

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

学位論文題目	定量位相顕微鏡による物体形状計測における再構成手法と結像評価法に関する研究
氏 名	波田地 洋隆
<p>医学と薬学の研究では、薬剤作用の評価や細胞のメカニズムを解明するために、光学顕微鏡を用いた生細胞の動的な反応が調べられている。細胞の多くは無色透明であるため、光吸収を用いる顕微鏡では、蛍光などの外因性物質を用いなければ、細胞を観察できない。しかし、外因性物質の利用には前処理が必要であり、選択性をもつ物質以外の構造を観察できない。また、長時間観察では光毒性や光退色の問題が生じる。このため、細胞のモニタリングや、細胞内の物質と形態を同時に取得する場合には、外因性物質を利用せずに細胞形態を観察できる方法が必要になる。</p> <p>近年、位相分布を定量的に復元する定量位相顕微鏡の開発が行われている。定量位相顕微鏡は位相分布を定量測定することにより、屈折率と厚さに関する情報を取得する。細胞内小器官は異なる屈折率をもつため、細胞の内部構造を可視化できる。また、振幅分布も同時に取得できる場合には、回折トモグラフィ等により3次元断層画像も取得できる。細胞は3次元的な形態を持っており、それは細胞の状態に合わせて変化している。このため、2次元的な観察に対して、より正確に細胞の状態を評価できることが期待できる。しかし、現在の撮影装置は光の強度情報しか記録できないため、撮影した強度情報から光の位相情報を抽出する実験系と再構成アルゴリズムが必要になる。この組み合わせには、現在、確定的な方法はなく、速度と精度を改善するために改良と試行錯誤が行われている。顕微鏡を構築するには、多数ある手法の中から測定対象に対して有効な手法を選択し、問題が生じれば改良することが必要になる。また、定量位相顕微鏡の測定精度は再構成アルゴリズムだけではなく、結像光学系の影響を強く受ける。この影響を調べるためには、測定対象の特性や結像光学系の特性のような測定精度に影響を与える要因を、個別に調査できる計算モデルが必要になる。本論文では、定量位相顕微鏡の1つであるデジタルホログラフィック顕微鏡を対象として、定量位相計測の再構成アルゴリズムの改良と測定限界の評価を目的とし、デジタルホログラフィック顕微鏡の実験装置の構築、位相復元のための再構成アルゴリズムの精度と分解能の評価、オートフォーカスの高速化の検討、及び、結像光学系と測定対象に起因する計測誤差を調査可能な結像計算モデルの構築を行い、そのモデルを用いた定量位相顕微鏡の測定限界に関する評価を行う。</p> <p>論文の構成について述べる。第1章では、研究背景と研究目的について述べている。第2章では、透過型デジタルホログラフィック顕微鏡の実験系を構築し、再構成アルゴリズムを構成する各手法の特性を評価している。また、再構成に利用されるオートフォーカスにおける高速化について検討している。再構成アルゴリズムは、カメラ上の物体光の復元、オートフォーカス、回折積分、位相アンラッピングから構成される。まず、カメラ上の物体光の複素振幅の復元手法に関して、代表的な手法である時間的位相シフト法、フーリエフィルタリング法、空間的位相シフト法の測定精度と分解能、計算時間の評価を行い、フーリエフィルタリング法は他手法に比べて、総合的に優れた特性をもっていることを示した。また、時間的位相シフト法は、位相シフト量を正確に制御する必要があるため、外乱に弱く、安定性に問題があることを述べた。さらに、分解能の評価においては、各手法とも、振幅分布と位相分布はそれぞれ回折限界まで観察することができ、インライン型とオフアキシス型で差は見られなかった。カメラ上の物体光を回折伝搬して像面上の複素振幅を再生する過程では、回折積分の数値計算方法を選択するための基準を調べ、背景値パッチングを用いる場合には回折積分の伝達関数を解析的に与えた方が良いことを示した。そして、回折積分の伝搬距離の計算に用いるオートフォーカシングでは、計算時間が問題となるため、処理の高速化を目的として縮小処理を導入することを提案した。この縮小処理の導入において、焦点評価関数である分散関数は、縮小処理を適用しても単峰性を維持し、極値の位置が変化しても、その変化は微量であり、定量位相計測結果への影響が小さいことを示した。結果として、構築した定量位相顕微鏡は、RMS誤差で約32.5[nm]の精度で、線構造のナノインプリントモールドの形状を測定できた。そして、塗沫標本上の赤血球とリンパ球を測定し、細胞の3次元形態に関する情報を取得できることを確認した。第3章では、瞳イメージング法とFDTD法を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡の結像計算モデル</p>	

