植物器官のデジタル画像面積を効率的に計測できる領域抽出ソフトウェアの開発

七夕高也¹・山田哲也^{2*}・清水悠介²・篠崎良仁²・金勝一樹²・高野 誠¹

¹ 農業生物資源研究所 305-8602 茨城県つくば市観音台

² 東京農工大学農学部 183-8509 東京都府中市幸町

Development of Automatic Segmentation Software for Efficient Measurement of Area on the Digital Images of Plant Organs

Takanari Tanabata¹, Tetsuya Yamada^{2*}, Yusuke Shimizu²,
Yoshihito Shinozaki², Motoki Kanekatsu² and Makoto Takano¹

¹National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8602

²Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509

Abstract

We developed automatic segmentation software for efficient measurement of area on digital images of plant organs. This software enables to measure area size of plant organs from a large number of images with less effort. The developed software has following two features. (1) We developed the technique for dividing plant organs and background using color difference of digital images. An accurate region extraction of plant organs can be executed compared with a conventional binarization method. (2) We developed software functions automating repetitive tasks to improve the task efficiency of image analysis. The developed functions enable efficient software operations and the processing of large number of image analysis. We applied the developed software to analysis of differences in the senescent pattern of petals in *Ipomoea nil* (L.) Roth. We found that the software effectively detected differences compared with conventional visual comparison methods. The developed software is available for use free of charge by downloading at <http://www.kazusa.or.jp/picasos/>.

Key Words : area measurement, image analysis, petal senescence, phenotypic analysis, varietal differences

キーワード : 画像解析, 花卉老化, 系統間差異, 表現型解析, 面積計測

緒 言

植物の研究では、植物体の形状を計測して得た値が重要な情報となる。特に、園芸学の分野では、収穫対象となる葉や果実、花などの器官について、その形状を評価することが多い。そのため、ノギスなどの測定器具を使用して長さなどを直接的に計測する方法（梶浦ら, 2002）や、ビデオ画像から重心座標などを間接的に計測する方法（田附・塩, 2007）などが提案されている。しかし、QTL 解析や遺伝資源の特徴付けなどのように、植物器官の形状を大規模に評価しなければならない場合、より効率的に形状を計測できる新たな方法を開発する必要がある。

近年、デジタル画像処理技術を活用し、植物器官の形状を計測する新たな方法が提案された（Bylesjö ら, 2008）。この方法を用いれば、コンピュータ処理により大量の画像を自

動処理することができ、植物器官の形状を大規模に評価することが可能になる。しかし、そのような大規模化の実現には、画像処理に用いる“領域抽出法”などのソフトウェア技術を改良し、形状計測の効率化を図らなければならない。

領域抽出とは、デジタル画像中の被写体など特定の対象物について、その画像領域を選択し、背景との区別を行う操作のことである。画像処理により植物器官の形状を計測する場合、この領域抽出を最初に行い、画像中の器官と背景とを区別する必要がある。領域抽出には“2 値化法”と呼ばれる手法が主に用いられている。2 値化とは、画像中の抽出対象と背景を、それらの領域の色や輝度値の違いに基づき区別する操作のことであり、Adobe® Photoshop®（アドビシステムズ）や ImageJ（フリーソフト, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>）など汎用の画像解析ソフトウェアを用いて実行することができる。

2 値化法により領域抽出を行うためには、抽出対象と背景の色および輝度値が大きく異なるデジタル画像を用いることが重要となる。植物でも、青や赤など単色の幕を背景として撮影した画像（田附・塩, 2007; 山本, 2003）やスキャナで取り込んだ画像（Bylesjö ら, 2008; Weight, 2008）

2009 年 10 月 17 日 受付. 2010 年 2 月 18 日 受理.

