

平成21年5月26日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19300058  
 研究課題名（和文） 視差情報と多重焦点情報の融合による蛍光顕微鏡画像の高速・高精度3次元映像化  
 研究課題名（英文） Three Dimensional Imaging of Fluorescent Microscopy by Combined Use of Multiple-focused Images and Stereo Images  
 研究代表者 熊澤 逸夫(KUMAZAWA ITSUO)  
 東京工業大学・大学院理工学研究科・教授  
 研究者番号：70186469

## 研究成果の概要：

本研究では、近年、ライフサイエンスやバイオテクノロジーの研究に不可欠な道具となりつつある蛍光顕微鏡の3次元画像再構成アルゴリズムの精度を向上するために、従来利用されてきた多重焦点画像に加えて、多数の視点から観測されるステレオ画像を相補的に利用することを目的として、蛍光顕微鏡の光学シミュレータを構築した。被写体のモデルを使ってシミュレータの能力を検証し、さらにシミュレータで実測したデータから光線場を推定し、任意のフォーカスセッティングに対する観察画像を数値的に再構成できることを実験的に示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・知覚情報処理・知能ロボティクス

キーワード：蛍光顕微鏡、デコンボリューション、3次元画像復元、ステレオ画像、光線場

## 1. 研究開始当初の背景

近年、蛍光顕微鏡は、各種タンパク質と特異的に親和性を持つ蛍光マーカの開発を通じて、多様な生命現象を観察する目的に使われるようになり、特に蛍光顕微鏡によって、単一分子を観察することも可能になったことから、バイオ技術分野において重要性が増している (T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida, Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual ATP Turnovers by Single Myosin Molecules in

Aqueous Solution, Nature Vol. 374 p. 555-559 (1995)). 蛍光顕微鏡自体は比較的安価で手軽に使える装置であるが、撮影した画像データにはそのままでは非焦点面から重畳するボケが混入しており、ボケを排除して3次元画像を構築する画像処理アルゴリズムが不可欠である。ところが現状のアルゴリズムは、高精度な再構成像を得るために、数時間以上、場合によっては数日の計算時間を要し、研究能率が低下する原因になっていた。またそうして長時間の計算を経てもボケ

がとりきれない場合が多かった。

蛍光顕微鏡画像の3次元映像化の従来研究では、高速だが精度の劣る Nearest Neighbor 法と高精度だが非現実的な計算時間を要する Estimation Maximization 法の改良を軸に進められてきた (Jose-Angel Conchello 他 “Fast regularization technique for expectation maximization algorithm for optical sectioning microscopy” SPIE 2655(1996))。現在製品化されている蛍光顕微鏡に組み込まれている再構成アルゴリズムも、基本的には Nearest Neighbor 法と Estimation Maximization 法をベースとしており、依然として、高速性と精度を両立する手法は存在していない。本研究では、両手法と異なる新しい観点から、視差情報という従来の蛍光顕微鏡では使われていなかった手掛かりを用いて、精度を維持しながら高速に3次元情報を再構成する新規の手法を開発する予定であり、これは国内外を通じて初めての試みである。

研究代表者らも、従来は、Nearest Neighbor 法と Estimation Maximization 法をベースとした高速画像再構成手法を開発していた (Koji Yano and Itsuo Kumazawa: “Modified Nearest Neighbor Method for 3D Image Imaging in Fluorescence Microscopy”, Proceedings of International Workshop on Advanced Imaging Technology, pp. 203-208(2005))。それによれば、理論上は、従来の Nearest Neighbor 法と同等の計算量で Estimation Maximization 法に匹敵する精度の再構成結果を得られるはずであり、実際に計算機上で合成した理想画像に関しては、その効果が確認できた。しかしながら、蛍光顕微鏡で観察した実画像に対しては、理想画像で確認したほどの画質の改善は得られなかった。これまでの研究を通じて、その原因を探ったところ、実際の被写体が理論で仮定している半透明性を備えておらず、光が透過しない部分があると、その部位からの誤差が蓄積して精度が低下することが明らかになった。

