

## 第五章 進んだ処理:シェーディング補正をかけてカウントする

ここでは、第二章で使用した“Slide.tif”の画像に写っている黒いオブジェクトを、*Measure* (測定)メニューの *Count/Size* (カウント/サイズ)コマンドで自動カウントし、黒いオブジェクトの平均直径を測定します。その後、測定結果を度数分布ヒストグラムに表示します。

既に第二章で見たように、“Slide.tif”の画像は画質に問題があり、解析を行なう途中で画質を改善する必要があります。

また、オブジェクトを抽出する輝度レンジも、第四章の場合とは異なり、手動で設定する必要があります。

本章で行なう操作は、主に以下の通りです。

- 画像を開く
- *Best Fit* (最適合わせ込み)コマンドで画像の表示を改善する
- 測定項目を指定し、カウントを実行する
- 画像のシェーディングを補正する
- 輝度レンジを手動で設定し、再カウントを行なう
- 測定結果を度数分布ヒストグラムに表示する
- ヒストグラムをワープロの文書に挿入する



この練習には、約 35分かかります。

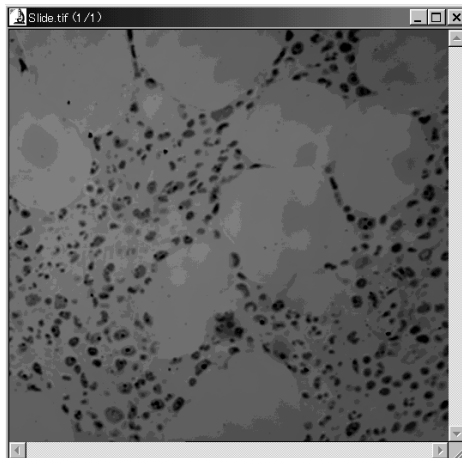
**準備:** Image-Proをまだ起動していない場合は、Windowsの「スタート」メニューの「プログラム」にある **Image-Pro Plus** をクリックしてImage-Proを起動します。Image-Proのアプリケーションウィンドウがアクティブになったら、練習を開始できます。

### ■ 画像を開く

ここでは、細胞を写した“Slide.tif”の画像を使用します。

1. *File* (ファイル)メニューから、*Open* (開く)コマンドを選択します。  
Open File (ファイルを開く) ダイアログボックスが表示されます。
2. Image-Proのアプリケーションフォルダ (通常はCドライブに“IpWin...”という名称で生成されています)にあるImagesフォルダから“Slide.tif”ファイルを開きます。

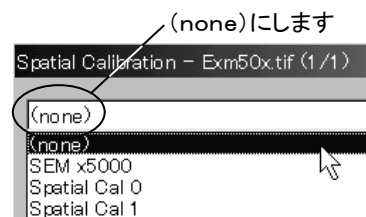
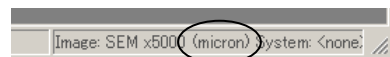
“Slide.tif”の画像ウィンドウが開きます。



**重要:** 場合により、前の練習のときの設定値が残っていて、以下の練習で行なう計測の手順に影響を与えることがあります。

画面下部のステータスバーに“micron”の表示が出ているときは、第三章で行なった較正の値がアクティブのままになっています。

この場合は **Measure (測定)** メニューの **Calibration (較正)** から **Select Spatial (空間較正值を選択)** を選択し、Spatial Calibration ダイアログボックスで“(none)”を選択して OK ボタンをクリックして下さい。



