

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02165

研究課題名(和文) スペックル干渉計測法を基礎とする三次元計測技術によるコンパクト超解像顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of compact super-resolution microscope using three-dimensional measurement technology based on speckle interferometry

研究代表者

新井 泰彦 (Arai, Yasuhiko)

関西大学・システム理工学部・教授

研究者番号：80131415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の基盤技術として位置付けていたスペックル干渉計測技術のもとで開発したプロトタイプ超解像光学干渉計をバイオ分野での利用を可能とするために、光学素子を三次元に配置し、かつアクティブ除振台を利用することで、生体観測が可能なコンパクト超解像観察光学系へと改良、発展させた。この改良により、生体の生態観測を可能とした。加えて、この光学系を用いたマイクロ領域での観察を円滑に行うための装置をMEMS技術を用いて開発した。さらに、本測定技術の測定限界についての議論を行った。この議論において超解像の実現において長年、光学的に困難であると信じられていたレーリー規準についての新たな見解を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ分野の研究が進展するに従い、生体を生きたままに観察する技術が強く求められている。特に、超解像技術を必要とする手法の開発は、2014年のノーベル化学賞を受賞した超解像顕微鏡の開発に見られるようにバイオ研究では必要不可欠な技術となっている。

本研究では、100年を超えて光学顕微鏡では超えることができないと考えられていた回折限界を超える微細構造の観察を光の強度分布の観察ではなく、位相分布の観察によって実現可能であることを示した。

今後本成果を基に新たな光学顕微鏡による生体観察のための超解像顕微鏡の開発が期待され、それらの顕微鏡を用いた新たなバイオ分野の研究が深化することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The prototype super-resolution optical interferometer developed on the basis of the speckle interferometer technology applied as the fundamental technology in this study was improved on a compact super-resolution observation optical system for use in the biotechnology field, using a three-dimensional arrangement of optical elements and active vibration isolators.

This improvement has made it possible to observe the ecology of living organisms. In addition, a device was developed using MEMS technology to facilitate observation in the micro region using this optical system.

Furthermore, a discussion was held on the measurement limits of this measurement technique. In this discussion, a new view on the Rayleigh criterion, which has long been believed to be optically challenging in the achievement of super-resolution, was presented.

研究分野：計測工学

キーワード：超解像顕微鏡 装置のコンパクト化 スペックル干渉計測法 位相検出 シミュレーション解析 レーリー規準 バイオ研究

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体組織の微細構造を観察する技術として、蛍光物質を用いた超解像顕微鏡等がノーベル賞を受賞するなどバイオ研究での微細組織を観察するための超解像技術が強く求められている。さらに、クライオ電子顕微鏡等による光の回折限界を超えた技術により生体微細組織の観察が行われている。しかし、この観察技術は一般に真空下の低温状態での観察技術であることから、常温での生物を生きのままに取り扱い、動的実環境下でその生態観察を不自由なく実施しようとする、従来用いられてきた光学顕微鏡下での観察時の観察対象の取り扱いに比べて、多くの困難が存在する。

本研究では、30年来スペックル干渉計測の高分解能化の技術開発に従事してきた研究代表者が、既に各専門誌に報告した様々な測定技術を駆使して、既存のスペックル干渉計を改良し、測定対象からの散乱光の位相情報を縞解析技術を用いて高分解能に解析することによって、回折の影響を回避することが可能な、実用に供するコンパクトな超解像顕微鏡システムを開発しようとしている。

本取組では、研究代表者がすでに開発したプロトタイプ超解像光学顕微鏡を生態観察が可能な顕微鏡へと深化させることで、人類の医学・生理学研究の発展に寄与することを目指している。

2. 研究の目的

2014年度ノーベル化学賞では、生体の微小構造組織の観察が可能な、蛍光物質を用いた超解像顕微鏡である STED 等が受賞し、2017年度ノーベル化学賞ではバイオ研究にさらなる発展をもたらすクライオ電子顕微鏡が受賞するなど、近年、バイオ研究での微細構造を観察するための技術が強く求められている。現在、微小構造物の観察は、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡、走査型トンネル顕微鏡、周期的微細構造の推定技術として半導体製造分野では Scatterometry などによる光の回折限界を超えた観察技術が用いられている。しかし、これらの技術を用いた場合においても、生物の動的実環境下での生態観察は伝統的な光学顕微鏡による観察過程に比べるとはるかに不自由な作業が求められる。すなわち、バイオ研究において強く求められる大気中での測定対象を自由に操作・観察可能な生態観察技術が強く求められている。

