

多重焦点顕微鏡画像列からの細胞の3次元形状復元

山口 貴大¹ 長原 一² 諸岡 健一¹ 中島 悠太² 浦西 友樹² 倉爪 亮¹ 大野 英治³

概要: 本研究では、焦点を変えながら撮影した細胞の多重焦点顕微鏡画像列から、細胞の3次元形状を推定する手法を提案する。まず、細胞内の物質によって透過光が減衰し、それが顕微鏡のレンズにより集光されることで顕微鏡画像が得られる、という光学モデルを仮定し、この光学モデルに基づいた画像生成を定式化する。この式により推定される輝度値と、実際の画像の輝度値の誤差を最小化することで、細胞の3次元透過率分布を推定し、それにより形状復元を行う。シミュレーションでは、細胞のCGモデルを使って多重焦点画像列を人工的に作成し、提案手法より推定した透過率と、真値を比較することで、本手法の有効性を確認した。また、実際の細胞の画像から3次元形状復元を行った。

3D Cell Shape Reconstruction From Multifocal Microscope Image Sequence

1. はじめに

光学顕微鏡による細胞の観察は、生物学や医学などで幅広く用いられている。具体的には、癌の確定診断に用いられる診断方法である細胞診断や、iPS細胞の培養や分化の観察などが挙げられる。一般的な顕微鏡による細胞の観察は、染色した半透明の細胞に光を当て、その透過光や反射光の輝度を2次元画像として観察または撮影する。実際の細胞は3次元形状を持つので、本来3次元形状を計測すべきであるが、実際の顕微鏡の被写界深度は狭いため細胞の一部のスライスのみ焦点の合った画像としてしか観測できない。このような状況で、細胞の3次元形状の計測技術は様々な応用が期待できる。例えば、細胞の立体的観察による正確な診断や、3次元形状情報を用いた機械学習による細胞の識別性能の向上などが考えられる。

顕微鏡観察において、フォーカス面または観測試料を移動させることで、対象の異なるスライスを断層像を観測したり、その断層画像を積層することで内部3次元形状を再構成することが行われている。これらを実現するために、顕微鏡において数多くの多重焦点画像列の計測手法が提案

されている。例えば、フォーカス面を変えるためにステージ [1][2][3][4]、対物レンズ [4][5][6] または撮像面 [1][7][8] を移動させる手法や、複数のフォーカス面を同時に撮像する手法 [1][7][9]、異なる波長の光から異なるフォーカス面の像を得る手法 [1][10][11]、変形可能な液体レンズを用いてフォーカス面を変える手法 [12][13][14] など、様々な手法が存在している [15]。

コンピュータビジョンにおいて、多重焦点画像列から3次元形状を推定する手法として、Depth from Focus (DFF)[16] や Depth From Defocus (DFD)[17][18] がある。DFFでは、多重焦点画像列から最も焦点が合っているスライスを特定し、このスライスが取られたフォーカス位置から対象の奥行きを求める手法である。DFDはぼけ方の異なる2枚の画像からそれらのぼけの大きさから対象物体の奥行きを少数の多重焦点画像から推定する手法である。しかし、これらDFFやDFDは一般的に不透明物体の表面形状の推定を対象としており、透明物体に直接適用したとしても、前後のスライスのテクスチャ情報の影響をうけてうまく元形状を計測できない。

物体の内部構造を含めた3次元計測手法に、コンピュータ断層撮影 (Computed Tomography; CT) [19] がある。X線CTでは、計測対象物体をボクセルに分割し、ある方向から物体に照射されるX線を計測対象空間を挟んで逆側に位置する検出器により検出する。光線は透過の過程で物体により吸収されて減衰するという仮定のもとで、これを線

¹ 九州大学
Kyushu University

² 大阪大学
Osaka University

³ 九州保険福祉大学
Kyushu University of Health and Welfare

源と検出器を回転させながら計測した複数方向からの検出器の強度から、各ボクセルの透過率を連立方程式により求め、物体の X 線吸収係数の 3 次元分布を推定する。しかし、この手法には CT スキャナなどの特殊で高価な装置が必要となる。X 線 CT と類似しているが、検出器の代わりにイメージセンサを用いることで 3 次元形状を再構成する手法の一つが、Optical Projection Tomography (OPT) [20] である。OPT においては、主にレンズ光学系を用いるため透視投影系となる近赤外、可視光および紫外線をテレセントリック光学系であるとみなし、近似的に CT と同様の問題として解く。X 線 CT や OPT はいずれも回転計測を前提としており、通常の顕微鏡で得られる多重焦点画像列から推定には適用できない。

