

角膜内皮細胞平均面積測定自動化の研究

その2 : Video camera 及び Video tape recorder を介して (図3, 表1)

西 興 史 (西眼科病院)

Automated Morphometry of Corneal Endothelial Cells Part 2 : Use of Video Camera and Video Tape Recorder

Okihiko Nishi

Higashinari-ku, Nakamichi 4-14-26 Osaka Japan, Nishi Eye Hospital

要 約

角膜内皮細胞平均面積を自動的に測定する装置を開発した。Specular microscope で内皮細胞を Video camera を介して撮影し Video tape recorder に録画する。これをコマ送りし最も鮮明な画像を静止させ画像解析装置に取り込み処理する。30眼の正常眼を処理した結果、1眼に要する時間は平均13分強で、この内人手による画像修正時間は平均4分弱であった。同一画像のトレース画像との相関係数は $r=0.9335$ 、平均測定細胞数87個で日常臨床で要求される正確性はあると判断された。本装置により角膜内皮細胞平均面積が直ちに得ることができる。この結果本装置は日常臨床において Specular microscope をもっと身近なものにする可能性を有している。(日眼 91 : 87—93, 1987)

キーワード : スペキュラー・マイクロスコープ, 角膜内皮細胞形態自動測定, 平均細胞面積, 角膜内皮細胞

Abstract

We developed an apparatus for automated morphometry of the corneal endothelium, which was photographed through a specular microscope connected to a video camera, and the images were stored in a video tape recorder. The clearest stationary image was input into an image analyzer to determine the cell boundaries automatically. Although human interaction is generally necessary, the mean time required to complete this procedure was about 13 minutes according to the results of the 30 normal eyes, of which the time needed for manual correction was about 4 minutes. The mean cell area obtained by this method correlated well ($r=0.9335$) with those obtained by tracing the same images. This apparatus has clinical meaning to get mean cell area of corneal endothelium immediately, so that it makes specular microscope more familiar to daily clinic. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91 : 87—93, 1987)

Key words : specular microscope, automated morphometry, mean cell area, corneal endothelial cell

I 緒 言

角膜内皮細胞の形態測定は角膜機能の評価上、日常臨床で特に眼内レンズ手術の前後では不可欠である。現在行われている一般的な内皮形態測定法にはデジタルタイザー法とイメージアナライザー法^{1)~6)}がある。前

者では内皮細胞の各頂点をなぞる、後者では原画をトレースすることにより細胞境界を確定する。しかし両者共人間の手作業であるため多大の労力と時間を必要とし、誤差の源ともなる。また写真を介しているので引き伸ばしによる誤差もあり得るし、撮影、現像、引伸ばしといった画像の準備も面倒かつ日時を要する。これ

別刷請求先 : 537 大阪東成区中道4-14-26 西眼科病院 西 興史

Reprint requests to : Okihiko Nishi, M.D. Nishi eye hospital Higashinari-ku, Nakamichi 4-14-26 Osaka Japan

(昭和61年7月3日受付) (Accepted July 3, 1986.)

等の欠点を克服するため人間の手作業なしに直接 image analyzer に境界を確定させ、原画像を自動的に処理する角膜内皮細胞形態自動測定, Automated morphometry of endothelial cells^{7)~11)}が研究されている。

我々は前報¹¹⁾で、35mm ネガフィルムから画像を直接 image analyzer に取り込んで自動的に細胞境界を確定、原画像を処理する装置を開発し、これによって相当の省力省時間化が可能になったことを報告した。しかし35mm フィルムを現象する作業が残っているのではなおデータを即日得ることができなかった。また全ての報告に共通する自動測定の問題点は、日常臨床で遭遇する通常の画質では境界の不十分な鮮明^{7)~11)}さと共に、核を含む細胞内封入体^{8)~10)}が障害となり、細胞境界の自動決定はなお不完全で、人間の判断による修正・補正が必須^{7)~11)}なことである。そこで日常臨床に内皮細胞形態測定の parameter をルーティンに活用するには、画像処理の Algorithm の改善と並んで、いかに良い画像を得る確率を高めるか、そしていかに合理的且つ快適、正確に修正・補正機能を解析過程で取り入れていくかが非常に重要になる。

