

角膜内皮細胞形態のパラメーター (図5, 表4)

大原 國俊・水流 忠彦・伊野田 繁 (自治医科大学眼科)

Morphometric Parameters of the Corneal Endothelial Cells

Kunitoshi Ohara, Tadahiko Tsuru and Shigeru Inoda

Department of Ophthalmology, Jichi Medical School

要 約

正常内皮と考えられる10歳から86歳までの238例238眼を対象に角膜内皮スペキュラーマイクロスコープを行ない、平均細胞面積と標準偏差 (μm^2)、変動係数 ($\text{CV}=\text{S.D.}/\text{mean}$)、細胞密度 (細胞数/ $\text{mm}^2=1,000^2/\text{平均細胞面積}$)、六角形細胞出現頻度 (%) を測定した。平均細胞面積は最小値226から最大値539までに分布し、10歳代の平均296から80歳代の367まで漸増する。変動係数は、10歳代の平均0.26から80歳代の0.40まで漸増し、細胞密度は、10歳代の平均3,410から80歳代の2,777まで低下する。六角形細胞の頻度は、10歳代の平均67%から80歳代の55%を示した。本結果を正常内皮の細胞形態のパラメーターとして使用できると考えられた。(日眼91:1073-1078, 1987)

キーワード：スペキュラーマイクロスコープ、角膜内皮細胞、ディジタイザー、形態学的パラメーター、分布

Abstract

We computed the mean cell area (μm^2) with S.D., coefficient of variation (CV; $\text{S.D.}/\text{mean}$), cell density ($1,000^2/\text{mean cell area}$), and percentage of hexagonal cells of the human corneal endothelium using a digitizer system in specular microscopy of 238 human eyes which had no abnormalities other than refractive error and senile cataract (age ranged from 10 to 86 years). The mean cell area ranged from 226 to $539\mu\text{m}^2$, and averages of the parameters in every decade from the second to the ninth decade were as follows: mean cell area increased from 296 to $367\mu\text{m}^2$, mean CV increased from 0.26 to 0.40, cell density decreased from 3,410 to 2,777, and the percentage of hexagonal cells varied from 67% in the second decade to 55% in the ninth. The present parameters can be used as standards for normal endothelium in clinical specular microscopy in Japanese populations. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 1073-1078, 1987)

Key words: Specular microscopy, Corneal endothelial cells, Digitizer, Morphometric parameters, and Distribution

緒 言

角膜内皮のスペキュラーマイクロスコープでは、平均細胞面積や細胞密度などの細胞形態の定量的パラメーターを指標として細胞形態異常の有無を推定することができる。このためには、正常内皮細胞形態のパ

ラメーターが基準となるが、加齢による形態変化が知られており^{1)~6)}、人種差があるとの報告もあるので⁷⁾、広い年齢層にわたる本邦正常人のデータが必要となる。現在までに報告されている内皮細胞平均面積や細胞密度などの数値には各施設間で大きな差があるため、いずれの数値を基準値とすべきか不明である。

別刷請求先：329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 自治医科大学眼科学教室 大原 國俊
Reprint requests to: Kunitoshi Ohara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Jichi Medical School
3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi-ken, 329-04, Japan
(昭和62年6月2日受付) (Accepted June 2, 1987)

表1 既報の角膜内皮平均細胞面積(μm²)

年代	Matsuda*		神島**		Ikeda***	
	mean	S.D. (n)	mean	S.D. (n)	mean	S.D. (n)
10	253	14 (9)				
20	258	18 (11)				
30	272	8 (6)				
40	269	28 (11)				
50	294	43 (13)	268	16 (4)	357	48 (10)
60	305	32 (8)	279	50 (7)	347	48 (29)
70	306	30 [△] (15)	253	26 (6)	338	44 (45)
80					349	41 (7)

