

画像処理による花粉計測

高山 晴光

1. はじめに

1995年以来花粉の観測（中村ほか：1997、高山ほか：1998）を行ってきたが、花粉量の多いときはその数量計測にはかなりの時間と労力が必要とされる。さらに、花粉粒径を測定するにはより多くの手間がかかる。また、同一サンプルであっても測定者により計測数に差が生じる。これは同一時期にスギ、ヒノキ以外に松等別の花粉も存在し目視判断による個人誤差も一因である。

そこで労力の軽減と数量的基準による計測としてパソコンを使用した画像処理による計測法（古野：1998、木下ほか：1999）の開発を行った。この方法においては、花粉数と同時に花粉粒径の測定が可能である。特に粒径測定には、有効な方法である。

2. 計測方法および計測例

測定に使用した資料はダーラム型花粉採集器を用い採集された花粉を、サフラニン溶液で染色しカバーガラスで覆ったものを用いた。顕微鏡に接続したデジタルカメラの画像をパソコンに取り込み解析を行った。図1が、計測システムのフローチャートである。

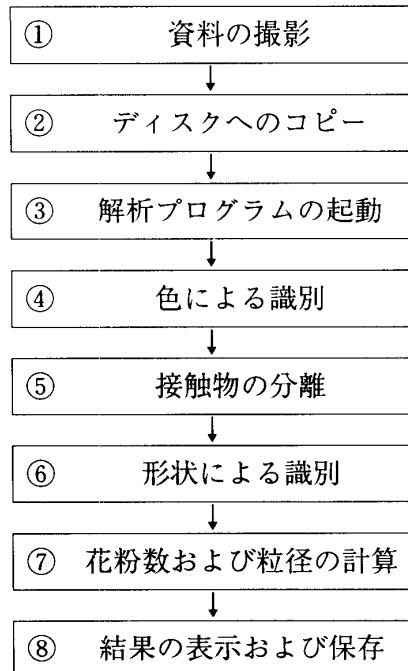


図1 計測システムのフローチャート

① 資料の撮影

顕微鏡（オリンパス CHT）に41万画素 CCDカメラ（ビクター TK-1283カラービデオカメラ、有効画素数：水平768×垂直494=379392）を接続し資料の撮影を行った。資料はメカニカルステージ上にセットし、マイクロメーター付きハンドルにより76（横）×50（縦）mmの範囲を自由に移動させることができる。照明は顕微鏡に組み込まれている30Wタングステンランプを使用した。CCDカメラの映像信号（インターレス信号）はNTSC方式であるためアップスキャンコンバータ（アップコン）でVGA方式に変換した。ディスプレーで

画像を見ながら画像の取り込み (SONY デジタルピクチャーディスク DPA-1 を使用) を行った。

② ハードディスクなどへのコピー

取り込まれた画像は RS-232C 接続ケーブルを経由してパソコン (CPU : P55C-200MHz-MMX 搭載) のハードディスクや CD-ROM にコピーする。1 画像の容量は 901kB であり、パソコンへの通信速度は 38400bps である。

③ 解析プログラムの起動

画像解析および計測に使用したプログラムは Visual Basic (谷尻豊寿ほか (1998)、笠原一浩ほか (1999)) で作成した。以下プログラムの実行順に従って解説する。

まず、プログラムを実行し、ハードディスクなどに保存してある画像を読み込む。図 2 は、パソコンに取り込まれた顕微鏡写真画像である。実際にはカラー画像であり、花粉は赤く染色されており、他の部分と明瞭に見分けがつく。一部には染色液の残っている部分が見られる。



図 2 読み込んだ画像例

④ 色による識別

パソコン画面上での色は R (赤)、G (緑)、B (青) の組み合わせで決まり、それぞれの値は 0 から 255 の範囲で指定できる。この組み合わせにより ($256 \times 256 \times 256 = 1,677$ 万色) 色が表現される。

