

視差情報を援用する蛍光顕微鏡画像の3次元再構成

栗田 俊[†] 熊澤 逸夫[†]

[†] 東京工業大学 像情報工学研究施設 〒226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259 R2 棟 330
E-mail: †{kurita,kumazawa}@isl.titech.ac.jp

あらまし 蛍光顕微鏡は、現在、バイオ技術関連分野やライフサイエンスの研究において、重要な役割を果たしているが、3次元画像再構成結果には、まだなお多くの誤差が含まれており、また数日にも及ぶ多大な計算時間を要することが問題であった。こうした問題点を克服するために、本研究室で提案された蛍光顕微鏡画像の高速3次元映像化手法を活用して計算量を削減すると共に、この方法でも大きな誤差を生じている原因となっていた被写体の非半透明部位の影響を取り除くために、異なる視点から撮影された際に生じる視差情報を援用する。このような多重焦点情報と視差情報が補完しあう3次元再構成手法を開発し、その有効性について検証を行う。

キーワード 画像復元、PSF、蛍光顕微鏡、デコンボリューション、ステレオ画像法

Reconstruction of Section Images in Fluorescence Microscopy Supporting Disparity in Stereo Method

Shun KURITA[†] and Itsuo KUMAZAWA[†]

[†] Imaging Science and Engineering Laboratory, Tokyo Institute of Technology
R2-330, 4259 Nagatsuta-tyo, Midori-ku, Yokohama-shi, Kanagawa, 226-8503 Japan
E-mail: †{kurita,kumazawa}@isl.titech.ac.jp

Abstract The fluorescence microscopy plays an important role in biotechnology and life science research. However, the image of focused section of a 3D object in the fluorescence microscopy contains mixed information of other parts of the target 3D object moreover blurred effects from the mixed component degrades the results of the observed image. In order to reduce this degradation, deconvolution method has been used to isolate the target section image from the mixed observation, however it assumes transparency of the object and requires excessive computation time. We developed a method of reducing degradation and computational cost which is effective for objects that contain Non-transparent area. In this paper, we propose the technique of using disparity in stereo observation to reduce the degradation from the Non-transparent area was proposed and the effectiveness of the technique was verified.

Key words Image Reconstruction, PSF, Fluorescence Microscopy, Deconvolution, Stereo Matching

1. はじめに

蛍光顕微鏡は、生体組織などの3次元試料の観察に利用されており、半透明の組織中の特定構造を蛍光染料で染色した後、紫外線を照射し、発光する3次元構造を任意断面に焦点を合わせて観測する。しかしながら、観測画像には蛍光染色された構造の、目標焦点面で発光する光ばかりでなく、その試料の他の部位の蛍光色素が励起して放出した光が混入してしまうため、焦点面前後にある

非焦点面の蛍光物質の放出光がぼけて重畳した、不鮮明な画像として観測される。この観測画像はコンボリューションと呼ばれる以下の数式で表現される。

$$i(x, y, z) = o(x, y, z) \otimes \text{psf}(x, y, z) \quad (1)$$

ここで、 i, o はそれぞれ、ボケ含む観察像、及び、対象の真の3次元構造を表す断面像である。なお今後、 i, o をフーリエ変換したものを、 I, O のように、大文字で記述することにする。

従来、非焦点面から混入するボケを除去するために、このコンボリューションの逆変換を用いるデコンボリューション法や、それを簡易化した Nearest Neighbor 法が使われてきた。本研究室で、これらを改良した新しい画像再構成手法提案され、その有効性が検証された。[7] [8] この手法を今後、YN 法と表記することとする。

しかし、物体に非透明部位があると、ボケが加法的に重畳することを前提としている従来法では、ボケが除去しきれないという問題が生じることが分かった。そこで、本研究では、加法的な重畳を前提としない3次元再構成原理である視差法を援用することで、こうした非透明部位を含む被写体に対して、高精度な画像再構成手法を提案し、その有効性について検証を行う。

