

Mathematical morphology に基づくバイオイメージからの 構造情報の抽出と解析

Extraction of Structural Features of Biological Images and Its Evaluation by Mathematical Morphology

木森 義隆^{a, b, c}, 諸根 信弘^b, 片山 栄作^c
Yoshitaka Kimori, Nobuhiro Morone and Eisaku Katayama

^a (財)医療機器センター

^b 国立精神・神経センター神経研究所

^c 東京大学医科学研究所

要旨 Mathematical morphology は、画像中の物体形状を操作し計測する理論的枠組みである。本稿では、バイオイメージに対し、mathematical morphology に基づく画像処理を適用することにより、その構造情報を抽出し、定量的に計測する手法について述べる。

キーワード：画像処理, mathematical morphology, 電子顕微鏡

1. はじめに

光学または電子顕微鏡を用いて *in vitro* 条件, あるいは組織・細胞中における生体高分子の分布や構造を捉え, それらの機能や動態を探るバイオイメージング技術は, 現代のライフサイエンスにとって必須の手段である。しかし, 画像データの解釈には, 観察者の主観が介在し, 客観的とは言い難い面もある。これは, 計算機による画像処理・認識技術に未整備な部分が多いことに起因する。観察者が像を解釈する場合, 経験や知識に基づいて“かたち”を読み解くプロセスを経る。しかし, 従来の画像処理手法ではそれを定量的に取り扱う手立てがなく, また, 互いに関連性のない様々なフィルタを寄せ集めて実行することが多く, 解析に対する論理性があいまいであった。

これを踏まえ, 我々は, Mathematical morphology¹⁾ (数理形態学, 以降モルフォロジ) に基づく非線形的な画像解析手法を開発し, 画像の定量的, 客観的な評価を目指して従来とは異なる観点から新たな試みを行った²⁾。

モルフォロジは, 集合論を基盤に, 様々な画像処理を一貫した理論体系のもとで表現し実行する数理体系である。物体の“丸い”, “線維状”などのかたちの表現形式を直接取り扱うことができるため, 形態に対し一定の論理的根拠を備えた定量的な解釈が可能となる。これは, 輝度分布に基づく画像

処理や, 周波数選択型の処理にはないユニークな特性である。また, 全ての演算は, Minkowsky 和と差という単純な2項演算を基本とするため, 計算機での実装が容易である。バイオイメージングの分野においてモルフォロジはまだ公知ではないが, 光学顕微鏡像³⁾, 電子顕微鏡像²⁾ さらに DNA マイクロアレイの画像⁴⁾ などに対して適用した例がある。いずれも, 対象物のセグメンテーションや特徴的な構造の抽出に用いられ, 効果的な処理方法が実現されている。

本稿では, 様々なバイオイメージから生物学的に有意な情報を発掘・整理して観察者に提示し, 新たな知見につなげるための一連のワークフローを計算機上に構築するモルフォロジカル画像処理理論について概説する。

2. Minkowski 集合演算とモルフォロジの基本演算

モルフォロジは, 1960年代の後半, 鉱物の顕微鏡画像中に分布する鉱物の幾何学的特性と物理的特性の関連を解析するための手段として G. Matheron と J. Serra により考案された。理論の整備と計算機環境の発展に伴い, 1980年代になって, テクスチャ解析や様々な画像処理に適用されるようになった。モルフォロジは, 対象画像に構造要素と呼ばれる基底関数を作用させる集合論的操作により, 画像中の構造を単純な“かたち”の集合として処理できることに特徴がある。これを活かし, 画像中の形状に関わる特徴抽出や識別に適した手法として用いられる。モルフォロジは一般に N 次元空間における集合論として展開されるが, 本稿では, バイオイメージへの適用を鑑み, 2次元モルフォロジ演算について説明する。

^b 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1
TEL: 042-341-2712; FAX: 042-346-1749
E-mail: kimori@ncnp.go.jp
2008年11月17日受付

