

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03538

研究課題名(和文) 情報欠落のない非線形再構成法による高速オンライン電子線トモグラフィの開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of a high speed online electron tomography system with a non-linear discrete reconstruction method unaffected by the missing data range

研究代表者

馬場 則男 (Baba, Norio)

工学院大学・情報学部(情報工学部)・教授

研究者番号：80164896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,570,000円

研究成果の概要(和文)：医療用X線CTと同様な原理で電子顕微鏡を使ってナノの分解能を持つ電子線CTが広く応用され、生物、材料科学分野の3次元構造解析に役立っている。しかし、装置の仕組みから一般に全方位の投影像が得られないため、特に奥行方向の分解能が低く、また、断層像を得るまでに少なくとも1時間以上かかるなど実用性に大きな問題があった。本研究では、これらを解決するために、独自に考案してきた断層像の演算方法の性能を大きく向上させ、分解能の劣化を無くした。また、少ない撮影枚数からでも視野のオートトラッキングとオートフォーカスを行うオンラインCTシステムを世界に先駆けて試作した。

研究成果の概要(英文)：Electron tomography based on the same principle as the medical X-ray CT is widely applied to various fields of biological and material science for 3D structural analysis with nano-order resolution. However, because in general the projection images of all directions are not acquired from the reason of instrumental specialty, the depth resolution is considerably low. In addition, it takes more than one hour to obtain tomographic images, which is serious problem from the viewpoint of practical use. In this research, to resolve these problems the efficiency of a uniquely devised reconstruction method has further improved. As a result, the depth resolution has been recovered enough. Furthermore, an online CT system has been experimentally made ahead of the world, which is capable of auto-focusing, auto-tracking of the field of view and tomographic reconstruction even for a small number of tilt series images.

研究分野：画像工学

キーワード：電子線トモグラフィ 電子顕微鏡 逆問題 画像再構成 情報欠落問題

1. 研究開始当初の背景

電子線トモグラフィ(電子線 CT)はナノの分解能で3次元構造を直視できることから生物、非生物(材料科学)分野の全物質材料研究の基盤ツールとなっている(文献)。

しかし、電子線 CTはその能力の大きな可能性をまだ実現・応用させていない。その一つは、一般に試料の傾斜角度に制限(投影方向が $\pm 60 \sim 70^\circ$ に限られている)があるため、入射電子線に直交する界面が解像できず、電子顕微鏡が得意としてきた界面・表面の構造解析が不得意になっていることである。二つ目は、未だにオンライン CTが実現できていないことである。電子線 CTでは、X線 CTと異なり、機械的に試料を傾斜しながらその都度レンズ結像によって撮影しているため自動化は容易でなく、一般的に撮影だけで約1時間以上も要する。投影像シリーズの位置合わせ処理を考えるとオンライン CTは不可能と思われてきた。

2. 研究の目的

上で述べた2つの問題点を解決するため次のことを目的とした。(1)、前回の科研費(課題番号:24510156)による研究で開発してきた「非線形離散濃度階調再構成法」(以下非線形再構成法と呼ぶ)の特徴である、試料傾斜角度制限による情報欠落があっても断層像の界面・表面の解像度が劣化しない点を更に広く一般試料に応用できるように汎用化させる。(2)、世界で初めてのオンライン CTシステムを試作する。このために、上記(1)の新奇な再構成法のもう一つの特徴である、少ない投影像枚数でも解像度を落とさない点を活かし、短時間での撮影で少ない撮影枚数での位置合わせの実現、独自のスポットオートフォーカス法(以下スポット AFと呼ぶ)などを実装し、自動化システムを実現する。

3. 研究の方法

目的の(1)について:本非線形再構成法の能力は大きいものがあるが、応用できる試料形態はこれまで限られてきた。すなわち、試料傾斜を大きくしても視野外から対象外の物体像が混入しない条件である。しかし、実際の試料では、傾斜角度に伴い、視野外の対象が入り込むことが頻繁である(以下、視野外投影像問題と呼ぶ)。これまでに改良して、支持膜のみといった比較的単調な像濃度分布の場合には応用可能となったが、3次元で広がる複雑な界面・表面形態のある試料にも広げるため次の方法を採用。

再構成(断層像)演算領域を本来の 0° 傾斜(通常の観察像)の視野のみを対象とせず、それより外側の方向に広く再構成断層空間を広げて演算する。さらに試料傾斜に伴う断層空間の広がりや投影範囲の広がり(視野外の影響が及ぶ領域)が幾何学的に正確に分かるので、その変化して増えた断層像部分につき

