ワンショットデジタルホログラフィによる赤血球の三次元計測*

Yu Qiyue** 田口 亮*** 保黒 政大† 堀米 秀嘉†† 梅崎 太造†††

3D Measurement for Human Red Blood Cells Using Single-shot Phase-Shift Digital Holography

Qiyue YU, Ryo TAGUCHI, Masahiro HOGURO, Hideyoshi HORIMAI and Taizo UMEZAKI

In these years, because of applications for medical analysis, such as biopsy, demand of 3D microscope is arising. Typical existing 3D microscopes are Scanning Electron Microscope (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). SEM is a type of electron microscope that produces images of an object by scanning it with a focused beam of electrons. The electrons interact with atoms in the object, producing various signals that can be detected and that contain information about the sample's surface topography and composition. However, SEM needs a vacuum system during measurement, and it is big size and price high. CLSM is a technique for obtaining high-resolution optical images with depth selectivity. It is its ability to acquire in-focus images from selected depths, a process known as optical sectioning. Images are acquired point-by-point and reconstructed with a computer, allowing 3D reconstructions of topologically complex objects. However, 3D measurement using CLSM is time consuming because it has to scan an object point-by-point, and 3D measurement accuracy of CLSM is about 1 μm which is difficult to measure nano-structure objects. To resolve problems in existing 3D microscopes, 3D microscope using single-shot phase-shift digital holography is proposed in this paper. In proposal 3D microscope, at first, a Michelson interferometer and general optical components are used, so reduction in system size and price-down can be realized easily. Second, the proposal 3D measurement method, single-shot phase-shift digital holography, uses Fourier-transform method of fringe-pattern which has been used for interferometry originally. Using the proposal method, 3D shape of an object can be measured in real-time(60 ms) with 5.5 nm accuracy in height direction and 0.59 μm resolution in XY plane. Finally, 3D shapes of human red blood cells are measured in measurement experiment. According to result of experiment, we conclude that the proposed 3D microscope can be applied to the field of precision medical analysis.

Key words: phase-shift digital holography, Fourier analysis for interference fringe, optical system, 3D measurement

1. 緒 言

近年、生体組織検査などの医療分析に対して、分解能の高い顕微鏡のニーズが増えている。既存の顕微鏡では、走査型電子顕微鏡および共焦点レーザ顕微鏡が最も利用されている。走査型電子顕微鏡は、光学顕微鏡に使用されている可視光線の代わりに、電子線を使用することで、0.1 nm 程度の高い画像分解能を実現する。しかしながら、走査型電子顕微鏡により得られた映像は高分解能の二次元電子映像であるため、物体の三次元形状を計測することができない。一方、共焦点レーザ顕微鏡は、計測光源としたレーザ光の焦点を対物レンズで計測対象表面に結び、計測対象を走査しながら、レーザの合焦位置を検知して計測対象の三次元形状を復元する。しかしながら、共焦点レー

ザ顕微鏡により得られた計測対象の三次元情報は微小なレーザの焦点毎に復元されるため、高速な三次元計測を実現することが困難である。また、距離精度が1 μm 程度であるため、微小な細胞やナノ構造物体などの三次元形状を正確に計測することが困難である。上記の問題点を解決して、高速、高精度かつ高分解能の三次元計測を実現するために、本研究では、ワンショット位相シフトデジタルホログラフィによる三次元計測法を利用した三次元顕微鏡を提案する。位相シフトデジタルホログラフィによる三次元計測法¹⁾³⁾では、参照光と物体光の光路差をレーザ波長の1/4倍ずつずらしながら、4枚の位相シフト干渉縞をカメラで撮影して、位相シフト法およびフレネル変換で物体の三次元形状を計測する。しかしながら、計測対象の動きや計測環境の振動などにより、位相シフトの位相差ずれが発生したため、4枚の位相シフト干渉縞撮影画像から物体光の相対位相値を正確に算出できず、生体組織や生きている細胞などの三次元計測が困難であるという問題点が存在した。この問題点に対して、ワンショットデジタルホログラフィ三次元計測法が提案されていた。従来のワンショットデジタルホログラフィでは、オフアクシスデジタルホログラフィ三次元計測法⁴⁾⁶⁾および並列位相シ

