

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34416

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25886014

研究課題名(和文) 蛍光3次元動画画像ホログラフィック記録法とその顕微鏡応用システム開発に関する研究

研究課題名(英文) Research on the development of fluorescent three-dimensional motion-picture holographic microscopy

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)インコヒーレント光による広範囲3次元画像情報をホログラフィックに瞬間記録する技術の開発と高光利用効率を誇るシステムの提案、(2)高画質3次元画像再生可能な処理法の提案、(3)色情報を多重記録する機能の付加、(4)ホログラフィック顕微鏡自体が有する分解能の評価を行なった。(1)では、技術の実現可能性を数値的に確認し、簡素且つ高光利用効率のシステムを考案した。(2)、(3)では研究の結果、(1)のシステムに機能付加可能であるという知見を得た。(4)においては、コヒーレント光による評価であるが、ホログラフィック顕微鏡自体が100nmオーダの開口を可視化可能である実験的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this research, (i) the development of an incoherent three-dimensional holographic recording technique and the proposal of a system with high light efficiency, (ii) signal processing techniques for reconstructing a high-quality three-dimensional image, (iii) simultaneous recording of multiple wavelengths with high light efficiency using the technique of (i), and (iv) experimental evaluation of the resolution in digital holographic microscopy were conducted. In (i), the technique was numerically simulated and its validity was confirmed. Also, a novel type of the incoherent system was proposed. In (ii) and (iii), it was clarified that signal processing and multiwavelength imaging techniques can be applied (i). In (iv), it was experimentally demonstrated that digital holographic microscopy has the ability for imaging 775 nm apertures with a single-shot exposure although the experimental evaluation of an incoherent holographic microscope was not experimentally conducted yet.

研究分野：光工学・光量子科学

キーワード：デジタルホログラフィ、ホログラフィ、デジタルホログラフィック顕微鏡、複数波長デジタルホログラフィ、蛍光イメージング、多重記録、位相分割多重記録技術、蛍光デジタルホログラフィ

1. 研究開始当初の背景

最先端の生命科学研究には非接触・非侵襲・深度イメージングと機能、動態解析が必要不可欠である。現在までに、蛍光プローブを用いた光学顕微鏡技術は生細胞内の生命機能を担うタンパク質 1 分子単位での動態、不確定性の観察、機能解明を可能にしてきた (Nature 374, pp.555-559, 1995; Nat. Biotech., 20, pp.287-294, 2002)。近年、細胞内の数個~数十個のタンパク分子が細胞の運命決定を担うことが明らかになり (Science, 329, pp.533-538, 2010。), 生命現象に対し少数分子が果たす役割や機能を探ることが未来の生命科学研究分野を担うものとして多くの研究者が参画しつつある。当該分野では (1)細胞内の少数分子の 1 分子ごと、しかも (2)同時の高速・深度 3 次元画像観察が要求されているが、近接場顕微鏡、共焦点顕微鏡など、従来の光計測技術ではこれらの要求全てを満たすことが不可能である。蛍光の 3 次元画像を記録する従来ホログラフィ技術では、試料を静止させた上での液晶素子の電気的変調と複数回の撮像が必須で、動く試料への適用が不可能であった (Nat. Photonics 2, pp.190-195, 2008。)

研究代表者はこれまでに、カメラのフレームレートで 3 次元動画画像記録可能なホログラフィック顕微鏡法を提案し、深さ 6mm にわたる深度で毎秒 15 万コマでの生体の高速 3 次元動画顕微鏡システムを構築、実証してきた。しかしながら、インコヒーレント光である蛍光への適用にはホログラフィに必要な 2 光波の内、共通光路で、片側の光のみを空間分割する方法の考案が課題であり、当時、未だ誰も考案・達成できていなかった。

