



1. 組織観察

1-5 組織写真のデジタル画像処理の基礎

小林 俊介*

1-5-1 はじめに

これから研究を始める学部生の方など初学者を対象として、撮影した組織写真を発表に使うための画像の取り扱いの基礎を解説していきます。最近の研究室では、アナログ画像を出力する装置は既に稼働しておらず、デジタルカメラ、光学顕微鏡や電子顕微鏡等から出力される組織写真は全てデジタル画像と言われる画像となっていると思います。デジタル画像とは何かということを知らなくても、ソフトウェアの機能で濃淡調整、画像の切り抜き、拡大縮小や回転といった画像処理を行うことができます。一方で、デジタル画像を理解した上で画像処理を行うことで、画像処理に伴う画像の変質(劣化)を理解することができます。また、画像から情報抽出や計測などの画像解析を行うための基礎を身につけることができます。そこで、前半はデジタル画像の基礎、後半に画像処理方法やその注意点を説明していきます。

最終的に「0 と 1」の2進数で表現ができるため、コンピューター上で取り扱うことができます。そのため、画像処理や複製が簡単に行え、取り扱いが非常に簡単に行える特徴があります。

実際のデジタル画像のデータ構造を見ていきます。図1に示す様に、デジタル画像を拡大すると一つ一つ正方形の格子が並んでいるのが分かります。この画像を構成する最小要素のことを画素(ピクセル: pixel)と呼びます。さらに、各画素は値をもっており、この値のことを画素値といいます。デジタル画像は画素値によって、大きくカラー画像とモノクロ画像に分類できます。カラー画像の代表例はRGB カラー画像です。図1に、本来の画像データ構造とは異なりますが、分かりやすく表記を変えたイメージ図を示します。RGB カラー画像の画素値には3種類の値が含まれます。これは赤(Red: R)、緑(Green: G)、青(Blue: B)の色成分を示しています。この3色は我々が使っているディスプレイの発光

1-5-2 デジタル画像の基礎知識

1-5-2-1 デジタル画像とは

アナログとデジタルという言葉を見たことがあると思います。このアナログ画像とデジタル画像の違いを理解することが第一歩となります。私たちが認識している自然界は連続的に変化しているアナログです。最近では使う機会が少なくなりましたが、フィルムなどに撮影した画像はアナログ画像となります。アナログ画像では非常に滑らかに画像を表現することができます。CCDやCMOSなどのイメージセンサで撮影した画像はデジタル情報となり、デジタル画像と呼ばれています。このデジタル画像はとびとびの値で変化し、中間値を取らないという特徴があります。この特徴により一般的なデジタル画像では画像の滑らかさではアナログ画像に劣ることになります。一方で、このデジタル画像のデータ構造は

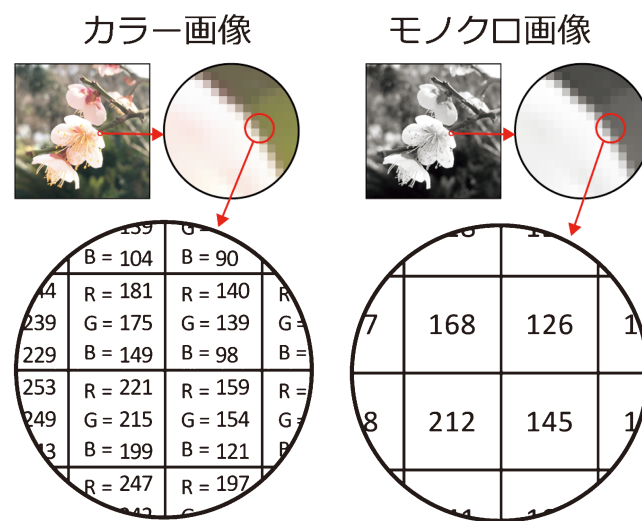


図1 デジタル画像のデータ構造イメージ図。

* 非営利・一般財団法人ファインセラミックスセンター(JFCC) ナノ構造研究所電池材料解析グループ; 上級研究員
 Keywords: micrograph, digital image, grayscale image, color image, image processing, resolution
 (組織写真, デジタル画像, グレースケール画像, カラー画像, 画像処理, 解像度)
 2022年1月25日受理[doi:10.2320/materia.61.218]

