

Image Processing with *ImageJ*

理科教育講座生物学教室
石田正樹

ImageJ の入手

ImageJ (Image Processing and Analysis in Java)

⊗ アメリカの国立衛生研究所 (NIH) が開発したフリーソフト

当初Mac用に開発された NIH Image → Scicon Image (Win版) と改良を重ねた結果、ImageJ (Mac OS, Win OS)となる

TIFF, GIF, JPEGなどのファイル形式の画像を処理することができる

⊗ ダウンロード先 <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>

⊗ 日本語対応はしていないので、メニューはすべて英語表記

⊗ JAVA が動作する OS で使用可能

⊗ 英語のマニュアル

⊗ HP版 <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/guide/index.html>

⊗ PDF版 <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>

⊗ 日本語のマニュアル

⊗ HP版 <http://seesaawiki.jp/w/imagej/d/>

⊗ HP版 <http://www.hm6.aitai.ne.jp/~maxcat/ImageJ.html>

⊗ ビデオ <http://togotv.dbcls.jp/20121119.html>

⊗ ビデオ <http://togotv.dbcls.jp/20130206.html?71#p01>

ImageJ の特徴

🎬 イメージ画像の加工ができる

🎬 鮮明化

🎬 疑似カラー表示

🎬 ノイズ除去

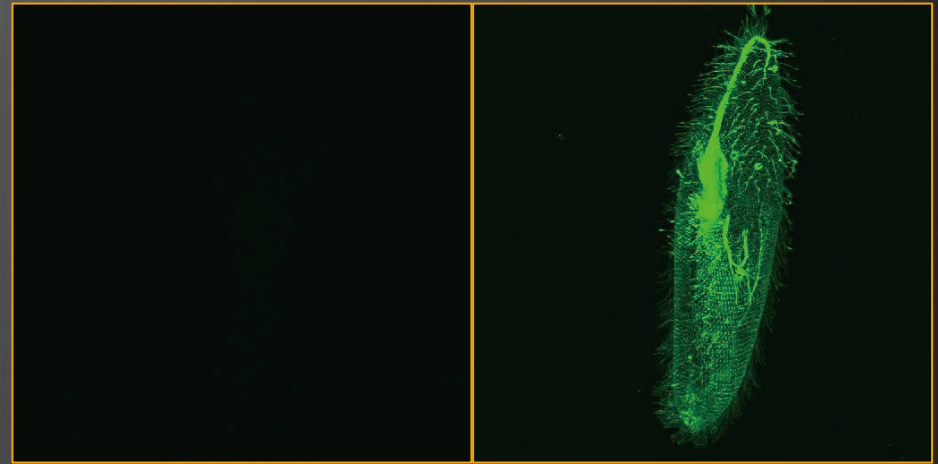
🎬 イメージ画像の測定・解析ができる

🎬 距離の測定

🎬 面積の測定

🎬 粒子計測

🎬 濃度解析(電気泳動ゲルや蛍光強度の測定)

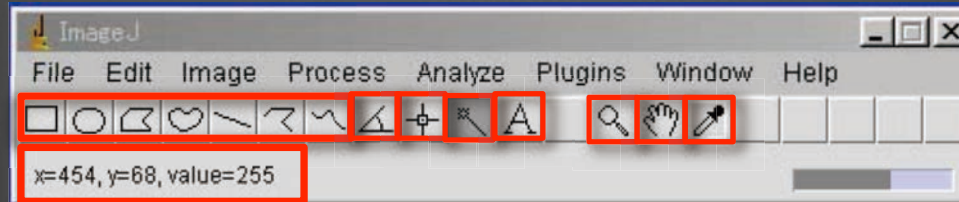


🎬 一連の操作をマクロを用いて自動記録ができる (バッチ処理に関して紹介する)

🎬 動画の作成ができる (紹介しない)

🎬 3D・4D (3D+時間) 画像が作れる (紹介しない)

操作の基本



☼ Tool Bar 工具箱

☼ 選択枠

☼ 画像上の特定の区画を選択できるツール

☼ 下の空白の欄には、各ツールの説明がでたり、カーソルの位置情報が出てくる

☼ 角度を測定するツール (Analyze→Measure)

☼ 点を選ぶツール (shiftで多くの点を選ぶと数が表示される)

☼ ワンドツール (線で囲まれた部分あるいは同一の値を持つ部分を選択)

☼ 文字を挿入するツール

☼ 倍率を変えるツール

☼ 画面をつかんでスクロールするツール

☼ 画面の色を抽出するツールや色を塗るツールなど Photoshopと同じような操作ができる しかも無料！

☼ 操作の進行状況を Progress bar で示してくれる

画像処理の実際

(画像の種類)

- ❁ ImageJ では、RGB カラー画像、およびグレースケール画像(モノクロ)を扱える
- ❁ RGB 画像では、Red, Green, Blue の三色がそれぞれ 8 bit で表現される
- ❁ グレースケール画像では、以下の画像が扱える
 - ❁ 8 bit (0~255) の最大 256 段階 (Binary)
 - ❁ 16 bit (0~65,535): 最大 64 K (Binary)
 - ❁ 32 bit (0~4,294,967,296): 最大 4G (Binary)
- ❁ 二値化(Binary)の場合、グレースケール形式では、白と黒の二つだけで描かれる

画像処理の実際

(疑似カラー表示)

- ⊗ グレースケール画像に色を付けて表示することができる
 - ⊗ File→Open Samples→Blobs
- ⊗ 例えば 8 bit の画像には、255 段階の色を対応させることができる
- ⊗ この対応のことを Lookup Table (LUT) という
- ⊗ ImageJ では、多数の LUT が用意されており、以下で選ぶことができる
 - ⊗ Image→Lookup Tables
 - ⊗ Image→Lookup Tables→Red
 - ⊗ Image→Lookup Tables→Green
 - ⊗ Image→Lookup Tables→Blue



画像処理の実際

(画像の加工)

