

散乱組織の超高速レンズなし撮像を可能にするホロスコーピー

ゲレオン・ヒュットマン、ゲサ・フランケ、クリスチャン・リュース、ピーター・コッホ、ディリユク・ヒルマン

ホロスコーピーとして知られるデジタルホログラフィーと光コヒーレンストモグラフィー(OCT)の組み合わせは、可動部品を使用しないので、3D画像の同時取得を極端に高いデータスループットと高い撮像速度で実行できる。

光学撮像の進歩は生物医学に大きな変革をもたらし、光学顕微鏡が発明され、バイオチップやフローサイトメトリが生まれ、非線形顕微鏡法の最新版も登場した。しかし、そこには理解すべきことがたくさんある。生物学は高分子、細胞小器官、細胞の3者が同時に相互作用する3次元サイエンスが基本になっている。これらのミリ秒レベルの時定数の巨大な並列で動的な生物学的相互作用は、生命の途方もない複雑さの基盤であり、その適切な研究には高速の非侵襲性撮像モダリティが必要になる。残念なことに、大きな生体組織を直列走査する現在の顕微鏡撮像技術は動作があまりにも遅い。

共焦点イメージングと非線形顕微鏡法は、生体組織の損傷と光物理/光化学飽和効果の閾値が励起フラックスとボクセル(2次元のピクセルに対応する3次元の最小単位)当たりの最大光子発生率を制約する。共焦点の直列走査は撮像高速化のボトルネックになる。

多波長の光干渉を利用してさまざまな散乱構造の深さを決定するフーリエ領域光コヒーレンストモグラフィー(FD-OCT)は、今日の最高速撮像モダリティの1つになっている。すべての深さからの光子の強い散乱信号を同時検出することで、その撮像速度は毎秒ギガボクセルに達する。しかし、この同時検出は共焦点イメージングを使う

ため、光ビームウェストの内部にしか適用できない(図1)。0.05の開口数(NA)の場合、透明媒質に埋め込まれた酸化鉄ナノ粒子のOCT画像は焦点面近傍の狭い領域の粒子として観察される。すべての体積を撮像するには異なる深さの連続走査が必要になる。分解能を向上し、捕集光子数を増加しようとしてNAを大きくすると、焦点深度がさらに狭くなる。

究極の撮像速度を得るには撮像プロセスの二重並列化が必要になる。この方法は拡張ビームを用いて組織を照射して焦点の高輝度を防ぎ、すべての戻り光子を高NAで捕集し、それらが発生する深さとは関係なしに発生源を同

