

深層ニューラルネットワーク を用いた多焦点顕微鏡の リアルタイム3次元局在化

有竹 俊光¹, 日野 英逸², 並木 繁行³
浅沼 大祐³, 廣瀬 謙造³, 村田 昇⁴

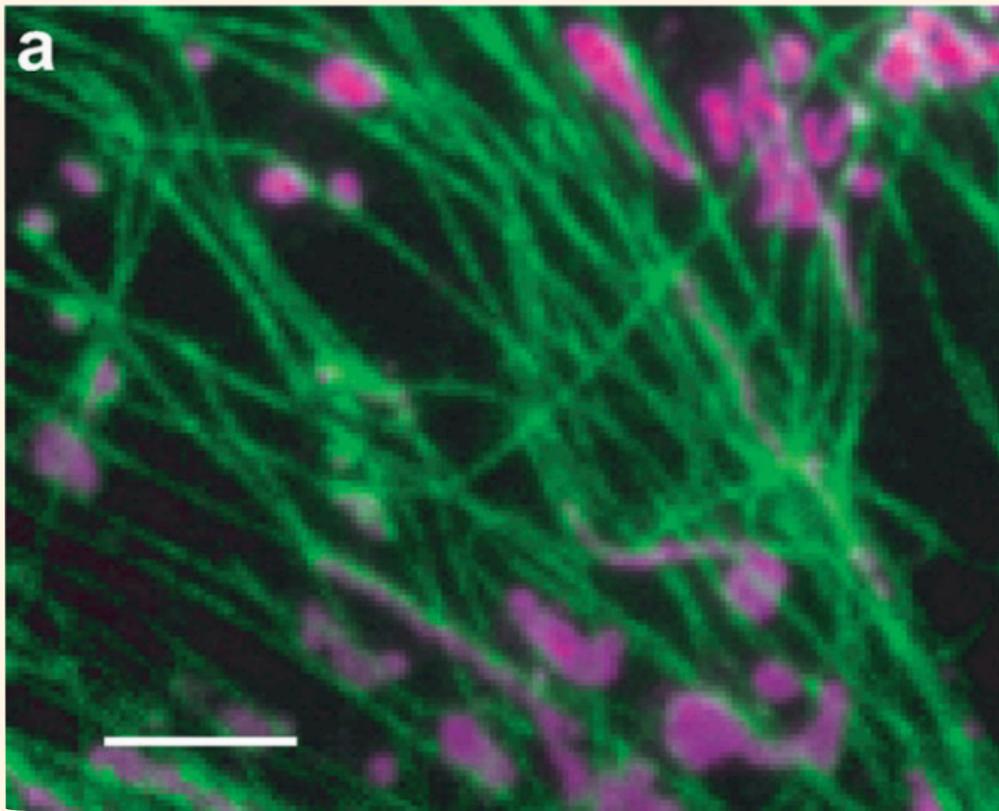
¹早稲田大学先進理工学研究科, ²統計数理研究所

³東京大学大学院医学系研究科, ⁴早稲田大学理工学術院

情報論的学習理論と機械学習研究会 (IBISML)

2020/01/10

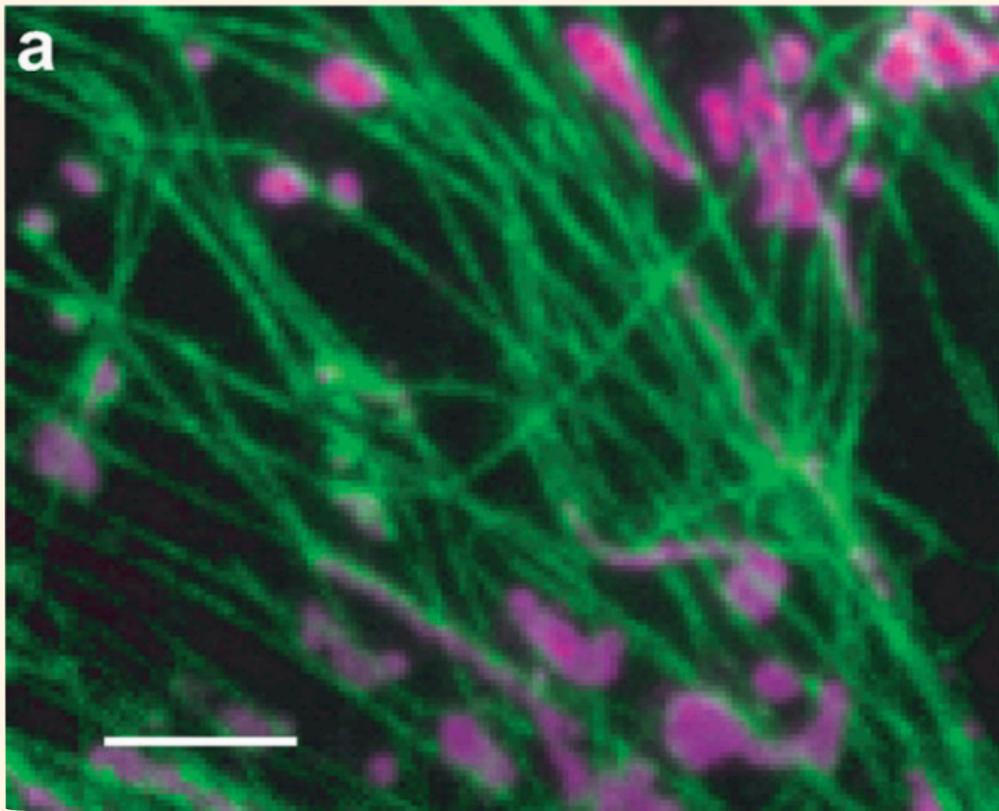
背景：蛍光顕微鏡



Huang et al, Nature Methods, 2008

- 生物試料の細胞内構造の観測に広く使われている
- 観測対象試料に添加した蛍光体にレーザーを照射して発せられる蛍光をレンズで観測する

背景：蛍光顕微鏡

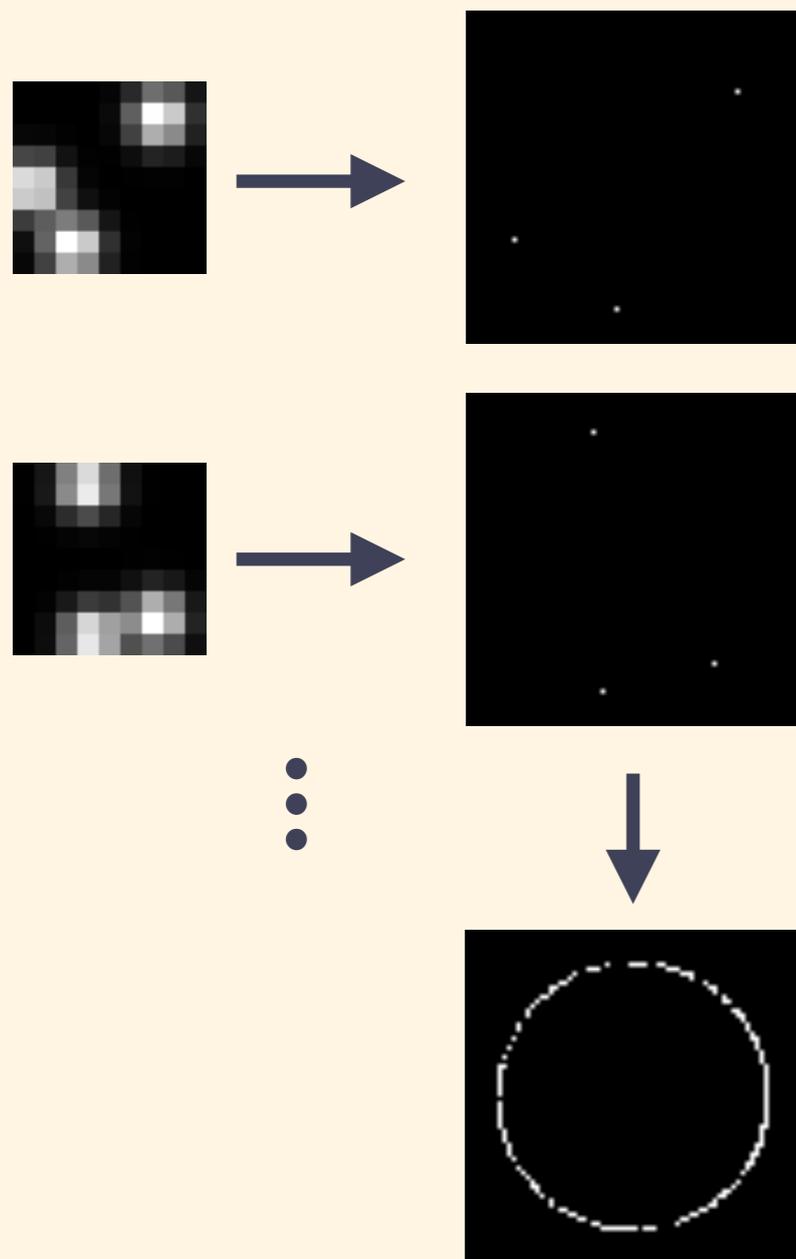


Huang et al, Nature Methods, 2008

- レンズで光を観察するとき解像度の限界が存在する（回折限界）
- 最大でも水平方向に200 nm 深さ方向に500 nm程度の解像度しか実現できない
- 細胞内のナノスケールの構造を観察することができない

背景：1分子局在顕微鏡法

(Single molecule localization microscopy ; SMLM)

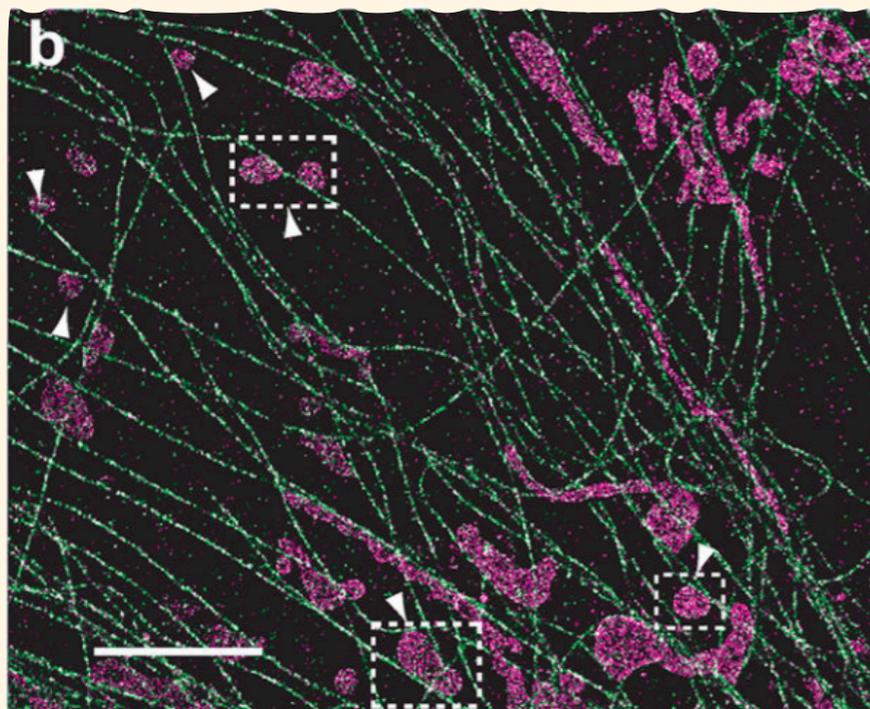
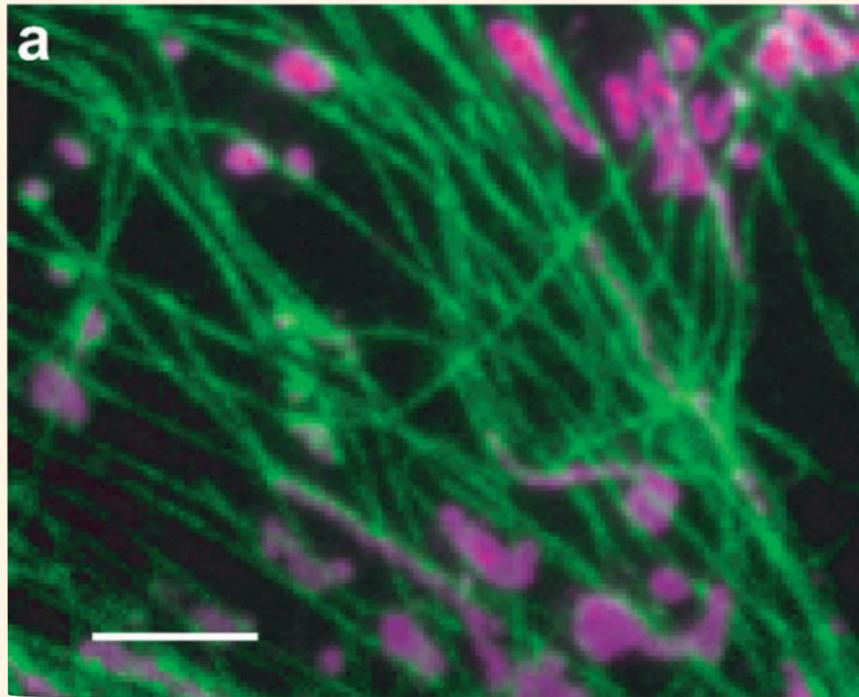


広く使われる超解像顕微鏡法の1つ

- 同時に少数の分子だけが発光するように発光を制御し蛍光分子の位置を推定（Gaussian Fitting等）
- 多数のフレームから得られた推定結果を重ね合わせて高解像度画像を得る