ルを開発し、実験によりモデルの妥当性を検証した。この計算モデルでは、FDTD法により物体からの回折光を計算し、光学系の入射瞳上の電場分布を計算する。そして、その電場分布からアッペの正弦条件に基づくエネルギー保存則により、射出瞳球面上の電場分布を計算し、回折伝搬により撮影面上のホログラムを求める。従来の瞳を用いた結像計算モデルでは、射出瞳球面上の電場分布から直接像面近傍の電場分布を計算できるデバイ回折積分が利用されてきたが、デフォーカス量が増加すると精度が悪化することが知られている。デジタルホログラフィック顕微鏡は、非共役面で撮影された電場分布に位相補正を行った後、それを像面まで数値伝搬することで像を計算するため、像面と撮影面の間にデフォーカスが存在する。一方で、デフォーカスが存在する場合にも利用できるレイリーゾーンマーフェルト回折積分とその近軸近似であるフレネル回折積分は、2つの平面間の回折伝搬計算に用いられる。このため、本論文では、射出瞳球面上の電場分布をその接平面上に投影し、投影した電場分布にこれらの回折積分を適用した。電磁波解析と瞳イメージング法を用いた結像光学モデルの実験的検証は少なく、デフォーカスが存在する場合の検証は行われていない。このため、モデルの検証を行うために、定量位相計測により厚さを測定可能な例とそうでない例として、ナノインプリントモールドとマイクロ粒子の定量位相計測を行い、結像計算モデルによる計算結果と比較することで、結像計算モデルの妥当性と定量性を検証した。そして、構築した結像計算モデルをマイクロレンズ状の物体に対して適用することで、物体と結像光学系の特性が測定精度に与える影響を調べた。その結果、物体の厚さが急激に変化する部位では、結像光学系の開口による影響で高周波成分がカットされ、誤差が生じることが分かった。また、物体の屈折率が大きい場合には、高さ分布と位相分布の間の線形関係が成立せず、物体形状を測定できなくなることが示された。構築した計算モデルは、これらの誤差を定量的に調べることができるため、構築した結像実験系の評価や実験により測定された結果の解釈に利用できると考えられる。最後に第4章では、本論文の総括について述べた。

【論文審査結果の要旨】

細胞自体のメカニズムの解明や薬剤作用の効果を評価するために、細胞外環境を変化させた場合の細胞の形態観察や蛍光を用いた細胞内分子観察が行われている。しかしながら、蛍光などの外因性物質を用いた観察では前処理が必要となること、選択された物質の構造しか観察できないこと、さらに光毒性や光退色のため長時間に渡るモニタリングに適さないなどの問題がある。このため培養環境下などの細胞観察においては、位相差顕微鏡などの定性的位相顕微鏡による画像に対して処理を施すことにより定量評価の試みがなされている。しかしながら、細胞の光学厚さの影響により境界が不鮮明となるため細胞膜境界の変化を詳細に観察できない、3次元的に変化している形態の観察ができないなどの問題がある。

本研究は、外因性物質を用いることなく、長時間の細胞の3次元的な形状計測を可能とする位相分布計測を可能とする定量位相顕微鏡としてデジタルホログラフィック顕微鏡を取り上げ、定量位相計測における再構成アルゴリズムの改良と測定限界の評価を目的として、デジタルホログラフィック顕微鏡実験装置の構築、位相復元のための再構成アルゴリズムの精度と分解能評価、オートフォーカシング高速化の検討、及び、結像光学系と測定対象に起因する計測誤差の調査を可能とする結像計算モデルの構築を行っている。

本論文は、4章からなり、第1章では、位相顕微鏡における課題と顕微鏡のデジタル化に伴う定量位相計測に関する展望を述べ、研究目的と論文構成について説明し、第4章で総括を行っている。

