

リフォーカシングによる初期胚の自由焦点画像生成

加藤 弓子[†] 澤田 好秀[†] 國吉 房貴[‡] 久保 尋之[‡] 船富 卓哉[‡] 向川 康博[‡]

[†] パナソニック(株) 〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台 3-4

[‡] 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

E-mail: [†] {kato.yumiko, sawada.yoshihide}@jp.panasonic.com,

[‡] {kuniyoshi.fusataka.jv6, hkubo, funatomi, mukaigawa}@is.naist.jp

あらまし 我々は、インキュベータ内で培養細胞を連続監視するための小型撮影システムを開発している。このシステムはイメージセンサ上に直接細胞を置き、レンズレスで生きた細胞を撮像する方式である。そのため、焦点の概念がなく、取得される画像は全焦点画像となるため、立体構造の情報が得られない。そこで我々は、複数の疑似点光源を順次点灯して、都度細胞の全焦点画像を撮像し、それらの画像を元にリフォーカシングを行うことで、立体構造情報の取得を試みた。これにより、細胞の輪郭を明確化し、さらに光学顕微鏡では困難な合焦面を斜めにした観測が可能となる。ガラスビーズとマウスの初期胚を対象とした実験を行ったので結果を報告する。

キーワード レンズレス顕微鏡, リフォーカシング, 多光源撮影, 半透明物体, 初期胚

Visualization of embryos at any focal plane using the refocusing processing

Yumiko O. KATO[†] Yoshihide SAWADA[†] Fusataka KUNIYOSHI[‡] Hiroyuki KUBO[‡]

Takuya FUNATOMI[‡] and Yasuhiro MUKAIGAWA[‡]

[†] Panasonic Corporation 3-4 Hikaridai, Seika-cho, Soraku-gun, Kyoto, 619-0237 Japan

[‡] Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and technology 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara, 630-0192 Japan

E-mail: [†] {kato.yumiko, sawada.yoshihide}@jp.panasonic.com,

[‡] {kuniyoshi.fusataka.jv6, hkubo, funatomi, mukaigawa}@is.naist.jp

Abstract We are developing a lensless small imaging system, which takes living cells photos inside the incubator. We have tried contact or direct imaging, to image objects which are on the image sensor directly. Lensless imaging derives omnifocal image. This means structure information are lost. To get structure information and clear contours, we adopted refocusing. Any focal image is calculated from images taken with point light source array. We tested our system by imaging glass beads and mouse embryos. Refocused images showed clearer contours than unprocessed image. Subjects structure was expressed as different images among each focal plane. Furthermore, tilted focal image supports observation from leaning inclined view point.

Keywords Lensless microscope, Refocusing, Point light source array, Translucent, Embryo

1. はじめに

培養細胞は、医学応用に限らずバイオ医薬等細胞由来物質の製造に使用されている。その際、細胞の状態を監視し続ける必要があり、細胞の状態監視には顕微鏡が利用される。

顕微鏡下の観察では、細胞の培養環境を保つ恒温槽であるインキュベータからの取り出しによる細胞への

負荷が高く、細胞の死亡や変性の危険がある。そのため、インキュベータ内で細胞を監視し続ける簡易なシステムの開発が期待されている。

我々は、レンズを使用せず、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を開発中である。この装置は、レンズや鏡といった光学系部品が不要となるため、小型

化が容易となる利点がある．図 1 にレンズレス顕微鏡の基本的な構成を示す．この構成では，イメージセンサに直接被写体を置き，透過光により撮影する．レンズは不要であり，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．そのため，細胞が重なり合った細胞塊を被写体とすると，個々の細胞の判別が困難となり，細胞の大きさや形状・配置といった，細胞の状態を判断するために必要な情報を取得することができない．そこで我々は，リフォーカシングを行うことで，細胞の立体構造を含む状態判別に必要な情報の取得を試みた．点光源による照明を多方向から照射する多光源撮影を行い，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．ガラスビーズとマウス初期胚を用いて実証したので報告する．