本研究では、焦点を変えながら撮影して得られた細胞の多重焦点画像列から、半透明物体である細胞の 3 次元形状 (透過率の 3 次元分布) を推定する手法を提案する。細胞領域とそれ以外の領域、さらには同じ細胞領域内でも細胞核や細胞質など異なる部分ではそれぞれ異なる透過率を有しているため、透過率の 3 次元分布を推定することは、3 次元形状を推定することと等価であると言える。具体的な手法としては、細胞内の物質によって透過光が減衰し、それが顕微鏡のレンズにより集光されることで画像が得られる顕微鏡画像の光学モデルを仮定する。この光学モデルに基づいた光学シミュレーション画像と撮像画像の誤差を最小化することで、細胞の 3 次元透過率分布の再構成を行う。提案手法では、フォーカスの違いを用いるため、特殊な装置や計測方法を必要とせず、一般的な顕微鏡画像のみから 3 次元形状を推定することができる。また、フォーカスを変えた撮影は様々な手法で実現することができるため、実現性や適用範囲が広いと言える。類似した問題への取り組みとしては、離散的かつ少数のレイヤが重畳していると仮定した透明物体の再構成 [21] や、ボクセル空間における各ボクセルの発光を基にした、離散的な内部 3 次元形状の再構成 [22] が挙げられるものの、いずれも離散的なレイヤの足し合わせにより記述可能なモデルに単純化している。離散的な多数のレイヤの足し合わせではなく、体積のあるボクセルを仮定することで、より連続的で自然な 3 次元形状を復元することができる。提案手法においては、非線形最適化により内部 3 次元形状をボクセルの集合として再構成することを目指す。

2. 手法

2.1 顕微鏡画像の光学モデル

本研究では、図 1 に示す光学モデルによって、多重焦点画像列 (図 2) が得られると仮定する。つまり、あるフォーカス位置において標本台の下側から照射された光線が減衰しながら細胞内を通過し、レンズにより集光されることでそのフォーカス位置での画像が得られる。また、本光学モデ

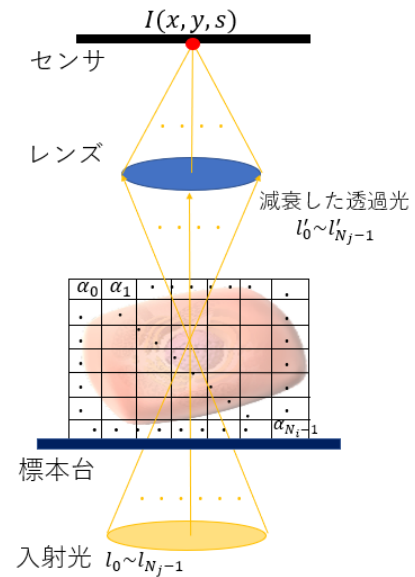


図 1 光学モデル

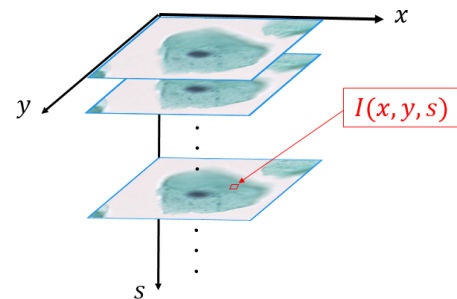


図 2 観測される多重焦点画像列

ルでは固定された光学系に対し、標本台を操作しながら観察する細胞を上下に動かすことで、フォーカス位置を変化させる。この時、図 2 に示すように、多重焦点画像列の s 枚目の画像の画素 (x, y) の輝度値を $I(x, y, s)$ とする。この光学モデルを計算機で実現するために、まず、細胞を覆う直方体領域をボクセルの集合で表現し、 $i (i = 0, 1, 2, \dots, N_i - 1, N_i: \text{全ボクセル数})$ 番目のボクセルに存在する物質の透過率を $\alpha_i (0 < \alpha_i \leq 1)$ とする (図 3)。

