# 蛍光による生体分子イメージングにおける画像 再構成法の高度化

大川 晋平\*・池原 辰弥\*\*・小田 一郎\*\*・山田 幸生\*\*\*

# Improvement of Image Reconstruction for in vivo Fluorescence Molecular Imaging

Shinpei OKAWA\*, Tatsuya IKEHARA\*\*, Ichiro ODA\*\* and Yukio YAMADA\*

Image reconstruction in *in vivo* molecular imaging, which non-invasively reconstructs the concentration and the properties of fluorophore in the biological medium, has technical difficulties of low spatial resolution and of artifacts due to the ill-posed nature of the inverse problem. Diffusive propagation of light in biological media makes it difficult to localize fluorescent light sources, and measurement noises cause artifacts in reconstructed images. In this article, the authors introduce two image reconstruction techniques which can alleviate the technical difficulties. One uses a combination of a spatial filter and successive updating of the forward model, and the other regularizes the inverse solution by use of socalled  $l_p$  sparsity criterion. Both suppress artifacts and reconstruct fluorescent light sources with a high spatial resolution.

**Key words:** spatial filter, singular value decomposition, regularization, fluorescence molecular imaging, inverse problem

分子イメージングの一手法である蛍光・生物発光トモグ ラフィー<sup>1)</sup>は、薬剤やがん組織などの計測対象を蛍光物 質等で標識し、生体内で計測対象から生じた光を生体表面 で非侵襲に測定して、計測対象の分布や状態に関する情報 を画像として再構成する.再構成画像から生きたままの小 動物体内での薬物や生体組織に関する経時的な計測が行え ることで、解剖では取得できない知見を得られることや、 小動物実験を効率化できることなどの利点がある.

蛍光・生物発光トモグラフィー画像の再構成では,生体 内の光伝搬を記述する光拡散方程式など(順問題)を利用 して,計測対象に関するパラメーター(発光強度,濃度な ど)の分布を求める(逆問題を解く).生体組織は光を散 乱,吸収するため,生体内で生じた光はぼやけた像として 生体表面に現れることから,生体表面での光測定データか ら光源の状態を一意に特定することは容易ではない.再構 成される蛍光物質などの分布は生体表面に偏ったり,広い 範囲にぼやけたりすることが多い.また,測定データに含 まれるノイズにより、画像にアーチファクトが生じる.

本稿ではノイズの影響を抑えながら,高い空間分解能で 蛍光物質の分布を画像再構成するために著者らが検討して いる2つの方法,空間フィルターを用いる方法<sup>2)</sup>と*l<sub>p</sub>ノル* ム最小化正則化法<sup>3)</sup>を,計算機シミュレーションやファ ントム実験の結果と合わせて解説する.

## 1. 生体内光伝搬の順問題と逆問題

近赤外光に対し生体は光の強散乱体であるため,生体内 の光伝搬は強散乱体中における輻射エネルギーの輸送現象 となり,輻射輸送方程式で厳密に記述される.この生体内 の光伝搬を近似的に記述するひとつの方法として,光が等 方的に散乱されるとの仮定に基づく光拡散方程式がよく用 いられる.生体組織は光を前方に強く散乱することが知ら れているが,媒体が十分大きく,伝搬中に多数回の散乱が 起きた後には散乱は等方的と考えることができる.

本稿では連続光を用いたイメージングを扱うこととし,

<sup>\*</sup>防衛医科大学校医用工学講座(〒359-8513 所沢市並木 3-2) E-mail: okawa@ndmc.ac.jp

<sup>\*\*(</sup>株)島津製作所基盤技術研究所(〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台 3-9-4)

<sup>\*\*\*</sup>電気通信大学大学院情報理工学研究科(〒182-8585 調布市調布ヶ丘 1-5-1)

時間に依存しない光拡散方程式,

 $\{-\nabla \cdot D(\mathbf{r})\nabla + \mu_{a}(\mathbf{r})\}\boldsymbol{\Phi}(\mathbf{r}) = q(\mathbf{r})$ (1) を生体内光伝搬のモデルとして用いる。