1.1. 関連研究

1.1.1. レンズレス顕微鏡

レンズレス顕微鏡については，位相差を利用するもの[1]，インラインホログラムによるもの[2]，ライトアレイによるもの[3]がある．位相差によるものは，同一光源からの光線を分けるための光学系が必要であり，小型化が困難である．インラインホログラムによるものも，バックグラウンド光の必要から，一定以上の小型化は困難である．ライトアレイによるものは，複数の光源を同時に照射して得られる，明視野像と暗視野像を利用して，半透明物質の境界面を明確に撮影する方法である．一方，我々の提案する方法は，多数の光源を用いる点でライトアレイによる撮影方法に類似するが，点光源を順次照射し，照明位置ごとに撮影した画像を基にリフォーカシングを行い，合焦画像を合成する点が異なる．

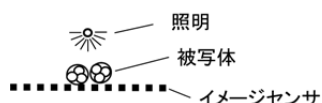


図 1 レンズレス顕微鏡の基本構成。

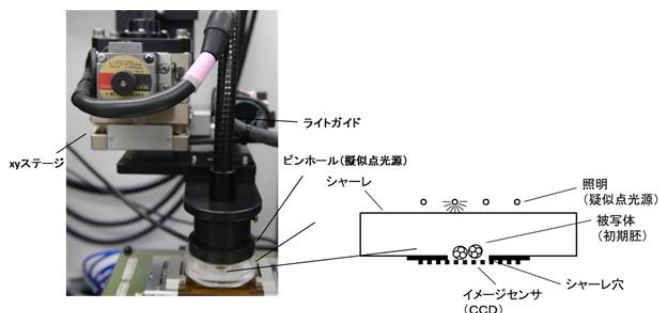


図 2 実験システムの照明とイメージセンサ部分。右は概略図。

1.1.2. リフォーカシング

リフォーカシングはライトフィールドカメラにより記録された 4 次元光線空間（LF: Light Field）情報より，任意の合焦面の画像を合成する際に用いられる．LF カメラにおけるリフォーカシングの手順は，以下のとおりである． 1）視点の異なる複数の全焦点画像を生成し， 2）視点の位置に応じて合成しようとする合焦点に対応する変位量を求め， 3）変位を与えた各全焦点画像を合成する[4]．

我々が提案するレンズレス顕微鏡は点光源の透過光により光学像を直接イメージセンサで取得する．位置の異なる複数の点光源による複数の光学像は，焦点の概念がないため，上記 1）の全焦点画像に相当する．そのため，光源の位置に応じて変位量を求め，変位を与えた画像を合成することにより，細胞塊の合焦点画像を合成することができる．

2. システム構成と撮影手順

2.1. 構成

図 2 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．イメージセンサはコンパクトデジカメに使用されている CCD であり，センサ表面の集光レンズは取り除いてある．なお，CCD の画素ピッチは $1.335\mu\text{m}$ であり，画像サイズは 4656×3480 である．

図 3 に細胞培養用のシャーレと一体となったイメージセンサの上面（左）と裏面（右）の図を示す．細胞培養用のシャーレの底面に $3\text{mm}\phi$ の穴をあけ，イメージセンサはシャーレ底面の穴をふさぐように防水可能な接着剤により貼り付けされている．撮影時には，シャーレと一体化したイメージセンサを専用のソケットにより基盤に固定する．

照明は光源（林時計工業製 LA-HDF5010）による白色光を $7\text{mm}\phi$ 1m のグ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）によりイメージセンサと平行な面上で移動可能に構成した．照明の高さとイメージセンサの

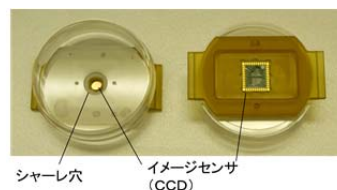


図 3 シャーレと一体化したイメージセンサ。左：上面，右：裏面。

画素ピッチから計算して十分に小さいピンホールを用いることで、ピンホールから射出した光束はイメージセンサの2画素以上に広がらない、擬似的に点光源とみなすことのできる照明となる。

2.2. 撮影手順

被写体として、ガラスビーズとマウス初期胚（2細胞期、4細胞期、8細胞期）を用いた。マウスの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。なお、ガラスビーズの直径もこれと揃えた。

図4は微分干渉顕微鏡によるマウス胚の写真である。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、8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、8個備わっている。2から8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い。したがって、胚に含まれる細胞の大きさは、細胞数が増えるに従って小さくなる。

