

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26390079

研究課題名(和文) 高精度位相計測を利用した非接触・非染色顕微断層解析の新技术開発

研究課題名(英文) Non-contact, non-staining three-dimensional microscopic imaging based on high-precision phase measurement

研究代表者

渡邊 恵理子 (Watanabe, Eriko)

電気通信大学・大学院情報理工学研究所・准教授

研究者番号：20424765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高精度位相計測を利用した偏光・位相計測システムおよびデジタルホログラフィック顕微鏡を開発した。偏光・位相計測システムは、スキャン型定量位相計測システムに偏光計測モジュールを組み込むことで実現した。このシステムに、細胞以外の情報を除去する補正方法を導入し、生体細胞の光路長変化量、複屈折位相差、主軸方位を高精度に計測できることを示した。また、強度分布と位相分布を正確に取得する光学系設計、位相シフト法の改善、3次元データ補正方法を導入して、高精度なデジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)を開発した。このDHMにより3次元的に配置されたビーズや生体細胞の3次元顕微イメージングを実現した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed a quantitative optical path length difference and polarization microscopy (QPPM) and a digital holographic microscope (DHM). The QPPM was accomplished by introducing a polarimetric module to one arm of the Mach-Zehnder interferometer in our conventional phase imaging system. The QPPM can almost simultaneously measure the optical path length difference, birefringence phase difference, and the azimuth angle of birefringence, using our new base-correction method, which reduced the influence of elements other than cells. We also demonstrated the high-precision three-dimensional microscopic imaging of three-dimensionally arranged beads and living cells using our developed DHM. This DHM was completed by introducing a design method for an optical system that accurately acquires intensity distribution and phase distribution, and by improving the phase shift method and the three-dimensional data correction method.

研究分野：光情報処理

キーワード：光干渉計測 ホログラフィ

1. 研究開始当初の背景

細胞のような無色透明物体の形状観察を非侵襲・非破壊・非染色で、定量的に計測できる技術が求められている。生体細胞の定量評価指標として、定量位相情報(厚みや屈折率)は細胞増殖や活性度、癌細胞有無と相関性が高いことが知られている。そのため、定量位相計測が可能なデジタルホログラフィック顕微鏡など光干渉を利用した顕微鏡技術の研究開発が行われてきた。

我々はこれまでフィードバック制御技術を導入したマッハツェンダー型光干渉光学系によるフィードバック型高精度定量位相計測システムを構築し、位相アンラッピング処理をせずに、2 nm 以下の微小な光路長変化から数波長を越える光路長変化まで高精度に計測できるシステムを構築してきた。このシステムでは、これまで困難であった光路長差 3λ 以上の厚い細胞の顕微位相像の計測を実現した。加えてレンズレス位相シフトデジタルホログラフィック顕微鏡を試作し、3次元イメージングに向けた基礎的な検討を重ねてきた。このように細胞等の透明位相物体を、非侵襲・非破壊・非接触で定量位相顕微計測が可能な基礎技術を、開発してきた。

2. 研究の目的

本研究では我々がこれまで構築してきたフィードバック型高精度定量位相計測システムやデジタルホログラフィック顕微鏡システム(Digital Holographic Microscope: DHM)を基盤技術とし、異なる焦点位置における高精度顕微イメージングを可能とする、3次元イメージングや細胞解析および細胞顕微断層解析システムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高精度位相計測を利用した偏光・位相計測システム(Quantitative optical path length difference and polarization microscopy: QPPM)の構築

細胞の微小変化を検出することによる細胞解析を目的として、定量位相と偏光情報を同時に計測する QPPM の開発を行った。複屈折位相差および主軸方位を測定する偏光モジュールを、これまで我々が開発してきたフィードバック型高精度定量位相計測システムに組み込むことで実現した。偏光計測光学系は回転偏光子法を用い、複屈折を有する細胞の透過前後の偏光状態を測定する構成とした。

(2) デジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)システムによる3次元高精度イメージング法
シャーレなどに培養された細胞の高精度な3次元イメージングを実現するために、DHMの開発を行った。

本研究では参照波として球面波を用いることで、対物レンズで細胞を拡大せずに顕微イメージングを実現可能なレンズレス DHM 光学系を採用した。DHM の基本構成を図1に示す。

物体光と参照光を、ビームスプリッタを通して同軸にし、撮像素子に2つの光を重ね合わせる。2つの光の干渉により干渉縞が形成され、撮像素子で受光する。干渉縞をコンピュータに取り込み、ホログラムの複素振幅をフレネル回折を行うことで像再生を行う。

