

大腸菌コロニーを題材とした LabVIEW を用いた画像計測・処理に関する教材

辻久巳* 中山享**

Teaching material concerning image measurement and processing by LabVIEW
about colony of coli bacillus

Hisami TSUJI* Susumu NAKAYAMA**

Contents concerning image measurement and processing by LabVIEW about colony of coli bacillus was introduced into “Practice of advanced instrument measurement” done by the first grader of Applied Chemistry and Biotechnology Program, Advanced Engineering Course. As a teaching material for lecture and self-study before lecture, a text had been made by the Power Point. The image data of colony of coli bacillus on agar medium was measured with the webcam. The interface is used as a joint of the webcam and PC. And, the system that is able to process the image by LabVIEW and PC is constructed.

1. 緒言

専攻科・生物応用化学専攻では、1年生の授業に13年前から「先端機器測定実習」という科目を取り入れている。筆者らは、「先端機器測定実習」において電気分野に詳しくない生物応用化学専攻の学生でも、ナショナルインスツルメンツ (National Instruments) 社が開発した LabVIEW (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench の略) という市販ソフトを用いた電気特性測定の自動化に取り組める、初心者向けに検討・作成してきた教材 (授業前自学自習用 4 編及び授業実習用 2 編) についての報告を行った。[1] その教材は、改良を加えながら現在でも「先端機器測定実習」の中で使用し続けている。さらに、4年前からは同じく LabVIEW を用いた画像計測・処理も「先端機器測定実習」で取り組んでいる。初心者向けに検討・作成してきた LabVIEW を用いた非常に初歩的な画像計測・処理に関する教材として、デジタル・マルチメータの画像

処理による電圧測定 (画像計測の例) についての報告を昨年度の本紀要で行った。[2]

本報告では、生物応用化学専攻の学生が特に取り組み易い専門分野の 1 つである微生物工学で取り扱う「大腸菌コロニー」を題材にした LabVIEW を用いた画像計測・処理に関する教材を、本年度新たに検討・作成したので紹介する。

2. 実施計画・方法

LabVIEW の「Vision Assistant」を用いて画像処理と画像計測を行った。Vision Assistant は対話式に画像処理を実行できる便利なシステム、つまり画像に対して 1 つずつ処理し、結果を試し、望む処理を実現できるというものである。さらに、処理が確定すれば、それを VI (Virtual Instruments、関数でアイコンをウィンドウ平面上に配置) に変換することができる。反対に、VI から Vision Assistant を呼び出すこともできる。

平成 29 年 11 月 1 日受付 (Received Nov. 1, 2017)

* 新居浜工業高等専門学校エンジニアリングデザイン教育センター (Engineering design education center, Niihama National College of Technology, Niihama, 792-8580, Japan)

** 新居浜工業高等専門学校生物応用化学科 (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Niihama National College of Technology, Niihama, 792-8580, Japan)

2-1 LabVIEWサンプルでの画像処理と画像計測

まず、「細胞」の画像サンプルにて、グレースケールフィルタ、2値化、バイナリモフォロジーなどを使用して細胞の数を数え、各細胞の面積を計測する解析手順を学ぶ。

2-2 画像処理

2-2-1 元画像

Fig.1は、8ビット画像のグレースケールである。8ビット画像とは、各ピクセルに8ビット(1バイト)、つまり256階調のカラー情報を割り当てた画像のことである。グレースケールとは、黒から白迄を中間の灰色を含め表示したものである。

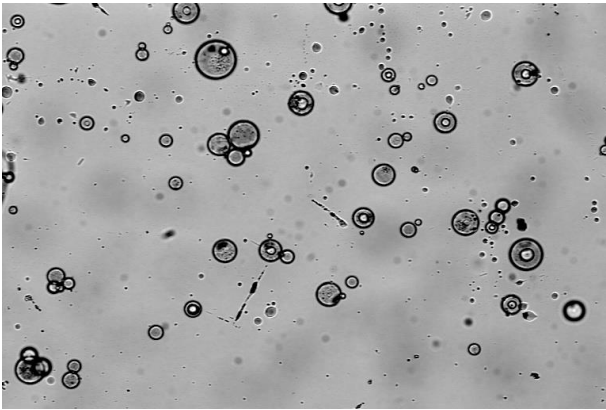


Fig.1 元の画像.