撮影にあたり、まず、マウス初期胚と培養液とをイメージセンサを貼り付けたシャーレに入れ、専用ソケットにより基板に固定する。

照明の高さはシャーレおよびソケットの形状に応じて調整した。本報告では図5に示すように、照明の高さは 11.5mm とした。

ピンホールの位置制御の原点は、イメージセンサ中心の直上を照明位置の原点とした。図5に、ピンホール配置の決定方法を示す。被写体の高さ方向の中心点を標準焦点位置とし、照明配置の1単位は、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

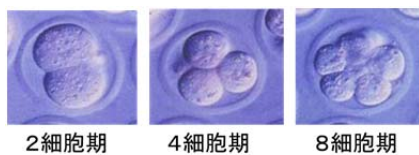


図4 マウス初期胚の微分干渉顕微鏡写真。

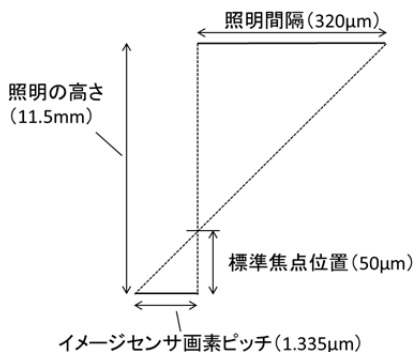


図5 擬似点光源の設置間隔（1単位）の決定方法。

うに決定した。なお、本報告で被写体としたマウスの初期胚は、直径が約 $100\mu\text{m}$ であるため、図5に示したように、イメージセンサから $50\mu\text{m}$ の高さをその中心位置として標準焦点位置と定め、照明の間隔を決定した。すなわち、照明1単位を $320\mu\text{m}$ とした。

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[4]。なお、撮影中の照明の強度は一定とし、照明位置による照明の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。図3のシャーレに培養液を入れ、シャーレ穴、すなわちイメージセンサ上にマウス初期胚およびガラスビーズを配置した。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。画像は16ビットグレースケールで記録し、露光時間は約 700ms とした。

3. 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、以下の式に従って合焦点画像 $R(d,u,v)$ を求める。

$$R(d,u,v) = \frac{1}{N} \sum_{i,j=-n}^n I_{(x,y)}(u-id, v-jd)$$

ここで $i^2 + j^2 < n^2 + 1$ であり、 d は光源位置の違いに

よるイメージセンサ上の変位量を表す。なお、変位量 d を合焦点画像 $R(d,u,v)$ 全体で一定とするのではなく、画素 (u,v) ごとに变化させることで、合焦点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点画像を生成することが出来る。この場合 d は (u,v) の関数となる。また、 N は光源の数であり、 $i=j=0$ がイメージセンサ中央の真上に位置する。

図6にリフォーカシング処理の概要を示す模式図を示す。焦点面1の位置で合焦したい場合を考える。このとき、変位量 d とすると、焦点面1上にある物体に対応する像は明確化させる。一方、焦点面2などの他の位置では変位量 d で計算されるため、像が明確化されず、ぼける。このように、リフォーカシングを用

いることで、対象物体の立体構造を把握することができるようになる。

4. 実験結果

本報告では、図7に示すような x 軸方向 9 単位、y 軸方向 9 単位の正方形の 4 隅を削った配置に照明を設定した。すなわち、 $n=4$ 、 $N=57$ である。

4.1. ガラスビーズ

図8に、直径平均約 $100\mu\text{m}$ のガラスビーズを用いて撮影した画像を示す。尚、振動等の影響を防ぐため、ガラスビーズは透明接着剤で図3に示すシャーレ穴内部のイメージセンサ上に固定した。a) はイメージセンサ中央の直上の点光源により撮影された、リフォーカシングを行っていない画像である。b) ~ d) はイメージセンサに平行な平面を合焦画像としてリフォーカシングを行った画像である。a) の全焦点では重なったガラスビーズのすべての輪郭が見えており、上下関係は不明である。一方、b) の $30\mu\text{m}$ の合焦画像では、白円で囲まれた部分以外のガラスビーズの輪郭ははっきりしているが、囲まれた部分のガラスビーズの輪郭はぼけている。また、c) の $40\mu\text{m}$ の合焦画像では、右側の白円で囲まれたガラスビーズの輪郭が明確になり、d) の $50\mu\text{m}$ の合焦画像で、左側の白円で囲まれたガラスビーズの輪郭が明確になった。このことから、リフォーカシングにより、各焦点面上にあるガラスビーズの輪郭が明瞭となり、立体構造が取得できることがわかった。

