

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760038

研究課題名(和文) 3次元光位相計測システムの構築と細胞検査への応用

研究課題名(英文) Three dimensional quantitative phase measurement system and its application to cytodiagnostics

研究代表者

渡邊 恵理子 (Watanabe, Eriko)

電気通信大学・情報理工学研究所・准教授

研究者番号：20424765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、厚みのある細胞や液中浮遊細胞の定量位相計測に向けて、3次元位相計測システムを構築した。はじめに精度低下の要因の一つである位相アンラッピング処理を必要としないスキャン型定量位相顕微計測システムを構築した。次に球面参照波を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡における、最適な設計手法、オートフォーカス手法を提案し、確立した。これにより広視野・高精度な定量位相顕微計測に加え、垂直方向において異なる位置で浮遊しているような細胞に対しても、精確な位置特定が可能となった。これらの定量位相計測システムを用いて、細胞の機能と形態の相関性を実験により解析した結果、細胞検査への有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this work, we developed two types of quantitative phase microscopes. One is a scan-type phase measurement system that does not require an phase unwrapping process. The other is the Digital Holographic Microscope (DHM), using a spherical reference beam that can measure wide field phase distribution. The scan-type phase measurement system is based on the Mach-Zehnder interferometer, which uses a phase-locking technique. In our preliminary experiments, cancer cells were distinguished from normal cells through comparison of differences in optical path length. The DHM system, which allows for high-precision quantitative phase measurements of large areas, facilitates improvements in terms of the diffraction calculation. With this system, we proposed a novel autofocusing technique that exploits the intensity distribution of the transparent phase object. We successfully obtained high-resolution large-area images of sheets of the cells.

研究分野：光情報処理

キーワード：ホログラフィ 光計測 定量位相顕微鏡 細胞検査

1. 研究開始当初の背景

近年、自己細胞などを培養して治療に用いる再生医療が医療機関にて提供され始めている。安定してリスクのない細胞を提供するためには、非侵襲・非接触での細胞検査が求められる。このような背景から非侵襲・非染色・非接触で細胞の厚みや屈折率を計測が可能である定量位相顕微鏡の研究が活発に行われている。しかし従来の干渉光学系による定量位相計測法では光路長変化量が λ を超える場合は位相接続処理が必要であり、 2λ を超えるような厚みのある細胞においての高精度顕微鏡定量位相計測は困難であった。また液中内を浮遊しているような細胞の定量位相計測も、光学系内の様々な誤差を差し引いた上で、3次元位相分布を正確に取得する必要があるため、課題となっていた。加えて干渉系では装置が複雑で大型化するなどの実用化に向けた課題もあった。

2. 研究の目的

本研究では厚みのある細胞や液中内の浮遊細胞における定量位相計測を実現可能な、3次元位相計測システムを研究開発する。はじめにスキャン型とデジタルホログラフィック顕微鏡の2つの手法において、3次元位相計測システムの最適設計方法を確立する。さらに液体内において浮遊している細胞の位置特定方法を位相物体のオートフォーカス手法と組み合わせで提案する。次に提案位相計測システムを用いて細胞の定量位相情報を収集し、そのデータから細胞の機能と形態の相関性を解析する。この特徴量を用いて、細胞検査への応用を検討する。

3. 研究の方法

通常の干渉計測では、干渉縞強度分布を利用して位相量を算出するため、位相接続処理が必要である。しかし急な位相勾配もつサンプルにおいては、位相接続エラーが起こり計測精度低下を招く。そこで受光強度が最小になるように常にフィードバック制御を施し、ピエゾ素子への印加電圧を取得することでサンプルの定量位相量を測定するスキャン型位相計測システムを構築した。これにより数 λ に及ぶ厚みのある細胞に対しても、位相接続を行わずに、定量位相を高ダイナミックレンジで計測可能である。

さらにこの定量位相計測システムを用いた細胞検査応用として、厚みのある重層細胞を対象とした再生医療の継代限界推定やがん細胞識別などの基礎実験を行った。

次に、広視野計測に向けてデジタルホログラフィック顕微鏡において、球面参照波を用いたインライン型の光学系を提案した。物体光と参照光を撮像面で干渉させ、撮像素子でその干渉縞を記録し、位相シフト法を用いることで1次光のみを再生する。このとき球面参照波を用いることで、最終的にはレンズレスの簡易な光学系を目標とした。撮像面での物体光は物体面での複素振幅の回折計算を行うが、サンプリング定理などを満たす条件を

計算上と光学系上で設計し、計算の高速化と再生像の精度向上を目指した。

また、物体はある一定の大きさを持つので、光軸中心からずれた位置から伝搬する物体光によりぼけが生じる。そのため、撮像面の光軸中心からの各位置における位相差を算出し、補正する必要がある。

4. 研究成果

スキャン型位相計測システムにおいては、スキャンエラー補正と校正デバイスによるキャリブレーションなどを導入し、高精度かつ高ダイナミックレンジ測定が可能で非侵襲・非染色定量位相計測システムを実現した。これにより従来の位相接続処理を必要とする定量位相計測技術では計測が困難な 3λ を超える光路長変化量を持つ積層培養細胞を計測できることを示した。さらに細胞検査への応用として、正常細胞とがん細胞の識別が可能であることを示した。

次に球面参照波を用いたデジタルホログラフィック光学系における設計手法を、サンプリング間隔や、回折面における再生距離などの条件を最適化し確立した。この基本設計法に沿って、分解能が 851 nm、計測範囲が 1.74 mm × 1.74 mm、となるようにホログラフィック顕微鏡を設計した。実験によりカットオフ周波数は 575 line pair / mm、空間分解能が 870 nm となり、理論分解能に近い値を得た。この球面参照波を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡では、レンズレスでの顕微計測が可能であるため、非常に簡易な光学系での実装が可能となる。

さらにこの試作したホログラフィック顕微鏡において、細胞シートを計測し、ある条件においての異常細胞と正常細胞を分離できる可能性を得た。

さらに、再生像に対する細胞の正確な位置の特定として、オートフォーカス手法を提案した。これは透明位相物体における強度分布の変化が微小であることに着目した新たなフォーカス関数 DMIHL (Difference between the mean intensity in the high and low regions in the intensity histogram) を定義し、最適な結像距離を算出するオートフォーカス手法である。強度分布のヒストグラムの上位と下位領域の平均強度の差を算出し、その最小値から焦点距離を推定可能である。

このオートフォーカス方法により、広視野分布計測における課題となる局所的な焦点距離の変動(ぼけ)の補正サンプル設置位置のエラーなどが補正可能であることを確認した。さらに垂直方向において異なる位置で浮遊しているような細胞に対してもオートフォーカスにより位置を特定し、定量位相計測を行うことが可能となった。

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2件)

- 1) E. Watanabe, K. Hoshino, and S. Takeuchi” Portable digital holographic microscope using a spherical reference beam”, Opt. Rev. , **22**, 342(2015)
- 2) E. Watanabe, T. Hoshiba, B. Javidi, “High-precision microscopic phase imaging without phase unwrapping for cancer cell identification,” Opt. Lett., **38**, 8, 1319-1321 (2013).

〔学会発表〕(計18件)

1. E. Watanabe, “High-precision microscopic phase imaging without phase unwrapping for cellular function evaluation,” Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display 2014, 9117-52 (Baltimore Convention Center, U.S.A., 2014) 招待講演.
2. K. Hoshino and E. Watanabe, “High-resolution and wide-field phase imaging through lensless digital holographic microscopy,” in Imaging and Applied Optics 2014, OSA (Optical Society of America) Technical Digest (online), DM3B.6 (Sheraton Seattle Hotel, 2014).
3. K. Hoshino, and E. Watanabe, “High-resolution phase measurement by phase-shifting lensless digital holographic microscopy,” International Workshop on Holography and related technologies 2013 (IWH2013) Digests, 16P-9, (Kitami institute of technology, Japan, 2013).
4. E. Watanabe,” High-precision microscopic phase imaging without phase unwrapping”, 12th Workshop on Information Optics (WIO'2013) (Hotel Beatriz Atlantis, Spain, 2013) 招待講演.
5. E. Watanabe, Y. Abe, and T. Hoshiba, “Two-dimensional phase measurement system based on closed loop feed-back control for identification biological cells,” Conference on Laser Surgery and Medicine 2012 (CLSM 2012) (Pacifico Yokohama, Japan, 2012).