一般に、光学顕微鏡を用いた観察は、二次元画像を瞬時に常温下での大気中の生体から取得可能であることより、バイオ研究の目的の推進に極めて沿った二次元観察が実現可能である特徴を有している。その一方で、光の回折限界が超解像技術開発の巨大な障壁となってきた。

本研究では、すでに報告したスペックル干渉計測技術を基礎とする回折限界を超えた光学技術を用いることで、バイオ研究の現場で簡便に利用可能な実用に供するコンパクトな超解像顕微鏡の開発、並びにその測定限界の解明を目的としている。バイオ関連研究等に寄与する新たな超解像顕微鏡を社会に提供することを本研究の目的としている。

3. 研究の方法

研究方法について「(1)光学系の改良」「(2)測定限界の検討」「(3)シミュレーションによるレイリー規準への新たな見解」「(4)バイオ分野における応用」の4項目に分けて説明をする。

(1)光学系の改良

30年来研究代表者が開発に努めてきたスペックル干渉計測技術¹⁾に圧電素子による横ずらし技術を付加することで、観察光学系の回折限界を超える微細構造物の形状計測が可能である技術を2018年度に報告した²⁾。この計測技術では、図1に示すような約2m四方の空気圧除振台上に設定された光学系によって超解像を実現していた。その後、圧電素子を用いなくても仮想的に横ずらしを与えることで圧電素子を用いた場合と同様の結果を得ることができる新たな観察技術が研究代表者によって開発された。さらに、画像のノイズ除去による高分解能化が図られ³⁾、この超解像技術はダイナミックに変化する対象物の計測が可能なる技術へと進化した⁴⁾。

本研究では、この新しい超解像技術を広くかつ簡易にバイオ分野の研究で利用することが可能となるようなコンパクトな顕微鏡として改良することを目指している。そのために、図1に示すような巨大な除振台を図2に示すようにアクティブ除振台に置き換え⁵⁾、かつ、光学系を三次元に、コンパクトに設置することによって実現しようとするものである。

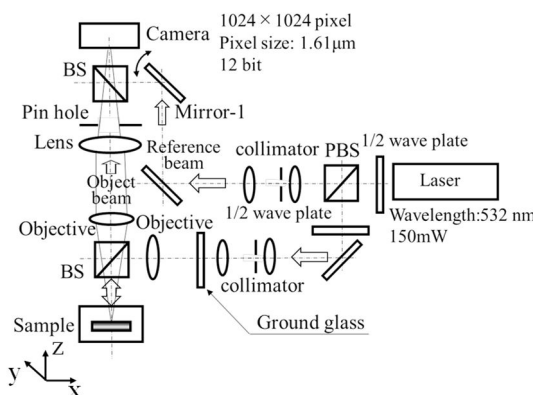


図1 基本となるスペックル干渉計

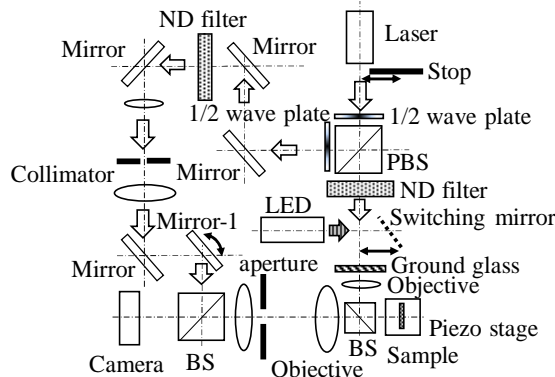


図2 改良されたコンパクト光学系

(2)測定限界の検討

本研究で開発した新たな光学系の測定限界を明確にするために、当初、回折格子を測定対象とした検討が行われ²⁾、その後、図3に示すようなマイクロ球(直径700nm)を測定対象とした検討^{6,7)}、さらに、電子線描画機により作製された微細構造モデル(線幅が100nm前後の溝)を測定対象とすることにより、本手法の測定限界を検討した。

