

光学顕微鏡のための画像処理の研究 (特に位相差顕微鏡の画質改善法について)

根本 幾

東京電機大学 理工学部 教授

1. はじめに

本研究の目的は2つある。1つは画像処理によって顕微鏡画像の改善を行うため、顕微鏡、特に位相差顕微鏡の3次元伝達関数を求めることである。他はこの位相差顕微鏡の伝達関数の考察より、位相差顕微鏡そのものを改善する方法の提案であり、これはコンデンサにその屈折率あるいは透過率を電氣的にコントロールできるものを用い、さらに簡単なハードウェアを顕微鏡自体に組み込むことを要求するものである。この方法の実現には、コンデンサに用いる物質の開発が必要であるが、シミュレーション結果はその改善の大きさを示唆している。さらに、より容易に位相差像を改善する方法として、位相差用レンズとして従来用いられているものより明るい(透過率100%に近いもの)を、顕微鏡TVカメラと併用する提案もする。理論計算とシミュレーションの結果、その効果が大きいことが分かった。

2. 顕微鏡の3次元伝達関数

顕微鏡の3次元伝達関数が求められたのは1985年にもなってからである、ということは少なからず興味深い事実である (Streibl[1])。この関数の導出のためStreiblはHelmholzの波動方程式から出発して、線形近似を用いて以下の一般的な伝達関数に到達した。光軸方向を z 軸とした空間座標を $(\mathbf{x}, z) = (x_1, x_2, z)$ とし、対応する空間周波数を $(\mu, \zeta) = (\mu_1, \mu_2, \zeta)$ とする。また観察対称の散乱ポテンシャルを $V(\mathbf{x}, z)$ としその実数部のFourier変換を P ,

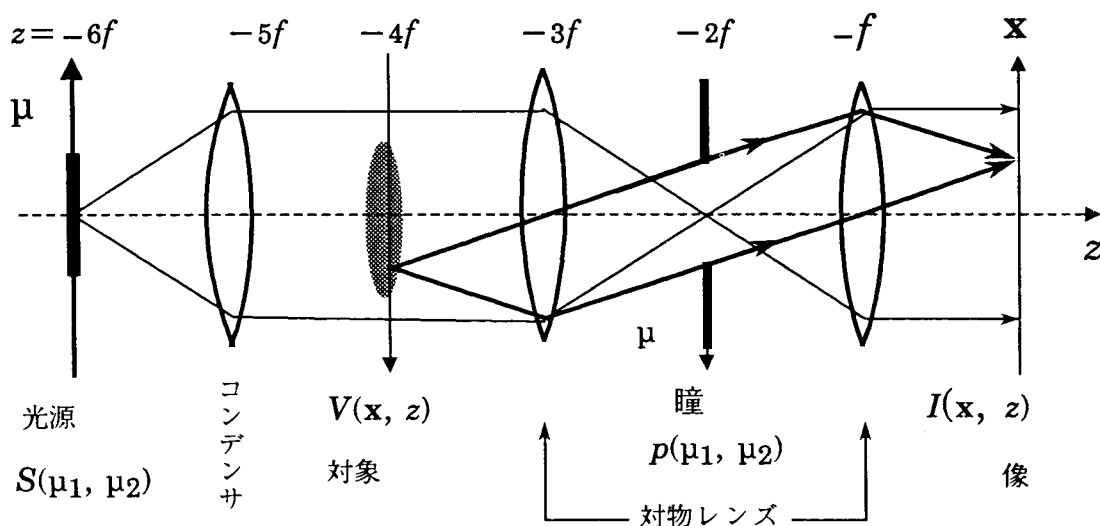


図1 光学顕微鏡の正規化した座標系

虚数部のそれをAとする。顕微鏡の光源はインコヒーレントで強度は $S(\mu)$ で与えられるとする(図1参照)を。このとき顕微鏡による観察像 $I(\mu, \zeta)$ は、

$$I(\mu, \zeta) = B\delta(\mu, \zeta) + P(\mu, \zeta)T_p(\mu, \zeta) + iA(\mu, \zeta)T_A(\mu, \zeta) \quad (1)$$

