ同じ傾向にあった.

血圧, 脈拍数, PaO₂, PaCO₂, pH, 眼圧の各パラメーターについて無作為に選択した白色家兎20羽では, 血流量測定前と3回の繰り返し測定後で各パラメーターに有意な差はなかった. 残りの白色家兎も同様に, これらのパラメーターが及ぼす血流量に対する影響は少ないと考えた.

ICCは連続値をとる評価の信頼性の指標として用いられるもので, 真値の分散と測定値の分散の比で定義される. 被験者間の差による分散が方法間の差による分散より大であるとき, κ係数は最大値1に近付き, 再現性が高いといえるが, 誤差が大きくなるにつれて最小値0に近い値をとる. 統計学的に有意であるのは0.75を超えた場合と考えられている¹⁷⁾. 我々の結果のκ係数の平均は, 毛様体で0.874, 脈絡膜で0.888, 網膜で0.988であり, 再現性は極めて良好であったといえる. 望ましい統計法とは傾向や相関などのバイアスのあるものではなく, 合致性を指し示さなければならない. 合致性を正しく測定する適切な方法とは適合性の指標であり¹⁷⁾, ICCはふさわしいと考えられる. かつての統計の主流であった χ^2 適合検定, 積率相関係数, ユールの連関係数などよりも適切で信頼性がある¹⁸⁾.

今後, 侵襲的で臨床に応用できない水素クリアランス法と非侵襲的であるカラードップラー法²⁰⁾, レーザードップラー法^{18,20,21)}, レーザースペックル法^{10,20)}, スキャンニングレーザードップラーフローメトリー法²⁰⁾などの関係が追試され, 近い将来, 正常眼圧緑内障, 糖尿病網膜症などを主とした微小循環が関与すると考えられる疾患のさらなる病態解明に役立つことを期待したい.

結 論

薬剤を点眼しない下での毛様体, 脈絡膜, 網膜血流量測定において, 水素クリアランス法は再現性に優れることが確認された.

文 献

- 1) 上野聰樹: 緑内障と眼循環. *Frontiers in Glaucoma*, 2: 116-120, 2001.

- 2) Aukland K, Bower BF, Berliner RW : Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ Res* **14** : 164-187, 1964.
- 3) 酒井亮一, 杉山哲也 : 水素クリアランス法. *NEW MOOK 眼科* **7** : 38-42, 2004.
- 4) 高橋節夫 : 脈絡膜組織血流量に関する研究-第1報 正常眼について. *眼紀* **32** : 510-519, 1981.
- 5) Dao-Yi Yu, Valerie AA, Stephen Jc, et al : Choroidal blood flow measured in the dog eye in vivo and in vitro by local hydrogen clearance polarography : validation of a technique and response to raised intraocular pressure. *Exp Eye Res* **46** : 289-303, 1988.
- 6) 田村 晃, 浅野孝雄, 卓 充佑, 他 : 水素クリアランス法による脳局所血流量の測定—方法および Venous Out Flow法との相関—. *脳神経* **30** : 47-54, 1978.
- 7) 宮本二郎, 福富久之, 島倉秀也, 他 : 電解式組織血流計による胃血流動態の検討. *Gastroenterological Endoscopy* **25** : 1658-1665, 1983.
- 8) Sato T, Muto T, Ishibashi Y, et al : Short-term effect of β -adrenoreceptor blocking agents on ocular blood flow. *Current Eye Research* **23** : 298-306, 2001.
- 9) 高橋節夫 : 脈絡膜組織血流量に関する研究—第2報 他の臓器との比較. *日眼会誌* **85** : 1426-1431, 1981.
- 10) 杉山哲也, 戸田恵美, 小嶋祥太, 他 : レーザースペックル眼底循環解析装置を用いた視神経乳頭循環測定の水素クリアランス法による評価. *日眼会誌* **100** : 443-447, 1996.
- 11) Okuno T, Oku H, Sugiyama T, et al : Evidence that nitric oxide is involved in autoregulation in optic nerve head of rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* : 784-789, 2002.
- 12) 木村保孝, 新田安紀芳, 清水 良, 他 : 網膜血流量の新しい測定法. *日眼会誌* **92** : 1489-1496, 1988.
- 13) 新田安紀芳, 高山秀男, 木村保孝, 他 : サル眼毛様体血流量の研究. *日眼会誌* **87** : 267-277, 1983.
- 14) Kimura Y, Nitta A, Takayama H, et al : The effect of raised intraocular pressures on blood flow in the optic nerve head in monkeys. *Chibert Int. J. Ophthalmol* **5** : 24-31, 1987.
- 15) 湯口幹典, 馬嶋昭生, 岩澤 暁, 他 : 実験的酸素誘導網膜症と網膜血流量 (I). *眼紀* **41** : 1233-1236, 1990.
- 16) 岩澤 暁, 湯口幹典, 馬嶋昭生 : 実験的酸素誘導網膜症と網膜血流量 (II)—幼若動物における脈絡膜血流量—. *眼紀* **42** : 1441-1444, 1991.
- 17) Kramer MS, Feinstein AR : Clinical biostatistics LIV. The biostatistics of concordance. *Clin Pharmacol Ther* **29** : 111-123, 1981.
- 18) Schmetterer L, Strenn K, Findl O, et al : Effects of antiglaucoma drugs on ocular hemodynamics in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology Therapeutics* : 583-595, 1997.
- 19) Hales JRS : Radiolabelled microspheres techniques for studies of the circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* : 31-46, 1974.
- 20) 宇治幸隆 : 5. 視神経乳頭の微小循環. *月刊眼科診療プラクティス Vol.1No.5 正常眼圧緑内障をどう診るか*. 文光堂, 東京 : 54-57, 1998.
- 21) 吉田晃敏, 小笠原博宣, 藤尾直樹, 他 : V. 眼循環 2. レーザードップラー 血流計. *眼科* **39** : 1255-1262, 1997.

Reproducibility of Intraocular Blood Flow Measurement in Rabbit Eyes Using Hydrogen Clearance Method

Tetsuya Mutoh¹⁾, Tsuyoshi Satoh²⁾, Yukihiro Matsumoto¹⁾, and Makoto Chikuda¹⁾

¹⁾ *Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital*, ²⁾ *Sato Eye Clinic*

We measured ciliary body, choroidal and retinal blood flow (CiBF,CBF,RBF) using hydrogen clearance method in albino rabbits in repeated measurement for three times. We considered κ (Intraclass Correlation Coefficient) which was an index for reproducibility of the ocular blood flow measurement.

CiBF was 167.8 ± 70.0 ml/min/100 g at first, 170.5 ± 69.6 at second, 171.8 ± 70.2 at third and the average of κ was 0.874. CBF was 212.2 ± 78.8 at first, 213.7 ± 79.5 at second,

216.4 ± 80.5 at third and the average of κ was 0.888. RBF was 165.6 ± 70.1 at first, 165.3 ± 68.9 at second, 165.5 ± 68.4 at third and the average of κ was 0.988.

This results confirmed that the hydrogen clearance method had a high reproducibility and an excellent method.

Key Words : hydrogen clearance method, ocular blood flow, reproducibility