

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420400

研究課題名(和文) 微生物の三次元行動解析に適合する計測空間拡張デジタルホログラフィック顕微鏡

研究課題名(英文) Wide field digital holographic microscopy for microscopic organism behavior analysis

研究代表者

吉川 宣一 (YOSHIKAWA, Nobukazu)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：00282335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：微小生物の行動解析のための広範囲の計測を可能とするデジタルホログラフィ計測システムを開発した。提案システムは複数のカメラを用いた合成開口法により広範囲の三次元空間の計測を行うことができる。提案法に適した干渉縞の合成と再生アルゴリズムを開発し、従来方式では困難であった移動物体への対応を行った。点光源を用いたカメラ位置推定法および実時間記録のための連続的な位相シフト量変化による一般化位相シフト法を提案した。提案システムにより移動物体の実時間計測を行った。

研究成果の概要(英文)：We develop a wide field digital holographic microscopy for microscopic organism behavior analysis. The proposed system can measure the motion of the object widely in the three-dimensional space by the synthetic aperture method with multiple digital cameras. Fringe synthesis and reconstruction algorithm for the interference fringes captured by the different cameras are presented to evaluate moving objects. We propose a camera position estimation method using a point source and a generalized phase-shifting method with a continuous fringe-scanning scheme for real time measurement. The behavior of the moving object is observed by the proposed system.

研究分野：応用光学

キーワード：光計測 デジタルホログラフィ 計測空間拡張

## 1. 研究開始当初の背景

生体は分子、細胞、組織、臓器のような階層性をもち、それらを統合した個体という生体システムで機能している。生体の全階層における構造と機能の相互関係の解明のために、それらを包括的に統合する個体レベルでの生体システムの解析があらためて注目されるようになってきた。

個体レベルの計測には一般に顕微鏡が用いられる。顕微鏡ではスライドガラス上に試料を固定して焦点を合わせて観察する。そのため広範囲の測定のためには試料を結像位置に移動させる必要がある。また、動きのある微小物体を固定すると動作範囲を制限してしまうことになる。微小生物の自由な運動解析を目的とする場合、従来の顕微鏡技術のみでは広範囲の三次元的な行動を調べることは難しいと考えられる。したがって、広い空間を動く物体を観察するためには、微小構造を観察する基本性能を維持したまま計測領域を拡大する新しい顕微鏡手法が必要となる。

デジタルホログラフィ(DH)は物体光のデジタル記録と数値計算によるデジタル再生の二段階のステップで行うイメージング技術であり、三次元的な情報を記録することができる。DHを顕微鏡技術に応用したものはデジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)と呼ばれている。DHは、デジタル撮像素子、コンピュータ、ソフトウェアの融合により柔軟かつ高精度な計測技術として発展している。一般に使用できる撮像素子の画素の大きさは $3\sim 5\mu\text{m}$ であり、撮像素子全体の大きさは十数mmである。DHで実際に記録できる干渉縞の大きさは撮像素子の面積となる。これは従来の写真技術によるホログラフィに比べてかなり小さい。デジタル再生ではFFTを利用したフレネル回折計算が用いられている。再生方式はフレネル近似方式と畳み込み積分方式に分類される。前者は再生画素間隔が再生距離に反比例するため再生距離が長いとき広範囲の像再生が可能であるが分解能は低い。後者はRayleigh-Sommerfeld回折積分に基づいた正確な再生が可能であり、再生画素間隔は撮像素子の画素間隔と同じである。しかし、広範囲の領域を再生する目的には適していない。

DHの再生領域を拡大する手法として合成開口法がある。合成開口法は異なる位置から撮影された複数の干渉縞から一つの広面積の干渉縞を合成する方法である。複数の干渉縞の記録は移動ステージ上に固定したカメラを平行移動させて広範囲に分布する干渉縞を逐次記録する手法が用いられている。このとき隣り合った干渉縞は少しだけ重なる部分を作っておく。複数の干渉縞は重なり部分に基づいて一枚の干渉縞に合成される。合成された干渉縞から広範囲の領域の光波分布を高分解能で再生することができる。しかし、異なる時間での干渉縞記録になるため静

