

イメージングとインフォマティクス  
の融合による樹木細胞の多元的形態情報解析

2024 年

喜多祐介

# 目次

## 第1章 序論

- 1.1 木材解剖学とその到達点
- 1.2 木材解剖学にみられる課題 - 多様性と機能の評価 -
- 1.3 画像解析による樹種識別, 定量木材解剖学の勃興
- 1.4 ナノ構造特性を繙く偏光イメージング
- 1.5 本研究の目的と章構成

## 第2章 解剖学的に類似したヒノキ科 2 樹種の識別

### 2.1 緒言

### 2.2 試料と方法

- 2.2.1 試料と前処理
- 2.2.2 可視光ハイパースペクトル画像の撮影
- 2.2.3 位相差・MFA 画像への変換と画像処理
- 2.2.4 他手法を用いた MFA 測定と Raman 顕微鏡法によるケミカルマッピング
- 2.2.5 MFA 画像と CNN を用いた樹種識別
- 2.2.6 モデル解釈手法の適用

### 2.3 結果

- 2.3.1 MFA 画像と Raman 顕微鏡画像
- 2.3.2 各手法により得られた MFA 値の比較
- 2.3.3 CNN による識別結果
- 2.3.4 モデル解釈手法によるモデル説明

### 2.4 考察

- 2.4.1 細胞壁の化学成分と計測された MFA との関係性
- 2.4.2 MFA 計測の手法依存性と MFA イメージングの優位性
- 2.4.3 CNN による識別とヒノキ・アスナロ属における樹種固有細胞構造

### 2.5 結語

### 2.6 補足資料

## 第3章 針葉樹仮道管形態の1年輪内変動追跡

### 3.1 緒言

### 3.2 試料と方法

#### 3.2.1 試料と前処理

#### 3.2.2 実験手順の概観と詳細

### 3.3 結果

#### 3.3.1 MFA イメージングと S<sub>2</sub> 層 MFA の選択的抽出

#### 3.3.2 仮道管形状の年輪内変動パターン

#### 3.3.3 仮道管形状と S<sub>2</sub> 層 MFA 年輪内変動の同時評価

### 3.4 考察

#### 3.4.1 仮道管形状の年輪内変動に影響を与える因子

#### 3.4.2 仮道管形状と S<sub>2</sub> 層 MFA との関係性

#### 3.4.3 応用展開の可能性と注意点

### 3.5 結語

### 3.6 補足資料

## 第4章 日本産広葉樹材の細胞形態定量による多様性解析

### 4.1 緒言

### 4.2 試料と方法

#### 4.2.1 試料と前処理

#### 4.2.2 XRD による MFA 測定

#### 4.2.3 POM と FLM による画像撮影

#### 4.2.4 MFA 画像への変換と画像解析

### 4.3 結果

#### 4.3.1 MFA 測定値の比較

#### 4.3.2 各細胞種の多層構造と MFA 分布の評価

#### 4.3.3 MFA と CWT の関係性

### 4.4 考察

#### 4.4.1 手法毎により得られる MFA の評価と利用

#### 4.4.2 細胞種に応じた MFA, 壁層構造とその機能

#### 4.4.3 広葉樹木部繊維, 仮道管の MFA, CWT の年輪内変動とその機能

### 4.5 結語

### 4.6 補足資料

## 第5章 結言

- 5.1 本研究の総括
- 5.2 今後の課題と展望

## 参考文献

出版論文一覧

データおよびコード利用

謝辞

## Appendix

### A.1 黄檗宗萬福寺の歴史と木材利用観

- A.1.1 黄檗宗萬福寺の歴史
- A.1.2 萬福寺における木材利用観
- A.1.3 参考文献

## 略称・数式記号一覧

### 略称一覧

略称	正式名称 (英語)	正式名称 (日本語)
<b>CNN</b>	Convolutional Neural Network	畳み込みニューラルネットワーク
<b>CT</b>	Computed Tomography	コンピューター断層撮影
<b>CWT</b>	Cell Wall Thickness	細胞壁厚
<b>FLM</b>	Fluorescence Light Microscopy	蛍光顕微鏡法
<b>Grad-CAM</b>	Gradient-weighted Class Activation Mapping	勾配重み付けクラス活性化マッピング
<b>IAWA</b>	International Association of Wood Anatomists	国際木材解剖学者連合
<b>LCTF</b>	Liquid Crystal Tunable Filter	液晶可変フィルター
<b>MEP</b>	Major Extinction Position	消光位
<b>MFA</b>	Microfibril Angle	マイクロフィブリル傾角
<b>NIR</b>	Near Infrared	近赤外
<b>XRD</b>	X-Ray Diffraction	X線回折法
<b>PEG</b>	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
<b>POC</b>	Phase Only Correlation	位相限定相関法
<b>POM</b>	Polarized Optical Microscopy	偏光顕微鏡法
<b>QWA</b>	Quantitative Wood Anatomy	定量木材解剖学
<b>SIFT</b>	Scale Invariant Feature Transform	スケール不変の特徴変換
<b>XAI</b>	eXplainable Artificial Intelligence	(結果や判断根拠が) 説明可能な人工知能

## 数式記号一覧

本論文で使用する数式では、スカラーをイタリック、ベクトルを矢印付きイタリック、マトリックスには太字を使用して区別を行っている.

スカラー：
$$\frac{1}{n_e^2(\theta_{MFA})} = \frac{\sin^2(\theta_{MFA})}{n_e^2} + \frac{\cos^2(\theta_{MFA})}{n_o^2} \quad \dots \text{Eq(2)}$$

ベクトル：
$$\vec{I}(\vec{\lambda}) = \begin{pmatrix} I(\lambda_1) \\ I(\lambda_2) \\ \vdots \\ I(\lambda_n) \end{pmatrix}$$

マトリックス：
$$\mathbf{T}(\vec{\lambda}) = \begin{pmatrix} T(\lambda_1) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & T(\lambda_2) & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & T(\lambda_n) \end{pmatrix}$$

# 第 1 章

## 序論

## 1.1. 木材解剖学とその到達点

17 世紀における Robert Hooke による先駆的な顕微鏡観察記録や, Nehemiah Grew と Marcello Malpighi による植物細胞観察に関連した一連の研究が植物解剖学 (Plant anatomy) ・植物組織学 (Plant histology) 分野のはじまりと言われており, その後植物分類学 (Plant taxonomy), 生態学 (Plant ecology) および生理学 (Plant physiology) といった植物学に内包される多くの関連分野を生み出し現代に至っている[1]. 植物と一言に言ってもその対象は極めて広く, それらをどのような観点で分類するか大きく依存するものの, 草本植物・木本植物という分類が用いられることが多い[2]. その歴史的経緯から木本植物の細胞形態を取り扱う木材解剖学 (Wood anatomy) は植物解剖学分野に取り込まれることなく, 独自の専門領域として発展しその基礎が確立された[1].

多くの学問領域がそうであるように, 木材解剖学分野の始まりは光学顕微鏡観察による細胞形態の記載および分類を目的とした記載解剖学 (Descriptive anatomy) 的側面を色濃く反映しているのが特長である[3]. 当該分野の体系整備は, 流通する木材の正確な同定が商業上極めて重要であることに大きく後押しされている. その応用として解剖学的知見による樹種識別を強く意図しているのは自然な流れであり[1], 本邦においても事情は同様であった[3,4]. 木材解剖学者が長年蓄積した記載解剖学的知見は様々な媒体を介して報告されているが[5-10], その1つの集大成が国際木材解剖学者連合 (International Association of Wood Anatomists, IAWA)[1,11]より発刊された光学顕微鏡的特徴リスト (IAWA list of microscopic features) である[12-17]. 当該リストでは主に針葉樹・広葉樹を対象として, 顕微鏡観察による樹種識別を行う上で着目すべき解剖学的特徴及びその識別基準が網羅されている. 現代の木材解剖学者は IAWA の光学顕微鏡的特徴リストというデジュレ・スタンダードをもとに, 顕微鏡観察によって得られる樹木細胞形態を体系的に議論することが可能となった.

時代が下るにつれ, 木材解剖学が対象とする範囲は記載解剖学だけでなく, 細胞壁形成機構や, 樹木細胞構造の多様性と機能の関係性等, 樹木細胞そのものに対する包括的理解を目的とした幅広い領域を取り扱う学問へと派生していった[3]. このような諸領域に対して, 樹木細胞観察に特化した様々な技術群 (e.g. 顕微手法: 偏光顕微鏡法 (POM)[18], 蛍光顕微鏡法 (FLM)[19]およびその関連手法[20], 紫外顕微鏡法[21], 共焦点レーザー顕微鏡法[22], 透過型電子顕微鏡法[23], 走査電子顕微鏡法[24,25]およびその関連手法[26-29],  $\mu$ -X 線 CT 法[30,31], etc.[32]; 前処理手法: 樹脂包埋・切片作製[33], 種々の染色法[34,35], 免疫標識[36,37], etc.) は大きな威力を発揮しており, 当該学問分野の深化に大きな貢献を果たしてきた[2].

## 1.2. 木材解剖学にみられる課題 -多様性と機能の評価-

木材解剖学の記載解剖学的側面は IAWA の提唱をもとに 1 つの体系を構築しているものの, 形質ベース生態学 (Trait-based ecology) [38]および機能・生態比較解剖学 (Functional & ecological comparative wood anatomy) [10,39,40]的視点からはその体系知の問題点が指摘され

ている。いずれの分野も、内的・外的諸要因 (e.g. 内的要因: 植物ホルモン量・勾配[41,42], 細胞発生機構[43], 樹齢[44]等; 外的要因: 気象条件, 生育環境[45,46]等) に適応もしくは制約として形作られた樹木細胞形態 (マクロスケールより, 年輪, 細胞形態, 多層構造, フィブリル-マトリックス構造, セルロース繊維といった階層構造[18,47,48]) とその多様性[38,49-51]・機能 (e.g. 物質輸送, 樹体支持, 物質貯蔵等)[52-61]との関係性に焦点が当てられている。現状の木材解剖学は人間に識別可能な形態情報に重きが置かれているため, 上記の問いに対する知見や答えを提示できる体系知は整備されていない。木材解剖学のスケールが樹木細胞の包括的理解へと遷移した現在において, 樹木細胞形態の多様性と機能について科学的且つ体系的に取り扱う基礎を構築する必要がある。

上記が要請される現代の木材解剖学において極めて重要なのは, 計測を通して物体を評価する形態測定学 (Morphometrics) 的視点, および多量のデータから本質的情報を抽出する情報学 (Informatics) 的視点の 2 つである。形態測定学・情報学を木材解剖学に援用する利点は, 細胞の定量形態情報を基に従来手法では到達し得なかった細胞形態-多様性-機能の関係性に対する理解の深化を実現できる可能性を有している点にある[61]。既往の研究にも定量計測やステレオロジーを利用した先進的で興味深い事例は存在するものの[62-64], 数は極めて少なく, その重要性にも関わらず木材解剖学分野で活発に取り組みされているトピックではないのが現状である。

木材解剖学において形態測定学・情報学的視点の援用が遅々として進まない原因として, 計測および情報処理に伴う技術的な課題が考えられる。実験手順を振り返ると, 樹木細胞の計測は顕微鏡画像を対象とした手動計測が支配的である。その計測コストは極めて高く且つ恣意的であるため, 細胞形態の多様性や機能を考察する上で, 十分量の計測データを以て行うインセンティブが働きにくいことが容易に想像される。加えて, 計測が実施された場合でも, その対象は樹木細胞の特定スケールにおける構造特徴のみに限定されてしまい, 樹木細胞の階層構造を多角的に繋ぎ合わせる手法がいまだ確立されていないのも大きな課題である。実際に, 樹木細胞の階層構造間での相互作用や, それによって生じる多様性や機能といった点に関しては未だ不明点が多いままとされている[47]。

種々の障壁により木材解剖学に対する形態測定学・情報学的視点の導入は困難となつてものの, 近年これらの障壁を押し下げる様々な技術が発展, 普及しつつある[65]。その代表例には, 顕微イメージング手法の発展[66-69], 顕微鏡用カメラの性能向上[70-73], コンピューターの性能向上[74]に伴う顕微鏡画像解析技術の高度化[71,75-77]等が挙げられる。樹木細胞の多様性と機能を評価するための形態測定学・情報学的視点が現代の木材解剖学におけるデファクト・スタンダードの地位を獲得する上で, これらの手法群の果たす役割は極めて大きいことが予想される。以下の 2 節では, 当該技術群の中でも本研究の技術的中枢を担う, 画像解析技術および偏光イメージング技術について詳説していく。

### 1.3. 画像解析による樹種識別, 定量木材解剖学の勃興

木材科学分野でコンピューターや画像解析が積極的に活用されている代表例として, 細胞形態を利用した樹種識別が挙げられる[78,79]. 従来の樹種識別では, 記載解剖学に記された細胞形態情報をもとに属レベルでの樹種同定が可能であり, 当該知見は考古学や建築学, 文化財科学との学際領域, 木材のトレーサビリティ向上といった社会課題にまで広く応用されている[80,81]. 樹種識別においてコンピューターが活用されたきっかけは, 上記に示すような幅広い応用領域において誰もが木材解剖学の体系的な知見を最大限享受することを目指したためである. この思想を基にした最初期のコンピューター活用事例は, 二又式や多口式検索[5,6,8]を電子化したコンピューター支援型 (Computer-aided) 樹種識別システム[82-84]であり, この発展形として現在では Web サイトベースの検索システムが開発され, 様々なユーザーが利用可能となっている[85,86]. ただし, このような樹種識別システムの活用には記載解剖学の専門家による判断が必須となるため, 非専門家にとってそれを利活用するハードルは決して低くない. このような欠点を回避し専門家による判断に依存しない手法として近年積極的に導入されているのが画像解析による樹種識別である. コンピューター性能の向上やユーザーフレンドリーなプログラミング言語 (e.g. Python[87], R[88]), 画像解析・機械学習ライブラリ (e.g. OpenCV[89], scikit-image[90], Mahotas[91], scikit-learn[92], etc.) の普及により, 上記ツール群と画像をベースとして, 非専門家でも信頼性の高い樹種識別結果が得られるだけでなく, 得られた結果を木材解剖学へと還元することを目的とした手法の開発も行われており[78], 更なる発展が期待される分野の1つである.

画像解析を用いた樹種識別では, 画像の撮影手法や倍率, データ数に応じた最適な方法論を選択することにより, 画像に映る樹木細胞形態の特徴量を抽出し, 樹種識別が実施可能となる[78]. X 線 CT 法や実体顕微鏡等で観察可能である macroscopic なテクスチャ情報に対しては Gray-Level Co-occurrence Matrix 法[93]や Local Binary Pattern 法[94]に代表されるようなテクスチャ解析, 光学顕微鏡で観察される microscopic な個々の細胞レベルにおける輝度変化情報を利用する場合は SIFT 法[95]のような局所特徴量抽出手法を用いることが多く, これに各種多変量解析 (e.g. Principle Component Analysis[96]; Partial Least Squares-Discriminant Analysis[97]) や機械学習手法 (e.g. Random Forest[98]; Support Vector Machine [99]) を識別機とすることで樹種識別が可能となる[100-106]. 特に近年注目されているのが畳み込みニューラルネットワーク (CNN) [107,108]に代表される深層学習をベースとした特徴量抽出・識別を利用した樹種識別であり[78,79], 応用事例が多くみられるようになっている (e.g. [109-112]). CNN はパラメーター数が極めて多く学習能力が極めて高いため, 画像からの特徴抽出および識別や回帰といったタスクにおいて高い性能を示すこと, その一方で高い識別・回帰性能のトレードオフとして判断根拠がブラックボックス化しやすいという欠点を有していることが知られている[113,114]. 後者に関して, その欠点を緩和しモデルの判断基準を説明可能とする XAI 手法[115-117]が盛んに研究され, モデル解釈性を上げる取り組みが多くなされている. CNN と XAI の組み合わせにより樹種識別を実施することで,

高い識別率を維持しながら、従来の木材解剖学では見出すことのできなかつた新たな細胞構造特徴を抽出できる可能性が期待されている。

樹種識別とは異なる形で画像解析技術の木材科学への適用が進むことで新たに勃興した研究分野が、定量木材解剖学 (QWA) である [65,118]。当該分野は主に年輪年代学 (Dendrochronology) および年輪気候学 (Dendroclimatology) といった樹木生態学に関連した諸分野でその威力を発揮している。従来は年輪という単位に着目していたのに対し、QWA では顕微鏡画像の画像解析を用いることで主に細胞レベルの形態変化に着目することに大きな長が存しており、今まで検知することが難しかったローカル且つ短期間における気候情報の復元や細胞形態の応答解析等に応用されつつある。

QWA を成立させた重要な画像解析技術の 1 つとして、画像セグメンテーション技術 (Image segmentation)[78,119]が挙げられる。画像セグメンテーションとは、画像の画素毎にクラス分類を行うタスクのことを指し、近年の深層学習の発展による爆発的な精度改善と、様々な学問領域や実社会で高い応用展開性を達成している [120]。画像セグメンテーションでは、具体的に実施するタスクに応じて呼称が異なり、セマンティックセグメンテーション (Semantic segmentation)、インスタンスセグメンテーション (Instance segmentation)、パノプティックセグメンテーション (Panoptic segmentation) がよく使用される [118]。QWA では細胞境界予測にセマンティックセグメンテーションが使用され、事例は多くないものの、針葉樹であれば仮道管 [121]や放射柔細胞 [122]、広葉樹であれば道管 [123,124]、木部繊維 [124,125]、放射柔細胞 [126]を対象に、画像上で個々の細胞を切り抜きそれぞれの細胞形態を抽出・解析することに成功している。

深層学習による画像セグメンテーションに限らず、QWA では木口断面より得られる細胞形態の定量化を円滑に進めるための手法が多く開発されている。代表例として、Root Xylem Analysis System [127,128]や WinCell™ [127]に代表される包括的な樹木細胞形態定量システムの他に、計測コストが高く自動化に多くの困難が伴う細胞壁厚計測を自動化するシステムも複数報告されている [130,131]。加えて、細胞の空間的配置を定量化する興味深い適用事例として針葉樹の放射列 [132]を基本単位とした tracheidogram という概念 [133,134]が提唱されており、1 年輪における針葉樹仮道管形態の変動を標準化した形で定量可能としつつある。特に年輪気候学分野での tracheidogram の適用事例は徐々に増えており (e.g. [135-138])、放射列を自動抽出可能とするアルゴリズムも複数提案されている [139-143]。

画像解析による樹種識別および QWA の多くの事例に共通している長は、画像という電子媒体によって記録された樹木細胞構造や配置、それによって形成されるテクスチャ情報を統計的・機械的に処理することで、取得された情報の特徴量化および定量化 (e.g. 画像特徴量、細胞形態の定量計測) を実現していることにある。これらの手法は、樹木細胞観察だけでは得られない、新たな知見を提供しうる可能性を有している。

#### 1.4. ナノ構造特性を繙く偏光イメージング

結晶構造の非対称性等に起因する光学的異方性を有する物質に特定の振動方向のみを有する光線 (偏光) が入射した際、偏光の向きに応じて光線が 2 つの光線 (通常光, 異常光) に分裂する現象のことを複屈折と呼称する[144]. 複屈折現象で生じる 2 種の光線は、物質内でそれぞれ異なる屈折率  $n_o$  および  $n_e$  の影響を受けるため、いずれかの光線の位相に対して相対的な遅れが生じる. 光学的異方性を有する物質を通過する光線に生じる相対的な位相の遅れを位相差 (Retardation) と呼び、当該物理量を利用することで、物質の光学特性や、光学特性が既知の物質の場合観察対象物質の厚みや配向情報を知ることが可能となる.

上記に示した物質の光学的異方特性を可視化するために開発された装置の 1 つが、偏光顕微鏡に代表される顕微偏光イメージング技術である. 古典的な偏光顕微鏡では、光源側および対物レンズ側それぞれに偏光子 (Polarizer) と言われる光学素子がサンプルを挟む形で配置されている. 偏光子とは、ある特定の方向に振動した光線のみを選択的に透過させる性質を有する光学素子であり、偏光顕微鏡では 2 つの偏光子の光の透過方向を変更する (e.g. 光の透過方向が直交するように配置されたクロス・ニコル状態が最も一般的である) ことで、物質の光学特性を定性可能としている. この方法で位相差について情報を得ることは一般に困難ではあるものの、遅相子 (Retarder) として 1/4 波長板や全波長板を用いることにより位相差を干渉色という可視光域の色情報に変換可能であることから、物質より生じる位相差をおおよそ見積もることが可能である[145]. しかしながら既述の通り、古典的な偏光顕微鏡は観測された位相差を厳密に定量することを意図して設計されていないため、そこから得られる情報は定性的且つ限定的という欠点を有していた.

上記の欠点を克服するために種々の手法が開発されたものの、生物学や植物学に最も影響を与えたと考えられるのが「新しい偏光顕微鏡」として開発された LC-PolScope [66,146-148] である. 当該顕微鏡の光学系は、電気制御された液晶変調位相子とその制御 PC, 1/4 波長板、および光源の波長選択のための干渉板により構成されている. 最大の特長は、オンタイムで位相差とそれが生じる軸の向き (方位角) を定量可能である点にある[71]. 当該手法により、従来無染色では観測が困難であった構造体を極微小な位相差を利用することで鮮明に可視化させ、そのダイナミズムを追跡することを可能としたのである. この手法により、ウニ精子の軸系の可視化やその厚み計測[149]、アメフラシ神経細胞の糸状・葉状仮足アクチンのダイナミズム可視化[150]をはじめとして多くの観察・定量事例が存在しており、当該手法のアプリケーションを含めて医学生物学で幅広く応用されている[148,151-154].

LC-PolScope をはじめとした新しい偏光イメージング手法は、近年その応用フィールドを植物学・木材科学に広げつつある. 当該イメージング手法でその真価を遺憾なく発揮している事例は、植物・樹木細胞の横断面切片を利用した MFA イメージングによる MFA の可視化・定量化である. これは、結晶性高分子のセルロースが一軸光学異方性を有していること [18]、セルロースの屈折率楕円体[145]とその傾き角の関係性から生じる位相差が MFA と三角関数によって既述可能なことにより成立するイメージング手法である. このことを応用

してはじめて植物・樹木細胞壁における MFA を計測したのが, Abraham et al. [155-157]である. 著者らは当該手法を主にフウロソウ科に属する草本植物の芒の細胞観察に使用し, その壁層構造・細胞配置に依存した MFA の空間分布より引き起こされるマクロなねじれ構造と, 芒の乾燥に伴うバイオメカニクス of 解明に成功した[155-157]. その他にも草本植物 [158-163]や竹[164,165]の細胞壁やその多層構造を対象とした偏光イメージングによる MFA 観察・計測事例が存在している一方で, 木本植物を対象とした実施事例は現在でもほとんど存在していない[156].

木材解剖学分野において古典的な偏光顕微鏡は樹木細胞多層構造の定性観察[18,166,167]や, single wall の消光位観察を用いた MFA 測定[18,168,169]等に使用されていたが, その利用は極めて限定的であった. それに比して, 偏光イメージングを利用した MFA イメージング手法では木口断面から広い視野を確保しつつ, MFA や細胞形態を多元的に計測することを可能とするため, 木材解剖学での展開性は極めて広いと考えられる. 当該手法を応用することで個々の細胞空間配置や多層構造の MFA が簡便に定量計測可能となるため, 樹木細胞のバイオメカニクスやその機能を解明する上で今後強力な手法になることが予想される.

## 1.5. 本研究の目的と章構成

本研究の第一の目的は, 樹木細胞形態が織り成す階層構造を多元的に計測可能とし, 且つ得られた計測データから樹木細胞の多様性及び機能に関する情報を抽出可能とする新たな手法群を開発することにある. これは 1.2.節で詳説した通り, 樹木細胞の包括的理解にまで広がった現代の木材解剖学において, 樹木細胞の観察のみではその目的を達成するのは困難であり, 特に樹木細胞の多様性や機能について理解を深化させるには今までにない方法論を導入する必要がある, という問題意識が研究目的設定の背景に存している. 開発する新規手法の技術的中枢は, 1.3.節および 1.4.節で詳説した, 偏光を利用した MFA イメージング技術および画像解析技術の 2 つである. これらは MFA から細胞配列まで, マルチスケールに渡る階層構造を有機的に繋ぎ合わせることを可能とするポテンシャルを有している. 本研究の第二の目的は開発した手法群を様々な対象に適用し, それらが木材解剖学に新たな知見を提供可能であるか検証することにある. 樹種識別, 針葉樹材の年輪内変動および広葉樹材における細胞多様性と機能の評価を適用対象として設定し, それぞれの内容について以下に示す章立てにより本論文は構成されている.

第 2 章では, 従来の木材解剖学的知見では樹種識別が困難であり, 且つそれらの樹種識別の学術的価値が高いことで知られる, ヒノキ科 (Cupressaceae) 樹種であるヒノキ属ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) とアスナロ属樹種 (*Thujopsis dolabrata*, *Thujopsis dolabrata* var. *hondai*) の識別[170]を対象としている. 上記手法の適用によって得られる MFA および細胞構造情報をもとに, 両樹種が十分な信頼性を以て識別可能か, 識別を通して目視では捉えることのできない両樹種固有の構造特徴が抽出可能であるか, 検証を実施した.

第 3 章では, その細胞構成が極めて単調である針葉樹材に対し, MFA・仮道管断面形態の

cell-by-cell 多元計測を通して、仮道管細胞構造-機能の関係性について詳細な議論が可能となるか、検証を実施した。測定対象にはヒノキ属ヒノキを選定した。針葉樹ではその細胞発生の軌跡が放射列 (radial files)[132,133]として記録される。当該単位を基準とし、針葉樹の1年輪内における MFA・仮道管断面形態変動の定量を行うことで、針葉樹材の横断面に見られる macroscopic な特徴量 (e.g. 早晚材移行, Intra-annual density fluctuations[171,172]) と microscopic な仮道管形態および二次壁 MFA が如何に関連しているか、仮道管に求められる支持・通水機能がどのように変化しているかについて詳細な議論を行っている。上記の実施を通して、新規測定手法の利点・欠点およびその適用範囲についても併せて詳説している。

第4章では、多種多様な解剖学的特徴を有する本邦産広葉樹材 16科 18属 20種に対し、MFA・細胞形態の cell-by-cell 多元計測を適用することで、機能分化の進んだ多種多様な細胞種の構造-機能の関係性[57-59,61]解明や、従来の解剖学では記載が困難であった解剖学的特徴の探索・定量化が可能となるか、検証を行った。従来、広葉樹材を対象とした MFA・細胞形態定量の事例は少なく、多くの場合有用樹種が対象となることがほとんどであった。そのため、本研究における実施内容そのものや、その構造-機能に関する議論は多くの新規性を含んでいると考えている。上記トピックスについて、特定の樹種を対象として多層構造毎の MFA 空間分布情報を用いた各細胞種の構造-機能推論、および細胞壁厚 (CWT)と MFA に着目した木部繊維多様性について考察を実施した。

第5章では、第2章-第4章で得られた結果の総括に加え、木材解剖学における樹木細胞形態の定量計測における課題と展望について現時点における私見を述べている。

## 第 2 章

解剖学的に類似したヒノキ科

2 樹種の識別検討

## 2.1. 緒言

本邦では木質資源の豊富さ故に、古代から現在に至るまで様々な目的に応じて木材を利用してきた長い歴史を有している[1,2]. 木材利用では、木材の性質 (密度, 耐水性, 加工性など) はもちろんのこと[1], 木材が利用された周辺地域の植生やその時代における文化的背景, 利用者の趣向を反映し樹種が選択される傾向にある[3]. 従って, 文化財等 (e.g. 木彫像[4-6]) における木材利用や樹種選定を通して, 我々は本邦における文化的背景を知ることが可能となっている.

樹種識別と日本の木材利用文化という観点から見た場合に重要な針葉樹材が, ヒノキ科に属するヒノキ属ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) とアスナロ属アスナロ (*Thujopsis dolabrata*) とその変種にあたるヒノキアスナロ (*Thujopsis dolabrata* var. *hondai*) である. ヒノキ・アスナロ属共に, 心材の保存性や耐久性が極めて高く[7], また許容応力度や繊維方向ヤング係数といった材の示す力学的性質が優良であるため[8], 建築用材としての利用は理にかなっている. しかしながら, 神社や宮殿, 寺社仏閣といった高貴さが求められた建築においては, 伝統的な木材利用観からヒノキが優先して用いられる傾向にある[7]一方で, アスナロ属はその群生地付近を中心に多様な建築物を対象にその利用が確認されている[9-17]. 上記の例より, ヒノキ・アスナロ属共にその優れた材質故建築用材として使用されるものの, 木材利用観や植生を考慮すると, その利用には地域差や意匠の特殊性といった要素を色濃く反映していることがわかる. そのため, ヒノキ・アスナロ属の正確な識別は本邦の木材利用文化をより深く理解する上で極めて重要であり, またその知見が歴史学や建築学といった他分野へも波及するだけのインパクトを有している.

針葉樹材の樹種識別を実施する上で最も一般的な方法は, 光学顕微鏡を用いた木材の解剖学的特徴の観察であり[18], 従来ヒノキ・アスナロ属の識別にもこの手法が用いられてきた. ヒノキ・アスナロ属の解剖学的特徴は極めて類似しているものの, 早材における分野壁孔 (cross-field pitting)[19]を観察することにより識別が可能であると論じている[20]. ヒノキであれば, 分野壁孔は典型的なヒノキ型で, 1分野あたり 2 個が普通であるのに対し, アスナロではスギ型壁孔でややヒノキ型の傾向があり, 数が分野あたり 3-4 個であるとしている[19]. 一方, Noshiro (2011)[21]によれば, 両者とも分野あたりの分野壁孔の個数自体に大きな違いはないものの, ヒノキではトウヒ型とヒノキ型の間, アスナロ属ではヒノキ型とスギ型の間をとる傾向が見られると結論づけている. しかしながら, 分野壁孔の分類そのものが主観的な観察に基づいて定義されており, またその特徴は個体間・内分散に大きく影響を受ける. そのため, 分野壁孔を用いたヒノキ・アスナロ属の識別は, 観察者の経験と勘が極めて重要であり, 従来法には多くの課題が存在している. より正確かつ再現性のあるヒノキ・アスナロ属の識別を行うためには, 樹種固有の細胞構造特性を反映した定量指標を基にした方法論が必要である.

樹木細胞構造の定量指標の代表例の 1 つとして, 木部細胞壁二次壁における MFA が挙げられる. 当該指標は木材の物性[22-24]や収縮挙動[25-27]といった, 木材の有する重要な特

性と関連することが知られているため、極めて重要視される指標の1つである。木材の物理的指標に対する MFA の影響は数多く議論されてきた一方で、針葉樹における MFA の樹種固有特性 (e.g. MFA の絶対値や早晚材移行に伴う MFA の変動) について数例を除き未だに不明点が多い[28,29]。これは従来の MFA 計測手法のほとんどは、細胞内・細胞間の MFA を計測するには十分な分解能を有していない、もしくは細胞分解能を有していたとしても細胞内における MFA の分散を十分に表現することができないという課題を抱えていたためである[30]。しかしながら、近年使用シンクロトロン  $\mu$ -XRD[29], POM による MFA イメージング[31-33]および Raman 顕微鏡法[34]は既述の障壁を乗り越える可能性を示しつつある。特に、POM による MFA イメージング法はラボスケールで簡易且つ安価に MFA を計測できること、また通常の光学顕微鏡画像と同様の画像データが手に入るため、画像解析手法と組み合わせることで MFA と細胞形態を同時評価可能とするポテンシャルを有している点で大きな魅力が存在している。細胞構造・配置にはっきりとした樹種固有特性が現れない針葉樹材に対し上記手法を適用することで、MFA や細胞断面形状といった仮道管の定量形態情報に樹種固有の構造特徴を見出すことのできる可能性が存している。

本研究の目的は、従来その識別が困難であったヒノキ科樹種のヒノキ・アスナロ属を識別可能とする新規手法を検討することにある。新規識別手法がその識別に利用するのは木口断面より観察可能な樹木細胞形態および仮道管  $S_2$  層の MFA の 2 指標である。当該指標の取得には、木口断面切片より MFA 画像を取得可能とする POM ベースの MFA イメージングを開発しそれを使用した。当該画像を CNN に供しすることで仮道管の横断面形状と MFA 情報から樹種識別を実施し、その後複数のモデル解釈手法を適用することで識別対象画像のどの部分が樹種識別に影響を与えているのか、その根拠の評価を行った。上記に示した一連のフローをヒノキ・アスナロ属の現生材および古材に適用することで、細胞形態情報をもとにした針葉樹材の識別が可能となるか、また識別結果とモデル解釈を通して従来の解剖学では発見されていないヒノキ・アスナロ属固有の形態特徴が検出可能であるか検討を実施した。

## 2.2. 試料と方法

### 2.2.1. 試料と前処理

本研究で用いたすべての現生材および建築古材サンプルは、京都大学生存圏研究所材鑑調査室 (<https://www.rish.kyoto-u.ac.jp/logos/wp-content/themes/Xylarium/>) に登録されている木材標本 (サンプル番号: KYOw) のみを使用した (Table 2-1). ヒノキ現生材 12 個体, アスナロ属ではヒバ・ヒノキアスナロ現生材を合わせて 12 個体を選定し, 現生材ブロックは心材で正常材のみを使用した. 建築古材には, 黄檗宗萬福寺の鐘楼・伽藍堂より収集した江戸から昭和初期の木材 4 個体を使用した. 使用した古材は, ミクロトームで切片を作製した切片を顕微鏡観察し, 既往の報告[35]にて樹種識別を行ったものである (Fig.S2-1 参照).

**Table 2-1** 実験に使用したヒノキ, アスナロ属サンプル一覧

Wood species	Sample state	Sample Number	KYOw IDs
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	New Wood	12	00638, 04432, 04434, 04435, 04436, 04439, 08004, 08005, 08007, 13832, 14105, 17824
	Old wood	2	20533, 20534
<i>Thujopsis dolarata</i>	New wood	10	00034, 00579, 00580, 11401, 11402, 11403, 13581, 20536, 20537, 20538
<i>Thujopsis dolarata</i> var. <i>hondai</i>	New wood	2	08017, 08018
<i>Thujopsis spp.</i>	Old wood	2	20485, 20539

\*古材は解剖学的特徴の顕微鏡観察により樹種を同定. 詳細は Fig.S2-1 を参照のこと.

現生材・古材の木材ブロックを数ミリ角の小片とし, 真空下で 2-3 日間脱気した. この小片を PEG1500 (Wako Pure Chemical Corporation) で包埋した. 包埋の際は, 蒸留水で希釈した 30% PEG1500, 50% PEG1500, 及び 100% PEG1500 に 1 日ずつ小片を浸して徐々に置換を行った. 置換が終わったブロックをシリコン製の鋳型に入れ, 100% PEG1500 で包埋した. 包埋試料はスライディングマイクロトーム (TU-213, Yamato Kohki Industrial Co., Ltd.) を用いて厚さがおおよそ 10  $\mu\text{m}$  となるように木口面断面切片を作製し, 水で脱包埋した. 得られた切片はガムクロラルに封入しプレパラートとした.

### 2.2.2. 可視光ハイパースペクトル画像の撮影

木口断面切片を鋭敏検板 (U-TP530, Olympus Corporation) を挿入した偏光顕微鏡 (BX-53P, Olympus Corporation) のステージに置き, 早材領域の放射壁および接線壁が鋭敏検板の遅相軸・進相軸とおおよそ平行となるようにセッティングした. x40 の対物レンズ (UPLFLN 40×P, N.A.=0.75, Olympus Corporation) に設定し, クロス・パラレルニコル下で干渉色のハイパースペクトル画像 (1536×1024 pixel) を撮影した. ハイパースペクトル画像の撮影は LCTF (VariSpec™, Cambridge Research & Instrumentation, Inc.) 搭載型冷却 CCD カメラ (Apogee Alta F2, Oxford Instruments plc) を使用した. 各波長における画像撮影の露光時間は 3 s, 測定波長領域は 461-602 nm, 測定点の波長間隔を 3 nm とし計 48 枚の画像を撮影した. これに加えて, 鋭敏検板を抜いたクロスニコル条件の場合も同様の撮影条件でハイパースペクトル画像の撮影を行った. 以下では, 鋭敏検板を挿入時におけるクロス・パラレルニコル条件でのハイパースペクトル画像をハイパースペクトル画像①および②, 鋭敏検板を挿入せず得られたクロスニコルで得られたハイパースペクトル画像をハイパースペクトル画像③と呼称する. このような方法で試料毎に約 10 セットのハイパースペクトル画像①-③を入手した.

得られたハイパースペクトル画像の各画素に対応する色スペクトルは移動平均法 (窓サイズ: 5 ポイント) により平滑化を行った. 平滑化したハイパースペクトル画像①と②において各波長各画素の強度値を足し合わせることで, 各画素における波長依存の透過率  $\mathbf{0}(\vec{\lambda})$  を得た. その後, 平滑化したハイパースペクトル画像①に, 画素ごとに得られた  $\mathbf{0}^{-1}(\vec{\lambda})$  を掛け合わせることで, 白色光下における理想的な干渉色のハイパースペクトル画像へと変換した (補足資料参照). この補正されたハイパースペクトル画像の画素ごとの強度スペクトルを再度移動平均法 (窓サイズ: 5 ポイント) で平滑化した.

### 2.2.3. 位相差・MFA 画像への変換と画像処理

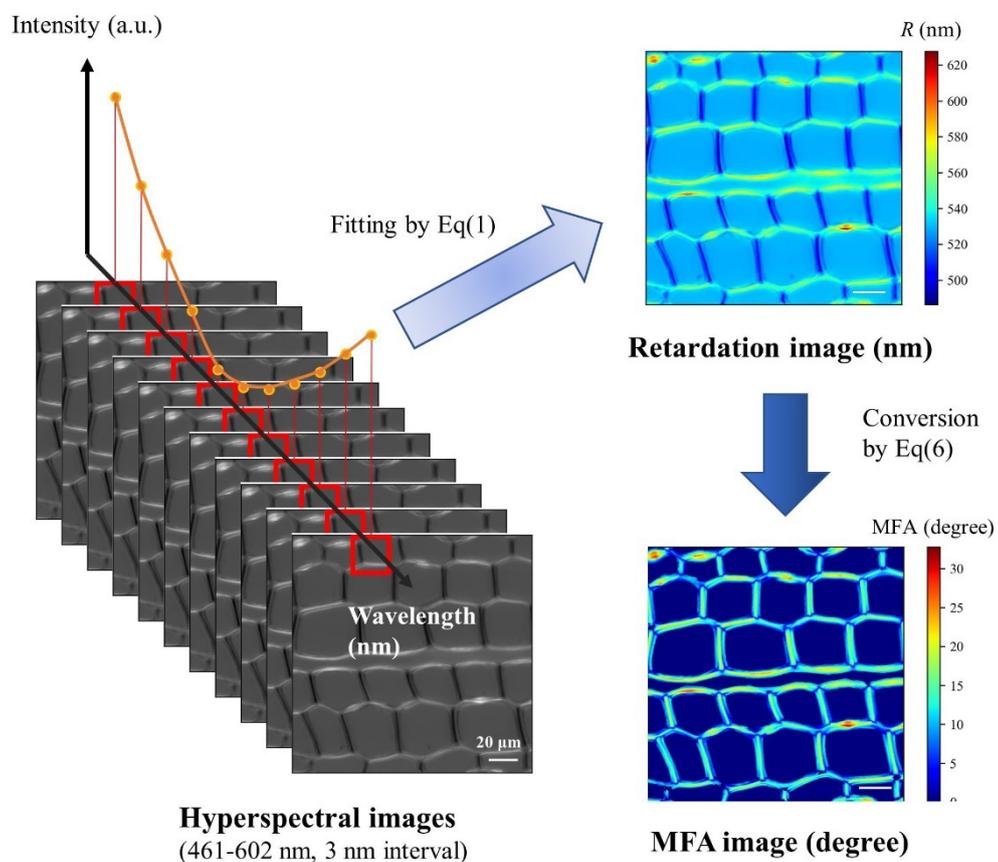
ハイパースペクトル画像から位相差および MFA 画像へと変換する工程を Fig.2-1 に示す. 平滑化後におけるハイパースペクトル画像の両端 2 点を除いた画素強度を, 干渉色スペクトルを表現する下式にフィッティングすることで, 可視光スペクトルを観測されたレターション  $R_{obs}$  に変換した.

$$\vec{I}(\vec{\lambda}) = a \cdot \sin^2\left(\frac{\pi R_{obs}}{\vec{\lambda}}\right) + b \quad \dots \text{Eq(1)}$$

$$R_{obs} = \begin{cases} R_{FWP} + R_{cell} & (\text{radial wall}) \\ R_{FWP} - R_{cell} & (\text{tangential wall}) \end{cases}$$

$$\vec{\lambda} = (467, 470, \dots, 593, 596(\text{nm}))$$

ここで、 $a$ および $b$ は、フィッティングにおけるスケーリングパラメーターである。また、 $R_{FWP}$  および $R_{cell}$ はそれぞれ、鋭敏検板および細胞壁中のセルロースより生じる位相差に対応する。フィッティングには非線形最小二乗法の1つである Levenberg-Marquardt 法[36,37]を用いた。上フィッティングによりそれぞれの画素が  $R_{Obs}$ よりなる位相差画像が得られた。その後、ハイパースペクトル画像③の各画素に対して非階層クラスタリング手法である K-means++法[38]を適用することで背景領域を抽出、当該背景領域に対応する $R_{Obs}$ の平均値を $R_{FWP}$ として設定した。これをもとに、フィッティングより得られた $R_{Obs}$ から $R_{FWP}$ を可算もしくは減算することで、細胞壁由来の位相差である  $R_{cell}$ を算出した。



**Fig.2-1** ハイパースペクトル画像 (左下) から位相差画像 (右上), MFA 画像 (右下) への変換の概念図. ハイパースペクトル画像の各画素に対応する可視光スペクトルに対し Eq(1)でフィッティングをかけることにより、位相差へと変換する。その後、Eq(6)を用いて位相差から MFA へと変換を実行する。

光学的一軸性を有する物質において、異方性体の配向に依存してその異常光屈折率が変化することが知られている (Fig.2-2). 異常光屈折率の配向角 ( $\theta_{MFA}$ ) 依存性および $R_{obs}$ をあらわす式は以下のように表現される.