で与えられる。ここで $i^2 = -1$ であり

$$B = \iint_{\mathbf{R}^2} S(\mu) |p(\mu)|^2 d\mu$$

$$\begin{pmatrix} T_A \\ T_p \end{pmatrix} = \frac{\lambda}{4\pi} \iint_{\mathbf{R}^2} p\left(\mu' + \frac{1}{2}\mu\right) \left[s\left(\mu' + \frac{1}{2}\mu\right) \pm s\left(\mu' - \frac{1}{2}\mu\right) \right] p^*\left(\mu' - \frac{1}{2}\mu\right) \delta(\zeta + \lambda\mu'\mu) d\mu' \quad (2)$$

である。ここで $p(\mu)$ は対物レンズの瞳関数で λ は照明光の平均波長である。

StreiblはこれをHelmholzの波動方程式から出発して線形近似を用い、極めて原理的に導出した。筆者は顕微鏡の2次元伝達関数は昔から知られているのであるから[2]、これから3次元伝達関数を導出できるものと考え、Streiblと同じ結果を導くことができた[3]。これを用いて位相差顕微鏡の3次元伝達関数を求めるのは、面倒だが初等的な計算でできる。いま3次元物体の複透過関数を $f(\mathbf{x}, z) = \gamma(\mathbf{x}, z) \exp[i\phi(\mathbf{x}, z)]$ とする。これはまた

$$f(\mathbf{x}, z) = 1 + f_A(\mathbf{x}, z) + if_p(\mathbf{x}, z), \quad (1 + f_A(\mathbf{x}, z) = \text{Re}[f(\mathbf{x}, z)], \quad f_p(\mathbf{x}, z) = \text{Im}[f(\mathbf{x}, z)])$$

と書ける。対象が光学的に弱い、すなわち $\gamma \cong 1, \phi(\mathbf{x}, z) \cong 0$ と仮定すると

$$|f_A(\mathbf{x}, z)| \ll 1, \quad f_p(\mathbf{x}, z) \cong \phi(\mathbf{x}, z) \quad (3)$$

となる。 f_A と f_p のFourier変換をそれぞれ $F_A(\mu, \zeta)$ と $F_p(\mu, \zeta)$ とすると、2次元伝達関数の拡張により、3次元結像に関する式は

$$I(\mu, \zeta) = B\delta(\mu, \zeta) + iF_p(\mu, \zeta)T_{PF}(\mu, \zeta) + F_A(\mu, \zeta)T_{AF}(\mu, \zeta) \quad (4)$$

で与えられる。ここで

$$T_{AF} = \frac{4\pi}{\lambda} T_A, \quad T_{PF} = \frac{4\pi}{\lambda} T_p$$

である。位相差顕微鏡においては、コンデンサは円輪状のスリットで、対物レンズの瞳はスリットに対応する部分が位相板となっている。図2参照。従って照明光は

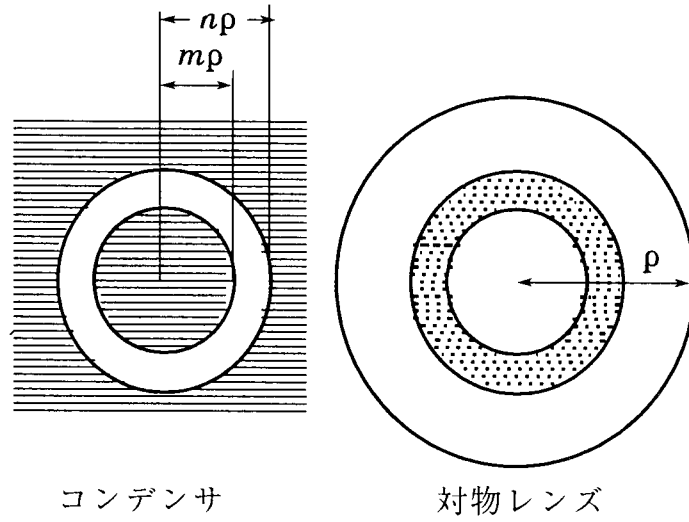


図2 位相差顕微鏡のコンデンサ部分と対物レンズの瞳

$$S(\mu) = \begin{cases} 1 & (m\rho/\lambda \leq \|\mu\| \leq n\rho/\lambda) \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (5)$$

で表わされ、対物レンズの瞳関数は

$$p(\mu) = \begin{cases} ce^{i\theta} & (m\rho/\lambda \leq \|\mu\| \leq n\rho/\lambda) \\ 1 & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (6)$$

