

九州大学中央分析センター

センター ニュース

44

平成6年4月

目 次

分析機器解説シリーズ（43）	2
顕微鏡画像の波数解析	
トピックス	9
酸性土壌中のアルミニウムイオンの形態	
お知らせ	13

★ 分析機器解説シリーズ (43) ★

顕微鏡画像の波数解析

工学部 岡部弘高、石田謙司、瀧 正二、原 一広

1. はじめに

近年、画像処理や画像解析はコンピュータの発達・普及に伴って簡単、高速、安価に行うことが可能になった。衛星画像の解析、ファクシミリにおける画像圧縮、郵便番号読み取りなどのパターン認識、さらに動画の圧縮転送まで非常に広い分野で常識化している。ここでは顕微鏡画像等の静止画像で行われている周期性の評価法である波数（空間周波数）解析に関する基本的な事柄の解説を行う。

2. 画像について

2.1. デジタル画像

コンピュータで処理可能なデジタル画像とは画素(Pixel)と呼ばれる点の集合である。画素は図1のように2次元格子状に配置され、(横方向の画素数)×(縦方向の画素数)画素の画像と呼ばれる。図1は16×8画素の画像である。画素が多いほど高解像度の画像であり、細かい表現が可能になる。

さらに各画素は明るさや色によって特徴付けられる。明るさは、最も明るい状態と真っ暗な状態を何段階で表現するかによって何階調と呼ばれる。色は、赤、緑、青の光の三原色の混合比で表す。例えば、白は赤、緑、青を1:1:1の明るさ比で混合したもののうち最も明るい色である。同じ混合比でも、明るさによって白から灰を表現することができる。三原色の明るさが0の場合が黒(暗)である。

通常用いられている全ての画像においてその画像を構成する画素が明るさと色という情報を持っているわけではなく、必要に応じて以下の3種類の画像が用いられる。

- 1) 2値化画像：各画素が明(白)と暗(黒)の様に2つの値で表現される。
- 2) 階調画像：各画素が何段階かの明るさを持ち、各画素の色は同じもの。白～灰～黒の場合をグレースケールと呼び一般的に用いられている。
- 3) カラー画像：各画素が階調だけでなく、色を持つもの。通常は赤、緑、青の三原色が各々階調を持つとして表現される。

1) から3) にゆくに従って表現力(情報量)が大きくなる代わりに保存や処理に必要なコストが増大することになる。

2.2. 画素の値

画素の値とは、2値化画像や階調画像ならば明るさであるが、カラー画像は色に対する情報をど

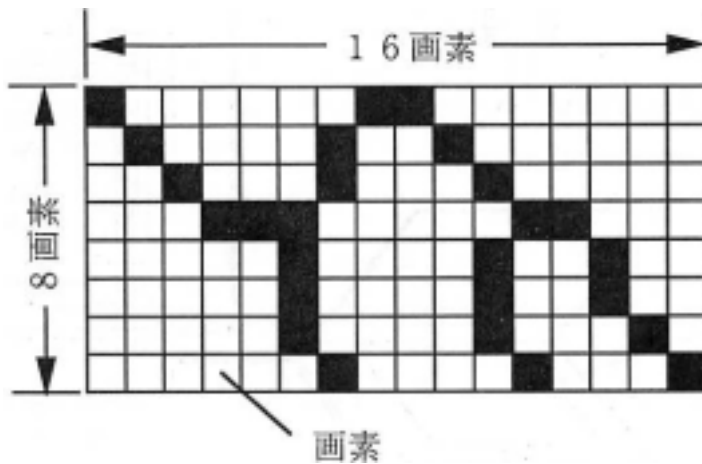


図1 16×8画素の2値画像

のように扱うかを注意する必要がある。例えば、赤、緑、青別に処理するのか、赤、緑、青の明るさ値を加えて絶対的明るさを画素値とするのか等である。また、カラー画像には赤、緑、青の比率を表す情報と各画素が表す色の情報を別々に保持するインデックス方式もある。例えば、最も普及している、NECのPC-9801標準のグラフィック画面は4096色の中から任意の16色を表示可能である。各画素に対応する情報は16色中の何番目の色かを保持している(0~15の数字、即ちインデックスである)。一方、何番目の番号がどのような色かは赤、緑、青の各明るさを16段階(16×16で4096色)で表される。画面に表示されるときには、インデックスと色情報はハードウェアで対応させられる。この様な方式の違いによって、画像の読み込みと処理を異なるソフトウェアで行う場合には画像形式の変換が必要になることがある。