2. 研究の目的

(1),(2)の要求両方を満たすホログラフィ技術を提案しそのシステム開発を目的とする。研究代表者が今回提案する方法では、偏光を駆使した複数ホログラムの同時記録システムをインコヒーレント光、共通光路での実現へ展開する可能性を拓く。インコヒーレント光の 3 次元画像情報を単一露光で記録可能にし、高速・深度の蛍光 3 次元画像記録を可能にする。さらに、複数分子の高速蛍光 3 次元動画イメージングを初めて実現可能にする方法の創出としてシステム提案を行なう。

3. 研究の方法

図 1 の、ホログラフィに基づく光学システムを開発する。空間光変調器により偏光方向に応じた変調有無の 2 光波を生成し、波長板とホログラム空間分割素子を用いることで、単一露光・高画質 3 次元画像記録可能なホログラフィック顕微鏡法に必要なホログラムを共通光路で記録する。共通光路でホログラム記録することで、蛍光などインコヒーレント光の 3 次元画像情報を単一露光で記録可能にする。

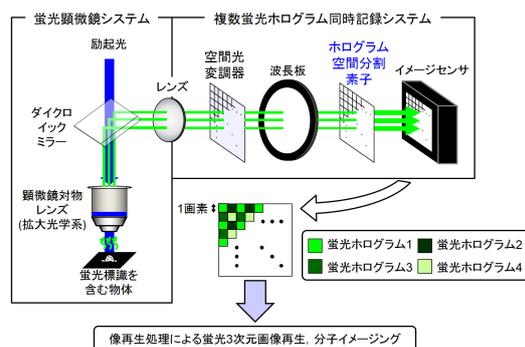


図 1. 提案法に基づく顕微鏡システム概略。

図 2 に提案方式の核となる複数蛍光ホログラム同時記録システムの流れを示す。試料から発せられる蛍光とその干渉により生成されるホログラム (以後、蛍光ホログラムと呼ぶ) を記録する。本方式では蛍光を、拡大光学系通過後に空間光変調器により“物体光”と基準となる“参照光”に分け、偏光調整素子である波長板と、ホログラム空間分割素子により高画質 3 次元蛍光画像記録に必要な複数種類の蛍光ホログラムを単一露光記録可能にする。記録した 1 枚の蛍光ホログラムに対しホログラフィの像再生処理法を適用することにより、単一露光で蛍光の 3 次元画像情報を可視化し、イメージセンサの連続画像取り込みにより高速の蛍光 3 次元動画画像記録を達成する。偏光を利用することにより蛍光の 3 次元イメージングに必要な複数ホログラムを単一露光で取得する。ランダム偏光でインコヒーレントな蛍光は、空間光変調器により位相変調された垂直偏光の物体光と変調を受けない参照光に分けられる。次に、ホログラムの空間分割多重記録システムを適用する。波長板により 2 波は互いに直交する円偏光となり、偏光方向に応じて位相差を異ならせることができ、ホログラム空間分割素子には微小偏光子アレイまたは空間光変調素子アレイを用い、複数種類のホログラムが生成される。イメージセンサ面で 2 波が干渉しホログラム記録される。

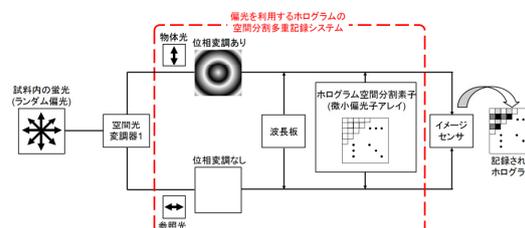


図 2. 複数蛍光ホログラム同時記録システムの流れ。

システム開発に向け、以下の研究を進めた。

- (1) 計算機シミュレーションにより提案方式の理論的性能を定量的に評価する。その際に、3 次元的空間分解能、どの程度までの微弱光を鮮明に像再生可能か調べる。

- (2) 提案法で記録される複数種類の蛍光ホログラムに対し、より高画質3次元画像再生可能な像再生処理法を検討する。
- (3) 蛍光のカラーイメージング応用に向けて、複数波長のホログラムを記録できる形態を検討し、基礎実験により評価する。
- (4) 励起光源、空間光変調器、精密偏光光学素子、ホログラム空間分割素子、イメージセンサ、蛍光顕微鏡システムにより図1の光学システムを設計する。ホログラム空間分割素子の選定を行ない、光学システムを設計する。また、システムの高品質化に向け検討する。

