

# 博士学位論文

|         |   |
|---------|---|
| 氏名(本籍)  | 友永祥彦(東京都)   |
| 学位の種類   | 博士(工学)  |
| 学位記番号   | 博甲第130号   |
| 学位授与年月日 | 平成 26年 7月 7日                                      |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第 1項                                       |
| 学位論文題目  | 電子線トモグラフィにおける<br>3次元断層像相関による<br>高精度投影像自動位置合わせ法の開発 |

|        |    |         |
|--------|----|---------|
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 馬場則男 |
|        | 副査 | 教授 於保英作 |
|        | 〃  | 教授 鷹野一朗 |
|        | 〃  |         |
|        | 〃  |         |
|        | 〃  |         |
|        | 〃  |         |

工学院大学大学院



## 目次

|       |                       |    |
|-------|-----------------------|----|
| 第 1 章 | 序論                    | 4  |
| 1.1   | 電子線トモグラフィの概要          | 4  |
| 1.2   | 位置合わせと傾斜軸探索・調整の必要性    | 13 |
| 1.3   | 新たに提案する位置合わせ法         | 14 |
| 第 2 章 | 従来の位置合わせ法             | 18 |
| 2.1   | マーカー法と特徴点追跡法          | 18 |
| 2.2   | 画像相関法                 | 21 |
| 2.3   | cos-stretch 法         | 25 |
| 2.4   | 位相限定相関法               | 26 |
| 2.5   | common line を利用する方法   | 26 |
| 第 3 章 | 新たに提案する位置合わせの手法       | 29 |
| 3.1   | 傾斜軸の位置ずれを考慮した 3 次元再構成 | 29 |
| 3.2   | 各投影像の位置合わせ法           | 31 |
| 3.3   | 傾斜軸探索                 | 35 |
| 3.4   | 自動視野追跡                | 37 |
| 3.4.1 | 基礎理論                  | 37 |
| 3.4.2 | 自動観察視野追跡処理手順          | 43 |
| 第 4 章 | シミュレーション              | 46 |

|       |                                   |    |
|-------|-----------------------------------|----|
| 4.1   | モデルとその傾斜シリーズ像.....                | 47 |
| 4.2   | 断層ボリューム相関法による各傾斜像の位置合わせ法の検証 ..... | 49 |
| 4.3   | 傾斜軸探索法の検証.....                    | 53 |
| 第5章   | 傾斜シリーズの位置合わせと傾斜軸探索の実験結果.....      | 55 |
| 5.1   | 生物系試料の実験結果.....                   | 55 |
| 5.1.1 | 切片試料作製 .....                      | 55 |
| 5.1.2 | 画像相関を用いた従来法による位置合わせ .....         | 56 |
| 5.1.3 | 傾斜軸探索 .....                       | 56 |
| 5.1.4 | 断層ボリューム相関法による各傾斜像の位置合わせ .....     | 59 |
| 5.1.5 | 処理時間 .....                        | 64 |
| 5.2.  | TiN-Ag 複合ナノ粒子の実験結果.....           | 66 |
| 5.2.1 | 試料について .....                      | 66 |
| 5.2.2 | 画像相関を用いた従来法による位置合わせ .....         | 66 |
| 5.2.3 | 各傾斜像の位置合わせ .....                  | 67 |
| 5.2.4 | 傾斜軸探索 .....                       | 67 |
| 第6章   | 自動視野追跡の実験結果.....                  | 71 |
| 6.1   | 切片試料作製.....                       | 71 |
| 6.2   | 使用した透過型電子顕微鏡.....                 | 71 |
| 6.3   | 自動視野追跡.....                       | 72 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 第7章 考察              | 78 |
| 7.1 傾斜像の位置合わせと傾斜軸探索 | 78 |
| 7.2 自動視野追跡          | 82 |
| 第8章 結論              | 91 |
| 謝辞                  | 94 |
| 参考文献                | 95 |
| 研究業績                | 99 |

# 第 1 章 序論

## 1.1 電子線トモグラフィの概要

コンピュータトモグラフィ (Computed Tomography: CT) とは物体を様々な角度に投影し、それらを逆投影して積算することで物体の 3 次元構造を再構成する技術である。この技術は 1917 年に Radon によって投影像から元の物体を再構成できることが理論的・数学的に示された [1]。そして 1963 年に Cormack によって X 線トモグラフィの原理が提案され、1972 年には Hounsfield によってこの原理に基づいた X 線トモグラフィが発明された [2,3]。これ以降医療の分野では X 線トモグラフィが実用化されていくのだが、一方では微細な構造物を 3 次元的に解析したいという需要もあった。

電子線トモグラフィは CT 技術を透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) に応用したもの (図 1.1 を参照) で、1966 年に生物学の分野で最初の論文が発表された [4]。電子顕微鏡学分野において、3 次元構造観察は長きにわたるテーマであり、多年にわたる手法開発が続いている。その中で電子線トモグラフィ法は、各種のデバイス、新素材、生体高分子などの内部構造をナノレベルで構造解析する手法として、最近特に注目されている解析法である。この手法では、透過型電子顕微鏡を使う。従来、この装置では 2 次元投影像しか得られなかったため直接の像観察としては最高の分解能を持ちながらも、奥行き分解能がない。故に、この電子線トモグラフィ法が真に完成すれば、その電子顕微鏡の構造解析能力が飛躍的に向上し、多くの応用に寄与すると考えられている [5]。

電子線 CT では試料の性質や分析の用途に応じて撮影に用いる方式や機器を使い分けている。それらは主に、TEM、走査透過型電子顕微鏡 (Scanning Transmission Electron Microscope: STEM)、及びクライオ電子顕微鏡である。TEM は主に散乱コントラストを利用し、試料の組成、密度、厚みに応じた投影像が得られる (所謂 mass-thickness)。これは主に生物切片や高分子材料の試料に用いられている。一方、金属、半導体などの材料系の試料は多くが結晶性である。結晶性の試料ではブラッグ反射の条件を満たした回折波によるコントラスト (回折コントラスト) の影響を受け、再構成された断層像にアーティファクトを生じてしまう。これを回避するため、STEM の高角度環状暗視野法 (High-Angle Annular Dark Field: HAADF) がよく用いられる。あるいは試料の組成情報の違いによるコントラスト (Z コントラスト) を得るためにもこれが用いられる [6]。また、近年研究が盛んな構造生物学において、生体高分子の応用には特殊な手法、それに適した装置が用いられる。TEM 内部は真空状態であるから生の生体高分子、すなわち、水分を含む試料を観察することはできない。また、TEM を用いて生物試料を観察するには、試料を乾燥させ、また散乱コントラストを得るためや電子線損傷を軽減するために染色、コーティング等の前処理を行わなくてはならない。このような事情から生物を生の状態で観察することは困難である。しかし、このような前処理をせず、水分を含んだ生の状態に近い状態で試料を観察する方法が近年開発され、トモグラフィも可能になった。これには、クライオ電子顕微鏡法と呼ばれる、非晶質の氷で包埋した生体試料を用いて行われる。これは低温または極低温 (例えば、液体ヘリウム仕様では  $-263^{\circ}\text{C}(= 10\text{K})$  まで、液体窒素仕様では  $-163^{\circ}\text{C}(= 110\text{K})$  程度までは冷却) のまま観察できる特殊な試料ホルダーを備えた TEM であり、急速凍結して氷包埋した試料をそのまま観察できる [7]。

このようなクライオ電子顕微鏡法では試料の染色を行わないため散乱コントラストが得られず、僅かな位相コントラストによって投影像を得るためコントラストが非常に低い。加えて電子線損傷が著しく、撮影を Low-dose で行うため S/N も非常に低くなる。

電子線 CT の撮影では、対象とする試料をその電子顕微鏡の中で連続傾斜し、傾斜ごとの画像を数十から百枚以上撮影してそれらから再構成処理を通し、3次元断層像を求めている。この電子線トモグラフィ法は、基本的には、X線 CT と同じ技術であるが、重要な違いも幾つか存在する。その一つは、試料傾斜の制限によるいわゆる“ミッシング・ウェッジ”の問題である。いま一つ重要な相違点として、投影像シリーズの位置合わせ、軸調整が挙げられる。これは、X線 CT では不要であるが、電子線 CT では分解能を決める非常に重要な要素技術である。位置合わせ、軸調整の必要性について 1.2 で述べる。図 1.2 は電子線トモグラフィの基本処理の手順である。





図 1.1. トモグラフィ機能のある透過型電子顕微鏡 (TEM) (日立ハイテクノロジーズ、HT7700)

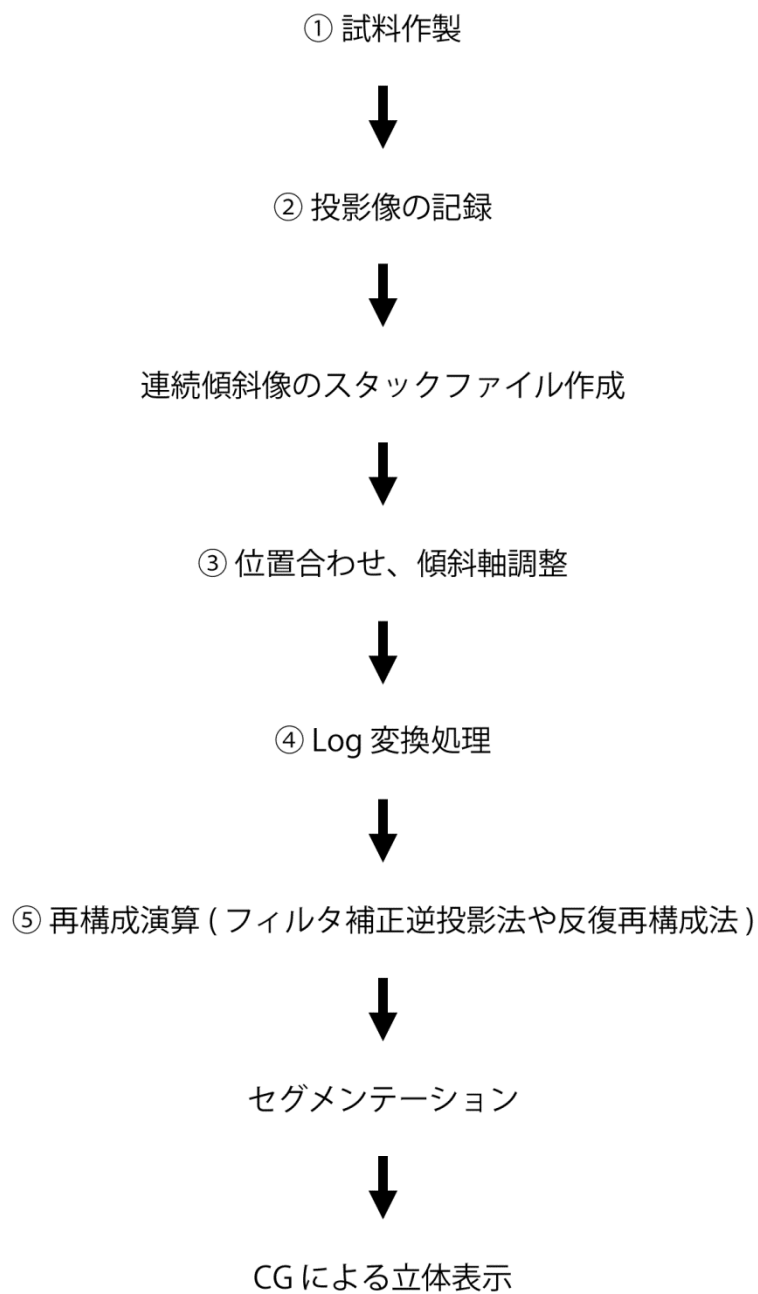


図 1.2. 電子線トモグラフィの基本処理手順

① **試料作成** : 試料としては、立体構造観察を目的とすることから、一般には厚い試料の作成が望まれる。実際には、使用する TEM の加速電圧に応じて、適切な厚さでなくては投影像が得られないため、例えば生物試料の場合、以下のように、加速電圧と観察可能な組織切片の厚みの関係が概ね与えられている [8]。すなわち、100kV で 150nm、300kV で 500nm、1MV で 2 $\mu$ m が上限の目安とされている。電子線トモグラフィが多用されている生物医学組織切片では、重元素による染色が行なわれ、厚い試料の場合、組織の内部まで均一に染色するように工夫されている。材料系試料では、有機高分子やいわゆるソフトマテリアルは、生物試料と同様であるが、金属や半導体などの試料作製では、出来るだけ、回折の影響を受けない様な材料の切り出し、方位決めが重要になる。なお、後で述べる位置合わせの方式によっては、金コロイド(金微粒子)等のマーカーを予め試料に添加することが行なわれている。

② **投影像の記録** : TEM の試料ホルダーを、対物レンズ内で、連続的にある刻み角度ごとに傾斜して(傾斜精度は約 0.1°)、その投影像を CCD あるいは CMOS カメラで記録する。試料ホルダーには、ユーセントリックゴニオメータと呼ばれるステージが使用され、一度メカニカルな調整がされれば、ある倍率制限下で、観察視野の中心で、位置ずれも高さも変わらずに傾斜させることを可能とする。カメラの画素数は、一般におよそ 4 メガピクセルから 16 メガピクセルである。全方位に試料を傾斜したいが、試料ホルダーとその付近の内部機構の関係から、角度範囲が制限され、通常約  $\pm 60^\circ$  から  $\pm 70^\circ$  である。一般には、 $1^\circ$  から  $3^\circ$  の刻みで、像枚数は約 40 枚から 140 枚となる。また、切片のような平板試料の場合、傾斜角度が大きくなると、両端から対象外の視野が入り込むことや、像が急激に暗く

なることなどから、これによっても角度範囲が制限される。これが位置合わせに悪影響を及ぼしてしまう。試料傾斜に伴い、フォーカスが変動し、また、傾斜による視野逃げとは別に、観察中に像が移動する試料ドリフト現象が起きる。これらも位置合わせに悪影響を及ぼす。これらのために、各メーカーでは、独自のオートフォーカス機能やドリフト補正機構が用意されているが、実際には問題も多く信頼性は十分とはいえない。

- ③ **位置合わせ、軸調整**：一般に、上記の手順によって記録されたシリーズ像は、位置が不揃いで、傾斜軸も正確にはわからない。そこで、画像処理による正確な位置合わせと傾斜軸の探索が行われる。これらが不正確のままでは歪んだ再構成像を生成してしまい、分解能も劣化する。組織切片試料のように、構造が全体として均等に分布していて、わずかな刻みでその構造が傾斜され、画像が変化していく場合には、画像の相関処理による位置合わせ法が有効で、市販のソフトも利用されている。その概要は、いわば、2枚の画像の一方を並進移動しながらその都度両画像を重ね合わせて、最も一致するとき、つまり両画像間の相関係数が最大になる時を位置合わせされたとする手法である。一見最良の方法に思えるが、一般試料では、構造が全体として均等に分布していないこともあり、複雑な一般試料の立体構造を考えたとき、この単純な原理的相関マッチング法では実用化に供しないこともある。従って、かなり詳細で具体的な開発を行わないと十分な性能が得られない。しかし、この相関法の利点は、汎用性に優れているので多用されている。一方、次に述べる特徴点探索法（マーカー法）も利用されている。傾斜軸の探索や、傾斜による試料の高さ変化などから起きる倍率変化および撮影中に起きる試料の収縮などの補正にもこれが有効である。この方法は、予め金コロイ

ドのようなマーカーを試料に添加し、各傾斜像のそのマーカーの軌跡をもとに行う手法である。ただ、場合によっては、視野内に金コロイドが無い場合や、さらに、それが高コントラストであるために再構成像に余計な筋状の画像を生成しかねない問題もある [9]。金コロイドの基準画像 ( テンプレート ) を用意して、試料傾斜角  $0^\circ$  の画像上で、まず数点から数十点の候補を画像処理で選び出す。次に、シリーズ中で隣接する画像間でそれぞれの対応点を、局所画像相関や発展的に工夫を凝らした手法によって自動探索させ、位置合わせを行う [ 文献に関しては 1.3 を参照されたい ]。なお、この位置合わせ及び傾斜軸探索処理の自動化と高精度化について、本論文で研究成果を述べた。

- ④ **Log 変換処理** : X 線 CT では再構成処理の前処理として、X 線検出器データから投影データである生データへの変換をする Log 変換処理が必要である。TEM 像が X 線 CT と同様、試料内部のいわゆる “mass-thickness” による投影像を与える と解釈することが一般の試料で概ね成りたっている。このとき、X 線 CT の場合と同様な扱いで、試料内部の線量  $I(z)$  の  $z$  位置における減衰量が、以下の微分方程式に従うと、吸収係数  $f(z)$  の積分値 ( 線積分 ) は、試料を通過した線量  $I(z)$  の逆数の対数変換に対して、線形関係になる。(ここで、 $I_0$  は入射線量)

$$\frac{dI(z)}{dz} = -f(z) \cdot I(z), \quad \int_0^z f(z) dz = \log \left( \frac{I_0}{I(z)} \right) \quad (1.1)$$

この  $f(z)$  の線積分が投影データと呼ばれ、そのような変換された TEM 像強度と比例関係の投影データになる。このことが、トモグラフィが可能な根拠となっている [10]。従って、投影像が前提となり、直接 TEM 像をそのまま扱えないため、一旦こうした Log 変換を行う必要がある。

⑤ **再構成演算**：今までいくつかの処理を行ってきたシリーズ像を元に再構成処理を行っていく。当然ながら、再構成処理を行うシリーズ像は、位置合わせ、軸調整が補正されている。主に利用されている再構成処理は、フィルター補正逆投影法 (FBP) と反復再構成法 (IRT) である。フィルター補正逆投影法は、2次元フーリエ変換法と数学的に等価な解析的手法である。シリーズ像の各水平ラインの1次元投影分布全てをフーリエ変換して、それらを2次元フーリエ面で収集して、高周波フィルターをかけて逆変換することによって、再構成像が得られる。実用の各2次元断層像演算処理では、あるy座標のx方向の1次元投影分布全てに対してコンボリューション積分を行い、像の微細なコントラストの強調を行う。このコントラストが強調された、多くの回転角  $\phi$  からの1次元投影分布の処理結果を断層面で合計する。このような再構成演算法がフィルター補正逆投影法であり、FBP法と呼ばれている。なお、フィルター補正逆投影法は、現在のCTで最も一般的に用いられている方法である。また、最近のコンピュータ性能の向上に伴い、本研究では3次元断層像を直接演算する方式を採用している。これまで述べてきた再構成法は、十分な投影データがある場合には最適な方法であり、高速に結果が得られる利点を持つ。しかし、TEMによる試料回転では、回転角度に制限があるので、先ほどの方法で処理を行っても完全な再構成画像を得ることは出来ない。このため反復再構成法 (Simultaneous Iterative Reconstruction Technique: SIRT) も利用されている。再構成されるべき真の断層像  $f_y(x, z)$  の各座標の  $(x, z)$  密度値を未知数と考えれば、それらの多元連立方程式が立てられる。投影方向に含まれる各投影線上の画素の合計がその投影方向の真下に当たる1次元投影分布の密度値と等しい、という方程式である。この連立方程式は解析的に解くことが出来

ないので解法のために開発されてきた数値計算法がうまく利用されている。それは、初期値の設定から始まり、反復演算によって最終の収束解を求めていく方法で反復再構成法と呼ばれている。以上の二つが、おもに利用されている再構成処理である[5,11]。

## 1.2 位置合わせと傾斜軸探索・調整の必要性

X線CTでは、X線管が被験者の周囲を回転して投影データを取得する。これに対して電子線CTでは、透過電子顕微鏡(TEM)において投影データを取得しているため、試料を傾斜してデータ取得するしかない。また、実際に撮りたい試料の位置は、試料ステージと呼ばれる移動機構を使ってナノレベルに充分観察・調整したのちに決めなければならないため、それ相応の位置決めの自由度が必要であり、かつ、仮に完全に機械的調整機構が達成されたとしても試料ドリフトと呼ばれる現象のために電子透過像は撮影中にかなり移動してしまう。こういったことから、X線CTと異なり、全体の連続試料傾斜像を取得した後に必ず画像の位置合わせと傾斜軸の探索・調整が不可欠である[12]。機械的試料位置調整機構として、通常、ユーセントリックゴニオメータステージと呼ばれるものが使われており、その位置再現精度は、直接倍率でいえば10万倍程度といわれている。しかし、一般的装置による経験ではそれより低いと思われ、さらに、試料傾斜軸は一般には視野中心にはなく、外れた軸を中心に傾斜していると考えた方がよい。さらに、傾斜軸は一般に傾いていて、数度の狂いがあるのが通常である。位置合わせと傾斜軸調整は避けて通れない。加えて、上で述べた試料ドリフトの影響がある。自動傾斜撮影は、うまくいっても1時間程度から数時

間かかることが頻繁にあり、試料がそうした長時間の電子線照射のなかで移動する。この位置補正も加わる。

シリーズ像の位置が正確に合っているかどうかと傾斜軸の探索精度と調整は再構成の精度と解像度を決める重要な要因となる。いかに再構成計算の方法を改良しても、位置合わせと軸調の精度が不十分であれば全く意味がなくなってしまう。

### 1.3 新たに提案する位置合わせ法

上記のように電子線トモグラフィにおいて、投影像の位置合わせと傾斜軸探索は分解能を左右する非常に重要な処理である。金微粒子を使うマーカー法が広く普及している [13] が、特に材料系試料で、金微粒子を付着できない試料が少なからずあり、また、一般に金微粒子を完全自動で追跡することは非常に難しい。（但し、それを行える高度な手法も考案されている [14-16]。）もう一つ普及している投影像の画像相関法は完全自動が可能 [17,18] だが、厚い試料においては精度が悪化する問題点があり [18]、また、この手法では傾斜軸位置の探索が別に必要となる [19]。試料のローカルな特徴点を追跡する手法も提案されているが [20-22]、こちらは傾斜軸位置の探索が同時に行える利点を持つ。しかしその精度は追跡する特徴点の形状や傾斜シリーズを通しての特徴点の一致度に依存する。このように、いずれの方法も自動化に難点があり、これらに代わる新たな高精度自動位置合わせ処理手法が望まれている。

一方、上記のような前処理が必要なため、傾斜シリーズを取得してからトモグラフィを観察するまでに非常に手間と時間を要する。現行の TEM には傾斜した試料



の自動視野追跡機能が付属しているが、これは画像相関に基づく位置合わせ法を用いているため、やはり高傾斜角や厚い試料では精度が悪化する [18,23]。加えて、オートフォーカスも同様に失敗する場合があります、こちらの機能の改善策も望まれている。

我々は最近、投影像に代わり断層像ボリュームに基づく手法を考案した。その一つは、断層像ボリューム相関を用いて、撮影された傾斜シリーズ像に対して位置合わせと傾斜軸探索を行う手法である。もう一つは、逆投影線像ボリュームデータを用いた、傾斜シリーズ撮影中の自動視野追跡法である。

新たに考案した各投影像の位置合わせ法と傾斜軸探索法の概要は次のようである。位置合わせ法は、 $x, y$  の並進移動成分を変数として、これらを変えながらその都度断層ボリュームデータの画質を定量評価 [24] し、その評価値が最大となる位置を探索する手法である。傾斜軸探索法は、傾斜軸の位置と傾きを変数として断層ボリュームデータの画質を定量評価 [24] し、同様に最大値を探索する手法である。従来の手法と比較すると、計算量は膨大であるものの、最終的な再構成像が直接評価される点で我々の手法は信頼性と自動化に有利である。

定量評価法には、選択された傾斜像グループから成るそれぞれの断層ボリューム間の一致度を測定するため、投影像の位置合わせと傾斜軸探索でそれぞれ次のような 3 次元相互相関を用いる。各投影像の位置合わせの場合、位置合わせを行う一枚の投影像による断層ボリュームデータと、それを除く全投影像を再構成した断層ボリュームデータから、それら 2 つの相関係数を計算する [24]。この相関係数が最大となるときが位置合わせ結果となる。この処理を傾斜シリーズ中の全投影像に対して行う。更に全投影像の位置合わせを反復して行い、位置合わせ結果が収束するま

で繰り返す。傾斜軸探索の場合、傾斜シリーズを偏りのないよう二つのシリーズに分割し、それぞれを再構成した断層ボリュームデータから、それら二つの相関係数を計算する [24]。位置合わせと同様に、この相関係数が最大となるのが傾斜軸の探索結果となる。

これらの手法を、まず断層像モデルを用いたシミュレーションによって十分な精度を有することを確認した。その上で、生物切片試料(酵母細胞)に応用した。その結果、従来法の画像相関法では試料の厚みのために、特に高傾斜角において、位置ずれが起きていたものが完全に解消し、傾斜軸も正確に補正できた。それによって、断層像の解像度が大きく改善した。

次に、同じく新たに考案した自動視野追跡法の概要は次のようである。従来法では一般的に、傾斜角度が隣接する傾斜像(投影像)の相互相関関数(XCF)を計算し、XCFのピーク位置から追跡する手法が利用されてきた。これの欠点は先にも述べたように、試料が厚く、また傾斜角度が大きくなるに従い、画像パターンの変化に対応できず、視野追跡が困難となることである [18]。先に述べたローカルな特徴点追跡法 [20-22] やマーカー法 [14-16] の発展的な手法では、マーカーを追跡するだけでなく、次の傾斜でマーカーがどこに移動するかを予測して正確に追跡することができる。これらの手法はオンライン自動視野追跡に使用できるようになる可能性があるが、これらは画像解析的アルゴリズムによる手法のため、現在は傾斜シリーズ像を撮影した後の処理として主に用いられている。前項の新しい位置合わせ法 [24,25] は反復処理を必要とするため、この手法も撮影の後処理を目的としている。

そこで我々は、全く新たに、傾斜像の代わりに、所謂“逆投影線像”を用いる方法を検討した [26]。これは再構成の計算中に得られる、積算される前の各々の断層

像である。逆投影線像について検討した結果、傾斜シリーズ中の一对の隣接する逆投影線像から得られる相互相関の精度が、投影像(傾斜像)のそれと比較して非常に高いことが分かった。従って、これを利用して新しい自動視野追跡法を考案した。

本手法を TEM において実験したところ自動追跡が実証された。手法は容易であり、また、3-D FFT 及び IFFT を用いているため、高速処理が期待できる。

## 第 2 章 従来の位置合わせ法

本章では本論文で提案する手法との違いを示す目的で、これまでの位置合わせ法を概観し、あるいは、必要に応じて詳述する。それらは、マーカー法、特徴点追跡法、画像相関法(位相相関法含む)、common-line 法である。

### 2.1 マーカー法と特徴点追跡法

マーカー法は位置合わせの手法として 1980 年代 から 1990 年代の電子線 CT 開発当初から採用され、金微粒子のような微細なマーカーを意図的に試料表面に付着させ、その位置追跡から位置合わせを行う手法である [13,14,16,17]。1.1 で述べたように、この手法は連続傾斜像中で高コントラストなそれらマーカーの軌跡を追跡することで非常に高精度な位置合わせが可能である。加えて、傾斜軸の探索や、傾斜から起きる倍率変化および撮影中に起きる試料の収縮などの補正にも有効である。

しかし、観察視野内に手頃なマーカー数に調整し、かつ目的の構造物と重ならないように金微粒子を付着させることは容易でなく、断層像中に余計なストリーク状のコントラストを生成しかねない。従って、金微粒子マーカーに代わって、視野内から効果的な特徴点を選択して用いる、特徴点追跡法 [18,20,21] も考案された。

これらの手法では、手順としてまず金微粒子のマーカーの自動抽出、あるいは、エッジなどの特徴点の自動抽出処理を行う。前者のマーカーでは、ほぼ点状の黒点であるので、例えば良く調整されたガウス分布を濃度分布の数学モデルとして、こ

れを自動検出テンプレートとして用いる [16]。あるいは、後者のエッジ特徴点検出には、よく知られた Harris の特徴抽出演算子 [21] が利用される。

このようにして抽出されたマーカーや特徴点は、投影像シリーズの中を隣接順に次々追跡される。この追跡法にも巧妙な手法が用いられている。マーカーについては、自動抽出された幾つかのマーカーを一組として、試料傾斜における幾何学的傾斜回転の変換式を推測して、隣接する傾斜像におけるそれらの位置を憶測する [21]。また、特徴点についても同様な追跡処理が行われるが、更に次のような巧妙な方法が採られている。すなわち、単純なテンプレートマッチングではなく、ウェーブレット変換を用いて、多重解像度分解を行い、低解像度によるパターンマッチングから徐々に高解像度でのマッチングによって追跡精度を上げる、また、ステレオ視差計測で用いられる、3眼視のエピポーラ幾何拘束を巧みに取り入れてその追跡の確実性を向上させている [21]。