色による識別には各画素 (1 ピクセル × 1 ピクセル) の色を取得し、それを RGB 値に分解したものを使う。

のである。図5は図4の画像に上述の処理を施したものである。この例の場合は花粉以外はほとんど消去されている。

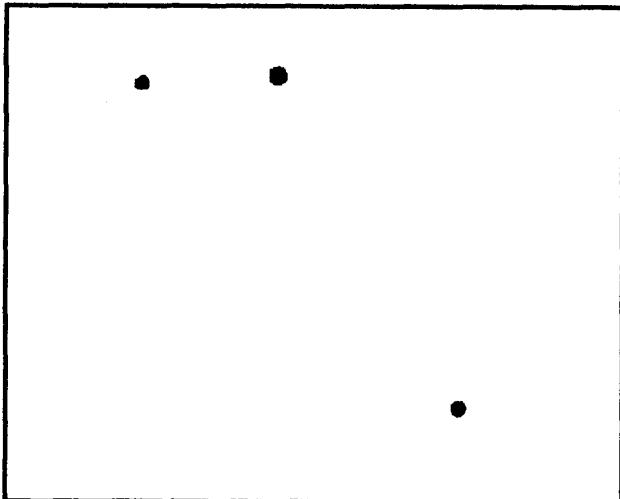
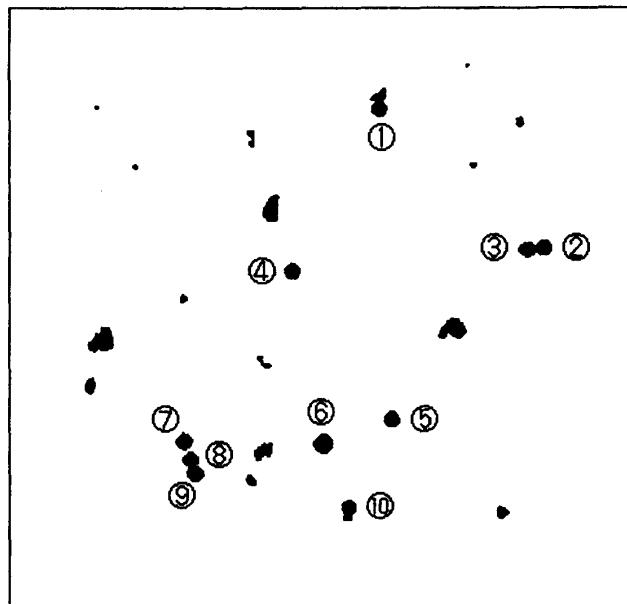


図5 色による識別処理後の画像

$19.2 \mu\text{m}^2$ (⑦参照) である。

図6 色による識別処理後の画像
(花粉以外のものが混在する例)

⑤ 接触物の分離

図6は④の色による識別処理後も花粉以外のものが多く混在した場合の例である。このような場合には、形状による識別が必要となる。また、花粉同士あるいは他のものと接触している場合は分離する必要がある。今回測定の対象にした花粉はスギ、ヒノキ、マツなど円形断面の花粉（1978：上原 勉）であり、形状において水平方向の長さが、急激に増加したり、一度減少した幅が増加した場合は花粉に他のものが接触しているとし、その部分で切り離すこととした。これは花粉に限らずそのような形状変化のある場合に実行される（後述のプログラム参照）。

⑥ 形状による識別

今回対象とした花粉の直径は約 $25\sim60 \mu\text{m}$ とし、花粉画像の形状を検討した結果、花粉形状判別に以下の条件を使用した（後述のプログラム参照）。ここで、1ピクセルは $4.83 \mu\text{m}$ 、1画素の面積は

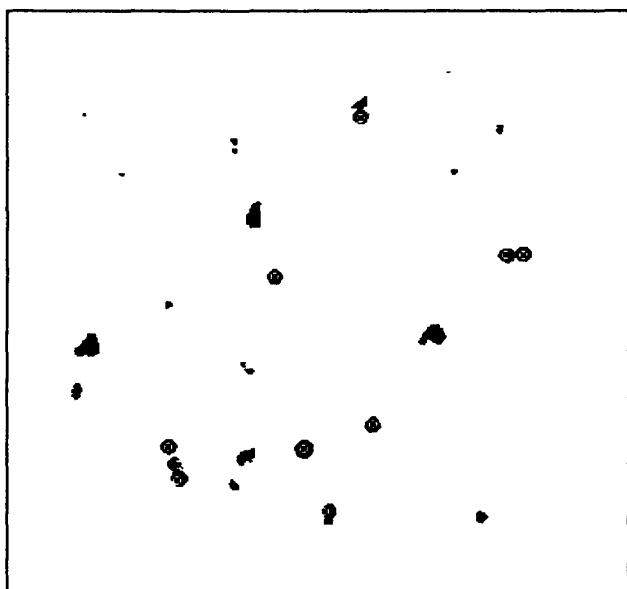


図7 形状による識別処理後の画像

- A. 1行目のピクセル数が5以下。
- B. 最終行のピクセル数が5以下。
- C. 2行目の1行目からのピクセルの増加量は、1~3ピクセル。
- D. 最終行の1行上からピクセルの減少量は、1~3ピクセル。

