

解説

イメージングスペクトロスコピーによるパターン分析

河田 聡

大阪大学工学部応用物理学教室 〒565 吹田市山田丘 2-1

Pattern Analysis by Imaging Spectroscopy

Satoshi KAWATA

Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Osaka University,
2-1, Yamada-oka, Suita 565

1. はじめに

高感度、高分解、広スペクトルレンジのフォトディテクタ・アレイの開発、およびそれに関わる光学設計技術の進歩と光学材料の開発に伴い、ポイント測定分光分析法から、2次元分布測定、いわゆる画像の分光分析への進展が現実化してきている。その応用は、天体計測やリモートセンシングのようなビッグスケールなものから、プラズマ・燃料診断、さらには、顕微分光に代表されるマイクロなもので広範であるが、いずれにおいても、画像分光分析は従来の分光分析と異なった特有の利点や問題を生み出してきている。

本稿では、顕微分光画像計測への応用例を中心に、イメージングスペクトロスコピーの分析への応用の新しい流れである、画像パターン分析法について概説する。この方法によれば、多波長で観察した単一のシーンから、そこに含まれるコンポーネントの個数も、各コンポーネントのスペクトル分布、空間分布（パターン）のいずれも知らずに、それらを推定することができる。すなわち未知な成分で構成されている画像に対して、そこに含まれる物質・物体のパターンを求めることができる。これは、パターンの空間的形状・特徴に類した従来のパターン認識・識別法とまったく異なる新しい方法である。原理を説明し、生物試料や組織細胞等の吸光顕微分光画像に対する応用や、蛍光顕微試料に対する新しい理論と応用等を紹介する。

2. 成分スペクトルの逆変換

画像処理の最終の目的はパターン認識、パターン識別

である。観察される視野内に、どんな物体、物質がどのように分布しているか、定性的にも定量的にも求めたい。このための研究はこれまで非常に精力的に行なわれてきており、テキストチャー解析や文字認識等ではすでに多くの成果が得られている。しかし、概してそれらの研究は、物体の空間的特徴に着目したものであり、もうひとつの座標である分光的特徴はあまり利用されていない。しかし、分光座標こそが物質の識別に最も重要な情報を含んでいる。異なる物質は、適当なエネルギー（周波数）の電磁波に対して必ず異なる応答を示すはずである。

各物質が互いに異なるスペクトル分布をもっていれば、そのスペクトルデータをあらかじめ知ることにより、各成分の空間統計量を用いずに、その空間パターンは連立方程式の解として求まる。

いま、複数 (M 個) の構成成分を含むシーンを複数 (N) のスペクトルバンドで観測した場合を考えよう。観測画像と各構成成分の分布（濃度、強度）に線形性が成立するならば、これらは次の行列方程式で表現できる。

$$[I] = [S][P] \quad (1)$$

ここで $[I]$ は、各バンドにおける画像の空間分布 (2次元、画素数 L) を1次元的に並べ直し、それぞれを行ベクトルに持つ行列、 $[S]$ は同様に、 M 個の成分のスペクトル分布を列ベクトル s_1, s_2, \dots, s_m としてそれらを並べた行列、 $[P]$ は各成分パターンを1次元的に並べ直した行ベクトル p_1, p_2, \dots, p_m から成る行列である。 $[I]$ の行数 N (すなわちバンド数) は、 $[P]$ の行数 M (成分数) と同じか、それ以上でなければならない。図1に(1)式を図解した。

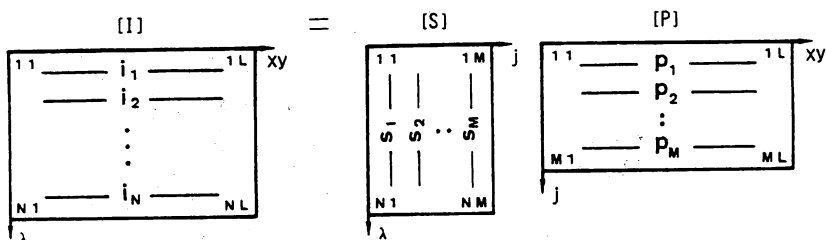


図 1 (1)式の要素の説明図

このように、観測されるシーン $[I]$ は、各成分のスペクトル分布 $\{s_j\}$ とその空間分布 $\{p_j\}$ の線形結合の形で与えられる。

さて、各成分のスペクトル $[S]$ があらかじめわかっている場合、観察画像 $[I]$ より各成分のパターン $[P]$ は最小二乗法を用いて、求めることができる。

