

Abstract

We have developed two-dimensional lock-in amplifier systems that can detect very small changes in the light intensity distributions of images. In this paper, we present a new technique to improve the depth resolution in optical microscope systems by implementing the lock-in amplifier technology. In this technique, the derivatives of the image intensity in the depth direction are obtained using the lock-in amplifier system. Using these derivatives, the depth resolution can be improved by a factor of 3.5. We believe that this system has many important applications in the two-dimensional measurement of optical information.

1. はじめに

微弱光の二次元分布を計測する手法はイメージインテンシファイアなどを用いてすでに実現されているが、光量や光位相の微小変化の分布を二次元で測定する方法は極めて古典的なものとどまっている。従来の測定対象が光量分布という直流量を求めていたのに対し、交流量(時間的微量)に相当する微小変化がとらえられれば、原子・イオンなどの分光測定、あるいは生物・生体分野における超微弱な蛍光測定、さらに機械的応力や電磁界により発生する歪みに伴う光位相変化の分布など¹⁾光の振幅および位相情報を利用する広い分野での測定に役立つ。本研究では、従来から理科学計測に広く用いられているロックインアンプの手法(同期検波)を二次元画像検出に適用するための開発を行っている。今回の発表では、二次元ロックインアンプの基本的な構成と、応用例として顕微鏡画像の深さ方向の解像度を向上させる方法について述べる。光学顕微鏡の深さ方向の解像度は横方向のそれにくらべ数分の1程度しかなく、三次元像を得る障害となっている。これを改善するために、ロックインアンプを用いて深さ方向の画像の微分を求めることで、解像度を向上させる手法を紹介する。

2. 二次元ロックインアンプによる微小光量変化の測定

二次元ロックインアンプの概要を示すため、光量の微小変化の二次元計測を例にとり説明する。レーザ分光や蛍光顕微鏡による計測の場合に多く経験することであるが、蛍光強度に対し励起光強度がはるかに強いため、励起光の散乱などのバックグラウンド雑音を蛍光から分離することが困難な場合がある。こうした場合、光の波長を掃引するか切り替えれば、背景光の強度分布はほとんど一定なのに対し蛍光は波長依存性を持つため変化が大きい。従って、全光強度の変化分に着目すれば蛍光のみを分離することができる。こうした状況を模擬するために、ビデオカメラのフレーム間隔と同じ周期で発光ダイオード(以下LED)を点滅させ、画像をVTRに収録する。LEDは光のあたっている散乱スクリーンの後ろに位置し、目視では確認が困難である。次に記録した画像をA/D変換器を通してメモリーに移し、奇数フレームと偶数フレームの各画素同士を減算することで変化分つまりLEDの光を抽出することができる。この演算は各フレームに±1を交互に掛け合わせた結果を平均化していくものであり、いわゆるロックインアンプの同期検波処理に相当する。背

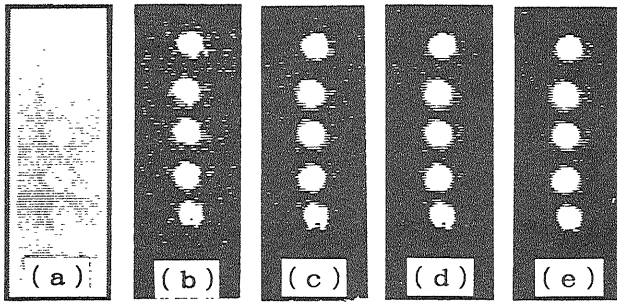


Fig.1 Measurement results of light intensity distributions. (a)Original image. (b)Differential processed image. 20 images were averaged. (c)Lock-in amplified image obtained from 30 images; (d) 120 images; (e) 480 images. S/N is improved as increasing the number of images.

景光を取り除くための減算は普通に行われていることであるが、ここでは時間的な相関がより強い画面同士でこの演算を行うことによって、S/Nを向上させる狙いがある。雑音は様々な要因によるゆらぎのため、周波数の低い領域ほど大きいことが多い。静止画像を良いS/Nで求めるため長時間平均化しても、S/Nが向上するのはゆらぎが白色雑音とみなせる領域であって、長時間になればなるほど低い周波数成分のゆらぎのため改善度は飽和する。従って、減算処理では1/f雑音による制限以上にはS/Nが改善しないが、同期検波処理によれば平均回数に平方に比例してS/Nは向上し、このような制限は受けない。

