

## 論文要旨

電子顕微鏡を用いて非常に微小な物体及び構造の観察を行う際には、まず初めに作製した試料内に存在する観察対象の位置を特定し、電子顕微鏡の視野内に収める必要がある。しかしながら、観察を行う視野が非常に微小であるがゆえに試料空間は広大な領域となり、その中から観察対象の探索を行わなければならない。これは多大な時間と労力を必要とし、電子顕微鏡を用いる多くの研究者たちの手を煩わせ、充分広い領域の形態観察をあきらめざるを得ないことともなってきた。

また、多大な労力をかけて観察対象を視野内に捉え画像を撮影することができたとしても、その物体及び構造について詳しく解析するには画像内における対象が存在する領域を厳密に特定しなければならない。これは形態計測に必須である。特に、生物超薄切片電子顕微鏡画像に関しては、染色に使用した試薬の種類や切削時の角度など試料作製段階の条件によっては画像に写る対象の輪郭が曖昧になってしまうことがあり、このような不明瞭な輪郭を持つ物体や構造の占める領域を厳密に特定することは、人の手でも困難な作業となる。

電子顕微鏡による観察・計測に付帯するこれらの問題に対する解決策として、本研究では可能な限りの自動化と補助を行うことで人のかける労力を削減するシステムの構築を目指し、結果、それとかなり近づく半自動輪郭抽出手法を提案することができた。本手法では、抽出された輪郭、を構成する輪郭点の座標や点毎の接線角度等の詳細なデータをすべて記録する。このデータは近年発展著しいディープラーニングを始めとしたAI技術の訓練データとして利用できると考えており、近い将来、そうしたAI技術によって電子顕微鏡試料の視野探し並びに輪郭抽出の自動化に応用できれば、最初に述べた、観察対象の探索の労力を改善させることにも貢献できると考えている。

本論文にて提案する手法では、信号解析手法の1つであり、特定の角度・周波数の波形に対して強く反応する性質を持つガボールウェーブレットの技術を応用して画像上の物体及び構造の輪郭の抽出を行う。ガボールウェーブレットは生成時のパラメータ設定によってどのような波形に特に強く反応するかが定まる為、抽出したい輪郭に応じて適切なパラメータ設定を行うことが肝要となる。本研究ではガボールウェーブレットのこの性質に着目し、生物超薄切片電子顕微鏡画像における物体輪郭の抽出に利用した。また、より効率的にガボールウェーブレットによる輪郭抽出を行う為に、限られた矩形領域内にガボールウェーブレットを封じ込める手法を新たに考案した。ただし、ガボールウェーブレットの理論式をそのまま本手法に用いることはできないため、その理論式を一部改良して用いることとした。

この改良したガボールウェーブレットを用いて、抽出を行いたい輪郭上の輪郭点の座標及びその接線角度を求める。接線角度を求めることで、次の輪郭点を予測でき、この処理

を繰り返すことにより目的の輪郭を自動的に抽出・追跡を行うことができる。さらに、この自動追跡の結果をコンピュータが自動監視し、実際の輪郭上を逸脱したか否か自動判断し、逸脱した場合に自動的に適切なパラメータの再設定を行い追跡を続行する。なお、本手法では、輪郭抽出の開始地点となる最初の点の指定と自動追跡に失敗したときに人為的補助作業が必要となる。この補助作業を効率的に行う為の GUI ツールも新たに開発した。

本研究では、画像上に現れる輪郭をリッジライン、ステップエッジ、パターン境界の大きく三種類に分類し、それらを模したモデル輪郭画像に対して本手法による輪郭抽出を行い、その精度や性能を調査したシミュレーションを行った。その結果、本手法による輪郭抽出は、単純なリッジラインやステップエッジのみならず、曖昧なパターン境界の輪郭も正確に抽出を行うことができることが示された。また、非常に似通ったパターン境界であっても、モデル輪郭画像に対してぼかしや雑音が付加されても許容される誤差の範囲で適切な抽出と追跡が行えることが示された。これらのシミュレーション結果を踏まえて、実際の生物超薄切片電子顕微鏡画像上に現れる細胞小器官と、更なる応用例としてより複雑な糸巻状の形態を示す液胞膜に対して本手法を用いた輪郭抽出実験を行い、その精度の検討を行った。その結果、本手法は電子顕微鏡画像上の各種細胞小器官の輪郭の抽出を、明瞭な輪郭のみならず不明瞭で曖昧な輪郭も含め、かなりの精度で行えることが分かった。また、複雑な糸巻状の形態を示す液胞膜についても、不明瞭な輪郭が多くとも同じく高い精度で輪郭抽出を行えることが分かった。ただし、これらの実験において、輪郭が不明瞭なときに人為的補助作業がしばしば必要であったが、それらは、自動追跡がかなり困難な箇所を人為的にスキップしたり、開始点を変えて追跡を再開したり、といった補助であってユーザーが容易に行える程度のものである。