2-2-2 平滑化

Fig.2は、元画像を平滑化したものである。平滑化とは、画像の輝度値を平らに滑らかにするための処理である。画像中のノイズを除去するために用いられる。

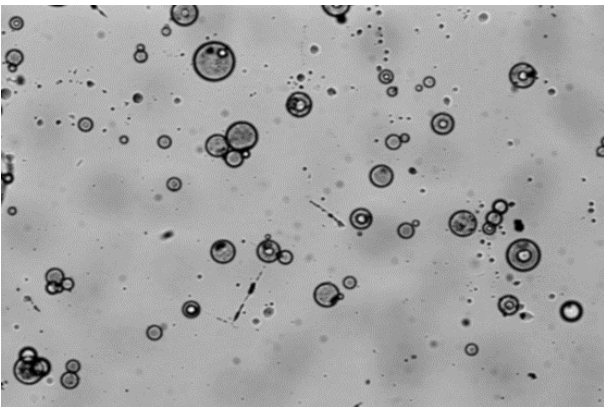


Fig.2 平滑化処理した画像.

2-2-3 エッジ検出

エッジ検出とは、画像の輪郭(エッジ)を検出するための処理である。この操作では、平滑化された画像からエッジを検出

し、それを元の画像に追加する。この操作を行うと、Fig.3のように細胞と背景がより明確に切り離される。

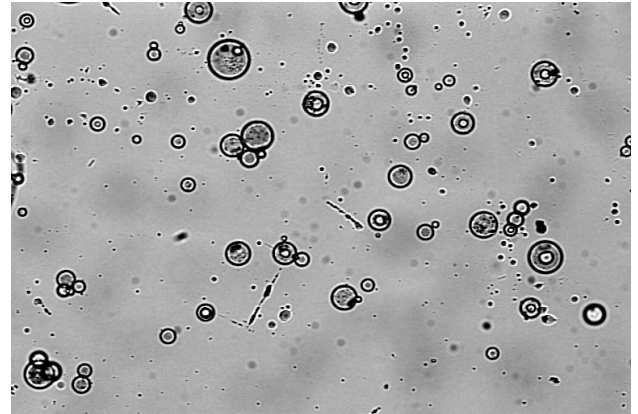


Fig.3 エッジ検出処理した画像.

2-2-4 2値化

2値化とは、濃淡のある画像を白と黒の2階調に変換する処理である。ある閾(しきい)値を定めて、各画素の値が閾値を上回っていれば白、下回っていれば黒に置き換える。この操作では、画像の暗い領域(閾値)を他の領域から分離する。Fig.4の場合、画像の暗い領域(白)は、細胞に対応する。細胞が存在する媒体に対応する領域は、結果のバイナリ画像で背景(黒)として表示される。

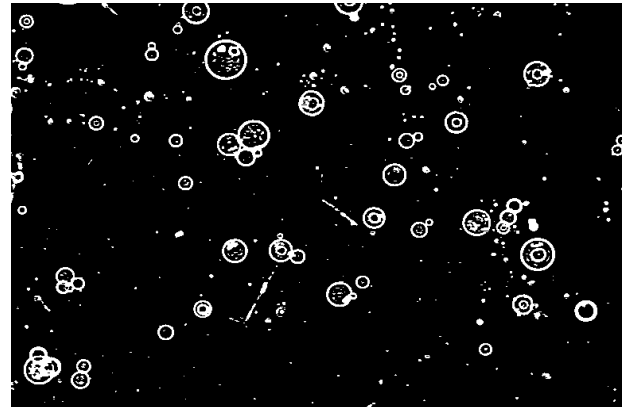


Fig.4 2値化処理した画像.

