

光相関イメージング法による長時間観察可能な蛍光顕微鏡の開発

Fluorescence microscope for long time observation by optical correlation

研究代表者 大阪大学 准教授 水谷康弘

Yasuhiro Mizutani

We propose a novel fluorescence imaging method in weak light using the Ghost Imaging (GI). The GI is a correlation-based imaging by a single pixel detector. In this report, in order to get images with weak light, number of counts in first photon detection (FPD) is applied to a correlation-based imaging. Since the method uses only a single photon to detect light intensity, it is particularly well suited to detect weak light. FPD has variations that are due to a shot or a thermal noise. Using a correlation, effect of these noises on images is removed. As a result, the GI with FPD (FPDGI) is able to get images by less photons than a conventional imaging method.

要旨

一般的なイメージング法では検出不可能な微弱蛍光を相関計算により画像取得を可能とした顕微鏡を開発した。光相関イメージング法は、ランダムな光強度分布を照明光とし、測定試料からの蛍光を光電子増倍管のような点型光検出器を用いて検出し、照明強度パターンとの相関演算を用いることで画像を再構成する手法である。点型検出器の感度が高いことと、相関演算によるノイズ減算効果により微弱な蛍光画像を得ることができる。本研究では、実証結果を報告するとともに、さらなる高感度計測を実現するために新たに導入した光子到達時間を利用した光相関法について取り組んだ。

1. はじめに

近年、蛍光物質を用いた細胞観察は生物学分野において必要不可欠な解析ツールとなっている。とくに、DNAなどに蛍光物質を修飾させた非常に精密な蛍光分析がなされている。しかしながら、蛍光物質は、光を照射しすぎると光を徐々に発しなくなる退色という問題があり、微小になるほどこの現象が顕著な問題となる。また、そもそも発する蛍光強度が弱くなり SN 比が悪くなると言う問題もある。これらの問題を回避するためには、できるだけ少ない照明回数で効率よく画像を取得することが必要とされている。

本研究では、高感度な光検出器を利用でき、さらに、相関演算を用いることで高効率な画像計測ができる光相関イメージング法を適用した蛍光顕微鏡を開発した。光相関イメージング法とは、ランダムな強度分布を持つ照明光を測定試料に照射し、試料か

ら発する光をすべて点型検出器に集光し、その検出器で得られた光強度と照明光分布との相関演算を行うことで画像を再構築する手法である⁽¹⁻⁵⁾。一般的には、ゴーストイメージング(GI: Ghost Imaging)とも呼ばれている。相関演算を用いるため複数回の照明が必要となるものの、無相関なノイズ成分が自動的に除去できることから弱い光強度でも高 SN 比の画像を取得することができる⁽⁶⁾。そこで、本研究では、光相関イメージング法を適用した蛍光顕微鏡を開発するとともに、さらに高感度化を実現するために光子計数法(フォトンカウンティング法)を導入した新たな手法も開発した。

2. 超微弱光検出のための光相関イメージング法の原理

2. 1 光相関イメージング法の原理

図1に、光相関イメージング法の原理を示す。ランダムな光強度分布を有する照明光を、バンドパスフィルタで所望の波長を選択し試料に照射する。試料から発した蛍光を、余分な照明光をカットするバンドパスフィルタを透過したのちに光電子増倍(PMT: Photo Multiplier Tube)のような点型検出器で蛍光強度を取得する。ここで得られた光強度と照明した照明光強度分布との相関演算を行うことで画像を再構成し測定試料の蛍光画像を得ることができる。ここで、*i*回目の照明で点型検出器で得られる光強度 B_i は、