で表わされる。ここで p は対物レンズの開口数、 θ は位相板の位相遅延、 c は位相板の透過率である。これより位相差顕微鏡における結像式の中の T_{AF} と T_{PF} が以下のように求められた。

$$T_{AF} = \frac{2}{\lambda\|\mu\|} (T_a + T_b), \quad T_{PF} = \frac{2}{\lambda\|\mu\|} (T_a - T_b) \quad (7)$$

ここで

$$\begin{aligned} T_a &= T_1 + T_2 + T_3, & T_b &= T_1 + T_4 + T_5 \\ T_1 &= c^2 [(\beta_1 - \Gamma)^{1/2} - (\alpha_1 - \Gamma)^{1/2}] \\ T_k &= ce^{i\theta} [(\beta_k - \Gamma)^{1/2} - (\alpha_k - \Gamma)^{1/2}] \quad (k = 2, 3, 4, 5) \end{aligned}$$

であり、さらに

$$\alpha_1 = \max \left\{ \Gamma, \frac{m^2 \rho^2}{\lambda^2} + \left| \frac{\zeta}{\lambda} \right| \right\}, \quad \alpha_2 = \max \left\{ \Gamma, \frac{m^2 \rho^2}{\lambda^2} + \frac{\zeta}{\lambda} \right\}$$

$$\alpha_3 = \max \left\{ \Gamma, \frac{m^2 \rho^2}{\lambda^2} + \frac{\zeta}{\lambda}, \frac{n^2 \rho^2}{\lambda^2} - \frac{\zeta}{\lambda} \right\}, \quad \alpha_4 = \max \left\{ \Gamma, \frac{m^2 \rho^2}{\lambda^2} - \frac{\zeta}{\lambda} \right\}$$

$$\alpha_5 = \max \left\{ \Gamma, \frac{m^2 \rho^2}{\lambda^2} - \frac{\zeta}{\lambda}, \frac{n^2 \rho^2}{\lambda^2} - \frac{\zeta}{\lambda} \right\}$$

$$\beta_1 = \frac{n^2 \rho^2}{\lambda^2} - \left| \frac{\zeta}{\lambda} \right|, \quad \beta_2 = \min \left\{ \frac{m^2 \rho^2}{\lambda^2} - \frac{\zeta}{\lambda}, \frac{n^2 \rho^2}{\lambda^2} + \frac{\zeta}{\lambda} \right\}$$

$$\beta_3 = \min \left\{ \rho^2 - \frac{\zeta}{\lambda}, \frac{n^2 \rho^2}{\lambda^2} + \frac{\zeta}{\lambda} \right\}, \quad \beta_4 = \min \left\{ \frac{m^2 \rho^2}{\lambda^2} + \frac{\zeta}{\lambda}, \frac{n^2 \rho^2}{\lambda^2} - \frac{\zeta}{\lambda} \right\}$$

$$\beta_5 = \min \left\{ \rho^2 + \frac{\zeta}{\lambda}, \frac{n^2 \rho^2}{\lambda^2} - \frac{\zeta}{\lambda} \right\}, \quad \Gamma = \frac{\|\mu\|^2}{4} - \frac{\eta^2}{\lambda^2 \|\mu\|^2}$$

である。筆者の知る限り、位相差顕微鏡の3次元伝達関数の導出はこれが初めてのものである。興味深いのは、上の3次元伝達関数の導出は面倒だが初等的な計算で足りるのに、2次元伝達関数の導出は非常に複雑だということである。図3に $c \cong 0.4$, $\theta = \pi/2$ である位相差顕微鏡の $|T_A|$ と $|T_F|$ の鳥瞰図を示す。後者すなわち位相成分に対する伝達関数の絶対値が大きいことがわかる。

