

画像処理装置による家畜の赤血球計測に関する研究

七條喜一郎*・郷田賢二*・豊澤敬一郎*・鈴木 實*

昭和62年5月30日受付

The Morphological Measurement of Erythrocytes by Image Analyzer in Domestic Animals

Kiitiro SITIZYO*, Kenji GOUDA*, Keiichiro TOYOSAWA* and Minoru SUZUKI*

The size and the modulus of deformation (morphological coefficient) of erythrocytes of bovine, swine, canine and fowl were measured by an image analyzer.

A microscopic image of blood smear was put into a image analyzer and treated with a computer : the using of image analyzer has made possible the measurments of maximal diameter, circumference, area and the morphological coefficient of erythrocytes simultaneously.

The maximal diameters of animal blood cells observed in this method were almost coincident with those obtained by a micrometer which had been ordinarily reported. The correlation of the maximal diameter, the circumference and the area of erythrocytes of the animals with the mean corpuscular volume (MCV) was high in bovine, swine and canine (r was more than 0.89); but no remarkable correlation was observed between the maximal diameter of erythrocytes and MCV in the fowl ($r=0.46$).

Erythrocytes of neonatal animals were a little larger than those of 150-day old.

緒 言

顕微鏡画像のコンピューターによる処理は、医用画像処理装置の開発の中でも早くから研究されてきた分野である。特に血液塗抹標本の画像解析は標本が画像処理に適していたこと、および臨床検査におけるその検査頻度が多いこともあって、早くから実用化されてきた¹⁾。今日では、ヒトの白血球分類装置として専用機が開発され、

白血球ばかりでなく異常赤血球をも自動的に分類できるようになった。しかし、この血球計測用画像処理装置はヒト血球を対象にして設計されたものであり、全ての動物血球にそのまま応用することは出来ない。

今回、著者らは鳥取大学広葉樹生態情報総合解析設備として設置された、多用途画像処理装置を使用する機会を得た。そこで、この装置を家畜動物の血液塗抹標本の解析に応用することを目的として、まず赤血球の形状計

* 鳥取大学農学部獣医学科家畜生理学講座

* *Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, Tottori University*

測を試みた。

その結果、本装置は多数の赤血球について、その最大直径、面積、周長および形状係数（血球の最大直径を直径とする正円に対するひずみ度）を同時に再現性良く迅速に計測できた。そこで、この装置でウシ、ブタ、イヌおよびニワトリの成長に伴う赤血球の形状変化を検索した。

実験材料および方法

1. 実験動物および塗抹標本の作成

赤血球形状の動物種差を検討するために、2～8才のウシ（和牛）、150日齢のブタ（LW雑種）、5か月齢のイヌ（雑種）および150日齢のニワトリ（ハイライン）をそれぞれ10例ずつ供試した。また、動物の成長に伴う血球形状変化については、上記と同一品種の各動物（ウシはホルスタイン）を用い、それぞれ10例ずつ出生時から150日齢まで、日齢を追って検索した。

ウシからの採血は外頸静脈、ニワトリは心臓、ブタは耳介枝静脈、イヌは頸静脈からそれぞれ採血した。採取した血液は直ちにスライドガラスに塗抹し、May-Giemsa染色を行った。また同時に赤血球数および Hematocrit (Ht)値を測定し、これらの値から平均赤血球容積 (MCV) を算出した ($MCV = Ht \text{ 値} \div \text{赤血球数} \times 10$)。

2. 画像処理装置による塗抹標本の解析

塗抹標本の解析はFig. 1に示した画像処理システムにより行った。すなわち、塗抹標本を顕微鏡にセットし、その像をビデオカメラで画像処理装置（ナックKK製、Model 4200F）に入力した。この装置で顕微鏡画像の輝度調整を行い、赤血球の強調、二値化、血球以外の粒状物除去および測定範囲の指定など一連の処理を行った。

次いで、コンピュータ（日本データゼネラル社製、Model 4000）で赤血球の最大直径、面積、周長、および

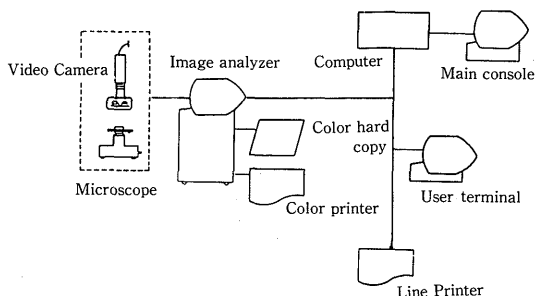


Fig. 1. Image analysing system.

