

# コンタクトイメージングにおける視認性向上のための リフォーカシングと高周波照明法の統合

國吉 房貴<sup>1,a)</sup> 船富 卓哉<sup>1</sup> 久保 尋之<sup>1</sup> 澤田 好秀<sup>2</sup> 加藤 弓子<sup>2</sup> 向川 康博<sup>1</sup>

概要：コンタクトイメージングは、細胞を培養しながら観察を行うことができるレンズレスの撮像装置であり、撮像素子の上に被写体を直接配置し撮影を行う。しかし、コンタクトイメージングによって撮影される被写体の視認性は低下する傾向にある。そこで本研究では、コンタクトイメージングの視認性を向上させるために、リフォーカシングと高周波照明法をコンタクトイメージングへ適用することに取り組む。リフォーカシングは撮像面と照明における双対の概念に基づき、浅い被写界深度を合成するために用いる。高周波照明法は、散乱光を分離するために用いる。しかし、単純な統合を行った場合、両者の手法を適用するために大量の撮影が必要になってしまう。そこで本研究では、高周波照明法とリフォーカシングを統一的な枠組みで定式化することによって、効率的に両者の手法を統合する手法を提案する。さらに、我々はウニの受精卵を用いて提案手法の有効性を検証した。

## 1. はじめに

近年、病理学の分野において安全な細胞培養への需要が高まっている。しかし、温度が一定に保たれた恒温器内で培養された細胞を観察するために、現在は一旦外部に取り出してから光学顕微鏡に設置した観察が行われている。しかし、細胞を恒温器から取り出して観察を行う場合、培養される細胞に汚れ、運搬時の振動、温度の変化によるストレスを与えてしまう危険性がある。そこで我々は受精卵の培養を目的とし、恒温器内に小型な細胞の観察装置を設置することによって細胞の培養と観察を同時に行うシステムを提案する。我々は、撮像素子の上に直接被写体を配置することによってレンズを省いた小型な撮像装置である、コンタクトイメージングを開発している [27]。しかし、コンタクトイメージングは、レンズを省いた撮像装置であるため、光学顕微鏡のように焦点を調節することによって被写体の重なりを観察する方法や、被写体により散乱した光のみを分離することによって被写体を鮮明に観察する暗視野検鏡を適用できない。そこで本研究では、レンズをもたないコンタクトイメージングにおける視認性を向上させるために、光線空間の取得に基づくリフォーカシングと散乱光を分離する高周波照明法を適用する。本研究の主な寄与は次の3つである。

- (1) 双対の概念 [19] の導入によってレンズレスで光線空間を取得する手法を提案。
- (2) コンタクトイメージングにおいてリフォーカシングと高周波照明法を効率的に統合する手法を提案。
- (3) 統合のために、高周波照明法とリフォーカシングの式を統一的な枠組みで定式化する手法を提案。

本論文では、2章で計算機演算を利用したレンズレス顕微鏡および光学顕微鏡における視認性向上手法についての関連研究を述べ、3章で提案手法の要素技術であるコンタクトイメージングと高周波照明法と光線空間を用いたリフォーカシングについて述べる。4章で高周波照明法とリフォーカシングを統合する提案手法について述べ、5章で提案手法の有効性を検証する実験結果を示す。6章でまとめと今後の課題について述べる。

## 2. 関連研究

レンズレスで撮影する手法は、顕微鏡を小型化できるため、生命科学の分野で広く研究されている。その中で主流とされるのは、撮像素子上に配置した被写体の像を直接観察するための手法、蛍光イメージングのための手法、超解像度画像を取得するための手法である。この中でも最も単純なものは撮像素子で取得される像を直接観察する画像処理を必要としない撮像手法である。撮像素子で取得される像を直接観察する手法は様々な目的で利用される。撮像素子で取得される像を直接観察する手法は恒温器内に設置可能な独立の小型顕微鏡を開発することを目的とする研究 [10]

<sup>1</sup> 奈良先端科学技術大学院大学 〒630-0192 奈良県生駒市高山町8916-5

<sup>2</sup> パナソニック株式会社 〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台3-4

<sup>a)</sup> kuniyoshi.fusataka.jv6@is.naist.jp

や、病気の診断アプリ [20], 細胞の性質を顕在化する高い処理能力を伴う撮影にも用いられる [21]. しかし, これらの手法では撮影対象となる細胞が撮像素子から離れた場所に設置されるため, 光の回折の影響により細胞の微細構造を撮影することができないという問題がある. また, レンズを省くことによる顕微鏡の小型化は蛍光イメージングにおいても実現される [8]. また, 照明の工夫によって解像度を高める技術 [3], [11], [26] や, 高解像度化された画像のカラー化 [12] も研究されている.

点光源の移動によって微細な細胞にパターンを投影する手法は, 超解像度画像を取得したり [2], 広い視野角で観察を行うために用いられる [5], [9], [16]. また, 照明を利用した小型な観察装置も開発され [1], 撮像素子の間隔をホログラフィックで再構成することによる実験も行われる [4]. また, 照明パターンを空間的に変化させることによって明視野観察, 暗視野観察, 位相差観察を実現させた研究も報告されている [6], [15], [22], [25]. フーリエ画像解析によって視認性を向上させる手法も同様に報告されている [7], [18], [24]. また, 照明をあてる角度によって生まれる位相差を利用する観察手法も報告されている [23]. しかし, これらの手法はレンズを含む観察装置のために研究される手法であり, 装置全体を小型化することは困難である.