$$B_i = \int T(x, y) I_i(x, y) dx dy, \quad (1)$$

(2)に代入すると,

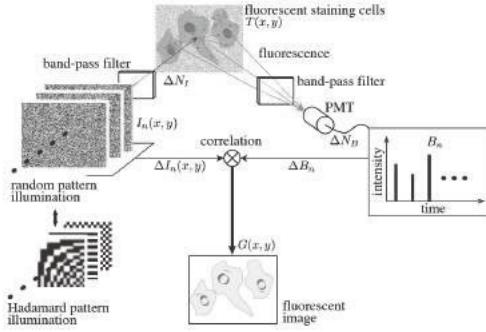


図1 光相関イメージング法の原理

となる。 $I_i(x, y)$ は励起光強度分布であり、 $T(x, y)$ は、試料の蛍光発光確率分布である。このとき、相関値分布 $G(x, y)$ は、

$$\begin{aligned} G(x, y) &= \langle \Delta I_i(x, y) \Delta B_i \rangle \\ &= \langle I_i(x, y) B_i \rangle - \langle I_i(x, y) \rangle \langle B_i \rangle \end{aligned} \quad (2)$$

となる。ここで、 $\Delta I_i(x, y)$ は $I_i(x, y)$ の強度揺らぎ、 $\langle I_i(x, y) \rangle$ は $I_i(x, y)$ の平均値である。ここで得られる $G(x, y)$ は蛍光強度に比例するため蛍光画像を得ることができる。

光相関イメージングは、相関計算により画像を再構成するため、環境光や信号経路に重畠されるノイズに対してロバストな画像取得方法である。ここで、照明光にノイズが含まれるときの照明光強度分布 $I_{R,i}(x, y)$ とすると、

$$\begin{aligned} I_{R,i}(x, y) &= \langle I_i(x, y) \rangle + \Delta I_i(x, y) \\ &\quad + \langle R_{I,i}(x, y) \rangle + \Delta R_{I,i}(x, y), \end{aligned} \quad (3)$$

となる。ここで、 R は環境由来のノイズ成分であり、測定試料に関係のない迷光などである。また、光検出器も同様に迷光や熱電子などの影響を受け、最終的に検出する光強度 $B_{R,i}$ は、

$$\begin{aligned} B_{R,i}(x, y) &= \bullet B_i \bullet + \bullet B_i \\ &\quad + \bullet R_{B,i} \bullet + \bullet R_{B,i}, \end{aligned} \quad (4)$$

となる。ここで、式(3)と同様にノイズに関する成分を R で表している。したがって、最終的に相関計算で得られる相関値分布 $G_{R,i}$ は、式(3)および(4)を

$$\begin{aligned} G_{R,i}(x, y) &= \langle \bullet I_{R,i}(x, y) \bullet B_{R,i} \rangle \\ &= \langle I_{R,i}(x, y) B_{R,i} \rangle \\ &\quad - \langle I_{R,i}(x, y) \rangle \langle B_{R,i} \rangle \\ &= \langle \bullet I_i(x, y) \bullet B_i \rangle \\ &\quad + \langle B_i \rangle \langle \bullet I_i(x, y) \rangle \\ &\quad + \langle I_i(x, y) \rangle \langle \bullet B_i \rangle + g(\bullet R_i), \end{aligned} \quad (5)$$

となる。ノイズに関する成分は g の関数としてまとめた。式(5)の第2および3項の中の Δ はばらつきを示しているため複数回の測定により0に収束する。また、ノイズに関しても同様に複数回の測定により0に収束する。以上より、ノイズに関係のある成分のみが検出されるためロバストな画像計測法といえる。

2.2 FPGI の原理

2.1に示したとおり、光相関イメージング法は相関のないノイズを除去できるため高感度なイメージング法と言える。しかしながら、サンプルの蛍光体の退色を防ぐために、イメージングに用いる光量を少なくする必用がある。そこで、サンプルに照明されてから光子が検出器に到達する時間を用いて、わずかな光子だけでイメージングできる手法を提案する。検出器に到達する光強度を低下させると、光子計数が可能な光電子パルス状態になる。そこで、図2に示すようなタイミングチャートで計測を行う。光子が計数される事象は確率的な現象であることから、単位時間あたりの計測で0もしくは1個の光子しか計数されなくなる。このとき、1つの照明強度分布ごとに検出器で初めて光子が計数されるまでの時間計測を繰り返し行うと、その繰り返し回数は光子が検出される確率を示すことになり幾何分布に従う。ここで、 i 回目の照明において、光子の検出確