❁ Process Menu では画像の加工ができます

❁ File→Open Samples→Blobs

❁ Process→Smooth: 画像がぼやける

❁ Process→Sharpen: 画像が鮮明になる

Smooth と Sharpen を交互に繰り返して
数回行くと、Smoothによりノイズがぼやけ

Sharpen で鮮明化されるので、わずかな情報も強調される

❁ Process→Find Edges: 輪郭を検出し強調

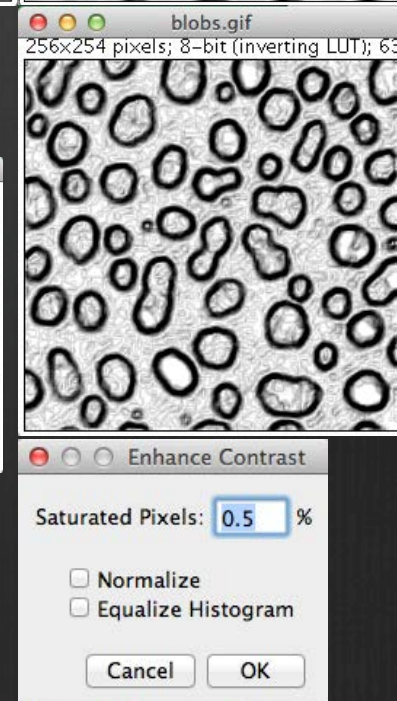
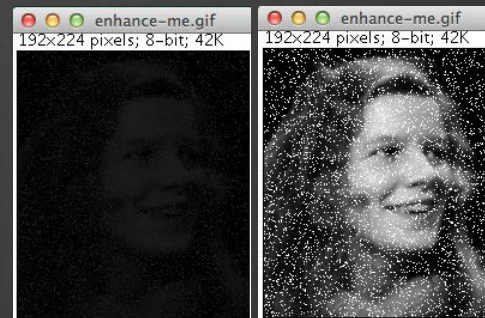
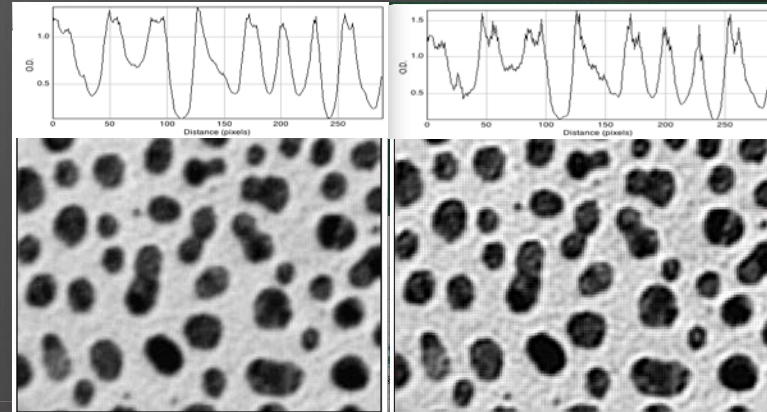
❁ Enhance Contrast: コントラストの強調

❁ File→Open Samples→Enhance Me

❁ Process→Enhance Contrast

Saturated Pixel は、0 以上にする

OK をクリック



画像処理の実際

(複数の画像を重ね合わせる Merge 1)

🔗 サンプル画像を開く

🔗 File→Open Samples→Fluorescent Cells

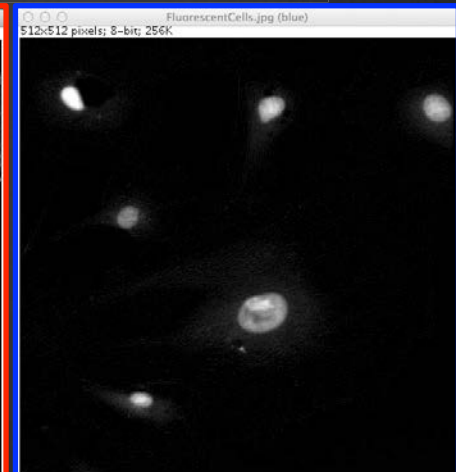
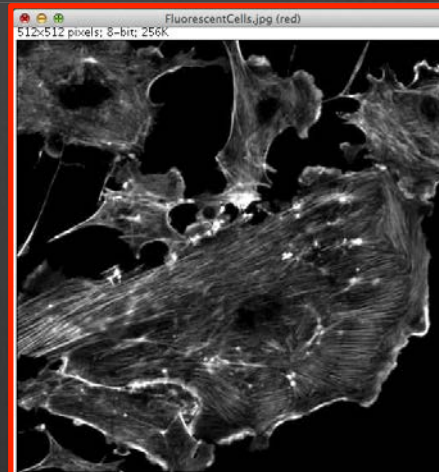
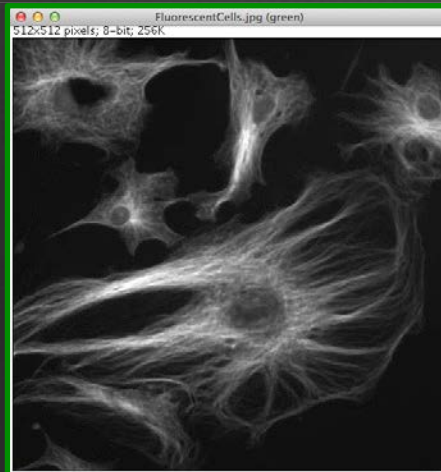
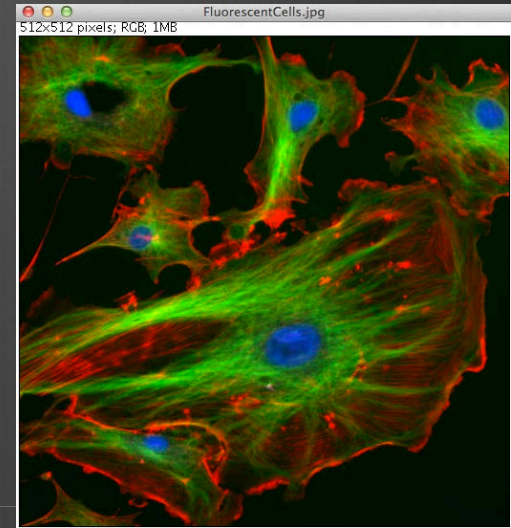
🔗 サンプル画像の情報を Green, Red, Blue に分割する

🔗 Image→Color→RGB Split

実際の実験では、カラー画像を個別に撮影している
注意すべきことは、視野を動かさないこと！

画像を見ると明らかであるが、カラー情報ではない

それぞれの画像は、特定の蛍光波長の光で撮影されたモノクロ画像である



画像処理の実際

(Merge 2)