本研究の一部は、農林水産省 新農業展開ゲノムプロジェクト (NVR-0006) の委託を受けて実施した。

本報告の一部は、園芸学会平成21年度秋季大会において発表した。

* Corresponding author. E-mail: teyamada@cc.tuat.ac.jp

を用いた領域抽出が行われている。しかし、圃場などで撮影した背景が単色でない画像や暗い照明下で撮影したコントラストの低い画像などを用いる場合、2値化のための閾値の微調整など、極めて煩雑な操作が要求される。また、それでも2値化に失敗した場合、修正作業が必要となるため、大量の画像を自動処理することは困難となる。

そのような2値化法における問題の解決には、デジタル画像の色情報に基づいて領域抽出を行う方法(山本, 2003)が有効と考えられる。この方法では、植物体の色とそれに近い背景の色を判別することができるため、通常の2値化法よりも正確に領域抽出を行うことが可能である。しかし、圃場で撮影した画像のように複数の色が背景に混在する場合、色の判別に多くの時間がかかり、領域抽出の効率が低下してしまう。そのため、大量の画像を自動処理するためには、色の判別をより迅速に行うことのできる新たな領域抽出法を考案する必要がある。

領域抽出後のデジタル画像からは、特定の画像領域における距離、面積および重心座標などの測定情報が得られる。それらの情報は、成長や老化に伴う植物器官の形状変化を客観的に評価する指標として用いることができる。しかし、そのような評価を行うためには、対象となる植物器官の時系列画像を大量に解析しなければならない。また、植物器官の形状を大規模に評価する場合にも、大量の画像を解析する必要がある。そのため、領域抽出とその後の距離や面積などの測定を連続的に実行できる新たなソフトウェアの開発が求められている。

そこで、本研究では、デジタル画像処理技術を活用した植物器官の形状計測を効率化するため、色情報(平均色差)を使った新たな領域抽出法を考案するとともに、その手法による領域抽出とその後の面積計測を複数の画像に対して連続的に実行できるソフトウェアを開発した。さらに、そのソフトウェアを用い、2種類のアサガオ自殖系統について、花冠の時系列画像を解析し、得られた花冠面積の時系列データから花卉老化の系統間差異を検出することで、開発した領域抽出ソフトウェアの実用性を確認した。

材料および方法

1. 領域抽出法の考案(実験1)

第1図Aに、アサガオ(*Ipomoea nil* (L.) Roth)の花冠(赤色)、花を挿したプラスチックチューブを固定するチューブスタンド(白色)およびそのスタンドを置いた実験台(黒色)をデジタルカメラで撮影した画像(解析対象画像)を示す。この画像を利用し、植物器官の画像領域を抽出する方法を考案した。領域抽出を行う前に、まずは、解析対象画像中の花冠(S1)、チューブスタンド(S2)および実験台(S3)の一部を参照画像として定義した(第1図B)。参照画像はサイズが大きく、数が多いほど正確に領域抽出を行えるが、抽出にかかる時間は増えてしまう。本実験では、試行錯誤により、参照画像のサイズを16ピクセル×16ピ

A. 解析対象画像

B. 参照画像

第1図 解析対象画像と参照画像

クセル、数を2～3枚とした。領域抽出は、数式(1)で求めた解析対象画像中の点Pと参照画像との平均色差(ΔPn)を使って行った。

$$\Delta Pn = \frac{1}{L \times L} \sum_{x'=0}^L \sum_{y'=0}^L \delta n^P(x', y') \quad (n=1, 2, \dots) \quad (1)$$

$$\delta n^P(x', y') = \sqrt{\sum_{c=L, a, b} (P_c(x, y) - S_{n_c}(x', y'))^2}$$

平均色差の算出にはCIE-L*a*b*表色系のL*a*b*値を用いた。第2図に、平均色差を使って植物器官(花冠)の領域抽出を実行する際に用いた自動抽出処理のアルゴリズムを示す。はじめに、撮影画像の粒状ノイズを除去するため、画像全体にメディアンフィルタを適用した。次に、解析対象画像の点Pにおける画素のRGB値からL*a*b*値を求めた。さらに、すべての参照画像(S1～S3)について点Pとの平均色差を求め、一番小さな値を示す参照画像($S_{\min}$)を決定した。 $S_{\min}$ がS1の場合には“花冠”と判定して255を、S2またはS3の場合には“背景”と判定して0を点Pの値とした。この作業を解析対象画像中のすべての点について実行することで、花冠領域を抽出した2値化画像を得た。最後に、判定ミスにより発生した2値化画像中の粒状ノイ

