

第四章 基本:カウント、測定、分類

本章では、画像内のオブジェクト(測定対象物)の自動カウント・自動計測の機能を紹介します。「オブジェクト」とは、指定した輝度レンジにある連続するピクセルの集まりと考えられます。*Count/Size* (カウント/サイズ) コマンドを使用すると、このようなオブジェクトを画像から抽出し、カウントすることができます。抽出されたオブジェクトは様々な方法で測定できます。ここでは個々のオブジェクトについて面積、周囲長、真円度その他を測定し、結果を記録します。

この練習では、以下の操作を行ないます。

- 多数のオブジェクト(ここでは粒子)を写した画像を開く
- 粒子の数をカウントし、それぞれの粒子について面積、周囲長、平均直径を測定する
- 画像から抽出されたオブジェクトのうち、画像の端にかかって切れているものを計測対象から除外する
- つながっている複数のオブジェクトを一つずつ分離し、分裂したオブジェクトを結合する
- 測定項目「真円度」を追加して測定する
- 測定データに基づいてオブジェクト进行分类し、分類クラス別に色分け表示する
- 測定結果を Microsoft Excel 形式のファイルに保存する



この練習には、約 35分かかります。

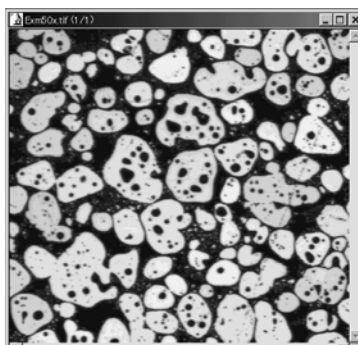
準備: Image-Proをまだ起動していない場合は、Windowsの「スタート」メニューの「プログラム」にある **Image-Pro Plus**をクリックしてImage-Proを起動します。Image-Proのアプリケーションウィンドウがアクティブになったら、練習を開始できます。

■ 画像を開く

ここでは、顕微鏡で撮影した粒子の画像を使用します。以下の手順に従って画像を開きます。(画像を開く手順を確認したい場合は、第二章「基本操作」を参照して下さい。)

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“Exm50x.tif”ファイルを開きます。

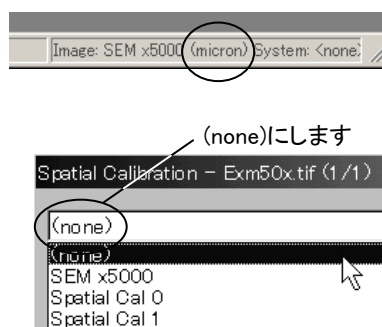
“Exm50x.tif”の画像ウィンドウが開きます。



注記: 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、第三章で行なった校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 (校正)** から **Select Spatial (空間校正値を選択)** を選択し、**Spatial Calibration** ダイアログボックスで“(none)” (なし) を選択して **Apply (適用)** ボタンをクリックして下さい。

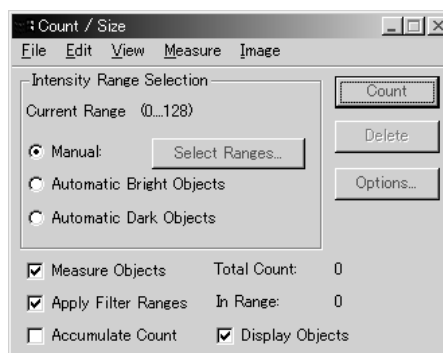


■ 粒子の個数をカウントして測定する

ここでは、画像内の粒子の個数を自動カウントします。“Exm50x.tif”は粒子を背景と区別しやすい画像なので、Image-Proの自動輝度レンジ選択機能により、画像内のオブジェクト (粒子) を背景から自動抽出できます。

1. **Measure (測定)**メニューから **Count/Size (カウント／サイズ)** コマンドを実行します。

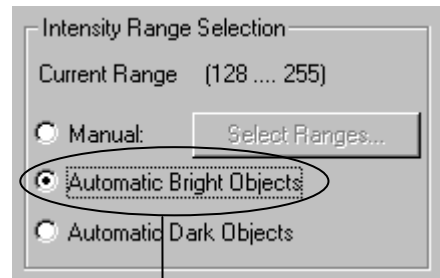
Count/Sizeダイアログボックスが表示されます。



2. *Intensity Range Selection* (輝度レンジの選択) 欄にある *Automatic Bright Objects* (明るいオブジェクトを自動抽出) オプションをクリックします。

Automatic Bright Objects 丸ボタンに●印が付き、選択されたことを示します。

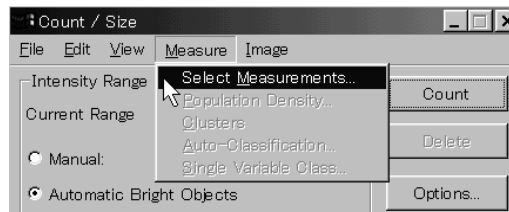
この練習では自動輝度レンジ選択の機能を使用するので、この設定はきわめて重要です。上の操作では、暗い背景にある明るいオブジェクトを抽出するように指定したことになります。(反対に、明るい背景の中の暗いオブジェクトを自動抽出するときは、*Automatic Dark Objects* を選択します。)



明るいオブジェクトを自動抽出します

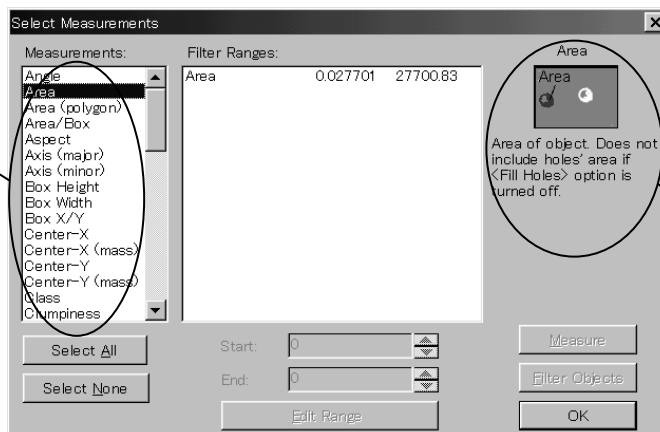
注記: 輝度レンジの選択は手動で行なうこともできます(5-10ページを参照)。

3. 次に、測定項目を選択します。*Count/Size* ダイアログボックスの *Measure* (測定) メニューで *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。