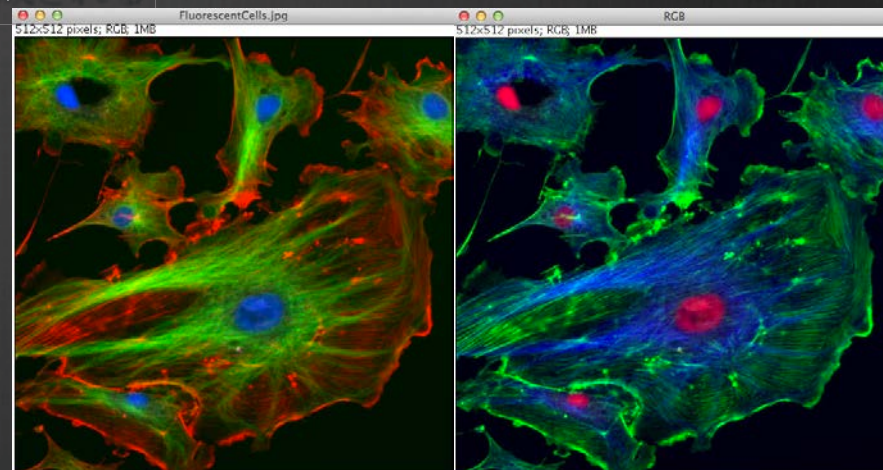
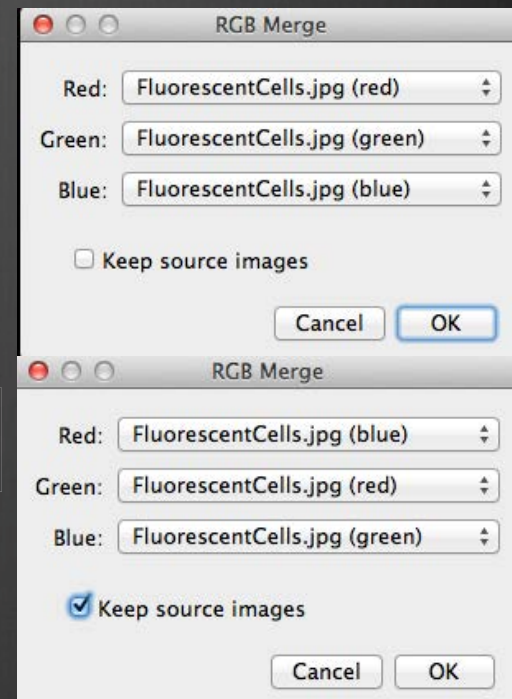
🌀 画像を重ね合わせる

🌀 Image→Color→RGB merge...

Red:, Gree:, Blue: の各フレームをクリックすると
現在開いているファイル名が示される(モノクロ情報)

のでそれぞれ選ぶ

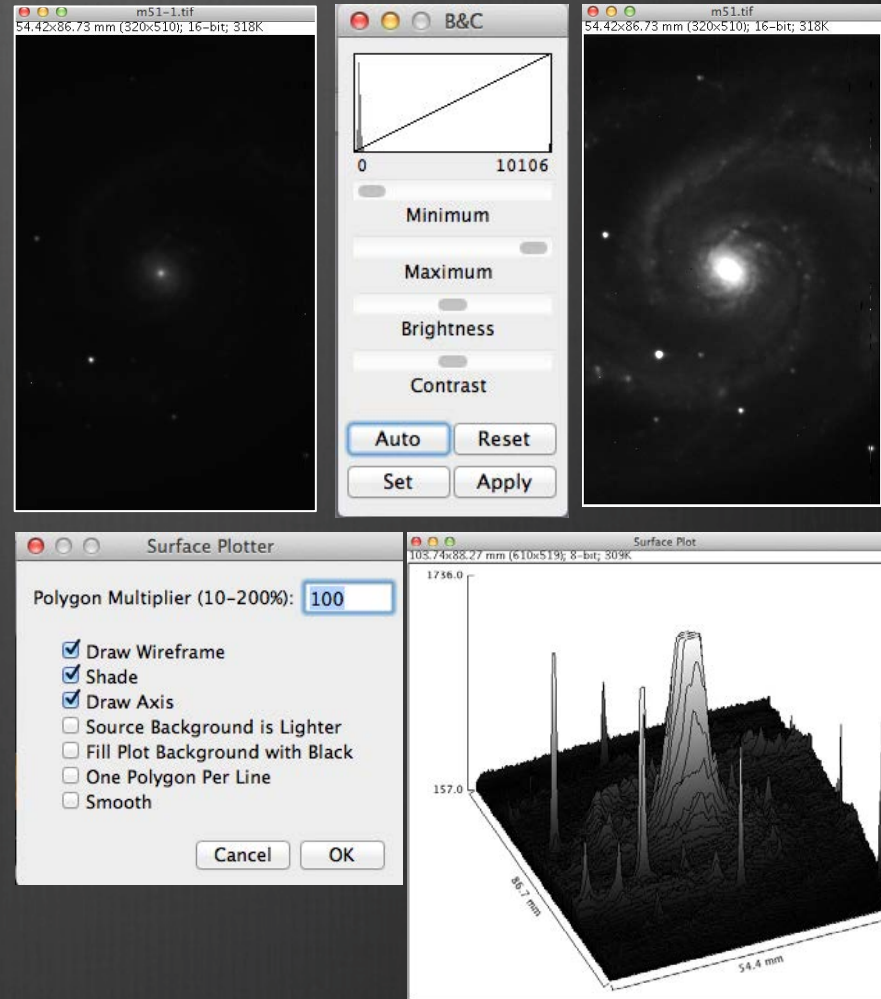
- 試しにすべてを入れ替えてみる(疑似カラー情報を置換)
- Keep source images にクリックを入れ、
元の画像を保護する
- OK をクリックすると三つの画像が合成される
- 先の画像と比較すると
全ての色が入れ替わっている
ことが確認できる



画像処理の実際

(光強度の立体グラフ化)

- 🌀 File→Open Snaples→M51 Galaxy
- 🌀 画像のコントラストを調整する
 - 🌀 Image→Adjust→Brightness/Contrast
 - 🌀 Auto を選択
- 🌀 光強度の3次元グラフを作成する
 - 🌀 Analyze→Surface Plot...
 - 🌀 Draw Wireframe を選択
 - 🌀 Shade を選択
 - 🌀 Draw Axis を選択
 - 🌀 OK をクリック



画像処理の実際

(ヒストグラムを用いたカラー補正)

🌀 サンプル画像を開く

🌀 File→Open Samples→Lena

すこし赤が強く、褪せた印象の写真である

この画像をそのままカラー補正やコントラスト調整しても

色合いが劇的によくなることはない

🌀 サンプル画像の情報を Green, Red, Blue に分割する

🌀 Image→Color→RGB Split

🌀 それぞれの画像のコントラストを調整する(ヒストグラム補正)

🌀 Image→Adjust→Brightness/Contrast

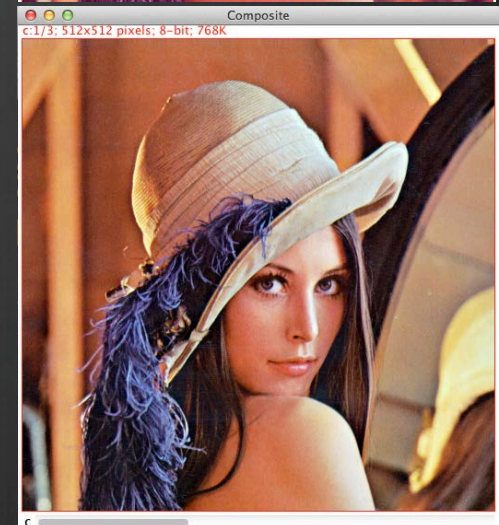
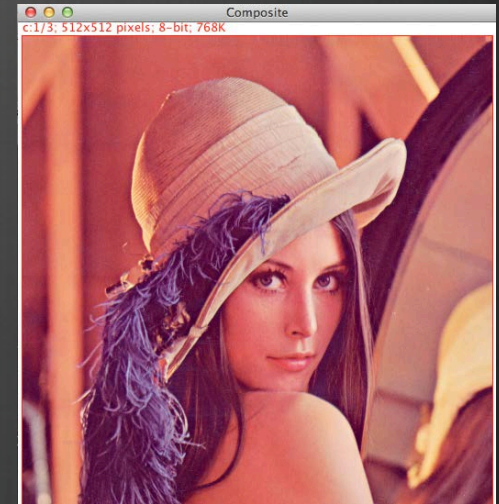
🌀 Auto を選択

🌀 画像を重ね合わせる

🌀 Image→Color→RGB merge...

