動物生理学実験 A

画像処理技術習得と光学顕微鏡観察

この実習は、光学顕微鏡の「分解能[#]」や「コントラスト[#]」について理解すること、そして、いくつかの 基礎的な画像処理技術を習得し、それを光学顕微鏡の観察に応用することを目標にしています。ここで演習 する画像解析法 (ImageJ) は、今回の実験だけではなく、タンパク質や DNA の電気泳動結果の定量的な解析、 記録画像中の周期構造の解析、経時的な変化を記録した動画の解析など、非常に幅広い解析手段として利用 できます。この機会に習得して、さまざまな場面でも活用できるようにしてください。

この実験Aは、すべて演習実施形式です。課題を順番に実施して行きます。多くは、ソフトの複雑なコマ ンドを忠実に実行するだけの作業ですが、中には、考えなければならない考察問題もあります。決められた 手順に従って作業を進めると、自動的に結果が出るようにしています。第1段階の課題 A1~A3 では、用い る画像処理ソフトの演習です。その後、課題 A4~A5 では、実際に光学顕微鏡を使った応用実験を実施しま す。演習課題形式になっていますので、それを1つ1つ解答する形でレポートを完成させて下さい。テキス トの文中にある番号、Q A1-1 ~ Q A1-3、Q A4-1 などは、例題や設問の番号を示しています。どの課題番号 に対応する解答か、レポート作成時には、必ず明記してください^[注1]。

^[注1] Q A1-~やQ A3-~は、各演習の終了した翌週(同じ曜日の 13:00)までに、word で書いたレポート ファイルとして manaba 上で提出してください。課題 A4~A5 は実習室 2232 号室で各自のペースで観察を実施し、それぞれの終了後、一週間以内(同じ曜日の 13:00)に、同様に manaba 上で提出して下さい。課題レ ポートのファイル名には、氏名と学生証番号(例:春日徹_9102050D.docx)を記載して下さい。提出するフ ァイル内にも、氏名と学生証番号は記しておいて下さい。

^[注#]この記号は、章の最後(A5-4以降)に用語解説を参照

A1-1

課題 A1 画像処理ソフトの導入と画像処理演習

はじめに

光学顕微鏡は、対象となる生物試料を拡大して観察する便利な道具ですが、1つ大きな欠点があります。 分解能#に限界のあることです。ここでは、実験を通して、顕微鏡の分解能と、合わせてもう一つの重要な パラメータであるコントラストとはどのようなものか、理解することが目的です。デジタルカメラ(USBカ メラ)を使った顕微鏡像の簡単な撮影方法も**課題 A4** 以降の実験で修得します。

まず、分解能#とコントラスト#の違いを考えてみます。下の4つの像の違いは何でしょうか?



mv.avex.jp/ga/news.html

aが一番はっきり見えますが、bは淡く、cはボケています。dはボケている上に、さらに全体が淡くなっ て見えます。bやdのような画像をコントラストの悪い画像といいます。コントラストとは、画像の中で<u>一</u> <u>番明るい部分</u>と暗い部分の差に相当します。cやdでは、微細な部分が見えなくなっていますが、このよう な画像を解像度の低い(悪い)、あるいは、分解能の悪い(低い)画像と呼びます。分解能とは、像の鮮明さ を示す指標です。厳密には、ある2点間の区別可能な最小距離で、それより接近すると識別できなくなる限 界の距離として定義されています(本章の後に続く「補遺:光学顕微鏡のしくみ」参照)。解像度は、分解能 と同義、あるいは、その逆数に相当する数値を用いることがあります。この課題で出てくる「空間周波数[#] (単位長さ当たりで何本の縞模様かを示す数値)」も分解能[#]や解像度[#]を示す指標として使われます。ピク セル数(画素数)[#]、階調[#]、ビット数[#]など、画像の精度を示す他の用語も含めて、この実習を通して理解 してください。

(i) 画像処理ソフトの導入

アップル社コンピュータ対応の画像処理ソフトとして開発された NIH Image は、その後、Windows 版に対応した Scion Image や Image Jとして改良されて来ています。フリーのソフト(米国、NIH[#]提供)で、政界中の研究者が多様な使い方をしており、画像計測や画像処理のための豊富な付加機能も提供されているのが特徴です。通常の PC 上の絵描きソフトとの違いは、32-bit の画像データまで取り扱うことができる点ですが、ここでは、この Image Jを各自が使用する PC に導入して。画像処理法の概要を演習します。A1-8ページ以降に始まる <Q A2-1>等は、設問や考察する課題ですが、レポートには、その番号と解答を順に記載して下さい。

PC への ImageJ の導入は manaba 上の下のサイト (コースコンテンツ→導入方法→入手先) を参照してくださ い。ImageJには、PCのOSの違いによってインストールソフトが違いますので、手持ちのPCにあったもの (Mac OS X, Windows 32bit, Windows 64bit など)を選んで、インストールしてください。この実習書は pdf版をmanabaのサイト上でも掲載しますが、そのpdfファイル内から、以下のページで示すアクセス先へ はリンクさせています。

動物生理学実験Aのpdf版 実習関連データ等リンク集

ImageJ ダウンロードサイト

https://imagej.nih.gov/ij/download.html

ダウンロードサイトのページ



インストールが完了すると、右の様なアイコンが現れます(インストール場所で指定したフォル ダ内の場合もあります)。

このアイコンをクリックすると下の様なコマンドメニューが現れます。

🛓 ImageJ	-	×
File Edit Image Process Analyze Plugins Window Help		
	3 1	≫
Multi-point or point (alt or long click to switch; double click to configure)		

どのアイコンから、どのような処理が可能となるは、下のサイトの解説を参考にしてください。他にも日本 語版・英語版の解説サイトが多数見つかりますので (manaba コンテンツ参照)、それも活用してください。

https://room.chuo-u.ac.jp/ct/page_3109836c2369172

以下に続く課題では、ダウンロードする画像が指定されています。それらの画像ファイル(名称を確認し て)を、各自のコンピュータにダウンロードしながら、作業を進めます。

(i)基本操作の練習

File Ed	it Imag	e Pro	cess A	nalyze	Plug	jins \	Windov	w H	lelp			
	30.	. A		AQ	3	1	Dev	Stk	0	8	8	>
ImageJ 1.4	6e: Java	.6.0 20	[64-bit]:	426 com	mand	s: 58 m	acros					

- デスクトップ上の「Image J」をクリックして画像解析ソフトを起動します。しばらくすると、上のよう なメニューがデスクトップ上に表示されて準備完了です。Mac OS の場合、左上のコマンドメニュー(ア イコンリスト)の中に、他のものに混ざって表示されているかも知れません。詳しい操作方法は(ii) 画像フーリエ変換以降で行いますが、ここでは、サンプル画像を使い、簡便な輝度データ#表示させる練 習を行います。
- 上に矢印で示した「File」→「Open Samples」のコマンドで、サンプル画像を表示させることができます。後日実施するようなカメラ撮影した画像も、「File」→「Open」で表示させることができます。以降、説明文の中で「・・・」と括弧で示した箇所は、このようなメニューからコマンドをクリックして選択する操作を意味しています。コマンドのリストは、manaba上の資料も参考にしてください。開いた画像の上左に、縦横の画素数と共に、RGB、 8-bit、 32-bit など、画像に関する情報が表示されるを確認してください。
- 3. 上の図の中にある(ア)のメニュー(直線)を選んで、画像の好きな箇所に線を引くことができます。その後、「Analyze」→「Plot Profile」と操作すると、ここで描いた線に沿った数値をグラフで示すこと

ができます。グラフの横軸、 Distance(pixels)が描いた直線 に沿った位置、縦軸が画像の明暗 の数値(輝度値)を示します。こ の輝度値は、マウスでカーソルを



移動させるだけでも、右図のように、XY座標(単位はpixel)とともに「value =149.2077」などと表示 されます。細かな値ですが、この数値から何 bit の画像データか推測できます。

4. Image J には、処理した画像を保存する機能も付いています。「File」→「Save」とすると、画像情報が すべて正確に Tiff 形式[#]で保存されます。Word に貼り付けたりする場合、まず、「Image」→「Adjust」 →「Size…」あるいは 「Canvas size…」で 500×500 程度の適度なピクセル数[#]に小さくします。小さ くするには別の方法もあります。上のメニューの中の矩形(イ)を選択し、必要な箇所だけを指定して、 「Edit」→「Copy」(または、Ctrl-C)の後で、「File」→「New」→「Internal Clipboard」で、コピー した箇所だけの画像が新しく作成できます(注:「Internal Clipboard」は、Image J ソフト内部だけの コピー・ペースト専用メモリー、「System Clipboard」は、他のソフトで作成した画像を取り込む機能で 使います)。word のファイルに画像を貼り付ける場合、「File」→「Save As」→「Jpeg …」のコマンド jpeg 形式[#]で一旦自分のフォルダに保存し、これを word 上で読み取って使います。「Edit」→「Copy to System」を実施してからも word ファイル上へ直接コピー/ペーストすることも可能です。複数の方法あ りますので、どれか使いやすいものを選んでおいてください。 記録した動画を表示させるには、「File」→「Import」→「AVI…」で開きます。Image J は、一般的な形 式の画像ファイル(*.bmp[#]、*.tiff[#]、 *.jpeg[#]、*.gif[#]など)は自動的に判別して対応しますが、そ れ以外の特殊なもの^[注3]は、この「Import」のメニューから画像の種類を選んで読み込みます。AVI[#](動 画のファイル)も「Import」のメニューで読み込みます。

^[注3] 画像のファイル形式はさまざまなものがあります。Tiff[#]や BMP[#]は元の画像情報をほとんどそのま ま記録するファイルですが、ファイルサイズが大きくなります。Jpeg[#]や Gif[#]は、画像を圧縮して保存 します。ファイルサイズは小さくなりますが、保存・読み込みを繰り返すと、細かな画像情報が失われ ます。AVI は、一般的な 8-bit[#]動画ファイルです。32-bit の動画ファイル(厳密には、後述するスタッ ク画像)としての保存も可能です。

