

技術報告

画像処理技術の植物プレパラート標本への応用

篠原 功治*

Application of Image Processing Technology to Plant Prepared Specimens
Koji Shinohara

ABSTRACT A blur which appears on an optical microscope remarkably reduces the resolution, because it has a property of three dimensional extent as involving the inner part of sample. It is tried to solve this problem by the fruitful image processing technology as compared with a hardware from viewpoint of the cost, the place, the time. This paper shows the methods to be able to observe internal and external structures of prepared specimens in images of result (a pollen of *Cucurbita*, a ramentum of *Elaeagnus*, a pollen of *Lilium*) and the processes. And the effective ways to use of them in the museum are considered.

はじめに

光学顕微鏡は、生きた細胞を観察することが可能であるが様々なレンズの収差による歪みとにじみや分解能の低さが課題である。電子顕微鏡は、高倍率で焦点深度が非常に深い蒸着と真空下の観察での二次電子の放出による試料の劣化は不可避であり色成分が得られない。共焦点レーザー顕微鏡は、専用の画像処理システムの操作が不可欠である。また、一般に光学顕微鏡と比べて電子顕微鏡とともに大変高価な機材であることに間違いはない(群馬県立自然史博物館, 1999; 井上, 1997, 1998)。

本稿では、光学顕微鏡から撮影したプレパラート標本の画像を画像処理し電子顕微鏡の特質と共焦点レーザー顕微鏡の特性を持ち合せた画像を作成することを試みた。作業全体のフローチャートを表1に示す。はじめに、撮影方法について記した後に光学系のぼけの要因について述べる。次に、主に使用した画像処理技術として全焦点画像のための逆フィルタとデジタル・フォト・コラージュ法や色分解と擬似カラーについて述べた後に結果の得られた画像とその処理過程を示す。また、この画像の作成は電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡と比べてコスト・場所・時間の観点からの制限も少なく有効であるためにあわせて作成された画像の博物館での利用についての考察を行った。

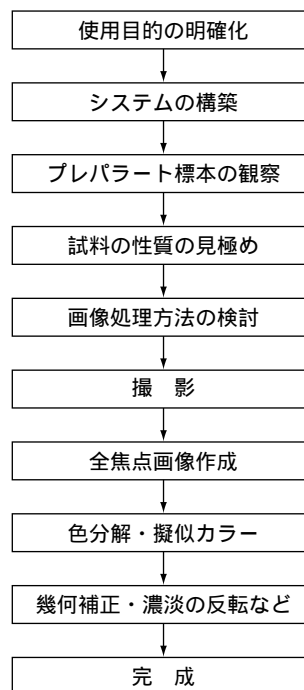


表1 作業全体のフローチャート
Table 1 Flowchart of all work.

撮影方法

生物顕微鏡OLYMPUS BX50の接眼レンズと三脚で固定したデジタルカメラFUJIX DIGITAL CAMERA DS-565の間にNikon BELLOWS PB-6を取り付け接眼レンズとデジタルカメラのCCDとの焦点距離を調整する。ステージを上下に1 μmから10 μmの範囲で移動させプレ

* 愛媛県総合科学博物館 学芸課 科学技術研究科
Dept. of Science and Technology Ehime Pref. Science Museum

プレート標本の試料への焦点を変更しながら連続切片画像を撮影する。撮影された画像の確認は、SONY TRINITRON COLOR VIDEO MONITORで行う。対物レンズは、OLYMPUS UplanFlの10x・20x・40x、開口数はそれぞれ0.30・0.50・0.75、接眼レンズは10xを使用した(図1)。



図1 撮影器機
Fig.1 Picture-taking machinery.

