

研究室での画像処理:

ImageJの使い方・基礎編

研究室で扱う画像には、western blotなどの電気泳動ゲル画像や蛍光顕微鏡画像があります。一般的に使われる画像編集ソフトとしては、Photoshop (有料) がありますが、研究室では必ずしも必要ありません。むしろ、非線形のトーンカーブやブラシなど、写真のレタッチ (修正) のためのソフトであるため、理解せずに使うと研究不正に該当する行為を気づかずにしてしまう危険性があります。

ここでは、米国NIH (National Institute of Health) でサイエンス向けの画像処理ソフトとして開発されたImage Jの使い方を紹介します。フリーで使え、WindowsでもMacでも同じように使用可能です。また、サイエンス向けであるがゆえに余計な機能はなく、誤って使用すべきでない機能を使ってしまうリスクを避けられる利点があります。ソフトウェアとしての使いやすさ (メニューのわかりやすさ・ユーザーインターフェイスの使いやすさ) は、有料のソフトには劣るものの、研究室に必要な (基本的な) 画像の取り扱いには十分な機能があります。

このチュートリアルでは、研究室で画像を取り扱う上での基本事項を理解し、Image Jを研究室での日々の画像処理に使えるようになることを目標とします。

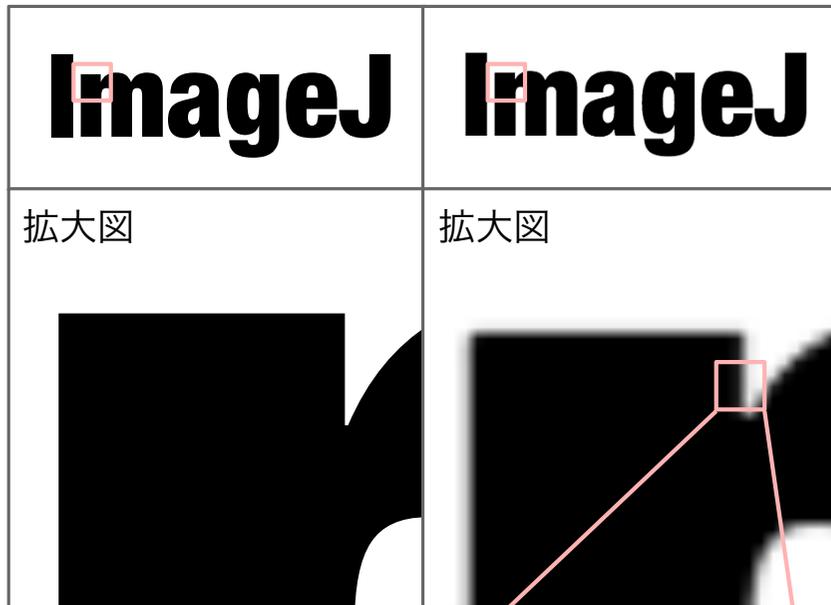
ベクター画像とビットマップ画像

■ ImageJで扱う画像データはビットマップ

顕微鏡写真やゲル画像は、ビットマップ画像。ビットマップ画像は数値 (intensity)の集まりである。

ベクター画像

ビットマップ画像



さらに拡大

0	26	234	255
0	26	234	255
0	26	232	245
0	26	238	131

8-bit モノクロ画像の例

0から255までの256階調で濃淡が表現される。

Bitに関しては後述。

ベクター画像

ベクター画像とは、線や図形を「どこに何を描く」といった指示の集まりでできた画像。拡大してもビットマップのようにギザギザが見えない。ベクター画像を扱える代表的なソフトウェアは、Adobe Illustrator (.ai)やPowerPoint (.pptx)、ChemDraw (.cdxml)、InkScape (.svg)などがある。また、PDFの文字などもベクターである。なお、ベクター画像の中にはビットマップ画像を配置することもできる。

概してファイルサイズはビットマップより軽い場合が多いが、非常に複雑な画像の場合はビットマップよりも重い画像になりうる (その場その場で描画するので遅くなる)。

ビットマップ画像

ビットマップ画像とは、ドット(ピクセル)の集まりでできた画像で、マス目にintensityを表す数値が入ったもの。拡大するとピクセルが見えてくる点がベクター画像とのわかりやすい違い。顕微鏡やゲルの写真はビットマップ画像。ImageJやPhotoshop、Paint (Win)やGimpなどが代表的なソフトウェア。

ビットマップ画像のResolutionとDepth

■ 解像度 (resolution, dpi = dot per inch)

解像度 (resolution)は通常 dpi で表される (2.54 cmあたりのピクセル数)。

■ Bit深度 (bit depth)

Bit depthは、白-黒 (暗いところから明るいところ)までの階調の数を表す (N bitは2のN乗だけの階調数)。極端な例をあげれば、1bitの画像は白黒の二値画像を表す。2bitであれば、白-白系グレイ-黒系グレイ-黒の4階調となる。よく使われるのは8 bit画像で、0-255までの256段階の階調を表現できる。8 bitは人の目でみて十分に滑らかな階調を表現できるが、intensityという観点ではdynamic rangeは狭い (300倍差の強度差は表現できない)。そのため、サイエンティフィックな場面では16 bit画像が現在は主流であり、65536階調を表現できる。これは10000倍以上の強度差に相当し、顕微鏡画像やゲル画像の定量には十分なdynamic rangeがある。

ファイルのサイズという点では、8bit画像は16bit画像の半分のサイズとなるため、定量目的ではない場合は8bit画像で十分である。また、(一般の)viewerでは16bit画像がうまく表示されない場合がある (Windowsのデフォルトviewerでは開けない)。

16-bit画像 v.s. 8-bit画像

顕微鏡やイメージャーから保存できる形式として、16-bit TIFFファイルがおそらく標準的と思われる。しかしながら、16-bit TIFFファイルは(サイズによるが)5MB/imageと比較的ファイルサイズが大きい。顕微鏡やイメージャー付属ソフトウェアによっては、8-bit TIFFに変換して保存することができ、ファイルを軽くするという点では便利である。

ただし、8-bitへの変換は、65536階調の強度差を表現していたデータをわずか256階調に圧縮することであり、強度のデータはかなり失われることは理解しておくべきである。また、多くの場合、8-bitへの変換時にスケーリングが行われている。例えば、16-bit画像でintensityが0から10000まで含まれていた場合、この最小値から最大値までを8-bitに変換するため、強度10000のピクセルは強度255へ変換される。このような変換は画像ごとに行われるため、画像間の定量的な比較はできなくなる。

よって、用途によっては8-bitへの変換を用いることは構わないが、生データは外付けハードディスクやサーバーに残しておくべきである。

主なビットマップ画像の種類と拡張子

- 研究で用いるビットマップ画像の基本は **vendor specific format**か**TIFFファイル**。解析目的ではなく、実験ノートやプレゼンテーション資料にはサイズの小さい**JPEG**も**OK**。

生データとしては、TIFFかvendor specific formatのデータを残しておく (論文発表時に必要)。

TIFF (Tagged Image File Format): 研究で用いる画像データの標準的なフォーマット。一般的な画像処理ソフトウェアで読み込める。可逆的なLZW圧縮に対応はしているが、基本的にはファイルサイズは大きい (1-3MB)。

JPEG: 不可逆でロスのある圧縮 (細部の情報が失われる) をするので、解析目的の画像には不向き。ただし、圧縮率を指定可能で、ファイルサイズを大幅に減らすことができる (100-300KB)。

PNG (Portable Network Graphics): 可逆圧縮であり、TIFFよりは軽いがJPEGより重い (500-1MB)。研究目的ではJPEG同様、解析目的の画像には不向き。背景が透明な画像を作成できるため、プレゼンテーション用の図の作成には有用。

Vendor specific format

蛍光顕微鏡やイメージャーの付属ソフトからデータを保存する場合、そのメーカー (あるいはソフトウェア)オリジナルのファイル形式で保存される場合が多くある (.lsmや.ccdや.img)。このようなvendor specific formatには、測定条件やセッティングなどのメタ情報が保存されていることと、binary (数値をtextではなく0/1のコンピューター内の「言語」) として画像を保存するため、ファイルサイズが軽くなるという利点がある。一方で、専用のソフトウェアでしか開けないという欠点もある。

複雑な機器設定を含む場合(共焦点顕微鏡など)は、vendor specific formatを生データとして残し、別に16-bit TIFFなどの一般的なフォーマットで書き出しておくことを勧める。ゲル画像などあまりメタデータがないものは最初から16-bit TIFFで保存するように設定しても良い。

なお、CarlZeiss .lsmなどのvendor formatでも、ImageJのバリエーションであるFijiや、Image JのBio-formatプラグインを用いることで開くことが可能である。

サイエンス向けの画像処理ソフト Image J

■ 研究室での基本的な画像の取り扱いは ImageJで十分

研究目的の画像処理では、有料のPhotoshopを使う必要性はあまりない。むしろ、Photoshopは写真の修正などが本来の用途であり、サイエンス分野では使うべきではない機能も多い。その点で ImageJは誤って使ってはならない機能を使ってしまう危険性は低い。

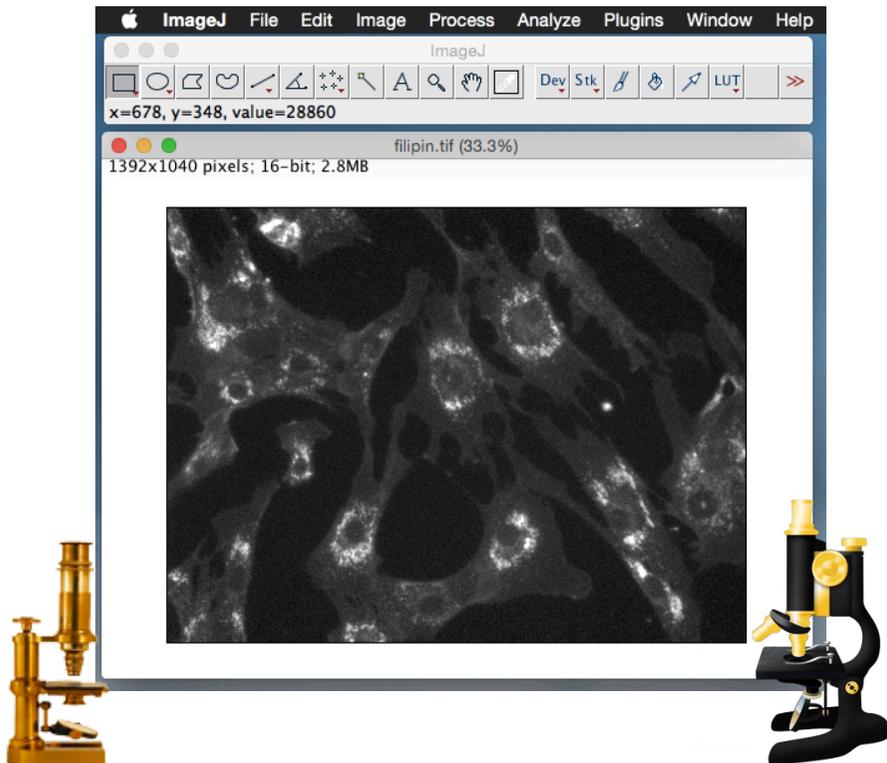


Image Jの入手

NIHより入手: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

ImageJ.netから入手: <https://imagej.net/ImageJ>

Image Jのバリエーション

ImageJには現在複数のバリエーション(亜種)が存在する。上記二つは本流と思われるものである。

有名なバリエーションとしてFijiがある。サイエンス分野でよく使うプラグインをまとめたもので使い易い(この資料でImage Jを説明しているのは、単純に筆者は説明できるほどFijiを使っていないため)。Fiji: <https://fiji.sc>