 以下に画像処理の例を示します。リンクされている箇所(下線部)をクリックすると、ネット上の画像 が表示あるいはダウンロードされます。この課題はレポートへの記載は不要ですが、操作に慣れる意味 で、是非、一度は試してみてください。



使用する画像

(ア) Pleurosigma part (ファイル名: <u>Pleurosigma_part.jpg</u>)

(イ) SinePattern (ファイル名: <u>SinePattern. bmp</u>)



(7) Pleuropsigma (ファイル名: <u>Pleurosigma_b. bmp</u>)



一個像の読み込みと書き出し:上の(ア)の画像(ファイル名:<u>Pleurosigma_part.jpg</u>、ケイ藻細胞の光 学顕微鏡写真、奥修博士提供)を開きます。「File」→「Save as」→「Text image...」でファイル名
 を指定すると、ここで表示されている画像の輝度データ[#]を、エクセルなどで読める数値のデータとして ファイル出力できます。Jpeg ファイル(JPEG 形式[#])の画像は、8-bit(8-ビット)[#](256 階調[#])で記録 されているので、ここで出力したデータも、0~255 の間の整数値(輝度データ[#])として出力されるこ とを確認して下さい。この機能を使って、画像⇒数値データの変換が自在にできることになります。逆 の変換、数値データ⇒画像の変換は「File」→「Import」→「Text image...」です(注:カラーの画像 の場合、この作業で記録できるものは、輝度を示す数値(輝度値)だけですので、逆の作業を行うと自 黒の画像となる)。

- 8. 次に、ここで書き出したテキストデータのファイルを Excel で読み込んでみます。その中で、例えば 16 番目の列(P列)のデータをグラフ表示させると、画像の輝度データ#がどのように変化しているかがわかります。さらに、その輝度変化の変動周期(一周期)は、ピクセル数(画像の最小単位)で、およそ、どの程度になるか、わかります。このような方法で繰り返しの縞模様の周期(グラフの頂点と頂点の間の距離)を簡便に調べることができます。周期には、ある程度のばらつきはありますが、複数調べるとその平均値もわかります。
- 9. 上のような数値を正確に出すには、他には、「Straight line selection」を使って、観察したい方向を 決め輝度データ[#]を読み込む方法、あるいは、単純にマウスで、位置を指定して、その座標を読み取って 計算する方法などがあります。
- 10. **画像の明るさ・コントラストの調整**:画像が暗いときや鮮明に見えないときは、「Image」→「Adjust」 →「Brightness/Contrast」で調節することができます(「Auto」のクリックなどで変わることを確認)。 Brightness とは、全体の明るさです。Contrast (コントラスト[#])は、もっとも明るい点と暗い点との 間の明るさの差に相当します。注意しなければならないのは、ここの操作で変化するのは、単に PC 上で の表示だけという点です。もとの画像データ(256 階調[#]のデータ)にない情報は、どのように輝度やコ ントラストを変化させても、あたらしく見えてくることはありません。最初に観察像を写真撮影したと きの条件で、すべて決まります。8-bitの輝度データ[#]のために、コントラストが高すぎると、ざらざら した感触の画像となり、詳細が見えにくくなります。その様子も確認してみてください。コントラスト を高めてから、「Analyze」→「Surface plot」などを使うと、その様子が直感的によく理解できる表示 となります。
- 11. 画像の回転、反転、擬似カラー表示などの加工:反転は「Edit」→「Invert」、擬似カラー表示は「Image」
 →「Lookup Tables」で選択し変えることができます。これらは表示方法の変更だけの意味しかありません。表現したい箇所を強調したり、向きを変更したりするときに使用します。回転は「Image」→「Transform」
 →「Rotate」で可能です。この回転作業だけは、肉眼ではよくはわかりませんが、ピクセルの間の補間処理#(ピクセルの間のデータを計算で予測する作業)を行いますので、実際は画像の情報量としては減少し、もとの画像が再現できなくなる点は注意しなければなりません。試しに、数度ずつ、数多く回転させる(同じ操作を繰り返すときは「Cnt1-R」)と、オリジナルのものとは異なる画像に次第に変化することがわかります。操作をもとに戻す作業は「Cnt1-Z」です。
- 12. 画像のエッジを抽出する方法①:上の(ウ)の画像(ファイル名:<u>Pleurosigma_b.bmp</u>)を開き、「Process」
 →「Enhance Contrast」の操作を行います。これによって、自動的にコントラストを増強させ、見やすくする加工を行います。
- 13. **画像のエッジを抽出する方法②**:上と同じファイルを新しく開き、「Image」→「Duplicate」で同じ画

像を別の名称で複製します。この操作で、「Pleurosigma_s-1.bmp」という別の名前の画像が自動的に作られます。2つある画像の中で、片方を、「Process」→「Filters」→「Gaussian Blur (radius は 5-10 程度を選択)」で処理します。Radius はボケ処理の程度を示すパラメータですが、ここでは詳細の説明は省きます。この操作で、人工的にボケさせた画像を作ることができます。この後、次の操作に移ります。

- 14.「Process」→「Image Calculator」で「Operation」を「Subtract」に選択した後に、上のボケ処理を 実施する前と後の2つの画像の間で減算処理(輝度データ#の減算処理)を行うことができます(注:それぞれのファイル名を間違えない様にして演算する)。もちろん、同じ画像から同じ画像を減算処理すると真っ暗な画像になります。また、処理のあとで、うまく表示できていなかったり、暗い像だったりしたら、上の(4)と同じ作業で、適切な明るさやコントラストを選択し、見やすくします。この減算処理によって、もともとの画像にある明るすぎる部分をキャンセルして暗くすることが可能になります。その結果、他の繊細なコントラストの部分を強く強調して、明瞭に表示させる効果が出てきます。小さな構造物を表示するときには特に効果的です。これもコントラストをあげて、見やすくするだけの加工作業です。もとの画像の輝度データ#にないものが、新しく見えてくる訳ではありません。
- 15. このような画像処理で守らなければならない重要なルールがあります。顕微鏡の画像は、様々な処理操作をおこなう場合には、最初のオリジナルの画像の全領域とコントロール#となる実験データの両方に、まったく同じ処理を実施する必要があります。観察者にとって都合の良いような、画像の一部の処理、強調したい箇所だけを見やすくしたり、逆に、見せたくない箇所を削除したりするような操作は、この様なソフトを用いれば容易に実施することができます。しかし、部分的な加工作業は真実をゆがめて伝えることに相当し、科学を志す者は、決して実施してはいけない捏造行為です。もし、様々な画像処理を実施した場合、どのような処理を、どのような順番で行ったか、実験レポートには正確に記述します。

(ii) 画像フーリエ変換

これまでの操作で、Image J の中の簡単な操作方法を学習しました。実際の機能はさらに多種・多様で、 学習や研究の上で、より使いやすい機能を関連 web サイトから見つけることもできます。この節では、2 次元のフーリエ変換の演習を行います。まず、上の(イ)からリンクされている画像(ファイル名: <u>SinePattern.bmp</u>)を開き、以下の操作を行います。これまでに開いている他の画像がある場合、それらは すべて閉じ、以下の作業に移ります。

 2次元フーリエ変換の操作:「Process」→「FFT」→「FFT」と順番に実施します。ここで用いる画像 は、一定の周期で明暗が変化する単純な縞模様です(正弦波格子と呼びます)。上の操作によって、別 の新しい画像(FFT of SinePattern.bmpと名前が付いている画像)が作られるのがわかります。これ は、SinePattern.bmpの中の周期的な模様を分析して、2次元のマップとして表現したものです。周期 は縞模様の間隔ですが、その逆数は単位長さあたりの縞の数に相当し、これを空間周波数[#]と呼びま す。音の周波数とその逆数の波長の関係と同じです。こうやって作成した空間周波数のマップ(強さと 方向を示したもの)を FFT 画像(フーリエ変換後の画像)と呼びます。このような操作を2次元画像の FFT 変換、あるいは、FFT 処理と呼びます。FFT は Fast Fourier Transformの略で、PC 上で演算するた めに高速化されたソフトに由来する名称です。さて、FFT 変換とは何でしょうか?実際の作業の意味を 理解する目的で、以下の操作を行います。 <u>FFT 画像が「active」になっている</u>のを確認して下の作業を実施します。Image Jのメニューの中で丸印のツールアイコン(Elliptical or brush selections)をまず選びます。次にFFT 画像の中にある中で、明るいスポット部分(中心以外にあるものの中からまず一つ選ぶ)をカーソルで小さく囲み(マウスのドラッグ作業)、「Edit」→「Cut」(又は、Ctrl+X)の操作で、この部分を削除します。この操作で、FFT 画像の中にある一部の輝度データ[#]が、完全に消去されたことになります(注)。消去する場合、画面の中心を挟んでちょうど反対側にある対称な位置にあるスポットも、必ず同じように消去処理するようにします。この操作で、FFT 画像の中にある一部の情報が欠落したものを人工的に作ることができます。その欠落した情報とは、何でしょうか?次に示す FFT 処理と逆の処理(逆変換)を行うとわかります。

注:ソフトの動作上の制約で、処理画像データの中に、0か255の輝度を持つデータが必要です。消去後の場 所が灰色になっているときは、「Image」→「Color」→「Color」→「Color Picker」または、「Cntl-Shift-K」で右のような画面を表示させて、マウスで一番黒い箇所(一番上のライン)をクリックしてから、 上の作業を再度進めてください。



