

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02026

研究課題名(和文) 水ストレス状態を定量化するデュアル光コムによるワンショット3D分光イメージング

研究課題名(英文) One-shot dual-comb 3D microscopy and spectroscopic imaging to evaluate moisture content of a living plant

研究代表者

山本 裕紹 (Yamamoto, Hirotsugu)

宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00284315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,200,000円

研究成果の概要(和文)：施設園芸の環境において、非侵襲で植物の水ストレス状態を明らかにするための光学技術を開発することを目的として、光周波数コム光源と呼ばれる超多チャンネル性を有する光源を用いて、波長を2次元空間に変換する光学系とデュアル光コム分光法を用いることで共焦点顕微鏡の同時並列化を実現するとともに、群生する葉の中の注目領域の分光イメージングを可能にする3D照明を反射型結像光学系を用いて開発した。さらに、生育葉を切り取ることなく水分状態の定量化に適した波長で照明するハンドヘルド型葉内水分センサを実現した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to realize optical techniques to investigate the moisture situation of crops in the plant factory, including microscopy, hyperspectral imaging, and spectroscopy. One-shot and full-field confocal microscope has been realized by use of 2D spectral coding and dual-comb spectroscopy. A novel 3D illumination by use of retro-reflector has been developed to converge the illumination light inside a group of leaves. Furthermore, we developed a handheld, scissors-like, spectroscopic sensing apparatus that evaluates water content in a crop leave by sandwiching the leave.

研究分野：情報フォトニクス

キーワード：デュアル光コム分光法 共焦点顕微鏡 分光イメージング 反射型結像光学系 施設園芸 水ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 共焦点レーザー顕微鏡は、3次元イメージング・高い空間分解能・低侵襲性といった特徴から、バイオイメージングや工業計測に幅広く使われている。バイオ分野では、生きたまま細胞や組織の生命現象を観察すること(ライブイメージング)により、生命現象を解き明かす手段として、共焦点レーザー顕微鏡が広く使われるようになっていく。

(2) しかしながら、農業の国際競争力を上げる大規模植物工場の現場においては、育成中の植物に対して非侵襲でライブイメージングを行う手法がなかった。実際に、共同研究者の梅田(現：日本大学)が当時所属していた農業・食品産業技術総合研究機構の野菜茶業研究所の植物工場の場合、400m²を超える面積で夏場は45°Cになる温室内に高さ2メートル超に育ったトマトが並ぶなど、まるでジャングルのように葉が生い茂る状況にあり、光学定盤の上で構築される従来の光計測技術では応用が難しい印象を得た。

(3) 農業の分野では、温度や湿度を計測・制御することで収率を上げるため最適化を目指す精密農業の分野が注目されている。植物工場で生育した状態で気孔の観察や分光スペクトルなどの定量化がなされれば植物の水ストレス状態をはじめとする状態観察を可能にする。このように生育したままの植物に対するライブイメージング手法が求められている。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、ワンショット・フルフィールド共焦点顕微鏡を開発することである。従来の共焦点顕微鏡は点走査であるため、撮影に時間を要することから、生育葉を観察する際に手振れあるいは被写体ブレの影響を除くことができない。短い露光時間でフルフィールドの共焦点画像を取得する技術は、生育葉に対するライブイメージングが可能にする。

(2) 分光イメージング手法の精密農業への応用に向けて、植物が生育したままの状態での分光画像を取得するための光学系を構築することが第2の目的である。画像計測は対象から離れた位置からの情報取得を可能にするが、一方で、植物工場などに代表される施設園芸の環境においては、注目領域の分光画像を得るための照明が重要になる。限られたスペースから影を作らないように注目領域を照明することが照明法のポイントとなる。

(3) 施設園芸環境下にて栽培中の作物に対して水分動態を非侵襲で計測する手法を開発することが第3の目的である。実際の施設園芸の現場で水ストレス状態を測定するには手持ちのセンサモジュールで生育葉の状態