画像処理による花粉計測

- E. 2行目のピクセル数が5以上。
- F. 最終行の1行上のピクセル数が5以上。
- G. 縦横2方向における半径のピクセルの差は2ピクセル以下。
- H. 横方向の最大の長さが12ピクセル以下、5ピクセル以上(約25~60 μm)。
- I. 縦方向の最大の長さが12ピクセル以下、5ピクセル以上。
- J. 大きさは画像数で40~110。

以上の条件を満たしたものは花粉と判断される。花粉と確認されたものには○印を入れ誤認がないかを確認できるようにした。図7に、図6の識別処理後の画像を示す。

⑦ 花粉直径の計算

顕微鏡付属のマイクロメータとパソコン画像上のピクセル数の比較から、画像の倍率は60.33倍で、
1ピクセル : $4.38 \mu\text{m}$
1画素面積 : $19.2 \mu\text{m}^2$
であった。

また、花粉直径dは面積をSとすると、次式から求めた。

$$d = 2\sqrt{S/\pi}$$

図8に画像の解析結果を示す。番号は図6で各花粉に付けられた数字に対応する。

花粉直径 (μm)

(1) 37.6 (2) 38.3 (3) 38.3 (4) 38.6 (5) 38.9
(6) 39.2 (7) 47.2 (8) 36.7 (9) 40.8 (10) 38.6

図8 解析結果

以下に花粉解析プログラムを示す。()内に作業内容等を示した。

花粉計測プログラム

(FloodFill 関数の定義)

```
Public Declare Function FloodFill Lib "gdi32" (ByVal hdc As Long, ByVal pp _  
As Long, ByVal qq As Long, ByVal crColor As Long) As Long
```

(変数の定義)

```
Public e As Long  
Public h As Integer  
Public i As Long  
Public j As Long  
Public l As Long  
Public m As Long  
Public s As Integer  
Public fa As Integer  
Public sg As Integer  
Public sb As Integer  
Public aa As Integer  
Public bb As Integer  
Public ed As Integer  
Public gg As Integer
```

```
Public nn As Integer  
Public d(1000) As Single  
Public W(100000) As Integer  
Public y(100000) As Integer
```

(画像の読み込み：ファイルのボタンを押す)

```
Private Sub Command1_Click()  
    CommonDialog1.ShowOpen  
    Picture1.Picture = LoadPicture(CommonDialog1.FileName)  
    step0  
End Sub
```

(花粉のクリックを指示する表示および終了の表示)

```
Private Sub step0()  
    If ed <> 1 Then  
        MsgBox "花粉をクリックしてください"  
    Else  
        MsgBox "OKをクリックすると終了します"  
    End If  
End Sub
```

(分析および計測の開始：開始のボタンを押す)

```
Private Sub Command2_Click()  
    step2  
End Sub
```

(分析および計測の終了：終了ボタンを押す)

```
Private Sub Command3_Click()  
    End  
End Sub
```

(クリックした部分の色を分析し染色領域は黒色に、染色域以外は白色にする)

```
Private Sub picture1_mousedown(button As Integer, shift As Integer,  
    p As Single, q As Single) Dim cc As Long  
    Dim dum As Long  
    Dim na As Integer  
    nn = nn + 1  
    na = nn Mod 2  
    If na = 1 Then  
        cc = Picture1.Point(p, q)  
        aa = (cc And &HFF) (R 値の取得)  
        gg = (cc And 65280) ￥ 256& (G 値の取得)  
        bb = (cc And &HFF0000) ￥ 65536 (B 値の取得)  
        MsgBox "花粉以外の部分をクリックしてください"  
    End If  
    If na = 0 Then  
        step1  
        Picture1.FillStyle = 0 (塗りつぶしを選択)
```

