

三重大学大学院生物資源学研究科

博士論文

レーザスペックル法による植物のストレス応答評価
(Evaluation of Stress Responses in a Plant Utilizing Laser
Speckle Method)

稲垣陽介

令和5年3月

目次

要約	1
第1章 序論	3
1.1 データ駆動型農業における情報	3
1.2 植物センシングに向けたレーザスペックル法の応用	3
1.3 研究目的	6
第2章 レーザスペックル法による水分ストレス検出	7
2.1 試料および実験環境	7
2.2 計測装置およびスペックル画像取得	7
2.3 解析方法	10
2.4 結果および考察	11
2.5 まとめと展望	16
第3章 スペックル変動と葉緑体動態の関係調査	17
3.1 葉緑体動態について	17
3.1.1 刺激による葉緑体動態抑制のメカニズム	17
3.2 葉緑体動態とスペックル変動の関係調査	18
3.2.1 供試植物	18
3.2.2 実験方法	18
3.2.3 解析方法	21
3.2.4 統計解析	22
3.2.5 結果および考察	22
3.3 葉緑体動態の把握に適した解析方法の検討	26
3.3.1 解析方法	26
3.3.2 統計解析	28
3.3.3 結果および考察	28
3.3.4 従前の解析手法との比較	31
3.4 陸上植物に対するランレンジス行列解析の適用	33
3.4.1 解析方法	34
3.4.2 結果および考察	36
3.5 まとめと展望	39
第4章 葉緑体の生理応答を利用した塩分ストレス検出	41

4.1	塩分ストレス評価の意義と検出可能性.....	41
4.2	実験方法および解析方法.....	42
4.2.1	供試植物および実験環境.....	42
4.2.2	スペックル画像取得およびストレス処理方法.....	42
4.2.3	ストレス処理に伴う葉緑体の形態変化観察.....	44
4.2.4	スペックル変動解析手法.....	45
4.2.5	統計解析.....	46
4.3	結果および考察.....	46
4.3.1	簡易植物生理指標の変化.....	46
4.3.2	ランレングス特徴量の変化.....	49
4.3.3	ストレス検出・分類に適した特徴量の検討.....	54
4.4	まとめと今後の展望.....	55
第5章	総括.....	57
	Nomenclature.....	61
	謝辞.....	62
	参考文献.....	63
	付録.....	68

要約

データ駆動型農業のさらなる発展のため、温湿度や土壌水分量など環境情報の利用だけでなく、植物体情報を加味した環境制御や肥培管理が加われば、より高品質・多収量の実現、病気の防除等による安定した農業生産が期待できる。すでに光合成能力の指標となるクロロフィル蛍光法や葉緑体の吸光度を利用した葉緑素計などは実用化されているが、環境変化に対して複合的に起こる植物生理応答について、単一の生理指標のみで説明することは難しく、様々な生体情報の計測・利活用が望まれる。

本研究では既存の植物センシング手法と原理が異なり、複雑な植物生体内動態をコヒーレント光による干渉現象の解析から評価するレーザスペックル法に着目した。レーザを物体に照射すると、光が対象表面や内部で拡散してカメラなどの撮像素子上で干渉する結果、明暗の斑点模様（スペックル）が形成される。対象に動態が存在する場合、光の拡散・干渉条件が時間的に変化するためスペックルの明るさは変動する（スペックル変動）。スペックル変動には、複合的かつ特異的な生体内動態が反映されるため、各種刺激に対応した生理指標の提案が期待できる。そこで、本研究では、レーザスペックル法による植物のストレス応答評価を目的とし、スペックル変動要因の究明とそれに対する適切な解析手法を提案し、植物生理応答の識別・評価を実施した。以下に、本論文の成果を要約する。

1. レーザスペックル法による早期ストレス検出の可能性を調査するため、ダイズ葉における水分ストレス応答の検出可否を検討した。既往の報告で用いられてきた複数の解析手法を適用したところ、いずれにおいてもストレス応答が検出可能であった。解析結果を画像化することで、水分輸送を担う主脈と側脈では解析値に差があり、葉面の部位によって生理応答が異なることが可視化できた。ストレス応答の検出精度は解析手法ごとに異なっており、植物が有する生理特性を踏まえた解析の必要性が示唆された。また、スペックル変動を引き起こす具体的な生体内動態が明らかでないことも課題として挙げられた。
2. スペックル変動要因となる生体内動態を調査するため、環境変化やストレスによって動態を変化させる葉緑体に着目して、次の実験を実施した。対象として、葉緑体動態の観察を容易にするためオオカナダモを供試した。1つの試料に対してスペックル変動ならびに葉緑体動態の観察を同時刻で実施できる実験系を構築し、電気刺激によって葉緑体動態を抑制し、スペックル変動と葉緑体動態を比較した。解析では、テクスチャ解析をスペックル変動に適応させた手法を提案し用いた。結果、電気刺激直後には葉緑体動態が抑制され、スペックル変動は減衰し、電気刺激除去後は、葉緑体動態は回復し、スペックル変動もほぼ初期状態まで回復した。解析も葉緑体動態を反映する手法として適しており、その有用性が示された。以上より、葉緑体動態がスペックル変動の一因であることが示された。
3. 環境ストレスに対する植物生理応答の識別・評価可能性を調査するため、葉緑体の

応答特性を利用して塩分・水分ストレス検出の可否を検討した。塩分・水分ストレスの原因はそれぞれ浸透圧差による吸収阻害と水分不足による吸収不能であり、初期症状が類似する。塩分ストレスの場合のみ葉緑体が肥大化すると報告されているため、前項で示した葉緑体動態を反映するスペックル変動解析が適用できると着想した。実験では、塩分・水分ストレス処理時のスペックル変動の観察と共に、簡易植物生理指標として葉緑素計や葉面温度の計測を実施した。結果、ストレス処理区間でスペックル変動の解析値に差異が確認された。また葉肉部分で解析値に経時的な変化が確認された一方、葉脈部分では変化が確認されなかった。葉脈部は、水や光合成産物の輸送路として維管束が通り、構造上、葉肉部に比べ細胞が少ない。そのため、葉緑体の肥大化やその動態が葉脈部分に比べ葉肉部分で強く反映されたものと考えられた。簡易植物生理指標ではストレス処理に伴うクロロフィルの分解などを反映した結果が確認されたものの、その値の変化率に比べスペックル変動解析の変化率が顕著に大きく表れた。したがって、環境ストレスの識別・評価においてレーザスペックル法が有用であることが示唆された。

以上の成果より、本研究提案の葉緑体動態に着目したレーザスペックル法が、植物のストレス応答評価に有効であり、新たな植物センシング手法ならびに生理指標の提案の可能性を示した。今後、生育段階や植物種ごとに本手法の適用可能性を調査することで、栽培環境の精密な制御からストレスの積極的利用による高品質生産を実現するなど、一層のデータ駆動型農業の発展が期待される。

第1章 序論

1.1 データ駆動型農業における情報

従来の勘と経験に依存した農業スタイルから脱却するため、データに基づいて植物を栽培するデータ駆動型農業が望まれており、計測対象となるデータは栽培環境情報と植物体情報に大別できる。

栽培環境情報には、温度、湿度、土壌水分量、二酸化炭素濃度などが挙げられる。すでに温度上昇に応じた細霧冷房システムや水田の水管理を遠隔で自動制御する圃場水管理システムが開発されている（農林水産省，2021）。さらに、高濃度二酸化炭素処理による防虫処理（小山田，村井，2013）や二酸化炭素施用によるトマトの成長促進（高橋ら，2012）など、単なる栽培管理だけでなく高品質生産に取り組む例もある。

植物体情報には、光合成活性、呼吸速度、蒸散速度、SPAD (Soil Plant Analysis Development)、水ポテンシャルなどが挙げられる。光合成活性は計測前に一定時間植物を暗黒化に置くという制約はあるが、クロロフィル蛍光法によって間接的に計測できる（Omasa, Takayama, 2003）。呼吸速度および蒸散速度は代謝や光合成などの植物生理現象に関わる要素であり、前者は開放系もしくは閉鎖系における気体の出入りから、後者はヒートパルス法（山中ら，1985）やサーマルカメラによる熱画像解析（Inoue, 1990）から推定することができる。SPADはクロロフィル含有量と相関のある指標であり、葉緑素計により求めることができる。SPADの計測においては、葉を複数箇所、接触計測により求める必要があるが、クロロフィルが葉色を決める要因の一つであることから画像処理により非接触かつ簡便に計測する方法が報告されている（佐野ら，2017；Borhan et al., 2017）。水ポテンシャルは周辺環境および植物体内の水移動に関わる数値として水分ストレスの指標にも用いられ、圧チャンバ法（荒木，五島，1987）によって求めることができる。また上記のような旧来の計測は植物体の局所的情報が大半であったが、近年の情報処理技術の発達やセンサ精度の向上に伴って、非接触で対象を面的に計測できる画像診断法も提案されている。例えば画像処理による成長量の計測（鈴木ら，1990）、生体重の推定（Leister et al., 1999）、ハイパースペクトルカメラによる葉内物質の分布推定（Vigneau et al., 2011）などが挙げられる。

植物生理応答は遺伝子レベルから細胞・組織・個体レベルと様々なスケールで、かつ複合的に起こることから、単一の生理指標で植物の状態判断は困難である。複数の植物生体情報を取得して複合的観点から栽培管理を実施することで、さらなる栽培の高度化・効率化を目指す必要がある。

1.2 植物センシングに向けたレーザスペックル法の応用

本研究では植物体情報の取得・活用へ向けた新たなアプローチとして、レーザスペックル法に着目した。Fig. 1-1 にレーザスペックル法の原理図を、Fig. 1-2 に植物葉へ白色光照射時の画像を、Fig. 1-3 に同様の葉におけるスペックル画像を示す。一般に光が物体に照射され

ると、肉眼では確認できないマイクロな凹凸構造が存在するため照射光が乱反射・拡散する。光源がレーザーの場合、性質として光の直進性や単色性のみならずコヒーレント性（可干渉性）を有しているため、拡散された光がカメラなどの撮像素子上で干渉する結果、スペックルと呼称される明暗の斑点模様が形成される。さらに生体を対象とする場合、内部の光拡散粒子群の動態および動態に起因する表面構造の変化によってレーザー光路が変化するため、スペックルの明るさは変動することが知られている（スペックル変動）。すなわち、レーザースペックル法とはスペックル変動を解析することで、肉眼で確認できないようなマイクロな動態を非破壊・非侵襲で評価する手法である（山口，1977）。すでに医療の現場において、網膜上の血流計測（対馬ら，1991；Fujii et al., 1985；田村ら，2002）として人体のセンシングで活用されている。さらに工業分野では金属のひずみの分布計測（川崎ら，1986），地質学分野では地殻変動解析（平林ら，1993）や地震予知（竹本ら，1994）などにも応用されている。

植物体を対象とした例では、成長量計測（小林，山口，2008），水分ストレス計測（石澤ら，2009），PIV（Particle Image Velocimetry）計測（Soares et al., 2013）などが挙げられる。植物は、環境変化やストレスに対して複合的に生理応答を示すため、植物に対して本手法を適用した場合にはスペックル変動解析から複数の生理応答指標を提案できる可能性がある。特に植物の活動や応答は生命の基本単位である細胞を起点として発現するため、スペックル変動によりマイクロな細胞内動態の初期兆候の捉えることで影響が顕在化するよりも早期に対応できる。さらに本手法では画素ごとにスペックル変動の解析結果を色付けしたカラーマップ（Fig. 1-4）で表現し、葉面の部位による生理応答の違いを可視化できる。また先述の既存植物体情報は生理応答の結果として起こる内容分量や濃度の変化を計測している。一方、本手法は動態を捉える手法のため、複合的かつ特異的に起こる生体内動態を計測することで各種刺激に対応した生理指標の提案や、生理応答の先駆的現象である情報伝達物質や植物ホルモンの動態計測による極早期ストレス指標など、新たな植物体情報の提案が期待できる。さらに本手法はレーザーの可干渉性を利用した計測であるため、太陽光など外乱の影響が少なく、計測に係る制限が少ない。

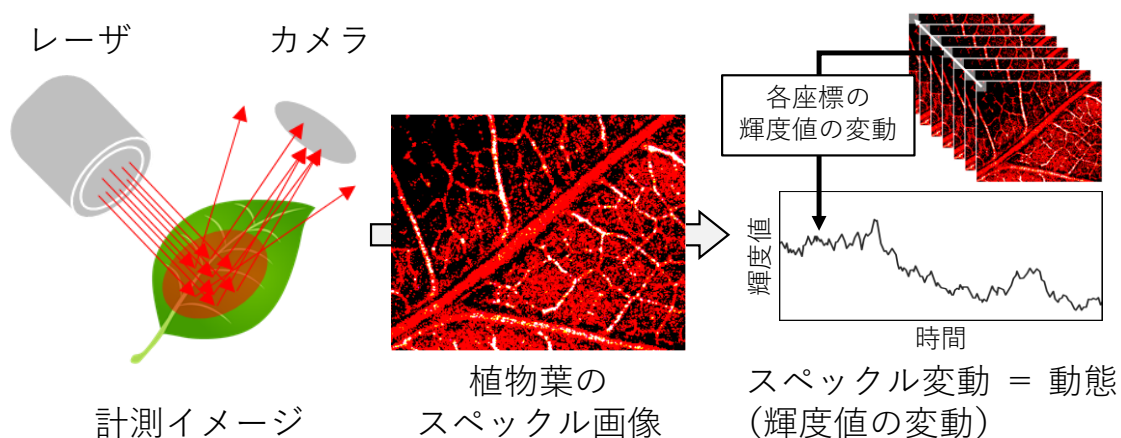


Fig. 1-1 レーザスペックル法の原理

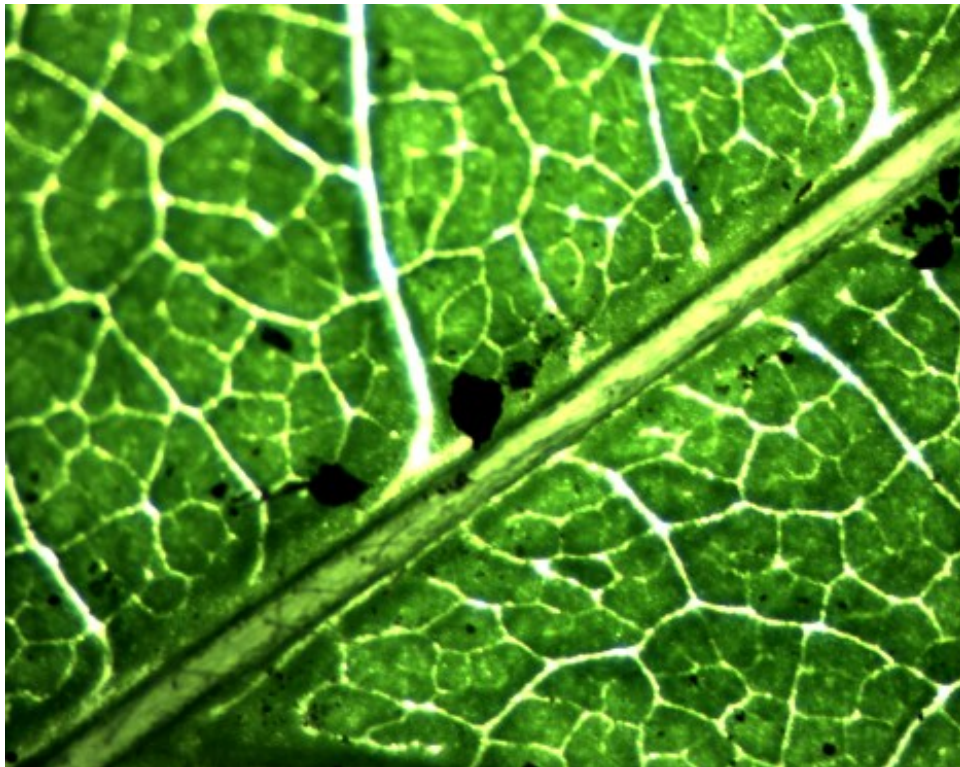


Fig. 1-2 白色光照射時の画像例

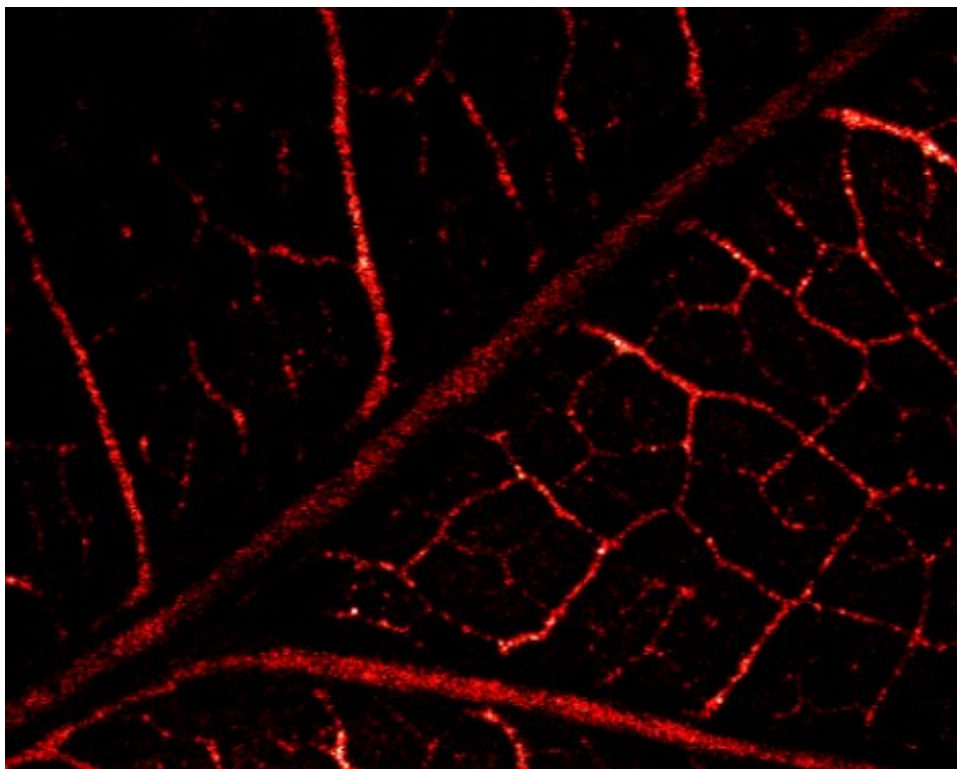


Fig. 1-3 スペックル画像例

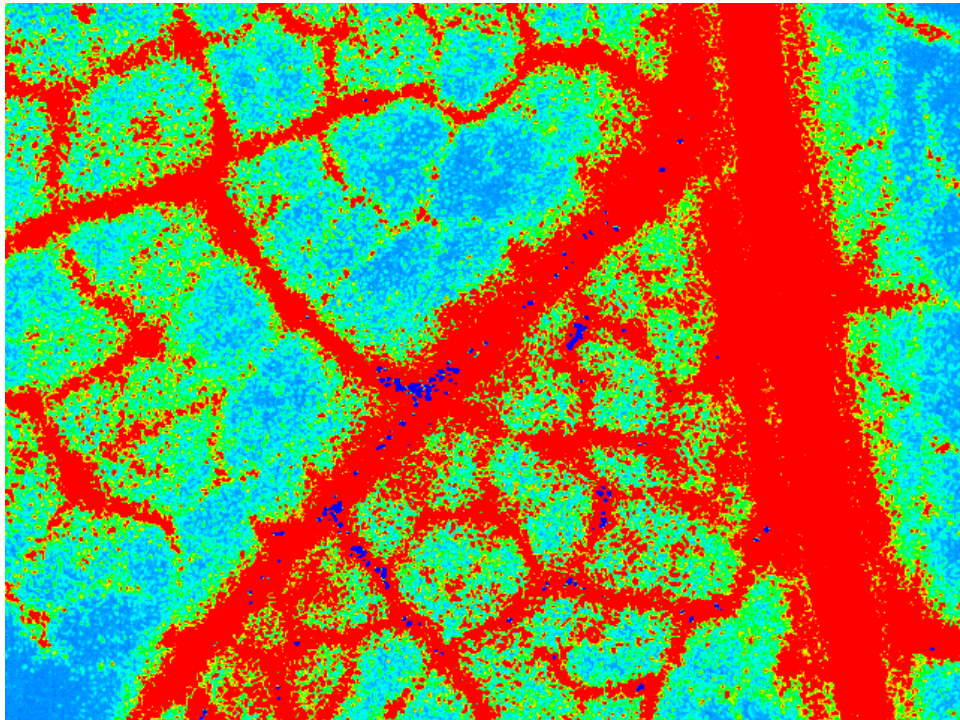


Fig. 1-4 カラーマップ例

1.3 研究目的

本研究の目的はレーザスペckル法による植物のストレス応答評価である。

第2章では、レーザスペckル法による早期ストレス検出の可能性を調査するため、ダイズ葉における水分ストレス応答の検出可否を検討した。さらに葉面の部位によるストレス応答の違いをカラーマップから考察した。第3章では、先行研究の課題であるスペckル変動を引き起こす動態の要因究明として、環境変化やストレスによって動態を変化させる葉緑体に着目し、スペckル変動との関係を調査した。対象として、葉緑体動態の観察を容易に実施できるオオカナダモを供試した。両者の関係を明瞭化する解析方法を提案したのち、ダイズを対象に提案手法の適用可能性を検証した。第4章では初期症状が共通しているため従来手法では識別が困難であった塩分・水分ストレスについて、葉緑体の生理応答特性を利用した識別・評価の可能性を調査した。以上の結果から、レーザスペckル法による植物センシングの可能性と検討事項および展望を第5章にまとめ、総括とした。

第2章 レーザスペックル法による水分ストレス検出

植物体に水分ストレスが発生すると、形態や色など物理的变化が顕著でない初期段階がまず観察され、その後クロロフィルの分解に伴う葉色の変化などが顕在化し、枯死に至る(石澤ら, 2009)。葉や根などの器官単位では、水分不足による吸水不能、気孔閉鎖および蒸散低下、光合成活性の低下などが起こる(山本, 渡部, 1982; Sheriff, Whitehead, 1984)。さらに維管束などの組織や細胞単位では、膨圧低下、アブシジン酸の合成促進、伸長成長の抑制、タンパク質を始めとした各種物質の生合成抑制、糖やアミノ酸などの適合溶質(高濃度に蓄積しても細胞毒性を呈さない溶質)の蓄積が報告されている(平沢, 2001; Begg, Turner, 1976; 吉里, 2012; 実岡, 2010)。

レーザスペックル法では、散乱粒子の動態、生体組織の変位、屈折率の変化などによってスペックル変動が生じるとされているため(石澤, 2009; 門野, 2004; Braga, 2005)、本実験においては、ストレスに伴う各種の動態抑制や、物質蓄積に起因する屈折率および細胞液粘性の変化などが反映されると推察される。

本章ではレーザスペックル法による早期ストレス検出を目的として、水分ストレスの検出可否を調査した。葉面は葉脈と葉肉に大別できるがそれぞれの持つ生理特性は異なるため、ストレス処理に伴うスペックル変動の変化をカラーマップにより葉の部位別に考察し、その後、解析手法による差異およびストレスの早期検出について考察した。

2.1 試料および実験環境

試料にはダイズ (*Glycine max* L., “フクユタカ”) を用い、プラグトレイ (セルボックス 16 穴, セル数: 16, セルサイズ: 62 mm × 62 mm, 明和株式会社) を用いて各個体が互いに干渉しないように間隔を空け栽培した。試料はまず人工気象室 (CFH-415, トミー工業株式会社) において、発芽・初期生育させた。人工気象室における栽培条件は、明期 13 時間 25°C, 暗期 11 時間 20°C とした。播種後 2 週間経過した後は、光量を確保するため実験まで屋外で育成した。実験に際して、葉色や形態などを目視で確認し状態の良い 2 個体を選定した。植物体は衝撃や急な温度変化に対する環境応答を示すため、対象個体は計測日の前日 7:00 に実験室内へ移動させ、実験環境に順応させた。

実験は三重大学機械実験棟内の暗室で実施され、試料はメタルハライドランプ (MF400DL/BUDP, 出力: 400 W, 岩倉電気株式会社) の下約 600 mm の場所に静置した。このとき計測位置の PPFD は約 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。実験室内は 7:00 から 19:00 を明期として照明 (蛍光灯, メタルハライドランプ) を点灯させ、室温は 25°C に保った。

2.2 計測装置およびスペックル画像取得

Fig. 2-1 に実験装置を示す。光源には半導体レーザー (LDU33, 波長: 635 nm, 出力: 4.4 mW, シグマ光機株式会社) を用いた。カメラは、メタルハライドランプからの熱でカメラノイズ

が発生するのを防ぐため、アルミホイルで覆い断熱に努めた。画像取得には、マクロズームレンズ (NS-IZ6N, エヌエスライティング株式会社) を装着した CMOS カメラ (k4, カトウ光研株式会社) を使用し、解像度 640×480 pixel, フレームレート 30 fps, 露光時間 $1/120$ s として 10 秒間撮影した。スペックル画像の取得では、レーザー光を試料に透過させる方法で実施した。Fig. 2-2 に示すように撮影範囲は主脈が中央を横断するように設定され、視野範囲は約 20×15 mm² であった。なお実験中に撮影位置がずれるのを防ぐため、3D プリンタで作成した ABS 樹脂製のオリジナル治具 (Fig. 2-3) で葉を固定した。治具の葉固定部はレーザー照射用の貫通口 (30 mm) を設け、さらにウレタンスポンジで被覆することで葉への負荷低減に努めた (Fig. 2-4)。また、実験中の試料状態を把握するため、葉緑素計 (SPAD-502plus, コニカミノルタ株式会社) を用いて SPAD を計測した。SPAD は測定面におけるクロロフィル濃度を非破壊的に推定でき (只木, 木下, 1988), 葉の光合成能力の間接的な指標となる。

一般に、光合成活性に代表される植物の生理活動は午前中に最大に達し午後には活性が低下することから、その活性推移を捉えるため、スペックル画像の取得は 7:00 から 19:00 まで 1 時間おきに実施し、2 日間継続した。各個体に対して、実験 1 日目の 9:00 の計測前に灌水、実験 2 日目の 7:00 の計測前に、葉を葉柄部分で切断することにより疑似的に水分ストレスを付加した。なお、2 個体の試料のうち、2017 年 9 月 13, 14 日に計測したものを個体 A、2017 年 9 月 15, 16 日に計測したものを個体 B とし、また計測 1 日目の計測を無処理区、計測 2 日目の計測を水分ストレス処理区とした。