また、本来連続的である入射光を、 N_j 本の光線の集合として離散化する。この時、 $j (j = 0, 1, 2, \dots, N_j - 1)$ 番目の光線の明るさを l_j と表すと、 $\sum_{j=0}^{N_j-1} l_j = I_{back}$ (I_{back} : 背景の輝度値) を満たすよう l_j の値を決める。この時、ある光線の明るさ l_j は、ボクセルを通過する度に、そのボクセルの透過率と、そのボクセルを通過した距離に応じて減衰し l'_j となる。 l_j と l'_j の関係は、図 4 に示すように j 番目の光線が i 番目のボクセルを通過する距離 d_{ji} を使うと、式 (1) で表される：

$$l'_j = l_j \times \prod_{i=0}^{N_i-1} \alpha_i^{d_{ji}}. \quad (1)$$

ただし、 j 番目の光線が i 番目のボクセルを通過しない場合は $d_{ji} = 0$ である。さらに、式 (1) の両辺の自然対数をとると、

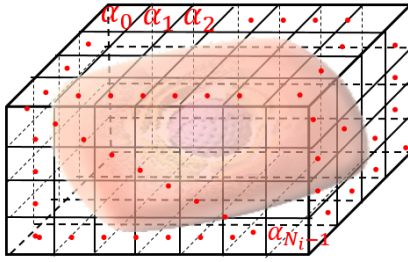


図 3 細胞が存在するボクセル領域

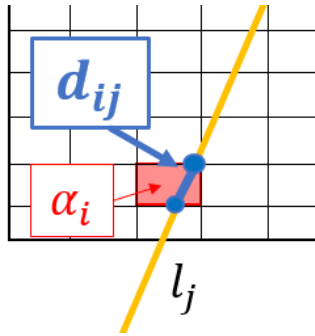


図 4 d_{ij} の具体例

$$\log l'_j = \log l_j + \sum_{i=0}^{N_i-1} d_{ij} \log \alpha_i \quad (2)$$

となる．式 (2) をもとに $\log l_0, \log l_1, \dots, \log l_{N_j-1}$ と $\log l'_0, \log l'_1, \dots, \log l'_{N_j-1}$ の関係を行列を用いて表現すると式 (3) となる：

$$\mathbf{L}' = \mathbf{D}\mathbf{A} + \mathbf{L}. \quad (3)$$

$$\text{ただし, } \mathbf{L}' = \begin{bmatrix} \log l'_0 \\ \vdots \\ \log l'_{N_j-1} \end{bmatrix}, \quad \mathbf{L} = \begin{bmatrix} \log l_0 \\ \vdots \\ \log l_{N_j-1} \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} \log \alpha_0 \\ \vdots \\ \log \alpha_{N_i-1} \end{bmatrix}, \quad \mathbf{D} = \begin{bmatrix} d_{00} & \cdots & d_{0(N_i-1)} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ d_{(N_j-1)0} & \cdots & d_{(N_j-1)(N_i-1)} \end{bmatrix}$$

である．さらに、輝度値を計算する画素が異なれば各光線がボクセル領域を通過する経路も異なるため、 \mathbf{D} 、 \mathbf{L}' は x, y, s の関数とみなせる．ここで、 \mathbf{D} 、 \mathbf{L}' をそれぞれ $\mathbf{D}(x, y, s)$ 、 $\mathbf{L}'(x, y, s)$ で置き換えると、式 (3) は、

$$\mathbf{L}'(x, y, s) = \mathbf{D}(x, y, s)\mathbf{A} + \mathbf{L} \quad (4)$$

となる．最後に、観測される画像の輝度値は減衰した光線の総和とみなせるので、本光学モデルに基づいて推定される画像の輝度値 $I_\alpha(x, y, s)$ は式 (5) で求められる：

$$I_\alpha(x, y, s) = \sum_{j=0}^{N_j-1} l'_j(x, y, s). \quad (5)$$

2.2 細胞の 3 次元形状復元

シミュレーションにより式 (5) で推定される画像の輝度値 I_α と、実際の画像の輝度値 I の誤差 $E(\alpha)$ ($\alpha = (\alpha_0, \alpha_1, \dots, \alpha_{N_i-1})$) を

$$E(\alpha) = \sum_{s=0} \sum_{y=0} \sum_{x=0} (I_\alpha(x, y, s) - I(x, y, s))^2 \quad (6)$$

