

【データ解析】

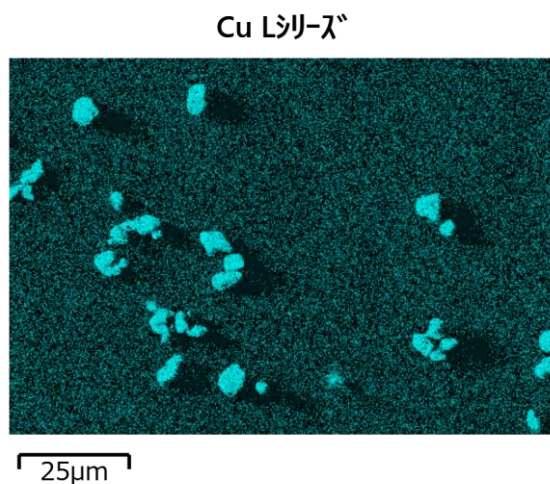
EDS イメージの画像解析をする方法を教えてください。(粒子径分布や表面被覆率の算出)

作成日： 2018 年 1 月 11 日

担当者： 石井 陽祐

「Image J」というフリーソフト (<https://imagej.nih.gov/ij/>) が有用です。このソフトは、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) の Wayne Rasband によって開発がされたもので、Windows、Mac、Linux で使用可能です。ソースコードも公開されています。Gatan 社の DM3 形式¹のファイルの読み込みにも対応しており、透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像の解析にも利用できます。

下記の画像は、カーボン膜の表面に銅粒子を付着させた試料の SEM-EDS 像 (Cu L 線のマップ像) です。水色の濃い部分が銅粒子、その他の部分が下地のカーボンです。今回は、この画像について、銅粒子の被覆率や粒子径分布を調べる方法を紹介します。

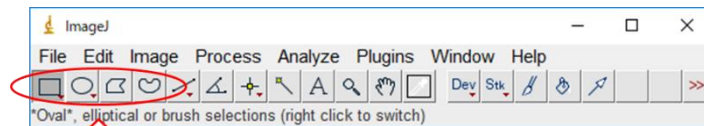


【画像データの前処理】

数値解析の前に、余分な情報 (スケールバーなど) のトリミング、カラー画像の白黒化、ノイズ除去が必要です。以下に具体的な手順を示します。

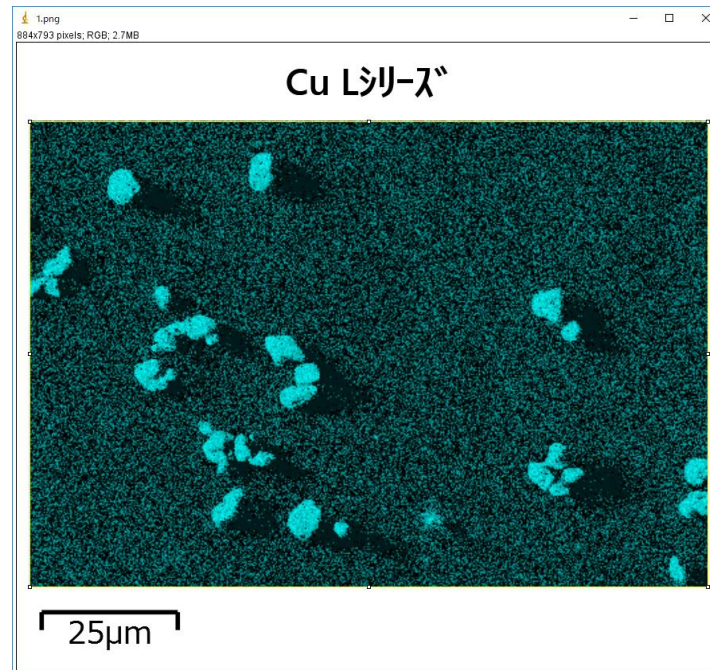
- (1) Image J を起動 → コントロールパネルが立ち上がる。
- (2) コントロールパネルに画像データ (BMP や TIFF 等) のファイルをドラッグ・アンド・ドロップ。
→ 画像データが表示されたウィンドウが立ち上がる。
- (3) 形状選択ツール (下図) を使って、解析する画像範囲を選択する。

¹ 我々の研究室で使用している TEM には、Gatan 社の CCD 検出器が搭載されています。この CCD 検出器の制御ソフト (GATAN DIgital Micrograph) の保存形式が DM3 となっています。DM3 ファイルにはスケール情報 (nm/pixel) が埋め込まれているため、測長やスケールバーの設定が容易に行えます。(DM3 を BMP や TIFF に変換してから持ち帰ると、後からスケールバーの長さや位置の変更ができません。)