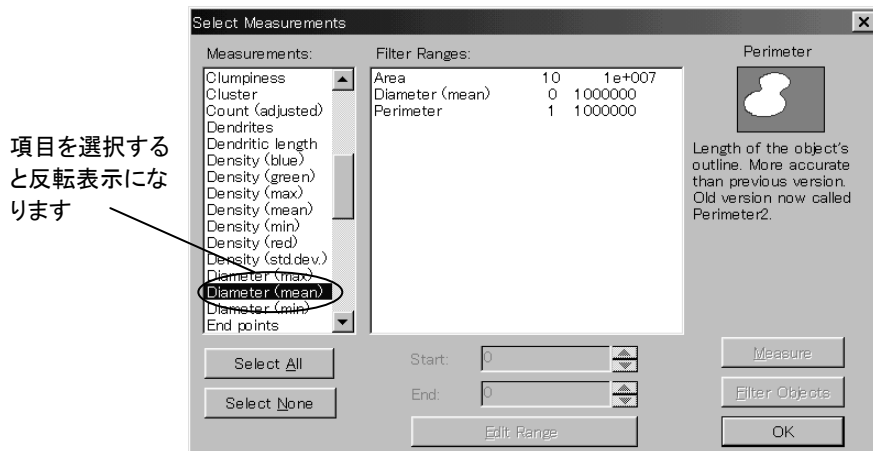
この欄で測定項目を選択します



選択中の測定項目についての説明が表示されます

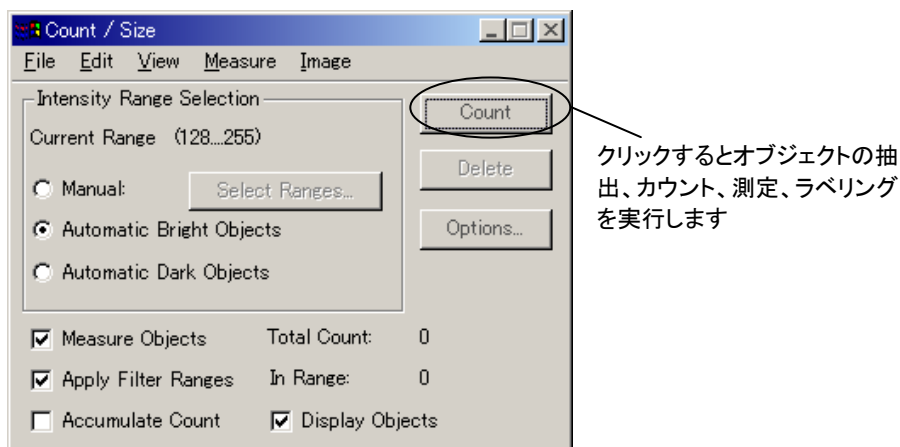
Image-Proは、ダイアログボックス左側の *Measurements* (測定項目) 欄で選択された測定項目について測定を行ないます。この欄には、デフォルトで *Area* (面積) の測定項目が選択されています。また、ダイアログボックスの右上には、選択中の測定項目について短い説明と解説図が表示されます。

4. **Measurements** (測定項目)欄で、**Diameter (mean)** (平均直径)と **Perimeter** (周囲長)の測定項目をクリックして選択します(項目が反転表示になります)。

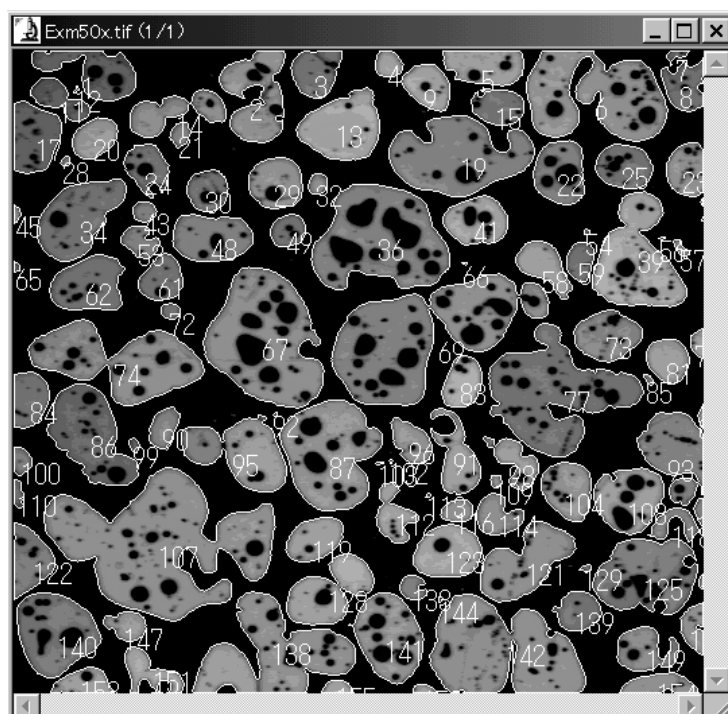


OKボタンをクリックします。**Select Measurements** (測定項目)ダイアログボックスが閉じます。

5. **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ます。



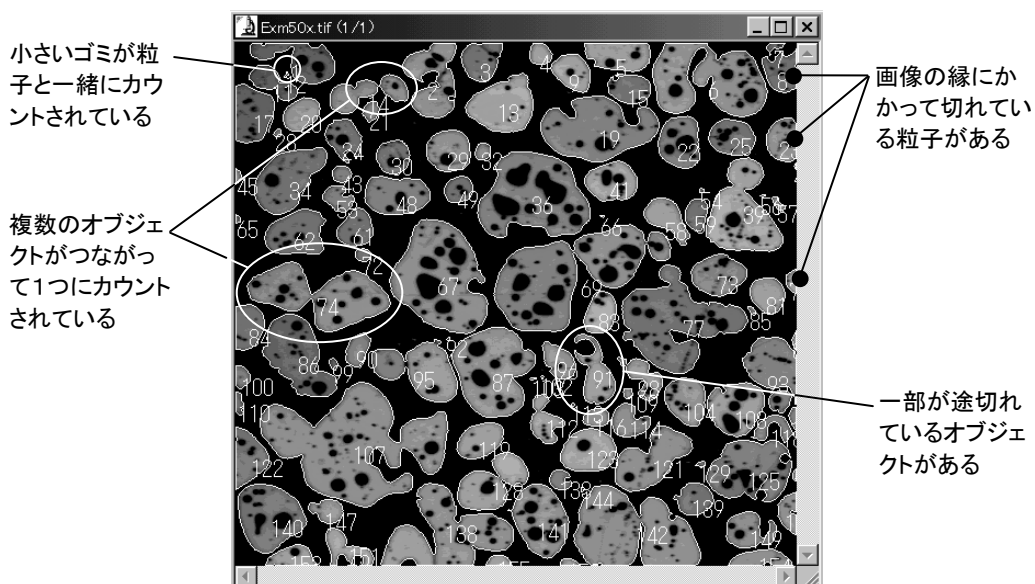
画像が解析され、明るいオブジェクトの抽出、個数のカウント、測定が行なわれます。オブジェクトのアウトラインとラベル(デフォルトではオブジェクトの通し番号)が、“Exm50x.tif”の画像ウィンドウに表示されます。



