

角膜内皮形態計測における測定誤差 (図5)

伊 野 田 繁 (自治医科大学眼科)

Simulation of Measurement Error in Corneal
Endothelial Morphometry

Shigeru Inoda

Dept. of Ophthalmology, Jichi Medical School

要 約

ディジタイザーとコンピューターを用いた角膜内皮細胞の形態計測における計測誤差を面積と偏平指数、方向性の各パラメーターについて求めた。誤差の主たる原因であるディジタイザーの機械的な誤差とディジタイズするための手入力誤差から計算機によるシュミレーションを行い、最終的に各パラメーターに含まれる誤差の範囲を算出した。その結果、測定する細胞面積を $300\mu\text{m}^2$ 、信頼区間を2S.D. (95%)としたとき、求める面積及び偏平指数の誤差を $\pm 5\%$ 以内で計測するには内皮細胞像の拡大倍率は500倍以上にする必要があった。また方向性は、偏平指数が15%以上の細胞では拡大倍率を500倍以上にしたときの誤差は $\pm 20^\circ$ 以内であったが、偏平指数15%未満の正多角形に近い細胞では1000倍以上に拡大してもそれ以上の誤差が生じ、正確に求めることが出来ないことがわかった。(日眼 92:1149-1153, 1988)

キーワード：スペキュラーマイクロスコープ、角膜内皮形態計測、ディジタイザー、シュミレーション、測定誤差

Abstract

A system using a digitizer and a computer is one of the most accurate methods in morphometry of the corneal endothelial cells. However, the values for the parameters obtained by this method comprise measurement error. The main sources of the error are the mechanical error of the digitizer and the manual digitizing error. Therefore, the author evaluated there two error sources in various parameters using a simulation model. The maximum mechanical error range of the digitizer was 0.4mm, and the distribution was a normal distribution with a standard deviation of 0.13mm. The manual digitizing error also showed a normal distribution with a standard deviation of 0.10mm. The overall error range in each parameter was simulated by a computer assisted program based on the above two factors. The measurement error range within $\pm 5\%$ in cell area and skewness index required a 500 times magnification of the endothelial picture. It was impossible to obtain accurate data concerning the major axis of the cell that has 0 to 15% of skewness index even when the image was enlarged 1000 times. In cells with a skewness index of over 15%, the major axis could be obtained with a measurement error range of $\pm 20^\circ$ by a 500 fold magnification of the endothelial picture. It was concluded that a 500 fold magnification of the endothelial picture enabled accurate data analysis. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1149-1153, 1988)

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 伊野田 繁
(昭和63年2月18日受付)

Reprint requests to: Shigeru Inoda, M.D. Dept. of Ophthalmol., Jichi Medical School
3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-04, Japan

(Accepted for publication February 18, 1988)

Key words: Corneal endothelial morphometry, Error of measurement, Specular microscopy, Computer simulation

I 緒 言

角膜内皮細胞のスペキュラーマイクロスコープは in vivo で内皮細胞の観察が行えるため、種々の内眼手術の侵襲程度や疾患による角膜内皮細胞の病態を把握する上で重要な臨床検査法となっている。その内皮細胞像の解析には、ディジタイザーや画像解析装置、Fixed Frame 法、cell sizer 法等^{1)~9)}様々な方法が用いられており、また内皮細胞像の定量的解析のパラメーターとしては、細胞面積や角数、周長、偏平指数、方向性等が使用されている。この場合使用する方法により、得られるパラメーターの種類やその値の精度が異なるため、検査結果の比較検討には用いた方法の誤差の程度を充分に考慮して行なう必要があるが、誤差の検討については必ずしも充分に為されていないのが現状である。

既に著者はパーソナルコンピューターとディジタイザーを用いて角膜内皮細胞形態の解析法を開発し⁹⁾、その方法を用いて白内障術後の角膜内皮細胞の変化や日本人における正常角膜内皮細胞形態の年齢別正常値などが報告されている^{9)~13)}。そこで今回、その解析方法の誤差を求めるため、新たに誤差のシュミレーション法を開発し、一定誤差内での測定結果を得るための内皮細胞像の拡大率について検討したので報告する。

