

多光源撮影による初期胚のリフォーカシングと3D表示

加藤弓子^{†1} 澤田好秀^{†1} 佐藤太一^{†1}
國吉房貴^{†2} 久保尋之^{†2} 船富卓哉^{†2} 向川康博^{†2}

1. はじめに

我々は、イメージセンサ上で細胞を培養して、透過光により半透明の細胞塊を撮影するレンズレス顕微鏡¹⁾²⁾を開発中である。光学系部品がなく、小型化が容易であり、狭いインキュベータ内で細胞を継続的に撮影しうる。レンズレス顕微鏡では、イメージセンサと照明の間にあるすべての細胞の光学像が取得されるため、重なり合った細胞を撮影すると、個々の細胞の判別は困難である。そのため、細胞の大きさや形状・配置がわからず、細胞の状態を判断できない。そこで我々は、照明を多方向から照射する多光源撮影を行い、リフォーカシング³⁾により撮影後に自由に焦点面を設定して、細胞塊中の細胞を観察可能とした。さらに、リフォーカシング画像を元に細胞の3D表示を行った。マウス初期胚を用いて実証したので報告する。

2. システム構成と撮影手順

2.1 構成

図1は我々の実験システムの写真と概略図である。細胞培養用のシャーレと一体となったイメージセンサ（パナソニック製 CCD MN34595PL）上にマウス初期胚と培養液を入れて撮影を行う。センサ表面の集光レンズは取り除いてある。CCDの画素ピッチは $1.335\mu\text{m}$ である。

細胞培養用のシャーレの底面に $3\text{mm}\phi$ の穴をあけ、イメージセンサは穴をふさぐように貼り付けされている。撮影時には、専用のソケットにより基盤に固定する。

照明はLED光源（林時計工業製 LA-HDF5010）による白色光をガラスファイバーで導光し、 $10\mu\text{m}\phi$ のピンホール（駿河精機製 S71-10）を通して照射している。ピンホールはxyステージ（駿河精機製 KYG06020-C）によりイメージ

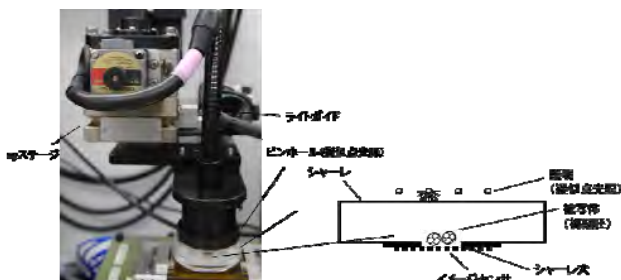


図1 実験システムの照明とイメージセンサ部分。右は概略図。

†1 パナソニック株式会社

†2 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科

センサと平行な面上で移動可能に構成した。照明の高さはシャーレの形状に応じて調整して 11.5mm とした。十分に小さいピンホールを用いることで、イメージセンサの1画素に、照明の面内の2点以上から光線が到達することのない、擬似的な点光源となる。

2.2 撮影手順

被写体として、マウス初期胚（2細胞期，4細胞期）を用いた。マウス初期胚は半透明物体で、ほぼ球形をしており、直径約 $100\mu\text{m}$ である。

マウス胚は外側を覆う胚膜（透明体）の中に、細胞がある。2細胞期，4細胞期の正常胚ではほぼ同じ大きさの細胞が、それぞれ2個，4個備わっている。2から4細胞期では、細胞数が増えても胚全体の大きさに変化はなく、細胞数が増えるに従って細胞は小さくなる。

ピンホールの位置制御の原点（照明位置原点）は、イメージセンサ中心の直上とした。図2にピンホールの設置間隔の決定方法を示す。被写体の高さ方向の中心点を標準焦点位置とし、照明間隔は、隣り合う2点からの光線が、標準焦点位置を透過して、イメージセンサ上の1画素ピッチ以上離れた点に到達するように決定した。本報告ではマウスの初期胚（直径約 $100\mu\text{m}$ ）の高さ方向の中心として、イメージセンサから $50\mu\text{m}$ の高さを標準焦点位置と定め、照明の間隔を $320\mu\text{m}$ と決定した。

ピンホールの位置は、理想的には円状に配置されることが望ましく、被写界深度を浅くするためには円の直径を大きくとることが望ましい。これは、ピンホールの配置が光学レンズに対応するためである³⁾。本報告ではx軸方向，y軸方向ともに9点分の正方形の4隅を削った57点の照明を設定した。なお、撮影中の照明の強度は一定とし、照明位置による強度変化に対する補正は行わなかった。

撮影は暗室内で行った。シャーレに培養液を入れ、底のイメージセンサ上

にマウス初期胚を配置した。専用ソケットによりイメージセンサ付きシャーレを基板に接続した後，xyステージによりピンホールの位置を移動

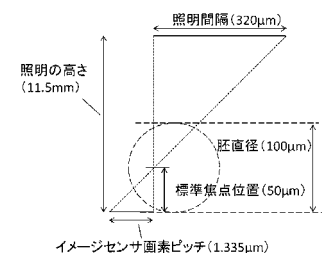


図2 擬似点光源の設置間隔の決定方法。

し、移動終了後に撮影した。ピンホールを移動するごとに撮影を繰り返し、リフォーカシングに用いる画像セットを取得した。露光時間は約 540ms とした。

3. 処理

3.1 リフォーカシング

我々は、異なる照明位置からの透過光によって被写体がイメージセンサ上の異なる位置に撮影されることを利用してリフォーカシングを行う。異なる位置に撮影された被写体のなかで、焦点を合わせたい部分（イメージセンサからの距離）が重なるように画像ごとの変位量を求める。変位量は照明位置の違いによるイメージセンサ上の位置の差である。変位量を合焦画像全体で一定とするのではなく、画素ごとに変化させることで、合焦面を斜めや曲面にするなど、通常の光学顕微鏡では実現が困難な合焦画像を生成することが出来る。リフォーカシングにより合焦面上の物体に対応する像は明確化されるがそれ以外に位置する物体の像はぼける。このように、リフォーカシングを用いて対象物体の立体構造が把握できる。

