

1 Photoshopによるゲル画像の調整

中山敬一

はじめに

Adobe社のPhotoshopをはじめとする画像解析ソフトウェアは、いまや研究者にとってなくてはならないものであるが、その便利さの反面、不適切な使用による捏造・偽造が問題となっている。過去の生物学研究における不正や誤りの多くの事例は、Photoshopの不適切な使用により起こっているといっても過言ではない。そこで本稿では、Photoshopに関する原理と使用指針について述べる。

科学誌におけるPhotoshopの使用に関する規定

現在のコンセンサスでは、必ずしもPhotoshopの使用を禁じているわけではない。実際、多くの科学誌の投稿規定にPhotoshopの使用を禁じるものはないが、その適正な使用に関しては注意を喚起している。たとえば、Nature Publishing Group (NPG) のホームページにおけるImage Integrityの項 (http://www.nature.com/authors/editorial_policies/image.html) には、下記のような記載がある。

“A certain degree of image processing is acceptable for publication (and for some experiments, fields and techniques is unavoidable), but the final image must

correctly represent the original data and conform to community standards” (意訳：ある程度の不可避な画像処理は許容されるが、その最終的な画像はオリジナルのデータを正確に反映していなければならず、その程度は科学的コミュニティの標準にそったものでなくてはならない)

この文章からわかるように、処理された画像がオリジナルを正確に反映しているか、科学的コミュニティの標準にそっているかを判断するのは、結局のところ研究者自身であり、あいまいな基準であるといわれればそのとおりである。ただし、要求されればオリジナルの画像を提出しなくてはならないし、科学誌によってはオリジナルデータをすべてSupplementary Informationとして提出することを奨励しているところもある。今後、この方針はますます一般的になっていくことが予想される。

Photoshop 使用における禁忌

Photoshopを使用するうえで、絶対にしてはいけないことは以下のとおりである。

- ① コピー&ペースト (あたりまえ) ←しかし、過去の捏造の大部分はこれ
- ② タッチアップ (写真の傷を修正するためのツール) の使用
- ③ 画面の一部のみ、明るさやコントラストを変更すること
- ④ 異なった時間・場所で行なった実験結果を、あたかもひとつのデータのようにみせること (たとえば、同じ電気泳動ゲル上の離れたレーンを近づけた場合でも、あ

Keiichi Nakayama

九州大学生体防御医学研究所 分子発現制御学分野

E-mail : nakayak1@bioreg.kyushu-u.ac.jp

URL : <http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

いだには境界線を描かなければならない)

①～③は誰にでもわかることで、確信犯的なケースしかこのルールを破る人はいないだろう。また、専門家がみれば、このような処理は簡単に見抜くことができる。④に関しては、きちんと境界線を描いていないケースをときどき認めることがある。注意されたい。

グレースケール：適正な画像処理の範囲

上記のような明らかな黒(捏造)ではなく、グレースケール領域となっているのは、“過剰”な画像処理の問題であろう。逆にいえば、どこまでが“適切な”画像処理の範囲であるかということだ。健全な科学者はつねにこの問題で悩むことであろうと思う。まず、Photoshopとはいかなるソフトウェアで、何が適正か、という原理を知ることが重要である。

あたりまえのことだが、Photoshopは入力値(シグナルあるいは信号強度 x) を出力値(レスポンスあるいは画像強度 y) に変換するソフトウェアだ。この点では、従来のX線フィルムとなんら変わることはないが、X線フィルムが固定の変換関数(すなわち、シグナル-レスポンス曲線)をもっているのに対し、Photoshopではこれをかなり自由に設定できる。そのため、不適切な操作によってはオリジナルの情報とはかけ離れた人工的な画像になってしまう。

話を単純化するため、ウェスタンプロッキングのデータをPhotoshopに取り込んだ場合を例にあげて説明しよう。

ウェスタンプロッキングでは電気化学発光(electrochemiluminescence; ECL)を検出系としている人が多いと思うが、従来はX線フィルムで感光しスキャナーでコンピュータに取り込んでいた。最近では、X線フィルムの代わりにCCDカメラでイメージングしそのままデジタルデータとして使える検出機器も普及している。この画像を調整する場合に、Photoshopを使用することは禁忌ではない。

Photoshopを用いて画像を調整する方法はいくつかある。“イメージ”→“色調補正”を選択すると、入力と出力に関する調整方法がいくつか示されている。本稿では、白黒画像の調整方法のみを論ずるので、“明るさ・コントラスト”“レベル補正”“トーンカーブ”などを例にあげる(図1)。複雑な画像でなければ、“レベル補正”を用いスポイトツールにて最白点(バックグラウンド)と最黒点(バンドのもっとも濃い点)を選択すればよい。自動で補正を行なうオプションもある。