三色のヒストグラムの分布を均質にすることで、

適正なカラー画像に仕上がる



解析の実際

(距離の測定)

❁ 画像サンプルを使う

❁ File→Open Samples→Leaf

❁ イメージを Gray Scale に変換する

❁ Image→Type→8-bit

❁ 直線ツールで、定規 50 mm 分の線を引く

❁ 引いた線の長さを 50 mm と定義する

❁ Analyze→Set Scale

Distance in Pixels は、線の長さに対応するピクセル数

Known Distance に「50」と入力し、

Unit of Length に「mm」と入力する

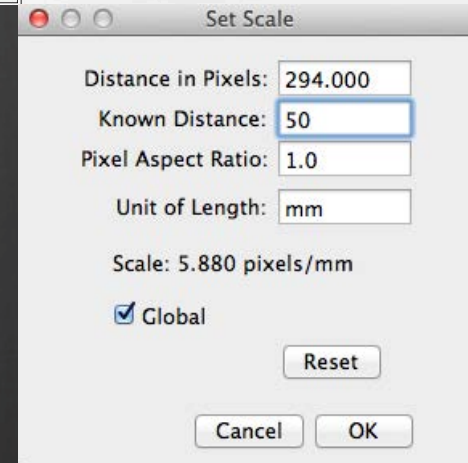
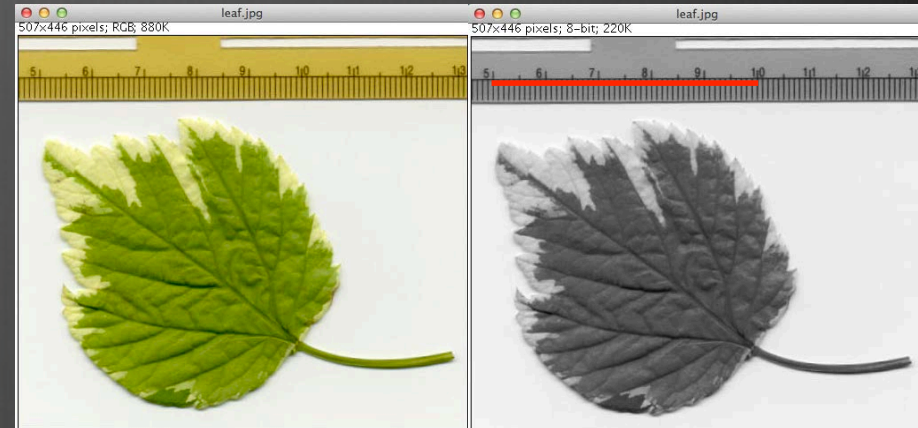
Global に Check を入れると、全ての測定がこのスケールで定義される

❁ 新たに同じくらいの長さの線をラインツールで引く

❁ 新たに引いた線の長さを確かめてみる

❁ Analyze→Measure

Length の項目に長さの値が示されている



	Mean	StdDev	BX	BY	Width	Height	Angle	Length	Results
1	60.647	13.255	25.170	13.946	50	0	0	50	

解析の実際

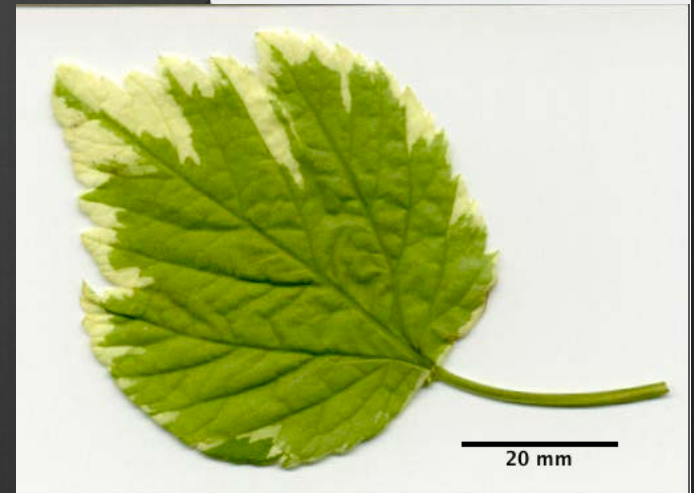
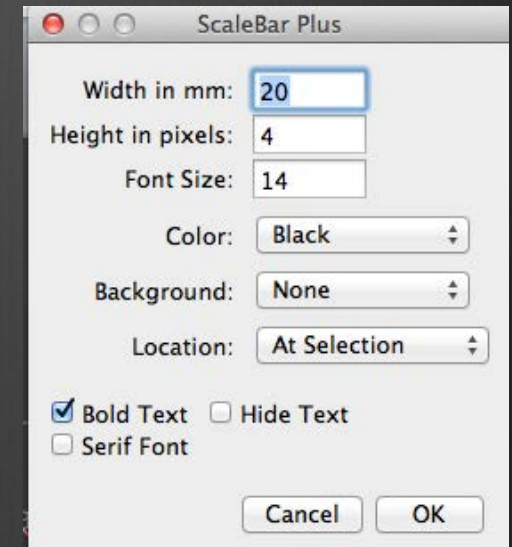
(面積の測定1)

🌀 スケールバーの挿入

🌀 画像の任意の場所に
直線ツールで線を引き

- Analyze→Tools→Scale Bar...
- Width in mm を任意の数値
(例えば 20)と入れると、20 mm
のスケールバーが表示される

- 論文における図には、こうしたスケールバー
の表示は必須である



解析の実際

(面積の測定2)

❶ 画像を2値化する

❷ Process→Binary→Make Binary

❸ 葉の「緑」の部分の面積を測定する

❹ Analyze→Analyze Particles

Show を Outlines に設定

Display Results に Check

OK をクリック

❺ 測定された全ての領域が番号付けされて表示され、さらに測定結果が表として現れる

❻ 相当する番号(2)の Area の値には、約 2,000 mm² と計算されている

The screenshot shows the ImageJ interface with a leaf image. The 'Analyze Particles' dialog box is open, showing settings for Size (mm^2) from 0 to Infinity, Circularity from 0.00 to 1.00, and Show set to Outlines. The 'Display Results' checkbox is checked. Below the dialog, a results table is displayed.

