

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22560032

研究課題名（和文）生体組織の3次元サブ波長イメージング

研究課題名（英文）Sub-wavelength 3-dimensional imaging of biological tissue

研究代表者 伊藤 雅英（ITO MASAHIDE）

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：30150874

研究成果の概要（和文）：

無色透明で媒質との屈折率差が小さい生体組織を可視化し、その形状や構造を可視化する手法を確立した。開発した位相変調型微分干渉顕微鏡を用いることで深さ方向の分解能としてサブ波長の位相分布を得ることができた。また、生体のような立体的な標本で位相再生を行う際、対象層前後の物体からのボケ像が正確な再生を妨げる問題があった。そこで、最近傍ボケ修正法を位相変調型微分干渉顕微鏡における位相再生手法に組み込み有用性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

We established the quantitative technique to visualize the shape and structure of biological tissue which has a small difference of a refractive index. We were able to get the sub-wavelength phase distribution as depth by using the phase modulation differential interference microscope which we developed. Moreover, when we observe three-dimensional object there was a problem which disturbs reconstruction with blurred image before and behind an exact image plane. Consequently, we combined the Nearest Neighbor Deblurring method with the phase reconstruction technique of a phase modulation differential interference microscope, and confirmed its availability.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用光学・量子光工学

キーワード：3次元計測、画像処理、生体計測

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) われわれは、明視野顕微鏡、微分干渉顕微鏡、レーザー走査顕微鏡などについて、部分的コヒーレンス結像理論を用いて解析可能な光学系について、その基礎特性を計測してきた。その結果、同一の基本式をベースにして結像特性を表すことができた。
- (2) 明視野顕微鏡でピントを外したデフォーカス像では透明な位相物体が観測できるが、その解析や定量的な評価はなされていない。これまで、位相変調型微分干渉顕微鏡によって、定性的にしか観測できなかった数十ナノメートルオーダーの段差を定量的に測定することにも成功している。

## 2. 研究の目的

- (1) 計測の分解能をサブ波長程度まで向上させることをめざして、近接場光と伝搬光を統合した新しい理論体系を構築する。
- (2) 生体組織などマイクロな構造を3次元的にとらえ、光源のコヒーレンス、光学的伝達関数、検出器を最適化することで、その位置や大きさを定量的に測定するシステムの開発を行う。
- (3) 顕微鏡画像は焦点面での画像のみ有用であるとして、焦点面以外からの散乱光の影響はバックグラウンドノイズとして扱われてきた。われわれは焦点像に上乘せされた非焦点像を系統的に補正する方法を開発する。

## 3. 研究の方法

- (1) コアとなる機器である顕微鏡について、その特性の計測をおこなった。これまで知られている顕微鏡の特性として知られているが定量的に定式化されていないものについて、顕微鏡の結像特性の由来から解明し、観測物体の正しい情報を抽出する手法を開発した。
- (2) 3次元的に広範囲に分布している生体試料の位相量を定量計測するために、光軸方向および水平方向への計測範囲の拡大を試みた。デフォーカス特性を解析することで計測範囲拡張をおこなった。水平方向への拡張は、ステッチング技術を応用することで、ステージ精度によらない計測視野範囲の拡張をおこなう。
- (3) 3次元に分布している資料についてデフォーカス成分が像面に与える影響を解析し、定量的な計測法の確立を目指した。再構成された3次元像と、複数枚のデフォーカス画像からMTFを用いて逆投影した画像との画質の比較検討し、逆投影ア

ルゴリズムの最適化をおこなった。

## 4. 研究成果

- (1) 微分干渉顕微鏡に位相変調機能を組み込むことによって位相の定量的な観測が可能となった。この位相変調型微分干渉 (Retardation modulation differential interference: RM-DIC) 顕微鏡の光学的応答関数 (MTF) 特性の測定を光学特性の解析などの司法を用いておこなった (図1)。解像力チャートは市販のものを用いた。ここでは、インフォーカス状態の結像特性を測定するとともに、デフォーカスによって結像特性がどのように変化していくかを計測した。その際、明視野顕微鏡、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡などについて計測をおこなった。これに平行して、これまでわれわれが開発してきた、フーリエ平面波展開法による結像特性評価シミュレーションコードの改良をおこなった。

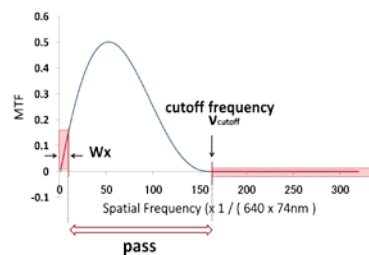
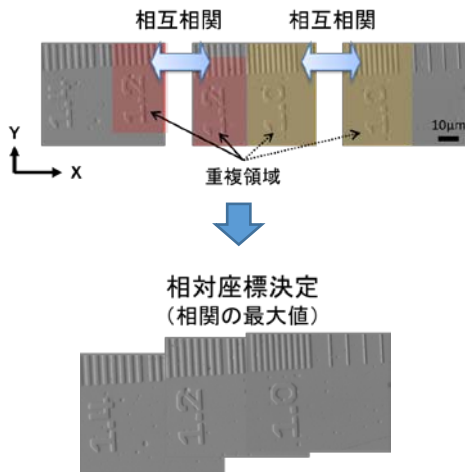


