細胞レベルでのマルチモーダルデジタルホログラフィックイメージング

全 香玉¹, クマー マノジ¹, 粟辻 安浩², 的場 修¹

¹神戸大学大学院 システム情報学研究科(〒657-8501神戸市灘区六甲台町1-1)

²京都工芸繊維大学 電気電子工学系(〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町)

Multimodal Digital Holographic Imaging for Cell Imaging

Xiangyu QUAN¹, Manoj KUMAR¹, Yasuhiro AWATSUJI², and Osamu MATOBA¹

¹Graduate School of System Informatics, Kobe University, Rokkodai 1-1, Nada, Kobe 657-8501, Japan

²Faculty of Electrical Engineering and Electronics, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

(Received March 11, 2019)

This review paper introduces a new type of microscope that enables simultaneous recordings of phase and fluorescence data and retrieves them in three-dimensions. Conventional microscopes take fluorescence and phase information in sequential manner, and it is far satisfying for fast reactions in living cells. In both imaging, digital holographic techniques are applied. For phase imaging, typical Mach-Zehnder interferometer is applied whilst common-path off-axis fluorescence digital holography is applied to fluorescence imaging. Individual and combined methods were verified by experiments results. We believe that the concept of multimodal digital holographic microscopy and the proposed method will push forward the life science to unprecedented level.

Key Words: Multimodal microscopy, Digital holographic microscopy, Fluorescence microscopy

1. はじめに

生命科学と基礎科学の飛躍的な発展は顕微鏡技術の発展と切り離せられない。顕微鏡は計測対象の様々な特徴を定量的または定性的に測る道具としてその役割を果たすが、構成によって計測可能な物理量が限られているのが現在の課題である。例えば蛍光顕微鏡では蛍光強度のみを、位相差顕微鏡では位相差から生じる形態情報のみを画像化する等の限定された特徴しか抽出できない。他にもスペクトル、偏光、吸収率、透過率等の様々な特徴量があるが、根本的な顕微鏡の構造を変えない限り、これらを複数同時に計測することは困難である。

単一の特徴から未知の細胞の活動を計測するのは限界があり、一度の計測であらゆる側面からの情報を取得することが望ましい。最近では具体的な計測目的に応じて複数の物理情報を同時取得可能なマルチモーダルイメージングの研究が盛んに行われている。代表的なものは蛍光と定量位相イメージング手法の組み合わせ^{1,2)}、位相差顕微鏡とラマン分光法の組み合わせ³⁾、光コヒーレンストモグラフィーと蛍光イメージングの組み合わせ⁴⁾、またはこれら複数の組み合わせを提案しているものもある⁵⁾。これらの手法は各物理量を同時に比較することで、別々で取得した以上の相乗効果を生むことが認めら

れている。

本解説では上述した組み合わせの中でも最も多く使われている蛍光イメージングと位相イメージングの組み合わせについて紹介する。蛍光顕微鏡は細胞内、外の特定タンパク質に蛍光マーカーを付けられるので、ターゲットとする個体の分布や動きを高いコントラストでイメージングできる。最も簡単な反射型2次元計測以外にも、共焦点レーザー走査型、構造照明パターンを用いた走査型超解像3次元イメージング方法⁶⁾がある。また、マイクロレンズアレイを用いたライトフィールド顕微鏡⁷⁾や干渉計測の一種であるインコヒーレントデジタルホログラフィーに代表されるシングルショット3次元計測方法も提案されている⁸⁻¹¹⁾。その一方、位相計測としても定量的な3次元再構成が可能であるデジタルホログラフィーを用いて細胞の形状や厚み情報等を高速に取得できる¹²⁻¹⁶⁾。蛍光と位相の同時取得が可能なマルチモーダルイメージング技術は、蛍光の変化が表す特徴量と細胞の3次元形態変化を同時に取得できるので、より包括的な計測を可能とする。

本論文では、まずデジタルホログラフィーを用いた定量的位相計測について簡単に述べた後に、2次元蛍光計測系と結合させたマルチモーダル顕微鏡を示し、その応用について紹介する¹⁷⁾。また、蛍光の3次元計測に向

