画像処理による長焦点深度光学顕微鏡画像の合成*

——長焦点深度画像の合成と三次元表示——

白石 利治** 三井 公之***

Image Processing System for Expanding Depth of Focus of Optical Microscope
- Composition of Expanded Depth of Focus Image and Three Dimensional Expression of Shape -

Toshiharu SHIRAISHI and Kimiyuki MITSUI

A original method to get long depth of focus of optical microscope image using computer image processing has been proposed. At first the principle of proposed method is explained, then the validity of the method is shown experimentally. The microscope objective is determined positioning by actuator such as PZT. At each located position digital picture image through CCD camera is taken into a computer. The computer extracts the area where the image is in focus from these pictures, then it composes whole frame image. The depth of focus of the composite picture image is nearly equal to the distance of motion of objective lens. As for the methods that distinguish between in-focus-area and out-of-focus-area, four different methods have been proposed. Processing time and accuracy point of view Hadamard transfer method is the best within these four methods. This method has been applied to the observation of several specimens such as standard surface roughness test piece, grooved metal surface and so on, with excellent results. By adding displacement information to the recorded CCD camera image, this method is also applicable to the three dimensional surface topography measurement.

Key words: image processing, optical microscope, long depth of focus

1. 緒 言

産業諸分野における超小型化、超高精度化の流れから、視覚補助装置、計測装置としての顕微鏡の必要性が増している。近年はレーザ顕微鏡、光CT顕微鏡など魅力的な顕微鏡技術¹⁾の開発も進んでいるが、特別な環境や技術を必要とせず、必要な倍率が得られることから、従来の光学顕微鏡が利用される場面は多い。

光学顕微鏡を用いて微小物体を観察する際に経験することとして、一度に明瞭に観察することができる試料の厚さに限界があることがあげられる。光学系の焦点深度は倍率が大きくなるほど浅くなるので顕微鏡のような高倍率の光学系ではこの問題は深刻であり、視野の広さに対して、焦点深度は数十分の一から数百分の一程度のオーダーしかない。これは厚みをもった物体の観察に不都合があるのみならず、ピント合わせの作業が非常に困難となる原因にもなっている。現状では鏡筒を微動させて試料の各部分ごと別々にピント合わせをおこない、これらの部分的に合焦した像から全体像を推測しなければならない。

長焦点深度顕微鏡観察の手法としては、電子顕微鏡あるいはレーザ顕微鏡が実用化されている。しかし電子顕微鏡は真空チャンバ内での観察が前提になるために、組立作業などへの利用は難しく、レーザ顕微鏡は空気中でも高解像度の長焦点深度画像を得ることが可能だが、レーザビームのスキャニングなど高度で複雑な機構を必要とする。

将来の発展が期待されるマイクロマシンのような微小部品の組立、動作確認を顕微鏡下で行うことを考えると、前述のような特長を有する光学顕微鏡の焦点深度を拡大するメリットは非常に大きいと考えられる。

光学顕微鏡の焦点深度を拡大する研究としては、まず光学系に工夫を加える試み²⁾³⁾がある。また計算機画像処理システムをこれに組み合わせた方法として、撮影対象との距離を変えながら撮影した複数の画像から輝度の分散に注目して合焦部分を合成する方法⁴⁾⁵⁾、画像のラプラシアンを計算して合焦部分を合成する方法⁶⁾、光の三原色を利用して3枚の画像を合成する方法⁵⁾、空間フィルタリングによって解像度を改善する方法⁷⁾、等の報告がある。

このような観点から、本研究では、視覚補助装置としての光学顕微鏡の優れた諸特性に注目し、計算機画像処理システムをこれと組み合わせることにより、長焦点深度画像を得る方法を提案する。この画像処理を実時間で実行することが可能となれば、工業分野以外にも外科手術、細胞融合等の微細作業能率の向上に寄与することができるであろう。