形状係数 ($\pi \times \text{最大直径の二乗} \div (4 \times \text{面積})$) を計測した。

実験成績

1. 赤血球形状の動物種差

画像解析法で測定した各種動物赤血球のそれぞれの測定値をTable 1に示した。面積、周長、最大直径のいずれの測定値とも、ニワトリの赤血球がほかの動物のそれよりも大きく、次いでイヌ、ブタ、ウシの順であった。しかし、ウシの血球とブタのそれはほぼ近似しており、有

Table 1. Size and morphological coefficient of erythrocytes in domestic animals.

	Bovine	Swine	Canine	Fowl
Area	24.5±2.0	25.1±2.5	34.9±2.8	55.0±2.9
circumference	18.4±0.8	18.9±0.9	22.4±1.1	29.5±0.9
Maximal diameter	5.8±0.2	6.0±0.3	7.1±0.3	11.0±0.4
Morphological coefficient	1.1±0.03	1.1±0.03	1.1±0.04	1.7±0.08
Mean±S.D.	n=10			

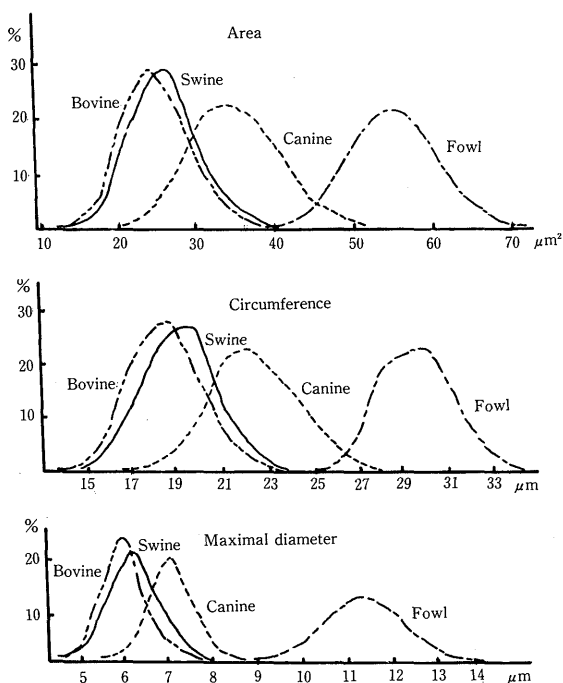


Fig. 2. Distribution curve of the area, circumference and maximal diameter of erythrocytes in domestic animals.

意差がみられなかった。また、各測定値の度数分布曲線を見ると、いずれの測定値ともほぼ正規分布しており、ウシとブタのそれが近似していた (Fig. 2)。しかし、イヌの度数分布曲線はウシ、ブタのそれに比べてやや右方に偏位しており、ニワトリのそれは更に右方に位置していた。

各動物の形状係数を見ると、ウシ、ブタおよびイヌの測定値はいずれも平均1.1で、赤血球はほぼ円形を呈していた (Table 1)。しかし、すべての赤血球が円形を呈するわけではなく、いずれの動物血球においても楕円形の赤血球 (形状係数が1.3以上) がみられた。その楕円形赤血球の出現頻度は動物種によってわずかつ違っており、ウシは7.8%、ブタは19.0%、イヌは14.5%であった。一方、ニワトリの赤血球はほとんどが楕円形を呈し (97.1%)、形状係数の平均値は1.7で、円形の血球は極めて少なかった (2.9%)。

次に、画像解析法では塗抹標本の血球の最大直径・面積・周長を同時に測定できるが、どの測定値で計測するのが最も合理的かどうかを明らかにするために、MCV値

Table 2. Correlation between size of erythrocytes and mean corpuscular volume in domestic animals.