ココ

→ 選択範囲を示す黄色の枠が表示される。(少し見づらいが) 今回は、下図のように選択した。



(4) コントロールパネルで Image > Crop を選択すると、選択範囲以外の領域が除去される。

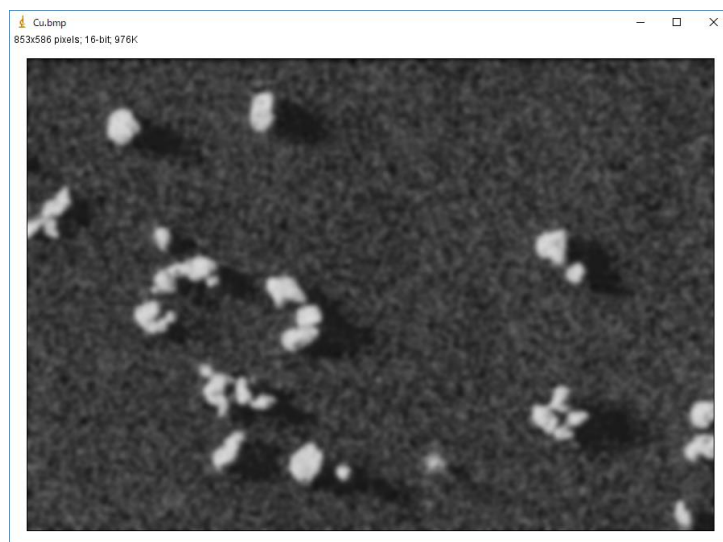
(5) Image > Type > 16-bit で、白黒画像に変換する。



(6) Process > Filters > Gaussian Blur...を選択する。

(7) 表示された Gaussian Blur... ウィンドウの Preview にチェックを入れた状態で、Sigma (Radius) の値を

調整し、ノイズを軽減する。（この際、数値を大きくするほどノイズが目立たなくなる。値を大きくしすぎると解析対象の粒子の輪郭もぼけてしまうので注意。）良い値を見つけたら、OK ボタンをクリック。（今回は Radius の値を 3 として、下図のような画像を得た。処理前に比べて、背景の粒子感（ざらつき）が不明瞭になったことがお分かりいただけるでしょうか？）

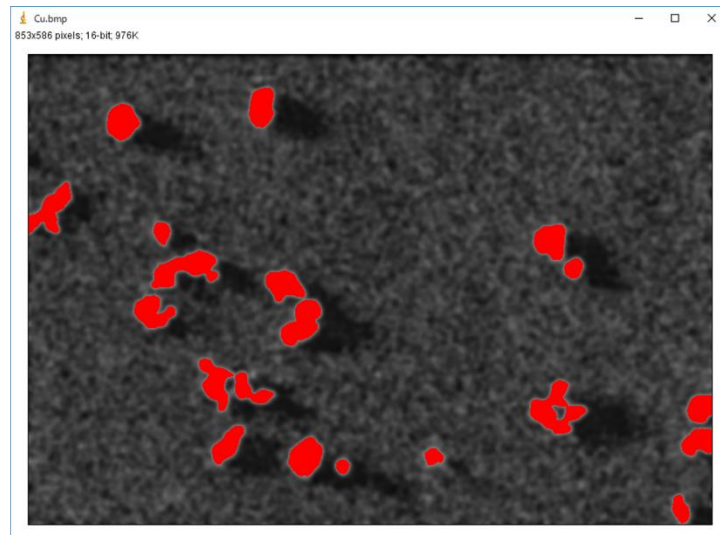
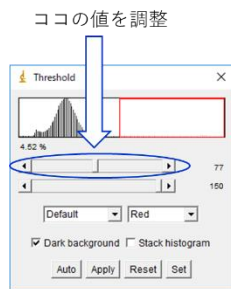


【画像の 2 値化】

今回の画像では、白い部分（輝度の高い部分）が粒子、黒い部分（輝度の低い部分）が背景です。粒子領域と背景領域を区別するための輝度閾値を設定し、画像を 2 値化します。（閾値 x を設定し、 x よりも輝度の高いピクセルは粒子、 x よりも輝度の低いピクセルは背景、といった具合に区別します。）