本論文は全6章で構成されている。以下に各章の概要を述べる。

## 第1章 序論

本章では、まず生物電子顕微鏡画像上の物体観察において大きな問題点となっている人手によるセグメンテーション作業の煩雑さについて述べる。次に、この問題を解決する為に、これまでに行われてきた生物電子顕微鏡画像を対象とした輪郭抽出法の先行研究についての概要を述べる。続いて、本論文にて提案する新しい手法の、ガボールウェーブレットを用いた生物電子顕微鏡画像の輪郭抽出法のアルゴリズムについて概要を述べる。さらに、本手法による画像上の物体輪郭抽出作業を効率化する為に開発した GUI ツールの概要を述べる。最後に、本論文の目的とそれを確かめるために行ったモデル輪郭画像を用いたシミュレーションと、実際の生物超薄切片電子顕微鏡画像を用いた実験と結果の概要を述べる。

## 第2章 ウェーブレット変換とガボールウェーブレット

本章では、本論文にて用いられる主要要素技術であるガボールウェーブレットの理論とその特性について述べる。初めに、その根幹となる理論であるウェーブレット解析について概説し、続いてウェーブレット解析の内の一種としての1次元ガボールウェーブレットとそれを拡張した2次元ガボールウェーブレットについて述べる。さらに、2次元ガボールウェーブレットを画像に対して畳み込むことで得られるガボール特徴量の特性、つまり画像上のある特定の角度、特定の周波数の信号のみを選択的に抽出し表現するという特性について、実際の生物超薄切片電子顕微鏡画像から抽出されたガボール特徴量の分布図を基に詳細に述べる。

### 第3章 ガボールウェーブレットを用いた輪郭抽出・追跡手法

本章では、ガボールウェーブレットを用いた生物超薄切片電子顕微鏡画像上の輪郭抽出法のアルゴリズムについて詳細に述べる。本論文では、2次元ガボールウェーブレットと対象画像との畳み込み演算処理をより効率的に行う為に、ガボールウェーブレットをある限定された矩形領域内に閉じ込めて利用する手法を提案する。ここで、ガボールウェーブレットはその理論上、直流成分が必ずゼロでなければならないという制約を持っているが、本手法では演算範囲を矩形領域内に限定している為に、この制約条件を満たすことができず、そのままでは正常にガボール特徴量の演算を行うことができない。そこで、本論文では実用上窓領域内での直流成分を完全にゼロにする為にガボールウェーブレットの理論式の改良を行い、新たな定式を提案した。まず初めに、この定式の導出過程と実用上の適応方法について詳細に述べる。本方法では、目的の輪郭付近に探索の開始点を設定し、その開始点周辺であらゆる角度のガボールウェーブレットと畳み込み積分を行う。これにより、目的の物体輪郭上の輪郭点の座標とその接線角度を特定し、その情報を基に続く輪郭点の推定を繰り返し自動追跡を行う。この本手法において最も肝要である輪郭抽出追跡アルゴリズムについて詳細に述べる。さらに、抽出の開始点で最初の探索を行う場合や追跡が目的の輪郭を逸脱してしまった場合に、その場所で最適なパラメータを自動的に探索し再設定を行う、パラメータ自動再探索処理についても述べる。最後に、本手法による輪郭抽出においては、最初の開始点の指定時や、前述したパラメータ自動再探索処理を行った上でも追跡の逸脱を防ぐことができない時には、人為的に開始点の再指定等の補助作業が必要となり、この補助作業の煩雑さを抑える為に今回新たに開発したGUIツールについて詳細に述べる。

### 第4章 提案手法のシミュレーション

本章では、本論文にて提案する手法が実際の画像上の輪郭抽出においてどれ程の精度を持つのか、また、どのような特性や性能を持つのかを、シミュレーションを通じて検証する。本研究においては、生物超薄切片電子顕微鏡画像上に出現する様々な物体輪郭を、リッジラ

イン、ステップエッジ、パターン境界の大きく三種類に分類した。そして、それぞれの理想的なモデル輪郭画像を作成し、本手法を用いた輪郭抽出シミュレーションを行った。さらに、その輪郭抽出の結果を精査することで本手法による各モデル輪郭画像に対する輪郭抽出の精度の定量的な評価を行った。その結果、単純なリッジラインやステップエッジのみならず、曖昧なパターン境界の輪郭をもかなり正確に抽出と追跡できることが示された。また、明瞭な輪郭のみではなく、意図的にぼかしを入れた不明瞭な輪郭であっても正確に抽出と追跡が行えることも示された。続いて、モデル輪郭画像に対して意図的に雑音を付加した画像を用いて本手法による輪郭抽出シミュレーションを行った。また、雑音の強度毎の抽出結果の精査も行い、本手法の雑音に対する耐性の評価を行った。その結果、理想的なモデル輪郭画像の時と比較すると精度が下がるものの、実用上許容範囲で輪郭を抽出・追跡できることが示された。