2-2-5 基本モフォロジー

モフォロジーとは、2値化した白黒画像内の図形を、1画素分膨らませる処理を膨張、逆に1画素分縮める処理を収縮という。膨張と収縮を数回組み合わせる処理をモフォロジー処理といい、2値化画像の平滑化(でこぼこを減らして滑らかにする)、孤立点除去(穴埋め)などに有効である。この操作では、Fig.5のように、粒子の境界線を平滑化して、粒子内の微小な穴を埋め、粒子の周囲の小さいギャップを閉じることによって、バイナリ画像内の粒子の形状を改善する。

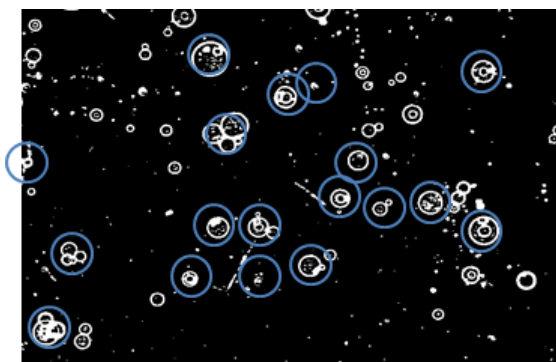


Fig.5 粒子内の穴埋め処理中の画像.

2-2-6 上級モフォロジー

粒子内のすべてのサイズの穴を埋めると、Fig.6 のようになる。

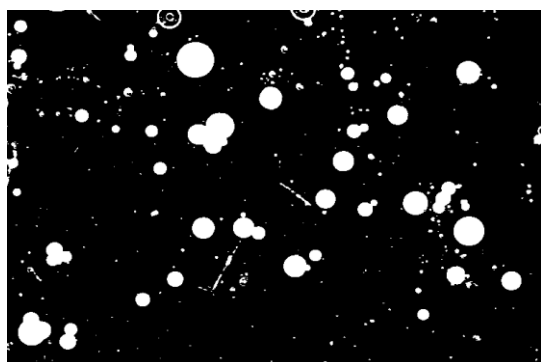


Fig.6 粒子内の穴埋め処理した画像.

次に、Fig.7 (a) のように縁に存在するオブジェクトを削除処理すると、Fig.7 (b) のようになる。

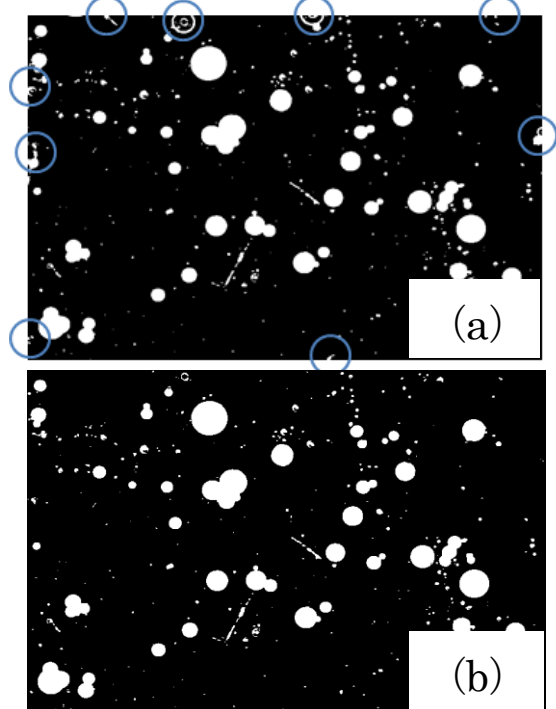


Fig.7 縁に存在するオブジェクトを削除処理中の画像 (a) と削除処理した画像 (b).