この問題は、理論上、非焦点面からのボケが加法的に重畳することを前提とした、従来のデコンボリューション法に基づく再構成原理では避けることができないものである。そこで本研究課題では、加法的な重畳を前提としない3次元再構成原理である微小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3次元画像再構成を行う方法について研究することにした。

## 2. 研究の目的

以上の背景に述べたように、現状の蛍光顕微鏡画像の3次元映像化技術はすべてデコンボリューション法の原理に基づくため、ボケが加法的に重畳することを前提としている。それは商用化されたシステムでも言える事であり、また研究代表者等によって開発された、従来手法を画期的に高速化・高品位化するアルゴリズム (Koji Yano and Itsuo Kumazawa: “Modified Nearest Neighbor Method for 3D Image Imaging in Fluorescence Microscopy”, Proceedings of International Workshop on Advanced Imaging Technology, pp.203-208(2005)) においても言えることである。しかしながら、ボケの加法的な重畳を前提とする限り、実対象に含まれる非透明部位が大きな誤差を引き起こす。一方、研究代表者や研究分担者等が研究してきた、視点の異なる2枚以上の観察画像の対応点から3次元形状を復元する方法であれば、こうした非透明部位の影響を受けずに3次元画像を再構成することができる。

本研究課題では、こうした視差情報を手掛かりとして、非透明部位を含む実対象に対しては、デコンボリューション法の誤差を補正しながら、精度良く3次元形状を復元する手法を開発することを第一の目的とする。従来から、蛍光顕微鏡でない通常のカメラによって撮影された画像に対しては、視差を用いるステレオ法によって3次元形状を推定する研究が行われているが、依然として安定・完璧に3次元形状を構成する手法は得られていないのが現状である。本研究課題では、蛍光顕微鏡画像の特殊性、すなわち視差手掛かりに加えて多重焦点による3次元情報の手掛かりがあることを利用して、視差の手がかりと多重焦点の手掛かりが補完しあうようにして、精度の高い3次元画像再構成を実現することを目的とする。

なお以上の3次元画像再構成手法は、本課題の中で独自に構築する蛍光顕微鏡シミュレータを用いて開発するので、開発に適したシミュレータを構築することを本研究課題の第二の目的とする。この蛍光顕微鏡シミュレータは、多重焦点情報に加えて視差情報を利用する上で最適な光学系を備えた新しい蛍光顕微鏡を設計する目的にも使用する。すなわちこのシミュレータを用いて、被写体 (実際の生態の組織ではなくて扱い易いように蓄光材料で形成したモデルを被写体とする) の発生する光の光線場を計測して、3次元画像再構成に適したステレオ画像計測系を設計することを第三の目的とする。

### 3. 研究の方法

前述した第一の目的に対しては、以下の3.1に示すように、また第二、第三の目的に対しては以下の3.2、3.3に示すように研究を行った。

#### 3.1. 視差情報の有効性評価

使用した蛍光顕微鏡：Axioskop2 MAT mot (Carl Zeiss 製)

励起波長 342nm

蛍光波長 515nm

対物レンズ倍率 20 倍, NA 数 0.50

作動距離 2200  $\mu\text{m}$

ここで作動距離とは対物レンズの表面から焦点面までの距離の事であり、作動距離が長いレンズでは視差を得にくい。そこで実験では最も作動距離の短いレンズを選んだ。被写体は厚さ約 150  $\mu\text{m}$  のカバーガラス、及び厚さ約 30  $\mu\text{m}$  のビニル膜の表裏に油性ペンで線を描いて、表裏の線の間奥行き差を生じたものとし、この観察対象について、以下の手順で表に描いた線と裏に描いた線の視差を求め、蛍光顕微鏡で計測できる視差の精度を検証した。