ここで、rは媒体内の位置、 $\sigma$ は位置と方向の関数である光強度を方向に関して積分した積分光強度、 $D = 1/(3\mu_s')$ は拡散係数であり、 $\mu_s' = (1-g)\mu_s$ は換算散係数とよばれ、等方散乱近似したときの媒体の散乱係数である。gは散乱の非等方性を表す異方散乱パラメーターである。 $\mu_a$ は吸収係数、qは光源であり、これらの物理量はすべて媒体内の位置rの関数である。式(1)の光拡散方程式は励起光と蛍光の両方に用いることができる。励起光の波長と蛍光の波長に対して換算散乱係数と吸収係数は基本的には異なるが、換算散乱係数は波長依存性が小さいため、両波長で等しいとしてもよい。

生体内の蛍光物質が発する蛍光の強度は蛍光物質の量子 収率や濃度,生体表面から照射し,蛍光物質に到達する励 起光強度に依存するので,光源としての蛍光 q は以下のよ うに記述される.

$$q = \eta \varepsilon N \Phi_x \tag{2}$$

ここで、 $\eta$ ,  $\varepsilon$ , N はそれぞれ蛍光物質の量子収率, モル吸光係数, モル濃度であり,  $\Phi_x$ は励起光の積分光強度である.

境界条件としては,境界でのエネルギーバランスから以下の式が導かれる.

$$-\mathbf{n} \cdot D\nabla \Phi = \Phi/(2A) \tag{3}$$

ここで**n** は媒体表面に垂直な単位ベクトルであり、A は媒体の屈折率に依存する定数である。生体表面で測定される 光強度は  $m = -\mathbf{n} \cdot D \nabla \Phi$  で与えられる。

有限要素法を用いて式(1)を解いて積分光強度 Φを計 算し,光伝搬をシミュレーションする.媒体を四面体など で細かい要素に分割し,積分光強度や吸収係数,換算散乱 係数を離散化された媒体中の各節点上に定義する.有限要 素法によって光拡散方程式は以下の行列とベクトルの方程 式で表される.

$$\{\mathbf{K}(D) + \mathbf{C}(\mu_{a}) + \mathbf{B}\}\boldsymbol{\Phi} = \mathbf{q} \qquad (4)$$

ここで  $\boldsymbol{\Phi}$ , **q** はそれぞれ節点数の成分をもつ積分光強度, 光源ベクトルであり, **K**, **C** は光学特性値である  $D \ge \mu_a$ に 依存した行列, **B** は境界条件に依存した行列である. この 方程式を積分光強度  $\boldsymbol{\Phi}$  について解く.

式(4)のベクトルと行列で表される連立方程式を整理 すると、生体表面で測定できる光強度と光源に関する以下 の線形の方程式を得る.

$$\mathbf{m} = \mathbf{L}\mathbf{q} \tag{5}$$

ここでmは測定される光強度を並べたベクトル,Lは光源

の測定データへの寄与の仕方を表す行列である.

生体内の蛍光源分布は m と L が既知であるときに式 (5)を q について解くことで求められる。蛍光物質の濃 度等についても式(2)から計算できる。このとき,光源 強度分布を高い空間分解能で再構成しようとすると,媒体 を多数の節点で離散化することになり,測定データ数が相 対的に少なくなる。連立方程式の数が未知数よりも少なく なると解が一意に定まらない。

一方で測定データ数が多く,光源分布の離散化を少なく すると,方程式が未知数よりも多くなる.このとき,ノイ ズなどによって乱された測定データが矛盾する連立方程式 を構成した場合には解が存在しないことも起こりうる.式 (5)を解く際には解を絞り込むことと,ノイズの影響を 小さくする工夫が必要になる.

# 2. 空間フィルターを用いた画像再構成

## 2.1 空間フィルターとその更新

空間フィルターは空間的に異なる位置にある信号源の測 定データへの寄与の仕方の違いを利用して所望の信号を抽 出するものであり、ここでは生体内に分布した蛍光源の強 度を場所ごとに抽出し、全体の分布を再構成する<sup>2)</sup>.

