

研究課題別評価書

1. 研究課題名

細胞情報解析のための超高精度・高速位相計測システム

2. 氏名

渡邊 恵理子

3. 研究のねらい

生体細胞のような無色透明体の形状の観察を行うためには、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡、蛍光剤を用いる蛍光顕微鏡などが利用され、通常位相情報を強度情報に変換して測定される。しかし細胞の染色や固定化により、その後の試料の利用が制限されてしまうことや、対象によっては前処理や染色等が不向きな試料もある。したがって生体サンプルに特異な前処理を施さず、本来の状態の細胞情報を非侵襲かつ定量的に位相分布を計測する技術が求められている。また病変部より細胞を採取してきて顕微鏡標本を作製し、顕微鏡観察する細胞診断やフローサイトメリーやイメージングサイトメリーは現在の医療を大きく支えている。また、培養した細胞や培養により得られた組織の移植により、失われた臓器や組織の機能を修復・再生する再生医療も近年研究が活発化してきており、それに平行してそれらの細胞の生産効率向上、効率の良い検査技術も同時に求められている。

本研究では細胞などの透明物体を対象とし、特異な前処理を施さずに測定可能な高速高精度な位相計測システムを構築し、位相情報を高速・高精度に可視化する。さらに得られた情報から細胞を位相情報でモデリングし位相物体識別システムを提案し構築する。これらを新しい細胞情報の解析ツールとして生物・医療分野などへの幅広い応用を目指す。

4. 研究成果

【高速・高精度位相計測システムの開発】

Fig.1 に構築した位相計測システムの実験系を示す。光源にいくつかのレーザを用いたマツハツエンダー型干渉計を基本としている。干渉計の一方のビームに測定試料を挿入し、屈折率変化がある方向にスキャンして、透過光を参照光と干渉させて光路長差による干渉光の強度変化を検出している。微小領域を計測するために、レーザ光を顕微鏡用対物レンズで試料上に集光させ、別の対物レンズで平行光に戻した。この集光ビームの直径により横方向の空間分解能が決定する。本システムでは直径約 $2\mu\text{m}$ の面積内における平均位相を検出している。高精度かつ定量的に位相計測を実現するため、PD での受光強度が最小になるようにフィードバック制御を施し、ピエゾへの印加電圧を 16bit の AD ボードを用いて記録した。これを予め測定したピエゾの半波長電圧(半波長の光路長変化をもたらす電圧)と比較することにより位相の変化量を求めた。さらに厚さを考慮すると屈折率が求められる。

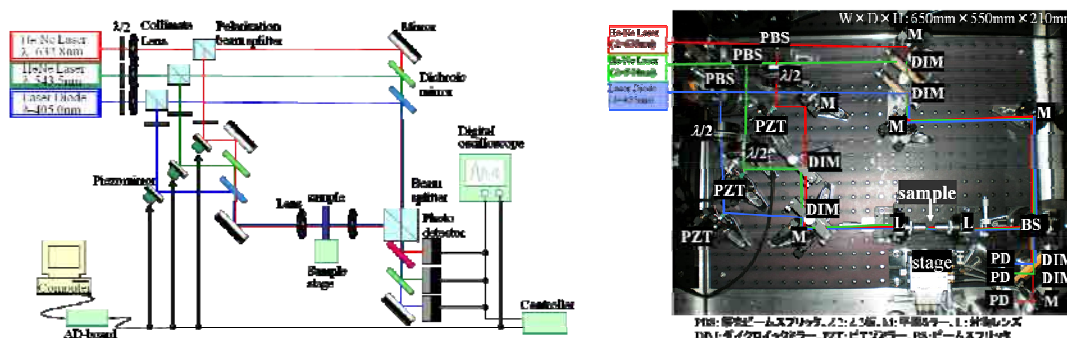


Fig.1 高速・高精度位相計測システム
(a) 位相計測システム光学系概略図、(b) 外観写真

フィードバック制御を用いない位相算出方法では、スキャンした場合に位相変化($\Delta\phi$)が光強度 $P=(P_0/2)(1+\cos \Delta\phi)$ として表れるので、 \arccos を利用して位相変化 $\Delta\phi$ に変換しなければならない。この際、 \arccos の非線形性によって精度が低下してしまう場合があり、さらに多価関数であるために $\Delta\phi$ の値は不定性が残る。本研究では、フィードバック制御によりピエゾの印加電圧を計測しているため、逆関数を利用せずに直接位相変化を算出することが出来る。これにより、局所的な精度低下はなくなり均一な測定が可能となる。

構築した縦型 2 次元位相計測システムの基礎評価として、格子周期 $2.2 \mu\text{m}$ 、厚さ $29 \mu\text{m}$ の屈折率変調格子の 2 次元計測を行った。 $20 \times 20 \mu\text{m}$ の面積内をx軸方向に $0.1 \mu\text{m}$ 間隔でスキャンした後、y方向に $0.2 \mu\text{m}$ 間隔でスキャンした。このとき光路長を補正するために生じたピエゾの印加電圧 V を検出した。ピエゾの印加電圧 V と1波長分の印加電圧 V_λ より光路長変化 $L = V \lambda / V_\lambda$ を算出した。光路長変化に試料の厚みを考慮することにより電圧値を屈折率変化に変換した。測定結果をFig.2(a)に示す。 $2.2 \mu\text{m}$ 間隔で正弦波状の屈折率分布を高精度に2次元測定ができていることが確認できる。次に血液を採取し、赤血球の位相測定結果をFig.2(b)に示す。 $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ の面積内をX軸方向に $0.2 \mu\text{m}$ 、Y方向に $0.1 \mu\text{m}$ 間隔でスキャンを行った。このように赤血球の位相変化を高精度な 2 次元計測することに成功した。このように光路長差 0.3nm から $3 \mu\text{m}$ を超える位相変化を精度よく 2 次元計測可能なシステムの構築に成功した。