本論文では、長焦点深度画像合成の原理、複数の画像処理方式の評価、観察結果の実例を示すとともに、三次元形状表示への応用についても述べる。

2. 長焦点深度画像合成の原理

ある光学系において合焦像として観察可能な観察対象の深さは、物体深度または被写体深度と呼ばれる値であるが、一般には焦点深度の方が広く使われている用語であり、本論文でもこれに倣って物体深度を便宜的に焦点深度と呼ぶことにする。

* 原稿受付 平成5年8月16日

** 学生会員 慶應義塾大学理工学部 (横浜市港北区日吉 3-14-1)

*** 正 会 員 慶應義塾大学理工学部

3. 実験装置

図1に本研究で提案する画像合成の基本的な原理を説明する。対物レンズもしくは観察対象を載せたステージを、焦点深度を拡大したい方向（図1では上下方向）に一定間隔で移動させながら、顕微鏡の対物レンズと観察対象との距離を変えつつ撮像し、画像データを計算機に取込んでいく。図1のdで示される距離がこの撮像間隔に相当する。観察対象との距離の変化に伴い合焦位置が移動していくために、撮像した画像における合焦部分は逐次変化していく。ここで撮像した画像データには合焦部分と非合焦部分が混在している。このときの撮像間隔dを使用した光学系の焦点深度に相当する距離に設定すれば、観察対象のすべての部分が最低1回は合焦像としていずれかの画像データに撮像される。

次に計算機に取込んだ各画像データを図2に示すように微小な処理単位に分割し、この処理単位ごとに合焦の度合を計算する。本研究では、この合焦の度合を「合焦度」と呼ぶことにする。そして観察対象の同じ部分を撮像している処理単位の合焦度を、各取込み画像同士で比較する。これらの処理単位は観察対象の同一部分を観察しているので、計算機は観察対象の材質、照明の強弱などを考慮すること無く合焦度の大小関係を比較できる。こうして最も合焦度の大きい処理単位を組み合わせると一枚の画像を合成すると、この合成画像は撮像間隔×撮像枚数に相当する焦点深度を持つことになる。これが本研究で提案する長焦点深度画像合成の原理であり、この撮像と合成のサイクルを可能な限り短くしていけば、将来的には実時間での動画像に対応することが期待できる。

また、今回の実験では画像の取込みにモノクロCCDカメラを使用した。カラー対応のCCDカメラを使用すれば、同じ原理でカラーの長焦点深度画像を得ることができる。

Fig. 1 Theory of composition of expanded depth of focus image

Fig. 2 Procedure of picture composition

図3に本研究で使った画像処理システムの構成を示す。金属顕微鏡に取り付けたモノクロCCDカメラによって撮像された画像は、フレームメモリを介して512×512画素、256階調のモノクロ画像データとして計算機（CPU:80486DX-33MHz）に取込まれる。取込まれた画像データは計算機上で合成され、合成画像はフレームメモリを介してビデオモニタに表示される。

観察対象と対物レンズの距離を変化させるには、ストロークが100μm以下の場合市販の圧電素子内蔵対物レンズフォーカスユニットを使用し、それ以上になる場合は観察対象を載せたステージを上下に微動することによっておこなった。なお、どちらの場合も電気マイクロメータあるいはダイヤルゲージで距離の変化を測定している。

Fig. 3 Layout of system

4. 合焦度の計算法

合焦度の計算法について論ずるため、全部分で合焦している画像と、その前後に対物レンズを微動させて故意にピントを外した画像を用意し、この両者を正確に区別することができる合焦度の計算法について考える。図4は、振幅1.5μmの三角波形状である標準粗さ試験片に対し、光学系の焦点深度に相当する10μmずつ対物レンズを遠ざけながら5枚の画像を取込んだものである。対物レンズは倍率10倍、NA（開口数）0.21のものを使用した。観察対象の凹凸の振幅が光学系の焦点深度に対して十分に小さいため、図4-3のみ被写体のすべての部分が焦点深度内に納まっているが、その前後ではピントがぼけてしまっている。

