適正な画像処理方法
～雑誌の投稿規定の解説～

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

生物画像に対する画像処理は比較的歴史の浅い学問である。特に生物学者を対象とした画像処理の教科書は非常に少なく、体系的な知識や技術を学ぶ機会がほとんどない。そこで本冊子では、生物画像に対する画像処理を対象として、雑誌の投稿規定をもとに適正な画像処理について解説する。

なお、雑誌の投稿規定は時代とともに変わっていくので、随時確認していくことが必要である。

また、雑誌に掲載された後は、掲載された論文に直接紐付く画像やデータのみならず、原画像やその他の生データも、少なくとも研究機関が定めた期間は確実に保管しておかなければならない。

©日本医療研究開発機構

1. 学術雑誌において明文化されている画像処理規範

生物画像に対する画像処理は、研究目的に応じて施すべき画像処理手法が全く異なることが多い。様々な種類の生物画像に対し多くの画像処理手法が存在するため、「こういう画像処理手法が画像不正に該当する」という処理を定義することが極めて困難である。しかし、最低限の基準については、投稿論文を掲載する学術雑誌の投稿規定として明文化されている。全ての学術雑誌が同様の投稿規定を掲げている訳ではないが、主要な学術雑誌については画像処理に対する規定の足並みを揃えていると言っても構わない状況だと考えられる。

2004 年に細胞生物学分野の論文を多く掲載している The Journal of Cell Biology (JCB) が、他の雑誌に先んじる形でいち早く画像処理規範を定めた[1]。2004 年に定められた画像処理規範ではあるが、現在の JCB あるいは Nature publishing group 等の投稿規定と比較してもほとんど変更点がない。逆に言うと、画像処理は目的が多種多様なため、厳守すべき最低限の規範のみを定めていると考えることもできる。

本冊子では、整備のされ方・アクセスの容易さ・雑誌の影響力を考慮し、Nature publishing group の画像処理規範を中心に解説する。上記の通り、Nature 以外の学術雑誌にも共通している規範が大半なため、Nature 誌以外の学術雑誌へ投稿する際にも厳守すべき内容である。

1.1　Nature publishing group の投稿規定

Nature の投稿規定は web 上で公開されており、下記 URL から自由に閲覧することが出来る。
http://www.nature.com/authors/policies/image.html

生物画像全体についての規定および電気泳動ゲル画像と顕微鏡画像について言及されている。各項目の概要は以下の通りである。

・生物画像全般について
- 原画像を保存すること。論文審査の際に要求されたら提出すること
- カラー画像については 300 dpi 以上の高解像度データを提出すること
- 画像処理は最小限に留め、提出する画像は原画像を反映していること
- 使用したソフトウェアおよび主要な画像処理手法を明記すること
- 不用意な画像合成を避けること。合成する場合は白線あるいは黒線を挿入し明記すること
- タッチアップ機能は使用しないこと
- 画像処理は画像全体に施すこと
- 比較する画像にも等価な画像処理を施すこと

・ゲル画像について
- 視認性を高める場合はゲル画像の合成を推奨するが、その旨明記すること。なお、ゲルの原画像を要求された場合は提出すること
- 異なるゲル由来のバンドを直接比較しないこと。する場合はその旨記載すること。なお、分子マーカーやコントロールを同じゲルで泳動すること。
- 切りとったバンド周囲に充分な幅があること
- 過剰なコントラスト強調は避けること。コントラストを過剰に強調した場合は原画像をサプリメントとして提出すること
- 定量評価を行なう際には非線形の濃度変換処理を避けること

・顕微鏡画像について
- 原画像を要求された場合には提出すること
- 画像処理は画像全体に施すこと
- 過剰なコントラスト強調は避けること
- 疑似カラー表示および非線形の輝度変換処理を施した場合は明記すること
- カラー画像において特定の色のみ画像処理する場合は明記すること
- 顕微鏡やレンズ、ソフトウェア情報を明記すること
- 疑似カラーを用いたヒートマップ表示の際は各色に対応する情報を明記すること
- 画像処理手法を明記すること
- 画像解像度を変更する場合はその手法と併せて明記すること