>> 次のステップ「カウント結果の修正: 画像の縁にかかって切れたオブジェクトを除外する」に進みましょう。

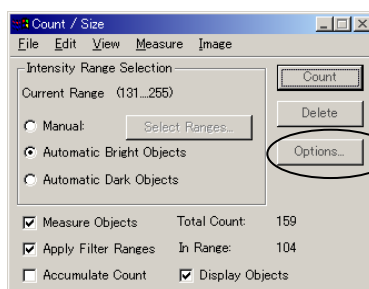
■ カウント結果の修正：画像の縁にかかって切れたオブジェクトを除外する

画像をよく見てみると、測定結果には以下のような問題があります。

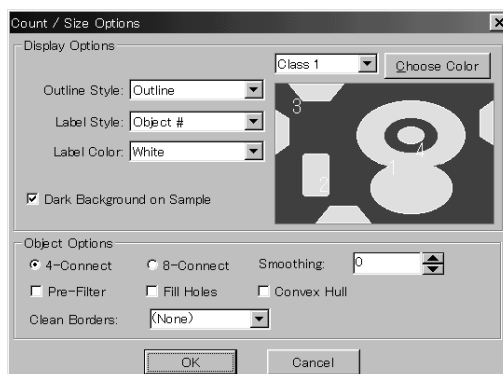


測定データに上のようなオブジェクトが含まれていることにより、正しい測定結果が得られなくなります。以降の手順では、これら問題のあるオブジェクトを除外ないし修正します。

1. まず最初に、画像の縁にかかって切れているオブジェクトを、自動的にカウントから除外します。Count/Size(カウント／サイズ)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。

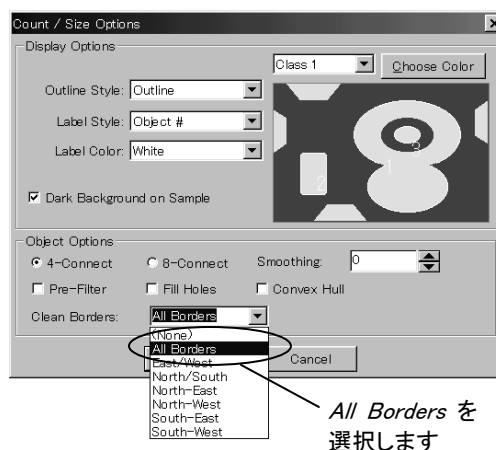


Count/Size Options (カウント／サイズのオプション) ダイアログボックスが開きます(右図)。



2. **Clean Borders** (境界上を除外)のスピンドボタンをクリックして、上下左右のウィンドウの縁にかかった粒子を除外する設定を行ないます。ここでは **All Borders** (全ての境界)を選びます。

Clean Borders は、画像(またはAOI)の中に収まりきらず、縁にかかって切れているオブジェクトを、測定対象から除外するオプションです。**All Borders** は、四方の縁にかかっている粒子を全て測定対象から除外します。



注記: **Clean Borders** のオプションで、**North, South, East, West** はそれぞれ上、下、左、右の境界線(ウィンドウの縁またはAOI)にかかるオブジェクトを除外します。

3. OK ボタンをクリックします。

Count/Size Options ダイアログボックスが閉じます。

4. Count (カウント)ボタンをクリックします。

画像が再び解析され、縁にかかっているオブジェクトを取り除いた上で、明るいオブジェクトの抽出、カウント、測定、ラベリングが行なわれます。"Exm50x.tif"画像ウィンドウ内のオブジェクトのアウトラインとラベルが更新されます。



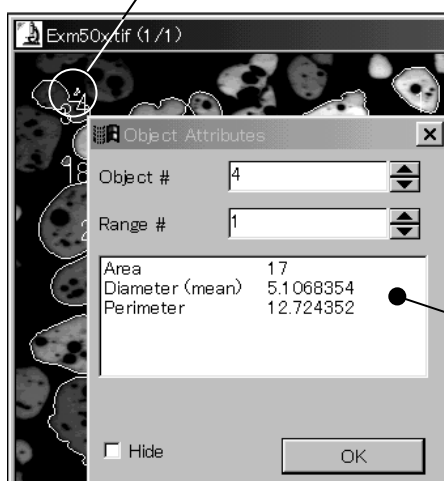
>> 次のステップ「カウント結果の修正: 小さいオブジェクトを除外する」に進みましょう。


■ カウント結果の修正：小さいオブジェクトを除外する

4-6ページで見たように、カウント結果には、まだいくつかの問題が残っています。次に、粒子としてカウントされている小さいオブジェクト(ゴミ)を手動と自動で除去します。

1. まずはじめに、ゴミを手動で除外します。画像の左上にある小さいゴミのオブジェクト("4"というオブジェクト番号が付いています)をダブルクリックして下さい。

小さいオブジェクト("4")をダブルクリックします



注記: オブジェクトが小さくてクリックしにくい時は、ズームツール()で拡大してからクリックして下さい。

Object Attributes ウィンドウが開きます

すると、Object Attributes(オブジェクトの属性)ウィンドウが開きます。Object # (オブジェクト番号) 欄には、ダブルクリックしたオブジェクトの番号("4")が表示されています。このウィンドウは、個々のオブジェクトの測定結果をまとめて表示するものです。

2. Object Attributes ウィンドウの左下にある Hide (除外) オプションをクリックして✓印を付けます。

すると、"4"番の小さいオブジェクトがカウントから除外されます(オブジェクトのアウトラインと番号が消えます)。

小さいオブジェクトが除外されました



選択します

上記の操作を繰り返して、画像内にある小さなゴミを全て測定対象から外すことができます。但し、ゴミの数が多い場合は面倒なので、自動で行なった方が便利です。以下、その方法について説明します。

