



## 光学顕微鏡像の3次元デジタル画像修正

前田 純治\*・加藤 直之\*\*・村田 和美\*\*・高桑 義夫\*\*\*

\* 室蘭工業大学産業機械工学科 〒050 室蘭市水元町 27-1

\*\* 北海道大学工学部応用物理学科 〒060 札幌市北区北13条西8丁目

\*\*\* 北海道大学教養部 〒060 札幌市北区北17条西8丁目

(1988年1月14日受理)

### Restoration of Light-Microscopic Images by 3-D Digital Image Processing

Junji MAEDA,\* Naoyuki KATO,\*\* Kazumi MURATA\*\* and Yoshio TAKAKUWA\*\*\*

\* Department of Industrial Mechanical Engineering, Muroran Institute of Technology,  
27-1, Mizumoto, Muroran 050

\*\* Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University,  
Kita 13, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060

\*\*\* Department of General Education, Hokkaido University, Kita 17, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060

In this paper we describe digital restoration of light-microscopic images. Since we consider thick microscopic objects, 3-D image processing is required instead of usual 2-D techniques. Our restoration procedure consists of two steps. The first step uses a 3-D inverse filtering within the spatial-frequency band. The second step aims at recovering the missing high-frequency components of Fourier spectrum by a 3-D superresolution algorithm. These methods enable a significant improvement in spatial resolution both perpendicular and parallel to the optical axis. We present some experimental results and discussions.

#### 1. はじめに

生物学や医学等の分野において、厚みをもった生物試料の3次元構造を知りたいという要求は古くから存在した。通常の光学顕微鏡下での観察では、試料内でのフォーカス位置を少しずつ変えて2次元の断面画像を捉え、一連の画像データから頭の中で試料の立体構造を再生することが多い。しかしこの場合、顕微鏡対物レンズの焦点深度が浅いため、観察される像は、試料中で焦点の合っている断面の像に隣接する上下の面からのさまざまなボケ量をもつ焦点はずれ像が重畳したものとなる。このため、観察像は空間的分解能の低い像となり、対物レンズの高解像力が生かされない。この影響を避ける方法として、試料を物理的に薄く切断するマイクロームの使用がある。しかし試料全体に渡って薄い切片を作製することの煩雑さや、生きたままの試料を取り扱えないこと、切断の際に試料を変形してしまう恐れがある等の欠点も

多い。

試料に手を加えずに上述の焦点はずれ像の重畳の効果を除去する方法として、走査型共焦点顕微鏡の使用が考えられる<sup>1-4)</sup>。走査型共焦点顕微鏡は、焦平面間の分離が著しく良いという特徴をもつが、現在のところ螢光試料に限られており、装置自体も高価である。通常の光学顕微鏡を用いて上述の問題を解決する方法としては、光学顕微鏡トモグラフィの手法<sup>5,6)</sup>と、3次元デコンボリューションの手法<sup>7-9)</sup>がある。前者は顕微鏡に off-axis の開口を設けることにより、偏斜照明光学系を実現し、光学的なトモグラフィを行なうものであり、後者は焦点位置を変えて得られる複数枚の結像データから元の物体(発光分布または吸収係数)を推定するものである。いずれの手法においてもいくつかの実験例が報告されているが、光学顕微鏡トモグラフィでは観察角度の制限が問題点であり、3次元デコンボリューションにおいては、空間周波数帯域の制限が問題となる。

本研究は、3次元デジタル画像処理の技法を用いて、3次元構造をもつ生物試料の光学顕微鏡像の画質改善を目的としており、3次元デコンボリューションの手法に属する。画像修正のためには、まず試料内で焦点位置を少しずつ変えて得られる観察像をデジタル化して計算機に取り込む。次にこの3次元結像データに対して、本研究では2段階の3次元画像修正を施すことにより、顕微鏡の光軸に垂直、および平行な両方向での分解能の向上を試みた。すなわち、第1段階では通過周波数帯域内における修正を行ない、第2段階で、空間周波数帯域を外そうする修正を行なった。この第2段階の修正により3次元デコンボリューションにおける空間周波数の帯域制限の緩和を試みた。本研究は、通常の光学顕微鏡を用いて、試料にも顕微鏡にもまったく手を加えずに、試料の鮮明な立体構造を得ようとするのが特徴である。4. 章において本論文の手法を用いた実験結果を報告する。