式(5)より,測定データ**m**はさまざまな場所の蛍光源 強度  $q_i(i = 1, 2, \dots, I)$ をLの列ベクトル  $l_i$ を重みとして,

$$\mathbf{m} = \sum_{i=1}^{I} \mathbf{l}_i \, q_i \tag{6}$$

のように混合したものとみることができる.( $l_i$ は*i*番目の 節点上の単位強度の光源が生成する測定データと解釈でき る.)そこで,mに作用させて,ある場所(*k*番目の節点 上)の蛍光源強度 $q_k$ を抽出するフィルター係数 $w_k$ を考え る.すなわち, $\hat{q}_k = w_k^T$ mのように蛍光源強度を抽出する. ここでTは転置を表す.このとき,式(6)から, $w_k$ は $l_i$ にかかるので, $w_k^T l_i$ が,i = kのときに1,それ以外では0 となるようにすることが理想的である(そうならないとき には所望の $q_k$ 以外の $q_j$ ,( $j \neq k$ )がフィルターから $\hat{q}_k$ に"漏 れ"出る)が,近接した光源による測定データが区別しに くいことから,理想的な $w_k$ を求めることはできない.

できるだけ理想的な $\mathbf{w}_k$ を求めるために、すべての  $(\mathbf{w}_k^{T}\mathbf{l}_i)^2$ の合計を1とした条件で、その中の $(\mathbf{w}_k^{T}\mathbf{l}_k)^2$ の値を できるだけ大きくし、他のものをゼロに近づける $\mathbf{w}_k$ を求 める最大化問題を解くと、以下のようなフィルター係数が 得られる、

$$\mathbf{w}_{k} = \left\{ \mathbf{l}_{k}^{\mathrm{T}} (\mathbf{L} \mathbf{L}^{\mathrm{T}})^{-1} \mathbf{l}_{k} \right\}^{-1/2} (\mathbf{L} \mathbf{L}^{\mathrm{T}})^{-1} \mathbf{l}_{k}$$
(7)

この空間フィルターは光源の深さによらず発光していそうな場所に対して大きい光源強度を推定する性質がある一 方で、フィルターの"漏れ"によって、発光している蛍

41巻8号(2012)

光源が実際よりも広い範囲に再構成される.そこで、測定 データへの寄与が小さい光源については順問題から徐々に 取り除いてしまうために、抽出された $\hat{q}_i$ を最大値で規格 化した値を重み $p_i$ とし、 $l_i$ を $p_i l_i$ と置き換えて、新しいL で空間フィルターを再度計算して光源強度を計算し直す. 空間フィルタリングとLの更新を繰り返すことによって、 発光している場所が絞り込まれていくことになる.

## 2.2 アーチファクトの除去

光検出器で生じるランダムな熱雑音や,順問題と実際の 測定系や測定対象の光学特性値との間のずれによって生じ る誤差は,空間フィルターによって *q*<sub>i</sub>に変換され,アー チファクトとして現れる.

アーチファクトを取り除くために、測定データ中の有用 な信号とそれ以外のノイズは相関がない(直交している) ものと考え、上述の *p<sub>i</sub>l<sub>i</sub>*(各位置の光源が測定データにど の程度寄与しているかの予測のようなもの)を直交するベ クトルに縮約する.このことは、新しい Lを L=UDV<sup>T</sup>の ように3つの行列に特異値分解したときの直交行列 Uを求 めることである.(Uの各列は *p<sub>i</sub>l<sub>i</sub>*を主成分分析したような ものである.)

ある程度の信号雑音比が得られているものと仮定し,特 異値を大きい順に並べた対角行列 D の M 個の対角成分の, 大きい特異値  $d_{1,1}, d_{2,2}, \dots, d_{j,j}$  (j < M) に対応する U の列  $u_1$ ,  $u_2, \dots, u_j$  が信号成分で,残りの小さい特異値に対応する列 がノイズ成分と判断し,測定データmを UHU<sup>T</sup>m とするこ とによって測定データからノイズ成分を取り除く.ここで H は対角行列で,その対角成分  $h_{1,1}, h_{2,2}, \dots, h_{j,j}$  は1でその 他はすべて0 である.

