

Huygens Deconvolution



Huygens Software

by Scientific Volume Imaging

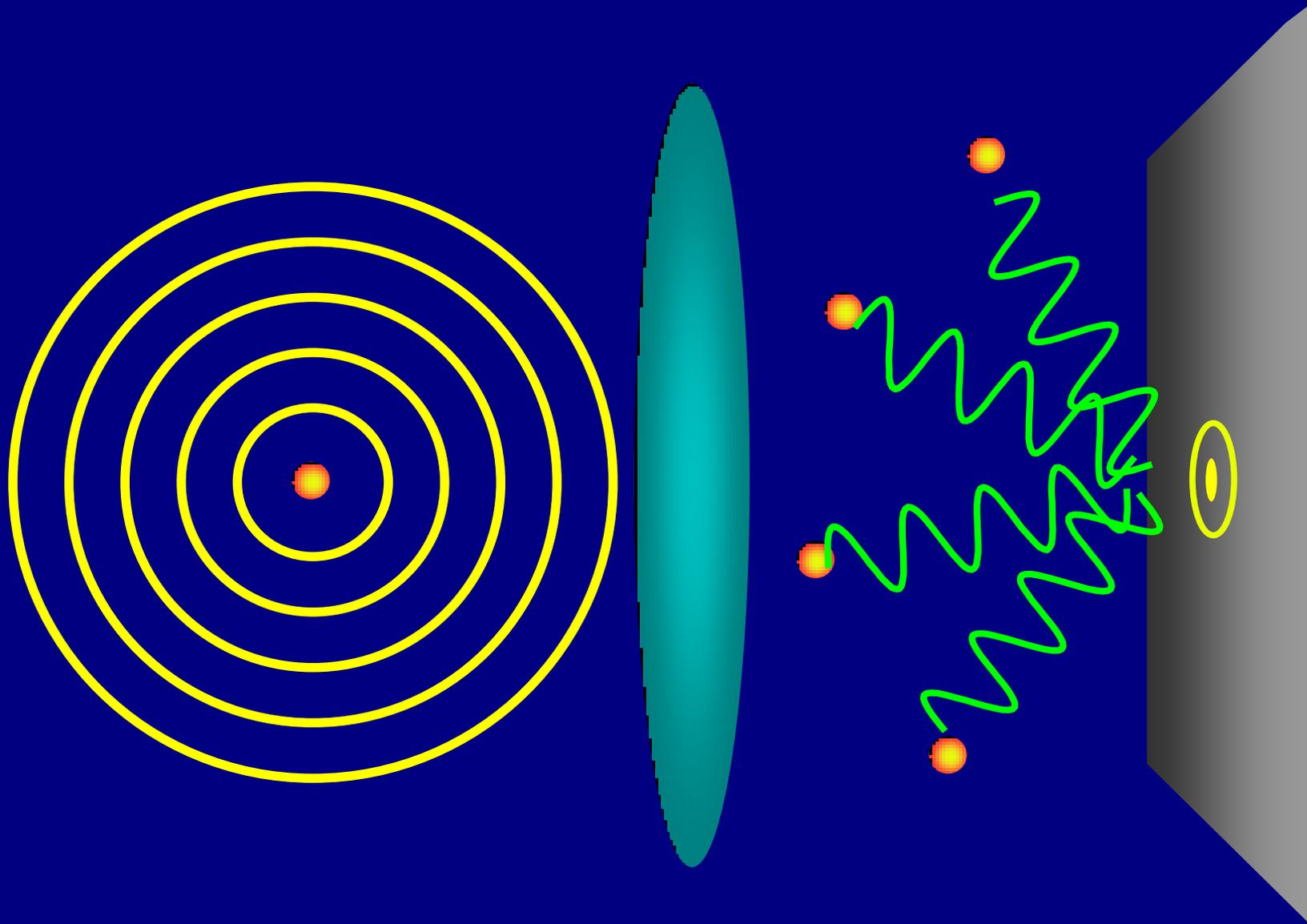
Degrading processes

顕微鏡において、ぼやけは、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 画像復元を使用した数学的な処理です。

Image formation



The Airy distribution at the focus

$$\text{resolution} = 0.61\lambda / \text{NA}$$

焦点の周囲は、弱め合う干渉の位置に対応する暗いリング、そして、強め合う干渉で異なる程度をもつより明るいリングです。中心にある中央のディスクをエアリーディスクと呼びます。開口が、高いほど、ディスクは、より小さく、より良い解像度です。

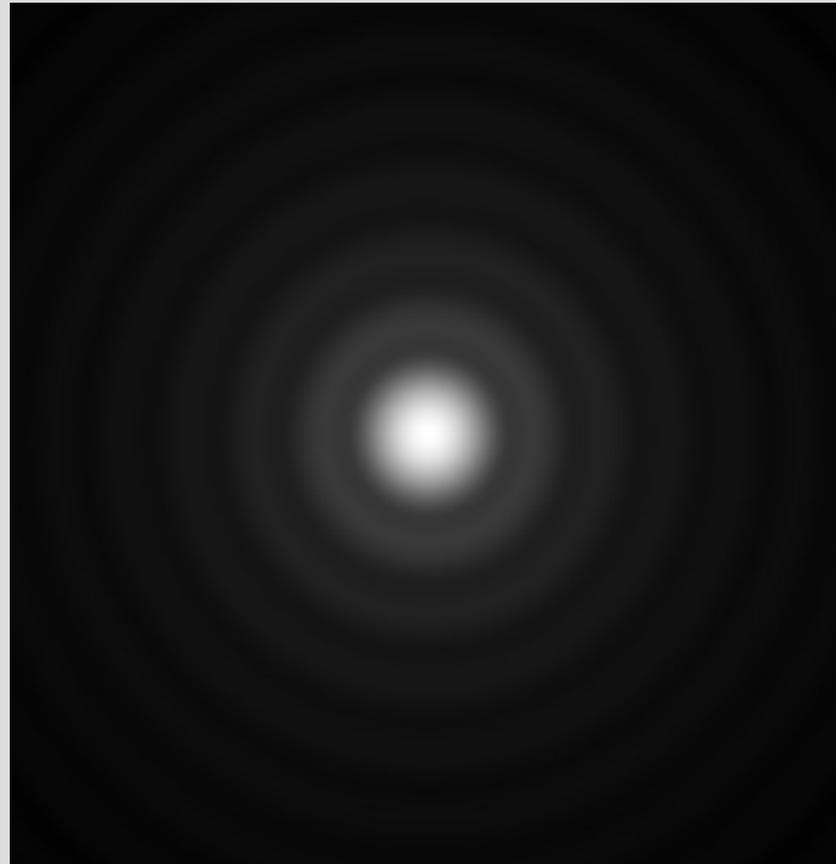
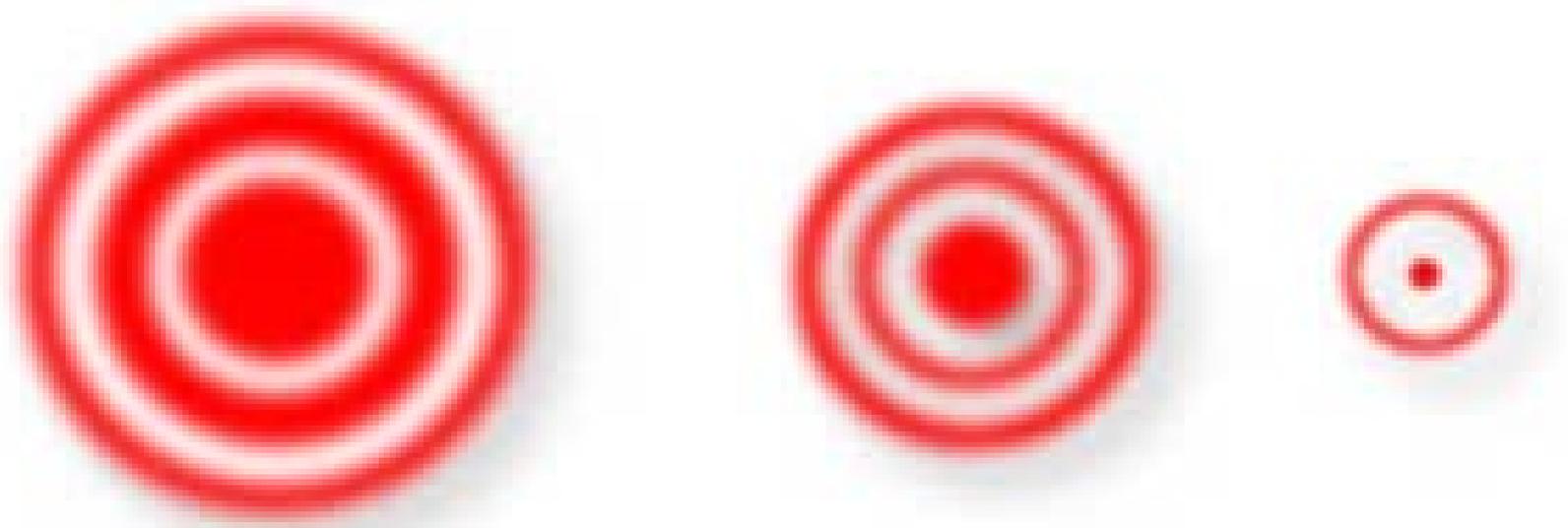


Image formation

Circular Aperture Airy Disk Patterns



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

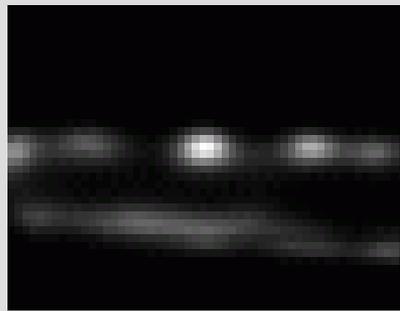
Microscopic imaging

■ 点像分布関数 PSF

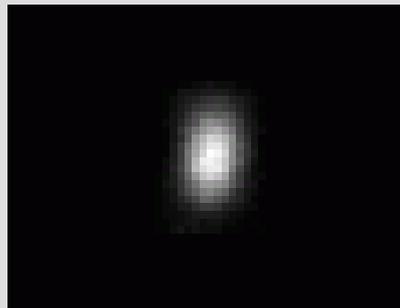
- 画像取得時に点像は、広がります
- PSF の総計は 1 です
- PSF は、以下に依存します：
 - 顕微鏡タイプ (confocal, widefield 等)
 - 画像取得パラメータ (開口数 NA、波長 等)

■ PSF による画像歪をコンボリューションと呼びます

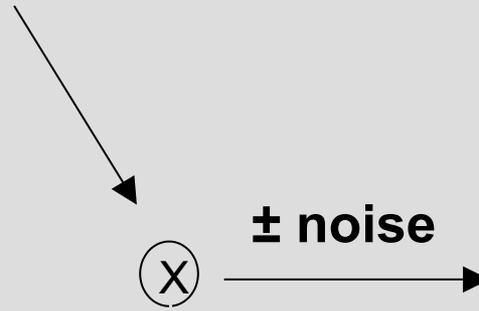
Microscopic imaging: Convolution



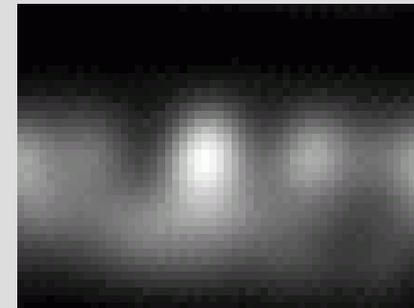
Object



PSF



XZ slices



Image

Spatial frequencies

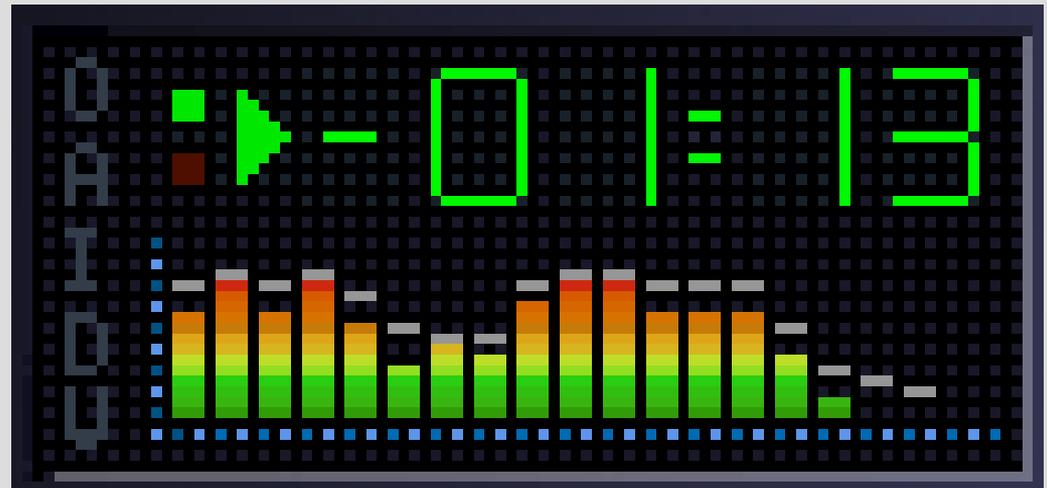
- 空間周波数は、ある微細レベルで対象物の(周期的な)成分を表します。
 - ◆ あいまいな対象物は、わずかな高周波数成分しか含みません；
良い質感の対象物は、多くの高周波数成分を含みます。
- 空間周波数成分に対象物を分解することをフーリエ解析と呼びます；この操作は、フーリエ変換です。