	Area	Mean	StdDev	Perim.	BX	BY	Width	Height
1	957.067	255	0	338.913	0	0	86.224	12.925
2	2023.578	255	0	416.964	4.762	17.687	79.082	54.592
3	0.029	255	0	0.481	50.170	23.129	0.170	0.170
4	0.087	255	0	0.962	7.993	26.531	0.340	0.340
5	0.116	255	0	1.302	5.952	27.891	0.510	0.340

解析の実際

(面積の測定 3)

🌀 葉っぱの全体の面積を測定する

🌀 Image→Adjust→Threshold

🌀 グラフの下のつまみを移動させると

グラフの**赤い枠**が移動する

同時に表示された葉っぱの映像が

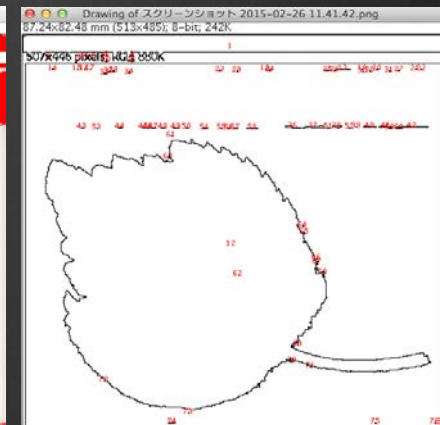
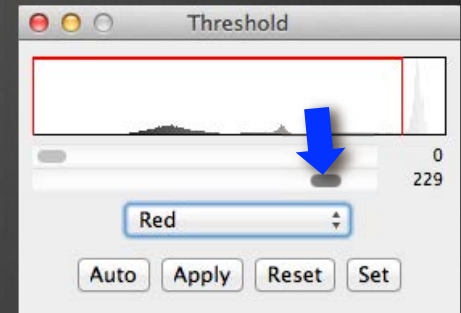
変化するので、**葉っぱ全体が赤くなる**ように設定する

🌀 赤く表示された部分を計測する

🌀 Analyze→Analyze Particles

🌀 測定された全ての領域が番号付けされて表示され、さらに測定結果が表として現れる

🌀 求めたい面積の番号(62)を調べると約 2495 mm² と計算されている



	Area	Mean	StdDev	Perim.	BX	BY	Width	Height	Results
60	0.231	231	0	2.862	78.231	19.558	1.361	0.170	
61	0.029	231	0	0.481	31.122	21.088	0.170	0.170	
62	2495.893	110.198	48.142	321.867	4.762	21.939	80.782	56.803	
63	0.029	229	0	0.481	30.442	25.680	0.170	0.170	
64	0.029	231	0	0.481	58.673	40.136	0.170	0.170	

解析の実際

(粒子分析)

🎯 染色された粒子の数や面積を測定する

🎯 File→Open Samples→Dot Blot

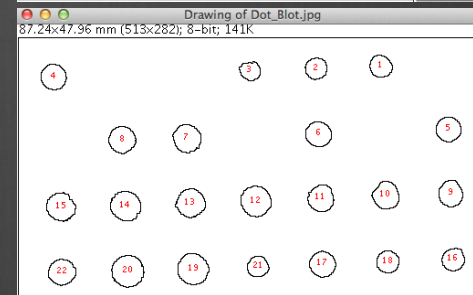
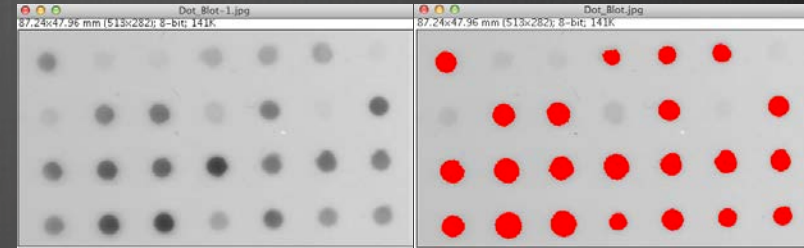
🎯 Image→Adjust→Threshold

🎯 ワンドツール + Shift で赤い点を全て指定

🎯 Analyze→Analyze Particles

🎯 ワンドで指定したものだけが、測定され
番号が付加され、それぞれの面積が測定
される

🎯 これにより、一視野中の標的とする粒子の
全体に対する比率を求めることができる



	Area	Mean	StdDev	Mode	Perim.	BX	BY	Width	Height	IntDen
1	13.305	168.717	4.087	169	13.578	65.306	3.061	4.252	4.082	2244.724
2	12.582	167.738	4.201	164	13.437	53.231	3.571	4.082	4.082	2110.405
3	10.326	173.081	2.095	172	12.317	40.986	4.252	3.912	3.571	1787.160
4	17.470	151.280	13.742	134	15.461	4.082	4.762	4.762	4.762	2642.794
5	16.631	126.433	21.878	105	14.980	77.721	14.626	4.592	4.592	2102.683
6	17.412	141.661	16.824	124	15.320	53.401	15.476	4.762	4.592	2466.565
7	20.854	137.449	20.933	117	17.344	28.571	15.986	5.272	5.272	2866.311
8	19.205	143.611	17.525	130	16.564	16.667	16.327	5.102	5.102	2758.052
9	16.891	144.497	15.358	135	15.320	78.231	26.361	4.422	4.932	2440.708
10	19.205	133.889	20.137	112	16.523	65.646	26.531	5.102	5.102	2571.324
11	18.482	140.858	18.430	121	16.362	53.741	27.211	4.932	4.932	2603.313
12	24.845	112.383	40.680	64	18.605	41.327	27.381	5.612	5.782	2792.153
13	21.808	130.443	27.788	97	18.007	29.082	27.891	5.612	5.442	2844.706
14	24.064	129.385	30.925	176	18.564	17.007	28.401	5.612	5.442	3113.518
15	21.316	142.151	22.308	177	18.066	5.102	28.571	5.442	5.442	3030.132
16	13.738	158.109	8.929	151	13.918	78.741	38.946	4.252	4.252	2172.185
17	17.817	133.372	22.444	107	15.843	54.082	39.456	4.932	4.932	2376.238
18	13.449	159.062	8.560	151	13.537	66.667	39.456	4.082	4.082	2139.271
19	25.944	116.369	41.431	176	18.945	29.592	39.966	5.782	5.782	3019.083
20	27.303	124.373	36.114	177	20.048	17.177	40.306	6.122	5.952	3395.807
21	11.830	167.719	4.631	163	12.857	42.517	40.476	4.082	3.741	1984.040
22	18.771	148.929	15.460	139	16.282	5.442	40.986	5.102	4.932	2795.566

解析の実際

(光学密度の校正1)

