# 6角形細胞率を含む角膜内皮細胞属性の画像解析

小山 鉄郎, 松尾 信彦, 坂口 紀子, 浅野 治子, 湯浅 久美, 土田 陽三 岡山大学医学部眼科学教室

#### 要 約

スペキュラーマイクロスコープによって撮影記録された角膜内皮細胞の解析方法として、6角形細胞率を含む任意の幾何学的形状パラメータを高速に解析できるシステムを開発した. 画像処理プロセッサとして MC68000を持つ画像処理解析装置の自動モードに画像処理解析の手順を設定した. 各細胞の角数測定には、ある2値化画像メモリ上で、1画素の列となった細胞境界の分岐点だけを選出し、別の2値化画像モメリ上で、 順次各細胞を全方向に3画素拡張させ、この拡張した細胞と先の分岐点との重複部分の数をその細胞の角数と した. トレースのしていない40例の角膜内皮細胞写真の解析時間は7.44±1.48分(平均値±標準偏差)であった.(日眼会誌 94:951-956, 1990)

キーワード:角膜内皮細胞,6角形細胞率,自動解析,画像解析

## Image Analysis of Morphologic Features of the Corneal Endothelium Including Hexagonality

Tetsuro Koyama, Nobuhiko Matsuo, Noriko Sakaguchi Haruko Asano, Kumi Yuasa and Yozo Tsuchida Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

#### Abstract

We developed an analysis system for the evaluation of corneal endothelial photographs. Morphological parameters including hexagonality were analyzed semiautomatically with this system. The image analyzer used consists of an image processor MC68000 and image memories  $512 \times 512 \times 17$  bytes in size. The algorithm that measures the number of apices of each cell is as follows. First, all crossing points of cell borders are detected. Then, each cell is enlarged in order by three pixels in eight directions. The number of crossing points which are overlapped with an enlarged cell is detected as the number of apices of the cell. The analysis time was  $7.44 \pm 1.48$ min. (mean  $\pm$  standard deviation) for 40 endothelial photographs which needed no manual trace for contrast enhancement. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94 : 951-956, 1990)

Key words : Corneal endothelium, Hexagonality, Auto-analysis, Image analysis

I 緒 言

床的意義が明らかになって久しい<sup>1)</sup>. ことに近年6角 形細胞率(hexagonality)の持つ意義が強調されるに もかかわらず<sup>2)~6)</sup>, この測定には多大な時間と労力が

角膜内皮細胞の形態学的属性の生理的意義および臨

別刷請求先:700 岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 小山 鉄郎 (平成元年7月23日受付,平成2年3月19日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsuro KOYAMA, M.D. Department. of Ophthalmology., Okayama University. Medical School

2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan

(Received July 23, 1989 and accepted in revised form March 19, 1990)

必要であった.スペキュラーマイクロスコープによっ て撮影記録された角膜内皮細胞の解析方法としては, 写真上の格子によるもの,標準写真との比較によるも の<sup>7)</sup>,マニュアル入力によるディジタイザーによるも の<sup>2)6)8)~11)</sup>,画像処理解析装置によるもの<sup>12)~15)</sup>等があ るが,6角形細胞率を含むいくつかの属性を高速に解 析できるシステムは見あたらない.我々は6角形細胞 率を含む任意の幾何学的形状パラメータを高速に解析 できるシステムを開発したので報告する.

## II 実験方法

使用した画像処理解析装置(Luzex 5000X, ニレコ) はホストコンピューターとして PC-98XA (NEC), 画 像処理プロセッサとして MC68000, 濃淡画像メモリ (512×512×8ビット)16画面分,および2値化画像メ モリ (512×512×1ビット)8画面分を備える.この 装置の自動モードに以下のように画像処理解析の手順 を設定した.

まず原画像を濃淡画像メモリへ取り込み、線形コン トラスト変換によるコントラストの強調を行い、画像 全体の濃度むらの補正をおこなうために帯域フィル ターを通して低周波成分を取り除き、最適な敷居値を オペレーターに求め、その値によって2値化を行なう。 2値化画像において侵食微小粒子除去と細胞縁の平滑 化を行なった後、オペレーターにマニュアル処理を促 す.ついで各細胞間に1画素の幅ができるまで細胞の 拡張を行い(図1)、面積率を測定し、各細胞の幾何学 的形状パラメータを角数測定を含めて解析する.ここ で面積率とは測定領域全体に占める細胞部分の画素 (図1における白色の画素)の割合で、1画素の幅をも たせた細胞境界線(図1における黒色の画素)が持つ 面積を最終的には0mm<sup>2</sup>として補正処理するさいに利 用される.