光学系のぼけの要因

レンズによって生じるぼけの原因としてフラウンホーファ回折による位相差のほかに球面を使用するレンズによる収差を挙げることができる。図2のようなレンズの場合、光軸に平行な光線aがレンズを通過後1点に焦点を結ぶのが理想であるが、実際のレンズではレンズ外周部を通りレンズの近くに大きく屈折した光の焦点bと近軸領域を通った光の焦点cとでは光軸の方向に f_1 と光軸に垂直の方向に f_2 の焦点距離差が生じ必ずしも一致はしない。これを球面収差と呼び、Seidelにより5種の収差が分類されている。ほかに光の波長によって屈折率が異なり焦点距離差が生じる収差を色収差と呼ぶ。光学顕微鏡の分解能をR、波長を λ 、開口数をNAとすると、

$$R=0.61 \lambda / NA$$

と表すことができる。分解能とは識別可能な2点間の最小の距離を表す。開口数とは明るさ及び分解能を表す量で、媒質の屈曲率をn、 θ を最大入射角とすると、

$$NA=n \sin \theta$$

と表すことができる。媒質が空気であれば $n=1$ となり開口数は最大で1以下の値となる。分解能を向上させるには、波長 λ を小さくするか開口数を大きくしなければならない。光源からの光が試料を透過することによって起こる吸収や反射による振幅の減衰も作用してレンズによるぼけの原因は三次元的に複雑となる(高木・下田, 1995; 櫛田, 1994)。

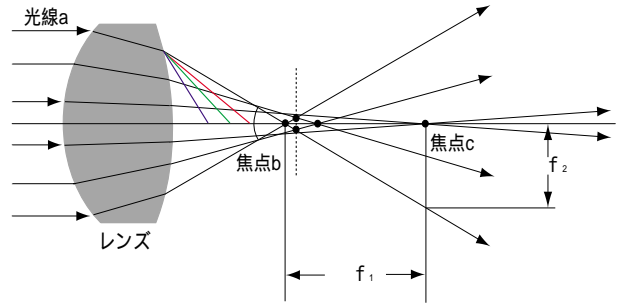


図2 球面収差と色収差
Fig.2 Spherical aberration and chromatic aberration.

全焦点画像

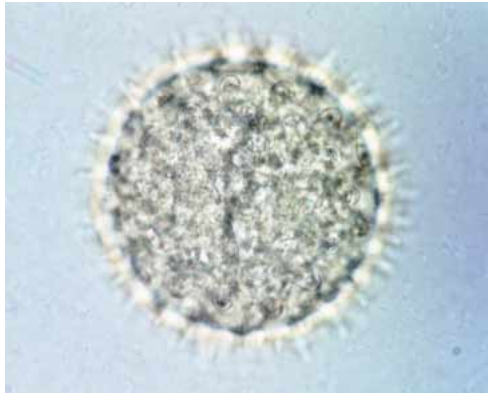
原画像は、レンズ固有の劣化特性に雑音加わり劣化画像となる。あらかじめ劣化特性が分かれば、劣化画像からレンズ固有の劣化特性を計算によって除去し原画像に近い画像を得ることができる。この過程を逆フィルタを行うという。逆フィルタは、使用した対物レンズの開口数・波長・複数枚撮影された画像間の距離を基にしたフィルタ $H(\lambda)$ を用いて行う。図3の撮影画像と逆フィルタ後の画像を比較してみると光学顕微鏡の特有の要素による劣化は補正しきれない。図4は、ヒストグラムでの比較である。そこで、デジタル・フォト・コラージュと呼ばれる方法でステージを移動させ試料への焦点を変えて撮影した複数枚の画像からの各々のぼけを含まない画像部分のみで1枚の画像を構成する。この画像を全焦点画像と呼ぶ(篠原, 2000)。これらの処理をソフトウェアImage-Pro PLUSとオプションモジュールSharp Stackで行う。

