

# 電子顕微鏡画像のもつ特徴とその画像処理

安永卓生

九州工業大学・大学院情報工学研究院・生命情報工学系  
(yasunaga@bio.kyutech.ac.jp)

## 1 はじめに

### 1.1 電子顕微鏡画像と画像処理

電子顕微鏡法は、サブナノメータからマイクロメータの空間スケールを高分解能で撮影することができる、物理、化学などの材料系の分野のみならず、医学・生物学において有用な道具である。電子顕微鏡画像には、組織レベルの構造から、タンパク質などの分子レベルの構造までを映り込んでおり、直接その像を観察することができる。また、画像処理を経ることで、それらの3次元像を得ることもできる。従って、電子顕微鏡法は、ナノレベルの構造であるタンパク質などを基礎として作り上げられている生物であるが故に、「見（観）ることは信じること: seeing is believing」をまさに体現する手法である。

しかし、「画像」としてみた場合には、電子顕微鏡により撮影された写真は、「試料をうまく調整して、よい画像をとる」こととは別に、電子顕微鏡装置と測定方法に由来した画像の変調（アーティファクト）を含んでいる。また、電子線が試料と相互作用することが強いことが、直接サブナノレベルの分解能での画像を得ることを可能ならしめている理由であるが、一方で、その相互作用の強さが故に、かつ、生物試料が多くの場合、低い導電性を示すが故に、電子線による損傷を免れない。従って、多くの電子線を試料に照射することができず、そのために、画像は、雑音（ノイズ）を含む、低いS/N比（Signal-to-Noise ratio）の画像となり得る。この画像の変調や雑音などのために、電子顕微鏡により得られた画像を何の処理もせず、そのまま信じることは危険である。

また、最近、透過型電子顕微鏡法においても、フィルムではなく、CCD カメラなどにより、最初からデジタル画像として取得することも増えた。また、走査型電子顕微鏡法では、最初からデジタル画像として取得されるようになってきている。デジタル画像は、フィルムで撮影したアナログの画像と異なり、デジタル画像ならではの特有の問題点をもっている。従って、デジタル画像の持つ意味、注意すべき点を知っておくことは重要である。

一方で、上述のアーティファクトやノイズをとるために、様々なデジタル画像処理・解析法が有効である場合がある。例えば、雑音をとるための各種フィルタや画像の補正、また、超解像法などが挙げられる。今回、こうした画像処理法の簡単な原理と実際の演習を通して、電子顕微鏡画像に適した画像処理法に入門してみよう。

## 1.2 画像処理のためのソフトウェア

一般的な画像処理であれば、Photoshop や ImageJ<sup>1)</sup>(FIJI<sup>2)</sup>)を用いて実施することができる。本演習でも、ImageJ を用いた演習を一部行い、紹介する。これらは、プラグインを導入することで拡張し、数多くの画像処理を行うことができる。FIJI は特に、顕微鏡画像などを含めて、生物研究向けのプラグインをまとめたパッケージである。一方で、画像処理の多さに何から使って良いかが分からぬ場合も多い。本演習では、その一部の機能を利用した演習を実施する。

一方、電子顕微鏡画像特有の画像処理もある。ImageJ にも、電子顕微鏡画像処理向けのプラグインも存在しているが、十分ではない。その場合には、電子顕微鏡に適した特別なソフトウェアを利用する必要がある。数多くの電子顕微鏡画像処理プログラムが存在している。その多くは、WIKIBOOKS<sup>0)</sup>として、まとめられている。また、EMDataBank<sup>0)</sup>においても、利用できるソフトウェアのリストが紹介されている。参考にしてもらいたい。

我々もまた、上記に登録されているが、開発を続けている Eos(Extensible object-oriented system)という画像処理システムをもつ。Eos は、多くのコマンドからなる画像処理パッケージである。その機能及び使い方の詳細は、Eospedia<sup>3)</sup>を参考にしてもらいたい。現在、CUI(Character User Interface)主体のパッケージから、GUI(Graphical User Interface)主体のパッケージにアップデートを続けているところである。上述したサイトにある各種プログラムもその多くは、CUI 型のソフトウェアが多く、OS-X(MAC)や UNIX などを利用する場合もある。そこで、本実習では、Eos を用いた演習を行う。その中で、こうした CUI 型、GUI 型の画像処理のメリット、デメリットについても体感してもらいたい。

## 2 電子顕微鏡画像の質を確認してみよう（フーリエ変換）

電子顕微鏡画像の質を知ることはとても重要なことである。目で見て理解できる場合も多いが、フーリエ変換することで更に明確になる。

## 2.1 電子顕微鏡画像の質の保証とフーリエ変換

撮影された電子顕微鏡画像が適切なものであるかどうかをどのように保証すれば良いであろうか。もちろん、エキスパートであれば、画像を見ただけで十分に理解できる。例えば、図 1A は、鞭毛の切片の写真(FlagellaSection.mrc)である。この写真に問題点はあるだろうか。実は、この写真は、対物レンズの非点補正が不十分な写真である。

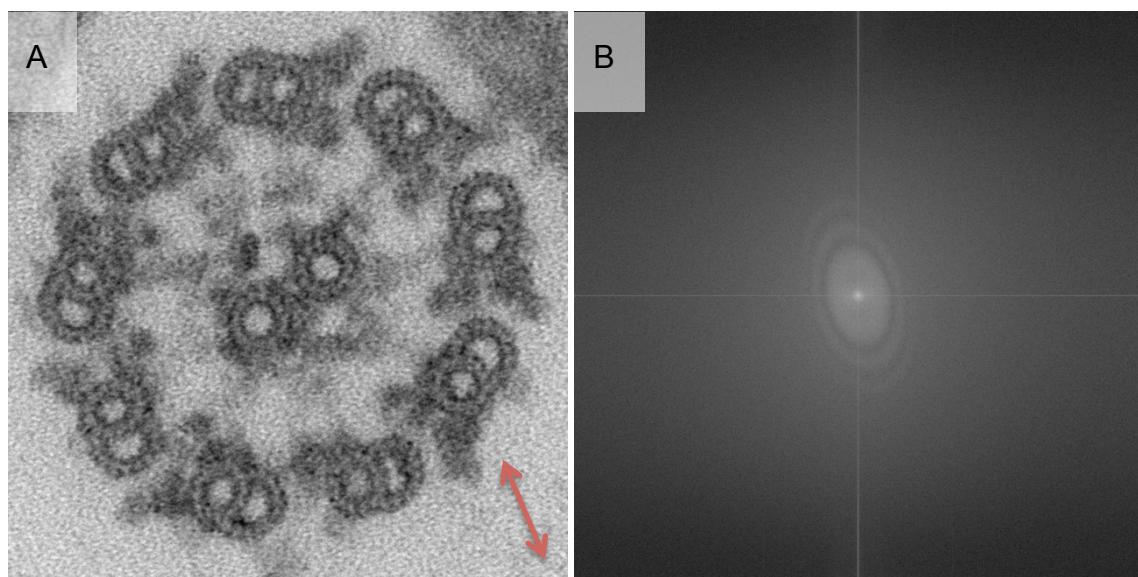


図 1 鞭毛の切片の画像(A)とそのフーリエ変換によるパワースペクトラム(B)。赤い矢印の向きの方向と、その直交方向で像のボケ方が異なっている。(B)をみると矢印の方向に楕円（黒い円：Thon Ring）が長く伸びている。この楕円の長軸側に不足焦点量が小さく、短軸方向に不足焦点量が大きい。

### 【演習 1】

(A)は、FIJI を起動

FlagellaSection.mrc をメニューにドラッグすることで表示できる。

Eos では、

```
$ Display2 -I FlagellaSection.mrc
```

により表示することが出来る。

(B)はそのフーリエ変換である。FIJI では、Process->FFT->FFT により、フーリエ変換した画像を手に入れることが出来る。この強度は、通常、強度のログをとったものである。

Eos では、

```
$ mrcImageFFT -I FlagellaSection.mrc -o FlagellaSection.fft
$ ctfDisplay2 -I FlagellaSection.fft
により表示できる。
```

**【応用 1】**他の Sample 画像に関しても、画像の表示、また、そのフーリエ変換パワースペクトラムを表示してみよう。

図 1Aだけからは、その画質の問題が分からぬ場合でも、そのフーリエ変換したパワースペクトラムで、黒い楕円が一本もしくは、二本あることは観察できるであろう。非点補正が十分されていれば、この楕円は真円となる。楕円の長軸の方向にデフォーカス量が小さく、短軸の方向にデフォーカス量が大きいことを示している。つまり、この写真は非点調整がうまくいっていないことが分かる。

まずは、自分がとった写真をフーリエ変換してみることから始めてみよう。走査型電子顕微鏡の場合にも、非点補正がうまくいっていない場合には、演習 2 で実施するように、同様の結果となる。最近は、CCD カメラなどで撮影した場合、ほぼリアルタイムで（同時に）フーリエパターンを計算できる。常に自分の画像の質を確かめながら、写真をとることが望ましいであろう。このことにより、早期に電子顕微鏡撮影技術があがり、よい質の写真を安定して撮影することができるようになるだろう。

**【演習 2】** 図 1 での評価方法をもとに、STEM.mrc 及び、STEM2.mrc ファイルのうち、いずれの画像が適切かについて、FIJI 及び Eos により評価してみよう。配布したそれ以外の SampleData 以下にある電子顕微鏡画像に関しても同様に評価してみよう。

**【応用 2】** 画像の劣化の原因が何かについても考えてみよう。

## 2.2 空間周波数とは何か

画像のコントラストとは、白と黒の差を示す。この白と黒の差がある画像ほど、コントラストの高い画像と呼ぶ。実際の画像は、白と黒の異なる波長の波の和として考えることができる。フーリエ変換とは、画像のなかの情報のうち、空間周波数毎に、どんな情報をもつかを求めることができる変換、すなわち、この異なる波の波長毎の強さと位置を与えることができる変換である。

ところで、前節で表れた、図 1B の黒い楕円は何だろうか。この黒いリングは、Thon-ring と呼ばれ、透過型電子顕微鏡において、情報量を持たない空間周波数があることを示している。もし、この空間周波数の繰り返し周期があった場合には、その情報が完全に消えてしまう。

ここで、空間周波数とは、単位長さ辺りの波の数（波数）、すなわち、波長の逆数を表している。例えば、空間周波数が、 $0.1 \text{ [\AA}^{-1}]$  とは、 $1\text{\AA}$  辺り  $0.1$  個の波があることを指すので、実際は、 $10\text{\AA}$  の波長の波を表していることになる。

図 2 は、Siemens Star(ジーメンススター)と呼ばれる、カメラなどの空間分解能を示すために使われる画像である。中心からの距離に比例して、円周方向の繰り返し周期（角度方向の周期）が変化するため、その問題点が捉えやすい。今回の場合、 $512 \times 512$ [pixel]の画像 (Sampling Rate:  $2\text{\AA}/\text{pixel}$ ) の中に、半径  $40 \text{ [nm]}$  ( $200[\text{pixel}]$ ) の Siemens Star の像(SiemensStar.mrc)が用意されている。今回、24 回の繰り返し ( $15$  度毎 =  $\pi/12[\text{rad}]$ ) であるので、一番外側で、その繰り返し周期(空間周波数は、 $40 \times \pi/12 = \sim 10.5 \text{ [nm]}$ ) となっている。

ここで、図 2A と図 2G を比較してみよう。図 2G は、 $2[\text{nm}]$ (半径の約  $1/5$ ) でその強度を半分に落とすローパスフィルタをかけたものである。ちょうど、半径の  $1/5$  位の所からその繰り返しの模様が消え始めている。このことから、この画像の空間分解能が、約  $2\text{nm}$  であることが分かる。

また、同様に、図 2A と図 2H を比較してみよう。ちょうど半径  $2/5$  程度の場所に灰色のリングが存在しており、この半径の繰り返しが消えていることが分かる。