1.2　Nature publishing group 以外の投稿規定

Nature 以外にも先進的な取り組みを行なっている学術雑誌があり、その代表例が JCB と EMBO press である。

▶ JCB: JCB Data Viewer

画像の扱いに対して先進的な取り組みを続ける JCB であるが、出版する論文に対して、原画像および画像処理手法をデータベース（JCB Data Viewer）へ登録

©日本医療研究開発機構

することを推奨している[2]。読者はJCBに掲載されている論文を参照しながら、自らの手で原画像に画像処理を施し、掲載されている画像へ編集することが可能である。

▶EMBO press: Data Integrity Analyst

EMBO pressには専属のData Integrity Analystが在籍しており、投稿された全ての図・画像に対して目視での確認を行なっている。チェックされた画像のうち、約20%の画像に対して何かしらの不備が確認され、約1%の画像が深刻な画像不正に該当すると発表されている[3]。

上記のように、画像処理に対する規範は学術雑誌ごとに定められているのが現状であるが、その内容は共通点が多く、最低限のポイントを抑えれば画像不正の疑いを避けることが出来る。次のセクションでは、適正な画像処理手法について解説する。

2. 適正な画像処理方法

例え悪意が無かったとしても、画像不正を疑われてしまうと研究者個人としてのキャリアに影響を及ぼす。原画像や画像処理手法が記録されていれば、作成したFigureが原画像を正しく反映していることを主張できる。一方で、万が一それらが保存されていなければ、議論に長い時間をついやすことになるかもしれない。

そのため、画像処理を施す際には必ず原画像を別に保存し、施した画像処理手法を記録しておくことが重要になる。

また、出版された学術論文に対して画像不正を疑う声があがった場合、それはコントラスト調整あるいは画像の組み方に問題がある場合がほとんどである。

本セクションでは、「原画像の保管・画像処理手法の記録」および「beautificationを避けたコントラスト調整」・「ゲル画像の合成例」を解説する。

2.1　原画像の保管・画像処理手法の記録

画像不正を疑われた場合のみではなく、論文を審査する過程でも原画像の提出を求められる場合がある。しかし、多くの画像処理ソフトウェアの機能は不可逆的に作用する。つまり、変更済みの画像を上書き保存してしまった場合に原画像が失われることがある。このような事態を避けるために、原画像を別に保存しながら画像処理を施すことが必要である。

また、施した全ての画像処理手法はそのパラメータ設定と併せて記録することが重要である。学術雑誌の投稿規定によれば少なくとも「画像処理に使用したソフトウェア名」・「ソフトウェアのバージョン」・「主要な画像処理手法とパラメータ設定」を明記することが求められている。