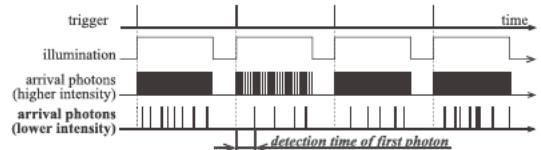


図2 超微弱光環境で相関計算に用いる第一光子到達時間。

率が P , 光子が計数されるまでの計測回数を X とすると, 幾何分布の期待値 E および分布 P は,

$$E_i(X_i) = \frac{1}{p_i}, \quad (6)$$

となる. ただし,

$$P_i(X_i = k) = (1 - p_i)^{k-1} p_i \quad (k = 1, 2, \dots), \quad (7)$$

ここで, 励起光強度分布を $I_i(x, y)$ とすると, 相関値分布 G は,

$$G(x, y) = \langle \Delta I_i(x, y) \Delta X_i \rangle \quad (8)$$

$$= \langle I_i(x, y) X_i \rangle - \langle I_i(x, y) \rangle \langle X_i \rangle$$

となる. ここで, Δx は x の揺らぎ, $\langle x \rangle$ は x の平均値である. G は, 試料の発光確率分布に比例するため蛍光画像を取得できる. 本手法では, 一度の照明で検出する光子が 1 個であるため, 照明強度分布と同じ数の検出光子数でイメージング可能である. 以下, 照明強度分布と初めて光子が計数されるまでの計測回数の相関値を用いる GI を FPDGI (First Photon Detection Ghost Imaging) と呼ぶ.

3. FPGI を用いた光相関顕微鏡の構築

3.1 FP の確認

初めて光子が検出器で計数されるまでの試行回数が光強度に依存することと, また, 光子の到達時間が幾何分布に従うことを検証した. ND フィルタを用いて光源の光強度を制御し, PMT へ入射させ光子が検出されるまでの試行回数を測定した. 具体的には, 光強度を $137 [\text{pW}/\mu\text{m}^2]$, PMT の露光時間を $50 [\mu\text{s}]$ に設定し, 試行回数の上限を 100 回として測定した. 図 3(a) に, 最初に光子を検出したときの試行回数をヒストグラム表示したものを示す. 式 (6) および (7) を用いて理論値を算出したところ, 実験値と良い一致を示した. これより, 光子が計数されるまでに要する試行回数は, 光子が検出される確率に依存し, 幾何分布に従っていることを確認した.

次に, 光子の検出確率と光強度の関係を測定から

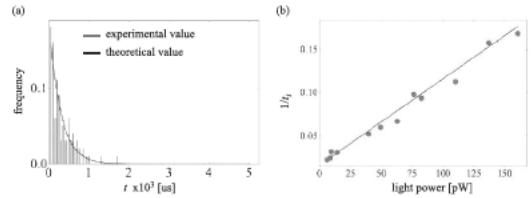


図 3 第一光子到達時間の強度線型性. (a) 第一光子到達頻度, (b) 強度線型性.

求めた. ここでは, 入射光強度を ND フィルタで調整し, 各光強度ごとにヒストグラムを作成し光子の検出確率を求めた. 図 3(b) に示すとおり, 入射光強度と光子の検出確率が比例していることがわかる. この比例関係は, 相関値を算出するために検出確率を用いることができるということを示している.