1. 観察対象の表と裏にそれぞれ油性マジック描かれたラインを観察し撮影する。こうして撮影された画像を右画像と呼ぶ。
2. 観察対象の裏側に焦点を合わせ、裏側を焦点面、表側を非焦点面と呼ぶ。
3. 非焦点面にある線を中心軸に揃える。
4. 1. で撮影した位置から一定距離だけステージを移動させる。この移動は x 軸方向右向きのみでこの移動距離を基線長と呼ぶ。
5. 4. の位置で撮影を行う。この画像を左画像と呼ぶ。

領域照合法及びエッジ照合法で上記の左右の画像について視差を計算し、この視差から三角測量法で求まる奥行き差が事前に分かっている真の厚さである 150  $\mu\text{m}$  及び 30  $\mu\text{m}$  とどの程度一致するのかを調べた。

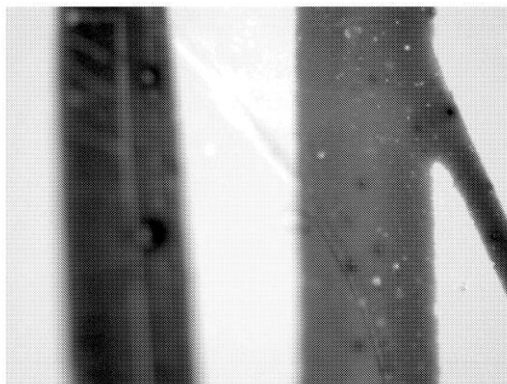


図1 カバーガラス表裏に描いた線分

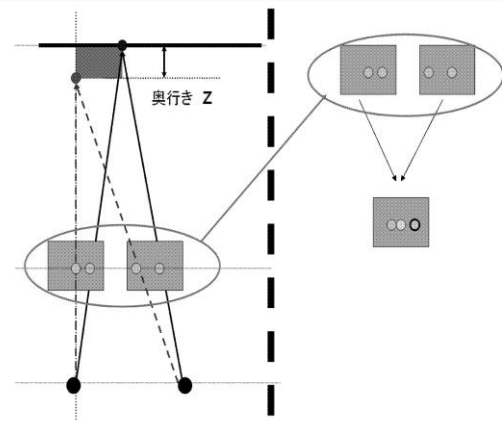


図2 視差計測の原理

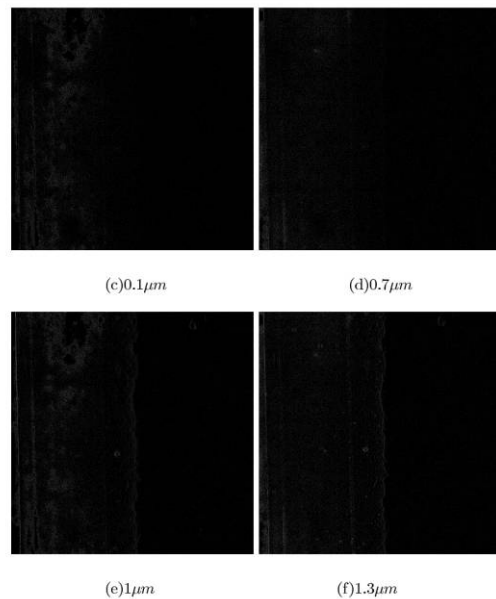


図3 基線長を変えた時の視差の変化

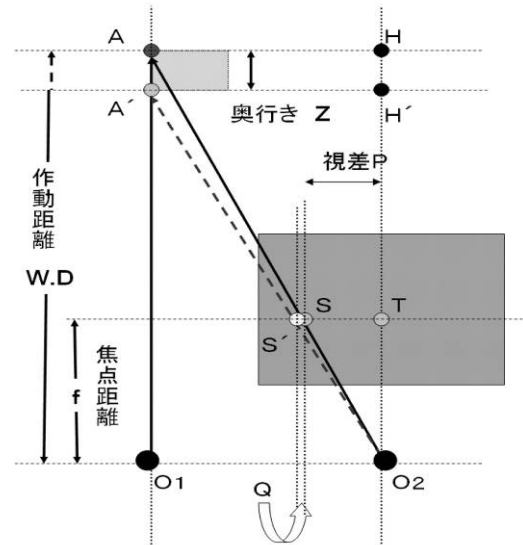


図4 視差の定式化

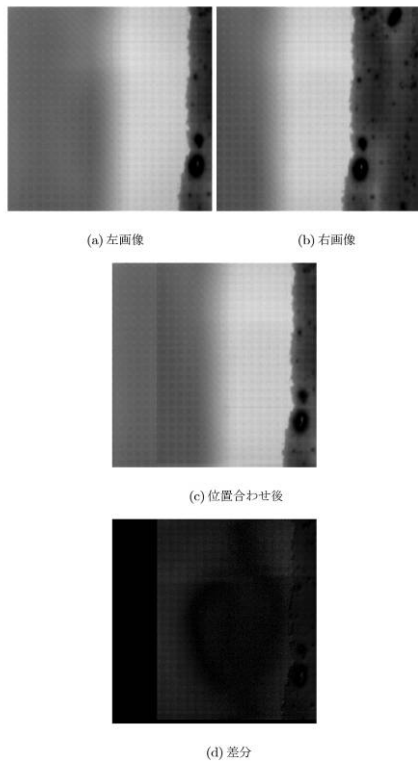


図5 カバーガラス表裏線分の左右画像領域照合と視差

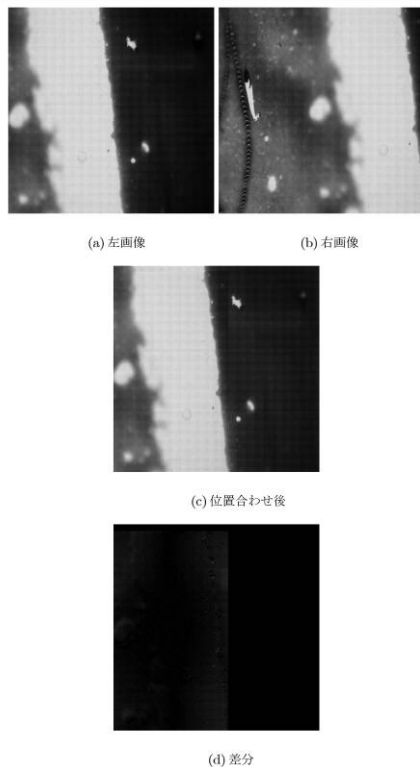


図6 ビニル膜表裏線分の左右画像領域照合と視差

### 3. 2. 視差情報有効性評価の結果

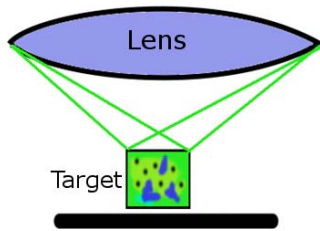
以上のように既知の厚みを有するカバーガラスとビニル膜を用いて、奥行差が既知の被写体を用意して、既存の蛍光顕微鏡において観測できる視差がどの程度三次元情報の計測に有効であるのかを評価してきたが、残念ながら既存の顕微鏡の光学系では十分に精度良く視差を計測できないことが判明した。その原因としては、蛍光顕微鏡がある特定の焦点面の画像を鮮明に映すことに適している反面、被写界深度が非常に浅いという特徴があり、それが災いして、視差情報を得るには画像がボケすぎてしまうことが上げられる。したがって前述した本研究の第一の目的は既存の蛍光顕微鏡を用いる限り達成できないことが判明した。そこで次に述べるように蛍光顕微鏡シミュレータを構築し、十分な精度で視差情報を計測できるように蛍光顕微鏡の光学系を設計することとした。

