

電子顕微鏡画像のDigital画像解析

九州工業大学・大学院情報工学
研究院・生命情報工学研究系

デジタル(Digital)画像処理

アナログ画像 (実画像)

↓

測定 (フィルムからCCD、CCD)

↓ CTF/PSF/MTFによる画像の変調

A/D変換・標本化 (入力、フィルムの場合はスキャナ)

↓ 標本化、量子化

デジタル画像 (計算機 (コンピュータ))

↓

デジタル画像処理

横軸変換 (フーリエ変換)

縦軸変換 (コントラスト増強、エッジ強調)

次元の変換 (2次元→3次元、2次元→1次元)

↓

D/A変換 (出力)

↓

アナログ画像

プリンタ・ディスプレイなど

デジタル画像の入力/input

- ・ 光でみる /by light

- デジカメ、ビデオカメラ、スキャナ、顕微鏡

digital camera, video camera, scanner, microscope

- ・ 電子でみる /by electrons

- 電子顕微鏡

electron microscope

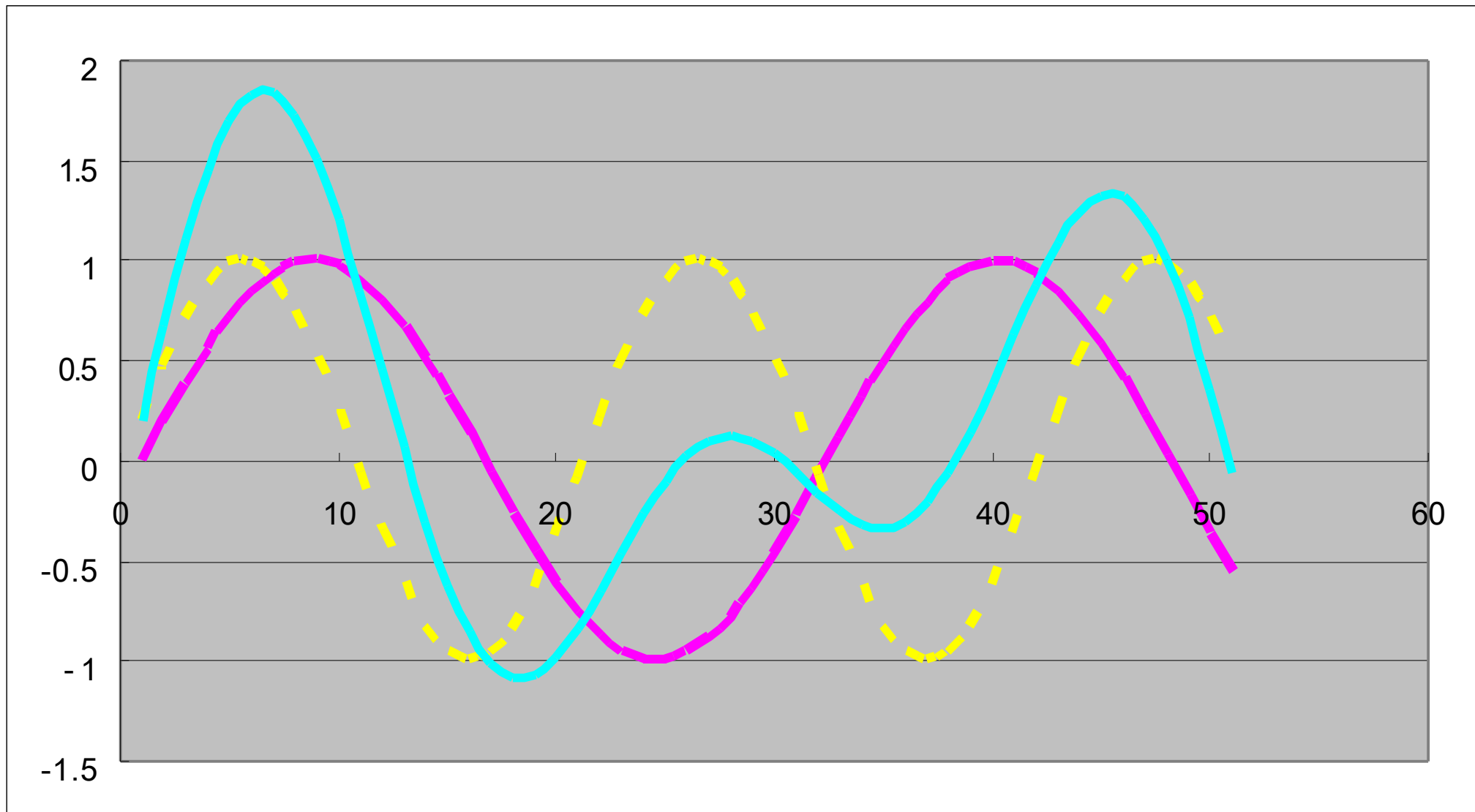
いずれも、波動の性質をつかって画像化している。

電子：加速電圧：200kV 2.5 pm

また、画像処理そのものも、波動の性質を使うと容易な場合もある。

特に、回折という現象が重要！！

波:wave



波は足し合わせることができる (フーリエ合成)。 $1 + 2 \rightarrow 3$
 分解することもできる (フーリエ変換)

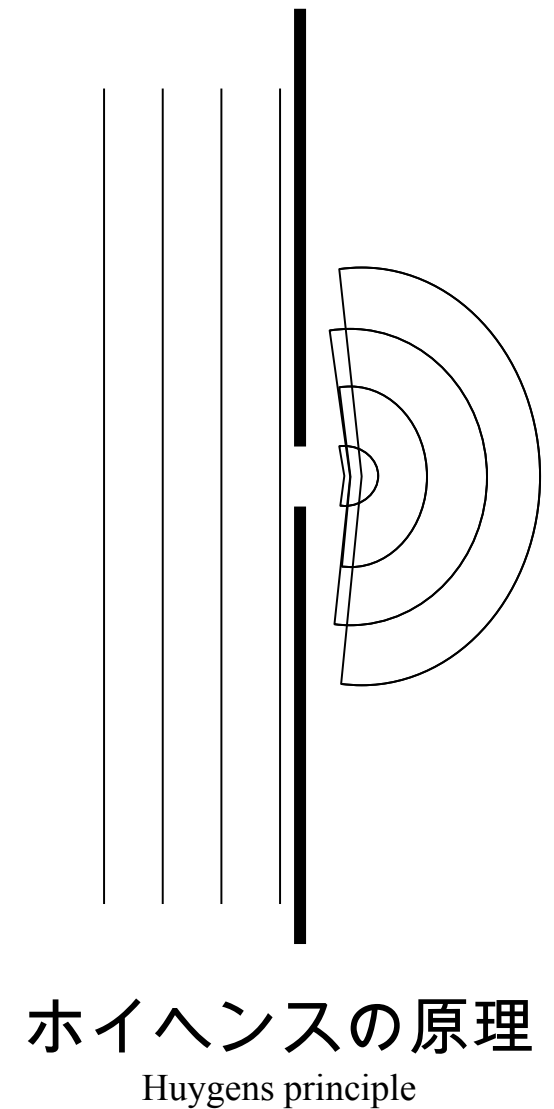
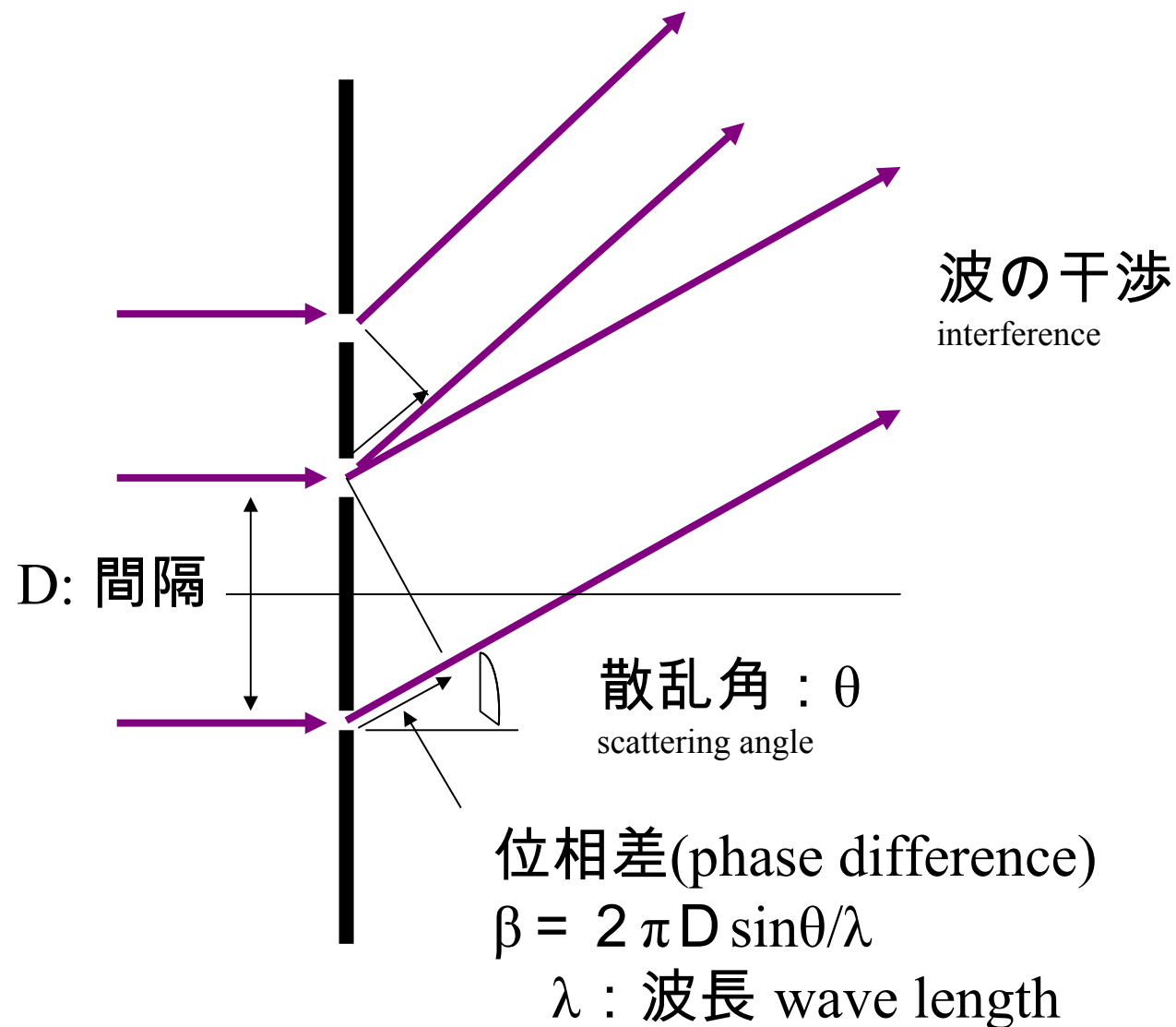
$$\begin{aligned} \operatorname{Re} e^{2ix/\pi_1} &\cong e^{2ix/\pi_2} \cong \operatorname{Re} e^{2ix/\pi_1} \cong e^{2ix/\pi_3} \\ &\cong \sin(4x/\pi) \cong \sin(6x/\pi) \cong \sin(x/\pi) \end{aligned}$$

光の回折とホイヘンスの原理

Diffraction of light and Huygens principle

気にしておくのは、細かい情報ほど、散乱角が大きいこと

回折現象：diffraction



レンズを使って観察する

分解能は、どの位の回折した波を像に結びつけるかで決まる

前焦点面

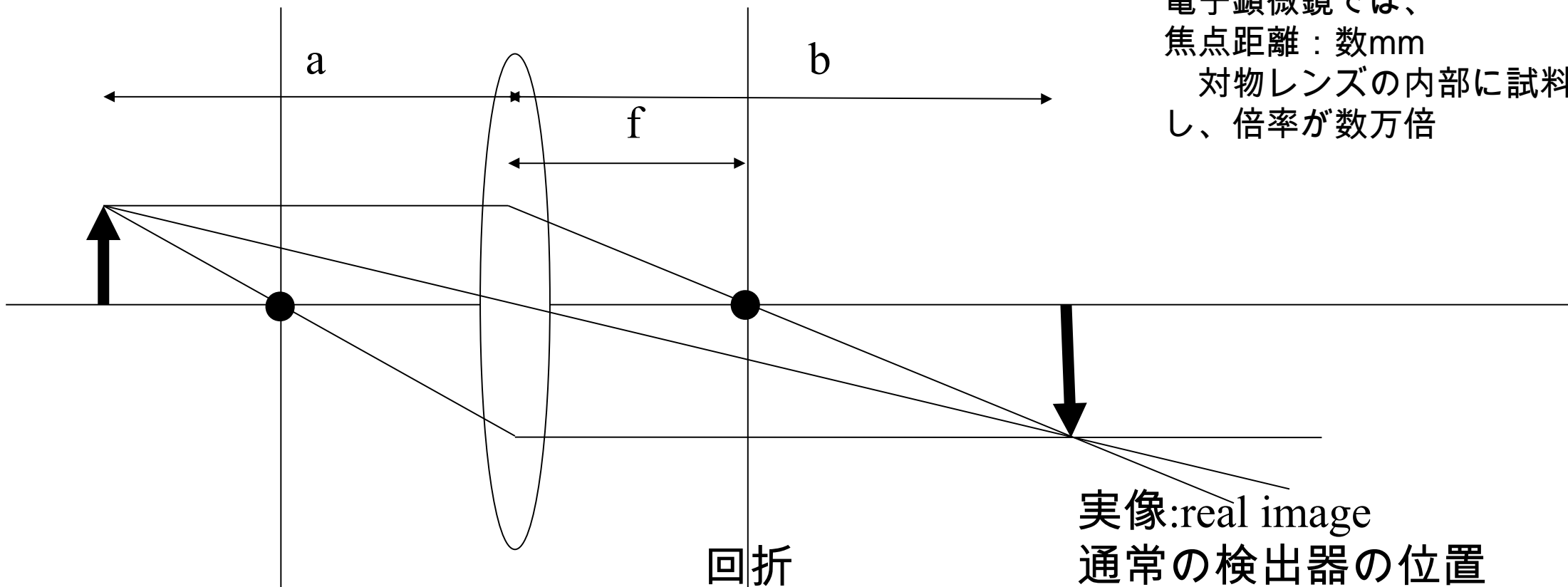
Forward focal plane

後焦点面

Back focal plane

倍率 $M=b/a$

電子顕微鏡では、
焦点距離：数mm
対物レンズの内部に試料が存在し、倍率が数万倍

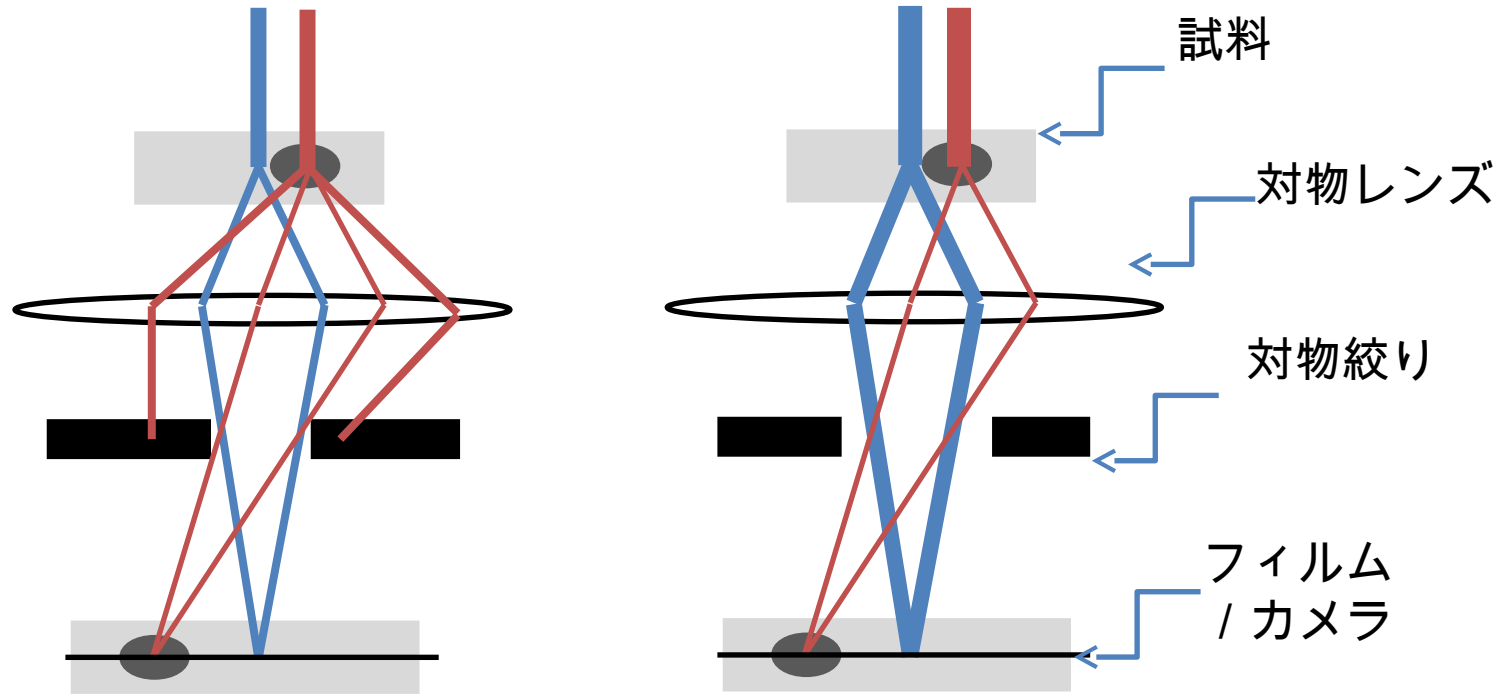


$$\frac{1}{f} = \frac{1}{a} + \frac{1}{b}$$

レンズとは

1. 前焦点を通った光は、光軸に平行となる。
2. レンズの中心を通った光は直進する
3. 光軸に平行な光は、後焦点を通る。
4. 平行な光は、後焦点面で一点に交わる。
5. 1点からでた光は、像面で一点に集まる。