今回我々は、これ等の点を考慮し、Video camera と Video tape recorder (以下 VC 及び VTR と略す) を介して内皮細胞境界を確定する方法を開発し、撮影と同時に内皮細胞面積を得ることが可能となり、Algorithm の改善により更に省力化が図れ、日常臨床に使用できるようになったので報告する。

II 方 法

1) 装置：50倍の対物レンズを装着した甲南社製 Clinical specular microscope CSP580に VC (NEC, TI-22AII) を装着し、得られた画像を VTR (Sony, U-Matic VO 5800) に録画する。この画像をコマ送りして最も鮮明な画像を選び、Digital time base corrector (朋栄, FOR. A FA-400) を介してタイムベースエラーを補正し、フレームメモリー機能を使ってこれを完全に静止させ、画像解析処理装置 (NEXUS 6400) に取り込み、Microcomputer (NEC 9801M2) で処理する (図 1)。

2) 細胞境界確定の Algorithm

(1) 原画像を入力し10~20回 stacking を行う。

(2) 画像の平滑化：高周波ノイズを3×3格子でフィルターし除去する。15×15格子で画面上場所によって異なる輝度差を平均化する。こうして得られた平滑化画像を(1)で得られた原画像から差し引き細胞境界を強調した画像とする。

(3) 二値化：(2)の平滑化画像を以下の二値化処理 (暗い細胞境界を0, 明るい細胞内部を1, という具合に決める) にかける。

1. 処理にかける画像の範囲を任意に枠を設定することにより決める。
2. 画像の輝度のヒストグラムから閾値の最大・最小を求める。
3. 最大閾値から順次二値化画面を作り、最小閾値まで重ね合せて合成画面を作る。

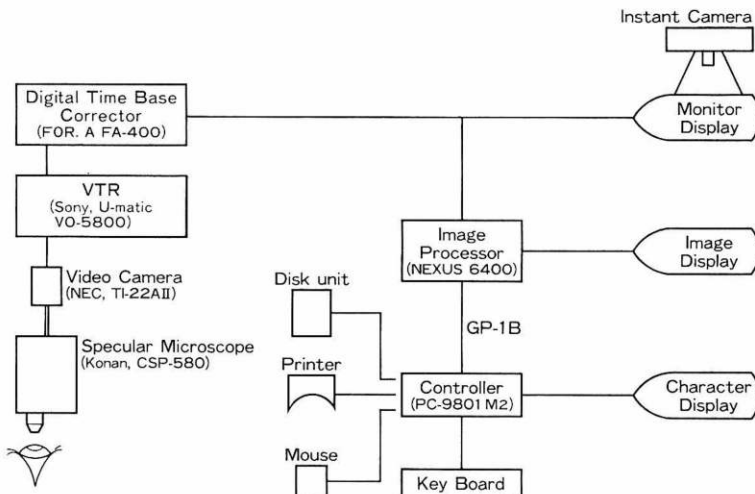


図1 装置の系統図

最小と最大閾値間のどの段階での二値化画像にでも、さかのぼって自在に再現できる。また二値化を再度最初から行うことも可能である。与えられた画像から最善の処理画像を得るにはこの二値化の閾値数をいくつにするかが決定的で、これは人間の判断により決定される。この判断を適確にするためにこれ等の機能は非常に重要であり、前報¹¹⁾と比べ決定的に改善された点である。

(4) 細胞境界の復元：二値化画像では細胞の形がなお変形しているので、穴埋め Hole filling, エッジ検出, 小粒子除去, 外周上の小粒子除去といった機能を使って復元する。