- FFT 処理した画像が選択されて active になっている(処理対象の対象画像として選択されている)こ とを確認し、Ctrl+A(全画面が選択される)を押した後に、「Process」→「FFT」→「Inverse FFT」 を実施します。新しい画像が現れますが、「Image」→「Adjust」→「Brightness/Contrast」で適度に コントラストと明るさを再調整して画像を表示させます。この操作は、上の操作(1)のまったく逆の計 算を行うもので、逆 FFT 変換と呼んでいます。計算の結果、別の画像(フーリエ逆変換像、Inverse FFT of SinePattern.bmpと名前が付いている画像)が表示されます。ここで新しく作られる画像は、 もとの画像から、上の(2)の操作で情報を削除した残りの部分に相当します。どの部分が欠落している でしょうか<Q A1-1>?同じように、FFT 画像の中の他のスポットも追加して削除するとどうなるでし ょうか?この一連の PC 上の画像処理演習の結果から、「FFT 画像上のスポット」とは何を意味するか 考察し、レポートに記述しなさい<Q A1-2>。これは、以下の「空間周波数[#]」を正しく理解すること につながります。
- 4. FFT 画像の中の1つのスポットは、元の画像の上に周期的な模様(繰り返し構造)があることを示しています。つまり、もとの画像の上では、その中心から、そのスポットの方向に向かって、中心からの距離の逆数を周期とする繰り返し模様が存在することになります。数学的には複雑な式で表現されますが、プリズムに白色光を通すとスペクトル(光の波長、周波数の逆数)に分けられるのと同じ様に、FFT 変換は、画像の中の縞模様(周波数の逆数)の分布を調べる正確で便利な計算方法です。1次元ではなく、2次元なので、少し複雑にはなります。FFT 画像の中心からの距離が周期の逆数なので、これを「空間周波数[#]」と呼びます。中心により近いスポットは、より長い周期(低い空間周波数、大まかな構造や荒い模様)のパターンを、中心からより離れた点は、より短い周期(高い空間周波数、小さい構造や微細な模様)のパターンを反映しています。



- 5. 上の(ウ)の画像(ファイル名: <u>Pleurosigma_b.bmp</u>)を新しく開きます。同じようにFFT処理します。現れた代表的なスポット像(FFT 画像)を使って、上の操作(2)→(3)と同じ操作を実施します。元の画像にはどのような変化が生じますか。違いがわかりにくい場合、上の(i)基礎操作の練習-(7)~(8)の操作で、処理前後の差を調べると明瞭にわかります(画像のわずかな差を見るときは、「Image」→「Adjust」→「contrast/Brightness」で、画像のコントラストや明るさを適宜調節して見やすくします)。この結果をもとに、このケイソウの細胞にはどの方向へどのような周期の繰り返し模様があると言えるか考察します。考察した結果をレポートに記述しなさい<Q A1-3>。
- 6. 上の(i)基礎操作の練習-(7)~(8)(A1-6ページ)では、2つの画像(ボケさせた画像とエッジを抽出した画像)を使いました。それぞれに、同様のFFT処理を行います。FFT処理した画像の上では、2つには、どのような違いがあるでしょうか<レポート記載不要>?
- 7. 次の2つの画像、(エ)と(オ)は、ケイソウ Pleurosigmaを、異なる照明条件下で観察した結果を示しています。この場合、もとの細胞の構造は、ほぼ同じのはずですが、観察方法の違いによって、見える像が変わって来ます。観察像の上でどのような違いがあると言えるでしょうか<Q A1-4>?それぞれFFT 画像変換の手法を作って比較し、そこから推察できることをレポートに記述しなさい。



(エ) 暗視野照明条件下で観察したケイソウ (<u>http://www.bio.chuo-</u> u. ac. jp/nano/LM/Image/Plurosigma_DM00. jpg)

(オ)明視野照明条件下での光学顕微鏡写真



(iii) 動画の解析

Image J は、*. AVI 形式[#]で保存された動画の処理機能も豊富に備わっています。ここでは、動画から輝度 データ[#]を読み取り、その時間的な変化を調べる例を演習します。この方法は、**課題 A3** や **A5** で応用する重要 な技術です。動画は、複数の静止画像からできていて、その1つ1つをフレーム(Frame)と呼びます。動画 は、それが時間方向へと積み重なった(スタックした)ものに相当します。3D 画像も Z 方向へと積み重さな ったものと見なすことができるので、このソフトの中では「Stack」と呼びます。

ここで用いるファイルは下の動画です。動物(プラナリア)が右から左へと移動 する様子が観察されています。まず、ダウンロードして、各自のコンピュータに保 存します。その後、Image Jで「File」→「Import」→「AVI…」で読み込んで使い ます(右図で「OK」をクリック)。全部で200フレーム(動画の画像の枚数)のフ ァイルです。コンピュータの性能上、この程度の枚数(フレーム数)の動画が扱い やすい枚数です。非常に長いビデオ記録はコンピュータの負担を軽減するために、 短い一部だけにして読み込むことを推奨します(First Frame と Last Frame で指



定する)。右に示すように、'Convert to Grayscale'をしとして操作するとコンピュータへの負担は小さ くなります。「Use Virtual Stack」は、PCメモリーの負担を少なくして計算する方法で、実際は動画や三次 元像をPC上のメモリーへ書き込むのではなく、1枚1枚の画像をその都度「開く・閉じる」の作業を繰り返 す方法です。1000-5000枚もあるようなスタック画像の処理には、この方法が向いています。



Image/Motion03.avi

(注:右クリックで、動画を保存します。画面の左右幅は30 mm、記録速度15 frames/秒の動画記録)

- 動画の表示:「Image」→「Stacks」→「Tools」→「Start Animation」によって動画の表示が始まり ます(または、▶のクリック)。画像の下の■を左右にスライド操作してもアニメーションの表示がで きます。アニメーションの表示は画像の上でクリックすると停止します。
- 時間軸方向への投影:動画を active にしたあとで「Image」→「Stacks」→「Z Project」によって、 全時間の輝度データ[#]をすべて重ねて表示します。これは xy 面の像を z 軸(時間軸)方向へすべて投影 して重ねたものに相当します。この操作を少し応用すると画像の加算平均し(動画でなく静止画として ビデオ撮影してから)、画質を大幅に改善する操作へと応用することも可能です(下記手順)。

(例題: Frame 加算平均による静止画の画質改善方法)

- a. 観察したい動きのないものを選び、動画(Avi 形式)として記録・保存します。その後、ImageJで 8bit-Stacks 画像として読み込みます。これを 32bit-Stacks に変換します(「Image」→「Type」 →「32-bit」)。撮影した画像の内容や表示はまったく変化しませんが、256 階調[#]の輝度データ[#] を、32-bit = 4,294,967,295 階調[#]まで、表示可能な枠を広げるための操作です。ここで 32-bit に 変換できるものは、白黒の画像のみです。処理中に警告が出てきたら、はじめの AVI 動画を読み込 むときにレ Convert to Grayscale(白黒画像)の設定で読み込むようにします。
- b. 「Image」→「Stacks」→「Z Project」で、画像を重ねますが、このとき、Projection Type で、 Sum Slices を選択します(Sum Slices を選ぶと、場合によっては自動的に 32-bit 画像になりま す)。この作業で、全画像が加算されて新しい画像が作られます。時間軸方向への合計算を行った ことになります(加算平均すると画像の標準誤差が顕著に減少します。添付資料:「実習に役立つ 統計学入門①」を参照)。この操作で、非常にキメの細かな画像(情報量の多い画像)となりま す。「Analyze」→「Histogram」を使えば、処理した画像の中で、輝度データ[#]がどのように分布 しているかがわかります(8-bit は 0~2⁸ の間, 32-bit は 0~2³² の間)。厳密には、この操作で、 画像の上の分解能が改善されることはありません。各画素の輝度値の精度が改善し(有効数字の桁 数が増え)、相対的にノイズが減少した鮮明な画質となります。
- 3. データの時間変化を見る①:メニュー上の Rectangular selections (□マーク)、あるいは Point selections (→マーク)を使って、まず、解析したい領域や点を選択します。その後、「Image」→「Stacks」→「Plot Z-axis Profile」と順番に実施すると、指定した場所の輝度データ[#]の経時変化 がグラフで表示されます(操作を繰り返す場合、前のグラフ表示を消去)。次に、メニュー上の Straight line selections (→マーク)を使って、まず、解析した位置に1本の線を選択します。その後、「Image」→「Stacks」→「Reslice」と順番に実施すると、指定した直線に沿った輝度データ[#] がどのように時間変化するかの画像が表示されます。これは、動画を x/y/t の 3 次元画像 (z 方向が時間に相当)と考えた場合に、その x/y のいずれかの軸を時間軸に置き換えて眺めたものと同じになります。「Reslice」とは辞書にはない用語で ImageJ 独特の造語です。3D の立体的なものを、x/t や y/t などの他の面で切り取る操作に相当します。なかなか難しそうな概念ですが、四角い模型など手にとって考えると簡単です(A-13 参照)。直線を描いた後で、「Analyze」→「Plot Profile」でグラフ表示させ、動画表示を開始させると、刻々とグラフ表示が変化することがわかります。この数値データに相当するものを、輝度データ[#]として表現したものが、上の「Reslice」で作成した画像になります。
- 上の方法によって、プラナリアの運動の速度が解析できます。まず、Straight line selections (
 マーク)を使って、動物の運動する方向に沿って線を描きます。その後で「Reslice」操作すると、下のような画像が表示されます。



 5. このような表示を一般にカイモグラフ表示(キモグラフ表示) #とよびます。このようなカイモグラフ 表示画像から動物の運動速度を求めるには、どのようにしたら良いでしょうか?もとの画像の横幅(30 mm)と記録速度(毎秒15コマ、15 fps)の値を使ってプラナリアの移動速度を計算しなさい<Q A1-5>。この手法は、実験A4のタマネギの細胞の中の顆粒輸送運動の解析に、そのまま応用できます。



ビデオ画像などの動画は、XY 面の二次元の平面像が、時間とともに変化するデータです。このとき第三の座標軸としての時 間軸(t軸)が Z 軸の代わりにあるとすれば、動画(XY 軸)の画像処理は、三次元の立体像(XYZ 軸)の処理と同じように 考えることができます。それまで XY 面で見ていたもの(A)を、Xt 面(B)や Yt 面(C)で観察することもできます。ある いは、XY 面の上で新しい線を「Straight Line」で指定すると(A の中の白破線)、その線とt 軸の切断面(t - Straight Line 面)で切り取った断面としても観察もできます(D)。これが Reslice という作業です。「Reslice」は ImageJ ソフト の中だけで使われる造語で、訳すと「再切断操作」ということになります。動画の上で、あるライン上の時間的な輝度変化 を追跡する(D)のような断面像は、キモグラフ表示(Kymographic display)とも呼ばれています。これはカイモグラフ (キモグラフ) #という心電図や筋収縮を調べる古典的な記録装置の名称に由来する呼び名です。