を調べることができるような簡易的なセンサモジュールの開発が求められる。

3. 研究の方法

(1) ワンショット・フルフィールド共焦点顕微鏡を構築するために、光周波数コム(光コム)を用いる。光コムは、いわば、一定間隔で数十万本の安定化された狭帯域レーザーから構成された光源である。光コムの超多チャンネル性をイメージングに利用するため、VIPA(virtually-imaged phased array)と回折格子からなる2次元の波長分散光学系を用いて、波長/2次元平面変換で光コムのモード毎に2次元平面に離散展開した上で、対物レンズでサンプルに平行集光する。サンプル反射光を2次元波長分散光学系に逆側から再入射することにより、2次元平面/波長変換が行われ、2次元イメージ情報がスペクトル波形に重畳されたシングルビームとなる(図1)。そして、共焦点光学配置を通過した後、そのスペクトル波形をデュアル光コム分光法により、超高分解スペクトル計測する。以上により、共焦点2次元イメージを機械的レーザービーム走査無しに得ることが可能になる。

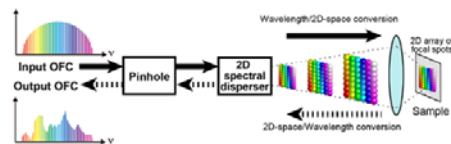


図1 波長/2次元変換を用いたワンショットイメージングの概要。

(2) 植物が生育したままの状態での分光画像を取得するために、通常のレンズで集光できる角度をはるかに超える広い角度から巨大な開口を通った光で注目領域を照明する光学系を構築する。このような光学系は、大型のビームスプリッターを開口として、再帰反射による空中結像(AIRR: aerial imaging by retro-reflection) [H. Yamamoto, et. al, Opt. Exp. 22, 26919 (2014)] や2層矩形ミラーレイ(WARM: double-layered arrays of rectangular mirrors)を用いて、照明光源を注目領域の周りに収束せさせることで可能である。ビームスプリッターと再帰反射素子を用いたAIRRによる実験の様子を図2に示す。このように十分な光量で注目領域を照明したうえで、ハイパースペクトルカメラ(HSC)を用いて分光画像を取得する。



図2 AIRRによる照明光の収束を用いた生育中のトマトの葉に囲まれた領域の分光イメージング実験配置。

(3)栽培中のトマトに対して、葉を切り取ることなく、水分量の定量指標を得るためのセンサを開発する。まず、トマトの葉の水分状態の違いによる分光スペクトルの変化を測定して注目波長を決定するとともに、非侵襲計測用のセンサを開発する。生育した状態の葉を、外光を防ぐ遮光マスクと光センサモジュールで挟む構造(図3)を有するセンサを製作して実験に用いる。

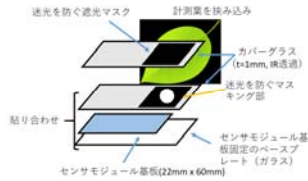


図3 生育中の葉面に貼り付けて計測可能な光センサモジュールの構成。

4. 研究成果

(1) 構築したデュアル光コム共焦点顕微鏡の構成を図4に示す。光源には位相制御された2台のErファイバー光コム光源 ($\nu_c = 193$ THz, $\Delta\nu = 1.25$ THz, $f_{\text{rep}1} = 100.387650$ MHz, $f_{\text{rep}2} = 100.386664$ MHz, $\Delta f_{\text{rep}} = 986$ Hz) を用いた。光コム光源1からの光をVIPA(FSR = 15 GHz, フィネス100)と回折格子(1200本/mm)から構成される2次元波長分散光学系によって波長/2次元空間変換により、対物レンズを介してサンプル上に集光スポットアレイを形成する。サンプルからの反射光は、光路を逆に伝搬した後、共焦点ピンホールを通過した後、光コム光源2と干渉する。デュアル光分光法によりモード分解スペクトルを取得する。フレームレートは1つのインターフェログラムを取得する周期 $1/\Delta f_{\text{rep}} = 1.01$ msまで高速化が可能である。テストチャートの反射光強度イメージおよび位相イメージをそれぞれ図5(a), (b)に示す。得られた位相差は光路長差88nmに相当し、AFMを用いて測定された反射クロム膜の厚さと一致した。提案法により、共焦点顕微鏡の同時並列化だけでなく、位相も取得できる従来にない新しい特長を有することを実証した。