新しいバリエーションの一つに、ImageJFXがある。これはImageJのユーザーインターフェースを改良したもので、ImageJの「使いにくさ」を改善している。データのブラウズ機能なども加わり、商用ソフトウェア並みに使いやすくなっている。今後、ユーザーが増える可能性がある。ただし、2017.5現在、Mac用はまだベータ版で安定に動作せず(OS X 10.10 Yosemiteでテストしたところ、動作はするが多少エラーがでている)、Enhance Contrastなどの機能が見当たらないなどの問題もあると思われる。

ImageJ^{FX}: <http://www.imagejfx.net>

Image Jの基本操作

- Image Jは、直感的にはやや使いにくいところがあるが、良く使う機能がどこにあるかだけ把握すれば問題ない。

商用ソフトウェアに比べてImageJが使いにくい理由は、よく使う機能が使いやすい位置に分かりやすい形で配置されていないことによると思われる。各機能については後述するが、どこに何があるかを把握しておくが良い。画像の拡大・縮小はタッチパッドやスクロールではできず、ズームツールを使うかキーボード (+ or -)を使うことに注意。

Image J ファイルメニュー



Image J ツールバー



ImageJの良く使う機能

良く使う機能を挙げておく。

- Rectangular選択ツール
- ズーム (キーボード+ or -)
- Stackでスライス間を移動 (←→)
- File > Save As
- Edit > Invert
- Image > Type
- Image > Color > Merge channels
- Image > Crop
- Image > Duplicate
- Image > Adjust > Brightness/Contrast
- Image > Lookup Table
- Image > Stacks > Images to stack
- Analyze > Measure
- Analyze > Tools > ROI Manager
- Analyze > Plot profile
- Process > EnhanceContrast

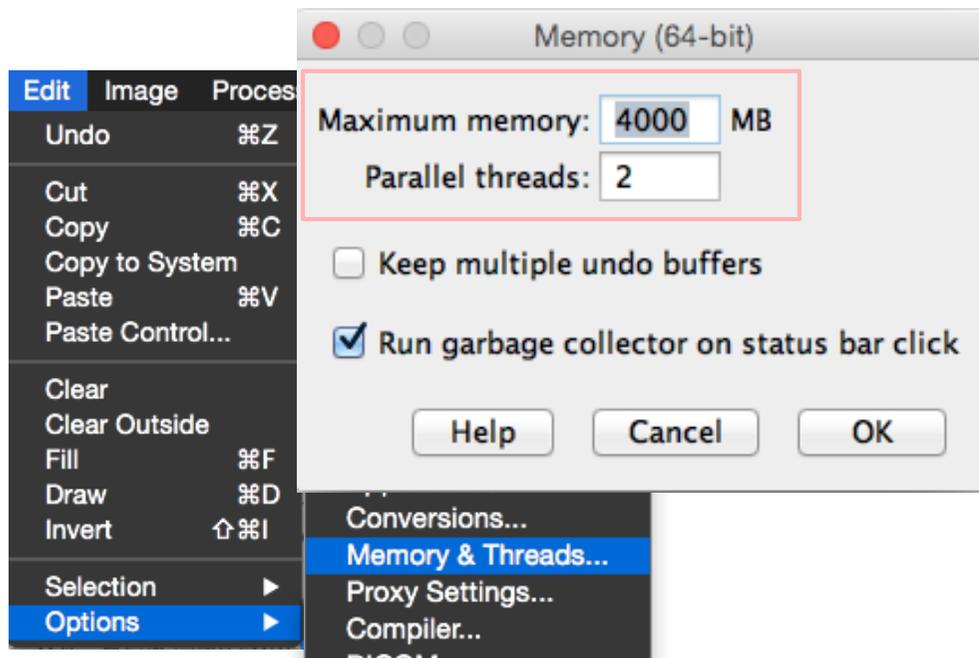
(補足) Image Jのメモリとコア(スレッド)数の設定

■ メモリは実際のメモリの半分に設定

Image Jが使用可能なメモリは、PCの実際のメモリの半分程度に設定する(必要であれば増やす)。多くの画像を読み込んだりしないのであれば、通常は事足りる。

多くの場合、他のソフトウェアも使いながらImage Jを使用するので、Image Jだけでメモリを占有しないほうが良い。

よほど重い画像処理をするのでなければ、Parallel threadsも実際のスレッド数より少なくて良いと思われる(並行作業が遅くなる)。



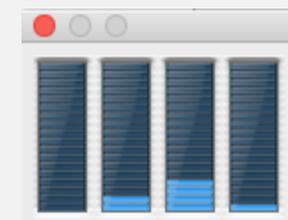
メモリとコア数の確認方法

Macであれば、appleマーク > このMacについてでメモリが表示される(下の例では4GB)。コア(thread)数は、アクティビティモニターを起動し、Window > CPU使用率とすると、CPU使用率を表すウィンドウが現れる。そのインジケータの数が並列使用可能なスレッドの数。

なお、Windowsの場合、タスクマネージャーを起動し、CPU使用率をモニターする画面から同様に確認可能。メモリは、コンピューター > 右クリック > プロパティとすることで確認可能。



メモリの確認

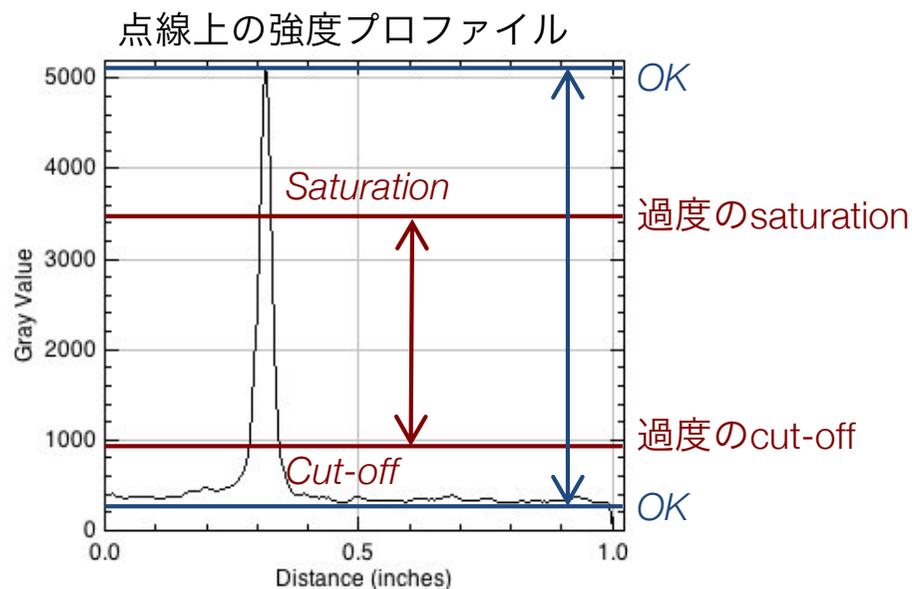
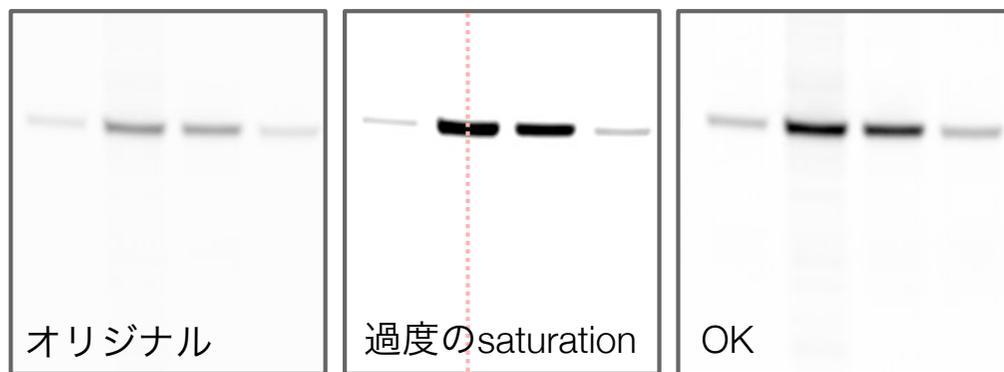


スレッド数の確認

Image Jでのコントラスト調整 (Adjust Brightness)

■ コントラスト調整 (手動での調整方法)

コントラスト調整では、過度にsaturationさせてはならない。バックグラウンドも、真っ白になるのは良くない。バックグラウンドの(ランダム)ノイズが残る程度が良い。



コントラスト調整(Adjust Brightness)

マニュアルでコントラスト調整をするには、Image > Adjust > Brightness/Contrast...とする。

基本的には、Minimum (白で表示する intensity)とMaximum (黒で表示する intensity)のみ変えればよく、Brightness (トーンカーブを左に平行移動)とContrast (トーンカーブの傾きを急に)のスクロールバーは変える必要はない。

