

フーリエ変換画像処理の確立と熱帯樹木の 三次元的特性解析への展開

(研究課題番号 13660164)

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

京都大学図書



9810059350

附属図書館

平成15年3月

研究代表者 藤田 稔

(京都大学農学研究科教授)

科研

2002

332

フーリエ変換画像処理の確立と熱帯樹木の
三次元的特性解析への展開

(研究課題番号13660164)

平成13～14年度科学研究費補助金補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

成 15 年 3 月

研究代表者 藤田 稔

(京都大学農学研究科教授)

研究組織

研究代表者 藤田 稔 (京都大学・農学研究科・教授)

研究分担者 吉永 新 (京都大学・農学研究科・助手)

研究分担者 村田功二 (京都大学・農学研究科・助手)

研究経費

平成 13 年度 3,100 千円

平成 14 年度 1,000 千円

研究発表等

- 紀 昌子、緑川葉子、藤田 稔:アカマツ仮道管の形状と壁厚の年輪内変化, 第 51 回日本木材学会大会研究発表要旨集,p1 (2002) 岐阜
- 紀 昌子、石田洋二、藤田 稔:可視域光学系による細胞壁厚測定 of の課題と提案, 第 52 回日本木材学会大会研究発表要旨集,p9 (2003) 福岡
- Kiyoko HONJO, Minoru FUJITA, Mohd.Hamami SAHRI: Radial variation in the morphology of axial elements in *Acacia mangium*, Abstract of the 5th Pacific Region Wood Anatomy Conference, p8-9(2002) Yogyakarta-Indonesia
- 本庄貴代子、藤田稔、野沢正、M.H.Sahri:熱帯広葉樹木部繊維の木口面切片からの再構築, 第 53 回日本木材学会大会研究発表要旨集, p8,(2002) 福岡
- 尾形善之、門川朋樹、藤田稔:木部細胞形態の定量的画像処理のための環境設定(第 2 報)フィルムスキャナによる超広領域画像の非顕微鏡的サンプリングの試み,木材学会誌 48(5), 341-347 (2002)
- Yoshiyuki OGATA, Tadashi NOBUCHI, Minoru FUJITA, M. Hamami SAHRI :Asynchronous wood formation in young *Acacia mangium* planted in Malaysia. J. Wood Sci., 48:89-94(2002)
- Yoshiyuki OGATA, Minoru FUJITA, Tadashi NOBUCHI, M.Hamami SAHRI: Macroscopic and anatomical investigation of interlocked grain in *Acacia mangium*, IAWA J. 24, 13-26(2003)
- Yoshiyuki OGATA, Minoru FUJITA, Tadashi NOBUCHI, M. Hamami SAHRI:Anatomical investigation of wood fiber and vessel orientation in *Acacia mangium*,Proceedings of the Fourth International Wood Science Symposium, 363(2002) Jakarta-Indonesia
- Yoshiyuki OGATA, Minoru FUJITA, Tadashi NOBUCHI, M. Hamami SAHRI:Three dimensional pattern of wood grain in *Acacia mangium* trunk. Abstract of the 5th Pacific Region Wood Anatomy Conferencets, 17(2002)
- 藤田 稔、緑川葉子、石田洋二:木部細胞形態の定量的画像処理のための環境設定(第 1 報)積算画像処理における各種誤差の検定、木材学会誌 48(5), 332-334 (2002)
- Yohji, ISHIDA, Minoru FUJITA:Multiformity of cell wall thickness in a tracheid and the geometrical models, Abstract of the 5th Pacific Region Wood Anatomy Conference,p8,9(2002) Yogyakarta-Indonesia
- MinoruFUJITA,Yohji ISHIDA and Masako KINO:Gold-lining method of inner surface of wall to measure precisely the cell wall thickness. Abstract of the 5th Pacific Region Wood Anatomy Conference, p5(2002) Yogyakarta- Indonesia
- Chunhua ZHANG, Minoru FUJITA, Keiji TAKABE :Extraction and analysis of the tangential arrangement of cambial cells in Japanese hardwood species, J. Wood Sci., 48, 353-358(2002)
- Chunhua ZHANG, Minoru FUJITA, Keiji TAKABE:Ray-contact and non-contact fibers in hardwoods. Abstract of the 5th pacific region wood anatomy conference, p31(2002) Yogyakarta,Indonesia
- Chunhua ZHANG, Minoru FUJITA, Keiji TAKABE:Contact and non-contact proportions between axial elements and rays. IAWA J. (in press) (2003)

目次

第1章 緒言	1
第2章 積算画像処理法(OAIA)の環境設定と細胞壁の厚さ測定法の確立	1
2.1 超広領域画像 sampling の試みと10%誤差範囲の工程管理への一提案	2
2.2 線の位置分解能の提案による光顕の測定能力の拡張	2
2.3 細胞壁厚さの高精度測定法	3
2.3.1 光学顕微鏡法による細胞壁厚測定の問題点	
2.3.2 標本作製と観察時の問題点	
2.3.3 顕微鏡で測定される細胞壁厚とは	
2.3.4 標準試料と木材細胞壁での各種顕微鏡法の適用結果	
2.3.5 金の内張法(Au-lining)法による定量的壁厚測定の見直し	
2.3.6 細胞壁厚の光顕的測定システムの提案	
第3章 フーリエ変換画像処理法(FTIA)の確立とさらなる発展に向けて	8
3.1 FTIA の独自プログラムの作成と濃度管理の向上	8
3.2 極座標系からデカルト座標系への変換	8
第4章 3次元解析とステレオロジー	9
4.1 3次元解析の重要性とこれまでの試み	9
4.2 連続切片の再構築	9
4.3 軟X線投影法	9
4.4 共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)と相互相関解析による木口切片からの木理解析への応用	9
4.5 今なぜ stereology か	10
資料1 藤田 稔、緑川葉子、石田洋二:木部細胞形態の定量的画像処理のための環境設定(第1報) 積算画像処理における各種誤差の検定、木材学会誌 48(5), 332-334 (2002)	11
資料2 尾形善之、門川朋樹、藤田稔:木部細胞形態の定量的画像処理のための環境設定(第2報) フィルムスキャナによる超広領域画像の非顕微鏡的サンプリングの試み、木材学会誌 48(5), 341-347 (2002)	20
資料3 Yoshiyuki OGATA, Minoru FUJITA, Tadashi NOBUCHI, M.Hamami SAHRI: Macroscopic and anatomical investigation of interlocked grain in <i>Acacia mangium</i> , IAWA J. 24, 13-26(2003)	27