電子顕微鏡のコントラスト



A: 散乱コントラスト

元素種の散乱能の違いによるコントラスト。小さい対物絞りをを使うほどコントラストはあがるが分解能は落ちる

B: 吸収 (強度) コントラスト

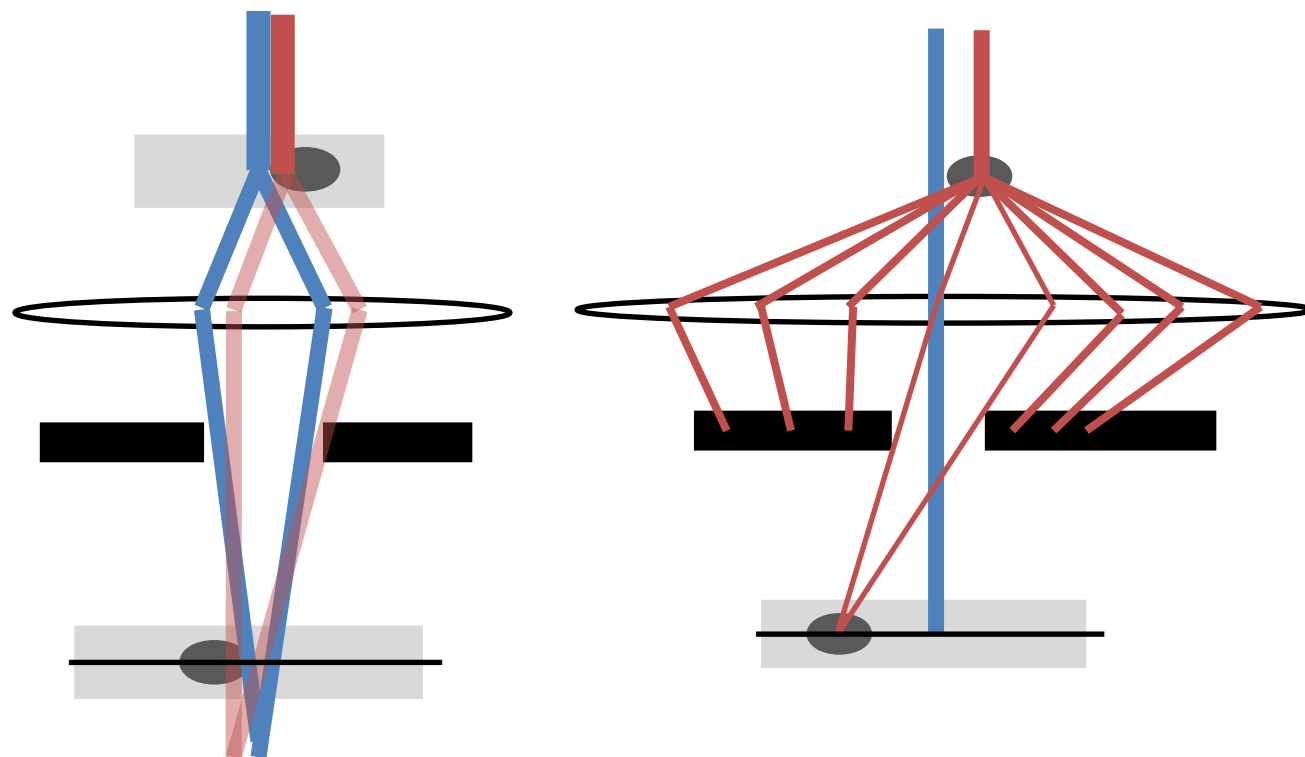
試料の電子線の吸収の違いによるコントラスト。エネルギーフィルタを用いたコントラストも同様。

C: 位相コントラスト

試料の電位の違いによるコントラスト。位相のずれ (電位が高いほど遅れる) をコントラストにする。

D: 回折コントラスト

試料の結晶性をもちいたコントラスト。生物試料ではあまり用いない。

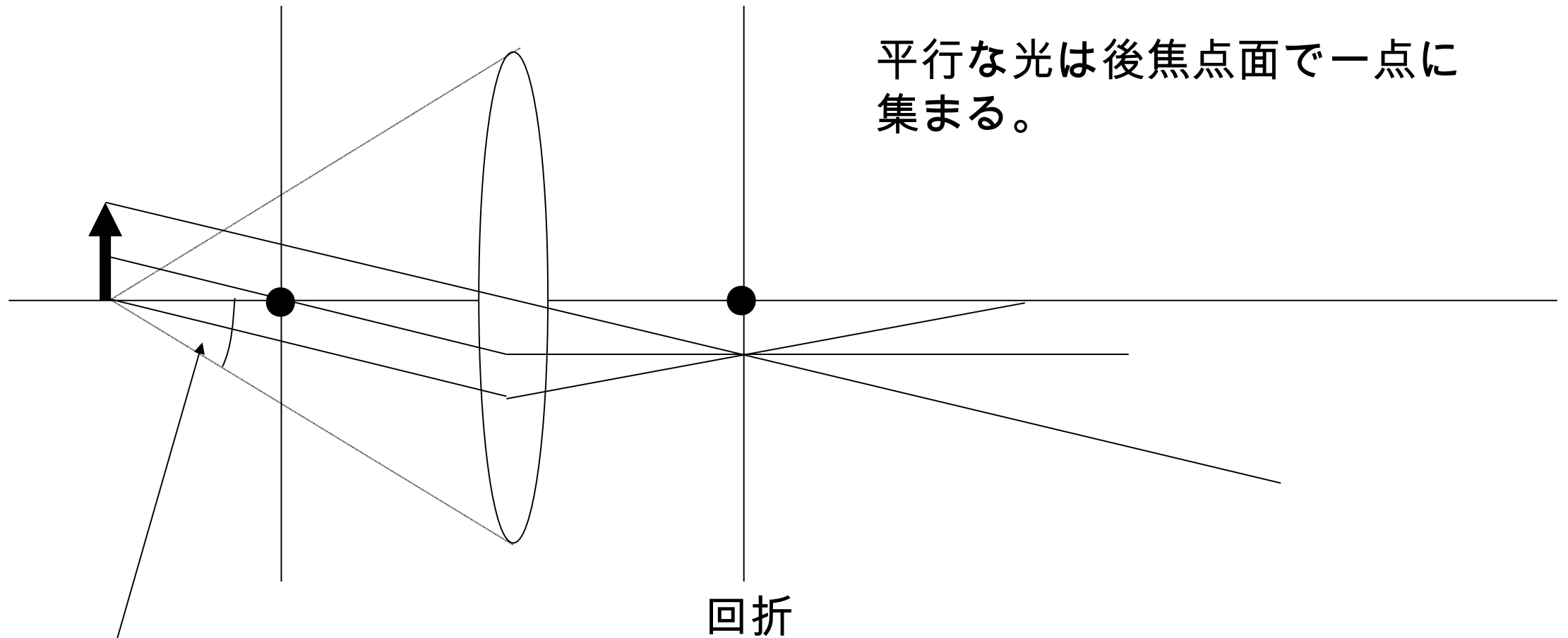


回折と開口数

分解能は開口数で決まる

前焦点面

後焦点面 (数学的にはフーリエ変換と同等)



開口数 (Numerical Aperture: N.A.)
 $n \times \sin \theta$

電子顕微鏡では、数十mrad
波長：2.5pm (200kV) に対して、
分解能：～200pm

アナログ画像のデジタル化 (量子化)

標本化 (サンプリング)

- 横軸 (位置)

量子化

- 縦軸 (濃度方向)

画素 (ピクセル:pixel)

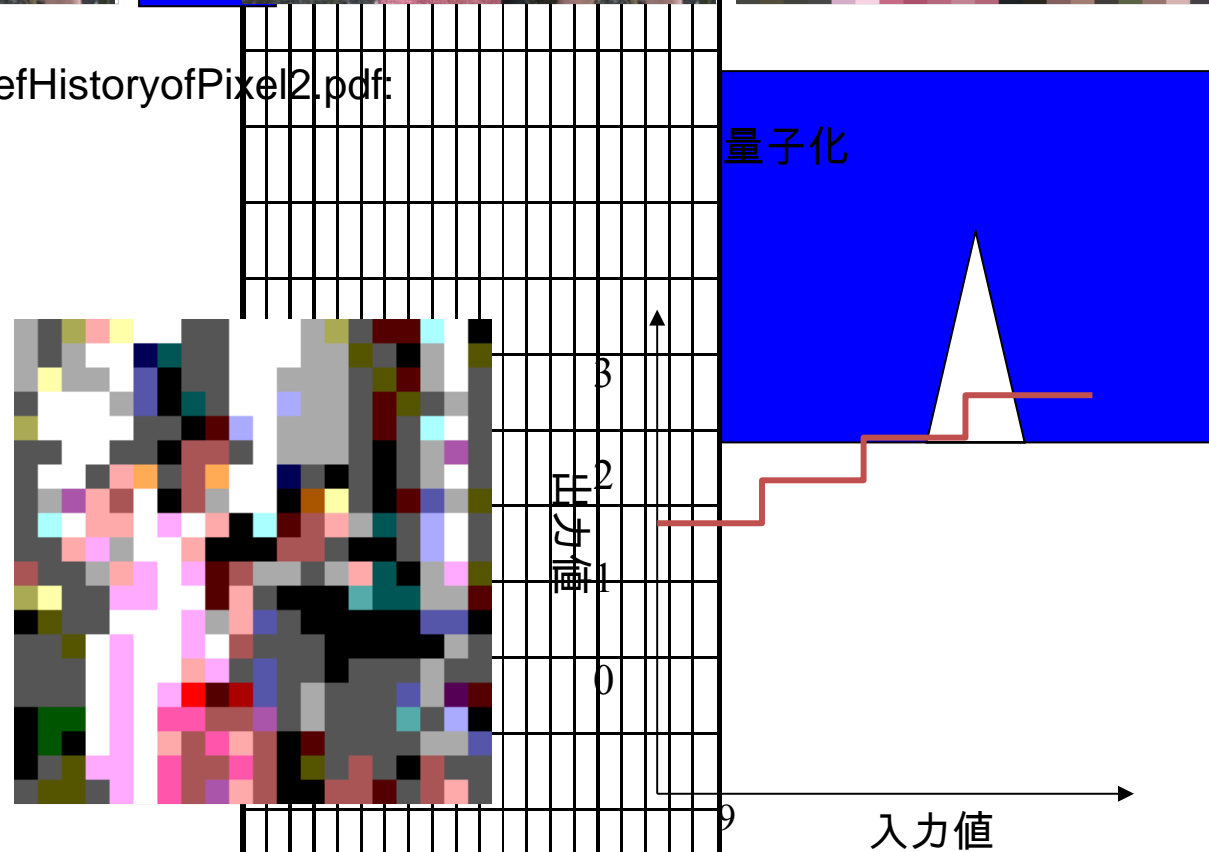
- 'Picture element/cell': <http://www.foveon.com/files/ABriefHistoryofPixel2.pdf>:
pel vs pixel, cell or element,

cf: ボクセル(voxel)

3次元

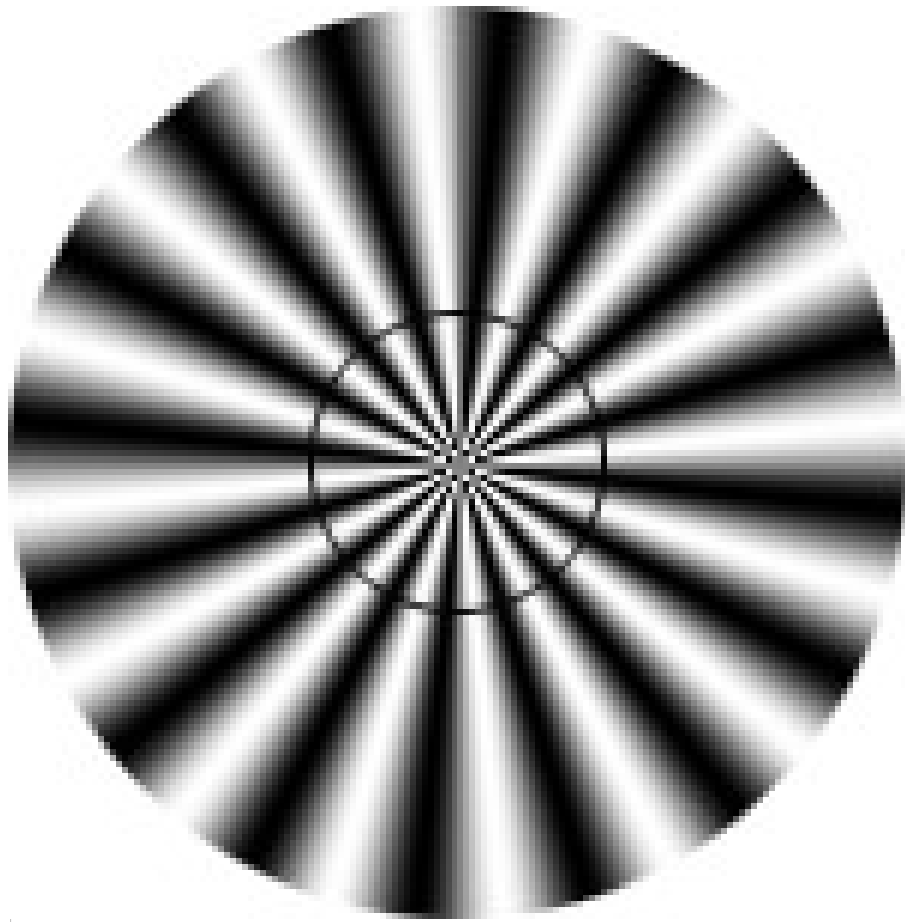
※ volume cell/element-volume pixel
※ 白黒でも6 bits以上で表現できれば人間は識別が困難である。これは、64階調、最大限に利用した場合である。実際には、10 bits以上の十分な量子化を行うと良い。

サンプリング



空間周波数(波数) とサンプリング

- ・ 単位長さ (1nm) に何個の波があるか
 - 細かい波があるほど、細かい情報を表現できる。



元の構造の中に、分解能を越えた構造がある場合に、デジタル化すると偽解像を生む場合がある。

白と黒がひっくり返っている事に注意。これは、aliasing (サンプリングに起因するフーリエ空間の繰り返し) の為に起こっている。

これを起こさないためには、入力画像を絞りなどを用いて高分解能成分を除去する、もしくは、超解像処理などを使って、サブピクセルの情報化の必要がある。

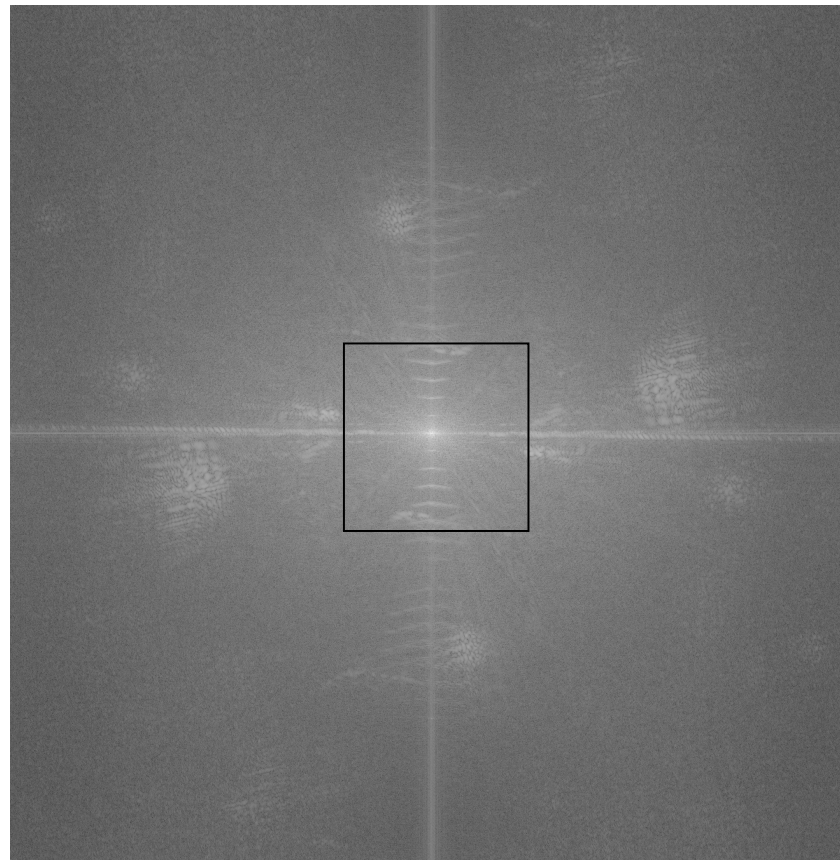
最新のDirect Counting Cameraなどでは、注意が必要。

ジーマンススター

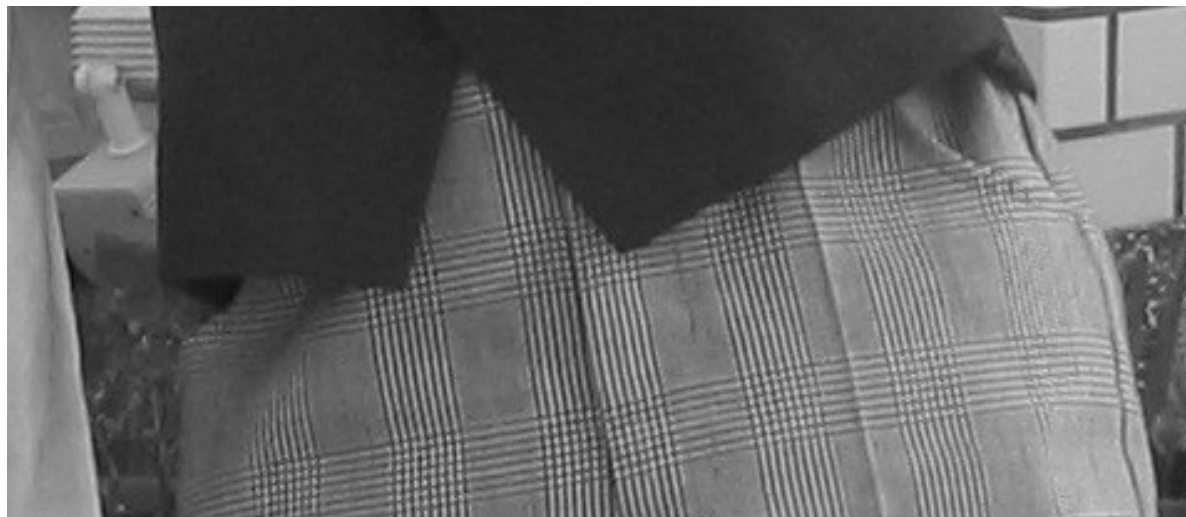
細かい画像があるときの問題

原図

ローパスフィルタ



図の特性を知る。フーリエ変換。



エイリアシング / モアレ

細かい構造があるのに、低倍で撮影してしまった場合

標本化の効果 1353x1431 pixels → 300x317にダウンサイズ:



原図から: from original

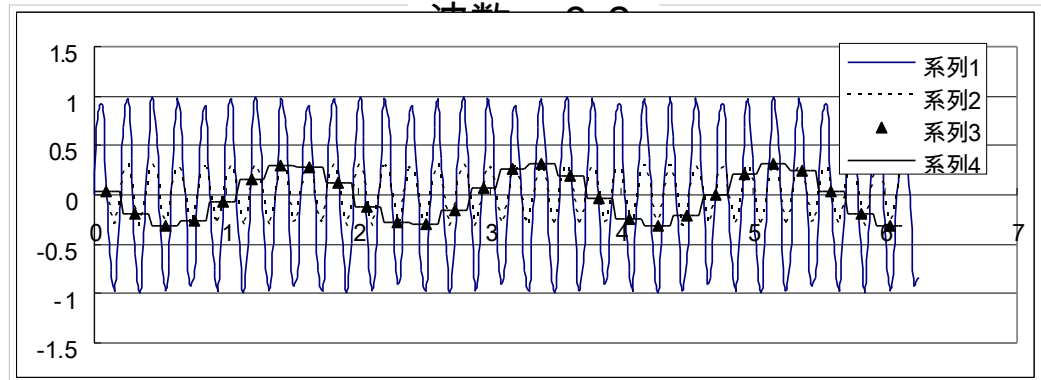
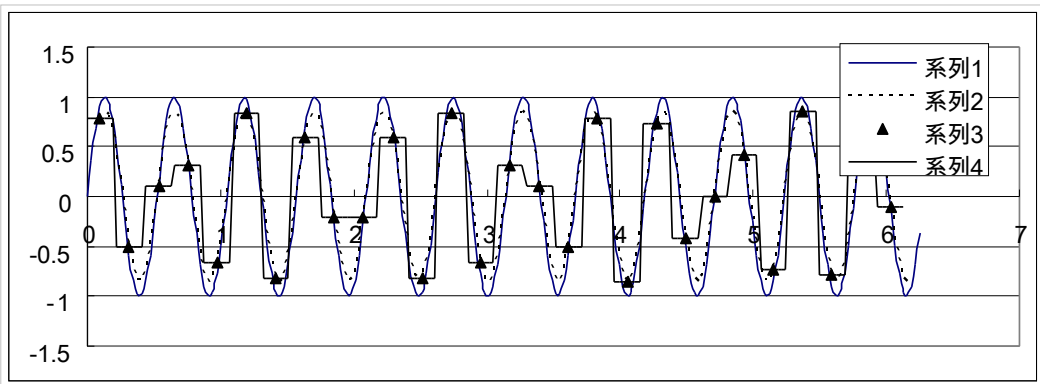
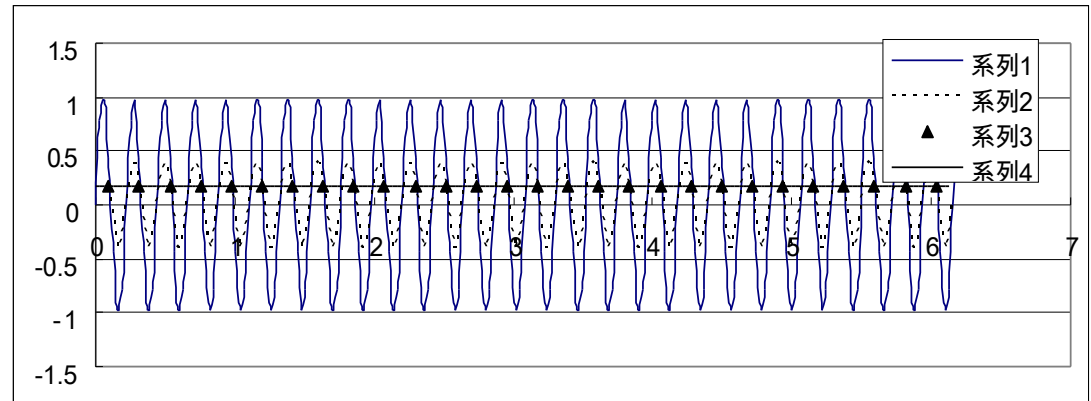
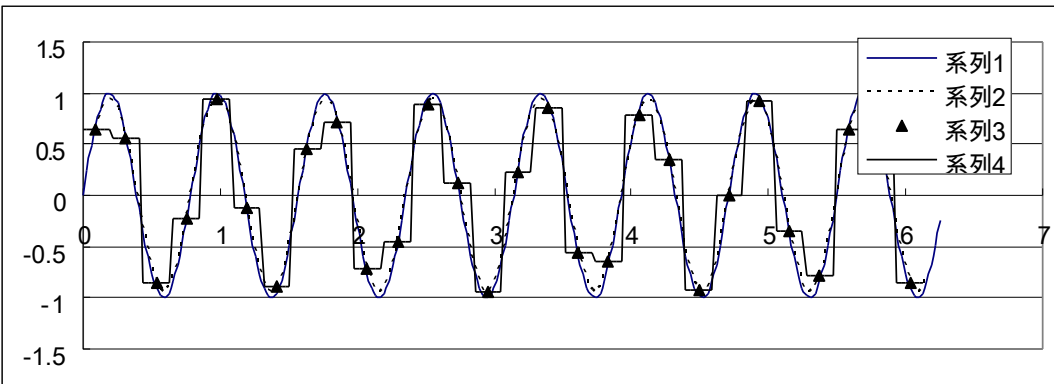
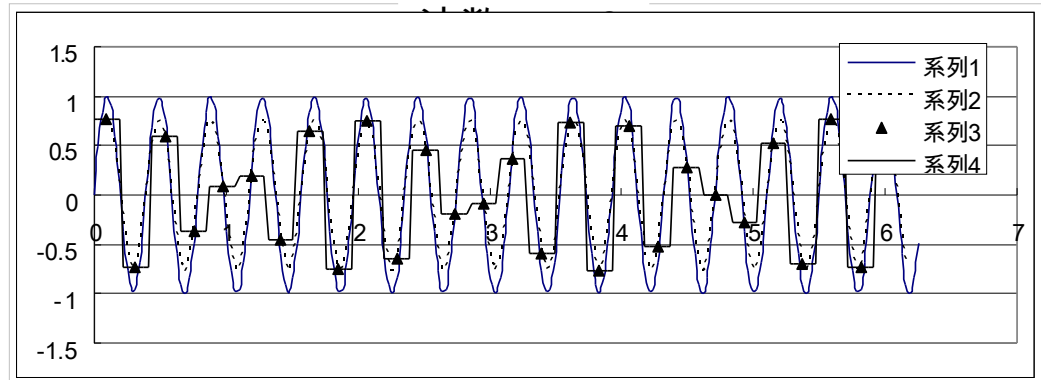
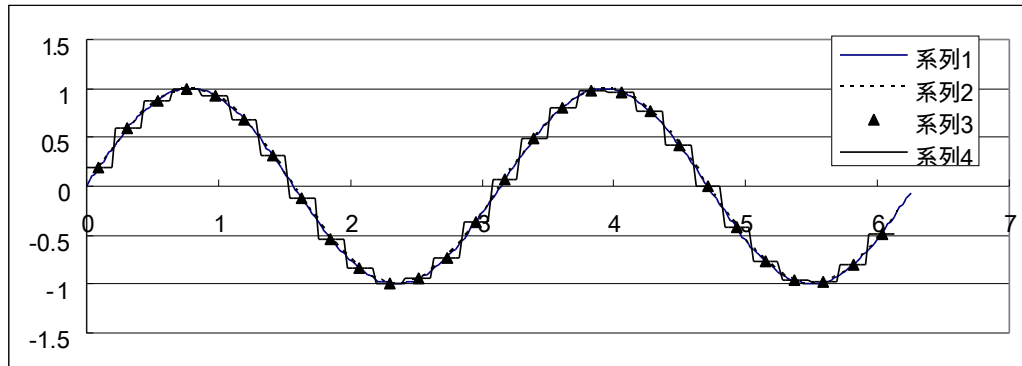
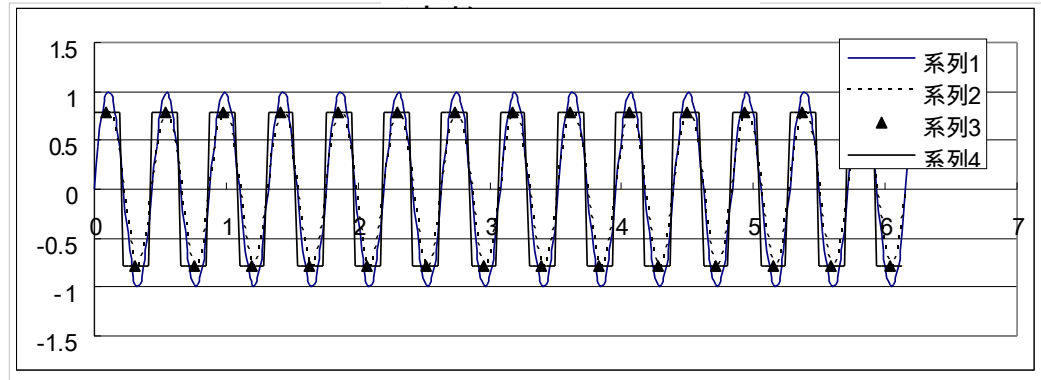
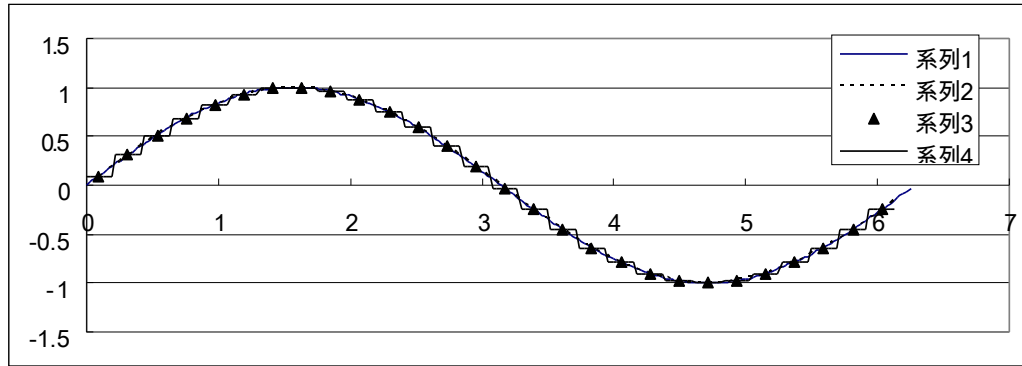


高周波を落としてから: after low pass

画像のデジタル化によるボケと偽解像

Window巾 : 7 pixel triangle, 200 pixel ウィンドウ幅の「のこぎり歯関数」の場合

Nyquist周
波数



デジタル画像処理では画像が繰り返す

周辺では、画像が大きく変わってしまうと考えよ。
(フーリエ変換の離散化に由来)



デジタル画像処理では画像が繰り返す

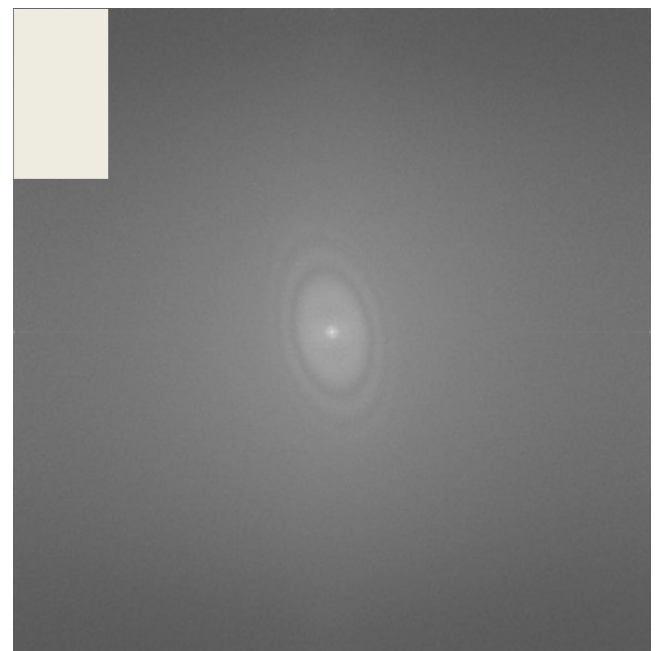
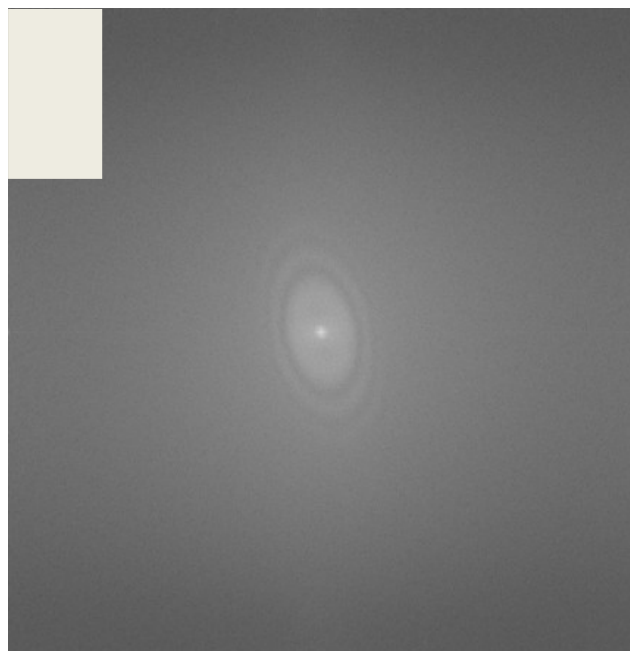
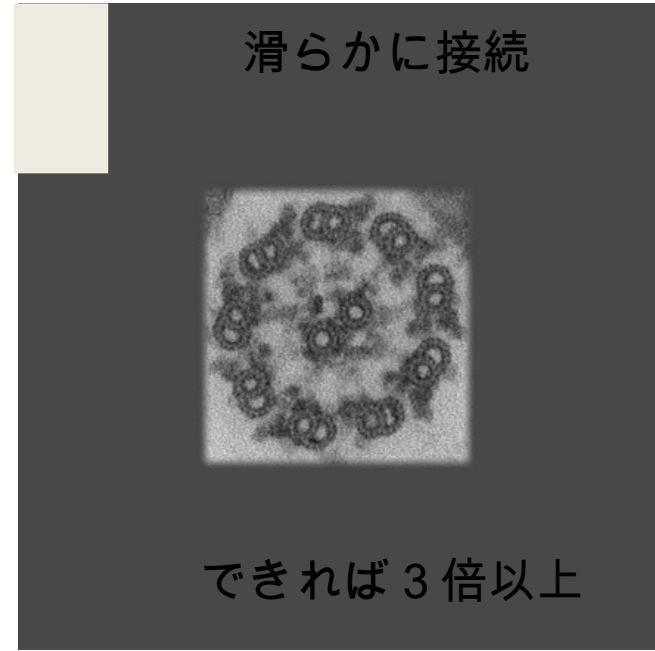
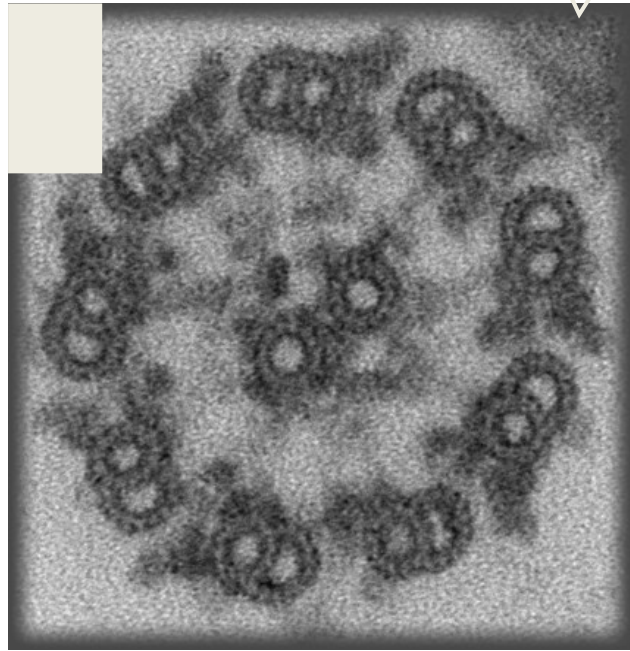
周辺では、画像が大きく変わってしまうと考えよ。
(フーリエ変換の離散化に由来)