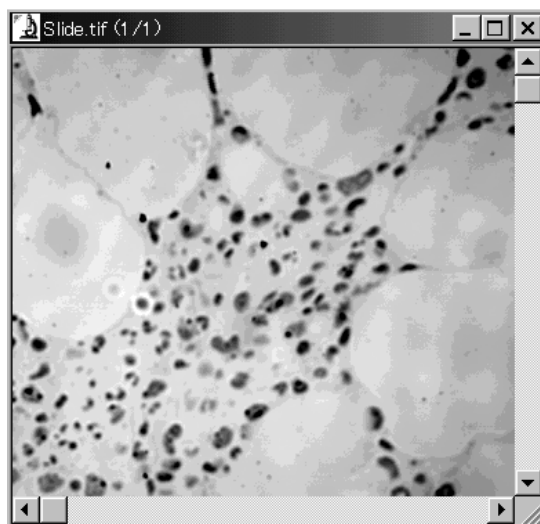
## ■ **Best Fit (最適合わせ込み)** コマンドで画像の表示を改善する

この画像は、上図のように暗く、細部が見分けにくくなっています。ここでは、とりあえず **Best Fit(最適合わせ込み)** コマンドで画像の表示を見やすくします。

1. **Enhance (強調)** メニューの **Equalize (イコライズ)** から **Best Fit (最適合わせ込み)** コマンドを実行します。



これで、画像の表示上のコントラストが強調され、細部が見分けやすくなりました。



---

注記:

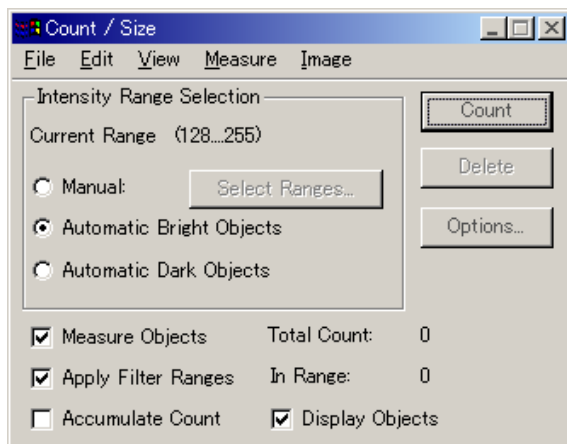
- **Best Fit (最適合わせ込み)** コマンドは、画像の輝度レンジ(カラー画像の場合はRGBの各レンジ)の上下 3% をカットすることで、画像のコントラストを自動的に最適化します。
  - **Best Fit** コマンドは、ルックアップテーブルの設定を変えることで画像の表示を改善するコマンドです。ピクセルの値は変更しません(2-7ページの7.を参照)。
- 

>> 次のステップ「測定項目を指定してカウントを実行する」に進みましょう。

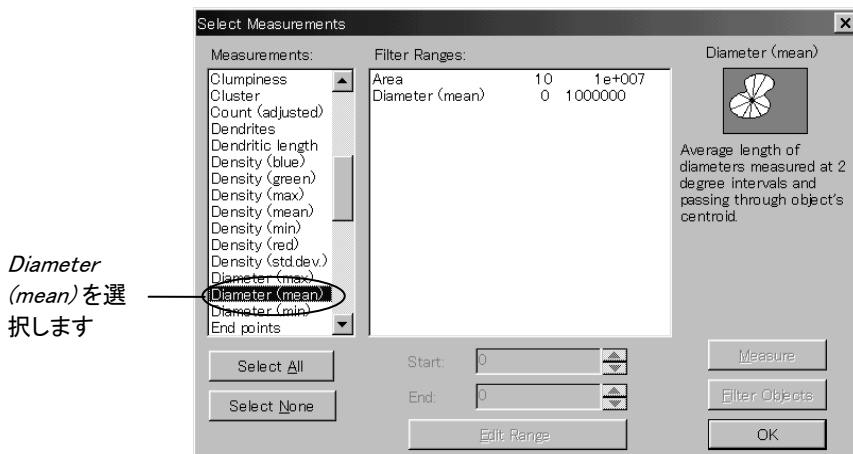
## ■ 測定項目を指定してカウントを実行する

次に、*Count/Size* (カウント/サイズ) コマンドで測定項目を指定して、カウントを実行します。

1. *Measure* (測定) メニューの *Count/Size* (カウント/サイズ) コマンドを実行します。  
*Count/Size* ダイアログボックスが開きます。