【演習 3】 図 2G において、灰色のリングがみえているところの空間周波数はいくらかを推定してみましょう。この Siemens Star の半径が  $400\text{nm}$  であり、 $15$  度毎に繰り返していることに留意しましょう。

透過型電子顕微鏡のコントラスト伝達関数 (Contrast Transfer Function)、及び、点拡がり関数(Point Spread Function)について後述するが、ちょうど Thon リングがこの空間周波数となっていることが分かる。

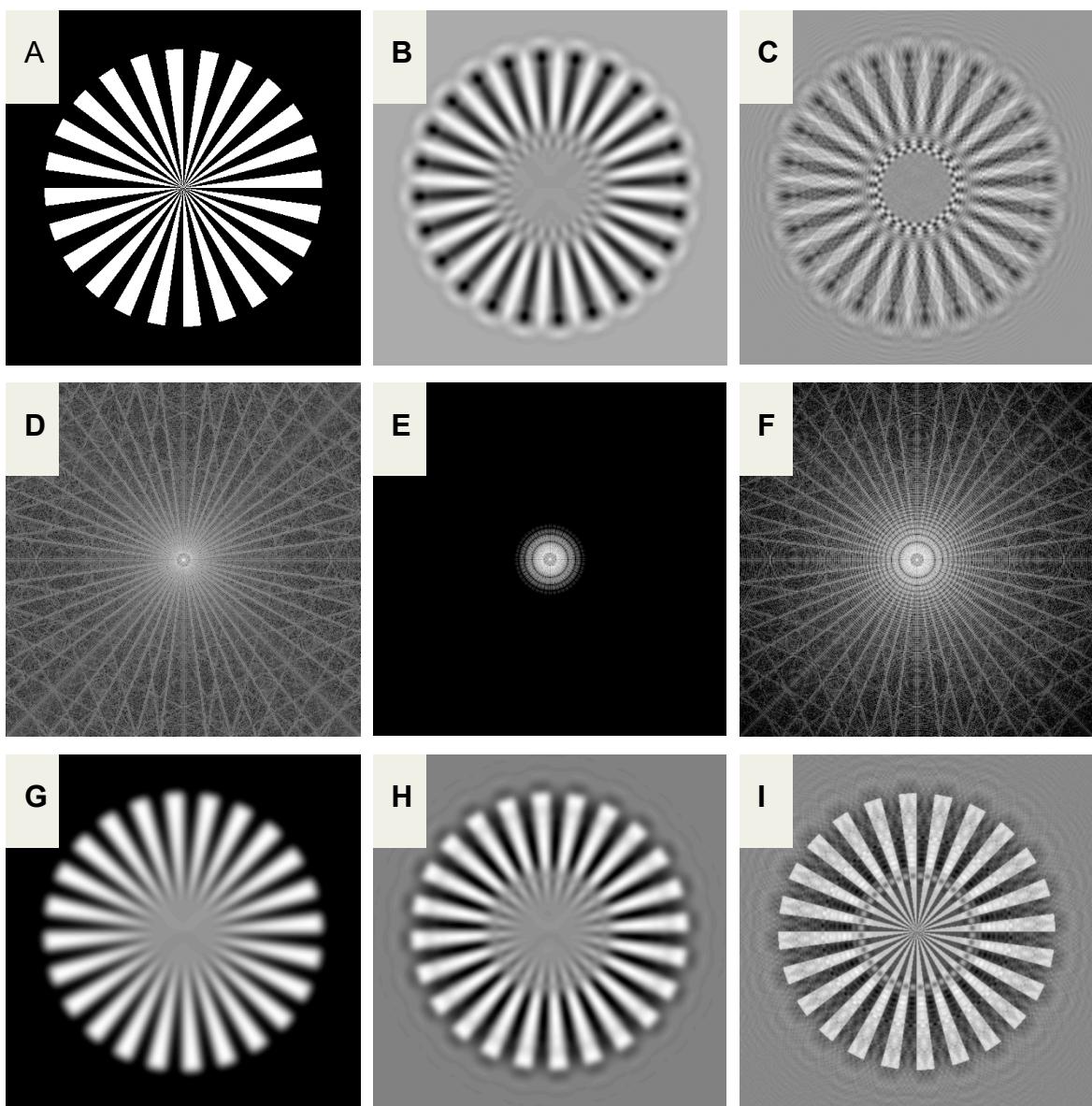


図 2 Siemens Star の画像とその電子顕微鏡画像。(A)は Siemens Star。空間周波数の違いによる振る舞いが分かりやすくするための画像として利用される。(B), (C)はシミュレーションにより推定された電子顕微鏡画像。加速電圧 200kV, 球面収差係数  $C_s=2.1\text{ mm}$ 、強度コントラストと位相コントラストの比 0.1、デフォーカス  $6.0\mu\text{m}$  (Underfocus) としてしている。照射半角が異なり、(B)  $A_{in}=0.2\text{ [mrad]}$  or (C)  $0.02\text{ [mrad]}$ 。(D), (E), (F) は、そのフーリエ変換のパワースペクトラム。(G)は、Gaussian Filter を用いたローパスフィルターであり、その強度が  $2\text{ [nm]}$ で半減するように設定した。(H), (I)は、(E), (F)の CTF(Contrast Transfer Function)の位相を修正したものである。

### 2.3 デジタル画像のもつ性質と注意

デジタル画像を処理する場合に注意しておくべきことがある。それは、デジタル画像は、繰り返していると考えておかなければならないことである。図 3 は、その意味を示している。

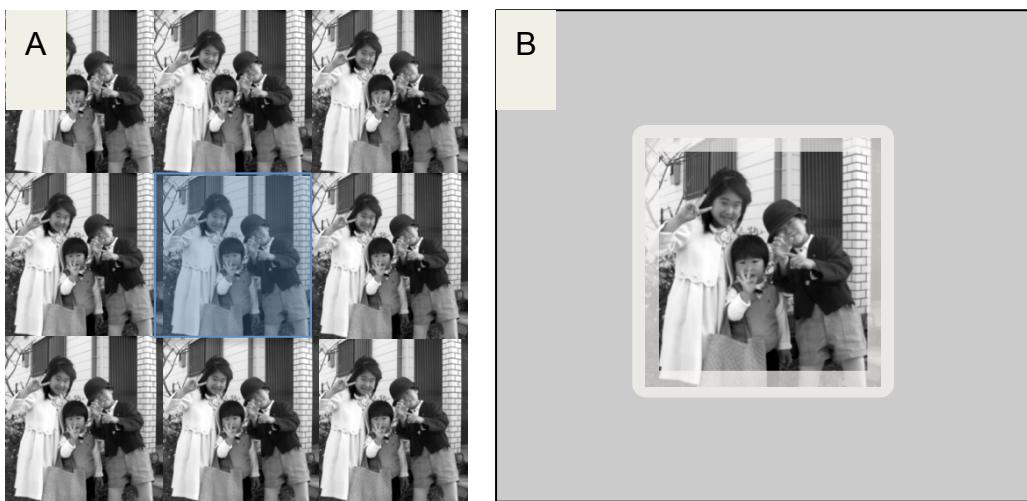


図 3 デジタル画像の持つ意味。本来、中央の1枚の画像であるが、実際には、(A)のように周辺に無限に繰り返している画像として認識しておくことが重要である。(B)は、その画像の周辺を Windowing により、コントラストを滑らかに落とし、Padding により、周辺が0となるように値を埋めることで、その繰り返しの影響を無くしている。周辺で急減に映像が変わる場合には、その影響が大きく表れる(図 4)。また、平均値そのものが一定の値となるようにする事を、Floating と呼ぶ。Floating は場合によっては、アーティファクトを生む場合があるので注意が必要である。

周辺の構造が滑らかに接続されていない場合には、多くの画像処理において、周辺にアーティファクトを生み出す場合がある。それから逃れるためには、周辺を滑らかに接続するために、Windowing（窓関数を積算する）を行い、その後、Padding（周辺を 0 とする）を実施する必要がある。

ここで、図 4 に電子顕微鏡画像とそのフーリエ変換を示している。(D)には、十字が表れているが、左右、上下のコントラストが異なっているために表れた。この十字は、繰り返していることを考慮しないと理解できない。(E), (F)からはそれが消えている。画像が $2^n \times 2^m$ に成っていない場合には、注意が必要である。また、CCD 等のノイズにより、周辺部などに、黒線や白線が表れている場合もあり、その場合にも注意が必要である。

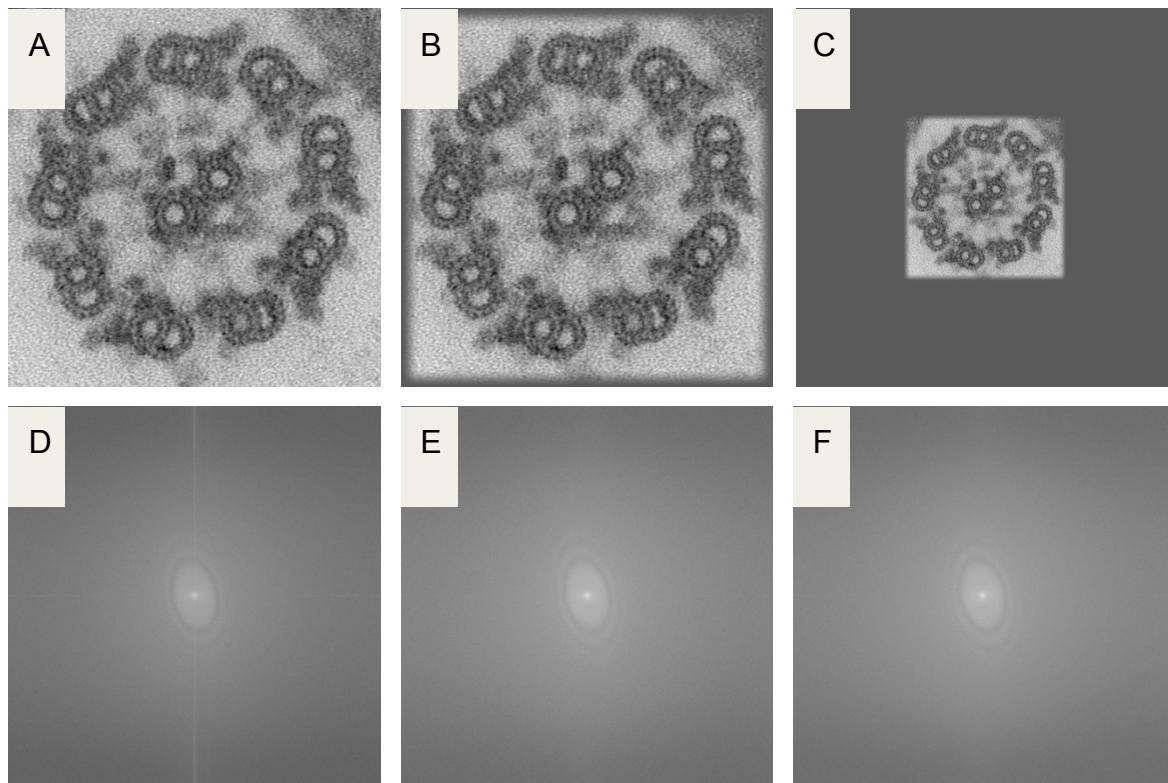


図 4 画像の Windowing と Padding の影響。(B)は、(A)の周辺の平均値に向けてコントラストを失うように、窓関数(コサイン型の周辺をもつ窓関数)を積算したものである。(C)はそれをさらにその周辺の平均値で埋めたものとなっている。(D)-(F)は、(A)-(C)のフーリエ変換である。これらの作業は下記に示す Eos のコマンドで行った。何の処理もなく、FIJI でフーリエ変換を行った場合には、自動的に $2^n \times 2^m$ の Padding が行われるため、十字が表れてしまうので、注意が必要である。

