

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：34416

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17474

研究課題名(和文) マルチスペクトル偏光3次元動画画像ホログラフィック顕微鏡法と生体観察

研究課題名(英文) Multi-spectral, polarization-imaging, and three-dimensional motion-picture digital holographic microscopy and its application to observation of biological specimens

研究代表者

田原 樹 (Tahara, Tatsuki)

関西大学・システム理工学部・助教

研究者番号：50709095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：可視・近赤外マルチスペクトル3次元ホログラフィック画像を多重記録する光学システムを開発し、水中を自由泳動するゾウリムシを観察できた。また、分解能向上のために信号理論を駆使するアプローチ、波長選択抽出位相シフト法を適用するアプローチをとり、いずれの方法でも実証した。後者のアプローチでは、マルチカラーデジタルホログラフィック顕微鏡システムを構築し、1 $\mu$ mオーダーの構造のカラー3次元イメージングを示した。また、デジタルホログラフィを用いた偏光情報の取得を確認した。以上より、要素技術の開発と性能向上を達成し、多波長ホログラフィシステムに偏光イメージングカメラを配置した光学システムが完成段階である。

研究成果の概要(英文)：I developed optical systems that acquire holographic three-dimensional images at visible and near-infrared wavelengths simultaneously and succeeded in observing a paramecium swimming freely in water with the systems. Then, I improved the resolution in multi-wavelength digital holography by using the signal theory, and phase-shifting interferometry selectively extracting wavelength information that had been proposed initially on 2013. The constructed multi-color digital holographic microscopy based on the phase-shifting interferometry performed color three-dimensional imaging of a biological specimen that had a 1 $\mu$ m-order structure. Acquisition of polarization information with digital holography was also confirmed. From the results described above, the developments of elemental technologies were successfully achieved and a multi-spectral, polarization-imaging, and three-dimensional motion-picture digital holographic microscopy system is constructed.

研究分野：光学

キーワード：ホログラフィ デジタルホログラフィ デジタルホログラフィック顕微鏡 マルチカラーデジタルホログラフィック顕微鏡 高速動画デジタルホログラフィック顕微鏡 多波長位相シフト干渉法 位相シフトデジタルホログラフィ 波長選択抽出位相シフト法

### 1. 研究開始当初の背景

近年の生命科学研究では、ラマン散乱顕微鏡に見られるように非染色イメージングの重要性が年々増している。生体内組成本来の動態を可視化するために、染色することなく組成、形態を解明する技術への期待は極めて高い。しかしながら従来、多波長、3次元空間情報の取得には波長、光源、試料ステージ、結像系などの走査過程が必要であるため、深深度マルチスペクトル3次元形態・組成観察の高速化には限界がある。一方、光学厚さから来る形態、高分子配向組成の偏光特性、吸収・分子振動から来る組成や波長特性など、多くのパラメータ、すなわち多次元情報取得によるイメージングの可能性拡張が論じられている。以上を踏まえ、生命現象の発見・解明のために、高速に多次元動画像情報を取得できる光学技術が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、マルチスペクトル3次元ホログラフィック画像を多重記録し、組成可視化のために偏光分布も同時動画像記録可能な光学システムを開発する。研究代表者は課題達成のために、汎用単板単色撮像素子を適用可能で、可視～近赤外領域にわたる広波長域の多波長3次元画像を多重記録可能なデジタルホログラフィ法を提案してきた。今回、上記方式に基づき可視～近赤外光のマルチスペクトル情報取得、そして偏光分布情報も同時記録するための光学システムを開発する。