### 3. 要素技術

#### 3.1 コンタクトイメージング

コンタクトイメージングは撮像素子の上に被写体を直接または近くに置き, 点光源で被写体に光をあてることによって撮影を行う手法である. Greenbaum[5]らは, 病理サンプルのホログラフィック画像を広範囲かつ高解像度で撮影する装置を提案した. Greenbaumらの観察対象は, 厚さ  $7\mu\text{m}$  の病理サンプルで, 機械的に撮像素子を動かすことによって自動的に焦点の調節を行う機能を実装した. しかし, 受精卵などの細胞は, サブミリメートル程度の厚みをもつため, 厚さ  $7\mu\text{m}$  の薄い病理サンプルを対象とした Greenbaum らの手法は適さない.

我々が開発した初期のプロトタイプを図 1 に示す. このプロトタイプは Greenbaum らの装置と近い構成であり, 固定された点光源と撮像素子が埋め込まれたペトリ皿で構成される. 撮像素子は培養液中の細胞を観察するために防水加工が施されている. 観察対象となる試料は Greenbaum らのように広視野観察の必要が無いため撮像素子の上に直接配置する.

#### 3.2 高周波照明法

一般に, 光源で照らされたシーン中のある点で観測される輝度値には直接光成分と大域光成分が含まれる. 直接光は光源から観測点まで直進性を保ったまま伝播する光であり, 大域光は被写体で散乱や反射や屈折をすることによ

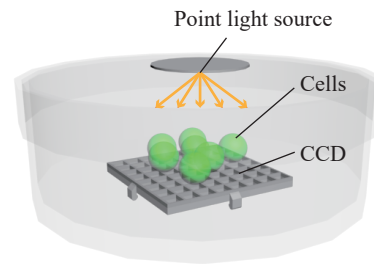


図 1 コンタクトイメージングの初期プロトタイプ [27]

て光源から観測点まで複雑な光路を伝播する光である. 直接光は細胞の輪郭を鮮明化する効果を持つことが知られる一方, 大域光は画像の視認性を損なわせる効果をもつ. 直接光と大域光を分離する手法として Nayar らは高周波照明法 [17] を提案した. 高周波照明法は明暗が繰り返されたパターン (以下, 高周波照明と呼ぶ.) を異なる位相で投影したシーンを撮影した複数の画像を用いて, 計算により直接光と大域光の分離を行う手法である. 位相が異なる高周波照明が投影されたシーンでは, 観測面におけるすべての点で観測される輝度値の総和は高周波照明を投影しないシーンと比較して減衰する. このとき, 高周波照明を投影した場合に観測される直接光と大域光は,

$$I(x, y) = \alpha(x, y)D(x, y) + \beta G(x, y) \quad (1)$$

としてあらわされる. このとき,  $I(x, y)$  は  $(x, y)$  点における輝度値を表し,  $\alpha(x, y)$  は高周波照明によって決定される直接光の係数を表す.  $\beta$  は大域光の係数を表す. そして,  $D(x, y)$  は直接光,  $G(x, y)$  は大域光を表す. ここで, 高周波照明の位相を  $N$  回シフトさせて撮影を行うことによって得られる各観測点における輝度値は,

$$\begin{bmatrix} I_1(x, y) \\ \vdots \\ I_N(x, y) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_1(x, y) & \beta \\ \vdots & \vdots \\ \alpha_N(x, y) & \beta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} D(x, y) \\ G(x, y) \end{bmatrix} \quad (2)$$

として表すことができる. 画像の各点における直接光と大域光をベクトル  $\mathbf{X}(x, y)$  とすると, 次式のように表記できる.

$$\mathbf{I}(x, y) = \mathbf{C}(x, y)\mathbf{X}(x, y) \quad (3)$$

$\mathbf{X}(x, y)$  は観測される輝度値との二乗誤差を最小化することによって, 求めることができる.

$$\operatorname{argmin}_{\mathbf{X}(x, y)} \|\mathbf{I}(x, y) - \mathbf{C}(x, y)\mathbf{X}(x, y)\| \quad (4)$$

#### 3.3 リフォーカシング

光線空間を用いた顕微鏡 [13], [14] は, シーン中を伝播する光線の集合を表す光線空間を画像の群として記録することによって, 撮影後, 任意の位置に合焦した画像 (以下,

リフォーカス画像とする。)を合成するリフォーカシングの手法を適用した顕微鏡である。そして、アレイ状に配置したカメラやレンズを用いて画像の群として光線空間を取得し [13], [14], 取得された画像をそれぞれ平行移動し, 加算平均することによってリフォーカス画像を合成する。リフォーカス画像  $R$  は以下のように表すことができる。

$$R(x, y, d) = \sum_m I_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m), \quad (5)$$

