

統計干渉法による植物の環境負荷に対する形態的応答のナノメータ計測 nanometric measurements of morphological reaction of plants for environmental stress using statistical interferometry

門野博史、清水直也、幡野敬典、豊岡 了、三輪 誠

Hirofumi KADNO, Naoya SHIMIZU, Keisuke HATANO, Satoru TOYOOKA and Makoto MIWA

In this study, we consider the interference of completely random wave fronts, i.e., speckle fields, and it has been proved that the complete randomness of the speckle field can play the role of a standard phase in a statistical sense. The advantage of the method, i.e., Statistical Interferometry, is that since the phase of the object under testing can be derived in a statistical way, the accuracy of the measurement depends only on the number of data taken to calculate a probability density distribution of speckle phase. This feature permits a simple optical system to achieve measurements with an extremely high accuracy.

Statistical interferometry was applied to monitor biological activity or growth rate of plant, aiming to investigate the influence of the environmental pollutions. In the experiments, the plants were exposed to Ozone that is the main substance of photochemical smog, and the growth rates were measured before and after the exposure. It was clearly observed that the fluctuation of growth rate as well as its mean rate was dramatically affected by the exposure of ozone. By the observation of growth rate of plant with the accuracy of sub-nanometer scale and a time scale of second, it was newly revealed that the fluctuation of the growth rate reflects the biological activity of the plant.

KEY WORDS: Statistical interferometry, Environmental pollution, Ozone, Plant growth

1. はじめに

植物は周りの環境条件に応じて様々な反応を示すことが知られている。環境条件は植物の生長生存にとって有利に働く場合もあれば、環境汚染のように負としてあるいはストレスとして作用する場合もある。一度発芽すると生存場所を変えることのできない植物は同じ場所であっても少しでも良い条件得るために茎を伸ばしたり、屈曲したり、回旋運動を示すなど様々な動態を示し環境に適用しようとする。

我々が特に注目しているのは環境汚染の影響である。近年、工業生産や人間活動の急速な増加に伴って大気汚染や水質汚染など様々な環境汚染が発生し、動植物に深刻な影響を与えている。環境汚染を抑制あるいは防止するには汚染の状況や影響を正確に把握することが重要である。筆者は、環境が植物に与える影響を簡便にインフィールドでセンシング可能な光計測法の確立を目指して

埼玉大学理工学研究科 環境科学・社会基盤工学部門
Department of Environmental Science & Human
Engineering, Graduate School of Science and Engineering,
Saitama University, 255 Shimo-Okubo, Sakura-ku,
Saitama, Saitama, 338-8570, Japan

研究を行ってきた。光を用いた計測は非接触、無侵襲であることが利点であり我々の目的に適している。先に述べた植物の屈性や回旋運動などはマクロな運動であり古くから認識され研究されてきた。これに対して、光干渉法¹⁾を応用すれば光の波長レベルあるいはそれ以下のスケールで植物の動態を精密に観測することができる。このような干渉計測は工業材料などに対しては日常的に行われているが植物に対してはほとんど適用されていないのが現状である。

本稿では、レーザー光が植物の表面で散乱されることにより生じるレーザースペckルを利用した新しい超高感度干渉計測法²⁻⁷⁾の原理を述べるとともにこれを用いた植物の活性状態や生長(伸長)モニタリング⁸⁾に関する我々の最近の研究成果を紹介する。この計測法ではスペckル場のランダム性に基づく新しい干渉計測法である統計的干渉法を用いて超高感度な計測を実現している。

2. 統計的干渉法の原理

図1に植物の生長計測に用いた実験光学系を示す。YAGレーザー(SHG)(波長 = 532nm)から直線偏光で

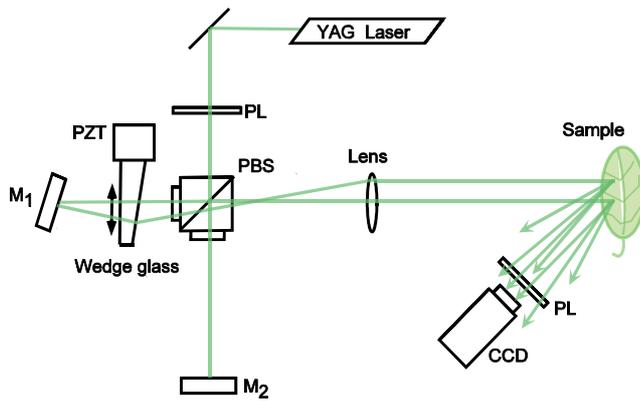


Fig.1 Optical system to measure the growth of the plant. Two parallel laser beams illuminate normally the object, and the extension between the illuminating points is measured.