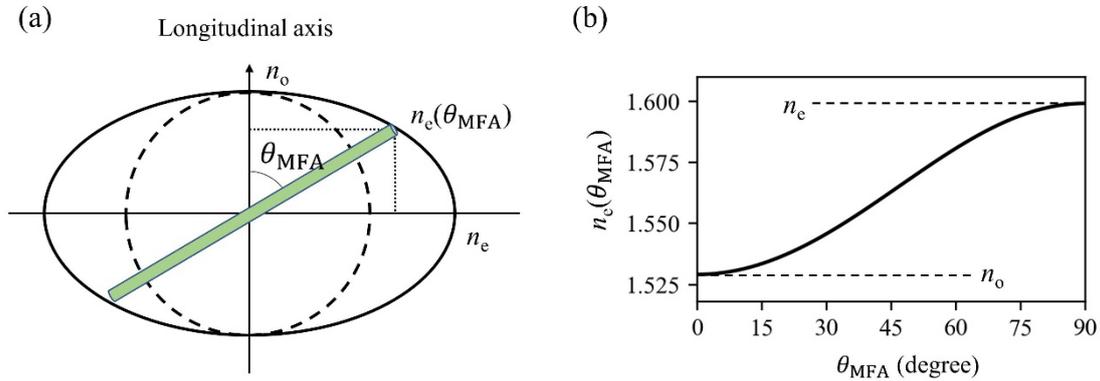
$$\frac{1}{n_e^2(\theta_{MFA})} = \frac{\sin^2(\theta_{MFA})}{n_e^2} + \frac{\cos^2(\theta_{MFA})}{n_o^2} \quad \dots \text{Eq(2)}$$

$$R_{obs} = R_{FWP} \pm R_{cell} \quad \dots \text{Eq(3)}$$

$$R_{cell} = d_{net} |n_e(\theta_{MFA}) - n_o| \quad \dots \text{Eq(4)}$$

$$d_{net} = d \cdot c_{cellulose} \quad \dots \text{Eq(5)}$$

ここで、 $d_{net}$ は木口断面切片における正味のセルロースの厚み (nm),  $d$ は木口断面切片の厚み (nm),  $c_{cellulose}$ は細胞壁におけるセルロース比率に対応する. また、 $n_e$ ,  $n_o$ はそれぞれ、異常光・正常光に対する屈折率に対応する. 本研究では、 $c_{cellulose}=0.5$  (50% [39]),  $n_e=1.599$ ,  $n_o=1.529$  [40]を採用した.



**Fig.2-2** セルロースの光学異方性と配向角との関係性. (a) セルロース結晶の屈折率楕円体, (b) 異常光の屈折率と MFA の関係性.  $n_e$ ,  $n_o$ はそれぞれ異常光, 正常光の屈折率である. 異常光の屈折率は Eq(2)に従い, MFA が大きくなるほど大きくなり, MFA=90°の時最大値をとる.

上式を変形することで得られる下式を用いて、位相差画像 ( $R_{cell}$ ) の MFA 画像 ( $\theta_{MFA}$ ) への変換を行った。

$$\theta_{MFA} = \frac{180}{\pi} \times \arccos \left( \sqrt{\frac{n_o^2}{n_e^2 - n_o^2} \times \left[ \frac{n_e^2}{(|R_{obs} - R_{FWP}| / d_{net} + n_o)^2} - 1 \right]} \right) \dots \text{Eq(6)}$$

$$0 \leq \theta_{MFA} \leq 90$$

得られた MFA 画像 (1536×1024 pixel) は、重複を許す形で 768×768 pixel となるよう 2 分割し、最終的にはすべての試料から合計 500 枚の MFA 画像を入手した。

#### 2.2.4. 他手法を用いた MFA 測定と Raman 顕微鏡法によるケミカルマッピング

ここでは、MFA イメージングにより得られた結果の妥当性を比較検証するための実験方法について記載する。MFA イメージングで得られた結果のうち、アスナロ KYOw20538 の個体のデータを比較検証に使用した。以下に示す実験は全て、当該個体を対象に実施したものである。

##### ヨウ素沈着法による MFA 測定

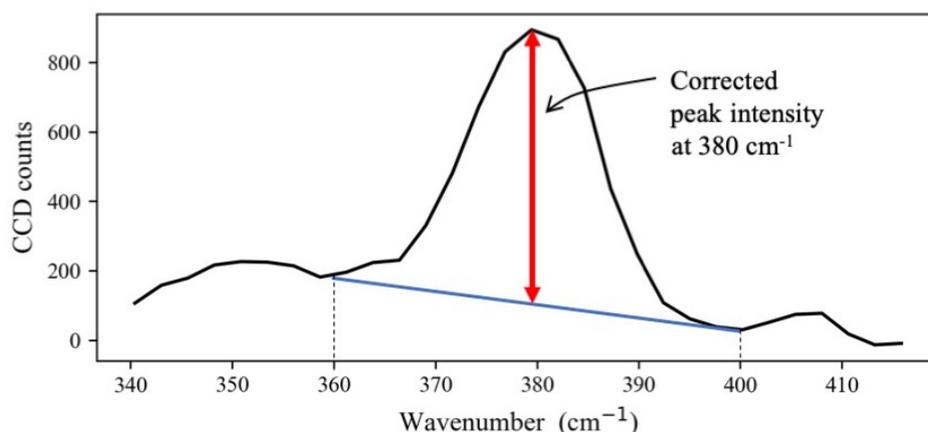
木材ブロックより 15-20  $\mu\text{m}$  の早材板目面切片をスライディングマイクロトームで切り出した。その後、板目面切片をシュルツ氏液に浸して、70°Cにて 30 分間加熱することで脱リグニン処理とした。シュルツ氏液として、蒸留水 50 ml, 60%硝酸 (Wako Pure Chemical Corporation) 50 ml および塩素酸カリウム (Wako Pure Chemical Corporation) 6 g を加えて攪拌したものを使用した[41]。シュルツ氏液を除いた後、脱リグニンした切片をエタノールシリーズ (50%, 70%, 90%, 無水) にて脱水し、2%ヨウ素ヨウ化カリウム水溶液に浸した。切片に冷却した 60%硝酸を数滴滴下した後、スライドガラスをかぶせて光学顕微鏡 (BX-51, Olympus Corporation) にて観察を行った。針状結晶が亀裂にうまく沈着している領域を顕微鏡用デジタルカメラ (DP-73, Olympus Corporation) で撮影し、30 本程度の仮道管における MFA の測定を行った。

##### 偏光顕微鏡による MEP を利用した MFA 測定

ヨウ素沈着法と同様に、木材ブロックより 15-20  $\mu\text{m}$  の早材板目面切片をスライディングマイクロトームで切り出した。その後、板目面切片をシュルツ氏液に浸して、70°Cで 60 分間加熱することで解繊処理とした。シュルツ氏液を除いた後、切片を超音波振動にかけることで繊維を単離した。単離した繊維をスライドガラスにのせ、偏光顕微鏡下でステージを回転させながら単細胞壁となった仮道管の消光位 (MEP) を探し出し、これを MFA とした[42-45]。およそ 30 本程度の仮道管における MEP の測定を行った。

## Raman 顕微鏡法を用いたケミカルマッピング

仮道管の壁層ごとにおけるセルロース量および性質の違いを可視化するため、仮道管横断面の Raman 顕微鏡によるマッピングを行った。木材ブロックから厚さ 15  $\mu\text{m}$  木口断面切片を作製した。この切片を石英スライドガラスにのせ、蒸留水で湿潤させた状態で石英カバーガラスをかぶせ[46]マニキュアを塗布した。Raman マッピングには 50 倍対物レンズ (MPLN, N.A.=0.75, 50x, Olympus Corporation) を装着した Raman 顕微鏡 (XploRA, HORIBA, Ltd.) を使用した。Raman スペクトルの補正にはシリコンウェハーを用い、ケイ素のピークがおよそ  $520\text{ cm}^{-1}$  となるように設定した。測定に使用したレーザーの波長は  $785\text{ nm}$  ( $90\text{-}100\text{ mW}$ ) である。当該条件で、早材仮道管の木口断面切片を対象として Raman マッピング測定を実施した。計測ステップは  $xy$  軸方向ともにおよそ  $0.5\text{ }\mu\text{m}$  として  $9\times 24\text{ pixel}$  の領域を対象に行った。各グリッドにおける露光時間は  $10\text{ s}$ 、積算回数は 4 回とした。また、測定領域はセルロースおよびリグニンのメインピークの大半が現れる  $250\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  を対象とした [47]。得られたスペクトルは、Adaptive iteratively reweighted penalized least squares 法[48]によるバックグラウンド除去を行った。Raman マッピングでは、セルロースに対応するピーク領域である  $380\text{ cm}^{-1}$ 、リグニン由来である  $1600\text{ cm}^{-1}$  の 2 ピークを対象として可視化を行った [47]。ピークの裾から 2 点選びだしこれらを結ぶ線分を引いた後、対象とするピークトップとこの線分の差分を用いることでピーク強度の算出を行った (Fig.2-3)。例えば  $380\text{ cm}^{-1}$  のピークの場合、Fig.2-2 に示すように  $360\text{ cm}^{-1}$  と  $400\text{ cm}^{-1}$  とを結んだ線分の  $380\text{ cm}^{-1}$  での強度の差分を使用した。同様に、 $1600\text{ cm}^{-1}$  では  $1550\text{ cm}^{-1}$  と  $1700\text{ cm}^{-1}$  を用いてピーク強度補正を行なった。各壁層における定性的なセルロースとリグニンの構成比とセルロース結晶化度を視覚化するため、 $380\text{ cm}^{-1}/1600\text{ cm}^{-1}$  のピーク強度比をもとにヒートマップを作成した。ただし、 $1096\text{ cm}^{-1}$  のピーク強度が 100 以下となったピクセルはバックグラウンドとみなし、相対強度比を 0 に設定した。

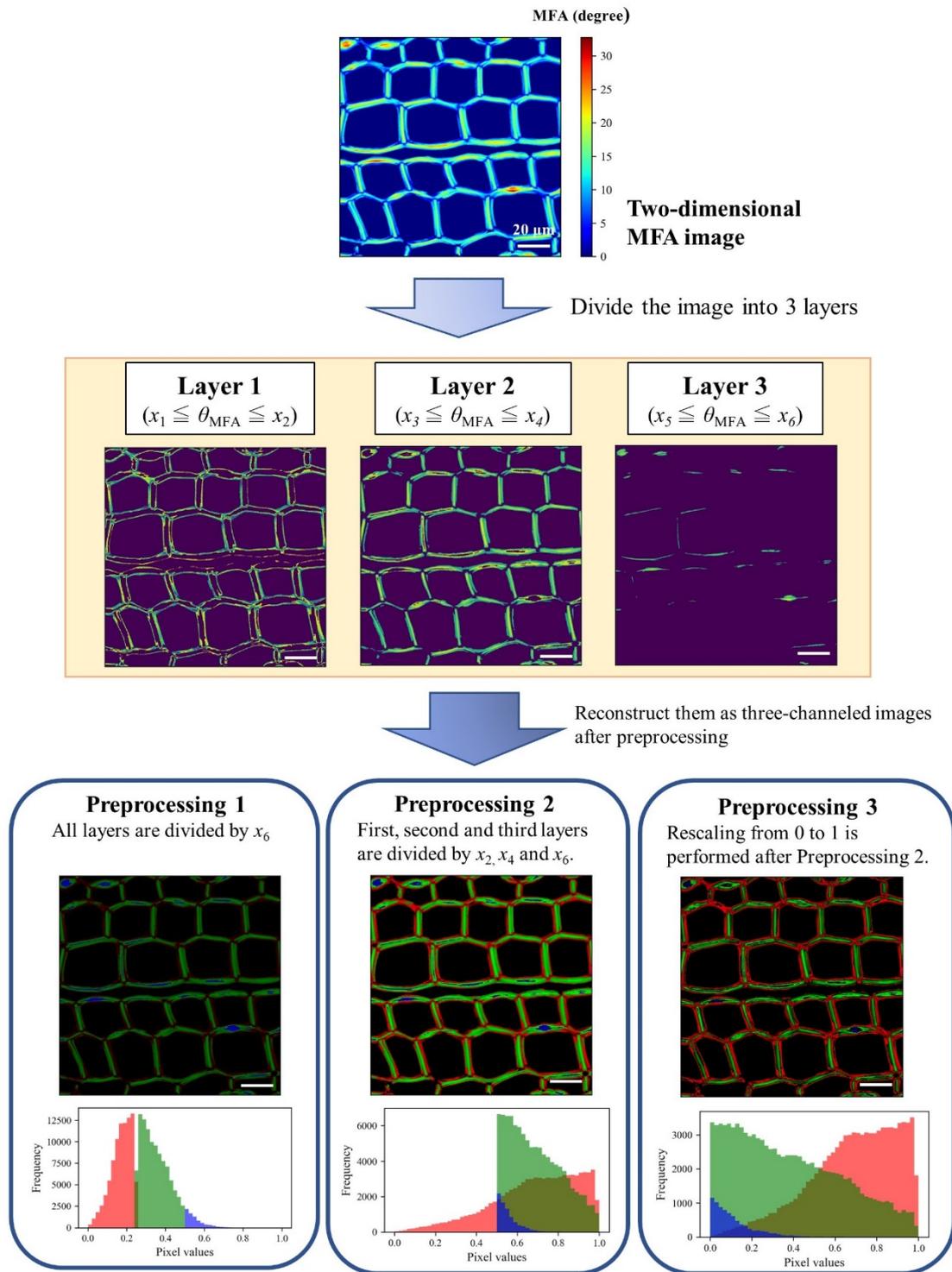


**Fig.2-3** Raman スペクトルの強度補正概念図 (セルロース由来  $380\text{ cm}^{-1}$ )。当該ピークの場合、 $360\text{ cm}^{-1}$  と  $400\text{ cm}^{-1}$  を結ぶ線分を引く。その後、ターゲットである  $380\text{ cm}^{-1}$  のピーク強度から線分のベースラインを差し引くことでピーク強度補正を実施している。

### 2.2.5. MFA 画像と CNN を用いた樹種識別

本研究では、構造が比較的単純で畳み込み層の数が少ない VGG16 モデル[49]を畳み込み層のモデル構造として採用した。また、今回は用意することのできる訓練画像が少なく、CNN を 1 から訓練することは難しいため、ImageNet[50]により既に最適化されたパラメータを転用する転移学習 (Transfer learning)[51]を利用した。全結合層に関しては、2 クラス識別問題用に対応できる形にノード数を設定した。データに対する過適合を防ぐために全結合層において一部のノードをランダムに欠損させる Dropout (dropout rate=0.2)[52]、パラメータ更新に重みづけをして過適合を防止する L2 正則化 ( $l=0.0000001$ )、訓練時と推定時でデータ分布が変化してしまう内部共変量シフトを防ぐバッチ正則化[53]を導入した。畳み込み層寄りの全結合層の活性化関数は Rectified Linear Unit 関数[54]を使用し、最後の全結合層は識別用の活性化関数としてソフトマックス関数を使用した。学習の際、最適なパラメータ更新をするために用いるオプティマイザーには Adam 法[55]を適用した。Adam 法のハイパーパラメータ値は原著論文の推奨値に従った。

VGG16 モデルの入力画像には、MFA 画像そのままのものに加えて、各チャンネルに入力する MFA 情報を変えた階層化 MFA 画像 (Stratified MFA image) を併せて識別に使用した。階層化 MFA 画像への変換は Fig.2-4 に示す手順で実施した。例えば、ある MFA 領域  $x_1 \leq \theta_{MFA} \leq x_2$  に対応する画素領域のみを取り出したものをチャンネル 1 に対応させ、同様に  $x_3 \leq \theta_{MFA} \leq x_4$ ,  $x_5 \leq \theta_{MFA} \leq x_6$  の場合はそれぞれチャンネル 2 および 3 の入力となる。 $x_1 - x_6$  の分割条件ならびに各チャンネル画像の処理方法に関しては Table 2-2 に示したものを採用した。各チャンネルに入力する画像の前処理方法についても 3 種類の条件について検討を行った (後処理条件 1-3)。後処理条件 1 では、3 チャンネルに分割した後、すべてのチャンネルを  $x_6$  で割る操作を実行する。後処理条件 2 では、3 チャンネルに分割した後、チャンネル 1, 2, 3 をそれぞれ  $x_2$ ,  $x_4$ ,  $x_6$  で割る操作を実行する。後処理条件 3 では、後処理条件 2 と同様の操作をした後、さらに画素の値が 0-1 の間に収まるように標準化を実行する。



**Fig.2-4** 階層化MFA画像の作成条件に関して. はじめに, オリジナルのMFA画像(上段)をMFA角度域に応じて分割し( $x_1 \leq \theta_{MFA} \leq x_2$ ,  $x_3 \leq \theta_{MFA} \leq x_4$ ,  $x_5 \leq \theta_{MFA} \leq x_6$ ), 3チャンネルとする(中段). その後, 各チャンネルに後処理を実行する(後処理条件1-3, 詳細は本分を参照). スケール: 20  $\mu\text{m}$ .

**Table 2-2** MFA 画像の階層化条件一覧

Name	Layer1		Layer2		Layer3		Preprocessed condition
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	x <sub>5</sub>	x <sub>6</sub>	
Stratified 1	0	10	10	20	20	40	1
Stratified 2	0	10	10	20	20	40	2
Stratified 3	0	10	10	20	20	40	3
Stratified 4	0	15	15	30	30	40	1
Stratified 5	0	15	15	30	30	40	2
Stratified 6	0	15	15	30	30	40	3
Stratified 7	0	15	10	25	20	40	1
Stratified 8	0	15	10	25	20	40	2
Stratified 9	0	15	10	25	20	40	3
Original	0	40	0	40	0	40	3

オリジナル MFA 画像ならびに階層化 MFA 画像のデータセット分割方法は、現生材のヒノキ・アスナロ属各 1 個体ずつ、及び古材サンプルより得られた全てのデータをテストデータとして使用し、残りを訓練データとした。訓練データのうち約 15% を交差検証用のデータとした。モデル訓練に際しては、訓練画像を分割してモデル更新を行うミニバッチ学習を使用し、ミニバッチサイズは 12 画像とした。学習推移の評価には、検証データセットにおける正確度および交差エントロピーの 2 種類の指標を採用した。学習は 100 エポックまで行い、検証データセットにおける交差エントロピーが最小となったモデルを保存し、テスト評価に使用した。

### 2.2.6. モデル解釈手法の適用

CNN はモデルを構成する多数のパラメーターのチューニングを行うことで識別や回帰といったタスクにおいて優れた性能を発揮するという特性故に、従来の統計手法に比べ得られた結果に対して妥当な解釈を得るのが一般的に難しいとされている。しかしながら、CNN に特化したモデル説明手法である XAI を用いることで、部分的ではあるものの得られた結果を解釈することは可能となりつつある[56]。今回は、Table 2-2 に示した階層化 MFA 画像条件の中でも特に優れた識別率が得られた条件を対象に示すモデル解釈手法を適用した。XAI として今回採用した手法は以下の 2 つである。

### **階層化 MFA 画像のチャンネルワイズ削除による識別率減衰**

CNN のモデル解釈に用いられるテクニックの 1 つとして、入力画像の情報の部分的消去が挙げられる。Brendel & Bethge (2019)[57]では、サイズの異なるパッチで入力画像の一部を隠しながら CNN モデルに画像を識別させ、その時の識別率の減衰を観察することにより CNN モデルが画像の局所的もしくは大局的な特徴のどちらをベースに識別を行っているかを部分的に証明することに成功している。当該手法を応用し、本研究ではチャンネルワイズな情報の消去に対する識別率の減衰量の比較を実施した。これにより、各チャンネルに対応する MFA 角度域の識別に対する寄与を定性的に証明することが可能となる。

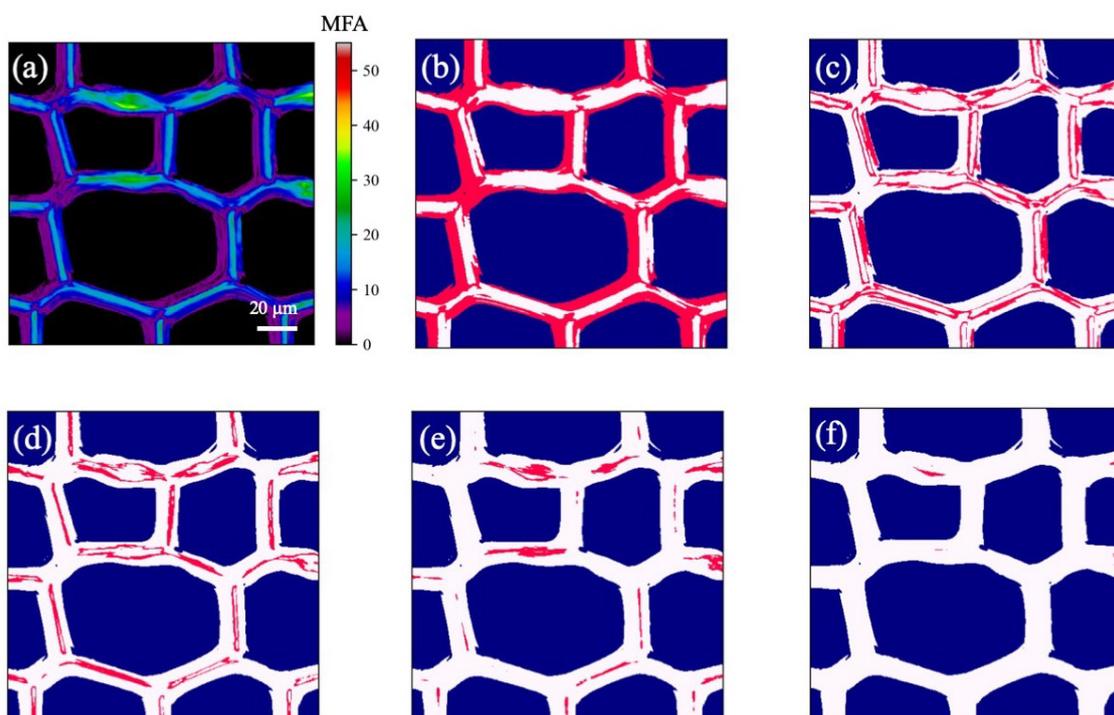
### **Grad-CAM 法**

Grad-CAM 法[58,59]は、数多く存在する CNN モデル説明手法の中でも信頼性が高いとされている手法の 1 つである[60]。当該手法を用いることで、画像があるクラスに分類された際、画像のどの部分が識別に大きく寄与しているかをヒートマップとして可視化することが可能である。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. MFA 画像とラマン顕微鏡画像

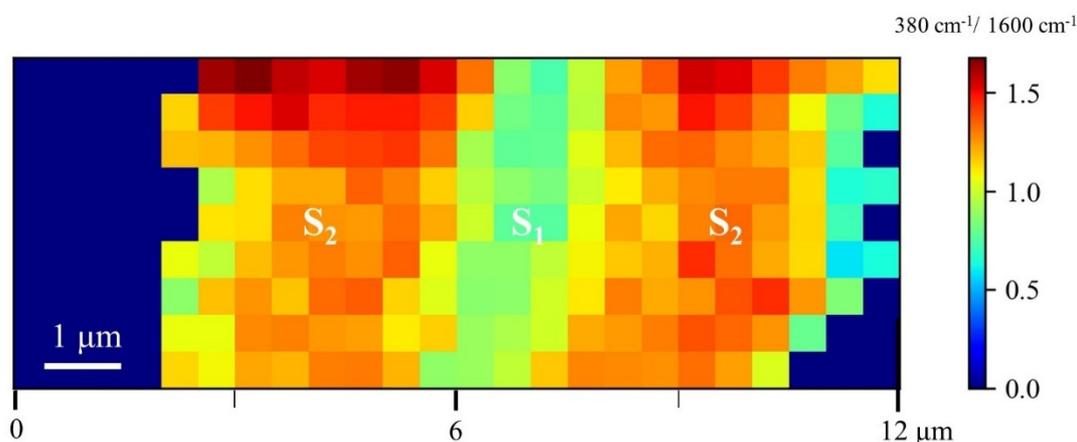
Fig.2-5 に MFA 画像の 1 例を示している。仮道管横断面の MFA 値より、仮道管多層構造 (主に  $S_1$  および  $S_2$  層) や有縁壁孔を確認されていることがわかる。得られた画像をより詳細に解析するために、細胞壁構造と MFA 角度域との対応を Fig.2-5 (b)-(f) に示している。Fig.2-5 (b) および (c) から、MFA が  $0-15^\circ$  に対応する低 MFA 域はほぼ全てが  $S_2$  層によって占められていることがわかる。次に MFA が  $15-30^\circ$  にあたる Fig.2-5 (d), (e) に注目すると、主に  $S_1$  層が対応していることがわかる。また、MFA= $20-40^\circ$  といった高 MFA 領域に対応する Fig.2-5 (e), (f) では、有縁壁孔の占める割合が高い傾向にあった。



**Fig.2-5** アスナロ (KYOw20538) 仮道管の MFA 画像拡大図および、各 MFA 領域の分布図。(a) 仮道管 MFA 画像拡大図, (b) MFA: $0-10^\circ$ , (c) MFA: $10-15^\circ$ , (d) MFA: $15-20^\circ$ , (e) MFA: $20-30^\circ$ , (f) MFA: $30-40^\circ$ . (b)-(f)では、各 MFA 領域に対応するピクセルは赤塗となっている。スケール:  $20 \mu\text{m}$ .

仮道管内における化学成分を確認するために実施したヒバ早材仮道管における Raman 顕微鏡によるケミカルマッピングの結果 ( $380 \text{ cm}^{-1}/1600 \text{ cm}^{-1}$ ) を Fig.2-6 に示す。図から明らかなように、 $S_1$  層周辺では、結晶性セルロースとリグニンのピーク強度比にあたる  $380 \text{ cm}^{-1}/1600 \text{ cm}^{-1}$  の値が小さくなっており、 $S_2$  層に比べ、 $S_1$  層では結晶性セルロースの含有量が少ないことを示唆している。既往の文献[39]より、一般的な針葉樹仮道管  $S_2$  層におけるセルロース含有量が 50%程度であるのに対し  $S_1$  層においては 20-30%であるとしている。これに

加え、針葉樹仮道管におけるセルロース結晶化度は、 $S_2$ 層に比べ $S_1$ 層では低い傾向にあることが知られている[61]。今回 Raman 顕微鏡により得られた結果は上記に示した既往の文献の結果と矛盾しなかった。



**Fig.2-6** アスナロ (KYOw20538) 仮道管の Raman イメージング結果. ヒートマップは、セルロース由来の  $380\text{ cm}^{-1}$  のピークおよびリグニン由来の  $1600\text{ cm}^{-1}$  のピークの強度比より算出している. スケール:  $1\text{ }\mu\text{m}$ .

### 2.3.2. 各手法により得られた MFA 値の比較

アスナロ KYOw20538 個体を用いた各手法の比較測定において、偏光顕微鏡を用いた MFA イメージングでは  $5.9 \pm 0.8^\circ$ 、ヨウ素沈着法では  $7.1 \pm 3.8^\circ$ 、偏光顕微鏡を用いた MEP による MFA 計測では  $7.0 \pm 3.2^\circ$  という結果が得られた。ただし、上記に示しているのは測定の平均値±標準偏差に対応している。上記の結果から、ヨウ素沈着法と MEP を利用した MFA 計測法の結果はほぼ一致し、両手法と MFA イメージングの計測結果もおおよそ一致する結果が得られた。アスナロの MFA を計測した事例は殆ど存在しないものの、Hori et al. (2002)[28]で報告された計測値 (早材: $9.2^\circ$ 、晩材: $4.5^\circ$ ) と大きく矛盾しない結果である。

### 2.3.3. CNN による識別結果

オリジナル MFA 画像ならびに階層化 MFA 画像を用いて識別を行った結果を Table 2-3 に示す。オリジナルの MFA 画像を用いた場合、現生材・古材の識別率は約 8 割、クロスエントロピーが約 0.5 であった。一方で、階層化処理画像を入力として使用した場合、処理条件によるものの、現生材・古材の識別率は約 9 割、クロスエントロピーも 0.3-0.4 という結果が得られた。このことから、階層化処理はヒノキ・アスナロ属識別能の改善に寄与したことがわかる。

**Table 2-3** オリジナルの MFA 画像および階層化 MFA 画像による樹種識別結果

Name	Cross-validation		New Wood		Old wood	
	Accuracy	Log loss	Accuracy	Log loss	Accuracy	Log loss
Stratified1	0.96 (0.02)	0.10 (0.02)	0.82 (0.08)	0.34 (0.14)	0.96 (0.02)	0.14 (0.03)
Stratified2	0.98 (0.03)	0.08 (0.03)	0.88 (0.03)	0.31 (0.11)	0.90 (0.04)	0.22 (0.07)
Stratified3	0.98 (0.01)	0.08 (0.02)	0.80 (0.15)	0.48 (0.38)	0.96 (0.02)	0.16 (0.04)
Stratified4	0.96 (0.03)	0.12 (0.02)	0.84 (0.03)	0.36 (0.04)	0.86 (0.04)	0.25 (0.04)
Stratified5	0.97 (0.03)	0.10 (0.04)	0.84 (0.04)	0.32 (0.10)	0.86 (0.04)	0.32 (0.11)
Stratified6	0.98 (0.01)	0.09 (0.03)	0.88 (0.06)	0.27 (0.10)	0.91 (0.04)	0.25 (0.07)
Stratified7	0.97 (0.01)	0.10 (0.02)	0.85 (0.09)	0.32 (0.13)	0.94 (0.03)	0.20 (0.06)
Stratified8	0.97 (0.04)	0.08 (0.04)	0.87 (0.05)	0.31 (0.12)	0.88 (0.05)	0.29 (0.11)
Stratified9	0.97 (0.02)	0.09 (0.02)	0.84 (0.05)	0.38 (0.14)	0.84 (0.06)	0.45 (0.16)
Original	0.97 (0.02)	0.09 (0.02)	0.77 (0.09)	0.51 (0.23)	0.80 (0.05)	0.45 (0.09)

\*括弧内の数値は標準偏差に対応する。

#### 2.3.4. モデル解釈手法によるモデル説明

階層化 MFA 画像の中でも現生材・古材の識別率が高かった階層化 MFA 画像 2, 6, 8 に対してこの方法論を適用し識別率の減少量を計算した。その結果を Table 2-4 に示す。階層化 MFA 画像条件 2, 6 では MFA が 0-20° といった低・中 MFA 域が含まれている層の情報が消去された時に大きな識別率の減衰を引き起こした。一方で、階層化 MFA 画像条件 8 において 0-15° に対応する層の消去では大きな減衰は見られないものの、10-25° の層の消去により 20% 以上の減衰が生じる結果となった。

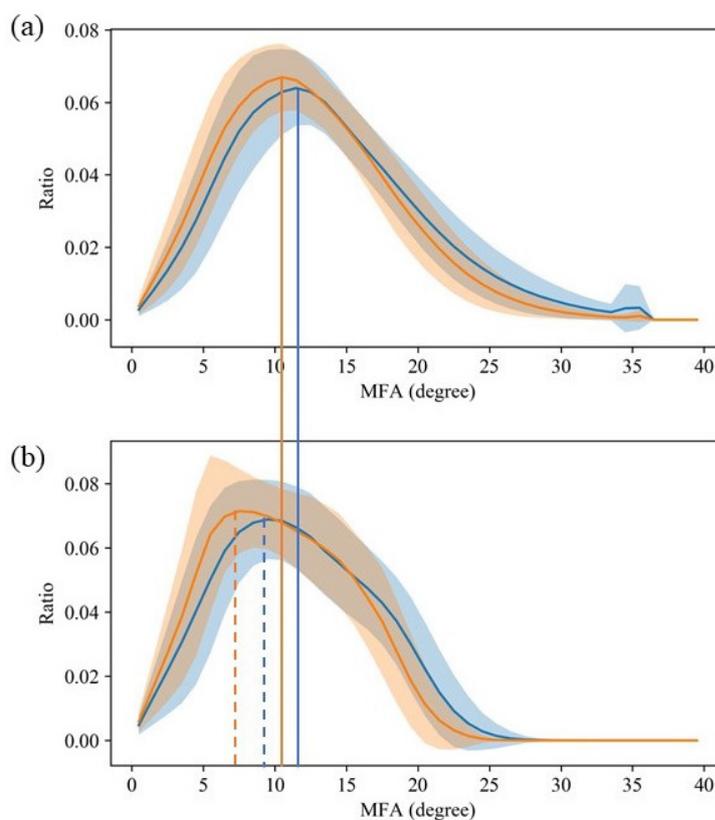
**Table 2-4** 階層化 MFA 画像のチャンネルワイズ削除による識別率減衰の結果

Name	Accuracy decay		
	Layer1	Layer2	Layer3
Stratified2	-0.30 (0.12)	-0.37 (0.03)	-0.03 (0.03)
Stratified6	-0.36 (0.05)	-0.18 (0.09)	0.00 (0.06)
Stratified8	-0.09 (0.06)	-0.22 (0.13)	-0.11 (0.09)

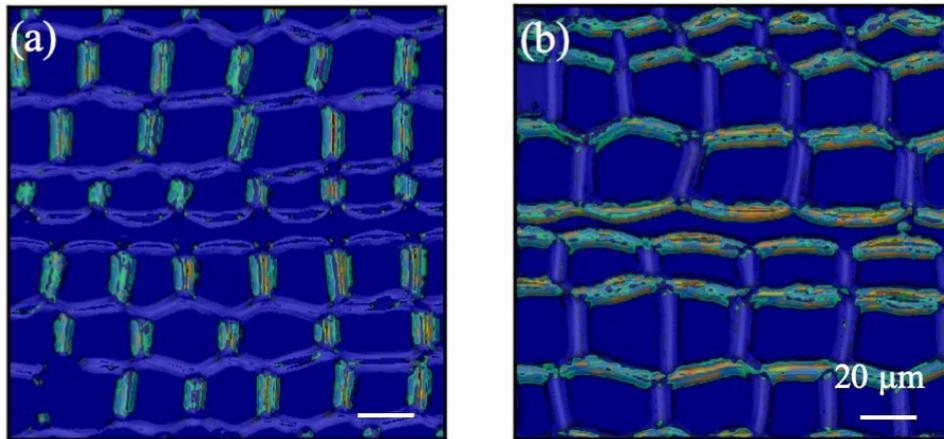
\*括弧内の数値は標準偏差に対応する。

Table 2-4 で示した特定の MFA 角度域が識別に大きく貢献している可能性を確認するため、ヒノキ・アスナロ属現生材を対象にその MFA 角度分布を可視化した。両樹種放射壁、接線壁の平均 MFA 分布を Fig.2-7 に示す。比較の結果、放射壁に対して接線壁の MFA において両樹種間での明瞭な差異が現れる結果となった。

VGG16 モデルの中間層を対象として Grad-CAM 法をヒノキ・アスナロ属の画像に適用した例が Fig.2-8 である。橙色および青色の領域はそれぞれ CNN の識別に重要もしくは重要でない領域に対応している。Grad-CAM 法により、ヒノキの特徴量は接線壁に、アスナロ属の特徴量は放射壁の MFA に対して選択的に現れるという結果が得られた。



**Fig.2-7** 現生材ヒノキ・アスナロ属試料の放射壁・接線壁平均 MFA 分布。(a) 放射壁 MFA, (b) 接線壁 MFA 平均分布。水色はヒノキ、橙色はアスナロ属に対応する。平均分布曲線に付属する帯は、各 MFA 分布の標準偏差である。垂直方向にのびる実線および点線は、ヒノキ・アスナロ属における放射壁、接線壁 MFA の平均値に対応している。



**Fig.2-8** 代表的な Grad-CAM ヒートマップ算出結果. (a) ヒノキ (KYOw04435), (b) アスナロ (KYOw11402). 当該ヒートマップは, VGG16 モデルの 3 ブロック目の最初の畳み込み層の出力をもとに作成している. スケール: 20 $\mu$ m.

## 2.4. 考察

### 2.4.1. 細胞壁の化学成分と計測された MFA との関係性

MFA イメージングにおける  $S_1$  層に着目すると、当該壁層が出現しているのは Fig.2-5 (d), (e)にあたる  $MFA=15-30^\circ$ の領域となっている。MFA イメージングより得られた  $S_1$  層の MFA は、電子顕微鏡による直接観察により得られた計測値と比較して著しく小さい値となっている[62-64]。Raman 顕微鏡によるケミカルマッピングおよび既往の研究から、壁層に応じてセルロースの性質 (e.g. セルロース構成比, 結晶性) が大きく異なることが確認されており、 $S_2$  層と  $S_1$  層とを比較すると後者においてセルロース比率が低く且つ結晶性が低いことが明らかとなっている[39,61]。Eq(4), Eq(5)より、上記に示したセルロースの性質は位相差から MFA への変換に大きな影響を与えるため、特に  $S_1$  層では MFA が大きい場合でも実際に観測される位相差自体は小さくなることが予測される。その結果として、MFA イメージングによる MFA 測定では  $S_1$  層の MFA が小さく見積もられたと考えられる。当該点は偏光顕微鏡を用いた MFA イメージングにおける大きな制約の 1 つであり、特に得られた MFA の絶対値の取り扱いには十分な注意を要する (e.g. セルロースの性質が異なる可能性の高い多層構造や細胞種における MFA の比較等)。

### 2.4.2. MFA 計測の手法依存性と MFA イメージングの優位性

今回使用した 3 手法 (MFA イメージング, ヨウ素沈着法, MEP を利用した MFA 計測) は全く異なる原理を応用して MFA 測定を実行している。そのため、各手法で得られた計測値には手法固有の欠点が反映されている可能性に十分注意する必要がある。ヨウ素沈着法で得られる計測値は必ずしも  $S_2$  層のみを反映するわけではなく、また有縁壁孔や分野壁孔といった壁孔によりその計測値は大きく影響を受けてしまうことが知られている[65]。MEP を用いた MFA 測定では、 $S_1$  層,  $S_3$  層の存在により MEP の厳密な同定は難しいため、計測値には誤差が生じやすい。MFA イメージングには、2.4.1.で記載している内容に加えて、切片作製時のアーティファクト[34,66]や、光学顕微鏡分解能[67]の制約が計測値に影響を与える可能性は否定できない。このように手法に応じて様々な要因により計測値に誤差が生じうる可能性があるものの、各手法より得られた計測値におおよそその一致が見られたことから、MFA イメージングは MFA 計測手法として信頼性を有していると判断することができる。

今回比較に使用した手法はいずれも、細胞レベルの形態観察を行いながら MFA 計測を実施することができる。その中でも MFA イメージングの最大の利点は木口断面を利用するため個々の仮道管形態特徴を詳細に解析することができる (e.g. 放射壁・接線壁の選択的抽出と MFA 評価, Fig.2-7 参照) ことに加え、それと同時に仮道管の配置といったマクロな空間情報と紐づけすることができる点が挙げられる。従来手法では細胞形態指標 (e.g. 細胞径, 細胞壁厚, 細胞長) と MFA の関係性について多くの不明点を残しており[30,68], MFA イメージングはこのギャップを埋めるポテンシャルを有している。また近年では画像解析手

法の1種であるセマンティックセグメンテーション[69]により、個々の細胞レベルでの形態評価が容易になりつつある[70]。これらの技術的發展を木材科学分野へ適切に取り込むことにより、樹木細胞形態の包括的理解および樹木細胞構造と機能（物質輸送、樹体支持、貯蔵）との関係性解明につながる事が期待される。

#### 2.4.3. CNNによる識別とヒノキ・アスナロ属における樹種固有細胞構造

階層化処理によって CNN を用いたヒノキ・アスナロ属の識別能が改善した理由として、元々コントラストの低い MFA 画像が階層化処理を通して適切に高コントラスト化したためと考えられる。画像コントラストが低い場合、特定のタスクパフォーマンスの低下につながる事[71,72]、CNN を用いた画像識別においてもガウシアンぼかしによりコントラストを落とした画像の識別率が著しく低下することが報告されている[73]。これらの報告からもわかるように、MFA 角度域のチャンネル分割による MFA の空間情報の強調は、CNN による効果的な特徴抽出を可能とし、結果として高い識別率を達成したと考えられる。

今回検討した手法では、MFA および仮道管断面形態を利用することで現生材・古材ともにその識別率は約9割に到達しており (Table2-3)、これは NIR による化学成分をベースとした樹種識別と遜色ない精度である[35,74]。NIR に比して細胞形態による樹種識別の優れている点は古材への適用可能性である。材の劣化に伴い主にリグニンやヘミセルロースといった非晶性成分を中心にその化学構造や組成は変化するため、現生材の化学組成情報を反映した NIR スペクトルをもとに構築した識別モデルは古材に対して一般的に有効でないことが知られている[35,74]。その一方で、風化など極端な劣化を伴わない場合であれば、細胞形態および結晶性セルロースは古材でも比較的維持されると予想されることから、本研究における古材の識別率は現生材と比較しても低減しなかったと考えられる。今回はヒノキ科の2属の識別のみの結果ではあるが、本研究のような形で針葉樹の木口断面より計測可能な細胞形態指標より針葉樹材が識別可能となれば、樹種識別を利用する関連分野に大きな影響を与えうる手法になる可能性が存している。ただし、仮道管形態は遺伝的要因だけでなく外的環境因子によって生じる獲得形質の影響を受けるため、樹種識別への応用には各樹種で生じる仮道管形態を網羅したデータベースの整備が必要になることが予想される。

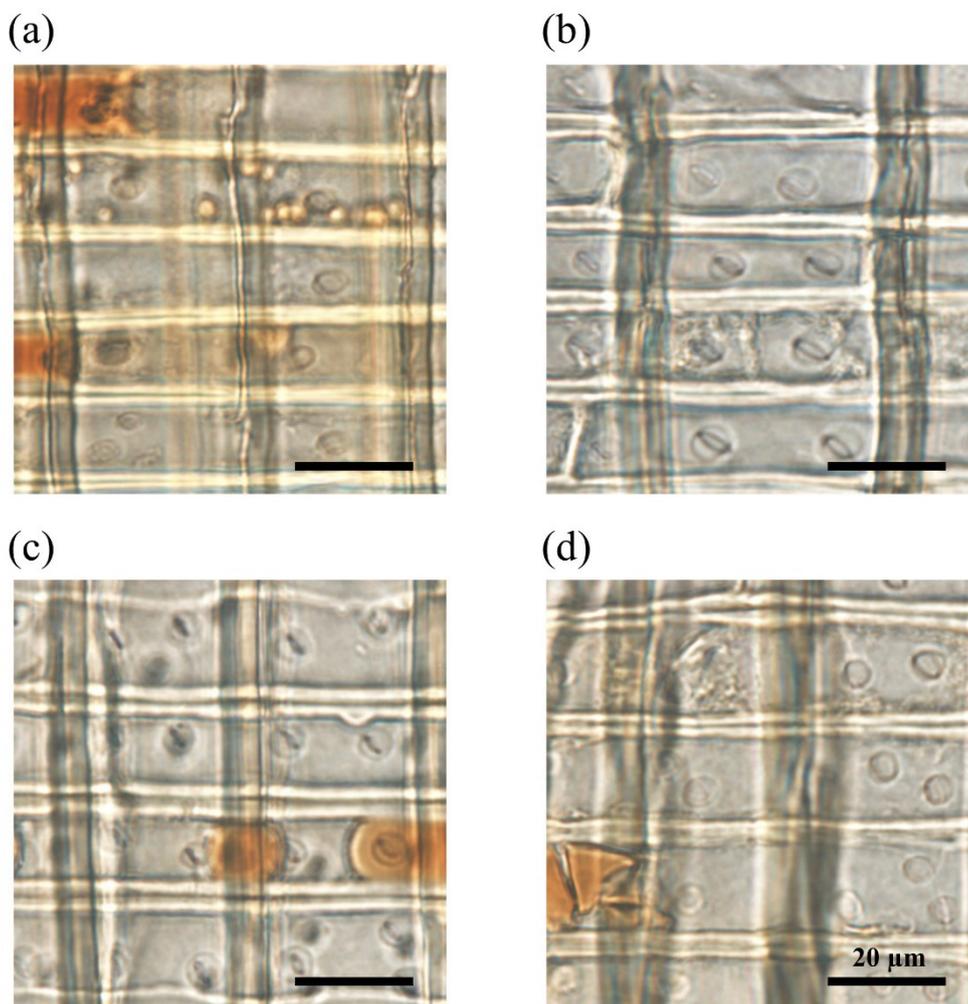
高識別率を示した階層化 MFA 画像に対するモデル説明法 (チャンネルワイズ削除による識別率減衰, Grad-CAM 法) の適用により、両樹種の樹種固有の特性は MFA が 0-25°という低・中 MFA 領域に存在し、且つ放射・接線方向における MFA 異方性が影響していることを示唆する結果が得られた。両樹種の平均 MFA 分布 (Fig.2-7 参照) において識別に影響を与えた 0-25°の MFA 領域に着目すると、放射・接線壁の MFA は両樹種において若干の差異を確認することが可能である。このような細胞壁の位置に依存した異方性が生じる原因として考えられる理由の1つとして、有縁壁孔および分野壁孔の出現およびその位置が挙げられる。壁孔構造があらわれる周辺において、セルロースは壁孔を大きく迂回するように配向

することが電子顕微鏡観察等により確認されている[75-81]. また, 早材仮道管では上下方向への物質輸送を実現するため壁孔は放射壁にのみ出現する傾向がある. 従って, 両樹種の放射壁 MFA において差異が生じている主要因は壁孔の形状や出現頻度といった形態特徴が影響していると予想される. その一方で, 壁孔が出現していない接線壁の MFA においても両樹種で差異が確認されており, 当該差異を説明することのできる形態特徴は不明である. 仮道管細胞壁全体の MFA を考慮した時, 壁孔がどの程度当該指標に影響を与えうるかについては壁孔の出現頻度や形状といった定量的なデータを以て評価する必要があるものの, 壁孔に関連した形態指標を網羅的に計測した事例は未だ少ないため[82], 現段階で当該点を議論することは困難である. 壁孔は仮道管が物質輸送効率を大きく左右する構造体であること, その一方で壁孔の出現により当該細胞種における樹体支持機能は減衰することが予想される. 針葉樹材において早材・晩材の細胞壁厚やその構成比に大きな差異があることからわかるように, 物質輸送と樹体支持のバランスには樹種固有の特性が現れている可能性が十分にあり, 壁孔や MFA についても同様の可能性が存する. そのため, 針葉樹材に対する理解を深化させるためにも, 木口断面より得られる形態に加え, 壁孔に関する定量形態情報を併せて整備していく必要がある.

