

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300156

研究課題名（和文）二光子ライブイメージレンダリング- μ レベル生体構造のボリューム探索

研究課題名（英文）Two-photon live image rendering - volume exploration of micro biological structure -

研究代表者

湊 小太郎（MINATO KOTARO）

奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：00127143

研究成果の概要（和文）：

μ レベルの三次元生体構造をリアルタイムに可視化可能な試作システムを構築した。また、生物学研究者が可視化及び解析に関する機能を簡単に活用できるようユーザーインターフェースを整備した。脳神経科学分野における神経回路網の極限観察と解析生物学研究者の協力を得て小動物の脳組織をイメージングし、 2000^3 voxel の二光子顕微鏡画像を取得した。可視化システムを用いて当該画像を可視化し、複雑な神経回路を観察した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a system for visualizing 3-d micro biological structure in real-time. The system can also be utilized by biological researchers both in visualization and analysis. With the help of biological researchers, a network of nervous system in the brain can be visualized and that image consists of $2000 \times 2000 \times 2000$ volume matrices. A complex circuit of the brain nervous system is proved by our visualization system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2012 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	11,100,000	3,330,000	14,430,000

研究分野：生体医工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオイメージング・知的可視化

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な生体イメージング技術の発展が目覚ましく、医学・生物学分野において幅広い用途に利用されている。医療現場では、CT や MRI などの撮像機器の進歩により、膨大な断層画像集合（以下、三次元画像）が得られている。一方、生物学分野では、共焦点顕微鏡や二光子顕微鏡などの顕微鏡技術の向上に伴い、ナノ・マイクロ領域の画像が大規模で高精細な三次元画像として得られるようになってきた。特に、二光子顕微鏡では、蛍光分子の二光子励起現象を利用して、レーザービームを集光点でのみ励起し蛍光を検

出するため、三次元構造を持つ試料を、ピントはずれ像の被りなしに像観察できる。マルチスライス CT で得られる断層画像と同様の画像が得られるため微細生体組織の三次元観察への利用が期待されている。申請者らの研究グループでは、組織深部を観察できることを特徴とする二光子顕微鏡を開発しており、横方向 $800 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$ 、奥行き方向 $500 \mu\text{m}$ を横分解能 $0.5 \mu\text{m}$ 、奥行き方向分解能 $1 \mu\text{m}$ で撮像することに成功している。さらに研究を進めることで分解能の向上に加え、奥行き方向の観察可能深度として $1000 \mu\text{m}$ を達成できる見込みである。すなわち、 1mm^3 の領

域を 2000^3 voxel の高分解能かつ大規模な三次元画像として取得可能となる。また、対象を切片にする必要がなく、 μ レベルの生体組織を生きた正常な状態で撮像（二光子ライブイメージング）できる。

二光子顕微鏡によって撮像された三次元画像に含まれる μ レベルの生体組織の全貌を立体的に可視化し、自在に探索できれば、これまで二次元で局所的にのみ観察することが多かった生物学分野において、複雑な微細生体構造の理解など新たな知の創成に繋がることが期待できる。一方、16bit 2000^3 voxel の三次元画像は 16GByte となる。医用画像が一般的に $512 \times 512 \times$ 数百枚の規模であることを考えると 100 倍近いサイズの画像が一度の撮像で得られることになる。

申請者らは、上記顕微鏡撮像技術の開発に加え、5 年以上に渡り三次元医用画像を対象とした画像処理やグラフィクスに関する研究を進めて来た。近年発展が目覚ましい GPU (Graphic Processing Unit) コンピューティングに対応した独自のライブラリを開発し、手術シミュレーション等への応用を試みてきた。一方、情報処理分野においてもメモリに直接展開することが困難な (Out of Core) 大規模三次元画像をリアルタイムに立体可視化し、効率的な探索を可能とする枠組みは十分に確立しておらず、その探究は研究課題の一つとなっている。この課題に Nano Optics (光学), Image Processing, Graphics (情報学) の融合研究として取り組むことで、各分野への学術的な貢献が可能である。さらに研究成果を統合した可視化システムは医学・生物学分野における未知の生体メカニズムの解明や診断にも大きく寄与するものと考え、本提案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、二光子顕微技術に基づく高分解能三次元イメージング系と、撮像によって得られる 2000^3 voxel (=16GB) 規模の三次元画像を脳の視覚情報処理に着想を得た再符号化によって階層的に構造化し、高速なボリューム可視化を達成する新手法の開発を目指す。まず、二光子顕微鏡の奥行き方向の観察可能深度について、蛍光励起用光源の高出力化、電気光学変調器 (EOM) を用いたパルス列変調法による高励起効率化により、現状の $500 \mu\text{m}$ から $1000 \mu\text{m}$ へ向上させる。また、検出系の改良等による高分解能化・高感度化を進め、 1mm^3 の領域を 2000^3 voxel の高精細かつ大規模な三次元画像として取得できる二光子イメージング系を確立する。