2.1. 2値のモルフォロジ演算

ここでは、まず、2値のモルフォロジについて説明する。2値画像は、黒い画素（値0）の背景中に、白い画素（値1）が集まってできた物体で構成されるものとする。この物体の存在領域が関心領域である。このとき、物体は「白い画素の集合」と捉えられる。個々の白い画素は集合の要素（元）であり、画像の原点からのベクトルとして表現されるので、物体の形状をベクトルの集合として捉えなおすことができる。本稿では、集合（画像）は、アルファベットの大文字で、要素は小文字で表す。

モルフォロジの演算は以下に示す Minkowski 和と差が基本になり、それらの組み合わせで演算が構成される。Minkowski 和とは、2つの集合 X, B があるとき、それぞれの集合の要素 x, b の全ての組み合わせからできる集合のことである。集合 X を b だけ平行移動して得られる集合を $(X)_b$ と書くと、Minkowski 和はその和集合であり、以下のように定義できる。

$$X \oplus B = \bigcup_{b \in B} (X)_b \quad (1)$$

一方、Minkowski 差は、集合 $(X)_b$ の積集合として以下のようにならされる。

$$X \ominus B = \bigcap_{b \in B} (X)_b \quad (2)$$

ここで、記号 \oplus, \ominus はそれぞれ、Minkowski 和、差の演算子という意味する。

また、集合 B を原点を中心として 180° 回転させて得られる集合を、集合 B の対称集合と呼ぶ。ここでは、 B^s と表し、以下のように定義する。

$$B^s = \{-b : b \in B\} \quad (3)$$

集合 B をその対称集合 B^s で置き換えたときの Minkowski 和と差をそれぞれ、dilation, erosion と呼ぶ。これらはモルフォロジの基本演算であり、dilation は、“ずらし重ね”，erosion は“掻き取り”と訳される。dilation は次のように定義される。

$$X \oplus B^s = \bigcup_{b \in B} (X)_{-b} \quad (4)$$

一方、erosion は次のように定義される。

$$X \ominus B^s = \bigcap_{b \in B} (X)_{-b} \quad (5)$$

これらの演算の適用例を図1に示す。2値画像を表す閉集合 X に、2次元の円盤状の閉集合 B （構造要素）を作用させる。この場合、 B は原点に対し対称であるため、dilation と erosion の結果は、それぞれ、Minkowski 和と差の結果に等しくなる。 X に B をずらし重ねた結果、dilation は B の半径分だけ外側に膨張させる。一方、erosion は B の半径の大きさだけ X を掻き取り、その分だけ収縮させる。また、dilation と erosion を組み合わせた演算として opening と closing がある。集合 X の構造要素 B による opening を X_B と表すと、以下のように定義できる。

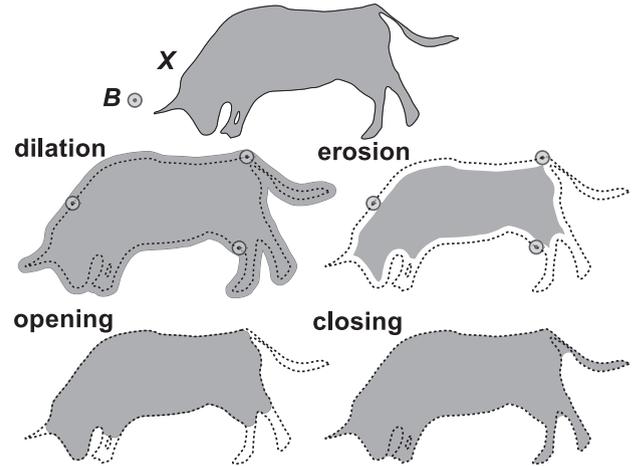


図1 原画像 X の構造要素 B による dilation, erosion, opening および closing 演算。点線は原画像の輪郭を、灰色の領域は演算後の画像を表す。

$$X_B = (X \ominus B^s) \oplus B \quad (6)$$

一方、closing を X^B とすると、

$$X^B = (X \oplus B^s) \ominus B \quad (7)$$

と定義される。これらは、dilation と erosion の演算順序が異なる。

図1に opening と closing の例を示す。opening は境界を滑らかにし、円盤 B が入り込めないような地峡形状や尖った岬形状を除去する平滑化作用をもつ。一方 closing は、 B が入り込めないような間隙や穴を埋め、一方で突起領域をそのまま残す作用をもつ。