* 原稿受付 平成 26 年 5 月 12 日

掲載決定 平成 26 年 10 月 30 日

** 学生会員 名古屋工業大学大学院(愛知県名古屋市御器所町)

*** 名古屋工業大学大学院

† 中部大学工学部(愛知県春日井市松本町)

†† 合同会社 3Dragons(愛知県名古屋市御器所町)

††† 正 会 員 名古屋工業大学大学院

フトデジタルホログラフィ三次元計測法⁷⁻¹⁰⁾が最も使用されている。オフアキシデジタルホログラフィ三次元計測法では、物体光と参照光の光軸角度を大きくすることで、再生像に存在する実像成分のみを直流成分と虚像成分から抽出して、物体光の絶対位相値を算出する。しかしながら、再生光に存在する3つの情報から実像情報のみを抽出するため、三次元計測に使用する情報量はカメラから得られた情報量の1/3しか利用できないという問題点が存在した。並列位相シフトデジタルホログラフィ三次元計測法では、並列位相シフトアレイ素子をカメラセンサ表面上に貼り付けることで、1枚の干渉縞撮影画像から計測に必要な物体光の相対位相値を算出する。しかしながら、並列位相シフトアレイ素子は数百万円程度と高価であるため、計測装置の低価格化が困難である。上記の問題点を解決するために、本研究では、まず、マイケルソン干渉ユニットおよび一般的な光学部品を利用したため、計測装置の小型化および低価格化が容易に実現できる。次に、干渉計測分野に利用されていた干渉縞の周波数解析法¹¹⁾をデジタルホログラフィ三次元計測分野に応用することで、1枚の干渉縞撮影画像から物体光の相対位相値を算出できる高速かつ高精度の三次元計測を実現した。さらに、対物レンズおよび球面アクロマティックレンズを用いて顕微鏡レンズシステムを構築することで、光学分解能の高い三次元顕微鏡を開発した。最後に、血液に存在する赤血球に対して三次元計測実験を実行することで、提案装置の距離精度と計測時間が赤血球の三次元形態を用いた精密血液検査条件に満たし、将来の精密医療分析へ応用する可能性があることを検証した。

2. 計測装置の構成

提案システムの光学構成を図1に示す。参照光と物体光の干渉縞を生成する際に、まず、計測範囲を広くするために、レーザビームエキスパンダで拡大する。次に、拡大されたレーザ光は1/2波長板を透過して偏光ビームスプリッタに照射される。また、偏光ビームスプリッタの光学特性により、偏光角度が45度のレーザ光を2つの光束に分割して、P偏光の光束は平面ミラーに照射し、S偏光の光束は計測対象に照射される。ここで、S偏光およびP偏光の光束は1/4波長板を透過して旋光方向が異なる円偏光になる。レーザ光が計測対象表面および平面ミラーから反射時、まず、計測対象の表面から反射された円偏光の物体光は1/4波長板を透過して、P偏光になり、偏光ビームスプリッタに照射する。同様に、平面ミラーから反射された円偏光の参照光は1/4波長板を透過して、S偏光になり、偏光ビームスプリッタに照射する。次に、物体光と参照光は1/4波長板を透過して、旋光方向が異なる円偏光になり、偏光板に照射する。最後に偏光板の回転角度により、偏光板を透過した物体光と参照光は旋光角度が同一の直線偏光になり、干渉する。提案装置の外観を図2に示す。提案装置では、計測光源として使用したレーザの波長が532 nm、コヒーレンス長が200 m、出力パワーが50 mWである。顕微鏡レンズシステムでは、微小な細胞やナノ構造物体を高分解能で撮影するために、表1に示す50倍の無限補正対物レンズを使用した。対物レンズから出力した物体の映像をCCDセンサ表面上に結像するために、表2に示す焦点距離が100 mmの球面アクロマティックレンズを使用した。上記の顕微鏡レンズシステムを使用することで、光学分解能が0.59 μm 、焦点深度が1.76 μm 、結像分解能が0.22 μm の三次元顕微鏡を実現した。ここで、提案装置の光学分解能が0.59 μm であるため、三次元形状計測におけるXY平面の空間分解能が0.59 μm である。また、