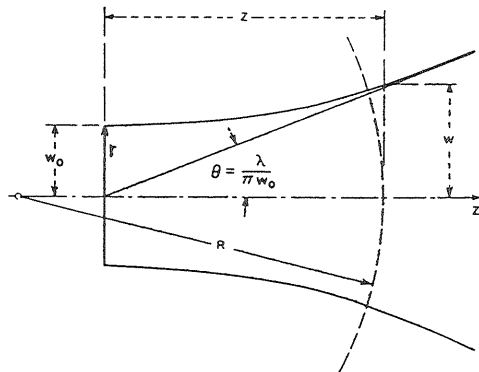
実験結果を図1に示す。箱の中のLEDの発光は図1(a)に示すようにほとんど確認できない。LEDが点灯している時と消えている時のおおの10フレームを平均化し、減算すると図1(b)のようになる。この場合には平均化数をこれ以上増加させても画像は改善しない。一方、同期検波処理をすると同図(c)(d)に示すように処理枚数が増すにつれS/Nが向上することが確認された。ただし、(e)のようにさらに処理枚数を増加させてもほとんど画像は変化がなくなるが、これはA/D変換器の分解能が6bitと少ないためであり、より高分解能なA/D変換装置の利用が望まれる。

3. 顕微鏡画像の解像度の改善

二次元ロックインアンプを用いて、顕微鏡画像の深さ方向の解像度を向上させる方法について述べる。¹⁾ 光学顕微鏡は長い歴史を持ち、その解像度はほぼ回折限界にまで達している。ところが、通常の光学顕微鏡は横方向の解像度に比べ深さ方向の解像度は数分の1程度しかない。そこで、深さ方向の解像度を向上させるため共焦点走査型顕微鏡²⁾や光学切片顕微鏡³⁾などの手法が提案されているが、測定に時間がかかりリアルタイム性が失われるとか、極めて複雑かつ大量な計算を要するといったことが実用上の困難さを生んでいる。そこで、より簡便に解像度を向上させるため、画像の深さ方向の微分を利用する手法を検討したので次に紹介する。

簡単のためにガウシアンビームを例にとり、図2に示すように絞り込まれた場合の焦点付近の光強度分布について検討する。焦点近傍のガウシアンビームは次のように記述される。⁴⁾

Z: 深さ方向(光軸)、r: 横方向(光軸からの距離)、 θ : ビーム広がり角、 w_0 : ビームウエストとすると光波の複素振幅 $\psi(r, z)$ は次のように表現できる。



$$\psi(r, z) = w_0/w \times \exp \{ -j(z - \Phi) - r^2(1/w^2 + j/2R) \} \dots (1)$$

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + (2z/w_0^2)^2} \dots (2)$$

$$R(z) = z \{ 1 + (w_0^2/2z)^2 \} \dots (3)$$

$$\Phi(z) = \tan^{-1}(2z/w_0^2) \dots (4) \quad \text{ただし、} \tan \theta = 2/w_0$$

となる。なお、長さの単位の変数は、 $r=kr$ 、 $z=kz$ などとし無次元化している。これを光の強度、 $U(r, z)$ 、についてまとめると次のようになる。

$$U(r, z) = |\psi(r, z)|^2 \dots (5)$$

$$|\psi(r, z)| = w_0/w \times \exp(-r^2/w^2) \\ = \exp(-r^2/w_0^2 a^2) / a \dots (6) \quad \text{ここで } a = \sqrt{1 + (2z/w_0^2)^2}$$

Fig.2 Gaussian beam profile on focus.