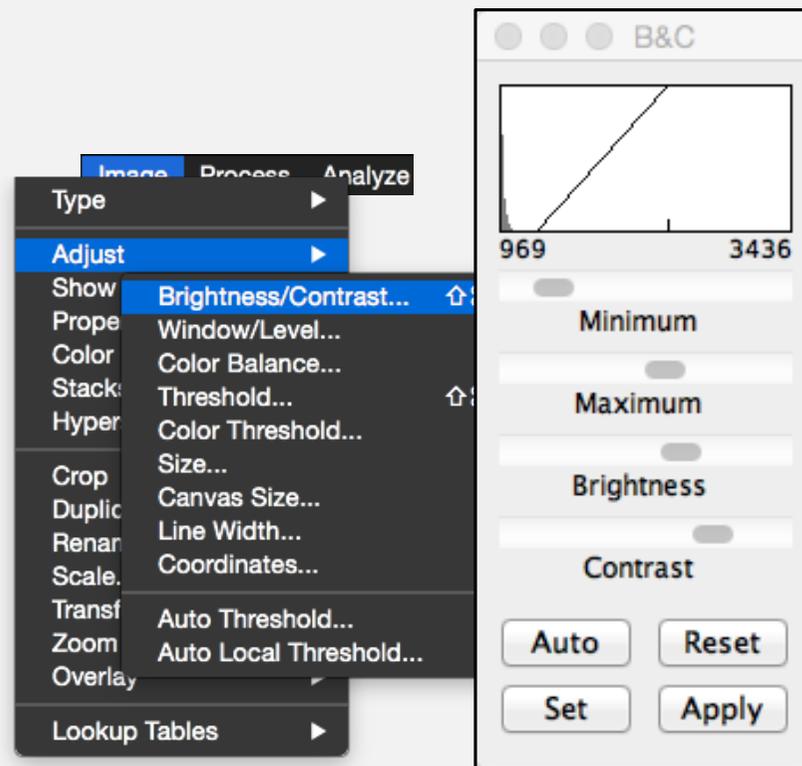


Image Jでのコントラスト調整 (Enhance Contrast)

■ コントラスト調整はEnhance Contrastで

よく使う機能。マニュアルでコントラストを調整する場面はあまりなく、たいていの場合はこのEnhance Contrastが良い。この方法では、何%のピクセルがsaturationするか(100分位)を基準にコントラストが決まる。そのため、intensityの強いノイズでコントラストが決まるようなことはない。基本的に、saturationはあまりしないほうが良いので、0.1%や0.05%を指定してEnhance Contrastするのが良い。

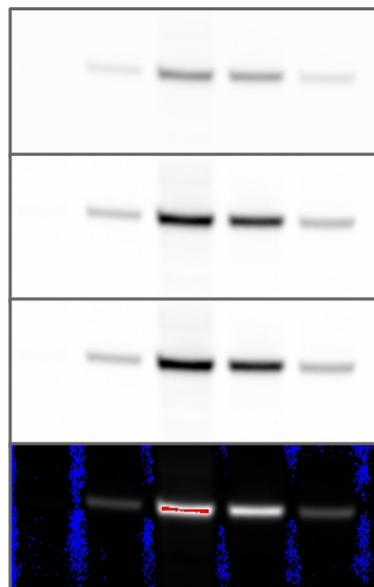
なお、saturationしているピクセルはImage > LUT > HiLoで確認できる (戻すにはGray + Invert LUT)。

オリジナル画像
(autorangeのみ)

Enhance Contrast
(0.05% saturation)

Enhance Contrast
(0.5% saturation)

(LUT: "HiLo")



Enhance Contrastによるコントラスト調整

Process > Enhance Contrastとし、Saturated pixelsを指定する。この機能は表示する白黒レベルの調整なので、画像のintensity値自体は変化しない。そのため、後からEdit > Adjust > Brightness / Contrastで元に戻すことも可能。Normalizeにチェックを入れると、intensityが書き換わることに注意 (最小値~最大値に引き伸ばされる)。

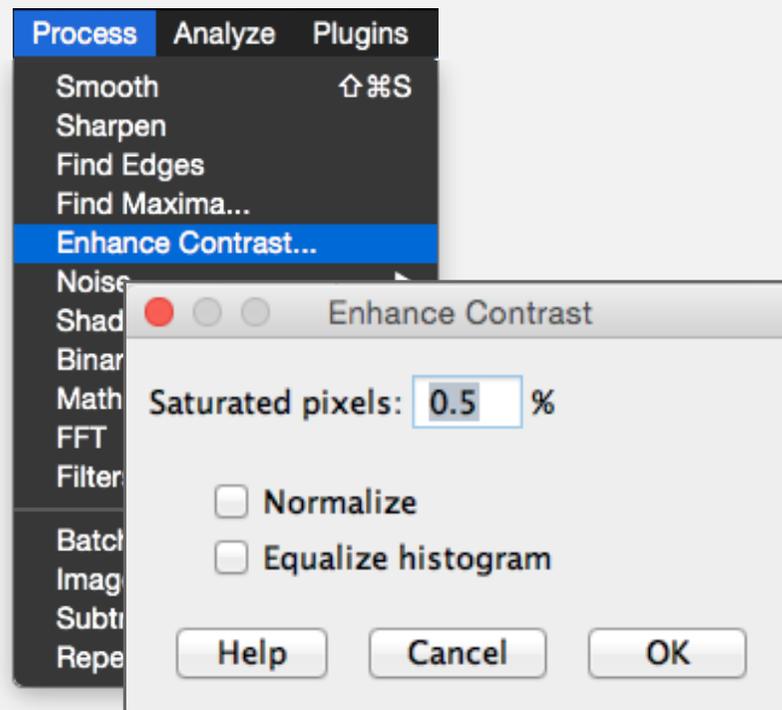


Image Jで扱える画像タイプ

■ モノクロ画像

Image Jでは8-、16-、24-bitの(モノクロ・グレースケール)画像を扱うことができる。基本は16-bitで32-bitが必要な場面はそう多くない。定量が目的でない場合は、8-bitで十分な場合もある。

■ カラー画像の種類

Image Jのカラー画像としては、通常RGB Colorが用いられる。この形式は、R (red) / G (green) / B (blue)といった光の三原色それぞれの8-bit画像を重ね合わせたものとして表現される。

原理上、モノクロ画像が16-bitや24-bitといった細かい階調まで表現できるのに対し、カラー画像は8-bit (256階調)しか濃淡を表現できない。そのため、サイエンティフィックな場面では、必要がなければグレースケールの画像を見せるべきで、むやみにカラー画像を使うのは避けたほうが良い。

Image Jの8-bit Colorというタイプは、256種類の色名でカラー画像を表現するものであり、階調は一層少ない。画像を軽くするという点では有用であるが、ほとんど使用場面はない。

モノクロ画像か？ カラー画像か？

MacのPreviewなどの一般的な画像viewerでは、画像のタイプを正しく扱えていない場合がある。たとえば、PNG形式で保存し直したモノクロ画像は、もはやモノクロ画像ではなくなってしまう。Image Jでこの画像を開くと、RGB Colorになっていることが確認できる。サイエンティフィックな画像は、それなりのソフトウェアで作成したほうが良い。