2.2. 多値のモルフォロジ演算

多値（濃淡）画像は、画素の座標（画像の空間領域）を x, y の2つの次元で表し、画素値 $f(x, y)$ を次元 z で表す3次元 Euclid 空間上の集合と考える。多値画像に対するモルフォロジ演算は、陰影 (Umbra) という概念を用いれば、2値画像の場合の演算と平行な議論が可能となる。陰影とは、 $z \leq f(x, y)$ を満たす領域であり、これは2値集合として表現することができるため、濃淡画像が2値の集合へ変換される。

関数 f の関数 g による Minkowski 和は、次のようになる。

$$(f \oplus g)(x) = \max_{x-z \in F, z \in G} \{f(x-z) + g(z)\} \quad (8)$$

ここで、 F, G はそれぞれ、関数 f, g の定義域である。Minkowski 差は、次のようになる。

$$(f \ominus g)(x) = \min_{x-z \in F, z \in G} \{f(x-z) - g(z)\} \quad (9)$$

関数 $g(x)$ の原点に対する対称関数 $g^s(x)$ を定義すると以下のようになる。

$$g^s(x) = g(-x) \quad (10)$$

2値のモルフォロジ演算と同様、この対称関数を用いた

Minkowski 和と差をそれぞれ dilation と erosion と呼び、多値画像に対する opening, closing もこれらを用いて定義される。

$$\text{Opening: } f_g = (f \ominus g) \oplus g \quad (11)$$

$$\text{Closing: } f^g = (f \oplus g) \ominus g \quad (12)$$

3. Image rotation mathematical morphology に基づく新規フィルタ

生物試料の形態は微細かつ複雑な様相を呈し、画像取得の段階で不可逆的なノイズが重畳される。それを軽減し原画像に含まれる情報を有効に利用するためには、微細構造の特性を良好に保存しつつ、背景ノイズや、画素値の変調にロバストに対応できる画像処理法が望ましい。しかし、前章で示した通常のもルフォロジ演算では構造要素の作用方向が一定のため、対象画像中に含まれる様々な向きの構造物に対し、均質な処理が困難である²⁾。そのまま実施すれば、解析対象の変形、構造要素の形状に依存したアーチファクトなどが生じる場合がある。

そこで我々は、もルフォロジの特性を活かしつつバイオイメージに対応できる画像処理を目指して新たなもルフォロジ演算 (Image Rotation Mathematical Morphology (IRMM) 演算)^{2,5)}を開発した。これは対象画像をあらゆる方向に回転させて処理することにより、任意の方向を向いた構造の処理を可能にするものである。

いま、対象画像を f 、構造要素を g とする。 f をその中心座標を回転の中心として角度 $180 \cdot i/N$ 度 ($i = 0, 1, \dots, N-1$) ごとに回転させ、そのつど演算を行う。 N は 180 度を等分した数である。結果は、各角度ごとの処理画像 N 枚のセットを統合して出力する。

この opening および closing 演算は以下の最大 (max)、最小 (min) 演算として定義される。

$$\text{Opening: } h_o(x,y) = \max[h_0(x,y), h_1(x,y), \dots, h_{N-1}(x,y)] \quad (13)$$

$$\text{Closing: } h_c(x,y) = \min[h^0(x,y), h^1(x,y), \dots, h^{N-1}(x,y)] \quad (14)$$

ここで、 h_i は画像 f_i の g による opening, h^i は closing を意味する。

3.1. IRMM による平滑化フィルタ

画像処理において平滑化は重要な役割を担う。単に画像のノイズ除去の目的のみではなく、背景と対象物体の分割 (segmentation) や特徴パターン抽出の前処理として使われる。平滑化フィルタには、対象物の領域が十分に均質な濃度値で表現されるとともに、そのエッジや比較的小さな構造的な特徴を保存することが要求される。これまで、線形や非線形の様々な平滑化フィルタが提案されているが、この要求を満たすロバストな処理は困難であった。