*, **, ***は参考文献の7), 8), 9)を示す。
[△]は70歳以上。

Sawa と Tanishima は正常内皮と考えられる13歳から88歳までの53例53眼についてその平均細胞面積(μm²)を303±63と報告した⁵⁾。神島, 澤らのデータによれば, 60歳代の老人性白内障術前7例の平均細胞面積は279±50であり⁸⁾, Matsuda らは同一年代の正常者8眼について305±32と報告しているが⁷⁾, Ikeda らの老人性白内障術前45例では345±46となり⁹⁾, 60歳代の平均細胞面積には最大約24%の差がある(表1)。スペキュラーマイクロスコープは, Werner 症候群などの比較的稀な症例を対象として, その年齢を考慮しながら内皮細胞形態の異常を判断することが必要となってきた¹⁰⁾。我々は, 広い年齢分布からなる多数例を対象として, 現時点では最も誤差が少ないと考えられるデジタルマイクログラフを用いた定量方法により, 本邦正常人の角膜内皮細胞形態の定量的パラメーターを算出した。

対象と方法

対象は, 屈折異常単独例と両眼性の老人性白内障症例の右眼, 片側性の外傷や角膜疾患及び白内障の健常他眼で, 238例238眼である。男女比は1:1で, 年齢は10歳から86歳である(表2)。屈折異常単独例では円錐角膜やコンタクトレンズ装用者は除外し, その自覚的屈折度は球面で-11.0D から+5.75D までである。白内障症例は全例術前症例で糖尿病症例は除外し, 他の眼疾患のないものとした。

表2 症例の年齢分布。眼数は症例数と同数

歳代	10	20	30	40	50	60	70	80
眼数	28	22	21	20	27	55	50	15

各症例につき, 角膜中央部の内皮細胞像をスペキュラーマイクロスコープ(甲南カメラ研究所)で撮影した。厚さ1mmのガラス板裏面(甲南カメラ研究所)に刻まれた0.1mm単位の倍率計算用スケールを撮影し, そのプリント上の拡大率を基準に, 細胞像を印画紙上で520から530倍に拡大した。多角形をなす各細胞の頂点を直径0.1mmのマーカープンで同定した後, 200個の細胞につきデジタルマイクログラフ(LOGITEC, K-510mk2)で細胞頂点を入力し, パーソナルコンピュータ(NEC9801F)を用いて伊野田らのプログラムにより細胞形態のパラメーターを計算した¹¹⁾¹²⁾。平均細胞面積と標準偏差(μm²), 変動係数(CV=S.D./mean), 細胞密度(細胞数/mm²=1,000²/平均細胞面積), 六角形細胞出現頻度(%)につき, 10歳毎に各年代の平均値を算出した。

結果

各症例の平均細胞面積(μm²)は, 最小値226(21歳男)から最大値539(77歳男)までに分布した(図1)。各パラメーターの各年代ごとの平均値については, 平均細胞面積は10歳代の296から80歳代の367まで漸増する(図2)。平均CVは, 10歳代の0.26から80歳代の0.40まで漸増し, 最小0.20(22歳女), 最大0.57(84歳男)

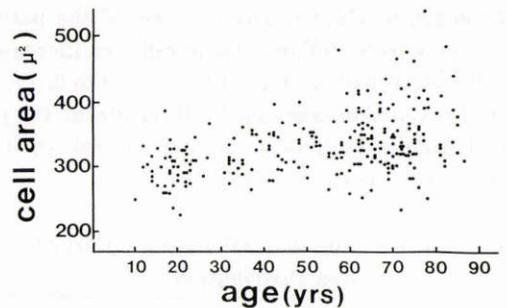


図1 角膜内皮平均細胞面積と年齢

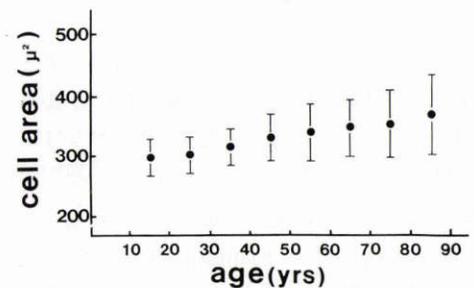


図2 年代別の平均細胞面積(mean±S.D.)

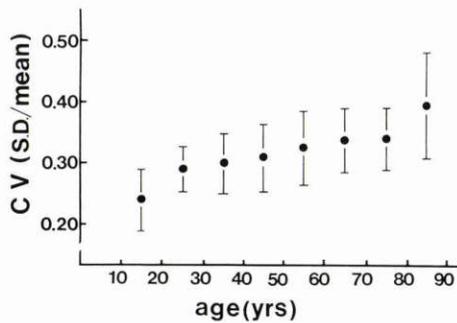


図3 年代別の変動係数 (mean±S.D.)

