

画像処理の最近の進歩

— 動画解析 —

寺川 進

はじめに

最近の光学顕微鏡応用技術の新しい展開には眼を見張るものがある。細胞内の化学的変化を形態の上に描き出したり、生理的反応を形態変化として直視したり、一個の分子の運動、回転などを計測したり、様々な研究法が開発され成果を上げている^{1,2)}。光学顕微鏡は電子顕微鏡の分解能には及ばないが、反応のダイナミクス(時間変化)を解析できる点が大きな利点である。このような応用を支えているものとして、いわゆる画像処理の技術がある。この画像処理法も急激な発展をしており³⁾、その内容は大変幅広く豊富になった。実際、画像処理のひとつことでは表しきれなくなった感がある。ここでは、画像処理の中でも、光学顕微鏡法によって得られる動的な画像を解析し細胞内の物理的・化学的変化を研究するための手段として使われる処理法について、そのいくつかを整理して解説したい。さらに、画像の記録法と、新開発の光学顕微鏡手法についても、併せて解説したい。

I. 画像処理

1. 画像の数値化 (digitization)

イメージとは明るさをもつ点が縦横(X-Y)に並んだ集合のことで、2次元のマトリックスである。画像処理とは、このマトリックスをコンピューターによってデジタル処理することである。明るさをマトリックス要素としての数値に換える時には、分解能が問題となる。同じ面積のイメージをいくつかの点に対応させるか、また、最高いくつの数字までが各点の明るさとして対応させられるかとい

う問題である。ともに大きければ大きいほど精度が高いことになるが、現段階での分解能限界と処理速度限界がある。通常、点の数は500×500個程度(実際は512×480など装置によって異なる)、明るさの分解能は256階調(8ビット)で、1枚の白黒イメージの情報量は250Kバイトで取り扱われる。動画は、時間tとともに変化するマトリックスの集合であり、立体はZ方向に集めたマトリックスの集合ということになる。1200×600以上(ハイビジョンクラス)の解像度をもつカメラや画像処理装置もあり、16ビット相当の精度を持つ装置も現れているが、まだ高価であり汎用には使いにくい。汎用画像処理装置において可能な、2次元マトリックスの集合に対する処理としては次のようなものがある。

2. 画像差分増幅

細胞や組織における物理化学変化は、色々な光の変化として捉らえることができる。化学物質の吸収や蛍光を直接分光学的に検出する方法、物質の構造に応じた、散乱、旋光、複屈折、二色性などを調べる方法、特別な化学状態に応じて色や強度を変化させる蛍光試薬や、反応性物質を標識として結合させたりガンドや抗体、化学発光試薬などを使う方法など、多くの光学顕微鏡的に応用できるものがある。このような光の変化が元の明るさに対して、1/1000しかないといったように、非常に小さい時にはこの小さな信号を忠実に再現するための高い分解能(16ビット)で記録するか、小さな部分を増幅して8ビットでも見えるようにする必要がある。後者の方法で小さな変化を画像的に可視化するには差分増幅を用いる。原理はアナログ信号における微小信号の抽出と同じである。元の大きさの分のゲタを差し引き、残余分を一定の

倍率で拡大して8ビット表示する。初めの画像を記憶させ、そのあとから入る連続的な各画像から初めの画像を差し引きし、その結果の数値をかけ算表を使って大きくする。膜電位色素の反応、脳下垂体後葉のホルモン分泌⁴⁾、脳興奮の可視化などに使われる。この機能はARUGUS(浜松ホトニクス)、イメージΣ(アビオニクス)、PIP(ADS)などの画像処理装置に載せられている。