第2図 自動抽出処理のアルゴリズム

ズを除去するため、膨張収縮処理を適用した。

2. 領域抽出ソフトウェアの開発 (実験2)

実験1で考案した領域抽出法を使い、複数の画像に対して連続的に領域抽出を行うとともに、抽出した画像領域の面積を計測できるソフトウェアを開発した。ソフトウェアの開発には VisualC++ (Microsoft® Visual Studio 2005) と OpenCV (Intel®) を使用した。第3図に、開発したソフトウェアの実行画面と解析結果の出力形式を示す。このソフトウェアは、任意のフォルダに保存されたデジタル画像を順番に読み込み、領域抽出と面積計測を実行し、フォルダ中のすべての画像を解析した後、その結果をまとめて出力する機能を持つ。第4図に、開発したソフトウェアの解析手順を示す。ソフトウェアを起動した後、解析したい画像が保存されたフォルダを指定すると、フォルダ内の画像ファイル (Bitmap, Jpeg, Tiff) が検索され、ファイルの名前順に並べられた画像リストが作成される。このリストの順番に従って画像が1枚ずつ実行画面に表示されるので、その画像について植物器官と背景の参照画像をそれぞれ1枚以上指定する。解析対象領域を指定して自動抽出処理を実行すると、植物器官の領域抽出が行われ、その結果が実行画面に表示される。このとき、間違っって抽出された場所があれば、2値化画像を使って修正することができる。最後に、抽出された領域のピクセル数を求め、植物器官の画像面積を計測する。フォルダ内のすべての画像について解析が終わると、解析結果が CSV 形式のファイルにまとめて出力される。なお、開発したソフトウェアは“Flower Shape Analysis System”と命名し、<http://www.kazusa.or.jp/picasos/> でフリーウェアとして公開している。

A. 実行画面

ディレクトリ名	C-W								
1ピクセルあたりの面積値									
ファイル名	Area1 [pixel]	Area2 [pixel]	Area3 [pixel]	Area4 [pixel]	Area1	Area2	Area3	Area4	
IMG_3321.JPG	5120	0	0	0	5120	0	0	0	0
IMG_3322.JPG	5210	0	0	0	5210	0	0	0	0
IMG_3323.JPG	5316	0	0	0	5316	0	0	0	0
IMG_3324.JPG	6795	0	0	0	6795	0	0	0	0
IMG_3325.JPG	7993	0	0	0	7993	0	0	0	0
IMG_3326.JPG	38309	0	0	0	38309	0	0	0	0
IMG_3327.JPG	75210	0	0	0	75210	0	0	0	0
IMG_3328.JPG	104600	0	0	0	104600	0	0	0	0
IMG_3329.JPG	125217	0	0	0	125217	0	0	0	0
IMG_3330.JPG	136624	0	0	0	136624	0	0	0	0
IMG_3331.JPG	142765	0	0	0	142765	0	0	0	0
IMG_3332.JPG	146492	0	0	0	146492	0	0	0	0
IMG_3333.JPG	150139	0	0	0	150139	0	0	0	0
IMG_3334.JPG	152021	0	0	0	152021	0	0	0	0
IMG_3335.JPG	155064	0	0	0	155064	0	0	0	0
IMG_3336.JPG	156163	0	0	0	156163	0	0	0	0
IMG_3337.JPG	157520	0	0	0	157520	0	0	0	0
IMG_3338.JPG	158132	0	0	0	158132	0	0	0	0
IMG_3339.JPG	158337	0	0	0	158337	0	0	0	0
IMG_3340.JPG	152853	0	0	0	152853	0	0	0	0
IMG_3341.JPG	154780	0	0	0	154780	0	0	0	0
IMG_3342.JPG	144675	0	0	0	144675	0	0	0	0
IMG_3343.JPG	113953	0	0	0	113953	0	0	0	0
IMG_3344.JPG	54524	0	0	0	54524	0	0	0	0
IMG_3345.JPG	30604	0	0	0	30604	0	0	0	0
IMG_3346.JPG	21645	0	0	0	21645	0	0	0	0
IMG_3347.JPG	17802	0	0	0	17802	0	0	0	0
IMG_3348.JPG	15810	0	0	0	15810	0	0	0	0
IMG_3349.JPG	14577	0	0	0	14577	0	0	0	0
IMG_3350.JPG	13161	0	0	0	13161	0	0	0	0