	Bovine	Swine	Canine	Fowl
Area	r = 0.90	r = 0.96	r = 0.96	r = 0.73
circumference	r = 0.89	r = 0.97	r = 0.96	r = 0.70
Maximal diameter	r = 0.89	r = 0.96	r = 0.97	r = 0.46

と各測定値との相関性を検討した。その結果、ウシ、ブタ、イヌの赤血球はいずれの測定値ともMCV値との間に高い相関関係 (r = 0.89以上) がみられた (Table 2)。しかしニワトリの赤血球では、最大直径とMCVとの間に明らかな相関がみられず (r = 0.46)、また面積および周長とMCV値との相関もウシ・ブタ・イヌのそれに比べて低かった。

2. 動物の成長に伴う赤血球の形状変化

動物の成長過程における赤血球の形状変化を明らかにする目的で、ウシ、ブタ、イヌおよびニワトリの出生(フ化) 当日から150日まで日齢を追って検索した。

1) 平均赤血球容積

ウシ、ブタ、イヌおよびニワトリの出生当日のMCV値はいずれも50日齢のそれに比べて有意に高い値を示し、生後50日齢まで漸減した (Fig. 3)。日齢ごとに各動物の

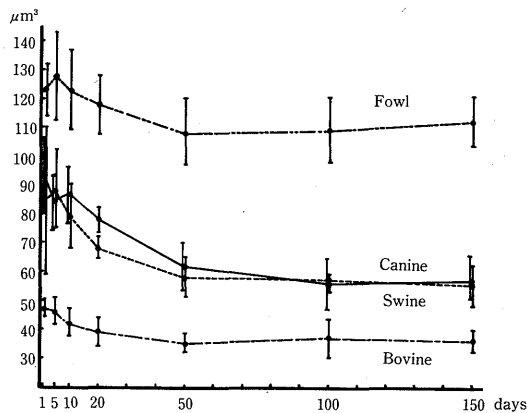


Fig. 3. Changes of mean corpuscular volumes following the growth in domestic animals.

MCV値を比較すると、いずれの日齢においてもニワトリ>イヌ≧ブタ>ウシの順であり、イヌとブタのMCV値はほぼ近似していた。

2) 血液塗抹標本の赤血球形状

動物の成長過程における血液塗抹標本の赤血球像を画像解析装置で検索した。ウシ、ブタ、およびイヌの赤血球面積は前述のMCV値の推移に類似する変動を示した (Fig. 4)。すなわち、これら動物の赤血球面積は出生時から150日齢まで成長に伴って減少した。その後、ウシとブタのそれは著明な変動を示さないが、イヌのそれは150日齢まで漸減した。同様な結果は赤血球の最大直径 (Fig. 5)

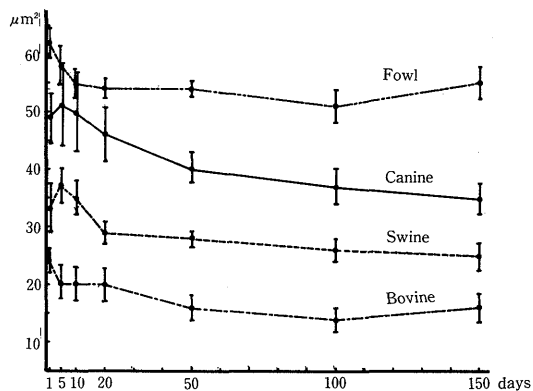


Fig. 4. Changes of area of erythrocytes following the growth in domestic animals.