- ❶ Kodak No.3 校正用の21ステップの

光学密度標準(0.05~3.05 OD)

を入手する <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>

- ❷ 入手した画像をステップごとに四角ツール

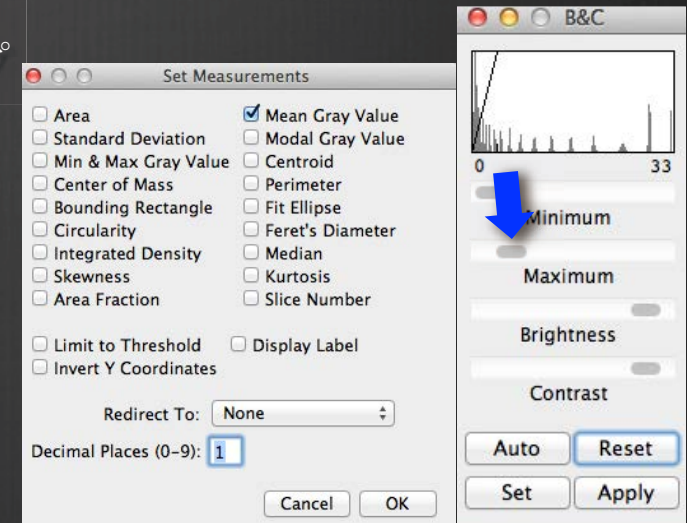
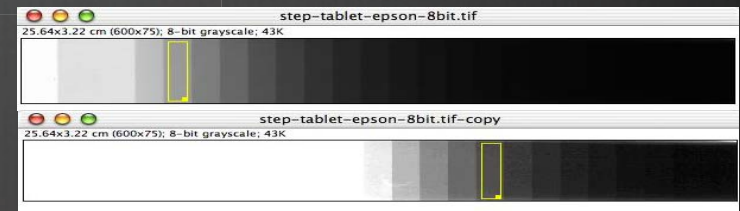
で Mean Gray Value のみを測定する

- ❸ 最初の白 (Background) を測定したら、順次18ステップ測定し、全部で19のデータを得る

途中、黒い部分の境目がわかりにくいので

- ❹ Image→Adjust→Brightness→Contrast

表示を明るくして測定をつづける



解析の実際

(光学密度の校正2)

🎯 Analyze→Calibrate...

こうすることで、今読みとった値が右の図に挿入されている

🎯 Function を Rodbard に設定

🎯 Unit を O.D. と入力

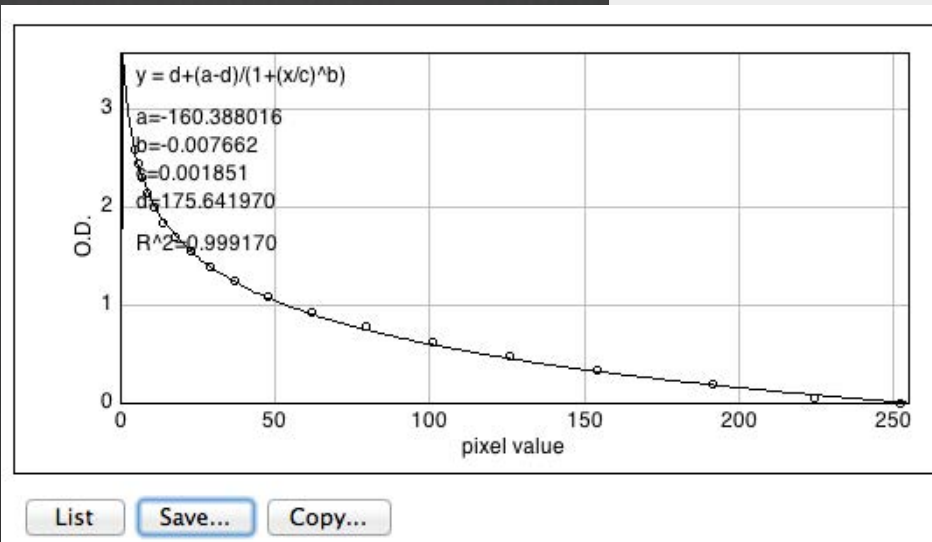
🎯 右側のカラムにO.D.の値を入力し、
一旦 Save する → 何度も使用できる

🎯 Global Calibration に Check を入れ、OK をクリック

🎯 カリブレーションカーブが出現するので、保存すると良い

252.39	0.00
224.73	0.06
191.82	0.20
154.57	0.34
125.80	0.49
101.16	0.64
79.50	0.79
61.78	0.94
48.15	1.10
37.09	1.26
29.22	1.41
23.10	1.56
17.88	1.70
13.99	1.85
10.95	2.01
8.60	2.16
6.99	2.32
5.80	2.46
4.95	2.60

0.00
0.06
0.20
0.34
0.49
0.64
0.79
0.94
1.10
1.26
1.41
1.56
1.70
1.85
2.01
2.16
2.32
2.46
2.60

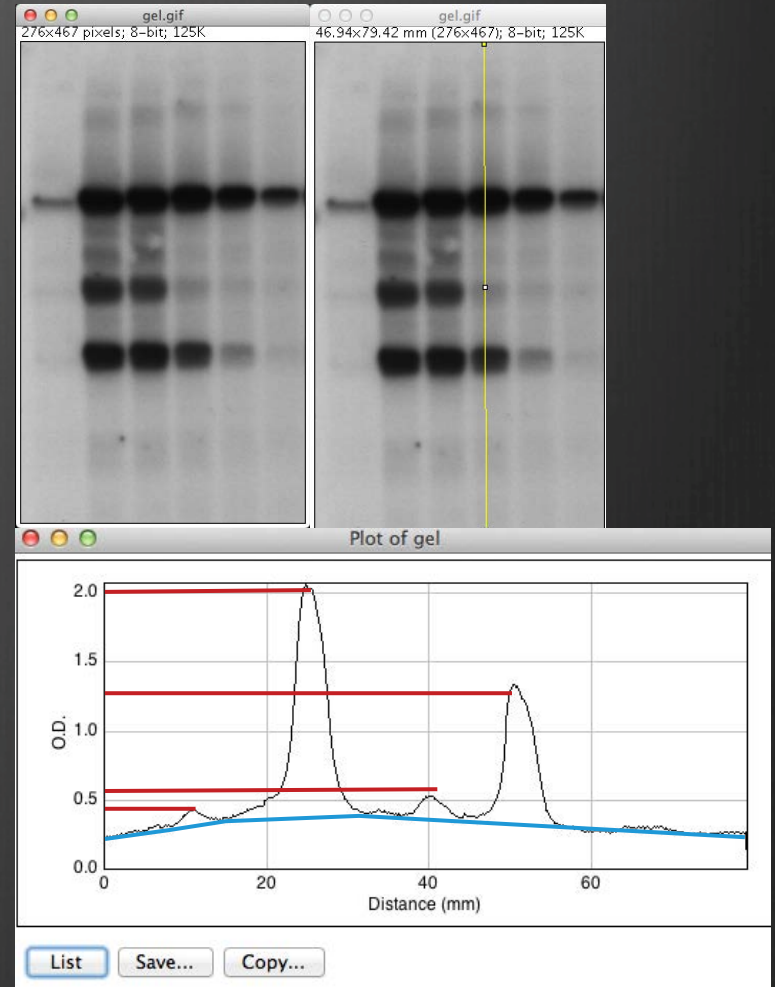


解析の実際

(線による測定)