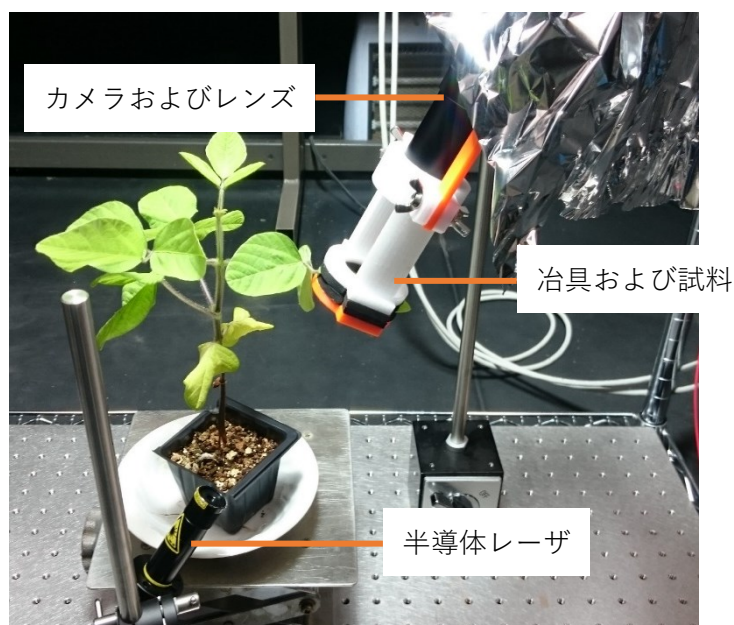


Fig. 2-1 実験装置

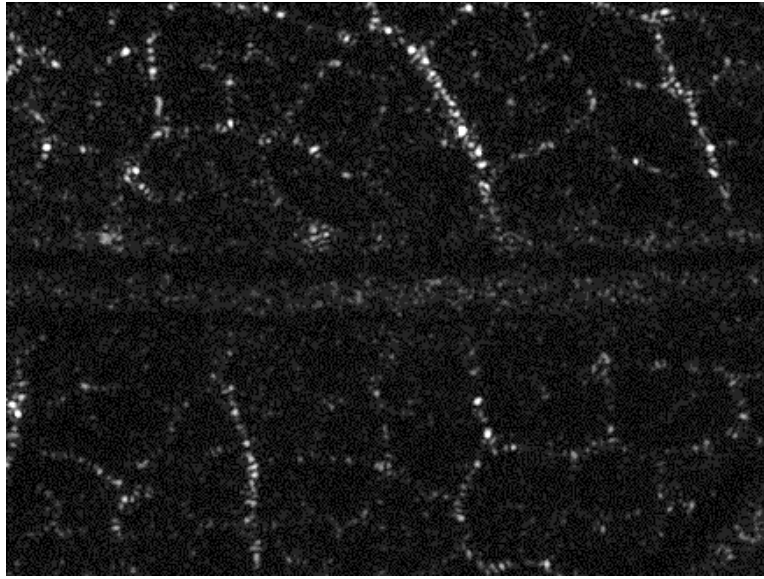


Fig. 2-2 撮影したスペックル画像例

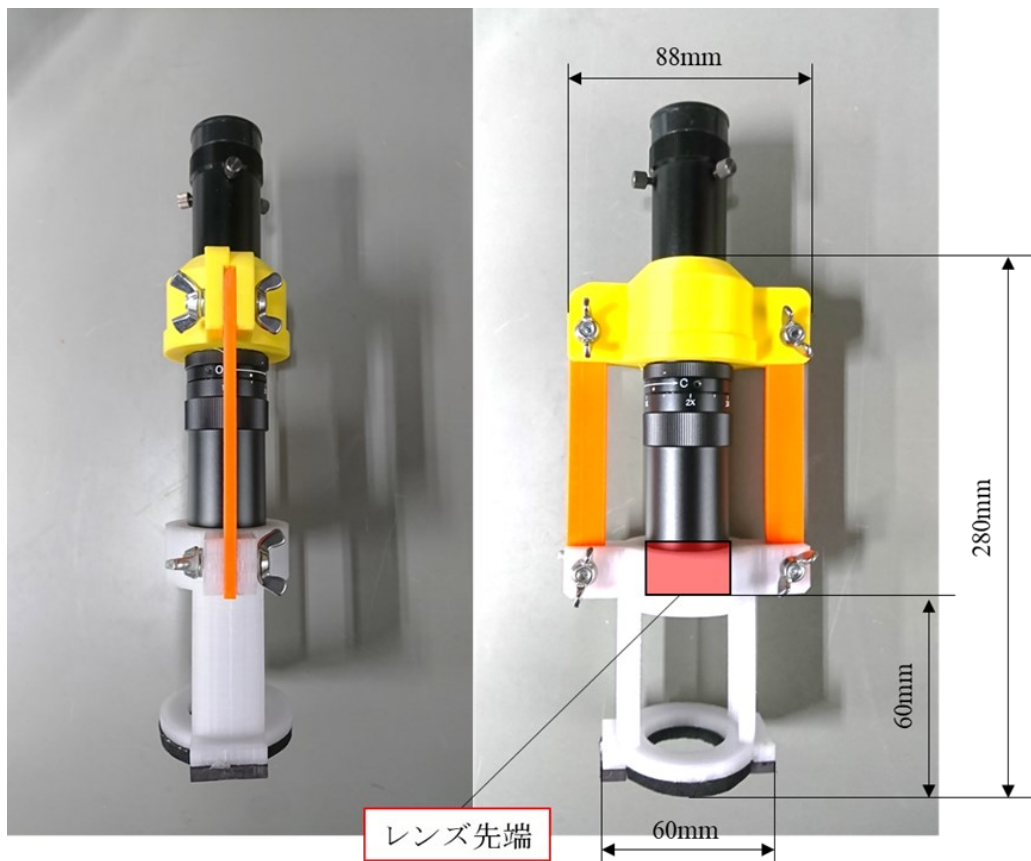


Fig. 2-3 レンズおよびオリジナル治具

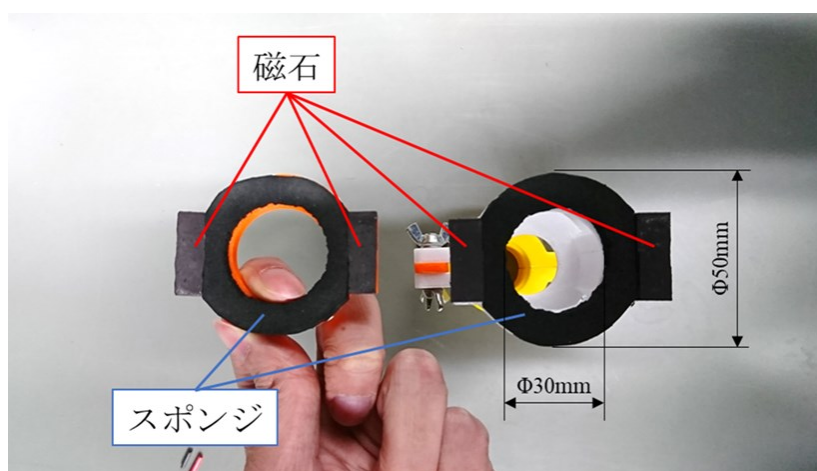


Fig. 2-4 葉固定部

2.3 解析方法

スペckル変動を解析するため、連続的に撮影したスペckル画像から各画素の輝度値を時系列順に取り出して解析した。変動の解析手法として本研究では Fujii method (FM) (Fujii et al., 1985) と Generalized difference method (GD) (Braga et al., 2005) を用いた。本研究ではいずれの解析法にも 300 枚のスペckル画像を供試した。スペckル変動は対象の動態に起因して発生し、FM, GD ともにスペckル変動が激しいほど解析値が上昇するため、両解析値は動態の活性指標として用いることができる。

FM は式 (1) で表され、レーザスペckル法による血流解析において実績がある。FM の特徴として、フレーム間差分法をベースにしており、解析速度が比較的早いことが挙げられる。また FM は連続した 2 枚の画像間で計算するため、1 フレーム間で変化の少ない動きは反映されにくい。すなわち FM は 1 フレーム間で変化を引き起こしやすい比較的早い動態が反映されやすい手法といえる。

$$FM(x, y) = \sum_k \left| \frac{I_k(x, y) - I_{k+1}(x, y)}{I_k(x, y) + I_{k+1}(x, y)} \right| \quad (1)$$

GD は式 (2) で表され、レーザスペckル法による種子の鮮度評価において実績がある。GD の特徴として、時間的な変動が大きい部分を明確に検出できることが挙げられる。また GD は計算に用いる 2 枚の画像のうち、 k 枚目の画像を固定し、以降の連続画像すべてと差分を算出する手法であるため、いずれのフレーム間の変化も同様に評価することができる。

$$GD(x, y) = \sum_k \sum_l |I_k(x, y) - I_{k+l}(x, y)| \quad (2)$$

なお k, l はそれぞれ 300 枚中何枚目の画像であるかを表す ($k = 1 \dots 300 - l, l = 1 \dots 300 - k$)。また (x, y) は画素の座標、 $I_k(x, y)$ は k 枚目の画素位置 (x, y) における輝度値を表す。

本研究では両手法とも、部位別に生理応答の差異を考察するためカラーマップを作製した後、式 (3) および (4) を用いてストレス検出の可否を検討するため全画素に亘る平均解

析値を算出した。

$$FM_{\text{avg}} = \sum_x \sum_y FM(x, y) \quad (3)$$

$$GD_{\text{avg}} = \sum_x \sum_y GD(x, y) \quad (4)$$

2.4 結果および考察

Fig. 2-5 および Fig. 2-6 にそれぞれに FM・GD によるカラーマップを示す。カラーマップにおいて、暖色の点は変動が大きく寒色の点は変動が小さいことを表す。無処理区では時間が経過しても解析結果は変化していないが、水分ストレス処理区では時間経過に伴い主脈を中心に変動が減衰した。FM, GD ともに同様の傾向がみられることより、両手法どちらの場合でも水分ストレスの検出が可能であると考えられる。植物は水分ストレスにより植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) を生産する (Begg, Turner, 1976)。加えて ABA は硝酸還元酵素活性の低下 (Fukutoku, 1996)、炭酸同化の抑制 (石原, 1997)、気孔の閉鎖と蒸散の抑制 (吉里, 2012) などを引き起こすことが知られており、これらによる生体活性の低下および動態の抑制がスペckル変動の減衰につながったと考えられる。他にも、葉柄切断による水分漏出で細胞液の濃度および粘性が上昇したことで、細胞内物質の動態が抑えられたことも一因に挙げられるものの、動態を捉えるレーザスペckル法においてスペckル変動に反映される具体的な動態は特定できなかった。

スペckル変動の減衰が葉面の部位によって異なっていた。植物体において葉柄内部には主脈となる維管束が存在している。葉柄を切断すると、切断面を境として植物-空気間で水ポテンシャルの勾配が発生し、水が切断面すなわち主脈から大気中へ流出する。加えて主脈は構造が比較的簡易で水分が流出しやすいため、側脈や葉肉細胞に比べて急激な水の流出が起こり、主脈を中心に変動が小さくなったと考えられる。

同じ葉脈に分類される主脈と側脈であるが、主脈の変動は減衰した一方、側脈の変動は維持されている部分が見られた。葉脈が網目状に張り巡らされた葉において、葉脈の一部に欠損が生じた場合、他の葉脈がバイパスして水や養分などを輸送することが知られており、この現象は主脈が欠損した場合にも同様に起こることが報告されている (佐藤ら, 2016)。さらに脈内に空気が流入すると脈が不活性化することも報告されている (古谷ら, 1972)。本実験においては主脈から水が流出するため、試料にとって主脈が欠損した状態に近くなり、かつ水が欠損した部分へ空気が流入する。そのため主脈は不活性化によって変動が減衰し、側脈はバイパス作用によって変動が維持されたと考えられる。

GD および FM の解析結果を比較すると、前者の方が主脈におけるスペckル変動の減衰をより明瞭に検出していた。フレーム間差分法をベースとする FM では k 枚目と $k+1$ 枚目間でのみ差分処理を行うため、1 フレーム間で変化の少ない変動は解析結果に反映されにくい。一方 GD は式 (2) に示すように、1 フレーム間で差分処理を行うため比較的low周波のスペckル

クル変動が結果に反映されやすい。生体に関するスペックル変動は低周波成分が強く（相津，朝倉，1990），さらに主脈における道管内の流速は最大でも20 $\mu\text{m}/\text{s}$ であること（越智ら，2016）や，細胞内の動きである葉緑体の環境応答時間は数分であること（瀧澤，2008）からも，植物体のスペックル変動も低周波のものが主であると推察される。そのため本実験ではFMと比較してGDによる解析がスペックル変動の減衰を反映しやすかったと考えられる。

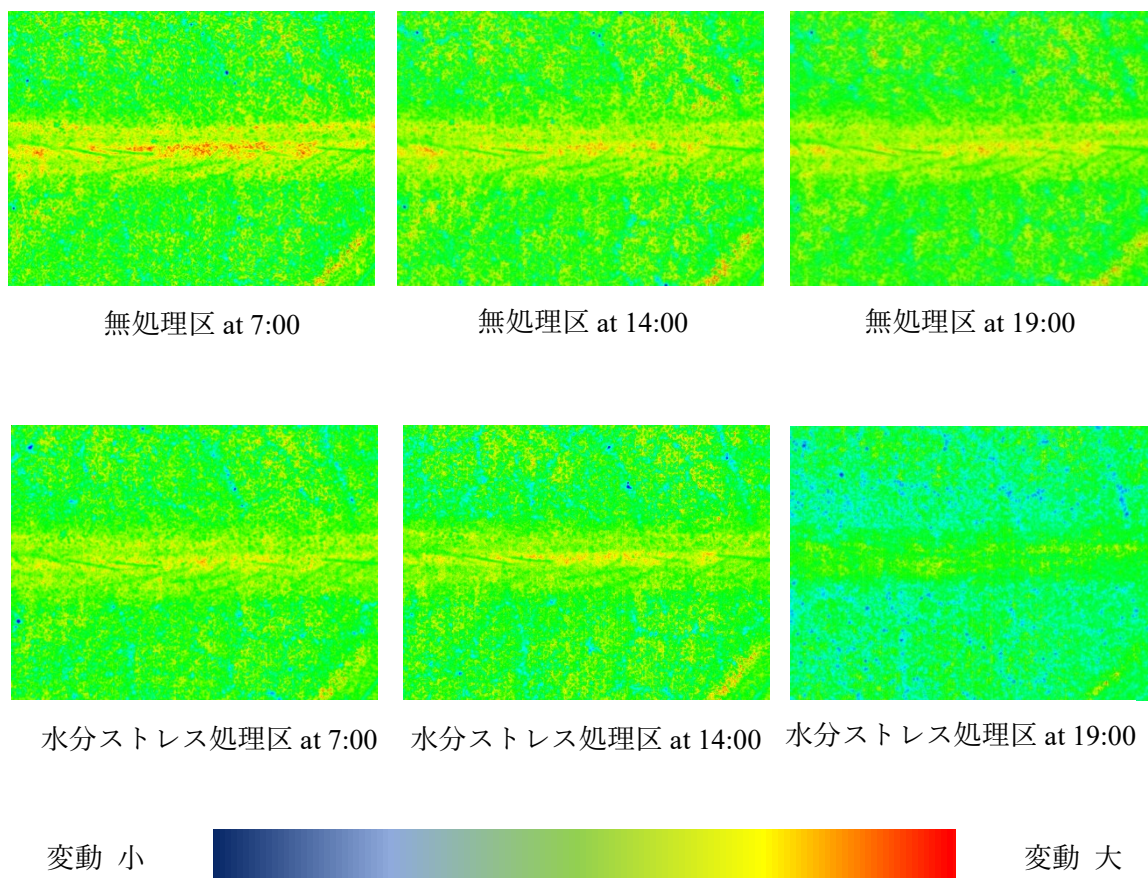


Fig. 2-5 FM 解析カラーマップ

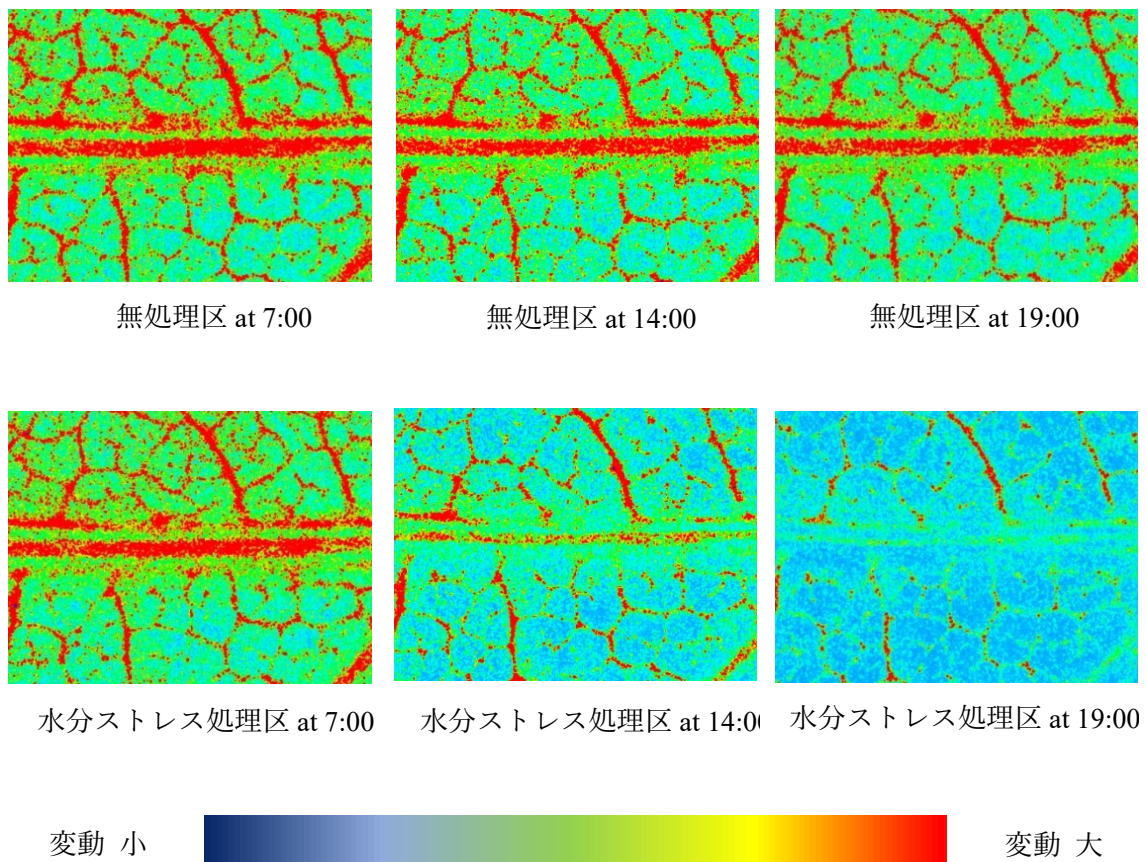


Fig. 2-6 GD 解析カラーマップ

Fig. 2-7 と Fig. 2-8 にそれぞれ FM・GD による各解析値の全面素に亘る平均値を示す。結果を定量評価するため、各計測時点の値を、各日 7:00 の値で除することにより規格化した。葉柄切断後、水分ストレスが増加すると FM、GD とともに解析数値が低下した。個体 A、B とともに同様の傾向を示した。目視ではあるが、Fig. 2-9 に示すような乾燥による萎凋が葉に確認されたのは切断 4 時間後であり、GD は水分ストレスが顕在化するよりも早期に水分ストレスを検出できたと言える。なお、切断 4 時間後の数値を実験開始時と比較すると、FM では 2%、GD では 30%数値が低下していた。

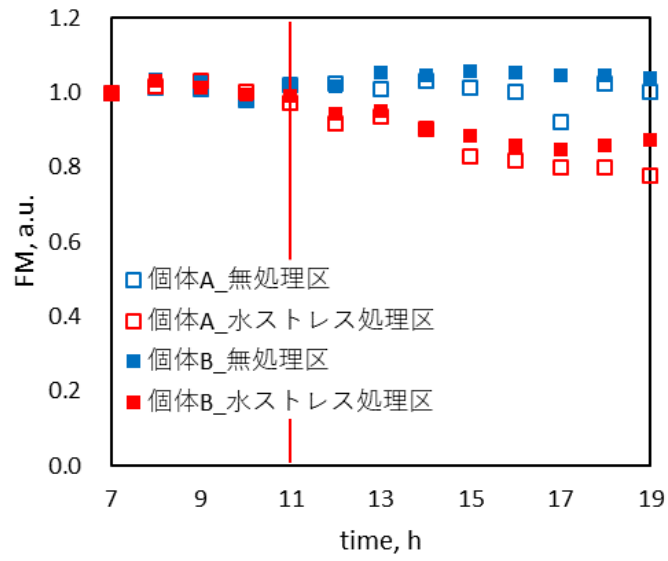


Fig. 2-7 水分ストレス処理の伴う FM 解析平均値の変化

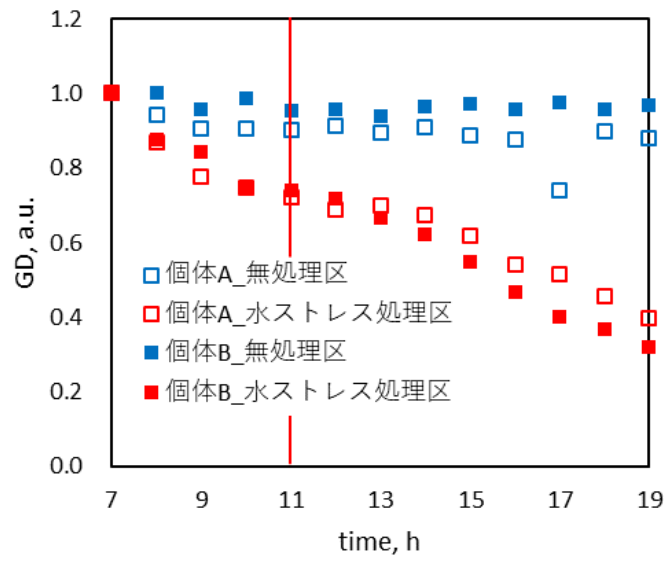


Fig. 2-8 水分ストレス処理に伴う GD 解析平均値の変化

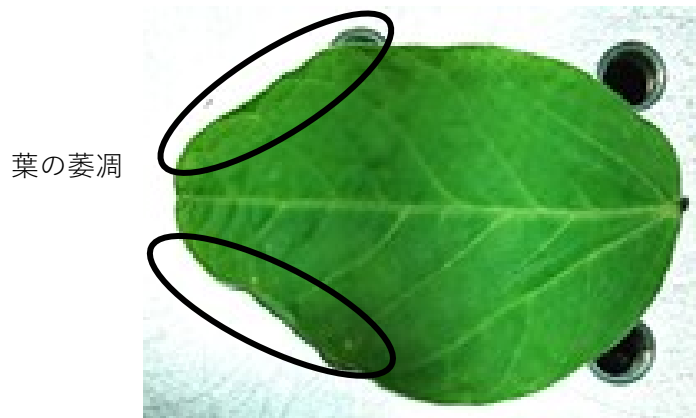


Fig. 2-9 乾燥による葉周辺部の萎凋

Fig. 2-10 に SPAD の計測結果を示す。Fig. 2-7, Fig. 2-8 と同様に、各計測時点の値を各日 7:00 の値で除することにより規格化した。ただし無処理区では全ての時間帯で計測できたが、水分ストレス処理区では葉の萎凋により実験途中から計測ができなかった。Fig. 2-10 の結果から、無処理区では SPAD に変化は生じなかったが、水分ストレス処理区では時間経過に伴って SPAD が上昇した。この原因として、葉および細胞間距離の収縮が考えられ、水分の欠乏によって萎凋が発生し葉緑素が凝縮されクロロフィル濃度が上昇した（小西，大政，2003；Kurahashi et al., 2001）と考えられる。Fig. 2-8 から、GD における解析数値は水分ストレス処理後 2 時間で 20%低下した一方、Fig. 2-10 に示すように、SPAD では水分ストレス処理後 4 時間（目視による萎凋確認と同時間帯）に値が 20%変化している。レーザスペックル法は前述のように水分ストレスに対する生理応答を捉えたと考えられるが、それら生理応答はストレスの影響を回避するために誘発されるものであるため、萎凋やクロロフィル濃度変化の顕在化よりも早期に生理応答が引き起こされる。これらのことからレーザスペックル法による計測が植物生理応答を検出するうえで有用な手法の一つである可能性が示された。

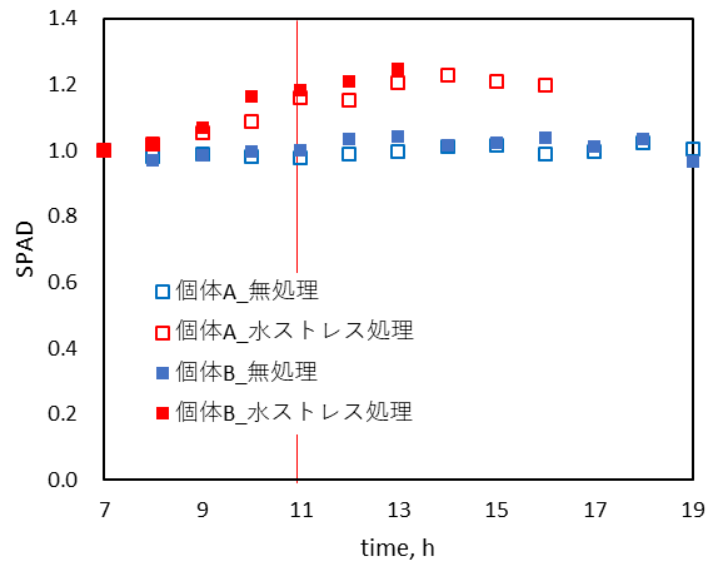


Fig. 2-10 水分ストレス処理に伴う SPAD の変化

2.5 まとめと展望

レーザスペックル法を用いて植物体のスペックル変動を解析すると、植物の水分ストレスを検出できることが判明した。スペックル変動の解析手法は、FM、GD いずれの場合でも検出することが可能であり、特に GD はストレス状態が葉に顕在化する前にストレス応答を検出できた。本稿では、水分ストレスを対象としたが、植物は各種刺激に対する生理応答が異なることが知られており、その応答特性を踏まえた解析の必要性が示唆された。今後は他の刺激に対する解析を実施し、かつ既往の植物体情報とスペックル変動の特徴量との関係を調査していく必要がある。またレーザスペックル法は動態を捉える手法である一方、水分ストレス応答としていずれの動態が反映されたのか不明であり、スペックル変動に関わる植物生体内動態は明らかにできていない。スペックル変動の発生要因を究明することで、動態の生理応答特性を利用したセンシングが実現できるだけでなく、種々の動態に関する情報を分離・抽出した複数の生理指標提案が期待できることから、具体的な動態の調査が求められる。

第3章 スペックル変動と葉緑体動態の関係調査

本章ではスペックル変動の要因となる植物生体内動態を明らかにすることを目的として、環境変化やストレスに応じて動態を変化させる葉緑体に着目し、スペックル変動と葉緑体動態の関係を調査した。葉緑体は原形質流動に従って受動的に流動する姿が顕微鏡によって観察されるだけでなく、その流動のエネルギー源は光合成によって生産される生体内エネルギー通貨 ATP であることから光合成と密接に関連する。さらに光条件によって細胞内の自己位置を変化させる光定位運動など、能動的かつ特異的で可逆な生理応答を見せる。葉緑体動態をレーザスペックル法によって非破壊で評価することができれば、細胞内における生理応答の初期兆候から症状顕在化前の栽培管理に応用できると考えられる。そこで本実験では、電気刺激によって葉緑体動態を抑制し、処理前後の状態と比較した。

3.1 葉緑体動態について

葉緑体動態および原形質流動は、1772年にイタリアの Bonaventura Corti によって発見された現象で、生きた植物細胞の外形が変わらずに内部で細胞質および細胞小器官（オルガネラ）が流動する現象である。流路とその向きによって、乱流動、循環型、周回、噴水型、多重軌跡型、往復型などに分類することができる（上坪, 1972）。また別の観点から、流動が絶えず行われているものと、光やアミノ酸などの各種刺激によって誘発される一過性のものの二群に分類することもできる（永井, 1999）。生理的意義として、細胞内における物質輸送を助けるために進化の過程で獲得したこと（新免ら, 1985）や大型化した細胞において物質輸送は拡散だけでは不十分であり輸送の補助を担っていること（菊山, 1995）などが報告されている。また、原形質流動の速度が植物体のサイズを決定する要因の一つであると示されている（Tominaga et al., 2013）。しかしながら植物体内でどのような役割を担っているのか本質的な解明には至っていない。