と定義する．そして、式 (6) の誤差が小さくなるよう、全ボクセルの透過率 α を求めることで、ボクセル内にある細胞の 3 次元形状を推定する．具体的には、目的関数 $f(\alpha)$ を

$$f(\alpha) = E(\alpha) + wTV(\alpha) \quad (7)$$

として定義し、この関数の最小化により最適な透過率を求める．ここで、 w は正則化項の重み、 $TV(\alpha)$ は正則化項である．本研究では、正則化項として total variation(TV) ノルムを用いる．TV ノルムを用いることで、細胞形状を滑らかに復元することを図る．

式 (7) の目的関数の最小化には、最急降下法を用いる． $t(\geq 0)$ 回目の更新時の透過率を $\alpha^{(t)}$ と表すものとし、

$$\alpha^{(t+1)} = \alpha^{(t)} - \mu \frac{\partial f}{\partial \alpha} \quad (8)$$

に従って透過率を更新する．そして、収束条件 $|f(\alpha^{(t+1)}) - f(\alpha^{(t)})| < \delta$ (δ は十分小さい正の数) を満たしたら処理を終了する．

2.3 透過率推定の効率化

上述のように、最急降下法を用いて透過率を推定するため、透過率の更新を繰り返し行う．そこで、最適解を効率的に推定するために、以下の 2 つの方法を導入する．

2.3.1 多重焦点画像からの初期透過率の推定

入力となる S 枚の多重焦点画像列の輝度値 $I(x, y, s)$ をもとに推定すべき透過率の初期値を設定することで、収束までの時間を短縮することを図る．具体的には、初期値 $\alpha^{(0)} = (\alpha_0^{(0)}, \alpha_1^{(0)}, \dots, \alpha_{N_i-1}^{(0)})$ を

$$\alpha_i^{(0)} = \sqrt[S]{I(x, y, s)} \quad (9)$$

によって求める．ここで、 i は光学モデルにおいて $I(x, y, s)$ を求める際に、全ての光線が一点で交わる位置にあるボクセルの番号である．この時、 i 番目のボクセルを全光線が通過するため、 $I(x, y, s)$ には i 番目のボクセルの透過率が最も反映されていると考えられる．さらに、本研究では得られた多重焦点画像列の枚数とボクセル領域の層数が同じになるように設定しているため、各入射光はレンズに到達するまでに少なくとも S 個のボクセルを通過し、その度に、通過したボクセルの透過率が掛け合わされていく．そこで、 $I(x, y, s)$ の S 乗根が i 番目のボクセルの透過率の最適値に近い値になると予想し、式 (9) を導出した．

2.3.2 coarse-to-fine 探索の導入

光線数が少ない場合、計算時間は短い、推定精度は低い。一方、光線数を増やせば、精度は高くなるが、計算時間が長くなる。そこで、まず、光線数が少ない状態(本研究では、 $N_l=25$)で透過率を推定し、次に求めた透過率を初期値として光線数を増やし($N_l=533$)透過率を推定する。このような処理により、計算時間を短縮させつつ、より高精度に3次元形状を復元することを目指す。

3. 実験

提案手法の有効性を検証するために、シミュレーションと、実際の細胞を撮影した多重焦点画像列を用いた実験を行った。前者については、細胞の形状モデルを人工的に作成し、それに対して本手法を適用し3次元形状復元の精度を検証した。また後者の実験では、光学顕微鏡を用いて撮影された実際の細胞の多重焦点画像列から、本手法を適用して細胞の3次元形状を復元した。

