

4. 3D クロロフィル蛍光顕微画像計測システム の開発

4.1 研究の背景

対象を微小にすればするほど、光学的に避けることのできない問題が焦点の問題である。ある対物レンズを用いたときに、深さ方向で焦点の合う範囲のことをそのレンズの焦点深度とよぶ。焦点深度は、対物レンズの倍率が高くなればなるほど小さくなるため、画像内に焦点の合わない領域が増える危険性が生じる。飽和パルス法によるクロロフィル蛍光画像解析では、異なるクロロフィル蛍光画像のピクセルごとの計算から蛍光パラメータ画像を算出する。このとき、各ピクセルにおいて焦点が合っていることはパラメータ画像算出にあたっての大前提となる。なぜなら、焦点の合っていない領域から得られるピクセル値はその領域での蛍光強度を正しく出力できていないからである。そのため、使用している対物レンズの焦点深度以上の凹凸をもつ対象には、そのままではクロロフィル蛍光画像解析を行うことができない。この問題を解決するためには、異なる焦点面において焦点領域を抽出して、それらを合成したモンタージュ画像を作成する必要がある。この焦点領域抽出処理を用いると、蛍光パラメータ画像の算出が可能になるだけでなく、3D 画像の構築も可能となる。これによって、細胞や細胞小器官の構造も含めた、より詳細な解析が可能になると考えられる。

4.1-a Rolfe and Scholes による研究

前項で述べた、合焦クロロフィル蛍光画像に対しては、Rolfe and Scholes がトマト、コムギ、ベゴニアを対象として、合焦画像の作成、及び蛍光パラメータの算出(Φ_{PSII})を行っている(Rolfe and Scholes 2002)。Rolfe and Scholes は、 Φ_{PSII} の算出のために、各焦点面において F 画像と Fm'画像を取得したが。焦点面は 39 個も設けられ、F 画像と Fm'画像合わせて 78 枚のクロロフィル蛍光画像が取得された。取得された深さ方向の距離は $214.5\mu\text{m}$ であった。また、対物レンズは 20x, 10x, 4x のものが用いられ、1 ピクセルあたりの最大解像度は約 $0.8\mu\text{m}$ であった。なお、各焦点面において Fm'画像を取得した際、飽和パルス光による非光化学的クエンチングの影響を排除するため、次の焦点面画像を算出するまでに約 30 秒間のインターバルを設けており、そのため、一枚の合焦クロロフィル蛍光パラメータ画像を算出するのにおよそ 20 分を要している。Rolfe and Scholes は、結論として、3D 画像計測は重要ではあるものの、高倍率での飽和パルス法を用いた 3D クロロフィル蛍光顕微画像計測は、フィルタリング、及び経時的なサンプル移動上の制約から困難であると結んでいる。

顕微鏡による観察領域は非常に微小である。個体、個葉レベルでは認識されない程度の位置変化であっても、顕微鏡観察においては致命的な変化となりうる。蛍光パラメータ画像算出にあたっては、ピクセルが合焦ピクセルであることに加え、F 画像及び Fm'画像が時間的に最大限に近接している必要がある。さらに、合焦画像作成の際にも、最初に取得する焦点面画像と最後に取得する焦点面画像との間で、視野内の個々の細胞(細胞小器官)の位置関係は保持されていなければならない。しかし、クロロフィル画像計測は非破壊かつ非接触計測であることが最大の長所であるため、対象を固定剤投与によって固定することはできない。そのため、対象の移動を最小限にするためには焦点面画像取得に要する時間を最大限に短縮する必要がある。焦点面の数を増やせば増やすほど、正確な合焦ピクセルを見出すことができる一方で長い取得時間を要してしまい、また、減らせば減らすほど、取得時間は短くすむ一方で正確な合焦ピクセルが焦点面に含まれない可能性が生じる。上の研究では、 $5.5\mu\text{m}$ 間隔で焦点面画像を取得し、得られた 39 セットの画像において最大の焦点測定度を有するピクセルが、その座標域における合焦ピクセルであるとされているが、 $5.5\mu\text{m}$ という数字に対しての理論的根拠は示されていない。上の研究では、一枚の合焦クロロフィル蛍光画像を取得するのに 20 分もの時間を要しているため、おそらく

計測対象の移動が高い確率で生じてしまっていると考えられる。また、対象の移動の問題は、対物レンズを高倍率にすればするほど顕著になる。Rolfé and Scholes の研究が比較的低倍率で行われており、葉緑体レベルでのクロロフィル画像計測にまで至っていない理由も上述の時間的制約に一因があると考えられる。

4.1-b 共焦点レーザスキャン顕微鏡システムによる 3D 画像構築

通常の光学顕微鏡では、視野内の光情報はすべて CCD カメラ内に入光するため、光軸方向の分解能はほぼ無限大であると考えられる。共焦点レーザ顕微鏡は、対物レンズを通して得られた像をさらに集光させ、その集光部に極小ピンホールを設置しているため、試料の焦点面からの情報はピンホールを通過できるが、非焦点面からの情報はほとんど通過できない。そのため、共焦点レーザ顕微鏡で得られる画像は焦点面における合焦領域のみを切片として取得することができる。ピンホールを通過できる視野範囲は狭小であるため、レーザ光をスキャンして照射し、コンピュータによって画像を構築する。このようにして得られた焦点面画像を重ね合わせることによって、容易に 3D 合焦画像を得ることができるため、近年本システムを用いた顕微画像解析が活発に行われている(Kitin et al., 2003)。

一方、本研究で用いている飽和パルス法では、視野内での均一な光照射が計測の前提となる。しかし、共焦点レーザ顕微鏡は、レーザ光を局所的に照射しながら顕微鏡視野内をスキャンし、付属のコンピュータ内で画像を再合成しており、画像内の光条件は空間的にも時間的にも均一ではない。このような理由により、飽和パルス法による解析を主眼とする研究では、共焦点レーザスキャン顕微鏡をクロロフィル蛍光顕微画像計測システムに導入することは困難である。

4.2 研究の目的

このように、飽和パルス法での解析が可能な、高倍率での 3D クロロフィル蛍光顕微画像計測システムは未だ実現に至っていない。しかし、本システムを開発することで、組織構造とクロロフィル蛍光及び光合成電子伝達収率を微小領域で比較できる。これにより、光合成機能に対するより複合的な解析が可能になると考えられる。また、Rolfe and Scholes の報告で指摘された問題点に関しては、高倍率での焦点抽出に適した焦点測度フィルタの使用、及び少ない焦点面画像からの 3D 画像構築によって、従来の課題は解決されると期待される。

そこで本章では、高倍率での 3D クロロフィル蛍光顕微画像計測システムの開発を研究の目的とした。

4.3 3D 蛍光画像構築

Fig. 4-1 に 3D 蛍光画像構築の流れを示す。まず, 焦点面測度を取得する(Fig. 4-1(I))。焦点面画像は, 3D 画像を取得する際に必要となる画像であり, その必要枚数は対象の深さとテクスチャ, 及び対物レンズの倍率に依存する。次に, ピクセルごとに焦点測度を算出し, 取得した焦点面間で比較を行う(Fig. 4-1(II))。焦点測度は, どのくらい焦点があっているかを示す指標であり, 既往の研究で様々な焦点測度算出式が提案されている(井口, 1995; Nayar and Nakagawa, 1990; 大政ら, 1997; Omasa et al., 1998)。焦点面間で焦点測度を比較すると, 焦点測度は合焦点において最大値をとるため, その最大値をもって焦点距離とする。この処理をピクセル数だけ繰り返し, 3D 画像を算出する。また, 焦点距離におけるピクセル値をマッピングすることで, 合焦蛍光画像も算出できる(Fig. 4-1(III))。本節では, この手順について説明する。