3.2 3D表示

イメージセンサから $1\mu\text{m}$ から $100\mu\text{m}$ まで $1\mu\text{m}$ ごとに生成したリフォーカシング画像を元に、3D表示を行った。

各リフォーカシング画像において、ハフ変換で円を1つ抽出し、胚膜の画像平面上の中心位置と半径を決定する。次に各リフォーカシング画像で上記円の内側に含まれるエッジ点を細胞表面の候補点とし、イメージセンサ表面と表面に直行する軸で構成される3次元座標上で、K-means法で細胞数にクラスタリングする。各クラスタの重心を各細胞の中心位置として球のモデルを当てはめる。

4. 実験結果

図3に4細胞期のマウス胚を被写体として撮影した画像を示す。a) は全焦点画像であり、b) c) はイメージセンサに平行な平面でリフォーカシングを行った画像、d)

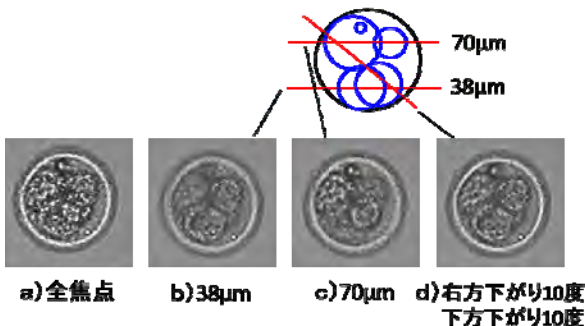


図3 マウス4細胞期胚を被写体とした撮影結果。上図は胚内の細胞の配置と設定した合焦面の位置を示す模式図。a) リフォーカシングを行っていない画像。照明位置はイメージセンサ中央直上。b) イメージセンサ上 $38\mu\text{m}$ 水平面の合焦画像。c) イメージセンサ上 $70\mu\text{m}$ 水平面の合焦画像。d) 傾斜平面の合焦画像。水平面に対して、画像右方向へ 10 度下がり、下方向へ 10 度下がる角度。

は合焦面を斜めにしてリフォーカシングを行った画像である。全焦点画像 a) では、個々の細胞の区別が困難であるが、リフォーカシングにより、b) の位置、c) の位置にそれぞれ2つの細胞が確認できる。さらに d) では、c) で確認できる細胞のうち大きい方（左側）と、b) の2つの細胞とを通る合焦面により、異なる位置に存在する細胞を同時に確認できた。任意の合焦面の画像生成を確認した。

図4は2細胞期胚を3D表示した一例である。2細胞胚については上記方法で3DCGを合成できたが、4細胞胚についてはクラスタリングによる重心の決定が出来なかった。

5. 考察と今後の課題

イメージセンサ上に半透明の被写体を直接置いて、擬似点光源により得られた画像をリフォーカシングすることで、マウス4細胞期胚中の細胞の明確な画像を得ることができた。さらに、任意の合焦面の画像を生成し、視点変換に相当する画像が生成できることを確認した。

本報告では2細胞期では3DCGの作成ができたが、4細胞期胚ではリフォーカシング画像から4つの細胞が判別できずにかかわらず3DCGが作成できなかった。4細胞期では細胞同士の接触部分が多く、重心決定に失敗したと考えられる。

リフォーカシングにあわせて、屈折光の分離、解像度を補う手法の導入により、細胞の境界面を鮮明に捉える方式を検討する。8細胞期胚の細胞の判別と3DCG化が可能な、実用的な撮影システムの開発を目指す。

参考文献

- 1) Bishara, W. Su, T. Coksun, A. F. and Ozcan, A.: Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution, Optics express, vol. 18, No.11, pp. 11181 – 11191 (2010).
- 2) Zheng, G. Kolner, C. and Yang, C.: Microscopy refocusing and dark-field imaging by using a simple LED array, Optics letters, vol. 36, 20, pp. 3987-3989, October, 2011.
- 3) Ng, R. et al.: Light Field Photography with a Hand-held Plenoptic Camera, Stanford Tech Report CTSR 2005-02 (2005).

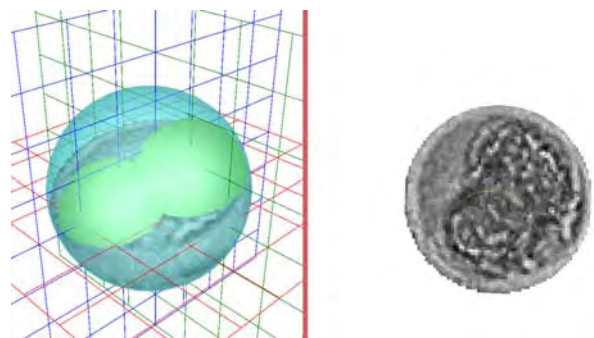


図4 マウス2細胞期胚の撮影結果から作成した3DCG。左図は胚膜（透明体）と細胞の3DCGと断面位置を示した図であり、右図は左図中の断面位置の合焦画像。