(6)式から、深さ方向の一階微分、二階微分を求めると図3

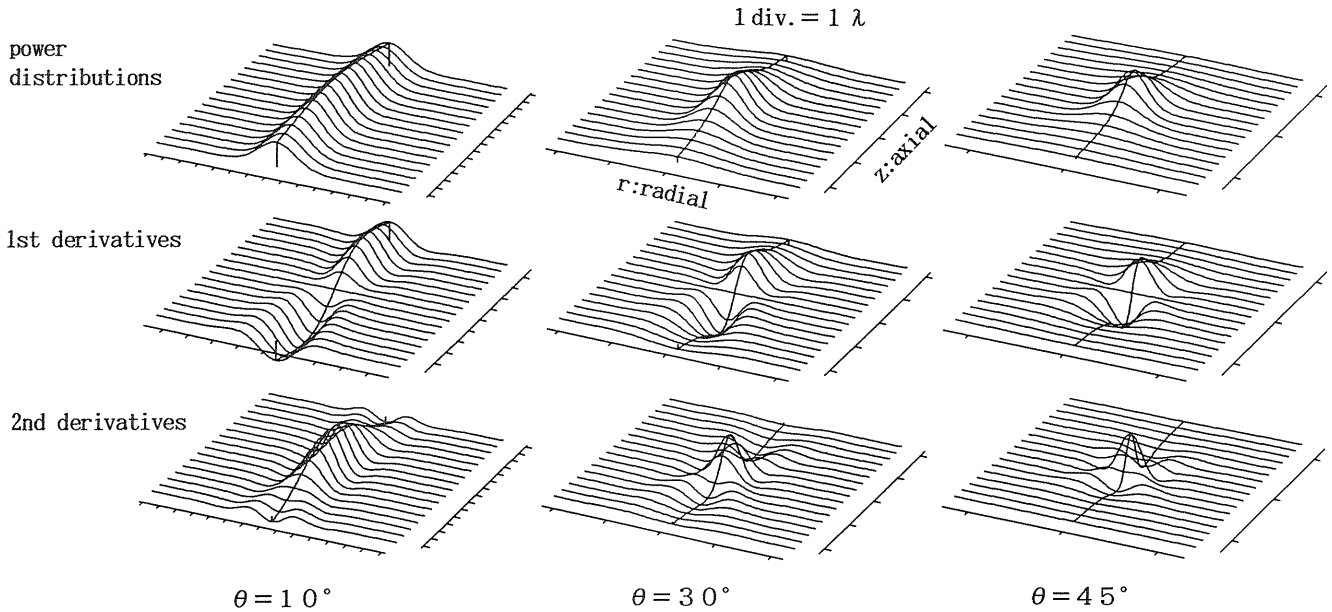


Fig.3 Simulations of improvements of the depth resolution by using derivatives. The upper panel shows original power distributions. The middle panel shows their first derivatives. The lower panel shows their second derivatives.

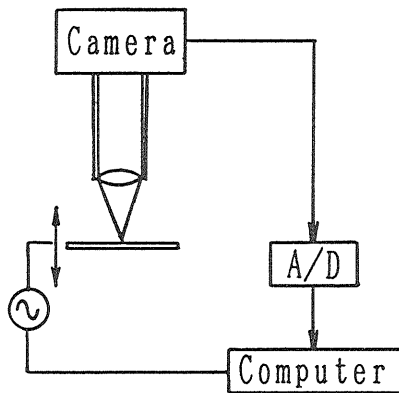


Fig.4 A measurement system of derivative for microscopic imaging.

のようになる。(a)はビームの広がり θ が 10° 、(b)は 30° 、(c)は 45° の場合である。一階微分は焦点面を境として画像の明暗が反転してしまうが、深さ方向のエッジ強調効果を得られる。また、二階微分ではこのような反転は避けられるが、今回の実験では使用機器の階調が6bitと少なく測定できなかった。

微分画像の測定装置を図4に示す。焦点付近で測定対象を深さ方向に周期的に移動させ、これと同期して手前と向こう側の2種類の画像を高速ビデオカメラで撮影する。映像はただちにA/D変換されて半導体メモリーに記録される。これをコンピュータで読みだし加減算処理した後、加算平均すると一階微分画像が得られる。対物レンズは40倍、

開口数0.65であり、図3(b)の計算例に相当する。試料はラテックスビーズ(直径 $3\mu\text{m}$)を牛乳に混ぜ寒天で固定したものである。

試料をのせたスライドガラスは積層セラミックスの圧電素子に接着してあり、画像取り込みのタイミングにあわせて焦点面付近で上下する。上下幅は $2\mu\text{m}_{\text{P-P}}$ として実験を行った。

図5(a)はスライドガラス表面近くに焦点面をおいて測定した画像で、(b)はこれから $5\mu\text{m}$ 奥つまりスライドガラス内に焦点がある場合の画像である。図中Aはラテックスビーズ、Bは牛乳の脂肪球で画面内に数多く存在している。また、Cはレンズ表面のゴミである。これらの画像を比較するとAについては $5\mu\text{m}$ ずれてもほとんど変化が無い。一方、Bは $1\mu\text{m}$ 以下の大きさしかないのではっきり見えず、どれが手前か奥かの判別は難しい。次に、100枚の画像を用いて微分画像を求めると、(c)に示すようにA・B共にはっきり見えるようになり、脂肪球のうち焦点面に近いものだけが特に強いコントラストで見られるようになる。一方、これと同様に(b)を微分した画像(d)では原画で見えていたAがほとんど消えており、深さ方向の解像度が向上していることがわかる。さらに、Cのようなゴミがこうした微分操作により消えるため実用には都合が良い。