2. 3次元結像系

Fig. 1 に示すようなテレセントリックな光学系による3次元結像を考える。すなわち、結像はシフトインバリアントであると仮定する。本研究ではインコヒーレントに照明された3次元物体を考え、理論の簡単化のために、物体内での光の吸収、回折は十分小さいものと仮定する。

上記の仮定の下で3次元像  $g(x, z)$  は、3次元物体  $f(x, z)$  と結像系の3次元点像分布関数 (3-D PSF)  $h(x, z)$  とのコンボリューションとして次式で与えられる<sup>10,11)</sup>。

$$g(x, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} f(x', z') \cdot h(x-x', z-z') d^2x' dz' \quad (1)$$

ここで  $\mathbf{x}=(x, y)$  であり、光軸に垂直な平面での座標を表わし、 $z$  は光軸方向の座標を表わす。(1)式を3次元フーリエ変換領域で書き表わすと

$$G(\mu, \eta) = F(\mu, \eta) \cdot H(\mu, \eta) \quad (2)$$

となる。ここで  $G, F$ , および  $H$  はおのおの像のスペク

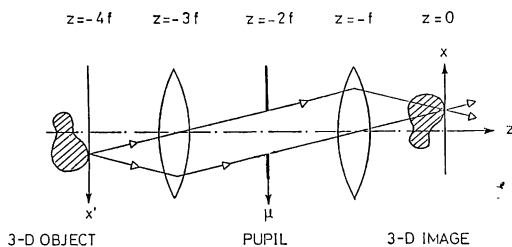


Fig. 1 3-D imaging by a telecentric system.

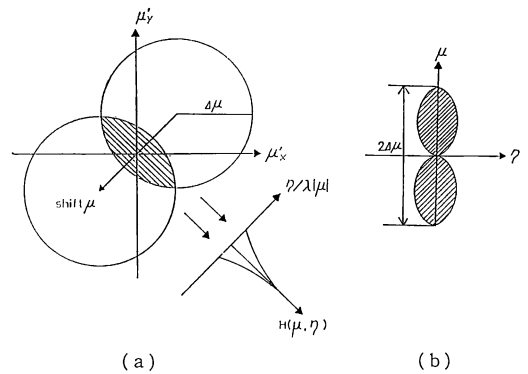


Fig. 2 (a) Calculation of the 3-D OTF for a given pupil function  $p(\mu)$ , (b) a sectional plot of the region of support of the 3-D OTF.

トル、物体のスペクトル、および3次元の光学的伝達関数 (3-D OTF) を表わし、 $(\mu, \eta)$  は  $(x, z)$  に対応する空間周波数を示す。

3次元結像系の性質を知るため、波動光学的に 3-D PSF, および 3-D OTF を求める。系の瞳関数を  $p(\mu)$  とするとき、点像の振幅分布は  $z$  方向への光の伝播を考慮して次式で与えられる。

$$h_a(\mathbf{x}, z) = \int_{-\infty}^{\infty} p(\mu) \exp [2\pi i z (\lambda^2 - \mu^2)^{1/2}] \times \exp (2\pi i \mu \cdot \mathbf{x}) d^2\mu \quad (3)$$

3-D OTF は 3-D PSF の 3次元フーリエ変換として次式で与えられる<sup>11)</sup>。

$$H(\mu, \eta) = \iint_{-\infty}^{\infty} p\left(\mu' + \frac{1}{2}\mu\right) p^*\left(\mu' - \frac{1}{2}\mu\right) \times \delta(\eta + \lambda\mu \cdot \mu') d^2\mu' \quad (4)$$

