

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03580

研究課題名(和文) 蛍光・位相同時3次元計測可能なマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡

研究課題名(英文) Multimodal Digital Holographic Microscopy for Simultaneous Measurement of 3D Fluorescence and 3D Phase

研究代表者

的場 修 (MATOBA, OSAMU)

神戸大学・システム情報学研究科・教授

研究者番号：20282593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛍光及び位相の同時3次元計測を実現するためにマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡を提案した。2次元蛍光像と3次元位相像を同時取得可能な光学系を構築し、植物細胞と動物細胞の観察を行ない、同時取得による有効性を実証した。さらに、蛍光の3次元取得に向けて、共通光路型オフ軸デジタルホログラフィー法を提案し、一度のホログラム計測で蛍光の3次元情報取得が可能であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we proposed a multimodal digital holographic microscopy (DHM) that can realize simultaneous measurement of three-dimensional (3D) fluorescence and 3D phase imaging. We fabricated a multimodal DHM that can obtain simultaneously two-dimensional fluorescence distribution and 3D phase distribution. The effectiveness of the proposed DHM was confirmed by the experimental results of plant cells and mouse's brain cells. Furthermore, for the development of single shot measurement of 3D fluorescence distribution, we proposed the common-path off-axis incoherent DHM and its feasibility was confirmed by the experiment.

研究分野：計測光学

キーワード：マルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡 蛍光 位相

1. 研究開始当初の背景

バイオ分野の研究に欠かせないイメージング手法として、蛍光標識技術が確立している。蛍光タンパク質が導入された細胞を観察することで、細胞核や細胞壁などの観察が容易になり、個々の細胞の状態観察から細胞間の観察までが可能になっている。現在バイオイメージングにおいて蛍光3次元像を高分解能で計測するツールとして、共焦点レーザー走査顕微鏡がある。しかし、この方法では計測物体の一点ごとに集光し、蛍光信号を得るため、3次元像を得るためには集光点の走査が必要なため、時間がかかり、動的物体の計測や奥行き位置が異なる複数の細胞の同時計測は不向きであるという本質的な限界がある。

また、蛍光像だけでなく細胞の大きさや厚みなどの構造を同時に観察する技術も求められる。構造観察の手段としては、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡などがある。蛍光3次元像と位相3次元像を同時に取得するマルチモーダル顕微鏡は本申請研究の時点で提案されておらず、蛍光像および位相像を同時観察することができれば、異なる情報を同時に取得することができるため、バイオ分野においてより多くの情報を提供することが可能になる。そのため、バイオ分野における新しいイメージングツールとして大いに役立つことが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、バイオイメージング分野で革新的な3次元動画像顕微鏡を提供するために、蛍光3次元像と位相3次元像を同時取得可能なマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡を提案し、その実証実験を行う。特に蛍光観察用ホログラムと位相観察用ホログラムを同時取得するために、位相物体情報をもつ光波には感度の低い偏光依存性のある2重焦点距離をもつフレネルレンズを設計・開発する。このため、サブ波長周期構造による偏光依存性を発現させる、あるいは同等の機能をもつ空間光変調素子を用いることを検討する。構築した顕微鏡を用いて、植物細胞の一つであるヒメツリガネゴケやマウスの神経細胞を観察し、提案したマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡の有効性を実証する。

3. 研究の方法

位相3次元および蛍光3次元情報の同時取得可能なマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡の構築に向けて3つの研究項目を設定した。

第1の研究項目として、蛍光2次元及び位相3次元の動画計測可能なデジタルホログラフィック顕微鏡を構築する。これを用いて、直径4 μm の蛍光ビーズやオオカナダモの自家蛍光と細胞形状の同時取得を行う。また、対象物体の時間変化を測定可能とするた

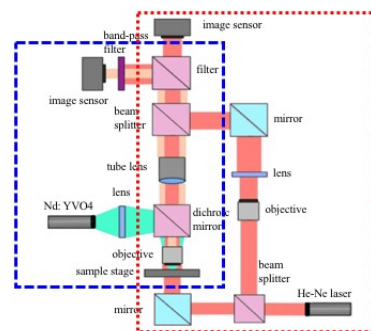
めに構築したマルチモーダル顕微鏡のタイムラプス計測が可能なソフトウェアを開発した。

