

Feature Article

特集論文

並列デジタルホログラフィック顕微鏡法による細胞の3次元動画像計測法及びその装置の開発

栗辻 安浩

試料の3次元情報を動画像計測できる方法として並列デジタルホログラフィを發明し、その有効性を計算機シミュレーションと原理実験により確認した。本方法は、動く細胞や生体粒子構造、機能、ダイナミクスなどの瞬時3次元計測や3次元動画像計測を可能にし、将来の医療分析、食品・製品検査など多くの応用に有効である。

はじめに

近年、エレクトロニクスとバイオテクノロジーが高度に発達し、社会のさまざまな分野に貢献している。エレクトロニクスにより大容量情報の高速処理が可能になった結果、より高次元な情報処理を可能にした。バイオテクノロジーも医学・薬学・農学において生体機能の理解・発見や新機能の発現・合成などを実現している。この二つの技術を融合させて医療分野に応用し、より豊かな生活を実現することが今後重要な課題となる。生体の計測には非侵襲性が必要で、更に画像として情報を得られることが検査や診断では重要である。古くは光学顕微鏡、近年では共焦点レーザー顕微鏡や近接場顕微鏡、原子間力顕微鏡、将来は光CT^{*1}など光計測が有望な技術として期待されている。しかし、これらの方法では3次元の奥行情報を計測するために走査処理が必要であり、生体粒子や動く細胞の計測は不可能である。一方、3次元情報を記録・計測できる技術としてホログラフィ^[1]がある。従来は高解像度写真乾板に3次元情報を記録し、それを現像・再生する過程が必要であり記録から再生まで長時間を要した。計算機の処理の高速化、記憶装置の大容量化、CCDやCMOSイメージセンサなどの撮像素子の高解像・高画素数化などエレクトロニクスの進展をホログラフィに導入することによりこれらの処理を省略できて、より高速に計測ができるデジタルホログラフィ^[2,3]が提案された。この方法では、撮像素子で干渉縞を取得し計算機におい

て3次元物体の位相と振幅を任意の奥行で得ることができ。しかしながら微細な干渉縞を記録するには、既存の撮像素子の画素数や画素ピッチでは解像力が低いので、ホログラムの記録に必要な参照光を撮像素子に垂直に照射することにより、干渉縞間隔を広げて記録するin-lineホログラフィ^[4-6]という方法が用いられている。ところが、この方法には、試料の必要な情報の上に、不要な背景光や共役光が重なることが原理的に避けられないという問題がある。デジタルホログラフィで、より信号対雑音比の高い情報を得るために記録時に必要な参照光の位相を3段階以上変化させて干渉縞を得る位相シフト法^[7]が用いられている。しかしながら、この方法では、位相を逐次的に変化させるために瞬時計測が不可能であった。そこで著者は、位相の変化を同時に行うことが可能な並列デジタルホログラフィ^[8-12]を考案した。

*1: Optical Computed Tomography. X線CTにおけるX線の代わりに光を試料に照射し、透過や散乱、反射などの光応答を計測し、コンピュータで処理して断層写真を得る方法。特に生体内での透過性が比較的高い近赤外光を用いた場合、生体組織を傷つけず3次元的な分析を行うことができることから医療面での応用が期待される。