背景：1分子局在顕微鏡法

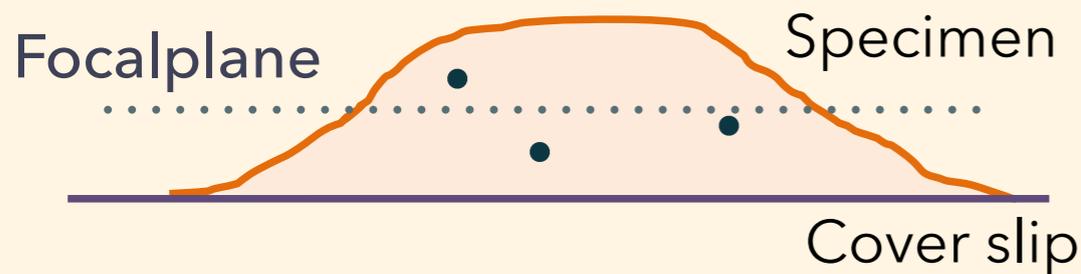
(Single molecule localization microscopy ; SMLM)



広く使われる超解像顕微鏡法の1つ

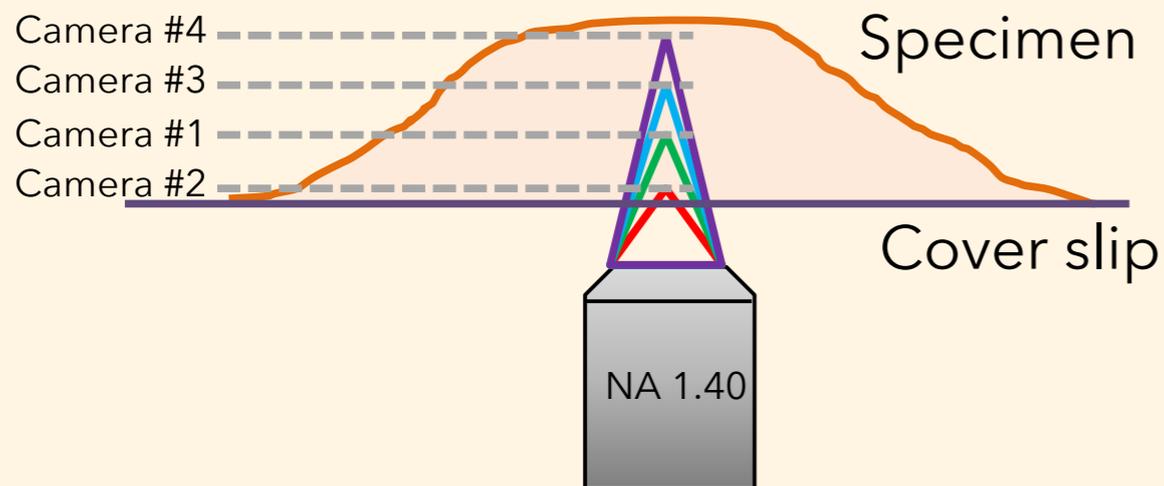
- 同時に少数の分子だけが発光するように発光を制御し蛍光分子の位置を推定 (Gaussian Fitting等)
- 多数のフレームから得られた推定結果を重ね合わせて高解像度画像を得る

背景：3次元分子局在

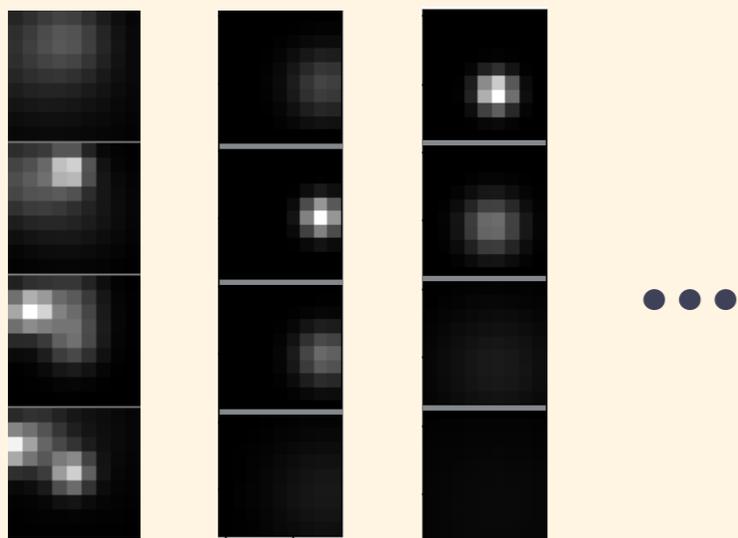


- 生物試料の多くは厚みをもつので試料の3次元構造を観察したい
- 観測される蛍光の形状の違いから深さ方向の分子位置を推定する
- 単一の焦点から深さ方向の分子位置を推定するには限界がある

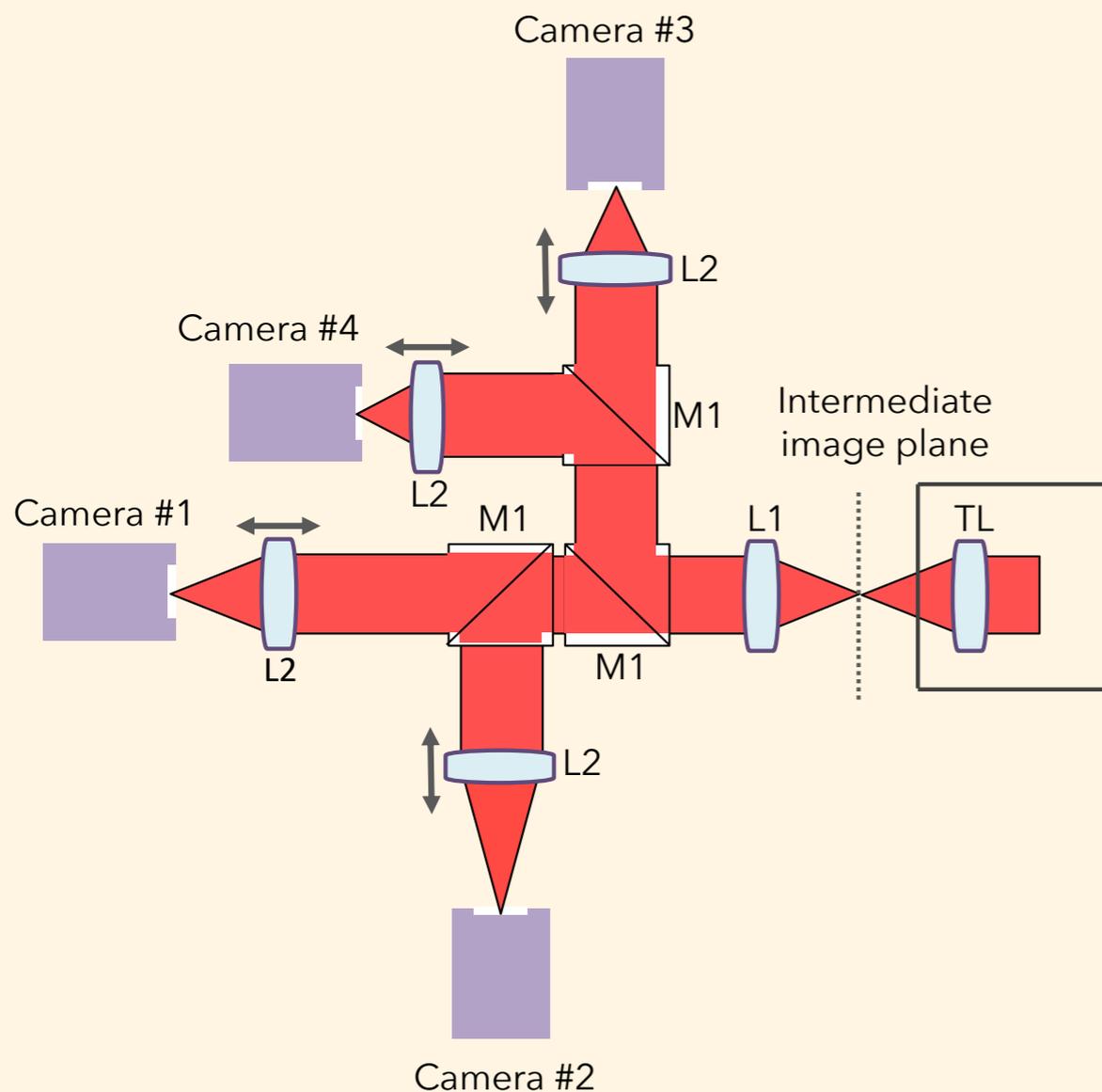
多焦点顕微鏡を利用した 3次元SMLM



- カメラを増やしてSMLMを深さ方向に拡張
- 4台のカメラがそれぞれ異なる焦点面で蛍光を同時に観測
- 4つの面で観測される蛍光の広がり方の違いを用いて分子の深さを推定



多焦点顕微鏡を利用した 3次元SMLM

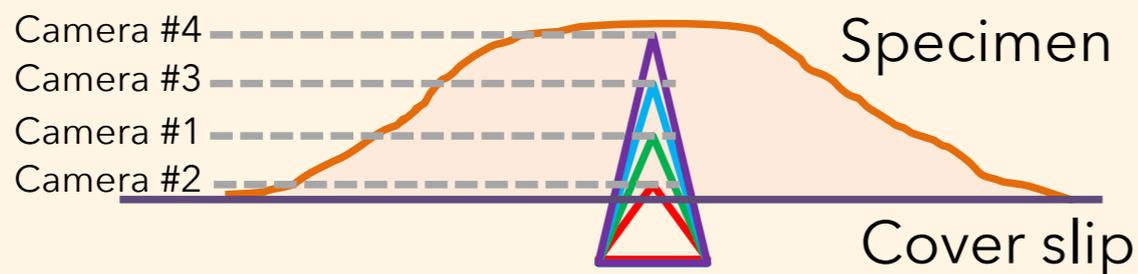


- カメラを増やしてSMLMを深さ方向に拡張
- 4台のカメラがそれぞれ異なる焦点面で蛍光を同時に観測
- 4つの面で観測される蛍光の広がり方の違いを用いて分子の深さを推定

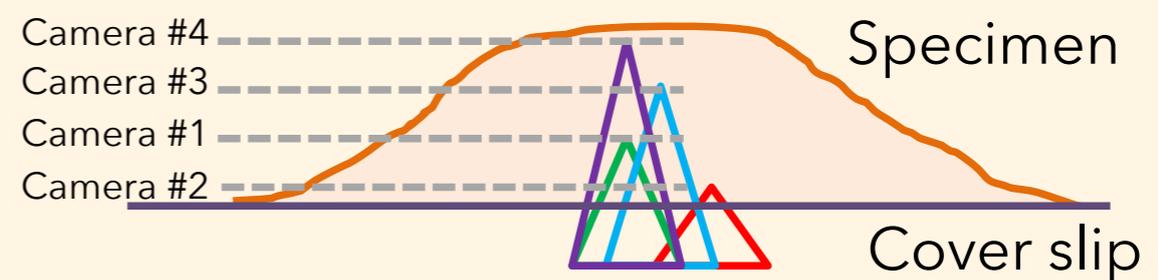
多焦点顕微鏡を用いた SMLMの問題点

各焦点を観測するカメラに微小な水平位置ずれが生じる

- 焦点面ごとに座標が一致しないため
分子位置推定の精度が低下する
- 位置ずれ量は観測画像の1ピクセル未満で
観測データ自体の補正が困難
- ずれの量は未知で観測から推定する必要がある



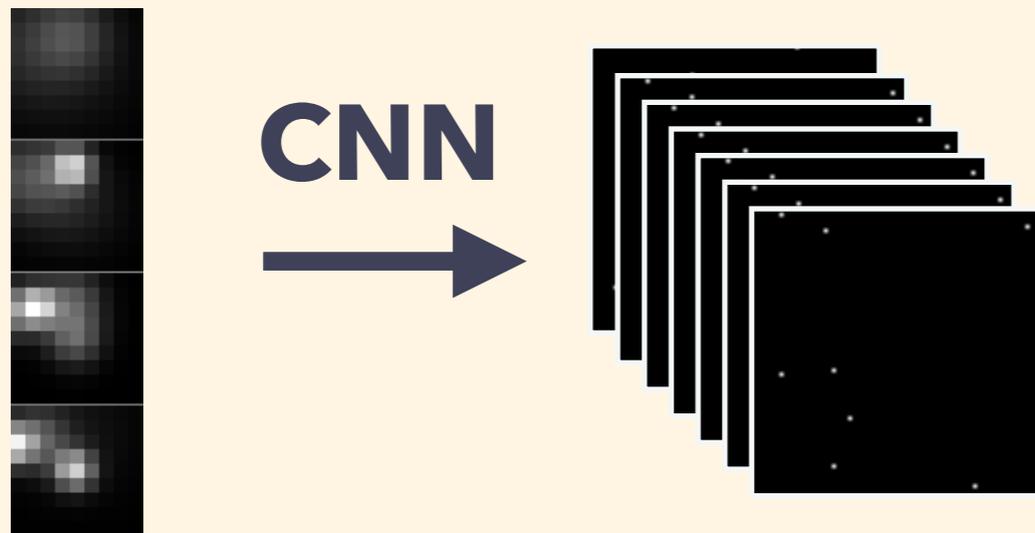
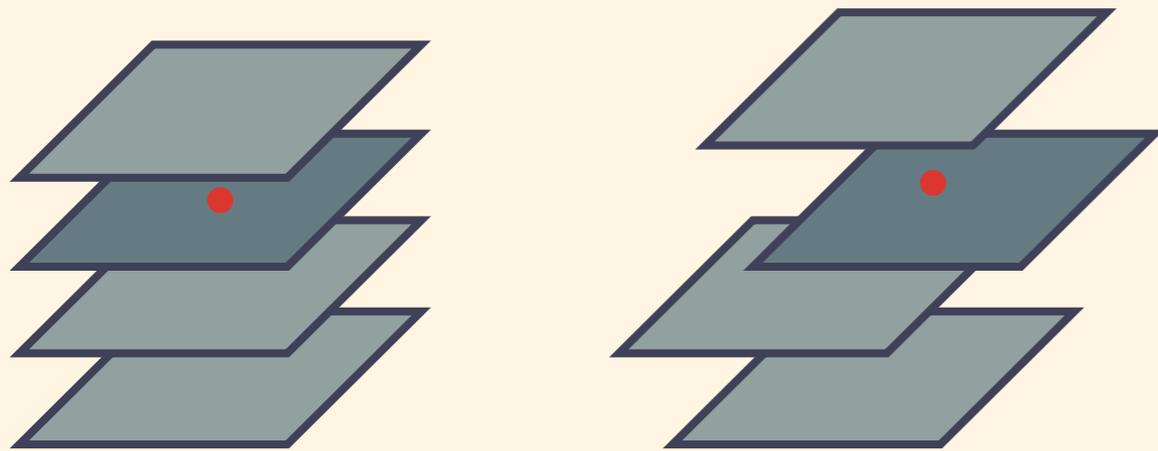
カメラ位置ずれなし