画像処理による花粉計測

```
Picture1.FillColor = QBColor(15)      (白色を設定)
pp = p
qq = q
dum = FloodFill(Picture1.hdc, pp / 15, qq / 15, QBColor(0)) (塗りつぶし)
Picture1.FillStyle = 1
End If
End Sub
```

(染色されている領域を黒色にする)

```
Private Sub step1()
For j = 0 To Picture1.Height Step 15
    For i = 0 To Picture1.Width Step 15
        c = Picture1.Point(i, j)
        g = (c And 65280) ￥ 256&
        b = (c And &HFF0000) ￥ 65536
        A = (c And &HFF)
        If A > aa * 0.9 And A < aa * 1.1 And g > gg * 0.8 And g < gg * 1.3 _
            And b > bb * 0.8 And b < bb * 1.3 Then
            Picture1.PSet (i, j), QBColor(0)
        End If
    Next i
Next j
j = 0
i = 0
End Sub
```

(花粉の形状による識別を行い、適合した場合は花粉数量に加え、粒径を計算し、その花粉画像上に○印を入れる)

```
Private Sub step2()
Dim c As Single
Dim wm As Integer
Dim ym As Integer
Dim dum As Long
Picture1.Width = 11790
Picture1.Height = 8295

                (形状識別)
If h = 1 And W(1) > 5 Then          (条件A)
    fa = 1
End If
If W(h) > 5 Then                   (条件B)
    fa = 1
End If
If h = 2 Then                      (条件C)
    If W(2) + y(2) - W(1) - y(1) > 5 Or W(2) + y(2) - W(1) - y(1) < 1 Then
        fa = 1
    End If
End If
If h > 2 Then                      (条件D)
```

環境情報研究 第 8 号

```
If W(h - 1) + y(h - 1) - W(h) - y(h) > 5 or W(h - 1) + y(h - 1) - W(h) - y(h)
    < 1 Then
        fa = 1
    End If
End If
If h = 2 And W(2) + y(2) < 4 Then                                (条件 E)
    fa = 1
End If
If h > 2 Then
    If W(h - 1) + y(h - 1) < 4 Then                                (条件 F)
        fa = 1
    End If
End If
If W(CInt(h / 2)) + y(CInt(h / 2)) - h < -2 Or W(CInt(h / 2)) -
    + y(CInt(h / 2)) - h > 2 Then                                (条件 G)
    fa = 1
End If
If W(CInt(h / 2)) + y(CInt(h / 2)) < 5 Or W(CInt(h / 2)) + y(CInt(h / 2)) -
    > 12 Then                                              (条件 H)
    fa = 1
End If
If h < 5 Or h > 12 Then                                              (条件 I)
    fa = 1
End If
If fa <> 1 And sb > 40 And sb < 110 Then                                (条件 J)
    sg = sg + 1
    s = s + 1
    d(s) = Sqr(sb * 19.193 / 3.1416) * 2
    Picture1.Circle ((l + i) / 2 - 15, (m + j) / 2), 30, QBColor(15)
End If
```

(全ての画素を1行ずつ左から右に検索し、染色画素があれば step3 へ。

以下の説明においてこの画素をAとする)

```
h = 0 : fa = 0 : sb = 0
For j = m To Picture1.Height - 1 Step 15
    For i = 0 To Picture1.Width - 1 Step 15
        c = Picture1.Point(i, j)
        If c < 12000000 And c >= 0 And c <> QBColor(12) And _
            c <> QBColor(10) Then
            l = i
            m = j
            Picture1.PSet (l, m), QBColor(12)      'この座標の画素をOとする
            step3
        End If
    Next i
Next j
MsgBox "花粉数：" & sg
ed = 1
```

画像処理による花粉計測

step9

End Sub

(画素Aより右に検索し、染色された領域を黒色にする。染色域を出たら step4 へ)

Private Sub step3()

Dim v As Integer

Dim ea(15000) As Single

e = 0 : f = 0

sb = sb + 1

v = v + 1

h = h + 1

i = i + 15 (右へ1ピクセル移動)

c = Picture1.Point(i, j)

If c = QBColor(15) Then (花粉管など突起の除去)

i = i - 15

Picture1.PSet (i, j), QBColor(15)

step2

End If

If c < 12000000 And c >= 0 And c <> QBColor(12) And __

c <> QBColor(10) Then

Do While c < 12000000 And c >= 0 And c <> QBColor(12) And __

c <> QBColor(10) (黒の間は右へ移動)