$I_m(x, y)$  は, 画像の群として取得された光線空間中の  $m$  番目の画像である。  $d$  は焦点面の深さを示し,  $\Delta x_m$  と  $\Delta y_m$  は画像間に存在する視差を表す。

#### 4. 高周波照明法とリフォーカシングの統合

本章では, コンタクトイメージングにおいて高周波照明法とリフォーカシングを統合する手法を説明する。まず, 光線空間を用いたリフォーカシングをコンタクトイメージングへ適用する手法を説明する。次に高周波照明法をコンタクトイメージングへ適用する手法を述べる。そして, 高周波照明法とリフォーカシングをナイーブに統合した場合にアルゴリズムが非効率化する問題を挙げる。そして, リフォーカシングを最小二乗法で解く新たな定式化を提案し, 最後に高周波照明法とリフォーカシングを統合する手法について述べる。

##### 4.1 コンタクトイメージングにおける光線空間の取得

リフォーカシングを適用するためには, シーン中の光線を画像の群として取得する必要がある。しかし, コンタクトイメージングの装置構成はレンズをもたない撮像装置であるため, カメラやレンズをアレイ状に配置し光線空間を取得する手法 [13], [14] を適用することができない。そこで本研究では, 双対の概念 [19] を導入することによって, カメラやレンズをアレイ状に配置する従来法をコンタクトイメージングへ疑似的に適用する。

光源で照らされたシーンを撮影する場合, 撮像素子と点光源の間には双対の関係が存在する [19]。このため, 単一点に配置された点光源と撮像素子の組は, 面光源とピンホールカメラの組とみなすことができる。双対の関係を図 2(a) に示す。そして, 双対の関係を利用すれば, コンタクトイメージングにおいて光線空間を画像の群として取得し, リフォーカスを実現できる。なぜなら, アレイ状に配置した点光源はアレイ状に配置されたピンホールカメラとみなせるためである。本論文では, 点光源の配置位置を  $m$  と表記し, 点光源を  $m$  に配置した場合に取得される画像を  $I_m$  と表記する。

##### 4.2 コンタクトイメージングにおける高周波照明の投影

直接光と大域光の分離の手法を適用するためには, 高周

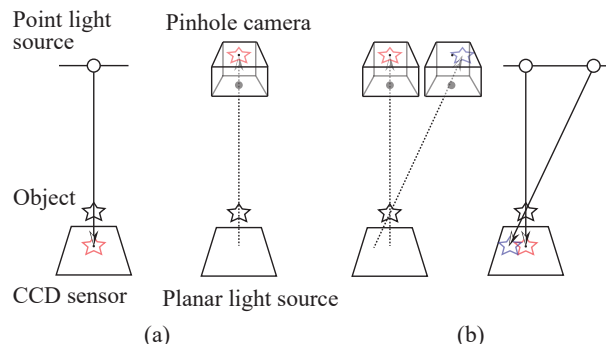


図 2 点光源と撮像素子の組と面光源とピンホールカメラの組の双対関係

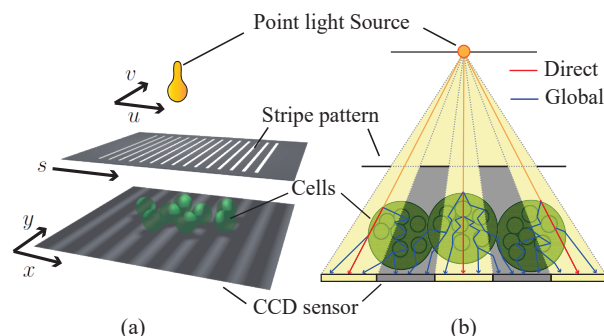


図 3 (a) ストライプパターンを点光源と撮像素子の間に設置した装置を示す。(b) 赤線は被写体を透過し直進する直接光を表す。そして, 青線は被写体にあたることによって散乱する大域光を表す。

波照明を対象物に投影する必要がある。そして, 安定的に分離を実行するためには, 高周波照明を一定量のステップずつパターンをシフトさせて撮影を行う必要がある。従来の研究において高周波照明の位相を変えるために用いられたのは, ディスプレイやプロジェクタである。しかし, コンタクトイメージングは点光源を照明として用いるため, 高周波照明を投影する機能をもたない。そこで我々は, 図 3(a) のようにストライプパターン<sup>\*1</sup> を点光源と撮像素子の間に挿入し, 点光源からの光をマスクすることによって, 高周波照明の投影を行う。また, パターンの移動のためにストライプパターンを機械的に移動する装置を導入した。本研究では, コンタクトイメージングにおける直接光と大域光を図 3 のように定義する。

##### 4.3 コンタクトイメージングにおけるナイーブな統合

位相を変化させた高周波照明を投影し, 十分な観測が得られた場合, 高周波照明法とリフォーカシングを順次適用することが可能である。高周波照明法とリフォーカシングを順次適用する場合,  $m$  回光源の位置を変更し撮影する

<sup>\*1</sup> 高周波照明法では, チェッカーパターンを用いることが一般的である。しかし, 簡易に手法の検証を行うために, 本研究では 1 次元のパターンを高周波照明法に用いる。

