

蛍光顕微鏡画像におけるカラーユニバーサルデザイン

Color Universal Design—How to Make Figures of Fluorescent Staining

岡 部 正 隆

Masataka Okabe

東京慈恵会医科大学解剖学講座

要 旨 カラー印刷技術の発達やインターネットの発達によって、近年我々の身近なところで、色の違いによって重要な情報を判断しなければならない機会が急激に増えた。学会においても、カラー印刷したポスターや、液晶プロジェクターを用いたカラフルなプレゼンテーションが基本となり、学術雑誌におけるカラー図版も圧倒的に増加している。そのため、使用している色そのものに重要な情報が含まれている写真や図版が多くなっている。文字や記号といった形に基づいた情報伝達と異なり、色による情報伝達は色覚の個人差によって、発表者の意図する情報が相手に正確に伝わらない可能性がある。本稿では、発表者が最も伝えたい情報をより多くの聴衆や読者に正確に伝えるための、蛍光多重染色画像の供覧の方法を紹介する。

キーワード：蛍光顕微鏡画像、色弱、色覚、カラーユニバーサルデザイン

1. はじめに

色は光の波長成分を元にして神経系で合成される感覚である。その感覚は遺伝的背景に依存した個人差が存在する。近年我々の身近なところで、色の違いによって重要な情報を判断しなければならない機会が増えた。その背景にはカラー印刷技術や多色 LED 光源を用いた電光掲示板の発達や、インターネットの普及によりだれでも自由にカラフルな情報画像を社会に公開することが可能になったことなどが大きく影響している。学会においても、カラー印刷したポスターや、液晶プロジェクターを用いたカラフルなプレゼンテーションが当たり前で、学術雑誌におけるカラー図版も圧倒的に増加している。そのため、使用している色そのものに重要な情報が含まれていることが多くなっている。文字や記号のような形の違いに基づいた情報伝達手段と異なり、色による情報伝達は色覚の個人差によって、相手に正確に伝わらない可能性がある。著者らは、2001年の夏より、様々な学会において、色弱の人たちにも理解しやすいカラー図版の作成方法や蛍光顕微鏡画像の供覧方法を普及させるために活動を行ってきた。当初「色覚バリアフリー」と称して行ってきたこの啓発活動も、多くの人たちの協力のおかげで、現在では「カラーユニバーサルデザイン CUD」として、学会だけではなく自治体や公共交通機関、様々な企業の商品や活動に広がりを見せている。学会発表や論文作成における、カラーユニバーサルデザインに基づいたグラフや模式図の作成方法に関しては

参考文献をご覧いただきたい^{1~3)}。本稿では、発表者が最も伝えたい情報をより多くの聴衆や読者に伝えるための、蛍光多重染色画像の供覧方法を紹介する。

2. 色覚について

色とは物の性質ではなく、我々の眼が受容した光の波長別強度情報に基づき脳がつくり出す感覚である。光刺激は、網膜上の杆体・錐体と呼ばれる視細胞によって神経の活動電位に変換される。全視細胞の95%を占める杆体は、暗所のみで機能し、明所では機能しない。明所では残りの5%を占める錐体が主に機能している。杆体が1種類しかないのに対し、錐体には分光吸収特性の異なる3種類、すなわちS錐体、M錐体、L錐体が存在する（以下青錐体、緑錐体、赤錐体とそれぞれ表記する）。暗所では光を感受する視細胞が杆体1種類だけであるため、光の強度は認識できるものの、どのような波長成分の光であるかを認識することができない。そのため我々は暗いところではモノクロームな1色型色覚となり、色を認識することはできない。一方明所では、眼に入った光は分光吸収特性の異なる3種類の錐体によって波長別に3つの成分に分解される。3変数に置換された光の波長別強度情報は、網膜内のその他の神経細胞によって情報処理が行なわれた後、中枢神経系に伝えられてはじめて色として知覚される。こうして明所において我々の色覚は3色型色覚となる。