利用できる投影データを集めて再構成する改良である。こうした視野外のみ制限した断層領域の再構成は、本来の断層像再構成(0° 傾斜における視野範囲)に影響しないようにすることが目的なので、ある程度不完全な再構成でよく、十分に達成されると考えられる。

目的の(2)について:既に要素技術として前回の科研費研究期間に開発できている3つの手法を本学既設 TEM/STEM の外部制御 PC に組み込み、オンライン電子線 CTを試作する。それらは、スポット AF(成果の発表論文)、完全自動視野追跡(文献)、像ドリフト補正(文献)、の制御ソフトウェアである。既設 TEM/STEM は最新のデジタル制御となっており、試料移動と傾斜、像シフト、電子レンズ焦点制御(非点収差含む)などが全て PC プログラムによって行える。画像取得も CCD カメラによる自動取得となっている。従って、それら要素技術とカメラを統合し、ライブ画像解析制御システムを試行する。

また、非線形再構成法により少ない撮影枚数で済ませられるが、枚数削減のための再構成法の改良も行う。ただ、この手法はオンライン演算に見合う速度には至らないと考えられるので、この時点では非線形再構成法による最終断層像はオフライン演算として求め、オンライン CTの断層像は従来法による高速演算法を採用する。

4. 研究成果

目的(1)に対する成果:研究の方法で述べた、視野外投影像問題、を次のようにほぼ解決し、非線形再構成法を広く一般試料に応用できるようにした。本再構成法では、断層像の濃度を表すのに“濃度量子”と呼ぶ濃度階調の一単位を多数用いて、それを必要な画素の位置に必要な数積み重ねて断層像を再構成する(量子配置演算と呼ぶ)。量子数は線形理論から投影像データより決まるが、視野外投影像問題から回避するために、 0° 傾斜(通常の観察像)の投影データから決定した。さらに視野外投影像問題を回避するために、方法で述べたように、外側の方向に広く再構成断層空間を広げて再構成演算(量子配置演算)を行い、ここで、 0° 以外の投影データとの誤差が最小になるように量子の配置を反復演算する。こうした反復収束演算は一般に最適化問題と呼ばれ、局所解にトラップされて正解に収束しない可能性を常に指摘されてきた。本手法では、この問題を回避するため、低精細度(解像度を下げた再構成演算)から高精細度に徐々に細度を上げていく方式にして正しい収束解に到達するようにした。こうしたことで、撮影枚数を削減しても真の断層像であるときに投影データとの誤差最小になることは自明であるので本方式は撮影時間の短縮に威力を発揮する。

以上の方法を複合ナノ粒子や切片試料の再構成に応用したところ視野外投影像問題の影響をほぼ受けず、情報欠落による奥行方向の粒子像の縦伸びの弊害も起きずにナノ粒子の外形が明瞭なコントラストで再構成された。また、異なる組成間の界面のコントラストも明瞭に再構成された。計算モデルによるファントムを用いた検証でも概ね良好な結果が得られた。これらの結果は、日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会に発表投稿した。

目的(2)に対する成果：試作ながらオンライン電子線 CT システムを完成出来た。

(2-1) 色々な試料であってもまた倍率に依存せずスポット AF によって、傾斜軸上付近を常に正確に焦点合わせできる手法・システムが完成した(成果の発表論文)。本手法では、独自に開発した高精細自己相関関数(HD-ACF)が威力を発揮した。HD-ACF は画像の生成を線形システムで考えたときの点広がり関数(PSF)に相当するため、これが最も小さく鮮鋭になるように対物レンズ電流を制御することで AF が実現できた。HD-ACF はスポット状の小さい画像領域で得られるため、CT における傾斜軸上で正確に焦点合わせが行える。

(2-2) 独自の高精度位置合わせ法は、文献で既に成果報告したが、倍率が高倍率(数十万倍以上)でも、また傾斜角度間隔が通常より 5 倍から 10 倍(10° ~ 20°) に広げた少ない枚数の投影像であっても正確に行えるようにさらに改良した。本手法は各投影像ごとに“逆投影線像”と呼ぶ 3 次元像を作りそれらの 3 次元相関によって高精度位置合わせを行うが、高倍率になった場合、逆投影線像を演算する FBP(フィルター交換逆投影)の閾値周波数が適切に変わるようにしたことである。これにより、例えば、触媒試料 50 万倍の STEM 像によるトモグラフィ実験において 5nm 解像度の高い断層像を得ることが出来た。