第2章では、透過型デジタルホログラフィック顕微鏡の実験系を構築し、再構成アルゴリズムを構成する各手法の特性評価とオートフォーカスにおける高速化について検討している。再構成アルゴリズムは、カメラ上の物体光復元、数値レンズによる倍率変換、オートフォーカス、回折積分、位相アンラッピングから構成され、カメラ上物体光の複素振幅の復元手法としてインライン型とオフアキス型の代表的な手法である時間的位相シフト法、周波数フィルタリング法、及び、空間的位相シフト法に対する測定精度、分解能、計算時間の評価を行っている。形状と屈折率が既知のナノインプリントモールドに対して再構成アルゴリズムを適用し、最も精度が高い測定結果に対するRMS誤差は、フーリエフィルタリング法は26.7[nm]、空間的位相シフト法は28.4[nm]、時間的位相シフト法は28.0[nm]となり、各手法間に差は殆ど見られないこと、また、複数回測定した際の平均的なRMS誤差は、フーリエフィルタリング法と空間的位相シフト法が、それぞれ約32.5[nm]、35.0[nm]と差がないのに対し、位相シフト法では、誤差の平均値が40-50[nm]となり、安定性に問題があることを明らかにした。分解能に関しては、各手法の振幅分布と位相分布は共に、回折限界以下の0.4[nm]の線幅のモールド構造を判別することはできなかったが、0.5、0.6[nm]の線幅のモールドの構造は判別することができ、結果として、インライン型とオフアキス型の各手法の分解能に差がないことを明らかにした。計算時間に関しては、フーリエフィルタリングは高速フーリエ変換により計算することができ、回折積分ではフーリエフィルタリングで計算したスペクト

ル分布を逆変換せずに直接利用できるため、計算時間が他手法に比べて短縮できることを示した。結果として、本実験系では、計算時間、安定性、測定精度、分解能の観点からフーリエフィルタリング法が他手法と比べて、総合的に優れた特性を持つことを明らかにした。また、カメラ上の物体光を回折伝搬し像面上の複素振幅を再生する過程において、回折積分の数値計算方法の選択基準を調べ、背景値パッチングを用いる場合には回折積分の伝達関数を解析的に与えた方が良いこと、構築した実験系では、再構成時の回折伝搬において、レイリーフレネル回折積分とフレネル回折積分の間の誤差は小さいことを示した。伝搬距離計算に用いるオートフォーカシングにおいては、縮小処理の導入を提案し、焦点評価関数として分散関数を用いることにより、デジタルホログラムに縮小処理を適用しても単峰性が維持でき、縮小処理を導入することによる再構成距離の誤差も小さく、定量位相計測の精度への影響は小さいこと、オートフォーカスの計算時間を数十分の一まで短縮できることを明らかにした。最後に、塗沫標本上の赤血球とリンパ球を測定し、細胞の3次元形態に関する情報を取得できることを確認している。

第3章では、結像光学系と測定対象に起因する計測誤差を評価する結像計算モデルの構築を行っている。結像計算モデルでは、電磁波解析手法である3次元並列FDTD法により、物体と入射波の相互作用を計算し、NFFF変換により結像光学系の入射瞳上の電磁波の振幅と位相分布を計算している。計算領域が有限のため入射平面波が切り取られ、NFFF変換において計算領域境界が方形開口として作用し、像面上の入射波に歪みが生じるという問題に対して、NFFF変換の積分面をFDTD法の計算領域の外側まで拡張して計算する方法を導入し、像面上の入射の歪みを解消している。入射瞳上の電場分布から変換された射出瞳上の電場分布のカメラ面までへの伝搬には、カメラと像面間のデフォーカス量を考慮できるレイリーゾンマーフェルト回折積分を導入し、その際、射出瞳球面上の電場と接平面上の電場のエネルギーが保存するように重み係数を与えて投影を行う。その後、伝搬後の電場分布からデジタルホログラムのシミュレーションを実施している。厚さ測定が可能な例とそうでない例として、ナノインプリントモールドとマイクロ粒子に対して定量位相計測を行い、その結果を結像計算モデルにより定量的に再現できることを示した。構築した結像計算モデルをマイクロレンズ状の物体に対して適用し、物体の特性と結像光学系の特性が測定精度に与える影響を検討し、物体の厚さが急激に変化する部位では、結像光学系の開口による影響で高周波数成分がカットされ、誤差が生じること、物体の屈折率が大きい場合には、高さ分布と位相分布の間の線形関係が成立せずに、物体形状を測定できなくなることが示している。構築した計算モデルは、構築した結像実験系の評価や実験により測定された結果の解釈に利用できることが判明した。

公聴会での主な質問は、オートフォーカシングによりどこに焦点位置が定まるのか、FDTD法に計算結果の検証はどのように行っているのか、ナノプリントモールドに対する結果に現れた変動原因は何かなどであった。いずれの質問に対しても発表者からの確かな回答がなされた。

以上より、本論文は、独創性、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士(医工学)の論文に十分値するものと判断した。