

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：10103

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820169

研究課題名(和文) レンズレスな新しい可搬型顕微鏡による血液細胞イメージング

研究課題名(英文) Imaging of blood cells using a field-portable microscopy without lens

研究代表者

船水 英希 (FUNAMIZU, Hideki)

室蘭工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90516486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液細胞の観測に用いる光学顕微鏡で大きな問題となるレンズ収差や合焦機構の振動ノイズによる計測誤差をデジタル補正で除去可能なデジタルホログラフィック顕微鏡を可搬性および実用性の高いファイバ光学系により構成し、血液細胞の3次元形状や空間分布および凝固機能を高精度に取得し、RGB半導体レーザーにより顕微鏡画像をカラー化することで分光情報を取得可能なレンズレスで合焦不要なファイバ光学系カラーデジタルホログラフィック顕微鏡を新規に提案・構成し、可搬型装置の設計を行った。

研究成果の概要(英文)：It is known that optical microscopy is a useful tool for non-invasive and non-destructive testing of living cells. A conventional optical microscopy has several disadvantages in that it includes errors due to the aberration of lens and the vibrational noise of focusing devices. Digital holographic microscopy (DHM), which has recently been proposed as a new optical microscopy, can eliminate these errors by numerical corrections. In this study, we investigated a field-portable microscopy and the imaging of blood cells using DHM. To develop a field-portable microscopy, we applied the optical system using optical fibers to the microscopy. For obtaining color information of blood cells, we used RGB laser diodes as optical sources. From this microscopy, we obtained the information about the three-dimensional shape, spatial distribution, and color of blood cells, and function of blood coagulation. Using these features of blood cells, the precision and accuracy of diagnosis were improved.

研究分野：光計測

キーワード：デジタルホログラフィ 顕微鏡 血液細胞

1. 研究開始当初の背景

2011年3月に発生した福島原発事故による東日本の放射能汚染により、放射線被曝による重篤な病気の発症への懸念が全国的に広がっている。それらの病気の中でも白血病はあらゆる年齢で発症し、治療開始時期により完治率が大きく変化するため早期発見・早期治療が重要である一方で、初期症状が風邪と酷似しており専門医の問診による初期診断が難しく、血液検査を行った後に白血病の疑いのある患者に骨髄穿刺検査を行なう。骨髄穿刺検査は白血病の診断において必須の検査法であるが、患者の身体的・金銭的負担が大きく血液検査による高精度な白血病の診断法に対する需要が高い。

本研究では、白血病の血液検査のための新規な顕微鏡としてレンズレスで合焦不要かつ分光情報が取得可能なカラーデジタルホログラフィック顕微鏡を可搬性および実用性の高いファイバ光学系により構成し、細胞の3次元形状や空間分布、分光情報の可視化および血液凝固機能の定量的評価を同時に実現する計測装置を新規に提案し、装置の可搬化および4情報による血液検査における白血病診断の高確度化を目的とする。

2. 研究の目的

- (1)ファイバ光学系によるレンズレスなカラーデジタルホログラフィック顕微鏡の確立および計測装置の小型・簡便・低コスト化。
- (2)再生像に対する種々のデジタル補正プログラムの開発による計測精度の向上。
- (3)カラーデジタルホログラフィック顕微鏡での実時間計測による血液細胞の空間分布、3次元形状、分光情報および凝固機能の4情報の同時取得法の確立。

3. 研究の方法

(1) 血液細胞観測のためのファイバ光学系を用いたレンズレスなデジタルホログラフィック顕微鏡を構成する。この顕微鏡を構成する際、インライン型ホログラフィ光学系を採用する。488 nmの青色LDを光源に使用し、モノクロ CCD カメラによりデジタルホログラフィック顕微鏡を構成する。

(2) (1)で構成したデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて血液細胞の可視化のための実験を行なう。被験物体にはヒト血液よりも安価なウマ血液を使用して基礎実験を行なう。スライドガラス上に滴下した血液にファイバから出射したレーザ光を照射し、CCDによりデジタルホログラム(干渉縞)画像を取得する。この画像を計算機に取り込み、数値計算により再生された血液細胞の画像から空間分布および位相分布を取得する

プログラムを開発する。

(3) (2)で取得したデジタルホログラムを用いて、可視化データにおける計測誤差を低減するプログラムを開発する。高精度なデジタルオートフォーカスおよび再生像ノイズのデジタル補正のプログラムを開発する。

(4) 青色LDに加え、532 nmのファイバ付緑色LDおよび640nmのファイバ付赤色LDをRGBレーザファイバコンバイナにより1つに結合し、ファイバ光学系によるカラーデジタルホログラフィック顕微鏡を構成する。

(5) カラーデジタルホログラフィック顕微鏡から得られたRGB再生像を色合成してカラー立体像を取得する。さらにRGB3色からカラー立体像における各画素の分光反射率を推定するプログラムを開発する。また、カラーCCDカメラでデジタルホログラムを実時間的に取得し、血液凝固機能を空隙度により定量化する。

(6) 装置の小型・簡便・低コスト化を図り、開業医レベルでも導入が容易で集団検診および出張診断に可搬な装置設計を行なう。

4. 研究成果

(1)可搬設計が可能なファイバ光学系を用いたカラーデジタルホログラフィック顕微鏡の構築。

図1に示すような光ファイバおよびRGBファイバコンバイナを用い、可搬型装置を目指して光学系を簡素化し、カラーデジタルホログラフィック顕微鏡を実現した研究は国内外に例を見ず新規である。図2に被験物体

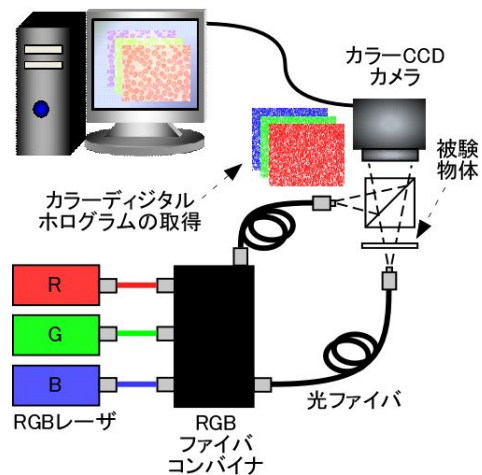
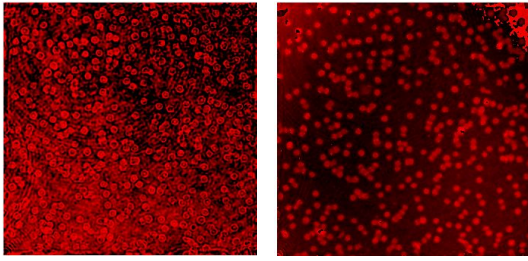


図1 ファイバ光学系を用いたカラーデジタルホログラフィック顕微鏡

に血液細胞を用いて得られた再生像の強度と位相の分布をそれぞれ示す。



(a) (b)

図2 血液を被験物体として用いて得られた再生像。(a)強度分布。(b)位相分布。

この結果は波長が 488 nm のレーザを用いて得られた。(a)の強度分布は血液の赤血球中に含まれるヘモグロビンによる光吸収量の相対値を示している。この図において、吸収量が小さい領域は黒色で、大きい領域は赤色で示されている。また、(b)の位相分布は血球の屈折率と厚みの積を表しており、赤色は位相量が大きい領域、黒色は小さい領域をそれぞれ表している。このようにして得られた位相値から屈折率と厚みの2つのパラメータを同時に取得することは困難であり、通常は一方を既知としてもう一方の値を求める。このように、再生像から血液細胞の空間分布および位相分布を取得することができた。

また、再生像の色情報を取得するためにRGBレーザによるホログラムの再生像を色合成して得られたカラー画像を図3に示す。被験物体は色彩再現性を評価する際に使用されるカラーチャートを透過型のカラーフィルムに転写したものを購入して用いた。

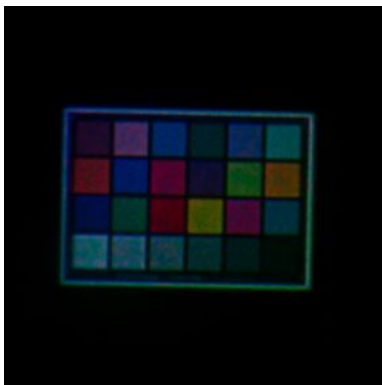


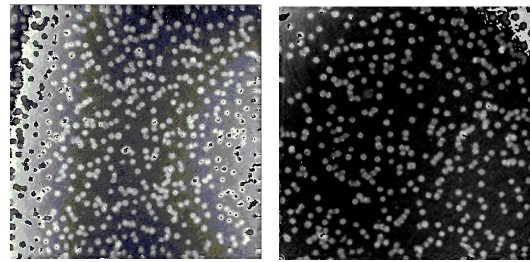
図3 RGBレーザから得られた再生像の色合成の結果。

図3の結果は実物と比較すると明度および色再現性が低いという問題点があることがわかった。これはRGBの3波長の透過率のみを用いて色合成を行なっているため、物体が本来持つ連続的な分光特性を得られていないことが原因である。

(2)再生像の位相ノイズに対する補正プログラム、デジタルオートフォーカスアルゴリズムの開発。

図1の光学系により取得したホログラムを再生した結果、図4(a)のように画像の中心からの距離に伴って生じる放物面状の位相誤差

差が背景ノイズとして生じた。これを除去または低減するために、コンピューターにより放物面の位相分布を生成するアルゴリズムを新規に提案した。曲率のパラメータを調整することで位相誤差を補正するプログラムを作成した。今後はこの補正を自動的に行うようなアルゴリズムの開発が課題である。図4(b)は(a)に位相補正プログラムを適用した結果であり、放物面状の位相誤差が大きく低減し、画像のコントラストが増加していることがわかる。



(a) (b)

図4 血液を被験物体として用いて得られた再生像の位相分布に生じる位相誤差の補正。

次に、取得したホログラムを再生する際に、焦点を自動的に合わせるプログラムの作成を行なった。本研究では、再生像の強度分布のコントラストを評価関数として、透過性の被験物体の場合には最小値を、空間的に吸収率が大きく異なる物体に対しては最大値となる再生距離を合焦距離とみなす。図5は図

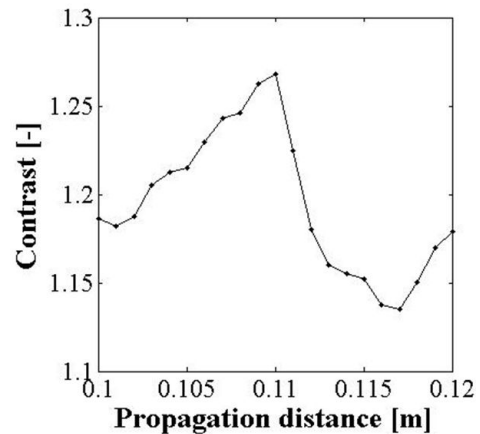


図5 再生像のコントラストを用いた合焦距離の推定。

2および図4で用いた血液細胞を被験物体としたときの合焦距離の推定結果を示している。血液細胞をほぼ透過性の物体とみなし、コントラストが最小値となる伝搬距離を合焦距離とした。この図から合焦距離は0.117 m となり、この距離は目視評価とほぼ一致しており、良好な結果が得られた。

(3)カラーデジタルホログラフィック顕微鏡での実時間計測による血液細胞の空間分布、3次元形状、分光情報および凝固機

能の4情報の同時取得法の確立.

本研究で用いたカラーデジタルホログラフィック顕微鏡による血液細胞の空間分布と3次元形状の取得は(1)で記述した.一方,(2)で記述したRGBレーザによる色情報では再生像の色再現性が低下するため,RGBの情報から分光特性を推定し,色再現性の向上を図った.図6は図3の各色の分光特性を,図7はその分光特性から色合成を行った結果を示している.図3と比較して,画像が明るくなったことに加えて色再現性が向上し,実物に近い見た目の画像を取得することができた.

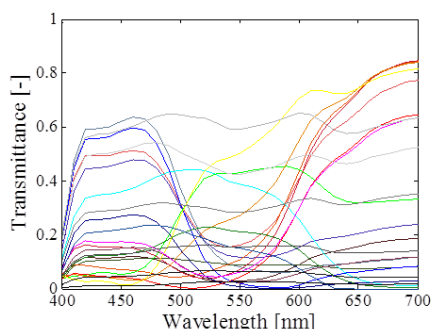


図6 推定された分光特性.



図7 推定された分光特性から色合成を行ったカラー画像.

血液の凝固機能の定量評価には,再生像の振幅または位相を用いて画像処理の1つである空隙度を用いた.空隙度は空間に存在する物理量の空隙分布を定量化する方法であり,数値が高いほど物理量の空間分布の偏りが大きいことを意味する.凝固前の血球の空間分布の空隙度は1.13であり,凝固後は1.42であった.これは,凝固前は血球が空間的に一様に分布するのに対して,凝固後は血球が凝集構造を形成し,血球の空間分布に偏りが生じることを定量的に表していると考えられる.

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 9 件)

(1) H. Funamizu, S. Shimoma, Y. Yuasa and Y. Aizu, Effects of spatio-temporal average processes on the estimation of spectral reflectance in color digital holography using speckle illuminations, Applied Optics, Vol. 53 pp. 7072 7080 (2014). 査読有.

DOI : 10.1364/AO.53.007072

(2) N. Yokoi, Y. Shimatani, M. Kyoso, H. Funamizu and Y. Aizu, Imaging of blood flow and blood concentration change in a frame rate using laser speckle: Methods for image analysis, Optics and Lasers in Engineering Vol. 64 pp. 352 362 (2014). 査読有.

DOI : 10.1016/j.optlastec.2014.06.007

(3) T. Yuasa, R. Honma, H. Funamizu, I. Nishidate and Y. Aizu, Color adjustment algorithm adapted to the spectral reflectance estimation method, Optical Review, Vol. 21 No. 3 pp. 369 372 (2014). 査読有.

DOI : 10.1007/s10043-014-0056-3

(4) H. Funamizu, S. Shimoma and Y. Aizu, Color digital holography using speckle illumination by means of multi-mode fiber, Optics Communications Vol. 312 pp. 245 251 (2014). 査読有.

DOI : 10.1016/j.optcom.2013.09.032

(5) H. Funamizu, S. Shimoma and Y. Aizu, Image quality improvement using speckle method in in-line digital holography by means of multi-mode fiber, Optics Communications Vol. 305 No. 15 pp. 100 106 (2013). 査読有.

DOI : 10.1016/j.optcom.2013.04.061

〔学会発表〕(計 31 件)

(1) 得能 友太, 船水 英希, 相津 佳永:「スペckル照明を用いたカラーデジタルホログラフィック顕微鏡の分光透過率推定」, 春季第62回応用物理学関係連合講演会, (2015年3月11-14日), 東海大学(神奈川県, 平塚市).

(2) 熊谷 泰志, 船水 英希, 相津 佳永:「デジタルホログラフィック顕微鏡による血液凝固過程の動的観察」, 春季第62回応用物理学関係連合講演会(2015年3月11-14日), 東海大学(神奈川県, 平塚市).

(3) 熊谷 泰志, 船水 英希, 相津 佳永:「デジタルホログラフィック顕微鏡を用いた血液凝固の動的観測」, 第50回応用物理学会北海道支部/第11回日本光学会北海道地

区合同学術講演会 (2015年1月9-10日), 勤労者福祉会館 (北海道, 旭川市).

(4) 得能 友太, 船水 英希, 相津 佳永: 「スペckル照明によるカラーデジタルホログラフィック顕微鏡」, 第50回応用物理学会北海道支部/第11回日本光学会北海道地区合同学術講演会 (2015年1月9-10日) 勤労者福祉会館 (北海道, 旭川市).

(5) 船水 英希, 湯浅 友典, 相津 佳永: 「スペckル照明を用いたカラーデジタルホログラフィにおける分光反射率推定と画質改善」, 第54回光波センシング技術研究会, (2014年12月9-10日) 東京理科大学森戸記念館 (東京都, 新宿区).

(6) 渡辺 裕樹, 熊谷 泰志, 船水 英希, 相津 佳永: 「デジタルホログラフィック顕微鏡を用いた血液凝固の動的イメージング」, Optics & Photonics Japan 2014, (2014年11月5-7日) 筑波大学文京キャンパス (東京都, 文京区).

(7) 得能 友太, 船水 英希, 相津 佳永: 「スペckル照明を用いたカラーデジタルホログラフィック顕微鏡」, 日本機械学会北海道支部 第53回講演会 (2014年9月27日), 室蘭工業大学 (北海道, 室蘭市).

(8) 熊谷 泰志, 渡辺 裕樹, 船水 英希, 相津 佳永: 「デジタルホログラフィック顕微鏡による血液凝固特性の観測」, 日本機械学会北海道支部 第53回講演会 (2014年9月27日), 室蘭工業大学 (北海道, 室蘭市).

(9) H. Funamizu, Y. Watanabe and Y. Aizu, Observation of red blood cells in blood coagulation using digital holographic microscopy, The 10th International Conference Series on Laser-light and Interactions with Particles (25-29, August, 2014), Aix-Marseille University (Marseille, France).

(10) H. Funamizu, Y. Watanabe and Y. Aizu: Observation of Aggregation Structure of Red Blood Cells in Blood Coagulation Using Digital Holographic Microscopy, Biomedical Imaging and Sensing Conference 2014 (22-24 April, 2014) Pacifico Yokohama (Kanagawa, Japan).

(11) 渡辺 裕樹, 船水 英希, 相津 佳永: 「デジタルホログラフィック顕微鏡による血液凝固の観測」, 春季第61回応用物理学関係連合講演会 (2014年3月17-20日), 青山学院大学 (神奈川県, 相模原市).

(12) 渡辺 裕樹, 下間 翔平, 船水 英希, 相

津 佳永: 「デジタルホログラフィック顕微鏡による血液細胞の観測」, 第49回応用物理学会北海道支部/第10回日本光学会北海道地区合同学術講演会 (2013年12月9-10日), 北海道大学 (北海道, 札幌市).

(13) 下間翔平, 船水英希, 相津佳永: 「スペckル照明を用いたカラーデジタルホログラフィによる分光反射率推定」, Optics & Photonics Japan 2013, (2013年11月12-14日) 新公会堂 (奈良県, 奈良市).

(14) H. Funamizu, S. Shimoma and Y. Aizu: In-line color digital holography using speckle illumination by means of multi-mode fiber, International workshop on holography and related technologies 2013 (15-17 October, 2013) Kitami Institute of Technology (Kitami, Japan).

(15) 渡辺 裕樹, 下間 翔平, 船水 英希, 相津 佳永: 「デジタルホログラフィを用いた血液の動的観測」, 日本機械学会北海道支部 第52回講演会 (2013年9月28日), 函館工業高等専門学校 (北海道, 函館).

(16) S. Shimoma, H. Funamizu and Y. Aizu: Estimation of spectral reflectance in color digital holography using a speckle method by means of multi-mode fiber, Tenth Japan-Finland Joint Symposium on Optics in Engineering (2-5 September, 2013) Utsunomiya University (Tochigi, Japan).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船水 英希 (FUNAMIZU Hideki)
室蘭工業大学・工学研究科・助教
研究者番号: 90516486