## 2.5. 結語

本章では偏光顕微鏡と LCTF を用いることで仮道管横断面より MFA を可視化する MFA イメージング手法の構築, および当該手法により得られた MFA 画像と CNN を組み合わせた新規樹種識別手法の開発を行った. 前者により, 従来計測が困難であった MFA の仮道管内分布を可視化することが可能となった. また, その他手法との比較を通して, MFA イメージングによる MFA 計測の信頼性を証明することに成功した. その一方で, Raman 顕微鏡によるケミカルマッピングと既往の報告から, 仮道管各壁層の結晶性セルロース量に大きな差異が存在することが示されており, その結果として  $S_1$  層の MFA は低く見積もられてしまうという技術的課題が明らかとなった. 後者では, 得られた MFA 画像の階層化処理を用いることで, 現生材・古材ともに 90%近い識別率を達成した. 識別結果解釈手法であるチャンネルワイズ削除と Grad-CAM 法, および MFA の平均分布より, 仮道管放射・接線壁  $S_2$  層に相当する MFA の仮道管内分布がヒノキ・アスナロ属を区別しうる樹種固有特性であることが示唆される結果が得られた. このような結果が得られた背景として, 早材仮道管放射壁に選択的に表れる有縁・分野壁孔の形態特徴上の差異が間接的に MFA へと影響した可能性がその一因として考えられる. しかしながら, 壁孔構造に関連した構造特性や個々の仮道管形態と MFA の関係性については未だ不明点が多い. 当該点は目的に合った適切な測定手法を開発・データ蓄積を行うことで議論可能な土台を形成していく必要がある.

## 2.6. 補足資料



**Fig.S2-1** 萬福寺古材の早材部まさ目断面切片およびその識別結果について. (a) KYOw20485, (b) KYOw20533, (c) KYOw20534, (d) KYOw20539 に対応する. 分野壁孔の孔口の形状から, KYOw20485, 20539 はスギ型, KYOw 20533, 20534 はヒノキ型に近いことがわかる. KYOw20485, 20539 では褐色の樹脂状物質が頻繁に放射柔細胞内に沈殿している傾向にあった. スケールバー: 20  $\mu\text{m}$ . 以上の観察結果と既往の研究[20,21]より, KYOw20485, 20539 はアスナロ属, KYOw 20533, 20534 はヒノキ属であると判断した. 観察用プレパラートは, スライディングマイクロトーム (TU-213, Yamato Kohki Industrial Co., Ltd.) を用いて厚さ約 20-30  $\mu\text{m}$  のまさ目断面切片を作製し, ガムクロラルで封入したものである. 上記画像は, 顕微鏡用 CMOS カメラ (DP73, Olympus Corp.) を装着した光学顕微鏡 (BX-51, Olympus Corp.) を用いて観察・写真撮影を行った.

### S2-1 ハイパースペクトル画像の補正について

Eq(1)に示したフィッティングが成立するのは、理想的な白色光下で且つ使用する光学系や試料により特定の波長域の吸収が起こらない、また透過光の取込時に取込効率に波長依存性がないことを前提としている。しかしながら、上記に示した条件が実際の測定系において成立しないと考えるのが自然である。このような種々の非理想的なふるまいを考慮した場合の透過光強度を $\vec{I}_{net}(\vec{\lambda})$ と置くと、以下のように記述することができる。

$$\vec{I}_{net}(\vec{\lambda}) = \mathbf{T}(\vec{\lambda}) \cdot \alpha_{lamp}(\vec{\lambda}) \cdot \vec{I}(\vec{\lambda}) \quad \dots \text{Eq(S1)}$$

$$\begin{aligned} \mathbf{T}(\vec{\lambda}) = & \mathbf{T}_{LCTF}(\vec{\lambda}) \cdot \mathbf{T}_{analyzer}(\vec{\lambda}) \cdot \mathbf{T}_{FWP}(\vec{\lambda}) \cdot \mathbf{T}_{objectivelens}(\vec{\lambda}) \cdot \mathbf{T}_{sample}(\vec{\lambda}) \\ & \cdot \mathbf{T}_{condenser}(\vec{\lambda}) \cdot \mathbf{T}_{polarizer}(\vec{\lambda}) \cdot \mathbf{T}_{LBDfilter}(\vec{\lambda}) \quad \dots \text{Eq(S2)} \end{aligned}$$

$$\vec{I}(\vec{\lambda}) = \begin{pmatrix} I(\lambda_1) \\ I(\lambda_2) \\ \vdots \\ I(\lambda_n) \end{pmatrix}$$

$$\alpha_{lamp}(\vec{\lambda}) = \begin{pmatrix} \alpha_{lamp}(\lambda_1) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \alpha_{lamp}(\lambda_2) & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & \alpha_{lamp}(\lambda_n) \end{pmatrix}$$

$$\mathbf{T}(\vec{\lambda}) = \begin{pmatrix} T(\lambda_1) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & T(\lambda_2) & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & T(\lambda_n) \end{pmatrix}$$

Eq(A1)において、 $\mathbf{T}(\vec{\lambda})$ は各波長における光学系の透過率、 $\alpha_{lamp}(\vec{\lambda})$ はハロゲン光源のスペクトル、 $\vec{I}(\vec{\lambda})$ は理想的な条件における透過光強度である。ここで、異なる波長間でエネルギー交換が起こらないことを仮定している。Eq(A2)では、今回使用した光学系の各要素と試料の波長毎における透過率をあらわしている。上式から明らかなように、実際に得られる透過光強度 $\vec{I}_{net}(\vec{\lambda})$ は理想的な透過光強度からは大きく変調してしまうことが容易にわかる。非理想的なふるまいを補正するためには $\mathbf{T}(\vec{\lambda})$ や $\alpha_{lamp}(\vec{\lambda})$ といった項の1つ1つを計測して入手する必要があるものの、そのような直接的な手段は現実的でない。したがって、適切な透過光強度補正を行うためには、これらの項を間接的に入手する手法を考える必要がある。

ここで、Jones 計算法[83]を用いてクロスニコルおよびパラレルニコル条件における透過光

強度 $\vec{I}_{cross}(\vec{\lambda})$ ,  $\vec{I}_{parallel}(\vec{\lambda})$ は以下のように表現することができる.

$$\begin{aligned}\vec{I}_{cross}(\vec{\lambda}) &= \vec{E}_{cross}^*(\vec{\lambda}) \cdot \vec{E}_{cross}(\vec{\lambda}) \\ &= A^2 \sin^2 2\theta_{sample} \sin^2 \frac{\delta_{sample}(\vec{\lambda})}{2} \quad \dots \text{Eq(S3)}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\vec{I}_{parallel}(\vec{\lambda}) &= \vec{E}_{parallel}^*(\vec{\lambda}) \cdot \vec{E}_{parallel}(\vec{\lambda}) \\ &= A^2 (1 - \sin^2 2\theta_{sample} \sin^2 \frac{\delta_{sample}(\vec{\lambda})}{2}) \quad \dots \text{Eq(S4)}\end{aligned}$$

上式において,  $\theta_{sample}$ は遅相軸の向きと水平方向の成す角度,  $\delta_{sample}$ はサンプルより生じた位相差[radian],  $A$ は入射光が最初に通過する偏光子を通過した後の光の強度をあらわすスケーリングパラメーターである. Eq(A3), Eq(A4)を足し合わせた時の透過光強度を $\vec{I}_{sum}(\vec{\lambda})$ とすると, 以下のように表現することができる.

$$\begin{aligned}\vec{I}_{sum}(\vec{\lambda}) &= \vec{I}_{cross}(\vec{\lambda}) + \vec{I}_{parallel}(\vec{\lambda}) \\ &= \begin{pmatrix} I_{cross}(\lambda_1) \\ I_{cross}(\lambda_2) \\ \vdots \\ I_{cross}(\lambda_n) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} I_{parallel}(\lambda_1) \\ I_{parallel}(\lambda_2) \\ \vdots \\ I_{parallel}(\lambda_n) \end{pmatrix} \\ &= A^2 \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ \vdots \\ 1 \end{pmatrix} \quad \dots \text{Eq(S5)}\end{aligned}$$

上式から, クロス・パラレルニコルの透過光強度を足し合わせると, その強度は波長に依存せず一定 (定ベクトル) となることがわかる. ここで, 非理想的な挙動を $\vec{I}_{sum}(\vec{\lambda})$ に取り込んだものを $\vec{I}_{sum,net}(\vec{\lambda})$ と定義すると, 以下のように記述することができる.

$$\begin{aligned}\vec{I}_{sum,net}(\vec{\lambda}) &= \vec{I}_{cross,net}(\vec{\lambda}) + \vec{I}_{parallel,net}(\vec{\lambda}) \\ &= \mathbf{T}(\vec{\lambda}) \cdot \alpha_{lamp}(\vec{\lambda}) \cdot (\vec{I}_{cross}(\vec{\lambda}) + \vec{I}_{parallel}(\vec{\lambda})) \\ &= \mathbf{T}(\vec{\lambda}) \cdot \alpha_{lamp}(\vec{\lambda}) \cdot \vec{I}_{sum}(\vec{\lambda}) \\ &= \mathbf{O}(\vec{\lambda}) \cdot \vec{I}_{sum}(\vec{\lambda}) \quad \dots \text{Eq(S6)}\end{aligned}$$

$$\mathbf{O}(\vec{\lambda}) = \begin{pmatrix} T(\lambda_1)\alpha_{lamp}(\lambda_1) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & T(\lambda_2)\alpha_{lamp}(\lambda_2) & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & T(\lambda_n)\alpha_{lamp}(\lambda_n) \end{pmatrix} \quad \dots \text{Eq(S7)}$$

$\mathbf{O}(\vec{\lambda})$ は光学系の非理想的なふるまいを集約した行列であるが、当該行列は対角行列であるため逆行列が存在する。したがって、非理想的な振る舞いを取り除いたクロスニコル強度は以下のように得ることができる。

$$\vec{I}_{cross}(\vec{\lambda}) = \mathbf{O}^{-1}(\vec{\lambda}) \cdot \vec{I}_{cross,net}(\vec{\lambda}) \quad \dots \text{Eq(S8)}$$

上記 Eq(S8)の $\vec{I}_{cross}(\vec{\lambda})$ とはすなわち、Eq(1)で示している理想的な光学系を仮定した場合における $\vec{I}(\vec{\lambda})$ に対応している。したがって、実際の実験ではクロスニコル・パラレルニコルの 2 条件で画像を取得した後、 $\mathbf{O}(\vec{\lambda})$ を算出する。その後、 $\mathbf{O}(\vec{\lambda})$ の逆行列である $\mathbf{O}^{-1}(\vec{\lambda})$ をクロスニコル条件下で得られたハイパースペクトル画像に掛け合わせることで補正が完了し、補正された画像に対して Eq(1)でフィッティングを実施する。当該補正手法の欠点としては、光学異性体における屈折率の波長分散特性[84]を考慮していない点にあり、幅広い波長域を扱う場合に短・長波長両端側での誤差が大きくなることが予想される。しかしながら、本研究で扱っている波長域は狭い範囲に限定されているため、当該特性による影響は無視できる程度であると仮定して位相差の算出を行っている。

## 第 3 章

### 針葉樹仮道管形態の 1 年輪内変動追跡

### 3.1. 緒言

仮道管, 木部繊維, 道管要素, 放射柔細胞等より成る樹木は, 細胞壁に関連した構造特性 (e.g. 一次壁・二次壁多層構造[1,2], 各壁層の MFA[3,4]), 樹木細胞形状 (e.g. 細胞横断面形状や細胞長[5,6]), 細胞の空間配置といった階層構造によって特徴づけられる. これらの樹木細胞形態には機能に応じた多様性がみられ, 針葉樹と広葉樹ではその形態が大きく異なっている. これに加えて, 樹木の生育環境 (降水量, 日射量, 干ばつ等) といった外部環境要因がここに影響を与えることが知られている[7,8].

針葉樹の細胞形態特徴は, 細胞配置, 細胞形状, および細胞壁の 3 つのスケールにおいて明瞭に表れている. 細胞配置については, 年輪内における早晚材仮道管の細胞形態の変遷を目視で確認可能であり, 当該特徴は年輪年代学や年輪気候学において外部環境要因のプロキシとして利用される[9]. 細胞形状は様々な指標 (e.g. 壁孔構造やその種類, 細胞壁厚, 細胞断面積, 細胞内腔径など [5,10]) を通して評価可能であり, それを以て細胞種の区別を行うことが可能である. 加えて, これらの情報を基に, 樹体支持や物質輸送[11,12]といった細胞の有する機能を定性的・定量的に評価することができる. 細胞壁レベルでは, 細胞壁 S<sub>2</sub> 層 MFA が樹木の力学特性を左右する最も重要な指標である. 樹木を木質バイオマスとして利用する際, その力学性能や異方性に大きな影響を与えることが知られているため [13,14], 当該指標を測定するための多くの手法が開発されてきた (e.g. 電子顕微鏡観察, XRD, 化学処理後の光学顕微鏡観察[4]). 以上に示した樹木細胞の形態特徴は, 針葉樹が生存環境に最適化する上で獲得してきた重要な形質であり, 生存戦略を反映したものである.

樹木細胞形態より針葉樹を構成する細胞の機能やその生存戦略を引き出すためには, 既述の階層的な細胞形態情報 (細胞配置, 細胞形状, 細胞壁) を繋ぎ合わせながら多元的に計測し, 各階層ならびに階層間における相互関係を同時に評価するのが最も望ましい. しかしながら, 上記の実現は既存の技術のみでは困難であるため, 研究例は極めて少ない[15,16]のが現状で, 特に階層構造間の関係性については依然不明な点が多い.

近年, 上記の課題を克服しうる手法として, POM による植物細胞壁の MFA イメージング手法が提案されている[17-20]. 当該手法の最大の利点は, 光学顕微鏡分解能で細胞の木口断面より MFA を可視化・定量できるため, 同時に細胞形状や細胞配置といった異なる階層の形態情報を同時に取得できることにある. 当該イメージング手法に加え, 画像解析分野において大きく発展している画像セグメンテーション技術[21]は画像上に写る細胞を切り分け, cell-by-cell でその形態評価することを可能としている. これらの手法をうまく組み合わせることで, 個々の細胞壁の MFA から細胞配置までを一気通貫で定量することが可能となることから, 針葉樹の形態評価をする上で極めて有用な手法になりうるポテンシャルを有していることがわかる.

本研究の目的は, 針葉樹における細胞機能およびその生存戦略の理解に重要である, 細胞形態の階層構造 (細胞配置, 細胞形状, 細胞壁 MFA) を多元的に同時計測可能とする新規手法の開発すること, およびこれら階層構造の 1 年輪内における相互関係を評価可能であ

るか検証することである。上記目的の達成のため、POM, FLM, 画像セグメンテーションを組み合わせた仮道管形態定量手法の構築を実施し、モデル針葉樹サンプルであるヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) に適用することで本手法の有効性を検証した。本研究では、仮道管配置の評価に細胞生成過程[22]を考慮した tracheidogram[23]を使用することで年輪内変動の体系的な評価を実施した。

## 3.2. 試料と方法

### 3.2.1. 試料と前処理

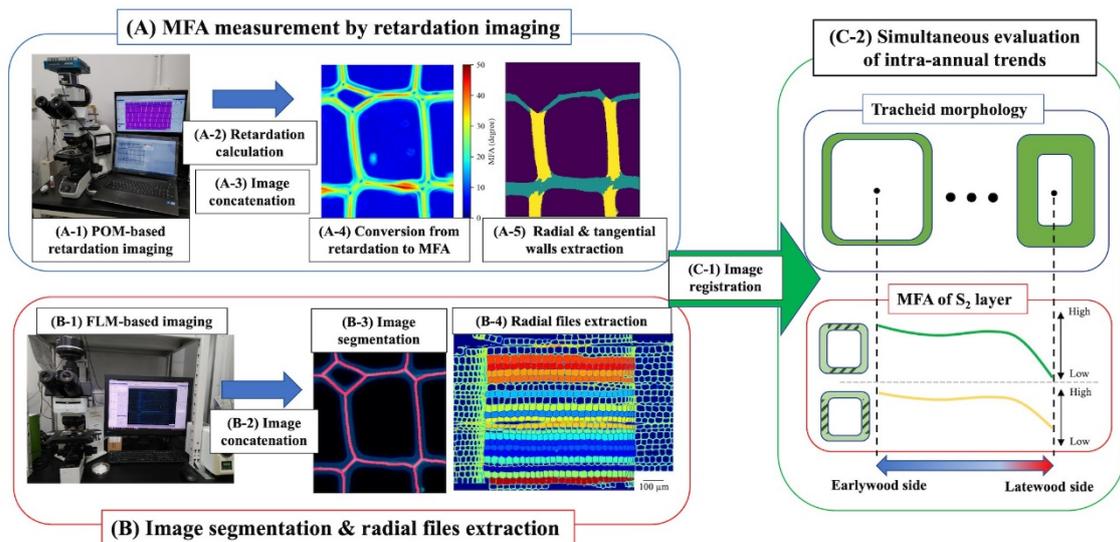
ヒノキの正常材心材部を含む試料として用いた。試料は 1 年分の年輪を含むようにサンプリングし、Spurr 樹脂 (Spurr Low Viscosity Embedding Kit, Polysciences, Inc.) に包埋した。ロータリーマイクロトーム (Sorvall JB-4, DuPont de Numours, Inc.) とダイヤモンドナイフ (HistoJumbo, Diatome Ltd) を用いて 5  $\mu\text{m}$  厚の木口断面切片を作製した。切片はスライドガラス上に置き、ホットプレート上で乾燥させた。切片に封入剤の Bioleit (Okenshoji Co., Ltd.) を数滴垂らし、カバーガラスを被せて封入した。

### 3.2.2. 実験手順の概観と詳細

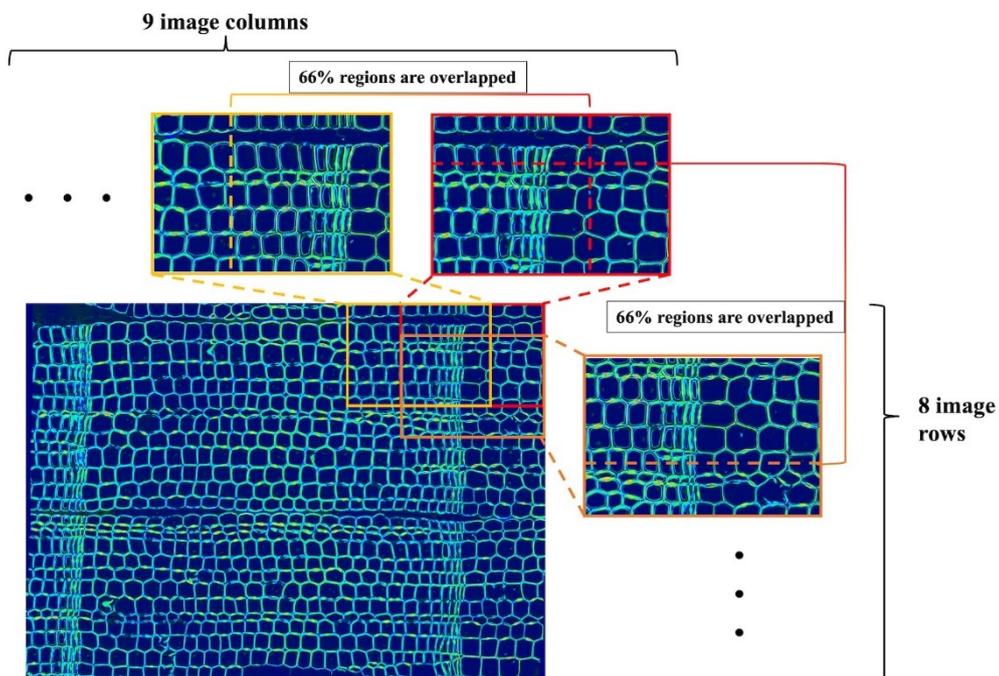
試料調製後の実験フローを Fig.1 に示す。実験フローは、試料調製後の 3 つのステップ (A, B, C) に分けられる。ステップ A (Fig.3-1, 左上) では、POM による位相差イメージングを用いることで、横断面の偏光画像を撮影し、連結してパノラマ画像とした。偏光画像を位相差画像、方位角画像に変換し、位相差画像を MFA 画像に変換した。方位角画像から方位角角度分布を抽出し、それを利用することで放射・接線細胞壁の画像ピクセルを取得した。ステップ B (Fig.3-1, 左下) では、偏光画像と同一視野の蛍光画像を撮影し、同様に連結してパノラマ画像とした。蛍光パノラマ画像に対し細胞セグメンテーションと仮道管放射列の抽出を行った。ステップ C (Fig.3-1, 右) では、POM と FLM の結果を組み合わせ、仮道管放射列単位で仮道管細胞形態と S<sub>2</sub> 層 MFA を取得した。各実験ステップの詳細については以下で詳説する。

#### POM および FLM による画像撮影 (Fig.3-1 A-1 & 1B-1)

木口断面の偏光画像撮影は、x40 対物レンズ (UPLFLN40XP, NA = 0.75, Olympus Corporation) および 1/4 波長板 (UTP-137, Olympus Corporation) を装着した偏光顕微鏡 (BX51-P, Olympus Corporation) に、フロントイルミネーション型モノクロ CCD カメラ (Alta F2, Apogee Imaging Systems, Inc.) と液晶可変帯域フィルター (VariSpec™, VIS: 400-720 nm, 7 nm バンド幅; Cambridge Research & Instrumentation, Inc.) を装着して実施した。バンドパスの波長中心は 546 nm, 露光時間は 1 s に設定した。木口断面の偏光画像は、偏光子を回転させることで異なる偏光状態の画像を 3 枚撮影した [24]。木口断面切片の全体を撮影するために、合計 72 枚の画像 (画像サイズ: 1536 × 1024 pixels, 9 列 8 行, Fig.3-2 参照) を撮影した。後に偏光画像はパノラマ画像として結合するため、上下左右に隣接する画像の重なりが約 66% となるように撮影した。以上の撮影に加えて、バックグラウンド補正用に細胞等何も写っていない領域を同様の手順にて撮影した[24]。



**Fig.3-1** 画像取得および解析の実験フロー. 仮道管放射・接線壁 S<sub>2</sub>層 MFA は POM による位相差イメージングを用いて取得する (step A). 仮道管放射列単位を基準として, FLM による蛍光画像と画像解析を用いて仮道管形態を定量した (step B). 最後に, 両者で得られた結果を統合し, S<sub>2</sub>層 MFA と仮道管形態を同時評価した (step C). 各実験ステップの詳細は本文中に記載している.



**Fig.3-2** 位相差画像に対し画像結合を適用した事例. 木口断面切片全体をカバーするために, 72 枚の画像の結合 (9 列×8 行) を実施した. それぞれの画像は隣接する画像とうまく結合させるため, 上下左右方向に隣接する画像に対し約 66%重複するように撮影している.

偏光画像を撮影した切片の蛍光画像の撮影を行った。当該撮影では 2 種類の蛍光フィルターキューブ (U-MWU2, U-MWIG3, Olympus Corporation) を使用した。前者は細胞壁中のリグニン芳香環骨格の自己蛍光を検出する UV 励起、後者は放射柔細胞中に沈殿する樹脂様物質を検出する緑色励起である。蛍光画像撮影には、x10 対物レンズ (UPLANFL, NA = 0.30, Olympus Corporation), 蛍光励起用光源 (U-HGLGPS, Olympus Corporation), およびフロントイルミネーション型カラー CCD カメラ (DP72, Olympus Corporation) を装着した蛍光顕微鏡 (BX50, Olympus Corporation) を使用した。切片の全領域を撮影するため、それぞれの蛍光フィルターキューブ条件で 4 枚の画像 (画像サイズ:4140 × 3096 pixels) を撮影した。偏光画像と同様に、隣接する画像は撮影領域が一部重複するように撮影を行った。

### 位相差・方位角画像への変換 (Fig.3-1 A-2)

3 種類の異なる偏光状態で撮影した画像のペアを位相差画像および方位角画像へと変換した。変換アルゴリズムには, "three-frame algorithm without extinction setting"を使用した[24]。

### 画像結合 (Fig.3-1 A-3 & B-2)

位相差画像, 方位角画像および蛍光画像を結合しパノラマ画像とすることで, 切片の全領域を写した画像を作成した。画像結合には, POC[25]を使用した。

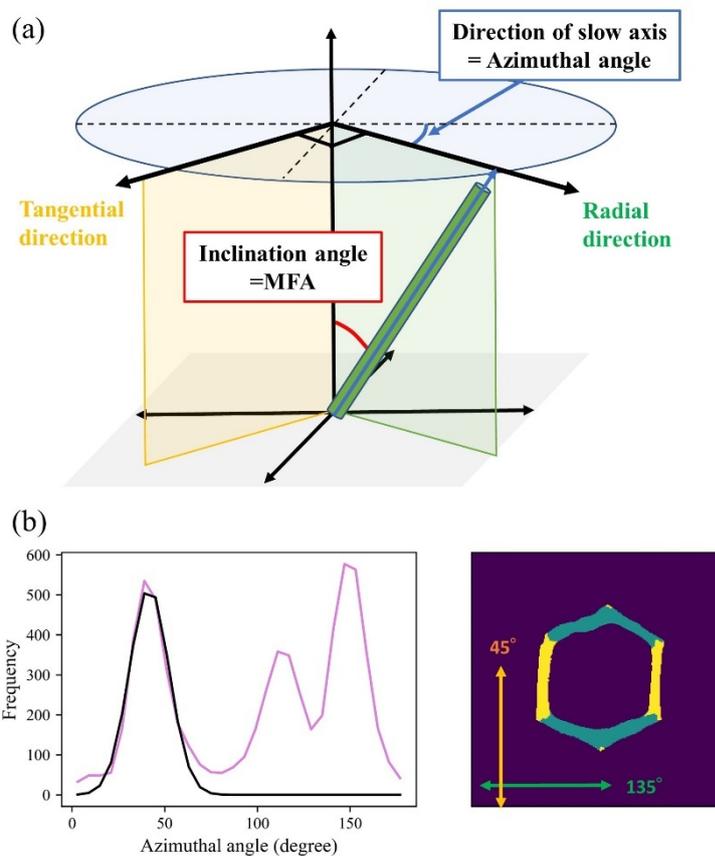
### MFA 画像への変換 (Fig.3-1 A-4)

位相差画像の MFA 画像への変換は過去の報告[13,16]に従って実施した。変換の際に使用するセルロースの屈折率には,  $n_o=1.529$ ,  $n_e=1.599$  を使用した[26]。仮道管のセルロース構成比率は  $S_2$  層の値を参考として, 50%と仮定した[27] (その他壁層を含めた場合のセルロース構成比率は 40-45%とされている[28])。早晚材でセルロース構成比率に違いがあるという報告があるものの[29], 変換後の結果に大きな影響を与えるものではないと本研究では仮定した。

### 放射・接線壁の $S_2$ 層 MFA の抽出 (Fig.3-1 A-5)

XRD より得られる方位角分布[30]と類似の概念である方位角画像を用いることにより, 放射・接線壁の MFA を抽出した (Fig.3-3)。方位角分布では放射・接線壁由来のピークが観測されているが, 今回の実験条件では方位角分布の  $45^\circ$ 付近に接線壁由来のピークが出現するように設定した。このピークの中心を  $\mu$  とするガウス関数によりフィッティングを行い, 方位角が  $\mu \pm 3\sigma$  の範囲にある画素を接線壁成分として抽出した。残りのピークは自動的に放射壁成分として抽出した。

$S_2$  層の MFA を抽出するためには, その他壁層 ( $S_1$ ,  $S_3$  層) の MFA の寄与を除く必要がある。scikit-image[31]ライブラリで実装されている局所極大値, 極小値検出を適用することで,  $S_2$  層およびその他壁層の選択的抽出を実施した。



**Fig.3-3** 位相差イメージングによる方位角の算出, および方位角分布を利用した放射・接線壁の選択的抽出. (a) 本実験条件における方位角, 放射・接線方向の定義. 放射面, 接線面はそれぞれ緑色および黄色としている. (b) 六角形の仮道管 (右) における方位角分布 (左, 紫色実線). 接線壁は方位角がおよそ  $45^\circ$  を中心としたガウシアン (左: 黒色実線) で囲まれた領域 (右: 黄色) に対応している. 放射壁は, 方位角分布の残った角度域に対応する領域 (右: 緑色) と定義している.

### セグメンテーションとマニュアル修正 (Fig.3-1 B-3)

セグメンテーションでは仮道管のみを対象とするため、放射柔細胞は画像から取り除く必要がある。緑色励起の蛍光画像を用いることで放射柔細胞のみを抽出し、UV 励起の蛍光画像より放射柔細胞領域のみを差し引いた。

上記処理の後、二値化した UV 励起蛍光画像に対し watershed 法[32]によるセグメンテーションを適用することで仮道管境界の検出を行った。watershed アルゴリズムは、Python パッケージの Mahotas[33]に実装されているものを使用した。当該セグメンテーション手法は早材に対して有効であったものの、内腔がほとんど存在しない晩材ではうまく機能しない傾向にあった。そのため、晩材部分は手動による修正を行った。セグメンテーション処理の後、仮道管放射列の抽出に必要となる仮道管断面積の計測を実施した。

### 仮道管放射列および仮道管形態パラメーターの抽出 (Fig.3-1 B-4)

Watershed 法によるセグメンテーションの後、Brunel et al. (2014)[34]により提案された手法を用いることで、UV 蛍光画像より仮道管放射列の抽出を行った。この手法では、Region adjacency graph と呼ばれるグラフネットワーク[35]と隣接細胞の相対位置および形状類似性 (Bray-Curtis 基準[36]) を基にした隣接仮道管選択アルゴリズムを用いることで、仮道管放射列の自動抽出を可能としている。当該アルゴリズムにおいて、最適な隣接仮道管の相対位置は、仮道管間の重心を結ぶベクトルと水平ベクトルとのなす角  $\theta$  により制御される。本研究では、 $|\theta| \leq 25^\circ$ となるように設定した。また、Bray-Curtis 基準の算出には仮道管断面積を使用した。以上の条件により、16本の仮道管放射列が抽出された。

抽出された仮道管放射列に属する仮道管を対象に、仮道管形状パラメーター (内腔断面積、細胞壁面積、細胞壁率、仮道管・内腔放射径、仮道管接線径、接線壁厚)[37]の算出を行った。接線壁厚の算出には Prendin et al. (2017)[38]に類似した手法を用いた。約 100 の仮道管に対して、仮道管・内腔放射径、仮道管接線径、接線壁厚の ImageJ[39]を用いた手動計測を実施した。自動・手動計測の結果を比較することで、自動計測の精度を検証した (Fig.S3-1)。

### 偏光画像と蛍光画像データの統合 (Fig.3-1 C-1)

偏光画像、蛍光画像より得られたデータを統合するため、両画像の画像位置合わせを行った。画像位置合わせは SIFT 法[40]により算出される画像特徴量を基に実施した。

### 相関分析、仮道管放射列による標準化、多重比較検定 (Fig.3-1 C-2)

接線壁厚による外れ値除去を実施した後 (Fig.S3-2), 432 の仮道管を対象に仮道管形状パラメーターと平均  $S_2$  層 MFA (放射壁、接線壁) とのピアソンの相関解析を実施し、相関係数  $r$  を算出した。仮道管放射列を基準とした年輪内変動の定性評価のため、仮道管放射列を構成する仮道管数を一定値とする標準化処理を行い (27 仮道管/放射列)、各パラメーターに対応する tracheidogram を作成した[8]。デノイズのため、各仮道管放射列の平均  $S_2$  層 MFA を

Savitzky-Golay フィルター (window size = 3, polynomial order = 1)[41]により平滑化した。標準化処理後のデータに対し, Shapiro-Wilk 検定による正規性検定, Bartlett 検定による等分散性検定を行った後, 仮道管放射列位置による仮道管形状パラメーターの差異の多重比較検定 (Steel-Dwass 検定) を実施した。

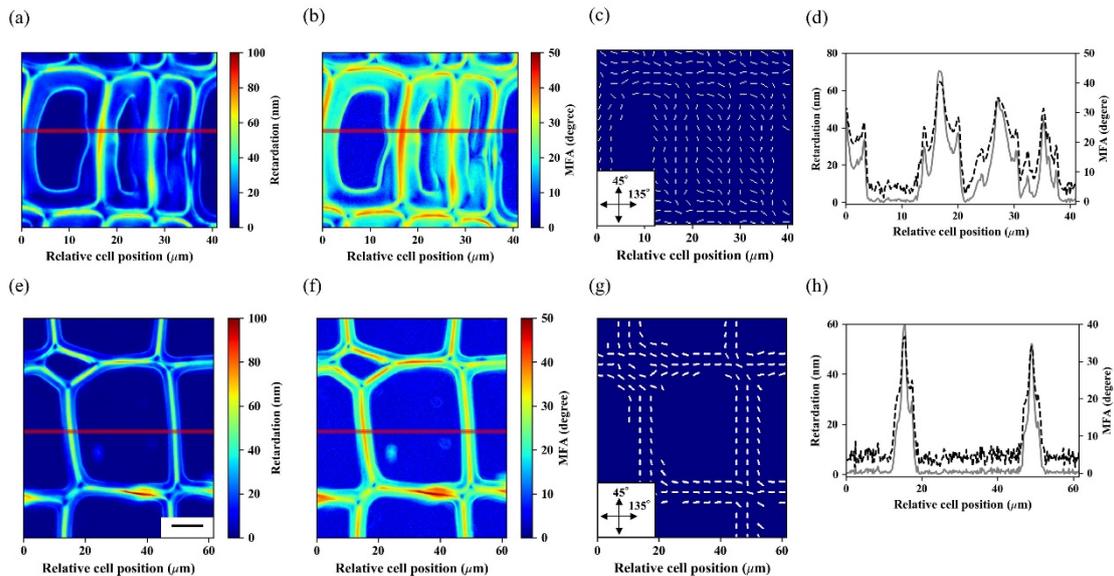
### **XRD による MFA 計測**

偏光画像より得られた結果を検証するため, 切片作製を行った同一サンプルに対し XRD による MFA 測定を実施した。XRD による測定は湾曲イメージングプレート単結晶自動 X 線構造解析装置 (R-AXIS RAPID II, Rigaku Corporation) を用いて行った。50 kV, 100 mA の Cu K $\alpha$  線を 0.3 mm 径にコリメートし, 試料軸方向に対して垂直方向に入射した。XRD 回折像は早材・晩材の 2 箇所より取得した。セルロース由来の回折ピークである(200)面に対して Cave 法[42]を適用することで MFA を算出した。

### 3.3. 結果

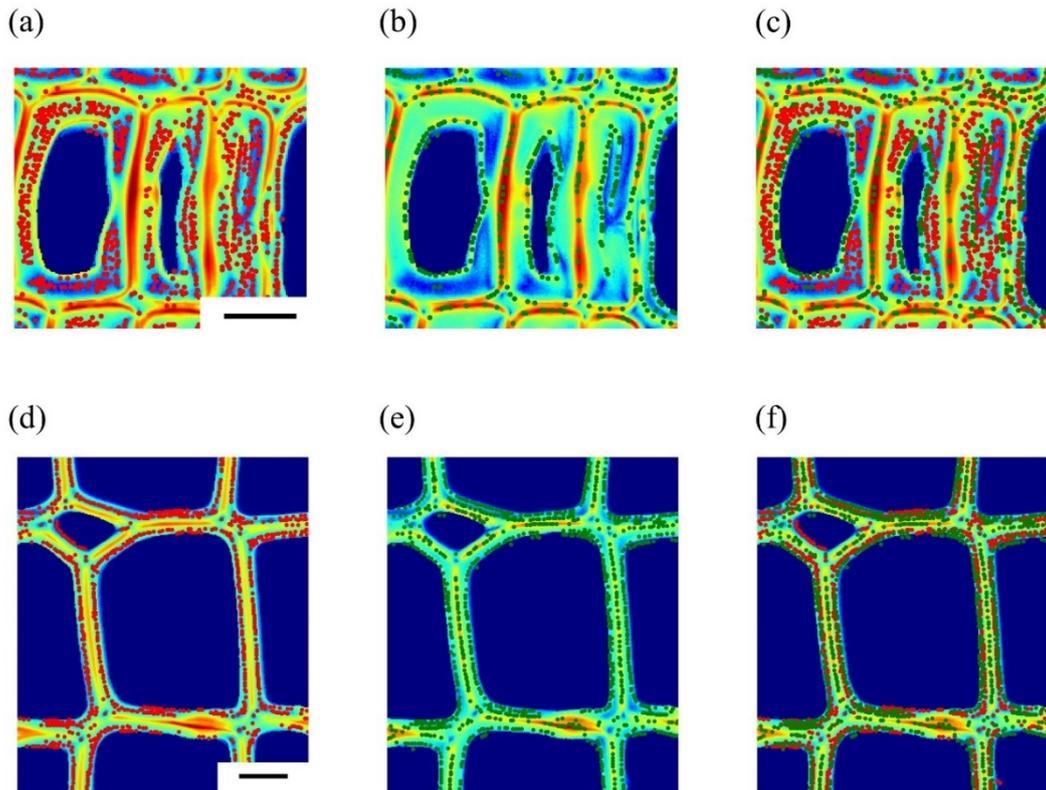
#### 3.3.1. MFA イメージングと S<sub>2</sub>層 MFA の選択的検出

Fig.3-4 に、早材・晩材仮道管の位相差, MFA, 方位角画像を示す. Fig.3-4 (a), (b), (e), (f)より、位相差, MFA の値から、S<sub>2</sub>層およびその他壁層 (S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>) を識別できる. Fig.3-4 (d), (h)より、早材・晩材の S<sub>2</sub>層と、S<sub>1</sub>層および S<sub>3</sub>層はそれぞれ位相差の極小、極大に対応しており、各層の MFA はそれぞれ 20°, 10-15°, 30-40°, 20-30°程度であることがわかる. 位相差は MFA に変換する際の実験的な誤差等により MFA の値が若干高くなっているものの (詳細は考察にて記述), 得られた MFA 値はこれまでのヒノキの正常木における MFA 値とおおよそ一致する [43-45]. S<sub>1</sub>および S<sub>3</sub>層の MFA は、透過型電子顕微鏡観察による報告[1]と大きく異なる結果となっている. この理由として、各壁層の化学組成が大きく異なる[27]ことに加えて、光学顕微鏡の分解能ではこれら壁層を十分に識別することは困難であることがあげられる[46]. 分解能が不十分なため、観測された S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>層 MFA は隣接する S<sub>2</sub>層 MFA とマージしてしまい、結果として実際の MFA 値を大きく下回る値になっていると考えられる.