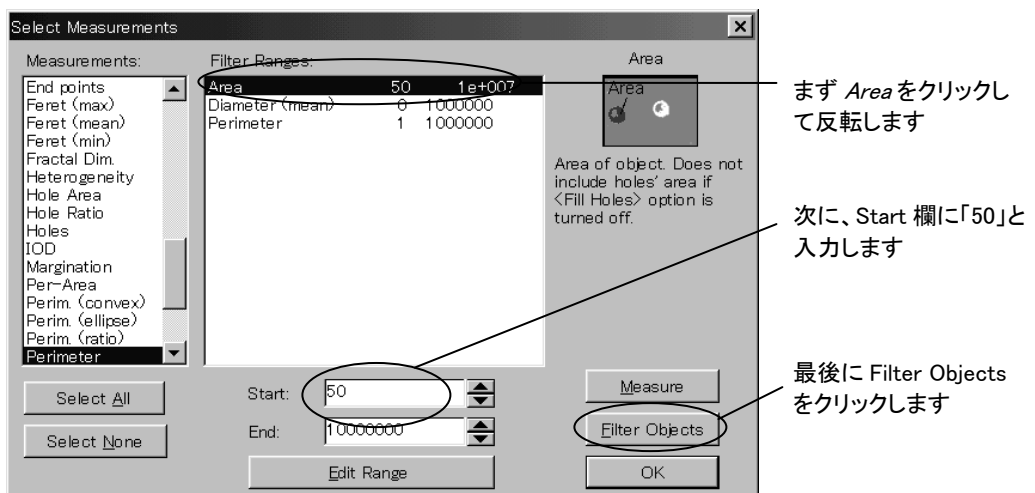
上の 1.と 2.で表示した **Object Attributes** ウィンドウに表示される測定値に着目します。上の 2.で除去した小さいオブジェクトは **Area** (面積)の測定値が「17(ピクセル)」でした(右図)。

Area	17
Diameter (ave)	5.1068354
Perimeter	12.724352

画像内の小さいオブジェクトをいくつかダブルクリックして調べると、測定対象から除外すべき小さいオブジェクトは、面積の測定値が「50」未満であることがわかります。

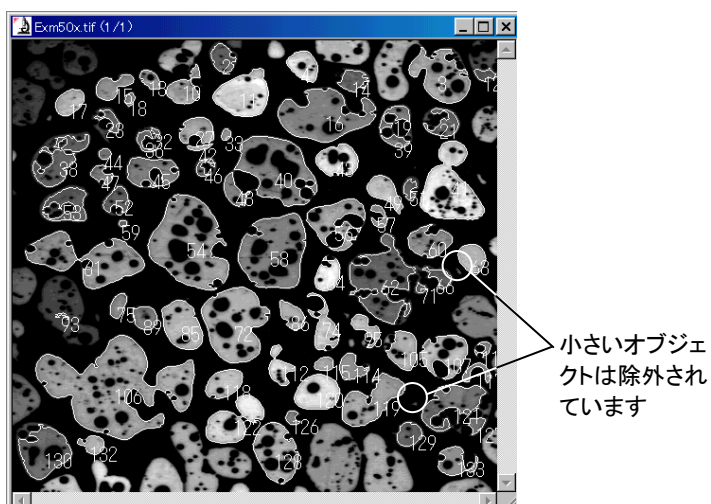
従って、以下の操作では、面積の測定値が「50」以上のオブジェクトのみを測定対象に含め、それ以下の面積をもつオブジェクトを自動的に除外する設定を行ないます。

3. まず、Count/Size(カウント/サイズ)ダイアログボックスの **Measure**(測定)メニューから **Select Measurements** (測定項目)コマンドを選択します。Select Measurements (測定項目)ダイアログボックスが開きます。



4. まず **Filter Ranges** (選別レンジ)欄で **Area** (面積)をクリックして反転表示させます(上図)。
5. 次に、**Start** (最小)欄に「50」と入力します(上図)。
6. **Filter Objects** (オブジェクト選別)ボタンをクリックします(上図)。

これで、面積が 50 ピクセル以下の小さなオブジェクトが、自動的にカウントから除外されました。



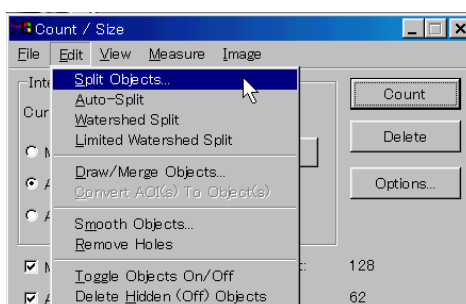
注記: 上記のように、Image-Proでは画像内のオブジェクトを測定し、その測定値に基づいてオブジェクトを自動選別することができます。オブジェクトの選別の基準となる測定値は、オブジェクトをダブルクリックすれば **Object Attributes** (オブジェクトの属性) ウィンドウで調べることができます。

>> 次のステップ「カウント結果の修正:オブジェクトの分割と結合」に進みましょう。

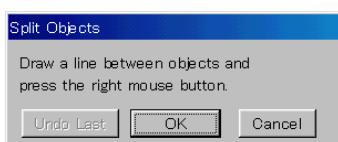
■ カウント結果の修正: オブジェクトの分割と結合

この画像のオブジェクトには、まだいくつかの問題があります(4-6ページ参照)。複数のオブジェクトがつながって1つにカウントされていたり、アウトラインの一部が途切れているオブジェクトがあります。以下の操作では、これらの問題を解決するために、つながったオブジェクトの分割と、途切れているアウトラインの結合を行ないます。

1. Count/Size (カウント／サイズ) ウィンドウの *Edit* (編集) メニューから、*Split Objects* (オブジェクトを分割) コマンドを選択します。



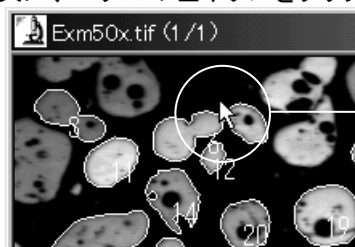
Split Objects (オブジェクトを分割) ダイアログボックスと、*Trace* (トレース) ダイアログボックスが表示されます。



非選択にします

もし *Trace* ダイアログボックスの *Auto* (自動) オプションに✓印が付いていたら、クリックして外して下さい。

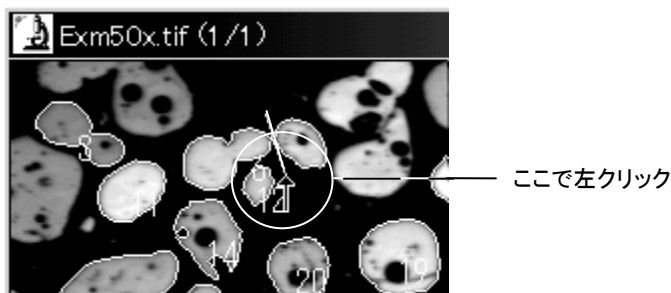
2. 下図に示すように、つながったオブジェクト(下の例では“6”番のオブジェクト)のやや上にカーソルを置きます。次に、マウスの左ボタンをクリックします。



