

共焦点画像強調のための デコンボリューション革命

ジェームズ・ロペス、藤井信太郎、土井厚志、宇都宮弘美

先進アルゴリズムとハードウェア向上の組み合わせにより、光学共焦点顕微鏡のデコンボリューションの評価が高まっている。

画像デコンボリューションとは、ブラー除去やコントラスト・分解能改善のために設計された画像処理技術である。歴史的に見て、その応用は広視野画像の強調に限られ、共焦点顕微鏡では不要と考えられてきた。デコンボリューションされたデータは解釈が難しく、ときには信頼に欠けるとされた。しかしながら現在では、デコンボリューションはパワフルで多用途な研究ツールと認識されており、しばしば共焦点プロトコルの一部となっている。メジャーな顕微鏡メーカーのすべてが、共焦点画像の分解能向上のためのデコンボリューションの使用を推進している。

ただ、デコンボリューションを有効に活用するためには、手法と、関連するアーティファクトに注意を向ける必要がある。

デコンボリューションと分解能

顕微鏡においてデコンボリューションは、アルゴリズムの使用を参照してシグナルノイズ比(SNR)と分解能を向上させる(この文脈における「分解能」とは2つの対象物がお互いに存在し、個々の存在として光学的に識別できる最小距離に関連する)。通常、焦点外の光を元の位置に再割り当てすることで実行する。

顕微鏡画像の分解能は通常、小さい対象物(50～100nmの蛍光ビーズなど)の3次元強度測定である点拡がり関数

(PSF)の半値全幅(FWHM)として測定される。デコンボリューション処理の効率を評価するために、元の画像またはデコンボリューションした画像におけるPSFのFWHM測定を使うことは可能だ。対象物は数学的に割り出され、分解能変化を決定するための古典的な手法であるレイリー基準に基づいて分類される。ところが、PSFにおけるFWHM測定はデコンボリューション効率の評価を完全に説明できるわけではない。

共焦点顕微鏡システムの分解能は、

しばしばFWHMによって定義されるが、特に処理された画像に関してFWHMは分解能とは異なる。FWHMが定義するように観測可能な像においてブラーを軽減できるが、分解能は向上しないかもしれない。デコンボリューション用の特定の手法やアルゴリズムに使われるパラメータは、計測可能なFWHMと全画像分解能の両方に影響を与える。細胞の画像でよく描かれるようなもつれたフィラメントではなく、ビーズのように小さく明確に定義された対象物なら、いくつかの手法はよりよく実行する。

研究の場では、デコンボリューションは2つの目的で使われる。画像品質を向

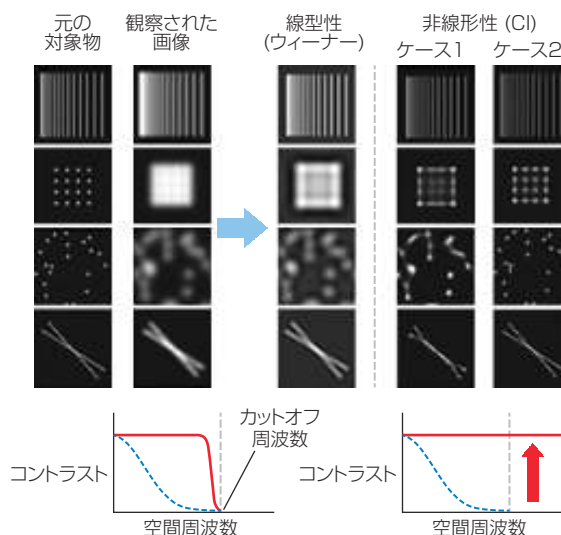


図1 線形性、非線形性によるデコンボリューションについて、画像取得前の元の対象物、顕微鏡によって観察された共焦点画像、デコンボリューションで示す(左)。中央のパネルは、ウィーナーフィルタによる線形性のデコンボリューションを示しており、ビーズや交差するフィラメントで観察されるリングングアーティファクトが生じている。非線形性のデコンボリューション(右)では画像の品質が向上しているが、空間周波数のカットオフを超えたデータが生成されているかもしれない。ケース1の結果は、隣接するビーズの間で連結されたアーティファクトが見られる。ケース2で示すように、デコンボリューションのパラメータを慎重に調節すると、良い結果が得られる。ケース1の結果は、隣接するビーズの間で連結されたアーティファクトが見られる。ケース2で示すように、デコンボリューションのパラメータを慎重に調節すると、良い結果が得られる。

上させるためと、ブラーで見えないデータを解決するためだ。しかし、もしデコンボリューションが常に分解能を向上したのなら、それは必要なのだろうか。

顕微鏡システムが作る画像には、描写された対象物そのものと、描写するPSFの両方があるため、対象物の周囲にはブラーが描写されるだろう。光学的・電子的システムのノイズはブラーに寄与し、さらにコントラストを下げる。デコンボリューションは数学的に「コンボリューション」、すなわちシステムノイズによるPSFと実際の対象物の混合を元に戻す。こうして、描写する対象物を元に復元する。

ここで画像処理の根本的な問題が浮上する。元の画像は本質的なのだろうか。もしくは、デコンボリューションされた画像は標本をよりよく描写するのだろうか。コンボリューションを考えれば、処理された画像は、元画像より実際の対象物を詳細に描写していると主張できる。ディテールの付加と画像品質の向上は、デコンボリューションが今や多くのイメージング様式で当たり前となっている理由だ。

先進的なデコンボリューションアルゴリズムと最近のイメージングシステムにおける感受性の向上によって、科学者は以前よりはるかに良い顕微鏡画像を取得できる。近年、デコンボリューションは長時間の画像処理に関連する障壁を克服している。オリンパス社のcellSensソフトウェアはGPUベースのデコンボリューションを実装しており、7倍高速な処理を実現している。現在の画像復元アルゴリズムはアーティファクトの発生も低くしており、デコンボリューションした画像は10年前より信頼できて標本を描写できるものとしている。その結果、よりよく見えるだけでなく、現象や構造をより正確に描写する。

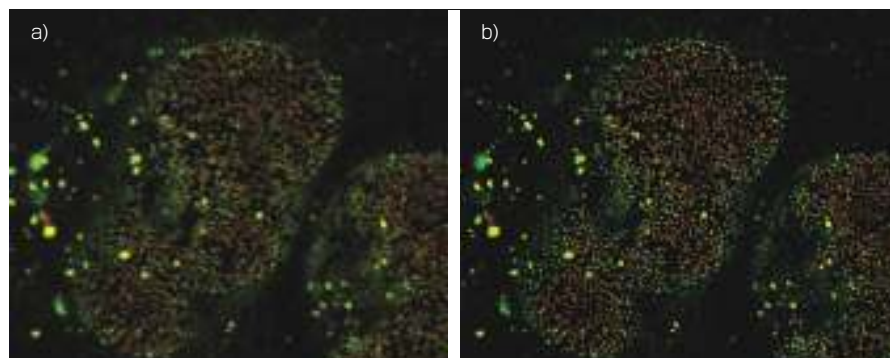


図2 オリンパス社FV3000共焦点システムで取得した核孔の画像におけるアドバンスト最尤推定(AdvMLE)デコンボリューションアルゴリズムを用いた非線形性デコンボリューションの実行前(a)と後(b)。徳島大学藤井節郎記念医科学センター小迫英尊博士提供。