2-2-7 粒子フィルタ

粒子フィルタを使用して、バイナリ画像から不要な粒子を削除する。この操作では、主に円形で10ピクセルより大きい粒子のみを解析する。Fig.8 のように、ヘイウッド円形要因が0~1.40の範囲外の粒子及びピクセル面積が10に満たない粒子は削除される。

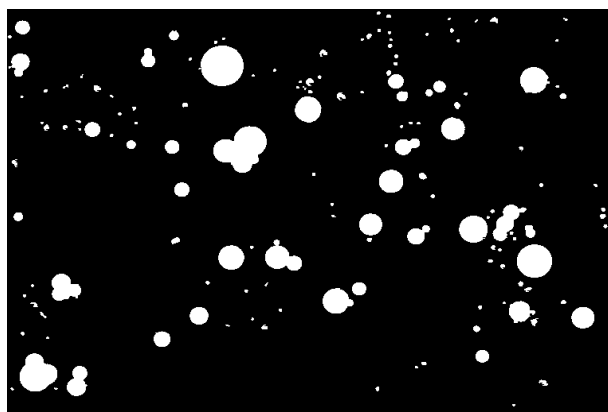


Fig.8 粒子フィルタ処理した画像.

2-3 画像計測 (粒子解析)

最後に、細胞の粒子解析を行うと、Fig.9 のように解析結果として細胞粒子 (オブジェクト) のカウント数が表示されるとともに Excel ファイルにて出力される。

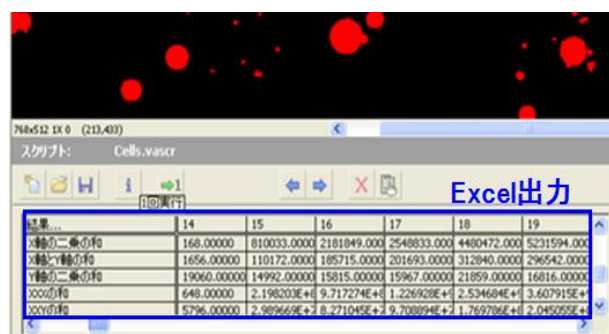
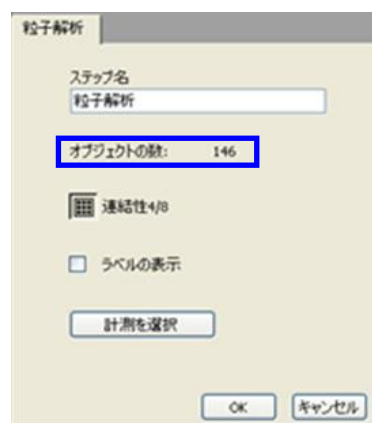


Fig.9 粒子解析処理した結果.

2-4 実際に作製したサンプルでの画像処理と画像計測

2-4-1 デスオキシコーレイト寒天培地の調製

①秤量した粉末培地をフラスコなどの容器に入る、②少量の精製水を加えて十分に攪拌し、均一なペースト状または泥状にする、③培地の塊（ダマ）がなくなってから残りの精製水を入れて均一にする（寒天は静置すると容器の底に沈殿する）、④オートクレーブを使って流通蒸気で培地の溶解を行う（培地を攪拌した時に容器壁に寒天粒子が付着して見えなくなるまで行う）、⑤溶解後は 50℃の恒温水槽にて保冷する（培地が恒温水槽中の水に浸かるようにする）、⑥保冷中に寒天が容器底に沈んでいるので極力泡を立てないように攪拌しシャーレに培地分注する。

2-4-2 大腸菌コロニーの準備

2-2-1 で調製したデスオキシコーレイト寒天培地を用いて、35℃で 24 時間培養して大腸菌コロニーの作製を行った。

2-4-3 画像処理

2-4-3-1 グレースケール画像

2-2-1 で作製した大腸菌コロニーを撮影したカラー画像を Fig.10 に示す。



Fig.10 カラー画像.