**Fig.3-4** 位相差, MFA, および方位角画像の一例. (a-c) 晩材仮道管における位相差, MFA, 方位角画像. (e-g) 早材仮道管における位相差, MFA, 方位角画像. (d), (h) 晩材および早材仮道管の位相差 (灰色実線), MFA (黒色点線) の赤線部における断面図. (d) および (h) では、S<sub>2</sub>層が局所極小, S<sub>1</sub>および S<sub>3</sub>層が局所極大に対応していることがわかる. スケールバー: 10  $\mu\text{m}$ .

Fig.3-4で示した仮道管に対し、 $S_2$ 層もしくは $S_1 \cdot S_3$ 層の選択的検出を適用した結果がFig.3-5である。局所極大値もしくは極小値検出が早晚材いずれにおいても $S_2$ 層(赤点)および $S_1+S_3$ 層(緑点)の選択的検出としてうまく機能していることがわかる。 $\times 40$ 倍対物レンズ( $NA = 0.75$ )の分解能[47]と、ヒノキ仮道管の各壁層の厚さおよび割合[46]を考慮すると、局所極小値として検出された成分は $S_2$ 層の純粋な寄与であると考えられる。



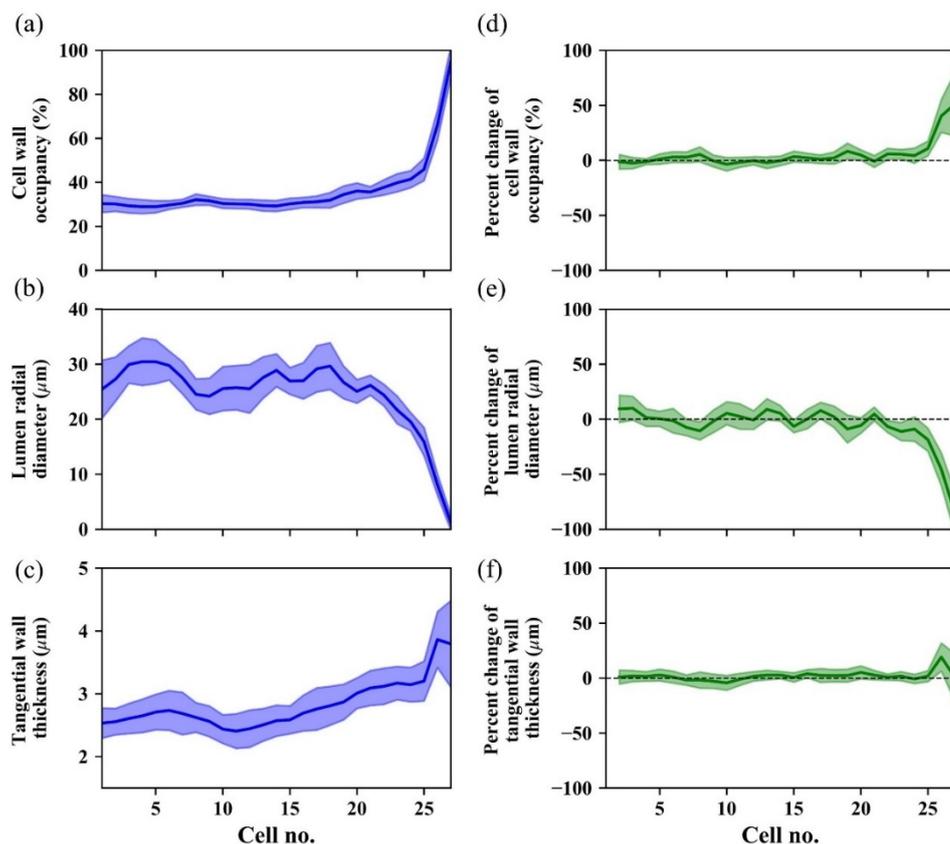
**Fig.3-5**  $S_2$ , および  $S_1+S_3$  層の選択的検出. (a) 晩材仮道管における  $S_2$  層, および (b)  $S_1+S_3$  層の選択的検出結果. (d) 早材仮道管における  $S_2$  層, および (e)  $S_1+S_3$  層の選択的検出結果. (c), (f) は晩材・早材仮道管の  $S_2$  層, および  $S_1+S_3$  層選択的検出結果をマージしたものである. 赤点および緑点は  $S_2$  層(局所極小) および  $S_1+S_3$  層(局所極大) として検出されたピクセルに対応する. スケールバー:  $10 \mu\text{m}$ .

### 3.3.2. 仮道管形状の年輪内変動パターン

細胞壁率, 放射内腔径, 接線壁厚の年輪内変動パターンをFig.3-6に示す. その他の仮道管形態パラメーターで得られた結果はFig.S3-4に示す. 仮道管形態パラメーターは, 年輪内で殆ど変動しないものと, 大きな変動を伴うものの2種に大別することができる. 前者は細胞壁面積 (Fig.S3-4 (c)) と仮道管接線径 (Fig.S3-4 (d)) であり, 年内を通してほぼ一定で, 細胞

壁面積において多少の増減がみられる程度である。それ以外のパラメーターは後者に属しており、これらはさらに細胞拡張（仮道管&内腔断面積，仮道管&内腔放射径）および二次壁堆積（接線壁厚），もしくは両者に関わるパラメーター（細胞壁率）に分類される。これらパラメーターの年輪内変動より（絶対値: Fig.3-6 (d), Fig.S3-4 (a), S3-4 (b); 変動比: Fig.3-6 (e), Fig.S3-4 (f), S3-4 (g), S3-4 (i)), 二次壁堆積に関連するパラメーターに比して，細胞拡張に関連するパラメーター群の方が年輪内で急激な変化を示す傾向にある[48]。したがって，いずれのパラメーターにも影響を受ける細胞壁率の年輪内における急激な変動は主に細胞拡張関連パラメーターの変動に依るところが大きいと推測される。

年輪内で最後に生産された晩材仮道管の接線壁厚の標準偏差が他の仮道管に比べて小さくなっており (Fig.3-6 (c), (f)参照), これは当該仮道管の内，一部接線壁厚が他の晩材仮道管と比して薄くなるという既往の報告[49]とも一致する傾向である。



**Fig.3-6** 仮道管放射列により標準化された仮道管形状パラメーターの年輪内変動. (a) 細胞壁率, (b) 内腔放射径, (c) 接線壁厚. (d)-(f) は (a)-(c) のパラメーターにおいて，ターゲットとなる仮道管の 1 つ前の仮道管と比して何パーセント変動しているかをあらわしている. 実線とその周囲を覆う帯は年輪内の平均変動とその標準偏差に対応する. 細胞 no.1 とは，年輪内で最初に生産された早材仮道管に対応し，標準化された tracheidogram では no.1-no.27 までナンバリングされている.

### 3.3.3. 仮道管形状と S<sub>2</sub>層 MFA の年輪内変動の同時評価

432 の仮道管を対象に、放射・接線壁の平均 S<sub>2</sub>層 MFA と仮道管形状の相関解析結果を Table 3-1 に示す。仮道管形状パラメーターは、S<sub>2</sub>層 MFA と中程度の相関を有する ( $|r| > 0.40$ )、もしくは相関が確認されなかった 2 グループに分類された。前者には内腔断面積、内腔放射径、接線壁厚、細胞壁率が分類され、後者には細胞壁断面積と仮道管接線径が分類された。ここで見られた 2 グループの分類は、年輪内変動が顕著に起こったもしくは起こらなかった形態パラメーターと一致する結果となった。また、放射壁と比較して接線壁の S<sub>2</sub>層 MFA の方が仮道管形状と高い相関を示し、且つ分散も小さい傾向にあった。これは、放射壁においてのみ有縁壁孔は出現し、S<sub>2</sub>層 MFA の配向乱れを誘発しているのが原因であると推測される[50,51]。

**Table 3-1** 仮道管形状パラメーターと S<sub>2</sub>層 MFA の相関解析結果

Anatomical parameters	Mean S <sub>2</sub> MFA	
	Radial wall	Tangential walls
Tracheid transverse area	<b>0.36</b>	<b>0.46</b>
Tracheid radial diameter	<b>0.45</b>	<b>0.48</b>
Tracheid tangential diameter	0.03	0.18
Lumen transverse area	<b>0.41</b>	<b>0.51</b>
Lumen radial diameter	<b>0.47</b>	<b>0.52</b>
Cell wall area	0.00	0.06
Cell wall occupancy	<b>-0.52</b>	<b>-0.55</b>
Tracheid wall thickness	<b>-0.45</b>	<b>-0.56</b>

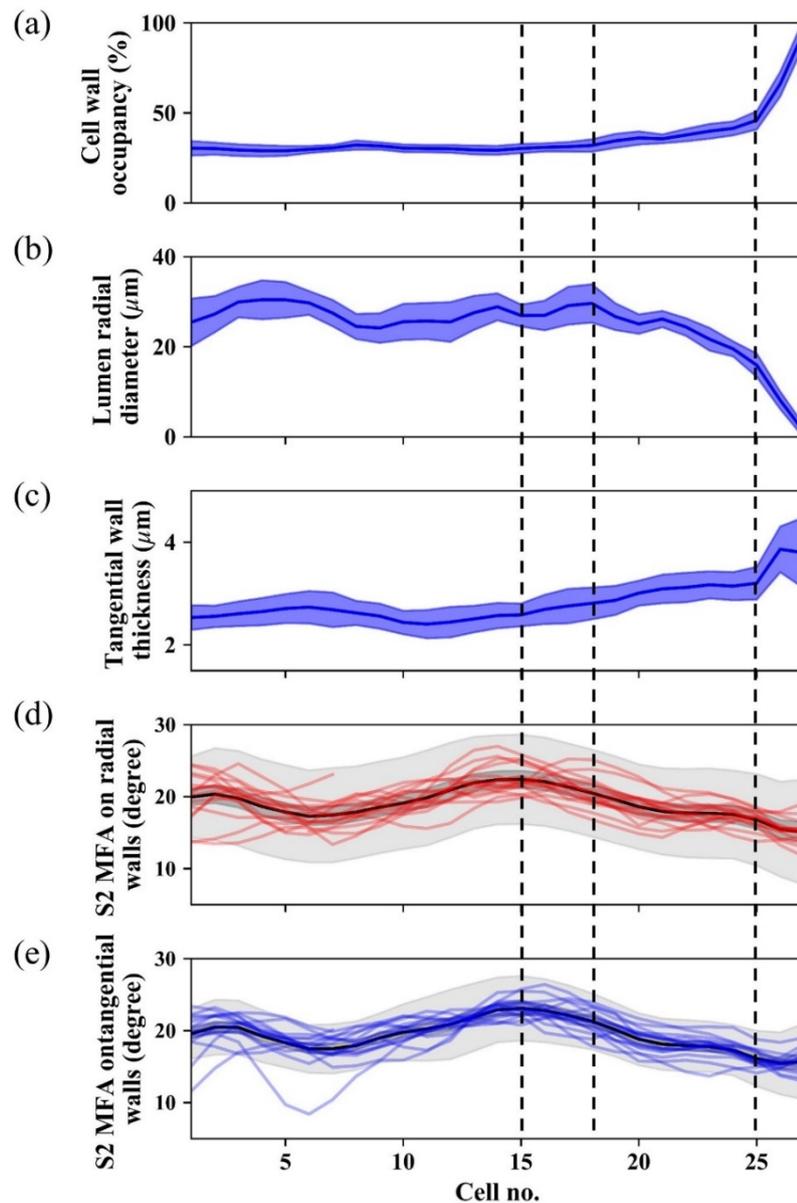
\*太字は統計的有意差 ( $p < 0.05$ ) が観測されたデータに対応。対象仮道管数は 432。

Fig.3-7 に、仮道管放射列をもとに標準化した 3 種類の仮道管形状パラメーター (細胞壁率、内腔放射径、接線壁厚)、放射・接線壁の平均 S<sub>2</sub>層 MFA の年輪内変動パターンを示している。XRD による MFA 測定の結果と比較すると (Fig.S3-4)、POM で得られた計測値は XRD に比較して大きいことがわかる。この原因は方法論の差異に起因する部分があるものの、POM による MFA 測定による誤差の影響が大きいと予想される (考察部参照)。早材・晩材の MFA に着目すると、いずれの手法においても早材よりも晩材の MFA の方が小さい傾向がみられた (POM:早材で 20°, 晩材で 15°以下; XRD:早材で 14°, 晩材で 10°)。

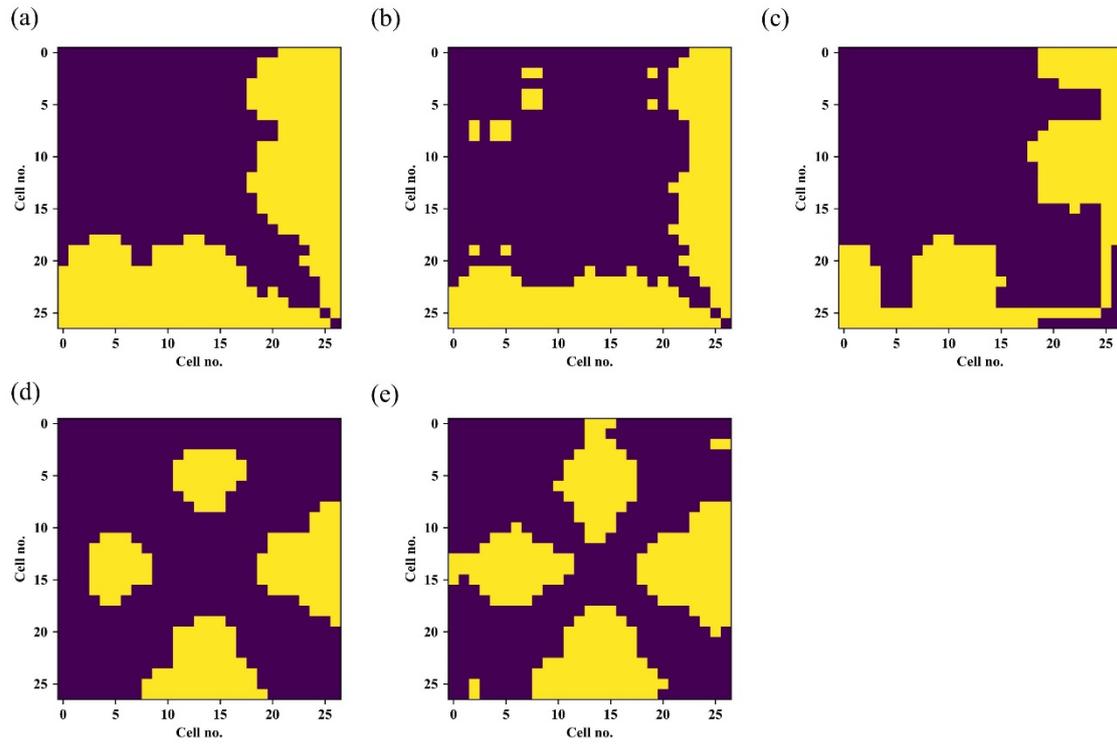
Fig.3-7 に示す 3 種の仮道管形状パラメーターの年輪内変動は、放射・接線壁の S<sub>2</sub>層 MFA と連動していることが確認された。細胞 no.1 から no.14 にかけて、内腔放射径が大きく、もしくは接線壁厚が薄くなるほど放射・接線壁の S<sub>2</sub>層 MFA は大きくなる傾向がみられた。細胞 no.11 付近より接線壁厚が徐々に厚くなりはじめ、細胞 no.15 になると放射・接線壁 S<sub>2</sub>層

MFA が、細胞 no.18 より内腔放射径が減少傾向に転じた。内腔放射径の減少に伴い、細胞壁率も併せて減少傾向を示した。最終的に、細胞 no.25, 26 においていずれの仮道管形態パラメーターも晩材への移行に伴い急激な変化を示す一方で、放射・接線壁の S<sub>2</sub> 層 MFA では晩材移行部で単調な減少傾向が確認された。興味深い点として、年輪の最後に生産された仮道管の一部において放射・接線壁いずれの S<sub>2</sub> 層 MFA が増加し、接線壁厚は薄くなる仮道管が確認された。その年の終盤に生産される仮道管の一部には、極端に仮道管長が短く且つ細胞壁厚の薄い仮道管が出現することが知られており[49]、当該仮道管と関連している可能性が示唆される。

仮道管放射列における各パラメーターおよび仮道管の位置に応じて多重比較検定を実施した結果を Fig.3-8 に示す。当該検定の結果、それぞれのパラメーターにおいて有意な差が生じている事が確認された。検定で有意差が出たペアのパターンを見ると、3 種の仮道管形状パラメーターおよび S<sub>2</sub> 層 MFA の 2 つにおおよそグルーピング可能であると判断できる。前者のグループでは早晚材の変化に伴って生じた仮道管形態の変化が有意差として確認されている。その一方で、S<sub>2</sub> 層 MFA では早材や移行材において確認された年輪内変動に対して有意差が確認されたものの、仮道管形態パラメーターに顕著な差がみられる早材・晩材間の比較で有意差は確認されなかった。ただし、個々のパラメーターで有意差が生じている細胞 no.はそれぞれ異なっていることから、各パラメーター固有の年輪内変動パターンが存在していることが示唆される。



**Fig.3-7** 仮道管放射列により標準化した仮道管形状パラメーターと S<sub>2</sub>層 MFA 年輪内変動パターンとの比較. (a) 細胞壁率, (b) 内腔放射径, (c) 接線壁厚, (d) 放射壁 S<sub>2</sub>層 MFA, (e) 接線壁 S<sub>2</sub>層 MFA. (a)-(c) において, 青色の実線とそれを囲む帯は, 対応するパラメーターの年輪内平均変動とその標準偏差に対応している. (d), (e) における赤線, 青線は個々の仮道管放射列における放射・接線壁の S<sub>2</sub>層 MFA にあたる. 垂直にひかれた黒色点線は, 仮道管形態または S<sub>2</sub>層に顕著な変動がみられた細胞 no.15, no.18, no.25 の位置に対応している. 細胞 no.1 は各仮道管放射列において年輪内で最初に生産された細胞に対応しており, 標準化された tracheidogram では no.1-no.27 までナンバリングされている.



**Fig.3-8** 各仮道管形状パラメーターおよび  $S_2$  層 MFA における Steel-Dwass 検定の結果. (a) 細胞壁率, (b) 内腔放射径, (c) 接線壁厚, (d) 放射壁  $S_2$  層 MFA, (e) 接線壁  $S_2$  層 MFA. (a)-(e) の x 軸, y 軸は標準化された tracheidogram の各仮道管位置 (no.1-no.27) に対応している. 黄色部は統計的有意差 ( $p < 0.05$ ) の見られた仮道管である.

## 3.4. 考察

### 3.4.1. 仮道管形状の年輪内変動に影響を与える因子

IAWA の針葉樹識別リスト[5]によれば、晩材の形成は仮道管放射径の減少および二次壁肥厚の 2 つに特徴づけられるとしている。仮道管放射列を基本単位とした年輪内変動の評価および多重比較検定の結果から、今回の実験で使用したヒノキ材において、二次壁肥厚と比較し仮道管放射径の減少が早材・晩材移行に大きく影響していることが明らかとなった。この結果は、ヒノキが一般的に均質緻密な材質であること[52]や、既往の研究で報告されたヒノキの年輪内変動の傾向ともよく一致している[53-55]。樹種固有の年輪内変動を議論するためには樹木の個体内間分散を考慮した十分な数のサンプルが必要であるため確定的な結論を現段階で引き出すことは不可能である。しかしながら、仮道管放射列を利用した針葉樹材における細胞形態評価という方法論そのものは、針葉樹における樹種固有の解剖学的特徴を定量的且つ体系立てて評価可能とする将来性があると考えられる。近年では、広葉樹に対して放射列を考慮した解析の実施例も見受けられ[34,56]、当該手法の応用展開はさらに進んでいくことが予測される。

多くの仮道管形状パラメーターとは異なり、仮道管接線径および細胞壁面積ではっきりとした変動見られなかった。この点は他の針葉樹において見られる傾向ではあるものの[37,57]、針葉樹の早晩材形成やエネルギー投資戦略という観点で興味深いのは後者の細胞壁面積である。Cuny et al. (2014)[37]によると、早晩材移行パターンの異なる針葉樹 3 種 (ヨーロッパモミ (*Abies alba*), オウシュウトウヒ (*Picea abies*), ヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris*)) においても細胞壁面積が年輪内を通してほぼ一定値を取っていることが報告されている。当該報告では、上記 3 種の針葉樹における仮道管形態の年輪内変動パターンは単位仮道管あたりに投資される光合成生産物に影響されているのではなく、仮道管横断面形状の変化そのものによって引き起こされていると結論付けている。今回使用したヒノキにおいても同様の傾向がみられていることから、これら樹種と同様のメカニズムで年輪内変動パターンが形成されている可能性が示唆される。当該点について、現状の技術的制約では仮道管横断面形状のみからの議論に留まっており、単位仮道管あたりの光合成生産物投資量をより正確に議論するためには軸方向 (細胞長) の寄与も考慮する必要がある。仮道管長等を含めた針葉樹における軸方向の細胞形態の年輪内変動については未だ研究例は少なく[58]、効率の良い測定方法論も整備されていない。針葉樹における細胞発生や光合成生産物の投資戦略の包括的理解を深めていくためには、2 次元・3 次元でのデータ取得 (e.g. 板目断面切片[59-62]や X 線 CT 法[63]を利用した計測法) と画像解析等を組合わせた計測手法の整備を進める必要があると考えられる。

### 3.4.2. 仮道管形状と S<sub>2</sub>層 MFA との関係性

本研究で使用した位相差イメージングによる MFA 測定と画像解析により、仮道管形態と放射・接線壁 S<sub>2</sub>層 MFA が 1 年輪内におけるグローバルなトレンドがおおよそ連動していることが明らかとなった。これらパラメーター間でみられた中程度の相関 (Table 3-1) や年輪内変動パターン (Fig.3-7) は、今回使用したヒノキ材において内腔放射径、接線壁厚、細胞壁率といった  $\mu\text{m}$  オーダーの細胞形態特徴と放射・接線壁 S<sub>2</sub>層 MFA という nm スケールにおける構造特性との間に何らかの関連性が存在している可能性を示唆している。仮道管形状と S<sub>2</sub>層 MFA の関係性に関して不明点が多く[4]、木材解剖学的視点において当該点を究明した研究例はほとんど存在していない。一方、年輪年代学・年輪気候学分野において仮道管放射径と MFA との関連性が調査された事例が存在しており、*Picea classifolia* 約 50 年輪分に見られたグローバルな傾向として、仮道管放射径と S<sub>2</sub>層 MFA との間に有意な負の相関関係が存在することを報告しており[64]、本研究の結果とも一致している。当該事例の興味深い点としては、1 年輪を対象に仮道管放射径、S<sub>2</sub>層 MFA の相関解析を実施した場合、少ないながらも有意な正の相関を有する年輪が複数報告されている点である。仮道管放射径と S<sub>2</sub>層 MFA のデータ点を示した散布図が提示されていないため、具体的にどのようなデータ分布を形成しているかは不明であるものの、気候条件等外的因子の影響によっては仮道管放射径と S<sub>2</sub>層 MFA は正負いずれの相関を取る場合が存在することを明らかとしている。

上記で議論したパラメーター間での一般的なトレンドに対し、局所トレンドを解析した事例は本研究を除いて確認することは出来ていない。局所トレンドにおいて、変動パターンの急激な変化が生じる部分はパラメーターに依存しており、この点は多重比較検定の結果 (Fig.3-8) から明らかになっている。年輪内変動の定性評価や相関解析を通して、晩材に現れる一部の仮道管 (細胞 no.25-no.27) を除くと、放射・接線壁 S<sub>2</sub>層 MFA の詳細なトレンドは接線壁厚のトレンドと類似していることがわかる。この結果は、一般的なトレンドとして接線壁厚が S<sub>2</sub>層 MFA を見積もる指標になりうるという過去の報告[4]とも矛盾しない結果である。局所トレンドで興味深い点としては、早材において仮道管形態パラメーターと S<sub>2</sub>層 MFA がよく連動していることが挙げられる。早材はその役割として物質輸送を優先しているため、物質輸送と輸送時に生じる圧力への抵抗を可能な限り両立する必要がある。これは仮道管径、MFA をより大きくすることで成立し[2]、外的環境の変化に併せて仮道管がそのような形態変化を実現している可能性が考えられるものの、詳細は不明である。

以上で議論した、年輪内の一般的もしくは局所的領域における仮道管形状パラメーターと S<sub>2</sub>層 MFA との関連性については、検討された事例研究数があまりにも少ないため、それらの間に存在する因果関係といったより深い議論に到達するためのデータの絶対数が少ないのが現状である。当該問題を解消していくためには、本研究により提案している位相差イメージングと画像解析を併せた方法論だけでなく、材質等に応じて XRD (e.g. SilviScan<sup>TM</sup>[65]、シンクロトロン放射光  $\mu\text{-XRD}$ [30]) や近赤外 (NIR) イメージング[66]等を用いた地道なデータ集積が必須であると考えている。

### 3.4.3. 応用展開の可能性と注意点

位相差イメージングと画像解析を組合わせたフレームワークには、針葉樹の仮道管形態を評価する上で優れた点が3つ存在している。1つ目は、従来手法に比べ細胞形態の計測・定量評価のコストが大幅に低下する点にある。画像セグメンテーションや仮道管放射列抽出といった仮道管の形態に特化した手法を利用することにより従来困難であったマスターデータの取得を容易とし、近年注目されつつある QWA[10]やコンピューターを利用した樹種識別 (Computer-aided wood identification) [67]といった分野の研究を加速させるポテンシャルを有している。2つ目の利点は、既に本分にて既述しているが、細胞形態と MFA の同時評価を可能とすることにある。これら指標が同時評価可能となることで、例えば個々の細胞レベルにおける仮道管形態・MFA・植物ホルモンの関連性の解明[68]や、正常材からあて材への移行に伴うマイクロ・ナノスケールにおける仮道管形態の遷移[69,70]の詳細化、気候変化に対するマイクロ・ナノスケールにおける仮道管形態の応答[64,71]、といった幅広いトピックに対する応用展開可能性を有している。3つ目の利点は、位相差イメージングが無染色の切片を対象とするため、免疫標識や異なる顕微鏡法と組合わせることで樹木細胞の構造だけでなく化学組成やトポケミストリーが同時評価可能となることである。免疫標識では、リグニン[72]、ヘミセルロース[73]といったセルロース以外の成分における壁中での局在情報を明らかにすることが可能である。また顕微鏡手法であれば、紫外線顕微鏡[74,75]や IR・ラマン顕微鏡[76,77]によりセルロース以外の化学成分についての情報を得ることができる。これら手法に位相差イメージングによる MFA 測定や画像解析を組合わせることで、細胞壁形成機構の解明や、セルロース・ヘミセルロース・リグニンと細胞形態の関係性に関する知見の蓄積に大きく貢献できることが期待される。

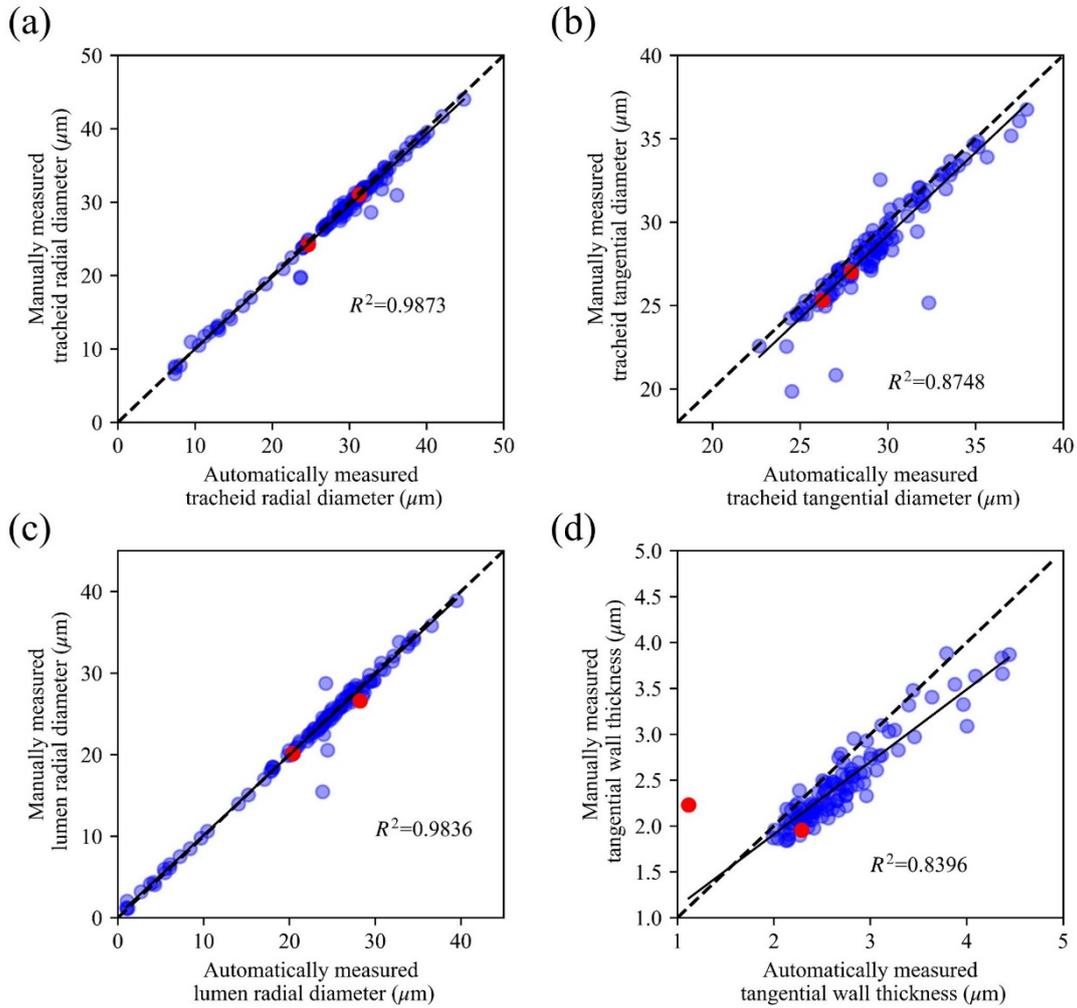
最後に、位相差イメージングによる MFA 測定を実施する上で注意すべき点について述べる。1 点目は木口断面切片の作製である。位相差イメージングで信頼性の高い結果を得るためには、切片作製の段階でアーティファクトの影響を可能な限り除くことが重要となる。しかしながら、切片作製とは細胞壁の切削を伴うことから、この過程で MFA が変化してしまう可能性は否定できない[78,79]。特に、急激な早晚材移行を伴う材や細胞壁厚が極端に厚い材 (引張あて材を含む) では切片作製の際に MFA が変化しやすく、当該特徴に当てはまる樹種への位相差イメージングの適用は容易ではない。2 点目は、位相差イメージングはあくまで光学顕微鏡手法の1種であることから、その空間分解能は Rayleigh 式で表現されるような分解能[47]の制約を受ける点である。特に樹木細胞では多層構造で壁層が隣接しているため空間分解能の影響を受けやすく、得られた MFA が真値であるかはよく注意する必要がある。3 点目は、位相差から MFA に変換する過程で、事前に計測することが困難なハイパーパラメーター2種 (切片厚、細胞壁におけるセルロース構成比率) を使用することである。これらの指標は一般的に測定困難であることから、装置の設定値や文献値を引用するほかなく、そのためある程度の誤差が発生してしまうため、位相差イメージングによって得られる MFA は半定量値として扱うのが適当である。もし MFA の絶対値が必要で、位相差イメ

ージングの結果を校正したい場合は, XRD 等その他の手法を併用し得られた計測値との比較を実施するのが理想的な運用方法であると考えられる[17].

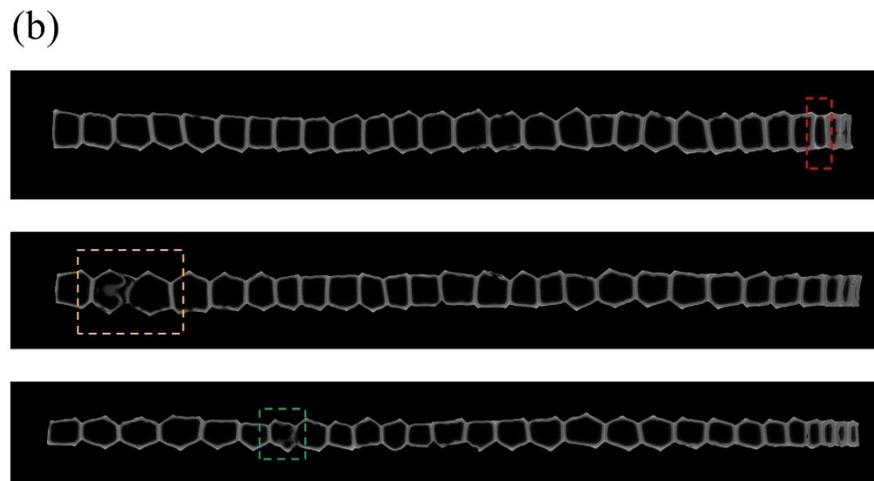
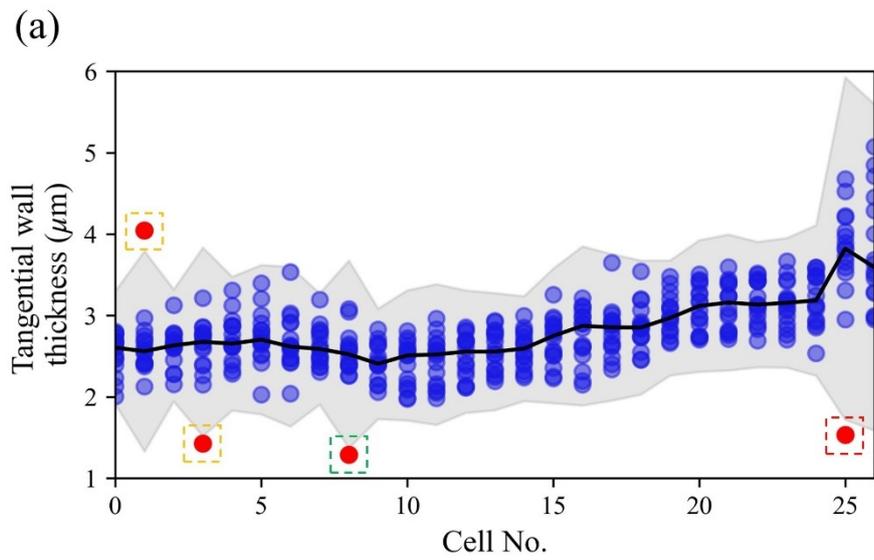
### 3.5. 結語

本研究では, POM による MFA イメージング, FLM, 画像セグメンテーションを組合わせた針葉樹形態評価のための新規手法の提案を行った. 加えて, 当該手法が針葉樹細胞形態の階層構造 (細胞配置, 形状, 細胞壁 MFA) および階層間の相互関係を多元的に評価可能とするか, ヒノキを対象とし手法の有効性検証を実施した. 本手法を針葉樹のヒノキに適用することで, 仮道管形態パラメーターと放射・接線壁 S<sub>2</sub>層 MFA の同時計測に成功した. 得られたデータの解析を通して, 仮道管 S<sub>2</sub>層 MFA と一部の仮道管形態パラメーターの間に中程度の相関が確認された. 加えて, 早材仮道管において両パラメーターは連動して変化していることが明らかとなった. 当該手法には現時点で克服すべき技術的課題は存在するものの, 針葉樹の仮道管形態と S<sub>2</sub>層 MFA と仮道管形態を同時に評価可能という, 他の手法にはない優れた特長を有している. 加えて, 当該手法の適用対象の幅は極めて広いこと, また免疫標識や他の顕微手法との組合わせに柔軟性があることから, 今後の樹木細胞研究の発展に大きく貢献する可能性を有する手法であると考えている.

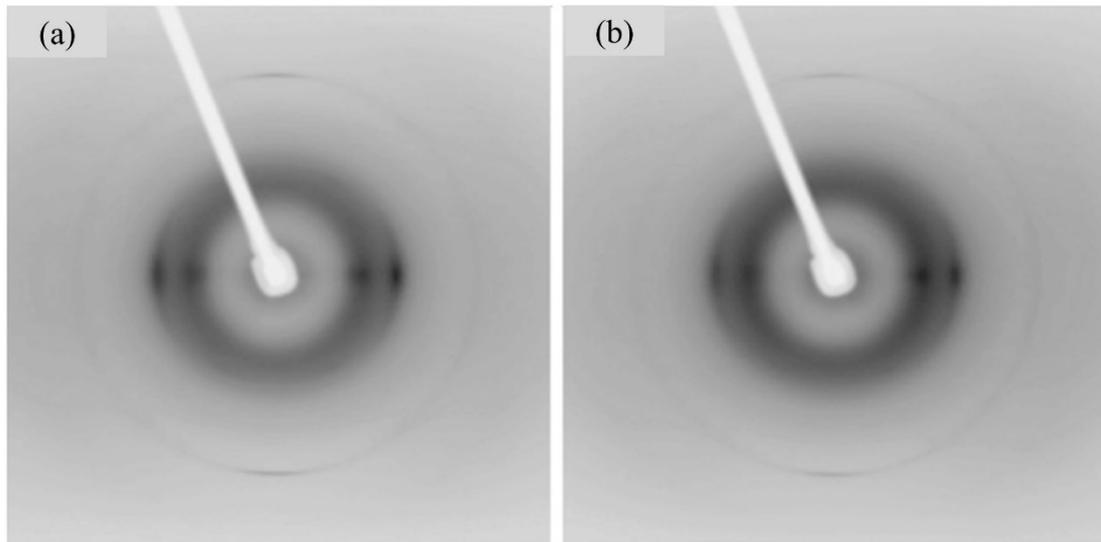
### 3.6. 補足資料



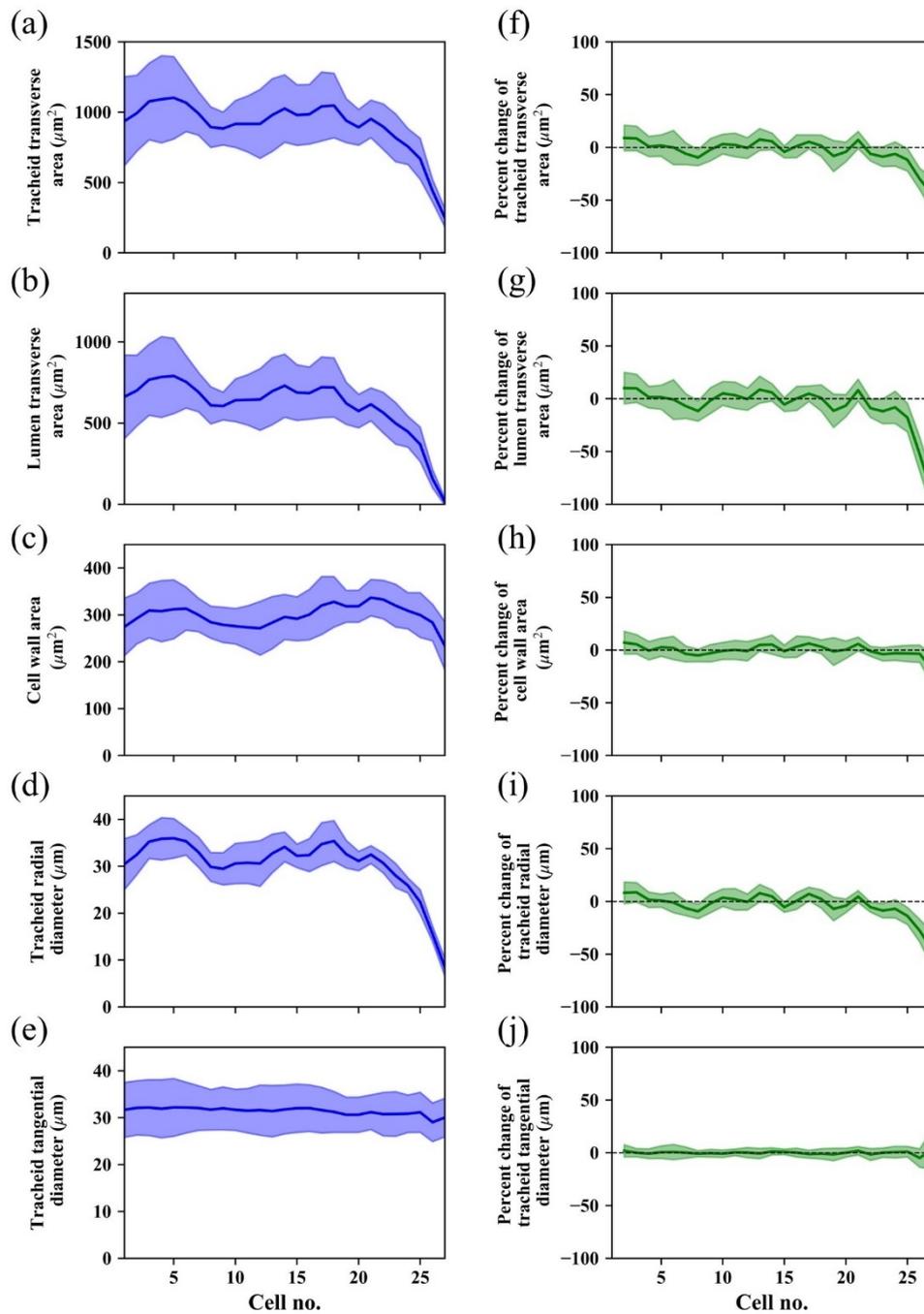
**Fig.S3-1** 仮道管形状パラメーターの自動・手動計測結果の比較. (a) 仮道管放射径, (b) 仮道管接線径, (c) 内腔放射径, (d) 接線壁厚. 赤色の点は切片作製時にできた細胞壁破れを有する仮道管である. 黒色の実線と  $R^2$  は, 自動・手動計測のデータを回帰した時の回帰直線とその決定係数に対応する. 黒色の点線は, 原点を通る傾き 1 の直線である.



**Fig.S3-2** 接線壁厚によるはずれ値処理と、はずれ値に対応するデータについて. (a) 各細胞 no.に対応する接線壁厚. 赤色の点は検出された外れ値に対応する. (b) はずれ値の仮道管を含んでいた仮道管放射列の画像. 赤色の点線枠は樹脂細胞, 黄色および緑色の枠は切片作製時にできた細胞壁破れを有する仮道管に対応する.