またストレス応答として、前述した光定位運動は強光ストレス下で葉緑体が垂直方向に整列することが知られている（笠原, 和田, 2003）。ほかにも、病原菌感染によって流動速度や流れ方が変化すること（永井, 1999；亀岡, 堀部, 1994）、病気の兆候として異形が確認されること（Ikeda, Ueda, 1964）などが報告されている。

3.1.1 刺激による葉緑体動態抑制のメカニズム

細胞内動態および葉緑体動態は光や薬品などによって動態が誘導される（富永ら, 1989）一方で、電気や物理的衝撃（Kikuyama, 1991）など各種刺激によって一時的に停止することが知られている。刺激による葉緑体動態抑制のメカニズムは以下の2点から考えることができる。

1. Ca イオンによる動態の制御

従前の研究では、細胞内に Ca イオンを注入すると葉緑体動態が抑制されたことや、逆に

Ca イオンを除去した場合、刺激しても動態の抑制は見られなかったことなどが報告されている（新免ら, 1985；菊山, 1995）。つまり、動態の制御は Ca イオンが担うと考えられている。

2. 刺激による濃度勾配の逆転

一般に、生物の細胞内外の生理的な環境、特にイオンや糖類などの物質は濃度勾配があり、細胞が持つ体内環境を一定に保つ機能（ホメオスタシス）によってその勾配は維持されている。代表的なものとして、Na イオンや Ca イオンは細胞外へ排出され、K イオンが細胞内へ誘引されることが知られている。さらに電気や物理的衝撃などの刺激によって濃度勾配が逆転し、Ca イオンが細胞内へ流入することが知られている（吉里, 2004）。

以上より、ホメオスタシスによって Ca イオンが細胞外へ取り除かれている場合、動態を観察することができ、刺激によって濃度勾配の逆転が起こり、Ca イオンが流入すると、動態の抑制が起こると推察される。

3.2 葉緑体動態とスペckル変動の関係調査

3.2.1 供試植物

通常の陸上植物は細胞が多層になっていることやクチクラ層および気孔の存在により、細胞および内部の葉緑体動態を観察することは難しい。そこで試料に、細胞が2層となっており気孔を有していないオオカナダモ（*Egeria densa*）を選択した。さらに本植物は被子植物に分類され（佐野, 2004）、細胞が持つ生理機能は陸上植物と近親的關係であると目算されることから、得られた実験結果が将来的な実地検証へ支障をきたしにくいと推察される。

オオカナダモはホームセンターで市販されているものを購入後、三重大学機械実験棟内の暗室において水槽で生育させた。生育条件として、水槽専用 LED 照明（4972547041586, ジェックス株式会社）を明期 12 時間、暗期 12 時間で制御した。水温制御は実施せず、エアコンによって室温を 25°C に保った。水槽内の水は水道水を用い、塩素やカルキなどの成分への対策として水槽用低床（水草一番サンド, ジェックス株式会社）を用いた。また生育用の液体肥料（sera フロレナ, 株式会社セラジャパン）を週に 1 度施肥した。さらに、エアレーションのため水槽内にはフィルタ付きエアポンプ（吐出量：1000cc/min）を設置した。実験に供試する葉は、伸長成長などが盛んなシュート上部における葉を無作為に選択・単離し、プレパラートを作成した。なお葉緑体動態は葉の単離に伴う刺激の影響で一時的に停止することが知られているため、プレパラート作成後 PFD 約 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下に 15 分程度静置し、目視による流動再開の確認を以て単離に伴う刺激の影響除去と判断した。

3.2.2 実験方法

スペckル変動と葉緑体動態の関係を明らかにするため、同一サンプルに対して細胞観察とスペckル画像撮影が同時刻に実施できる実験系を構築し、抑制前後でのスペckル変動の差異を調査した。Fig. 3-1 と Fig. 3-2 にそれぞれ実験装置の概略図と実験手順を示す。

計測は1サンプルにつき計7回行っており、各計測で細胞観察・スペックル画像計測を順に実施した。計測間に30秒間のインターバルを設け、電気刺激は3回目の計測直後のインターバル中に電圧30Vを30秒間印加した。電圧決定に際して、予備実験で24V印加の条件も試行したが、60分間印加し続けても葉緑体動態は停止しなかったため、印加装置の最大電圧である30Vとした。電気刺激の印加には、Fig. 3-3に示すような両端にアルミホイルを巻き付けた自作のライドガラスを用いた。電圧印加装置には直流安定化電源（CPS-3025L，出力電圧：0～30V，株式会社カスタム）を用いた。なおサンプルサイズは5とした。

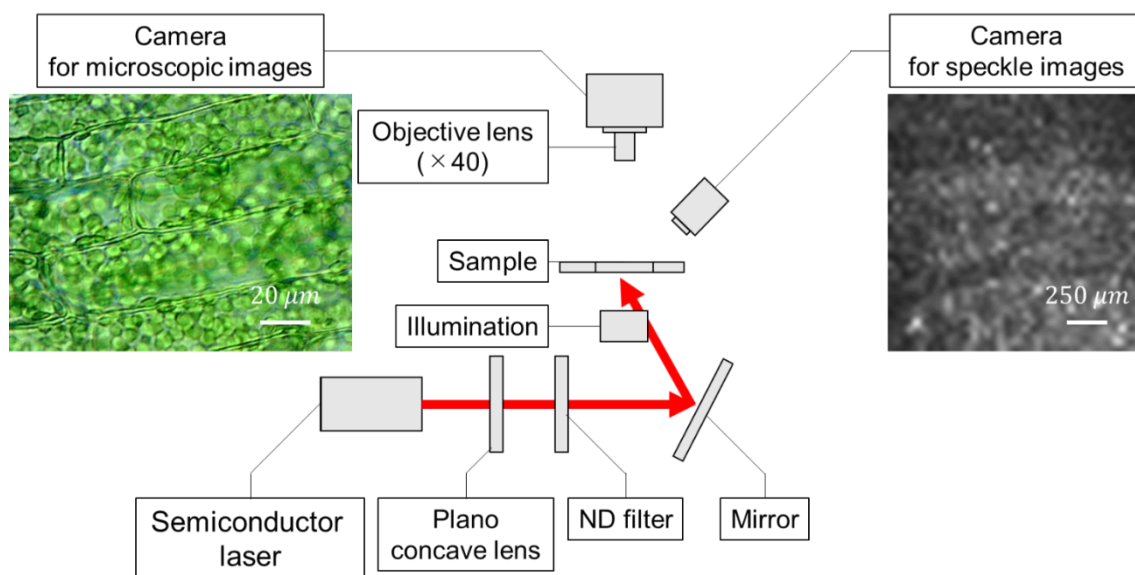


Fig. 3-1 計測システム（概略図）

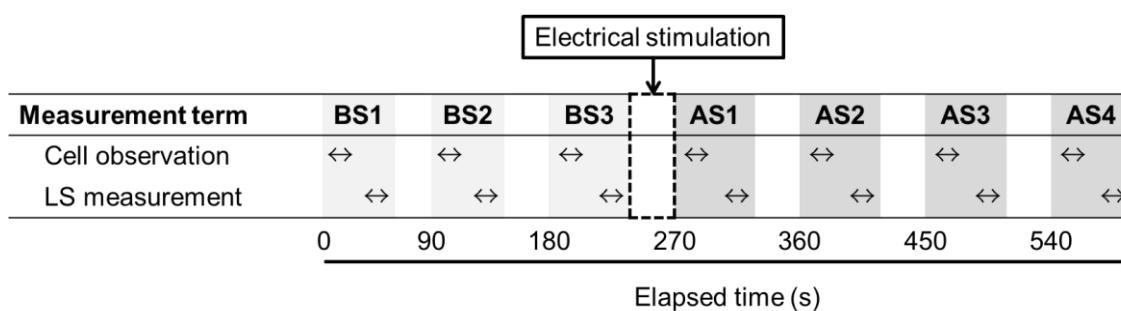


Fig. 3-2 実験手順

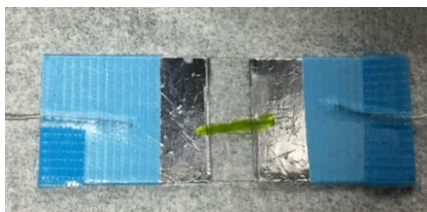


Fig. 3-3 電気刺激印加用の自作スライドガラス

細胞観察には Fig. 3-4 に示す CMOS カメラ (ARTCAM-130SN2, 株式会社アートレイ) を装着した顕微鏡 (ECLIPSE E100, 株式会社ニコン) を用いた. Fig. 3-5 に示すような RGB 画像を, 解像度 640×480 pixel, フレームレート 1 fps の撮影条件において 30 秒間の連続撮影により取得した. 露光時間やホワイトバランスなどその他の設定は撮影ソフトウェア ArtViewer (ARTRAY Co., Ltd) によりオートとした. スペックル画像取得時を除き, 顕微鏡付属のハロゲンライトから PPFD 約 $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を常に照射した.

Fig. 3-6 に示すようなスペックル画像を, CCD カメラ (DCU223M, Thorlabs Inc.) と半導体レーザー (LDU33, 波長: 635 nm, 出力: 4.4 mW, シグマ光機株式会社) を用いて取得した. スペックル画像取得に際してハレーションを避けるため, レーザ光は ND フィルタ (AND-10C-50, 透過率: 50%, シグマ光機株式会社) を用いて減光した. またレーザー照射径を拡大するため球面平凹レンズ (外径: $\phi 30$ mm, 焦点距離: -35 mm) を用いたのち, 反射鏡によって試料全体に照射した. 画像は, 解像度 1280×1024 pixel, フレームレート 5 fps, 露光時間 200 ms の撮影条件において 30 秒間の連続撮影によりモノクロ画像で取得し, 解析には試料のみが映り込むようにトリミング (40×40 pixel) した画像を用いた.



Fig. 3-4 細胞観察に用いた光学顕微鏡

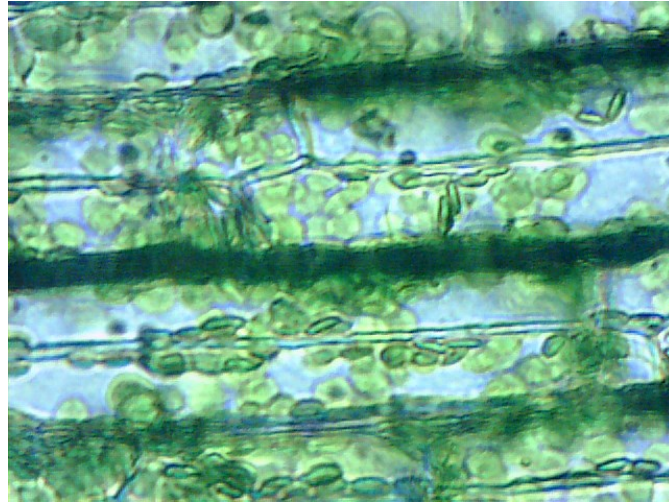


Fig. 3-5 細胞観察画像例

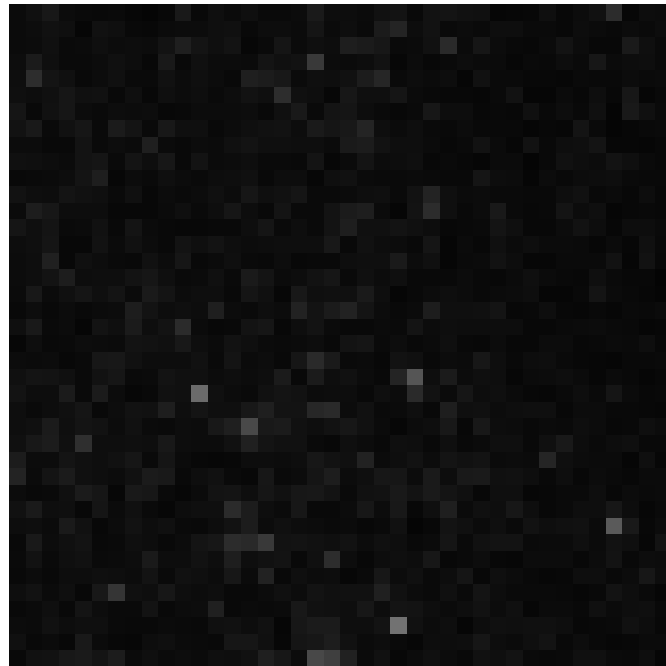


Fig. 3-6 スペックル画像例

3.2.3 解析方法

細胞観察画像の解析について、本研究では個々の葉緑体における移動量や変位量ではなく、細胞内全体における葉緑体の活性度を評価するため、Mineyuki (1983) を参考に輝度値の変動係数 (CV) を算出した。式 (5) に CV の計算式を示す。

$$CV = \frac{\sigma_t(x,y)}{\bar{I}_t(x,y)} \quad (5)$$

ここで、 (x,y) は画素位置を、 $\sigma_t(x,y)$ は位置 (x,y) における輝度の時間変動の標準偏差を、

$\bar{I}_t(x, y)$ は (x, y) における時間平均輝度を表す。葉緑体動態が激しく輝度値が頻繁に変化すると $\sigma(x, y)$ が大きくなるため、CVは上昇する。逆に動態が穏やかな場合は標準偏差が小さくなるためCVが小さくなり、細胞内の動態を定量評価できる。なお解析に際して、RGB値に対してそれぞれ0.299, 0.587, 0.114の係数を乗算することで、取得したRGB画像をモノクロ変換した。

スペックル画像の解析には第2章と同様にFMとGDを適用した。試料であるオオカナダモはダイズ等に比べて葉構造が単純であるためカラーマップは作成せず、2.3に示した式(3)および(4)を用いて平均解析値を算出した。

3.2.4 統計解析

電気刺激前後における経過時間を水準として、葉緑体動態の抑制およびスペックル変動の変化を比較するため、有意水準10%で統計解析を実施した。本実験において、電気刺激前後で1つの試料を計測・比較しているが、サンプルサイズが5で正規性を担保できないため、対応ありのノンパラメトリック検定の一つであるBonferroni testを選択した。解析はPython (ver. 3.9.12)を用いてstatsmodels (ver. 0.13.2)を用いて実行した。

3.2.5 結果および考察

Fig. 3-7に電気刺激印加時のCVの変化を、Fig. 3-8に無刺激時のCVの変化を示す。図中の帯は電気刺激時点を示す。なお、各時間における値は実験開始時点の値で除することにより規格化した。

刺激前の3回の計測においてCVに変化は確認されなかった。刺激後には統計的有意に値が減少しており、従前の報告(Tazawa, Kishimoto, 1968)と一致した。カメラの電氣的なノイズの影響に関して、カメラのみを暗所に静置した際のCVはBS1との相対値で0.001であり、本実験においては無視できる程度であると考えられる。目視の観察ではあるが、刺激直後のAS1において葉緑体は完全に停止しておらず、画像輝度値の変動が引き起こされたため、CVは0とならなかった。無刺激の場合、顕微鏡付属のハロゲンライトが光量不足だったため、CVが減少傾向にあったものの、統計的有意な変化は確認されなかった。(葉緑体動態および原形質流動は暗黒中で停止するとされている(高木, 2012))電気刺激によるCVの低下と比較しても無刺激時の値の低下は小さかった。Table 3-1にオルガネラのサイズを示す。CVに対する他のオルガネラの影響として、本実験における細胞観察画像の空間分解能は $0.22 \mu\text{m}/\text{pixel}$ であったことから、核とミトコンドリアを除くnmオーダーのオルガネラはCVに対する影響が小さいと判断できる。また一般に、核の数は葉緑体に比べて少なく、ミトコンドリアは葉緑体と比較して1オーダー小さい。さらに染色を実施していないことから、細胞観察画像には葉緑体や静的な構造物である細胞壁が主として撮影された。以上から、CVの変化は葉緑体動態の変化が反映されていると考えられ、細胞観察画像におけるCV解析によって葉緑体動態を評価できた。なお、電気刺激後は時間経過とともにCVの上昇、す

なわち葉緑体動態の回復が確認された。葉緑体動態および原形質流動は死細胞で観察されないことが知られているため、本実験における電圧印加条件は試料に対して過剰な刺激でなく、細胞が生理的な機能を失っていないと判断できる。

Fig. 3-9 と Fig. 3-10 に FM および GD の解析結果を示す。なお、図中の帯は電気刺激時点を示す。両解析結果において、刺激前の変化は確認されず、刺激後の解析値の統計的有意な減少およびその後の回復も共通していた。本実験において、電気刺激によって葉緑体動態が抑制され、レーザ拡散が起りづらくなったことで、スペックル変動が減衰したと考えられる。スペックル変動に対する葉緑体以外の動態について、従前の報告 (Braga et al., 2009) では、ミトコンドリアや核など他の細胞小器官が該当するとされているものの、前述のように、細胞内に存在する粒子において葉緑体は最大かつ多数存在するため、スペックル変動を引き起こすレーザ拡散・干渉条件の変化は、葉緑体動態に起因する幾何学的拡散が最も大きな要因であると考えられる。また電気刺激に伴って葉緑体の生理機能が低下している可能性もあるが、レーザスペックル法は原形質流動ならびに葉緑体動態などの動きを検出する手法であるため、本結果に対する生理的な変化は反映されにくいと考えられる。葉緑体の環境応答時間は数分であること (瀧澤, 2008) も、仮に光合成機能が損傷して ATP 生産が停止していても、本実験の計測時間が 30 秒であることから ATP は枯渇しておらず葉緑体動態の抑制には影響が少ないと考えられる。一方、CV と FM および GD で値の低下率に着目すると、CV ではすべてのサンプルで 20%以上値が低下したが、FM・GD では最大でも 20%までしか低下しなかった。前者は細胞観察画像における輝度の時間輝度変動を計算するため大部分の葉緑体が停止していれば解析値は低下しやすい。後者は対象となる物体 (葉緑体) の動態によってレーザ光路が変化するとスペックル変動が生じる。本実験では、大部分の葉緑体は停止していたが、わずかな葉緑体動態によってスペックル変動が生じたことから、FM と GD は減少しづらかったと考えられる。さらに解析手法の特性に関して、連続するフレーム間の輝度値差分を計算する FM は血流計測で実績がある (Fujii et al., 1985)。血流計測分野において、血流の増加と共にスペックル変動の高周波数成分 (約 370 Hz) が増加すること (Ruth, 1986) が報告されており、FM は高周波数のスペックル変動を評価するのに適すると考えられる。GD の計算は $I_k(x,y)$ と $I_{k+l}(x,y)$ 間で計算され、 l の範囲は $k < l \leq 299$ であるため、GD は FM に反映されやすい高周波数の変動も含めて計算される。生体におけるスペックル変動の周波数は血流に比べてはるかに低く (会津, 朝倉, 1990)、最大でも 6 Hz 程度であることが報告されている (Cardoso et al., 2011)。したがって植物体に対する解析手法として FM ならびに GD が不適であったため、解析値が低下しづらかった可能性が考えられる。以上から、刺激に対する葉緑体動態を適切に評価するには、完全停止しないわずかな葉緑体動態の影響や、植物体および葉緑体動態の有する低周波数成分を考慮したスペックル変動解析手法が望まれる。

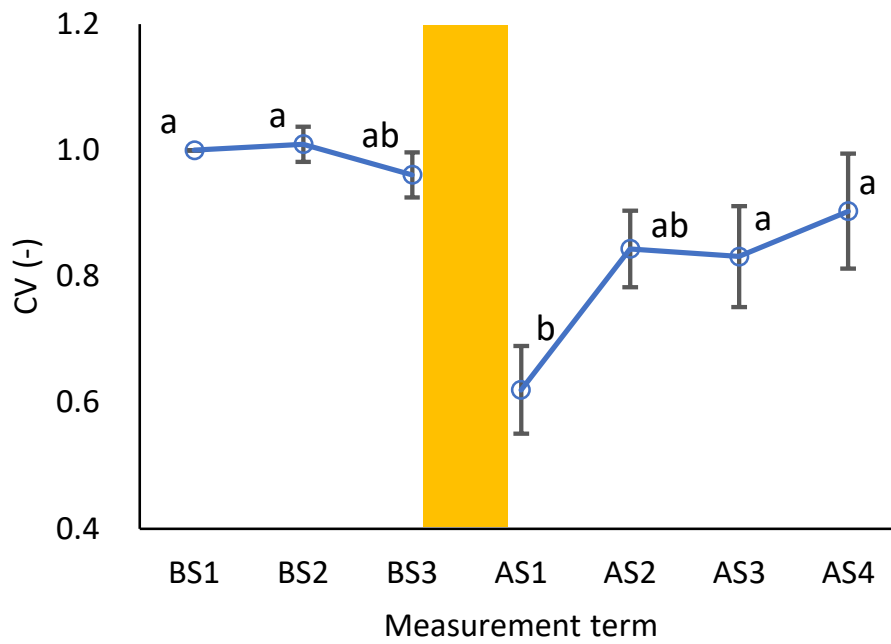


Fig. 3-7 電気刺激印加時の細胞観察画像における CV の変化

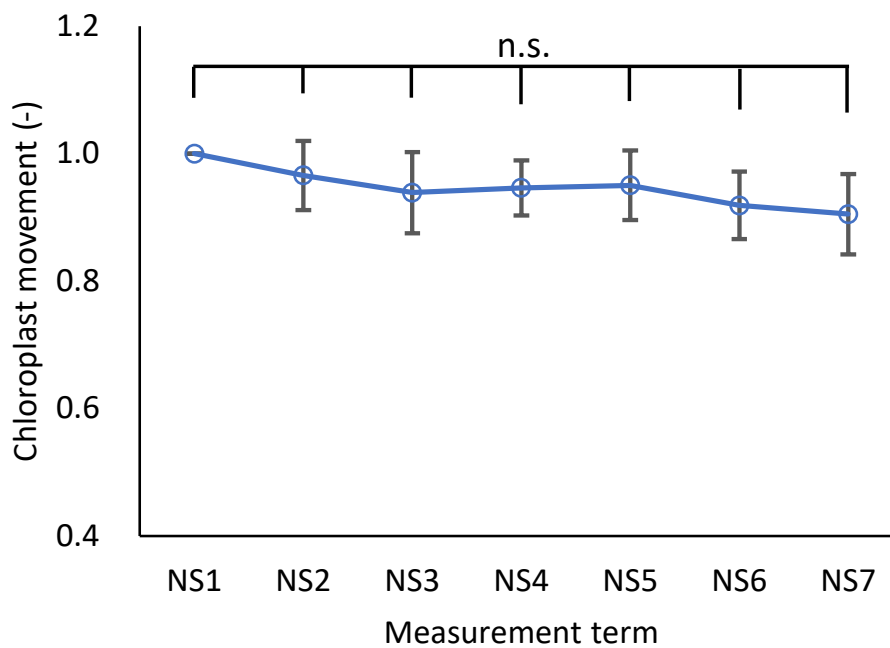


Fig. 3-8 無刺激時の細胞観察画像における CV の変化

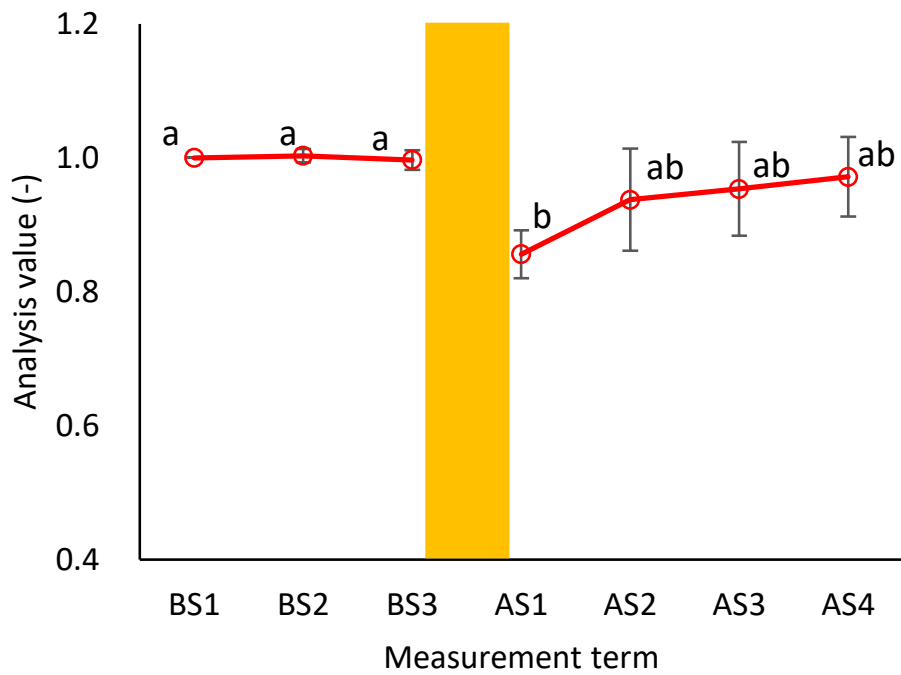


Fig. 3-9 電気刺激印加時のスペックル画像における FM の変化

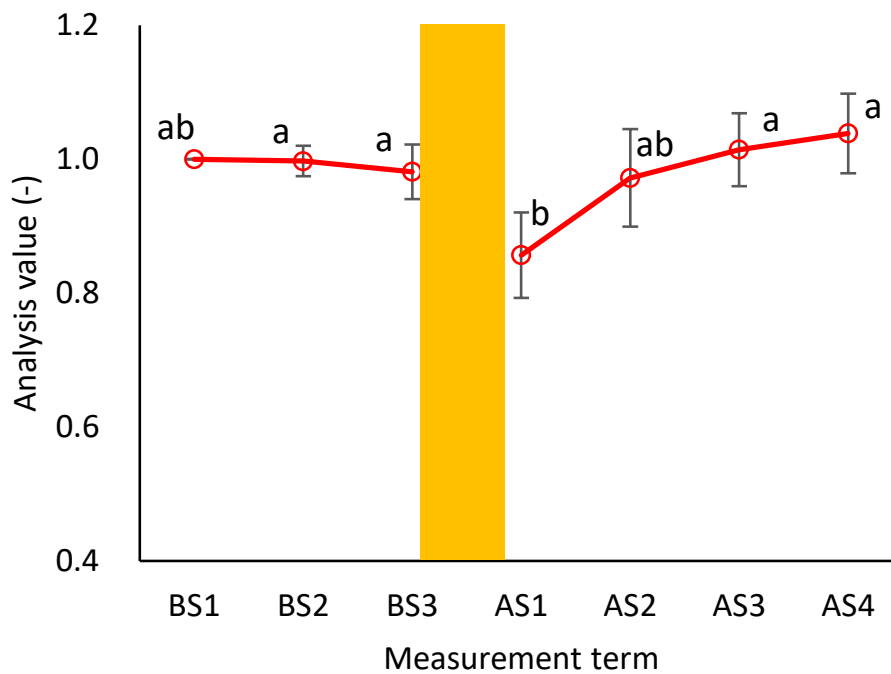


Fig. 3-10 電気刺激印加時のスペックル画像における GD の変化

Table 3-1 主な細胞内小器官および細胞内物質

名称	サイズ
細胞	20 × 40 μm
葉緑体	5 μm
核	3- 10 μm
ミトコンドリア	0.5 μm
リボソーム	30 nm
酵素タンパク質	3- 10 nm
アミノ酸	1 nm
スクロース	1 nm以下
ATP (アデノシン三リン酸)	15- 30 nm