図 1. MTF 特性

- (2) セクショニング効果が高い微分干渉顕微鏡について3次元的な結像空間周波数特性(MTF)の解析を中心におこない、微分干渉顕微鏡における計測レンジの拡大を試みた。3次元的に広範囲に分布している生体試料の位相量を定量計測するために、光軸方向および水平方向への計測範囲の拡大が必要である。光軸方向の計測範囲は反射型計測で四分の一波長に制限されるため、解析されたデフォーカス特性に基づき、インフォーカス領域を検出する方法であるセクショニングマスク法による計測範囲拡張をおこなった。これにより、焦点深度をはるかに超えるマイクロンオーダーの計測をナノメートルの精度でおこなうことができるようになると考えられるが、デフォーカス像の映り込みの課題が残った。水平方向への拡張は、ステッチング技術を応用することで、ステージ精度によらない計測視野範囲

の拡張が可能となった。その中で重要なポイントである画像どうしの相対位置座標の検出については、相関により決めることが可能と考え、微分干渉顕微鏡のエッジ検出能力を活かしたエッジマスクや移動量予測による使用する画像領域限定について検討をおこなった(図2)。グラフはオーバーラッピングエリアと実際の距離を計測したものでDICのみは緑の四角、RM-DICは青い三角、開発されたマスクを用いる本手法は赤丸で示さていて、本手法の優位性が認められる。



Comparison of accuracy of detecting relative coordinates

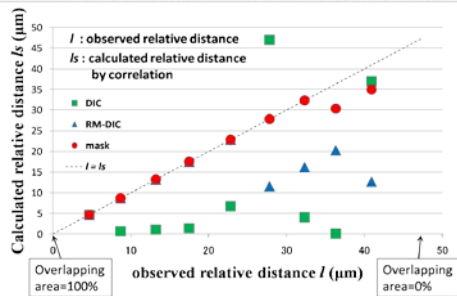


図2.ステッチング法による視野拡大

- (3) 位相変調型微分干渉顕微鏡を用いた位相再生手法を生体などの3次元屈折率分布を持つものに適用する場合、物体の位相分布の断層画像群が必要とされる。しかしながら、生体のような立体的な構造を持つ標本においても、従来の位相再生手法を用いても、前後にある物体のボケ像が寄与し、3次元像に使える位相分布の断層像を取得できなかった。そこで、この前後層からのボケ像の寄与を補正するために Nearest Neighbor Deblurring (NND) 法 (最近接ボケ除去法)

を位相再生に適用した。NND は、ピントをずらしながら撮像された画像を用いて合焦像面前後の物体がボケ像として及ぼす影響を補正する手法である。NND を適用するにあたって以下の点に留意した。位相変調型微分干渉顕微鏡で取得される RM-DIC 像は、資料の位相分布の微分像である。ここから光学特性を逆算することで、位相分布を再生像として取り出している。すなわち、試料の様子を表わすものは、位相再生像であり、RM-DIC はそれを取得するための中間データである。位相変調型微分干渉顕微鏡を用いる場合には、再生像に NND を適用する必要があり、こちらで NND のボケ像除去の効果が表れるようにしなければならない。まず、前後で合焦した RM-DIC 画像から位相再生画像を計算し、この位相再生像にデフォーカスの MTF をかけ RM-DIC 像に戻す。次に中央の RM-DIC 像から、前後のデフォーカスした RM-DIC 像を減算し、それを再び、位相再生する。こうすることにより、正しい位相像が再生される (図3)。その結果、これまで前後層のボケ像が原因で生じていた位相量のずれを補正することが可能となり、3次元像再生への応用可能であろう位相分布の断層像形成を確認することができた。図4に(a)従来の再生手法を用いた位相像、(b)NNDを組み込んだ位相再生手法を用いた位相像、(c)断面位相分布を示す。

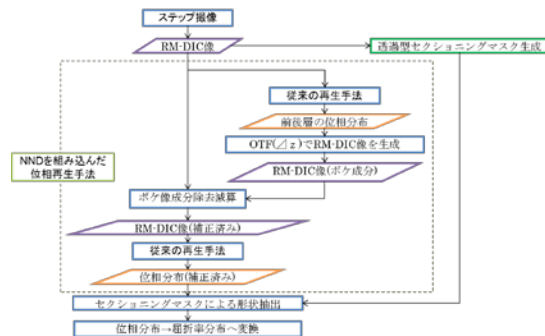
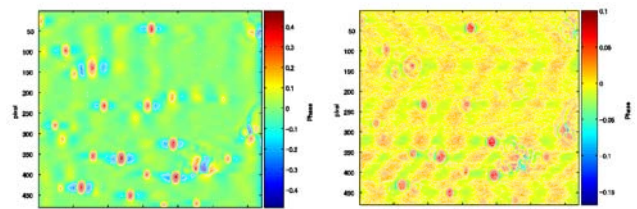
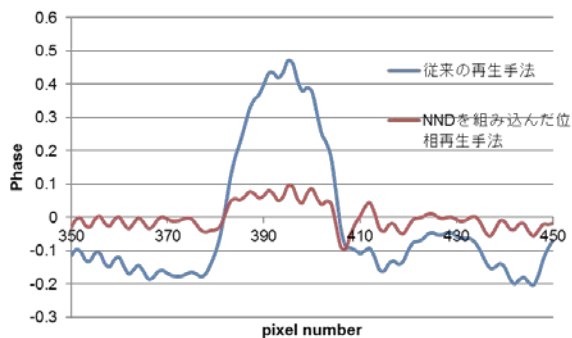