ここで左クリック

マウスをクリックする際に、オブジェクトの内側をクリックしないようにしてください。つながったオブジェクトを分割する分割線の始点は、分割するオブジェクトの外側になければなりません。

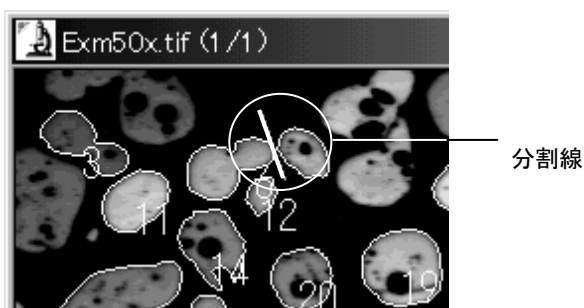
3.次に、カーソルをオブジェクト下方に置き、もう1度マウスの左ボタンをクリックします。



マウスをクリックする際に、オブジェクトの内側をクリックしないように注意して下さい。分割線の終点は、分割するオブジェクトの外側になければなりません。

4. マウスの右ボタンをクリックします。

これで、2つのオブジェクトの間に緑色の分割線が引かれます。



注記: マウスの右ボタンをクリックする際には、カーソルを“Exm50x.tif”画像ウィンドウの内部でクリックして下さい。ウィンドウの外でクリックすると分割線が引かれません。

5.Split Objects (オブジェクトを分割)ダイアログボックスの OK ボタンをクリックします。

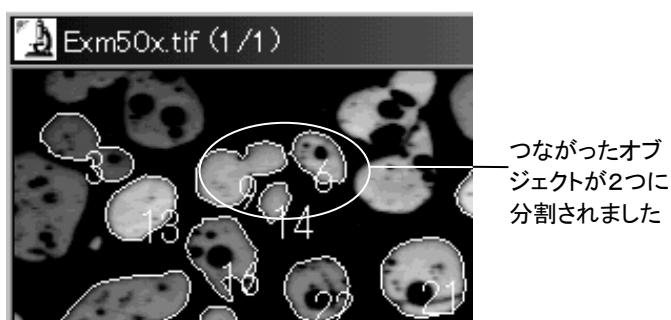
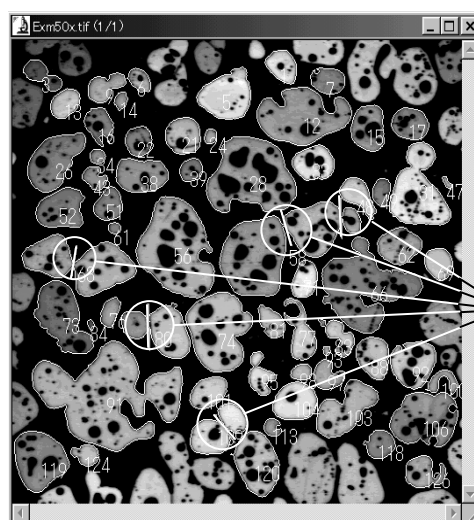


Image-Proは画像を再解析し、つながったオブジェクトを2つのオブジェクトに分割します。分割されたオブジェクトには、それぞれ“6”と“9”の番号が付きました。

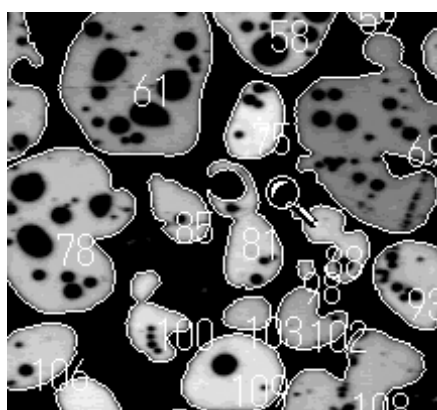
6. 次に、画像内にまだ残っている、つながったオブジェクトを全て切り離します。

分割するオブジェクトが多数の場合、上の 1.~5.の手順をその都度繰り返すのは面倒です。複数のオブジェクトを連続して分割するときは、1.~4.の手順を行なって緑色の分割線を引いた後で、もう一度マウスの右ボタンをクリックします。これで、引き続き他のオブジェクトの分割を行なえます。画像内のオブジェクトを全て分割してから、最後に Split Objects (オブジェクトを分割)ダイアログボックスの OK ボタンをクリックします。



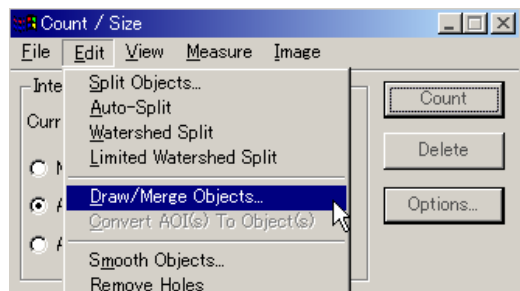
その他のつながったオブジェクトを切り離します

7. 次に、途切れたオブジェクトのアウトラインをつなぎます。まず、ツールバーのズームツール (🔍) をクリックしてアクティブにし、虫メガネカーソルでアウトラインが途切れたオブジェクト(下の例では"81"番のオブジェクト)を1回クリックします。

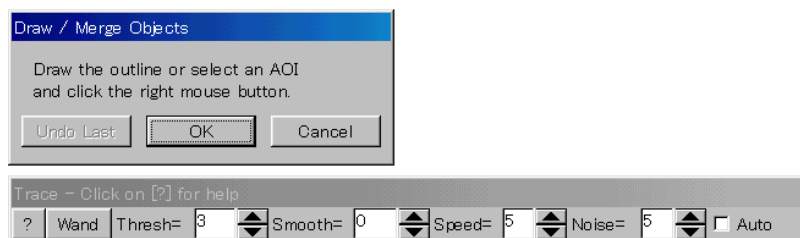


画像の表示サイズが 200% に拡大されます。

8. Count/Size (カウント／サイズ)ウィンドウの *Edit* (編集)メニューから、*Draw/ Merge Objects* (オブジェクトを描く／結合する)コマンドを選択します。



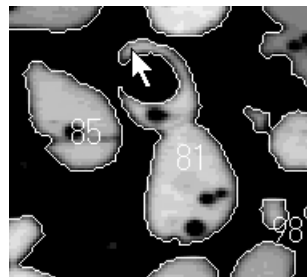
- Draw / Merge Objects* (オブジェクトを描く／結合する)ダイアログボックスと、*Trace* (トレース)ダイアログボックスが表示されます。