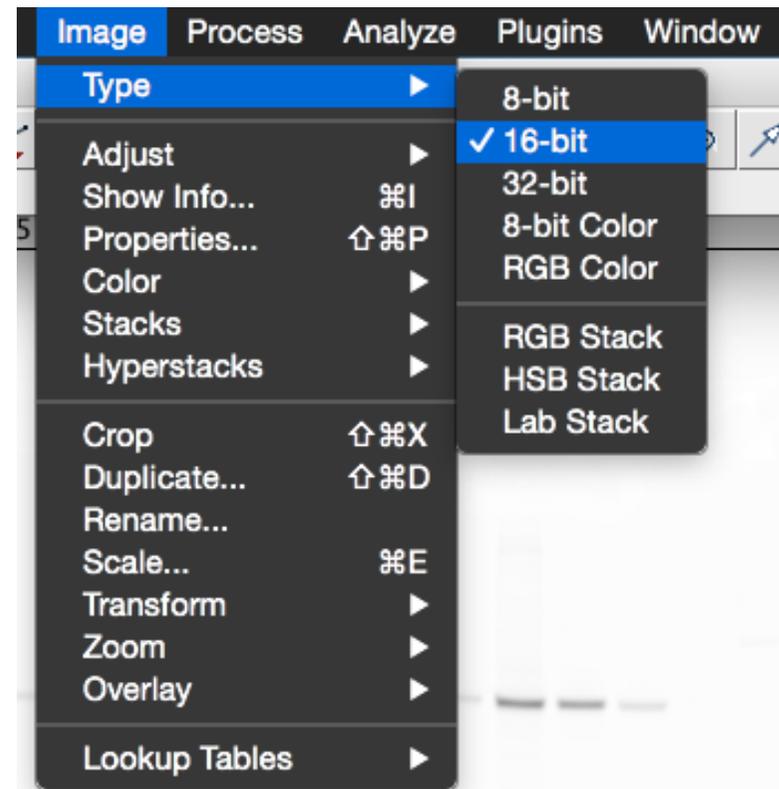


Image Jの設定: JPEG qualityのデフォルト設定

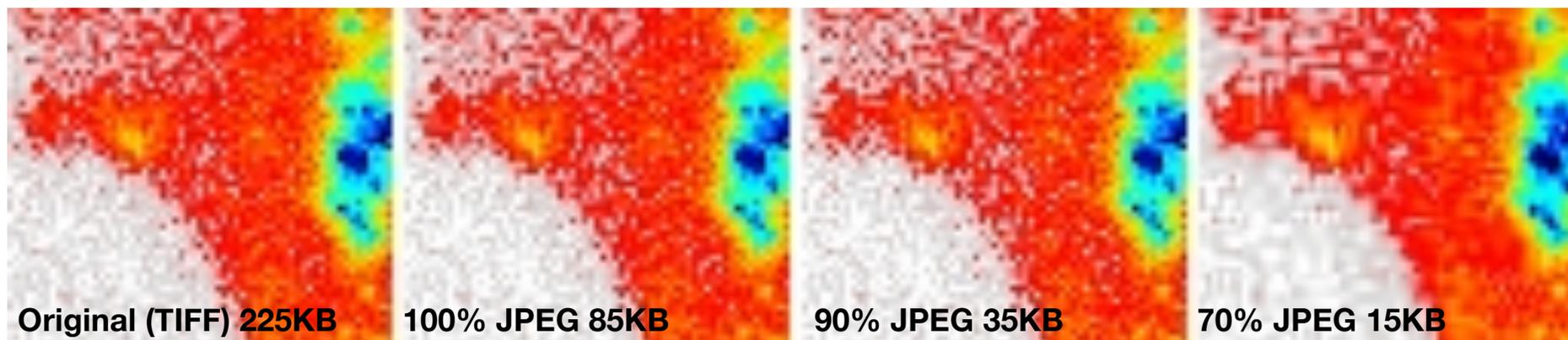
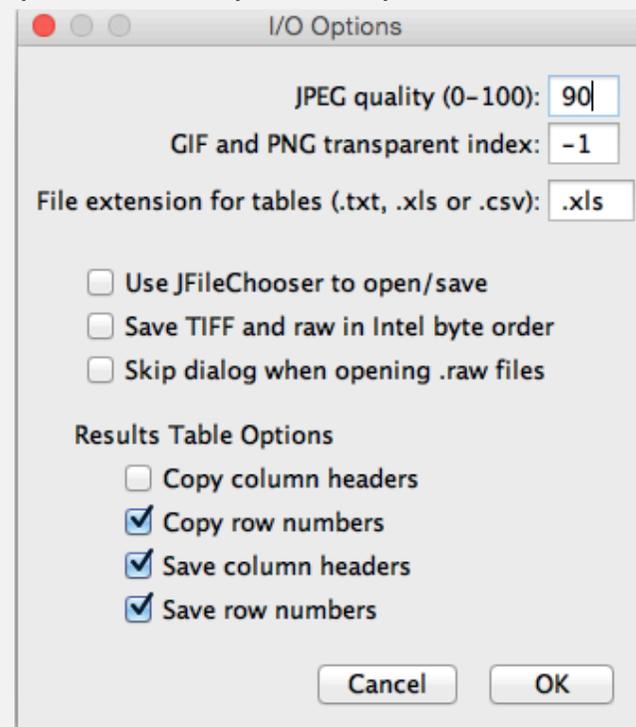
■ JPEG qualityの設定は85-100程度が良い。

デフォルトではJPEG qualityは75に設定されている。圧縮率が高いほうがファイルは軽くなるが、それだけ劣化の度合いが大きい。画像の複雑さによるが、TIFFファイルに比べればJPEG qualityが100でも十分軽いファイルになり、画質の劣化は最小限になる。

JPEGはファイルサイズが軽く扱いやすいため便利ではあるが、プレゼンテーション資料などに貼る直前まではTIFFファイルなどロスのない形式で保存しておくべきである。

JPEG qualityの設定方法

Edit > Options > Input/Outputから変更可能



Mac Previewでの16bit TIFFファイルの見え方

■ Image JとPreview (Mac)の見え方の違い

同じ16-bit tiffファイルをImage JとPreviewで開いた場合、見た目が違う場合がある。この理由は、autorange機能にある。Previewは16-bitの画像をそのまま表示(1-2¹⁶までを白-黒に表示)するが、Image Jはデフォルトでは最小値から最大値までを白-黒に表示する。16-bitの階調のうち、一部しか使われていない場合は、真っ白/真っ黒に見える場合もある。

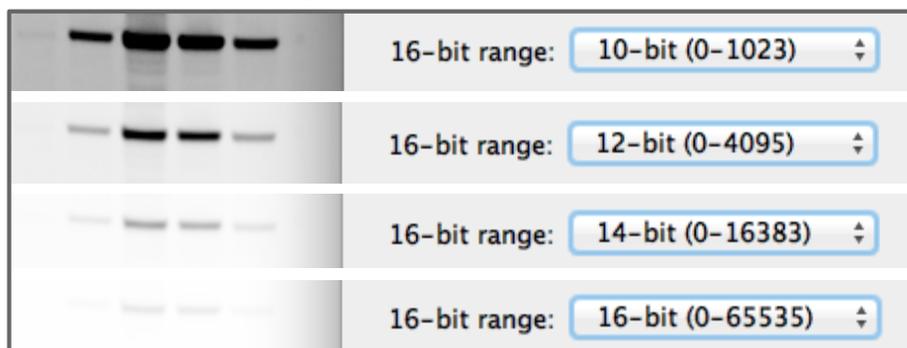
Mac Previewでの見え方



Image Jでの見え方 (default)



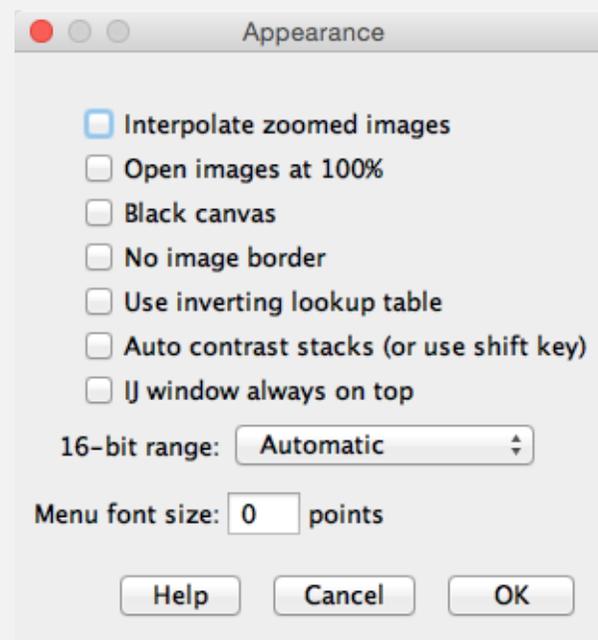
Image Jのautorange機能で表示コントラストが変化



デフォルトの表示rangeの変更方法

基本的に変更する必要はないと思われるが、Edit > Options > Appearanceから16-bitのうちどこまでを表示するかが選択できる。

この設定は、デフォルトのAutomaticか変えるとしても16-bitで使用すべき。不適切な設定だと、書き出し時に白抜け・黒抜け(saturation)した画像が書き出されてしまう。なお、この設定は表示に関するものなので、元のピクセルごとのintensity自体は残っている。よって、定量値には影響しない。



画像の回転と拡大・縮小

■ 画像の回転と拡大縮小はなるべく避ける

任意の角度で画像の回転が可能。ただし、ビットマップ上で回転するため、画質は劣化する (interpolationなしでは顕著に劣化)。Interpolationすることでスムーズな画像にはなるが、画像の強度値はInterpolationにより変化する (ぼやける)。

スケーリング (拡大縮小) も同様に不可逆な変換である。縮小時には解像度が低下するため情報が失われ、拡大時にはinterpolationにより増えた解像度分のピクセルを埋めている。

このように画像の回転や拡大縮小は不可逆かつロスのある変換であるので、明確な意図がない限りは避けるべきである。斜めに撮影してしまったゲルの画像を回転させると、

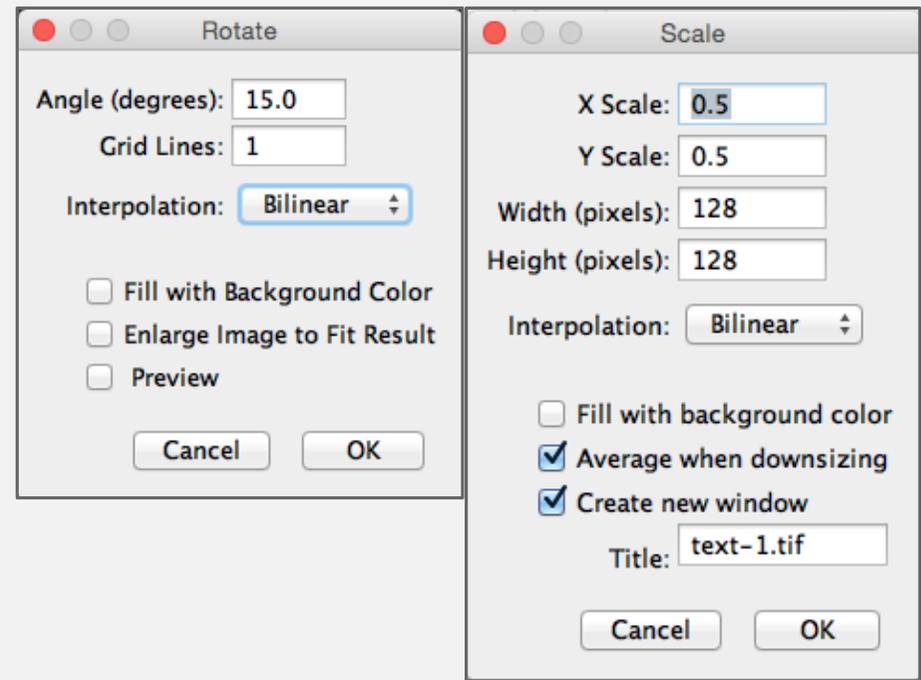


画像の回転方法

Image > Transform > Rotate で画像の回転が可能。Previewで確認してから実行する。不可逆な変換なので、10度回転を2回と20度回転は異なる結果になる。

画像の拡大・縮小 (解像度変更)

Image > Scale で画像のスケーリング (解像度変更) が可能。



画像の切り取り (crop)

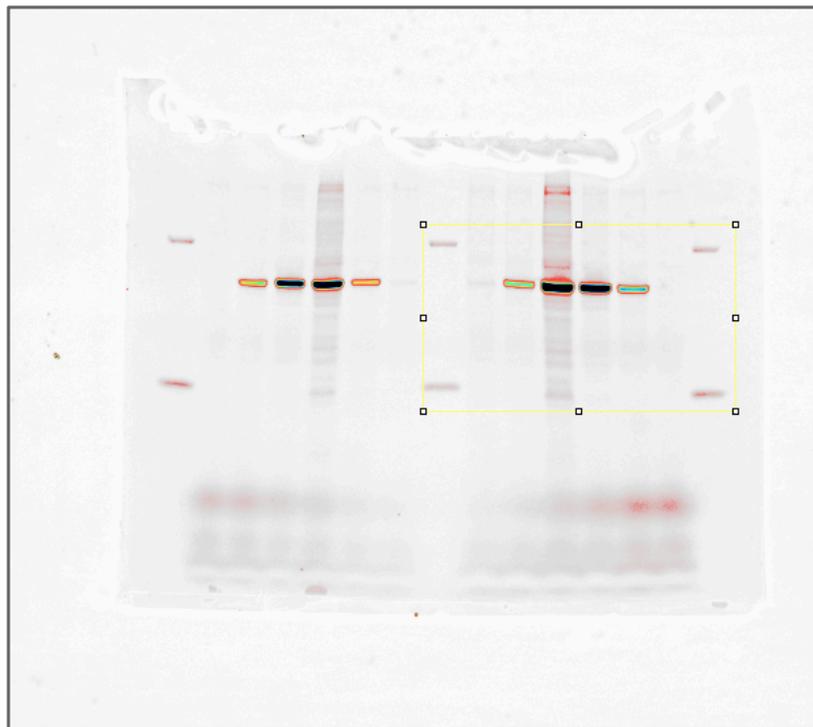
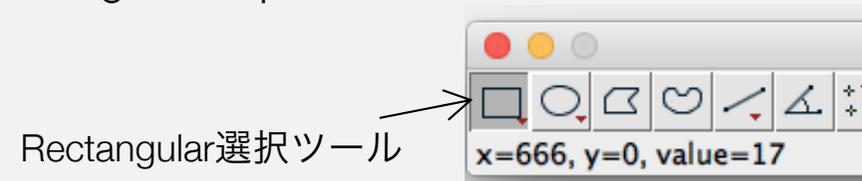
■ 画像の切り取り (crop)