フーリエ変換の特性：

- 2つの関数を畳み込む(コンボリューション)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。

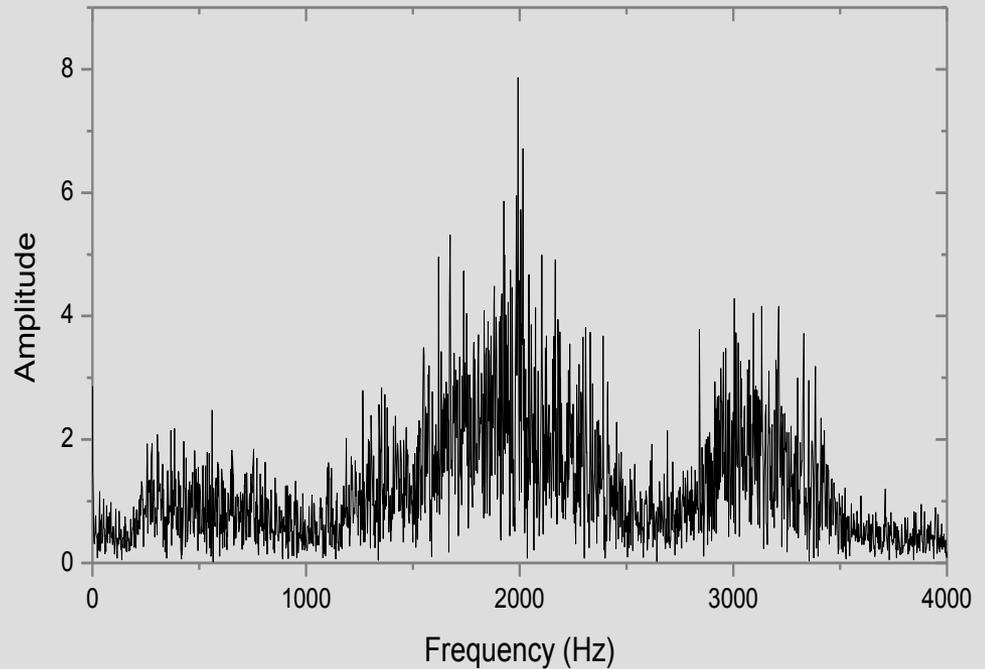
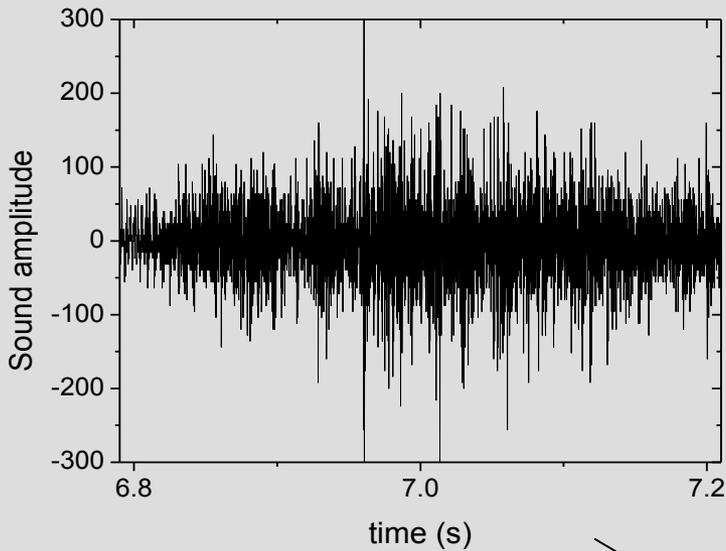
Fourier transforms

Frequency analysis, like in a music player



Fourier transforms

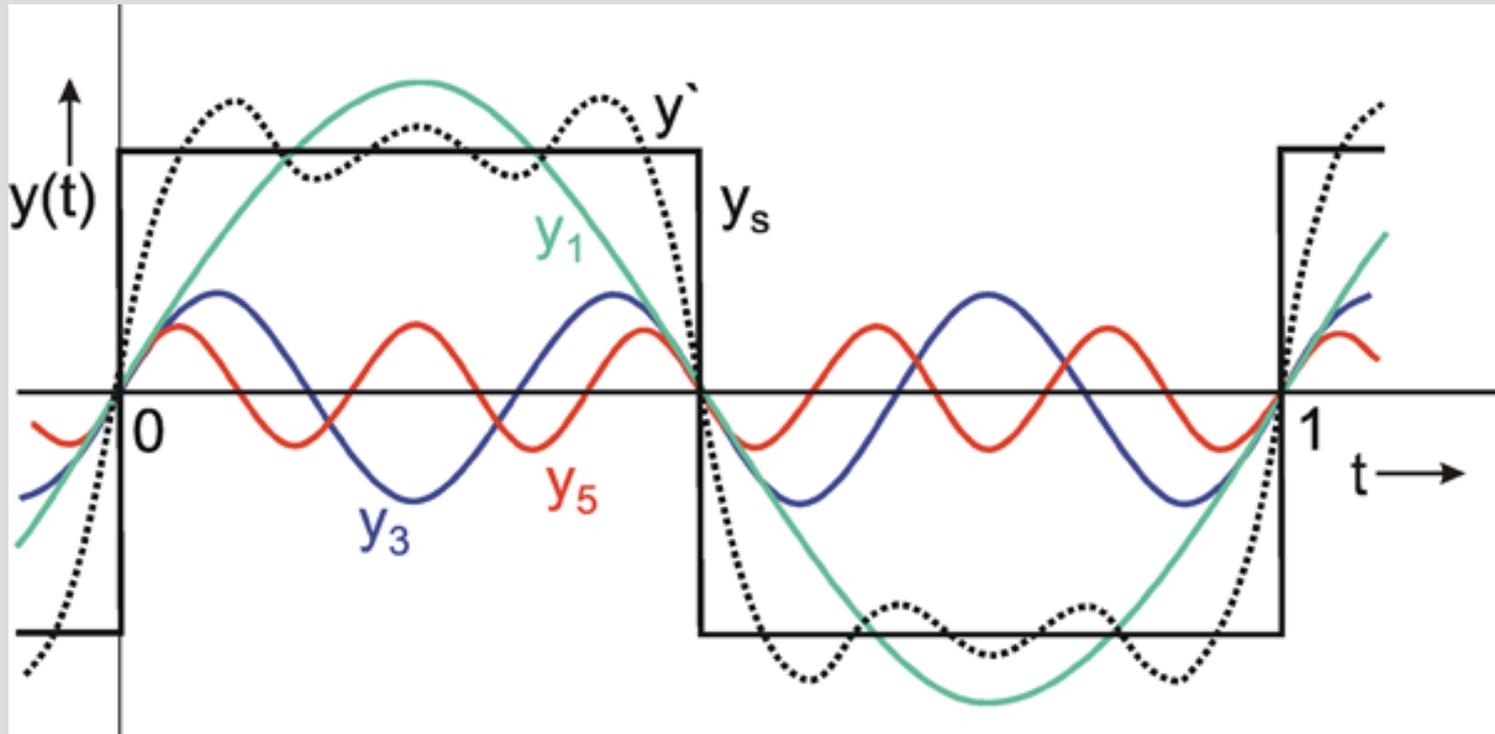
Frequency analysis



This is 1D...

Fourier transforms

Frequency analysis

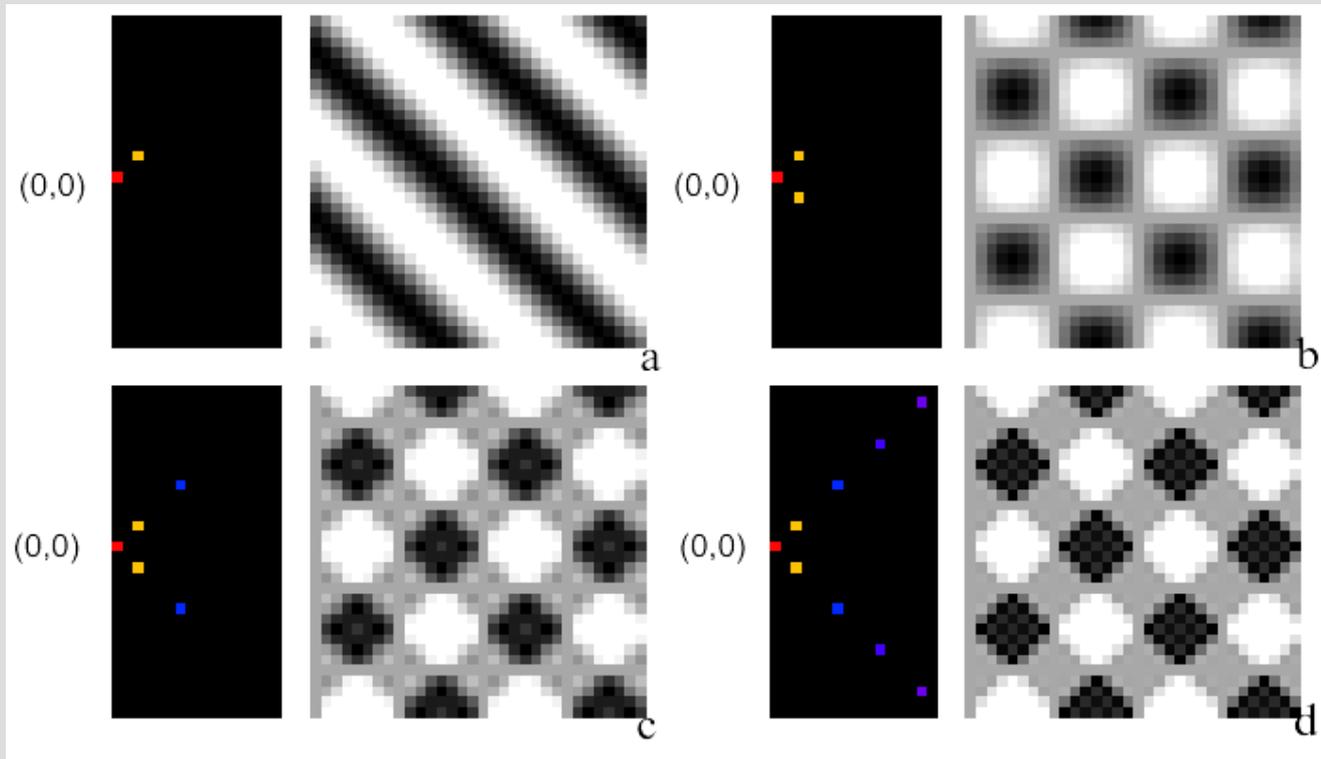


This is 1D...

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

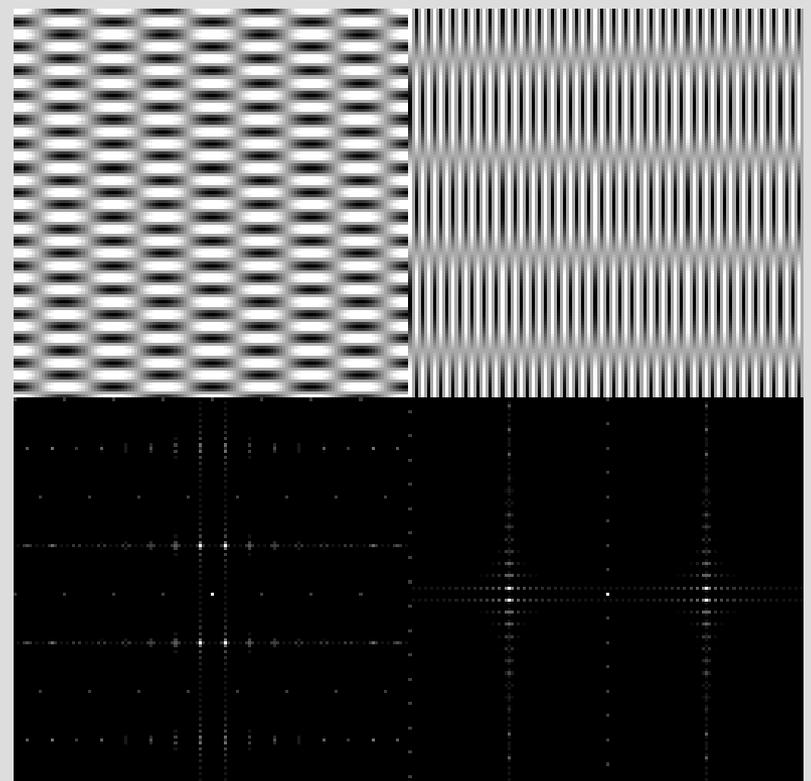
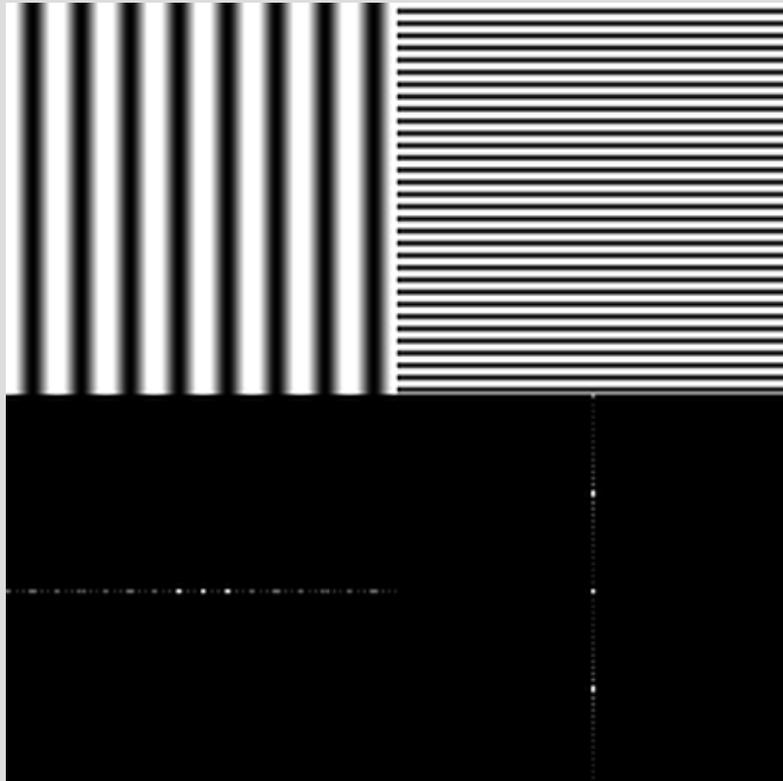
Fourier transforms

- 空間周波数から画像を合成



Fourier transforms

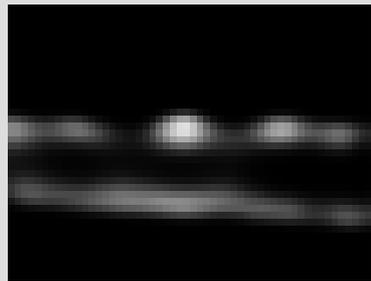
Frequency analysis



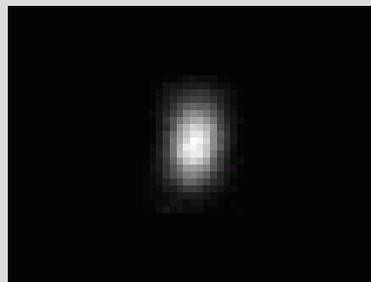
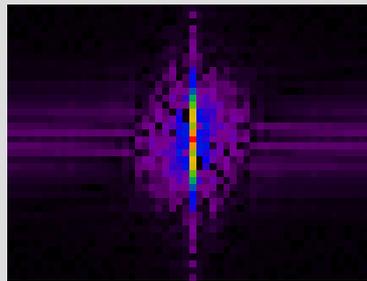
This is 2D...