### 3. 3. 蛍光顕微鏡シミュレータの構築

以上の評価結果を踏まえ、蛍光顕微鏡（図7）をシミュレートする装置（図8）を構築し、従来の多重焦点情報に視差情報を援用して高精度に三次元画像再構成を行うために最適な光学系を新たにデザインすることにした。本研究課題の蛍光顕微鏡シミュレータの特徴は、光線場理論を導入して、蛍光顕微鏡の特徴である「(1) レンズ口径の被写体に対する相対サイズの大きさ」と、「(2) 微弱な蛍光の検出」の2点に対応できる観測系を構築した点にある。本課題では実際の光学系のスケールを50倍に拡大したシミュレータを作ることを目的としてきたが、50倍のサイズのレンズを制作することは現実問題として不可能であるため、通常のレンズサイズのカメラを多数設置して、それらの観測結果から光線場理論に基づき、計算機内の数値処理によって、大口径レンズの光学系をシミュレートするようにした点は従来にない独自の工夫である。また蛍光タンパク質の発光を模擬する被写体モデル（ファントム）を本年度予算で購入した3次元加工機と試作業者の支援によって制作し、多数のサンプル画像を撮影した。なおこの際にファントムの発光方法としては、紫外線を照射しながら励起光を観測するよりも、紫外線をファントムに蓄光しておき、蓄光された光が放出されてくるのを観察した方が容易であることが判明したため、蛍光方式はやめて蓄光方式を採用することになった。また蓄光された光が放出される際のエネルギーが小さいために、長時間露光可能なカメラを購入して実験を行った。本課題で制作したシミュレータはパラメータを変更するだけで、任意の光学系をシミュレートすることが可能であり、各方面に利用できることが期待できる。



(a) 蛍光顕微鏡

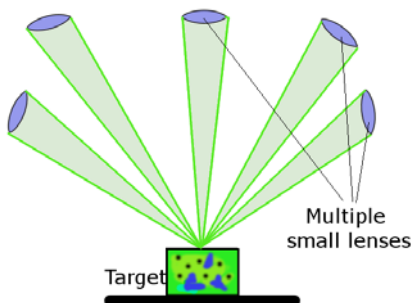


(b) 蛍光顕微鏡では被写体に比べてレンズ系が大きい。

図7 蛍光顕微鏡とその光学系



(a) 試作した蛍光顕微鏡シミュレータ



(b) 被写体に比べて小さなレンズでも多数使うことで大きな一つのレンズを代替

図8 試作したシミュレータとその光学系

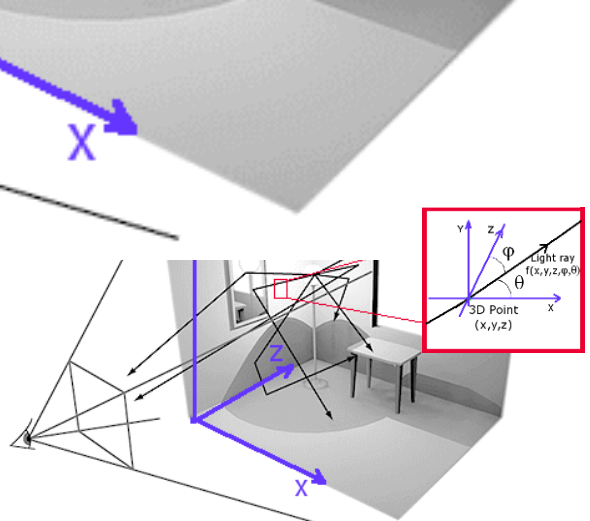
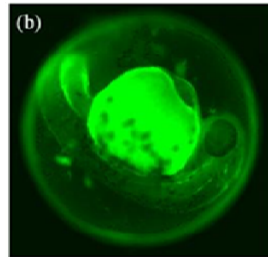


図9 光線場の定義: 3次元空間内の全点において全方向に向かう光線の強度を定義。光線場を計測できればあらゆる光学系のシミュレーションが可能。



Real-life (target) object image



Object model used for simulation (Phantom)