円形開口の場合の 3-D OTF の積分を Fig. 2(a) に示す。(4)式の被積分関数の第1, 第2項は、2次元 OTF を求めるときの瞳関数の自己相関と同じである。第3項の  $\delta$  関数は開口をずらせる方向に垂直な一連の線分の方角を示し、この線分に沿っての線積分値が、中心から  $\eta/\lambda|\mu|$  の位置での 3-D OTF の値を示す。この結果 3-D OTF の存在する範囲は、Fig. 2(b) の斜線部を  $\eta$  軸のまわりに回転させた領域に限られる。

いま、円形開口の瞳関数を次式のようにおく ( $\rho = |\mu|$ )。

$$p(\rho) = \begin{cases} 1, & \rho < 1/2\lambda A \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (5)$$

ここで  $A$  は光学系の  $f$  値を示す。(4)式を用いると円形開口の 3-D OTF は次式のように得られる。

$$H(\rho, \eta) = (1/\lambda^2 \rho A) \text{Re} [ \{ 1 - (\lambda \rho A + 2|\eta|A/\rho)^2 \}^{1/2} ] \quad (6)$$

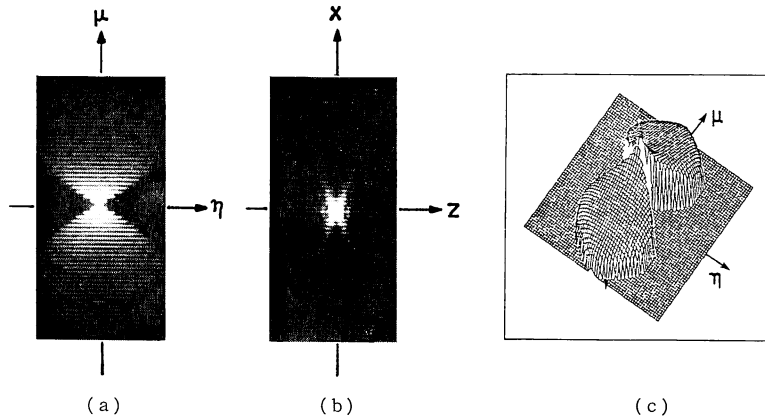


Fig. 3 Two-dimensional sections of (a) the 3-D OTF and (b) the 3-D PSF for a circular pupil, (c) perspective plot of (a) on a logarithmic scale.

Fig. 3(a) にこの 3-D OTF の  $\eta$  軸に平行な断面を示し, Fig. 3(b) はこれに対応する 3-D PSF の光軸に平行な断面を示す. 3-D OTF, 3-D PSF はこれらの図をそれぞれ  $\eta$  軸,  $z$  軸のまわりに回転させたものである.

Fig. 3 (c) は(a)を対数表示したものである. これらの図より 3-D OTF は  $\eta$  軸方向に厳しく帯域制限を受けており, さらに通過空間周波数の完全に欠落した帯域が存在することがわかる.  $\rho$  軸方向の遮断周波数は  $\rho_{\max} = 1/\lambda A$  であるから, これより光軸に垂直な方向の分解能として次式を得る.

$$\delta x = 1/2\rho_{\max} = (\lambda/2)A \quad (7)$$

$\eta$  軸方向の遮断周波数は周波数  $\rho$  に依存し, その最大値  $\eta_{\max} = 1/8A^2\lambda$  はこの光学系の光軸に平行な方向の分解能の限界を与え

$$\delta z = 1/2\eta_{\max} = 4\lambda A^2 \quad (8)$$

となる.

