

O-043

## 実用化を指向した低コスト高性能なポータブルデジタルホログラフィック顕微鏡の開発 Development of digital holographic microscopy with compact and low-cost

佐野 麻理恵† 糸井 淳一† 遠藤 優† 白木 厚司‡ 下馬場 朋禄† 角江 崇† 伊藤 智義†  
Marie Sano Junichi Itoi Yutaka Endo Atsushi Shiraki Tomoyoshi Shimobaba Takashi Kakue  
Tomoyoshi Ito

### 1. はじめに

近年、バイオイメージング（細胞などの生体を生きたまま観察する技術）分野の発展により、顕微鏡は重要な要素技術となっている。この分野で求められる顕微鏡の能力として、以下3点が挙げられる。

- (A) 試料を高い分解能で観察可能
- (B) 試料を広い視野領域で観察可能
- (C) 試料を三次元的に観察可能

しかし、従来の光学顕微鏡では、これら全ての能力を同時に満たすことは難しい。空間分解能向上のために高倍率レンズを使用すると視野領域が狭まるため、原理的に (A) と (B) を両立させることは困難である。また、三次元的な観察を行うには、多角的な画像を複数得る必要があり、即時性に乏しい。

この問題を解決するため、ホログラフィの原理を応用したデジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM: Digital Holographic Microscopy) が新しい顕微鏡技術として注目を集めている。DHM では、1 枚の画像に三次元情報を記録することで、高い空間分解能と広い視野領域の両立及び三次元的な観察が期待できる[1][2][3]。

しかしながら、一般的な DHM は、光学系の構築に多額の費用がかかり、規模も大きくなるため、フィールドワークや開発途上国などへの導入が困難である。そこで、本研究では、光学系の配置を工夫し、安価な光学素子を組み合わせることで、小型・低費用かつ高性能な DHM を開発した。

### 2. DHM の開発

DHM には、観察試料に光を照射し、反射した光をホログラムに用いる反射型 DHM と、透過した光を用いる透過型 DHM がある。本研究では、透過型 DHM を採用した。透過型 DHM の利点は、試料内部に光を通すことができる点である。透過した光は、試料の表面だけでなく、内部の情報も含んでいるため、試料の任意部分を再生することができる。

記録は、まず、光源から出た光を試料に透過させ、その透過光と光源から出た元の光（参照光）を干渉させる。そして、その干渉縞を CCD カメラに記録する。このようにして記録された画像がホログラムとなる。再生は、記録されたホログラムをもとに計算機上で光波伝播計算を行う。DHM の記録法及び再生法の模式図を図 1 に示す。

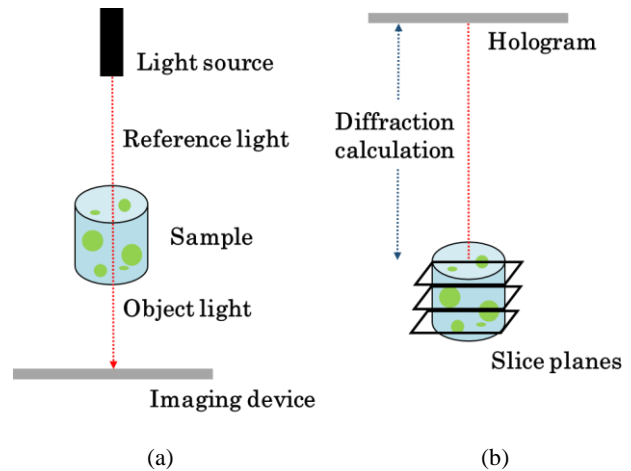


図1 DHM 記録・再生法模式図

(a)記録法 (b)再生法

本研究では、ポータブル性を考慮し、必要な光学部品が少ない Gabor (ガボール/ガボア) 型 DHM[4]を開発した。開発した DHM の概略図とその写真を図 2 及び図 3 に示す。本光学系では、対物レンズとピンホールを組み合わせることで光の干渉性を高め、ホログラム（干渉縞）を形成する。ホログラムは、Web カメラを用いてコンピュータに保存し、光波伝播計算を行い、再生像を得る。図 3 に示す通り、光学系の規模は(D)14cm×(W)19cm×(H)6.5cm、重量は 500g とフィールドワークなどに持ち運びしやすいサイズにまで小型化することに成功した。

本光学系の構築に使用した主要部品の品名とその価格を表 1 に示す。光源は LED を採用し、撮像素子は Web カメラの CCD 素子を流用することで費用を 6 万円以下に抑えた。

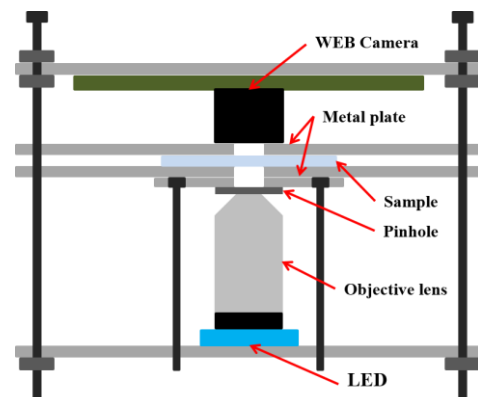


図 2 開発した DHM 概要図

† 千葉大学大学院工学研究科, Graduate School of Engineering, Chiba University

‡ 千葉大学統合情報センター, Institute of Management and Information Technologies, Chiba University

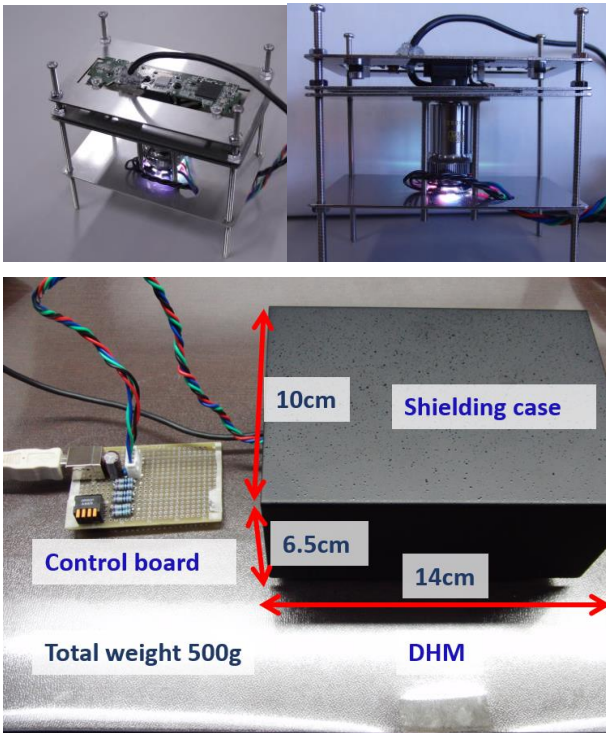


図 3 開発した DHM の写真

表 1 光学系構築に使用した主要部品の費用

部品	品名	価格 (円)
Web カメラ	HD Pro Webcam C920t	11,410
LED	OSTCXBCBC1E	400
ピンホール	SUS304	22,700
対物レンズ	M-1 0X	19,300
遮光ケース	PSA-12	840
ステンレス板等	-	5,000
	計	59,650

### 3. 光波伝播近似手法

ホログラムの再生を計算機上でシミュレートするにあたり、光波伝播に使用される式を計算機で扱いやすい形に近似する必要がある。具体的には、高速フーリエ変換 (FFT: Fast Fourier Transform) アルゴリズムの適用が可能な形式に変換されなければならない。

近似手法には角スペクトル法、フレネル回折、フラウンホーファ回折などの手法が知られており、これらは伝播距離などの光を扱う際の条件によって使い分ける[5]。本研究では、光学系の規模を小さくするため、短距離での演算が可能な角スペクトル法を採用し、開発を行った。