**Fig.S3-3** POM による MFA 測定で使用したヒノキサンプルの X 線回折像. (a) 早材仮道管, (b) 晩材仮道管由来の回折像. 回折像に現れているハローは樹脂包埋に使用した非晶性エポキシ樹脂由来である. X 線は 0.3 mm 径にコリメートし, 早晩材別々の回折像を得た. バックグラウンドに現れるハロー由来の成分を除いた後, (200)面由来の方位角分布から Cave 法を用いて MFA を算出した. その結果, 早材・晩材の平均 MFA はそれぞれ  $14^{\circ}$ ,  $10^{\circ}$ であった.



**Fig.S3-4** 仮道管放射列により標準化された仮道管形状パラメーターの年輪内変動. (a) 仮道管断面積, (b) 内腔断面積, (c) 細胞壁面積, (d) 仮道管放射径, (e) 仮道管接線径. (f)-(j) 1つ前の仮道管と比べて時における各パラメーター(a)-(e)の変動率. (a)-(e)において, 実線とそれを囲んでいる帯は, 各パラメーターの年輪内における平均変動とその標準偏差に対応する. 年輪内で最初に生産された細胞を no.1 とし, 標準化した tracheidogram ではそれぞれの仮道管を no.1-no.27 までナンバリングしている.

## 第 4 章

### 日本産広葉樹材の細胞形態定量による 多様性解析

## 4.1. 緒言

双子葉類の進化の過程で広葉樹は大きく繁栄し、現代の地球環境においてその地上の多くを支配することに成功している。広葉樹は葉、幹、根といった自身を構成する器官を多様化させることで、地球上の様々な環境条件での生存競争に適応していった。広葉樹の樹幹部では、細胞の階層構造（細胞壁、細胞形状、細胞配置）に多様化の痕跡が確認される。

$\mu\text{m}$  から  $\text{mm}$  スケールにおける広葉樹材の特徴は、様々な細胞種の存在とその存在比率、それらの特異的な 3 次元配置に観察される。これらの特徴は、木材解剖学者による顕微鏡観察により記録・分類され、樹種識別に利用されてきた[1-3]。  $\text{nm}$  から  $\mu\text{m}$  スケールでは、細胞壁多層構造[4,5]や MFA[6]といった特徴が存在する。特に、二次壁で最も占有率の大きい  $S_2$  層の MFA は木材の物理化学的性質に大きな影響を与えるため、多くの木材科学者の注目を集めてきた[7-9]。このような様々なスケールに渡る階層構造が複雑に組み合わさり、立木における物質輸送や樹体支持といった機能を最適化していると考えられている[10,11]。

広葉樹における多様性や樹種固有の構造最適化戦略への理解を深める上でも、上述したマルチスケールに渡る階層構造特性を一度に測定し、それらの情報を統合して解釈するのが理想的である。従来これを実現する手法が十分に整備されていないという状況ではあったものの、近年の顕微法・画像認識分野における技術発展がその状況を変えつつある。

画像認識分野における大きな進展とは、セマンティックセグメンテーション法の出現と普及である。近年における当該手法の飛躍的な発展は医学、工学、農学等様々な分野に対し影響を与え、その応用が試みられている[12]。植物や樹木細胞に対して当該技術は、細胞定量の前処理である細胞境界予測に適用されており、例えばシロイヌナズナの共焦点顕微鏡画像へ適用可能な技術開発[13]、針葉樹実態顕微鏡画像への適用による仮道管形態定量[14]、広葉樹光学顕微鏡画像への適用による道管要素の評価[15]等に用いられている。以上の事例からもわかるように、当該技術は細胞の顕微鏡画像と組み合わせることで従来コストが大きく実施が困難であった細胞毎の形態評価・定量を実現可能としている。顕微鏡分野において注目すべき技術とは、POM を用いた位相差イメージング技術である。当該技術は動物の生細胞を観察するために開発され、光学異方性を有する極めて微小な構造体 (e.g. 微小管) の定性・定量観察を可能とした[16,17]。事例は少ないものの、この技術は近年、植物や樹木細胞の木口断面切片から MFA を計測するために利用されている (MFA イメージング)。光学顕微鏡の広い視野や細胞壁多層構造、細胞形態、MFA を一度に評価することが可能であるという特長を活かして、草本植物[18]、針葉樹[19]、タケ[20]のナノ・マイクロ細胞構造評価に適用されており、その適用範囲に大きな可能性を秘めている。

本研究では、MFA イメージングとセマンティックセグメンテーションにより、細胞毎の MFA と細胞形態を同時評価する技術を確立し、それを広葉樹に適用することで MFA と細胞形態を明らかにすることを目的としている。上記目的を達成するために、解剖学的特徴が多彩な日本産広葉樹試料を実験に使用した。POM による MFA イメージングの結果を検証するために、XRD による MFA 計測を併せて実施した。

## 4.2. 試料と方法

### 4.2.1. 試料と前処理

本研究では、16科18属20種の日本産広葉樹試料を実験に使用した (Table 4-1). 使用した全ての試料は京大生存圏研究所材鑑調査室にて保管されており、KYOw ID により識別されている木材である (<https://www.rish.kyoto-u.ac.jp/logos/wp-content/themes/Xylarium/>). ナナカマド (*Sorbus commixta*) 以外は全て、正常材部を使用した。また、早材と晩材の解剖学的特徴を含むように、多くの試料では少なくとも2ヶ所からサンプリングを実施し、それらを直径約1mmの円柱状に加工した。

**Table 4-1** 本研究で使用した広葉樹サンプル一覧.

Family	Genus and Species	Japanese name	KYOw IDs	Number of measurement positions
Aceraceae	<i>Acer nipponicum</i>	テツカエデ	11627	2
	<i>Acer rufinerve</i>	ウリハダカエデ	09560	1
Anacardiaceae	<i>Rhus javanica</i>	ヌルデ	09555	2
Aquifoliaceae	<i>Ilex macropoda</i>	アオハダ	09556	2
Araliaceae	<i>Acanthopanax</i>	コシアブラ	09570	1
	<i>sciadophylloides</i>			
	<i>Evodiopanax innovans</i>	タカノツメ	01633	2
Betulaceae	<i>Carpinus tchonoskii</i>	イヌシデ	09532	2
Cerastraceae	<i>Euonymus alatus</i>	ニシキギ	09558	2
Cornaceae	<i>Cornus controversa</i>	ミズキ	10375	2
Fagaceae	<i>Quercus salicina</i>	ウラジロガシ	09538	1
	<i>Quercus serrata</i>	コナラ	09537	1
Hydrangeaceae	<i>Hydrangea petiolaris</i>	ツルアジサイ	09545	1
Lamiaceae	<i>Clerodendrum</i>	クサギ	09579	2
	<i>trichotomum</i>			
Magnoliaceae	<i>Magnolia salicifolia</i>	タムシバ	09541	1
Oleaceae	<i>Fraxinus lanuginosa</i>	アオダモ	09578	2
	var. <i>serrata</i>			
Rosaceae	<i>Sorbus commixta</i>	ナナカマド	09550	1
	<i>Phellodendron amurense</i>	キハダ	09552	2
Rutaceae	<i>Zanthoxylum ailanthoides</i>	カラスザンショウ	09551	1
Trochodendraceae	<i>Trochodendron aralioides</i>	ヤマグルマ	09540	2
Viburnaceae	<i>Vibrunum furcatum</i>	オオカメノキ	10378	2

#### 4.2.2. XRD による MFA 測定

XRD による円柱状サンプルの MFA 測定を実施した。サンプルの繊維回折像は湾曲イメージングプレート単結晶自動 X 線構造解析装置 (R-AXIS RAPID II, Rigaku Corporation) により記録した。50 kV, 100 mA 条件で発生させた Cu-K $\alpha$  線を 0.5 mm 径にコリメートし, (004) 面からの回折を得るため 17°に傾斜させた円柱状サンプルに照射した。(004) 面由来の回折プロファイルにガウス関数をフィッティングすることで, 試料の MFA を取得した。

#### 4.2.3. POM と FLM による画像撮影

XRD による MFA 測定の後, 全てのサンプルは Spurr 樹脂 (Spurr Low Viscosity Embedding Kit, Polysciences) に包埋した。ロータリーマイクローム (Sorvall JB-4, DuPont de Numours, Inc.) とダイヤモンドナイフ (Histo Jumbo, Diatome AG) を用いて 3-5  $\mu\text{m}$  厚の木口断面切片を作製した。切片をスライドガラスに載せた後, 封入剤である Bioleit (Okenshoji Co., Ltd.) もしくはカナダバルサムを数滴垂らし, カバーガラスを被せ封入を行った。

顕微鏡画像撮影は, およそ既報[19]と同様のフローに従った。POM による位相差画像の撮影は MFA 取得のため, FLM による蛍光画像の撮影は木口断面より細胞壁由来のピクセルを抽出するために行った。POM による "three frame algorithm without extinction setting"[21]の実施には, x40 対物レンズ (UPLFLN40XP, NA=0.75, Olympus Corporation), 1/4 波長板 (UTP-137, Olympus Corporation), 干渉板 (45IF546, Olympus Corporation) を装着した偏光顕微鏡 (BX51-P, Olympus Corporation) により実施した。全ての顕微鏡画像はモノクロ CMOS カメラ (ORCA-Fusion BT, Hamamatsu Photonics Inc.; 画像サイズ: 2304 $\times$ 2304 pixels) により撮影を行った。

蛍光画像の撮影は, 蛍光顕微鏡用光源 (U-HGLGPS, Olympus Corporation), x20 対物レンズ (UPLANFL, NA=0.50, Olympus Corporation), 蛍光顕微鏡用フィルターキューブ (U-MWU2; 励起フィルター波長: 330-385 nm, 発光フィルター波長: 420 nm; Olympus Corporation) を装着した顕微鏡 (BX-50, Olympus Corporation) を用いて実施した。全ての画像は RGB カラー CCD カメラ (DP72, Olympus Corporation; 画像サイズ: 4140 $\times$ 3096 pixels) を用いて記録した。

#### 4.2.4. MFA 画像への変換と画像解析

取得した偏光画像は位相差, 方位角画像に変換した後, セルロースの正常光・異常光屈折率 ( $n_o=1.529$ ,  $n_e=1.599$ ; [22]), 細胞壁におけるセルロースの構成比率[23], 木口断面切片厚を用いて方位角画像を MFA 画像へと変換した。

MFA 画像および蛍光画像に対し POC[24] を適用することで, 複数の画像を繋ぎ合わせモンタージュ画像とした。SIFT 法[25] を用いて MFA 画像と蛍光画像から特徴量を抽出し, それらをマッチングさせることで 2 種のモンタージュ画像の画像位置合わせを行った。蛍光

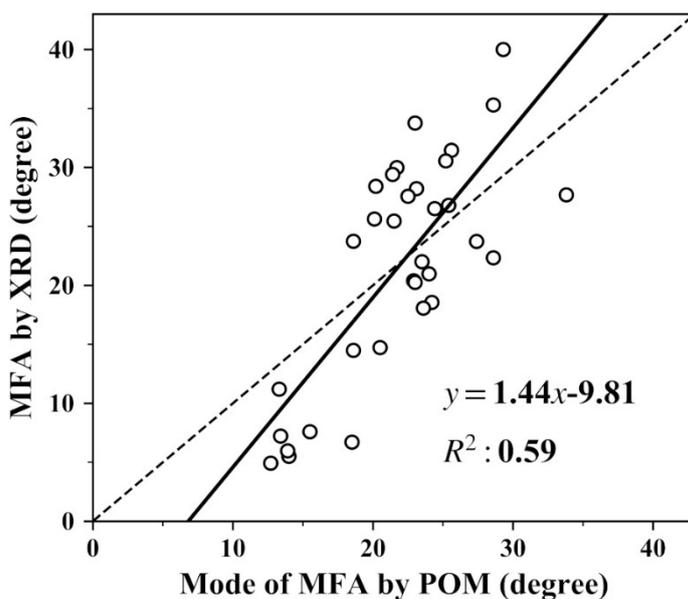
画像の2値化画像から細胞壁のピクセルを選択的に抽出した後、MFA 画像よりMFA ヒストグラムを作成した。当該ヒストグラムより、平均と最頻値を抽出し、これを平均・最頻 MFA 値とした。最頻値は、ヒストグラムに対しカーネル密度推定法より得られた近似曲線より取得した。

細胞毎の MFA および形態評価のための細胞間境界の推定には、深層学習ベースのセマンティックセグメンテーション[26]を使用した。MFA 画像の一部を抜き出し訓練画像とし、GIMP (<https://www.gimp.org/>) を使用して正解画像を作成した。モデル構造には U-Net[27]を使用し、訓練画像とその正解画像を用いてモデル訓練を行った。訓練後のモデルを用いて全ての MFA 画像の細胞間境界の予測を行い、エラーが多い部分は手動による修正を実施した。その後、細胞形態を抽出、細胞毎の MFA 分布とその平均、最頻値を計算した。本研究では、細胞形態として細胞壁厚 (cell wall thickness, CWT) のみを考慮し、当該指標と MFA の関係性について解析を行った。

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. MFA 測定値の比較

POM および XRD を用いて計測した MFA の散布図と、両者を線形回帰した結果を Fig.4-1 に示す. 決定係数  $R^2$  の値から, 両手法より得られた MFA はおおよそ一致する傾向が見られた. また, 回帰直線の傾きおよび切片の値から, POM による計測値が XRD より得られた計測値に比して, 大きな値を取ることが示された.



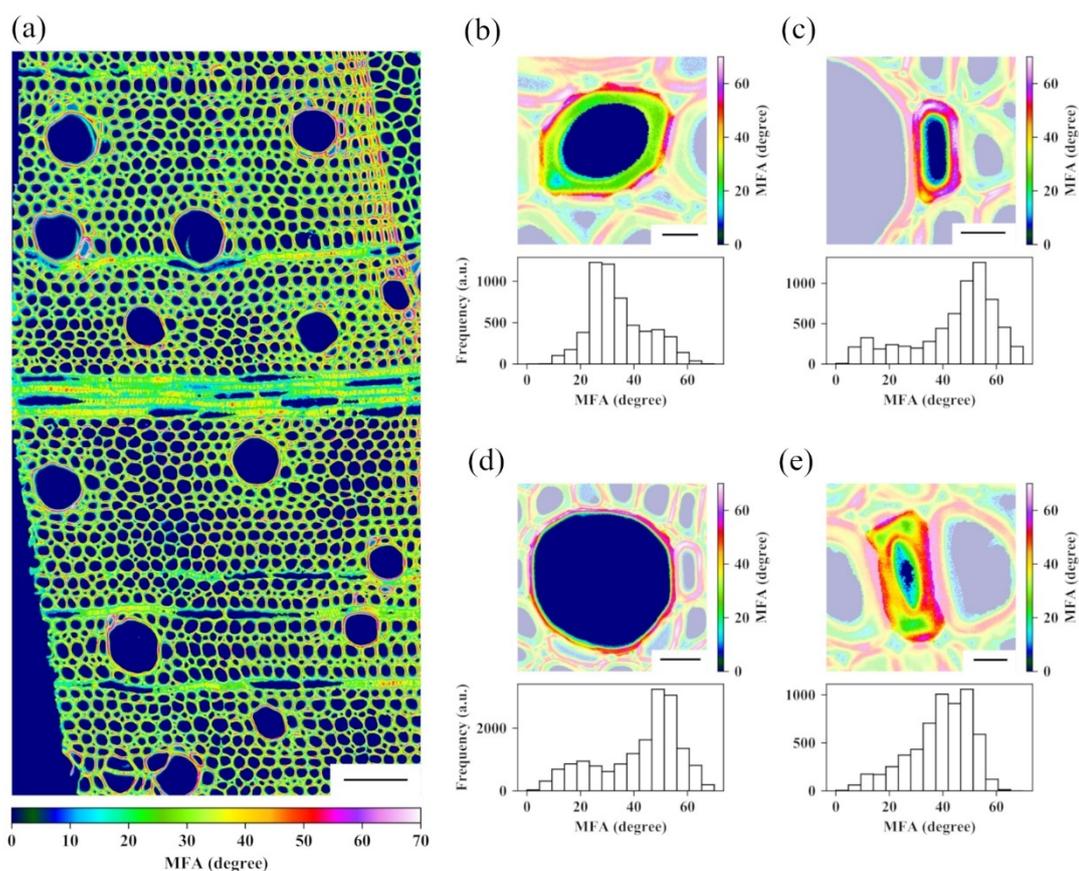
**Fig.4-1** 偏光顕微鏡法 (POM) およびX線回折法 (XRD) による MFA 計測値の散布図. x 軸が POM, y 軸が XRD による計測値に対応する. 実線・点線はそれぞれ, 両手法により得られたデータ点を結んだ回帰直線, および両手法により得られた計測値が等しい場合の直線 ( $y=x$ ) を示している. 図右下部の式は得られた一次回帰式であり,  $R^2$  は当該直線の決定係数である.

#### 4.3.2. 各細胞種の多層構造と MFA 分布の評価

広葉樹材で見られる代表的な細胞種の内軸方向成分 (道管要素, 木繊維, 軸方向柔細胞, 仮道管) について, MFA 画像から MFA や多層構造の可視化を行った.

Fig.4-2 にテツカエデ (*Acer nipponicum*) の切片全体の MFA 画像, それぞれの細胞種 (道管要素, 木部繊維, 道管要素の周辺に出現する随伴状軸方向柔細胞, 年輪境界に出現するターミナル軸方向柔細胞) の MFA 画像およびヒストグラムを示す. 木部繊維が  $30^\circ$  近くの MFA をとっているのに対し, 2 種の軸方向柔細胞と道管要素はさらに大きな MFA ( $50^\circ$  周辺) をとっていることがわかる. 多層構造に着目すると, 木部繊維とターミナル軸方向柔細胞では 3 層構造が確認された一方で, 道管要素と随伴状軸方向柔細胞では明確な多層構造は

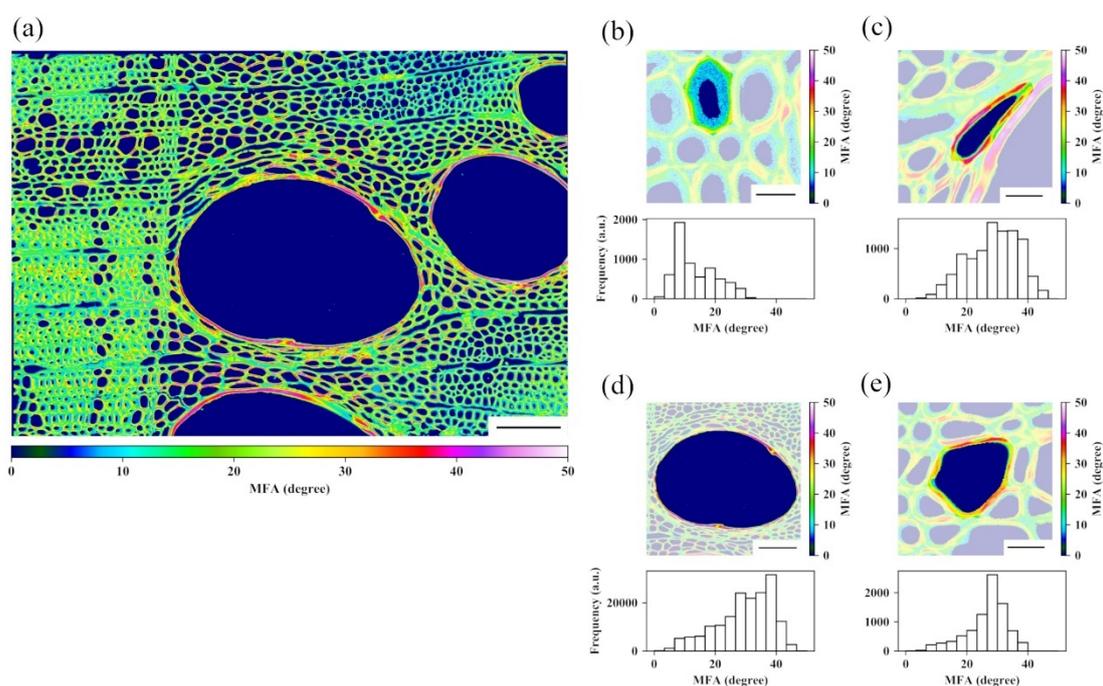
確認されなかった。ターミナル軸方向柔細胞では、内腔側と細胞外周側にはっきりと高 MFA 層が確認されたことと、MFA ヒストグラムの分布形状から、当該細胞種では木部繊維と比較して S<sub>1</sub> 層および S<sub>3</sub> 層が分厚く、各壁層の構成比が異なる可能性が考えられる。木部繊維に着目すると、Fig.4-2 (a)上部と下部では CWT が厚壁と薄壁のものが存在していることがわかる。これは、カエデ属に見られる 2 種類の木部繊維の可能性が考えられる[28]。MFA 画像を確認する限りでは、両者の MFA に顕著な差は見られなかった。



**Fig.4-2** テツカエデ (*Acer nipponicum*) における細胞種に応じた MFA 画像および MFA 分布。(a) 切片全体の MFA 画像 (スケールバー: 75  $\mu\text{m}$ ), (b) 木部繊維 (スケールバー: 5  $\mu\text{m}$ ), (c) 随伴状軸方向柔細胞 (スケールバー: 10  $\mu\text{m}$ ), (d) ターミナル軸方向柔細胞 (スケールバー: 5  $\mu\text{m}$ ) の MFA 画像および MFA ヒストグラム。ヒストグラムはそれぞれの MFA 画像 (b)-(d) でハイライトされた細胞より算出している。

Fig.4-3 にコナラ (*Quercus serrata*) の切片全体の MFA 画像、それぞれの細胞種 (早材・晩材道管要素, 木部繊維, 周囲仮道管) の MFA 画像およびヒストグラムを示す。木部繊維は 10°以下という極めて小さい MFA を示す一方で、その他細胞種はその MFA ピークトップが

30-40°と高い値をとっていることがわかる。ただし、周囲仮道管は軸方向に通直ではなくその3次元的配置が極めて複雑であるため、今回の結果が実際のMFAをそのまま反映しているわけではないことについて留意する必要がある。Fig.4-3(a)の画面左側の晩材部において厚壁の木部繊維が20°周辺のMFA値をとっていることが確認されるが、これは切片作製の際に発生したアーティファクトによる影響を大きく受けている可能性が高いことがわかっている (Fig.S4-3 参照)。唯一多層構造が確認されたのは木部繊維 (細胞外周と内側の2層) と晩材導管要素 (コーナー部で3層構造を確認) のみであった。



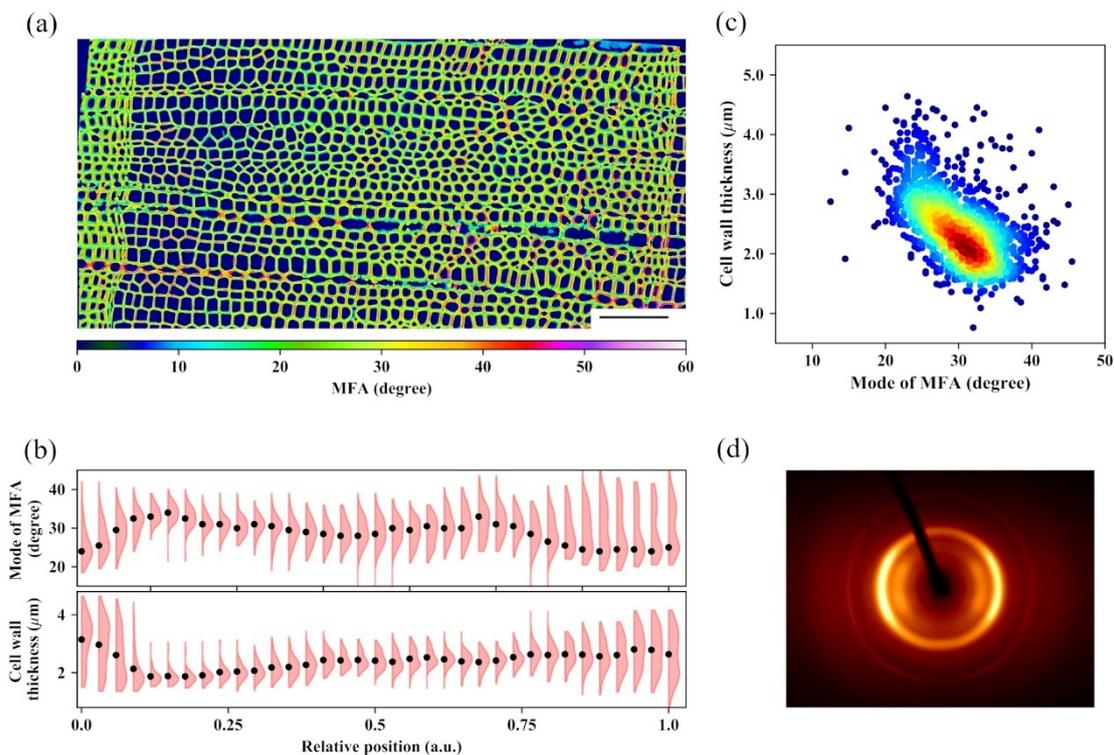
**Fig.4-3** コナラ (*Quercus serrata*) における細胞種に応じたMFA画像およびMFA分布。(a) 切片全体のMFA画像 (スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ ), (b) 木部繊維 (スケールバー: 10  $\mu\text{m}$ ), (c) 周囲仮道管 (スケールバー: 15  $\mu\text{m}$ ), (d) 早材道管要素 (スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ ), (e) 晩材道管要素 (スケールバー: 15  $\mu\text{m}$ ) のMFA画像およびMFAヒストグラム。ヒストグラムはそれぞれのMFA画像 (b)-(e) でハイライトされた細胞より算出している。

#### 4.3.3. MFA と CWT の関係性

以下では、道管要素の有無および環孔性の異なる樹種を対象に、MFA と CWT の関連性について得られた代表的な結果を示す。

## 無道管材

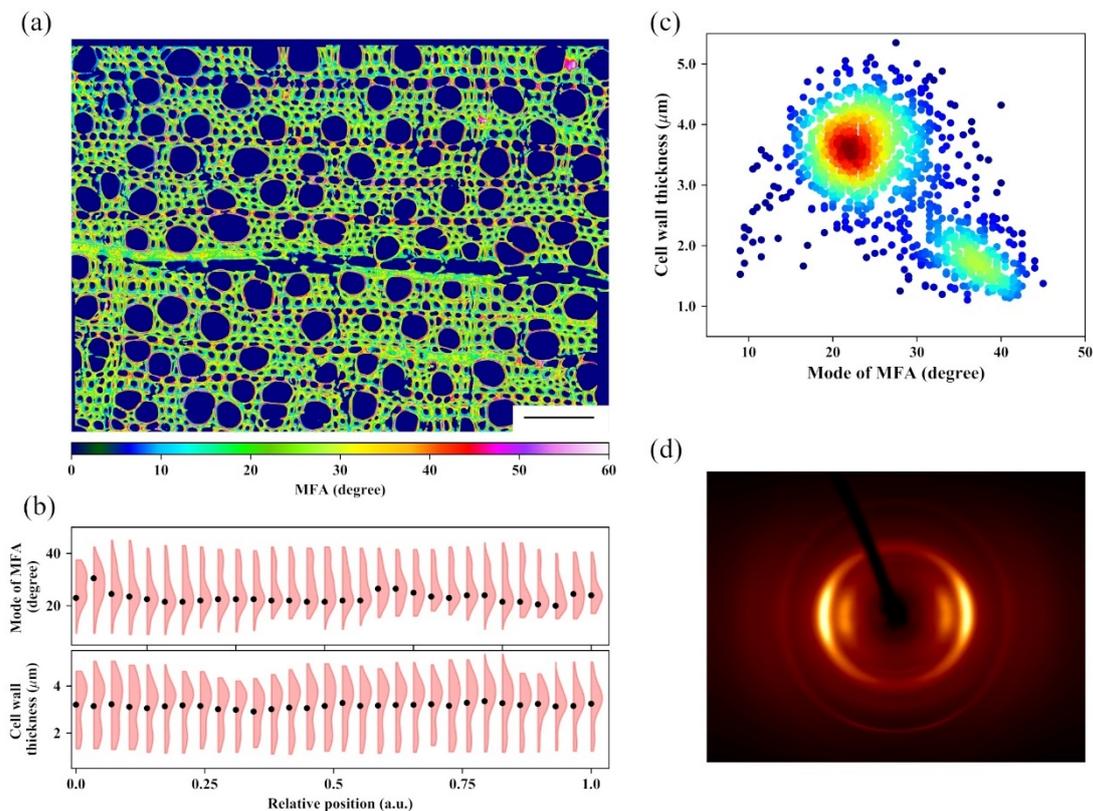
無道管材であるヤマグルマ (*Trochodendron aralioides*) の MFA 画像, MFA および CWT の年輪内変動, MFA と CWT の散布図, 繊維回折像を Fig.4-4 に示す. 本樹種は早晚材で細胞放射径と CWT がはっきりとした違いを示し, 針葉樹に類似した細胞形態を有していることがわかる. また, 軸方向成分の殆どが仮道管より構成されていることがわかっている[2]. 晩材から早材へと移行した直後に (相対位置:0.1) 急激な MFA の増加と CWT の減少が観測され, 早材とみられる領域 (相対位置:0.1-0.25) では MFA の大きい薄壁の仮道管により占められていることがわかる. 早晚材移行部および晩材では (相対位置:0.25-1.0), MFA では徐々に減少しながら晩材で急激な減少 (相対位置:0.7-1.0), CWT では増加し続ける傾向にあった. MFA・CWT とともに早材から晩材へ移行するに伴い分布の裾が広がる傾向にあるが, これは晩材側における軸方向柔細胞の出現頻度増加が影響していると考えられる. MFA と CWT の散布図より, 両パラメーターの間には中程度の負の相関 ( $R = -0.52$ ) が確認された.



**Fig.4-4** ヤマグルマ (*Trochodendron aralioides*) の MFA と CWT の年輪内変動, 両パラメーターの関連性, および繊維回折像. (a) 切片全域の MFA 画像 (スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ ), (b) MFA (上側) および CWT (下側) の年輪内変動に対応するハーフバイオリンプロット, (c) MFA vs CWT の散布図, (d) 繊維回折像. ハーフバイオリンプロットでは, (a) の左端を 0, 右端を 1 とした相対距離である. 黒点は, それぞれのハーフバイオリンプロットの最頻値に対応する. 散布図において, 赤色および青色の領域は, カーネル密度推定によりデータ密度が高いもしくは低いと判定された領域である. MFA, CWT は 1141 細胞より計測を行った.

## 散孔材

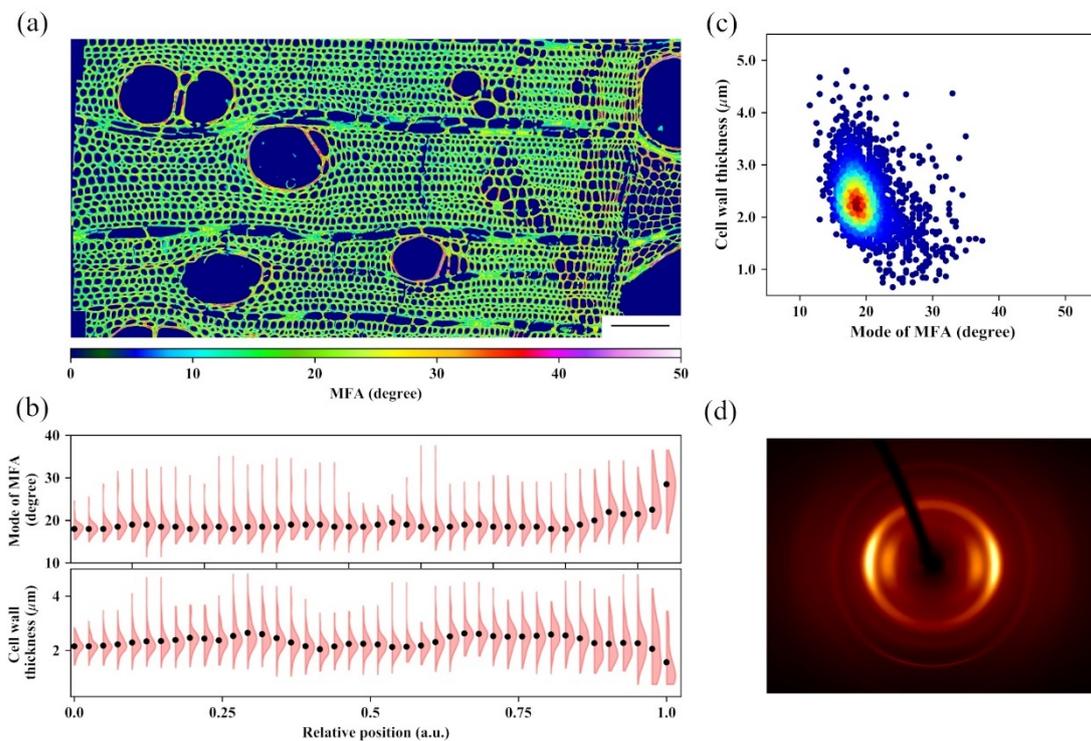
散孔材であるオオカメノキ (*Viburnum furcatum*) の MFA 画像, MFA および CWT の年輪内変動, MFA と CWT の散布図, 繊維回折像を Fig.4-5 に示す. MFA, CWT の年輪内変動より, 両者ともに年間を通してほぼ一定の値をとっていることがわかる. MFA vs CWT の散布図では, MFA が小さく CWT の厚い細胞と, MFA が大きく且つ CWT が薄い細胞よりなる 2 つのクラスターが観測された. 各細胞の平均 MFA および CWT を顕微鏡画像に投影した結果, 2 つのクラスターの内前者は木繊維, 後者は放射柔細胞および道管要素より構成されることが明らかとなった (Fig.S4-1 参照). 岡野ら (1972)[29]によると, 散孔材ブナ (*Fagus crenata*) において MFA および繊維長は年輪内を通してほぼ一定であることが報告されている. CWT の分布が広いミズキ (*Cornus controversa*) を除くと, 本研究で利用した散孔材では, 年輪内で MFA・CWT とともにほぼ一定値をとるという同様の傾向が観測された (data not shown).



**Fig.4-5** オオカメノキ (*Viburnum furcatum*) の MFA と CWT の年輪内変動, 両パラメーターの関連性, および繊維回折像. (a) 切片全域の MFA 画像 (スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ ), (b) MFA (上側) および CWT (下側) の年輪内変動に対応するハーフバイオリンプロット, (c) MFA vs CWT の散布図, (d) 繊維回折像. ハーフバイオリンプロットでは, (a) の左端を 0, 右端を 1 とした相対距離である. 黒点は, それぞれのハーフバイオリンプロットの最頻値に対応する. 散布図において, 赤色および青色の領域は, カーネル密度推定によりデータ密度が高いもしくは低いと判定された領域である. MFA, CWT は 1225 細胞より計測を行った.

## 環孔材

環孔材であるヌルデ (*Rhus javanica*) の MFA 画像, MFA および CWT の年輪内変動, MFA と CWT の散布図, 繊維回折像を Fig.4-6 に示す. 早晚材移行および晩材に着目すると (相対位置:0.0-0.9), MFA・CWT ともに変化を伴ってはいるもののおよそ一定値をとっていることがわかる. その一方で, 早材で出現する木繊維は移行部および晩材の木繊維に比べて高 MFA (25-30°) かつ薄壁であり, 早材に着目した MFA 画像においても同様の傾向が確認された (Fig.S4-2 参照). MFA vs CWT の散布図では, 両者の間に微弱な負の相関 ( $R = -0.36$ ) が確認されており, コナラ属の 2 種 (*Quercus serrata*, *Quercus salicina*) とキハダ (*Phellodendron amurense*) においても同様の傾向がみられた (data not shown).



**Fig.4-6** ヌルデ (*Rhus javanica*) の MFA と細胞壁厚 (CWT) の年輪内変動, 両パラメーターの関連性, および繊維回折像. (a) 切片全域の MFA 画像 (スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ ), (b) MFA (上側) および CWT (下側) の年輪内変動に対応するハーフバイオリンプロット, (c) MFA vs CWT の散布図, (d) 繊維回折像. ハーフバイオリンプロットでは, (a) の左端を 0, 右端を 1 とした相対距離である. 黒点は, それぞれのハーフバイオリンプロットの最頻値に対応する. 散布図において, 赤色および青色の領域は, カーネル密度推定によりデータ密度が高いもしくは低いと判定された領域である. MFA, CWT は 2538 細胞より計測を行った.