### 3. 画像修正

まず, 厚みのある試料内で焦点位置を少しずつ変えて顕微鏡像を撮影することにより, 計算機内に 3 次元的な画像データを取り込む. このときのサンプリング間隔は, 顕微鏡対物レンズの開口数 (または  $f$  値) により, (7), (8)式から決定される. こうして入力された 3 次元データに対して, 本研究では次の 2 段階の修正を試みた.

第 1 段階は 3 次元的な逆フィルタリングによる画像修正である<sup>12)</sup>. これによって, 光軸に垂直な各焦平面内で分解能を大幅に向上させるとともに, 上下の面から重畳しているボケもある程度取り除くことができる. しかしながら, この修正はあくまでも通過空間周波数帯域内での修正にとどまる. Fig. 3 からわかるように  $\eta$  軸方向

の帯域制限に対しては逆フィルタが存在しないため, 光軸に平行な方向の修正は不十分なものとなる.

そこで第 2 段階として, 完全に欠落している  $\eta$  軸方向の空間周波数帯域を外そうによって回復する, いわゆる超解像を行なう. 本研究では物体の拡がり有限であると仮定して (あるいは物体の有限領域のみに着目して), Gerchberg と Papoulis により提案されている反復アルゴリズム<sup>13,14)</sup> (以下 G-P アルゴリズム) を 3 次元領域に拡張して用いることにより超解像が行なわれ, 光軸に平行な方向の像の分解能の向上が図られる<sup>15,16)</sup>.

実際に用いられるアルゴリズムとしては, 第 1 段階では, 雑音の影響を考慮して, (9)式に示すように 3 次元ウィナーフィルタをフーリエ変換領域で施すことにより推定解が得られる.

$$\hat{G}(\mu, \eta) = \frac{H^*(\mu, \eta)}{|H(\mu, \eta)|^2 + \Phi_n(\mu, \eta)/\Phi_s(\mu, \eta)} \times G(\mu, \eta) \quad (9)$$

ここで  $H^*$ ,  $\hat{G}$  はそれぞれ 3-D OTF の複素共役, 第 1 段階の修正像  $g(x, z)$  のフーリエスペクトルを表わす. また  $\Phi_n(\mu, \eta)$ ,  $\Phi_s(\mu, \eta)$  はそれぞれ雑音と物体のパワースペクトル密度を表わす. 本研究では簡単のため  $\Phi_n(\mu, \eta)/\Phi_s(\mu, \eta) = \epsilon$  (定数) を用い, その値は実験的に決定された. 次に第 2 段階では, 前段階で得られる解を初期推定解として Fig. 4 に示す G-P アルゴリズムを用いて超解像が行なわれる. まず初期推定解を, 仮定した物体の拡がりの大ききで切り出し, フーリエ変換によりスペクトルを得る. 次に, 通過空間周波数帯域内においては, 初期推定解のスペクトルと置き換え, 帯域外に拡がったスペクトルはそのままにし, 逆フーリエ変換して次の推定解とする. この反復作業を繰り返すことにより超

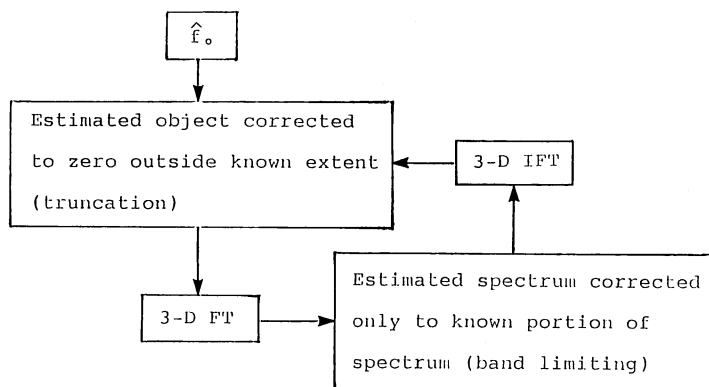


Fig. 4 Schematic diagram of Gerchberg-Papoulis algorithm.

解像が達成される。いま、物体空間において物体の拡がりを制限する truncation オペレータを  $D$ 、空間周波数空間における帯域制限オペレータを  $B$  とするとき、G-P アルゴリズムによる第  $n+1$  番目の推定解は

$$f_{n+1}(\mathbf{x}, z) = \hat{g}(\mathbf{x}, z) + [I - B]Df_n(\mathbf{x}, z) \quad (10)$$

で与えられる。ここで  $\hat{g}(\mathbf{x}, z)$  は第 1 段階の推定解であり、初期推定解として  $f_0(\mathbf{x}, z) = \hat{g}(\mathbf{x}, z)$  を用いる。また  $I$  は identity オペレータを表わす。

#### 4. 実験結果と考察

本研究においては、2種類の3次元構造をもった生物試料を用いて実験を行なった。第1の試料はアメリカザリガニの機械感覚介在ニューロン (6D2) を用い、第2の試料としてアフリカツメガエルの卵母細胞核を用いた。これらの生物試料は吸収が比較的少なく、近似的に本研究の条件を満足するものと思われる。使用された顕微鏡対物レンズは  $4\times$ ,  $NA=0.16$  のものであり、 $21\mu\text{m}$  ごとに焦点位置を変えて撮影された。断面画像の枚

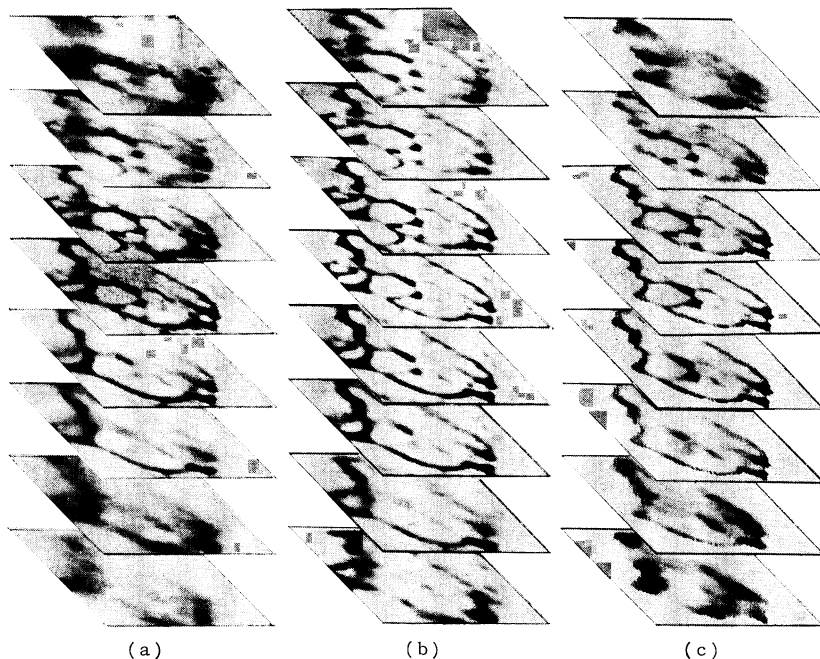
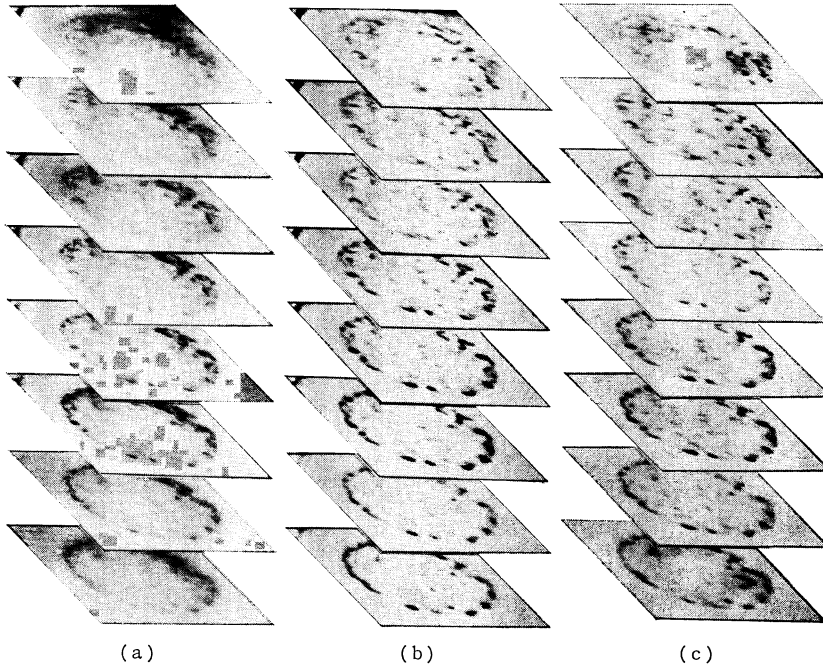


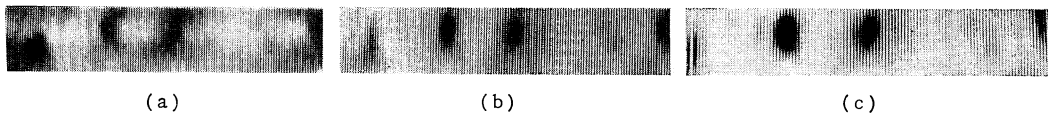
Fig. 5 Images of mechano sensory interneurons (6D2) of an American crayfish (*Procambarus clarkii*) perpendicular to the optical axis. (a) Observed slices, (b) restored slices by the first step and (c) restored slices by the second step.



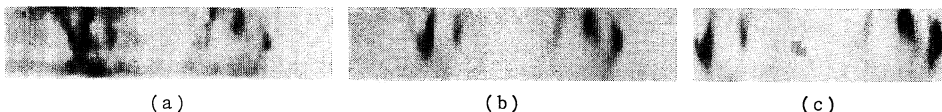
**Fig. 6** Images of nucleus in an oocyte of a South African clawed frog (*Xenopus laevis*) perpendicular to the optical axis. (a) Observed slices, (b) restored slices by the first step and (c) restored slices by the second step.

数は8枚, 各断面内の画素数は  $128 \times 128$  点でサンプル点の間隔は,  $0.83 \mu\text{m} \times 0.83 \mu\text{m}$  に相当する. この3次元データを6bit A/D変換器を介して計算機内に取り込み, 本研究の2段階の手法により, 画像修正を施した. 画像データの取込みに当たっては, 積算平均を行ない, S/N比の向上を図った. 第1段階のウィナーフィルタリングに当たっては, 第1の試料では  $\epsilon = 0.01$ , 第2の試料では  $\epsilon = 0.0075$  を用い, 第2段階のG-Pアルゴリズムは30回反復を行なった.  $\epsilon$  の値は試料ごとに実

験的に最適値を決定した. 計算機は北大大型計算機センターのM-680HとM-682Hを用いた. 上記2種類の試料についての実験結果をそれぞれ **Fig. 5**, **Fig. 6** に示す. これらの図は光軸に垂直な断面の像を示しており, 各図において(a)が観察像, (b)が第1段階の修正像, (c)が第2段階の修正像である. またそれぞれの試料について, 光軸に平行なある断面の像を **Fig. 7**, および **Fig. 8** に示す. やはり(a), (b), (c)の順に観察像, 第1段階の修正像, 第2段階の修正像を示す.



**Fig. 7** Images of mechano sensory interneurons (6D2) of an American crayfish (*Procanbarus clarkii*) parallel to the optical axis. (a) An observed slice, (b) a restored slice by the first step and (c) a restored slice by the second step.



**Fig. 8** Images of nucleus in an oocyte of a South African clawed frog (*Xenopus laevis*) parallel to the optical axis. (a) An observed slice, (b) a restored slice by the first step and (c) a restored slice by the second step.

**Table 1** Squared errors in the simulated examples; no-noise case and a 30-dB signal-to-noise ratio case.

	Degraded image	At 1st step	At 2nd step
No-noise	1.00	0.42	0.09
30-dB SNR	1.00	0.64	0.51

これらの修正結果から以下のようなことがわかる。まず第1段階目のウィナーフィルタリングにより修正した結果、両方の試料について光軸に垂直な方向での空間的分解能が飛躍的に向上している。また光軸に平行な方向でも大幅に分解能の改善がなされている。とくに上下の端に近い断面において良好な画質改善が達成されている。この結果、それぞれの観察像と比較すると、第1の試料 (**Fig. 5**) では、上方と下方では全く異なるニューロンの構造が、また第2の試料 (**Fig. 6**) では核内に散在する核小体の分布が、より明確に判別できるようになった。次に第2段階目の超解像による修正結果について考察する。**Fig. 6** の卵母細胞核に関しては、核の存在範囲で物体空間を制限したため、自然な画像が得られ、核小体の部分のコントラスト向上等、若干の画質改善が認められる。とくに上下両端の画像においてかなりの改善が見られる。しかしながら、**Fig. 5** のニューロンについては、人為的に空間領域での制限を行なったため、画像が不自然であり、とくに上下の端の断面においてかえって像が悪化してしまった。他の部分においては、光軸に平行な方向において若干焦平面間の分離が良くなっているが、これも小幅な改善にとどまっている。

以上のことを定量的に示すために、以前学会にて報告した計算機シミュレーションの結果を **Table. 1** に示す<sup>17)</sup>。これは  $10\times$ ,  $NA=0.25$  の対物レンズを想定したシミュレーションの自乗誤差を示している。雑音のない理想的な場合は、第2段階の修正も有効に働き、光軸に平行な方向での分解能向上も達成されている。しかし、より現実的な雑音の存在する場合は、確かに第1段階の修正は比較的良好に行なわれているが、第1段階から第2段階においては、わずかな修正にとどまっている。これは G-P アルゴリズムが本質的に雑音に弱いことを示している。

上記の実験結果から、本研究における第1段階の修正は光学顕微鏡像の画質改善に非常に有効であることが確認された。観察者の要求によっては、この第1段階の修正のみで十分であることも考えられる。第2段階の超解

像による修正は、その拡がり(輪郭)が比較的明確で、第1段階の修正像から容易に推定しうる物体に対してはある程度効果があるといえる。しかし、物体空間での truncation の必要から任意の物体に用いるのは無理であり、適用物体が制限されてしまう。また今回用いた第2段階の修正手法は、大量のデータについて多数回のフーリエ変換を行なわなければならない、計算量が膨大な割には期待されたほどの修正がなされなかった。より少ない計算量で修正効果の大きい超解像アルゴリズムを開発することが、今後に残された課題である。

本研究においては、物体内での光の吸収は十分小さいことを仮定し、しかもインコヒーレント照明下での結像のみを考えている。このため本研究の手法を適用できる生物試料はある程度限定されてしまう。より一般的な吸収のある物体を取り扱うためには、光源を考慮した 3-D OTF を用いる必要がある。すなわち、部分的コヒーレント照明下における結像を考えねばならず、しかも物体の吸収部分と位相部分に分けて取り扱う必要がある<sup>8)</sup>。この場合 3-D OTF はさらに狭帯域になるため、画像修正はますます困難になることが予想される。これも今後に残された問題点の一つと考えられる。

## 5. ま と め

3次元構造をもつ生物試料の通常の光学顕微鏡による観察像を、デジタル画像修正により画質改善する手法と実験結果について報告した。インコヒーレント光照明下の低吸収物体という条件の下で、2段階の画像修正法を提案し、計算機シミュレーションおよび2種類の生物試料を用いた実験を行なった。この結果、本研究の第1段階の手法によって、光軸に垂直な方向において大幅な画質改善が行なわれ、また光軸に平行な方向についてもかなりの程度改善が見られることを確認した。しかしながら第2段階の手法については不満足な結果に終わり、欠落した空間周波数帯域を十分に回復することはできなかった。

今後の研究課題としては、より効果的な超解像アルゴリズムの開発、部分的コヒーレント照明下での結像への本研究の拡張が考えられる。また、3次元デジタル画像を任意の方向から観察、表示できるアルゴリズムを現在開発中であり、これを用いることにより、生物試料の3次元構造をより明確に把握することが可能となるであろう。さらに、第1段階の処理を実空間で効率よく行なう3次元デコンボリューションのアルゴリズムを開発することにより、パソコンレベルでの(第1段階までの)実

用的なシステムの実現も十分可能であると思われる。

### 文 献

- 1) T. Wilson and C. Sheppard: *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic Press, London, 1984).
- 2) R. W. Wijnaendts van Resandt, H. J. B. Marsman, R. Kaplan, J. Davoust, E. H. K. Stelzer and R. Stricker: "Optical fluorescence microscopy in three dimensions: microtomography," *J. Microsc.*, **138** (1985) 29-34.
- 3) K. Carlsson, P. E. Danielsson, R. Lenz, A. Liljeborg, L. Majlot and N. Åslund: "Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope," *Opt. Lett.*, **10** (1985) 53-55.
- 4) 中村 収, 河田 聡, 南 茂夫: "コンフォーカル・レーザ-走査顕微鏡の三次元結像特性", *応用物理*, **57** (1988) 784-791.
- 5) 河田 聡: "トモグラフィック光学顕微鏡イメージング", *光学*, **5** (1985) 333-342.
- 6) S. Kawata, O. Nakamura and S. Minami: "Optical microscopic tomography. I. Support constraint," *J. Opt. Soc. Am.*, **A4** (1987) 292-297.
- 7) D. A. Agard and J. W. Sedat: "Three-dimensional architecture of a polytene nucleus," *Nature*, **302** (1983) 676-681.
- 8) N. Streibl: "Three-dimensional imaging by a microscope," *J. Opt. Soc. Am.*, **A2** (1985) 121-127.
- 9) A. Erhardt, G. Zinser, D. Komitowski and J. Bille: "Reconstructing 3-D light-microscopic images by digital image processing," *Appl. Opt.*, **24** (1985) 194-200.
- 10) N. Streibl: "Fundamental restrictions for 3-D light distributions," *Optik*, **66** (1984) 341-354.
- 11) N. Streibl: "Depth transfer by an imaging system," *Opt. Acta*, **31** (1984) 1233-1241.
- 12) C. W. Helstrom: "Image restoration by the method of least squares," *J. Opt. Soc. Am.*, **57** (1967) 297-303.
- 13) R. W. Gerchberg: "Super-resolution through error energy reduction," *Opt. Acta*, **21** (1974) 709-720.
- 14) A. Papoulis: "A new algorithm in spectral analysis and band-limited extrapolation," *IEEE Trans. Circuits Syst.*, **CAS-22** (1975) 735-742.
- 15) K. C. Tam and V. Perez-Mendez and B. Macdonald: "Limited angle 3-D reconstructions from continuous and pinhole projections," *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, **NS-27** (1980) 445-458.
- 16) S. Kawata and J. Sklansky: "Elimination of non-pivotal plane images from X-ray motion tomograms," *IEEE Trans. Med. Imag.*, **MI-4** (1985) 153-159.
- 17) 前田純治, 加藤直之, 村田和美: "3次元デジタル画像処理による光学顕微鏡像の修正", 第17回画像工学コンファレンス論文集 (1986) 233-236.