

# ノイズが多くてもぼやけの少ない画像を撮るための顕微鏡システムの開発～大学×国研×産業連携による成果～

2023年7月4日更新

お茶の水女子大学基幹研究院  
理化学研究所 脳神経科学研究センター  
科学技術振興機構（JST）創発的研究支援事業



お茶の水女子大学  
Ochanomizu University



**BOCC** RIKEN  
CBS-EVIDENT  
Open Collaboration  
Center



創発的研究支援事業  
*Fusion Oriented REsearch for disruptive Science and Technology*

## 発表のポイント

- 生体組織は散乱が大きく、顕微鏡から照射したレーザーが一点に集光しない「球面収差」と呼ばれる光学エラーのため、ぼやけた像が得られやすい。
- これまで、ノイズの多い生体組織深部でも鮮明な画像となるよう自動で補正を行う顕微鏡システムを開発してきた。
- 本研究では、従来の取得した画像のコントラストに基づいたアルゴリズムを改良し、画像の空間周波数に基づいた計算手法を用いることで、よりノイズやサチュレーションに頑強なアルゴリズムを提案した。
- 提案したアルゴリズムを顕微鏡システムに実装することで、生体組織深部や高齢化した生体脳組織のように、散乱によるノイズの影響が無視できないほど大きい生体試料においても、安定してぼやけの少ない画像を撮ることが可能であることを実証した。

## 概要

生きた状態の脳を深くまで鮮明に観察するため、脳研究の分野では二光子顕微鏡と呼ばれる特殊な顕微鏡が広く用いられています。しかしながら、生体組織は散乱が大きく、顕微鏡から照射したレーザーが一点に集光しない「球面収差」と呼ばれる光学エラーが生じ、ぼやけた像が得られやすいのが難点です。私たちはこれまで、このエラーを効率的に補正し、ぼやけの少ない画像を撮影するための顕微鏡システムを産学連携により開発してきました<sup>註1</sup>。本研究では、さらにこの顕微鏡システムの改良を行い、高速かつノイズ頑強性の高いアルゴリズムを提案しました。さらに、それを顕微鏡システムに実装することで、生体組織深部や老齢化した生体脳組織のように、散乱によるノイズの影響が無視できないほど大きい生体試料においても、安定してぼやけの少ない画像を撮ることが可能であることを実証しました。本研究成果は、6月14日の *Microscopy* 誌（電子版）に掲載されました。

本研究は、科学技術振興機構（JST）創発的研究支援事業（グラント番号 JPMJFR204G）および文科省「世界で活躍できる研究者戦略育成事業」 大学×国研×企業連携によるトップランナー育成プログラム（通称 TRiSTAR）の支援のもと行いました。

註1) 2018年5月7日理化学研究所 深部微細構造を鮮明かつ定量的にイメージングする自動球面収差補正システムを共同開発－産業界との連携制度（バトンゾーン制度）を活用－

[https://www.riken.jp/press/2018/20180507\\_1/](https://www.riken.jp/press/2018/20180507_1/)

## 詳細な説明

### 背景

生きた状態の脳を深くまで鮮明に観察するために、脳研究の分野では二光子顕微鏡と呼ばれる特殊な顕微鏡が広く用いられています。しかしながら、これらの顕微鏡に用いられる対物レンズの特性により、試料の散乱や屈折率によって、画像がぼやけてしまう「球面収差」という光学的なエラーが生じます。このエラーを解消するために、対物レンズには補正環と呼ばれる光学機構が備わっており、これを回転させて内部のレンズを上下させることで収差の少ない鮮明な像を得ることが可能となります（図1）。ただし、補正環の調整には明確な指標がなく、また観察中に対物レンズに触れる必要があり、試料屈折率による球面収差の補正は困難でした。

そこで開発されたのが、自動球面収差補正システムです。このシステムでは補正環を電動で回転しながら画像を撮像し、各画像において画素値の最小値と最大値の差を表すコントラスト値が最大となるような最適な補正環の位置を決定してきました（Peak-C）。しかしながら、画像のコントラストは、ノイズや輝度の飽和（サチュレーション）の影響を受けやすいため、生体組織深部や老齢化脳などノイズが多く信号が埋もれてしまうような画像では最大限の性能を発揮できないという問題がありました。