色分解と擬似カラー

光学顕微鏡からの撮影画像は、様々な要因のため肉眼により接眼レンズから確認した像と異なる。そのため、図5で示す任意の色で3つの独立な要素であるRed・Green・Blueの3原色(以下、RGBと記す。)に分解する。波長は、RGBにあわせてそれぞれ700nm・546nm・435nmとして処理する。そして、雑音除去などの補正を行い混色し合成する。この合成をフォールスカラー合成といい、割り当てられる色はフォールスカラーや擬似カラーと呼ばれる。一般に、複数の波長帯に分けて撮影した3つの異なる画像にRGBを割り当て1つの画像上にこの情報を効果的に再現することに使われる。RGBを割り当て合成された画像は、人間のみる色に近い自然の色となるためナチュラルカラー画像やトゥルーカラー画像とも呼ばれる。色相・彩度・明度で扱うHSI変換は使用していない(木内, 1992)。



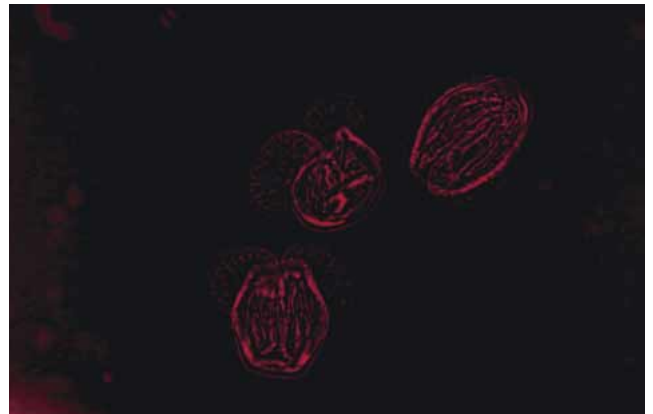
(a) A taken image.



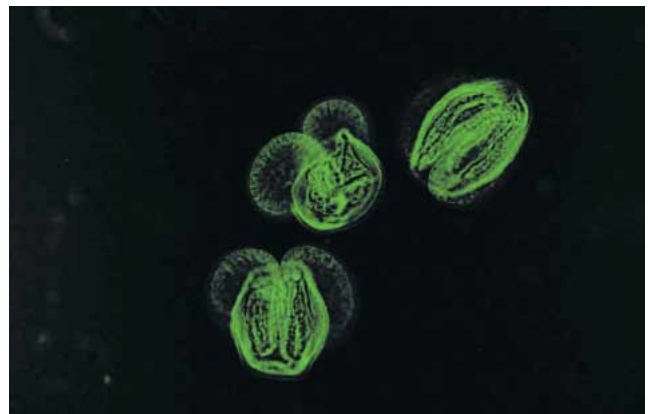
(b) An image done inverse filter.



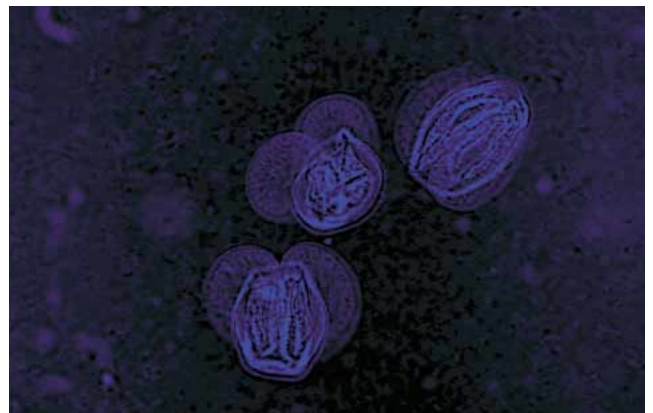
(a) A taken image.



(b) An image of a red element.

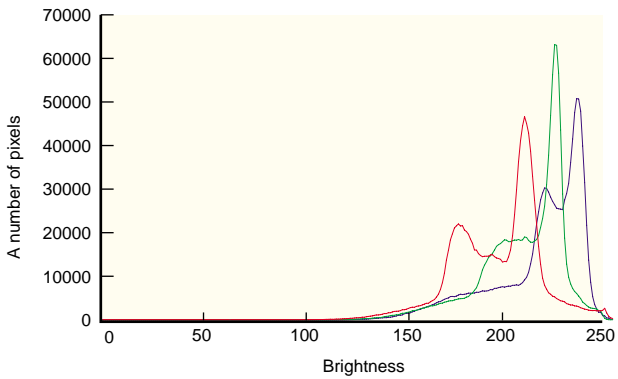


(c) An image of a green element.