3. 画像の取扱い

3.1. 画像の読み込み

顕微鏡像をコンピュータで処理したい場合には、像をデジタル画像として読み込む方法が必要になる。最も望ましいのは、顕微鏡にCCDカメラ等を接続し、付属のコンピュータで読み込むことであろう。しかし、それが出来ない場合にも写真を撮ることができれば、写真をスキャナーで読み取ることによってデジタル画像化が可能である(図2参照)。もちろん、この方法なら顕微鏡像に限らず写真に撮れるものならどのようなものでも処理が可能になる。

3.2. 画像処理ソフトウェア

画像をコンピュータに読み込んだらそれを処理するソフトウェアが必要になる。自作や購入以外

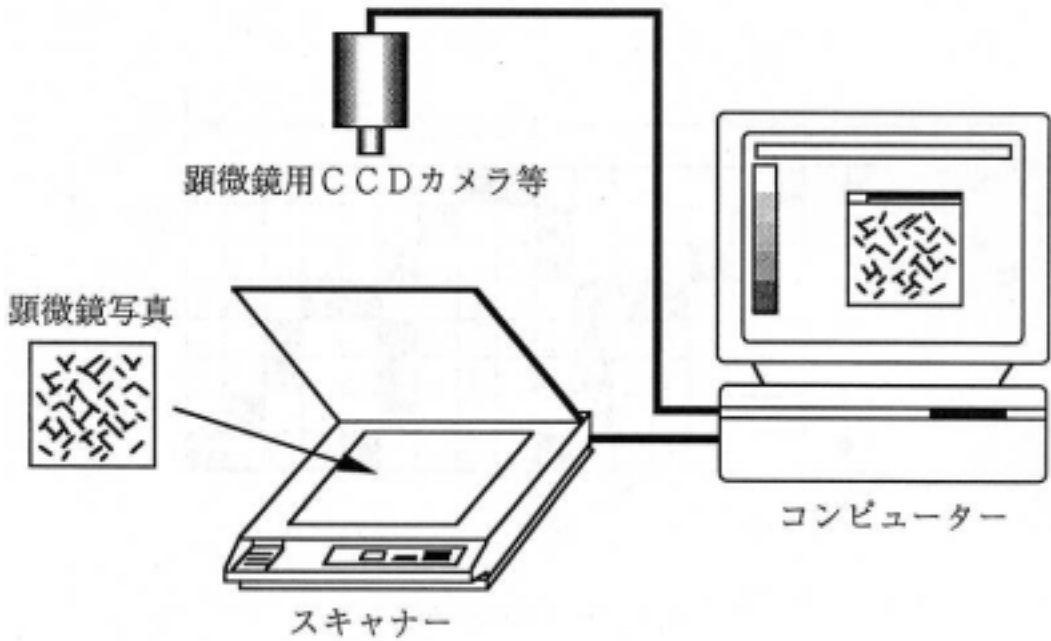


図2 画像の読込方法

にも高度な機能をもったフリーソフトウェアを広域ネットワークやパソコン通信から得ることが出来る。例えば、マッキントッシュコンピュータ用にはパブリックドメインソフトの NIH Image (U.S. National Institute of Health の Wayne Rasband 氏作) というソフトウェアがある。Image はソースコードが公開されていることから、2次元フーリエ変換機能を持った原子間力顕微鏡用等の改造版も存在している。NIH Image は Internet で zippy.nimh.nih.gov (国内でも多数のサイトで入手可能) に anonymous ftp で入るか、NTIS (5285 Port Royal Rd., Springfield, VA22161, Part number PB93-504868) からフロッピーディスクで入手できる。3月時点での最新のバージョンは 1.54 で、マニュアルは日本語訳もある。

4. 周期性の評価

4.1. 二次元フーリエ変換

周期性の解析に欠かせないのがフーリエ変換であり、顕微鏡像の場合も音の周波数解析と基本は同じである。音では元データが時間の経過に伴うものであるのに対し、画像の場合には位置が変わることによるものになる。従って、フーリエ変換後の次元は元データの次元の逆数となるので、音が周波数(単位は $s^{-1} = \text{Hz}$)に変換されるのに対し、このような画像では波数(空間周波数ともいう; 単位 m^{-1})に変換される。図3(a)は横方向に正弦波的周期性で明るさが変化する画像である。図3(a)の画像を二次元フーリエ変換し、パワー(絶対値の自乗)を濃淡で表したのが図3(b)である。