B. 出力形式

第3図 開発したソフトウェアの実行画面と解析結果の出力形式

3. 開発したソフトウェアの実用性の確認 (実験3)

アサガオの自殖系統‘紫’と‘渦’の実生を25°C、12時間日長 (12:00 ~ 24:00) に設定したインキュベーター内で栽培し、実験に供試した。開花当日10:30 ~ 11:00の間に、各系統の実生から花卉の展開を開始している花を、萼下0.5 ~ 1 cmの花柄を残して切除した。採取した花の花柄を、蒸留水を注水した2 mL容量のポリプロピレン製マイクロチューブ (直径10 mm, 長さ40 mm) に挿し、インキュベーター内に静置した。インターバル撮影機能を備えたデジタルカメラ (PowerShot S3 IS, キヤノン) を用い、天井側から30分ごとに花の様子を撮影し、花冠の時系列画像を得た。画像データをPCに取り込み、モニター上で各系統の画像を時系列に並べ、花冠形状の変化について視覚的な比較を行った。次に、実験2で開発したソフトウェア (Flower Shape Analysis System) を用い、花冠の時系列画像を解析した。画像中の各花について花冠の領域抽出を行い、その領域の面積を計測することで、花冠面積の時系列データを得た。各花の花冠面積の時系列データについて、その最大値

第4図 解析手順

を 100 とした時の相対値を求め、これを花冠面積の変化を評価する指標とした。さらに、各花の花冠面積の相対値が 90 以上に到達した状態を“開花”，その後、90 以下に到達した状態を“インローリング（花冠の周縁部が老化に伴って萎縮し、向軸側に巻き込まれる状態）”と定義し、開花後インローリングが開始するまでの時間（h）を求め、これを花卉老化が開始する時期を評価する指標とした。

結果および考察

1. 領域抽出法の考案（実験 1）

本実験で考案した領域抽出法の性能を評価するため、実験室内で撮影したアサガオ花冠のデジタル画像に対して抽出処理を試み、他の領域抽出法と結果を比較した（第 5 図）。なお、解析対象は、アサガオの花が開花してから萎れるまでの花冠形状の変化を解析することを目的として得た時系列画像の一枚であり、第 1 図に示したものと同一画像である（第 5 図 A）。この原画像に対し、Adobe® Photoshop® を用いた 2 値化処理（閾値 140）による領域抽出を行ったところ、花冠だけでなく、実験台やチューブスタンドの影も同時に抽出された（第 5 図 B）。一方、考案手法では、花冠だけが抽出されることを確認した（第 5 図 C）。このように、色情報を使った考案手法では、背景に異なる色が混在した画像でも、正確な抽出処理が可能であることを明らかにした。

色情報を使った他の領域抽出法と比較するため、フリーウェア“LIA32”（山本，2003）による抽出を試みた。LIA32 には、任意に指定した画像中の座標と同じ色を示す領域を抽出する色探索機能がある。この機能を使って抽出を行っ

第 5 図 実験室内で撮影したアサガオ花冠の画像に対する抽出処理結果

A：抽出処理に用いた原画像、括弧内の数値は色情報を得た画像中の座標を示す、B：Adobe® Photoshop® による 2 値化処理（閾値 140）による抽出、C：提案手法による抽出、D：LIA32 による座標 (376, 202) の色情報（R169, G50, B144）を用いた抽出、E：座標 (210, 234) の色情報（R220, G74, B111）を用いた抽出