#### 2.3 シミュレーションによる検証

空間フィルターを用いた方法と、一般逆行列と代数的再 構成法をシミュレーションで比較した.二次元円盤状の媒 体中で図1(a)のように光源強度が分布しているときに、 媒体円周状に等間隔で配置した16個の光検出器で測定 データを有限要素法シミュレーションで求め、光源強度分 布を再構成した.ここでは測定ノイズ等を考慮していない.

図1(b)のように、一般逆行列を用いた場合、光源強度 は媒体表面の検出器近くに再構成された.これは一般逆行 列による解が最小ノルム解であり、できるだけ弱い(ノル ムの小さい)光源の分布で測定データを説明しようとする ことによる.代数的再構成法で光源強度分布の初期値をゼ ロで一様な分布とした場合は一般逆行列の解と一致する が、弱い光源が一様に均一とした場合は図1(c)のように 光源がぼやけて再構成された.一方で、図1(d)のよう に、筆者らの空間フィルター法では光源が正しい位置に再



図1 空間フィルター法と従来法による再構成結果の比較<sup>2)</sup>.(a) 真の光源強度分布,(b)一般逆行列,(c)代数的再構成法,(d) 空間フィルター法.

構成されている.

次に,アーチファクト除去が十分でない場合と十分な場 合を比較した.媒体は4つの異なる光学特性をもつ領域で 構成された三次元円柱であり,2か所に発光している領域 がある(図2).

高さの異なる2つの円周上に8個ずつの光検出器を等間 隔で配置した条件で測定データをシミュレーションした. 測定データには1%の標準偏差をもつガウスノイズを加 え,画像再構成には真の散乱・吸収係数の平均値を用い, 媒体中で一様な分布とした.測定ノイズと順問題の光学特 性値の誤差はアーチファクトの原因となる.

図3(a),(b)は再構成された光源強度分布の断面図で ある.アーチファクト除去が十分ではないときにはアーチ ファクトが現れ,光源分布が乱されている(図3(a)) が,アーチファクト除去が十分に行われている場合には2 か所の発光部位が特定されている(図3(b)).

筆者らの提案する空間フィルター法では,媒体の深い位 置に局所的に存在する蛍光源をノイズに頑健に再構成でき ることがシミュレーションによって示されている.

## 3. lp ノルム最小化正則化法

# 3.1 正則化と lp ノルムの効果

画像再構成は,実際の測定データと順問題によるシミュ レーションから求めた測定データとの誤差を最小にする蛍 光物質分布を求めることによって行われる.すなわち,以 下のような最適化問題を解く.



図2 シミュレーションに用いた円柱状媒体の断面と光学特性値<sup>2)</sup>.光学特性 値の異なる4つの領域に分かれている。●は真の発光部位,点線は光検出器が 配置された高さ.



図3 再構成された円柱状媒体中の光源強度分布<sup>2)</sup>.(a)アー チファクト除去が不十分な場合,(b)アーチファクト除去が 十分な場合.

$$\min_{\mathbf{N}} \|\mathbf{m} - \mathbf{L}\mathbf{N}\|^2 + \lambda \cdot f(\mathbf{N})$$
 (8)

ここでは、順問題の式(5)は式(2)を用いて、 $\mathbf{m} = \mathbf{L} \mathbf{N}$ のように蛍光物質濃度分布  $\mathbf{N}$ と測定データの関係式に書き 変えている.式(8)の第一項は測定データとシミュレー ションとの誤差を表している.第二項fは正則化項(制約 項)とよばれ、誤差項と同時に最小化して解 $\mathbf{N}$ がある条件 を満たすようにするものである.この解の正則化は逆問題 の解の一意性や安定性を保つためによく用いられる. $\lambda$ は 正則化項の効き具合を調整する正の定数である.