図3(b)の中心が波数0になる。中心を挟んで左右に同じだけ離れた輝点が現れている。この点が図3(a)における正弦波の周期に対応する点である。中心から輝点へ方向は、正弦波の方向と一致する。1つの方向に対し、向きは2つあるので、波数0の点を中心として2つの対象な点が現れることになる。また、輝点の中心からの距離が正弦波の波数を表している。図3(b)の四隅で波数は最も大きくなり、その大きさは画素数と元データの大きさから決まる。即ち、画像が $x \times x$ 画素であり、画像の一边の大きさを l_m とすると、四隅の波数の絶対値は、

$$x / \sqrt{2} l_m \quad (\text{m}^{-1})$$

であり、そのときの横方向と縦方向の各成分は

$$x / 2 l_m \quad (\text{m}^{-1})$$

となる。横と縦の画素数はフーリエ変換を高速（実用に耐える早さで）に行うためには2の累乗にする必要がある。よく用いられるのは、 128×128 、 256×256 、 512×512 等である。また、波数の最大値は画像の一边の大きさが同じならば画素数に比例することに注意しなければならない。例えば図3は 256×256 画素であるが、同じ画像が 512×512 画素で構成されている場合には図3(b)の輝点はAの位置に、 128×128 画素ならばBの位置に現れる。

図4(a)はHOPG（高配向焼結グラファイト）のSTM（走査型トンネル顕微鏡）像である。STM像は電子の密度分布を反映したものであり、HOPGでは60度ずつ方向の異なった3つの正弦波の重なったもので近似できることが知られている。フーリエ変換像（図4(b)）では3つの正弦波に対応する6つの点が現れており、各点は波数0の点を中心に60度ずつ回転した位置にある。

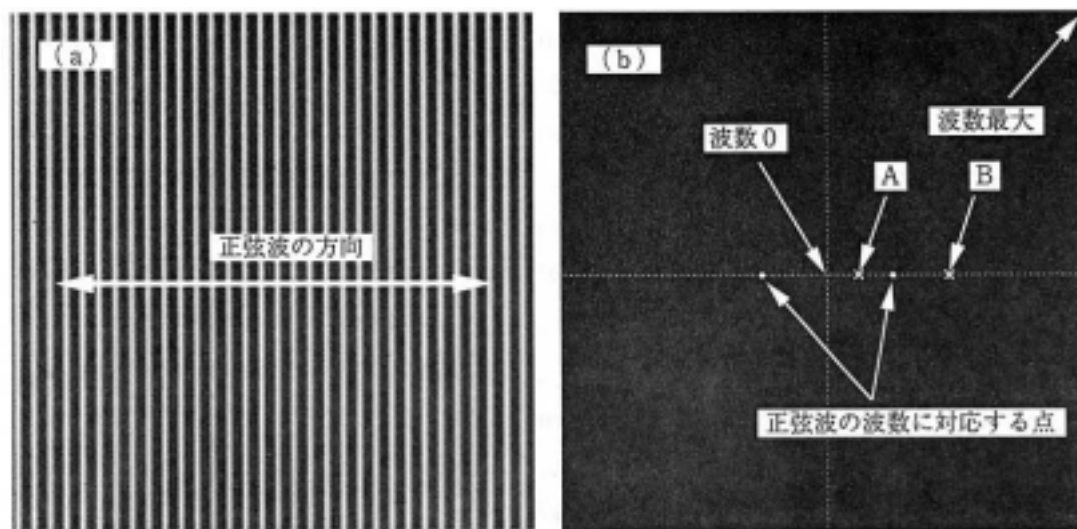


図3 1方向への正弦波的濃淡のある画像(a)とそのフーリエ変換像(b)

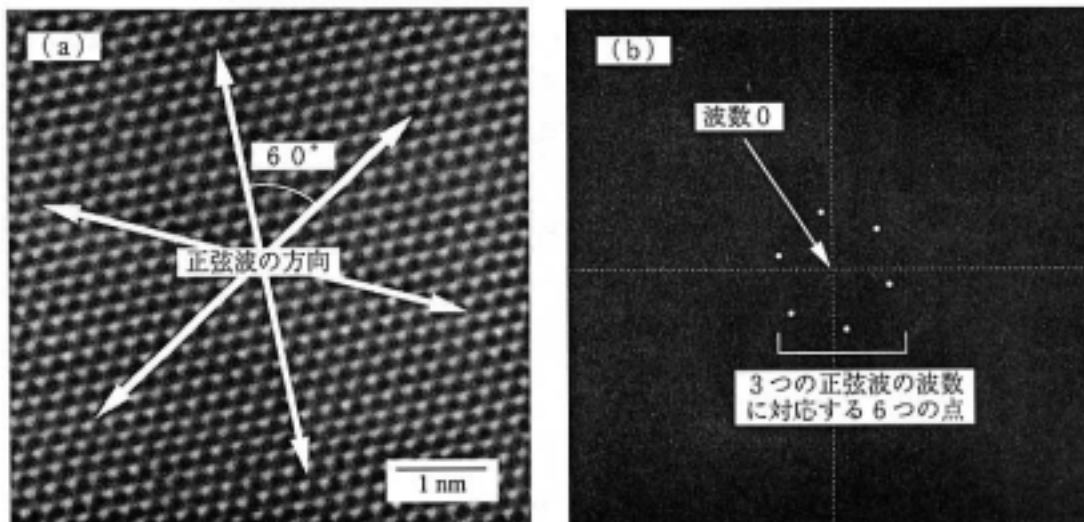


図4 HOPGのSTM像(a)とそのフーリエ変換像(b)