第1章 緒言

研究代表者である藤田(筆者)が木材の組織構造の3次元解析と定量化に挑んで、はやくも20年を経過してしまっただけでなく、この20年はパソコンが研究室へ導入され、様々な分野で活用されるようになり、そしてごく最近ではデジタルカメラ(以後デジカメと略記)が確固とした地歩を築くまでになった時期である。すなわち従来の写真フィルムによる形態像(以後画像と呼ぶ)の記録、すなわちアナログ画像処理から、CCDカメラによるデジタル画像処理への劇的な変化の時期でもある。筆者が木材の超微形態学を志した35年も前には、スケッチに代わって写真法が画像の記録に一般化していた時代であった。鮮明かつ微細な、そして説得力のある美しい写真を求めて、研究室の仲間達と腕を競い合った。この意味では偏執狂とも言える原田浩教授、佐伯浩助教授の両先生のもとで、筆者はすっかり顕微鏡のマニアになっていた。しかしながら一方では、新規な分野としてコンピュータに対する憧れも持ち続けてきた。それは観察された折角の鮮明な画像も、数値化するには全く無力であったからである。洗練された顕微鏡とくに光顕の画像に比べると、コンピュータを介した20年前のデジタル画像の画質は大変見劣りするもので、嘲笑の対象ですらあったが、現在の普及型デジタルシステムと、そこでサンプリングされた画像の質は、その基本性能(具体的には離散化分解能)において写真法にほぼ匹敵し、その利便性においてはアナログ写真法をはるかに凌駕していると実感している。このデジタル化の流れはもはや逆戻りしないであろう。そして画像の数値化すなわち定量解析が高精度で実行できる環境が、装置的には整ったと判断される。また第2章に述べるように、木材細胞形態の重要な要素である細胞壁の厚さを、光顕で高精度かつ効率的に測定することに成功した。この意味でも木材細胞構造の定量解析の環境がハード面で整ったと言えよう。

筆者がソフト面で強調したいことは、この一連の工程をバランス良く管理することである。アナログ、デジタル、数学と、個性の違う3者を均衡させて全工程を管理することは容易ではない。正直なところ未だ正解を見いだせないでいる。しかし定量解析を目指すからには、これは避けて通れない課題である。アナログ工程では、写真の出来映えで実験の信頼性は評価され得る。しかし数値的データで表示される画像処理では、実験の巧拙やミスは隠されてしまう。解析精度は最も誤差の大きい工程に支配されるので、個々の工程を厳密に管理し精度を検定しておく必要がある。測定個所の客観性はさらに重要な定量解析の必須要因である。そして精度をバランス良く管理して初めて意味のある研究と言えよう。本報告に添付した資料1はこうした環境設定の用語と精度管理をまとめたものである。

天然生産物である木材の細胞構造は極めて大きなゆらぎを伴う。ゆらぎの数量表現として筆者らは的確な尺度を未だ見いだせないでいる。そこで便宜的に分散として表現している。また測定精度として筆者は個々の処理工程を10%の誤差範囲で揃えようと試みている。言い換えれば精々二桁の精度で定量解析できれば良しと考えている。この10%レベルは通常の物理量の測定に比べると極めて低いが、これが画像の定量解析の現状と考えている。一方で、これだけ装置的な改善が進んできたのに対して、これらを使用した画像処理の実例はいまだ少ないのが実態であり、残念である。

筆者はこの20年間に於いて様々な画像処理ソフトウェアを体験した。これらソフトウェアは各々が独自の開発目的で発展してきたものであり、木材の細胞形態解析においてはそれぞれ一長一短であった。筆者は若者達と共同研究を進めることで、多数の機種を経験し、画像処理ソフトの特徴と個々の処理の内容に詳しくなった。今回も実際に装置や数式を使いこなしてくれたのは尾形善之、張春花、緑川葉子、本庄貴代子、紀昌子君ら学生諸君であり、彼らの力に負うところが多かった。筆者は実際に情報処理機器を使いこなす段階ではむしろ稚拙なことをここで断っておかなければならない。ここに上記学生諸君に謝意を表するものである。

なお本報告は代表者である藤田 稔が直接関係する内容に限定した。

第2章 積算画像処理法(OAIA)の環境設定と細胞壁の厚さ測定法の確立

2.1 超広領域画像 sampling の試みと 10%誤差範囲の工程管理への一提案

前章に述べたように、通常の画像処理すなわち積算画像処理(OAIA)では 10%の誤差範囲で光顕観察から始まる一連の工程を管理しようと試みた。定量解析を目的とする画像処理において、最も重要なことは画像 sampling の客観性である。これを達成するにはできるだけ広い領域からの画像入力が見られる。そこで film scanner を導入することにした。その成果については添付資料2を参照されたい。これを要約すると超低拡大の光顕写真フィルムからの画像 sampling に成功し、さらに光顕を使用せずにプレパラートからの直接的画像 sampling にも成功した。切片からの直接 sampling は光顕の各種収差や焦点合わせの際の誤差の混入を防止できる。この方法は離散化分解能の観点から見て、現段階では $6.35 \mu\text{m}$ (4000dpi) であり、道管の解析には最適である。しかし、針葉樹仮道管では視覚的に樹種識別には使えても、定量解析には少し問題が残る。早材部では細胞径の多くは $30\sim 50 \mu\text{m}$ でも、晩材部や個々の仮道管の先端部では $20 \mu\text{m}$ 以下のことが多い。10%の誤差範囲を保証するには、 $2 \mu\text{m}$ 程度の離散化問題が見られる。2000年頃には scanner の改善に目を見張るものがあったが、その後は急に改善速度がダウンした。メーカーの主眼は現在はデジカメに力点を置いているように見える。