各細胞の角数測定には次のようなアルゴリズムを用 い,拡張 PASCAL 言語である LION で記載し,画像 解析ライブラリに登録した.すなわちある2値化画像 メモリ上で,1画素の列となった細胞境界の分岐点だ けを選出し(図1における○印の画素),別の2値化画 像メモリ上で,順次各細胞を全方向に3画素拡張させ, この拡張した細胞と先の分岐点との重複部分の数をそ の細胞の角数とした.

この解析システム全体の効果を評価する目的で,広 視野スペキュラーマイクロスコープ(SP-1, KONAN-KEELER,撮影系の倍率:30倍)によって撮影した角



図1 2値化画像処理の最終過程で1画素の列となった細胞境界とその分岐点(○印の画素)の概念図.



図2 16回平均化によって濃淡画像メモリに入力され た原画像、長方形は測定領域(本例では166×329 µm)を表わす、図2-図11の画像は図12のAに相当 する、

膜内皮細胞写真(ネガフィルムより14倍に引き延ばし 焼付けしたポジ写真)より無作為に100例を抽出し,そ のうち個々の角膜内皮細胞の境界が鮮明でフェルトペ ンによる境界のトレースを行なわなくても解析が可能 であると判断された40例を本システムにより解析し た.参考のために写真上にフェルトペンで細胞境界を トレースした3例も同時に解析した.

### III 結 果

モニター画面をみながらオペレーターが行なう実際 の画像処理解析の流れは次のようになった.

あらかじめ初期設定として,実寸換算,測定領域の 設定,測定する幾何学的形状パラメータの登録,およ

#### 平成2年10月10日

び原画像を濃淡画像メモリに入力するさい16回平均化 を行なう旨の選定を行なう.

各原画像毎に,方法の項目に記した手順プログラム を自動モードで走らせる(図2,図3).1度目のプロ グラムの停止時に2値化画像をモニターしつつ2値化



図3 線形コントラスト変換と帯域フィルター処理.



図4 2 值化.



図5 侵食微小粒子除去,平滑化.

に必要な最適な敷居値を決定する(図4).2度目のプ ログラムの停止時に,画像処理画面を原画像とスー パーインポーズさせつつ,カーソルによって見かけ上 の融合細胞の切り離しを行なう(図5,図6).穴埋め,



図6 カーソルによる見かけ上の融合細胞の切り離し (矢印).



図7 穴埋め,侵食微小粒子除去,拡張.



図8 カーソルによる最終的な手動処理(矢印).



図9 再拡張後の面積率の測定.各画素は画面の左上 から右下に向けて解析されている.画面撮影の露出 時間は1秒.



図10 個々の細胞の角数以外の属性の解析.測定領域 に完全に含まれる細胞のみ,画面の左上から右下に 向けて順に解析されている.画面撮影の露出時間は 1秒.

侵食微小粒子除去,拡張を行なって各細胞間に1画素 の幅の境界を設ける(図7,図1).必要があれば,再 度カーソルによる最終的な手動処理を行なう(図8). 残りのプログラムを走らせて(図9,図10,図11)解 析結果を得る

この解析システム全体の効果を評価する目的で行 なった角膜内皮細胞写真の解析結果を図12に示す.ト レースのしていない40例(図12の A-p)角膜内皮細胞写 真の解析時間は7.44±1.48(平均値±標準偏差)であっ た.各々の解析時間の長短は主に手動処理時間の長短 に依存し,解析細胞数(109.8±27.0, R<sup>2</sup>=0.07, R<sup>2</sup>は 解析時間に対する相関係数),細胞密度(2530.9± 558.5/mm<sup>2</sup>, R<sup>2</sup>=0.06),変動係数(coefficient of



図11 個々の細胞の角数の測定.測定領域に完全に含 まれる細胞のみ画面の左上から右下に向けて順に解 析されている.画面撮影の露出時間は1秒.

variation, 34.4 $\pm$ 7.5%, R<sup>2</sup>=0.12), 6 角形細胞率 (53.6 $\pm$ 9.0%, R<sup>2</sup>=0.03)等と相関はなかった.参考 のために写真上にフェルトペンで細胞境界をトレース した 3 例 (図12の\*) については手動処理の必要はな く,解析時間は 2 分以内であった.