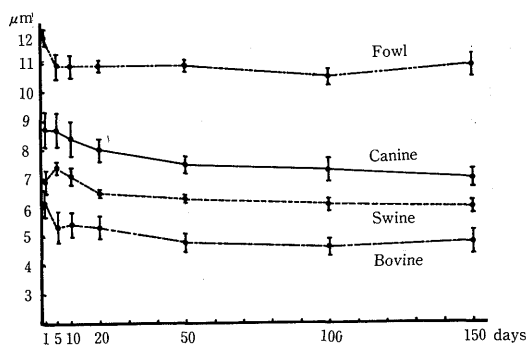


Fig. 5. Changes of maximal diameters of erythrocytes following the growth in domestic animals.

および周長においてもみられた (Table 3)。しかし、ニワトリ赤血球の面積および最大直径は孵化後10日目および5日目までに減少し、その後大きな変動を示さず、MCV値の変動とは明らかに異なっていた。

各日齢における赤血球形状の動物種差をみると、MCV値ではイヌとブタのそれがほぼ近似していたの

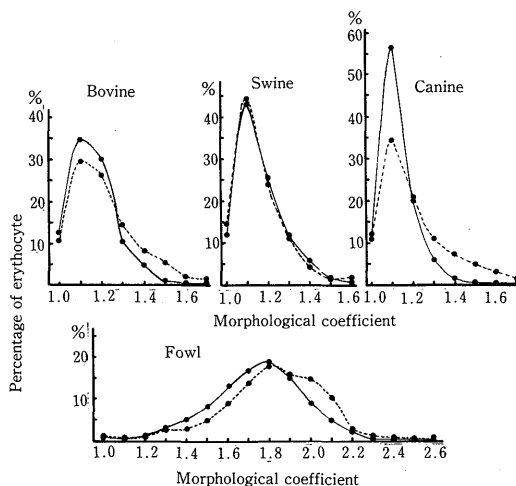


Fig. 6. Distribution curve of erythrocytes in neonatal and 150 days old animals.

して血液塗抹標本の赤血球計測では面積、周長、最大直径のいずれもイヌの測定値がブタのそれより高い値であった。

Table 3. Changes of size of erythrocytes following the growth of domestic animals.

	Days	Bovine	Swine	Canine	Fowl
Area (μm^2)	1	24.6 \pm 2.0	33.7 \pm 4.2	49.7 \pm 4.3	62.3 \pm 2.5
	5	20.5 \pm 3.3	37.9 \pm 3.0	51.5 \pm 6.9	58.4 \pm 3.3
	10	20.3 \pm 3.1	35.8 \pm 2.9	50.0 \pm 6.8	55.8 \pm 2.4
	20	20.1 \pm 3.2	29.9 \pm 1.9	46.2 \pm 4.8	54.0 \pm 1.7
	50	16.3 \pm 2.3	28.0 \pm 1.4	40.4 \pm 2.7	54.5 \pm 1.2
	100	14.8 \pm 2.0	26.0 \pm 2.1	37.0 \pm 3.1	51.4 \pm 2.9
circum- ference (μm)	1	18.0 \pm 0.9	21.8 \pm 1.5	27.0 \pm 1.2	31.5 \pm 0.7
	5	16.9 \pm 1.4	23.2 \pm 0.8	27.2 \pm 1.9	30.2 \pm 1.1
	10	16.8 \pm 1.3	22.4 \pm 0.9	26.5 \pm 1.8	29.6 \pm 0.7
	20	16.5 \pm 0.8	20.5 \pm 0.6	25.8 \pm 1.6	29.2 \pm 0.3
	50	15.1 \pm 1.0	19.8 \pm 0.4	24.1 \pm 0.9	29.2 \pm 0.4
	100	14.4 \pm 1.0	19.1 \pm 0.6	23.4 \pm 1.4	28.4 \pm 0.7
Maximal diameter (μm)	1	6.1 \pm 0.4	6.9 \pm 0.4	8.7 \pm 0.6	11.9 \pm 0.3
	5	5.3 \pm 0.5	7.4 \pm 0.2	8.7 \pm 0.6	10.9 \pm 0.4
	10	5.4 \pm 0.4	7.1 \pm 0.3	8.4 \pm 0.6	10.9 \pm 0.4
	20	5.3 \pm 0.4	6.5 \pm 0.1	8.0 \pm 0.4	10.9 \pm 0.2
	50	4.8 \pm 0.3	6.3 \pm 0.1	7.5 \pm 0.3	10.9 \pm 0.2
	100	4.6 \pm 0.3	6.1 \pm 0.2	7.3 \pm 0.4	10.5 \pm 0.3
150	4.8 \pm 0.4	6.0 \pm 0.2	7.0 \pm 0.3	10.9 \pm 0.4	