カメラ位置ずれあり

研究目的

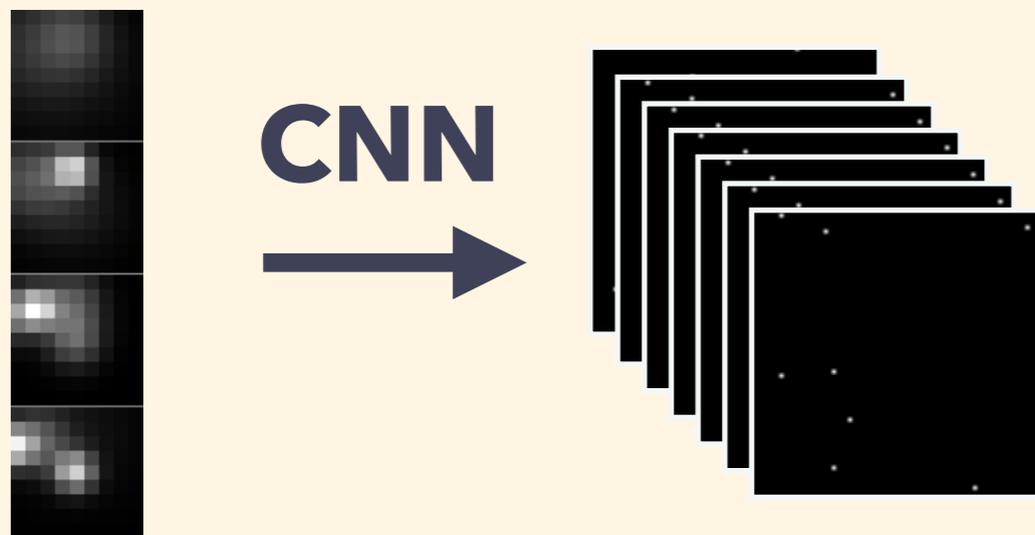
多焦点顕微鏡のためのカメラの位置ずれに頑健かつ効率的な分子位置推定法の提案



1. カメラ位置のずれ推定と分子位置推定を圧縮センシングの問題として定式化
2. カメラの位置ずれに頑健かつ効率的な分子位置推定を行うために畳み込みニューラルネットワーク(CNN)を用いる

研究目的

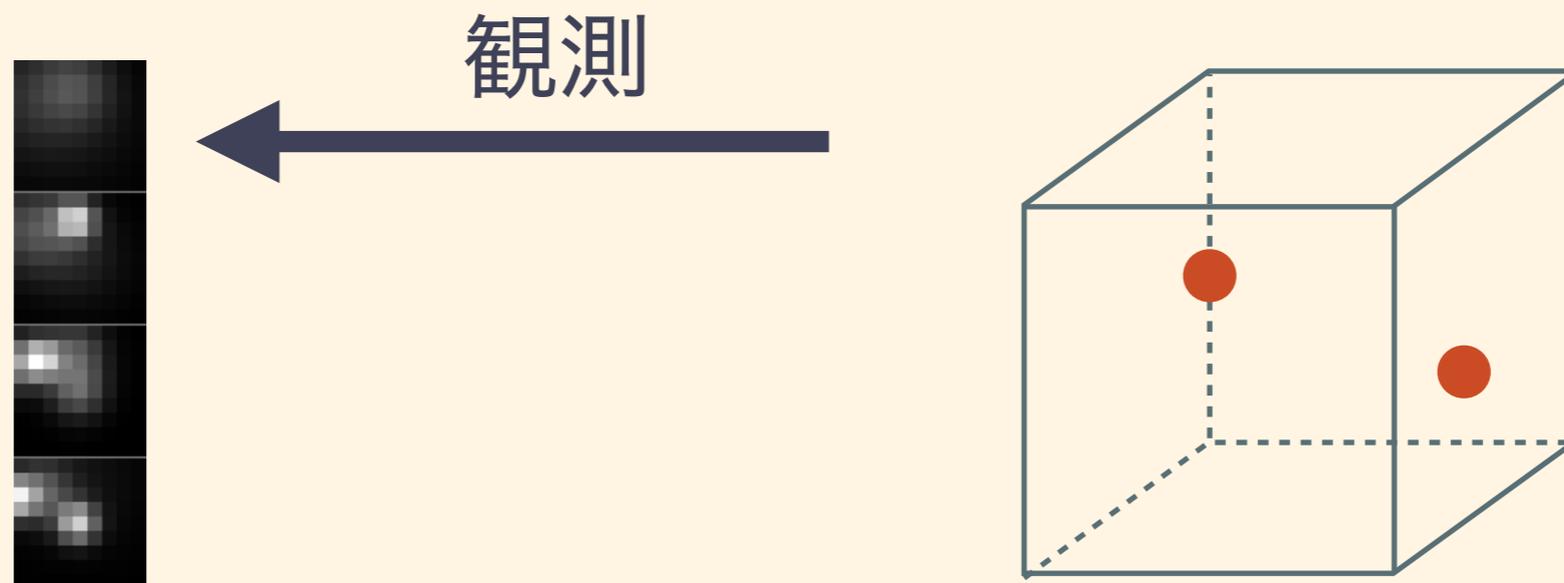
多焦点顕微鏡のためのカメラの位置ずれに頑健かつ効率的な分子位置推定法の提案



- カメラの位置ずれを考慮した学習データの生成により位置ずれに頑健な分子位置推定ネットワークを学習する
- 学習済みモデルを用いた推論は高速かつ顕微鏡の撮影画像をリアルタイムに処理可能

分子位置推定問題

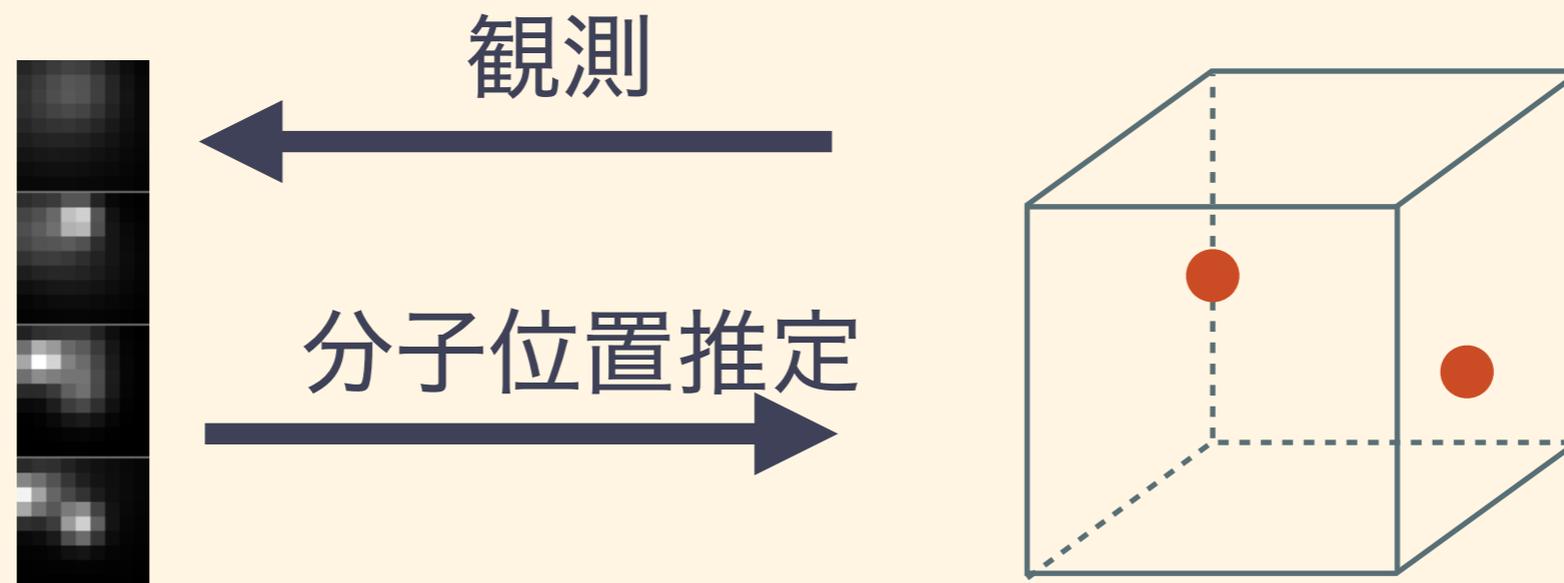
- 実データの分子位置は正解がわからない
- 観測過程を近似する関数を定義
 - ぼけ（光学系に依存）
 - ダウンサンプリング
 - カメラ位置ずれ



分子位置推定問題

分子位置推定は観測過程の逆を求めることに相当する

- 観測過程を近似する関数により人工的な観測画像を生成
- 人工的な観測画像から分子位置推定を行う
アルゴリズムを構築
- アルゴリズムを実データに適用して
実データの分子位置推定結果を得る