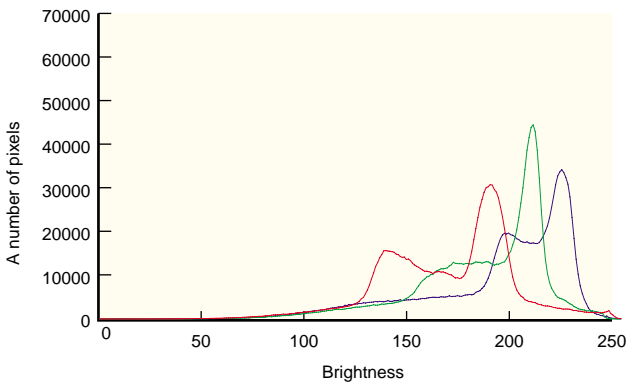


(d) An image of a blue element.

図3 撮影画像と逆フィルタ後の画像の比較
Fig.3 Comparison of a taken image and an image done inverse filter.



(a) A taken image.



(b) An image done inverse filter.

図4 図3のヒストグラムでの比較
Fig.4 Comparison by histogram of Fig.3.

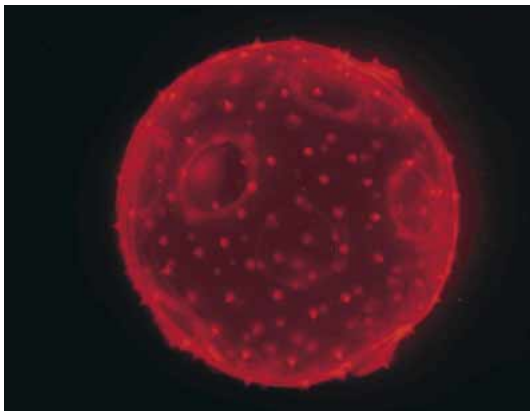
図5 色分解と擬似カラー
Fig.5 Color separation and pseudo-color.



(a) A taken image.



(b) An All-Focused Image done inverse filter.



(c) An image done pseudo-color from a green element of (b) to a red color.

図 6 カボチャの虫媒花粉
Fig.6 A pollen of *Cucurbita*.

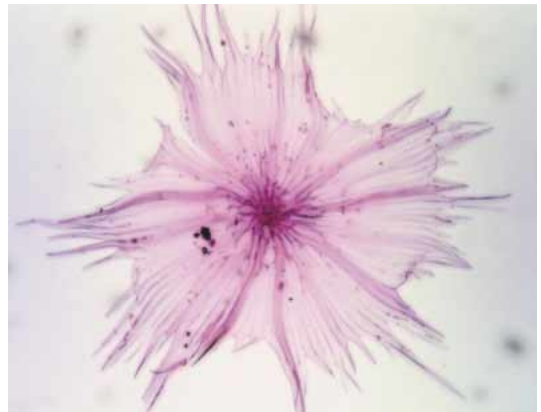
画像処理技術の植物プレパラート標本への応用

プレパラートは、スライドガラスとカバーガラスとの間に試料を封じ込めた実物資料標本である。一時プレパラートと永久プレパラートがあり、永久プレパラートの場合は防腐を目的とする薬品で封入することから広義の封入標本にも分類される。博物館資料としては微細であるために展示の際には顕微鏡を用いたり来館者にとって分かりやすい顕微鏡写真や図をそえることが必要不可欠である（加藤ほか，1999）。