Meann \pm S.D. (n = 10)

動物の成長に伴う赤血球の形状係数の変動をみると、ブタのそれはいずれの日齢とも平均1.1であり、その度数分布曲線においても、出生当日と150日齢で明らかな差はみられなかった (Fig. 6)。しかし、ウシ、イヌおよびニワトリの出生 (フ化) 当日の赤血球は150日齢のそれに比べて楕円形を呈するものが多く、形状係数の度数分布曲線に差がみられた (Fig. 6)。

考 察

1. 血液塗抹標本の画像解析法

従来ヒトおよび動物赤血球の大きさは、血液塗抹標本の赤血球直径を一個ずつMicrometerで計測していた^{5,6)}。この方法で多数個の赤血球を計測するには多大の労力と時間が必要であった。したがって、臨床診断の目的には個々の赤血球の大きさを計測することが少なく、多くは血液塗抹標本の赤血球像で異形赤血球の出現、あるいは赤血球の大小不同を観察して、赤血球の形態異常を推測していた。

今回、血液塗抹標本の赤血球像を画像解析装置で分析したところ、この装置では赤血球の最大直径、面積、周長および形状係数を一括して短時間に計測できた。また同時に各測定値をコンピュータ処理することにより、それぞれの度数分布曲線を記録できた。したがってこの画像処理装置による測定は臨床診断にも応用できる有用な方法であろうと考えられる。

また従来、赤血球および白血球の大きさは、その最大直径あるいは最大直径と最小直径などで表示されてきたが^{5,6)}、本実験のMCV値と各測定値の相関性から考えると、最大直径よりも、面積あるいは周長で表示するほうがより合理的であろうと思われる。

しかし本測定方法は血液塗抹標本の赤血球を計測する方法であり、標本作成時の乾燥や固定などの操作条件によって血球が変形することが懸念されている^{6,10)}。したがって、塗抹標本作成にあたっては、塗抹方法、乾燥条件、染色方法を一定にする必要がある。また、本装置による測定は顕微鏡から入力した画像を二値化して測定するため、二値化時に入力する輝度値のわずかな違いによって、測定誤差を生じる可能性がある。したがって、画像の二値化に当たっては最適輝度域値を用いなければならない。

2. 赤血球形状の動物種差

家畜の正常赤血球の大きさは報告者によって若干相違しているが、その直径はウシで5.1~6.0 μm ^{3,13)}ブタでは6.0~6.25 μm ¹³⁾イヌでは6.7~7.3 μm ^{2,7,13)}でありニワトリでは最大直径10~14 μm 、最小直径6.1~9.0 μm ⁹⁾と報告

されている。本実験における各種動物の赤血球最大直径は平均値で、ウシ5.8 μm 、ブタ6.0 μm 、イヌ7.1 μm 、ニワトリ11.0 μm であり、先人が報告したそれぞれの動物血球測定値にほぼ一致するものであった。