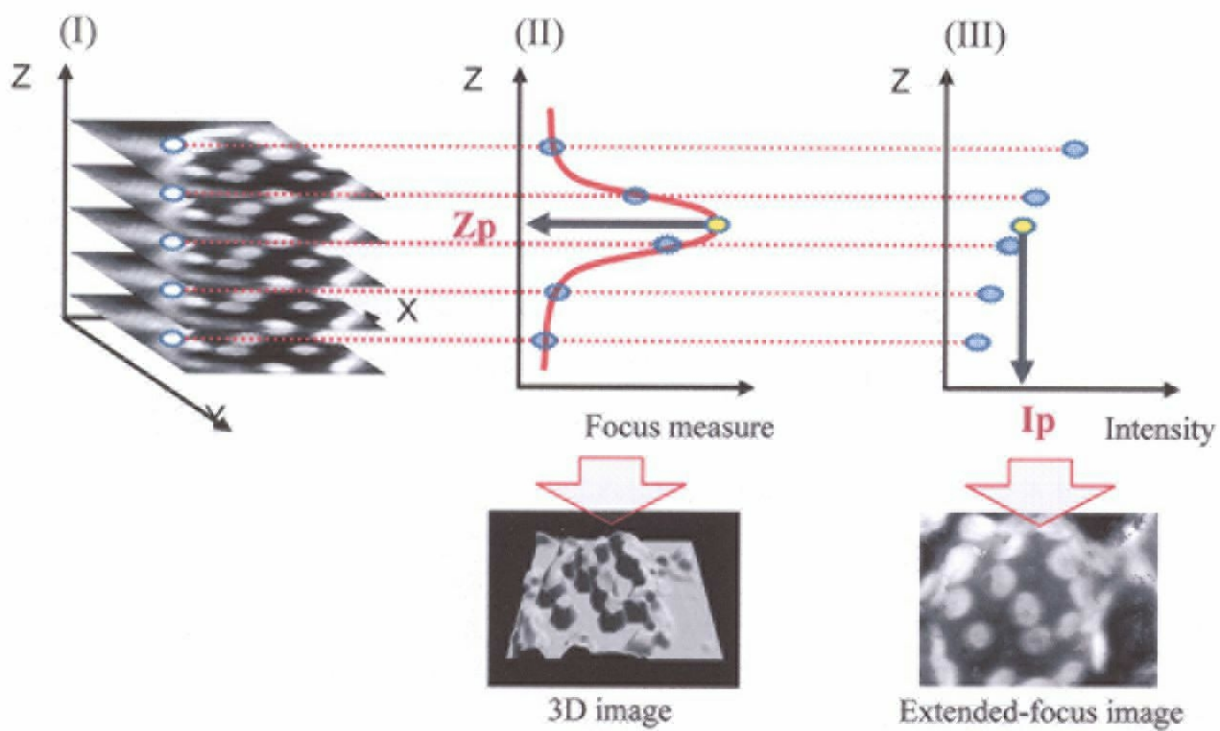


Fig. 4-1 Procedure of calculating of a 3D image and an extended-focus image. z-axis means heights from the standard focal plane. Z_p means a focal point by calculating a focus measure from multi-focal plane pixel which is located same point on X-Y coordinate plane. I_p means the fluorescent intensity at the point at that time by interpolating from two fluorescence intensities at both sides pixels.

4.4 実験材料

クロロフィル蛍光顕微画像システムでは、励起波長と取得する蛍光波長をクロロフィル蛍光に最適化しているため、クロロフィル蛍光を発する葉緑体のみを観察できる。葉緑体以外の細胞小器官、及び表皮組織はほぼ無色であるため、低倍率レンズを用いたときにはこれらの器官の影響について無視することができた。しかし、高倍率対物レンズを使用して葉緑体からのクロロフィル蛍光画像を取得すると、これらの影響、特に表皮組織による散乱の影響により、葉肉細胞の葉緑体に対して十分な解像力を得られなくなる。そこで本実験では、ムラサキツユクサ葉から主葉脈を避けて 5mm 四方の葉片を切り出し、背軸面の表皮をピンセットにて剥離した。ムラサキツユクサは、気孔や葉肉細胞の顕微鏡観察に頻繁に用いられる単子葉植物で、背軸面の表皮を剥がしやすいという特徴がある。このようにして表皮を剥離した葉片を、窪みつきスライドガラスに背軸面の海綿状組織を上にして載せ、葉片と等張のスクロース溶液を滴下した。これに非蛍光加工済みのカバーガラスをかぶせ、プレパラートを作成した。

4.5 焦点面画像の取得

3D 画像構築に当たっては、対象の凹凸を複数の焦点面焦点面の間隔を厳密に保ちながら、焦点面画像を取得する必要がある。そこで、先に開発したクロロフィル蛍光顕微計測システムの鏡筒部分に、コンピュータによる微細な制御が可能なステッピングモータ(PH544-NA-C2, 株式会社 ハーモニック・ドライブ・システムズ)を取り付けた(Fig. 4-2)。このステッピングモータを制御するプログラムを作成し(F-basic), 要求に応じて同一の間隔を保ちながら鏡筒を移動できるようにした。なお, 本ステッピングモータは 1 パルスあたり $0.02\mu\text{m}$ の分解能を有する。

光学顕微鏡には、合焦距離算出を容易にするために、作動距離が長く(6.0mm)、焦点深度が浅い(波長 550 nm で $0.6\mu\text{m}$), 100 倍の対物レンズを用いた(BD Plan Apo 100×, 株式会社ミットヨ)。

また、本システムでは、クロロフィル蛍光画像取得用に新たに冷却型 CCD カメラ(Cascade 650, Photometrics®)を計測に使用した。本カメラは、画像劣化の元となる光電変換素子を廃し、ノイズの大幅な削減を実現している。カメラからの信号は、16 ビットのグレースケール画像($653 * 492$ ピクセル)に A/D 変換されコンピュータに取り込まれた。

計測は、ステージ上に作成したプレパラートを置き、計測期間にわたって同一強度の光を、鏡筒を介して照射しながら行った。この際、プレパラート中のムラサキツユクサ葉海綿状組織における葉肉細胞のクロロフィル蛍光強度が定常になるよう明期状態でしばらく静置した。これに要した時間は、15 分間程度であった。なお、窪みつきスライドガラスを用いてプレパラートを作成したことにより、静置前後において光照射による水分損失の影響は見られず、サンプルの移動もほとんど観察されなかった。