もし *Trace* ダイアログボックスの *Auto* (自動)オプションに✓印が付いていたら、クリックして外して下さい。

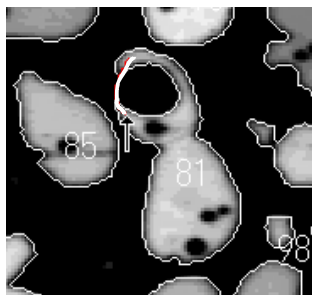
9. 右図のように、輪郭の途切れている一端にカーソルを当てます。

このとき、必ずオブジェクトの内側にカーソルを当てて下さい。



10. マウスの左ボタンを押しながら、オブジェクトの途切れた輪郭に沿ってドラッグして線を引きます。

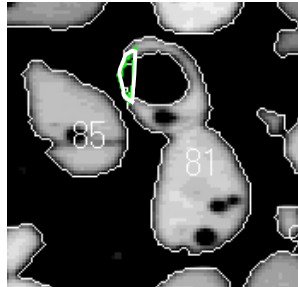
線は、オブジェクトの内側から始まって内側で終わるように引きます。



注記: 線が正しくない方向へ進んでしまったら、[Backspace] キーを押し続けて線を逆方向に戻して、もう一度引き直して下さい。

11. マウスの右ボタンをクリックします。

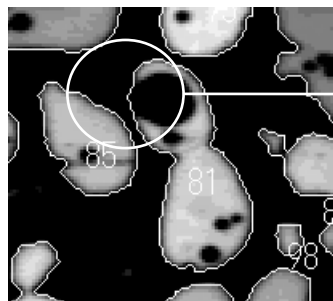
これで緑色の閉曲線が表示され、描いた線が閉じます。



注記: マウスの右ボタンをクリックする際には、カーソルを“Exm50x.tif”画像ウィンドウの内部でクリックして下さい。ウィンドウの外でクリックすると線が引かれません。

12. Draw /Merge Objectsダイアログボックスの OK ボタンをクリックします。

これで画像が再解析され、オブジェクトの途切れたアウトラインがつながります。



途切れていたアウトラインがつながりました

- 注記: ● 画像内の複数のオブジェクトを連続して結合するときは、分割の場合と同様に、緑色の接続線を入れた後でもう一度右マウスボタンをクリックしてから、次のオブジェクトへ移動して 9.～11.の手順を繰り返し、最後に **Draw/Merge Objects (オブジェクトを描く／結合する)** ダイアログボックスの **OK** ボタンをクリックします。
- **Draw/Merge Objects** 機能を使用すると下の例のように完全に分離している 2 個のオブジェクトをつないで、1つのオブジェクトとしてカウントさせることも可能です。



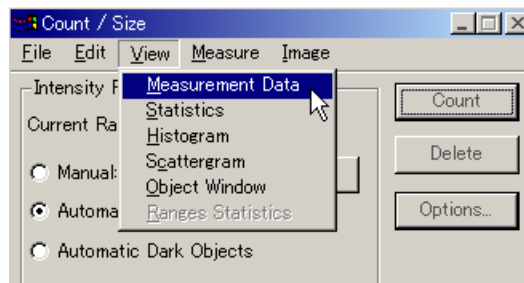
13. ツールバーのズームツール(🔍)をクリックして、[Shift]キーを押しながら虫メガネカーソルで画像ウィンドウ内を1回クリックします。これで画像の表示サイズが元の大きさ(100%)に戻ります。

>> 次のステップ「測定結果を表示する」に進みましょう。

■ 測定結果を表示する

このステップでは、前のステップで実行した測定（面積、平均直径、周囲長）の結果を表示します。また、新たに *Roundness*（真円度）の測定項目を追加して再計測します。

1. Count/Size（カウント/サイズ）のダイアログボックスの *View*（表示）メニューから、*Measurement Data*（測定データ）コマンドを選択します。



Measurement Data（測定データ）の表が表示されます。

Obj#	Area	Diameter (mean)
1	914	33.323574
3	768	34.479458
5	2372	53.652439
6	470	24.018551
7	859	33.007519
9	878	34.923077
12	4222	76.390717
13	801	31.118193
14	226	16.335222
15	1243	42.805122

カウントされた各オブジェクトについて、*Area*（面積）、*Diameter (mean)*（平均直径）、*Perimeter*（周囲長）の測定値が表示されます。

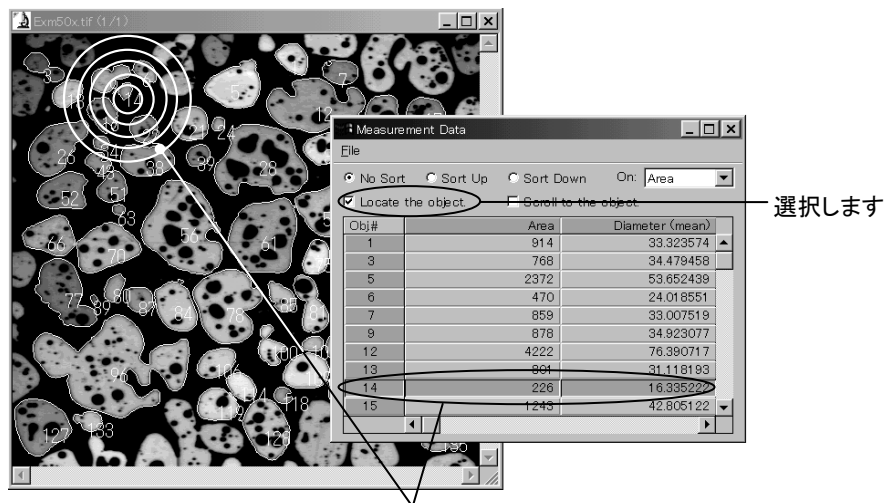
各オブジェクトには通し番号（Obj.#）が振られています。表の一番左の列にある *Obj.#* の番号が、画像内のオブジェクトに付けられたラベルの番号と一致します。

番号が 1, 3, 5... のように非連続なのは、前のステップで小さいオブジェクト（面積が 50ピクセル以下のオブジェクト）を除外したためです。除外されたオブジェクトは測定結果の表には現れませんが、番号は持っています。このため、測定データのオブジェクト番号が非連続になります。

番号を連続させたいときは、Count/Size ウィンドウの *Edit* (編集)メニューにある *Delete Hidden (Off) Objects*(除外されたオブジェクトを削除)コマンドを実行します。

Measurement Data(測定データ)の表の各測定結果に対応する画像内のオブジェクトを素早く見つけるには、Measurement Dataウィンドウの上部にある *Locate the object.*(オブジェクトを見つける)オプションに✓印を付けてから、表の中の測定結果をクリックします。