以上の追跡が正確に行われれば、それらのマーカーや特徴点は試料に付着したものであるため、すなわち、試料そのものの傾斜回転の幾何が正確に調べられたことになり、投影像の位置合わせはもとより、傾斜軸を正確に導出する、更には、倍率補正や試料の変形・歪み補正も可能とする。実に高精度な処理能力を持つ。ただ、特徴点の場合、その追跡精度には自ずと限界があることは容易に推測されるため、実際には多くの特徴点追跡を必要とする、このため、傾斜回転の幾何変換式の精度を向上させるのに、ベイズ推定法や最尤法などの統計処理が利用される [21]。

以下の連続傾斜像の例は、米国コロラド大学が公開しているウェブサイト (<http://bio3d.colorado.edu/imod/>) から取得した微小管の切片試料である。コロイダルゴ

ールド ( 液状 ) を切片に付着し、倍率 1000 倍から 10000 倍程度で撮影したものである。これをサンプルに、マーカー法を実施した際の処理過程の一部を示した。

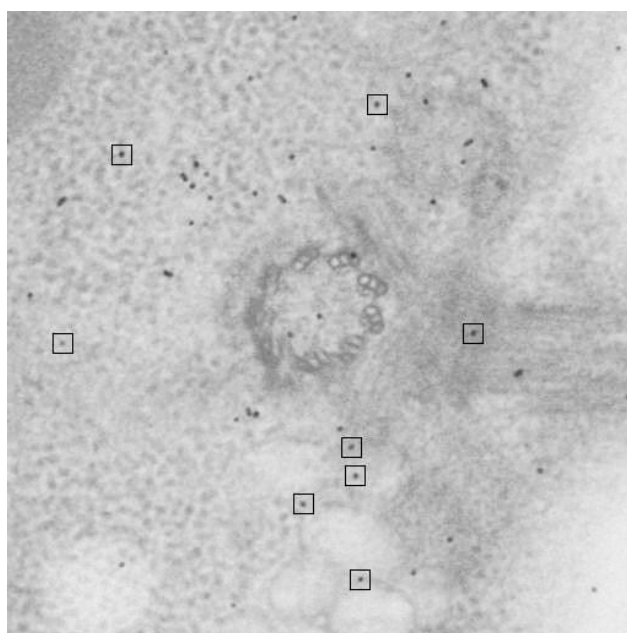


図 2.1. 金微粒子マーカーの例。矩形で示されたマーカーは追跡処理に用いられ、その追跡結果の 3 次元軌跡は次の図に示されている。

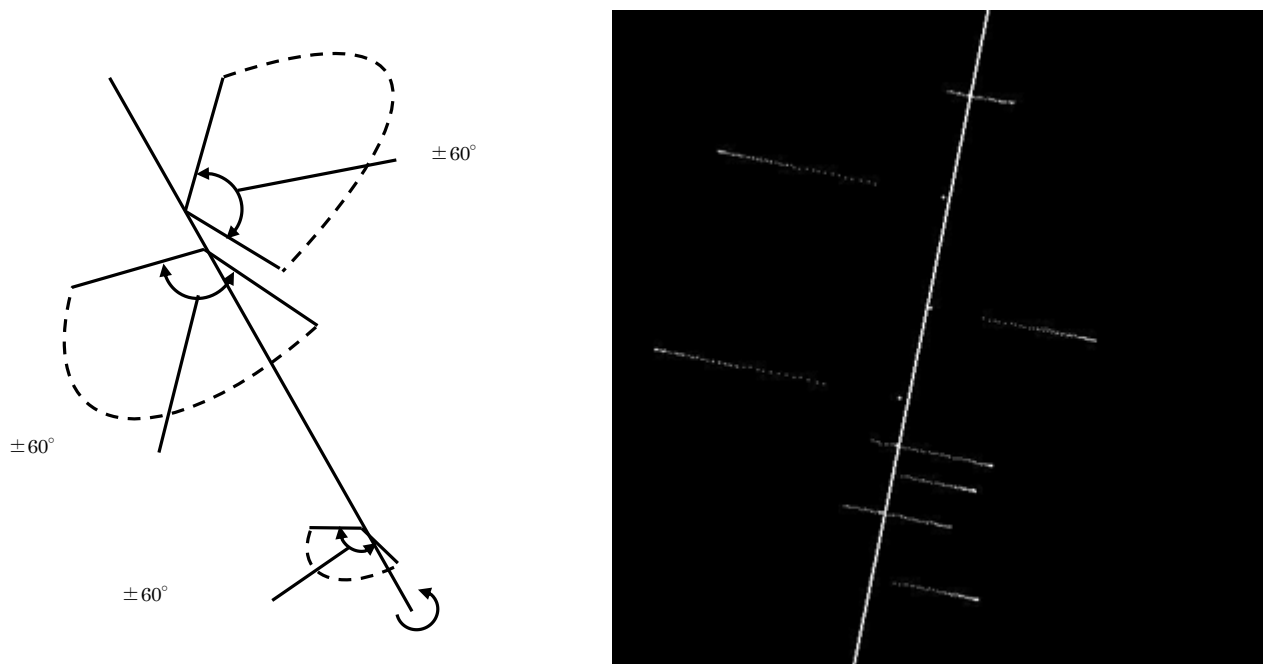


図 2.2. 金微粒子マーカー追跡の 3 次元的模式図 (左) と実際の追跡結果の投影図 (右) (右図中央の線は傾斜軸)。

## 2.2 画像相関法

前項で述べたようにマーカー法では応用も限られるため、こうしたマーカーを必要としない手法として、一般的な画像相関による位置合わせ法も検討されてきた。しかし数十枚から百数十枚以上にも及ぶ多数の画像の位置合わせは単純でなく、また、種々の試料が対象となることから、通常 of 画像相関法を単に適応するだけでは不十分である。

通常 of 相関法としては、最も一般的な方法をいえば、基準画像を  $0^\circ$  傾斜の像として、これに対して、まず隣接する傾斜角度 (例えば  $2^\circ$ ) の像を、画像相関処理によって位置合わせする。次に、その位置合わせされた像に対して、また次の隣接する傾

斜角度の像の位置合わせを行う。これをプラス方向で最後まで行い、次にまた  $0^\circ$  の基準に戻って、マイナス方向の隣接角度の画像シリーズに対して、画像相関の位置合わせを行っていく [5]。こうした手法の最初の応用は、1980 年代の Frank ら [17] によってはじめられた。この方法は、一見改善の余地のない適切な処理系のように見られるが、正確に言えば、実験像には傾斜に伴い視野外の像が入り込み、傾斜角によっては隣接する傾斜像であってももはや同じ画像とはいえず、画像相関自体に問題も出てくる。また、位置合わせの精度を考えると、仮に 1 画素の位置不一致が起こっても、その画像枚数の多さから誤差が累積し、簡単に数十画素の位置ずれが容易に発生する。従って、その隣接画像との位置合わせ精度は、1 画素でも大きいと考えても言い過ぎではなく、非常に精度が要求される問題である。

ここで、フーリエ変換を用いた相互相関法について、その処理方法を述べる。隣接する傾斜角度の画像間をそれぞれ  $I_1$ 、 $I_2$  と置く。一方を基準画像とし、他方を補正対象画像とする。両画像をフーリエ変換し、位置合わせの補正対象画像の結果を共役にする。それぞれの結果を乗算し、逆フーリエ変換を行う。その結果得られる画像は 2 枚の画像における相互相関関数の分布図になっており、画像の中心と相関値が最大となる点の座標のずれを計測することにより、並進移動に関する補正量が得られる。これが位置合わせとなる。

以上の処理を、連続傾斜像を通して順次行い、隣り合う全ての画像間の補正量を求める。ここで、傾斜角度  $0^\circ$  の画像を基準とし、全ての画像間の補正量を算出する。その後、求めた補正量に従い実際の位置合わせ処理を実行する [27,28]。図 2.3 に相互相関法に関する処理手順を示す。また、図 2.4 に 2 枚の画像における相互相関法の視覚的処理の手順を示す。



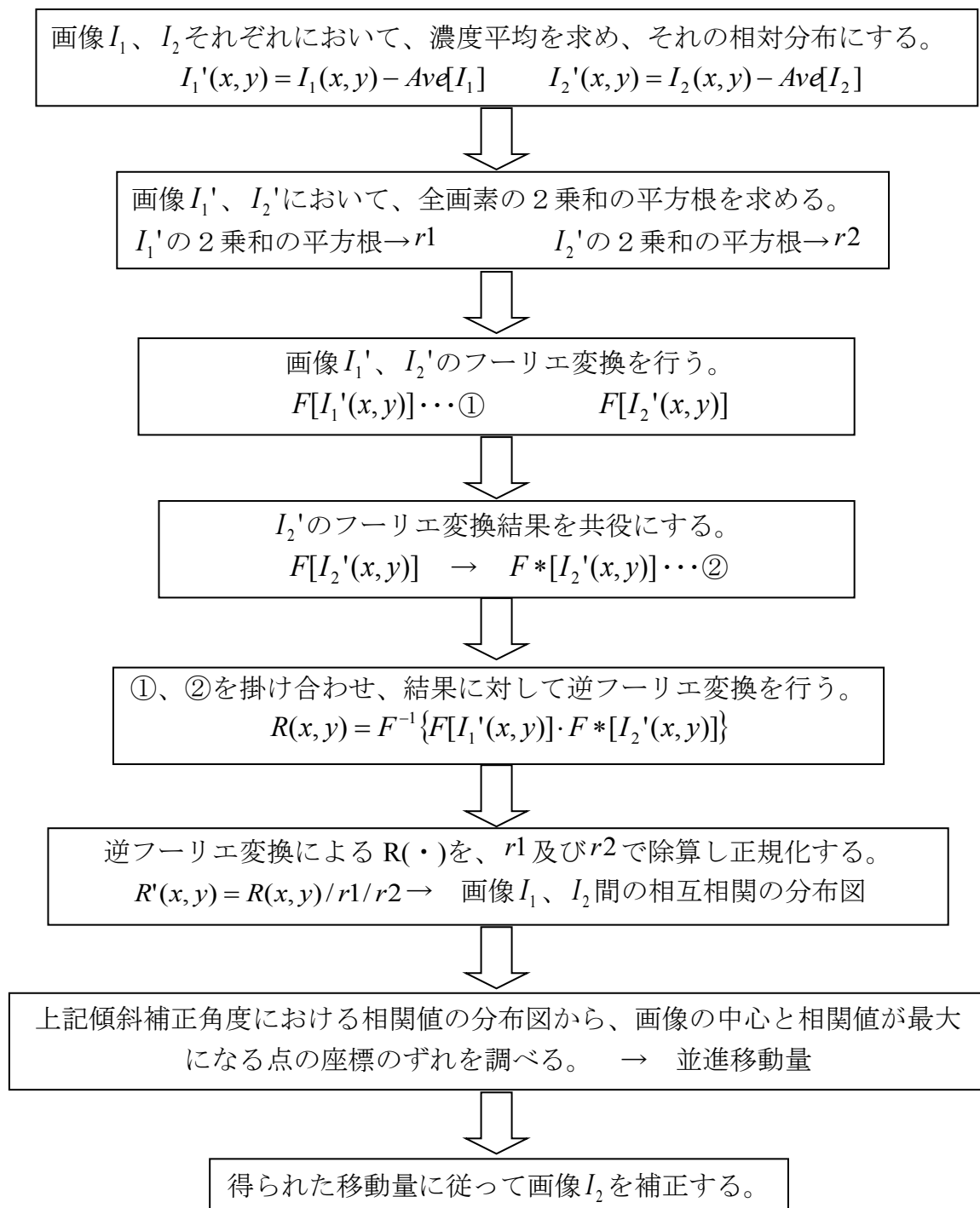


図 2.3. 相互相関法による位置補正処理

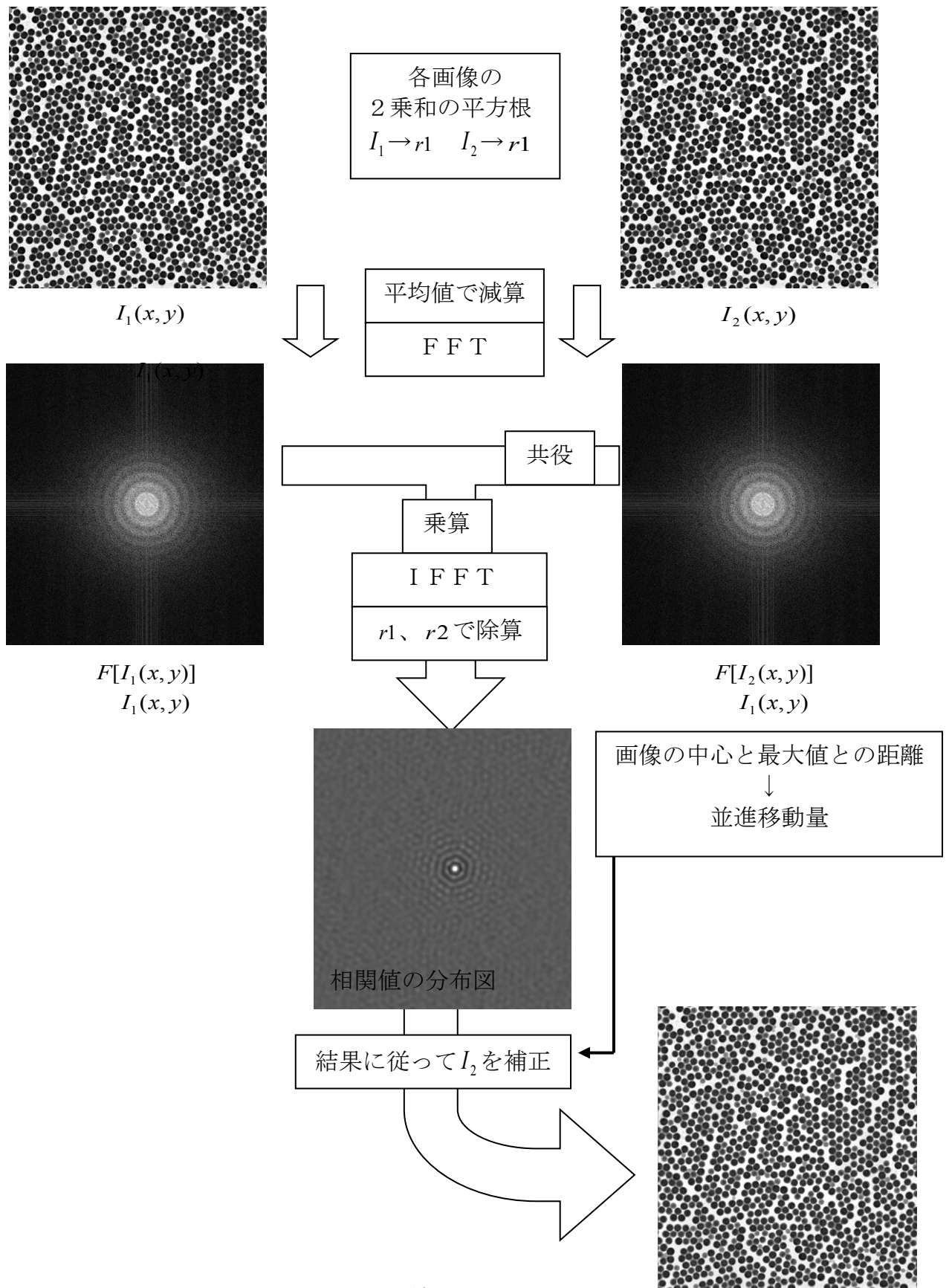


図 2.4. 2 枚の画像における相互相関位置補正の処理手順

### 2.3 cos-stretch 法

生物切片のような平板状試料に限定されるが、相互相関による位置合わせを改善するため、cos-stretch 法と呼ばれる次のような手法を用いる [17]。

電子顕微鏡で撮影する際、一般的な切片試料は、傾斜角度  $0^\circ$  の画像と  $\phi$  傾いた画像では  $\phi$  の画像の方が横方向に関しては視野が広がる、あるいは視野外の像が  $1/\cos \phi$  に比例して広く入り込んでくる (図 2.5 参照)。そこで  $\phi$  傾いた画像を  $0^\circ$  の画像範囲まで引き伸ばして、その後に相互相関を行い位置合わせする手法 (cos-stretch と呼ばれる) を行った。これはつまり傾斜角度  $\phi$  傾いた画像を  $1/\cos \phi$  倍してやれば良いことになる。これにより像の傾斜による見かけの伸びが解消され、画像間の相関演算が正確になり、精度の向上が期待できると考えられる。なお、位置補正後に引き伸ばした画像をすべて元通りに縮める処理 (cos-unstretch) が必要になる。

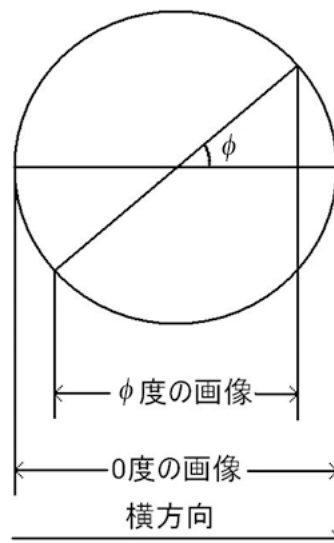


図 2.5. cos-stretch 法の説明図

## 2.4 位相限定相関法

また、位相限定相関法 (Phase-only Correlation Function: PCF) を利用した位置合わせ法もよく用いられる [29,30]。

いま、画像  $f(x, y)$  のフーリエ変換を  $F(u, v)$  としたとき、絶対値の分布を  $|F(u, v)|$ 、また、位相分布を  $\phi_F(u, v)$  として、 $F(u, v) = |F(u, v)|\exp[-j\phi_F(u, v)]$  と表せる。ここで、位相に関する項すなわち  $\exp[-j\phi_F(u, v)]$  のみを逆フーリエ変換した画像は、 $f(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{\exp[-j\phi_F(u, v)]\}$  となる。これは、振幅を 1 として、位相に関する項だけに限定した画像となる。位相限定相関関数は、相互相関の演算において  $R(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{\exp[j(\phi_{F_2}(u, v) - \phi_{F_1}(u, v))]\}$  として位相のみで逆変換することで求められる。

PCF はこの分野でよく知られた精度の高い位置合わせ法で、これまでに多くの実績を残している。ただ、ノイズに対する悪影響も指摘され、しばしばノイズが問題となる電子顕微鏡像への応用は、状況によって確実でないことも指摘されてきた。我々は、この基本的には高い精度をもつ位相限定相関法に適切な改良を加え、信頼性を向上させて利用している [31]。

## 2.5 common line を利用する方法

common line を利用する方法 (以下、単に common line 法と呼ぶ) は原理的にはもっとも理論にかなった方法で、原理的方法は、既に Frank らのグループによって提案されている [32]。単一軸傾斜によるトモグラフィでは、後述するように、各傾斜

像は同一の傾斜軸を像の何所かに必ず内在している。従って、これを探し出せば、そこに位置合わせすることで問題が解決する。原理上は、傾斜角が大きく離れた 2 枚の画像間でもこの理論は成り立つため、上記の相互相関における問題点は解決する。しかし、その手法が提案されて以降、トモグラフィに応用された例は、ほとんどない。理由は、応用できる試料が限られていること（単粒子のような試料であること）と、common line 法自体の精度の低さである。

一軸傾斜によるトモグラフィの場合、中央断面定理からすると、各方位に投影した像のフーリエ変換は、3次元逆空間において、1本の共通なライン (common line) を共有していなければならない (図 2.6 参照)。従って、この common line が各画像のフーリエ面で見つければ、正確な位置合わせができることになる。さらに、他の手法と比べて有利な点は、任意に離れた方位どうしの画像間でも位置合わせができる (原理上) ことである。他の全ての方法が、傾斜像シリーズにおいて、隣り合う画像間で個々に位置のずれを調べて位置合わせをする、いわゆる逐次方式であるので、この common line 法のいわば直接的位置合わせ法は魅力的である。各傾斜画像から common line を見つけるには、実際にはフーリエ変換を使う必要はなく、それに等価な sino-gram と呼ばれるある相関分布を求めることによって行われる。

具体的な処理方法について説明する。

- 1) common line を見つけるために、2枚の任意の投影像を選ぶ。
- 2) それらの濃度分布を、その 2次元平面上で、極座標  $(r, \phi)$  に座標変換し、 $\phi$  を変数として 1次元投影分布  $p_1(\phi)$  と  $p_2(\phi)$  をそれぞれ求める。
- 3) ここで、その投影分布に、新たに位置ずれ調整用の変数  $x'$  を加えて  $p_1(\phi, x')$  と  $p_2(\phi, x')$  とする。

- 4) そして、それらの 1 次元投影分布どうしが最も一致する  $p_1(\phi_1, x_1')$  と  $p_2(\phi_2, x_2')$  を、相互相関関数などを使って探す。
- 5) このときの変数  $\phi_1$  と  $\phi_2$  がそれぞれの投影像の common line を与え、 $x_1'$  と  $x_2'$  が、さらに common line に平行な方向の位置ずれ移動量を与える。[12,13]

以上の方法では、傾斜軸、すなわち common line に直交する方向の位置ずれの測定は直接できないが、これは何らかの別方法で行うことが充分可能である。結論として、原理上全ての傾斜シリーズ像が個々に独立して位置合わせ出来ることになる。しかし、上でも述べたように現状では 4) と 5) の精度が必ずしも高くなく改良の余地はあるものの common line 法だけで位置合わせを行うのは精度の点で不利である。

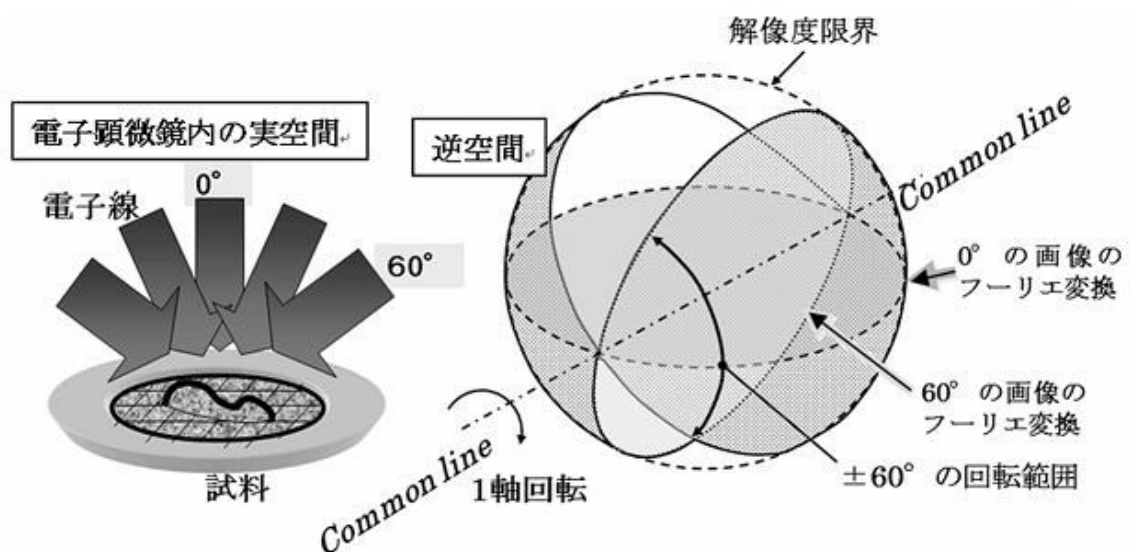


図 2.6. common line の説明図

## 第3章 新たに提案する位置合わせの手法

### 3.1 傾斜軸の位置ずれを考慮した3次元再構成

本稿で提案する手法は全て断層ボリュームデータの相互相関を用いているため、まずは断層ボリュームデータの再構成について述べる。再構成においては信頼性と計算時間短縮の為に Filtered Back Projection (FBP) 法を用いる。他の手法に Algebraic Reconstruction Technique (ART) 法と Simultaneous Iterative Reconstruction Technique (SIRT) 法があるが、計算量が膨大であるため、今回は用いない。FBP では従来法 [28] の通り、投影像  $f_n(x, y)$  は次式の重み関数  $h(r)$  によってフィルタリングされる。

$$\begin{aligned} g_n(x, y) &= \mathcal{F}^{-1}[F_n(u, v)h(r)], \\ F_n(u, v) &= \mathcal{F}[f_n(x, y)] \\ \begin{cases} h(r) = r & (r < r_c) \\ h(r) = r_c \exp\left(-\frac{(r_c - r)^2}{2r_s^2}\right) & (r_c \leq r) \end{cases} \\ r &= |(u - u_0) \cos(\theta) + (v - v_0) \sin(\theta)| \end{aligned} \quad (3.1)$$

但し、 $g_n(x, y)$  はフィルタリングされた画像で、 $\mathcal{F}$  と  $\mathcal{F}^{-1}$  はフーリエ変換と逆フーリエ変換をそれぞれ表し、周波数平面の座標は  $(u_0, v_0)$  を原点として  $(u, v)$  で表される。 $n$  は試料の傾斜順を表し、 $r$  は common line からの距離を表す。 $r_s$  と  $r_c$  はフィルタ関数の高周波領域をなだらかに減衰させるためのパラメータである (詳細は [22] を参照)。 $\theta$  は位置ずれした傾斜軸の回転角度 (図 3.2 を参照) であり、周波数空間上の理想的な傾斜軸位置は  $v$  軸に一致 ( $\theta = 0^\circ$ ) するものとする。

ここで、 $g_n(x, y)$  を逆投影して断層ボリュームデータ  $I(X, Y, Z)$  とする。本手法では容易さと効率性を重視し、ボリューム再構成演算を用いる。理想的な傾斜軸位置を  $Y$  軸として、そこから位置ずれした傾斜軸の周りに試料が傾斜することを考慮すると、試料上のある 3 次元座標  $(X, Y, Z)$  (断層ボリュームデータ上の座標と同一) から傾斜した 3 次元座標  $(x, y, z)$  への座標変換は次式で表される。

$$\begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} l_x^2 + (1 + l_z^2) \cos \phi_n & l_x l_y (1 - \cos \phi_n) + l_z \sin \phi_n & l_x l_z (1 - \cos \phi_n) - l_y \sin \phi_n \\ l_x l_y (1 - \cos \phi_n) - l_z \sin \phi_n & l_y^2 + (1 + l_x^2) \cos \phi_n & l_y l_z (1 - \cos \phi_n) + l_x \sin \phi_n \\ l_x l_z (1 - \cos \phi_n) + l_y \sin \phi_n & l_y l_z (1 - \cos \phi_n) - l_x \sin \phi_n & l_z^2 + (1 + l_y^2) \cos \phi_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} \quad (3.2)$$

但し、 $\phi_n$  は傾斜順を  $n$  とした傾斜角度を表し、 $(l_x, l_y, l_z)$  は傾斜軸の単位ベクトル (方向余弦) である。上式は任意の軸の回りで 3 次元回転変換を行う線形代数を用いて導出される [e.g. 33]。本手法では傾斜軸は  $Z = 0$  の  $X$ - $Y$  平面上にあり、 $Y$  軸から  $\theta$  だけずれた位置にあると仮定する。このとき、 $(l_x, l_y, l_z) = (\cos \theta, \sin \theta, 0)$  であるから (3.2) 式は以下のように書ける。

$$\begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (\sin \theta)^2 + (\cos \theta)^2 \cos \phi_n & \sin \theta \cos \theta (1 - \cos \phi_n) & -\cos \theta \sin \phi_n \\ \sin \theta \cos \theta (1 - \cos \phi_n) & (\cos \theta)^2 + (\sin \theta)^2 \cos \phi_n & \sin \theta \sin \phi_n \\ \cos \theta \sin \phi_n & -\sin \theta \sin \phi_n & \cos \phi_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} \quad (3.3)$$