2. 従来手法と YN 法の概要

従来、上式の psf (Point Spread Function) として、次のガウス型ボケ関数を用いることが多かった。

$$psf(x, y, z) = \frac{1}{\pi R_z^2} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{R_z^2}\right) \quad (2)$$

この psf でボケの混入した多数の断面の観察画像から、鮮明な真の断面画像を復元するというものである。これは下記に紹介する3次元のデコンボリューションを行うため計算量が爆発するという問題が生じ、また純粋なデコンボリューション法はノイズに弱いため、これらの問題を克服することが重要になる。まずは、そうした観点から開発されてきた代表的な既存手法である Nearest Neighbor(NN) 法と Expectation Maximizing(EM) 法、及び NN 法を改良した YN 法の概要を以下に示す。

2.1 NN 法

NN 法は式1の逆を目的平面とその前後2平面の3平面だけを用いて近似的に計算する手法である。 i_n, o_n は第 n 平面の画像とする。この手法では、 i_n に混入しているボケは上下の面の影響が強いと仮定し、この影響の重みを α で表し、目標面の前後の $i_{n\pm 1}$ を用いて次式で計算する。[1] ここで、 I_z と OTF_z はそれぞれ $i(x, y, z)$ と $psf(x, y, z)$ の z を固定したときの (x, y) に関する2次元フーリエ変換を意味する。

$$\hat{O}_n = I_n - \alpha \times I_{n+1} \times OTF_1 - \alpha \times I_{n-1} \times OTF_{-1} \quad (3)$$

ここで、パラメータ α が 0.49 のとき最も良い復元となるとされている。[2] [3]

この手法は、各断面を計算する際に、3枚の画像しか使用しないため、高速計算することが出来るが、荒っぽい仮定を前提としているため、再構成画像の品質が低いことが問題である。また、目標断面、及びその断面の反対側から混入している像をさらにぼかして差し引くことによって誤差が発生してしまうという問題がある。[7]

2.2 EM 法

EM 法を利用し式1の逆を、以下の計算式で繰り返し法によって計算する。[5] この計算式は三次元の計算である。ここで \hat{o}_{EM}^{k+1} は繰り返し法によって $k+1$ 回目に得られる真の画像の推定値である。

$$\begin{aligned} \hat{o}_{EM}^{k+1} &= \frac{\hat{o}_{EM}^k}{H_0} \times psf \otimes \left(\frac{i}{\hat{z}^k}\right) \\ \hat{z}^k &= psf \otimes \hat{o}^k \\ H_0 &= \iiint psf \, dx dy dz \end{aligned} \quad (4)$$

この手法は、現在のところ最も品質の良い再構成画像を提供する手法である。[4] 純粋なデコンボリューション法に比べて、ノイズにも強いと言われているが、三次元の畳み込み積分を繰り返すため、多大な計算時間がかかってしまうことが問題である。

2.3 YN 法

YN 法は NN 法の計算コストの低さを維持しながら、画像品質を向上させた手法である。NN 法の問題点を解決するために、次に示すように、 I_{n+1}^+, I_{n-1}^- という二つの画像を定義する。

$$I_{n-1}^- = \sum_{k=-\infty}^0 (O_{n+k-1} \times OTF_k) \quad (5)$$

$$I_{n+1}^+ = \sum_{k=0}^{\infty} (O_{n+k+1} \times OTF_k) \quad (6)$$

I_{n-1}^- という画像は、平面 $n-1$ に焦点を合わせて撮影した画像 I_{n-1} から、 $n \leq z$ である全ての I_z のボケの混入を除去した画像を表している。同様に、 I_{n+1}^+ は、平面 $n+1$ に焦点を合わせて撮影した画像 I_{n+1} から、 $n \geq z$ である全ての I_z のボケの混入を除去したものを表している。

この二つの画像を NN 法における I_{n+1}, I_{n-1} の代わりに用いる。これらを用いると復元される画像 \hat{O} は次式で表される。

$$\hat{O}_n = I_n - OTF_1 \times I_{n+1}^+ - OTF_{-1} \times I_{n-1}^- \quad (7)$$