3. 色弱について

遺伝子の変異によって各錐体の分光吸収特性が大きく変化すると、視力や視野は他の人と変わらないものの色覚だけが特徴的な先天的影響を受ける。色弱と呼ばれるこの現象には、赤、緑、青のいずれかの視物質タンパク質（オプシン）を発

〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8
TEL: 03-3433-1111; FAX: 03-3433-2065
E-mail: maokabe@jikei.ac.jp
2010年7月10日受付

現する錐体が存在しない場合に生じる2色型色覚(強度の色弱)や、変異によって視物質の分光吸収特性が大きく変化して起きる異常3色型色覚(軽度の色弱)がある。緑錐体と赤錐体の分光吸収特性はよく似ており、どちらの機能に影響が出ても同じような表現型となるため、赤緑色弱と総称されている。赤オプシン遺伝子も緑オプシン遺伝子もX染色体に存在するため伴性劣性遺伝形式を示す。すなわち赤緑色弱は男性で頻度が高く、日本人の多くを占める黄色人種では男性の約5%、白人男性では約8%、黒人男性では約4%がこれに相当する(日本人男性に約300万人)。また日本人女性でも0.2%(約12万人)が赤緑色弱であり、保因者は女性10人に1人の割合で存在する。この頻度は極めて高く、男女比1対1の40人学級で1名、200名の講演会場で5名いる計算になる。投稿した論文が3人の白人男性によって査読を受けたとすると、色弱の査読者に遭遇する確率は22%にもなる。一方、常染色体に存在する青オプシン遺伝子の変異は数万人に1人と極めて少ない。

4. 色覚タイプの呼称について

色弱のことを医学の世界では先天色覚異常、マスコミ関係では色覚障害と呼んでいる。しかし当事者からすれば色弱は感覚の多様性の一つに過ぎず「異常」や「障害」ではないという声が多い。そのため、色弱を多様性の一つと捉えるために、「異常」や「障害」といった価値観を伴わない呼称が推奨される。NPO法人カラーユニバーサルデザイン機構(CUDO)が推奨する色覚のタイプの呼称は、ABO型血液型をモデルにして遺伝子変異を単なる遺伝的多形の一つとして捉え、正常や異常という余計な価値観を与えない点で画期的である。最も多い色覚、つまり色弱でない色覚をC型(commonの意味)と呼ぶ。赤オプシン遺伝子に変異が生じたものをP型(Protanope)、緑オプシン遺伝子に変異が生じたものをD型(Deutanope)、青オプシン遺伝子に変異が生じたものをT型(Tritanope)、錐体がないもしくは錐体が1種類しかない全色盲をA型(Achromat)と呼ぶ。最も頻度の高い色弱は、赤緑色弱と呼ばれるP型とD型であり、どちらもよく似た表現型を示す。眼科領域での呼称との関係はCUDOのホームページを参考にしてもらいたい。

5. P型D型の人が見た蛍光顕微鏡画像

つい数年前まではカラーフィルムを使って蛍光顕微鏡写真を撮影していたが、現在はデジタルカメラで撮影してパソコン上で疑似カラーを用いて表現するのが一般的になった。共焦点レーザー顕微鏡の画像の掲示方法も同様である。蛍光2重染色では、黒い背景に赤と緑(モニター上ではほぼ黄緑)で表現し、赤と緑が共存する部分は黄色として表現されるのが一般的である。この慣例となっている赤と緑の蛍光2重染色画像が、P型やD型の人にとどのような困難をもたらすかを、シミュレーション画像を用いて説明しよう。本稿で示すシミュレーション画像はすべてソフトウェアVischeckを用い

て作成しており、すべて2色型色覚すなわち強度の色弱のものである。異常3色型色覚すなわち軽度の色弱ではこれらシミュレーション画像とオリジナル画像(C型)との中間になる。ちなみに著者は強度のP型色覚であり、本稿で用いているオリジナル画像とP型シミュレーション画像を識別することができない。