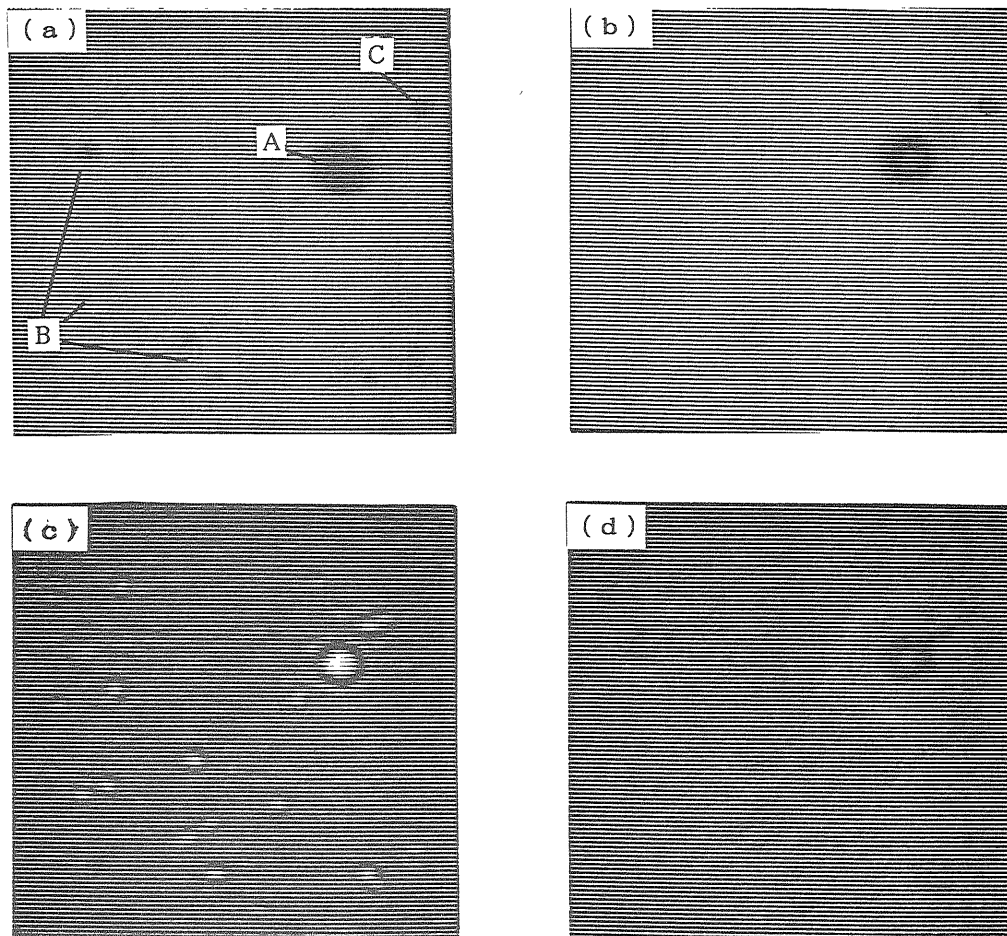


Fig.5 Improvement of the depth resolution by derivative imaging. (a) Focused image. (b) Defocused image, $5\mu\text{m}$ deeper than (a). (c) and (d) show the derivative images calculated from 100 images of (a) and (b), respectively.

5. おわりに

光量・光位相の微小変化の二次元測定法について基本的な考え方を示した。ビデオカメラのフレーム時間に同期した変調をかけることで、光信号を二次元で処理できるロックインアンプが構成できる。さらに、本装置を用いて、顕微鏡画像の深さ方向の一階微分を求めることで、深さ方向のコントラストの強調ができることを示した。近年、高速・高分解能 A/D 変換器の開発が目覚ましいいきおいで進められており、近い将来、従来のロックインアンプと同様な高い雑音除去能力を持った二次元ロックインアンプを実現することが可能となろう。

参考文献

- 1) 前野 恭他、「二次元ロックインアンプによる顕微鏡画像の深さ方向分解能の改善」、電学論 C、8月号掲載予定(平成4年)
- 2) 藤田 哲也他、「限界を超える生物顕微鏡」、第4章、学会出版センター、(1991)
- 3) Y. Hiraoka, D. A. Agard and J. W. Sedat, "Temporal and Spatial Coordination of Chromosome Movement, Spindle Formation and Nuclear Envelope Breakdown During Prometaphase in *Drosophila Melanogaster* Embryos", *J. Cell Biol.*, 111, pp.2815-2828 (1990)
- 4) H. Kogelnik and T. Li, "Laser Beams and Resonators", *Applied Optics*, Vol.5, No. 10, pp.1550-1567 (1966)