たところ、指定した座標の違いにより、良好な結果が得られる場合（第 5 図 D）と、そうでない場合（第 5 図 E）があることを確認した。LIA32 の色探索機能には、色の違いを許容する範囲を設定できるオプションがあり、その設定を画像ごとに厳密に行えば、より正確な抽出が可能になると思われる。しかし、そのための試行錯誤の時間を考えると、考案手法のほうが処理効率が良いと判断された。

被写体や背景に複数の色が混在する複雑な画像に対する考案手法の性能を評価するため、圃場で撮影したアカクロウバーの画像に対して抽出処理を試みた（第 6 図）。原画像に対し、Adobe® Photoshop® を用いて 2 値化処理（閾値 140）を行ったところ、被写体に影がかかっている部分（a）や被写体の輪郭が明確でない部分（b）、複雑な色合いを示す背景の部分（c）では、正確な抽出が行われなかった（第 6 図 B）。一方、考案手法では、そのような部分でも比較的正確に抽出が行われており（第 6 図 C）、複雑な画像でも、若干の修正を加えれば、十分に領域抽出を行えることが示された。

考案手法は、あらかじめ指定した植物器官と背景のサンプル（参照画像）を使い、解析対象画像の各画素が植物器官と背景のどちらにより近い色を示すかを判別する方法である。また、抽出する領域だけでなく、抽出しない領域の色情報を使うことで、判別の正確性を高めている。考案手法の主な特徴を挙げると、次の 3 つになる。

1) 簡易な解析作業の実現

画像処理を実行するために必要な設定は、植物器官（抽出する領域）と背景（抽出しない領域）の指定だけで、作業を繁雑にする数値パラメータの調整や画像処理の知識は不要である。

2) 照明変化に強い

色情報を使った判定であり、通常の2値化法で行われる輝度情報による処理では失敗するような画像でも、抽出処理を実行できる。撮影のたびに照明の強さが変わり、画像が明るい、暗いと変化するような場合にも、安定して抽出処理を実行できる。

3) 複数色の植物器官や背景への対応

圃場で撮影した背景の色が複雑な画像から植物器官を抽出する場合や、花と葉のように異なる色の植物器官をまとめて抽出する場合でも、参照画像を複数用意することで一度に処理することができる。

第6図 圃場で撮影したアカクローバーの画像に対する抽出処理結果

2. 領域抽出ソフトウェアの開発 (実験2)

本実験で開発した領域抽出ソフトウェア (Flower Shape Analysis System) の作業効率について考察する。デジタル画像処理技術を活用し、植物器官の形状変化を評価するためには、大量の時系列画像に対して植物器官の領域抽出と面積計測を行う必要があるが、それらを Adobe® Photoshop® や ImageJ を使用して実施する場合、

- ① 画像ファイルを選択して開く
- ② 領域抽出処理 (2値化, 色範囲指定) を実行する
- ③ 抽出した領域のピクセル数を計測する
- ④ 計測したデータをメモする
- ⑤ 画像ファイルを閉じる

第7図 時系列画像の解析によるアサガオの花卉老化に関する系統間差異の検出

A: 花冠形状の変化を視覚的に比較した結果, B: 花冠面積の変化を相対値で比較した結果, C: 花卉老化の開始時期をインローリング開始時間で比較した結果, 垂直線は標準誤差 ($n=5$) を示す, **は t 検定により 1% 水準で有意差あり

⑥ 画像枚数分①—⑤を繰り返す

⑦ メモしたデータを表計算ソフトに入力する

という手順で操作が進められる。このうち、④と⑦の操作は、作業への負担が非常に大きく、計測データの記録ミスや転記ミスが生じる可能性がある。また、①の操作も、大量の画像を処理する場合、画像ファイルの選択ミスが生じる可能性がある。一方、Flower Shape Analysis System を使用する場合、

①' 画像ファイルが入っているフォルダを指定する

②' 解析対象領域を指定する

③' 参照画像を指定する

④' 領域抽出処理の実行する

⑤' 画像枚数分②'—④' を繰り返す

⑥' 計測結果ファイルを出力する

という手順で操作が進められる。このうち、作業に負担のかかる作業は②' と③' だが、これは画面に示された画像の一部を指定する簡単な操作であり、負担の度合いは比較的小さいと判断される。また、画像ファイルの選択や計測データの記録が自動化されているため、作業負担やミスの発生が軽減され、Photoshop® や ImageJ を使用する場合に比べ、作業効率は大幅に改善されている。