**【演習 4】** Eos を用いて、FlagellaSection.mrc に Windowing や Padding を実施し、その影響をフーリエ変換して確認してみよう。

```
$ mrcImageWindowing -i FlagellaSection.mrc -o FlagellaSection.win.mrc
-m 2 -w 0.05 0 0.05 0
$ mrcImagePad -i FlagellaSection.win.mrc -o FlagellaSection.pad.mrc -m
3 -H 4096 -W 4096
```

それぞれ、Display2 及び、フーリエ変換後、ctfDisplay を使って確認するか、もしくは、FIJI を使って表示し、そのフーリエ変換を確認してみよう。

## 2.4 点拡がり関数 (PSF) とコントラスト伝達関数 (CTF)

画像が、撮影装置によって撮影された場合には、撮影装置特有の画像のボケを生じ、本来、点であるべき画像が拡がりをもつ。この点がどのようにボケるかをしめした関数を点拡がり関数(PSF: Point Spread Function)と呼ぶ。実際の画像は、この点の集まりであるため、この PSF が画像に畳み込まれた(Convolution) 画像となる。次の図は、この畳み込み演算と PSF の関係を示したものである。今回、ガウス関数が畳み込まれたため、(A)の絵がボケたことがよく分かる。

また、画像に対して畳み込むと、フーリエ空間では積算することに対応する。ここで、PSF のフーリエ変換をコントラスト伝達関数(CTF: Contrast Transfer Function)とよび、この CTF を原図のフーリエ変換に積算したことになる。いま、ガウス関数のフーリエ変換は、ガウス関数であるため、結果として、後述するローパスフィルタと同じ効果を示す。

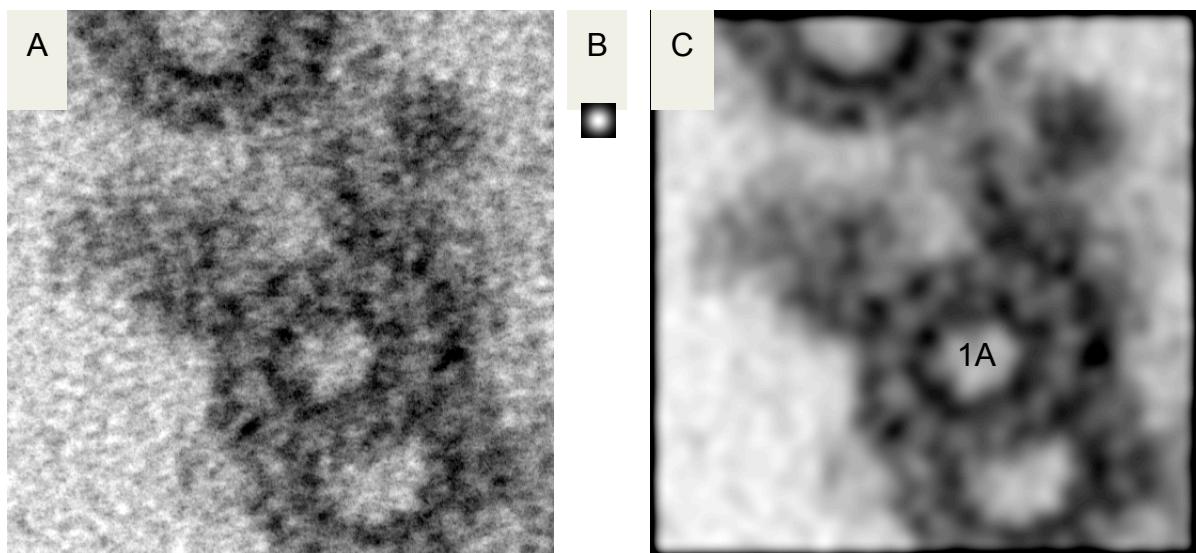


図 5 PSFによる畳み込み。(A)の画像に対して、(B)の画像を畳み込むと、(C)の画像が得られる。(B)は、標準偏差が 1 [nm]となるガウス関数である。(A)では、噪音が多いために、はっきりしないが、1A(A 小管)は13個の白い○(微小管のプロトフィラメント)からなることが分かる。ガウス関数による畳み込みにより、平均化がなされ、ノイズが落ちることで明らかに見やすい画像を手に入れることができている。画像 A に画像 B を畳み込むとは、画像 A を画像 B の絵に従って、移動しながら画像 B の強度をかけ、足し合わせた画像の事である。この場合には、自分自身周辺の強度を高く、周辺の強度を少しづつ落としながら平均した、重み付き平均操作を行ったことに対応する。

**【演習5】** Eos を用いて、ガウス関数によるボケを通して、畳み込み演算を理解してみよう。また、ガウス関数のフーリエ変換がガウス関数であることを確かめた上で、畳み込まれた画像が積算になっていることを確認してみよう。

```
$ mrcImageGaussDisc -o GaussDisc.kernel -W 32 -H 32 -size 2 -sigmax 10
-sigmay 10
$ mrcImageConvolution -i FlagellaSectionROI.mrc -o
FlagellaSectionROI.GaussConv.mrc -ikm GaussDisc.kernel.mrc
```

**【応用3】** 作成する GaussDisk.kernel の sigmax, simgay を変更し、畳み込みの効果を確認してみよう。

**【演習6】** FIJI を用いて、畳み込み演算を実施してみよう。FIJI では、畳み込むべき関数 (PSF) を行列として、設定する。FlagellaSectionROI.mrc を Open した後、  
FIJI -> Process -> Filteres -> Convolve  
として、設定する行列を、下記のように設定してみよう

```
1 1 1
1 2 1
1 1 1
```

**【応用4】** これを更に、ボケた画像にするにはどのようにすればよいかを考えてみよう。

**【応用5】** 次のような行列を設定すると、エッジの強調が可能であるが、位相が変化するため白黒がおかしくなる部分が表れる。確認してみよう。

```
-1 1 -1
1 2 1
-1 1 -1
```

## 2.5 電子顕微鏡画像のもつコントラスト

さて、ここで、電子顕微鏡画像生成の原理について、簡単にまとめておこう。透過型電子顕微鏡のコントラストは、基本的に、原子核のつくる静電ポテンシャルによる弾性散乱により、生成される。コントラスト生成には、主に4つの方法がある。散乱コントラスト、強度コントラスト（吸収コントラスト）、位相コントラスト、回折コントラストである。特に、生物試料で構造解析をするには、前3者が重要である。図 6 にそのメカニズムの概略を図示している。

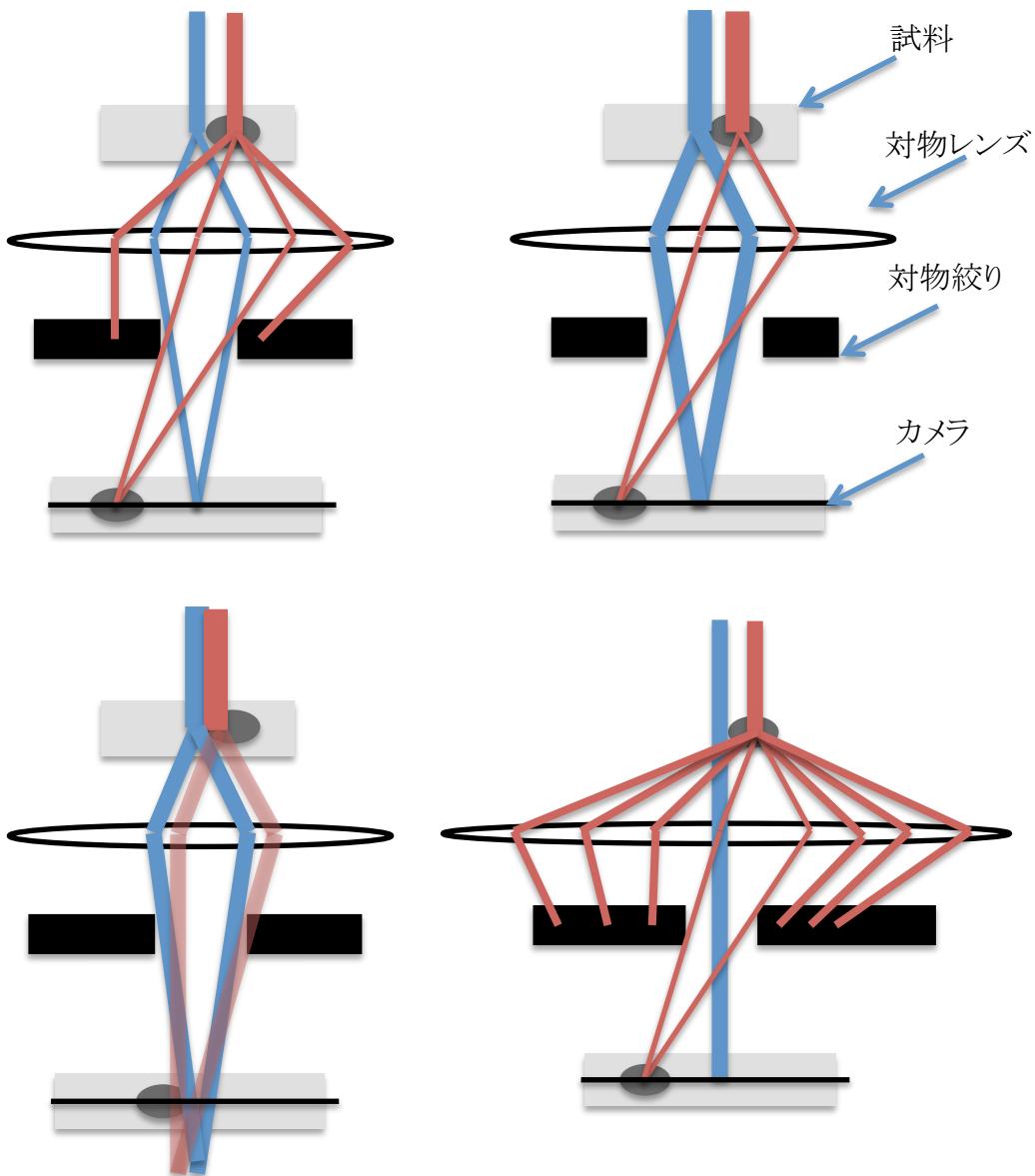


図 6 電子顕微鏡によるコントラスト生成のメカニズム。(A) 散乱コントラスト、(B) 強度(吸収)コントラスト、(C) 位相コントラスト、(D) 回折コントラスト。(A) 高角へ散乱する電子線が多い試料(濃灰色)では、対物しづりにより一部の電子しかカメラまで届かない。そのため、コントラストが生じる。(B) 電子線の吸収がある試料では、その一部の電子しかカメラまで電子が来ない。(C) 異なる静電ポテンシャルを通り抜けた電子は、その透過度が同じであっても、その電子線の波の位相が異なる。そのために、焦点が外れたところでは、カメラで干渉し、コントラストを生む。(D) 結晶性をもつ試料では、結晶によるラウエ散乱の高次の散乱を対物絞りで排除することによりコントラストを生むことができる。

第一に、散乱コントラストとは、元素の種類の違いや密度の違いに起因する高角への散乱量の違いによりコントラストを生む方法である。原子により、高角側に散乱した電子は、対物絞りによって吸収される。このため、結像面での結像に電子が寄与せず、重原子や密度の高い領域が黒（電子線量が少）となる。

第二に、強度コントラストとは、試料そのものが電子線を吸収した場合、あるいは、非弾性散乱し、エネルギーを失い、その後、エネルギー・フィルタによりゼロロス電子のみを透過した場合に生じるコントラストである。