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

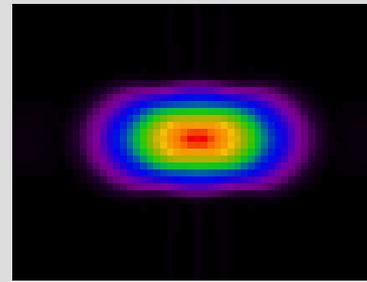
Computing a convolution (applying the convolution theorem)



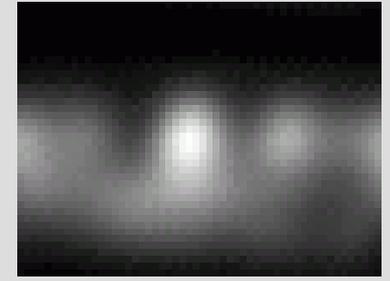
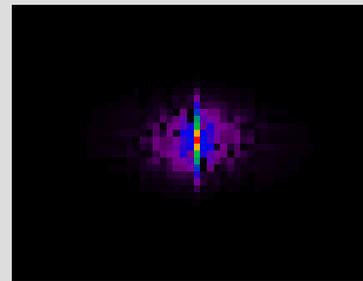
Object



PSF



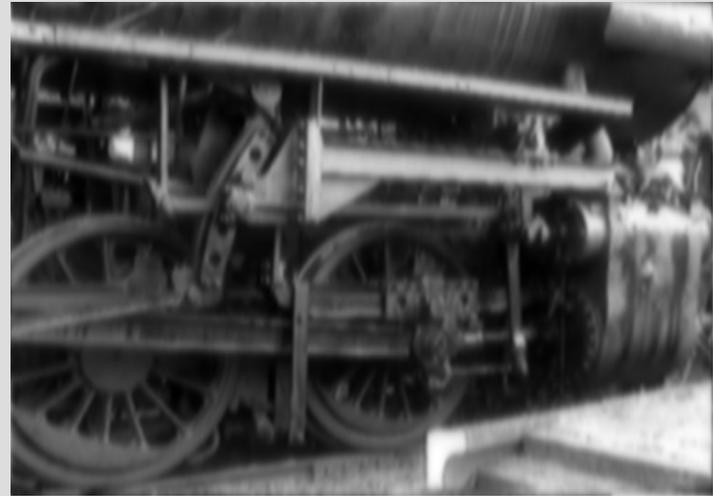
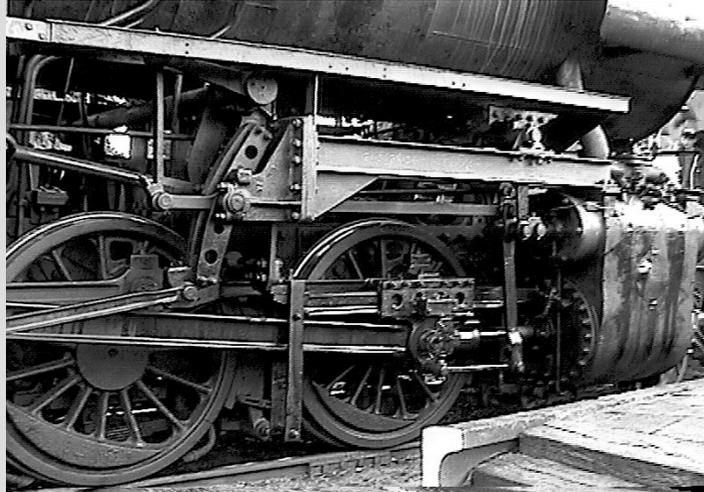
X



逆フーリエ変換
Image

フーリエ変換

Convolution: example



Confocal



Widefield

0.001 Surface Sum 1.180e6 85.894 270.261 4.44 3.46

set deconv \$retval
deconv factor [expr \$m
(\$factor>0)]
reportToIn
reportTo
\$deconv

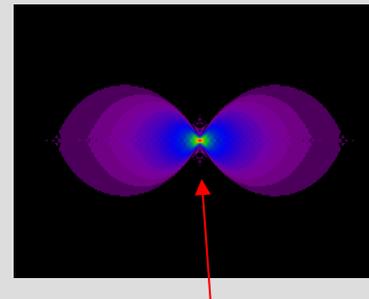
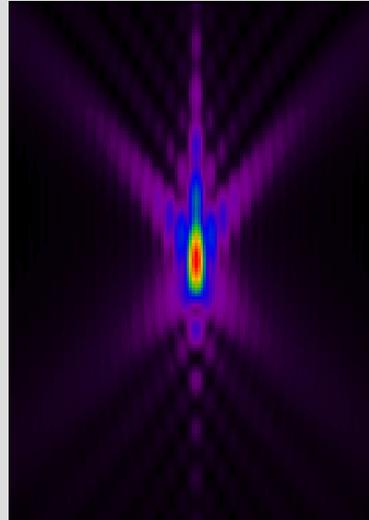
The 'cookie cutter'

PSF は、cookie cutter として働きます。

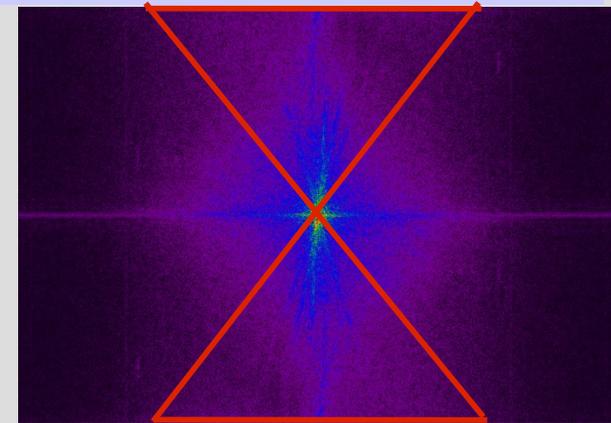
- 高周波数をカットオフ
- 限界は、顕微鏡の帯域幅を決定
 - 水平で約 10 cycles/micron
 - 光軸で約 2-3 cycles/micron

Cutting out frequencies in the Fourier domain

- Wide field 顕微鏡には、固有の光学伝達関数 (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 光学伝達関数 (OTF) で増加することは、水平軸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**



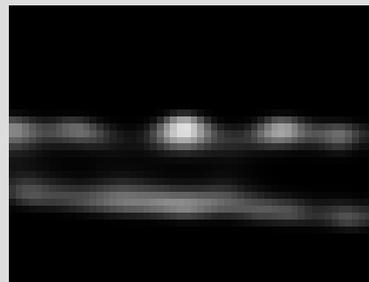
Huygens の電磁回折理論で計算されるとき、適度な球面収差をもつ widefield PSF の XZ 面。



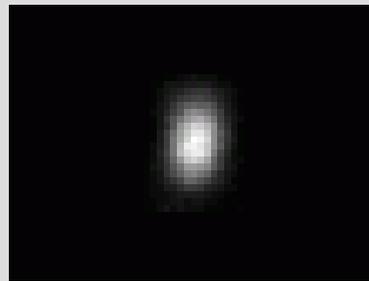
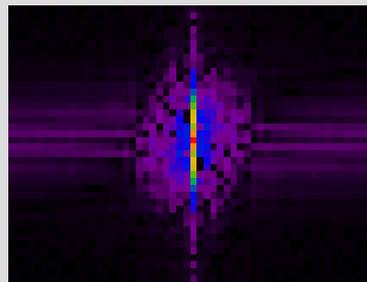
対象物スペクトルのこれらの周波数を切り落とします。

Wide Field 顕微鏡の光学伝達関数 (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。

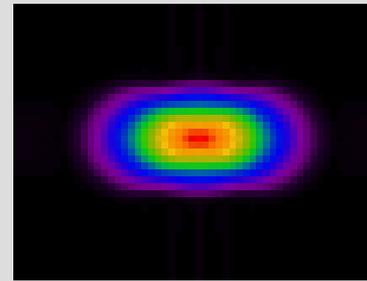
Deconvolution: inverse filtering?



Object



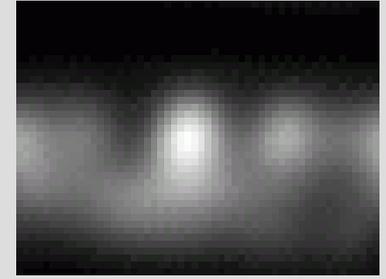
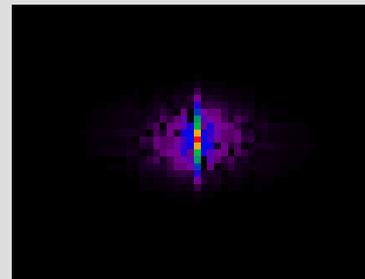
PSF



フーリエ変換

X

問題: ノイズ!



逆フーリエ変換

Image

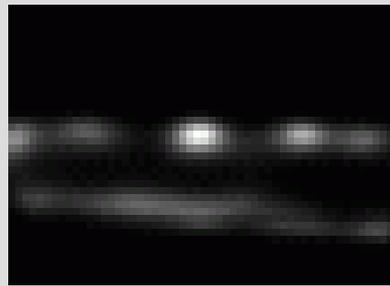
Inverse convolution: Deconvolution

- 顕微鏡画像は、対象物と PSF のフーリエ変換の乗算で説明されます。
- このことは、対象物のフーリエ変換は、顕微鏡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。
 - **本当ではありません！**
- デコンボリューションは、逆フーリエ変換フィルター技術より複雑です。

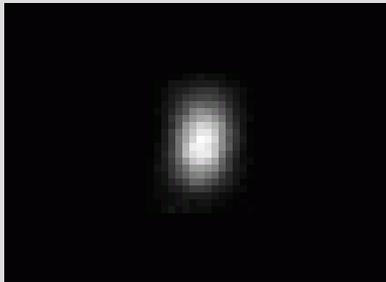
Iterative method

1. 対象物の（賢明な）初期評価をします。
2. PSF でこの評価を畳み込みます。
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ます。
5. この質の測定で評価を改善します。
6. ステップ 2 より繰り返します。

The 'van Cittert' iterative method

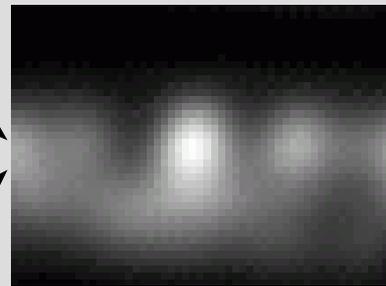


Estimate of object

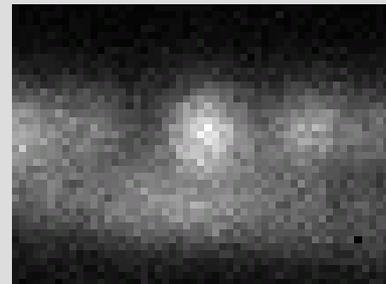


PSF

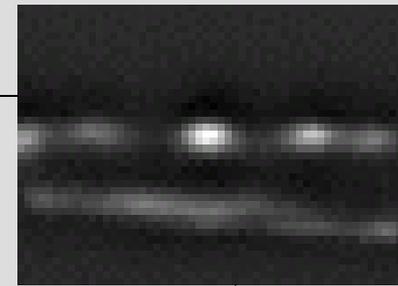
Add to previous iteration



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

0.001 Surface Sum 1.180e6 85.894 270.261 4.44 3.46
0.001 31.437 1.180e6 85.894 270.261 4.44 3.46
0.001 31.437 1.180e6 85.894 270.261 4.44 3.46

level 1
deconvolution on
set deconv \$retval
factor \$expr \$m
(\$factor>0)
reportToM
\$e

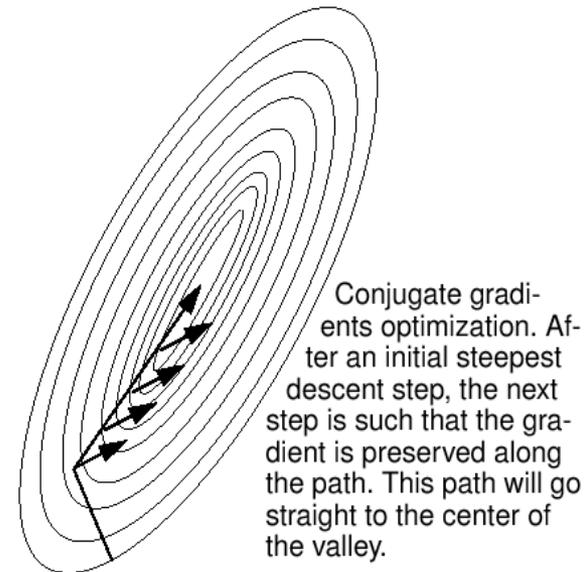
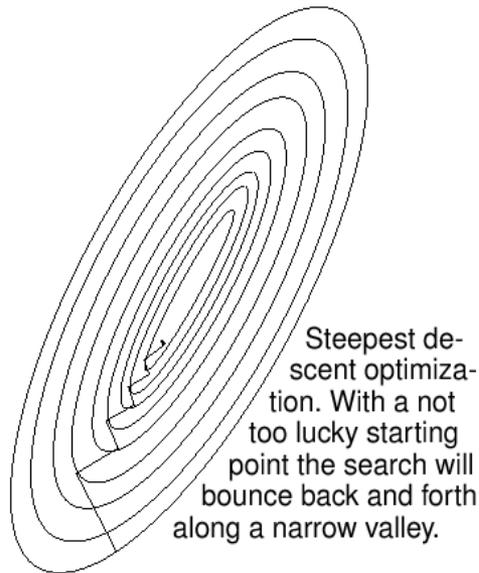
Huygens - MLE