シミュレーションと実験は、汎用PC(動作環境 CPU: Intel(R) Core(TM) i7-7820X CPU @ 3.60GHz, メモリ: 32GB, GPU: NVIDIA GeForce GTX 1080 Ti)を用いて行った。パラメータ w と μ については、シミュレーションと実験いずれの場合も同一の設定である。 $w = 0.33$, 透過率を更新する式(8)のパラメータ μ は、最初 $\mu = 0.01$ に設定しておき、透過率を更新する間で目的関数 $f(\alpha)$ の値が増加した場合、 $\mu \leftarrow \mu * 0.99$ と更新する。ただし、収束条件 δ については、シミュレーションにおいては $\delta = 0.001$, 実験においては $\delta = 0.01$ とする。

3.1 細胞の形状モデルを用いたシミュレーション

図5に作成した細胞の3次元モデルを示す。本シミュレーションにおいては、細胞核(図5赤色)、細胞質(同図水色)、細胞膜(同図青色)の各透過率を、それぞれ0.80, 0.95, 0.98に設定した。これらの透過率は、細胞核は比較的低め、細胞膜、細胞質は比較的高めの透過率を有するので、シミュレーション画像の輝度値が実際の細胞画像に近づくよう設定した。

この細胞モデルに対し、2.1節で述べた光学モデルに基づいて、10回焦点位置を変えて細胞を撮像するシミュレーションを行った。ここで、計測モデルにおいて最大ぼけが生じる時に、入射光により作られる三角錐部分に含まれる各ボクセルに少なくとも1本の光線が通過するよう光線数を設定し、 $N_l = 533$ としている。

このシミュレーションにより、 50×50 [画素]からなる画像11枚からなる多重焦点画像列を生成した。これらの画像の各画素の値は8bitの値である。生成した画像のうち6枚を図6に示す。

3.1.1 透過率の初期値決定法の検証

まず、初期値を全て0.80に設定した場合と、2.3.1節で述

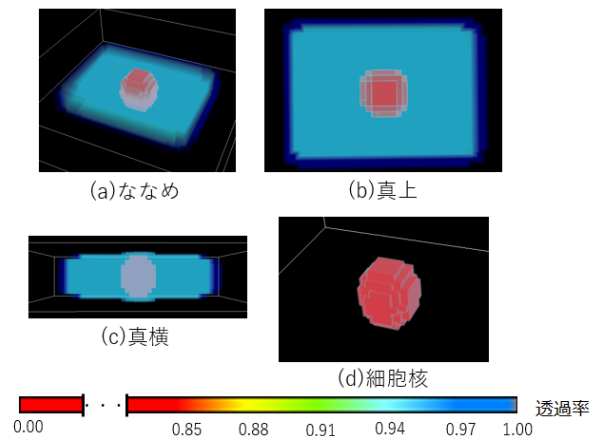


図5 細胞の3次元モデル

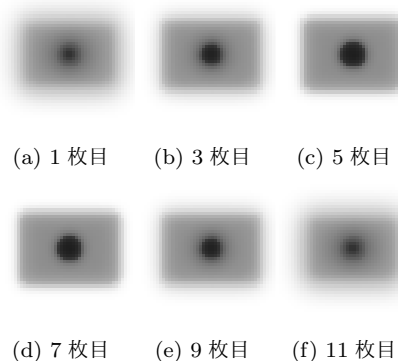


図6 細胞モデルの多重焦点画像列

表1 復元精度と計算時間の比較(1)

初期値の設定	光線数 N_l	RMSE	計算時間 [秒]
入力画像の輝度を基に設定	25	1.122×10^{-2}	47
全て 0.80	25	1.167×10^{-2}	67
入力画像の輝度を基に設定	533	1.120×10^{-2}	2,219
全て 0.80	533	1.166×10^{-2}	3,180

べた方法によって透過率の初期値を決めた方法を使って、透過率を推定した。今回、初期値を全て0.80に設定した理由は、ある程度最適解に近い値を初期値として設定しておかないと、うまく $f(\alpha)$ を最小化できず、最適解を得るのが難しいためである。原因は、局所解に収束してしまっているためと考えられる。この時、光線数が25, 533の場合について行い、表1は2つの方法の真値との平均平方二乗誤差(Root Mean Square Error: RMSE)と、計算時間を示す。