(5) 画像の修正・補正：こうして得られた画像でも

画質によって細胞同士が一部くっついたり、細胞の一部が欠損したりしていることがある。これを原画像をオーバーラップさせ更にディジタイザー機能で修正する。すなわち欠損は線及び面を描くことにより埋める。線の太さは2Pixelで、面描は大きさを自在に調節できる。融合した細胞の境界設定には2Pixelの太さの線で個体を分割する。また一境界内全体の個体も消却できる。この部分は人間の判断力と手作業を要する。

(6) 細線化：各細胞の境界線はなお太く、幅も不規則なので、両細胞を拡大し、境界を最終的には1pixelの線にする。

(7) ラベリング及び計測：Image analyzerのROMルーチンが行う。

表1 VTR画像から直接処理して得られた各症例の平均細胞面積(Y), 測定細胞数, 修正時間及び測定時間と同一VTR像のトレース画像から得られた平均細胞面積(X)および測定細胞数

症例	性	年齢	VTR画像		修正時間 (分)	測定時間 (分)	トレース画像	
			平均細胞面積 (Y) ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$)	細胞数			平均細胞面積 (X)	細胞数
1	F	21	342±130	77	6.8	15.2	361±126	81
			353±85	83	6.2	14.1	363±87	85
2	F	22	339±88	69	4.5	13.4	347±92	83
			331±96	84	3.8	11.3	340±101	90
3	F	23	323±88	99	0	9.5	314±116	104
			336±92	101	0	10.4	321±97	110
4	F	23	341±84	88	0	9.3	336±84	80
			335±91	92	0	9.8	325±86	82
5	F	26	359±109	86	9.3	17.9	385±113	99
			361±130	67	7.3	18.2	374±126	55
6	F	24	355±122	81	7.8	14.9	372±102	75
			350±129	70	4.0	16.8	358±120	65
7	M	36	388±88	75	6.2	16.2	399±146	67
			393±96	84	6.4	15.2	412±101	79
8	M	30	367±103	88	0	12.9	371±121	70
			355±101	114	4.8	15.2	376±111	109
9	M	54	391±112	98	0	11.5	386±98	86
			386±103	106	3.0	12.2	398±118	99
10	M	64	405±103	76	6.5	14.3	415±101	80
			417±111	71	7.9	15.7	436±128	76
11	F	28	362±84	101	3.5	12.3	353±91	90
			350±88	104	3.9	12.7	361±86	85
12	F	24	346±88	62	0	12.2	322±99	80
			351±89	54	3.3	13.9	343±92	72
13	F	24	332±108	97	6.3	16.5	326±106	88
			340±118	91	7.4	18.0	352±128	86
14	F	23	323±93	98	3.5	11.3	335±95	89
			336±101	94	2.2	9.2	329±92	92
15	F	21	330±90	101	2.3	11.5	327±95	97
			326±88	98	0	10.0	311±97	114
平均				87±14	3.9±2.9	13.3±2.7		

3) 測定対象：15人30正常眼(年齢22～64歳)を夫々約20～30秒ずつ Specular microscope で角膜中央部を撮影する(絞り1/2)次いで、

(1) このシステムの測定精度を調べるために、先ず、一眼のVTRに録画された内皮画像(以下VTR画像と略す)を本装置を使用して処理し、内皮細胞平均面積を出す。同時にVideo monitor上に写ったフリーズされた同一画像をインスタントカメラで撮影し、得られた陽画像(約200倍)を直接幅0.1mmのペンでトレースする(以下トレース画像と略す)。このトレース画像を前報で述べたテレビカメラ、浜松ホトニクス製C5100¹¹⁾で撮影し、本装置の画像処理にかけ内皮細胞平均面積を出す。各眼につき両画像の測定値を比較する。つまり現在標準的な方法⁴⁾の一つであるイメージアナライザー法におけるトレースによる内皮細胞確定の方法と、修正・補正を加えたコンピューターによる自動的な内皮細胞確定の方法とで得られる値を相対的に比較する。