3. 画像加算平均

何枚かのイメージ・マトリクスを足し合せて一枚のイメージとする処理である。動画のなかの固定したイメージを抽出できる。イメージに含まれるランダムノイズを消す目的でよく使われる。これだけを専門にする簡易型画像処理装置もある。動画に対しては、平均の対象とする画像を常に新しいもので更新していく手法がある。直前のイメージに、その画との変化分を指定の画像枚数 n でわり算したものを加えるという演算である。これをローリング・アベレッジ(rolling average)という。 n は時系列に従って平均化する際に、過去の画と最新の画の重みの配分を決める。ランダムノイズの多いある程度変化していく画像をきれいにみることができ。しかし、速く動いたり変化したりする動画に対してこの処理をおこなうと、動く部分が平均化され、尾を引いたような残像ができ、鮮明さは失われる。この性質を積極的に利用すれば、動画の中の固定した部分の像を抽出する機能としても使える。暗い蛍光像などを撮る時には便利な機能である。暗い像はフォトン数が少ないので、ノイズが多くなる。きれいなイメージを撮るには、カメラの受光部においてフォトンの効果を蓄積するか、時間をかけてたくさんのイメージを得てそれを加算する。一般に、暗い対象(高倍率像)を高速高分解能で精度よく撮ることには限界がある。

4. 動画の時間微分処理

動画は時間変化するイメージであるが、変化の中にもゆっくりとしたものと速いものがある。時間微分処理によって速い変化のみを取り出して

表示することができる。連続したイメージにおいて一つのイメージとその直前のイメージとの差をリアルタイムに連続表示すると、微小時間における変化分のみが抽出され、近似的には微分をしたことになる。時間間隔をおいたイメージとの差を表示すると遅い変化も現れてくる。変化した部分を抽出し、さらに、その結果にかけ算をほどこすと、画像のAC増幅ができる。AC増幅はオーディオなどのアナログ信号処理でごく一般的に使われ、いわゆるコンデンサー結合を介せばよいのであるが、動画の信号線においてコンデンサー結合をすると、画面横方向の空間微分になる。時間微分は、読み書きが同時にできる画像メモリーを使って初めて実現できる。この機能は、はじめ筆者と浜松ホトニクスの細田によって開発され、浜松ホトニクスの大型画像処理装置C-2000に搭載された⁵⁾。現在は、ARGUS-20に sequential subtractionとして入れられて、きわめて小型化し簡便になった。この機能は細胞の開口分泌(エキソサイトーシス)反応を抽出しその数を数えるのに大変都合がよい⁵⁾(図1)。

5. 輝度ヒストグラム

ある一定の領域の点のそれぞれの明るさの分布ヒストグラムを作らせることができる。256階調(8ビット)の中で、どの明るさの点がいくつあるかという表である。これは、イメージ内の明るさの差が大きいか小さいかということ調べのに使える。平滑なイメージか、凸凹なイメージかの区別がつけられ、その程度が定量化できる。著者らは、大脳ニューロンのグルタミン酸中毒による核内変化をこの方法で定量的に計測した(図2)。細胞内の分泌顆粒が多数運動している場合にも、上記の時間微分処理で運動を抽出し、その結果のイメージの輝度ヒストグラムを使って、その運動の程度を定量化した。この機能は画像処理装置によって処理時間が異なり、速いものは専用のハードウェアを内蔵して、33ミリ秒のうちに完了するが(PIP-4000)、あまり速さを求められない場合が多く、連続処理ができない装置が多いようである。図は