強度のP型やD型では赤錐体もしくは緑錐体の機能が失われている。つまり、網膜上には短波長側の光を受容する青錐体とあわせて2種類の錐体が存在することになり、2色型色覚となる。赤緑の蛍光2重染色で識別しなければならない緑、黄色、赤はどれも緑錐体や赤錐体の興奮の比によって色相が識別されるため、P型やD型では色相の差はほとんど感じることができず、主に明度の差としてしか認識することができない。さらに、可視光線領域の最も長波長領域の光を受容する赤錐体の機能が失われているP型では、長波長の赤が認識できず、赤のシグナルが暗く見えてしまう。

赤と緑の蛍光2重染色像を見てみよう(図1A)。シミュレーションを見ると、P型とD型ともに3色の色の差が小さくなっており、それぞれのシグナルの分布を理解するのが困難である(図1B, C)。特に、緑単独なのか、赤と緑が共存して黄色になっているのかを区別することが困難である。さらにP型の場合は、赤が暗く見えるために赤いシグナルの有無がわかりにくい(図1B)。これでは、発表者の意図することを赤と緑の蛍光2重染色を通じて色弱の聴衆や読者に理解してもらうことは極めて難しいといえる。

ここでP型とD型だけでなくC型つまり色弱でない人を含めて、ほぼ全ての人に理解できる蛍光2重染色画像の供覧方法を紹介したい。それは、赤のシグナルをマゼンタ(赤と青を1対1で混ぜた赤紫色)で掲示する方法である。この方法では、黒い背景上にマゼンタと緑、そして2つの色が共存した部分は白として表現される(図1D)。網膜上でマゼンタ(赤紫)、白、緑を識別するには、短波長側の光を認識する青錐体を用いるため、P型とD型にとっては、2種類の錐体を使い3色の色相の差を感じることができる。シミュレーションを見ると、マゼンタの部分、緑の部分、白の部分が明確に区別できていることがわかる(図1D, E)。赤のシグナルの有無が分かりにくかったP型においても赤の領域が青くはっきり見えるようになる(図1E)。

最近には様々な蛍光色素が開発され販売されるようになった。中には赤外線領域のような我々の眼では認識できない波長領域の蛍光を示す物質まである。蛍光物質と同じ色の疑似カラーを用いる必然性はもはやなく、むしろ査読者を含む読者や聴衆に理解しやすい色遣いをすることで、研究内容をより多くの人に正確に理解してもらうことができる。

6. 赤緑画像からマゼンタ緑画像への変換法

顕微鏡各社はマゼンタ緑の蛍光画像表示を簡単にできるように、疑似カラーにマゼンタを選択できるよう販売時から設定している。これを活用するのが最も簡単であるが、すでに

撮影した手持ちの赤緑画像をマゼンタ緑に変換するためにはどのようにしたらよいのだろうか。Adobe Photoshop を用いた非常に簡単な変換方法を紹介しよう。基本的にはRGB表示における赤チャンネルの絵を青チャンネルにコピーするだけである(図2)。まず既存の赤緑の画像を開き、レイヤーウィンドウの中のチャンネルのタグを選択する(Step1)。この時使用する画像はRGBモードの画像でなければならず、論文投稿用もしくは印刷用にCMYKモードに変換した後の画像は使用できない。次に赤チャンネルだけを表示させる(Step2)。ショートカットキーを使用する場合は、Macで

れば⌘+1, Windowsであればctrl+1でできる。つぎに赤チャンネルの画像のすべてを選択し(⌘ないしはctrl+A),これをコピーする(⌘ないしはctrl+C)。つぎに青チャンネルだけを表示させる(⌘ないしはctrl+3)。赤緑の2重染色の場合、青チャンネルにはなにも表示されないはずである(Step3)。ここにペーストする(Step4: ⌘ないしはctrl+V)。そして全チャンネルを表示させるとマゼンタ緑画像が完成する(Step5: ⌘ないしはctrl+^)。この一連の操作は、ショートカットキーを用いれば、⌘ないしはctrlを押しながら、1AC3V^とタイプするだけのことで、わずか数秒でできる作業である。