加えて、図4に示す物理演算ソフト(COMSOL)を用いてコンピューターシミュレーションを行い、詳細な測定限界に関する検討を行った⁸⁾。

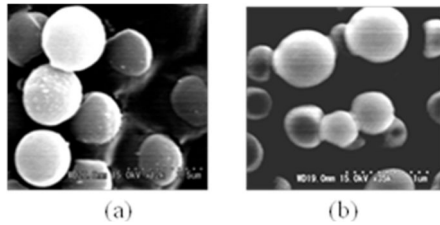


図3 マイクロ球の測定

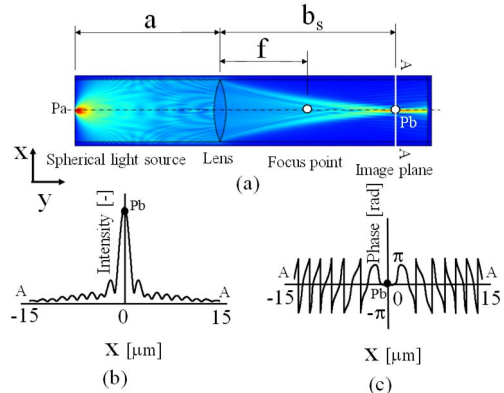


図4 測定限界検討シミュレーションモデル

(3)シミュレーションによるレーリー規準への新たな見解

本研究において用いた測定技術は100年を超えて、光学分野において信じられてきたレーリー規準が存在する限り、本研究における計測結果は論理的に説明することが困難であると考えられていた。

本研究では、図5に示すモデルを物理演算シミュレーションソフト(COMSOL)を用いて作製し、コンピューターシミュレーションにより、レーリー規準と本研究の測定原理との関係を明確にすることで、レーリー規準は光の強度分布による考察結果であり、本研究における測定原理は光の位相分布に基づくものであることを踏まえて、その物理現象としての相違について考察し、レーリー規準に関する、新たな見解を示している⁹⁾。

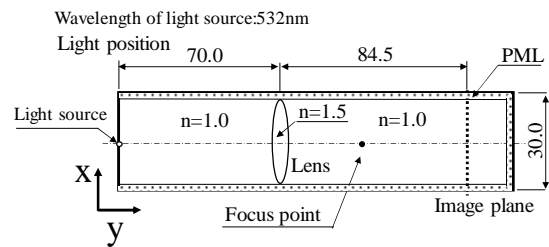


図5 レーリー規準シミュレーションモデル

(4)バイオ分野における応用

本研究の最終目標は、光学顕微鏡を用いた超解像技術をバイオ研究において有効利用することである。そのために、本研究では、図6に示すようににんにくの細胞における染色体(幅は700nm前後)を観察することによって、バイオ分野における本手法の利用の可能性を検証した¹⁰⁾。この場合に、染色体は、従来実施されている「固定」「解離」「染色」の手順で処理された押しつぶし法による試料を観察対象として用いている。

4. 研究成果

研究成果について「(1)光学系の改良」「(2)測定限界の検討」「(3)シミュレーションによるレーリー規準への新たな見解」「(4)バイオ分野における応用」の4項目に分けて説明をする。

(1)光学系の改良

本研究では、図2に示す光学系を図7に示すようにアクティブ除振台上にハニカム構造の定盤を設置し、その上に光学系をコンパクトに配置することで、700×600mmのコンパクトな光学系を設置した。

