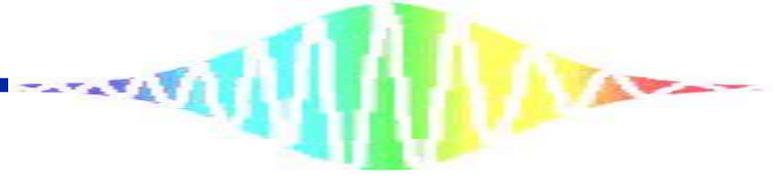


# 論文紹介

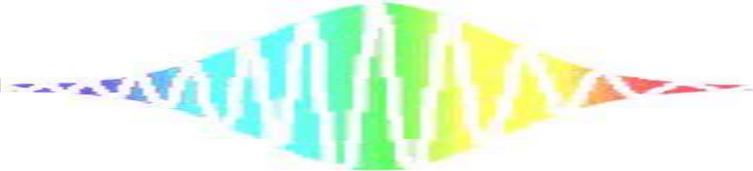
安井研究室 B4 小川貴之



Christopher J Mann, Lingfeng Yu , Myung K  
Kim,

“Movies of cellular and sub-  
cellular motion by digital  
holographic microscopy”

BioMedical Engineering OnLine 5:21 (2006)



# イントロダクション

## 目的

ホログラフィック顕微鏡を用いて、生きた細胞や細胞内運動の動的プロセスの可視化

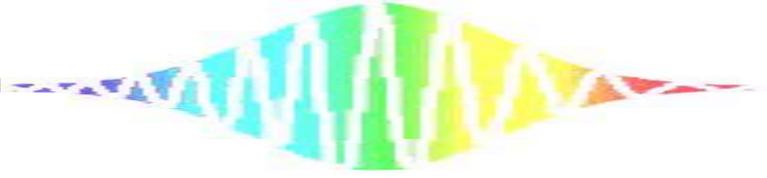
## 従来の顕微鏡

- ・ 明視野顕微鏡 → コントラストが低く区別できない
- ・ 暗視野顕微鏡 → 可視性が改善

**定量的な位相イメージングができない**

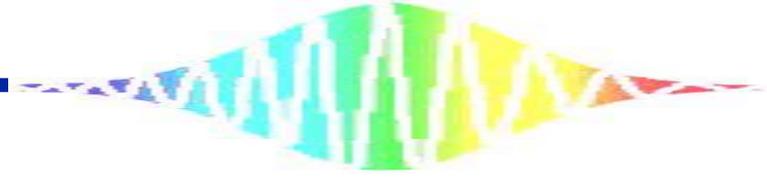


**屈折率や厚さの変化を高い精度で決定可能**



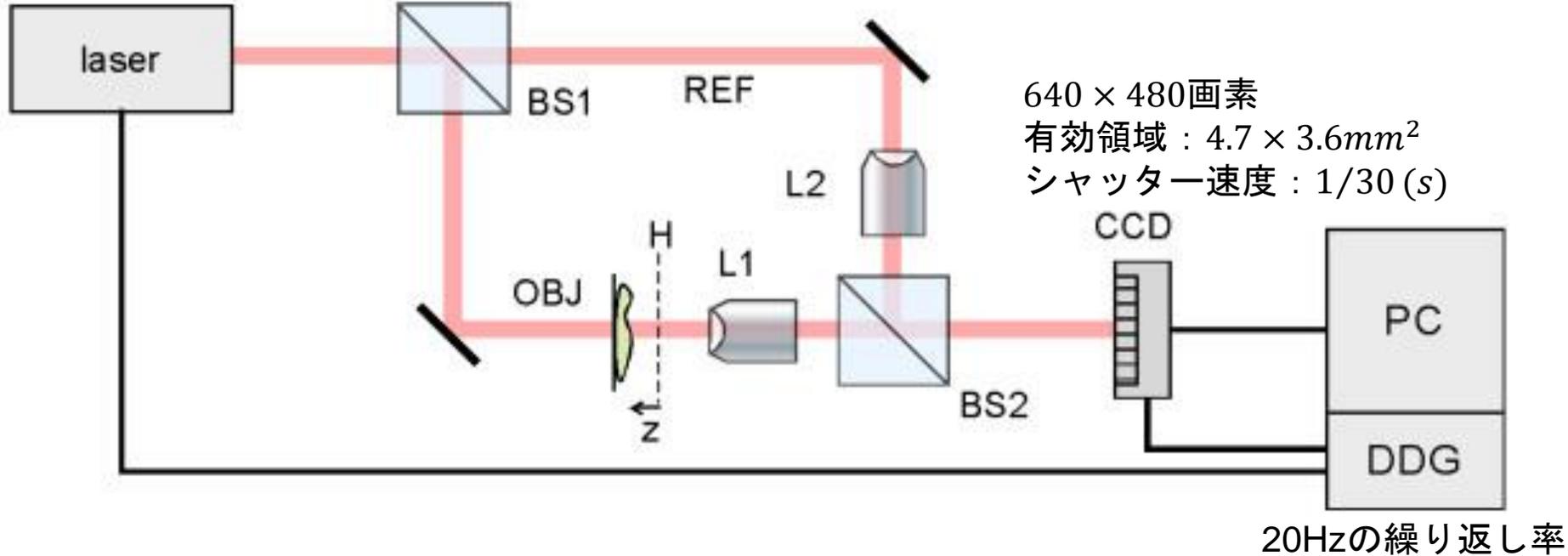
# デジタルホログラフィの利点

- 定性的および定量的な位相情報が得られる
  - ➡ 高精度な光学的厚さプロファイルが可能
- 単一のホログラムから複数の面に焦点を当てることができる（デジタルフォーカシング）
  - ➡ 従来の顕微鏡のような焦点制御が不要
- ホログラムを連続記録することで4次元情報を得られる
  - ➡ サンプルの動的プロセスの可視化



YAGレーザー  
 $\lambda = 532\text{nm}$   
 パワー : 2mJ

# セットアップ



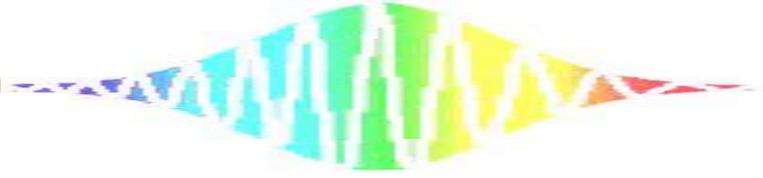
CCDに記録されるホログラムの強度 $|H|^2$

$$|H|^2 = \underbrace{|O|^2 + |R|^2}_{\text{DC項}} + \underbrace{O^*R + OR^*}_{\text{共役像}}$$

DC項

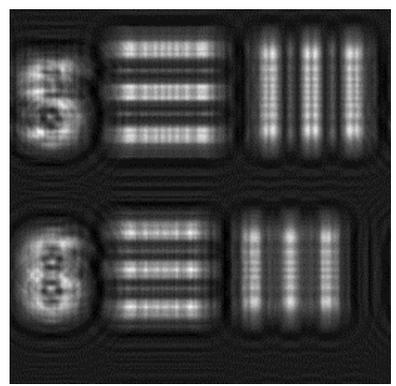
共役像

BS2をずらしてオフアクシス型にし、**共役像を分離**する

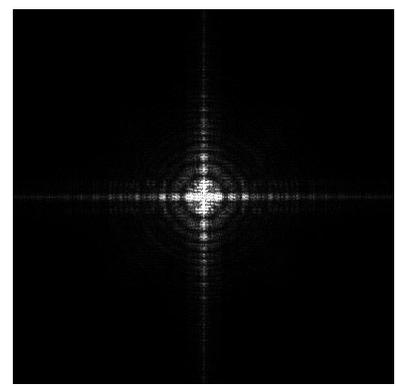


# オンアクシスとオフアクシス

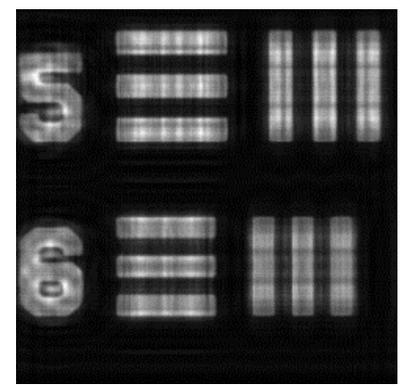
## オンアクシス



ホログラム

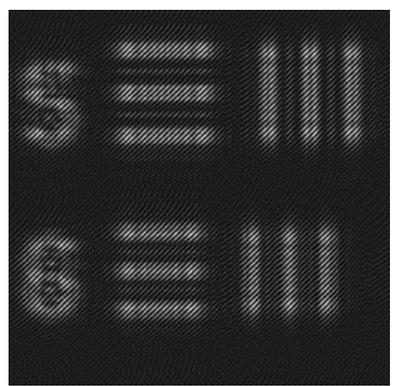


スペクトル

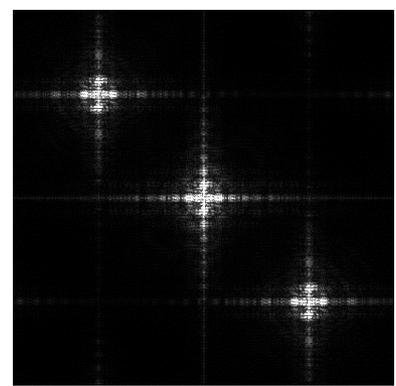


再構成像

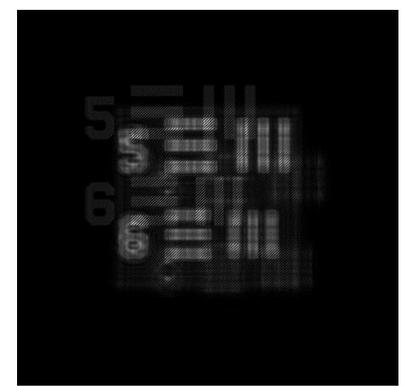
## オフアクシス



ホログラム

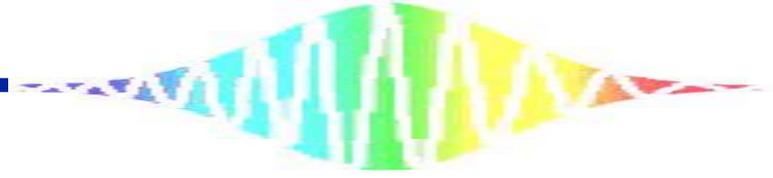


スペクトル



再構成像

画素数が1/4になる



# 再構成法

ホログラムの記録後、回折計算アルゴリズムを用いて数値的に伝搬計算を行う

- コンボリューション法
- フレネル回折法
- 角スペクトル法

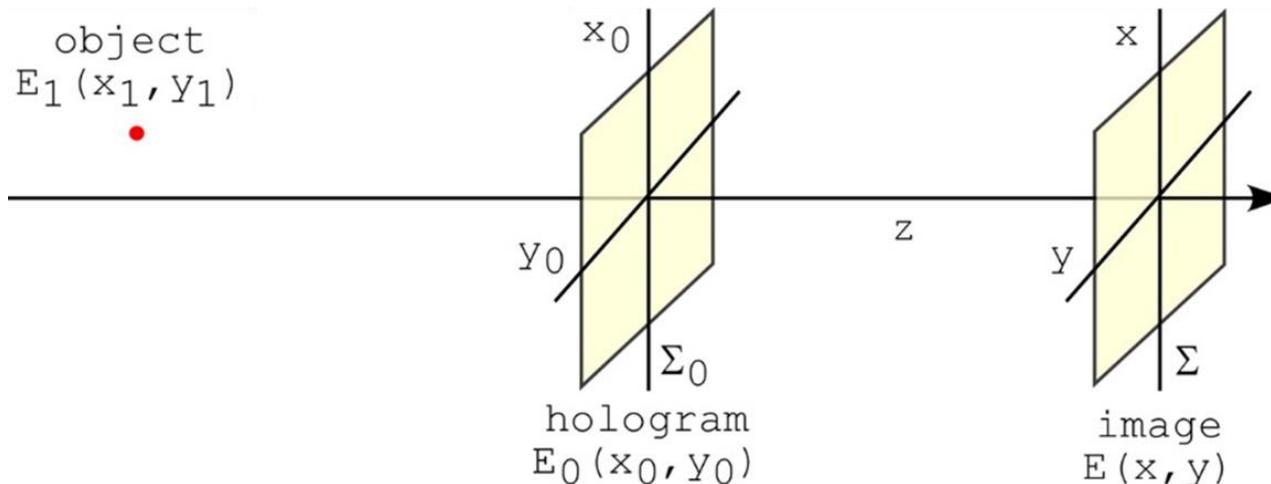
# コンボリューション法

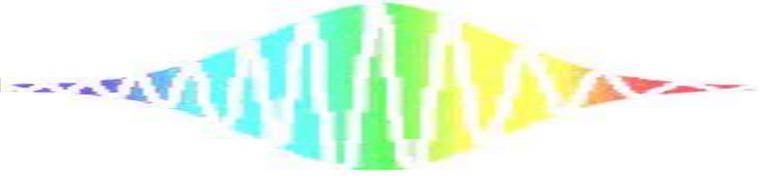
再構成面  $E(x, y; z)$

$$\begin{aligned} E(x, y; z) &= E_0(x_0, y_0) \otimes S_H(x, y; z) \\ &= F^{-1}[F(E_0) \cdot F(S_H)] \end{aligned}$$

$S_H$  はホイヘンスPSF

$$S_H(x, y, z) = -\frac{ik}{2\pi z} \exp\left[ik\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}\right]$$





# コンボリューション法の特徴

$$E(x, y; z) = F^{-1}[F(E_0) \cdot F(S_H)]$$

- FFTを3回行う
- 再構成後のピクセルサイズはホログラムと同じ大きさ
- 最小の再構成距離 $z_{min}$ が存在する

$$z_{min} = \frac{a_x^2}{n_x \lambda}$$

距離が近すぎると  
エイリアシングが発生

$a_x$  : フレームサイズ

$n_x$  :  $a_x$  中の画素数

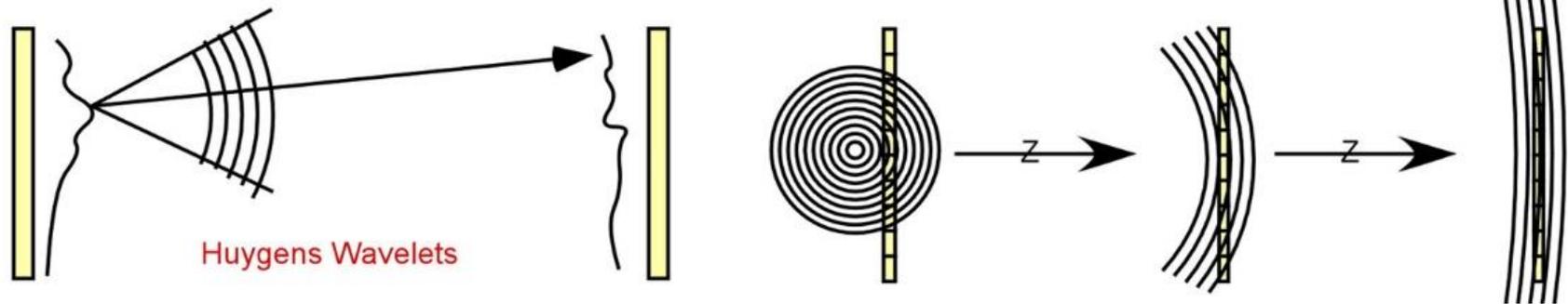
対象物は最小距離の外側に配置

# 最小の再構成距離 $z_{min}$

再構成の式

$$E(x, y; z) = F^{-1} [F(E_0) \cdot \underline{F(S_H)}]$$

球面波で再生している



伝搬距離が短いとサンプリング定理を満たせない

エイリアシングが発生

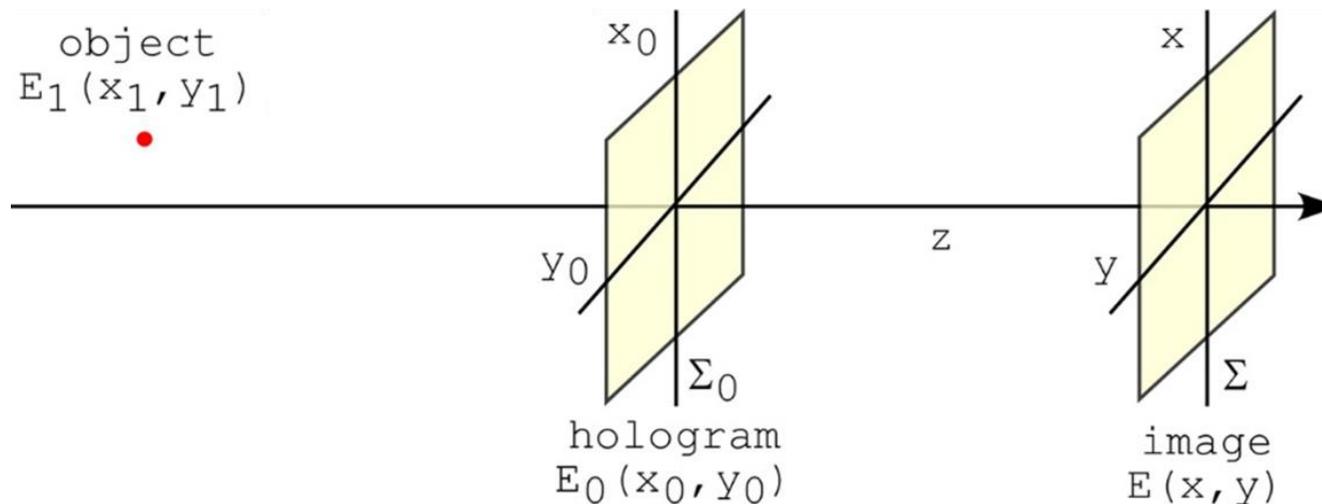
# フレネル回折法

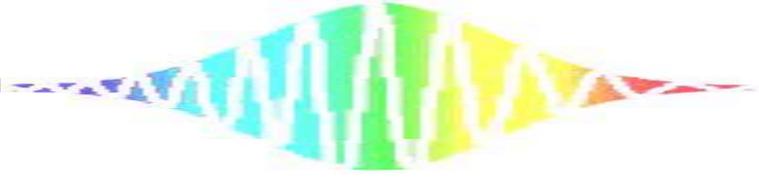
PSFをフレネル近似によって簡略化

$$S_F(x, y, z) = -\frac{ik}{2\pi z} \exp \left[ ikz + i \frac{k}{2z} (x^2 + y^2) \right]$$

再構成面

$$E(x, y; z) = \exp \left[ \frac{ik}{2z} (x^2 + y^2) \right] F\{E_0(x_0, y_0) S_F(x_0, y_0; z)\} [k_x, k_y]$$





# フレネル回折法の特徴

$$E(x, y; z) = \exp \left[ \frac{ik}{2z} (x^2 + y^2) \right] F \{ E_0(x_0, y_0) S_F(x_0, y_0; z) \} [k_x, k_y]$$

- FFTを1回行う
- 最小の再構成距離 $z_{min}$ が存在する
- 再構成後のピクセルサイズ $\Delta x$ が伝搬距離 $z$ によって変化する

$$z_{min} = \frac{a_x^2}{n_x \lambda}$$

$$\Delta x = \frac{\lambda z}{N \Delta x_0}$$

$a_x$  : フレームサイズ

$N$  : CCDのピクセル数

$n_x$  :  $a_x$  中の画素数

$\Delta x_0$  : CCDのピクセル幅

# 角スペクトル法

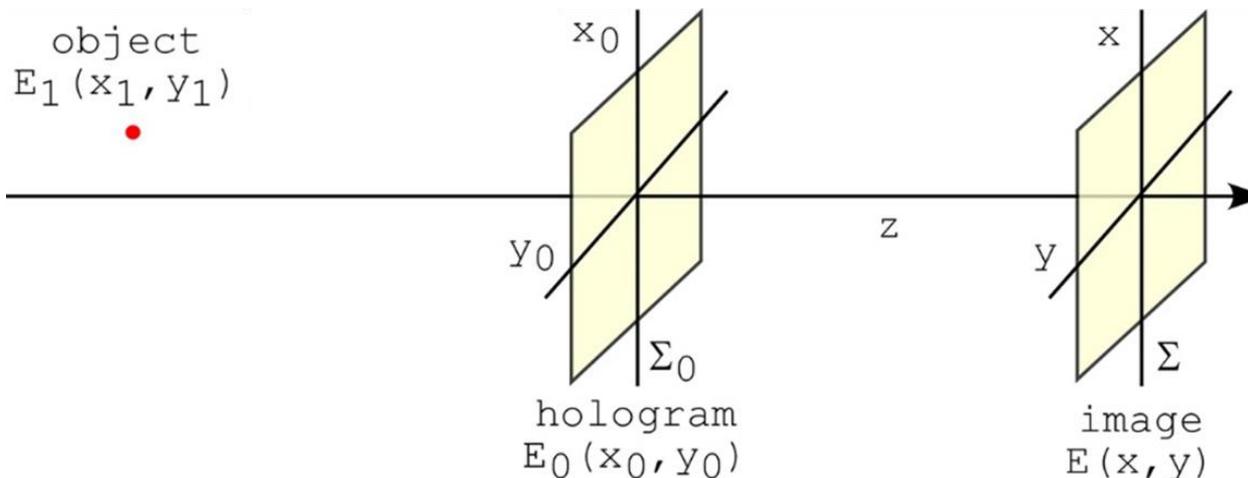
角スペクトルは波面をフーリエ変換することで得られる

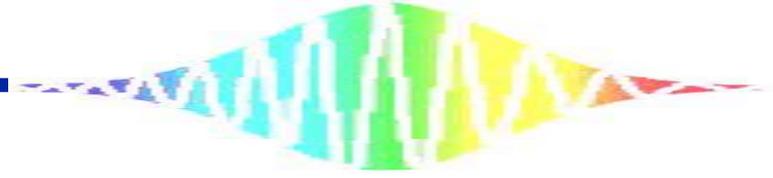
$$A(k_x, k_y; 0)$$

$$= \iint E_0(x_0, y_0; 0) \exp[-i(k_x x_0 + k_y y_0)] dx_0 dy_0$$

位置 $z$ における角スペクトル $A(k_x, k_y; z)$

$$A(k_x, k_y; z) = A(k_x, k_y; 0) \exp[ik_z z]$$



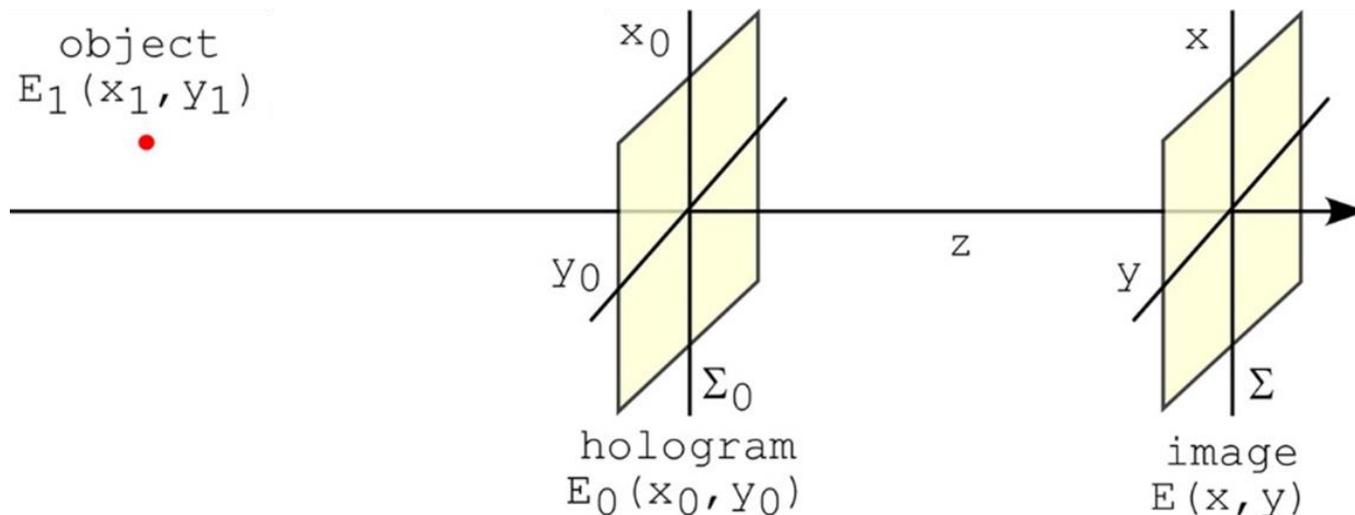


# 角スペクトル法

## 再構成の式

$$E(x, y; z) = F^{-1} \left[ F\{E_0(x_0, y_0; 0)\} \exp[ik_z z] \right]$$

ホログラムの角スペクトル      位相因子  
距離 $z$ での角スペクトル

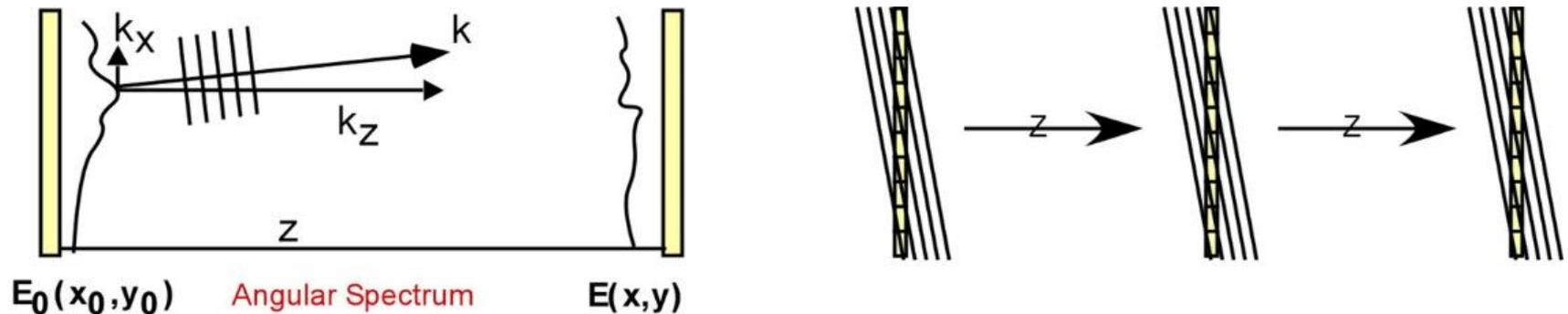
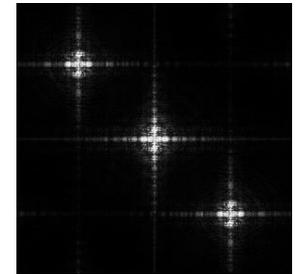


# 角スペクトル法の特徴

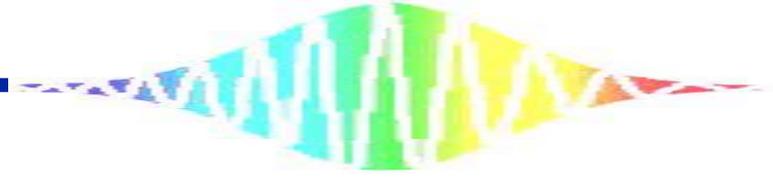
$$E(x, y; z) = F^{-1} \left[ F \{ E_0(x_0, y_0; 0) \} \exp[ik_z z] \right]$$

平面波で再生している

- FFTを2回行う
- 最小の再構成距離  $z_{min}$  が存在しない
- 周波数領域でフィルタリングが可能

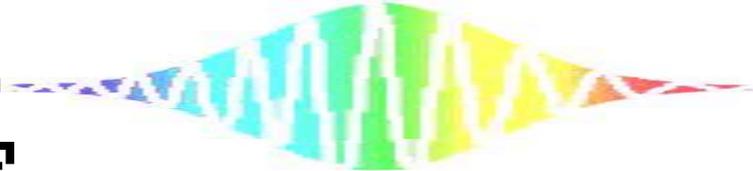


伝搬距離が短いとサンプリング定理を満たせない



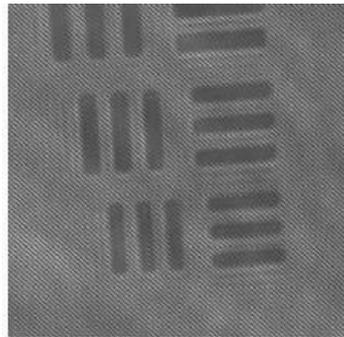
# 実験結果

- 光学的厚さプロファイル
- デジタルフォーカシング
- ホログラフィックムービー

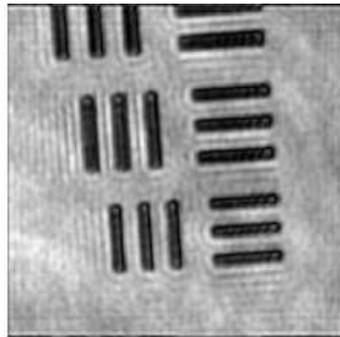


# 厚さ測定

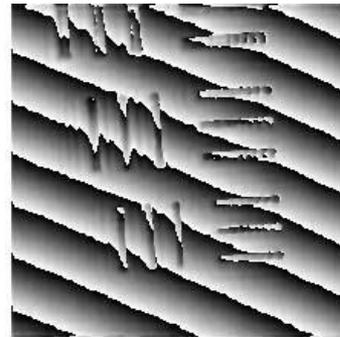
USAF 1951 解像度ターゲットのグループ7、要素6を使用 (線幅 $2.2\mu\text{m}$ )  
 分解能は光学系の回折限界と同じ ( $0.81\mu\text{m}$ )



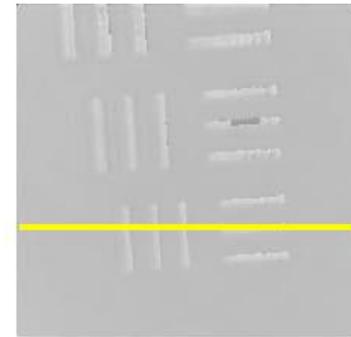
a) ホログラム



b) 振幅画像

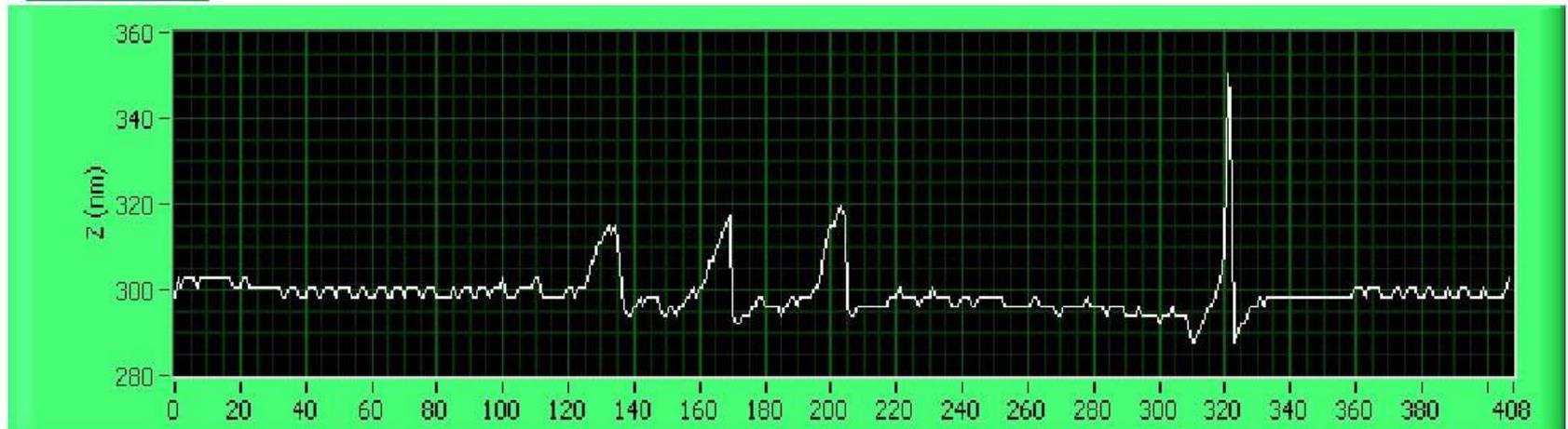


c) 不連続  
位相画像



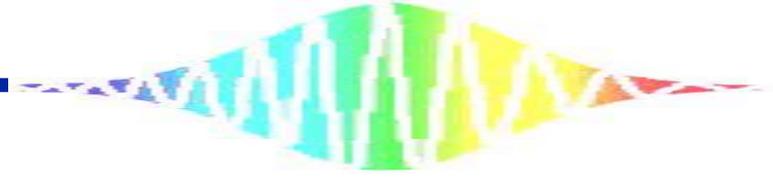
d) 連続  
位相画像

CROSS SECTION



e) Z軸方向の断面プロファイル

約5nmのガラスの厚さ変化に対応

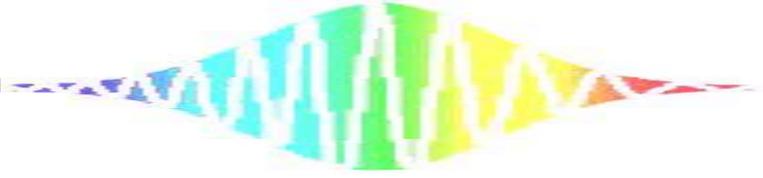


# 3次元疑似カラーレンダリング

接続された位相画像(d)の3次元疑似カラーレンダリング



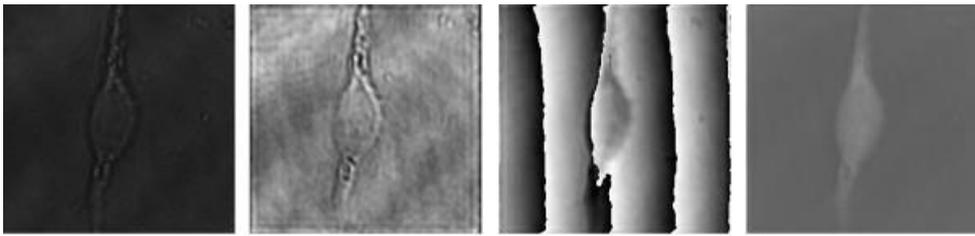
位相画像のノイズはビームプロファイルに依存しない  
そのため、振幅画像のノイズより著しく小さい



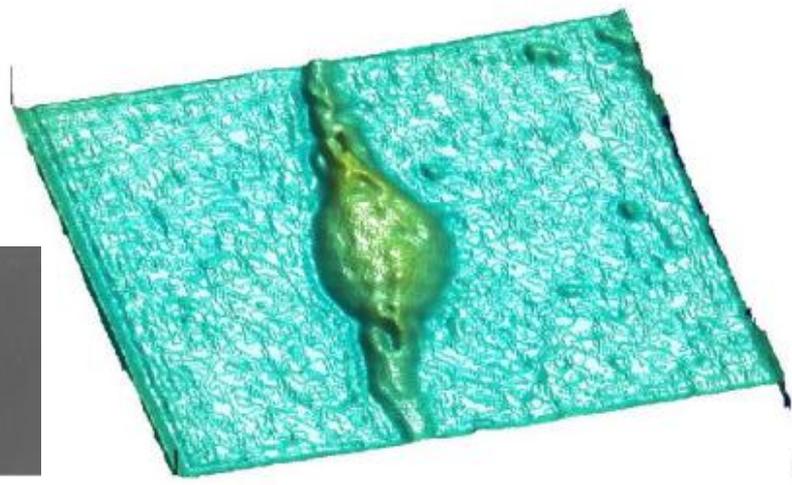
# 細胞の観察

## マウスの胚性線維芽細胞

位相画像から **質の高い表面画像** が得られる



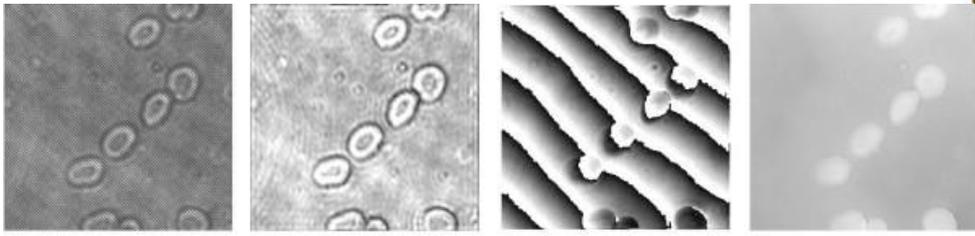
a) ホログラム    b) 振幅画像    c) 不連続位相画像    d) 連続位相画像



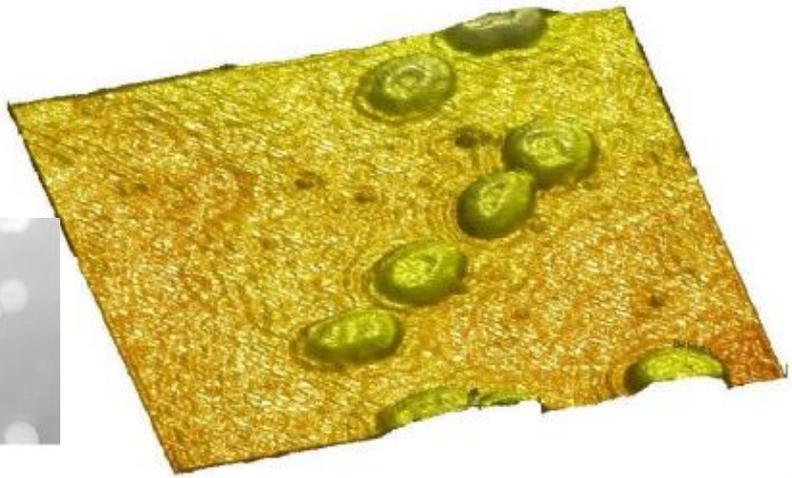
Opt. Thickness (microns)

## 赤血球

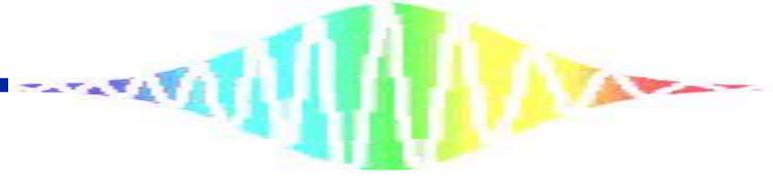
位相画像の分析により **光学的厚さのプロファイル** が可能



a) ホログラム    b) 振幅画像    c) 不連続位相画像    d) 連続位相画像



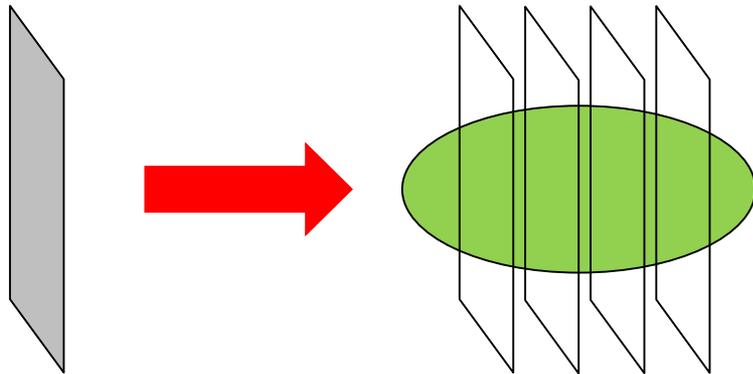
Opt. Thickness (microns)



# デジタルフォーカシング

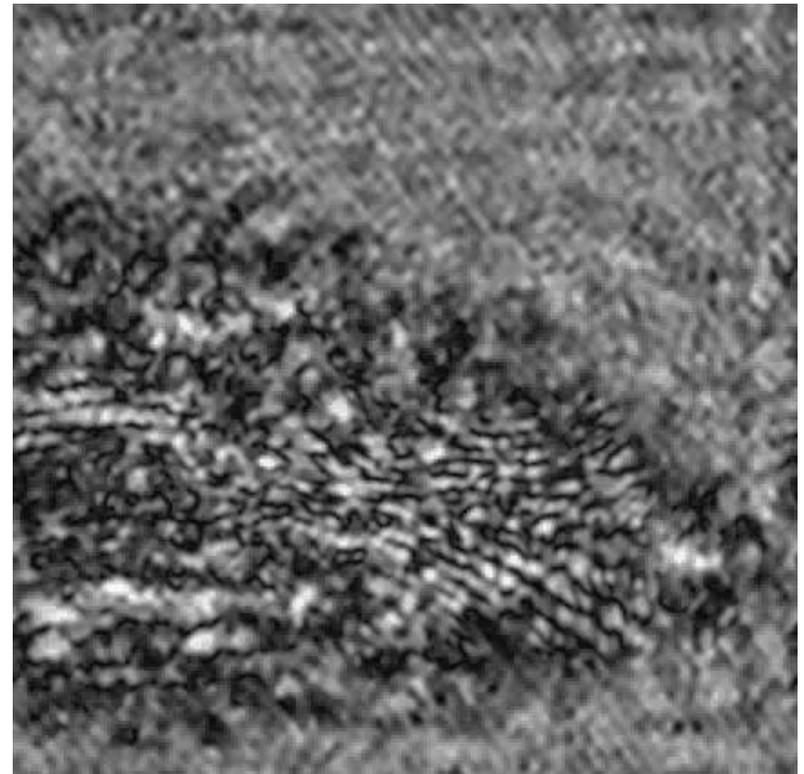
単一のホログラムから任意の位置で再構成ができる

$z = 50 \sim 250 \mu\text{m}$ の範囲を  
 $10 \mu\text{m}$ ごとに再構成した21枚  
の連続したゾウリムシの画像



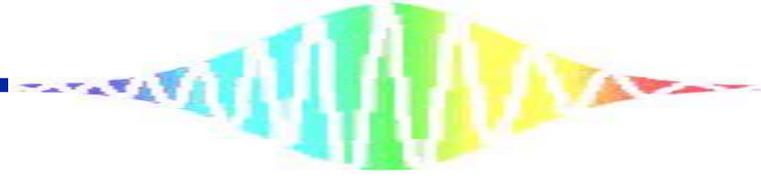
ホログラム

任意の距離で再構成



顕微鏡のような機械的走査は不要

画像領域  $90 \times 90 \mu\text{m}$

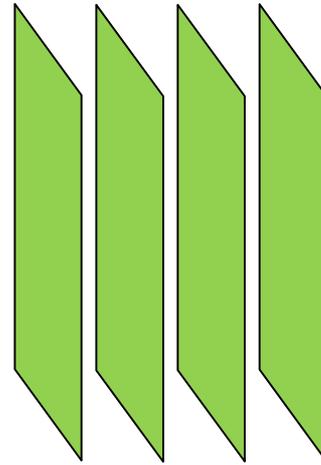
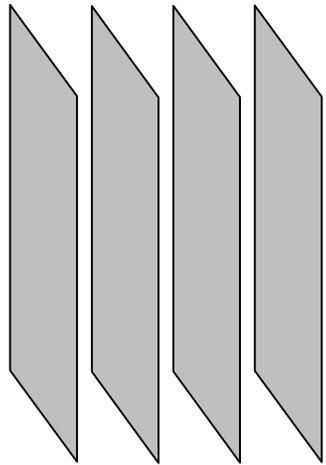


# デジタルホログラフィックムービー

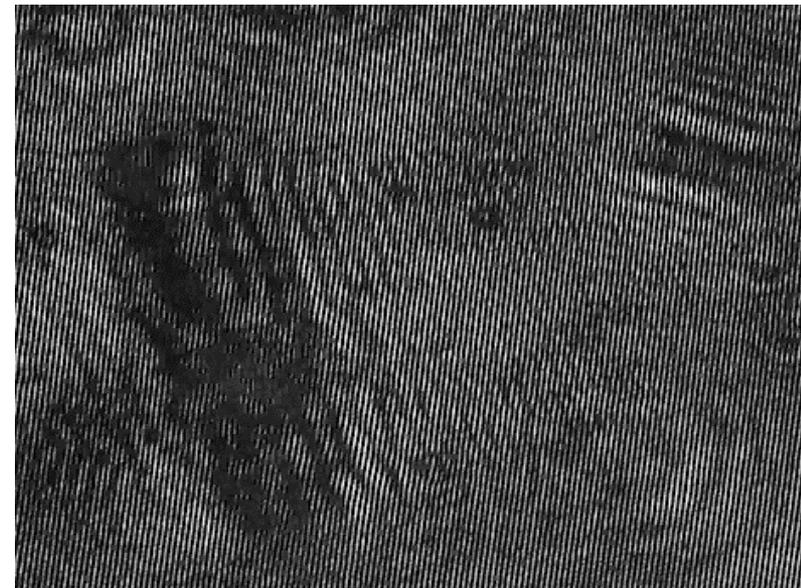
ホログラムを連続で記録し、それぞれを再構成することでサンプルの動的プロセスの可視化が可能



再構成



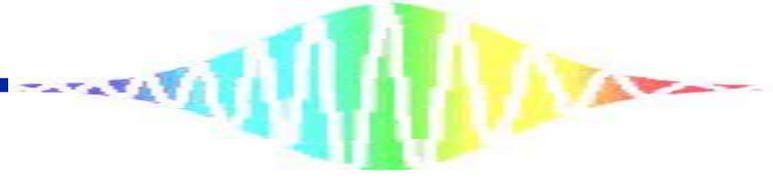
約300msごとに記録  
ゾウリムシのホログラム動画



画像領域  $80 \times 80 \mu m$

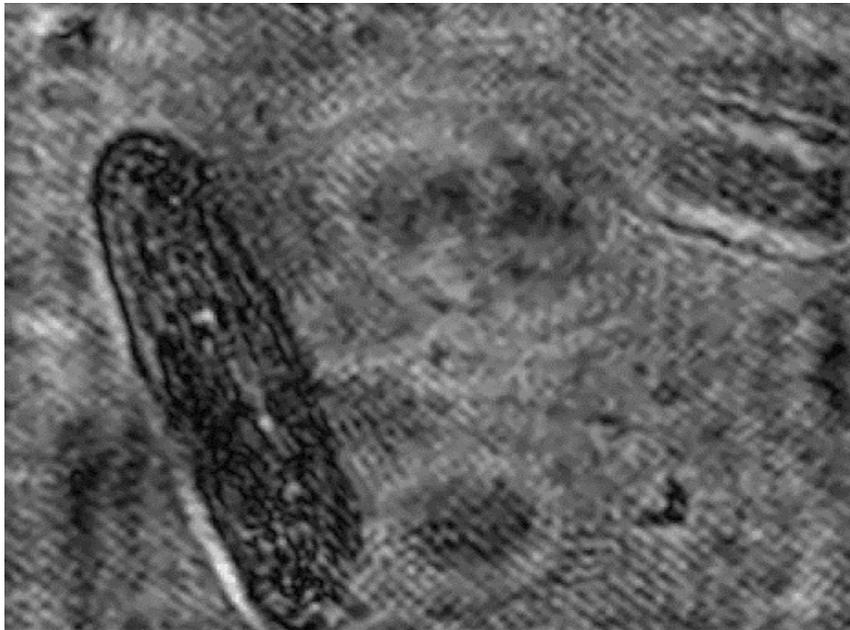
ホログラム

動画

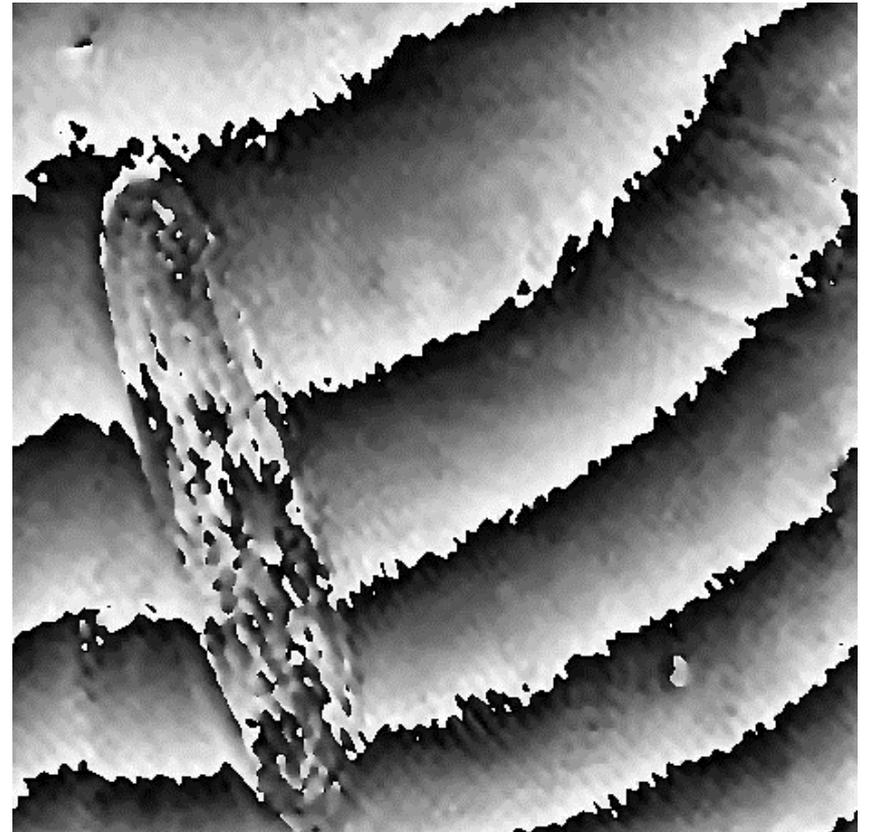


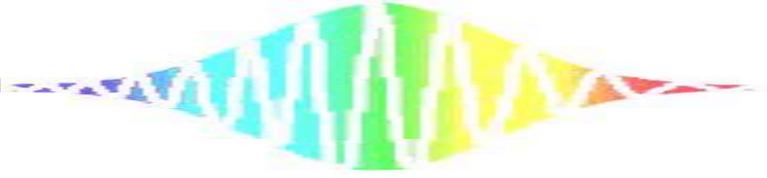
# ゾウリムシのホログラフィックムービー

振幅動画



位相動画





## まとめ

- 再構成像の分解能は回折限界と同じ
- 定量的な位相画像が取得可能
- デジタルフォーカシングにより焦点走査が不要
- サンプルの動的プロセスの可視化