## 第5章 ガボールウェーブレットを用いた生物電子顕微鏡画像の輪郭抽出実験結果

本章では、前章のシミュレーションの結果を踏まえ、本手法を用いた実際に透過型電子顕微鏡を用いて酵母細胞を撮影した生物超薄切片電子顕微鏡画像上の物体輪郭抽出実験を行った。まず初めに、シミュレーションに用いた三種のモデル輪郭に相当する細胞小器官の輪郭の一部の抽出を行い、その結果から本手法の実際の画像上の輪郭抽出と追跡の精度とその傾向の確認を行った。その上で、酵母細胞中の各種細胞小器官の輪郭全体と、さらなる応用例として複雑な形態を示す糸巻状の液胞膜の輪郭全体について、本手法を用いた抽出実験と、自動追跡のロバスト性の評価などを行った。その結果、生物超薄切片電子顕微鏡画像上の細胞膜、核、液胞、ミトコンドリアといった細胞小器官の輪郭を、明瞭なものから人間の目をもってしても判別の難しい曖昧なものまで、かなり高い精度で抽出を行うことができた。また、複雑な形態を示す糸巻状の液胞膜の輪郭についても、同様に高い精度での抽出を行うことができた。ただし、明瞭な輪郭のみで構成されている箇所については、人為的補助作業をほとんど必要とすることなく輪郭全体を抽出しきることができたが、不明瞭な輪郭を含む箇所についてはしばしば人為的補助作業を行う必要があったことを言及した。また、一部の不明瞭な輪郭の追跡においては、人為的補助作業の前後で抽出された輪郭線同士を滑らかに接続することができず、若干不自然さが残る結果も見られたことも述べた。

## 第6章 考察及び結論

本章では、前章の実験結果の考察、並びに本論文の内容を総括した結論を述べる。また、本手法では解決できなかった課題と、それを踏まえた上での今後の展望についても述べる。本手法は、微妙に異なるテクスチャパターン同士の境界から成る輪郭の他、雑音によって視認性が著しく下がっているような輪郭であっても正確に抽出し追跡を行えることがシミュ

レーションや実験の結果より示されている。特別な前処理などを必要とせずこのような直接的な輪郭抽出が行えることは、従来の輪郭抽出手法にはない利点である。しかしその一方で、このように微妙な輪郭にも敏感に反応し抽出を行えるということは、ある輪郭の追跡中にその周辺に存在する別の輪郭に反応しやすく、逸脱が起りやすいことも意味する。輪郭点の探索を行う際に探査範囲に制限を設けたり、あるいは追跡の逸脱が検知された場合にパラメータ自動再探索処理を行い、適切なパラメータ設定に変更するなどの対策を駆使することである程度回避することができた。しかし、それでも回避しきれない場合は人為的補正作業を行う必要がある。全手動で輪郭抽出を行うよりは煩雑さも恣意性も十分に削減することができているものの、人為的補助作業を現状以上に削減することは今後の研究課題の一つである。また、もう一つの課題としては処理速度の高速化が挙げられる。パラメータ設定によっては輪郭抽出処理に時間がかかる他、パラメータ自動再探索処理は一度実行するだけでもかなりの時間が必要になる。しかし、GPGPU等による高速な並列演算処理を行うことを計画しており、近い将来、この問題は解消できると考えている。本手法による輪郭抽出は、画素値の濃度分布を利用するシンプルな手法である為、他分野の画像にも応用できる可能性がある他、本手法によって抽出された輪郭上の輪郭点とそれに関わるデータはディープラーニング等のAI技術を用いた輪郭抽出およびセグメンテーションの為に訓練データとして活用できる可能性もあり、今後様々な分野での貢献が期待できる。

## 目次

### 第1章 序論

- 1.1 本研究の背景
- 1.2 電子顕微鏡画像に対する輪郭抽出法の従来手法
- 1.3 新たに提案する手法
- 1.4 本論文の構成

### 第2章 ウェーブレット変換とガボールウェーブレット

- 2.1 ウェーブレット変換
- 2.2 1次元ガボールウェーブレット変換
- 2.3 2次元ガボールウェーブレット
- 2.4 ガボール特徴量

### 第3章 ガボールウェーブレットを用いた輪郭抽出・追跡手法

- 3.1 直流成分ゼロのガボールウェーブレット
- 3.2 ガボールウェーブレットを用いた輪郭線抽出・追跡法
- 3.3 パラメータ自動再探索処理

3.4	輪郭抽出を支援する GUI ツール
第4章	提案手法のシミュレーション
4.1	理想的なモデル輪郭画像に対するシミュレーション
4.2	雑音入りモデル輪郭画像に対するシミュレーション
第5章	ガボールウェーブレットを用いた生物電子顕微鏡画像の輪郭抽出実験結果
5.1	実験の目的
5.2	実験環境及び試料の作製と撮影
5.3	実験の手順
5.4	細胞小器官の輪郭追跡時における GFM の観察
5.5	酵母超薄切片電子顕微鏡像の細胞小器官の輪郭抽出
5.6	酵母超薄切片電子顕微鏡像の複雑な糸巻き状液胞膜の輪郭抽出
第6章	考察及び結論
	謝辞
	参考文献