ホログラフィ

ホログラフィは、光の干渉・回折を利用して光波の振幅と位相の分布を記録、再生する技術である^[1]。この技術

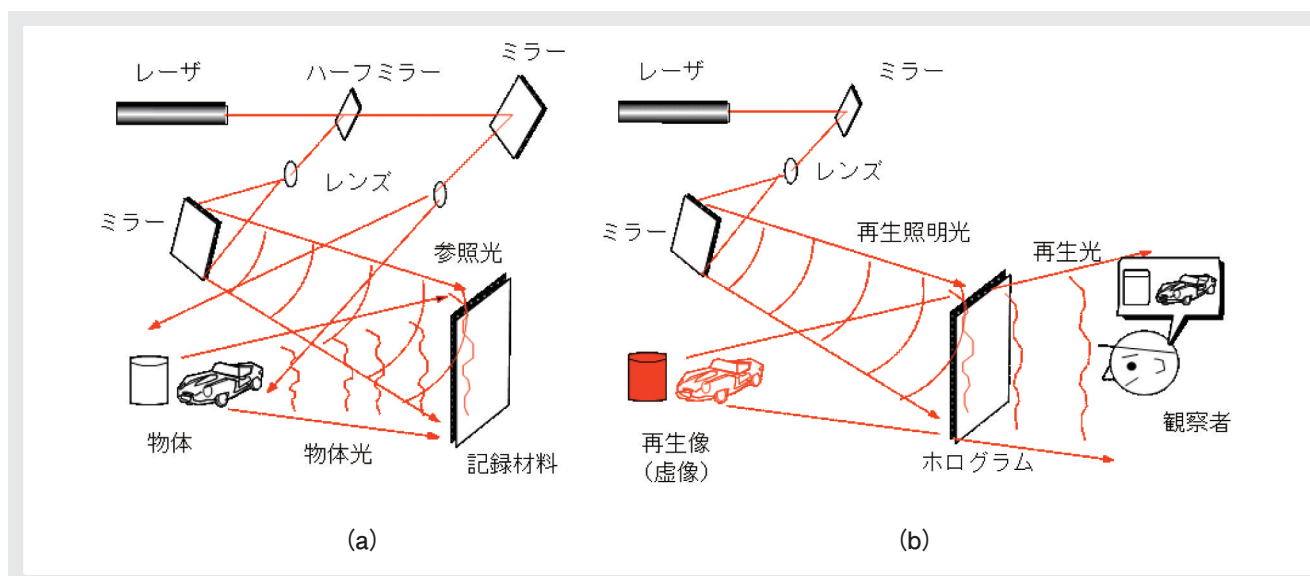


図1 ホログラフィの原理
(a)記録, (b)再生

は完全な立体像を記録・再生できることから3次元画像表示の有力な手段となっている。光が物体に照射されると、物体の各点で乱反射を起して強度と位相が変調される。このようにして、その物体特有の光の波面が作られる。波面の記録には、その波の強度と位相を記録する必要がある。しかし、記録材料や撮像素子には強度しか記録できない。そこで、位相を記録するために光の干渉を利用して、位相情報を強度情報に変換して記録する。

ホログラムの記録と再生を図1に示す。物体に光を当て、物体から散乱した物体光と、物体に当たらない参照光とを干渉させると干渉縞パターンができる。この干渉縞の光強度のパターンをホログラムとして記録材料に記録する。ここでは、そのホログラムに参照光と同じ再生照明光を当てると、物体の像が再生される。

デジタルホログラフィ

図2に、デジタルホログラフィ^[2,3]の概念図を示す。この技術は、干渉縞パターンをCCDなどのイメージセンサに画像として記録し、その干渉縞画像のデータに対してコンピュータにより光の回折現象を数値計算することで記録物体の3次元像をコンピュータ内に再生する。デジタルホログラフィには、以下の特徴がある。