3.3 葉緑体動態の把握に適した解析方法の検討

前節から、植物を対象としたレーザスペックル法において、葉緑体動態に対する解析手法の不適性が示唆された。FM や GD は活性指標として用いることができ動態が盛んなときは値が上昇するが、動態が穏やかになっても原理的にスペックル変動が発生しやすいため解析値は減少しづらい。さらに画像取得時の電氣的ノイズによる輝度値の変動も解析値に反映されやすいという課題も挙げられる。そこでストレスに伴う植物生体内動態の変化を捉えやすい解析手法を検討する必要がある。本節ではスペックルが斑点模様であることから着想し、テクスチャ解析の一つであるランレングス行列解析を 3.2 と同様のデータへ適用し、FM および GD の結果と比較する。

3.3.1 解析方法

スペックル変動解析手法としてランレングス行列解析を適用した。本解析手法において、同様の輝度値が特定の方向に連続する輝度の集合をランと呼び、その長さをランレングスと呼ぶ。本研究では、連続画像群中の同位置のピクセルに着目し、時間的に連続する輝度の集合をランとした。

ランレングス行列は輝度値 f とランレングス l に基づいてランの発生頻度をカウントした行列である。Fig. 3-11 に解析手順を示す。まずノイズ等に由来するわずかな輝度値の変動を除去するため、スペックル画像の輝度階調を 256 段階から 32 段階に変更した。次に連続画像群から抽出した同一列を用いて、Time-History Speckle Patterns (THSP) 画像 (Oulamara et al., 1989) を作成した。そして THSP 画像の水平方向でランをカウントしランレングス行列を作成した。最後に、ランレングス行列の要素 $M(f, l)$ を用いて、以下の 5 つの特徴量を算出した。

$$L1 = \frac{\sum_f \sum_l \{M(f, l)/l^2\}}{\sum_f \sum_l M(f, l)} \quad (6)$$

$$L2 = \frac{\sum_f \sum_l \{M(f, l) \times l^2\}}{\sum_f \sum_l M(f, l)} \quad (7)$$

$$L3 = \frac{\sum_f \{\sum_l M(f, l)\}^2}{\sum_f \sum_l M(f, l)} \quad (8)$$

$$L4 = \frac{\sum_l \{\sum_f M(f, l)\}^2}{\sum_f \sum_l M(f, l)} \quad (9)$$

$$L5 = \frac{\sum_f \sum_l M(f, l)}{A} \quad (10)$$

ここで、 f はランレングス行列の行、 l はランレングス行列の列、 $M(f, l)$ はランレングス行列の要素、 A はTHSP (40 × 150 pixel) の全画素数である。またL1からL5はそれぞれ短いランレングスの指標、長いランレングスの指標、ラン輝度の不均一性の指標、ランレングスの不均一性の指標、ランの総数の指標である。

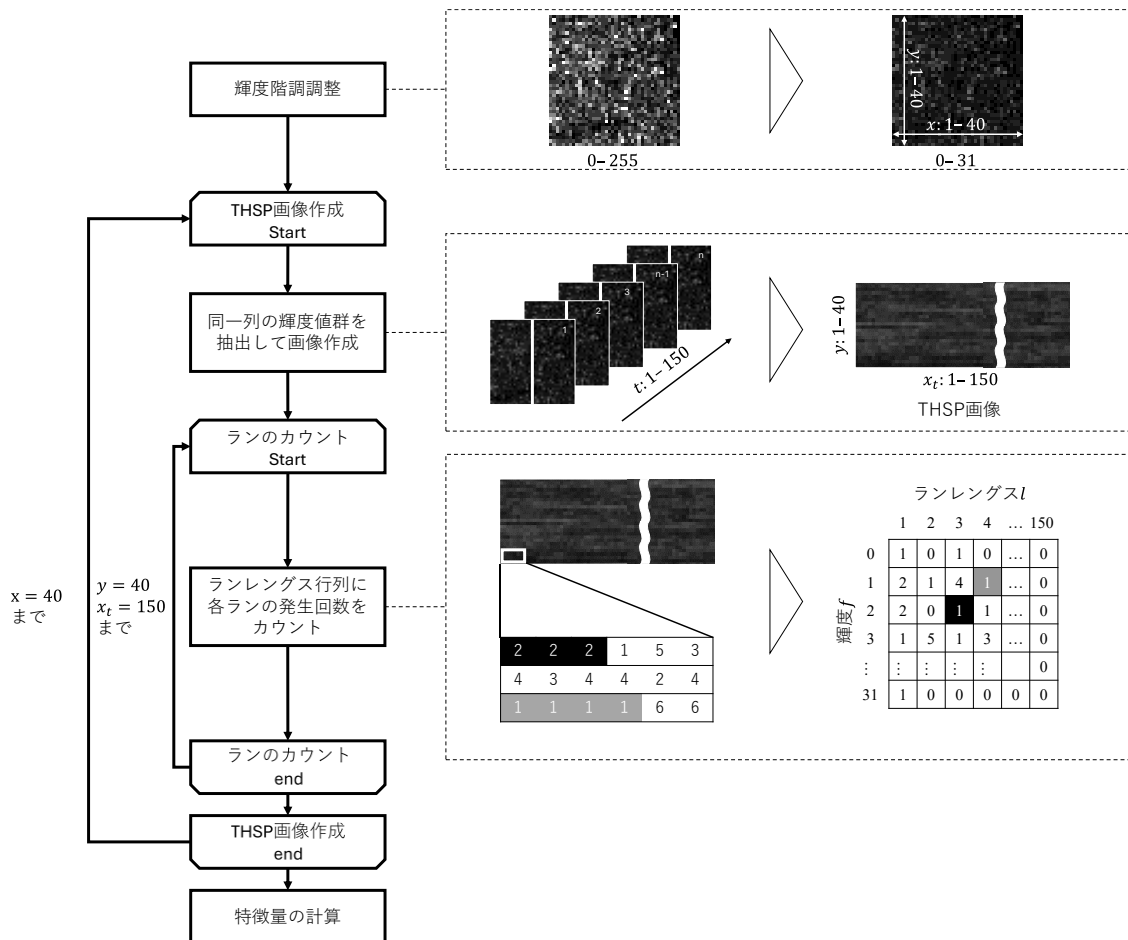


Fig. 3-11 ランレングス行列の解析手順

3.3.2 統計解析

電気刺激前後における経過時間を水準として、葉緑体動態の抑制およびスペックル変動の変化を比較するため、有意水準 10%で統計解析を実施した。本実験において、電気刺激前後で 1 つの試料を計測・比較しているが、サンプルサイズが 5 で正規性を担保できないため、対応ありのノンパラメトリック検定の一つである Bonferroni test を選択した。解析は Python (ver. 3.9.12) を用いて statsmodels (ver. 0.13.2) を用いて実行した。

3.3.3 結果および考察

Fig. 3-12 から Fig. 3-16 にランレングス行列解析によって算出した特徴量の変化を示す。図中の帯は電気刺激時点を示す。なお、各時間における値は実験開始時点の値で除することにより規格化した。電気刺激前においていずれの特徴量にも経時的な変化は確認されなかった。刺激直後では、値の増加もしくは減少が確認され、その後徐々に初期値と同程度に回復した。

L1 および L2 はそれぞれ短いランと長いランの指標である。一般に、スペックル変動が発生して輝度値が変動する場合、輝度の時間的な連続性は低くなるためランは短くなりやすい。逆にスペックル変動が穏やかで輝度値が変動しづらい場合、ラン同士が同じ輝度値を有することでランは長くなりやすい。本実験において、電気刺激の前は葉緑体動態が活発だったため短いランが多く、長いランは少なかったが、刺激直後は葉緑体動態が抑制されたことで短いランが減り、長いランは増えたと考えられる。実際に、 $l = 1-74$ を短いラン、 $l = 75-150$ を長いランとしてそれぞれの数をカウントすると、前者は BS1 と AS1 でそれぞれ 101977 個、82903 個と減少しており、後者は 4 個、38 個と増加している。さらに本実験では、初期値に対する相対値を示したため、値の変化率は初期の数に影響される。そのため、L1 は初期の短いランが多かったため変化しづらく、L2 は初期の長いランの数が少なかったため、変化率に差が生じたと考えられる。また細胞観察の結果から、刺激印加によって抑制された後も葉緑体動態は完全に停止しなかったことで、レーザ光路の変化およびスペックル変動が生じ、短いランの総数は減少しづらかったと考えられる。以上から、L1 は電気刺激が印加されても完全には停止しない葉緑体動態による短いランの存在が反映され、L2 は葉緑体動態の抑制によって短いラン同士が結合し、長いランが発生したことが反映されていると考えられる。

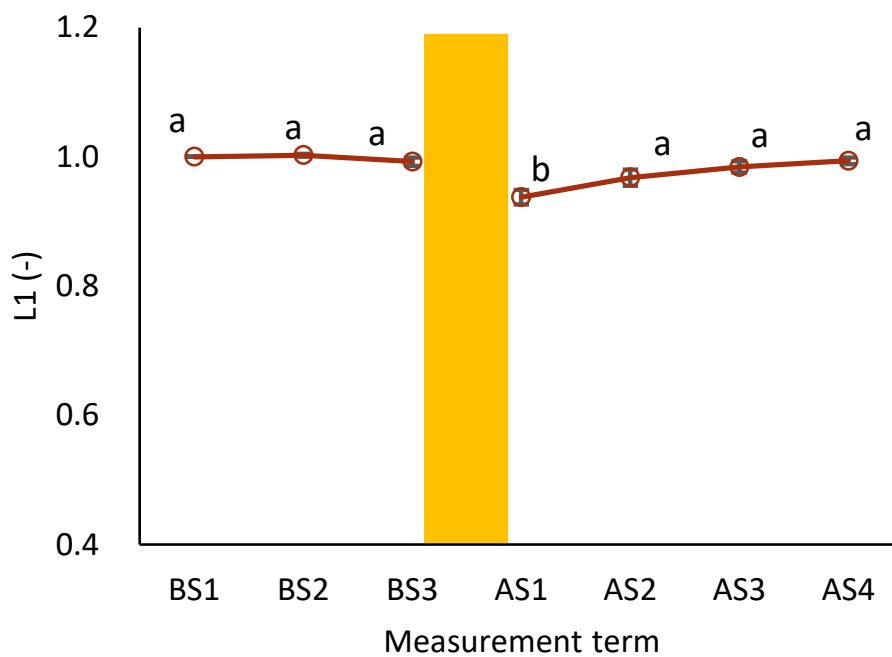


Fig. 3-12 L1 の変化

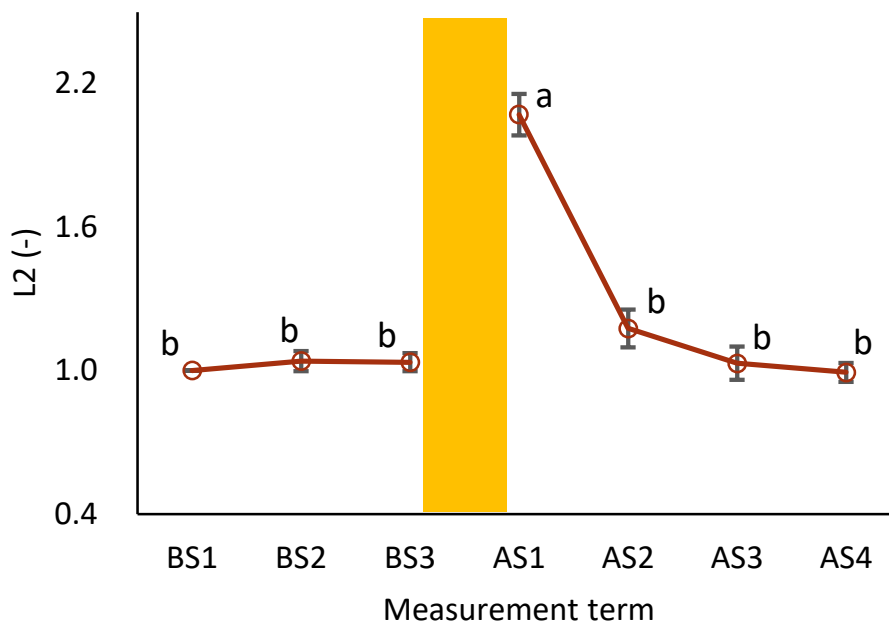


Fig. 3-13 L2 の変化

L3 はラン輝度の不均一性の指標である。刺激前は葉緑体動態によってスペckル変動が頻繁に引き起こされるため輝度値が変化していたが、刺激後はスペckル変動が抑制され

たことで輝度値が時間的に安定するため L3 は減少したと考えられる。またスペックル変動が穏やかな場合、同じ輝度を有する短いランが結合して長いランが発生するため、1つのランにおけるランレングスは長くなり、ランレングス行列の要素和が減少すると推察される。本実験においても、既述データの長短ランの和を算出すると、BS1 で 101981 個、AS1 で 82941 個であった。式 (6) に示すように L3 はランの総数に影響されるため、ラン数の減少も L3 に影響したと考えられる。L4 はランレングスの不均一性の指標である。短いランと長いランの数の比を計算すると、刺激前は 25494.3 であり、刺激後は 2181.7 であった。比が 1 に近いほど長短の不均一性が小さいことを考えると、刺激前後で不均一性が減少しているため、L4 は減少したと考えられる。またランの総数の指標である L5 に関して、既述のように L1 の減少および L2 の増加が確認され、ランの総数も減少していたことから、L5 が減少したと考えられる。

ランレングス特徴量を比較すると、いずれの特徴量でも AS4 において初期値と同程度まで回復した。刺激直後の増減率は L2 が最も大きいことから、ストレスに伴う葉緑体動態の抑制を評価しやすいのは L2 であると考えられる。

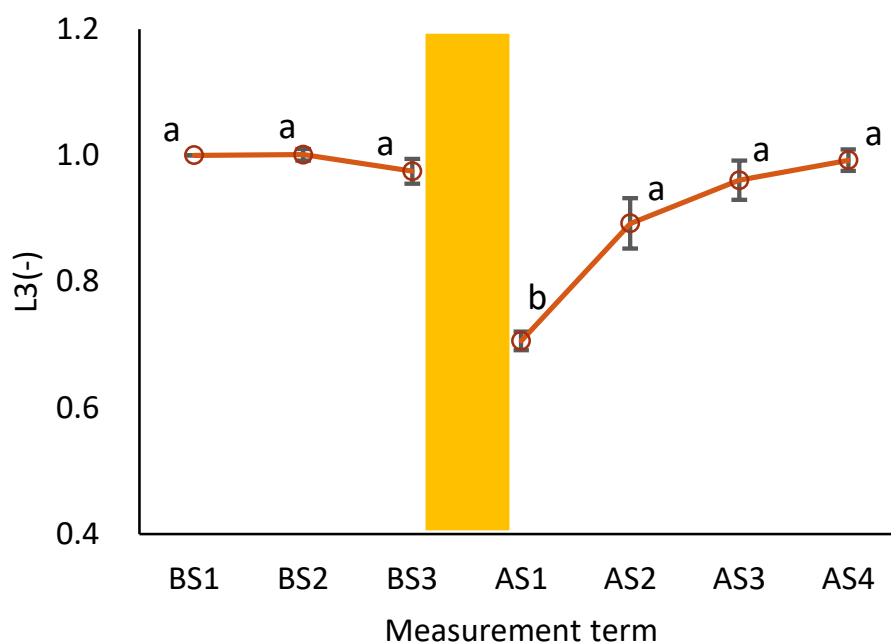


Fig. 3-14 L3 の変化

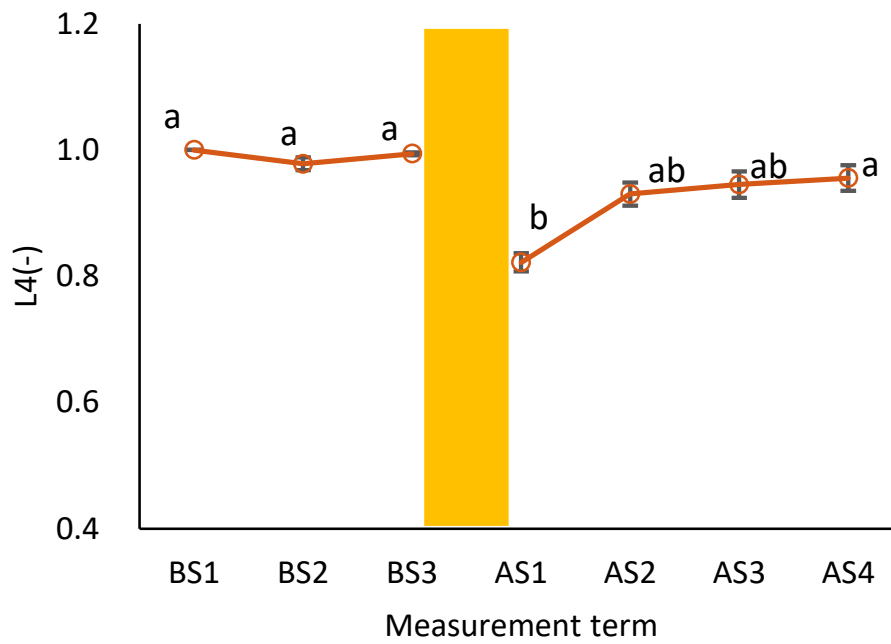


Fig. 3-15 L4 の変化

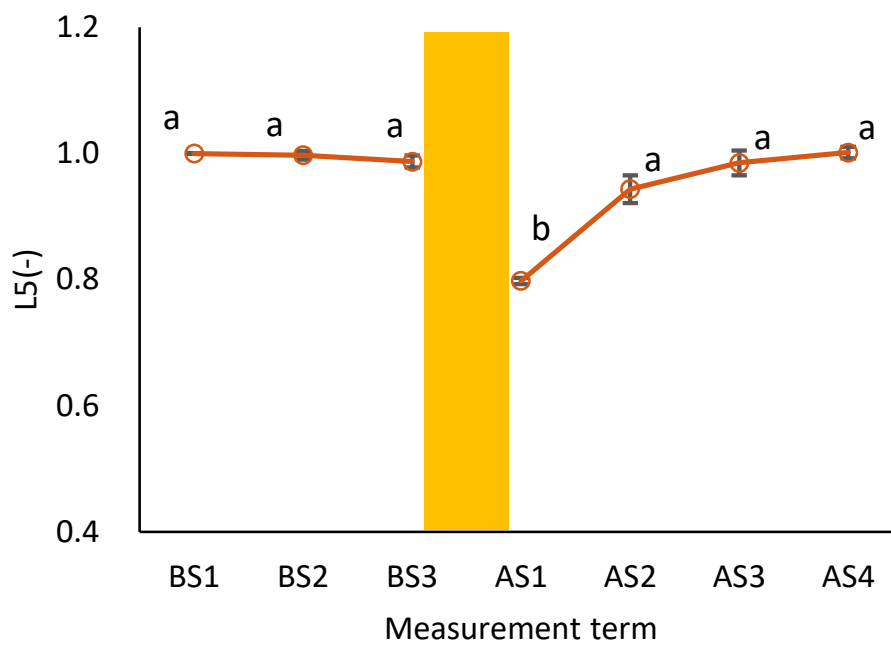


Fig. 3-16 L5 の変化

3.3.4 従前の解析手法との比較

Fig. 3-17 にランレンクス特徴量の中で最も葉緑体動態の評価に適すると考察された L2 と

第2章で用いた解析手法である FM および GD によるスペックル変動解析結果の比較を示す。いずれの解析手法においても刺激前の経時的な変化は確認されず、刺激印加に伴う解析値の変化およびその後の回復は共通していた。値の変化率に着目すると、FM、GD が-20%であったのに対し、L2 では+100%であった。FM と GD は3.2.5 で述べたように早い動きを捉えるのに用いられてきた活性評価手法で、植物の比較的緩慢とした生体動態評価には不適であったと考えられる。一方でランレングス行列解析ではランのカウント前に輝度階調を変更していたことが L2 の変化率に関わると考えられる。例えば連続する輝度がそれぞれ 256 段階で 100 と 101 と異なる輝度値であっても、32 段階に変更すると共に 12 という同一の輝度値に変換される。レーザスペックル法においては振動や電氣的ノイズによる外乱、また前述の完全停止しない動態によってわずかな輝度値の変動が生じると考えられる。輝度階調の変更によってノイズなどの影響を除くことができ、葉緑体動態の抑制に伴う長いランの発生を主として捉えることができたため、L2 の変化率は大きかったと考えられる。なお、FM と GD は輝度値の差を積算していく計算方法であるため、ランレングス行列解析と同様に輝度階調の変更を適用しても、輝度値の差が 0 となり、Fig. 3-18 および Fig. 3-19 に示すように解析値には反映されない。

以上から、ランレングス行列解析による葉緑体動態評価の有用性を示し、葉緑体動態がスペックル変動の一因であることが示された。

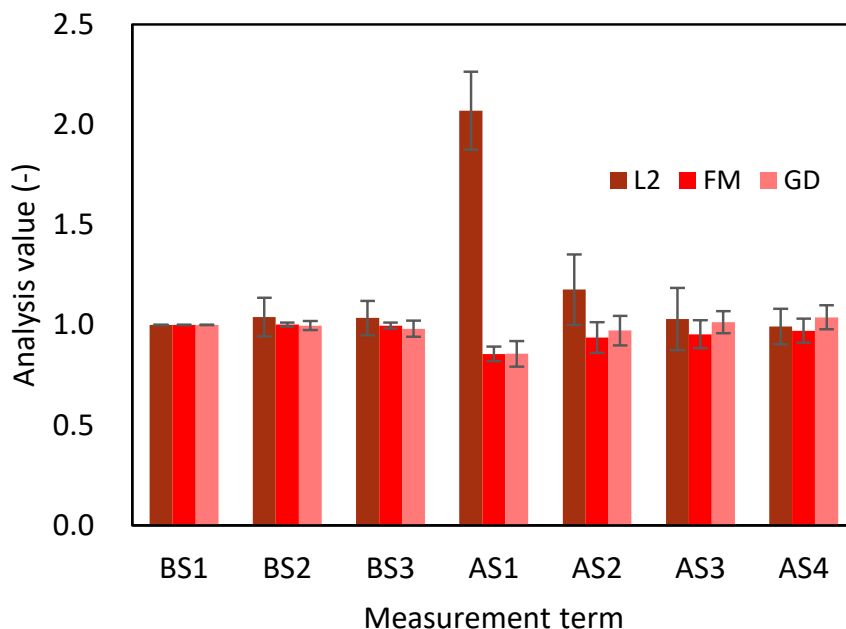


Fig. 3-17 L2 と従前解析手法 FM および GD との比較

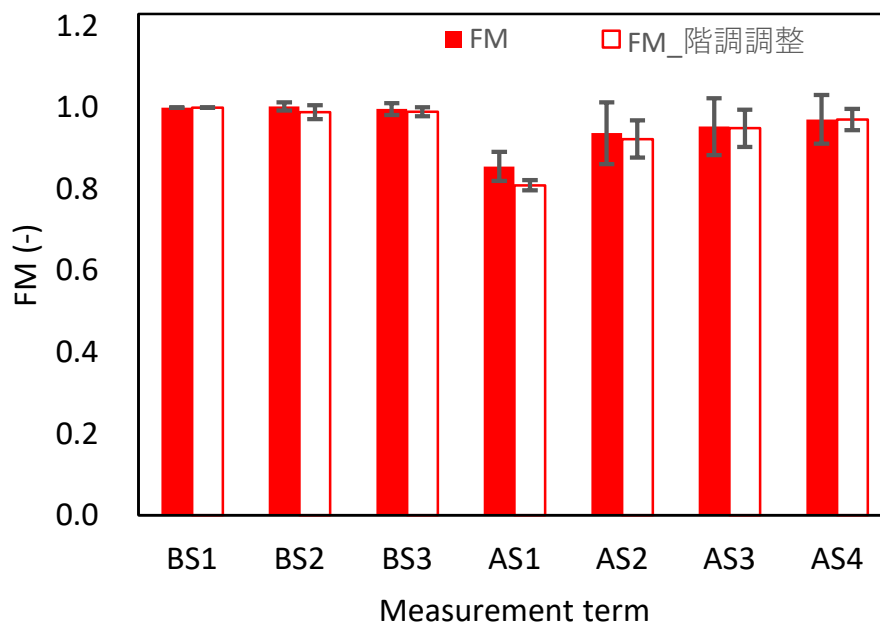


Fig. 3-18 輝度階調調整による FM の違い

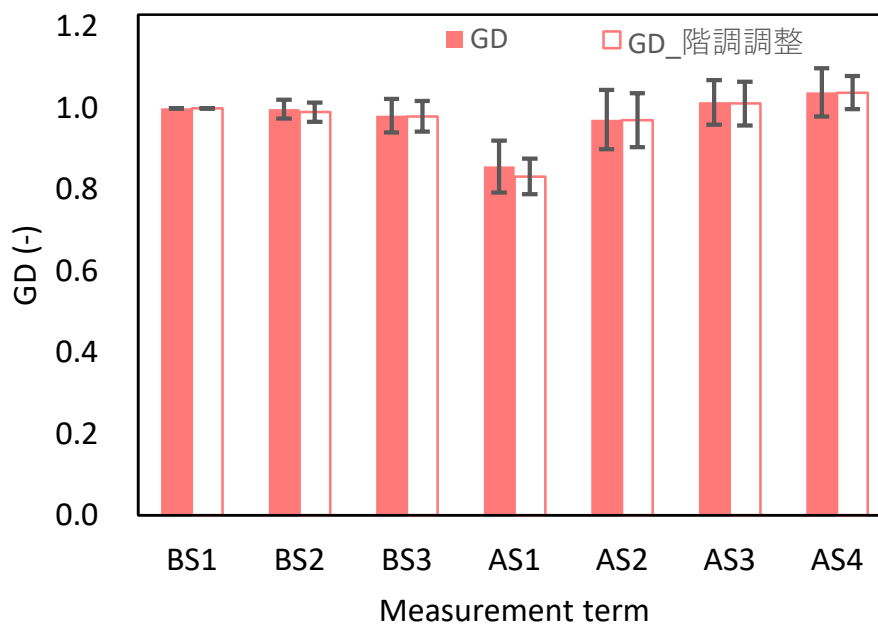


Fig. 3-19 輝度階調調整による GD の違い

3.4 陸上植物に対するランレングス行列解析の適用

前節の結果は水草の一種であるオオカナダモを対象としていた。オオカナダモは被子植

物に分類され、その生理的特性は陸上植物に近いと推察されるが、気孔を有していないなどの違いがある。そこで提案解析手法の汎用性・有用性を示すため、第2章のデータに対してランレングス行列解析を適用し、水分ストレス処理されたダイズにおける解析値の変化を調査した。またレーザスペックル法は高解像度・低ノイズのカメラが望ましいだけでなく、連続撮影することから植物体の比較的緩慢な動態を捉えるためには1回の撮影時間が長くなりデータ量も増大しやすい。さらに提案手法のランレングス行列解析は座標ごともしくは列ごとに輝度データを抽出してランをカウントすることから従来手法に比べて解析に時間を要する。そこで植物活性やストレス状態の推定に必要な解析領域の検討も併せて実施した。試料および実験環境は2.1と、計測装置およびスペックル画像取得方法は2.2と同様である。

スペックル変動を細胞サイズに基づいて考察するため、細胞観察を実施した。Fig. 3-20に示すように、葉の表面表皮を除去して裏面の細胞群を得た。得られた細胞群を蒸留水で洗浄後、プレパラートを作成して細胞観察画像を取得し、細胞サイズを計測した。観察にはFig. 3-4に示す顕微鏡を用いた。



Fig. 3-20 サンプル例

3.4.1 解析方法

スペックル変動解析手法としてランレングス行列解析を適用した。本解析手法において、同様の輝度値が特定の方向に連続する輝度の集合をランと呼び、その長さをランレングスと呼ぶ。本研究では、連続画像群中の同位置のピクセルに着目し、時間的に連続する輝度の集合をランとした。

