

光学系における二点分解能解析のための統計的手法

野田 朋裕^{†1} 前田 新一^{†1} 石井 信^{†1}

天文学、化学、生物学などの分野では、複数の点光源（恒星や蛍光分子）の識別が求められ、識別性能の理論限界について議論されてきた。本研究では、識別性能の基本的な指標である二点分解能を求めることを目的とする。ここで、二点分解能とは、点光源が1点であるか2点であるかを識別する性能である。

従来から二点分離の性能の理論的限界が求められてきたが、観測過程に含まれる確率的要因（光子の有限性に由来する回折における確率的なばらつきやセンサーノイズなど）を考慮に入れた評価は存在しなかった。そこで、本研究ではそれらの確率的要因を考慮に入れた、尤度比検定による二点分解能の評価を行った。これにより、空間解像度と識別誤り率の間にはトレードオフが観測されるようになり、二点分離の意味で最適な解像度を選択できた。

Statistical Method for Analyzing Two-Point Resolution in Optical Systems

TOMOHIRO NODA,^{†1} SHIN-ICHI MAEDA^{†1} and ISHII SHIN^{†1}

In astronomy, chemistry, biology, the discrimination of the number of the point sources such as stars and fluorescent molecules is important, and the fundamental limit of the discrimination ability of the point sources has been discussed. In this study, we aim to evaluate the fundamental limit of the two-point resolution where the number of point source (either one or two) is estimated.

So far, the two-point resolution has been studied, however, there are no studies that taking the stochastic nature of the observation process (e.g., stochastic diffraction due to the finite number of the emitted photons, or, sensor noise) into account. Therefore, we evaluate the two-point resolution taking such stochastic factors into account by using likelihood ratio test.

By considering the stochastic factors, the trade-off between the spatial resolution and signal to noise ratio is emerged as can be seen in actual microscopy imaging, and the optimal spatial resolution can be selected.

1. 序 論

天文学、化学、生物学といった様々な場面において、光源数の識別は重要な問題となる。たとえば、化学や生物学などの分野では、生体内などの特定の環境において自由に振舞う分子の挙動を観測することが重要となるが、その観測に適した光学顕微鏡による像はレンズの回折によってボケが不可避免的に生じる¹⁾。このようなボケを含んだ観測画像から、点光源を識別することは重要な問題となるため、古くから点光源の分離の限界が議論されてきた。

その点光源の識別能力の高さを測る基準の中で最も基本的な基準といえるものが、二点分解能である。二点分解能は、光源が1点であるか2点であるかを識別する性能であり、その指標として古くからレイリー限界が知られる。レンズにおける回折は、フラウンフォーファー回折でよく説明できるが、レイリー限界は、フラウンフォーファー回折で生じる光源を中心とした円環（エアリーディスク）の半径で表される。図1は、レイリー限界だけ離れた二つの点光源からの光がレンズにおける回折で生じるボケた様子を表したものである。二つの点光源の中心を通る直線で切ったときの輝度値の分布を表したものが図2である。レイリーは、2点の光源間の距離がエアリーディスク半径を下回れば分離不可能、それ以上の距離であれば分離可能であるとした²⁾。レイリー限界は、レンズによる光の回折のみを考慮に入れたシンプルな指標であるが、各点光源から放出される光子数の有限性やゆらぎ、検出器に含まれるノイズ（例えばショットノイズ）の影響、観測画像のピクセル化（空間上の離散サンプリング）など、実際の観測過程における環境や確率的要因を無視しているため、現実の光学系における二点分解能とは異なる指標となっている。図3と図4に実際に観測される画像を模擬した例を示す。これらの図を図2や図1と比べればわかるように、実際の画像はレイリー限界が暗黙に仮定している理想的な状況によるものとは大きく異なることが分かる。実画像からの光源の識別（分離）においては、観測画像に確率的な要因が含まれるため、ある距離以下であれば必ず2点が識別可能、あるいは必ず識別不能ということはありません。識別の成否は観測されたサンプルに含まれる不確実要素に応じて確率的に決まることになる。したがって、二点分解能は元来、レイリーの基準のような決定論的基準として表現することはできず、確率を用いて表現されるべきものであるといえる。