第2の研究項目として、先に構築した蛍光2次元及び位相3次元同時計測の利点を生かし、蛍光2次元観察ではデフォーカス位置にある物体像は広がった強度分布として観測される。この広がった強度画像を、位相3次元計測で得られるデフォーカス距離情報を用いて、計算機内で光波逆伝搬計算及び波面補正を適用することでフォーカス面で見られる画像を推定し、3次元化を行なうことに取り組んだ。

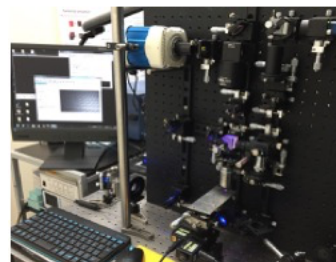
第3の研究項目として、光学系による蛍光3次元像の取得に向けて、回折格子付き2重焦点レンズを位相変調型空間光変調素子に実装する方法を提案する。また、1度の計測で蛍光像の3次元再生を行うために、周期の異なる2つの回折格子を用いることで、オフアクシスホログラムを形成する方法を提案する。LED及び蛍光ビーズを用いた実験により提案手法が実現可能であることを実証する。

4. 研究成果

はじめに第1の研究項目である、蛍光2次元及び位相3次元像の同時取得が可能なマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡を構築した。構築した顕微鏡の概要図と写真を図1に示す。左側の青い破線部分が落斜型蛍光顕微鏡であり、波長532 nmの励起光が対物レンズを通して対象物体を照射する。発生した蛍光は対物レンズとチューブレンズを通過し、バンドパスフィルタにより不要な波長を除去した後、イメージセンサに記録される。このため2次元の蛍光像を観察できる。



(a)



(b)

図1 蛍光2次元及び位相3次元像の同時取得可能なマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡。

右側の赤の破線で囲まれた部分が3次元位相分布観察用のデジタルホログラフィック顕微鏡である。波長 632.8 nm の He-Ne レーザーから射出した光はビームスプリッターで2分割される。透過した光は対象物体を通過し、チューブレンズを通り、参照光と合波した後、イメージセンサで干渉縞が記録される。構築したシステムの記録速度は、蛍光画像が 6 フレーム毎秒、位相画像が 40 フレーム毎秒であり、時間変化を取得することも可能である。

はじめに HeLa 細胞の位相計測を行なった結果を図 2 に示す。定量的に位相が測定されている。次に、ヒメツリガネゴケを用いて、蛍光と位相の同時測定した結果を図 3 に示す。ヒメツリガネゴケの葉緑体による自家蛍光が観察されている。また、位相像からは細胞の構造が見られる。同時測定の有効性を示す結果を図 4 に示す。図 4 はマウスの神経細胞のスライスを測定したものである。図 4(a) には神経細胞と神経繊維の異なる蛍光波長を画像化したものである。図 4(b) は位相像であり、白質と灰白質の境界がはっきりと見える。図 4(a) と (b) はそれぞれ異なる情報を示しており、同時測定の優位性を示している。

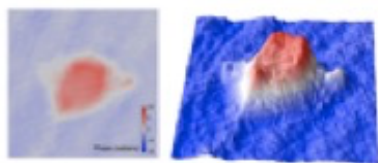


図 2 HeLa 細胞の位相測定結果.

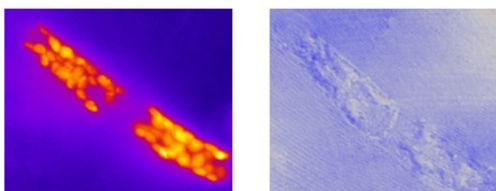
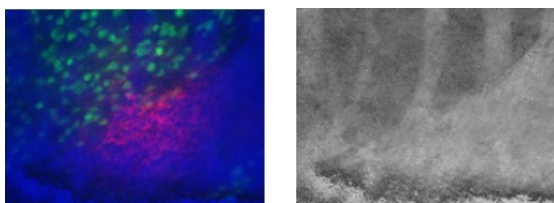


図 3 ヒメツリガネゴケの蛍光像と位相像の同時測定結果.