出射した光はビームスプリッター P B S により 2 つのビームに分割されそれぞれミラー M₂ および M₃ により反射され再び P B S に入射する。この 2 本のビームをレンズ L により互いに平行とした後物体を 2 点で垂直に照明する。ここで、物体表面は光学的に十分粗いとする。すなわち表面粗さが光の波長に比べて大きいとすると十分発達した 2 つのスペックル場がそれぞれ独立に生じる。物体法線から角度 θ の位置に置かれた C C D カメラにより 2 つのスペックルパターンの重ね合わせの結果生じるやはりランダムな干渉パターンが計算機に取り込まれる。C C D カメラの前面に置かれた偏光フィルター P L は 45° の偏光角に設定されており 2 つのスペックル場の干渉成分のみを選択する。いま、照明ビームの間隔を x とし、2 点間で x の面内の伸長が起こると 2 つのスペックル場の間には次のような位相差 $\Delta\phi$ が生じる。

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta x \sin \theta \tag{1}$$

植物の伸長に伴うランダムな干渉パターンの変化が逐次 ($t=t_0, t_1, \dots, t_n$) 計算機に取り込まれ、フレームメモリに記録される。3 つの画像の強度を I_1, I_2, I_3 と置くとそれぞれ次式で与えられる。

$$\begin{aligned} I_1(x) &= I_0(x) [1 + \gamma(x) \cos(\phi(x) + \psi_1)], \\ I_2(x) &= I_0(x) [1 + \gamma(x) \cos \phi(x)], \\ I_3(x) &= I_0(x) [1 + \gamma(x) \cos(\phi(x) + \psi_3)]. \end{aligned} \tag{2}$$

ここで、 $I_0(x)$ 、 $\gamma(x)$ はそれぞれ各点での平均強度、コヒーレンス係数であり、 $\phi(x)$ はランダムなスペックル位相である。 ψ_1, ψ_3 は求めるべき物体変位に対応する位相である。3 つの方程式に対して 5 つの未知数が存在するので、連立方程 Eq.(2) からただちに I_1, I_3 を解くこと

はできない。そこで I_1, I_3 に対して次のように仮定する。

$$-\psi_1 = \psi_3 = \psi. \tag{3}$$

ここでは ψ を仮想位相と呼ぶことにし、その値は任意に選ぶことができる。このように未知数を見かけ上減少させることにより空間上の各点においてスペックル位相 $\phi(x)$ について解くことができる。Eq.(2) で与えられる 3 つの画像よりスペックル位相は

$$\phi'(x) = \tan^{-1} \frac{I_1(x) - I_3(x)}{I_1(x) + I_3(x) - 2I_2(x)} \cdot \frac{\cos \psi - 1}{\sin \psi}. \tag{4}$$

で与えられる。Eq.(2) の仮定の元に計算されたスペックル位相を“真のスペックル位相”と区別するためにここでは $\phi(x)$ としておき、“計算されたスペックル位相”と呼ぶことにする。我々は、各点におけるランダムなスペックル位相 $\phi(x)$ の具体的な値は知らないが、その統計的特性は非常に良く知っている⁹⁾。すなわち、スペックル位相の確率密度関数 $p(\phi)$ は次式で与えられるように $-\pi$ から π にわたって一様に分布する。

$$p_\phi(\phi) = \frac{1}{2\pi}, \quad (-\pi < \phi \leq \pi). \tag{5}$$

このような性質を持つスペックル場は十分発達したスペックル場と呼ばれ、スペックルパターンの明暗の程度を表すスペックルコントラストは最も大きくなり 1 となる。同時に、その波面は全くランダムとなりスペックル位相は一様に分布するのである。スペックル理論によるとそのようなスペックル場の発生に必要な条件はレーザーで照射される粗面の表面粗さが光の半波長程度かそれ以上であることが要求されるだけである。植物はもとより通常の身の回りの物体の多くはこの条件を満たしている。この条件よりも表面粗さが小さい場合スペックルコントラストは 1 より小さい値を取る。このようなスペックル場は未発達なスペックル場と呼ばれており、物体の表面粗さおよび表面高さ変動の相関長（横方向の粗さ）や用いられる光学系の詳細なパラメータに複雑に依存することが知られている^{10,11)}。しかしながら、表面粗さの条件が満たされると、Eq.(5) で与えられる特性は極めて高い精度で成り立つ。