次に、得られた大規模三次元画像を効率的に構造化し、高速な可視化を達成する新手法開発に取り組む。従来のポリゴンモデルへの変換には観察対象が発見済みで、関心領域が抽出されていることが前提となる。これに対

し、本研究では膨大な画像空間における特徴的な三次元構造の探索をいかに支援するかに着目し、輝度値の三次元分布を局所的な構造的特徴に関する情報に再符号化し、階層的に再サンプリングして保持する三次元画像の構造化の概念を提案する。例えば、画像空間内に細い毛細血管が広範囲に渡って存在する場合はその構造的特徴に基づいて再符号化・サンプリングすることで、省容量化と管径の大きさ等による階層的な構造表現を同時に達成できる。また、構造的特徴を指標として色・不透明度を割り当てることで生体深部に位置する特定の構造を強調して可視化できる。この処理と我々の脳の一次視覚野が持つ機能には類似点があるが、三次元画像を直接に処理対象とする点で大きく異なる。視覚情報を空間的な像としてではなくコントラストや局所トポロジーに符号化することで瞬時に情報を伝達する脳の情報処理メカニズムにヒントを得て、大規模三次元画像の構造化とリアルタイム可視化の達成を目指す。また、着目する複雑な微細生体構造の抽出・解析法の開発にも取り組む。

これらの考え方に基づいて、 μ レベルの生体組織が持つ構造的特徴の強調と詳細度制御によってシームレスに組織全体の俯瞰と局所微細構造の観察を可能とするリアルタイム可視化システムを構築する。本システムの利用先としては、A) 脳組織の微細神経回路網の三次元観察、B) 微小癌組織の形成過程の観察などを想定している。A) に関して、脳神経科学分野では主に特定の神経細胞に着目して観察されてきたが、実際の神経回路網では全体のネットワーク構造の中で複雑なフィードバックループを形成するなど、特定の神経細胞に着目するだけでは理解が困難な観察対象が多く存在する。本システムで数 μ メートルの局所的な微細構造と数百 μ メートルに渡る全体像のシームレスな観察を可能とし、着目する神経回路の抽出と構造的な解析を試みる。B) では、初期癌細胞が病巣を形成する過程、および、転移癌細胞が組織中に侵入し癌組織を形成する過程を直接観察し、癌形成および癌の侵潤のメカニズム解明に供する。

3. 研究の方法

(1) 二光子顕微鏡の観察可能深度の向上
生体深部組織のイメージングを目的として、二光子顕微鏡の奥行き方向の観察可能深度を現状の $500 \mu\text{m}$ から $1000 \mu\text{m}$ へ向上させる。購入予定のパルスレーザー励起用高出力レーザーダイオードによる蛍光励起用光源の高出力化、電気光学変調器 (EOM) を用いたパルス列変調法による高励起効率化により上記の達成を目指す。

(2) 三次元画像に含まれる構造的特徴の再符号化理論の構築

三次元画像内に暗黙的に含まれる様々な局所三次元構造を再符号化し、その幾何学的特徴を保持するボリュームデータ（幾何学的指標ボリューム）として保持するための理論構築を目指す。特に生物学分野において関心が高い微小神経や毛細血管などの管状構造に着目し、その構造的特徴の定量化を目指す。

(3) 構造的特徴を指標としたボリューム可視化アルゴリズムの開発

保有する曲率を指標とした局所構造のボリューム可視化方法をベースとしつつ、構築する幾何学的指標ボリュームを参照することで管状構造などの特定の幾何学的特徴のみを強調して可視化する知識発見支援型のボリューム可視化アルゴリズムを開発する。