ここで、投影面は  $(x, y)$  平面で与えられるから、再構成された断層ボリュームデータ  $I(X, Y, Z)$  とフィルタリングされた投影像  $g_n(x, y)$  の関係は定式化できる。実験では標準的な単軸トモグラフィとしてサイドエントリー式のゴニオメーターステージ



を用いた。その機構から、この試料ステージは  $X$ - $Y$  平面上に傾斜軸が存在すると考えて問題ない [34]。そのため、傾斜軸方向の  $Z$  成分はここでは考慮しない。

従って、傾斜軸の原点 ( $X_0$ ) からの位置ずれ  $X_s$  と投影像の位置ずれ ( $x_{sn}, y_{sn}$ ) を考慮し、最終的に  $g_n(x, y)$  の断層ボリュームデータ  $I(X, Y, Z)$  への逆投影は次式のように表せる。

$$\begin{bmatrix} x - (x_0 + x_{sn}) \\ y - (y_0 + y_{sn}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (\sin \theta)^2 + (\cos \theta)^2 \cos \phi_n & \sin \theta \cos \theta (1 - \cos \phi_n) & -\cos \theta \sin \phi_n \\ \sin \theta \cos \theta (1 - \cos \phi_n) & (\cos \theta)^2 + (\sin \theta)^2 \cos \phi_n & \sin \theta \sin \phi_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X - (X_0 + X_s) \\ Y - Y_0 \\ Z - Z_0 \end{bmatrix} \quad (3.4)$$

但し、 $(x_0, y_0)$  と  $(X_0, Y_0, Z_0)$  は投影像と断層ボリュームデータ  $I(X, Y, Z)$  それぞれの原点を表し、それらは互いに一致する。 $I(X, Y, Z)$  は (3.4) 式を用いて、フィルタリングされた各投影像  $g_n(x, y)$  の逆投影の総和によって再構成される。なお、本論においては、個々の投影像の回転ずれは考慮していない。(本質的には考慮しなければならないが、本論では議論を簡単にするために無視している。)

### 3.2 各投影像の位置合わせ法

各投影像の位置が完全に合っているとき、3次元空間で全ての逆投影線像の総和をとると3次的に完全に一致した位置にのみ構造物が再構成されるはずである。本手法はこの原理に基づいている。ここで、再構成された断層ボリュームデータを二つに分割することを考える。一方は位置合わせを行う投影像を傾斜シリーズの中から任意に1枚選択して逆投影し、もう一方はその他の全投影像から再構成する。

それら 2 つの断層ボリュームデータを用いて、位置合わせをに必要な投影像の最適な移動ベクトル  $(x_{sn}, y_{sn})$  が得られる。

この位置合わせを行うための手法を図 3.1 に示す。まず、傾斜シリーズから位置合わせを行う投影像を選択し ( 図 3.1 の loop B )、FBP による逆投影を行う  $(I_1(X, Y, Z))$ 。一方、他の全投影像からも断層ボリュームデータを再構成する  $(I_2(X, Y, Z))$ 。 $I_1(X, Y, Z)$  を該当する投影像の傾斜平面上  $(x, y)$  で移動させ ( 図 3.1 の loop A )、2 つの断層ボリュームから正規化相互相関係数  $R_{NCC}$  を算出する。ここで  $R_{NCC}$  は次式で表される [35]。

$$R_{NCC} = \frac{\text{Cov}\{I_1(X, Y, Z), I_2(X, Y, Z)\}}{\sqrt{\text{Var}\{I_1(X, Y, Z)\}\text{Var}\{I_2(X, Y, Z)\}}} \quad (3.5)$$

但し、以下の式のように、 $\text{Cov}\{\}$  は共分散、 $\text{Var}\{\}$  は分散を表す。

$$\text{Cov}\{I_1(X, Y, Z), I_2(X, Y, Z)\} = \frac{1}{N_x N_y N_z} \sum_i^{N_x} \sum_j^{N_y} \sum_k^{N_z} \{I_1(X_i, Y_j, Z_k) - \bar{I}_1\} \{I_2(X_i, Y_j, Z_k) - \bar{I}_2\},$$

$$\text{Var}\{I_1(X, Y, Z)\} = \frac{1}{N_x N_y N_z} \sum_i^{N_x} \sum_j^{N_y} \sum_k^{N_z} \{I_1(X_i, Y_j, Z_k) - \bar{I}_1\}^2,$$

$$\text{Var}\{I_2(X, Y, Z)\} = \frac{1}{N_x N_y N_z} \sum_i^{N_x} \sum_j^{N_y} \sum_k^{N_z} \{I_2(X_i, Y_j, Z_k) - \bar{I}_2\}^2,$$

$$\bar{I}_1 = \frac{1}{N_x N_y N_z} \sum_i^{N_x} \sum_j^{N_y} \sum_k^{N_z} I_1(X_i, Y_j, Z_k),$$

$$\bar{I}_2 = \frac{1}{N_x N_y N_z} \sum_i^{N_x} \sum_j^{N_y} \sum_k^{N_z} I_2(X_i, Y_j, Z_k),$$

但し、 $\bar{I}_1$  と  $\bar{I}_2$  は  $I_1 O$  と  $I_2 O$  の平均値を表し、 $N_x$ 、 $N_y$  及び  $N_z$  はそれぞれ  $x$  軸方向、 $y$  軸方向、 $z$  軸方向のボクセル数を表す。

$R_{NCC}$  が最大となったとき、(3.4) 式における最適な移動ベクトル  $(x_{sn}, y_{sn})$  が得られる。相互相関演算は、効率と処理時間短縮の為、構造物が比較的集中している領域に演算範囲を制限して行う。しかし、制限範囲はボリューム上でバランスよく設定する方が望ましい。一般に、非常に狭い領域を設定した場合、全視野の断層像の画

質が保証されない。(しかし実際の実験では(図 4.3)、構造物が一部に集中していたため演算範囲もその一部に限定した。)次に、異なる投影像を選択し、同様に相関演算を行い最適な移動ベクトルを得る(図 3.1 の loop B)。全投影像について同様の相関演算を行った後に、実際の傾斜シリーズ像の位置合わせ移動を行う。位置合わせ結果を評価するため、傾斜シリーズ像を偶数番号と奇数番号の 2 組に分割し、それぞれ再構成した断層ボリュームデータから相互相関係数  $R_{NCC}$  を演算する。この演算は次項で述べる傾斜軸探索法と同様の演算である。この  $R_{NCC}$  の項を用いて、位置合わせ結果が収束しているかを判断し、上記の位置合わせを反復して行い、投影像を最適な位置に移動させる。

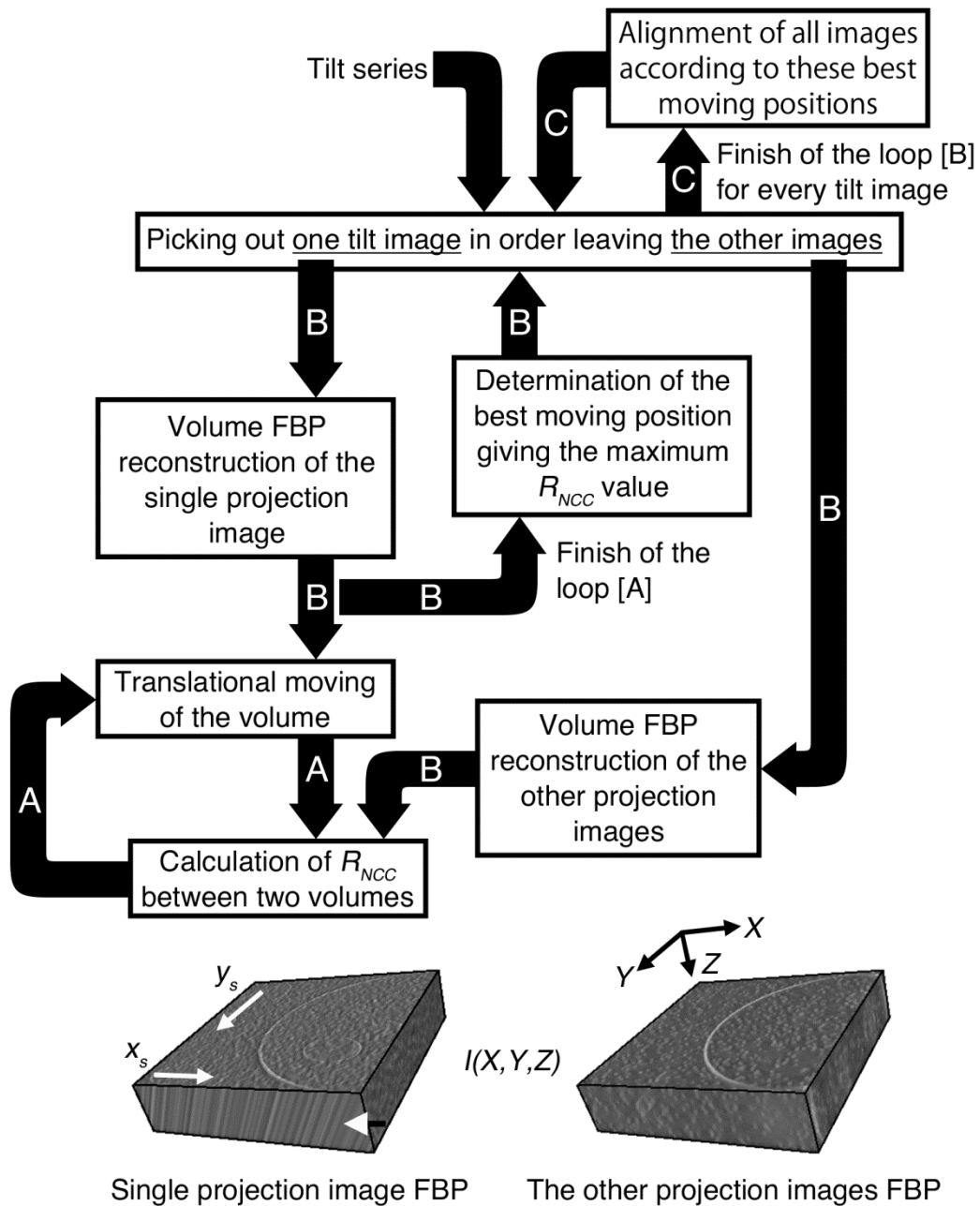


図 3.1. 傾斜シリーズの位置合わせ法のプロセスチャート。FBP による 2 つの断層ボリュームデータ (位置合わせを行う 1 枚の投影像を逆投影した断層ボリュームデータと、その他の全投影像から再構成した断層ボリュームデータ) から 3 次元相互相関によって位置合わせを行う。

### 3.3 傾斜軸探索

トモグラフィの再構成においては、全ての投影像が正しい唯一の傾斜軸上で逆投影されなければならない。傾斜軸が正しい位置でなかった場合、逆投影線の強度分布が構造物の正しい位置に集中せず、アーク状の偽像が生じる。そのため、集中の度合いを測定できれば傾斜軸が正しい位置にあるかを計測できる。

その計測法として、次のような手法を考案した ( 図 3.2 ) 。 (a): 傾斜シリーズを偶数番号と奇数番号の 2 組に分割する。それぞれの組で断層ボリュームデータを再構成し、それらを  $I_1(X,Y,Z)$  と  $I_2(X,Y,Z)$  とする。 (b):  $I_1(X,Y,Z)$  と  $I_2(X,Y,Z)$  から、(3.5) 式に従って相互相関係数  $R_{NCC}$  を演算する。投影像の位置合わせと同様、相互相関演算は効率と処理時間短縮の為適当な領域内に制限され、また、この演算は実空間上で行われる。 (c): (a) と (b) の処理を、 $X_s$  と  $\theta$  を変化させながら反復し ((3.3) と (3.4) 式を参照 ) 、変域内での傾斜軸位置を決定する。最終的に、 $R_{NCC}$  が最大となったときの  $X_s$  と  $\theta$  が正しい傾斜軸位置となる。計算時間を減らすため、 $\theta$  が推定できるのであればその周囲で探索 ( 手順 (c) ) を行うことが望ましい。または、 $X_s$  と  $\theta$  の探索は最初に大きめの間隔で行い、その後小さな間隔で行えば時間短縮につながる。

一般に、結果が不十分であれば投影像の位置合わせと傾斜軸探索は反復して行われる。

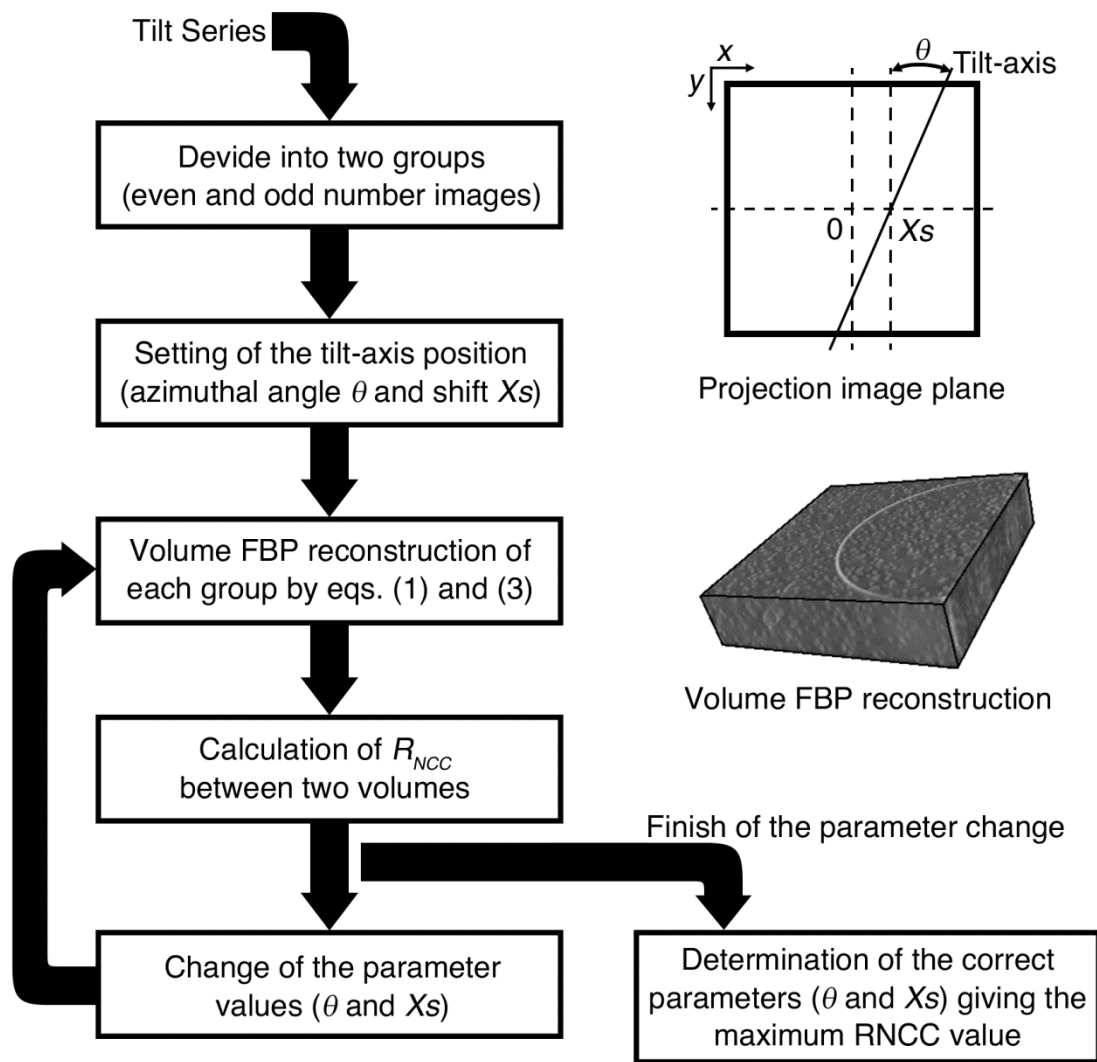


図 3.2. 傾斜軸探索法のプロセスチャート。2 組に分けた 傾斜シリーズ ( 偶数番号と奇数番号 ) から FBP を用いて断層ボリュームデータを再構成し、3 次元相互相関によって傾斜軸探索を行う。

## 3.4 自動視野追跡

### 3.4.1 基礎理論

FBP による 3 次元再構成は、個々の投影像 ( 傾斜像 ) を逆投影して得られる逆投影線像ボリュームの総和によって求められる [32] 。議論を簡単にするため、傾斜軸は  $y$  軸と一致することとすると、再構成される対象物体の断層ボリュームデータ  $O(X, Y, Z)$  は、各投影像の逆投影線像ボリュームデータ  $B_n(X, Y, Z; \phi_n)$  の積算の形で定式化され、(3.1) 式でも使用された  $g_n(x, y; \phi_n)$  を用いて次式で表される。

$$O(X, Y, Z) = \lim_{n \rightarrow \infty} \sum_n B_n(X, Y, Z; \phi_n),$$
$$B_n(X, Y, Z; \phi_n) = g_n(x, y; \phi_n) \begin{cases} x = \cos \phi_n \cdot X - \sin \phi_n \cdot Z \\ y = Y \end{cases}, \quad (3.6)$$

但し  $(X, Y, Z)$  はボリューム内の 3 次元座標、 $\phi_n$  は  $n$  を傾斜順序とした試料の傾斜角度、 $(x, y)$  は傾斜像の座標である。一般的に、傾斜角度は  $\phi_{n+1} = \phi_n + \Delta\phi$  の一定の刻み角で増加する。

図 3.3 はある 2 次元断層モデルを異なる傾斜角度刻み  $\Delta\phi$  で投影し、FBP によって再構成した図である。(a) は 2 次元の断層モデル、(b) は  $\Delta\phi = 20^\circ$ 、(c) は  $\Delta\phi = 2^\circ$  である。この図では通常の TEM トモグラフィと同様に傾斜角度を  $\pm 60^\circ$  に制限している。(b) は  $\Delta\phi$  が大きく、個々の逆投影線像が顕著に見られる。ここで、任意に選択した 2 枚の逆投影線像とその相互相関係数  $R_{NCC}$  を考える。図 3.4(a) と (b) は図 3.3(a) に示したモデルの、逆投影線像のペアである。2 つの傾斜角度は  $20^\circ$  と  $25^\circ$  とし、図 3.4(e) はこれらの相関分布である。位置追跡のための  $x$  軸シフト量

$x_s$  の関数として相関分布を高速に求めるため、以下のような方法を採用した。まず、相関係数  $R_{NCC}$  が次式で計算される。

$$R_{NCC}(x_s) = \frac{\int_{-T/2}^{T/2} \int_{-X_0}^{X_1} B_n(X, Z; \phi_n) \cdot B_{n+1}(X + x_s \cos \phi_{n+1}, Z + x_s \sin \phi_{n+1}; \phi_{n+1}) dXdZ}{\sqrt{\int_{-T/2}^{T/2} \int_{-X_0}^{X_1} B_n^2(X, Z; \phi_n) dXdZ} \sqrt{\int_{-T/2}^{T/2} \int_{-X_0}^{X_1} B_{n+1}^2(X + x_s \cos \phi_{n+1}, Z + x_s \sin \phi_{n+1}; \phi_{n+1}) dXdZ}} \quad (3.7)$$

但し、 $T$  は再構成の厚み ( $Z$  軸)、 $X_0$  と  $X_1$  は  $X$  軸の積分範囲である。図 3.4(e) では  $\phi_n = 20^\circ$ 、 $\phi_{n+1} = 25^\circ$  である。この計算式に基づき、 $R_{NCC}$  の  $(X, Z)$  2 次元分布を演算するが、演算には FFT を用いる。これにより高速化が図れるが積分範囲の  $T$  と  $(X_1 - X_0)$  の長さ (画素値) は 2 の累乗である必要がある。 $X$  と  $Z$  に関する  $R_{NCC}$  の 2 次元マップを得た後、 $x_s$  軸のラインプロファイルを抽出する。図 3.4(c) と (d) は  $B_{n+1}(X, Z; 25^\circ)$  を  $x_s$  軸上で移動させ、2 つの逆投影線像を重ね合わせた図である。(f) と (g) は同様に  $\phi_n = 20^\circ$ 、 $\phi_{n+1} = 21^\circ$  である。(h) はそれらの  $R_{NCC}$  プロファイルを示している。(e) と (h) を比較すると明らかに  $\Delta\phi$  が小さい方が鋭いピークが得られている。(i) と (j) は同様に  $\Delta\phi = 1^\circ$ 、 $T = 512$  で計算した  $R_{NCC}$  プロファイルを示している。従って  $\Delta\phi$  と  $T$  が適切な値に設定されていれば、逆投影線は同一の構造物から発せられる為、逆投影線相互相関は矛盾なく視野追跡できることが判明した。表 3.1 はこれらパラメータの関係と断層モデルの追跡誤差を表しており、上記の傾向を示している。



表 3.1 図 2.3(a) のモデルを用いて計算した  $R_{NCC}$  ピーク位置の誤差 (画素単位)。ピークのプロファイルが明確でなくなった時点で計算を終了した。

|                           |                    | $\Delta\phi$ [deg] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------------------|--------------------|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                           |                    | 1                  | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 | 24 | 26 | 28 | 30 |
| $\phi$ [deg], $T$ [pixel] | $\phi: 60, T: 128$ | 0                  | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | / | / | / | /  | /  | /  | /  | /  | /  | /  | /  | /  | /  | /  |
|                           | $\phi: 60, T: 64$  | 0                  | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0  | -2 | /  | /  | /  | /  | /  | /  | /  | /  | /  |
|                           | $\phi: 20, T: 128$ | 0                  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | -1 | 0  | 1  | 1  | -1 | 1  | 3  | /  | /  | /  | /  |
|                           | $\phi: 20, T: 64$  | 0                  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1  | 0  | 0  | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 |

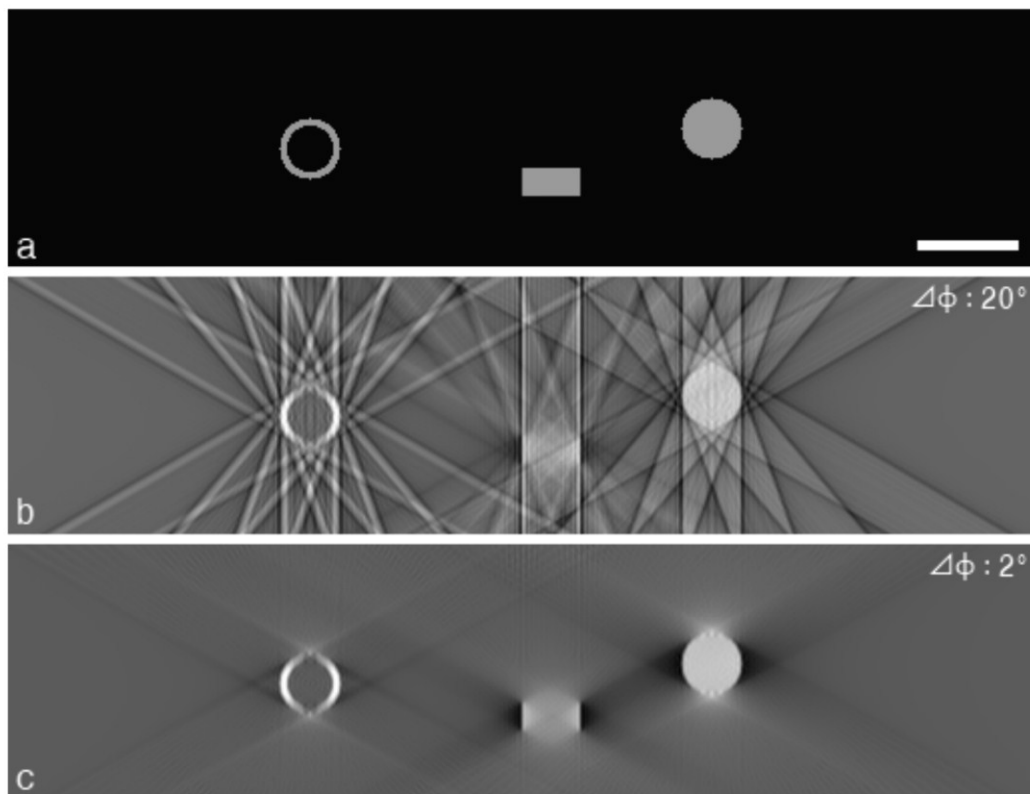


図 3.3. FBP による再構成の傾斜角度  $\Delta\phi$  による差異。(a): 断層モデル。スケールバー: 50 [pixel]。(b):  $\Delta\phi = 20^\circ$  の再構成。(c):  $\Delta\phi = 2^\circ$  の再構成。

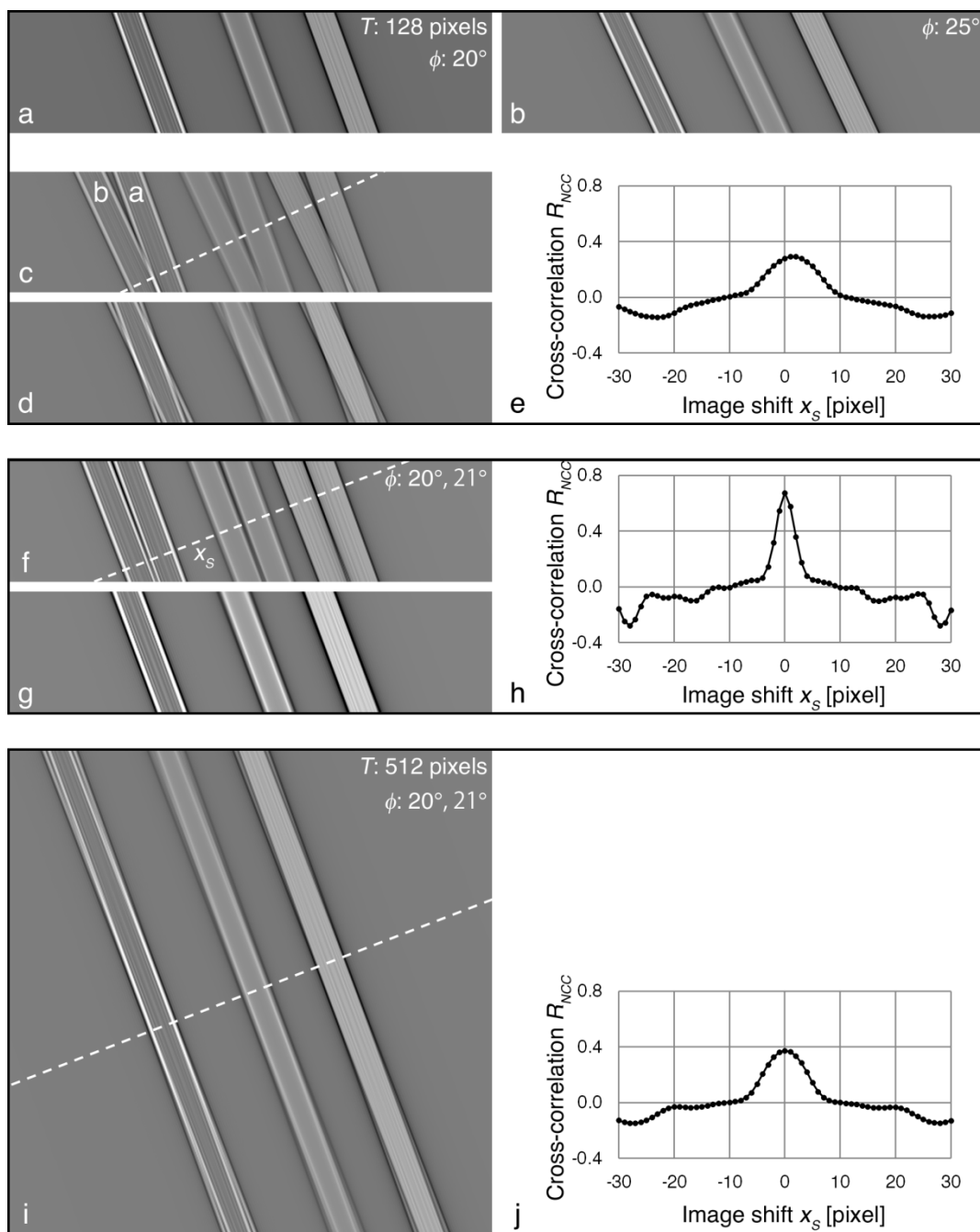


図 3.4.  $\Delta\phi$  と再構成の厚み  $T$  の違いによる相関ピークの鋭さの変化。(a): 断層モデルの  $\phi = 20^\circ$  の逆投影像。(b):  $\phi = 25^\circ$  の逆投影像。(c-e):  $\phi = 20^\circ$   $\Delta\phi = 5^\circ$ 、 $T = 128$  の結果。(f-h): 同様に  $\Delta\phi = 1^\circ$  の結果。(i,j): 同様に  $\Delta\phi = 1^\circ$ 、 $T = 512$  の結果。