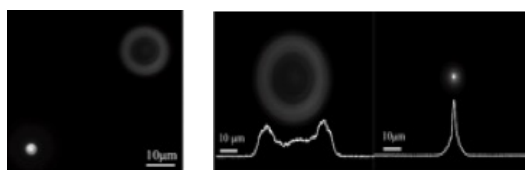


(a) (b)

図 4 マウス神経細胞の観察像; (a) 蛍光像, (b) 位相像.

第 2 の研究項目として、デフォーカスした蛍光画像の復元を行ない、蛍光の 3 次元化を試みた。第 1 の研究項目で構築した、蛍光 2

次元及び位相 3 次元分布を測定可能なマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡を元に、3 次元位相分布を用いてデフォーカス距離を算出する。このデフォーカス距離を元に、焦点位置からずれて観測される 2 次元蛍光分布の画像補正を行う方法を提案した。提案した画像補正方法は、デフォーカス距離分の光波逆伝搬計算と空気と溶液の屈折率差による球面収差補正である。図 5 に実験結果を示す。図 5(a) は 2 次元蛍光画像である。直径 4 μm の蛍光ビーズが 2 つあり、左下の蛍光ビーズはフォーカス面にあるが、右上の蛍光ビーズは奥行き方向にデフォーカスして広い強度分布となっている。図 5(b) に示すように、上述の補正により、蛍光ビーズの強度分布が補正され、図 5(a) に近い強度分布に回復できていることがわかる。



(a) (b)

図 5 デフォーカスした 2 次元蛍光画像の補正; (a) 2 つの蛍光ビーズの蛍光画像, (b) デフォーカス蛍光像の補正結果.

第 3 の研究項目として蛍光 3 次元分布の光学的取得に向けて、共通光路型オフアキシスインコヒーレントデジタルホログラフイー法を提案した。提案手法の概要を図 6 に示す。提案手法の鍵となる点は、微小蛍光信号から発した光の空間コヒーレンスを利用して 2 つの角度の異なる回折光を生成し、その 2 つの光波を干渉させる。このとき 2 つの回折光に焦点距離の異なる凸レンズで変調することで 3 次元計測を可能にする。回折格子及び凸レンズは位相変調型空間光変調素子 (SLM) を用いて実装される。2 つの回折光を用いることでレンズなどの光学素子表面の反射光や SLM での非変調光などのノイズ成分を除去でき、一度のホログラム記録で蛍光物体の 3 次元測定が可能になる。これは従来法が位相シフト計測により最低 3 度のホログラム記録が必要であったのを 1 回のホログラム記録にすることができ、リアルタイム記

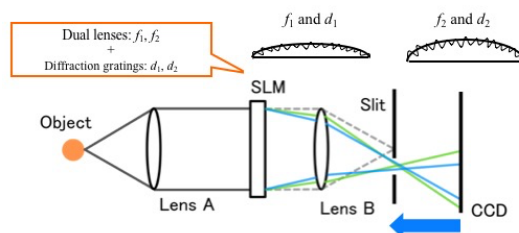


図 6 共通光路型オフアキシスインコヒーレントデジタルホログラフィック光学系の概要図.

録に有効である。

提案手法の原理確認実験として、LED 光源及び蛍光ビーズを用いた。図 7 に LED 光源を用いた実験結果を示す。LED 光源からの光は直径 10 μm のシングルモード光ファイバを通して微小光源として用いられる。バンドパスフィルタとして中心波長 532 nm, 波長幅 10 nm を用いた。この微小光源からの光を 2 つに分割し、奥行き位置の異なる 2 つの微小光源として用いた。この実験では回折格子の周期を同じとしたため、同軸型のホログラムが記録される。そのため図 7(a) に示すように同心円型の干渉縞が 2 つ見られる。このホログラムを用いてイメージセンサからの距離変化させて再生した結果を図 7(b) に示す。再生距離 550 mm と 940 mm でそれぞれ微小光源が再生されていることがわかる。次に、オフアクシス型ホログラムの作製実験として、直径 4 μm の蛍光ビーズを用いた。SLM は 1920 \times 1080 ピクセル, ピクセル周期 8 μm であり、回折格子の周期が 24 μm と 25.6 μm とした。2 つの凸レンズの焦点距離として 1000 mm と 800 mm に設定した。実験結果を図 8 に示す。図 8(a) がオフアクシスホログラムであり、(b) にその再生像を示す。点光源に近い微小光源が再構成されていることがわかる。図 8(c) にイメージセンサからの伝搬距離を変化させたときのピーク強度をプロットしたグラフを示す。約 600 mm のところ