(4) 生体微細組織の三次元構造の自動抽出・解析法の検討

二光子顕微鏡画像に含まれる毛細血管や神経回路などの複雑な生体組織の抽出、その三次元構造や機能の解析に向けて、具体的な抽出対象を定めつつ、生物学研究者のニーズに基づいた自動抽出法・モデリング法を検討する。

(5) 生体深部組織の観察へのボリューム変形・加工アルゴリズムの応用

保有する臓器のボリューム変形技術の μ レベル生体構造のブラウジング・探索への応用研究に取り組む。レンダリング像に対する直接入力によって遮蔽物の変形や除去などの操作が可能な枠組みを開発し、周辺組織に埋もれたり隠れている微細構造を局所的に観察可能とする。

(6) 二光子顕微鏡の観察分解能及び測定感度の向上

1000 μm の観察可能深度を維持しつつ、フォトンカウンタ検出系による高検出効率化など装置のさらなる高分解能化・高感度化へ向けた研究開発を進め、一度の撮像で1mm³の領域を2000³ voxelの大規模三次元画像としてイメージングできる系を確立する。

(7) 三次元画像に含まれる構造的特徴の階層的再サンプリング理論の構築

従来から取り組まれてきた画像の空間的な階層化だけでなく、二光子顕微鏡画像に含まれる生体組織の構造的特徴を階層化してサンプリングすることで三次元画像全体を省容量で構造化し、管径の大きさ等による階層的な構造表現を可能とする理論の構築を目指す。

(8) 幾何学的指標ボリュームから色・不透明度への変換方式の開発

幾何学的膨大な三次元画像空間の中から特徴的な生体の三次元構造に対して選択的に色・不透明度を割り当てることで生体組織の深部に埋もれた構造的な特徴を強調して可視化できる。(2)(7)によって生成された幾何学指標ボリュームからの色・不透明度への変

換方式を開発する。

(9) 局所構造と全体像をシームレスに可視化するLoDレンダリングの開発
階層化された幾何学的指標ボリュームに基づくレンダリング時の詳細度(Level of Details: LoD)制御によって、数 μ メートルの局所的な構造と数百 μ メートルに渡る全体像のシームレスな可視化を達成するアルゴリズムを開発する。

(10) 生体微細組織の三次元構造の抽出法の開発

医用画像処理における冠動脈や大腸の抽出とCurved MPR(Multi Planar Reconstruction)による表現などの考え方を μ レベルの三次元生体組織へ応用、独自に発展させることで微小神経や毛細血管などの複雑な生体組織の抽出を試みる。

(11) μ レベル三次元生体構造を探索可能な可視化プロトタイプシステムの構築

これまでに開発したアルゴリズムを統合し、 μ レベルの三次元生体構造をリアルタイムに可視化可能な試作システムを構築する。二光子顕微鏡画像を読み込み後、可視化に必要なデータ構造をバックグラウンドで構築し、速やかに可視化結果を表示する設計とする。また、生物学研究者が可視化及び解析に関する機能を簡単に活用できるようユーザインターフェースを整備する。

(12) GPU コンピューティングによる画像処理・可視化プロセスの高速化

大規模三次元画像からの幾何学指標ボリュームへの変換・階層化やボリューム可視化、三次元構造の抽出などの一連の処理に関してGPU上での並列演算に対応したアルゴリズム開発に取り組み、前処理の高速化やリアルタイムレンダリングを達成する。

(13) 生体微細組織の三次元構造の解析法の開発

二光子顕微鏡画像から着目する末梢神経や毛細血管を抽出し、その接続状態や走行を幾何学的に解析・定量化するための手法開発に取り組む。

(14) 脳神経科学分野における神経回路網の極限観察と解析

生物学研究者の協力を得て小動物の脳組織をイメージングし、2000³ voxelの二光子顕微鏡画像を取得する。可視化システムを用いて当該画像を可視化し、複雑な神経回路を観察する。着目する神経回路の三次元構造を抽出・モデル化し、その幾何学的・機能的解析を試みる。

4. 研究成果

(1) 二光子顕微鏡の観察可能深度の向上と三次元画像に含まれる構造的特徴の再符号化理論の構築に取り組み、特定構造を選択的に強調するボリューム可視化アルゴリズムを開発した。また、生体深部組織の効率的