三次元計測の範囲は500×500 μm 、計測装置のサイズは480×240 mmであるため、小型かつ高分解能の三次元計測装置の実現が可能である。さらに、一般的な光学部品を使用することで、150万円程度で構成が可能であり、既存の三次元顕微鏡が数千万円程度であることを比較すれば、計測装置の低価格化が実現できると考えられる。

Fig.1 Optical schematic diagram of proposal system

Fig.2 Appearance of proposal system

Table 1 Specification of Microscope objective Lens

Part number	Nikon LCD Plan
Magnification	50X
Focal length	1.76 μm
Working distance	4 mm
NA	0.55

Table 2 Specification of computer

Part number	SIGMAKOKI DLB-30-100PM
Focal length	100 mm
Back focal length	96.0 mm

3. 計測原理

Fig.3 Flow chart of proposal 3D measurement method

三次元計測処理の流れを図3に示す。まず、物体光と参照光の干渉縞を CCD カメラで撮影する。次に、干渉計測分野に応用されていた干渉縞の周波数解析法を用いて、計測対象から CCD センサ表面上に伝播された物体光の相対位相値を算出する。さらに、物体光の相対位相値を用いて、式(1)に示す畳み込み原理を利用したフレネル変換で計測対象表面上の物体光の複素振幅を算出し、式(2)により物体光の絶対位相値を算出する。最後に、Quality Map 位相連結法¹³⁾で物体光の絶対位相値を連結して、式(3)により、計測対象の三次元形状を復元する。ここで、位相連結法について、隣接する位相値の差が 2π の場合に連結箇所として判断し位相を連結するという最も単純な手法を使用した。しかしながら、位相連結の誤りを減らすために、Quality Map を使用することで、絶対位相分布に存在するノイズを除去した。

$$\Gamma(\xi, \eta) = \mathfrak{F}^{-1} \left\{ \frac{\mathfrak{F}\{E_o(x, y)\}}{\mathfrak{F}\{g(\xi, \eta, x, y)\}} \right\}$$

$$E_o(x, y) = \exp\{i\Delta\varphi(x, y)\} \quad (1)$$

$$g(x - \xi, y - \eta) = \frac{i \exp \left(-i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2 + d^2} \right)}{\lambda \sqrt{(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2 + d^2}}$$

ここで、 $E_o(x, y)$ は計測対象から CCD センサ表面上に伝播された物体光の複素振幅、 $\Delta\varphi(x, y)$ は干渉縞の周波数解析法で算出した物体光の相対位相値、 $\Gamma(\xi, \eta)$ は計測対象表面上の物体光の複素振幅である。 (x, y) は干渉縞撮影画像の画像座標(CCD センサの平面座標)、 (ξ, η) は計測対象の平面座標、 λ はレーザ光の波長、 d は計測対象の平面座標から CCD センサの平面座標までの距離を表す。

$$\varphi(\xi, \eta) = \tan^{-1} \left\{ \frac{\text{Im}[\Gamma(\xi, \eta)]}{\text{Re}[\Gamma(\xi, \eta)]} \right\} \quad (2)$$

$$X = \frac{\lambda d}{W \Delta x} x \quad Y = \frac{\lambda d}{H \Delta y} y \quad Z = \varphi \frac{\lambda}{2\pi} \quad (3)$$

ここで、 $\varphi(\xi, \eta)$ は計測対象表面上の物体光の絶対位相値、 (X, Y, Z) は計測対象の三次元座標、 W と H は撮影画像の幅と高さ、 Δx と Δy は CCD センサのピクセルサイズである。

4. 距離精度および計測時間の評価

本研究で開発した計測装置および手法について距離精度および計測時間の評価実験を実行した。まず、距離精度を評価するために、ミットヨ社製の段差マスタ(Mitutoyo No.616-498)を使用して、提案手法の距離精度を評価する。精度評価実験では、段差マスタにおける $1 \mu\text{m}$ 段差箇所を 10 回計測して、取得した三

