

**Image restoration for
fluorescence microscopy**

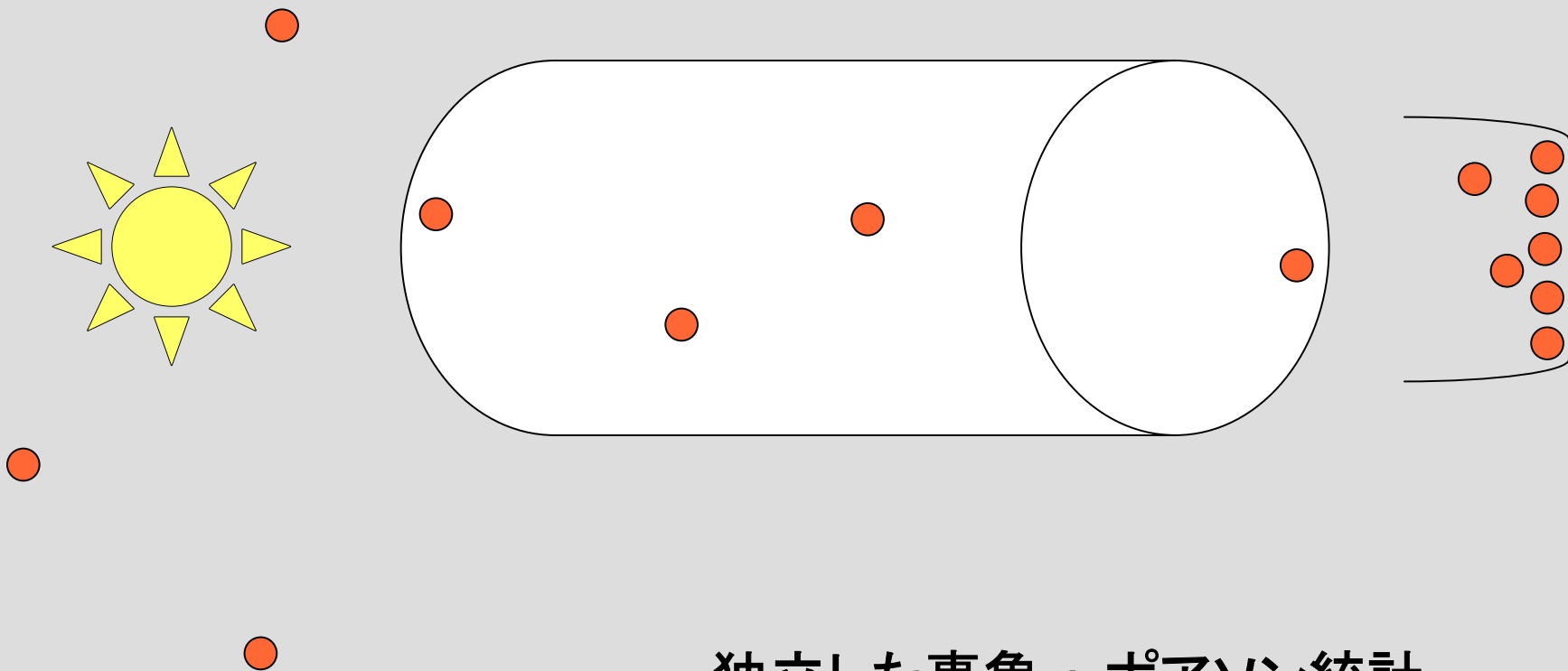


Huygens Software

by Scientific Volume Imaging

2008

Intensity recording



独立した事象：ポアソン統計

Signal ~ Noise

Noise ~ \sqrt{N}

SNR = \sqrt{N}

Photon noise

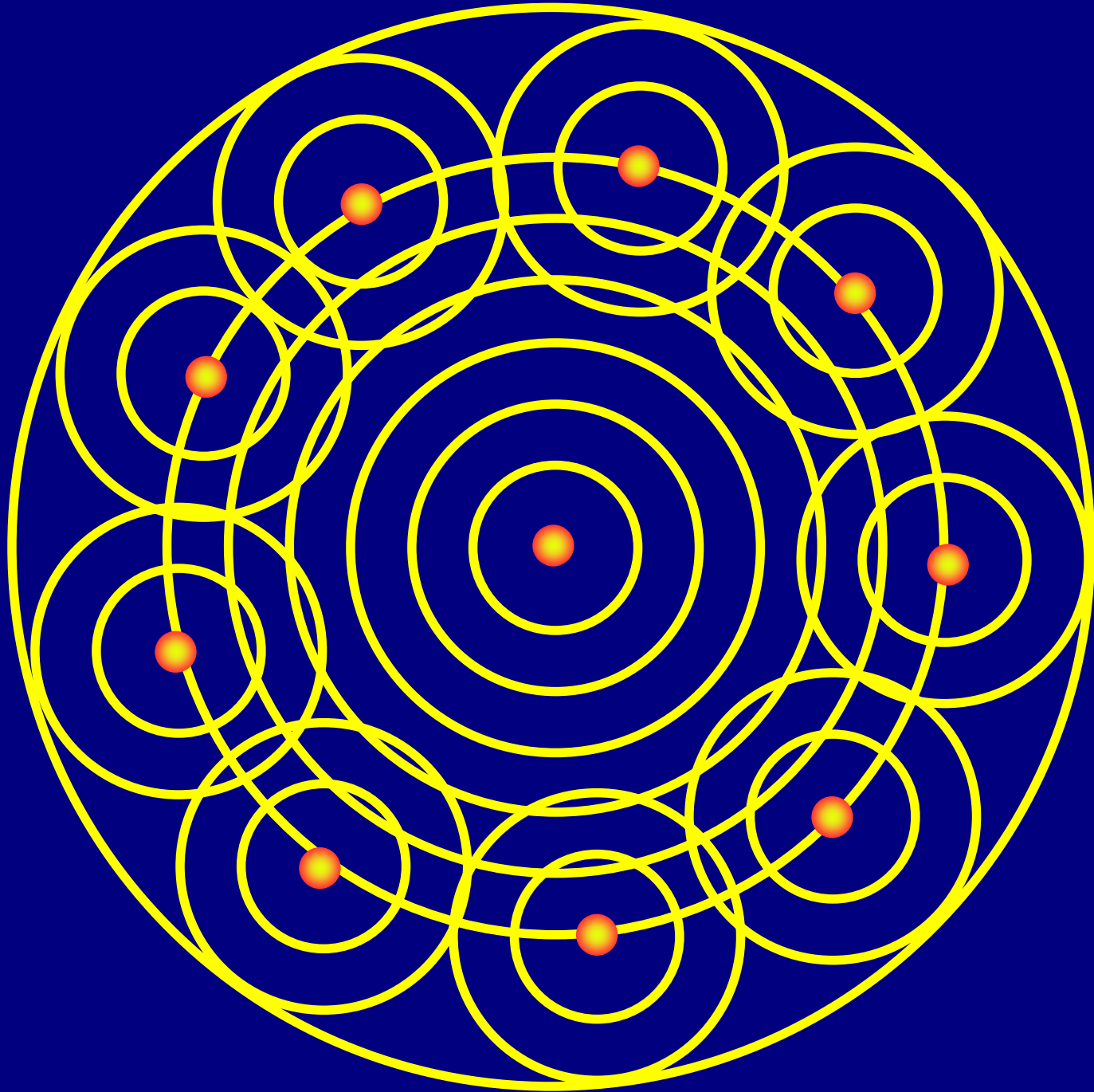
Image taken from the Wikipedia



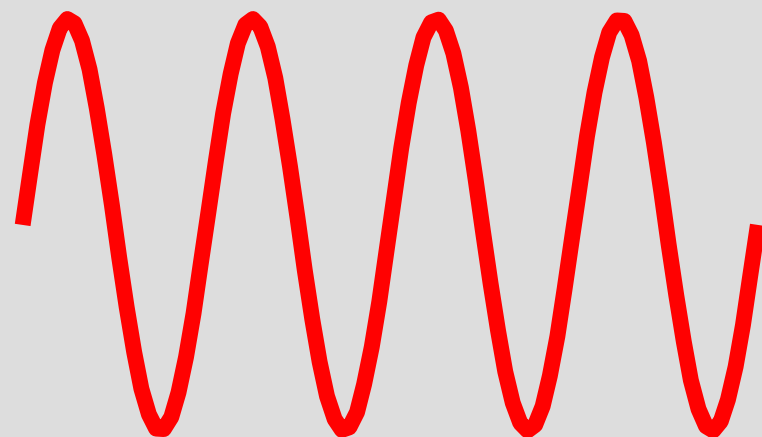
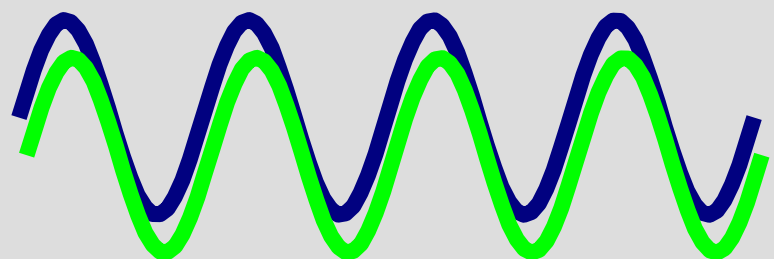
COI SURFACE SUN
1.180e6 85.894 270.261 4.44
3.46