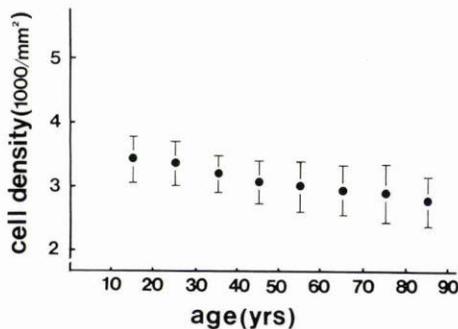


図4 年代別の細胞密度 (mean±S.D.)

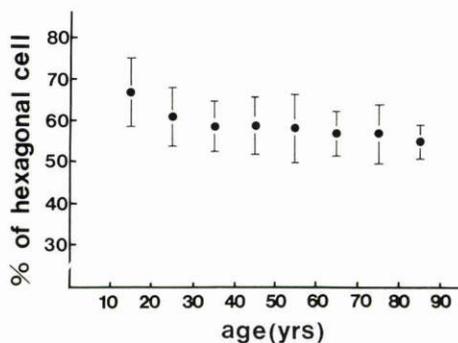


図5 年代別の6角形細胞頻度 (mean±S.D.)

表3 年代別の平均細胞面積と細胞密度

年代	平均細胞面積 (μm ²)		細胞密度 (No./mm ²)	
	mean	S.D.	mean	S.D.
10	296	30	3410	358
20	301	29	3350	333
30	314	27	3202	268
40	328	36	3081	335
50	336	42	3012	343
60	345	46	2950	385
70	352	55	2907	438
80	367	52	2777	367

表4 年代別の変動係数と6角形細胞頻度

年代	変動係数 (CV)		6角形細胞(%)	
	mean	S.D.	mean	S.D.
10	0.26	0.05	67	8
20	0.29	0.04	61	7
30	0.30	0.05	59	6
40	0.31	0.05	59	7
50	0.33	0.06	58	7
60	0.34	0.05	57	5
70	0.34	0.05	57	7
80	0.40	0.08	55	4

までの値をとる(図3). 平均細胞密度(細胞数/mm²)は, 10歳代の3,410から80歳代の2,777まで低下し, 最大4,424から最小1,855までの値を示した(図4). 6角形細胞の平均頻度(%)は, 10歳代の67から80歳代の55であり, 最大は79(12歳女)で最小は43(72歳女)であった(図5). 各パラメーターの年代別平均値とその標準偏差を表3と4に示す. 平均細胞面積と細胞密度と年齢の相関は直線回帰を思わせるが, CVと6角形細胞頻度は各々10歳代と80歳代, 10歳代で変動が大きいと考えたため, 回帰直線は計算していない.

考 按

スペキュラーマイクロスコープで得られる角膜内皮細胞形態パラメーターの正常値を得るためには, 症例と例数や年齢分布がその精度を規定する要因となり, 方法では, 撮影方法や拡大倍率と定量方法が問題となる. 本研究では, 屈折異常眼を含め, 他の報告と同様に老人性白内障例を正常角膜を持つものとみなして対象とした. 正常値を得るためには, 眼科的異常の全くない正常眼を対象とするのが原則であるが, 各年代について多数例を集めることは極めて困難である. 石田らは, -10Dから-30Dまでの強度近視眼では正常者との間に細胞面積に差がないと報告しており¹³⁾, 本報症例の屈折異常度は内皮細胞形態に影響を与えていないと考えられる. 角膜内皮細胞は加齢変化を示すことが知られているので^{1)~6)}, 対象年齢は10歳から86歳までとし, 各年代で最少15例15眼, 最大55例55眼を対象とした. 撮影は, 広視野スペキュラーマイクロスコープを用いた接触法で行なっているので撮影が容易で, 非接触法に生じる可能性がある涙液層によるアーチファクトを除外することができる. 細胞形態の定量化は細胞像の拡大写真とディジタイザーを用いた画像処理装置により行なった. 細胞形態を定量化する方法に