4.2. マウス初期胚

図9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を合焦面としてリフォーカシングを行った画像、d) 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) の位置に2つの細胞があり、それらの細胞の上に重なるようにして、c) の位置に別の2つの細胞が確認できる。さらにd) では、c) で確

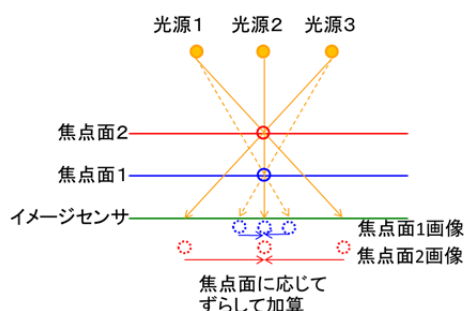


図6 リフォーカシングによる合焦画像生成の概念図。

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これら細胞を同時に確認できた。変位量を合焦画像の画素ごとに計算することで、画素ごとに異なる合焦位置を用いることができ、それにより任意の合焦面の画像が生成できた。

次に、図10に8細胞期のマウス胚を被写体として撮影した画像を示す。図9と同様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を合焦画像としてリフォーカシングを行った画像である。ここで、8細胞期胚の細胞は4細胞期胚よりさらに小さく、各細胞の直径は $30\mu\text{m}$ 程度であることに注意する。a) の全焦点画像では、胚膜に沿って見える6個の細胞と中央に重なる細胞が見える。一方、 $60\mu\text{m}$ のc) では全焦点画像a) の胚膜に沿った6個の細胞の輪郭が明瞭化しているが、 $36\mu\text{m}$ のb) では低い位置にあると見られる2つの細胞の輪郭は確認できない。

5. 考察

イメージセンサ上に半透明の被写体を直接置いて撮影するレンズレス顕微鏡において、擬似点光源を複数用いて透過光による撮影を行った。擬似点光源を用いて透過光で撮影された画像は、LFカメラの全焦点画像に相当する。我々は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、レンズを使わず、多光源撮影の結果からリフォーカシングすることで、任意の合焦面の画像を生成し、光学顕微鏡では実現不可能な視点変換に相当する画像が生成できることを確認した。斜めの合焦画像により、初期胚中の細胞の配置に関わらず、個々の細胞の大きさと形を確認しやすい画像を得ることができる。

しかし、8細胞期胚については部分的には細胞の輪郭を確認することが出来たが、細胞の位置によっては輪郭線を確認することが困難であった。これは、細胞

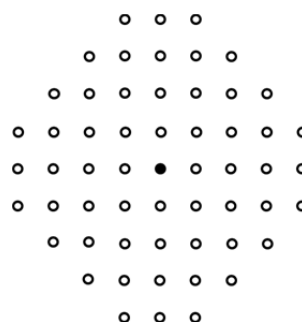


図7 撮影実験時の照明配置。黒丸がイメージセンサ中心の直上に位置する照明配置の原点である。照明位置の間隔は照明1単位 ($320\mu\text{m}$) である。

の重なるの多さにより、光が複雑に屈折し、光源からの直接光以外の光の影響が増したためと考えられる。これについては、リフォーカシングのみでは解決が困難であり、直接光と屈折光の分離が必要である。さらに、レンズレスであるため、画像の解像度はイメージセンサの画素ピッチに依存する。マウスの初期胚は、直径が約 $100\mu\text{m}$ と大きく、2細胞期胚、4細胞期胚の中の細胞も大きい。しかしながら8細胞期さらに分裂が進み細胞が小さくなると、解像度不足により細胞の観察が困難になる。ヒトの初期胚もマウスの初期胚と同様の大きさや形状である。不妊治療の臨床現場では、8細胞期胚の細胞の観察が多く行われており、8細胞期の細胞が明確に判別できることが、実用化のひとつの目安である。本報告では4細胞期胚の細胞が判別でき、その立体的配置が判断できることを示したが、