REACTOR
FACTORY
SEE

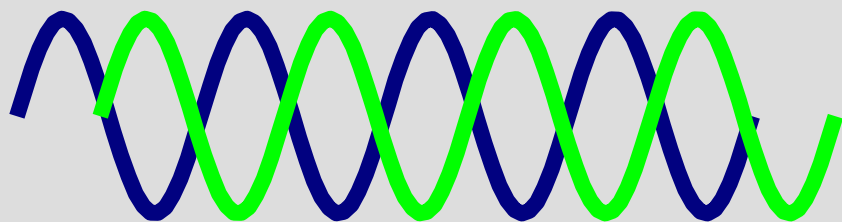
ホイヘンス-フレネル 原理



Interference



同じ位相:
constructive



反対の位相:
destructive

Huygens-Fresnel imaging by delaying waves with a lens

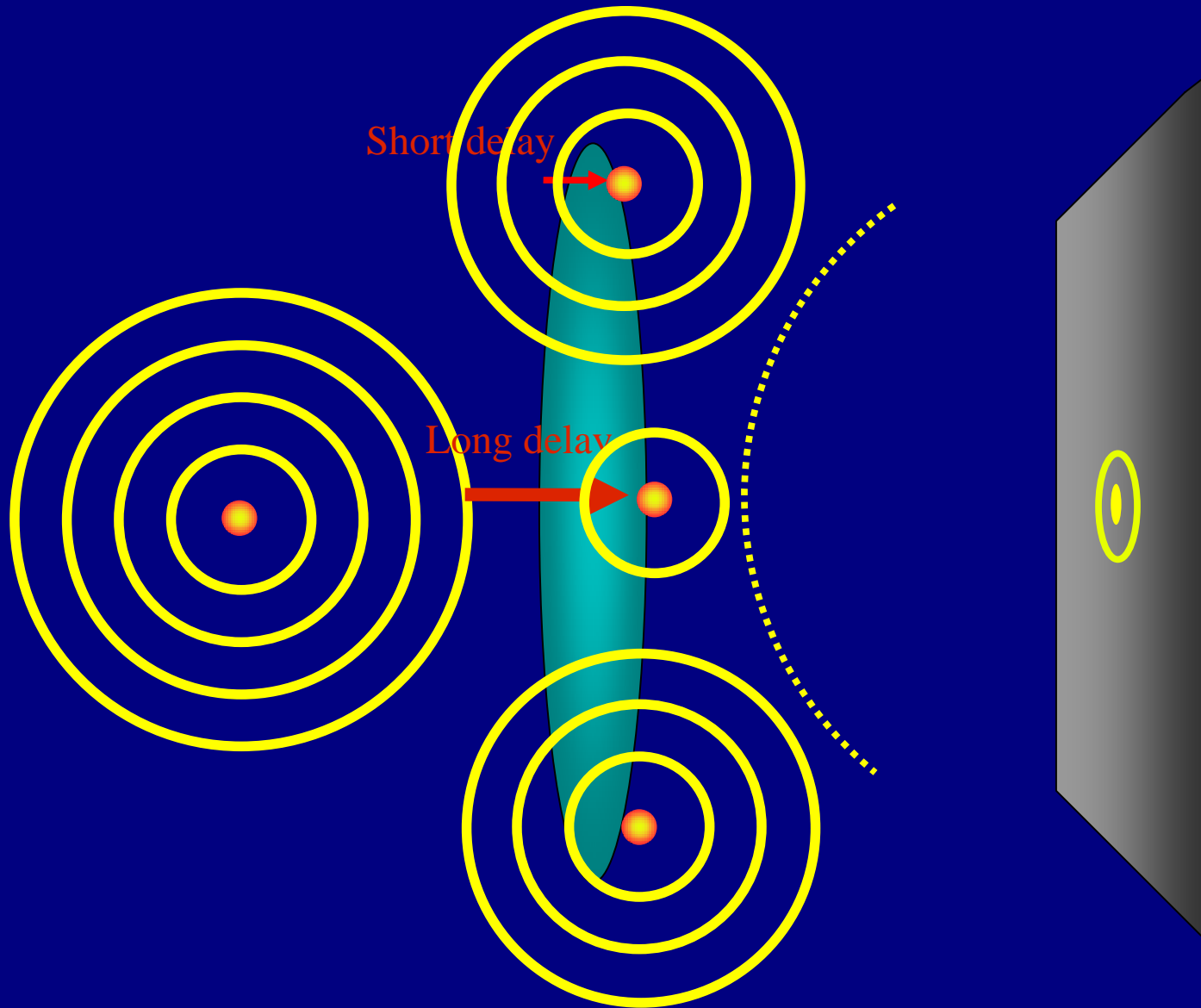


Image formation

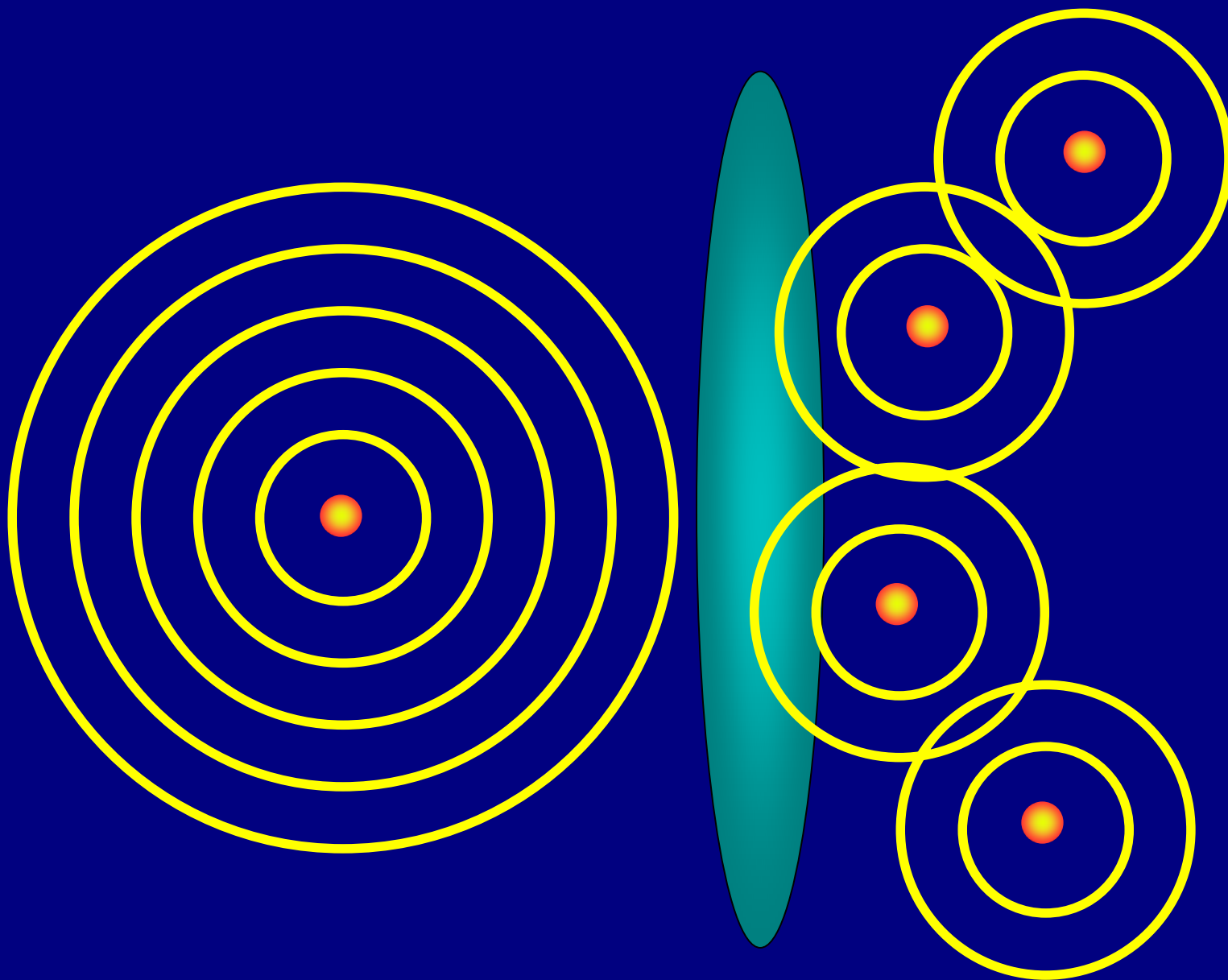


Image formation

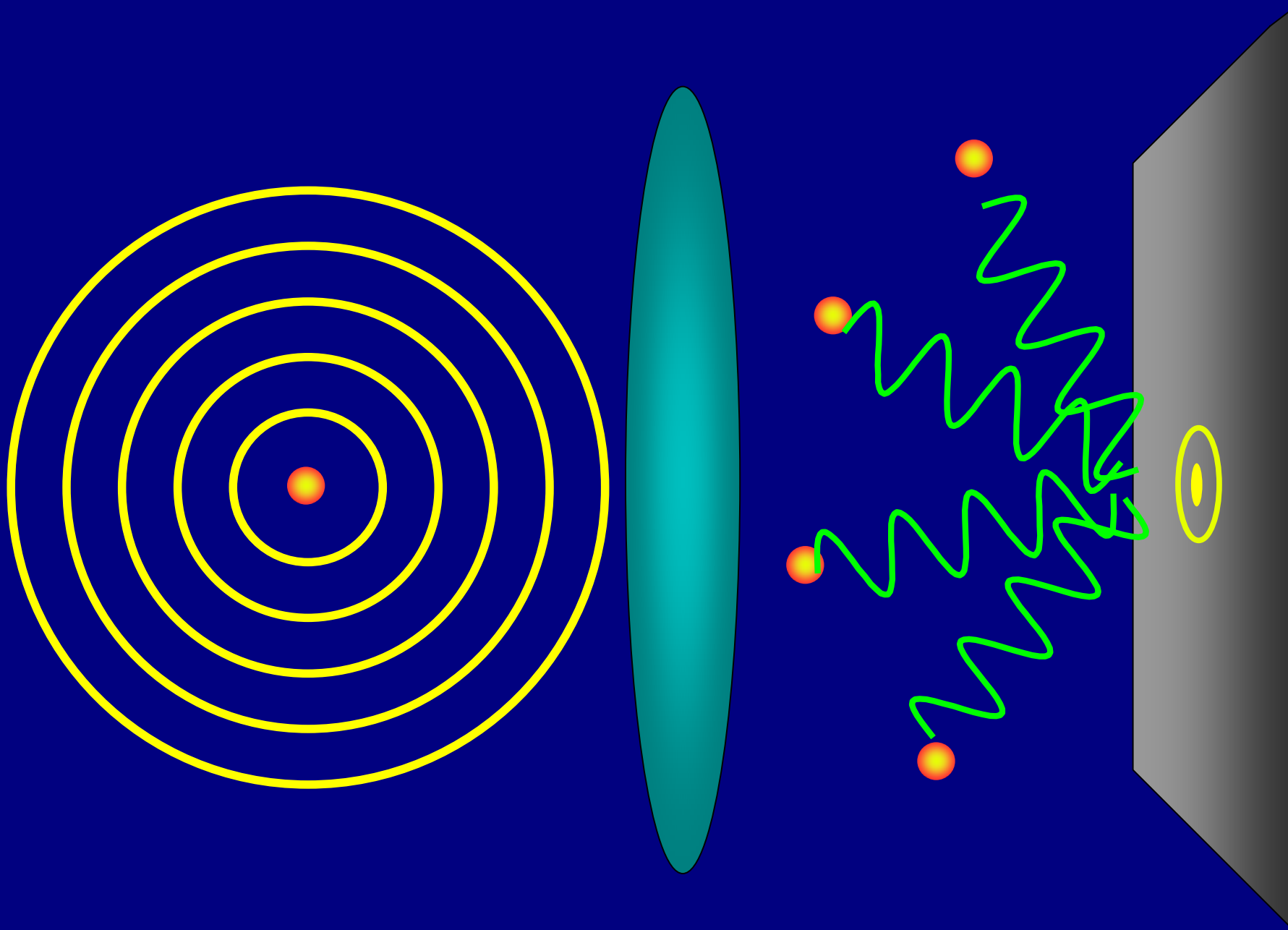
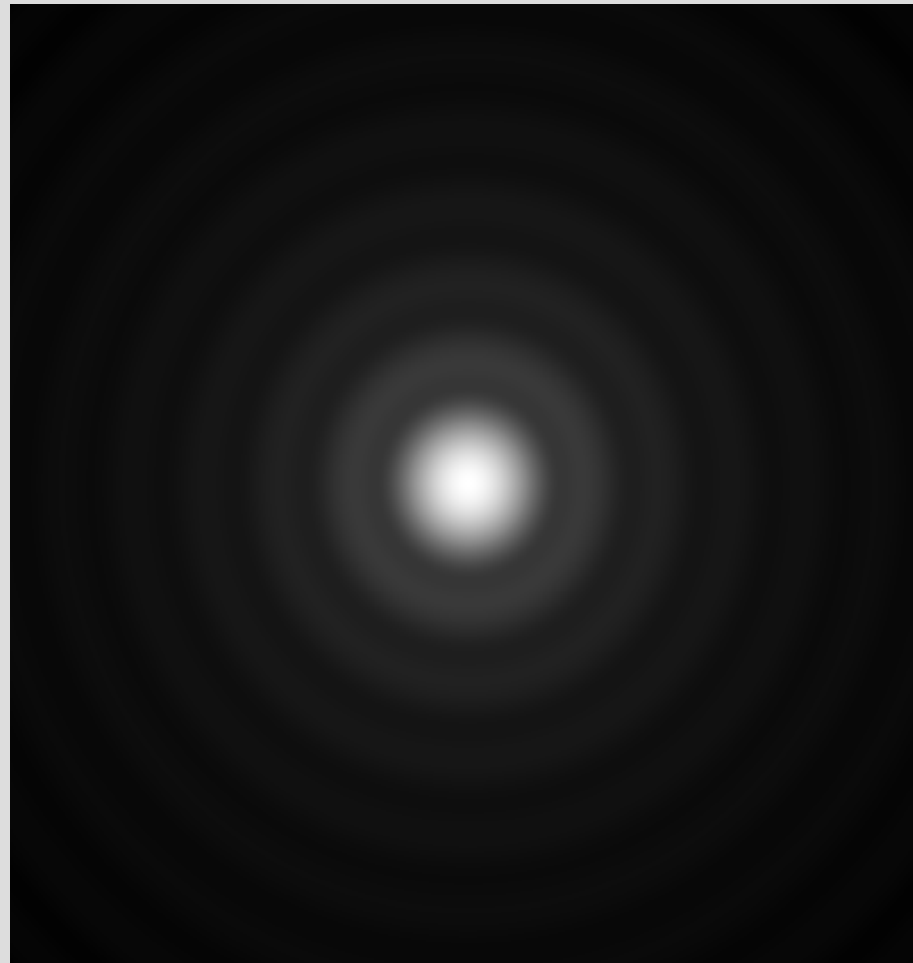
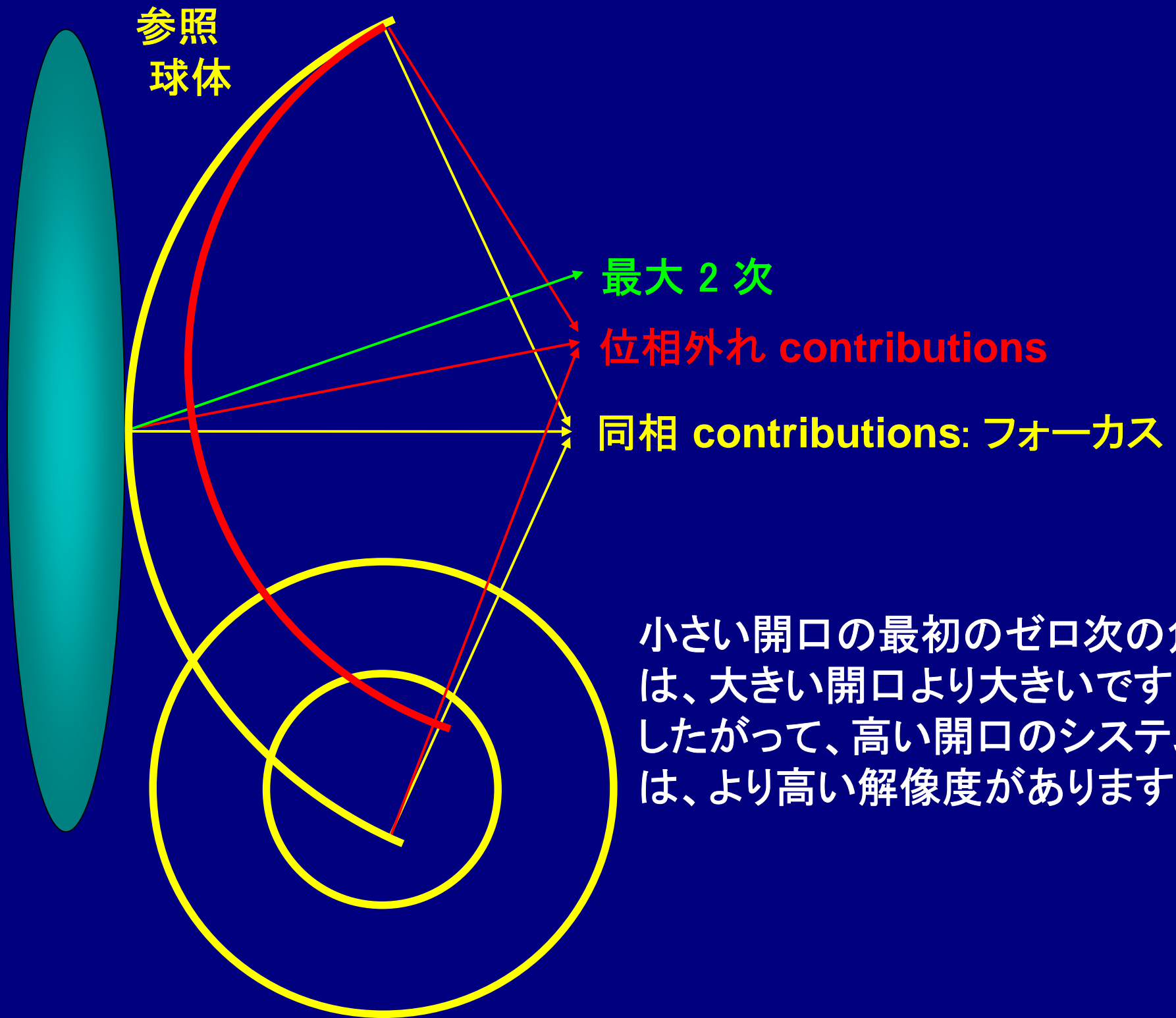