4.2. 電子顕微鏡像の波数解析

図5(a)はHOPG 基板上的パラフィン蒸着膜の透過型電子顕微鏡像である。この蒸着膜はHOPG 基板にエピタキシャル成長していると考えられている。図5(a)の α 、 β 、 γ の方向には周期的構造がみられる。その周期は矢印で示したように長いものから短いものまで様々である。この周期に対応する波数が図5(b)のフーリエ変換像では色の濃い部分として表れている。すなわち、 α 、 β 、 γ の方向の様々な波数に対応する α 、 β 、 γ 方向の画素が濃く表れている。

一方、周期性を示している、それは他の方向の周期性の射影という場合がある。例えば図5(a)から分かるように、 δ 方向も周期性を示しているが、蒸着膜のパターンの方向とは直交しておらず、図5(b)では δ 方向は濃くなっていない。すなわち、 δ 方向の周期性は α 、 β 、 γ 方向の周期性の射影であることがフーリエ変換像では明らかとなるのである。図5(b)のようにHOPG 基板上的パラフィン蒸着膜は図4(b)で示したHOPGと同じ対称性を示し、エピタキシャル成長したことの有力な証拠となっている。一方、HOPGのような周期構造を持たないガラス基板上的パラフィン蒸着膜(図6(a))ではパターンの大きさにはさほど違いはない(倍率が違うことに注意)が、フーリエ変換した画像(図6(b))は特徴のないハローパターンになるだけで明らかな対称性は示さない。また、図5(b)、6(b)の円はパターンの幅(約 $0.6\mu\text{m}$)の波数に対応しており、その外で色が薄くなるのは、これ以上小さい構造は少ないことを示している。

もちろん、以上のような解析を顕微鏡写真自体から行うこともある程度は可能であろう。しかし、フーリエ変換による波数解析を行うことによってより定量的な取り扱いが可能になるのである。

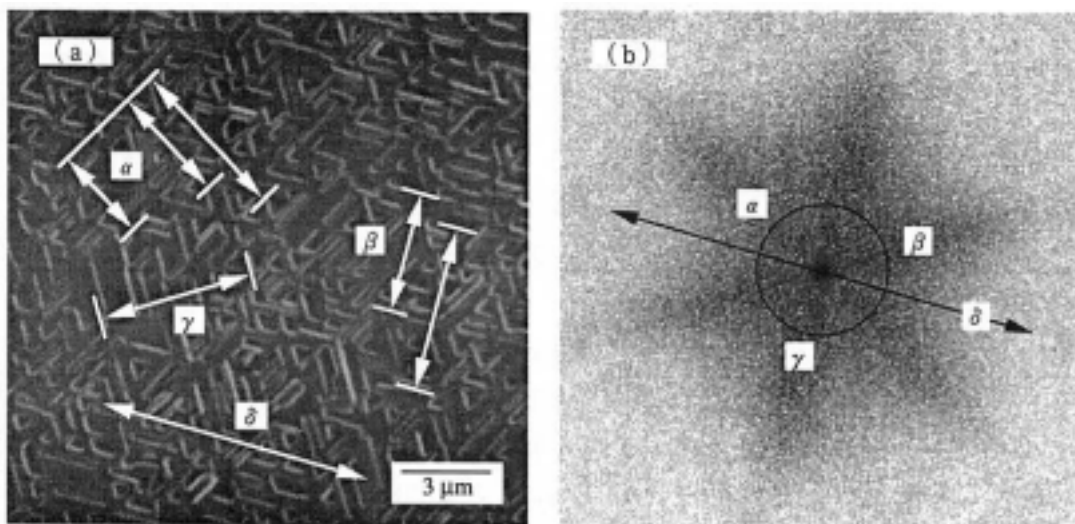


図5 HOPG基板上のパラフィン薄膜(a)とそのフーリエ変換像(b)