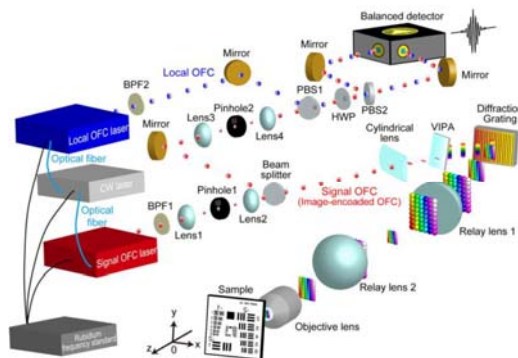


図4 デュアル光コム分光法を用いたワンショット・フルフィールド共焦点顕微鏡の構成。

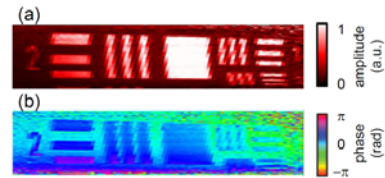


図5 テストチャートの観察結果。(a)反射強度イメージならびに(b)位相イメージ。

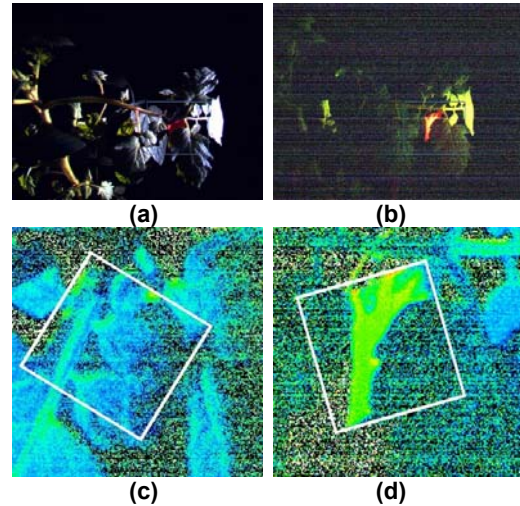


図6 (a)直接照明および(b)AIRRによる収束照明で得られたカラー画像。(c)直接照明および(d)AIRRによる収束照明で得られた注目領域付近のNDSI画像。

(2) 注目エリアを照明する手法のライブイメージングに対する有効性を示すために、生育中のトマトの葉群の中に赤色のターゲットを固定して光ファイバーガイドで出力されるソーラーシミュレーター光源(朝日分光, HAL-320, 波長幅350nm~1100nm)を用いて、直接照明とAIRRによる照明を行った。ハイパースペクトルカメラ(エヴァジャパン, NH7-7UY)を用いて得られた結果を図6に示す。カラー映像において、直接照明ではターゲット付近の葉が明るく証明されているのに対してターゲットは影となって証明されていない。一方、AIRRによる収束照明の場合には、注目領域にある赤色ターゲット付近のみが明るく照明されていることがわかる。さらに、正規化分光反射指数(NDSI:normalized difference spectral indices)で画像化した結果、提案法では図6(d)に示される通り、赤色ターゲット部分で周囲とは顕著な特徴量の局在が確認された。同じ光源をWARMや放物面鏡を用いて収束する実験を行った。結果を図7に示すように、WARMでは透過光および1回反射光により注目領域の範囲外も照射がなされた。放物面鏡では光が高い指向性を持って収束されるためターゲット手前の葉によってターゲットが見えない結果が得られた。以上により、大型のビームスプリッターと再帰反射シートを用いたAIRRによる照明が生育中の植物の分光イメージングに有効であることが確認された。

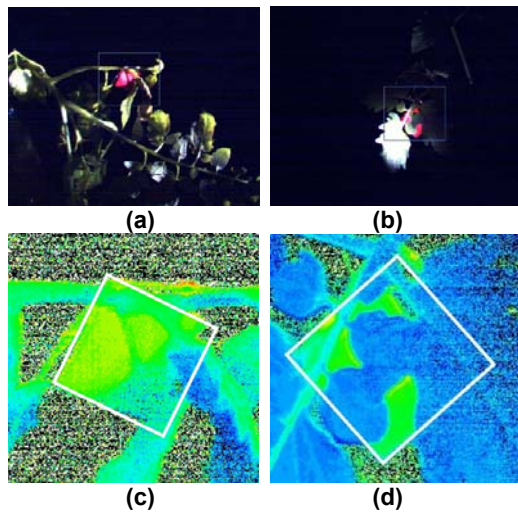


図 7 (a)WARM および(b)放物面鏡による収束照明で得られたカラー画像. (c)WARM および (d)放物面鏡による収束照明で得られた注目領域付近のNDSI 画像.