表1に示すように、光線数が少ない方が計算時間は短い、推定精度は低い。一方、光線数を増やせば、推定精度は高くなるが、計算時間が長くなる。また、光線数が25, 533本どちらの場合も、入力画像列の輝度値を基に初期を設定した方が、復元精度が良く、計算時間も短縮できている。これは、入力画像列の輝度値を基に初期値を設定したことにより、各ボクセルの透過率がより最適解に近い値の状態から計算を始めることができたためであると考えら

表 2 復元精度と計算時間の比較 (2)

光線数 N_l	誤差 e	計算時間 [秒]
coarse-to-fine	1.101×10^{-2}	755
25	1.122×10^{-2}	47
533	1.120×10^{-2}	2,219

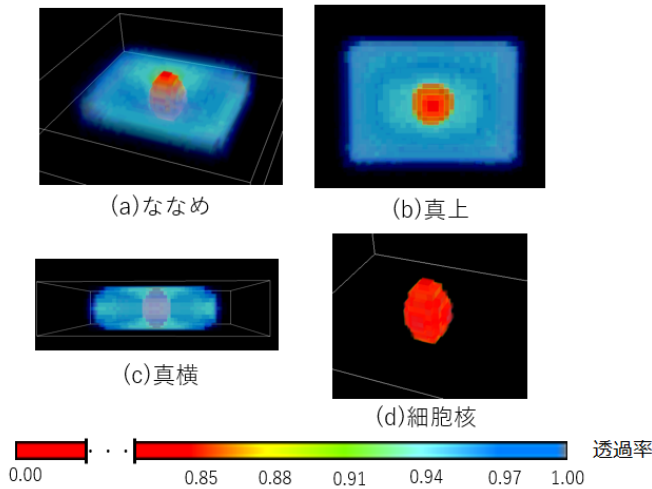


図 7 細胞の CG モデルから復元した 3 次元形状

れる。

3.1.2 coarse-to-fine 探索による透過率推定の効率化の検証

次に、2.3.2 節で述べた coarse-to-fine 探索法によって透過率を推定する方法を使って、透過率を推定した。この時、光線数が 25, 533 として推定する方法と比較した。ただし、いずれの 3 手法とも、初期値は入力画像列の輝度値を用いて設定する。表 2 に、coarse-to-fine 探索による手法および光線数 25, 533 の各手法における真値との RMSE と、計算時間を示す。

表 2 より、光線数 25, 533 の場合と比べ coarse-to-fine を適用した手法の推定精度が良く、また光線数が 533 本の場合より計算時間も短縮できている。これは、最初に少ない光線数で最適解に近い値まで効率的に収束させた後、光線数を増やすことで信頼性の高い解が得られたためであると考えられる。図 7 に初期値を入力画像列の輝度値を基に設定し、coarse-to-fine を用いた手法で復元した 3 次元形状を示す。

3.2 細胞画像を用いた形状復元

図 8, 9 に示す正常・癌細胞の多重焦点画像列 (1 枚 62×62 [画素], $0.92\mu\text{m}/1\text{pixel}$) を用いて各細胞の 3 次元形状を復元する実験を行った。本実験では、上述の入力画像の輝度値を基に初期値を設定する手法と、coarse-to-fine 探索を適用する手法の両方を用いた。また、入力には 8bit RGB 画像 (図 8, 9) にグレースケール変換を施した画像を用いた。各画像列から復元した 3 次元形状を図 10, 11

に示す。本実験では、推定処理の終了条件である δ の値を 0.001 から 0.01 に変更し、収束条件を緩めたにも拘わらず計算時間が増えている。これは、CG モデルは類似した透過率を有するボクセルが連続して分布しているのに対し、実細胞では様々な透過率を有するボクセルが混在しているため、シミュレーションに比べて最適解を求めることが難しくなったためであると考えられる。したがって、より複雑な形状の細胞でも実用的な時間で推定を行うために、処理の高速化が必要である。処理の高速化によって、光線数や、推定するボクセルの個数を増やしたり、 δ の値を小さくし、収束条件をより厳しくした場合でも実時間で推定が可能となれば、復元精度の向上が期待できる。