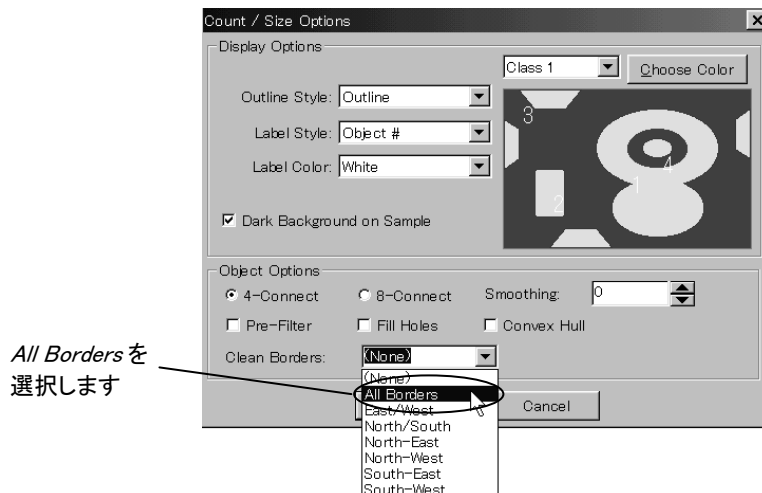
2. *Count/Size* ダイアログボックスのメニューバーから *Measure* (測定) メニューを選び、そこから *Select Measurements* (測定項目) コマンドをクリックします。*Select Measurements* ダイアログボックスが開きます。



3. *Measurements* (測定項目) 欄から *Diameter (mean)* (平均直径) を選択します (上図)。OK をクリックします。

これで *Select Measurements* ダイアログボックスが閉じます。

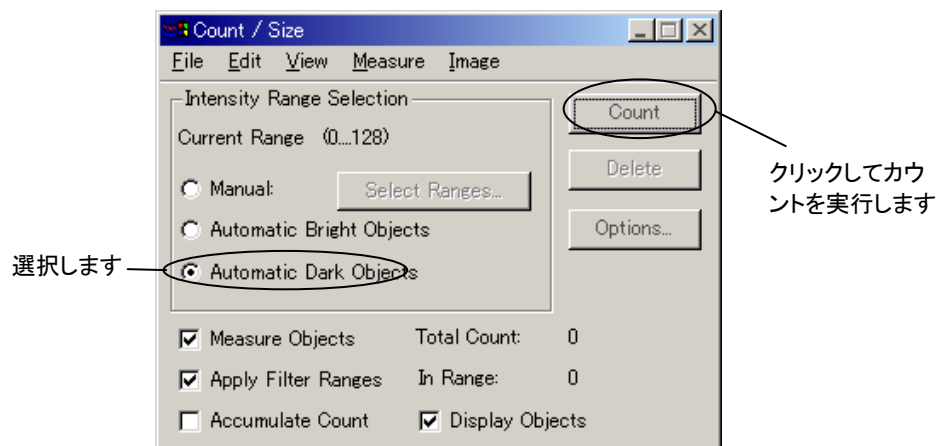
- Count/Size ダイアログボックスの Options (オプション) ボタンをクリックします。  
Count/Size Options (カウント/サイズのオプション) ダイアログボックスが開きます。



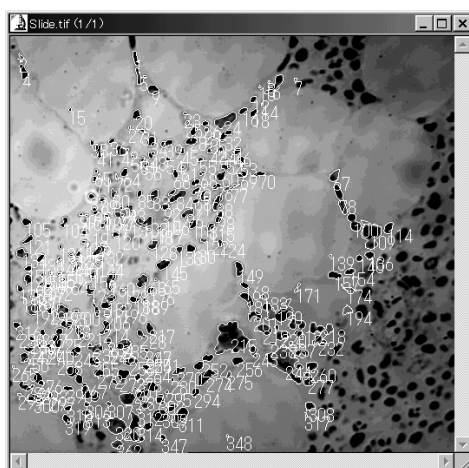
- Clean Borders (境界上を除外) 欄の横のスピンドットをクリックして、All Borders(全ての境界)オプションを選択します。OKボタンをクリックします。