### 研究手法と成果

本研究では、これらの問題を解決するため、コントラストではなく、画像を一度波形として分解し、ノイズ成分を除いてから最適補正環位置を決定するアルゴリズム（Peak-F）を開発しました。これは、生体にとって最も本質的な構造が、ノイズよりも低い周波数領域に情報を持っているという性質から着想を得た方法です。このようにすることで、ノイズやサチュレーションのある画像でも最適な補正環の位置を決定し、鮮明な画像を得ることが可能です。

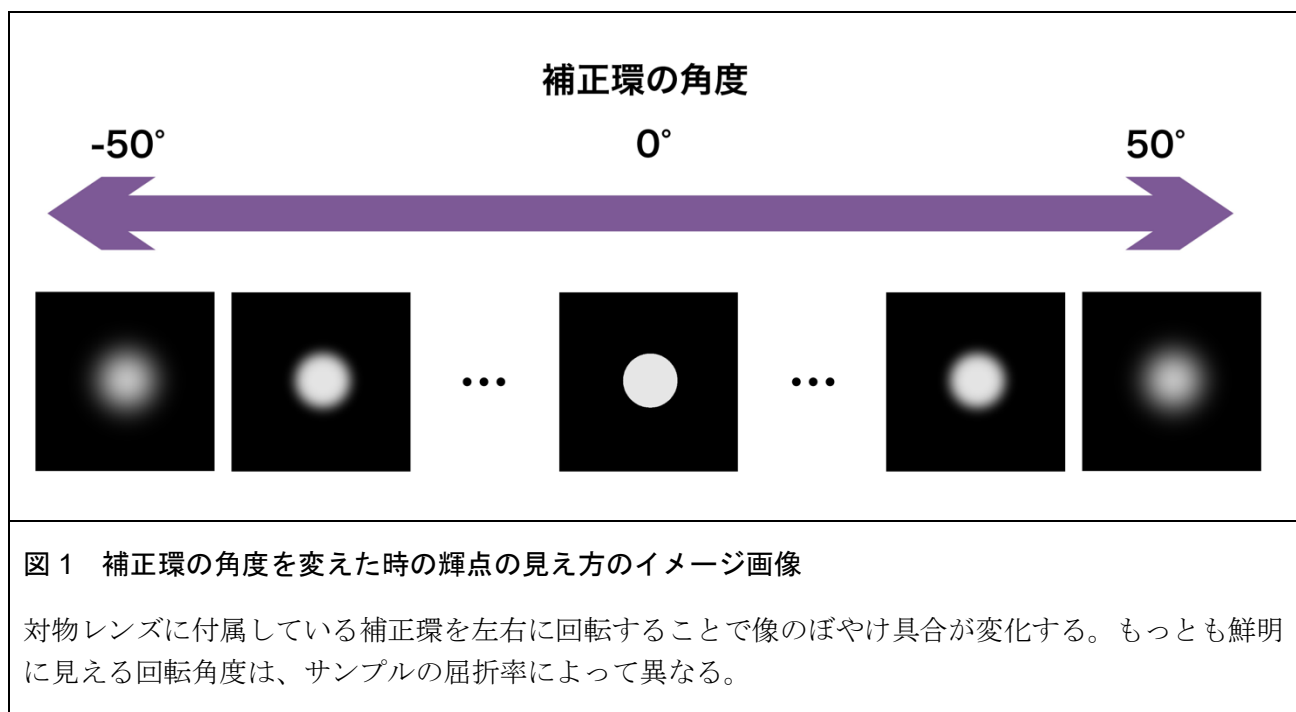
図2は、補正環の角度を変えて撮像した画像に対して、人工的にノイズを付加した画像です。本来、最適な補正管の角度は $\theta=0^\circ$  となっていて、ノイズのない、または少ない画像では Peak-C、Peak-F ともに  $\theta=0^\circ$  のときに最大の強度となっています。ノイズが大きくなると、Peak-C ではグラフの山の形が平坦となり、最大の強度となる補正環の位置が分からなくなりました。一方 Peak-F では、ノイズが大きくなっても、最適な補正環位置を判別することができました。

図3は、補正環の角度を変えて撮像した画像に対して、人工的に明るさを増して、サチュレーションを起こした画像です。ノイズの時と同様に、Peak-F ではサチュレーションの量が増えても最適補正環位置を判別することができました。

最後に、Peak-F を用いてノイズの多い老齢マウスの脳で最適補正環位置を決定しました。さらに、補正環角度と撮像深度から組織の屈折率を算出した結果、若齢マウスと老齢マウスの脳では屈折率が異なることを見出しました(図4)。つまり、老齢化した脳組織では、屈折率が不均質に分布しており、深いそうでは、より脂質に近い性質を持ち得ることが明らかになりました。

### 今後の期待

本研究で提案した手法は、ノイズやサチュレーションに強い特性を生かして、様々な状態の脳や他の生体組織での高分解能観察のみならず、屈折率等の観察対象の組織の物理学的特性の研究に活用できると期待しています。



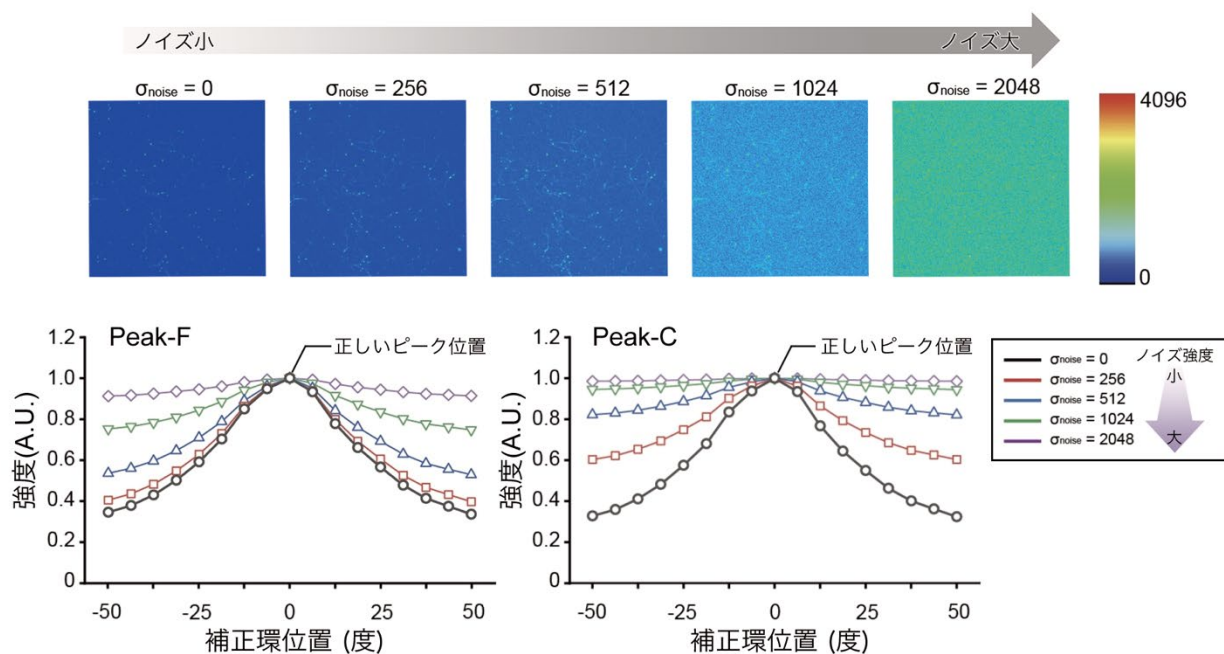


図2 補正環の角度を変えて撮像した画像にノイズを付加した際の最適補正環位置検出能の違い

あらかじめ取得していた画像に対してコンピュータ上でノイズを付加し、Peak-FおよびPeak-Cのアルゴリズムのどちらがよりノイズに対して頑強であるかどうかを検証した。Peak-Fでは、どのノイズ強度においても、最適な補正環位置0度で正しいピーク位置の検出ができた。

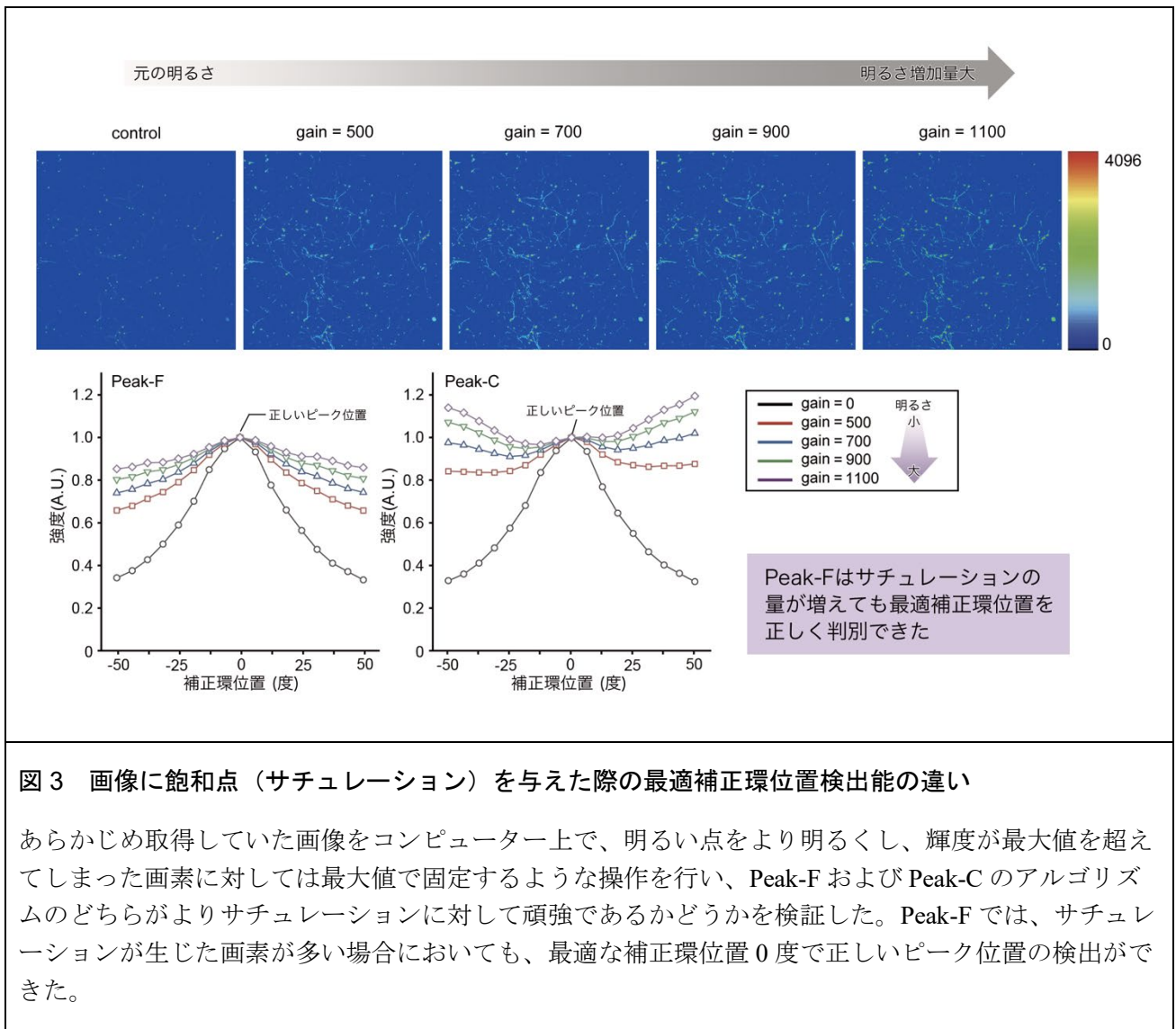


図3 画像に飽和点（サチュレーション）を与えた際の最適補正環位置検出能の違い

あらかじめ取得していた画像をコンピューター上で、明るい点をより明るくし、輝度が最大値を超えてしまった画素に対しては最大値で固定するような操作を行い、Peak-FおよびPeak-Cのアルゴリズムのどちらがよりサチュレーションに対して頑強であるかどうかを検証した。Peak-Fでは、サチュレーションが生じた画素が多い場合においても、最適な補正環位置0度で正しいピーク位置の検出ができた。

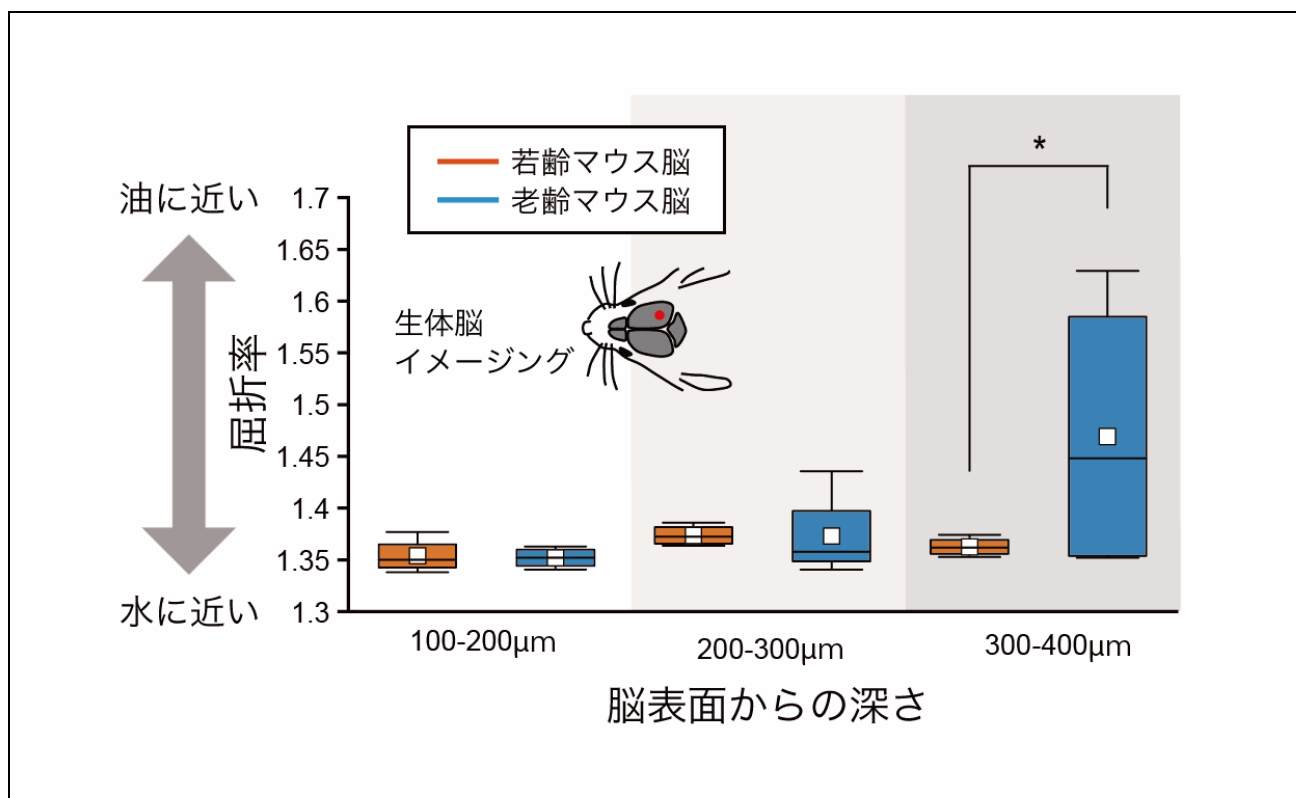


図4 若齢マウスと老齢マウスにおける生体脳組織の屈折率の違い

本研究で提案したアルゴリズムを二光子顕微鏡に実装し、若齢マウスと老齢マウスにおいて生体脳イメージングを行った結果から、観測部位の屈折率を計算した。その結果、老齢マウスでは特に深い層（脳表から 300-400 μm）において、有意に高い屈折率を持ち得ることが明らかになった。

## 論文題目

題目 : Spatial frequency-based correction of the spherical aberration in living brain imaging

著者 : Aoi Gohma, Naoya Adachi, Yasuo Yonemaru, Daiki Horiba, Kaori Higuchi, Daisuke Nishiwaki, Eiji Yokoi, Yoshihiro Ue, Atsushi Miyawaki, Hiromu Monai

著者情報 :

郷間 葵 (お茶の水女子大学大学院 人間文化創成科学研究科 ライフサイエンス専攻 博士後期課程、理化学研究所研修生)

足立 尚哉, 米丸 泰央, 堀場 大輝, 樋口 香織, 西脇 大介, 横井 英司, 上 喜裕 (理研 CBS-エビデント連携センター(BOCC)客員技師)

宮脇 敦史 (理研 CBS-エビデント連携センター(BOCC)センター長)

毛内 拓 (お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系・助教、理化学研究所客員研究員)

雑誌：Microscopy オンライン版 dfad035

DOI: 10.1093/jmicro/dfad035

リンク：<https://doi.org/10.1093/jmicro/dfad035>

### 【問い合わせ先】

（研究に関すること）

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系

助教 毛内 拓（もうない ひろむ）

電話番号：03-5978-5303

Eメール：[monai.hiromu@ocha.ac.jp](mailto:monai.hiromu@ocha.ac.jp)

（報道に関すること）

お茶の水女子大学広報室企画戦略課（広報担当）

電話番号：03-5978-5105

Eメール：[info@cc.ocha.ac.jp](mailto:info@cc.ocha.ac.jp)