素子に対応しています。言い換えれば、ディスプレイ上で表現される色の情報を RGB カラー画像は持っていることとなります。各色の成分は 8 ビット (0~255) の値を与えられており、3 成分全てで表現できる色は 24 ビット (8 ビット×3) となります。このことから、RGB カラー画像は 24 ビットカラー画像とも呼ばれています。数に直すと $256^3 = 16,777,216$ 色 (約 1677 万色) となり、ほぼ全ての色を再現可能であると言えます。モノクロ画像の画素値はカラー画像と異なり、輝度に対する数値で与えられます。そして、この画素値に対して黒から白までのグレーで表示されます。このことから、モノクロ画像はグレースケール画像や強度画像と呼ばれています。

1-5-2-2 デジタル画像の階調

先ほどのデジタル画像の説明で「ビット (bit)」という言葉を使いました。このビットとはコンピューター上で使うデータの単位を意味します。1 ビットでは「1 か 0」の 2 つの情報、2 ビットでは 2×2 の 4 つの情報を示すことができます。カラー画像においても 24 ビットカラー画像や 48 ビットカラー画像、モノクロ画像でも 8 ビットグレースケール画像や 16 ビットグレースケール画像のように、画像の持っている情報量 (階調) で呼び方を変えたりします。ここでは、グレースケール画像を用いてビット数の違いによる画像の変化を見ていきます。

まず、模式的に示したアナログ画像では滑らかにコントラストが変化していることが図 2(a) から分かります。一方、デジタル画像では 1 ビットでは白と黒の 2 階調、2 ビットでは 4 階調とビット数が大きくなるにつれてコントラスト変

化が滑らかになっていくことが分かります。8 ビット (256 階調) と 16 ビット (65536 階調) では見分けがつかません。これは一般的なディスプレイで表現できる階調は 8 ビットのため、16 ビット階調をディスプレイでは表現することができません。そのため、図 2 に示している 8 ビット以上の画像とアナログ画像は 8 ビット画像と同じ階調で表示されています。また、8 ビットのグレースケール階調を限りなく真の値で線形的に表現できるディスプレイは非常に高価となります。おそらく、使っているディスプレイによって、それぞれ見え方が異なっているはずですが、もし、電子顕微鏡画像などグレースケール画像を良く使う必要があれば、グレースケール画像の階調が概ね正しく表現できるディスプレイを使うと良いでしょう。

8 ビット以上では視覚的に変化が分からないため、学会発表などで使う画像としては 8 ビット画像で十分となります。実際に図 2(b) の写真に示す通り、8 ビットでは十分滑らかな画像となっています。1 ビット (2 階調) 画像は白と黒のみで表現するため 2 値化画像とも呼ばれ、特定の領域を識別するときなど画像解析に多く用いられています。また、16 ビット以上の画像では視覚的に変化が分かりませんが、濃淡調整の際に差が表れてきます。この点に関しては、後ほど改めて説明します。

1-5-2-3 デジタル画像の座標

デジタル画像の座標に関しては、既存のソフトウェアを使って画像処理を行うだけであれば、そこまで重要ではありません。ただし、画像解析をする際など将来的に役立つ知識となると思います。図 1 に示したようにデジタル画像のデー