画像の周辺処理

画像が繰り返す影響を低減することが必要

ImageJでは、 $2n \times 2m$ の枠にWindowingなしで、自動的にPadするので注意が必要



Windowing

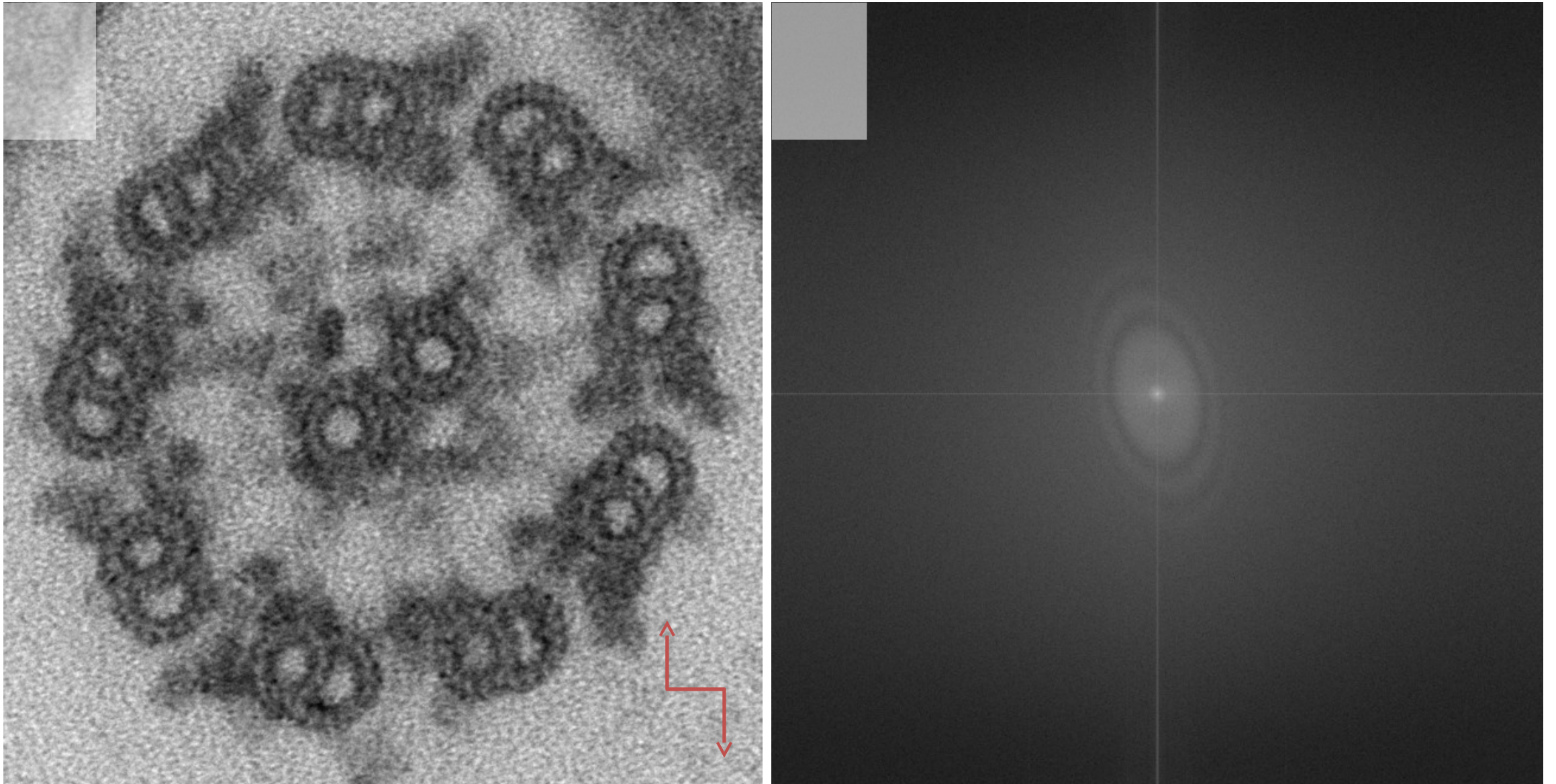
Floating/Padding

まとめ 1

- ・ 電子顕微鏡のもつ画像の性質
 - 透過型電子顕微鏡
 - ・ NAの小さい透過像
 - ・ コントラストの生成方法に注意を払う
- ・ デジタル画像で注意すること
 - サンプリング：偽解像を避ける
 - 画像の周辺処理：画像の繰り返しの影響を避ける

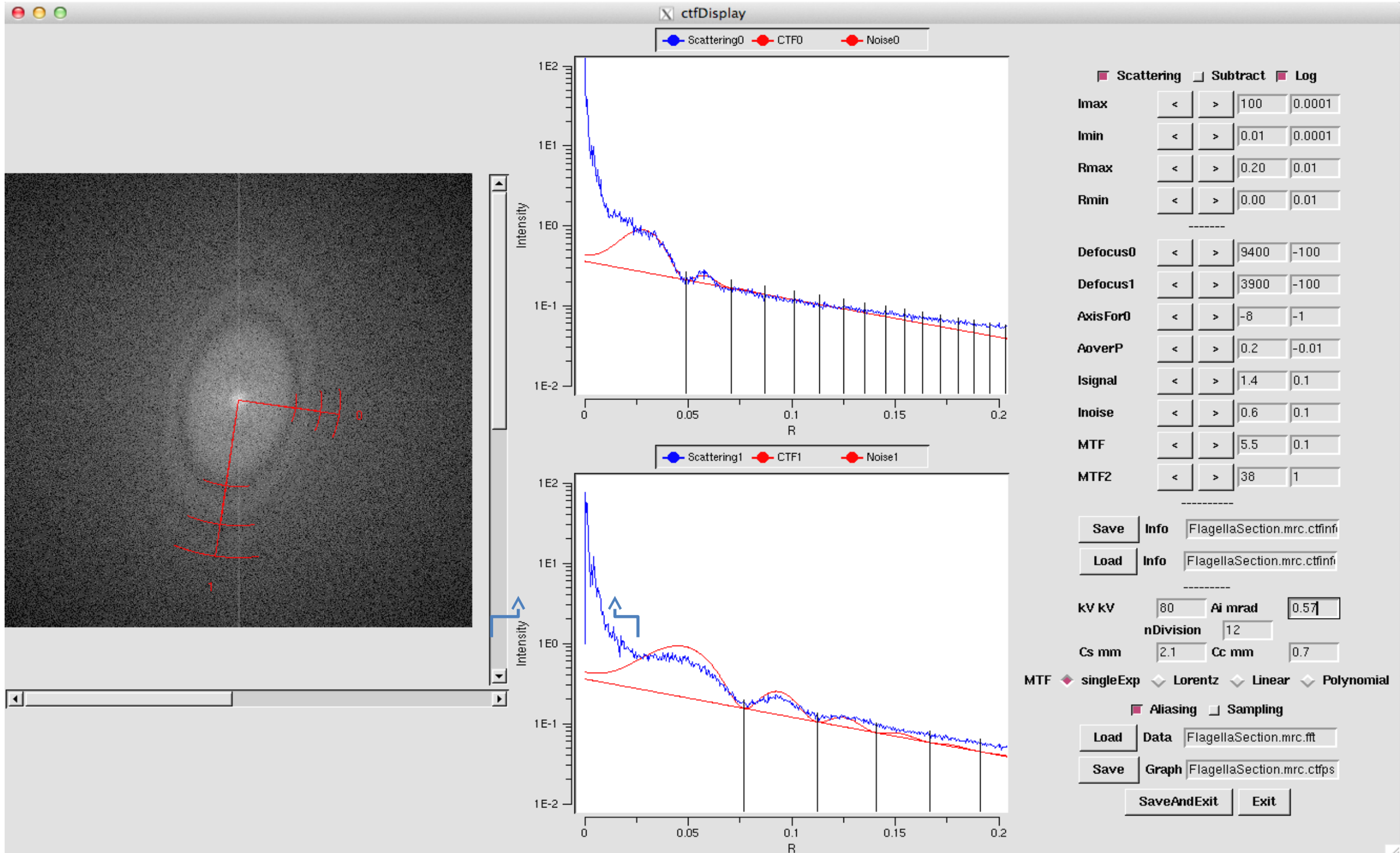
フーリエ変換で知る電子顕微鏡の画質

フーリエ変換とは、空間周波数（波数）に分解すること



デフォーカス量、非点、ドリフト、照射角（電子線の状態）、結果として分解能が分かる

空間分解能とCTF



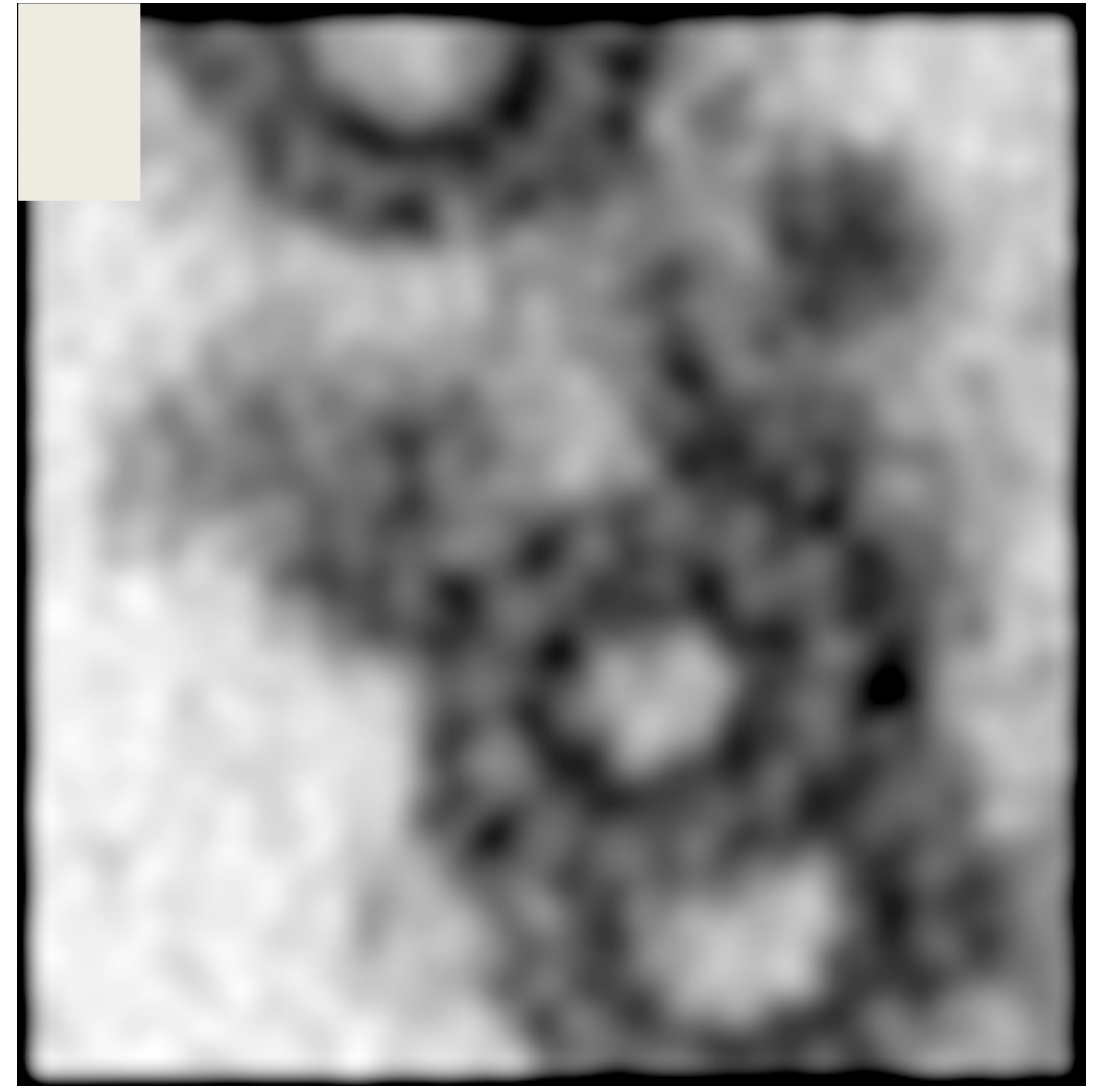
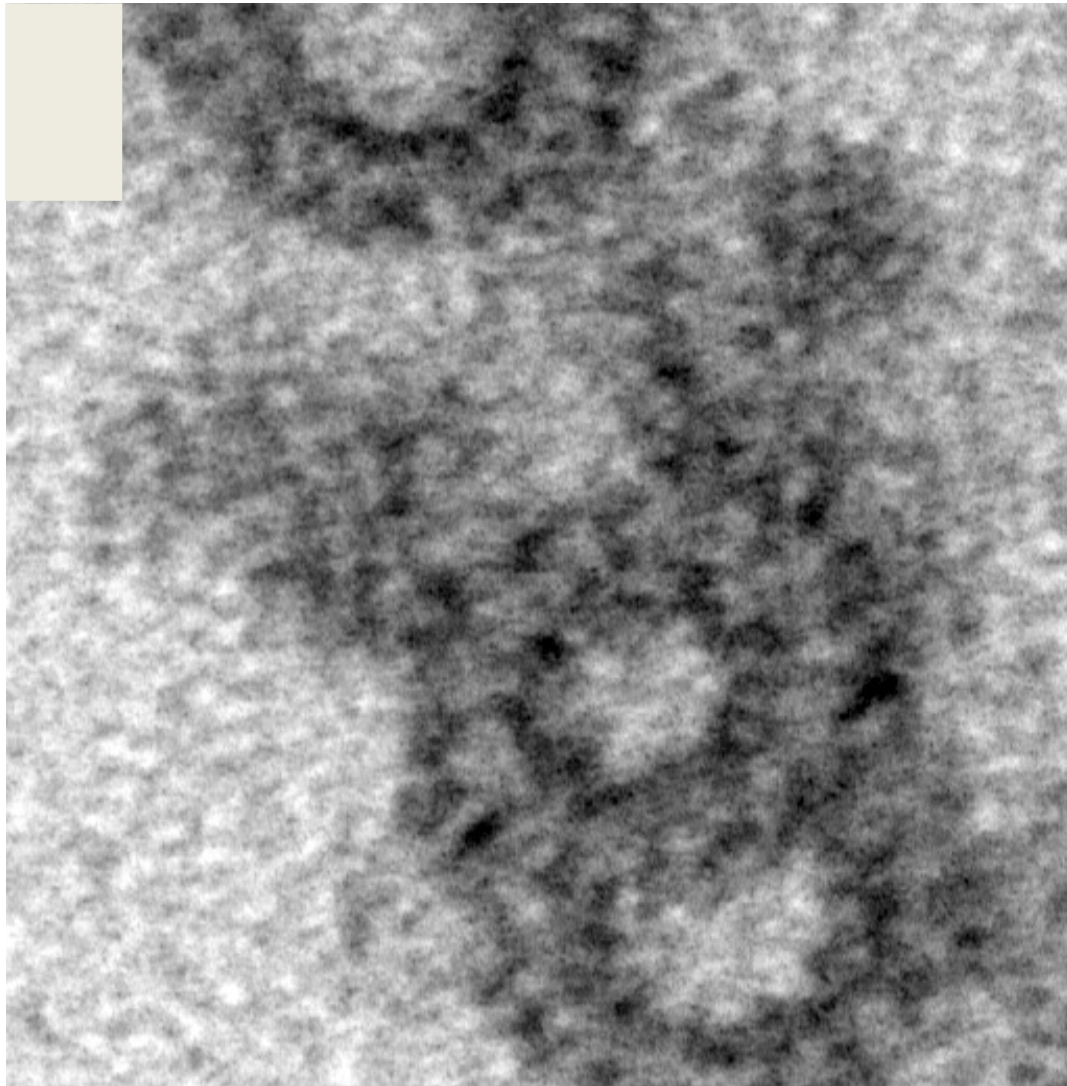
1/20 [-1]

1/10 [-1]

点拡がり関数(PSF: Point Spread Function)と コントラスト伝達関数(CTF: Contrast Transfer Function)

点拡がり
関数

点拡がり関数が畳み込まれた (Convolute)され
た画像)