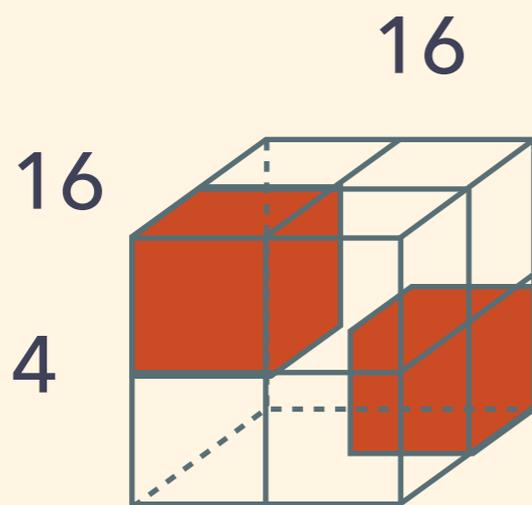


分子位置推定問題

分子位置推定は観測過程の逆を求めることに相当する

- 分子位置はボクセル状に分割した粒度で扱う
- 観測画像はより荒い粒度で分割されたボクセルにおける観測値とみなせる

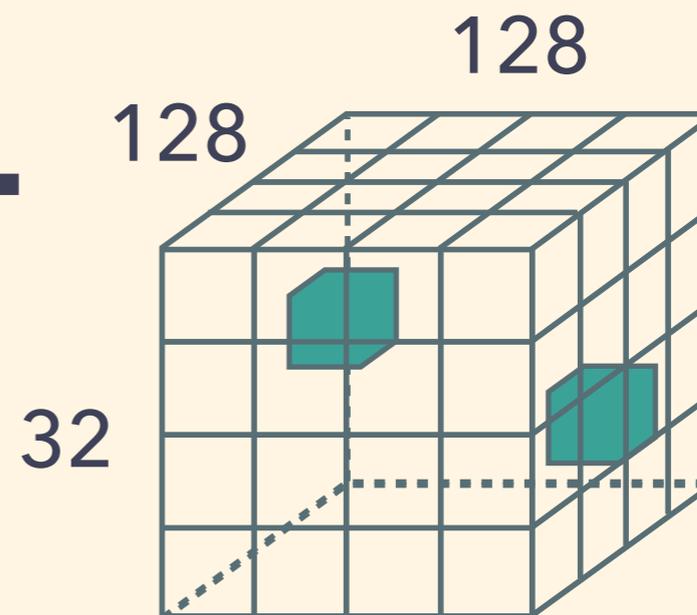
低解像度画像



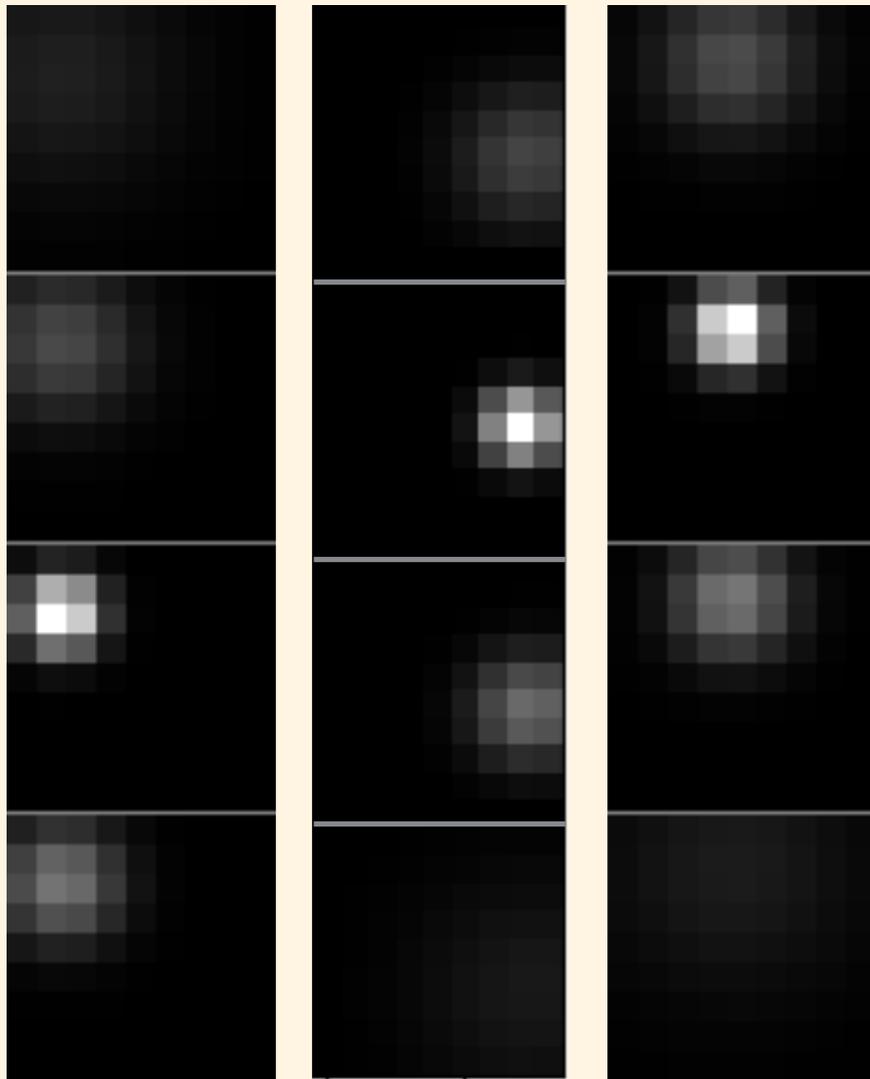
観測

分子位置推定

高解像度画像



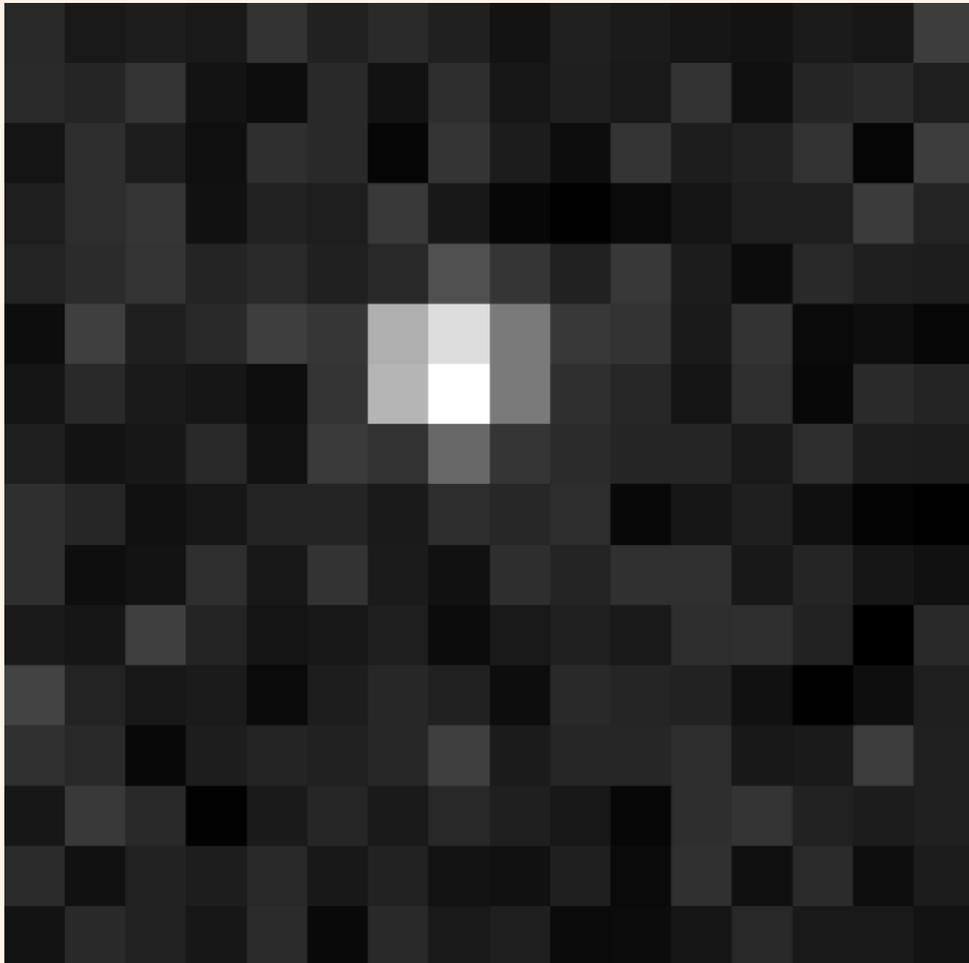
観測過程



Point Spread Function (PSF)
によって分子から計測される蛍光の
広がりが近似される

- 蛍光はガウス関数状に広がる
- 分子の深さ方向の位置が変わると
各面での蛍光の幅が変わる
- PSFの値は $16 \times 16 \times 4$ 点のみで
計算される

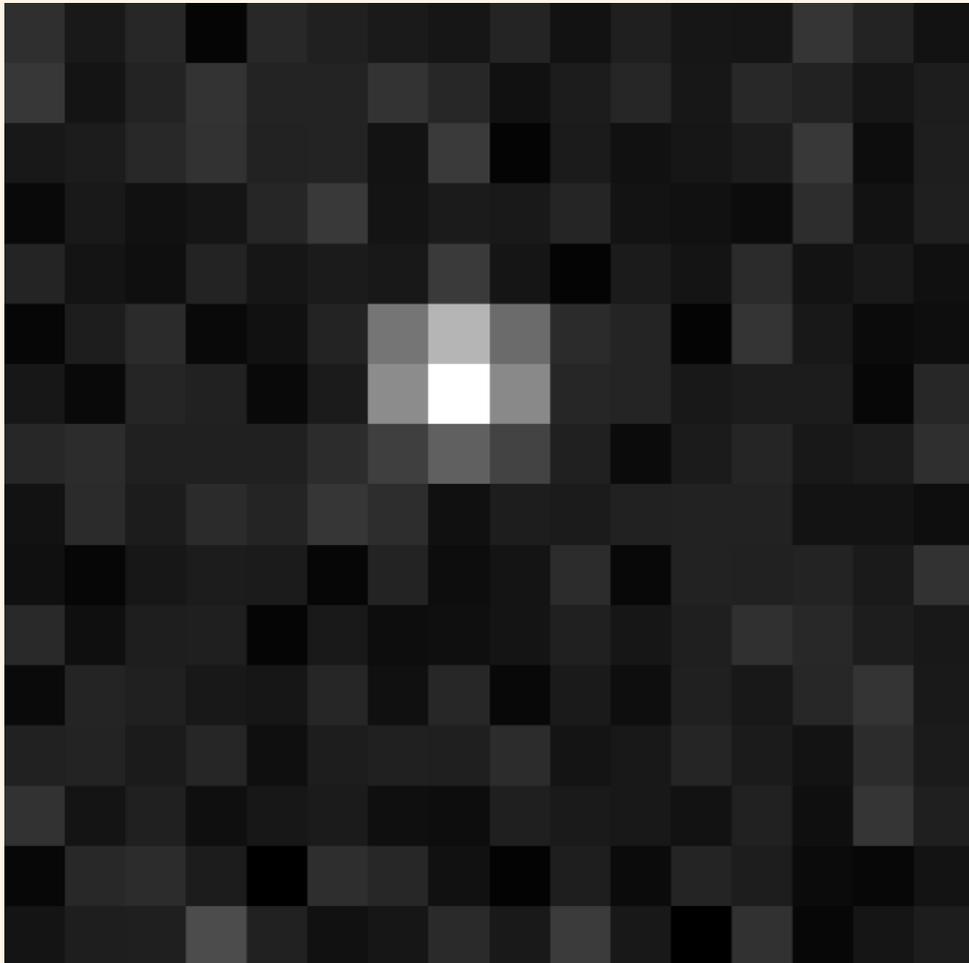
観測過程



Point Spread Function (PSF)
によって分子から計測される蛍光の
広がりが近似される

- サブピクセルレベルでカメラの位置が変わると各ピクセルの輝度値がわずかに変わる

観測過程



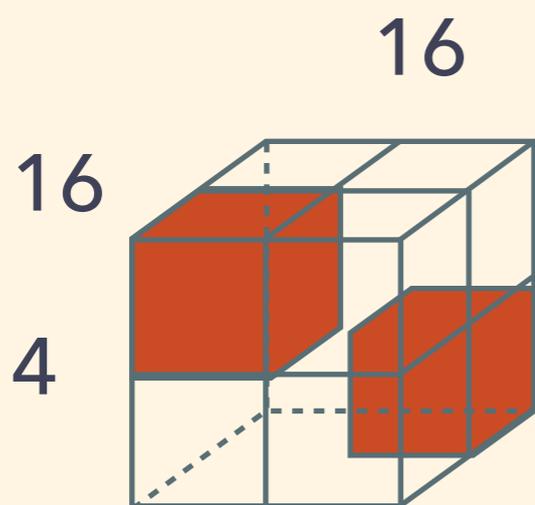
Point Spread Function (PSF)
によって分子から計測される蛍光の
広がりが近似される

- サブピクセルレベルでカメラの位置が変わるとPSFを計算する座標が変わる
- 各ピクセルの輝度値がわずかに変わる

畳み込みニューラル ネットワーク (CNN)

- 観測過程のぼけの除去 + アップサンプリングを行う
 - 今回は水平, 深さ方向ともに解像度を8倍にする
 - 自然画像の超解像と同様の構造をもったネットワークを利用
- 高解像の各ボクセルで分子の存在確率を推定する
 - 輝度値によらず分子が存在するか否かを推定する2値分類問題