実現のため、マルチスペクトル3次元ホログラフィック画像記録法に、偏光分布画像情報を同時記録する機能を付加する。3次元形態、吸収・屈折率の波長特性、高分子組成の3次元画像情報を同時記録する光学システムを構築する。図1に技術の概略を示す。広波長域のマルチスペクトル3次元画像を瞬間記録可能なデジタルホログラフィック画像記録法を用いて多波長3次元画像情報を取得し、偏光イメージングカメラを用いて偏光特性情報を取得する。カメラのフレームレートで動画像記録を行なうことを目指す。以上、3次元空間、位相、近赤外光を含むマルチスペクトル、偏光特性の情報をデジタルホログラフィで得ることにより、非染色で多数物理量の同時動画イメージングを達成することが狙いである。これまでの研究では専用撮像素子の動作波長域に起因しイメージングに緑色光～青色光しか使えず、水中微小生体の内部構造が不明瞭であった。可視3波長に加え近赤外光を用い同時イメージングすることで、色味と内部構造の高速同時3次元動画像記録可能性を調べる。また、屈折率分散より生体情報のさらなる取得と可視化可能性拡張が考えられる。偏光情報を用いると、筋繊維や細胞膜、細胞境界などの生体情報を明瞭に同時可視化できると期待される。開発する技術に基づく顕微鏡で生体観察を行なう。

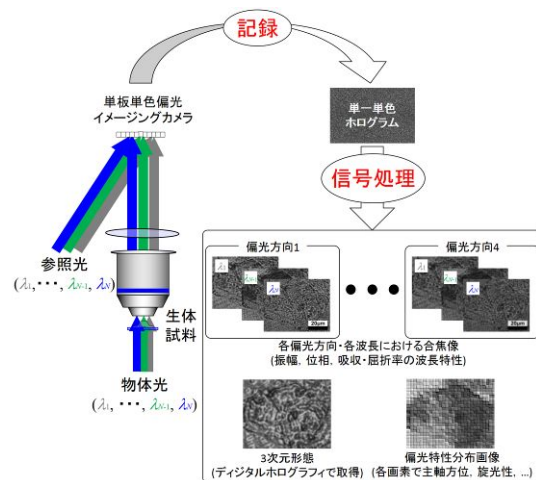


図1.提案法に基づく光学システム例の概略。

### 3. 研究の方法

図2に光学システム例のホログラム記録から像再生までの流れを示す。可視3波長に加え近赤外波長のレーザー光を同軸とし、off-axis型のデジタルホログラフィの光学系配置に基づき、多波長多重化ホログラムをイメージセンサで取得する。記録デバイスに偏光子アレイ付イメージセンサを用いることにより、偏光分布情報の同時記録を可能にする。ホログラム記録後、フーリエ変換法に基づき縞解析する。まず、フーリエ変換することで波長情報を分離する。分離された各波長の物体光波情報を選択的にフィルタリングし、所望の波長におけるホログラフィック3次元画像を得る。これを偏光子アレイの各透過軸より得られる4種の波長多重化ホログラムに適用し、3次元画像の偏光分布情報も得る。以上より、3次元空間、位相、波長、偏光の画像情報を同時動画像記録・像再生できる。

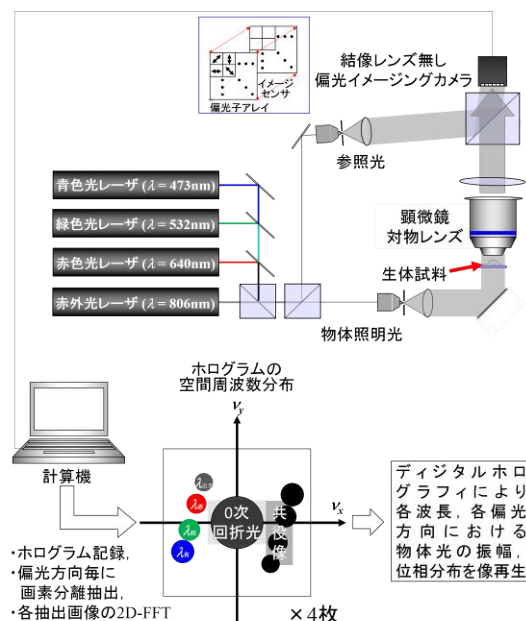


図2. マルチスペクトル偏光3次元動画像ホログラフィック顕微鏡システムの全体図。

図2と並行し、波長選択抽出位相シフト法に基づく光学システムを開発し、限界性能の向上を目指す。

#### 4. 研究成果

まず、多波長同時記録可能性を調べるために、図2のイメージセンサを単板単色高速カメラとし、波長数2,4として高速多波長デジタルホログラフィック顕微鏡システムを構築した。そして、生きたゾウリムシをホログラフィック動画像記録した。記録波長数を4とし、波長806nmの近赤外光、波長640,532,473nmの可視3波長を記録したときの実験結果を図3に示す。画質と分解能共に低い、4波長多重記録可能性を示すことができた。

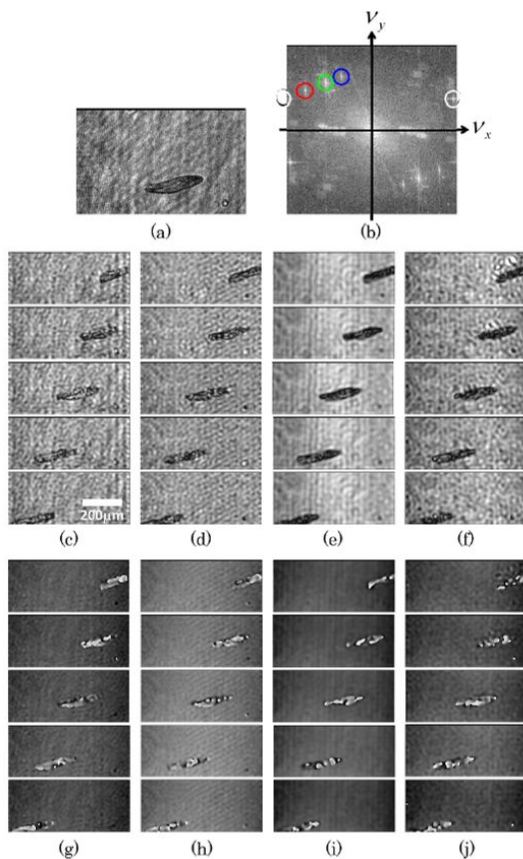


図3. 4波長同時ホログラフィック動画像記録実験結果。(a)記録された4波長多重化ホログラム画像群の1枚。(b)(a)の空間周波数分布画像。波長(c)806nm,(d)640nm,(e)532nm,(f)473nmにおける強度画像群,波長(g)806nm,(h)640nm,(i)532nm,(j)473nmにおける位相画像群。

しかしながら、画質と分解能が共に低いため、偏光情報の同時記録が困難であるという課題に行きついた。そこで、分解能を向上させるためのアプローチを複数とることにし、偏光分布の同時記録に繋げるべく多波長記録方式を研究した。まず、図2の方式において、波長分解能、空間分解能を上げるために、信号理論を駆使するアプローチをとった。通

常、デジタルホログラフィにおいて、市販されている撮像素子の性能では10度未満の入射角しかとれない。一方で、参照光の入射角度を大きくとることができれば、図2のシステムにおいて視野角、空間分解能、波長分解能いずれの性能も向上させることができる。そこで、意図的にサンプリング定理を破たんさせエイリアシングを発生させるものの、デジタル信号の周期性により多波長の物体光波を記録する方法を考案した。実証実験においては、参照光と物体光の角度差は最大で40度以上とし、10円硬貨の複数波長ホログラムを単一露光同時記録した。結果として、同一視野において、高空間分解イメージング能力を示し、分解能向上を達成した。

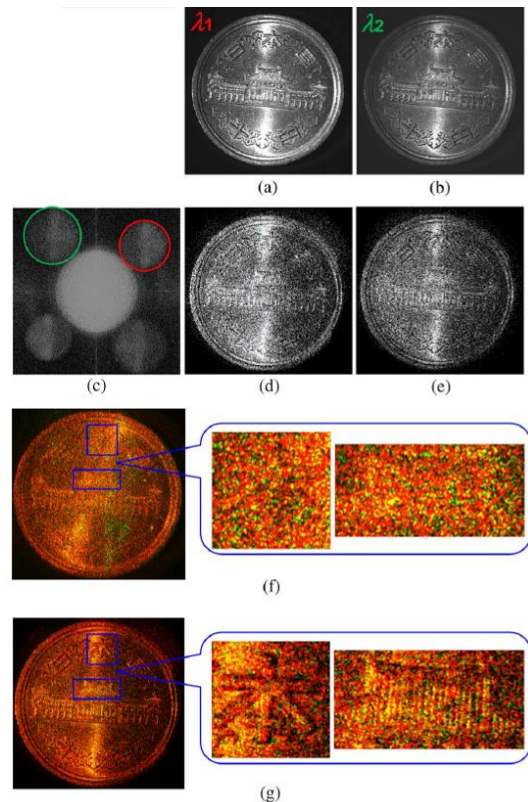


図4. 分解能向上方法の実験結果。波長(a)640nm,(b)532nmにおける写真画像。(c)提案方法により得られたホログラムの空間周波数分布,波長(d)640nm,(e)532nmにおける再生像。(f)従来方法,(g)提案方法によるカラー合焦像と構造の拡大図。

また、波長選択抽出位相シフト法と呼ばれる、2013年に世界で初めて発表された多波長ホログラフィック画像記録法を、課題解決のために継続して研究した。理論的に、先述の分解能向上方法に比べ、面内視野9倍、分解能3倍向上できる限界性能に着目し、実証、記録波長数増大に取り組んだ。まず、記録波長数2として、青色、赤色のOHPフィルムを異なる深さ位置に配置し、カラー3次元物体として設定した。そして、波長選択抽出位相シフト法の実証実験光学系を構築し、波長

多重ホログラムを汎用単板単色撮像素子で記録した。結果として、波長分離能力の実証に成功した。また、変数の数よりも少ない枚数の波長多重ホログラムで連立方程式を解く方法を実証することを目指し、図5に示す光学系に可動式遮光板を配置し実験した。その結果、図6に示す通り、波長選択抽出位相シフト法が、撮像素子の空間情報量全てを多波長ホログラフィック3次元画像記録に使い、カラー3次元イメージング能力を有することを実証した。当該成果は、英国物理学会(IOP)発行 Journal of Optics 誌にて Paper of the Week (2015年11月第2週)と a Highlight of 2015 に選出された (Highlights of 2015: <http://iopscience.iop.org/journal/2040-8986/page/Highlights-of-2015>)。

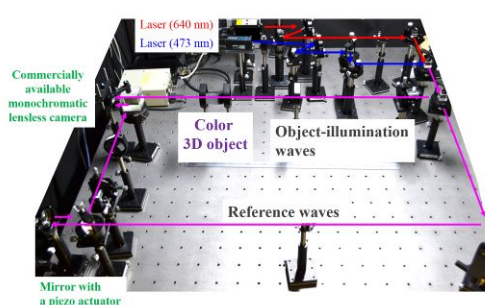


図5. 基礎実験光学系の写真。

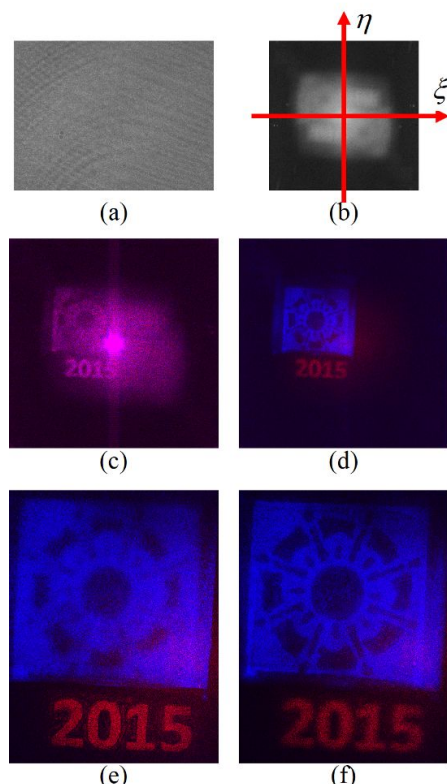


図6. 実証実験結果。(a)記録された4枚の2波長多重ホログラムの中の1枚の画像。(b)(a)の空間周波数画像。(c)(a)から回折積分のみ計算して得られた再生像。(d)波長選択抽出位相シフト法により得られた再生像。(e)赤色OHPシートに合焦の像。(f)青色OHPシートに合焦の像。

また、記録波長数3以上に適用するための計測方式とアルゴリズムを提案し、3波長デジタルホログラフィック顕微鏡システムを開発した。そして、1 $\mu$ mオーダの細胞核を有するマウス腎臓細胞に対し、高分解マルチカラー3次元イメージング能力を実証した。

以上、マルチスペクトル3次元ホログラフィック画像を多重記録する光学システムを開発し、生体の観察可能性を示した。そして、分解能向上のために複数の提案を行ない、いずれの方法においても実証した。また、偏光板を被写体に用いて、偏光イメージングカメラとデジタルホログラフィを用いて偏光情報を取得できることを確認している。そのため現在は、多波長ホログラフィシステムの撮像素子にワイヤグリッド型偏光イメージングカメラを配置した光学システムが完成段階である。今後は、開発した光学システムで3次元形態、吸収・屈折率の波長特性、高分子組成の3次元画像情報を同時記録する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

T. Tahara, T. Kanno, Y. Arai, and T. Ozawa, "Single-shot phase-shifting incoherent digital holography," J. Opt. (IOP Publishing) **19**, p.065705 (2017). <https://doi.org/10.1088/2040-8986/aa6e82> (査読有)

T. Tahara, R. Otani, K. Omae, T. Gotohda, Y. Arai, and Y. Takaki, "Multiwavelength digital holography with wavelength-multiplexed holograms and arbitrary symmetric phase shifts," Opt. Express **25**, pp.11157-11172 (2017). <https://doi.org/10.1364/OE.25.011157> (査読有)

T. Tahara, Y. Arai, "Multiwavelength off-axis digital holography with an angle of more than forty degrees and no beam combiner to generate interference light," Appl. Opt. **56**, pp.F200-F204 (2017). <https://doi.org/10.1364/AO.56.00F200> (査読有)

T. Tahara, R. Mori, Y. Arai, and Y. Takaki, "Four-step phase-shifting digital holography simultaneously sensing dual-wavelength information using a monochromatic image sensor," Journal of Optics (IOP Publishing) **17**, 125707 (10 pages) (2015). <https://doi.org/10.1088/2040-8978/17/12/125707> (査読有)

T. Tahara, R. Mori, S. Kikunaga, Y. Arai, and Y. Takaki, "Dual-wavelength phase-shifting digital holography selectively extracting wavelength information from wavelength-multiplexed holograms," *Optics Letters* **40**, pp.2810-2813 (2015).  
<https://doi.org/10.1364/OL.40.002810> (査読有)

〔学会発表〕(計 15 件)

T. Tahara, R. Otani, K. Omae, Y. Arai, and Y. Takaki, "Three-wavelength phase-shifting interferometry selectively extracting wavelength information from wavelength-multiplexed images with arbitrary symmetric phase shifts," *Proc. SPIE 10251, Biomedical Imaging and Sensing Conference*, 1025111, April 21, 2017. パシフィコ横浜(神奈川県)。

T. Tahara, T. Kanno, Y. Arai, and T. Ozawa, "Incoherent digital holography system utilizing single-shot phase-shifting interferometry," *Proc. SPIE 10251, Biomedical Imaging and Sensing Conference*, 102510F, April 20, 2017. パシフィコ横浜(神奈川県)。

T. Tahara, K. Omae, R. Otani, Y. Arai, and Y. Takaki, "Relationship between the image quality and constant phase shifts in phase-shifting interferometry selectively extracting wavelength information," *JSAP-OSA Joint Symposia 2016*, September 14, 2016. 朱鷺メッセ(新潟県)。

T. Tahara, R. Otani, Y. Arai, and Y. Takaki, "Multiwavelength digital holography based on phase-division multiplexing using arbitrary symmetric phase shifts," *Imaging and Applied Optics 2016 OSA Technical Digest (online) (Optical Society of America, 2016)*, DW5E.2, Germany, July 27, 2016. ドイツ連邦共和国ハイデルベルク市。

田原 樹, 大前 快人, 大谷 礼雄, 新井 泰彦, 高木 康博, "位相分割多重方式に基づくマルチカラーデジタルホログラフィ," 3次元画像コンファレンス 2016, 2-5 (4 pages), 関西大学(大阪府), 2016年7月13日。