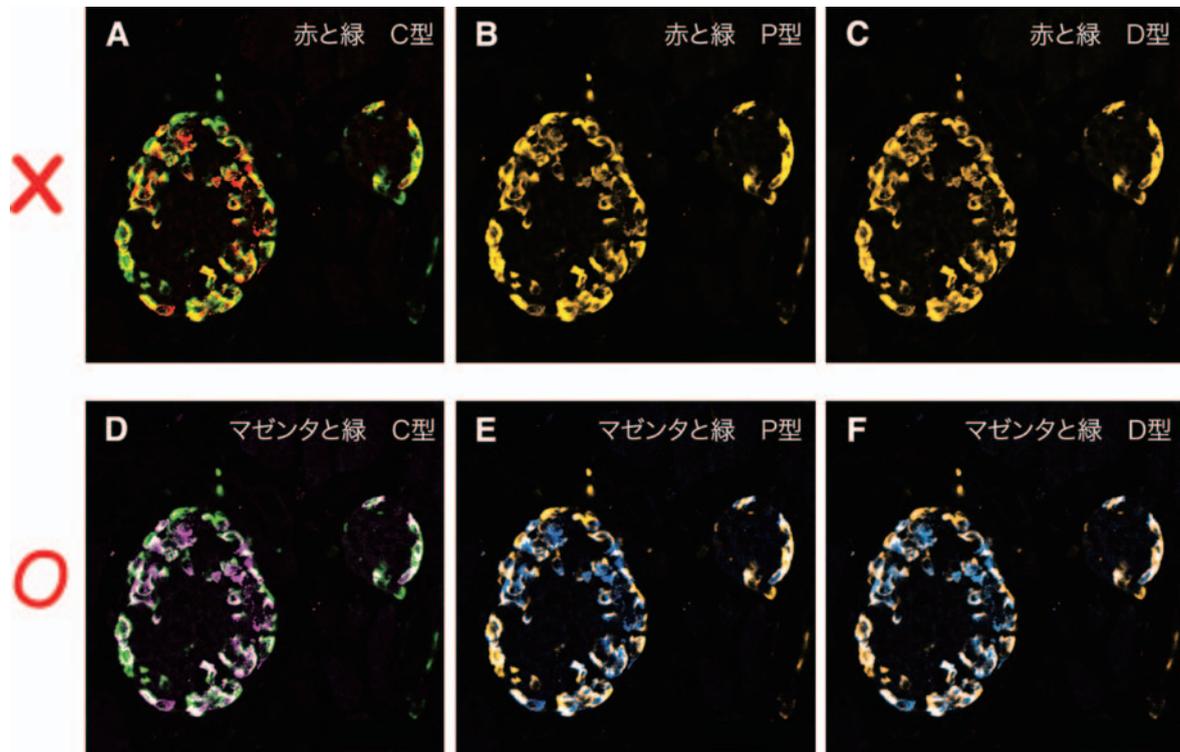


図1 蛍光2重染色画像のシミュレーション

赤と緑の蛍光2重染色画像では赤緑色弱(P型D型)の人に正確に情報を伝えられない。赤の代わりにマゼンタを用いれば正確に情報を伝えることができる。

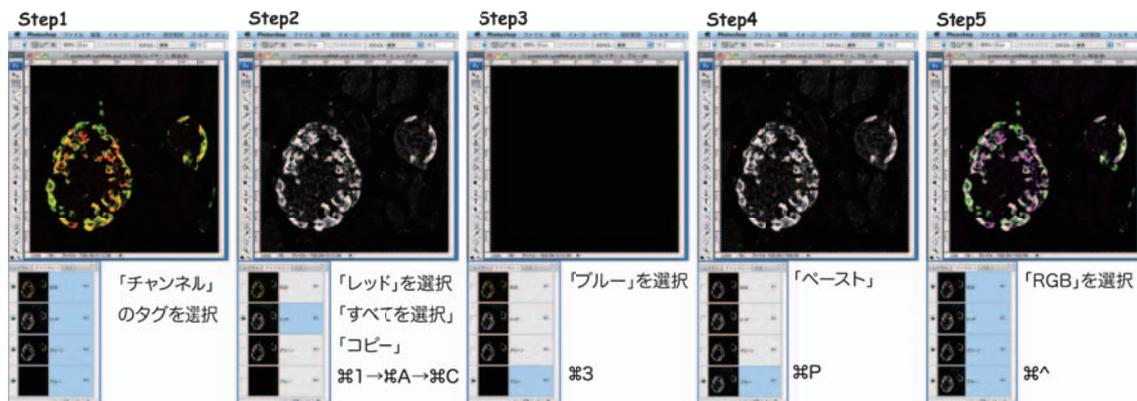


図2 赤緑画像からマゼンタ緑画像への変換方法

Adobe Photoshopを用いた例。赤チャンネルの画像を青チャンネルの画像にコピーするだけで変換できる。ショートカットキーを用いれば数秒しかかからない。

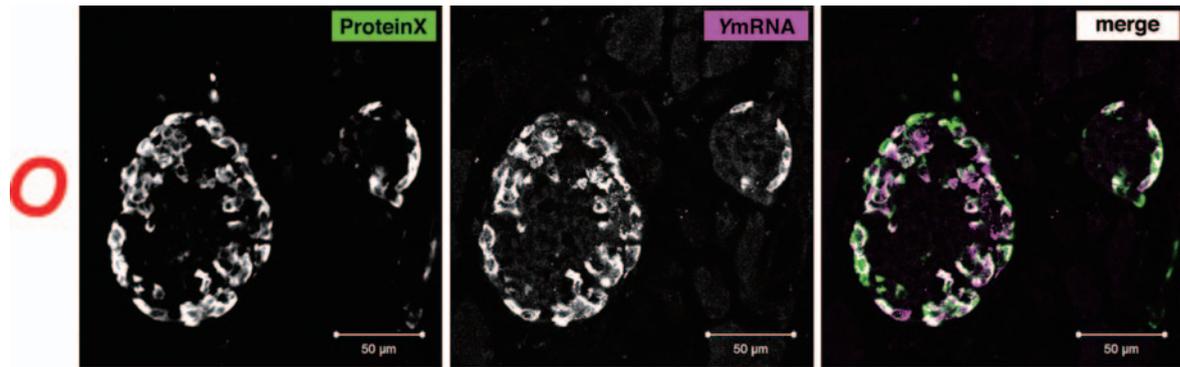


図3 蛍光2重染色の供覧例

それぞれのチャンネルはグレースケールで表示し、統合画像はマゼンタと緑で示す。統合画像で用いている色を文字の背景色で表現している。文字色で表現するよりも色面積が大きくなってわかりやすい。

7. 各チャンネルの画像はグレースケールで供覧する

抗原毎に部位別のシグナル強度を比較するために、各チャンネル単独の画像も並べて供覧するのが一般的であるが、各チャンネルの画像をカラーで供覧しているポスターや論文が多い。各チャンネルの画像はグレースケールで示すことをお勧めする(図3)。