

G-001

明視野・暗視野・位相差の合成撮像法 Composite imaging method for bright-field, dark-field and phase-contrast imaging

今井 瑞穂[†]
Mizuho Imai

宮本 啓太[†]
Keita Miyamoto

高橋 正信[†]
Masanobu Takahashi

中野 雅行[‡]
Masayuki Nakano

1. 背景

病理組織標本とは生体組織をスライス、染色し顕微鏡で観察可能にした標本である。この標本を顕微鏡で観察し、診断するのが病理組織診断である。

通常、病理組織診断は明視野画像のみで行われるが、光学顕微鏡では他にも暗視野撮影、位相差撮影といった撮像法が可能であり、それらは明視野にはない情報を含んでいる。そうした複数の撮像法による画像を利用することで、明視野単独の場合よりも核位置や核輪郭の抽出精度を改善できる[1]。しかし、そのためには複数回の撮影が必要となる上、共用コンデンサを回転させる際などに撮像位置がずれることがあり、ずれ補正が必要になる場合があった。その問題を解決するため、一度の撮影によって擬似的に合成画像を撮影できる手法(合成撮像法)を実現した[2][3]。

2. 目的

本研究では、従来の明視野と暗視野に加え、位相差も含めた合成撮像法を実現し、明視野画像、暗視野画像、位相差画像の3つの合成画像を一度に撮影する手法について検討する。

3. 撮影手法

3.1 明視野撮影

試料を均一に照らし、試料の各部分における光の吸収率の違いによって透過光の像にコントラストが付くことを利用して撮影する。病理診断や画像解析において通常利用される撮像法である。

3.2 暗視野撮影

暗視野コンデンサにより明視野の光を遮蔽し、試料へ斜めから光を当てて散乱光や反射光を撮影する(図1(左))。対物レンズに直接光が入らないため、視野は暗くなる。

3.3 位相差撮影

屈折率の差異によって生じる位相差がコントラストに変換される。通常は透明な対象に対して利用される。

3.4 擬似明視野撮影

視野絞り上部に図3(a)のような遮蔽板を置き、明視野の光のみを透過させることにより明視野と同様な撮影を実現する。

3.5 擬似暗視野撮影

暗視野コンデンサを使用せず、図3(b)の遮蔽板を使用する。明視野の光が完全に遮蔽され、暗視野の光のみが透過するため、図1(右)のように暗視野撮影と同等な光の道筋が実現される。

[†] 芝浦工業大学 Shibaura Institute of Technology

[‡] 大船中央病院 Ofuna Chuo Hospital

3.6 擬似位相差撮影

図3(c)のようなリング状領域のみ光を透過させる遮蔽板を利用することで位相差の光の道筋を実現する。

3.7 合成撮影

擬似明視野撮影と擬似暗視野撮影で使用した遮蔽板を合成した遮蔽板(図3(d))を用いると、図2のように両者の光が加算されることになり、一度に明視野画像と暗視野画像を合成した画像を撮影できる。明視野画像と暗視野画像の合成比率は明視野部分の光をNDフィルタで減衰することにより調整できる。具体的には、NDフィルタの減衰を大

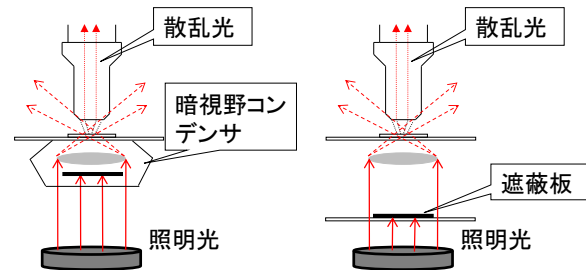


図1 暗視野撮影(左)と擬似暗視野撮影(右)の光の道筋

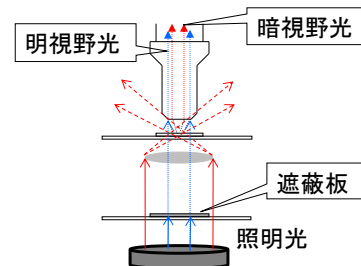


図2 合成撮影(明視野+暗視野)の光の道筋

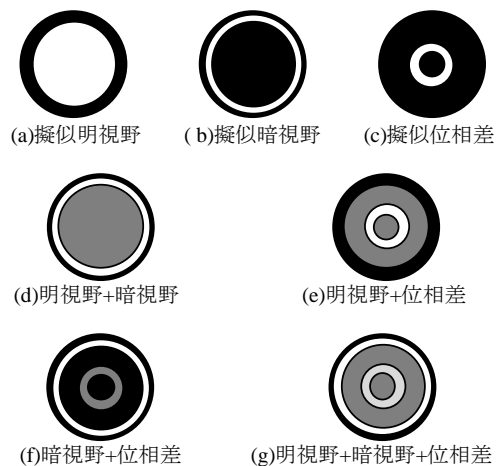


図3 合成撮像法に使用する遮蔽板

大きくすることにより暗視野の割合を増やすことができる。

同様に、擬似位相差用の遮蔽板のパターンと組み合わせることにより、明視野と位相差(図 3(e)), 暗視野と位相差(図 3(f)), 明視野と暗視野と位相差(図 3(g))の合成画像も撮影可能となる。

4. 実験

4.1 各手法の擬似撮影画像

40倍の対物レンズを用いて肝病理組織の標本画像を撮影した。

通常の撮影法と本手法による撮影画像の例を図 4 に示す。明視野と擬似明視野, 暗視野と擬似暗視野, 位相差と擬似位相差の画素値の平均誤差 (RGB 各色の誤差の平均) は, それぞれ 2.1, 2.6, 4.4 となり, 本手法によって, ほぼ同等の画像を撮影することができた。

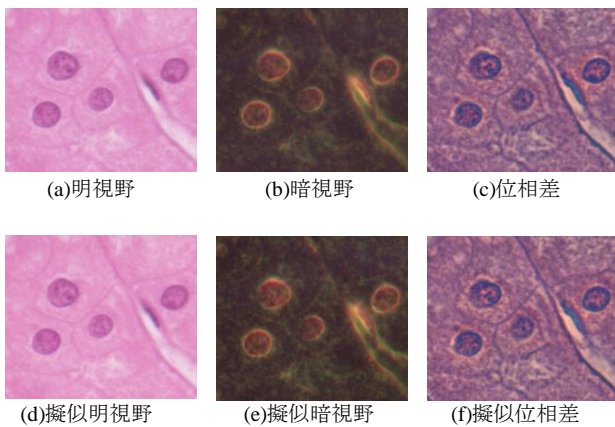


図 4 各撮像法による撮影画像

4.2 合成撮影画像

擬似明視野撮影に使用する遮蔽板(図 3(a))と擬似暗視野撮影に使用する遮蔽板(図 3(b))を組み合わせさせた遮蔽板(図 3(d))によって明視野と暗視野の合成画像を一度に撮影した。

図 5(a)は図 3(d)で $ND=2.2$ とした遮蔽板で撮影した明視野と暗視野の合成撮影画像である。合成撮影画像における明視野と暗視野の合成比率を推定するため, (1)式によって理想的な合成画像(計算機合成画像)を作成し, 実際の合成撮影画像との画素値の誤差が最小となる α を求めた。

$$g = ((1-\alpha)f_1 + \alpha f_2) \times \beta \quad (1)$$

g : 計算機合成画像
 f_1 : 擬似明視野画像 f_2 : 擬似暗視野画像
 α : 合成比率($0 < \alpha < 1$) β : コントラスト補正

図 5(b)は合成撮影画像(図 5(a))に対して最も誤差が小さかった計算機合成画像であり, この時の α は 0.54, 画素値の平均誤差は 7.0 であった。 α が 0.02~0.97 の範囲となるその他の ND 値についても実験を行い, すべて画素値の平均誤差 10 程度以内で合成撮影できることを確認した。

明視野と位相差, 位相差と暗視野, 明視野と暗視野と位相差の合成撮影画像についても同様な実験を行った。明視野と位相差の合成撮影画像(図 6(a))と計算機合成画像(図 6(b))の誤差は 4.3, 位相差と暗視野の合成撮影画像(図 7(a))と計算機合成画像(図 7(b))の誤差は 5.0, 明視野と暗視野と

位相差の合成撮影画像(図 8(a))と計算機合成画像(図 8(b))の誤差は 6.8 であった。即ち, 別々に撮影した画像を計算機により合成した画像とほぼ同等の画像を一度の撮影で得ることができた。

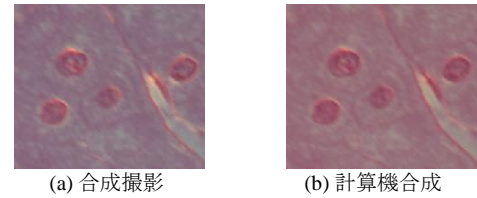


図 5 明視野と暗視野の合成画像(暗視野の割合 $\alpha_{DF}=0.54$)

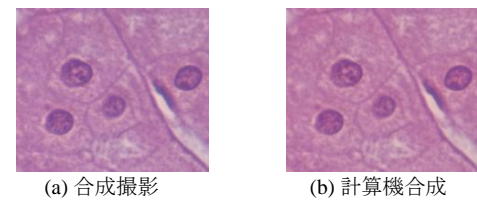


図 6 明視野と位相差の合成画像(位相差の割合 $\alpha_{PH}=0.45$)

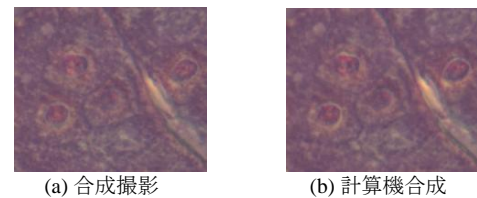


図 7 位相差と暗視野の合成画像(暗視野の割合 $\alpha_{DF}=0.65$)

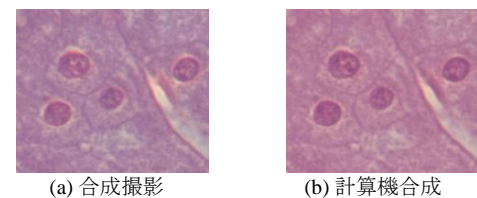


図 8 明視野と暗視野と位相差の合成画像(暗視野の割合 $\alpha_{DF}=0.35$, 位相差の割合 $\alpha_{PH}=0.28$)

5. まとめ

明視野, 暗視野, 位相差の任意の合成比率の合成画像とほぼ同等の画像を一回の撮影で得ることのできる合成撮像法を実現した。

なお, 現在は正の比率による合成を実現しているが, 色フィルタなどを利用することで各画像を分離撮影することも可能であり, 負の比率の実現など様々な展開が考えられる。また, 遮蔽板として SLM を利用すれば撮像法の高速切替えも可能となる。今後は, そうした改善を進めると共に, 有用な応用について検討を進める。

本研究の一部は科研費 24500514 による。

参考文献

- [1]M. Takahashi, et. al.: "Segmentation of nuclei in hepatic histological images using multimodal method", EMBEC2011, pp 219-223, 2011.
- [2]宮本啓太: "マルチイメージングによる肝病理組織標本画像の解析", 芝浦工業大学システム工学部電子情報システム学科 2011 年度卒業論文。
- [3]宮本啓太, 他: "合成撮像法の基礎検討", 2013 年度電子情報通信学会総合大会, D-16-1, 2013.