止物体を対象にすることが一般的であり、移動物体の計測には適していない。

## 2. 研究の目的

本研究では、微小生物の行動解析のための広範囲の計測を可能とするDHM計測システムを開発する。提案システムでは、複数のカメラを用いた合成開口法に基づいて広面積の干渉縞をつくり、これを再生することにより広範囲の三次元空間の物体光分布を求めることができる。提案法に適した干渉縞の合成と再生アルゴリズムを開発し、従来方式では困難であった移動物体への対応を行う。点光源を用いたカメラ位置推定法および計測時間の短縮と実時間記録のための連続的な位相シフト量変化による一般化位相シフト法を提案する。提案システムにより移動物体の実時間計測を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 合成開口方式のための点光源を用いたカメラ位置推定の開発

広範囲の三次元空間の光波分布を計測するために、複数のカメラを用いた合成開口法を検討する。複数のカメラを用いる場合において重要となるのはカメラの位置関係を正確に設定することである。しかし、厳密に位置設定を行うことは難しい。そこで本研究では外部に置かれた点光源を基準とするカメラ位置推定法を提案する。この方法では点光源と参照平行光を用いてつくられる同心円干渉縞を用いる。この干渉縞自体が点光源の位置情報を含んでいる。非線形最小二乗法を用いてカメラからの点光源位置を精密に求めカメラ位置推定に用いる。シミュレーションと光学実験により有効性を確認する。

(2) 連続的な位相シフト量変化を用いる一般化位相シフト法の開発

DHの再生像から不要な0次光と共役光成分を除去し必要な情報を含む物体光成分のみを抽出するために位相シフト法がよく用いられる。しかし、一般的な位相シフト法では位相シフト量 $\pi/2$ で制御された3枚の位相シフト干渉縞が必要であり、比較的長い計測時間が必要になる。本研究では連続的な位相シフト量変化を用いる一般化位相シフト法を開発し、連続的な記録再生が行えるようにする。また、連続記録された多数の干渉縞から物体光を推定する最小二乗推定アルゴリズムを提案する。

(3) 合成開口 DH 計測システムによる計測領域の拡張

複数のカメラを用いた DH 計測システムを構築する。カメラ位置推定に基づいた合成開口法による干渉縞の合成と数値再生を行う。本研究では再生法として角スペクトル法を用いる。実際にシステムを構築するとき、カメラ筐体が撮像素子自体よりも大きく複数台を並べて配置することが困難であることが明らかになった。そこで移動ステージを用

いて擬似的に撮像素子のみを並べて配置する方式で原理確認を行う。また、凹レンズによる光波の拡大を利用して複数のカメラを配置する方式とビームスプリッタ (BS) で光波を分割する方式を検討する。移動物体の連続計測を行いその有効性を確認する。

#### 4. 研究成果

(1) 複数のカメラで撮影された画像を統合するため各カメラの位置関係を正確に把握することは重要である。本研究ではカメラの前方に置かれた点光源を基準として用いるカメラ位置推定法を提案する。

図1に実験システムを示す。まずレーザーから出た光を平行光に変換してBSで物体光と参照光に分割する。参照光はさらに分割され、一方はホログラム記録のための参照光となり、他方はカメラ位置推定に用いる点光源になる。本研究では対物レンズを用いて点光源をつくっている。ホログラム記録時は各光路に設置したシャッターを切り替えて点光源記録と物体光記録を行う。