光検出器に入射させる光量を少なくし光電子パルス状態にすることで測定に利用することができる. 一方で, 光量が多くなると正確な光子到達時間を測定することができなくなるため, 利用できる光量には上限が存在する. そこで, イメージングに利用できる光量の上限を測定より求めた. 波長 560nm の半導体レーザを ND フィルタを用いて光量を制御し光電子パルス状態にしたのちに光電子増倍管で検出した. 図 4(a) に示すとおり, 光量が多いと光電子増倍管のゲート時間内に複数の光子が到達してしまい正確な光子到達時間を算出することは不可能である. 一方で, 光量が少ないと PMT に到達する光子数は 1 もしくは 0 個となり正確な光子到達時間を測定することができる. 図 4(b) に示すとおり, 光量が増加するに従い, 徐々に理論値と測定値が乖離していることが分かる. 本測定結果によると, 光子数と PMT ゲート時間の積が 1 以下となる条件で良い一致を示している

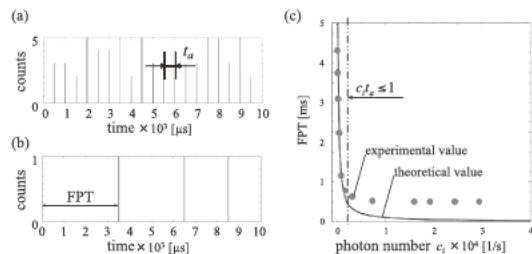


図 4 検出可能な第一光子到達時間の強度範囲. (a) 光子数 $7281.2 [1/\text{s}]$ の時間ごとのカウント数, (b) 光子数 $427.6.2 [1/\text{s}]$ の時間ごとのカウント数, (c) 光強度ごとの到達時間.

ことが分かる。以上より、本研究で用いる光量の条件は、 $ct < 1$ である。

3.2 FPGI を用いた光相関顕微鏡の光学系

光子到達時間を利用した微弱光顕微イメージングを実現した光学系を図 5 に示す。図 5(a)に示すとおり、ランダムな光強度分布を照明するために DMD プロジェクターを用いた。DMD プロジェクタでつくられたランダム照明分布は、フィルタ等で蛍光励起波長を選択し、対物レンズにより測定試料面上に結像される。測定試料が発した蛍光はバンドパスフィルタで蛍光以外の光を除去した後に PMT で光子数を検出される。検出された光子数は A/D 変換器をとおして PC に取り込み、照明光強度分布との相関の算出を利用して測定試料の蛍光イメージを取得する。なお、PMT の動作開始時刻は DMD から出力されるトリガ信号と同期されている。以上の光学系の実際の写真は、図 5(b)に示すとおりで、全体を暗幕でおおうことで