これで、画像ウィンドウの四方の縁にかかって切れたオブジェクトを、全て測定対象から除外します。

- Count/Size ダイアログボックスで、Automatic Dark Objects (暗いオブジェクトを自動抽出) オプションを選択して、Count (カウント) ボタンをクリックします。



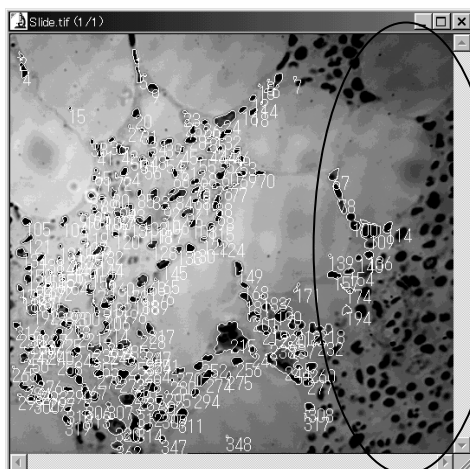
- これで、画像内の黒いオブジェクトが自動カウントされ、測定されます。



>> 次のステップ「画像のシェーディングを補正する」に進みましょう。

## ■ 画像のシェーディングを補正する

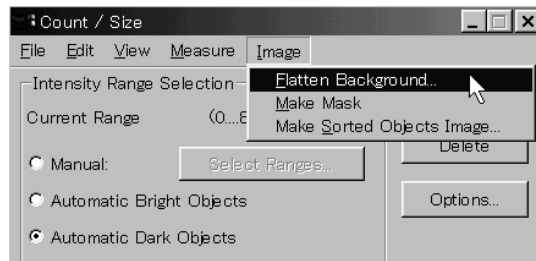
前のステップの測定結果には問題があります。画像の右側が影(シェーディング)になっていて、左側と比べて濃度が一樣でないため、画像の左側では概ね正しくオブジェクトを抽出していますが、右側のオブジェクトは抽出されていません(オブジェクトにアウトラインが付いていません)。



この部分が影になっていて、オブジェクトが正しく抽出されていません

このような場合は、通常 **Flatten (平坦化)** フィルタを使用して画像の背景(オブジェクトの周りの領域)の濃淡のムラを減らしてから、再度カウントを実行します。

1. まず、Count/Size ダイアログボックスの **Image (画像)** メニューから **Flatten Background (背景の平坦化)** コマンドを実行します。



Flatten Background (背景の平坦化)ダイアログボックスが開きます。



Brightを選択します

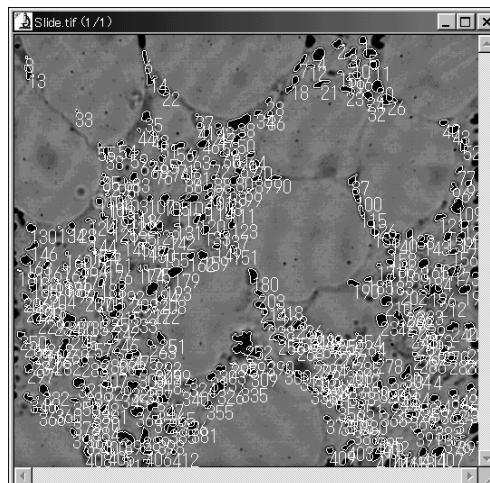
2. "Slide.tif"の画像では、測定対象のオブジェクトが黒く、画像の背景が白いので、ダイアログボックスの *Background* (背景)で *Bright* (明るい)を選択します。OK ボタンをクリックして、Flatten(平坦化)フィルタを画像に適用します。