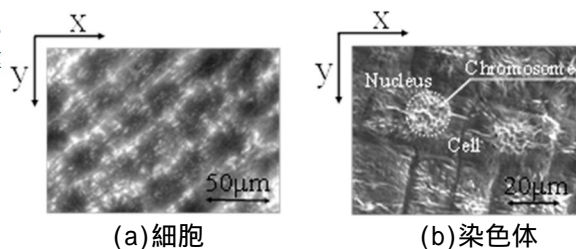


図6 にんにくの細胞並びに染色体 SEM 画像

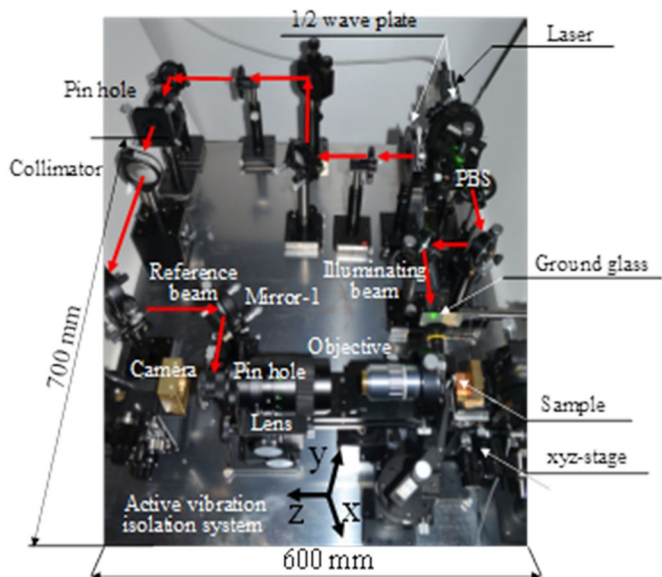


図7 作製されたコンパクト光学系

この新たな光学系では、従来の大規模な光学系と同様の超解像が可能であることが確認され、「Photonics 誌」にその成果を報告した⁵⁾。

(2)測定限界の検討

図 3 に示すマイクロ球を図 8 に示すように独立した微細構造物として観察が可能であることを「Photonics 誌」に報告した⁷⁾。

さらに、図 9 に示すように電子線描画機により描いた微細構造物(微細文字)の観察において、実験的に 60nm 幅の構造物の観察が可能なることを「Modern optics 誌」「Photonics 誌」に報告した^{6, 7)}。

加えて、図 10 に示すコンピュータシミュレーションにより、本研究において用いた測定原理に従うと、光源波長の 0.05 倍程度の規模の構造物の観察が可能であることを「Photonics 誌」で明らかにした^{8, 11, 12, 13)}。

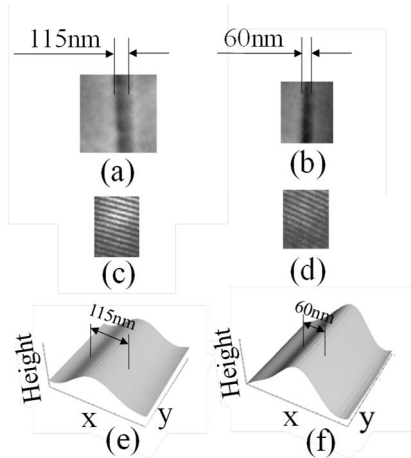


図 9 電子線描画機を用いて作製した測定対象の観察結果

(3)シミュレーションによるレーリー規準への新たな見解

図 11 の結果が示すように COMSOL を用いたコンピュータシミュレーションにより、伝統的なレーリー規準に基づく回折限界の考え方は、光の強度分布による回折時のエアリディスクとの関係により定められたものであり、本研究における測定原理に関連する測定限界は、光の位相分布に基づくものであることより、本研究の測定原理を伝統的なレーリー規準に基づく議論によって考察することはできないものであることを示した⁹⁾。