(2-3) 以上の主な改良を行ったシステムでオンライン実験を行い、少ない方位数シリーズ(例えば 10° 刻み)で、エコマテリアル薄膜積層デバイス(TiO₂/Ti/炭化層/生分解性樹脂、など)で界面の 3D 解析実験を行った。2016 年度に、独自に改良して導入(購入)した、“3D 解析ホルダー”(汎用性の高い試料回転機構をもつ)が本応用実験に役立っている。なお、高速化を優先する場合には、スポット AF のみで連続試料傾斜撮影し、シリーズの撮影後に正確な位置合わせ処理を行っている。

以上、撮影枚数を減らしても偽像などの劣化なく撮影時間が大きく短縮でき、動的“その場”3次元解析に応用できる基盤整備ができた。実際の上述のデバイスの実験で、 10° より細かい傾斜角度間隔で撮影したところ電子線ダメージによって試料は変形を起こしたが、 10° での少ない撮影枚数では変形が

起こる前に撮影が行え正確な断層像を得ることが出来た。

<引用文献>

P.A. Midgley and M. Weyland, 3D electron microscopy in the physical sciences: the development of Z-contrast and EFTEM tomography, Ultramicroscopy 96 (2003) 413-431

S. Tomonaga, M. Baba, S. Yamazaki and N. Baba, A new field-of-view auto tracking method for online tomography reconstruction based on back-projected ray image cross-correlation, Microscopy, 63 (5) (2014) 357-369

S. Isakozawa, S. Tomonaga, T. Hashimoto and N. Baba, High-precision image-drift-correction method for EM images with a low signal-to-noise ratio, Microscopy, 63 (4) (2014) 301-312

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 3 件)

Shigeto Isakozawa, Taishi Fuse, Junpei Amano, Norio Baba, Spot auto-focusing and spot auto-stigmatism methods with high-definition auto-correlation function in high-resolution TEM Microscopy, 67, 75-88, (2018), 査読有 DOI:10.1093/jmicro/dfy001

馬場則男, 電子顕微鏡画像処理による 3 次元断層法と表面構造復元法、画像ラボ、日本工業出版、9月号、2017、pp.57-61、査読無

S. Isakozawa, I. Nagaoki, A. Watabe, Y. Nagakubo, N. Saito, H. Matsumoto, X.F. Zhang, Y. Taniguchi and N. Baba, Design of a 300-kV gas environmental transmission electron microscope equipped with a cold field emission gun, Microscopy, 65 (4) 353_362, 2016、査読有 DOI:10.1093/jmicro/dfw015

[学会発表](計 24 件)

馬場則男, 増本奉之, 馬場美鈴, 濃度量子単位に基づく非線形離散再構成法の最適化の改善、日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会、札幌コンベンションセンター、5/31、2017

天野純平, 坂本祥平, 手塚聖貴, 馬場美鈴, 久保貴, 砂子沢成人, 馬場則男, 高精細自己相関関数による電子顕微鏡のスポットオートフォーカス及びオートスティグマ、日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会、札幌コンベン

ションセンター、5/30-6/1、2017

前田元, 手塚聖貴, 坂本祥平, 馬場美鈴, 馬場則男, 機械学習による電子顕微鏡像のセグメンテーション及び輪郭線抽出手法の提案、日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会、札幌コンベンションセンター、5/30-6/1、2017

手塚聖貴, 前田元, 馬場美鈴, 馬場則男 自己符号化器の改良と事前学習の効率を上げる HOG 特徴解析法による粒子自動抽出、日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会、札幌コンベンションセンター、5/30-6/1、2017

馬場則男, 増本奉之, 馬場美鈴, 電子線トモグラフィにおける最近の再構成法の進展と新奇な濃度量子単位に基づく再構成法、日本顕微鏡学会第 60 回記念シンポジウム(招待講演) 12/2、2017

Gen Maeda, Shoki Tezuka, Shohei Sakamoto, Misuzu Baba and Norio Baba, Segmentation and Contour Extraction in Biological Transmission Electron Microscope Images with 'Bag-of-Features' Method in Machine Learning, Microscopy and Microanalysis 2017, (Saint Louis), Vol.23 No.S1, pp. 138-139, (2017)

Shoki Tezuka, Gen Maeda, Misuzu Baba and Norio Baba, A particle extraction method with an improved auto-encoder in neural networks with the aid of HOG feature analysis, Microscopy and Microanalysis 2017, (Saint Louis), Vol.23 No.S1, pp. 134-135, (2017)

馬場則男, 電子線トモグラフィ高精度化画像処理法と新奇な断層像再構成法の試み、日本顕微鏡学会・研究部会講演会、東北大学片平キャンパス、2/24(2017)

手塚聖貴, 前田元, 馬場美鈴, 馬場則男, ニューラルネットワークにおける自己符号化器を用いた自動粒子抽出、日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会、仙台国際センター、6/14-16(2016)