実際に、これまで、上記のような確率的な特性を考慮した二点分解能の評価が行われてい

^{†1} 京都大学
Kyoto University

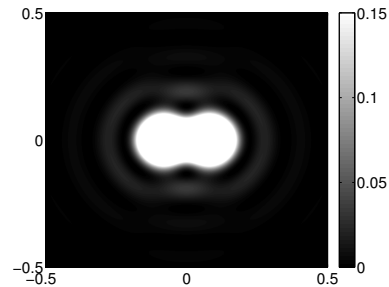


図 1 レイリー限界だけ離れた二つの点光源からの像

Fig.1 Image of light emitted from two-point sources distant by Rayleigh limit

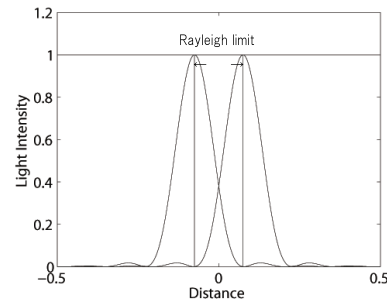


図 2 レイリー限界だけ離れた二つの点光源がつくる輝度値の分布

Fig.2 Distribution of light intensity of two-point sources distant by Rayleigh limit

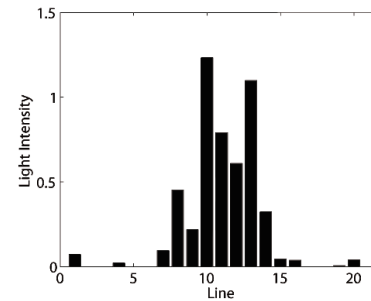


図 3 実際に観測される二つの点光源の輝度値を模擬した図:

図 4 の中心を通る直線上での輝度値を表す.
Fig.3 Schematic diagram of observed light-intensity of two-point sources actually : This figure corresponds to centerline of Fig. 4.

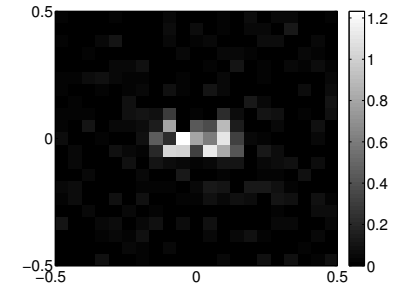


図 4 実際に観測される二つの点光源の画像を模擬した図

Fig.4 Schematic diagram of observed image of light emitted from two-point sources actually

る．Ramら³⁾は、点光源が観測画像中に2個存在すると分かっている状況のもとで、それらの間の距離を推定した際の推定値の分散の下界（クラメルラオの下界）を二点分解能の指標として用いることを提案している．

また、Shahramら^{4),5)}は、仮説検定に基づいて点光源が1点か2点かを識別した際の識別誤りを二点分解能の指標として用いることを提案しており、様々なS/N比における識別誤りを求めている．

しかし、前者は放出光子数のゆらぎを考慮に入れていないことや、そもそも2点が存在することを前提として2点間の距離を推定すること自体が光源数の識別性能を表す二点分解能の指標としてふさわしくないという問題があり、後者は各点光源から放出される光子数の割合が等しく、その数が無限大とする仮定のため、観測画像に光子の確率的な回折によるゆらぎが生じないという問題がある．

現実には、光子数は有限であるため、空間解像度を高めると1画素に入射する光子数の減少のためSN比の劣化を生む．この空間解像度とSN比の間のトレードオフはよく知られているものであるが、上記の研究では単純化した環境を仮定しているため、このトレードオフが生じないものとなっている．

本研究では、Shahramら⁵⁾と同様に仮説検定に基づいて二点の識別の識別誤りを求めることで二点分解能を評価する．ただし、Shahramら⁵⁾の方法と異なり、仮説が表す観測過程に上記で述べた光子数の有限性や不確実性、観測時の確率的要因を含める．とくに推定方

法によらない識別誤り率の理論的限界を求めるために、検定に尤度比検定を用いる．現実に即した観測過程を考えたり、尤度比検定を用いたりしたことで尤度や識別誤り率の評価を解析的に行うことは困難となったが、モンテカルロ法とカーネル密度推定法を用いることで数値的に識別誤り率を求めることができた．また、観測画像の画素による分割や、光子数の有限性やショットノイズなどのノイズを考慮に入れたことで、空間解像度とSN比の間のトレードオフが観測されるようになり、2点識別の上で最適な空間解像度を求められた．

