

SharpStack ver.5.0

"Advanced"(拡張)メニューの"SharpStack"コマンドは、Image-Pro Plus ver. 4.5.1以降のオプションソフトSharpStack version 5.0を起動します。このソフトは、デジタルデコンボリューションと呼ばれる方法で、Z軸のスタック画像から焦点の合っていない部分(ボケ、Haze)を取り除き、焦点の合っている部分のみの画像を生成します。

SharpStackの理論的背景

3次元構造を持つ生物系の試料(細胞や組織)を顕微鏡で観察すると、焦点面の上下に焦点の合わない部分(ボケ、Haze)がどうしても現われます。このようなボケは、顕微鏡のPSF(Point Spread Function:点像分布関数)とたいへん密接に関係しています。SharpStackは、PSFが線形で一定のものと仮定した光学モデルを作り、これを逆方向に演算、補間していくことで、焦点の合った画像を生成するものです。つまり、

$$\text{「実際に取りこまれた画像」} = \text{「PSF」} (*) \text{「焦点の合った画像」}$$

という関係が成り立つと仮定することで、

$$\text{「焦点の合った画像」} = \text{「PSF」} (* -1) \text{「実際に取りこまれた画像」}$$

という演算から「焦点の合った画像」を生成するという方法です。ここで、「(*)」という演算がコンボリューション、「(*-1)」という演算がデコンボリューションとなります。

3つのデコンボリューション方法

- "No Neighbor": デコンボリューションしようとする1枚の画像スライスから2次元のPSFを構築してデコンボリューションする方法です。最も高速な方法で、他の方法を実行する前のサンプリングとしてデコンボリューションを行う場合などに用います。
- "Nearest Neighbor": 顕微鏡のZ軸に沿って連続した3枚の画像スライスを取り込み、その中央の画像スライスを上下2枚のスライスをを用いてデコンボリューションし、その処理を画像スライスの枚数分繰り返すものです。CPUの負荷が少ないので、コンピュータの能力が低い時、速度が要求される場合に有効です。

近傍のスライスの情報も加味するため、No Neighborよりも高質な結果が得られますが、S/N比が落ちる、オブジェクトの見かけ上の位置が変化してしまうなどの欠点があり、デコンボリューション後の画像は測定にはあまり向きません。目安として、スライスが3～5枚の場合に用います。

- "Inverse Filter": 収束演算を行わず、逆方向のフィルタをかけることで、ワンステ

ップでデコンボリューションする方法です。PSFを用いて3次元全体のボケを計算します。周波数領域では、コンボリューションは、試料のフーリエ変換とその"Optical transfer function" (OTF:光伝達関数)との乗算として変形することができます。このOTFがフーリエ変換のPSFとなり、"Inverse Filter" (逆方向フィルタ)はフーリエ変換した画像をOTFで除算したものとなります。

他の2つの方法より時間と使用メモリは増えますが、より正確です。スライス枚数の制限はありません。但し、小さなノイズを増幅します。

システム要件

SharpStack version 5.0を実行するためには、次の環境が必要です。

- Image-Pro Plus V4.5.1以降
- Pentium 以上 (800MHz以上) のCPU
- Microsoft Windows 2000 SP3以降/XP Professional
- 512MB RAM (1GB以上を推奨)
- 3GB以上のハードディスク及び (1ピクセル = 4バイトとして) 取り扱う画像サイズの4倍のディスク空き領域
- 24ビットフルカラー以上、解像度1024 × 768以上のグラフィックボード/カラーモニタ
- Windows互換のマウス、キーボード、CD-ROM

一般的な操作手順

1. 顕微鏡ステージをZ軸上に沿ってスライドさせ、複数のスライス画像を取り込み保存します。Image-Proで取り込んだ場合は、シーケンス画像 (画像形式: SEQ) として保存します。
2. 取り込んだ画像をImage-Proで開き、"Advanced" (拡張) メニューから "SharpStack" コマンドを実行します。

"SharpStack" ダイアログボックスが表示されますので、画像のPSF (点像分布関数) に関する情報等を各欄に入力します。

注記: デコンボリューションしたい画像がカラー画像の場合は、一旦RGBの各チャンネルの色成分を取り出し、RGB各画像別にデコンボリューションしてから、結果の画像をマージするようにします。

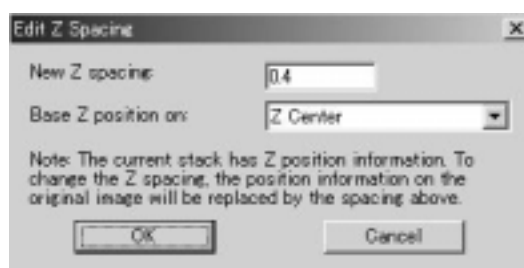
(色成分の抽出、マージは、Image-Proの処理メニューにある「色成分」コマンドで行うことができます。)

