

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560024

研究課題名(和文)電子線トモグラフィー用ビデオレートフォーカスシステムの開発

研究課題名(英文)Development of autofocusing system with video-rate camera for electron tomography

研究代表者

西 竜治(Nishi, Ryuji)

大阪大学・超高压電子顕微鏡センター・准教授

研究者番号：40243183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：超高压電子顕微鏡トモグラフィーは医学・生物学系試料の3次元構造を観察することに有用である。その撮影は数十枚以上の試料傾斜角を少しずつ変えた像が必要であり、数マイクロメートルの機械的回転精度より良い精度で、オートフォーカスおよび視野位置補正を自動的に行い、傾斜像シリーズの撮影の大幅な高速化を実現した。4000×4000ピクセルの61枚のCCD画像からなるトモグラフィー傾斜シリーズを取り込むのに従来の半分の30分で完了する。

研究成果の概要(英文)：It is useful to observe the three-dimensional structure of medical and biological samples by using ultrahigh voltage electron microscope tomography. Taking several tens or more images with slightly different tilt angle of sample is necessary, however, a mechanical rotation accuracy is worse than of a few micrometers. Therefore, we accomplished fast taking of the tilt image series with automatic focusing and field position correction. To capture the 61 CCD images with a resolution of 4000 X 4000 pixels is completed in 30 minutes of half of conventional method.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・薄膜・表面界面物性

キーワード：電子線トモグラフィー 超高压電子顕微鏡 オートフォーカス 自動撮影 画像鮮鋭度

1. 研究開始当初の背景

超高圧電子顕微鏡トモグラフィーは医学・生物学系試料の3次元構造を観察することに有用である。その際、電子顕微鏡像の撮影には試料傾斜角を少しずつ変えた像を数十枚から百数十枚もの画像を取得する必要があり、撮影プロセスの自動化が求められている。

電子線トモグラフィー撮影では、試料を1度または2度おきに傾斜させ電子顕微鏡像を連続的に撮影し、それらから3次元形状を再構築する。通常、回転軸は視野の中心に置かれるが、実際には機械的制約の限界から傾斜に伴い僅かに視野位置やフォーカスがずれる。そこで1枚撮影するごとに位置とフォーカスを補正しながら100枚を越えるような多量の画像シリーズを撮影している。

これに用いられる視野位置補正は通常相互相関法を用いたテンプレートマッチングであり、オートフォーカス方式として、実用化されているのはイメージヴォブラー方式である。それは試料に入射する電子線を一定角度だけ傾斜させたときの像の移動量を断続的に測定してフォーカスを合わせる方式である。しかし、これらの方法では撮影時間が長く、オートフォーカス精度が不十分で、画像シリーズの一部にフォーカスのずれている画像が含まれてしまうことがあった。

2. 研究の目的

超高圧電子顕微鏡トモグラフィー画像シリーズ撮影の際に必要なオートフォーカス性能を飛躍的に向上させ、画像取得時間の大幅な短縮をはかり、画像シリーズ取得の操作性を向上させる。超高圧電子顕微鏡トモグラフィーでよく用いられる生物系の試料を対象としたオートフォーカスアルゴリズムとする。フォーカスのずれを画像のぼけ具合から画像鮮鋭度を表す評価関数を用いる方式を採用し、画像撮影カメラを動画撮影できるハイビジョンビデオカメラを使った方式とする。

3. 研究の方法

画像鮮鋭度を使ったオートフォーカスを動画撮影用のハイビジョンカメラを用いて行うために次のような方法を用いた。

(1) 動画撮影用のハイビジョンから精度の良い画像鮮鋭度を求めるための手法

動画撮影用であるため1枚の画像は1/30秒で得られることがメリットであるが、同時に画像に利用できる信号量(電子数)が少ないことがデメリットとなる。つまり、少ない電子数領域ではショットノイズの影響が目立ちSN比が悪化し、画像鮮鋭度の計算で用いている微分演算のため誤差が大きくなる。画像積算法により改善を図るが最小の積算数で最適フォーカスを求めるのに十分な精度を得られる条件を探す。

(2) 超高圧電子顕微鏡をリモートで制御するための通信ソフトウェアの開発

超高圧電子顕微鏡の制御にはTCP/IP経由でのコマンド制御方式を用いる。レンズ電流制御、試料傾斜/位置制御などを最小の時間で行えるようソフトウェアを開発する。

(3) 解像度が少ない像から最適フォーカス値を予測する手法

ハイビジョンビデオカメラは解像度が約1000ピクセルと最終像撮影に用いるスロースキャン冷却CCDカメラの約4000ピクセルに比べると1/4である。十分なフォーカス精度を得るための条件を明らかにする。