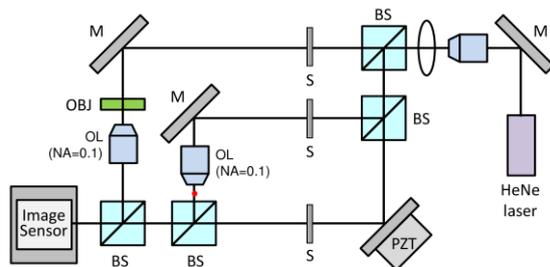


図1 実験システム

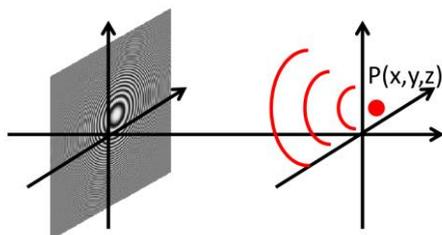


図2 点光源と同心円干渉縞

カメラ位置推定では、参照光側の干渉計を使う。まず点光源と平行光の干渉縞を記録する。この干渉縞は同心円形状をもっており、点光源の位置情報を含んでいる(図2)。この干渉縞を数値再生すると点光源の再生像が得られる。点光源再生像の座標(X, Y, Z)はカメラからの点光源の相対的な位置を表している。同様にして別のカメラから点光源再生像の位置を求める。複数の点光源を用いることによりカメラ間の相対的な位置関係を知ることができる。

点光源の場合、ホログラム面における物体光(球面波)を逆伝搬計算し、再生像の面積が最小かつ強度が最大となる位置を点光源の位置とみなすことができる。しかし、DHでは再生像のフォーカス位置を正確に求めるこ

とは難しい問題である。XY平面では画素が最小の面積であり、Z方向の再生強度は数十 $\mu\text{m}$ の範囲で同じような値を取るため点光源再生像の位置には曖昧さを伴う。

そこで本研究では点光源から発した球面波をホログラム面で評価し最適化手法を用いて点光源位置を高精度に推定する手法を提案する。点光源が位置 $(x_0, y_0, z_0)$ にある球面波は $P(x, y, z) = \exp(ikr + \theta_0)$ ,  $r = \{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2 + z_0^2\}^{1/2}$ のように表すことができる。ここで $\theta_0$ は初期位相、 $k$ は波数、振幅は簡単化のため一定としている。実験で得られた点光源のホログラムからホログラム面における光波分布すなわち球面波 $O(x, y, z)$ を抽出する。 $O$ と一致する球面波 $P$ を数値的に求めることにより点光源の位置を推定することができる。具体的には $O$ と $P$ の位相差を用いて最適化手法により誤差が最小になる座標と初期位相を求める。しかし、この方法ではz方向の位置変化に伴いピストン位相項が変化してしまうため初期位相の推定が困難になり十分に最適化を行うことができない。そこで反復処理を行うたびに初期位相を近似的に推定し、 $O$ と $P$ の位相差から初期位相を除いた評価関数を用いて最適化を行う。

基本アルゴリズムを以下に示す。

- ① おおよその点光源位置 $(x_0, y_0, z_0)$ を従来手法により求め、球面波 $P$ を数値的につくる。
- ② 同心円干渉縞から光波 $O$ を抽出する。ここでは同心円干渉縞が半径方向にキャリア成分を持っていることを利用して1枚の干渉縞から物体光を抽出するラジアルキャリアDH(RCDH)の手法を用いる。
- ③  $O$ と $P$ の位相差を求め、最大頻度の位相差 $\varphi_0$ を初期位相の近似値(バイアス位相)とする。
- ④  $O$ の位相分布から $P$ の位相分布およびバイアス位相を引いた位相分布の分散値を評価関数とする。
- ⑤ 非線形最小二乗法により分散値が最小となる点光源の座標を求める。この座標が点光源の推定座標となる。

提案手法の有効性を確認するためシミュレーションを行った。撮像素子の中央部を原点とし、点光源は位置 $(324.383\mu\text{m}, 262.347\mu\text{m}, 163.927\text{mm})$ に置き、初期位相 $0[\text{rad}]$ と仮定した。図3に同心円干渉縞と推定球面波の位相分布を示す。推定された点光源位置と初期位相は $(324.38\mu\text{m}, 262.35\mu\text{m}, 163.927\text{mm})$ および $4.5 \times 10^{-5}[\text{rad}]$ であった。異なる初期位相の場合でも全ての座標軸に対して波長以下の精度で点光源位置が推定された。点光源をカメラ前方の視野外にオフセットさせた条件では、線形位相項によるキャリア成分を考慮した点光源の初期位置推定を行った。シミュレーションではオフセットの場合でも波長以下の精度で点光源位置を推定できることが分かった。