本論文の構成は、以下の通りである．第2節では尤度比検定と、検定の対象となる仮説の設定について詳述し、尤度と識別誤り率の評価手法を述べる．第3節では、尤度比検定を用いて二点分解能の数値評価を行う．第4節では、本研究のまとめを述べる．

2. 提案手法

観測画像 v を、 $M \times M$ ピクセル ($M \in \mathbb{N}$) の空間解像度をもつ M^2 次元ベクトルとする．観測画像 v に含まれる点光源の数が1点であるか2点であるかを推定する問題は、仮説検定で定式化される．ここで帰無仮説 H_0 、対立仮説 H_1 を、それぞれ点光源の数が1点である場合、2点である場合を表すとし、それぞれの仮説における観測画像 v の尤度を $p_0(v)$ 、 $p_1(v)$ と表すこととする．

2.1 仮説の設定

仮説 H_0 と H_1 における尤度は、それぞれ点光源が1点である場合と2点である場合における観測過程を確率モデルで表現したもので与えられる。点光源が2点である場合、各光源の位置や放出光子数、回折、ノイズの影響などは独立に決定されると考えられるため、点光源が1点であるか2点であるかに依存せず点光源からの光は共通した観測過程を経て観測されるとした。この観測過程は、図5に示す通りおおまかに五つの要素に分かれる。以下では、変数 $m \in \{0, 1\}$ を仮説のインデックスを表す変数として用いて、観測過程の各要素の詳細について述べる。

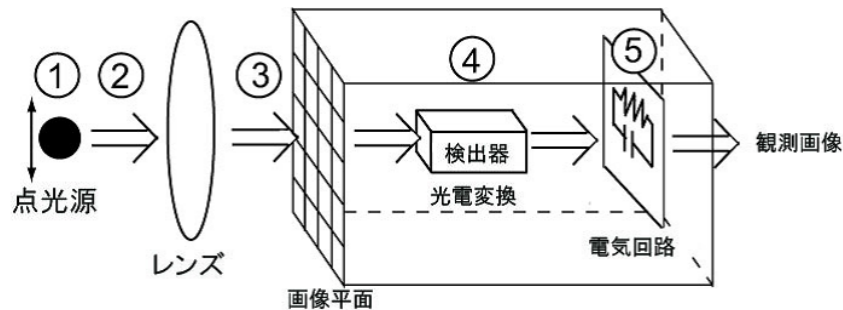


図5 観測過程の模式図
Fig. 5 Schematic diagram of observation process

1. 点光源の位置, 個数 点光源の観測画像中の2次元位置を, $\mathbf{u}^{(m)}$ で表すとする。点光源が1点 ($m = 0$) の場合は, その xy 座標を $\mathbf{u}^{(0)} = (u_x, u_y)$ と表し, 点光源が2点 ($m = 1$) の場合は, 各点光源の xy 座標を $(u_x, u_y), (u'_x, u'_y)$ として, $\mathbf{u}^{(1)} = (u_x, u_y, u'_x, u'_y)$ と表す。観測画像は画像の中央部分の輝度値が高いことを想定するとともに, 点光源の位置に不確実性があることを表すため, $\mathbf{u}^{(m)}$ の分布 $\mathbf{u}^{(m)}$ は正規分布 $N(\mathbf{u}^{(m)} | \boldsymbol{\mu}_m, \sigma_u^2 I_m)$ で表されるとした。ここで, $\boldsymbol{\mu}_m$ は, 観測画像の中央を原点 $(0, 0)$ として, $\boldsymbol{\mu}_0 = (0, 0)$, $\boldsymbol{\mu}_1 = (0, 0, 0, 0)$ であり, σ_u は位置の不確実性の程度を表すある定数, I_m ($m \in \{0, 1\}$) は, I_0, I_1 がそれぞれ $2 \times 2, 4 \times 4$ の単位行列である。
2. 点光源からの光子の放出 点光源から放出される光子数を $l^{(m)}$ で表す。点光源が1点 ($m = 0$) の場合は, 1点の点光源から放出される光子数 (スカラー) を表し, 点光源が2点 ($m = 1$) の場合は, 2点の点光源から放出される光子数 (2次元ベクトル) を