これで、画像の背景が平坦化されました。

注記:Count/Sizeダイアログボックスの*Image* (画像)メニューにある*Flatten Background* (背景の平坦化)コマンドの機能は、*Process* (処理)メニューの *Filters* (フィルタ)コマンドからFlatten(平坦化)フィルタを実行するのと同じです。

3. ここで、Count/Size ダイアログボックスの *Count* (カウント)ボタンをクリックして、カウントを再実行します。

これで、画像の右側にあるオブジェクトも抽出され、カウントされました(下図)。



>> 次のステップ「輝度レンジを手動で設定し、再カウントを行なう」に進みましょう。

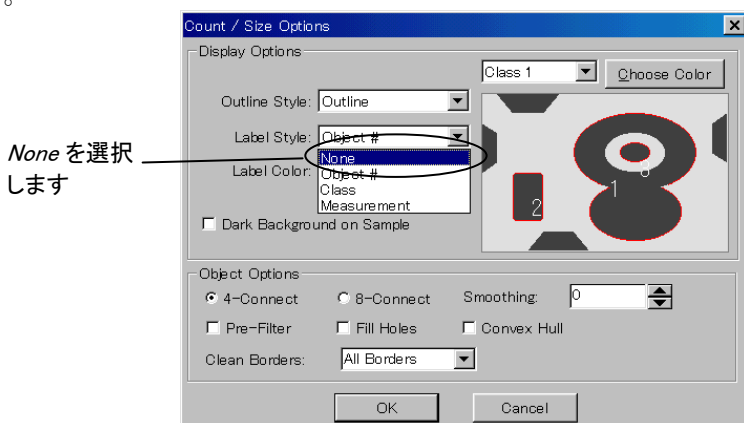
## ■ 輝度レンジを手動で設定し、再カウントを行なう

前のステップでカウントした画像には、まだ問題があります。複数のオブジェクトがつながって1つになっているところがあります。

つながったオブジェクトを切り離すには、第四章で練習したように、Count/Sizeダイアログボックスの *Edit* (編集)メニューにある *Split Objects* (オブジェクトを分割)コマンドを使用することもできますが、ここではオブジェクトを抽出する輝度レンジの設定値を手動で変更して、結果的につながったオブジェクトが切り離されるようにします。

1. まず最初に、画像内に表示されているオブジェクト番号が邪魔でオブジェクトのアウトラインが見にくいので、オブジェクトの番号を非表示にします。Count/Sizeダイアログボックスの Option (オプション) ボタンをクリックして下さい。

Count/Size Options(カウント/サイズのオプション)ダイアログボックスが表示されます。

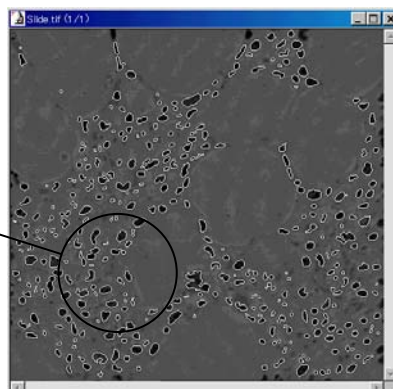


2. *Label Style* (ラベルの形式) 欄から *None* (なし)を選択して、OK ボタンをクリックします(上図)。

これでオブジェクトの番号が非表示になり、オブジェクトのアウトラインが見やすくなります。

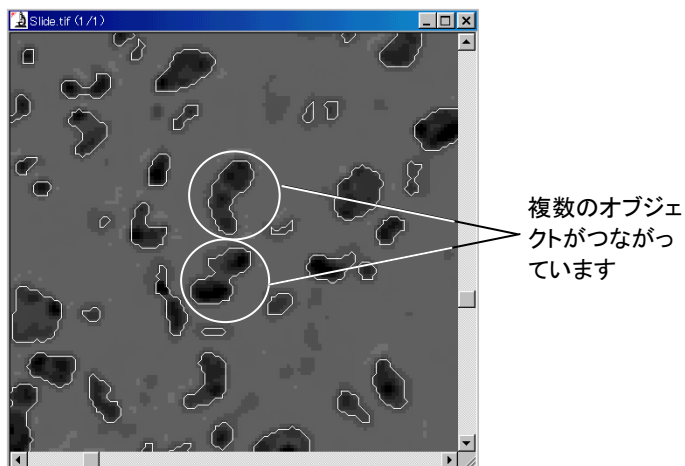
3. ツールバーのズームツールボタン(🔍)をクリックしてアクティブにし、画像の中央やや左寄りをクリックして拡大します。