課題 A2 電気泳動データの解析課題

はじめに

これまで演習してきた、ImageJの画像処理方法を活用して、ここでは、SDS-PAGE (SDS ポリアクリルアミ ドゲル電気泳動)のデータ(箕浦研究室のご提供)の解析に挑戦します。2種類のゲル写真の中から、<u>自由</u> に1つ選択し、以下に説明するポリペプチドの Stoichiometry (化学量論)を議論して下さい。2種類の画 像は、それぞれ、8-bit の Jpeg フォーマット (33kB)、または、32-bit の Tiff フォーマット (1~2MB)の 両方で web サイトにアップしてあります。

1. Stoichiometryとは

これはすでに皆さんは中学校や高等学校で、気体反応の法則として、すでに勉強している概念です。化学反応は、分子間での共有結合の再編の結果おこる現象ですが、原子の持つ価数に応じた単純なモル比での共有結合が生じる結果、反応物・ 生成物共に、比較的単純な量比(モル比)、あるいは、気体の場合、体積比になるというルールです。 このルールは、生体分子まで拡張することが可能です。

左図は、代表的なタンパク質複合体の例を 示します。1つ1つの分子は、1~数 nm の大 きさを持っていますが、それらが数十と積み 重なって複雑な複合体を作るのが生体分子 の特徴です。典型的な例がリボソームで、約 50 nm の顆粒状の構造ですが、その中には整 然とポリペプチド鎖とRNA分子が配置してい ます。ミトコンドリアや葉緑体の電子伝達 系、さらに、ATP 合成酵素(FoF1合成酵素)も そのような特徴を持った構造物です。その一



部 F₀リングの場合、基本的な構造は同じですが、stoichiometry の分子構成比が生物種で異なる(機能上の 差があるため)という報告もあります。

2. 鞭毛軸糸の中の分子構成比(Stoichiometry)

鞭毛・繊毛は、さらに複雑な構成をしています。 直径 200 nm、長さは 5~500 µm の大きさで、上で 説明した分子や生体高分子に比べると遙かに巨 大な構造物となります。右は、二次元電気泳動法 で、クラミドモナスの鞭毛軸糸タンパク質の分離 を試みた結果です。コントールと突然変異の間の 比較を行ってものですが、約 300~500 種ものポ リペプチド鎖 (RNA や DNA は無いとされている) から構成されていると報告されています。この 1 つ1つに必ず決まった量比があると考えられます



A3-1

が、この演習課題では、一次元の電気泳動ゲル (SDS-PAGE)の結果をもとに、主成分となるチューブリン(下 図 e) と、高分子量タンパク質であるダイニン分子(ダ イニン腕、下図 d)の量比を議論してください。

軸糸の構造は、現在、クライド電子顕微鏡の技術が 著しく発展し、分子1つ1つが、電子顕微鏡像の上で 確認できるまで、詳細が解明されつつあります。その ような研究報告から抜粋したものが右の模式図です。



(Axoneme)の構造はすべての真核生物で同じ





3. SDS-PAGE データ

上の写真は、クラミドモナスの鞭毛軸糸を取り出し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法によって分子量 の大きさでポリペプチドを分離した結果です。分子量調べるために、分子量の分かっている標準試料も同時 に調べますが、a にその分子種名、b に分子量が記載されています。c、d は実際の電気泳動の結果で、CBB という染色剤で染色してあり、その濃さは、それぞれの分子の質量に、ほぼ匹敵するものです。それぞれの 一番左側に標準分子量の試料、右側2列は、同じ試料を2回、ほぼ同じ量の試料を電気泳動した結果です。 c、dはゲルの濃度が異なるために、移動度が多少異なります。

課題 A-2:下の画像(SDS-PAGE 写真)の中のいずれかをダウンロードして、その画像の輝度データ、電気 泳動位置、濃度、ピーク値など、画像処理で得られる結果をもとに、クラミドモナス軸糸構造内のチューブ リン(MW約50,000 Da)とダイニン(MW>2,500,000 Da)の分子数比(stoichiometry)を推計し、さらに、 前ページの模式図で示された構造から予測される stoichiometry との一致・相違点について考察しなさい。

画像

Gel_Example1 jpg (33kB) 、Tif (2MB) Gel_Example2 jpg (34kB) 、Tif (1.3MB)

> この課題を進めるに当たって、考慮する必要があると考えられるものを 下に並べました。順番は、特に解決すべき課題の順序とは関係ありません。



課題A3 動画解析の応用課題

はじめに

これまで演習してきた、ImageJの画像処理方法を活用して、ここでは、4 例の動画の中から、<u>自由に1つ</u> 選択し、各自のアイデアで解析し、そこから意味のある結論を引き出す工夫をしてください。4 種類の動画 は、それぞれ、8-bitのAVIフォーマット、または、32-bitのTiffフォーマットの両方でwebサイトにア ップしてあります。8~200MBのサイズの異なる動画ですが、webサイトからダウンロードするときは、通信 環境の良い場所や時間帯に実施するのを推奨します。Wordファイルとして書くレポート内には、選んだ課題 の番号(i)~(iv)も明記してください。参照先リンク集(動画の項目参照)

(i) 動画例-1:ケイソウ細胞の位相差顕微鏡観察 ファイル名: M_Sample_PC_Image (<u>AVI:50MB</u>, <u>TIFF:200MB</u>) 用いた試料: *Pleurosigma angulatum* 対物レンズ: Plan C N 40x/0.65 Ph3 ∞/0.17

一般に電子顕微鏡の観察で使用される用語で すが、焦点の合った位置(in-focus)に対して、 試料が対物レンズに近い場合、焦点のある位置 が遠い場合を underfocus、その逆の条件となる 場合を overfocus と呼びます(右図、Ponce et al., 2012, Meth.mol.Biol.より)。電子顕微鏡 の場合、焦点の位置によって観察像の特徴が大 きく変化します。やや underfocus 条件にしては じめてコントラストの高いシャープな像となる



ために、どの程度、焦点面から故意にずらす(defocus する)かは、撮影者の技術力が試される所です。 さて、光学顕微鏡の場合、この3つの条件では、観察像はどのように変化するでしょうか?位相差顕微鏡 観察像で議論してください。撮影は、*Pleurosigma angulatum*のプレパラートを用い、焦点面を少しずつ変

化させながら連続的に撮影した動画で す。この動画をもとに、何枚目の像が infocus と判別できるのか、その位置 と他の焦点位置では、この位相差顕微 鏡観察像は、どのように異なるのか、 定性的・定量的な議論に挑戦してくだ さい。観察像内のスケールは 10 μm。





左:明視野照明条件下で観察した試料(参考)

(ii) 動画例-2:ミドリムシ遊泳行動

ファイル名: M_Sample_Euglena (<u>AVI:35MB</u>, <u>TIFF:35MB</u>) 用いた試料: *Euglena gracilis* (渡邊正勝先生提供) 対物レンズ: UPlan XAPO 20x/0.85 Ph2 ∞/0.17

ミドリムシ(右図、wikipediaから)は、細胞の端に2 本の鞭毛(Flagellum)を持ち、その1つを投げ縄のよう に鞭打ちながら回転させることで駆動力を生み出しま す。光刺激には敏感に反応し、この鞭毛運動を一旦停止 させるために、その瞬間、細胞の遊泳も停止することが 分かっています。これを光驚愕反応と呼びます。この反 応は、眼点部分、厳密には、その近辺にある光受容体に よって cAMP が合成され、その濃度上昇が引き金となって いて、何らかのしくみで鞭毛運動を一旦停止させるもの と考えられています。

ここで提供する動画は、毎秒 400 コマ(1 コマが 2.5 ミリ秒)で撮影した高速度撮影像です。光刺激 (波長 310-370 nm の光刺激)した瞬間は、背景の像 が一瞬明るくなるので確認できます。右の写真は、 光刺激の無い条件下(赤色光での観察)一定の速度 で遊泳している動画だけ切り取って、5 コマ重ねて (Z-Project 処理)表示した例ですが、遊泳する速度 や向き、遊泳時の進行方向などにも、個体差がある ことがわかります。

この動画をもとに、ミドリムシの光驚愕反応、お よび、その前後の行動についてどのようなことが言 えるか、解析に挑戦してください。





(iii) 動画例-3:クラミドモナス鞭毛に沿った物質輸送 ファイル名: M_Sample_Rosembaum (<u>AVI:8.5MB</u>, <u>TIFF:8.5MB</u>) 用いた試料: *Chlamydomonas rheinhardtii* (Rosenbaum & Witman, 2002) 対物レンズ:不明(微分干渉顕微鏡観察像)

クラミドモナス(右写真、*Chlamydomonas rheinhardtii*)は、緑藻の単細胞生物です。動物の祖先型原生生物が襟鞭毛虫であるのと同じ意味で、高等植物の祖 先型の生きものとして、進化系統樹の上では重要な位置にいます。さらに、鞭毛 の運動機構を分子遺伝学的な手法で探ることのできるモデル生物の一つとして も重要な実験材料です。

鞭毛の中には、その構造を維持したり、他の細胞との間でシグナル伝達を行ったりするために、盛んに物質輸送が行われており、これを IFT (Intra flagellar



transport)と呼んでいます。この輸送機構は我々哺乳類の繊毛・鞭毛にも共通してあると考えられ、IFT 関連のタンパク質が欠落すると重篤な疾患を引き起こすこともわかって来ており、繊毛・鞭毛機能に関連した疾患を総称して繊毛病(ciliopathy)と呼ぶようにもなりました。クラミドモナスは、そのような繊毛病の原因解明のために最初に使われた実験材料です。

ここで紹介する動画は、この IFT 研究に貢献した Rosenbaum 博士のグループが、微分干渉顕微鏡を使って、初期に報告した論文から借用したものです。クラミドモナスから鞭毛を単離して、カバーガラス上に付