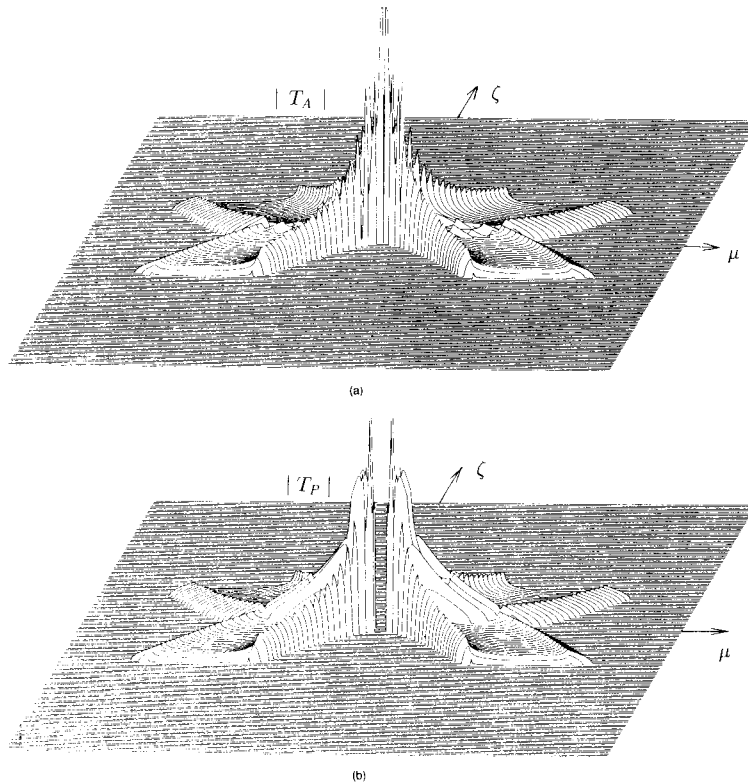


図3 位相差顕微鏡の3次元伝達関数の実数部分(a)と虚数部分(b)の絶対値の鳥瞰図。
対称性により、x-y軸に対応する空間周波数 μ_1 , μ_2 は μ 軸1本で表わしてある。

3. 位相差顕微鏡の結像における非線形成分

簡単のため、2次元の結像原理によってこれを考える。 f_A と f_P の2次元Fourier変換をそれぞれ $F_A(\mu, z)$, $F_P(\mu, z)$ とし、 $F_o = F_A + iF_P$ とする。このとき対称の $z = z$ における断面から得られる像のFourier変換は、

$$I(\mu, z) = \delta(\mu)\tau(\mathbf{0}, \mathbf{0}, z) + \tau_A(\mu, z)F_A(\mu, z) + i\tau_P(\mu, z)F_P(\mu, z) + \int \tau(\mu' + \mu, \mu', z)F_o(\mu' + \mu, z)F_o^*(\mu', z)d\mu' \quad (8)$$

で与えられる。ここで

$$\tau_A(\mu, z) = \tau(\mathbf{0}, -\mu, z) + \tau(\mu, \mathbf{0}, z), \quad \tau_P(\mu, z) = \tau(\mu, \mathbf{0}, z) - \tau(\mathbf{0}, -\mu, z) \\ \tau(\mu_1, \mu_2, z) = \int_{R^2} S(\mu')K(\mu_1 + \mu', z)K(\mu_2 + \mu', z)d\mu'$$

であり、 K は対称が焦点から距離 z ずれたときの瞳関数で2次元の瞳関数 $p(\mu)$ とは

$$K(\mu, z) = \exp\left(i\frac{\pi\lambda\|\mu\|^2 z}{n_c}\right)p(-\mu) \quad (9)$$

という関係にある。ここで n_c は対称の周囲の媒質の屈折率である。以下では $z = 0$ と仮定する。すなわち対称は平面的なもので焦点の合った場所にある。式(8)において式(3)の仮定は必要ないことに注意する必要がある。式(8)において右辺第3項の積分が非線形項である。この成分を減少させる方法を以下に3つ提案する。

4. 非線形成分の減少法

(1) 暗視野法

暗視野瞳関数は

$$p_D(\mu) = \begin{cases} 0 & (m\rho/\lambda \leq \|\mu\| \leq n\rho/\lambda) \\ 1 & (\text{otherwise}) \end{cases}$$

で表わされる。これを式(9)に代入しそれを式(8)に用いて得られる像を暗視野像と呼ぶ。この暗視野像を通常の位相差像から引き算した像は、非線形成分が減少した像となる。計算は省略するが後で歪率の低下でこれを確かめる。

(2) 逆位相法

通常の位相差像を得るときの対物レンズの位相板の位相より、位相が π 進んだものを用いた時の像を逆位相像と呼ぼう。このとき通常の位相差像より逆位相像を引く方法を逆位相法とする。これによって非線形成分がより少ない像が得られる。