第三に、位相コントラストとは、原子核のつくる静電ポテンシャルにより、弾性散乱した際に生じる位相のズレを基に、干渉させて、コントラストをつくる方法である。通常、不足焦点（アンダーフォーカス）として写真を撮影することにより、互いの位相ズレの違いを干渉させる。通常、不足焦点（実際の像を形成する面の位置が、検出器・カメラの下に存在しており、対物レンズの焦点距離が長い状況にあること）で撮影する場合が多い。

これらのいずれも、本来であれば、重原子ほど、静電ポテンシャルが高く、大きな値を持つべきであるが、実際には、その逆のコントラストを生むために、コントラストが逆転してしまう（位相コントラストでは不足焦点の場合）。すなわち、重原子や同じ元素であれば、密度が高い領域のコントラストが電子が来ないために黒くなる点に注意が必要である。

最後に、詳細な式の説明は行わないが、位相コントラストと強度コントラストに関して、物理的に弱位相物体（薄い試料）の場合に生じる、コントラスト伝達関数を示す式を示しておく。この辺りの詳細については、参考6が詳しい。

位相コントラストと強度コントラストが  $1:A_{\text{overP}}$  で表現されている場合、第1項位相コントラストと第2項強度コントラストの和に、包絡算数 Env を積算したものとして、コントラストは表記できる。

$$CTF = (-\sin 2\pi\chi - A_{\text{overP}} \times \cos 2\pi\chi) \times Env$$

$$\text{, where } \chi = \frac{1}{2} \Delta f \lambda R^2 + \frac{1}{4} C_s \lambda^3 R^4$$

Cs: 球面収差係数、 $\Delta f$ : デフォーカス量(不足焦点:正), R: 空間周波数

包絡関数(Envelope Function)は分解能を制限する関数であり、電子顕微鏡の性能に依存する項としては、Es（点光源性、空間的コヒーレンス）に依存する項と Ec（単色性、時間的コヒーレンス）に依存する項、そして、MTF(検出器の性能に依存する項:Modulation Transfer Function)の積で表現できる。

$$Env = E_s \times E_c \times MTF$$

点光源性に依存する項は、

$$E_s = \exp[-\pi^2 A_{in}^2 (C_s \lambda^2 R^3 - \Delta f R)^2]$$

, where  $A_{in}$  is half angle of illumination anagle (照射半角)

となり、主に、照射半角 ( $A_{in}$ : 試料からみたときの電子線源の大きさを視野角で表現した量) と不足焦点量( $\Delta f$ )と球面収差( $C_s$ )に依存する。

単色性に依存する項は、

$$E_c = \exp \left[ -\frac{\pi^2}{16 \ln 2} C_c^2 \lambda^2 \left( \frac{\Delta E}{E} \right)^2 R^4 \right]$$

となり、エネルギー幅( $\Delta E/E$ )と球面収差係数( $C_c$ )に依存する。

MTF は、カメラやフィルムなどのディテクターに依存する項であり、その関数系は検出器によって異なる。フィルムではローレンツ関数、CCD カメラでは指数関数や多項式関数で近似する場合が見受けられる。

## 2.6 電子顕微鏡画像の補正

では、透過型電子顕微鏡の場合には、上述した CTF はどのような性質をしめる関数であろうか。図 2B, C はそれを Siemens Star に対して示したものである。何が変化し、どのような点に注意するべきかについて考えてみよう。

第一に、全体としては、白黒が反転していることに気がつくであろう。これは、2.5 節でしめた様に、コントラストが反転することに起因している。

第二に、それにも関わらず、白黒が再び反転している領域がある点が注目できる。このことは、単に、コントラストが反転したのみならず、分解能に応じて白黒が反転している事を示しており、この補正が必要であることを示している。

第三に、前述したが、灰色のリングとして、情報を失っている領域があること、また、リングの中心付近もまた、灰色となっており、情報を失っていることである。

次に、図 2D-F はそれぞれ、A-C のフーリエ変換である。原図 A のフーリエ変換である D と比較すると、E, F 共に二つの点に注目できる。

第一に、黒いリング上の構造 (Thon Ring) が観察できることである。これは、情報を失った領域である。第二に、E は、ローパスフィルタがかかり、高周波の情報を失っていることである。そのため、一見すると、B のほうがよく見えなくも無いことである。

B, C の違いは、照射角の違いで有り、B が LaB<sub>6</sub> により撮影された場合(照射

角 0.2mrad)、C は、FEG (電界放出型電子銃) により撮影された場合(照射角 0.02mrad)に対応している。デフォーカス量が大きい場合には、この照射角の違い (点光源性の違い) が像質を左右している。同じ LaB<sub>6</sub>で撮影した場合でも、0.15-0.6mrad 程度の違い (前者がスポットサイズを小さくし、電子線を拡げた条件で撮影した場合、後者はスポットサイズを大きくし、明るくした場合に対応する) が生じる。同じ電子顕微鏡を使ったから、同じ像質を得られる訳ではない。したがって、演習 1 で示したように、自分自身が撮影した電子顕微鏡像がどのような質をもっているかを調べることが重要である。

H, I は、空間周波数毎の CTF の値から、その位相 (+-) の補正を行った画像である。これにより、H, I ともに A と同様のコントラストを取り戻した。ただし、H, I ともに、Thon Ring の影響により、コントラストを取り戻していない部分が存在する。また、H は、G のようなローパスフィルタの掛かった像となってしまい、内側の高分解能構造を失っていることを示している。それに対して、I では十分に内側まで情報を保っていることが分かる。ここでは、こうした透過型電子顕微鏡画像の性質を理解する演習を実施してみよう。

### 【演習 7】 SiemensStar.mrc に関して、Eos を用いて、その電子顕微鏡画像のシミュレーションとその CTF 補正を実施してみよう。

```
$ mrcImageCTFObservation -i SiemensStar.mrc -o SiemensStar.ctftest.mrc -kv
 200 -Cs 2.1 -df 60000 -A 0.1 -Ain 0.2 -ctfMode 33
$ mrcImageCTFCompensation -i SiemensStar.ctftest.mrc -o
  SiemensStar.ctfcomp.mrc -kv 200 -Cs 2.1 -df 60000 -A 0.1 -m 1
```

### 【応用 5】 ctfDisplay を使って、CTF のもつ特徴を検討してみよう。とくに、演習 3 で問題とした、Thon Ring の周波数について検討してみよう。

```
$ mrcImageFFT -i SiemensStar.ctftest.mrc -o SiemensStar.ctftest.fft
$ ctfDisplay2 -i SiemensStar.ctftest.fft
```

### 【応用 6】 加速電圧、デフォーカス量、照射角などを変えて、画像がどのように変わると試してみよう。

それでは、こうした影響が具体的な電子顕微鏡画像にどのように表れているかを検討してみよう。そのためには、電子顕微鏡画像がどのような条件で撮影されたかを決定する必要がある。特に、デフォーカス量を決定することは重要である。

【演習8】Eos の ctfDisplay を用いて、図 1(A)の画像の電子顕微鏡撮影条件を求めよ。加速電圧 80kV, 球面収差係数 2.1mm である。

```
$ mrcImageFFT -i FlagellaSection.pad.mrc -o FlagellaSection.mrc.fft
$ ctfDisplay -i FlagellaSection.mrc.fft
```

として、図 7 を参考にしながら、不足焦点量、照射角、シグナル、ノイズ量、カメラ（フィルム）の MTF(変調関数：カメラによる CTF をこの場合は指している。)を求めよ。

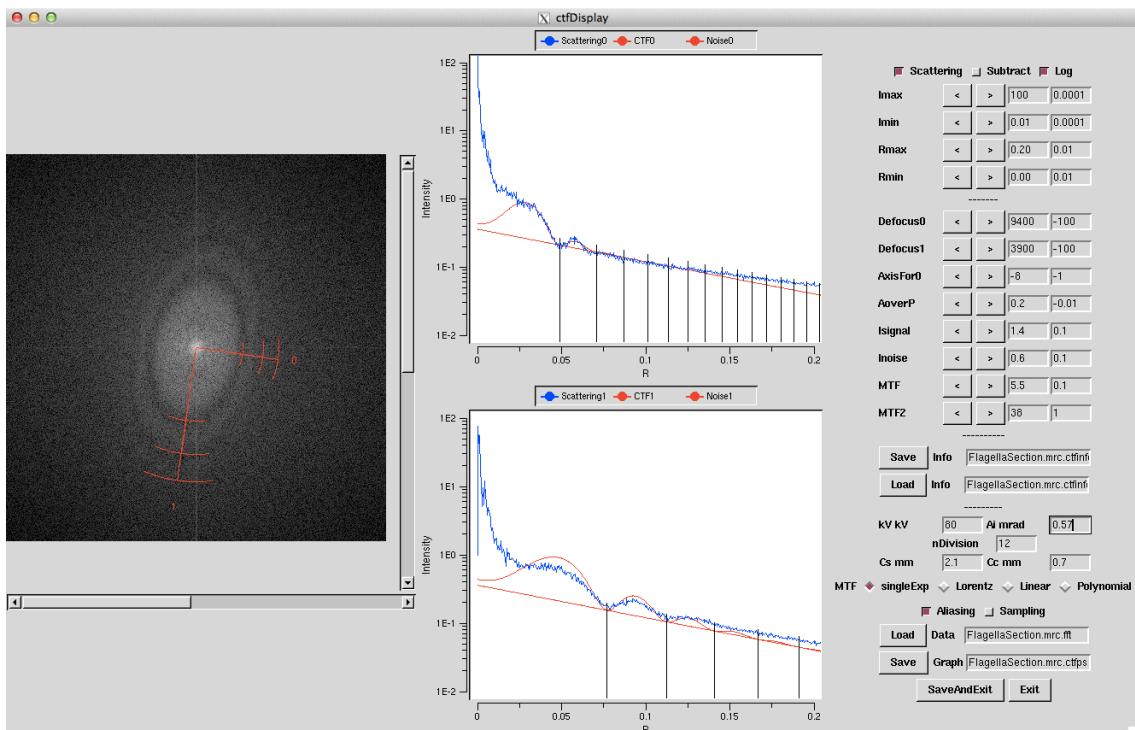


図 7 ctfDisplay により、図 1B を表示したもの。このソフトウェアにより、デフォーカスなどの電子顕微鏡画像のパラメータを決定することができる。青の線は、軸0とそれと直交する軸1方向におけるパワースペクトラム。**nDivision=12** であるので、**30** 度の確度の平均値を示している。この青い線のピークが見える範囲で、電子顕微鏡写真が十分な空間分解能をもっていることを示している。照射半角(**Ain**)の影響や試料そのもののドリフトや振動の影響により、電子顕微鏡の分解能は低下する。赤の線は、(**Isignal\*CTF+Inoise**)x**MTF** として、予測したパワースペクトラム。縦の黒い線は **Thon Ring** の位置である。この **Thon Ring** の位置を精確に決めることが、その後の画像処理、特に、高分解能画像処理にとって重要である。実際には、**Thon Ring** 毎に、位相が反転するため、決定精度が悪いと高分解能の画像を得るために平均操作を行うと情報が消えてしまう

上述のステップにより、電子顕微鏡画像の条件が決定すると、その条件を使って、補正をかけてみよう。

【演習 9】ctfDisplay により決定した情報を FlagellaSection.mrc.ctfinfo として ctfDisplay 上で保存し、その補正の効果を確認してみよう。

```
$ mrcImageCTFCompensation -i FlagellaSection.mrc.fft -o
FlagellaSection.ctf.mrc -info2 FlagellaSection.mrc.ctfinfo -m 1
$ Display2 -i FlagellaSection.mrc &
$ Display2 -i FlagellaSection.ctf.mrc &
```