Fig.4 Measured values of $1 \mu\text{m}$ step by measuring 10 times

Table 3 Specification of computer

CPU	Intel core i7 3.20 GHz
GPU	NVIDIA Tesla C2050
RAM	18 GB
Operating system	Windows 7 64-bit

Table 4 Specification of CCD sensor

Serial number	Point Grey FL3-GE-50S5M-C
Sensor type	Sony ICX255 CCD
Interface	GigE
Image size	2048×2048 pixel
Pixel size	3.45×3.45 μm
Frame rate	13 FPS

Table 5 Measurement times of proposal method ms

	Proposal method
Rotation and capturing time	77
Processing time	60
Total measurement time	157

次元形状から段差の計測値を算出した。算出した段差の計測値を図4に示す。段差マスタの許容誤差値は $\pm 200 \text{ nm}$ であり、計測の再現性を評価するために、接触式精密三次元計測機(Detac 150 Surface Profiler)を用いて、同一計測箇所を計測した結果($1.04 \mu\text{m}$)を真値とし仮定し、段差の計測値および真値との平均誤差および分散値を提案手法の距離精度として算出した。これにより、提案手法の計測平均誤差は 5.5 nm 、計測分散値は 0.22 nm であることを確認できた。また、顕微鏡レンズシステムの光学分解能は $0.59 \mu\text{m}$ 、結像分解能は $0.22 \mu\text{m}$ であるため、サイズが $1 \mu\text{m}$ 以上の微小な細胞やナノ構造物体に対して、三次元形状を正確に計測することが可能であると考えられる。次に、提案手法の計測時間を評価するために、表3および表4に示すコンピュータおよびカメラを使用した。撮影時間および計測時間を表5に示す。表5により、GPUを用いて計測処理を並列化することで、カメラの撮影画像サイズが $2048 \times 2048 \text{ pixel}$ の場合、 $500 \times 500 \mu\text{m}$ の計測範囲における三次元計測の処理時間は 60 ms 、撮影時間を含めた総合計測時間は 157 ms であることが確認できた。このことにより、生きている細胞などの生体に対して、実時間の高精度三次元計測が可能であると考えられる。

5. 赤血球の三次元計測実験

通常の血液検査では、血液に存在する赤血球の形態を光学顕微鏡で観察することで、血液の病症を判断することが多い。従来の赤血球の形態検査では、血液を染色して、光学顕微鏡により取得された赤血球の二次元画像を観察することで、赤血球の

平均体積や平均大きさを算出する。算出した赤血球の平均体積や平均大きさの値により、赤血球の三次元形態を判断して血液病症があるかを判断する。しかしながら、光学顕微鏡で観察する前、血液サンプルを染色する必要がある。また、赤血球を観察するには時間がかかるという問題点が存在していた。上記の問題点を解決するために、三次元計測技術を用いた自動血液検査が期待されている。血液検査では、健康な赤血球の平均容積は $80 \sim 100 \mu\text{m}^3$ 、平均半径は $4 \mu\text{m}$ であることが検査の基準として使用されている。そのため、健康な赤血球の平均容積範囲は $100 - 80 = 20 \mu\text{m}^3$ となり、式(4)より、高さの範囲は $0.4 \mu\text{m}$ と計算できる。

$$V = H \times (\pi \times R^2) \quad (4)$$

ここで、 V は健康な赤血球の平均容積、 R は健康な赤血球の平均半径、 H は求める健康な赤血球の平均高さ範囲である。共焦点レーザ顕微鏡を用いた三次元計測の距離精度は $1 \mu\text{m}$ 程度であり、血液検査には使用できない。また、電子顕微鏡の場合は計測時間が長いので、浸透圧により赤血球の形状が変化するというおそれがある。

