研 究

生物顕微鏡写真のフォーカス精度の改善

矢島正男* 柴 和夫* 近藤秀幸* 一柳寿壮**

周 欣欣*** 大木 真*** 橋口住久***

*(株)三協精機製作所 **日新工機(株) ***山梨大学 工学部

Improvement of focusing accuracy in microscopic photography

Masao Yajima*, Kazuo Shiba*, Hideyuki Kondo*, Toshitake Ichiyangi**

Xinzin Zhou***, Makoto Ohki***, and Sumihisa Hashiguchi***

*Sankyo Seiki Mfg. Co., Ltd., Shimosuwa Nagano 393, Japan

**Nissin Kohki Co., Ltd., Suwa Nagano 392, Japan

***Department of Electronics, Yamanashi University, Kofu 400, Japan

Abstract

Exact focusing in microscopic photography is sometimes difficult even at low magnification, because the depth of focus of the focus-detecting system including the human eye is longer than that of the photographing system. We have devised a focus-aid system to improve the focusing accuracy of microscope photography. The standard deviation of the focus position error with the present system is $1.1\mu\text{m}$ in 100 trials, which is $1/9$ of $9.5\mu\text{m}$ for manual focusing.

あ ら ま し

光学顕微鏡で病理標本を撮影する際、低倍率対物レンズ(1~4倍程度)使用時のフォーカシングが難しいということが経験的に知られている。ここでは、CCDカメラによるオートフォーカス装置を写真撮影装置に取り付け、フォーカシングを自動化する装置を試作した。その結果、フォーカシングの繰り返し精度が著しく改善され、フォーカス状態の良好な写真が容易に撮影できるようになった。

1. はじめに

組織の標本を観察して癌などの診断を行う際、

患者のいる場所では診断ができず、専門医のところへ標本を送る場合がある。診断にあたっては光学顕微鏡を用いて観察や診断を行い、病変部の写真を撮影する。また、症例によってはスライドを作成し、研究発表に利用する。

写真の撮影の際は、標本の全体像を把握するための低倍率(弱拡大)写真と、病変部を精査するための高倍率(強拡大)写真を撮ることが多い。低倍率写真の撮影においては、焦点深度が非常に深いためにフォーカシングが難しく、目視で観察したときにははっきり見えても、写真に撮影したものはボケており実用に耐えないことが多い。1~4倍の低倍率対物レンズを用いた時

の写真撮影の難しさは関係者のあいだでは常識となっており、フォーカシングの自動化が望まれている。

これまでにフォーカシングにともなう像の動きを検出する方式による生物顕微鏡用のオートフォーカス装置が開発されているが¹⁾、機構が複雑であり、高価格でもある。ここでは、CCDカメラをセンサとしたオートフォーカス装置を利用し、既存の顕微鏡に付加するオートフォーカスシステムを開発した。

2. 生物顕微鏡のフォーカシング

図1は生物顕微鏡と写真撮影装置の概要である。また、図2はその光路図である。写真を撮

図1 生物顕微鏡と写真撮影装置

図2 顕微鏡写真システムの光路図

影するときは、ステージに試料を置き、接眼部を用いて目視によりフォーカシングと視野の決定を行う。つぎにフォーカシングビューワによってさらに正確にフォーカシングを微調整し、写真を撮影する。フォーカシングが難しい低倍率対物レンズ使用時には、フォーカシングビューワにフォーカシングテレスコープを取り付け、光学系の倍率を高くすることによって焦点深度を浅くしてフォーカシング調整を行う。

低倍率対物レンズ使用時のフォーカシングが難しいのは、写真撮影装置の光学系の焦点深度が目視での焦点深度よりも浅いことが原因である。目視でフォーカス状態がよくみえても、写真撮影装置のフォーカス領域から外れている場合が多く、このときには撮影した写真はボケたものになってしまう。

目視の場合の焦点深度 Δt_e (物点の片側)はBer ekの式から²⁾

$$\Delta t_e = n \left\{ \frac{\epsilon_e}{N.A.} \left(\frac{250}{m} \right) + \frac{1}{2} \frac{\lambda}{(N.A.)^2} \right\} \quad (1)$$