Picture1.PSet (i, j), QBColor(12)

sb = sb + 1

v = v + 1

W(h) = v

e = e + 15

i = i + 15

c = Picture1.Point(i, j)

Loop

(接触物の切り離し：花粉画像のピクセル数が前行より右方向へ3以上増加した場合は切り離し step7 へ
それ以外は step2 へ)

If h > 2 And W(h) Then

step7

End If

If h > 7 And W(h) - W(h - 1) > 0 And W(h) - W(h - 1) <= 2 Then

For n = 1 To W(h) - W(h - 1)

Picture1.PSet (i + 15, j), QBColor(0)

i = i + 15

Next n

sb = sb - W(h)

W(h) = 0

y(h) = 0

h = h - 1

step2

End If

Else

W(h)

End If

```
step4
End Sub
```

(画素Aより左に検索し、画素が白色になつたら step5 へ)

```
Private Sub step4()
    Dim u As Integer
    i = i - e - 30                                (左へ 1 ピクセル移動)
    c = Picture1.Point(i, j)
    If c < 12000000 And c >= 0 And c <> QBColor(12) And __
        c <> QBColor(10) Then
        Do While c < 12000000 And c >= 0 And c <> QBColor(12) And __
            c <> QBColor(10)           (黒の間は左へ移動)
            Picture1.PSet (i, j), QBColor(12)
            sb = sb + 1
            u = u + 1
            y(h) = u
            e = e - 15
            i = i - 15
            c = Picture1.Point(i, j)
        Loop
```

(接触物の切り離し：花粉画像のピクセル数が前行より左方向へ 3 以上増加した場合は切り離し step8 へ
それ以外は step2 へ)

```
If h > 2 And y(h) - y(h - 1) >= 3 Then
    step8
End If
If h > 7 And y(h) - y(h - 1) > 0 And y(h) - y(h - 1) <= 2 Then
    For n = 1 To y(h)
        Picture1.PSet (i + 15, j), QBColor(0)
        i = i + 15
    Next n
    sb = sb - y(h)
    y(h) = 0
    h = h - 1
    step2
End If
Else
    y(h) = 0
End If
step5
End Sub
```

(画素Aの 1 行下に移動し、画素が白色でなければ step3 へ、白色ならば step6 へ)

```
Private Sub step5()
    i = 1
    j = j + 15
    c = Picture1.Point(i, j)
    If fa = 0 And c < 12000000 And c >= 0 And c <> 255 And __
        c <> QBColor(10) Then           (黒ならば step3 へ)
```

画像処理による花粉計測

```
Picture1.PSet (i, j), QBColor(12)
step3
End If
step6
End Sub
```

(画素Aの1行下から右へその上の画素が白色になるまで移動検索し、白色以外の画素が検出されれば
step3へ、されなければ step2へ)

```
Private Sub step6()
    i = i + 15
    c = Picture1.Point(i, j)
    Do Until c < 12000000 And c >= 0 And c <> QBColor(12) And __
        c <> QBColor(10)
        i = i + 15
        j = j - 15
        c = Picture1.Point(i, j)
        If c <> QBColor(12) Then
            step2
        End If
        j = j + 15
        c = Picture1.Point(i, j)
    Loop
    Picture1.PSet (i, j), QBColor(12)
    step3
End Sub
```

(黒色にした画素を白色に戻す)

```
Private Sub step7()
    Dim n As Integer
    For n = 1 To W(h) - W(h - 1)
        Picture1.PSet (I-15, j), QBColor(0)
        i = i - 15
    Next n
    sb = sb - (W(h) - W(h - 1))
    e = e - (W(h) - W(h - 1) + 1) * 15
    W(h) = W(h - 1)
    step4
End Sub
```

(黒色にした画素を白色に戻す)

```
Private Sub step8()
    Dim n As Integer
    For n = 1 To y(h) - y(h - 1)
        Picture1.PSet (i + 15, j), QBColor(0)
        i = i + 15
    Next n
    sb = sb - (y(h) - y(h - 1))
    e = e + (y(h) - y(h - 1) + 1) * 15
    y(h) = y(h - 1)
    step5
End Sub
```

End Sub

(各花粉の直径をディスプレーに表示する)