理想的な  $R_{NCC}$  分布は積分範囲を構造物が存在する領域のみに制限することによって、次の (3.8) 式で与えられる。ここでは単純なモデルについて計算した結果を示すが、実際と異なるにせよ、どのような分布になるかを知っておくことには意味があるろう。

$$R_{NCC}(x_s) = \frac{\int_D B_n(X, Z; \phi_n) \cdot B_{n+1}(X + x_s \cos \phi_{n+1}, Z + x_s \sin \phi_{n+1}; \phi_{n+1}) ds}{\sqrt{\int_D B_n^2(X, Z; \phi_n) ds} \sqrt{\int_D B_{n+1}^2(X + x_s \cos \phi_{n+1}, Z + x_s \sin \phi_{n+1}; \phi_{n+1}) ds}} \quad (3.8)$$

ここで、 $D$  は積分領域、 $ds$  は微小領域である。図 3.5 は図 3.4(e) と (h) の場合に対する理想的なプロファイルを計算した結果である。図 3.5 は  $\Delta\phi = 5^\circ$  の場合であるが、積分領域が制限されている為  $\Delta\phi$  が大きくても非常に鋭いピークを形成している。図 3.5(c) と図 3.4(h) を比較すると  $\Delta\phi = 1^\circ$  の場合が理想的なプロファイルに近いことが分かる。しかし図 3.5(d) と図 3.4(e) を比較すると、可能な限り  $T$  を小さく選択すれば、 $\Delta\phi$  が十分小さくなくても、相互相関の精度は高くできることを示している。

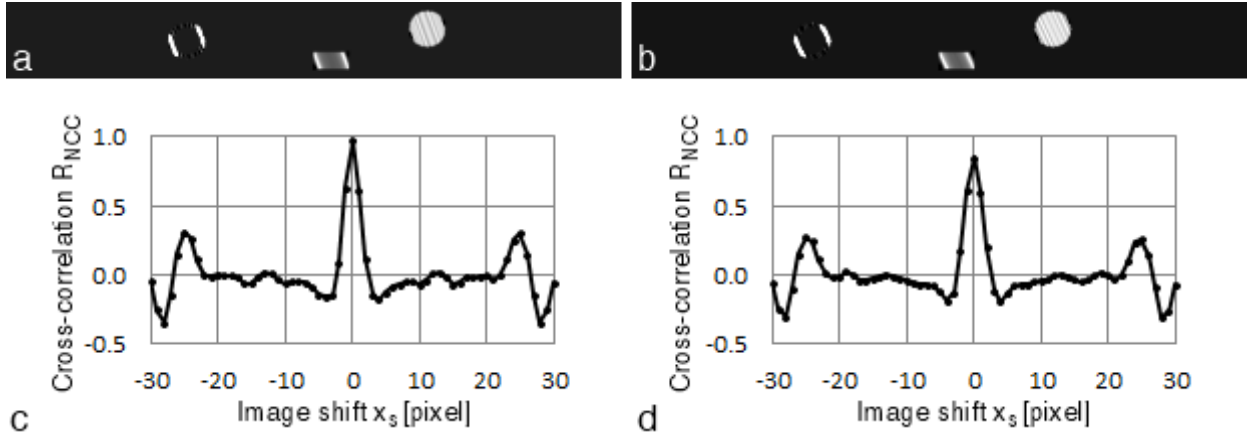


図 3.5. 構造物が存在する領域のみで相関演算を行った結果。(a): 断層モデル図 3.4(a) に対する  $\phi = 20^\circ$  の逆投影像。(b):  $\phi = 25^\circ$  の逆投影像について構造物が存在する領域のみに制限した結果。(c):  $\phi = 20^\circ$  と  $\phi = 21^\circ$  で、(d) は  $\phi = 20^\circ$  と、 $\phi = 25^\circ$  で計算した結果。

### 3.4.2 自動観察視野追跡処理手順

上記の理論検討の結果、逆投影線相互相関は変数  $T$  と  $\Delta\phi$  が適切に選択されることで高い精度と信頼性を持つことが判明した。それに基づき、オンライン再構成の新しい視野追跡法を提案する。処理手順を図 3.6 に示す。処理の主要部は、一組の逆投影線像  $[B_n(X, Y, Z; \phi_n), B_{n+1}(X, Y, Z; \phi_{n+1})]$  から算出される 3 次元相互相関  $R_{NCC}$  である。(3.6) 式をボリュームデータに対応して拡張すると次式となる。

$$R_{NCC}(x_s, y_s) = \frac{\int_{-T/2}^{T/2} \int_{-Y_0}^{Y_1} \int_{-X_0}^{X_1} B_n(X, Y, Z; \phi_n) \cdot B_{n+1}(X + x_s \cos \phi_{n+1}, Y, Z + x_s \sin \phi_{n+1}; \phi_{n+1}) dXdYdZ}{\sqrt{\int_{-T/2}^{T/2} \int_{-Y_0}^{Y_1} \int_{-X_0}^{X_1} B_n^2(X, Y, Z; \phi_n) dXdYdZ} \sqrt{\int_{-T/2}^{T/2} \int_{-Y_0}^{Y_1} \int_{-X_0}^{X_1} B_{n+1}^2(X + x_s \cos \phi_{n+1}, Y, Z + x_s \sin \phi_{n+1}; \phi_{n+1}) dXdYdZ}} \quad (3.9)$$

但し、 $(x_s, y_s)$  は傾斜像の移動ベクトルを表す変数である。拡張に伴い、計算速度向上の為にボリュームデータの 3-D FFT と 3-D IFFT を用いる。一度 3 次元相互相関  $R_{NCC}(X, Y, Z)$  を計算し、その中から  $(x_s, y_s)$  平面の分布を抽出することで  $R_{NCC}(x_s, y_s)$  を得る (図 3.7 参照)。

視野追跡は次のような手順で行う。必ずしも開始位置が  $0^\circ$  である必要はない。(a) オートフォーカスの後、最初の画像を撮影し逆投影線像  $B_1(X, Y, Z)$  を生成する。同時に、 $B_1(X, Y, Z)$  をトモグラフィの 3 次元空間  $I(X, Y, Z)$  に保存する。(b) 試料を傾斜し、オートフォーカスを行う。画像を撮影し、逆投影線像  $B_2(X, Y, Z)$  を生成する。(c)  $B_1(X, Y, Z)$  と  $B_2(X, Y, Z)$  から、3-D FFT と 3-D IFFT を用いて相互相関  $R_{NCC}(x_s, y_s)$  を算出する。(d) 外部 PC から制御しイメージシフト機能を用い、 $R_{NCC}$  のピーク位置が中央にくるように画像を移動させる。画像を撮影し、位置合わせされた逆投影線像  $B_2(X, Y, Z)$  を生成する。同時に、 $B_2(X, Y, Z)$  を  $I(X, Y, Z)$  に加える。(e)  $B_2(X, Y, Z)$  を  $B_1(X, Y, Z)$  に置き換え、(b) から (d) までの処理を最大傾斜角度まで行う。最終的に、追跡の終了と同時に再構成が完了する。

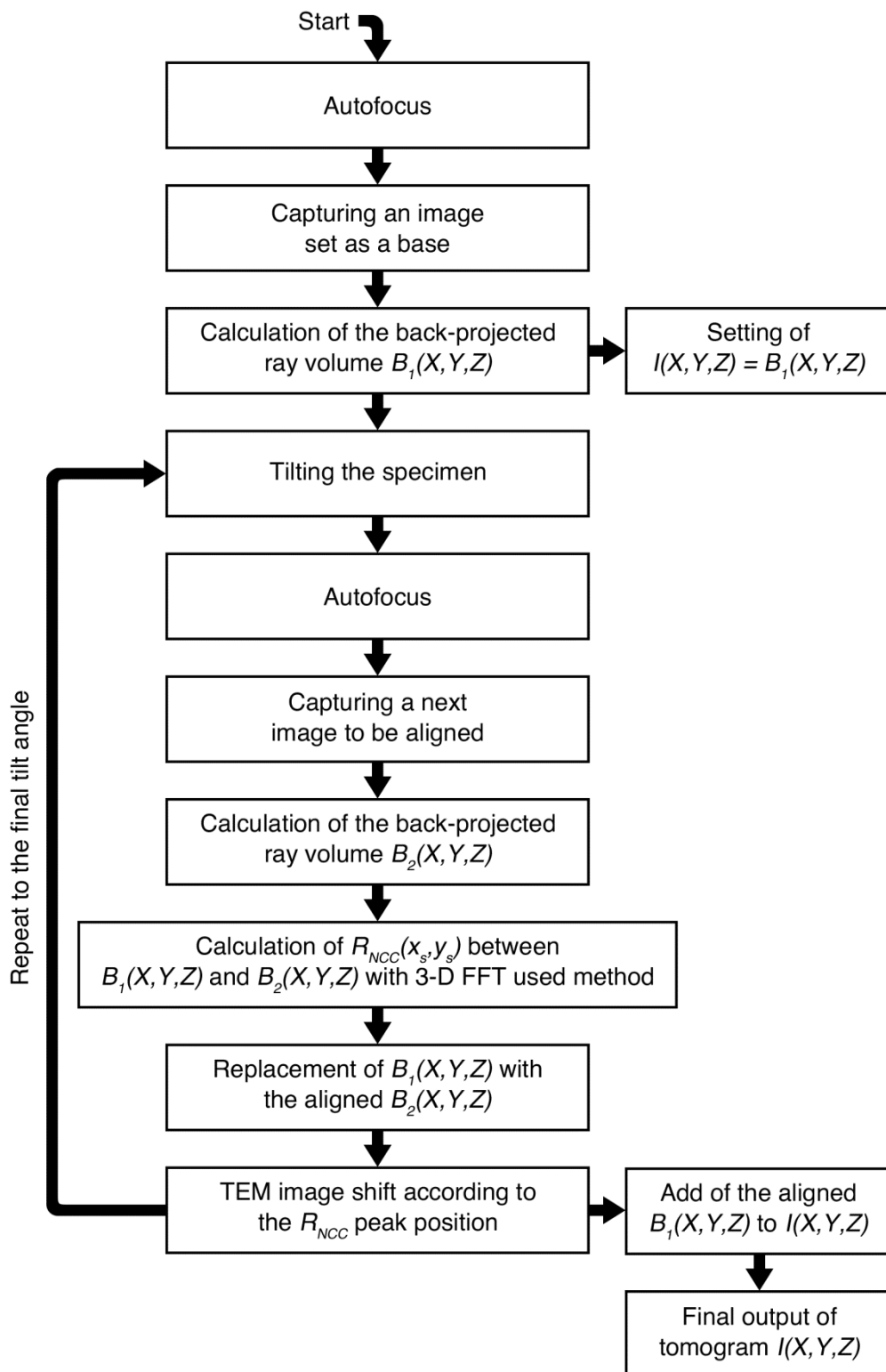


図 3.6. 自動視野追跡の処理手順。

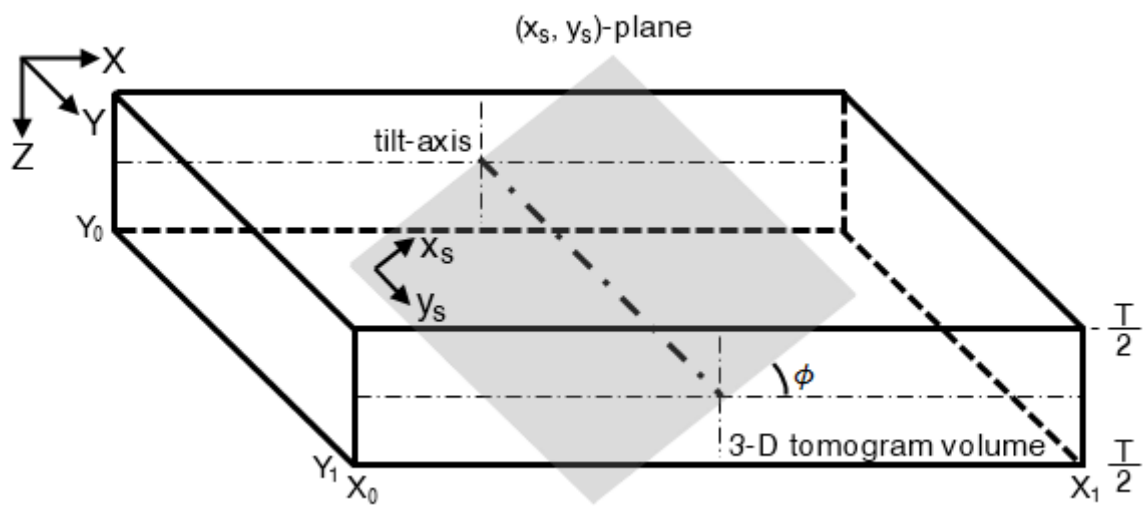


図 3.7. 投影方向に対して垂直な画像シフト平面  $(x_s, y_s)$  と 3 次元断層ボリュームの関係。



## 第4章 シミュレーション

### 4.1 モデルとその傾斜シリーズ像

本手法を検証するため、一般的な生物切片を模して作成したモデル画像を用いてシミュレーションを行った。図 4.1(a) と図 4.5(c) に示すように、構造物として単純な膜、微小管、楕円体状の構造、粒子を含んでいる。このモデルの投影像を 図 4.1(c) から (e) に示す。

続いて、シミュレーションに用いる傾斜シリーズ像 (512 × 512 画素) を作成した。まず、傾斜軸の位置を鉛直方向 ( $y$  軸) から  $0.5^\circ$  時計方向に回転させ、更に  $x$  軸方向に 10 画素ずらした。傾斜軸の回転角度は、実際的な観点からこのように小さく設定した。次に、位置ずれた傾斜軸でモデルを投影する際に、乱数を用いて投影像を並進移動させ位置を不揃いにした。本手法は粗く位置合わせされた傾斜シリーズに適していると考えた為、隣接する投影像の相対的な位置ずれは数ピクセル以下に設定した (図 4.3 の Initial error に示す)。実際、従来法の位置合わせ後に残った位置ずれは、これより少ないか、またはこれと同程度であると考えられる。傾斜シリーズ像のモデル動画を作製したが、その映像から、視覚的に位置ずれが起きていることを確認した。

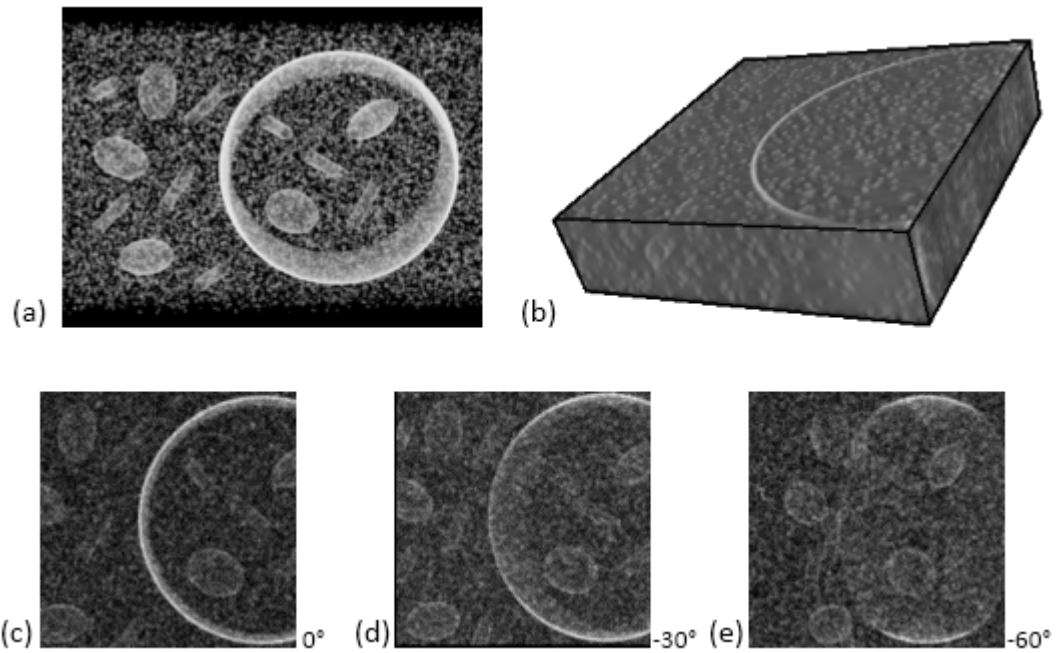


図 4.1. シミュレーションに用いたモデル。(a): 生物切片の構成要素を幾何学的な図形を用いて作成した CG。膜、微小管、楕円体状の構造、粒子を含む(図 4.5(a)も参照)。(b): モデルの 3 次元断層像; 傾斜角度を  $\pm 60^\circ$  傾斜刻み角を  $2^\circ$  として、位置ずれのない傾斜シリーズ像を FBP によって再構成した。(c)~(e) は投影像 ( $512 \times 512$  画素)。

## 4.2 断層ボリューム相関法による各傾斜像の位置合わせ法の検証

3.2 で述べた断層ボリューム相関法による各傾斜像の位置合わせの検証を行った (処理手順は図 3.1 を参照)。図 4.2(c) に示す通り、位置合わせの反復はおおよそ 10 回程度で収束し、最終的な位置合わせ誤差は僅かであった (図 4.3)。動画では位置合わせされた傾斜シリーズ像を作製したが、視覚的にも精度良く位置合わせされていることを確認した。位置合わせ処理によって生じた誤差 (位置ずれを加える前の、オリジナルの傾斜シリーズ像との差) を求め、 $x$  成分の標準偏差は 1.28 画素、 $y$  成分は 0 画素 (全投影像で同じ誤差) であり、また  $x$  成分の誤差の最大値は 2 画素であった。

本位置合わせ法においては、それぞれの投影像が個別に、他の投影像から再構成される断層ボリュームデータとのマッチングによって最適な位置へ移動する (図 3.1)。図 4.2(a) と (b) は傾斜角度が  $-2^\circ$  と  $-60^\circ$  の、反復初回のマッチング結果である。1 枚のみの逆投影像との比較であったため相互相関係数 ( $R_{NCC}$ ) が低い、ピークは非常に鋭く現れた。各投影像の位置合わせは反復して行われる (図 3.1 の loop C) ため、一般に、各投影像の最初の位置ずれがランダムに加えられる場合には、再構成に必要な傾斜軸位置が正しい位置でない為、最終的な位置合わせ後の傾斜シリーズは最初のものとは僅かに異なる基準点に収束している場合がある (この処理では、傾斜軸は  $y$  軸と一致するとして演算を行った)。最終的な位置合わせ結果は、オリジナルの基準点とは僅かに異なる位置 ( $x_0 = 0.8$  画素、 $y_0 = -1$  画素) に収束して位置合わせされた。この結果から、位置合わせ誤差は上の推定よりも小さく、傾

斜軸位置は違っていたが、傾斜シリーズはほぼ最良の位置合わせが行われたと考えられる。

この処理では、位置合わせが反復して行われるため、処理時間の観点から、サブピクセルの精度は今後の課題として考慮せず、計算上の刻み精度は 1 画素で行った。

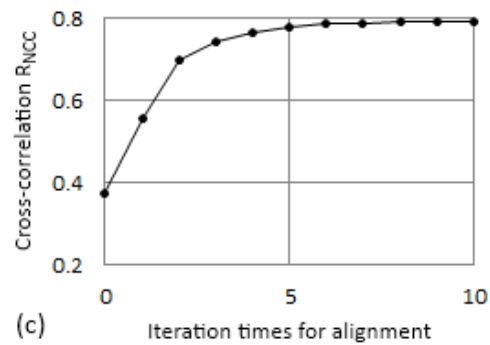
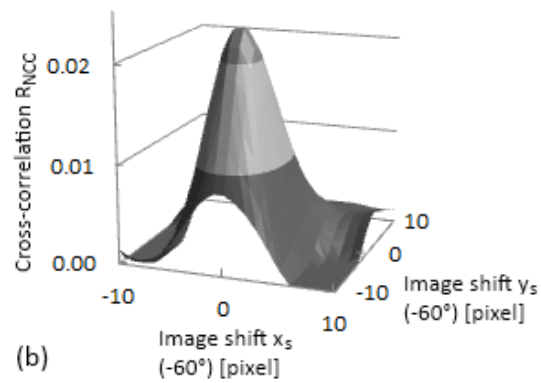
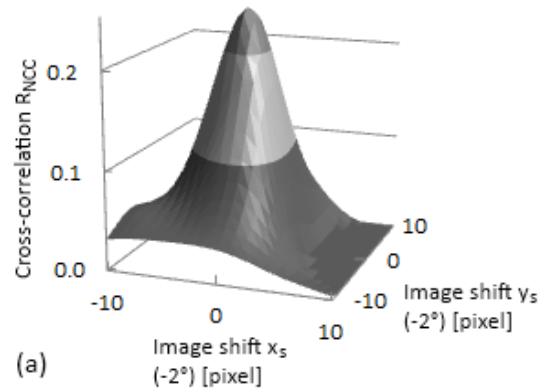


図 4.2. 投影像の位置合わせのシミュレーション結果。(a):  $-2^\circ$  の投影像と他の全傾斜像からそれぞれ再構成したボリウムデータ間の  $R_{NCC}$  分布 (反復初回)。(b): (a) と同様に  $-60^\circ$  の投影像に対する結果。(c): 反復による位置合わせ精度の改善を示している。

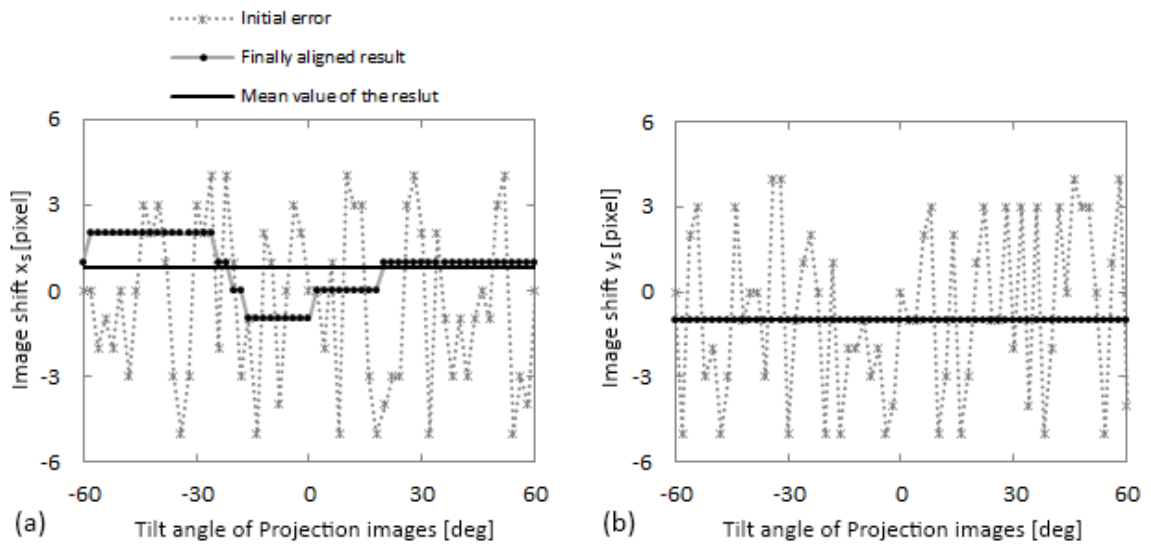


図 4.3. シミュレーションの最終位置合わせ結果。(a): 画像移動量の  $x_s$  成分について、位置合わせ前後を全傾斜角度の投影像に対して比較したグラフ。(b): (a) と同様に、 $y_s$  成分について比較したグラフ。

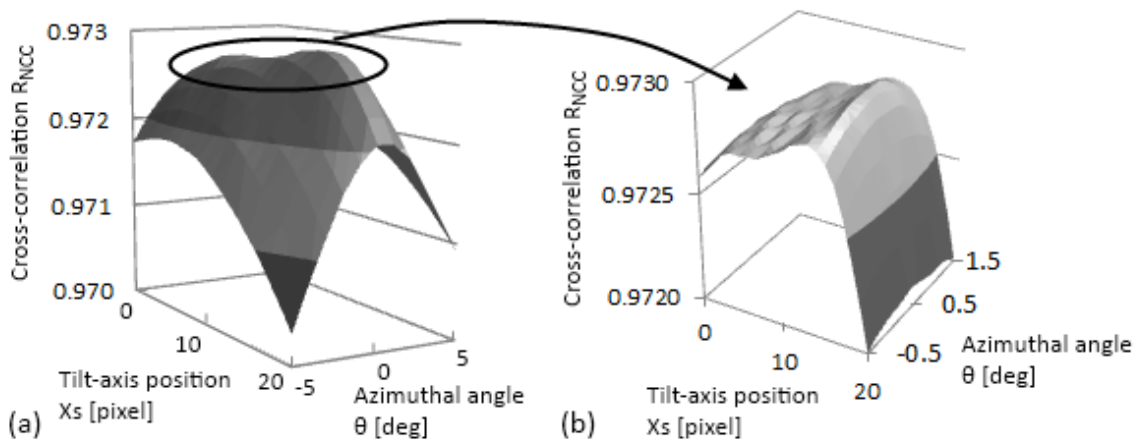


図 4.4. シミュレーションの傾斜軸探索結果。(a): 傾斜軸の中心からのずれ  $X_s$  と、 $1^\circ$  刻みで回転角度  $\theta$  を変化させたときの  $R_{NCC}$  分布。(b): (a) と同様に  $0.1^\circ$  刻みで  $\theta$  を変化させたときの  $R_{NCC}$  分布。

### 4.3 傾斜軸探索法の検証

前項で位置合わせされたモデルに対して、図 3.2 の手順で示す手法を用いて傾斜軸探索を行った（傾斜軸探索の節を参照）。図 4.4 は  $X_s$  と  $\theta$  を変数とした断層ボリュームの相関分布である。ピーク位置は最初に設定した値 ( $X_s = 10$  画素、 $\theta = 0.5^\circ$ ) とは異なるが近い値で、 $X_s = 14$  画素、 $\theta = 0.4^\circ$  であった。この傾斜軸位置を使用して求めた断層像を図 4.5 に示す。この図では、ミッシング・ウェッジに起因するアーティファクト以外の劣化が見られなかった。 $\theta$  に関しては、考察に記述するように、現状では  $0.1^\circ$  の精度は期待できないと考えている。 $X_s$  に関しては、各投影像の位置合わせの結果基準点が平均して  $(0.8, -1)$  画素移動していたことから、誤差はおおよそ 3 画素程度だと推定した。この後再び傾斜シリーズと傾斜軸の調整を反復して行ったが、得られた結果は僅かに良くなっただけであった。

以上の結果、再構成に用いる傾斜軸位置を  $y$  軸 ( $X_s = 0$  画素、 $\theta = 0^\circ$ ) として投影像の位置合わせを行った最初の傾斜軸探索では、おおよそ正しい傾斜軸位置 ( $X_s = 14$  画素、 $\theta = 0.4^\circ$ ) を検出した。検出された傾斜軸位置は設定した位置と僅かに異なった。しかし、我々の手法は再構成された 3 次元構造物の解像度が最も高くなる位置に投影像を移動させた。精度に関して課題はあるものの、この特性は他の手法と比較して有利に働くと考えられる。（このシミュレーションでは  $\theta$  が小さかったが、 $\theta$  が大きい場合はその角度を推定するか、傾斜シリーズの位置合わせと傾斜軸探索を反復して行う必要があると思われる。）