操作と一定回数ずつパターンを移動させる操作が必要である。そして、撮影された画像に対し高周波照明法を適用することによって、直接光  $D_m(x, y)$  と大域光  $G_m(x, y)$  を取得することができる。このとき、 $D_m(x, y)$  は散乱光除去された全焦点画像とみなすことができる。このため、光源位置  $m$  ごとに取得した直接光  $D_m(x, y)$  に対してリフォーカシングの処理を適用することによって、任意の深さ  $d$  に合焦した直接光画像を取得することが可能である。しかし、章 4.3 の統合は、ストライプパターンと点光源の両方を動かすため、大量の撮影を行う必要があり、非効率である。また、ストライプパターンと点光源の両方を動かす装置を導入する必要があるため、装置全体が大型化してしまう。装置全体が大型化してしまうと、恒温器内に設置することが不可能となる。このため、ストライプパターンと点光源の移動の併用による統合は実用的とはいえない。

#### 4.4 コンタクトイメージングにおける効率的な統合

前節で述べたナイーブな統合法の欠点は、恒温器内に収まるコンパクトな顕微鏡を開発する上で大きな問題となる。そこで本研究では、ストライプパターンを固定し、点光源の移動のみで高周波照明法とリフォーカシングを統合する手法を提案する。点光源の移動のみで統合を行うことによって、装置の大型化を防ぐ。さらに我々はそれぞれ式の形が異なる高周波照明法の式 (4) とリフォーカシングの式 (5) を統一的な枠組みで定式化することによって、撮影回数を増加させずに統合を行う手法を提案する。

##### 4.4.1 最小二乗法を用いたリフォーカシングの定式化

ストライプパターンを固定し、点光源の移動のみで高周波照明法とリフォーカシングを統合する提案手法は、ストライプパターンを固定するため撮影回数が増加せず、また、ストライプパターンを動かす装置が不要であるため装置全体が大型化しないという利点が存在する。しかし、提案手法では点光源の移動とストライプパターンの移動が同時に実行されるため、高周波照明法とリフォーカシングを順次適用することができないため、最小二乗法を用いてリフォーカシングを定式化する。

まず、 $\hat{R}(x, y, d)$  を深さ  $d$  に合焦した画像とする。そして、複数の視点  $m$  から撮影された全焦点画像を  $I_m(x, y)$  とする。ここで、点光源の位置によって決定される視差  $(\Delta x_m, \Delta y_m)$  に応じて平行移動した画像  $I_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m)$  は  $\hat{R}(x, y, d)$  と等価であるとみなすことができる。このとき、リフォーカシング画像間の差であるデフォーカス成分  $\epsilon_m(x, y, d)$  は、

$$\epsilon_m(x, y, d) = \hat{R}(x, y, d) - I_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m) \quad (6)$$

として表すことができる。ここで、デフォーカス成分の二乗総和の最小化式を以下のように表す。

$$\min \sum_m \|\epsilon_m(x, y, d)\|^2 \quad (7)$$

式 (7) は  $\hat{R}(x, y, d)$  が  $I_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m)$  を満たす場合に成り立つ。このとき  $\hat{R}(x, y, d)$  は画像の枚数を  $M$  とおき、

$$\hat{R}(x, y, d) = \frac{\sum_{m=1}^M I_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m)}{M}, \quad (8)$$

を解くことにより求まる。

式 (5) の場合、リフォーカス画像  $R(x, y, d)$  は、平行移動された画像  $I_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m)$  の加算平均を計算することで求まる。一方、式 (8) は、デフォーカス成分を最小二乗法を用いて解くことによってリフォーカス画像  $R(x, y, d)$  を求める。両者には解の求め方に違いがあるが、合成されるリフォーカス画像は数式的に等価である。

##### 4.4.2 高周波照明法とリフォーカシングの統合

章 4.4.1 において、リフォーカシングの式 (5) を最小二乗法を用いて解く式 (8) を提案した。本章では、高周波照明法とリフォーカシングを統合する手法を説明する。

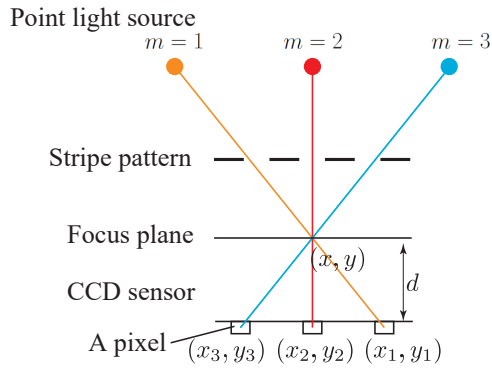
章 4.3 において導入された、 $D_m(x, y)$  と  $G_m(x, y)$  は光源位置  $m$  における直接光と大域光であり、それぞれ全焦点画像とみなすことができる。ここで、深さ  $d$  に合焦した直接光と大域光をそれぞれ  $D(x, y, d)$  と  $G(x, y, d)$  として表す。それぞれの光源位置  $m$  で取得された画像間のデフォーカス成分  $\epsilon'_m(x, y, d)$  は、高周波照明を投影し撮影した画像  $I_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m)$  とリフォーカスされた直接光  $D(x, y, d)$  と大域光  $G(x, y, d)$  を用いて以下のように表すことができる。

$$\begin{aligned} \epsilon'_m(x, y, d) = & \alpha_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m)D(x, y, d) \\ & + \beta_m G(x, y, d) \\ & - I_m(x - d\Delta x_m, y - d\Delta y_m). \end{aligned} \quad (9)$$