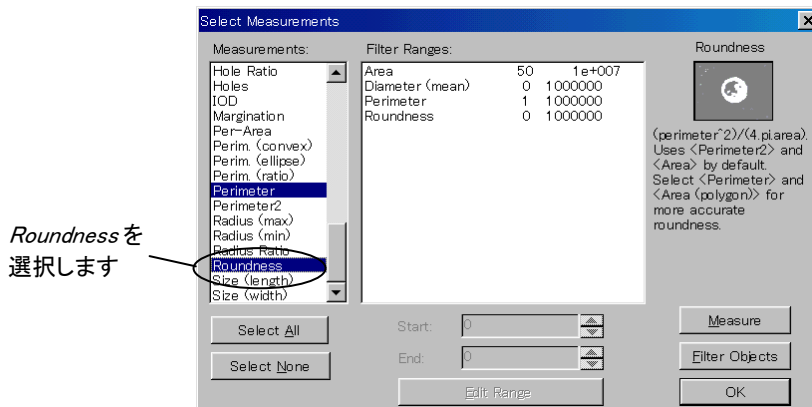
画像内に同心円のマークが表示され、該当するオブジェクトの位置を示します。



測定値をクリックすると、対応するオブジェクトの位置を画像内に表示します

- 次に、測定項目に *Roundness* (真円度)を追加して、再測定を行ないます。まず、Count/Size (カウント／サイズ)ダイアログボックスの *Measure* (測定)メニューから、*Select Measurements*(測定項目)コマンドを選択します。

Select Measurements ダイアログボックスが表示されます。



3. ダイアログボックス左側の *Measurements* (測定項目) 欄で、*Roundness* (真円度) をクリックします(前図)。

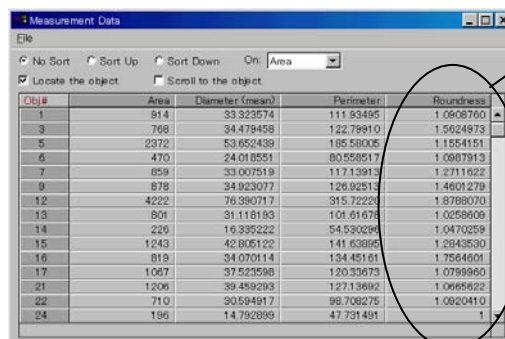
Roundness が反転表示になり、測定項目として選択されたことを示します。

4. *Measure* (測定実行) ボタンをクリックします。

これで、今までの測定(面積、平均直径、周囲長)に加えて、真円度について追加測定されます。

注記:ここでは、追加測定を実行するために、*Measure* (測定実行) ボタンをクリックすることに注意して下さい。*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も再測定を行なうことはできませんが、*Count* ボタンを使用すると、前のステップで行なった手動によるカウント結果の修正(手動によるオブジェクトの除外、オブジェクトの分割ないし結合)が全て無効になってしまいます。カウント結果を手動で修正した後は、*Count* ボタンを使用しないように注意して下さい。

追加測定が終了すると、測定結果が *Measurement Data* ウィンドウに表示されます。



Obj#	Area	Diameter (mean)	Perimeter	Roundness
1	914	33.323574	111.93495	1.0608760
3	768	34.479458	122.79910	1.5624973
5	2372	53.652438	185.59005	1.1554151
6	470	24.018551	80.558517	1.0967913
7	859	33.007519	117.13913	1.2711622
9	878	34.923077	126.92513	1.4601278
12	4222	76.990717	315.72229	1.8789070
13	801	31.118193	101.61675	1.0258609
14	226	16.385222	54.530295	1.0470258
15	1243	42.805122	141.63895	1.2943530
16	819	34.070114	134.45161	1.7564601
17	1067	37.523586	120.33673	1.0799960
21	1206	39.459293	127.13692	1.0665622
22	710	30.594917	96.708275	1.0920410
24	196	14.792899	47.731491	1

Roundness の測定結果が表示されます

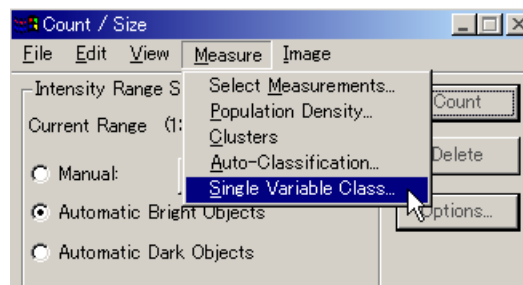
測定結果を表示しきれないときは、ウィンドウを横に広げる・スクロールする等の操作を行なって下さい。

>> 次のステップ「オブジェクトの分類・色分け表示」に進みましょう。

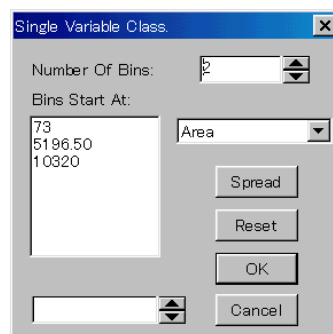
■ オブジェクトの分類・色分け表示

Image-Proでは、測定結果のデータに基づいて画像内のオブジェクトを分類・色分け表示することができます。以下の操作では、オブジェクトを「周囲長」の測定値に基づいて分類します。

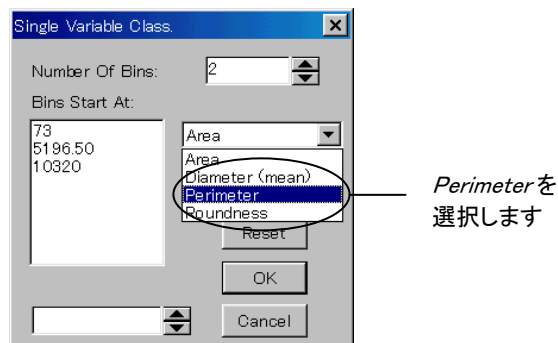
1. Count/Size (カウント／サイズ)ダイアログボックスの *Measure* (測定)メニューから、*Single Variable Class.* (1変数で分類する)コマンドを選択します。