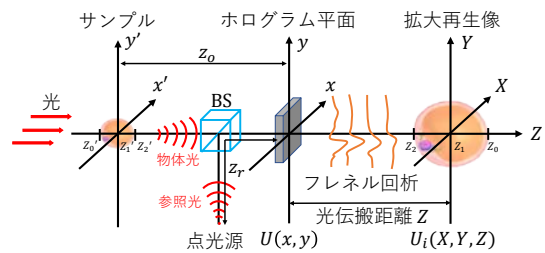


図1 DHMの基本構成

このとき、光伝搬距離はホログラム平面から再生像の距離を示し、光伝搬距離は以下の式で与えられる。 $Z = -(1/z_0 - 1/z_r)^{-1}$ 。ここで、 Z, z_0, z_r はそれぞれ、光伝搬距離、物体から撮像素子までの距離、参照光の光源から撮像素子までの距離である。また、空間分解能 δx_0 は $\delta x_0 = \lambda |z_0| / (\delta x \cdot N)$ の式であらわされる。ここで、 $\delta x, N, \lambda, |z_0|$ はそれぞれカメラのピクセルピッチ、ピクセル数、光源波長及び物体から撮像面までの距離である。ここで装置の設計では、まず装置の仕様(要求空間分解能や視野)を決定し、物体面から撮像面までの距離 z_0 を算出する。また、撮像素子の仕様からサンプリング条件($Z = N(\delta x)^2 / \lambda$)により距離 Z が求まる。最後に Z と $|z_0|$ から $|z_r|$ の距離を決定する。上記の光学設計法により、光学系を実装することで、強度分布と位相分布を正確に取得することが出来る。また、図1中の Z_0', Z_1', Z_2' はそれぞれ物体のフォーカス位置である。また、 Z_0, Z_1, Z_2 は、それぞれ Z_0', Z_1', Z_2' に対応する再生した像のフォーカス位置である DHM を用いることで、測定物体のフォーカス位置を自由に設定することが可能である。

4. 研究成果

(1) QPPM の構築

図2に構築した QPPM の光学系を示す。この光学系は、マッハツェンダ干渉計に基づく光学系であり、He-Ne レーザーを光源として使用している。レーザーから出た光は偏光ビームスプリッタ(PBS)によって参照光と物体光の2光束に分けられる。参照光とサンプルを通った物体光を干渉させてフォトディテクターでダークフリンジになるようにフィードバックし、位相をロックする。参照光側に配置されたピエゾ印加された電圧から光路長変化量を算出する。ピエゾに印加される電圧、は1波長だけ変化させるときの電圧により算出する。この位相計測システムに、回転偏光子法による偏光計測モジュールを組み、QPPM を構築した。実験では回転ステージに取り付けた偏光子を 10° 毎に回転させ、1回

転分の光強度の変化を測定し、そこから主軸方位と複屈折位相差を求める設定とした。複屈折位相差を測定する際は参照光側にシャッターを入れて1光束で測定する光学系とした。

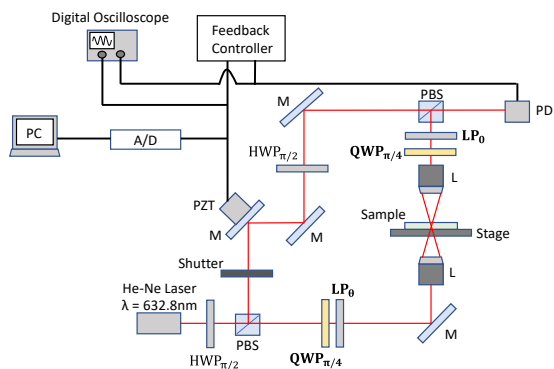


図2 QPPMの光学系

M, mirror; L, lens; PBS, polarization beam splitter; PZT, piezoelectric transducer; PD, photodetector; LP θ , rotational polarizer at a rotation angle of θ ; LP 0 , linear polarizer at a rotation angle of 0; HWP $_{(\pi/2)}$, half wave plate at an azimuth angle of $\pi/2$; and QWP $_{(\pi/4)}$, quarter wave plate at an azimuth angle of $\pi/4$

(2) 高精度イメージングのためのQPPM用補正方法の導入

構築したQPPMで測定する際、細胞などのサンプルは専用のシャーレ上で培養されるため、光路長変化量でも複屈折位相差でも細胞をシャーレ上に乗せたまま測定する必要がある。従って、シャーレの厚さムラや表面状態、応力状態などが、細胞の光路長変化量や複屈折位相差に重畳されて計測されることになる。ここでは、シャーレの光路長分布、複屈折位相差分布を、それぞれ光路長ベース、複屈折ベースと記述する。ベース値は細胞計測において無視できない大きさであることが多いため、ベース値を差し引いて細胞だけの情報を求めるベース補正を施す必要がある。ベース補正は、後述するように光路長ベース補正と、複屈折ベース補正とを別々に扱う。