虫メガネでこの付近をクリックします

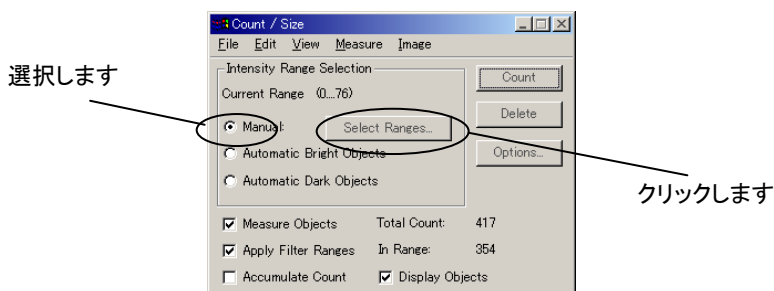




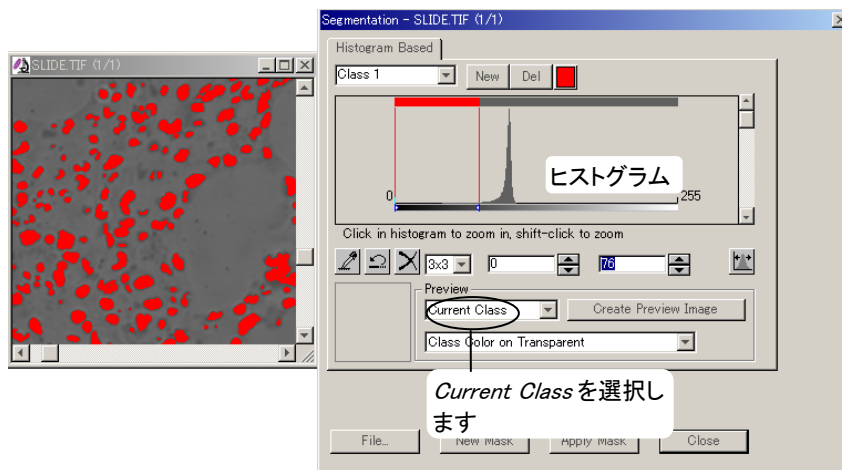
クリックした領域が拡大され、一部のオブジェクトがつながっているのがわかります。



4. ツールバーのズームツールボタン (🔍) をクリックして非アクティブにします。次に Count/Size ダイアログボックスの Manual (手動抽出) ボタンと Select Ranges (レンジを選択) ボタンをクリックします。