干渉縞にノイズを付加したとき推定誤差に数波長程度の増加がみられた。オフセット

量が増加すると、同心円構造が消滅した等間隔干渉縞になり、点光源位置の推定ができなくなった。提案手法は同心円干渉縞の構造が保持されている範囲で適用できることおよび撮像素子の間隔を狭くするような配置を取る必要があることが明らかになった。

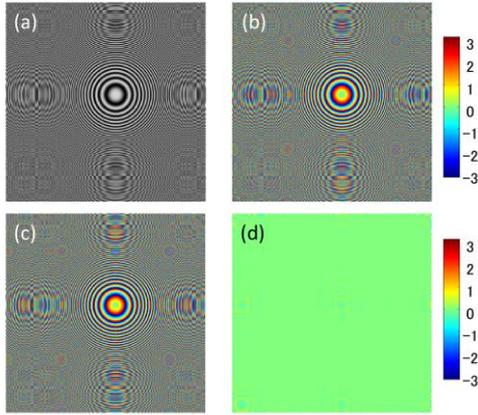


図3 (a)同心円干渉縞, (b)RCDHで抽出された(a)の位相分布, (c)提案手法で推定された球面波の位相分布, (d)位相誤差。

光学実験で提案手法を検証した。点光源はピエゾステージ上に設置された4倍対物レンズ(NA=0.1)に平行光を入射したときの焦点を用いた。1024×1024画素、画素ピッチ6.45μmのCCDカメラを用いて干渉縞を記録した。図4に実験結果を示す。点光源は位置(68.0μm, 189.7μm, 145.6mm)、初期位相1.35[rad]と推定された。図5に点光源をx軸およびz軸方向に5μmずつ平行移動させたときの点光源位置の推定結果を示す。平均移動量は、x軸およびz軸方向に対してそれぞれ5.2μm, 5.1μmであった。推定誤差は1波長以下であった。また移動軸以外の方向にサブμmオーダーの微小な線形移動も測定された。カメラ姿勢と点光源の移動方向にわずかなずれが存在していると考えられる。このようなずれを考慮すればさらに高精度な位置補正が期待できる。