図10 制作した蛍光顕微鏡被写体モデル

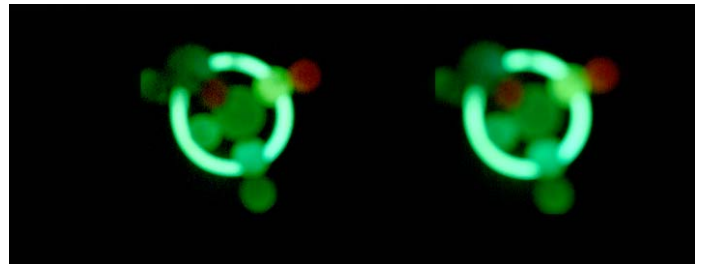


図11 上記モデルからフォーカスセッティングを変えて撮影した複数の画像

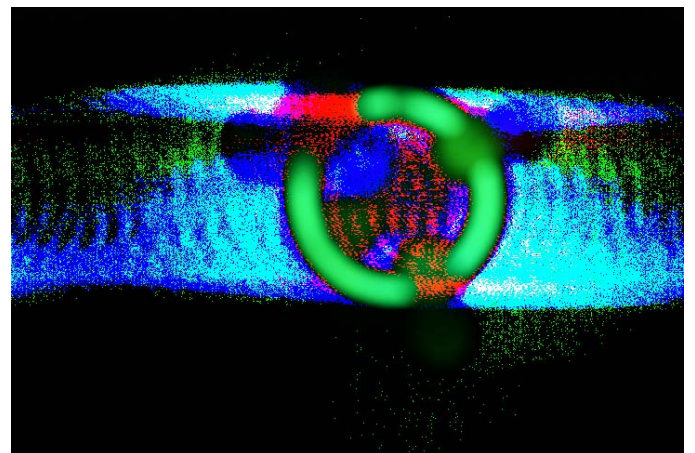


図12 図11の観察画像から求めた光線場を使って、任意に設定した焦点条件で画像を再構成した結果

#### 4. 研究成果

以上に示してきたことを総括すると本研究課題で得られた成果は以下の通りである。

(1) 所有している蛍光顕微鏡を用いて既知の奥行きを持つ被写体に関する視差の実データを計測した。

(2) 上記視差実データから再構成できる奥行情報の精度を評価してきたが既存の蛍光顕微鏡の光学系を用いる限り、被写体深度が狭いことが原因となって、十分な精度で視差情報を検出できないことが判明した。

(3) 上記(2)の結果に鑑み、「ステレオ画像(視差情報)と多重焦点画像」の両情報を利用する上で最適な光学系を独自に設計することとし、設計を効率良く進めるために蛍光顕微鏡シミュレータを試作した。

(4) 上記シミュレータを使い、蛍光顕微鏡の被写体が発生する光の光線場を計測することに成功した。光線場が分かれば、あらゆる光学的現象を把握できるので、被写体の3次元再構成を行う上で新たな手法の開発につながる。

(5) 上記光線場の応用として、多重焦点画像から推定される光線場を用いて、任意のフォーカスセッティングの観測画像を再現することに成功した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) 松村将太郎,熊澤逸夫, 連続境界条件を導入した画像のブロック分割によるグレイスケール変換, 電子情報通信学会論文誌(D-II), Vol.J90-D, No.8, pp.1977-1986, 2007年8月1日,(査読有)

[学会発表] (計2件)

(1) 松村将太郎,熊澤逸夫, ニューラルネットワークを用いた色境界におけるカラーチャンネルのエッジ位置修正, 画像の認識・理解シンポジウム 2007 予稿集, IS-3-23, pp. 1057-1062, 2007年7月31日, 広島(査読無)

(2) 福司 謙一郎,熊澤逸夫, ダイクストラ法と最急降下法を併用したステレオ画像からの3次元計測, 画像の認識・理解シンポジウム 2007 予稿集, IS-3-36, pp. 1135-1140, 2007年7月31日, 広島(査読無)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊澤 逸夫(KUMAZAWA ITSUO)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 70186469

(2) 研究分担者

長橋 宏(NAGAHASHI HIROSHI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 20143084

(3) 連携研究者

なし