- (1) Image > Adjust > Threshold...を選択する。
- (2) 表紙された Threshold ウィンドウ中の Dark background にチェックを入れる²。
- (3) Threshold...ウィンドウのスライダー（上側）を移動させて、解析対象の粒子のみが赤色で選択されるようにする。（下図参照）

² 今回の画像は輝度の低い部分（黒い部分）が背景のため、このチェックが必要。白背景の場合は、チェックを外す。



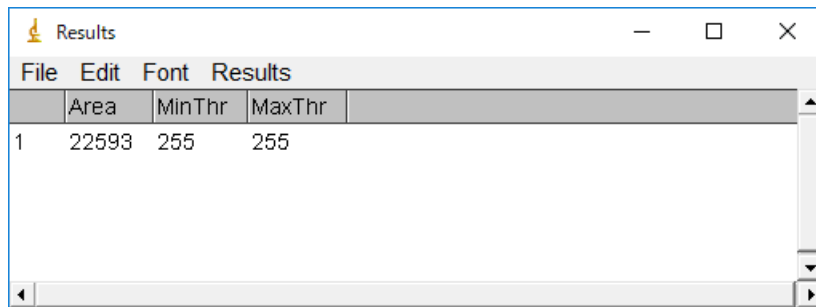
- (4) 満足のゆく値が見つけれられたら、**Apply** を押して確定する。下図のように、粒子の領域が黒色、背景の部分が白色になる。



【被覆率の算出】

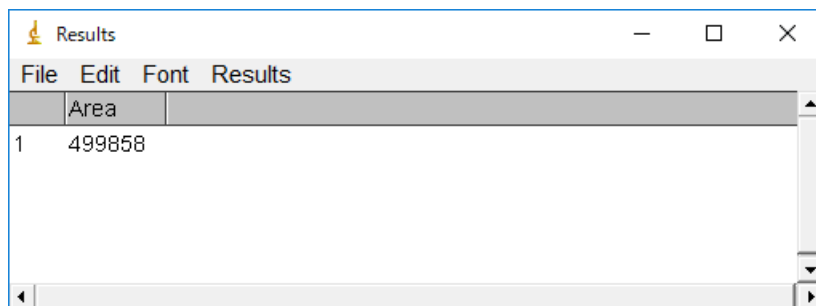
上記 2 値化画像について、粒子領域（黒色の部分）の面積を算出します。画像全体の面積 S に対する粒子領域の面積 T の比 (T/S) が被覆率となります。

- (1) **Analyze > Set Measurements...** を選択し、**Set Measurements** ウィンドウを表示させる。
- (2) 「**Area**」と「**Limit to Threshold**」にチェックを入れて、**OK** を押す。
- (3) **Analyze > Measure** を選択すると、**Results** ウィンドウが表示される。このウィンドウには、下図のように粒子領域の面積（ピクセル数）が **Area** として表示される。（今回の T は 22593 ピクセル）



	Area	MinThr	MaxThr
1	22593	255	255

- (4) 数値を確認したら、Result ウィンドウを閉じる。この際、解析結果を保存するか確認されるので、Yes / No で答える。Excel 形式 (xls) で保存可能。
- (5) Analyze > Set Measurements... を再度選択し、Set Measurements ウィンドウを表示させる。
- (6) 「Limit to Threshold」にチェックをはずして、OK を押す。
- (7) Analyze > Measure を選択し、Results ウィンドウを表示させる。今回のウィンドウに表示された値は画像全体の面積（ピクセル数）である。（今回の S は 499858 ピクセル）



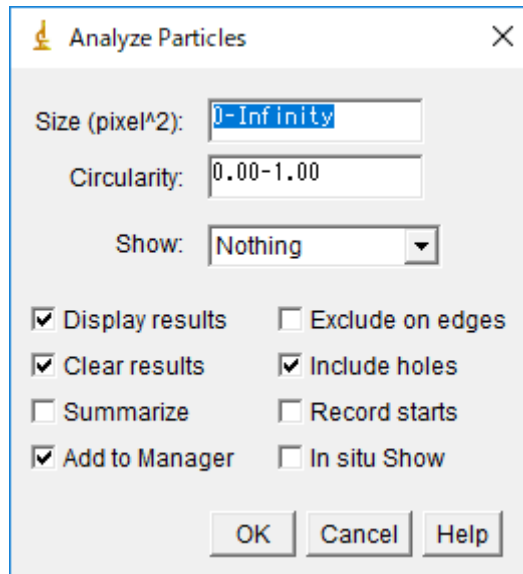
	Area
1	499858

- (8) T/S が被覆率となる。

【粒子径分布の解析】

2 値化した画像を利用して、粒子数のカウントや粒子サイズ分布を求めることができます。

- (1) Analyze > Analyze Particles を選択する。
- (2) 表示されたウィンドウを下図のように設定し、OK ボタンを押す。
（解析範囲等のパラメータは、測定試料に応じて適宜変更してください。Exclude on edges をチェックしておくと、画像の端にある粒子（一部しか表示されていない）が除外できて便利です。）