4. 研究成果

トモグラフィーの撮影シーケンスは観察対象の視野位置補正、明るさ補正、フォーカス調整、スロースキャン冷却CCDカメラによる撮影、試料傾斜(1度または2度)の順に進めていく。このうちとこの補正にハイビジョンビデオカメラを使って補正の高速化を行った。

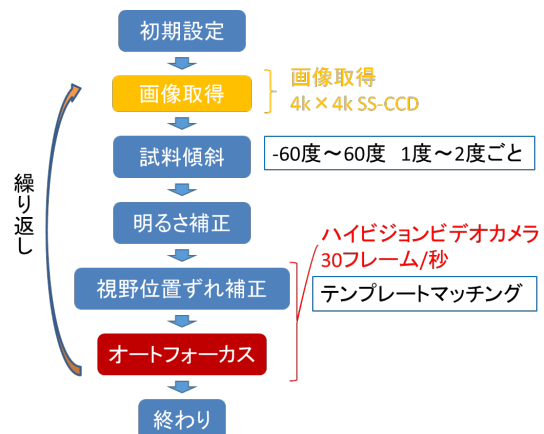


図 1. 超高圧電子顕微鏡トモグラフィー自動撮影シーケンス

フォーカスの算出に用いる画像鮮鋭度はノイズを低減させた画像に対し、水平・垂直の2方向に対しソーベル微分演算子を適用し、その標準偏差の2乗和の平方根により定義した。

最適フォーカス値の算出にはこれらの画像鮮鋭度を異なる5種類のフォーカスに対して求め、関数フィッティングにより画像鮮鋭度が最大となるフォーカス値を算出した(最適フォーカス)。用いた関数は疑似ガウス関数

$$f(x) = a \exp\left(-\frac{|x-b|^{1.3}}{d}\right) + c$$

でパラメータが4つなので最低で4点必要だが、実際には画像鮮鋭度には誤差があるので5点以上ないと正確に求まらない。

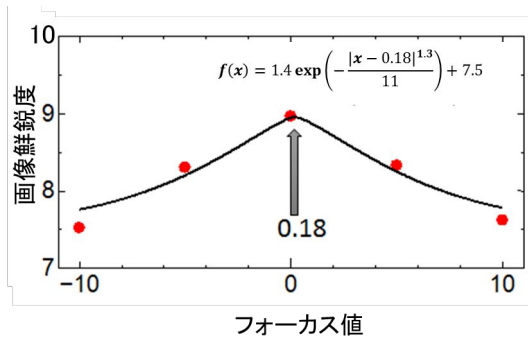


図2 疑似ガウス関数にフィッティングする。点は画像鮮鋭度。この図の例では最適フォーカスが0.18と決まる。

必要なSN比を得るために画像積算を行った。積算する画像数に対してSN比はその1/2乗でしか増加しない。積算する枚数を変えながら、実際に最適フォーカス値を算出した場合の誤差を求めることで十分な精度が得られる最小の積算枚数を決定した。

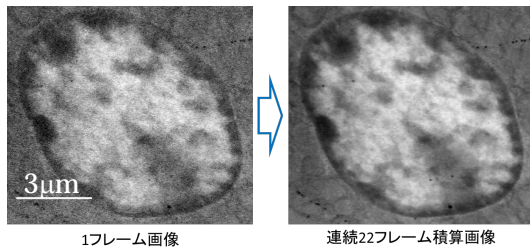


図3 画像積算の効果(ラット細胞核)

超高圧電子顕微鏡の外部制御のソフトウェアを作成した。ソフトウェアはVisual C++で実装し、画像処理ライブラリOpenCVと組み合わせて用いた。制御タイミングは電子顕微鏡の動作速度に合わせて1つ1つ調整した。フォーカスに使うレンズである対物レンズの電流を変換させたとき実際の画像のフォーカスの応答には遅れがある。この遅れはレンズ電流駆動回路と対物レンズ磁場の応答遅れの複合であることがわかった。整定までの時間は対物レンズ電流のわずかな変化では200ミリ秒以下であるが、電流変化量が増すにつれて大きくなっている。フォーカス調整に使う画像にはこの時間領域は使わないようにした。