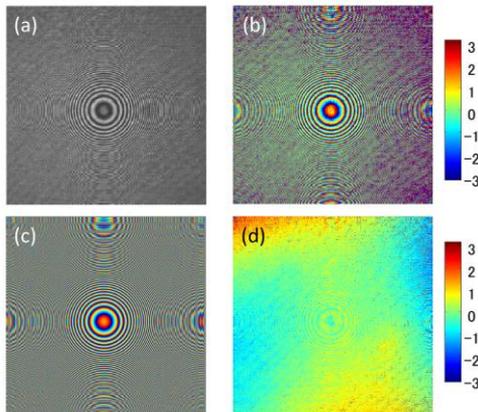


図4 (a)同心円干渉縞, (b)RCDHで抽出された(a)の位相分布, (c)提案手法で推定された球面波の位相分布, (d)位相誤差。

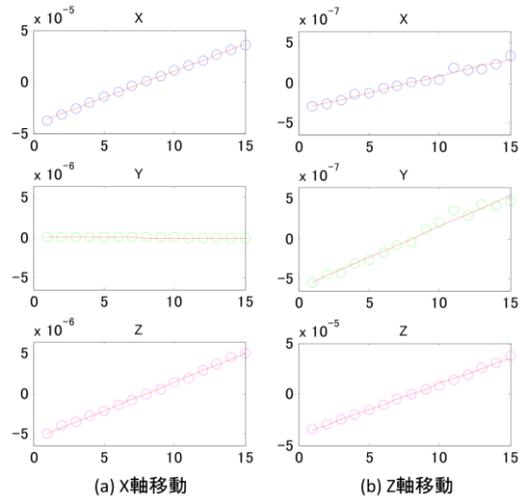


図5 点光源を(a)x軸, (b)z軸方向に平行移動させたときの位置変化

(2) 連続位相シフト量変化を用いる統計手法に基づいた一般化位相シフト法を提案する。連続的な位相シフト量変化は連続フリンジスキャンによるノンストップ計測により実現する。統計手法は任意の位相シフト量に対応しているため、精密な位相シフト量制御なしで高速に連続記録されたホログラムを用いることができる。

基本手順は以下のようになる。インラインDH光学系において、物体光を $O = |O| \exp\{j\theta\}$ 、参照光を $R = |R| \exp\{j\phi\}$ 、 $i = 0, 1, 2$ とする。 $\phi$ は*i*番目の位相シフト量である。連続フリンジスキャンでは位相シフト量は露光時間 $\Delta_i$ で積分された値となる。統計手法では3枚の位相シフト干渉縞から位相シフト量を推定する。*p*番目と*q*番目の連続するフレーム間の位相シフト量は $\Delta\phi_{pq} = \hat{c}_{pq} \arccos(1 - \kappa_0 E_{pq})$ で得られる。ここで $\kappa = (4|R|^2 \langle |A|^2 \rangle)^{-1}$ 、 $E_{pq} = \langle |\Delta I_{pq}|^2 \rangle$ 、 $\Delta I_{pq}$ はホログラムの強度差、 $\langle \rangle$ はフレーム全体の平均値を求める演算子、係数 $\hat{c}_{pq}$ は符号係数である。位相シフト範囲は $[0, 2\pi]$ となるため、位相シフト量と露光時間の同期制御を行わなくても問題は発生しない。ホログラム面における物体光は $O = (e^{j\phi_0} / |R| \Delta) \{ (1 - e^{-j\Delta\phi_{20}}) \Delta I_{01} + (1 - e^{j\Delta\phi_{01}}) \Delta I_{20} \}$ 、 $\Delta = -2j(\sin \Delta\phi_{01} + \sin \Delta\phi_{02} + \sin \Delta\phi_{20})$ で求めることができる。これを数値再生すれば物体面における物体光を得ることができる。

連続フレーム間の位相シフト量が推定できるならば最小二乗法に基づいた高精度な物体光推定ができる。しかし、統計手法は連続する3フレーム間で成立し、それに続くフレームとは位相連続性が考慮されていないため、推定位相シフト量をそのまま最小二乗法を用いることはできない。そこで全フレームが同じ初期位相と位相回転方向になる補正法を導入した最小二乗推定法を考案した。

図6にランダムな位相シフト量に対して位相補正を行ったときの第一、第二位相シフト量を示す。正しい位相関係が成り立つならば

第二位相シフト量は次フレームの第一位相シフト量と同じ値になるはずである。位相補正により第一、第二位相シフト量の一致が得られており位相関係が補正されたことが分かる。図7に最小二乗アルゴリズムによる再生像を示す。推定位相シフト量をそのまま用いると不要成分の影響が残りノイズが生じるが、位相補正を行うとノイズが除去されて明瞭な物体光が得られている。