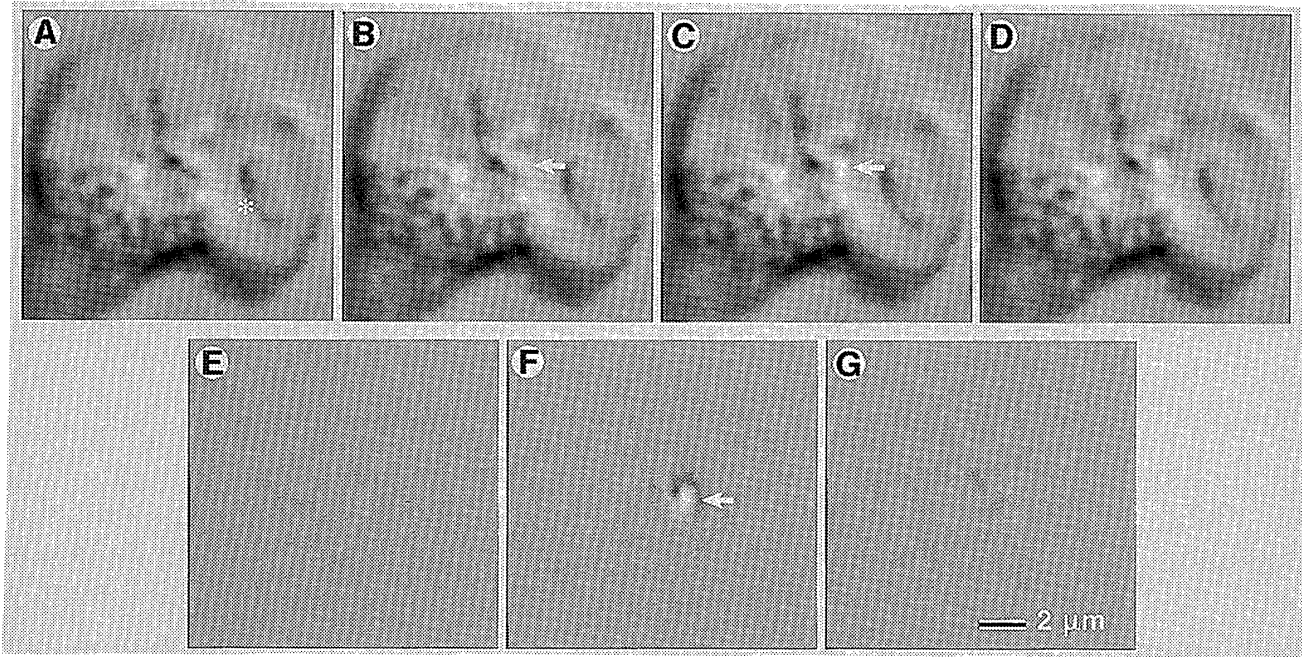


図1 好中球のファゴサイトーシスに伴って起こるエキソサイトーシス反応

A~D: 33 ミリ秒間隔で捉えた微分干渉モードでの連続画像。好中球がザイモサン（星印）を呑み込んだところ。食胞辺縁にある顆粒が急速な明るさの変化を示すのがエキソサイトーシス反応である（矢印）。E~G: 同じ連続画像を記録したテープを時間微分処理したもの。変化分のみが現れる。変化のないところは灰色で、明るくなったところは白く、暗くなったところは黒く現れている。A~Dの隣合う画像間の差に128の数値を加えた ($E=B-A+128$)。[洲崎, 寺川, 升島らによる]