上記のカラー画像を、8bit グレースケール画像 (Fig.11) に変換する。

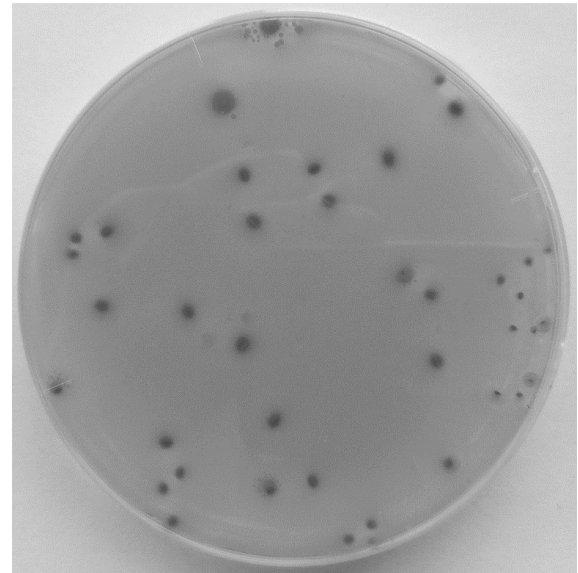


Fig.11 グレースケール画像.

2-4-3-2 閾値決定

ラインプロファイルを用いてグレースケール画像の 2 値化処理を行うための閾値を求める。ライン上のグレーレベルの変化を調べた結果は、Fig.12 に示す。その結果から分かるように閾値は、100 程度であった。

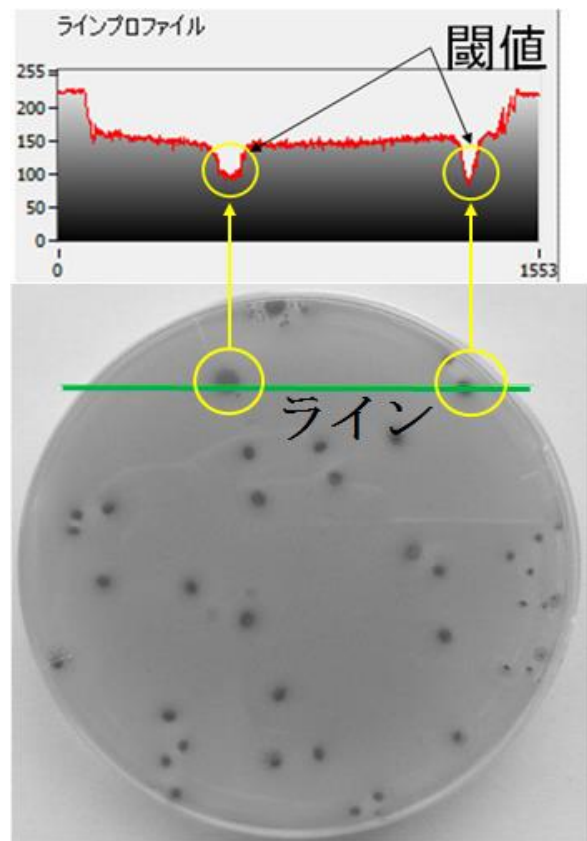


Fig.12 グレースケール画像のラインプロファイル.

2-4-3-3 2値化処理

グレースケール画像の大腸菌コロニーと背景を分離するために2値化処理をする。グレースケール画像と2値化処理した画像を、それぞれFig.13 (a) と (b) に示す。