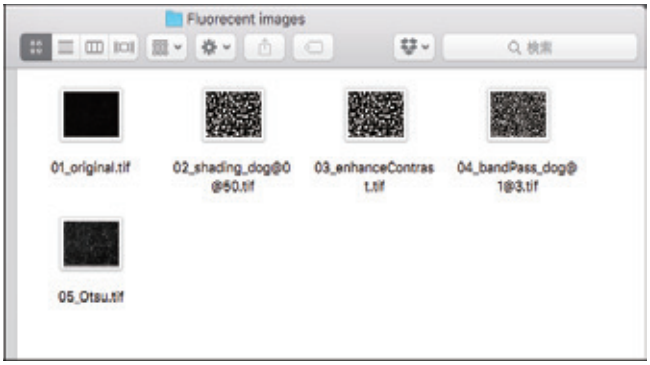


図1-1　原画像を保存しながら画像処理を施すことが重要である。
なお、上記画像群ではファイル名として施した画像処理手法とパラメータ設定が記録されている

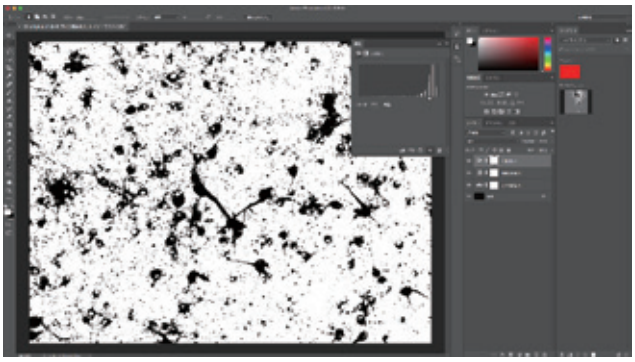


図1-2　Photoshopであれば、原画像をレイヤーとして保持することで非破壊的な画像処理を施すことができる

©日本医療研究開発機構

2.2　beautification を避けたコントラスト強調

画像の視認性を向上させるために生物画像のコントラストを強調することはむしろ推奨されている。しかし、過剰にコントラスト強調を施した場合には beautification（黒つぶれ・白飛び）を引きおこしてしまう。過剰にコントラストを強調した結果、真っ黒になってしまう領域を黒つぶれ、真っ白になってしまう領域を白飛びと言い、両者を併せて beautification と表現される。この領域がある場合、純粋にコントラスト強調の結果かあるいは不都合なデータを隠した結果か区別することが出来ず、画像不正を疑われてしまう。

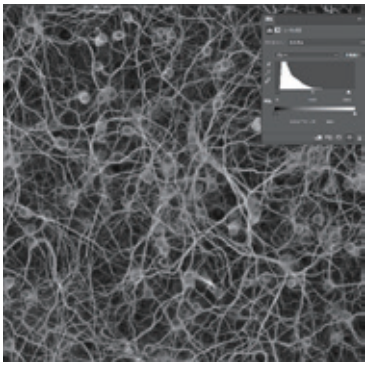


図 2-1 コントラスト調整を施す場合、輝度ヒストグラムの両端に合わせるよう調整すると beautification を避けることができる

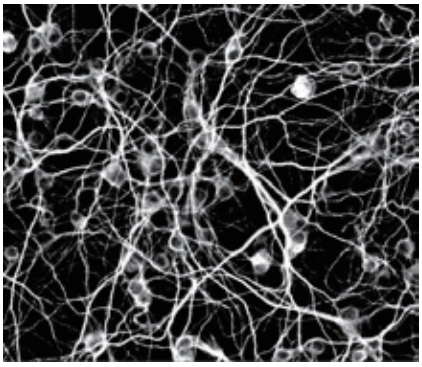


図 2-2 過剰にコントラスト調整した例。画像の一部に黒つぶれ（青）および白飛び（赤）が観察される

2.2.1　1 枚の静止画像に対する適切なコントラスト調整

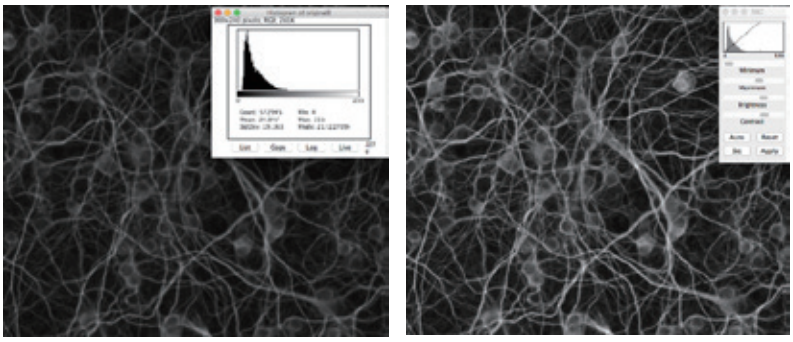
コントラスト調整を施す場合は、基本的に下記の 3 つの手法のうちいずれかで調整することが推奨されている。

1. 輝度ヒストグラムの両端（目的とするシグナルの最小値と最大値）を用いてレベル補正を施す
2. 画像内で 1-2% 程度、白飛び・黒つぶれをあえて生じさせるよう調整する
3. 背景輝度を視認できる程度に調整する

これらの手法を用いることで、過剰な beautification を避けながら見栄えの良い画像へ調整することができる。

基本的には 1 番の最小値および最大値を用いてレベル補正を施す手法が良い。背景輝度を抑えながら白飛び黒つぶれが全く存在しない画像となる（図 2-3）。

2 番の手法は学術データとしての質を担保しながら、見栄えが求められるような画像（特に、学術雑誌の表紙画像や一般向けの解説記事用の画像など）の場合に効果的である（図 2-4）。



原画像　　コントラスト調整画像

図 2-3 輝度ヒストグラムの両端（目的とするシグナルの最小値と最大値）を用いてレベル補正を施した例

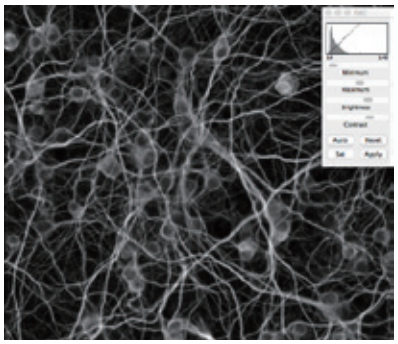


図 2-4 あえて 1-2% 程度の黒つぶれ白飛びを生じさせたコントラスト調整例

3 番目は注目するシグナル領域が定量的に認識しやすくなる。実は、人間の視覚にとって真っ白あるいは真っ黒の領域はほとんど同じ輝度に見えている。数値上の定量性とは異なり、感覚としての定量性がなくなってしまう。そのため、画像を定量的に認識するためには、注目させるべきシグナル領域をあえて灰色の領域（人間の視覚にも定量的に認識される）に収めることが重要である。また、印刷を伴う場合にも定量性の担保に寄与する。

©日本医療研究開発機構

図 2-5 上記画像は幅 256 ピクセルであり、輝度 0 (真っ黒) から輝度 255 (真っ白) まで 1 輝度ずつ遷移している。しかし、人間の視覚（および印刷）により、両端部分の定量性が失われている

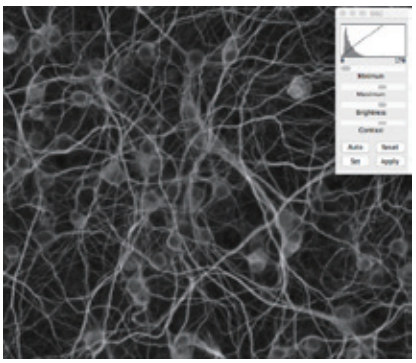


図 2-6 注目させるシグナル領域が定量的に認識できる程度にコントラスト調整をほどこした例

2.2.2　複数枚の比較画像に対するコントラスト調整

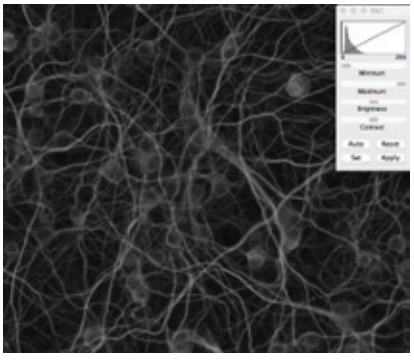
なお、上記解説は 1 枚の静止画像におけるコントラスト調整を解説している。比較対象を含めて提示する生物画像が複数枚ある場合、その全ての画像に対して同等のコントラスト調整を施す必要がある。

例えば蛍光顕微鏡画像の場合、最低輝度 (画像の背景輝度) は同一であっても、シグナル (蛍光物質や蛍光タンパク質) の最大輝度は画像によってまちまちである。複数の画像間で蛍光輝度を定量的に評価したい場合、レベル補正を施す際の上限は全画像の最大輝度が適切だと考えられる。あるいは、レベル補正は下限のみの調整でも良いだろう。