その理由は、画像をカラーで印刷すると、階調が飛んでしまうという欠点があるからだ。パソコンモニターの画面表示(RGB方式)では、これらの色はかなり鮮やかに表示される。しかし論文やポスターの印刷(CMYK方式)では、これら光の3原色は単独のインクではなく、赤はマゼンタ(M)とイエロー(Y)、緑はイエローとシアン(C)、青はシアンとマゼンタという2つのインクを混ぜ合わせて表現され(さらに黒をシャープに見せるためにCMY以外に黒インク(K)が用いられる)、混ぜ合わせたインクでは、彩度が高く明るい鮮やかな色が再現できない。とくに緑においてはモニターでは表現できる明るい鮮やかな緑色が印刷では再現できない。結果としてグレースケールに比べカラーの単色画像では、明るい部分や暗い部分が潰れてしまう(図4)。グレースケールなら90%と100%でも十分にシグナル強度の差を再現できるが、緑では60%程度ですでにシグナルが飽和してしまい、100%との差がわからなくなってしまう(図4上段)。実際にシグナルの強度分布の情報をなるべく正確に伝えたい顕微鏡画像においては階調が飛んでしまう影響は大きい(図4下段)。以上のことから、各チャンネルの画像もしくは蛍光単色の顕微鏡画像は、ダイナミックレンジを最も有効に使って表現できるグレースケールを用いるのが最善である(図3)。