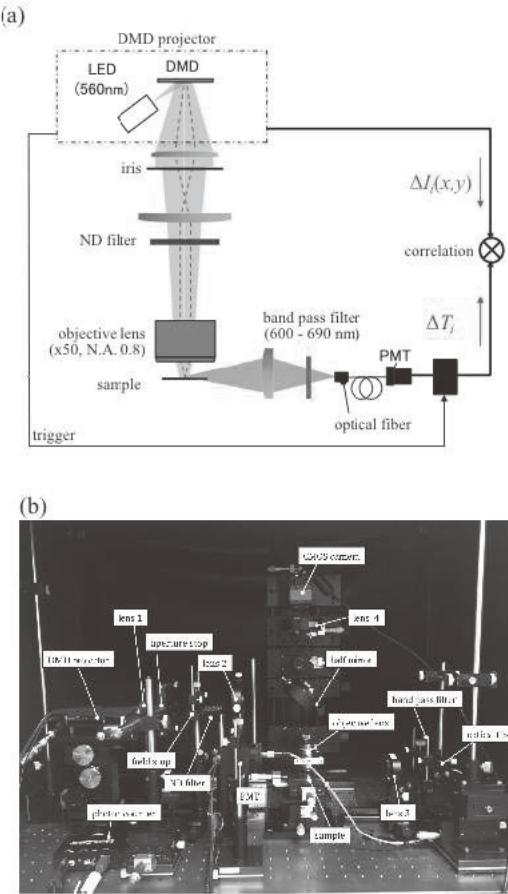


図 5 第一光子到達時間検出による光相関イメージング顕微鏡。(a) 光相関検出システム、(b) 装置写真。

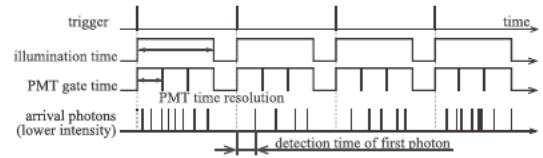


図 6 第一光子検出のための測定時間チャート。

環境光などの余分な光の侵入を防いだ。

図 6 に測定のタイミングチャートを示す。トリガ信号は、1 つの照明パターンごとに同期出力される。このトリガ信号を PMT の動作開始信号として、あらかじめ設定したゲート時間で PMT は繰り返し駆動する。なお、PMT のゲート時間内の時間を分割することはできないため、光子の到達した時間はゲート時間が最小単位となる。

4. 微弱光特性と蛍光イメージングへの応用

構築した顕微鏡光学系を用いて本提案手法の原理確認を行った。表 1 に取得した画像を示す。また、図 7 に、計数する回数と取得できる画像の関係の測定結果を示す。CNR とは、画像のコントラストとノイズの比を表した計数であり、

$$CNR = \frac{\langle S \rangle - \langle B \rangle}{\sqrt{\sigma_s^2 - \sigma_B^2}} \quad (9)$$

と表される。ここで、 $\langle S \rangle$ はシグナルが存在する領域の光強度平均値、 $\langle B \rangle$ はシグナルが存在しない領域の光強度平均値、 σ_s および σ_B はシグナルが存在する領域と存在しない領域の光強度のばらつきをそれぞれ示す。数値が高いほど鮮明な画像が得られていることを示している。照明光強度は、36.76 [pW/ μm^2] とし、サンプルには 8 [μm] のシリカ球を用いて散乱光を検出した。測定結果より、50 個のフォトンを用いることでコントラストの良い画像が得られることが分かる。すなわち、少なくとも 50 回の繰り返し測定を行うことで画像が得られることが分かった。

表 1 時間分解能別に取得した光相関イメージ。

α [1/s]	148153.0	29393.4	15926.7	7281.2	1734.2	777.0
image t_0 [us]: 50						
Cdf	7.41	1.47	0.80	0.36	8.67×10^{-2}	3.23×10^{-2}
image t_0 [us]: 500						
Cdf	74.08	14.70	7.96	3.96	0.87	0.39

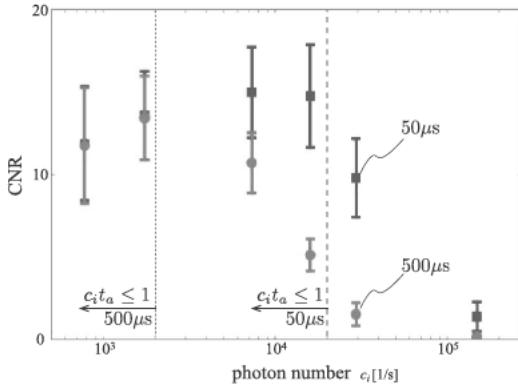


図7 PMT ゲート時間と画像品質の限界強度の関係.

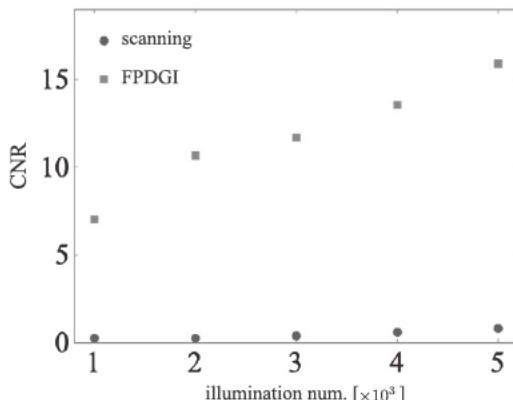


図8 走査型イメージング法との比較.