“Deconvolve” (実行) ボタン



- "Type" (タイプ) : デコンボリューション方法を、"No Neighbor"、"Nearest Neighbor"、"Inverse Filter"から選択します。開いた画像が1フレームのみの画像の場合は、"No Neighbor"で固定となります。
- "NA" (開口数) : 使用した対物レンズのNA (Numerical Aperture : 開口数) を入力します。この値はPSFに影響しますので重要です。
- "From Lens..." : 当欄は、Image-Pro Plus ver. 5.0以降にSharpStackをインストールした場合にのみ表示されます。Image-Pro Plus ver. 5.0では、NAや下記の屈折率などの情報をレンズの設定ファイル (拡張子 ".ipl") に保存できるようになります。
- "Refractive Index" (屈折率) : 油浸オイルの屈折率を入力します。右隣の選択ボックスから "Air"、"Water"、"Glyceline"、"Oil" のいずれかを選択すると、対応した屈折率が当欄に表示されます。"Custom" (ユーザー定義) を選択した場合には任意の数値を入力できます。
- "Wavelength" (波長) : 取り込み光の波長 (ピークの波長) をナノメートル単位で入力します。カラー画像をRGB各チャンネルに分けた場合は、RGBのそれぞれの波長を入力します。
- "X Spacing" / "Y Spacing" : X、Y各軸の、ピクセルあたりの寸法をミクロン単位で入力します。開いた画像が較正されている場合は、この欄はアクティブになりません。後述の "Edit X/Y.." (X/Y編集) ボタンを参照して下さい。
- "Edit X/Y.." (X/Y編集) ボタン : 較正されている画像の較正を変更する場合に使用します。このボタンをクリックすると、"Spacial Calibration" (空間較正) ダイアログボックスが表示されますので、これを用いてXY方向のピクセルあたりの寸法を較正します。空間較正について詳しくは、Image-Proのリファレンスマニュアルの "Calibration" (較正) の項をご覧下さい。

- "Z Spacing": フレーム間(Z軸のスライス間)の距離をミクロン単位で入力します。開いた画像が較正されている場合は、この欄はアクティブになりません。後述の"Edit Z.." (Z編集) ボタンを参照して下さい。
- "Edit Z.." (Z編集) ボタン: 較正されている画像の較正を変更する場合に使用します。このボタンをクリックすると、"Edit Z Spacing" ダイアログボックスが表示されますので、これを用いてZスライスの厚みおよびスライスのベースポジションを編集入力します。



- "Z Center": スライスの持つZ位置情報を用います。
- "Center zero": 中央のスライスを位置ゼロとします。
- "Start zero": スライスの先頭を位置ゼロとします。
- "Noise level": 画像のノイズを平滑化するレベルを指定します。"Auto"、"Low"、"Medium"、"High"が指定できます。どのレベルを指定すればよい結果が得られるかは画像により異なりますが、重要なオプションです。この欄はInverse Filterの場合にのみ入力可となります。
- "Neighbor Spacing" (近傍スライスの間隔): Nearest Neighborデコンボリューションを実行する際の、中央のスライスから見た近傍スライスへの間隔を指定します。1から5までが入力でき、1は直上/直下のスライスを意味します。スライス間隔が極めて狭く、直上/直下のスライスと中央のスライスとでデコンボリューションの情報がほとんど異なる場合に2から5を使用します。
- "Haze Removal" (ボケ除去率): ボケ(Haze)を除去する率をパーセントで指定します。"Inverse Filter"デコンボリューションではこの欄は入力できません。通常90から99の数値を入力します。

Nearest Neighborでは除去率50～65%程度から始めて、除去したりないと感じたら増やすようにして下さい。高い除去率ですとノイズが増加します。
- "Process in montage" (モンタージュ処理): このオプションはInverse Filterが選択された時にアクティブになります。このオプションをオンにすると、モンタージュ(サブ領域に分けてデコンボリューションを連続的に適用)することでデコンボリューションの速度を上げます。Inverse Filterは通常、画像ボリュームの5倍以上のメモリが必要となりますが、パソコンのメモリが限られている時などにこのオプションを使用します。