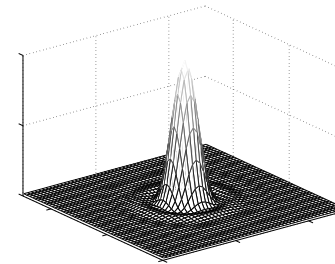


図6 点像分布関数
Fig. 6 Point spread function (PSF)

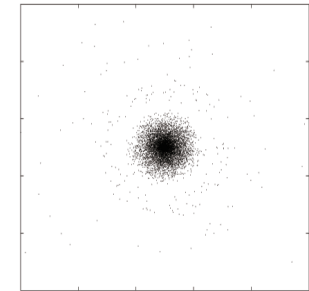


図7 点像分布関数にしたがってばらけた光子セットの例

Fig. 7 Schematic diagram of photons scattering according to PSF

表す。以降の λ, A についても, 同様に点光源が1点 ($m = 0$) の場合はスカラー, 点光源が2点 ($m = 1$) の場合は2次元ベクトルを表すとする。一般に光源から放出される光子数 $l^{(m)}$ はポアソン分布にしたがうため, 光子数のゆらぎを, パラメータ $\lambda^{(m)}$ を持つポアソン分布 $p_m(l^{(m)} | \lambda^{(m)})$ で表現する。ここで, ポアソン分布の平均パラメータである $\lambda^{(m)}$ は, 点光源の単位時間あたりの平均光子放出率 $A^{(m)}$ (photons/s) と光子の捕捉時間 t (s) の積から, $\lambda^{(m)} = A^{(m)}t$ と求まる。さらに, 各点光源の光の強さを表す $\lambda^{(m)}$ は, 実際には既知とはいえず, ある一定の不確実性を有するため, 一定範囲内で一様分布すると仮定する。

3. レンズによる回折を経た光子の検出器への入射 光源から放出された光子は全方位に分散し, レンズや中間光学系によってもわずかであるが損失が起こる。光子が放出され, 光子検出器に到達するまでの光学効率を O_e とすると, 捕捉される光子数の期待値は, $O_e A^{(m)} t = O_e \lambda^{(m)}$ で表される。レンズを通る際, 光子はフラウンホーファー回折によって, 点像分布関数にしたがい確率的に散乱する。図6に典型的な点像分布関数を示す。また, 点像分布関数にしたがってばらけた有限個の光子セットの例を図7に示す。このフラウンホーファー回折の広がり具合は, レンズの開口数 NA に依存して決定される。回折した光子が, $M \times M$ 個の各検出器に入射する確率は M^2 項の多項分布 $p_m(\boldsymbol{\theta} | \mathbf{u}^{(m)}, O_e l^{(m)})$ によって記述される。ここで, $\boldsymbol{\theta}$ は, 各検出器に入射する光子数を表す M^2 次元のベクトルである。
4. 光子検出器でのノイズ 光子検出器は, 入射した光子を電子に光電変換して検出する。

この際の光電変換の効率 (Q とする) は量子効率と呼ばれる。光電変換時にはフォトンショットノイズが²⁾。各検出器に入射した光子の画像 θ にフォトンショットノイズが乗った画像を M^2 次元ベクトル x で表すと、分布 $p_m(x|Q\theta)$ は、画素ごとに独立に平均パラメータが $Q\theta_i$ ($i = 1, \dots, M^2$) で規定されるポアソン分布で与えられる。

5. 電気回路でのノイズ 光電変換の後、生じた電気信号を読み出す際に、リードアウトノイズが²⁾。リードアウトノイズは、画素ごとに独立なガウス分布と仮定する。すなわち、分布 $p(v|x)$ は、平均 x 、分散 $\sigma^2 I$ の多次元ガウス分布と仮定する。ここで、 I は $M^2 \times M^2$ の単位行列である。