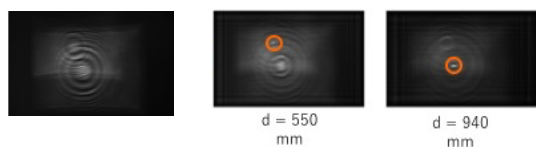


図 7 LED 光源を用いた蛍光 3 次元記録実験結果; (a) ホログラム, (b) 再生時の伝搬距離を変化させたときの再生像。

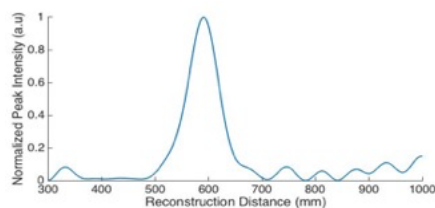


図 8 蛍光ビーズを用いたオフアクシス蛍光デジタルホログラフイーの実験結果; (a) ホログラム像, (b) 再生像, (c) 伝搬距離に対するピーク強度の変化。

でピーク位置が見られ、奥行き方向にも再生されていることがわかる。

以上の研究成果から、本研究では、バイオ分野における新しい顕微鏡として、蛍光及び位相の同時計測可能なマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡の構築に成功するとともに、蛍光 3 次元及び位相 3 次元像の同時取得に向けた基礎実験に成功した。また、構築した実験システムを用いて蛍光ビーズ、HeLa 細胞、ヒメツリガネゴケ、マウスの神経細胞の観察に適用した。特に、蛍光信号からは細胞核の情報が得られ、位相情報からは細胞の大きさや厚さの情報を得ることができるため、対象物体の状態を一度の計測で多次元的に得ることができる。記録速度はイメージセンサの画像取得速度に依存するが、本実験では蛍光画像が 6 フレーム毎秒、位相画像が 40 フレーム毎秒で取得でき、時間変化を取得することも可能である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. O. Matoba, X. Quan, P. Xia and Y. Awatsuji, "Multidimensional measurement by hybrid digital holographic microscopy for biological applications" Asian Journal of Physics, 査読有, Vol. 24, 2015, 1467-1471 (招待論文).
2. X. Quan, O. Matoba, Y. Awatsuji, "Single-shot incoherent digital holography using a dual-focusing lens with diffraction gratings," Optics Letters, 査読有, Vol. 42, 2017, 383-386. DOI: 10.1364/OL.42.000383
3. X. Quan, O. Matoba, and Y. Awatsuji, "Image recovery from defocused 2D fluorescent images in multimodal digital holographic microscopy," Optics Letters, 査読有, Vol. 42, 2017, 1796-1799. DOI: 10.1364/OL.42.001796
4. O. Matoba, X. Quan, P. Xia, Y. Awatsuji, and T. Nomura, "Multimodal imaging based on digital holography," Proceedings of the IEEE, 査読有, Vol. 105, Issue 5, 2017, 906-923. DOI: 10.1109/JPROC.2017.2656148
5. T. Tahara, X. Quan, R. Otani, Y. Takaki, O. Matoba, "Digital holography and its multidimensional imaging applications: a review," Microscopy, 査読有, Vol. 67, No. 2, 2018, 55-67. DOI: 10.1093/jmicro/dfy007

[学会発表] (計 2 9 件)

1. X. Quan, K. Nitta, O. Matoba, and Y. Awatsuji, "Integrated fluorescence and phase-contrast digital holographic microscopy for live cell imaging," SPIE DSS, Sensing Technology + Applications, 9495-4, 2015.
2. O. Matoba, "A hybrid digital holographic microscopy," 14th workshop on information