## 4.4. 考察

### 4.4.1. 手法毎により得られる MFA の評価と利用

XRD より得られる (004)面からの回折パターンは、樹木細胞における MFA を直接反映することができる点が特長である。今回の実験では、回折像のメインピークのみを対象とすることで、各壁層の MFA の内最も存在比率が高く且つ低角に出現する  $S_{2}$ 層由来の MFA を選択的に計測することが可能である。一方で、POM による MFA 測定はその原理上、樹木細胞壁中のセルロースが生じる位相差より間接的に MFA を算出している。この位相差は MFA だけでなく、例えばセルロースの化学的性質 (e.g. 樹木細胞壁中のセルロース構成比率[1]; セルロースの結晶性[30]) にも影響を受けることがわかっている[18,19]。今回 POM により算出している全ての MFA 値は  $S_{2}$ 層におけるセルロースの化学的性質に準拠しているため、セルロース比率と結晶性の低いその他の壁層の MFA は実際の値より小さく見積もられることとなる。結果として、 $S_{2}$ 層由来の MFA とその他壁層由来の MFA が MFA 分布上で一部もしくは大部分が重複することとなり、XRD のように  $S_{2}$ 層のみの寄与を単離することが一般的には困難となる。加えて、MFA が小さく且つ CWT の厚い細胞ではしばしば、切片作製時のアーティファクトとして細胞壁の MFA が真値よりずれてしまう現象が発生してしまうことがわかっている (Fig.4-3(a), Fig.S4-3 参照)[19,31,32]。上記2点は  $S_{2}$ 層 MFA を評価する上で、実際の MFA より大きく見積もる原因となるため、Fig.4-1 において XRD に比して POM の計測値が大きくなる傾向にあったと推測される。したがって、POM を用いた MFA 計測を実施する際は、試料調製や得られたデータの解釈 (特に平均、標準偏差といった要約統計量) において細心の注意が必要である。

### 4.4.2. 細胞種に応じた MFA, 壁層構造とその機能について

細胞種毎の MFA と壁層構造については、広葉樹で頻出する代表的な細胞種をカバーすることのできるテツカエデおよびコナラを例として使用した。テツカエデのターミナル軸方向柔細胞、コナラの早材・晩材道管要素の多層構造について、MFA イメージングによって観測された結果は透過型電子顕微鏡による類縁樹種の直接観察結果とよく一致していることがわかる[33,34]。多層構造の存在が報告されているにも関わらずそれが確認されなかった一部の細胞種 (e.g. テツカエデの随伴状軸方向柔細胞、コナラの木部繊維) は、特定の壁層が光学顕微鏡分解能[35]で確認するには困難なほど薄壁であった可能性が考えられる。実際、*Quercus Robur* の木部繊維は 3 層構造であることがわかっているが、 $S_{3}$ 層は極めて薄壁であるため、光学顕微鏡での観察は不可能であることが予想される[34]。また、コナラの晩材導管要素においても多層構造の確認は困難であったものの、細胞壁厚が厚くなるコーナー部において 3 層構造が確認されたのも光学顕微鏡分解能が影響したためであると考えられる。多層構造について定性を行う場合、導管要素や軸方向柔細胞等、CWT が薄い細胞種については、使用する対物レンズに応じた光学顕微鏡の分解能について常に考慮し[36]、可能であ

れば電子顕微鏡等の手法を併用しながらその構造特性を決定するのが推奨される。

道管要素に着目すると、本実験の結果では対象とした全ての樹種で木繊維に比して当該細胞種の MFA は高い傾向を有していた。高 MFA 及び道管要素の木化パターン[37,38]といった化学的性質は当該細胞種では水分通導に対する圧力抵抗を向上させることに寄与している可能性が示唆されており[5]、主に物質輸送に特化した機能分化を実現していることがわかる。導管要素と共に物質輸送をサポートし且つ通水機能停止 (gas embolism) 対応のために存在するとされる周囲仮道管[39]も同様に高 MFA であり、且つ木部繊維と比較するとリグニン量も多いことが確認されている[34]。物理・化学的性質は導管要素と類似する点が多いため、当該細胞種も同様に水分通導に対する圧力抵抗を意識した形態をとっている可能性が高いと考えられる。樹体支持機能に特化した細胞種である木部繊維に着目すると、道管要素と比べ厚壁で低 MFA の傾向にあった。加えて、壁孔が小さくその出現頻度が低く通水機能が考慮されていない点を併せて考えると[40]、軸方向に対する樹体支持に適した機能分化を果たしていることがわかる[7]。導管要素と木部繊維に限定すれば、CWT および MFA に着目することで、それぞれの樹種における当該細胞種の機能や環境適応について情報を得ることができる可能性がある[41]。

その一方で、細胞壁構造とその機能との間における関係性に不明点が多いのが放射方向・軸方向柔細胞である。これら柔細胞の役割として、構造多糖ではない多糖の貯蓄および輸送、菌等の外敵からの防御、水分・ミネラル分の貯蓄、辺材から心材への遷移、および力学的な寄与が挙げられている[42]。壁層構造やその MFA について議論する場合、最も着目される論点はその力学的寄与である[43]。放射柔細胞については、広放射組織を対象として力学試験が実施されており、そのサイズによらず当該組織の力学的寄与が存在している[44,45]ことから、放射柔細胞の壁層構造が当該結果に影響を与えている可能性は高い。ただし、軸方向柔細胞の壁層構造が力学的にどのような寄与をしているかは不明であり、またその MFA についても報告された事例はほとんど存在していない。

以下では、テツカエデを対象として柔細胞の内、木口断面でその壁層構造や MFA が確認可能な軸方向柔細胞に焦点を当てて議論を進める。解剖学的観点から見ると、軸方向柔細胞はその配置および機能により随伴軸方向柔組織 (Paratracheal axial parenchyma) と非随伴軸方向柔組織 (Apotracheal axial parenchyma) の 2 種類に分類されており[40,46,47]、その配置パターンは樹種識別にも使用されている[2]。Fig.4-2(c)のテツカエデ導管要素周囲に配置される随伴軸方向柔細胞は、高 MFA の壁層により構成されており、CWT は隣接する木繊維と大きな差異がみられないという結果が得られている。随伴上軸方向柔細胞の主だった機能としては、光合成生産物である糖の貯蓄およびそれをを用いた浸透圧調整[45,46]や気泡発生による通水機能停止への防御機構[40,48]が挙げられることが多い。これらの機能を考慮すると、随伴軸方向柔細胞の壁層構造及び MFA に求められる力学的機能は、道管要素との間に生じる圧力勾配に耐えうることであり、したがって軸方向柔細胞が高 MFA を

とることとも矛盾しない仮説である。加えて、カエデ属のイタヤカエデでは軸方向柔細胞の内、随伴軸方向柔細胞にのみ通常の3層の二次壁に加えアモルファスレイヤーが存在していることが知られており[33]、当該壁層も既述の機能に関連していると予想される。テツカエデで見られるもう1種類の軸方向柔細胞は年輪境界に形成されるターミナル軸方向柔細胞である(Fig.4-2(e))。当該細胞の機能は、一部の樹種で褐色腐朽菌に対する防御機能を有する[49,50]こと以外ほとんど明らかとなっていないが、本実験で得られたMFA画像を確認すると通常の木繊維と同様2次壁の3層構造よりなり[33]、S<sub>2</sub>層MFAおよびCWTは木繊維と同程度であることがわかる(Fig.4-2(e))。従って、随伴軸方向柔細胞に比してターミナル軸方向柔細胞では軸方向に対する力学的寄与を意識した細胞壁構造を有していることが可能である。また、随伴軸方向柔細胞で見られるようなALはターミナル軸方向柔細胞では見られない[33]ことから、その細胞壁の壁層構成も比較的木繊維に類似している可能性が考えられる。細胞壁構造で木繊維と唯一異なる点はS<sub>2</sub>層以外の壁層の構成比であり、細胞壁よりターミナル軸方向柔細胞の機能を類推する上で重要と考えられるが、詳細な点は現状不明である。当該点を明らかにするためには、MFA・CWTだけでなく、免疫標識法[51]やその他顕微手法[52-55]を利用した細胞壁層の化学的性質も併せて取得し、その細胞種における機能を類推していく必要がある。軸方向柔細胞は細胞の配置によりその機能が異なる可能性は極めて高いため、当該細胞種についてその点を今後の課題としたい。

#### 4.4.3. 広葉樹木部繊維、仮道管のMFA, CWTの年輪内変動とその機能

4.3.3の結果より、無道管材のヤマグルマと一部の環孔材において、MFAとCWTの間には負の相関が存在する一方で、多くの環孔材と散孔材では両パラメーターの間に明確な相関関係は確認されなかった。細胞形態が針葉樹と類似しているヤマグルマにおいては、早材部では通水効率を優先した大口径薄壁の仮道管、晩材部では樹体支持機能に特化した厚壁且つ低MFAの仮道管を生産することにより、仮道管という単一の細胞種のみで通水・樹体支持に関連した構造最適化を実現していると考えられる[56]。その一方で、一部の環孔材においてMFAとCWTとの間に負の相関関係が見られるのは興味深い点である。ヤマグルマなど無道管材を除いた一般的な広葉樹では、針葉樹と違って異なる形態的特徴を有した様々な細胞種を生産することで機能分化を実現している。例えば上記に記載している通りであるが、道管要素であれば物質輸送、木部繊維だと軸方向支持に特化したマイクロ・ナノスケール細胞形態を確認することができる。重力刺激に対する応答で生じる引張あて材[57]を除けば、木部繊維のMFA・CWTは年輪内を通してほぼ一定であったとしても樹体支持機能は十分発現できることが予想され、実際に今回対象としたほとんどの環孔材と散孔材ではそのような傾向を示している。ところが、環孔材の中でもヌルデ等では機能分化を果たしているにも関わらず、早材に出現する薄壁且つ高MFAの木部繊維、移行および晩材で出現する厚壁且つ低MFAの木部繊維の2種類が存在しており(Fig.4-6, Fig.S4-3)、前者は明らか

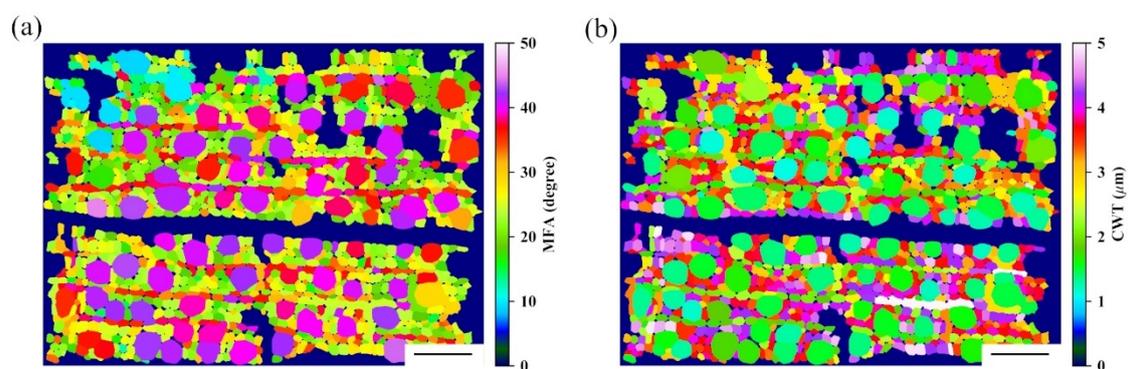
に軸方向支持に対して適した形態を有しているとは言い難い。このような木繊維の多様性は一部の広葉樹において確認されているが、このような多様性を合理化することのできる機能面での説明は、カエデ属等に見られる *living fiber* を除いて存在していない[28,58]。しかしながら、環孔材の早晚材で特徴的な差異がある導管要素の形成に着目すると、そのメカニズムは不明であるものの道管要素直径は形成時における植物ホルモンの量や質に影響を受けている可能性が指摘されており[59,60]、環孔材ではそのような季節変動の影響を導管要素が大きく受けている可能性は否定できない。針葉樹においても、植物ホルモンの季節依存性が確認されており、それが針葉樹における年輪内の仮道管形態変化に影響を与えていることが報告されており[61]、広葉樹材の木繊維や仮道管に対して同様の傾向が現れている可能性が考えられる。今回一部の樹種で見られた木繊維の多様性は、それが出現する科が限定されているため進化の過程における分化の観点からも非常に興味深いトピックである[58]。当該点については細胞形態計測だけでなく、樹木生理を含めた包括的な研究および議論を推し進めていく必要がある。

## 4.5. 結語

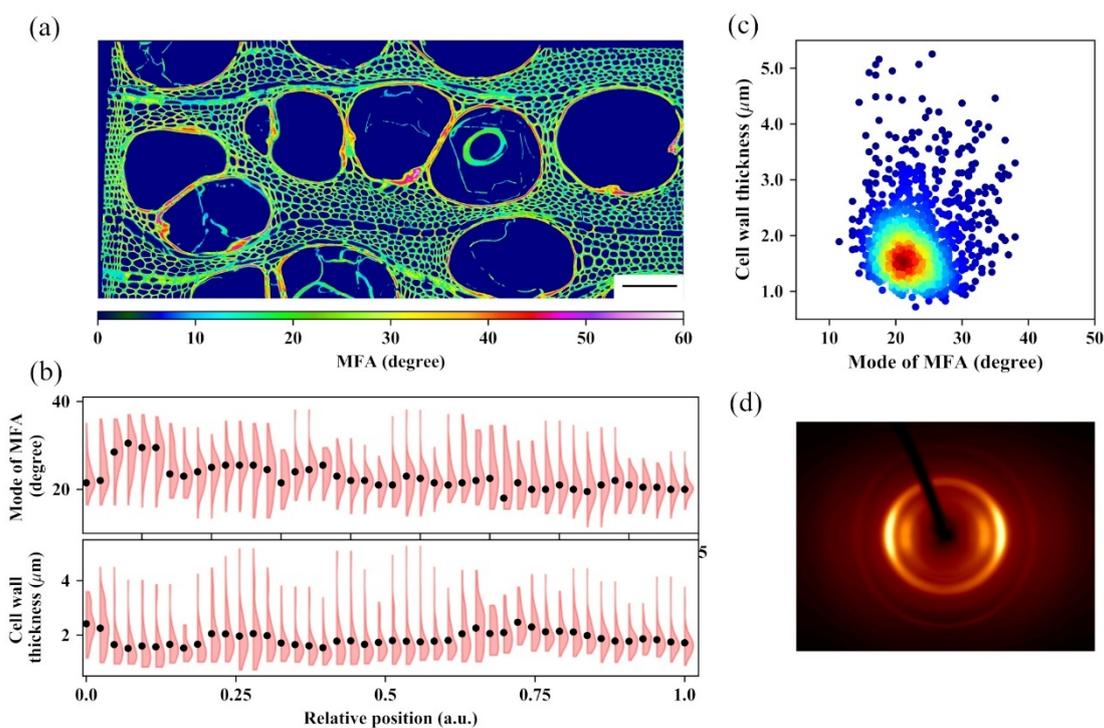
本研究では、様々な形態的特徴を有する日本産広葉樹を対象として、細胞毎の MFA や形態 (特に CWT) という観点からその多様性と両者の関連性を定量データに基づいて議論を行った。MFA 画像およびそこから得られる MFA ヒストグラムから、樹種特異的な細胞種に依存した多層構造および MFA が可視化することに成功した。加えて、MFA と細胞形態との関係性[6]を評価する上で、MFA 画像とセマンティックセグメンテーションは有効な手段になりうることを示された。上記手法を利用することにより、無道管材のヤマグルマと一部の環孔材 (ヌルデ) の木繊維において、MFA と CWT の間に微弱-中程度の相関がみられることが確認された。

POM を用いた MFA 測定の利点は、その他の顕微鏡手法 (e.g. 紫外線顕微鏡[52], 蛍光顕微鏡[53,54], ラマン顕微鏡[55]), 免疫蛍光標識[51], 画像解析[62]と柔軟に組み合わせることが可能であり、MFA だけでなく樹木細胞の形態やトポケミストリー等を同時評価可能とする応用展開性の高さにある。これらの手法を組み合わせることで、樹木細胞の二次壁堆積やその制御[63], 気候などの外的要因が樹木細胞形成に与える影響[64]等、様々な視点から樹木細胞の多様性にみられる生存戦略を評価可能になると予想される。また、樹木細胞は天然の高分子複合材料であることから、当該手法により将来的に得られる知見は木質バイオマスの利用に関連した材料科学やセルロース科学を発展させるポテンシャルを有していると考えている。

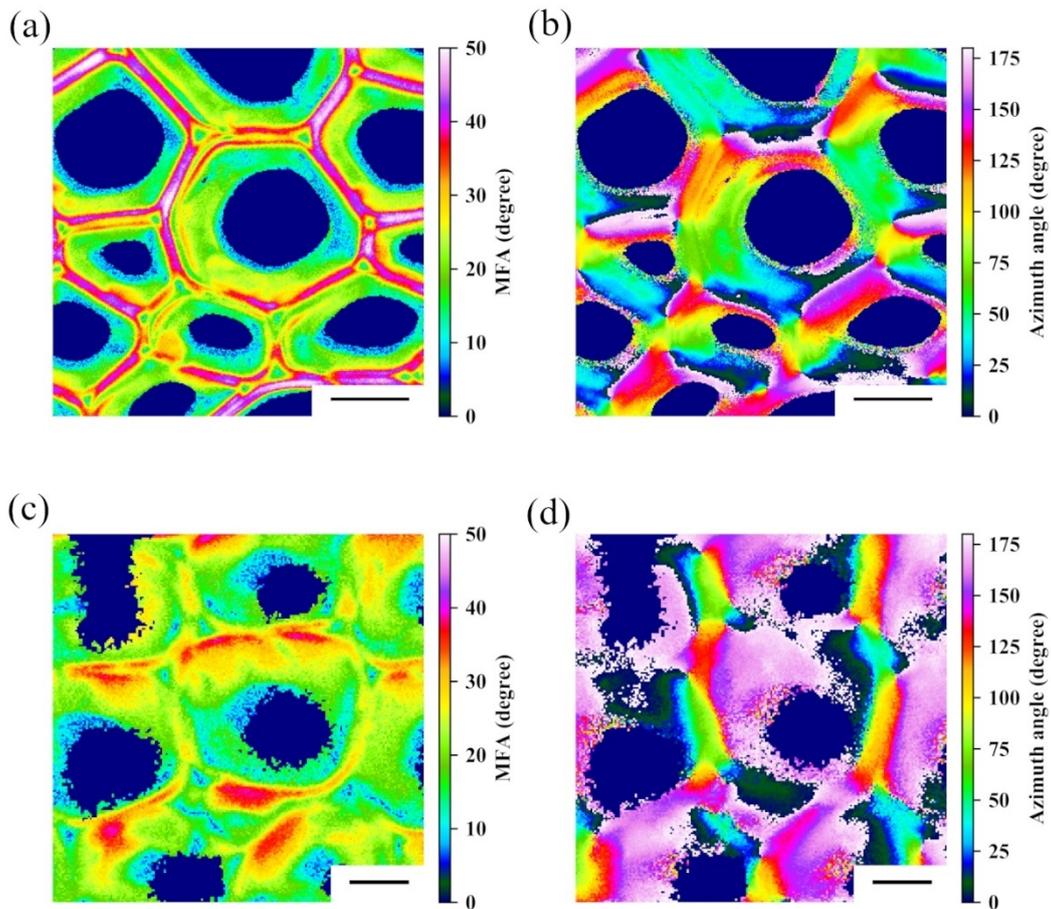
## 4.6. 補足資料



**Fig.S4-1** オオカメノキ (*Viburnum furcatum*) における細胞毎の MFA および CWT の可視化画像. (a) MFA 画像, (b) CWT 画像. スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig.S4-2** ヌルデ (*Rhus javanica*) 早材の MFA と CWT の年輪内変動, 両パラメーターの関連性, および繊維回折像. (a) 切片全域の MFA 画像 (スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ ), (b) MFA (上側) および CWT (下側) の年輪内変動に対応するハーフバイオリンプロット, (c) MFA vs CWT の散布図, (d) 繊維回折像. ハーフバイオリンプロットでは, (a) の左端を 0, 右端を 1 とした相対距離である. 黒点は, それぞれのハーフバイオリンプロットの最頻値に対応する. 散布図において, 赤色および青色の領域は, カーネル密度推定によりデータ密度が高いもしくは低いと判定された領域である.



**Fig.S4-3** 切片作製時のアーティファクトが MFA および方位角に与える影響の可視化例. (a) 切片作製時のアーティファクトが見られないイヌシデ (*Carpinus tschonoskii*) の MFA 画像および (b) 方位角画像. スケールバー: 10  $\mu\text{m}$ . (c) 切片作製時のアーティファクトが確認されたウラジロガシ (*Quercus salicina*) の MFA 画像および (d) 方位角画像. スケールバー: 5  $\mu\text{m}$ . (b) の方位角画像では, 細胞壁に沿って方位角が  $0^\circ$  から  $180^\circ$  にかけて遷移していることがわかる. その一方で, (d) の方位角画像では方位角が  $0^\circ$  もしくは  $180^\circ$  近辺の値のみを示している. このようなアーティファクトは, 細胞壁切削の際, セルロースの配向が維持されず切削方向に沿ってなぎ倒されてることで発生している[31,32]. 本図において, 切片作製時の切削方向は図の水平方向に対応している.

## 第 5 章

### 結言

## 5.1. 本研究の総括

第 1 章にて、本研究の目的は樹木細胞の階層構造を多元的に計測可能とする新規手法の開発、および当該手法群が樹木細胞形態の多様性と機能[1-6]に関して新たな知見を提供可能であるかその有効性を検証することであると述べた。これは既存の木材解剖学分野が重視する形態観察では樹木細胞形態を包括的に議論する上で必ずしも十分でなく、形態測定学や情報学的な視点がこの点を補うるのではないかという問題提起に端を発している。

前者について、本研究では顕微鏡イメージング (主に POM による MFA イメージング[7]) と画像解析技術 (深層学習による画像識別[8]とセマンティックセグメンテーション[9,10]) の両者を、木材解剖学に対して最適化した形で組み合わせた新規手法の開発を実施した、特に MFA イメージングとセマンティックセグメンテーションを組み合わせた cell-by-cell 多元的細胞形態計測技術は、細胞壁 MFA, 多層構造, 細胞断面形態と細胞配置情報を一気通貫でつなぎ合わせることを可能とすることが示された。

後者のうち樹種識別について、形態情報と深層学習の利用により従来識別が困難であった針葉樹材 2 樹種が高い精度で識別可能となったことから、従来形態的に特徴が少ないとされた仮道管において樹種固有の形態特性が存在する可能性を示唆する結果が得られた (第 2 章)。ただしモデル説明手法等による結果解釈の面では不十分な点があったため、両樹種の識別可能とする形態特徴の同定にまでは至らなかった。樹種細胞形態は遺伝形質および獲得形質の両者によってその多様性が生じていると考えられる。現段階では定性的な顕微鏡観察により明確に遺伝形質と判断可能な細胞形態特徴を除くと、特定の形態指標についてどこまでが遺伝および獲得形質による影響で形作られているか明確な線引きは出来ていない。定量的な形態指標を基にした樹種識別では、上記の点を解消するため種々の環境に生息する同一樹種の形態比較の実施とデータベース化が必要不可欠であり、その実現には時間を要すると予想される。

針葉樹材・広葉樹材の細胞形態について、針葉樹では仮道管の 1 年輪内変動、広葉樹では樹種に依存した異なる細胞種やその配置に着目して解析を実施した (第 3 章および第 4 章)。針葉樹材の場合、仮道管の MFA および断面形状の同時追跡により年間を通した仮道管の詳細な機能変遷を追跡することが可能となった、興味深い点として、早晚材移行において仮道管 MFA と断面形状は必ずしも連動していないこと、また早材部仮道管で両者は一定でなく変動しており且つその動きは連動していることが確認された。MFA と外的環境との間に相関関係がみられる報告[11]があることから、早材部の変動は外的環境を反映した結果である可能性が示唆される。MFA イメージングの制約より早晚材移行が急激な材に対して当該手法を適用することは困難であるものの、早材仮道管細胞形態の多元的計測により当該細胞種の生態的応答[12,13]に関する理解の深化に繋がることが予想される。広葉樹材の場合、樹種に応じて複数の細胞種が多種多様な配置をしているため、これらの MFA や細胞断面形状を評価することは従来極めて困難であった[14]。しかしながら、本研究で開発した手法はこの両課題について同時に解消することで、細胞形態多様性およびその機能について体系

的に議論可能とすることに成功した。特に軸方向柔細胞については、MFA や多層構造、細胞の配置といった細胞形態情報と既存の比較解剖学的知見[1,4,15,16]を組み合わせることで、複合的な視点により当該細胞種における構造と機能の関係性について議論することが可能となった。また、MFA と CWT の計測を通して一部の樹種では木部繊維の形態に多様性が確認された。このような多様性がどのような意味やメカニズムを以て生じているかは現状不明であるため、当該点は定量計測をベースとした比較解剖学研究を推し進める必要があると考えられる。

開発手法の応用に関する結果を総合すると、POM および画像解析を利用した多元的細胞形態計測手法は、樹木細胞の多様性と機能の解明に向けた基礎研究を遂行する上で重要な地位を確立するのに十分な潜在能力を保有していると考えられる。この潜在能力を引き出し樹木およびその細胞への理解をより深化させるには、木材解剖学より得られた細胞形態情報に関連諸分野（樹木生態学、生理学、遺伝学他）の知見を統合していくことが必要不可欠である。細胞形態の多元的計測手法を含めた技術革新を通して、樹木細胞という基本単位をベースに木材解剖学分野が諸分野の知見を繋ぎ合わせる横串として機能することが今後期待されると考えている。

## 5.2. 今後の課題と展望

5.1.節に述べた展望の実現には、種々の現実的な課題に対処していく必要があると考えられる。以下では光学顕微鏡による細胞形態の計測に話題を絞って、現在の木材解剖学において克服すべき課題とその展望について私見をまとめている。樹木細胞の多様性と機能を議論する上では、形態に加えて化学情報も合わせて取得するのが望ましく、第4章で述べたように顕微手法や免疫標識と組み合わせるのが現在実施可能な手法であると考えられる。このような樹木細胞の細胞形態と化学情報については、紙幅の関係上ここでは割愛する。

### ・計測・解析に関わる障壁

2020 年以降、種々のイメージングと深層学習ベースの画像解析を組み合わせることで、従来困難であった樹木細胞形態のマスタデータ取得が容易且つハイスループットになりつつあるのは既往の研究や本論文が示すところである[10,17-19]。その一方で、従来の細胞形態観察に比べると計測・解析実施コストはまだまだ高い状態にあり、その利用者はごく一部に限られている。上記技術群を木材解剖学のデファクト・スタンダードとするためには、以下に示す乗り越えなければいけない障壁を適切に把握し解消していく必要がある。

第一の障壁且つ最大の障壁は、画像解析に耐えうる画像を取得するための前処理、すなわち切片作製である。画像を取得する装置に依存して切片作製の前処理手法は大きく変わる[20]ものの、一般的に切片の質は対象とする材の性質（密度、水分量、化学的性質、壁層構造、MFA etc.）および切片作製者の経験や練度に大きく依存してしまう。特に材鑑等で保

管されている木材標本の場合は乾燥状態となっているため、そのような材の切片作製はさらに難しくなる。画像解析の場合、細胞形態の定量が前提となるため、切片作製により生じるアーティファクト (e.g. 細胞の破れ、軸方向からの傾き、厚みムラ etc.) を極力避ける必要があり、目視観察以上に要求される精度が高いのが難点である。このような課題を解消するため光学顕微鏡観察に絞れば、インクレメントコアおよびマイクロコア切片作製に特化したミクロトームや樹脂包埋[21,22], PEG による簡易包埋[23,24], 非ニュートン性液体を使用した前処理[25]等, 主に QWA の発展に伴う手法整備が進んでおり[26], これらを積極的に活用することは必須になりつつある。加えて近年、材表面を磨いたものを反射型の光学顕微鏡に供することで詳細な細胞形態観察を可能とする技術的進展が起こっている[27-29]。当該手法の最大の利点は切片作製を回避できる点であり、前処理に伴う細胞の破れが発生する確率を大幅に低減することが可能であり且つ材質による質低下の影響も起こりにくい。また、切片とは異なり大断面積をイメージング可能とするのも大きな魅力である。特にアクリル系樹脂の包埋と表面研磨、染色を組み合わせる準備した材では細胞破れの伴わない極めてコントラストの高い画像を取得した事例が報告されており[28], 木材解剖学分野における細胞形態定量への応用が期待される。近年全自動ステージングと撮影を可能とする顕微鏡も多く登場しており[30-33], 当該技術群を組み合わせることで木材の大断面積を対象としたイメージングおよび細胞形態定量も実現可能になることが期待される。

第二の障壁は第一の障壁に関連するが、画像解析で利用可能な質の高いデータベースの構築コストである。現在の画像解析の主流は深層学習モデルであり、その学習には極めて大量の画像データが必要である。そのようなモデルに対する学習データの供給源、且つ統一した基準のもと個々のモデルの性能評価やモデル間での性能比較が実施可能とするのが大規模データセットの役割である。ImageNet データセット[34]のような整備された大規模データセットなしに現在における深層学習の発展を語ることは不可能であることが、その重要性を十二分に証明している[35]。木材解剖学分野において細胞形態定量に耐えうる顕微鏡画像データセットは存在しておらず、当該分野で深層学習を利用する場合はユーザーが目的に応じて適宜データセットを作製している状態となっている。木材解剖学分野では画像解析の活用が進んでいるとは言い難い状況であるため、当分は上記の状態が継続することが予想される。特にデータセット作成においては第一の障壁に記述した前処理コストの課題に加えて、画像セグメンテーションモデル学習に必要な正解ラベル画像 (ground truth) 作成や予測画像のマニュアル修正コストが極めて大きい。前者は、種々のアノテーションツールの利用の他、能動学習 (active learning) による正解ラベル画像の自動作成[36,37]は今後期待される技術であるため、これを積極的に活用していく必要がある。後者については、U-Net[9]以降、多種多様なモデルアーキテクチャが公開されており (e.g. [38,39]), 性能も向上しているためマニュアル修正の手間は減っていくことが予想される。また、植物、樹木細胞の学習に特化したデータ前処理や損失関数の定義ができれば、学習効率および更なるアウトプットの精度向上に繋がることが期待される (e.g. 樹木細胞の場合その細胞境界を予想

させることが多く、その場合どれだけ予測精度が高くても予測された細胞境界に 1 pixel でも繋がっていない場所があると細胞が 1 つの閉じた空間として認識されず、その後の解析には支障が出てしまう。壁孔がなければ細胞とは細胞境界により閉じたものであるという木材科学者が当然のように認識しているコンテキストを汎用の深層学習モデルやその損失関数では取り込むことができない。木材科学や木材解剖学で蓄積してきた知見を如何に深層学習モデルに反映させるかは木材科学者自らが模索する必要がある。大規模な画像データベース構築について、種々の深層学習モデルが **overfitting** せずにより高い汎化性能を獲得するために、データベースは多種多様な細胞形態特徴を保有する樹種より取得されたものより構築されるのが望ましい。このような要望に応え得るのは標本試料を多く収蔵している材鑑であり、材鑑を保有する研究機関を中心に画像データベースの整備を主導している状態が理想的であると考えている。

第三の障壁は、樹木細胞形態解析を可能とする手法が必ずしも利用できる形をとっていない点である。木材科学分野で画像解析を利用した研究事例の多くでは、解析に使用したデータや詳細な解析過程 (特にプログラミングのコード) が公開されておらず、有望な手法であったとしても万人が利用できる状態になっていない。画像や数値データおよび解析過程を公開するメリットは、木材解剖学だけでなく様々な専門分野を有する研究者間での情報交換が活発化し、コミュニティのアクティビティ向上に繋がることが予想されることにある。近年では、ソフトウェア開発プラットフォームの **Github**[40]や研究機関のリポジトリ (e.g. [41]) を介してコードやデータを公開しやすい環境が整っているため、これらを積極的に活用しオープンサイエンスの文化を根付かせていく必要がある。

### ・軸方向および 3 次元樹木細胞形態の評価

QWA を中心に専ら樹木細胞形態定量の対象となるのは細胞の横断面であり、これは当該断面がより多くの形態情報を反映しており且つ 1 つの断面画像で 1 年輪もしくは複数年輪に跨った情報を入手可能とするためである。その一方で、木口断面より取得することのできない細胞長や壁孔に関連した指標 (サイズ, 出現頻度, 配置), 放射柔細胞高といった軸方向の情報, 3 次元的な細胞形状や単位細胞あたりの細胞壁量については、数少ない個別事例が存在するのみである (e.g. [42-46])。ここで例として出した細胞長, 壁孔, 放射柔細胞はいずれも樹体内における軸方向・放射方向への物質輸送に影響する重要なパラメーターであり[47], それらをハイスループットで取得可能とすれば樹種毎における物質輸送の戦略を推し量ることが可能となるはずである。また, 単位細胞あたりの細胞壁量は樹木における物質投資戦略を反映するものであるため, こちらも同様にその計測が極めて重要である。

細胞長と放射柔細胞に話を絞ると, その計測をする上で重要なのは板目断面等軸方向の情報を保有する断面の活用である。板目断面を用いた計測の最大の利点は細胞の位置情報を保存可能であることに加え, 放射方向に対する高い空間分解能を保持している点にあり, 従来法に比べて多くの形態情報を提供する潜在的能力を有している。板目断面を利用した

細胞長計測は Ladell によって提案された方法[48]が初出であり、その後数例の実施例があるのみとなっている[49-51]. 放射柔細胞の定量も同様に事例は未だ少ないものの、板目断面と画像セグメンテーションを組み合わせたハイスループット定量事例が現れつつある[52,53]. 放射柔細胞定量で使用している手法は板目断面を利用した細胞長計測にそのまま援用可能であるため、今後細胞長計測コストは大幅に低減することが期待される. これに加え、板目断面の連続切片と組み合わせることにより、1 年輪内における仮道管長変動[54]や形成層における擬横分裂パターンの解析 (e.g. [55-57]) 等、その応用展開は極めて広いと考えられる.

樹木細胞が高アスペクト比を有しているため、X 線 CT[58]や MRI[59], 共焦点レーザー顕微鏡[60]に代表される 3 次元イメージング手法を以てしても、壁孔やその他細胞形態の 3 次元的計測には未だ課題が多い状態である. 壁孔については、細胞間の位置情報は失われるものの解繊試料を用いた計測自体は可能であるため、物体検出と画像セグメンテーションを組み合わせる (e.g. Mask R-CNN[61]) ことでハイスループットな定量解析が実現可能であるとみられる. 3 次元的な細胞壁量については、解繊繊維と偏光を利用した手法が有効である可能性が高い[62-66]. 当該手法群では解繊繊維の細胞壁 MFA が奥側と手前側で対称であると仮定して光学モデルを設計することにより、double wall 状態から MFA および細胞壁厚を同時計測可能とする. 解繊繊維より細胞長は測定可能であることから、細胞長と細胞壁厚より単位細胞あたりの細胞壁量が概算可能であることがわかる.

軸方向および 3 次元的な細胞形態評価は未だ課題が多いものの、既存の測定手法と画像解析をうまく組み合わせることにより、従来計測が困難であった細胞形態指標の評価も可能であることが予想される.

## データおよびコード利用について

本博士論文で使用したデータおよび解析コードの一部は **Github** のパブリックリポジトリにて公開している (<https://github.com/pywood21>).

3 章: [https://github.com/pywood21/po\\_mfa\\_2022](https://github.com/pywood21/po_mfa_2022)

4 章: [https://github.com/pywood21/po\\_mfa\\_2023](https://github.com/pywood21/po_mfa_2023)

## 謝辞

本論文を構成する研究は、自身が博士前期課程に所属していたバイオマス形態上学分野(現マテリアルバイオロジー分野)において実施した内容、および博士後期課程に所属していた樹木細胞学分野において実施した内容を統合したものになっています。

杉山淳司教授には研究室が変わりながらも博士前期・後期課程の5年間、指導教員として自身の研究をサポートくださり、大変お世話になりました。博士後期課程の3年間は会社員として勤務する傍ら研究を進めていたこともあり、研究の進捗は芳しくありませんでしたが、杉山教授の支援もありなんとか博士論文をまとめることができました。ここに深謝申し上げます。樹木細胞学分野の吉永新准教授および栗野達也助教にはゼミやメール等を通して研究を進める上で貴重なご意見を数多くいただきました。Mr. Titis Setiyobudi には第4章における試料選定・繊維回折像撮影など、実験データ取得の多くの部分を実施くださいました。自身が樹木細胞学分野に在籍していた2021年4月から2024年3月の期間に同じく在籍していた当該分野の学生の皆様には、研究室セミナーや維持管理に参画できていないことでご迷惑をおかけしたかもしれません。本研究は研究室の皆様のサポートや配慮なしには完成に至らなかったと存じます。この場を借りて感謝申し上げます。

第3章に掲載した繊維回折像の撮影にご協力いただいた小林加代子助教(京都大学農学研究科森林科学専攻生物繊維学分野)、研究を進めるにあたって木材物理学等、木材解剖学とは異なる視点からコメント・議論くださった陳碩也助教(京都大学生存圏研究所循環材料創成分野)、本研究で使用した試料を快く提供くださった高田克彦教授(秋田県立大学木材高度加工研究所)、竹下弘展氏(京都府教育庁文化財保護課)、反町始氏(京都大学生存圏研究所材鑑調査室)、何かと会話する機会が多かった金井いづみ氏(レンゴー株式会社)、学会やX上で活発に意見交換くださった高田直樹氏(国立研究開発法人森林研究・整備機構、森林総合研究所 森林バイオ研究センター主任研究員)に、心より感謝申し上げます。

2021/4より社会人博士として進学・在籍することを快く受け入れてくださった、株式会社カネカテクノロジー(2020/4-2022/3まで在籍)、住友化学株式会社(2022/4-2023/1まで在籍予定)、株式会社村田製作所(2023/2より在籍予定)、および筆者の所属部署の皆様に深く御礼申し上げます。特に、谷川竜一氏(株式会社カネカテクノロジー大阪分析センター第二グループ組成分析チーム)には合成高分子、添加剤、無機材料を対象とした溶液・固体

NMR による解析や企業人としての伊呂波をご指導いただいただけでなく、公私ともに様々な面でサポート・意見交換いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

様々な組織体が日夜競争に追われ、無用之用の精神が廃れた現代において、木材科学、殊に木材解剖学という基礎学問に携れたこと、その中で“科学とは、その現在たると過去たるを問わず、可能なる事物の観察”であることの一部を経験できたことは大変幸運でありました。月並みではありますが、以上を以て本論文の謝辞とさせていただきます。

2023/12/11

喜多 祐介

## 出版論文一覧

1. 喜多祐介, 田鶴寿弥子, 竹下弘展, 杉山淳司. 2020. 近赤外分光法と多変量解析を用いた建築用材の識別とその汎化性能向上. 木材学会誌 66: 171-182.
2. Kita Y, Sugiyama J. 2020. Wood identification of two anatomically similar Cupressaceae species based on two-dimensional microfibril angle mapping. *Holzforschung* 75: 591-602.
3. Kita Y, Awano T, Yoshinaga A, Sugiyama J. 2022. Intra-annual fluctuation in morphology and microfibril angle of tracheids revealed by novel microscopy-based imaging. *PLOS ONE* 17: e0277616.
4. Kita Y, Titis S, Awano T, Yoshinaga A, Sugiyama J. 2023. Simultaneous cell-by-cell recognition and microfibril angle determination in Japanese hardwoods by polarized optical microscopy combined with semantic segmentation. *Cellulose* 30: 8439-8450.

論文 1 および 2 は 2 章に, 論文 3 は 3 章に, 論文 4 は 4 章に対応している.

## 参考文献

### 第1章

1. Metcalfe CR, Chalk L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Volume I. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Second edition. Clarendon Press, Oxford.
2. 福島和彦, 船田 良, 杉山淳司, 高部圭司, 梅澤俊明, 山本浩之. (編) 2011. 木質の形成. バイオマス科学への招待. 第2版. 海青社, 滋賀.
3. 須藤彰司. 2000. この120年間の記載解剖学の変遷からみる日本における木材解剖学. 植物史研究 8: 53-65.
4. Sudo S. 2007. Wood anatomy in Japan since its early beginnings. IAWA J. 28: 259-284.
5. 小林彌一. 1957. 本邦における針葉樹材のカード式識別法. 林業試験場研究報告 98: 1-84.
6. 須藤彰司. 1959. 本邦産広葉樹材の識別 (識別カードを適用して). 林業試験場研究報告 118: 1-138.
7. 須藤彰司. 1963. 熱帯材の識別. 林業試験場研究報告 157: 1-262.
8. 島地 謙, 須藤彰司, 原田 浩. 1976. 木材の組織. 森北出版, 東京.
9. Panshin AJ, De Zeeuw C. 1980. Textbook of wood technology: Structure, identification, properties, and uses of the commercial woods of the United States and Canada. 4th edition. McGraw-Hill, New York.
10. Carlquist S. 2001. Comparative wood anatomy: systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood. Springer, Berlin.
11. <https://www.iawa-website.org/> (2023/11/05 閲覧)
12. Wheeler EA, Baas P, Gasson PE. (eds) 1989. IAWA list of microscopic features for hardwood identification. IAWA Bull. 10: 219-332.
13. Richter HG, Grosser D, Heinz I, Gasson PE. (eds) 2004. IAWA list of microscopic features for softwood identification. IAWA J. 25: 1-70.
14. Angyalossy V, Pace MR, Baas P. (eds) 2016. IAWA list of microscopic bark features. IAWA J. 37: 517-615.
15. Wheeler EA, Baas P, Gasson PE. (編) 1998. 広葉樹材の識別-IAWAによる光学顕微鏡的特徴リスト. 伊東隆夫, 藤井智之, 佐伯 浩. (翻訳) 海青社, 滋賀.
16. Richter HG, Grosser D, Heinz I, Gasson PE. (編) 2006. 針葉樹材の識別-IAWAによる光学顕微鏡的特徴リスト. 伊東隆夫, 藤井智之, 佐野雄三, 安部 久, 内海康弘. (翻訳) 海青社, 滋賀.
17. Angyalossy V, Pace MR, Baas P. (編) 2021. 樹皮の識別- IAWAによる光学顕微鏡的特徴リスト. 佐野雄三, 吉永 新, 半 智史. (翻訳) 海青社, 滋賀.
18. Preston RD. 1974. The physical biology of plant cell walls. Chapman and Hall, London.
19. Kutscha NP, McOrmond RR. 1972. The suitability of using fluorescence microscopy for studying

- lignification in balsam fir. *Univ. Maine Tech. Bull.* 62: 1–15.
20. Donaldson L, Radotic K. 2013. Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. *J. Microsc.* 251: 178-187.
  21. Scott JAN, Procter AR, Fergus BJ, Goring DAI. 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood: Description and validity of the technique. *Wood Sci. Technol.* 3: 73–92.
  22. Donaldson LA, Lausberg MJF. 1998. Comparison of conventional transmitted light and confocal microscopy for measuring wood cell dimensions by image analysis. *IAWA J.* 19: 321-336.
  23. Côté WA. 1965. Cellular ultrastructure of woody plants. Syracuse University Press, New York.
  24. 佐伯 浩. 1982. 木材の構造 走査電子顕微鏡図説. 日本林業技術協会, 東京.
  25. Butterfield BG, Meylan BA. 1980. Three-dimensional structure of wood. An ultrastructural approach. Chapman and Hall, London.
  26. Abe H, Ohtani J, Fukazawa K. 1991. Fe-Sem observations on the microfibrillar orientation in the secondary wall of tracheids. *IAWA J.* 12: 431-438.
  27. Abe H, Funada R. 2005. Review — The orientation of cellulose microfibrils in the cell walls of tracheids in conifers. *IAWA J.* 26: 161-174.
  28. Sano Y, Moriis H, Shimada H, De Craene LPR, Jansen S. 2011. Anatomical features associated with water transport in imperforate tracheary elements of vessel-bearing angiosperms. *Ann. Bot.* 107: 963-964.
  29. Hatano T, Nakaba S, Horikawa Y, Funada R. 2022. A combination of scanning electron microscopy and broad argon ion beam milling provides intact structure of secondary tissues in woody plants. *Sci. Rep.* 12: 9152.
  30. van den Bulcke J, Boone M, van Acker J, Stevens M, van Hoorebeke L. 2009. X-ray tomography as a toll for detailed anatomical analysis. *Ann. For. Sci.* 66: 508.
  31. Brodersen CR. 2013. Visualizing wood anatomy in three dimensions with high-resolution X-ray micro-tomography ( $\mu$ CT) -a review-. *IAWA J.* 34: 408-424.
  32. Donaldson L. 2019. Wood cell wall ultrastructure The key to understanding wood properties and behavior. *IAWA J.* 40: 645–672.
  33. Berlyn GP, Miksche JP. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State University Press, Iowa.
  34. Lillie RD. 1969. H.J. Conn's biological stains. A handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory. 8th edition. Waverly Press, Baltimore.
  35. Hubbe MA, Chandra RP, Dogu D, van Velzen STJ. 2019. Analytical staining of cellulosic materials: A review. *BioResources* 14: 7387-7464.
  36. Donaldson LA. 2009. Immunocytochemistry of xylem cell walls. *NZ J. Forestry Sci.* 39: 161-168.

