

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657050

研究課題名(和文) 生体観察のためのホログラフィック4次元顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of Holographic Four-Dimensional Microscopy for Biomedical Diagnostics

研究代表者

佐藤 邦弘 (Sato, Kunihiro)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40167432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：大開口数ホログラムの高速記録法と高分解能画像の高速再生法、およびレンズレス実時間3次元顕微鏡を開発した。また、光学実験を行い、無歪高分解能(1 $\mu$ m以下)な画像、焦点深度の1000倍以上の撮像深度の水中遊泳微生物の画像、および物体光位相分布の正確な記録と再生を示した。反射型レンズレスホログラフィック顕微鏡を開発し、波長掃引レーザ光を用いて3次元断層顕微鏡の原理を確認した。微小球からの反射光と斜め入射照明光を用いたホログラム記録方法を提案した。テストターゲットを用いた実験を行い、大開口数物体光波の記録と再生画像の高分解能化が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：A lens-less holographic microscope has been developed for 4-D measurement of micro organisms swimming in water. Intensity and phase images with a high resolving power and with a large depth are precisely reconstructed for moving objects in air or even in dielectric media. High-resolution microscopic tomography has also been developed for optical measurement of living tissue by using the lens-less reflection-type holographic microscope. Experimental results demonstrate tomographic 3-D imaging with diffraction limited resolution. A new method has been proposed in order to develop a super-resolution lens-less holographic microscopy. Four or more holograms with different incident angles of illuminating light are recorded to generate one hologram with a large value of the numerical aperture (NA). NA of the generated hologram can be enlarged up to a value larger than 1, and a resolution of the microscopy can be improved up to a value higher than one half of the wave length.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 形態・構造

キーワード：顕微鏡技術 デジタルホログラフィ 3次元断層顕微鏡 レンズレス 超高分解能 生体計測 生体細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ホログラフィック顕微鏡として Lyncee Tec 社製の顕微鏡がすでに市販されているが、結像レンズを使用しているために撮像深度は小さく、媒質中物体の観察も困難である。結像レンズを使用しない顕微鏡としてインライン・ホログラフィによる顕微鏡も開発されているが、正確な位相測定は困難であり、被写体も微粒子のようなものに限定される。

(2) 断層画像観察は主に生体画像診断に用いられ、医療技術として大きな役割を担っている。しかし、細胞レベルの病変を診断するには  $1\mu\text{m}$  以下の分解能が要求される。現在まで波長数  $\mu\text{m}$  の近赤外光を用いる OCT(Optical Coherence Tomography)が活発に研究・開発され眼底検査などに用いられているが、面方向の光学的分解能は照明スポット光の直径で決まるので高分解能化は難しく観察可能な深度も制限される。

(3) 通常の光学顕微鏡では、空気中の開口数は 1 以下であり達成可能な分解能は半光波長より低くなる。この限界を超えるものとして照明光が作る干渉縞を利用した SIM(Structured Illumination Microscopy)があるが、非常に高価でその構造や取扱いは複雑である。また、反射型 SIM の開発は原理的に難しい。ところで、ホログラフィック顕微鏡では光波の記録や変調および複数光波の合成が可能であり、光回折の性質を利用すると高分解能化が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 水中遊泳微生物の 4 次元 (空間+時間) 観察を可能にする高分解能レンズレス顕微鏡を開発する。

(2) 反射型レンズレスホログラフィック顕微鏡と波長掃引レーザ光を用いた 3 次元断層撮像の原理を提案し、細胞レベル高分解能断層撮像が可能であることを示す。

(3) 照明光入射角を変えて複数枚のホログラムを記録し、大開口数の物体光波を計算機合成して再生画像の高分解能化を実現する。

3. 研究の方法

(1) 大開口数ホログラムの高速記録法と無歪高分解能画像の高速再生法を新たに開発する。ワンショット記録は、オフアクシス球面波参照光を用いて行う。空間周波数フィルタリングにより複素振幅オフアクシス・ホログラムとして取り出し、空間ヘテロダイン変調して画像再生に必要な複素振幅インライン・ホログラムを求める。