計測に際しては、最初の焦点面画像の焦点面は、目視により焦点が合う面より少し下方にあわせた。その後、等間隔($1\mu\text{m}$)に焦点面をずらしながら焦点面画像を取得し、最後の画像の焦点面は、同様に目視により焦点が合う面より少し上方に合わせ

た。最下部、及び最上部で画像を余分に取得したのは、上下端の深さ方向の情報が欠落するのを防ぐための処理である。

Fig. 4-3 に、連続的に焦点面を変えて得られた、ムラサキツユクサ葉海綿状組織における葉肉細胞の焦点面画像を示す。Fig. 4-3 (11) において、赤線枠で囲まれている構造が一つの葉肉細胞であり、青線枠で囲まれている構造が一つの葉緑体である。葉肉細胞は、その容積の大半を液胞が占め、核や葉緑体は細胞周辺部に偏在している。また葉緑体には、弱光下においては受光面を最大に、強光下においては受光面を最小にするよう細胞内を移動する現象が知られている。このような現象は葉緑体移動とよばれる。本研究では、葉緑体から発せられるクロロフィル蛍光画像を取得するために、弱光によって葉緑体の受光面が最大になるように設定した。このとき、葉緑体は葉肉細胞上面に張り付くように存在するため、葉緑体の位置は、葉肉細胞上面の位置を表していると考えられる。

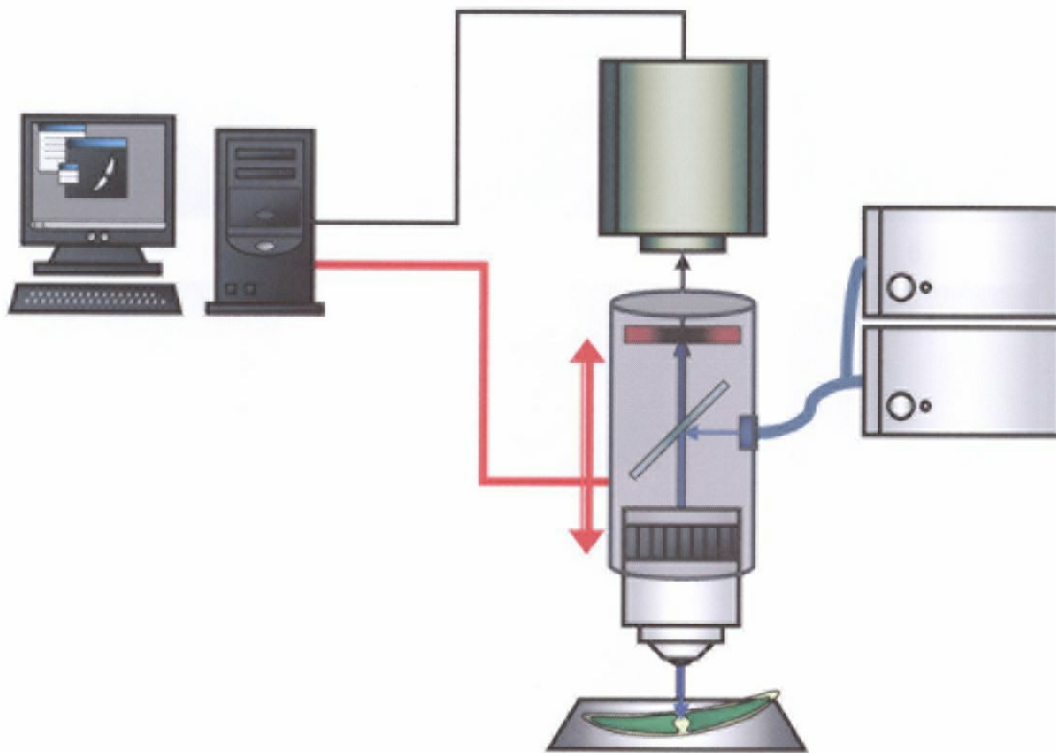


Fig. 4-2 Schematic diagram of 3D-chlorophyll fluorescence imaging system. A lens-barrel controlling system (red line) was installed in the chlorophyll fluorescence imaging system shown in Fig. 2-1 with some modification.

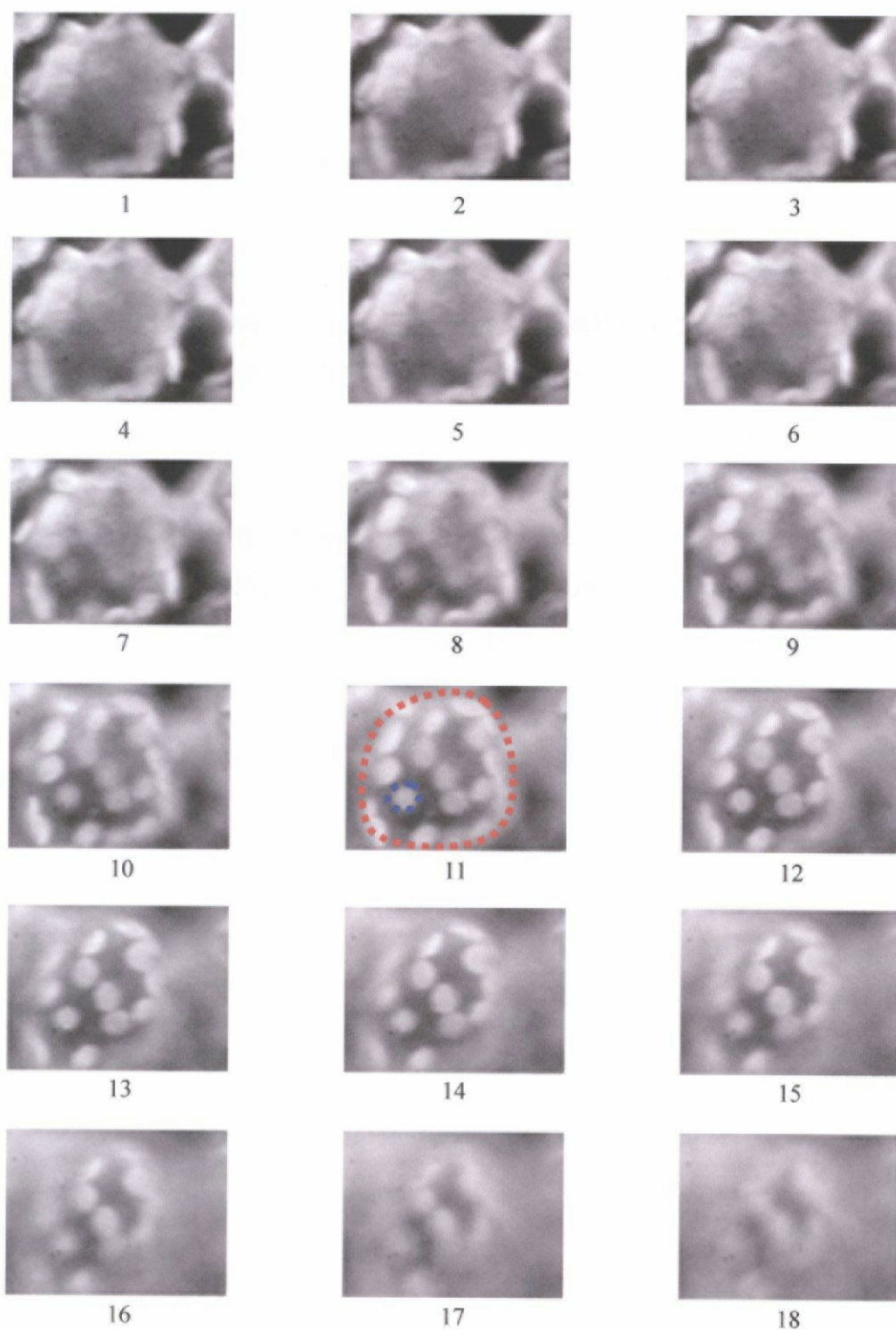


Fig. 4-3 Focal plane images of chlorophyll fluorescence captured at steady-state under an actinic irradiance of $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A total of 18 images were captured at $1 \mu\text{m}$ intervals using a $100\times$ objective.