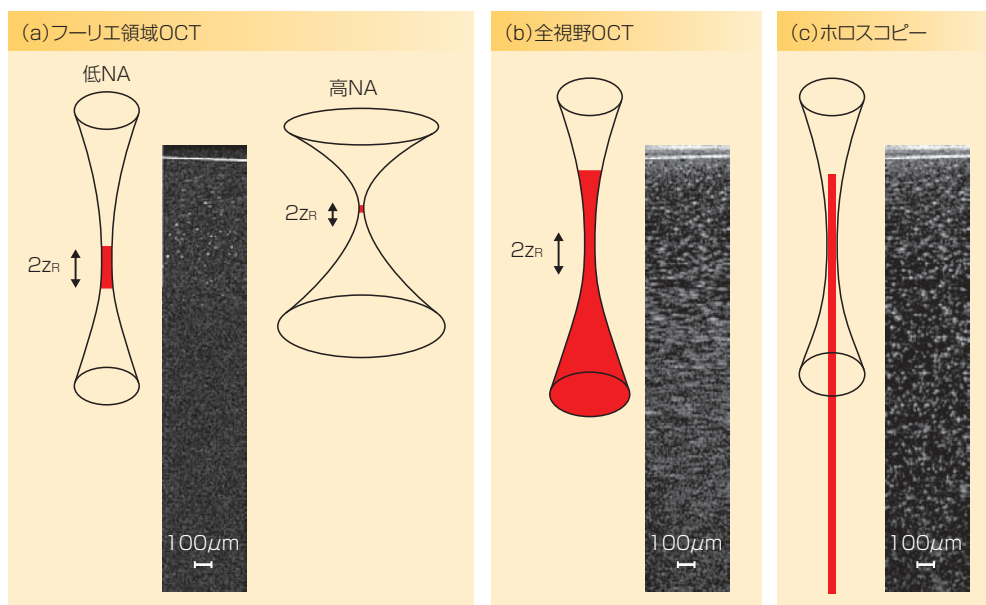


図1 散乱ナノ粒子をもつ試験物体を使用して、光コヒーレンストモグラフィー(OCT)、光コヒーレンス顕微鏡法(OCM)、掃引光源全視野OCTおよびホロスコーピーの被写界深度(DOF)と横方向分解能を比較した。DOFと横方向分解能をガウスビームウェストに関係付けて(赤色)図解している。

表1 ホロスコピーはいくつかの手法による最適画像を組み合わせることで3D光学撮像を改善する。

画像形態	同時照明	照射した体積から散乱した光子の同時検出	走査不要	開口数に無関係の被写界深度
光コヒーレンストモグラフィー (OCT)		×		
光コヒーレンス顕微鏡法 (OCM)		×		
掃引光源全視野光コヒーレンストモグラフィー (SS-FF-OCT)	×	×	×	
ホロスコピー	×	×	×	×

時に位置決めする。可変波長光源とカメラを使用して共焦点なしのOCT撮像を行うフーリエ領域全視野OCTは、すべての深さの照明と検出を同時に行うが、焦点面の外側ではぼけた画像しか得られない⁽¹⁾。

しかし、フーリエ領域全視野掃引光源OCTは、特定面のイメージングばかりでなく、全体積を回折限界の分解能で画像化できるデジタルホログラフィー (DH) と組み合わせることで、すべての深さの高分解能画像を取得できる (表1)。両者を組み合わせたホロスコピーはすべての散乱光子の検出が可能であり、その発生源を高い横方向と軸方向の分解能で追跡できる。ホロスコピーを用いたときの撮像速度の増加は、レイリー散乱長の2倍 ($2z_R$) に対する所望の被写界深度 (DOF) の比から推定できる。DOFは通常の方法で鮮明な画像が得られる深さ領域を意味している。NAが0.8でDOFが $100\mu\text{m}$ の場合、ホロスコピーは異なる面の200枚の画像を1つの大きな画像に置換できる。

ホロスコピーの登場

ホロスコピーの発想は60年以上も昔に生まれた。デニス・ガポールは1949年に、分離された参照波による干渉を用いて散乱光場の全体情報を記録し回復するホログラフィーを提案した⁽²⁾。エミール・ウルフは1960年代の終わりに、

それほど強くない散乱体積からの光には内部散乱構造の全情報が含まれることを明らかにした⁽³⁾、⁽⁴⁾。1970年代の終わりになると、フェルチャーらはホロスコピーの発想の実験による実証を報告した⁽⁵⁾。しかし、デジタル記録媒質と計算能力が不足していたので、この研究は実用的な価値が得られなかった。

ウルフとフェルチャーはいずれも、2D記録面内の電磁場は散乱中心の3D配置だけからは決定できないため、つまり自由度の1つが失われるため、単一ホログラムだけでは全体積を十分に画像化できないと報告した。しかし、単一デジタルホログラムを用いて散乱体積を再構成すると、すべての単一面は鮮

明になり、他の面のぼけた画像は不明瞭になって、鮮明な画像の効果的な多層化が可能になる。異なる方向からの照明や異なる波長による多重ホログラムの記録からは失われた情報が得られる⁽⁶⁾。

この先駆的な研究から、異なる波長によるホログラフィーを用いると、OCTと同様に、散乱性組織の画像化は可能になることが明らかにされた。しかしながら、最近まで、この技術は生体組織のホログラフィック撮像には利用されなかった。ところが、最近の高速コンピュータと高速で高分解能のカメラの登場によって、デジタル化したホログラフィーの利用が顕微イメージングを中心に増大している⁽⁷⁾。