I_{n+1}^+, I_{n-1}^- は、 n 上の画像 O_n を含んでいない。また、 I_{n+1}^+, I_{n-1}^- は、それぞれ、再構成しようとしている目標断面の奥側にある断面から放射された光のみが混入した画像、及び目標断面の手前側から放射された光のみが混入した画像を意味しており、同じ断面の画像を含んでいない。そのため NN 法での問題点の原因であった誤差を軽減できることになる。

ここで、 I_{n+1}^+, I_{n-1}^- を計算するために以下の仮定をする

$$\begin{cases} OTF_z \times OTF_1 \doteq OTF_{z+1} & \text{if } z \geq 0 \\ OTF_z \times OTF_1 \doteq OTF_{z-1} & \text{otherwise} \end{cases} \quad (8)$$

ある z のボケの広がり方と $z+1$ のボケの広がり方は $z+1$ の方が大きい。そのため、 z をさらにわずかにぼかすと $z+1$ の広がり方に近くなると考えた。

さらに近似式

$$OTF_1 = OTF_{-1} \quad (9)$$

を用いて計算を行うこととする。[6][7]

3. 従来手法での実験結果

以上の手法についての実験結果を示す。理想画像を用いた評価については、文献[7]において紹介しており、その結果によれば、YN法はNN法と同等の計算時間で、EM法に迫る高品質の再構成画像を与えることが実証されている。実画像での実験結果を示す。

3.1 実画像の準備

実画像を撮影するのに用いた蛍光顕微鏡の各パラメータは次のとおりである。

◎励起波長 342 μm

◎蛍光波長 515 μm

◎対物レンズ開口数 (NA) 5倍…0.13 10倍…0.25
20倍…0.50 50倍…0.80 100倍…0.90

NAの小さな対物レンズでは、あまり小さな構造は観察できないが、焦点深度が深く焦点からずれた場所にある構造も見取れる。逆に、NAの大きなレンズを用いた結果では、細かな構造は観察できているが、焦点深度が浅く、焦点からずれた部位はボケてしまいうまく結像されない。

撮影する対象としては、半径が既知で表面に蛍光染料が塗布された球状のビーズを用いた。このビーズを図1のようにスライドガラス上に多数散らばして被写体とした。

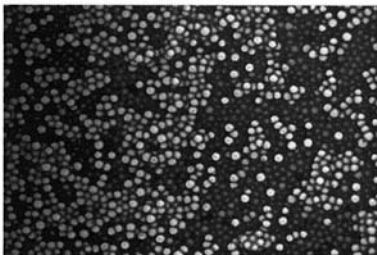


図1 ビーズ (対物レンズ $\times 5$)

ビーズのパラメーターは次のとおりである。

◎直径 32 μm

◎媒質 (ビーズ) の屈折率 589nm のとき 1.59

各断面の撮影の際には、明るさを顕微鏡付随の自動調整機能を使用して調整した。またフィルターを通じて励起光のうちの緑成分のみを画素数が 1388×1040 の画像センサーで撮影し、その撮影画像から画素数を 1024×1024 のエリアを切り取って上述した各手法で処理した。処理後のままではコントラストに乏しく、印刷後の画像で差異を判別することが困難だったため、Adobe社のフォトショップの自動コントラスト調整機能を利用して、処理後の画像のコントラストを自動調整して掲載画像とした。図1のようにスライドガラス上に散らばったビーズに紫外線を照射して、ビーズ表面の蛍光染料が発光している状態で、画面内に数個のビーズが入る程度にまで、蛍光顕微鏡の倍率を拡大して観察画像を得る。図1には、小さなビーズが多数写っているが、このような低い倍率で、多数のビーズが画面に入るようにすると、スライドガラス表面が平面で、その上に散らばるビーズも平面的に並ぶため、立体構造に乏しく、再構成結果を評価し得ないので、数個のビーズのみが画面に入る程度にまで、蛍光顕微鏡の拡大倍率を上げて撮影したものである。