は、ディジタイザーにより個々の細胞頂点から細胞形態を定量化するディジタイザー法の他に、一定面積内の細胞個数を数えて平均細胞面積や細胞密度を計算する fixed frame 法、一群の細胞につきその総面積と細胞個数から細胞面積を算出する variable frame 法、トレースした細胞輪郭画像を特定のプログラムをもつ画像処理装置に取り込ませるイメージアナライザー法などがある¹⁴⁾。fixed frame 法は、一定面積の境界上にある細胞が誤差の要因となり精度が充分ではない。variable frame 法は、細胞群の総面積をディジタイザーなどで正確に測定できればよいが、CV や 6 角形細胞頻度などのパラメーターが得られない。イメージアナライザー法では、TV カメラから細胞輪郭をトレースした細胞像を取り込ませる段階で、二値化設定の変動や拡大率の変動により画像上での細胞面積に対する細胞輪郭部分面積の比率が変動する。したがって、取り込まれた画像上の細胞が小さい場合には細胞面積は小さく、大きい場合には真の値に近く計算されるため測定誤差が細胞の大きさによって異なる可能性が強い。またその演算過程では、取り込んだ画像上の細胞輪郭部分の面積を補正するために全ての細胞を正 6 角形と仮定して計算することがある³⁾⁵⁾⁸⁾。正常内皮での 6 角形細胞の頻度は本結果が示すごとく各年代で平均 55 から 67% しかなく、Matsuda らも最大平均 74% と報告しており⁷⁾、また、正多角形は全細胞の 20% 以下であるので¹⁵⁾、正 6 角形は實際上極めて少なく、同解析法で得られる数値の絶対値としての精度は疑問である。本法で用いたディジタイザー法は、面積演算上で線分としての細胞輪郭は除外され、多角形をなす個々の細胞面積を実測値として計算することができる¹⁶⁾。

ディジタイザー法での誤差の主な要因は、細胞の印画紙上の拡大倍率の誤差と、ディジタイザー盤面の解像力、及び、入力作業中の細胞頂点の入力ミスによるものである。本法の内皮細胞像の最終拡大倍率は、スペキュラーマイクروسコープで撮影した倍率計算用のスケールの印画紙上からの拡大率から計算した。0.1 mm 単位のスケールは、対物マイクロメーターとの比較で 1% 以内の誤差範囲であることが確認されている。内皮細胞は対物レンズから角膜を通して約 0.5 mm の位置で撮影されるのに対し、スケールは 1 mm のガラスを通して撮影されるので、両者は同一の光学条件で撮影されたものではない。しかしながら、これらの屈折率と厚さの差は倍率計算上は最大約 1.5% であり、倍率計算上では大きな誤差を生じない¹⁷⁾。ディジタイザー

は盤面で 0.1 mm の解像度があり、520 倍の拡大倍率では盤面上の 52 mm が内皮面上の 0.1 mm に相当するので解像力は問題とならない。入力ミスについては、盤面上の同一細胞を 5 回繰り返し入力する方法で細胞面積の変動を測定したが、細胞 1 個 (細胞面積 300 μm^2) の変動は最大 4% 以内で、細胞数 200 の入力による 5 回の平均細胞面積の変動は 3% 以内であり、いずれも誤差要因としては小さい (大原國俊ら、未発表データ)。したがって、本法で求めた細胞面積に関する各パラメーターの信頼性は他の報告に比して高いものと考えられる。

本研究で得られた結果は、絶対値を除いては従来の報告とほぼ一致している。平均細胞面積には大きな個体差があることは従来より知られており、本邦でも細胞面積 (μm^2) は 226 から 539 までの広い範囲に分布した。細胞面積は加齢により拡大すると同時に、CV で表される大きさのバラツキも同様の拡大傾向を示すことが報告されているが¹⁾⁶⁾、著者らの結果も同様の値を示した。6 角形細胞の頻度は各年代で Matsuda らの報告より低い値を示す⁷⁾。多角形細胞の 2 次元配列においては正 6 角形の配列が最も力学的な安定性を示すとされており⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、加齢による細胞脱落と残存内皮の拡大に伴って 6 角形細胞の頻度は低下するものと思われるが⁷⁾、本報の結果では、10 歳代から 20 歳代の間に低下傾向があるものの、以後、漸減傾向はわずかと考えられた。0 歳児に内皮細胞の加齢現象がなく、細胞の全てが 6 角形を示すと仮定するならば、6 角形細胞頻度の加齢による減少は直線的ではなく指数関数的な減少を示すことも考えられるので、この年齢変化については今後の検討が必要であろう。