Segmentation (色抽出) ウィンドウが表示されます (下図)。



ウィンドウの中央には、画像内の輝度の分布を示すヒストグラムが表示されます。ヒストグラムの X軸は輝度値(ここでは0~255)、Y軸はピクセルの個数を表します。

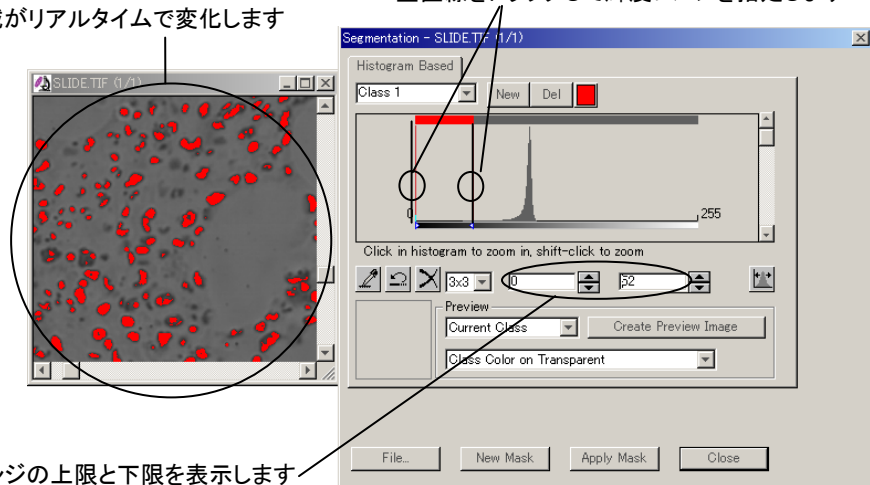
ウィンドウ下部で、**Current Class(現レンジ)** オプションが選択されていることを確認します(選択されていないときは、クリックして選択して下さい)。

##### 5. ヒストグラムの垂直線をマウスでドラッグします。

この2本の垂直線に挟まれた領域が、**Count** ボタンをクリックしたときに抽出されるオブジェクトの輝度レンジです。左側の線がレンジの下限を指定し、右側の線がレンジの上限を指定します。レンジの上限と下限の値は、ヒストグラムの下に欄に表示されます。垂直線をドラッグする代わりに、この欄に直接数値を入力して輝度レンジを指定することもできます。

輝度レンジを変更すると抽出されるオブジェクトの領域がリアルタイムで変化します

垂直線をドラッグして輝度レンジを指定します



輝度レンジの上限と下限を表示します

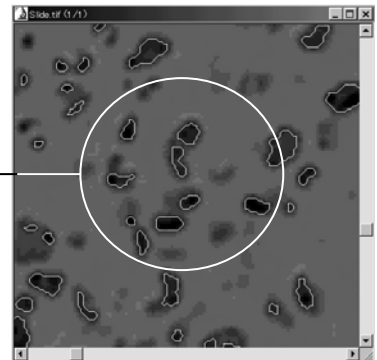
2本の線に挟まれた輝度レンジは現在赤色で表示されていますが、その輝度レンジ内に含まれるピクセルは、"Slide.tif"の画像内で同じ赤色に表示されています。ヒストグラムの垂直線マーカーをドラッグすると、画像内の赤色の領域が変化します。この赤色の領域が、**Count**ボタンをクリックしたときにオブジェクトとして抽出される領域です。

つながっているオブジェクトが分離するように、ヒストグラムの垂直線をドラッグして下さい(上図のように、下限が「0」、上限が「52」程度に設定するとほぼ分離できます)。

6. オブジェクトを抽出する輝度レンジの設定が完了したら、Segmentation ダイアログボックスの Close (閉じる)ボタンをクリックします。これでカウントを再実行する準備が整いました。
7. Count/Size(カウント／サイズ)ダイアログボックスで、Count(カウント)ボタンをクリックします。