## IV 考 按

画像解析装置による角膜内皮細胞写真の解析12)15)が 写真上の格子による解析,標準写真との比較による解 析7)、マニュアル入力によるディジタイザーによる解 析2)6)8)~11)等より優れているのは、処理時間が短い点と 解析に主観が入りにくい点、および再現性のよい点に ある12)~15).けれども細胞の角数を測定するプログラム がなければ、6角形細胞率を得ようとすると、すべて の細胞の頂点の座標をマニュアルで入力するディジタ イザーに頼らざるえなかった.本システムはこの作業 を完全に自動化した.この部分のプログラムはモ ジュール化されているため、画像解析装置の他のプロ グラムと共存している. すなわち, 初期設定の際に登 録する幾何学的形状パラメータを追加するだけで、今 回例示した測定の他に各細胞の最大長, 円相当径, 周 辺長, 方向, 等々を同時に測定することができる. 最 近西等<sup>16</sup>は角膜内皮細胞の角数を数えるプログラムを 報告しているが、そのアルゴリズムは当該細胞に隣接 する細胞の数を教えており, 当該細胞の頂点を検出す る我々のアルゴリズムとは異なっていて興味深い.

本システムによると2値化に必要な最適の敷居値を 決定する際と,カーソルによって見かけ上の融合細胞 の切り離しを行なう際に,オペレーターのパターン認



図12 写真上にフェルトペンでトレースした3例(\*)とトレースしていない40例 (A-p)の解析結果. CV:変動係数(coefficient of variation)

識<sup>12)</sup>が必要である.2分を越える解析時間の大部分は これらの作業に費やされているわけであるが、コント ラストの良い良質の撮影像を得ることにより、これら の判断を容易にすることができ、解析における主観の 排除と解析時間の短縮とを図ることができる.パター ン認識のすべてを現在の世代の画像解析装置に委ねる ことは、はなはだ困難である.

入力媒体として、この度はネガフィルムより14倍に 引き延ばし焼付けしたポジ写真を使用したが、本シス テムではネガフィルムからの直接入力も同等に行うこ とができ, またビデオテープ<sup>15)17)</sup>からもデジタルタイ ムベースコレクターによる画像のフリーズとデコーダ による NTSC テレビジョン信号の RGB 映像信号へ のデコードを行なうことにより, 容易に入力できる. さらに本システムは画像入出力媒体として, フロッ ピーディスク, ハードディスクを利用することができ る. 将来的にはハイビジョンとレーザーディスクとを 加えたシステムにより, 解像力の問題を解決しつつ, 写真処理を割愛し, しかもランダムなデジタルデータ 処理を実現して行くことになろう. 本論文の要旨は第91回日本眼科学会総会において示説展示された.プログラミングに際し協力を得たニレコの田辺 寛一郎氏に謝意を表する.プログラムは公開されている.

### 文 献

- Mishima S: Clinical investigations on the corneal endothelium. Am J Ophthalmol 93: 1 -29, 1982.
- 2)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.日眼会誌 1204-1207, 1981.
- Rao GN, Lohman LE, Aquavella JV: Cell size-shape relationships in corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 271-274, 1982.
- 4) 松田 司,塩崎陽一,須田秩史,他:ヒト角膜内皮 細胞の創傷治癒過程.日眼会誌 86:1944-1951, 1982.
- Matsuda M, Bourne WM: Long-term morphologic changes in the endothelium of transplanted corneas. Arch Ophthalmol 103: 1343 -1346, 1985.
- 6) Glasser DB, Matsuda M, Gager WE, et al: Corneal endothelial morphology after anterior chamber lens implantatin. Arch Ophthalmol 103: 1347-1349, 1985.
- 7) Yee RW, Matsuda M, Edelhauser HF: Wide-field endothelial counting panels. Am J Ophthalmol 99: 596-597, 1987.
- Bigar F: Specular microscopy of the corneal endothelium. Dev Ophthal 6: 1-94, 1982.

- 9) 稲葉昌丸,湖崎 弘,松田 司,他:白内障手術に よる角膜内皮損傷の部位別観察. 眼紀 34: 725 -727, 1983.
- 10) Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, et al: Corneal endothelial changes in type I and type II diabtes mellitus. Am J Ophthalmol 98: 401 -410, 1984.
- 伊野田繁,大久保彰,龍井哲夫,他:新しいバラ 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.
- 12) Fabian E, Mertz M, Köditz W: Endothelmorphometrie durch automatisierte Fernsehbildanalyse. Klin Mbl Augenheilk 182: 218-223, 1983.
- Hirst LW, Sterner RE, Grant DG: Automated analysis of wide-field specular photomicrographs. Cornea 3: 83-87, 1984.
- 14) Hartmann C, Köditz W: Automated morphometric endothelial analysis combined with video specular microscopy. Cornea 3: 155-167, 1984/1985.
- 15) 西 興史: 角膜内皮細胞平均面積測定自動化の研究. 日眼会誌 91:87-93, 1987.
- 16) Nishi O, Hanasaki K : Automated determination of polygonality of corneal endothelial cells. Cornea 8: 54-57, 1989.
- 17) Roberts CW, Koester CJ: Video with widefield specular microscopy. Ophthalmology 88: 146-149, 1981.