統合画像上で各チャンネルの画像がマゼンタと緑のどちらに相当するかを示すには、図3で示すように抗原名を表記する文字で伝えるのがよいだろう。図3では文字に色を載せず、文字の背景に色を用いている。文字に色を載せると色の面積が少なくなり、図版が小さくなると色弱の人には色の区別がしにくくなる。そのため文字に色を載せるのではなく、むしろ色を塗った背景の上に黒や白などの無彩色で文字を書

き込むと、色の載った面積が広くなり、色情報をより伝え易くなる。

8. 蛍光3重染色の供覧方法

蛍光3重染色の統合画像では、赤緑青の各チャンネルの色に加え、そのうち2色が重なり合った部分(赤と緑で黄色、赤と青で赤紫、緑と青で水色)、さらに3色が重なった部分

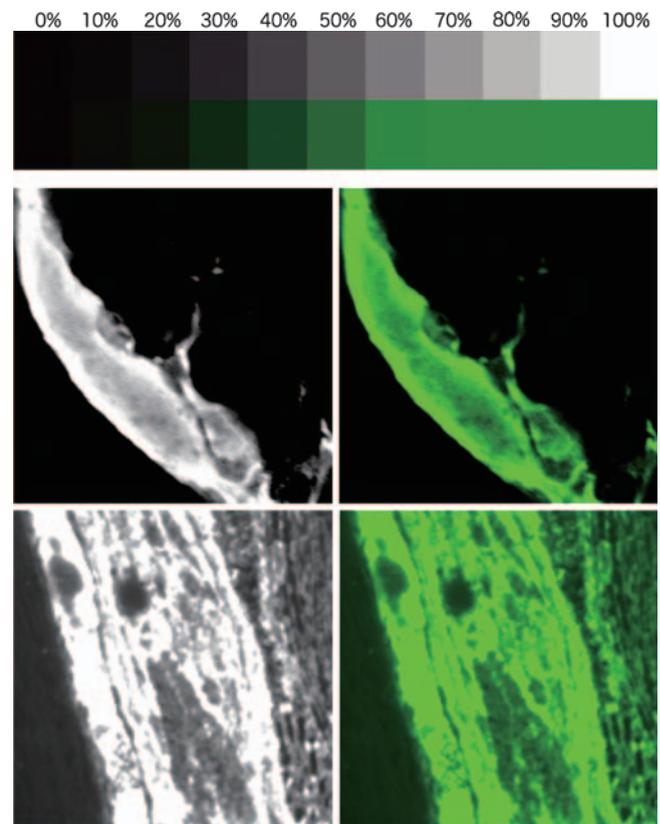


図4 単染色画像はカラーではなくグレースケールでカラー図版は鮮やかに印刷することができず(CMYKモード)、シグナルの強度を正確に表現できない。飽和度60%と100%を区別して表現できないのがわかる。一方でグレースケールならば90%と100%を大きな差をもって表現できることがわかる。