以上より、観測画像 v の尤度は以下のように定義される。

$$p_m(v) = \int \int \sum_{l^{(m)}} \sum_x \sum_{\theta} p_m(v|x) p_m(x|Q\theta) p_m(\theta|u^{(m)}, O_e l^{(m)}) p_m(u^{(m)}) p_m(l^{(m)}|\lambda^{(m)}) p_m(\lambda^{(m)}) d\lambda^{(m)} du^{(m)} \quad (1)$$

ここに、 $m \in \{0, 1\}$ である。

2.2 尤度比検定

尤度比検定は Neyman-Pearson の補題によって最強力であることが保障されているため、最小の識別誤り率を達成できる。本研究では推定方法によらない識別の限界を求めるために、尤度比検定を用いた。

尤度比を $S(v)$ とすると、

$$S(v) = \frac{p_1(v)}{p_0(v)} \quad (2)$$

となる。尤度比検定では、尤度比 $S(v)$ が、ある閾値 γ_α を超えれば 2 点、下回れば 1 点と点光源数を識別する。ここで、閾値 γ_α は有意水準 α から決まる値である。

尤度比検定を行うためには、尤度比の評価が必要であり、有意水準 α を求めるためには尤度比の分布 $p_m(v)$ に関する定積分が必要となる。しかしながら、尤度 $p_m(v)$ は複数の過程を反映したことによる多重積分を含むため、尤度や尤度比を解析的に評価することは困難である。そこで、モンテカルロ法によるサンプリングによって、尤度 $p_m(v)$ を数値的に求める。尤度 $p_m(v)$ は、 $p_m(v|x)$ の $p_m(x)$ に関する期待値で得られることに着目すると、以下のように近似できる。

$$p_m(v) = \int p_m(v|x) p_m(x) dx \approx \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T p_m(v|x_t) \quad (3)$$

ただし、

$$p_m(x) = \int \int \sum_{\theta} p_m(v|x) p_m(x|Q\theta) p_m(\theta|u^{(m)}, O_e l^{(m)}) p_m(l^{(m)}|\lambda^{(m)}) p_m(\lambda^{(m)}) p_m(u^{(m)}) du^{(m)} dl^{(m)} \quad (4)$$

ここに、 $m \in \{0, 1\}$ である。 T は分布 $p_m(x)$ に従うサンプル x_t の数である。分布 $p_m(x)$ に従うサンプル x_t は、同時分布 $p_m(x, \theta, l^{(m)}, \lambda^{(m)}, u^{(m)})$ からのサンプルのうち x のサンプルのみを用いることで得られる。すなわち、分布 $p_m(u^{(m)})$ 、 $p_m(\lambda^{(m)})$ 、 $p_m(l^{(m)}|\lambda^{(m)})$ 、 $p_m(\theta|u^{(m)}, O_e l^{(m)})$ 、 $p_m(x|Q\theta)$ に従って、それぞれ $u^{(m)}$ 、 $\lambda^{(m)}$ 、 $l^{(m)}$ 、 θ 、 x のサンプルを順に生成する。これらの分布は、一様分布、正規分布、ポアソン分布、多項分布とサンプルを得るのが容易な分布であることに注意する。尤度比 $S(v)$ の分布 $p_m(v)$ に関する定積分は、分布 $p_m(v)$ に従って生成した v から尤度比 $S(v)$ のサンプルを繰り返し求め、これらのサンプルからカーネル密度推定を行うことで求めることができる。カーネルには、Matlab 組み込みの `ksdensity` を標準設定で用いた。

3. 数値評価と考察

提案手法に基づき、二点分解能の評価を行う。前述のとおり観測過程には、確率的要因が含まれるため識別誤り率で二点分解能を評価する。テスト画像として、点光源が 2 点含まれる画像を用いる。点光源は、図 8 に示すように観測画像の中心付近に互いに距離 d だけ離れた位置に配置する。ここで距離 d は、レイリー限界を 1 となるよう正規化した長さを表す。