ここで測定精度について新たな基準を提案する。筆者らは一貫して測定対象の寸法に対して、その 10分の 1、すなわち 10%の寸法の測定精度を目標としている。しかしこの測定精度を満たさない寸法の小さいものも含まれていても、その存在比が全測定対象の 10%以下であればその影響は小さいと言える。しかし異常に寸法が大きいものも含まれると、平均値は過大評価されてしまう。例えば木部繊維を測定対象として、その 10 倍の寸法の道管が 1%混入すると、全体として 10%大きく見積られる。今後はこの新しい基準を導入し、体系づけたい。

2.2 線の位置分解能の提案による光顕の測定能力の拡張

細胞壁の厚さは、スギ早材仮道管の single wall で $1 \mu\text{m}$ 程度であり、細胞先端などでは $0.5 \mu\text{m}$ の場合すらある。木材形態の画像処理では、木口断面における仮道管壁と内腔部との 2 値化が最も基本的かつ最初のデジタル工程となる。しかしながら、 $1 \mu\text{m}$ の形態要素(仮道管先端部では $0.5 \mu\text{m}$)については、その 10%の精度すなわち $0.1 \mu\text{m}$ ($0.05 \mu\text{m}$)の解像力を光顕に要求すると、従来の有名な Abbe らの光学的限界、すなわち

$$\text{解像力} = \text{係数} \times \text{波長} / \text{開口数} \quad (R = a \lambda / \text{N.A.}) \quad (\text{式 1})$$

にぶちあたってしまう。ここで係数 a は近接する 2 点間の識別では 0.61、2本の線では 0.5 と見積られる。細胞は多角形(多边形)であり、細胞壁の抽出では点よりも線が問題となるので後者が重要である。現在の最高性能の光顕で、油浸レンズを使用しても線分解能は $0.22 \mu\text{m}$ と見積もられ(添付資料1)、二桁の精度は絶望的である。最近共焦点走査レーザー顕微鏡などの優れた顕微鏡が続々と開発されてきた。これらによって一見この難問が克服できるように錯覚するが、本質的には無理がある。また上記の分解能(光軸を z 軸としたときの x, y 平面での Rayleigh limit)は光学顕微鏡の最高の能力を定義したものであり、標本作製や光顕操作法の善し悪しで実際にはずっと能力が劣っていることに留意しなければならない。こうした観点から、筆者らはこれまでの報告では敢えて細胞壁の情報を結果に含めないように注意を払ってきた。

一方著者らは、光顕の分解能について、新しく線の位置分解能(resolution of line localization: R_{LL})の考え方を提案した。この時係数 a は 0.15 となる。これについては添付資料を参照されたい。この提案は濃度変化による場所の識別は Abbe、Rayleigh らの limit よりもずっと小さい perception limit の概念によっても裏付けられる。この線の位置分解能 R_{LL} の提案に対して、寄せられた疑問の多くは(sinc 関数)²の極大値から 10%濃度(輝度)が低下する位置をもって識別限界と見なした根拠である。本項ではこれについ

て説明を加える。約 1 千光年の彼方にある北極星は、我々の目に入る段階で大きさを持たずに、数学的な意味の点に見なし得る。しかし夜空に北極星を見上げる時、その大きさは測れなくとも位置は特定できる。ここには Rayleigh limit を超える perception limit があり、コントラストが支配因子である。最近の 1 分子までも可視化する蛍光顕微鏡等の発展もこの延長上にある。デジタル画像処理では理想的には 1 画素でもそれが周りよりも濃度が異なっておれば識別が可能である。しかし定量解析を目的とする画像処理では、測定対象の画像領域全体における照明の均一性、標本やレンズの汚れ、切片のうねりによる焦点はずれなどを考慮しなければならない。筆者はある程度の安全を見越して、キリの良い 10% の濃度低下点を採用した。従来の Rayleigh limit の数字が必ずしも理論的に決定されたものではなく、キリの良い位置から演算されたのと同様である。しかし重要なことは、この R_{LL} の提案によって細胞壁厚さを二桁で定量解析する際の障壁が取り除かれたことである。

2.3 細胞壁厚さの高精度測定法

2.3.1 光学顕微鏡法による細胞壁厚測定の問題点

光顕で細胞壁厚を測定する場合の最も重要な課題は、測定対象が光顕の画像拡大能力の限界付近にあることである。さらに問題となるのは、細胞壁と内腔部(W-LB)の正確な識別、すなわち edge 問題である。これには 2 種の要因(コントラストの差と屈折率の差)がある。人間は強調された edge の像を好むので、無意識のうちに位相コントラストや Fresnel 縞などに頼ってしまう。この時本来の焦点位置(just-focus)から無意識のうちにずれ(de-focus)しており、W-LB はどちらかに移動してしまう。通常の染色木口切片を、屈折率を最適にして封入すると、壁部は暗部に、内腔は明部となり、W-LB は階段関数的となるべきであるが、実際には境界で濃度が緩やかに移行する。移行部の巾は線分解能($a=0.5$)の 2 倍($a=1.0$)以上と見積もられ、式(1)の係数 a は倍加してしまう(式 1)。二桁の精度で細胞壁厚を測定できるのは油浸系でも single wall 厚さで $4.0 \mu\text{m}$ 以上の対象物となる。さらになだらかな濃度変化の中で視覚的に閾値を決めるには不安が伴うので、観察者は edge 強調処理(コンデンサを絞込み:部分的コヒーレント条件)を施してきた。この操作はさらに大きな誤差を生起する。これらに加えて切片厚さも大きく影響する(2.3.2)。結論的には通常の染色法では W-LB の定量解析は絶望的な状況にある。