正則化項として、例えば解のノルム  $\|\mathbf{N}\|^2 = \sum_{i=1}^{I} |N_i|^2$ (ここで  $N_i$ はベクトル Nの要素)を用いる方法は Tikhonov の正則化とよばれ、これによってできるだけ小さいノルム をもつ蛍光物質濃度分布が得られることになるために、再 構成される分布は起伏が少ない滑らかなものになることが 知られている。測定ノイズを含むデータに合うように Nを 求めると、解はノイズの影響を受けることになるが、正則 化によって測定データに合わせ過ぎないことによってアー チファクトを低減する効果も期待できる。

著者らは上述のノルムを $\sum_{i=1}^{I} |N_i|^p$ , (0 とした,

 $l_p$ ノルムを正則化項に用いた場合について検討した.この ようにfを選ぶと蛍光物質分布が疎になるような解が得ら れる.p = 0の場合を考えると、 $|N_i|^0$ は $N_i$ が0のときには 0、そうでないときには1になり、ノルムは蛍光物質濃度 が0ではない位置の数を数えることになるのがわかる.つ まり、p = 0の場合、ノルムを小さくすることは、蛍光物 質が存在する場所をできるだけ狭くすることになる.pを 0に近づけると、以上のような蛍光物質分布を局在化する 性質が得られる.筆者らは非線形共役勾配法を用いて式 (8)の最適化問題を解く.また、その際に0 の範囲ではノルムの勾配の計算に不都合が生じるため、別の媒介変数を用いて**N**を変形している<sup>3</sup>.

## 3.2 生体模擬試料を用いた実測データからの画像再構成

生体模擬試料を測定対象として用いた測定データから画 像再構成を行い、 $l_p$ ノルムを最小化する正則化の効果を検 証した.生体模擬試料はシリコーン樹脂で製作した直径 25 mm、高さ150 mmの円柱であり、市販の顔料とカオリン を混入して吸収係数と散乱係数を調整している.生体模擬 試料の光学特性値は $\mu_a = 0.022 \text{ mm}^{-1}, \mu_{s'} = 0.6 \text{ mm}^{-1}$ で ある.円柱の内部に直径1 mmの蛍光試薬を封入したチュー ブを設置した.蛍光試薬は有機溶剤 dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解させた濃度 10 ppm のインドシアニング リーン (ICG) である.

蛍光強度測定には ClairvivoOPT<sup>4)</sup>(島津製作所)を用いた. ClairvivoOPT は近赤外領域の高輝度半導体レーザーによって小動物等の測定対象を5方向から照射し,蛍光物質を励起して,測定対象の周囲に配置したミラーを用いて,測定対象の表面に達した蛍光の強度を最大で5方向からCCD カメラで同時に測定することができる.本実験でも5方向からの励起照射ごとに5方向からの観察画像をそれぞれ取得している.画像再構成に使用する蛍光画像は全部で



図4 ClairvivoOPT (島津製作所)による測定の模式図. ①~⑤で励起光を照射し、それぞれの励起光に対して A~E の面の蛍光画像を同時に得る.

25 枚である (図 4).

図5は蛍光チューブの表面からの位置(深さ)を4 mm, 6 mm, 12.5 mm と変化させた場合に ClairvivoOPT で測定 された蛍光強度の測定結果を示している.表面で検出され る蛍光強度は深さによって異なり,4 mm に対して 12.5 mm での蛍光強度は2 桁以上減少した.

図 5 の蛍光強度測定データを利用して,画像再構成を 行った.具体的には,蛍光チューブが深さ4,6,12.5 mm にあるそれぞれの場合についてp=2,1,0.5 を適用し た.その結果,p=2を用いた場合でみられたぼやけがpを小さくすることで緩和されて,疎な蛍光物質分布が得ら



図5 円柱状生体模擬試料を用いた蛍光測定結果. 右下数値は蛍光強度 [a.u.] の範囲を示す.



図6 再構成された円柱状生体模擬試料中の蛍光物質濃度分布.

れた.また、円筒表面近傍でみられたアーチファクトについても、pを小さくすることで除去される傾向にあることがわかった(図 6).

定量性については,深さ(4 mm と 12.5 mm)によって 表面の蛍光強度が2桁以上減少したものに対して,再構成 で求めた相対濃度は5分の1程度の誤差内に納まることが わかった.現在,光学定数等の最適化による定量性向上 や,絶対値での濃度算出に取り組んでいる.