(3) 水分状態を定量化するセンサモジュールを開発するために施設園芸で栽培されたトマトの葉 48 枚の反射光スペクトルを測定した. 得られたスペクトル分布に対して MSC (multiplicative scattering correlation) 処理を行った後に 2 次微分処理を行った結果を図 8 に示す. 複数の吸収ピークが確認され, 得られた吸収ピークと分光器の波長範囲における OH 基の吸収バンドから, 携帯用センサモジュールの光源には中心波長 1450nm の LED(light-emitting diode)を用いることとした. LED を組み込んで開発したハンドヘルド型葉内水分センサを図 9 に示す. 上部は迷光を防ぐ遮光部であり, 下部は光センサモジュールである. ハサミのように持って葉を切り取ることなく, 挟むだけで反射光強度を計測できる. ろ紙換算法により開発したセンサの PDF (photon flux density) 出力の線形性を確かめた. トマトの切り取り葉を乾燥させることで含水比を変化させたサンプルに対して, 葉の先端部分について測定した結果を図 10 に示す. 実験の結果, 開発したハンドヘルド型葉内水分センサを用いて水分状態の変化を定量化できる可能性が明らかとなった.

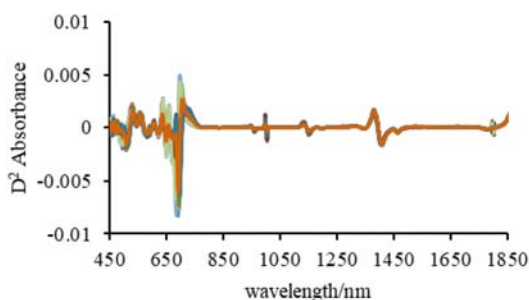


図 8 トマト葉の反射スペクトルに対する 2 次微分処理後のスペクトル分布.

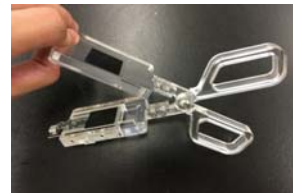


図 9 生育葉を非侵襲で測定するために開発したハンドヘルド型葉内水分センサ.

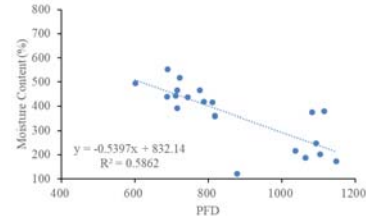


図 10 葉の先端部分に対して測定で得られた PFD 値と含水比の関係.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① E. Hase, T. Minamikawa, T. Mizuno, S. Miyamoto, R. Ichikawa, Yi-Da Hsieh, K. Shibuya, K. Sato, Y. Nakajima, A. Asahara, K. Minoshima, Y. Mizutani, T. Iwata, H. Yamamoto, and T. Yasui, “Scan-less confocal phase imaging based on dual-comb microscopy,” *Optica*, 査読有, Vol. 5, No. 5, pp. 634-643 (2018).
DOI:10.1364/OPTICA.5.000634
- ② 長谷栄治, 宮本周治, 市川竜嗣, 南川丈夫, 山本裕紹, 安井武史, “スペクトル・エンコーディングを用いたラインフィールド共焦点デュアル光コム顕微鏡”, *レーザー研究*, 査読有, Vol. 45, No. 6, pp.324-327 (2017).
<https://ci.nii.ac.jp/naid/40021244785>
- ③ 安井武史, 宮本周治, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本裕紹, “ライン集光スリットと波長 - 空間変換を用いたスキャンレス・フルフィールド共焦点レーザー顕微鏡”, *光アライアンス*, 査読無, Vol. 27, No. 11, pp. 10-13 (2016).
<https://ci.nii.ac.jp/naid/40020986422>
- ④ 宮本周治, 長谷栄治, 南川丈夫, 謝宣達, 水谷康弘, 岩田哲郎, 安井武史, 山本裕紹, “スリット共焦点と波長/空間変換を用いたスキャンレス・フルフィールド共焦点顕微鏡”, *精密工学会誌*, 査読有, Vol. 82, No. 7, pp. 679-682 (2016).
<https://ci.nii.ac.jp/naid/130005162950>
- ⑤ 山本裕紹, “フォトニック 3 次元情報環境の創成に向けて”, *フォトニクスニュース*, 査読無, Vol. 1, No. 2, pp. 45-50 (2015).
<https://annex.jsap.or.jp/photonics/>