ここで筆者らが提案した線の位置分解能を採用すると、

$$R_{LL} = 0.15 \lambda / \text{N.A.} \quad (\text{式 2}) \text{ となる。}$$

この定義では油浸系レンズで $R_{LL} = 0.06 \mu\text{m}$ となり、約 $0.5 \mu\text{m}$ 厚さの single wall 壁でもほぼ二桁の精度が期待でき、乾燥系レンズでは $0.10 \mu\text{m}$ と見積もられる。上記の悪影響を克服できれば、光顕で、しかも乾燥系レンズで約 $1 \mu\text{m}$ の single wall を測定できる。係数 a はさらに小さくできると期待される。また仮道管先端部などの、 $1.0 \mu\text{m}$ 以下の single wall については、これらの出現頻度は小さいので、2.1 に述べたように深刻な誤差を生起しないと考えられる。

2.3.2 標本作製と観察時の問題点

ここでは切片の厚さと光軸に対する細胞壁の傾斜、細胞壁・包埋樹脂・封入媒体の屈折率の変動、染色効果などについて考察する。切片の厚さについては、光顕の被写界深度がまず問題となる。焦点合わせや正焦点の範囲については、カメラ等との混同もあって参考書により用語や定義が様々で混乱するが、本報では以下の様に整理する。①焦点深度については標本側での正焦点とみなされる範囲とする。②de-focus については、対物レンズと標本間の距離が just-focus 距離よりも離れている場合を under-focus、近すぎる場合を over-focus と呼ぶ。③just-focus と見なされる正焦点の範囲は光軸に沿った場合の Rayleigh limit で規定する。

通常の $20\ \mu\text{m}$ 厚程度の切片では、油浸系はもちろん、乾燥系でも just-focus の部分は切片のごく一部で、他は de-focus 像を生起し、必然的に画像劣化の原因となる。 $3\ \mu\text{m}$ 程度の薄切片でも同様であるが、分解能を多少犠牲にしても深度を優先し、N.A.が 0.8 以下の乾燥系レンズを選択して撮影あるいは画像 sampling するのが得策と判断される。細胞壁が光軸に対して傾斜している場合には just-focus 範囲でも傾斜細胞壁の投影像にならざるを得ない。これに de-focus 像が加わり 拡大像を著しく劣化させる。一見正しい木口切片でも、部分的に木理が傾斜する場合も多く、細胞の tip 部は必然的に湾曲する。これら非焦点情報の悪影響の除去を画期的に改善できると期待されるのが共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) であり、木材への応用例も報告されているが、今回尾形らはその適用範囲は木口切片表面から僅か $15\ \mu\text{m}$ に過ぎないことを検証した。

境界面での屈折率の変動は焦点位置によって見せかけのコントラスト、いわゆる Becke 線などを生起する。これは輪郭線を一見明瞭にする効果を持つが、本来の境界位置は移動する。二次壁と細胞間層の屈折率は 1.54 と 1.46、封入材にバルサムもしくはグリセリンを使うと 1.52 と 1.46、エポキシ樹脂包埋薄切片では内腔を充填するエポキシ樹脂の屈折率はバルサムとほぼ同じで 1.52 と見積もられる。そこでエポキシ樹脂薄切片での W-LB では 0.02 の差異があり、コンデンサを絞って弱 under focus 条件にすると、Becke 線が内腔側に表れて一見輪郭が明瞭になるが、細胞壁厚は過小評価されることになる。グリセリンで封入する紫外線顕微鏡では屈折率の差異は 0.08 もあり、影響が大きい。

2.3.3 顕微鏡で測定される細胞壁厚とは

細胞壁の厚さは、生材 (立木) 状態、気乾状態、絶乾状態で異なるはずである。樹木生理の観点では前者が、木材利用では後二者が望まれる。顕微鏡標本の細胞壁は如何なる状態であろうか。通常の sliding microtome 切片では、煮沸による水膨潤、薄切時のひび割れによる拡大、エタノール脱水による収縮等が重複している。顕微鏡測定の結果は物理的測定から推定される結果よりも大きな値をとることが多いとされる。数 μm の壁厚値に対して、従来の測定では 10 倍程度も厚い切片を用いてきたので、光学的に過大評価してきた可能性が高い。本報で述べた方法は、光学的には誤差が非常に少ないと期待されるが、水膨潤などの影響は未検定である。

一方細胞壁の厚さとは、単一の細胞でも部位によって大きく変動することが明らかとなった。例えば仮道管の壁厚は中央部と先端部で異なり、同一横断面でも接線壁と放射壁、また壁中央部と corner 部で異なることが指摘されている。single wall 壁厚の測定が可能となったので今後はこれらの解析が望まれる。

2.3.4 標準試料と木材細胞壁での各種顕微鏡法の適用結果

日本において最も重要な針葉樹材であるスギ (*Cryptomeria japonica*)、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、アカマツ (*Pinus densiflora*) を供試した。細胞壁の厚さは早晚材の移行過程で大きく変化するので、本研究では成長の良い年輪部から試料片を切り出した。本報では主にアカマツの早材の結果を報告する。

木材試片を約 3 時間煮沸処理し、sliding microtome により $10, 20, 30, 50, 100\ \mu\text{m}$ 厚さの木口切片を数枚ずつ連続的に切り出した。この操作を数回繰り返して、全体の切り込み量を約 5mm とした。切片の多くは 0.1% サフラニン染色し、一部は無染色とした。 $10-30\ \mu\text{m}$ の切片はバルサム封入し、 $50, 100\ \mu\text{m}$ 切片は水封入して、これらを低倍率対物レンズで撮影・記録した。成長の良い年輪部を選び、たまたま早材部に現れた樹脂道を基準として、その周辺の仮道管を、放射細胞列をアルファベット記号で、年輪境界からの順番を数字で標識した。そして連続切片を軸方向に再構築して、放射組織との接触状況や仮道管の部位 (body と tip) を検定した。