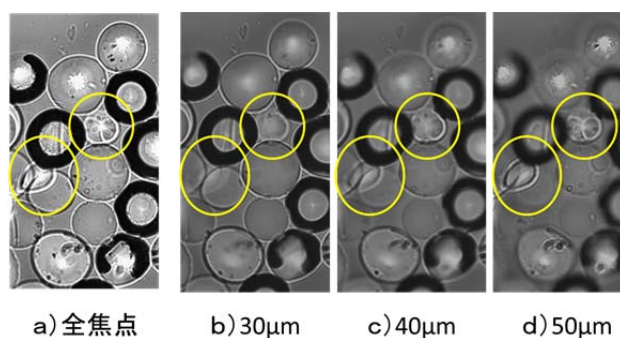


図8 ガラスビーズを被写体とした撮影結果。図中楕円部分はガラスビーズの重なり部分を示す。a) リフォーカシングを行っていない画像。照明位置はイメージセンサ中央直上。b) イメージセンサ上 $30\mu\text{m}$ 水平面（イメージセンサ平面に平行）の合焦画像。c) イメージセンサ上 $40\mu\text{m}$ 水平面の合焦画像。d) イメージセンサ上 $50\mu\text{m}$ 水平面の合焦画像。

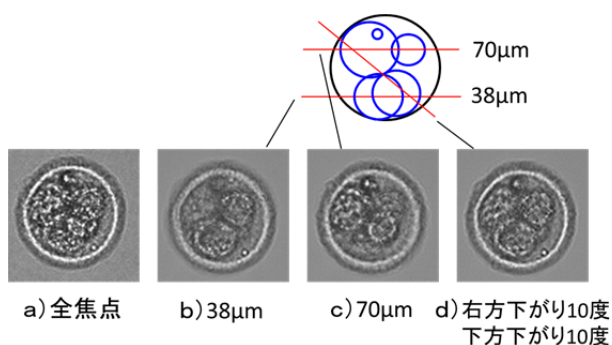


図9 マウス4細胞期胚を被写体とした撮影結果。上図は胚内の細胞の配置と設定した合焦面の位置を示す模式図。a) リフォーカシングを行っていない画像。照明位置はイメージセンサ中央直上。b) イメージセンサ上 $38\mu\text{m}$ 水平面の合焦画像。c) イメージセンサ上 $70\mu\text{m}$ 水平面の合焦画像。d) 傾斜平面の合焦画像。傾斜は水平面に対して、画像右方向へ 10° 下がり、下方向へ 10° 下がる角度。

8細胞期胚の明瞭化が課題である。

6. まとめと今後の課題

レンズレス顕微鏡の光源として複数の擬似点光源を用い、リフォーカシングにより任意の合焦面画像を生成し、マウス4細胞期胚中の細胞を撮影することに成功した。しかし、臨床で重要な8細胞期胚中の細胞については、現段階ではすべての細胞の輪郭を確認するには至っていない。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、実用可能な撮影システムの開発を目指す。

文 献

- [1] S. V. Kesavan et.al., "Real-time label-free detection of dividing cells by means of lensfree video-microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 19, 3, pp.036004-1 – 036004-10, March, 2014
- [2] W. Bishara, T. Su, A. F. Coksun, and A. Ozcan, "Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution," *Optics express*, vol. 18, 11, pp. 11181 – 11191, May, 2010.
- [3] G. Zheng, C. Kolner, and C. Yang, "Microscopy refocusing and dark-field imaging by using a simple LED array," *Optics letters*, vol. 36, 20, pp. 3987-3989, October, 2011.
- [4] R. Ng, et.al., "Light Field Photography with a Hand-held Plenoptic Camera," *Stanford Tech Report CTSR 2005-02*, 2005.

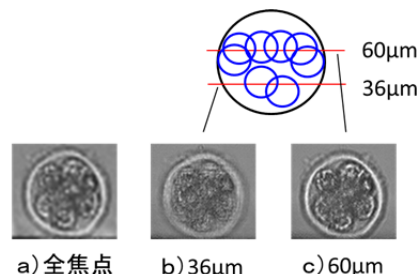


図10 マウス8細胞期胚を被写体とした撮影結果。上図に胚内の細胞の配置と設定した合焦面の位置を示す。a) リフォーカシングを行っていない画像。照明位置はイメージセンサ中央直上。b) イメージセンサ上 $36\mu\text{m}$ 水平面の合焦画像。c) イメージセンサ上 $60\mu\text{m}$ 水平面の合焦画像。