提案した三次元顕微鏡は上記の問題点を解決し、将来の精密医療分析への応用が可能であることを検証するために、ヒトの血液に存在する赤血球に対する三次元計測実験を実行した。計測実験を実行する際に、まず、ヒトの血液を採集するために、デメカル血液検査キットを用いて、指先から採血した。次に、採集した血液を平面ミラーの上に置き、顕微鏡観察用のカバーガラスを血液上に載せた。計測に使用した血液の外観図および対物レンズと血液の位置関係の概念図を図5に示す。最後に、対物レンズから出射されたレーザ光を血液に照射して赤血球から反射された物体光と参照光を干渉させ、ワンショット位相シフトデジタルホログラフィを用いて赤血球の三次元形状を計測する。ここで、赤血球は透明な細胞の一種であるため、レーザ光は赤血球を透過して平面ミラーから反射した物体光と参照光を干渉させ、周波数解析法を用いて、物体光の相対位相値が算出できる。実験の結果例を図6に示す。図6より、 $500 \times 500 \mu\text{m}$ の計測範囲において、血液に存在する赤血球(約 6000 個)の三次元形状をワンショットで計測することが可能であることが確認できる。

また、赤血球に対する三次元計測の再現性を検討するために、まず、水環境の浸透圧が赤血球の形態に与えた影響を三次元計測で検証した。赤血球の外部水環境において、高浸透圧、等浸透圧および低浸透圧のとき、計測した赤血球三次元形状を図7に示す。次に、同一計測範囲に対して、1時間、1200回の三次元計測を実行した。計測の結果により、計測範囲に存在する赤血球の平均体積を算出し、赤血球の平均体積の変化を確認した。

図7より、同一の赤血球に対して、外部に水成分が多いとき、赤血球の浸透圧が大きいので、赤血球の三次元形状が膨らんでいることが確認できた。また、計測サンプルにおける水の揮発により、水成分が少なくなる。そのため、等浸透圧時、赤血球の三次元形状において、高さが $5 \mu\text{m}$ 、幅が $7 \mu\text{m}$ であることが確認できた。最後に、水成分がほぼ揮発してしまい、赤血球の外部水環境が低浸透圧である際に、赤血球の高さが $2 \mu\text{m}$ と薄くなることが確認できた。また、図8より、1時間、1200回の三次元計測を実行することで、計測サンプルにおける水が揮発してしまい、赤血球の外部水環境の浸透圧が低下になり、平均体積が小さくなることが確認できた。

最後に、赤血球の三次元形状と体の健康状態との関係を検討するために、朝6時、午前12時および午後6時において、血液

Fig.5 Appearance and conceptual diagram of red cells sample

Fig.6 Measurement result of red cells sample

サンプルにおける異なる 10 箇所(7 万個の赤血球)に対して三次元計測を実行することで、それぞれの赤血球の体積分布を算出した。時間帯が異なる赤血球の体積分布を図9に示す。図9より、朝6時においては、赤血球の体積の平均値は $90.0 \mu\text{m}^3$ 、分散値は $0.9 \mu\text{m}^3$ である。午前12時においては、赤血球の体積の平均値は $89.9 \mu\text{m}^3$ 、分散値は $0.9 \mu\text{m}^3$ である。午後6時においては、赤血球の体積の平均値は $89.8 \mu\text{m}^3$ 、分散値は $1.3 \mu\text{m}^3$ である。そのため、一日中においては、赤血球の平均体積がほぼ同一であるが、朝および午前のときでは、赤血球の体積分散値が最も小さく、赤血球の三次元形状の変化が最も小さいことが確認できた。また、午前12時において、食事直前および食後の赤血球の体積分布を図10に示す。図10より、食事直前においては、赤血球の体積の平均値が $89.6 \mu\text{m}^3$ 、分散値は $1.0 \mu\text{m}^3$ である。そのため、食事直後より、食事直前では、赤血球の三次元形状が少し薄いことを確認できた。