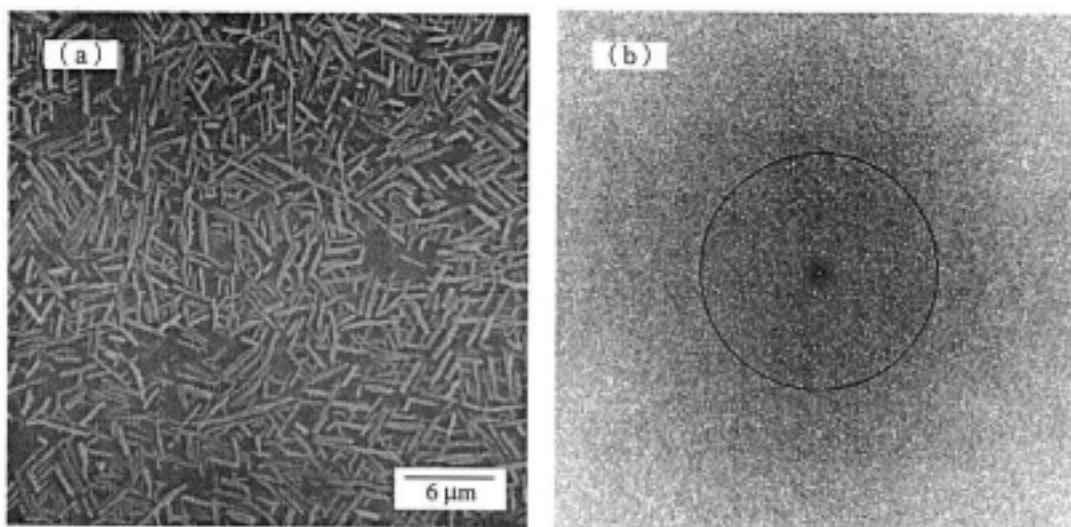


図6 ガラス基板上的パラフィン薄膜(a)とそのフーリエ変換像(b)

5. おわりに

以上、波数解析について簡単に解説した。一般に、画像処理はその限界をわきまえなければ誤った結論を導くことにもなりかねない。ソフトウェアを自作しない人でも処理の内容をある程度理解しておくことが大切である。

参 考 文 載

画像処理の一般的解説書は以下の文献以外にも多数出版されているので目的に応じて選ぶとよいだろう。

- 1) 牧島邦夫、篠原靖忠、小森尚志訳「計量形態学」内田老鶴圃刊
- 2) 木内雄二著「画像認識のはなし」日刊工業新聞社刊
- 3) 安居院猛、中嶋正之、木見尻秀子著「C 言語による画像処理」昭晃堂刊
- 4) 丹慶勝市、奥村晴彦、佐藤俊郎、小林 誠訳「NUMERICAL RECIPES in C [日本語版]」
技術評論社刊

1. 酸性土壌とアルミニウム

酸性降下物による植生衰退が契機となって、土壌酸性およびそれによる植物生育阻害についての研究が再び活発になっている。ここで「再び」というのは、土壌の酸性化機構や、酸性土壌における植物生育阻害要因について非常に精力的に研究された時代が過去にあったからである。多くの酸性土壌における酸性が主としてアルミニウムイオン(Al^{3+})の加水分解によるものであること、そしてアルミニウムイオンの大部分は陽イオン交換能を持つ層状ケイ酸塩鉱物に交換性陽イオンとして吸着された形で存在することが明かにされたのはその時代である。ちなみに、このことを世界で初めて発見したのは大工原銀太郎博士であり、大工原博士は九大農学部土壌学講座の最初の教授である。

土壌の酸性化は酸性降下物の生態系に対する多くの影響のひとつにすぎない。しかしその研究は、酸性降下物と植生衰退の因果関係を明かにするには重要である。以下では酸性土壌におけるアルミニウムイオンの化学に関する比較的最近の研究の一端についてごく簡単に紹介する。

2. アルミニウムイオンの形態と植物毒性

分子機構はともかく、アルミニウムイオンが植物に対して強い細胞毒性を示すことは実験的には明かであり、植物の酸性障害は土壌中のアルミニウムイオンと関連させて議論されることが多い。しかし一方、多くの研究によれば、土壌中に存在するアルミニウムイオンの多少あるいは土壌 pH の高低と酸性障害の程度は必ずしも 1:1 には対応しない。このような見かけ上の矛盾の原因のひとつは、酸性障害がアルミニウムイオンの毒性のみによるのではないということである。そしてもうひとつは、おそらく、アルミニウムイオンの毒性が形態によって異なるということである⁽¹⁾。

様々な形態のアルミニウムイオンを含む培地を用いた水耕栽培の結果によれば、 Al^{3+} (正確には $Al(OH_2)_6^{3+}$) に比較するとフッ化物錯体、硫酸錯体、有機酸錯体などの毒性は格段に低い。一方、重合塩基性アルミニウムイオン ($Al_{10}Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{12}^{7+}$ 、以後 Al_{13} ポリマーと略す) の毒性は Al^{3+} よりもはるかに高いことが明かにされている。