な観察や構造解析のための手法を検討した。まず生体深部組織のイメージングを目的として、二光子顕微鏡の奥行き方向の観察可能深度を現状の $500\ \mu\text{m}$ から $1000\ \mu\text{m}$ へ向上をはかった。多光子レーザー顕微鏡および deformable mirror の導入により、上記の達成を目指した。次に、三次元画像内に暗黙的に含まれる様々な局所三次元構造を再符号化し、その幾何学的特徴を保持するボリュームデータ（幾何学的指標ボリューム）として保持するための理論を構築した。特に生物学分野において関心が高い微小神経や毛細血管などの管状構造に着目し、その構造的特徴の定量化を試みた。さらに、保有する曲率を指標とした局所構造のボリューム可視化方法をベースとしつつ、構築する幾何学的指標ボリュームを参照することで管状構造などの特定の幾何学的特徴のみを強調して可視化する知識発見支援型のボリューム可視化アルゴリズムを開発した。二光子顕微鏡画像に含まれる毛細血管や神経回路などの複雑な生体組織の抽出、その三次元構造や機能の解析に向けて、具体的な抽出対象を定めつつ、生物学研究者のニーズに基づいた自動抽出法・モデリング法を検討した。保有する臓器のボリューム変形技術の μ レベル生体構造のブラウジング・探索への応用研究に取り組んだ。この結果レンダリング像に対する直接入力によって遮蔽物の変形や除去などの操作が可能な枠組みを開発することで、周辺組織に埋もれ、隠れている微細構造を局所的に観察可能となった。

(2) 二光子顕微鏡の分解能・感度のさらなる向上を目指しつつ、三次元画像に含まれる構造的特徴の階層的再サンプリング理論とそのレンダリング法を確立した。また、複雑な生体微細構造を対象とした抽出・モデル化法を開発した。特に二光子顕微鏡の分解能・感度のさらなる向上に向け、深さ $1000\ \mu\text{m}$ まで高感度イメージングを達成するために二光子顕微鏡に電気光学効果素子 (EOM) を用いたパルス列変調法を導入した。パルス列変調法とは矩形形状にパルス強度を変調し入射強度を減弱させる方法である。この手法を用いれば高いピークパワーを持つレーザーを試料に入射することが可能となり、二光子励起効率を向上させることができる。さらに、パルス列変調の効果が顕著に表れるように光学系を最適化することで二光子励起効率を向上させた。そして、脳ファントムを用いて感度評価実験を行い深さ $1200\ \mu\text{m}$ まで観察可能であることを確認した。加えて、パルス列変調法を使用することで、従来手法に比べ SN 比を最大 22 dB 上昇させることができた。また、 $1000\ \mu\text{m}$ までは蛍光粒子像の強度分布はイメージング深さの違いに依らずほ

ぼ等しいことを確認した。

(3) これまでに開発したアルゴリズムを統合し、 μ レベルの三次元生体構造をリアルタイムに可視化可能な試作システムを構築した。二光子顕微鏡画像を読み込み後、可視化に必要なデータ構造をバックグラウンドで構築し、速やかに可視化結果を表示する設計とする。また、生物学研究者が可視化及び解析に関する機能を簡単に活用できるようにユーザーインターフェースを整備した (図 1)。

大規模三次元画像からの幾何学指標ボリュームへの変換・階層化やボリューム可視化、三次元構造の抽出などの一連の処理に関して GPU 上での並列演算に対応したアルゴリズム開発に取り組み、前処理の高速化やリアルタイムレンダリングを達成した。

生体微細組織の三次元構造の解析法の開発二光子顕微鏡画像から着目する末梢神経や毛細血管を抽出し、その接続状態や走行を幾何学的に解析・定量化するための手法開発に取り組んだ。

脳神経科学分野における神経回路網の極限観察と解析生物学研究者の協力を得て小動物の脳組織をイメージングし、 2000^3 voxel の二光子顕微鏡画像を取得した。可視化システムを用いて当該画像を可視化し、複雑な神経回路を観察した。着目する神経回路の三次元構造を抽出・モデル化し、その幾何学的・機能的解析を試みた (図 2)。