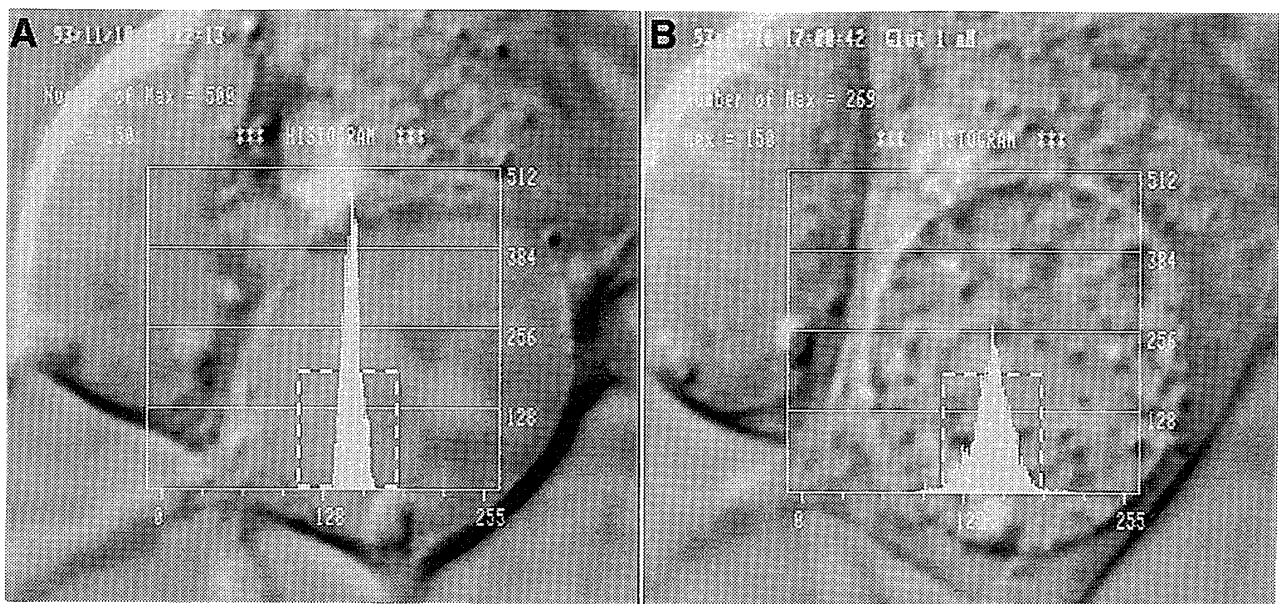


図2 ヒストグラム処理

培養大脳ニューロンの核に対するグルタミン酸の効果を定量化した。微分干渉像とヒストグラムが重ねてある。A: グルタミン酸投与前。点線で囲んだ領域の画素の明るさ分布を示す。B: 1 mM グルタミン酸投与35分後。同じ領域の明るさ分布を示す。ヒストグラムの横軸は明るさ (256階調), 縦軸は画素の数を表す。[池田と寺川による]

顆粒の運動性の程度を表すヒストグラムである。

6. ラベリング処理

エキソサイトーシス反応などは、微小な顆粒 (0.2~1.0 μm) の急速な明るさの変化 (10~100 ms)

となって現れる。このような反応の数を数えて定量化するにはラベリングという画像処理機能を使う。これは、画面上の点, 穴, 島などの孤立した形の数を数える機能である。画面上にある穴が, 左

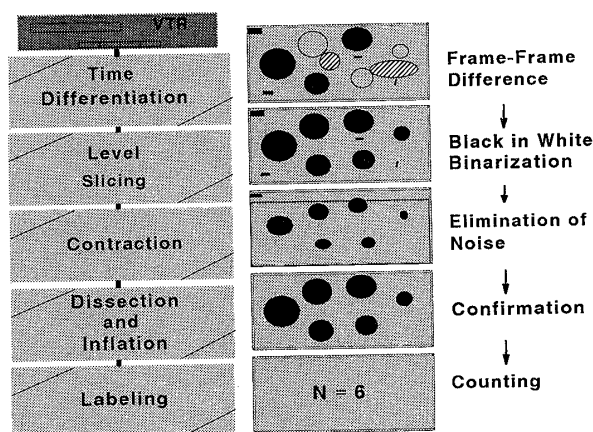


図3 エキソサイトーシス反応数を自動的に計測するための画像処理ブロックダイアグラム
左は画像処理名、中央は対応した画像の変化、右は画像処理の内容を示す

上から右下への順に数えた時に何番目にあるのかという番号を各穴に着けて表示したり、各点の番号に相当する明るさでその穴を表示したりできる。最後の穴の番号は穴の総数となる。ラベリングは2値化した画像に対して実行できる機能である。エキソサイトーシスをした顆粒の形を周囲の背景とは異なるものとして2値化して取り出せれば、これを穴として計数できる。このために、ラベリングの前に、微分処理によりエキソサイトーシス反応を抽出し、これをある閾値で2値化する。実際にはエキソサイトーシスでない画面の細かなノイズを穴の“縮小処理”で消す。このような前処理のステップが多く、ラベリングのアルゴリズム実行時間も長いので、実際の処理には0.5秒ほどかかる。エキソサイトーシス反応の数を計測するための処理順を図3に示す。

7. デコンボリューション・スライシング

通常の見視野光学系で蛍光観察などをすると、フォーカス面前後にある像も重なってしまい、鮮明な画像にならない。これに対して、共焦点レーザー顕微鏡を使うと、標本の光学的な断層像が捉えられ、重なりが減少して鮮明な画像となることはよく知られている。共焦点型でない通常の顕微鏡像でも、画像処理によって鮮明にする手法がある。フォーカスを観察したい面とその前後に一定

距離ずらして、計3枚の画像を記録する。それぞれの画像には、互いにぼけた画像が重なっている。この重なりを理論的に解きほぐすデコンボリューション演算を用いた計算処理があり、ずらした距離、使用した対物レンズの倍率、開口数(NA)などの値を用いて、中央の面の画像から重なりを除いて鮮明にすることができる。そのプログラムを載せた画像処理装置が専用機として売られている(セキテクノトロン, Delta Vision)。