画像の重要な部分だけ見せる必要がある場合、余分な部分を切り落として図を作る場合がある。その場合は、cropした画像を用いて図を作成する。

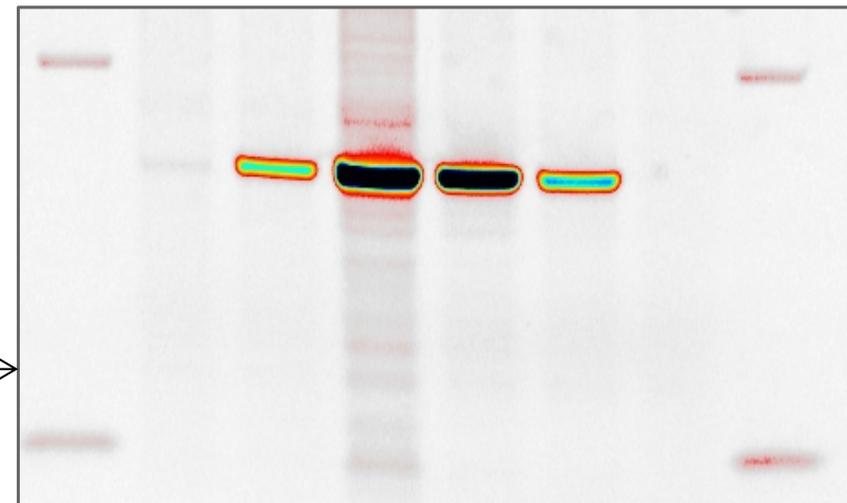
ただし、場合によっては切り取る前の全体の画像を要求される場合もある (supportingに載せなければならない)ので、当然のことながら生データは残しておくこと。

画像の切り取り (crop)

Rectangular選択ツールで切り取りたい領域を選択
> Image > Crop



crop



この画像はゲルの形が見えやすいように、コントラストを(ややおおげさに)調整し、さらに疑似カラー表示している。バンドがsaturationしているので、「いい画像」ではないことに留意。

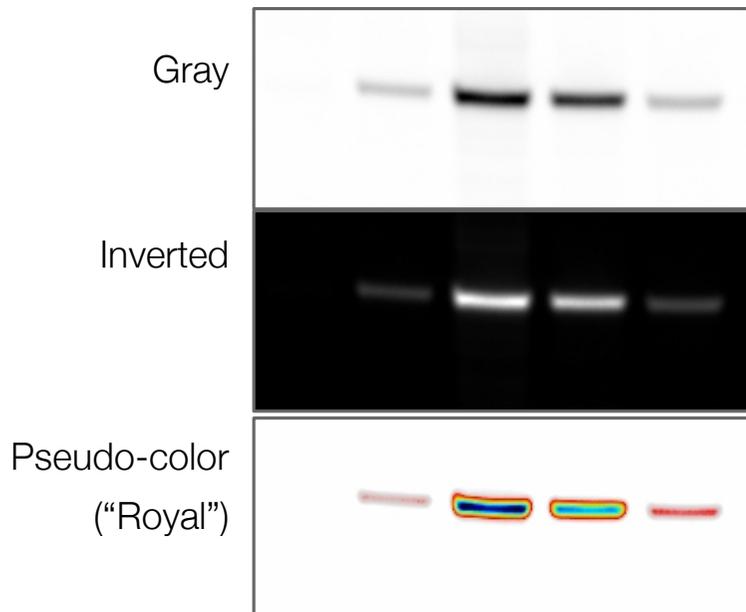
画像の白黒反転と疑似カラー表示

■ 画像の白黒反転は有用

蛍光顕微鏡画像の場合は、背景が黒で表示される場合が多いが、ゲル画像の場合は背景が白の場合が多い。Image Jではデフォルトでintensityの高いピクセルを白、背景を黒として表示する。白黒を逆転させて表示したい場合、一つにはintensityの値を反転させる方法がある。

■ 場合によっては疑似カラー表示も有効

画像のintensity差が小さい場合に、差を認識しやすくするために疑似カラー表示が用いられる場合がある。ただし、視覚的な定量性はないことは理解すべき。

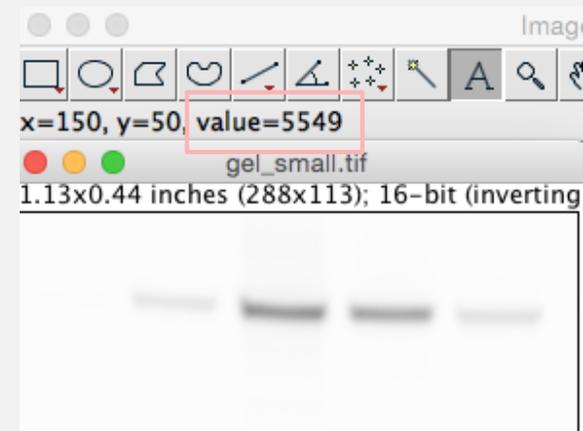


画像の白黒反転

Edit > Invert で白黒が反転する。Intensityの値も反転することに注意。定量する際には反転が必要な場合もある。なお、カーソル位置のintensityはImage Jウィンドウに数値が表示されている。

疑似カラー表示 (LUT)

Image > Lookup Tables からLUTを選択できる。LUTとは、intensityと色の対応リストのことである。なお、Invert LUTでも白黒反転は可能であるが、intensityの値は変わらないことに留意。



Invert LUT
Apply LUT

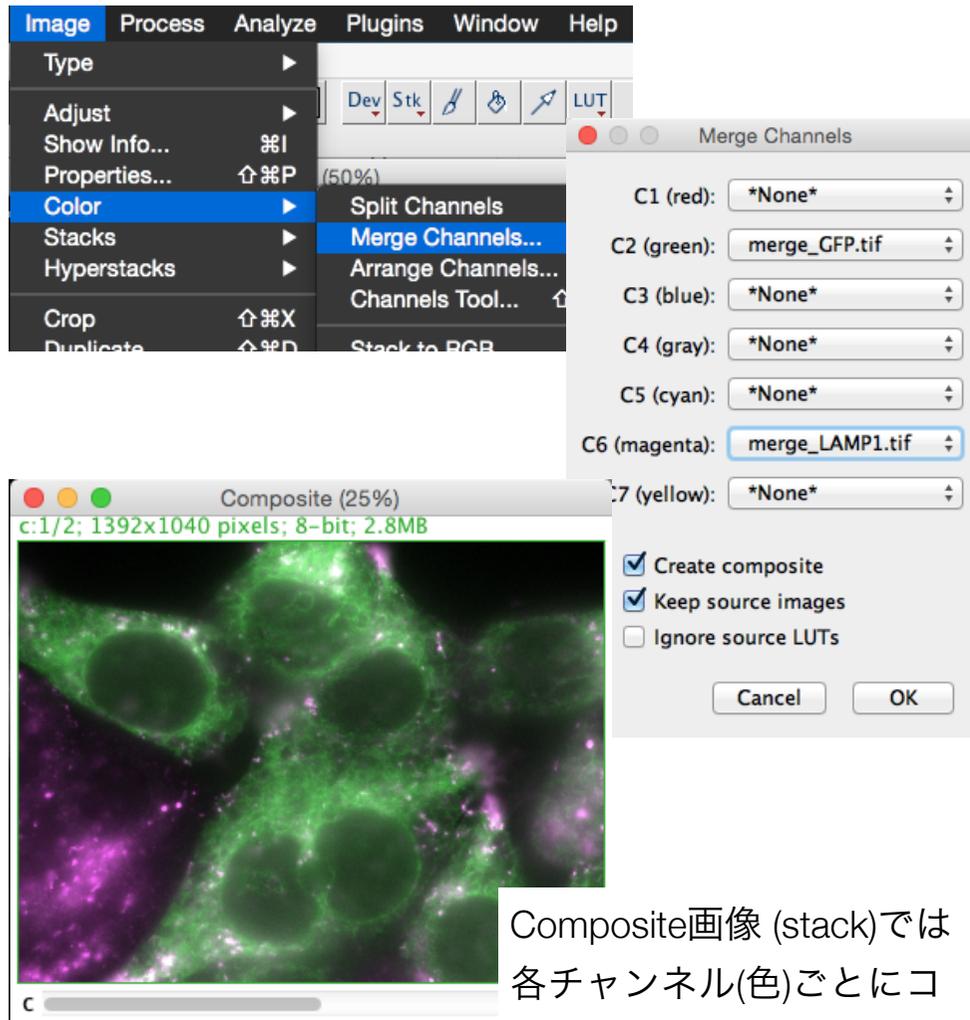
Fire
Grays
Ice
Spectrum
3-3-2 RGB
Red
Green
Blue
Cyan
Magenta
Yellow
Red/Green

16 Colors
5 Ramps
6 Shades
Blue Orange icb
BRGBCMYW
Cool
Cyan Hot
Edges
Gem
Glasbey
Green Fire Blue
HiLo
ICA
ICA2
ICA3
Jet
Magenta Hot
Orange Hot
Phase
Red Hot
Royal
Sepia
Smart
Thal
Thallium
UnionJack
Viridis