で与えられる。ここで、 n は生物標本表面のカーガラスの屈折率、 ϵ_e は眼の分解能、 $N.A.$ は対

物レンズの開口数(Numerical Aperture), m は光学系の総倍率, λ は照明光の波長である。また, 写真撮影装置の焦点深度 Δt_c は, カメラの分解能を ϵ_c とすると,

$$\Delta t_c = n \frac{\epsilon_c}{m N.A} \quad (2),$$

となる。

表1は, 式(1)と(2)から, 目視とフィルムカメラの焦点深度を各種の対物レンズについて求めたものである。ただし, 屈折率 $n=1.52$, 眼の分解能 $\epsilon_e=1.4\mu\text{m}$ (約5'), 波長 $\lambda=550\text{nm}$ とした。また, カメラの分解能 ϵ_c は, 撮影した写真を裸眼で観察するときの眼の分解能から算出した値 $30\mu\text{m}$ を用いた。なお, 目視の場合は図2のように, 対物レンズ倍率が10倍以上ではフォーカシングビューワを, 4倍以下ではビューワとテレスコープを取り付けた。撮影レンズは5倍である。

表1から, 1~4倍の低倍率のときは, 目視の焦点深度は写真撮影装置の焦点深度の2倍程度となること, フォーカシング微調整ノブの操作量が大きくなるのでフォーカシング調整の失敗が起き易いことがわかる。

4倍の対物レンズを用いて写真を撮影するときのフォーカスエラー許容値は, 経験的には $\pm 5\mu\text{m}$ 程度である。このことから, 式(2)によってフィルムカメラの分解能を逆算すると約 $9\mu\text{m}$ となる。カメラの分解能 ϵ_c として, この値を用いると, フィルムカメラの焦点深度は表1の1/3となり, フォーカシング精度に対する要求はさらに厳しくなる。

表1 各種対物レンズ使用時の焦点深度

対物レンズ倍率	開口数 $N.A$	目視倍率	撮影倍率	目視の焦点深度 $[\mu\text{m}]$	フィルムカメラの焦点深度 $[\mu\text{m}]$
1	0.04	78	5	432	228
2	0.08	156	10	108	57.0
4	0.13	312	20	37.9	17.5
10	0.30	200	50	13.5	3.0
20	0.46	400	100	4.9	1.0
40	0.70	800	200	1.8	0.33

撮影レンズの倍率は5倍。目視の場合は対物レンズ倍率10倍以上ではフォーカシングビューワ(×4)を, 4倍以下ではビューワとフォーカシングテレスコープ(×3.9)を使用。

3. 試作フォーカシングシステム

3-1 システムの構成

図3のように, CCDカメラをフォーカスセンサとして利用したオートフォーカス装置を試作して顕微鏡に取り付ける。フォーカシングビューワをとりはずしたあとにCCDカメラを取り付け, フォーカシングノブの微動軸をステッピングモータで駆動する。

図3 オートフォーカスシステム

フォーカスディテクタは, CCDカメラの映像信号を利用したコントラスト検出型である。映像信号からコントラストを検出し, コントラストが最も高い位置をフォーカスポイントとする。フォーカスポイントを含む範囲を光学系の焦点深度の1/5~1/10程度のピッチで移動しながらコントラストデータを取り込むスキャン動作を行

わせ、コントラスト値が最も大きい位置を検出しフォーカスポイントとする。

このオートフォーカス装置の繰り返し精度は、表2に示すように光学系の焦点深度の1/2程度である。後述するように、CCDカメラの焦点深度を写真撮影装置よりも小さくすることにより、正確なフォーカシング調整を行うことができる。

表2 オートフォーカスのくり返し精度と焦点深度

繰り返し精度 3σ [μm]	焦点深度 Δt [μm]	$3\sigma / \Delta t$
1.8	4.6	0.4
0.7	1.4	0.5

3-2 オートフォーカス動作

フォーカシングモータでステージを駆動しながら、フォーカスディテクタで映像信号のコントラスト情報を検出する。正確にフォーカシング調整を行うために、焦点深度の1/5~1/10のピッチでフォーカスポイントを含む広い範囲のコントラスト値を調べる。

映像信号1フィールドごとに1つのコントラスト値が得られるので、1つのコントラストデ

ータの入力には1/60秒かかる。低倍率対物レンズ使用時には、1~5 μm ピッチで400~800 μm にわたってスキャンする必要がある、1スキャンあたり10秒以上かかることもある。スキャンに要する時間を短縮するために、図4のように、粗いピッチでおおよそのフォーカスポイントを求め(コースフォーカス)、次に細かなピッチで正確なフォーカスポイントを探す(ファインフォーカス)アルゴリズムを用いた。

3-3 CCDカメラの選定条件

CCDカメラの焦点深度は式(2)で表される。正確なフォーカシング点を得るためには、式(2)の ϵ/m を小さくして焦点深度を浅くする必要がある。倍率 m を大きくするには、新たに光学系を追加することが必要になるので、スペースとコストの点で不利である。ここでは、CCDカメラの分解能 ϵ_c を高くすることにする。