(2) 各処理過程の時間を計算するようプログラミングし、画像解析に要した全時間及び画像修正・補正に要した時間を測定した。

III 結 果

(1) VTR画像の平均細胞面積(Y)とトレース画像の平均細胞面積(X)を表1に対比して示す。値はmean±S.D.である。これ等の値の回帰直線は $Y=0.7190X+96.5$ 、相関係数 $r=0.9335$ で図2に示す。

全症例の平均測定時間(mean±S.D.)は13.3±2.7分

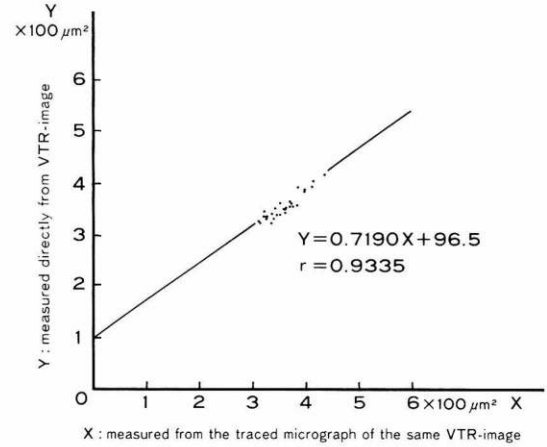


図2 VTR画像(Y)と同一VTR画像のトレース画像(X)の平均細胞面積の1次回帰式

で、その内修正時間は3.9±2.9分を要した。処理細胞数は87±14個で、完全自動処理つまり修正を必要としないと判断された画像は30例中8例、27%であった。図3に画像処理の1例を示す。

IV 考 按

Computerに内皮細胞の境界をできるだけ正確に認識させる上で重要なのは画像の質である。ピントがよく合って鮮明なこと、全画面上で場所によって輝度差が少ないこと、これ等の条件が満たされている程自動化率は高くなり、修正・補正の必要が少なくなる。従って正確性を損なうことのない省力化、省時間化と言う