$$[P] = ([S]^T [S])^{-1} [S]^T [I] \quad (2)$$

M と N が等しいとき、より簡単に、

$$[P] = [S]^{-1} [I] \quad (3)$$

(3)式によるパターン推定は、二波長吸収顕微分光法や臨床X線画像処理において実用的に利用されており、たとえば、赤血球/白血球の自動画像分類やX線写真からの骨部と軟部組織の分離等の目的に応用されている^{1,2)}。

3. 未知成分から構成されるシーンのアナリシス

もし物質のスペクトル $[S]$ すらわからないとき、すなわち、未知の物質や予期しない物質が観測画像内に含まれているときは、どうすればよいだろうか？ 筆者らは、マルチバンドでシーンを観察すれば、そこに含まれる成分の数も、スペクトルも空間的形状も知らなくても、それらを求めることができ、結局、各物質の空間分布も推定できるという手法を提案してきた³⁻⁹⁾。

実際、主成分分析法を用いれば成分数は簡単に求めることができる。観測画像 $[I]$ ($[I]$ が正方でない場合、共分散行列 $[I][I]^T$) のランク数を、 $[I][I]^T$ のゼロでない固有値の数より求めれば、それが成分数となる。各成分がいずれも互いに異なるスペクトル分布と空間分布を持っていれば(もし完全に同一な分布なら同一物質と見なされる)、画像セットデータ $[I]$ は、特異値分解により、

$$[I] \approx [U][A][V] \quad (4)$$

と表現できる。ここで $[A]$ は $M \times M$ (M は $[I]$ に含まれる成分の数) の対角行列で、その対角要素は、 $[I][I]^T$ のゼロでない(あるいは雑音の分散値以上の)固有値の平方根である。 $[U]$ と $[V]$ はそれぞれ、 $[I][I]^T$ およ

び $[I]^T [I]$ の固有値ベクトルから成る行列を表わす。

4. 先験情報の導入—非負拘束

さて、スペクトルもパターンも未知の場合に、すなわち、(1)式で、 $[S], [P]$ のすべての要素が未知であるとき、観測画像データ $[I]$ より、それら両方を求めることがこの研究の目的である。しかし、いかなる $[S]$ に対しても(1)式を満足する $[P]$ は存在し、当然のことながら、 $[S]$ と $[P]$ の解はまったく不定である。この問題を克服するためには、 $[S]$ か $[P]$ に関する、何らかの別の式(または不等式)が必要である¹⁰⁾。今回の問題に関しては、次のような拘束条件を導入することができる。

(1) あらゆる物質は、観察シーンのすべての画素において負の密度を持ちえないこと、すなわち

$$[P] \geq [0] \quad (5)$$

および、(2)あらゆる物質のスペクトルはいかなる波長においても負にならないこと、すなわち

$$[S] \geq [0] \quad (6)$$

(5)、(6)式の拘束は当たり前の条件ながら、(1)式でもってこの二つを結合すれば、きわめて有効な条件式となりうる。すなわち、(5)式による $[P]$ の制限は、(1)式を介して $[S]$ を制限し、逆に(6)式は $[P]$ に対する新たな拘束となる。(5)、(6)式の拘束は、全成分、全画素、全波長での拘束であるので、(1)式と結合させると膨大な数の不等式のセットとなる。しかし、これを固有空間で行なうと、たかだか成分数の二乗 (M^2) 個のパラメータに次元が圧縮されるので、計算・アルゴリズムが簡単になる。