“トーンカーブ”は、Photoshopの入力出力変換ソフトウェアとしての原理を直感的に理解するうえでもっとも重要であり、また、これにより自由にシグナル-レスポンス曲線を設定することができる。しかし、自由度が高いということは、使い方を誤ると不適切な画像を作成してしまう。では、適切な画像処理とは何か? 原則は、“2倍のシグナルは2倍のレスポンスに(直観的に)みえるように”である。上記のウェスタンプロッキングでECLによる検出の場合、シグナル(入力)は光子数、レスポンス(出力)はグレースケ

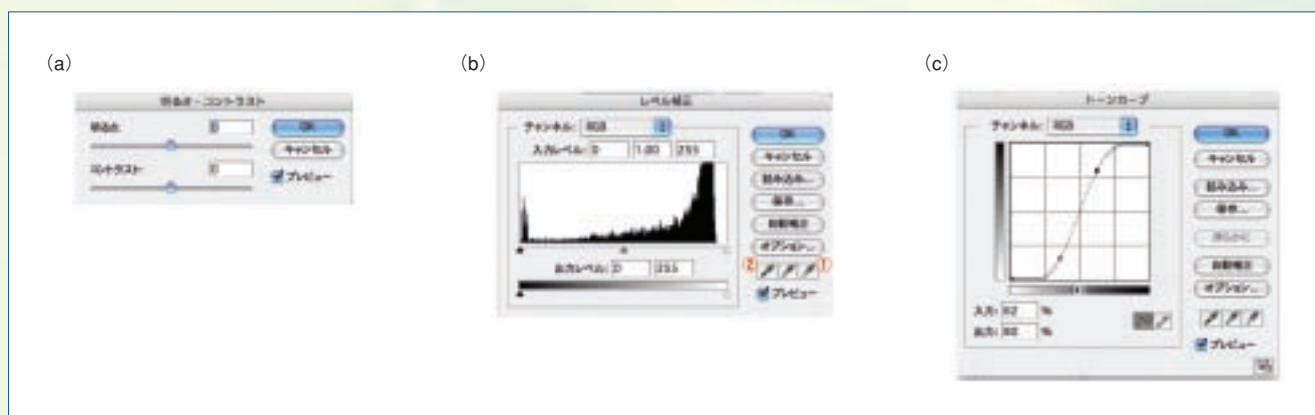


図1 Photoshopにおける種々の画像調整方法

“イメージ”→“色調補正”を開くと、いくつかの画像調整方法が選択できる。そのうち代表的なものを示した。

- (a) 明るさ・コントラスト。もっとも単純な調整方法。明るさはトーンカーブの水平方向の移動に、コントラストは傾きの変化にほぼ等しい。
- (b) レベル補正。入力における最白点と最黒点を指定できる方法。スポイトツールを用いてゲル画像上のバックグラウンドを最白点(①)に、バンドのもっとも濃い箇所を最黒点(②)に指定する。
- (c) トーンカーブ。もっとも自由にシグナル-レスポンス曲線を設定できる方法。最白点や最黒点を指定できるのはもちろん、直線だけでなく、S字曲線やそのほかの曲線を描かせることも可能だが、不自然な操作にならないよう、原理をよく知ることが大切である。

ールである。キーワードは“直観的”というところだ。たとえば、見慣れたX線フィルムでの変換特性はS字曲線になっている(図2a)。Photoshopでは、変換関数をS字曲線でも直線でも何にでもできる。S字曲線よりも直線のほうがよいような気もするが、実際に変換関数を直線にすると、バックグラウンドが高い場合には感覚的に差が縮小してみえ、2倍のシグナルの差が1.5倍くらいにみえるようになってしまう(図2b)。

この例でわかるように、“適正な画像処理とは、シグナルとレスポンスのあいだに直線的な相関関係が成立する範囲で、シグナル-レスポンス曲線を調整すること”、にはかならない。このことから、従来のX線フィルムであっても、シグナル-レスポンス曲線が直線的でない領域(S字曲線の水平部分、つまり、シグナルの低すぎる領域や、レスポンスの飽和している領域)で取得した画像は適切ではないことがわかるだろう。