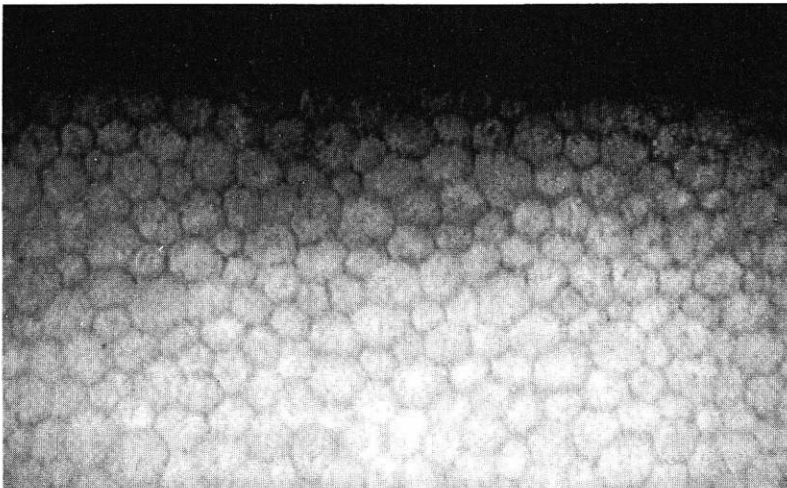
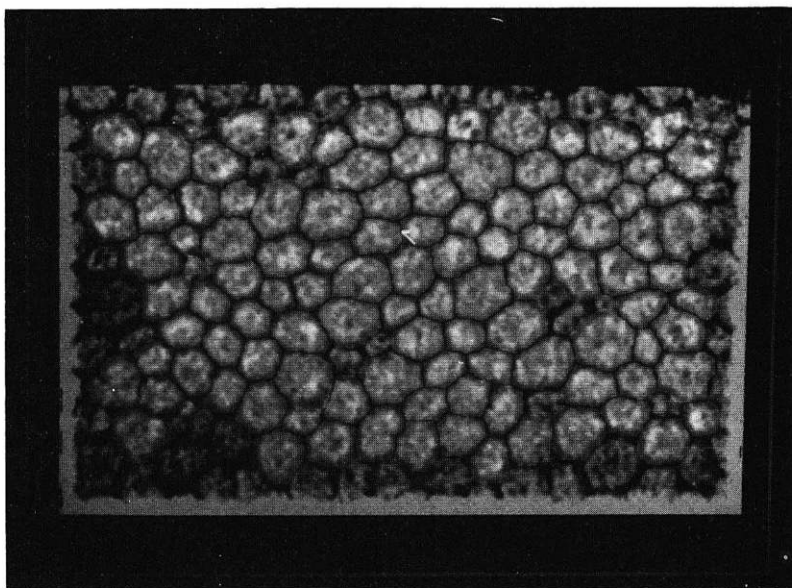
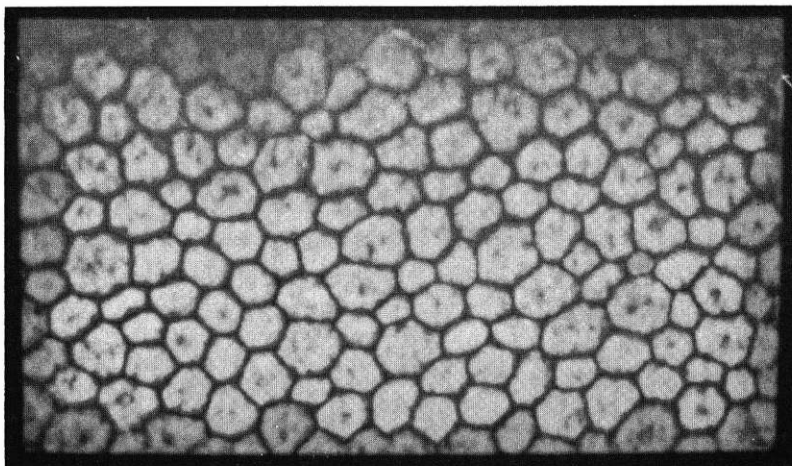


図3 a. Video monitorのVTR原画像



b. VTR 画像を画像解析装置で処理して得られた最終画像



c. Video monitor の VTR 原画像をインスタントカメラで写し、得られた陽画を直接トレースした画像（トレース画像）を処理して得られた最終画像

観点から見ると、細胞境界確定の Algorithm の工夫と共に、いかに良質の画像を得る確率を高めるかということが重要となる。

前報の装置¹¹⁾と比べ今回使用した装置の特色は先ず、VC 及び VTR の画像を直接解析することにより 35mm フィルムでは必須の写真処理過程が全て省け、撮影と同時に解析可能となりこれだけで相当の省力化と時間短縮が可能になったことである。しかも VC で 10~20秒撮影すると必ず数コマは非常に鮮明な画像が

キャッチされていて大変有利である。

Hartmann 等¹⁰⁾は最近フレーム・メモリーを利用した自動測定を報告した。この場合は確かに VTR に一旦撮影して次の処理をするという課程は省ける利点はある。また Digital memory system のため S/N 比がより高いのでより良い画質を得ることができると考えられる。従って撮影対象が Eye bank eye や、動物実験の Cadaver eye のように静止している場合は最適と思える。しかし容量が限られている上、連続撮影が

できないので人眼のように微動している対象を撮影する場合、シャッターのタイミングが非常に難しく鮮明な画像を取り込める迄何度も撮影しなければならない。従って日常臨床で術前後の人眼を撮影し鮮明な画像を得るにはより困難と思える。