観測過程には、種々のパラメータが含まれるが、ここでは主に光学顕微鏡を用いた 1 分子計測での評価を想定し、開口数、光学効率、量子効率、リードアウトノイズの大きさを表す分散パラメータ値は文献を参照して決定した^{2),6)}。光子の平均放出個数に関しても文献を参考にした⁶⁾ が、平均放出個数の不確実性を表す一様分布に関してはデータが得られないため、平均放出個数だけでは点光源の数が一意に決定できないように最小値と最大値で 3 倍の差がつくように決定した。また、その範囲は二つの点光源で同一のものを設定した。光源位置の不確実性を表すガウス分布の分散パラメータも、位置に関する不確実性をたかめるために標準偏差がレイリー限界より大きくなるよう決定した。これらのパラメータの値を表 1 に示す。

以上の設定のもとで、識別誤り率の点光源の二点間距離 d や空間解像度 M に対する依存性を調べた。その結果を図 9 に示す。予測されるとおり、 $M = 1$ の場合は、画素数が一つであるので識別誤り率は点光源間距離 d に依存しない。それ以外の解像度では、点光源間距

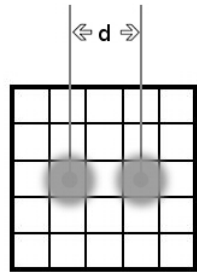


図 8 テスト画像の模式図
Fig. 8 Schematic diagram of test image

評価設定	
レイリー限界の 画像の大きさに 対する比率	0.1525
点光源位置の 不確実を表す ガウス分布の 標準偏差 σ_u	0.1525 /2.35
平均放出光子数の 一様分布する範囲 λ (photons)	$2 \times 10^5/3 \sim$ 2×10^5
量子効率 Q	0.95
開口数 NA	1.4
光学効率 O_e	0.033
リードアウトノイズの 標準偏差 $\sigma(e^-/\text{pixel})$	7
有意水準 α	0.05

表 1 評価設定
Table 1 Settings

離 d がある一定以上、大きくなると光子が入射する画素が増え、輝度の空間的情報が増えることで、識別誤り率が急激に低下することがわかる。2点間距離 d がレイリー限界 $d = 1$ より小さい $d = 0.6$ などにおいても識別誤り率は 0.01 以下と小さい値を示すことがわかった。また、光子数の有限性など現実的な環境を想定したことによって、空間解像度と識別誤り率の間にはトレードオフが観測された。図 9 は、2点間距離 d が $d = 0.1, 0.3, 0.5$ の 3 通りの場合の空間解像度 M に対する識別誤り率の変化を表している。この図からわかるように、空間解像度 M は $M = 5, 11, 23, 31$ の 4 通りの中では $M = 11$ の場合が最適な解像度となることがわかった。

最後に、本手法の応用として、点光源の位置推定を行った結果を示す。テスト画像として、図 11 のように広い範囲に点光源がスパースに分布する画像を用いた。ただし、空間的な輝度値の分布だけでは識別が難しい状況を想定するために点光源は近くに 2 点が密集するか、1 点のみであるかの両方が含まれるように設定した。観測過程のパラメータ設定は表 1

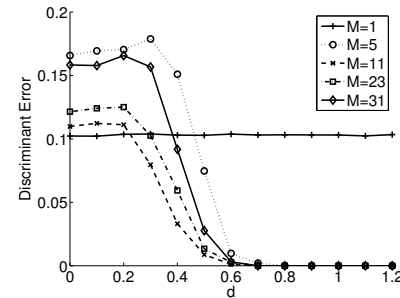


図 9 様々な解像度における個数識別誤り率と二点光源間距離の関係
Fig. 9 Relationship between discriminat error rate and distance between two-point sources under various spatial resolution

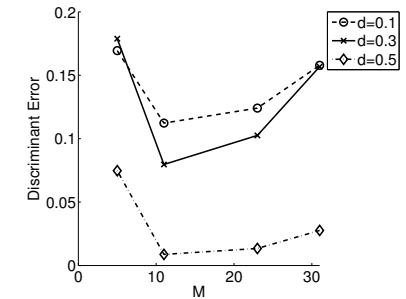


図 10 様々な点光源間距離における個数識別誤り率と解像度の関係：図 9 と対応する。
Fig. 10 Relationship between discriminat error rate and spatial resolution under various distance between two-point sources : This figure corresponds to Fig. 9