$[P]$ と $[S]$ を(4)式の固有ベクトル行列で表現すると、

$$[P] = [T][V] \geq [0] \quad (7)$$

$$[S] = [U]^T [A] [T]^{-1} \geq [0] \quad (8)$$

となり、(5)、(6)式は $M \times M$ の係数行列 $[T]$ に関する不等式に置換される。

(5)、(6)式非負拘束条件式の導入がいかに有効であるかを知るために行なった実験の結果の例を示す³⁾。

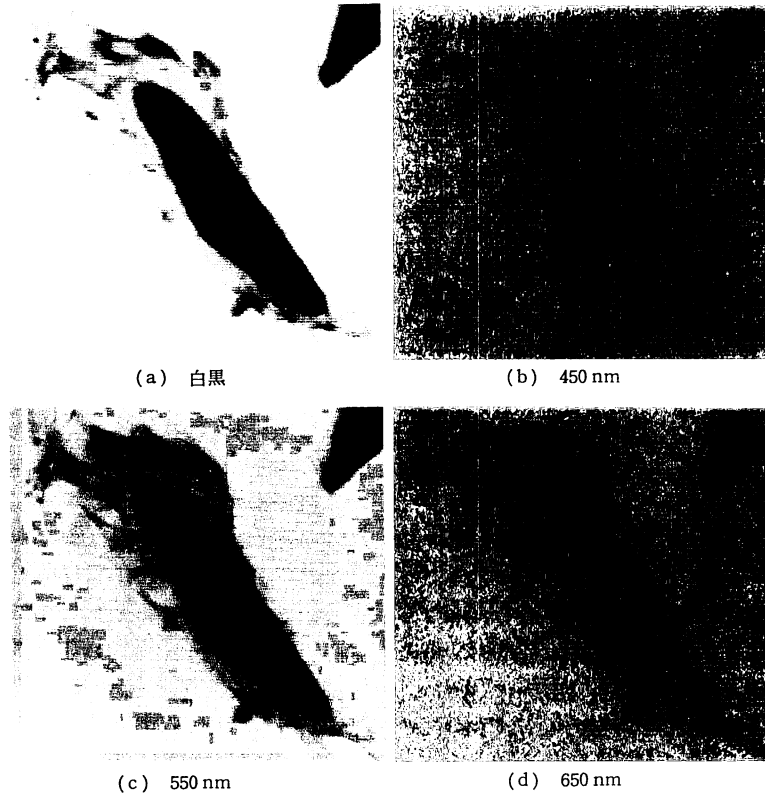


図2 ゾウリムシの顕微鏡観察像

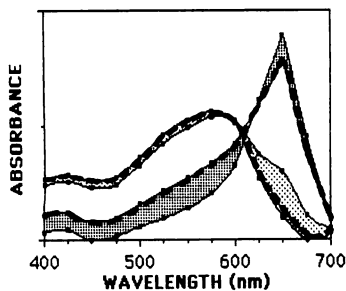


図3 図2の3枚の画像を含む13枚の画像データから求めた二つの成分スペクトルの存在範囲と、エントロピー最小化規範によって一意的に決定された成分スペクトル(破線)

図2(a)はゾウリムシの顕微鏡写真像(白黒)である。この試料は2種の色素で染色されており、それぞれは細胞膜と核、および細胞膜と繊毛とに選択的に染色することが知られている。図2(b)~(d)は(a)の顕微鏡像をそれぞれ450, 550, および650 nmの干渉フィルタを通して観測した画像である。さて、この試料を、450~750 nmの可視域において図2(b)~(d)の3バンドを含む13バンドで計測し、既述の固有値解析法を用いればこの画像に含まれる成分数が求まる。この場合では、2成

分系であることが求まった。さらに、非負拘束を導入することによってそれぞれの成分は、図3の網点で示された二つのスペクトル領域にあることが求まった。同時に、二つの成分の空間分布パターン[P]についても、それぞれ、各画素ごとにとりうる強度範囲が求まる(データについては文献3)を参照)。

5. スペクトルの一意的決定法—エントロピー規範の導入

既述の方法で求めた各成分のスペクトルと空間分布のとりうる範囲内から、さらに一意的に[S]と[P]を求めるための二つの方法を筆者らは考案した。第1の方法は、(5)、(6)式以外に、シーンに関する先験情報や拘束式がないなら、存在範囲の中から最ももらしいパターンを一意的に決定しようというやり方であり、すなわち、解析的に答を求めるのではなく、最適解を求めることになる。

この方法の原理は次のとおりである。(5)、(6)式の拘束条件をみだす[S]の解の集合、 $[S_1] \leq [S] \leq [S_2]$ は必ず真のスペクトルのセット[S]を含んでいるが、そのうち、真でない解は複数の成分が重畳しており、各

成分スペクトルの特徴が互いに影響し合っている。そこで、真のスペクトル・セット $[S]$ を $[S_1]$ と $[S_2]$ の間から選ぶためには、各推定成分スペクトルが互いに行き来するだけ似通っていない、すなわち互いに特徴的なものを捜す^{6,7)}。この規範は、情報エントロピーの最小化の話と対応しており、次式の H_s を最小にするような $[S]$ を求めればよい^{4,6,11)}。

$$H_s = - \sum_{j=1}^M \sum_{k=1}^N a_{jk} \ln a_{jk} \rightarrow \text{Min} \quad (9)$$

$$a_{jk} = \frac{|s_j^*(\lambda_k)|}{\sum_{k=1}^N |s_j^*(\lambda_k)|} \quad (10)$$

ただし、 $s_j^*(\lambda_k)$ は $[S]$ の j 番目のベクトル s_j (図 1 参照) の波長軸に関する二次微分 (差分) を表わし、 a_{jk} は、それを各推定スペクトルについて面積で規格化し、絶対値をとったものである。

(5), (6) 式の不負拘束下で、(9) 式の最適解を求める方法としては、黄金分割法、または SUMT (sequen-

tial unconstrained minimization technique) と呼ばれる非線形最適アルゴリズムを利用すればよい^{4,6,7)}。

もし、各物体が分光的のみならず空間的にも互いに特徴的であるなら、(9) 式の H_s にかわって、あるいはそれに加えて、

$$H_p = - \sum_{j=1}^M \sum_{l=1}^L b_{jl} \ln b_{jl} \rightarrow \text{Min} \quad (11)$$

$$b_{jl} = \frac{|p_{jl}^*|}{\sum_{l=1}^L |p_{jl}^*|} \quad (12)$$

なる規範を用いることも可能である。ただし p_{jl}^* は j 番目の成分の推定パターン¹⁾の空間的二次微分値を表わす。

前出のゾウリムシの顕微鏡画像 (図 2) に対して、エントロピー最小化規範を適用して推定した 2 成分のスペクトルを図 3 に波線で示した。図中、二つのスペクトルは色素、ヘマトキシリンとファストグリーンのスペクトルに非常によく一致している。また、それぞれの空間分布

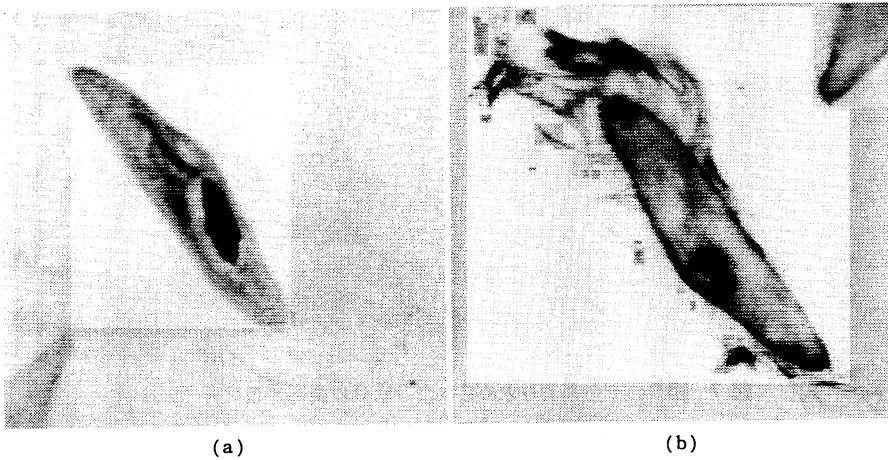


図 4 推定された 2 成分の空間分布パターン

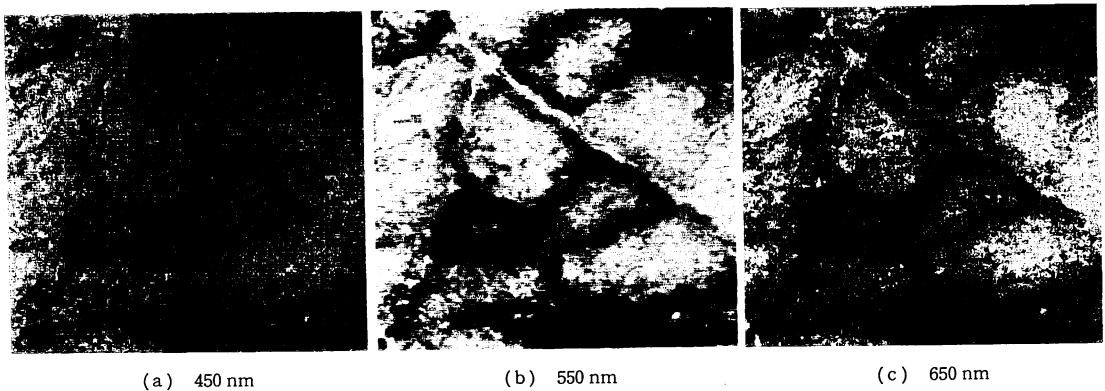


図 5 ラット筋肉細胞の透過顕微鏡画像

を図4に示す。図4(a)では細胞質と核が、(b)では細胞膜と繊毛が非常によく分離して求められている。

筆者らは、この方法を、組織細胞化学における各種試料の酵素活性状態分布の推定^{11,12)}や、分光分析化学にお

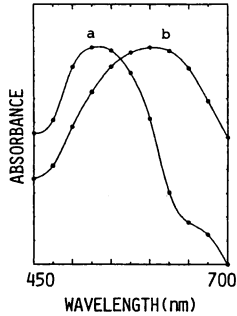


図6 図5のデータより推定された2成分のスペクトル分布

ける化学反応過程の中間生成物の発見^{9,13)}等に実用的に応用してきている。ここでは、この原理を実用的に応用した例として、組織細胞中の酵素活性化の空間的定量分析の実験を示す^{11,12)}。図5(a), (b), (c)はそれぞれ450, 550, および650 nmの干渉フィルタで観測したラットの筋肉細胞の顕微鏡写真像である。筋肉はNBTと呼ばれる色素で染色されているが、3種の細胞(図中a, b, c)はそれぞれ、酵素活性化の状態が異なるので、それによって異なる物質構成分布を示す。図6は、図5に示した3枚を含む13波長で測定した分光画像データセットより提案した手法によって推定した2成分のスペクトル分布である。これらは、予想された2色素、モノフォルマザンとダイフォルマザンによく一致した。この2成分のそれぞれの濃度分布も同時に求め、それらは図7(a), (b)に示すように細胞a, b, cに対し、異なる分布を示している。

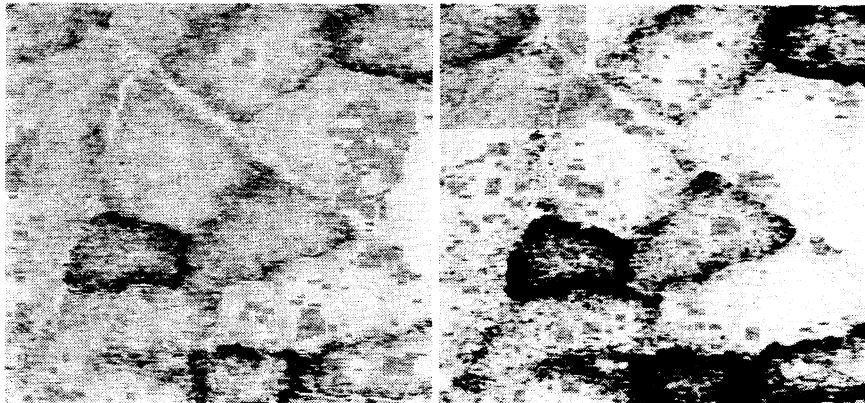
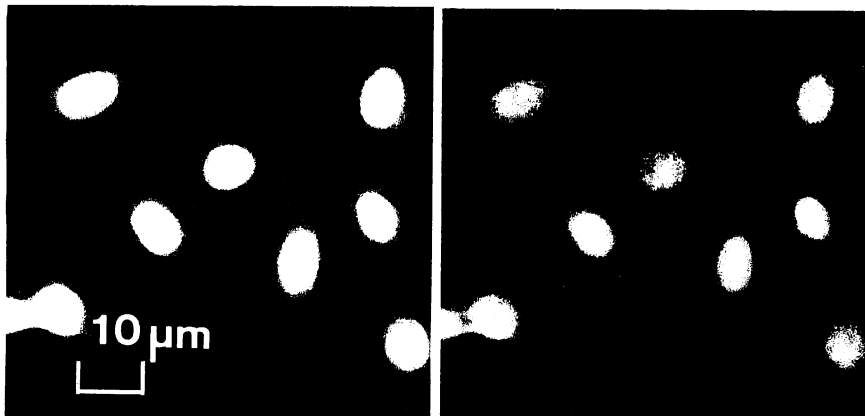