正常内皮細胞形態パラメーターとして、本報の結果と比較すべき数値は、ディジタイザーにより本邦と米国の正常人の内皮細胞を比較した Matsuda らの報告と、同じく老人性白内障患者を対象とした Ikeda らの数値と考えられる⁷⁾⁹⁾。平均細胞面積について前者は、本邦正常人の 50 歳代平均が 294 ± 43 ($n=13$) で、60 歳代では 305 ± 32 ($n=8$) と報告し、後者のデータからは、各々、 357 ± 48 ($n=10$) と 347 ± 48 ($n=29$) と計算される (表 1)。著者らの値は Matsuda の数値と比較して約 20% 大きく、Ikeda らの数値とよく一致する。前者では、その対象を正常人と報告しており、老人性白内障を含んだ我々の対象と異なることから、老人性白内障の角膜内皮が同年齢の正常人に比べて大きい可能性がある。しかしながら、現在まで、同疾患で内皮

障害が生じるとする確実な報告はなく、また、結果に示したごとく、本報の若年者を含んだ細胞面積の分布は2相性ではなく直線回帰と考えられるのでその可能性は低い。また、同一の解析法によるSawaとTanishimaの正常人症例と神鳥、澤らの老人性白内障術前例の両者の間に差はないと考えられたことから⁷⁾⁸⁾、内皮細胞面積は老人性白内障による影響はないと考えざるを得ない。定量法は、Sawaらはイメージアナライザー法で、Matsudaら、大原らはともにディジタイザー法であり、Matsudaらのソフトウェアは本報で用いた著者らの発表したものに酷似している⁷⁾¹¹⁾¹²⁾²⁰⁾。Matsudaらが本邦正常人の撮影に用いたスペキュラーマイクروسコープの機種が報告されておらず、その詳細は明らかでないが、著者らの結果との相違は機種によるものか、あるいは、その機種の拡大倍率の誤差によるものである可能性が残されている。澤は、イメージアナライザー法により細胞面積(μm^2)が290~300である25歳と65歳の正常者を示し、正常角膜内皮細胞の代表値としているが、その値は著者らの示した平均値±標準偏差以内ではあるが平均値としては低いと考えられる²¹⁾。内皮細胞面積は、組織標本でも測定することができる²²⁾、スペキュラーマイクروسコピーで得られる細胞面積の値と組織標本での測定値とを直接に比較することはできない。矢野と谷島は、家兎角膜内皮細胞面積についてスペキュラーマイクروسコピーと組織標本を用いて比較し、両者間の差は走査電顕標本で平均52%あり、銀染色標本では16%あると報告している²³⁾。六角形細胞の頻度は、著者らの数値が低い⁷⁾。多角形をなす細胞の隣接する2点の頂点が近接している場合には、低倍率の拡大では2点を1点として入力する入力ミスが生じやすい。しかしながら、両者の拡大倍率はいずれも400倍以上であり、この原因については今後さらに検討する予定である。

内皮細胞形態の各パラメーターは個体差が大きく、年齢により変化する。しかしながら、同一条件の個体では各数値は正規分布をとると考えられるので、各個体の数値は各年代ごとでその平均値±2標準偏差以内に95.45%の確率で含まれる。したがって、上記の範囲を正常値と考えれば、単一例でもその内皮細胞形態異常の有無を判断することが可能である。今回の結果は、本報と同一方法で内皮形態を定量化する場合の正常値を示す基準値として使用できると考えられた。