- ゲルのサンプル画像を使ってみる
 - File→Open Samples→Gel
- ラインツールでゲルに線を引く
- Analyze→Plot Profile
- 先に設定した距離やO.D.の情報をグラフにプロットしてくれる
- 直線ツールでピークの位置までの距離を測定することができるので、バンド位置を測定することが可能
- Analyze→Measure

- ところで、青線でしめした部分にみられるように写真撮影した画像上には、光ムラが生じている
- こうした光ムラを除去するには、どうしたらよいだろうか？



解析の実際

(バックグラウンド除去の原理)

🌀 ImageJ には、先ほどの光ムラのノイズを消去する機能がある

🌀 Process→Subtract Background である

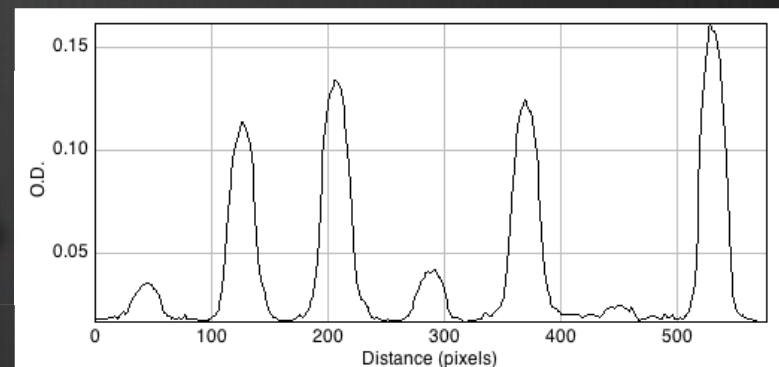
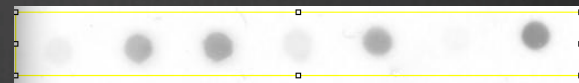
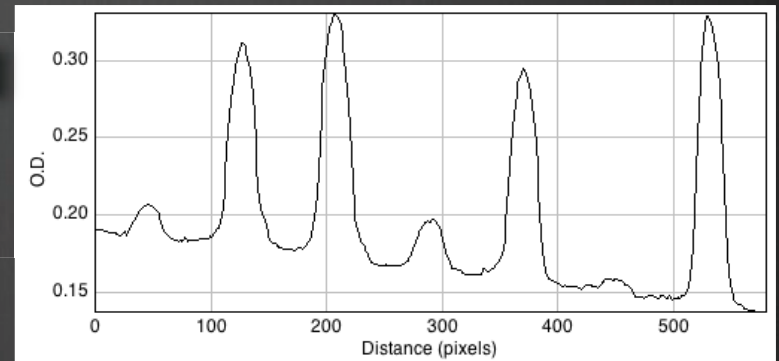
🌀 例えば、サンプル画像の Dot Blot の一部分の OD を Plot Profile で描かせると右の図のようになる

🌀 この Profile を平滑化する



🌀 平滑化で得られたこの部分をノイズとして元の Profile から引き算する

🌀 すると、下の図のようなプロフィールになるという仕組みである



解析の実際

(バンドの比較 1)

🌀 ゲルのサンプル画像を使ってみる

🌀 File→Open Samples→Gel

🌀 バックグラウンドを消去

🌀 Process→Subtract Background...

🌀 Rolling Ball Radius 数値を設定(何度か試行し適正に)

🌀 バックグラウンドが白い場合は、Light Background に Check を入れ、バックが黒い場合は、Check を外す

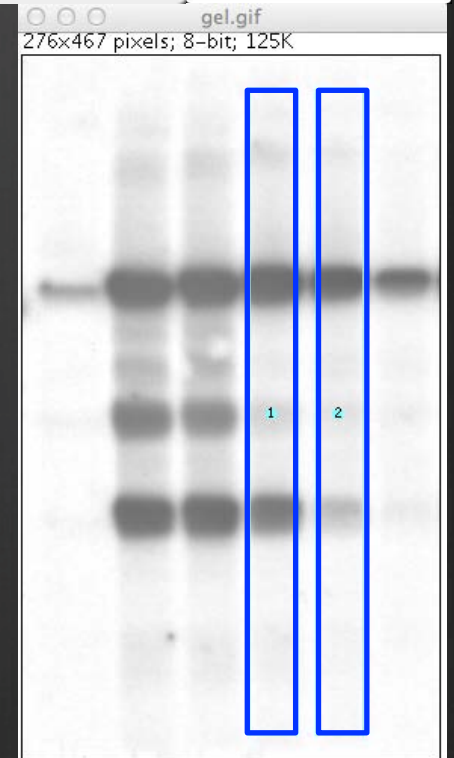
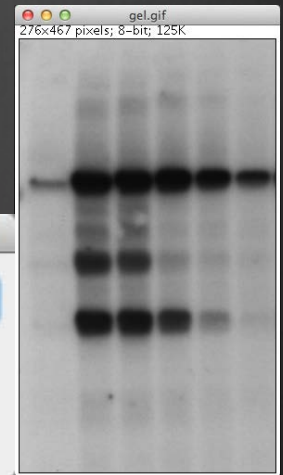
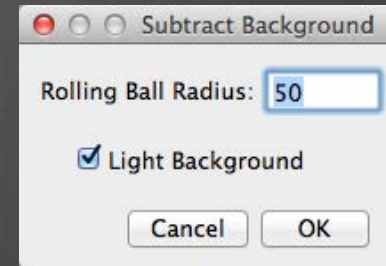
🌀 長方形枠でバンドを一本囲み