Single Variable Class. (1変数で分類する)ダイアログボックスが表示されます。

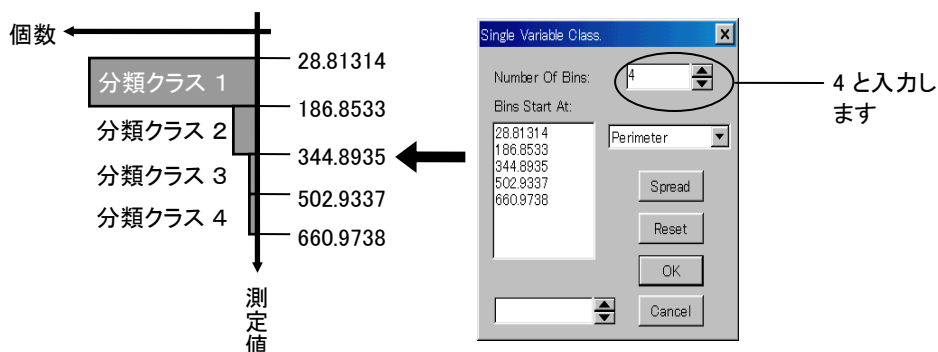


2. *Area* と表示されている欄をクリックして、測定項目の一覧から *Perimeter* (周囲長)を選択します。



この操作により、周囲長の測定結果に基づいてオブジェクトを分類するように指定しました。

3. **Number Of Bins** (クラスの数)欄の右側のスピンドット(▲)をクリックして、欄に「4」を表示させます。



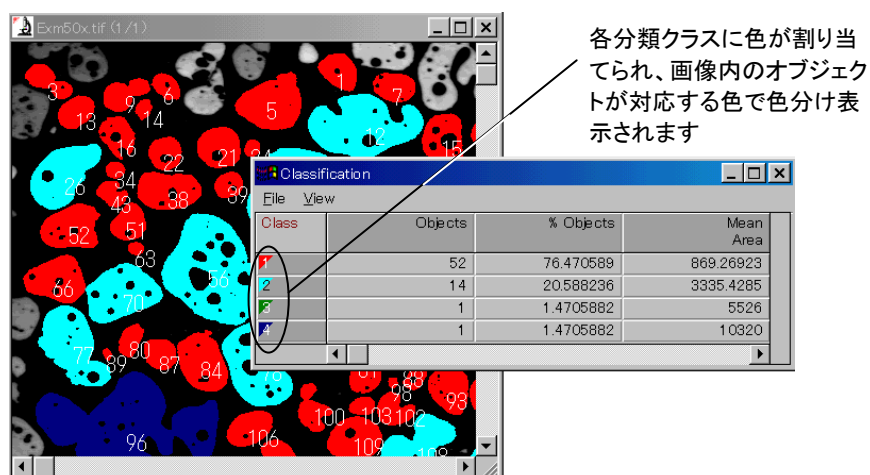
この操作により、周囲長の測定値の範囲(最小値から最大値まで)を 4つの等区間の分類クラス(級)に分けるように指定しました。

Bins Start At (クラス開始値)欄の上から 4つの値は、4つの分類クラスの最小値を表しています。 5番目の値は、周囲長の測定値の最大値を示します。

4. **OK** ボタンをクリックします。

Classification (分類) ウィンドウが表示されます。このウィンドウには、分類クラスの各区分の最小・最大値、クラスごとのオブジェクトの平均測定値等のデータが表示されます。

同時に、画像内のオブジェクトが、分類クラス別に色分け表示されます。

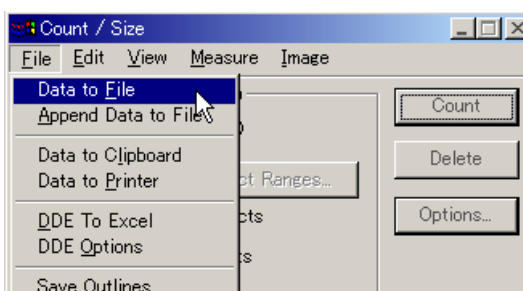


>> 次のステップ「測定結果を保存する」に進みましょう。

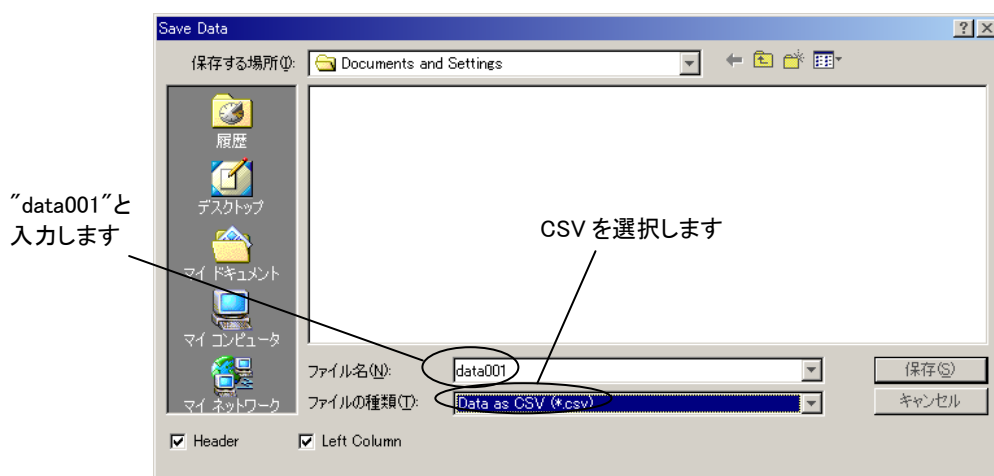
■ 測定結果を保存する

このステップでは、今までの測定結果をファイルに保存します。

1. Count/Size (カウント／サイズ)ダイアログボックスの *File* (ファイル)メニューから、*Data To File* (データをファイルに保存)コマンドを選択します。



Save Data (データを保存する)のダイアログボックスが表示されます。



2. *Save as type* (ファイルの種類)欄から、*Data as CSV(*.csv)*を選択します。

この操作により、測定結果は、Microsoft Excel などの表計算ソフトで使える **CSV 形式(*.csv)**で保存されます。また、測定結果は **テキストファイル(*.txt)**で保存することもできます。

3. *File Name* (ファイル名)欄に“data001”と入力します。

注記: Image-Pro でファイルないしフォルダに名前を付けるときは、**半角英数文字**のみを使用されることを推奨します。(日本語の文字を使用しても通常は動作しますが、マクロなど一部の処理で不都合が起きる可能性があります。)

4. 保存 ボタンをクリックします。

測定データは、Image-Proのディレクトリに、“data001”のファイル名で保存されます。

これで、測定結果を Microsoft Excel や、Excelのフォーマットをサポートする表計算ソフトで読み込むことができます。

5. 最後に、“Exm50x.tif”の画像ウィンドウを閉じ、Image-Proを終了します。まず、Image-Proのアプリケーションウィンドウの *Window* (ウィンドウ) メニューから *Close All* (全てを閉じる) コマンドを実行します。

これで画像ウィンドウが閉じます。

6. Image-Proを終了するには、*File* (ファイル) メニューから *Exit* (終了) コマンドを選択します。

これで測定結果のウィンドウが自動的に閉じ、Image-Proが終了します。

次の練習に進む場合も、この段階で Image-Proを一旦終了してください。終了して再起動することにより、次の練習で使用するオプションが再設定されます。