Maragos らは、従来のフィルタでは実現できない、幾何学的な解析を行うことが大きな優位性をもつとして、もルフォ

ロジ演算を用いた平滑化フィルタを提案している⁶⁾。その具体例として opening と closing を組み合わせた、open-closing (OC) 演算, close-opening (CO) 演算があり、これらの演算をさらに線形結合した LOCO (Linear combination of OC and CO) フィルタ⁷⁾が知られる。しかし、これらのフィルタには、処理結果に前述した構造要素の形状由来のアーチファクトが生じる場合がある。それを改善するため、OC, CO 演算を式 (13, 14) で書き直し (それぞれ $h_o h_c, h_c h_o$ とする)、それらを線形結合した IRMM による新たな平滑化フィルタ (SF) を定義する。

$$SF = (h_o h_c)/2 + (h_c h_o)/2 \quad (15)$$

図 2 はノイズ除去を目的として、原画像 (図 2a) に対し、メディアンフィルタ, LOCO フィルタおよび SF による平滑化処理の結果を比較した例である。図 2b は、メディアンフィルタでの結果である。ウィンドウサイズは、 9×9 画素とした。ノイズの除去とともに、解析対象の輪郭がなまっている。図 2c は、LOCO フィルタでノイズを除去した結果である。やはり 9×9 画素の正方形構造要素を用いたが、この場合も輪郭形状が変形している。さらに、構造要素の形状が重畳されアーチファクトが生じた。対象物は、6 回の回転対称性をもつため、この輪郭形状を保持するには、それぞれの突起の方向に沿った平滑化処理が必要である。 SF による処理では、 9×9 画素の正方形構造要素を用い、原画像を 22.5 度ずつ回転させ、そのつど平滑化処理したものを統合し出力した (図 2d)。その結果、ノイズは除去され、対象物の輪郭形状が保たれている。図 2c と比較すると、構造要素の処理方向の多方向性が結果の向上をもたらしている。

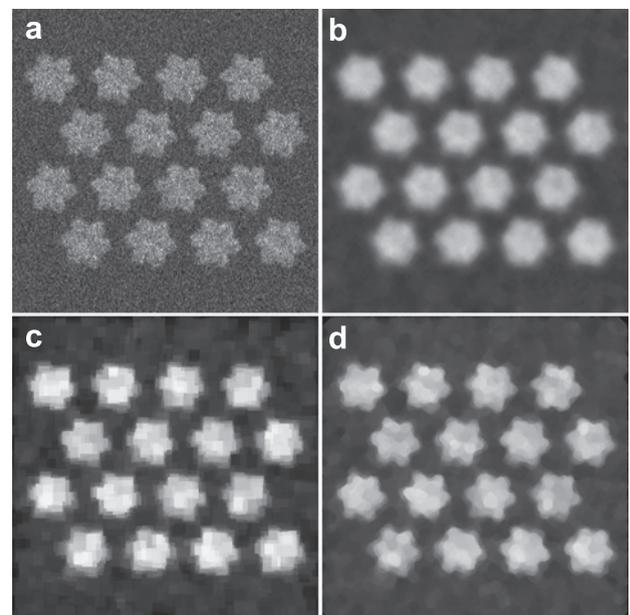


図 2 様々な平滑化処理の比較。(a) 原画像 (311×311 画素)、(b) メディアンフィルタ、(c) LOCO フィルタ、(d) IRMM による平滑化フィルタ (SF) の結果。

3.2. IRMMによる特徴抽出フィルタ

さらに、top-hat変換と呼ばれる演算もIRMMで定義した。

$$TH(f) = f - h_o \quad (16)$$

top-hat変換は、原画像から、それをopeningした結果を差し引く演算である。opening (h_o) は、一種の平滑化処理であり、構造要素に比べて小さな凸部は削られる。これは、low-pass filterであり、この出力を元の画像から引き去ればhigh-pass filter (openingによって削られた部分が残る) となる。構造要素のスケールを変化させるとその通過帯域が変化するという特性を活かし、画像に含まれる特定の形状の抽出に用いられる。