🌀 Analyze→Gel→Select First Lane

🌀 次にカーソルキーで、長方形枠を隣の Lane に移動させる

🌀 Analyze→Gel→Select Next Lane

🌀 順次、長方形枠をカーソルで隣の Lane に移動させ、すべてのレーンを指定する



解析の実際

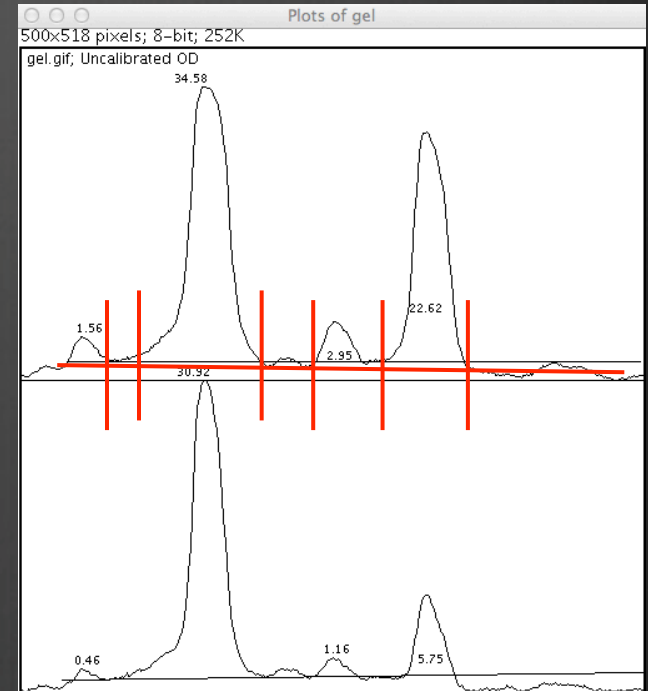
(バンドの比較 2)

- 各レーンのプロファイルをプロットする
 - Analyze→Gels→Plot Lanes
- 直線選択ツールで、ベースライン(横)とドロップラインを引いて、ピークの領域を閉じる
- 各ピークを中心をワンドツールで選択すると各ピークのエリア面積が測定される
- プロットにピーク面積の全体の面積に対する比率を表示させる

Analyze→Gels→Label Peaks

こうすることで、測定値の表に percent が表示されることになる

後は、エクセルで計算すればよい



	area	percent
1	368.506	1.560
2	8166.468	34.581
3	696.749	2.950
4	5341.841	22.620
5	108.607	0.460
6	7301.296	30.918
7	273.799	1.159
8	1357.870	5.750

解析の実際

(測定値の設定 1)

⊗ Analyze→Measure や Analyze→Particles で測定するときに記録すべき測定値を指定することができる

⊗ Analyze→Set Measurements

⊗ Area: 選択領域の面積

⊗ Mean Gray Value: 選択枠内の平均グレー値

Analyze→Calibrate で画像補正をしていれば、補正単位 (O.D.) で記録される

⊗ Standard Deviation (標準偏差): 中間グレー値を使ってグレー値の標準偏差を示す

⊗ Modal Gray Value: 選択枠内の最も高いピークを示す

⊗ Min & Max Gray Value: 選択枠内の最大と最小を示す

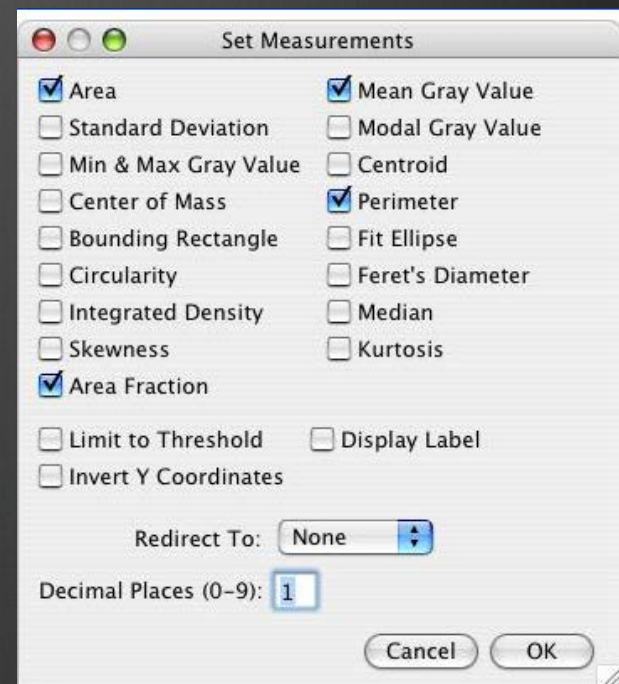
⊗ Centroid (重心): 選択枠内の中心座標

⊗ Center of Mass (質量中心): 選択枠内の全ての画素のXY軸の明度の平均値

⊗ Perimeter (周囲): 選択枠の外周境界線の長さ

⊗ Bounding Rectangle: 選択枠内の最小の長方形

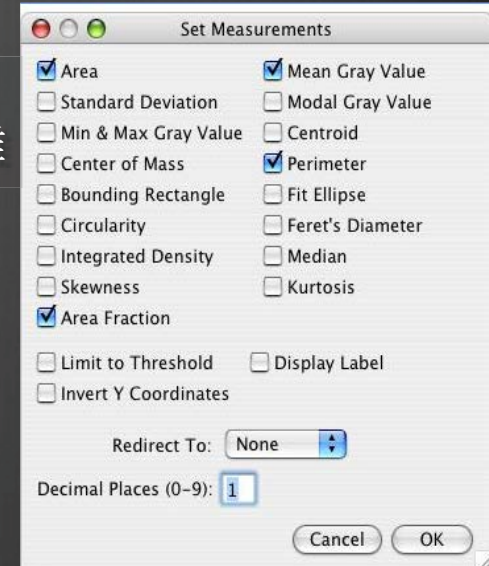
⊗ Fit Ellipse (最適楕円): 選択枠にフィットする楕円



解析の実際

(測定値の設定 2)

- ❁ Circularity (円形度) : $4\pi * \text{面積} / \text{直径}^2$ この値が1.0だと正円
- ❁ Feret's Diameter (フェレ径) : 選択範囲内の二点間で最も長い距離
- ❁ Integrated Density (総密度) : 画像や選択枠内の画素値の合計
- ❁ Median (中央値) : 画像や選択枠内の画素の中央値
- ❁ Skewness (歪度) : 分布の非対称性を示す指標
- ❁ Kurtosis (尖度) : 分布の鋭さを示す指標
- ❁ Area Fraction (面積比) : Image > Adjust > Thresholdを使って赤くハイライトした部分のパーセント表示
- ❁ Limit to Threshold (閾値制限) : 閾値に該当する画素だけが計算測定される 使用するためには、Image > Adjust > Thresholdで制限閾値をセット
- ❁ Display label (ラベルの表示) : 画像名とスライス番号(スタック画像のみ)が Result tableの最初の行に記録される



解析の実際

(測定値の設定 3)

- ❁ **Invert Y Coordinates (Y軸の逆転)**: XY原点は、画像ウィンドウの上方左端を原点とする代わりに、下方右端になる
- ❁ **Redirect To (リダイレクト)**: このポップアップから選択された画像が、Measure (測定), Analyze Particle (粒子解析) コマンドによって行われる統計計算の対象になる。Redirect To の特長は、画像のアウトラインの描画を許可し、他の画像でこれと一致した領域を測定できる
- ❁ **Decimal Places (小数点の位置)**: これは、ヒストグラムウィンドウやresultテーブルにおいて表示される実数の小数点の右側の桁数