実空間での畳み込み演算は、フーリエ空間での積となることを意識
ここでは、ローパスフィルタ (ガウス型) が積算された画像と同じ

電子顕微鏡のCTF

電子顕微鏡のCTFは振動する。Thon-Ringという0点をもつ。

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

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

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

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

点光源性に依存する項は、

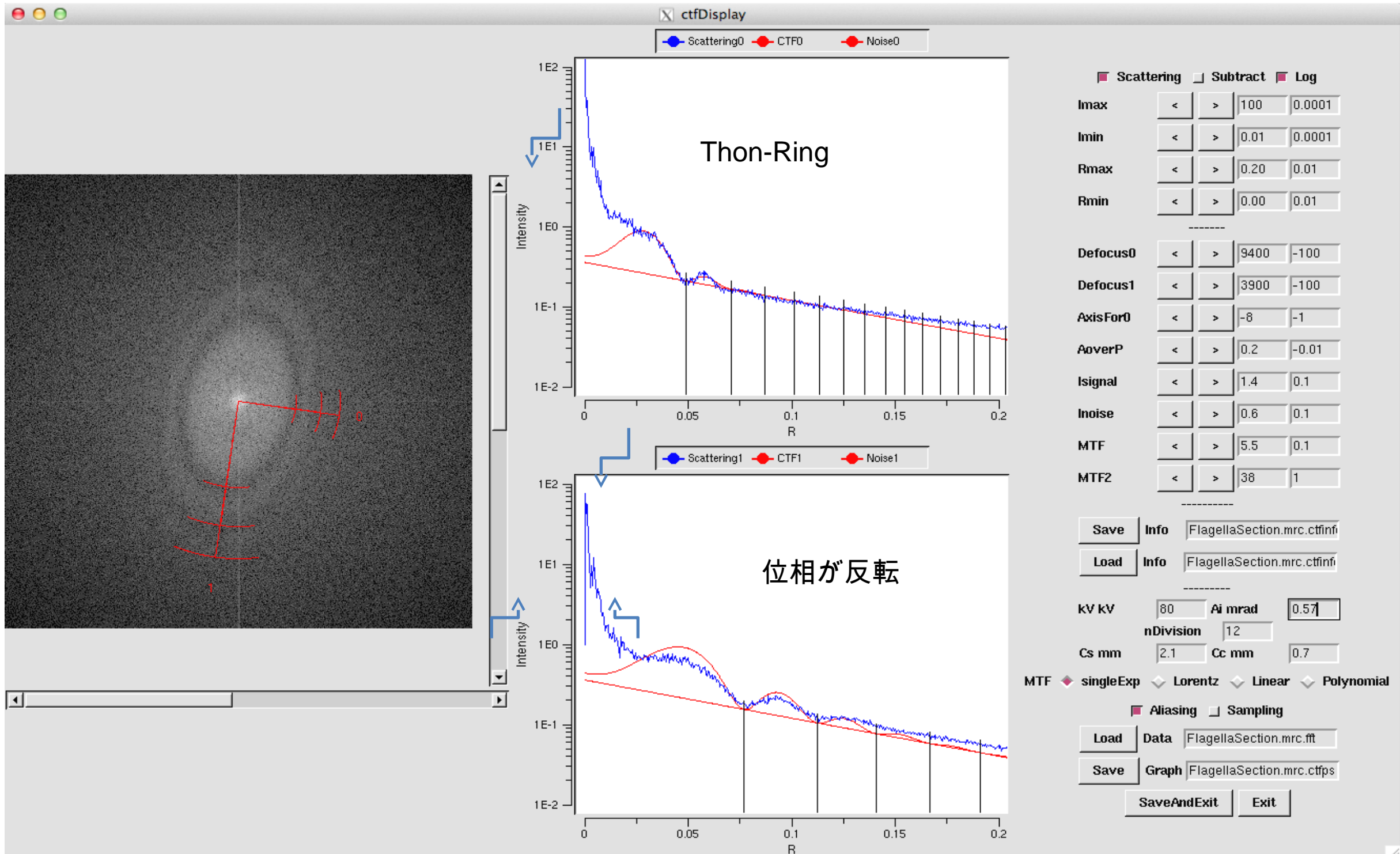
$$E_s = \exp[-\pi^2 A_{in}^2 (C_s \lambda^2 R^3 - \Delta f R)^2]$$

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

単色性に依存する項は、

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

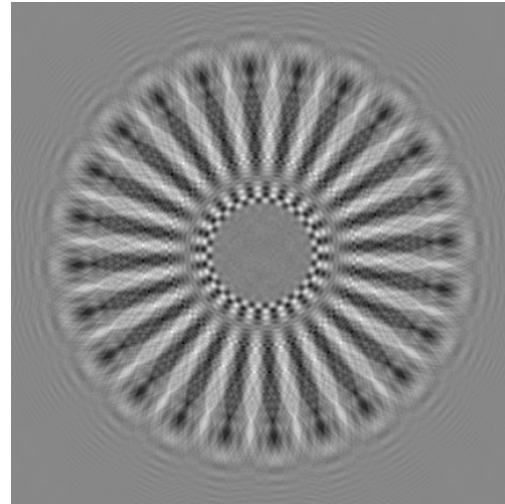
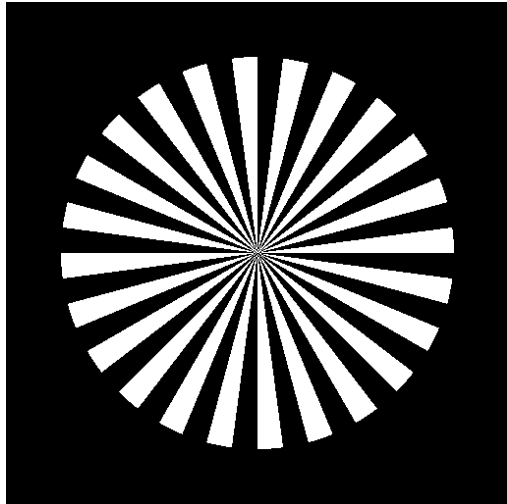
空間分解能とCTF



1/20 [-1]

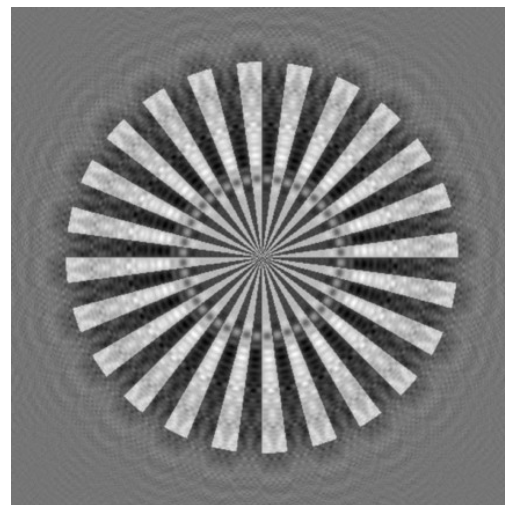
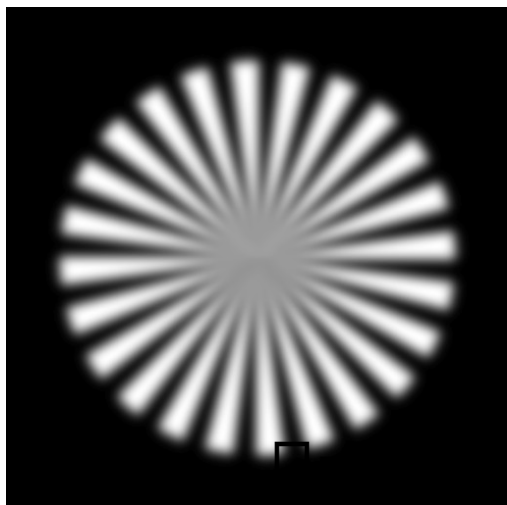
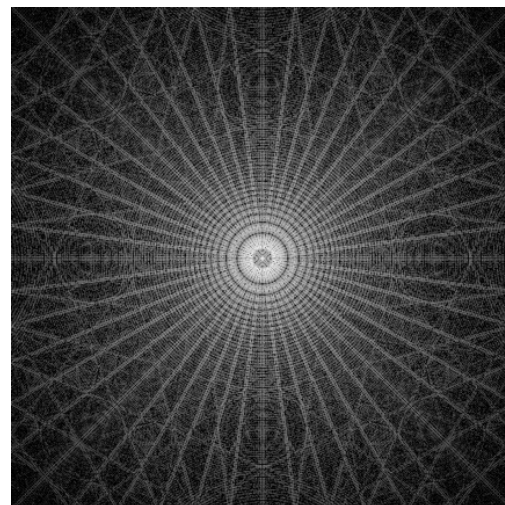
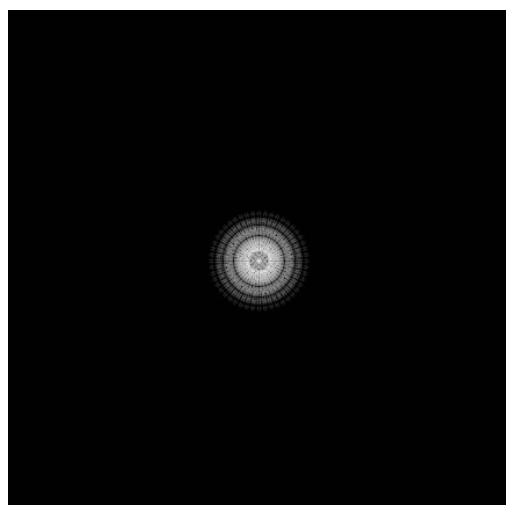
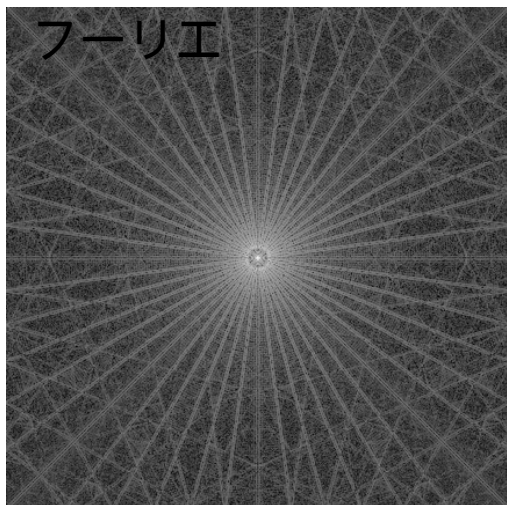
1/10 [-1]

電子顕微鏡の性能と画像



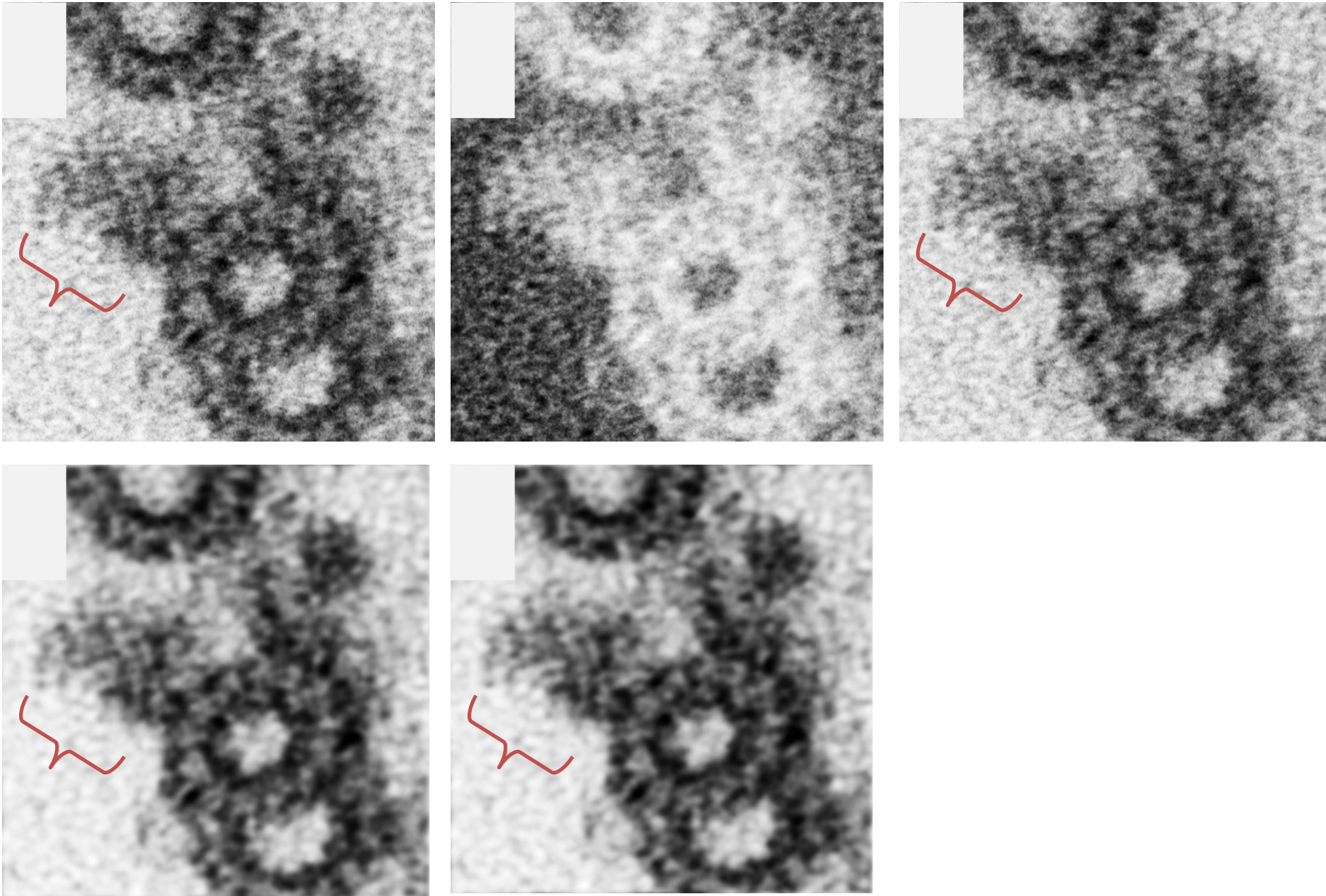
半径：40nmの粒子に対応
外側の繰り返しが約10nm
1/5の半径くらいで消えている
Thon-Ringに対応

200kV, Cs=2.1mm, AoverP=0.1
Defocus: 6.0 μm
Ai = 0.2 mrad or 0.02 mrad
(LaB6:0.15-0.5) (cFEG: 0.02-0.03)