- 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。

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。

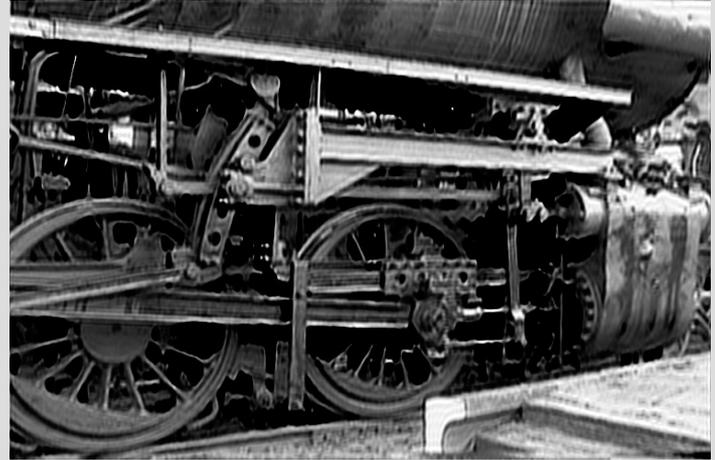
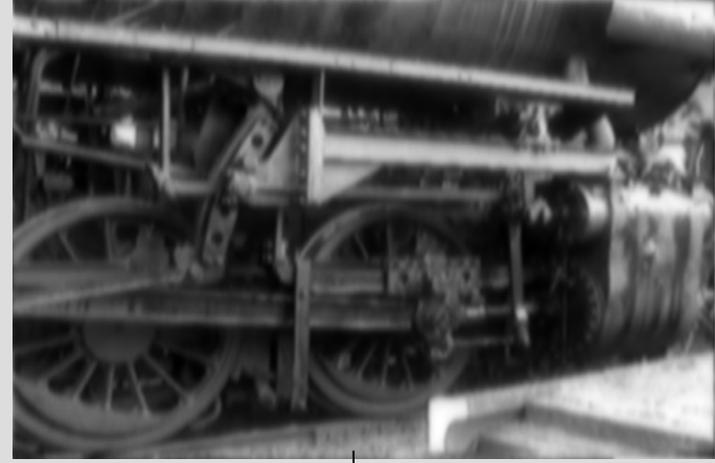
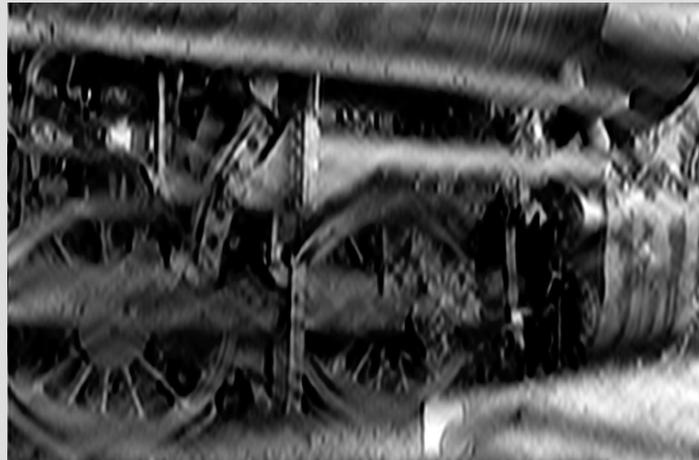
- 各繰り返しは、classic-MLE の 5 倍の繰り返しとおおよそ同じくらい有効です。
- 単一面の復元をする極端な場合の不完全なデータの優れた処理。



Results

Widefield

Confocal



NOV 01 11:31:31 AM
Surface Sum
1.180e6 85.894 270.261 4.44
3.46

```
set deconv $retval  
set factor [expr $m  
if {$factor>0}  
reportToM  
reportToM  
$e  
reportToM  
$dest
```

Huygens calculates theoretical PSF from microscopic parameters (metadata)

Templates

Load Save Help

Edit microscopic parameters of image:
WF-deconvolved

Sampling interval:

- X (nm) 67.0
- Y (nm) 67.0
- Z (nm) 300.0
- T (s) 1.000000

Optical parameters:

- Microscope type Widefield
- Numerical aperture 1.40
- Objective quality Good
- Coverslip pos. (µm) 0.000
- Imaging direction Upward
- Pinhole spacing (µm) 2.500

Refractive indexes:

- Lens Oil 1.515
- Medium Oil 1.515

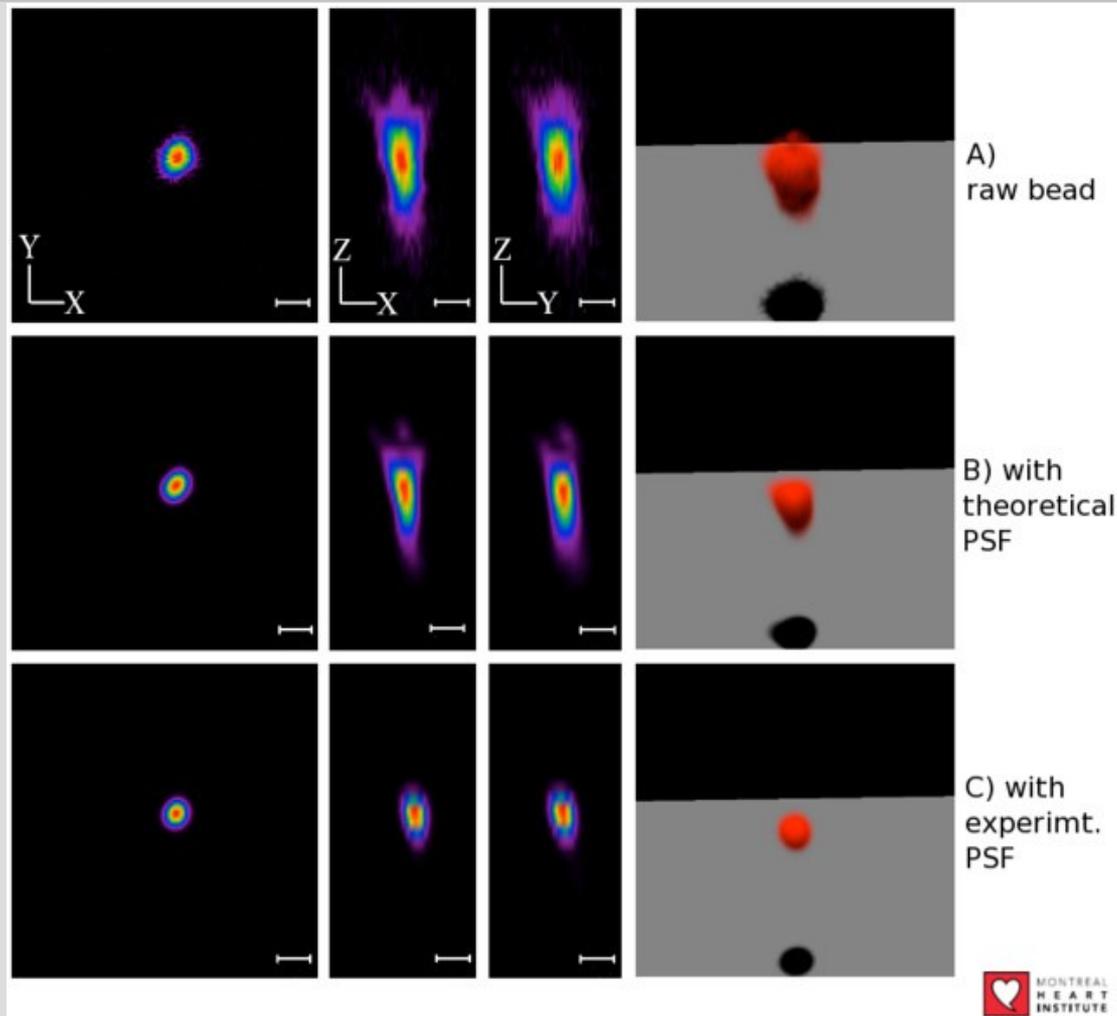
Parameters for channel: 0

- Backprojected pinhole r. (nm) 250
- Excitation wavelength (nm) 360
- Emission wavelength (nm) 460
- Excitation photon count 1
- Excitation fill factor 2.00
- Deviating microscope type Widefield

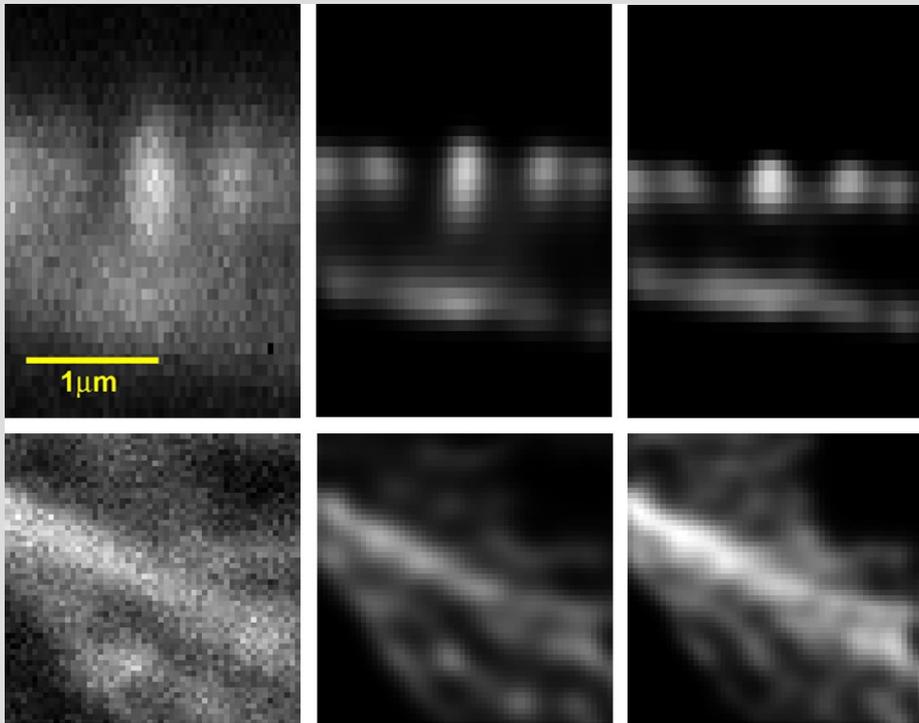
Reports

Meta data All verified Revert Cancel Accept

Bead deconvolved with Theoretical or Experimental PSF

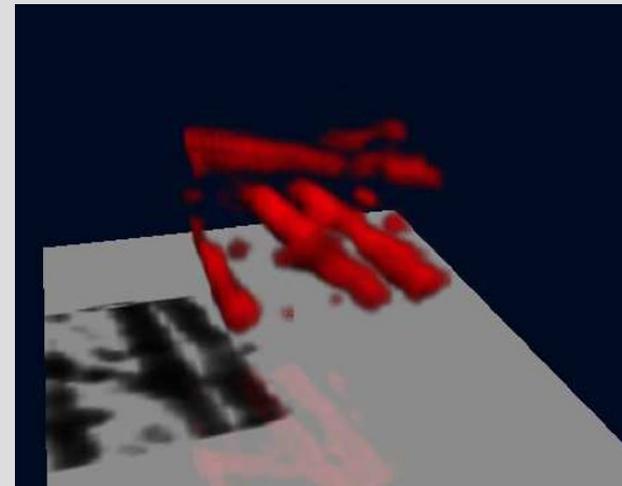


Measured vs. theoretical PSFs two-photon image of actin filaments



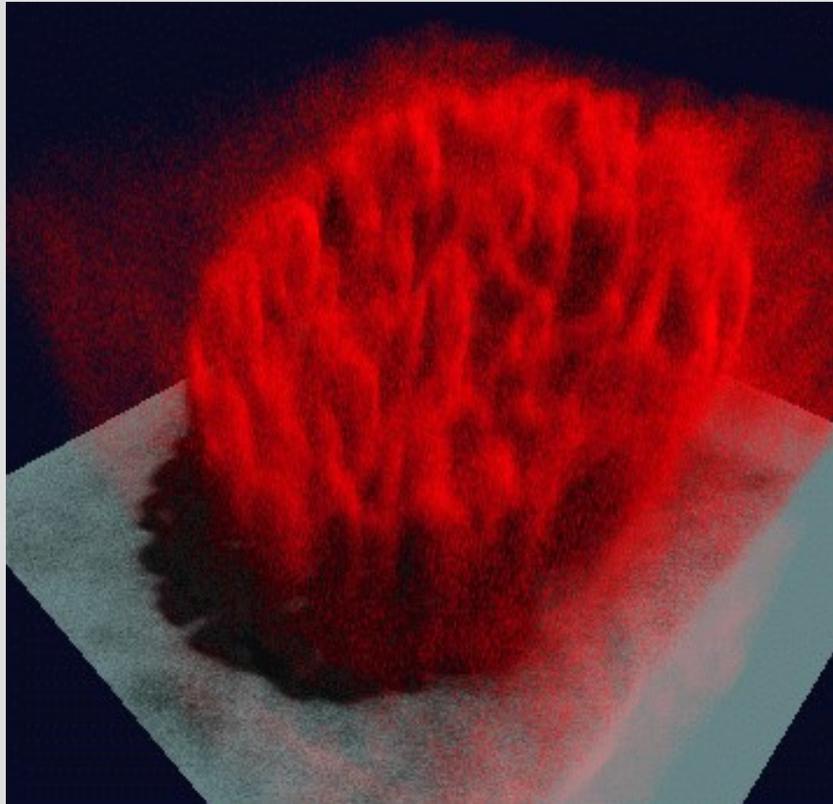
Measured data Restored, theor. PSF Restored, meas. PSF