けて、インコヒーレントデジタルホログラフィーの一種である共通光路型オフアキシス蛍光デジタルホログラフィーを紹介する^{18,19)}。最後にまとめと3次元マルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡の展望について述べる。

2. マルチモーダルデジタルホログラフィックイメージング

2.1 定量的位相計測

光が計測物体を通過した際に物体によって生じる位相変化量を正確に測れば、計測物体が持つ光学的特徴がわかる。光学的特徴には細胞の屈折率、厚み、透過率等が含まれる。位相計測は弱い光で3次元形体や位置情報等を取得できるので最も低侵襲な計測と言われる。また、蛍光計測等に加えて多次元の物理量も同時に取得できる。現在一般的に用いられる位相差顕微鏡は2次元定量的計測に適しているが、定量的な3次元情報の取得は困難である。

本研究では定量的位相計測の方法の一つであるデジタルホログラフィック顕微鏡を用いる。Fig. 1にその原理図を示す。平行な物体光は細胞などの計測対象を透過した際に物体と媒質の間の屈折率差により、記録面で空間的な位相の遅れが生じる。位相の遅れは記録された強度画像に反映できないため、コヒーレントな平行参照光を干渉させてホログラムを記録する。Fig. 1で媒質の屈折率を n_1 、計測物体の屈折率を n_2 、光軸方向での物体の厚みを d とすると、記録面に到達した際に生じる位相の遅延差は $\Delta\phi = dk(n_1 - n_2)$ となる。ここで k は波数を表す。

記録面での物体光の複素数振幅を $u_o = a_o \exp(i\Delta\phi)$ 、参照光の複素数振幅を $u_r = a_r \exp[i(k_x x + k_y y)]$ とすると、イメージセンサーで記録する光の強度は次の式で表わされる。

$$\begin{aligned} I &= |u_o|^2 + |u_r|^2 + u_o u_r^* + u_r u_o^* \\ &= I_0 + a_o a_r \exp[i\Delta\phi - i(k_x x + k_y y)] \\ &\quad + a_o a_r \exp[-i\Delta\phi + i(k_x x + k_y y)] \end{aligned} \quad (1)$$

得られたホログラムをフーリエ変換すると、実数成分である $I_0 = |u_o|^2 + |u_r|^2$ はフーリエ面で低空間周波数域で

Fig. 1 Typical method to obtain quantitative phase images using off-axis digital holographic configuration.

の分布を持つ。共役信号である $u_o u_r^*$ と $u_r u_o^*$ はフーリエ面で原点からそれぞれ (k_x, k_y) と $(-k_x, -k_y)$ 離れた場所に現れる。 k_x と k_y は参照光の波数ベクトル k の x , y 成分である。オフアキシスデジタルホログラフィーでは、物体共役光の空間周波数領域をカバーするバンドパスフィルタを掛けた後、周波数面の原点にシフト処理をすることで物体共役光の複素数分布が得られる。記録面での物体光の複素数振幅が求められると再生距離を変えながら光波の逆伝搬計算を適用することで奥行きが異なる物体も合焦再生、或いは再構成面での位相の定量的解析が可能となる。その再構成例をFig. 2に示す。Fig. 2(a)-(c)は、HeLa細胞から取得したホログラム、フーリエ変換像、位相の再構成画像をそれぞれ表す。再構成画像から細胞と媒質の位相差が 4π であることがわかる。Fig. 2(d)-(g)は奥行きが異なる蛍光ビーズを再構成距離 $(-68 \text{ mm}, 122 \text{ mm}, -158 \text{ mm})$ を変えながらデジタルリフォーカシングした結果を示す。Fig. 2(c)と(g)のスケールバーは位相の値(ラジアン)を示す。

2.2 定量位相計測と蛍光強度分布の同時取得

現在市販の顕微鏡は位相と蛍光の計測モードを順次切り替えながら計測することはできるが、同時計測は不可能である。これは多次元の情報を必要とする計測の高速化において限界を与える要因となる。また、今までに位相と蛍光の同時計測を提案した論文はあるが、定量的位相計測ができないこと¹⁾と、差分計算方法で得られる画像に対して、クロストークが必然的に生じてしまう²⁾問題等が存在する。本研究で提案するマルチモーダル顕微鏡は定量的位相計測と蛍光2次元計測を同時、かつ独立したイメージセンサーで取得することで上述の問題を解決した。提案したマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡の構成をFig. 3に示す。