4. 研究成果

まず3(1)の計算機シミュレーションを行ない、画質・分解能を評価した。深さ方向に $3.13\mu\text{m}$ 離れた位置に直径 500nm である2個の蛍光ビーズがあると想定し、図1の系を用いてホログラムを記録したと仮定した。図3に像再生結果を示す。複数回撮像方法(Nat. Photonics 2, pp. 190-195, 2008.)で鮮明に深さ分解イメージングできるのに対し、工夫なしに単一露光記録ではSN比が低下し画質も劣化している。一方、当該課題を用いれば複数回撮像と同程度の画質を誇り、工夫なしの方法に比べSN比を100倍程度取れることが判明した。これを微弱光検出可能性の指標とした。

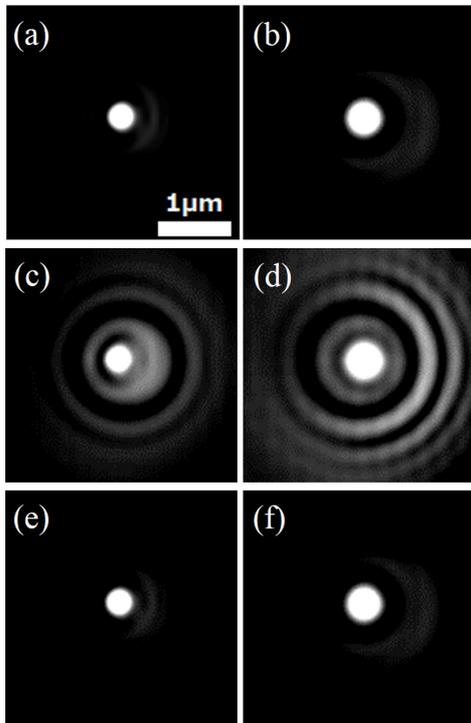


図3. 計算機シミュレーション結果。(a),(b)複数回撮像方法,(c),(d)通常単一撮像,(e),(f)申請課題の方法による像。(a),(c),(e)と(b),(d),(f)で異なる蛍光物質を像再生、深さ差 $3.13\mu\text{m}$ を想定。

3(2)においては、信号処理方法の検討の結果、まず、デジタルホログラフ一般に信号成分が減衰し画質劣化することを突き止めた。干渉パターン記録時一般に、縞が細くなるにつれて、撮像素子の各画素で縞の積分効果が顕著となる。その結果、縞の変調成分が物体の3次元画像情報を含んでいるため、物体の像が暗くなってしまふ。当該課題の解決には計算機技術による補償処理が有効であることに着目し、信号減衰の数学モデルの逆関数を演算することによる解決を試みた。図4に計算機シミュレーション結果を示す。物体本来の輝度情報復元に成功した。

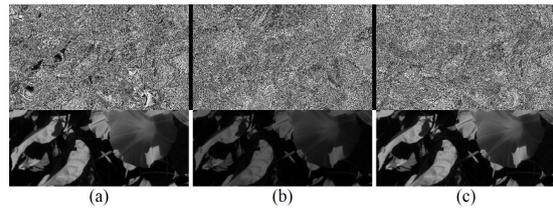


図4. 信号減衰補償の計算機シミュレーション結果。(a)物体像,(b)信号減衰を伴った再生像,(c)補償処理を伴った結果。

次に、ホログラムの空間分割多重記録システムに特有の、視野狭窄の問題を信号処理により解くアプローチを試みた。当該システムにおいて、高い光利用効率を保ったまま広視野3次元イメージングを達成することが従来不可能であったため、その解決に当たり記録されるホログラムにフーリエ縞解析を利用する信号処理を施すことを試行した。信号処理法の有効性を確認するために、コヒーレント光を用いた実験であるが基礎実験を行なった。その結果、図5に示す通り、全く同じ一枚のホログラム画像から信号処理方法を変えるだけで、撮影可能範囲の広域化を達成できることを明らかにした。