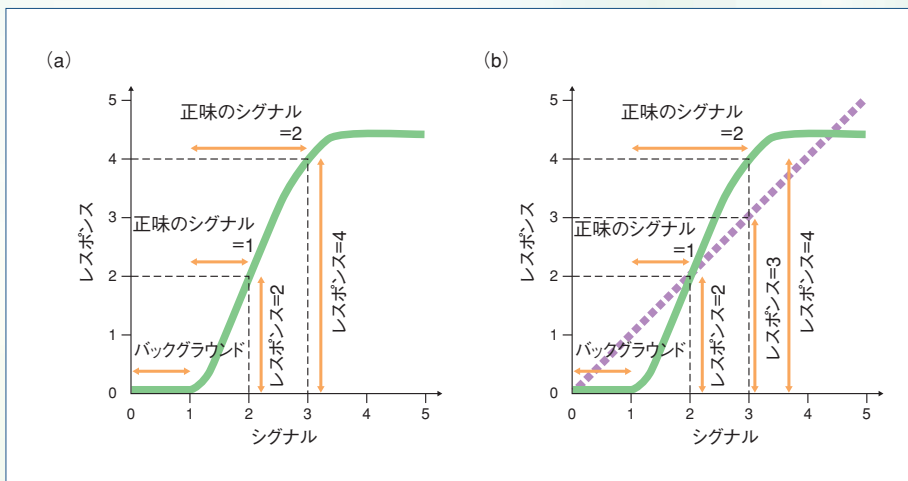


図2 シグナル-レスポンス曲線

(a) S字曲線型のシグナル-レスポンス曲線。シグナルからバックグラウンド(シグナル1)を引いた正味のシグナルは、ある範囲(シグナル3以下)ではレスポンスとほぼ直線的に相関するが、それ以上ではプラトーに達してしまい定量的な意味はなくなる。
 (b) S字曲線型と直線型との比較。シグナル2からシグナル3へ正味のシグナルが2倍になったとき、単純な直線型のシグナル-レスポンス曲線ではレスポンスが1.5倍にしかになっておらず、実際よりも差が小さく感じられる。

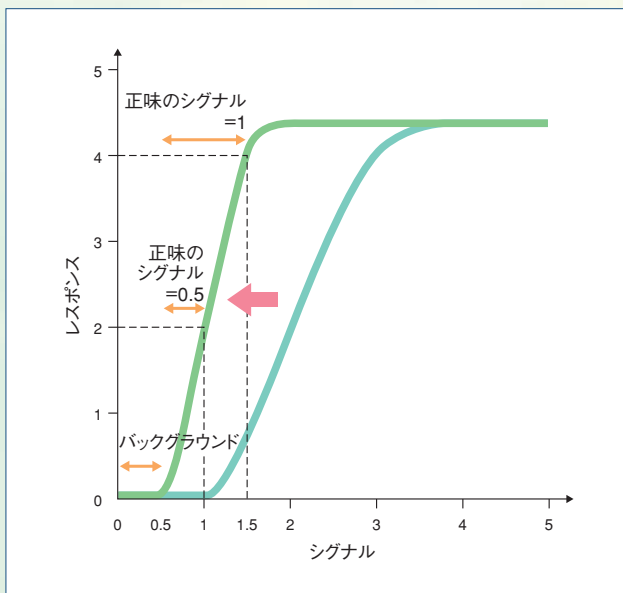


図3 X線フィルムで露光時間を2倍にした場合と同等の効果をPhotoshopで行なう

露光時間を2倍にするということはシグナルが2倍になるということなので、Photoshop上でシグナル-レスポンス曲線を左へ1/2倍にしたのと同様である。この場合、0.5以下または1.5以上のシグナルは定量には使用できない。

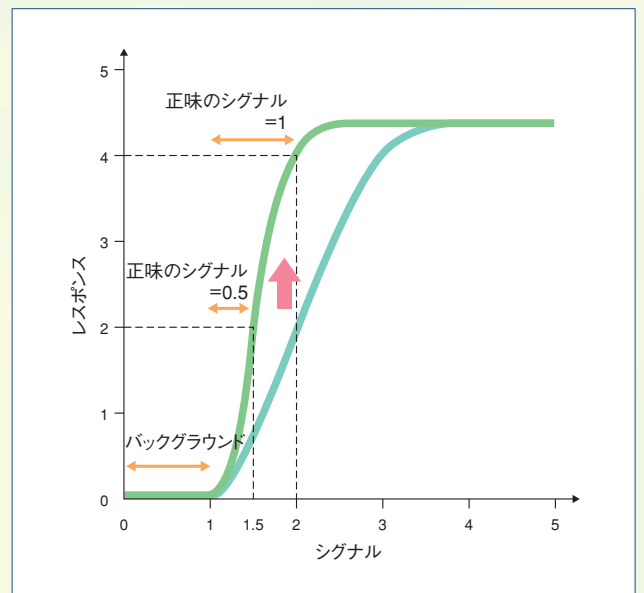


図4 X線フィルムで感度を2倍にした場合と同等の効果をPhotoshopで行なう

感度を2倍にするということは一定のシグナルに対するレスポンスが2倍になるということなので、Photoshop上でシグナル-レスポンス曲線を上へ2倍にしたのと同様である。この場合、1以下または2以上のシグナルは定量には使用できない。