CTFの補正による効果

細かい部分での変化に注意。
分子レベルでの構造を述べるのであれば。

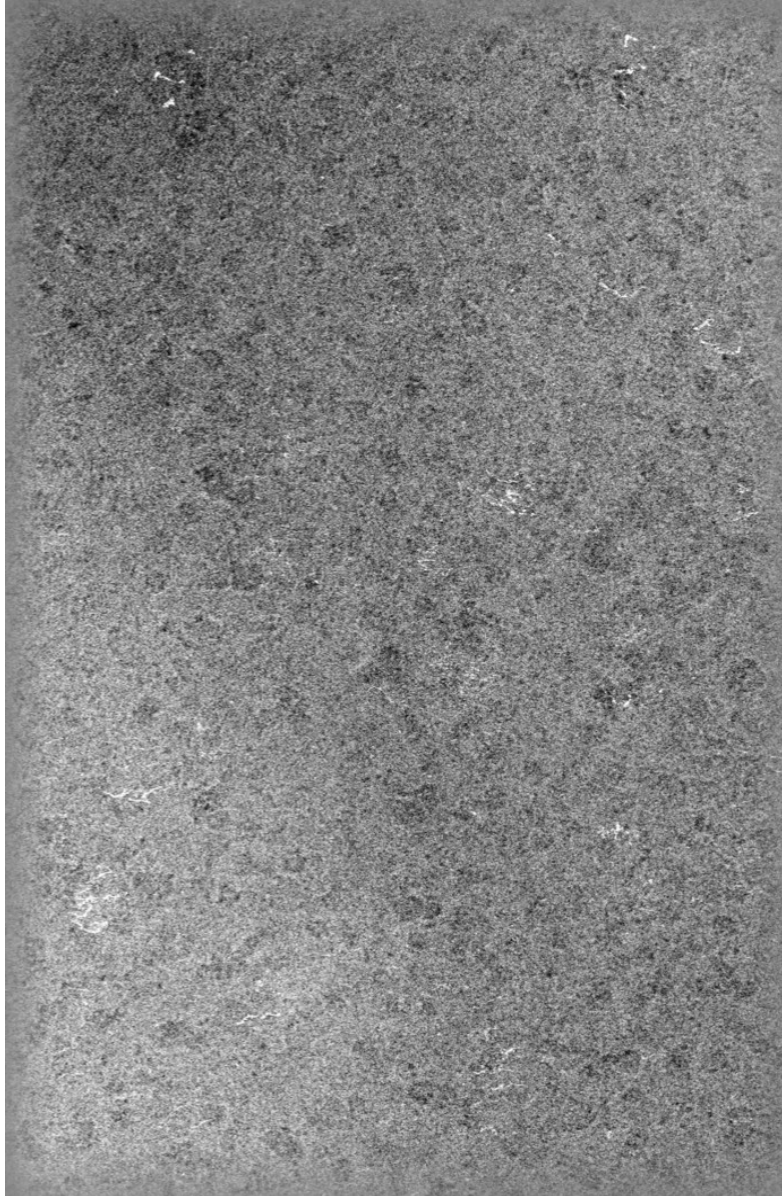


まとめ 2

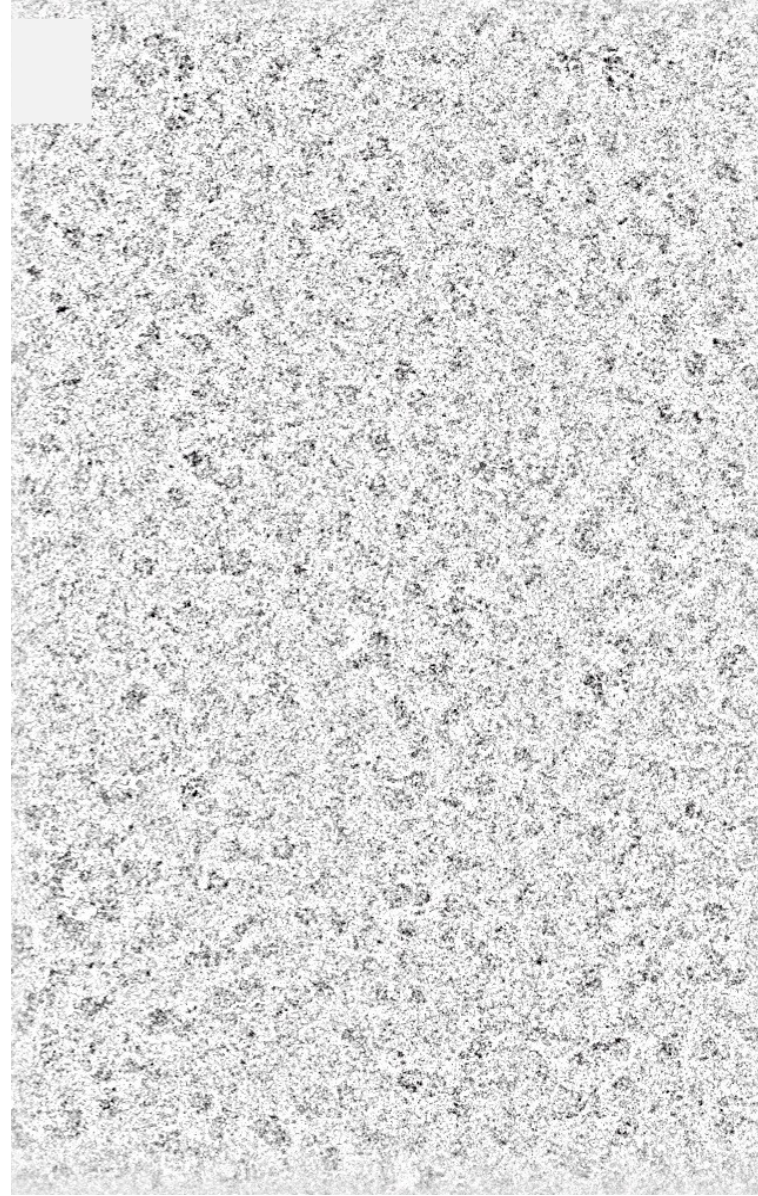
- ・ 空間周波数（フーリエ変換）を意識しよう
- ・ PSFの畳み込み演算、CTFの積算を意識しよう。
- ・ 透過型電子顕微鏡画像には、CTFによる変調が掛かっているなので、高分解能の議論をするためには必ず補正をかけること。

画像のムラをとる

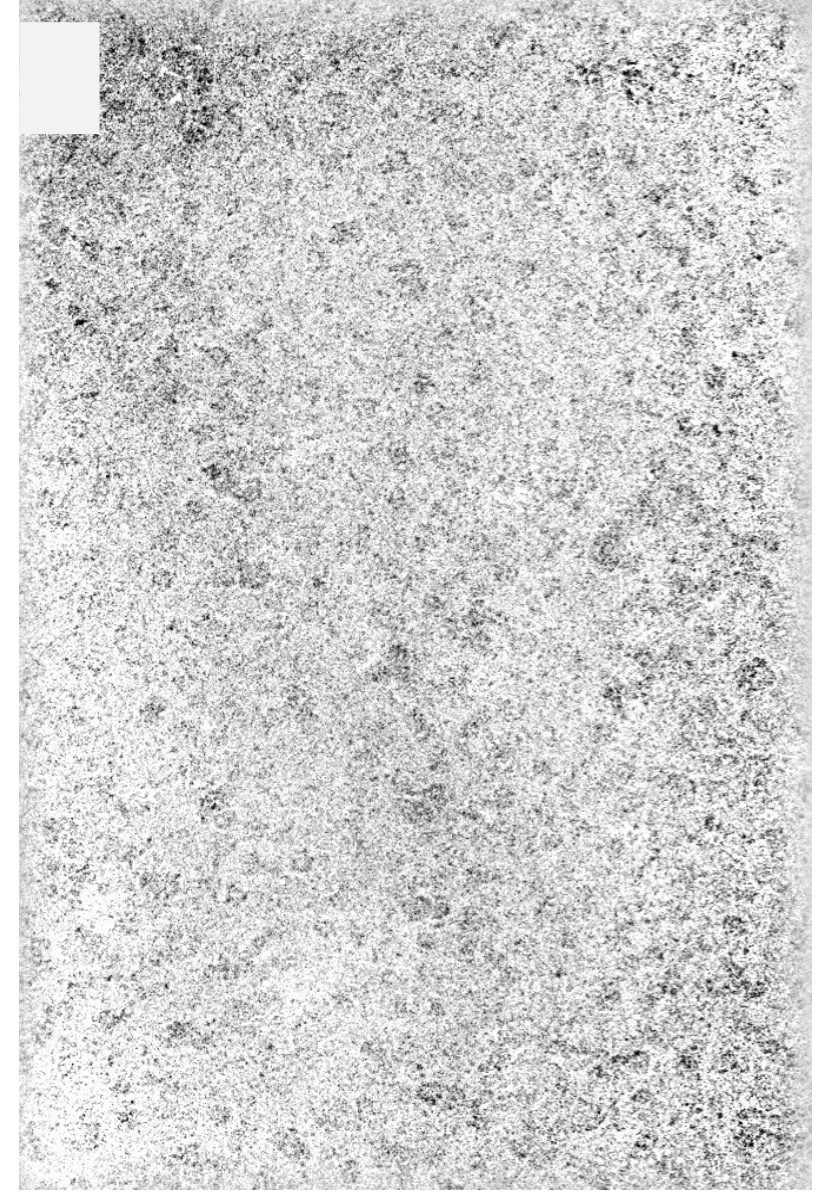
濃度ムラとは、低分解能のノイズ



原図



ハイパスフィルター
Cos型 : 0.001-0.002-0.003 A-1
50nm程度でムラをとる
粒子の大きさの5倍



CVEフィルター
指定した大きさ(256nm)の範囲で
平均、分散を揃える

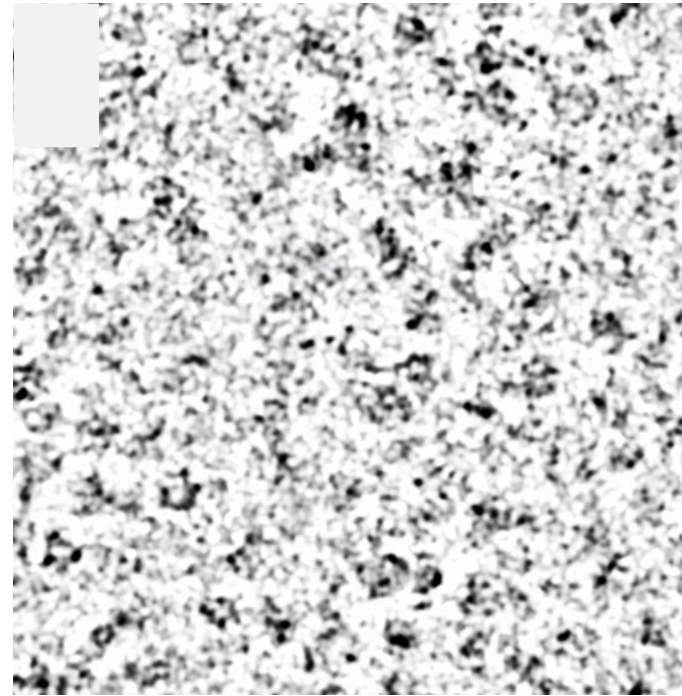
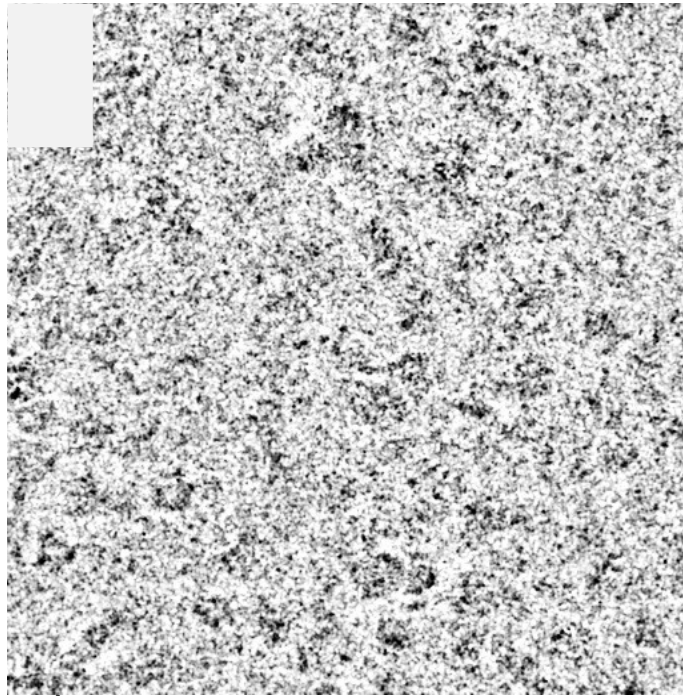
ノイズをとる：ローパスフィルタ

人が認識するときには、いくつかのローパスフィルタを試している。

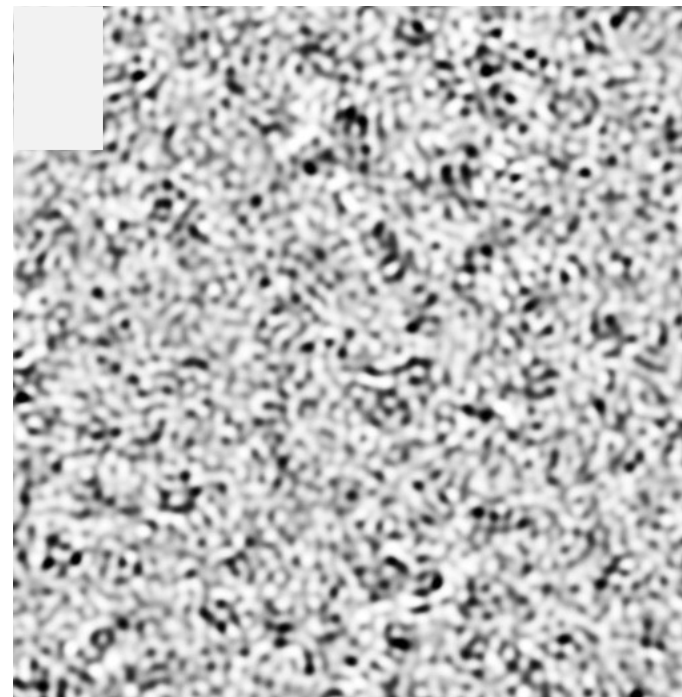
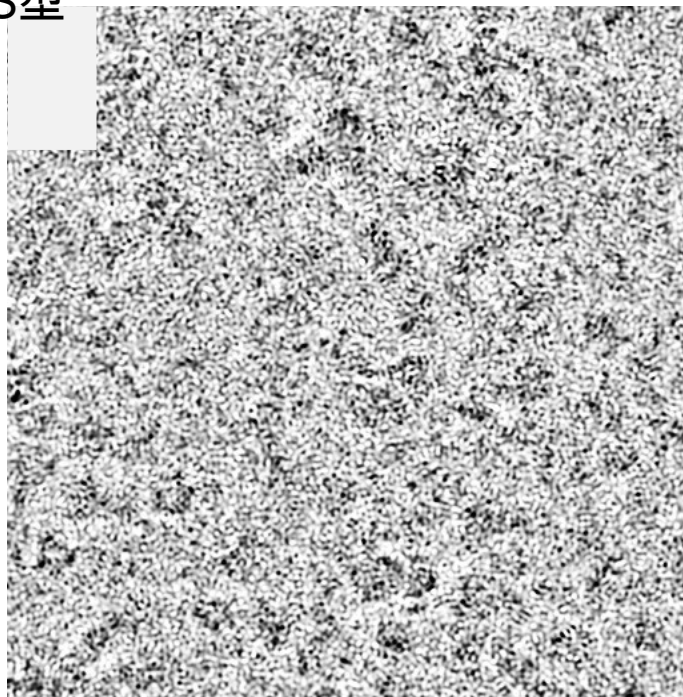
ガウス型

0.05 A-1

0.02 A-1

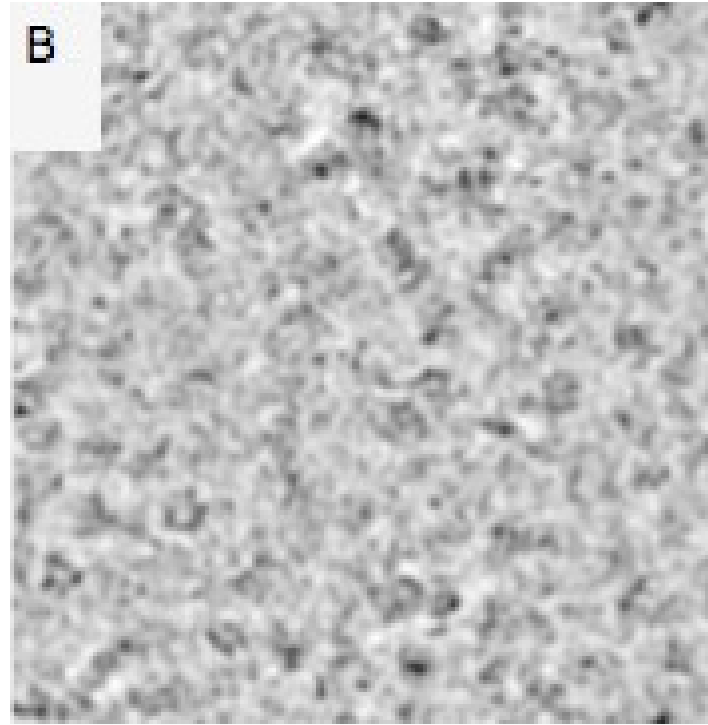
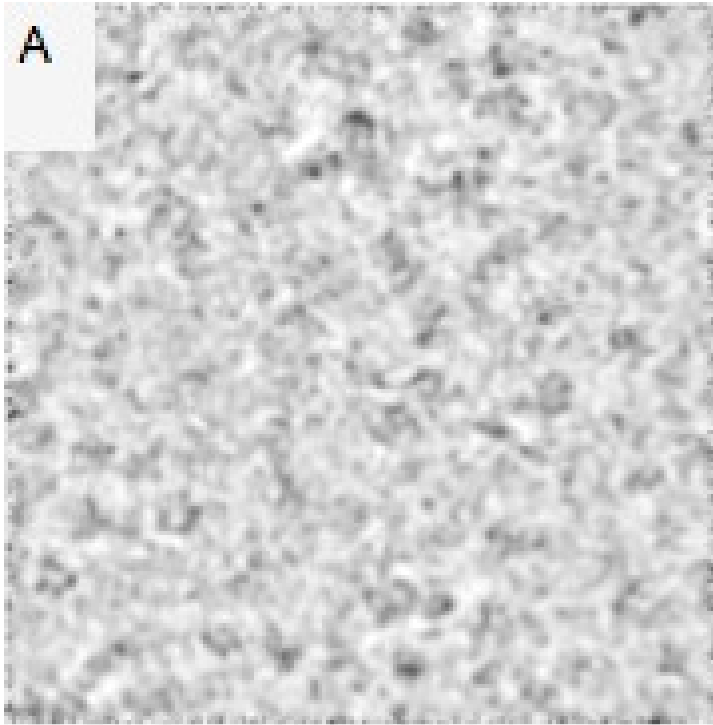