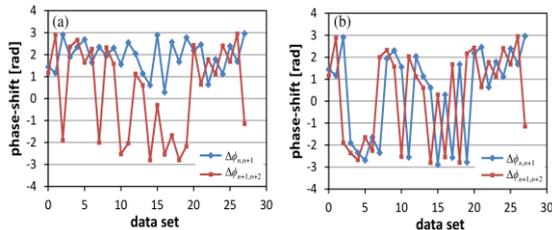


図6 (a)位相補正前, (b)位相補正後の位相シフト量

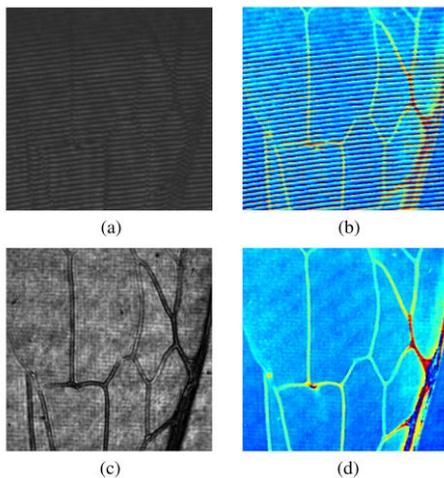


図7 最小二乗推定法による再生像, (a), (b)位相補正前, (c), (d)位相補正後の強度および位相再生像。

(3) 複数のカメラを用いた合成開口デジタルホログラフィ計測システムを構築する。カメラ位置推定では点光源でつくられる同心円干渉縞をカメラで撮影し点光源の位置を求めることによってカメラ位置を推定する。しかし、市販のカメラの構造は、撮像素子が素子自体よりも大きな回路基盤や筐体で囲まれており撮像素子を密に配列することができない。そこで撮像素子のみを並べる配置を移動ステージで擬似的につくる方式で基本的な実験を行った。また、凹レンズによる光波の拡大を利用して複数のカメラを配置する方式およびBSを用いる光波分割方式を検討した。

撮像素子のみを並べて配置する条件でカメラ位置推定法および提案システムの有効性を調べた。図8に4方向から撮影された干渉縞を合成したときの結果を示す。単独ホログラムの再生領域に比べて約4倍の再生領域が得られており、提案手法により計測領域の

拡大が行えることが分かった。

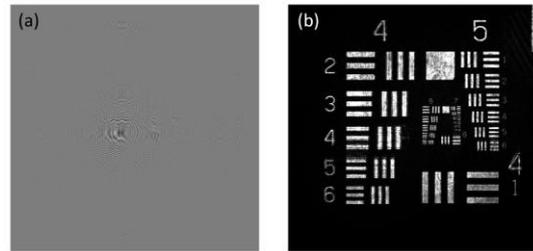


図8 (a)合成干渉縞, (b) (a)の再生像。

光波を拡大して複数のカメラを配置する方式を検討した。光波の拡大は実験システムにおいてBSとカメラ間に凹レンズを置いて実現した。カメラを並べて配置できるのでカメラ位置推定はオフセット方式で行った。光波拡大方式においても干渉縞合成を行い明瞭な再生像を得ることができた。この方式は市販のカメラをそのまま利用できる利点はあるが、1台のカメラの計測範囲が狭くなるため広範囲再生のためには多くのカメラが必要となりコスト面で問題があることが明らかになった。

BS分割方式では、実験システムにおいてBSを置いて光波を分割し2台のカメラで記録する配置とした。カメラは上下の位置関係で設置されており、上半分と下半分では異なるカメラで干渉縞が記録されている。連続フリンジスキャンで連続的な位相変化を発生させて干渉縞を同時に記録することにより移動物体の計測を行うことができる。フレームレート26fpsのカメラを用いて水中を移動する藻を対象物体としたときの位相再生像を図9に示す。物体移動の様子が再生されていることが分かる。再生距離を変更することにより異なる奥行き位置の再生像も得られるため三次元的な物体の移動を広範囲にわたって観察することができる。実験結果よりカメラごとに異なる位相歪みが存在することが分かった。今回は合成後に位相歪み補正を行ったので再生像にはその影響が残っている。計測精度を向上させるためにはカメラに起因する位相歪み補正を個別に行う必要がある。