ベース補正の基本的なプロセスは下記の通りである。まず、計測結果画像から、細胞部分を選択しこの範囲を切り抜く。次に、細胞部以外の画像を使って、切り抜かれた部分の補間演算を行い、ベース値を推定する。最後に、細胞部分からベース値を差し引くことで、細胞のみの計測値を算出する。ベース値は面内において連続でなだらかに変化していることを仮定し、補間演算は2次元の高次式でフィッティングした。

光路長ベース補正は、面内位置座標を x, y とし、光路長値を z として xyz 直交座標系において曲面補間を行った。一方、複屈折は位相差量 δ と主軸方位 φ の二つで決定されるため、それぞれを別々に処理する必要がある。すなわち面内位置座標を x, y とし、複屈折量 δ を z として xyz 直交座標系とする場合と、面内位置座標は同じで主軸方位 φ を z として xyz 直交座標系とする場合との二つに分けて推定を行った。

光路長のベース補正は光路長の値を単純減算処理で行うことができるため、そのまま単純減算する。しかし、複屈折は位相差量 δ と主軸方位 φ の二つで決定されるため、両者を合わせてベクトルと考え、ベクトル減算で処理した。ここで、複屈折量の加減算は $\delta \ll 1$ であればベクトルの加減算で求められる。細胞の複屈折量、およびシャーレに残存する残留ひずみ量は両者とも数度程度の値であることが予想されるため、 $\delta \ll 1$ の条件を満たす。そのため、複屈折のベース補正式を

$H_C = H_M - H_S$ として、シャーレの推定値を実測値から差し引いた H_C を細胞の複屈折値を補正方法とした。ここで、 H_M はシャーレを含めた実測値、 H_S はシャーレ等の細胞以外のベース推定値である。

(3) QPPMによる細胞計測結果

構築したQPPMおよび補正方法を利用して、定量位相計測と偏光計測を行った。図3は乳腺細胞(癌細胞)の3次元の光路長変化量分布の一例である。

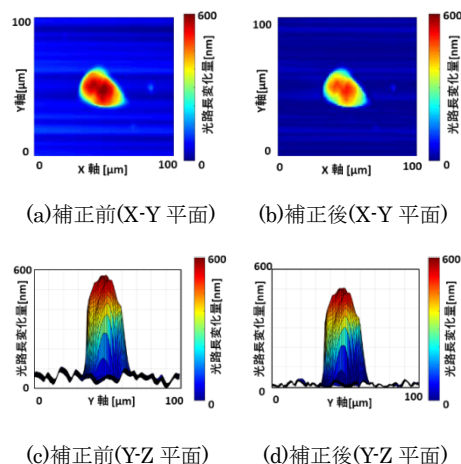


図3 乳腺細胞の光路長変化量測定結果

シャーレの光路長を含んだベース補正前に比べ、補正後は細胞部分のみ光路長変化量を検出できるため、高精度な細胞計測が可能となった。図4は補正方法を組み込んだ偏光計測により得られた細胞の主軸方位と複屈折位相差の分布を示したものである。細胞部分では主軸方位と複屈折が大きく変化していることがわかる。光路長変化量に比べて複屈折位相差では細胞内の細かい構造が可視化できている。

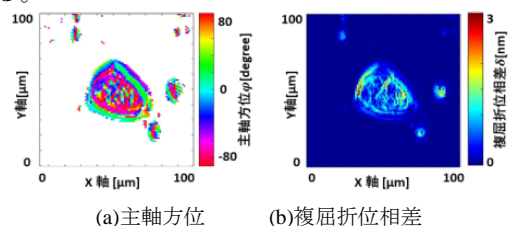


図4 乳腺細胞の複屈折測定結果

このように偏光測定モジュールを従来のフィードバック型高精度定量位相計測システムに

導入することにより、光路長差、複屈折位相差、主軸方位を測定できることを示した。またベース補正により、細胞以外の要素による影響をほぼ除去し、生体細胞に関する高精度な計測を実現した。