2光子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 面 ($y = 32$)、下行は、XY 面 ($z = 11$)。下図: 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。

Volume rendering sea urchin chromosomes

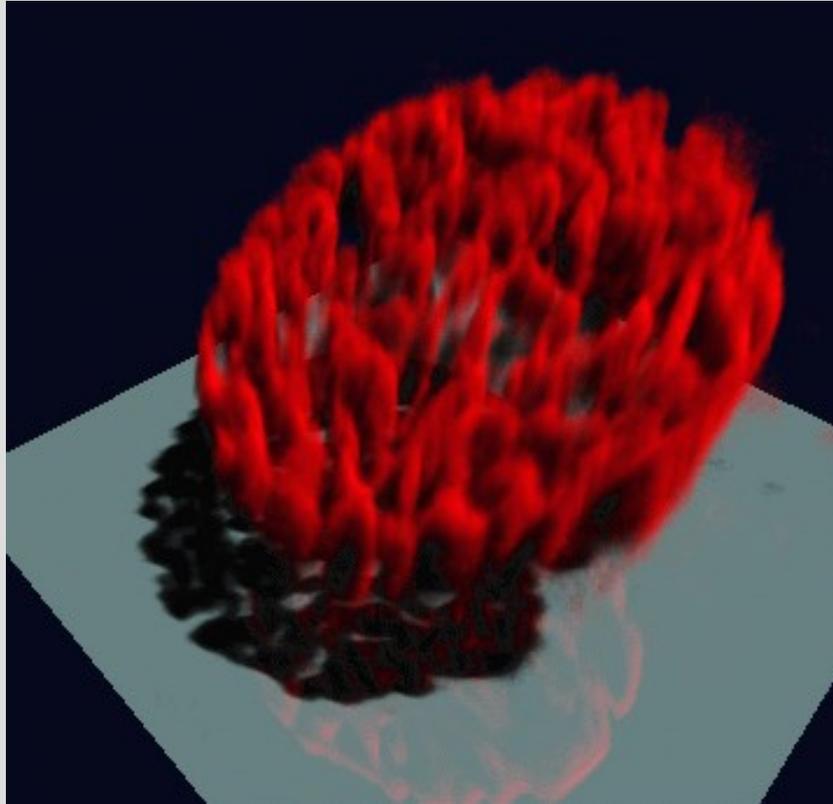


左図：バックグラウンドをスレッシュホールド後

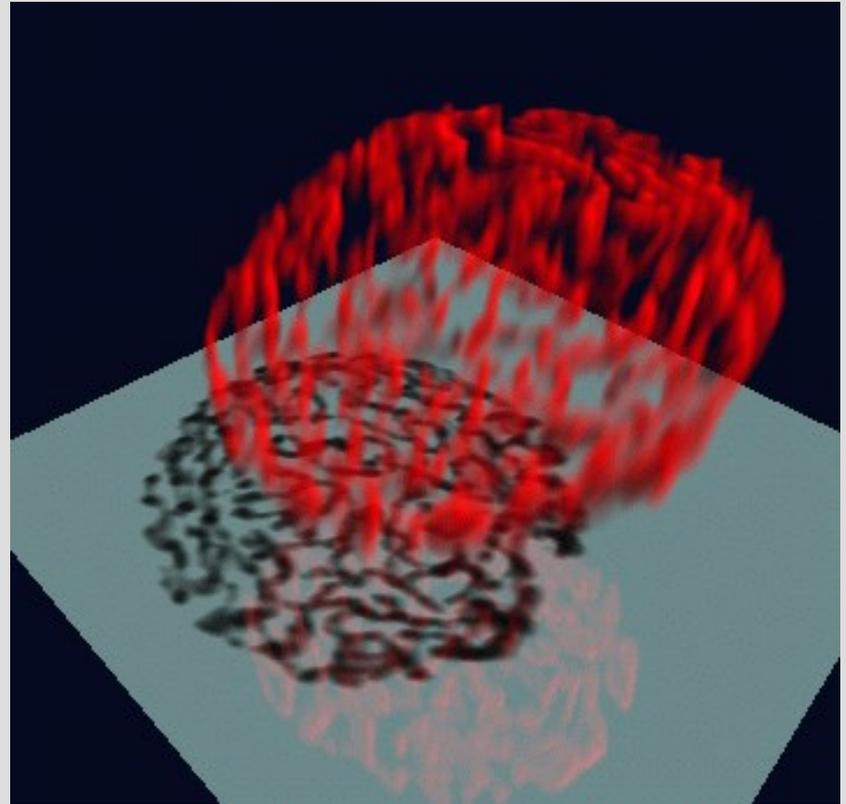
右図：3D ガウスノイズフィルターとソフトスレッシュホールドを適用後

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

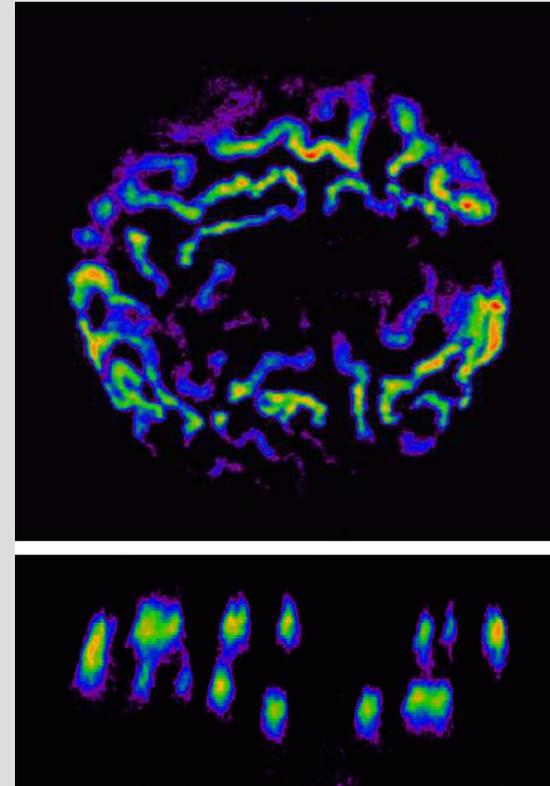
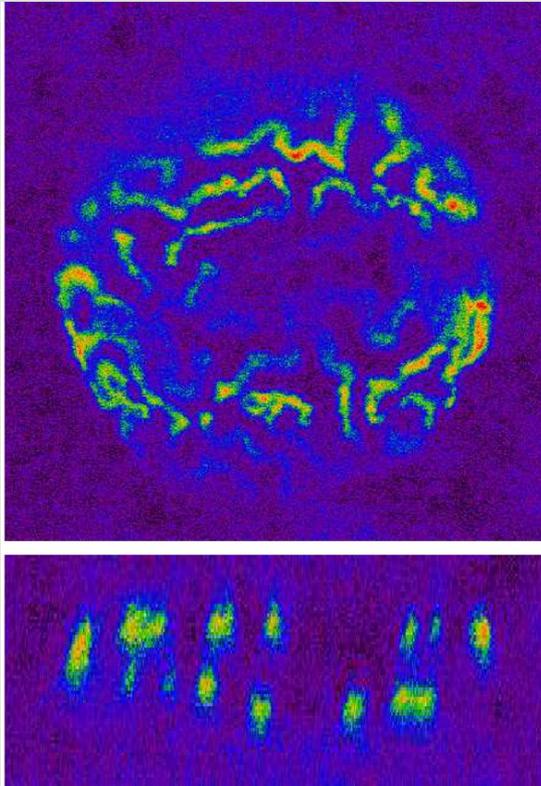
Volume rendering the deconvolved sea urchin nucleus



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



Confocal volume image: sea urchin chromosomes

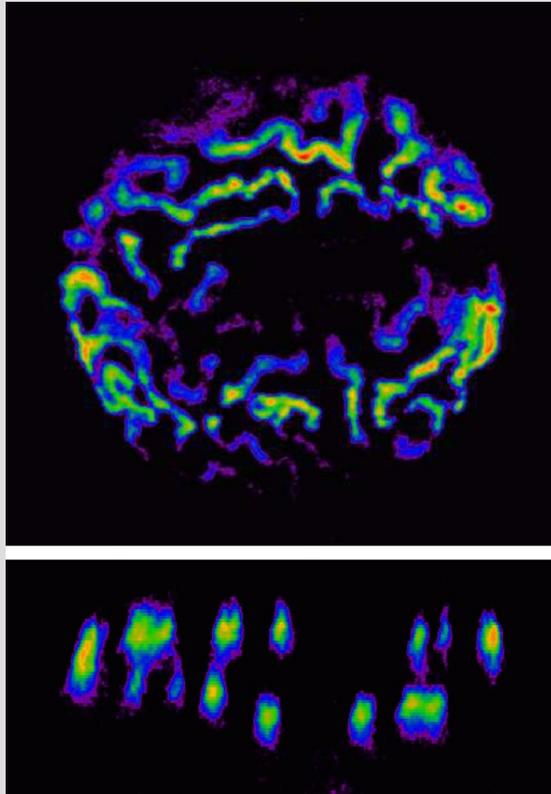


左図: オリジナル画像

右図: 3D ガウスノイズフィルター適用後

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

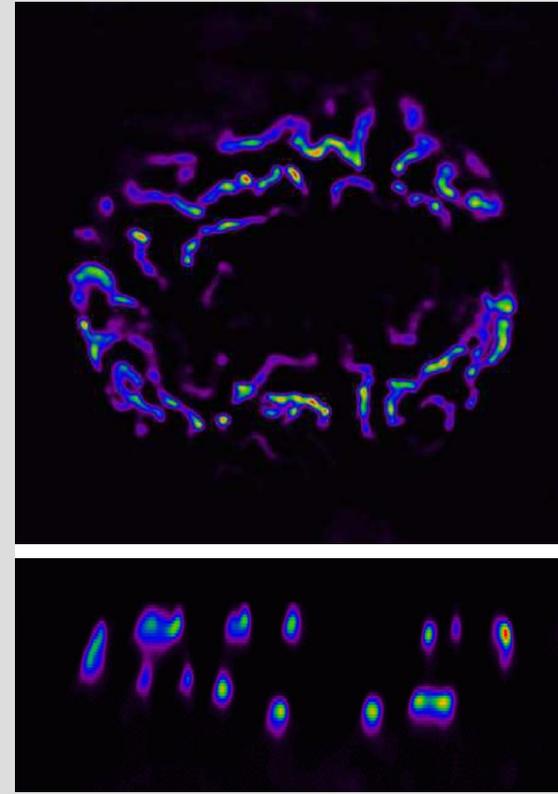
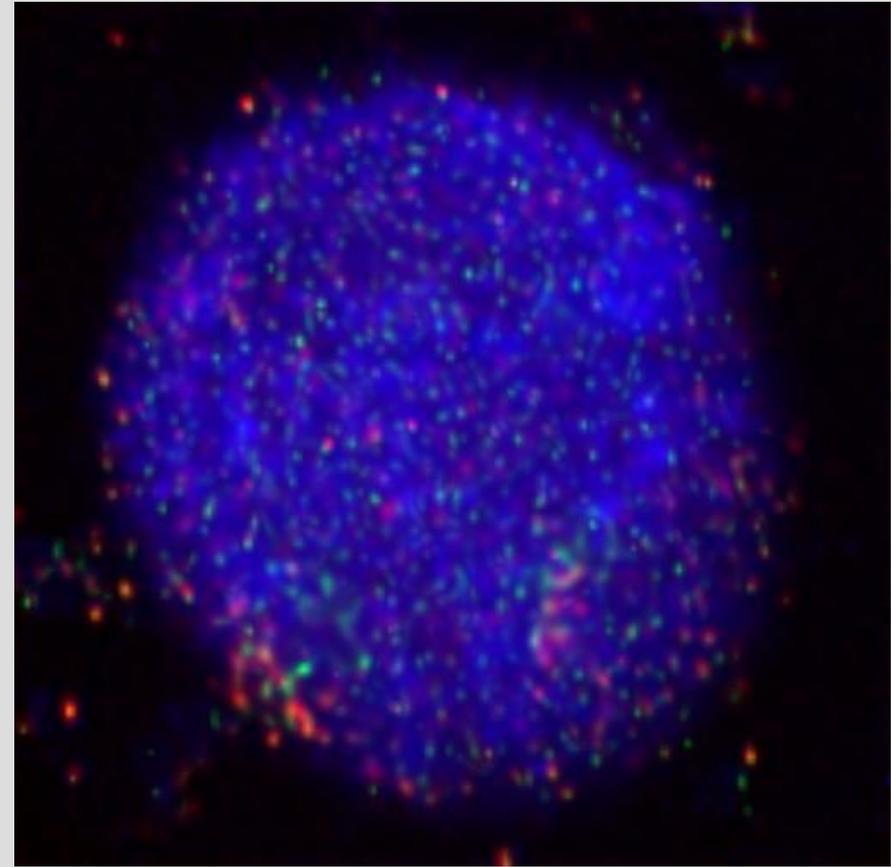
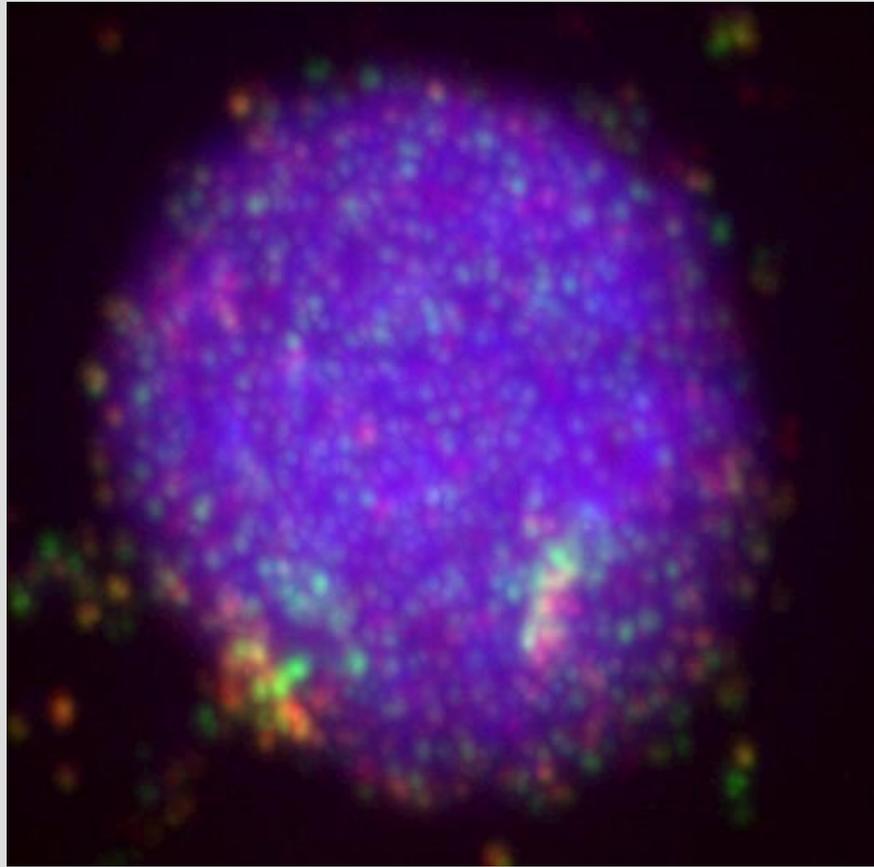