・従来の木口切片と通常の生物顕微鏡(BOM)観察

ここでは $20\ \mu\text{m}$ 厚さの木口切片を 0.1% サフラニン染色し、エタノールで洗浄・脱水してバルサム封入した標本と、対物マイクロメータのスケール線(太さ約 $1.8\ \mu\text{m}$)を、BOM(Olympus BX50)生物顕微鏡で対物レンズ(UPlan Apo シリーズ)とコンデンサレンズを様々に調整して拡大撮影した結果を記す。画像入力についてはデジタルカメラ(Olympus DP50, 2024×2024 画素)で拡大像を直接画像入力し、また Fuji Minicopy あるいは Fuji Neopan F に記録した拡大像を film scanner を介して画像入力した。標本面に換算された離散化分解能 R_D (画素巾 Ws)は、 $0.12\ \mu\text{m}$ (40倍レンズ)、 $0.03\ \mu\text{m}$ (20倍レンズ)である。

そして5カ所程度の早材仮道管壁(double wall)の濃度分布を、壁に垂直に1次元トレースした。最も濃度の高いのは IL すなわち細胞間層に相当する。しかし W-LB を特定するのは容易ではなかった。コンデンサの N.A. が大きいときには W-LB が不明瞭となり、絞ると境界付近に小さな peak が現れた。しかし peak 位置は焦点や絞りで大きく変動し、正確な計測は不可能と判断された。

・薄切片法と BOM 観察

$50\ \mu\text{m}$ 厚の木口切片を 2.3.6 の④～⑧の工程に従い $1\sim 5\ \mu\text{m}$ 厚さの薄切片を Sovall JB4 ミクロームとガラスナイフで切り出した。切片の一部はサフラニン染色して、バルサムに封入し画像 sampling した。無染色切片は、水(屈折率:1.33)、グリセリン(同 1.44)、バルサム(同 1.52)で封入し、屈折率の影響を検定した。

染色切片からは美しい仮道管断面像が得られたが、部分的に de-focus 像の部分もあった。この de-focus は切片の波打ちに起因する。 1 および $2\ \mu\text{m}$ 厚切片では切片の波打ちが著しく、切削方向への収縮も大きくて定量解析の作業を阻害した。今回の薄切片法での定量測定には $3\ \mu\text{m}$ 以上の厚さが要求されると判断する。W-LB の peak は N.A. が大きいときにはやはり特定できず、光束を絞った時に初めて peak が特定できた。しかし peak 位置は絞りと焦点位置によって移動した。edge 問題の一つである屈折率の影響については、わずかに over-focus 条件(Becke 線が内腔側に生起する条件すなわち壁の輪郭が強調される条件)が、視覚的には最適と判断された。さらに under 条件では、IL が白く浮き出る artefact を生じた。染色効果の点では IL は二次壁部より濃度が大きいはずであるが、屈折率では逆に小さいので、二次壁に対する Becke 線が生起して、濃度が下がったと考えられる。反対に under-focus 条件では二次壁部が白く浮き出て、位相差顕微鏡における bright contrast 条件と類似した像となった。このように通常の薄切片法でも壁厚測定は大きな誤差を伴い、一般的には壁厚値を過小評価する傾向があった。

・スケール線による edge 問題と線の位置分解能(R_{LL})の検定

屈折率が均一と期待され、濃度が画然と変化する対物マイクロメータのスケール線を用いて、edge 問題のうち濃度差の影響を検証した。まずスケール線の巾を測定した。N.A.1.30、just-focus 条件でスケール線を画像 sampling し、これを標準とした。つぎにコンデンサを絞ったコヒーレント条件で、focus 条件を変えて Fresnel 縞の発生を検定した。これは under および over の両条件で現れ、後者は虚の Fresnel 縞と考えられる。edge の位置は高濃度側に移動した。これは壁厚の過小評価につながる。

一方ケーラー照明(インコヒーレント条件)のもとで、edge での濃度変化を調べた。実測を容易にするために、N.A.を 0.3 と小さくして edge での濃度変化域の巾(transition:T)を大きくした T は $1.8\ \mu\text{m}$ と見積もられ、2.3.1 での推定を裏付ける。焦点条件を変えると T は増大した。

ここで just-focus 像と $1\ \mu\text{m}$ の de-focus 像を画像入力し、これらを最大濃度の 90%位置で 2 値化し、さらに細線化処理して両者を比較すると、両者は一致した。これは線の位置分解能 R_{LL} の妥当性を示す。

・特殊光顕法

①共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM): CLSM には内部構造を観察できる落射蛍光顕タイプと、大気中で表面構造を観察できる反射タイプの 2 種類がある。前者では Olympus FLUOVIEW を用いた。照明に

は波長 534nm の He-Ne レーザーを、590nm 以下の波長をカットするフィルタを用い、100 μ m 径のピンホールを用いた。3 μ m、20 μ m、100 μ m の染色切片をバルサム封入し、切片の表面側から内部へと逐次 optical sectioning(OS)し、各々の画像をサンプリングした。3 μ m 薄切片は樹脂包埋の効果で損傷なく薄切されているので、表面近くで明瞭な W 像と IL 像が観察できた。しかし W-LB についてはやはり濃度の移行域(T)が検出された。一方 20 μ m、100 μ m 切片では、表面近くの OS では microtome 切削時の切片の損傷が目立ち、OS が深くなると光量が急激に減少し、像が不安定となった。仮道管壁が光軸と平行に位置しているので、照明光と蛍光が染色された細胞壁中を長距離通過する間に吸収された結果と判断される。安定した測定値が得られるのはわずかに 15 μ m 程度と判断された(尾形善之ら:投稿準備中)。またフォトマルの感度を変えると edge の位置が大きく変動し、single wall の測定を繰り返すと値が変動した。落射タイプの CLSM は大変優れた装置ではあるが、定量的解析には未だ問題点が多い。一方反射タイプの CLSM には Lasertek 1LM15 を使用した。得られた拡大像は SEM 像に類似していたが、分解能の点では限界があり、IL の検出も困難であった。

②位相差顕微鏡(PhCM): W、IL と、L のエポキシ樹脂は各々屈折率が少し異なる。PhCM はこの差異をコントラストに変換できる。バルサム封入した 3 μ m 薄切片を PhCM を用いて bright contrast 条件で観察すると、W は明るく、IL は暗く観察されたが、W-LB での halo が著しくて壁厚値は過大評価された。またナイフマークが著しく強調され、画像処理には不適であった。