さらに、簡易な光学系を用いてシミュレーション結果の検証を図 12 に示すように「Photonics 誌」において報告した⁹⁾。

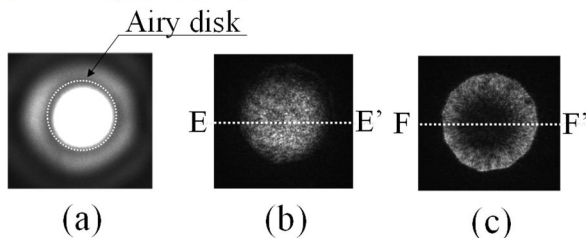


図 12 レーリー限界の実験検討結果

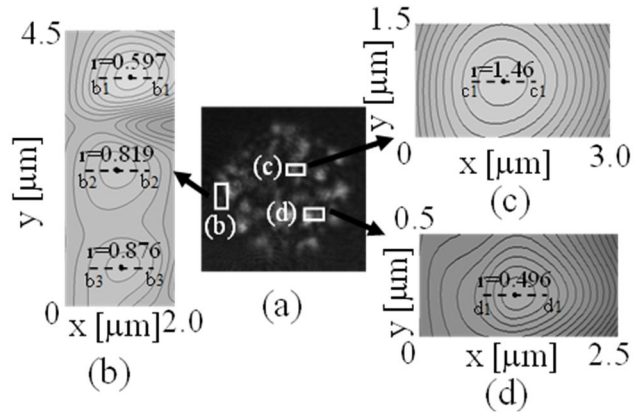


図 8 マイクロ球の観察結果

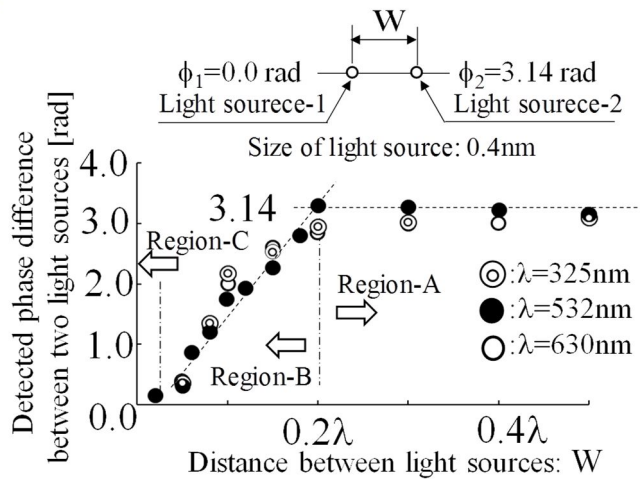


図 10 測定限界の検討結果

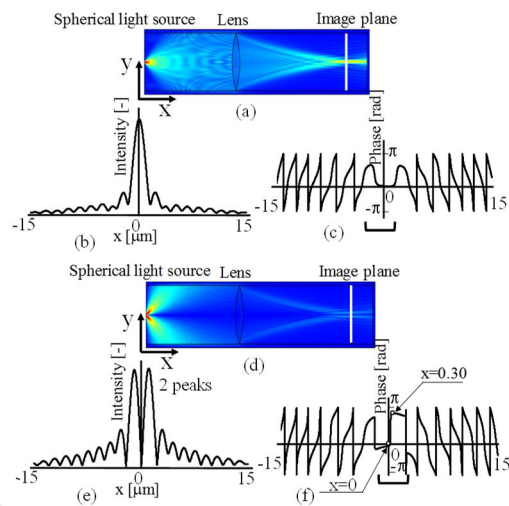


図 11 レーリー限界のシミュレーション検討結果

(4) バイオ分野における応用

本研究では、図 13(a)に示すように a と b に示すにんにくの染色体の三次元構造を図 14 に示すような断面形状として測定可能であることを示した。しかし、この染色体は、染色体を観察するために事前に行った「固定」「解離」「染色」の処理過程において、本来の生体の形状から大きく変形を受けていることが確認できた。すなわち、本研究の目的である細胞の生態観測においては、伝統的な染色体観察のための処置は染色体の構造を破壊するものであり、このような処理を行うことなく観察が可能な測定過程が必要であることを「Micro 誌」に報告した¹⁰⁾。生態観察の重要性を改めて明確にした。

最後に、本科学研究助成事業における成果により、研究代表者は 2022 年度 Stanford 大学等による「世界で最も影響力のある研究者トップ 2%」に選出された。科研費に深く感謝いたします。