T. Tahara, K. Omae, R. Otani, Y. Arai, and Y. Takaki, "Algorithm for removing the limitation of intensity ratio in four-step dual-wavelength digital holography based on phase-division multiplexing," *Biomedical Imaging and Sensing Conference*

2016 (BISC'16), BISCp6-9, May 20, 2016. パシフィコ横浜(神奈川県)。

T. Tahara, R. Otani, R. Mori, Y. Arai, and Y. Takaki, "Multi-wavelength digital holography based on phase-division multiplexing," *International Workshop on Holography and Related Technology 2015 (IWH2015)*, Dec., 2015. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県)。

田原 樹, 新井 泰彦, 高木 康博, "位相分割多重記録に基づく複数波長イメージング," *Optics and Photonics Japan 2015 講演予稿集*, 30aES12, 筑波大学東京キャンパス(東京都), 2015年10月30日。

田原 樹, 大谷 礼雄, 新井 泰彦, 高木 康博, "緩和された条件下で波長情報を位相分割多重記録するデジタルホログラフィ," *Optics and Photonics Japan 2015 講演予稿集*, 28aE2, 筑波大学東京キャンパス(東京都), 2015年10月28日。

T. Tahara, Y. Arai, and Y. Takaki, "Multi-wavelength 3-D imaging based on phase-division multiplexing," *The 5th Korea-Japan Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2015)*, p. 73, Sept. 18, 2015. 大韓民国江陵市。(invited)

T. Tahara, R. Mori, Y. Arai, and Y. Takaki, "Four-step in-line digital holography simultaneously sensing dual-wavelength information using wavelength-multiplexed holograms," *JSAP-OSA Joint Symposia 2015 (4.5 Information Photonics)*, 15p-2F-4, Sept. 15, 2015. 名城大学(愛知県)。

T. Tahara, T. Kaku, and Y. Arai, "Single-shot multispectral digital holographic microscopy," *14th Workshop on Information optics (WIO2015)*, doi:10.1109/WIO.2015.7206921 (3 pages), June 5, 2015. ホテル京都ガーデンパレス(京都府)。(invited)

田原 樹, 森 亮太, 新井 泰彦, 高木 康博, "波長情報を選択的抽出可能な位相シフトデジタルホログラフィの実証," 3次元画像コンファレンス 2015, H-4 (4 pages), 海洋研究開発機構 横浜研究所(神奈川県), 2015年7月9日。

加来徹, 田原 樹, 新井 泰彦, "複数波長デジタルホログラフィック顕微鏡法による4波長同時4.2万fps 3次元動画記録," 3次元画像コンファレンス 2015, H-3 (4

pages), 海洋研究開発機構 横浜研究所(神奈川県), 2015年7月9日.

T. Tahara, T. Kaku, and Y. Arai, "Simultaneous high-speed motion-picture sensing of visible and invisible light with a monochromatic image sensor by using digital holography," Digital Holography and Three-Dimensional Imaging (DH2015), DT3A.6 (3 pages), May 25, 2015. 中華人民共和国上海市.

〔図書〕(計2件)

T. Tahara, R. Otani, Y. Arai and Y. Takaki, Chapter 9, "Multiwavelength Digital Holography and Phase-Shifting Interferometry Selectively Extracting Wavelength Information: Phase-Division Multiplexing (PDM) of Wavelengths," (InTech, 2017) pp.205-223.  
DOI: 10.5772/67295

田原 樹, (分担, 岩堀祐之 監修)「三次元画像センシングの新展開 ~リアルタイム・高精度に向けた要素技術から産業応用まで~」株式会社 エヌ・ティー・エス 出版, 2015年初版, pp.153-158, 第2編 応用技術, 第4章「三次元画像計測技術, 第3節単眼単色市販カメラを用いた単一露光複数波長三次元画像計測システムの開発」.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.itc.kansai-u.ac.jp/~tahara/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田原 樹 (TAHARA, Tatsuki)

関西大学・システム理工学部・助教

研究者番号: 50709095