6. Y. Abe, K. Hiramatsu, and E. Watanabe, “High accuracy phase measurement system for identifying cancer cells,” International Workshop on Holography and related technologies 2012 (IWH2012) Digests, 12B4 (National Central University, Taiwan, 2012).
7. E. Watanabe, Y. Abe, T. Hoshiba, “Two dimensional phase measurement system for biomedical applications,” Triangle Symposium on Advanced ICT 2012 (TriSAI 2012) (The University of Electro-Communications, Japan, 2012).
8. 渡邊恵理子, 原菜摘, 池田佳奈美, 阿部耶依, 香取良祐, 林竜平, 西田幸二 “重層上皮細胞イメージングに向けた位相計測システム,” 第20回画像センシングシンポジウム(SSII 2014), パシフィコ横浜(2014).
9. 星野和博, 渡邊恵理子, “位相シフト型レンズレスデジタルホログラフィック顕微鏡の高分解能化,”第19回画像センシングシンポジウム(SSII2013)ダイジェスト集, IS1-13, 2013.
10. 渡邊恵理子, 阿部耶依, 水野潤, 小館香椎子, “位相アンラッピングを必要としない高ダイナミックレンジ位相顕微鏡と応用,” 第二回ホログラフィック・ディスプレイ研究会, 33, 2, 16-20, (2013)
11. 阿部耶依, 平松敬太, 渡邊恵理子, “高精度位相計測システムによるがん細胞識別,” 画像センシング技術研究会第18回画像センシングシンポジウムダイジェスト集 (SSII 2012), IS1-14, (2012).
12. 阿部耶依,渡邊恵理子, “フィードバック制御位相計測システムによるがん細胞識別,” 電子情報通信学会 電子部品・材料研究会 (CPM), (2012).
13. 小池綾, 池田佳奈美, 渡邊恵理子, ”細胞検査に向けた偏光顕微計測,” 情報フォトニクス研究会第8回関東学生研究論文講演会講演予稿集, O1-1 (2014).
14. 星野和博, 渡邊恵理子, “位相シフト型レンズレスデジタルホログラフィック顕

微鏡におけるオートフォーカシングの検討,” 第 14 回情報フォトンクス研究グループ研究会(秋合宿)講演用予稿集, 58 (2013).

15. 星野和博, 渡邊恵理子, “位相シフト型レンズレスデジタルホログラフィック顕微鏡における高分解能位相計測,” 2013 年<第 74 回>応用物理学会秋季学術講演会[講演予稿集], 19P-C13-11 (2013).
16. 星野和博, 渡邊恵理子, “位相シフト型レンズレスデジタルホログラフィック顕微鏡における広範囲位相計測,” 第 7 回新画像システム・情報フォトンクス研究討論会講演予稿集, 60-61 (2013).
17. 星野和博, 渡邊恵理子, “位相シフト型レンズレスデジタルホログラフィック顕微鏡における位相分解能の高精度化,” 講演論文集電子情報通信学会東京支部学生会研究発表会第 18 回, 148 (2013).
18. 阿部耶依, 干場隆志, 渡邊恵理子, “高精度位相計測によるがん細胞識別システム,” 日本光学会年次学術講演会, 24aD2 (2012).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 光学測定装置

発明者: 渡邊恵理子, 岡本勝就, 水野潤, 星野和博, 池田佳奈美

権利者: 国立大学法人電気通信大学

種類: 特許

番号: 2015-004055

出願年月日: 2015/1/13

国内外の別: 特願 2015-4055.

名称: 細胞識別装置及び細胞識別方法, 並びに, 細胞識別方法のプログラム及びそのプログラムを記録した記録媒体

発明者: 渡邊 恵理子 遠島 未希

権利者: 国立大学法人 電気通信大学

種類: 特許

番号: 2012-163980

出願年月日: 2012/7/24

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 恵理子 (Eriko Watanabe)

電気通信大学・情報理工学研究科・准教授

研究者番号: 20424765