③微分干渉顕微鏡(DIC): ②と同じ薄切片を観察した。特定の方位と特定の edge 強調部分では W-LB や IL が明瞭に観察できたが、観察視野のなかで背景の濃度勾配があり、濃度閾値を用いる画像処理には致命的な短所になった。

④偏光顕微鏡(PoM): 針葉樹仮道管横断面切片では、細胞壁の方位(対角位と消光位)の影響もあるが、暗黒の背景の中で S_1 層と S_3 層が輝き、 S_2 と IL は暗いままである。通常 S_3 層は非常に薄いので、 S_3 の場所を W-LB と考えても実用的には差し支えなからう。実際に 2.3.5 での Au-lining 層と PoM での S_3 層を同一切片の同一部位で比較した場合に、両者は使用した機材の離散化分解能 R_D の範囲では区別できなかった。これは Au-lining 層の厚さが非常に薄いことの証左にもなる。一方 IL は S_1 層に挟まれた暗色線で特定できる。消光位の影響は甚大であるが、深刻な edge 問題を克服できる利点があることが明らかとなった。

・電子顕微鏡法

100 μ m 厚さの木口切片をアロンアルファで包埋し、3-5 μ m 薄切片を 10 数枚に切りだした。これら薄切片と切り残した数 10 μ m 厚さの薄片をアセトンで脱包埋し、通常の Au-coating 後に SEM(JSM-2200T)観察した。また 2.3.5 に述べる Au-lining 切片を、薄く Au-coating して SEM 観察した。アロンアルファ包埋切片では、細胞壁横断面は、内腔表面と同時に美しく観察できたが、W-LB は edge 部の SEM 観察の特徴として高輝度となり、正確な位置の特定が容易ではなかった。また IL は不明瞭であった。さらに仮道管全体が大きく変形していた。これはアロンアルファの硬化時に引張応力が発生し、ガラスナイフによる薄切時に収縮したためであろう。定量解析には問題である。エポキシ樹脂包埋試料の薄切片では W-LB が特定できたが IL は不明瞭であった。SEM 観察は分解能と被写界深度の点では光顕に優るが、逆に拡大率は不安定となる。また W-LB と IL の特定が困難である。反射型 CLSM と同様に細胞壁の水膨潤など特別な観察目的を除いては、SEM 観察の利点はない。

TEM 観察については、光顕よりも分解能の観点からははるかに優れているが、著者らの経験から、超薄切片作製時と観察時の電子線照射による寸法変化が著しい。また作業の煩雑さなどから定量解析には不適であると判断される。

2.3.5 金の内張法(Au-lining)による定量的壁厚測定の見直し

・輪郭線間隔測定の見直し

古典的な分解能の概念、式(1)では定量測定が不可能と判断され、edge 問題などの影響も甚大である。そこで特定の巾を持った single wall について、壁の巾自体を測定するのではなく、その両端の輪郭線(W-LBとIL)を抽出し、線と線の間隔を測定することにした。この方法の見直しは、edge 問題を回避できるのみならず、線の位置分解能 R_{LL} を活用できることである。さらに次のような利点があった。①光顕の被写界深度の影響を軽減できた。de-focus 像は輪郭線を鈍くするが、濃度は両側に等しく広がり、濃度 peak の位置は変化しないと期待される。試みにスケール線を低開口条件で、just-focus と defocus 像を作製し、画像処理の濃度 filter で 2 値化して、巾を持った線を細線化すると、両者が一致することで検証できた。②細胞壁が切片中で光軸に対して傾斜している場合でも測定が遂行できた。傾斜の影響は深刻であり、切片の中央で焦点を合わせると両側で濃度は対象となるが、焦点が上下にずれると非対称となり①での手法は使用できない。しかしながら幸運なことに、壁が傾斜していても W-LB と IL の peak や広がり同調的に移動するので、両者の間隔は変化しないと期待される。そこで正しい木口面(傾斜 0°)から逐次 15°まで傾斜させて薄切片を作製し、single wall 測定値を 0°の値と比較した。結果として傾斜の悪影響は克服できたと判断される。

一方 Au-lining では、coating された金の層が付加されるので、壁厚値は過大評価される危険性がある。sliding microtome で成形されたスギ試片を、通常の SEM 観察と同様に表面で 0.05 μm 程度の厚さで Au-coating された場合、試片の縦断切片の検定から、仮道管内表面の lining 効果は早材部で約 50 μm 深さまで、晩材部では 20 μm 程度であった。すなわち 100 μm 厚木口切片では、切片の両側から金粒子が入り込むので、早材仮道管は内部まで lining され、層の厚さは表面近くでは 0.05 μm と見なされるが、内部ではずっと薄いと考えられる。例え Au 層が 0.05 μm であっても、対象物の 10% 以下となり無視できる。晩材部では lining 効果が及ばない部分も生じるので、より表層から薄切片を得る必要がある。

・誤差の影響と画像処理への適用性

目的とする形態要素の拡大像を視覚的に識別するのは比較的容易であるが、解析できる要素数は限定されて定性的解析に留まらざるを得ない。定量的解析には測定場所の客観性と一定数以上の測定数が要求される。そこで BOM で測定を実施するには、作業が極めて煩雑な油浸系レンズは実際的ではない。この点で乾燥系の対物レンズの活用が必須と判断される。2.2 に述べたように N.A. が 0.7 程度の 40 倍対物レンズでも筆者らが提案した R_{LL} を活用すると 1.0 μm の壁厚が二桁まで測定できる。

2.3.6 細胞壁厚の光顕的測定システムの提案

針葉樹仮道管壁厚の定量的計測を想定して、測定精度と作業効率からつぎのような実験工程を提案する。

① 5mm×5mm 程度の木口面と数 cm 程度の軸方向長さを持つ試片を作製し、角を削り取って方位を標識する。0.1% サフラニン水溶液中で数時間煮沸させて、軟化および染色処理する。その後何度か水を取り替えて煮沸しサフラニンを洗い出す。