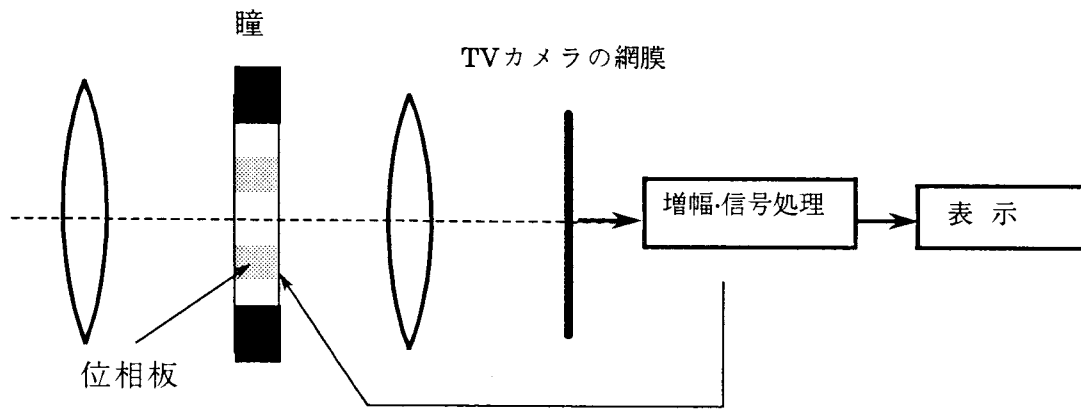


図4 非線形成分を軽減する位相差顕微鏡の構造（提案）

暗視野法ならびに逆位相法を実現するには、現在の位相差顕微鏡を図4の様なものに改造する必要がある。ここで、一番問題になるのは位相板である。この位相板は短時間のうちに暗視野瞳または逆位相瞳に変化させねばならない。このためには2種類の位相板を用意して、回転などの機械的方法で交換しながら、同期した電子回路で2つの像の引き算を行う必要がある。理想的な方式は液晶などのデバイスを用いた位相板を作り、電気信号でこれの特性を1秒間に30~60回位変化させるものである。

(3) 明るい対物レンズを用いる方法

これは単に対物レンズの位相板に通常使われているものより光の透過率 c の高いものを用いる方法である。通常は $c \approx 0.4$ であるが、これは背景光と対象から得られる位相差像とのコントラストを得るために経験的に定められたものである。しかし、 $c \approx 1$ とすることにより、感度が上昇するばかりでなく、非線形成分も減少させられることが示された。顕微鏡TVカメラを用いてオフセットの調整を行えば、背景光を自由に減少させることができる。従って顕微鏡TVカメラの使用を前提とすれば、コーティングによりわざわざ透過率を低くした位相板を用いるより、コーティングしない位相板を用いる方が高画質が得られる。これはまだあまりよく認識されていないようであるが、顕微鏡TVが広く用いられていることを考えれば、顕微鏡メーカーの再考を促したいところである。

5. 各方法の効果

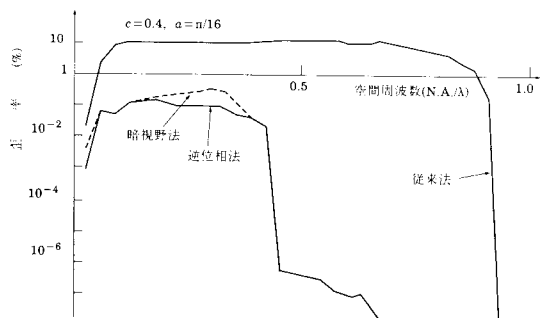
シミュレーションも行ったが〔4〕、ここでは歪率について述べる。純粹に位相成分のみの対象で、位相遅延量が x -方向に正弦波状に変化する対象を考える。すなわち