- optics (WIO2015), F1-2, 2015. (招待講演)
DOI:10.1109/WIO.2015.7206920
3. O. Matoba, X. Quan, and Y. Awatsuji, "A hybrid digital holographic microscopy for biological applications," The 2nd International Conference on Photonics Solutions (ICPS2015), I-01, 2015 (招待講演).
 4. O. Matoba, "Holographic applications -3D display and digital holography-," Proceedings of 3D Systems and Applications (3DSA), S3-1, 2015 (招待講演).
 5. O. Matoba, X. Quan, P. Xia, Y. Awatsuji, "Phase and fluorescence imaging by digital holographic microscopy," The 5th Korea-Japan Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2015), 2015(招待講演).
 6. O. Matoba, X. Quan, H. Inokuchi, P. Xia, Y. Awatsuji, "3D Sensing by Digital Holography," The 15th International Conference on Computers, Communications and Systems (ICCCS2015), A2-02, 2015(招待講演).
 7. X. Quan, P. Xia, K. Nitta, O. Matoba, Y. Awatsuji, "Demonstration of phase and fluorescence imaging with dynamics using a multi-modal digital holographic microscope," International Workshop on Holography and Related Technologies 2015 (IWH2015), We4-4 , 2015 (Best Student Award).
 8. X. Quan, P. Xia, Y. Awatsuji, and O. Matoba, "Application of a dual-excitation multi-modal digital holographic microscope to biological imaging," Collaborative Conference on 3D & Materials Research 2016 (CC3DMR 2016) Program, pp.284-285, 2016(招待講演).
 9. O. Matoba, X. Quan, Y. Tamada, and Y. Awatsuji, "Multi-modal digital holography for live cell imaging," Proceedings of 15th Workshop on Information Optics (WIO2016), Barcelona, Spain, 2016(招待講演).
DOI: 10.1109/WIO.2016.7745587
 10. X. Quan, O. Matoba, K. Nitta, Y. Tamada, and Y. Awatsuji, "Live cell imaging of Physcomitrella patens using a multi-modal digital holographic microscope," Proceedings of 15th Workshop on Information Optics (WIO2016), Barcelona, Spain, 2016.
DOI: 10.1109/WIO.2016.7745594
 11. X. Quan, P. Xia, K. Nitta, O. Matoba, and Y. Awatsuji, "Multi-modal digital holographic microscopy and demonstration on dual-excitation fluorescence," Imaging and Applied Optics 2016, OSA Technical Digest, Digital Holography and Three-Dimensional Imaging (DH) 2016, DT4G.5, 2016.
 12. X. Quan, O. Matoba, K. Nitta, Y. Awatsuji, Y. Takizawa, "Multi-modal digital holographic microscope with dual wavelength excitation and dual-wavelength phase imaging," JSAP-OSA Joint Symposia 2016 in The 77th JSAP Autumn Meeting, 14a-C301-3, 2016.
 13. O. Matoba, X. Quan, and Y. Awatsuji, "Digital holographic imaging and sensing for biology and sound wave measurement," Photonics Asia 2016, 10022-21, 2016(招待講演).
 14. X. Quan, O. Matoba, Y. Awatsuji, "New configuration of Incoherent digital holography by dual focal lenses with grating," OSA-OSJ Joint Symposia in Optics & Photonics Japan 2016 (OPJ2016) , 30pOD3, 2016(**Best Student Award**).
 15. X. Quan, O. Matoba, Y. Awatsuji, "Image recovery of fluorescence light from phase hologram in multi-modal digital holographic microscopy," OSA-OSJ Joint Symposia in Optics & Photonics Japan 2016 (OPJ2016), 31aOD2, 2016.
 16. X. Quan, O. Matoba, Y. Awatsuji, "Evaluations on reconstruction distance in incoherent digital holography with a diffraction grating," Technical Digest of The 6th Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2016), pp. 175-176, P20-41, 2016.
 17. O. Matoba, X. Quan, Y. Awatsuji, "Multimodal imaging of 3D phase and 2D fluorescence distributions using digital holographic microscopy," Technical Digest of The 6th Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2016), Inv21-a2, pp. 63-64, 2016(招待講演).
 18. 的場 修, 全 香玉, 栗辻 安浩, "マルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡と植物細胞イメージング", Optics & Photonics Japan 2016 (OPJ2016), 1pDS2, 2016 (シンポジウム講演) .
 19. O. Matoba, X. Quan, and Y. Awatsuji, "Common-path incoherent digital holography," Proceedings of SPIE, Vol. 10219-2, Three-dimensional Imaging, Sensing, and Display 2017, SPIE Commercial + Scientific Sensing and Imaging, 2017(招待講演).
 20. X. Quan, O. Matoba, and Y. Awatsuji, "Off-axis incoherent digital holographic microscopy," Proceedings of SPIE, Vol. 10219-38, Three-dimensional Imaging, Sensing, and Display 2017, SPIE Commercial + Scientific Sensing and Imaging, 2017.
 21. X. Quan, A. Moriyama, K. Nitta, O. Matoba, Y. Awatsuji, "Analysis of common-path incoherent digital holography using