これに対して一旦VTRに取り込むと、画像の解像度が落ち、又撮影された画像を選択しこれを始めてImage analyzerに取り込むという課程が一つ増えるが、短時間かつ簡単のため特に大きな問題ではない。一方撮影時間は充分あり1/30秒毎の連続撮影が可能のためピント合せが容易である。従って生体眼が対象の場合はより鮮明な画像を得やすいと考えられ、これが我々がVTRを選んだ理由である。

一般に内皮細胞形態測定では修正が必須の自動測定も含めディジタイザー法、イメージアナライザー法でも誤差の源は多くあるので、どれか一つを絶対的な基準値として把えることは妥当でない。従って本自動測定装置の精度を考える場合、他の標準的な方法との比較における相関性が問題となる。イメージアナライザー法、つまりトレースして細胞境界を確定する方法との比較では、 $r=0.9335$ という高い相関が得られた(図2)。トレース画像では処理されたVTR画像と全く同一細胞群をトレースしてはいないが、画像の周辺部の幾つかの細胞を除いて、同一細胞群を含み(図3)処理された細胞数もほぼ同数(表1)なことから、日常臨床に必要な正確性を試す程度の相関関係の吟味の条件は満たされていると考えてよい。また同一画像の再現性に関しては人間の手作業が全くないか、あっても極僅かなので、コンピューターの本来の機能を考えて、これを試すのは不必要と考え省いた。

次に、解析される細胞数について考察すると、平均 87 ± 14 とその数が少ないのは、一つは、今回は焦点深度を深くする目的で絞りを1/2に設定したのでMonitor上150程の細胞しか撮影されていないこと、多大の修正が必要と考えられる細胞を二値化の段階で、閾値を少なくすることにより、意図的に減らしていることにもよっている。実際に通常測定されている細胞数は文献上少なくとも^{2)4)6)12)~15)}100~150個で、理論的には測定数が多い程、全体の内皮細胞の特徴をより正確に捉えていると言える。幾つの細胞数を測定すれば統計上全体性を損なわないで、その特徴を表わし得るかという理論的根拠に関して私の知る範囲では研究はないようである。特に最小必要な測定数は細胞のばらつき(S.D.)が小さい場合は数10個でも充分であろうし、こ

れが大きい場合には100個でも全体の特徴からずれた値が出ることもあると考えられるので一概には言えない。しかし我々の測定した平均87個という数は、通常測定されているより少ないものの、日常臨床で素早くオリエンテーションをつけるには充分の数と考えられる。勿論二値化の段階で閾値を増やせば、理論的には、写っている全細胞を取り込むことも可能であり、絞りももっと開けば数百個を取り込むことも可能である。しかしこれにより取り込まれた細胞数が増えれば、必然的に不完全な境界も増加し、修正時間及び測定時間が長くなり、正確性も落ちてくる。そして、原画像との比較・修正はもはや通常の人間の判断力の限界を越えるものとなる可能性がある。このように解析される細胞数は正確性を考慮すれば、基本的には画質によっているが、修正・補正時間の長さ及び正確性の要素にも必然的に依存してくる。これ等の諸要素をコントロールすること、すなわち、どの閾値で二値化しどれだけ修正を加えれば、全体として妥当な線で納得できる正確性を有する情報が得られるかという判断は、画質をimage display上で見つつ、人間がある程度経験的に行う必要がある。しかしこの点を省力化及び自動化という観点から検討すると、最高の画質で全て自動的に測定できるケースでも、境界設定が正しいかどうかには、現時点では人間の判断を必要とすることを考えると、細胞が150程度以下であれば、上記の経験的判断の必要性は細胞境界確定のAlgorithmの(3)二値化で述べた機能を使用すれば、熟練を必要とせず面倒な操作も不要なことから、特に決定的に不利な点とならない。この、全閾値の各値での二値化画像を任意にボタン操作で取り出せるという機能が前報と比べAlgorithmで特に改善された点である。

