

フォトサーマルイメージングのための off-axis 型

デジタルホログラフィック顕微鏡の開発

戸倉川研究室 丸山 朋希

1. はじめに

我々は波長 2-20 μm 帯の中赤外光源の開発を行ってきた。この波長 2-20 μm 帯には分子の指紋領域と呼ばれる 2.5-20 μm 帯が含まれており、生体分子を含む様々な分子(分子結合)固有の共鳴吸収線を有する。これらは基本音に相当する共鳴を多く含み近赤外帯の高次振動に比べて強い共鳴となる。よって波長 2-20 μm 帯の光源は、この中赤外領域の吸収を利用して高感度な分子の特定が可能とする。

生体のような微小な試料を観察する手法としてフォトサーマル効果 [1]を用いたものがあり、これを用いた顕微鏡をフォトサーマル顕微鏡と呼ぶ。フォトサーマル効果とは、試料に光を照射したときの光エネルギーによる温度上昇のことである。従来の赤外吸収顕微鏡では赤外光をプローブ光として検出していたため、空間解像度が赤外光の回折限界で制限されてしまうという問題点があったが、対してフォトサーマル顕微鏡では局所的な赤外のポンプ光による吸収を波長の短い可視光のプローブ光で検出するため、より高い空間解像度が得られる。

本研究では、フォトサーマル顕微鏡で試料の位相情報を定量的に得るために、off-axis 法を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡の開発を目指し、光学系の構築及びフーリエ変換を用いた画像解析を行った。

2. 原理

2.1 デジタルホログラフィ

ホログラフィとは、物体から回折された波面を

記録する技術である [2]。光の干渉を利用して、物体の振幅と位相の情報を記録する。

デジタルホログラフィはホログラフィの一種で、光学系で情報を記録し、イメージセンサーで現像し、コンピュータデジタルに情報を再生する。透過物体の情報を記録する場合、図 2-1 のようなマッハ・ツェンダー型の干渉計がよく用いられる。

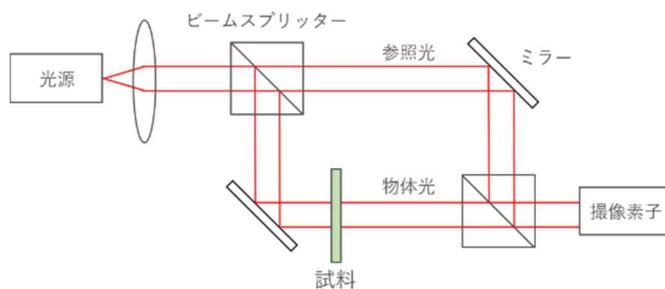


図 2-1 マッハ・ツェンダー型による干渉計

このとき参照光と物体光を角度をつけて撮像する構成を off-axis 型と呼ばれる。この構成では角度に依存した干渉縞のついた干渉画像が得られ、この後記載するフーリエ変換法によって単一画像から位相情報の取得が可能となる。

2.2 フーリエ変換法 [3] [4]

off-axis デジタルホログラフィによって得られた干渉画像にフーリエ変換を用いると干渉縞の空間周波数スペクトルの検出が可能となる。フーリエ変換法は干渉縞の空間周波数スペクトルに含まれる強度分布と位相の情報を算出する手法である。

干渉縞画像に対してフーリエ変換を行うと、回折されていない非回折光、物体の情報が記録されている物体像、その共役像の成分に分離された空

間周波数スペクトルが得られる。この物体像の成分のみをフィルタリングで抽出し、空間周波数面の中心に平行移動させる。この空間周波数スペクトルに対して逆フーリエ変換を行うと、振幅と位相の情報をもった複素振幅が得られる(図 2.2)。この複素振幅から強度と位相の情報得られる。