3.2 復元結果の予想

上述したようにビーズを拡大して撮影すると、蛍光染料が球体のビーズの表面にのみ塗布されているので、その断面像が正しく再構成されているのであれば、ビーズの円形断面の円周付近のみが発光し、円形の内部の領域は発光しないはずである。したがって、以下の実験結果の正しさを判断する際には、再構成されたビーズの内部が発光していないかどうか、ビーズ表面に相当する円形断面の円周部分のみが発光しているかに着目して頂きたい。本来であれば、真の断面画像と比較して、再構成結果の正しさを数値的に評価したいところであるが、実画像では、真の断面像に関する情報が存在しないため、定量的な評価は不可能であり、上述した観点から定性的に再構成結果の正当性を評価するしかない。実験結果とともに、実画像の評価用の画像として、Media Cybernetics社で市販されているソフトであるAuto Deblurでの復元結果をのせる。[9]このソフトは、2.節で、示したデコンボリューション法を用いており、現在復元精度が一番良いとされているものである。この画像とも比較して、提案手法の評価を行うこととする。

3.3 実験結果

実験結果を図2、図3に示す。ビーズを画像中で大きく写るように、図2(a)では対物レンズの倍率を100倍にして、図3(a)では倍率を50倍にして z シリーズ画像を撮影した。スライス幅は $5 \mu\text{m}$ であり、復元する際の式(2)における psf_1 の R_1 は、10pixelに相当する値とした。これは、実験の過程で色々試した結果、目視での結果が一番良かった値を選んだものである。

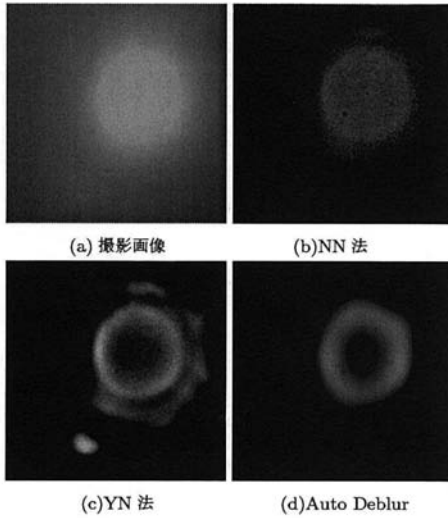


図2 ビーズ (対物レンズ × 100) の復元結果

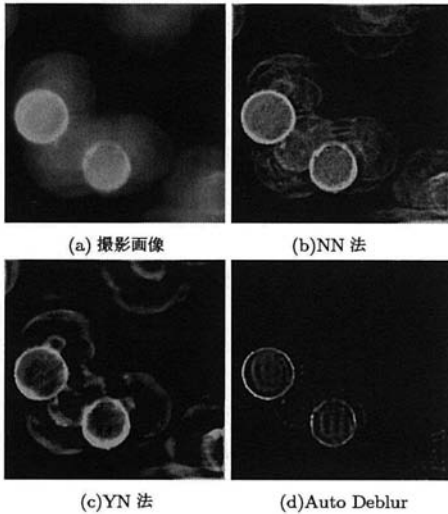


図3 手前のビーズに焦点を合わせた面 (対物レンズ × 50) の復元結果

図2のような、対物レンズの倍率100倍で撮影したものは、開口数が一番大きいので、ボケが最も多く含まれるときである。この結果では、YN法はNN法よりも試料自体の復元とボケ除去の観点で優れているといえる。

また、図3、では対物レンズの倍率50倍で、前後に位置する試料を復元した。このような画像だと、手前にあるビーズからの混入光が影響し復元精度が悪くなってしまう。YN法はNN法よりは良い復元結果を示している。