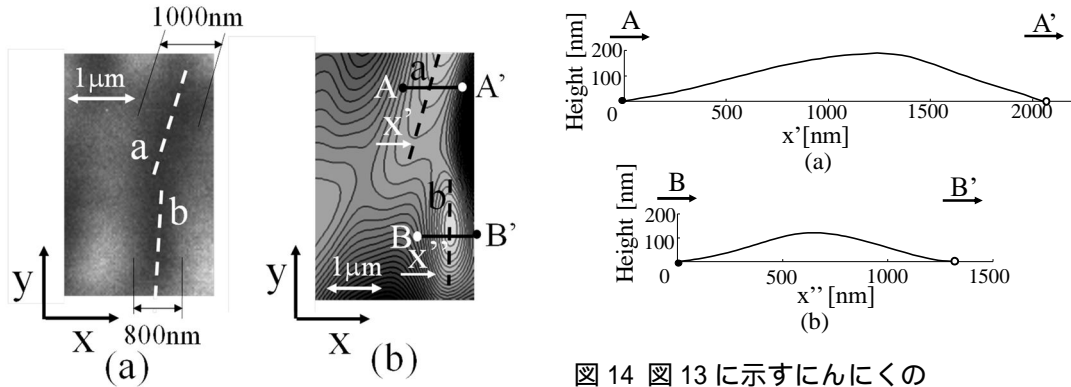


図 13 にんにくの染色体観察結果

図 14 図 13 に示すにんにくの染色体断面(A-A'、B-B')観察結果

<引用文献>

- 1) R.S. Sirohi: Speckle Metrology, Marcel Dekker, New York, 1993.
- 2) Y. Arai: Three-dimensional shape measurement beyond the diffraction limit of lens using speckle interferometry, J. Modern Optics (2018) Doi:1080/09500340.2018.1470266.
- 3) Y. Arai: Pre-treatment for preventing degradation of measurement accuracy from speckle noise in speckle interferometry, Measurement (2019) No.136 36-41 36-41.
- 4) Y. Arai: Three-Dimensional shape measurement beyond diffraction limit for measurement of Dynamic Events, Progress in Optomechatronic Technologies, Springer Proceedings in Physics (2019) No.233, https://doi.org/10.1007/978-981-32-9632-9_1.
- 5) Y. Arai: Shape measurement method of two-dimensional micro-structures beyond the diffraction limit based on speckle interferometry Photonics (2021) Vol.8, 420.
- 6) Y. Arai: Observation of micro-characters using three-dimensional shape measurement method based on speckle interferometry. J. Mod. Opt. (2020) Vol.67, 1451-1461.
- 7) Y. Arai: Microshape measurement method using speckle interferometry based on phase analysis, Photonics (2021) Vol.8, 112-.
- 8) Y. Arai: Simulation-based verification of the shape measurement mechanism of micro structures beyond the diffraction limit using speckle interferometry, Journal of modern optics (2021) <https://doi.org/10.1080/09500340.2021.2024901>.
- 9) Y. Arai: Simulation-based considerations on the Rayleigh Criterion in super-resolution techniques based on speckle interferometry, Photonics (2023) <https://doi.org/103390/photonics10040374>.
- 10) Y. Arai: Possibility of biological observations using the speckle interferometry-based super-resolution technology, Micro (2022) <https://doi.org/10.3390/micro2040041>.
- 11) Y. Arai: Consideration of existence of phase information of object shape in zeroth-order diffraction beam using electromagnetic simulation with aperture in front of object, J. Mod. Opt. (2020) Vol.67, 523-530.
- 12) Y. Arai: Precise wide-range three-dimensional shape measurement method to measure superfine structures based on speckle interferometry, Opt. Eng. (2020) Vol.59, doi: 10.1117/1.OE.59.1.014108.
- 13) Y. Arai: Factors affecting the measurement resolution of super-resolution techniques based on speckle interferometry, Journal of modern optics (2022) DOI: 10.1080/09500340.2022.2094011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yasuhiko Arai	4. 巻 8
2. 論文標題 Microshape Measurement Method Using Speckle Interferometry Based on Phase Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photonics	6. 最初と最後の頁 112 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/photonics8040112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yasuhiko Arai	4. 巻 8
2. 論文標題 Shape Measurement Method of Two-Dimensional Micro-Structures beyond the Diffraction Limit Based on Speckle Interferometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photonics	6. 最初と最後の頁 420 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/photonics8100420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yasuhiko Arai	4. 巻 69
2. 論文標題 Simulation-based verification of the shape measurement mechanism of micro structures beyond the diffraction limit using speckle interferometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Modern Optics	6. 最初と最後の頁 251 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09500340.2021.2024901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 新井 泰彦	4. 巻 74
2. 論文標題 スペックル干渉計測法を基礎とする超解像技術の二次元化によるバイオ分野への利用の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 機械の研究	6. 最初と最後の頁 22-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiko Arai, Eri Yane, Ryosuke Koyama	4. 巻 13
2. 論文標題 Feasibility of Optical Bearing Fabrication Using Radiation Pressure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 733-733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi13050733.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiko Arai	4. 巻 67
2. 論文標題 Consideration of existence of phase information of object shape in zeroth-order diffraction beam using electromagnetic simulation with aperture in front of objective	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Modern Optics	6. 最初と最後の頁 523-530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09500340.2020.1760383.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiko Arai	4. 巻 67
2. 論文標題 Observation of micro-characters using three-dimensional shape measurement method based on speckle interferometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Modern Optics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09500340.2020.1864041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiko Arai, Tong Chen	4. 巻 -
2. 論文標題 Simulation-based considerations on the Rayleigh Criterion in super-resolution techniques based on speckle interferometry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Photonics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/photonics10040374.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiko Arai	4. 巻 -
2. 論文標題 Possibility of biological observations using the speckle interferometry-based super-resolution technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/micro2040041.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiko Arai	4. 巻 -
2. 論文標題 Factors affecting the measurement resolution of super-resolution techniques based on speckle interferometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of modern optics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09500340.2022.2094011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮原理紗、新井泰彦
2. 発表標題 シミュレーションアプローチによるスペックル干渉計を用いた回折限界を超える微小構造物の形状計測法の開発
3. 学会等名 COMSOL Simulations WEEK(オンライン開催)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	青柳 誠司 (Aoyagi Seiji) (30202493)	関西大学・システム理工学部・教授 (34416)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前 泰志 (Mae Yasushi) (50304027)	関西大学・システム理工学部・教授 (34416)	
研究分担者	多川 則男 (Tagawa Norio) (50298840)	関西大学・先端科学技術推進機構・研究員 (34416)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関