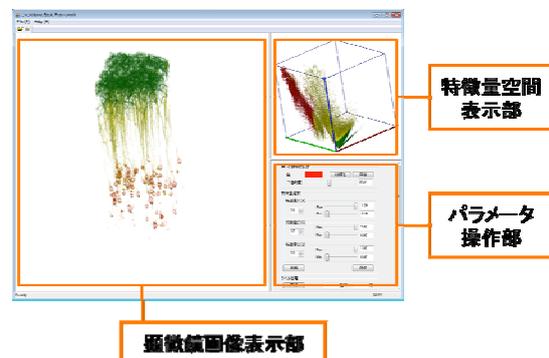


図 1 : ユーザーインターフェース

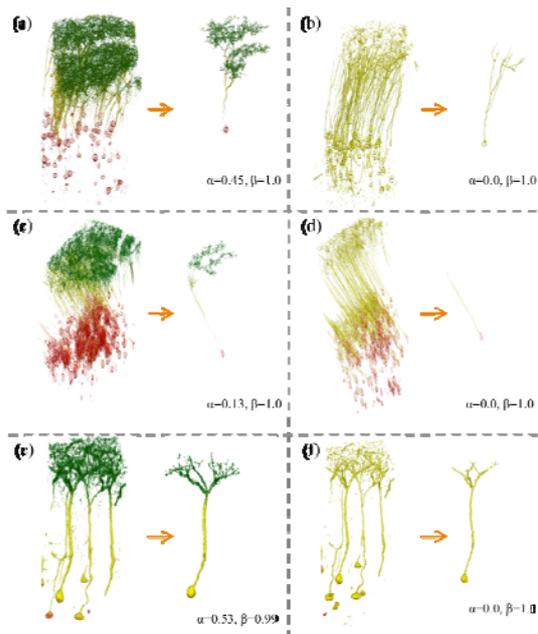


図 2 : 可視化結果 (例)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. F. R. Punzalan, Tetsuo Sato, T. Okada, S. Kuhara, K. Togashi and Kotaro Minato, "Respiratory Motion and Correlation Simulation Platform for Coronary MR Angiography," IEICE Trans. on Information and Systems, vol. E96-D, 査読有り, no. 1, pp111-119, Jan. 2013
2. Tadao Sugiura, H. Miyoshi, T. Nishio and A. Honda, "Cell palpation with an optically trapped particle," Journal of Micro-Nano Mechatronics, 査読有り, vol. 7, no. 4, pp131-136, Nov. 2012
3. Megumi Nakao, K. Maeda, R. Haraguchi, K. Kurosaki, K. Kagisaki, I. Shiraiishi, K. Nakazawa and Kotaro Minato, "Cardiovascular Vessel Modeling of Congenital Heart Disease Based on Neonatal Echocardiographic Images", IEEE Trans. on Information Technology in BioMedicine, 査読有り, Vol. 16, No. 1, pp. 70-79, 2012.
4. K. W. C. Hung, Megumi Nakao, K. Yoshimura and Kotaro Minato, "Background-incorporated Volumetric Model for Patient-Specific Surgical Simulation: A Segmentation-free, Modeling-free Framework", International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery, 査読有り, Vol. 6, No. 1, pp. 35-45, 2011.
5. Megumi Nakao, R. Kitamura, Tetsuo Sato

and Kotaro Minato, "A Model for Sharing Haptic Interaction," IEEE Trans. on Haptics, 査読有り, Vol. 3, No. 4, pp. 292-296, 2010.

6. K. Imanishi, Megumi Nakao, M. Kioka, M. Mori, M. Yoshida, T. Takahashi and Kotaro Minato, "Interactive Bone Drilling using a 2D Pointing Device to Support Microendoscopic Discectomy Planning", International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery, 査読有り, Vol. 5, No. 5, pp. 461-469, Sep. 2010.
7. Megumi Nakao and Kotaro Minato, "Physics-based Interactive Volume Manipulation for Sharing Surgical Process", IEEE Trans. on Information Technology in Biomedicine, 査読有り, Vol. 14, No. 3, pp. 809-816, 2010.

[学会発表] (計 12 件)