以上より、焦点からずれた部位が多くボケてしまう画像について、YN法はNN法より優れている。しかしYN法ではNN法より優れた復元結果を示しているが、Auto

Deblurほどの復元は出来ていない。

3.4 非透明部位の影響

以上より、NN法よりYN法の方が試料の復元に優れていることが伺えるが、Auto Deblurと比較すると未だ実画像に対する再構成画像の品質が低いことが明らかである。これは、図2～図3の各復元結果から判断すると、本来であれば、ビーズ表面にのみ塗布されている蛍光体が発光するので、ビーズ表面において円形ビーズの円周部分のみが発光すべきであるのに、NN法ではビーズ内部も強く発光して観察されるということである。

またYN法においては、若干内部が暗くなっているが、依然として内部も発光しているように観察され、かつビーズとビーズの交差部分で大きな誤差が生じている。これはビーズ表面に塗布されている蛍光物質が非透明であり、ビーズ表面から発光する光が加法的に重畳しないためである。これはAuto Deblurでも除去しきれていない部分である。

すなわち、従来のデコンボリューション法に依存する限り、上記の問題は避けられないことが分かった。このため、加法的な重畳を前提としない3次元再構成原理である視差法を援用することで、こうした非透明部位の影響を受けない再構成手法を考案する。

4. 視差情報

本節では、援用する3次元距離計測技術である視差を用いたステレオ画像法について述べ、その実験結果を示す。

4.1 ステレオ画像法

視点をずらした2枚の画像から三角測量を用いて物体の3次元距離計測を行うステレオ画像法を用いる。また、ピンホールカメラモデルを用いるとする。

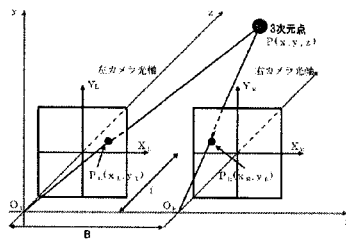


図4 ステレオ画像法における3次元計測系

図4に2台のステレオカメラを用いた3次元計測系を図示する。それぞれのカメラ光軸は平行で、さらにそれぞれの画像面は同一平面上にあるものと設定する。ここで、3次元空間における点 P が、左カメラ・右カメラ画像上における点 P_L, P_R に投影されたとする。今後、左カメラに投影される画像を左画像、右カメラに投影される画像を右画像と呼ぶことにし、添え字 L, R を用いて表

す。3次元座標における点 $P(x, y, z)$ とスクリーン座標に投影された点 $P_L(x_L, y_L)$, $P_R(x_R, y_R)$ には、以下の関係式が成り立つ。

$$x = x_L \frac{B}{x_L - x_R} \quad (10)$$

$$y = y_L \frac{B}{x_L - x_R} = y_R \frac{B}{x_L - x_R} \quad (11)$$

$$z = f \frac{B}{x_L - x_R} \quad (12)$$

ここで、 d は基線長と呼ばれ、ステレオカメラレンズの中心 O_L, O_R 間の距離を表す。 $x_L - x_R$ を視差と呼び、基線長 B と光学中心から撮像面までの距離 f が既知であれば、この視差を求めることによって3次元位置 $P(x, y, z)$ を計測することができる。

4.2 領域ベースマッチング

左右画像の対応点の決定において、エッジベースを用いた領域ベースマッチングを行う。領域ベースマッチングとは、左右画像における局所領域を探索範囲内で動かしながら、もっとも類似した場所を探索する手法である。類似度を測る尺度として、下式の左右の局所領域間の輝度差の総和と輝度差の2乗和 (SSD: Sum of Squared Difference) を用いる。[8]

$$R_{SSD}(s) = \sum_{i=0}^{M_T-1} \sum_{j=0}^{N_T-1} \{I_L(i, j) - I_R(i - s, j)\}^2 \quad (13)$$

ここで、 $I(i, j)$ は画素 (i, j) における輝度値である。 s は視差探索範囲におけるウィンドウの水平方向画素移動量。ウィンドウのサイズは $M_T \times N_T$ である。

4.3 実験結果

ステレオ画像法を蛍光顕微鏡画像に適用した結果を示す。用いる画像は図1のビーズを撮影した物を用いる。

図5(a)は撮影した画像、図5(b)はそこから右に3μm平行移動して撮影した画像である。この2枚のステレオ画像を用い、領域ベース手法により、3次元距離を計測した結果が図5(c)である。ウィンドウサイズは5×5としている。図5(c)では、距離が近くなるほど明るく、遠くなるほど暗く表示している。