着させた後に、内部の微細な顆粒(薄い影のよう に見えるもの)が運動している様子がわかりま す。この動画をもとに、クラミドモナス鞭毛内に は、どのような IFT 機構が存在するのか、定量的 な議論や解析に挑戦してください。

右の写真: 毎秒 0.5 コマの速度(2 秒で1 枚)の速度で 撮影した動画(微速度撮影動画)の中から、一部を切り 取って鞭毛の部分だけを平行に並べ変えた写真です (「Image」→「Stacks」→「Make Montage…」)。鞭毛 に沿った薄い影が移動する様子がわかります。微分干渉 顕微鏡で観察できるこのような顆粒は数 10 nm の大きさ であると言われています。



(iv) 動画例-4:バフンウニの第一卵割 ファイル名: M_Sample_EggDivision (<u>AVI:175MB</u>, <u>TIFF:175MB</u>) 用いた試料: *Hemicentrotus pulcherrimus* 対物レンズ: Plan C N 40x/0.65 Ph3 ∞/0.17

バフンウニ(Hemicentortus pulcherrimus)は、秋口から冬にかけて繁 殖時期を迎える日本産のウニです(写真は、環境省のサイトから)。容易 に未受精卵を回収でき、光学顕微鏡下で受精する様子を直接観察できるこ とから、海に囲まれた日本では、初期発生を観察するための実習や研究材 料として、頻繁に使われています。初期の卵割の様子が、全割で観察しや すいことも大きな特徴です。



ここで紹介する動画は、この実習用の位相差顕微鏡を使い、位相差毎秒1コマの微速度撮影したものです。 受精膜が形成された後に、しばらくして、細胞が形を変え、第一卵割が起こる様子が、数倍の速度で観察で

きます。この動画をもとに、卵割はどのような時間経過で起こる のか、細胞の内部ではその時どのような変化が起こっているのか (実際は、細胞分裂装置の再構成と崩壊)、動画の解析からどの

ような定量的な議論が可能か、挑戦してください。





課題 A4 光学顕微鏡基本操作

<u>(参考資料: 補遺資料「CX41 取り扱い説明書」)</u>

(i) 光学顕微鏡の基本操作



Diatom Test Plate, 8 forms 試料は矢印(右写真)の中心にある

ケイソウの種名(左写真の左側から) Amphipleura pellucida Frustulia rhomboides Pleurosigma angulatum Surireila gemma Nitzschia sigma Stauroneis phoenoceneron Navicula lyra Gyrosigma balticum



- 光学顕微鏡を使った実際の観察を始めます。光学顕微鏡(実習用生物顕微鏡)は、自分の指定された出 席番号(実習参加者にふられた番号)のものを使います。精密な機械なので、必ず両手で持ち運んでく ださい。落としたり、ぶつけたりしないように注意しながら、各自の実験机まで移動し、電源コードを 接続します。電源コードを接続する側と反対側の「OLYMPUS(黒色)」のマークのある方を手前にして置 きます。顕微鏡の番号を各自の実験ノートに記録します(以下、【】の中の番号と名称は、A4-7ページ の顕微鏡模式図を参照)。
- [OLYMPUS CX41] と書かれた青いラベルと同じ側面にあるネジ(銀色の小さめの手回しネジ)をゆるめ ます。このネジをゆるめると接眼レンズの鏡筒部分(顕微鏡の上部で斜めの接眼レンズが付いている箇 所)が回転できるようになります(*このネジは、標準品を描いた模式図の中にはない特注部品です。 ネジの場所がわからないときは、無理に鏡筒部を廻さずに、担当者に質問します)。
- 3. 鏡筒部を回転させて、接眼レンズが手前に向くようにして、上のネジを軽く締めます(締めすぎないように要注意)。観察試料は、ケイソウの細胞の標本(DIATOM TEST PLATE, 8 FORMS と書かれた右上写真のようなプレパラート#)です。共通物品を置いた机(共通物品机)上から、各自1枚ずつ取ります。このプレパラート#は、スライドガラスの中心に、左上の写真のようにケイソウ#の標本が並んでいます。細胞壁だけが残るように化学処理したケイソウ細胞標本です。
- 4. ケイソウの細胞の特徴は、細胞壁の表面に一定間隔の規則 的な縞模様があり、そのパターンや間隔が種ごとに異なる 点です。次ページの表には、細胞のおよその大きさ(個体 差あり)、10µm あたりに模様が何本あるか(空間周波数 に相当)、縞模様間の距離(周期という)、および、走査電 子顕微鏡観察*を使って調べた正確な周期の値(有効数字)



の違いに注意)をまとめてあります。この数値は、今後の観察や解析のときの参考にします。

5. このプレパラート#に表と裏があることを確認して、表(ラベルのある方、丸いカバーガラスのある方) を上にして、顕微鏡の試料台の上に載せます。プレパラート#は、銀色のレバー【③クレンメル】に挟む ようにしてしっかり固定します。試料を移動させる時は、右側についている縦方向のハンドル【④縦送 り・横送りハンドル】を使います。プレパラート内には8個のケイソウ細胞しかないので、顕微鏡で見 つけ出すにはそれなりの工夫が必要です。まず、一番倍率の低い対物レンズ(Plan C N 10x/0.25 Ph1 ∞/-と側面に書かれています)を使い、その対物レンズの真下に、円形のカバーガラスの中心付近に来 るようにします。

		細胞表面の周期構造							
		光学顕微	(鏡データ	走査電子顕微鏡観察での詳細データ					
種名	およその細胞の長 さ	10µm当たりの本数	周期(μm)	平均值	標準偏差	標準誤差			
Gyrosigma balticum	~280	15	0.66						
Navicula lyra	~160	8	1.25						
Stauroneis phoenoceneron		14	0.71						
Nitzschia sigma	~200	23	0.43						
Surireila gemma	70-140	20	0.5	22.66-24.36	0.824-1.550	0.180-0.323			
Pleurosigma angulatum	150-360	18-20	0.52	15.95-16.60	0.767-0.810	0.130-0.137			
Frustulia rhomboides	~50	34	0.29						
Amphipleura pellucida	150-360	37-40	0.27	35.65-37.47	0.497-0.730	0.084-0.133			

- 6. 顕微鏡の「OLYMPUS CX41」と書かれた青いラベルの下に、<u>電源スイッチ【①メインスイッチ】</u>と、明る さを変えるツマミ(1~5の目盛り【②調光つまみ】)があります。電源スイッチを on にして、接眼レン ズを覗いて適度の明るさとなるように、調光つまみで調節します(ここでは、後述のコンデンサターレ ットを廻して【0】の表示の箇所、明視野照明条件、で使用)。プレパラートは、長く照明を続けると温 度が上昇し、封入してある特殊な樹脂が融解し、試料にダメージを与えます。観察しないとき、席を外 すときは、必ず電源スイッチ【①メインスイッチ】を OFF にしてください。
- 7. プレパラートの中心には、丸いマークが描いてあり、そのほぼ中心に、上の写真の順番で(上下逆の場合もあります)ケイソウが並んでいます。顕微鏡で観察しながら、まず、そのマークや丸いやカバーガラスの縁に、焦点を合わせます。その後、その中心を探すとケイソウの細胞を見つ易くなります。対物レンズの先端部分が試料から10~13mmの高さとなる位置が、焦点のほぼ合う位置です。これを作動距離と言います。対物レンズの種類によって、この作動距離は大きく異なりますが、一番倍率の低い対物レンズでの位置を、感覚的に把握しておくと、今後の作業がスムーズに進みます。いきなり高い倍率で焦点を合わせる試みは、試料と対物レンズとが接触したり、探し出すのに時間を要したりと、トラブルが多く、作業効率も悪くなります。
- 8. 焦点が合わない、あるいは、ケイソウが 見つからない、ケイソウの配置がバラバ ラになっているなどの問題があった場 合、担当者に伝えてください。試料を交 換します。



9. 次に、左右の接眼レンズの幅(55~75 mm) を自分の眼幅に合わせます。左右2つの像が重なって見えるちょうど良い目幅にします。通常、私たち が外の景色を見るときには、左右で見られる像には、わずかな違いがあって、 それをもとに立体的な空間を認識します。しかし、光学顕微鏡を使って両眼で 観察する像は、水平方向に多少ずれてはいても、見えるものは、まったく同一 の像です。日常の外景を眺めるときとの違いがあるために、慣れないと頭痛や 疲労感が出て来ることもあります。左右の眼で同時に観察することが難しい 場合、無理に両目を使う必要はありません。両眼か、片眼かは、特に観察精度



上の問題はありません。「像が見えない」、「左右の倍率が異なる」、「片方が見えない」、「ゴミが多い」、 「くもって見えて焦点が合わない」などの問題点がある場合、担当者に伝えてください。