Private Sub step9()

```
Dim r As Integer
Dim s As Integer
Dim n As Integer
Dim t As Integer
Picture1 = Picture2
Picture1.FontSize = 14
Picture1.DrawWidth = 1
Picture1.CurrentX = 1500
Picture1.CurrentY = 700
Picture1.FontBold = True
Picture1.Print " 花粉直径 (μm) "
For k = 1 To CInt((sg + 2) / 5)
    If k <> CInt((sg + 2) / 5) Then
        t = 5
    End If
    If k = CInt((sg + 2) / 5) Then
        t = sg - 5 * (k - 1)
    End If
    For r = 1 To t
        n = n + 1
        If n < 10 Then
            Picture1.CurrentX = 1300 * r
            Picture1.CurrentY = 500 * (2 + k)
            Picture1.Print "(" & n & ")" & Format(d(n), "0.0")
        End If
        If n >= 10 Then
            Picture1.CurrentX = 1300 * r
            Picture1.CurrentY = 500 * (2 + k)
            Picture1.Print "(" & n & ")" & Format(d(n), "0.0")
        End If
    Next r
Next k
step10
End Sub
```

(結果を保存する)

Private Sub step10()

```
On Error GoTo err_handle
CommonDialog2.ShowSave
SavePicture Picture1.Image, CommonDialog2.FileName
err_handle:
step0
End Sub
```

3. まとめ

本測定に使用したカメラは約40万画素であり、1画素の大きさは ($4.38 \times 4.38 \mu\text{m}$) である。また、1画像の大きさは ($3.36 \times 2.16\text{mm}$) であり、 1cm^2 の範囲を測定するためには16枚の画像が必要となる。画像保存においては、1画像当たり 901kB の容量が必要であった。650MB の CD であればの721画像が保存できる。1画像の処理時間は約1分であった。

広い視野で効率よく、正確に測定するためには低倍率での形状識別を可能にするか、顕微鏡電動ステージによるスキャンが必要であろう。また、現時点では割れている花粉や形状が大きく変形している花粉は計測されない。また、色による識別では、サンプルの染色液の違いや撮影時の照明の違いにより識別条件を設定し直さなければならぬ。汎用的な識別方法の検討が望まれる。

こうした多くの問題点があるが、この方法は、目視判断による個人誤差をなくし客観的結果を得ることができる。特に、花粉量が多い場合や花粉粒径の測定が必要な場合（菅原文子ほか：1999）には有効な方法と考えられる。

参考文献

- 中村圭三・高山晴光・勇 勝美(1997)：首都圏におけるスギ・ヒノキ科花粉の飛散と気象との関係について。環境情報研究、5、43-55。
- 高山晴光・中村圭三・勇勝美(1998)：首都圏におけるスギ・ヒノキ科花粉の飛散と気象との関係について。環境情報研究、6、53-62。
- 古野 肇：画像処理によるスギ材の年輪内密度の測定。木材工業、53、10、455-459。
- 木下 統・永田雅輝(1999)：画像処理によるイチゴ形状の判別。農業機械学会誌、61、5、41-48。
- 谷尻豊寿・谷尻かおり(1998)：Visual Basic5。
- 笠原一浩・山本美孝(1999)：Visual Basic6 入門。
- 上原 勉(1978)：花粉の観測実験。
- 菅原文子・宮沢 博・岡部かおり(1999)：住居内侵入スギ花粉エアロゾルに関する研究、日本建築学会計画系論文集、515、75-81。

ABSTRACT

Measurement of Pollen by Image Processing

Harumitsu TAKAYAMA

Airborne pollen surveys of *Cryptomeria japonica* and *Cupressaceae* have been performed since 1995, during the pollen season, was Pollen was collected using a Durham standard sampler and the pollen count was measured with a microscope. The measurement process was time and labor intensive when the pollen count was large, and since the count was made by eye alone errors occurred.

Therefore, in order to reduce labor and to remove errors, a method was developed to measure pollen using image processing. In this paper an experimental process for the determination and the programming of image processing is described. This method can not only measure the pollen count but the pollen grain diameter at the same time. The time required to process one micro photo image ($3.36 \times 2.16\text{mm}$) by personal computer was 1 minute and the accuracy was about $4.38 \mu\text{m}$ in this experiment. This method is effective and convenient for investigating the globular pollen. And is considered especially useful in measuring pollen grain diameter.