- dual-focusing lens with diffraction gratings,” Proc. SPIE, Vol. 10251, 10251-12, in Biomedical Imaging and Sensing Conference (BSIC'17), BISCp8-4, 2017.
22. X. Quan, O. Matoba, and Y. Awatsuji, “Recovery of fluorescent bead image by phase compensation method based on the defocusing distance,” Technical Digest of 2017 OSA Topical Meeting, Digital Holography and Three-Dimensional Imaging (DH) 2017, Tu2A.6, 2017.
23. O. Matoba, X. Quan, and Y. Awatsuji, “Three-dimensional fluorescence imaging based on digital holography,” Proceedings of 16th Workshop on Information Optics (WIO2017), 2017(招待講演). DOI: 10.1109/WIO.2017.8038177
24. X. Quan, O. Matoba, and Y. Awatsuji, “Simultaneous imaging of 3D phase and 3D fluorescence for biological application,” Proceedings of 16th Workshop on Information Optics (WIO2017), 2017. DOI: 10.1109/WIO.2017.8038183
25. X. Quan, O. Matoba, Y. Awatsuji, “A simple deblurring method by phase correction in the Fourier domain of out-of-focus images,” The 24th Congress of the International Commission for Optics (ICO-24), W1F-05, 2017.
26. O. Matoba, X. Quan, and Y. Awatsuji, “Multimodality of phase and fluorescence in digital holography,” The 3rd International Conference on Photonics Solutions (ICPS2017), P.231, 2017(招待講演).
27. O. Matoba, X. Quan, and Y. Awatsuji, “Fluorescence imaging by common-path off-axis digital holography,” International Workshop on Holography and Related Technologies 2017 (IWH2017), 2017(招待講演).
28. 的場修, 全香玉, 栗辻安浩, “デジタルホログラフィック顕微鏡によるマルチモーダルイメージングシンポジウム,” 第64回応用物理学会春季学術講演会講演予稿集 シンポジウム「顕微鏡領域における光波バイオセンシングの今」15p-413-4, パシフィコ横浜, 横浜, 2017(招待講演).
29. 全香玉, 仁田 功一, 的場 修, 栗辻 安浩, “蛍光画像のフーリエ変換面での位相補正方法”, 日本光学会年次学術講演会 (Optics & Photonics Japan 2017), 1aD07, 2017.

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

○出願状況 (計2件)

名称：デジタルホログラフィック顕微鏡
 発明者：的場修
 権利者：国立大学法人神戸大学
 種類：特許
 番号：特願2016-200457
 出願年月日：2016年10月11日
 国内外の別：国内

名称：デジタルホログラフィック顕微鏡
 発明者：的場修, 全香玉
 権利者：国立大学法人神戸大学
 種類：PCT
 番号：PCT/JP2017/36894
 出願年月日：2017年10月11日
 国内外の別：国外

○取得状況 (計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
<http://brian.cs.kobe-u.ac.jp/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的場 修 (MATOBA, Osamu)
 神戸大学・大学院システム情報学研究所・教授
 研究者番号：20282593

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

水上民夫 (MIZUKAMI, Tamio)
 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部・教授
 研究者番号：80367896

(4) 研究協力者

なし