図5(c)において、ビーズの内部で暗くなっている部分があることが分かる。これは、ブロックマッチングを行ったときに、ブロックの中が一樣な領域であったために、対応が取れなかった部分である。

さて、3.節で述べたように、蛍光塗料はビーズの表面上に塗布されているので、本来焦点面には円周上の部分のみが復元されるべきである。この円周上の部分に注目してみると、ある程度奥行きが推定されていることが分かる。

そこで、この円周上の部分においての奥行き情報を用

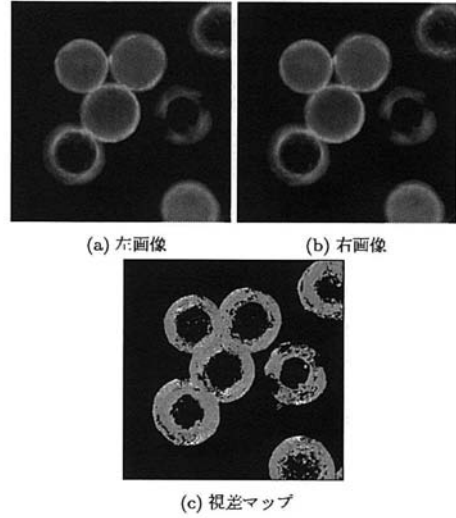


図5 ステレオ画像法の実験結果

いて、焦点面の復元を行うことを考案する。

5. 提案手法

4.3節で得た視差情報を援用する、蛍光顕微鏡画像の復元手法について述べる。

まず視差情報として、4.3節で述べた円周上の部分のみを用いることとする。円周上の部分の領域を決定する手法として、計算速度の関係からYN法で復元した画像を用いる。以上より、提案手法として以下の方法で復元を行う。

- (1) ステレオ画像法より視差情報を得る。
- (2) 前後の面を用いYN法で復元する。
- (3) 復元画像から、輪郭部分を決定する。
- (4) 視差情報より、輪郭部分と同じ奥行きにある部分だけを復元する。

6. 提案手法での実験結果

提案手法による実験結果を以下に示す。

図6では、提案手法(図6(e))において、ある程度円周上の部分が復元されているが、欠けてしまっている部分がある。これは、ステレオ画像法(図6(b))による3次元距離が精度良く計測できていない部分による誤差と推定できる。ビーズよりも奥にあると推定されるビーズ周辺のボケの部分においてはわずかながら除去が出来ることが分かる。

図7では、提案手法(図7(e))において、NN法(図7(c))、YN法(図7(d))で見られるような背後にあるビーズからのボケを除去出来ていることがわかる。これは、ステレオ画像法(図7(b))による3次元距離がある程度精度良く計測出来ているためである。

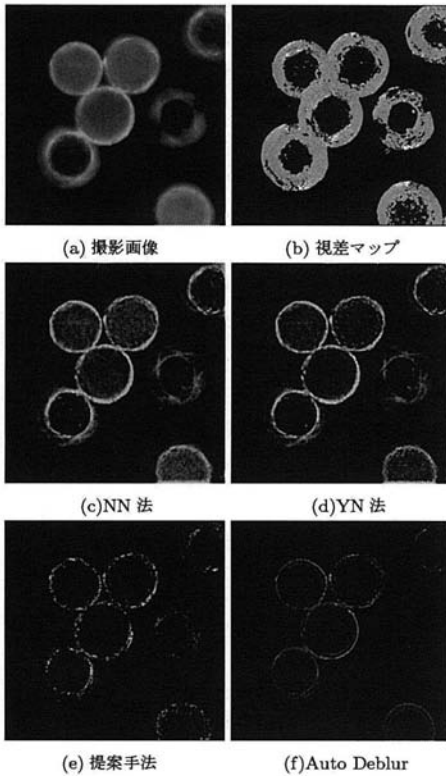


図 6 実験結果 (1)