図3.計測のアルゴリズム



(a) 従来法

(b) 本手法



(c) 断面位相

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6件)

1. Tetsuji Mori and Masahide Itoh, "Unique ZnS-SiO<sub>2</sub> Morphologies Reflecting a Laser-Induced Heat Distribution", Japanese Journal of Applied Physics Vol.52 (2013) 048004, DOI: 10.7567/JJAP.52.048004 査読有
2. Tesuya Hoshino, Toyohiko Yatagai, and Masahide Itoh, "Precise and rapid distance measurements by scatterometry", Optics Express, Vol. 20, Issue 4, pp. 3954-3966 (2012), DOI:10.1364/OE.20.003954 査読有
3. Sugisaka, Jun-ichiro; Yamamoto, Noritsugu; Okano, Makoto; Komori, Kazuhiro; Itoh, Masahide, "Short Photonic-Crystal Directional Coupling Optical Switch of Extended Optical Bandwidth Using Flat Dispersion", Japanese Journal of Applied Physics, Volume 50, Issue 3, pp. 032201-032201-6 (2011), DOI:10.1143/JJAP.50.032201 査読有
4. Tetsuya Hoshino, Saswatee Banerjee, James B. Cole, Masahide Itoh and Toyohiko Yatagai, "Shape analysis of wavelength-insensitive grating in the resonance domain", Optics Communications 284 (2011) 2466-2472, DOI:10.1016/j.optcom.2011.01.056 査読有
5. Shigeru Sugawara, Shoichi Nakanishi, Masahide Itoh, and Toyohiko Yatagai: "Detection of falsification of security documents using white light interferometer", Optics and Lasers in Engineering, 48 (2010) 448-452 査読有

6. Hiroshi Ishiwata, Hiroki Nagai, Toshihisa Naka and Masahide Itoh: "Widening the range of high-precision quantitative measurement in retardation-modulated differential interference microscope", Optical Review, 17 (2010) 214-217 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 笠木隆裕, 石渡裕, 伊藤雅英, "位相変調型微分干渉顕微鏡を用いた位相再生手法への Nearest Neighbor Deblurring の応用提案", 第60回応用物理学関係連合講演会, 2013年3月27日, 神奈川工科大学
2. 笠木隆裕, 石渡裕, 伊藤雅英, "透過型位相変調型微分干渉顕微鏡におけるセクションニングマスク法の計測範囲の検討", 第59回応用物理学関係連合講演会, 2012年3月17日, 早稲田大学
3. 笠木隆裕, 石渡裕, 伊藤雅英, "位相変調型微分干渉顕微鏡を用いた位相再生手法への Nearest Neighbor Deblurring の応用提案", 第60回応用物理学学会学術講演会, 2013年3月27日, 神奈川工科大学
4. 風間至弘, 伊藤雅英, "フーリエ変換による位相アンラッピングの重みづけ法", 第59回応用物理学関係連合講演会, 2012年3月18日, 早稲田大学
5. 笠木隆裕, 中俊久, 石渡裕, 伊藤雅英, "生体計測における位相変調型微分干渉顕微鏡の高精度セクションニング化の提案", Optics & Photonics Japan, 2011年11月29日, 大阪大学
6. 中俊久, 笠木隆裕, 石渡裕, 伊藤雅英, "位相変調型微分干渉顕微鏡を用いた球形試料の高精度位相再生手法", Optics & Photonics Japan, 2011年11月29日, 大阪大学
7. 永井 宏樹, 俊久, 笠木隆裕, 石渡裕, 伊藤雅英, "位相変調型微分干渉顕微鏡の計測範囲の3次元拡張", Optics & Photonics Japan, 2010年11月8日, 中央大学 駿河台記念館
8. 中俊久, 永井 宏樹, 石渡裕, 伊藤雅英, "シア方向の異なる2枚のRM-DIC像を用いた位相再生手法の検討", Optics & Photonics Japan, 2010年11月8日, 中央大学 駿河台記念館

[その他]

ホームページ等

<http://gabor.bk.tsukuba.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 雅英 (ITO MASAHIDE)  
筑波大学・数理物質系・教授  
研究者番号：30150874

### (2) 連携研究者

谷田貝 豊彦 (YATAGAI TOYOHICO)  
宇都宮大学・オペティックス教育研究センター・教授  
研究者番号：90087445