COS型



Ideal Filterによる
アーティファクトに
近い模様が見える

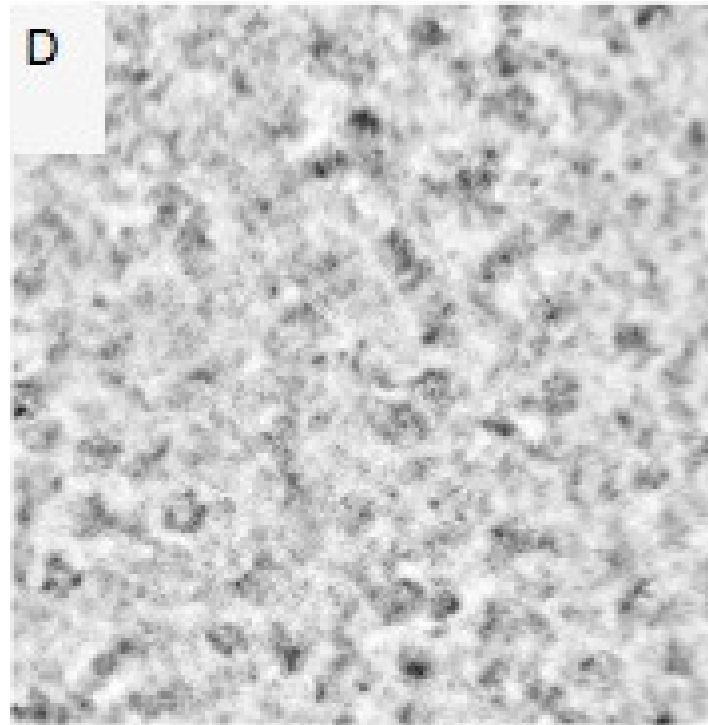
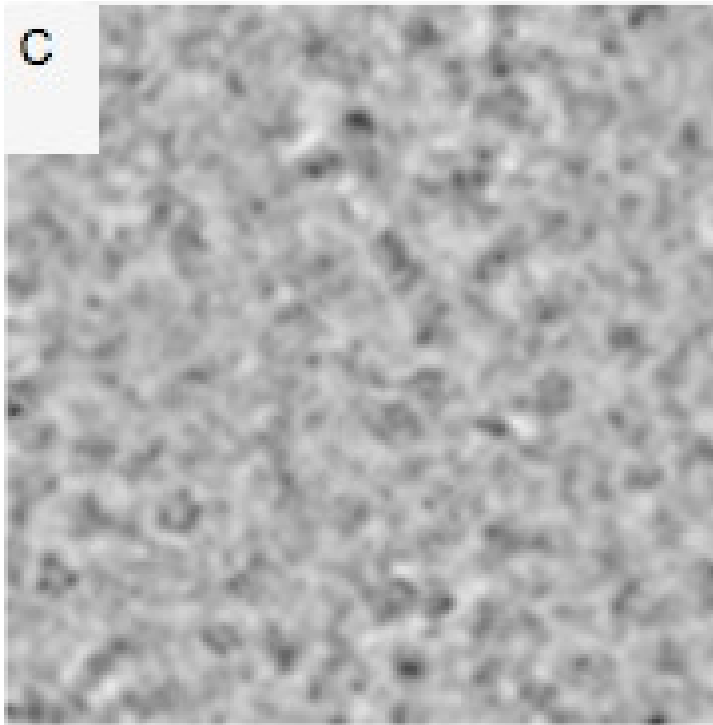
ノイズをとる：非線形フィルタ



エッジを保存するフィルタ

A: メジアンフィルタ
中央値を採用
ごま塩ノイズに強い

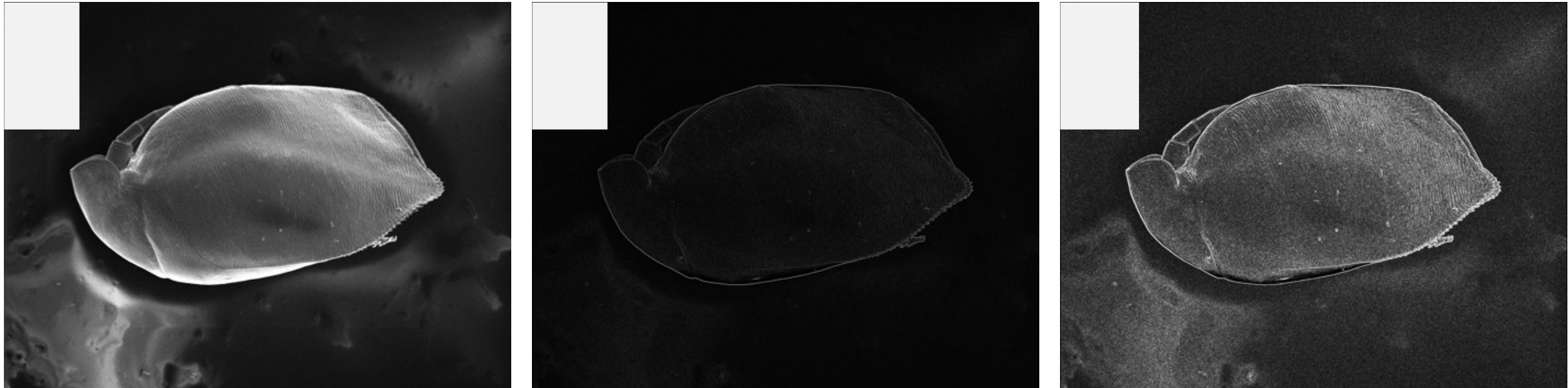
B: Lee-Sigma フィルタ
極端に違う値を除いた平均値を利用
fごま塩ノイズに強い



C, D: Bilateral フィルタ
密度が異なる粒子などはエッジを残しながらはっきりと区別された画像となる。
ただし、極端に高いノイズは残る

画像のきれをよくする：エッジ強調

エッジ強調、エッジ抽出のためのフィルタ：Sobel Filter

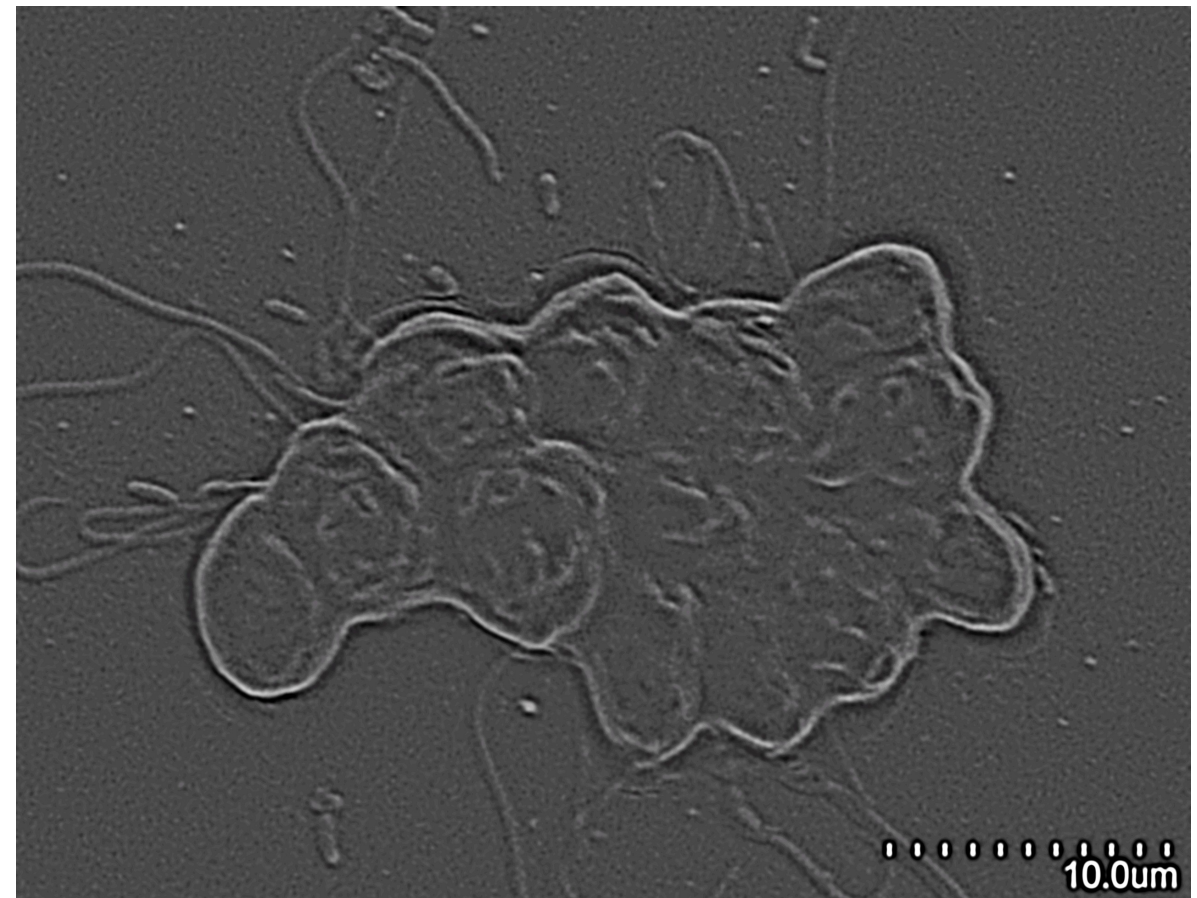
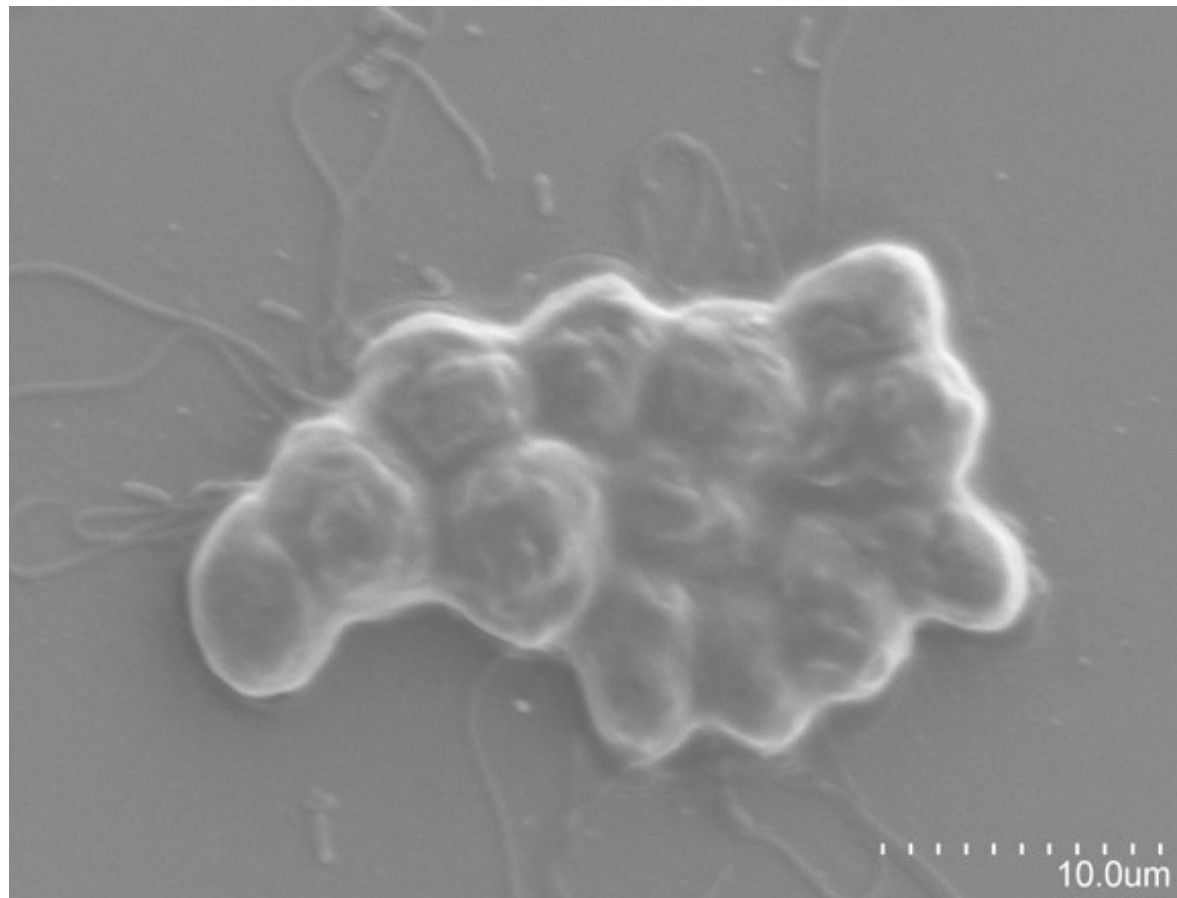


エッジ強調は、微分演算に対応。これに、平滑化フィルタを畳み込めばノイズに強くなる。画質に合わせて、フィルタを設計することができる。

微分とは、フーリエ空間で空間周波数を積算することにあたる（ハイパスフィルタ）

ラプラシアン・フィルタ

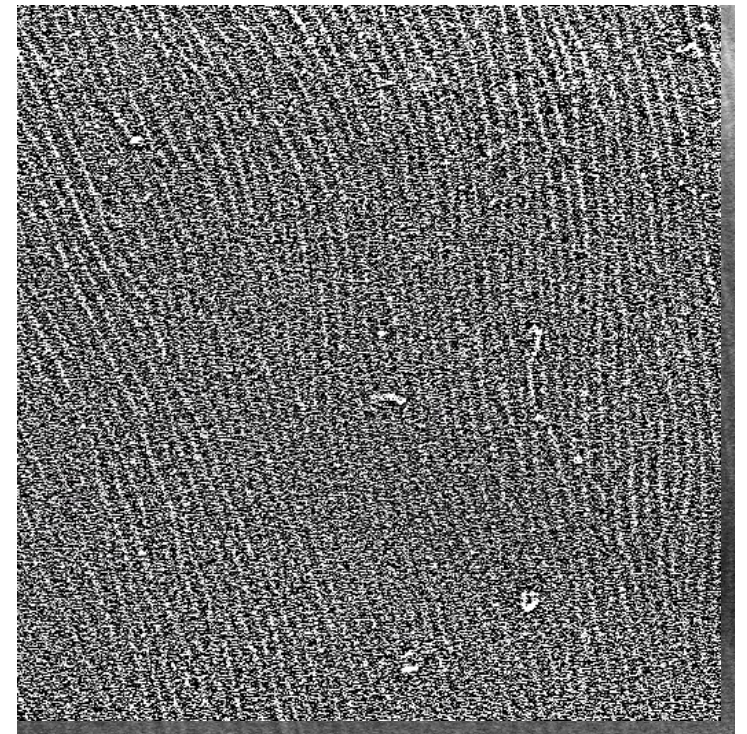
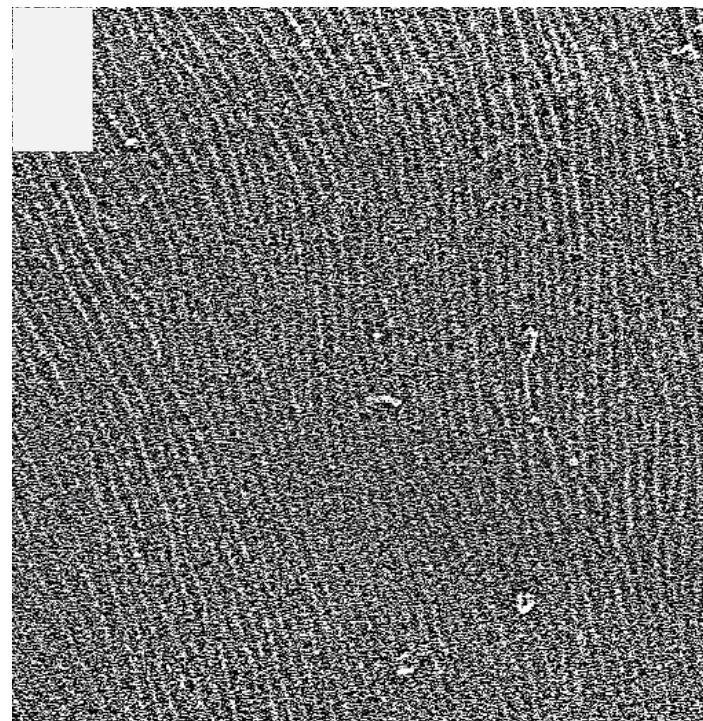
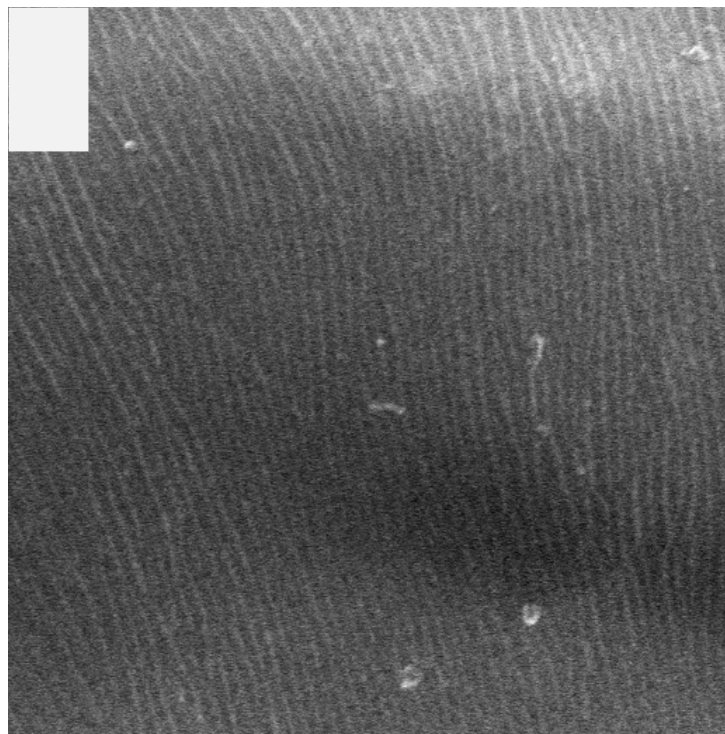
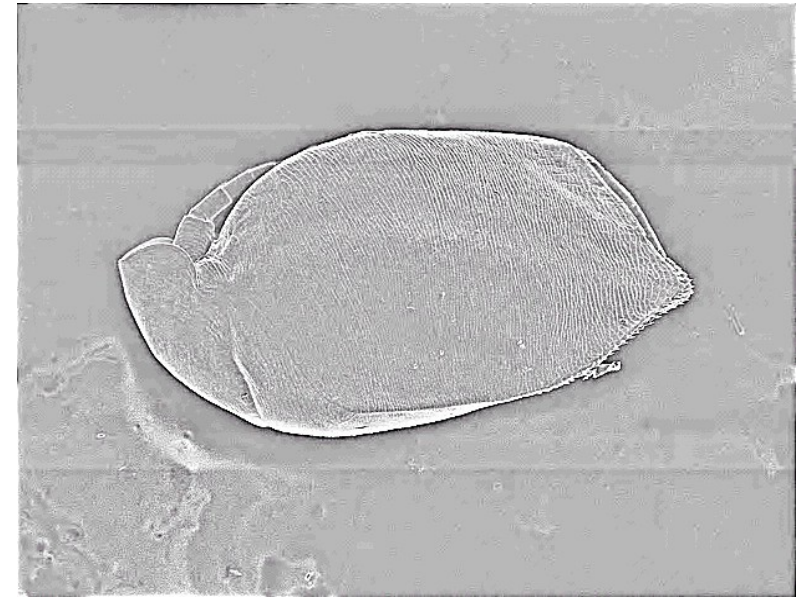
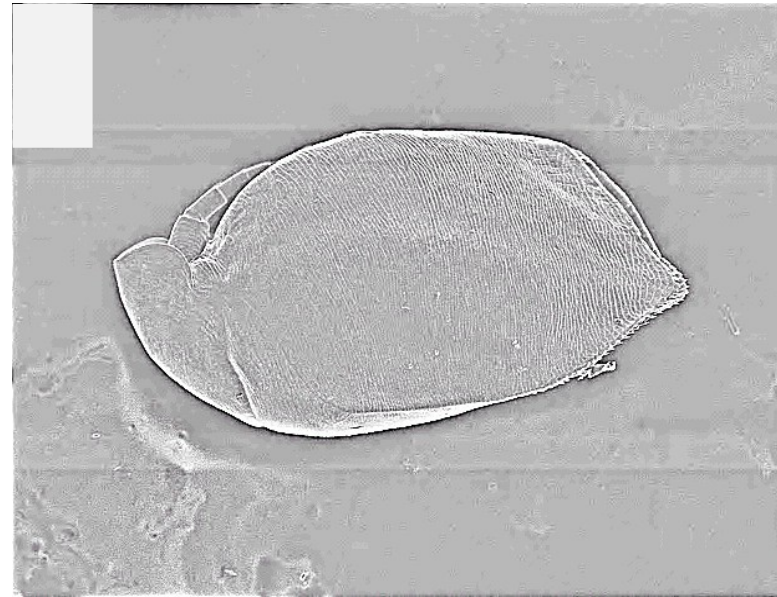
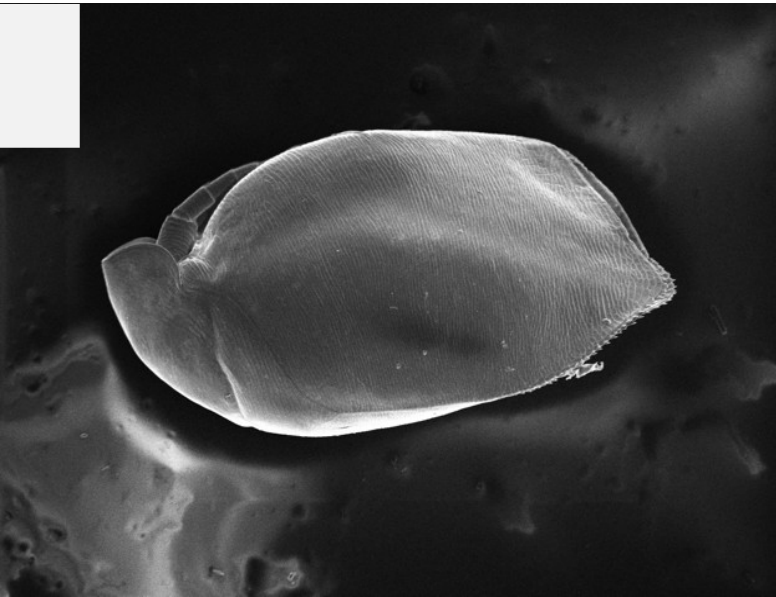
2次微分 (ラプラシアン) も有効