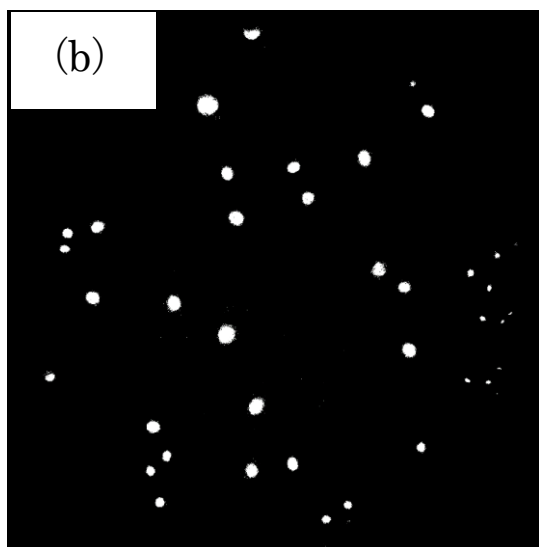
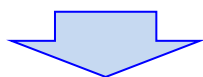
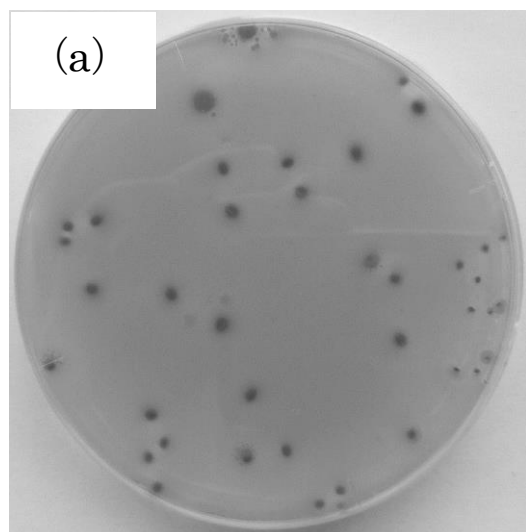


Fig.13 グレースケール画像 (a) と2値化画像 (b) .

2-4-3-4 不要粒子削除

粒子フィルタを用いてバイナリ画像から不要な粒子を削除する。Fig.14 (a) のバイナリ画像から、外接長方形幅が0~10ピクセルの粒子 (代表例を○印で示しているが実際には100箇所以上存在する) を削除した画像がFig.14 (b) である。

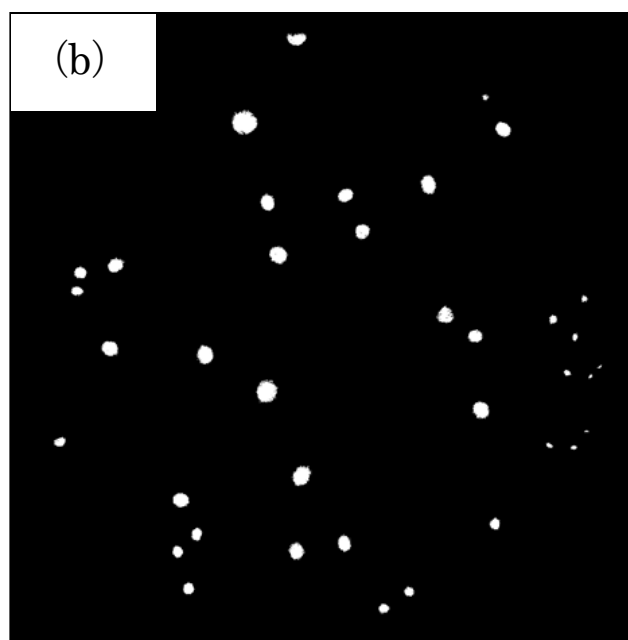
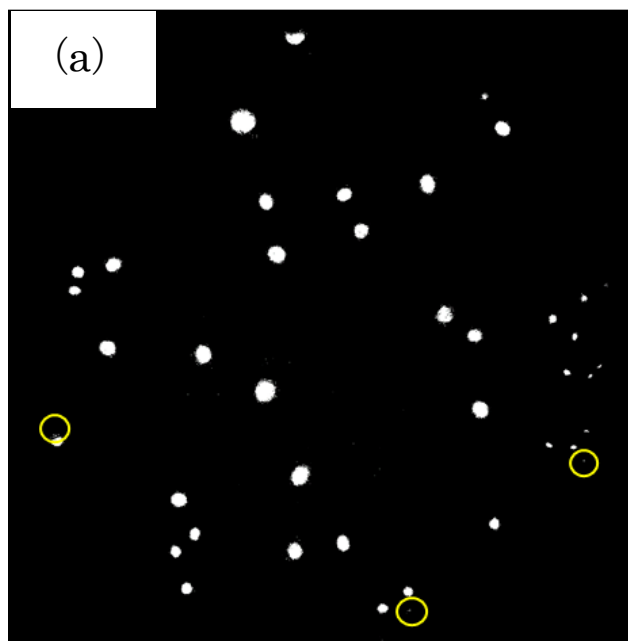