図3は、様々な大きさの構造要素でTHによる処理を行った例である。原画像(図3a)は、 305×305 画素の画像であり、画素値を高さとした複雑な地形を表現している。図3bでは、構造要素を 5×5 画素の正方形とすることにより、5画素以下の幅をもつ凸状の領域を抽出した。図3cでは、25画素以下、図3dでは、45画素以下の幅をもつ凸状の領域を抽出した。

構造要素をパラメータとしてTHを用いれば、このように原画像から特定の形状情報を選択的に抽出することが可能である。実際の処理では、顕微鏡などの分解能を考慮しながら抽出すべき領域の大きさを実測し、それに基づいて構造要素の大きさを決定する。

4. 光学顕微鏡で可視化された粒子の自動解析を可能にする画像処理

細胞内部に存在する分子に蛍光タグを融合して蛍光観察することにより、その局在や挙動を可視化できる。蛍光1分子

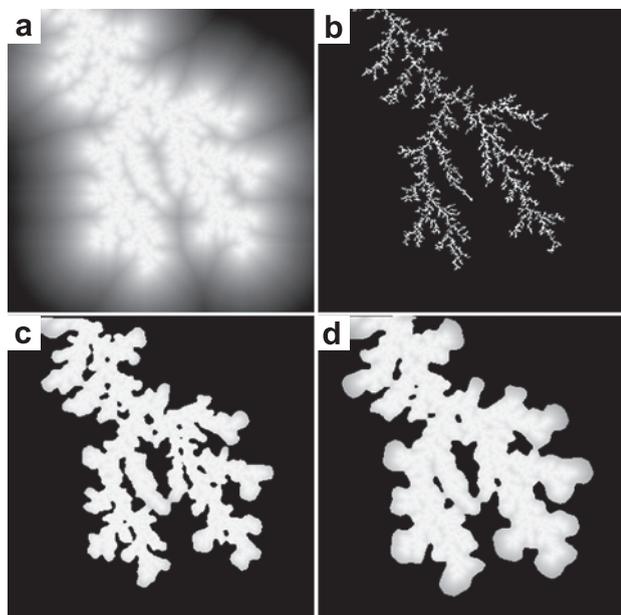


図3 IRMMによる特徴抽出フィルタ(TH)による構造抽出。(a) 原画像 (305×305 画素) から、5画素以下 (b)、25画素以下 (c)、45画素以下 (d) の凸状の構造を抽出した。

でも孤立した輝点として観察できるが、その分子の位置の決定には個々の輝点の像を識別して抽出する必要がある。ここでは、輝点の抽出過程を自動化するための手法を説明し、抽出した輝点を既存の解析法に適用可能なかたちに変換する手法を述べる。

実際の画像に先立ち、モデル画像に本手法を適用した例を示す。図4aは、不均一な背景画像 (231×231 画素) 上に輝点のモデル像 (半径7画素のガウス分布) を配置したものである。図中の点線は、画素値のプロファイルを計測した位置であり、以降の各処理による画素値の変化を図4eに示す。図4bは、aにガウスノイズ ($\sigma = 40$) を加えコントラストを低下させたものである。原画像とのS/N比は、12.36 [dB]であり、画素値のプロファイルを見ても、輝点と背景はほとんど区別が付かない。この画像にTHを用いた結果を図4cに示す。ただし、抽出された領域を1、他を0とする2値化を行っている。構造要素は、 15×1 画素の線分を用いた。top-hat変換では1階調でも差があればその領域を抽出できる。抽出したそれぞれの輝点領域の重心位置を決定し、それを頂点に半径7画素のガウス分布を発生させて輝点を復元(規格化)した(図4d)。頂点位置の誤差は、画像劣化の影響により 0.88 ± 0.06 (平均値 \pm 標準偏差) 画素であった。従来の輝点解析手法は、輝点の点像分布関数 (point spread function) をガウス関数と仮定したテンプレートマッチングを基本とする手法が多い⁸⁾。従って、この規格化および頂点位置の定量化は、既存のシステムに適用する際に重要になる。