〔学会発表〕(計40件)

- ① E. Hase, S. Miyamoto, T. Mizuno, T. Minamikawa, H. Yamamoto, and T. Yasui, “Dual-comb microscopy for scanless confocal phase imaging,” Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2018, 2018年.
- ② T. Mizuno, E. Hase, T. Minamikawa, H. Yamamoto, and T. Yasui, “Video-rate confocal phase imaging by use of scan-less dual comb microscopy,” Photonics West 2018, 2018年.
- ③ K. Kawai, R. Kujime, T. Okamoto, H. Yamamoto, “3D Lighting for Hyperspectral Imaging of Leaf Group by Use of Aerial Imaging Optics,” IDW’ 17, 2017年.
- ④ 村松慧哉, 梅田大樹, 川越義則, 杉原敏昭, 山本裕紹, 安井武史, 小泉明嗣: 施設園芸における作物水分動態推定のための非侵襲計測技術(3)一分光センサによるトマト葉内水分の定量化指標と現場計測手法の提案一, 第18回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2017年.
- ⑤ K. Kawai, R. Kujime, T. Okamoto, H. Yamamoto, “Ring-lighting for hyperspectral imaging by use of a retro-reflector,” JSAP-OSA Joint Symposium 2017, 2017年.
- ⑥ 宮本周治, 長谷栄治, 南川丈夫, 安井武史, 山本裕紹: 波長/空間変換を用いたスキャンレス共焦点レーザー顕微鏡の開発, レーザー学会学術講演会第37回年次大会, 2017年.
- ⑦ 杉原敏昭, 澁澤栄, 梅田大樹, 岩崎泰永, 中野明正: 施設園芸における作物水分動態推定のため非侵襲計測技術(2)一分光センサを用いた計測器と指標の開発一分光センサを用いた計測器と指標の開発一, 第17回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2016年.
- ⑧ 梅田大樹, 岩崎泰永, 中野明正, 杉原敏昭, 澁澤栄, 山本裕紹, 安井武史: 施設園芸における作物水分動態推定のため非侵襲計測技術(1)一栽培中の観察を可能とする非侵襲手法の提案一, 第17回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2016年.
- ⑨ 山本裕紹: フォトニックインテリジェンスの様相, 第77回応用物理学学会秋季学術講演会, 2016年.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計3件)

①名称: 計測装置及び照射装置
発明者: 安井武史, 岩田哲郎, 水谷康弘, 南川丈夫, 長谷栄治, 山本裕紹
権利者: 国立研究開発法人科学技術振興機構
種類: 特許
番号: 特願 2017-154392
出願年月日: 2017年8月9日
国内外の別: 国内

②名称: 計測装置
発明者: 安井武史, 岩田哲郎, 水谷康弘, 南川丈夫, 謝 宣達, 長谷栄治, 山本裕紹
権利者: 国立大学法人徳島大学・国立大学法人宇都宮大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2016/66636
出願年月日: 2016年6月3日
国内外の別: 国際

③名称: 計測装置
発明者: 安井武史, 岩田哲郎, 水谷康弘, 謝 宣達, 長谷栄治, 山本裕紹
権利者: 国立大学法人徳島大学・国立大学法人宇都宮大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-130249
出願年月日: 2015年06月29日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yamamolab.science/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 裕紹 (YAMAMOTO, Hirotsugu)
宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 00284315

(2) 研究分担者

梅田 大樹 (UMEDA, Hiroki)
日本大学・生物資源科学部・講師(専任講師クラス)
研究者番号: 70615377

安井 武史 (YASUI, Takeshi)
徳島大学・大学院理工学研究部・教授
研究者番号: 70314408

南川 丈夫 (MINAMIKAWA, Takeo)
徳島大学・大学院理工学研究部・講師
研究者番号: 10637193

長谷 栄治 (HASE, Eiji)
公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・研究員
研究者番号: 50805512