直接光の係数  $\alpha_m(x, y)$  と大域光の係数  $\beta_m$  は、高周波照明法に基づいて被写体を置く前にあらかじめ計測可能な係数である。本研究では、 $\alpha_m(x, y)$  をストライプパターンがある場合と無い場合に撮像素子上の観測点  $(x, y)$  で観測された光線がもつ輝度値の比として取得し、同様に、 $\beta_m$  をストライプパターンがある場合と無い場合に撮像素子で得られる輝度値の総和の比を計測することによって取得する。なお、 $\alpha_m(x, y)$  と  $\beta_m$  を計測する際は、撮像素子上に被写体を置かずに撮影を行った。

そして、リフォーカスされた直接光  $D(x, y, d)$  と大域光  $G(x, y, d)$  はデフォーカス成分  $\epsilon'_m(x, y, d)$  の二乗総和  $\|\epsilon'_m(x, y, d)\|^2$  を最小化することによって、以下のように取得することができる。また、図 4 にリフォーカスされた直接光  $D(x, y, d)$  と大域光  $G(x, y, d)$  の概略図を示す。





$$\begin{aligned} \epsilon'_1(x, y, d) &= \alpha_1(x_1, y_1)D(x, y, d) + \beta_1G(x, y, d) - I_1(x_1, y_1) \\ \epsilon'_2(x, y, d) &= \alpha_2(x_2, y_2)D(x, y, d) + \beta_2G(x, y, d) - I_2(x_2, y_2) \\ \epsilon'_3(x, y, d) &= \alpha_3(x_3, y_3)D(x, y, d) + \beta_3G(x, y, d) - I_3(x_3, y_3) \end{aligned}$$

図4 ストライプパターンを固定し、点光源の移動のみで高周波照明を投影することによって得られるデフォーカス成分。

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} D(x, y, d) \\ G(x, y, d) \end{bmatrix} &= \underset{\mathbf{X}}{\operatorname{argmin}} \| \mathbf{I}(x, y, d) - \mathbf{C}(x, y, d)\mathbf{X} \|^2 \\ &= \mathbf{C}^+(x, y, d)\mathbf{I}(x, y, d) \end{aligned} \quad (10)$$

$$\mathbf{I}(x, y, d) = \begin{bmatrix} I_1(x - d\Delta x_1, y - d\Delta y_1) \\ \vdots \\ I_M(x - d\Delta x_M, y - d\Delta y_M) \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{C}(x, y, d) = \begin{bmatrix} \alpha_1(x - d\Delta x_1, y - d\Delta y_1) & \beta_1 \\ \vdots & \vdots \\ \alpha_M(x - d\Delta x_M, y - d\Delta y_M) & \beta_M \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{C}^+(x, y, d) = (\mathbf{C}(x, y, d)^\top \mathbf{C}(x, y, d))^{-1} \mathbf{C}(x, y, d)^\top$$

## 5. 実験

### 5.1 実験環境

図5に提案手法を検証するために作成した装置を示す。そして、ストライプパターンは固定し、点光源のみを平行移動ステージを用いて移動させることによって高周波照明の位相を変化させる。本実験に用いる被写体は、未染色のウニの固定胚である。固定胚の大きさは直径約  $100\mu\text{m}$  であり、培養液で満たされたペトリ皿の中に配置する。また、撮影に用いる撮像素子 (Panasonic MN34595PL) の解像度は  $4,656 \times 3,480$  であり、ピクセル間の間隔は  $1.335\mu\text{m}$  である。撮像素子はペトリ皿に開けられた穴に埋め込まれている。また、高周波照明を投影するために  $40 \text{ lpmm}$  (lines per mm) のストライプパターンを用いる。ストライプパターンは撮像素子から高さ  $2.6\text{mm}$  の位置に配置される。照明として用いる点光源は、LEDと直径  $10\mu\text{m}$  のピンホールで構成される。点光源は撮像素子から高さ  $14.9\text{mm}$  の位置に配置される。また、点光源は平行移動ステージを用いて移動する。本実験では提案手法の検証を目的とし、点光源を  $-5,020\mu\text{m}$  から  $5,020\mu\text{m}$  の範囲で移動し、 $1,005$  枚の画像を撮影し、撮影した画像に提案手法を適用すること