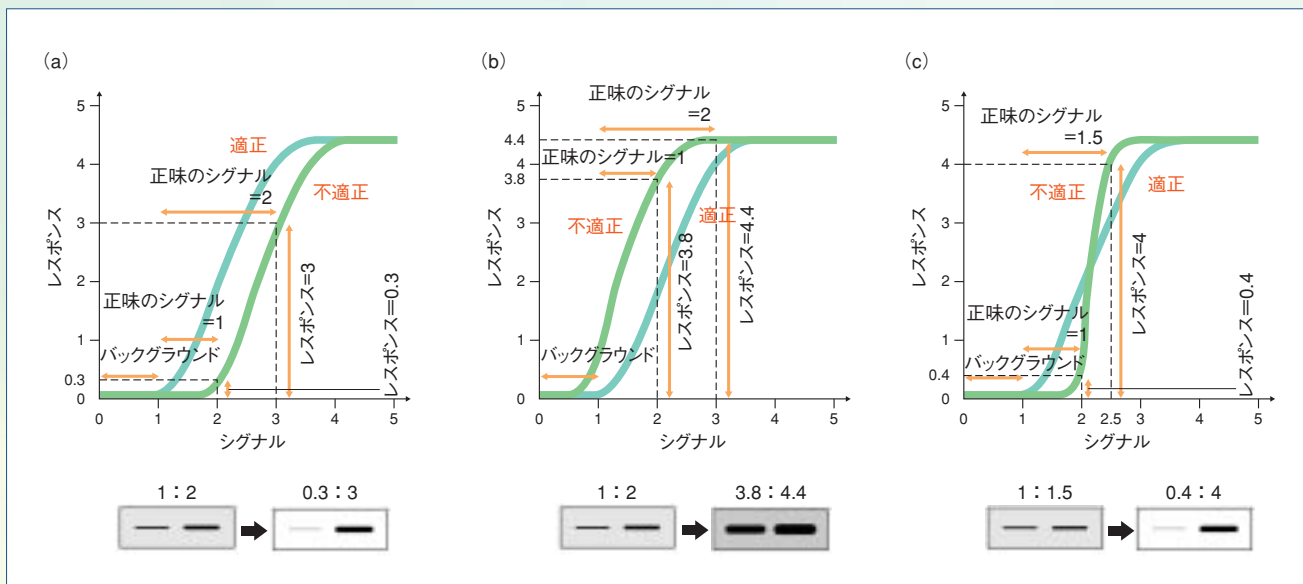


図5 Photoshopによる不適切な画像処理

- (a) 実際以上に差が強調される場合。正味のシグナルが2倍になっているのに対し、レスポンスが10倍になっている。
 (b) 実際以上に差が縮小される場合。正味のシグナルが2倍になっているのに対し、レスポンスが1.2倍にしかならない。
 (c) 極端な傾きの使用。正味のシグナルが1.5倍になっているのに対し、レスポンスが10倍になっている。

適正な画像処理とは

従来のX線フィルムでできることが、Photoshopではどのような意味をもつかを考えてみる。たとえば、バンドの濃さを上げたいときはどうするか？ X線フィルムでは露光時間を延ばすか、あるいは、フィルム感度を上げるという操作を行なうが、これをPhotoshopで行なったときのシグナル-レスポンス曲線の変化を考えてみよう。

まず、X線フィルムで露光時間を2倍にしたときのことを考えてみよう(図3)。この場合、シグナル(この場合は、光子数)は単純に2倍になる。ということは、シグナル-レスポンス曲線を左に1/2にしたことに等しい。つまり、Photoshopにおけるシグナル-レスポンス曲線の左右への等倍変化は、X線フィルムでの露光時間の増減とほぼ同義であるので、極端でないかぎり(すなわち、レスポンスが飽和しないかぎり)、それほど問題はない。

つぎに、X線フィルムの感度を2倍にしたとしてみよう(図4)。この場合、シグナルは同じでも、レスポンス(この場合は、グレースケール)が2倍になる。つまり、シグナル-レスポンス曲線を上に2倍にしたことに等しい。これも、定量性という点では、極端でないかぎり(すなわち、レスポンスが飽和しないかぎり)、それほど問題はない。しかし、実際に

は画像は多くの点の集合体であるので、この操作を極端に行なうと隣接した点どうしのあいだでの不均一を生み、画質の低下をまねく(これを“salt & pepper”パターンという)。

不適切な画像処理とは

不適切な画像処理とは、シグナル-レスポンス曲線の直線部分ではなく、非直線部分を用いて画像処理を行なうことである。たとえば、2点の比較を行なうとき、①一方のシグナルを直線部分のまえのバックグラウンド領域におくと、実際よりも差が大きくなり(図5a)、②逆に、一方のシグナルを直線部分のあとのプラトー領域におけば、実際よりも差が小さくみえる(図5b)。また、③シグナルのあいだでの傾きを大きくすると、非常に小さな差も大きくみえる(図5c)。

しかし現実的には、多くの論文でこのような不適切な画像処理を目にすることがある。たとえば、上記の例で説明すると、①バックグラウンドを大きくするため、背景が極端に白い画像になる、②シグナルが飽和した領域で画像をみせるため、“潰れた”感じの画像になる、③実際には画像は多数の点の集合体であり、そのバラツキが大きくなるため、画質が荒れ“salt & pepper”状態になる(図6)。

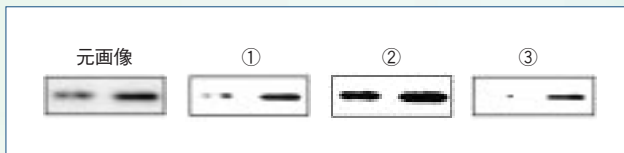


図6 不適切な画像処理の例

いちばん左が元画像。①バックグラウンドの引きすぎ(図5a)。②シグナルがプラトーに達している(図5b)。③極端な傾きをつけたため画質が著しく低下している(図5c)。

数値を付加した処理画像

上記のような不適切な画像処理を避けるために理想的なのは、すべての画像に数値を付することである。数値とは、光子量を測定した生のデータからバックグラウンドを差し引いた値(正味のシグナル)をさす。しかし、現実的にすべての画像でそれを行なうのは煩雑なため、本質的に比較が重要な意味をもつデータにかぎって行なえばよいと思われる。最近では、そのような論文が増えつつある(図7)。

おわりに

Photoshopを使用することは禁忌ではないが、それを正しく使用するためには、まず、画像調整の原理を理解し、自分が行なっている画像調整の意味を正しく知ることが第一である。必要ならば、オリジナル画像のもつ情報の意味を正しく反映した、誇張やごまかしのない画質調整を行なうべきである。その際、オリジナル画像の提出や、数値化などの客観的な判定が求められるようになってきている。

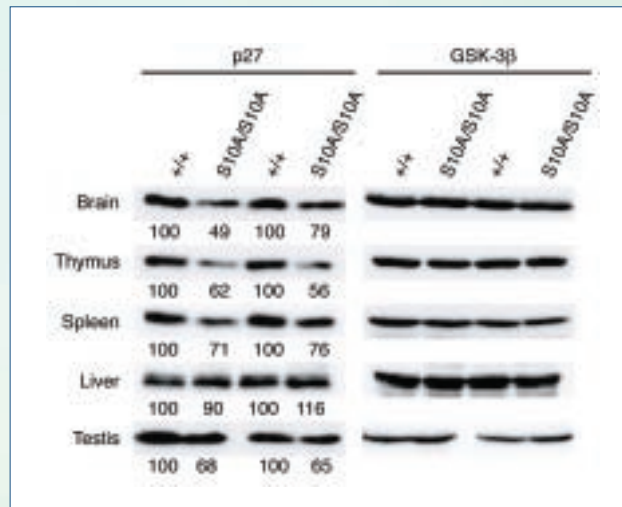


図7 定量値を付加した画像データの例

臓器ごとにp27の量をウェスタンブロットティング法で定量し、正常マウス(+/+)とノックイン型変異マウス(S10A/S10A)とのあいだで比較した。図中の数値は、対照(GSK-3β)とp27を定量後、対照量で補正し、正常マウス(+/+)の平均値を100と定義した値を示している。

[Kotake, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 1095-1102 (2005) より引用]

中山敬一

略歴：1986年 東京医科歯科大学医学部 卒業，1990年 順天堂大学大学院医学研究科 修了，同年 米国Washington大学 博士研究員，1995年 日本ロシュ研究所 主幹研究員を経て，1996年より九州大学生体防御医学研究所 教授。