のものを用いた。点光源の位置を推定するために、まずこの画像から局所的に輝度の最も高い画素を中心として大きさ 31×31 の画像を切り取り、2 節で述べた尤度比検定によって光源数の識別を行った。光源数を推定した後、回折によって生じるボケの関数を当てはめるときに、観測画像との誤差が最も小さくなるようなボケの中心、すなわち点光源位置の推定を行った。

結果を図 12 に示す。は実際の点光源の位置を表し、 \times は推定された点光源の位置を表す。図 12 からわかるように、このテスト画像においては点光源の数は正しく推定され、非常に高い精度でその位置を推定することに成功していることがわかる。点光源 1 点あたりの位置推定の平均誤差は 0.0534 であり、レイリー限界である 1 より小さいばかりでなく、画素の 1 辺の大きさ 0.212 に比べても非常に小さい値となることがわかった。このように、点光源の数が正しく推定できればその位置は非常に高精度に推定できるといえる。

4. 結 論

本研究では、尤度比検定を用いて現実的な環境における光学系の二点分解能を評価した。尤度比検定を用いることで、観測過程に含まれる種々の確率的要因を考慮するとともに、想定した環境における点光源の識別の統計的限界を求めることができた。具体的には、放出

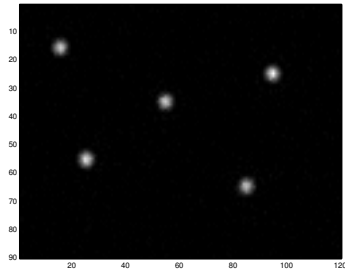


図 11 大きなテスト観測画像：
解像度 120 × 90 である。

Fig. 11 Large test observation image : Spatial
resolution 120 × 90.

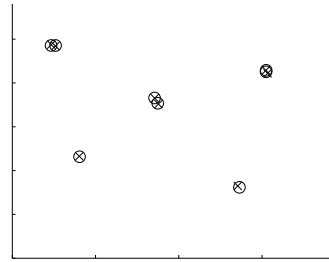


図 12 点光源の位置推定の結果：
は実際の位置，×は推定位置である。

Fig. 12 Result of estimated locations of point
sources : shows real locations of point
sources. × shows estimated locations of
point sources.

光子数の不確実性や有限性を含めることで点光源の明るさの非一様性と回折による確率的な光子の散乱を考慮し、検出器におけるショットノイズ、リードアウトノイズを考慮した。これらの不確実性を考慮することで、従来研究では見られなかった、実際の環境と同様の空間解像度と SN 比のトレードオフが観測されるようになり、二点分離の意味で最適な空間解像度を選択することができた。

また、尤度比検定に基づく点光源の個数推定を行った後に位置推定を行うことで画素の大きさ以下の高い精度で位置を推定できることがわかった。ただし、本研究で用いたテスト画像は、切り出した観測画像中に点光源が 1 点もしくは 2 点しか含まれないような状況であり、仮説が想定した環境に近い環境を実現していたが、実際の顕微鏡画像においてはより多くの点光源が含まれる可能性を想定する必要がある。今後、実際の環境においても高い精度で個数推定を行うためには、仮説の拡張が必要となると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 原口徳子, 平岡 泰: ビジュアルバイオロジー 細胞の蛍光イメージング, サイエンス社 (2006).
- 2) 原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰: 講義と実習 生細胞蛍光イメージング 阪大・北大 顕微鏡コースブック, 共立出版株式会社 (2007).
- 3) S.Ram, R.J.Ober, E.S.Ward and R.J.Ober: Beyond Rayleigh's criterion: A res-

olution measure with application to single-molecule microscopy, *PNAS*, Vol.103, No.12, pp.4457–4462 (2006).

- 4) M.Shahram and P.Milanfar: Imaging Below the Diffraction Limit: A Statistical Analysis, *Trans. IEEE*, Vol.13, No.5, pp.677–689 (2004).
- 5) M.Shahram and P.Milanfar: Statistical and Information-Theoretic Analysis Resolution in Imaging, *Trans. IEEE*, Vol.52, No.8, pp.3411–3437 (2006).
- 6) R.J.Ober, S.Ram, R. and E.S.Ward: Localization Accuracy in Single-Molecule Microscopy, *Biophys J*, Vol.86, No.2, pp.1185–1200 (2004).