Image formation: Airy disk and rings





参照
球体

最大 2 次

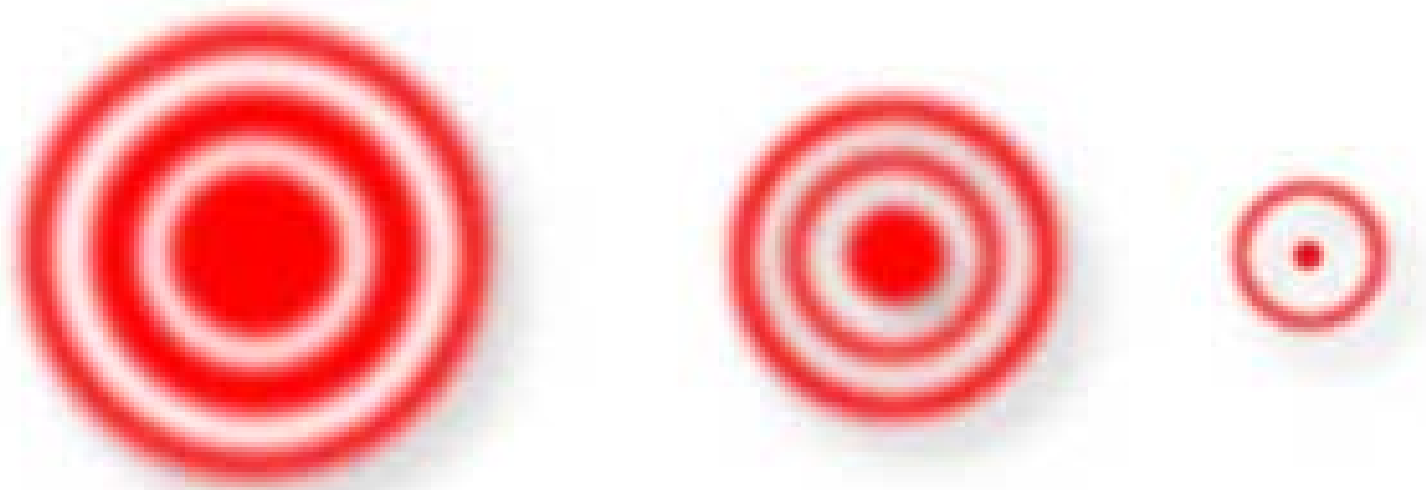
位相外れ contributions

同相 contributions: フォーカス

小さい開口の最初のゼロ次の角度は、大きい開口より大きいです。したがって、高い開口のシステムは、より高い解像度があります。

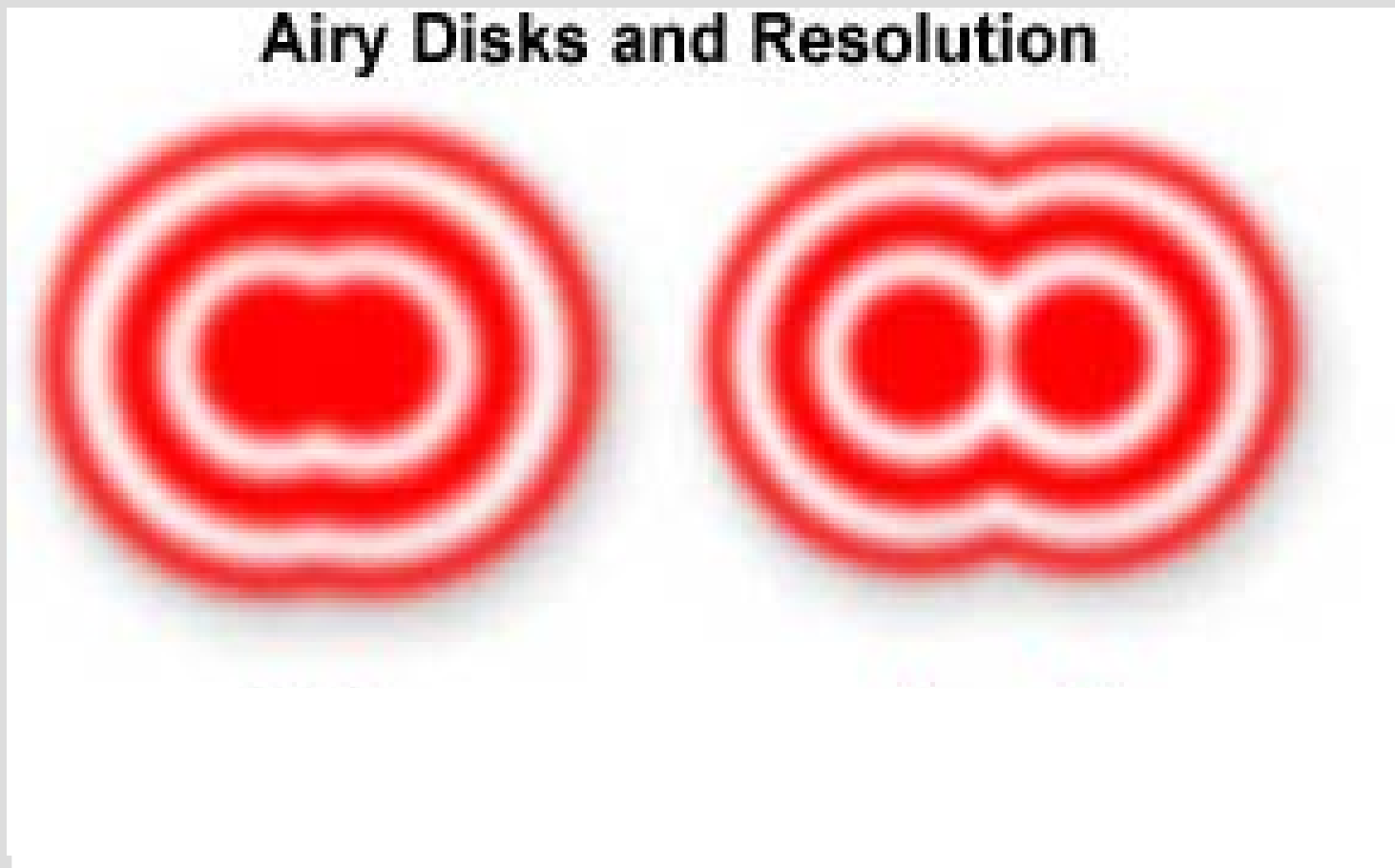
Image formation

Circular Aperture Airy Disk Patterns



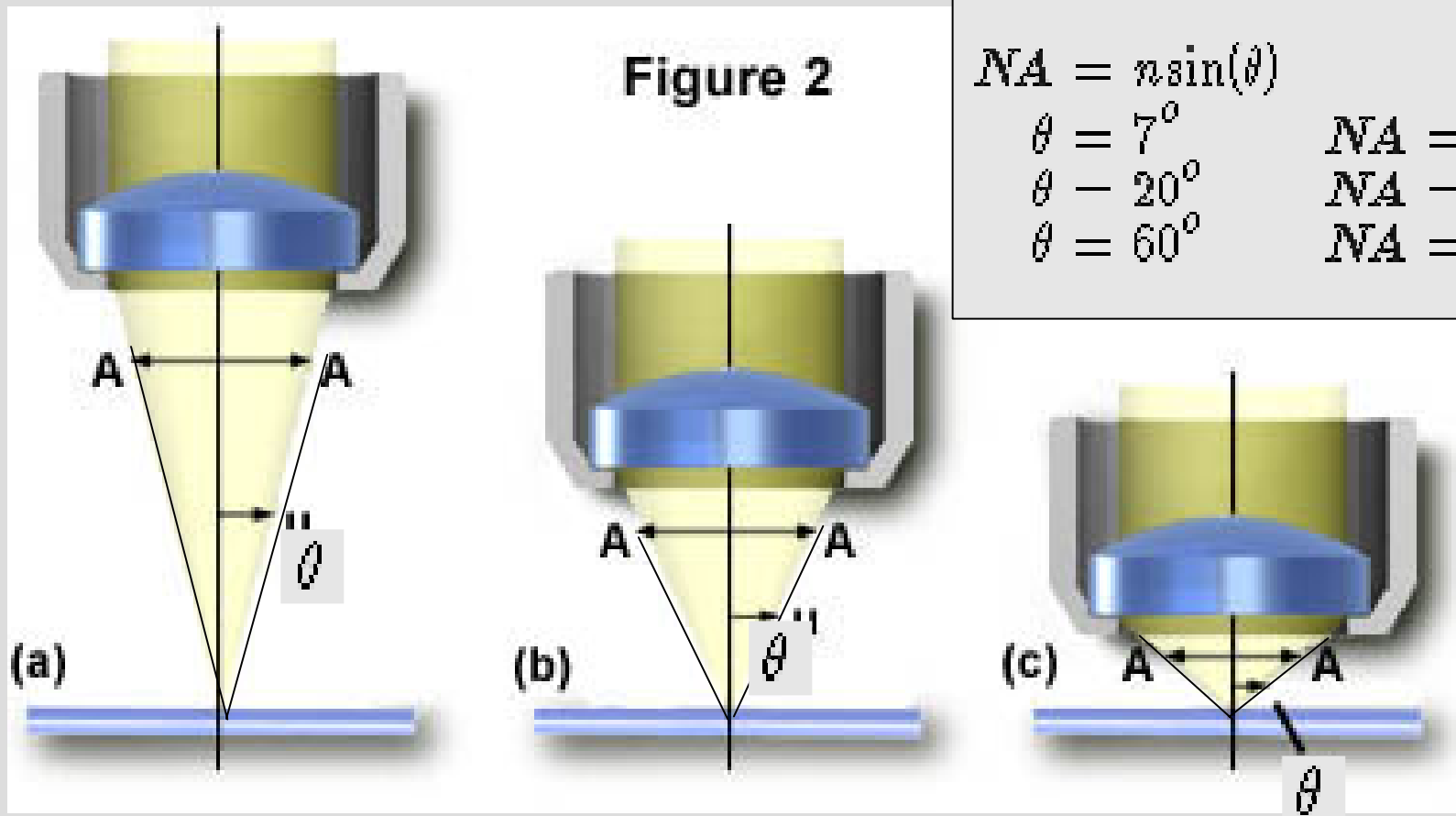
<http://microscopy.fsu.edu/>

Resolution



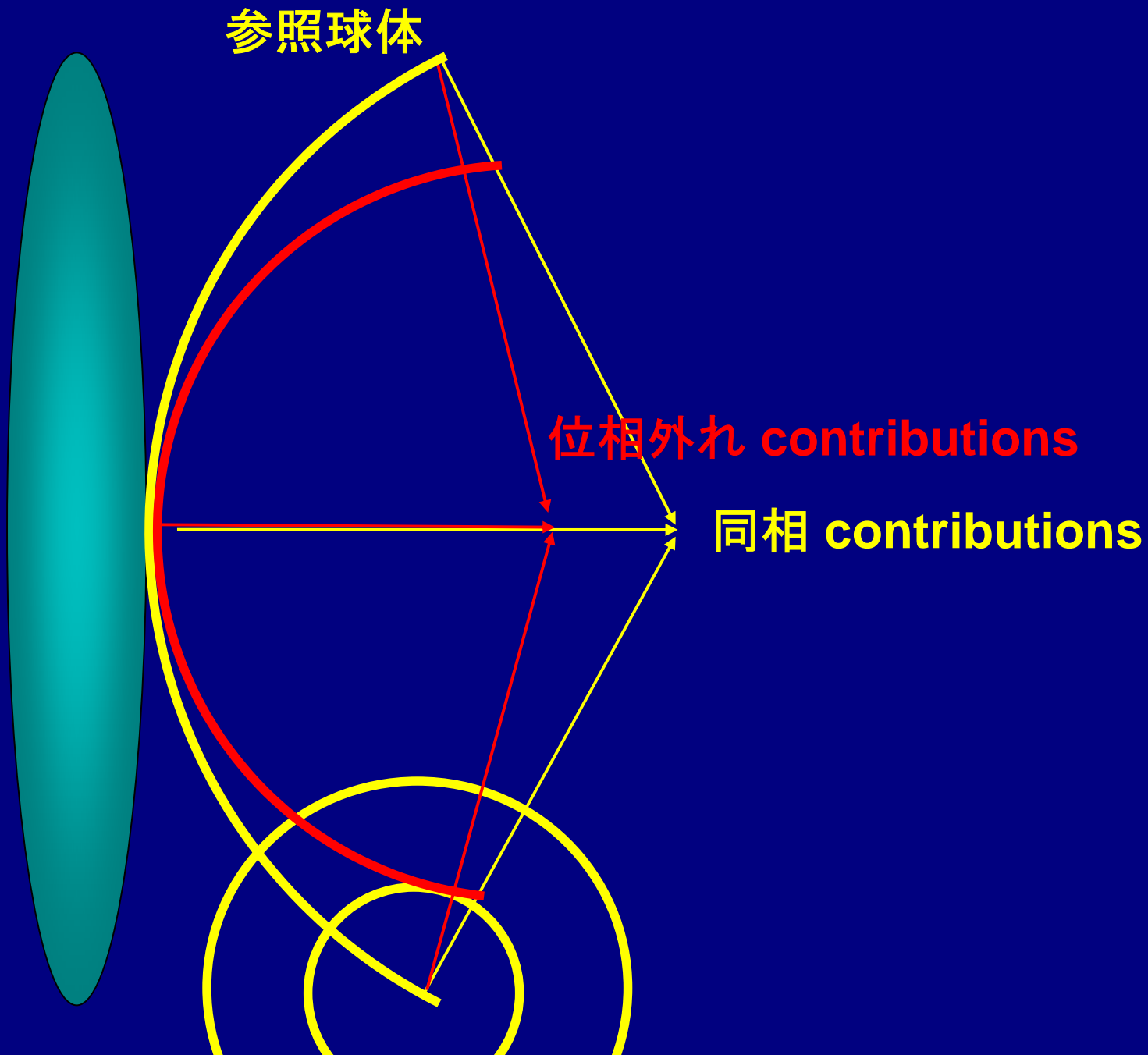
<http://microscopy.fsu.edu/>

Numerical Aperture



<http://microscopy.fsu.edu/>

焦点領域での 3 次元分布

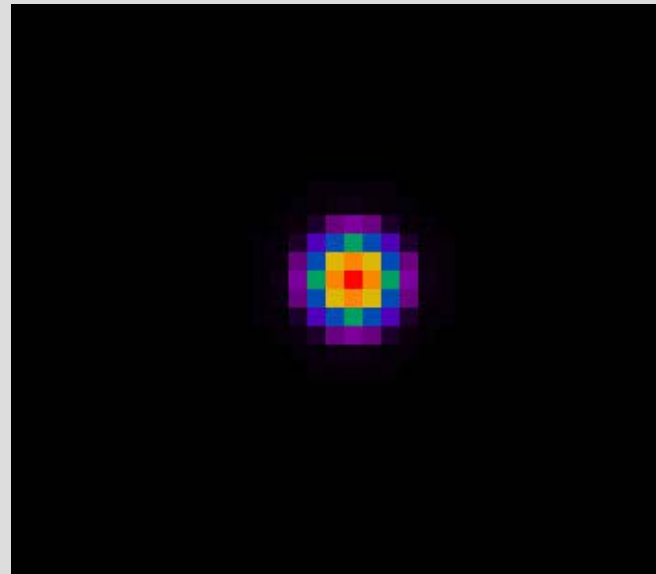


Point Spread Function (PSF)

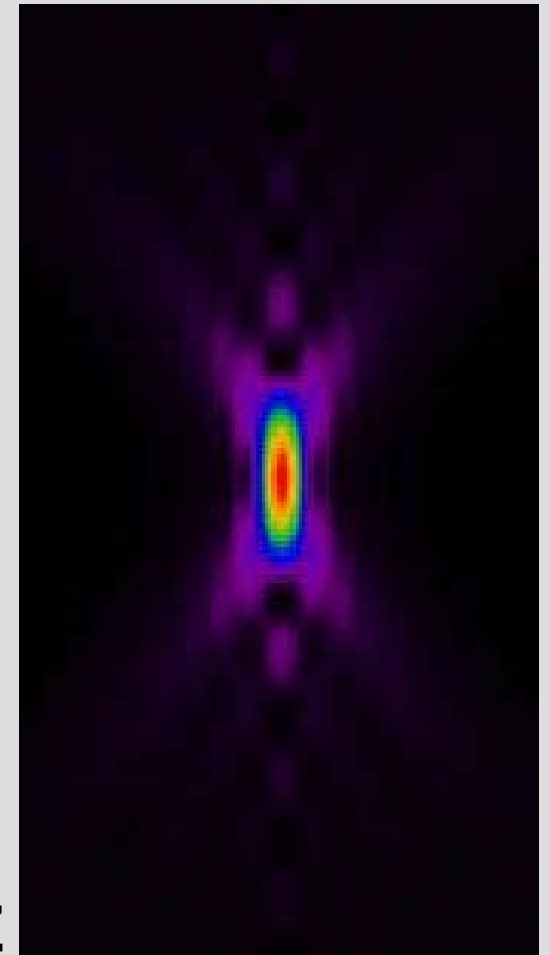
点像の 3D 画像

顕微鏡の校正

比例的に結像を決定



XY

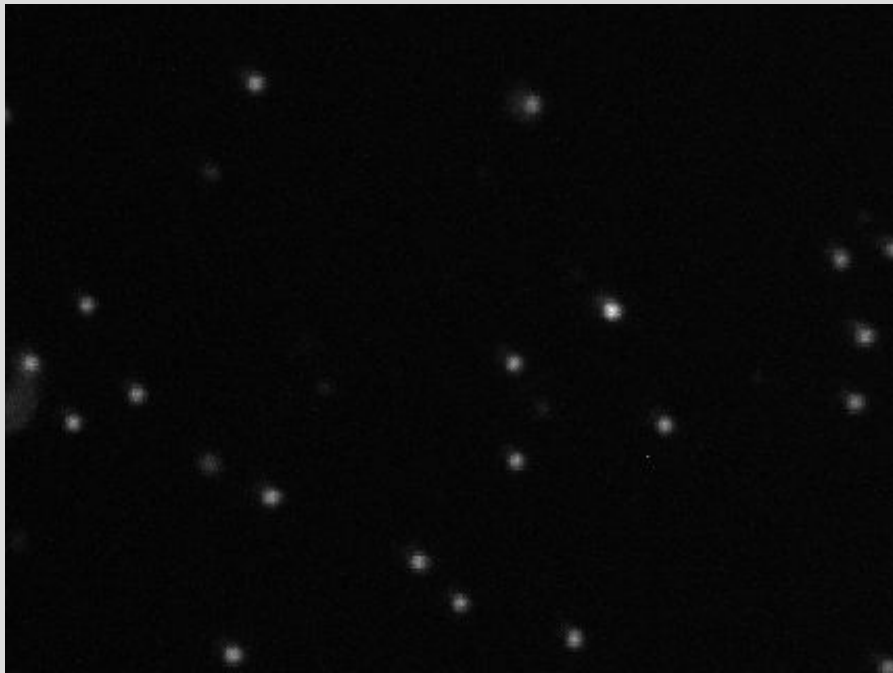


XZ

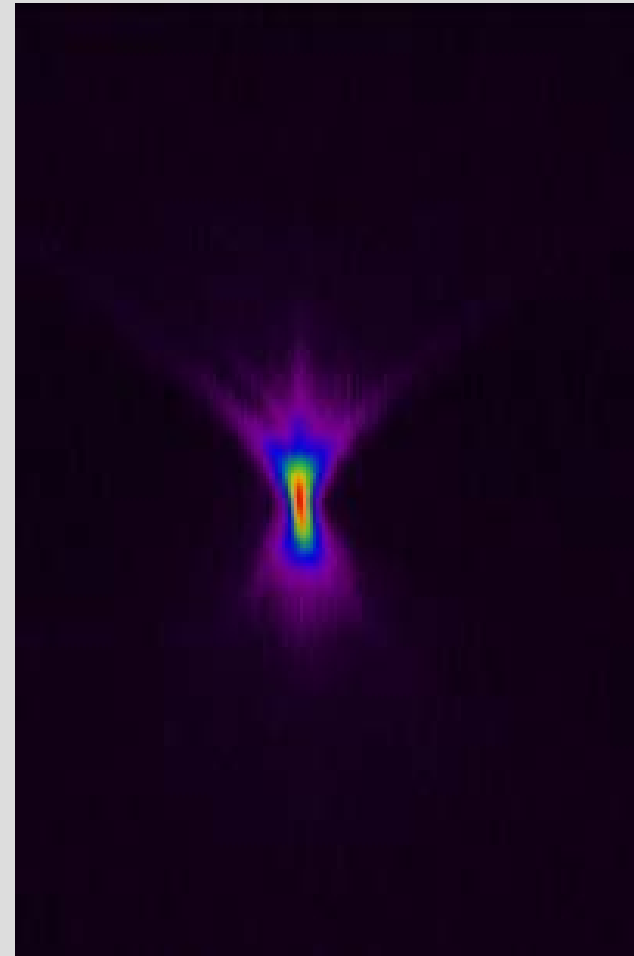
Microscopic imaging

- 点像分布関数 PSF
 - 画像取得時に点像は、広がります
 - PSF の総計は 1 です
 - PSF は、以下に依存します：
 - 顕微鏡タイプ (confocal、widefield 等)
 - 画像取得パラメータ (開口数 NA、波長 等)
- PSF による画像歪をコンボリューションと呼びます

PSF measurement



•ビーズ画像

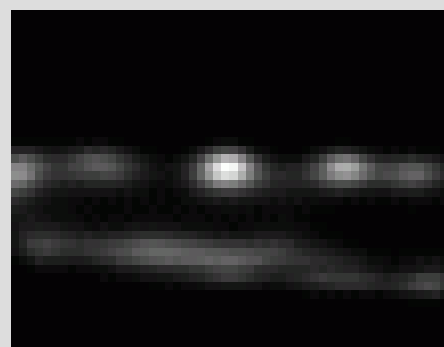


The 'cookie cutter'

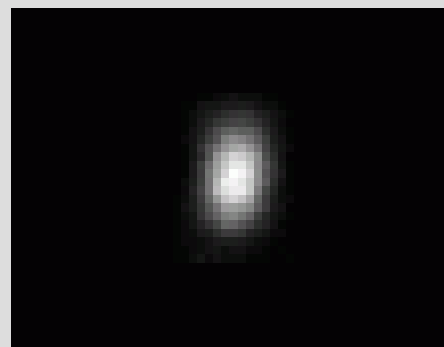
PSF は、cookie cutter として働きます。

- 高周波数をカットオフ
- 顕微鏡の帯域幅限界を決定
 - 水平で約 10 cycles/micron
 - 光軸で約 2-3 cycles/micron

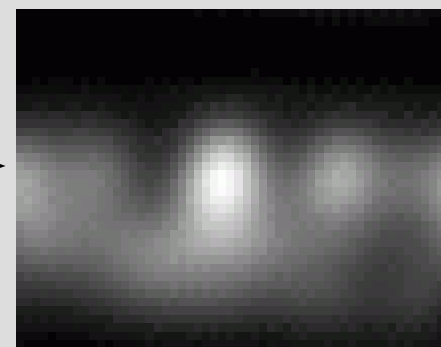
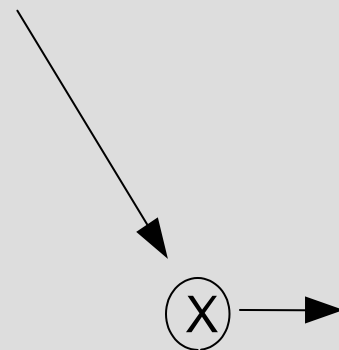
Microscopic imaging: Convolution



Object



PSF



Image

XZ
slices

Degrading processes

顕微鏡において、ボケけは、主に以下の理由によります:

- 回折限界のイメージング
- フォトンノイズ

デコンボリューションは、このコンボリューションで低下する画像を回復するために *Image Restoration* を使用した数学的な処理です。

Spatial frequencies

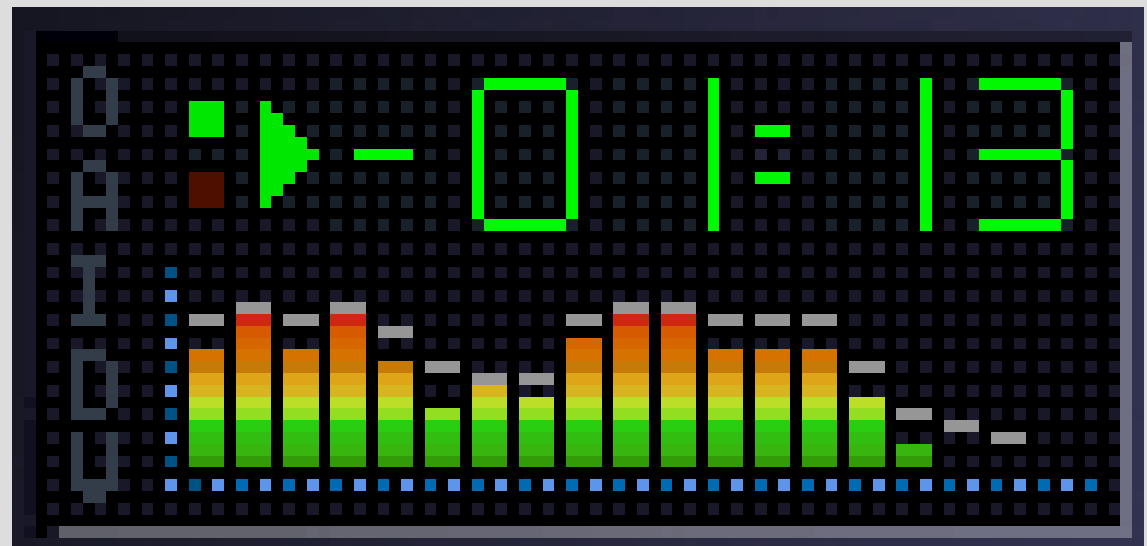
- 空間周波数は、ある微細レベルで対象物の（周期的な）成分を表します。
 - ▶ あいまいな対象物は、わずかな高周波数成分しか含みません；良い質感の対象物は、多くの高周波数成分を含みます。
- 空間周波数成分に対象物を分解することをフーリエ解析と呼びます；この操作は、フーリエ変換です。

フーリエ変換の特性：

- ▶ 2つの機能を合成することは、それらのフーリエ変換をかけることに等しいです。

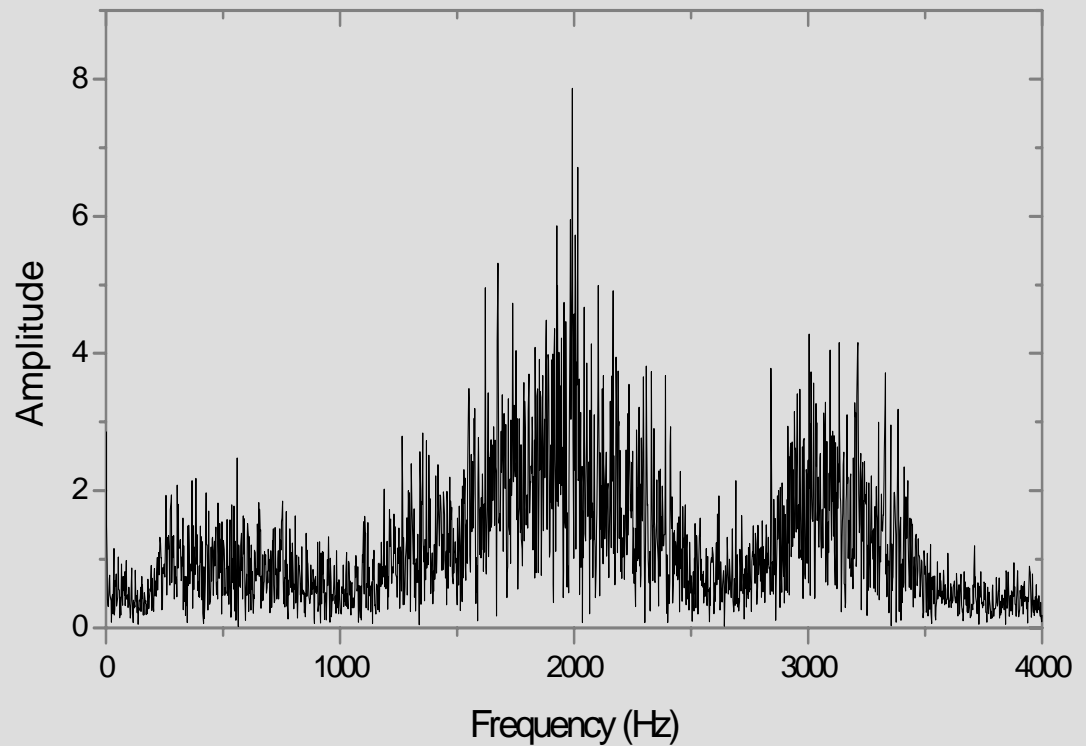
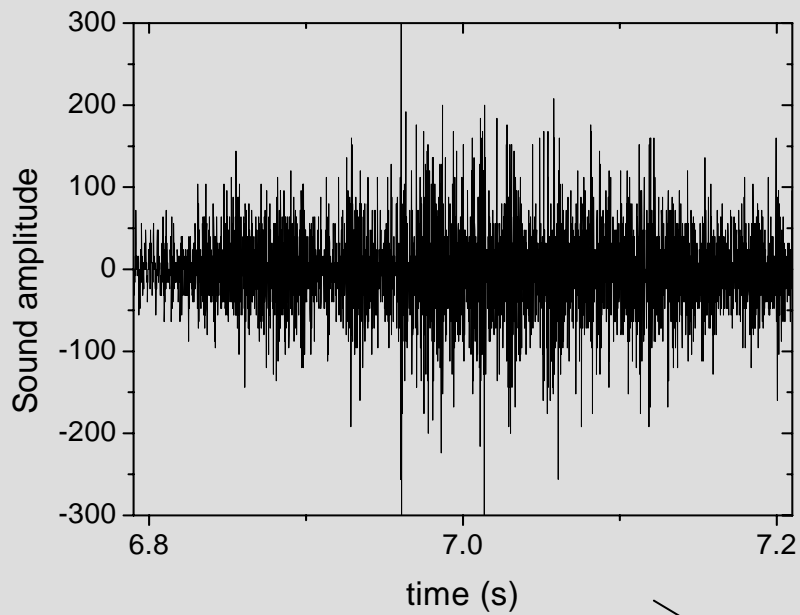
Fourier transforms