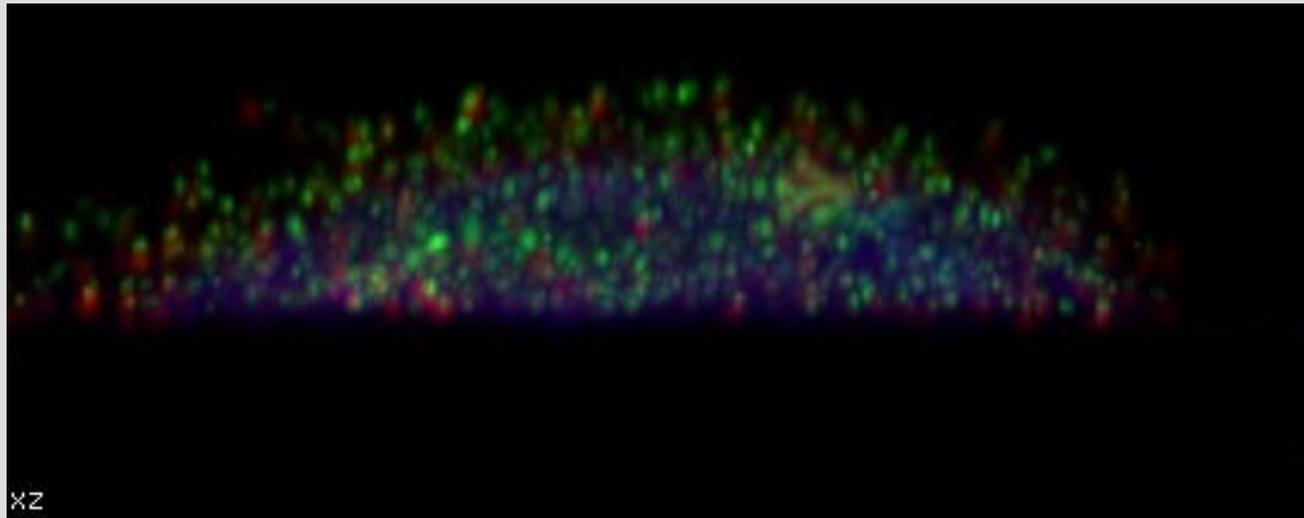
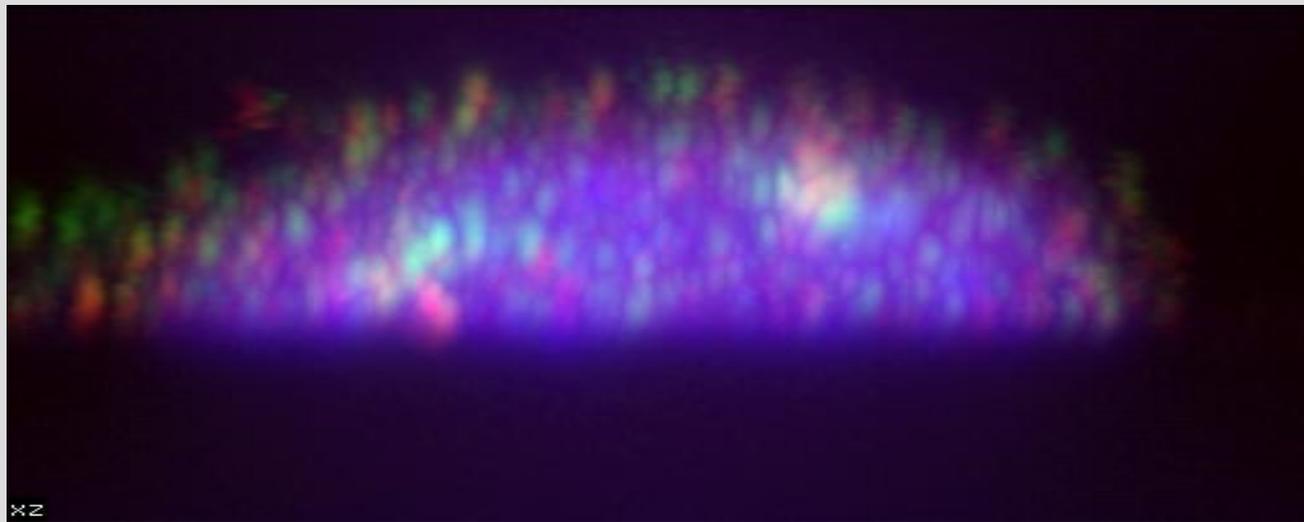
Image recorded by Prof. Thomas Baechli, University Zürich, Switzerland

Restoration results for Nipkow confocal data



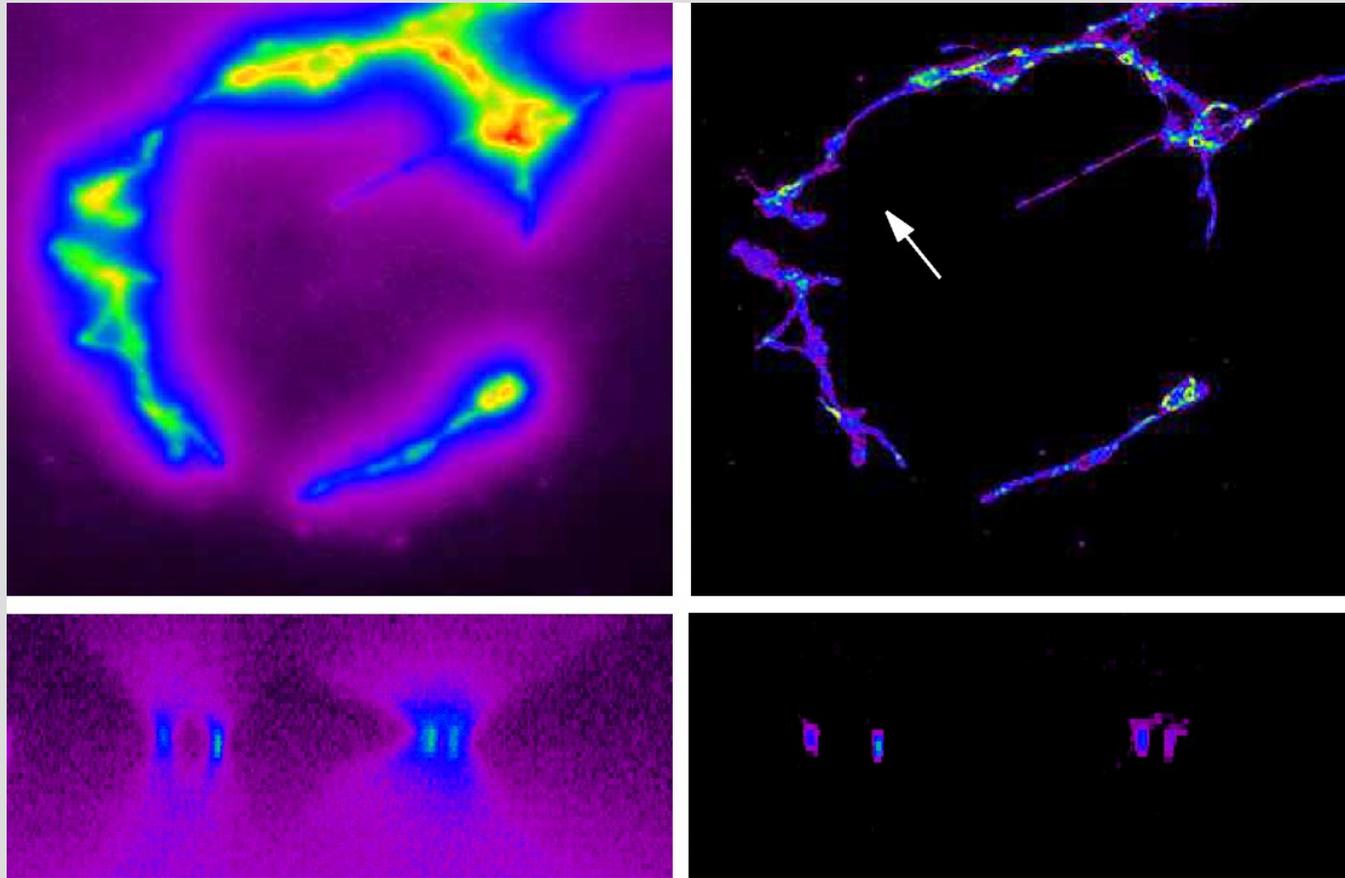
Data courtesy Dr. Kozubek, Brno, Czech republic,
FP6 3DGenome Project <http://3dgenome.uva.sara.nl>

Restoration results for Nipkow confocal data



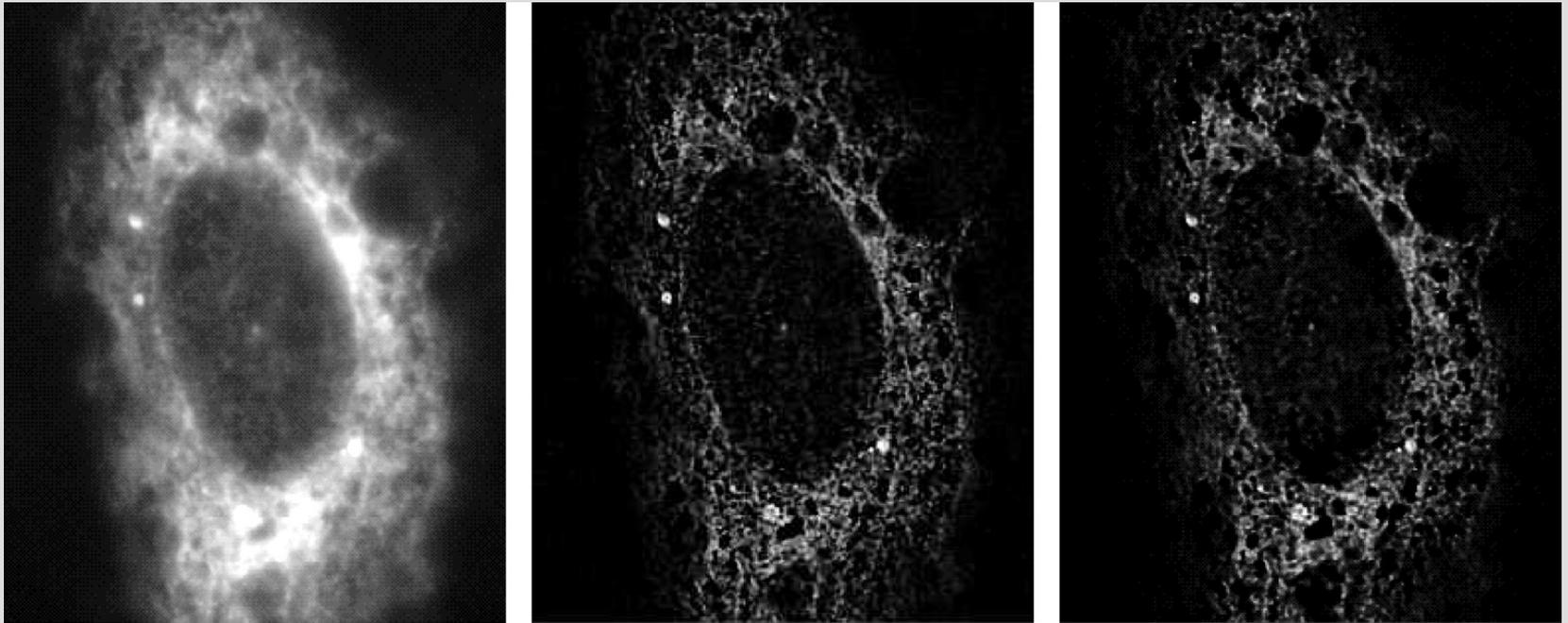
Data courtesy Dr. Kozubek, Brno, Czech republic, FP6 3DGenome Project 3dgenome.uva.nl, sara.nl

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 面。
下段: XZ 面。
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