II 方 法

1. ディジタイザーの精度の測定

ディジタイザーの機械的誤差の測定のため10cm×10cm内に1cm毎に線巾0.1mmのグリッドを書いた紙を作り、グリッドの各交点間の距離をノギス（三豊製作所）にて0.05mmの精度で5回測定しその平均値を真の値とした。交点は全部で100個あるので全ての交点間は4950区間（ $=_{100}C_2$ ）あることになる。この紙をディジタイザーの中央と四隅に置き各グリッドの交点をディジタイズした後、各交点間の距離を算出しノギスで測定した値と比較した。ディジタイズの方法は各グリッドの交点とディジタイザーのカーソル上の十字線（線巾0.1mm）が正確に重なっていることをルーペ（5倍）で確認して行った。即ち合計24750区間（4950×5）のディジタイザーによる機械的な誤差の平均値とその分布を求めた。使用したディジタイザーは関東電

子製 K-510で、A3サイズまで入力可能である。読み取り方式は絶対座標電磁誘導方式、公称精度は最小分解能0.1mm、最大読み取り誤差0.5mmである。

2. 手による入力誤差の測定

入力の誤差を求めるため、一辺が1cmの正六角形の各頂点を通常に入力する速度（200個の細胞を入力するのに約25分）でディジタイズした。著者自身が各頂点をそれぞれ50回づつ入力し、得られた各頂点の座標値（X, Y 軸方向）と平均位置との差を算出し検討した。

3. 面積、形に与える誤差のシュミレーション

1., 2. で測定した誤差が各細胞頂点をディジタイズする際に生じ、その細胞頂点の座標値に含まれる誤差が最終的な面積、偏平指数、方向性の各パラメーターに誤差を生じさせる。1., 2. の誤差は内皮細胞像の拡大倍率とは無関係に生じるので内皮細胞像を大きく拡大することにより相対的に誤差の影響は小さくなる。従って各パラメーターに生じる誤差と内皮細胞像の拡大倍率との関係をコンピュータによるシュミレーションにより求めた。全ての計算は有効数字16桁の倍精度計算で行い計算途中での桁落ちを最小限にした。角膜内皮細胞形態の計算は既に報告した方法⁹⁾を用いた。即ち各細胞頂点の座標値から、面積や偏平指数、方向性などのパラメータを算出するものである。偏平指数は細胞の重心回りの慣性モーメントの最大値と最小値から求める細胞の長軸と短軸長との百分率であり、細胞の細長さを表す。また、方向性は細胞の長軸方向をX, Y平面上でX軸の正の方向より反時計回りに180°までの角度で表すものである。

シュミレーションの方法は以下のごとく行った。

1) 細胞モデル

ディジタイザー面上において面積が $1\text{mm}^2 \sim 300\text{mm}^2$ 、偏平指数が5%~45%、方向性が90°方向である六角形の細胞モデルを仮定し、それぞれ面積や偏平指数、方向性の各パラメーターの値を求めた。

2) 誤差の加算

各細胞頂点座標値に含まれるそれぞれの誤差は正規確率分布にしたがってランダムに生じると考えられるので、乱数を使用して誤差を生じさせた。乱数は混合合同法¹⁴⁾によるものと、EWSモデル9000（YHP製）のBASIC3.0言語によるRandom関数をそれぞれ別個に使用し、それぞれ機械的誤差、手による入力誤差

(1., 2.)の標準偏差を持ち、互いに独立な正規乱数(誤差)を作った¹⁵⁾。6角形のモデル図形各頂点の真の座標値 X, Y に、この正規乱数の値をそれぞれ加算し、誤差のある6角細胞をつくった。

3) パラメーターの計算

2)で得られた6角形の各頂点の座標値(誤差を含む)より面積、偏平指数、方向性の各パラメーターを計算し、更に1)で求めた真の値との差を計算した。

4) 繰り返し計算

各細胞頂点座標値に含まれる誤差により各パラメータ値はばらつくが、そのばらつきの程度が即ち誤差である。従って一つのモデル図形当たり2)~3)を一万回繰り返し、各パラメータの平均値、標準偏差を計算した。本報告では標準偏差の2倍の値(2S.D.)を誤差とすることにより信頼区間95%の値を示すことにした。その計算結果を拡大倍率と誤差の関係に変換するため、内皮細胞の面積を $300\mu\text{m}^2$ と $600\mu\text{m}^2$ の2種類を仮定して、その関係を調べた。

III 結 果

1. デジタイザー固有の機械的誤差

デジタイザー盤面上の四隅と中央に於て、デジタイザーの誤差は $\pm 0.4\text{mm}$ 以内に分布し、その平均値は $0.0 \pm 0.13\text{mm}$ (標準偏差)であった(図1)。