Frequency analysis, like in a music player



Fourier transforms

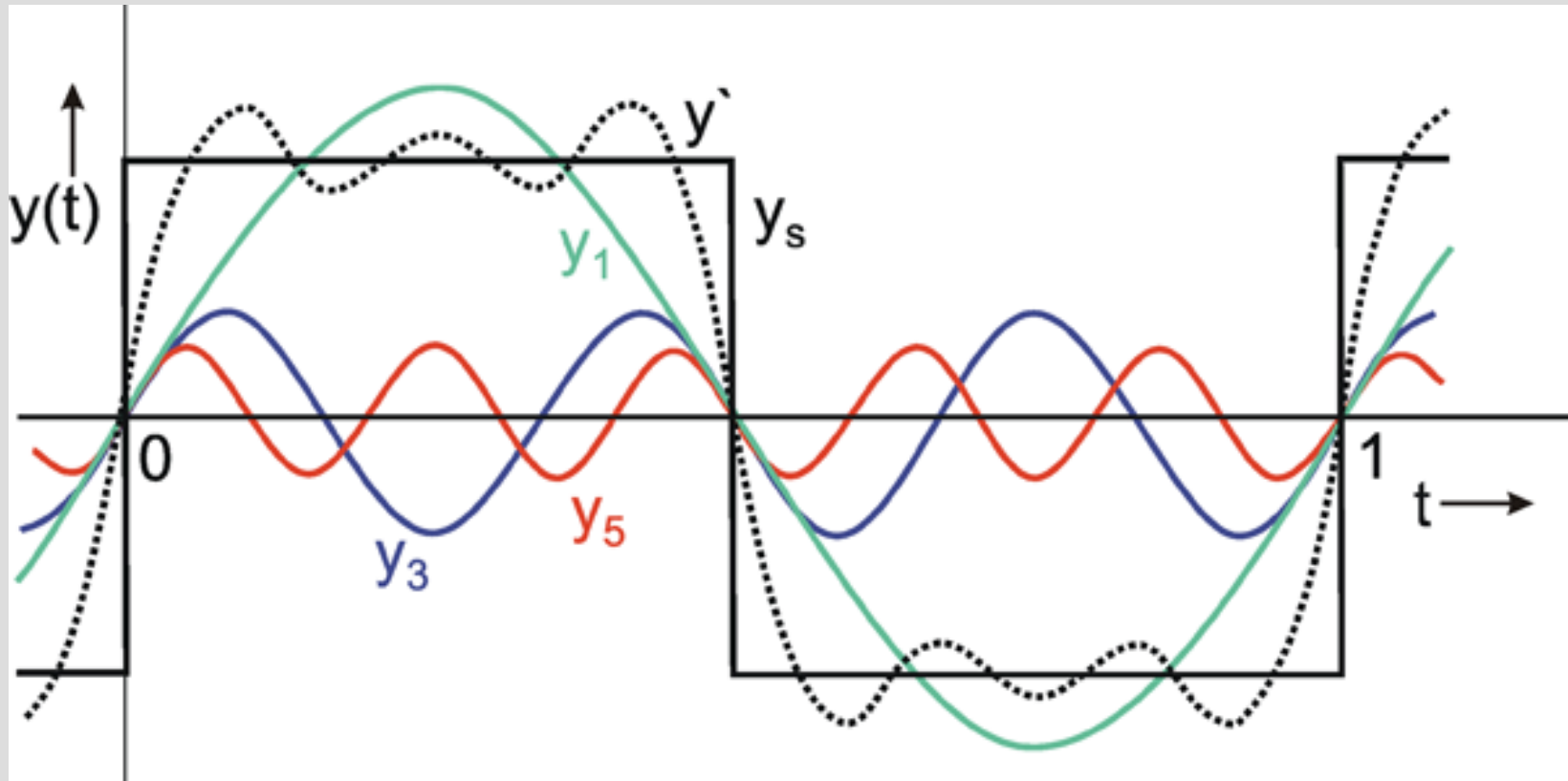
Frequency analysis



This is 1D...

Fourier transforms

Frequency analysis

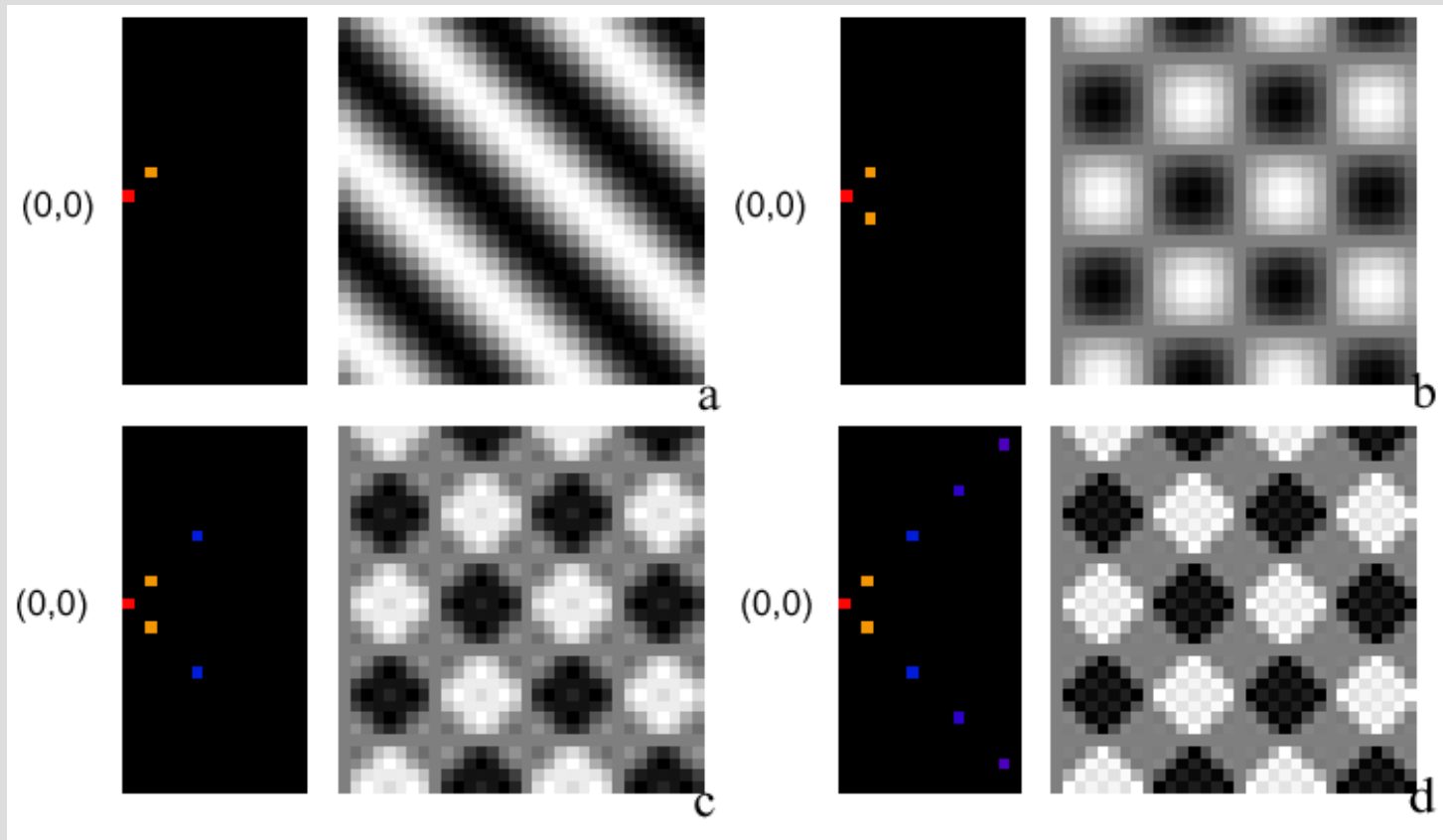


This is 1D...

<http://www.brains-minds-media.org/archive/289/>

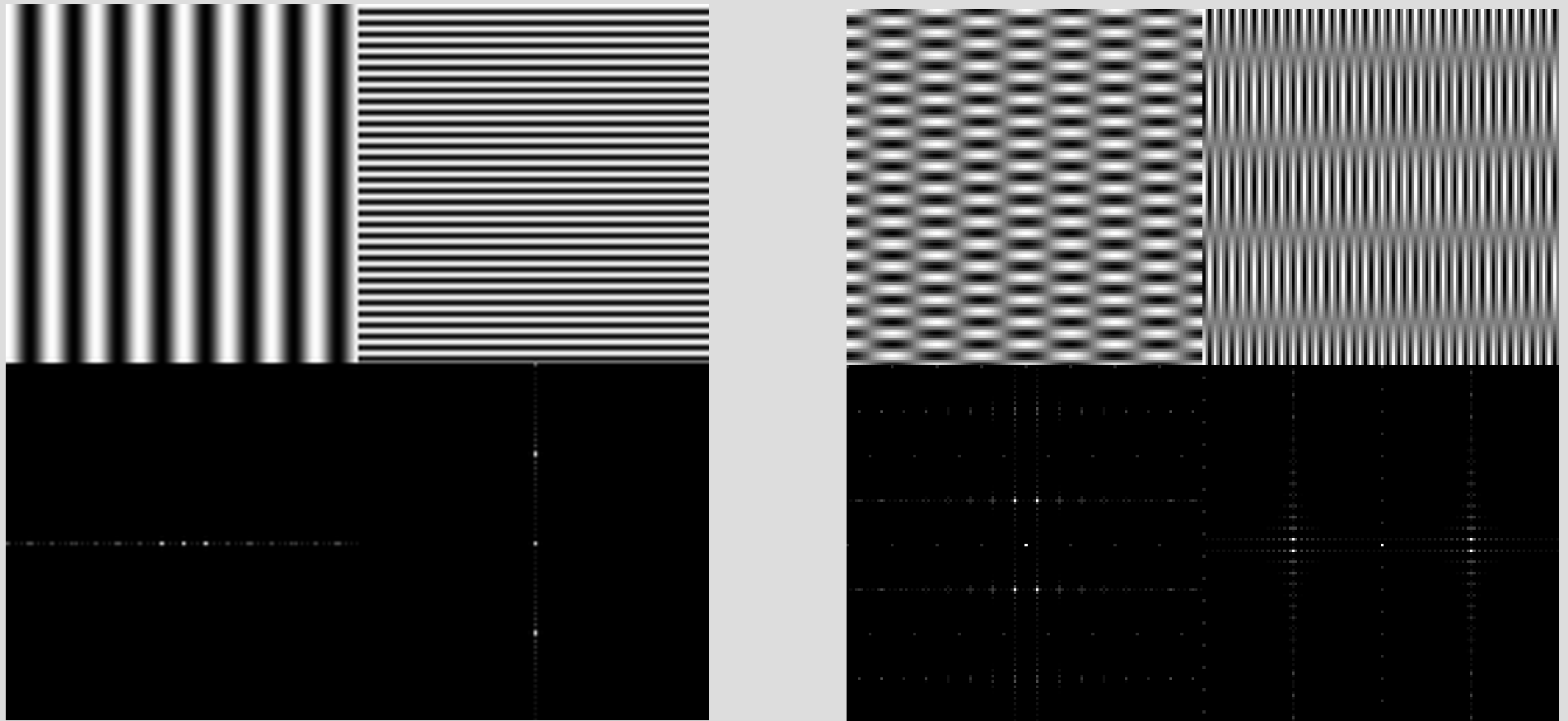
Fourier transforms

空間周波数からの画像を統合します



Fourier transforms

Frequency analysis

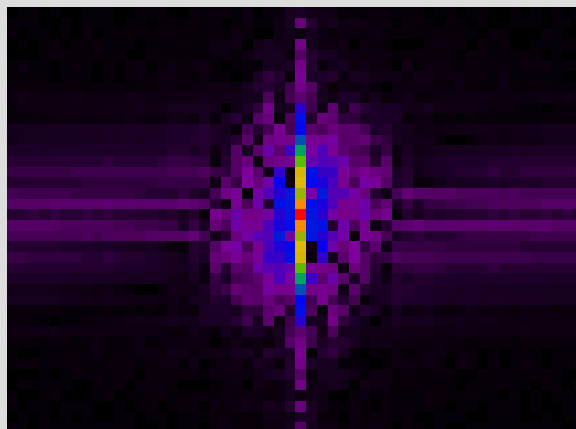
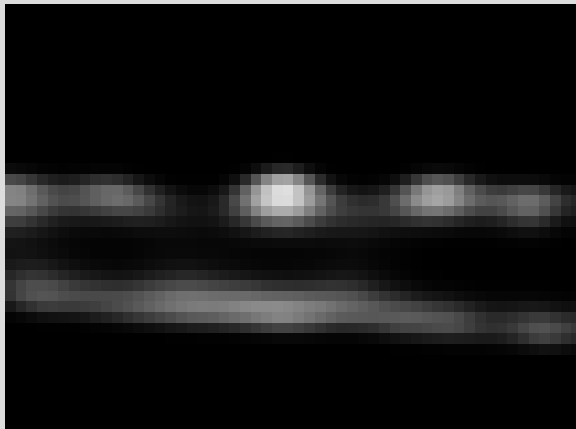


This is 2D...

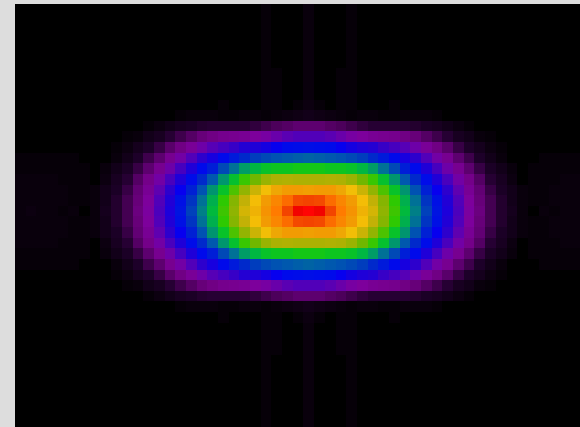
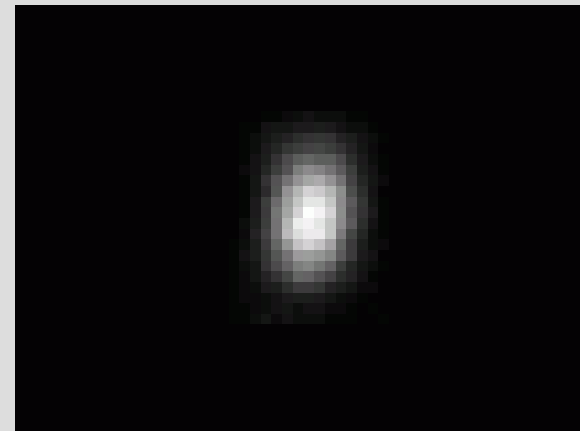
<http://www.cs.unm.edu/~brayer/vision/basis.gif>

Fourier transforms

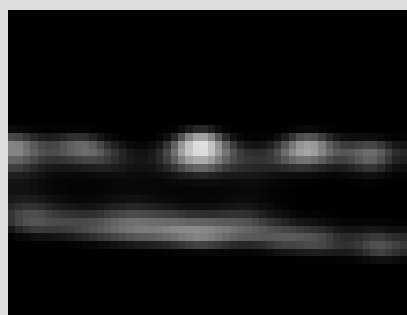
Object



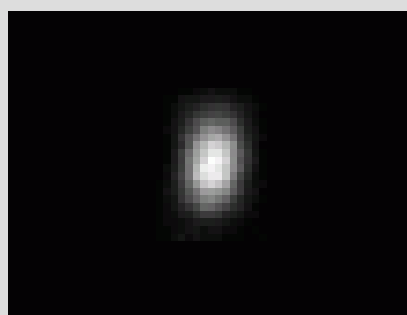
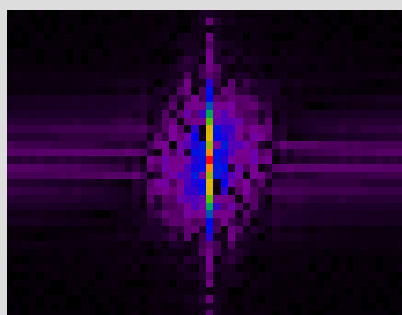
PSF



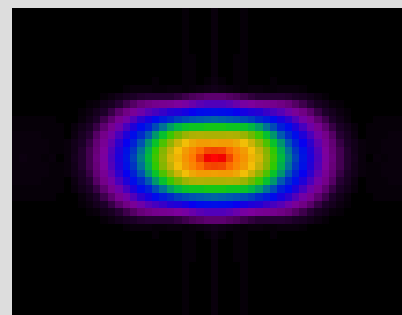
Computing a convolution (applying the convolution theorem)



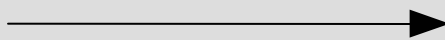
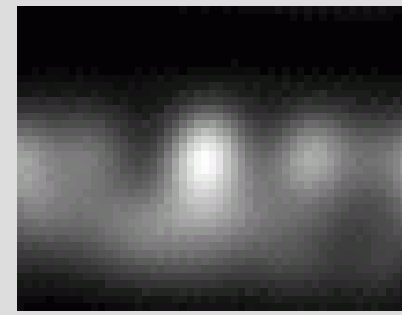
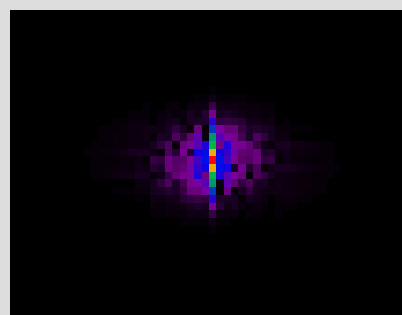
Object