$$f(x, y) = \exp(ia \cos ax) \quad (10)$$

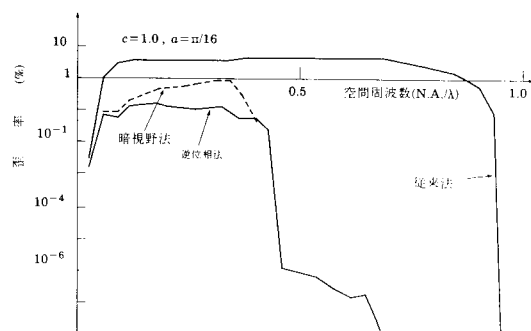
とする。この対象に対する像の歪率を

$$r(\omega) = \frac{\left(\sum_{k=1}^n |c_k|^2 \right)^{1/2}}{|c_1|}$$

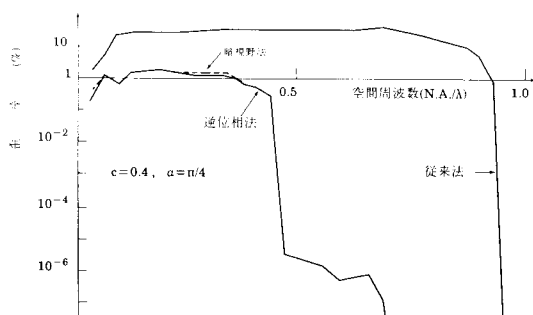
で定義する。ここで c_k は像信号の第 k 空間高調波の複素振幅である。各方法による結像の式に式(10)を代入し、結果をFFTによりFourier変換して c_k を求めた。図5に結果を示す。



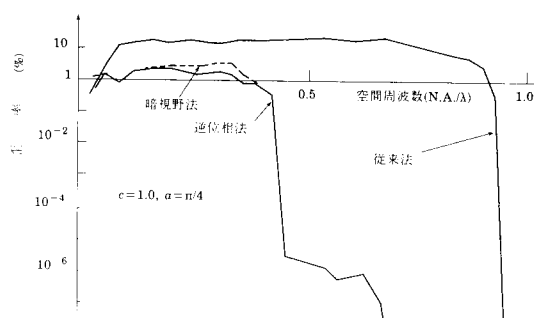
図(5-1)



図(5-2)



図(5-3)



図(5-4)

図5 提案した各方法における結像の歪率特性

横軸は空間周波数 ω を対物レンズの開口数で正規化したもので、縦軸は歪率を%で示したものである。図から、暗視野法と逆位相法の両者ともその効果が極めて大きいことが分かる。特に逆位相法の効果が大きい。また、明るい位相板を用いるだけでも、歪率をある程度改善できることも分かる。明るい位相板を用いる方法については、実際にメーカー(オリンパス光学工業)に依頼して、 $c \cong 1$ であるような位相差レンズを製作し、顕微鏡TV像を観察した結果も、かなりの改善を示した。

暗視野法や逆位相法は、顕微鏡の提案だけで実際に製作したわけではないので、実験はできないが、シミュレーションにより、位相物体の像が大きく改善できることが分かった。さらに位相差顕微鏡の3次元伝達関数の逆フィルタを原画像に施す場合、非線形成分が大きいと、処理後の画像は著しいアーチファクトに汚染されるが、ここで提案した非線形成分の軽減法を用いると、このアーチファクトが極めて小さくなることも確認された[4]。

6. 結語

顕微鏡の3次元伝達関数を、すでに知られているその2次元伝達関数を拡張することによって求め、それが最近Streiblによって求められた3次元伝達関数と一致することを示した。それを利用して、位相差顕微鏡の3次元伝達関数を求めた。さらに、位相差顕微鏡の観察の際問題となる、非線形成分を極めて効果的に減少させる方法を2つ提案した。これらの方法の実現には、顕微鏡の改造が必要であるが、共焦点レーザ顕微鏡のような複雑で高価なものにはならないと思われるので、試作品を製作するメーカーが現われないものかと考えている。さらに明るい対物レンズを用いる方法も提案した。これは顕微鏡TVカメラの使用を前提とすれば、感度を上げ非線形歪もある程度低減できる方法であり、簡単な方法でもあるので、使われるようになってよいと考えている。

参考文献

- [1] N. Streibl, "Three-dimensional imaging by a microscope," J. Opt. Soc. Am. A, 2, 121-127, 1985.
- [2] H. H. Hopkins, "The frequency response of a defocused optical system," Proc. R. Soc. London Ser. A231, 91-103, 1957.
- [3] I. Nemoto, "Three-dimensional imaging in microscopy as an extension of the theory of two-dimensional imaging," J. Opt. Soc. Am. A, 5, 1848-1851, 1988.
- [4] I. Nemoto and A. Takahashi, "Methods of improving the images in phase-contrast microscopy: theory and computer simulation," J. Opt. Soc. Am. A, 8, 511-519, 1991.