ハイパスフィルタとしての効果があり、ムラのある背景から構造を浮かび上がらせることができる。

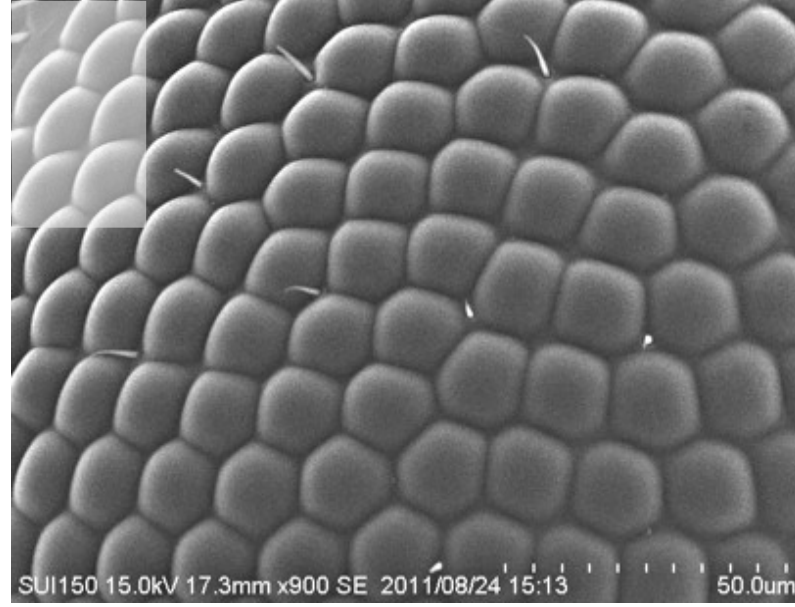
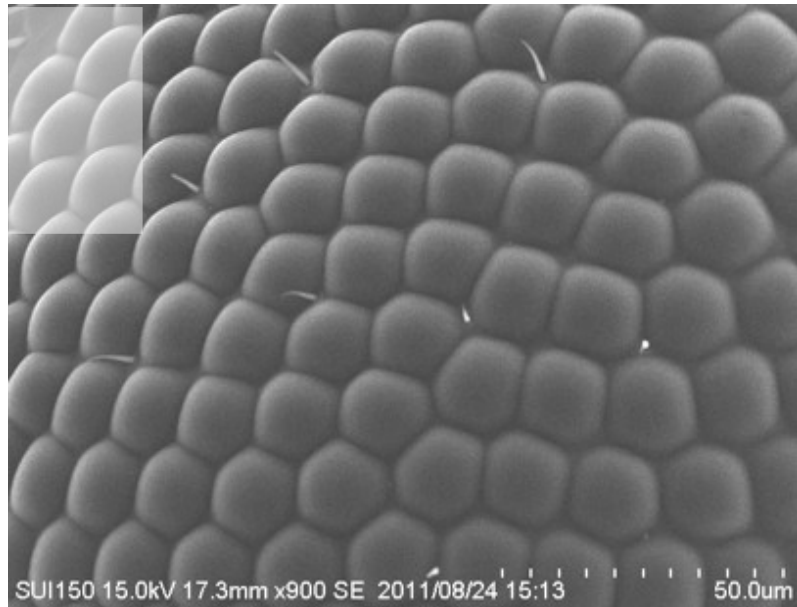
ハイパスフィルタ

ハイパスフィルタの周波数に応じて、キレをよく出来る。
低分解能側を残せば、違和感のなく、切れをあげたフィルタも可能

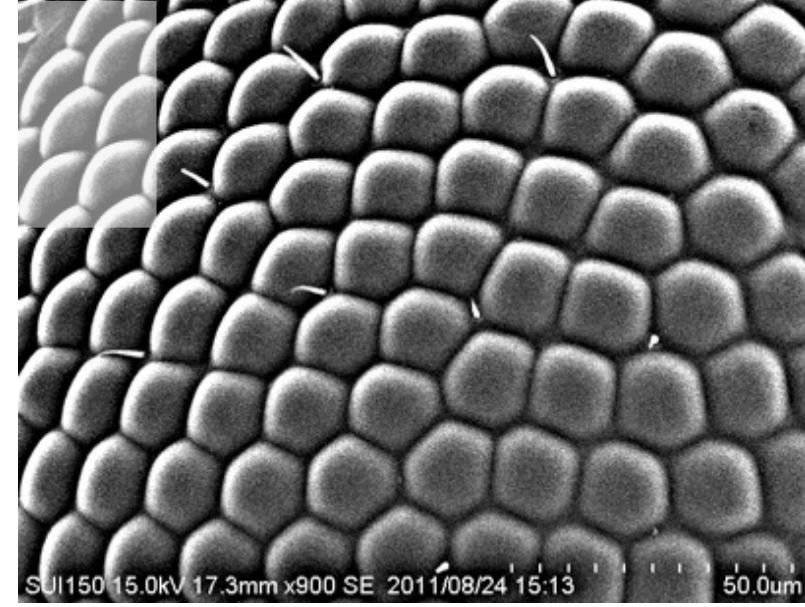


Unsharp Maskによる切れの向上

ラプラシアンフィルタと実像の和により、画像のキレを上げる



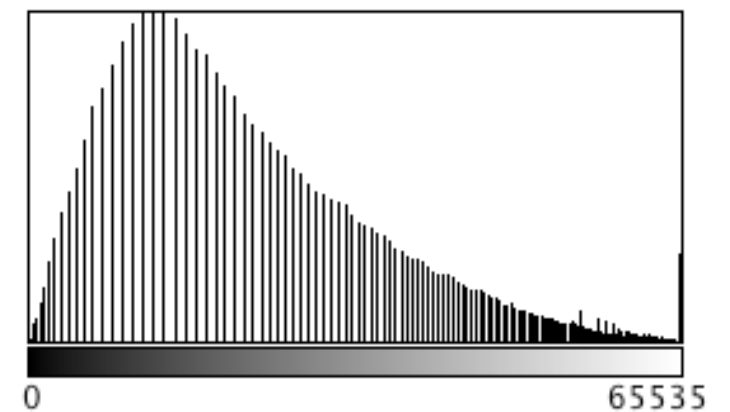
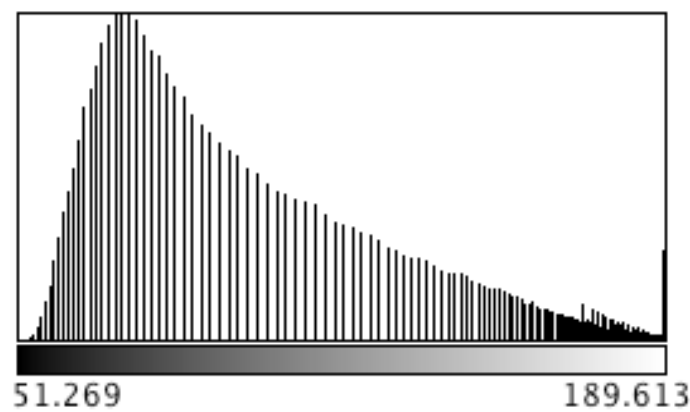
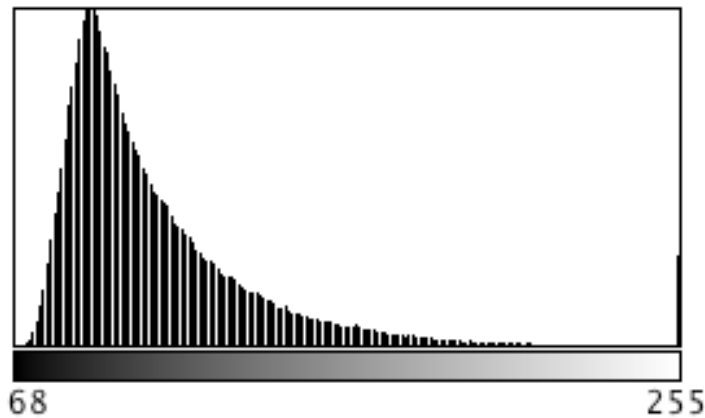
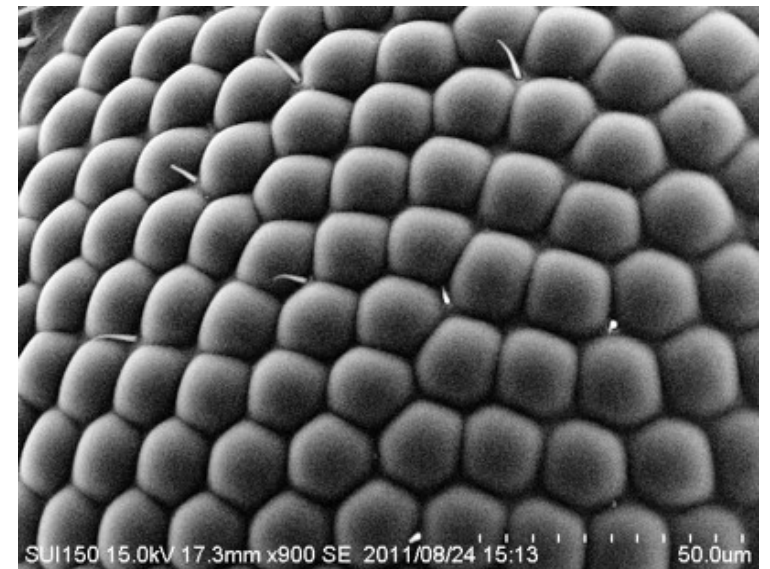
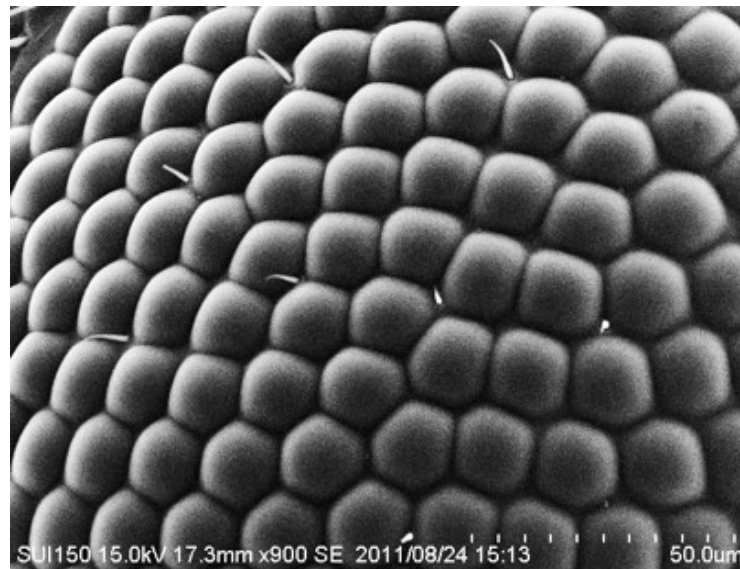
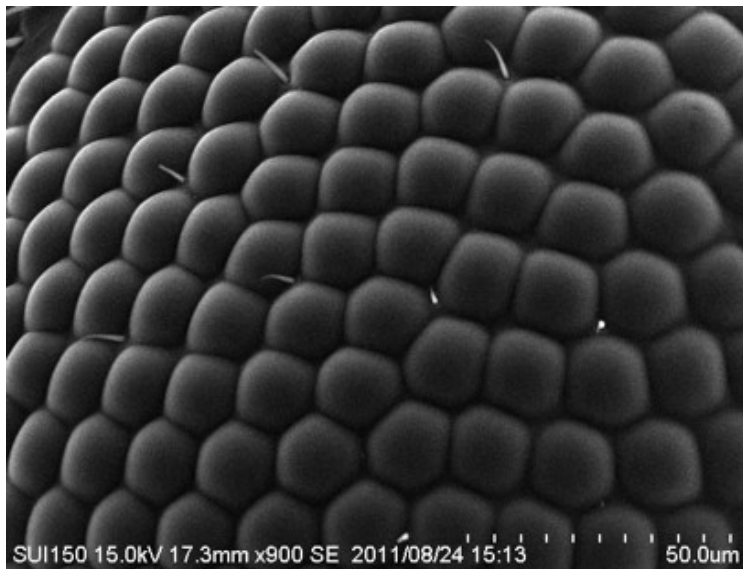
k=0.4



k=0.8

$$(f + k \times f \otimes L)$$

縦軸の変換: ヒストグラム変換



Arctan型の変換

ヒストグラムの平滑化

それぞれの密度分布をもつ領域でコントラストを上げる。密度の順位は変化しない。

次元の変更

- ・ 2Dから3Dへ
 - シリアル画像 (シリアルセクション)
 - ・ 連続した2D画像の重ね合わせ
 - 単粒子解析
 - ・ 同一構造の粒子の異なる投影像から
 - 電子線トモグラフィー
 - ・ 同一視野の傾斜シリーズから
 - 電子線回折
 - ・ 傾斜した試料の電子線回折と画像から
 - 3次元再構成法
 - ・ 逆投影 -> SIRT、ベイジアン推計
 - GPGPUなどを使った高速化 (コンピュータのハードの変遷)

まとめ

画像処理、解析は、対象があって初めて成り立ちます。それぞれの対象の特徴をよく眺めて、画像処理、解析方法を選択しましょう。

現在、様々な画像処理方法をまとめようとしています。

(Eos/PIONE)

情報や疑問を頂けましたら、少しずつ充実していきたいと思えます。

- <http://www.yasunaga-lab.bio.kyutech.ac.jp/EosJ/>
 - SourceForge:Eos
- yasunaga@bio.kyutech.ac.jp