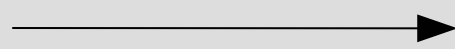
PSF



X

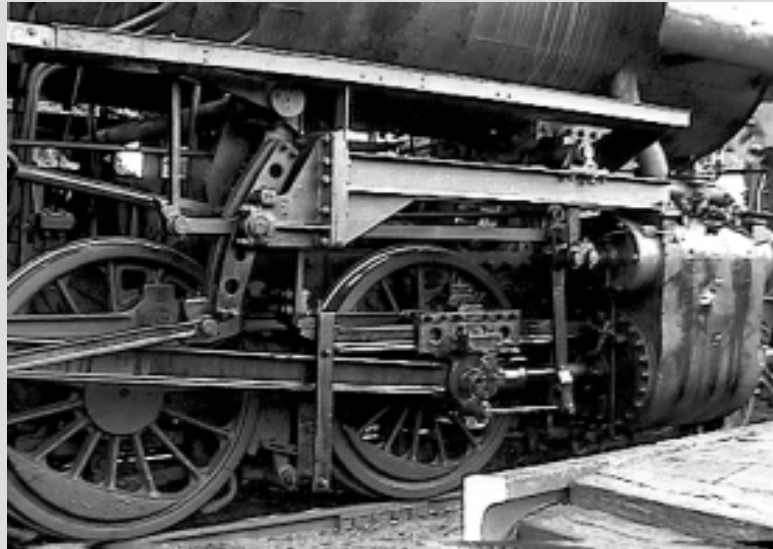


逆フーリエ変換



フーリエ変換

Convolution: example

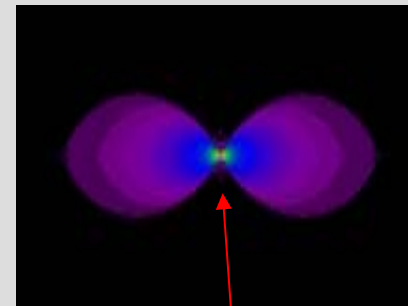
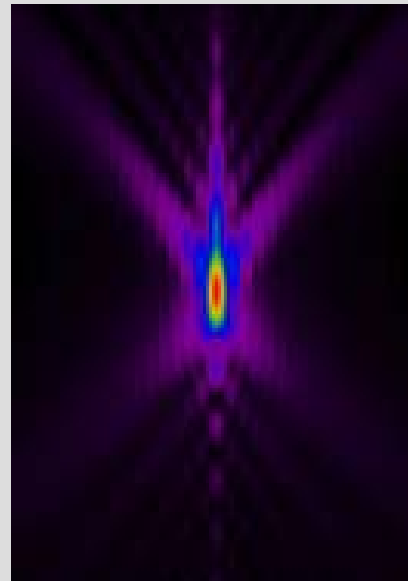


Confocal

Widefield

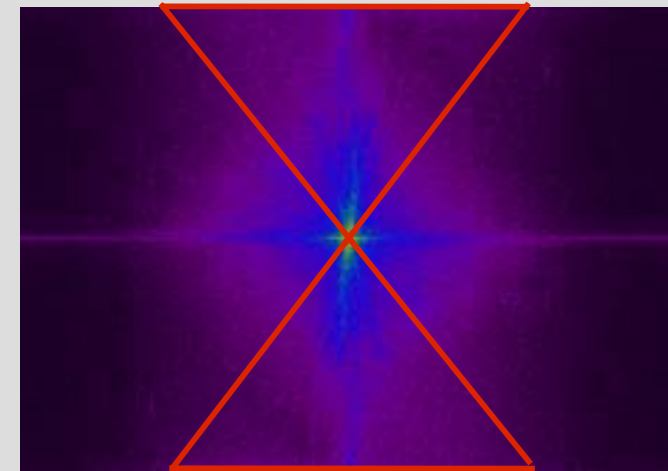
Cutting out frequencies in the Fourier domain

- Wide field 顕微鏡には、固有の光伝達関数 (OTF) があります: 円錐形状領域の周波数は、全く伝えられません。
- WF 光伝達関数 (OTF) で増加することは、水平バー近くの周波数成分の対象物を完全に除去した画像を結果としてもたらしめます。
- この欠陥は、賢明な平面統合された定エネルギー特性に依存します: **決して、ボケをとめられない**。



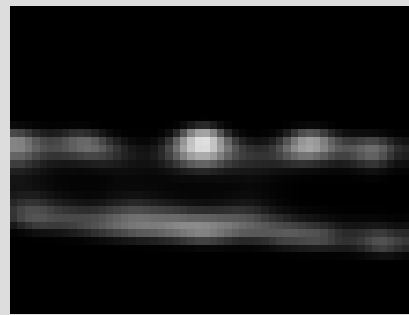
Wide Field 顕微鏡の光伝達関数 (OTF) で失った円錐形状。 水平の画像は、この領域に表されます: これらは、画像になりません。

Huygens の電磁回折理論で計算されるとき、適度な球面収差をもつ widefield PSF の XZ 面。

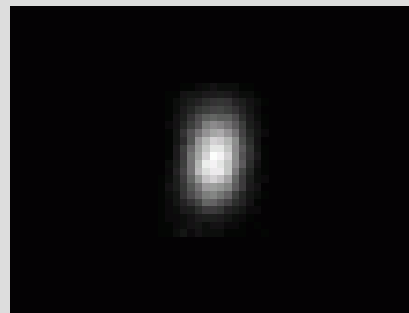
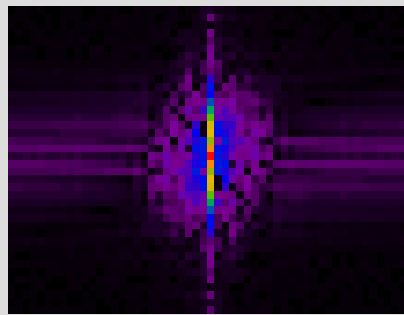


対象物スペクトルのこれらの周波数を切り落とします。

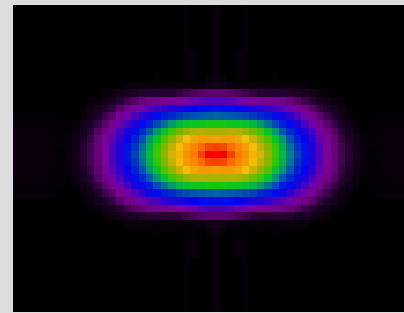
Deconvolution: inverse filtering?



Object

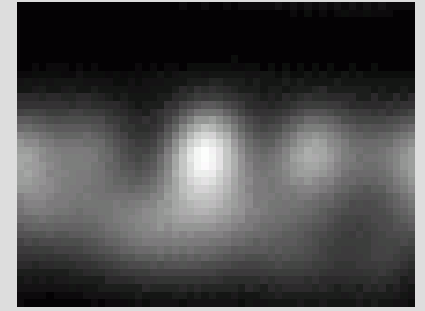
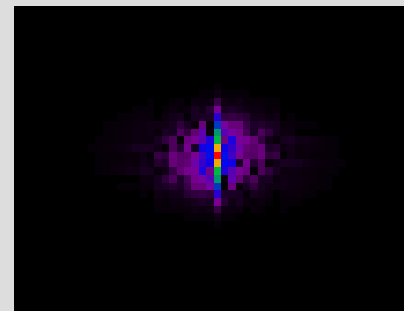


PSF



フーリエ変換

X



逆フーリエ変換

Inverse convolution: Deconvolution

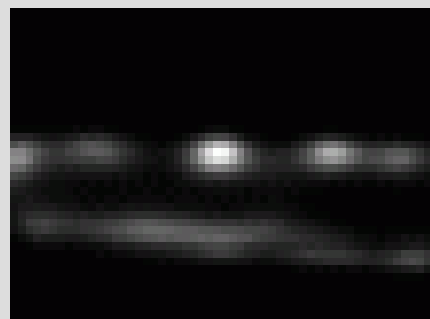
・顕微鏡画像は、元画像と PSF のフーリエ変換の乗算で説明されます。

- このことは、元画像のフーリエ変換が画像のフーリエ変換を PSF のフーリエ変換で除算することを意味します。

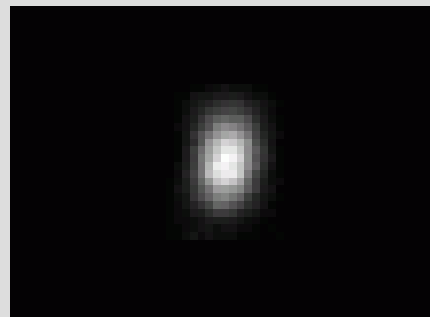
・本当ではない！！

- デコンボリューションは、インバースフィルター技術より複雑です。

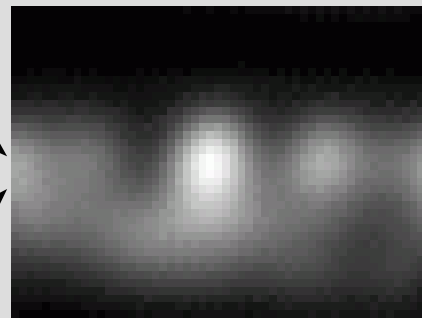
The 'van Cittert' iterative method



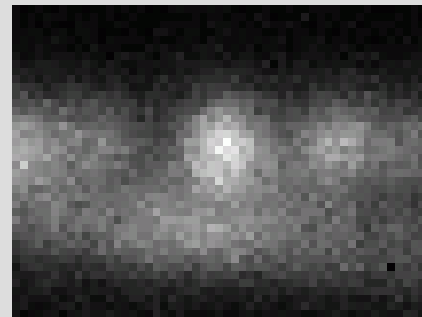
Estimate of object



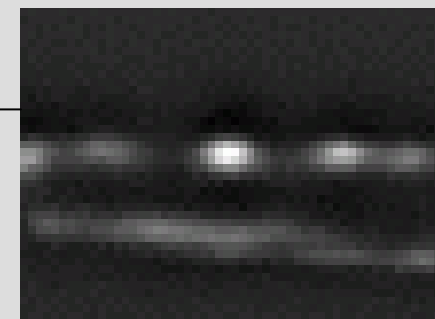
PSF



Imaged estimate



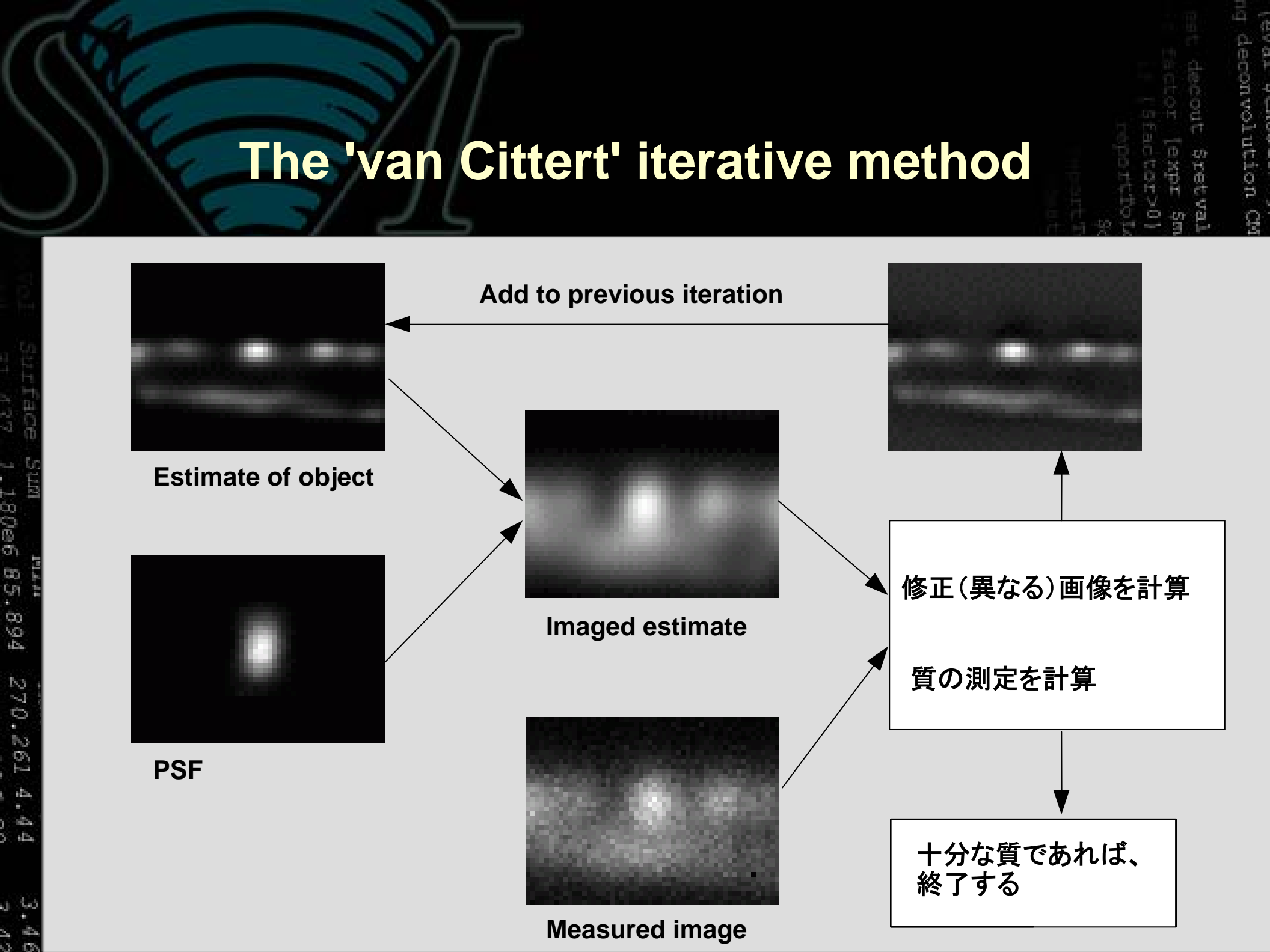
Measured image



修正(異なる)画像を計算
質の測定を計算

十分な質であれば、
終了する

Add to previous iteration



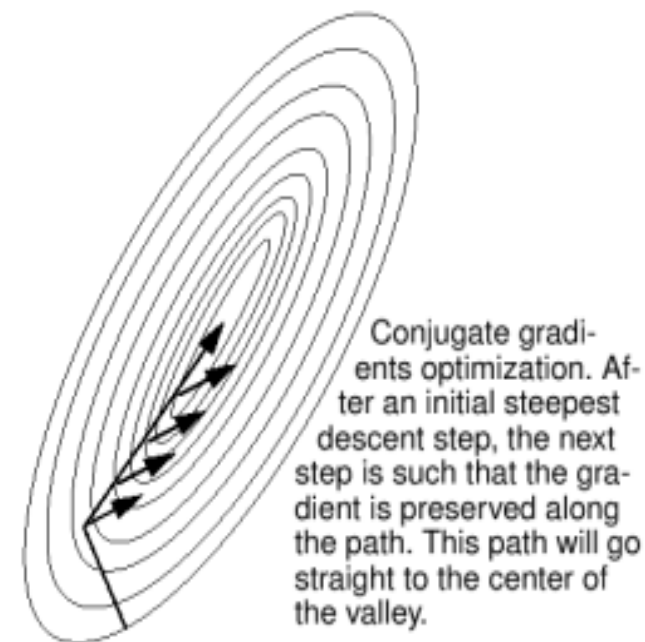
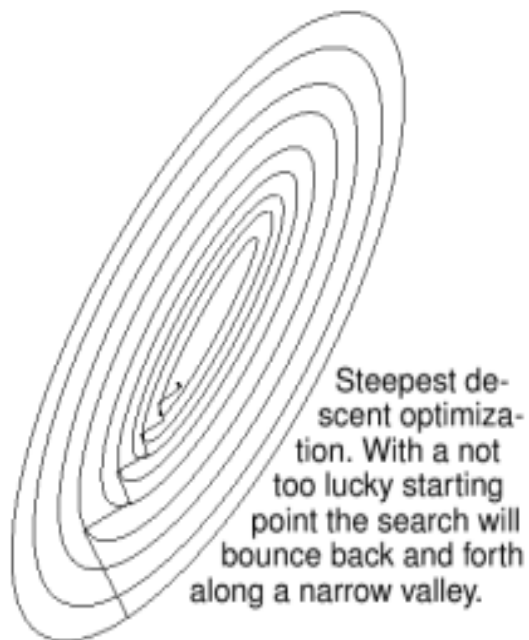
Iterative method

1. 対象物の（賢明な）初期評価をします。
2. **PSF** でこの評価を合成します。
3. 顕微鏡からの画像と結果を比較します。
4. 差異を質の測定に割り当てられます。
5. この質の測定で評価を改善します。
6. 繰り返します。

QMLE: a fast conjugate gradients MLE algorithm

-Quick-MLE アルゴリズムは、共役勾配最適化手法と呼ばれる MLE 解決策を見つけるための最新の体系に基づいています。このテクニックは、ICTM 方法で既に使用されています。これまで、これは、画像復元問題を解決する最も速いことで知られているテクニックです。

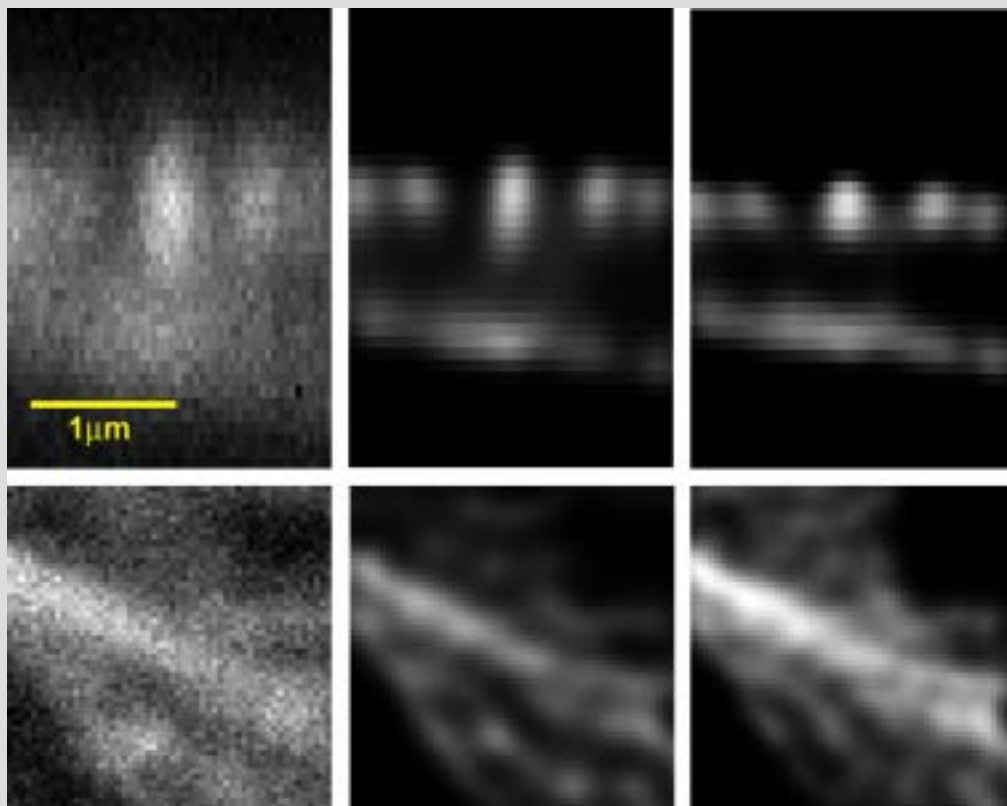
- 各繰り返しは、classic-MLE の 5 回の繰り返しとおおよそ同じくらい有効です。
- 単一面の復元をする極端な例の不完全なデータの素晴らしい処理。