37. Donaldson LA, Knox JP. 2012. Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant Physiol.* 158: 642–653.
38. Beeckman H. 2016. Wood anatomy and trait-based ecology. *IAWA J.* 37: 127-151.
39. Kedrov GB. 2012. Functioning wood. *Wulfenia* 19: 57-95.
40. Olson ME. 2020. From Carlquist’s ecological wood anatomy to Carlquist’s Law: why comparative anatomy is crucial for functional xylem biology. *Am. J. Bot.* 107: 1328-1341.
41. Digby J, Wareing PF. 1966. The effects of applied growth hormones on cambial division and the differentiation of the cambial derivatives. *Ann. Bot.* 30: 539-548.
42. Kijidani Y, Tsuyama T, Takata K. 2021. Seasonal variations of auxin and gibberellin A4 levels in cambial-region tissues of three conifers (*Pinus elliotii*, *Chamaecyparis obtusa*, and *Cryptomeria japonica*) with inherently different wood densities. *J. Wood Sci.* 67: 46.
43. Fukuda H. 1996. Xylogenesis: Initiation, progression, and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 299-325.
44. Zobel BJ, Sprague JR. 1998. Juvenile wood in forest trees. Springer, Berlin.
45. Fritts FC. 1976. Tree rings and climate. The Blackburn Press, New Jersey.
46. Scweingruber FH. 1993. Trees and wood dendrochronology. Springer, Berlin.
47. Donaldson L. 2008. Microfibril angle: measurement, variation and relationships—a review. *IAWA J.* 29: 345–386.
48. Gibson LJ. 2023. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *J. R. Soc. Interface* 9: 2749-2766.
49. Zobel BJ, van Buijtenen JP. 1989. Wood Variation. Its causes and control. Springer, Berlin.
50. Rathgeber CBK, Cuny HE, Fonti P. 2016. Biological basis on tree-ring formation: A crash course. *Front. Plant Sci.* 7: 734.
51. De Micco V, Carrer M, Rathgeber CBK, Camarero JJ, Voltas J, Cherubini P, Battipaglia G. 2019. From xylogenesis to tree rings: wood traits to investigate tree response to environmental changes. *IAWA J.* 40: 155-182.
52. Tyree MT, Zimmermann MH. 2002. Xylem structure and the ascent of sap. Springer, Berlin.
53. Pittermann J, Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK, Sikkema EH. 2005. Torus-margo pits help conifers compete with angiosperms. *Science* 310: 1924.
54. Fratzl P, Weinkamer R. 2007. Nature's hierarchical materials. *Prog. Mater. Sci.* 52: 1263-1334.
55. Niklas KJ, Spatz H-C. 2012. Plant physics. University of Chicago Press, Chicago.
56. Lachenbruch B, McCulloh KA. 2014. Traits, properties, and performance: how woody plants combine hydraulic and mechanical functions in a cell, tissue, or whole plant. *New Phytol.* 204: 747-764.
57. Carlquist S. 2014. Fiber dimorphism: cell type diversification as an evolutionary strategy on

- angiosperm woods. *Bot. J. Linn. Soc.* 174: 44-67.
58. Carlquist S. 2015. Living cells in wood. 1. Absence, scarcity and histology of axial parenchyma as key to function. *Bot. J. Linn. Soc.* 177: 291-322.
  59. Carlquist S. 2015. Living cells in wood. 2. Raylessness: histology and evolutionary significance. *Bot. J. Linn. Soc.* 178: 529-555.
  60. Morris H, Jansen S. 2016. Secondary xylem parenchyma - from classical terminology to functional traits. *IAWA J.* 37: 1-15.
  61. Carlquist S. 2018. Living Cells in Wood 3. Overview; Functional Anatomy of the Parenchyma Network. *Bot. Rev.* 84: 242-294.
  62. 佐伯 浩. 1968. 針葉樹材における構造の年輪内変移に関する研究 (博士論文). 京都大学.
  63. Ifju G. 1982. Quantitative wood anatomy certain geometrical-statistical relationships. *Wood Fiber Sci.* 15: 36-337.
  64. 藤田稔. 2003. フーリエ変換画像処理の確立と熱帯樹林の三次元的特性解析への展開. 平成 13~14 年度科学研究費補助金基盤研究(C)(2)研究成果報告書.
  65. von Arx G, Crivellaro A, Prendin AL, Cufar K, Carrer M. 2016. Quantitative wood anatomy—practical guideline. *Front. Plant Sci.* 7: 781.
  66. Oldenbourg R, Mei G. 1995. New polarized light microscope with precision universal compensator. *J. Microsc.* 180: 140–147.
  67. Ntziachristos V. 2010. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat. Methods* 7: 603-614.
  68. 長野主税. 2017. 光学顕微鏡の技術系統化調査. *かはく技術史大系*. 第 24 集. pp.308-402.
  69. Wan Y, McDole K, Keller PJ. 2019. Light-sheet microscopy and its potential for understanding developmental processes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 35: 655-681.
  70. Hiraoka Y, Sedat JW, Agard DA. The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structure. *Science* 238: 36-41.
  71. Inoue S, Spring KR. 1997. *Video microscopy: The fundamentals*. Springer, Berlin.
  72. Bigas M, Cabruja E, Forest J, Salvi J. 2006. Review of CMOS image sensors. *Microelectron. J.* 37: 433-451.
  73. 竹村裕夫. 2013. ビデオカメラ技術の系統化. *かはく技術史大系*. 第 18 集. pp.112-206.
  74. 山田昭彦. 2014. パーソナルコンピュータ技術の系統化調査. *かはく技術史大系*. 第 21 集. pp.219-319.
  75. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* 9: 676-682.
  76. Wolny A, Cerrone L, Vijayan A, Tofanelli R, Barro AV, Louveaux M, Wenzl C, Strauss S, Wilson-

- Sánchez D, Lymbouridou R, Steigleder SS, Pape C, Bailoni A, Duran-Nebreda S, Bassel GW, Lohmann JU, Tsiantis M, Hamprecht FA, Schneitz K, Maizel A, Kreshuk A. 2020. Accurate and versatile 3D segmentation of plants tissues at cellular resolution. *eLife* 9: e57613.
77. Gómez-de-Mariscal E, García-López-de-Haro C, Ouyang W, Donati L, Lundberg E, Unser M, Muñoz-Barrutia A, Sage D. 2021. DeepImageJ: A user-friendly environment to run deep learning models in ImageJ. *Nat. Methods*. 1192-1195.
  78. Hwang SW, Sugiyama J. 2021. Computer vision-based wood identification and its expansion and contribution potentials in wood science: A review. *Plant Methods* 17: 47.
  79. Silva JL, Bordalo R, Pissarra J, de Palacios P. 2022. Computer vision-based wood identification: A review. *Forests* 13: 2041.
  80. 安部 久. 2016. 木材の樹種識別の重要性と識別技術. *木材学会誌* 62: 240-249.
  81. 安部 久. 2018. 木材利用における木材の樹種識別の重要性. *木材保存* 44: 284-291.
  82. Miller RB. 1980. Wood identification via computer. *IAWA Bull.* 1: 154-160.
  83. Pearson RG, Wheeler EA. 1981. Computer identification of hardwood species. *IAWA Bull.* 2: 37-40.
  84. LaPasha CA, Wheeler EA. 1987. A microcomputer based system for computer-aided wood identification. *IAWA Bull.* 8: 347-354.
  85. Wheeler EA. 2011. Insidewood - A web resource for hardwood anatomy. *IAWA J.* 32: 199-211.
  86. <https://db.ffpri.go.jp/WoodDB/IDBK/home.php> (2023/10/29 閲覧)
  87. <https://www.python.org/> (2023/12/11 閲覧)
  88. <https://www.r-project.org/> (2023/12/11 閲覧)
  89. Bradski G. 2000. The OpenCV Library. *Dr. Dobb's J. Softw. Tools* 120: 122-125.
  90. van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, Boulogne F, Warner JD, Yager N, Guillaud E, Yu T, the scikit-image contributors. 2014. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2: e453.
  91. Coelho LP. 2013. Mahotas: Open source software for scriptable computer vision. *J. Open Res. Softw.* 1: e3.
  92. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Dubourg V, Vanderplas J, Passos A, Cournapeau D, Brucher M, Perrot M, Duchesnay E. 2011. Scikit-learn: Machine learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* 12: 2825–2830.
  93. Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. 1973. Texture features for image classification. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* SMC-3: 610-621.
  94. Ojala T, Pietikäinen M, Harwood D. 1996. A comparative study of texture measures with classification based on featured distributions. *Pattern Recognit.* 29: 51-59.
  95. Lowe DG. 2004. Distinct image features from scale-invariant keypoints. *Int. J. Comput. Vis.* 60: 91–110.

96. Karl Pearson FRS. 1901. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. Lond. Edinb. Dublin philos. Mag. J. Sci. 2: 559-572.
97. Barker M, Rayens W. 2003. Partial least squares for discrimination. J. Chemom. 17: 166-173.
98. Breiman L. 2001. Random Forests. Mach. Learn. 45: 5-32.
99. Cortes C, Vapnik V. 1995. Support-vector networks. Mach. Learn. 20: 273–297.
100. Tou JY, Lau PY, Tay YH. 2007. Computer vision-based wood recognition system. In: Proceedings of international workshop on advanced image technology. Bangkok, Thailand, 8-9 January 2007. pp.1-6.
101. Khalid M, Lew E, Lee Y, Yusof R, Nadaraj M. 2008. Design of an intelligent wood species recognition system. IJSST 9: 9-19.
102. Kobayashi K, Akada M, Torigoe T, Imazu S, Sugiyama J. 2015. Automated recognition of wood used in traditional Japanese sculputures by texture analysis. J. Wood Sci. 61: 630-640.
103. Huang S, Cai C, Zhang Y. 2009. Wood image retrieval using SIFT descriptor. In: Proceedings of the international conference on computational intelligence and software engineering. Wuhan, China, 11-13 December 2009. pp.1-4.
104. Hwang SW, Kobayashi K, Zhai S, Sugiyama J. 2018. Automated identification of Lauraceae by scale-invariant feature transform. J. Wood Sci. 64: 69-77.
105. Kobayashi K, Kegasa T, Hwang SW, Sugiyama J. 2019. Anatomical features of Fagaceae wood statistically extracted by computer vision approaches: some relationships with evolution. PLoS ONE 14: e0220762.
106. Hwang SW, Kobayashi K, Sugiyama J. 2020. Detection and visualization of encoded local features as anatomical predictors in cross-sectional images of Lauraceae. J. Wood Sci. 66: 16.
107. Goodfellow I, Bengio Y, Courville A. 2016. Deep learning. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
108. Al-Saffar AAM, Tao H, Talab MA. 2017. Review of deep convolutional neural network in image classification. In: Proceedings of international conference on radar, antenna, microwave, electronics, and telecommunications. Jakarta, Indonesia, 23-24 October 2017. pp.26-31.
109. Hafemann LG, Oliveira LS, Cavalin P. 2014. Forest species recognition using deep convolutional neural networks. In: Proceedings of 22nd international conference on pattern recognition. Stockholm, Sweden, 24-28 August, 2014. pp.1103-1107.
110. Kwon O, Lee HG, Lee MR, Jang S, Yang SY, Park SY, Choi IG, Yeo H. 2017. Automatic wood species identification of Korean softwood based on convolutional neural network. J. Korean Wood Sci. Technol. 45: 797-808.
111. Ravindran P, Costa A, Soares R, Wiedenhoeft AC. 2018. Classification of CITES-listed and other neotropical Meliaceae wood images using convolutional neural networks. Plant Methods 14: 25.
112. Kwon O, Lee HG, Yang SY, Kim H, Park SY, Choi IG, Yeo H. 2019. Performance enhancement

- of automatic wood classification of Korea softwood by ensembles of convolutional neural networks. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 47: 265-276.
113. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. 2009. The elements of statistical learning. Data mining, inference, and prediction. Second edition. Springer, Berlin.
  114. Wooldridge M. 2021. The road to conscious machines: The story of AI. Pelican Publishing, New Orleans, Louisiana.
  115. Adebayo J, Gilmer J, Muelly M, Goodfellow I, Hardt M, Kim B. 2018. Sanity check for saliency maps. In: Proceedings of 32nd conference on neural information processing systems. Montréal, Canada, 3-8 December 2018. pp.9525-9536.
  116. Guidotti R, Monreale A, Ruggieri A, Turini F, Giannotti F, Pedreschi D. 2018. A survey of methods for explainig black box models. *ACM Comput. Surv.* 51: 93.
  117. Adadi A, Berrada M. 2018. Peeking inside the black-box: A survey on explainable artificial intelligence (XAI). *IEEE Access* 6: 52138-52160.
  118. von Arx G, Carrer M, Crivellaro A, De Micco V, Fonti P, Lensg F, Prendin AL, Rosner S, Sass-Klaassen U. 2021. Q-NET – a new scholarly network on quantitative wood anatomy. *Dendrochronologia* 70: 125890.
  119. Meijering E. 2012. Cell segmentation: 50 years down the road. *IEEE Signal Process. Mag.* 29: 140–145.
  120. Minaee S, Boykov Y, Porikli F, Plaza A, Kehtarnavaz N, Terzopoulos D. 2022. Image segmentation using deep learning: A survey. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 44: 3523-3542.
  121. Chen S, Awano T, Yoshinaga A, Sugiyama J. 2022. Flexural behavior of wood in the transverse direction investigated using novel computer vision and machine learning approach. *Holzforschung* 76: 875–885.
  122. Yoo HJ, Kwon O, Seo JW. 2022. Mask region-based convolutional neural network (R-CNN) based image segmentation of rays in softwoods. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 50: 490-498.
  123. Garcia-Pedrero A, García-Cervigón AI, Olano JM, García-Hidalgo M, Lillo-Saavedra M, Gonzalo-Martín C, Caetano C, Calderón-Ramírez S. 2020. Convolutional neural networks for segmenting xylem vessels in stained cross-sectional images. *Neural Comput. Appl.* 32: 17927–17939.
  124. Resente G, Gillert A, Trouiller M, Anadon-Rosell A, Peters RL, von Arx G, von Lukas U, Wilmking M. 2021. Mask, Train, Repeat! Artificial Intelligence for Quantitative Wood Anatomy. *Front. Plant Sci.* 12: 767400.
  125. Ergun H. 2021. Segmentation of wood cell in cross-section using deep convolutional neural networks. *J. Intell. Fuzzy Syst.* 41: 7447-7456.
  126. Ergun H. 2021. Segmentation of rays in wood microscopy images using the U-Net model.

- BioResources 16: 721–728.
127. von Arx G, Dietz H. 2005. Automated image analysis of annual rings in the roots of perennial forbs. *Int. J. Plant Sci.* 166: 723-732.
  128. von Arx G, Carrer M. 2014. ROXAS – A new tool to build centuries-long tracheid-lumen chronologies in conifers. *Dendrochronologia* 32: 290-293.
  129. [https://regentinstruments.com/assets/wincell\\_about.html](https://regentinstruments.com/assets/wincell_about.html) (2023/12/11 閱覽)
  130. Prendin AL, Petit GP, Fonti P, Björklund J, von Arx G. 2017. New research perspectives from a novel approach to quantify tracheid wall thickness. *Tree Physiol.* 37: 976-983.
  131. Gebregeorgis EG, Boniecka J, Piątkowski M, Robertson I, Rathgeber CBK. 2021. SabaTracheid 1.0: A Novel program for quantitative analysis of conifer wood anatomy — A demonstration on African Juniper from the Blue Nile Basin. *Front. Plant Sci.* 12: 595258.
  132. Bannan MW. 1968. Anticlinal divisions and the organization of conifer cambium. *Bot. Gaz.* 129: 107-113.
  133. Vaganov EA. 1990. Basic chronology statistics and assessment. In: Cook ER, Kairiukstis LA. (eds) *Methods of dendrochronology: Applications in the environmental sciences*. Springer, Berlin. pp.137–152.
  134. Vaganov EA, Hughes MK, Shashkin AV. 2006. *Growth dynamic of conifer tree rings. Images of past and future environments*. Springer, Berlin.
  135. Vysotskaya LG, Vaganov EA. 1989. Components of the variability of radial cell size in the tree rings of conifers. *IAWA Bull.* 10: 417-428.
  136. Olano JM, Eugenio M, García-Cervigón AI, Folch M, Rozas V. 2012. Quantitative tracheid anatomy reveals a complex environmental control of wood structure in continental Mediterranean climate. *Int. J. Plant Sci.* 173: 137-149.
  137. Carvalho A, Nabais C, Vieira J, Rossi S, Campelo F. 2015. Plastic response of tracheids in *Pinus pinaster* in a water-limited environment: Adjusting lumen size instead of wall thickness. *PLoS ONE* 10: e0136305.
  138. Popkova MI, Vaganov EA, Shishov VV, Babushkina EA, Rossi S, Fonti MV, Fonti P. 2018. Modeled tracheidograms disclose drought influence on *Pinus sylvestris* tree-rings structure from Siberian forest-steppe. *Front. Plant Sci.* 9: 1144.
  139. Kennel P, Subsol G, Guérault M, Borianne P. 2010. Automatic identification of cell files in light microscopic images of conifer wood. In: the paper of 2010 2nd International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications, IEEE, Paris, France, 2010: pp. 98–103.
  140. Brunel G, Borianne P, Subsol G, Jaeger M, Caraglio Y. 2014. Automatic identification and characterization of radial files in light microscopy images of wood. *Ann. Bot.* 114: 829–840.
  141. Campelo F, Nabais C, Carvalho A, Vieira J. 2016. tracheidR –An R package to standardize tracheidograms. *Dendrochronologia* 37: 64-68.

142. Peters RL, Balanzategui D, Hurley AG, von Arx G, Prendin AL, Cuny HE, Björklund J, Frank DC, Fonti P. 2018. RAPTOR: Row and position tracheid organizer in R. *Dendrochronologia* 47: 10-16.
143. Dyachuk P, Arzac A, Peresunko P, Videnin S, Ilyin V, Assaulianov R, Babushkina EA, Zhirnova D, Belokopytova L, Vaganov EA, Shishov VV. 2020. AutoCellRow (ACR) - A new tool for the automatic quantification of cell radial files in conifer images. *Dendrochronologia* 60: 125687.
144. Hecht Z. 1974. *Optics*. Addison-Wesley Publishing, Boston.
145. 坪井誠太郎. 1959. 偏光顕微鏡. 岩波書店, 東京.
146. Oldenbourg R. 1996. A new vision on polarization microscopy. *Nature* 381: 811–812.
147. Oldenbourg R. 2004. Polarization microscopy with the LC-PolScope. In: Goldman RD, Spectro DL. (eds) *Live cell imaging: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp.205-237.
148. <https://openpolscope.org/> (2023/11/01 閲覧)
149. Oldenbourg R, Salmon ED, Tran PT. 1998. Birefringence of single and bundled microtubules. *Biophys. J.* 74: 645-654.
150. Katoh K, Hammer K, Smith PJS, Oldenbourg R. 1999. Birefringence imaging directly reveals architectural dynamics of filamentous Actin in living growth cones. *Mol. Biol. Cell* 10: 197-201.
151. DeMay BS, Bai X, Howard L, Occhipinti P, Meseroll RA, Spiliotis ET, Oldenbourg R, Gladfelter AS. 2011. Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals. *J. Cell Biol.* 193: 1065-1081.
152. Abrahamsson S, McQuilken M, Mehta SB, Verma A, Larsch J, Ilic R, Heintzmann R, Bargmann CI, Gladfelter AS, Oldenbourg R. 2015. Multifocus polarization microscope (MF-PolScope) for 3D polarization imaging of up to 25 focal planes simultaneously. *Opt. Express* 23: 7734-7754.
153. Koike-Tani M, Tani T, Mehta SB, Verma A, Oldenbourg R. 2015. Polarized light microscopy in reproductive and developmental biology. *Mol. Reprod. Dev.* 82: 548-562.
154. Tran MT, Oldenbourg R. 2018. Mapping birefringence in three dimensions using polarized light field microscopy: the case of the juvenile clamshell. *J. Microsc.* 271: 315-324.
155. Abraham Y, Tamburu C, Klein E, Dunlop JWC, Fratzl P, Raviv U, Elbaum R. 2012. Tilted cellulose arrangement as a novel mechanism for hygroscopic coiling in the stork's bill awn. *J. R. Soc. Interface* 9: 640-647.
156. Abraham Y, Elbaum R. 2013. Quantification of microfibril angle in secondary cell walls at subcellular resolution by means of polarized light microscopy. *New Phytol.* 197: 1012-1019.
157. Abraham Y, Elbaum R. 2013. Hygroscopic movements in Geraniaceae: the structural variations that are responsible for coiling or bending. *New Phytol.* 199: 584-594.
158. Handakumbura PP, Matos DA, Osmond KS, Harrington MJ, Heo K, Kafle K, Kim SH, Baskin TI, Hazen SP. 2013. Perturbation of *Brachypodium distachyon* CELLULOSE SYNTHASE A4

- or 7 results in abnormal cell walls. *BMC Plant Biol.* 13: 131.
159. Elbaum R, Abraham Y. 2014. Insights into the microstructures of hygroscopic movement in plant seed dispersal. *Plant Sci.* 223: 124–133.
160. Fridman Y, Holland N, Elbaum R, Savaldi-Goldstein S. 2016. High resolution quantification of crystalline cellulose accumulation in *Arabidopsis* roots to monitor tissue-specific cell wall modifications. *J. Vis. Exp.* 111: e53707.
161. Shtein I, Elbaum R, Bar-On B. 2016. The hygroscopic opening of sesame fruits is induced by a functionally graded pericarp architecture. *Front. Plant Sci.* 7: 1501.
162. Shtein I, Shelef Y, Marom Z, Zelinger E, Schwartz A, Popper ZA, Bar-On B, Harpaz-Saad S. 2017. Stomatal cell wall composition: distinctive structural patterns associated with different phylogenetic groups. 119: 1021-1033.
163. Shtein I, Popper ZA, Harpaz-Saad S. 2017. Permanently open stomata of aquatic angiosperms display modified cellulose crystallinity patterns. *Plant Signal. Behav.* 12: e1339858.
164. Mannan S, Zaffar M, Pradhan A, Basu S. 2016. Measurement of microfibril angles in bamboo using Mueller matrix imaging. *Appl. Opt.* 55: 8971-8978.
165. Hu K, Huang Y, Fei B, Yao C, Zhao C. 2017. Investigation of the multilayered structure and microfibril angle of different types of bamboo cell walls at the micro/nano level using a LC-PolScope imaging system. *Cellulose* 24: 4611–4625.
166. Fujikawa S, Ishida S. 1975. Ultrastructure of ray parenchyma cell wall of softwood. *Mokuzai Gakkaishi* 21: 445-456.
167. 原田 浩. 1979. 木材の特性-1-木材細胞壁の微細構造 (講座). *材料* 28: 540-546.
168. Cousins WJ. 1972. Measurement of mean microfibril angles of wood tracheids. *Wood Sci. Technol.* 6: 58.
169. Leney L. 1981. A technique for measuring fibril angle using polarized light. *Wood Fiber Sci.* 13: 13-16.
170. 島地 謙, 伊東隆夫. 1982. 図説木材組織. 地球社, 東京.
171. De Micco V, Campelo F, De Luis M, Bräuning A, Grabner M, Battipaglia G, Cherubini P. 2016. Intra-annual density fluctuations in tree rings: How, when, where, and why? *IAWA J.* 37: 232-259.
172. Rathgeber CBK, Pérez-de-Lis G, Fernández-de-Uña L, Fonti P, Rossi S, Treydte K, Gessler A, Deslauriers A, Fonti MV, Ponton S. 2022. Anatomical, developmental and physiological bases of tree-ring formation in relation to environmental factors. In: Siegwolf RTW, Brooks JR, Roden J, Sauser M. (eds) *Stable isotopes in tree rings: Inferring physiological, climatic and environmental responses*. Springer, Berlin, pp 61–99.

## 第2章

1. 島地 謙, 伊東隆夫編. 1988. 日本の遺跡出土木製品総覧. 雄山閣出版, 東京.
2. 農商務省山林局編. 1912. 木材ノ工藝的利用. 大日本山林会, 東京.
3. 田鶴寿弥子. 2019. 茶室建築の樹種を科学的に知る—樹種識別法の今—. 茶の湯文化学 27: 59-66.
4. 金子啓明, 岩佐光晴, 能代修一, 藤井智之. 1998. 日本古代における木彫像の樹種と用材観—7・8世紀を中心に—. Museum 555: 3-54.
5. 金子啓明, 岩佐光晴, 能代修一, 藤井智之. 2003. 日本古代における木彫像の樹種と用材観 2—8・9世紀を中心に—. Museum 583: 5-44.
6. 金子啓明, 岩佐光晴, 能代修一, 藤井智之. 2010. 日本古代における木彫像の樹種と用材観 3—8・9世紀を中心に—(補遺). Museum 625: 61-78.
7. 平井信二. 1996. 木の大百科. 朝倉書店, 東京. pp.50-64.
8. 井道裕二. 2018. 我が国の製材規格と許容応力度の変遷. 森林総合研究所報告 17: 1-33.
9. 文化財建造物保存技術協会編. 2009. 重要文化財長勝寺本堂・御影堂保存修理工事報告書. 弘前, 長勝寺.
10. 文化財建造物保存技術協会編. 2012. 重要文化財長勝寺庫裏保存修理工事報告書. 弘前, 長勝寺.
11. 文化財建造物保存技術協会編. 1995. 重要文化財最勝院五重塔保存修理工事報告書 (災害復旧). 弘前, 最勝院.
12. 文化財建造物保存技術協会編. 2005. 重要文化財喜多家住宅主屋・表門・道具倉・味噌倉保存修理工事報告書. 宝達志水町 (石川県), 喜多家保存会.
13. 田鶴寿弥子. 2019. 建築保存修理工事における部材の樹種調査の現状. 建築史学 72: 34-43.
14. 水野寿弥子, 杉山淳司. 2010. 重要文化財丸岡城店主の古材に関する樹種識別調査. 建築史学 55: 63-71.
15. 国京克己/建築設計工房編. 2009. 福井県指定有形文化財劔神社本殿・同摂社織田神社本殿修理工事報告書. 宗教法人 劔神社, 福井.
16. 国京克己/建築設計工房編. 2011. 福井県指定有形文化財瑞源寺本堂・書院修理工事報告書. 高照山瑞源寺, 福井.
17. 国京克己/建築設計工房編. 2016. 福井県指定有形文化財本荘春日神社本殿修理工事報告書. 本荘春日神社建設委員会, 福井.
18. 安倍 久. 2016. 木材の樹種識別の重要性と識別技術. 木材学会誌 62: 240-249.
19. Richter HG, Grosser D, Heinz I, Gasson PE. 2004. IAWA list of microscopic features for softwood identification. IAWA J. 25: 1-70.
20. 島地 謙, 伊東隆夫. 1982. 図説木材組織. 地球社, 東京. pp.76-77.
21. Noshiro S. 2011. Identification of Japanese species of Cupressaceae from wood structures. Jpn.

- J. Histor. Bot. 19: 125-132.
22. Bendtsen BA, Senft J. 1986. Mechanical growth and anatomical properties in individual growth rings of plantation-grown eastern cottonwood and loblolly pine. *Wood Fiber Sci.* 1: 23-38.
  23. Cave ID, Walker JCF. 1994. Stiffness of wood in fast-grown plantation softwoods: the influence of microfibril angle. *For. Prod.* 44: 43-48.
  24. Cowdrey DR, Preston RD. 1966. Elasticity and microfibrillar angle in the wood of Sitka spruce. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 166: 245-272.
  25. Abe K, Yamamoto H. 2006. Behavior of the cellulose microfibril in shrinking woods. *J. Wood Sci.* 52: 15-19.
  26. Barber NF, Meylan BA. 1964. The anisotropic shrinkage of wood. A theoretical model. *Holzforschung* 18: 146-156.
  27. Meylan BA. 1972. The influence of microfibril angle on the longitudinal shrinkage-moisture content relationship. *Wood Sci. Technol.* 6: 293-301.
  28. Hori R, Müller M, Watanabe U, Lichtenegger HC, Fratzl P, Sugiyama J. 2002. The importance of seasonal difference in the cellulose microfibril angle in softwoods in determining acoustic properties. *J. Mater. Sci.* 37: 4279-4284.
  29. Lichtenegger H, Reiterer A, Stanzl-Tschegg SE, Fratzl P. 1999. Variation of cellulose microfibril angles in softwoods and hardwoods- A possible strategy of mechanical optimization. *J. Struct. Biol.* 128: 257-269.
  30. Donaldson L. 2008. Microfibril angle: Measurement, variation and relationship- A review. *IAWA J.* 29: 345-386.
  31. Abraham Y, Elbaum R. 2012. Quantification of microfibril angle in secondary cell walls at subcellular resolution by means of polarized light microscopy. *New Phytol.* 197: 1012-1019.
  32. Mannan S, Zaffar M, Pradhan A, Basu S. 2016. Measurement of microfibril angles in bamboo using Mueller matrix imaging. *Appl. Opt.* 55: 8971-8978.
  33. Savić A, Mitrović A, Donaldson A, Radosavljević JS, Pristov JB, Steinbach G, Garab G, Radotić K. 2016. Fluorescence-detected linear dichroism of wood cell walls in juvenile Serbian spruce: Estimation of compression wood severity. *Microsc. Microanal.* 22: 361-367.
  34. Gielringer N, Luss S, König C, Konnerth J, Eder M, Fratzl P. 2010. Cellulose microfibril orientation of *Picea abies* and its variability at the micro-level determined by Raman imaging. *J. Exp. Bot.* 61: 587-595.
  35. 喜多祐介, 田鶴寿弥子, 竹下弘展, 杉山淳司. 2020. 近赤外分光法と多変量解析を用いた建築用材の識別とその汎化性能向上. *木材学会誌* 66: 171-182.
  36. Levenberg K. 1944. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Q. Appl. Math.* 2: 164-168.
  37. Marquardt DW. 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc.*

- Ind. Appl. Math. 11: 431-441.
38. Arthur D, Vassilvitskii S. 2007. k-means++: The advantages of careful seeding. In: Proceedings of the eighteenth annual ACM-SIAM symposium on Discrete algorithm. 1027-1035.
  39. Panshin AJ, De Zeeuw C. 1980. Textbook of wood technology: structure, identification, properties, and uses of the commercial woods of the United States and Canada. McGraw-Hill, New York.
  40. Iyer KRK, Neelakantan P, Radhakrishnan T. 1968. Birefringence of native cellulose fibers. I. Untreated cotton and ramie. J. Polymer Sci. 2 Polymer Phys. 6: 1747-1758.
  41. 滝本裕美, 安江 恒, 徳元守彦, 武田孝志, 中野達夫. 2013. 106 年生カラマツ造林木における仮道管 S<sub>2</sub> 層マイクロフィブリル傾角の年輪内及び樹幹内半径方向変動. 木材学会誌 59: 121-127.
  42. Preston RD. 1934. III-The organization of the cell wall of the conifer tracheid. Philos. Trans. R. Soc. B 224: 131-174.
  43. Preston RD. 1974. The physical biology of plant cell walls. Chapman and Hall, London, pp.77-86.
  44. Cousin WJ. 1972. Measurement of mean microfibril angles of wood tracheids. Wood Sci. Technol. 6: 58.
  45. Leney L. 1980. A technique for measuring fibril angle using polarized light. Wood. Fiber. Sci. 13: 13-16.
  46. Gierlinger N, Keplinger T, Harrington M. 2012. Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy. Nat. Protoc. 7: 1694-1708.
  47. Agarwal UP. 2014. 1064 nm FT-Raman spectroscopy for investigations of plant cell walls and other biomass materials. Front. Plant Sci. 5: 490.
  48. Zhang ZM, Chen S, Liang YZ. 2010. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. Analyst 135: 1138-1146.
  49. Simonyan K, Zisserman A. 2015. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. In: Paper presented at the 3rd International Conference on Learning Representations (ICLR), San Diego, CA, USA, 7-9 May 2015.
  50. Russakovsky O, Deng J, Krause J, Satheesh S, Ma S, Huang Z, Karpathy A, Khosla A, Bernstein M, Berg A. 2015. ImageNet large scale visual recognition challenges. Int. J. Comput. Vis. 115: 211-252.
  51. Glorot X, Bordes A, Bengio Y. 2011. Deep sparse rectifier neural networks. In: Gordon G, Dunson D, Dudik M (eds.) Proceedings of the fourteenth international conference on artificial intelligence and statistics, Ft Lauderdale, FL, USA, 11-13 April 2015. JMLR Cambridge MA, pp.315-323.
  52. Srivastava N, Hinton G, Krizhevsky A, Sutskever I, Salakhutdinov R. 2014. Dropout: A simple

- way to prevent neural networks from overfitting. *J. Mach. Learn. Res.* 15: 1929-1958.
53. Ioffe S, Szegedy C. 2015. Batch normalization: Accelerating deep network training by reducing internal covariate shift. In: *Proceedings of the 32nd international conference on machine learning*, 37. *JMLR*, Cambridge MA, pp.448-456.
  54. Min L, Chen Q, Yan S. 2014. Network in network. In: Paper presented at the 2nd International Conference on Learning and Representations (ICLR). Banff, AB, Canada, 14-16 April 2014.
  55. Kingma DP, Ba LJ. 2015. Adam: A method for stochastic optimization. In: Paper presented at the 3rd International Conference on Learning and Representations (ICLR). San Diego, CA, USA, 7-9 May 2015.
  56. Guidotti R, Monreale A, Ruggieri S, Turini F, Giannotti F, Pedreschi D. 2018. A survey of methods for explaining black box models. *ACM. Comput. Surv.* 51: 93.
  57. Brendel W, Bethge M. 2019. Approximating CNNs with bag-of-local-features models works surprisingly well on ImageNet. *International Conference on Learning Representations*, New Orleans, Louisiana, USA, May, 2019.
  58. Selvaraju RR, Cogswell M, Das A, Vedantam R, Parikh D, Batra D. 2017. Grad-CAM: visual explanations from deep networks via gradient-based localization. *The IEEE International Conference on Computer Vision*, Venice, Italy, October, 2017, pp.618-626.
  59. Selvaraju RR, Cogswell M, Das A, Vedantam R, Parikh D, Batra D. 2019. Grad-CAM: Visual explanations from deep networks via gradient-based localization. *Int. J. Comput. Vis.* 128: 336-359.
  60. Adebayo J, Gilmer J, Muelly M, Goodfellow I, Hardt M, Kim B. 2018. Sanity check for saliency maps. In: *Proceedings of the 32nd International Conference on Neural Network Information Processing Systems*. Montréal, Canada, December, 2018, pp.9525-9536.
  61. Müller M, Hori R, Itoh T, Sugiyama J. 2002. X-ray microbeam and electron diffraction experiments on developing xylem cell walls. *Biomacromolecules* 3: 182-186.
  62. Donaldson L, Xu P. 2005. Microfibril orientation across the secondary cell wall of *Radiata* pine tracheid. *Trees* 19: 644-653.
  63. Abe H, Ohtani J, Fukazawa K. 1991. FE-SEM observations on the microfibrillar orientation in the secondary wall of tracheids. *IAWA J.* 12: 431-438.
  64. Brändström J, Bardage SL, Daniel G, Nilsson T. 2003. The structural organization of the S<sub>1</sub> cell wall layer of Norway spruce tracheids. *IAWA J.* 24: 27-40.
  65. Abe H, Funada R. 2005. Review – the orientation of cellulose microfibrils in the cell walls of tracheids in conifers. *IAWA J.* 26: 161-174.
  66. Konnerth J, Gielringer N, Keckes J, Gindl W. 2009. Actual versus apparent within cell wall variability of nanoindentation results from wood cell walls related to cellulose microfibril angle. *J. Mater. Sci.* 44: 4399–4406.

67. Pluta M. 1988. *Advanced Light Microscopy*. Volume 1. Principles and basic properties. Elsevier, Amsterdam.
68. Frank D, Fang K, Fonti P. 2022. Dendrochronology: fundamentals and innovations. In: Siegwolf RTW, Brooks JR, Roden J, Sauser M. (eds) *Stable isotopes in tree rings: Inferring physiological, climatic and environmental responses*. Springer, Berlin, pp 21–58.
69. Guo Y, Liu Y, Georgiou T, Lew MS. 2018. A review of semantic segmentation using deep neural networks. *Int. J. Multimed. Inf. Retr.* 7: 87–93.
70. Wolny A, Cerrone L, Vijayan A, Tofanelli R, Barro AV, Louveaux M, Wenzl C, Strauss S, Wilson-Sánchez D, Lymbouridou R, Steigleder SS, Pape C, Bailoni A, Duran-Nebreda S, Bassel GW, Lohmann JU, Tsiantis M, Hamprecht FA, Schneitz K, Maizel A, Kreshuk A. 2020. Accurate and versatile 3D segmentation of plants tissues at cellular resolution. *eLife* 9: e57613.
71. Yingjie Z, Liling G. 2008. New approach to low contrast image segmentation. In: *Proceedings of 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, Shanghai, China, May, 2008. pp.2369-2372.
72. Shivakumara P, Huang W, Phan TQ, Tan LC. 2010. Accurate video text detection through classification of low and high contrast image. *Pattern Recognit.* 43: 2165-2185.
73. Dodge S, Karam L. 2016. Understanding how image quality affects deep neural networks. In: *Proceedings of Eighth International Conference on Quality of Multimedia Experience*, Lisbon, Portugal, March, 2016.
74. Horikawa Y, Mizuno-Tazuru S, Sugiyama J. 2015. Near-infrared spectroscopy as a potential method for identification of anatomically similar Japanese diploxylons. *J. Wood Sci.* 61: 251-261.
75. Bailey IW, Vestal MR. 1937. The orientation of cellulose in the secondary wall of tracheary cells. *J. Arnold Arbor.* 18: 185-195.
76. Hirakawa Y, Ishida S. 1981. A scanning and transmission electron microscopic study of layered structure of wall in pit border region between earlywood tracheids in conifer. *Res. Bull. Coll. Exp. For. Hokkaido Univ.* 38: 249-263.
77. Khalili S, Nilsson T, Daniel G. 2001. The use of rot fungi for determining the microfibrillar orientation in the S2 layer of the pine tracheids. *Holz als Roh- und Werkstoff* 58: 439-447.
78. Anagnost SE, Mark RE, Hanna RB. 2002. Variation of microfibril angle within individual tracheids. *Wood Fiber Sci.* 34: 337-349.
79. Lichtenegger HC, Müller M, Wimmer R, Fratzl P. 2003. Microfibril angles inside and outside crossfields of Norway spruce tracheids. *Holzforschung*, 57: 13-20.
80. Sedighi-Giliani M, Sunderland H, Navi P. 2005. Microfibril angle non-uniformities within normal and compression wood tracheids. *Wood Sci. Technol.* 39: 419-430.
81. Sedighi-Giliani M, Sunderland H, Navi P. 2006. Within-fiber nonuniformities of microfibril

angle. *Wood. Fiber. Sci.* 38: 132-138.

82. 佐伯 浩. 1968. 針葉樹材における構造の年輪内変移に関する研究 (博士論文). 京都大学.
83. Jones RC. 1941. A new calculus for the treatment of optical system, I. Description and discussion of the calculus. *J. Opt. Soc. Am.* 31: 488-493.
84. Hecht Z. 1974. *Optics*. Addison-Wesley Publishing, Boston. pp.230-231.

### 第 3 章

1. Côté WA. 1965. *Cellular ultrastructure of woody plants*. Syracuse University Press, New York.
2. Donaldson L. 2019. Wood cell wall ultrastructure The key to understanding wood properties and behavior. *IAWA J.* 40: 645–672.
3. Donaldson L, Xu P. 2004. Microfibril orientation across the secondary cell wall of *Radiata* pine tracheids. *Trees* 19: 644-653.
4. Donaldson L. 2008. Microfibril angle: measurement, variation and relationships—a review. *IAWA J.* 29: 345–386.
5. Richter HG, Grosser D, Heinz I, Gasson PE. 2004. IAWA list of microscopic features for softwood identification. *IAWA J.* 25: 1–70.
6. Wheeler W, Baas P, Gasson PE. 1989. IAWA list of microscopic features for hardwood identification. *IAWA Bull.* 10: 219–332.
7. Fritts HC. 1976. *Tree rings and climate*. Elsevier, Amsterdam.
8. Pandey S. 2021. Climatic influence on tree wood anatomy: a review. *J. Wood Sci.* 67: 24.
9. Schweingruber FH. 1991. *Trees and wood in dendrochronology*. Springer, Berlin.
10. von Arx G, Crivellaro A, Prendin AL, Cufar K, Carrer M. 2016. Quantitative wood anatomy—practical guideline. *Front. Plant Sci.* 7: 781.
11. Zimmermann MH. 1983. *Xylem structure and the ascend of sap*. Springer, Berlin.
12. Gibson AC, Calkin HW, Nobel PS. 1985. Hydraulic conductance and xylem structure in tracheid-bearing plants. *IAWA Bull.* 6: 293–302.
13. Preston RD. 1974. *The physical biology of plant cell walls*. Chapman and Hall, London.
14. Barnet JR, Bonham VA. 2004. Cellulose microfibril angel in the cell wall of wood fibres. *Biol. Rev.* 79: 461–472.
15. Sarén MP, Serimaa R, Andersson S, Saranpää P, Keckes J, Fratzl P. 2004. Effects of growth rate on mean microfibril angle and cross-sectional shape of tracheids of Norway spruce. 18: 354–362.
16. Marko P, Sarén MP, Laukkanen J, Nygård K, Andersson S, Saranpää P, Paakkari T, Hämäläinen K, Serimaaa R. 2008. The element composition, the microfibril angle distribution and the shape of the cell cross-section in Norway spruce xylem. *Trees* 22: 499–510.

17. Abraham Y, Elbaum R. 2013. Quantification of microfibril angle in secondary cell walls at subcellular resolution by means of polarized light microscope. *New Phytol.* 197: 1012–1019.
18. Fridman Y, Holland N, Elbaum R, Savaldi-Goldstein S. 2016. High resolution quantification of crystalline cellulose accumulation in Arabidopsis roots to monitor tissue-specific cell wall modifications. *J. Vis. Exp.* e53707.
19. Hu K, Huang Y, Fei B, Yao C, Zhao C. 2017. Investigation of the multilayered structure and microfibril angle of different types of bamboo cell walls at the micro/nano level using a LC-PolScope imaging system. *Cellulose* 24: 4611–4625.
20. Kita Y, Sugiyama J. 2020. Wood identification of two anatomically similar Cupressaceae species based on two-dimensional microfibril angle mapping. *Holzforschung* 75: 591–602.
21. Meijering E. 2012. Cell segmentation: 50 years down the road. *IEEE Signal Process. Mag.* 29: 140–145.
22. Bannan MW. 1968. Divisions and the organization of conifer cambium. *Bot. Gaz.* 129: 107–113.
23. Vaganov EA. 1991. The tracheidogram method in tree-ring analysis and its application. In: Cock ER, Kairiukstis LA, editors. *Methods of dendrochronology. Applications in the environmental science.* Springer, Berlin, pp.63–75.
24. Shribak M, Oldenbourg R. 2003. Techniques for fast and sensitive measurements of two-dimensional birefringence distributions. *Appl. Opt.* 42: 3009–3017.
25. Ito K, Nakajima H, Kobayashi K, Aoki T, Higuchi T. 2004. A fingerprint matching algorithm using phase-only correlation. *IEICE Trans. Fundam. Electron. Commun. Comput. Sci.* E87-A: 682–691.
26. Iyer KRK, Neelakantan P, Radhakrishnan T. 1968. Birefringence of native cellulose fibers. I. Untreated cotton and ramie. *J. Polym. Sci. Part A-2. Polym. Phys.* 6: 1747–1758.
27. Panshin AJ, De Zeeuw C. 1980. *Textbook of wood technology: structure, identification, properties, and uses of the commercial woods of the United States and Canada.* McGraw-Hill, New York.
28. Higuchi T. 1997. *Biochemistry and molecular biology of wood.* Springer, Berlin.
29. Bertaud F, Holmbom B. 2004. Chemical composition of earlywood and latewood in Norway spruce heartwood, sapwood and transition zone wood. *Wood Sci. Technol.* 38: 245–256.
30. Lichtenegger H, Müller M, Paris O, Riekkel CH, Fratzl P. 1999. Imaging of the helical arrangement of cellulose fibrils in wood by synchrotron X-ray microdiffraction. *J. Appl. Crystallogr.* 32: 1127–1133.
31. van der Walt S, Schonberger JL, Nunez-Iglesias J, Boulogne F, Warner JD, Yagerm N, Guillaert E, Yu T, the scikit-image contributors. 2014. *Scikit-image: image processing in Python.* PeerJ 2: e453.
32. Vincent L, Soille P. 1991. Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion

- simulation. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 13: 583–597.
33. Coelho LP. 2013. Mahotas: Open source software for scriptable computer vision. *J. Open Res. Softw.* 1: e3.
  34. Brunel G, Borianne P, Subsol G, Jaeger M, Caraglio Y. 2014. Automatic identification and characterization of radial files in light microscopy images of wood. *Ann. Bot.* 114: 829–840.
  35. Trémaeu A, Colantoni P. 2000. Regions adjacency graph applied to color image segmentation. *IEEE Trans. Image Process.* 9: 735–744.
  36. Bray JR, Curtis JT. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27: 327–349.
  37. Cuny HE, Rathgeber CBK, Frank D, Fonti P, Fournier M. 2014. Kinetics of tracheid development explain conifer tree-ring structure. *New Phytol.* 203: 1231–1241.
  38. Prendin AL, Petit G, Carrer M, Fonti P, Bjöklund J, von Arx G. 2017. New research perspectives from a novel approach to quantify tracheid wall thickness. *Tree Physiol.* 37: 976–983.
  39. Schneider CA, Rasband WS, Eliceriri KW. 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9: 671–675.
  40. Lowe DG. 2004. Distinct image features from scale-invariant keypoints. *Int. J. Comput. Vis.* 60: 91–110.
  41. Savitzky A, Golay MJE. 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 36: 1627–1639.
  42. Cave ID. 1966. Theory of X-ray measurement of microfibril angle. *For. Prod. J.* 16: 37–42.
  43. 佐伯 浩. 1968. 針葉樹材における構造の年輪内変移に関する研究 (博士論文). 京都大学.
  44. Kijidani Y, Fujii Y, Kimura K, Fujisawa Y, Hiraoka Y, Kitahara R. 2012. Microfibril angle and density of hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) trees in 15 half-sib families in a progeny test stand in Kyusyu, Japan. *J. Wood Sci.* 58: 195–202.
  45. Kijidani Y, Kawasaki Y, Matsuda D, Nakazono F, Hayakawa M, Mutagushi H, et al. 2014. Tree heights in the ring-formed years affect microfibril angles in the rings from juvenile to mature wood at breast height in hinoki trees (*Chamaecyparis obtusa*). *J. Wood Sci.* 60: 381–388.
  46. 佐伯 浩. 1970. 針葉樹材の早材および晩材における仮道管膜の膜層構成割合. *木材学会誌* 16: 244–249.
  47. Pluta M. 1988. *Advanced Light Microscopy. Volume 1. Principles and basic properties.* Elsevier, Amsterdam.
  48. 佐伯 浩. 1965. 針葉樹材の年輪構造に関する研究 (第 4 報) 仮道管の径減少と膜肥厚の効果. *木材学会誌* 11: 1–6.
  49. Brändström J. 2001. Micro- and ultrastructural aspects of Norway spruce tracheids: A review. *IAWA J.* 22: 333–353.