Fig. 2 Experiment results of quantitative phase imaging (a-c) and numerical 3D reconstruction (d-g): (a) hologram of a HeLa cell, (b) Fourier transform of the hologram, (c) reconstructed HeLa cell, (d) hologram of a microbeads ($4 \mu\text{m}$), (e) reconstructed at distance -68 mm , (f) reconstructed at -122 mm and (g) reconstructed at -158 mm .

Fig. 3 Multimodal digital holographic microscopic set-up for simultaneous quantitative phase imaging and epifluorescence imaging. (M: mirror, BS: beam splitter, SPF: short-pass filter)

Fig. 3の光学系では反射型蛍光顕微鏡と透過型オフアキシスデジタルホログラフィック顕微鏡の2つで構成される。まずFig. 3のObject armとFluorescence armで蛍光顕微鏡の光路を構成した。励起光源はシャッター付き波長532 nmの緑色或いは473 nmの青色レーザーを用いた。励起光をサンプルに当てると、サンプルから励起光より長波長の蛍光が放出され、Recording device 1で記録される。右半分のReference armとObject armは定量位相計測用のデジタルホログラフィック顕微鏡を構成する。照明光源として、蛍光と波長で分離できるように632.8 nmの赤色He-Neレーザーを用いた。

Fig. 4は蛍光イメージングと定量位相の計測を同時に行ったタイムラプス計測例を表す。Fig. 4(b)列の位相画像は位相の値 $[-\pi, \pi]$ をグレースケールで表す。計測サンプルはヒメツリガネゴケの細胞を水中で密閉したもので

Fig. 4 *Physcomitrella patens* cell growth time-laps imaging using multimodal digital holographic microscopy. (a) Fluorescence imaging results, (b) quantitative phase imaging results.

ある。細胞体中で葉緑体が青い光を吸収して自家蛍光を発した部分が蛍光で明るく光っている。位相画像は $[-\pi, \pi]$ の値をグレースケールで表したものである。黒が $-\pi$ 、白が π の値に相当する。48分目から蛍光画像はフォーカス面から外れて、葉緑体の分布と細胞の模様が特定できなくなったが、位相画像からは細胞膜の模様が明瞭に見える。細胞は数 μm ほどの成長をみせているが、細胞を透過する光の位相が一様分布から中央に集中するような分布に変化している。細胞内の位相値は概ね葉緑体から生じる位相差を積算した結果に比例するため、48分以降からは葉緑体が細胞体の中心に移動していることが推測できる。蛍光画像からも同様の傾向が見られる。

3. 共通光路を使ったオフアキシス蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡

2次元画像を取得できる蛍光顕微鏡を使う際の最大の課題は画像のデフォーカシングである。計測物体が対物レンズの被写界深度の範囲を外れると、計測面で得られた画像はぼやけてしまう。走査せずに3次元の蛍光画像を取得する方法としてインライン型インコヒーレントデジタルホログラフィック顕微鏡が多くの関心を集めてきた^{8,9)}。この手法を使った顕微鏡の数値的評価や解析も活発に行われている²⁰⁾。また、インライン手法では位相シフト計算を行うために、少なくとも2枚以上の干渉画像が必要なために、それらの取得に時間を要するというデメリットから、オフアキシスインコヒーレントデジタルホログラフィック顕微鏡も提案されている^{10,11)}。しかし、蛍光のコヒーレンス長が短いことから、オフアキシスホログラフィーでは、光路長調整が難しい、外乱に弱い等の問題を抱えている。これらの問題を踏まえて我々は共通光路を持つ新しいオフアキシス蛍光デジタルホログラフィーを提案した¹⁸⁾。提案手法では共通光路による計測システムの安定性を保ちながら、位相シフト計算を必要としないオフアキシスホログラフィーなのでシングルショット3次元記録が可能である。Fig. 5に提案光路図を示す。コヒーレンス長が非常に短い蛍光による干渉を確保するために、回折光学素子を使って変調された物体光と非変調の参照光の2つの光波を発生させる。通常、位相型空間光変調器を使い、変調光と非変調光の間に波面の曲率半径に差を付ける。更に、オフアキシス

Fig. 5 Proposed off-axis fluorescence digital holographic microscopy using diffraction gratings with lens function.