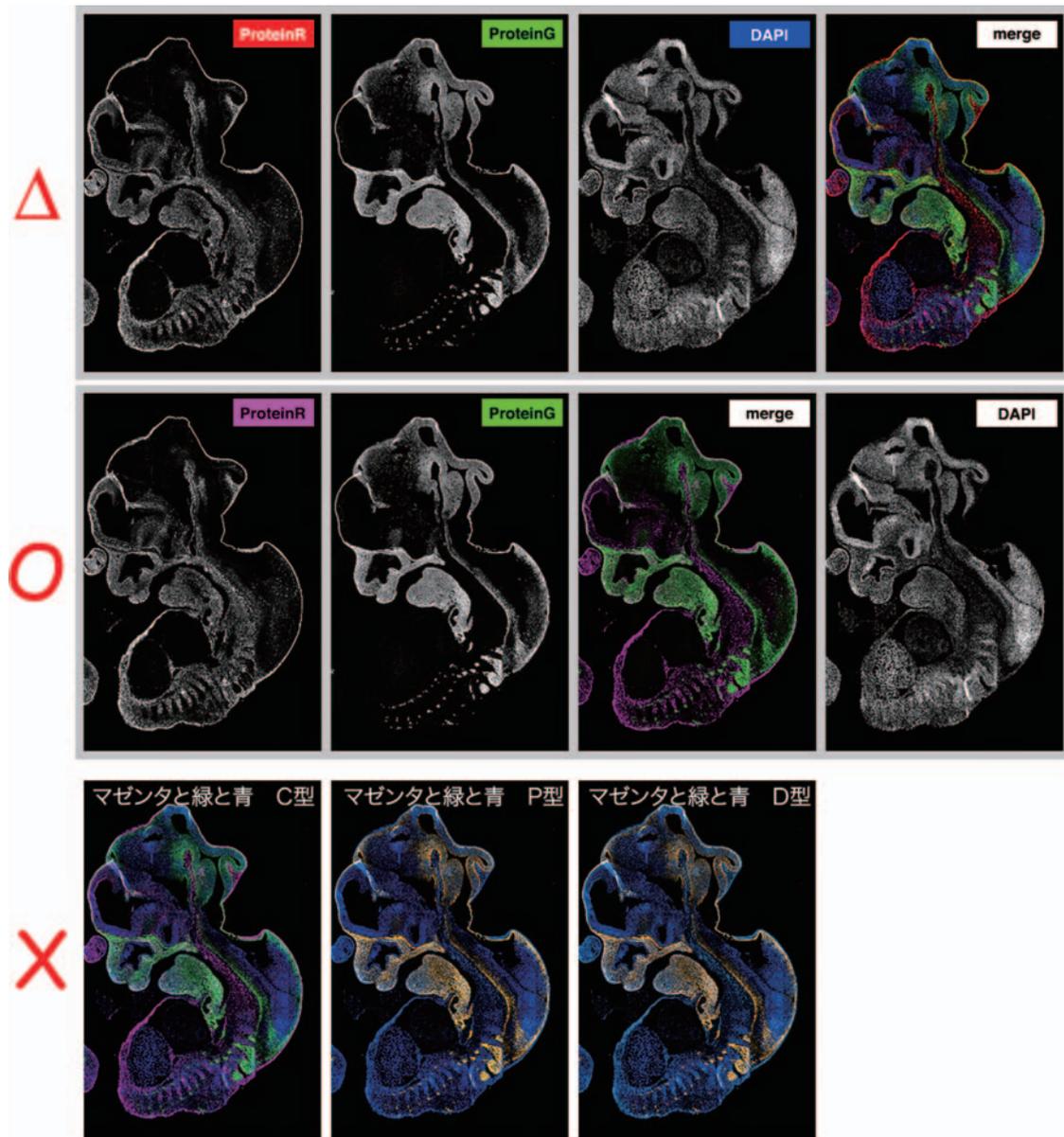


図5 蛍光3重染色の供覧例

上段：それぞれのチャンネルをグレースケールで表現した例。

中段：注目したい2つのチャンネルの関係をマゼンタ緑の組み合わせで表現し、細胞の存在を示す核染色は別にグレースケールで示した例。

下段：マゼンタ緑の2重染色画像にさらに青の核染色画像を重ねた例。赤緑色弱（P型D型）の人はマゼンタと青を区別するのが困難なため、マゼンタと青が共存すると画像の理解がむづかしくなってしまいます。