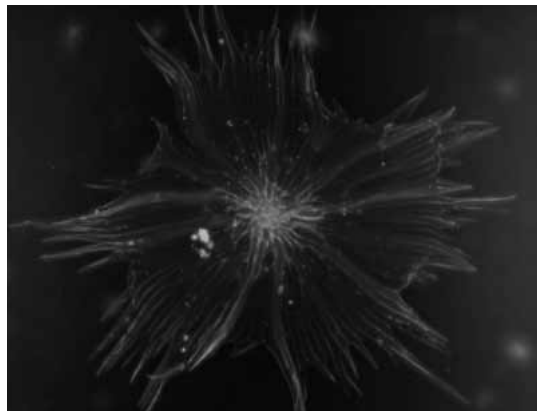
そこで、当館のプレパラート標本を生物顕微鏡で撮影



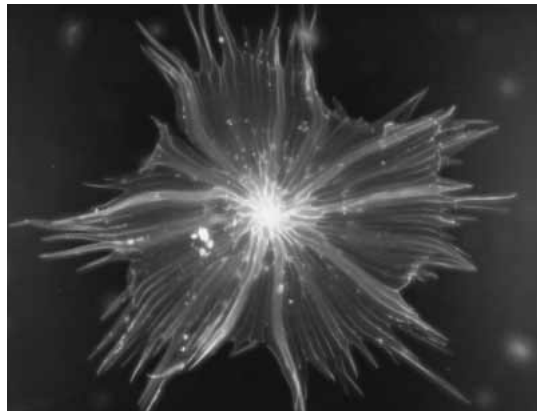
(a) A taken image.



(b) An All-Focused Image done inverse filter.

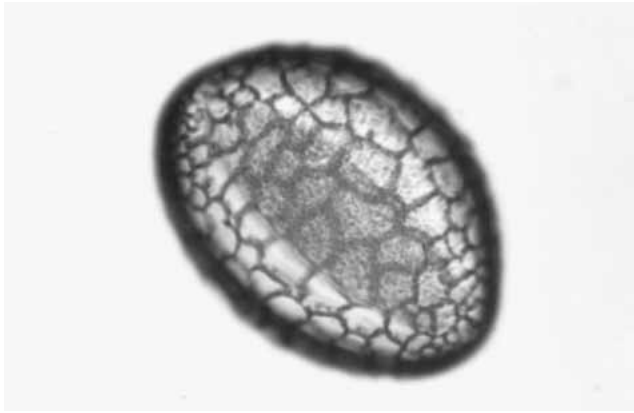


(c) An image reversed the light and shade of a red element of (b).



(d) An image reversed the light and shade of a green element of (b).

図 7 グミのりん毛
Fig.7 A rametum of *Elaeagnus*.



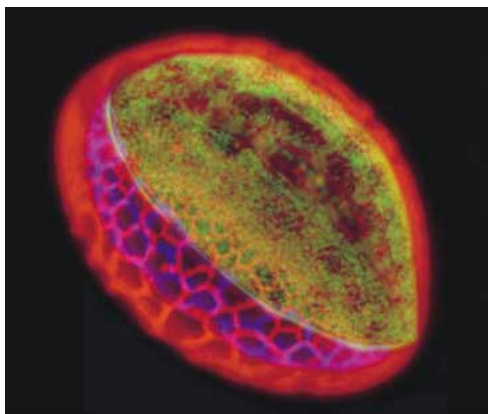
(a) An All-Focused Image made of 3 images of the bottom.



(b) An All-Focused Image made of 5 images of the middle.



(c) An All-Focused Image made of 5 images of the top.



(d) An All-Focused Image done pseudo-color and composed.

図8 ユリの虫媒花粉
Fig.8 A pollen of *Lilium*.