- ここでは視度調節も実施してください。これは左右の視力差を補正する作業です。右側の接眼レンズで 観察しながら、試料のある1点(小さなゴミや粒などで良い)に焦点を合わせます。次に、同じものが 左側の接眼レンズでも、できるだけ同じように観察できるように、接眼レンズの付け根にあるツマミ(・・ +・・0・・-・の目盛り付き【⑧視度調節環】)で調節します。
- 11. この時点で、次の4つの下線を引いた箇所の名称、および、その場所を、しっかり覚えてください。続く顕微鏡の調整には大変重要な名称です。
 - a. <u>コンデンサレンズ</u>[#]は、試料台の直下にあるレンズです。試料台の下、右側の黒いツマミ【⑨コンデ ンサ上下動ハンドル】で上下調節します。このレンズは、通常、もっとも高い位置、つまり、上面 が試料のプレパラートにほぼ接する位置で使用します。後述の操作で、正確な位置を微調整します。
 - b. ここで使用するコンデンサレンズ[#]は位相差顕微鏡用[#]のもので【型名:CX-PCD】、手前側に<u>ターレット</u>と呼ばれる。滑り止めの刻み模様(凹凸)が付いています。右に廻すと、順番に【0】→【Ph1】 →【Ph2】→【Ph3】→【DF】→【0】→・・・と小窓の表示が変わります。それぞれの記号や番号の場 所でカチッと音がして、停止できるようになっています。はじめは【0】(明視野照明[#]条件)で使用 します。
 - c. このターレットの下面側に、手前に向けて、黒いレバーが付いています。先端が下側に折れ曲がっ たレバーで、左右に振れる構造です。これは「<u>コンデンサ絞り</u>[#]」を開閉するレバーです。この絞り は、別名「開口絞り[#]」とも呼びます。レバーを左⇔右に動かすと、コンデンサレンズの内部にある 絞りが開⇔閉します。上のターレットが【0】(明視野照明[#]条件)の場合以外では、この絞りは全開 にして使います。この絞りは、あらゆる光学顕微鏡に必ず付属しているもので、この絞りの使い方 で、観察像の質は大きく変わります。
 - d. 試料台の下「0LYMPUS」のマークの反対側に、光源からの光の出口(射出孔)があります。その出口 側面にも、刻みの付いたツマミがあり、左右に廻せます。これは「視野絞り[#]」を開閉するツマミで、 左⇔右に廻すと、顕微鏡の下部土台の内部にある別の絞りが開⇔閉します。
- 12. ケイソウが観察できているのを確認し、視野絞り[#]を一番小さく絞ります。周辺部に、黒い枠(絞りのふち)が見えますか?見えない場合、コンデンサ[#]を側面にある黒いツマミ【⑨コンデンサ上限ハンドル】を廻しながら、上下に微調整し、明瞭に絞りの枠(輪郭)が接眼レンズを通して観察できる位置にします。
- 13. コンデンサの位置を上下に微調節すると、観察試料の中心付近に 12 角形の絞りの形が明瞭に見える場所があります。視野絞り#の意味がここで理解できるかと思います。ちょうど観察したい箇所だけを明るく照明し、その範囲を調整する絞りとなります。コンデンサレンズは、この視野絞りが明瞭に観察できる位置で使用します。

- 14. 視野絞りが、視野全体の中心にない場合、コンデンサレンズの下側、左右手前に向かって一対ある銀色のつまみ【⑩補助レンズ心出しつまみ】で調節します。ほぼ中心が合っていればじゅうぶんです。この位置が多少ずれていても、観察する像の質は大きくは変わりません。視野絞りは、視野全体に開けて、ケラレ#(絞りの影が見える状態)のない位置で使うのが一般的です。ここまで来たら、対物レンズの倍率を他のものに変えても大丈夫です。×20、×40 倍と変えて、その度に、焦点#が多少変わるので【⑥ 微動バンドル】を使い焦点を合わせて観察します。
- 15. 次に、ターレットが【0】の明視野照明、および視野絞りは一定のままで、コンデンサ絞りのみを開閉します。明るさが劇的に変わりますが、調光つまみ【②】を使って、もっとも観察しやすい明るさにします。コンデンサ絞りの開閉で、観察像のコントラストはどのように変化しますか?倍率によって、その変化にも違いありますか?注意深く観察し、気付いたことをレポートに記載しなさい<Q A4-1>。コンデンサ絞りはいつも一定の開閉状態で使うものではなく、対物レンズの倍率によって異なる最適の状態があります。また、肉眼で観察するとき、あとで修得する CCD カメラで撮影するときでも、最適な状態が微妙に変わります。ここでは、顕微鏡像の解像度#(分解能#)についての理論的な背景は特に紹介しませんが、まずは、自分の眼を信じて、試料の細かな部分を明瞭に観察する上で、最善と思われる開口絞りの条件を、対物レンズの倍率が変えるたびに、こまめに調節するように心がけます。
- 16. この実習用光学顕微鏡では、以下のような対物レンズと照明条件が選択できます。それぞれの組み合わ せで、どのような観察像になるか、比較してみてください(レポート記載不要)。

<u>対物レンズの種類</u> PlanC N 10x/0.25 Ph1 ∞/-/FN22、PlanC N 20x/0.40 Ph1 ∞/0.17/FN22 PlanC N 40x/0.65 Ph2 ∞/0.17/FN22

コンデンサターレットの選択

【0】 明視野照明用[#]、【Ph1】10x、20x 用の位相差用[#]、【Ph2】40x の位相差用[#]、

【Ph3】100xの位相差用#、【DF】暗視野照明用#





(ii) デジタルカメラ基本操作

PC に直接接続した<u>デジタルカメラ</u>(下の写真の様に、HOZAN 社デジタルカメラを<u>接眼レンズの位置に装着</u>して使用します)を使って、顕微鏡像の撮影を行います。以下に、操作の手順を示します。デジタルカメラの 代わりに外した接眼レンズは、プラスティックケースに納めて、机上のゴミやほこりが付着しないように注 意してください。

1. 静止画の撮影方法



この操作を実施するには上の図の中にある「IJ webcam plugin」が表示されている必要ありますが、manaba 上の資料を参照して、このプラグイン機能(ImageJの上のさまざまな追加メニュー)を導入してあることを 確認してください。

下の様な画面が表示されたら、「OK」で画像が取り込まれます。③の選択肢は毎回リセットされるので、撮影時には毎回確認する必要があります。

6	約 IJ webcam plu	gin	×	
	Camera name	USB Camera L-835 1 💌		
	 Show FPS Grab and Custom si Width Height Calibration Unit Pixel size Timelapse Do timelaps Press Shi Interval Frames Live FFT ii Process L run('8-b1) 	in status bar (3) reterm ze [1200 pixels [800 pixels [1.00000000 units/px ose tto start [1000 msecs [1000 secs [1000	USB Cam を選	era L-835 1 .స
④ [OK] で	動画の耳		OK Cancel	
⑤ 表示のImageJ上(の画面で	「焦点を合わせ	,指定の形	式で保存する。

2. 動画の撮影方法

動画の撮影も同じプラグイン機能を使用します。



下の様な設定にして、「OK」で動画が記録開始されます。動画の枚数は、使用する PC のメモリーや速度によって変わります。100-200 枚程度が無難です。

	U webcam p	lugin		×	
	Camera name	USB Camera L-83	351 🔹 🖣		
	F Show FF	S in status bar	3	USB Camer	a L-835 1
	l Grab and	d return		を選ぶ	
	I✓ Custom	size			
	Width	1280 pixels			
	Height	960 pixels			
	Calibration	ı			
	Unit	un			
	Pixel size	1.00000000	units/px		
	Timelapse	,			
	I Do timel	apse	<		
	Press St	hift to start			
	Interval	50 msecs	(4) [D	o Timelaap	selの選択
	Frames	100	Proce	Shift to etc	けの選択
	Live FFT	instead of image	[[TC33	Shint to Sta	
	F Process	Live Image			
	run ('8-b	it Color', 'numb	er=4');		
				_	
				_	
0.000			-		
(5) (OK	しで動画の	の取込 💻		OK Cancel	
@ +-0		والمراجع المعرجين	A 1 11	for soil b	
 し 表示のImageJ サかたはあ 	上の画面	して馬品を1	合わせ、	[Snift]キー 旧左ナマ	で指定の
収数だけ期間 実際の記録	uて取りx を度け、F	ムめ、 指正 PCの性能に	形式で 「依存」	木1チ9 る。 ます	
Services Horseved		C - C IL IC I	- 124 13- 0		

3. 撮影画像の保存方法(「Save」や「Save As」で保存します。用法の違いは、下図、あるいは、manaba上 の資料を参照してください。

d Imagel	-	
File Edit Image Process New Open Ctrl+(Open Next Ctrl+Shift+(Open Samples Open Recent	nalyze Plugins Window Help ▲ ▲ ↓ ● CF □ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ★ pht click to switch) 32bitデータとしても保存でき、元の情報を	
Show Folder Close Ctrl+V Close All Ctrl+Shift+V Save Ctrl+ Save As Report Ctrl+Shift+I	すべて正確に保存できます。 Tff Gf Jpeg Text Image Text Image)読 量
Page Setup Print Ctrl+ Quit	ZIP Raw Data Image Sequence AVL BMP PMC	
	PGM	

(iii)画像処理の確認(レポート記述不要)

1. ここでは、撮影記録した画像を使って、簡単な画像データの解析を行います。



- a. 上のようなケイソウの撮影像を例に取って説明します。実際は、各自で撮影した画像ファイルを使って練習します。表示された Window の枠上のバーや緑が濃色で表示されているものが「active」となっている画像で、操作中の画像を意味します。ImageJ は多数の画像を同時に表示できますが、この active な画像だけが、メニューで指定された画像処理の対象になります(間違いが起こりやすいので要注意)。
- b. 直線を引く機能「Straight line selections」(ア)を選び、画像の上に、例 (あ)で示すような線を引きます(実際は 黄色線で表示されます)。その後、 「Analyze」→「Plot Profile」とメニュ ーを選ぶと、右のようなグラフが表示され ます。これは直線(あ)に沿って像の明る さのデータ(輝度データ[#]といいます)を グラフにしたものです。「Gray Value(濃 淡値)」は、輝度データ[#]を 256 段階(2⁸、



8ビットのデータで、0~255の数値になります)の整数値で表現してあります。画像の上にマウス を置くと、その箇所の輝度データ[#]を直接表示させることもできる点は、画像処理の練習で確認した 通りです。

c. グラフの横軸「Distance (pixels)」は、直線上の距離を意味します。画像は小さな点(最小単位、 ピクセル、<u>pixel</u>とよぶ)が集まったものですが、その画素の数で距離を表現してあります。このよ うなグラフを使うことで、どのような像が、どのような輝度データ[#]の変化として観察されているの か、グラフで表示することができます。「List」は輝度データ[#]を数値表示させる機能、「Save…」は データをテキストファイルとして保存する機能です。「Copy to System」 をクリックすると、他の ソフト(エクセルなど)の上で、貼り付け作業を行うこともできます。「Live」は、動画で使用する 機能です(後述)。この機能には、他に以下のような機能も付加できます。