図7 図5のデータより求められた2成分の濃度分布パターン



(a) 励起フィルター: 455~490 nm

(b) 励起フィルター: 475~490 nm

図8 ラット肝細胞の顕微鏡蛍光画像

6. 2バンド励起蛍光分光画像計測

シーンに含まれる各成分のスペクトルも空間パターンを知らずに、それらをユニークに求めるためには非負拘束だけでは不十分であり、エントロピー最小化という最適化理論を利用した。しかし、この方法はあくまで推定法であり、もっともらしい答えを生み出すものの、真の解を必ず与えるわけではない(これらについての議論は文献3)に詳しい)。

最近、筆者らは、蛍光画像のイメージングスペクトロスコピーにおいて、観察画像データのみから各成分の真のスペクトルと空間パターンをユニークに決定する方法を考案した^{14,15)}。この場合、非負拘束条件すらまったく必要でなくなる。

ポイントは、試料に照射する励起光のスペクトルバンドを変えて2回、画像の分光計測(蛍光パターンを多バンドで別々に観察すること)を行なう点にある。原理を簡単に説明する。

あるシーンを、異なる二つのスペクトルバンド b_1, b_2 の光で別々に照明して、発する蛍光パターンを分光計測する。これは(1)式と同じことで、二つのマルチバンド画像データに対して、

$$[I_1] = [S_1][P] \tag{13}$$

$$[I_2] = [S_2][P] \tag{14}$$

が求まる。ここで、 $[S_1], [S_2]$ は、 b_1, b_2 の励起に対する各成分の蛍光スペクトル分布を表わす。その要素は(1)式および図1と同じである。ここで未知なのは $[S_1], [S_2]$ および各成分の空間パターン $[P]$ であるが、これまでの議論と違い、二つの式の $[P]$ が共通となっている。

さて、 $[S_1]$ と $[S_2]$ は、対角行列 $[A]$ (未知)を用いることによって、次式のように結びつけることができるはずである。

$$[S_2] = [S_1][A] \tag{15}$$

これは励起光の波長を変えても、各成分の蛍光スペクトルのプロファイルは変わらず、ただ、励起光波長における各成分の吸光度が変わるだけであることを意味している。(15)式を(14)式に代入し、かつ、 $[I_1]$ の固有ベクトル展開を(4)式と同じ表記を用いて

$$[I_1] = [U]'[A][V] \tag{16}$$

と表わすと、

$$[I_2] = [U]'[A][T]^{-1}[A][T][V] \tag{17}$$

となる。ここで、

$$[B] = [A]^{-1}[U][I_2][V]' \tag{18}$$

とおくと(これは右辺の行列がすべて既知であることより求められる)、これを(17)式に代入して変形することにより、

$$[T][B][T]^{-1} = [A] \tag{19}$$

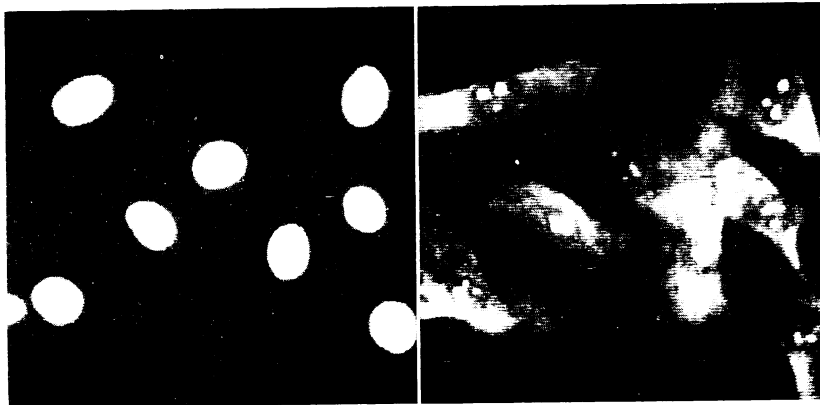
となる。 $[A]$ が対角行列であることより、(19)式は $[B]$ を固有値解析する式となっている。そこで、 $[B]$ を再び固有値解析することにより $[T]$ が求まる。さらに、