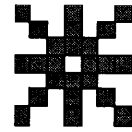
4.6 焦点測度の算出

焦点解析の方法は、自動的に焦点のあった画像を得るために用いられてきたが、1980年代から、深さ方向の情報を得るためにも用いられ始めた。この焦点解析の方法はさらに発展され、3次元形状計測のための Shape-form-focus 法が提案された(Nayar and Nakagawa, 1990)。本手法は、ランダムな金属微粒子で形成されたセラミック基盤ビアホールの計測を目的として開発されたもので、きめの細かい、ざらざらしたテクスチャを有する被写体の計測には適しているもの、テクスチャのきめの粗い生体の計測には適していなかった。大政らは Nayar and Nakagawa の手法を改良し、テクスチャのきめが粗い場合にも適用でき、エッジでのピクセル値の急激な変化にも対応できる手法を検討した。そして、いくつかの焦点測度フィルタを比較(加算変形ラプラシアン演算フィルタ, Max-Min 演算フィルタ)し、最小二乗法フィルタが顕微鏡画像の合焦点抽出に有効であると報告した(大政ら, 1997)。本研究では、この最小二乗演算法を元に、本蛍光計測システムに適するようフィルタを改良して用いた。

4.7 最小二乗法フィルタ

最小 2 乗演算法は，変形マスク内の座標点(i, j)を中心とした縦・横・斜めの 4 つのラインマスク($M_k(i, j)$, $k=1, 2, 3, 4$)において，それぞれのラインマスクを座標軸とした場合の座標軸の位置を示す $p_k(x, y)$ に対して，最小二乗法によって得られた(x, y)の回帰直線を近似し，この直線と(x, y)との絶対誤差の和から焦点測度 $f(i, j)$ を求める方法である。具体的には，回帰直線の係数を $a_k(i, j)$, $b_k(i, j)$ とすると，焦点測度 $f(i, j)$ は次式で求められる。

$$f(i, j) = \sum_{k=1}^4 \sum_{x, y \in M_k(i, j)} \left| (x, y) - \{a_k(i, j) \cdot p_k(x, y) + b_k(i, j)\} \right|$$



変形マスク
(マスクサイズ 7, 中心が(i, j))

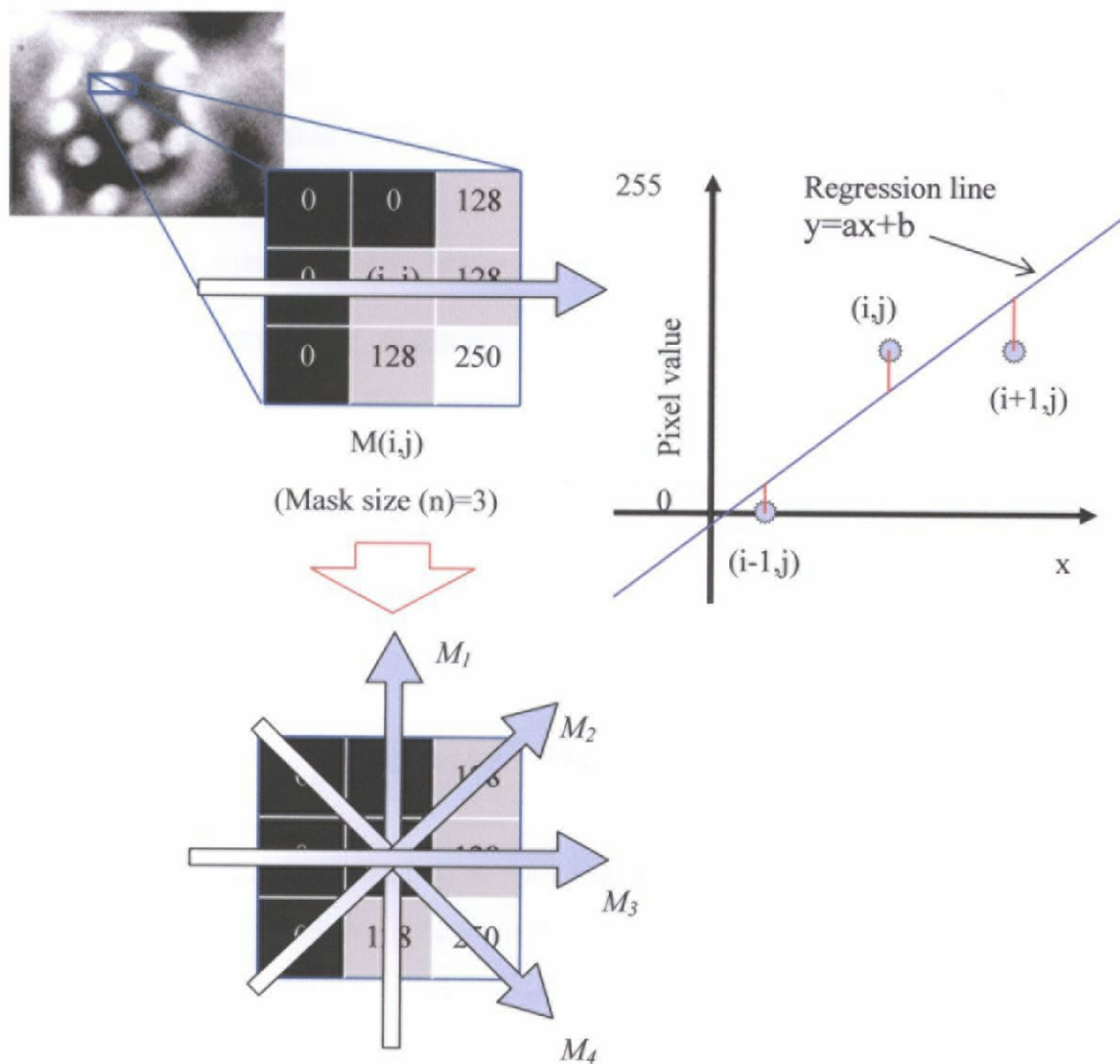


Fig. 4-4 The algorithm employed to calculate focus measure using the least-squares operator.