ランレングス行列は輝度値 f とランレングス l に基づいてランの発生頻度をカウントした行列である。Fig. 3-11に解析手順を示す。まずノイズ等に由来するわずかな輝度値の変動を除去するため、スペックル画像の輝度階調を256段階から32段階に変更した。次に連続画像群から抽出した同一列を用いて、Time-History Speckle Patterns (THSP) 画像 (Oulamara et al., 1989) を作成した。そしてTHSP画像の水平方向でランをカウントしランレングス行列を作成した。最後に、ランレングス行列の要素を用いて、式(7)に示す $L2$ を算出した。

また解析領域の検討として、全列を対象とする場合、単一系列を対象とする場合、取得画像の中央列を起点として複数列を対象とする場合の3通りを無処理区、水分ストレス処理区

のそれぞれで実施した。Fig. 3-21 および Fig. 3-22 に示すように、単一系列では10,100,200,300,400,500列目のみを、複数列では基準列320列目から±10,20,30,60,120,200列分を解析対象として設定した。なお、解析に供試した画像には主脈が横方向に横断するように撮影され、また解析領域は列を基準として設定したため、解析結果には脈構造および葉肉構造の両者が反映されることが考えられる。

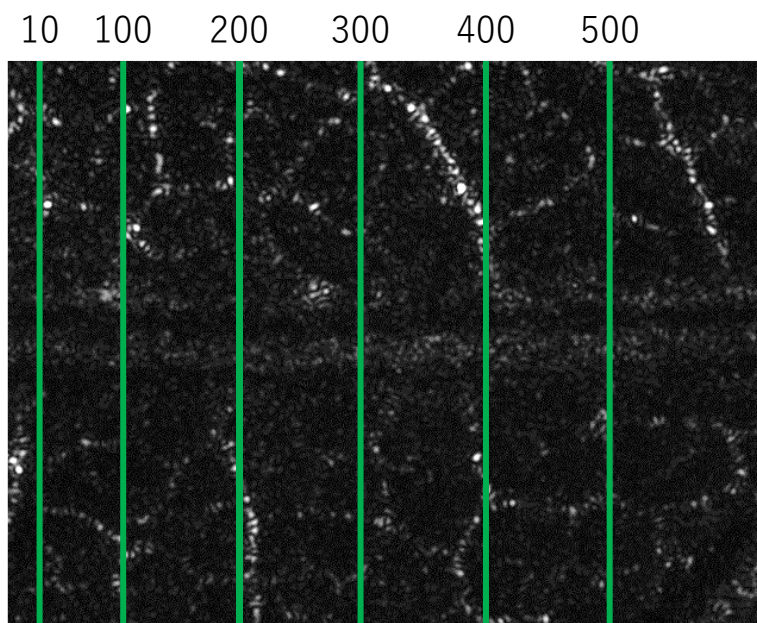


Fig. 3-21 単一系列の解析領域

基準列：320

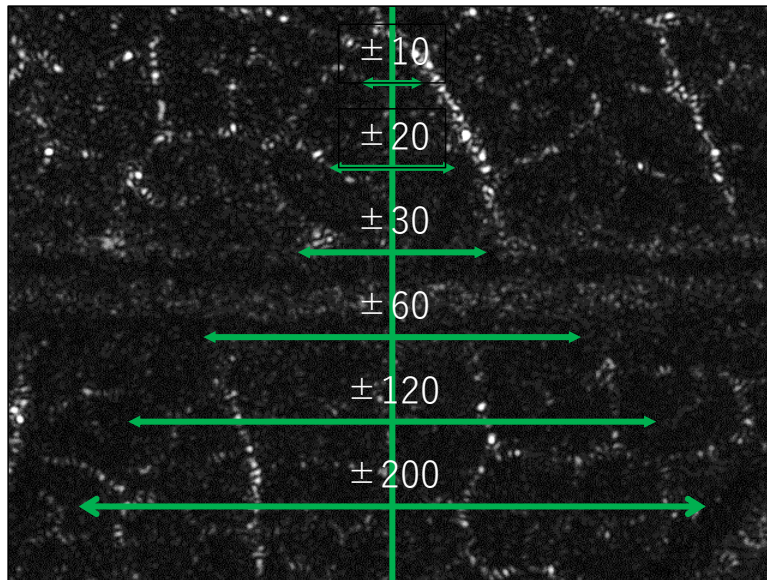


Fig. 3-22 複数列の解析領域

3.4.2 結果および考察

Fig. 3-23 に全列を対象とした場合の L2 の変化を示す。なお本節における結果ではいずれも実験開始時点の値が 1 となるように規格化した。無処理区では 17:00 を除き L2 は一定、水分ストレス処理区で L2 は上昇した。第 2 章において、解析手法には活性評価の手法である FM や GD を用いていたため、ストレス処理によって解析値は減少していた。一方、本節における L2 はストレスに伴うスペckル変動の抑制を評価するストレス指標であるため、処理による解析値の上昇は妥当であると考えられる。さらにいずれの解析方法を適用しても無処理区の場合は解析値が一定の傾向を示し、無処理区 17:00 の値の上昇は第 2 章においては値の減少が確認されている。以上から、全列を対象とした場合、ランレングス行列解析は水草だけでなく陸上植物に対しても適用可能であると考えられる。

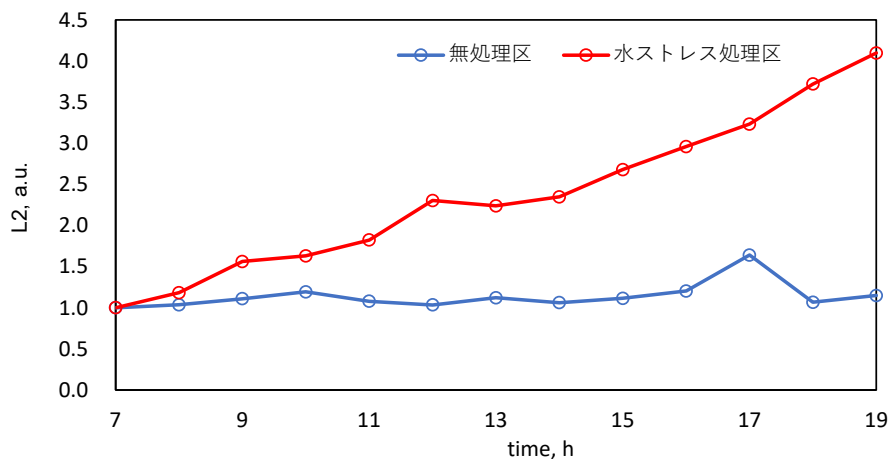


Fig. 3-23 全列を対象とした L2 の変化

Fig. 3-24 および Fig. 3-25 に単一系列を対象とした場合の L2 の変化を示す。無処理区では全列の場合と同様の傾向であった。ダイズにおける葉の細胞サイズは約 $20 \times 40 \mu\text{m}$ で、スペックル画像における 1 画素の撮影範囲は約 $38 \mu\text{m}$ であった。L2 が細胞内の葉緑体動態や細胞内動態を主として反映することを考えると、本実験の無処理区において 1 画素で 1 細胞程度を撮像することから、単一系列でも細胞内の生理応答を検出できたと考えられる。一方で、水分ストレス処理区の場合、いずれの列でも上昇傾向があり、一部の列では偶発的に全列の結果と一致したが、18:00 や 19:00 で値が減少するなど正確にストレス応答を検出できなかった。本研究グループの他の研究から、ストレス処理に伴ってスペックルの輝度値が上昇することで、スペックルサイズが増大することが経験的にわかっており、本実験においても無処理区では 1 つのスペックルが 4-5 画素で表現され、ストレス処理後は 8-10 画素程度で表現されていた。つまり細胞サイズや 1 画素の撮影範囲は変化しないがスペックルサイズは大きくなり、スペックル変動を単一系列で表現しにくくなるため、ストレス状態の推定が困難になったと考えられる。

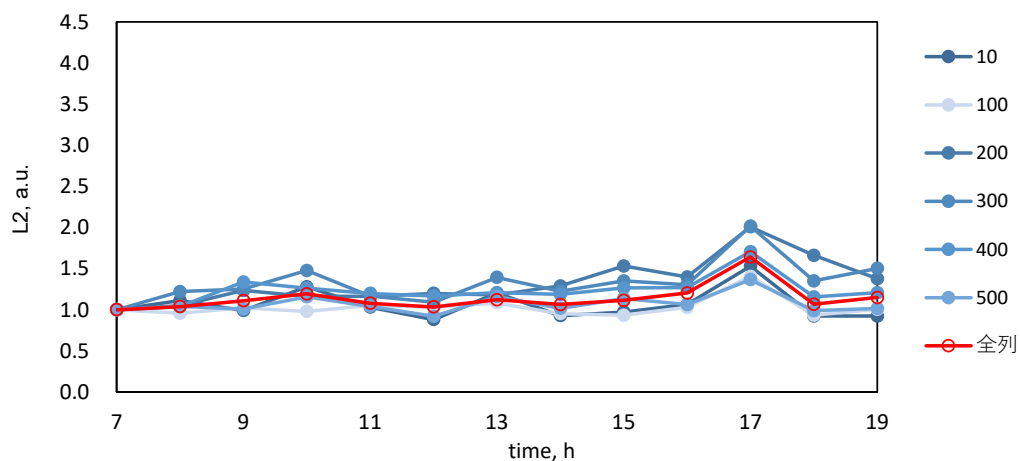


Fig. 3-24 単一行を対象とした L2 の変化（無処理区）

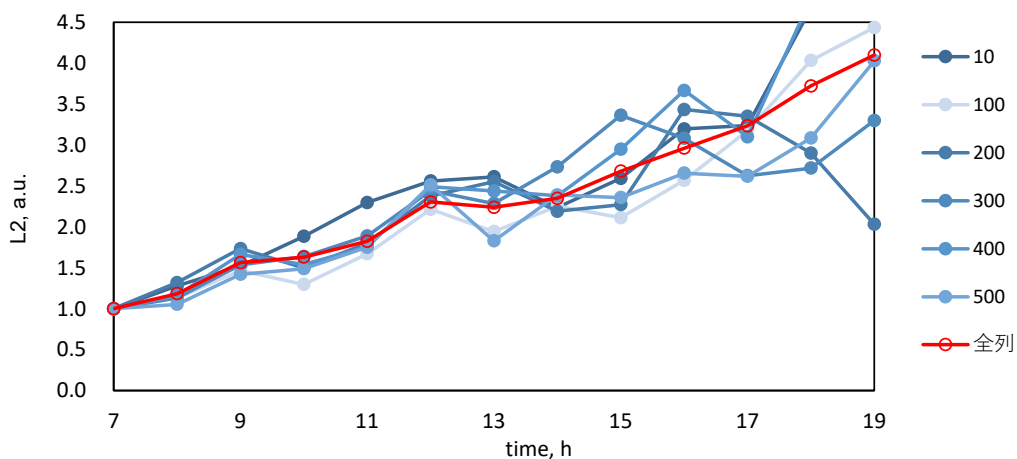


Fig. 3-25 単一行を対象とした L2 の変化（水分ストレス処理区）

Fig. 3-26 および Fig. 3-27 に複数列を対象とした場合の L2 の変化を示す。無処理区ではいづれの列数でも全列と同様の傾向であり、さらに解析対象となる列数が増えるほど全列と同様の値に近づいた。水分ストレス処理区では、無処理区と同様に解析対象列の増加とともに全列の結果に近づいた。本実験においてスペックルサイズは 4~10 pixel 程度であったことから、活性の情報を有するスペックルが分割されず、全体が解析領域に含まれることが活性推定に必要なデータ量であると考えられる。

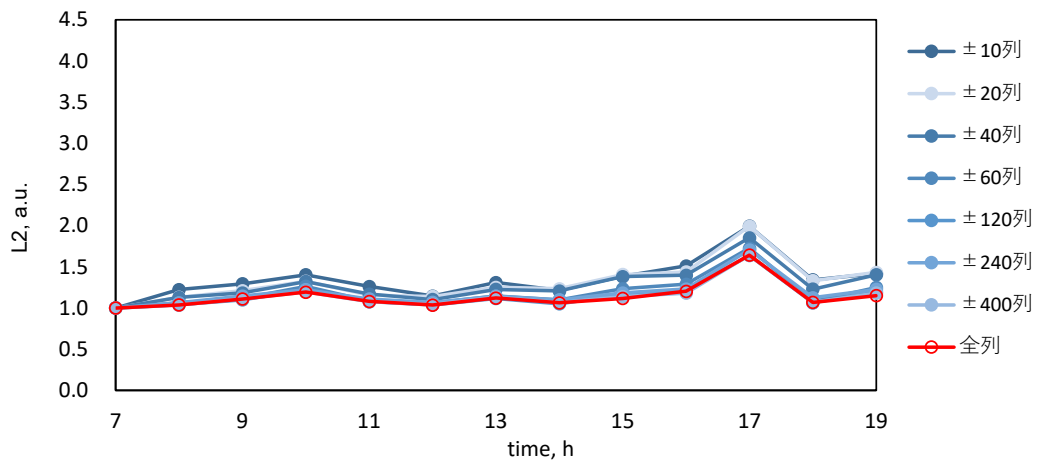


Fig. 3-26 複数列を対象とした L2 の変化（無処理区）

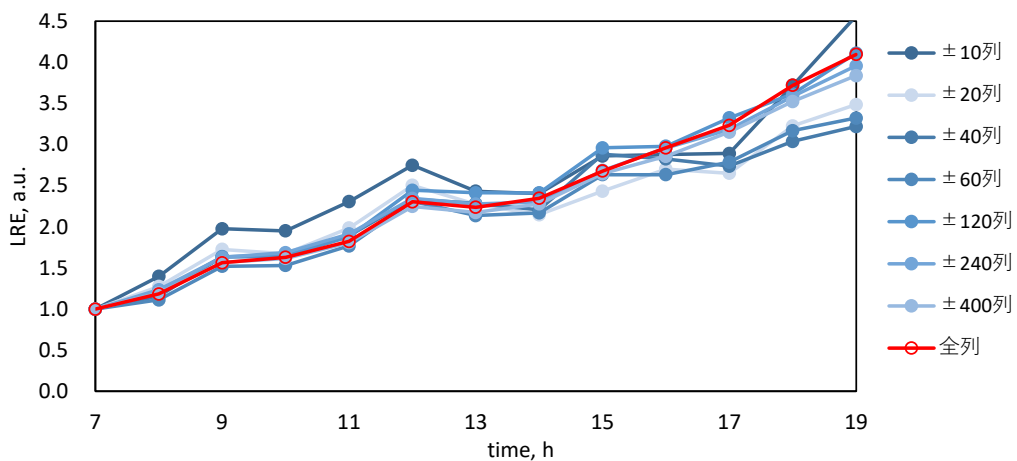


Fig. 3-27 複数列を対象とした L2 の変化（水分ストレス処理区）

3.5 まとめと展望

本章ではスペckル変動と葉緑体動態の関係を明らかにするため、電気刺激による動態抑制の前後でスペckル変動を比較した。結果、葉緑体動態の抑制に伴ってレーザの拡散が抑えられたため、スペckル変動が減衰した。解析には従来手法である FM と GD を用いていたが、両手法は血流など比較的早い動きを評価する手法であったことから、植物体の生理応答特性を考慮した解析手法としてランレンジ行列解析を適用した。結果、長いランの指標である L2 は、動態抑制に伴うスペckル変動の減衰を長いランの増加として検出できる特徴量であった。また FM や GD と比較して、値の変化率が大きかったことから、葉緑体動態を反映するスペckル変動解析手法としての有用性を示し、葉緑体動態がスペckル変動の一因であることが示された。ただし、スペckル変動に対するミトコンドリアなどの動

態の影響は不明のため、高分解能の顕微鏡による観察などが求められる。また本手法は陸上植物に対しても適用できることが示され、ストレス応答の検出にはスペックルが分割されず全体が解析領域に含まれることが必要と考察された。

一方で、本実験では電気刺激によって葉緑体動態を抑制しており、3.4での水分ストレス処理も葉柄切断による疑似ストレスであることから、栽培現場における植物生理応答の検出には至っていない。今後は葉緑体動態の生理特性を利用した生理応答検出方法の開発が必要である。

第4章 葉緑体の生理応答を利用した塩分ストレス検出

これまでにスペckル変動に葉緑体動態が関わることを示され、評価に適した解析手法を提案した。本章では、レーザスペckル法によるストレスの検出・識別を目的とし、塩分に対する葉緑体の生理応答特性を利用した塩分ストレス検出に取り組んだ。また初期症状の類似する塩分ストレスと水分ストレスにおいて、スペckル変動の違いを比較した。レーザスペckル法の有用性を示すため簡易的な植物生理指標も計測し、ストレス応答の速さや変化率を比較した。

4.1 塩分ストレス評価の意義と検出可能性

塩分ストレスの代表的な原因は塩害である。塩害は沿岸部において高潮や津波によって発生するだけでなく、内陸部においても過度な灌漑によって地下塩類が地表付近に移動することで発生し、すでに世界の陸地の7%、作物に関しては約30%が被害を受けている(Rana, Tester, 2008)。土壌の除塩方法には生物的・化学的・物理的な除去が挙げられる。生物的除去は耐塩性の高い植物に土壌塩類を吸収させる方法であるが、生育および塩害緩和に時間がかかることが課題である。化学的除去は石灰などを土壌に混ぜることで塩害発生の主物質である塩化ナトリウムを除く方法であるが、石灰の購入コストだけでなく化学反応を促進させるために定期的な土の掘り起こしが求められ、人的・時間のコストが必要である。物理的除去は多量の真水による土壌の洗浄であるが、利用できる水資源は特に内陸部において限られている。塩害環境下における植物への影響として、根をはじめとしたバイオマスの減少が挙げられる(Taibi et al., 2016)。さらに生体内部では活性酸素の増加やそれに伴うクロロフィル含量の減少、細胞膜の酸化、膜透過性の低下などが報告されている(Breusegem, Dat, 2006; Verma, Mishra, 2005)。一方で、実験的に弱いストレス影響を調べた報告では、トマト(Zhang et al., 2017)やイチゴ(Galli et al., 2016)、ダイズ(Zandt et al., 2003)などの農作物においてミネラルや機能性成分が増加するとされている。さらに、有機酸や無機成分含量に関して、水分ストレス処理では低下する一方で塩分ストレス処理では増加するなど、ストレスの種類によって農産物に対する影響は異なることが報告されている(Mitchell et al., 1991)。以上より、栽培環境のコントロールによって塩害を阻止するだけでなく、将来的な高品質栽培の多様化を実現できる可能性があることから、塩分ストレスの把握はさらなるデータ駆動型農業の発展のため重要と考えられる。

これまで、塩害および塩分ストレスを症状の顕在化前に検出することは、既存の植物センシング機器では困難とされてきた。原因として、塩分ストレスは土壌の浸透圧差による水分吸収阻害が起こり(Tanaka et al., 2019)、乾燥ストレスでは水分不足による吸収不能が起こることから(Lata et al., 2015; Farooq et al., 2009)、両者の初期症状が似ていたためである(Ma et al., 2020)。一方で、塩分ストレスの場合のみ、本研究で対象としている葉緑体の形態変化(Goussi et al., 2018; Oi et al., 2017)や細胞内の自己位置変化(Yamane et al., 2003)が起こる

こと、この変化は他のオルガネラよりも葉緑体が敏感であること (Yamane et al., 2003) などが報告されている。さらに 3.1.1 で述べたように、葉緑体動態や原形質流動は Ca イオンによって抑制され (Tominaga et al., 1985)、根の細胞において NaCl 処理による細胞内の Ca 濃度上昇や動態の抑制 (Lynch et al., 1989) が確認されている。以上から、葉緑体に影響を与える塩害や塩分ストレスの検出に対して、非破壊的に葉緑体動態を評価できるレーザスペックル法の適用は有効であると着想した。

4.2 実験方法および解析方法

4.2.1 供試植物および実験環境

ダイズ (*Glycine max* L., “フクユタカ”) を供試した。試料はプラグトレイ (セルボックス 16 穴, セル数: 16, セルサイズ: 62 mm×62 mm, 明和株式会社) を用いて各個体が互いに干渉しないように間隔を空け栽培した。土壌は培養土とし、表面をバーミキュライトで覆った。栽培は自作の植物栽培棚を用い、LED 光源のもと 3 週間生育させた。なお栽培時の光条件は PPFD 約 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。環境設定は明期 (12 時間) 30°C, 暗期 (12 時間) 25°C とした。

光や温度など環境条件のコントロールが容易なことから、実験は三重大学機械実験棟内の暗室で実施した。通常、植物の活動は暗所で低下するため、日中は室内蛍光灯を点灯させ、さらにサンプルはメタルハイドランプ (MF400DL/BUDP, 出力: 400 W, 岩倉電気株式会社) の下、約 700 mm に設置した。メタルハイドランプは光要求量の多い植物の生育に適するとされており (Goto, 2011) 計測部位地点における PPFD は約 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。照明の点灯期間は 7:00 から 18:00 とした。室温はエアコンによって制御し、25 度に保った。湿度はなりゆきだが、実験期間中は 30–70%RH 程度であった。なお植物体は衝撃や急な温度変化に対する環境応答特性を有していることから、実験環境に順応させるため対象個体は計測開始日の 7:00 に実験室内へ移動させた。

4.2.2 スペックル画像取得およびストレス処理方法

Fig. 4-1 にスペックル画像取得のための計測システムを示す。光源には半導体レーザ (CPS635, 波長: 635 nm, 出力: 4.5 mW, Thorlabs Inc.) を用いた。まずレーザ光は水平方向に照射し、ミラーによって垂直方向に光路を変化させた。次に、先行研究 (Dhanotia et al., 2017) に倣い、ディフューザ (ED1-C20-MD, Thorlabs Inc.) によって照射径を拡大した後、ダイズ試料葉に照射した。照射面におけるビーム径は約 25 mm であった。試料透過後のレーザ干渉によって発生したスペックルはレンズ (Ns-lz6n, エヌエスライティング株式会社) 付き CCD カメラ (DCU223M, Thorlabs Inc.) を用いて撮影された。撮影条件を解像度 1024×768 pixel, フレームレート 10 fps, 露光時間 100 ms に設定し、30 秒間連続撮影した。計測対象の葉は上位第 3 葉 (n+2 葉) 中央小葉とし、撮影範囲は Fig. 4-2 に示すように主脈が画像中央の横向き、画像上部および下部に側脈や葉肉細胞が写りこむよう設定した。計測

葉は関心領域がずれるのを防ぐため、第2章と同様に3Dプリンタで作成したオリジナルの治具で固定した。固定部は直径30 mmの穴が開いており、固定による過度な圧力がかからないようにウレタンスポンジで覆った。スペックル画像の撮影範囲は約20×15 mmであった。

スペックル画像の取得に併せて、塩分ストレス検出におけるレーザスペックル法の有用性を示すため、簡易的な植物生理指標としてSPAD、葉面温度、葉面積を同じ個体に対して計測した。上位第3葉はスペックル画像取得用に治具で固定されているため、生理指標の計測対象葉は上位第2葉中央小葉とした。なお生理指標へのストレス影響を確認しやすくするため、第4葉でなく展開途中の若い第2葉を選択した。SPADの計測は葉緑素計（SPAD-502Plus, コニカミノルタジャパン株式会社）を用いた。SPADは非破壊で計測できるクロロフィル濃度に関連する値であり、光合成能力の間接的な指標となる（只木, 木下, 1988）。葉面温度の計測は非接触温度計（AD-5612, 株式会社エーアンドデイ）を用いた。ストレスによる水分欠乏によって葉の熱容量が減少すると、葉面温度は雰囲気温度などの外的要因により変動しやすくなる（Ono et al., 2010）。葉面積は葉の長辺と短辺の長さから楕円近似によって算出した。長さの測定には定規を用いた。

実験期間は1個体につき3日間に設定した。スペックル画像取得および簡易生理指標の計測を1回の測定として、9:00から18:00まで3時間おきに1日計4回実施した。処理区として、塩分ストレス処理区、水分ストレス処理区、無処理区を設定した。塩分ストレス処理区ではLuo et al. (2005) およびRahnesha et al. (2018) の濃度を参考にして、150 mmol/L（強ストレスレベル）のNaCl溶液50 mLを毎日7:00に底面灌水した。水分ストレス処理区は水道水50 mLを初日7:00のみ底面灌水し、2日目ならびに3日目は断水した。無処理区は水道水50 mLを毎日7:00に底面灌水した。サンプルサイズは3とした。なおNaCl溶液の濃度を浸透圧に換算すると約0.7 MPaであり、植物の初期萎凋が確認される土壌水ポテンシャルが0.61 MPa程度とされている。さらに断水は急激なストレス処理（国政ら, 2012）とされていることから、本実験ではいずれのストレス処理区でも強いストレスを与えたと考えられる。

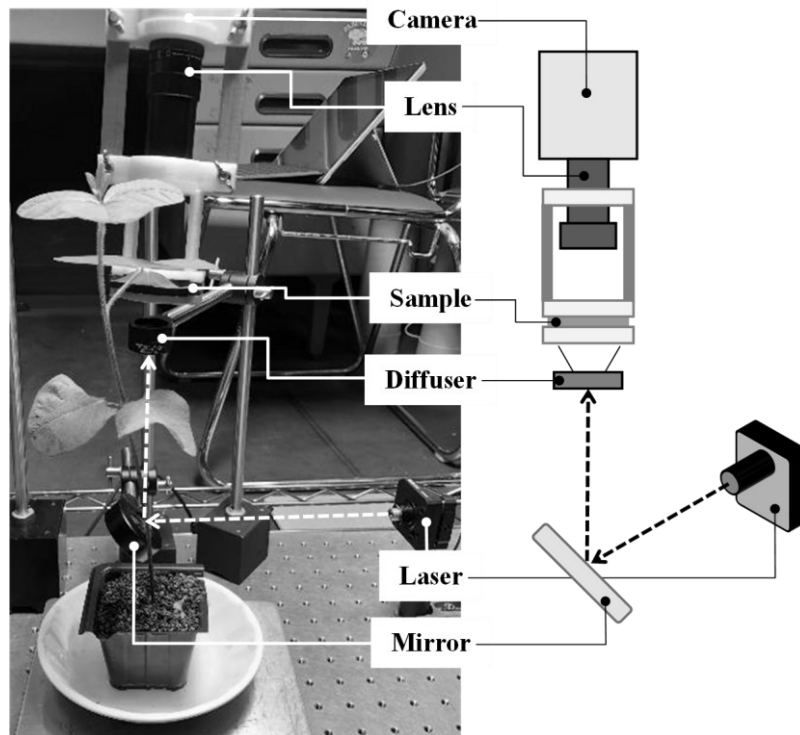


Fig. 4-1 スペックル画像取得のための計測システム

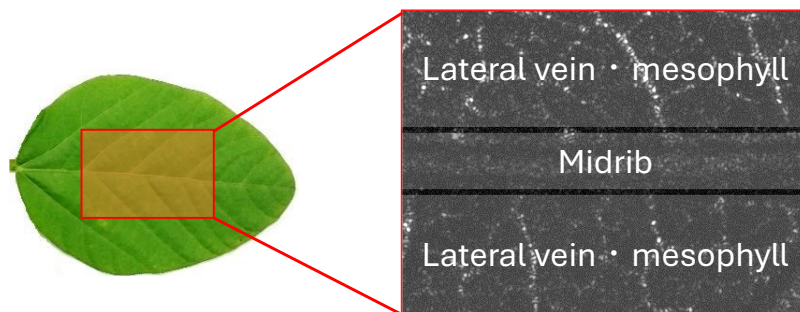


Fig. 4-2 撮影範囲

4.2.3 ストレス処理に伴う葉緑体の形態変化観察

葉緑体に対するストレスの影響を確認するため、細胞観察を実施した。Fig. 4-3 に示すように、本試験は剥離切片を用いた破壊試験であるため、4.2.2 で述べたスペックル画像取得および生理指標計測とは別の個体を用いた。観察には CMOS カメラ（ARTCAM-130SN2，株式会社アートレイ）を取り付けた光学顕微鏡（ECLIPSE E100，株式会社ニコン）を用いて、3 日目 18:00 時点の細胞および葉緑体の様子を RGB 画像で撮影した（×40）。撮影条件は解像度640×480 pixel とし、その他、露光時間やホワイトバランスなどはビューワソフトウェア ART-VIEWER（株式会社アートレイ）を用いて自動で設定した。葉緑体の形態変化の指標として本実験では観察画像におけるサイズを測定した。手順として、まず葉の表面