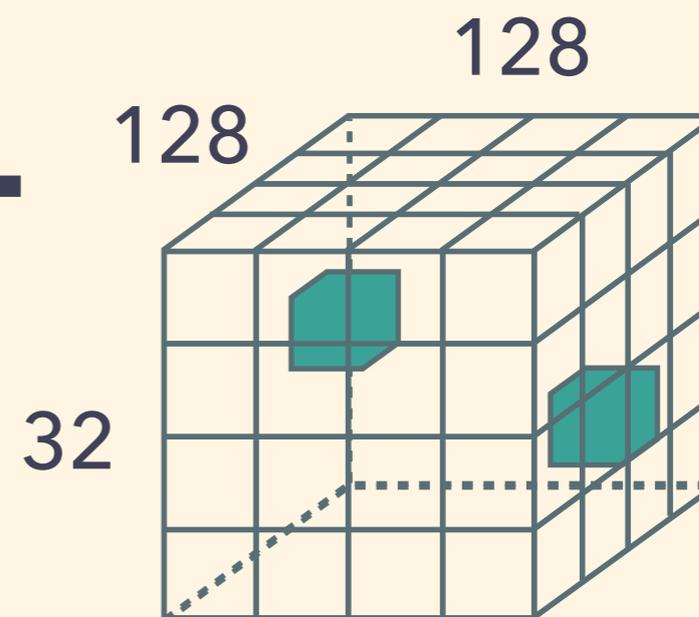
低解像度画像



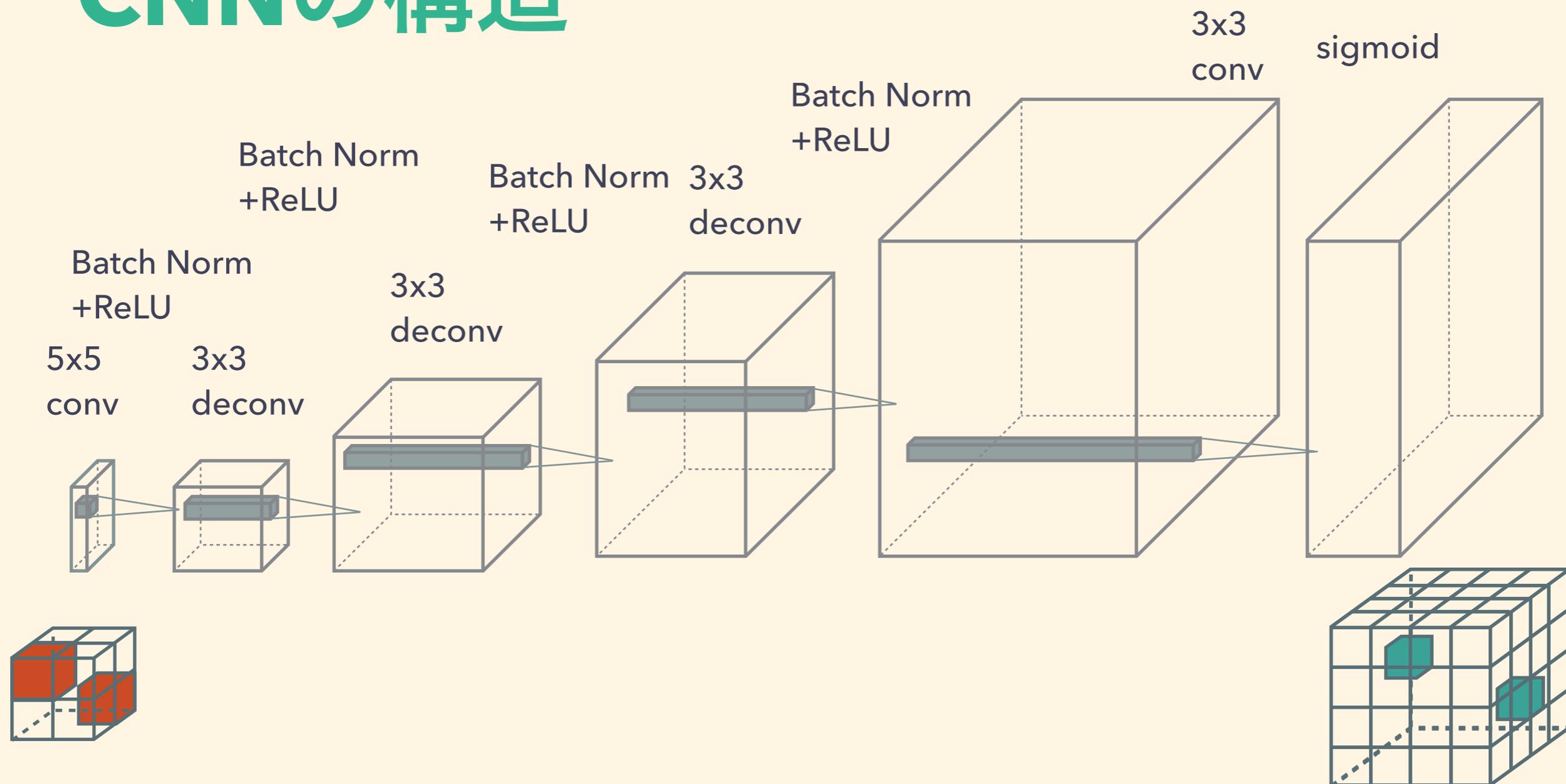
観測

分子位置推定

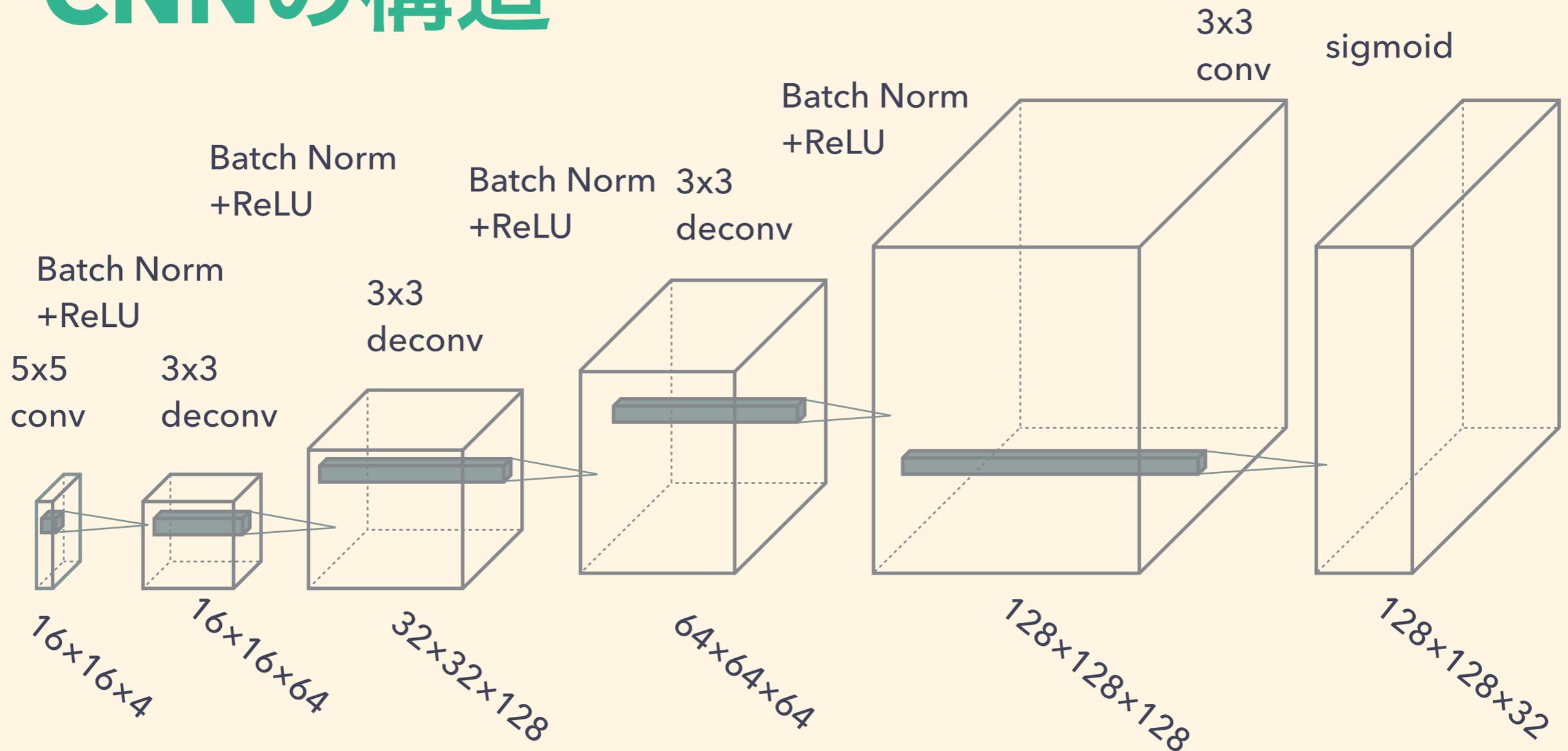
高解像度画像



CNNの構造

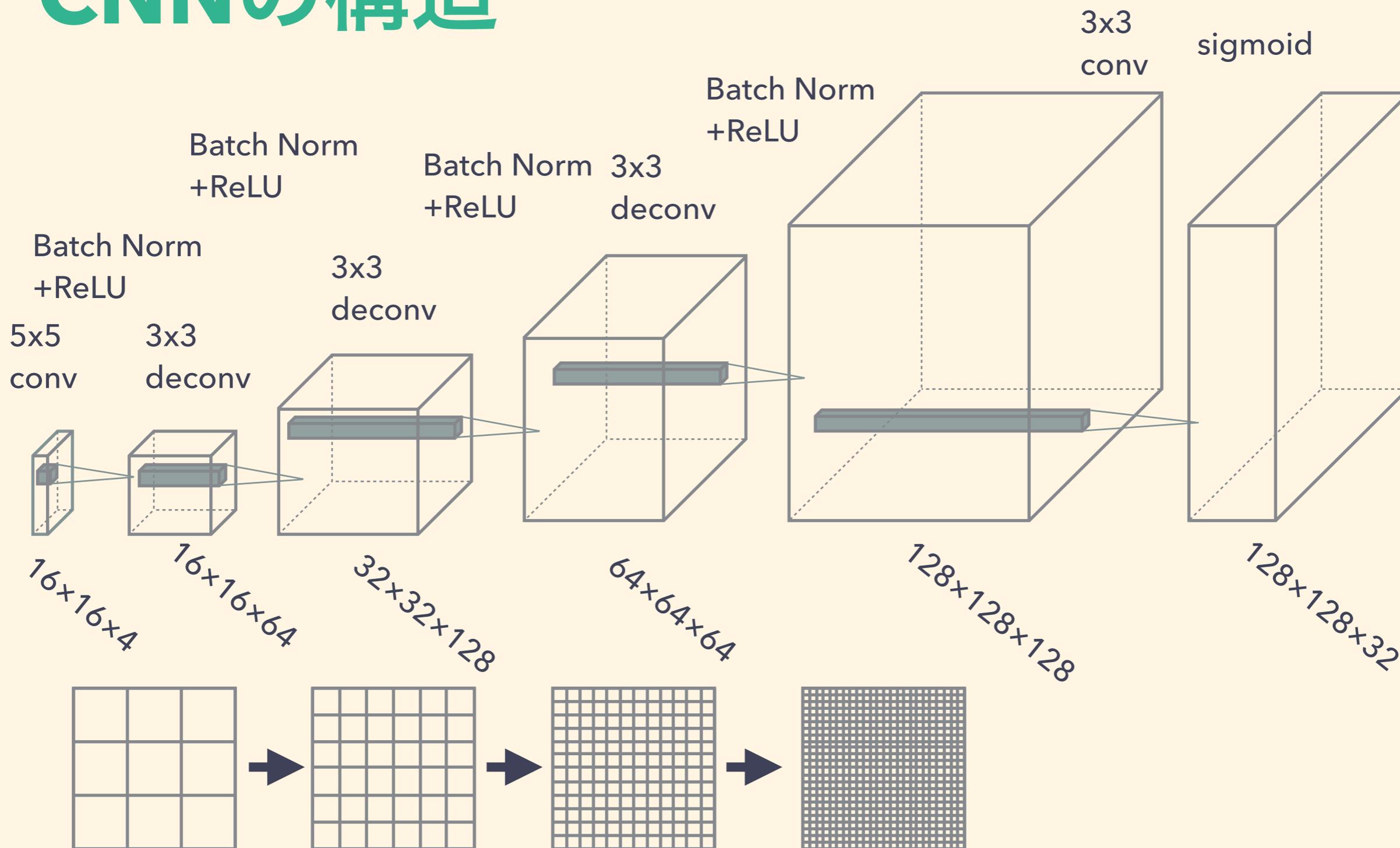


CNNの構造



- Convolutionによって近傍の特徴を抽出
- 中間層ではDeconvolutionによって水平方向の空間解像度をあげながら特徴抽出を行う
- 最終層でsigmoid関数を用いて分子存在確率を出力

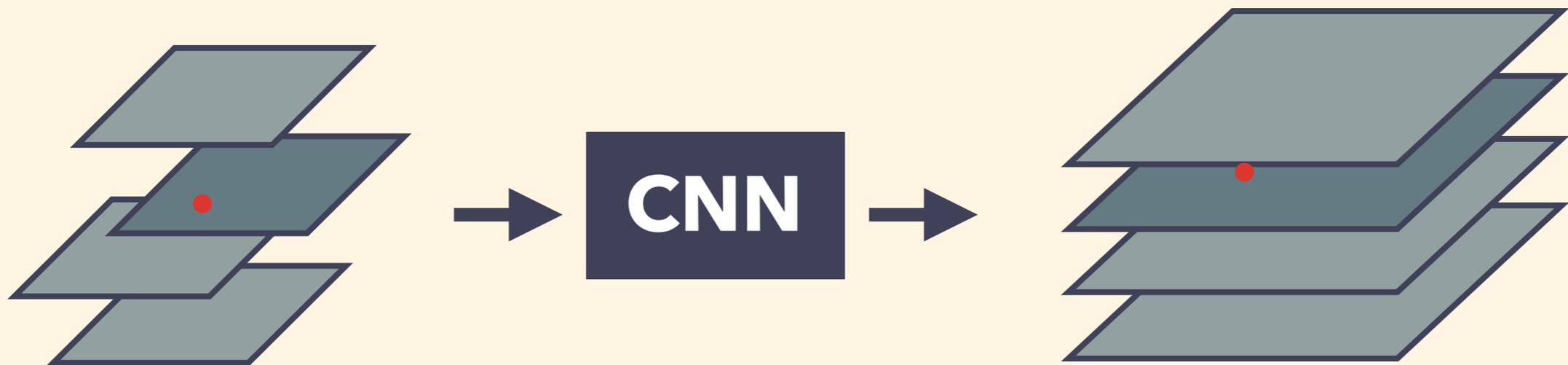
CNNの構造



- 深さ方向の解像度はチャンネル数を変えることで上げる

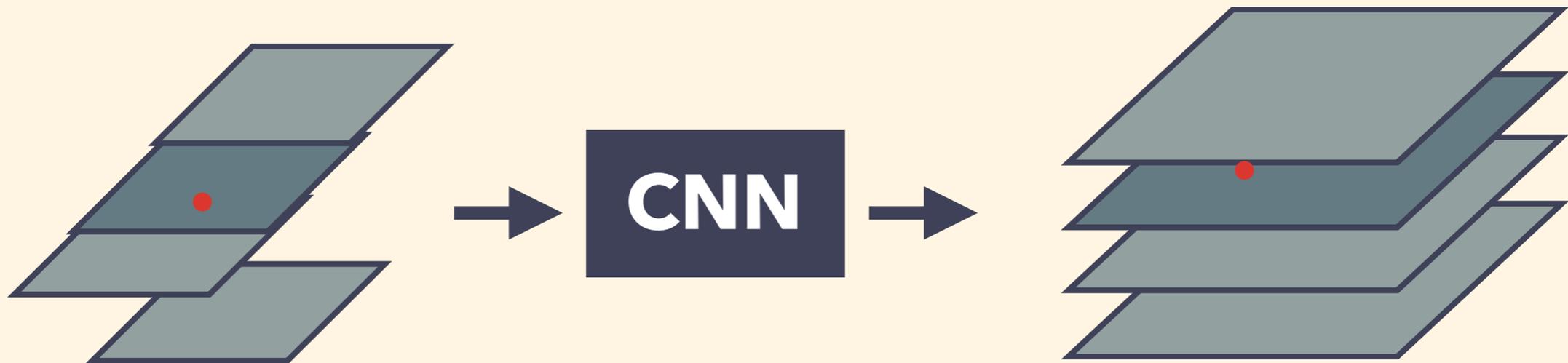
カメラの水平位置ずれ に頑健なCNNの学習

- 学習データとして様々な観測位置の水平ずれを含む人工データを利用する
データごとにランダムな高解像 ± 2 pixelまでのずれを想定
- カメラ位置の水平ずれによらず精度良く分子位置推定ができるようにネットワークを学習する