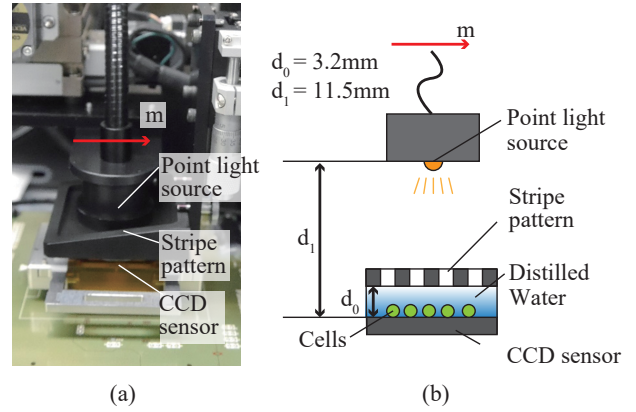
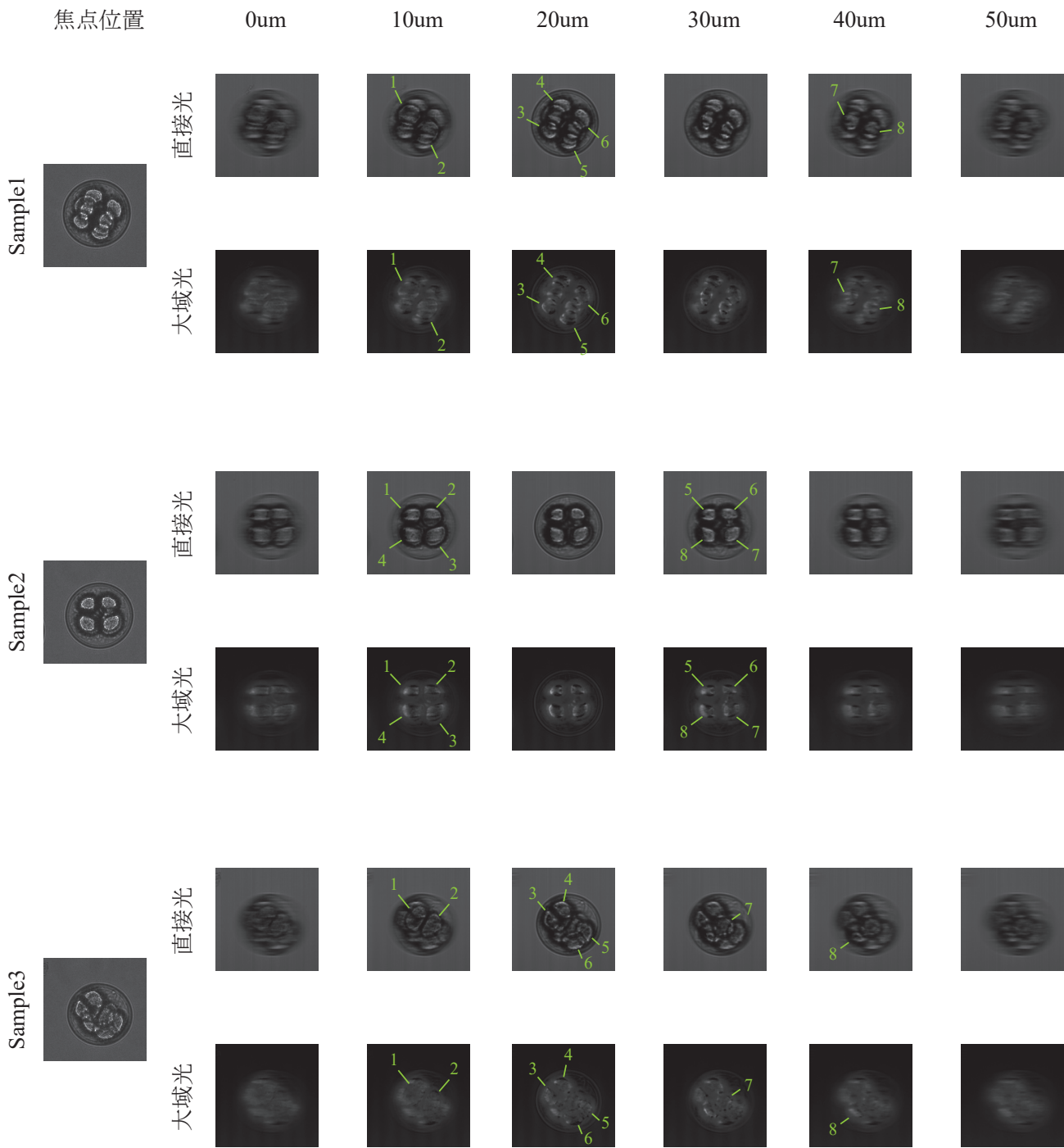