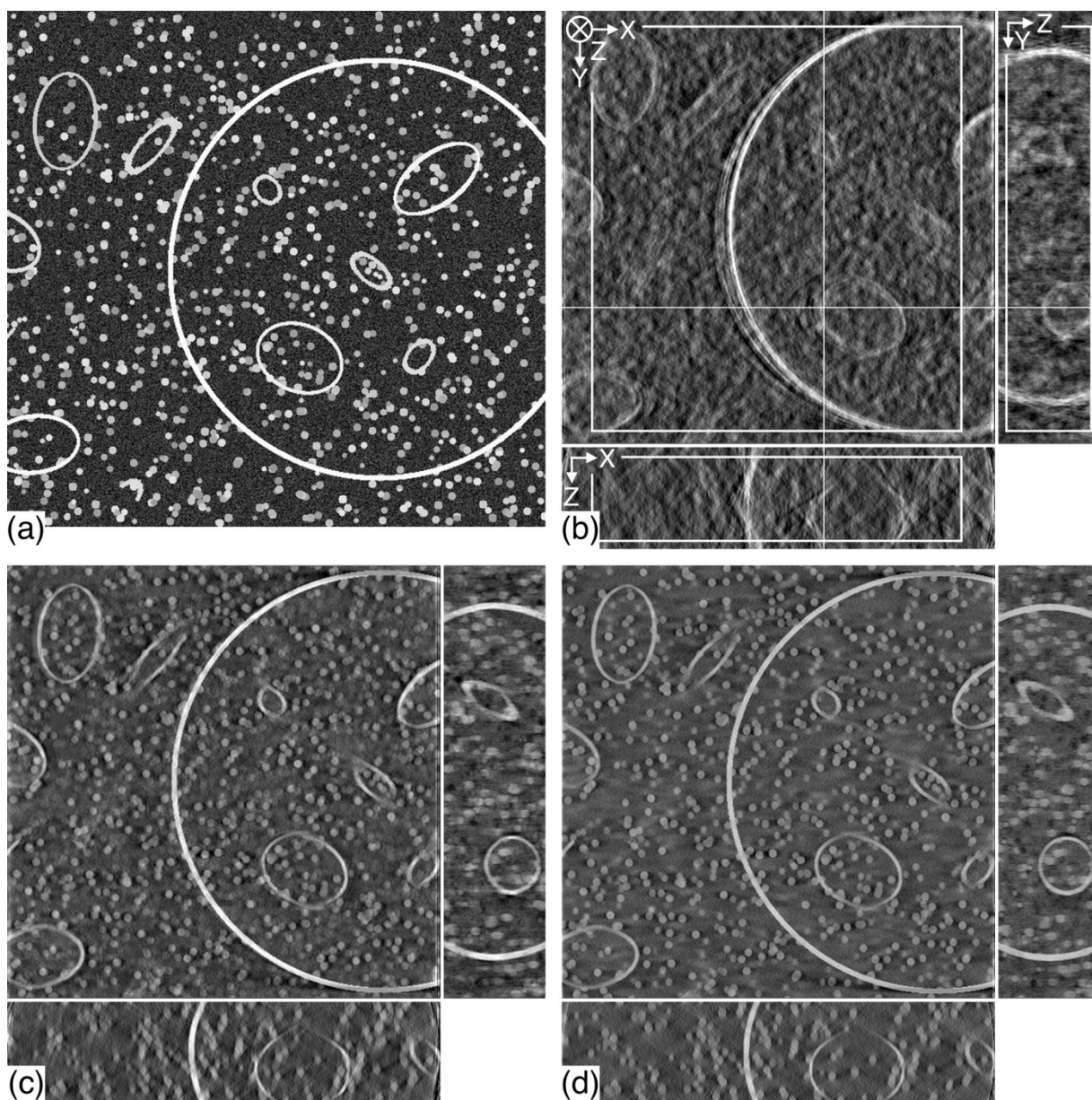


図 4.5. 位置合わせと傾斜軸探索前後の比較。(a): (c) や (d) と比較するためのオリジナル断層像。(b) それらの処理前の断層像 (512 × 512 画素)。(c): 処理後の断層像 (ミッシング・ウェッジによる劣化は見られる)。(d): 位置ずれのない傾斜シリーズから再構成した断層像。



## 第5章 傾斜シリーズの位置合わせと傾斜軸探索の実験結果

### 5.1 生物系試料の実験結果

#### 5.1.1 切片試料作製

一般的なケースとして、本手法をテストする為に生物切片試料を用いた。実験には酵母細胞を用いた。栄養豊富な媒体で細胞を成長させた後、ラパマイシンを含有する媒体に移し、2時間培養した。固定は[36]と同様の方法で行った。400 nm から500 nm の厚さの切片を、鷹岡らによる手法で染色した[8]。この切片をTEM トモグラフィによって観察した。一般に、特定の生物学的研究目的を達成するには、多くのサンプルを観察する必要があるため、撮影時間短縮のために、分解能が十分であるときには傾斜ステップを少々大きくすることもしばしばある。ここで使用されるデータはそのような状況下で撮影された。通常傾斜ステップは $1^\circ$  または $2^\circ$  が設定されるが、この試料では $3^\circ$  に設定し、アライメントが不完全な傾斜シリーズ像を撮影した。この傾斜シリーズは $\pm 60^\circ$  の $3^\circ$  ステップ、機器はH-9500SD (日立ハイテクノロジー) の加速電圧300kVを用いた。カメラはTemCam-F224HD 2k CCD camera (TVIPS) を使い、トモグラフィソフトウェアはEMMENU3 (TVIPS) を用いた。撮影された画像は $1024 \times 1024$  画素 (binning 2) である。

### 5.1.2 画像相関を用いた従来法による位置合わせ

本手法による傾斜シリーズ像の位置合わせと傾斜軸探索を効率的に行うため、最初に相互相関ベースの手法 [17,18] を用いて位置合わせを行った。ここではより高精度を得る為、相互相関関数 (XCF) の代わりに 位相限定相関関数 (PCF) [29-31,35] を用いた。従来法による位置合わせ結果から再構成された断層像を図 5.3(c) に示す。位置合わせされた傾斜シリーズを動画で視覚的に判断すると、非常に滑らかに見えた。(目視による位置合わせのエラーチェックは比較的高感度であることが報告されている [37]。 ) しかし、主に傾斜軸位置の不正確さによってアーク状の広がりを持った偽像が傾斜軸と垂直の  $x$ - $z$  断面上に現れた (図 5.3(c) 中の矢印を参照) [38]。このことから、実際は  $x$  成分に関する傾斜シリーズの若干の位置ずれが残っていたことがわかる。

### 5.1.3 傾斜軸探索

まずは傾斜軸の位置 ( $x$  座標 :  $X_s$ ) を推定するため、 $\theta = 0^\circ$  であると仮定して本手法による傾斜軸探索を行った。その結果を図 5.1(a) に示す。このグラフは  $X_s$  を変数とした 3 次元相互相関係数  $R_{NCC}$  の変化を示し、その最大値から仮の  $X_s$  が求まった。次に傾斜軸の  $x$  座標を仮の位置  $X_s$  として、 $\theta$  の探索を行った。その結果を図 5.1(b-1) に示す。第 6 章で詳細に述べるように、ここで予想外の特異的現象が起き、問題が発生した。それは、 $\theta = 0^\circ$  の付近で  $R_{NCC}$  が急峻に低下するという問題である。最大となる位置はその下に凸なピークに隠れてしまい、検出できなかった。この問

題を回避する為、全ての傾斜シリーズを特定の十分な角度 ( この場合  $-5^\circ$  ) 回転させ、もう一度同様の探索を行った。その結果を図 5.1(b-2) に示す。予想通りこの問題は解決し、測定値の問題の部分は  $0^\circ$  付近から移動し、 $R_{NCC}$  が最大となる  $\theta$  が検出できた。グラフの形状はかなり滑らかであったが、最大値は  $0^\circ$  の付近であった。

最後に、上記の予備測定結果に基づいて、変数を傾斜軸位置の  $x$  座標  $X_s$  と傾斜軸の回転角度  $\theta$  の 2 つにして傾斜軸探索を実行した。その相関分布を図 5.1(c) に示す。傾斜軸位置は  $X_s = 25$  画素、 $\theta = -0.1^\circ$  であった。

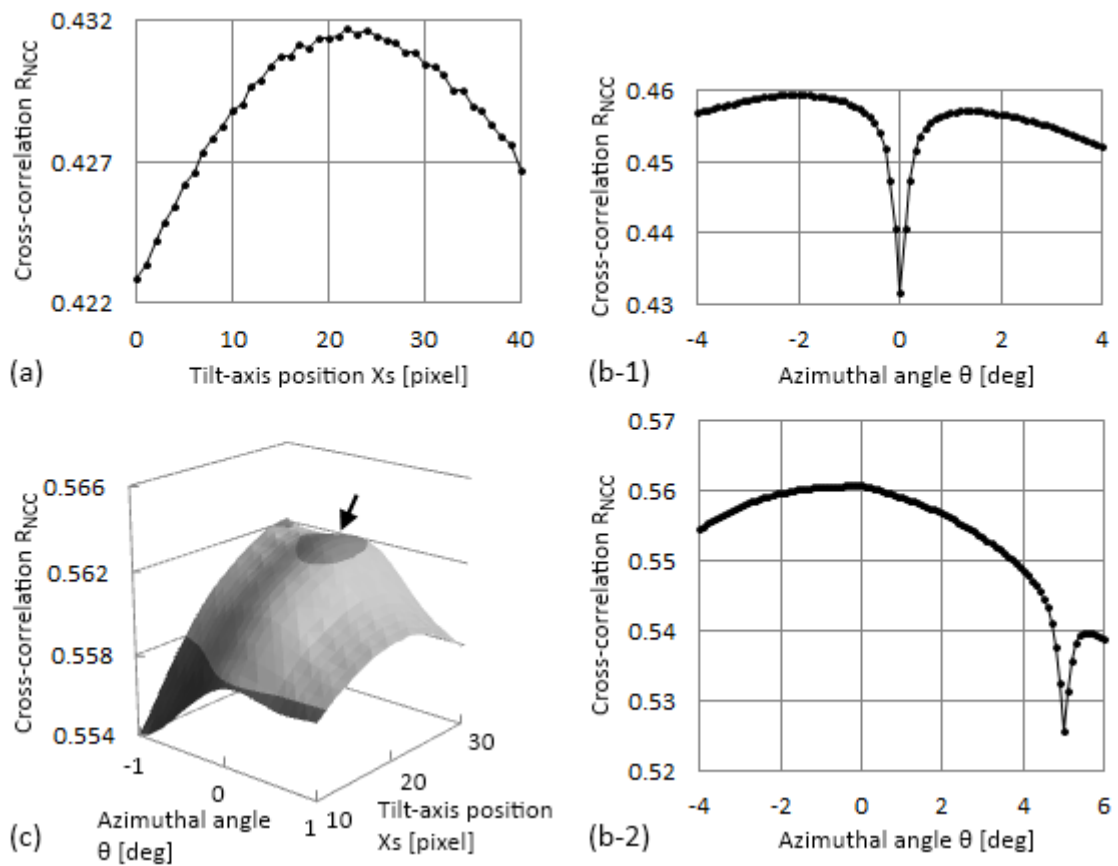


図 5.1. 本手法による傾斜軸探索結果。(a): 軸位置  $X_s$  を変数とする相関係数  $R_{NCC}$ 。但し  $\theta = 0^\circ$  と仮定した。(b-1): (a) で推定した  $X_s$  を仮の軸位置として行った  $\theta$  の探索。 $\theta = 0^\circ$  付近で  $R_{NCC}$  が急峻に低下し、ピーク位置が測定できなかった。(b-2): (b-1) と同様だが、探索前に傾斜シリーズ像を  $-5^\circ$  回転した。問題の個所は  $\theta = 5^\circ$  付近に移動し、 $\theta = 0^\circ$  付近にあったピークが測定できた。(c):  $X_s$  と  $\theta$  を変数とした最終的な 2 次元相関マップ。ピーク位置を矢印で示した。

#### 5.1.4 断層ボリューム相関法による各傾斜像の位置合わせ

傾斜軸位置の決定後、本手法によって各傾斜像の位置合わせを行った。図 5.2 の (a) と (b) に、 $-3^\circ$  の傾斜像と  $-60^\circ$  の傾斜像の位置合わせ結果を示す。“各傾斜像の位置合わせ法”にあるように、相互相関係数  $R_{NCC}$  は次の 2 つの断層ボリュームから計算された。一方は位置合わせを行う投影像から逆投影した断層ボリュームデータ、もう一方はその他全て投影像から再構成した断層ボリュームデータである。相互相関演算を 図 5.3(c) にある実線で囲まれた比較的構造物が集中した領域に制限し、傾斜像の移動量  $x_s$  と  $y_s$  を変数とした相関分布が得られた。図 5.2(a) に示すように傾斜角度が小さい場合は鋭いピークが現れた。しかし、図 5.2(b) に示すように傾斜角度が大きい場合は、ピークは存在したものの図 4.2(b) では見られなかったようななだらかで複雑な形状であった。これは電子ビームの非弾性散乱とフォーカシングの不正確さ、そしてノイズが原因として挙げられる。図 5.2(c) は反復による位置合わせの精度向上と補正量の収束を示している。反復 10 回程度で収束しており、反復によってこれ以上の大幅な向上が見込まれなかったため 10 回目の結果を最終的な位置合わせ結果とした。

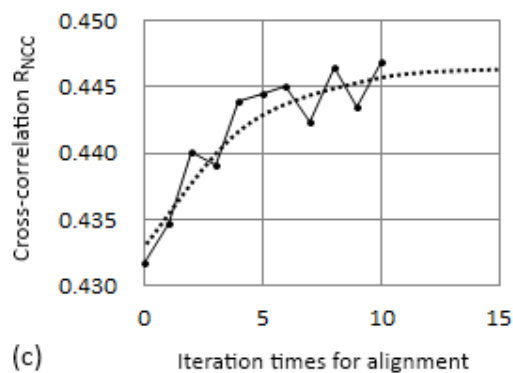
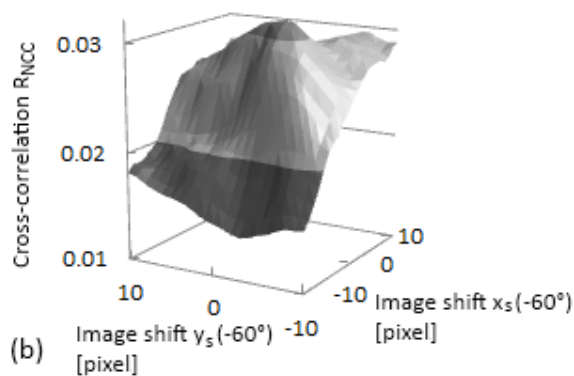
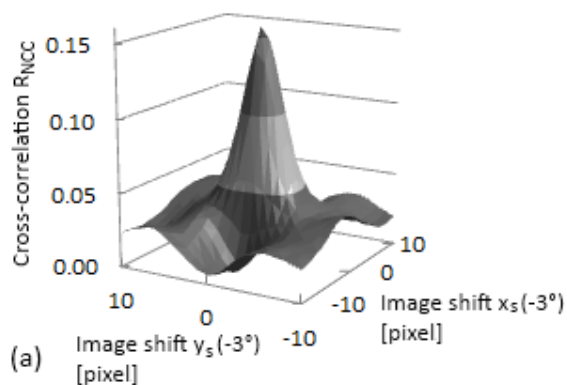


図 5.2. 投影像の位置合わせの実験結果。(a):  $-3^\circ$  の投影像と他の全投影像から再構成した断層ボリュームデータから演算した  $R_{NCC}$  分布 (反復初回)。(b): (a) と同様に  $-60^\circ$  の投影像の  $R_{NCC}$  分布。(c): 反復による位置合わせの精度向上と補正量の収束を示している。

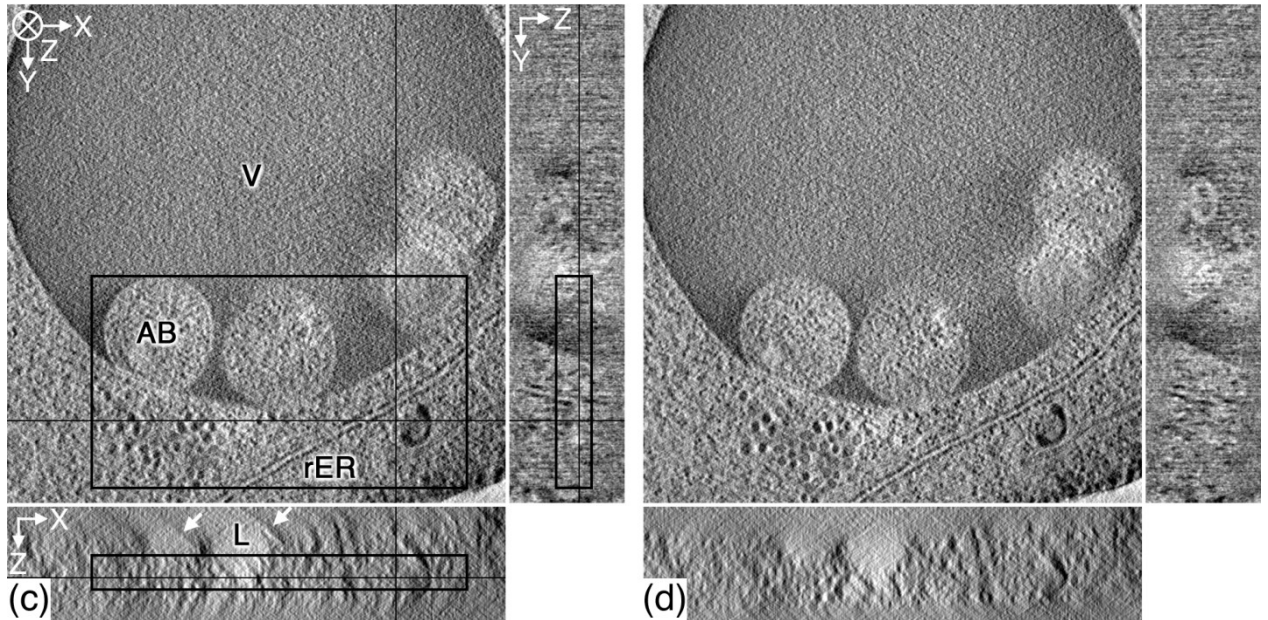
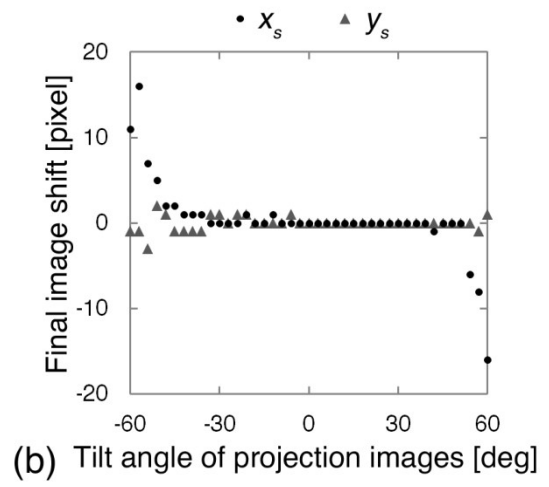
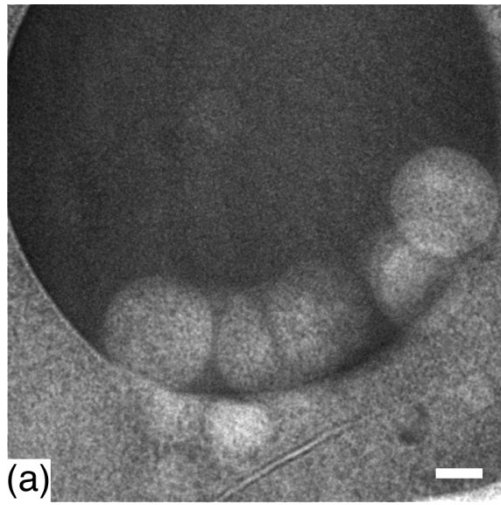


図 5.3. 位置合わせ及び傾斜軸探索前後の比較。(a): 生物切片 (酵母細胞) の  $0^\circ$  の投影像。スケールバー:  $0.2\mu\text{m}$ 。(b): 従来法によって粗調整された傾斜シリーズを、本手法によって位置合わせしたときの全傾斜像の移動量。特に、高傾斜角度の  $x_s$  成分が良く補正された。(c): 本手法による位置合わせ及び傾斜軸探索前の断層像。(d): 本手法による位置合わせ及び傾斜軸探索後の断層像。略記: V: 液胞; rER: 粗面小胞体; AB: 自食体; L: 脂質。

ここで、図 5.2(b) で示されるボリューム相互相関のピーク形状と、 $-57^\circ$  と  $-60^\circ$  の傾斜像 ( 図 5.4(a) と (b) ) から計算される PCF との比較を行った。図 5.4(c) は通常の XCF ( 中央  $512 \times 512$  画素の範囲 )、図 5.4(d) は PCF ( 同様の範囲 ) の相関分布を示し、図 5.4(e) と (f) はそれらの  $R_{NCC}$  分布のピーク部分をそれぞれ拡大表示した図である。この比較で示すように、PCF には非常に鋭いピークがあるが、断層ボリュームデータ相互相関は再構成された結果から直接測定した値であるので、 $x_s$  成分に関しては PCF より鋭い形状をしている。また、 $R_{NCC}$  分布は単軸傾斜 ( $y$  軸) トモグラフィの解像度に依存している為、ピークの  $y_s$  成分に関しては  $x_s$  成分より滑らかに見える。 $y$  軸傾斜のトモグラフィでは、ミッシング・ウェッジ効果のため  $y$  軸方向の分解能が  $x$  軸方向よりも低くなる。そのようなボリュームデータで相互相関演算を行っているため、 $R_{NCC}$  は分解能低下の影響を受け、 $y$  軸方向に関してはぼやけてしまう。



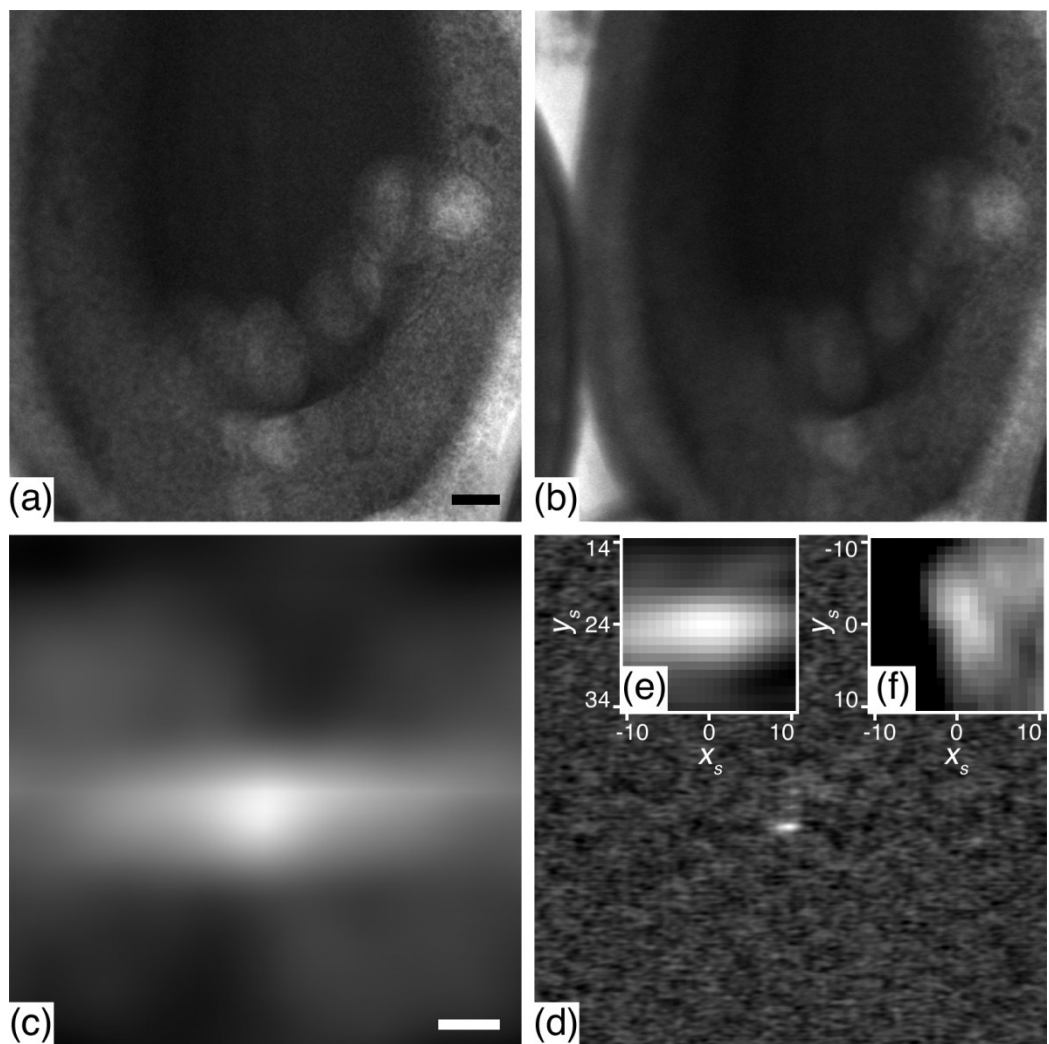


図 5.4. PCF と断層ボリュームデータ相関法の比較。(a,b): 酵母細胞の高傾斜 TEM 像 ( $-57^\circ$  と  $-60^\circ$ ) ( $1024 \times 1024$  画素)。スケールバー:  $0.2\mu m$ 。(c,d): (a,b) 間の XCF と PCF。スケールバー: 50 画素。(e,f): (d) と図 5.2(b) のピーク付近を拡大表示して比較した図。

最終的に位置合わせされた断層像を図 5.3(d) に示す。図 5.3(c) の、本手法による位置合わせ前の断層像と比較すると、従来の画像相関法では位置合わせしきれなかったために生じていたアーク状の偽像が消失した。また、5.1.2 で PCF による位置合わせを行った段階では  $R_{NCC} = 0.177$  であったが、本手法による傾斜軸探索と位置合わせを行った結果  $R_{NCC} = 0.447$  まで向上した。この結果は傾斜シリーズ像の位置合わせと傾斜軸位置探索が高精度に行われたことを意味している。なおより確実にするために傾斜軸探索と投影像の位置合わせを反復して行ったが、僅かに改善されるのみであった。

本手法はオートファジーに関連する生物学の研究において、実際に多くの傾斜シリーズ ( およそ 40 種類の生物切片の 2 軸傾斜トモグラフィ ) に適用され、その全てにおいてほぼ完全自動で位置合わせが行われ、劣化がなく解像度の高い断層像が得られた。また、以上のように本手法は実際にトモグラフィの高効率化に貢献した [39]。

### 5.1.5 処理時間

我々の手法は自動処理に有利だが、処理時間が非常に長くかかることが問題である。しかし、これは将来的には、ますますのコンピュータ能力の発展の中で解決に向かうと考えている。図 4.5 及び図 5.3 に示した結果を得るまでにかかる時間は、表 5.1 のようになる。これらの処理は東京大学情報基盤センターのスーパーコンピュータシステム (Fujitsu PRIMEHPC FX10 System (Oakleaf-FX)) を用いて行われた。仕様を表 5.2 に示す。

表 5.1 位置合わせと傾斜軸探索の処理時間

|  | シミュレーション(図 4.5)                     | 酵母切片の実験(図 5.3)                      |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| FBP による 3 次元再構成                          | 4 秒 ~ 5 秒<br>(512 × 512 × 150 ボクセル) | 16 秒 ~ 20 秒<br>(1k × 1k × 128 ボクセル) |
| 位置合わせ<br>(反復 10 回)                       | ~2 時間<br>(投影像 61 枚)                 | ~8 時間<br>(投影像 41 枚)                 |
| 傾斜軸探索<br>( $X_s$ と $\theta$ の変域 20 × 20) | ~1 時間                               | ~3 時間                               |

表 5.2 ハードウェアの仕様 (演算には 12 ノードを使用した)

| ノード             |              | プロセッサ  |              |
|-----------------|--------------|--------|--------------|
| 理論演算性能          | 236.5 GFlops | 理論演算性能 | 14.78 GFlops |
| プロセッサ数<br>(コア数) | 16           | 周波数    | 1.848 GHz    |
| 主記憶容量           | 32 GB        |        |              |