角スペクトル法は、フレネル回折で扱う光波の回折の位置よりも近距離の光波の回折を扱う場合に使用する手法である。

### 4. 最高空間分解能の評価

開発した DHM では、LED とピンホールを組み合わせることにより、光の干渉性を高めている。光の干渉性を高

めるためには、理論上、光源は波長が短く、かつ、出力の高い方がよい。また、光源を点光源に近づける必要があるため、ピンホールのサイズは小さいものが望まれる。

しかし実際には、光量や CCD 素子の性質、光学系の組み方等の影響で、一意に組み合わせは決まらなかった。そこで、赤・緑・青の高出力 LED と  $1\mu\text{m} \cdot 5\mu\text{m} \cdot 10\mu\text{m}$  のピンホールから最適な組み合わせを実験によって検証した。

分解能を調べるために、USAF テストターゲット (1951 United States Air Force Resolution Test Target) というテストパターンをポジパターンを用いた。テストパターンとは、顕微鏡などの分解能を計測する際の基準として用いる試料で、段階的に大きさが変化していく微細なパターンが刻印されている。使用したテストパターンを図 4 に示す。

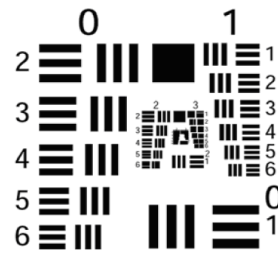


図 4 USAF テストパターン

USAF テストパターンターゲットを使用するために用いる表を表 2 に示す。1mm あたりのラインペアの数  $u$  を求めるときは、観察したグループ番号と要素番号をもとに表から当てはまる数値を読み取る。その数値がラインペア数  $u$  である。そして、分解能は次の式で求められる。

$$\delta x = \frac{1}{2u} \quad (1)$$

検証した結果、赤色の LED と  $5\mu\text{m}$  のピンホールを組み合わせた場合が最も高分解能であった。そのときの様子を図 5 と図 6 に示す。図 6 の再生像では、赤色で取得したホログラムから再生した図 6(a) が最も高解像で、グループ番号 6、要素番号 6 のラインがはっきりと確認できる。

このとき、ラインペア数を算出する表 2 から  $114\text{lp/mm}$  となることがわかる。したがって、この場合の分解能は、次の式で求められる。

$$\delta x = \frac{1}{2u} = \frac{1}{2 \times 114} = 4.39\mu\text{m} \quad (2)$$

開発した DHM は、光源が赤色の LED と  $5\mu\text{m}$  のピンホールを用いたときに、最高分解能  $439\mu\text{m}$  を発揮することを確認した。この分解能は、本研究よりも大規模で高頻な先行研究[6][7]で開発した DHM の分解能と同等の結果である。

表 2 1mm あたりのラインペア

要素番号	グループ番号							
	0	1	2	3	4	5	6	7
1	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.0	64.0	128
2	1.12	2.24	4.49	8.98	17.95	36.0	71.8	144
3	1.26	2.52	5.04	10.10	20.16	40.3	80.6	161
4	1.41	2.83	5.66	11.30	22.62	45.3	90.5	181
5	1.59	3.17	6.35	12.70	25.39	50.8	102.0	203
6	1.78	3.56	7.13	14.30	28.51	57.0	114.0	228

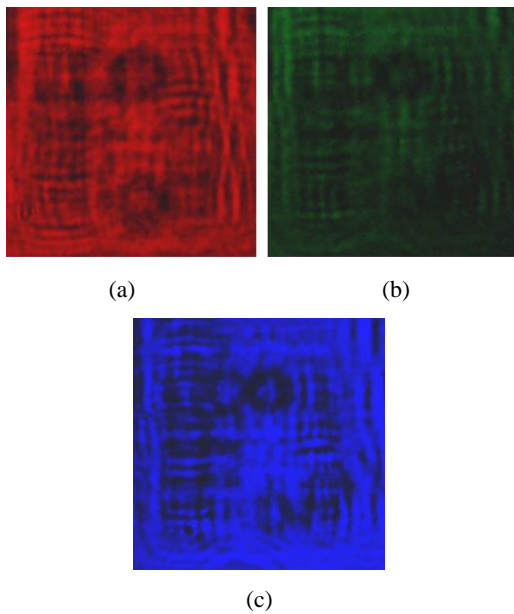


図 5 5 $\mu$ m のピンホールを用いて撮影したホログラム

(a) 赤 (b) 緑 (c) 青

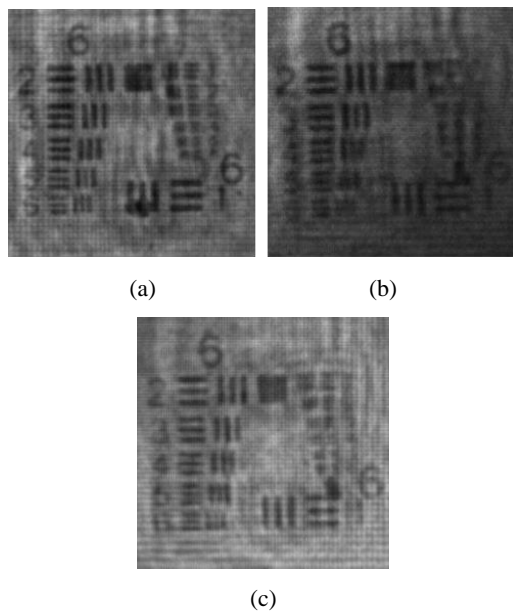


図 6 5 $\mu$ m のピンホールを用いて撮影した再生像

(a) 赤 (b) 緑 (c) 青

### 5. 微生物や細胞の再生像

開発した DHM を使用して観察した試料の一例を示す。図 7 では長さ約 0.1mm の 2 匹のミカヅキモが重なっている様子を示し、図 8 では約 1mm の蟻の頭部や口、触覚部分で示す。また、図 9 ではホウセンカ茎の断面図の一部を示す。約 50 $\mu$ m の細胞の輪郭が確認できる。いずれも (a) はホログラムで、(b) が光波伝播計算によって求めた再生像である。各試料の輪郭や核、細胞を観察することができた。

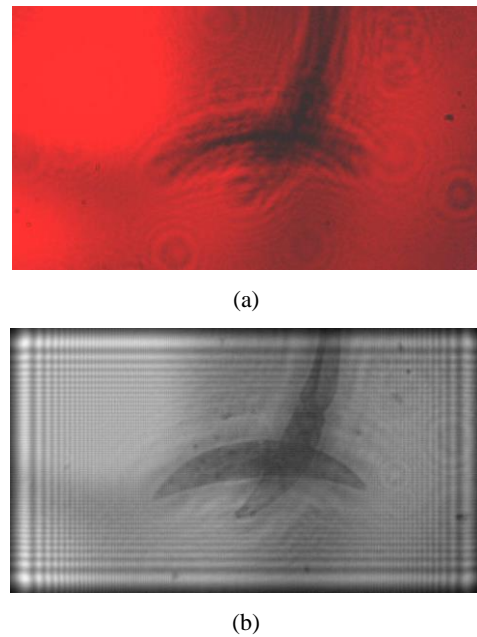
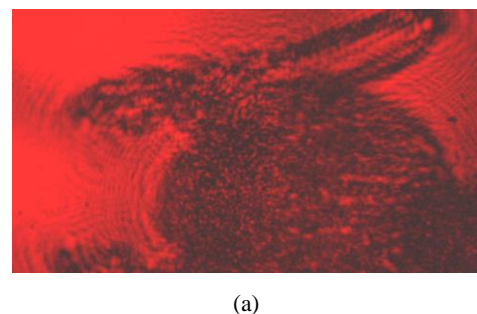
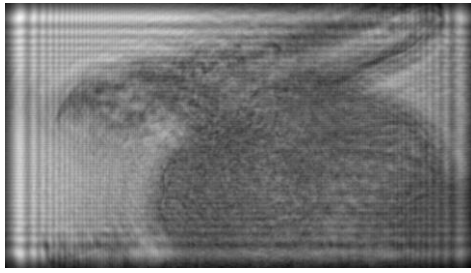


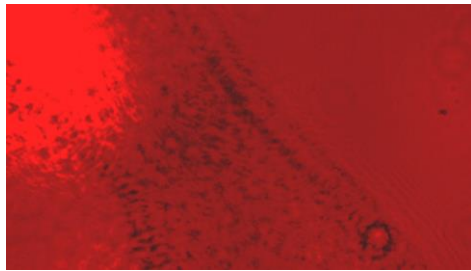
図 7 ミカヅキモ : (a)ホログラム (b)再生像



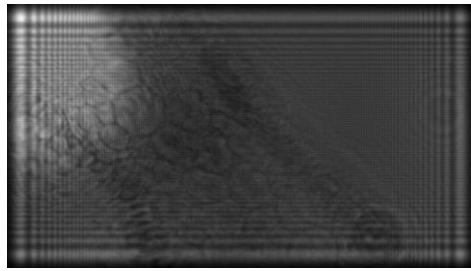


(b)

図 8 蟻の頭部 : (a)ホログラム (b)再生像



(a)



(b)

図 9 ホウセンカ茎の断面図 : (a)ホログラム (b)再生像

## 参考文献

- [1]U. Schnars and W. Juptner, "Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction", Appl. Opt. 33, 2, 179-181 (1994)
- [2]U. Schnars and W. Jueptner, "Digital Holography - Digital Hologram Recording, Numerical Reconstruction, and Related Techniques", Springer (2005)
- [3]T. C. Poon (ed.) , "Digital Holography and Three Dimensional Display - Principles and Applications", Springer (2005)
- [4]J. W. Goodman, "Introduction to Fourier Optics (3rd ed.)", Robert & Company (2005), pp55-59
- [5]T. Shimobaba, J. Weng, T. Sakurai, N. Okada, T. Nishitsuji, N. Takada, A. Shiraki, N. Masuda, and T. Ito, "Computational wave optics library for C++: CWO++ library", Comput. Phys. Commun. 183, 1124-1138 (2012).
- [6]T. Shimobaba, Y. Taniguchi, A. Shiraki, N. Masuda, and T. Ito, "Portable and low-cost digital holographic microscopy using web camera, point light source LED and open-source libraries", in Biomedical Optics and 3-D Imaging, JM3A.50 (2012)
- [7]A. Shiraki, Y. Taniguchi, T. Shimobaba, N. Masuda, and T. Ito, "Handheld and low-cost digital holographic microscopy", ArXiv e-prints (arXiv:1211.0336) (2012)

## 6. まとめ

本研究では、光学系の規模は(D)14cm×(W)19cm×(H)6.5cmで、費用は6万円以下に抑えた小型かつ低費用なDHMの開発を行った。小型であることを活かし、フィールドワークなど顕微鏡を必要とするあらゆる場面での活用も期待できる。また、空間分解能は4.39 $\mu\text{m}$ を得ることができ、実際に微生物を観察してその有用性を確認した。人体の細胞が6-26 $\mu\text{m}$ であることから、本DHMはバイオイメージングに十分に使用可能と考えられる。今後の展望として再生像の動画化が挙げられる。試料の動きを観察することができる動画は、バイオイメージングやフィールドワーク、開発途上国などへの導入において、大きなメリットとなる。

## 謝辞

本研究の一部はJSPS 科研費 25330125, JSPS 科研費 25240015, 矢崎科学技術振興記念財団, 柏森情報科学振興財団の助成により行われました。ここに深く感謝いたします。