Huygens - MLE

- Maximum Likelihood の概念から直接由来した質評価基準を使用します: I-分散
- 効率よく質評価基準を最適化します。
- 位置の最小値を回避できます。

Measured vs. theoretical PSFs two-photon image of actin filaments

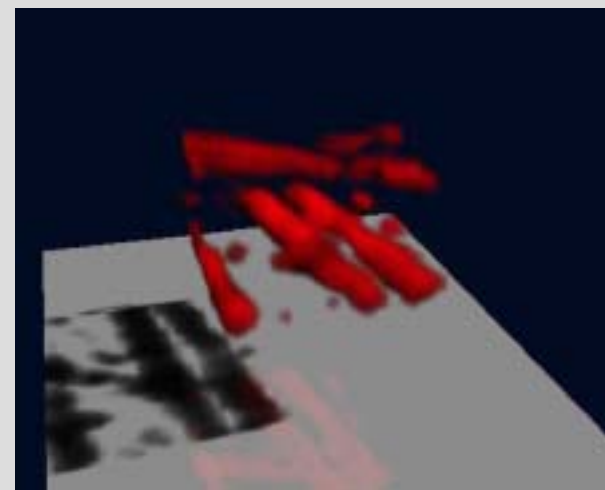


Measured data

Restored, theor.
PSF

Restored, meas.
PSF

2 フォトン共焦点顕微鏡で記録され、理論上の、そして、測定された PSF で、MLE を使い回復したマウス線維芽細胞のアクチン・フィラメント。最大光子数: 204。
上行は、XZ スライス ($y = 32$)、下行は、XY スライス ($z = 11$)。右図: SFP レンダリング

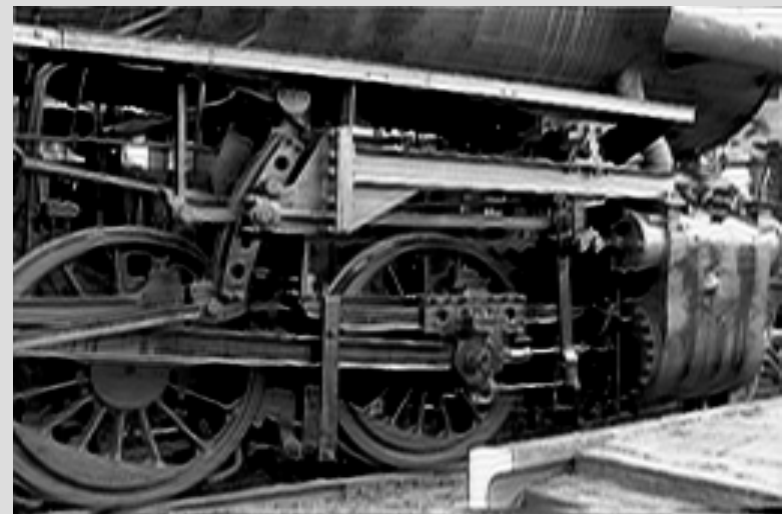


- 理論上の PSF では、事実上、ノイズを減少させて、容易に 2 倍以上の軸解像度改善を達成できます。
- 測定した PSF では、軸解像度改善は、3 - 4 倍に増加します。

Results

Widefield

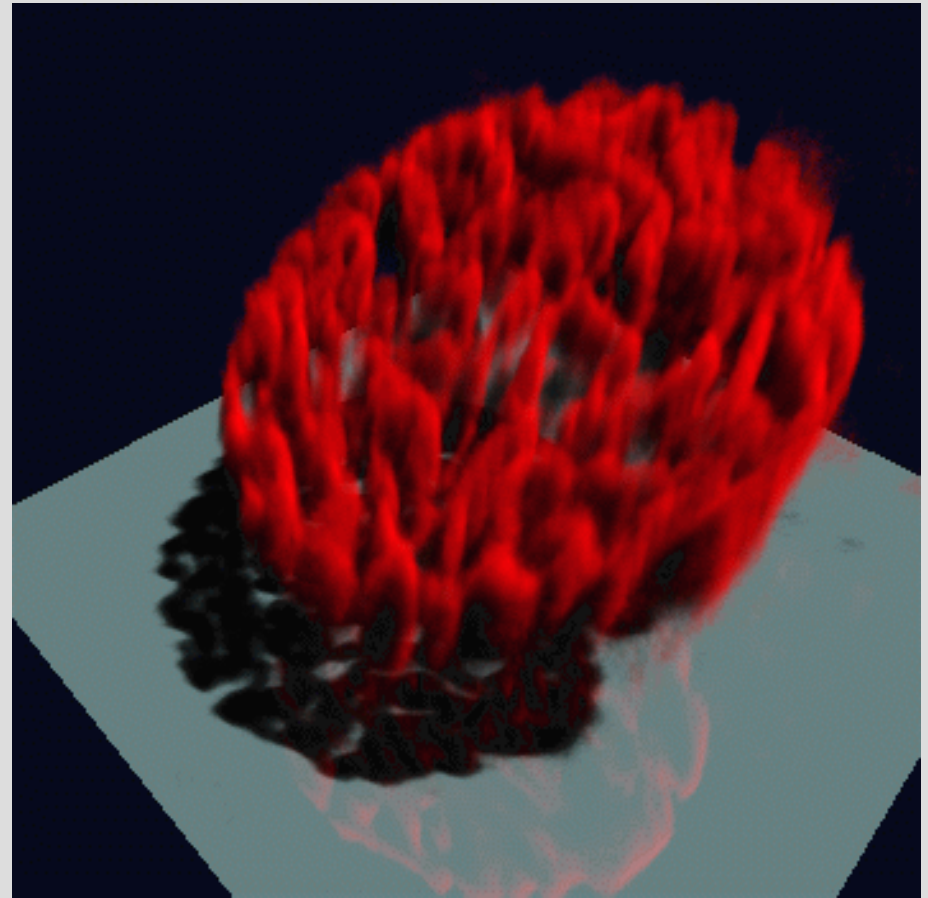
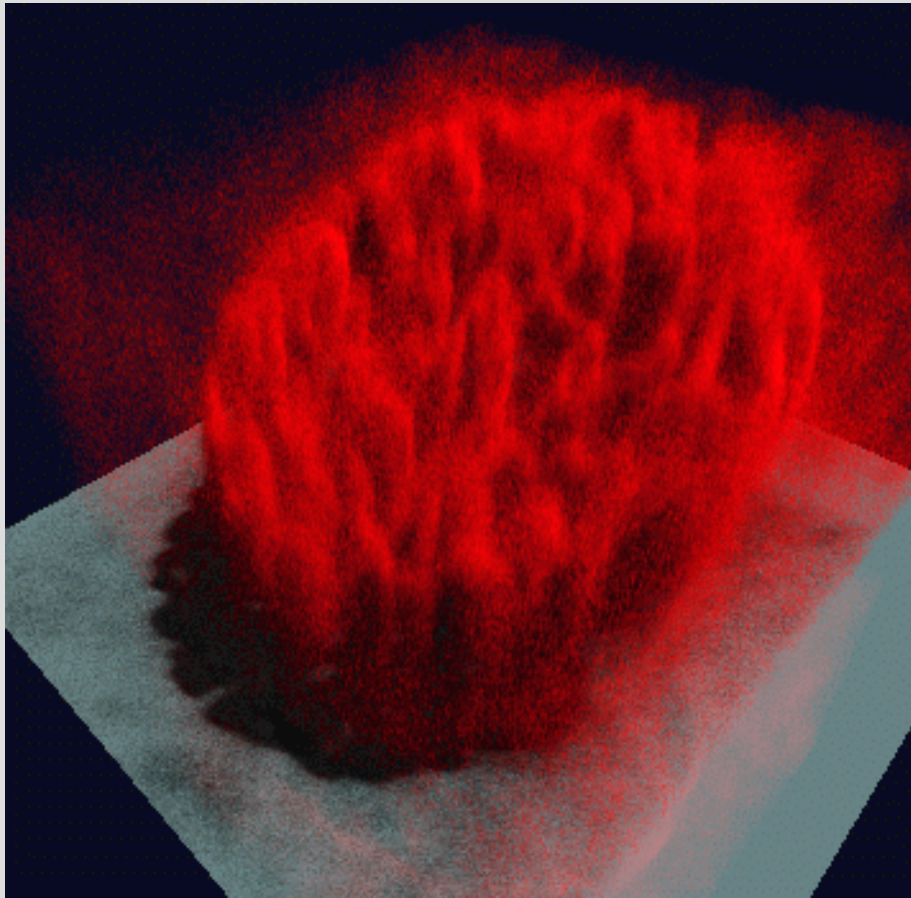
Confocal



COL SURFACE SUM 1.180e6 85.894 270.261 4.44 3.46

set decout \$retval
factor [expr \$m
(5factor>0)
reportFov
reportT
out

Volume rendering sea urchin chromosomes

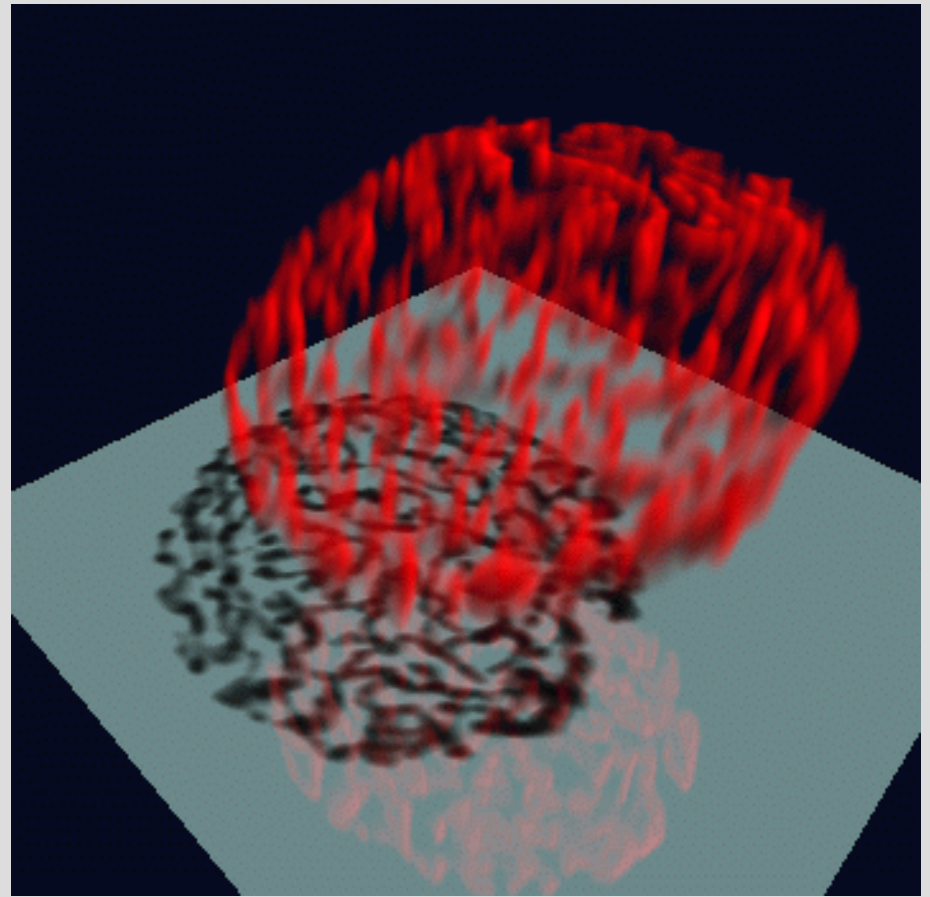
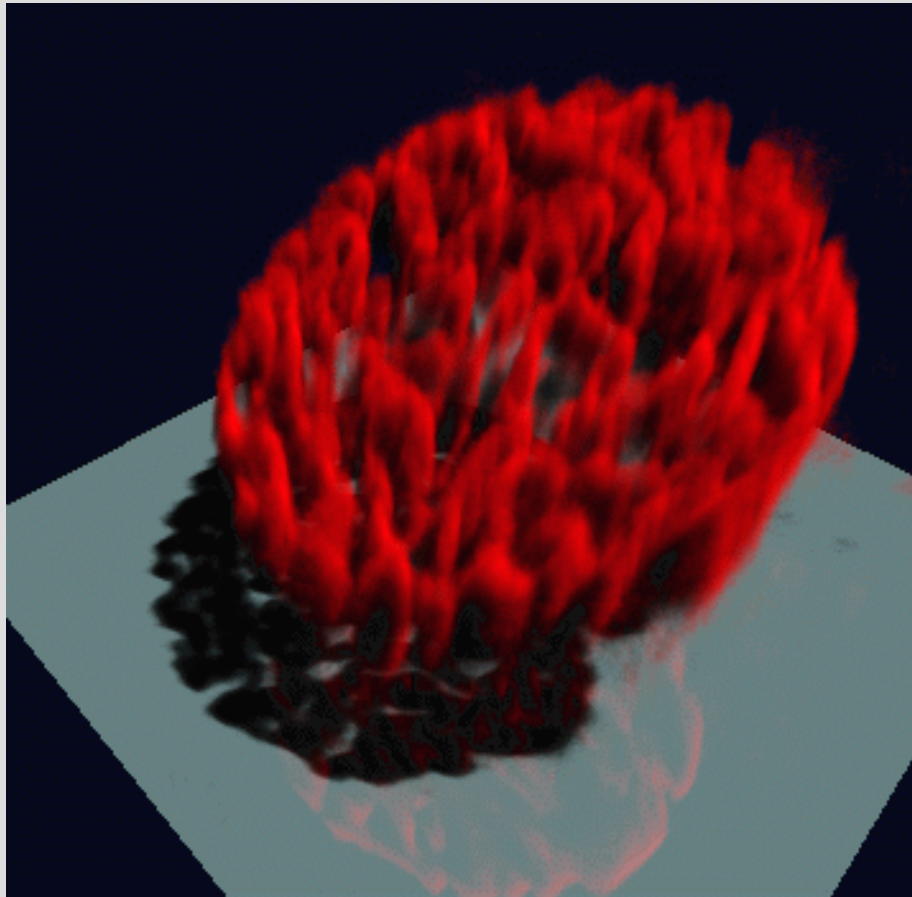


左図：バックグラウンドをスレッシュホールド後

右図：3D ガウスノイズフィルターストソフトスレッシュホールドを適用後

Image recorded by Prof. Thomas Baechi, University Zürich, Switzerland

Volume rendering the deconvolved sea urchin nucleus

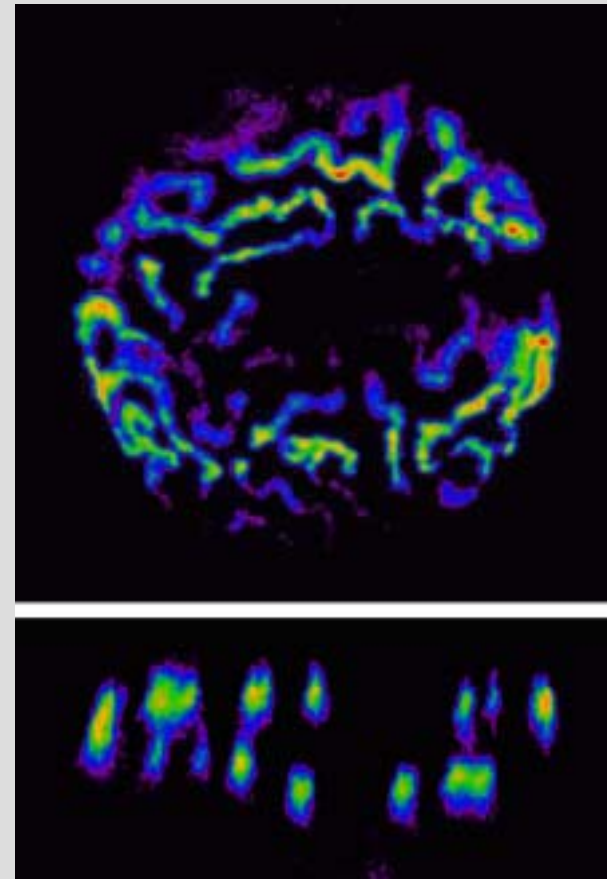
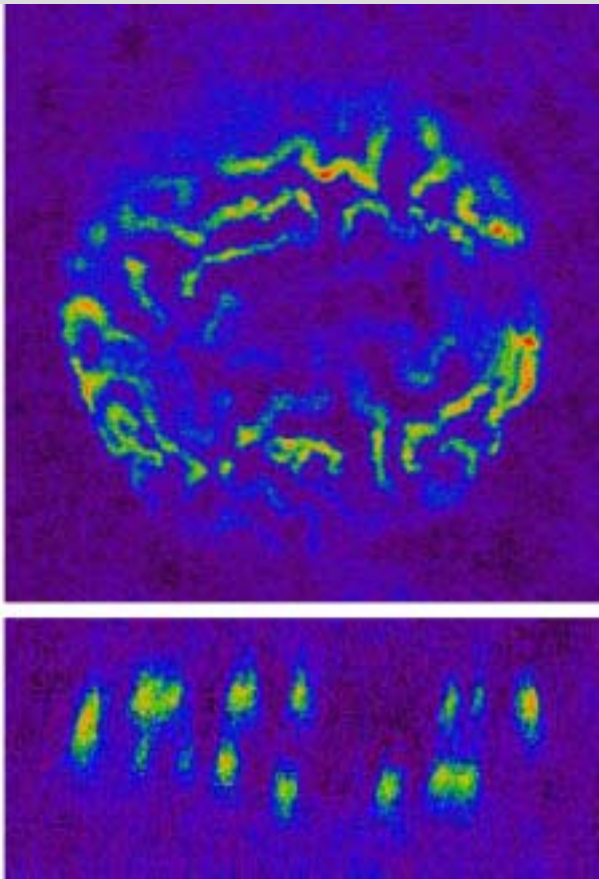