- (1) 現像処理が不要で、撮影現場で再生像が得られる。
- (2) 任意の面での再生像が得られる、焦点深度が深い像が得られる。

- (3) 定量的な評価が行える。
- (4) ホログラムのデータを容易に伝送、複製できる。
- (5) 使用するレーザー光の波長の制限が少ない。

これらの特徴により、粒子や流体の3次元計測、生物3次元顕微鏡、3次元内視鏡、機械振動の3次元計測などを旨とした研究が近年盛んに報告されている(図2)。

従来のデジタルホログラフィ

これまでに報告されているデジタルホログラフィは、大別してin-line型^[4-6]、off-axis型^[7]、位相シフト型^[7,8]の3つの型に分類される。in-line型は参照光を撮像素子に対して垂直に照射する。この型では、再生時に非回折光と所望の像とその共役像は重なってしまい、その結果、再生像が劣化する。これに対してoff-axis型は物体光と参照光が角度を持って入射するので、再生時においても非回折光と所望の像とその共役像が分離して結像され、像が重なるのを防ぐことができる。しかし、この型では、ホログラムの記録には1 mmあたり千本～数千本という高い解像力が必要になる。この干渉縞パターンを既存の撮像素子で撮影する場合、現在のCCDの解像度は1 mmあたりせいぜい数百本程度であるために、参照光と物体光の角度は小さい値しかとることができないということになる。非回折光と所望の像とその共役像が重なるために、小さな試料に対して非常に狭い領域でしか記録できないという問題がある^[13]。

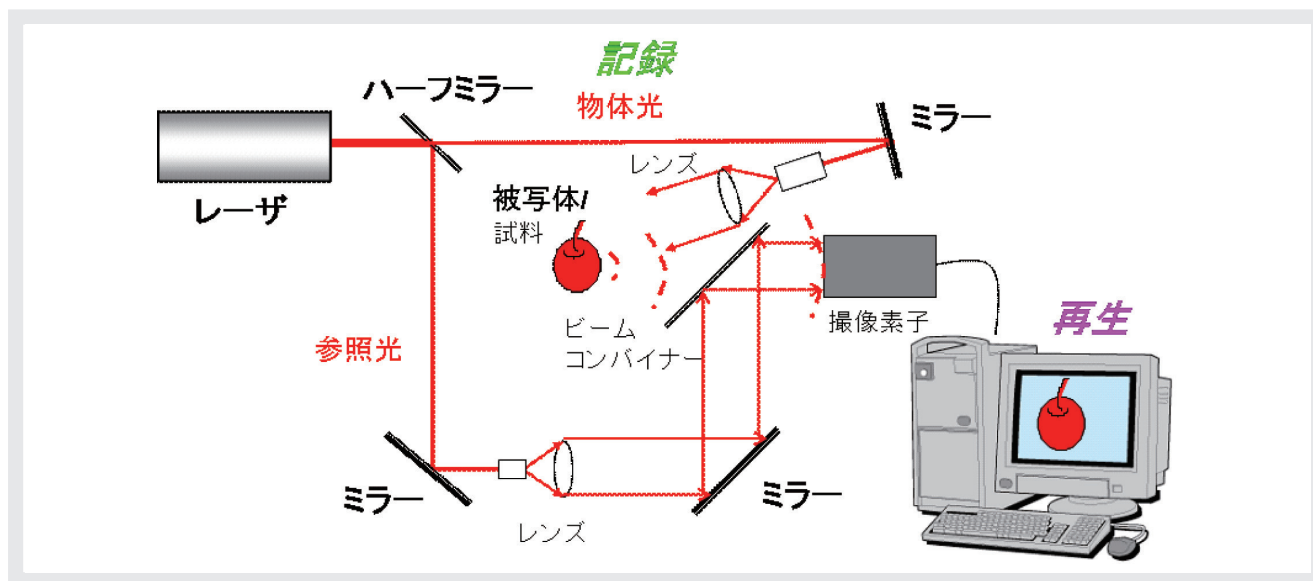


図2 デジタルホログラフィ

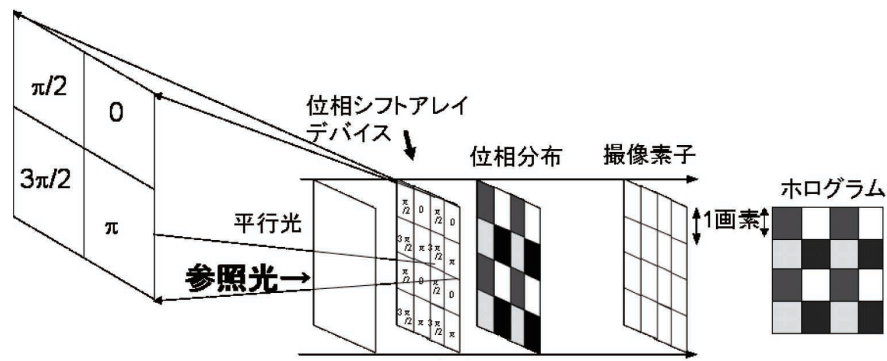
位相シフト型^[7]は、位相シフト干渉法を用いて物体光の複素振幅を直接求めようとするタイプのデジタルホログラフィである。位相シフト干渉法^[7]とは、物体形状を計測するために広く用いられる干渉計測の手法である。干渉計の光路差に対する干渉縞の変化から試料の位相分布を求める。二光束干渉計において、参照光側の光路中にはピエゾ素子や波長板など光路長を変化させることができる素子を用いて参照光の位相を変化させる。位相を変化させた時の複数の干渉縞パターンを順次計算機に取り込み、それらの干渉縞パターンから試料の複素振幅分布を求める。計算がし易くなるという理由から一般的には3枚、または4枚の干渉縞パターンが用いられる。位相シフト型では、試料の完全な複素振幅が求まるので、鮮明な像が得られ高精度計測が可能である。しかしながら、参照光の位相を順次変えて干渉縞パターンを撮影するために動く被写体には適用ができなかった。

並列デジタルホログラフィ

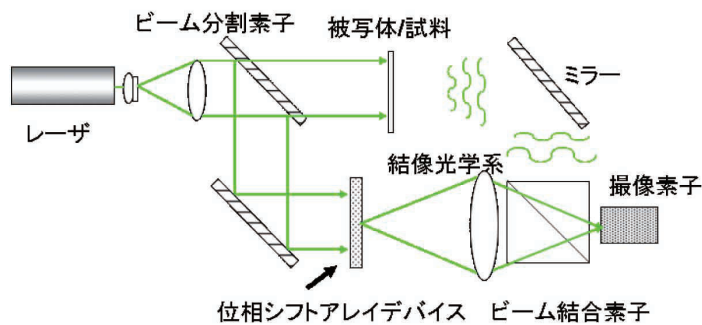
従来のデジタルホログラフィの欠点をクリアし、動く試料に対して3次元画像計測が可能なる方法として並列デジタルホログラフィを発明した^[8-12]。この方法では、参照光の位相を光軸に対して垂直な面で空間的に変化させ、1枚のホログラムに位相シフトデジタルホログラフィに必要な複数枚のホログラムの情報を記録する。記録したホログラムに対して計算機処理を施し複数枚分の