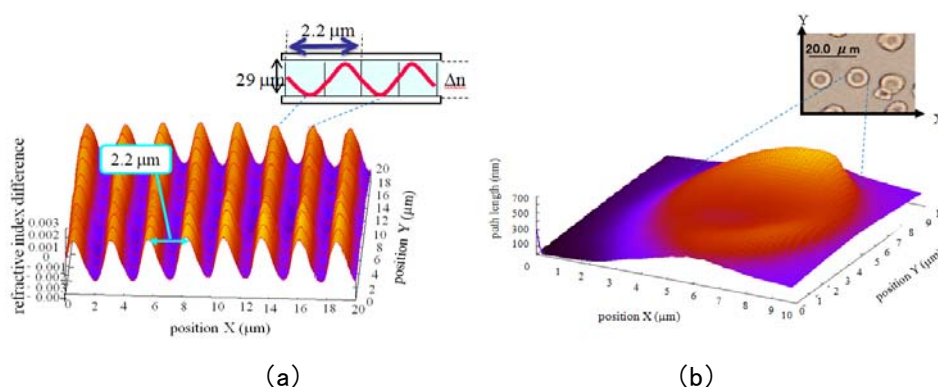


Fig.2 位相計測結果 (a)屈折率変調格子の測定結果 (b)赤血球の測定結果

【デジタルホログラフィック位相顕微鏡の開発】

通常の光学顕微鏡や2.1節における位相計測システムで3次元物体を観察する際には、レンズの焦点距離やステージを機械的に調節する必要がある。このため、高速に動く物体の観察には制限がある。デジタルホログラフィでは3次元情報が同時に記録されるので再生時の数値的焦点合わせによって任意の深度を再生することができる。また通常の顕微鏡では観察できない位相分布も測定可能である。今回我々は、結像レンズを使わずに球面参照光を用いるレンズレス方法によりデジタルホログラフィック位相顕微鏡システムを構築した。参照光の波面の曲率が再生における結像レンズの働きを果たしている。ホログラムを記録する CCD カメラの空間分解能が限られているため、物体光と参照光がほぼ平行となるインライン光学系を採用し、直接光や共役像は位相シフト法により複数のホログラムを用いることで除去した。CCDカメラと対象物体との間にはレンズを配置せず、参照光として発散光を用いることにより物体の拡大像を得る。今回の実験では CCD カメラのピクセルサイズ $7.4 \mu\text{m}$ に対し再生画像のピクセルサイズは約 $1 \mu\text{m}$ となっている。取得したホログラムを元に計算によって物体面での複素振幅を再生し、各点における定量的な位相値 ($\text{mod } 2\pi$) を位相接続処理することにより元の像を再現した。位相シフト型デジタルホログラフィーなどで用いられる離散フーリエ変換による光学伝搬のシミュレーション計算について、連続フーリエ変換と離散フーリエ変換の相違により、位相のそろった平面波に近い状態で離散フーリエ変換を用いて伝搬を計算すると、生成される画像の範囲が狭まり、なおかつ振動状のノイズが重複される問題がある。これらに対する対策を検討し、ノイズについてはノイズ除去用の関数を利用すること、画像範囲についてはデータ取得時点で工夫することでの改善を行った。

これらの改善事項を取り入れたレンズレスデジタルホログラフィシステムにより取得したミカズキ

モなどの位相形状を示す。今後今後精度・速度の向上を行い、細胞解析として意義深いサンプルを計測していく。

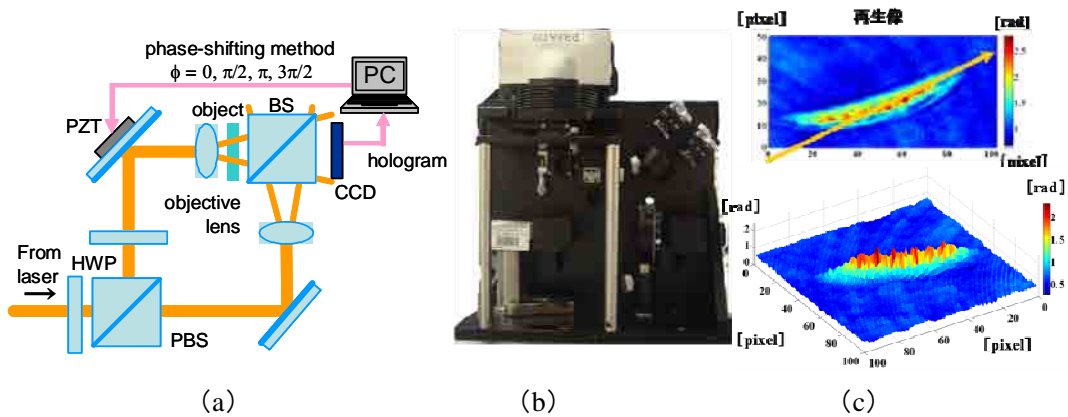


Fig.3 レンズレスデジタルホログラフィシステムと実験結果
(a)光学系概要図、(b)試作装置外観、(c)ミカツキモの位相計測実験結果

【ホログラフィックマッチトフィルタによる位相識別システム】

筆者は直接位相記録の可能な光相関システムの研究を行い、高精度・高速なシステム構築に成功している。構築してきた光相関システムは、無色透明の位相変調物体の識別が可能であり、背景で述べた細胞診断におけるサンプルを対象に何らかの診断や検査指針の一部を担える可能性がある。本研究では直接位相変調する透明物体を対象サンプルとして想定し、位相相関システムを提案し、原理的な実験に成功した。

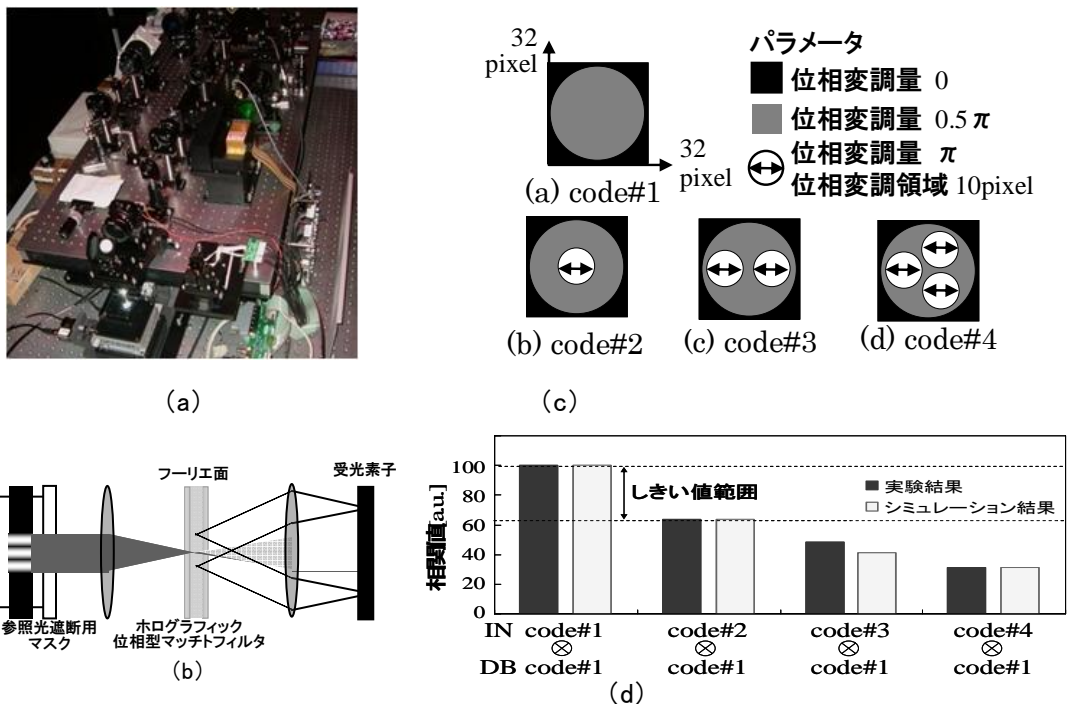


Fig.4 位相識別システムと実験結果
(a)位相識別システム外観図、(b)ホログラフィックマッチトフィルタ、
(c)位相差を持つ物体 (code#1~#4)模式図、(d)位相識別実験結果

同軸型ホログラムシステムにおいて、位相変化を強度情報として検出できる同軸ホログラム用強

度位相変換マスクを結像面に搭載し、位相型マッチフィルタを記録する。次にそのフィルタを用い、光相関演算を行う(Fig.4(a, b))。本実験では細胞サンプルの代用として位相変調型空間光変調器(PAL-SLM)を用い、識別する入力データは、各々 $\pi/2$ ずつ位相差を持つ物体 (code#1~#4) を使用した(Fig.4(c))。Fig.4(d)に実験結果を示す。細胞の核の個数などを想定した透明物体の識別の原理実験に成功した。

以上、高速・高精度な位相情報計測システムや位相物体識別システムなどの基盤技術の構築に成功した。これらのシステムをより意義深い生物・医療分野などの計測を行い、幅広い応用を目指す。

5. 自己評価

本研究では細胞などの透明物体を対象とし、特異な前処理を施さずに測定可能な高速高精度な位相計測システムを構築し、これまで測定困難であった生体細胞や光デバイスなどにおける空間分解能 600nm 程度で、微小領域において光路長変化 1nm 以下という微小位相変化の計測に成功した。さらに将来的に超高速位相識別を可能にする位相物体識別システムを提案し、基盤技術の構築に成功した。このように当初目標にしていた位相計測・識別システムの構築には成功し、システム構築の目標は達成した。特に位相物体識別システムは次世代の細胞情報の解析ツールとなりうる研究者の独自性のある新しいシステムである。しかしながらより具体的で意義深い生体細胞サンプルの計測やこれらのシステムを利用したアプリケーションは、今後に向けてさらに追求していく必要がある。今後、構築したシステムを利用し、生物・医療分野などへの幅広い応用を目指す。

6. 研究総括の見解

位相情報をもとに無染色で細胞イメージングを行うというユニークで新しい測定システムを開発し、限られてはいるものの細胞の形態測定などの基本実験にも成功している。今後多数のサンプルを計測して生細胞系への実際の応用が可能になることを大いに期待したい。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・E. Watanabe, Y. Ichikawa, R. Akiyama, and K. Kodate, "Ultra-high-Speed Optical Correlation System Using Holographic Disc," Japanese Journal of Applied Physics, 47, 5964-5967 (2008).

論文(国内)

・中山朋子, 水野潤, 渡邊恵理子, 小舘香椎子, 「デジタルホログラフィにおける撮像素子の量子化による測定誤差の検討」, 日本女子大学紀要理学部, 17, 13-22 (2009).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 3件 (うち2件は出願公開前)

発 明 者: 渡邊恵理子、水野潤、小舘香椎子

発明の名称: 「計測システム及び計測方法」

出 願 人: 小舘香椎子

出 願 日: 2008年5月7日

出願番号: 特願 2008-121300

(3) 著書

- ・渡邊恵理子,「3.6.1 光情報処理」, 技術動向調査報告書(2007 年度), (財)光産業技術振興協会 (2008).
- ・渡邊恵理子,「3.5.1 光情報処理」, 技術動向調査報告書(2008 年度), (財)光産業技術振興協会 (2009).

(4) 学会発表

学会発表(国際)

- ・E. Watanabe, J. Mizuno, C. Fujikawa, and K. Kodate, “Measurement of refractive index of photopolymer for holographic gratings,” Proc. SPIE, 6488-09 (2007).
- ・M. Hanesaka, E. Watanabe, J. Mizuno, and K. Kodate, “Two dimensional phase measurement of microscopic objects using phase locking technique,” 13th Microoptics Conference (MOC) '07, 160-161 (2007).
- ・E. Watanabe, M. Hanesaka, J. Mizuno, and K. Kodate, “Two Dimensional Phase Measurement of biological cell Using Phase Locking Technique,” 6th International Conference on Optics-photonics Design & Fabrication (ODF) 2008, 547-548 (2008).
- ・E. Watanabe, A. Naito, and K. Kodate, “Ultra-high-speed compact optical correlation system using holographic disc,” Proc. SPIE, 7442, 74420X-74420X-8 (2009).

学会発表(国内)

- ・渡邊恵理子, 水野潤, 藤川知栄美, 小館香椎子, 「閉ループフィードバック制御による高精度位相計測—Volume Phase Holographic Grating 作製のための屈折率変調量測定—」, Optics & Photonics Japan 2006 講演会予稿集, 366-367 (2006).
- ・羽根坂円彩, 渡邊恵理子, 水野潤, 小館香椎子, 「位相ロック技術を用いた微小物体 2 次元位相計測システム」, Optics & Photonics Japan 2007 講演会予稿集, 272-273 (2007).
- ・大財真梨子, 水野潤, 中山朋子, 渡邊恵理子, 小館香椎子, 「位相シフトデジタルホログラフィを用いたレンズレス顕微鏡による位相像の観察」, 第 69 回応用物理学会学術講演会, 3, 870 (2008).
- ・大財真梨子, 渡邊恵理子, 小館香椎子, 「位相シフト型レンズレスデジタルホログラフィによる位相計測システム」, 電子情報通信学会東京支部学生会研究発表会, 126 (2009).
- ・渡邊恵理子, 羽根坂円彩, 藤川知栄美, 水野潤, 小館香椎子, 「位相ロック技術を用いた二次元位相計測システムの高分解能化」, 2009 年春季第 56 回応用物理学会学術講演会, 1037 (2009).

(5) 招待講演

招待講演(国内)

- ・渡邊恵理子, 小館香椎子, “Two dimensional phase measurement of biological cell using phase locking technique”, 光設計研究グループ第 39 回研究会(ODF'08 ダイジェスト), 39, 41-46 (2008).
- ・渡邊恵理子, 小館香椎子, 「超高速光相関演算システムと応用」, 日本化学会第 89 春季年

会, 128 (2009)

・渡邊恵理子,「光演算に基づく情報処理システム」, 精密工学会・画像応用技術専門委員会
サマーセミナー2009, 97-98 (2009).