1. Megumi Nakao, K. Imanishi, M. Kioka, M. Yoshida, Kotaro Minato and T. Matsuda, "Synchronized Visualization of Bone Cutting to Support Microendoscopic Discectomy", 19th International Display Workshop, INP6-4L, Dec. 6 2012, Kyoto
2. Mary-Clare Dy, Tadao Sugiura and Kotaro Minato, "Axial particle displacement using optical tweezers," 第 73 回応用物理学会学術講演会講演予稿集, ppJSAP-OSA-149, 14 Sep. 2012, 愛媛大学
3. 紅林 広亮, 中尾 恵, 杉浦 忠男, 佐藤 哲大, 澤田 和明, 川上 良介, 根本 知己, 湊 小太郎, "特徴量空間を用いた二光子顕微鏡画像のボリューム可視化," 生体医工学シンポジウム 2012 講演予稿集, 2012. 9. 7-8, 大阪大学基礎工学部
4. 益田 祐次, 原口 亮, 中尾 恵, 岩田 倫明, 黒崎 健一, 鍵崎 泰治, 中沢 一雄, 湊 小太郎, "新生児心エコー画像に基づく先天性心疾患の 3 次元モデル構築支援システム," 生体医工学シンポジウム 2012 講演予稿集, 2012. 9. 7-8, 大阪大学基礎工学部
5. 益田 祐次, 原口 亮, 中尾 恵, 黒崎 健一, 白石 公, 中沢 一雄, 鍵崎 康治, 湊 小太郎, "新生児心エコー画像に基づく先天性心疾患の形状モデル構築支援システム," 生体医工学, 50 巻、特別号 (第 51 回生体医工学大会抄録集), vol. 50, no. 02-13-8, pp196, 2012. 5. 11, 福岡国際会議場
6. 加村 翔平, 中尾 恵, 今西 勁峰, 湊 小太郎, "三次元画像診断支援を目

- 的としたすりガラス状陰影のボリューム可視化法,” 電子情報通信学会技術研究報告, vol.111, no.389, pp153-158, 2012.1.19, 那覇市ぶんかテンブス館
7. Y. Oda, Megumi Nakao, K. Imanishi, K. Taura and Kotaro Minato, “Direct Volume Manipulation for Navigating Lever Resection,” Int. Conf. Artificial Reality and Tele-existence, pp158, 29 Nov. 2011, 大阪大学
 8. 井元 兼太郎, 杉浦 忠男, 湊 小太郎, “高感度二光子顕微鏡イメージング,” Optics Photonics Japan 2011, pp p 52, 2011.11.30, 大阪大学
 9. 衛藤 聖, 中尾 恵, 杉浦 忠男, 湊 小太郎, “局所構造の大きさに基づくボリューム探索,” メディカルイメージング連合フォーラム 電子情報通信学会信学技法, vol.110, no.364, pp153-156, 2011.1.20, 那覇市ぶんかテンブス館
 10. 中尾 恵, “医用グラフィクスアプリケーション開発におけるGPUの活用事例”, 第3回GPUコンピューティングセミナー, 2010.9.16, 梅田センタービル
 11. Megumi Nakao and Kotaro Minato, “Direct Medical Image Deformation,” 第49回日本生体医工学会大会, vol.48, no. Suppl.1, pp0S-3-1, 2010.6.25, 大阪国際交流センター
 12. 衛藤 聖, 中尾 恵, 杉浦 忠男, 湊 小太郎, “脈管の太さを指標としたボリューム可視化法の提案,” 第49回日本生体医工学会大会, vol.48, no. Suppl.1, pp0S-3-1, 2010.6.25, 大阪国際交流センター

[図書] (計3件)

1. 佐藤 哲大, 湊 小太郎, “MRIによる神経束の可視化-トラクトグラフィ作成法を中心として,” 実践医用画像解析ハンドブック, pp402-408, 2012.11.1
2. 佐藤 哲大 and 湊 小太郎, “Differences in Analysis Methods of the Human Uncinate Fasciculus Using Diffusion Tensor MRI,” Biomedical Engineering and Cognitive Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications, pp162-170, Oct. 2012
3. 佐藤 哲大, “筋肉,” 医用画像工学ハンドブック, pp627-632, 2012.9.15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湊 小太郎 (MINATO KOTARO)
 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 教授
 研究者番号: 00127143

(2) 研究分担者

杉浦 忠男 (SUGIURA TADAO)
 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 准教授
 研究者番号: 60304010
佐藤 哲大 (SATO TETSUO)
 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 助教
 研究者番号: 90362839
中尾 恵 (NAKAO MEGUMI)
 京都大学 情報学研究科 准教授
 研究者番号: 10362526
 (3) 連携研究者
根本 知己 (NEMOTO TOMOMI)
 北海道大学・電子科学研究所・教授
 研究者番号: 50291084
川上 良介 (KAWAKAMI RYOSUKE)
 北海道大学・電子科学研究所・助教
 研究者番号: 40508818