3(3),(4)においては、以下の研究推進を並行して行なった。インコヒーレントホログラフにおいてマルチカラーを記録するためには通常、ベイヤー型のカラーフィルタアレイを用いることが一般的である。しかしながら、光吸収によるSN比低下や露光時間増大による時間分解能低下、波長間クロストークによるゴースト発生などの問題を引き起こしてしまう。しかしながら、異なる分子組成に異なる波長の蛍光標識を付してしまえば、複数種類の分子組成の同時3次元動態可視化を達成可能にする。そこで、本申請課題の発展可能性に賭け、単板単色撮像素子を用いて、分光吸収の利用なしに、マルチカラーイメージングを達成する方法を考案するに至った。図6に考案した計測法のシステムと処理手続概略を示す。ホログラム空間分割素子を偏光感受性の位相板アレイに置き換え、空間光変調器で並列デジタルホログラフに必要なホログラムを生成させるときに、波長ごとに異なる位相シフト量を生じさせる。考案

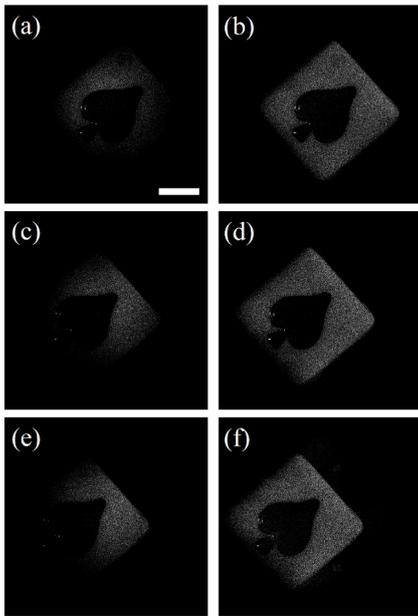


図 5. 撮影範囲広域化実験結果。(a), (c), (e) 従来の信号処理による再生像。(b), (d), (f) は, (a), (c), (e) を再生した同じホログラムから, 提案する信号処理方法による再生像。被写体は(a), (c), (e)において異なる位置へ配置されている。スケールバーは 5mm。

した信号処理法により単一単色画像から複数波長情報を像再生可能とすることで, 高光利用効率でマルチカラーインコヒーレントホログラフィックイメージングを達成可能にすることを見出した。また, 考案の過程で, 図 6 中の空間光変調器の代わりに, レンズ系と波長板を挿入することで等価の働きをすることを見出し, また, 当該システム光利用効率を高められるとの知見を得た。上記の成果を PCT 出願にて特許出願申請した。