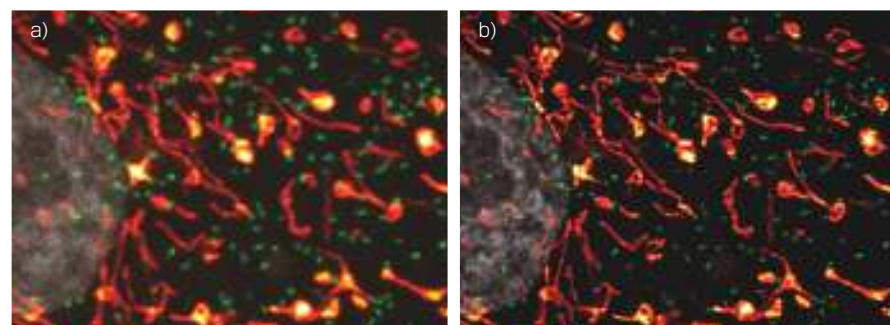


図3 0.5エアリーユニットの最大投影法で描写された共焦点データ(a)と、アドバンスト最尤推定(AdvMLE)デコンボリューションアルゴリズムを用いて高分解能の非線形性デコンボリューションを実行したもの(b)。画像はオリンパス社FV3000共焦点レーザー走査顕微鏡システムと開口数1.49の100倍対物レンズのオリンパス社TIRFを用いて取得した。

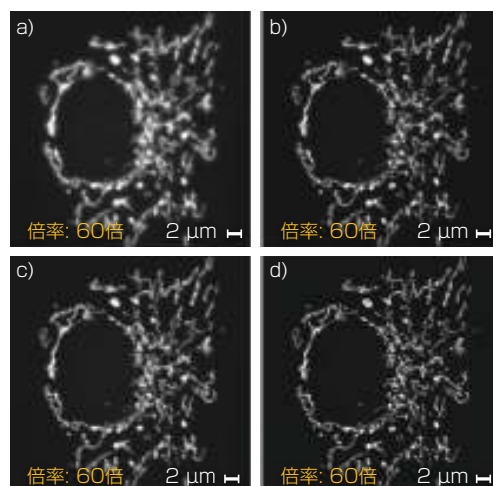


図4 デコンボリューションによって明るさと分解能のバランスを取ることができる。線維芽細胞をMitotracker Redで標識し、開口数1.35の60倍油浸対物レンズを用いてオリンパス社FV3000共焦点システムで描写したものを示す。(a)元画像となる4エアリーユニットの共焦点絞り、(b)非線形性のAdvMLEデコンボリューション処理後の4エアリーユニットの共焦点絞り、(c)元画像となる0.5エアリーユニットの共焦点絞り、(d)非線形性のAdvMLEデコンボリューション処理後の0.5エアリーユニットの共焦点絞り。最大値投影法とレーザー出力は、画像の明るさを維持するために調整された。

デコンボリューション法

デコンボリューションの種類には、線形性、非線形性、そして両者の組み合わせがある。デコンボリューション法は、光学システムが検出する小さい対象物からのコントラストを強調する。フーリエ変換を適用することで、

空間ドメインから周波数ドメイン(または空間周波数)に画像を変換できる。対象物が多い場合、周波数が低くコントラストが高いため、光学システムで検出しやすい。一方、対象物が少ない場合、周波数ドメインが増加し、通常はコントラストが低下する、空間周

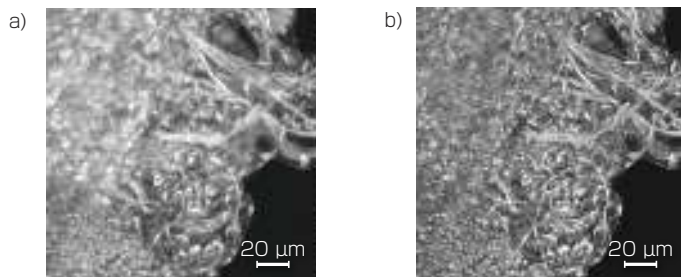


図5 エオシンで標識したブラインシュリンプを、オリンパス社FVMPE-RSシステムを用いて960nmで二光子励起して取得したもの。(a)最大値投影法、(b)非線形性のAdvMLE。

波数が増加してコントラストが低下すると、周波数ドメインのある点で「カットオフ周波数」が生じ、光学システムはこの空間周波数以上の情報を取得しない。周波数ドメインでは、線形性のデコンボリューションは、カットオフ周波数以下においてのみコントラストを増幅させる。しきい値を超えた、より高い周波数コンポーネントを作成しないため、信頼できると考える。