これでカウントが再実行され、上で設定した輝度レンジに基づいてオブジェクトが抽出されます。前回つながっていたオブジェクトは分離しています(右図)。

つながった  
オブジェクト  
が分離され  
ました



>> 次のステップ「測定結果を度数分布ヒストグラムに表示する」に進みましょう。

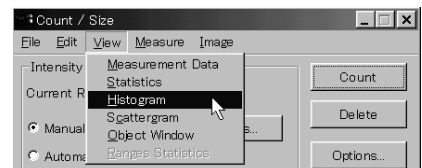
## ■ 測定結果を度数分布ヒストグラムに表示する

ここでは、前のステップで測定したオブジェクトの測定結果(平均直径)を度数分布ヒストグラムに表示します。

注記: 測定値の度数分布ヒストグラムは、前のステップで輝度レンジの設定に使用した、輝度分布を表すヒストグラムとは別のものです。

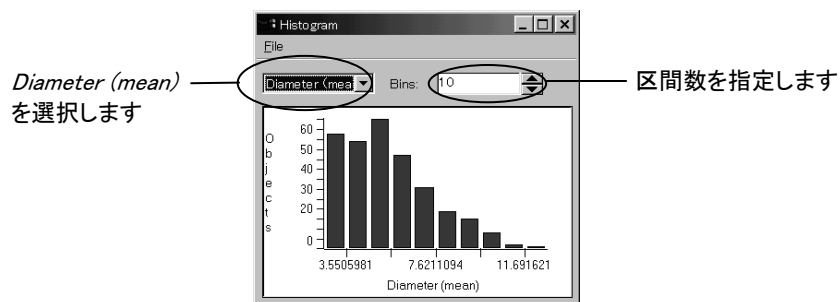
1. Count/Size(カウント/サイズ)ダイアログボックスの View (表示)メニューからHistogram (ヒストグラム)コマンドを実行します(右図)。

度数分布ヒストグラムが表示されます。



2. Histogramウィンドウの左上の欄から、Diameter (mean) (平均直径)を選択します。

これで、オブジェクトの平均直径の分布を示すヒストグラムが表示されます。



ヒストグラムの区間数を変更するときは、Bins (ビン数)欄に区間数を入力します。

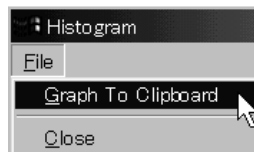
>> 次のステップ「ヒストグラムをワープロの文書に挿入する」に進みましょう。

## ■ ヒストグラムをワープロの文書に挿入する

ここでは、測定結果の度数分布ヒストグラムをワープロソフトの文書に挿入します。ヒストグラムは、クリップボード経由で他のアプリケーションに貼り付けることができます。

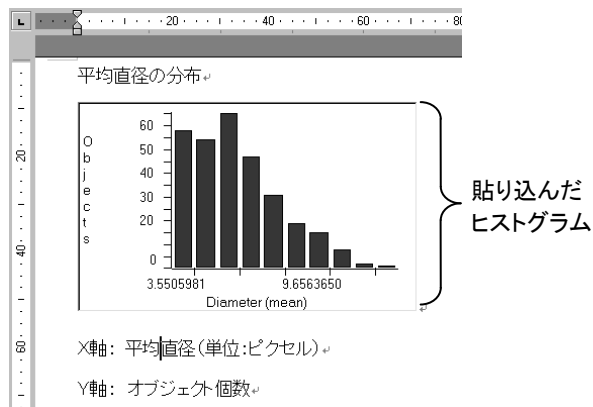
**注記:** 貼り付け先のアプリケーションが、ベクトルデータを受け付けるソフト(例えば Windows に付属する「ワードパッド」や、その他多くのワープロソフト)である必要があります。Image-Pro 自体はベクトルデータを受け付けないため、Image-Pro の画像ウィンドウに貼り付けることはできませんので、ご注意ください。

1. Histogram (ヒストグラム) ウィンドウの *File* (ファイル) メニューから *Graph To Clipboard* (グラフをクリップボードへコピー) コマンドを実行します。



これで、ヒストグラムが画像データとしてクリップボードにコピーされました。

2. ベクトルデータを受け付けるワープロソフトを起動し、貼り付け先の文書を開きます。
3. ワープロソフトの「編集」メニューから「貼り付け(またはペースト)」コマンドを実行し、ヒストグラムを文書内に貼り付けます。



貼り付けたヒストグラムは通常の画像と同じようにサイズ変更、移動、印刷が可能です(詳しくはワープロソフトのマニュアルをご覧ください)。

4. 最後に開いている画像ウィンドウとダイアログボックスを全て閉じ、Image-Proを終了します。

*File* (ファイル) メニューから *Exit* (終了) コマンドを選択します。

これで全てのウィンドウが自動的に閉じ、Image-Proが終了します。