ホログラムの光学的再構成から数値計算にもとづくデジタルホログラフィーへの置換が進行している。カメラで記録された干渉パターンは、記録した光場を試料体積に逆伝搬させる数学的手法を用いて、画像の再構成 (物体情報の回復) が行われる。DHは3次元の表面と薄い微視的試料をうまく画像化できるが、ホログラムを多波長で記録して深さ情報を取得すると、散乱性組

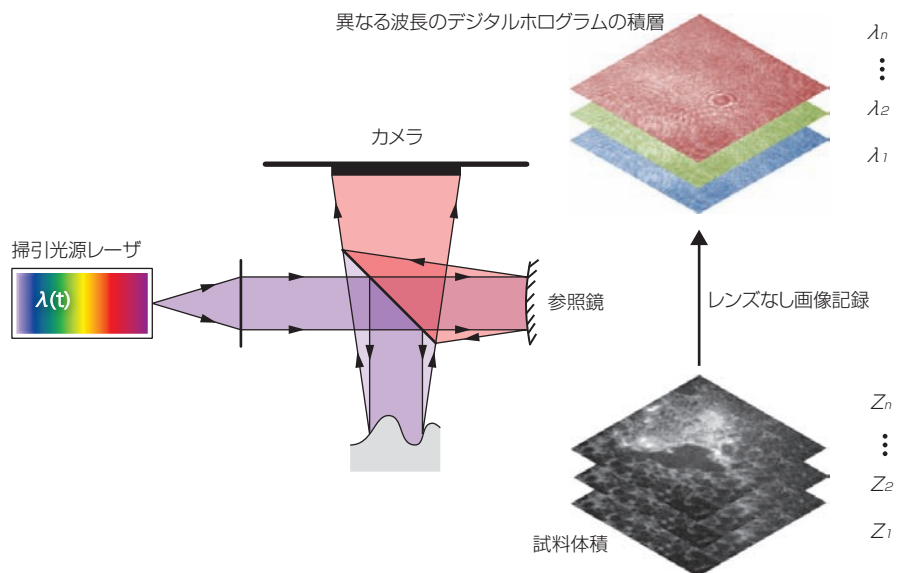


図2 ホロスコピーはデジタルホログラフィーを使用して散乱光場を画像化する。

織だけが画像化される。異なる波長によるデジタルホログラフィーはさまざまな研究グループにより実験的に実証されたが、得られた画質は不十分であった^{(8)~(11)}。

数十レイリー長をもつ散乱体積を画像化する実用的ホロスコープは掃引光源OCTとDHの組み合わせの良否が鍵になる。

超高速レンズなし撮像

独リューベック大学 (University of Lübeck) が初めて成功した一連の実験は、マイケルソン干渉計、半導体レーザー可変波長光源および1536×1536画素イメジャのCMOSカメラを使用して行われた(図2)。散乱ナノ粒子をもつ試料から全体で1024枚の画像が異なる波長で取得された。物体情報を再構成するために、それぞれのホログラムの光場が体積の特定面の角スペクトル法により計算された。次に、波数に関係するフーリエ変換を用いて、それぞれの画素の深さ情報が取得された。

全視野OCTと同様に横方向構造は再構成面の近くだけに高い分解能で現れる。全視野OCTは異なる面を再結像して全体深さの体積を画像化しなければならない。しかし、ホロスコープはこれらの付加データを必要としない。われわれは再構成面の位置だけを変更し、フーリエ変換を反復して、体積の全体を画像化した。これはまったくエレガントでなく、全体を何回にもわたり異なる仮想焦点位置で再構成する方法だが、最近、われわれはフーリエ変換の前のデータポイント再サンプリングを利用する高効率の一段再構成法を実証した。この方法は静止物体の画像化をOCT走査に匹敵する性能で行うことができた(図3)。