(白色)の計7色を見分ける必要が生じる。人間が同時に認識・識別できる色の数は、4、5種類と言われており、蛍光3重染色の統合画像を認識するのは色弱でない人にも難しい課題である。3チャンネル画像は一見カラフルで情報豊富に見えるが、見る人に正確に伝えられる情報は実際にはむしろ少ない。

全体像を示すため全チャンネルの統合画像は必要であるが、それに加えてどのような画像を供覧するかを十分に考えねばならない。各チャンネルの画像がそれぞれ独特のパターンを示し、その分布の違いに興味がある場合や、各シグ

ナルの強度分布を忠実に示したい場合には、統合画像に加えて各チャンネルの画像をグレースケールで供覧すると効果的である(図5上段)。一方、培養細胞の蛍光3重染色に多い例であるが、3つのチャンネルのうち、特定の2つのチャンネルのシグナルの分布関係にとくに興味があり、残りの1チャンネル(通常青が多い)は単に細胞の位置を示すための核染色に使われていることがある。この場合は、比較する2つのチャンネルをマゼンタと緑の組み合わせで供覧し、核染色の画像は別画像としてグレースケールで掲示する方が、発表者が最も正確に伝えたい情報を分かり易く示すこと

ができる (図5中段). ここで注意しなければならないのは、マゼンタ緑の統合画像に、核染色の青色の画像を統合してはいけない. P型D型では青と紫の色の区別が困難であるため、マゼンタと核染色の青の区別が難しくなり、むしろ分かりにくくなってしまう (図5下段). 蛍光2重染色をすでにマゼンタ緑の組み合わせで発表している研究者が、3重染色を供覧する際にこの方法を用いることが多いため、注意が必要である.

9. 最後に

本稿では、より多くの読者や聴衆に、発表者の最も伝えたいことが伝わるための蛍光多重染色画像の供覧方法について紹介した. 著者がこの活動を始めてから、多くの身近な研究者が自分も色弱であると伝えてきた. 日本人男性の20人に1人が色弱であるが、研究者における頻度は明らかにこの頻度を上回る感がある. ある共著の論文発表をした際、10人弱の著者のうち約半数が色弱だった経験まであった. 学会会場においても、発表者に有益な助言をし得る研究者がカラー図版の内容を理解できないというのは、発表者にとっても極めて残念なことである. 外国雑誌の査読者が「自分は色弱でこのカラフルな画像が理解できないので、この論文を評価できない。」と回答してきたので、相談に乗ってほしいと依頼を受けた経験もある. 色弱という現象を発見したのは

分子量で有名なジョン・ダルトンであり、彼もまた色弱であった. なぜ研究者に色弱が多いのか、他の人と見ている世界が生まれながらに違うことがなにかしら影響しているのかもしれない.

学会のポスターや論文では、蛍光顕微鏡画像以外にも、カラフルなグラフや模式図を用いるため、いたるところにカラーユニバーサルデザインの配慮が必要になってくる. これらの問題点や具体的な工夫方法に関しては参考文献やホームページをご覧ください. 尚、参考文献に挙げている月刊細胞工学の連載は、発行元の秀潤社のご好意により、PDFファイルを <http://www.nig.ac.jp/color> よりダウンロードすることができる.

文 献

- 1) 岡部正隆, 伊藤 啓: 細胞工学, 21, 733-745 (2002)
- 2) 岡部正隆, 伊藤 啓: 細胞工学, 21, 909-930 (2002)
- 3) 岡部正隆, 伊藤 啓: 細胞工学, 21, 1080-1104 (2002)

URL:

色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション
<http://www.nig.ac.jp/color>
NPO 法人カラーユニバーサルデザイン機構
<http://www.cudo.jp>