一方、未知の物体位相 ϕ_1, ϕ_3 はいかなる値も取りうるので Eq.(3) の仮定は一般には成り立たず不合理な仮定であ

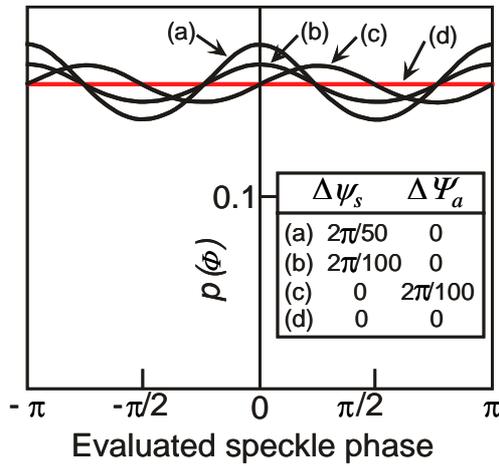


Fig.2 Effects of symmetrical $\Delta\psi_s$ and antisymmetrical $\Delta\psi_a$ phase terms on the probability density distribution of the evaluated speckle phases. (a) $\Delta\psi_s=2\pi/50$ and (b) $2\pi/100$, and antisymmetrical phase term for (c) $\Delta\psi_a=2\pi/100$ on the PDF $p_\phi(\phi')$ of evaluated speckle phase ϕ' . $p_\phi(\phi')$ becomes uniform when (d) $\Delta\psi_a=\Delta\psi_s=0$.

る。したがって、Eq.(4)で与えられる計算されたスペックル位相は真のスペックル場の位相とは異なっている。計算されたスペックル位相の確率密度関数 $p(\phi')$ は確率変数 ϕ から ϕ' への変換として次式を計算することにより容易に見い出される。

$$p_{\phi'}(\phi') = p_\phi(\phi) \left| \frac{d\phi(\phi')}{d\phi'} \right| \tag{6}$$

図2に理論計算結果の1例を示す。ここでは、見通しをよくするため物体位相 ψ_1, ψ_3 の仮想位相からの偏差を対称位相項 ψ_s および反対称位相項 ψ_a を用いて表している。すなわち

$$\psi_1 = -\psi - \Delta\psi_s + \Delta\psi_a, \tag{7}$$

$$\psi_3 = \psi + \Delta\psi_s + \Delta\psi_a. \tag{8}$$

である。図2から $\psi_a = 0$ あるいは $\psi_s = 0$ のとき、本来 ϕ から ϕ' において一様に分布すべきスペックル位相の確率密度が不均一に分布することがわかる。特に、波長の100分の1の比較的小さな位相成分でさえ顕著な影響を与えていることは注目し得る(図2(b)と(c))。それでは、本来一様に分布する真のスペックル位相の確率密度分布を基準として未知の物体位相 ψ_1, ψ_3 あるいは ψ_s, ψ_a を決定することができないであろうか。三角関数の直交性を利用して、計算されたスペックル位相の確率密度分布から \cos^2 および \sin^2 成分を抽出し、これらから未知の物体位相 ψ_1, ψ_3 に対して一意な解を見い出すことが可能である^{2,6)}。我々の目的は逐次

取り込まれた干渉画像における物体位相を全て決定することであるが、これは3つの画像の組み合わせを換えながら同様な処理を繰り返すことによりおこなわれる。

確定的な手法である従来法においては干渉計測精度の向上とは確定的な波面を導入し、あらゆる誤差や揺らぎを排除して精密に制御することであり、要求される精度が高くなるにしたがって技術的にもコスト的にも大きな問題となる。さらに、高精度化を達成する技術は用いられる光学系や要求精度に強く依存し一様ではない。これに対して統計的干渉法では位相の基準をスペックル場の完全なランダムさに求めている。すなわち、単に光学的に粗い表面をレーザー光で照射することにより位相の基準が自然に作り出されるのである。十分発達したスペックル場は一種の飽和した状態であるため、その特性は光学系に用いられるレンズや鏡などの光学素子の面精度には依存せず安定した位相の基準として用いることができる。

統計的干渉法では単に確率密度関数を求める際に用いられるデータサンプル数が計測精度を決定する。計算機シミュレーションによると、約3万点のデータを用いることにより $1/1000$ の精度が達成されることがわかる。今日では数百万画素のCCDカメラの利用も可能であり、さらに高い精度での計測も可能である。

3. 植物の生長計測

これまでに統計干渉法を用いて金属などの材料の変位、熱ひずみなどの測定に応用し、その有効性を確認してい

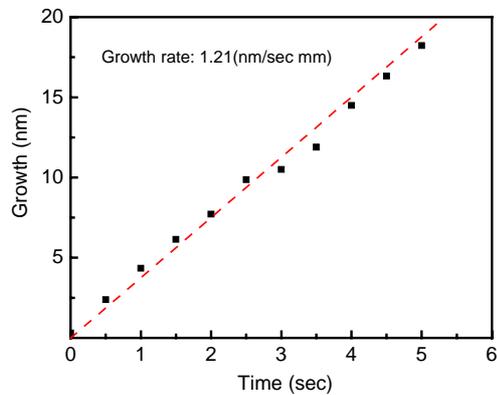


Fig. 3 Growth of Scallion. Growth rate over 5.5 sec is 1.21 (nm/sec mm)

る⁵⁻⁷⁾。図3に植物試料としてニラを用いた場合の生長測定結果を示す。この場合2つの照射ビーム間隔は3.12mmであり、葉の端から1cmおよび5cmの場所で測定を行った。画像取り込みのフレームレート1fpsで数秒間にわたり成長による伸びを測定した。図からわかるように、成長速度は葉の先端から1cmでは18.8nm/sec、5cmでは7.2nm/secであり、葉の先端部分の成長速度が約2.6倍早いことがわかる。これは葉の生長点が先端部分にあることから理解できる。

植物生長の定量計測法として従来より用いられている方法は植物の乾燥重量による方法である。これは、数日間から数週間かけて植物の重量を量る方法である。すなわち、この間の積分値としてしか植物の挙動が観測されない。あるいは顕微鏡とビデオシステムを用いればさらに短時間の生長の様子を観察できるが、これとて顕微鏡の回折限界を超えて植物の微小な挙動を観察することはできない。しかしながら、図3の実験で示したように、極めて高感度な統計的干渉計測法を用いることにより、ビデオシステムのフレームレートで決まる高い時間分解能でサブナノメートルスケールの植物の挙動が観測可能である。植物の計測にこのような高感度なツールが存在しなかったため、統計干渉法を用いることによりこれまで観測されたことのない興味深い植物の挙動が種々観測可能となった。

図4に日照条件に対する植物の成長速度の反応を示す。実験では植物としてニラを用いて80,000Luxの蛍光灯照明を2時間ごとにon/offを繰り返した。当初の照明なしの状態では平均成長速度1.3nm/secであったが照明をオンにすると急激に植物が生長(伸張)しはじめ平均成長速度4.9nm/secとなっていることがわかる。このような植物生長の光に対する俊敏な反応は我々の予想を裏切るものであったが、この挙動が、光合成→炭水化物生産→細胞分裂→生長のメカニズムによるかどうかは時間応答があまりにも早いため疑問が残る。詳細については専門家の分析にゆだねたい。

我々は現在この統計干渉法を用いて、環境汚染が植物に与える影響の計測を試みている。ここでは、光化学オキシダントの主要物質であるオゾンの植物の生長に与える影響を計測した例を示す。植物サンプルとしてはヤブ

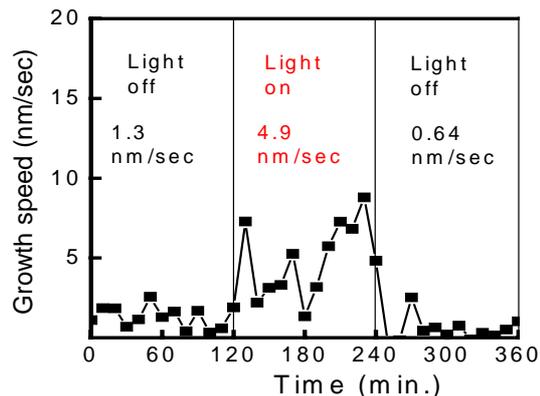


Fig. 4 Variation of the growth speed of Liriope platyphylla under the switching of light radiation to the plant.

ランを用いて0.06ppmから10ppmのオゾンに暴露し生長に与える影響を観測した。図5に日本の光化学オキシダント注意報が発令される基準値である0.12ppmおよび非常に高濃度な例であるが5ppmのオゾン濃度に対する生長速度変化を示す。各点での生長速度は10秒間に渡り20フレームを取り込み算出した。これを15分間隔で暴露前後でそれぞれ2時間および6時間半に渡り観測した。Time<0のオゾン暴露前では平均生長速度2.1nm/secであった生長速度が暴露開始後約1時間で0.48nm/secと約23%に大きく低下していることがわかる。この他特徴的なことは、暴露前の健康な状態では生長速度は一定ではなく大きく揺らいでいることがわかる。この揺らぎは計測精度の不安定性ではなく、健康なサンプルでは必ず観測される挙動である。著者が知る限り植物のこのような短時間での挙動は知られておらず、植物の生命活動の基本的性質を映し出しているのではないかと考えてい

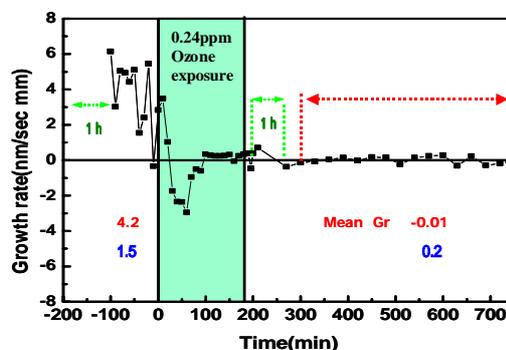


Fig. 5 Measured growth rate of scallion leaf before and after exposure of 0.24ppm ozone for 3hours

る。生長速度ゆらぎの標準偏差で見ると暴露前には1.3nm/secであったが暴露後では0.48nm/secと大きく低下している。高濃度の5ppmに対しては暴露開始後わずか15分後には伸長が負に転じていることがわかる。これは、細胞から水分が抜けることにより一時的に収縮が起こっていると考えられる。現在、植物のオゾンストレスの指標として生長速度ゆらぎに注目し、研究を進めているところである。

4. むすび

本稿では、高感度な統計的干渉法を用いて植物の生長計測を行った。これにより、秒オーダーでの植物の挙動を観測することができ、これまでに知られていない植物の世界が見えてきた。植物の成長速度が絶えず揺らいでいることもその一例であり新たな発見である。我々は本手法を用いて、環境汚染が植物に与える影響を知り、さらには植物を通じた環境センシングへと発展させたいと考えている。

計測法そのものについて言えば、干渉計測に限らず、一般に計測において統計を用いると聞くとどのような印象を持たれるだろうか。おそらく多くの読者は、測定システムが不安定であったり、ノイズが多すぎるための苦肉の策として多数回の測定を行い統計を用いて力づくで値のバタツキを押さえ込むと言うようなネガティブなイメージを持たれるのではないだろうか。しかしながら、ここで述べた計測法はランダムさそのものが本質的な役割を果たしている。この点が従来の計測法と決定的に異なる点であり、今後このような視点の元に新しい計測法が開拓されることを期待している。

参考文献

- 1) P. Hariharan: *Optical Interferometry*, Academic press, Inc. (1985).
- 2) H. Kadono, and S. Toyooka: "Statistical interferometry based on a statistics of speckle phase," *Opt. Lett.*, **16-12** (1991), 883-885.
- 3) 門野博史: スペックル干渉計における液晶位相シフターの較正法, *光学*, **20-5** (1991), 273-274.
- 4) H. Kadono, S. Toyooka, and Y. Iwasaki: "Speckle

shearing interferometry using a liquid crystal cell as a phase modulator," *J. Opt. Soc. Am*, **A8**(1991), 2001-2008.

- 5) 門野博史, 豊岡了: 統計的干渉計測法による高精度変位計測, *光技術コンタクト*, **32-5**(1994), 17-23.
- 6) H. Kadono, Y. Bitoh, and S. Toyooka: "Statistical interferometry based on fully developed speckle field: An experimental demonstration with noise analysis," *J. Opt. Soc. Am A*, Vol.18, (2001), 1267-1274
- 7) H. Kadono, H. Kitajima, and S. Toyooka: "Thermal strain measurement of joint materials over a small spatiol region using statistical interferometry," *Proc. 18th Congress of the International Commission for Optics*(1999)741-742
- 8) H. Kadono, T. Nakamura, K. Matsui, and S. Toyooka, "Monitoring of biological activity and growth of plants using laser speckle techniques", *Proc. VII International Conference on Optics within Life science* (2003)(In press).
- 9) Dainty, J. C., ed.: *Laser speckle and related phenomena*, Springer-Verlag, Berlin(1975).
- 10) H. Kadono, and T. Asakua: "Statistical properties of the speckle phase in the optical imaging system," *J. Opt. Soc. Am.* **A2** (1985), 1787-1792
- 11) H. Kadono, N. Takai, and T. Asakua: "Statistical properties of the speckle phase in the diffraction region," *J. Opt. Soc. Am.* **A3** (1986), 1080-1089.