4.8 最小二乗法フィルタと他のフィルタの比較

先ほど得られた焦点面画像を対象にして, Nayar and Nakagawa が開発した加算変形ラプラシアンフィルタ(Nayar and Nakagawa, 1990), SD フィルタ(Rolfe and Scholes, 2002), 及び最小二乗法フィルタの比較を行った。焦点測度は, 理想的には合焦域を頂点とした正規分布曲線を描く(Nayar and Nakagawa, 1990)。そこで比較の際には, 計算により得られた焦点面と目視により取得した焦点面との一致性, 及び計算により得られる曲線と正規分布曲線との類似性を, フィルタの優位性に対する判断の基準とした。

4.8-a 加算変形ラプラシアンフィルタ

この演算法では, 焦点面画像に対して同一座標点(x, y)で, 変形ラプラシアン $L_M(x, y)$ を次式によって求め,

$$L_M(x, y) = |2I(x, y) - I(x - step, y) - I(x + step, y)| \\ + |2I(x, y) - I(x, y - step) - I(x, y + step)|$$

さらに, 焦点測度 $f(x, y)$ を, 座標点(x, y)を中心とした $N \times N$ マスクにおいて, $L_M(x, y)$ の局所加算演算により計算する。

$$f(i, j) = \sum_{x, y \in M_N(i, j)} L_M(x, y), \text{ if } L_M(x, y) \geq T_l$$

ここで, $x, y \in M_N(i, j)$ は, x, y が, $M_N(i, j)$ 内の座標点であることを意味し, $x = i - (N - 1) / 2, \dots, i + (N - 1) / 2, y = i - (N - 1) / 2, \dots, i + (N - 1) / 2$ で与えられる。また, $step$ や T_l などのパラメータは目的に応じて設定されるが, 通常, $N=3$ または 5 , $step=1$ または 2 , $T_l=7$ 程度の値が適用される。

4.8-b SD フィルタ

SD 演算法では, 焦点面画像をいくつかのブロックに分割して, そのブロック内における焦点測度を求めた。その後, 焦点面画像間の同一ブロックについて焦点測度を比較し, 最も焦点測度の高いブロックのピクセル集合をその領域での合焦画像としている。この方法では, 例えば, 幅 400 ピクセル x 高さ 300 ピクセルの焦点面画

像を取得して、これらを 10 ピクセル x 10 ピクセル のブロックで分割した場合、得られる Z 画像の解像度は 40 ピクセル x 30 ピクセルとなる。

ブロック内のピクセル値のばらつき具合を焦点測度とする。

$$SD = \frac{\sum_{a=1, b=1}^{x, y} i_{(a, b)}^2 - \left(\sum_{a=1, b=1}^{x, y} i_{(a, b)} \right)^2}{n(n-1)}$$

x, y はブロックのサイズ、n はブロック内のピクセル数を表す。

4.8-c 結果と考察

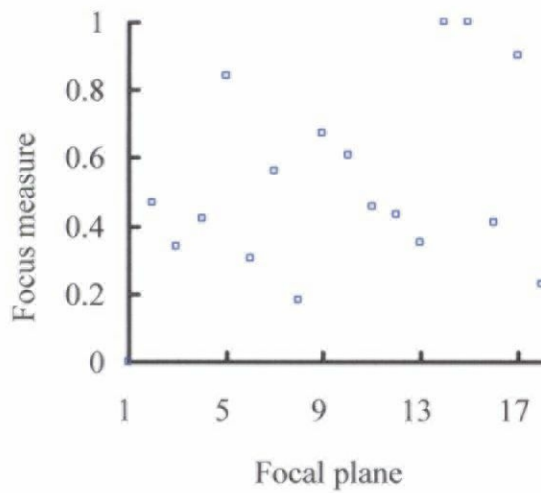
Fig. 4-3 の焦点面画像での(289,224)における焦点測度グラフを示す。Fig. 4-5 (I)は加算変形ラプラシアンフィルタ、Fig. 4-5 (II)は SD フィルタ、Fig. 4-5 (III)は最小二乗法フィルタを用いたときの、それぞれの焦点測度の最大値を 1 とした焦点面画像と焦点測度の関係を表している。また、Fig. 4-5 (IV)は、(289,224)近傍において目視により最も焦点があっていると判断できた 14 枚目の焦点画像であり、赤枠は(289,224)地点を示している。

加算変形ラプラシアンフィルタは、Nayar and Nakagawa が論文中でセラミック基盤ビアホールの場合の合焦距離算出に用いたパラメータ値を利用した。その結果、Fig. 4-5 (I)に示すように、おおよそその焦点面は抽出できているものの 14 枚目と 15 枚目の焦点面の差を区別することはできなかった。また、得られた曲線は、ばらつきが大きく正規曲線との類似性は低かった。これは、生体の高倍率画像のテクスチャのきめが、セラミック基盤ビアホールの低倍率画像のものより粗いことが原因であると考えられた。なお、パラメータ値を様々な値に変化させた計算も行ったが、良い結果は得られなかった。

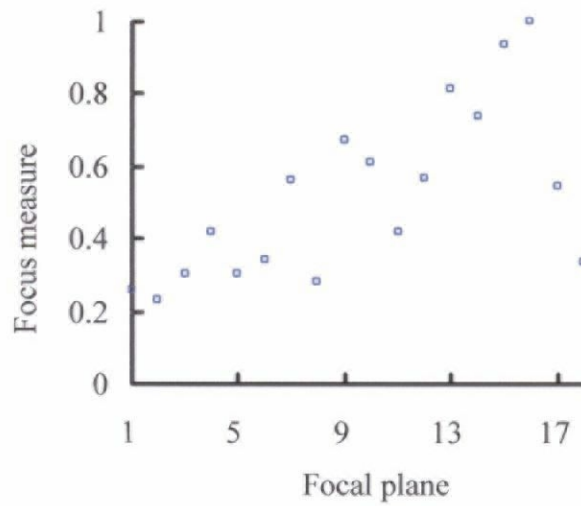
Rolfe and Scholes が用いた SD 法では、加算変形ラプラシアンフィルタより焦点測度曲線が正規分布に類似していた。しかし、焦点測度が最も高い焦点面を 16 枚目の焦点面画像と誤認識していた。標準偏差を利用した本手法は、値のばらつきが大きいところを合焦域と仮定しているが、発光点と非発光点が混在する画像においては、両者の焦点がずれて明るいピクセルと暗いピクセルが混在する焦点面の方が、ばらつきが大きくなる場合がある。この場合、SD 法は正しい焦点面を抽出できなくなってしまうと考えられる。

最小二乗演算法では、前二者のフィルタに較べて、焦点測度曲線も正規分布曲線に類似しており、また、正しい合焦点の抽出にも成功していた。最小二乗法フィルタでは、ラインマスクの点群から近似直線を作成する。このラインマスクの点群に着目した時、非合焦域では点群のピクセル値は緩やかに変化するのに対し、合焦域では急激に変化すると考えられる。最小二乗法フィルタでは、緩やかなピクセル値変化を持つラインマスクでは、近似直線の決定係数は高い値を示し、近似直線と点群との残差の絶対値の合計、つまり焦点測度は小さくなる。一方、急激なピクセル値の変化が見られる場合、その変化区間よりも大きなマスクサイズを使用すれば、同様の理由で焦点速度は大きく計算される。このような理由により、最小二乗法フィルタでは、焦点面を正しく抽出できたと考えられる。