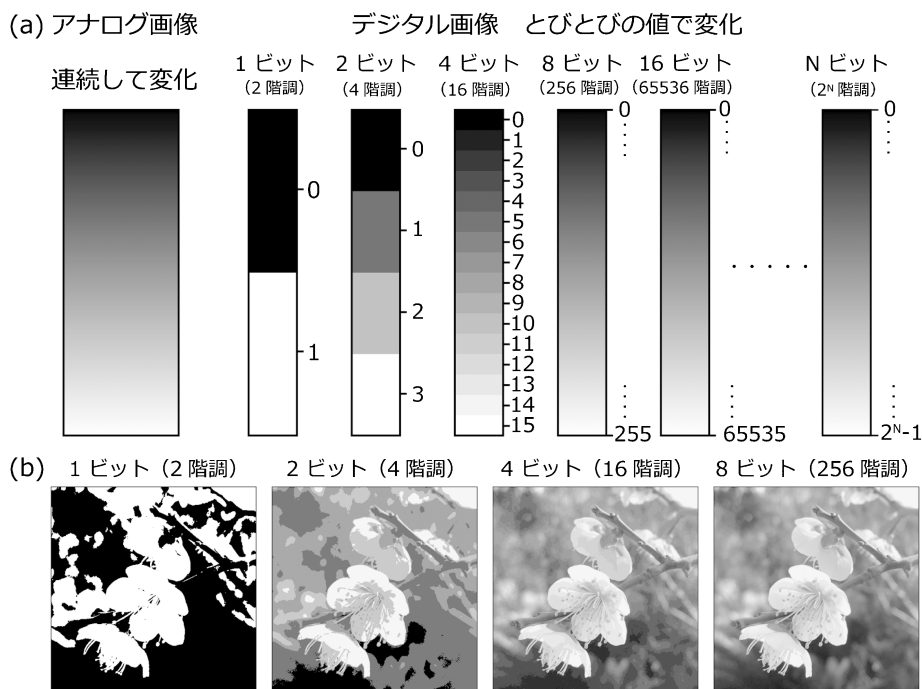
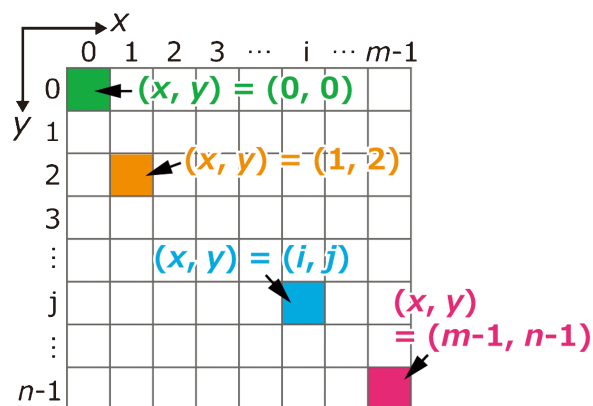


図 2 (a)アナログ画像とデジタル画像の違い。図面化のため全て 8 ビット画像へ変換した画像で示す。(b) 1 ビット, 2 ビット, 4 ビットと 8 ビットでの画像変化。

画像の左上が原点 (0,0)、y は下方向が正



例) 512×512 画像



図3 デジタル画像の座標系.

タ構造は全て数値で表すことができます。そして、これらの数値は座標で示すことができます。一般的にデジタル画像の原点と座標は図3に示す通り、画像の左上が原点となり、xは右方向を正に、yは下方向を正にとります。これは、コンピューターを用いた画像処理が左上の画素から行われていくためです。そのため、デジタル画像ではここに示した座標系をとるのが一般的です。

1-5-2-4 デジタル画像形式の種類と特徴

デジタル画像は様々なファイル形式が存在します。各ファイル形式にはそれぞれ特徴があり、目的に応じて使い分けると良いでしょう。ここでは、組織写真を取り扱う上で必要となる各画像形式を表1にまとめました。基本的に組織写真は全てTIFF形式にしておけば間違いありません。これは、画像処理に使う画像は非圧縮形式が望ましいためです。既に圧縮されたJPEG等の形式は、画像が劣化しているため、元画像として画像処理には用いないことが基本となります。そのため、各装置で観察した画像データはTIFF形式で保存しておくことをお勧めします。ただし、TIFF形式は無圧縮画像のため容量が大きくなるデメリットがあります。このTIFF形式にはLZW圧縮を代表として様々な画像圧縮形式があり、画質を保ったまま圧縮が可能です。

JPEG形式は画像圧縮形式ですが、良い画質を保つことができ、データ容量も小さいという特徴があります。また、アニメーション動画(パラパラ動画)を作成できるGIF形式や

表1 組織写真に使うデジタル画像のファイル形式と特徴.

ファイル形式	読み方	拡張子	研究用途	特徴
TIF/TIFF	ティフ	.tif/.tiff	画像処理, 画像解析, 図面, 動画	汎用性が高く非圧縮画像
GIF	ジフ	.gif	アニメーション動画	アニメーション動画
PNG	ピング	.png	Web掲載用, 図面	背景の透明化が可能 可逆式圧縮画像
JPG/JPEG	ジェイペグ	.jpg/.jpeg	Web掲載用, 図面	データ容量小 圧縮画像である が高画質

データ容量を小さくしながら透明背景ができるPNG形式など、目的に応じてファイル形式を使い分けると良いでしょう。ただし、これらの動画作成や背景の透明化なども、データ容量を気にしなければTIFF形式で対応可能です。研究用途でTIFF形式が使えない状況はホームページWeb掲載用の図面として使用する時となります。その場合は、TIFF画像をWebで掲載可能なファイル形式であるJPEG形式やPNG形式へ変換すれば良いでしょう。また、RAWデータやテキストイメージ(Text Image)等の重要なファイル形式が多くありますが、応用となりますので将来的に様々な画像処理をする可能性がある方は、調べておく良いでしょう⁽¹⁾。

1-5-3 組織写真の基礎的な画像処理

1-5-3-1 組織写真の画像処理に関して

学会発表や学術論文に使う組織写真は、撮影したままの画像を使うことはほとんどありません。画像の濃淡調整、回転、拡大縮小といった画像処理を行った後、スケールバーを入れて図面化した画像を使います。これは、他の研究者に対して、組織写真から得られた知見を分かりやすく伝えるための画像処理となります。これらのデジタル画像処理が数学的に何をしているか、また、応用となる画像処理に関しては数多くある専門書⁽¹⁾⁽²⁾にお任せして、撮影した組織写真を発表に用いるための画像処理を主体として説明をしていきます。

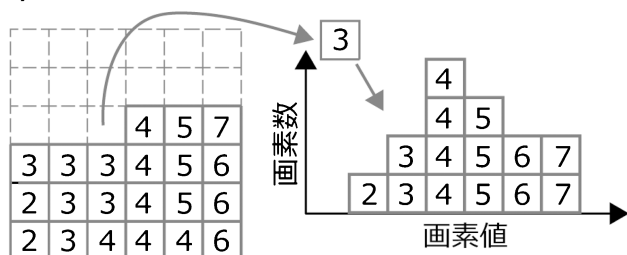
始めに撮影した組織写真から発表用の図面化までの画像処理の一連の流れを示します。まず、観察した組織写真の画像は、伝えたい箇所の組織が見やすいように濃淡調整をします。最初に濃淡調整をする理由は、画像処理(回転や拡大縮小)の過程で画像劣化が生じる可能性があり、元画像を使った方が良いためです。次に、画像データの向き(回転)、大きさ(拡大縮小)や必要に応じて画像の必要な部分を残して切り抜きなどの調整をします。この時、図面を貼り付ける発表スライドもしくはA4用紙に合わせて画像の縦横の大きさを決めておく良いでしょう。次に、調整した画像にスケールバーや文字を入れて適切な解像度へ変換し図面化していきます。それでは、下記に各項目について注意点を踏まえて説明していきます。

1-5-3-2 濃淡調整

組織写真において画像の明るさやコントラストを変化(濃淡の変化)させることで組織を見やすくする画像処理である濃淡調整(階調変換)を説明します。この濃淡調整を行う上で重要な指標となるのが画像の画素値の頻度(ヒストグラム)になります。ここでは8ビットグレースケール画像を用いて説明をしていきます。まず、グレースケール画像の画素値は輝度情報に対応する値を持っていきます。図4(a)に画素値を横軸、画素数の頻度を縦軸とした各画素値の画像上での出現頻度を簡易的に表した模式図を示します。このグラフは濃淡ヒストグラム、もしくは単にヒストグラムと呼ばれています。このヒストグラムを見ることで画像の性質(暗い画像や明るい画像など)を把握することができます。また、RGBカラー画像においても、赤(R)、緑(G)、青(B)の3成分のヒストグラムを同様に求めることができます。

図4(b)に組織写真を示します。実際には16ビットグレースケール画像を使い濃淡調整を行っていますが、ここでは模式的に8ビットグレースケール画像へ変換した画像を用いて説明していきます。この組織写真は、酸素欠損を含むストロンチウムマンガンナイト薄膜を透過型電子顕微鏡の暗視野法で取得した組織写真です⁽³⁾。この組織写真の画素値をヒストグラムで表した結果を図4(b)に示します。8ビット画像の階調0から255までの範囲で組織写真の画素値の分布がどのようになっているのかが分かります。ここで、0に近い画素値は暗い値(黒に近い階調)を意味しており、255の方では、明るい値(白に近い階調)をもつことを意味しています。ここでヒストグラムを見てみると、全体的に暗い値を持つ画素値が多いことが分かります。実際に、組織写真を見てみると、暗く

(a) 各画素の画素値とヒストグラムの模式図



(b) 組織写真とヒストグラム

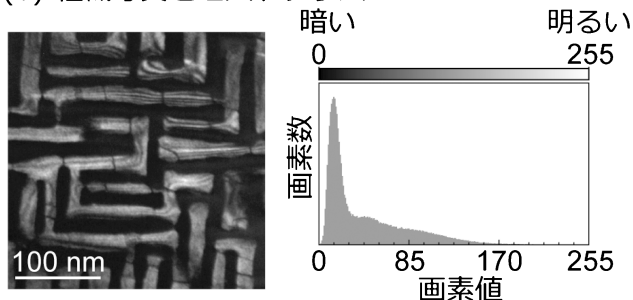


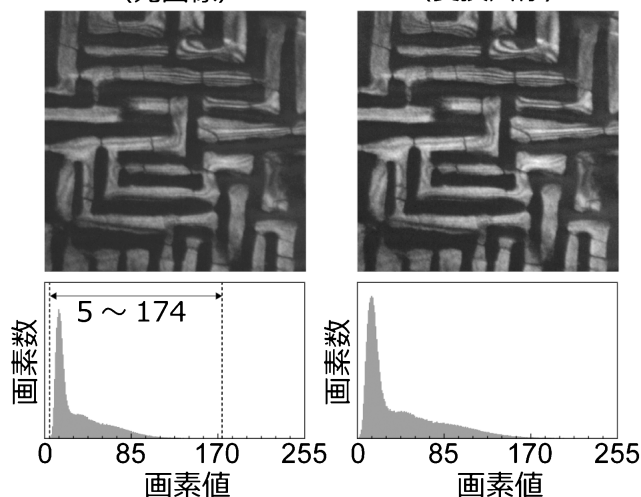
図4 (a)画像のヒストグラムの模式図。(b)実際の組織写真とヒストグラム。

見える領域が多いことが分かります。この様に、画素値のヒストグラムを見れば、画像の性質を理解することができます。

実例を用いて濃淡調整を説明していきます。本質的に理解するためにはコントラストを定量的に扱う方法(マイケルソンのコントラスト)やトーンカーブ(階調変換関数)を理解する必要があります。興味がある方は調べてみると良いでしょう⁽¹⁾⁽²⁾。ここでは、組織写真の濃淡調整においてヒストグラムにおける画素値の範囲を変化させる画像処理を説明します。専門的な言い方をすれば折れ線型トーンカーブによる変換となります。

図5(a)に組織写真の観察時の画像(元画像)を示します。便宜的に回転処理を行っていますが、濃淡調整はしていません。また、スケールバーは敢えて入れていません。ここで、元画像は全体的に暗い画像であることが分かります。元画像の画素値は最小値5から最大値174の範囲となります。この

(a) 観察時の取得画像 (元画像) (b) 濃淡調整の一例 (変換画像)



(c) 不適切な濃淡調整例

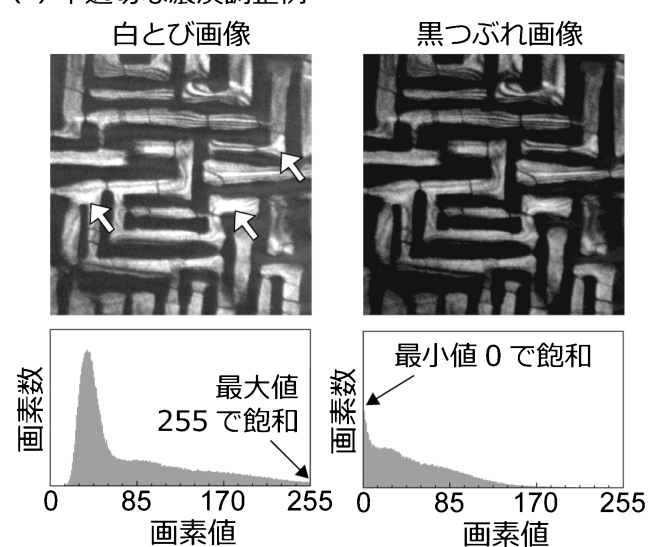


図5 (a)観察時の取得画像(元画像)と(b)濃淡調整の一例(変換画像)。(c)不適切な濃淡調整例。

最小値5から最大値174を0から255まで線形的に画素値の範囲を広げた画像(変換画像)を濃淡調整の一例として図5(b)に示します。観察時の画像よりも明暗が分かりやすくなり、組織が鮮明になっています。この様にヒストグラムの画素値から濃淡調整を行うことで画像を視認しやすことができます。

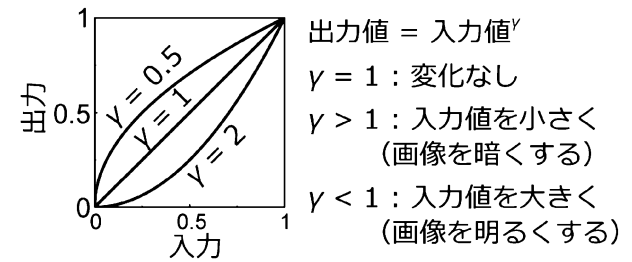
ここで、濃淡調整を行う際に白とびや黒つぶれなどが生じ、本来の情報が消えてしまうことがあります。元画像の0から100の階調範囲を広げることで白とびした画像(図5(c)の白とび画像)を見てみると、矢印で示した箇所は全て白くなっており、組織の情報が無くなっていることがわかります。ヒストグラムをみると最大値255のところで画素値が飽和しており、本来、100以上の階調を持っていた画素が白く表示されていること意味しています。また、元画像の20から255の階調範囲を広げた画像(黒つぶれ画像)では、逆に画素値0で飽和していることがヒストグラムからわかります。この画素値0の画素を含む箇所では黒つぶれが生じており、やはり組織の情報が無くなっていることが組織写真からわかります。このことから分かるように、組織の情報が消失しないよう濃淡調整は白とびや黒つぶれが無く、画像が持っている画素値が全てヒストグラム内に収まるように調整を行う必要があります。

組織写真の元画像で画素値が飽和している場合は、濃淡調整をしても意味がありません。デジタル画像は取得後に濃淡調整ができるため、組織写真を取得する際には、明暗が分かりにくい場合でも画素値が飽和しないよう元画像を取得するよう心がけましょう。

濃淡調整には曲線のトーンカーブを使うことで、画素値の欠損(白とびや黒つぶれ)させずに画像変換を行い、明暗をはっきりとさせることができます。そのため、強い強度に埋もれた非常に弱い強度領域を強調する際に有効な画像処理となります。この曲線トーンカーブの代表的な画像変換に γ 変換があります。 γ 変換は各画素の画素値の入力値と出力値において(出力値) = (入力値) $^\gamma$ の関係で与えられます。図6(a)に $\gamma=0.5, 1, 2$ の場合の入出力の関係(γ カーブ)を示します。また、横軸と縦軸のスケールは階調で規格化した値を示しています。例えば、8ビット画像の場合には、画素値を255で割った値が、その規格化した値となります。 $\gamma=1$ では線形であり、画像の画素値は変わりません。 γ が1より大きい場合には、入力値を小さくすることで画像全体が暗くなります。 γ が1より小さい場合には、入力値が大きくなり画像全体が明るくなります。実際に γ 変換を行った画像とヒストグラムを図6(b)に示します。 $\gamma=1$ の組織写真は図5(b)と同じ画像となります。 γ を変化させることで、画素値を飽和させることなく、明るい画像($\gamma=0.8$)や暗い画像($\gamma=1.2$)へ変換できていることがわかります。

濃淡調整を行っても組織の明暗をはっきりとさせることが難しい場合があります。例えば、図7のグレースケール画像の様な場合です。画素値90, 80, 70の各領域は強度が近いため、視認しづらくなります。また、この画像は画素値2と

(a) γ カーブ



(b) γ 変換画像とヒストグラム

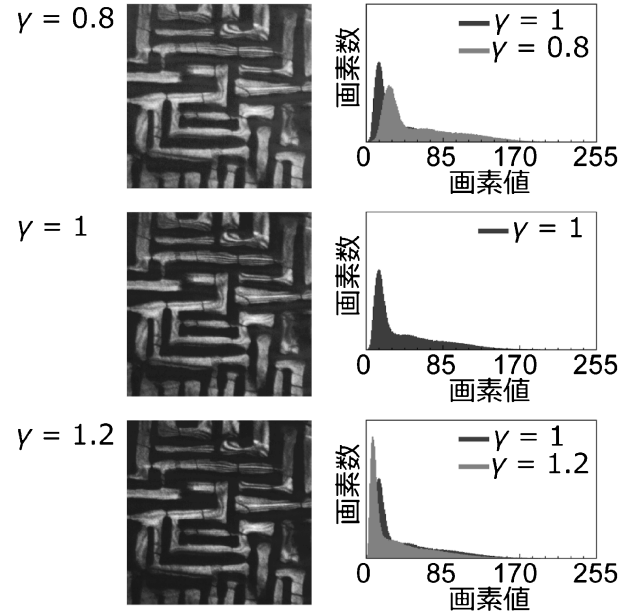


図6 (a) γ カーブ(b) γ 変換画像とヒストグラム。

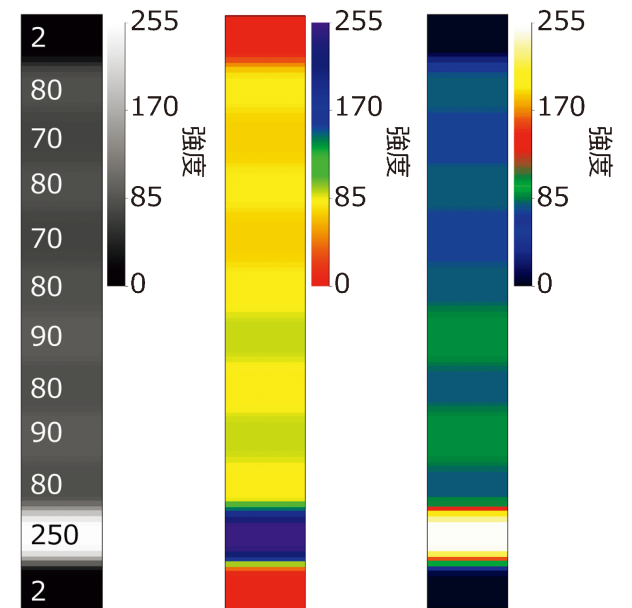


図7 グレースケール画像のカラーマップ画像への変換例。グレースケール画像中の数値は画素値を示す。

250が含まれているため、線形的に画素値の範囲を広げたとしても明暗のコントラスト比を大きく改善することができません。このような場合、各画素値の強度をカラーマップ強度へと置き換えることで、組織を見やすくすることができます。実際にこのグレースケール画像をカラーマップ画像へと変換した例を図7に示します。画素値90, 80, 70の領域が見やすくなっていることが分かります。また、カラーマップ画像へ変換した画像を使う場合は、各色に対する強度が分かるように必ずカラースケールバーと一緒に示すようにしましょう。

濃淡調整に関して注意点を明記しておきます。γ変換を含む曲線トーンカーブを使った画像変換では不都合な情報を見えにくくしたり、本質とは異なる組織を強調して見せたりすることもできてしまいます。必ず元画像に含まれている情報が、変換画像に正しく残っているかを確認する必要があります。そのためには、画像処理の知識だけではなく、材料学や観察装置からの出力データの強度や色調がどのようなものかを正しく理解する必要があります。もし、画像データの強度情報そのものに意味がある場合は曲線トーンカーブを使った画像処理はすべきではありません。また、組織写真においては折れ線型トーンカーブを使った濃淡調整のみで十分な場合が多く、必要がなければ曲線トーンカーブを使った画像処理はしない方が良いでしょう。以上のことから、発表などで曲線トーンカーブにより特定の画素値を強調した画像を使う場合は、元画像(もしくは線形的な濃淡調整した画像)も一緒に示すと良いでしょう。

また、濃淡調整は16ビット以上の階調を持つ画像を使用する方が適しています。これは、16ビットでは65536階調あり、ある特定の画素値の領域を広げた場合でも、画素値の連続性のとび(欠損)が少なくなるためです。そして、発表用に図面化する際に16ビットから8ビット階調へ変換すれば、画素値の欠損はほぼ無視できるようになります。そのため、8ビット画像で濃淡調整をするよりも16ビット画像で濃淡調整を行い8ビット画像へ変換した画像の方が、画像の質としては良くなります。