本研究では合焦度の計算法として以下に示す4種類の方法を試みた。

Fig. 4 Samples of various focal-series images

4.1 隣接輝度差比較法

図4の合焦位置からはずれた画像は不鮮明になる。これはある画素と周りの画素との輝度の差が小さくなるためである。そこで単純に隣接する画素の輝度差に注目する方法を試みた。これは画像上のある一画素に対し、その画素に隣接する画素との輝度差の絶対値をその画素の合焦度とするものである。原理上、この場合の処理単位は1画素ずつとなる。

4.2 輝度分散比較法

次に、合焦部分と非合焦部分で処理単位内の輝度の分布に差があるかどうかを調べてみた。光学顕微鏡では非合焦部分は点で結像すべき像が広がりを持って結像するため、隣接した画素は干渉しあって輝度が平均化され、その近辺の輝度値の分布を調べれば、その分散は小さくなるものと考えられる。例えば図5は図4-1と図4-3の256×256画素の領域内で輝度ヒストグラムをとったものである。この図からわかるように合焦した領域では輝度が広範囲に分布しており、輝度の分散が大きくなっている。この性質が微小な領域に対しても保持されるのであれば、処理単位内の輝度の分散は合焦度として利用することができる。

Fig. 5 Histogram of brightness

4.3 コントラスト比較法

前述したように合焦位置から外れた画像では周りの画素との輝度の差が小さくなる。その結果、合焦位置から外れるほど処理単位内の最大輝度と最小輝度の差、すなわちコントラストが小さくなると予想される。図5においても、合焦した部分は合焦していない部分よりもコントラストが大きくなっている。そこで処理単位内のコントラストを合焦度とする方法が考えられる。

4.4 アダマル変換像比較法

最後に、画像に対する直交変換をおこなって合焦画像の特徴を抽出する方法について考える。本研究ではこの直交変換にアダマル変換⁸⁾を採用した。アダマル変換は計算機上で加算と減算だけで実現できるため、各種の直交変換の中でも計算時間が短くて済むという特長がある。この変換によって、N×N画素の画像はN×N個の周列数成分の和の形に変換される。合焦部分は非合焦部分に比べて処理単位内での細かい輝度変化が大きい。そのために合焦部分ではアダマル変換像の各周列数成分、特に高次の周列数成分の絶対値は非合焦部分に比べ大きくなる。この性質を合焦度の計算に利用するのがアダマル変換像比較法である。

合焦部分の判別法の評価で最も重要な点は、その方法がどれだけ正確に合焦部分を判別できるかである。そこで、図4の5枚の画像に対して画像合成をおこない、合成画像を構成する処理単位の内図4-3を合焦部分と判定した割合を合焦判定精度として定義し、処理に要した時間と共に評価パラメータとした。なお、隣接輝度差比較法以外の処理単位は16×16、8×8、4×4画素の3通りを試行し、その場合の差についても検討を加えた。以上、各方

法についての画像合成の結果を表1に示す。

Table 1 Comparison of the methods of image composition			
Methods	Processing elements pixel	Processing time s	Accuracy %
Difference of brightness	16×16	18.0	58.1
	8×8	1.08	89.1
	4×4	1.30	80.9
Variance of brightness	16×16	2.26	64.6
	8×8	0.66	94.9
	4×4	0.82	91.7
Contrast of brightness	16×16	1.58	79.5
	8×8	2.90	99.6
	4×4	3.70	95.4
Hadamard transform	16×16	7.40	73.5
	8×8		
	4×4		

隣接輝度差比較法は処理時間が極めて長い上に、合焦判定精度も満足いくものではない。輝度分散比較法は処理時間は短い、合焦部分の判定精度にやや難点がある。コントラスト比較法は処理時間が短くてすみ、合焦判定精度も優れている。ただし処理単位を構成する画素数が少なくなると合焦判定精度が悪化する。これに対しアダマル変換像比較法は処理時間がやや長いものの、合焦部分判定精度は最も優れている。しかし、この方法でも処理単位の構成画素数が少ないと合焦部分の判別がやや不正確となることがわかる。