② 通常の sliding microtome により、20 μm 数枚と 100 μm の木口切片数枚を連続的に切り出し、番号を付けて wet 状態で保管する。薄切後の試片も wet 条件で保管しておき、必要に応じて繰り返して上記の工程を繰り返す。20 μm 切片は通常の工程で ethanol 脱水・xylen 置換し、balsam 封入する。100 μm 切片は 80% ethanol で、IL の染色は残し、SW は洗い出す。これらを水封入し、20 μm 切片と合わせて低拡大倍率で撮影記録しておく。画像記録後の 100 μm 切片は乾燥保存する。

③ 100 μm 切片は SEM 用の sputter-coating 装置で、切片の両面から Au-lining する。lining 層の厚さ

は通常の SEM 観察と同じく切片表面で $0.05 \mu\text{m}$ 程度とする。

④切片をエポキシ樹脂調合液(TEMと同じもしくは少し柔らかく)に浸し、小さな polyethylene 袋に入れて、2枚の glass slide と洗濯挟みで平滑に保ち、 60°C で硬化させる。

⑤切片両側の polyethylene film を剥がして、アロンアルファで plastics 試料台に貼り付ける。

⑥glass knife を装着した ultramicrotome あるいは準 ultramicrotome により、 $3 \mu\text{m}$ 厚さの薄切片を、wet あるいは dry cutting して glass slide 上の水滴に浮かべる。切片を伸展させて乾燥し、balsam で封入・固化させる。

⑦画像入力前には、薄切片上を clip で挟んで 80°C で balsam を軟化させ、薄切片の波打ちを極力除去する。室温に戻してから clip をはずして、検鏡する。

⑧測定部位を明確とするために、②で記録した低倍率拡大像を参考とし、測定対象を $\times 40$ 、あるいは $\times 20$ の対物レンズを用いて、IL および W-LB の contrast の発現に注意しながら撮影・画像記録する。画像処理 software の操作で 2 値化して壁厚値(single wall 値、double wall 値)を求める。

なお上記①から⑧の工程で、寸法、処理時間、濃度、温度などの諸条件は目安を記したものであり、適宜調整すべきであろう。

第 3 章 フーリエ変換画像処理法(FTIA)の確立とさらなる発展に向けて

3.1 FTIA の独自プログラムの作成と濃度(輝度)管理の向上

前回の科学研究費補助金(回折法とフーリエ変換法による生物材料の曖昧な形態の定量解析)の研究成果報告書(代表:藤田 稔, 平成 12 年 3 月)に記載した時点で、フーリエ変換画像処理(FTIA)の実際の工程管理(環境設定)は一段落した。ここではその時の課題として残された濃度(輝度)管理、方位管理について再検討した。まず現在の画像処理システムでは画像の濃度管理と処理能力が不足している。画像の入力と出力は多くは 8 bit 処理(256 階調)である。FTIA では、フーリエ変換の結果はパワースペクトルパターン(PSP)すなわちフーリエスペクトルの 2 乗値で出力されるので、8 bit の範囲をすぐに超えてしまう。そこで、原画像から 2 値化画像への単純化、デコンボリューション、周波数選択などの環境設定でこの問題を回避してきた。しかし PSP の極座標解析では誤差を拡大し、自己相関関数への展開も容易ではない。今回コンピュータの FFT 演算の結果をそのまま外部出力するために、FFT のテキストを参考にして独自にプログラムした。これによって 8 bit の制約を越えてフーリエスペクトルとパワースペクトルパターンの生の情報を出力できるようになった。これによって FTIA を Wiener-Khinchin の関係から自己相関関数や相互相関関数への発展が期待できる。

また緑川らは FTIA を応用して、sampling 画像の周波数 filtering により、shading 補正を可能とした。

3.2 極座標系からデカルト座標系への変換

パワースペクトルパターンは極座標に展開される。これをより一般化するにはデカルト座標系に変換することが望ましい。この変換は数学的には容易であるが、コンピュータ上では様々の問題がつかまとう。筆者らはすでにパワースペクトルパターンからデカルト座標系の角度分布関数や周波数分布関数への変換プログラムを作成してきた。今回これを拡張し、前項の FFT の生データから分布関数への変換を可能にした。

また座標変換は FFT 処理前の原画像にも適用された。我々の研究対象である木材は本来 2 次元の極座標(円筒座標)によって解析されるべきものである。非常に大径な樹幹の樹皮近くでは、軸方向、半径方向、接線方向の直交デカルト座標系で近似できるが、小径木あるいは髓付近の木口断面では半径(r)と方位(θ)での解析がふさわしい。そして必要に応じて x, y 座標に変換することが望まれる。尾形らはこの手法で、熱帯産樹木で渦巻き状の成長輪を発見した(添付資料3)。

第4章 3次元解析とステレオロジー

4.1 3次元解析の重要性和これまでの試み

木材は多くの細胞・組織が幹の長軸に平行して配列している。例外としての放射組織も放射方向に配向している。自然界の物体の多くは3次元的に複雑な形状を持つが、木材の場合には一枚の木口切片の観察で微細構造のあらましが把握できる。そして板目切片と柃目切片の観察がこれに付加されてきた。

しかし詳細な組織と細胞の構造解析には数量的な裏付けを持つ観察が要求される。筆者らの一連の研究も加えて積算画像処理(OAIA)が高度化するには、その成果を3次元に拡張するべき段階にある。3次元解析には、①CT スキャナ、MRI 等による専用の高度機器に依存するもの、②連続切片の再構築によるもの、③ステレオロジーに基礎を置くもの、④対象物体の傾斜・回転と可視光やX線によるその投影像から形状を演算するもの、⑤共焦点レンズ系による optical sectioning 等々、様々な手法がある。筆者らはこれらについて②～④については実際に解析を試みた経験がある。①については筆者らも関係するフーリエ変換画像処理(FTIA)の最も発展したものである。そしていずれの手法も膨大なデータ処理が要求されるので、コンピュータの普及を待って具体的成果が期待できる。次項から各々についての挑戦の結果を記す。