## 5.2. TiN-Ag 複合ナノ粒子の実験結果

### 5.2.1 試料について

材料系の試料では、第 1 章で述べたようにマーク法が利用できないケースも多く、特に厚い試料の場合、試料傾斜によって構造物の位置関係が大きく変動し、従来の画像相関法では位置合わせが不正確になることがしばしばある。九州大学の金子賢治博士より提供を受けた試料も、従来の位置合わせ法では高精度な位置合わせが難しい試料であった。

提供された試料はアークプラズマ法により作成した窒化チタニウム複合ナノ粒子である [40-42]。この試料は、“原料に用いる金属と雰囲気中の気体との親和力などの違いから構造が変化することが期待”されるため、“生成した窒化チタニウム (TiN) と銀 (Ag) からなる複合ナノ粒子の構造を解析することを目的”とされた [40 より引用]。トモグラフィの最大傾斜角度は  $-72^\circ$  から  $72^\circ$ 、傾斜刻み角は  $2^\circ$ 、画素数は  $1024 \times 1024$  画素であった。

### 5.2.2 画像相関を用いた従来法による位置合わせ

5.1 で行った生物切片の位置合わせ実験と同様の理由で、本実験でも最初に PCF を用いて位置合わせを行った。従来法による位置合わせ結果から再構成された断層像を図 5.6(a) に示す。位置合わせされた傾斜シリーズを視覚的に判断すると、やはり

高傾斜において、傾斜像の移動量  $x_s$  成分に関して位置ずれが確認された。そのため傾斜軸探索の前に各傾斜像の位置合わせを先に行った。

### 5.2.3 各傾斜像の位置合わせ

従来法による粗調整後、本手法による位置合わせを行った。図 5.5(a) と (b) に  $-2^\circ$  の傾斜像と  $-72^\circ$  の傾斜像の初回の位置合わせ結果を示す。相互相関演算は図 5.6(b) と (c) にある実線で囲まれた、試料全体を覆うような広い範囲に制限し、傾斜像の移動量  $x_s$  と  $y_s$  を変数とした相関分布が得られた。図 5.5(a) と (b) を見ると図 5.2(a) と (b) と同様の理由で、低傾斜角度の  $R_{NCC}$  分布に比べ高傾斜角の  $R_{NCC}$  分布はピーク値の値が低下していた。図 5.2(b) と図 5.5(b) のピーク形状を比較すると、前者の形状はいくつかの極大値を持ち凹凸が存在したのに対し後者の形状はただ一つのピークを持っていた。これは生物切片と違い、この実験で用いたサンプルが図 5.6(a) と (e) に示すような、単純なキューブ状の構造物で構成されていたことが影響したと考えられる。図 5.2(c) は反復による位置合わせの精度向上と収束を示しており、反復 8 回目で  $R_{NCC}$  が最大となった。

### 5.2.4 傾斜軸探索

各傾斜像の位置合わせ後、傾斜軸位置の探索を行った。 $\theta = 0^\circ$  の付近で  $R_{NCC}$  が急峻に低下する問題を考慮し、全傾斜像を事前に  $-3^\circ$  回転させてから探索を行った。傾斜させたときの構造物の軌跡から、目視により  $\theta$  は  $-3^\circ$  程度であると推測された

ため、この実験では予備測定を行わずに探索を行った。傾斜軸位置の  $x$  座標  $X_s$  と傾斜軸の回転角度  $\theta$  を変数とした相関分布を図 5.5(d) に示す。非常に滑らかであったがピークを形成し、傾斜軸位置を検出することができた。傾斜軸位置は  $X_s = -17$  画素、 $\theta = -3.3^\circ$  であった。また、5.2.2 で PCF による位置合わせを行った段階では  $R_{NCC} = 0.812$  であったが、本手法による位置合わせと傾斜軸探索を行った結果  $R_{NCC} = 0.964$  まで向上した。

従来法による位置合わせ結果の断層像と本手法による位置合わせと軸探索結果の断層像の比較を図 5.6 に示す。図 5.6(a) から (d) は従来法による位置合わせ結果の断層像、図 5.6(e) から (h) は本手法による調整結果の断層像である。図 5.6(a) と (e) は TiN-Ag 複合ナノ粒子の再構成結果の  $X$ - $Y$  断面であり、図 5.6(b) と (f) の視野から点線で囲まれた部分を拡大表示したものである。図 5.6(c) と (g) 及び図 5.6(d) と (h) は図 5.6(b) の実線で示された部分の  $X$ - $Z$  断面である。これらの図から、断層像の像質が大幅に改善されたことがわかり、回折コントラストに起因すると思われる数方位のストリーク状のコントラストが等方的かつ対称に再構成されている。なお、相関演算は図 5.6(b) と (c) の実線で囲まれた範囲で行った。

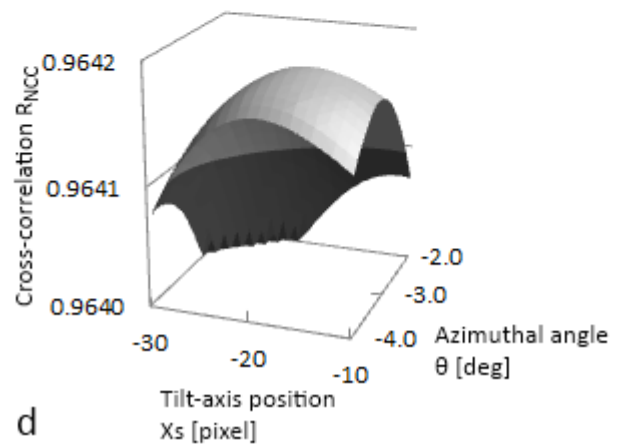
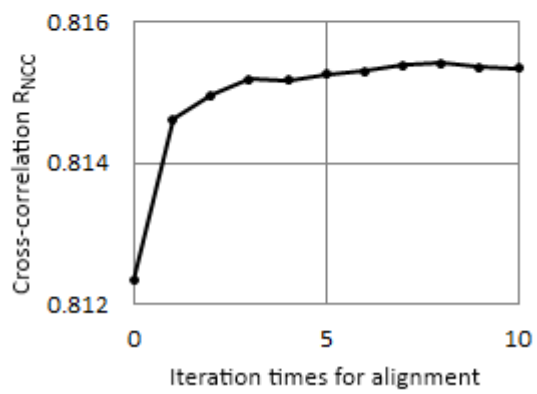
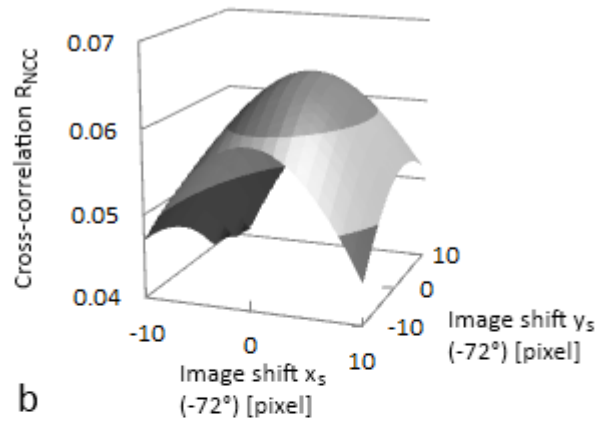
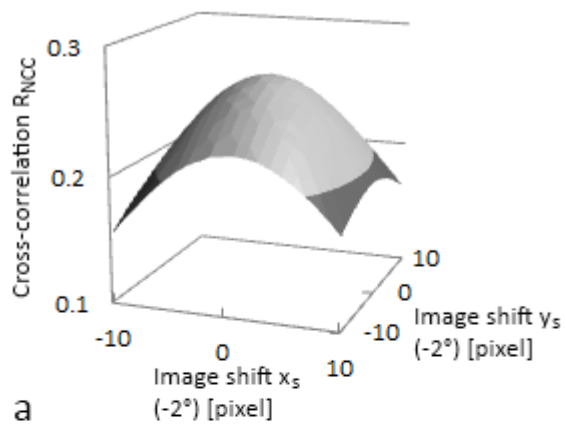


図 5.5. 位置合わせと傾斜軸探索の結果。

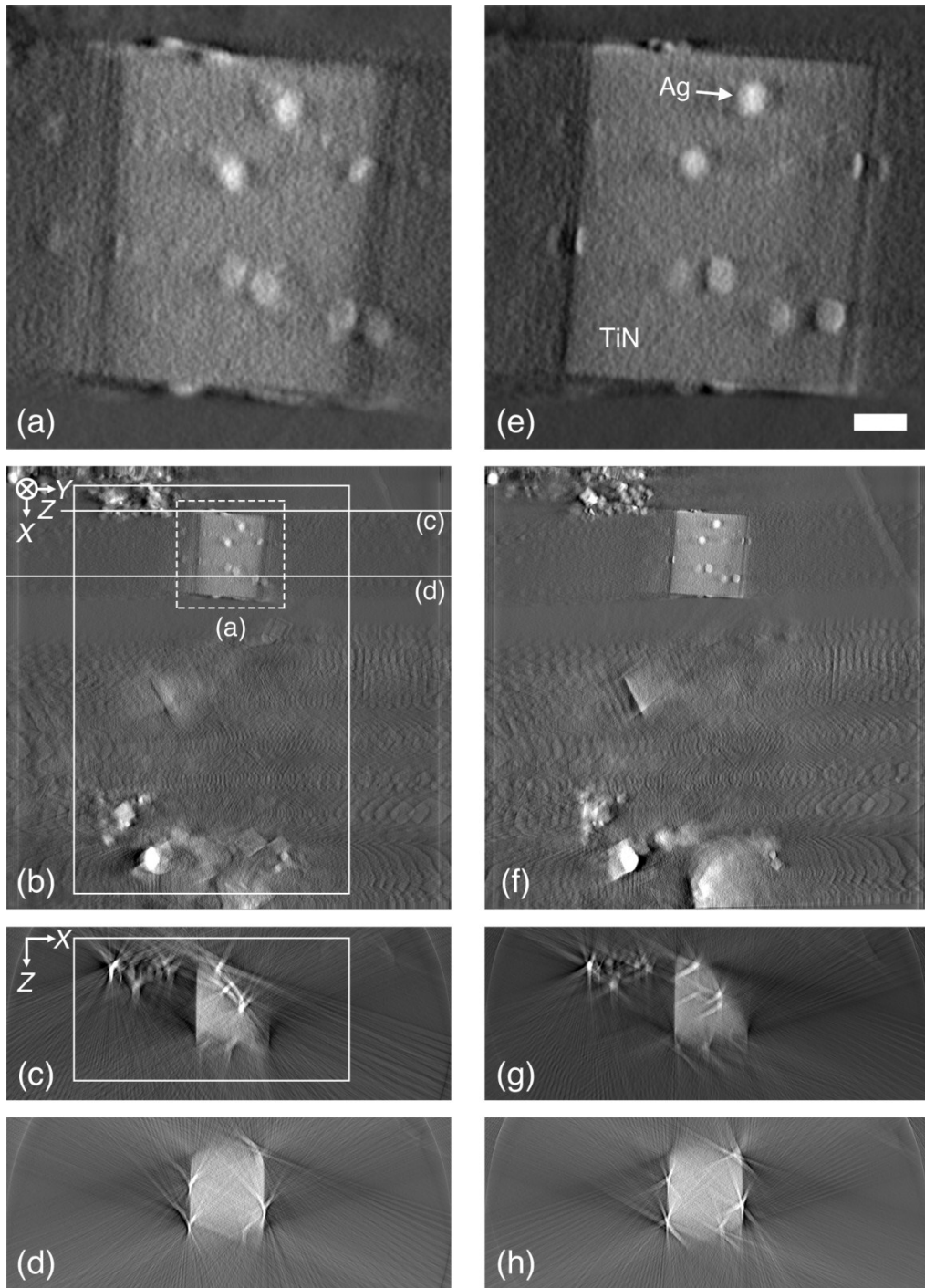


図 5.6. 位置合わせと傾斜軸探索前後の比較。(a-d) は処理前の断層像。(a): (b) の点線部分を拡大表示した図。(b): 視野全体の  $X$ - $Y$  断層面。(c,d): (b) に直線で示した位置の  $X$ - $Z$  断層面。(e-h): 同様に処理後の断層像。スケールバー : 10nm 。(b,c) の枠線は相関演算範囲。



## 第 6 章 自動視野追跡の実験結果

### 6.1 切片試料作製

本手法を検証するために 2 種類の試料を用意した。

一つは、20nm 径の金微粒子で覆われた樹脂切片である。まず使用する Epon 樹脂をおよそ 200nm の厚さに切断し、カーボン支持膜のはられた銅メッシュに載せた。その後切片を親水化処理し、金微粒子(コロイド粒子)を両面に付着した。金微粒子の非常に強いコントラストに対し樹脂層はほとんど見えなかった為、僅かな試料傾斜であっても金微粒子分布のパターンの変化が鮮明に見られた。これは本手法と従来法の比較に有用であった。

もう一つの酵母細胞の切片は、第 4 章で用いた試料と同様の手法で作成した [36]。作成された切片の厚さはおよそ 150nm であった。

### 6.2 使用した透過型電子顕微鏡

この実験では、TEM は HT-7700 電子顕微鏡(日立ハイテクノロジーズ)(XR-412B CCD カメラ (AMT) を備えている)が使用された。加速電圧は 120kV、基本のトモグラフィソフトウェアは EMIP-3D を用いた。TEM の本体側コントロール以外は、我々の研究室が独自に C++ を用いて作成した。外部制御としての試料傾斜、追跡における位置ずれ補正フィードバックを行うコントロールプログラムは日立ハイテク

ノロジーズより提供された [30]。TEM にインストールされている既存の機能からは、オートフォーカスのみを使用した。

### 6.3 自動視野追跡

前述の試料を用いて、図 3.6 に示した手順で実験を行った。3.3 で提案した傾斜軸探索法を用いて傾斜軸の方位角度は事前に測定され、 $1.1^\circ$  であった [25]。この角度は本手法の逆投影の演算に用いられた。傾斜角度刻みは  $1^\circ$  や  $2^\circ$  の他にも様々な角度で実験し、最大傾斜角度は  $\pm 70^\circ$  とした。実験に用いたソフトウェアはまだ試作段階であり、想定しているよりも処理速度が遅い。そのため画像サイズを  $1k \times 1k$  画素に縮小して処理を行った。倍率は金微粒子、酵母細胞ともに 30,000 倍で行った。視野追跡では、傾斜前の像と傾斜後の仮の像を撮影して我々の制御プログラムによって移動量を算出し、追跡した傾斜後の像を撮影した。そして、傾斜角度  $0^\circ$  から開始して最大傾斜角度である  $70^\circ$  までこの処理を反復し、次に、 $0^\circ$  から  $-70^\circ$  までこの処理を反復した。TEM にインストールされている既存のソフトウェアでこの実験に用いたのはオートフォーカスのみである。

実験では従来の手法に対して明らかに優位性を示す結果が得られた。金微粒子の試料は自動追跡を  $2^\circ$  刻みで行ったが、従来の手法による追跡は失敗した。対照的に、我々の手法では高い精度で追跡が成された。動画からも、傾斜シリーズ像は非常によく位置合わせされ、それはそれぞれの傾斜シリーズ像から再構成した断層像でも確認できる (図 6.2(b) と (c))。酵母細胞の試料では、自動追跡を  $8^\circ$  刻みで行った。通常設定される刻み角度よりかなり大きいですが、それでも全ての傾斜像で精度よく追

跡できた。対照的に、PCFによる追跡はうまくいかなかった。こちらも、それぞれの傾斜シリーズから再構成した断層像で違いが確認できる(図6.4(b)と(c))。

図6.1と図6.3は自動追跡した傾斜シリーズと対応する $R_{NCC}$ 分布(図6.1(d)から(i)及び図6.3(d)から(i))を示している。これは非常に鋭いピークを示している。双方の試料において、高傾斜で $R_{NCC}$ が低下したが、2つの逆投影線像において重なり合う積分領域が低傾斜と比較して小さくなる為である。3.4で記述したように、これらのピークの鋭さは追跡が高精度であることを示している。更に、我々の手法の効果を確認するために双方の試料において最大傾斜角度を $\pm 70^\circ$ とし、 $1^\circ$ 刻みで自動追跡を行った。図6.2(a)及び図6.4(a)に示されるそれらの再構成結果は、ミッシング・ウェッジの影響はあったもののアーティファクトによって劣化することなく鮮明な断層像を示した。

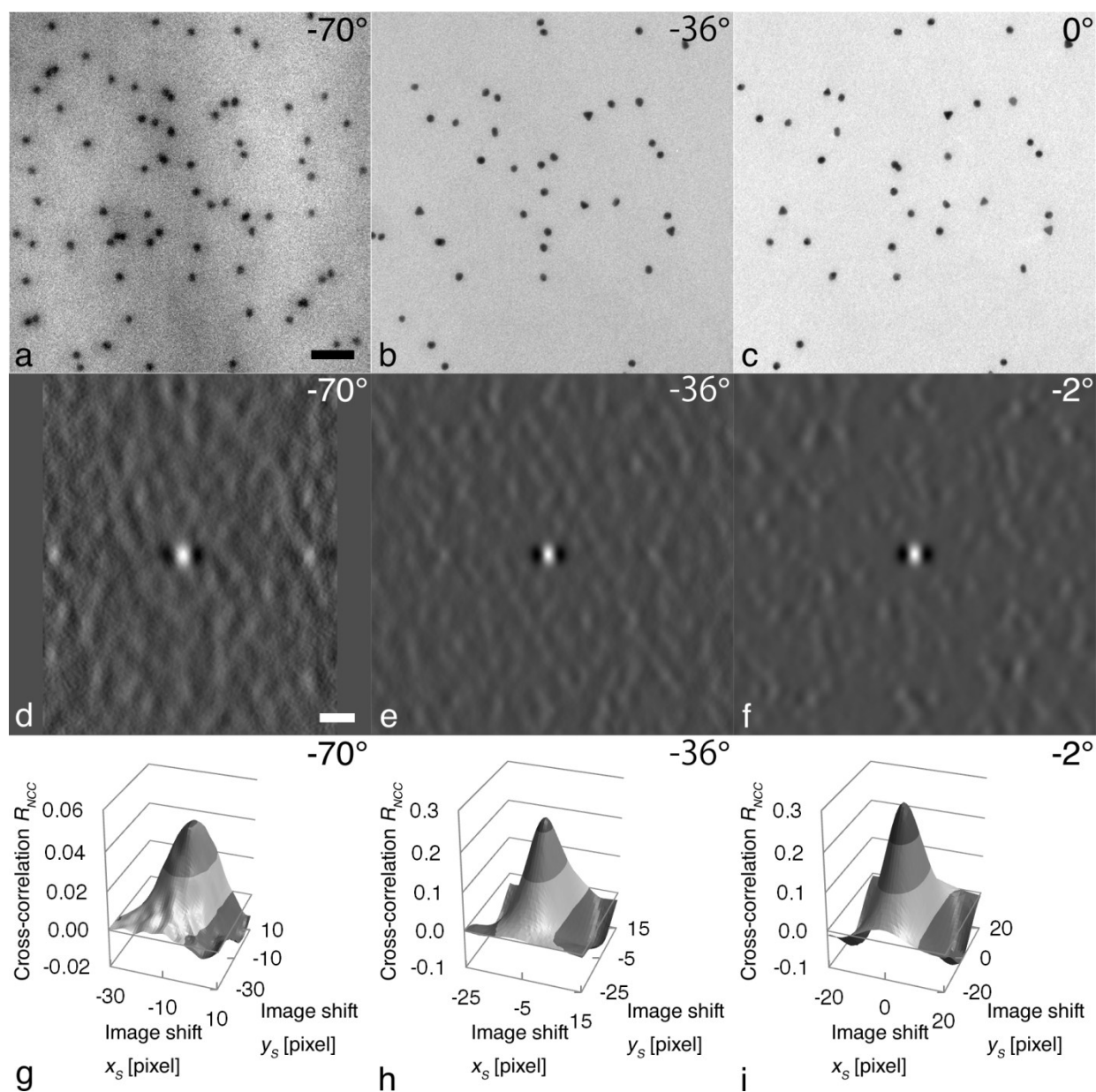


図 6.1. 金微粒子を付着した樹脂切片の自動追跡結果。(a-c): 本手法による追跡結果の投影像。スケールバー:  $0.5\mu\text{m}$ 。(d-f): それぞれの  $R_{NCC}$  分布 ( $0^\circ$  は開始の角度なので、 $-2^\circ$  の分布を用いた)。スケールバー: 50 画素。(g-f):  $R_{NCC}$  分布のピーク位置を中心とした 3 次元表示。

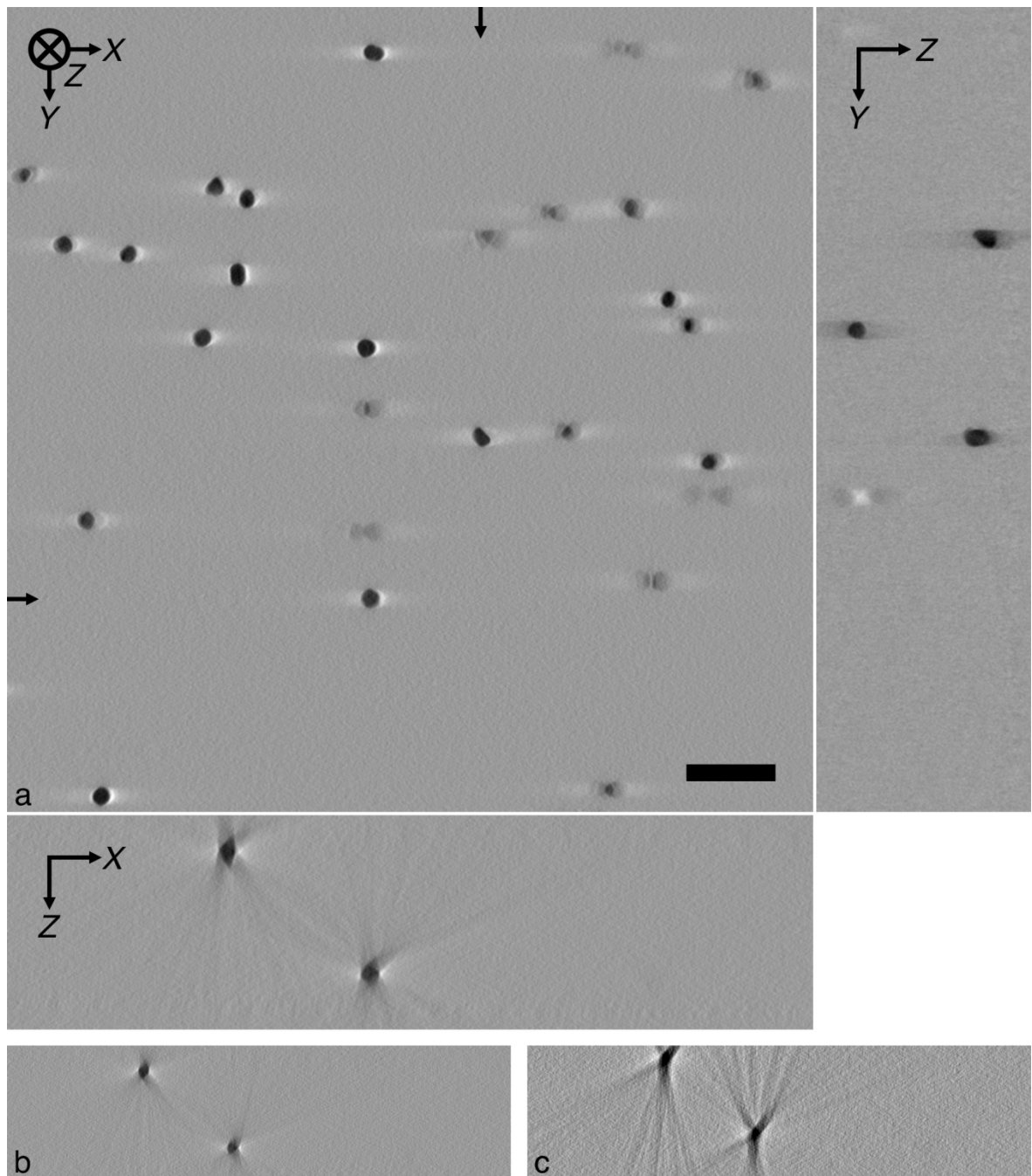


図 6.2. 金微粒子を付着した樹脂切片の断層像の比較。(a): オンライン再構成した結果 ( $1^\circ$  刻み)。スケールバー:  $0.5\mu\text{m}$ 。(b): 同様に  $2^\circ$  刻みでオンライン再構成した結果 ((a)の  $X$ - $Z$  断層面と同視野)。(c): (b)と同様で PCF を用いて位置合わせを行い再構成した結果。

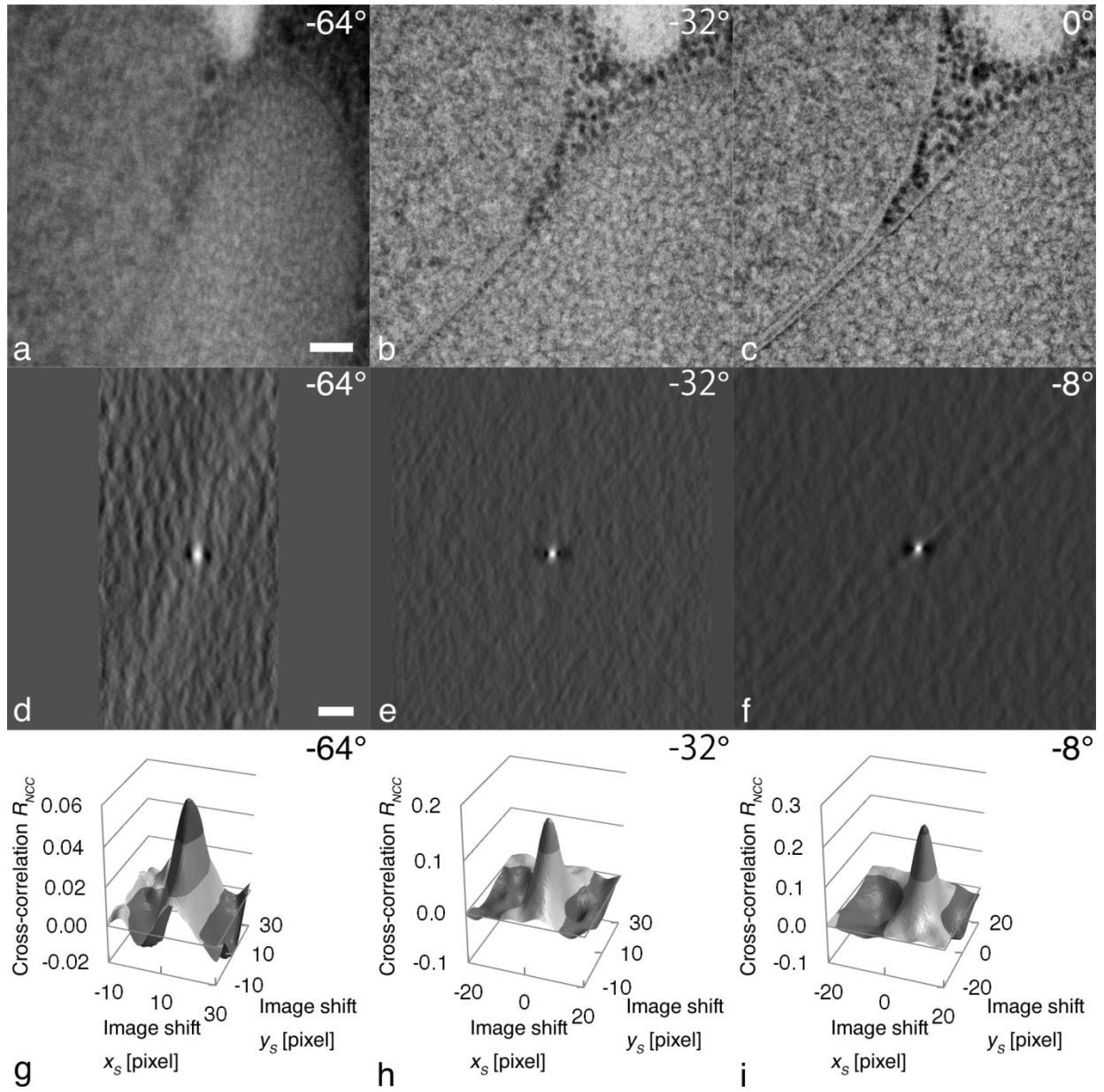


図 6.3. 酵母細胞の自動追跡結果。(a-c): 本手法による探索結果の投影像。スケールバー:  $0.5\mu\text{m}$ 。(d-f): それぞれの  $R_{NCC}$  分布 ( $0^\circ$  は開始の角度なので、 $-2^\circ$  の分布を用いた)。スケールバー: 50 画素。(g-f):  $R_{NCC}$  分布のピーク位置を中心とした 3 次元表示。