この一段法を用いた330メガボクセ

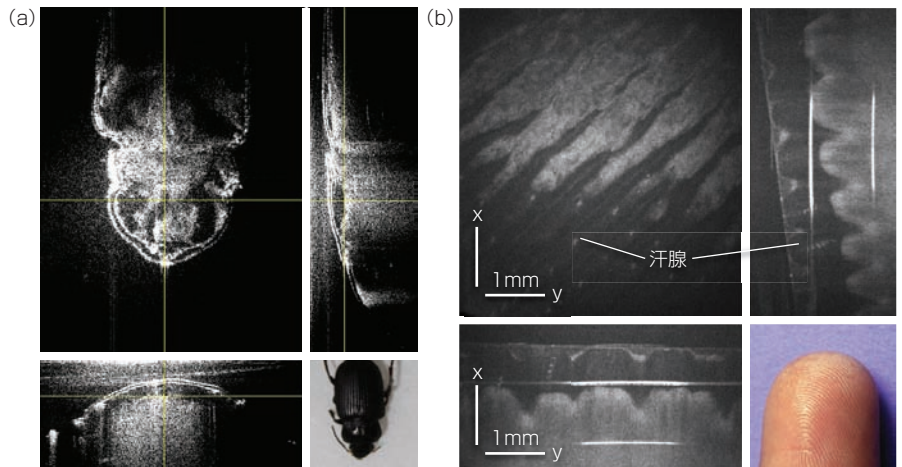


図3 昆虫の生体外(a)と指先の生体内(b)のホロスコープ画像およびそれぞれのデカルト座標の3軸に平行な画像体積の断面を示している。

ルの全体積の取得時間はわずか1.2秒であった。この取得時間内の組織の運動は軸方向構造の画像ぼけをもたらすので、この方法は生体内撮像には遅すぎる。しかし、米フォトロン社(Photron)の7000フレーム/秒の超高速Fastcam SA5 CMOSカメラを用いた皮膚の撮像では、その画像取得速度の増強によって、毎秒3.5ギガボクセルの生体内画像化が可能になった。

われわれはOCTとデジタルホログラフィーを組み合わせるホロスコープを使用して、散乱組織の生体外と生体内

の画像化を行い、30レイリー長以上にわたる深さ画像をOCTと同様の画質で取得した。ホロスコープは体積内のすべてを同時に照明し、大きな受光角内のすべての散乱光子を検出するため、FD-OCTのような被写界深度による制約を受けない。われわれは次の段階において、光学系を付加してNAをさらに拡大し、ホロスコープに必要な帯域幅と位相の瞬間的安定性をもつスペクトル幅>200nmのTi:サファイアレーザーを使用して、横方向と軸方向のマイクロメートル分解能イメージングを実現する⁽¹²⁾。

参考文献

- (1) T. Bonin et al., Opt.Lett., 35, 20, 3432-3434(2010).
- (2) D. Gabor, Nature, 161, 4098, 777-778(1948).
- (3) E. Wolf, Opt. Comm., 1, 4, 153-156(1969).
- (4) E. Wolf, J.Opt. Soc. Am., 60, 1, 18-20(1970).
- (5) A.F. Fercher et al., Appl. Opt., 18, 14, 2427-2439(1979).
- (6) A.F. Fercher, Zeitschrift Für Medizinische Physik, 20, 4, 251-276(2010).
- (7) M.K. Kim, SPIE Reviews, 1, 018005(2010).
- (8) P. Blazkiewicz et al., Appl. Opt., 44, 36, 7722-7729(2005).
- (9) M.C., Potcoava and M.K. Kim, Measurement Sci. and Technol., 19, 7, 07410(2008).
- (10) D.V. Shabanov et al., Laser Phys. Lett., 6, 10, 753-758(2009).
- (11) V.S. Dmitry et al., Digital Holography and Three-Dimensional Imaging (DH) conference, paper DMC7, Miami, FL (April 2010).
- (12) G.L. Franke et al., Photonics West BiOS 2012, paper 8213-75, San Francisco, CA (Jan. 25, 2012).

著者紹介

ゲレオン・ヒュットマン(Gereon Hüttman)は独リューベック大学(University of Lübeck)生物医学光学研究所(e-mail: huettmann@bmo.uni-luebeck.de; www.bmo.uni-luebeck.de)の研究主幹、ゲサ・フランケ(Gesa Franke)は同研究所のPhD学生、クリスチャン・リュース(Christian Lührs)とピーター・コッホ(Peter Koch)は独ソーラボ社(Thorlabs GmbH)の製品開発技師、ディルク・ヒルマン(Dierck Hillmann)は同社のソフトウェア技師。