ハイビジョンビデオカメラ像の解像度が最終画像をとるスロースキャン冷却CCDカメラに比べて低い点は次のように回避した。最適フォーカス値を求めるためにフォーカスをずらした画像を撮影する際に、有意な画像鮮鋭度変化が得られるフォーカスずらし量に設定した。このずらし量はスロースキャン冷却CCDカメラ像から画像鮮鋭度を算出する場合に比べ1.5~2倍大きな値である。ずらし量を大きくした場合最適フォーカス値の

算出誤差が増加することが予想されたが、実際はその誤差は手でフォーカスするよりも小さいことがわかった。

以上のような結果を基に自動撮影のシーケンスを構成した。視野位置補正に用いた像は画像鮮鋭度算出に使うのと同じ画像積算条件で得られた像を使い、テンプレートマッチングを相互相関法で行った。視野位置の補正はイメージシフトを使い電磁的に行った。また撮影する画像の明るさは試料の傾斜角度に伴って変わるため(高傾斜角度の時は実効的な試料厚さが厚くなるので)、傾斜がないときの(明るさを調整するレンズである)集束レンズ電流値と最大傾斜時に必要な集束レンズ電流から2次関数補間で間の傾斜角の時は集束レンズ電流を決定した。

超高圧電子顕微鏡トモグラフィーの傾斜像シリーズの自動撮影の大幅な高速化を実現した。実際に4000×4000ピクセルのスロースキャン冷却CCDで2度おきのトモグラフィー傾斜像シリーズを取り込むのに30分で完了する。オートフォーカスおよび視野位置補正を合わせて7秒で完了し、補正時間を従来比で1桁改善し、全体の撮影時間を従来の半分に減らした。3次元構造観察の大幅な効率化を達成できたと考えられる。これにより世界に1台しかない超高圧電子顕微鏡の有用性をさらに高め、多くの研究者の研究の効率化を図ることに役立つと期待される。

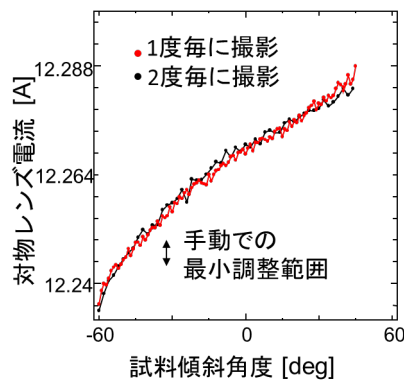
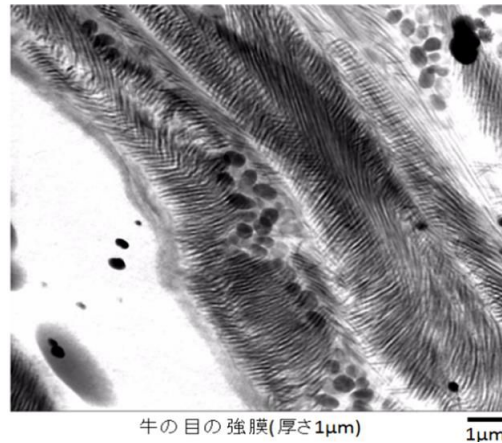


図4 自動撮影の例(上図は画像、下図はフォーカスである対物レンズ電流の推移)

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 1 件)

— R. Nishi, Y. Moriyama, K. Yoshida, N. Kajimura, H. Mogaki, M. Ozawa, and S. Isakozawa, Autofocus method using quasi-Gaussian fitting of image sharpness in ultra-high-voltage electron microscopy, *Microscopy*, 62, 2013, 515-519, doi: 10.1093/jmicro/dft030 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

金治 敦子, 森山 宣孝, 四方 宏紀, 吉田 清和, 梶村 直子, 西田 倫希, 砂子沢 成人, 西 竜治, 超高压電子顕微鏡トモグラフィー自動撮影用ビデオカメラを用いた高速オートフォーカス, 日本顕微鏡学会第 70 回学術講演会, 2014 年 5 月 11~13 日、幕張メッセ国際会議場
西 竜治, 森山 宣孝, 吉田 清和, 梶村 直子, 茂垣 宏明, 小沢 賢, 砂子沢 成人, 超高压電子顕微鏡トモグラフィー用画像鮮鋭度オートフォーカス法における近似関数, 日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会, 2013 年 5 月 10~12 日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪)

他 7 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 竜治 (NISHI, Ryuji)
大阪大学・超高压電子顕微鏡センター
准教授
研究者番号：40243183

(2) 研究分担者

吉田 清和 (YOSHIDA, Kiyokazu)
特任研究員・超高压電子顕微鏡センター
研究者番号：50263223

(3) 連携研究者

()

研究者番号：