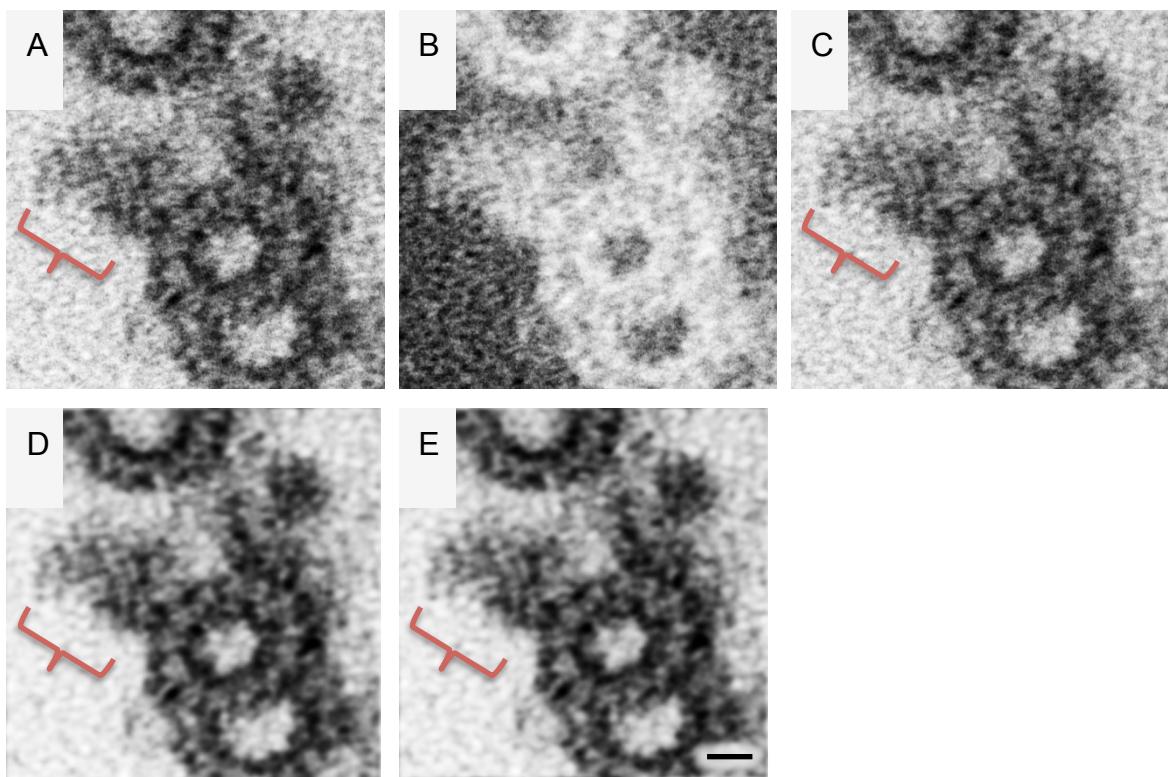


図 8 鞭毛の2連微小管の構造に対するCTFによる影響とその補正。(A)補正前の画像、(B)補正後の画像、(C)補正後の画像(B)のコントラストを反転させた画像。(D, E)は、(A, C)に  $0.5 \text{ [nm}^{-1}]$  のガウスフィルタ(ローパスフィルタ)をかけたものである。今回のデフォーカスにおいては、空間周波数が  $4 \text{ [nm]}$  の点で位相が反転している。微小管のプロトフィラメントが約  $5 \text{ [nm]}$  であることから、それより小さい構造での白黒が反転することになる。プロトフィラメントのかたちやダイニン(赤の括弧で示した部分)の構造が変わっていることが分かる。スケールバーは  $8 \text{ nm}$  を示す。

3 画像のノイズを落としたい。

既に、これまでの画像処理でもノイズを落として、画像の認識がしやすい画像に変換してきた(図 5, 図 8)。ここでは、画像のノイズを落とす方法について紹介する。

### 3.1 ノイズの種類

ノイズには大きく二つの種類が存在している。一つは、白色ノイズ（雑音）、例えば、ポアッソンノイズ（量子ノイズ）、あるいは、ごま塩ノイズのような、広範囲の空間周波数に渡り強度をもつノイズである。もう一つは、画像のムラと呼ばれるような、低周波側に主に影響があるものである。図 9 を参考に考えてみよう。これらのノイズの性質に依存して、様々なノイズ除去の方法が考えられる。ここでは、そのいくつかを紹介する。

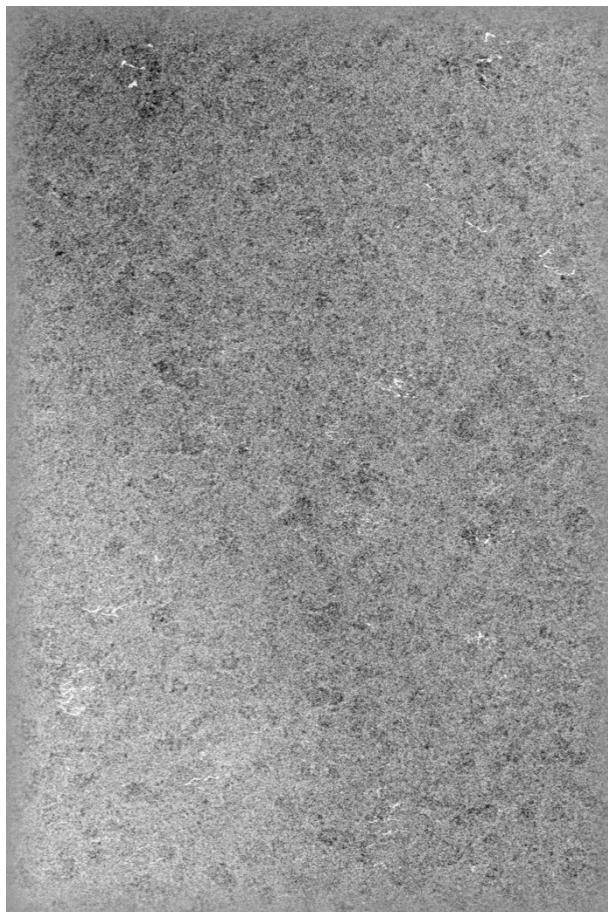


図 9 氷包埋された GroEL の電子顕微鏡写真。CTF による補正をおこなったものである。黒くみえる粒状の構造が GroEL である。

氷包埋された試料は電子線ダメージに弱いため、電子線量が少ない。そのため、ポアッソンノイズ（量子ノイズ）とよばれるノイズがあり、「闇夜のカラス」の写真と言える。ポアッソンノイズとは、ピクセル辺りの電子の個数に起因するノイズであり、電子の個数のルートの電子線個数の揺らぎをもつ。すなわち、ピクセル辺り 100 個の場合、10 個の揺らぎをもつ。実際のコントラスト（白と黒の差）は 10 個程度であるため、SN 比（Signal-to-Noise ratio）がピクセル辺り 1 程度である。

また、写真のように、氷の厚さの違いにより、全体的に、右上が黒く、左下が白くなっている。これは、氷の厚さの違いに起因する。

### 3.2 全体のムラをとるフィルタ

画像を表示する場合に、ヒストグラム（濃度分布）を変換して、コントラストをあげる。その際、最大値、最小値をそれぞれ白、黒として表現する方法がある。しかし、画像全体にムラがある場合、ヒストグラムを変更しても見やすい場所と見にくい場所があるために、その後の処理が非常にとりにくい。そのため、全体のムラをなくすことがその後の処理を楽にする場合がある。

ここで、よく使われるのは、ハイパスフィルタや CVE(Constant Variance Enhancement)とよばれる方法である。下記にその結果を示す。前者が不自然なほどに全体のムラが無くなっているのに対して、後者は、Window の大きさに依存して、元の構造情報が残っており、比較的自然な写真にみえる。

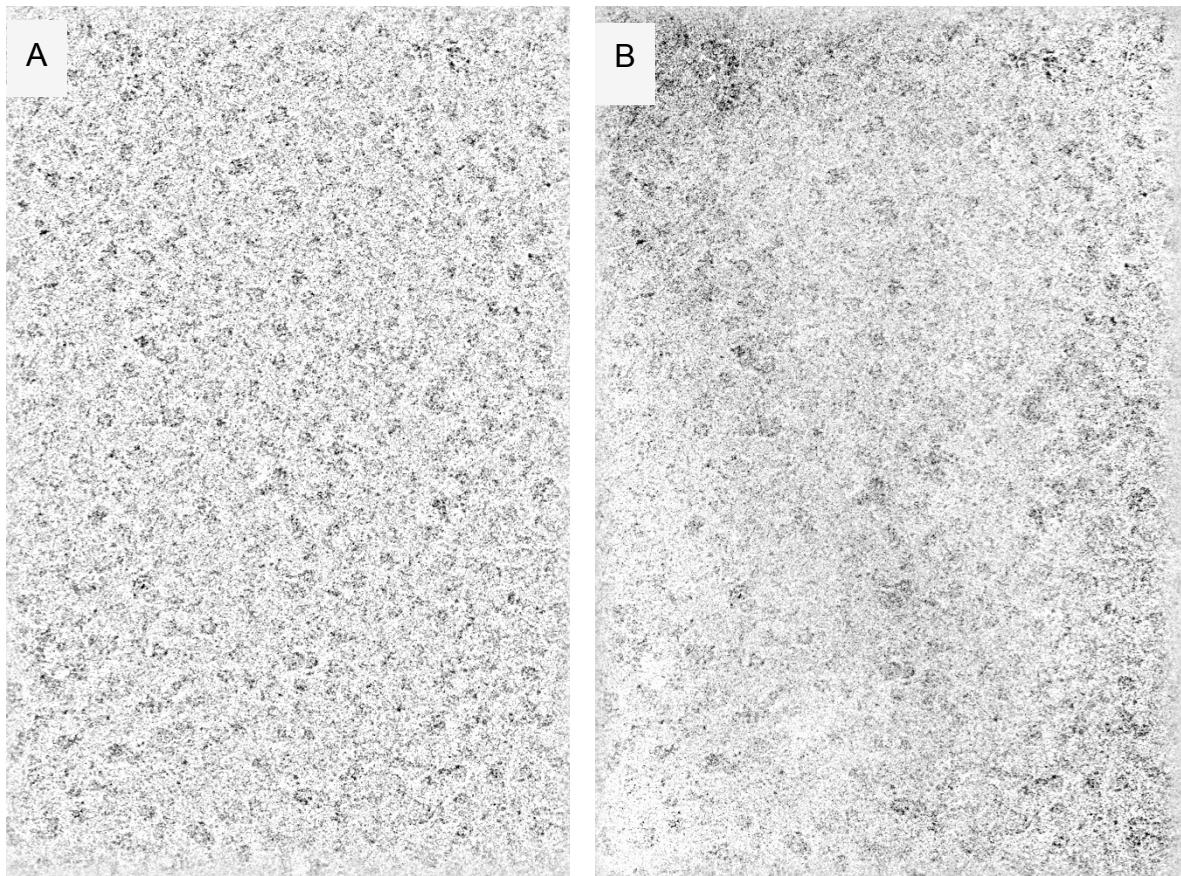


図 10 図 9 の画像から、画像ムラを除去した画像。(A)は、ハイパスフィルタを用いたもの( $\cos$  型フィルタ、 $0.001 \rightarrow 0.002 \rightarrow 0.003 \text{ \AA}^{-1}$ )。(B)は、CVE フィルタ (Window 幅、1024pixel: 256nm) を用いた画像。いずれもムラがとれていることがわかる。

【演習 10】サンプルデータのうち、cryo-GroEL.ctf.mrc にハイパスフィルタをかけて

みよう。-hvp は強度が  $1/2$  になる空間周波数 [ $\text{\AA}^{-1}$ ]

```
$ mrcImageHighPassFilter -i cryo-GroEL.ctf.mrc -o cryo-GroEL.hi.mrc -hvp  
0.002 -w 0.001 -m 2
```

【応用7】 -hvp, -w, -m の値を変えることで、フィルタの性質を変えることができる。  
適切な大きさやフィルタモードを検討してみよう。

### 3.3 ローパスフィルタ

ホワイトノイズ（白色雑音）は、全空間周波数領域に渡り、同程度の強度をもつ。一方で、シグナル（構造情報、構造因子）は、低空間周波数領域の強度のほうが高く、高周波の強度が弱い。このため、特に、高周波領域において、S/N 比が低くなる。単粒子解析法などで用いられる平均操作はこの高周波領域での S/N 比をあげるために、多くの分子の位置と向きを決定し、平均する方法である。しかし、写真一枚での粒子の認識をあげることも、粒子の抽出、識別などでは重要である。

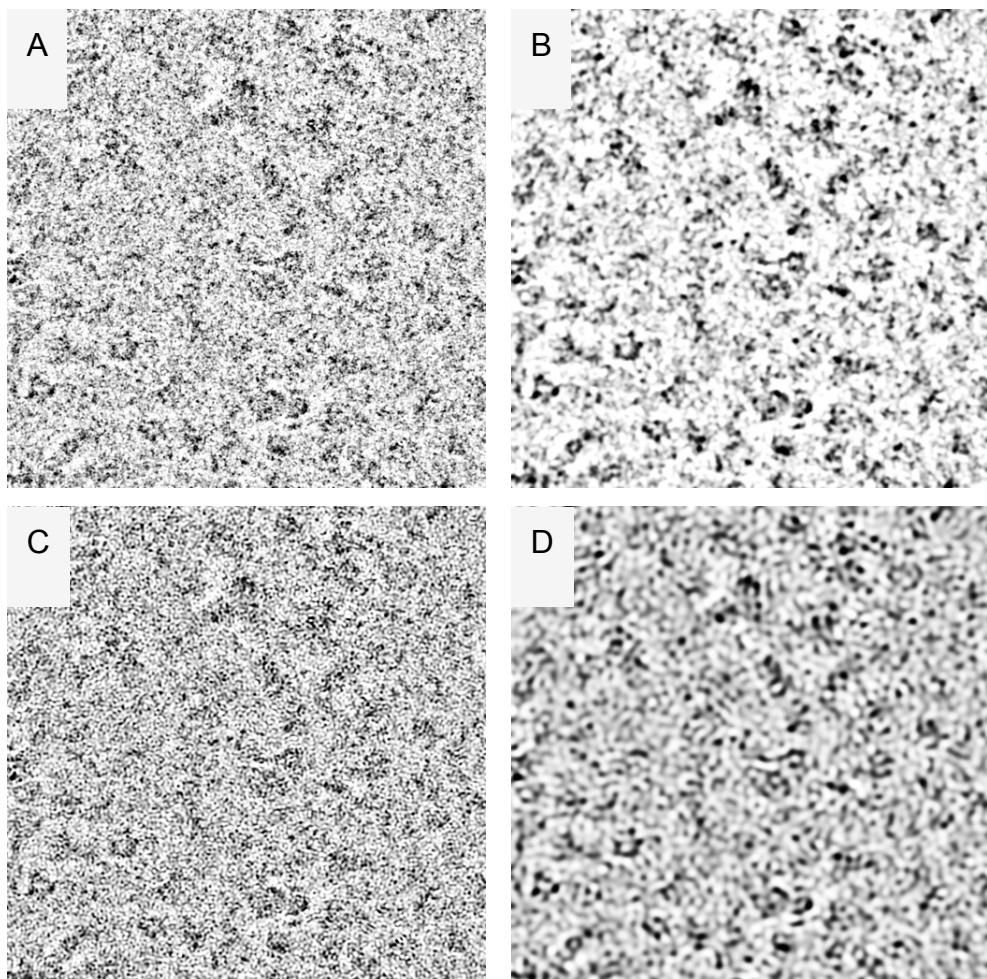


図 11 ローパスフィルタの効果。(A, B) ガウス型ローパスフィルタ、(C, D) コサイン型ローパスフィルタ(幅: 0.01 [Å<sup>-1</sup>] )。 (A, C) 0.05 [Å<sup>-1</sup>] (B, D) 0.02 [Å<sup>-1</sup>]。

そこで、ローパスフィルタが用いられる。ローパスフィルタは、空間周波数の低い領域だけの情報を抽出する方法であり、S/N比の高い領域だけの情報を使うことで粒子の識別が可能になる手法である。図 11 にその例を示す。

構造因子がガウス型、あるいは、指数関数型で近似できる場合が多いため、S/N比の低下も同様におきる。そのため、それらのフィルタ型が用いられる場合が多いが、それぞれに特徴がある。指数関数型は、比較的高周波まで情報を保持する。

Ideal (理想型) は、アーティファクトが目立つため、cos 型が用いられる。しかし、cos 型でも縞模様のあるアーティファクトが目立っていることが分かる。

【演習 11】Eos のローパスフィルタを適用し、その効果を比較してみよう。

Eos における cos 型のフィルタは、下記。-hvp は強度が 1/2 になる空間周波数[Å<sup>-1</sup>]  
`$ mrcImageLowPassFilter -i cryo-GroEL.hi.mrc -o cryo-GroEL.hi.low.mrc -hvp 0.05 -w 0.01 -m 2`

Eos におけるガウス型のフィルタは、下記。

`$ mrcImageLowPassFilter -i cryo-GroEL.hi.mrc -o cryo-GroEL.hi.low.mrc -hvp 0.05 -m 4`

【応用 8】その他のフィルタ型(exp, ideal)についても試してみよう。

### 3.4 カーネルの畳み込みによる画像処理

ローパスフィルタを用いた処理では、フーリエ空間での空間周波数を意識しながら、画像からノイズをとる。一方、実空間での畳み込みによる画像処理も比較的よく利用される。

【演習 12】FIJI を用いて、各種のフィルタを試してみよう。

FIJI におけるガウス型フィルタの利用方法は下記。

`FIJI -> Process -> Filters -> GaussianBlur`

【応用 9】【演習 5】で利用した畳み込み演算の手法をノイズ除去のための操作として利用してみよう。

### 3.5 様々なローパスフィルタ

ここまでに紹介した、多くのローパスフィルタ処理は、線形演算であるため、効果が比較的分かりやすい。しかし、ノイズは落ちるが、同時にフィルタの効果によって画像のエッジがなまってしまう。そこで、ノイズの性質とエッジの性質を利用した非線形型のノイズ除去フィルタが紹介されている。ここでは、Median Filter(中央値フィルタ)、Lee-Sigma フィルタ及び、Bilateral Filter(バイラテラルフィルタ)について試してみよう。

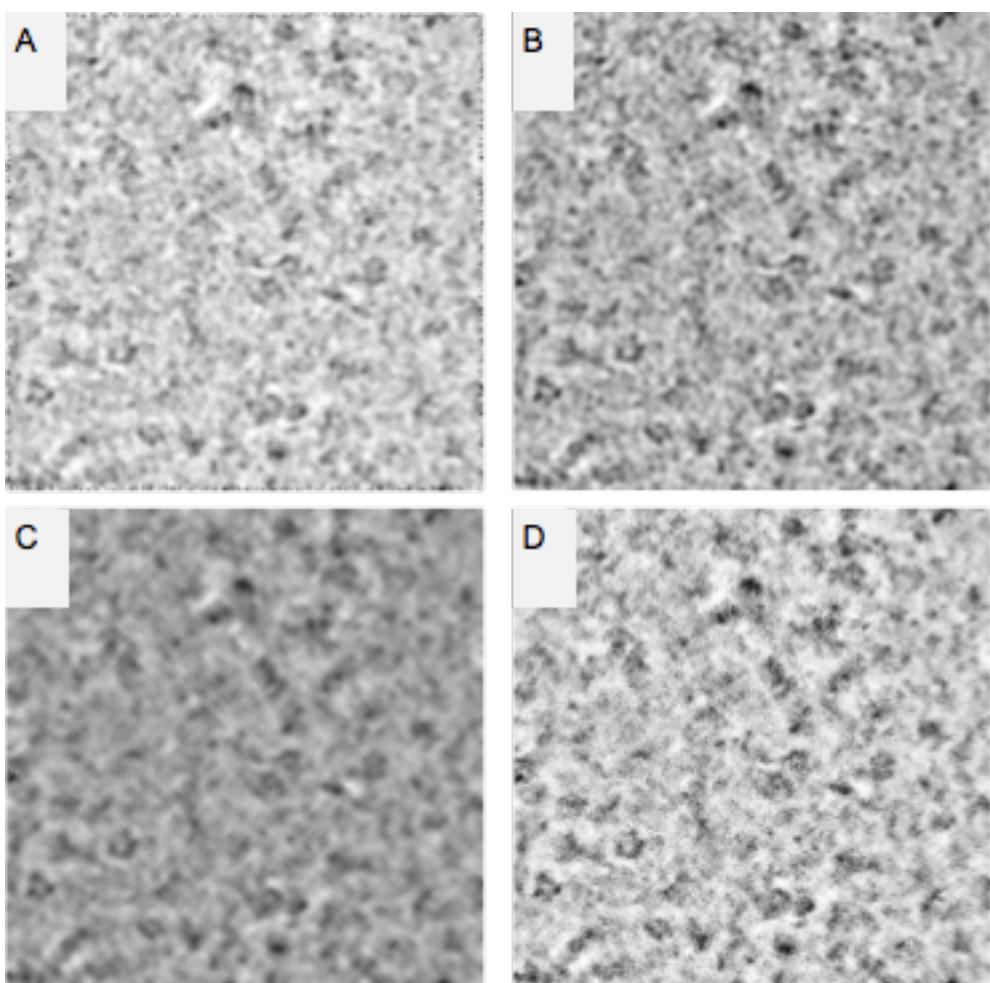


図 12 各種非線形平滑化フィルタ。(A) メジアンフィルタ。(B) Lee-Sigma フィルタ。(C,D) Bilateral フィルタ(密度方向の拘束:,とした)。いずれも、空間方向のカーネルは、半径 5 [pixel]=2.5 [nm]の円形カーネルである。ローパスフィルタに比べて、平滑化は進んでいるもののエッジが保存している様子がみてとれる。(C)と(D)を比較すると、(D)の方が密度差を維持するフィルタとなっており、(C)では、かなり同一の密度をもつようになっていることが分かる。(D)のように、元々のノイズの範囲を指定した場合には、極端に高いもしくは、低いノイズが残る傾向があることがわかる。

Median Filter（中央値フィルタ）は、設定したウィンドウ内の中央値を代表値としてとるためのフィルタであり、エッジを保持した平滑化が可能である。特に、極端に高い、若しくは、低い1点からなる雑音が加えられている、ごま塩ノイズ（Salt-and-Pepper Noise）やスペックルノイズに対して有効である。

Lee-Sigmaフィルタは、指定したウィンドウ内での平均値 $\bar{v}$ と標準偏差 $\sigma$ を計算し、その標準偏差の定数倍以内(通常は)のピクセルのみを求め、その平均値を代表値とするフィルタである。ウィンドウ内にある極端に高い、もしくは、低い値をもつピクセルを除いて平均することが出来る。その意味で、メジアンフィルタと同じ効果をもつが、平均値を用いる分、平滑化の影響が大きい。エッジの中央付近では、標準偏差が大きくなり、その平均値をもつが、エッジの縁では、エッジ側が指定した範囲より外部の値となるため、底もしくは台の値をもつことになる。

Bilateral Filter（バイラテラルフィルタ）は、密度の違いが大きいところは出来るだけ、ローパスフィルタをかけないようにするためのフィルタである。近傍で、密度が近いピクセル同士は、できるだけ同じ密度をもつようになり、密度が異なるエッジ付近では、近傍の平滑化がかかりにくくなる。

**【演習13】** Eosのコマンドを使って、各種紹介したフィルタをかけてみよう。  
-rで指定した値により、ウィンドウの大きさを変更できる。これ以外にも平均値

フィルタや2次曲面近似フィルタなどを選択できる。

メジアンフィルタは、下記。-rが半径。-Mは、フィルタの種類の選択

```
$ mrcImageSmoothing -i cryo-GroEL.hi.mrc -o cryo-GroEL.hi.sm1.mrc -r 5 -  
M 1
```

Lee-Sigmaフィルタは、下記。

```
$ mrcImageSmoothing -i cryo-GroEL.hi.mrc -o cryo-GroEL.hi.sm4.mrc -r 5 -  
M 4
```

Bilateralフィルタは、下記。

```
$ mrcImageBilateralFilter -i cryo-GroEL.hi.mrc -o cryo-GroEL.hi.bila.mrc  
-kS 15 -sD 4000 -ss 5
```

**【応用10】**複数のフィルタを組み合わせることで、それぞれのフィルタが得意なノイズ除去が可能となる。氷包埋試料の場合、前処理として、どのようなフィルタが適切であると考えるか、その組み合わせを考えてみよう。

## 4 画像のキレを上げたい。(エッジの強調)

少しなまつた、ボケた画像を先鋭化処理を手法を用いて、画像のキレをあげたい場合がある。画像処理においては、ノイズをとった後、エッジを明確にすることにあたる。また、エッジ強調やエッジ抽出といった手法は、その後のセグメンテーションや形状認識にとって重要である。ここでは、何種類かの画像の先鋭化のための画像処理を紹介する。

### 4.1 カーネルを用いたエッジの強調

前述したカーネルの畳み込みによるエッジ強調・検出法は数多く提案されている。その中でも、Prewitt, Roberts, Sobel オペレータによるものは基本的なオペレータとしてよく目にする。いずれも微分演算にあたるオペレータを用いたものであるが、特に、Sobel オペレータを用いたものは、平滑化とエッジ検出ができる点でよく使われる。利用されるオペレータは、下記に示すものである。

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 2 \\ 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

これは、近傍の重み付き平均と微分演算を組み合わせたものであり、微分演算がノイズを強調しがちであるので、平均操作を加えている点に特徴がある。また、実際には、このカーネルのみでは、縦方向のエッジのみが強調されるため、このオペレータを 90 度回転したものを組み合わせる。その場合でも斜めのエッジが弱くなるため、45 度ごとに回転させる場合もある。図 13 にその例を示す。

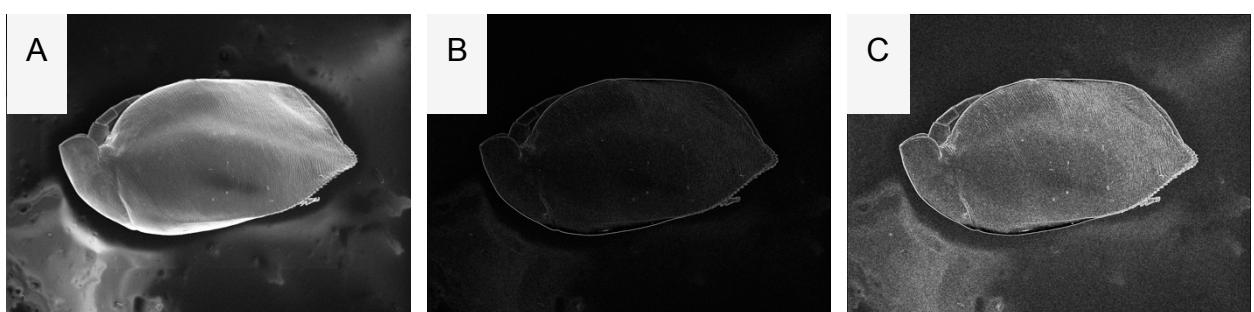


図 13 ミジンコの走査型電子顕微鏡に対するエッジ強調。(A) 元図 (B, C) Sobel オペレータによるエッジの検出、強調。それぞれ、画像のコントラストが異なる。(B)はエッジ検出等のためのコントラスト。

【演習14】Eosのコマンドを用いて、実際に、走査型電子顕微鏡像mijinko.mrcを変換してみよう。`-m`によりモードを変更することで異なるエッジ検出アルゴリズムが利用できる。

```
$ mrcImageEdgeEnhancement -i mijinko.mrc -o mijinko.sobel -m 6
```

【応用 11】FIJI を用いて、【演習 5】で利用した畳み込み演算の手法を先鋭化のために利用してみよう。FIJI->Process->Filters->Convolve が利用できる。

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -x & y & x \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

この中で、 $x, y$ の値を大きくすると元の画像の性質を残しやすい。また、 $5\times 5$ に拡張してみよう。

これ以外にも、ラプラシアン・フィルタなども有効である。図 14 にその例を示す。

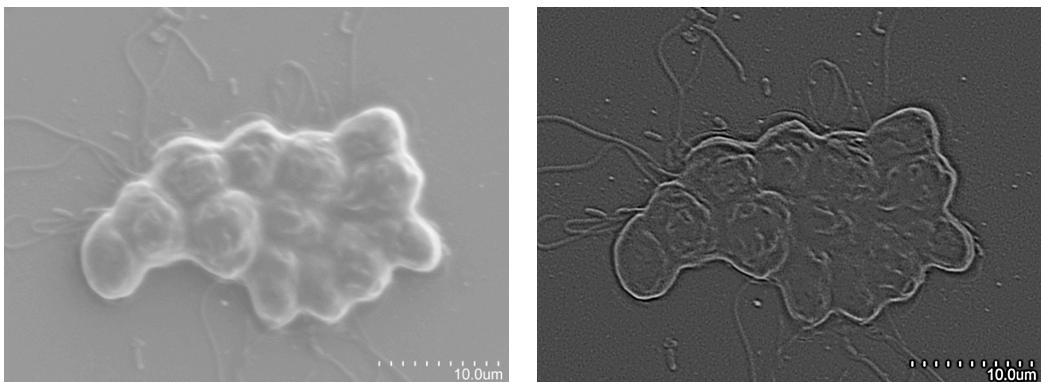


図 14 クラミドモナスの走査型電子顕微鏡写真。(A)は元図。(B)は、ウインドウ幅を 10[pixel]としたラプラシアン・フィルタ。FIJI->Plugin->FeatureExtraction->FeatureJ->Laplacian により作成した画像。Eos でも mrcImageEdgeEnhancement を用いて、同様のフィルタをかけることができる。

#### 4.2 ハイパス・フィルタ

前述したように微分演算は、フーリエ空間では線形のハイパスフィルタに対応している。ハイパスフィルタは、広域を強調するという意味で、画像の先鋭化、エッジの抽出を行うことができる。図 15 では、走査型電子顕微鏡画像に対し、ハイパスフィルタを施した例を示す。前述したムラの除去と共に、ボケた画像の先

鋭化が進んでいる。もう少し空間周波数の低い部分も取り込んでくれば、先鋭化の効果が明確になり、また、もう少し高周波のみを取り込めば、エッジ抽出の効果が明確になってくる。

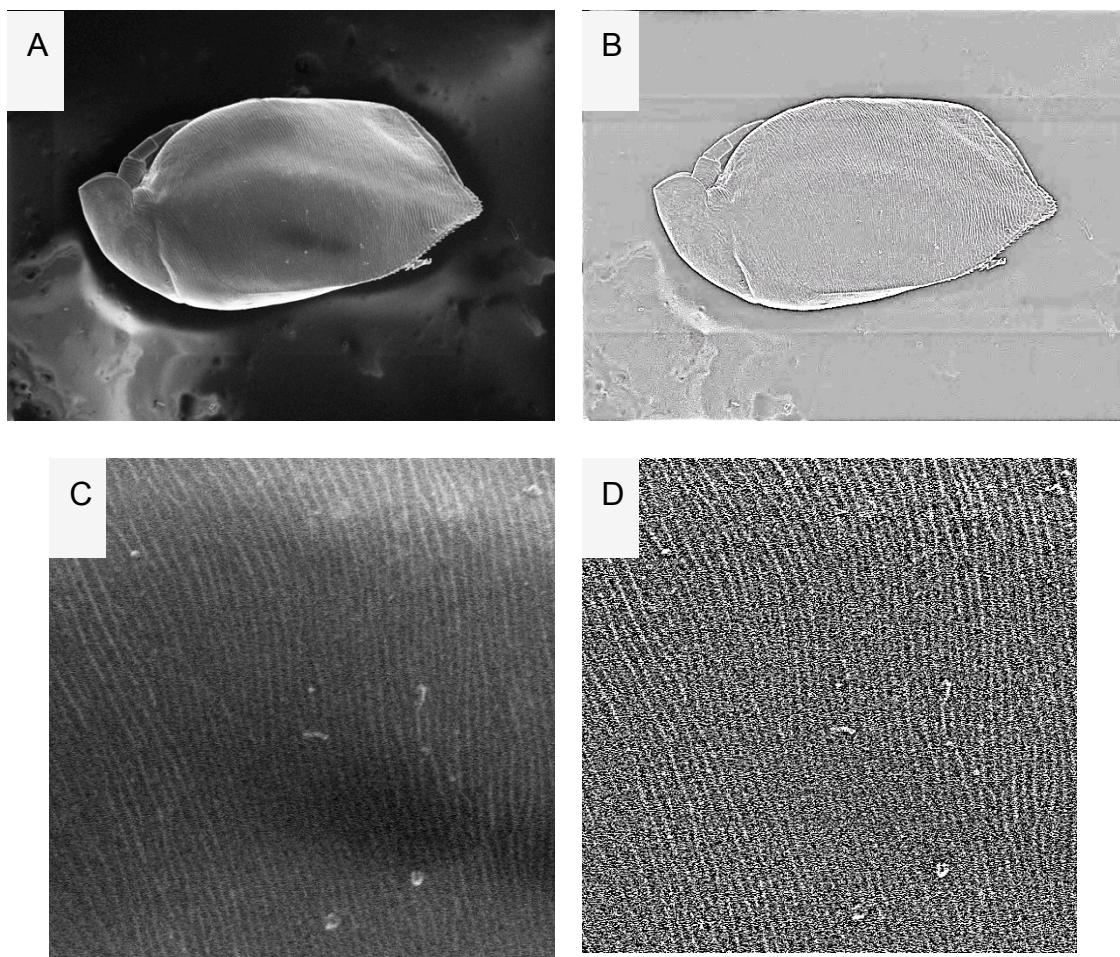


図 15 走査型電子顕微鏡によるミジンコに対するハイパスフィルタの影響。(A, B) 元図とその拡大図。(C, D)は、ハイパスフィルタ ( $1/5 [\text{pixel}^{-1}]$ ) の結果。ミジンコの表面にある縞模様が明確になっている。

【演習 15】Eos を用いて、様々なハイパスフィルタ (ideal 型、cos 型、指數関数型) をかけてみよう。 $-m$  及び  $-hvp$ ,  $-w$ , の値を変えてみよう。

```
$ mrcImageHighPassFilter -i mijinko.mrc -o mijinko.hi3.mrc -m 3 -hvp 0.2
$ mrcImageHighPassFilter -i mijinko.mrc -o mijinko.hi2.mrc -m 2 -hvp 0.2
-w 0.1
```

Ideal 型（理想型）は、理想的ではあるが、フーリエ空間でのエッジの影響が実空間に畳み込みとして現れてくる。確認してみよう。

### 4.3 画像の先鋭化のためのフィルタ

これ以外によく使われ、かつ、比較的お手軽に画像のキレを上げる手法として、Unsharp マスクがあげられる(図 16)。これは、ガウス関数のラプラシアンをカーネル( $L$ )として用い畳み込んだ画像(図 14 を参考)を作成し、かつ、重み付けして、元図( $f$ )との和をもとめることで、エッジのみの強調を行う方法( $f + k \times f \otimes L$ )である。ウェイト  $k$  を上げてくると、よりエッジが強調されてくるが、ノイズも若干増していく。

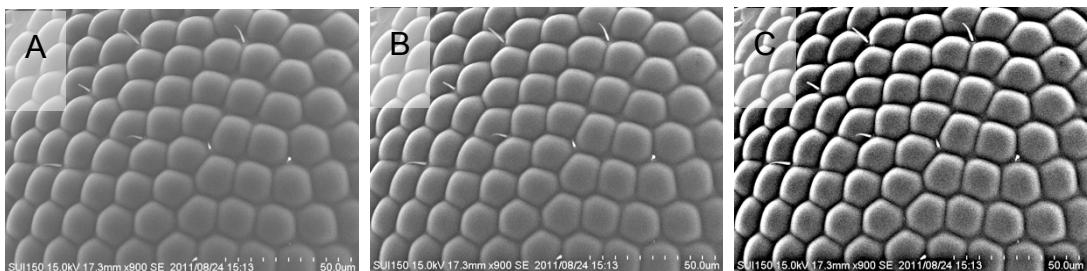


図 16 走査型電子顕微鏡(アリの目)に対する Unsharp マスクの影響。(A) 元図。(B, C)はそれぞれ Unsharp マスク。Window 幅を 10.0 [pixel]とし、それぞれ、0.4, 0.8 のウェイトとした。

【演習 16】 FIJI の Unsharp マスクを用いて、画像の変換を行ってみよう。

FIJI->Process->Filters-> Unsharp Mask により実施できる。

※ Eos でも、mrcImageEdgeEnhancement でも実行できる。

## 5 その他の画像処理

### 5.1 画像のヒストグラムの変換

画像によっては、ヒストグラムに偏りがあるために、コントラストが十分に得られていない場合がある。印画紙に焼いていた時代であれば、印画紙の種類を選び、長時間露光などを組み合わせることでコントラストの強調を行っていた。特に、暗い部分の強調を行いたい場合も多い。例えば、図 17 は、蟻の目の例であるが、暗い部分が多く、その部分の構造が十分にはつきりしない。この場合、ガンマ補正など、ヒストグラム変換が有効である場合がある。

【演習17】Eos のヒストグラム変換ツールを用いて、画像処理を行ってみよう。

```
$ mrcImageHighlighting -i ant.mrc -o ant.highlight1.mrc -m 1
$ mrcImageHighlighting -i ant.mrc -o ant.highlight2.mrc -m 2
```

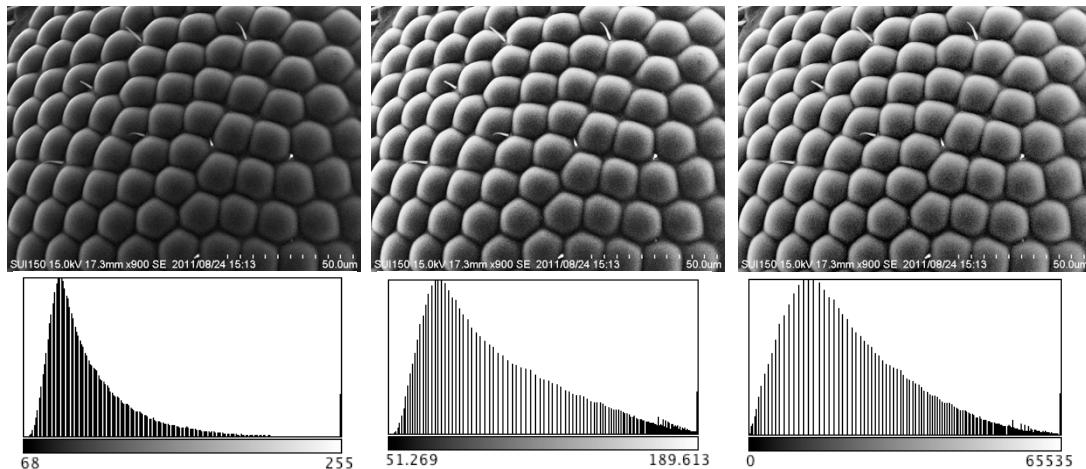


図 17 蟻の目の走査型電子顕微鏡写真的ヒストグラム変換によるコントラスト強調。(A) 元図, (B)  $\arctan$  型のヒストグラム変換(暗い部分のコントラスト強調), (C) ヒストグラム・平坦化によるヒストグラム変換。下段は、それぞれのヒストグラムを示す。ヒストグラム平坦化では、ヒストグラムを 16bits で表現している。それぞれ、暗い部分(値が小さい部分)が広がっているのが分かる。

## 5.2 画像を切り出し、回転させたい。(画像の補間)

興味ある領域(ROI: Region of Interest)だけを切り出したい、また、その ROI が、回転しているために、切り出すことが困難である場合には、Eos の Display2 などが有効に機能する。その場合に、画像の補間(Interpolation)を適切に行うことが必須となる。2次元の場合も、3次元の場合も同様である。

主に使われる方法としては、最近傍法(ニアレスト)や線形補間(バイリニア)、3次関数法(バイキュービック)、スプライン法、2次曲面補間などが上げられる。最近傍法はもっとも高速であり、元のピクセル値を保存するが、ピクセルのブロックが目立ち、シャギー(ギザギザ)になるなど、問題点も多い。線形補間はよりよいが、それでも補間場所によって、ノイズの振る舞いがことなり、ノイズのモアレが出る場合がある。

本来は、サンプリング理論(ある一定以上の分解能の情報がない場合には、ピクセル点以外の点の値も全て推定できる)に従った、完全補間が望ましいが、大変時間がかかる。この完全補間式を3次関数で近似したものが三次補間法(バイキュービック法)であり、ノイズの性質も含めて、比較的再現できている。時間が許す限り、採用することをお勧めしたい。

### 5.3 ステージが不安定な電子顕微鏡写真で画質をあげたい。(画像の加算)

ステージが不安定である場合には、一回あたりの露出時間を短くして、複数回、連続して撮影し、その後、移動量をサブピクセルの分解能で求めて、画像を平均することが出来る。最近、ダイレクトディテクタ (DD: CMOS カメラ) を用いた撮影により、画期的な写真がとれるようになってきている。この手法は、電子顕微鏡画像はどうしてもノイズが多いために、画像を切り出した後に、よく似た画像を分類し、その後、回転移動、平行移動を行って、ノイズを除去する方法がある。

さらに、移動している複数の画像を組み合わせる際に、単純に平均し、ピクセル毎の値をもとめるのではなく、サブピクセルの分解能で画像を生成することもできる。これは、超解像法という画像処理手法である。前述したダイレクトディテクタは、高速かつ電子カウンティングした画像を取り込めるので、この100枚以上の画像を1秒間で摂黛できる。この手法を一部利用しており、更なる活用も可能である。今回、時間に余裕があれば、この超解像法についても紹介する。

## 6 3次元画像を作り出したい（ここは演習なし、理論だけ）

### 6.1 3次元画像の取得

透過型電子顕微鏡像は、その画像が投影像であるが故に、その内部構造の情報も写真の中にもつ。また、走査型電子顕微鏡においても、FIB/SEM や SBF-SEM など、表面を連続的に加工しながら、連続した表面像を撮影することも出来るようになった。ここでは、いくつかの3次元再構成法を紹介することとする。今回は、十分な演習時間をとることが困難であるため、原理の紹介とよく利用されるソフトウェアの紹介にとどめる。詳細は、Wikibooks<sup>3</sup>を参考にせよ。

### 6.2 シリアル切片画像からの3次元再構成

基本的には、シリアル切片間の相関を利用して、平行移動（回転も場合によっては考慮）し、3次元画像を組み立てる方法である。最近は、各切片毎に、複数枚の画像（場合によっては、数千枚の自動撮影）を撮影し、モザイキング技術（モンタージュ機能）を利用して、巨大な3次元画像を再構成することが試みられている。

imod/etomo による 3 次元再構成がよく利用されている。Spider や Eos のプログラムを組み合わせることでも可能である。

### 6.3 連続傾斜像からの電子線トモグラフィ

同一視野の連続傾斜像を撮影し、その傾斜像が投影像で有ることを利用して、CT(Computed Tomography)技術を用いて、3 次元構造を再構成する手法である。

ダウンロードして利用できるソフトウェアとしては、imode/etomo が利用される場合が多い。Inspect3D や TEMography などは、商用のソフトウェアとして有効である。それぞれ、特徴があり、苦手な画像も存在している。Eos でも、ツールを組み合わせ、実行できる。

### 6.4 単粒子解析法

構造が共通であるか、もしくは、小数の複数の異なる構造をしていることを仮定し、撮影された写真の中で、様々な投影方向からの像が撮影されていることを前提に 3 次元再構成する方法である。

Spider/Eman2 など、数多くのソフトウェアが提案されている。投影角の決定、粒子の自動抽出などに未だ問題も残っており、どんなタンパク質でも問題なく再構成出来るわけではない。分子量が大きいタンパク質複合体ほど、3 次元像が再構成出来る可能性が高い。

### 6.5 セグメンテーション

3 次元画像、2 次元画像の中から、自分が欲しい構造だけを抽出していくことをセグメンテーションと呼ぶ。絶対にセグメンテーションができるという画像処理法があるわけではない。しかし、ノイズの除去、ヒストグラムの平坦化、オープニング・クロージングなどのマスマティカル・モルフォロジーを用いた構造情報の補正などの前処理を適切に行うことで問題を易しくすることは可能であろう。後者では、切れた構造や意味の無いヒゲなどを消すことができる。適切な前処理を選択し、セグメンテーションしたい構造が他の構造と出来る限り区別できるようにすることが重要である。

Amira はよく使われている商用ソフトウェアの一つである。FIJI にもセグメンテーションのためのプラグインが用意されている。HawkC は、最近、大阪大学で開発された新しいセグメンテーションの為のツールである。

また、amira で最近、細胞内のアクチンフィラメントを抜き出す為のプラグインが示された。これは、棒状の構造要素を使って、アクチンフィラメントを追跡する手法である。特定の構造情報を抽象化できれば、それを使ったマッチング・追跡は有効である。

## 7　まとめ

今回、電子顕微鏡画像処理、解析の基礎に焦点を当て、その処理方法を紹介した。まだまだ、それぞれの方が、自身の電子顕微鏡画像から取り出したい欲求があるであろう。今回紹介できない多くの画像処理技術があり、また、解決したい問題によっては、新しいアルゴリズムを生み出す必要もあるだろう。画像処理に詳しいユーザ間で情報を共有し合い、処理方法のノウハウをためる必要もあるだろう。

我々もまた、Eos を元にした活動ではあるが、こうしたサイトを Eospedia もしくは、SourceForge, Facebook 及び、上で展開を始めた。  
eos-users@lists.sourceforge.jp,

**https://www.facebook.com/EosUserGroup** もしくは、  
yasunaga@bio.kyutech.ac.jp まで連絡を下されば、出来る限りの相談にのり、情報共有してよいものを展開していきたい。

## 参考文献

1. ImageJ: <http://imagej.nih.gov/ij/>
2. FIJI: <http://fiji.sc/Fiji>
3. EM-Wikibooks:  
[http://en.wikibooks.org/wiki/Software\\_Tools\\_For\\_Molecular\\_Microscopy](http://en.wikibooks.org/wiki/Software_Tools_For_Molecular_Microscopy)
4. EMDataBank: <http://emdatabase.org/emsoftware.html>
5. Eospedia: <http://www.yasunaga-lab.bio.kyutech.ac.jp/EosJ/>
6. 高分解能電子顕微鏡—原理と利用法：堀内繁雄（共立出版）
7. タンパク質をみる—構造と挙動（やさしい原理からはじめるタンパク質科学実験法）  
(化学同人)

**MEMO**