以上の結果から、動画像等の計算速度が重視される場合はコントラスト比較法が適しており、計算時間に制約の少ない静止画像の合成や、合成画像に正確さが要求される場合はアダマル変換像比較法が適していると言えよう。現時点では計算機や対物レンズの駆動装置が動画像に対応していないため、アダマル変換像比較法により画像合成を進めていくことにする。

5. 画像合成の結果

アルミニウム板上に厚さ0.35mmの鉄板を重ねた段差を倍率10倍、NA0.21の対物レンズで観察したものが図6である。この段差は光学系の焦点深度の約35倍に相当するため、図6のように段差の下部にピントを合わせると上部は観察することができない。この試料に対して10μm間隔で撮像した40枚の画像を処理単位

Fig. 6 Metal surface with groove (microscope picture image)

Fig. 7 Metal surface with groove (composite picture image)

16×16のアダマル変換像比較法で合成した結果が図7であり、段差の上部と下部を同時に観察することができる。また、図8に示す形状を持つ標準粗さ試験片を倍率40倍、NA0.65の対物レンズで観察した画像が図9である。三角波形状の振幅が光学系の焦点深度の10倍以上あるため、粗さ試験片の一部分しかピントがあっていない。先の例と同様に撮像間隔を1μmとして20枚撮像した画像を処理単位16×16のアダマル変換像比較法で合成した結果が図10であり、粗さ試験片の全体が合焦している画像が得られていることがわかる。図7、10の合成画像からわかるように、本研究で提案する画像処理を組み合わせることにより、光学系の焦点深度を大幅に上回る高さをもつ物体を鮮明な像として観察することが可能になる。

Fig. 8 Standard surface roughness test piece (by stylus method)

Fig. 9 Standard surface roughness test piece (microscope picture image)

Fig. 10 Standard surface roughness test piece (composite picture image)

顕微鏡の焦点深度不足が障害になる例として、微小部品の組立て作業があげられる。たとえ個々の部品が焦点深度内に収まる大きさだとしても、それらを立体的に組み上げた物の大きさは顕微鏡の焦点深度を上回り、ピントが合うのはその一部分に限定されるために、各部品の相互関係を把握することが困難になる。

例えば図11は電磁リレーの接点を金属顕微鏡で観察したものである。この部分は約0.2mm厚の金属片が井げた状に高さ約2mmの3層構造をとっているのだが、使用した顕微鏡の焦点深度が0.2mm程度なため、3層のパーツを同時に観察することができない。この観察対象に対して画像合成を利用した結果が図12である。画像合成の結果、3層構造のパーツを同時に観察することが可能になる。

Fig. 11 Electrical relay contact (microscope picture image)

Fig. 12 Electrical relay contact (composite picture image)

6. 三次元形状表示への応用

本研究の画像処理では、図2の画像合成の過程で取込み画像に撮像時の位置情報を記録させることによって、合成画像の各部分に位置情報を持たせることができる。例えば、先に図7で示した合成画像の各部分の位置情報を三次元表示した結果を図13に、同

Fig. 13 Metal surface with groove (bird's-eye-view)

Fig. 14 Standard surface roughness test piece (bird's-eye-view)

様に図10から求めた三次元形状を図14に示す。対物レンズの焦点深度を利用するという原理のため分解能は高くはないが、段差の形状や三角波の形状を求めることができる。

光干渉方式の三次元粗さ測定法を別にすれば、接触式、光触針式粗さ計により得られるデータは二次元的データである。三次元情報を得たい場合には、微動テーブルなどを用い、測定面をスキャンする必要がある。通常測定時間との関係で、スキャンの間隔をあまり小さくすることはできないから、測定ライン間のデータは測定漏れとなる。本研究の画像合成法を三次元形状測定に応用する場合にはスキャンの必要はなく、また顕微鏡の視野の範囲内であれば、光学系の分解能の許す限りの画像データが得られるという特長がある。形状データと同時に画像データも得られるという性質を生かすことにより、例えば、図7の画像だけでは段差の上下関係が判別不能であるが、図13の三次元形状データと比較することによってこれを知ることができる。また、三次元形状測定のデータからみれば、画像データの存在は、処理単位がある程度の面積をもつことからくる横分解能の不足を視覚面より補うという効果があり、表面の凹凸と肉眼による観察結果とを対比して表面状態をより詳しく分析することも可能となろう。

本方式の三次元形状測定では縦分解能に相当するのが画像の撮像間隔、すなわち光学系の焦点深度である。そして、処理単位の大きさが横分解能に相当する。このとき開口数の大きい対物レンズを使用して焦点深度を短くし、撮像枚数を増やすことで縦分解能を向上させることができる。また横分解能に相当するのが処理単位の面積であるが、現時点では処理単位の画素数を少なくすることは合焦判定精度の悪化につながる。このため、横分解能を向上させるためには処理単位の面積を小さくして画素数を増やす、すなわち高解像度で画素数の多いCCDカメラを使用することが望ましい。ただし画像の撮像枚数を増やすこと、画像の画素数を増やすことは、当然計算処理時間を増加させることになる。

7. 結 言

本研究では、計算機画像処理システムと光学顕微鏡とを組み合わせることにより、長焦点深度画像を得る方法の原理について述べるとともに、観察結果の実例を示した。また、三次元形状表示

への応用についても触れた。

本研究で得られた成果をまとめると以下のようになる。

- (1) 本研究で提案する画像処理システムを光学顕微鏡に組み合わせることで、任意の焦点深度を持つ拡大画像を得ることができる。
- (2) 合焦部分と非合焦部分は、画像のコントラストやアダマール変換像の周列数成分を比較することにより判別することができる。コントラストの比較による合焦判定は計算速度が速いという特長があり、アダマール変換像の比較は合焦判定精度が高いという特長がある。
- (3) 本研究で提案する画像処理システムによれば、視覚補助のみならず三次元形状も把握できる。このため1回の画像合成で観察対象の画像と三次元形状の両方を得ることが可能であり、この2種類のデータを組み合わせた観察対象の評価が可能となる。

なお、本研究は一部財団法人メカトロニクス技術高度化財団からの助成を受けておこなわれたことを記し、関係各位に深く感謝する。

参 考 文 献

- 1) 河田 聡：光学顕微鏡における新しい映像形成技術、計測と制御, 29, 4, (1990) 317.
- 2) W. T. Welford : Use of Annular Aperture to Increase Focal Depth, J. Opt. Soc. Am., 50, 8, (1960) 749.
- 3) G. Indebetown & H. Bai : Imaging with Fresnel Zone Pupil Masks -Extended Depth of Field-, Appl. Opt., 23, 23, (1984) 4299.
- 4) R. J. Piper & A. Korpel : Image Processing for Extended Depth of Field, Appl. Opt., 22, 10, (1983) 1449.
- 5) S. A. Sugimoto & Y. Ichioka : Digital Composition of Images with Increased Depth of Focus Considering Depth Information, Appl. Opt., 24, 14, (1984) 2076.
- 6) S. K. Nayer and Y. Nakagawa : Shape from Focus - An Effective Approach for Rough Surfaces, 1990 IEEE Int. Conf. on Robotics & Automation (1990-5) 218.
- 7) G. Hausler : A Method to Increase the Depth of Focus by Two Step Image Processing, Opt. Commun., 6, 1, (1972) 38.
- 8) 例えば、有本 卓：信号・画像のデジタル処理, 産業図書, (1980).