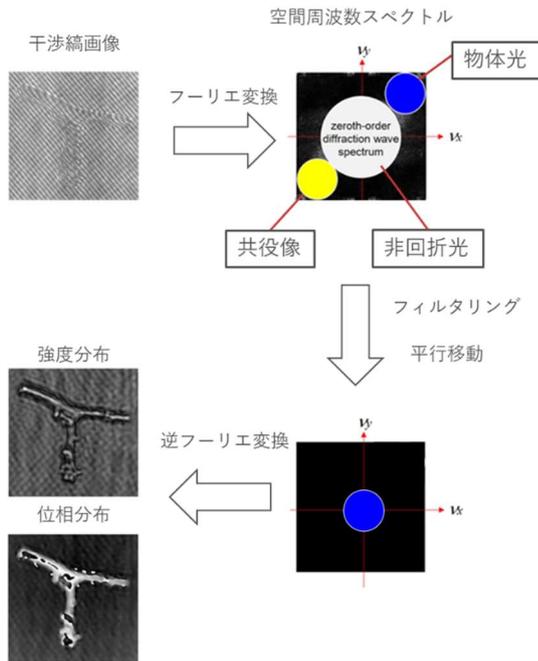


図 2-2 フーリエ変換法による画像処理のプロセス

2.3 デジタルホログラフィック顕微鏡

デジタルホログラフィック顕微鏡 (Digital Holographic Microscopy :DHM) は、顕微鏡のシステムにデジタルホログラフィの技術を導入したものである [5]。特徴として 1 回の露光で全焦点画像を取得できること、ラベルフリーで微細な透明体の定量イメージングが可能であることが挙げられる。定量的に光波の位相状態を得るため、細胞のような透明体を定量観測できる。このことから、DHM は定量位相顕微鏡とも呼ばれる。

本研究ではこれをフォトサーマル顕微鏡に利用することを将来的な狙いとしている。

2.4 フォトサーマル顕微鏡

試料にポンプ光を照射すると光エネルギーが吸

収され温度上昇が起きる。この現象をフォトサーマル効果と呼び、その結果、照射された領域で屈折率が変化する。この屈折率変化を検出する顕微鏡をフォトサーマル顕微鏡と呼ぶ。フォトサーマル顕微鏡は、ポンプ・プローブ顕微鏡の一種で、強度変調されたポンプ光と、もうひとつのプローブ光を試料に照射する。ポンプ光によって試料の温度が上昇し、それによる屈折率の変化をプローブ光で検出する。ホログラフィック顕微鏡技術によって 1/1000°C程度のごく僅かな温度変化の検出も可能である。

生体分子を含む様々な分子は波長 2.5-20 μm の間に固有の吸収を示すため、この波長帯は分子の指紋領域と呼ばれる。そのため、この波長帯の光源をポンプ光に用いることによって、標識を用いずに分子の特定が可能な顕微イメージングを行うことができる。

従来のラベルフリーイメージングにおいて、赤外吸収顕微鏡は空間分解能が低く、ラマン散乱顕微鏡は感度が低く、コヒーレントラマン散乱顕微鏡はパルス光を試料に照射するため侵襲性が高いという欠点を有する。そこでフォトサーマル顕微鏡は、高空間分解能、高感度、非侵襲性のラベルフリーイメージングとして注目されている [6]。

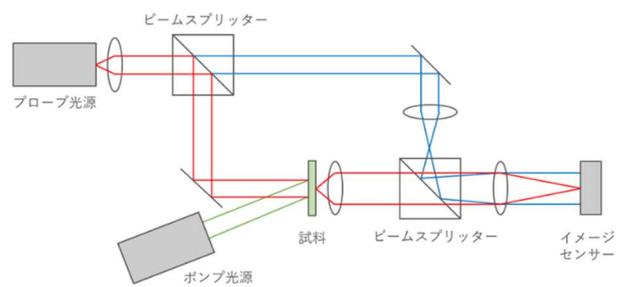


図 2-3 フォトサーマル顕微鏡概念図

3. デジタルホログラフィック顕微鏡の構築

デジタルホログラフィック顕微鏡の構成を図 3-1 に示す。光源にはスペクトル幅が狭く、コヒーレンス長の長い He-Ne レーザーを用い、ビームスプリッターで物体光と参照光に分けられる。試料

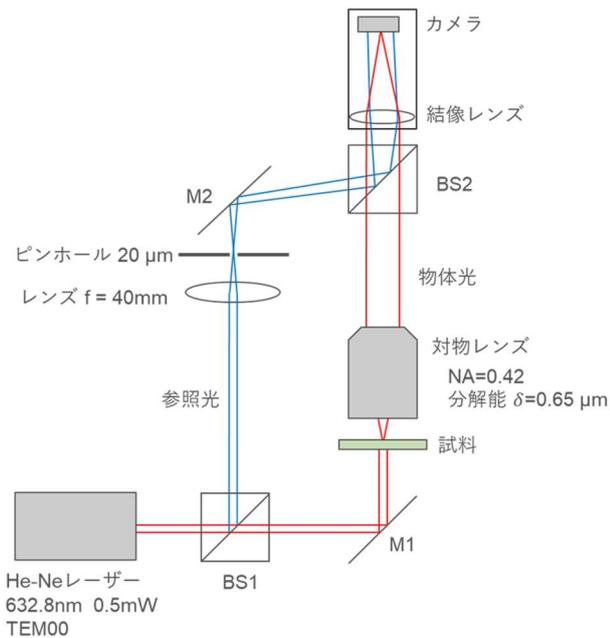


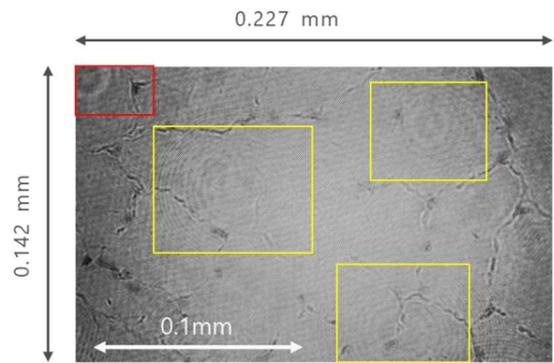
図 3-1 構築したデジタルホログラフィック顕微鏡

から回折された光は対物レンズと結像レンズで50倍に拡大される。このとき対物レンズのNAは0.42であり、波長633nmでは空間分解能は0.65µmときまる。参照光側にレンズとピンホールを配置し、レンズとピンホールの位置を変えることによって仮想点光源の位置、強度を調整できるようにした。参照光側のミラーの傾きを変化させることでイメージセンサーに入射する参照光に角度がつき、イメージセンサー面上で干渉縞が発生する。イメージセンサーのピクセルサイズは5.86µm×5.86µmで、視野範囲0.142mm×0.227mm、露光時間1.794msで撮影した。この露光時間はプローブ光の光出力を増加することによって一桁以上短くできる。試料は透明なマウスの骨格筋細胞を用いた。

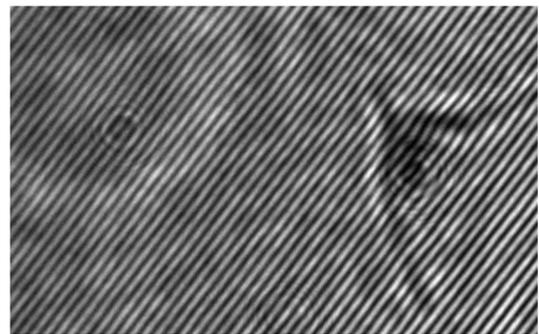
4. 画像解析

4.1 干渉縞画像

撮影された干渉縞画像を図4-1に示す。図4-1(a)の黄色の枠の部分に、同心円状のゴーストが発生した。これは拭きにくい場所のレンズの汚れ、試料での面反射が原因であると考えられる。



(a) 干渉縞画像全体



(b) (a)の赤枠部分の拡大図 干渉縞画像全体に左下から右上にかけての縞模様が入っている

図 4-1 干渉縞画像

拡大画像図4-1(b)をみると干渉縞が確認できる。この干渉縞の周期 Λ 、参照光と物体光の角度 θ 、光源の波長 λ の関係は

$$\Lambda = \frac{\lambda}{\sin \theta}$$

で表される。干渉縞の周期は29.6µmで、光源の波長は632.8nmであったので、この式から参照光と物体光の角度は1.23°であることが分かった。また、サンプリング定理より、干渉縞の最小周期はピクセルサイズから5.86µm×2=11.72µmと計算され、角度は3.10°未満にする必要がある。

4.2 空間周波数スペクトル

次に、干渉縞画像に対してPythonを用いて二次元フーリエ変換を行い、図4-2の空間周波数スペクトルを得た。非回折光、物体像、共役像の成分が重ならないように分離できた。この分離量が先に説明した干渉縞の空間周波数に相当している。こ

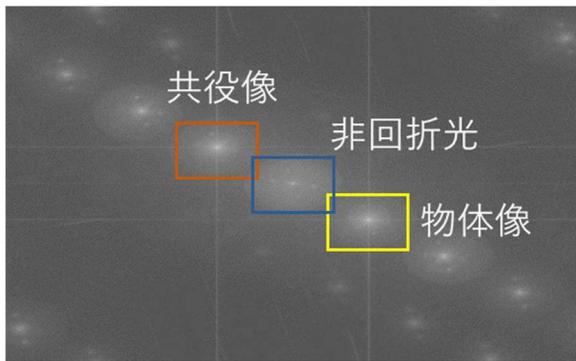


図 4-2 空間周波数スペクトル

のとき高次周波数成分が発生した。これは干渉縞の断面方向の強度分布が三角関数の形状になっておらず、フーリエ変換時に高次成分が発生したと考えられる。off axis の角度を浅くし干渉縞の空間周期を広げると高次の成分は除去できるが、非回折光、物体像、共役像の成分が重なってしまい、画像の空間分解能が低下してしまう。高次成分が発生しても分解能への影響はないためこの画像で解析を進めた。

4.3 強度分布・位相分布

得られた空間周波数スペクトルに対して、物体像の成分のみをフィルタリングで抽出し、中央に平行移動させて搬送波の成分を除去する。その空間周波数スペクトルに対して逆フーリエ変換を行い、振幅と位相の情報を含んだ複素振幅を得た。図 4.3、図 4-4 より、組織によって強度位相の違いを検出できたことが分かった。

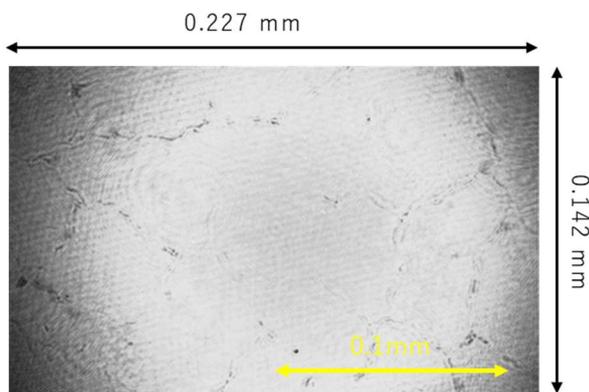


図 4-3 強度分布

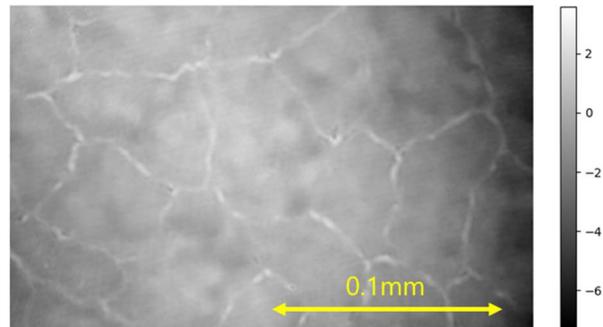


図 4-4 位相分布

5. まとめと今後の展望

デジタルホログラフィック顕微鏡を設計し構築した。また、画像処理によって、生体試料の 0.142 mm×0.227 mm の範囲を分解能 0.65 μm で強度分布と位相分布を取得し、組織による位相の違いを検出した。

今後の展望として、ワンショットで高速な撮影を利用した動画の撮影や、試料に中赤外光を照射してフォトサーマル顕微鏡の構築を試みる。

参考文献

- [1] M. Tamamitsu, et.al., "Label-free biochemical quantitative phase imaging with mid-infrared photothermal effect," *Optica* Vol. 7, Issue 4, pp. 359-366(2020).
- [2] 早崎芳夫, "光学ライブラリー7 デジタルホログラフィ", 朝倉書店(2016).
- [3] 武田光夫, "フーリエ変換によるしま画像解析とその応用", *応用物理* 第 62 卷 第 6 号(1993).
- [4] M. Takeda, et.al., "Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry", *J. Opt. Soc. Am./Vol. 72*, No. 1, pp.156-160(1982).
- [5] T. Tahara, et.al., "Digital holography and its multidimensional imaging applications," *Microscopy*, Vol.67, Issue 2, pp.55-67(2018).
- [6] K. Toda, et.al., "Molecular contrast on phase-contrast microscope", *Scientific Report*, 9, No.9957, 2019.