将来的に SNR(signal-to-noise ratio)の悪い画像(ノイズの多い画像)を取扱うことができるとおもいます。その際は画像処理の一つであるフィルタ処理が有効な手法の一つになります。様々なフィルタ処理方法がありますので、是非調べてみてください⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾⁻⁽⁶⁾。ただし、フィルタ処理もγ変換と同様に不都合な情報を見えにくくできてしまいます。そのため、フィルタ処理を行う際は、その処理がどのような原理なのかを理解する必要があります。また、フィルタ処理画像を使う場合は、フィルタ処理の方法を必ず明記するようにしましょう。

1-5-3-3 画像の回転, 拡大縮小, 切り抜き

発表に用いる組織写真は画像の回転, 拡大縮小, 切り抜きといった画像処理を行うことにより、着目してほしい組織構造を見やすくなります。これらの画像処理は様々なソフトウェアで感覚的に行うことができます。また、これらの画像処

画像処理 (回転と拡大縮小)

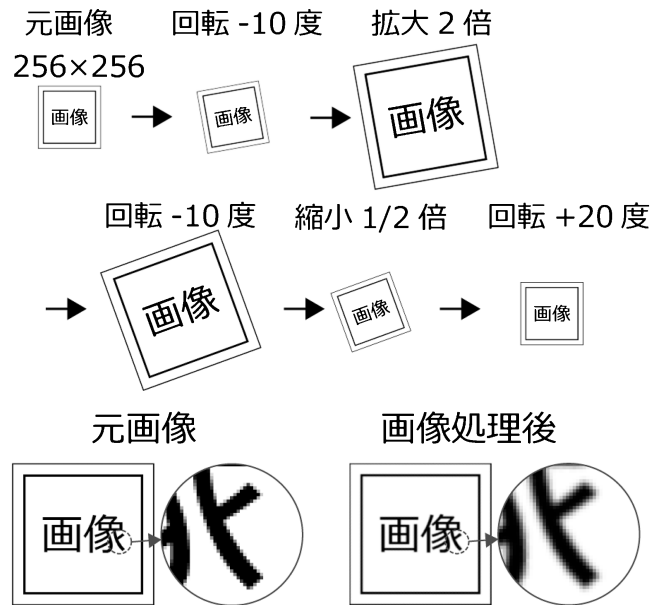


図8 回転と拡大縮小による画像変化の例。補間処理はBilinearにより実施。

理にも色々な処理が行われています。もし興味がある方は、画像処理の線形変換やアフィン変換という項目を調べてみると良いでしょう⁽¹⁾⁽²⁾。

ここで、デジタル画像は正方格子に並んだ画素の集合体であることを説明しました。そのため、単純に画像を回転や拡大縮小させると画素の欠け(欠損)が生じるため、この欠けた画素の補間処理(画素の内挿)が行われています。良く使われる補間処理はBilinear(最近傍の2×2の画素の加重平均)やBicubic(最近傍の4×4の画素の加重平均)があります。つまり、90度、180度回転や反転の場合は問題ありませんが、ある任意の回転や拡大縮小させた画像はオリジナル画像とは完全に一致せず、ある程度の画像劣化が生じることとなります。実際に画像処理を行った画像の変化例を図8に示します。画素の補間処理により、境界部分がにじんだ様に見えるのが分かります。回転や拡大縮小を行う際は必要最小限の回数で行うことが望ましいと言えます。

1-5-3-4 適切な解像度と画像の縦横サイズ

デジタルカメラなどで1200万画素や2400万画素のような言葉を聞いたことがあるかと思いますが。一般的に撮影した画像の画素数が多いほど、高精細な画像となります。しかしながら、画素数の多い画像はデータ容量が大きくなり、取り扱いが大変になります。そこで、濃淡調整や画像の回転等の画像処理を行った後、発表に使う画像は、どの程度の画素数で表示すれば良いかについて説明します。

重要な指標として解像度という言葉があります。この解像度を理解しておく最適な画像サイズ(容量)で発表用の画像を準備することができます。デジタル画像の解像度は1インチ(25.4 mm)あたりの画素数で定義され、dpi(dots per