2. 手による入力誤差

入力誤差は図2に示すごとく $\pm 0.3\text{mm}$ 以内に分布し、その平均は $0.0 \pm 0.11\text{mm}$ (標準偏差)であった。

3. シミュレーション結果

乱数が混合合同法によるものと、Random関数によるものとはシミュレーション結果に差が認められなかったためRandom関数を用いた結果を示す。得られた各パラメーターの標準偏差の値の2倍の値(2S.D.)を誤差として検討した。

1) 面積について

図3に面積 $300\mu\text{m}^2$ と $600\mu\text{m}^2$ の細胞を測定するときの、誤差(2S.D.)と拡大倍率の関係を示す。倍率が低くなるにつれて指数関数的に標準偏差は大きくなり、

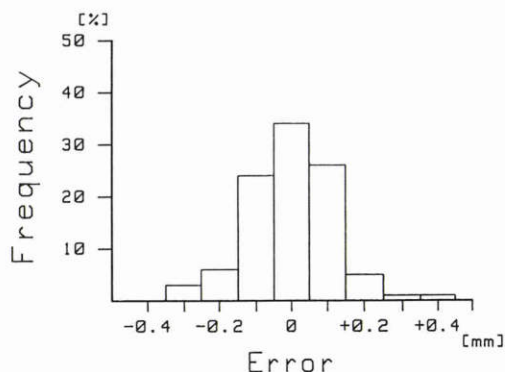


図1 デジタイザーの機械的誤差分布

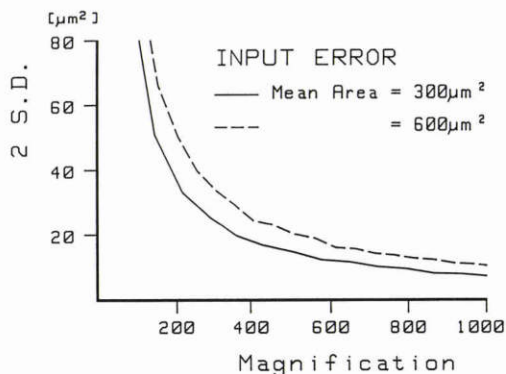


図3 面積の誤差

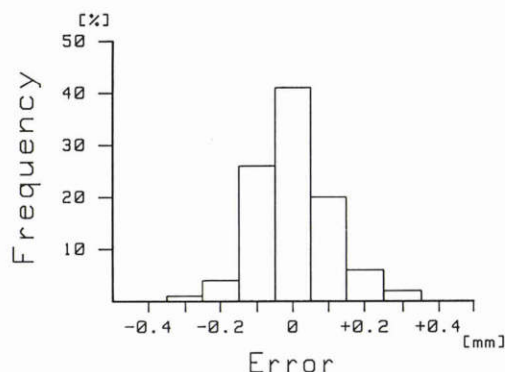


図2 手による入力誤差分布

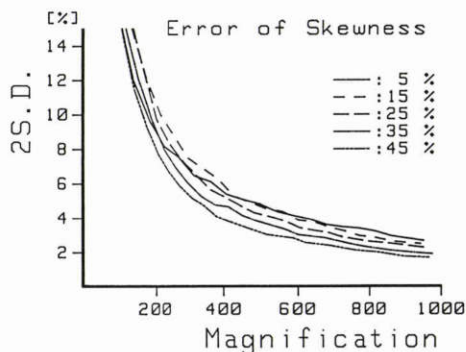


図4 偏平指数の誤差(細胞面積 $300\mu\text{m}^2$)

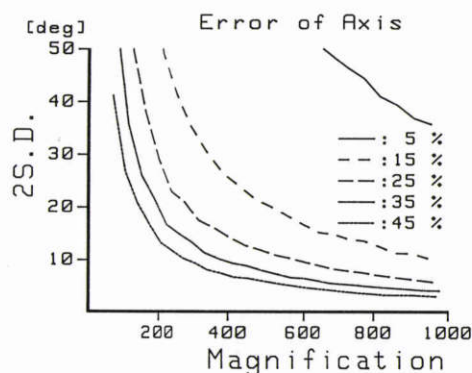


図5 方向性の誤差 (細胞面積 $300\mu\text{m}^2$)