本稿では蛍光を用いた生体分子イメージング, 蛍光トモ グラフィーにおける逆問題の原理とその困難さについて解 説し, 画像再構成法の一例として, 筆者らが提案している アーチファクトを低減したり, 画像のぼやけを改善したり する方法を紹介した.

ここで示した方法は、蛍光トモグラフィーで再構成した い対象である蛍光標識された薬剤やがん組織などが生体内 で局在化して存在していることを期待し、そのことを先験 情報として取り入れた画像再構成であるといえる。蛍光・ 生物発光トモグラフィーのアプリケーションにおいては再 構成対象の局在性を期待する場合が多いと思われるが、対 象が局在化していない場合には再構成画像が実際の生体内 部の状態を適切に反映しないことも起こりうる.

逆問題を解く際には、問題の非適切性を軽減するため に、解が満たす条件を正則化に利用する必要がある。例え ば拡散光トモグラフィーにおける画像再構成では、MRI 等の他のイメージングモダリティーから得た生体の構造に 関する情報を利用することも有効であると考えられてい る<sup>5-10)</sup>. 蛍光・生物発光トモグラフィーのアプリケーショ ンに合った先験情報を取り入れる正則化法は、再構成画像 の高精度化のためのひとつの有効な手段になると思われる。

蛍光トモグラフィーは高感度に蛍光を検出するハード ウェアや,標的と効率的に相互作用する蛍光薬剤など,さ まざまな要素技術から実現される高度な生体計測技術である.さまざまな方面からの新しい研究成果によって、今後 ますますの発展が期待される.

# 文 献

- V. Ntziachristos, J. Ripoll, L. V. Wang and R. Weissleder: "Looking and listen to light: The evolution of whole-body photonic imaging," Nat. Biotechnol., 23 (2005) 313–320.
- S. Okawa and Y. Yamada: "Reconstruction of fluorescence/ bioluminescence sources in biological medium with spatial filter," Opt. Express, 18 (2010) 13151–13172.
- S. Okawa and Y. Yamada: "Improvement of image quality of time-domain diffuse optical tomography with *l<sub>ρ</sub>* sparsity regularization," Biomed. Opt. Express, 2 (2011) 3334–3348.
- 4) 矢嶋 敦, 樋爪健太郎,池原辰弥,小田一郎, 綱澤義夫, 原 功,上掛惟史,目賀章正,藤田 健,蔵谷 豊,中川 一也,北岡光夫,山本林太郎,星野昌吾:"小動物用 in vivo 蛍 光イメージング装置 Clairvivo OPTの開発",島津評論別冊, 66 (2009) 21-28.
- B. W. Pogue, T. O. McBride, J. Prewitt, U. Lösterberg and K. D. Paulsen: "Spatially variant regularization improves diffuse optical tomography," Appl. Opt., 38 (1999) 2950–2961.
- 6) G. Boverman, E. L. Miller, A. Li, Q. Zhang, T. Chaves, D. H. Brooks and D. A. Boas: "Quantitative spectroscopic optical tomography of the breast guided by imperfect a priori structural information," Phys. Med. Biol., **50** (2005) 3941–3956.
- 7) P. K. Yalavarthy, B. W. Pogue, H. Dehghani, C. M. Carpenter, S. Jiang and K. D. Paulsen: "Structural information within regularization matrices improves near infrared diffuse optical tomography," Opt. Express, 15 (2007) 8043–8058.
- A. Douiri, M. Schweiger, J. Riley and S. R. Arridge: "Anisotropic diffusion regularization methods for diffuse optical tomography using edge prior information," Meas. Sci. Technol., 18 (2007) 87–95.
- P. Hiltunen, D. Calvetti and E. Somersalo: "An adaptive smoothness regularization algorithm for optical tomography," Opt. Express, 16 (2008) 19957–19977.
- C. Panagiotou, S. Somayajula, A. P. Gibson, M. Schweiger, R. M. Leahy and S. R. Arridge: "Information theoretic regularization in diffuse optical tomography," J. Opt. Soc. Am. A., 26 (2009) 1277–1290.

(2012年3月12日受理)