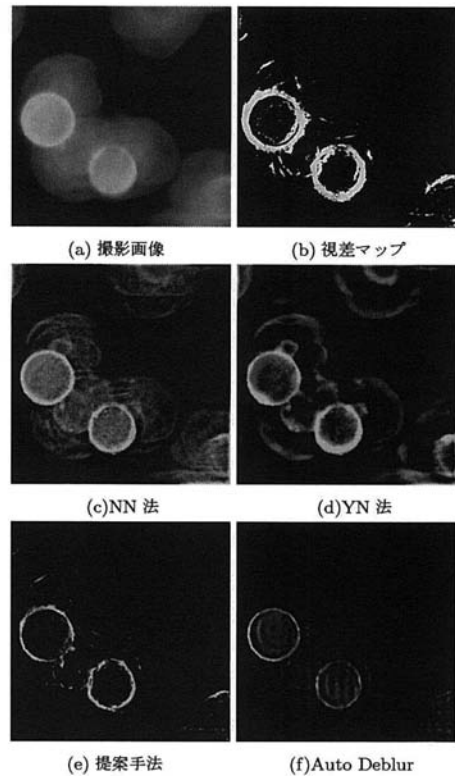


図 7 実験結果 (2)

図 6～図 7 において、提案手法は Auto Deblur では除去しきれなかった部分がわずかながら除去できていることが分かる。計算時間においても提案手法の方が格段に勝っている。

以上より、提案手法は図 7 のように、ステレオ画像法 (図 7(b)) による 3 次元距離が精度良く計測出来れば、焦点面の画像を精度良く復元出来ることが分かる。

7. まとめと今後の課題

提案手法では、ステレオ画像法において精度良く 3 次元距離計測が出来た場合、ピーズが重なり合っているような画像において良い復元結果が得られた。これは、手前にあるピーズと背後にあるピーズの非透明部位の影響により、デコンボリューション法では除去しきれなかった部分を、ステレオ画像法により手前にあるピーズと背後にあるピーズの 3 次元距離を計測することによって除去できたものである。

しかしながら、未だ完全にボケを除去できていないため、今後の課題として、奥行き推定精度の向上、焦点を Z 軸方向に移動させて際に生じる視差の利用、ピーズ以外の様々な撮影対象について実験などが挙げられる。

文 献

- [1] D.A.Agard, "Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions" Annual Reviews in Biophysics and Bioengineering, Vol.13, pp.191-219, 1984.
- [2] Randy Hudson, John N. Aarsvold, Chin-Tu Chen, Jie Chen, Peter Davies, Terry Disz, Ian Foster, Melvin Griem, Man K. Kwong, and Biquan Lin, "An optical microscopy system for 3D dynamic imaging."
- [3] Jie Chen, John Aarsvold, and Chin-Tu Chen, "High-Performance Image Analysis and Visualization for Three-dimensional Light Microscopy" 1997.
- [4] Greet M.P. van Kempen, "Image Restroration in Fluorescence Microscopy" 1999.
- [5] Jose-Angel Conchello, James G. McNally, "Fast regularization technique for expectation maximization algorithm for optical sectioning microscope" SPIE 2655, 199-208 1996.
- [6] 矢野 幸司, 熊澤 逸夫, "蛍光顕微鏡による撮影画像のボケ除去に関する研究" 「画像の認識・理解シンポジウム (MIRU2004)」 2004 年 7 月.
- [7] 伊藤 隆泰, 熊澤 逸夫, "他断面からの光の混入を除去した蛍光顕微鏡画像の再構成手法" 信学技法, 電子情報通信学会, DE2006-21.
- [8] 清水雅夫, 奥富正敏, "画像のマッチングにおける高精度なサブピクセル推定手法", 電子情報通信学会論文誌, D-II, vol. J84-D-II, no. 7, pp. 1409-1418, 2001.
- [9] "AutoDeblur" <http://www.mediacy.com/>.