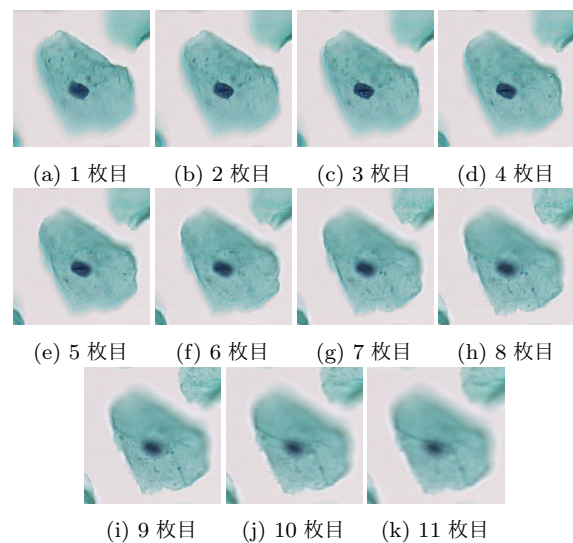


図 8 実細胞の多重焦点画像列 (正常細胞)

4. まとめ

本研究では、焦点を変えながら撮影した細胞の多重焦点顕微鏡画像列から、細胞の 3 次元形状を復元する手法を

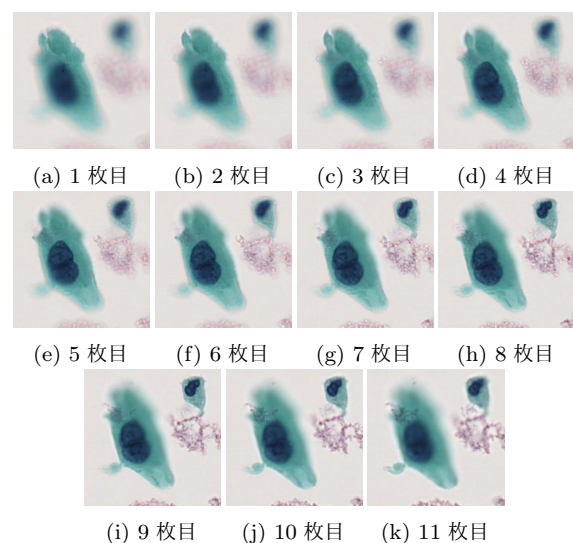


図 9 実細胞の多重焦点画像列 (癌細胞)

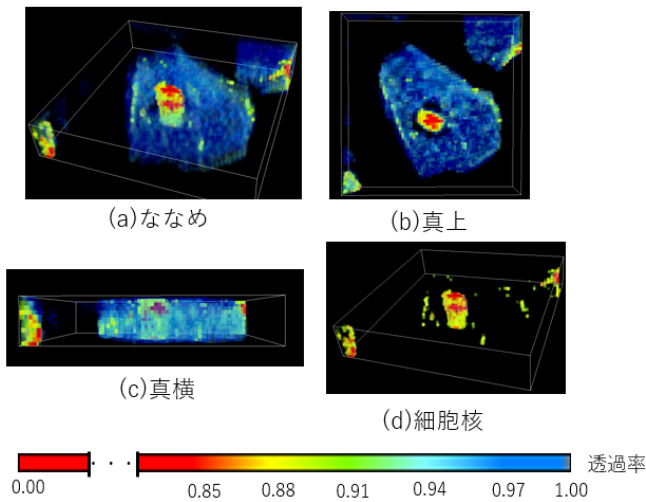


図 10 復元した細胞の 3 次元形状 (正常細胞)

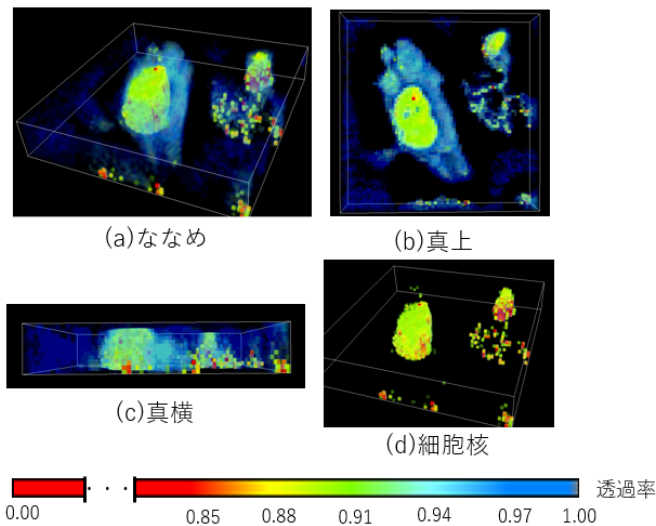


図 11 復元した細胞の 3 次元形状 (癌細胞)