細胞面積が $300\mu\text{m}^2$ の場合では、拡大倍率100倍で2S.D.は $80\mu\text{m}^2$ 、500倍で2S.D.は $15\mu\text{m}^2$ 、1000倍で2S.D.は $7\mu\text{m}^2$ であった。

2) 偏平指数について

細胞面積が $300\mu\text{m}^2$ の場合の偏平指数における誤差検討結果を図4に示す。偏平指数を5%~45%の範囲で10%ステップで細胞の偏平指数を変えたときの誤差(2S.D.)と拡大倍率の関係を示してある。偏平指数が低い値のものほど偏平指数の測定誤差が大きくなる傾向を認めたが、その差は大きくなかった。拡大倍率100倍で2S.D.は15%、500倍で2S.D.は4%、1000倍で2S.D.は3%であった。

3) 方向性について

細胞面積が $300\mu\text{m}^2$ における方向性の誤差検討結果を図5に示す。偏平指数の値を5%~45%の範囲で10%ステップで変化させたときの方向性の測定誤差(2S.D.)と拡大倍率の関係は、偏平指数の小さい細胞ほど(正多角形に近いほど)、また拡大倍率が低いほど方向性の測定誤差が大きくなる結果が得られた。特に偏平指数が5%の細胞では拡大倍率を1000倍以上に拡大した場合でも誤差は 40° となった。一方偏平指数15%以上の細胞では拡大倍率を500倍以上にすると誤差が $\pm 20^\circ$ 以内で方向性が求まることがわかった。

IV 考 按

物を測るとき、得られた値には必ず誤差が含まれるため、測定者は得られた値がどの程度信頼できるのか知っている必要がある。従って角膜内皮細胞の形態計測を行う場合にも、得られた値の誤差について検討する必要がある。つまり内皮細胞の測定結果を、その結果に含まれる誤差の程度を知らずに比較検討すると

誤った判断をする可能性があるからである。しかし、測定結果に含まれる誤差については殆ど検討されずに、出てきた値をそのまま使用しているのが現状である。

形態計測の精度はその測定できる最小分解能に最も左右される。画像解析装置では一般的にTV入力であり、一画面を 512×512 の点に分解して測定している。一方、一般的なディジタイザーでは 0.1mm の精度でA4($296 \times 210\text{mm}$)又はA3($296 \times 420\text{mm}$)サイズの範囲を測定することができる。従ってディジタイザーではA4サイズの場合、 2960×2100 の点に分解して計測していることになり画像解析装置に比べはるかに正確に測定できる。またFixed Frame法やcell sizier法等では平均面積しか求められず、形の特徴を測定することはできない。従ってディジタイザーを用いて行う方法は、現在のところ種々の形態についてのパラメーターを最も正確に測定できる方法であり、しかも機器は比較的安価なため広く用いられている。

スペキュラーマイクロスコープで得られた角膜内皮細胞像をこの方法によって測定する際に生じる誤差は、拡大倍率や細胞境界決定の誤差、及びディジタイザーを使用することによって生じる誤差がある⁵⁾。フィルムの拡大倍率はキャリブレーションを繰り返し正確に行うことにより、正確に求められるが、細胞境界の誤差はスペキュラーマイクロスコープによって得られる写真の質により異なり、写真の質が悪ければこの方法によっても正確な結果は得られない。そこで今回の解析では、正確な拡大倍率で正確に細胞境界を捉えた写真が得られたとしても生じる測定誤差について解析を行った。従って写真の質が悪い場合又は倍率が不正確な場合は、ここで述べる誤差よりも大きな誤差が生じることになる。

ここで用いたコンピューターによるシュミレーションの方法はディジタイザーで一点をポイントするとき生じる真の位置からのずれの確率分布が、内皮細胞各頂点をディジタイズするときにも当てはまると考えられるため、それらの誤差が細胞形態に関するパラメータの算出に最終的に生じる誤差を求めるものである。実際に人が何万回も同じ細胞を入力してその誤差の分布を調べる事は実際上不可能であり、このようなシュミレーションを行うことにより統計学的に正確に誤差を推定することが可能となる。

ディジタイザーを使用する場合に生じる誤差は、機械的誤差と手で入力する為の誤差である。今回の結果

では、機械的誤差と手による誤差は標準偏差がそれぞれ0.13mm, 0.11mm とほぼ同じ値であり、この程度の精度のディジタイザーで十分であると考えられた。手で入力するための誤差は、測定者により異なり必ずしもこの結果と一致しない。従って測定者毎にこの入力誤差を求め各パラメーターへの影響を求めておく必要がある。