8. 超高速画像処理装置

画像処理の内容には色々なものがあるが、単一の処理では目的とする結果が得られない場合が多い。動画に対して時々刻々必要な処理をして情報を取り出していくためには、処理速度が速くなければならない。現在一般的に入手できる画像処理装置では、個々の演算処理は33ミリ秒をクロックとして実行するように設計されている。すなわち、連続ビデオ画面の一駒が更新されていく間(ビデオレート)に、一つのかけ算や2値化などの処理が完了する。これに対して、DSPプロセッサーや、パイプラインプロセッサーを持つ画像処理装置(Sony, SVS-200; Sumitomo, 画像処理ICシリーズ)は、演算が高速で、処理によっては33ミリ秒の間に何ステップも実行できる。複雑な処理を連続的に行う必要がある場合には、このような画像処理装置を使うことを考えなければならない。これらの装置の制御にはC言語を必要とするなど、使用法が容易でないのが難点である。

II. 画像入力のための光学顕微鏡法の新展開

1. 多重光顕法

微分干渉法は形態を詳細に観察するのに向いているが、蛍光プローブを使うCa反応などの観察をすることはできない。顕微鏡としては、微分干渉モードと蛍光モードは切り換えることができるが、反応によっては形態と、蛍光像を同時に観察したい場合がある。これを、実現するのが多重光顕法である。波長の違う光や偏光状態の違う光は同じ

光路に通しても適当なフィルターで分離できるということを利用する。木下らはダブルマイクロコピーとも呼んでいる⁶⁾。その一つが微分干渉法と蛍光法の同時観察である。我々は、これを高倍率で実現した⁷⁾。微分干渉用に 650±20 nm の光を一方から標本に当て、落射蛍光用に 380±5 nm の光を他方から標本に同時照射する。650 nm の透過光と同方向に現れる 500 nm 近辺の蛍光とを、ダイクロイック・フィルターによって分離し、それぞれの光を二つの別々の ICCD カメラによって捉える (図 4)。Ca 反応と分泌顆粒のエキソサイトーシスの同時観察、蛍光プローブを用いたエキソサイトーシスの証明、エキソサイトーシス時の細胞膜の変化の測定などができた。同じ方法は、異なる蛍光波長帯をもつ二つの蛍光プローブの観察にも用いることができ、Ca イオンと Na イオンの濃度変化の同時観察などが可能になっている。

2. 高開口数対物レンズ

光学顕微鏡の分解能は光の回折理論から決まり、分解できる 2 点間の距離を d とすると

$$d = \lambda / (NA_{\text{obj}} + NA_{\text{cond}})$$

となる。ただし、 λ は使用する光の波長、 NA_{obj} は対物レンズの開口数、 NA_{cond} はコンデンサーレンズの開口数である。これまで、顕微鏡レンズの開口数は油浸レンズにおける $NA=1.4$ が最も高いものであり、これより高いものは製作できないとされてきた。鈍角でレンズ表面に当たった光は全反射のためレンズ内には入射できず有効な光にならないことがその限界となる。しかし、レンズの材質の屈折率が高ければ全反射の臨界角が大きくなり、これまで入射できない角度でも入射できるようになる。そこで我々は、高屈折率のガラスを研磨することにより $NA=1.65$ のレンズを作りだすことに成功した。水中に置かれた標本ではカバーガラスに光が入射しなければならず、カバーガラス表面でも入射角を広げなければならない。従って、このレンズを使う時は、カバーガラスも、油浸用の油とともに、高屈折率の材質を使わなければならない。コ