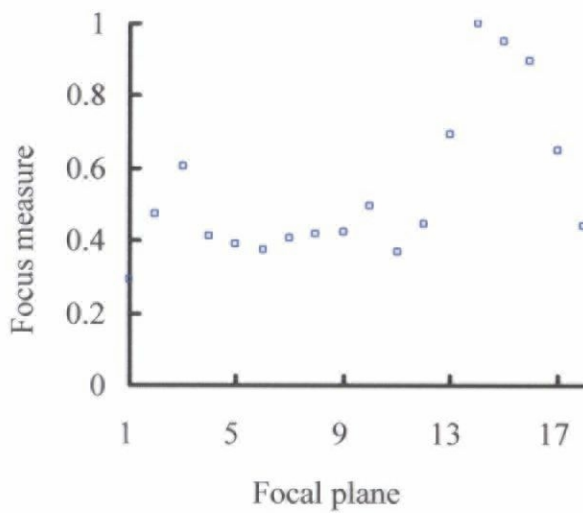
(I) Laplacian method



(II) S.D. method



(III) Least-square method (M=17)



(IV) Focal plane image (14)



Fig. 4-5 Comparison of focus measure at (289,224) among three kinds of focus measure operator; Laplacian method (I), S.D. method (II), least-square method (III). A pixel (shown into a red square, IV) was used the comparison of focus measure in focal plane images (14).

4.9 最小二乗法フィルタの改良

前節の検証実験により、加算変形ラプラシアンフィルタ及びSDフィルタに対する最小二乗法フィルタの優位性を示した。しかし、マスクサイズには便宜的に定めた値を用いており、このマスクサイズが全ピクセルの合焦点抽出に有効であるかは示されていない。先ほどの検証では、葉緑体と葉緑体でない部分、つまり発光域と非発光域の区別が明瞭になる領域を対象に用いていた。これとは条件の異なる、発光域、もしくは非発光域のみからなる領域では違う結果が現れる可能性も考えられる。そこで、葉緑体の中心部のように、マスクサイズ内が発光域のみからなる地点、(344,145)を対象に前節と同様のフィルタリングを行った。

Fig. 4-6 (I)に、マスクサイズを 13 に設定して最小二乗法フィルタを用いた時の(344,145)における焦点面と焦点測度の関係を示す。Fig. 4-5 (III)の結果とは異なり、焦点面間の焦点測度のばらつきが大きくなり、正規曲線との類似性が小さくなった。また、最も焦点があっていると判断できた焦点面も正しく算出されなかった。そこで、(344,145)に対して、様々なマスクサイズでの焦点測度算出を行ったところ、マスクサイズを 31 に設定して最小二乗法フィルタを用いたときの結果が最も妥当であった。

このように、マスクサイズを固定したフィルタリングでは、テクスチャのきめの複雑な画像には対応できないことが示された。(289,224)におけるピクセルのように、エッジが明瞭な場合、比較的小さなマスクサイズで正しい合焦地点を求めることができる。一方、(344,145)におけるように、対象のテクスチャが滑らかでエッジが不明瞭な場合、中心ピクセルと近傍のピクセルの値に大きな差が現れず、比較的大きなマスクサイズが合焦地点の決定に適している。多くの場合、顕微鏡視野内にはこの両方が混在する状況が多く見受けられる。このような場合に、マスクサイズをある一定値に固定すると、合焦地点をうまく算出できない領域が出現する。そこで、本節ではマスクサイズの自動化を含めた最小二乗法フィルタの改良を行った。

4.9-a マスクサイズの自動化

各マスクサイズで得られた焦点測度を標準化するために、式(1)をマスクサイズで除した。

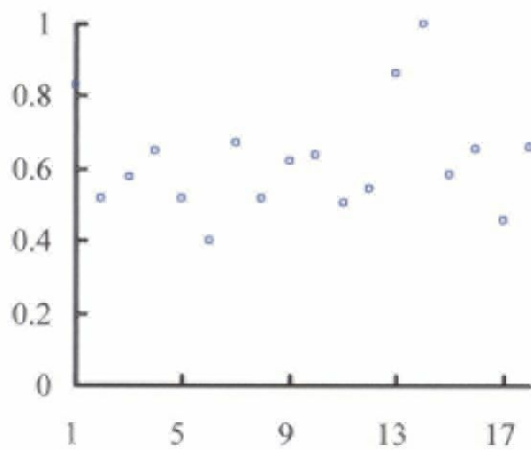
$$f(i,j) = \sum_{k=1}^4 \sum_{x,y \in M_k(i,j)} \frac{|(x,y) - \{a_k(i,j) \cdot p_k(x,y) + b_k(i,j)\}|}{N}$$

ここで、Nはマスクサイズを表す。この演算により、マスクサイズを7から41まで変化させて焦点測度を計算し、最も高い焦点測度を示すマスクサイズを最適サイズとして、そのピクセルにおける最適焦点測度とした。最小マスクサイズを7に設定したのは、近似直線の計算上、参照点数が少ないときの精度が高くないためである。

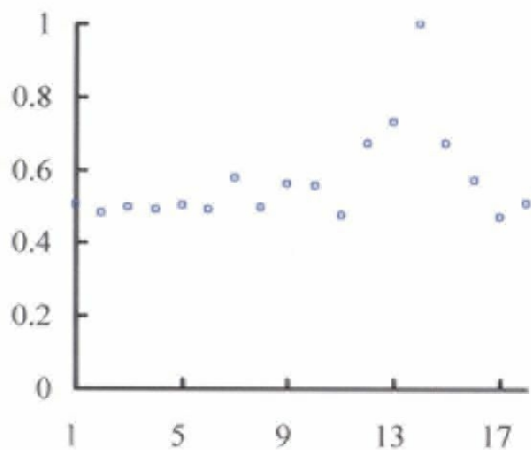
4.9-b 結果

(344,145)における、マスクサイズと各マスクサイズで求めた最大焦点測度との関係を Fig. に、また、(344,145)における、マスクサイズと各マスクサイズで求めた最大焦点測度との関係を Fig. に示す。(344,145)では、マスクサイズが25のときに焦点測度が最大値を示した。また、(344,145)では、マスクサイズが25のときに焦点測度が最大値を示した。このように、フィルタリングの改良によって、エッジが明瞭な領域においては小さなマスクサイズが、エッジが不明瞭な領域においては大きなマスクサイズが選択され、より精度よく焦点測度が求められるようになった。

(I) Least square method (M=17)



(II) Least square method (M=39)



(III) Focal plane image (14)

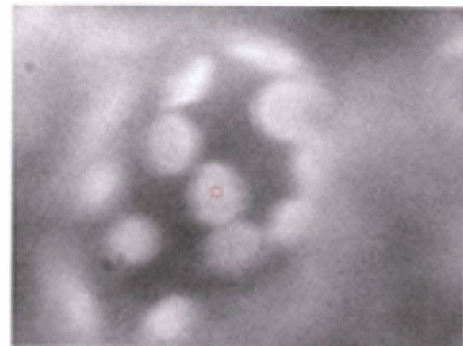


Fig. 4-6 Comparison of focus measure when using different mask size by the least-squares operator, mask size =17 (I), mask size = 39 (II). A pixel (shown into a red square, III) was used the comparison of focus measure in focal plane images (14).

4.10 3D 画像及び合焦蛍光画像の算出

4.10-a 焦点距離及び合焦蛍光画像算出

焦点測度は合焦地点において最大値を取り，焦点面を上下した際には，合焦地点を頂点とした正規分布を描くと仮定してよい(Nayar and Nakagawa1994)。これを利用して，少ない焦点面から，理想上の合焦地点とピクセル値を求めることができる。焦点面を少なくすることで，一連の画像を短い時間で取得することができ，対象への時間的なずれを極力抑えることができる。具体的には，焦点測度の最大値をとる焦点面と，その前後の焦点面の 3 つから正規分布を近似し，その頂点に相当する値を以って合焦距離とした。以下に，3 点を通る正規分布曲線の頂点を求める式を展開する。

合焦点 Z_p 、標準偏差 σ の、 Z_n における正規分布確率密度変数 $f(n)$ は、

$$f(n) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{(Z_n - Z_p)^2}{2\sigma^2}\right)$$

で表される。両辺の対数をとると，

$$\begin{aligned} \ln(\sqrt{2\pi}\sigma \cdot f(n)) &= -\frac{(Z_n - Z_p)^2}{2\sigma^2} \\ \ln(\sqrt{2\pi}\sigma) + \ln(f(n)) &= -\frac{(Z_n - Z_p)^2}{2\sigma^2} \dots\dots\dots ① \end{aligned}$$

同様に、

$$\ln(\sqrt{2\pi}\sigma) + \ln(f(n-1)) = -\frac{(Z_{n-1} - Z_p)^2}{2\sigma^2} \dots\dots\dots ②$$

①－②より、

$$\begin{aligned} \ln(f(n)) - \ln(f(n-1)) &= -\frac{1}{2\sigma^2} \{(Z_n - Z_p)^2 - (Z_{n-1} - Z_p)^2\} \\ &= -\frac{1}{2\sigma^2} \{Z_n^2 - Z_{n-1}^2 - 2Z_p(Z_n - Z_{n-1})\} \end{aligned}$$

よって、

$$\sigma^2 = \frac{(Z_n^2 - Z_{n-1}^2) - 2Z_p(Z_n - Z_{n-1})}{\ln(f(n)) - \ln(f(n-1))} \dots\dots\dots ③$$

同様に、

$$\sigma^2 = \frac{(Z_n^2 - Z_{n+1}^2) - 2Z_p(Z_n - Z_{n+1})}{\ln(f(n)) - \ln(f(n+1))} \dots\dots\dots ④$$

③ = ④ より、

$$\begin{aligned} \frac{(Z_n^2 - Z_{n-1}^2) - 2Z_p(Z_n - Z_{n-1})}{\ln(f(n)) - \ln(f(n-1))} &= \frac{(Z_n^2 - Z_{n+1}^2) - 2Z_p(Z_n - Z_{n+1})}{\ln(f(n)) - \ln(f(n+1))} \\ \frac{(Z_n^2 - Z_{n-1}^2)}{\ln(f(n)) - \ln(f(n-1))} - \frac{(Z_n^2 - Z_{n+1}^2)}{\ln(f(n)) - \ln(f(n+1))} &= 2Z_p \left(\frac{Z_n - Z_{n-1}}{\ln(f(n)) - \ln(f(n-1))} - \frac{Z_n - Z_{n+1}}{\ln(f(n)) - \ln(f(n+1))} \right) \end{aligned}$$

$$\therefore Z_p = \frac{\frac{(Z_n^2 - Z_{n-1}^2)}{\ln(f(n)) - \ln(f(n-1))} - \frac{(Z_n^2 - Z_{n+1}^2)}{\ln(f(n)) - \ln(f(n+1))}}{2 \left(\frac{Z_n - Z_{n-1}}{\ln(f(n)) - \ln(f(n-1))} - \frac{Z_n - Z_{n+1}}{\ln(f(n)) - \ln(f(n+1))} \right)}$$

$Z_n - Z_{n-1} = Z_n - Z_{n+1} = \Delta Z$ より、

$$Z_p = \frac{(\ln(f(n)) - \ln(f(n+1)))(Z_n^2 - Z_{n-1}^2) - (\ln(f(n)) - \ln(f(n-1)))(Z_n^2 - Z_{n+1}^2)}{2\Delta Z \{ (\ln(f(n)) - \ln(f(n+1))) - (\ln(f(n)) - \ln(f(n-1))) \}}$$

このようにして、全てのピクセルに対し合焦距離を算出し、3D 画像を算出した。

合焦地点におけるピクセル値は、合焦地点と隣接する二つの焦点面におけるピクセル値を用いて、z 軸方向に内挿することによって求めた。具体的には、合焦距離 $Z_p(i, j)$ の前後の計測焦点面の z 軸方向の距離を $Z_n(i, j)$, $Z_{n-1}(i, j)$ とし(焦点面の間隔を ΔZ)、そのときのピクセル値をそれぞれ $\ln(i, j)$, $\ln-1(i, j)$ とすれば、 $\text{Ip}(i, j)$ は、

$$I_p(i, j) = I_{n-1}(i, j) \times \frac{\{Z_n(i, j) - Z_p(i, j)\}}{\Delta Z} + I_n(i, j) \times \frac{\{Z_{n-1}(i, j) - Z_p(i, j)\}}{\Delta Z}$$

で与えられる。このようにして、全てのピクセルに対し合焦距離、及びピクセル値を算出し、合焦画像を算出した。

4.10-b 結果と考察

高さ画像を 3D 化した画像を Fig. 4-7 に示す。3D 化は画像処理ソフト(Erdas IMAGINE)を用いて行った。なお、本 3D 画像では、高さの異なるピクセル間は直線で結ばれているが(例えば Fig. 4-7(A)の斜線部)、このようにしてできた側面部分は、実際の葉肉細胞の構造を反映するものではない。Fig. 4-7(A)は斜め上方向から、Fig. 4-7(B)は横方向からの図である。Fig. 4-7(B)から、赤枠で囲まれた葉肉細胞の葉緑体が、赤枠で囲まれた葉肉細胞の中心部部分で高位置に存在し、周辺部で低位置に存在しているのがわかる。前述のとおり、葉緑体は葉肉細胞の表面に位置していると考え、本結果は楕円状の形状を示す海綿状組織葉肉細胞の特徴をよく表していた。また、画像中のノイズが少ないこと、及び個々の焦点面画像との比較から、精度良く 3D 画像構築が行えていると考えられた。

この 3D 画像にクロロフィル蛍光合焦画像をマッピングした 3D クロロフィル蛍光合焦画像を Fig. 4-8 に示す。Fig. 4-7 と同様、Fig. 4-8(A)は斜め上方向から、Fig. 4-8(B)は横方向からの図である。本検証実験においては、高さと蛍光強度には特に関係が見られなかった。また、葉緑体内部での蛍光強度の分布もほぼ一様であったが、同一細胞内の葉緑体間では、蛍光強度の不均一性を確認することができた。葉緑体の蛍光強度は、周辺部のものほど高く、逆に中央部の葉緑体の蛍光強度は周辺部に比べ、やや低い値を示していた。この結果は、周辺部の葉緑体が縦向きに立った状態で分布し、ピクセルあたりのクロロフィル密度が高くなっていることに起因している可能性が考えられる。しかし、高さ方向にクロロフィルが密に分布しても、奥からのクロロフィル蛍光は手前のクロロフィルによって再吸収されるため、この結果については、バンドパスフィルタを用いて表面からのクロロフィル蛍光を取得するなどの更なる検証が必要であると考えられる。なお、バンドパスフィルタを用いた実験を行ったところ、取得できる光量が不足し、現段階での画像化は困難であった。

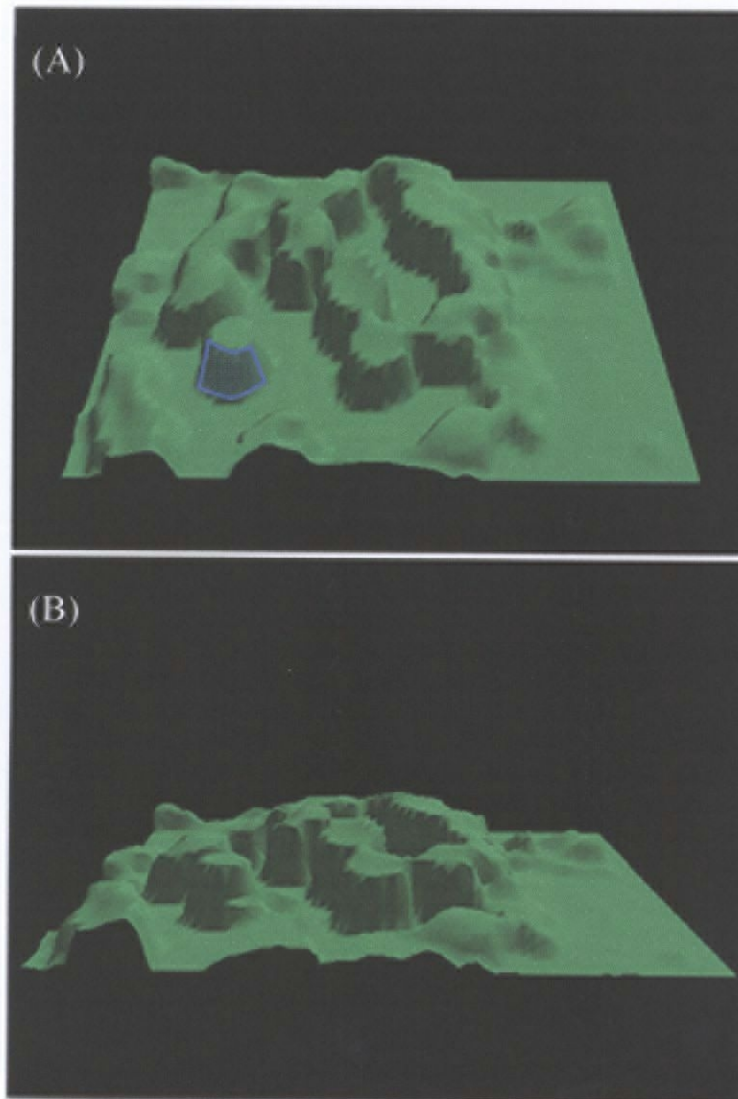


Fig. 4-7 3D images calculated by least-square operator and Gaussian approximation. (A) is a birds-eye view. (B) is a side-on view. The area such as framed in by a blue line (A) is not an actual structure, but an only the area which is interpolated from the pixel values.

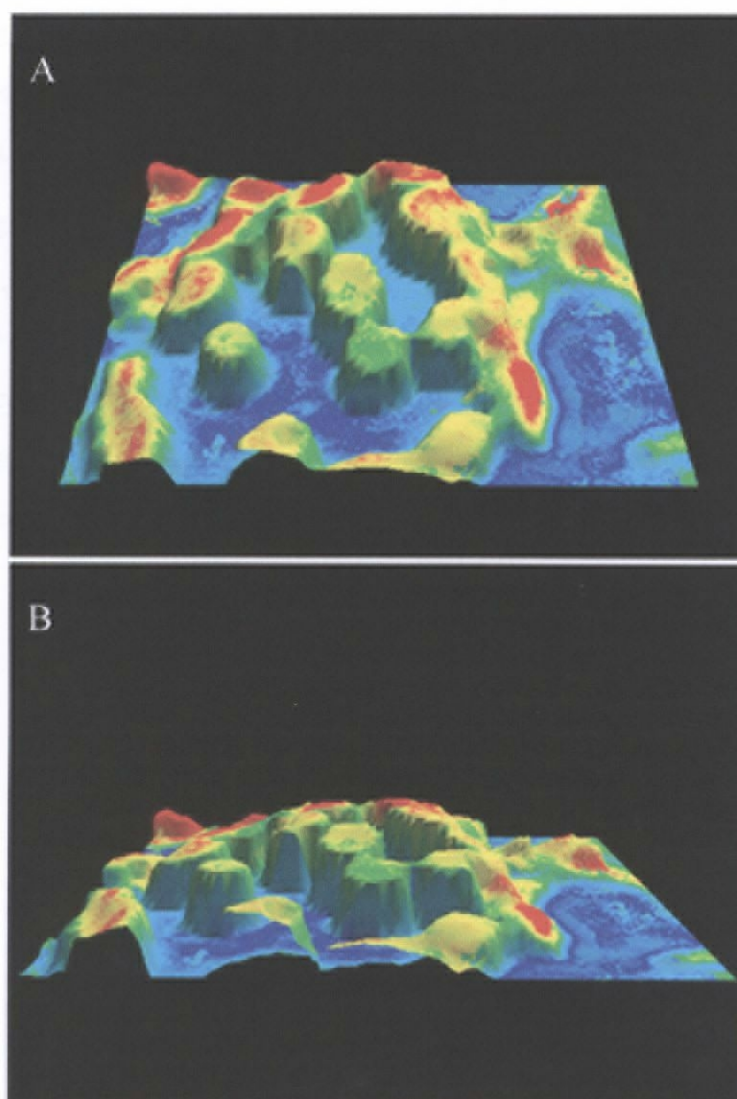


Fig. 4-8 3D chlorophyll fluorescence images calculated by least-square operator and Gaussian approximation. Other conditions were the same as those in Fig. 4-7.

4.11 本章のまとめ

クロロフィル蛍光顕微画像計測システムに 3D 画像計測システムを導入した 3D クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを開発した。本研究で開発したシステムは、100 倍の対物レンズを用いた高倍率の 3D 画像構築も可能であった。

本計測システムを用いて、ムラサキツユクサ葉海綿状組織の葉肉細胞に対して、3D クロロフィル蛍光画像を算出した。そして、高さ情報とクロロフィル蛍光強度について解析を行ったところ、高さと蛍光強度に関連性は見られなかったものの、周辺部の葉緑体からの蛍光が、中央部の葉緑体からの蛍光よりも高いことを見出すことができた。この差異に関しては、光合成活性の違い、及び鉛直上方から見たときの平面あたりのクロロフィル密度の違い、の二つが原因として考えられた。