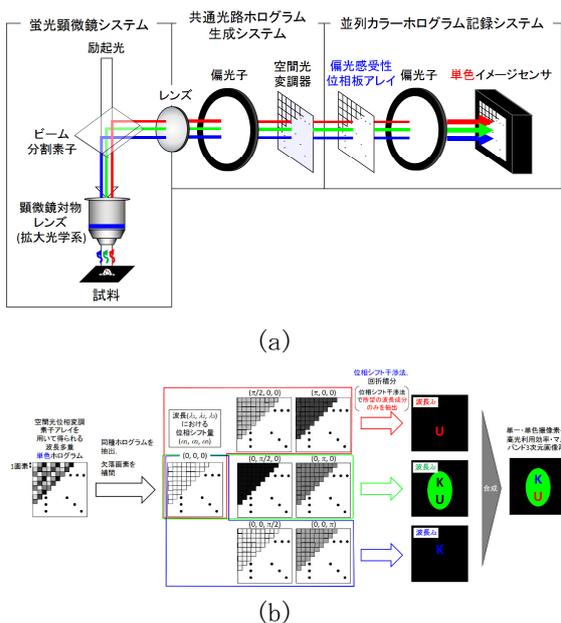


図 6. 単板単色撮像素子を用いるマルチカラーインコヒーレントホログラフィの(a)光学システム, (b)処理手続概略。

また, 偏光感受性位相板アレイの開発が困難であったことに鑑み, 既存の素子構成で実現可能な複数波長記録光学システムの開発と図 1 システムへの融合可能性を検討した。波長毎に, 空間光変調器で異なる空間変調を参照光に与え, 波長多重ホログラムを得る。記録したホログラムにフーリエ縞解析を施すことで単色のホログラムより複数波長情報を分離抽出する。以上の, 波長情報の空間周波数分割多重記録により, 複数波長における 3 次元画像情報をカラーフィルタなしの単板単色撮像素子で記録・像再生する。コヒーレント光を用いた実験であるが, ホログラフィック顕微鏡の 100nm オーダの開口に対する 3 次元分解イメージング可能性を示すために, 2 波長デジタルホログラフィック顕微鏡を構築し実験した。図 7 に結果を示す。図 7 より, 3 次元空間に置かれた複数の 775nm の開口に対し, 各波長において 3 次元分解イメージングできている様子が伺える。以上より, ホログラフィック顕微鏡に 100nm オーダの開口を分解イメージング可能であることが示され, フーリエ光学に基づく理論的解析より, インコヒーレントホログラフィにおいても同様に 100nm オーダの分解能で 3 次元イメージング可能であるという知見を得られた。

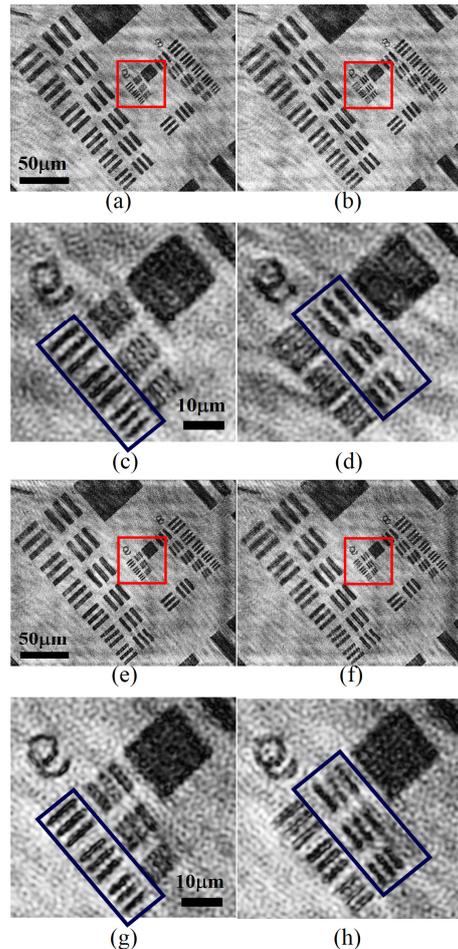


図 7. 実験結果。(a)-(d)波長 640nm, (e)-(h)532nm による結果。(a),(c),(e),(g)と(b),(d),(f),(h)の深さ差 1760nm。(c),(d), (g),(h)はそれぞれ(a),(b),(e),(f)内赤矩形の拡大。