多色蛍光顕微鏡画像の重ね合わせ

■ 蛍光画像の重ね合わせ

局在を比較する場合や、オルガネラの位置を見せたい場合、二色以上の蛍光画像を重ね合わせることがある。



Composite画像 (stack)では各チャンネル(色)ごとにコントラスト調整が可能。

画像のmerge

1. 重ね合わせたい画像を(順に)Image Jで開く。
2. Image > Color > Merge Channelsで開くwindowで重ね合わせる画像と色を指定。Keep source imagesにチェックを入れると、mergeの元にした画像を開いたままにする (チェックしないと閉じる)。Create compositeをチェックしておくカラーチャンネルごとに元のデータを保持した重ね合わせ画像(stack画像)ができる (チェックしないとRGB Colorタイプとしてmerge画像が表示される)。
3. 矢印キーでチャンネルを選び、Enhance Contrastなどでコントラスト調整。
4. 適度なコントラストになったら、Image > Type > RGB Colorとすれば、調整後のコントラストで固定された画像ができる。
5. 名前を付けて保存 (資料に貼り付けるのであればjpegだけでも良いが、論文用にはTIFFで保存しておいたほうが良い)。

多色蛍光画像の重ね合わせに用いる色

■ 慣習として、重ね合わせには緑と赤がよく使われるが、緑とマゼンタが好ましい。

男性のうち10%程度は色の見え方・感じ方が異なる。特にその中でも、赤と緑の区別がつきにくい人の割合が多い。そのため、現在では緑と赤の重ね合わせ画像は使うべきではないという考えが定着しつつある。誰でも区別できる色として、緑とマゼンタの組み合わせが提案されている。

■ また、単色画像を(緑や赤のカラー画像ではなく)モノクロで並べることが望ましい。

カラー画像では階調数が各色8-bitであるため、最大でも256階調しか表現できない。また、単色画像に色をつけて表示するのは、プレゼンテーションとして何で染めているかをわかりやすくするという点では良いが、詳細がはっきり見えないなどの欠点がある。

よって、論文においてはカラーの重ね合わせ画像とモノクロの単色画像を並べると良い。ただし、聞き手や査読者によっては、単色もカラー表示することを要求される場合もある。

カラーユニバーサルデザイン

2004年、色の見え方・感じ方に多様性があることを啓発する団体としてNPO法人カラーユニバーサルデザイン機構(CUDO)が設立された。

地震速報の色分けや地下鉄路線図などの情報は、色を多用して表現される。この情報が誰にでも正しく伝わるためには、色覚の差があったとしても伝わるようなデザイン・色使いを用いることが重要。

現在ではCUDOの活動により、カラーユニバーサルデザインの考え方が徐々に浸透し、時刻表・ハザードマップ・カレンダー・パンフレットなど、色覚の多様性にも配慮されたデザインが用いられるようになってきている。

研究活動においても、プレゼンテーションは誰にでも伝わるようなデザインが望ましいことから、蛍光顕微鏡画像の色やPowerPointなどで用いるカラーパレットの配色など、少し工夫できると良い。

- (CUDO) <http://www2.cudo.jp/wp/>
- (カラーユニバーサルデザイン推奨配色セット) <http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/colorset/>
- スマートフォンアプリの「色のシミュレーター」

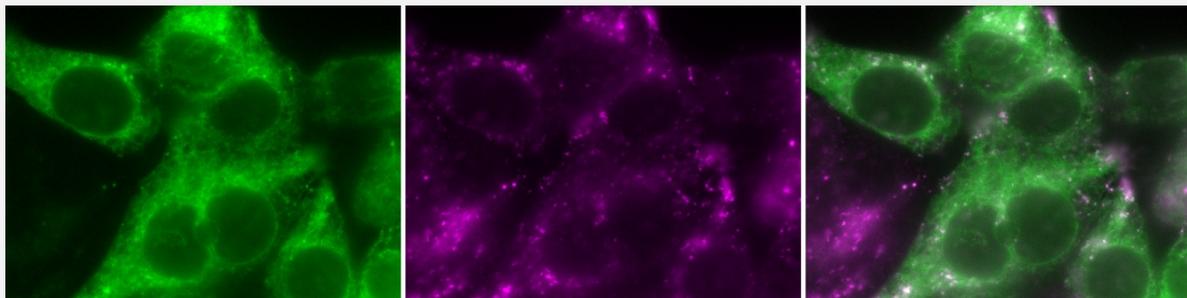
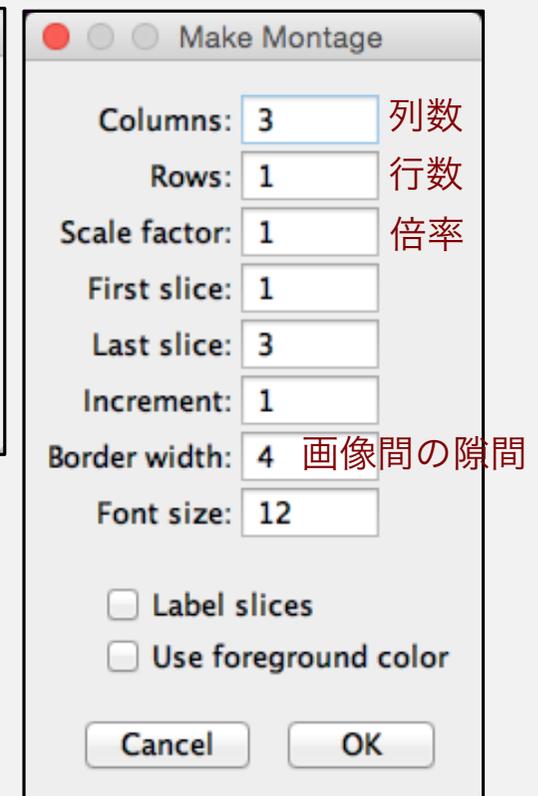
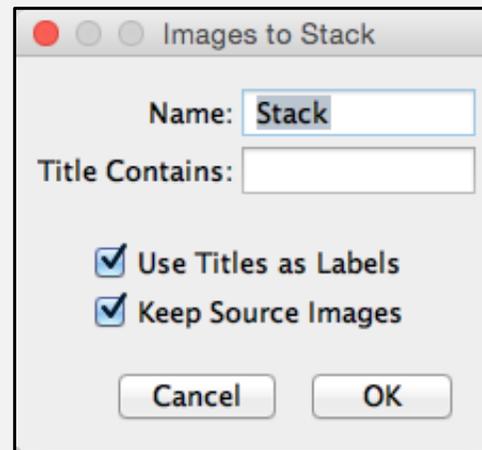
複数の画像をまとめてMontageを作成

■ 複数の画像をまとめたパネル (montage) を作る方法

共局在の解析など、二色以上で染色した画像は、単色画像と重ね合わせ画像を並べて見せる場合が多くある。ImageJでは複数の画像をパネルとしてまとめる機能 (montage) がある。

GreenとRedとmerge画像のmontageを作成する例

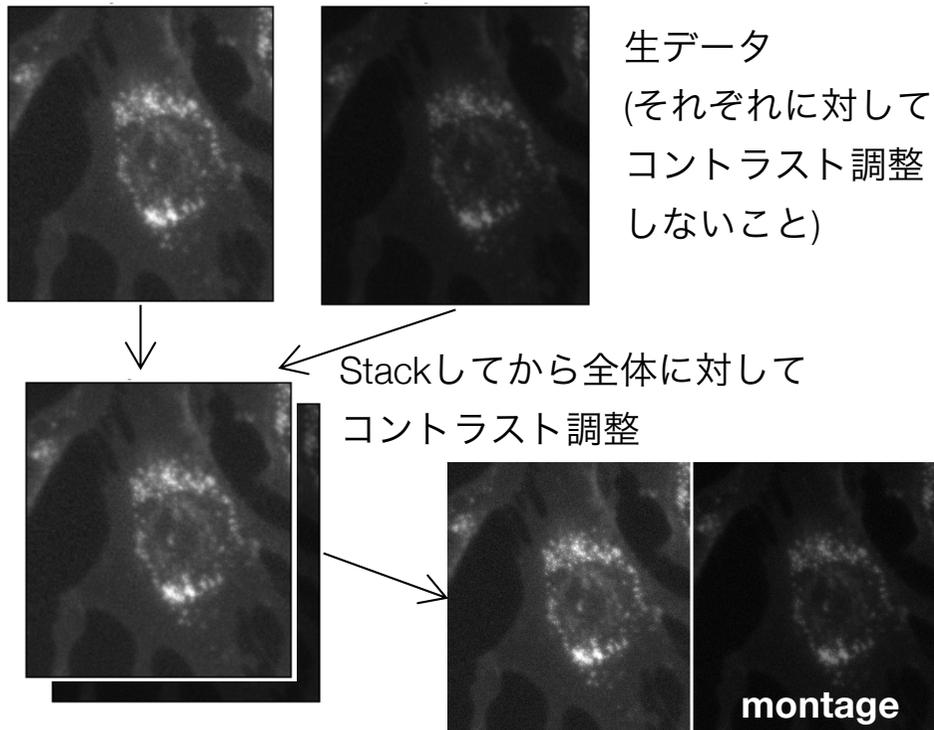
1. Greenで表示する画像、Redで表示する画像を開く
2. MergeしてRGB Color画像を作成する
3. 単色画像2枚とmerge画像をstackにまとめる (Image > Stacks > Images to stack)
4. Image > Stacks > Make Montage



画像間の蛍光強度の比較

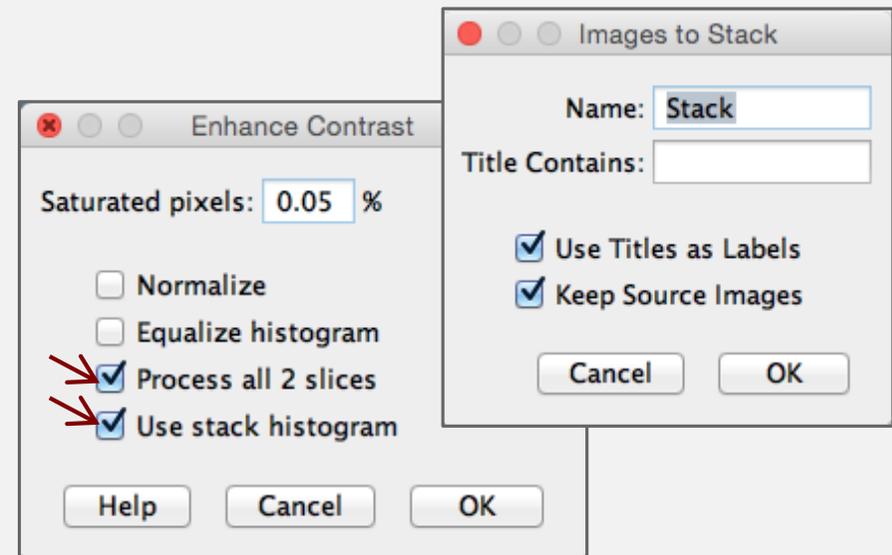
- 同一条件で撮影し、同一のコントラストでない限り、見た目での蛍光強度の議論はできないことに注意。

複数の画像に対して同一のコントラストを適用するには、一度stackとしてまとめてから、全画像の強度分布を考慮してEnhance Contrastするのが良い。Image Jでのコントラスト調整をAdjust > Brightness & Contrastのスライダーで行うと、同じコントラストを適用するのは難しい(数値入力する方法は次ページ参照)。



Stackを用いて同一のコントラストを適用

1. 比較したい画像を順にImageJで開く
2. Image > Stacks > Images to stackで開いた順番に画像がstackされる
3. Process > Enhance Contrastで、Process all slicesとUse stack histogramにチェックを入れて実行すると、stackされたすべての画像を考慮してコントラストが設定され、同じコントラストがstack全体に適用される。
4. このstackを用いてmontageすれば、強度比較ができる画像となる。



数値の手入力によるコントラスト調整法

- 表示するコントラストの黒(最小値)および白(最大値)となる値を直接入力することでも、コントラストの調整が可能。

複数の画像に対して同じコントラストを適用するのに、数値を直接入力する方法もある。

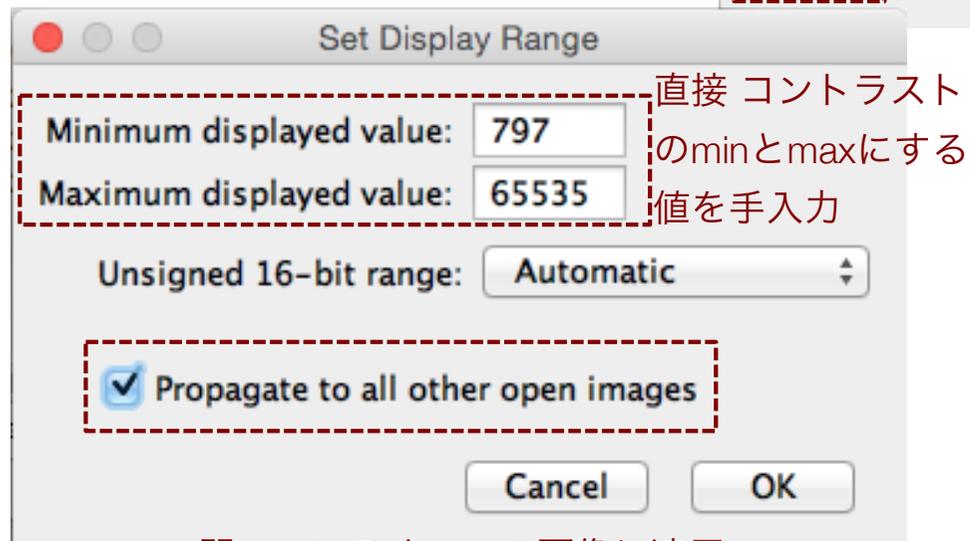
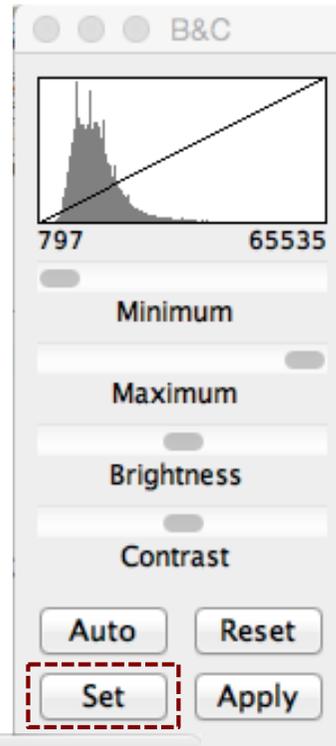


Image Jで開いているすべての画像に適用

Set Display Rangeによる同一コントラストの適用方法

Enhance Contrastを使わずに同一コントラストを複数の画像に適用する方法を説明する。

1. Image > Adjust > Brightness & Contrastでコントラスト調整ウィンドウを表示。
2. Setをクリックし、Set Display Rangeウィンドウを表示。
3. Minimum displayed value (これ以下の輝度のピクセルを黒にする)とMaximum displayed value (これ以上の輝度のピクセルを白にする)の値を入力する。
4. Propagate to all other open imagesにチェックを入れてOKとすると、Image Jで開いているすべての画像に適用される。

蛍光強度の比較を行う際の注意点

■ 同時に行った実験内の比較であること

同じサンプル調製法で、並べて行った実験であること。異なる実験間では比較できない。

■ 撮像条件が同じであること

レンズ・励起光の強度 (レーザーパワー)・露光時間 (レーザー照射時間)・binningなど、同じ撮像条件が必要。

■ 撮像時、画像取得の前に励起光を当てすぎると蛍光団の退色が起こることに注意

視野の選択やピント合わせに手間取っていると蛍光が退色し、比較ができなくなる。退色が起きていることは、蛍光顕微鏡を覗いていれば見ればわかるが、共焦点顕微鏡など、画面上でピントや視野の微調整を行う場合、liveで表示される画像は通常オートコントラストがかかっているため、蛍光が徐々に退色していることがわかりにくい場合がある (バックグラウンドノイズや蛍光強度のヒストグラムも見れば分かる)。

■ 撮像する視野間やreplicateサンプル間でもばらつきがあることを認識した上で行うべき。

蛍光顕微鏡は「定量的比較」に強い方法ではない (細胞内局在が観察できることが強みである)。撮像する視野やサンプル間でのばらつきが大きいことを認識した上で使用すべき。実際に蛍光顕微鏡を覗いて認識できる程度の差は当然画像上でも差が出る(はずである)が、微妙な差を議論するには画像の見た目ではなく、定量的な画像解析が必要である。あるいは、Flow cytometryなどの顕微鏡ではない実験法が適している。

■ 見せる画像は実際の観察結果を反映しているか、客観的に見るべき。

画像の比較データを見せる場合、各サンプルで複数の視野を観察・撮像した上で、差があるという結論に至っているはずである。多くの場合、撮像したすべての画像を論文・プレゼンテーションで見せることはできないため、「代表的な」画像を見せることになる。この際、各サンプル群から「代表的な」画像を見せているか、客観的に考える必要がある。サンプルの特徴を反映しているか、サンプル間の違いを反映しているか、考えるべきである。

ゲル上のバンド定量

■ ゲル上のバンドを定量する

RectangularツールとAnalyze > Measure (Command+M)で定量が可能であるが、ROI Managerを使うのが便利。

同一面積であれば、MeanでもIntDenでもどちらでも良い。

ROI ID	Area	Mean	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	0.018	287.492	262	333	5.098	328891
2	0.018	590.064	265	1397	10.463	
3	0.018	1965.610	282	5722	34.854	
4	0.018	1521.628	274	4706	26.982	
5	0.018	666.843	274	1560	11.824	
6	0.018	274.721	258	296	4.871	
7	0.018	277.705	259	298	4.924	
8	0.018	358.963	282	436	6.365	
9	0.018	301.560	262	344	5.347	
10	0.018	284.878	256	305	5.051	

ROI Managerを用いたバンド定量

1. 定量したい画像を開く。
2. まずはカーソルを動かし、ImageJツールバーwindowに表示されるintensityをチェックし、バンド部分で値が大きいことを確認。バンド部分の値が背景よりも低い場合は、Edit > Invertで反転する。
3. Analyze > Tools > ROI Manager... からROI Managerを起動する。
4. Rectangularツールでバンドを囲む (ROI, region of interest)
5. Command+tでROI ManagerにROIを登録する。
6. Rectangularツールの四角をドラッグ&ドロップして別のバンドに移し、同様にCommand + tで測定したい場所全てを登録する。
7. Measureで測定。Save asで保存。測定結果がtableとして表示される。表示される項目は、列名部分の右クリックからSet Measurementsで変更できる。測定項目の変更をした後は、Measureし直さないと値が反映されないことに注意。

定量に関連したImageJの設定

■ 定量結果の保存形式

File extension for tablesのデフォルトは「.xls」となっているが、実際に保存されるのはxlsではなくcsv形式であり(バグと思われる)、Excelで開くと拡張子と中身が異なると警告が出る。「.csv」に変えておいたほうが良い。

■ 定量結果のtableをコピーした時の動作

デフォルトでは、Copy column headersにチェックはなく、定量結果のtableをコピーすると列名がない状態でコピーされる。どの列が何の値かわからないと不便なので、この項目はチェックしておいたほうが良い。

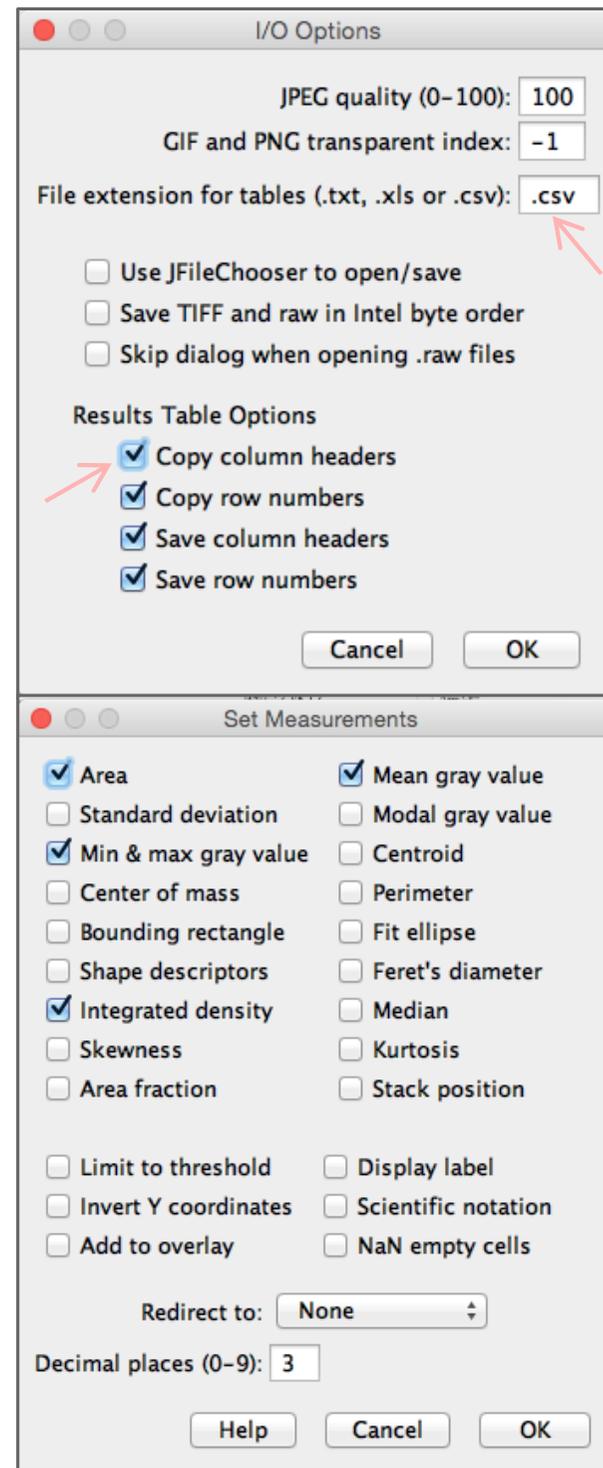
■ 定量結果tableに表示する測定項目

定量する項目は、Analyze > Set Measurements (あるいはResult table上で右クリック、Set Measurements)から変更できる。