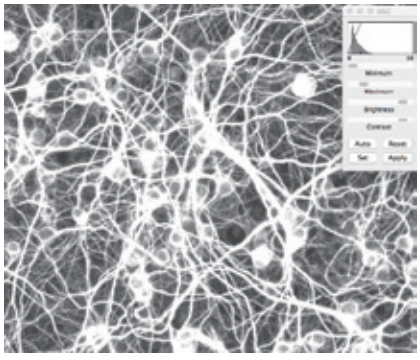
2.2.3　高コントラストでなければ示せない画像の場合

注目させたい領域が美しく撮像されているのが理想ではあるが、時として自家蛍光や non-specific な蛍光など、より明るく撮像されている領域が含まれる画像が撮像されることがある。その場合、注目させたい領域に合わせてコントラスト調整を施せば周囲の領域が過剰に beautification されてしまう。

その場合、コントラスト調整を段階的に施し示すか、原画像を supplemental figure として提出するなどの方法が考えられる。



原画像



コントラスト調整画像

図 2-7 シグナルが乏しい領域を強調したい場合の例
段階的にコントラストを調整した画像を並べて表示するか、原画像を supplemental data として提出する。

2.3　ゲル画像の合成例

スペースを節約させるために複数枚の画像を合成することがあるかもしれないが、明示なく画像を合成してはならない。例えばゲル画像の場合だと、合成しても良い 3 つの条件がある。

1. 合成元ゲルの分子マーカーを含めること
2. 合成された領域に白線あるいは黒線を挿入すること
3. Materials and Methods あるいは legend に合成した旨を記載すること

上記 3 条件が守られている場合は合成しても良いことになっている。一方で、上記が守られていない場合は投稿規定に反する場合がある。

©日本医療研究開発機構

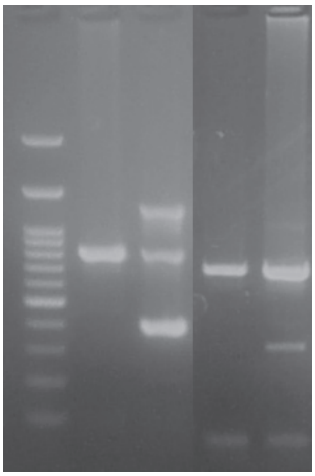


図 3-1 推奨されていない合成画像の例

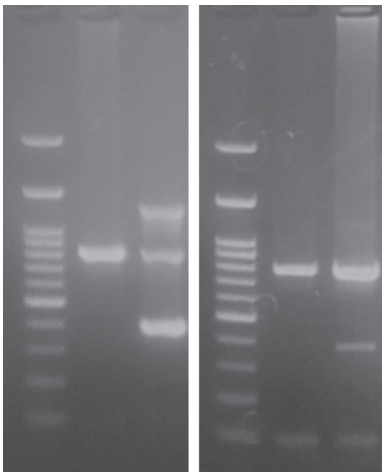


図 3-2 推奨されているゲル画像合成の例
ゲル画像ごとに分子マーカーを含め、合成領域に白線を挿入している

3. 施してはいけない画像処理手法

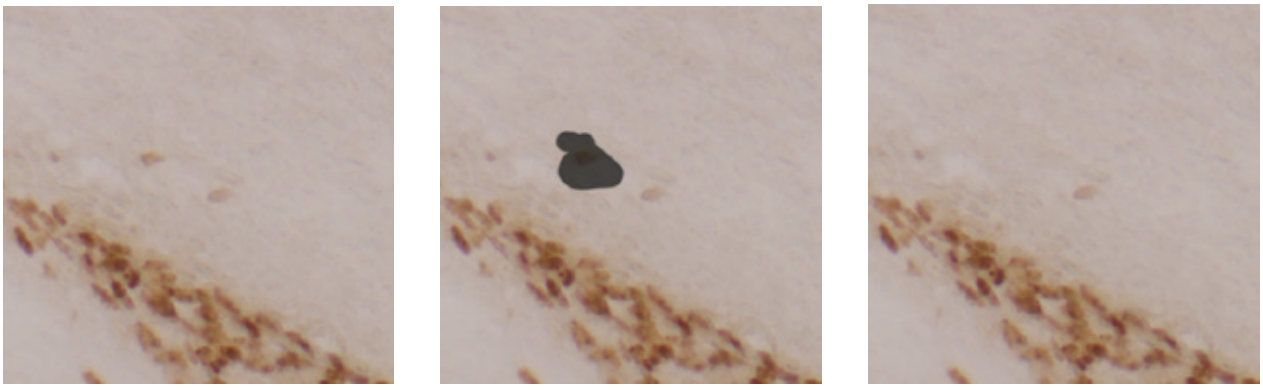
生物画像の画像処理は多種多様かつ多目的である。例えば同じ画像についても、研究の目的が異なれば、異なる画像処理手法を施す必要がある。しかし実験データとして扱う場合において、施してしまったために定量性や客観性を損なってしまう画像処理手法が存在する。やっかいな点は、そのような手法の多くが工学あるいは画像編集（フォトレタッチ）の分野では視認性や見栄えを向上させるためにむしろ積極的に施すような場合もあり得ることである。したがって、画像処理の教科書などの書籍にも、生物画像に施すべきではない処理手法が登場する。生物学者として、研究の目的に応じて画像処理手法を取捨選択する必要がある。その場合に、多くの生物学者が避けるべき画像処理手法を解説していく。

3.1　画像の切り貼り（コピー&ペースト）

画像の切り貼りはたとえ悪意がなくとも不用意に行なうべきではない。前述したゲル画像の合成など、紙面スペースを活用するためや読者の視認性を高めるための画像の合成は推奨されているが、必ず明記することが求められている。なお、後述するように、画像の合成跡はノイズを確認することにより一目瞭然となり、悪意を持った画像の合成は必ず見抜かれる。

3.2　タッチアップ機能

高機能な画像編集（フォトレタッチ）機能を有するソフトウェアの場合、実験データとして不必要なゴミ（ゲル画像に含まれた細かな埃など）を除去する機能がある。しかし、何を除去するかは作業者の主観に任されてしまい、ゴミを除去しているのか、あるいは不都合な実験データを除去しているのか判断がつかない。加えて、細かなゴミの除去は見栄えを良くする効果はあったとしても、学術データとしては必要不可欠ではない。そのため、タッチアップ機能は生物画像に対して施すべきではない。



原画像　　特定領域のみタッチアップ機能を施した画像　　特定領域の除去後

図 4-1 自動修復機能の例

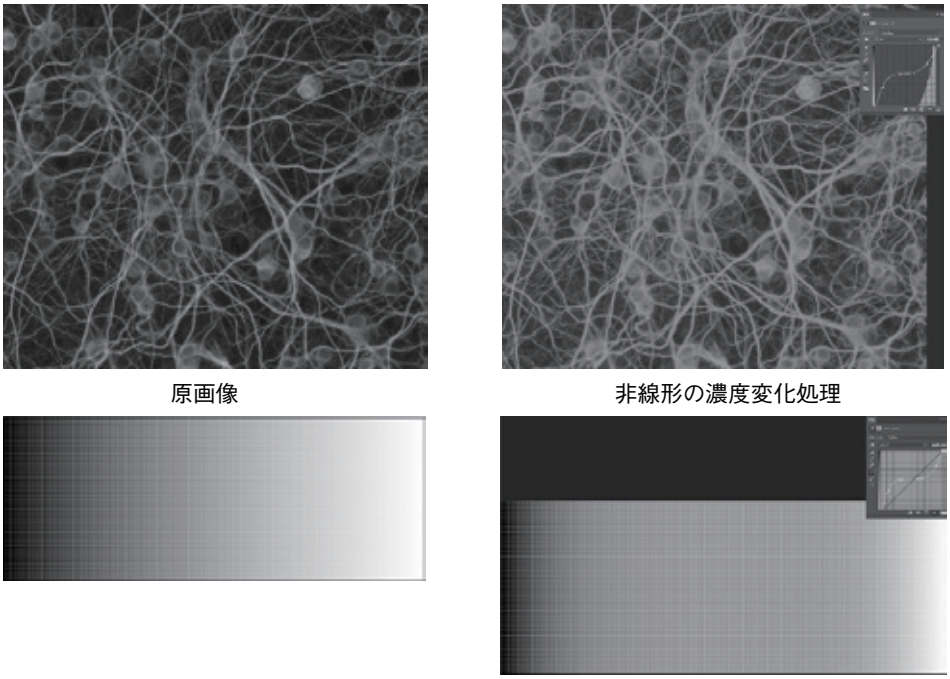
©日本医療研究開発機構

3.3　S 字状のトーンカーブ処理 (非線形の濃度変換)

高機能な画像編集 (フォトレタッチ) ソフトウェアで写真などを編集する場合、トーンカーブを S 字状に編集することがよくあるかと思われる。この処理を施すことにより、暗い領域を明るく、明るい領域を抑え、画像全体の視認性を向上させることができる。本機能は写真加工では効果的であるが、生物画像に施す場合には注意が必要である。

デジタル画像では、カメラに入力された輝度と画像に表示される輝度の比例関係が重要である。例えばこの比例関係が保たれているゲル画像の場合、背景輝度の差分処理を施した後、輝度が 2 倍に近しければ発現量も 2 倍に近しいなどの考察が可能である。しかし、S 字状のトーンカーブ処理を行うとこの比例関係が S 字状に変化するため、輝度を定量的に評価することが不可能になる。

なお、Nature ではゲル画像へは線形の濃度変換を施すことと定めており、Journal of Cell Science (JCS) では非線形の濃度変換処理を施す場合は Materials & Methods あるいは legend に記載するよう求めている。

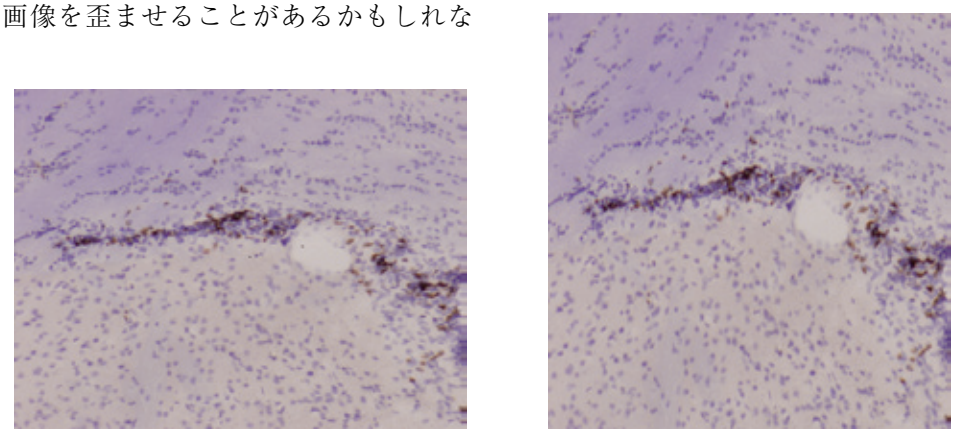


原画像　　非線形の濃度変化処理

図 5-1 S 字状のトーンカーブ設定により輝度の定量性が失われる例
画像は輝度 0 から輝度 255 まで連続的に遷移しているが、トーンカーブ設定を変更することによりその連続性が失われている