6. 結 言

本研究では、走査型電子顕微鏡および共焦点レーザ顕微鏡に存在する問題点を解決して、ワンショット位相シフトデジタルホログラフィを利用した高速、高精度かつ安価な三次元顕微鏡装置を開発した。提案装置では、まず、対物レンズおよび結像レンズで構築した顕微鏡レンズシステムを使用することで、計測装置の光学分解能の向上を実現した。次に、一般的な光学部品を使用することで、提案装置の低価格化を実現した。また、干渉計測分野に应用されていた干渉縞の周波数解析法を位相シフトデジタルホログラフィ分野に应用することで、高速かつ高精度の三次元計測が実現できた。ここで、距離精度および計測時間に対する評価実験の結果により、5.5 nm の距離精度および 60 ms の計測処理時間が得られた。顕微鏡レンズシステムの使用により、0.59 μm の XY 平面空間分解能を実現した。最後に、血液に存在する赤血球に対する三次元計測実験の結果より、従来の血液検査に必要な血液染色や光学顕微鏡観察を行わず、提案装置を用いて、計測した赤血球の三次元形状により、血液を高精度で検査する可能性がある。そこで、赤血球の三次元形状解析がコンピュータで自動で行われるため、リアルタイムの血液検査の可能性がある。そのため、赤血球の三次元計測実験を通して、提案装置を将来の精密医療分析に应用する可能性が示された。今後は、健康や不健康な血液を入手して、三次元計測による血液検査の結果と従来の血液検査の結果と比較することで、血液の検査精度を評価すると考えている。

Fig.7 3D shape of red cells in different water environments

Fig.8 Variation of red cells' average volume in an hour

Fig.9 Histograms of red cells' volume in different time periods

Fig.10 Histograms of red cells' volume before and after lunch

参 考 文 献

- 1) Yamaguchi, and Zhang t: Phase-shifting digital holography, Optical letter, **43**, (1997) 1268.
- 2) Y. Y. Cheng, and J.C. Wyant: Multiple-Wavelength Phase-Shifting Interferometry, Applied Optics, **24**, 6 (1985), 804.
- 3) B. Barrientos: Transient Deformation Measurement with ESPI Using a Diffractive Optical Element for Spatial Phase-Stepping, Fringe, (1997) 317.
- 4) Daesuk Kim, Robert Magnusson, Moonseob Jin, Jaeyong Lee, and Won Chegal: Complex object wave direct extraction method in off-axis digital holography, Optics Express, **21**, 3 (2008) 3658.
- 5) Etienne Cuche, Frederic Bevilacqua, and Christian Depeursinge: Digital holography for quantitative phase-contrast imaging, OPTICS LETTERS, **24**, 5 (1999) 291.
- 6) Etienne Cuche, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge: Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography, APPLIED OPTICS, **39**, 23 (2000) 4070.
- 7) James Millerd, John Hayes, Michael North-Morris, Matt Novak, James Wyant: Pixelated Phase-Mask Dynamic Interferometer, Interferometry XII Techniques and Analysis (2004).
- 8) Yasuhiro Awatsuji, Masaki Sasada, Toshihiro Kubota: Parallel quasi-phase-shifting digital holography, Applied physics letters, **85**, 6 (2004) 1069.
- 9) M. Sugiyama, H. Ogawa, K. Kitagawa, K. Suzuki: Single-shot surface profiling by local model fitting, Appl. Opt., **45** (2006) 7999.
- 10) Tatsuki Tahara, Kenichi Ito, Takashi Kakue, Motofumi Fuji, Yuki Shimozato, Yasuhiro Awatsuji, Kenzo Nishio, Shogo Ura, Toshihiro Kubota, Osamu Matoba: Parallel phase-shifting digital holographic microscopy, Biomedical optics express, **1**, 2 (2010) 610.
- 11) Mitsuo Takeda, Hideki Ina, Seiji Kodayashi: Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry, J.Opt.Soc.Am., **72**, 1 (1982) 156.
- 12) Yu Qiyue, 田口亮, 保黒政大, 堀米秀嘉, 梅崎太造: ワンショット位相シフトデジタルホログラフィによる三次元計測装置の開発, 精密工学会誌, **80**, 4 (2014) 375.
- 13) Yu Qiyue, 田口亮, 保黒政大, 堀米秀嘉, 梅崎太造: 位相シフトデジタルホログラフィによる三次元計測システムの開発, 電気学会論文誌 C, **134**, 1 (2014) 56.