画像再生は、物体光の平面波展開を用いて行う。まず、サンプリング間隔を光波長以下に細分化し、データ補間を行って各サンプリング点における値を求める。ホログラムの分割と分割ホログラムの重ね合わせを行って 1 枚の微小ホログラムを合成し、この合成ホログラムから被写体の 3 次元像を再生する

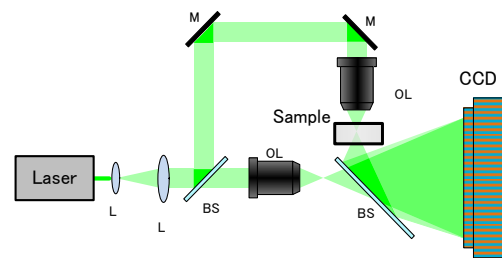
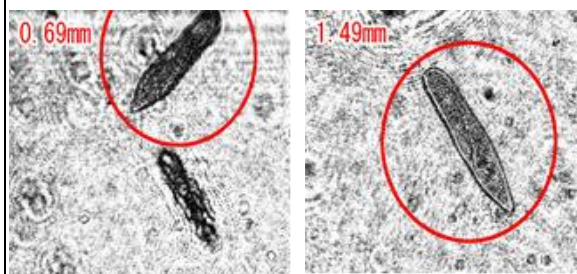


図 1. 透過型ホログラフィック顕微鏡の光学系



(a) (b)  
図 2. 水中遊泳微生物再生画像：ゾウリムシ



図 3. 水中遊泳微生物の位相差画像

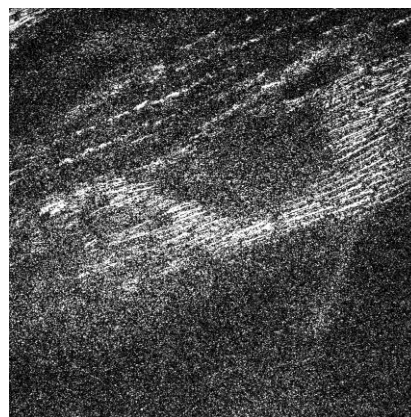
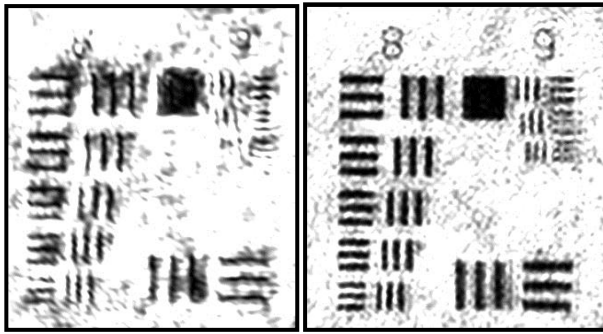


図 4. タマネギ鱗葉の断層画像



(a) ホログラム一枚 (b) 合成ホログラム  
図5. USAFテストターゲットの再生画像

(2) 断層撮像手法を用いて生体組織の断層撮像実験を行う。物体光と照明光をホログラムに同時記録し、レーザー光の波長を変えながらホログラム多数枚を記録する。次に、同時記録したホログラムから照明光と物体光を分離して取り出し、光波長が異なる多数の物体光と照明光を用いて断層画像を生成する。玉ねぎの鱗葉を生体試料として断層撮像の実験を行い、実験結果を示しながらこの断層撮像法の特徴を明らかにする。

(3) 種々の線間隔を持つ回折格子からの回折光を開口数  $NA$  で記録すると、記録可能な波数  $k = 2\pi/d$  の帯域幅は  $4\pi NA/\lambda$  となる。ところが、照射光の入射角  $\theta_i$  を  $-NA < \sin \theta_i < NA$  の範囲で変化させながら複数枚記録すると、波数  $k$  の帯域幅を  $8\pi NA/\lambda$  まで広げることができる。

#### 4. 研究成果

(1) 大開口数ホログラムの高速記録法と高分解能画像の高速再生法、およびレンズレス実時間3次元顕微鏡を開発した。また、光学実験を行い、無歪高分解能( $1\mu\text{m}$ 以下)な画像、焦点深度の1000倍以上の撮像深度の水中遊泳微生物の画像、および物体光位相分布の正確な記録と再生を示した。

実験に用いた透過型ホログラフィック顕微鏡の光学系を図1に示す。レーザー光源として半導体励起固体レーザー(波長532nm、出力50mW)を、撮像装置としてカメラリンク CCDカメラを使用した。

図2(a)と図2(b)はそれぞれ、深さ0.69mmおよび1.49mmの水中を素早く移動中のゾウリムシを1枚の記録ホログラムから再生した画像である。この画像の分解能は $1\mu\text{m}$ 以下、焦点深度 $1.5\mu\text{m}$ 、撮像深度約2mmであり、撮像深度は焦点深度の1000倍以上の値になった。この結果より、素早く移動する微生物の低エネルギー照射・水中・大深度・4次元・高速撮像が可能であることが分かる。図3は、光位相差から求めた水深1.49mmのゾウリムシの画像を示す。光位相差分の計算により、通常の顕微鏡では困難な透明生体細胞の4次

元(空間+時間)観察が可能になる。また、細胞の屈折率が分かれば光位相差よりその厚さを求めることもできる。

(2) 反射型レンズレスホログラフィック顕微鏡を開発し、波長掃引レーザー光を用いた実験を行って3次元断層顕微鏡の原理を確認した。深度の大きい細胞レベル高分解能断層画像の撮像が可能であることを示し、断層画像の分解能および断層の厚さとして理論値と一致する値を得た。また、玉ねぎの鱗葉を試料にして実験を行い、細胞レベルで表皮組織の観察が可能な高分解能断層画像を得た。

図4は、奥行き $10\mu\text{m}$ 間隔で作成した断層画像を示す。タマネギ鱗葉の細胞壁によって照明光が反射されるので細胞壁の部分は白くなり、断層内にある細胞壁を画像として観察できる。CCDから距離 $40.39\text{mm}$ の付近では幅 $15\mu\text{m}$ 程度の小さい表皮細胞を確認でき、それから奥に向かって進むと幅 $50\mu\text{m}$ 程度の大きな内部細胞を確認できる。これらの断層画像から半透明な生体組織の内部構造を求めることができ、断層画像データを集積すると生体組織内部の体積画像データを得ることができる。

(3) ホログラフィック顕微鏡の超高分解能化を目的として、微小球からの反射光と斜め入射照明光を用いたホログラム記録方法を提案した。この方法により、開口数が1を超える物体光記録が可能になり、透過型に限らず反射型の顕微鏡に対してもその分解能を光回折限界の2倍まで高めることができる。テストターゲットを用いた実験を行い、大開口数物体光波の記録と再生画像の超高分解能化が可能であることを示した。

図5(a)は一枚のホログラムから再生した画像を示すが、ノイズによる画質の低下を確認できる。これらのノイズは、滑らかな金球を用いることによって取り除くことができる。被写体を透過した照明光  $Q$  は一点に集光するのに対して、被写体によって散乱された光は点の周りに広く分布する。この集光を利用して物体光  $O$  から光  $Q$  を分離して取り出し、 $O$  と  $Q$  を用いて開口数の大きい物体光  $O'$  を求めた。図5(a)は、 $O'$  から求めた画像を示す。1枚のホログラムの  $NA=0.28$  から求まる分解能が  $0.95\mu\text{m}$  となるのに対して、図5(b)では線間隔  $0.78\mu\text{m}$  の最小部分を見分けることができ、物体光の合成による分解能化を確認できる。また、図5(a)に示す再生画像と比較して画質が大きく改善されている。

#### 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 6件)

[1] "Instantaneous shape measurement of moving surface with high accuracy by one-shot digital holography"

K. Sato, Y. Iwayama  
Proc. of SPIE, **8281**, pp.0K1-0K6(2012)  
[2]“Real-time recording and reconstruction of moving 3D images using electronic holography”  
K. Furuichi, K. Sato  
Proc. of SPIE(reviewed),**8281**, pp.0L1-0L6(2012)  
[3]“Lensless holographic microscopy with high-resolving power for 4D measurement of micro-organism swimming in water”  
M. Otani, K. Sato  
Proc. of SPIE,**8227**, pp.2901-2906(2012)  
[4]“Numerical Reconstruction of Hi-Resolution Microscopic Images for Lens-Less Holographic Microscopy”  
K. Sato  
International Journal of Intelligent Computing in Medical Sciences and Image Processing, **4**, pp.77-86(2012)  
[5]“Lens-less holographic microscope with highresolving powerandno-distortion”  
K. Sato and O. Murata  
Proc. of SPIE, **7904**, pp.011-018(2011)  
[6]“Instantaneous measurement of surface shape with high accuracy by one-shot digital holography”  
Y. Iwayama and K. Sato  
Proc. of SPIE, **7904**, pp.081-088(2011)

〔学会発表〕(計 9件)

[1]「生体光計測のためのレンズレスホログラフィック顕微鏡」  
佐藤邦弘  
電気四学会関西支部専門講習会(招待講演)  
2014年1月24日 大阪中央電気ぐらく部  
[2]「ホログラフィによる生体計測用高分解能3次元断層顕微鏡を用いた生体細胞の観察」  
横山潤平、大谷真由、佐藤邦弘  
日本光学会年次講演会 2013年11月14日 奈良公会堂  
[3]「レンズレスホログラフィック顕微鏡の多方向照明による超高分解能化」  
横山潤平、大谷真由、佐藤邦弘  
日本光学会年次講演会 2013年11月13日 奈良公会堂  
[4]“Real-time recording and real-time display of moving 3-D images by electronic holography”  
K. Kawachi, K. Furuichi, K. Sato  
The 3ed International Symposium on Himeji Initiative in Computational Medical and Health Technology 26, July (2013)  
[5]“High-resolution Lens-less Holographic Microscopy for 4-D Measurement of Transparent Microorganism Swimming in Water”  
J. Yokoyama, M. Otani, K. Sato  
The 3ed International Symposium on Himeji Initiative in Computational Medical and Health Technology 26, July (2013)  
[6]「ワンショットデジタルホログラフィによる高速運動物体のための高精度形状計測」  
佐藤邦弘、岩山義秀

日本光学会 2012年10月25日 タワーホール船越  
[7]「生体計測用の細胞レベル高分解能3次元断層顕微鏡の開発」  
古市和稔、佐藤邦弘  
日本光学会 2012年10月25日 タワーホール船越  
[8]“Holographic microscope by one-shot digital holography”  
M. Otani and K.Sato  
OSA Optics & Photonics Congress(reviewed), ISBN978-1-55752-912-1, DTuC23(2011)  
[9]「室内照明下における運動物体3次元像の実時間撮像と実時間表示」  
古市和稔、佐藤邦弘  
3次元画像コンファレンス2011講演論文集(査読有), pp.9-12 (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3件)  
[1]名称:ホログラフィック顕微鏡、高分解能画像用のホログラフィックデータ取得方法、および高分解能ホログラフィック画像再生法  
発明者:佐藤邦弘  
権利者:兵庫県  
種類:特許  
番号:特願2013-223761  
出願年月日:25年10月28日  
国内外の別:国内  
[2]名称:ホログラフィック断層顕微鏡、ホログラフィック断層画像生成法、およびホログラフィック断層画像用のデータ取得方法  
発明者:佐藤邦弘  
権利者:兵庫県  
種類:特許  
番号:PCT/JP2013/077059  
出願年月日:25年10月4日  
国内外の別:米国、欧州  
[3]名称:ホログラフィック断層顕微鏡、ホログラフィック断層画像生成法、およびホログラフィック断層画像用のデータ取得方法  
発明者:佐藤邦弘  
権利者:兵庫県  
種類:特許  
番号:特願2012-223690  
出願年月日:24年10月5日  
国内外の別:国内

○取得状況(計 1件)

[1]名称:GENERATION METHOD FOR COMPLEX AMPLITUDE IN-LINE HOLOGRAM AND IMAGE RECORDING DEVICE USING SAID SAID METHOD  
発明者:Kunihiro Sato  
権利者:Hyogo Prefectural Government  
種類:United States Patent  
番号:US 8,416,669 B2  
取得年月日:Apr. 9, 2013  
国内外の別:国外(米国)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 邦弘 (SATO KUNIHIRO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40167432

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし