

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18724

研究課題名（和文）後方散乱行列による高解像度散乱イメージング

研究課題名（英文）High-resolution scattering imaging using backscattering matrix

研究代表者

的場 修（Matoba, Osamu）

神戸大学・次世代光散乱イメージング科学研究センター・教授

研究者番号：20282593

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、散乱体内部にある蛍光情報の高解像度イメージングを実現するために、空間光変調素子と散乱体で発生させたスペックル照射に基づく2光子励起による散乱蛍光画像から非負値行列因子分解によって分離される散乱点像分布関数とそれらの相互相関計算を用いて画像復元する手法を開発した。蛍光ビーズを用いた実験により提案手法が蛍光ビーズ位置を再生可能なことを実証した。また、散乱体深部照明に向けて同軸型散乱行列計測手法を提案し、シミュレーション及び実験で実現可能なことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体は強い散乱体として作用することからその内部を非破壊かつ低侵襲に高解像度イメージングを実現することは非常に困難な状況にある。特に生体内部を観察するためには散乱で劣化した画像を反射型で観察する必要がある。本手法は、反射型配置に基づき、生体深部を観察するために2光子励起を用いる手法を提案したものである。実証実験によりスペックルパターン照明でも2光子励起が可能であり、散乱画像から直径2 μmの蛍光ビーズの位置を再生できることを実証した。これらの成果により深部散乱透視イメージング技術の開発に向けて重要な基礎的な結果を得た。

研究成果の概要（英文）：In this research, in order to realize high-resolution fluorescence imaging in the scattering media, we have developed a method to recover images from scattered fluorescence images by two-photon excitation based on speckle illumination generated by a phase-mode spatial light modulator and a scattering medium, using the scattered point spread function obtained by non-negative matrix factorization and their cross-correlation calculation. Experiments using fluorescent beads have demonstrated that the proposed method is capable of regenerating fluorescent bead positions. We also proposed a coaxial configuration of scattering matrix measurement method for deep illumination of scattering medium, and demonstrated its feasibility by simulations and experiments.

研究分野：光計測

キーワード：散乱イメージング 後方散乱行列

1. 研究開始当初の背景

近年、散乱体越しの像回復[1-3]や散乱体中または散乱体越しの集光操作[4]など、散乱体を対象としたイメージングや光波操作の研究が盛んに行われている。散乱体内部にある情報は散乱により劣化する。この劣化画像を復元し、高解像度にイメージングする研究が行われている。その中で、散乱媒体の入力光波と出力光波の関係を表す透過散乱行列を用いて散乱媒体中の光操作及びイメージングを行う方法がある。特に、空間周波数型透過散乱行列は様々な方向の平面波の振幅と位相の入出力関係を表しており、干渉性のあるコヒーレント光源を用いて求められている。生きた生体内部にある情報を取得する場合には、様々な蛍光タンパク質を利用できることから、蛍光を元に散乱体情報を取得し、それを用いて復元する手法が有効である。蛍光は照射エネルギーによって発生し、入射光の方向性を保持しないため、新たな方法の開発が必要である。本研究では散乱体内部にある蛍光情報の画像復元について取り組む。

2. 研究の目的

本研究では、散乱体内部にある蛍光情報の高解像度イメージングを実現するために、微小蛍光体を用い、空間光変調素子による様々な照射パターンとそれによる蛍光強度イメージングにより反射型配置で後方散乱行列を求める方法を提案する。この後方散乱行列を用いた高解像度復元手法の開発に取り組む。また、人工散乱体を用いて実験を実施し、提案手法の可能性を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、2光子励起を用いた後方散乱行列による画像復元手法の開発と、散乱内部での集光性能向上を目的として散乱体越しの光波制御法の改良に関する研究を実施した。以下、2つに分けて研究方法を説明する。

(1) 2光子励起を用いた後方散乱行列による画像復元手法の開発

後方散乱行列として2光子励起を利用した散乱蛍光イメージング画像に対して、非負値行列因子分解(NMF)によって分離される散乱点像分布関数とそれらの相互相関計算やデコンボリューションを用いて画像復元する手法を開発する。なお、本方法では散乱体がつもメモリ効果を利用して、同一平面上及び奥行き方向の位置情報を検出する。従来法としては1光子励起を用いてNMFによる散乱点像分布関数の抽出と、相互相関やデコンボリューションによる物体位置検出が行われている。本研究では、生体内部での散乱イメージングにおいて適用深さを拡張するため、長波長を用いた2光子励起による方法を開発する。

蛍光ビーズに、位相変調型の空間光変調素子(SLM)による位相変調及び散乱体によって発生するランダムスペckルパターンを照射する。スペckルパターンにより発光する蛍光ビーズからの蛍光強度が変わる。今、 N 個の蛍光ビーズがあり、 k 番目の蛍光ビーズに対する散乱点像分布関数を PSF_k とする。 j 番目のスペckルパターンによって k 番目の蛍光ビーズの発光係数を $a_{j,k}$ とすると、蛍光ビーズからの発光強度の重ね合わせは以下の式で表される。

$$I_j = \sum_{k=1}^N a_{j,k} PSF_k \quad (1)$$

照射スペckルパターンを変えながら複数の画像データを取得する。画像を行ベクトルに変形し、全ての画像データを結合させた画像行列 V を用意する。NMFでは、散乱点像分布関数を列ベクトルとする行列 W と各散乱点像分布関数の係数を与える係数行列 H の二つの行列に分解する。

$$V \approx WH \quad (2)$$

これにより各蛍光ビーズからの散乱点像分布関数が得られ、メモリ効果によるPSFの同一平面内でのシフト不変性を利用して、相互相関演算またはデコンボリューションにより蛍光ビーズの位置を求めることができる。

(2) 散乱体越しの光波制御法の改良

散乱体中の深部イメージングを実現するためには、深部に光を届ける必要がある。そのため、SLMのつも空間・周波数帯域幅積を最大限に利用可能な散乱行列の測定手法を提案する。提案手法の有効性を実証するために透過散乱行列を測定し、散乱体越しの集光操作を実施する。

4. 研究成果

(1) 2光子励起を用いた後方散乱行列による画像復元手法の開発

図1に実験光学系の概要図を示す。2光子励起を行うためにフェムト秒レーザー光を用い、さらにスペckル照明を実現するために位相変調型SLMと散乱板を用いた。SLMによる位相パターンを変化させることで、スペckルパターンが変化する。本研究で用いたフェムト秒レ

レーザーは Spectra Physics 社の Ti:Sapphire フェムト秒レーザーを用いた。中心波長は 950 nm, パルス幅が 100 fs, 繰り返し速度が 80 MHz である。散乱板として, 拡散角度が 1 度のホログラフィック拡散板を用いた。蛍光ビーズとして直径 1.98 μm の Nile red を用いた。

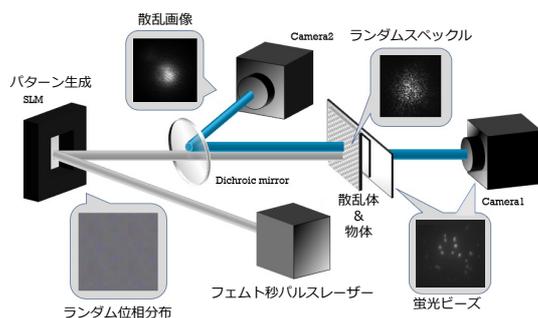


図1 2光子励起による後方散乱行列を用いた散乱透視イメージングの光学系概要図.

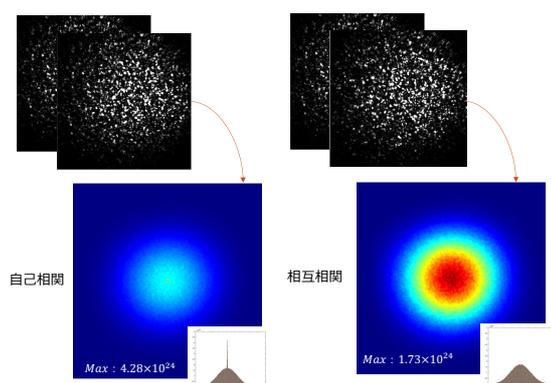


図2 物体に照射するスペckルパターンとその自己相関及び相互相関の様子.

実験では, フェムト秒レーザー光を SLM に入射させる。照射されたフェムト秒レーザー光は SLM 面で 512 個のランダムスペckルに変調される。このランダムパターンは, 任意の整数 N を用いて $N \times N$ のランダムパターンを, 1024×1024 ピクセルに表示する。図 2 にスペckルパターンの例を示す。スペckルパターンの独立性を検証するため, 自己相関及び相互相関を求めた。自己相関の幅は $2 \mu\text{m}$ であり, ビーズ径と同じ値が得られている。さらに相互相関において鋭いピークが現れていないことからスペckル同士の独立性が高くなっていることがわかる。これにより, 複数のスペckルパターン照射により各蛍光ビーズからの発光強度が変化し, それらが重畳された散乱画像が得られると期待できる。

実験で得られた 1024 枚の散乱画像から散乱点像分布関数 (散乱 PSF) を入手する際の NMF 処理における W の列数は 45 に設定して行った。これは NMF で分解したときの二乗誤差が最小となる列数であった。図 3 に 45 個の散乱 PSF の内の 4 個を示す。中心座標がずれた位置に各散乱 PSF が得られている。図 4 に 45 個の PSF の相互相関を重畳させた結果を示す。図 4 (a) は図 1 の Camera 1 で撮影した, スペckルパターン照明によって励起された蛍光像を重畳させたものであり, 理想的な再生像である。図 4 (b) は相互相関ピーク値の場所を 1 として全ての相互相関画像を重畳させたものである。図 4 (a), (b) の比較から構造は得られているものの, 相互相関のピーク位置がずれており, 複数点に分割している。相互相関ピーク値の位置ずれについては調査しているが, 蛍光ビーズの大きさから本手法で蛍光ビーズの位置を再生可能なことがわかる。

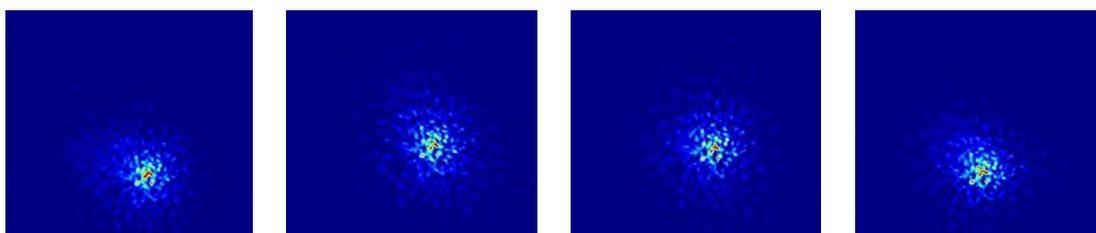


図3 1024 個のスペckルパターンから NMF で抽出された散乱点像分布関数の例.

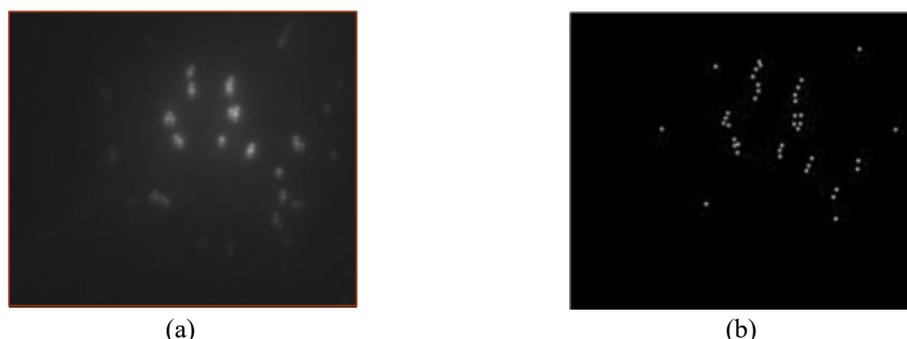


図4 相互相関による再生結果; (a)直接透過光の重畳画像, (b) 相互相関結果の重畳画像.

(2) 散乱体越しの光波制御法の改良

散乱行列の安定した取得を実現するために、参照光と物体光を共通光路型にした方法を提案した。また、これにより SLM の空間・周波数帯域幅積を最大限に利用できる。図 5 に実験系の概要を示す。SLM に位相分布を表示し、それをレンズによりフーリエ変換する。このフーリエ変換パターンが 3 枚の散乱板を通過し、その出力強度分布が観察される。液晶を用いた位相変調型 SLM では複屈折性があるので、常光線となる偏光の光は変調を受けない。一方、異常光線となる偏光の光は SLM で位相変調される。この非変調及び変調の光はレンズによりフーリエ変換され、散乱体に入射する。この二つの光波は散乱体で変調されてスペckルパターンとなり、散乱体から射出される。その後、偏光板により偏光状態を揃えることで干渉像が記録される。SLM で 4 ステップ位相シフトを行うことで、物体光の位相と振幅分布が得られる。これが散乱体の透過行列となる。所望の出力光波分布を与える入力光波分布の算出には、本研究では逆行列の代わりに随伴行列を用いた。

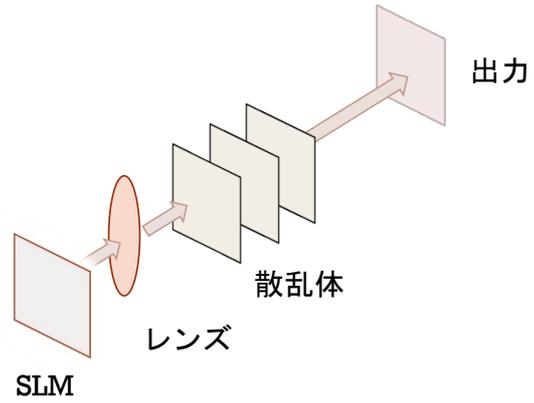


図 5 実験光学系の概要

シミュレーション及び実験を実施し、提案手法により散乱体通過直後に 1 から 3 個の集光スポットを同時作成することを試みた。図 6 にシミュレーション結果を示す。図 6 左側が理想的な 3 点のスポットを表し、右側がシミュレーションによる出力である。3 つのスポットが得られているが、ピーク強度が不均一なことがわかる。この原因としては、参照光のスペckル強度のバラツキが原因の一つである。実験結果を図 7 に示す。図 7 (a) は SLM に均一な位相分布を表示した場合の出力面での強度分布であり、図 7 (b), (c) はそれぞれ提案手法及び従来手法による散乱体直後での出力光強度画像である。ここで従来手法とは、SLM の領域を中心部分に物体光、周辺部分を参照光として分割する方法である。この 2 つの結果から、提案手法は従来手法と同様に散乱体越しに集光スポットを形成できることがわかる。シミュレーションでは提案手法での 1 つの集光スポットの強度は従来手法の 3.089 倍であることがわかった。これらの結果から、SLM 全面を物体光変調に利用できる提案手法の有効性を実証した。

この他の散乱体中の集光方法として、蛍光散乱光の位相情報を計測し、それをもとに周辺部分へ集光スポットを形成する方法について検討した[5]。散乱蛍光信号の位相計測には強度輸送方程式を用いた。デジタル位相共役及び周辺への集光作用として位相共役分布の位置シフト及び 2 次位相分布を付加することで、集光点の走査が可能であることをシミュレーションで確認した。

以上の結果をまとめ、学会発表及び学術論文として出版する準備を進めている。

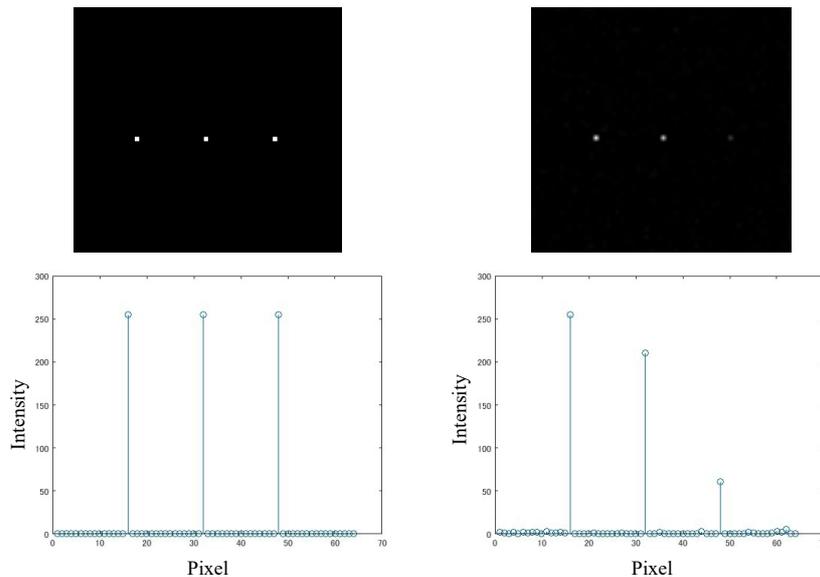


図 6 3 点の集光スポットを形成するシミュレーション結果；左側が理想的な出力で右側がシミュレーション結果。

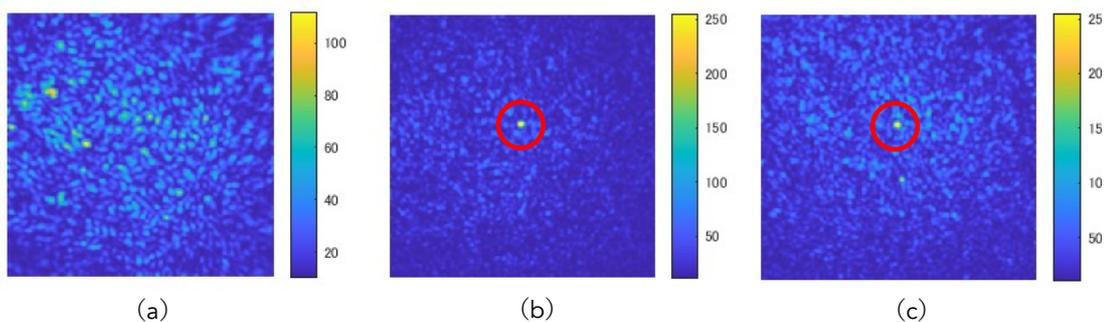


図7 実験系による1つのスポットの形成結果; (a) SLMに変調パターンを表示しない場合の出力強度分布, (b) 提案手法の出力強度分布, (c) 従来手法の出力強度分布.

参考文献

- [1] J. Bertolotti, E. G. van Putten, C. Blum, A. Lagendijk, W. L. Vos, and A. P. Mosk, "Non-invasive imaging through opaque scattering layers," *Nature* **491**, 232 (2012).
- [2] S. M. Popoff, G. Lerosey, R. Carminati, M. Fink, A. C. Boccara, and S. Gigan, "Measuring the transmission matrix in optics: An approach to the study and control of light propagation in disordered media," *Phys. Rev. Lett.* **104**, 100601 (2010).
- [3] A. Boniface, J. Dong, and S. Gigan, "Non-invasive focusing and imaging in scattering media with a fluorescence-based transmission matrix," *Nat. Commun.* **11**, 6154 (2020).
- [4] I.M. Vellekoop, A. Lagendijk, A.P. Mosk, "Exploiting disorder for perfect focusing," *Nat. Photonics* **4**, 320 (2010).
- [5] S. Matsuda, N. Yoneda, X. Quan, O. Matoba, W. Watanabe, "Focused Spot Generation based on Digital Phase Conjugation by Transport of Intensity Equation in Scattering Media," *Biomedical Imaging and Sensing Conference (BISC) 2022*, 250294

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 的場修, 全香玉	4. 巻 44
2. 論文標題 「散乱・揺らぎ場の包括的理解と透視の科学」におけるコンピューショナルイメージングの活用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 OplusE	6. 最初と最後の頁 124-128
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 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 的場修, 全香玉, マノジクマー, スディーシュラジプット, 粟辻安浩
2. 発表標題 マルチモーダルイメージング技術とその散乱光計測への展望
3. 学会等名 Optics and Photonics Japan 2021, 28aAS1 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大浦秀喜, Sudheesh K. Rajput, Manoj Kumar, 全香玉, 的場修
2. 発表標題 深層学習を用いたTIE 3次元蛍光像の改善
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会, X02-14a-X-03
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiori Matsuda, Naru Yoneda, Xiangyu Quan, Osamu Matoba, Wataru Watanabe
2. 発表標題 Focused Spot Generation based on Digital Phase Conjugation by Transport of Intensity Equation in Scattering Media
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference (BISC) 2022, 250294 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.lab.kobe-u.ac.jp/csi-applied-optics/index.html>

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	全 香玉 (Quan Xiangyu) (40814778)	神戸大学・システム情報学研究所・助教 (14501)	スペックル2光子励起散乱行列実験の実施

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
---------	---------