モニタージュ間(サブ領域毎のデコンボリューション)の結果が食い違うという画像もあります。その場合は次の"Overlap"オプションを使用して下さい。

- "Overlap" (オーバーラップ): モニタージュ間でオーバーラップさせる範囲を1 ~ 100のピクセル単位で指定します。但し、画像の横サイズより大きな数値は指定できません。また、モニタージュが必要でない小さな画像では、入力した値は無視されます。
- "Brightfield" (明視野): このオプションをオンにすると、明視野画像を反転させ、明るいオブジェクトに暗いバックグラウンドの画像を生成します(蛍光画像をエミュレートします)。
- "Phase Objects" (位相物体): このオプションをオンにすると、位相物体が対象であることを示します。明視野顕微鏡で染色剤を用いず、位相特性のコントラストを得るためコンデンサを絞って取り込んだ画像の場合に使用します。

注記: "Phase Object"を選択する場合は、"Brightfield"を選択する必要はありません。

このオプションをオンにすると、明視野標本のデコンボリューション後のピクセルが、バックグラウンドより明るい輝度になることを可能にします。これはレンズの効果で起こることでもあります。

このオプションは、主に明視野での位相物体観察用に作られた機能ですが、稀なケースとして、蛍光画像でも、明るいオブジェクトの周りの輝度の低い微細なシミを消さないようにするために役立ちます。この場合は、"Phase objects"オプションをオンにし、"Brightfield"オプションをオフにします。これにより、デコンボリューション後のピクセルがバックグラウンドより低い輝度になることを可能にします。この場合には最小値が負になる場合があります。

- "Convert results to floating-point" (結果を浮動小数点形式に変換): デコンボリューションした結果を浮動小数点形式の新規画像として生成します。表示状態が改善される場合があります。
- "Spherical Aberration (SA)" (球面収差): 球面収差補正の数値を-15 ~ +15の数値で入力します。0は補正なしを意味します。このオプションはInverse Filterが選択された時にアクティブになります。

下記の"Calculate SA"で計算した推算値が-3 ~ +3の場合は、球面収差の影響は少なく補正の必要はありません。0を入力して下さい。-3 ~ +3の数値(0以外)を入力した場合も補正はなされますが、多くの場合、補正結果は認知できる程度ものではありません。


- "Calculate SA" (球面収差を計算): 球面収差補正の推定値を計算し、上記の"Spherical Aberration"欄に推算値を表示します。推算値が妥当な値であるかをご確認下さい。

- "Use accelerated spherical aberration calculation" (球面収差計算を加速) : 球面収差補正の推定値計算を加速させます。精度は落ちます。
- "Deconvolve" (デコンボリューションの対象) 欄: デコンボリューションが適用されるZ軸スタックの範囲を指定します。
 - 画像がZ軸の位置情報を持っていない場合: 画像情報ダイアログボックスの一般情報タブに表示されているZ位置が"Unknown" (不明) の場合は、"Active portion (frames .. through ..) of the active image" (アクティブ画像の..から..フレームまでが対象となっています) というメッセージが表示されます。デコンボリューションするフレームの範囲は、シーケンサーツールバーの先頭フレーム、最終フレームで指定します。
 - 画像がZ軸の位置情報を持っている場合: 一般情報タブにZ位置が表示されている場合は、"Use the active portion of sequence" (アクティブなフレームのみを対象とする) というチェックボックスが表示されます。チェックをオフにすると、"Z stack in frames .. thorough .. of the active image" (アクティブ画像の..から..フレームまでがZ軸のスタックとなっています) というメッセージが表示され、全フレームがデコンボリューションの対象となります。

オンにすると、"Active portion (frames .. through ..) of the active image" (アクティブ画像の..から..フレームまでが対象となっています) というメッセージが表示されます。デコンボリューションするフレームの範囲はシーケンサーツールバーの先頭フレーム、最終フレームで指定します。

注記: 画像情報ダイアログボックスは、Image-Proの編集メニューから画像情報コマンドで起動されます。シーケンスツールは、取り込みメニューのシーケンスツールコマンドで起動されます。詳細は、Image-Proのレファレンスマニュアルをご参照下さい。

- "Save Settings.." (設定を保存する) : "SharpStack" ダイアログボックスに入力した設定情報を保存します。拡張子は".dcs"となります。
 - "Open Settings.." (設定を開く) : 保存した設定情報をロードします。
4. オプションを入力し終えたら、"Deconvolve" (実行) ボタンをクリックしてデコンボリューションを実行します。

注記: デコンボリューション処理は、サイズの大きな画像になると非常に時間がかかる場合があります。サイズの大きな画像の場合は、画像の一部をImage-Pro PlusのAOIツール()で囲んで切り出し、デコンボリューションする範囲を小さくしてから試しのデコンボリューションを行います。その後、ボケ除去率等の最適な値を得た後に、全体をデコンボリューションするようにします。