デジタルホログラフィーを構成するために、回折格子を加えて非変調光と変調光との伝搬方向の間に角度をつける。空間光変調器を用いて、変調光に対する結像面を非変調光の結像面から奥行き方向と面内方向にずらし、オーバーラップさせることで干渉縞を得る。

計測物体が置かれた3次元座標を (x_s, y_s, z_s) とする。 r_1 と r_2 は記録面でのそれぞれ非変調光 u_1 と変調光 u_2 の曲率半径を表す。変調光は非変調光に対して常に $\Delta r = f_{\text{Tube}}^2 / f_{\text{SLM}}$ の曲率半径に差が生じる。

記録されたホログラムの強度 $I = |u_1 + u_2|^2$ は以下の項目から構成される。

$$u_1 = \exp \left\{ \frac{i\pi}{\lambda r_1} (x - x_s M)^2 + (y - y_s M)^2 \right\} \quad (2)$$

$$u_2 = \left\{ \frac{i\pi}{\lambda r_2} \left[\left(x - x_s M - \frac{f_{\text{Tube}}}{d_h} \right)^2 + (y - y_s M)^2 \right] \right\} \quad (3)$$

$$r_1 = -z_s \frac{f_{\text{Tube}}^2}{f_{\text{OL}}^2}, \quad r_2 = \Delta r - z_s \frac{f_{\text{Tube}}^2}{f_{\text{OL}}^2}, \quad M = \frac{f_{\text{Tube}}}{f_{\text{OL}}} \quad (4)$$

d_h と f_{SLM} は SLM に表示する回折格子の周期とレンズ関数の焦点距離である。ホログラムから元画像を復元するには再構成距離 $z_h = \pm r_1 r_2 / (r_1 - r_2)$ を適用する。ホログラムの再構成距離 z_h と対物レンズの焦点から奥行き方向に離れた距離 z_s の関係について数値シミュレーションによって得られた曲線と実験で得られた結果を Fig. 6(a) のグラフに示す。計算と実験に用いたパラメータを Table 1 に示す。グラフの理論値と実験値との比較から式(2) – (4)の有効性が示されている。

直径 $10 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを光軸方向に $80 \mu\text{m}$ 移動させ、デフォーカスさせた状態で変調光を生成し、ホログラムを記録した。そのホログラムからの再構成結果を Fig. 6(b) – (d) に示す。全てのビーズが正しい位置で再構成できているのが確認できる。再構成画像と元画像を比べると、再構成像が垂直方向に伸びていることが確認でき

Fig. 6 (a) A plot of reconstruction distance and object depth position from the focal plane in experiments and theoretical calculations, (b) a focused beads' image, (c) hologram, and (d) the reconstructed image.

Table 1 Experimental parameters and instruments.

f_{OL}	4 mm
f_{Tube}	200 mm
Fluorescence Wavelength (λ)	$575 \pm 12.5 \text{ nm}$
f_{SLM}, d_h	800 mm, $300 \mu\text{m}$
CCD sensor	Andor iXon, 1024×1024 , pixel size $13 \mu\text{m}$
SLM	Holoeye pluto (1920×1080 pixels, $8 \mu\text{m}$ pixel pitch, phase-only modulation)
Objective lens	$\times 50$, NA 0.6

る。この原因としてオフアクシスホログラフィーにおいて空間周波数面で物体光を分離する際に、物体光成分が DC 信号に近い周波数を持っているため窓関数の大きさが十分でないことが挙げられる。共通光路型では分離角度を大きくするとコヒーレンス長により干渉領域が狭くなるため、回折角と伝搬距離等の光学パラメータを適切に設定することが必要になる。