$$[P_1] = [T][V] \tag{20}$$

$$[S_1] = [U]'[A][T]^{-1} \tag{21}$$

より、各成分パターン $[P]$ およびスペクトル $[S_1], [S_2]$ がユニークに求まる。

この手法を細胞内の DNA と RNA の定量分布解析に応用した例を示す^{14,15)}。図8はアクリジンオレンジで染色した歯肉の培養細胞の顕微蛍光画像である。さて、図8の2枚の画像を4枚の色カットフィルタの組合せを変えて観測した8枚の蛍光画像から、開発した手法によ



(a) DNA

(b) RNA

図9 推定された DNA と RNA の空間パターン

り推定された DNA と RNA の空間分布パターンを図 9 に示す。細胞核に分布する DNA, 細胞質と核の両方に存在する RNA の 2成分が適切に分離, 識別されており, また, それらの定量的な空間濃度分布が明確に検出されたことが観察される。

7. おわりに

スペクトロスコーピーとイメージング技術を積極的に結合させることにより, 新しい画像パターン分析法が実現された。この方法のポイントは, 画像, シーンをどのように計測するかにある。未知画像から, そこに含まれる物質のパターンやスペクトルを発見するためには, いかにかそれらの情報を含んだ形で計測して, そして分析するかが最も重要なことである。最後に述べた 2バンド励起蛍光画像計測は, 一般的ではないがその一つの答えといえるだろう。

イメージングスペクトルスコーピーと顕微鏡 CT との組合せ¹⁶⁾や, 最適測光波長の選択法¹⁷⁾等, 関連のトピックスについては, 紙面の都合で触れることができなかった。別の機会に譲りたい。

文 献

1) 河田 聡: 第 17 回画像工学コンファレンス論文集(1988)

- pp. 191-195.
- 2) L. A. Lehmann, R. E. Alvarez, A. Macovski and W. R. Brody: *Med. Phys.*, **8** (1981) 659.
 - 3) S. Kawata, K. Sasaki and S. Minami: *J. Opt. Soc. Am. A*, **4** (1987) 2101-2106.
 - 4) K. Sasaki, S. Kawata and S. Minami: *J. Opt. Soc. Am. A*, **6**, No. 1 (1989) in press.
 - 5) 河田 聡: *O plus E*, **85** (1986) 87-94.
 - 6) S. Kawata, H. Komeda, K. Sasaki and S. Minami: *Appl. Spectrosc.*, **39** (1985) 610-614.
 - 7) K. Sasaki, S. Kawata and S. Minami: *Appl. Opt.*, **23** (1984) 1955-1959.
 - 8) K. Sasaki, S. Kawata and S. Minami: *Appl. Opt.*, **22** (1983) 3599-3603.
 - 9) 河田 聡, 南 茂夫: *分光研究*, **35** (1986) 24.
 - 10) 河田 聡: *応用物理*, **55** (1986) 2-23.
 - 11) 河田 聡, 笹木敬司, 南 茂夫: 第 16 回画像工学コンファレンス論文集 (1985) pp. 219-222.
 - 12) T. Araki, K. Chikamori, K. Sasaki, S. Kawata, S. Minami and M. Yamada: *Histochemistry*, **86** (1987) 567.
 - 13) 河田 聡: *高性能化学センサニュース*, No. 6 (1987) 7-13.
 - 14) 笹木敬司, 河田 聡, 南 茂夫: 第 19 回画像工学コンファレンス論文集 (1988) pp. 233-236.
 - 15) S. Kawata, K. Sasaki and S. Minami: *OSA Annu. Meet. Tech. Dig.*, MR 13 (1988).
 - 16) 中村 収, 河田 聡, 南 茂夫: 第 18 回画像工学コンファレンス論文集 (1987) pp. 249-252.
 - 17) K. Sasaki, S. Kawata and S. Minami: *Appl. Spectrosc.*, **40** (1986) 185-190.