従って他の報告も含め自動化と名付けてはいるが^{7)~10)}細胞境界をcomputerが自動的に決定するということであって、その正確性のチェックはどんな場合でも最終段階では人間の判断力を必要とするので、言葉の真の意味の自動化はもう次元上の次世代のcomputerの登場を待つしかないと考えられる。

このように他の装置も含めて一般に自動測定装置では最善の二値化閾値数の決定の判断および原画像との比較による画像修正という2点に関して、なお人間の判断力が必要である。しかし本装置ではAlgorithmの工夫とVCおよびVTRの採用により全測定時間が13分強で正確な情報が得られ、また人間による判断にも極度の集中力を必要としないところから、その作業は

人間の生理的忍耐力の範囲内であり日常臨床にルーティンとして取り入れ、直ちに内皮細胞の情報が得られる道が拓けた。

画像処理の Algorithm に関する今後の課題は画面の適切な平滑化及び最適の二値化である。その為には部分的な平滑化や二値化を行う方法、複数のしきい値で二値化しこれ等を合成する方法等が考えられるが、今後の課題である。

最後に VTR では大量の情報の保存、取り出しに難があり、retrospectiv に以前の画像を必要とする時にはやはり35mm ネガフィルムの方が優れている。この点に関しては本文でも示したように、同時にインスタントカメラや35mm カメラで撮影を行なってこの画像を保存しておくのがよいと考えている。Monitor 上の画像を写すので、いちいち Specular microscope に VC とインスタントカメラをつけかえる必要がないし、また現像・引伸しといった処理も不要だからである。

文 献

- 1) Laing RA, Sandstorm MM, Berrospi AR, Leibowitz HM: Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res* 22: 587—594, 1976.
- 2) Sato T: Studies on the endothelium of the corneal graft. *Jpn J Ophthalmol* 22: 114—126, 1978.
- 3) Shaw EL, Rao GN, Arthur EJ, Aquavella JV: The functional reverse of corneal endothelium. *Ophthalmol* 85: 640—649, 1978.
- 4) Mishima S: Clinical investigation on the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 93: 1—29, 1982.
- 5) Waring GO, Krohn MA, Ford GE, Harris RR, Rosenblatt HL: Four methods of measuring human corneal endothelial cells from specular photomicrographs. *Arch Ophthalmol* 98: 848—855, 1980.
- 6) 西 興史, 花崎絃一: 各種眼内レンズ挿入による角膜内皮障害の比較. *臨眼* 37: 13—17, 1983.
- 7) Lester JM, McFarland JL, Bursell SE, Laing RA, Brenner JF: Automated morphometric analysis of corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 407—410, 1981.
- 8) Hartmann C, Weingart M, Dünner P, Giraud JP: Automatistierte Endothelmorphometrie. *Fortschritte der Ophthalmol* 79: 261—265, 1982.
- 9) Hirst LW, Sterner RE, Grant DG: Automated analysis of wide-field specular photomicrographs. *Cornea* 3: 83—87, 1984.
- 10) Hartmann C, Köditz W: Automated morphometric endothelial analysis combined with video specular microscopy. *Cornea* 3: 155—167, 1985.
- 11) 西 興史: 角膜内皮細胞面積測定自動化の研究. その1: ネガフィルムからの直接測定の試み. *日眼* 89: 1120—1124, 1985.
- 12) Sawa M, Tanishima T: The morphometry of the human corneal endothelium and follow-up of postoperative changes. *Jpn J Ophthalmol* 23: 337—350, 1979.
- 13) 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 と画像解析装置との比較. *日眼* 85: 457—463, 1981.
- 14) 神鳥高世, 沢 充, 谷島輝雄: ヒト角膜内皮細胞のコンピューターによる形態計測. *日眼* 85: 1204—1207, 1981.
- 15) 伊野田繁, 大久保彰, 龍井哲夫, 大原国俊: 新しいパラメータ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.

(第90回日眼総会原著)