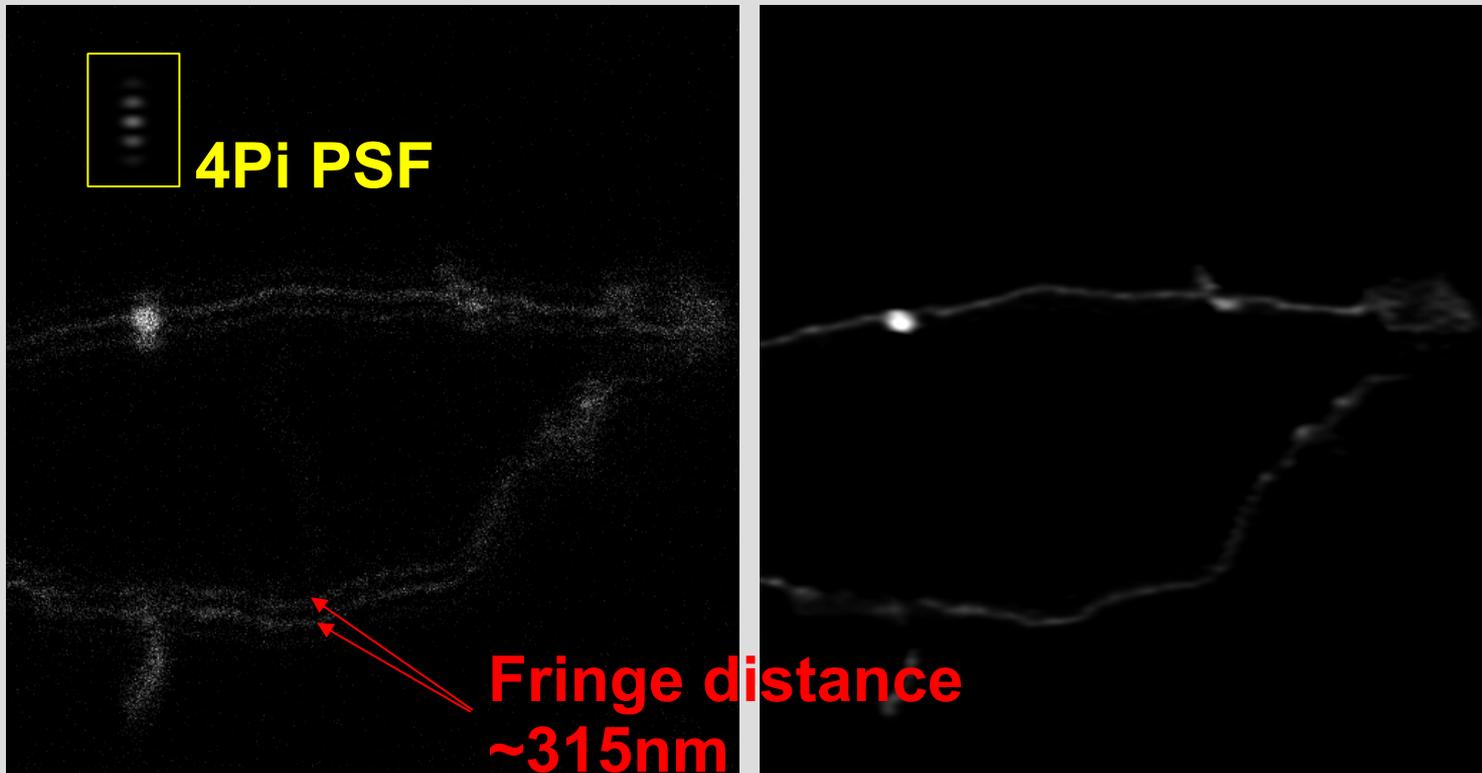
左: 細胞の Wide Field 画像。3D データセットからの単一 2D 面。

中央: 単一面の 2D 復元。

右: 復元した完全なデータセットからの同じ面。

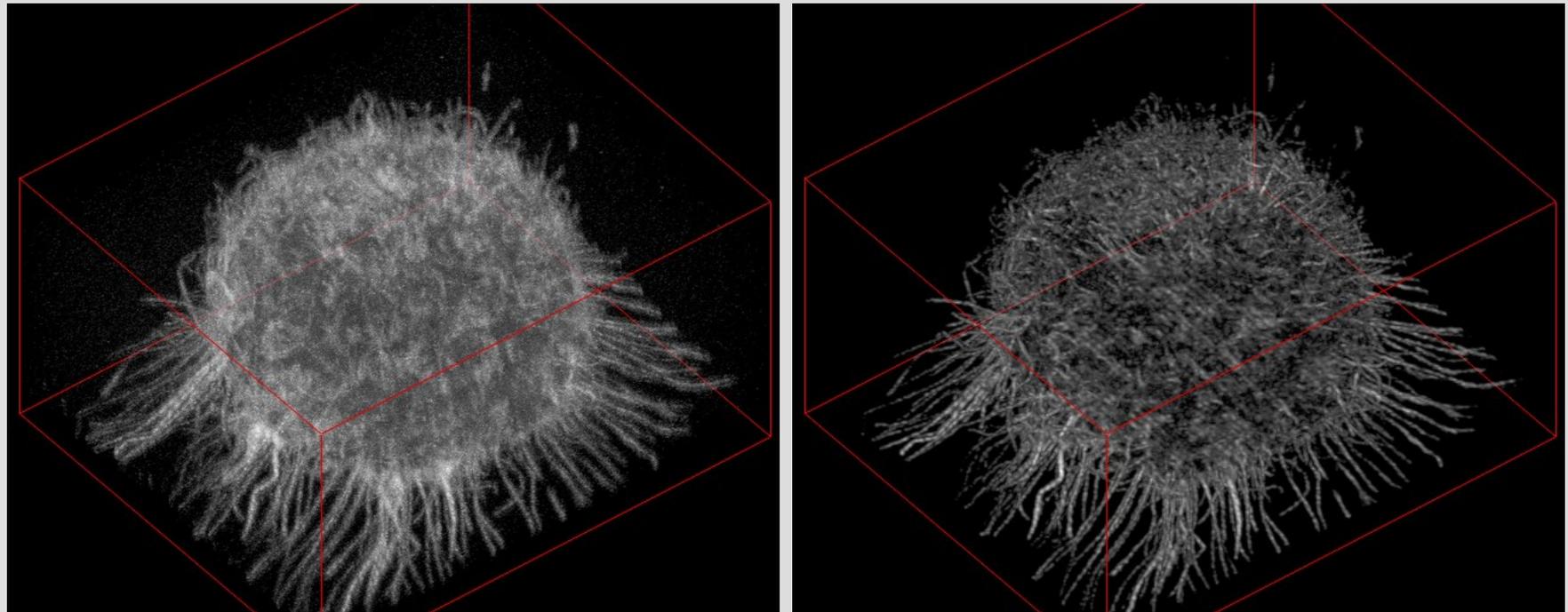
データは、Dr. P. Travo, CNRS, Montpellier, France

Restoration of 4Pi confocal images



- 測定して、復元した 4Pi データ (XZ 面)。4Pi 画像の復元は、測定データのフリッジの存在のために特に難しいです。フリッジは、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



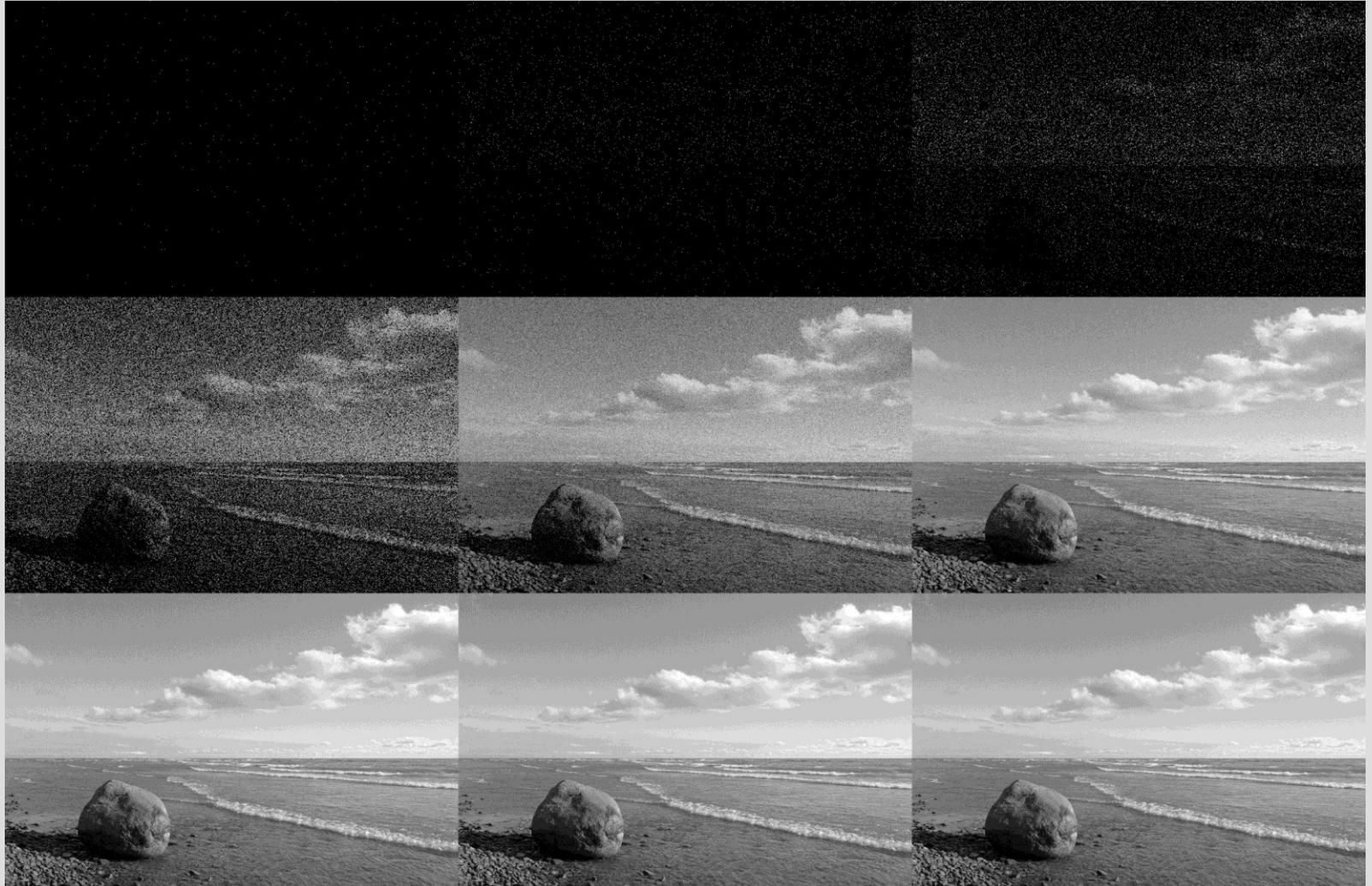
Maximum Intensity Projection で描写された 4Pi 2 フォトン。

左図：生データ。右図：デコンボリューション処理後。

Data courtesy Dr. Tanjef Szellas, Leica Microsystems GmbH ,
Mannheim, Germany

Photon noise

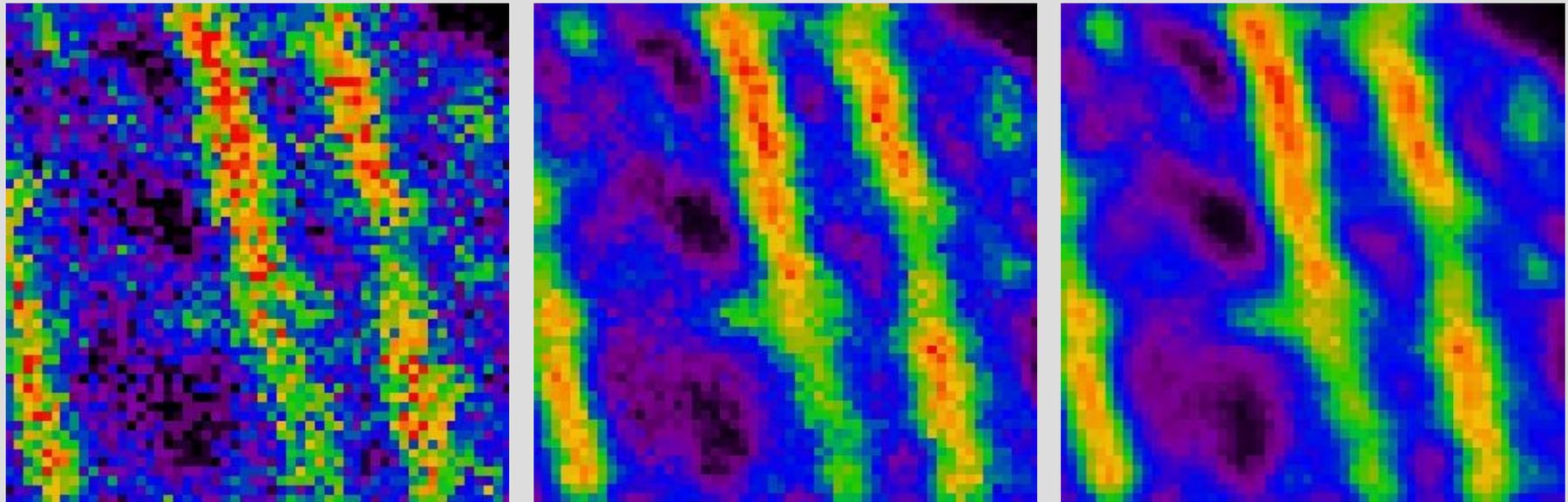
Image from the Wikipedia



0.001 Surface Sum 1.180e6 85.894 270.261 4.44 3.46

```
set deconv $retval  
set factor [expr $m  
if ($factor>0)  
reportToM  
$c  
reportTo  
$dest
```