を剥離して切片を作成後、プレパラートを作った。次に顕微鏡を用いて1つのサンプルに対してランダムな位置で5回画像を撮影した。最後に、葉緑体の長辺と短辺の長さを計測することで楕円近似によるサイズを算出した。

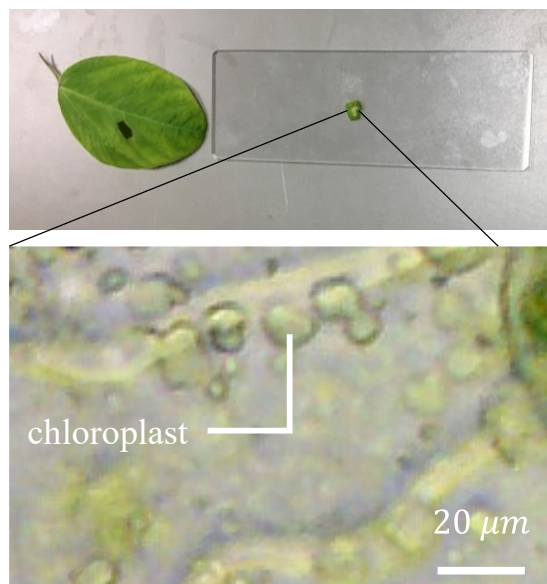


Fig. 4-3 細胞観察の試料例

4.2.4 スペックル変動解析手法

スペックル変動解析にはランレングス行列解析を適用した。Fig. 4-4 に解析手順を示す。なお 3.3.1 に示した解析手順では THSP 画像を作成していたが、解析原理上不要であったため簡素化した。解析ではまず、連続的に撮影したスペックル画像群から同位置における輝度値の変動データ $f'(t)$ を抽出した。次に電気的ノイズなどに由来するわずかな輝度値変動を除くため、輝度階調を 256 段階から 32 段階に変更したのち、輝度値とランレングスに基づいてランの発生回数をカウントした。カウントした数は、行が輝度値、列がランレングスで構成されるランレングス行列の対応する要素に格納した。以上の手順をすべての画素に対して適用し、最後にランレングス行列の要素 $M(f, l)$ を用いて式 (6) - 式 (10) に示す各ランレングス特徴量を算出した。対象物体の内部で粒子が動くと、拡散反射や干渉条件の変化につながるため、スペックル変動が発生し、ランは短くなりやすい。さらに粒子が大径化するとレーザー光が対象粒子に当たりやすくなるため、粒子動態によるスペックル変動はより促進されランは短くなると推察される。

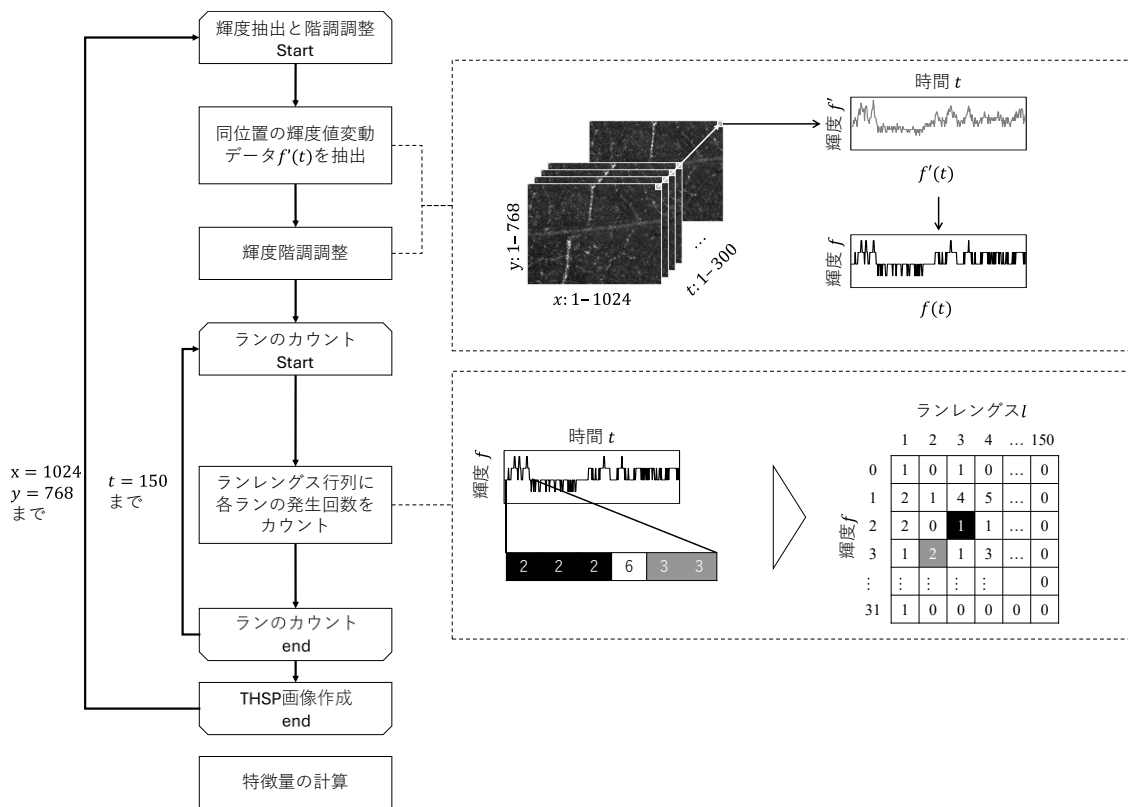


Fig. 4-4 ランレングス行列解析の解析手順

4.2.5 統計解析

ストレス処理の違いを水準として、同計測時における生理指標およびスペックル変動の差異を検出するため、有意水準 5%で Kruskal-Wallis test を実施した。また日数経過を水準として、経時変化の影響を検出するため、有意水準 5%で Friedman test を実施した。なお、いずれの解析においても 3 日間同じ個体を計測したが、サンプルサイズが 3 で正規性を担保できないため、ノンパラメトリック検定を選択した。解析は統計解析ソフト SPSS (version: 27.0.1.0, IBM) を用いて実行した。なお 2 水準における統計的有意差を検定する方法として二元配置分散分析が挙げられるが、本検定法はパラメトリックなデータにのみ適用可能であることから、本実験では各水準で検定した。

4.3 結果および考察

4.3.1 簡易植物生理指標の変化

Fig. 4-5, Fig. 4-6 および Fig. 4-7 にそれぞれ SPAD, 葉面積, 葉面温度の変化を示す。各計測時点の値は、各サンプルごとに計測開始時点の値で除することにより規格化した。水分ストレス処理区と無処理区の SPAD, 無処理区の葉面積, 塩分ストレス処理区と水分ストレス処理区の葉面温度の経時変化に関して 5%水準で有意差が認められた。一方で、いずれの計測時点においても処理区間に有意な差は認められなかった。

SPAD は、塩分ストレス処理区で2日目まで上昇傾向にあったが、3日目には初期値と同程度まで減少した。水分ストレス処理区では3日目まで増加した。急激なストレス付加によって細胞内水分が減少することで濃縮効果が起こるため、SPAD は上昇するとされている（小西，大政，2003；Kurahashi et al., 2001）。本実験では、塩分ストレス処理が強ストレスレベルに相当する 150 mM の塩水の灌水，水分ストレス処理が断水による急激なストレス処理（国政ら，2012）である。塩分ストレスと水分ストレスがともに水分不足を引き起こすこと（Tanaka et al., 2019）を勘案すると，本実験において塩分・水分ストレス処理区においては水分が失われたことで2日目まで濃縮効果により SPAD が増加したと考えられる。3日目において，目視の確認ではあるものの葉の黄変が発生したことからクロロフィルの分解が引き起こされていると考えられ，塩分ストレス処理区では3日目で SPAD が減少したと推察される。水分ストレス処理によっても同様にクロロフィルの分解が起こることは報告されているが（Ma et al., 2020），3日間の無灌水ではクロロフィル含量が変化しなかったとされている（Tanaka et al., 2019）。つまり本実験においては実験期間が3日間であったため，水分ストレス処理区においてクロロフィルの分解よりも濃縮効果が優位で，SPAD が上昇し続けたと考えられる。無処理区における SPAD は実験終了時まで上昇し続け，原因として植物体の成長が原因であると考えられる。Asanuma et al. (2011) は植物の成長に従って SPAD は上昇し続けると報告している。Fig. 4-6 に示すように，本実験では無処理区において葉面積が増大しており，目視ではあるが草高の増大も確認した。さらに実験対象に用いたダイズは播種から収穫までおよそ 80 日要するとされているが，本実験では播種後3週間の個体を供試していた。計測対象葉は上位第2葉で比較的若葉であると考えられるため，無処理区においては実験期間中も試料が成長したことで，SPAD が上昇し続けたと考えられる。

葉面積は，塩分ストレス処理区で維持され，水分ストレス処理区で増加したのち減少し，無処理区では増加した。塩分ストレス処理区において，長期のストレス処理（少なくとも1週間）によって葉面積が減少することが報告されている（Liu, Stutzel, 2004；Karamanos, 1978）が，本実験では実験期間が3日間であるため，変化が小さかったと考えられる。水分ストレス処理区において，初日のみ灌水しており，Day 1 時点ではストレスがない，もしくは小さかったため，葉面積は増加したと考えられる。またその後，断水に伴って葉の水分が欠乏すると，細胞の膨圧低下によって葉の萎凋が生じ，葉面積は減少したと考えられる。無処理区においては前述のように植物個体が成長し続けたため葉面積が増大したと考えられる。

葉面温度は塩分ストレス処理区，水分ストレス処理区で上昇し，無処理区では統計的に有意ではないが上昇傾向がみられた。いずれの処理区でも同日中の傾向として朝方は葉面温度が低く，夕方になるにつれて上昇したことから，計測時間帯における葉面温度の上昇はメタルハイドランプの発熱であると考えられる。葉面温度の上昇に伴う熱ストレスの影響に関して，35°C以上で光合成活性が低下すると報告されている（Crafts-Brandner, Salvucci, 2002；Salvucci, Craft-Brandner, 2004）。本実験では室温を 25°Cに設定し，また計測された葉面温度の最大値は 30.9°Cであったため，熱ストレスの影響は少なかったと判断できる。塩

分・水分ストレス処理区における葉面温度は無処理と比べて上昇率が大きかった。葉面温度は、ストレスによる水分不足で葉の熱容量が低下することで変化しやすくなる (Ono et al., 2010)。すなわちストレス処理区では葉内水分が減少したため、無処理区の葉面温度よりも上昇率が大きくなったと考えられる。無処理区において午後は葉面温度の上昇が確認できるが、蒸散が気化熱によって葉面温度上昇を防ぐこと (Hino, 2005)、午後には蒸散活性が低下すること (Tanaka et al., 2009) から、午後の葉面温度上昇が起こったと考えられる。

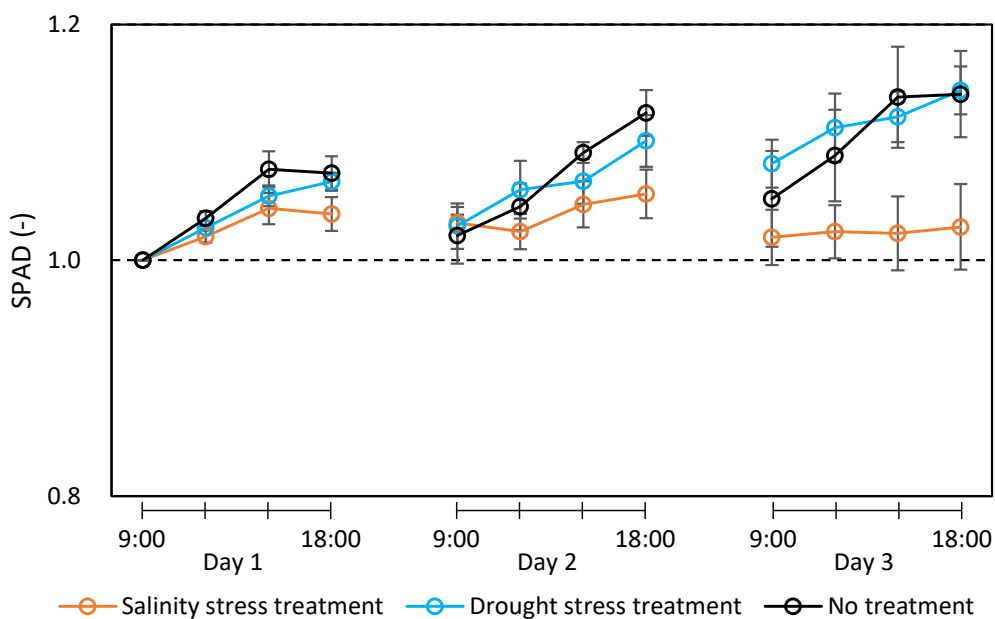


Fig. 4-5 ストレス処理に伴う SPAD の変化

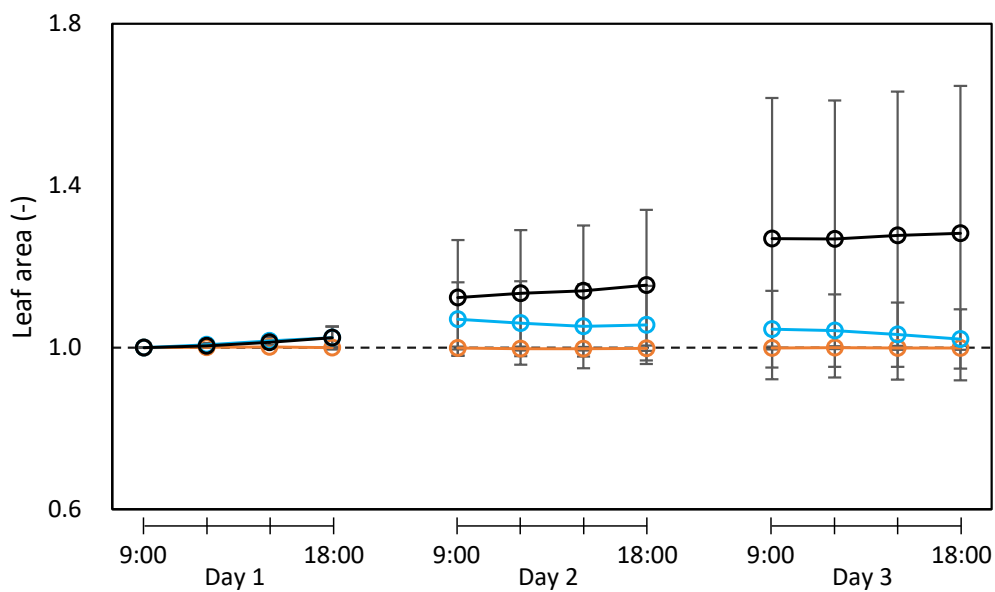


Fig. 4-6 ストレス処理に伴う葉面積の変化

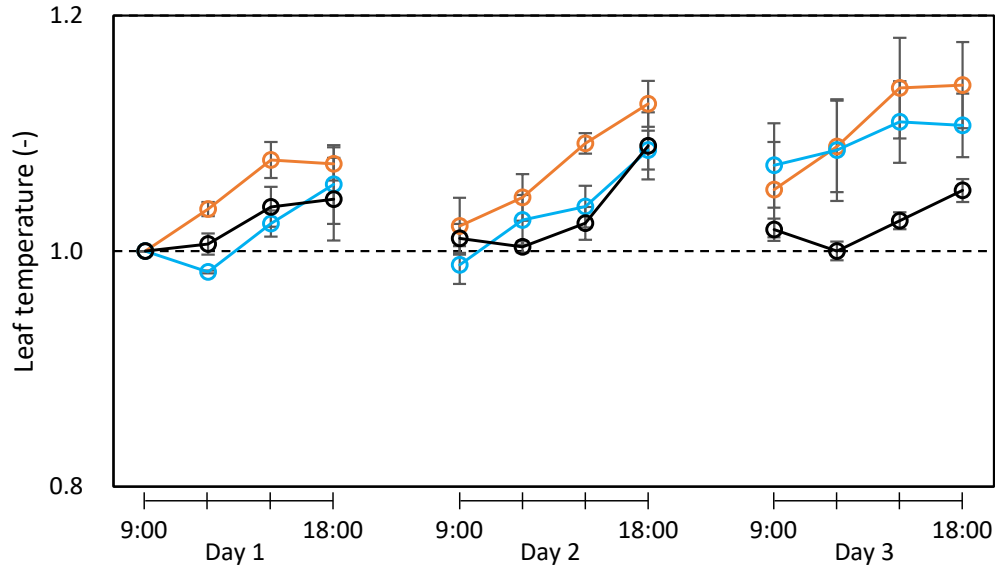


Fig. 4-7 ストレス処理に伴う葉面温度の変化

4.3.2 ランレングス特徴量の変化

Fig. 4-10 を除く Fig. 4-8 から Fig. 4-13 に L1 から L5 の変化を示す。各計測時点の値は、各サンプルごとに実験開始時点の値で除することで規格化した。レーザスペックル法は植物生体内動態を計測しているが、対象個体は葉の厚みや色味など個体差があり、いずれの場合でも処理区間の違いや経時的な影響は確認されなかった。

L1 は活発な粒子動態によって発生する短いランの指標である。各処理区間で L1 に差は確認されなかった。第 3 章で述べたようにスペックル変動に葉緑体動態が関わるが、既往の報告では原形質流動に代表されるミトコンドリアやリボソームなどオルガネラ動態、さらにブラウン運動が関わりとされている (Rabal, Roberto, 2008 ; Braga et al., 2009)。加えて、塩分に対する感受性はオルガネラの中で葉緑体が最も高いと報告されており (Yamane et al., 2003)、本実験における細胞観察でも他のオルガネラへの顕著な影響は見受けられなかった。したがって、ストレスの有無にかかわらず葉緑体以外のオルガネラの動態によってスペックル変動が引き起こされ短いランが発生し続けた結果、L1 は処理区間で差が確認されなかったと考えられる。

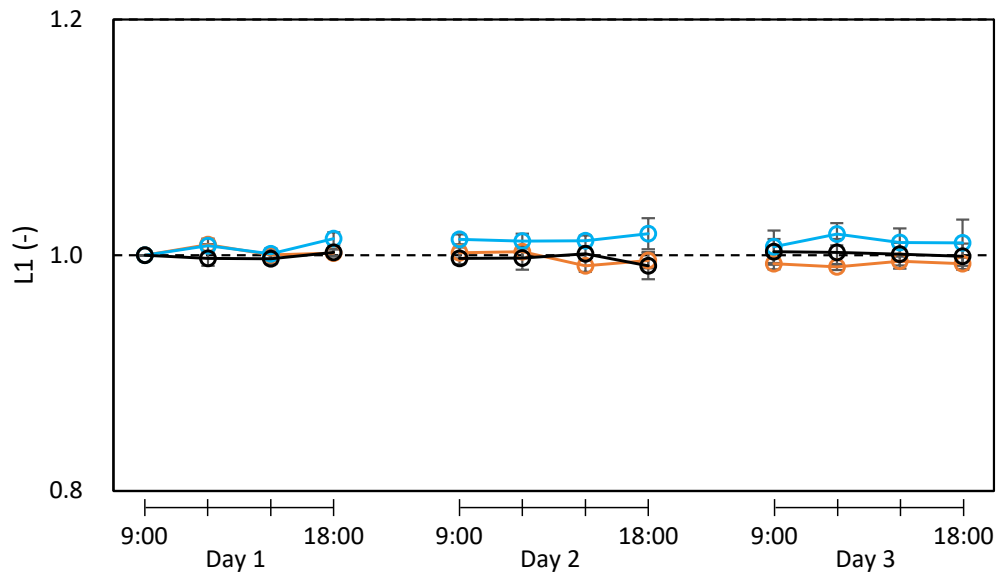


Fig. 4-8 L1 の変化

L2 は 3.4 で述べたように葉緑体動態の評価に適すると考えられ、長いランの指標である。スペックル変動の促進によりランの輝度値が変わりやすくなると L2 は低下する。L2 は塩分ストレス処理区で減少し、水分ストレス処理区で上昇し、無処理区では概日リズムによって変動した。レーザー光が光拡散動態にあたると光は様々な方向へ拡散して素子上で干渉が起こる。その結果、スペックル変動が誘発され、(相津, 朝倉, 1990), 本実験では短いランの発生につながる。また, Salama et al. (1994) は塩分ストレス処理によって葉緑体の形態が変化し、そのサイズが増大したと報告している。本実験でも細胞観察で葉緑体のサイズを計測した結果、塩分ストレス処理区・水分ストレス処理区・無処理区で平均サイズおよび標準偏差はそれぞれ、 28.6 ± 3.05 , 11.0 ± 4.80 , $12.7 \pm 3.52 \mu\text{m}$ であった。さらに Yamane et al. (2003) は塩分ストレス処理によって葉緑体が細胞壁面から細胞内全体へ移動していくと報告している。したがって、肥大化した葉緑体が細胞全体へ移動したことでレーザー光が拡散されやすくなり、スペックル変動が促進された結果、L2 は減少したと考えられる。スペックル変動に対する他の要因として、水輸送などの水分動態も該当する可能性がある (Riahi et al., 2006)。本実験では、水分不足を引き起こす塩分・水分ストレスを対象とし、主脈を含めて撮影している。Fig. 4-10 に、各画素のスペックル変動に対して算出した L2 のカラーマップを示す。黄色で表される画素は L2 の値が高いことを表し、青の画素は L2 の値が低いことを表す。1 日目の 9:00 には葉肉細胞部分が高い L2 を有し、主脈部分が低い L2 を有している。また 3 日目 18:00 には葉肉細胞部分も L2 の値が減少している。葉脈部は、水や光合成産物の輸送路として維管束が通り、構造上、葉肉部に比べ細胞が少ないため、葉緑体の肥大化やその動態が葉肉部分では強く反映されたものと考えられる。すなわち L2 が葉緑体動態の評価に適

することを考慮すると、Fig. 4-9 に示した L2 の変化も葉緑体の形態変化およびその動態を反映し、水分動態の影響は低いと考えられる。塩分ストレス処理区では、1 日目において L2 が時間経過とともに減少傾向にあるが、2 日目の朝には初期値付近に回復している。さらにその後は再度、値が減少し、3 日目にはいずれの計測でも初期値を下回っている。この原因として、夜間の蒸散活性低下に伴う Na イオン流入量の減少（野坂ら、1993）と植物体内における Na イオン移動制御機構（森田ら、2010）が挙げられる。1 日目は塩分ストレス処理によって夕方に値が減少するが、ストレスレベルが比較的低い段階でイオン流入量が少ないため、暗期に移動制御機構によって Na イオンが排出されストレスが軽減されたと考えられる。2 日目も同様にストレスが進行し、時間経過によって値が減少した。しかし 3 日目は葉のクロロフィルが分解されて黄変が目視でも確認できる程度にストレスが進行していることから、暗期のストレス軽減以上に負荷が増大したため値は初期値以下になったと考えられる。さらにランレングス行列解析、特に L2 の汎用性に関して、3.4 で述べたようにダイズに対して疑似的な水分ストレスの検出は可能であった。本実験においても上記のように塩分ストレス処理区において葉緑体の形態変化を反映したと考えられる L2 の変化を確認し、また断水による水分ストレス処理区では 3.4 の結果と同様に L2 の上昇が確認されたことから、ダイズなどの陸上植物へランレングス行列解析を適用することは可能であると考えられる。

短いランが同じ輝度値となり結合することで長いランになるが、それぞれの指標である L1 と L2 間にトレードオフ関係は確認されなかった。各計測時点の値は規格化された相対値であるため、初期のラン数が重要である。ストレスレベルが低いもしくはストレスがない場合、葉緑体動態を始めとするオルガネラ動態などが活発で、スペckル変動も激しいと考えられるため、各処理区における初期状態は短いランが多い。したがって、L1 は初期状態で短いランが多かったため、ストレス処理によって変化しづらかったと考えられる。逆に L2 は初期に活発なスペckル変動が起こるため長いランは少なく、L1 よりも変化が大きくなったと考えられる。実際に、 $l = 1-149$ を短いラン、 $l = 150-300$ を長いランとしてそれぞれの数をカウントすると、1 日目 9:00 時点ではそれぞれ 23885 個、211 個と 2 オーダ異なり、3 日目 18:00 時点においてもそれぞれ 26578 個、184 個であった。以上から、L1 と L2 にトレードオフ関係は確認されなかった。

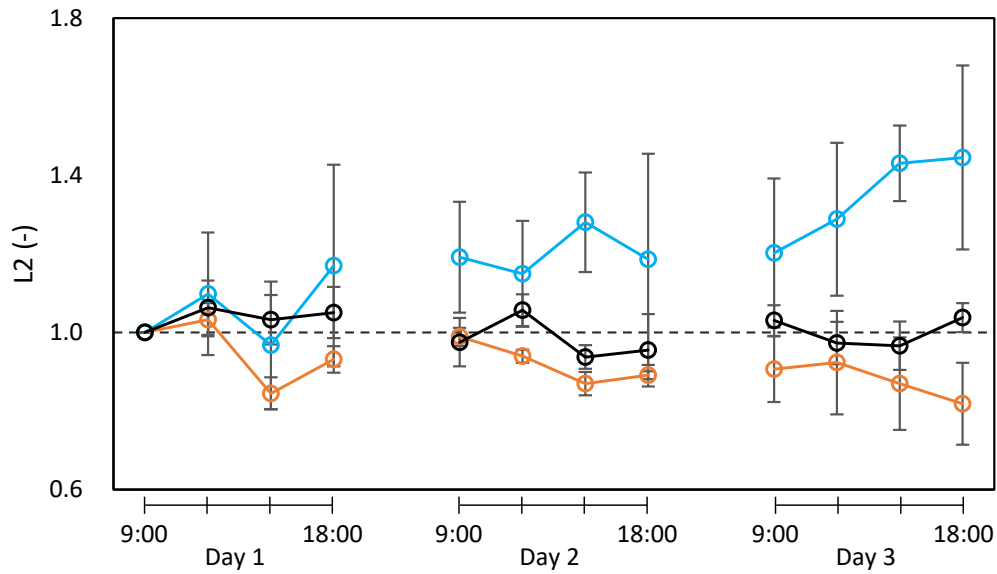
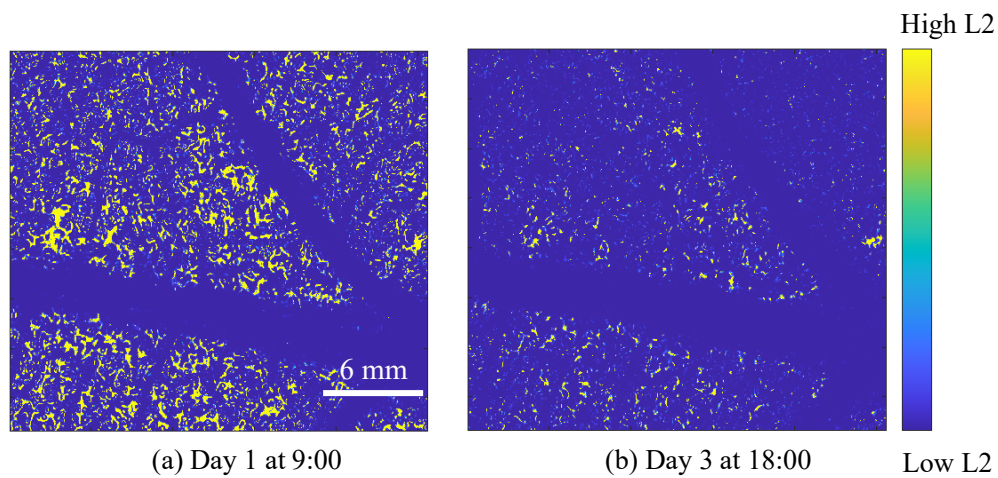


Fig. 4-9 L2 の変化



(a) Day 1 at 9:00

(b) Day 3 at 18:00

Low L2

Fig. 4-10 各画素に対する L2 解析のカラーマップ

L3, L4, L5 はそれぞれ輝度の不均一性, ランレングスの不均一性, ランの総数の指標である. いずれの特徴量でも, 塩分ストレス処理区で増加し, 水分ストレス処理区で減少し, 無処理区では概日リズムによって変動する傾向にあった. 式 (8) および式 (9) に示すように L3 と L4 は共にランの総数を計算し, L5 が総数の指標であることから, L3 と L4 の変化は L5 の変化に起因すると考えられる. 短いランが多い場合は総数が多くなるが, 逆に短いランが結合することで発生する長いランが多い場合には総数が減少する. 塩分ストレス処理区においては長いランの指標である L2 が減少したことで L5 の増加につながったと考え

られる。反対に水分ストレス処理区では、L2が増加したことからL5が減少したと考えられる。

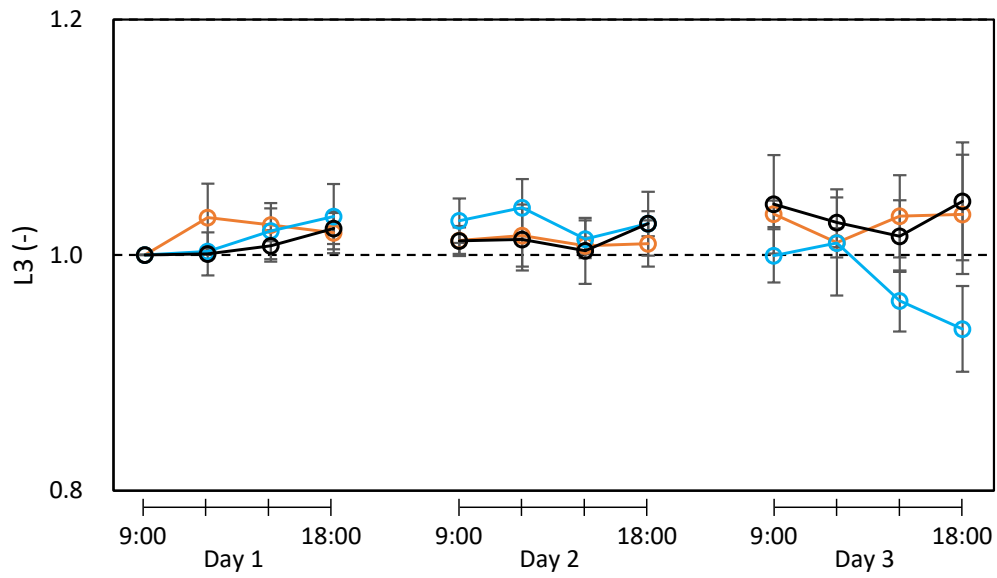


Fig. 4-11 L3 の変化

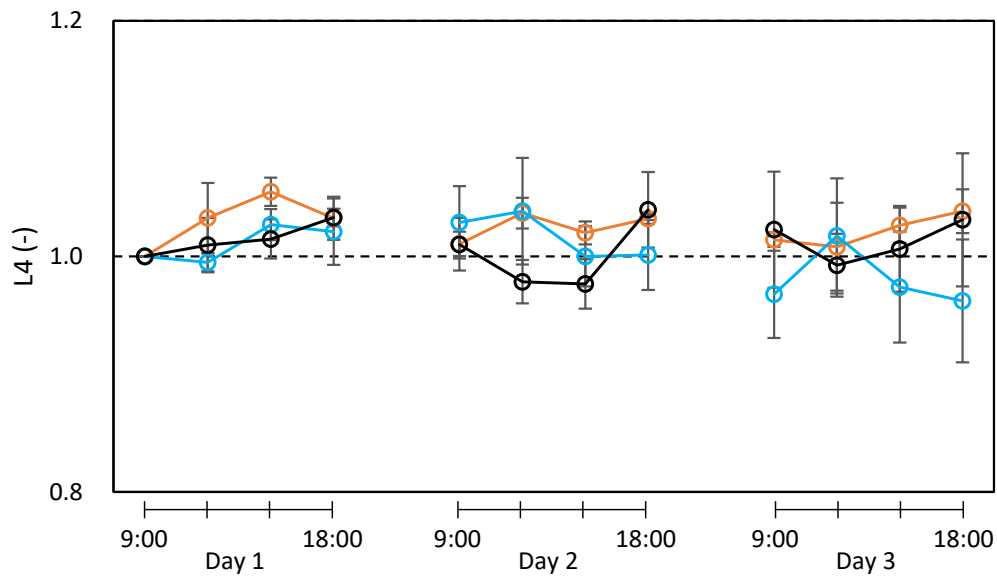


Fig. 4-12 L4 の変化

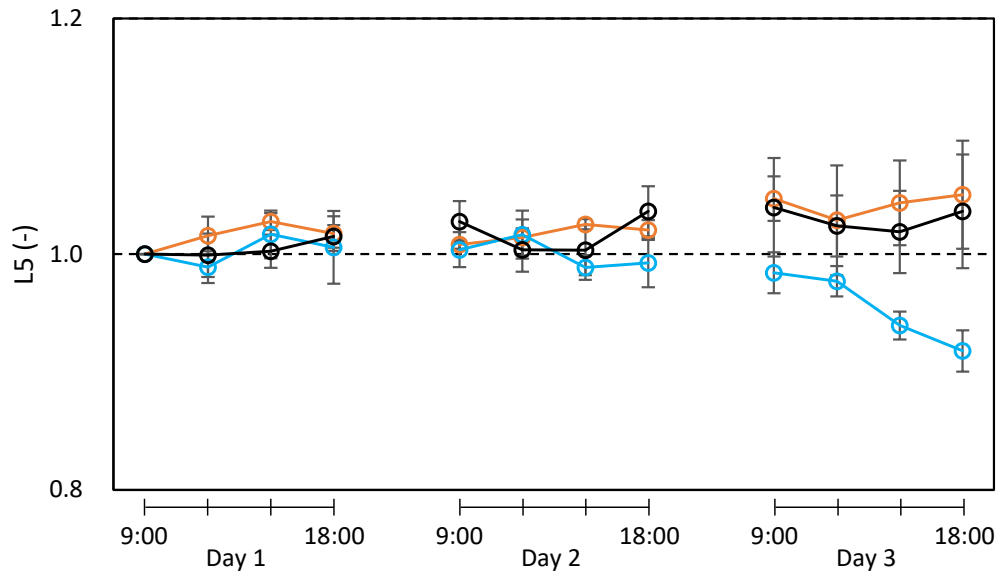


Fig. 4-13 L5 の変化

4.3.3 ストレス検出・分類に適した特徴量の検討

L1 は塩分・水分ストレス処理区間で明瞭な差は確認されなかったが、L2・L3・L4・L5 は塩分・水分ストレス処理区間で逆の傾向を示しており、特に L2 の変化量は他のランレングス特徴量や簡易植物生理指標として計測した SPAD や葉面温度、葉面積に比べて明瞭であった。また L2 は塩分ストレス処理区において 1 日目の 15:00 時点で値が低下しており、早期にストレス応答が確認できた。ただし Fig. 4-9 と Fig. 4-13 に示したように、塩分ストレス処理区と無処理区の違いが明瞭でなかった。そこで L2 と、L3・L4 に対して支配的であった L5 に関して、Fig. 4-14 ならびに Fig. 4-15 にストレス処理区の値を無処理区の値で除した値の変化を示す。なお本実験はストレス処理区間で別個体を計測しているため、各処理区の平均値を用いて除算した。その結果、L5 は無処理の変化に対して塩分ストレス処理区の変化が小さいが、L2 のグラフでは、無処理区が概日リズムによって変動したとしても塩分ストレス処理区の変化が大きかった。以上から、本研究において L2 が塩分ストレスの検出に最も適した特徴量であり、レーザスペックル法による塩分ストレスの判別に有効であることが示された。

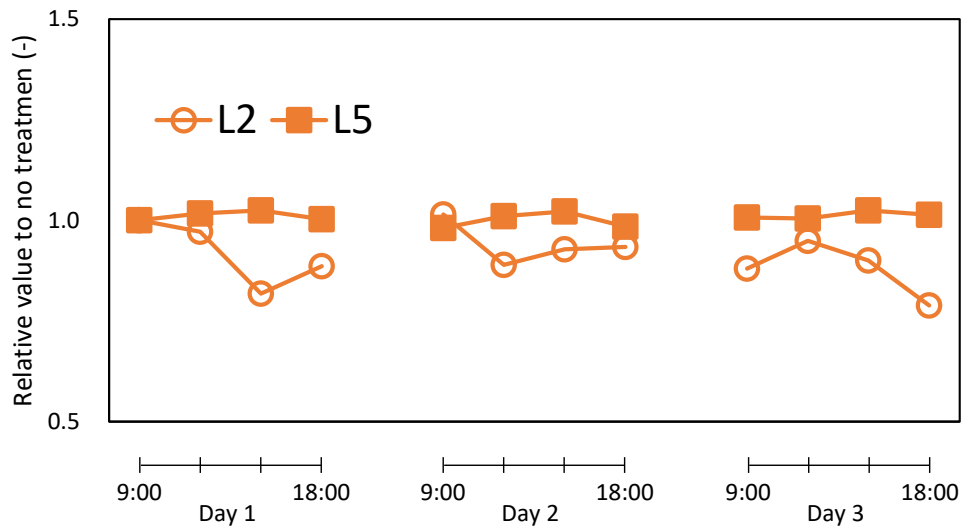


Fig. 4-14 無処理区に対する変化率の比較（塩分ストレス処理区）

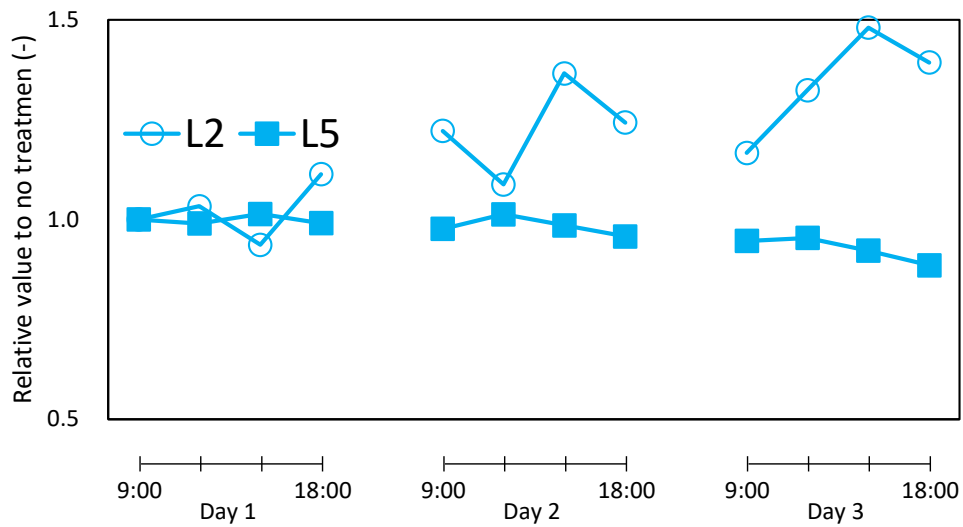


Fig. 4-15 無処理区に対する変化率の比較（水分ストレス処理区）

4.4 まとめと今後の展望

本実験の目的は、葉緑体動態やその形態に影響を与える塩分ストレスをレーザスペックル法によって検出することであった。塩分ストレス処理区および水分ストレス処理区の結果を比較すると、ランレングス特徴量 L2 が他の特徴量や SPAD や葉面温度、葉面積などの簡易的な植物生理指標よりも明確に変化することを確認した。L2 の解析カラーマップによって L2 は葉肉細胞、特に葉緑体の変化が反映されていると考察された。さらに塩分ストレ

ス処理区においてL2の変化は葉緑体の肥大化と移動に起因していたと考えられる。ただし、概日リズムによって無処理区のランレングス特徴量の変動していたため、塩分ストレス処理区との違いが不明瞭な計測時点が存在した。本研究においては、無処理区に対する変化量を確認し、塩分ストレス処理区におけるL2の変化が概日リズムによる変動よりも大きいことを示した。将来的に栽培現場では、ストレス処理区と無処理区で違いのあったSPADや葉面温度と併せて計測することで塩分ストレスを検出できると考えられる。今後の展望として、塩分ストレスの発生を検出するだけでなく、ストレスレベルの評価が求められる。また生育段階や植物種によっても検出・評価精度が異なると推察されるため、今後の検証が必要である。

第5章 総括

データ駆動型農業において、温湿度や土壌水分量など植物体周辺の環境情報を利用した栽培管理が進んでいる。例えば、施設栽培において、栽培環境の自動制御システムを導入し、室温、湿度、日射量などの情報から窓やカーテンの開閉を制御している例や、栽培環境のガス組成を計測し、二酸化炭素濃度を制御することで収量を増加させた例が挙げられる。今後、光合成・蒸散速度や呼吸速度など植物体の生理応答を生体情報として取得・活用することで、さらなる高品質・多収量生産が期待できるだけでなく、病気の防除を始めとした適期管理をすることで安定生産へ貢献できると考えられる。すでに光合成能力を間接的に評価するクロロフィル蛍光画像計測法やクロロフィルの吸光度を利用した葉緑素計などは実用化されているものの、複合的で複雑に誘導される植物生理応答に対して単一の生理指標での解釈は困難であり、多様な生体情報の計測・利活用が求められる。

本研究は植物センシング法としてレーザスペックル法に着目した。一般に光が物体に照射されると、肉眼では確認できないミクロな凹凸構造が表面や内部に存在するため照射光が乱反射・拡散する。光源がレーザ光の場合、単色性や直進性に加えてコヒーレント性（可干渉性）という特徴があるため、拡散した光が撮像素子上で干渉する結果、特殊な斑点模様“スペックル”が形成される。特に生体を対象とする場合には、生命活動に伴う動態が内部および表面に存在することから、拡散・干渉の条件が時間的に変動するため、スペックルの明るさは変動する（スペックル変動）。すなわち本手法はスペックル変動の解析から物体内部および表面の微視的な動態を評価する手法である。植物を対象とする場合、環境変化やストレスに応じて気孔開閉や色素の合成・分解など様々な応答を示すため、植物に対してレーザスペックル法を適用した場合には上記応答に対応した動態を検出できる可能性がある。さらに植物の起こす複合的かつ特異的に起こるストレス応答の動態を計測することで、各種刺激に対応した生理指標の提案や、生理応答の先駆的現象である情報伝達物質や植物ホルモンの動態計測による極早期ストレス指標など、新たな植物体情報の提案が期待できる。以上から、本研究の目的はレーザスペックル法による植物のストレス応答評価とした。

レーザスペックル法によって早期ストレス検出の可能性を調査するため、水分ストレス応答の検出可否を検討した。試料にはダイズ葉を用い、葉柄切断による疑似的な水分ストレスを処理した。また実験中の試料の状態を把握するため、光合成能力の間接的な指標となるSPADを計測した。解析方法にスペックル変動解析手法として既往の報告で用いられてきたFMおよびGDを適用した結果、いずれの手法でもストレス処理によって解析値の減少が確認された。原因として水分ストレス応答でABAなどの植物ホルモンが生産され、酵素活性や炭酸同化速度の低下などによる動態抑制および生体活性低下が考えられ、結果としてスペックル変動が減衰したと考察された。また解析結果をカラーマップとして画像化することで、水分輸送を担う主脈と側脈では解析値に差があり、葉面の部位によって構造的・生理

的な違いが反映されたことを可視化できた。解析方法による結果の違いとして、FM より GD の方が早期に値の減少を確認できただけでなく、SPAD の変化や目視によって葉の萎凋を確認するよりも早期であった。すなわちレーザスペックル法によるストレス早期検出の可能性が示された。ただし、本実験では動態を捉えるレーザスペックル法によって、いずれの生体内動態をストレス応答として捉えたのか明らかにできていない。スペックル変動の発生要因を究明できれば、動態の生理応答特性を利用したセンシングが実現できるだけでなく、種々の動態に関する情報を分離・抽出した複数の生理指標提案が期待できることから、具体的な動態の調査が求められる。

スペックル変動の要因究明のため、本研究では植物体内における代表的な動態である葉緑体に着目した。葉緑体は原形質流動に従って受動的に流動する姿が観察されるだけでなく、病原菌の感染によって流速を早めることや、光条件によって細胞内の自己位置を変化させる光定位運動など、能動的かつ可逆的に生理応答を示すことが知られている。さらに植物の活動や応答は生命の基本単位である細胞を起点として発現するため、スペックル変動から細胞内における葉緑体動態の初期兆候の捉えることで、影響が顕在化するよりも早期の対応が期待できる。

本実験では、葉緑体動態を電気刺激によって抑制し、その際のスペックル変動の変化を調査した。実験装置は、スペックル画像の取得に併せて光学顕微鏡による細胞観察を1つのサンプルに対して同時刻で実施できるものを構築した。また葉緑体動態の観察を容易にするため、試料にクチクラ層や気孔などがなく細胞が2層となっているオオカナダモを用いた。解析にはFM と GD を適用した。細胞観察の結果、電気刺激によって大部分の葉緑体動態は抑制され、刺激除去後は葉緑体動態の回復が確認された。スペックル変動は、電気刺激印加のタイミングで活性度を示す解析値が減少し、また動態の回復に応じて解析値はほぼ初期状態まで回復した。葉緑体動態の抑制中は、時間的にレーザ光が拡散されづらくなり、干渉条件の変化も起こりづらくなるため、スペックル変動が減衰したと考えられる。スペックル変動に対する葉緑体以外のオルガネラの影響について、数は葉緑体に比べて少なく、またサイズも1オーダー以上小さいことから葉緑体動態の変化が主としてスペックル変動に反映されたと考えられる。ただし、解析方法としてFM・GD は生体の中で比較的低速な植物体内動態を評価するには不適な可能性があったため、スペックル変動解析手法としてテクスチャ解析の1つであるランレングス行列解析の適用を試みた。本解析法において、同様の輝度値が特定の方向に連続する輝度の集合をランと呼ぶ。動態が活発でスペックル変動が激しい場合にランは短くなり、逆に動態が抑制されるとランは長くなりやすい。電気刺激印加によって葉緑体動態の抑制とスペックル変動の抑制が起こるため、短いランの指標 L1 は減少し、逆に長いランの指標 L2 は増加した。両者の変化量には差があり、L1 は完全には停止しなかった葉緑体動態によって短いランが発生し続けたため変化しづらかったと考えられる。さらに本研究では初期値からの相対値を表していたため、刺激印加前は短いランの数が多

く、L1 は変化しづらかった。一方、刺激前において長いランは短いランに比べて数が少なかったため L2 は変化しやすかった。輝度の不均一性の指標 L3 はスペックル変動の抑制によって輝度値が時間的に安定したため、値は減少した。また特徴量自体がランの総数に影響を受けるため、短いランが結合して長いランになることを考えると、スペックル変動の抑制でランの総数が減ったことも L3 減少の一因であると考えられる。長さの不均一性の指標 L4 が減少した原因として、L1 と L2 の結果から刺激前に多かった短いランが減少して長いランが増加したことで、不均一性が低下したためと考えられる。ランの総数の指標 L5 に関して、既述のように刺激印加に伴うスペックル変動の抑制によってランの総数が減少したため L5 は減少したと考えられる。なお、いずれの特徴量でも刺激前の変化は確認されず、刺激後は時間経過に伴って特徴量が初期値付近に回復した。5 つの特徴量を比較すると、刺激前後で最も変化率の大きかった L2 がストレスに伴う葉緑体動態の評価に適すると考えられる。以上から、レーザスペックル法による葉緑体動態評価に対してランレンジ行列解析の有用性を示し、葉緑体動態がスペックル変動の一因であることが示された。

前段落の結果は水草の一種であるオオカナダモが試料であった。そこで陸上植物のダイズを対象として、解析手法の有効性を調査した。ストレス処理として無処理区と水分ストレス処理区を設けた。結果、無処理区では値の変化は確認されず、水分ストレス処理区ではストレスに伴う植物活性の低下を反映して、長いランの指標 L2 が増加したことから、ランレンジ行列解析はダイズに対しても適用可能であると考えられる。さらにストレス状態の推定に必要な解析領域を検討した結果、1 つのスペックルよりも大きく解析領域を設定すること必要であり、スペックルサイズに依存すると考察された。

環境ストレスに対する植物生理応答の識別・検出可能性を調査するため、葉緑体の生理応答特性を利用した塩分ストレス・水分ストレス検出の可否を検討した。塩分・水分ストレスの原因はそれぞれ浸透圧差による吸収阻害と水分不足による吸収不能であり、初期症状が類似する。塩分ストレスの場合のみ葉緑体の肥大化や細胞内での移動が報告されているため、葉緑体動態を反映するスペックル変動解析が適用できると着想した。スペックル変動の解析にはランレンジ行列解析を適用した。ストレスの識別と検出におけるレーザスペックル法の有用性を検討するため、簡易植物生理指標として SPAD、葉面温度、葉面積を計測した。またストレス処理に伴う葉緑体の形態変化の観察も実施した。結果、SPAD は、塩分ストレス処理区では2日目まで水分不足による濃縮効果で増加したが、3日目にストレスによるクロロフィル分解が起こり初期値と同程度まで減少した。水分ストレス処理区ではクロロフィルの分解よりも水分減少による濃縮が優位となり SPAD は上昇し続けた。葉面積は実験期間が3日間と短期であり、また塩分・水分ストレスで初期症状が似ていることから、両ストレス処理区間で明瞭な変化は確認されなかった。無処理区における SPAD および葉面積は試料の成長に伴い増加した。葉面温度は、いずれの処理区でも増加し、環境光として照射していたメタルハライドランプからの熱が原因であると考察された。ただしストレ

ス処理区と比較して葉内水分が保持された無処理区では、葉面温度の上昇が緩やかであった。ランレングス特徴量について、短いランの指標 L1 はいずれの処理区間でも一定で、差異は確認されなかった。原因として、塩分に対して比較的耐性があると推察されるミトコンドリアなど他のオルガネラ動態が考えられる。ストレスの有無にかかわらず葉緑体以外のオルガネラの動態によってスペックル変動が引き起こされ短いランが発生し続けた結果、L1 は処理区間で差が確認されなかったと考えられる。長いランの指標 L2 は塩分ストレス処理区で減少、水分ストレス処理区で増加、無処理区では概日リズムによって変動した。塩分ストレス処理区において、葉緑体のサイズが大きくなることを細胞観察により確認し、また塩分ストレス処理によって肥大化した葉緑体が細胞全体へ移動することも報告されている。スペックル変動は光が粒子動態に当たって拡散・干渉条件が変化することで生じるため、肥大化した葉緑体が細胞全体へ移動したことによってレーザー光が拡散されやすくなり、スペックル変動の促進および L2 の減少につながったと考えられる。さらに L2 のカラーマップによって、時間経過に伴って葉肉細胞部分で解析値が減少したことから、L2 は主として葉肉細胞ならびに葉緑体動態が反映されたと考えられる。なお、水分ストレス処理区の変化は先行研究を裏付ける結果であった。L3, L4, L5 はいずれも塩分ストレス処理区で増加、水分ストレス処理区で減少、無処理区では概日リズムによって変動した。L3, L4 はそれぞれ輝度の不均一性、ランレングスの不均一性の指標であるが、ともにランの総数に影響されることから、L5 の変化に支配的であったと考えられる。なお、L5 の増減について、塩分ストレス処理では L2 の減少によるラン総数の増加、反対に水分ストレス処理区では、L2 が増加によるラン総数の減少が原因と考えられる。

ストレスの識別・検出に関して、ランレングス特徴量のうち、L2 から L5 は塩分ストレス処理区と水分ストレス処理区で逆の傾向を示した。簡易植物生理指標ではストレス処理に伴うクロロフィルの分解などを反映した結果が確認されたものの、その値の変化率は L2 よりも小さかった。したがって、レーザスペックル法による塩分・水分ストレスの識別に加え、植物生理応答の評価法として本手法が有用であることが示された。

今後は、本実験よりも高・低濃度の塩水を処理することで段階的なストレスの検出・評価が求められるだけでなく、生育段階や植物種による検出・評価精度の違いの調査が必要である。さらに本研究によって葉緑体動態がスペックル変動の一因であることが示されたが、ミトコンドリアやブラウン運動など先行研究で変動要因に該当するとされている動態については未検証である。変動要因のさらなる究明によって、各動態に由来するスペックル変動の分離やそれに応じた新たな生理指標の提案が望まれる。

Nomenclature

(x, y)	Coordinate of the image
k, l	Number of frames on the consecutive images
$I_k(x, y)$	Intensity of each pixel at k^{th} frame
$\sigma(x, y)$	Standard deviation of each pixel
$\bar{I}(x, y)$	Average value of the $I_k(x, y)$
f	Intensity of the run
l	Run length
$M(f, l)$	Element of the run-length matrix
A	Total number of pixels in a speckle image

謝辞

本研究および本論文は多くの方のお力添えを賜り完成に至りました。ここに記して心より御礼申し上げます。

学士課程より授業ならびに研究で御指導・御鞭撻を賜り、お忙しい中にもかかわらず学位審査委員を御快諾くださいました、主査 村上克介教授、副査 王秀崙教授、森尾吉成教授、長菅輝義教授、福島崇志准教授に心から感謝の意を表します。

6年もの間に亘り終始丁寧かつ熱心な御指導を頂き、研究の難しさだけでなく楽しさ、そして研究者として心構えを教えていただきました福島崇志准教授、化学分析の基礎を御教授くださり、研究内容に対して親身なアドバイスをくださった滝沢憲治助教、退官後も折に触れて気にかけて、あたたかい言葉をかけてくださった佐藤邦夫名誉教授に深くお礼申し上げます。また、日々の研究室生活を支え、賑やかな学生生活を送らせてくださった応用環境情報学研究室および環境情報システム工学講座の先輩、同輩、後輩方に深く感謝いたします。

これまであたたかく応援してくれた両親、見守ってくれた兄弟ならびに御協力・御支援くださいました皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げます。

なお本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2137 の支援を受けたものです。

参考文献

- 相津佳永, 朝倉利光 (1990) バイオスペックル現象とその生体への応用, *レーザー研究*, 18(5), 321–335.
- 荒木陽一, 五島康 (1987) プレッシャーチャンバー法のトマト小葉への適用, *園芸学会雑誌*, 56(3), 328–333.
- Asanuma A., H. Toyoda, S. Shimada, I. Asanuma (2011) A possibility of an index of NDVI and SPAD to estimate protein contents of rice, *Journal of the Japan society of photogrammetry and remote sensing*, 50(1), 34–39.
- Begg J., N. Turner (1976) Crop water deficits, *Advances in agronomy*, 28, 161–217.
- Borhan M.S., S. Panigrahi, M. A. Satter, H. Gu (2017) Evaluation of computer imaging technique for predicting the SPAD readings in potato leaves, *Information Processing in Agriculture*, 4(4), 275–282.
- Braga R. A., G. F. Rabelo, L. R. Granato, E. F. Santos, J. C. Machado, R. Arizaga, H. J. Rabal, M. Trivi (2005) Detection of Fungi in Beans by Laser Biospeckle Technique, *Biosystems Engineering* 91(4), 465–569.
- Braga R. A., L. Dupuy, M. Pasqual, R. R. Cardoso (2009) Live biospeckle laser imaging of root tissues. *European Biophysics Journal*, 38, 679–686.
- Breusegem F. V., J. F. Dat (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141, 384–390.
- Cardoso R. R., A. G. Costa, C. M. B. Nobre, R. A. Braga (2011). Frequency signature of water activity by biospeckle laser, *Optics Commun.*, 284(8), 2131–2136.
- Crafts-Brandner S. J., M. E. Salvucci (2002) Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize to heat stress. *Plant physiology*, 129(4), 1773–1780.
- Dhanotia J., L. Bopche, V. Bhatia, S. Prakash (2017) Quality assessment of medicinal leaves through biospeckle technique. *Advances in Optical Science and Engineering*, 389–294.
- Farooq M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, S. M. A. Basra (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture*, 153–188, doi: org/10.1007/978-90-481-2666-8_12.
- Fujii H., T. Asakura, K. Nohira, Y. Shintomi, T. Ohura (1985) Blood flow observed by time-varying laser speckle, *Optics Letters*, 10(3), 104–106.
- Fukutoku Y. (1996) Effect of water stress on nitrate assimilation in soybean leaves, *Bull. Fac. Agr., Saga Univ*, 80, 69–76.
- 古谷雅樹, 宮地重遠, 玖村敦彦 (1972) 「植物生理学講座 5 物質の交換と輸送」, 朝倉書店, 東京, p134.
- Galli V., R. S. Messias, E. C. Perin, J. M. Borowski, A. L. Bamberg, C. V. Rombaldi (2016) Mild salt stress improves strawberry fruit quality. *LWT*, 73, 693–699.
- Goto E. (2011) Introduction and future prospects of plant factory that uses light emitting diodes as a light source. *Oyo Buturi*, 80(1), 43–45.
- Goussi R., A. Manaa, W. Derbali S. Cantamessa, C. Abdelly, R. Barbato (2018) Comparative analysis of salt stress, duration and intensity, on the chloroplast ultrastructure and photosynthetic apparatus in *Thellungiella salsuginea*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.047.
- Hino A. (2005) An essay on transpiration from stomata and related phenomena. *Journal of Japan Society of Fluid Mechanics*, 24(5), 473–481.
- 平林純, 竹本修三, 鈎卯三郎, 田中豊, 天神林孝二 (1993) 電子式スペックル・パターン干渉計を用いた地殻応力測定装置の開発, *地震*, 46(2), 135–142.