左図: 3D ガウスノイズフィルターとソフトスレッシュホールドを適用後

右図: Huygens システムで画像復元を適用後

Image recorded by Prof. Thomas Baechi, University Zürich, Switzerland

Confocal volume image: sea urchin chromosomes

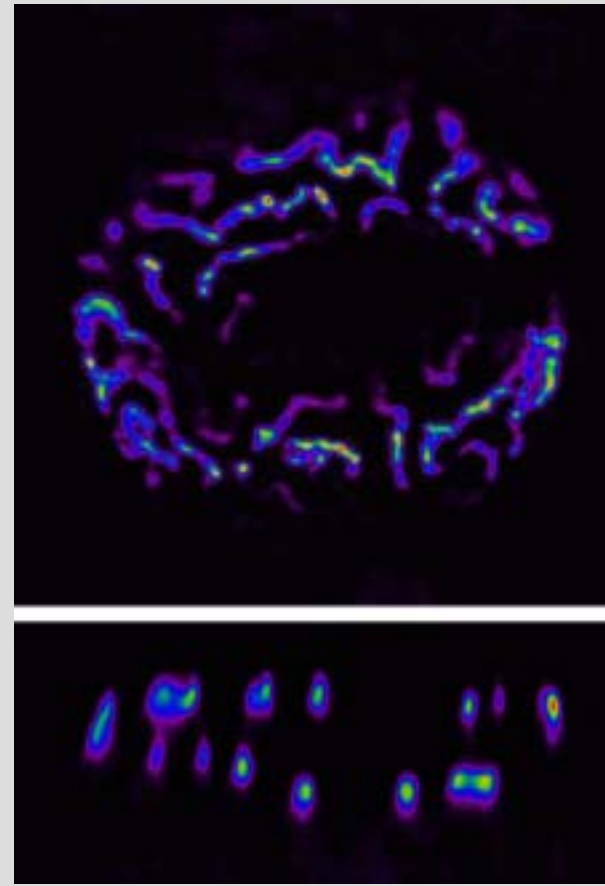
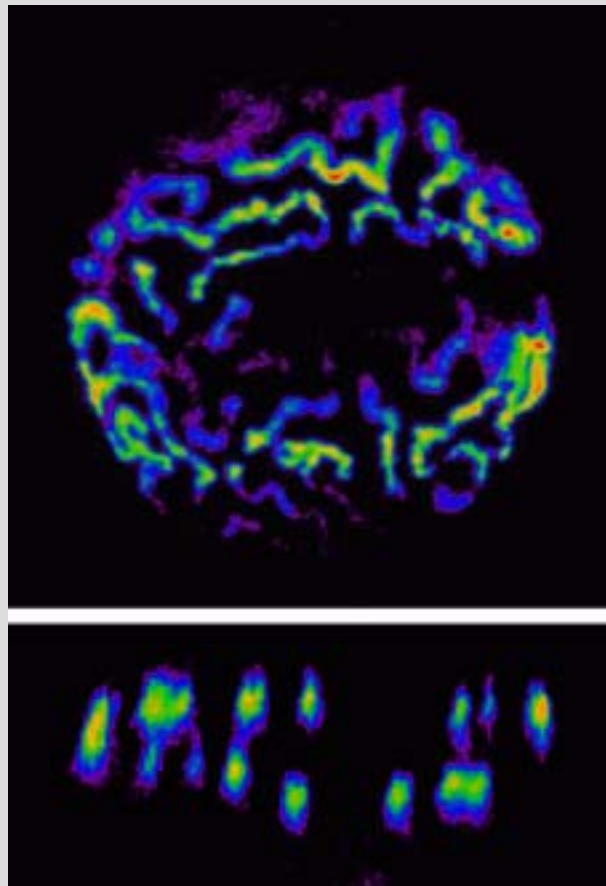


左図：オリジナル画像

右図：3D ガウスノイズフィルタ適用後

Image recorded by Prof. Thomas Baechi, University Zürich, Switzerland

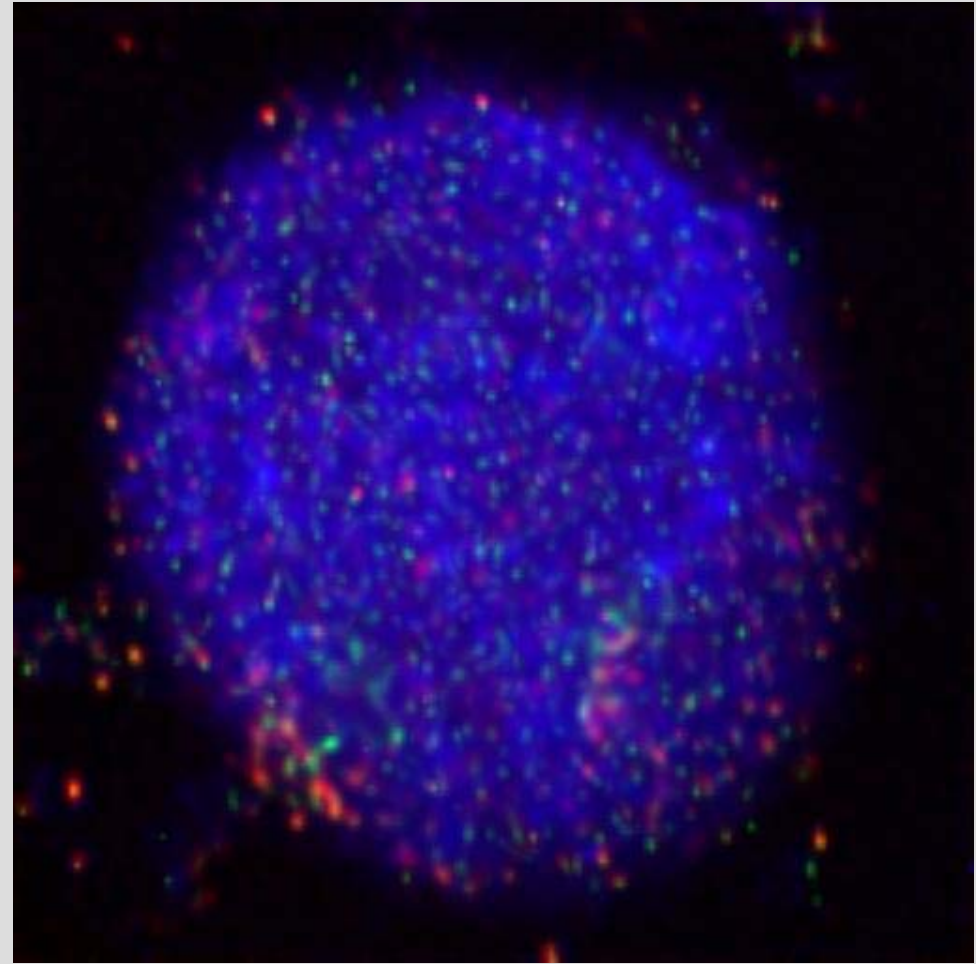
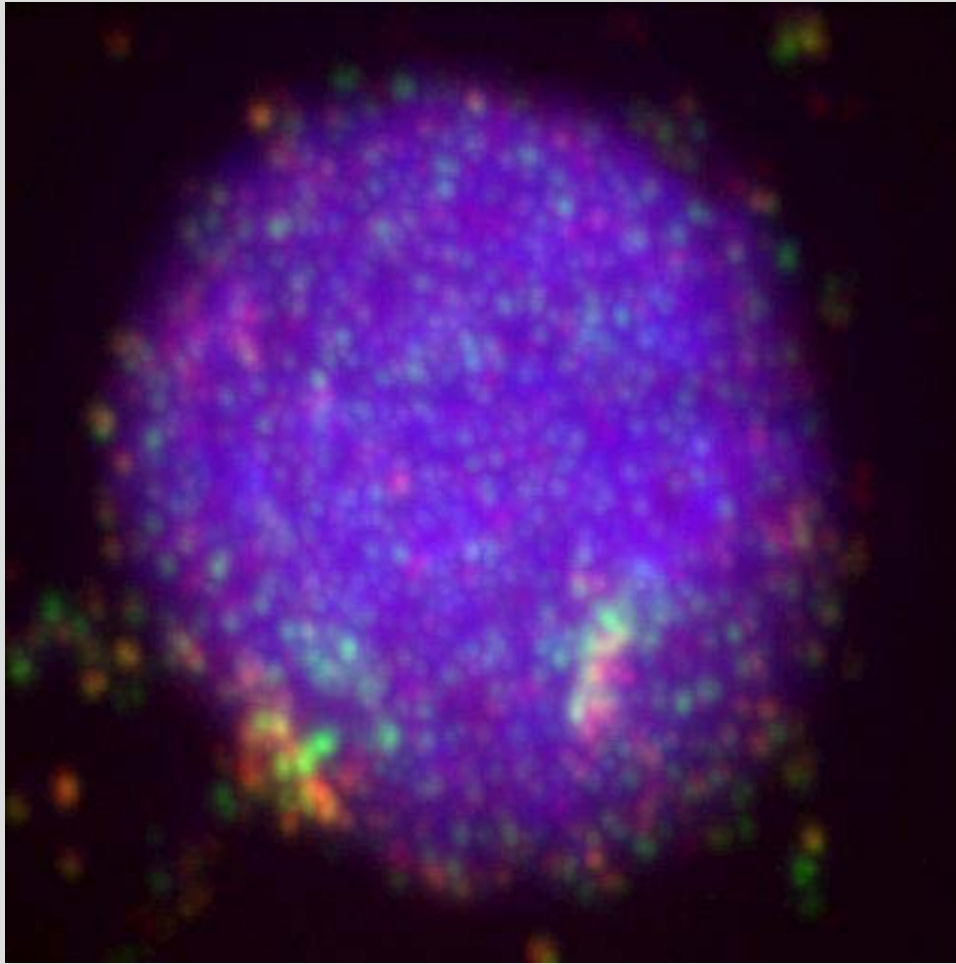
Confocal volume image: sea urchin chromosomes



左図: 3D ガウスノイズフィルターを適用後
右図: Huygens システムで画像復元を適用後

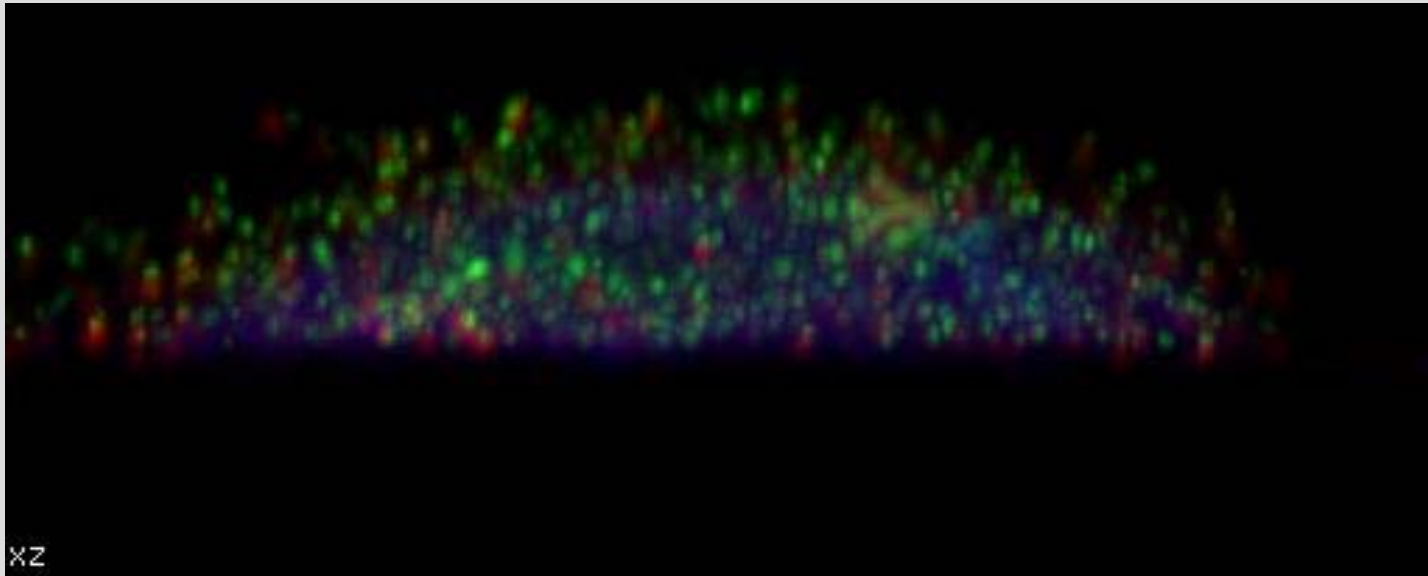
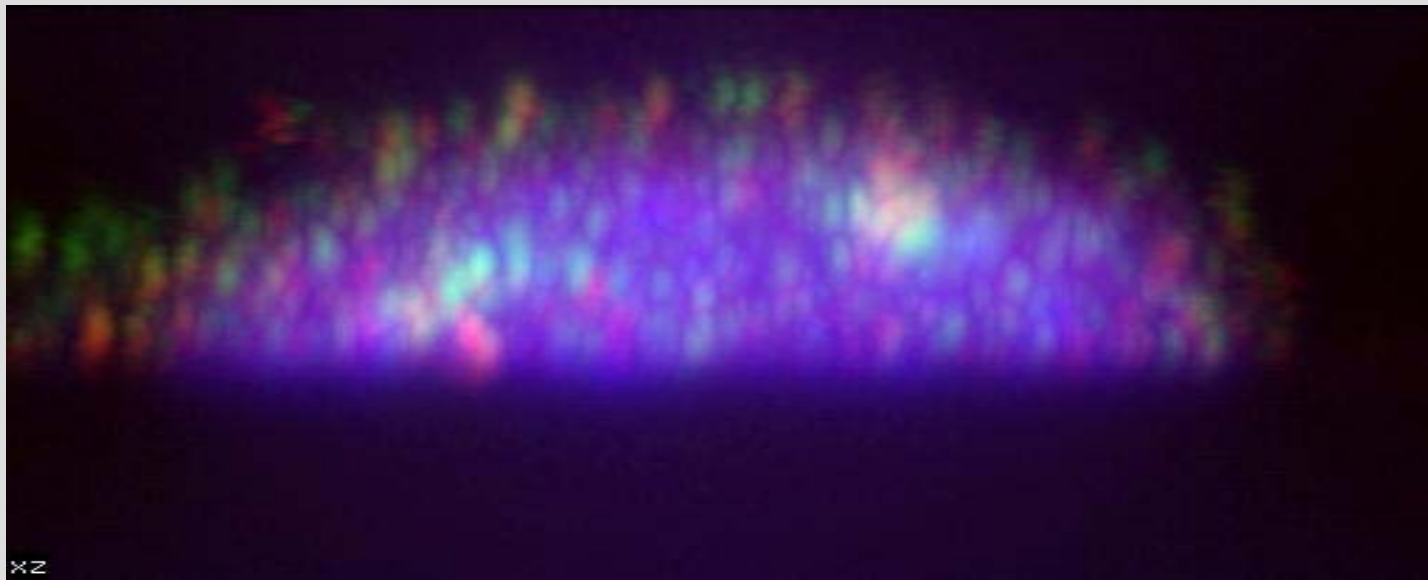
Image recorded by Prof. Thomas Baechli, University Zürich, Switzerland

Restoration results for Nipkow confocal data



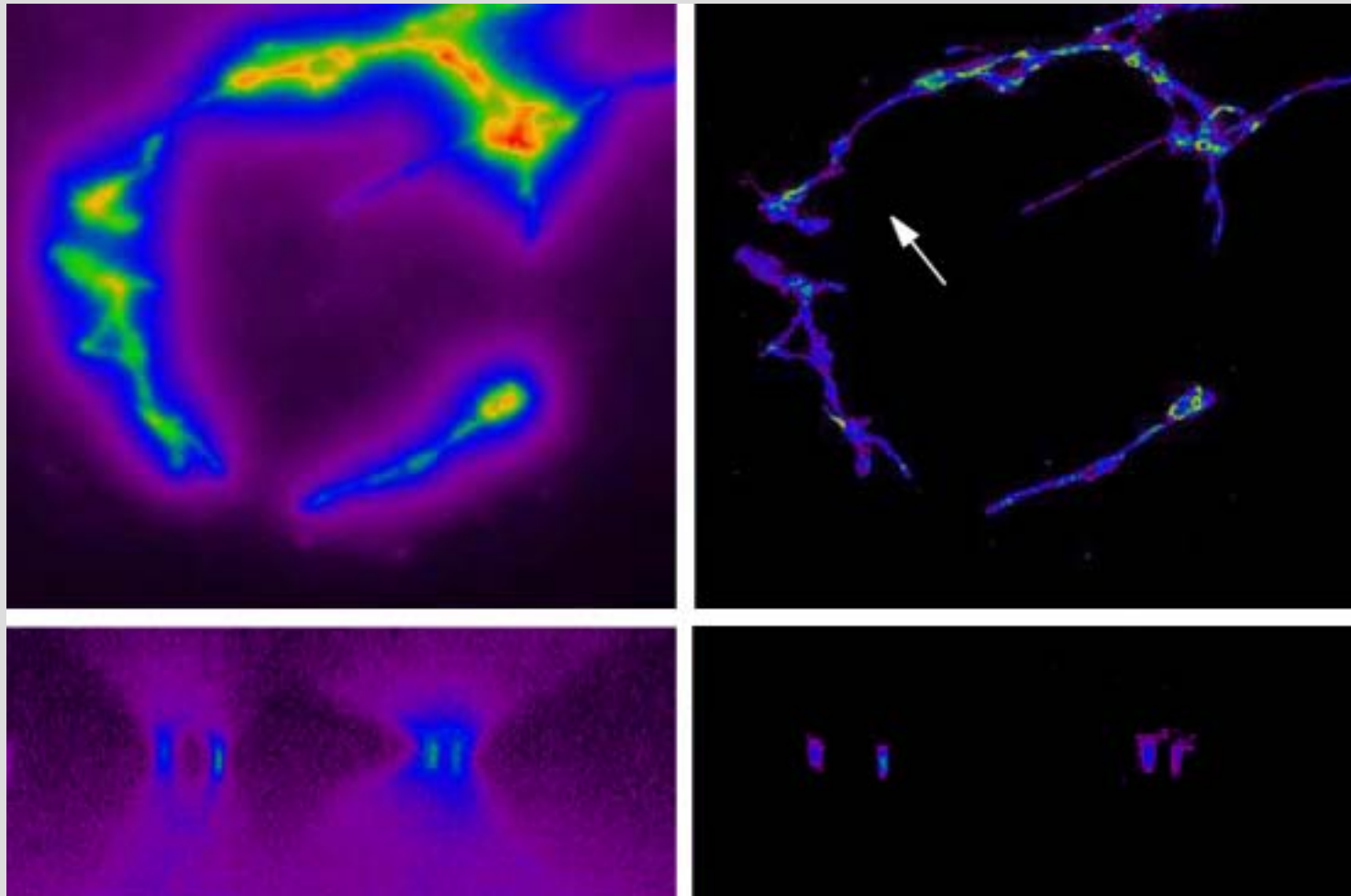
Data courtesy Dr. Kozubek, Brno, Czech republic,
FP6 3DGenome Project <http://3dgenome.uva.sara.nl>