ホログラムの画像情報を抽出し、それらの画像情報を処理することで並列に位相シフト法を行い、再生像を得る。

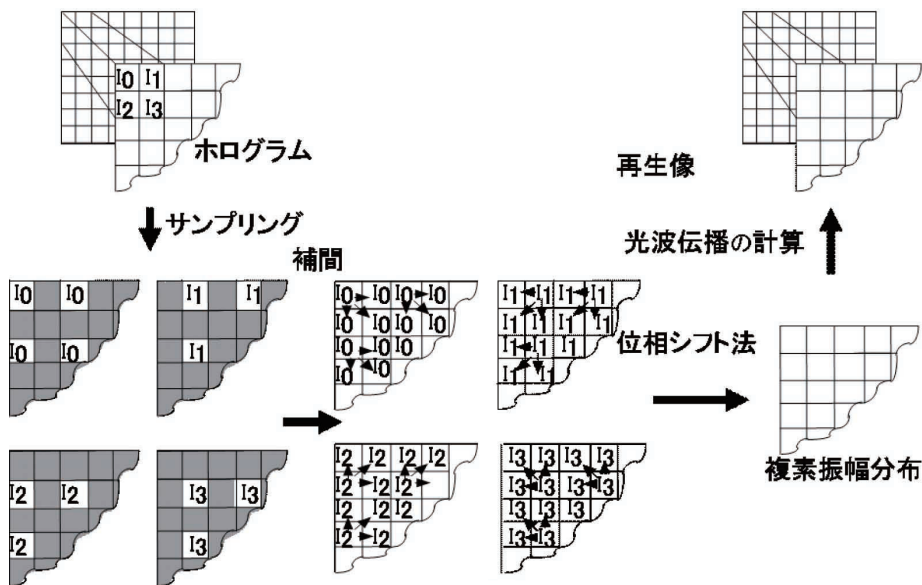
並列デジタルホログラフィの記録の概略図を図3(a)に示す。4段階に位相をシフトさせる位相シフト干渉法を同時に行う場合を例に説明する。参照光は空間的に4段階に位相をシフトさせた光を利用する。このような光を実現する一例として、位相シフトアレイデバイスがある。位相シフトアレイデバイスにはCCDの画素のサイズほどの微小な1/2波長板、1/4波長板をアレイにした波長板アレイや厚みの異なる光学素子アレイを並べたもので実現できる。このデバイスを参照光の光路に導入することで、空間的に異なる位相を持った参照光と物体光との干渉縞が記録でき、位相シフト干渉計測法に必要な4枚の干渉縞パターンの画像は、各画素数は1/4になるが1枚の干渉縞パターン中に存在することになる。この方法の光学的実現法の一例を図3(b)に示す。撮影された干渉縞パターンから試料の3次元像をコンピュータで再生するために考案したアルゴリズムの流れを図3(c)に示す。干渉縞パターンの中から参照光が同じ量の位相のシフトを受けた部分を抜き出して、それぞれで画素数が1/4になった4枚の干渉縞パターンの画像を作る。元の画像サイズに戻すために、値を持たない画素に対して、補間により画素値を設定する。補間後の4枚の干渉縞パターンの画像に対して、位相シフト干渉法と同様の数値計算により、撮像素子面上での物体光の位相分布と振幅分布の両方、すなわち複素振



(a) 原理



(b) 光学的実現方法例



(c) 像再生アルゴリズム

図3 並列デジタルホログラフィ
(a)原理 (b)光学的実現方法例 (c)像再生アルゴリズム

幅分布が求められる。この複素振幅に対して光波の伝播を計算することにより、物体の複素振幅が得られる。

並列デジタルホログラフィック顕微鏡の原理確認実験

並列デジタルホログラフィの有効性を示すために、原理確認実験を行った。先に述べた位相シフトアレイデバ

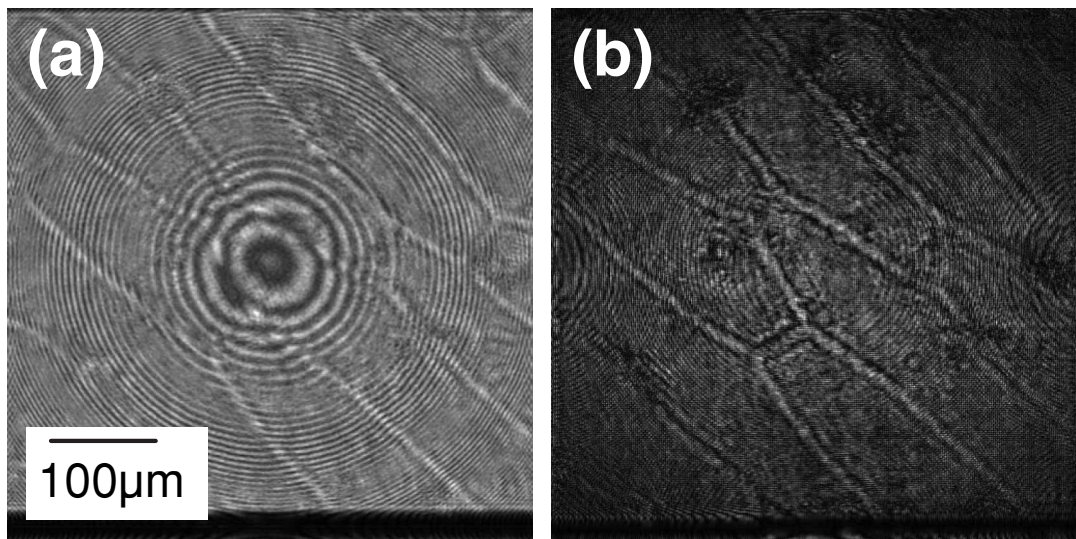


図4 原理確認実験結果(タマネギの細胞を試料とした)
(a)従来法 (b)提案法

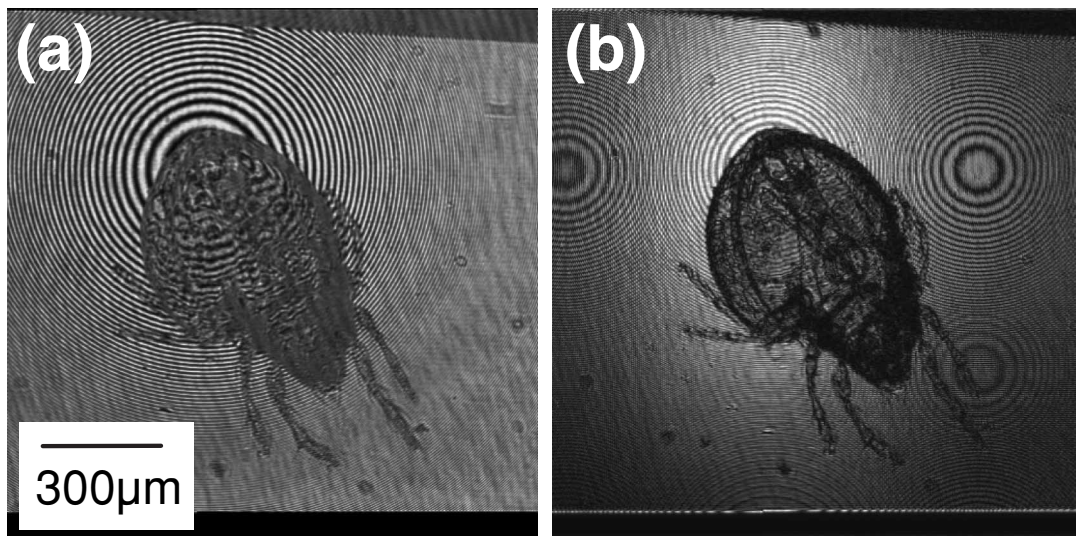


図5 原理確認実験結果(ミジンコを試料とした)
(a)従来法 (b)提案法

イスが現時点では開発されていない。そこで、従来の逐次位相シフトデジタルホログラフィにより光学的に4枚の干渉縞パターンの画像を記録し、これらの画像からコンピュータ処理により、位相シフトアレイデバイスを用いた時に記録できる1枚のホログラムを等価的に作製した。このホログラムに対して考案したアルゴリズムを用いて像を再生した。

本方法の顕微鏡への応用可能性を調べるために、顕微

鏡対物レンズを用いた試料の拡大像の3次元像の記録とその再生を行った。細胞観察・計測の例としてタマネギの表皮の細胞を試料に用いた場合の再生結果を図4に示す。また、微生物観察・計測の例としてミジンコを試料に用いた場合の再生結果を図5に示す。いずれの場合も、提案方法で求めた再生像は従来のin-line型で記録・再生した像よりも、鮮明かつ高精度な像が得られ、提案方法の有効性を確認できた。

並列デジタルホログラフィにより瞬時の3次元画像取得と計測が可能であることがわかった。現在、並列に位相をシフトさせる技術とデバイスを開発中であり、このデバイスを用いて干渉縞の連続取り込みを行うことで、3次元動画像計測装置が実現できる。また、カラー化を目指した研究も進めている^[14,15]。