し画像処理技術によってより鮮明な画像を作成した．その中から結果が得られた3点を処理過程の説明を加えて図6～図8に示す．図6のカボチャの虫媒花粉は10 μ m毎に被写体の下側から上側にかけてレンズとの焦点距離を変えて10枚の撮影を行った．倍率は200倍である．図6(a)は撮影した画像の1枚である．撮影した画像をすべて逆フィルタしデジタル・フォト・コラージュ法によりぼけを除去した全焦点画像の図6(b)を作成した．試料の輪郭ににじみを確認できるため色分解し緑色の成分の画像の濃淡を反転し赤色の擬似カラーを図6(c)に施した．図7のグミのりん毛は5 μ m毎に19枚の撮影を行った．倍率は50倍である．図7(a)は撮影した画像の1枚であり図7(b)は逆フィルタ後の全焦点画像である．この全焦点画像は逆フィルタを行うことにより明度低下現象による画像中心部から離れた部分での明度の低下が強調されており図7(c)では赤色の成分にそして図7(d)では緑色の成分に色分解し濃淡を反転した．図8はユリの虫媒花粉であるがこの試料は表面と内部の構造が大きく異なり通常的全焦点画像では特徴を伝えることができない．そのため、1 μ m毎に35枚の撮影を行い被写体の下側からの1枚目から3枚目の3枚・21枚目から25枚目の5枚・31枚目から35枚目の5枚を逆フィルタし各々の全焦点画像の作成後に緑色の成分の画像(図8(a),(b),(c))の濃淡を反転した．倍率は100倍である．これらの画像からソフトウェアPhotoshopにより幾何補正を行う．それぞれ青色・緑色・赤色の擬似カラーを施して合成した画像が図8(d)である．

考 察

撮影に使用したデジタルカメラFUJIX DIGITAL CAMERA DS-565のCCDは、緑色の波長546nmの領域を鮮明に受光する性質があり赤色の波長700nmの領域は遮断する傾向にある．そのため、試料の本来持つ色により色分解後の処理方法が左右される．光源からの光が試料を透過することから内部で光を吸収したり反射する構造の試料は、結果が得られない場合がある．図8の結果のように幾何補正が必要になる画像は、非常に多くの処理時間が必要となりその処理方法に対する検討にも時間が必要となる．そのため、試料の資性を見極め使用目的を明確にして判断することが必要となる．

光学顕微鏡を用いてプレパラート標本を展示する際には、解説文のみでは来館者が特有性を観察しきれない場合がある．この場合、撮影された写真をその状態で示することは光学顕微鏡から観察する意義を薄弱化させ好奇心を低くする．そのため、写真にこれらの画像処理を加え鮮明な画像を作成しながらも色相を落としたり濃淡を反転させたり意図的に擬似カラーを施すなどの工夫が効

果的な展示へとつながる。よって、本稿での方法を提案する。また、画像処理に時間を費やすことはこの過程でも微細構造の観察が行えるために異なった視点から学術資料と接する機会となり有用である。

謝 辞

本稿を遂行するにあたり、光学顕微鏡の使用方法やプレパラート標本についてご助言やご討論を頂いた当館の自然研究科 小林真吾 学芸員、川又明德 学芸員に深く感謝の意を表します。

文 献

- 井上 勤 (1997) : 顕微鏡のすべて . 地人書館 , 東京 . pp.6-8 , pp.57-68 .
- 井上 勤 (1998) : 植物の顕微鏡観察 . 地人書館 , 東京 . pp. 224-233 .
- 加藤有次・鷹野光行・西源二郎・山田英徳・米田耕司 (1999) : 博物館資料の分類 , 博物館資料論 . 雄山閣出版 , 東京 . pp.26-45 .
- 木内雄二 (1992) : 画像入力技術ハンドブック . 日刊工業新聞社 , 東京 . pp.23-25 .
- 櫛田孝司 (1994) : 光物理学 . 共立出版社 , 東京 . pp.30-33 .
- 群馬県立自然史博物館 (1999) : ミクロの世界 . 群馬県立自然史博物館 , 群馬 . p.2 , pp.11-23 .
- 篠原功治 (2000) : 画像処理技術の学術資料への応用 . 愛媛県総合科学博物館研究報告 , 5 . 愛媛県総合科学博物館 , 愛媛 . pp.39-49 .
- 高木幹雄・下田陽久 (1995) : 画像解析ハンドブック . 東京大学出版会 , 東京 . pp.129-140 , pp.481-491 .