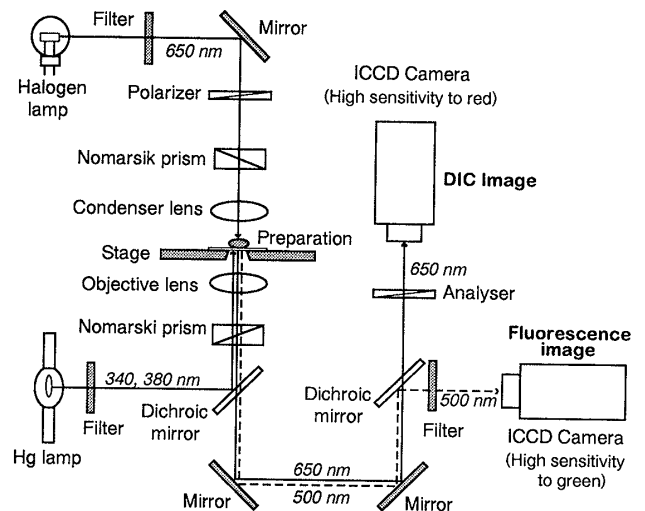


図 4 微分干渉像と蛍光像の同時観察のための二重光顕法

ツアイズ倒立型顕微鏡にダイクロイックミラー、フィルター等を加え、アナライザーの位置を動かして実現した。1万倍の倍率で観察できる。

ンデンサーレンズも対物レンズと同じものを用い、450 nm の光に対して計算上の d をこれまでの 0.161 (実際は 0.20 ぐらいであった) から 0.136 μm に改善することができた。画像処理によって分解能が改善する分を考慮すると、0.10 μm のものが見分けられるようになったといえる。このレンズを使うと小腸上皮細胞のマイクロビリがかなりよくみえる (図 5)。

2 点を分解するには 100 nm が限界であるが、1 点の位置というものはもっとよい精度で決定できる。ある微小な点のイメージは回折理論から決まる広がりをもっている。その広がりから画像処理的に重心を求められるからである。この方法によって、レセプターや膜分子に結合させた小さなビーズの位置が 1 nm の精度で測定されている^{8,9)}。

III. 画像の記録

1. 動画記録

動画の記録としては一般にビデオテープが使われる。その記録のフォーマットは VHS, Hi8, S-VHS, W-VHS, コンポーネント, デジタル, ハイビジョン等色々である。おおむねこの順序で画質がよくなり、同時に高価になると考えてよい。筆

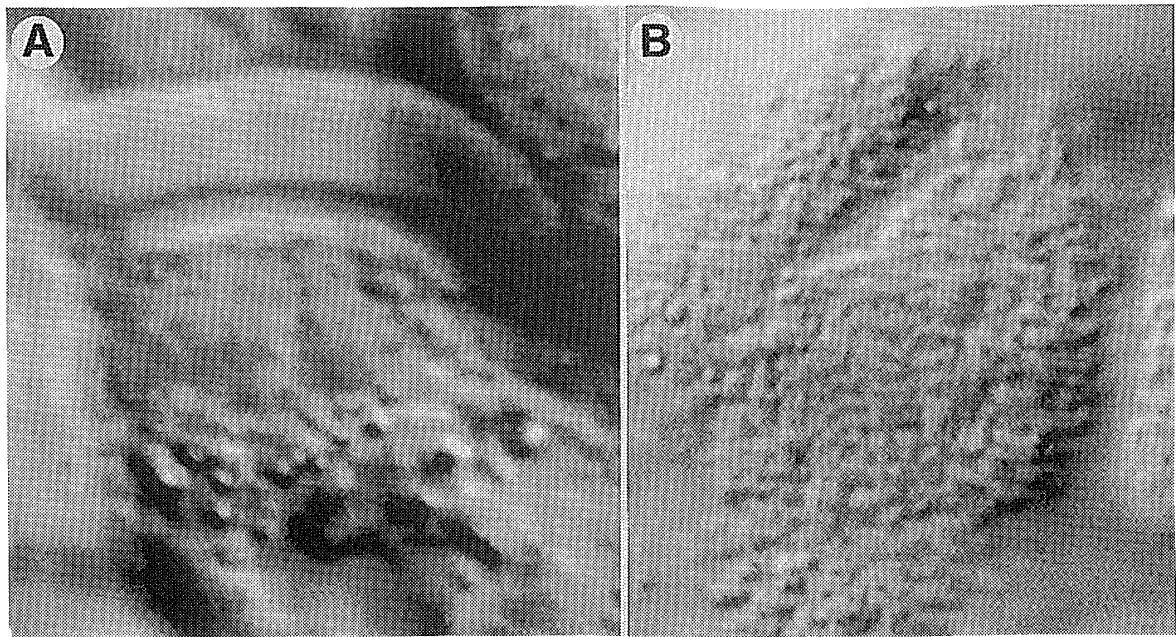


図5 NA=1.65の微分干渉用対物レンズを使用して観察した、モルモット小腸上皮細胞の微絨毛 (microvilli)
A: 一つの細胞の側方断面図。B: 微絨毛上面の俯瞰図。