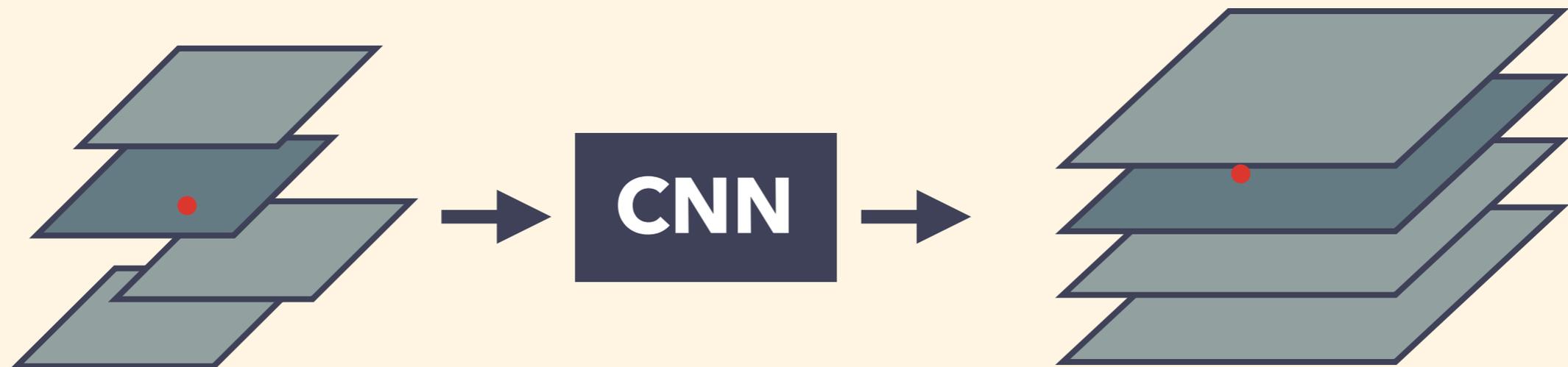
カメラの水平位置ずれ に頑健なCNNの学習

- 学習データとして様々な観測位置の水平ずれを含む人工データを利用する
データごとにランダムな高解像 ± 2 pixelまでのずれを想定
- カメラ位置の水平ずれによらず精度良く分子位置推定ができるようにネットワークを学習する



カメラの水平位置ずれ に頑健なCNNの学習

- 学習データとして様々な観測位置の水平ずれを含む人工データを利用する
データごとにランダムな高解像 ± 2 pixelまでのずれを想定
- カメラ位置の水平ずれによらず精度良く分子位置推定ができるようにネットワークを学習する



ネットワークの学習

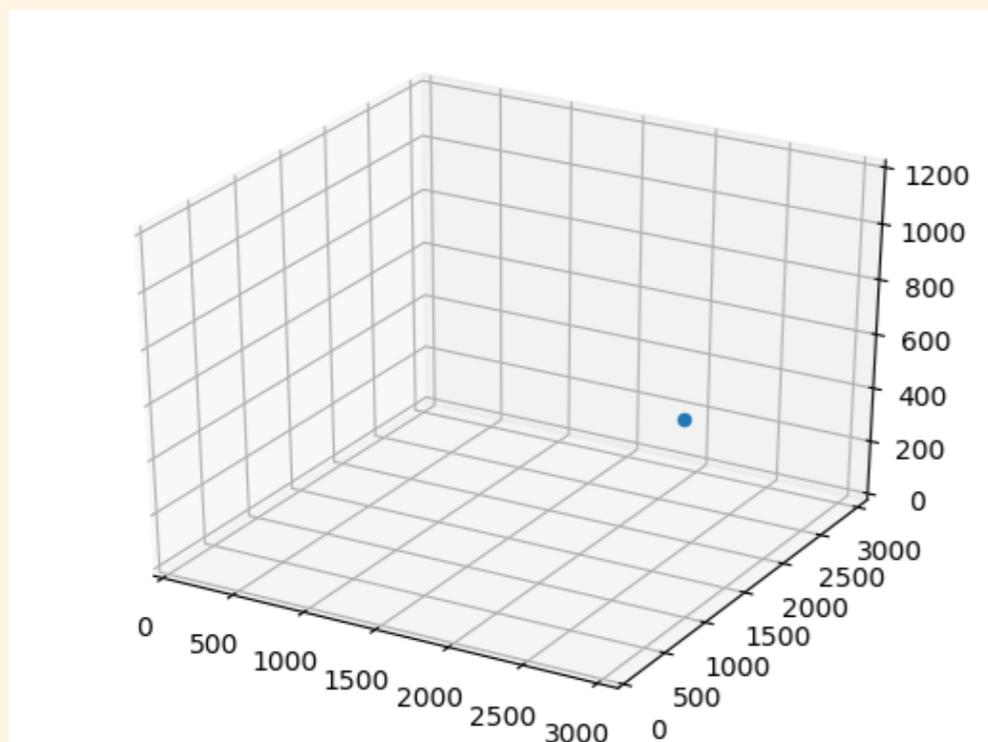
- 学習データ数：90000, テストデータ数：10000
- 空間中の分子数：3

- ロス関数：Binary Cross Entropy Loss

$$\ell(x, y) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N - \{y_n \log x_n + (1 - y_n) \log(1 - x_n)\}$$

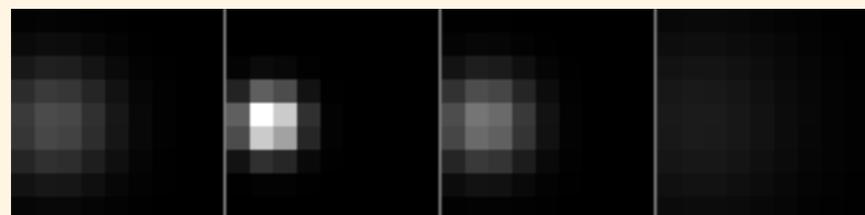
- 解像度：192nm×192nm×400nm/voxel
→24nm×24nm×50nm/voxel
- 最適化手法: Adam (初期学習率 1.0×10^{-3}), 30 epoch

実験：人工データ

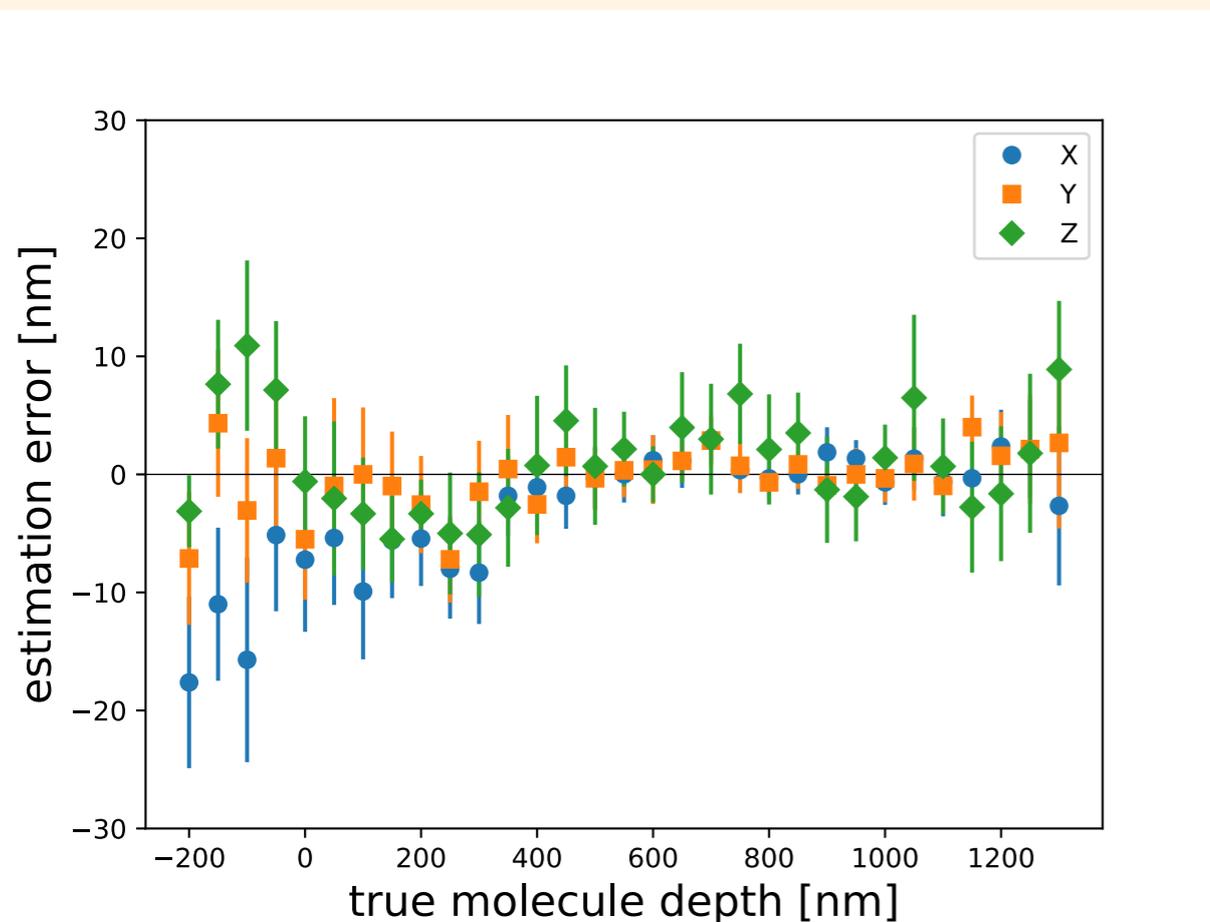


- 空間内に分子を1つだけ置いた人工データを作成
- ネットワークの出力が最大値をとるボクセルに分子が存在すると推定
- 推定した分子位置と真の分子位置の誤差を評価