おわりに

並列デジタルホログラフィック顕微鏡法は、蛍光標識など特殊な薬品が不要なために、無毒無害で生体に対して安全な3次元画像計測技術である。また、本技術に基づく装置において、像再生の計算には、パーソナルコンピュータを用いており、パーソナルコンピュータの性能により、動画の再生速度が制限される。像再生の計算に利用される演算は少ない種類で十分であるので、フレネル変換、高速フーリエ変換、画素間の補間などの演算に特化した専用のLSIや、各画素の情報を並列に処理するスマートピクセルを開発することにより、リアルタイムで3次元の動画計測が可能で高性能装置化に発展できる。また、計算で得られた試料の3次元情報は、インターネットを通じて遠隔地に伝送できる。伝送先において空間光変調素子を用いた書き換えホログラムを利用することにより、遠隔地で試料の3次元表示も可能なシステムに発展できる。本技術に基づく3次元動画像計測装置をバイオ・医療計測に応用することで生体粒子や細胞のダイナミクスや機能の新たな発見や理解に貢献できる。この機能や能力は、新たな医療技術、診断方法、食品検査法に有用である。日本にとって近未来に不可避で世界的にも未曾有の高齢化社会において、人々が健康で豊かな生活を送れるように医療分析技術の発展に貢献でき、更には人類の未来において光明をあてるものとして期待される。

参考文献

- [1] 久保田敏弘, ホログラフィ入門, 朝倉書店(1995).
 [2] U. Schnars and W. Jueptner, *Digital Holography*, Springer (2005).
 [3] M. A. Kronrod, N. S. Merzlyakov and L. P. Yaroslavskii, Reconstruction of a hologram with a computer, *Sov. Phys. Tech. Phys.* **17**, 333-334 (1972).
 [4] L. Onural and P. D. Scott, Digital decoding of

- in-line holograms, *Opt. Eng.*, **26**, 1124-1132 (1987).
 [5] U. Schnars, Direct phase determination in hologram interferometry with use of digitally recorded holograms, *J. Opt. Soc. Am.*, **A 11**, 2011-2015 (1994).
 [6] G. Pedrini, P. Froning, H. Fessler and H. J. Tiziani, In-line digital holographic interferometry, *Appl. Opt.*, **37**, 6262-6269 (1998).
 [7] I. Yamaguchi and T. Zhang, Phase-shifting digital holography, *Opt. Lett.*, **22**, 1268-1270 (1997).
 [8] 特許第4294526号.
 [9] Y. Awatsuji, M. Sasada and T. Kubota, Parallel quasi-phase-shifting digital holography, *Appl. Phys. Lett.*, **85**, 1069-1071 (2004).
 [10] M. Sasada, A. Fujii, Y. Awatsuji and T. Kubota, Parallel quasi-phase-shifting digital holography implemented by simple optical set up and effective use of image-sensor pixels (in Technical Digest of the 2004 ICO International Conference: Optics and Photonics in Technology Frontier), International Commission for Optics, 357-358, (2004).
 [11] Y. Awatsuji, M. Sasada, A. Fujii and T. Kubota, Scheme to improve the reconstructed image in parallel quasi-phase-shifting digital holography, *Appl. Opt.*, **45**, 968-974 (2006).
 [12] Y. Awatsuji, A. Fujii, T. Kubota and O. Matoba, Parallel three-step phase-shifting digital holography, *Appl. Opt.*, **45**, 2995-3002 (2006).
 [13] 山口一郎, *HODIC Circular*, **20**, 1, 38-45 (2000).
 [14] 藤井 淳, 栗辻安浩, 久保田敏弘, 並列準位相シフトカラーデジタルホログラフィ, *Optics Japan 2005 講演予稿集*, 256-257(2005).
 [15] 小山貴正, 金子篤志, 藤井 淳, 栗辻安浩, 西尾謙三, 裏 升吾, 久保田敏弘, 並列位相シフトカラーデジタルホログラフィとその原理確認実験, 3次元画像コンファレンス2007講演論文集, 121-124(2007).



栗辻 安浩

Yasuhiro Awatsuji

京都工芸繊維大学大学院
准教授