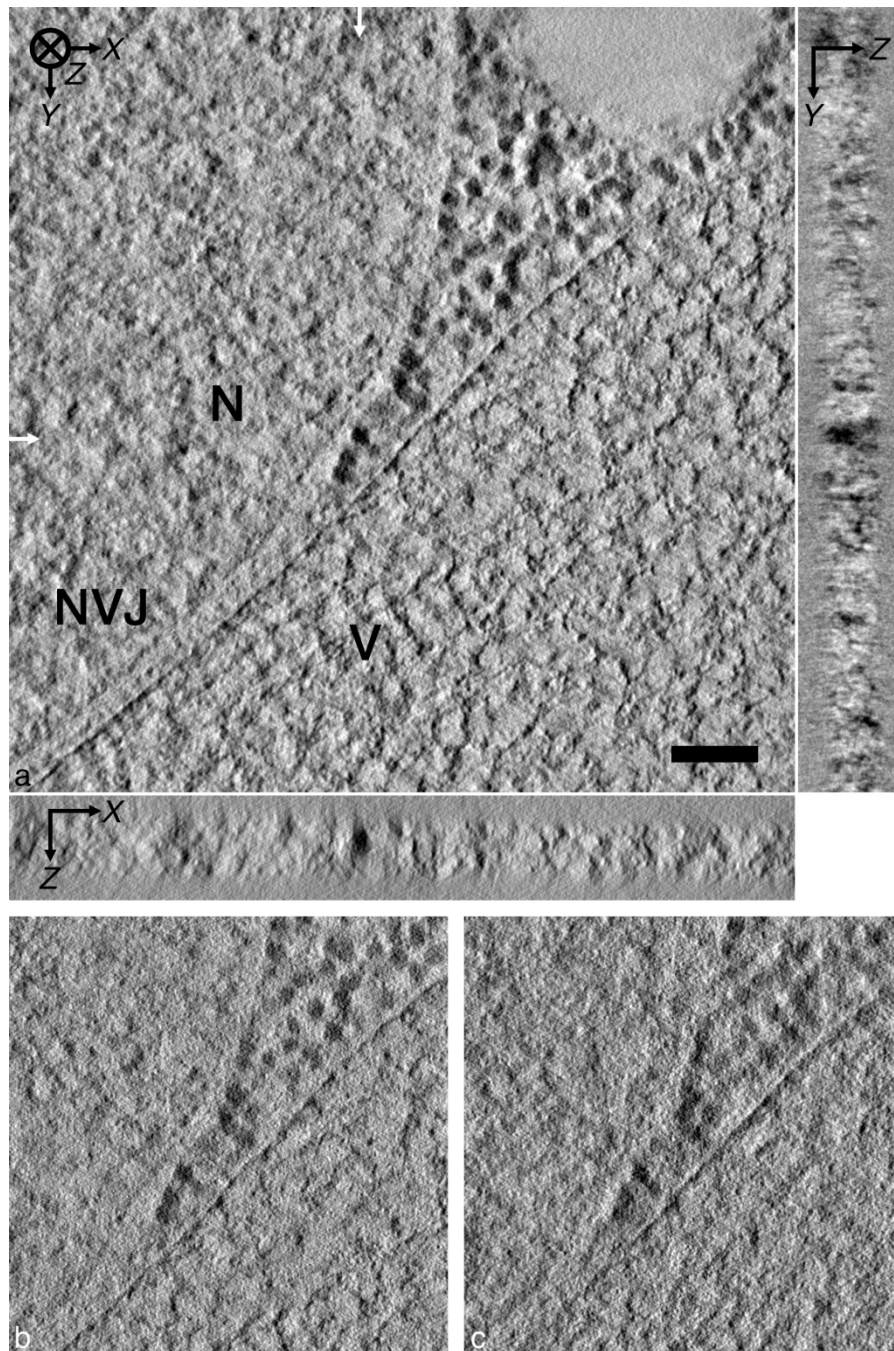


図 6.4. (a) は酵母切片のオンライン再構成結果 ( $1^\circ$  刻み)。スケールバー：  
 $0.5\mu\text{m}$ 。(b): (a) と同様に  $8^\circ$  刻みでオンライン再構成した結果 ((a) の X-Y  
 断層面と同視野)。(c): (b) と同様、PCF を用いて位置合わせを行い再構成  
 した結果。略記 : N: 核; V: 液胞; NVJ: 核と液胞の接合部

## 第7章 考察

### 7.1 傾斜像の位置合わせと傾斜軸探索

従来の画像相関法との大きな違いは、FBPによって再構成された断層ボリュームを用いる点にある。従来の画像相関法は、一般に、隣り合う2枚の投影像の類似度に依存し、試料が厚くなる、または高傾斜角になると画像パターンが大きく変化するため信頼性が低下する。この問題は特徴点追跡法 [20-22] でも同様だろう。対照的に、断層ボリュームデータ相関法は投影像の類似性に頼らず再構成された断層ボリュームデータに基づく。断層ボリュームデータは個々の投影像(傾斜像)の逆投影ボリュームを積算することによって得られる。各投影像の位置が合っていないと、対応する逆投影ボリュームの位置が互いにずれ、断層像が不鮮明になる。

本手法では傾斜シリーズ像間の位置ずれを、2つの断層ボリュームデータから3次元相互相関によって計測する。一方は位置合わせを行う1枚の投影像から再構成され、もう一方はその他全ての投影像から再構成される。前者の断層ボリュームデータ  $I_1(X,Y,Z)$  を移動し、後者の断層ボリュームデータ  $I_2(X,Y,Z)$  と3次元相互相関によるマッチングを行うことによって最適な位置を探索する。 $I_1()$  と  $I_2()$  の像は大きく異なる (i.e.  $I_1()$  の  $X-Z$  断面は広がりを持った平行線のみで構成される (図 2.1 の矢印を参照)) ため、相関係数が非常に小さい。加えて、傾斜角度が高くなると、 $I_1()$  と  $I_2()$  の間で構造物が重なり合う領域が小さくなるため、相関係数は更に小さくなる。本論ではシミュレーションモデルと実験用試料として切片を用いた。再構成像の  $X-Z$  断面において、相関範囲は  $x$  軸方向を長辺とした長方形に設定した。高傾斜



角度では、 $I_1O$  のストリーク像が大きく傾斜して  $I_2O$  との相関演算が行われる。例えば傾斜角度  $60^\circ$  の場合、有意な相関演算が行える範囲は  $0^\circ$  の場合のおおよそ半分以下となる。更に、相関範囲が長方形であるから、傾斜させると  $I_1O$  のストリーク像が長くなる。そのため  $I_2O$  の断層面との差異が低傾斜角度より大きく、やはり相関係数が小さくなる。このように、高傾斜角度では相関に有意な部分が小さくなり、相関範囲を大きくしても相関係数の値は高くない。以上のことから高傾斜角度では  $R_{NCC}$  のピーク値が小さくなることが分かったが、しかしそれでも  $s/n$  が十分である限り、 $I_1O$  は確かに断層像を構成する要素の一つであるから、位置合わせに影響はない。これは図 3.3 や図 4.3(b) に示される位置合わせ結果からも確かめることができる。TEM 像に含まれるノイズは再構成像、そして相関分布に影響を及ぼす。これについては現在調査中だが、シミュレーションではノイズが存在したとしてもピークプロファイルは変形してしまうものの、位置合わせが可能であることを示唆している。また、実験に用いた酵母細胞の傾斜シリーズ像や TiN-Ag 複合ナノ粒子にも当然ながらノイズは含まれている。

本手法はより高い傾斜角度、そしてより厚い試料であっても信頼性が高い。これは、位置合わせに断層ボリュームデータを用いることで、構造物の 3 次元的な位置情報が計測に用いられているからである。しかし、全ての傾斜像について位置ずれが存在する場合、後者の断層ボリュームも位置ずれによって不鮮明になっており、一度の位置合わせでは高精度にならない。従って本手法は位置合わせを反復して行う必要がある。それによって膨大な処理時間を要するが、断層ボリュームを直接評価することは位置合わせに有利である。図 3.3 を見ると  $y_s$  成分の位置合わせの方が  $x_s$  成分の位置合わせよりも精度が高いことがわかる。我々の断層ボリューム相関法

は傾斜シリーズ像に基づいている。y 軸傾斜の単軸トモグラフィでは投影像間の差異が x 軸方向に現れるため、この差異が誤差の主要な原因であると考えられる。

原理的に、画像相関法に基づく位置合わせ法は傾斜軸位置を直接探索する機能を持たないが、本手法は金微粒子や特徴点追跡を用いることなく画像処理によって傾斜軸探索を可能とした。探索には傾斜像の位置合わせに類似した 3 次元相関法を用いる。図 2.2 に示される手順によって、傾斜シリーズから偶数番号と奇数番号の 2 つの断層ボリュームを作成し、相関演算を行った。理想的には、この 2 つの断層ボリュームは同等である。傾斜軸位置がずれると、それぞれの断層ボリュームデータにアーク状の偽像が生じ、その結果 2 つの断層ボリュームデータに差異が生じる。二つの断層像  $I_1()$  と  $I_2()$  は傾斜角度の異なる ( 偶数と奇数 ) 傾斜シリーズ像から再構成される。ここで、単純に点を再構成することを考える。傾斜軸が正しい位置で再構成された場合は、全ての逆投影像は一点に集中し、 $I_1()$  と  $I_2()$  間の差異は非常に僅かである。しかしそうでない場合は、断層像はアーク状にぼやけた像になるが、このとき傾斜角度が異なるため  $I_1()$  と  $I_2()$  間でアーク状の偽像に若干の差異が生じる。傾斜軸位置が逸脱するに従ってこの影響が大きくなり、そのとき、相互相関演算 [ 式 (3.5) ] によって傾斜軸位置を検出することができる。

傾斜軸の移動量  $X_s$  は、シミュレーションと 2 つの実験で  $R_{NCC}$  分布のピーク位置 ( 図 3.4 、 図 4.1 及び 図 4.5 ) からおよそ 1 画素の精度で正しく測定された。位置合わせされた断層像はアーク状の偽像が消え、 $X_s$  の正確さが視覚的にも確かめられた。傾斜軸探索に関するシミュレーション ( 図 3.4 ) では、得られた  $X_s$  は設定値と 3 画素程度異なっていた。これは傾斜シリーズの位置合わせの不完全さ ( 図 3.3 ) から起こることであり、傾斜軸の位置はこの不完全さを補正するように数画素移動したと解

積した。実際、位置合わせ前後の X-Z 断層像を比較すれば適切であったことが分かる。

$\theta$  も、シミュレーションと 2 つの実験で正しく測定されたが、 $\theta$  の関数としての  $R_{NCC}$  測定においてこれが  $\theta = 0^\circ$  付近で著しく減少する問題が起こった。本手法の探索可能性は相関に用いる  $I_1(X,Y,Z)$  と  $I_2(X,Y,Z)$  の差異に依存した。 $I(X,Y,Z)$  は式 (2) (3) によって計算されたが、これは実質的に回転計算のため、補間処理 (線形補間を用いた) が行われた。補間処理は断層ボリュームに若干のスムージング効果を与えたが、 $\theta = 0^\circ$  では補間処理が行われず、更に TEM 像にはノイズが存在していたためボリューム間の差異が比較的大きくなった。この現象は  $\theta$  が  $0^\circ$  から特定の角度まで離れば弱まったため、測定においては事前に傾斜シリーズを十分な角度に回転させておくことで回避することができた。

$\theta$  の精度に関して、本手法では次のような理由で  $0.1^\circ$  の精度を得ることが難しい。微小な回転角度  $\Delta\theta$  のとき外側の画素の回転変換を単純に  $L\Delta\theta$  ( $L$  は原点からの距離 (画素値)) とすると、 $1024 \times 1024$  画素サイズの画像で  $0.1^\circ$  のずれは 1 画素にも満たない。従って、これが  $\theta$  に関してシミュレーション (図 3.4) と実験 (図 4.1、図 4.5) の結果で示されるように  $0.1^\circ$  度の精度が低い主要な原因であると考えた。本手法の精度はマーカー法に及ばないかもしれないが、実用にふさわしい精度で自動処理が行えるという点で有利である。更に、マーカーを利用しない手法と比較すると、本手法は容易で、特別な画像分析 (たとえば特徴点抽出と追跡) を必要としない。位置合わせと傾斜軸探索が断層像の像質が最も高くなるよう直接計測されるので、本手法によって得られる調整結果はより信頼できる。この断層ボリューム相互相関法は他の調整 (例えば回転補正、倍率補正や傾斜角度補正) にも用いることができると

考えている。現在の手法では領域を制限して相互相関を計算しているが、領域をさらに局所的 (例えば構造物などのエッジ) に限定すれば相関感度が更に改善できると考えている。

## 7.2 自動視野追跡

従来の画像相関に基づく手法に代わり、新しい自動視野追跡法を提案した。現状では、TEM/STEM に付属しているトモグラフィ機能の大多数で自動追跡に何らかの画像相関法を用いている。ここでは比較のために位相限定相関法 (PCF) [29-31,35] を用いた。通常このような調整には XCF が用いられるが、これに代わる手法として PCF も高精度の画像位置合わせ法であることはよく知られている。

図 7.1 及び 図 7.2 で、金微粒子と酵母細胞の高傾斜角度の追跡において PCF と我々の手法の比較を示した。(図 7.1(c) と 図 7.2(c) に示したように XCF のピークプロファイルは予想通り非常に鈍く、これはトモグラフィの視野追跡には適さないことを示している。) 図 7.1(c) に示した PCF のピークプロファイルは歪み、不規則な形状を示した。これは、投影像のパターンが  $68^\circ$  (図 7.1(a)) と  $70^\circ$  (図 7.1(b)) の多くの場所で大きく変化したからである。一方、図 7.1(d) に示した我々の手法のピークプロファイルは、より鮮明で単純な形状であった。酵母細胞への応用実験では、図 7.2(d) に示すように、断層像の厚みを  $T = 32$  画素に設定した場合 (i.e. できるだけ小さく設定した) のピークプロファイルは図 7.2(e) の  $T = 128$  画素のものより鋭くなった。そのため傾斜刻み角度が非常に大きかった ( $8^\circ$ ) としても視野追跡を正確に行うことができた。対照的に図 7.2(c) に示すように、PCF のピークプロファイルは非常

に劣悪で、傾斜時のパターン変化 (図 7.2(a) と図 7.2(b) 間) の影響を大きく受けていた。

図 7.3 は従来法の画像相関に基づく手法と本手法との違いを示す。図 7.3(a) と (b) は、互いに隣接する高傾斜角度の TEM 像 ( $-58^\circ$  と  $-60^\circ$ ) を示している。図 7.3(c) は、(a) 中に示される破線に沿った X-Z 断層面である。加えて、図 7.3(d) 及び (e) はそれぞれ  $-58^\circ$  と  $-60^\circ$  の逆投影線像と (c) を重ねた図である。図 7.3(f) は(d) と (e) を重ねた図である。

画像相関法に基づく追跡方法では、構造物が上層面と下層面に大きく離れて存在しているとき、図 7.3(c) 中で  $\alpha$  と  $\beta$  で示される 2 つの金微粒子のように、投影像上では小さな傾斜 (この場合  $-58^\circ$  から  $-60^\circ$ ) で構造物の位置が大きく変化する (図 7.3(a)(b)(d)(e) の①と②に 2 つの金微粒子の距離が示されている) ので正しい位置合わせを行うのは非常に難しくなる。対照的に、新しい手法は逆投影線をマッチングに用いているため、試料が傾斜しても構造物の 3 次元位置を一貫して追跡することができる。図 7.3(f) に示すように (d) と (e) の逆投影線像は実際の物体のある 3 次元位置でマッチングされた。図 7.3(f) 中で興味深いのは、2 つの逆投影線像が金微粒子の位置で完全に一致し距離が離れると線が広がっていたことである (図 7.3(f) のアローヘッドを参照)。電子線トモグラフィにおいて、投影像は平行投影によって形成され、逆投影線像もまた平行投影によって演算される。従って逆投影線像を用いたマッチングでは、断層像の厚み内で構造物を含むよう適切に  $T$  が設定されれば、間違いなく二つの逆投影線像は構造物が存在する唯一の位置で合致する。これは傾斜軸が断層ボリュームデータにおける Z 軸上の中央に位置することを意味する。

逆投影線と垂直方向のラインプロファイルは、FBPにおいて高周波フィルタによって強調される。従って、図 5.1(d) から (i) で示すようにピークは非常に鋭く、高精度であった。逆投影像が常に線状の像を形成するため、酵母細胞の実験で検証した通り (図 5.3 及び 図 7.2 を参照)、サンプルに依存しない高精度な視野追跡が実現した。

我々の追跡法は基本的に現在の逆投影線像と次の逆投影線像のマッチングを連続して行うため、追跡精度と試料ドリフトに起因する累積誤差が問題となる。しかし表 2.1 に示したように相関範囲の厚み  $T$  と傾斜刻み角度  $\Delta\phi$  が適切に設定されていれば、累積誤差は非常に僅かであると推定できる。我々は、これを第 3 章のシミュレーションモデルを用いて調査を行った。追跡結果を図 7.4 に示す。この結果から、最大傾斜角度付近の一部分を除く全ての傾斜角度で、視野追跡が完璧に行われた。

更に、自動視野追跡の精度を定量評価するため、Fourier Ring Correlation (FRC) を用いて再構成された断層像の分解能測定を行った [43]。FRC とは完全同一視野の 2 枚の画像を用い、微小周波数領域毎に位相情報に関する相関を求める方法である。完全同一画像のため情報を持っている周波数の相関係数は多少ノイズの影響はあるが 1 となるはずである。しかし、情報を持たない周波数領域の相関係数は 1 より低下する。以下に FRC の式を表す。

$$\text{FRC}(k, \Delta k) = \frac{\text{Re}\{\sum_{[k, \Delta k]} F_1(k) F_2^*(k)\}}{\left|\sum_{[k, \Delta k]} |F_1(k)|^2 \sum_{[k, \Delta k]} |F_2(k)|^2\right|^{1/2}} \quad (7.1)$$

但し、 $k$  は空間周波数、 $\Delta k$  は微小空間周波数帯域、 $F_1$  及び  $F_2$  は同一視野画像のフーリエ変換であり、 $\text{Re}$  は実部を示している。FRC の評価は、位置合わせされた連続傾斜像を偶数と奇数のグループに分割して再構成された 2 つの断層ボリュームから、

それぞれ厚み方向  $Z$  における中央の  $X$ - $Y$  断層面を抽出し、2次元像を用いて計測を行った。このときミッシング・ウェッジにより情報が欠落した部分を演算から除外した。図 7.5 に逆投影線像相関法による自動追跡結果と PCF による位置合わせ結果の比較を示す。(a) は図 4.1 のシミュレーションモデルにおける、断層ボリューム相関法、逆投影像相関法それぞれの位置合わせ結果の比較である。両手法ともオリジナルの断層像とほぼ同等の分解能を復元できていることが分かる。(b) は金微粒子試料、(c) は酵母切片試料における本手法による自動追跡結果と PCF による位置合わせ結果の比較である。この結果からも本手法の方が分解能が明らかに向上しており、より精度よく追跡できることを示している。

なお、撮影中の試料ドリフトは累積誤差を生じさせるため深刻な問題である。我々の経験では、試料ドリフトによる僅かな位置ずれが撮影の度に繰り返されるため(傾斜によってドリフト方向が変わる)、この種の累積誤差は断層像に若干のアーチ状の偽像を生じさせる。従って、このような状況では、試料ドリフトを止めるための対策を別途講じるか、撮影後のオフライン調整が必要になる場合がある。

本手法による視野追跡は  $0^\circ$  の投影像を基準とし、かつ逆投影の際に傾斜軸位置の中央からのずれ量  $X_s$  を 0 画素と仮定して位置合わせを行うため、仮に  $X_s$  がずれていたとしてもそれを補正するように視野追跡が行われる。従って、標準試料等を用いて傾斜軸の回転量  $\theta$  を事前に調べておけば撮影後の傾斜軸探索が不要となった。その結果撮影後の処理が不要になり、トモグラフィの手順が大幅に簡素化された。調整を要する他の項目に投影像の回転補正と倍率補正、傾斜角度補正などが考えられるが、これらも本手法の応用によってオンライン補正が可能となることが期待できる。

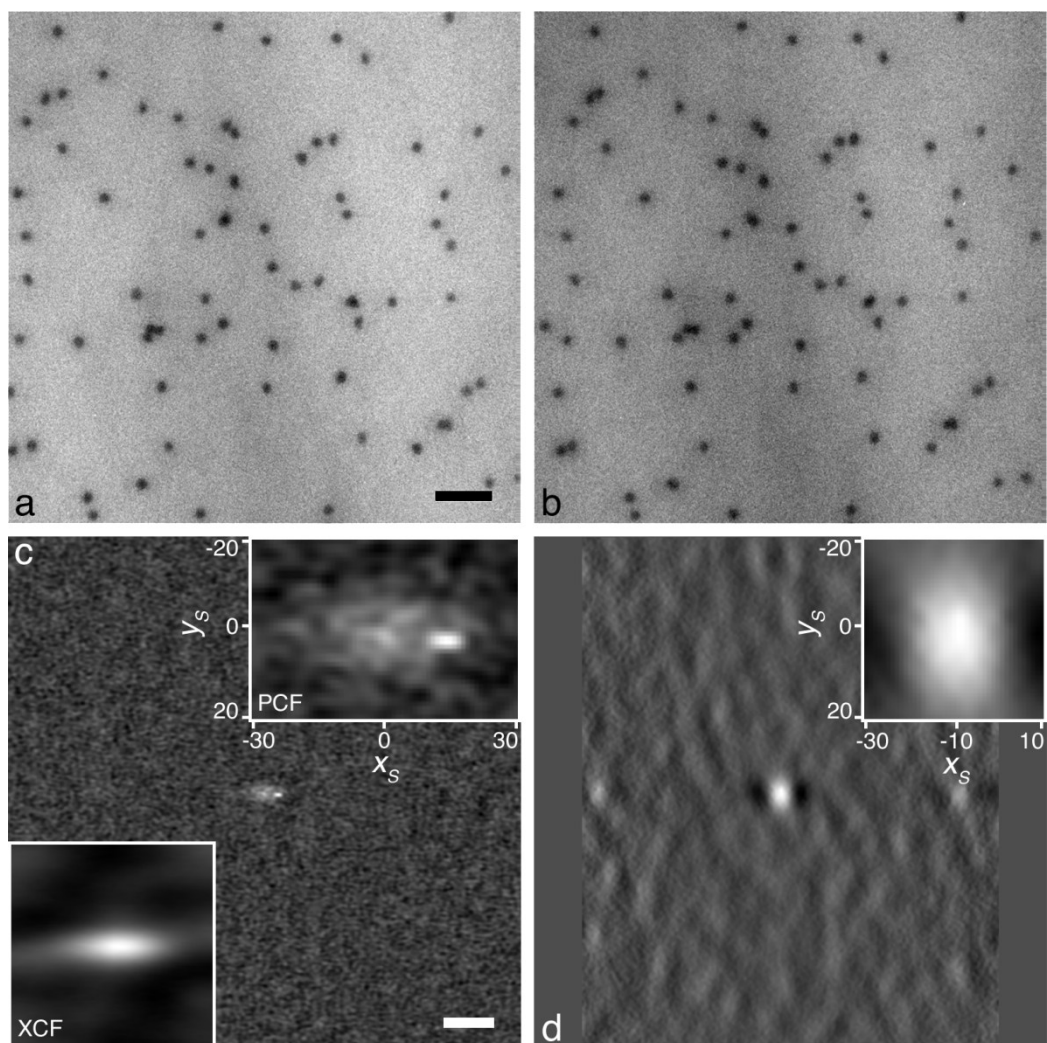


図 7.1. 金微粒子を付着した樹脂切片における本手法と従来の画像相関法による視野追跡結果の比較。(a,b):  $-68^\circ$  と  $-70^\circ$  の高傾斜 TEM 像。スケールバー:  $0.5\mu\text{m}$ 。(c,d): (a,b) 間の相関分布。(c) は XCF と PCF、(d) は本手法。それぞれピーク付近を拡大表示した。スケールバー: 50 画素。



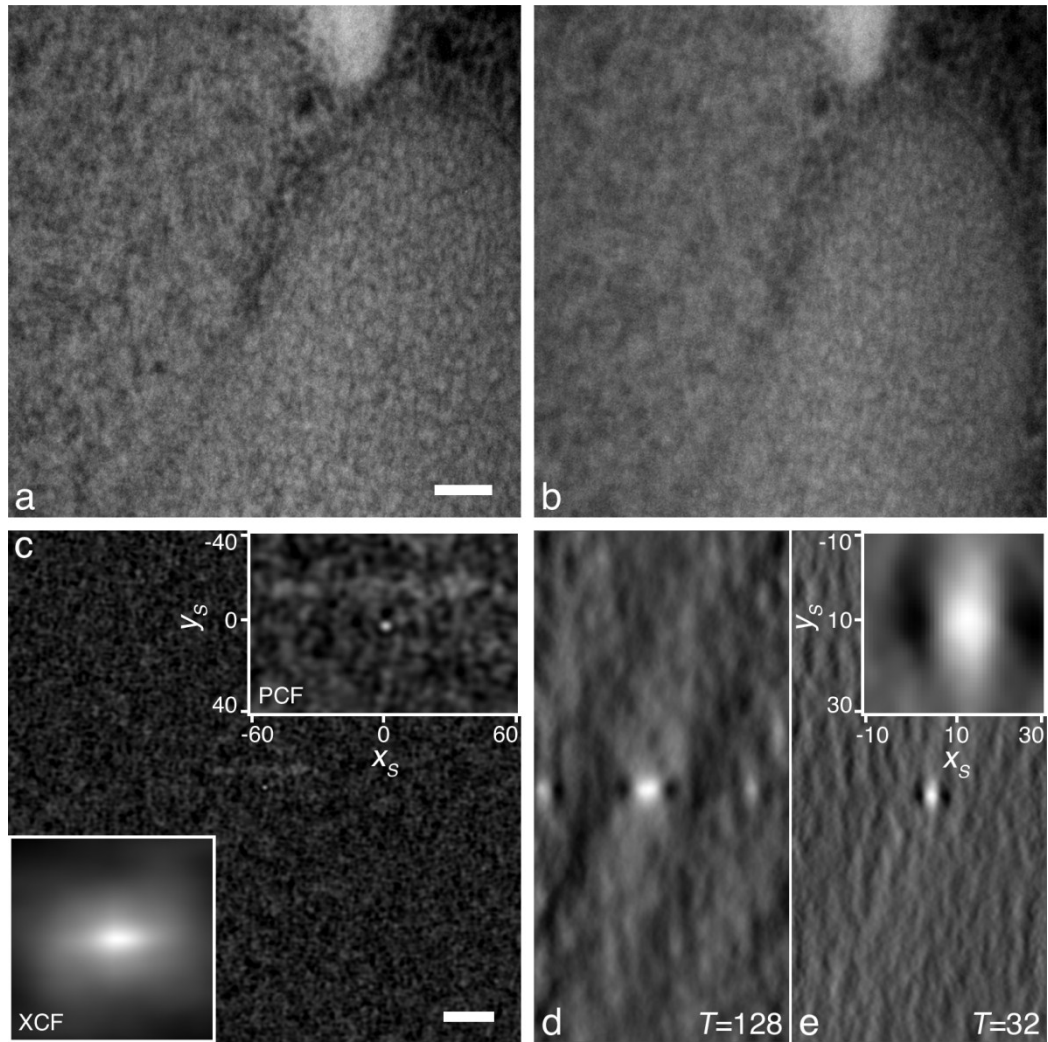


図 7.2. 酵母細胞における本手法と PCF に基づく手法による視野追跡結果の比較。

(a,b):  $-56^\circ$  と  $-64^\circ$  の高傾斜 TEM 像。スケールバー:  $0.5\mu\text{m}$ 。 (c-e): (a,b) 間の相関分布。 (c) は XCF と PCF、 (d) は本手法 (断層像の厚さ  $T = 128$  画素)。 (e) は (d) と同様に  $T = 32$  画素。それぞれピーク付近を拡大表示した。スケールバー: 50 画素。

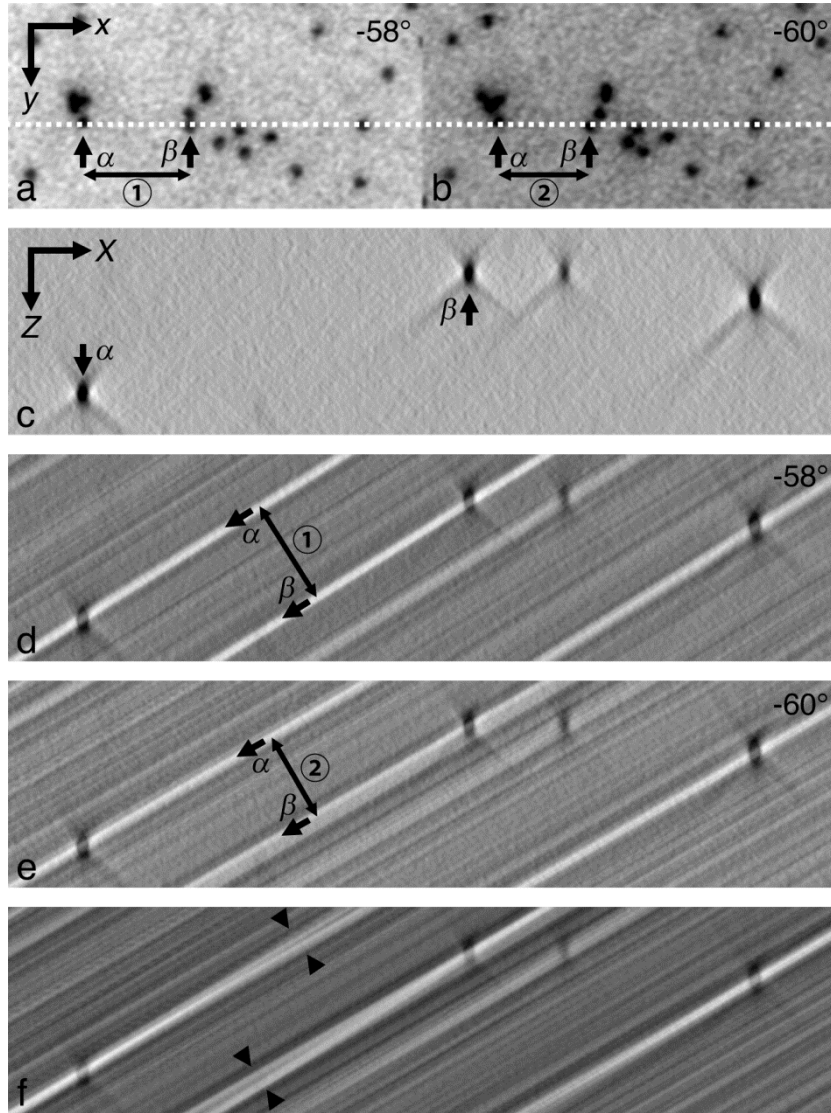


図 7.3. 他の画像相関に基づく手法との差異を示した図。(a,b):  $-58^\circ$  と  $-60^\circ$  の高傾斜 TEM 像の一部。試料は金微粒子に覆われた樹脂切片。(c): (a,b) 中の破線に沿った X-Z 断層面。スケールバー: 50nm。(d,e): (d) は (a)、(e) は (b) の逆投影線像を (c) に重ねた図。(f): (d) と (e) を重ねた図。

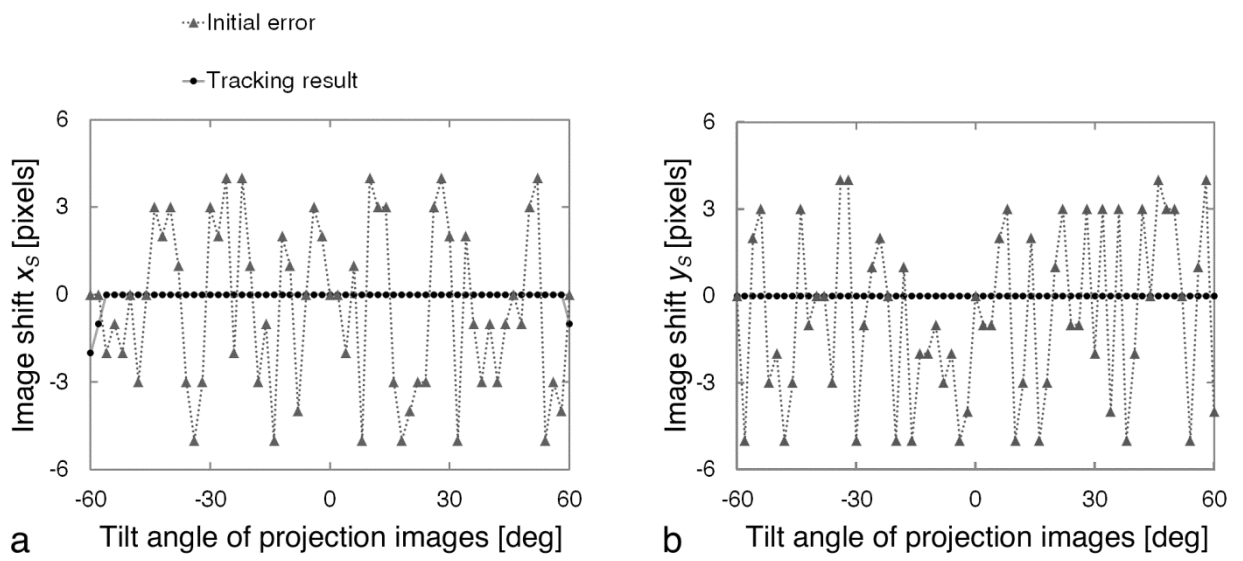


図 7.4. 4.1 で作成したモデルを用いた追跡精度の検証結果。横軸は投影画像毎の傾斜角度、縦軸については (a) は  $x_s$  成分、(b) は  $y_s$  成分の誤差を示す。

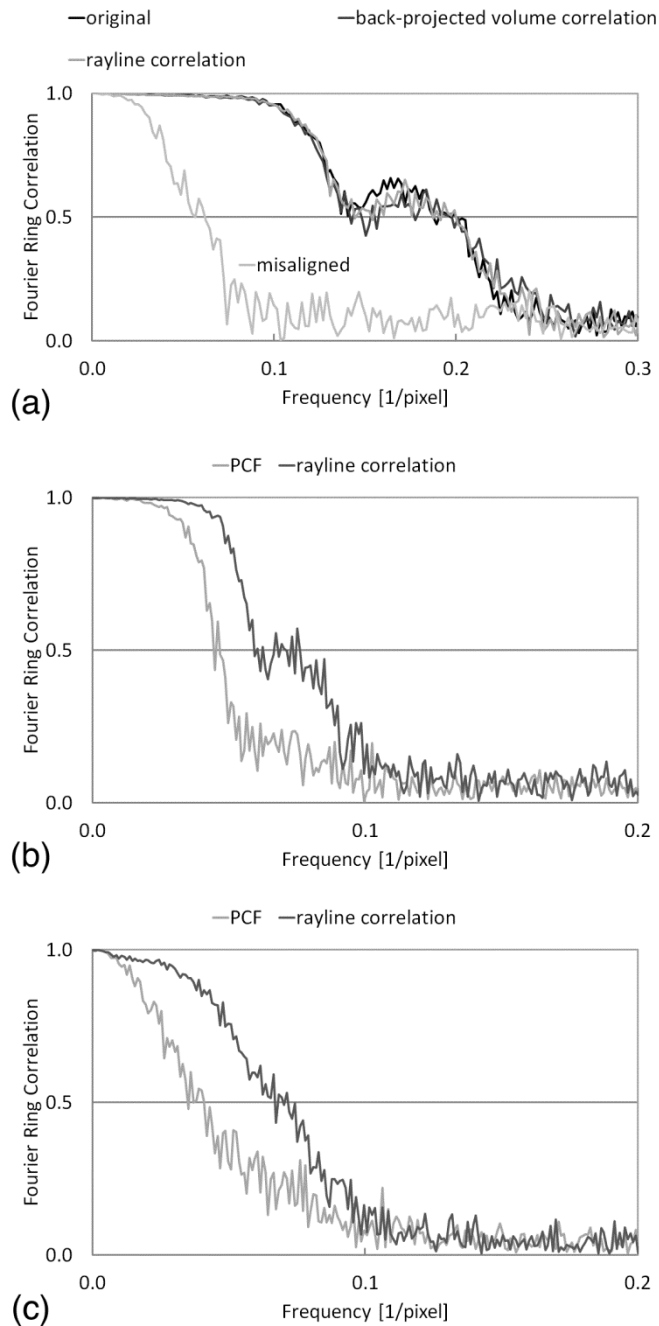


図 7.5. 2 つに分割した断層像における FRC の測定結果。(a): 断層ボリューム相関法、逆投影像相関法それぞれの位置合わせシミュレーション結果 ( 図 4.1 のモデル ) の比較。(b): 金微粒子試料の、傾斜角度  $2^\circ$  刻みの自動追跡結果における逆投影線像相関法と PCF の比較。(c): 同様に酵母切片試料の、傾斜角度  $8^\circ$  刻みの自動追跡結果における比較。(b,c) は 1 画素あたり 0.95 nm。

## 第 8 章 結論

我々は傾斜シリーズ像の新しい位置合わせ法と傾斜軸探索法、及び撮影中の自動視野追跡法を提案した。本手法はマーカーも試料のローカルな特徴点も必要なく、自動で行うことができる。

位置合わせと傾斜軸探索は 2 つの断層ボリュームデータ間の 3 次元相互相関を用い、それが最大となるパラメータを探索することで行われる。一方は位置合わせを行う投影像を逆投影した断層ボリュームデータ、他方はそれを除く全投影像を再構成したボリュームである。傾斜軸探索においては、偶数番号と奇数番号に分割したそれぞれの傾斜シリーズ像から再構成した断層ボリュームデータである。計算時間が膨大だが断層像から直接評価でき、信頼性が高い。我々はこれをシミュレーションと実験から確かめた。

自動視野追跡は、傾斜角度が隣接する 2 つの逆投影線像から同様に 3 次元相互相関を用いて行われる。逆投影線像を検討した結果、厚み  $T$  と傾斜刻み角  $\Delta\phi$  を適切に設定すれば、相互相関によって確実に構造物の 3 次元的位置を追跡できることが分かった。これによって従来の画像相関に基づく手法の欠点を克服し、加えて、本手法は容易であり、3-D FFT 及び IFFT が用いられるため、処理を高速で行える。TEM を用いたオンライン自動視野追跡実験によって本手法の確実性が確認された。さらに、最後の視野追跡を終了した時点で位置合わせされた 3 次元断層像が得られるため撮影後の位置合わせ処理が不要である。この効率性はユーザにとって非常に有利な点である。

ここで開発された手法の応用の仕方について述べる。新たに提案した自動視野追跡は1回の追跡が数秒で行える(処理時間は試料の厚さに依存する)ため非常に効率性に優れる反面、追跡演算において予め傾斜軸の回転ずれ $\theta$ が既知でなくてはならない。このため $\theta$ を事前に計測しておく必要がある。現在の一般的なユーセントリックゴニオメータステージは試料ホルダーの出し入れによる $\theta$ の変動がほとんどなく、一旦 $\theta$ を計測すればその値を継続して用いることができる。すなわち、何らかの標準試料を用いて、新たに提案した手法による位置合わせと傾斜軸探索を行い $\theta$ を事前に計測しておけば、新たに提案した自動視野追跡の高い精度と効率性を十分に発揮することができる。

また、次のような利用の仕方も考えられる。すなわち、大きな角度刻みによる自動追跡法の応用である。生物切片の追跡実験では $8^\circ$ という通常よりかなり大きな刻み角度でも自動追跡が出来、再構成も正確に行われた。このことは実験の効率を大きく改善し、つまり、良くシステムが調整されていれば、数分で低分解能のトモグラフィーを観察できるため、研究目的部分の実用的な3次元視野探しも可能になる。さらには、将来、動的観察やその場観察へのトモグラフィー応用も夢ではなくなる。

ここで課題についても言及する。再構成された断層像を劣化させる主な要因として、各投影像の位置ずれと傾斜軸位置のずれの他に、試料傾斜やフォーカシングによる微妙な像回転や倍率変動、及び電子線損傷による試料の変形歪みなどが挙げられる。新たに提案した自動視野追跡法によってオンライントモグラフィーが可能となったが、現状ではこれらには対応できないため、これらの影響が大きい場合にはやはり撮影後の精密な画像調整が必要となる。しかしながら、断層ボリューム相関法

と逆投影線像相関法は断層像を直接評価するため、原理的にはそれらのパラメータを補正することも可能である。従って、今後の課題としては、これらパラメータの自動補正が挙げられよう。

これらによって真のオンライントモグラフィが実用化され、トモグラフィの処理効率が大幅に改善されることが期待される。

また、現行の TEM/STEM では、特殊な試料ホルダーを除いては試料の  $\pm 90^\circ$  傾斜ができないため、ミッシング・ウェッジの影響を回避できない。この影響を軽減するため、 $x$  軸と  $y$  軸で傾斜する 2 軸傾斜トモグラフィが主流となっている。従って、それぞれの軸で傾斜したトモグラフィを積算する際に位置合わせや倍率変動、断層像の歪み等の自動補正を包括的に行える手法が更なる処理効率の向上に不可欠である。本開発の手法を更に発展させ 2 軸傾斜トモグラフィの自動補正にも応用したい。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり多大なご指導ご助力をいただきました、指導教官である本学の馬場則男教授、並びに、本研究において、生物切片試料及び金微粒子試料について試料のご提供、ご指導いただきました本学総合研究所の馬場美鈴博士、透過型電子顕微鏡の構造や仕様に関してお教え下さいました小笠原光雄氏に謹んで感謝の意を表します。

本論文作成にあたってご指導ご助力いただきました本学の於保英作教授、鷹野一朗教授、大阪大学の鷹岡昭夫名誉教授に謹んで感謝の意を表します。

第 4 章において、TiN-Ag 複合ナノ粒子の実験にあたっては九州大学の金子賢治先生より試料をご提供いただきました。生物切片試料の撮影にあたっては大阪大学 300kV H-9560SD ( 阪大複合機能ナノファウンダリ ) を、演算にあたっては東京大学情報基盤センター PRIMEHPC FX10 (Oakleaf-FX) を使用させていただきました。ここに感謝の意を表します。



## 参考文献

1. Radon, J (1917) Über die Darstellung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Math-Phys.* **69**: 262-277.
2. Cormack, A M (1963) Representation of a Function by Its Line Integrals, with Some Radiological Applications. *J.Appl. Phys.* **34**: 2722-2727.
3. Hounsfield, G N (1973) Computerized transverse axial scanning (tomography): Part 1. Description of system. *British J. Radiology* **46**: 1016-1022.
4. Klug, D, and De Rosier, D J (1966) Optical Filtering of Electron Micrographs: Reconstruction of One-Sided Images. *Nature* **212**: 29-32.
5. 馬場則男 (2004) 電子線トモグラフィー再構成の原理 . *顕微鏡* **39**: 4-10.
6. 金子賢治 , 馬場則男 , 陣内浩司 (2010) 電子線トモグラフィー法 その 2: 課題と応用例 . *顕微鏡* **45**: 109-113.
7. 岩崎憲治 (2004) 生体高分子系のトモグラフィー . *顕微鏡* **39**: 18-21.
8. Takaoka A, Hasegawa T, Yoshida K, and Mori H (2008) Microscopic tomography with ultra-HVEM and applications. *Ultramicroscopy* **108**: 230–238.
9. 小上祐一郎 (2005) 電子線トモグラフィーにおける傾斜軸検索と位置ずれ補正の画像処理手法に関する研究 . *工学院大学修士論文*.
10. 馬場則男 (2007) トモグラフィーの数学的基礎 . *日本顕微鏡学会研究部会講演会予稿集* , pp. 1-4.
11. 馬場則男 (2004) 電子線トモグラフィー . *蛋白質 核酸 酵素* **49**: 1601-1606.

12. 古河弘光 (2007) なぜ電子線トモグラフィーでは軸合わせが必要なのか . *日本顕微鏡学会研究部会講演会予稿集*, pp. 9-11.
13. Mastronarde, D N (2006) Fiducial Marker and Hybrid Alignment Methods for Single- and Double-axis Tomography. In: Frank, J (ed.), *Electron Tomography*, Second Edition, pp. 163-185 (Springer, New York).
14. Brandt, S (2001) Multiphase Method for Automatic Alignment of Transmission Electron Microscope Images Using Markers. *J. Struct. Biol.* **133**: 10–22.
15. Amat, F, Moussavi, F, Comolli, L R, Elidan, G, Downing, K H, and Horowitz, M. (2008) Markov random field based automatic image alignment for electron tomography. *J. Struct. Biol.* **161**: 260–275.
16. Cao M, Takaoka A, Zhang H B, and Nishi R (2011) An automatic method of detecting and tracking fiducial markers for alignment in electron tomography. *J. Electron Microsc.* **60(1)**: 39-46.
17. Frank, J, and McEwen, B F (1992) Alignment by cross-correlation. In: Frank, J (ed.), *Electron Tomography*, pp. 205-213 (Plenum Press, New York).
18. Brandt, S (2006) Markerless Alignment in Electron Tomography. In: Frank, J (ed.), *Electron Tomography*, Second Edition, pp. 187-215 (Springer, New York).
19. Winkler, H, and Taylor, K A (2006) Accurate marker-free alignment with simultaneous geometry determination and reconstruction of tilt series in electron tomography. *Ultramicroscopy* **106**: 240–254.
20. Brandt, S, Heikkonen, J, and Engelhardt, P (2001) Automatic Alignment of Transmission Electron Microscope Tilt Series without Fiducial Markers. *J. Struct. Biol.* **136**: 201-213.
21. Brandt, S, and Ziese, U (2005) Automatic TEM image alignment by trifocal geometry. *J. Microsc.* **222**: 1-14.

22. Sorzano, C O S, Messaoudi, C, Eibauer, M, Bilbao-Castro, JR, Hegerl, R, Nickell, S, Marco, S, and Carazo, J M (2009) Marker-free image registration of electron tomography tilt-series. *BMC Bioinformatics*. **10**: 1-11.
23. Zheng S Q, Sedat, J W, and Agard, D A (2010) Automated Data Collection for Electron Microscopic Tomography. *Methods in Enzymol.* In: Jensen, G J (eds.), *Cryo-EM, Part A*, vol.481, pp. 284-315 (Elsevier, Sandiego, CA, USA).
24. Tomonaga S, Kato D, Baba M, and Baba N (2013) An Alternative Image Alignment Method Based on Reconstructed Cross-section Image Correlations. *Microscopy and Microanalysis 2013 Meeting*, PD-3.
25. Tomonaga S, Baba M, and Baba N (2014) Alternative automatic alignment method for specimen tilt-series images based on back-projected volume data cross-correlations. *Microscopy* (doi: 10.1093/jmicro/dfu014).
26. Tomonaga S, Baba M, Yamazaki S, and Baba N (2014) A new field-of-view auto tracking method for online tomography reconstruction based on back projected ray image cross-correlation. *Microscopy* (doi: 10.1093/jmicro/dfu021).
27. Baba N, Satoh H, and Nakamura S (1993) Serial section image reconstruction by voxel processing. *Bioimages* **1**: 105.
28. Sandberg, K, Mastronarde, D N, and Beylkin, G (2003) A fast reconstruction algorithm for electron microscope tomography. *J. Struct. Biol.* **144**: 61-72.
29. Kuglin, C D and Hines, D C (1975) The phase correlation image alignment method. *Proc. of IEEE Int. Conf. on Cybernet. and Soc.*, pp. 163-165.
30. Tsuneta R, Koguchi M, Nakamura K, and Nishida A (2002) A specimen-drift-free EDX mapping system in a STEM for observing two-dimensional profiles of low dose elements in fine semiconductor devices. *J. Electron Microsc.* **51(3)**: 167-171.
31. 下田浩記 (2008) 電子線 CT における連続傾斜像の位相相関および “common

line” 法による位置合わせ . 工学院大学修士論文.

32. Frank, J (1996) *Three-dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*, pp. 202-210 (Academic Press, San Diego).
33. Murray, G (2013) Rotation about an arbitrary axis in 3 dimensions. <http://inside.mines.edu/~gmurray/ArbitraryAxisRotation/ArbitraryAxisRotation.html>.
34. Turner, J N, and Valdre, U (1992) Tilting stages for biological applications. In: Frank, J (ed.), *Electron Tomography*, pp. 167-196 (Plenum Press, New York).
35. Saxton, W O (1978) *Computer Techniques for Image Processing in Electron Microscopy*, pp. 185-248 (Academic Press, New York).
36. Baba M (2008) Electron microscopy in yeast. Methods in Enzymol. In: Klionsky, D J (ed.), *Autophagy: Lower eukaryotes and Non-mammalian systems, Part A*, vol.451, pp. 133-149 (Elsevier, Sandiego).
37. Liu Y, Penczek, P A, McEwen, B F, and Frank, J (1995) A marker-free alignment method for electron tomography. *Ultramicroscopy* **58**: 393–402.
38. Midgley, P A, and Weyland, M (2003) 3D electron microscopy in the physical sciences: the development of Z-contrast and EFTEM tomography. *Ultramicroscopy* **96**: 413–431.
39. Baba M, Suzuki M, Tomonaga S, Ogasawara M, Kamada Y, and Baba N (2012) Morphological analysis of the intracellular structures in *atg* mutants. *The 6th International symposium on Autophagy 2012 (Okinawa, Bankoku Shinryokan)*, pp. 77.
40. Kaneko K, (2011) Characterization of Crystalline Materials by Electron Tomography. *J. the Vacuum Society of Japan* **54**: 253-255.

41. Kitawaki K, Kaneko K, Inoke K, Hernandez-Garrido, J C, Midgley, P A, Okuyama H, Uda M, and Sakka Y (2009) Fabrication and characterization of TiN-Ag nano-dice. *Micron* **40**: 308-312.
42. Sakka Y, and Ohno S (1996) Hydrogen sorption-desorption characteristics of mixed and composite Ni TiN nanoparticles. *Nanostruct. Mater.* **7**: 341-353.
43. Frank, J (1996) *Three-dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*, pp. 110-123 (Academic Press, San Diego).

#### 研究業績

#### 審査付論文

1. Tomonaga S., Baba M., and Baba N., “Alternative automatic alignment method for specimen tilt-series images based on back-projected volume data cross-correlations”, *Microscopy* (doi: 10.1093/jmicro/dfu014) 2014
2. Tomonaga S., Baba M., Yamazaki S., and Baba N., “A new field-of-view auto tracking method for online tomography reconstruction based on back-projected ray image cross-correlation”, *Microscopy* (doi: 10.1093/jmicro/dfu021) 2014
3. Isakozawa S., Tomonaga S., and Baba N., “High precision image-drift-correction method for EM images with a low signal to noise ratio”, *Microscopy* (doi: 10.1093/jmicro/dfu016) 2014

#### 研究発表

#### 【国際会議】

1. Baba M., Suzuki M., Tomonaga S., Ogasawara M., Kamada Y., and Baba N., “Morphological Analysis of the Intracellular Structures in *atg* Mutants”, *The 6th International symposium on Autophagy (Okinawa, Bankoku Shinryokan)* 2012, p.77, (29th, 30th Oct 2012)
2. Tomonaga S., Kato D., Baba M., and Baba N., “An Alternative Image Alignment Method Based on Reconstructed Cross-section Image Correlations”, *Microscopy and Microanalysis 2013 Meeting (Indiana convention center)*, PD-3, (5th Aug 2013)  
[http://www.microscopy.org/MandM/2013/late\\_poster\\_sessions.cfm](http://www.microscopy.org/MandM/2013/late_poster_sessions.cfm)

#### 【国内学会】

1. 西原佑祐、中村新、友永祥彦、馬場則男、“微小位相シフト自己相関法によるオートチューニング”、日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 ( 仙台国際センター)、P-I11、(2009 年 5 月 26 日)
2. 中村新、西原佑祐、友永祥彦、馬場則男、“微小位相シフト自己相関関数による電子顕微鏡の非点収差補正”、日本顕微鏡学会関東支部第 34 回講演会 ( 帝京大学医学部板橋キャンパス)、p.92、(2010 年 3 月 20 日)
3. 西原佑祐、中村新、友永祥彦、馬場則男、“微小位相シフト自己相関関数による電子光学パラメータの測定”、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会 ( 名古屋国際会議場)、p.198、(2010 年 5 月 24 日)
4. 友永祥彦、砂子沢成人、馬場則男、“位相相関の改良による低 S/N ドリフト画像の位置合わせ法”、日本顕微鏡学会関東支部第 35 回講演会 ( 東京大学本郷キャンパス武田先端知ビル)、p.50、(2011 年 3 月 5 日)

5. 友永祥彦、西原佑祐、久保貴、馬場則男、“微小位相シフト自己相関関数によるポイントオートフォーカシング”、日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会 (福岡国際会議場)、p.254、(2011 年 5 月 16 日)
6. 蒼田亮、笹島洋輔、友永祥彦、馬場則男、牛木辰男、“位相シフト位相相関法による高精度 SEM ステレオ視差立体計測法”、日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会 (福岡国際会議場)、p.257、(2011 年 5 月 16 日)
7. 友永祥彦、砂子沢成人、馬場則男、“位相相関法の改良による低 S/N ドリフト画像の高精度位置合わせ法”、日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会 (福岡国際会議場)、p.263、(2011 年 5 月 16 日)
8. 友永祥彦、加藤大貴、馬場美鈴、馬場則男、“従来法に代わる断層像画質評価に基づく投影像の位置合わせ法”、日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会 (つくば国際会議場)、p.193、(2012 年 5 月 14 日)
9. 加藤大貴、友永祥彦、布施太嗣、馬場則男、“3 次元断層データ相関法による連続投影像の位置合わせ法”、日本顕微鏡学会関東支部第 37 回講演会 (東京大学本郷キャンパス山上会館)、p.45、(2013 年 3 月 6 日)
10. 馬場美鈴、友永祥彦、鈴木雅斗、加藤大貴、馬場則男、“酵母細胞の phagophore 膜形成に關与する新規膜構造体の検出”、日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会 (ホテル阪急エキスポパーク)、20-P47、(2013 年 5 月 20 日)
11. 友永祥彦、加藤大貴、馬場美鈴、馬場則男、“従来法に代わる断層像相関法に基づく投影像の位置合わせ法”、日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会 (ホテル阪急エキスポパーク)、21-P01、(2013 年 5 月 21 日)
12. 岡田拓也、佐藤晴彦、友永祥彦、馬場則男、牛木辰男、“連続試料傾斜による高精度 SEM ステレオ視差立体計測法”、日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会 (ホテル阪急エキスポパーク)、21-P03、(2013 年 5 月 21 日)

13. 布施太嗣、友永祥彦、久保貴、砂子沢成人、馬場則男、“電顕像高精細自己  
相関関数によるオートチューニング”、日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会  
(ホテル阪急エキスポパーク)、21-P16、(2013 年 5 月 21 日)
14. 杉本健太、友永祥彦、馬場美鈴、馬場則男、“高精細位相シフト PCM による  
倍率等の投影像シリーズ画像補正の自動化応用”、日本顕微鏡学会第 70 回記  
念学術講演会(幕張メッセ国際会議場)、P\_I-49、(2014 年 5 月 11 日)
15. 友永祥彦、馬場美鈴、馬場則男、“従来法に代わる 3 次元断層データ相関法  
に基づく投影像の位置合わせ法”、日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会  
(幕張メッセ国際会議場)、12amB\_I1-02、(2014 年 5 月 12 日)