Fig.14 バイナリ画像 (a) と0~10ピクセル粒子削除後の画像 (b) .

2-4-4 画像計測 (粒子解析)

粒子 (大腸菌コロニー) の粒子解析を行い、Excel ファイルにて出力された解析結果の一部をTable 1にまとめた。Table 1からわかるように、大腸菌コロニーの画像計測されたカウント数は38であった。

Table 1 粒子解析の結果

オブジェクト 番号	重心 X	重心 Y	最初の ピクセル X	最初の ピクセル Y
1	864.49631	85.1632	881	66
2	1431.85714	259.80788	1434	251
3	707.22943	335.42528	707	298
4	1485.59959	355.88049	1477	333
5	1261.15128	521.69197	1263	493
6	1011.49229	553.73035	1013	534
7	776.81202	575.09496	773	548
8	1061.96855	662.13767	1063	640
9	809.14855	732.37137	799	706
10	319.34667	763.63509	317	741
11	213.41476	785.73077	214	767
12	203.26184	840.9429	201	827
13	1729.72199	863.92116	1726	854
14	1311.78353	913.79788	1312	886
15	1636.04751	926.04299	1634	912
16	1401.83887	976.27326	1395	957
17	1702.16487	978.681	1706	966
18	302.4111	1013.1969	295	991
19	588.90541	1032.00809	583	1002
20	1776.59016	1068.11475	1780	1063
21	1678.84064	1086.25896	1674	1078
22	1748.35802	1096.77778	1749	1091
23	774.09538	1141.99435	774	1107
24	1419.31702	1197.52529	1415	1172
25	1736.29091	1261.52727	1730	1259
26	151.97804	1293.67057	159	1278
27	1624.765	1304.08	1620	1297
28	1698.17391	1310.19255	1699	1304
29	878.85396	1395.22693	877	1365
30	515.80821	1467.80564	520	1446
31	1461.18063	1539.63482	1463	1520
32	563.64865	1570.41104	562	1552
33	1007.88808	1597.95858	1007	1570
34	863.72497	1621.21229	861	1594
35	506.18148	1622.99249	501	1604
36	539.04571	1733.60457	537	1715
37	1202.99837	1742.55049	1197	1728
38	1126.92366	1793.3084	1130	1778

を用いた画像処理と画像計測の関係を学ぶことができた。今後は、「顕微鏡画像の自動取り込み」や「微生物サイズの画像計測」についての教材の検討・作成を進めて行く予定である。

参考文献

- [1] 辻久巳、中山享、LabVIEW を用いた電気特性測定自動化に関する教材、新居浜工業高等専門学校紀要、**48**、57-62 (2012).
- [2] 辻久巳、中山享、LabVIEW を用いた画像計測・処理に関する教材、新居浜工業高等専門学校紀要、**53**、71-76 (2017).

謝 辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 (奨励研究: 17H00241) によって行われた。

3. 結 言

専攻科・生物応用化学専攻 1 年生の「先端機器測定実習」で行っている LabVIEW を用いた画像計測・処理に関する内容に、本年度新たにを取り入れた「大腸菌コロニー」を題材にした教材を紹介した。微生物工学などで取り扱う画像処理と画像計測の方法を学ぶため、LabVIEW を用いた大腸菌コロニーの画像計測 (カウント) を行った結果、当初の目的であった LabVIEW