- (3) 下図のように粒子ごと³に番号が割り振られ、Results ウィンドウに各粒子の面積（ピクセル数）が一覧表示されます。このデータを Excel 等でうまく処理すれば、粒子サイズ分布のヒストグラムが得られます。



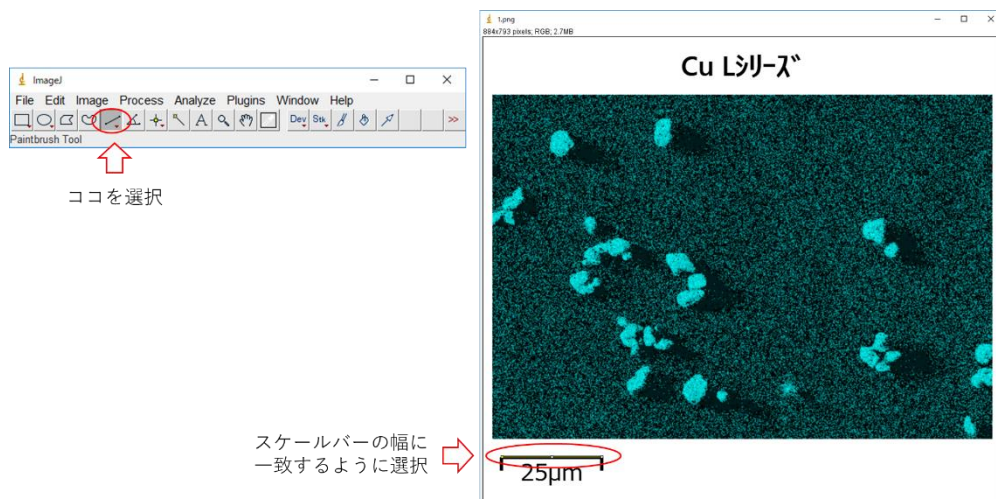
【ピクセルサイズを実サイズに換算する方法】

トリミングや2値化を行う前の画像（スケールバーを含む）から、1ピクセルあたりの長さを求めることができます。

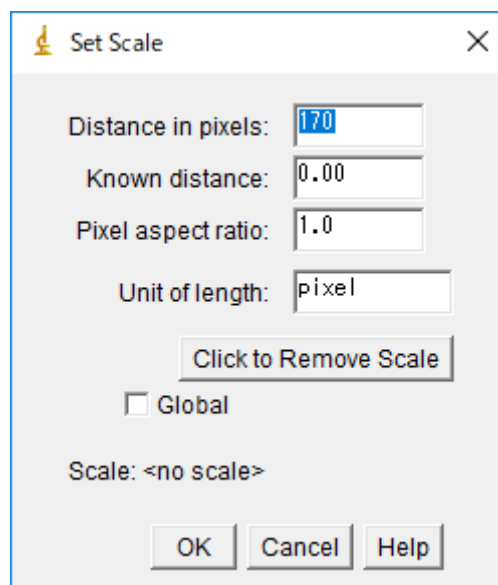
- (1) 未処理の画像データを Image J で開く。
- (2) 直線選択ツールを選択。スケールバーの幅に一致するように、直線領域を選択。（キーボードのシフ

³ 今回の場合、重なり合った複数の粒子が1つの粒子として認識された箇所がいくつかあるので注意が必要。場合によっては、Process > Binary > Watershed などを利用した粒子の自動分割がうまく機能するかもしれない。

トキーを押しながらドラッグすると、水平が保証される。)



- (3) Analyze > Set Scale を選択。表示されたウィンドウの Distance in pixels の部分に選択範囲の長さ（ピクセル数）が表示される。ここから、ピクセルサイズと実サイズの対応関係がわかる。（今回のケースでは 170 ピクセルが 25 µm なので、147 nm / pixel）



- (4) Known distance と Unit of length の部分にスケールバーのサイズと単位（今回の場合は、Known distance: 25、Unit of length: um）を入力して OK を押すと、以降の解析時には、結果がピクセル単位ではなく、実単位（µm や nm など）で表示されるようになります。