CNN ↑ ↓ PSF

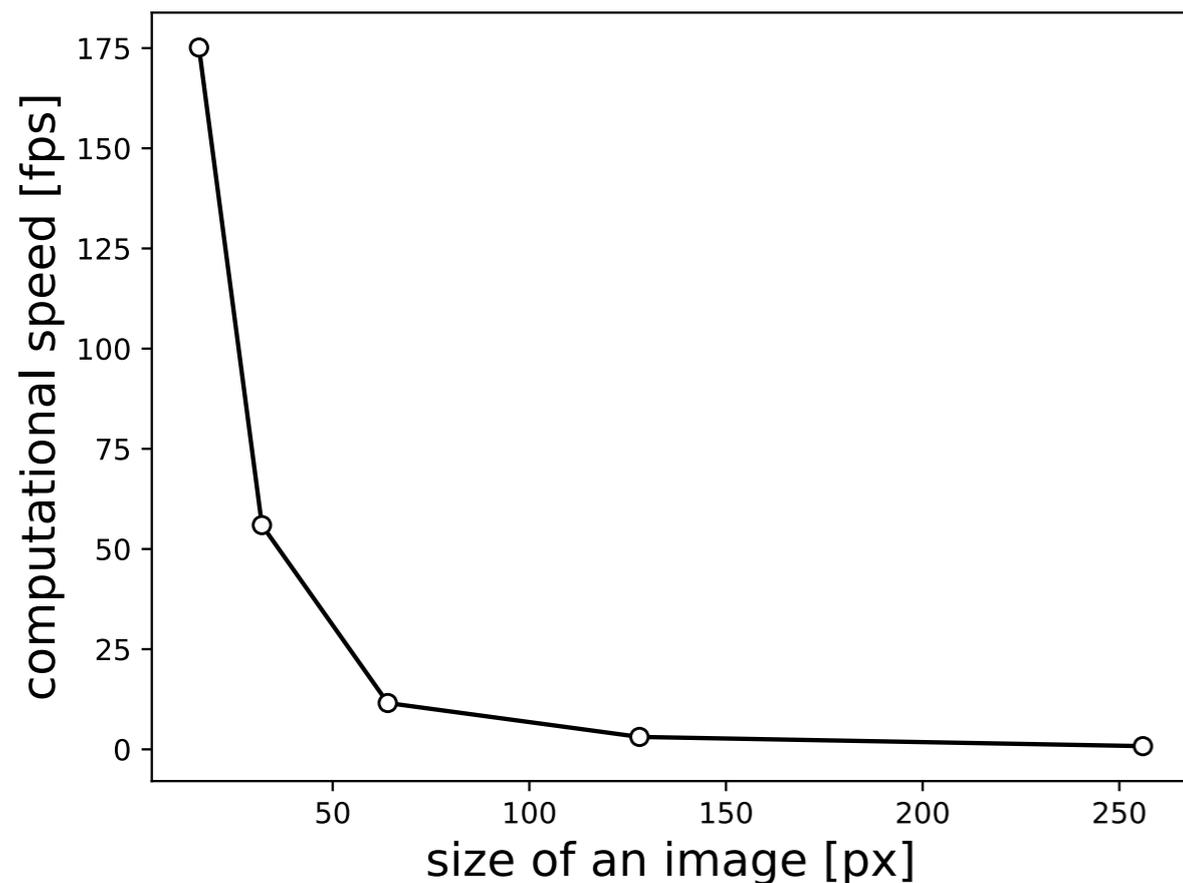


結果：位置推定精度



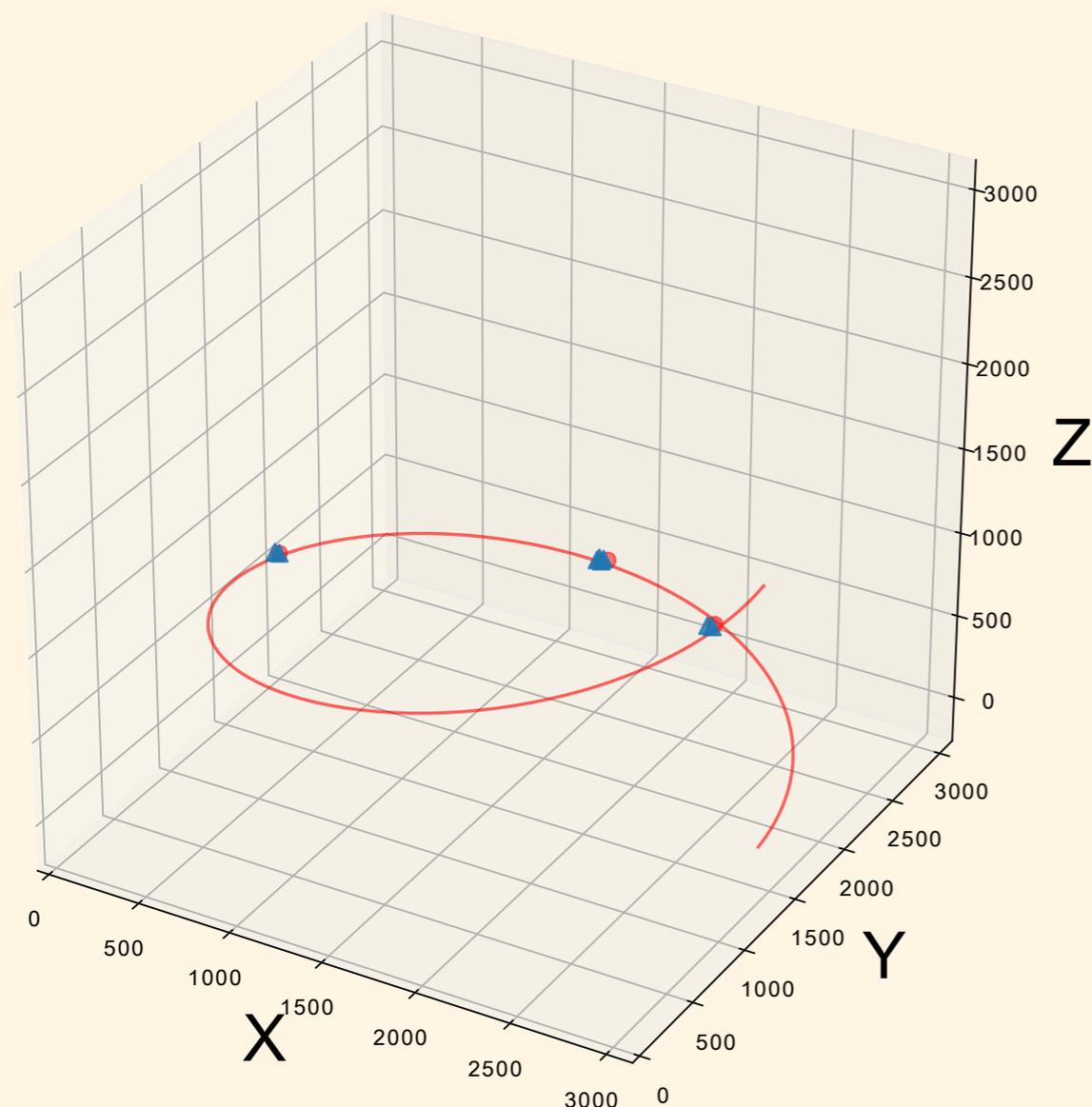
- 真の分子位置の深さごとに水平，深さ方向の位置推定精度を評価
- 深さによらず平均的に1ピクセルずれない精度で分子位置の推定が可能

結果：推定速度



- 画像サイズを $16 \times 16 \times 4$
 $32 \times 32 \times 4$, $64 \times 64 \times 4 \dots$ と
変化させた場合の処理速度
(frame per second)
- 処理速度は画像の
ピクセル数に反比例
- 顕微鏡の撮影速度は約50fps
- 顕微鏡が広域を撮影する場合はさらなる速度向上が課題

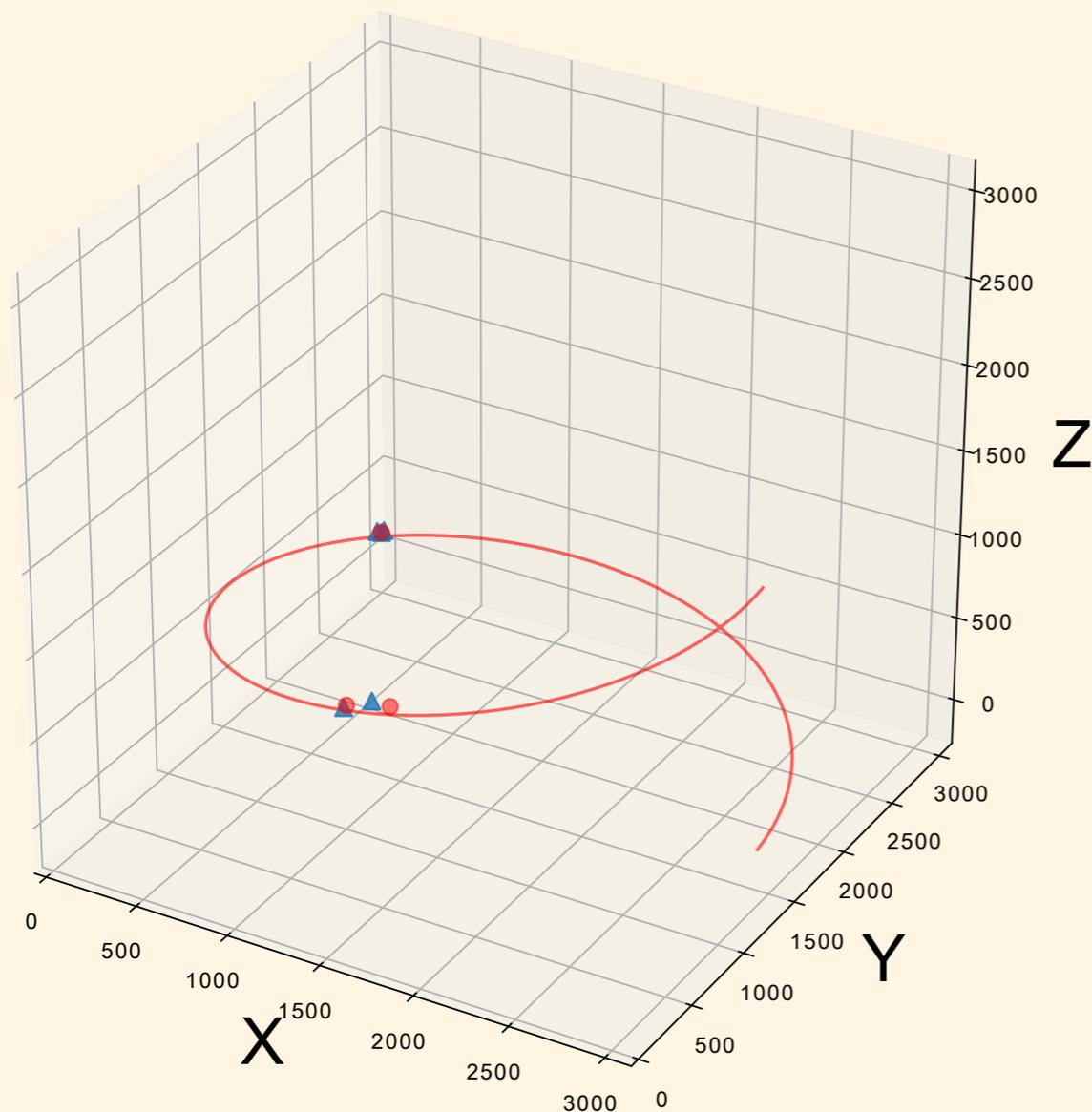
結果：複数分子の位置推定



- ▲ 推定位置
- 真の分子位置

- 赤い線の上の点をランダムに3点サンプリングし観測画像を生成
- ネットワークの出力が0.05を超える点に分子が存在すると推定
- 分子同士が離れている場合は正しく位置推定が可能