Restoration results for Nipkow confocal data



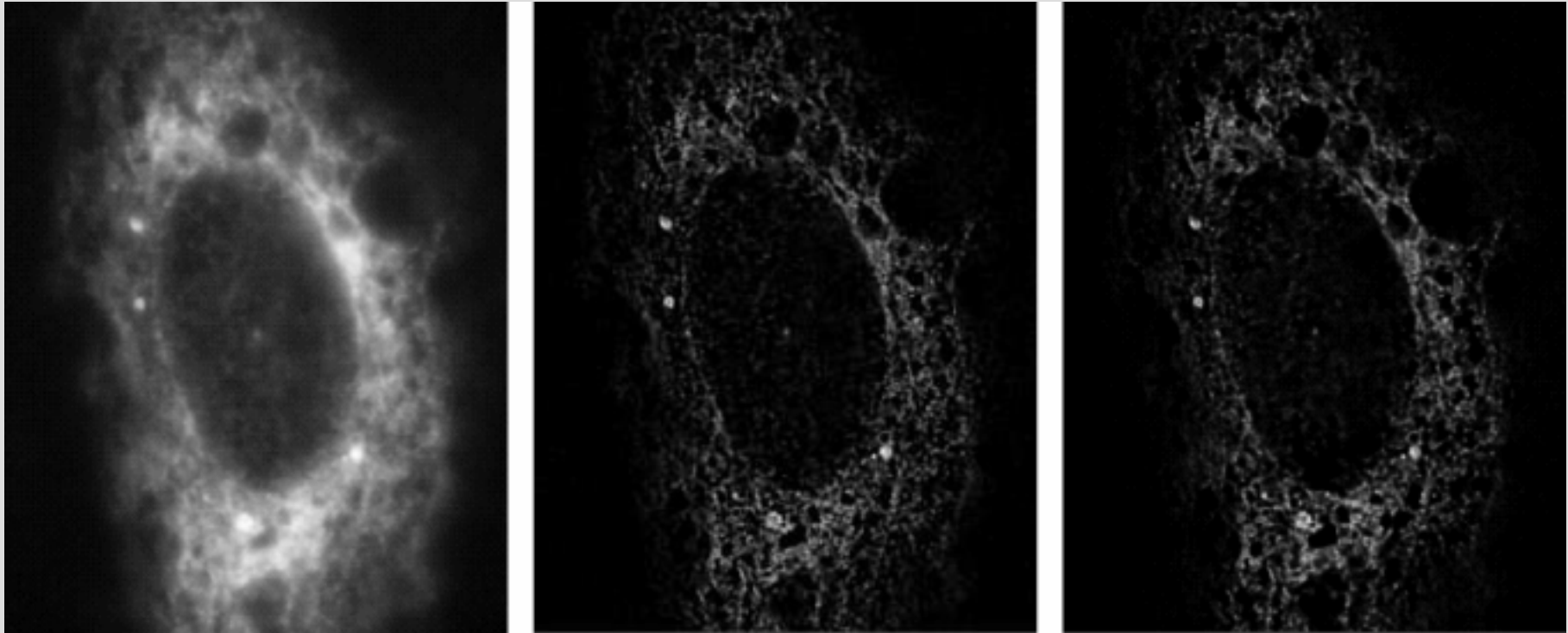
Data courtesy Dr.
Kozubek, Brno, Czech
republic,
FP6 3DGenome Project
3dgenome.uva.
sara.nl

Deconvolving Wide Field images



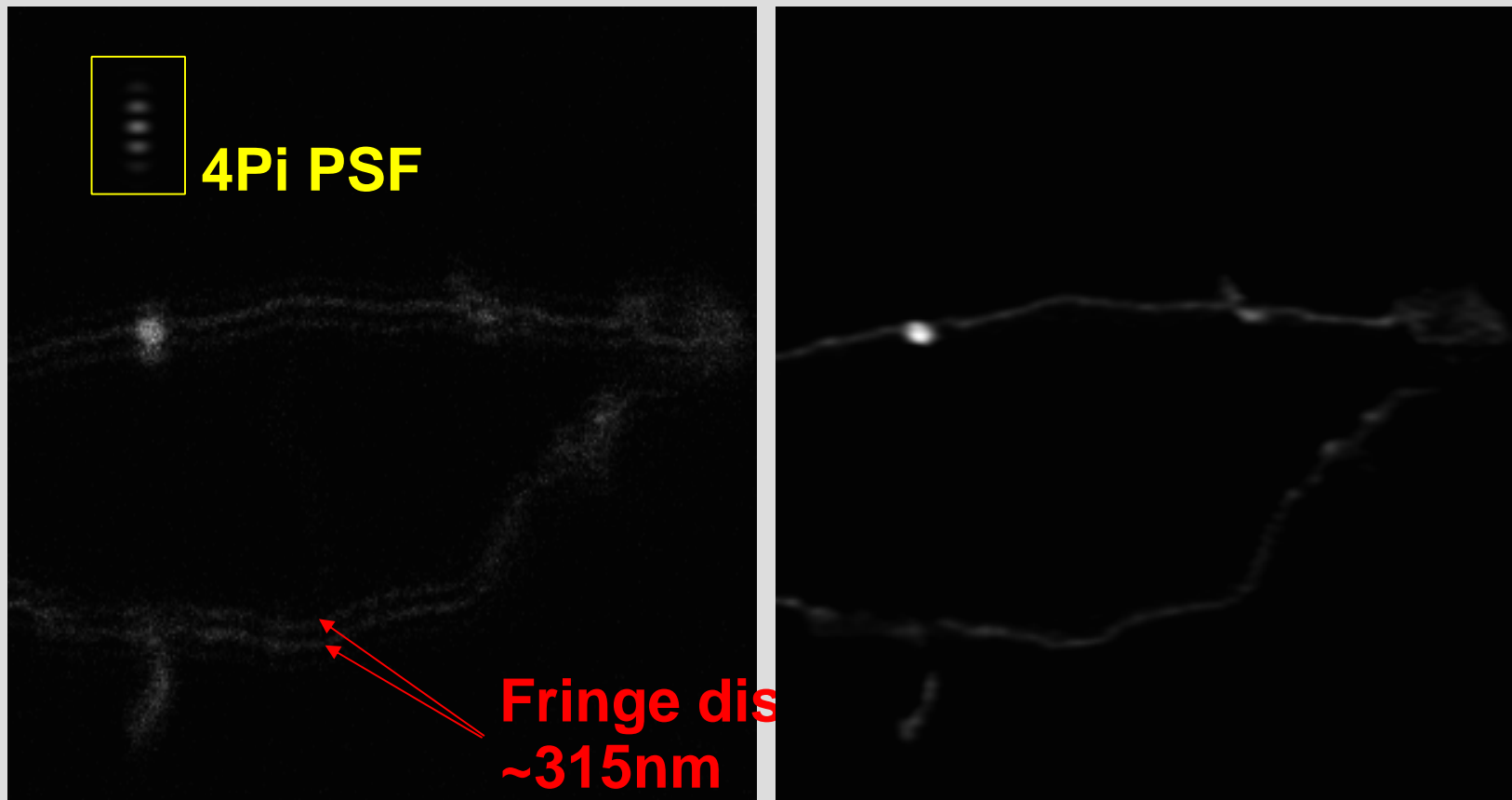
Wide Field 顕微鏡
のゴルジ体（左列）。
そして、デコンボリ
ューション後（右列）。
上段: XY スライス。
下段: XZ スライス。
ボケは、実際に取り除
かれ、大変薄い構造
の可視化を改善しま
す（白い矢印）。

Deconvolving 2D Wide Field Image



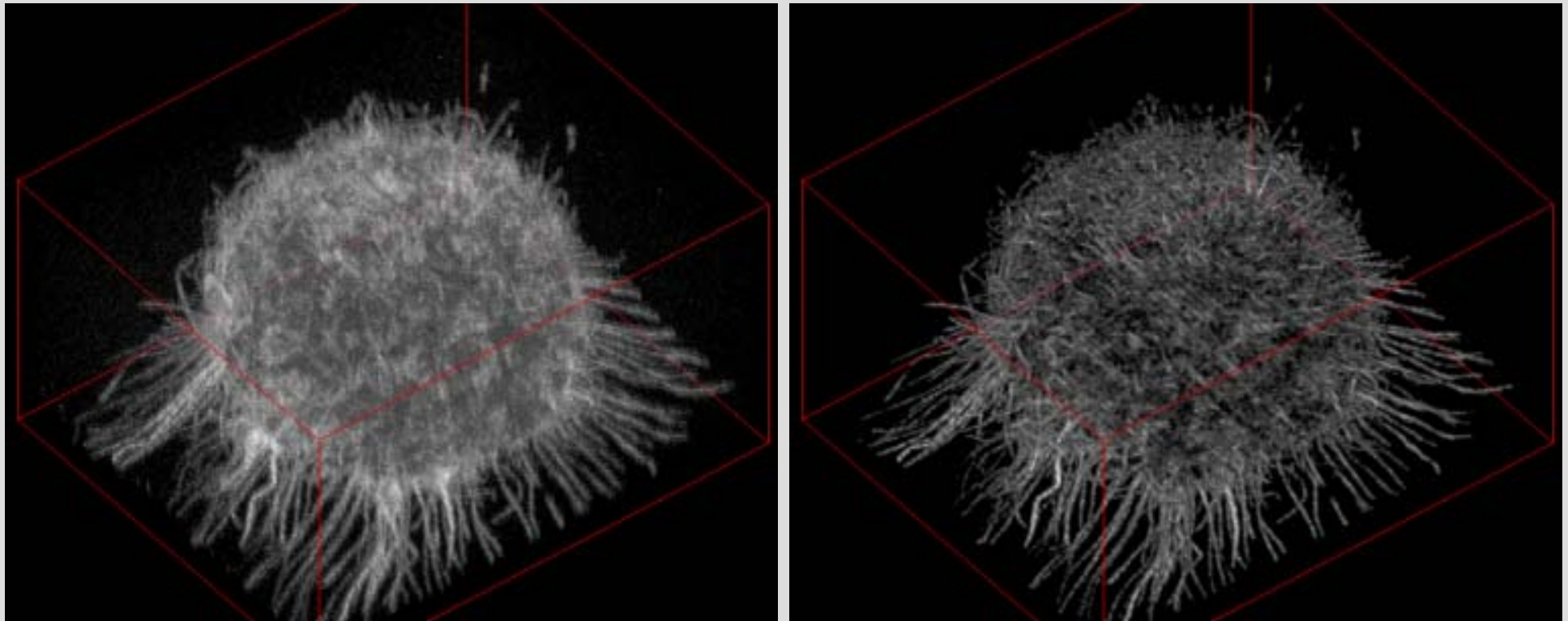
左: 細胞の Wide Field 画像。3D データセットからの単一 2D 面。
中央: 単一面の 2D 回復。
右: 回復した完全なデータセットからの同じ面。
データは、Dr. P. Travo, CNRS, Montpellier, France

Restoration of 4Pi confocal images



- 測定して、復元した 4Pi データ (XZ 断面)。4Pi 画像の復元は、測定データのフリンジの存在のために特に難しいです。フリンジは、4Pi PSF (挿入図) のサイドローブのためです。Data courtesy Prof. C. Cremer, Kirchhoff Institute for Physics, Heidelberg, Germany, FP6 3DGenome Project.

Visualizing a 4Pi dataset



Maximum Intensity Projection で描写された 4Pi 2 フォトン。左図: 生データ。右図は、デコンボリューション処理後。Data courtesy Dr. Tanjef Szellas, Leica Microsystems GmbH , Mannheim, Germany

Acquisition note

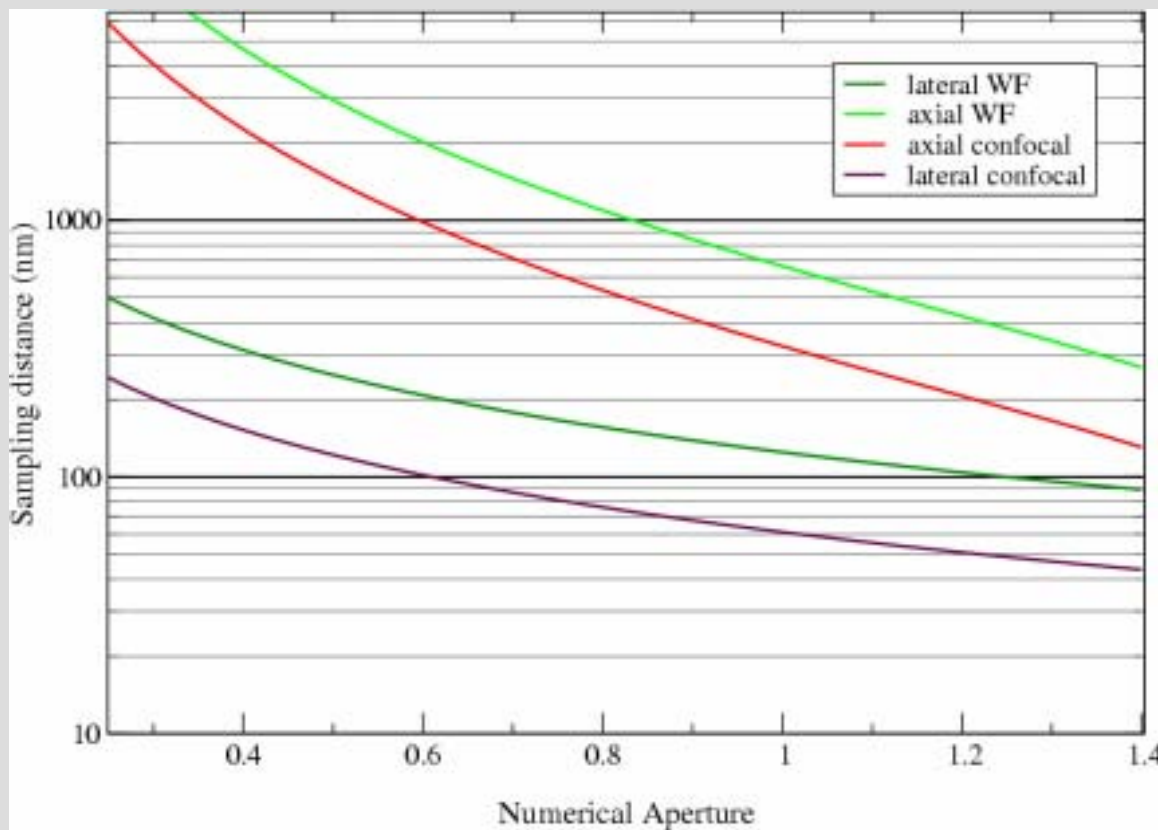
• Nyquist ratio に従ったサンプリング

- 顕微鏡が対象物について伝えるすべての情報を取得するために、顕微鏡が伝えることができる最も高い周波数の 2 倍のサンプル周波数を使用する必要があります。
- 以下に依存します：
 - 顕微鏡タイプ
 - 開口数 (NA)
 - 波長

Acquisition Pitfall examples

- 光学的: 球面収差 (S.A.)、歪、褪色...
- 機械的: ドリフト、動作、スキヤニング
- 検出: クリッピング、アンダーサンプリング

Nyquist sampling



經驗則：

Confocal, Nipkow

Lateral: 50nm to 80 nm

Axial: 150nm to 200nm

Widefield

Lateral: 100nm to 130 nm

Axial: 200nm to 300 nm

Important factors

1. PSF
2. 適切なサンプリング
3. クリッピングを回避
4. 復元パラメータ

Conclusions

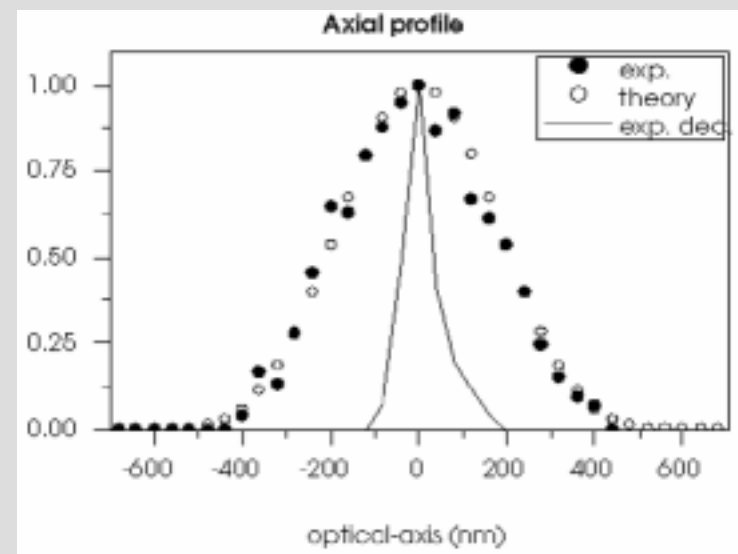
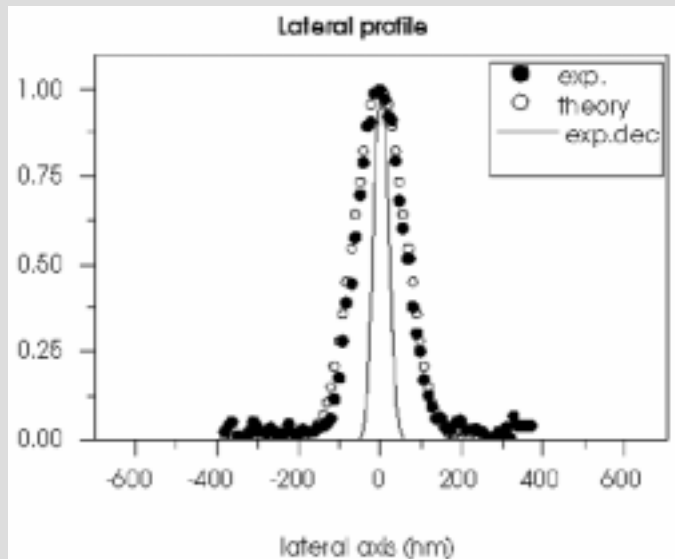
・画像復元は、顕微鏡ボリュウム画像のビジュアライゼーションと解析に主要なテクニックです：

- コンボリューションは、対象物の詳細を隠す問題です。
 - CF と WF の両方での歪み
- デコンボリューションは、これらの詳細を復元する良い仕事をします。
- 画像である限り、適切に取得されます。

・あらゆるタイプの高解像度画像にもデコンボリューションを使用してください！

The limit ?

反射する金粒子を高精度ステージ共焦点顕微鏡で画像取得した Stefan W. Hell による実験で回復された共焦点顕微鏡で達成できる解像限界は、研究されています。
結果は、100 nm オーダーの軸解像度 (FWHM) と 50 nm オーダーの水平解像度を示しています。



… これは顕微鏡の解像力に関する最終的な答えですか? いいえ!
共焦点検出器に結合された 4- $\pi/2$ フォトン励起と MLE 画像回復の使用で、サブ-100 nm 領域での解像度は可能です。

Huygens software

Processing stages

- * データをロードして、任意に切り取ります。
- * 光学パラメータをチェックします。
- * デコンボリューションパラメータを確証します。
- * **Iterations** を実行します。
- * 結果を保存します。

Essential vs Professional

- GUI のようなウィザード形式。4 つのステージは、デコンボリューション手順をガイドします。

- CMLE (バッチプロセッサ、QMLE 利用可能)

- チャンネルごとに異なったパラメータ設定が可能なデコンボリューション

- 画像ビジュアライゼーションと解析の多くの可能性をもつ広範囲にわたる GUI ツールボックス

- CMLE – QMLE – ICTM (MLE – TM)

- 1 つの操作で全てのチャンネルを自動でデコンボリューション



***For more details, visit
support.svi.nl/wiki***



Huygens Software
by Scientific Volume Imaging