正常人角膜内皮細胞の大きさは平均約 $300\mu\text{m}^2$ であり¹³⁾、入力する細胞面積を $300\mu\text{m}^2$ として計算した。また各パラメーターに生じる誤差として標準偏差の2倍の値、即ち信頼区間95%を誤差の範囲とした。

面積に与える入力誤差の影響は細胞面積が一定の場合、その最終拡大倍率が低いほど得られる面積のばらつきは指数関数的に増大する(図3)。入力する細胞の真の面積を $300\mu\text{m}^2$ としたとき、得られた値がその面積の $\pm 5\%$ ($\pm 15\mu\text{m}^2$)以内の誤差にするためには、内皮像の最終倍率を500倍以上に拡大しなければならず、一方 $\pm 10\%$ 以内にするためには約200倍の拡大でよいことになる。大きな細胞の入力時には誤差の絶対値は大きくなるが、面積に対する相対誤差は小さく、細胞面積 $600\mu\text{m}^2$ の場合、 $\pm 5\%$ ($\pm 30\mu\text{m}^2$)以内の誤差で測定するには約300倍の拡大でよいことになる。以上の結果は、正六角形の細胞についてシュミレーションを行ったものであるが、細長い細胞つまり偏平指数の大小には影響されず、5~45%の偏平指数の細胞でも同様の結果を得ている。

偏平指数については細胞面積 $300\mu\text{m}^2$ において、95%の信頼区間で測定誤差が $\pm 5\%$ 以内にするためには細胞の最終拡大率を500倍以上に拡大しなければならないが、その誤差は測定する細胞の偏平指数の値の大小にはあまり影響されないことがわかった。

方向性の誤差は細胞の形が正六角形に近くなるほど(偏平指数が小さくなるほど)、各頂点をディジタイズする時の小さな誤差が大きく影響するため、偏平指数が5%のものでは方向性を正確に求めることが出来ないことが明らかになった。方向性を求める場合、誤差を95%の信頼区間での測定誤差範囲を $\pm 20^\circ$ にするためには、偏平指数が15%以上で拡大倍率を500倍以上にしなければならないと考えられた。

以上より角膜内皮細胞の形態計測をディジタイザーと計算機を用いて計測するとき、面積、偏平指数の測定誤差を $\pm 5\%$ 以内、方向性の誤差を $\pm 20^\circ$ 以内で計測

するには内皮細胞面積の平均値が $300\mu\text{m}^2$ の正常眼では最終内皮細胞像の拡大倍率を500倍以上にする必要がある、また方向性については偏平指数が15%以内の正多角形に近い細胞では拡大倍率を1000倍以上にしても正確にその値を求める事ができないことが判明した。

擱筆にあたり清水晃幸教授の御指導、御校閲に深謝いたします。

文 献

- 1) 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, 日眼 83: 936—946, 1979.
- 2) 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.
- 3) 神島高世, 澤 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.
- 4) 澤 充, 崎元 卓: ヒト角膜内皮細胞の傷害に対する治癒過程, 日眼 83: 947—952, 1979.
- 5) 小峰輝男, 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 笠原達也, 阿部國臣, 伊野田繁他: 臨床検査法としての新しい角膜内皮形態定量化システム, 眼紀 38: 834—841, 1987.
- 9) 伊野田繁, 大久保彰, 龍井哲夫他: 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.
- 10) 大原國俊, 伊野田繁, 赤星隆幸: Nd-YAG レーザーと Specular Microscope を用いた生体角膜内皮損傷修復過程研究の実験モデル, あたらしい眼科 1: 394—397, 1984.
- 11) 大久保彰, 伊野田繁, 大原國俊: 前眼部炎症と角膜内皮 (1), 日眼 87: 1233—1241, 1983.
- 12) 宮本孝文, 大原國俊, 伊野田繁: 眼球打撲と角膜内皮, 眼紀 38: 1157—1161, 1987.
- 13) 大原國俊, 水流忠彦, 伊野田繁: 角膜内皮細胞形態のパラメーター, 日眼 91: 1073—1078, 1987.
- 14) 藪下 信: 計算物理 (I), 地人書館, 東京, 1982.
- 15) S. プラント ((吉城 肇, 高橋秀知, 小柳義夫 訳): データー解析の方法, みすず書房, 東京, 1976.