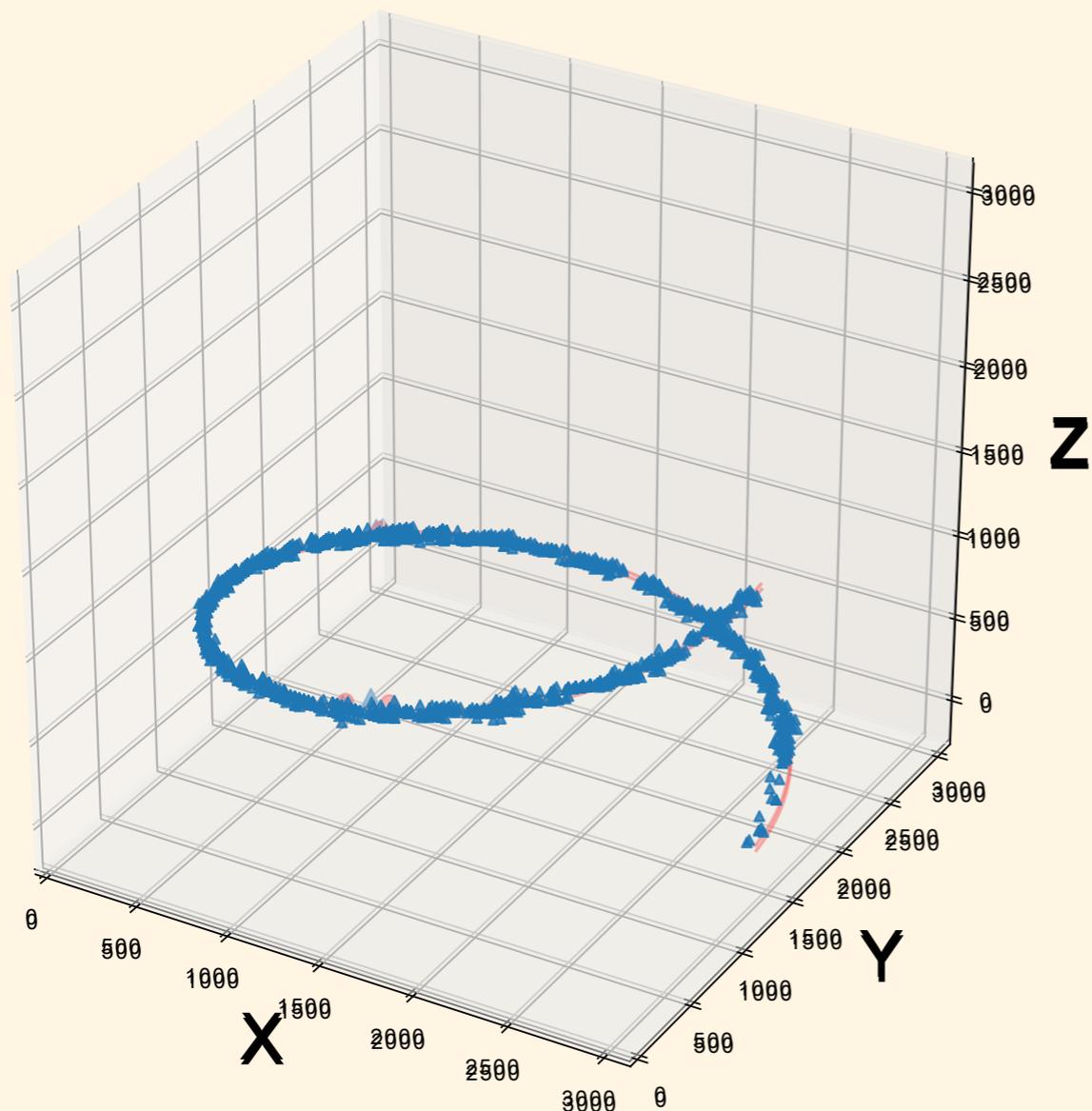
結果：複数分子の位置推定



- 分子同士が近い場合は真の分子間に分子が存在すると推定してしまう
- 深さ方向の位置は正しく推定可能

- ▲ 推定位置
- 真の分子位置

結果：複数分子の位置推定



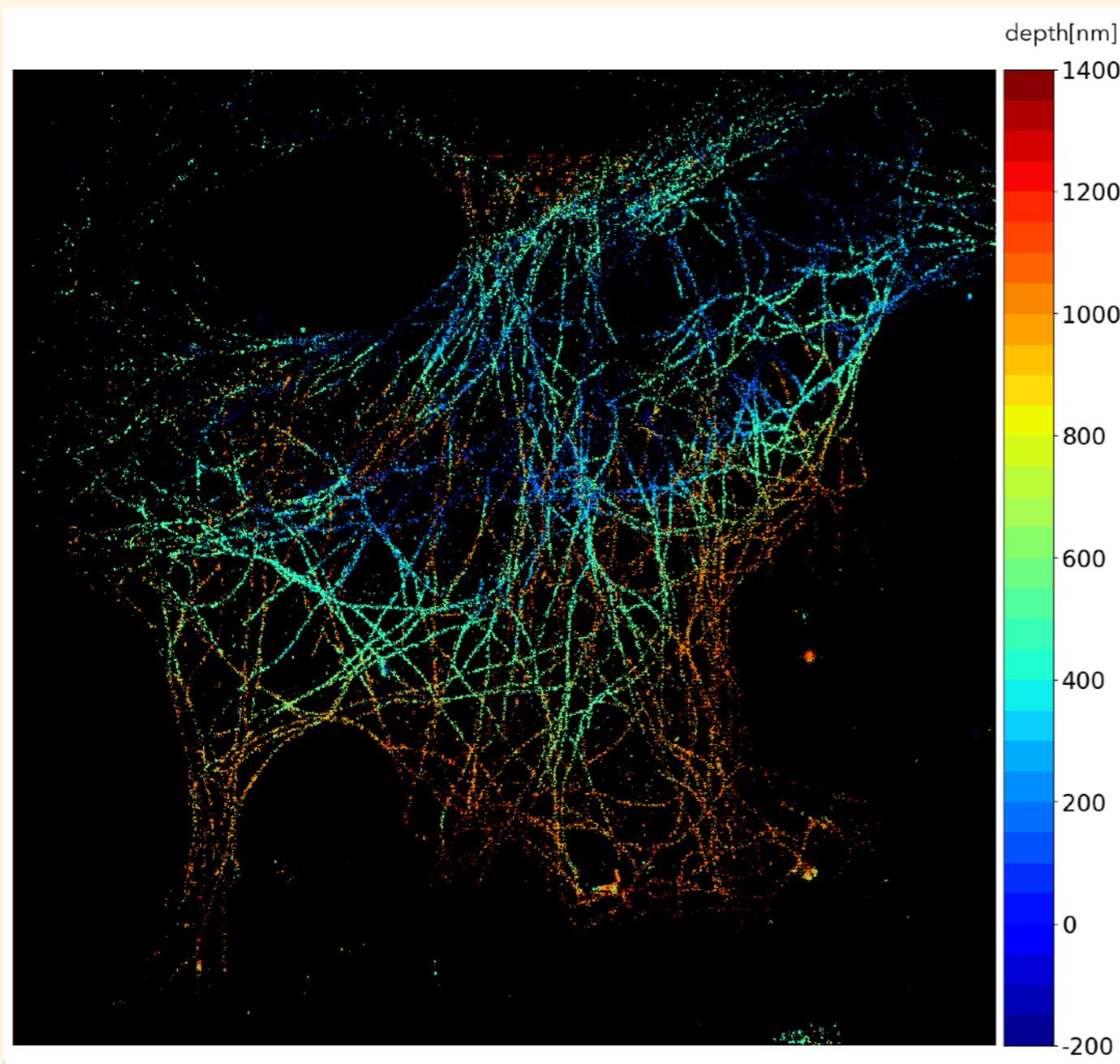
- 3000フレームから推定された結果を重ねた散布図
- データの背後にある螺旋構造を見ることができる

- ▲ 推定位置
- 真の分子位置

実験：Tubulin

- Tubulinとは
 - 微小管や中心体からなるタンパク質
 - 正しく分子位置が推定できれば微小管構造が見える
- 4焦点顕微鏡で撮影したTubulin画像を学習済みネットワークに入力
- 画像サイズは $256 \times 256 \times 4$
29000 フレーム

結果：Tubulin



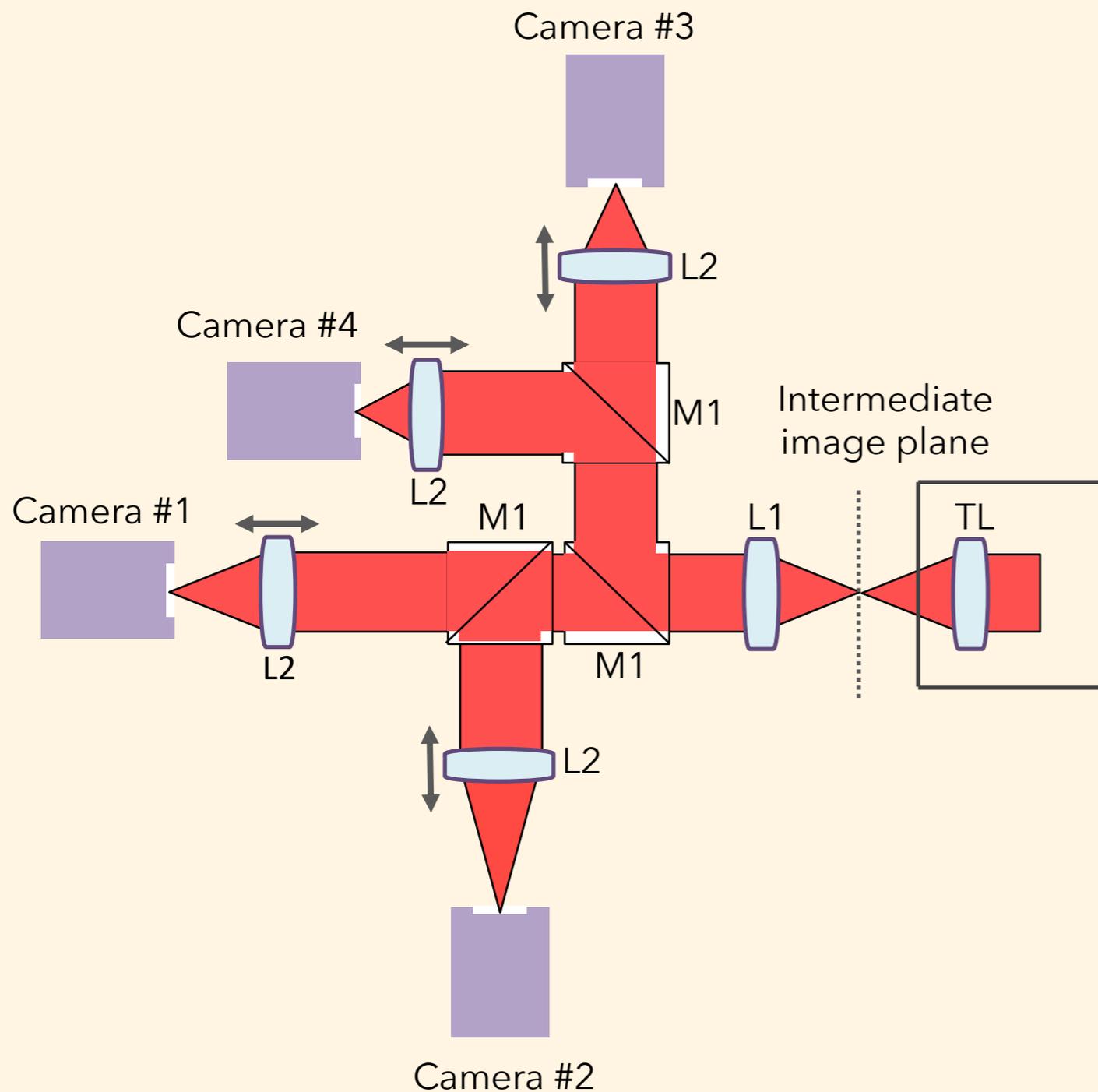
- ネットワークの出力が 0.05 を超える場合に分子が存在すると推定
- 深さごとに推定された分子を色分けして表示
- 深さごとに異なる微小管の構造を見ることができる

まとめ

- 多焦点顕微鏡を用いた3次元SMLMのための分子位置推定法を提案
- 多焦点顕微鏡のカメラの位置ずれに対してロバストかつ効率的に分子の位置推定を行うことができる
 - 1分子の場合は平均的に1px以内のずれで位置推定可能
 - 16×16×4画像では約170fps
- より大きいサイズの画像のリアルタイム処理は今後の課題

Appendix

顕微鏡の光学配置



- 対物レンズで計測した蛍光をミラーで50:50に分ける
- カメラの前に設置されたレンズ (L2) の位置により焦点が変化する
- 今回の実験では各焦点が400 nmずつ離れるように設定

顕微鏡の光学配置

- 対物レンズで計測した蛍光をミラーで50:50に分ける
- カメラの前に設置されたレンズ (L2) の位置により焦点が変化する
- 今回の実験では各焦点が400 nmずつ離れるように設定

Point Spread Function (PSF)

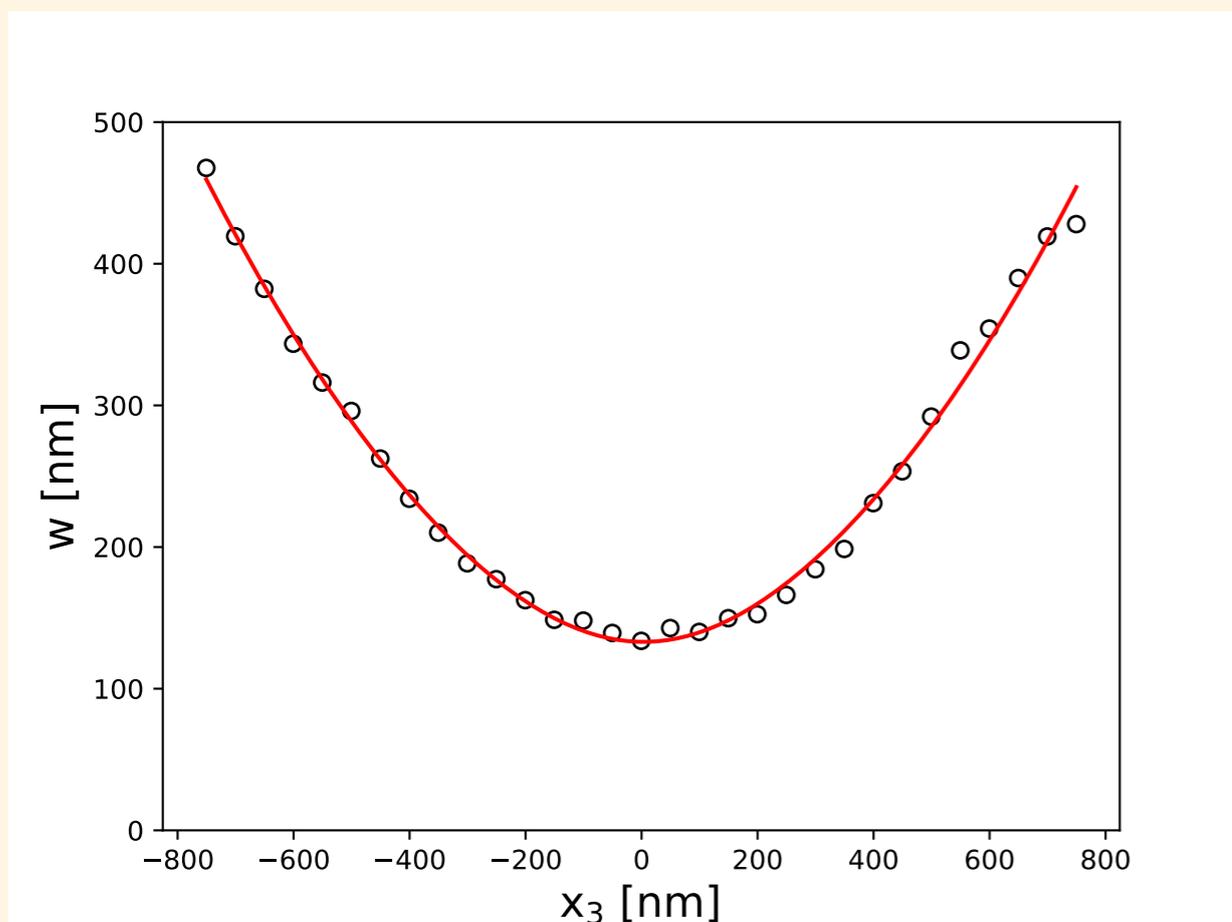
- ある点 $\mathbf{p} = (p_1, p_2, p_3)$ に蛍光分子が存在するとき
観測点 $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3)$ における観測輝度値は

$$f(x_1, x_2, x_3; p_1, p_2, p_3) = \frac{a'}{2\pi w} \times \exp \left\{ - \left(\frac{x_1 - p_1}{2w} \right)^2 - \left(\frac{x_2 - p_2}{2w} \right)^2 \right\} + b$$

- a' : 輝度値最大値, b : バイアス
- ぼけの広さ w はレンズの焦点 d と蛍光分子と観測点の深さの差, 焦点面のぼけの広さ w_0 に依存し

$$w = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{x_3 - p_3}{d} \right)^2 + A \left(\frac{x_3 - p_3}{d} \right)^3 + B \left(\frac{x_3 - p_3}{d} \right)^4}$$

Defocus curve



- 深さ方向の位置を変えながら蛍光ビーズを撮影し蛍光の幅を計測したデータをプロットしたもの
- 多項式によって蛍光の幅を近似するようにパラメータを調整する

カメラの水平位置ずれの影響

$$f(\mathbf{x}_i^l, \mathbf{x}_j^h) = f(x_{i1}^l, x_{i2}^l, x_{i3}^l, x_{j1}^h, x_{j2}^h, x_{j3}^h)$$

$$= \frac{a'}{2\pi w} \times \exp \left\{ -\frac{(x_{i1}^l - x_{j1}^h)^2 + (x_{i2}^l - x_{j2}^h)^2}{2w^2} \right\} + b$$

- \mathbf{x}_i^l を z 番目の焦点面上の観測点とし対応するカメラの水平位置ずれ量を $\Delta_z = (\Delta_{z1}, \Delta_{z2}, 0)$ とする

- 上の式から次の関係が成り立つ：

$$f(\mathbf{x}_i^l + \Delta_z, \mathbf{x}_j^h) = f(\mathbf{x}_i^l, \mathbf{x}_j^h - \Delta_z)$$

- 位置ずれしたカメラで観測した点 \mathbf{x}_j^h の分子の蛍光は位置ずれのないカメラで観測した点 $\mathbf{x}_j^h - \Delta_z$ の分子の蛍光と等しい

Deconvolution

- 元の画像を0埋めによりピクセル数を増やす
- 0部分をconvolutionにより補完
- Convolutionに用いるフィルタは学習パラメータ