形態による毒性の差が何に由来するかは明かでない。ただ、コーヒー樹において、土壌水中の Al^{3+} の活量と葉中のアルミニウム濃度の間に高い相関があることが観察されていることから⁽²⁾、単核錯体間の毒性の差は植物による吸収され易さと関係している可能性が高いと考えることができる。

3. 土壌水中のアルミニウムイオンの形態分析

このような研究結果をうけて、酸性土壌（特に酸性降下物の負荷をうけた土壌）の研究においては土壌水中のアルミニウムの形態分析が盛んに行われるようになった⁽¹⁾。まず、減圧法や遠心分離法により土壌から分離された土壌水をメンブランフィルターで濾過する。酸性化した濾過液にICPや原子吸光法を適用すると全アルミニウム濃度が求められる。未処理の濾液を弱アルカリ性で8-ヒドロキシキノリン、フェロン、ピロカテコールバイオレットなどと短時間反応させることによって、アルミニウムイオンの単核錯体の合計濃度が推定される。そしてCaまたはNa型の陽イオン交換樹脂カラムを通過させた濾液に同じ方法を適用することにより単核の有機酸錯体が定量される。そして、これらを全アルミニウムから差し引くことによりAl₁₃ポリマーや水酸化物微粒子として存在するアルミニウムの濃度が求められる。概要は図1に示した。

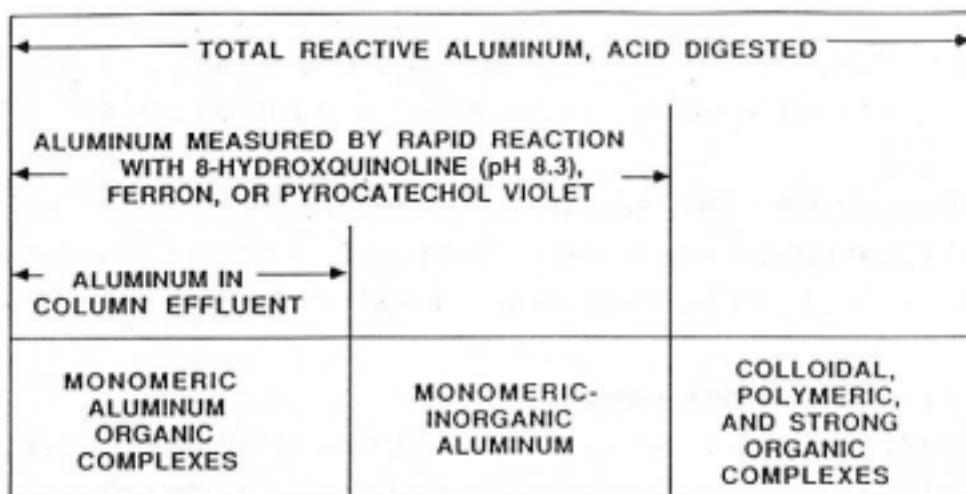


図1 土壌中水のアルミニウムの形態分析法(1)

この方法を土壌水や表流水に適用した結果によれば、溶存アルミニウムの主体は無機単核錯体であるが、土壌によっては有機単核錯体が半分あるいはそれ以上を占める場合もまれでない。

このような面倒な分画をしなくても、土壌水の化学分析結果から化学平衡計算によってイオン積の内訳が計算できるのではないと思われる方々もいるに違いない。しかし、実際にはそれは難しい。というのは、土壌水中の有機配位子の大部分は、低分子の有機酸等ではなく、分子量も構造も不明の、フミン酸と総称される一群の有機化合物であるからである。計算に必要な平衡定数の類は求められていないし、求めること自体が不可能に近い。

4. Al₁₃ポリマーの検出

しかし図1のような方法では、Al₁₃ポリマーの同定、定量は困難である。Al₁₃ポリマーはそれを

構成する 13 個のアルミニウムイオンのうち中心の 1 個が 4 配位であること、構造の対称性がよいことのために、 ^{27}Al NMR スペクトルにおいて 62.5ppm に非常に鋭いピークを与える (図 2 参照)。現在のところ最も信頼性の高い Al_{13} ポリマーの同定、定量法は ^{27}Al NMR を利用することである。ただ、筆者の知るかぎりでは分離された土壤水から Al_{13} ポリマーが検出された例はない。その理由のひとつはおそらく、 Al_{13} ポリマーは (存在したとしても) その大きな電荷のため土壤の陽イオン交換体に強く吸着され土壤水中に溶存しにくいということであろう。酸性の森林土壤をそのまま試料管に充填して測定した ^{27}Al NMR では、微弱ではあるが明かに 62.5ppm のピークがみられた例が (1 例だけ) ある⁽³⁾。これは吸着された Al_{13} ポリマーを検出したのかも知れない。