赤血球の大きさが動物の種類によって異なることは上述したとおりであるが、その形も動物種によって大きく異なっている。一般に、ほ乳類の赤血球は無核で円形を呈する (ラクダの赤血球は楕円形) が、鳥類以下の動物赤血球は有核の楕円形である。しかし哺乳類の正常赤血球であっても、その全てが円形を呈するわけではなく、軽度に楕円形化したものが少なくない。また、いろいろな原因による貧血時には楕円形をした赤血球が増加し、肝・脾・骨髄などの造血組織の疾患においては、球状赤血球、的状赤血球およびその他の変形赤血球が出現することが知られている^{6,9,10)}。したがって、血液疾患の臨床診断において赤血球の大きさばかりでなく、形状 (変形度) をも測定することが必要である。河北と山崎⁹⁾はヒト赤血球の変形度を表す方法として、赤血球の長径と短径から楕円度 (離心率 $\cdot \epsilon = 1 - (\text{長径} \div \text{短径})$) を算出して、血液疾患の診断に応用している。本実験では赤血球の変形度を表す指標として、血球の最大直径と面積から形状係数を算出した。この係数は血球の最大直径を直径とする円の面積に対する血球面積比を示したものである。ウシ、ブタおよびイヌの赤血球の多くはいずれもほぼ円形であり、その形状係数は平均1.1であった。一般に正常なヒト赤血球においても楕円形赤血球の存在が報告されている (約8%)。これらの報告と本実験の形状係数を直接比較することはできないが、本実験において形状係数が1.3以上のものを楕形と仮定すると、ニワトリ血球の97.1%が楕円形で、ウシのそれは7.8%、ブタでは19.0%、イヌでは14.5%が楕円形赤血球であった。したがって、ウシの正常赤血球にみられる楕円形赤血球の出現頻度はヒト血球のそれにほぼ近似するものと思われる。しかしブタおよびイヌの赤血球はウシの血球に比べて変形したものがわずかに多い。

3. 動物の成長に伴う赤血球形状変化

一般に幼若動物の赤血球は成熟期のそれに比べてやや大きいことが知られている^{4,5,8,13)}。Holman⁹⁾はウシの成長に伴う赤血球の形態変化について検索し、出生時の赤血球直径は5.4~5.6 μm であるが、1~2か月後には小型化して4.5~4.7 μm になり、10~11か月目には再び4.9~5.5 μm になると報告した。本実験においても1~5日齢子ウシの赤血球最大直径は5.3~6.1 μm であったが、50日齢では4.6 μm になり、Holmanの成績にほぼ近似するもので

あった。

ウシ^{2,13,16)}、ブタ^{3,11,13)}、イヌ^{13,14,15)}、ニワトリ^{1,8,12)}赤血球の大きさをMCV値で検索した報告は多く、Schalmら¹³⁾は、新生子ブタのMCV値は65~67 μm^3 であるが、2~6か月齢にかけて小型化し(50~55 μm^3)、その後は平均60 μm^3 で推移すると報告した。また、古都ら³⁾も出生時のMCV値は64~70 μm^3 で、15日目には約50 μm^3 になり、貧血症状を呈したと述べている。本実験における出生直後の子ブタ赤血球のMCV値は平均84.8 μm^3 であり、Schalmら¹³⁾および古都ら³⁾の測定値より高い値であった。しかし、50~150日齢のMCV値はSchalmらの2~6か月齢の値にほぼ一致していた。また、本実験においてウシ、イヌおよびニワトリの新生子MCV値は150日齢に比べて大きく、いずれの動物赤血球とも成長に伴って小型化することが明らかになった。

以上、述べたように動物の赤血球は生後成長に伴って小さくなるが、新生子の赤血球が成熟期のそれに比べて大きいことは、胚子期に造られた若い血球が多いためと考えられる。また、赤血球が生後小型化することは母乳に含まれる鉄濃度が少ないために、新生子の旺盛な赤血球造血にHemoglobine量が伴わないためと考えられている¹³⁾。しかし、ニワトリ赤血球においても、フ化後小型化する現象がみられたことから推察すると、生後、若い赤血球が成熟して小型化すると同時に、いまだ造血機能の発達も悪いものと考えられる。

要 約

多用途画像処理装置を動物の血液塗抹標本解析に応用する目的で、ウシ、ブタ、イヌおよびニワトリの赤血球形状計測を行った。

実験にはナックKK製の画像処理装置 (Model 4200F) および日本データーゼネラル社製のコンピュータ (Model 4000) を使用した。本装置では多数の赤血球の最大直径、面積、周長および変形度 (形状係数) を一括して迅速に測定できた。