Photon noise



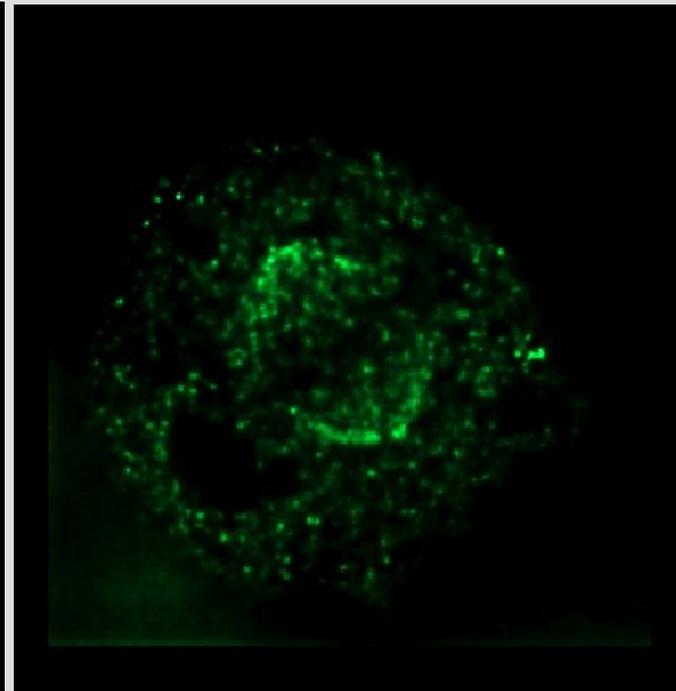
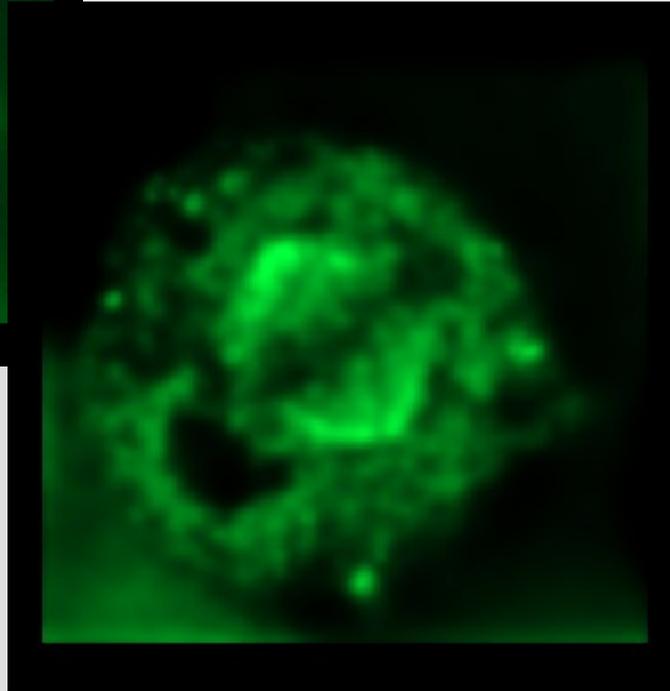
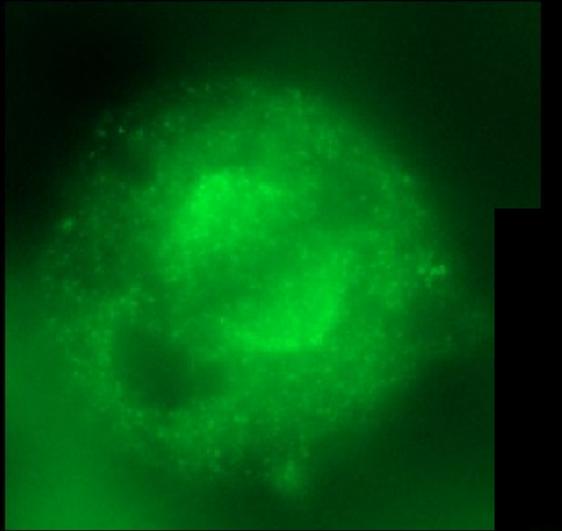
- 解決策:
- 光の増加 (いつも可能ではない)
 - デコンボリューション処理 (MLE)

SNR is a regularization parameter

RAW image

Deconvolved
SNR:5, CMLE

SNR:100, CMLE



Widefield
NA1.25
Lens: Oil
Medium: Water

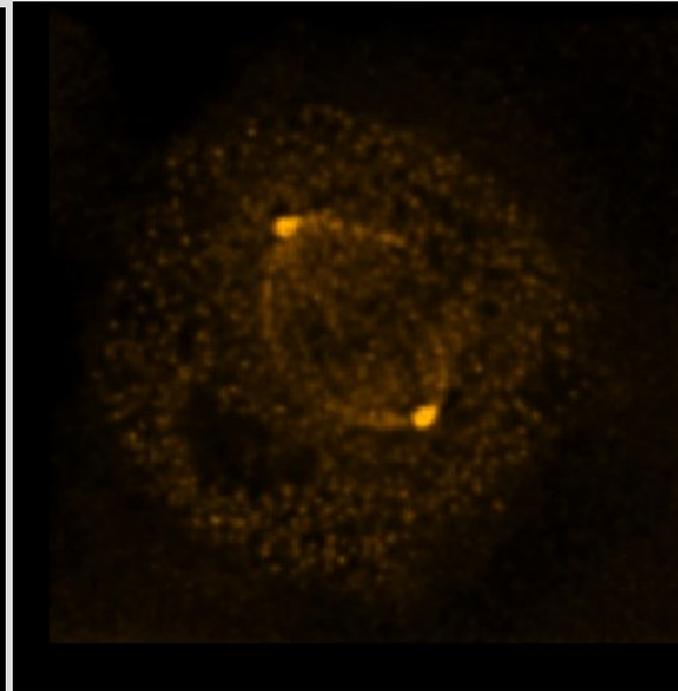
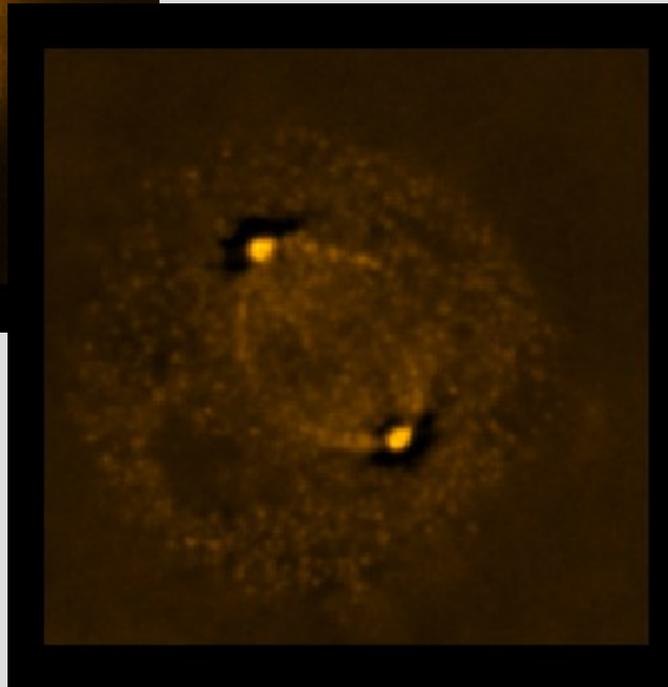
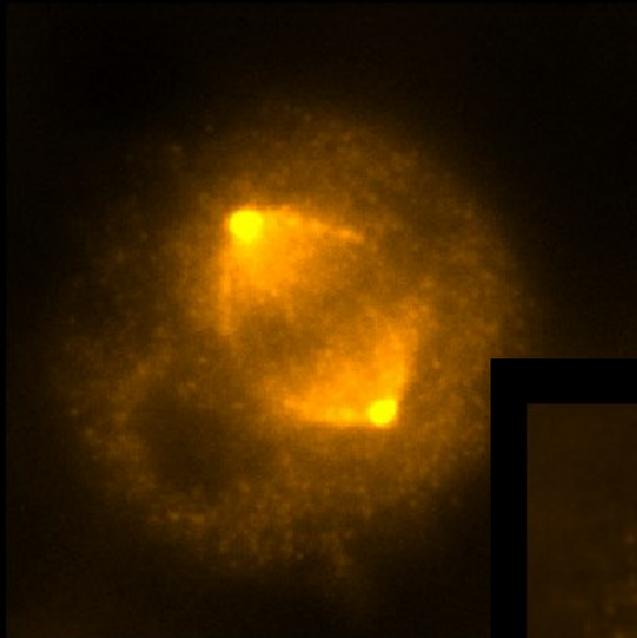
SNR is a regularization parameter

RAW image

Deconvolved

Ringing (high SNR?)

better match with original



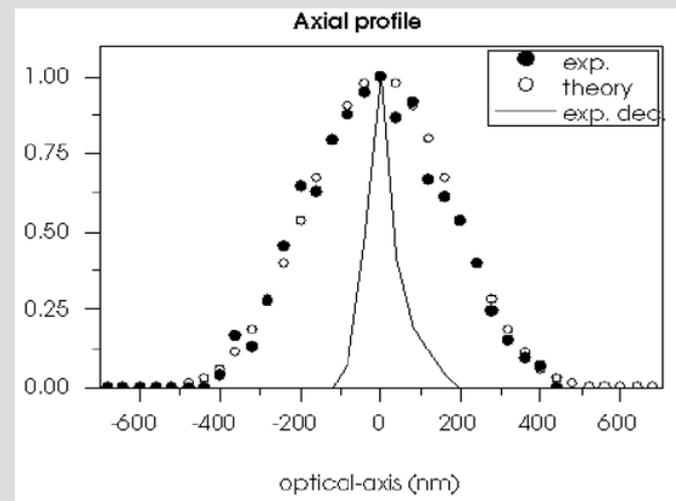
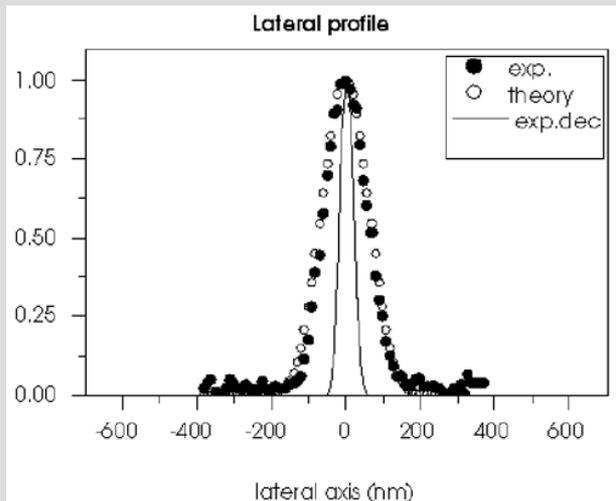
Widefield
NA1.25
Lens: Oil
Medium: Water

Conclusions

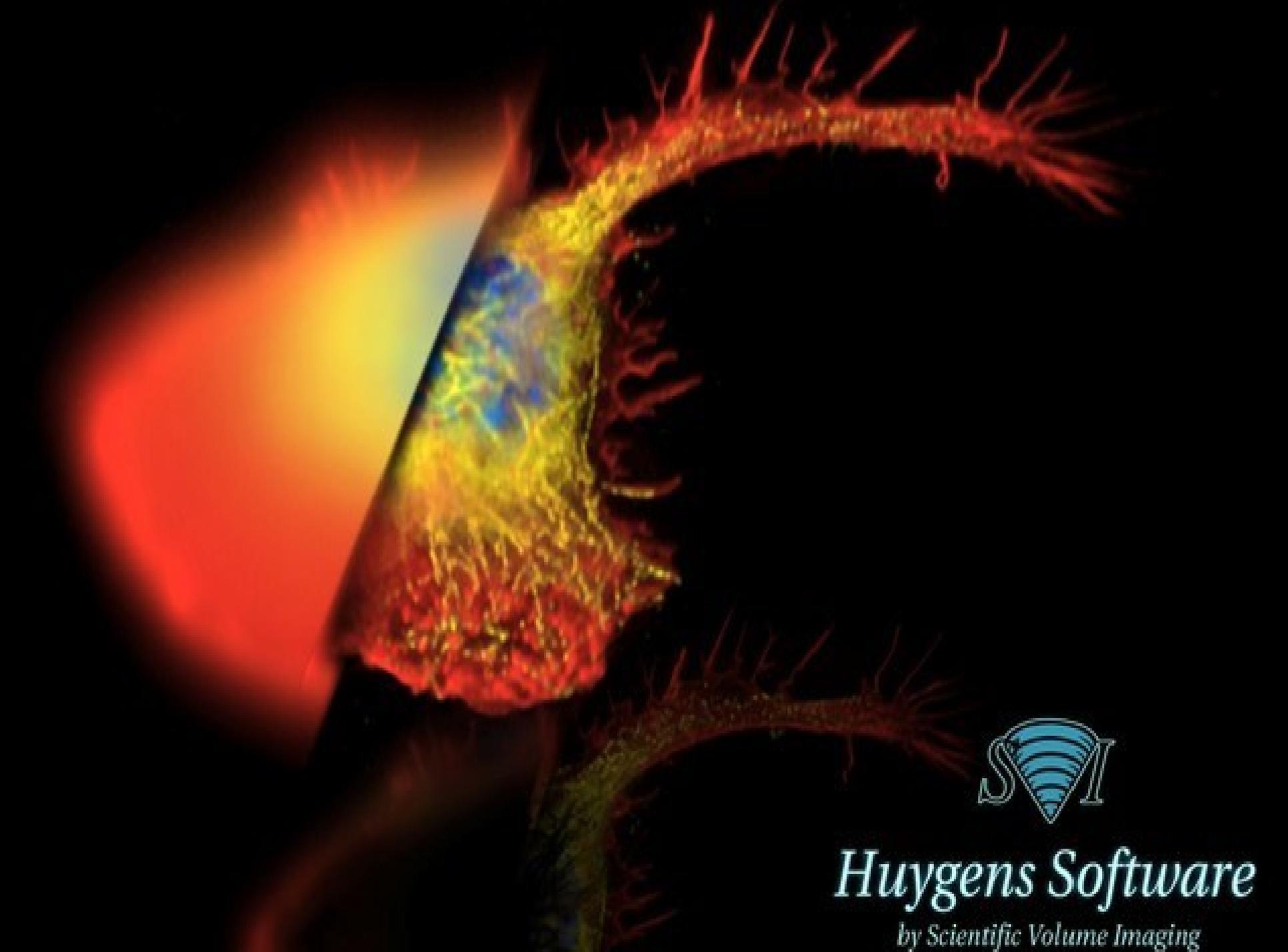
- 画像復元は、顕微鏡ボリウム画像のビジュアリゼーションと解析に重要なテクニックです：
 - コンボリューションは、対象物の詳細を隠す問題です。
 - Confocal と WideField の両方での歪み
 - デコンボリューションは、これらの詳細を復元する仕事をします。
 - 画像である限り、適切に取得されます。
- あらゆるタイプの高解像度画像にもデコンボリューションを使用してください！

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 による実験で復元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 画像復元の使用で、サブ-100 nm 領域での解像度は可能です。



Huygens Software

by Scientific Volume Imaging