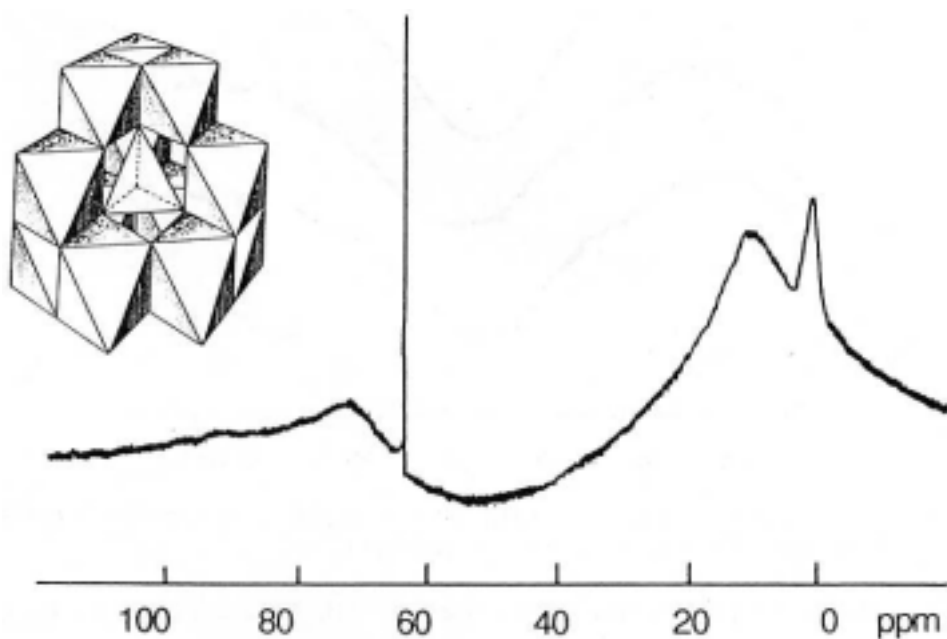


図 2 重合塩基性アルミニウムイオン水溶液の ^{27}Al NMR スペクトルとイオンの構造

5. Al_{13} ポリマーの存在可能性

そのつよい植物毒性ゆえに、 Al_{13} ポリマーは酸性障害の原因物質のひとつに挙げられることが多い。しかし今のところ、土壤中におけるその存在についての直接の証拠は十分ではない。

Al^{3+} が炭酸カルシウムと接触することにより Al_{13} ポリマーが生成することが室内実験で示された⁽⁴⁾。しかし筆者は、土壤中で Al_{13} ポリマーが生成し、安定に存在する可能性は低いのではないかと考えている。その理由のひとつは Al_{13} ポリマーとケイ酸との反応性である⁽⁵⁾。図 3 は 0-2mM のモノケイ酸溶液に、合成した Al_{13} ポリマーを全アルミニウム濃度が 3.5mM になるように添加した直後に測定した ^{27}Al NMR スペクトルである。ケイ酸が存在すると 62.5ppm のピークは微弱になり、0.5mM 以上では消失している。