者は現在、S-VHS編集機を使用している。入出力されるビデオ信号の形式はハイビジョン以外では共通で、日本とアメリカではいわゆるNTSC規格である。ヨーロッパではPAL規格となっており、日本で録画したVHSテープを持っていてもヨーロッパのビデオプレーヤから画は出ない。あらかじめ変換が必要である(ナショナル、NV-W1を使うとよい)。駒撮りには、ビデオ・ディスクレコーダーが向いているが、安価なテープ式でも性能のよいものがある(ビクター、BR-S925)。テープに撮った画像は、ビデオ取り込みボードや画像処理装置のコンピュータインターフェースを介してデジタル化してコンピュータファイルとし、光磁気ディスクなどに記録する。これらの画はPhotoshopやPersuasionといったプログラムを使って図やスライドに加工できる。

2. 多重記録法

動画記録としてのビデオレコードに様々な情報を追加したくなることがある。例えば、実験時刻、温度、実験条件、対物レンズ焦点の位置、刺激のタイミングや大きさ、矢印などがあり、さらに平行して行っている実験のデータなどもビデオテー

プに同時記録できれば便利である。これらの一部は、画像処理装置の文字入力機能によって実現できる。コンピューター(PC)で制御のできる画像処理装置では、PCからのキー入力でも画像処理装置のオーバーレイメモリーに線画やアルファベットを書き込むことができる。PC側で、時刻や温度、刺激のタイミングなどを必要な時に画像処理装置に送れば出力ビデオに重ねられる。速い信号をビデオに書き込むには、マシン語などでPCの画面に直接結果を出力し、その画面とビデオ信号を合成(スーパーインポーズ)する方法がある。コンピューター用のさし込みボードにもスーパーインポーズの機能を持つものがある。また、FFT解析装置などの特別な計測器はビデオ信号を出力するものがあり、ビデオ画面を分割して同時記録することができる。画面の分割には監視用に作られた専用機や、ビデオエフェクター(またはビデオミキサー)を使う。

おわりに

生きている細胞や組織内にある化学物質は固定的にそこにあるのではなく、動的な平衡のもとに

存在する。生化学的な反応式や分子生物学的な経路図で示されるような様々な物質の動的变化を捉えることが、これからの組織化学に求められてい

る。このためには、化学物質に対する新しい選択的プローブの開発と、動的画像処理法のさらなる発展が待たれるところである。

文 献

- 1) 寺川 進: 高速画像処理による細胞生理機能の可視化. 生物物理, **30**: 10-16, 1990.
- 2) 寺川 進: 神経伝達物質の開口放出. 吉岡 亨他編, シナプス伝達のダイナミクス (情報生物学シリーズ), pp.71-90, 培風館, 東京, 1995.
- 3) 寺川 進: 光学顕微鏡の限界を広げる - ビデオ顕微鏡 - . 実験生物物理 (丸善アドバンステクノロジー・シリーズ), 石渡信一編, pp.45-80, 丸善, 東京, 1993.
- 4) Terakawa S, Nagano M: Visualization of secretory activities in the *Xenopus* neurohypophysis by a high S/N video camera. *Brain Res*, **435**: 380-386, 1987.
- 5) Terakawa S, Fan J H, Kumakura K, Ohara-Imaizumi M: Quantitative analysis of exocytosis directly visualized in living chromaffin cells. *Neurosci Lett*, **123**: 82-86, 1991.
- 6) Kinoshita K Jr, Itoh H, Ishiwata S-I, Hirano K-I, Nishizaka T, Hayakawa T: Dual-view microscopy with a single camera: real-time imaging of molecular orientations and calcium. *J Cell Biol*, **115**: 67-73, 1991.
- 7) Suzaki E, Terakawa S, Kataoka K: Real time analysis of exocytosis and cellular Ca^{2+} during phagocytosis in neutrophils. *Acta Histochem Cytochem*, **26**: 484, 1993.
- 8) Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M: Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J*, **65**: 2021-2040, 1993.
- 9) Sheetz MP, Turney S, Qian H, Elson EL: Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive membrane glycoprotein movements. *Nature*, **340**: 284-288, 1989.