3.4　歪ませる

生物画像は歪ませてはならない。非常に単純な話であるが、パワーポイントなどのプレゼンテーションソフトウェアでは簡単に縦横比が変更できてしまう。スライドや論文の限られたスペースに画像を配置させるために誤って画像を歪ませることがあるかもしれない。あるいは、意図しない作業上のミスにより画像を歪めている場合もあるかもしれない。特に、問題意識の浅い学生あるいは若手研究員などがこの操作を施す可能性があるため、研究室に配属された際に画像の取り扱い方を指導することが望まれる。



原画像　　歪ませた画像

図 6-1 パワーポイントなどで縦横比が簡単に変更できてしまう例
画像を歪ませることで見栄え良く配置できてしまうため、注意が必要

©日本医療研究開発機構

3.5　beautification となるコントラスト強調

beautification が施された画像は不都合なデータを消したと疑われてしまう。主張したい箇所のシグナルが極端に弱く、過剰なコントラスト強調が避けられない場合は原画像をサプリメントとして提出するなどの配慮が求められる。

3.6　比較対象の片方のみへの画像処理

野生型や変異体、処理区と無処理区など、比較対象がある場合は比較する画像全てに対して同じ処理を施す必要があり、片方のみに過剰に画像処理を施してはならない。そのため、施した画像処理手法とパラメータ値を統一させる必要がある。

3.7　画像の一部分のみへの画像処理

画像処理は画像全体に施す必要があり、画像の一部分のみに画像処理を施してはならない。例えば人間が視認した色と画像として表現された色が微妙に異なる場合であっても、特定の箇所のみ色情報を変更するのではなく、画像全体について色情報を修正する必要がある。

4. 画像不正を検出できるソフトウェアツール

高度な画像編集 (フォトレタッチ) ソフトウェアを用いた場合、悪意を持って不都合な箇所を除去することが可能である。その場合、一見しては悪意のある加工を見抜くことは困難である。しかし、このような悪意のある画像編集は必ず見抜かれてしまう。画像には連続的なノイズが乗っており、不正な画像編集を施した場合はその箇所のノイズが不連続になってしまう。したがって、ノイズを検出するようなソフトウェアで確認すると画像編集の跡は一目瞭然となる。不正な処理が施された画像の検出をサポートするソフトウェアは既に市販されており、2014 年より評価版を Web 上で無償公開されている。

公開先

URL: https://lpixel.net/services/research/lpexampro-2/

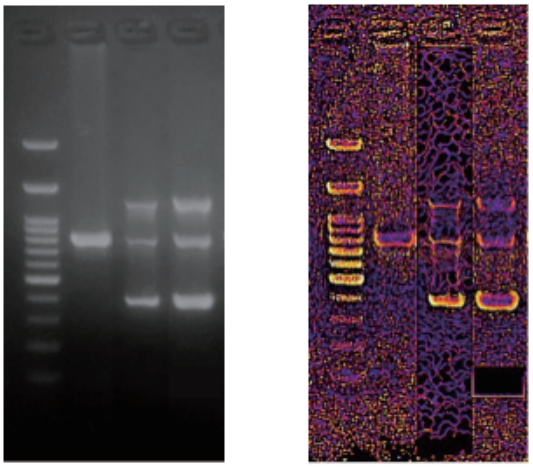


図 7 不正に加工されたゲル電気泳動画像 (左)、および不正画像検出用ソフトウェアにより加工跡が強調された画像 (右)
第３レーンに切り貼り跡が、第４レーン下部に挿入跡が確認される

参考文献

1) Rossner, M. and Yamada, K.M. What's in a picture? The temptation of image manipulation. *The Journal of Cell Biology*, **166**, 11 (2004).
2) Hill, E. Announcing the JCB DataViewer, a browse-based application for viewing original image files. *The Journal of Cell Biology*, **183**, 969 (2008).
3) Noorden, R.V. The image detective who roots out manuscript flaws. *Nature News & Comment*, 12 June 2015.

平成 29 年 11 月　初版発行

発行：国立研究開発法人日本医療研究開発機構
制作協力：エルピクセル株式会社

©日本医療研究開発機構