3. 開発したソフトウェアの実用性の確認 (実験 3)

実験 2 で開発した領域抽出ソフトウェアの実用性を確認するため、アサガオの自殖系統‘紫’と‘渦’について、花冠の時系列画像を解析し、花卉老化に関する系統間差異の検出を試みた (第 7 図)。はじめに、各系統の時系列画像を並べて表示し、花卉老化に伴う花冠形状の変化を視覚的に比較した (第 7 図 A)。その結果、花冠形状の変化について、2 つの系統間に差異があるかどうかを明確に判断することは困難であることが分かった。そこで、Flower Shape Analysis System を用い、各系統の時系列画像から花冠面積の時系列データを求め、花卉老化に伴う花冠面積の変化を比較した。花冠面積の相対値を用い、採花時 (0 h) の花卉の展開程度がほぼ同じ‘紫’と‘渦’の花について比較を行ったところ (第 7 図 B)、花冠面積は両系統とも採花後 8 h 以降に減少するが、その減少速度は‘渦’に比べ‘紫’のほうが早く、2 つの系統間には花卉老化の速度について差異が存在することが示された。さらに、各系統の花冠面積の時系列データから、開花後インローリングが開始するまでの時間を求め、花卉老化が開始する時期を比較したところ (第 7 図 C)、『紫’と‘渦’のインローリング開始時間には有意な差が認められ、2 つの系統間には花卉老化の開始時期についても差異が存在することが明らかになっ

た。以上の結果から、時系列画像の視覚的な比較では器官形状の変化について差異を確認することが困難な系統間でも、本研究で開発したソフトウェアを用いて時系列画像を解析することにより、系統間差異を検出することが可能であることが示唆された。

摘 要

デジタル画像処理技術を活用した植物器官の形状計測を効率化するため、色情報 (平均色差) を使った新たな領域抽出法を考案し、その手法による領域抽出とその後の面積計測を連続的に実行できる領域抽出ソフトウェア “Flower Shape Analysis System” (<http://www.kazusa.or.jp/picasos/>) を開発した。従来法との比較から、考案した手法は、被写体や背景の色が複雑な画像でも、植物器官の領域抽出を効率よく、正確に実行できることを明らかにした。また、開発したソフトウェアは、画像ファイルの選択や計測データの記録が自動化され、作業効率が大幅に改善されている。さらに、開発したソフトウェアを用い、アサガオ花冠の時系列画像を解析したところ、視覚的な比較では検出が困難な花卉老化の系統間差異を容易に検出することができた。以上の結果から、本研究で考案した手法および開発したソフトウェアが、植物器官の形状計測に極めて有用であることが示唆された。

謝 辞 ソフトウェア評価のための圃場画像を提供いただいた磯部祥子博士 (かずさ DNA 研究所) に深く感謝いたします。

引用文献

- Bylesjö, M., V. Segura, R. Y. Soolanayakanahally, A. M. Rae, J. Trygg, P. Gustafsson, S. Jansson and N. R. Street. 2008. LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters. *BMC Plant Biol.* 8: 82. DOI: 10.1186/1471-2229-8-82. <<http://www.biomedcentral.com/>> .
- 梶浦一郎・町田 裕・佐々木 修・大垣智昭. 2002. ナシ葉形の簡便な数値化法. *園学研.* 1: 5-8.
- 田附明夫・塩 光輝. 2007. 数種浸透質の添加と無酸素または通気停止処理によるキュウリ幼植物体の水ストレスの画像診断. *園学研.* 6: 367-373.
- Weight, C., D. Parnham and R. Waites. 2008. LeafAnalyser: a computational method for rapid and large-scale analyses of leaf shape variation. *Plant J.* 53: 578-586.
- 山本一清. 2003. LIA for Win32 (LIA32). フリーウェア. <http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/%7Eshinkan/LIA32/>