- 平沢正 (2001) 植物の体内水分調整と水輸送, 日本作物学会紀事, 70(4), 477-488.
- Ikeda T., R. Ueda (1964) Light and electron microscope studies on the senescence of chloroplasts in Elodea leaf cells, *Journal of plant research*, 77(915), 336-341.
- Inoue Y. (1990) Remote detection of physiological depression in crop plants with infrared thermal imagery, *Japanese journal of crop science*, 59(4), 762-768.
- 石原邦 (1997) 水環境に対する植物の反応について, 土壌の物理性, 76, 23-29.
- 石澤広明, 松尾司, 三木誉史 (2009) レーザスペックル法の植物水分ストレス検出への適用, 計測自動制御学会, 45(2), 127-131.
- 門野博史 (2004) 統計干渉法による植物を通じた環境計測, 応用物理, 73(6), 772-775.
- 加川貴俊 (2002) 光を求めて動く葉緑体の運動機構の解明-青色光受容体フォトトロピンの役割-, 「さきがけ研究 21」研究報告会「素過程と連携」領域講演要旨集, 10-11.
- 上坪英治 (1972) 原形質繊維の運動, 生物物理, 12(2), 58-68.
- 亀岡孝治, 堀部和雄 (1994) オオムギ子葉鞘細胞における画像解析 (第 1 報), 農業機械学会誌, 56(4), 93-99.
- Karamanos A. J. (1978) Water Stress and Leaf Growth of Field Beans (*Vicia faba* L.) in the Field: Leaf Number and Total Leaf Area. *Annals of Botany*, 42(6), 1393-1402.
- 笠原賢洋, 和田正三 (2003) 高等植物の青色光受容機構の新展開, 生物物理, 43(4), 174-179.
- 川崎亮, 渡辺龍三, 島田平八, 鈴木英夫 (1986) レーザースペックル法による金属-セラミックス接合界面におけるひずみ分布の測定. 日本金属学会誌, 50(12), 1056-1060.
- Kikuyama M. (1991) A wireless method for stimulating Characeae internodal cells, *Journal of the university of the air*, 9, 199-205.
- 菊山宗弘 (1995) 原形質流動のカルシウムによる制御, *RADIOISOTOPES*, 44(2), 155-156.
- 小林幸一, 山口一郎 (2008) レーザ・スペックルひずみ計による植物の生長測定. 電子情報通信学会技術研究報告. LQE, レーザ・量子エレクトロニクス, 108(51), 55-58.
- 小西充洋, 大政謙次 (2003) ホウレンソウ葉の水分欠乏に伴う励起-蛍光 matrix への影響-. 農業情報研究, 12(1), 25-32.
- 国政あゆ, 大藪崇司, 澤田佳宏, 山本聡, 藤原道郎 (2012) 小型クロロフィル蛍光測定器を用いた水ストレスによる樹勢衰退の客観的診断の可能性, 日本緑化工学会誌, 38(1), 56-60.
- Kurahashi Y., T. Horiba, K. Morita (2001) Evaluation of trees vitality using a spectroradiometer, *Aichi Industrial Technology Institute*, 37, 4-7.
- Lata C., M. Muthamilarasan, M. Prasad (2015) Drought stress responses and signal transduction in plants. *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, 195-225, doi: org/10.1007/978-1-4939-2540-7_7.
- Leister D., C. Varotto, P. Pesaresi, A. Niwergall, F. Salamini (1999) Large-scale evaluation of plant growth in *Arabidopsis thaliana* by non-invasive image analysis, *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(9), 671-678.
- Liu F., H. Stutzel (2004) Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 102(1), 15-27.
- Luo Q., B. Yu, Y. Liu (2005) Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. *Journal of Plant Physiology*, 162(9), 1003-1012.
- Lynch J., V. S. Polito, A. Lauchli (1989) Salinity stress increases cytoplasmic ca activity in Maize root protoplasts. *Plant Physiology*, 90(4), 1271-1274.
- Ma Y., M. C. Dias, H. Freitas (2020) Drought and salinity stress responses and microbe induced

- tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.591911>.
- Mineyuki Y., M. Yamada, M. Takagi, M. Wada, M. Furuya (1983) A digital image processing technique for the analysis of particle movements: its application to organdie movements during mitosis in *Adiantum protonemata*, *Plant and cell physiology*, 24(2), 225–234.
- Mitchell J. P., C. Shennan, S. R. Grattan, D. M. May (1991) Tomato fruit yields and quality under water deficit and salinity, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 215–221.
- 森田勝也, 荒木卓哉, 上野修 (2010) 塩分ストレス下におけるイネ葉身内 Na^+ : Nona Bokra と日本晴の比較. *日本作物學會記事*, 79, 312–313.
- 永井玲子 (1999) 原形質流動, *植物の化学調節*, 34(2), 236–248.
- 農林水産 (2021) 農業新技術活用事例, <https://www.maff.go.jp/j/kanbo/smart/jirei/smajirei_2019.html#sisetsu_engei>, 2022年8月18日参照.
- 野坂治郎, 靱井和郎, 矢野友久 (1993) 土壤-植物根系における塩分集積. *農業土木学会論文集*, 164, 55–63.
- 越智誠, 矢野裕也, 寺尾京平, 鈴木孝明, 高尾英邦, 小林剛, 片岡郁雄 (2016) MEMS 技術を用いた超小型道管流センサ, *日本生態学会誌*, 66, 465–475.
- Oi T., S. Enomoto, T. Nakao, S. Arai, K. Yamane, M. Taniguchi (2017) Three-dimensional intracellular structure of a whole rice mesophyll cell observed with FIBSEM. *Annals of Botany*, 120, 21–28.
- Omasa K., K. Takayama (2003) Simultaneous Measurement of Stomatal Conductance, Non-photochemical Quenching, and Photochemical Yield of Photosystem II in Intact Leaves by Thermal and Chlorophyll Fluorescence Imaging, *Plant Cell Physiol.*, 44(12) 1290–1300.
- Ono A., K. Kajiwara, Y. Honda (2010) A basic study to detect water stress of vegetation in its early stages. *Journal of the Japan society of photogrammetry and remote sensing*, 49(2), 83–92.
- Oulamara A., G. Tribillon, J. Duvernoy (1989). Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *J. of Modern Optics*, 36(2), 165–179.
- 小山田浩一, 村井保 (2013) 高濃度二酸化炭素くん蒸処理のナミハダニ *Tetranychus urticae* Koch に対する防除効果とイチゴ苗に及ぼす影響, *日本応用動物昆虫学会誌*, 57(4), 249–256.
- Rabal H. J., R. A. Braga (2008) *Dynamic laser speckle and applications*. CRC press (Chapter 8, p. 187).
- Rahnesan Z., F. Nasibi, A. A. Moghadam (2018) Effects of salinity stress on some growth, physiological, biochemical parameters and nutrients in two pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstocks. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 73–82.
- Rana M., M. Tester (2008) Mechanisms of salinity tolerance, *Annual review of plant biology*, 59, 651–681.
- Riahi M. R., H. Latifi, M. Sajjadi (2006) Speckle correlation photography for the study of water content and sap flow in plant leaves. *Applied Optics*, 45(29), 7674–7678.
- Ruth B. (1986). Superposition of two dynamic speckle patterns an application to non-contact blood flow measurements. *J. of Modern Opt.*, 34(2), 257–273.
- Salama S., S. Trivedi, M. Bushva, A. A. Arafa, G. Garab, L. Erdei (1994) Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplast structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 144(2), 241–247.
- Salvucci M. E., S. J. Crafts-Brandner (2004) Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 120(2), 179–186.
- 実岡寛文 (2010) 植物の水および塩ストレス耐性の栄養生理学的研究, *日本土壤肥料學雜誌*, 81(5), 447–450.

- 佐野元昭, 内川千春, 中川裕, 大平武征, 白川貴志, 杉本恒美 (2017) CCD カメラを用いた葉の固有振動数計測による植物の水分ストレス推定, 桐蔭論叢, 35, 197-201.
- 佐藤慧拓, 窪田佳寛, 望月修 (2016) 葉脈のネットワーク構造, 日本機械学会論文集, 82(833), 1-10.
- Sheriff D. W., D. Whitehead (1984) Photosynthesis and wood structure in *Pinus radiata* D. Don during dehydration and immediately after rewatering, *Plant Cell and Environment*, 7, 53-62.
- 新免輝夫, 富永義人, 田沢仁 (1985) 車軸藻脱膜モデルによる原形質流動の研究, 生物物理, 25(1), 1-16.
- Soares R. R., H. C. Barbosa, R. A. Braga, J. V. L. Botega, G. W. Horgan (2013) Biospeckle PIV (Particle Image Velocimetry) for analyzing fluid flow, *Flow Measurement and Instrumentation*, 30, 9098.
- 鈴木敏征, 村瀬治比古, 穂波信雄 (1999) 画像情報によるキャベツセル成型苗個体群の非破壊生育計測 (第1報), 農業機械学会誌, 61(2), 45-51.
- 只木良也, 木下真実子 (1988) 葉緑素計 SPAD-501 を用いて測定した樹木の葉のクロロフィル濃度, 日本林学会誌, 70(11), 488-490.
- Taibi K., F. Taibi, L. A. Abderrahim, A. Ennajah, M. Belkhdja, J. M. Mulet (2016) Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105, 306-312.
- 高木慎吾 (2012) ストロボスコープ型遠心顕微鏡による運動現象の解析, *Plant Morphology*, 24, 5-11.
- 高橋太郎, 石神靖弘, 後藤英司, 新堀健二, 後藤格士 (2012) 換気窓解放時の大規模温室での CO₂ 施用がトマトの成長および収量に及ぼす影響, *植物環境工学*, 24(2), 110-114.
- 竹本修三, 坪井泰住, 天神林孝二, H.スベツラー, 藤森邦夫, 東敏博 (1994) 地震予知のためのマン・マシン・インターフェイスにおける地殻変動の可視化の研究, 日産科学振興財団研究報告会, 17, 57-59.
- 田村明子, 小暮朗子, 渡辺五郎, 岸章治, 堀貞夫 (2013) レーザースペックルフローグラフィを用いた正常眼における網脈絡膜血流動態と加齢の関係, *日本眼科学会雑誌*, 177(2), 110-116.
- 瀧澤美奈子 (2008) 「植物まるかじり叢書植物は感じて生きている」, 化学同人, 京都, p46.
- Tanaka (Oda) A., H. Usuki, K. Fukuda (2009) Relationship between vitality estimated by leaf SPAD value and diurnal trends of photosynthesis and transpiration in *Zelkova serrata* Makino trees. *Tree and Forest Health*, 13(1), 12-16.
- Tanaka (Oda) A., H. Kataoka, M. Mishima, H. Hasegawa, H. Kobayashi (2019) The effect of water stress on the photosynthesis and transpiration rate of *Laburnum×watereri* 'Vossii'. *Tree and forest health*, 23(2), 108-109.
- Tazawa M., U. Kishimoto (1968). Cessation of cytoplasmic streaming of *Chara* internodes during action potential. *Plant and Cell Physiology*, 9(2), 361-368.
- Tominaga Y., S. Muto, T. Shimmen, M. Tazawa (1985) Calmodulin and Ca²⁺-controlled cytoplasmic streaming in characean cells. *Cell Structure and Function*, 10(4), 315-325.
- 富永義人, 松本友孝, 朽津和幸, 且原真木, 田沢仁, 宮地重遠 (1989) オオカナダモにおける原形質流動と細胞質 pH におよぼす光とヒスチジンの効果, 日本植物生理学会年会お

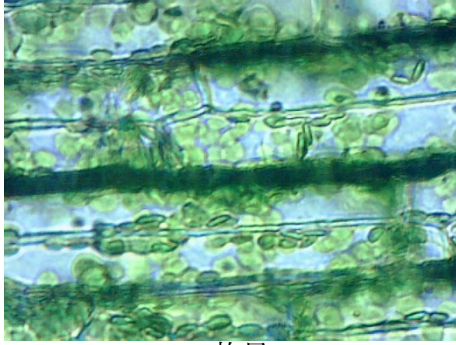
よびシンポジウム講演要旨集, 29, 385.

- Tominaga M., A. Kimura, E. Yokota, T. Haraguchi, T. Shimmen, K. Yamamoto, A. Nakano, K. Ito (2013) Cytoplasmic streaming velocity as a plant size determinant, *Developmental cell*, 27(3), 345–352.
- 対馬健祐, 檜村博正, 中原朗, 福富久之, 大菅俊明, 藤居仁 (1990) 胃粘膜血流の画像化 (レーザースペックル法), *日本レーザー医学会誌*, 11(Supplement), 353–356.
- Verma S., S. N. Mishra (2005) Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology*, 162, 669–677.
- Vigneau N., M. Ecartot, G. Rabatela, P. Roumet (2011) Potential of field hyperspectral imaging as a non destructive method to assess leaf nitrogen content in Wheat, *Field Crops Research*, 122(1), 25–31.
- 山口一郎 (1977) スペックルの性質と応用, *応用物理*, 46(8), 803–812.
- 山本隆儀, 渡部俊三 (1982) 葉の水ストレス及び葉やけが‘バートレット’の光合成に及ぼす影響, *園芸学会雑誌*, 51(1), 10–28.
- 山中勤, 開発一郎, 中谷重紀, 飯田真一 (1999) デジタル式ヒートパルスセンサーによる樹液流速測定, *地下水学会誌*, 41(4), 307–318.
- Yamane K., K. Hayakawa, M. Kawasaki, M. Taniguchi, H. Miyake (2003) Bundle sheath chloroplasts of rice are more sensitive to drought stress than mesophyll chloroplasts. *Journal of Plant Physiology*, 160(11), 1319–1327.
- Yamane K., M. Kawasaki, M. Taniguchi, H. Miyake (2003) Differential effect of NaCl and polyethylene glycol on the ultrastructure of chloroplasts in rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 160(5), 573–575.
- 吉里勝利 (2012) 「スクエア最新図説生物」, 第一学習社, 東京 (p.206).
- Zandt P. A. V., M. A. Tobler, E. Mouton, K. H. Hasenstein, S. Mopper (2003) Positive and negative consequences of salinity stress for the growth and reproduction of the clonal plant, *Iris hexagona*. *Journal of Ecology*, 91(5), 837–846.
- Zhang P., M. Senge, K. Yoshiyama, K. Ito, Y. Dai, F. Zhang (2017) Effects of low salinity stress on growth, yield and water use efficiency of tomato under soilless cultivation. *Transactions of The Japanese Society of Irrigation, Drainage and Rural Engineering*, 85(1), 15–21.

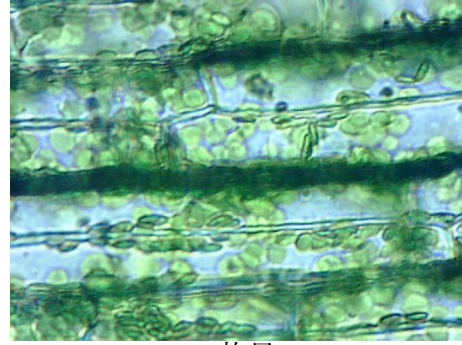
付録

付録 1

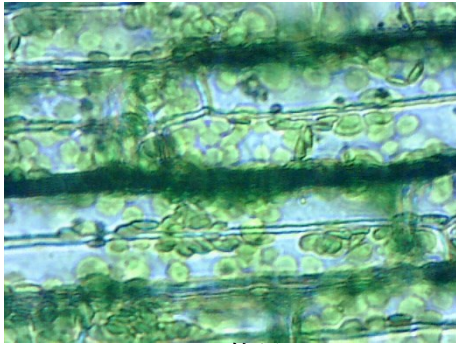
細胞観察における連続画像例



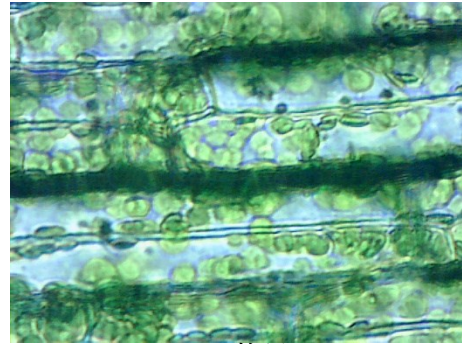
1 枚目



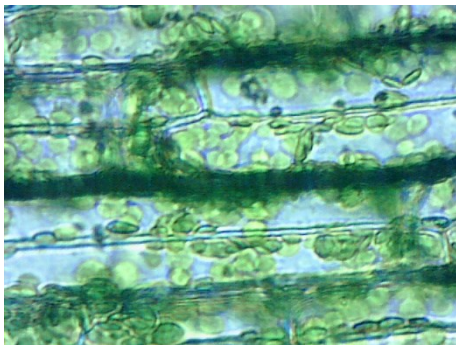
5 枚目



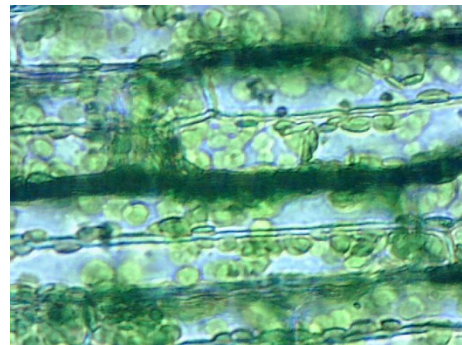
10 枚目



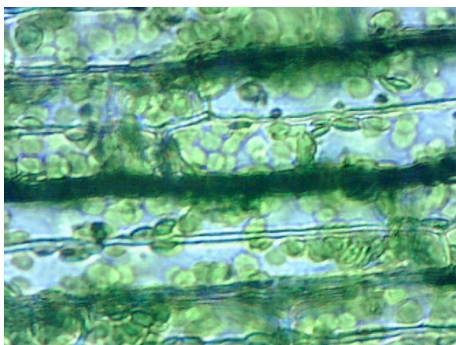
15 枚目



20 枚目



25 枚目



30 枚目

付録 2

FM の解析プログラム (2.3 に該当)

%初期化

clearvars

close all

%ファイル参照先の指定

fileName='C:\Users\%LS';

imgF=sprintf('%s\sample.tif',fileName);

%解析枚数を設定

flameN=300;

%カラーマップのスケールを設定

clims=[0,1];

%各画像の平均輝度保存用配列

Iavg=zeros(1,flameN);

%画像間で計算した GD を積算する配列

FM=zeros(480,640);

%FM の計算

for fileNo=1:flameN-1

 %1 枚目

 I1=double(imread(imgF,fileNo));

 %2 枚目

 I2=double(imread(imgF,fileNo+1));

 %各画像の平均輝度の保存

 Iavg(1,fileNo)=mean(I1(:));

 %FM の分母および分子をそれぞれ計算

 A=abs(I2-I1);


```

B=abs(I2+I1);

%分母が 0 となる画素は FM 値を 0 とする
A(B==0)=0;
B(B==0)=1;

%各画像の FM 値を積算
FM=FM+A./B;

end
%for 文が (flameN-1) までなので, (flameN) 番目の平均輝度を保存
Iavg(1,flameN)=mean(I2(:));

%FM300 枚分の平均を算出
FM=FM/(flameN-1);

%FM の全画素に亘る平均値を算出
FMavg=mean(FM(:));

%カラーマップ作成用に規格化
FM=FM/10;

%ファイル名指定および保存
outputFilename = sprintf('test.bmp');
imagesc(FM,clims);
colorbar;
saveas(gcf, outputFilename);

%解析終了音
beep

```

付録 3

GD の解析プログラム (2.3 に該当)

```
%初期化
clearvars
close all

%ファイル参照先の指定
fileName='C:\Users\%s\LS';
imgF=sprintf('%s\sample.tif',fileName);

%解析枚数を設定
flameN=300;

%カラーマップのスケールを設定
clims=[0,1];

%各画像の平均輝度保存用配列
Iavg=zeros(1,flameN);

%画像間で計算した GD を積算する配列
GD=zeros(480,640);

%平均値算出のため, 計算回数 (除数) カウント用変数
c=0;

%GD の計算
for i=1:flameN-1
    %1 枚目
    I1=double(imread(imgF,i));

    %各画像の平均輝度の保存
    Iavg(1,i)=mean(I1(:));

    for k=i:flameN
        %2 枚目
```

```

I2=double(imread(imgF,i+1));

%各画像の GD 値を積算
GD=GD+abs(I1-I2);

%計算回数カウント
c=c+1;

    end
end
% (flameN) 番目の平均輝度を保存
Iavg(1,flameN)=mean(I2(:));

%GD の平均を算出
GD=GD/c;

%GD の全画素に亘る平均値を算出
GDavg=mean(GD(:));

%カラーマップ作成用に規格化
GD=GD/10;

%ファイル名指定および保存
outputFilename = sprintf('test.bmp');
imagesc(GD,clims);
colorbar;
saveas(gcf, outputFilename);

%解析終了音
beep

```

付録 4

細胞観察画像の解析プログラム (3.2.3 に該当)

```
clearvars
close all

%解析対象画像のプロパティ設定
hight=480;
width=640;
N=30;

%全画像をまとめる配列宣言
I=zeros(hight,width,N);

%カラーマップのスケールを設定
clims=[0 1];

%画像まとめ
for fileNo=1:N
    fileName='C:\¥¥Users¥¥¥CellObservation';
    imgF=sprintf('%s.tif',fileName);
    I(:, :, fileNo)=double(imread(imgF,fileNo));
end

%画像間で計算した SD および平均輝度を積算する配列
SD=zeros(hight,width);
AVG=zeros(hight,width);

%各画素における SD および平均輝度の算出
for i=1:hight
    for j=1:width
        SD(i,j)=std(I(i,j,:));
        AVG(i,j)=mean(I(i,j,:));
    end
end
end
```

```
%変動係数 CV の計算
CV=SD./AVG;
CVavg=mean(CV(:));
CVsd=std(CV(:));

%カラーマップ作製
outputFilename = sprintf('test.bmp');
imagesc(CV,clims);
saveas(gcf, outputFilename);

close all
beep
```

付録 5

ランレングス行列解析の解析プログラム (3.3 に該当)

```
%初期化
```

```
clearvars
```

```
close all
```

```
%撮影枚数
```

```
N=300;
```

```
%解像度および読み込む行・列の最大の設定
```

```
colMax=1024;
```

```
rowMax=768;
```

```
%階調数の設定
```

```
ToneVal=32;
```

```
%Time History Speckle Pattern の配列宣言
```

```
THSP=zeros(rowMax,N);
```

```
%ランレングス行列の配列宣言
```

```
runMatrix=zeros(ToneVal,N);
```

```
% 画像読み込み
```

```
imgF=sprintf('C:\Users\%s\%s.tif');
```

```
for colRead=1:colMax
```

```
    %THSP の作成
```

```
    for fileNo=1:N
```

```
THSP(:,fileNo)=double(imread(imgF,fileNo,'PixelRegion',{[1,rowMax],[colRead,colRead]}));
```

```

end

%輝度階調の調整
THSP=round(THSP*(ToneVal-1)/255);

%ランのカウント用変数
length=1;

%列ごとにランのカウント
for row=1:rowMax
    for t=1:N-1

        %右隣に同輝度が続く限り length をカウントアップ
        if THSP(row,t)==THSP(row,t+1)
            length=length+1;

            %THSP の最終列まで計算したら次の行へ
            if t==N-1
                a=THSP(row,t)+1;
                runMatrix(a,length)=runMatrix(a,length)+1;
                length=1;
            end

            %右隣に異なる輝度値ならカウントアップをやめる
            elseif THSP(row,t)~=THSP(row,t+1)
                a=THSP(row,t)+1;
                runMatrix(a,length)=runMatrix(a,length)+1;
                length=1;

            end

        end

    end

end

end

end

%L1, L2 の計算用配列

```

```

L=zeros(1,N);

%L1 の計算
for length=1:N
    L=runMatrix(:,length)/length^2;
end
L1=sum(L(:))/sum(runMatrix(:));

%L2 の計算
for length=1:N
    L(:,length)=runMatrix(:,length)*length^2;
end
L2=sum(L(:))/sum(runMatrix(:));

%L3 の計算
L3=sum((sum(runMatrix)).^2)/sum(runMatrix(:));

%L4 の計算
L4=sum((sum(runMatrix.')).^2)/sum(runMatrix(:));

%L5 の計算
L5=sum(runMatrix(:))/(rowMax*N);

%カラーマップの作製および保存
Mname=sprintf('test.bmp');
figure
imagesc(runMatrix,clims);
saveas(gcf,Mname);

beep

```