鈴木恵美子、片庭史子、伊澤有美、川田正美各氏の研究補助に感謝する。本論文は第91回日本眼科学会総会で発表し

た。清水昊幸教授のご校閲に深謝する。

文 献

- 1) Laing RA, Sandstrom MM, Berrosapi AR, Leibowitz HM: Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res* 2: 587—594, 1976.
- 2) Blackwell WL, Gravenstein N, Kaufman HE: Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. *Am J Ophthalmol* 84: 473—476, 1977.
- 3) Sato T: Studies on the endothelium of the corneal graft. *Jpn J Ophthalmol* 22: 114—126, 1978.
- 4) 馬嶋慶直, 野川秀利, 湯浅英治: Specular microscopeによる角膜内皮細胞の考察—経年変化ならびに白内障術後変化について—, *日眼* 83: 936—946, 1979.
- 5) Sawa M, Tanishima T: The morphometry of the human corneal endothelium and follow-up of postoperative changes. *Jpn J Ophthalmol* 23: 337—350, 1979.
- 6) 松田 司, 大迫一人, 須田秩史, 真鍋礼三: 全層角膜移植における角膜内皮細胞の経時変化について。第1報。健康角膜内皮細胞分布について。 *眼紀* 32: 569—572, 1981.
- 7) Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF: Comparison of the corneal endothelium in an American and a Japanese population. *Arch Ophthalmol* 103: 68—70, 1985.
- 8) 神鳥高世, 澤 充, 谷島輝雄: 白内障術後の部位別角膜内皮細胞の変化。 *日眼* 87: 363—369, 1983.
- 9) Ikeda S, Fukao R, Sagawa Y, Nagata M: Analysis of specular photomicrograph with graphpen digitizer II Long-term results in cataract surgery. *Jpn J Ophthalmol* 26: 75—84, 1982.
- 10) Ohara K, Tatsui T, Tsurimaki Y, Shimizu H: Specular microscopic study on the corneal endothelium in Werner's syndrome. *Proceedings of 7th Congress of the European Society of Ophthalmology*, 283—285, 1985.
- 11) 伊野田繁, 大久保彰, 龍井哲夫, 大原國俊: 定量的パラメーターを用いた部位別角膜内皮形態の解析。第48回日本中部眼科学会発表, 抄録集90, 1982.
- 12) 伊野田繁, 大久保彰, 龍井哲夫, 大原國俊: 新しいパラメーターを用いたヒト角膜内皮細胞の定量的形態計測。 *眼紀* 34: 1002—1009, 1983.
- 13) 石田誠夫, 後藤淑子, 木村泰朗, 金井 淳, 加藤和男, 中島 章: 高度近視眼の角膜内皮細胞の変化について。厚生省網脈絡膜萎縮症調査研究班, 昭和55年度分担研究報告書 2: 6—9, 1980.
- 14) Waring GO, Krohn MA, Ford GE, Harris RK, Rosenblatt LS: Four methods of measuring

- human corneal endothelial cells from specular photomicrographs. Arch Ophthalmol 98: 848—855, 1980.
- 15) 大原國俊, 伊野田繁, 大久保彰: “かたち”を表わすパラメーターを用いた白内障術後角膜内皮形態の研究. 日眼 88: 662—667, 1984.
- 16) 小峯輝男, 及川徳郎, 加藤桂一郎: 角膜内皮細胞面積測定における digitizer と画像処理装置との比較. 日眼 85: 457—463, 1981.
- 17) 甲南カメラ研究所, 阿部国臣との私信.
- 18) 高木隆司: 「かたち」の探究. ダイヤモンド社, 東京, 1980.
- 19) **Honda H, Morita T, Tanabe A:** Establishment of epidermal cell columns in mammalian skin: Computer simulation. J Theor Biol 81: 745—759, 1979.
- 20) 稲葉昌丸, 湖崎 弘, 松田 司, 塩崎陽一: 角膜内皮細胞の新しい形状的解析法. 眼紀 34: 223—226, 1983.
- 21) 澤 充: 角膜の臨床検査法, 三島濟一編: 眼科 Mook 15, 角膜—最近の知見—. 東京, 金原出版, 51—64, 1981.
- 22) **Svedbergh B, Bill A:** Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. Acta Ophthalmol 50: 321—336, 1972.
- 23) 矢野真知子, 谷島輝雄: 家兎角膜内皮細胞の標本作製過程での収縮. 日眼 89: 235—238, 1985.
(第91回日眼総会原著)