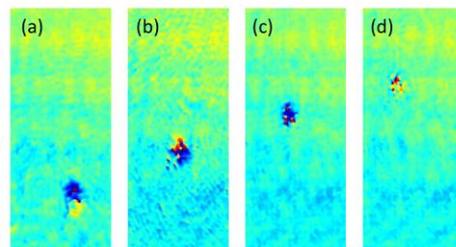


図9 移動物体の再生 (a) 0[s], (b) 0.27[s], (c) 0.53[s], (d) 0.80[s]。

カメラ位置推定法が可能な範囲に撮像素子をアレイ状に複数配置することができれば提案手法により計測領域はさらに拡大す

ることができる。微小生物の広範囲の行動解析は提案手法で得られた三次元再生像分布に対して三次元的な物体追跡の手法を用いて行うことができる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① N. Yoshikawa and K. Kajihara, "Statistical generalized phase-shifting digital holography with a continuous fringe-scanning scheme," Optics Letter, 査読有, Vol. 40, No. 13, 3149-3152 (2015).
- ② N. Yoshikawa, T. Shiratori and K. Kajihara, "Robust phase-shift estimation method for statistical generalized phase-shifting digital holography", Optics Express, 査読有, Vol. 22, Issue 12, pp. 14155-14165, 2014.
- ③ N. Yoshikawa and T. Koseki, "Complex wavefront reconstruction of digital in-line holography with a spatial radial carrier", Optical Review, 査読有, Vol. 21, No. 3, pp.325-332, 2014.

[学会発表] (計 30 件)

- ① T. Shiratori and N. Yoshikawa, "Color Digital Holography using Statistical Generalized Phase-shifting Method, International Workshop on Holography and related technologies (IWH2015), 2015.12.2, Okinawa Convention Center, Ginowan City, Okinawa, Japan.
- ② R. Taguchi and N. Yoshikawa, "Radial Carrier Digital Holography Reconstructing Self-transform Objects", International Workshop on Holography and related technologies (IWH2015), 2015.12.2, Okinawa Convention Center, Ginowan City, Okinawa, Japan.
- ③ 吉川宣一, 白鳥貴朗, 田口 瞭, 葛西敬介,"連続フリンジスキヤンを用いた統計的一般化位相シフトデジタルホログラフィのための位相補正法", 三次元画像コンファレンス 2015, 2015.7.10, 海洋研究開発機構横浜研究所 (神奈川県横浜市) .
- ④ N. Yoshikawa and K. Kajihara, "Phase correction method for least-squares wavefront calculation in statistical generalized phase-shifting digital holography", Optics and Photonics for Information Processing IX, 2015.8.10, San Diego Convention Center, San Diego, United States.
- ⑤ N. Yoshikawa, K. Kajihara and T. Shiratori, "Integrated phase-shifting digital holography using statistical approach", Optical Design and Testing VI, Photonics Asia 2014, 招待講演, 2014.10.9, Beijing International Convention Center, Beijing, China.
- ⑥ N. Yoshikawa, T. Shiratori, K. Kajihara,

"Robust phase-shift estimation method for generalized phase-shifting digital holography using statistical approach", Digital Holography and Three-Dimensional Imaging in Proceedings Imaging and Applied Optics 2014, 2014.7.14, Seattle, Washington, United States.

- ⑦ R. Saito, N. Yoshikawa, "Omnidirectional 3D shape measurement using digital holography", The 9th International Conference on Optics-photonics Design and Fabrication (ODF'14), 2014.2.13, Itabashi Culture Hall, Itabashi-ku, Tokyo, Japan.
- ⑧ N. Yoshikawa and T. Koseki, "Digital in-line holography using a spatial radial carrier", The Tenth Japan-Finland Joint Symposium on Optics in Engineering (OIE'13), 招待講演, 2013.9.2, Utsunomiya University, Tochigi, Utsunomiya, Japan.
- ⑨ N. Yoshikawa and K. Kajihara, "Low-cost and high accuracy phase-shifting digital holography", The 3rd Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2013), 招待講演, 2013.11.18, ETRI, Daejeon, Korea.
- ⑩ K. Kajihara, N. Yoshikawa, "Statistical generalized phase-shifting digital holography using integrating bucket method", International Workshop on Holography and related technologies (IWH2013), 2013.10.16, Kitami Institute of Technology, Hokkaido, Kitami, Japan.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 宣一 (YOSHIKAWA, Nobukazu)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00282335

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし