

結像型二次元フーリエ分光法による分光断層像計測技術

小林 宏明*・河尻 武士**・矢野川果奈**・西山 成***・田中 直孝****・
高橋 悟**・石丸伊知郎**

*香川県産業技術センターシステム技術部門 〒761-8031 高松市郷東町 587-1

**香川大学工学部 〒761-0396 高松市林町 2217-20

***香川大学医学部 〒761-0793 香川県木田郡三木町大字池戸 1750-1

****香川大学農学部 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

Spectroscopic Tomography by Imaging-Type Two-Dimensional Fourier Spectroscopy

Hiroaki KOBAYASHI *, Takeshi KAWAJIRI **, Kana YANOGAWA **, Akira NISHIYAMA ***,
Naotaka TANAKA ****, Satoru TAKAHASHI ** and Ichirou ISHIMARU **

*System Application Technology Branch, Kagawa Prefectural Industrial Technology Center, 587-1
Goto, Takamatsu 761-8031

**Faculty of Engineering, Kagawa University, 2217-20 Hayashi, Takamatsu 761-0396

***Faculty of Medicine, Kagawa University, 1750-1 Ikenobe, Miki, Kita-gun, Kagawa 761-0793

****Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki, Kita-gun, Kagawa 761-0795

We proposed a new method for 3-dimensional component analysis by imaging type Fourier spectroscopy. This optical system imparts spatial phase difference to a wavefront of diffracted lights from objects at the Fourier transform plane. In the case of diffracted lights from focal plane, these are concentrated and interfered on imaging plane. It is possible to observe interferograms in accordance with the imparted phase difference at each bright point. On the other hand, lights from outside of focal plane never to be interfered. Thus, this method can limit the observable range of interference to the neighborhood of focal plane. This paper describes the principle of this method from a standpoint at Fourier transform optics. The depth resolution is estimated at $2.34\ \mu\text{m}$ by verification experiment using a submicron fragment of fluorescence stained cells. In addition, we have successfully obtained spectroscopic cross-sectional images of fluorescence stained cells at $2\ \mu\text{m}$ intervals.

Key words: spectroscopic tomography, interferometer, Fourier transform spectrometry, biomedical measurement

1. はじめに

近年の医療分野においては、非侵襲で生体内部の三次元構造の測定が可能な、光断層像撮像技術 (optical coherence tomography: OCT) による新しい診断技術が注目されている¹⁻³⁾。特に、最新の swept-source OCT 等の開発により、高速かつ高分解能な生体内観察が可能となった。これらの技術革新により、汗腺の活動のような高速な現象もリアルタイムに描画が可能となったほか、眼科における網膜診断の際には不可欠な技術にもなっている⁴⁻⁶⁾。

一方で、分光 OCT とよばれる三次元分光分析手法⁷⁾が Morgner らより提案されており、新しい非破壊成分分析手法として注目されている。生体内構造を高解像度で撮像可

能な OCT に分光計測機能がそなわれれば、生体内の構造変化だけでなく、成分分布の変化をとらえることができるようになり、医学分野においては、病気のメカニズム解明や早期診断などへの応用が期待されている。しかし、現在主流となっている、spectral-domain OCT や swept-source OCT などの手法で測定されるスペクトルは、薄膜干渉のように構造間干渉情報を有するため、測定対象そのものの分光分布を正しく測定することができない。そこで、分光 OCT では時間領域干渉波形から短時間フーリエ変換等を用いて分光情報を取得するが、time-domain OCT の場合、吸収や分散が生じて反射光の可干渉距離が長くなると深度方向分解能が劣化するため、強い吸収、分散が起こる波長

帯では、空間情報と分光情報の相関がとれなくなる問題がある⁸⁾。また、短時間フーリエ変換等では、深度方向分解能を向上させるためには時間窓を狭くする必要があるが、時間窓を狭めると波長分解能が劣化する。このため、生体のような微細構造の観測の場合、高い波長分解能による測定が不可能となる。さらに、OCTの場合、参照鏡と物体からの反射光の光路長差により生じる干渉を観測するため、染色法や蛍光観測などとの併用には向かない。一方で、われわれは、分光 OCT と異なる結像型二次元フーリエ分光法を用いた分光トモグラフィ技術を提案している⁹⁻¹¹⁾。

結像型二次元フーリエ分光法は、光学的フーリエ変換面上に位相可変フィルターと名づけた局所可動ミラーを設置することで、試料観察面内から生じる回折光、散乱光などの物体光に対し、空間的位相差を与える手法である。これにより、結像状態が変化し、結像強度分布は与えられた空間的位相差に応じて変化することになる。ここで、空間的位相差を連続的に変化させることにより、通常の干渉計と同様のインターフェログラムを取得することができる。このときに生じる干渉現象は、合焦面上のすべての輝点において観測されることから、各点で観測されたインターフェログラムをフーリエ変換することによって二次元分光情報の測定ができる。

従来、提案手法のような結像型の二次元フーリエ分光手法は、おもに天体分光等の分野において研究開発が行われてきた¹²⁻¹⁶⁾。これらの従来手法は振幅分割型の干渉計であり、試料から反射、あるいは透過してきた光をハーフミラー等で分割し、任意の位相差を与えたうえで再び合流させることで干渉を観察する。そのため、すべての光線が同様に分割され干渉を起こすので、原理的には、合焦面以外からくる光の干渉も観測されてしまう。一方で、本手法は波面分割型の干渉計であり、干渉が起こるのは各光線が一点に集まる条件となる場合のみとなることから、合焦面以外からくる光の干渉は観測されない。このとき、結像に寄与しなかった合焦面以外からきた光は、インターフェログラムの直流成分として検出される。そのため、光軸方向に合焦面を操作することで、三次元の分光データを取得することができる。従来手法でも、焦点深度の浅い光学系で合焦面を走査すれば、ある程度の三次元分光データの計測が可能と考えられるが、本手法は原理的に干渉を観察可能な範囲を合焦面近傍に限定しているため、深度方向分解能が向上する。また、深度方向分解能は、基本的に焦点深度に依存し、波長分解能はシフト量に依存するため、互いの分解能はトレードオフの関係とならない。そのため、空間と

波長双方の高分解能の両立が可能となる利点がある。さらに、分光 OCT と違って自発光体も測定可能であり、他の分光手法と併用できることも長所となる。なお、自発光体の立体分布の計測が可能な三次元分光イメージング技術として、二光波折り畳み干渉計を利用した手法が提案されている¹⁷⁾。本光学系は非結像型であり、観測面では同心円状の干渉縞の位相シフト干渉が観測され、解析することで立体的な光源分布が測定できる。この場合、再生画像の空間方向や深さ方向の分解能は光学系には依存しないが、観測に用いる撮像素子の画素サイズと分解能の影響を受けると考えられる。一方、提案手法では、これらの分解能は光学系の空間分解能および焦点深度に依存するため、設計がある程度自由になることから、高空間解像度での立体分布計測には有利であるといえる。

本稿では、光学的フーリエ変換をもとに、新たに結像型二次元フーリエ分光モデルを構築し、空間周波数成分に対する空間的位相シフト干渉として、本手法の原理を説明する。また、本光学系の深度方向分解能を実験的に検証するため、光学的に輝点とみなすことができる大きさに粉碎した蛍光染色細胞の断片を用いて、検証実験を行った。さらに、分光断層像計測実験として、蛍光染色細胞の断面形状の計測結果について報告する。

2. 結像型二次元フーリエ分光法

Fig. 1 に示すレンズを 2 枚用いた単純な光学系を用いて、本手法の原理を、フーリエ変換光学の観点から説明する。はじめに、簡単のため単一波長の場合を考える。なお、ここでのレンズの大きさは、無視できることとする。

合焦面上の物体の振幅分布を $f(x_i, y_i)$ としたとき、物体が対物レンズ L1 の焦点距離上にあるとき、フーリエ変換面上では

$$F(v_x, v_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} f(x_i, y_i) \exp[i2\pi(v_x x_i + v_y y_i)] dx_i dy_i \quad (1)$$

が得られる。式中の v_x, v_y は空間周波数を表し、対物レンズ L1 の焦点距離 f_1 と波長 λ により、次の式 (2)、(3) で表すことができる。

$$v_x = x_i / \lambda f_1 \quad (2)$$

$$v_y = y_i / \lambda f_1 \quad (3)$$

ここで、 x_i, y_i はフーリエ変換面上の空間座標を示す。これらの式から、フーリエ変換面上の空間周波数分布 $F(v_x, v_y)$ は複素振幅分布 $F(x_i, y_i)$ として表すことができる。この $F(x_i, y_i)$ に対して、式 (4) のように複素振幅分布 $H(x_i, y_i)$ を与えることを考える。

$$H(x_i, y_i) = \exp[i\phi(x_i, y_i)] \quad (4)$$

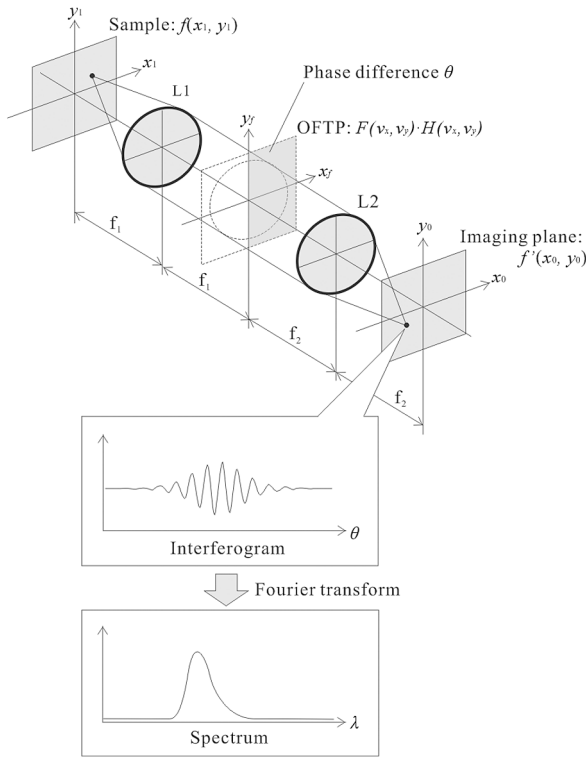


Fig. 1 Principle of the imaging-type two-dimensional Fourier spectroscopy. L1: objective lens, L2: imaging lens, OFTP: optical Fourier transformation plane.

この分布は反射および吸収を無視することができ、与える位相差が可変である、理想的な位相板とする。例えば、式(4)中の位相分布 $\phi(x_f, y_f)$ を

$$\phi(x_f, y_f) = \begin{cases} 0 & (x_f < 0) \\ \theta & (y_f \geq 0) \end{cases} \quad (5)$$

のように定義すれば、面内を二分割して位相差 θ が与えられることとなる。回折光分布に位相差分布を与えたものをレンズで結像するので、最終的な結像面での複素振幅分布 $f'(x_0, y_0)$ は、 $F(x_f, y_f) \cdot H(x_f, y_f)$ の逆フーリエ変換として、次式のように表すことができる。

$$\begin{aligned} f'(x_0, y_0) &= \iint_{-\infty}^{\infty} F(x_f, y_f) H(x_f, y_f) \\ &\quad \exp[-i2\pi(x_f x_0 + y_f y_0)] dx_f dy_f \\ &= \iint_{-\infty}^{\infty} F(x_f, y_f) \exp[-i\{2\pi(x_f x_0 + y_f y_0) \\ &\quad - \phi(x_f, y_f)\}] dx_f dy_f \end{aligned} \quad (6)$$

ここで、観察面上に1つの輝点があった場合を考える。位相差 θ を連続的に変化させると、 $f'(x_0, y_0)$ 上の輝点に周期的な強度変化が生じる。例えば、Fig. 2 (a) のように θ が半波長相当の位相差になると、中心部の強度が低下し、周辺に強度分布が生じる。さらに、輝点の強度プロファイルについて、Fig. 2 (a) の灰色部分のように、初期分布の半値幅の範囲を検出範囲と定義し、この範囲内の積分値 S の変化を観測すると、輝点強度 S_0 から S_3 は Fig. 2 (b) に

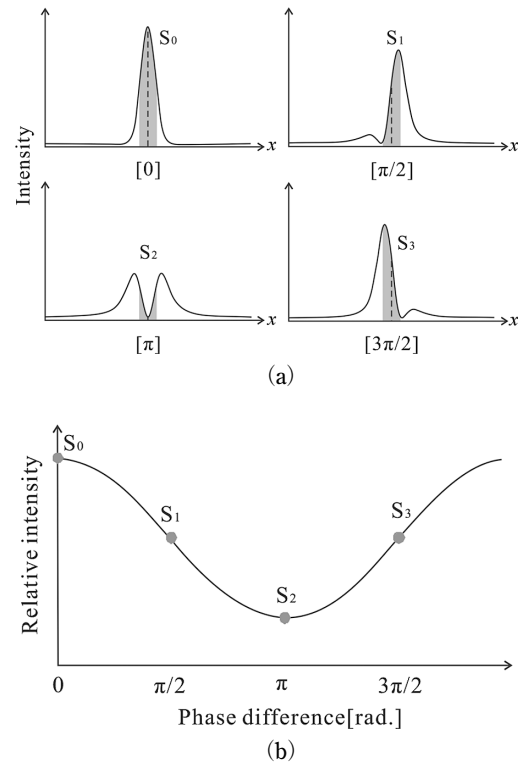


Fig. 2 Simulation results of changing intensity distribution at a bright point by phase-shifting. (a) Intensity distributions on imaging plane every 90 degrees phase-shifting. (b) Change of relative intensity of a bright point due to phase shifting.

示すように余弦波状に変化する。すなわち、単色光のインターフェログラムが観察できる。以上のように、本手法では、自発光体から放出された光に対しても、物体光間の位相シフト干渉を与えることでインターフェログラムを観測することができる。

続いて、多波長光の場合を考える。多波長光の場合は、波長 λ に伴う、空間周波数成分 v_x および v_y と位相項 $\phi(x_f, y_f)$ の変化についても考慮する必要がある。まず、本手法における位相差は、光路差 δ として与えられる。そこで、フーリエ変換面で与えられる波長ごとの位相差 θ について考慮すると、以下のように表すことができる。

$$\theta(\lambda) = 2\pi\delta/\lambda \quad (7)$$

さらに、式(6)を用いて、すべての波長について考えると、多波長における結像複素振幅分布は式(2), (3)より、

$$\begin{aligned} f'(x_0, y_0) &= \iiint_{-\infty}^{\infty} F'(x_f, y_f, \lambda) \exp[-i\{2\pi(x_f x_0 + y_f y_0) \\ &\quad + \phi(x_f, y_f)\}] dx_f dy_f d\lambda \end{aligned} \quad (8)$$

となる。ここで、 $F'(x_f, y_f, \lambda)$ は、各波長における回折光分布である。

光路差 δ の変化に伴って位相差 $\theta(\lambda)$ が連続的に変化する場合、輝点の強度変化は、初期位相が等しく周期の異なる

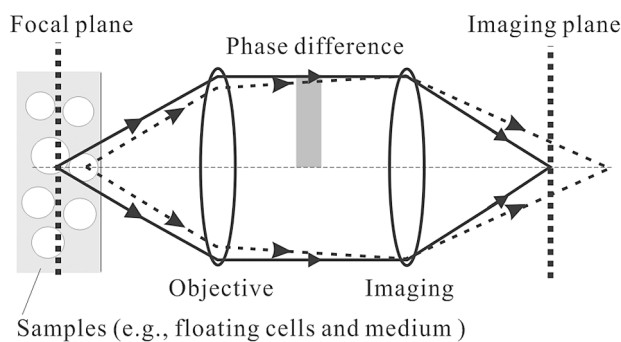


Fig. 3 Principle of spectroscopic tomography.

る波の足し合わせととらえることができる。このとき、観察されるインターフェログラムは、白色光のインターフェログラムと同意であり、通常のフーリエ分光法と同じ数学的処理によりスペクトル解析ができる。

3. 結像型二次元フーリエ分光法による分光断層像計測手法

前章で述べたように、結像型二次元フーリエ分光法は、物体光間の位相シフト干渉法となっている。本手法では、結像の強度分布そのものに位相シフト干渉を起こさせるため、Fig. 3のような幾何光学的モデルで考えると、合焦面外からの光は各光線が交わらないために干渉を起こさない。したがって、観測されるインターフェログラムの周波数成分は、合焦面内からの光のスペクトルのみとなり、それ以外の光はすべて直流成分に積算されることになる。ただし、そのためには、観測される物体からの光は空間的にインコヒーレントであることが前提条件となる。これらの理由から、本手法により、計測対象を光軸方向に走査しながら各観察面の分光分布計測を行うことで、分光断層像計測が可能となっている。

ここで、合焦面付近の輝点からの光について考えると、輝点は結像せずにぼやけた状態で観測される。本手法では、結像強度分布の光学的フーリエ変換像に位相差分布を与えているととらえることができ、このぼやけた輝点像に対しても、位相シフトによる干渉が起こってしまうことになる。ただし、本手法により観測されるインターフェログラムの強度振幅は、測定対象の結像強度とコントラストにより決まることから、対象が合焦面から離れるにつれ干渉強度は指数関数的に減衰すると考えられる。この深度方向の分解能については、第5章の検証実験結果で後述する。

また、合焦面外からきた干渉に寄与しない光線はすべて、スペクトルにおける直流成分となるが、直流成分が交流成分、すなわち測定したい波長帯の干渉強度変化よりも

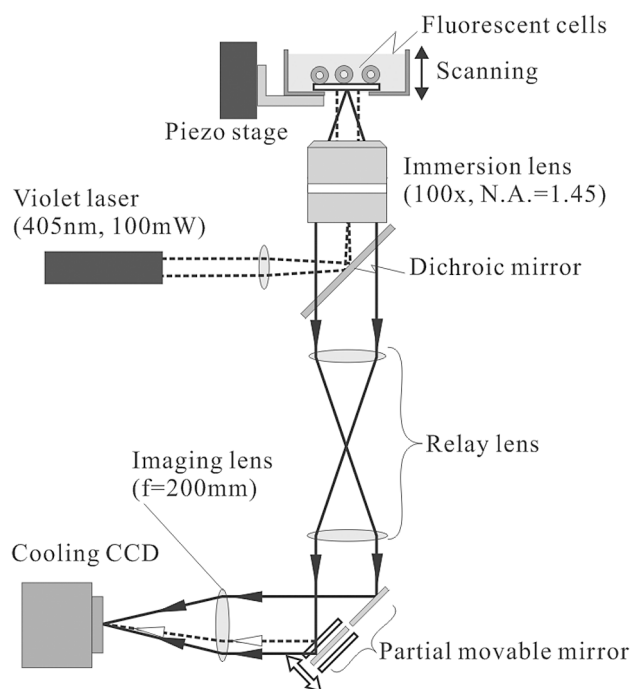


Fig. 4 Experimental configuration for the spectroscopic tomography.

強い場合、検出器側でとらえられる強度振幅は相対的に減少するため、強い背景光があるときは測定感度が低下すると考えられる。さらに、観測面の手前側に物体がある場合、本手法では、フーリエ変換面で各光線に位相差分布を与え、これらの光線が結像面で交差することで干渉しているととらえることができる。そのため、高い吸収率をもつ物体があるときは当然として、像が完全にぼやけてしまうような強い散乱や屈折の影響による波面歪みが起こった場合も、各光線の集光度が落ちるため測定感度が減少するなどの悪影響を受けてしまう。本稿では、蛍光染色細胞を用いた *in-vitro* 環境での実験のみに言及するため、具体的な屈折や散乱の影響については考察していない。これらの影響については、今後、マウスなどを用いる生体計測実験の中で検証していく予定である。

4. 実験光学系

Fig. 4は、分光断層像測定用の実験光学系の概略図である。本光学系では、主として、蛍光染色された細胞の観察を行うことを想定している。これは、蛍光染色細胞が自発光体かつ三次元構造物体であることから、本手法の原理確認に最適と判断したためである。

本光学系の蛍光励起用のレーザーには、紫外レーザー（コヒーレント製、型式：CUBE-405-100C、出力：100 mW）を利用した。励起レーザーは、ダイクロイックミラーに

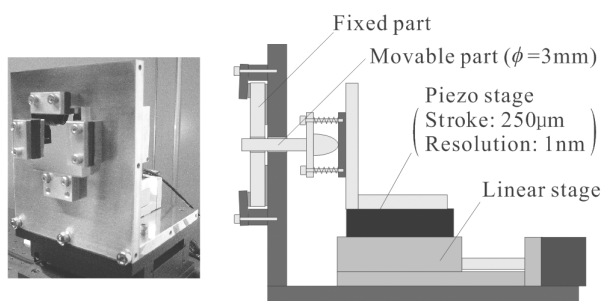


Fig. 5 Schematic and photo of partial movable mirror device.

よって観察光学系側とは完全に分割されており、撮像素子までは到達しない。蛍光は微弱光であるため、対物レンズには100倍油浸レンズ（オリンパス製，型式：PlanApo100×OTIRFM，NA: 1.45）を，さらに撮像素子として冷却CCDカメラ（アンドール製，型式：DV887DCS-BV，512×512 pixs，QE>95% (@560 nm)，デジタル変換：11 bit）を用いている。この対物レンズの後方焦点面はレンズの鏡筒内にあるため，等倍のリレーレンズにより，フーリエ変換面を引き出している。このフーリエ変換面上に，本光学系における位相シフターとなる部分可動ミラーを，反射角が45度となるように配置し，結像レンズにより冷却CCDカメラへと結像させる。このとき，部分可動ミラーは，フーリエ変換面での光束を上下方向（光学系の配置面に対して垂直方向）に，理想的には二等分するように配置するのが望ましい。このように分割することで，ミラーが移動した際に，ミラーによってできる影の影響を抑えることができる。部分可動ミラーを直角反射型に配置することの利点は，ビームスプリッターなどの光学素子による光量減少の抑制が可能なことである。ここで，本光学系における位相シフターの移動量 δ と位相シフト量 θ の関係は，式（7）より $\theta = 2\sqrt{2}\pi\delta/\lambda$ となる。また，サンプルホルダーは，ピエゾステージ（PI製，型式：P-622.1CL，分解能：1 nm，ストローク：250 μm ）により精密な位置決めが可能であり，分光断層像取得の際に観察面を高精度に走査することができる。

本光学系に用いた部分可動ミラーをFig. 5に示す。本装置のミラー部は，ミラー中央部に円形の穴を開け，そこに円柱状に加工したガラス製のミラーを挿入している。円柱と穴の直径は，3 mmを目標寸法に，数十 μm の嵌合公差となるように加工されている。また，可動ミラーおよび固定ミラーのエッジ部からの回折光が結像に影響しないよう，エッジ部は，20 μm の面取りとなるように精密に作製されている。これにより，エッジ部から生じた回折光は結像面には入射しない。この円柱ミラーが駆動部となって，

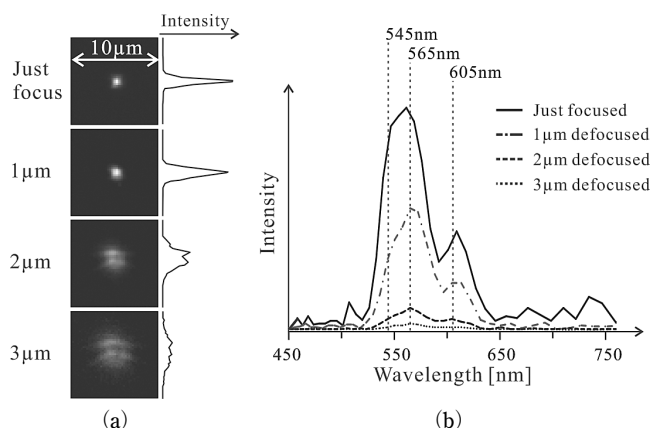


Fig. 6 Verification of depth resolution.

ホルダーを介してピエゾステージ（サンプル駆動用ステージと同製品）へとつながっている。ピエゾステージの下部にある直動ステージは，初期位置調整の粗動のみに用いる。本光学系において，位相シフト干渉を正しく観測するためには，部分可動ミラーの可動部と固定部の平行度が位相シフト中に保証される必要がある。しかし，動作中のピッチングやヨーイングは制御が難しいため，機械的な嵌め合いにより，これらを抑制することを目的に本構成を採用した。なお，部分可動ミラーの設置位置となるフーリエ変換面の光束径は3 mmとして設計している。本装置の可動ミラーは円形であるため，光束を完全に等分した配置が難しいことから，実際にはフーリエ変換面のミラー位置と光束の状態を観察し，最終的には，位相シフトの干渉縞の振幅を確認しながら最も振幅強度が高くなる位置に調整している。

5. 深度分解能の検証実験

Fig. 4の光学系を用いて，深度方向分解能の検証実験を行った。本実験では，蛍光染色した細胞を細かく碎き，これを結像限界に近い大きさの輝点として，結像型二次元フーリエ分光法により観測した。さらに，合焦位置から1 μm ずつ焦点位置をずらしながら同様の観測を行い，測定されるスペクトルの強度変化を確認した。

本実験に用いる蛍光染色細胞は，蛍光ピーク波長が545, 565, 605 nmの3種類の量子ドットにより染色した。3種類の量子ドットを用いたのは，断片化により蛍光光量の減少が考えられたことから，局所的に数種類の量子ドットを付着させ蛍光光量を稼ぐねらいと，深度方向の“ずれ”による測定スペクトルへの影響を確認するためである。なお，本実験では，位相シフト量を $\pm 30 \mu\text{m}$ とし，1,024枚の画像からスペクトルを算出しており，理論波長分解能は波長

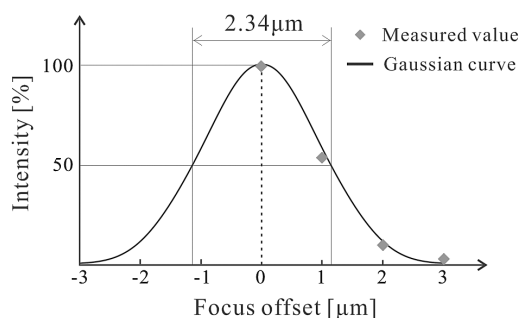


Fig. 7 Decreasing of peak intensity.

550 nm 付近で約 5 nm となる。

Fig. 6 に検証実験の結果を示す。Fig. 6 (a) は上図より、合焦位置から $1\ \mu\text{m}$ ずつ焦点位置をずらしたときに観測された、蛍光断片画像から断片周辺部の $10\times 10\ \mu\text{m}$ の範囲を切り出した画像である。本光学系の理論空間分解能は $0.46\ \mu\text{m}$ であり、これは冷却 CCD カメラの数画素程度の大きさである。実際に、Fig. 6 (a) の合焦位置での断片画像は、半値幅で約 8 画素の大きさで撮影されている。このときの、輝度中心を通る縦方向の輝度プロファイルが、Fig. 6 (a) の右側のグラフである。さらに、Fig. 6 (b) は、各焦点位置で計測された輝度中心部のスペクトルを示す。Fig. 6 (b) より、波長の近い 545 nm と 565 nm のピークは分離できていないが、これは 565 nm のピークに対し 545 nm のピーク強度が小さく、ピークが埋もれてしまったためと考えられる。しかし、デフォーカスによる測定スペクトルへの影響はなく、スペクトル分布は変わらず総光量が減少していることが確認できた。

光学系の仕様と実験条件から、本光学系の焦点深度はおよそ $0.14\ \mu\text{m}$ となるが、実験結果では、 $1\ \mu\text{m}$ デフォーカス時は合焦時と比較しても大きなピーク光量の変化は観測されなかった。これについては、輝度プロファイルの半値幅は 2 倍程度広がっていることから、デフォーカスは生じているものと考えられる。また、測定スペクトルにおいては、 $1\ \mu\text{m}$ デフォーカス時のピーク光量が合焦時のおおよそ半分となっており、明確に干渉強度が弱くなっている。これは、見た目のデフォーカス状態とは異なり、各光線が一点に集光しなくなったため、総合的な干渉強度が減少したためと考えられる。さらにデフォーカスを進めることで、干渉強度は、 $2\ \mu\text{m}$ で 10 分の 1、 $3\ \mu\text{m}$ で 40 分の 1 程度となった。これらの結果を、Fig. 7 のグラフに示す。グラフ中の実線は、計測値を正規分布で近似したものである。ここで、この正規分布の半値幅を深度分解能と定義すると、本光学系における深度分解能は $2.34\ \mu\text{m}$ となった。この結果は光学系の理論焦点深度の約 17 倍に相当するが、Fig. 6

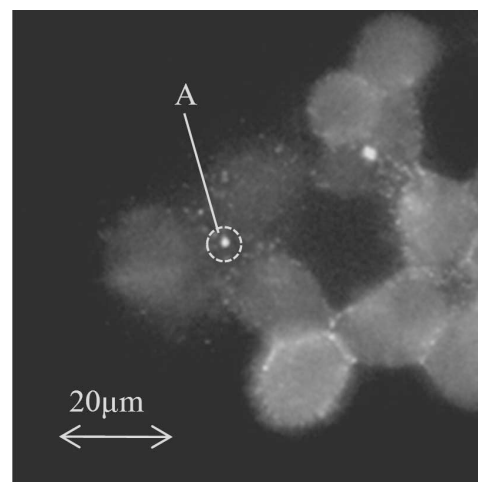


Fig. 8 Fluorescence image of human breast cancer cells.

(a) に示した実際の結像光量変化が $2\ \mu\text{m}$ デフォーカス時にピーク時の半分となっていることを考慮すれば、深度分解能は実測上の有効焦点範囲の約半分になっていることがわかる。この結果については、従来の共焦点方式との比較では劣るが、実際には、空間方向の輝点の広がりも観測できるため、数値解析的な手法で分解能を上げることは可能であると考えている。なお、本実験は対物レンズに対して手前側へのデフォーカスのみの結果となっているが、これは量子ドットの退色が問題となり、数分間しか安定して実験が行えないためである。しかし、被写界深度は合焦面の前後で非対称であるため、厳密には、後側も検証する必要があると考えている。これに関して、本稿では、前側のみの実験結果から深度方向分解能を推定したが、今後の研究開発の中で、より厳密な検証を行っていく予定である。

6. 分光断層像取得実験

表層部を量子ドットで染色した細胞を用いて、分光断層像取得実験を行った。測定サンプルとして、直径が $10\sim 20\ \mu\text{m}$ 程度の大きさの浮遊細胞であるヒト乳がん細胞を用いた。細胞は、細胞表層部に分布する糖タンパク質を、ピーク波長 565 nm の量子ドットで染色した。この方法で染色された細胞は、輪郭部のみが蛍光発光するので形状を認識しやすい。なお、ヒト乳がん細胞は浮遊細胞なので、測定中に微動する可能性がある。そのため、マウント試薬とよばれる硬化剤で処理し、測定中に細胞が安定して観察できるようにしている。

本実験では、蛍光染色細胞を深さ方向に $2\ \mu\text{m}$ ごとに走査し、各断面の分光断層像を測定した。撮影は、 2×2 のビニング機能により、 256×256 画素、30 fps で行った。1 層の測定時間は約 76.6 s で、2,300 枚の画像を取得した。

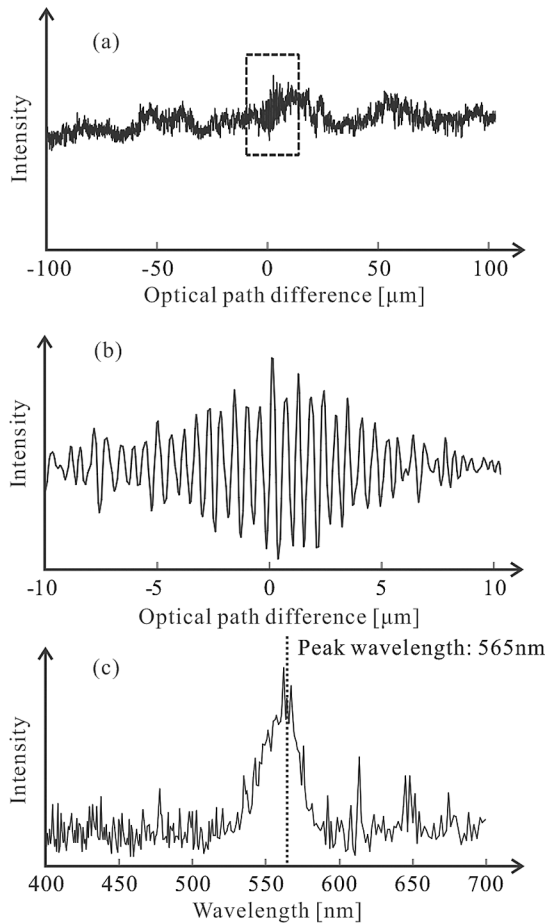


Fig. 9 Interferogram (a), (b) and spectrum (c) at a bright point.

なお、本実験では、位相シフト量は $\pm 85 \mu\text{m}$ とし、本実験条件での波長分解能は波長 550 nm 付近で約 2 nm となっている。まず、初期位置による通常の観測画像を Fig. 8 に示す。浮遊細胞は本来ばらばらに分布するが、硬化処理の際に凝集したと考えられる。次に、Fig. 8 中に示す輝点 A における、干渉波形とスペクトル解析結果を Fig. 9 に示す。Fig. 9 (a) は、測定されたインターフェログラムの波形である。量子ドットは比較的安定して観測できるものの、ノイズ成分が大きく、このままではインターフェログラムを確認することはできない。そこで、バンドパス処理を行い、可視領域の周波数帯のみを抽出し、Fig. 9 (a) 内の点線で囲った部分を拡大した結果を Fig. 9 (b) に示す。本実験に用いた量子ドットは、半値幅が 20 nm 程度であり、可干渉距離はおおよそ $12 \mu\text{m}$ となることから、Fig. 9 (b) の干渉波形は正しく観測されていると考えられる。また、Fig. 9 (a) の波形を FFT (fast Fourier transform; 高速フーリエ変換) 解析することにより得られたスペクトル分布は、Fig. 9 (c) のようになった。測定されたスペクトル分布に

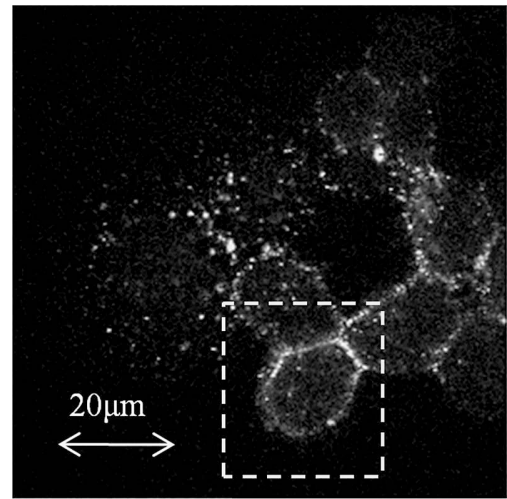


Fig. 10 Measurement result of spectral cross-sectional image at 565 nm .

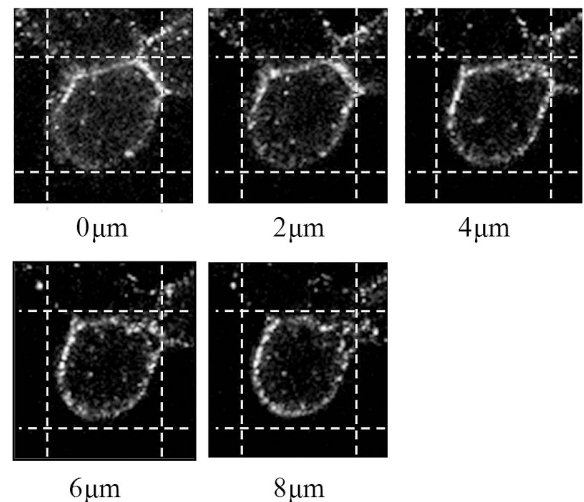


Fig. 11 Spectral cross-sectional images about a cell.

は若干のノイズが含まれるものの、量子ドットのピーク波長である 565 nm を中心として、半値幅 20 nm のスペクトル分布が測定できている。

続いて、分光断層像の計測結果として、ピーク波長を中心に、波長 $560 \text{ nm} \sim 570 \text{ nm}$ の範囲における平均強度分布像を Fig. 10 に示す。分光断層像計測の結果、Fig. 8 の焦点深度外の結像していない光は除外され、焦点付近の細胞輪郭部のみが抽出されている。さらに、走査した際の形状変化の様子について、Fig. 10 内点線部の細胞に注目した結果を Fig. 11 に示す。これらの結果から、本手法により、細胞の断面形状の変化に伴って、抽出された輪郭が小さくなっていく様子がわかる。また、最終的な実験結果として、三次元点群データを立体表示した。ここでは、各輝点のインターフェログラムの強度が高いほど、緑色が濃くな

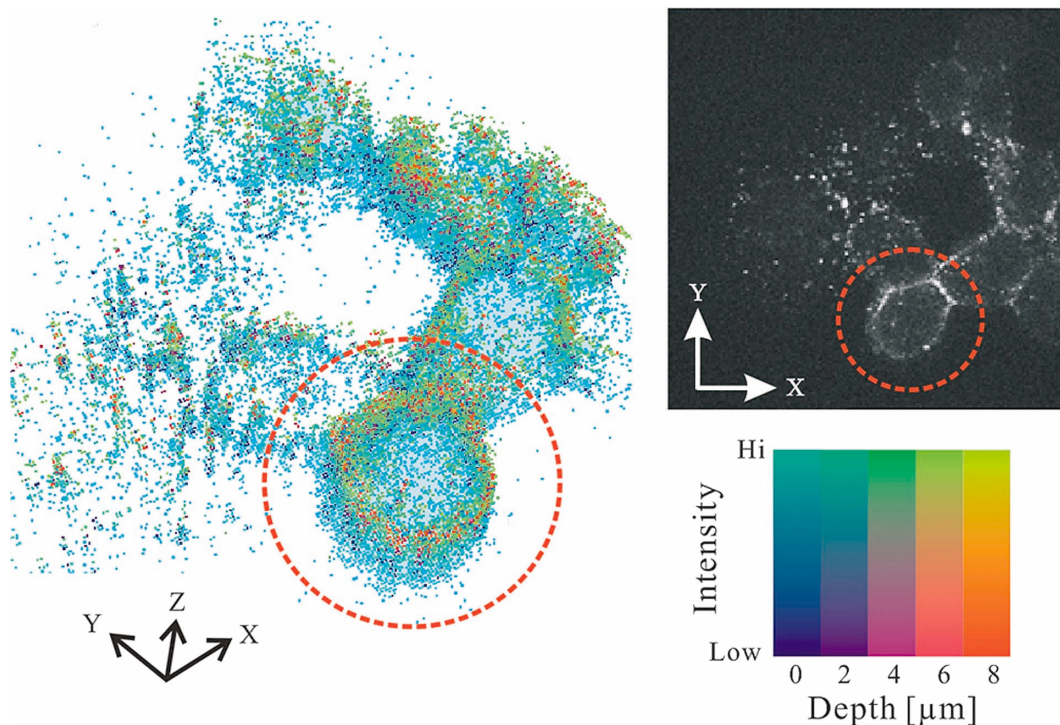


Fig. 12 3D image of fluorescence cells.

り、観測方向から見て奥側で青色、手前側では赤色が濃くなるように描画している。この結果、蛍光細胞の立体像として、Fig. 12 に示す三次元点群画像が得られた。以上の結果から、本手法により、三次元構造をもつ自発光体に対する分光断層像計測が可能であることを確認した。

現段階では、これらの解析に要する時間は、クアッドコアプロセッサ (Intel Xeon 3500 2.67 GHz) 搭載の PC を用いて 20 分程度である。今後の開発では、より高速な解析を行うため、FPGA (field-programmable gate array) や GPGPU (general-purpose computation on graphics processing units) を用いて計測速度の向上を目指す予定である。

7. ま と め

われわれは、生体内を非侵襲で三次元的に測定することができる、分光断層像計測技術を提案してきた。本手法は、局所可動ミラー型の位相可変フィルターにより物体光の光束内に位相差を生じさせ、位相シフト干渉を観測する結像型二次元フーリエ分光法を用いる。本手法では、合焦点外からくる光は干渉に寄与しないため、干渉波形のフーリエ解析結果では合焦点近傍の情報のみが計測される。このことから、細胞などの三次元構造体の立体的な分光分布画像を取得することが可能である。本稿では、結像型二次元フーリエ分光法の干渉原理モデルを、光学的フーリエ変換の観点から新たに構築し、これを用いた原理説明を行っ

た。さらに、本手法の原理確認実験として、蛍光染色細胞を用い、次の結果が得られた。

- (1) サブミクロンオーダーの粒径に砕いた蛍光染色細胞を用いて、分光断層像の深さ方向の分解能を測定した。このとき、ピーク波長の強度の変化を正規分布により近似し、近似曲線の半値幅を深度分解能と仮定したところ、試作光学系の深度分解能は $2.34 \mu\text{m}$ という結果が得られた。
- (2) 細胞表層部のみを蛍光染色した細胞を用いて、自発光源群の三次元分光分布の計測が可能であることを確認した。

以上のことから、本手法による、自発光物体の三次元フーリエ分光イメージングの可能性が確認された。特に中赤外領域においては、すべての物体が自発光体とみなせることや、物質特有の吸光スペクトルを計測できることから、今後、応用範囲を赤外領域まで拡張し、医学的価値の高いデータの取得を目指したい。また、現在、新型の部分可動ミラーを開発中である。新型の部分可動ミラーにより、上下対称となるミラーの可動側の位置と姿勢を制御することで平行度を保つことができ、完全に対称な光束の二分割が可能になると考えられる。本稿では、細胞を染色することにより実験を行ったが、実際の生体組織の測定時には、吸光スペクトルや吸収率の測定が有用な場合も少なくない。しかし、これらを行う際には、波長帯域の拡張だけ

でなく、三次元的な吸収率の解析手法の検討が必要となってくる。これらの課題については、今後の研究の中で取り組んでいく予定である。

この開発は、独立行政法人科学技術振興機構産学イノベーション加速事業【先端計測分析技術・機器開発】事業による成果である。

文 献

- 1) D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Puliafito and J. G. Fujimoto: "Optical coherence tomography," *Science*, **254** (1991) 1178-1181.
- 2) E. A. Swanson, J. A. Izatt, M. R. Hee, D. Huang, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Puliafito and J. G. Fujimoto: "In vivo retinal imaging by optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, **18** (1993) 1864-1866.
- 3) 宇山昌延: "OCT でみた先天性網膜分離症の黄斑部", *臨床眼科*, **52** (1998) 1510-1514.
- 4) 藤 利栄, 上田悦弘, 近江雅人, 林 直人, 春名正光: "光コヒーレンストモグラフィを用いたヒト指細動脈の断層イメージング", *生体医工学*, **44** (2006) 606-612.
- 5) H. Saigusa, Y. Ueda, A. Yamada, M. Ohmi, M. Ohnishi, M. Kuwabara and M. Haruna: "Maximum-intensity-projection imaging for dynamic analysis of mental sweating by optical coherence tomography," *Appl. Phys. Express*, **1** (2008) 098001.
- 6) K. Kurokawa, K. Sasaki, S. Makita, M. Yamanari, B. Cense and Y. Yasuno: "Simultaneous high-resolution retinal imaging and high-penetration choroidal imaging by one-micrometer adaptive optics optical coherence tomography," *Opt. Express*, **18** (2010) 8515-8527.
- 7) U. Morgner, W. Drexler, F. X. Kartner, X. D. Li, C. Pitris, E. P. Ippen and J. G. Fujimoto: "Spectroscopic optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, **25** (2000) 111-113.
- 8) 藤岡良太, 藤田昌也, 末国雅行, 神成文彦: "周波数域干渉を用いた光コヒーレンストモグラフィと分光情報抽出に関する検討", *レーザー研究*, **31** (2003) 668-673.
- 9) Y. Inoue, I. Ishimaru, T. Yasokawa, K. Ishizaki, M. Yoshida, M. Kondo, S. Kuriyama, T. Masaki, S. Nakai, K. Takegawa and N. Tanaka: "Variable phase-contrast fluorescence spectrometry for fluorescently stained cells," *Appl. Phys. Lett.*, **89** (2006) 121103.
- 10) T. Kawajiri, K. Yanogawa, K. Yamamoto, M. Kondo, T. Harada and I. Ishimaru: "3-Dimensional spectroscopic-tomography of biological membrane with high spatial resolution by the imaging-type 2-D Fourier spectroscopy," *Proc. SPIE*, **7266** (2008) 72660G.
- 11) K. Yanogawa, T. Kawajiri, T. Harada, K. Yamamoto and I. Ishimaru: "3-Dimensional spectroscopic-tomography of biological membrane by the imaging-type 2-D Fourier spectroscopy," *Proc. of The 25th Sensor Symposium* (2008) pp. 421-426.
- 12) L. Lindegren and D. Dravins: "Holography at the telescope: An interferometric method for recording stellar spectra in thick photographic emulsions," *Astron. Astrophys.*, **67** (1978) 241-255.
- 13) D. Simons and L. Cowie: "First 2D spectroscopy tests in the IR with a CCD and the FTS," *CFHT Information Bulletin, No. 22* (Canada-France-Hawaii Telescope Corporation, Kamuela, Hawaii, 1990), p. 8.
- 14) D. Simons, J. P. Maillard and L. Cowie: "Update on the 2D FTS project," *CFHT Information Bulletin, No. 24* (Canada-France-Hawaii Telescope Corporation, Kamuela, Hawaii, 1991), p. 8.
- 15) K. Itoh, T. Inoue, T. Ohta and Y. Ichioka: "Liquid-crystal imaging Fourier-spectrometer array," *Opt. Lett.*, **15** (1990) 652-654.
- 16) T. Inoue, K. Itoh and Y. Ichioka: "Fourier-transform spectral imaging near the imaging plane," *Opt. Lett.*, **16** (1991) 934-936.
- 17) M. Sasamoto and K. Yoshimori: "First experimental report on fully passive interferometric three-dimensional imaging spectrometry," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **48** (2009) 09LB03.