CCDカメラの分解能 ϵ_c は、

$$\epsilon_c = \frac{3L}{2K} \quad (3),$$

図4 オートフォーカス動作

である。ここで、 L はCCD素子の幅、 K [TV本]は水平解像度である。

したがって、焦点深度 Δt_c は

$$\Delta t_c = n \frac{3L}{2mK} \frac{1}{N.A} \quad (4),$$

となる。したがって水平解像度 K が大きく、素子の幅 L が小さいCCDカメラを用いることが望ましい。さらに、カメラはフォーカシングビューワ部に取り付けるので小さいことが望ましいが、十分な視野を確保するにはCCD素子サイズは大きい方がよい。ここでは、小型・高解像度のCCDカメラとして、1/2インチ35万画素のCCD-27B (SONY)を用いた。

3-4 フィルム面とCCD面の位置調整

正確なフォーカシングを実現するためには、フォーカスセンサであるCCDをフィルムと光学的に共役な位置に置くことが重要である。

CCDの位置ズレによって生じる試料(物体)側フォーカスエラーは、(位置のズレ)/(倍率)²となる。表3は、CCDの位置が1mmズレたときの物体側の焦点位置の差(フォーカスエラー)である。たとえば、CCD面がフィルム面と1mmズレている場合、4倍の対物レンズではフォーカスポイントの差は2.5 μ mであり、2倍の対物レンズでは10 μ mになる。CCD位置を調整して、このフォーカスエラーが焦点深度に比べて無視できる程度まで小さくなるようにする。

倍率が低いときには焦点深度が深いので、CCD位置を正確に決定することが困難になる。ここでは、CCD面のズレは350 μ m以下としてある。このズレは、物体(標本)側に換算すると、4倍

対物レンズ使用時で0.9 μ m、2倍対物レンズ使用時で3.5 μ mに相当し、カメラの焦点深度(4倍対物レンズのとき約18 μ m)より十分小さな値となっている。

4. 繰り返し精度の検討

同一の試料に繰り返しフォーカシングを行い標準偏差を実測した。表4は、オートフォーカスの繰り返し精度である。また、比較のために低倍率でのフォーカシングになれていない被験者5人が20回ずつフォーカシングを行った結果を示した。使用した対物レンズは4倍、撮影レンズは3.3倍である。これより、オートフォーカスの精度は目視より約9倍高いことがわかる。

表4 フォーカシングの繰り返し精度

フォーカシング方法	標準偏差 [μ m]
目 視	9.5
オートフォーカス	1.1

対物レンズは $\times 4$ ($N.A$ 0.13), 撮影サンズは $\times 3.3$ を使用。目視の場合はビューワとテレスコープを用いた。

写真1は、オートフォーカスの効果を示す分解能テストターゲット(メスグリオ製)の写真である。写真1bはフォーカスポイントで撮影したもの、写真1aと1cは、それぞれフォーカスポイントの前後30 μ mの位置で撮影したものである。写真1aと1cは共に同程度ぼけており、オートフォーカスによるフォーカスポイント(写真1b)が妥当であることがわかる。

5. おわりに

CCDカメラを用いた写真撮影装置用のオートフォーカス装置を開発した。CCDカメラの焦点

表3 フィルムとCCDの位置ズレとフォーカスズレの関係

対物レンズ倍率	総合倍率 m	m^2	フォーカス位置の差 [μ m]	焦点深度 [μ m]
1	5.0	25.0	40.0	228
2	10.0	100.0	10.0	57.0
4	20.0	400.0	2.5	17.5
10	50.0	2500.0	0.4	3.0
20	100.0	10000.0	0.1	1.0

焦点深度は、式(2)より求めたフィルムカメラの値。

a. フォーカスポイントの $-30\mu\text{m}$ で撮影

b. オートフォーカスにより検出したフォーカスポイントで撮影

c. フォーカスポイントの $+30\mu\text{m}$ で撮影

写真1 テストチャートの写真

深度をスチルカメラの焦点深度の1/2程度とすることにより、繰り返し精度の高いオートフォーカス動作が可能となった。また、フィルムカメラのフィルム面に結像する像を直接観察してフォーカスポイントを検出することにより、フィルムとCCDとが共役の位置となるように調整し、ズレの低減をはかった。

これにより、フォーカシングの繰り返し精度が目視の場合より9倍高くなり、良好な写真を確実に撮ることが可能となった。

参考文献

- 1) 堀川嘉明：“顕微鏡用自動焦点装置”，光学，Vol. 13, No. 4, p.320, 1984.8
- 2) 久保田広ほか編：“光学技術ハンドブック増補版”，pp. 834-838, 朝倉書店，1987