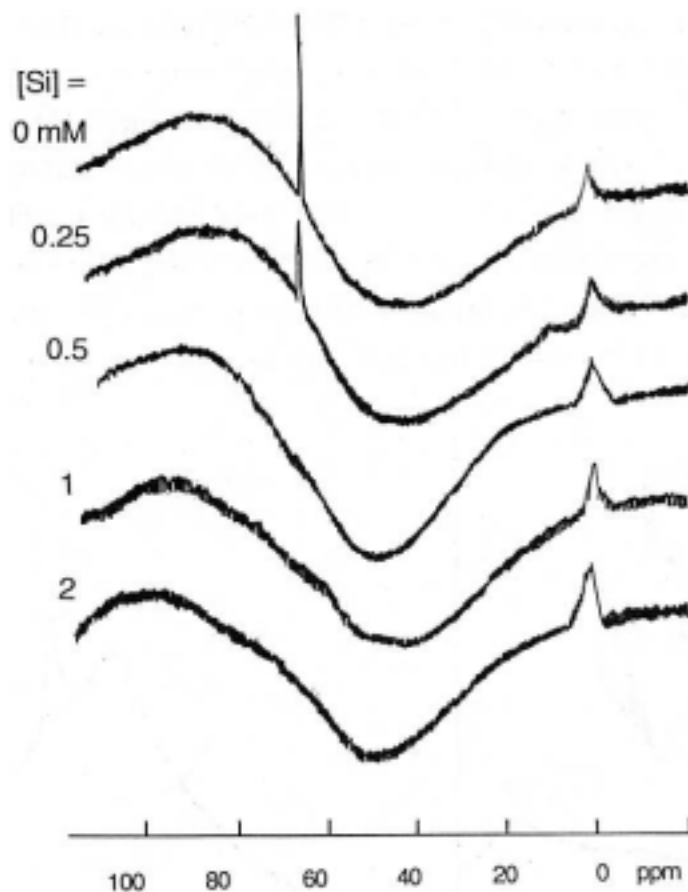


図3 重合塩基性アルミニウムイオン (Al_{13} ポリマー) 水溶液を水またはモノケイ酸溶液添加した後の ^{27}Al NMR スペクトル。全Al濃度は3.5mM。

土壌水には例外なくケイ酸が含まれ、しかもその濃度は一般にアルミニウム濃度よりもはるかに高い。そして、ケイ酸存在下で Al^{3+} が加水分解するときにも Al_{13} ポリマーは生成しないことも明らかにされている⁽⁶⁾。つまり、土壌中では Al_{13} ポリマーは生成しにくく、生成したのも安定には存在できないように思われるのである。

- (1) Bloom, P. R. and Erich, M. S. in *The Environmental Chemistry of Aluminum*, G. Sposito (ed.), P. 1, CRC Press (1989)
- (2) Pavan, M. A., Bingham, F. T. and Pratt, P. F. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 1201 (1982)
- (3) Hunter, D. and Ross, D. S. *Science* 251, 1056 (1991)
- (4) Furrer, G., Trusch, B. and Muller, C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56, 3831 (1992)
- (5) 和田信一郎・横山拓史・角藤やす子 第37回粘土科学討論会講演要旨集、25 (1993)
- (6) Wada, S. -I. and Wada, K. J. *Soil Sci.* 31, 457 (1980)

★★★★ お 知 ら せ ★★★★★

(1) 新設装置の紹介

「熱分析システム」

工学分室（箱崎地区）の所管装置である熱天秤（島津製 TG-30 型）及び示差熱分析装置（同社製 DTA-30 型）の老朽化に伴い、下記の装置に更新しましたのでお知らせします。

○ セイコー電子工業製 熱分析システム

〔構成〕

- ・ 超高感度示差走査熱量計 (DSC120)
- ・ 高感度示差走査熱量計 (DSC220)
- ・ 高温型示差熱重量同時測定装置 (TG/DTA320)
- ・ 全自動ガス冷却ユニット
- ・ ディスクステーション

〔仕様〕

型式名	DSC120	DSC220
温度範囲	-150~500℃	-150~725℃
測定範囲（感度）	±40mW (0.4 μW)	±100mW (1.6 μW)
プログラム速度	0.01~20℃/min	0.01~100℃/min
最大試料量	100 μl (オープン型試料容器)	
	70 μl (密封型試料容器)	15 μl (密封型試料容器)

型式名	TG/DTA320
温度範囲	室温~1500℃
天秤方式	水平差動型
TG 測定範囲（感度）	±200mg (0.2 μg)
DTG 測定範囲	0.5mg/min~1g/min
DTA 測定範囲（感度）	±2500 μV (0.06 μV)
最大試料量	200mg
ページガス流量	0~1000ml/min
冷却時間	1000~50℃まで 15 分以内

※利用開始にあたって簡単な講習会を4月に予定しております。参加希望者は、内線 5973 まで近日中にご連絡下さい。追って日程等をお知らせします。

(2) 登録装置についての変更

① 登録取消装置

1. 表面積測定装置

型 式：柴田化学機器製 P-700 型

管理講座：工学部応用物質化学科機能物質工学講座

2. 光透過式粒度分布測定器

型 式：セイシン企業製 SKN500 型

管理講座：工学部応用物質化学科機能物質工学講座

② 新規登録装置

・円二色分散計

型 式：JASCO J-720

管 理 講 座：工学部応用物質化学科機能有機化学講座

装置管理者：浜 地 格

装置責任者：浜 地 格

利 用 料 金：500 円／時間

装置の性能：1. 測定波長範囲：170～800nm
2. ノイズレベル：0.03mdeg
3. 可変走査速度 1～5000nm/min
4. 広い吸光度測定範囲：0～5Abs
5. ウィンドウズ対応のソフト
6. 直線偏光の測定も可能

登録開始時期：平成 6 年 4 月 1 日

※利用等についての詳細は直接管理講座（内線 5636）にお問い合わせ下さい。