線形性のデコンボリューションは、アーティファクトを最小化できるなら画像の品質において非常に良い効果をもたらすかもしれない。しかしながら、線形性のデコンボリューションはリングング効果のアーティファクトをもたらす。これは、描写した対象物の外周で正負の強度振幅が生じることを意味する。リングング効果はイメージの分解能全体を減少させるが、個々に計測できる対象物は、FWHM計測の減少を示すかもしれない。

非線形性のデコンボリューションでメジャーな手法は、複数の反復による結果を再割り当てすることで対象物を推定するアプローチである。この推定は、コンボリューションを構築してブラー画像を作成し、これとオリジナルを比較することで形成される。推定された微細構造の画像は、漸進的処理で生成される。推定画像を生成するために、さまざまなアルゴリズム (MLE、Fast MLE、Gold など) が利用可能だ。

さらに反復を適用するにつれて、非

線形性のデコンボリューションは、計算されたブラー画像とオリジナルを比較することで、漸進的にオブジェクトサイズを縮小させる。このため、線形性のデコンボリューションよりも非線形性デコンボリューションのほうが画像の外観を向上させるのにより効果的である。しかし、画像強調の結果は、画像における構造に依存する。非線形性のデコンボリューションの効果は、PSFにおける単純な減少や、空間的周波数の増幅として記述できない。なぜなら、元の画像がデコンボリューションされた画像の結果に影響を与えるからだ。

非線形性のデコンボリューションでは、推定確度は対象物の構造に依存する。点は推定しやすいが、より高密度な構造になると推定はより困難になる。構造は縮小するが、分解能は向上しないかもしれない。カットオフ周波数を超えた部分を推定によって生成でき、光学システムで捉えられないデータがアーティファクトを形成しうる。推定の反復が多すぎると、100nm ピーズが80nm まで縮小し、データ損失が生じる。

対象物の密度に加え、イメージング環境や、PSF 形状、反復回数、非線形性デコンボリューションのモードなどの処理パラメータの因子によっても推定結果は影響を受けるだろう。このため、慎重に検討することが必要であり、さまざまな値をテストすべきである。推定の妥当性は、画像の外観によってのみ判断される (図1)。

知識を実践に活用する

要約すると、線形性の手法ではリングング効果が生じ、分解能が向上せずにFWHMが減少する可能性がある。そして、カットオフ周波数以下の部分のみ強調する。非線形性のデコンボリューション手法では、画像の品質は向上するが、その結果を評価することは難しい。非線形性の手法は、カットオフ周波数を超えた部分で増幅する可能性があるため、信頼性が低いかもしれない。

実際には、市場で優位に立っている非線形性の手法は、3次元でブラーやノイズを減少させる優れたツールである。PSFに類似するさまざまな顕微鏡様式 (広視野、共焦点、回転盤、超解像度、二光子など) でもサポートされている (図2～5)。

- ・さまざまなデコンボリューションのモード (線形性、非線形性、組み合わせ) の長短を検討する。
- ・デコンボリューションは過剰になり得る。アーティファクトと分解能復元のバランスを探す。
- ・FWHMと分解能は一致しない。FWHMが減少しても分解能が向上しない可能性がある。
- ・すべてのデコンボリューションの手法でアーティファクトは生じ得るが、最小化できる。

上記のファクタを十分に考慮した上で、デコンボリューションは、画像の品質を向上させるための優れたツールである。

著者紹介

ジェームズ・ロベスは米オリンパス社 (Olympus Corporation of the Americas) サイエンスソリューショングループのライフサイエンスアプリケーションのマネージャー。
e-mail: james.lopez@olympusamerica.com
www.olympus-lifescience.com 藤井信太郎はオリンパス社光学システム本部、土井厚志と宇都宮弘美は同社サイエンスソリューショングローバルマーケティング本部の社員。
www.olympus-global.com