Area: ROIの面積。画像(TIFF)によっては、ピクセルと実際の長さの対応が記録されている場合がある(ImageJツールバーにROIのサイズがinch表示されている)。その場合は、実際の面積。

Mean: ROI内の平均強度。ピクセルサイズが設定されている場合は、単位サイズあたりの平均蛍光強度。

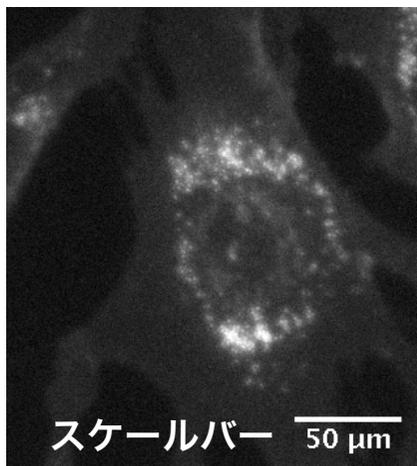
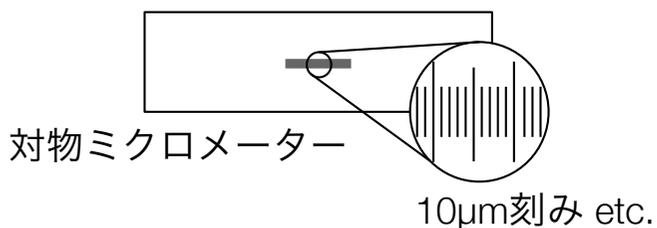
IntDen&RawIntDen: IntDenはピクセルサイズの単位あたりの合計強度。RawIntDenはROIピクセル内の強度の総和(ピクセルサイズに無関係)。



スケールバーの挿入

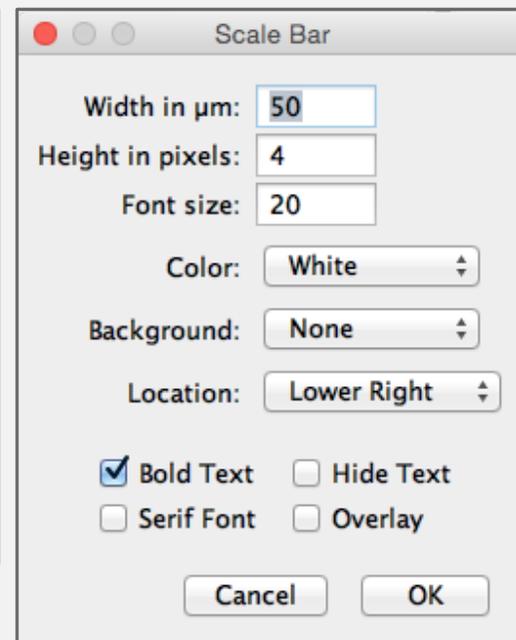
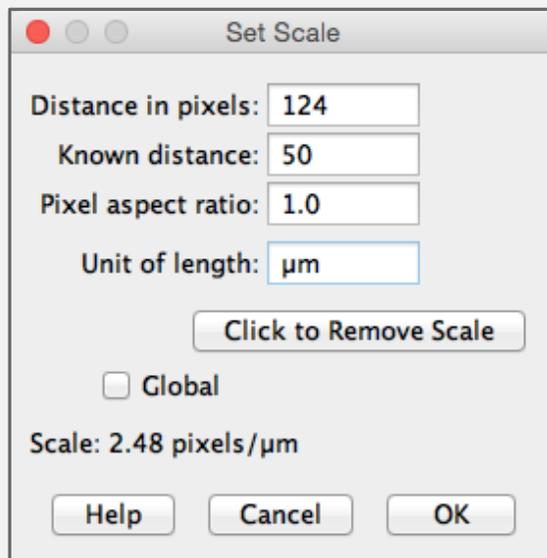
■ 対物マイクロメーターを用いたスケールバーの挿入

撮影に用いた機器・ソフトウェアによっては、そのソフトウェア上で、実際のサイズとピクセルのcalibrationが行える場合がある。そうでない場合、通常は対物マイクロメーターを用いてスケールバーを作成する。



対物マイクロメーターを用いたcalibration

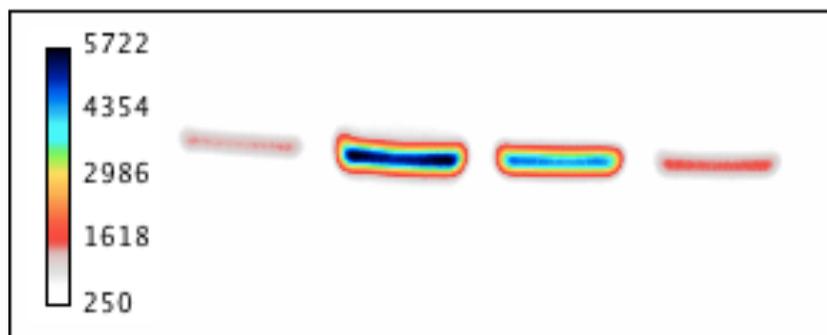
1. 対物マイクロメーターをスケールバーを挿入したい画像と同じ倍率撮影する。
2. 対物マイクロメーターの画像をImage Jで開く。
3. Line選択ツールでマイクロメーター上の適度な長さを選択し、何ピクセルか確認
4. Analyze > Set Scale でピクセル数(選択したlineの長さがすでに入っている)と距離(known distance)の対応を入力
5. Analyze > Tools > Scale Barで描きたいバーの長さなどを設定し、OKとすることで画像にスケールバーが描き込まれる。



Calibration barの挿入

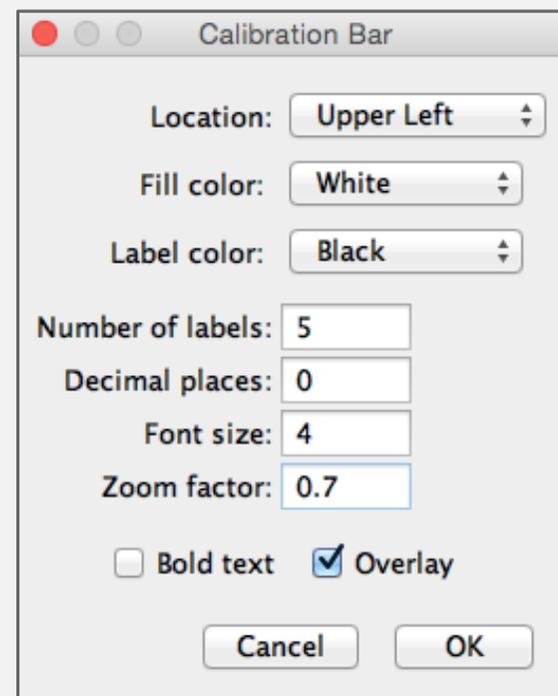
■ 蛍光強度と色の関係を表す calibration bar を挿入する方法

実際のところ、あまり必要な場面はないが、蛍光強度と色の関係を示す calibration bar を追加できる。疑似カラー表示を行った場合などにはあった方がよい。が、疑似カラー表示もそれなりの理由がなければ論文などでは使わない方がよい (見た目の定量性が直線的とは限らない)。実験ノートなど、プリントアウトしたものでデータを見やすく・理解しやすくするためという点では、疑似カラー表示は有用。



Calibration barの挿入

Analyze > Tools > Calibration bar
場所や文字サイズ (font size)、バーのサイズ (zoom factor)などを設定し、OK。



正当な理由なく行ってはいけない操作

下記の操作は不正とみなされる場合がありうるので、正当な理由なく行ってはならない。

■ もともとある特徴が見えなくなるような操作

コントラスト調整において、うっすらと見えているバンドなど、都合の悪い特徴が見えないレベルまでコントラストを調整すること、強度差を議論する際にsaturationさせて同程度の強度にみえるようにすることなど。基本的に元データをまっとうに解釈できなくなるような処理はダメ。このような操作は画像を見ればすぐわかる。

■ (当然ながら)写真修正の技術を使った切り貼り

バンドがない部分の画像を切り取って持ってきて、バンドの上に貼り付けてバンドがないように見せるなど、いうまでもなくアウト。Photoshopの写真修正の技術を使って貼り付けた部分がわかりにくくするというのは論外。このような操作をした画像も、画像データを見ればわかる。

■ 非線形の変換

コントラスト調整に用いるトーンカーブ (画像の強度と表示される色の濃さの対応)は、基本的に直線のものを用いること。Photoshopや商用ソフトウェアの中には手動でトーンカーブを曲げられるものや、シグモイド型(S字)のものがあるが、研究目的ではこのよう非線形のトーンカーブは使用すべきではない。また、ガンマ変換も同じである。画像処理・解析の技術としてガンマ変換などの非線形な処理は有用であり(細胞が占める領域を自動で選択するのに用いるなど)、正当な理由があれば明記した上で使用することは可能。ただし、単純に画像を見せるという目的では、正当な理由がある場合はほとんどないと思われる(生物学・化学分野では)。

■ 画像の一部に対する処理

画像のうち一部だけにコントラスト調整を施すのはダメ。また、ノイズ除去目的でのフィルター処理なども部分的に用いるのは不可。画像全体に対して適用する場合、正当な理由があれば明記して使って良い場合はある。ただし、これも通常の画像を見せるという目的では必要ない。