- ・ 計測する領域幅(線幅)を変えて平均値を表示させるとき:「Edit」→「Options」→「Line Width…」
- 直線ではなく他の線を選ぶ機能:「Straight line selections」(ア)で右クリックして選択します。
- d. メニューの中から、四角で囲む機能「Rectangular selections (矩形領域選択)」(イ)を選び、観察像の上 に(い)のような四角形を描きます。その後、「Image」 \rightarrow 「Type」 \rightarrow 「8-bit」としたあとで、「Analyze」 \rightarrow 「Surface Plot」とメニューを選ぶと、右のような 3D 図が表示さ れます。最初の操作は、画像タイプを 8 ビット画像#に 変換する作業です。ここで撮影した CCD カメラ画像は、 カラー画像(8-bit Color や RGB-color)のために、必 ず必要になるビット数の変換作業です。この操作で、選 んだ範囲の明るさのデータ(輝度データ[#])が 3D グラフ



として表示できます。ここでも明るさのデータは8ビットの256段階で表示されています。このような8ビット画像#を「256階調#」の画像と言います。もし、画像が、10、12、16、32ビット画像ならば、1,024 (= 2¹⁰)、4,096 (= 2¹²)、65,536 (=2¹⁶)、4,294,957,295 (= 2³²)階調#となります。カラー画像の場合、一般に、24ビット(8ビットカラー)画像で、R(赤)、G(緑)、B(青)色の情報が、それぞれ8ビットの256階調#で表現されています。一般のデジタル放送のテレビ画面、デジタルカメラやスマートフォンの画面もこのような8ビットカラー画像です。

e. 同じように、四角で囲んだ後に、「Analyze」→ 「Histogram」とメニューを選択すると、右のよう なグラフ表示になります。全画素数 (Count)、輝度 平均値 (Mean)、輝度標準偏差 (StdDev.)、256 階 調の最小値 (Min)、最大値 (Max)、どの輝度のデー タが一番多いか (Mode)、分布はどのようになって いるのかを示すヒストグラム (分布を示す棒グラ フ)が示されます。 (Value=、count=)はカーソル で選択した輝度値のデータ数(頻度値)を示す。こ この例では、輝度が、右側に偏った分布であるこ と、情報量が 200 階調付近だけに集中しているこ とがわかります。理想的には、256 階調を均等に使 って表示されている画像が、一番、情報量が多いこ



とになり、これも、画質の良し悪しを決める重要な要素になります。

<Q A4-2> 課 題

Q A4-2

撮影した顕微鏡像の1ピクセル(画像の最小ユニット)が何ミクロンに相当するかは、対物マイクロメ ーターなどの標準となるモノサシ(スケール)を使って調べます。誤差や再現性、像のゆがみ(もし、あ れば)、観察する視野の中の中心か周辺部かで多少変わります。可能な限り正確にその値を知るのには、ど のようにするのがよいでしょうか。どのように工夫したか、手順を詳しくレポートに記しなさい。また、 実際にその手順にしたがって実施し、得られた数値(1ピクセル幅が何µmか)を計算しなさい。対物レン ズの倍率が変わっても、その値は一定であるべきですか?あるいは、倍率に応じて変わるべきものです か?これを、異なる倍率の対物レンズを使って実際に確かめます。このような測定で、再現性の良いデー タとなっているかを確かめるために、一回ではなく、複数回の測定を実施して、平均値と標準偏差を計算 する必要があります(添付資料:「実習に役立つ統計学入門①」参照)。

Q A4-3

8 つのケイソウ細胞標本の、細胞の長さと幅を計測しなさい。また、長軸方向(A4-1 ページの写真の上 下方向、細胞が長い方向にある体軸の意味)に垂直な方向線(横縞模様)の平均間隔(周期や空間周波数 に相当)を求めなさい。その周期を調べたときの観察条件、計算方法、データの数などもわかるように詳 細に記しなさい。計測は、誤差を考慮して、必ず複数回実施して、その平均値(m)・標準偏差(s)・計測回 数

(

n

Q A4-4

A4-4ページ、#14~#15等で、条件を変えて観察した明視野観察像の中で、詳細な構造が観察できたとを 判断できた条件を一例選びます。どのケイソウでも、どの倍率でも結構です。その条件で観察した顕微鏡 像を撮影します。このとき、下の6つの条件で、それぞれ画像を記録します。 m

a. 細かな構造がよく観察できて、最良と思われる観察条件で1枚。

s(B.=a*め条単体との光源の明記を表示<u>く正たまめで</u>容易に計算できます。巻末資料:「実習に役立つ統計学<u>入</u>門(**D**) (案件))、ら、光源の明るさを明るくしたもの1枚。

- d. aの条件から、焦点をわずかにずらして、ボケさせたもの1枚。
- e. a の条件から、コンデンサ絞りを、さらに開いた状態にしたときの像。明るさは、撮影し易いよう に、暗くします。
- f. a の条件から、コンデンサ絞りを、さらに閉じた状態にしたときの像。明るさは、撮影し易いよう に、明るくします。

撮影した画像を全ページの例で行った輝度データ解析方法で調べ、a~fの撮影条件で、どのような点が 変化するかを調べます。ここで、以前、勉強した FFT 変換の方法(A1-7 参照)を使っての議論も可能で す。そのしくみが理解できている場合は、FFT を使っての考察も入れてください。調べた結果を、レポート に、文章で簡潔に記述します。

Q A4-5

コンデンサ絞りと視野絞りを全開にします。コンデンサのターレットは【0】の明視野照明で観察しま す。その後、黒い紙(共通物品机上)を下のように照明光源(視野絞りの真上)に置いて、図のように、 左右に位置を微調節しながら、ケイソウを観察します。観察像にどのような変化が生じますか?これは、 斜光照明法と呼ばれる古典的な方法です。遮光紙を挿入した方向の周期構造(数の黒矢印に直交する縞模 様)について、解像度が向上すると考えられています。実際に、解像度が上昇し、より細かな周期構造が 観察できるようになるかを調べなさい。コンデンサレンズをわずかに上下させることでも、照明条件が変

化して、より細かな構造が観察される場合 もあります。微細な周期構造が観察できた ことを示す証拠を得るためには、どのよう な観察や画像処理を行うのが適切でしょう か?通常の明視野照明条件と斜光照明の違 いがわかる証拠となる観察像をレポートに 添付し、その撮影条件も詳細に記しなさ い。



Q A4-6

暗視野照明条件(コンデンサターレット【DF】)では、細かな構造が高いコントラストで観察できる特徴 があります。しかし、像が暗いために一般にデジタルカメラで観察像を正確に記録することは難しいこと があります。どのような解決方法があるでしょうか?どのような方法でもよいので、考えついたものを試 して画像を記録し、観察条件も合わせて詳細を記述しなさい。

<実験が終わったら>

- □ 用いた顕微鏡・デジタルカメラ・コンピュータの番号を実験ノートに記録します。
- □ 光学顕微鏡は、電源を 0FF にします。
- □ 顕微鏡の不具合、汚れなどは、教員か TA に報告します。
- □ 電源コードを顕微鏡の後に巻き取ります。
- □ 接眼レンズを使用前の向きに廻します。固定ネジは、鏡筒が回転しないように(あまり強すぎない ように)締めます。
- □ デジタルカメラを外し、下側キャップを付け、もとの共通物品机に戻します。
- □ デジタルカメラの代わりに外した接眼レンズを戻します。
- □ 光学顕微鏡に破損や、汚れのある場合には、教員や TA の学生に伝えます。
- □ 光学顕微鏡にカバーをかけて、指定されたもとの棚に戻します。
- □ コンピュータの電源を OFF (電源を切る) にします。
- □ コンピュータは、コンピュータ専用棚へ戻します。
- □ ケーブル類、コネクタ類は、共通物品机に戻します。
- □ ケイソウのプレパラートは、共通物品机のケースに戻します。
- □ 掃除当番(別の当番表参照)は、この実習で使った全机・周辺床の清掃をします。

課題 A5 タマネギの細胞の観察(位相差顕微鏡・暗視野照明法)

(i) タマネギの鱗茎細胞観察

ここでは、タマネギの鱗茎細胞を使います。中学校・高校生の生物実習でも頻繁に使用される実験材料です。 細胞が大きく、透過して内部構造が観察できる点が特徴です。ここでは、次の2点に絞って観察を実施しま す。

- ・ 位相差顕微鏡による細胞内繊維構造(実際は、原形質糸)の観察。これまでの観察や画像処理の技術を 生かして、できるだけ詳細な構造観察を行うようにします。
- ・ 暗視野照明、または、位相差顕微鏡による原形質流動の観察。細胞内の原形質流動の解析を行うための 動画記録をとります。その後、記録データを解析して、どのような運動速度を持つかを調べます。

各自で、まず、プレパラートを作成します。カッターナイフを用いて鱗茎の内側(凹部)に約5 mm 四方 の切り込みを作成します。切り込んだ箇所に、水道水を 2-3 滴載せて乾燥を防ぎつつ、手早くピンセット で剥ぎ取るようにして取り出します。次に、あらかじめ準備しておいたスライドガラスの上に、鱗茎の内側 をスライドガラス側にして置き、すみやかに水(水道の水)を加えます。空気の泡のできるだけ入らないよ うに工夫しながら、カバーガラスをかけて観察します。

この作業に必要な材料(タマネギ1個)・道具類(カッターナイフ、ピンセット、スポイト)は、共通物品 机上から、各実験机に1セット移動して共同で使用します。スライドガラスとカバーガラスは、各自、プレ パラートを作成する時点で、共通物品机から持ち出して使用します。

細胞内の構造の観察しやすいものとそうでないもの、観察の度に、あるいは、プレパラートを作成する度 に、微妙に状態が異なる点は注意します(薄い表皮を使う方が細胞は観察しやすい)。

Q A5-1

光学顕微鏡では、コンデンサレンズを使い、試料の一部に強い光を集中させて当てて観察を続けます。生きた細胞を観察するとき、強い光で照明すると、試料にどのような影響があると予測されるでしょうか? 影響があるとすれば、それをできるだけ小さくするにはどのような配慮が必要でしょうか?