(4)DHM による高精度 3次元顕微イメージング

ホログラフィック顕微鏡における3次元イメージングの高精度化として、奥行方向などの校正方法を検討した。本研究で実装したホログラフィック顕微鏡では、前述した通り、要求される空間分解能と視野を元に、撮像面からサンプル設置位置までの距離、参照光源から撮像面までの距離を決定する。しかし、装置実装の際に参照光源から撮像面までの距離などに誤差が生じると、その値は物体の奥行情報のイメージングに対して大きな誤差となる。そのため、奥行方向に強度分布の指標を付けた、厚みの既知な校正デバイス(指標以外は透明)を試作し、この校正デバイスの実測値により、再構成イメージングの結像関係パラメータを決定する方法を提案し、校正方法を実現した。また、位相シフト法の改善も行った。

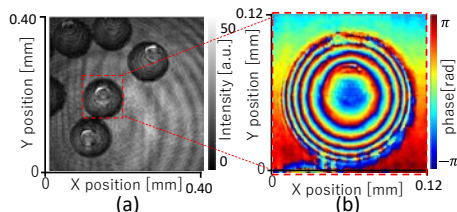


図5 (a)再構成強度像, (b)再構成位相像

直径 $101 \mu\text{m}$ 、屈折率 1.5 のビーズを、屈折率 1.47 のマッチングオイルに浸した試料を観察した。図5(a)にビーズを再構成した強度像と位相像を示す。図5(b)に位相アンラッピング処理を行ったビーズの定量位相像を示す。ビーズの理論位相像とほぼ等しい位相像であることを確認した。

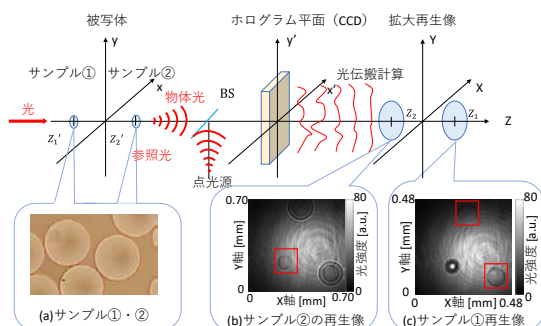


図6 ビーズの3次元イメージング例

さらに、奥行方向に異なる位置に複数配置したビーズを、DHMにて計測した3次元イメージング結果を図6に示す。(a)はビーズの明視野観察像 DHMによって取得された再生像が(b),(c)である。この結果より、取得し

たホログラムから異なる焦点位置を再構成し、3次元イメージングが可能であることを確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

①H. Satake, K. Ikeda, H. Kowa, T. Hoshiba, E. Watanabe, "Microscopic optical path length difference and polarization measurement system for cell analysis", 10714, Proc. SPIE, 査読無, 107140A(2018)

②渡邊恵理子, "デジタルホログラフィーの定量位相顕微鏡応用", 光技術コンタクト, 査読無, Vol. 54, No.5, pp.1-8, (2015)

[学会発表] (計 8 件)

①K. Ikeda, N. Hara, T. Hoshiba, E. Watanabe, "Microscopic Polarization Imaging of Human Breast Cancer Cells", BISC'16, (2016)

②E. Watanabe, K. Ikeda and K. Okamoto, "Lensless Digital Holographic Microscope Based on Planer Lightwave Circuit" The 25th International Conference on Optical Fiber Sensors, Th-VII2 (2017) 招待講演

③原菜摘, 渡邊恵理子, "細胞検査に向けた捜査型定量位相計測による断層解析の基礎検討" 日本光学会コンテンポラリーオプティクス研究会, (2015)

④倍味幸平, 池田佳奈美, 高和宏行, 渡邊恵理子, "定量位相計測と定量偏光計測を組み合わせた細胞識別のための特徴量の基礎検討", 平成 28 年度コンテンポラリーオプティクス研究会, (2016)

⑤渡邊恵理子, 池田佳奈美, 武田光夫, "揺らぎ媒質解明へ向けた顕微位相イメージング", 2aES2, Optics & photonic Japan 2017, (2017)

⑥渡邊恵理子, 池田佳奈美, 佐竹 宏基, 井元克駿, "生体イメージングのための定量位相顕微鏡", 日本光学会フォトダイナミズム研究グループ 研究会, (2018)

⑦井元 克駿, 佐竹 宏基, 池田 佳奈美, 岡本勝就, 渡邊 恵理子, "平面導波路型デジタルホログラフィック顕微鏡での定量位相イメージング", 19a-P2-7, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会, (2018)

⑧児玉周太朗, 佐竹宏基, 高和宏行, 干場隆志, 渡邊恵理子, "細胞計測のための定量位相・偏光イメージング", 第 46 回画像電子学会年次大会, (2018)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 光学測定装置及び光学測定方法

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：特願 2016-004384
出願年月日：2016/01/13
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
<https://thetis.f-lab.tech.uec.ac.jp/posts/index>

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