以上、理論的検証を済ませ、光利用効率が低く像を再生しがたいという課題にいち早く着手し解決する方法を見出した。また、複数波長の情報を、カラーフィルタアレイを用いずに記録・像再生する方法を提案し、当該課題との融合可能性も示すことができた。そして、ホログラフィック顕微鏡自体に 100nm オーダの開口を 3 次元分解イメージングする能力があることを示し、インコヒーレントホログラフィック顕微鏡でも同様に分解可能であることが理論的検証より判明した。現在、改良したシステム構成に則り、より簡素化された光学システムの構築と実験に着手している。高い光利用効率にて蛍光の 3 次元動画像記録を行ない、実証結果を示すことを目指す。また、本課題中に発案したマルチカラー記録システムとも融合させ、100nm オーダのカラー蛍光物質の 3 次元動態可視化を達成させることが今後の課題である。

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 4 件)

① T. Tahara, T. Kaku, Y. Arai, "Single-shot multiwavelength phase unwrapping using a single reference beam and a monochromatic image," *Optical Review* **22**, pp. 415-421 (2015).

doi: 10.1007/s10043-015-0072-y (査読有)

② T. Tahara, T. Kaku, Y. Arai, "Digital holography based on multiwavelength spatial-bandwidth-extended capturing-technique using a reference arm," *Optics Express* **22**, pp. 29594-29610 (2014).

doi: 10.1364/OE.22.029594 (査読有)

③ T. Tahara, Y. Takahashi, and Y. Arai, "Image-quality improvement in space-bandwidth capacity-enhanced digital holography," *Optical Engineering*, **53**, 112313 (6 pages) (2014).

doi:10.1117/1.OE.53.11.112313 (査読有)

④ T. Tahara, Y. Lee, Y. Ito, P. Xia, Y. Shimozato, Y. Takahashi, Y. Awatsuji, K. Nishio, S. Ura, T. Kubota, and O. Matoba, "Superresolution of interference fringes in parallel four-step phase-shifting digital holography," *Optics Letters* **39**, pp. 1673-1676 (2014).

doi: 10.1364/OL.39.001673 (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

① 加来徹, 田原 樹, 新井泰彦, "可視・近赤外光の同時 3 次元動画像記録可能なデジタルホログラフィック顕微鏡システム," 第 13 回関西学生研究論文講演会予稿集, 2015

年 3 月 9 日, 大阪市立大学(大阪府大阪市).

② T. Tahara and Y. Arai, "Single-shot multiwavelength digital holography using a monochromatic image sensor and a single reference beam," *Optics and Photonics Taiwan, International Conference (OPTIC)*, Dec. 4, 2014, 中華民国台中市. (invited)

③ 田原 樹, 加来 徹, 新井 泰彦, 高木 康博, "光の位相を利用した単一露光複数波長デジタルホログラフィ," 平成 26 年度第 4 回ホログラフィック・ディスプレイ研究会, 2014 年 11 月 19 日, 関西大学(大阪府吹田市).

④ 田原 樹, 加来 徹, 新井 泰彦, "50° 超の入射角をなす単一参照光路を用いる単一露光複数波長デジタルホログラフィ," *Optics and Photonics Japan 2014 講演予稿集*, 2014 年 11 月 6 日, 筑波大学東京キャンパス(東京都文京区).

⑤ 田原 樹, 森 亮太, 菊永 修平, 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干渉法におけるホログラム記録枚数低減," *Optics and Photonics Japan 2014 講演予稿集*, 2014 年 11 月 6 日, 筑波大学東京キャンパス(東京都文京区).

⑥ 田原 樹, 加来 徹, 高橋 祐樹, 新井 泰彦, 高木 康博, "位相を利用し多波長情報を取得するデジタルホログラフィ," *Optics and Photonics Japan 2014 講演予稿集*, 2014 年 11 月 5 日, 筑波大学東京キャンパス(東京都文京区).

⑦ T. Tahara, T. Kaku, Y. Arai, and Y. Takaki, "Digital holography for simultaneously sensing multiple wavelength information," 第 5 回デジタルオプティクス研究会 CIS-Japan Collaboration Symposium, 2014 年 11 月 4 日, 電気通信大学(東京都調布市).