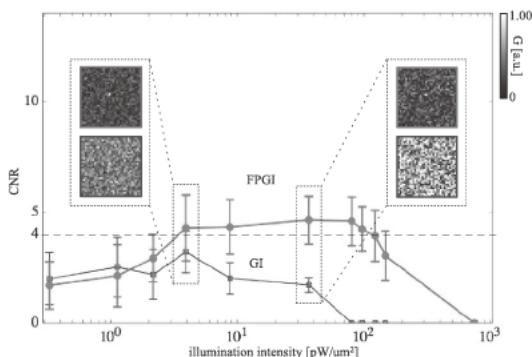


図9 従来の光相関イメージング法との比較.

一般的な走査光学系による画像計測との比較を行った。光学系は同じものを用いて、DMDにより走査を行った。図8に、照明する回数に対する画像のコントラストを示す。なお、測定試料には8[um]のシリカ球を用い、照明光強度は30 [pW/um²]とした。測定結果からも明らかのように、走査光学系ではコントラスト

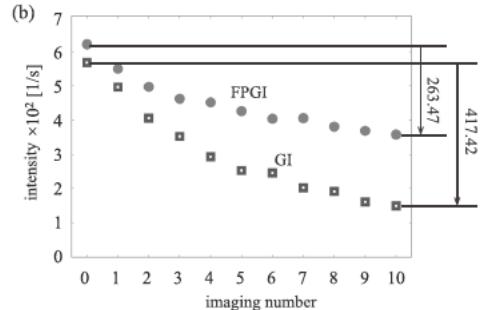
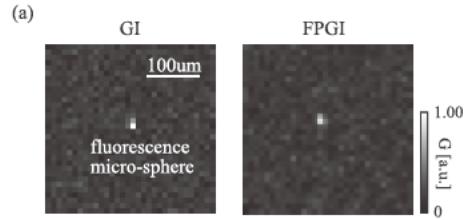


図10 FPGI の退色低減効果. (a) 取得した蛍光画像。画像を取得するのに要した光子数は、GI の 3617 個に対して、FPGI は 1695 個であった。(b) 繰り返し計測による退色の様子.

トの良い画像が得られないが、本提案手法では照明回数に比例してコントラストのよい画像が得られた。これは、環境光や電気信号に重畠される熱電子などにより SN の低いシグナルとなるため走査光学系で画像が得られないことを示している。

従来の光相関法に対しての優位性を確認した。試料を直径 8[um] のビーズとして、その試料から β の散乱光を検出した。比較のための実験光学系は同様のものを用いて、データの取得方法のみの違いとした。すなわち、従来手法では、PMT に入射する光子数をすべて計数することで光強度とした。ただし、検出に用いる全光子数を 100 個に限定した。図 9 に、照明光強度を変化させたときに得られる画像のコントラストを示す。光子数を 100 個に限定したことにより、従来の光相関法ではどの光強度でも画像を取得できないことが分かる。それに対して、本提案手法では、10 から 100 [pW/um²] の領域で画像が得られており本提案手法の有効性を示すことができた。

最後に、蛍光退色に対する優位性を確認した。ここでは、蛍光ビーズを試料に用いて複数回測定した後の蛍光強度を測定することで優位性を示す。図 10 に、従来の光相関法と提案手法それぞれに対して、10 回同様の測定を行ったときの、各回のはじめに得られる蛍光強度を示す。なお、ここでの照明光強度は 880 [pW/um²] とし、PMT の時間分解能は 50 [us] とした。

図10(a)に示すとおり、各イメージ回数において得られた画像の品質にはあまり差が観られないものの、(b)に示すとおり、10回測定後の光強度が、従来法では 417×10^{-2} の低下に対して、提案手法では 263×10^{-2} の低下にとどまっており、本手法が蛍光退色に有効であることが分かる。

以上より、光子到達時間を利用した光相関イメージング法が、超微弱光のイメージングに有効であるとともに、蛍光退色に対しても優位であることを示した。

5.まとめ

超微弱光による画像計測を実現するために、光子が検出器に到達する時間に着目することで、そもそもノイズに強い光相関法と組み合わせる手法を提案した。光強度分布を任意に制御できるようにするために、DMDを用いた顕微鏡光学系を構築し、さらに、光電子増倍管を組み込むことで光子到達時間を計測可能とした。従来の走査光学系や光相関法との比較を行い、提案手法の優位性を示した。また、蛍光退色を確認することで本手法の有用性も確認した。

本研究では顕微鏡光学系に利用したが、一般的な光学系、例えばカメラによる画像計測などに応用することで、夜間の監視や赤外線検出などへの応用も見込まれる。

発表論文

- [1] (invited) Yasuhiro Mizutani, Hiroki Taguchi, Yasuhiro Takaya, Single-pixel imaging by Hadamard transform and ghost imaging and its application for hyperspectral imaging, Proc. SPIE, 10021, 8, Beijing, China, 2016年10月.
- [2] (invited) Yasuhiro Mizutani, Illuminated pattern analysis of fluorescent Ghost imaging for single-molecule imaging International Symposium on Optical Memory 2016, Tu-H-02, Kyoto, Japan, 2016年11月.
- [3] (invited) Yasuhiro Mizutani, Yasuhiro Takaya, Yukitoshi Otani: Ghost imaging ellipsometry, International Symposium on Optomechatronic Technology (ISOT) 2016,

SS2-4-1-SS2-4-2, Tokyo, Japan, 2016年11月。

- [4] Sho Onose, Masashi Takahashi, Hirotugu Yamamoto, Yasuhiro Mizutani, Takeshi Yasui, Single Pixel Imaging with a High-Frame-Rate LED Digital Signage, The 23rd International Display Workshops in conjunction with Asia Display 2016, 2016年12月.
- [5] Kyuki Shibuya, Takeo Minamikawa, Yasuhiro Mizutani, Takeshi Yasui, Tetsuo Iwata, Hyperspectral single-pixel imaging with dual optical combs, Proc. SPIE, Vol. 10076, 100761C, USA, 2017年6月.
- [6] Hiroki Taguchi, Yasuhiro Mizutani and Yasuhiro Takaya, First Photon Detection Ghost Imaging, Imaging and Applied Optics 2017, USA, 2017年6月.
- [7] Yasuhiro Mizutani, Yasuhiro Takaya, Tetsuo Iwata, Two dimensional ellipsometer by ghost imaging technique, The 13th International Symposium on Measurement Technology and Intelligent Instruments, China, 2017年9月.
- [8] (invited) Yasuhiro Mizutani, Hiroki Taguchi, Yasuhiro Takaya, Ghost imaging for single photon counting, The seventh Korea-Japan Workshop on Digital Holography and Information Photonics, Korea, 2017年12月.

参考文献

- (1) A. V. Belinsky and D. N. Klyshko, 2 - photon optics - diffraction, holography and transformation of 2-dimensional signals, Sov. Phys. JETP, 78, 259 (1994).
- (2) T. B. Pittman, Y. H. Shih, D. V. Strekalov, and A. V. Sergienko, Optical imaging by means of two-photon quantum entanglement, Phys. Rev. A, 52, R3429 (1995).
- (3) A. Gatti, E. Brambilla, M. Bache, and L. A. Lugiato, Ghost Imaging with Thermal Light: Comparing Entanglement and ClassicalCorrelation, Phys. Rev. Lett., 93, 093602 (2004).
- (4) J. H. Shapiro, Computational ghost imaging, Phys. Rev. A, 78, 061802(R) (2008).
- (5) B. Sun, M. P. Edgar, R. Bowman, L. E. Vittert, S. Welsh, A. Bowman, and M. J. Padgett, 3D computational imaging

- with single-pixel detectors, *Science*, 340, 844 (2013).
- (6) Kyuki Shibuya, Kazuhiro Nakae, Yasuhiro Mizutani, and Tetsuo Iwata, Comparison of reconstructed images between ghost imaging and Hadamard transform imaging, *Opt. Rev.*, 22, 897 (2015).