次に、これを踏まえ培養細胞中のカベオリンに蛍光抗体を付け、光学顕微鏡で可視化した像を対象として処理した(図5)。モデル画像と同様に輝点を抽出、規格化した。図5a, bの左側は、それぞれ別の細胞の原画像 (515×515 画素) を、そこから輝点を抽出した結果をその右側に示す。輝点は、非常に込み合っているため、大きな幅を持つ構造要素では、近接する複数の輝点をそれぞれ独立したものとして抽出できない。そこで、構造要素は幅1画素の線状

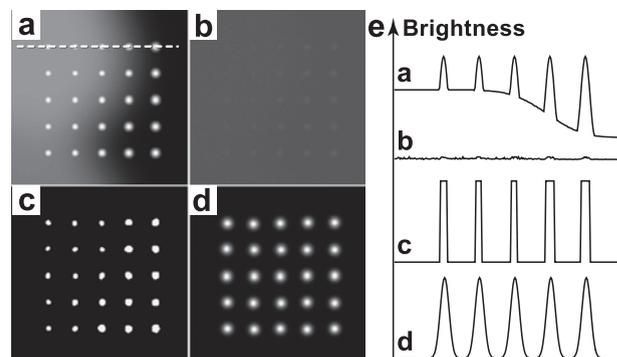


図4 輝点モデルの抽出。(a) 原画像 (231×231 画素)。画素値のプロファイルを測定した位置を点線で示す。(b) 劣化画像。(c) (b) にIRMMによる特徴抽出フィルタ(TH)を施し、輝点領域を抽出した後、2値化した。(d) 輝点の復元(規格化)。(e) 各処理後の画素値プロファイル。

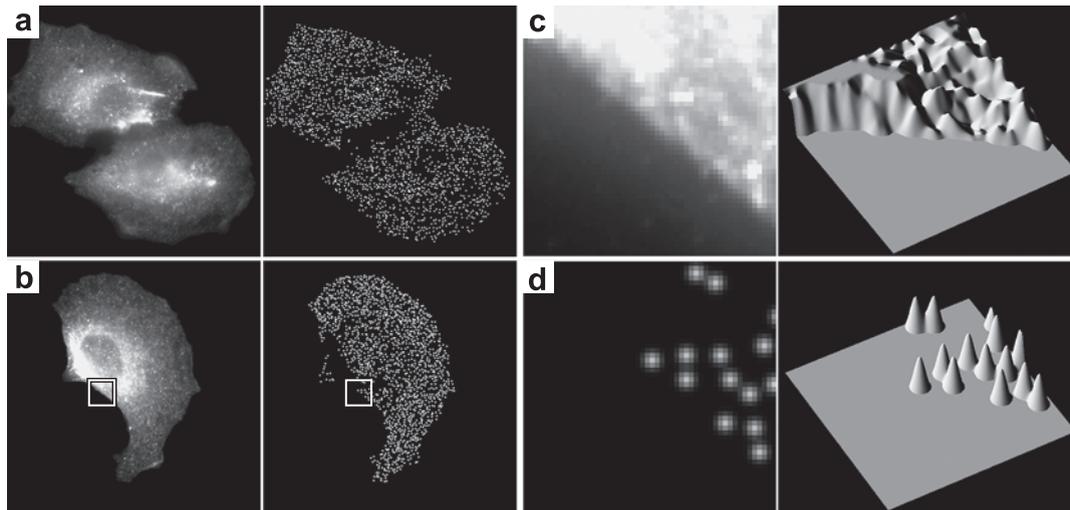


図5 光学顕微鏡画像中の輝点の抽出。(a), (b)の左側は、カペオリンを可視化した蛍光顕微鏡像(原画像, 515×515画素)。それぞれ、右は抽出された輝点の像。(c)は、(b)の左図の矩形領域の拡大。(d)は、(b)の右図の矩形領域の拡大。それぞれの右側に、画素値を高さに変換した図を表す。