Q A5-2

タマネギの細胞の核のできるだけ鮮明な観察像を記録したいと思います。どのような工夫が必要でしょう か?考えられる工夫を実践して、核の拡大像を記録しなさい。

Q A5-3

タマネギの細胞の大きさを計測しなさい。最低限 10 個の細胞の長さと幅を計測し、その平均値、および 標準偏差を求めなさい (エクセルで容易に計算できます。添付資料:「実習に役立つ統計学入門①」参照)。 最終的に体積を計算したい場合、細胞の厚みを調べる必要があります。この実習室で実施できる範囲で、 どのような方法ならば、細胞の厚みを計測できるか提案しなさい。

Q A5-4

原形質流動を観察します。位相差顕微鏡像と暗視野照明での観察像の違いは、どのようなものでしょう か?細胞内で流動する顆粒について、比較した結果を記述しなさい。

Q A5-5

原形質流動の速度を、できるだけ正確に解析します(対物レンズ x40 の位相差顕微鏡を推奨)。そのために は、実際の画像処理を使った解析方法を工夫するのと同時に、次の2つが重要な課題となります。

- ◆ 絶対距離を正確に求める
- ◆ 時間を正確に求める

この点を解決するには、どのような工夫が必要でしょうか?考えられる工夫を実践して、運動している顆 粒の中の1つに着目して、その速度を求めます。時間的な余裕があれば、複数箇所、複数の場面でも測定 して、その速度にどのようなばらつきがあるか、できるだけ正確に求めなさい。データ数や解析した方法 も記載しなさい。

注:この速度の解析は、ビデオ撮影を行いますが、コマ数(1秒間に撮影する画像の枚数)をできるだけ 数多くするために、画像のサイズを <u>640×480</u>など小さなサイズで行うのが良いです。ここで使用する Web カメラで記録した動画は、Media-player では再生できなません。動画の観察には、ImageJ を使ってくだ さい。 <実験が終わったら>

- □ 用いた顕微鏡・web カメラ・コンピュータの番号を実験ノートに記録します。
- □ 使用後のスライドガラスとカバーガラスは、廃棄ガラス屑入れに入れます。
- □ ピンセットやカッターナイフなど、他の用いた道具類は、蒸留水、70%アルコールで洗浄後、 キムワイプで水気を拭き取り、共通物品棚に戻します。
- □ 光学顕微鏡は、電源を 0FF にします。試料台・鏡筒・接眼レンズの周辺部(ゴム枠部分)など
 を、70%アルコールを付けたキムワイプで拭きます。このとき対物レンズの先端、接眼レンズの上面は、絶対にさわらないようにします。
- □ 光学顕微鏡に破損や、汚れのある場合には、教員やTAの学生に伝えます。
- □ 電源コードを顕微鏡の後に巻き取ります。
- □ 接眼レンズを使用前の向きにします。鏡筒が回転しないように、ネジを(強すぎない程度に) 締めます。
- □ web カメラを外し、下側キャップを付け、もとの共通物品机に戻します。
- □ web カメラの代わりに外した接眼レンズを戻します。
- □ 光学顕微鏡にカバーをかけて、指定されたもとの棚に戻します(番号を確認)。
- □ レポートを manaba 上で提出し、コンピュータに残った不要なファイルは消去します。
- □ コンピュータの電源を OFF (電源を切る) にします。
- □ コンピュータは、コンピュータ専用棚へ戻します。
- □ ケーブル類、コネクタ類は、共通物品机に戻します。
- □ 掃除当番(別の当番表参照)は、この実習で使った全机・周辺床の清掃をします。
- □ 実験Aの最終日(全3班の最後)には、デスクトップ、D:¥Images などの中で、実験Aに関わる画像ファイル、doc ファイルをすべて消去しておいてください。

理解すべき重要語句に関する Questions

(レポートへの記載は不要ですが、レポートを仕上げる上で理解しておいて欲しい点)

・画素数とは何か、説明しなさい。

- ・ 画像の深さ(輝度の階調)の大小を示す言葉は?
- ・階調を深くするメリットは何か。階調をより深くする方法を提案しなさい。
- ・生物顕微鏡のコンデンサ絞りを開閉した時に、観察像の上で起こることは何か?3 点あげなさい。
- ・生物試料の移動する速度を正確に表現するときに必要となる条件を列挙しなさい。

用語解説(#の印のある語句の説明)

- 8 ビット画像 (8-bit image):明暗の強さを、2⁸ = 256 段階の数値データとして表現した画像。Windows 上 の一般的な写真や画像のデータ (jpeg、gif、bmp など) は、8bit 画像 (カラーの場合、RGB (Red/Green/Blue) の3 色がそれぞれが 8-bit) で扱われることが多い。
- AVI (avi)形式 (AVI format):一般的な windows 版での動画フォーマット形式。各コマが 8-bit 画像データ となっている。
- BMP(bmp)形式(BMP format):マイクソフト社/IBM が最初に提唱した画像保存形式。8-bit 画像データ。
- CCD カメラ (CCD camera): 光を受けて発生した電荷を受光素子に蓄積した後、順番に読み取る形式で画像を 得る方式のカメラ。一般的なデジカメの受光素子として使われている。
- JPEG(jpeg)形式(JPEG format): 圧縮して画像を保存するときの一般的なフォーマット方式。画像をフーリ エ変換に似た操作を行って保存するが、この方法で保存すると元の情報の一部が失われるので、完全には 再現できない(非可逆的な圧縮)点は要注意。重要な実験データを保存するときは使わない方が良い。
- NIH (NIH):米国の厚生省に相当する組織の下にある研究機関。
- Tiff 形式 (Tiff format): 8~32bit 画像を保存する一般的なフォーマット。動画保存も可能であり、元の 情報が正確に再現できる点で優れている。
- USB カメラ (USA camera): コンピュータに USB ケーブル経由で画像を送信するデジタルカメラの一般名称。 暗視野照明 (dark-field illumination microscope): 観察する試料からの散乱・屈折される光 (ミー散乱 と言う)のみを使って拡大像を得る顕微鏡。像の輝度は低いが、高いコントラストの観察像となる。
- 位相差顕微鏡 (phase-contrast microscope): 観察する試料と背景との屈折率差を明暗差に変えて観察でき るしくみの顕微鏡。像の輝度・コントラストともに高い。人工的に発生させた陰影・コントラストである 点は、間違った解釈をしないようにしなければならない。暗く見えるところに、いつも物質が集積してい る訳ではないため。
- 解像度 (resolution): 画像の細かさを表現する指標で、一定間隔に何本の線や点が存在するか(空間周波数)で表現したもの。下の分解能の逆数に相当する。
- 階 調 (gradation, gray level): 画像の明暗値 (デジタル値) を示す段階の数。8 ビットは 2⁸ = 256 階調、 12 ビットは 2¹² = 4096 階調、32 ビットは 2³² = 4,294,967,296 階調に相当。
- カイモグラフ(kymograph):動画の中で、ある決まった線上のデータを抽出し、これをY軸、時間軸(コマ 数)をX軸として並べ直した二次元表示の画像データ。
- 輝度データ(brightness):画像の中の各ピクセルの明暗を数値データで示したもの。
- 空間周波数 (spatial frequency):単位距離内に何本の線や点が存在するかを示す指標。
- ケイソウ (diatom):細胞壁に種ごとに決まった模様や周期のパターンを持つのが特徴の藻類。光学顕微鏡の性能を確認するための試料として古くから使われて来た。
- コンデンサ絞り(aperture stop, condenser stop): コンデンサと照明ランプの間にある絞り。顕微鏡を通 過する光の広がり角(光束という)を調節する役割を持つ。観察像の明るさが変わるが、観察像のコント ラストや分解能も同時に変化することがわかっている。
- コンデンサレンズ (condenser lens):光学顕微鏡の観察試料と光源の間に配置されているレンズ。光源の 光を集光して試料に照射するために用いる。コンデンサレンズの性能は、観察像のコントラストや分解能 にも影響する。
- コントラスト (contrast): 観察画像の中でもっとも明るい点と暗い点の差を示す指標。
- コントロール (control): 実験・観察を実施するときに、実験操作を施すグループと比較するために必ず準備する非操作実験グループ (対照実験グループ)。
- 視野絞り (field stop): コンデンサ絞りと照明装置の間に配置されていて、観察する試料の照明領域(照 野とも言う)を制限するために使用する絞り。

- 焦 点 (focus): 集光レンズで光がもっとも集まる箇所。あるいは、試料から出発した光が、観察像の上で 集まって、明瞭な像を投影させる位置。
- 走査電子顕微鏡 (scanning electron microscope): 観察試料へ細く絞った電子線(一次電子)を操作しな がら照射し、反射する電子(二次電子)を集めて拡大像を得る方式の顕微鏡。
- ピクセル数(画素数、ピクセルサイズ)(pixel number): デジタル化した画像で、XY 方向に細分化した最小 単位をピクセルとよぶ。そのピクセルの総数で示した画像の精度を示す数値。 ピクセルサイズは、その 最小単位の観察試料上での大きさ、つまり、顕微鏡拡大像上の何ミクロンに相当するかを示す用語として も使われる。
- プレパラート (preparat [独]):光学顕微鏡観察するために、試料をスライドガラス上に載せたもの。多く の場合、0.17 mm 厚のカバーガラスを載せる (載せたものを観察するように顕微鏡の光学系が設計されて いる)。Prepared と同じ意味のドイツ語から来た呼称。
- 分解能 (resolution): 画像の細かさを表現する指標で、判別可能な2点、あるいは2線間の最小距離で表現したもの。上の解像度の逆数に相当する。
- ホワイトバランス (white balance):画像の中の赤〜青の色調を、白色光源を使った照明条件下で観察した 状態に近くなるように人工的に加工する作業や画像処理操作を指す。あるいは、その目的で使用する処理 ソフトや光学フィルター。
- 明視野照明(bright-field illumination microscope):観察する試料を透過した光(吸収光以外、回折光・ 散乱光も含む)を使って観察する顕微鏡で、像は明るいが、低いコントラストとなることが多い。