50. Bailey IW, Vestal MR. 1937. The orientation of cellulose in secondary cell wall of tracheary cells. *J. Arnold Arbor.* 18: 185–195.
51. Sedighi-Gilani M, Sunderland H, Navi P. 2005. Microfibril angle non-uniformities within normal and compression wood tracheids. *Wood Sci. Technol.* 39: 419–430.
52. 島地 謙, 伊東隆夫. 1982. 図説 木材組織. 地球社, 東京.
53. 佐伯 浩. 1963. 針葉樹材の年輪構造に関する研究 (第 2 報) 早材・晩材の区分 (1). *木材学会誌* 9: 231-236.
54. 佐伯 浩. 1963. 針葉樹材の年輪構造に関する研究 (第 2 報) 早材・晩材の区分 (2). *木材学会誌* 9: 237-243.
55. 藤原新二. 1995. スギおよびヒノキ材の年輪幅による細胞寸法と年輪構造の変動. *木材学会誌* 41: 774-779.
56. Noyer E, Stojanović, Horáček P, Pérez-de-Lis G. 2023. Toward a better understanding of angiosperm xylogenesis: a new method for a cellular approach. *New Phytol.* 239: 792-805.
57. Havimo M, Rikala J, Sirviö J, Sipi M. 2007. Distributions of tracheid cross-sectional dimensions in different parts of Norway spruce stems. *Silva Fennica* 42: 89-99.
58. Mäkinen H, Jyske T, Saranpää P. 2008. Variation of tracheid length within annual rings of Scots pine and Norway spruce. *Holzforschung* 62: 123-128.
59. Ladell JL. 1959. A new method of measuring tracheid length. *Forestry* 32: 124-125.
60. Wilkins AP, Bamber RK. 1983. A comparison between Ladell's wood section method and the macerated wood method for tracheid length determination. *IAWA Bull.* 4: 245-247.
61. Baas P, Schmid R, van Heuven BJ. 1986. Wood anatomy of *Pinus longaeva* (bristlecone pine) and the sustained length-on-age increase of its tracheids. *IAWA Bull.* 7: 221-228.
62. Mayer K, Grabner M, Rosner S, Felhofer M, Gierlinger N. 2020. A synoptic view on intra-annual density fluctuations in *Abies alba*. *Dendrochronologia* 64: 125781.
63. Reynolds TPS, Burrige HC, Johnston R, Wu G, Shah DU, Scherman OA, Linden PF, Ramage MH. 2018. Cell geometry across the ring structure of Sitka spruce. *J. R. Soc. Interface* 15: 20180144.
64. Xu J, Lu J, Evans R, Downes GM. 2015. Climatic signal in cellulose microfibril angle and tracheid radial diameter of *Picea clasifolia* at different altitudes of the Tibetan plateau, northwest China. *Wood Sci. Technol.* 49: 1207-1318.
65. Evans R, Ilic J. 2001. Rapid prediction of wood stiffness from microfibril angle and density. *Forest Prod. J.* 51:53–57.
66. Ma T, Inagaki T, Tsuchikawa S. 2017. Calibration of SilviScan data of *Cryptomeria japonica* wood concerning density and microfibril angles with NIR hyperspectral imaging with high spatial resolution. *Holzforschung* 71: 341-347.
67. Hwang SW, Sugiyama J. 2021. Computer vision-based wood identification and its expansion and

- contribution potentials in wood science: A review. *Plant Methods* 17: 47.
68. Kijidani Y, Tsuyama T, Takata K. 2021. Seasonal variations of auxin and gibberellin A4 levels in cambial-region tissue of three conifers (*Pinus elliottii*, *Chamaecyparis obtusa*, and *Cryptomeria japonica*) with inherently different wood densities. *J. Wood Sci.* 67: 46.
  69. 吉澤伸夫. 1987. 針葉樹における傾斜刺激に対する形成層の応答と圧縮あて材仮道管の構造変化. 宇都宮大学農学部演習林報告. 23: 23-141.
  70. 日本木材学会組織と材質研究会編. 2016. あて材の科学 樹木の重力応答と生存戦略. 海青社, 滋賀.
  71. Frank D, Fang K, Fonti P. 2022. Dendrochronology: fundamentals and innovations. In: Siegwolf RTW, Brooks JR, Roden J, Sauser M. (eds) *Stable isotopes in tree rings: Inferring physiological, climatic and environmental responses*. Springer, Berlin, pp 21–58.
  72. Kiyoto S, Yoshinaga A, Fernandez-Tendero E, Day A, Chabbert B, Takabe K. 2018. Distribution of lignin, hemicellulose, and arabinogalactan protein in hemp phloem fibers. *Microsc. Microanal.* 24: 442-452.
  73. Donaldson LA, Knox JP. 2012. Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant Physiol.* 158: 642–653.
  74. Scott JAN, Procter AR, Fergus BJ, Goring DAI. 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood: Description and validity of the technique. *Wood Sci. Technol.* 3: 73–92.
  75. 吉永 新, 藤田 稔, 佐伯 浩. 1989. モイレ反応と顕微分光測定法によるリグニンの多様性検討. 京都大学演習林報告 61: 276-284.
  76. Cuello C, Marchand P, Laurans F, Grand-Perret C, Lainé-Prade V, Pilate G, Déjardin A. 2020. ATR-FTIR microspectroscopy brings a novel insight into the study of cell wall chemistry at the cellular level. *Front. Plant Sci.* 11: 105.
  77. Gierlinger N, Keplinger T, Harrington M. 2012. Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy. *Nat. Protoc.* 7: 1694-1708.
  78. Konnerth J, Gierlinger N, Keckes J, Gindl W. 2009. Actual versus apparent within cell wall variability of nanoindentation results from wood cell walls related to cellulose microfibril angle. *J. Mater. Sci.* 44: 4399–4406.
  79. Gierlinger N, Luss S, König C, Konnerth J, Eder M, Fratzl P. 2010. Cellulose microfibril orientation of *Picea abies* and its variability at the micron-level determined by Raman imaging. *J. Exp. Bot.* 61: 587–595.

## 第 4 章

1. Panshin AJ, De Zeeuw C. 1980. Textbook of wood technology: Structure, identification, properties, and uses of the commercial woods of the United States and Canada. 4th edition. McGraw-Hill, New York.
2. Wheeler E, Baas P, Gasson PE. (eds) 1989. IAWA list of microscopic features for hardwood identification. IAWA Bull. 10: 219–332.
3. Carlquist S. 2001. Comparative wood anatomy: systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood. Springer, Berlin.
4. Côté WA Jr. 1965. Cellular ultrastructure of woody plants. Syracuse University Press, New York.
5. Donaldson LA. 2019. Wood cell wall ultrastructure. The key to understanding wood properties and behavior. IAWA J. 40: 645–672.
6. Donaldson L. 2008. Microfibril angle: measurement, variation and relationships – a review. IAWA J. 29:345–386.
7. Lichtenegger H, Reiterer A, Stanzl-Tschegg SE, Fratzl P. 1999. Variation of cellulose microfibril angles in softwoods and hardwoods – a possible strategy of mechanical optimization. J. Struct. Biol. 128: 257–269.
8. Barnett JR, Bonham VA. 2004. Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. Biol. Rev. 79: 461–472.
9. Niklas KJ, Spatz H-C. 2012. Plant physics. University of Chicago Press, Chicago.
10. Berglund LA, Burgert I. 2018. Bioinspired wood nanotechnology for functional materials. Adv. Mater. 30: 1704285.
11. Chen C, Kuang Y, Zhu S, Burgert I, Keplinger T, Gong A, Li T, Berglund L, Eichhorn SJ, Hu L. 2020. Structure–property–function relationships of natural and engineered wood. Nat Rev Mater 5: 642–666.
12. Guo Y, Liu Y, Georgiou T, Lew MS. 2018. A review of semantic segmentation using deep neural networks. Int. J. Multimed. Inf. Retr. 7: 87–93.
13. Wolny A, Cerrone L, Vijayan A, Tofanelli R, Barro AV, Louveaux M, Wenzl C, Strauss S, Wilson-Sánchez D, Lymbouridou R, Steigleder SS, Pape C, Bailoni A, Duran-Nebreda S, Bassel GW, Lohmann JU, Tsiantis M, Hamprecht FA, Schneitz K, Maizel A, Kreshuk A. 2020. Accurate and versatile 3D segmentation of plants tissues at cellular resolution. eLife 9: e57613.
14. Chen S, Awano T, Yoshinaga A, Sugiyama J. 2022. Flexural behavior of wood in the transverse direction investigated using novel computer vision and machine learning approach. Holzforschung 76: 875–885.
15. Garcia-Pedrero A, García-Cervigón AI, Olano JM, García-Hidalgo M, Lillo-Saavedra M, Gonzalo-Martín C, Caetano C, Calderón-Ramírez S. 2020. Convolutional neural networks for segmenting xylem vessels in stained cross-sectional images. Neural Comput. Appl. 32: 17927–

17939.

16. Oldenbourg R, Mei G. 1995. New polarized light microscope with precision universal compensator. *J. Microsc.* 180: 140–147.
17. Oldenbourg R. 1996. A new vision on polarization microscopy. *Nature* 381: 811–812.
18. Abraham Y, Elbaum R. 2013. Quantification of microfibril angle in secondary cell walls at subcellular resolution by means of polarized light microscopy. *New Phytol.* 197: 1012–1019.
19. Kita Y, Awano T, Yoshinaga A, Sugiyama J. 2022. Intra-annual fluctuation in morphology and microfibril angle of tracheids revealed by novel microscopy-based imaging. *PLOS ONE* 17: e0277616.
20. Hu K, Huang Y, Fei B, Yao C, Zhao C. 2017. Investigation of the multilayered structure and microfibril angle of different types of bamboo cell walls at the micro/nano level using a LC-PolScope imaging system. *Cellulose* 24: 4611–4625.
21. Shribak M, Oldenbourg R. 2003. Techniques for fast and sensitive measurements of two-dimensional birefringence distributions. *Appl. Opt.* 42: 3009–3017.
22. Iyer KRK, Neelakantan P, Radhakrishnan T. 1968. Birefringence of native cellulose fibers. I. Untreated cotton and ramie. *J. Polym. Sci. Part A-2 Polym. Phys.* 6: 1747–1758.
23. Rowell R. 1984. *The chemistry of solid wood.* American Chemical Society, Washington, DC.
24. Ito K, Nakajima H, Kobayashi K, Aoki T, Higuchi T. 2004. A fingerprint matching algorithm using phase-only correlation. *IEICE Trans. Fundam. Electron. Commun. Comput. Sci.* E87-A:682–691.
25. Lowe DG. 2004. Distinct image features from scale-invariant keypoints. *Int. J. Comput. Vis.* 60: 91–110.
26. Garcia-Garcia A, Orts-Escolano S, Oprea SO, Villena-Martinez V, Garcia-Rodriguez J. 2017. A review on deep learning techniques applied to semantic segmentation. *arXiv:1704.06857 [cs.CV]*.
27. Ronneberger O, Fischer P, Brox T. 2015. U-Net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. In: Navab N, Hornegger J, Wells W, Frangi A (eds) *Medical image computing and computer-assisted intervention – MICCAI 2015.* Lecture Notes in Computer Science vol. 9351. Springer, Cham, pp.234–241.
28. Vazquez I, Meyer RW. 2008. Fundamental differences between two fiber types in *Acer*. *IAWA J.* 29: 129-141.
29. 岡野 健, 小貫茂樹, 平井信二. 1972. ブナ樹体内における平均ミセル傾角および繊維長分布について. *木材学会誌* 18: 629-633.
30. Müller M, Hori R, Itoh T, Sugiyama J. 2002. X-ray microbeam and electron diffraction experiments on developing xylem cell walls. *Biomacromolecules* 3: 182–186.
31. Konnerth J, Gielringer N, Keckes J, Gindl W. 2009. Actual versus apparent within cell wall variability of nanoindentation results from wood cell walls related to cellulose microfibril angle.

- J. Mater. Sci. 44: 4399–4406.
32. Gielringer N, Luss S, König C, Konnerth J, Eder M, Fratzl P. 2010. Cellulose microfibril orientation of *Picea abies* and its variability at the micron-level determined by Raman imaging. *J. Exp. Bot.* 61: 587–595.
  33. Fujii T, Harada H, Saiki H. 1980. The layered structure of secondary walls in axial parenchyma of the wood of 51 Japanese angiosperm species. *Mokuzai Gakkaishi* 26: 373–380.
  34. Kim JS, Daniel G. 2016. Variations in the cell wall ultrastructure and chemistry in cell types of earlywood and latewood in English oak (*Quercus robur*). *IAWA J.* 37: 383–401.
  35. Pluta M. 1988. *Advanced Light Microscopy. Volume 1. Principles and basic properties.* Elsevier, Amsterdam.
  36. Preston RD. 1974. *The physical biology of plant cell walls.* Chapman and Hall, London.
  37. Yoshinaga A, Fujita M, Saiki H. 1992. Relationships between cell evolution and lignin structural varieties in oak xylem evaluated by microscopic spectrophotometry with separated cell walls. *Mokuzai Gakkaishi* 38: 629-637.
  38. Boyce CK, Zwieniecki MA, Cody GD, Jacobsen C, Wirrick S, Knoll AH, Holbrook NM. 2004. Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 17555-17558.
  39. Carlquist S. 1985. Vascentric tracheids as a drought survival mechanism in the woody flora of southern California and similar regions; Review of vascentric tracheids. *ALISO* 11: 37-68.
  40. Sano Y, Moriis H, Shimada H, De Craene LPR, Jansen S. 2011. Anatomical features associated with water transport in imperforate tracheary elements of vessel-bearing angiosperms. *Ann. Bot.* 107: 963-964.
  41. Echeverría A, Petrone-Mendoza E, Segovia-Rivas A, Figueroa-Abundiz V, Olsoon ME. 2022. The vessel wall thickness-vessel diameter relationship across woody angiosperms. *Am. J. Bot.* 109: 856-873.
  42. Morris H, Jansen S. 2016. Secondary xylem parenchyma - from classical terminology to functional traits. *IAWA J.* 37: 1-15.
  43. Burgert I, Fratzl P. Plants control the properties and actuation of their organs through orientation of cellulose fibrils in their cell walls. *Integr. Comp. Biol.* 49: 69-79.
  44. Mattheck C, Kubler H. 1997. *Wood - The internal optimization of trees.* Springer, Berlin.
  45. Burgert I, Eckstein D. 2001. The tensile strength of isolated wood rays of beech (*Fagus sylvatica* L.) and its significance for the biomechanics of living trees. *Trees* 15: 168-170.
  46. Braun HJ. 1984. The significance of the accessory tissues of the hydrosystem for osmotic watershifting as the second principle of water ascent, with some thoughts concerning the evolution of trees. *IAWA Bull.* 5: 275-294.
  47. Carlquist S. 2015. Living cells in wood. 1. Absence, scarcity and histology of axial parenchyma

- as key to function. *Bot. J. Linn. Soc.* 177: 291-322.
48. Brodersen CR, McElrone AJ, Choat B, Matthews MA, Shackel KA. 2010. The dynamics of embolism repair in xylem: In vivo visualizations using high-resolutional computed tomography. *Plant Physiol.* 154: 1088-1095.
  49. Schwarze FWMR, Fink S, Deflorio G. 2003. Resistance of parenchyma cells in wood to degradation by brown rot fungi. *Mycol. Prog.* 2: 267-274.
  50. Schwarze FWMR. 2007. Wood decay under the microscope. *Fungal Biol. Rev.* 21: 133-170.
  51. Donaldson LA, Knox JP. 2012. Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant Physiol.* 158: 642–653.
  52. Scott JAN, Procter AR, Fergus BJ, Goring DAI. 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood: Description and validity of the technique. *Wood Sci. Technol.* 3: 73–92.
  53. Donaldson L. 2013. Softwood and hardwood in lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media. *IAWA J.* 34: 3-19.
  54. Donaldson L, Radotic K. 2013. Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. *J. Microsc.* 251: 178-187.
  55. Gierlinger N. 2018. New insights into plant cell walls by vibrational microspectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* 53: 517–551.
  56. Lachenbruch B, McCulloh KA. 2014. Traits, properties, and performance: how woody plants combine hydraulic and mechanical functions in a cell, tissue, or whole plant. *New Phytol.* 204: 747-764.
  57. Groover A. 2016. Gravitropisms and reaction woods of forest trees – evolution, functions and mechanisms. *New Phytol.* 211:790–802.
  58. Carlquist S. 2014. Fiber dimorphism: cell type diversification as an evolutionary strategy on angiosperm woods. *Bot. J. Linn. Soc.* 174: 44-67.
  59. Digby J, Wareing PF. 1966. The effects of applied growth hormones on cambial division and the differentiation of the cambial derivatives. *Ann. Bot.* 30: 539-548.
  60. Hacke UG, Spicer R, Schreiber SG, Plavová L. 2017. An ecophysiological and developmental perspective on variation in vessel diameter. *Plant Cell Environ.* 40: 831-845.
  61. Kijidani Y, Tsuyama T, Takata K. 2021. Seasonal variations of auxin and gibberellin A4 levels in cambial-region tissues of three conifers (*Pinus elliottii*, *Chamaecyparis obtusa*, and *Cryptomeria japonica*) with inherently different wood densities. *J. Wood. Sci.* 67: 46.
  62. Hwang S-W, Sugiyama J. 2021. Computer vision-based wood identification and its expansion and contribution potentials in wood science: A review. *Plant Methods* 17: 47.
  63. Didi V, Jackson P, Hejátko J. 2015. Hormonal regulation of secondary cell wall formation. *J. Exp.*

Bot. 66: 5015–5027.

64. Frank D, Fang K, Fonti P. 2022. Dendrochronology: fundamentals and innovations. In: Siegwolf RTW, Brooks JR, Roden J, Sauser M. (eds) Stable isotopes in tree rings: Inferring physiological, climatic and environmental responses. Springer, Berlin, pp 21–58.

## 第 5 章

1. Carlquist S. 2001. Comparative wood anatomy: systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood. Springer, Berlin.
2. Lachenbruch B, McCulloh KA. 2014. Traits, properties, and performance: how woody plants combine hydraulic and mechanical functions in a cell, tissue, or whole plant. *New Phytol.* 204: 747-764.
3. Carlquist S. 2014. Fiber dimorphism: cell type diversification as an evolutionary strategy in angiosperm woods. *Bot. J. Linn. Soc.* 174: 44-67.
4. Carlquist S. 2015. Living cells in wood. 1. Absence, scarcity and histology of axial parenchyma as key to function. *Bot. J. Linn. Soc.* 177: 291-322.
5. Carlquist S. 2015. Living cells in wood. 2. Raylessness: histology and evolutionary significance. *Bot. J. Linn. Soc.* 178: 529-555.
6. Carlquist S. 2018. Living Cells in Wood 3. Overview; Functional Anatomy of the Parenchyma Network. *Bot. Rev.* 84: 242-294.
7. Abraham Y, Elbaum R. 2013. Quantification of microfibril angle in secondary cell walls at subcellular resolution by means of polarized light microscopy. *New Phytol.* 197: 1012-1019.
8. Hwang S-W, Sugiyama J. 2021. Computer vision-based wood identification and its expansion and contribution potentials in wood science: A review. *Plant Methods* 17: 47.
9. Ronneberger O, Fischer P, Brox T. 2015. U-Net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. In: Navab N, Hornegger J, Wells W, Frangi A (eds) Medical image computing and computer-assisted intervention – MICCAI 2015. Lecture Notes in Computer Science vol. 9351. Springer, Cham, pp.234–241.
10. Wolny A, Cerrone L, Vijayan A, Tofanelli R, Barro AV, Louveaux M, Wenzl C, Strauss S, Wilson-Sánchez D, Lymbouridou R, Steigleder SS, Pape C, Bailoni A, Duran-Nebreda S, Bassel GW, Lohmann JU, Tsiantis M, Hamprecht FA, Schneitz K, Maizel A, Kreshuk A. 2020. Accurate and versatile 3D segmentation of plants tissues at cellular resolution. *eLife* 9: e57613.
11. Xu J, Lu J, Evans R, Downes GM. 2015. Climatic signal in cellulose microfibril angle and tracheid radial diameter of *Picea clasifolia* at different altitudes of the Tibetan plateau, northwest China. *Wood Sci. Technol.* 49: 1207-1318.
12. Fritts FC. 1976. Tree rings and climate. The Blackburn Press, New Jersey.

13. Frank D, Fang K, Fonti P. 2022. Dendrochronology: fundamentals and innovations. In: Siegwolf RTW, Brooks JR, Roden J, Sauser M. (eds) *Stable isotopes in tree rings: Inferring physiological, climatic and environmental responses*. Springer, Berlin, pp 21–58.
14. Donaldson L. 2008. Microfibril angle: measurement, variation and relationships—a review. *IAWA J.* 29: 345–386.
15. Fujii T, Harada H, Saiki H. 1980. The layered structure of secondary walls in axial parenchyma of the wood of 51 Japanese angiosperm species. *Mokuzai Gakkaishi* 26: 373–380.
16. Morris H, Jansen S. 2016. Secondary xylem parenchyma - from classical terminology to functional traits. *IAWA J.* 37: 1-15.
17. Chen S, Awano T, Yoshinaga A, Sugiyama J. 2022. Flexural behavior of wood in the transverse direction investigated using novel computer vision and machine learning approach. *Holzforschung* 76: 875–885.
18. Garcia-Pedrero A, García-Cervigón AI, Olano JM, García-Hidalgo M, Lillo-Saavedra M, Gonzalo-Martín C, Caetano C, Calderón-Ramírez S. 2020. Convolutional neural networks for segmenting xylem vessels in stained cross-sectional images. *Neural Comput. Appl.* 32: 17927–17939.
19. Kita Y, Titis S, Awano T, Yoshinaga A, Sugiyama J. 2023. Simultaneous cell-by-cell recognition and microfibril angle determination in Japanese hardwoods by polarized optical microscopy combined with semantic segmentation. *Cellulose* 30: 8439-8450.
20. Jansen S, Kitin P, De Pauw H, Idris M, Beeckman H, Smets E. 1998. Preparation of wood specimens for transmitted light microscopy and scanning electron microscopy. *Belg. J. Bot.* 131: 41-49.
21. Gärtner H, Lucchinetti S, Scweingruber FH. 2014. New perspectives for wood anatomical analysis in dendrosciences: The GSL1-microtome. *Dendrochronologia* 32: 47-51.
22. Oribe Y, Morioka M, Shirahama C, Kawabe S, Nabeshima E, Ishida K. 2021. A novel tight cylindrical mold for epoxy resin embedding allows enhanced microscopic analysis of microcores extracted from woody plants. *Dendrochronologia* 69: 125875.
23. Ferreira BG, Teixeira CT, Isaias RMS. 2014. Efficiency of the polyethylene-glycol (PEG) embedding medium for plant histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 62: 577-583.
24. Mozzi G, Romero E, Martínez-Quezada M, Hultine KR, Crivellaro A. 2021. PEG infiltration: an alternative method to obtain thin sections of cacti tissue. *IAWA J.* 42: 204-208.
25. Schneider L, Gärtner H. 2013. The advantage of using a starch based non-Newtonian fluid to prepare microsections. *Dendrochronologia* 31: 175–178.
26. von Arx G, Crivellaro A, Prendin AL, Cufar K, Carrer M. 2016. Quantitative wood anatomy—practical guideline. *Front. Plant Sci.* 7: 781.
27. Gärtner H, Nievergelt D. 2010. The core-microtome: A new tool for surface preparation on cores

- and time series analysis of varying cell parameters. *Dendrochronologia* 28: 85-92.
28. Azrac A, López-Cepero JM, Babushkina EA, Gomez S. 2018. Applying methods of hard tissues preparation for wood anatomy: Imaging polished samples embedded in polymethylmethacrylate. *Dendrochronologia* 51: 76-81.
  29. Kitin P, Hermanson JC, Abe H, Nakaba S, Funada R. 2021. Light microscopy of wood using sanded surface of slides. *IAWA J.* 2021: 322-335.
  30. <https://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/automated-microscopes/> (2023/12/09 閱覽)
  31. <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscopes/inverted/ixplore-pro/> (2023/12/09 閱覽)
  32. <https://www.microscope.healthcare.nikon.com/about/news/nikon-instruments-launches-fully-automated-a1-confocal-laser-microscope-series> (2023/12/09 閱覽)
  33. <https://www.zeiss.co.jp/metrology/seihin/shisutemu/industrial-microscopy/smartzoom-5.html> (2023/12/09 閱覽)
  34. Deng J, Dong W, Socher R, Li LJ, Li K, Fei-Fei L. 2009. ImageNet: A large-scale hierarchical image database. In: Paper of 2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, Miami, FL, USA, 20-25 June 2009. pp.248-255.
  35. Birhane A, Prabhu VU. 2021. Large image datasets: A pyrrhic win for computer vision? In: Paper of 2021 IEEE Workshop on Applications of Computer Vision (WACV), Waikoloa, HI, USA, 5-9 January 2021. pp.1536-1546.
  36. Vezhnevets A, Buhmann JM, Ferrari V. 2012. Active learning for semantic segmentation with expected change. In: Paper of 2012 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, Providence (CVPR), RI, USA, 16-21 June 2012. pp.3162-3169
  37. Mittal S, Niemeijer J, Schäfer JP, Brox T. 2023. Best practices in active learning for semantic segmentation. arXiv:2302.04075v2.
  38. Strudel R, Garcia R, Laptev I, Schmid C. 2021. Segmenter: Transformer for semantic segmentation. In: Proceedings of the IEEE/CVF International Conference on Computer Vision (ICCV), 11-17 October 2021. pp.7262-7272.
  39. Wolny A, Yu Q, Pape C, Kreshuk A. 2022. Sparse object-level supervision for instance segmentation with pixel embeddings. In: Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), New Orleans, Louisiana, USA, 19-23 June 2022. pp.4402-4411.
  40. <https://github.co.jp/> (2023/12/03 閱覽)
  41. <https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/245888> (2023/12/03 閱覽)
  42. Bailey IW, Tupper WW. 1918. Size and variation in tracheary cells: I. A comparison between the secondary xylems of vascular cryptogams, gymnosperms and angiosperms. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 54: 149-204.

43. Bailey IW. 1920. The cambium and its derivative tissues. II Size variations of cambial initials in gymnosperms and angiosperms. *Am. J. Bot.* 7: 355-367.
44. 滝沢忠昭. 1974. カラマツ仮道管における膜孔の分布. 北海道大学農学部演習林研究報告 31: 481-500.
45. Sirviö P, Kärenlampi P. 1998. Pits as natural irregularities in softwood fibers. *Wood Fiber Sci.* 30: 27-39.
46. Noshiro S. 2011. Identification of Japanese species of Cupressaceae from wood structures. *Jpn. J. Histor. Bot.* 19: 125-132.
47. Scholz A, Klepsch M, Karimi Z, Jansen S. 2013. How to quantify conduits in wood? *Front. Plant Sci.* 4: 56.
48. Ladell JL. 1959. A new method of measuring tracheid length. *Forestry* 32: 124–125.
49. Wilkins AP, Bamber RK. 1983. A comparison between Ladell's wood section method and the macerated wood method for tracheid length determination. *IAWA Bull.* 4: 245–247.
50. Baas P, Schmid R, van Heuven BJ. 1986. Wood anatomy of *Pinus longaeva* (bristlecone pine) and the sustained length-on-age increase of its tracheids. *IAWA Bull.* 7: 221–228.
51. Mayer K, Grabner M, Rosner S, Felhofer M, Gierlinger N. 2020. A synoptic view on intra-annual density fluctuations in *Abies alba*. *Dendrochronologia* 64: 125781.
52. Ergun H. 2021. Segmentation of rays in wood microscopy images using the U-Net model. *BioResources* 16: 721–728.
53. Yoo HJ, Kwon O, Seo JW. 2022. Mask region-based convolutional neural network (R-CNN) based image segmentation of rays in softwoods. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 50: 490-498.
54. Mäkinen H, Jyske T, Saranpää P. 2008. Variation of tracheid length within annual rings of Scots pine and Norway spruce. *Holzforschung* 62: 123-128.
55. Bannan MW. 1950. The frequency of anticlinal divisions in fusiform cambial cells in *Chamaecyparis*. *Am. J. Bot.* 37: 511-519.
56. Bannan MW. 1957. The relative frequency of the different types of anticlinal divisions in conifer cambium. *Canad. J. Bot.* 35: 875-884.
57. Bannan MW. 1970. A survey of cell length and frequency of multiplicative divisions in the cambium of conifers. *Canad. J. Bot.* 48: 1585-1589.
58. Reynolds TPS, Burrige HC, Johnston R, Wu G, Shah DU, Scherman OA, Linden PF, Ramage MH. 2018. Cell geometry across the ring structure of Sitka spruce. *J. R. Soc. Interface* 15: 20180144.
59. Stagno V, Moricca C, Sadori L, Dell'Aglio E, Reale R, Capuani S. 2023. Evaluation of the efficacy of micro-Magnetic Resonance Imaging compared with light microscopy to investigate the anatomy of modern and ancient waterlogged wood. *Magn. Reson. Imaging* 102: 164-178.
60. Schubert M, Stührk C, Fuhr MJ, Schwarze FW. 2014. Imaging hyphal growth of

*Physisporinus vitreus* in Norway spruce wood by means of confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Holzforschung* 68: 727-730.

61. He K, Gkioxari G, Dollár P, Girshick R. 2017. Mask R-CNN. In: Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV), Venice, Italy, 22-29 October 2017. pp.2961-2969.
62. Ye C, Sundström MO, Remes K. 1994. Microscopic transmission ellipsometry: measurement of the fibril angle and the relative phase retardation of single, intact wood pulp fibers. *Appl. Opt.* 33: 6626-6637.
63. Ye C, Sundström O. 1997. Determination of S2-fibril-angle and fiber-wall thickness by microscopic transmission ellipsometry, *TAPPI J.* 80: 181-190.
64. Ye C. 2006. Spectroscopic imaging ellipsometry: real-time measurement of single, intact wood pulp fibers. *Appl. Opt.* 45: 9092-9104.
65. Ye C. 2006. Measurement of the microfibril angle and path difference of intact pulp fibers by spectroscopic imaging ellipsometer. *Nord. Pulp Paper Res. J.* 21: 520-526.
66. Jang HF. 2007. Circularly polarized light method and device for determining wall thickness and orientations of fibrils of cellulosic fibers. Patent No.: US 7,289,210 B2. Date of Patent: Oct. 30, 2007.

# Appendix

## A.1. 黄檗宗萬福寺の歴史と木材利用観、古材の樹種識別

### A.1.1. 黄檗宗萬福寺の歴史

黄檗宗萬福寺は、京都府宇治市五ヶ庄三番割に所在し、禅宗の一派である黄檗宗の大本山に当たる[1]。開祖は中国福建省福州福清県永福郷にある黄檗宗萬福寺の住持である隠元隆琦 (1592-1673) である。隠元は、長崎において建立した黄檗宗系寺院長崎三福寺の1つである東明山興福寺の役僧無心正覚 (しょうがく) (1613-1671) の強い要望から、承応三年 (1654) に長崎に渡航した[2]。本来は3年で帰国する予定であったが、日本国内の禅僧たちの強い要望により在留することとなった。寛文元年 (1661) 5月8日に徳川第四代将軍家綱を大檀越(だいだんおち)として、山城国宇治郡岡屋郷五箇庄村大和田において黄檗宗萬福寺が開創された[2]。隠元は伽藍の完成を見届けることなく寛文十三年 (1673) に逝去したものの、二代目の住持である木庵性瑠 (しょうとう) (1611-1684) が退隠した延宝八年 (1680) には一部の建造物を除き現在の伽藍に近い形にまで整備されたという[1-3]。

現在における萬福寺の伽藍配置図を Fig.A-1 に示す。伽藍の最大の特徴としては、国内では黄檗宗系寺院にのみ見られる天王殿の存在、そして東西方向を軸線として三門・天王殿・大雄(だいおう)宝殿・法堂(はつとう)を配置、その他の建造物に関しても同じ大きさのものを東西対称に配しており、総門のみが軸線を外している等、明代における禅宗寺院に見られる構成をとっている点にある[4]。また、萬福寺より創建が早い長崎三福寺を除くと、禅堂・齋堂が対称に配置され、それらと大雄宝殿が廊下で結ばれるという伽藍配置も特徴的で、この形式は九州において中枢的であった黄檗宗系寺院の伽藍にも引き継がれている[5,6]。萬福寺を構成するそれぞれの建造物に関しても、天井をアーチ状とした蛇腹天井(別名黄檗天井)や、大棟(おおむね)の上に鴟吻(しぶん)を載せるなど異国情緒に溢れた独特の建築様式をとっている[4]。

### A.1.2. 萬福寺における木材利用観

萬福寺における木材利用に関しては、昭和四十五年 (1970) 以降に修理工事が行われた建造物の修理工事報告書[1,3,7-12]をもとに議論を進める。修理工事報告書を見る限り、いずれの建造物において共通して使用されている樹種には、針葉樹のマツ属 (*Pinus spp.*)、ツガ属 (*Tsuga spp.*)、ヒノキ、スギ、広葉樹のケヤキ (*Zelkova serrata*) などが挙げられる。これらに加えて、特定の建造物の木材利用において建築様式同様に特殊性を垣間見ることができる。特殊性の1点目が、チーク (*Tectona grandis*) 材の利用である。萬福寺において用いられたチーク材は、寛文七年 (1667)、台湾に住む南蛮人が城を築くためにジャカルタより輸送していたものが嵐により難破し漂流、長崎に辿り着いたものを幕府が差し押さえて萬福寺建設の際に寄進したとされている[1]。この漂流してきたチーク材45本と、寛文元年 (1661) に商人勝性印(かつしょういん)が寄進した9本を合わせて、萬福寺大雄宝殿、禅堂、齋堂および天王殿の主に柱材として用いられたとされている[1]。上記のようにチーク材の大半

が偶然の出来事により得られたものではあるものの、それらが全て萬福寺の建設に用いられたことを考えると、萬福寺における木材利用観に特殊性が現れていると見ることができ。もう1つの特殊な木材利用観は、アスナロ属を積極的に利用している点である。報告書においてアスナロ属の使用が確認されているのは、東方丈(とうほうじょう)と松隠堂である。特に松隠堂の修理工事では、建築部材の樹種を網羅的に識別しているため、松隠堂設立当初(寛文三年, 1663年)から現在にかけてどの部材に対してどのような樹種が用いられたかを理解する上で極めて重要な資料となっている。松隠堂の場合、当初材として用いられている樹種の大半がアスナロ属であり、柱や桁といった構造部材はもちろんのこと、懸魚(けぎょ)といった装飾部材においても使用が確認されている。一方ヒノキは当初材として一部用いられているものの、その大半は後補材としての色合いが強い。2.1節で言及した通り、寺社建築におけるアスナロ属の利用は地域性・特殊性が高いため、萬福寺の木材利用において極めて強い趣向性もしくは用いざるを得ない事情が存在していた可能性が高い。現在大規模修理工事中である鐘楼ならびに伽藍堂(Fig.A-2)の木材利用においてもこのような傾向が現れる可能性は否定できない。以上より、萬福寺の歴史的・文化的背景は文献による記述と使用されている建材の樹種を通して明らかとなる点が多く、それ故建材として使用されるヒノキ・アスナロ属の明瞭な識別は大きな重要性を有している。

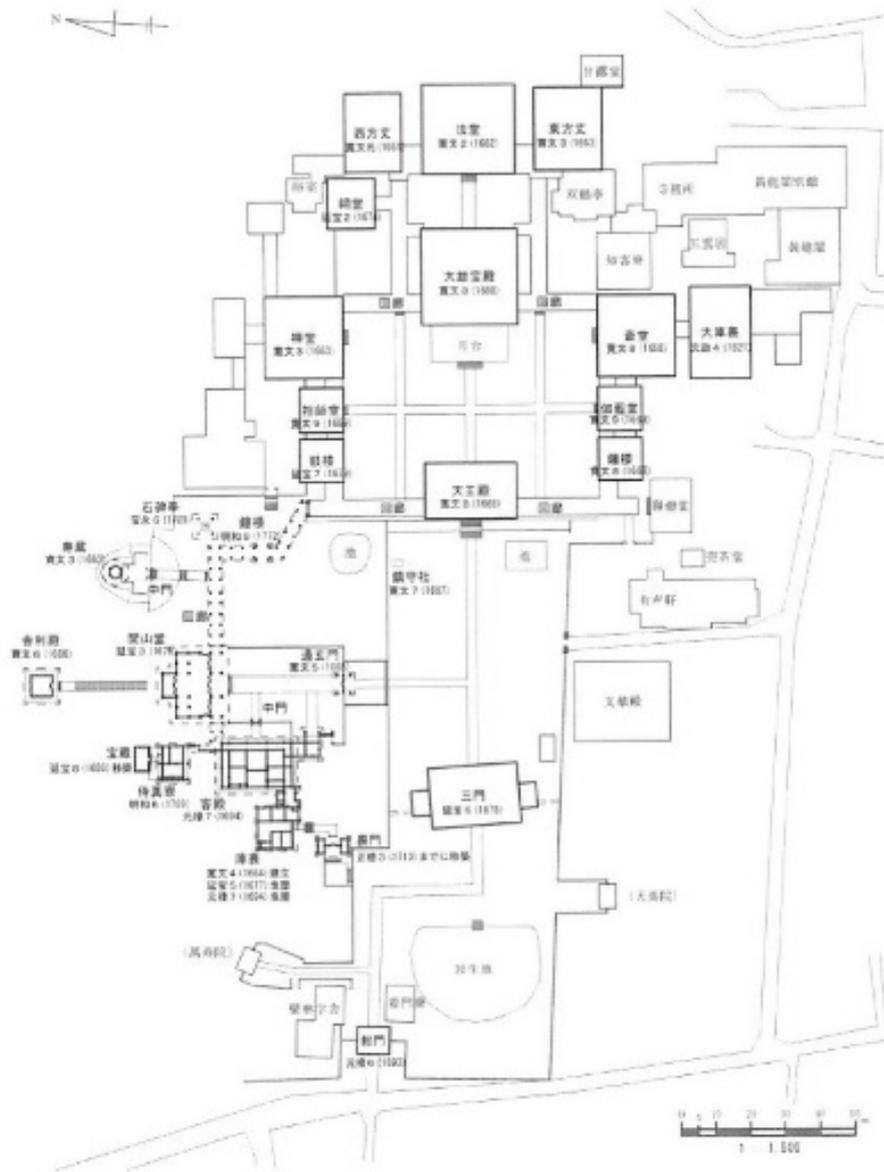


Fig.A-1 黄檗宗萬福寺伽藍配置図 ([3]より引用)



**Fig.A-2** 黄檗宗萬福寺で現在大規模改修工事を行っている文化財建築（筆者が許可を得て撮影）. (a) 伽藍堂, (b) 鐘楼.

### A.1.3. 参考文献

1. 京都府教育庁指導部文化財保護課編. 1986. 重要文化財萬福寺天王殿修理工事報告書, 京都府教育委員会, 京都.
2. 富士正晴, 安部禅梁. 1977. 古寺巡礼京都 9 萬福寺, 淡交社, 京都.
3. 京都府教育庁指導部文化財保護課. 2013. 重要文化財萬福寺松隠堂庫裏及び裏門・東方丈修理工事報告書, 京都府教育庁指導部文化財保護課, 京都.
4. 日本建築学会編. 2011. 日本建築史図集, 彰国社, 東京, p.174.
5. 山本輝雄. 1988. 九州の黄檗宗寺院における 2 つの伽藍構成について. 日本建築学会計画系論文報告集, 389: 143-149.
6. 山本輝雄. 1991. 筑後地方南部における黄檗派寺院の本堂形式とその変遷. 日本建築学会計画系論文報告集, 422: 125-137.
7. 京都府教育庁指導部文化財保護課編. 1981. 重要文化財萬福寺東方丈修理工事報告書, 京都府教育委員会, 京都.
8. 京都府教育庁指導部文化財保護課. 2009. 重要文化財萬福寺松隠堂・中門・侍真寮・宝蔵修理工事報告書 (本文編), 京都府教育庁指導部文化財保護課, 京都.
9. 京都府教育庁指導部文化財保護課編. 1970. 重要文化財萬福寺大雄宝殿・禅堂修理工事報告書, 京都府教育委員会, 京都.
10. 京都府教育庁指導部文化財保護課編. 1972. 重要文化財萬福寺通玄門・開山堂・舍利殿・祖師堂・寿蔵附中門・総門・鼓楼・法堂修理工事報告書, 京都府教育委員会, 京都.
11. 京都府教育庁指導部文化財保護課編. 1983. 重要文化財萬福寺西方丈修理工事報告書, 京都府教育委員会, 京都.
12. 京都府教育庁指導部文化財保護課編. 1989. 重要文化財萬福寺齋堂修理工事報告書, 京都府教育委員会, 京都.