坂本祥平, 杉本健太, 増本奉之, 手塚聖貴, 馬場美鈴, 馬場則男, 3D 相関視野追跡法と HD-ACF スポットオートフォーカスによるオンライントモグラフィ、日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会、仙台国際センター、6/14-16(2016)

前田元, 手塚聖貴, 馬場美鈴, 馬場則男 積算平均ラインプロファイルマップを用いた電子顕微鏡画像上の輪郭線抽出法、日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会、仙台国際センター、6/14-16(2016)

増本奉之, 馬場美鈴, 馬場則男, 濃度量子単位に基づく非線形離散濃度階調再構成法の実用化、日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会、仙台国際センター、6/14-16(2016)

馬場美鈴, 坂本祥平, 前田元, 手塚聖貴, 馬場則男, オートファジー不能変異株の形態学的解析、日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会、仙台国際センター、6/14-16(2016)

馬場則男, 増本奉之, 馬場美鈴, 濃度量子単位に基づく非線形離散濃度階調再構成法の総当たり法による改善、日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会、仙台国際センター、6/15(2016)

Tomoyuki Masumoto, Misuzu Baba, Norio Baba, A non-linear discrete reconstruction method based on the gray-level quantization unit, The 59th Symposium of the Japanese Society of Microscopy (帝京平成大学池袋キャンパス), Nov. 18-19, 2016

Gen Maeda, Shoki Tezuka, Shohei Sakamoto, Misuzu Baba, Norio Baba, Contour detection and segmentation method applicable to Electron tomography images with auto-classification by machine learning The 59th Symposium of the Japanese Society of Microscopy (帝京平成大学池袋キャンパス), Nov. 18-19, 2016

Shohei Sakamoto, Kenta Sugimoto, Tomoyuki Masumoto, Shoki Tezuka, Misuzu Baba and Norio Baba, A spot auto-focus method with high definition ACF and applications to electron tomography The 59th Symposium of the Japanese Society of Microscopy (帝京平成大学池袋キャンパス), Nov. 18-19, 2016

Shoki Tezuka, Gen Maeda, Misuzu Baba, Norio Baba, Applications of a particle extraction method with deep neural networks using improved auto-encoders to biological ultra-thin section images The 59th Symposium of the Japanese Society of Microscopy (帝京平成大学池袋キャンパス), Nov. 18-19, 2016

馬場則男, 濃度量子化単位に基づく非線形離散濃度階調再構成法の収束性の改善 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、国立京都国際会館、5/15(2015)

馬場美鈴, 杉本健太, 坂本祥平, 前田元, 増本奉之, 馬場則男, オートファゴソーム前駆体膜が積荷を選択的に捕捉する機構の 3 次元形態解析、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、国立京都国際会館、5/14(2015)

②①増本奉之, 前田元, 馬場則男, ガボールウェーブレットフィルターを用いた電子顕微鏡画像強調処理、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、国立京都国際会館、5/14(2015)

②②杉本健太, 友永祥彦, 馬場美鈴, 馬場則男, 3次元逆投影線像相互相関法による投影シリーズの倍率補正、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、国立京都国際会館、5/14(2015)

②③坂本祥平, 杉本健太, 友永祥彦, 馬場美鈴, 馬場則男, ‘逆投影線像’相互相関による自動視野追跡法の広角度傾斜追跡性能、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、国立京都国際会館、5/14(2015)

②④Tomoyuki Masumoto, Gen Maeda and Norio Baba, Image enhancement of electron microscope images with Gabor wavelets-based filtering, The 2nd East-Asia Microscopy Conference, The Himeji Chamber of Commerce and Industry, Nov.25-27,2015

〔図書〕(計 1 件)

馬場則男, 馬場美鈴, 他、朝倉書店、ライフサイエンス顕微鏡学ハンドブック(山科正平、高田邦昭、他、編集) 執筆:「2 電顕トモグラフィ」(pp.293-300)、2018、344

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 則男 (Baba Norio)
工学院大学・情報学部・教授
研究者番号: 8 0 1 6 4 8 9 6

(2) 研究分担者

馬場 美鈴 (Baba Misuzu)
工学院大学・総合研究所・研究員
研究者番号: 8 0 4 3 5 5 2 8

(3) 連携研究者

金子 賢治 (Kaneko Kenji)
九州大学大学院・工学研究院・教授
研究者番号: 3 0 3 3 6 0 0 2

(4) 研究協力者

小笠原光雄 (Ogasawara Mitsuo)
工学院大学・総合研究所・研究員