4.2 連続切片の再構築

連続切片の再構築は最も単純な手法であり、かつては粘土板やバルサ板を写真に沿って切り取って積み上げた。これだけでもかなりの労力を要したであろう。当研究室では、深川知恵(1984年課題研究論文)、鈴木健二(1989年課題研究論文)、金井秀恭(1998年修士論文)がこれに取り組んだ。深川は、オニグルミの複合道管の数個の要素を対象として、各々の外形を3次元表現したもので、この時期ではパソコンの能力が制限因子であった。そこで情報を単純化し、デジタイザで入力して、個々の平面像を窓のブラインドの様に一定間隔で積み上げ、種々の角度から自由に俯瞰できるようにした。得られた結果は大変興味深い。鈴木はトチノキの連続木口切片像を画像処理装置 PIAS II で入力し、細胞の位置を重心点で抽出することで単純化した。そしてこれら重心点を細胞軸方向に連結した。ここで大変重要なことは、連続切片間の再構築で、位置決めが決定的に重要なことを見いだしたことである。連続切片を貫通する信頼できる基準軸と方位があれば、再構築は無理なく実施できるが、現実にはこれは困難であることを指摘し、最小自乗法などの数学的処理によって新たに相対軸の概念を導入した。この工程は10数年を経た現在も意義を失わないので、今後早急にプログラムを一般化すべきであろう。金井はキリの道管ネットワークを可視化したもので、情報を単純化かつ復元できる精密なものであるが、プログラムの一般化までには至っていない。これら三人の研究は当時のパソコンの能力を最大限に活用したもので興味深い。連続切片法による定量的3次元解析には基準軸と方位の重要性を共通して指摘している。

4.3 軟X線投影法

木材の円筒状の組織が外部から照射される平行なX線束に対して、照射軸平行に配向している場合にはその組織の輪郭が明瞭に投影され、斜行していると像が流れる。組織を傾斜させて明瞭になる角度を求めると、その組織の配向角が求まる。この方法で木口の鋸断薄片に軟X線を投影し、道管の配向を測定することに成功した。そしてユーカリとアカシアなどの樹種で交錯する道管木理が捉えられた。残念なことに仮道管や木部繊維をこの手法で解析するには感光 film の粒子径が大きすぎる。

4.4 共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)と相互相関解析による木口切片からの木理解析への応用

CLSM の最大の特徴として、optical sectioning 効果が期待される。交錯木理を持つクスノキ等では、例え樹幹軸に垂直な、正確な木口切片においても部位によって木部繊維は斜めに切断されてしまう。この斜

断の角度が微小な領域で測定できれば、交錯木理の出現を高精度で検定できることになる。optical sectioning で切片表面から一定深さの繊維断面像を sampling すると、繊維集団の断面は、表面像と類似してはいるが全体的に横ずれするはずである。この横ずれ量を定量化するとその領域での繊維群の配向が演算される。尾形らは画像間の相互相関関数のプログラムを作成した。この相互相関関数によって木理解析が飛躍的に進展すると期待される。しかしながら、CLSM の optical sectioning 効果が木材切片では予想外に制約される事実が明らかとなった。これは細胞壁が光軸にほぼ平行になるために、細胞壁を通過する肝腎の励起光と蛍光の両者が細胞壁に吸収されてしまうと考えている。厳密に環境設定すると、optical sectioning 可能な試料深さは $15\ \mu\text{m}$ に過ぎず、筆者らは大変落胆している。しかしながら、CLSM では試料台に乗せた切片を水平方向(x,y 方向)に移動することなく、光軸方向(z 方向)にのみ自動的に移動できるので、前項に述べた基本軸と方位を維持できるという極めて有利な条件を持つ。画像の相互相関により、極微量の横ずれを検出すべく努力中である。

4.5 今なぜ stereology か

ステレオロジーとは、対象物の平面像から元の立体構造を確率的演算から求める方法である。その前提としては元の対象物の立体的特徴(寸法と方位)が確率的に規定される必要がある。立体構造が形と分布においてランダムな場合から、種々の要素が規則的になるに連れて、統計的演算が容易になり、解析結果の確度も高まる。木材の形態解析の場合には、主要細胞が紡錘形で樹幹軸方向に配向して集合するので木口切片に多くの情報が表れる。また軸方向の細胞要素は紡錘形始原細胞から放射方向に規則正しく生産され、放射方向に列をなす。これら細胞要素の長さについては、筆者らは軸方向柔組織に着目した。張らはこれらが紡錘形始原細胞の長さや分布の情報を保持していることを明らかとした。紡錘形始原細胞から上下に均等に伸長すると考えると、一枚あるいは一定間隔の数枚の木口切片の解析から横断面情報に加えて細胞の長さまでも推定することが可能と期待している。

30 年ほど以前には、このステレオロジー解析が木材形態の定量的解析法の主役になるとして期待された。実際には条件設定と確率演算に厳密さを要し、また当時としてはかなりの計算量を要することから具体的成果をみなかった。しかし画像処理技術の発展で演算工程の課題は完全に克服できると判断される。また前者の条件設定に関しては、筆者らは原画像から形態要素や形状因子の抽出・単純化の工程を管理できることに成功した(添付資料参照)。上記のように木部柔組織の長さが、形成層始原細胞の長を反映することも検証できたので、このステレオロジー解析法に再び挑戦できる条件が整ったと判断される。そして最初のアプローチとしてアカシアマンギウム材の材質解析に取り組んだ。得られた結果は、従来法に比べると少し小さい傾向を示したが、ほぼ満足できる成果であった。

ステレオロジーは解析の初期段階から確率演算を前提としており、定量性を議論するのに最適である。そしてまた効率的な構造解析を目指すものである。本研究課題では熱帯産木材の多様性の解析と育林のための材質解析を目的とした。極めて多様な熱帯樹木を考える場合には、比較的短時間で解析でき、さらに将来的な発展性が望める解析法を確立することが急務である。従来の顕微鏡観察と通常の画像処理だけでは本来の目的を達成するのに長時間を要する。一方、繊維長測定などの伝統的材質解析には、定量性の基本となる測定対象の客観性に問題が残り、また余りにも発展性がない。そこでステレオロジーを木材分野で成功させたいと考えている。