図5 リフォーカシングと高周波照明法を統合する手法の検証を行うために構成した実験装置

によって有効性の検証を行う。

### 5.2 実験結果

図6は提案手法により、高周波照明法とリフォーカシングを統合し、焦点位置の調節を浅い被写界深度で実現し、直接光と大域光の分離を行った結果である。本実験は異なる3つの受精卵に対して行った。(a)に初期のプロトタイプで撮影した全焦点画像を示し、(b)に提案手法により取得された画像を示す。初期のプロトタイプで撮影した全焦点画像中の細胞の輪郭は鮮明であるといえるが、奥行に応じて現れるぼけが存在しないため、細胞の重なりを観察することができない。特に sample3 の全焦点画像を用いて細胞の重なりを観察することは難しい。一方、それぞれの受精卵に対して生成したリフォーカス画像は細胞の3次元的な構造を鮮明に観察することができる。例えば、sample1 について、図6(a)の全焦点画像からは、8つに重なる細胞を見分けることができない。一方、図6(b)の  $10\mu\text{m}$  と  $20\mu\text{m}$  と  $40\mu\text{m}$  にリフォーカスされた直接光画像を比較すると、8つの細胞が3層に重なっていることが観察できる。一方、 $10\mu\text{m}$  と  $20\mu\text{m}$  にリフォーカスされた大域光画像は、散乱光により視認性が低下しているものの、重なる細胞の輪郭を視認することができる。しかし、 $40\mu\text{m}$  にリフォーカスされた大域光画像は、散乱光の影響で視認性が低下し、細胞の輪郭を視認することが難しい。上層の細胞ほど視認性が低下する原因については、撮像素子からの距離が離れるにつれて細胞の重なりによる散乱光の量が増加したためであると考察する。また、大域光画像における細胞の輪郭は発光しているかのように見え、直接光画像と若干異なる。同様に sample2 について、図6(b)の  $10\mu\text{m}$  と  $30\mu\text{m}$  にリフォーカスされた直接光画像を比較すると、8つの細胞が下層に4つ上層に4つ重なっていることが視認できる。図6(b)の  $10\mu\text{m}$  と  $30\mu\text{m}$  にリフォーカスされた大域光画像からも細胞の輪郭が多少確認できるものの鮮明とはい



(a) 通常画像

(b) 提案手法

(全焦点画像)

図 6 リフォーカシングと高周波照明法を統合し、ウニの固定胚を撮影した実験結果。(a)の列に示されるのは、初期のプロトタイプで撮影した全焦点画像であり細胞の重なりを観察することが困難である。(b)に示されるのは、高周波照明法によって分離された直接光画像および大域光画像である。そして列状に連なる画像は、リフォーカシングによって撮像素子から各距離に合焦したリフォーカス画像を示す。また、提案手法を適用することによって観察することができた細胞を緑線で示し、番号を付与した。

ない。さらに sample3 について、 $10\mu\text{m}$  と  $20\mu\text{m}$  と  $30\mu\text{m}$  と  $40\mu\text{m}$  にリフォーカスされた直接光画像から複雑に重なる 8 つの細胞を観察することができる。しかし、大域光画像からは、細胞の輪郭はほとんど確認できない。よって、大域光画像も細胞の観察に用いることができるものの、細胞によって大域光画像の視認性効果には個体差があることがわかった。以上の結果より、提案手法は高周波照明法とリフォーカシングの効果を同時に実現していることを確認した。また、通常画像では観察できない細胞の重なりを観察できたことから提案手法にはコンタクトイメージングにおける視認性を向上させるために有効であるといえる。

## 6. まとめ

我々は、恒温器内で細胞の培養と観察を同時に行うシステムの実現に向けて、レンズを省いた小型な細胞の観察装置、コンタクトイメージングの開発に取り組んだ。本研究は、コンタクトイメージングにおける視認性を向上させるために、計算機上で焦点位置の調節を行うリフォーカシングとシーン中の直接光と大域光を分離する高周波照明法の統合を行った。また、効率的に統合を行うために、高周波照明法とリフォーカシングを統一的な枠組みで定式化する手法を提案した。さらに、ウニの受精卵を用いた実験によって提案手法の有効性を確認した。今後の課題として、受精卵以外の被写体に対する提案手法の有効性の検証や、照明を多重化することによる撮影時間を削減すること、2次元に明暗が繰り返される高周波照明を用いて更なる視認性の向上を図ることが挙げられる。

## 参考文献

- [1] Bishara, W., Sikora, U., Mudanyali, O., Su, T.-W., Yaglidere, O., Luckhart, S. and Ozcan, A.: Holographic pixel super-resolution in portable lensless on-chip microscopy using a fiber-optic array, *Lab on a Chip*, Vol. 11, No. 7, pp. 1276–1279 (2011).
- [2] Bishara, W., Su, T.-W., Coskun, 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).
- [3] Cui, X., Lee, L. M., Heng, X., Zhong, W., Sternberg, P. W., Psaltis, D. and Yang, C.: Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for *Caenorhabditis elegans* and cell imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 105, No. 31, pp. 10670–10675 (2008).
- [4] Greenbaum, A., Luo, W., Khademhosseini, B., Su, T.-W., Coskun, A. F. and Ozcan, A.: Increased space-bandwidth product in pixel super-resolved lensfree on-chip microscopy, *Scientific reports*, Vol. 3 (2013).
- [5] Greenbaum, A., Zhang, Y., Feizi, A., Chung, P.-L., Luo, W., Kandukuri, S. R. and Ozcan, A.: Wide-field computational imaging of pathology slides using lens-free on-chip microscopy, *Science translational medicine*, Vol. 6, No. 267, pp. 267ra175–267ra175 (2014).
- [6] Guo, K., Bian, Z., Dong, S., Nanda, P., Wang, Y. M. and Zheng, G.: Microscopy illumination engineering using a low-cost liquid crystal display, *Biomedical optics express*, Vol. 6, No. 2, pp. 574–579 (2015).
- [7] Guo, K., Dong, S., Nanda, P. and Zheng, G.: Optimization of sampling pattern and the design of Fourier ptychographic illuminator, *Optics express*, Vol. 23, No. 5, pp. 6171–6180 (2015).
- [8] Heng, X., Erickson, D., Baugh, L. R., Yaqoob, Z., Sternberg, P. W., Psaltis, D. and Yang, C.: Optofluidic microscopy—a method for implementing a high resolution optical microscope on a chip, *Lab on a Chip*, Vol. 6, No. 10, pp. 1274–1276 (2006).
- [9] Isikman, S. O., Greenbaum, A., Luo, W., Coskun, A. F. and Ozcan, A.: Giga-pixel lensfree holographic microscopy and tomography using color image sensors, *PloS one*, Vol. 7, No. 9, p. e45044 (2012).
- [10] Kesavan, S. V., Momey, F., Cioni, O., David-Watine, B., Dubrulle, N., Shorte, S., Sulpice, E., Freida, D., Chalmond, B., Dinten, J. et al.: High-throughput monitoring of major cell functions by means of lensfree video microscopy, *Scientific reports*, Vol. 4 (2014).
- [11] Lee, S. A., Erath, J., Zheng, G., Ou, X., Willems, P., Eichinger, D., Rodriguez, A. and Yang, C.: Imaging and identification of waterborne parasites using a chip-scale microscope, *PloS one*, Vol. 9, No. 2, p. e89712 (2014).
- [12] Lee, S. A., Leitao, R., Zheng, G., Yang, S., Rodriguez, A. and Yang, C.: Color capable sub-pixel resolving optofluidic microscope and its application to blood cell imaging for malaria diagnosis, *PloS one*, Vol. 6, No. 10, p. e26127 (2011).
- [13] Levoy, M., Ng, R., Adams, A., Footer, M. and Horowitz, M.: Light field microscopy, *ACM Transactions on Graphics (TOG)*, Vol. 25, No. 3, pp. 924–934 (2006).
- [14] Lin, X., Wu, J., Zheng, G. and Dai, Q.: Camera array based light field microscopy, *Biomedical optics express*, Vol. 6, No. 9, pp. 3179–3189 (2015).
- [15] Liu, Z., Tian, L., Liu, S. and Waller, L.: Real-time brightfield, darkfield, and phase contrast imaging in a light-emitting diode array microscope, *Journal of biomedical optics*, Vol. 19, No. 10, pp. 106002–106002 (2014).
- [16] Luo, W., Greenbaum, A., Zhang, Y. and Ozcan, A.: Synthetic aperture-based on-chip microscopy, *Light: Science & Applications*, Vol. 4, No. 3, p. e261 (2015).
- [17] Nayar, S. K., Krishnan, G., Grossberg, M. D. and Raskar, R.: Fast Separation of Direct and Global Components of a Scene Using High Frequency Illumination, *ACM SIGGRAPH 2006 Papers*, SIGGRAPH '06, New York, NY, USA, ACM, pp. 935–944 (online), DOI: 10.1145/1179352.1141977 (2006).
- [18] Ou, X., Horstmeyer, R., Yang, C. and Zheng, G.: Quantitative phase imaging via Fourier ptychographic microscopy, *Optics letters*, Vol. 38, No. 22, pp. 4845–4848 (2013).
- [19] Sen, P., Chen, B., Garg, G., Marschner, S. R., Horowitz, M., Levoy, M. and Lensch, H.: Dual photography, *ACM Transactions on Graphics (TOG)*, Vol. 24, No. 3, ACM, pp. 745–755 (2005).
- [20] Seo, S., Su, T.-W., Tseng, D. K., Erlinger, A. and Ozcan, A.: Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics, *Lab on a Chip*, Vol. 9, No. 6, pp. 777–787 (2009).
- [21] Su, T.-W., Seo, S., Erlinger, A. and Ozcan, A.: High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip, *Biotechnology and*

- bioengineering*, Vol. 102, No. 3, pp. 856–868 (2009).
- [22] Tian, L., Wang, J. and Waller, L.: 3D differential phase-contrast microscopy with computational illumination using an LED array, *Optics letters*, Vol. 39, No. 5, pp. 1326–1329 (2014).
- [23] Waller, L., Kou, S. S., Sheppard, C. J. and Barbastathis, G.: Phase from chromatic aberrations, *Optics express*, Vol. 18, No. 22, pp. 22817–22825 (2010).
- [24] Zheng, G., Horstmeyer, R. and Yang, C.: Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy, *Nature photonics*, Vol. 7, No. 9, pp. 739–745 (2013).
- [25] Zheng, G., Kolner, C. and Yang, C.: Microscopy refocusing and dark-field imaging by using a simple LED array, *Optics letters*, Vol. 36, No. 20, pp. 3987–3989 (2011).
- [26] Zheng, G., Lee, S. A., Yang, S. and Yang, C.: Sub-pixel resolving optofluidic microscope for on-chip cell imaging, *Lab on a Chip*, Vol. 10, No. 22, pp. 3125–3129 (2010).
- [27] 加藤弓子, 澤田好秀, 國吉房貴: リフォーカシングによる初期胚の自由焦点画像生成 (医用画像), 電子情報通信学会技術研究報告 (IEICE technical report) 信学技報, Vol. 115, No. 401, pp. 135–139 (2016).