⑧ T. Tahara, T. Kaku, and Y. Arai, "Multiwavelength digital holography utilizing the space-bandwidth capacity-enhance," *SPIE/COS Photonics Asia, Proc. SPIE*, Oct. 11, 2014, 中華人民共和国北京市.

⑨ T. Tahara, T. Kaku, and Y. Arai, "Single-shot color digital holography based on spatial frequency-division multiplexing and space-bandwidth capacity-enhance," *JSAP-OSA Joing Symposia 2014 (18.6 Information Photonics)*, Sept. 20, 2014, 北海道大学(北海道札幌市).

⑩田原 樹, 加来 徹, 新井 泰彦, "単色撮像素子と単一参照ビームを用いるシングルショットカラーデジタルホログラフィ," 精密工学会 2014 年秋季大会, 2014 年 9 月 15 日, 鳥取大学(鳥取県鳥取市).

⑪田原 樹, "多次元画像情報を同時記録するホログラフィ," 第 23 回 日本バイオイメージング学会学術集会 講演予稿集 S4-3, p.75, 大阪大学, 9 月 6 日, 2014, 大阪大学(大阪府吹田市). (招待講演)

⑫T. Tahara, S. Kikunaga, Y. Arai, and Y. Takaki, "Phase-shifting interferometry capable of selectively extracting multiple wavelength information and its applications to sequential and parallel phase-shifting digital holography," in Digital Holography and Three-Dimensional Imaging 2014 (DH), OSA Technical Digest (online) (Optical Society of America, 2014), July 14, 2014, アメリカ合衆国シアトル.

⑬T. Tahara, P. Xia, Y. Awatsuji, K. Nishio, S. Ura, T. Kubota, and O. Matoba, "Multi-parameter motion-picture recording with wide space-bandwidth by parallel phase-shifting digital holography," SPIE DSS Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display 2014, Proc. SPIE, May 6, 2014, アメリカ合衆国ボルチモア. (invited)

⑭T. Tahara and Y. Arai, "Extension of the Space-bandwidth Product in Single-shot Multiwavelength Interferometry Using a Single Reference Beam," Biomedical Imaging and Sensing Conference 2014 (BISC'14), April 23, 2014, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

⑮田原 樹, 新井 泰彦, "単一参照ビームを用いる単一露光複数波長位相接続法における空間帯域幅積拡大法," 2014 年 第 61 回 応用物理学会春季学術講演会, 2014 年 3 月 18 日, 青山学院大学(神奈川県相模原市).

⑯ T. Tahara, "High-speed color 3D motion-picture recording by multi-wavelength parallel phase-shifting digital holography," The International Symposium on 3D Display and Imaging Conference, Nov. 21, 2013, 中華人民共和国北京市. (invited)

⑰T. Tahara, P. Xia, T. Kakue, Y. Awatsuji, K. Nishio, S. Ura, T. Kubota, and O. Matoba, "3-D motion-picture recording by parallel phase-shifting digital holographic

microscopy," 2013 International Conference on Optical Instrument and Technology (OIT2013), Nov. 19, 2013, 中華人民共和国北京市. (invited)

⑱田原 樹, 新井 泰彦, "角度多重記録を用いる多波長位相接続法における空間周波数帯域拡張法," Optics and Photonics Japan 2013 講演予稿集, 2013 年 11 月 14 日, 奈良県新公会堂(奈良県奈良市).

⑲田原 樹, 菊永修平, 新井 泰彦, 高木康博, "波長情報の選択的抽出可能な位相シフト干渉法と単一単色撮像素子を用いたカラー 3 次元イメージング," Optics and Photonics Japan 2013 講演予稿集, 2013 年 11 月 13 日, 奈良県新公会堂(奈良県奈良市).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: デジタルホログラフィ装置およびデジタルホログラフィ方法

発明者: 田原 樹, 菊永修平, 新井泰彦

権利者: 同上

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2014/067556

出願年月日: 平成 26 年 7 月 1 日

国内外の別: 外国

[その他]

ホームページ

<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