とした。実際には、あらかじめ輝点のサイズを実測し、7×1画素とした。これにより、直径が7画素以下の輝点を抽出でき、また近接している場合は、それらが1画素でも離れていれば、それぞれを独立したものとして抽出できる。最終的に輝点は、半径3画素のガウス分布として規格化した。図5bの矩形領域を拡大したものが図5c, dである。図5cが原画像、図5dが抽出された輝点の画像である。それぞれの右側に輝度を高さとして示す。背景の不均一な輝度分布の中から、輝点のみが抽出されていることがわかる。既存の輝点トラッキングシステムなどへの入力に図5dを用いれば、マッチング

のミスなどが低減することが期待でき、より効果的であると考えられる。

5. アクチン系解析：蛋白質複合体の電子顕微鏡画像への応用

筆者らは、精製された蛋白質の電子顕微鏡像の中から、対象蛋白質像をセグメンテーションし、あらかじめ作成された“像の見え方”のデータベース(対象蛋白質の結晶構造から構築された3Dモデルをあらゆる角度で2Dに投影した画像の辞書)とマッチングを行うという画像認識システムを構築

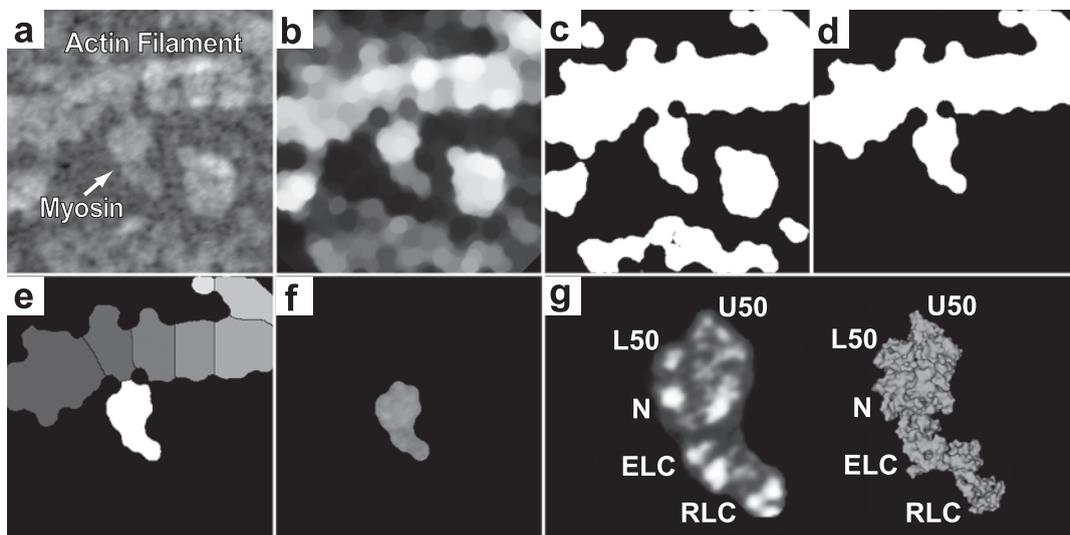


図6 蛋白質複合体への応用。(a)原画像. 337×337画素. 背景を含むアクチンとミオシンの複合体の電子顕微鏡像。(b)平滑化処理。(c)2値化処理。(d)複合体の領域の抽出。(e)複合体領域のセグメンテーション。(f)ミオシンの領域の抽出。(g)構造特徴(サブドメイン)を強調したミオシン像(左)と対応するモデル像(右)。主要なサブドメインを図中に示す。それぞれ、U50 (L50), upper (lower) 50-kD subdomain, Nは、NH₂-terminal barrel, ELC (RLC)はessential light chain (regulatory light chain)。

した²⁾. ここでは、機能中の分子モーター蛋白質複合体（アクチン、ミオシン）を急速凍結ディープエッチレプリカ法で捉えた画像を対象に解析を行った例を示す. まず、原画像（図 6a, 337×337 画素）から、アクトミオシンの複合体を抽出し、次に、複合体からのミオシン分子像のみをセグメンテーションする. このため、まず、原画像を平滑化処理し（図 6b, SF による. 構造要素は直径 21 画素の円盤）、その後、自動閾値処理⁹⁾により 2 値化した（図 6c）.

その後、最大の面積をもつ領域（すなわち複合体の領域）のみを残し、あとは削除した（図 6d）. その画像に Watershed 変換¹⁰⁾を施すことにより、複合体の領域を複数の断片にセグメンテーションした（図 6e）. 各セグメントは、それぞれ異なる濃淡値で表している（ラベル処理）. この中から、ミオシンの領域を選択し、その部分をマスクとして、原画像からミオシン像を抽出した（図 6f）. この画像を、ミオシン分子のさまざまな状態の結晶構造と比較し、最もよく合致する 3D 構造とその投影角の推定を行う. ただ、今回解析したのはアクチンの滑り運動を起こしつつある反応中間体の一瞬の構造であり、その結晶構造は得られていない. そこで、既存の結晶構造をサブドメイン単位に分割し、それらの構成部品を、電子顕微鏡像にマッチングさせ、全体として 3 次元的に合致するモデルを再構築した（未発表データ）. モデル像との照合には、ミオシンのレプリカ像そのものは用いず、分子内サブドメインで構成される構造パターン抽出した特徴画像を用いた（図 6g 左側）. 構造パターンは、レプリカ像の空間分解能を考慮し、1 辺が 2 nm の正方形を構造要素として TH によって抽出した. 図 6g の右側は、最もよく合致する原子モデルの像である. 原子モデル像との対応により、ミオシンのサブドメイン配置の同定まで可能となった.

構造パターンを抽出した TH は、4 章で輝点を抽出したフィルタと同じである. 様々な大きさや形状の異なる抽出対象物でも、構造要素を変更することにより同じ手続きで抽出が可

能であることがわかる. これは、周波数選択型の線形フィルタでは実現困難な処理であり、また、このような汎用的特徴は、ロバストなフィルタリングアルゴリズムの創出を支えている.

6. おわりに

本稿では、モルフォロジーの基礎演算から、バイオイメージに適すよう拡張した IRMM 演算について説明した. そして、光学顕微鏡の輝点抽出、電子顕微鏡の蛋白質複合体に適用した例を示した. 数学的基盤に裏打ちされた本画像処理理論では、フィルタの設計、処理結果の解釈などに対して客観的な議論が可能となる. 解析対象のかたちを定量的に取り扱い、ノイズに埋もれた情報を顕に提示する本演算法は、今後ますます必要になるとと思われる.

文 献

- 1) Serra, J.: *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Academic Press, London, (1982)
- 2) Kimori, Y., Oguchi, Y., Ichise, N, *et al.*: *Ultramicroscopy*, 107, 25–39 (2007)
- 3) Beare, R.: *IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 28, 1063–1074 (2006)
- 4) Angulo, J. and Serra, J.: *Bioinformatics*, 19, 553–562 (2003)
- 5) 「回転式モルフォロジーフィルタ及びそれを用いた画像処理法」出願番号：2006-280441
- 6) Maragos, P. and Schafer, R.W.: *IEEE Trans. Acoust. Speech Signal Process.*, 35, 1153–1184 (1987)
- 7) Schulze, M.A. and Pearce, J.A.: *Proc. of IEEE. Int. Conf. on Acoustics Speech and Signal Processing*, 1993, Vol. 5, p. 57
- 8) Cheezum, M.K., Walker, W.F. and Guilford, W.H.: *Biophys. J.*, 81, 2378–2388 (2001)
- 9) Otsu, N.: *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, 9, 62–66 (1979)
- 10) Mayer, F. and Vachier, C.: *Math. Morphology, proc. 6th Int. Symp.*, 2002, p. 69