提案した。具体的には、光学モデルに基づいた光学シミュレーション画像と撮像画像の誤差を最小化する細胞の透過率 3 次元分布を求め、3 次元形状を推定するという手法である。提案手法は、一般的な顕微鏡画像のみから 3 次元形状を復元するため、実現性や適用範囲が広いことが利点である。次に、提案手法の有効性を検証するためにシミュレーションを行った。その中で、多重焦点画像列の各画像の輝度を基に初期値を設定し、coarse-to-fine 探索を導入することで、復元精度の向上と処理の高速化ができたことを確認した。また、提案手法を実際の細胞画像に適用し、3 次元形状復元を行った。

謝辞 本研究の一部は、JST CREST JPMJCR1786 および JSPS 科研費 16K00243, 17H05299 の支援を受けたものである。

参考文献

- [1] Tip/tilt-compensated through-focus scanning optical microscopy, 2016.
- [2] , . Critical dimension metrology by through-focus scanning optical microscopy beyond the 22 nm node. Applied Physics Letters, 06 2013.
- [3] year, year, year, year, year, year, year. Tsom method for semiconductor metrology. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, 03 2011.
- [4] year, year, year. Three-dimensional automated nanoparticle tracking using mie scattering in an optical microscope. Journal of microscopy, pp. 172–178, 2011.
- [5] year, year. Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3d laser scanning. Nature methodspp. 73–9, 02 2007.
- [6] year. Optical signatures of small nanoparticles in a conventional microscope. Small, pp. 1703–1706.
- [7] year, year, year. Simultaneous imaging of different focal planes in fluorescence microscopy for the study of cellular dynamics in three dimensions. IEEE Transactions on NanoBioscience, pp. 237–242, Dec 2004.
- [8] year, year, year. An optical technique for remote focusing in microscopy. Optics Communications, pp. 880 – 887, 2008.
- [9] year, year, year, year, year, year. Designing the focal plane spacing for multifocal plane microscopy. Opt. Express, pp. 16706–16721, Jul 2014.
- [10] year, year, year, year. Motion-free all optical inspection system for nanoscale topology control. Opt. Express, pp. 14958–14963, Jun 2014.
- [11] year, year. Enhancing diffractive multi-plane microscopy using colored illumination. Opt. Express, pp. 11150–11161, May 2013.
- [12] year. Variable-focus liquid-filled hydroacoustic lens. Journal of The Acoustical Society of America - J ACOUST SOC AMER, 01 1971.
- [13] year, year, year, year. Materials, effects and components for tunable micro - optics. IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineeringpp. 232 – 248, 05 2007.
- [14] year. Miniaturized variable-focus objective employing a liquid-filled tunable aspherical lens. Optical Engineeringpp. 56 – 56 – 7, 2017.
- [15] year. Through-focus or volumetric type of optical imaging methods: a review. Journal of Biomedical Opticspp. 23 – 23 – 10, 2018.
- [16] year. Shape from focus. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, pp. 824–831, Aug 1994.
- [17] year. A new sense for depth of field. IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence, pp. 523–531, 1987.
- [18] year. Depth recovery from blurred edges, pp. 498–503. IEEE, 1988.
- [19] year. Computed tomography — an increasing source of radiation exposure. New England Journal of Medicine, pp. 2277–2284, 2007. PMID: 18046031.
- [20] year, year, year, year, year, year, year, year, year. Optical projection tomography as a tool for 3d imaging of hydrogels. Biomed. Opt. Express, pp. 3443–3449, Oct 2014.
- [21] year, year, year, year. Recovering inner slices of layered translucent objects by multi-frequency illumination. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, pp. 746–757, April 2017.

- [22] year, year, year, year, year, year, year, year, year, year.
3d image reconstruction from multi-focus microscope:
Axial super-resolution and multiple-frame processing.
IEEE, 2018.