この測定法による各動物の赤血球直径は従来報告されているMicrometer法による測定値にほぼ一致していた。また、動物の赤血球の大きさを測定する場合、どの計測値を用いるのがより合理的かどうかを知るために、MCV値と各測定値との相関を検討した。その結果、ウシ、ブタ、イヌの赤血球は直径、面積、周長の各測定値ともMCV値と高い相関を示した ($r=0.89$ 以上)。しかし、ニワトリ赤血球の最大直径はMCV値との相関がみられず ($r=0.46$)、面積あるいは周長で測定すべきであろうと

思われた。

次に、ウシ、ブタ、イヌ、およびニワトリの成長過程における赤血球の形状変化を検索した。その結果、いずれの動物においても出生当日の赤血球が150日齢のそれに比べて大きく、また、変形 (楕円形化) した赤血球が多くみられた。

文 献

- 1) Atwal, O. S., Mcfarland, L. Z. and Wilson, W. O. : Hematology of coturnix from birth to mature. *Poult. Sci.*, **43** 1392-1401 (1964)
- 2) Doxey, D. L. : The hematology of the ox. In *Comparative clinical hematology*. Edited by Archer, R. K. and Jeffcott, L. B. Blackwell Scientific Publications, London (1977) pp. 365-440
- 3) 古郡 浩・石井忠男・戸原三郎 : 子豚の発育時の赤血球および血液比重の変化について。畜試研報, **16** 51-59 (1968)
- 4) Holman, H. H. : Changes associated with age in the blood picture of calves and heifers. *Br. Vet. J.*, **112** 91-104 (1956)
- 5) 石谷類造・伊藤道男・小林好作・田中亨一・早川龍雄・山本春弥 : 家畜血液学図説。チクサン出版社。東京 (1980) pp. 78-114
- 6) 河北晴夫・山崎徳二 : 日本血液学全書 3. 日本血液学会編, 丸善株式会社, 東京 (1964) pp. 28-88
- 7) 小林好作 : イヌ。実験動物の血液学。関正利・平嶋邦猛・小林好作編, ソフトサイエンス社, 東京 (1981) pp. 362-370
- 8) Kostecka-myrycha, A. : Variation in the red blood cell picture during growth of goslings and chickens *Poult. Sci.*, **17** 93-101 (1976)
- 9) Lucas, A. M. and Jamroz, C. : Blood cell of other avian species In *Atlas of avian hematology*. United States Department of Agriculture, Washington (1961) pp. 202-221
- 10) 松本 昇・石原得博・高橋睦夫 : 赤血球膜の研究に役立つ形態学的検査。臨床病理, 特集**33** 139-148 (1978)
- 11) Miller, E. R., Ullrey, D. E., Ackermann, I., Schmidt, D. A., Leucke, R. W. and Hoefler, J. A. : Swine hematology from birth to maturity II, Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. *J. Anim. Sci.*, **20** 890-897 (1961)

- 12) Nirmalan, G. P. and Robinson, G. A. : Hematology of the japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Br. Poult. Sci.*, **12** 475-481 (1971)
- 13) Schalm, O. W., Jain, N. C. and Carroll, E. J. : *Veterinary hematology* 3th ed. Lea and Febiger, Philadelphia (1975) pp. 82-218
- 14) 芹田真理・吉広欽一・浜名克己：新生子犬の血液性状の変化——初乳の影響——. 獣畜新報, **643** 735-739 (1975)
- 15) Shifrine, M., Munn, S. L., Bulgin, M. S. and Wilson, F. D. : Hematologic changes to 60 days of age in clinically normal beagles. *Rab. Anim. Sci.*, **23** 894-898 (1973)
- 16) Tennant, B., Herrold, D. and Reina-Guerra, M. : Hematology of the neonatal calf ; erythrocyte and leukocyte values *Cornell. Vet.*, **64** 516-532 (1974)
- 17) 山本真司：血球自動分類. 医用画像処理. 尾上守夫編, 朝倉書店, 東京 (1982) pp.371-381