4. 終わりに

本論文では、生体計測の中で最も有用な蛍光計測と位相計測において同時3次元計測が可能な、新しいマルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡を紹介した。まず、蛍光2次元計測と定量的位相計測が可能なマルチモーダル顕微鏡とその実験結果を示した。次に、蛍光の3次元計測に向けてシングルショット3次元計測が可能な共通光路型オフアクシス蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡を示し、蛍光ビーズを用いた実験結果を示した。最終的に定量的位相計測と共通光路型オフアクシス蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡を結合させて、位相と蛍光の高速3次元イメージングを実現することを目指している。この実現により現在では不可能である神経細胞の3次元光刺激による状態計測や、植物細胞の幹細胞化プロセスの可視化などの長時間に渡る状態変化を被写界深度を超えてタイムラプスで計測することに使われると期待される。また、光遺伝学などの学問においても、走査を必要としない3次元計測方法として、有力なツールを提供できると考えられる¹⁹⁾。

現段階の実験結果はまだ原理検証段階のデータであり、細胞の密度が大きい実際の生体のサンプルに対して厳密には評価していない。今後の課題として、生細胞に対する蛍光計測の精度向上を目指す。

謝 辞

本研究の成果は、(独)日本学術振興会 科学研究費補助金 15H03580, 17F17370, 18H03888 および科学技術振興機構 CREST 17939097 の支援で行われものである。

参考文献

- 1) Y. Park, G. Popescu, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld: Opt. Express **14** (2006) 8263.

- 2) E. Shaffer, N. Pavillon, and C. Depeursinge: *J. Microsc.-Oxford* **245** (2012) 49.
- 3) N. McReynolds, F. G. Cooke, M. Chen, S. J. Powis, and K. Dholakia: *Sci. Rep.* **7** (2017) 43631.
- 4) O. Thouvenin, M. Fink, and A. C. Boccara: *J. Biomed. Opt.*, **22** (2017) 026004.
- 5) T. Tahara, X. Quan, R. Otani, Y. Takaki, and O. Matoba: *Microscopy* **67** (2018) 55.
- 6) B. C. Chen, W. R. Legant, K. Wang, L. Shao, D. E. Milkie, M. W. Davidson, C. Janetopoulos, X. S. Wu, J. A. Hammer III, Z. Liu, *et al.*: *Science*, **346** (2014) 439.
- 7) R. Prevedel, Y. G. Yoon, M. Hoffmann, N. Pak, G. Wetzstein, S. Kato, T. Schrödel, R. Raskar, M. Zimmer, E. S. Boyden, *et al.*: *Nat. Methods* **11** (2014) 727.
- 8) B. W. Schilling, T.-C. Poon, G. Indebetouw, B. Storrie, K. Shinoda, Y. Suzuki, and M. H. Wu: *Opt. Lett.* **22** (1997) 1506.
- 9) J. Rosen and G. Brooker: *Nat. Photon.* **2** (2018) 190.
- 10) M.K. Kim: *Appl. Opt.* **52** (2013) A117.
- 11) K. Watanabe, and T. Nomura: *Appl. Opt.* **54** (2015) A18.
- 12) B. Kemper and G.V. Bally: *Appl. Opt.* **47** (2008) A52.
- 13) T. Kreis: *Handbook of Holographic Interferometry* (Wiley-VCH, 2005).
- 14) M. K. Kim: *SPIE Rev.* **1** (2010) 018005.
- 15) Y. K. Park, C. Depeursinge, and G. Popescu: *Nat. Photon.* **12** (2018) 578.
- 16) Y. Frauel, T. J. Naughton, O. Matoba, E. Tajahuerce, and B. Javidi: *Proc. IEEE* **94** (2006) 636.
- 17) X. Quan, K. Nitta, O. Matoba, P. Xia, and Y. Awatsuji: *Opt. Rev.* **22** (2015) 349.
- 18) G. Brooker, N. Siegel, V. Wang, and J. Rosen: *Opt. Express* **19** (2011) 5047.
- 19) X. Quan, O. Matoba, and Y. Awatsuji: *Opt. Lett.* **42** (2017) 383.
- 20) X. Quan, M. Kumar, O. Matoba, Y. Awatsuji, Y. Hayasaki, S. Hasegawa, and H. Wake: *Opt. Lett.* **43** (2018) 5447.