

令和元年6月10日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04976

研究課題名(和文) 微分位相コントラスト超解像顕微鏡の開発とその応用

研究課題名(英文) Development of differential phase contrast super resolution microscope and its application

研究代表者

居波 渉 (INAMI, Wataru)

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号：30542815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：光の回折限界を超えた空間分解能を有する電子線励起超解像顕微鏡に微分位相コントラスト法を導入し顕微鏡像のコントラストを向上させることができた。微粒子の観察結果より、単一検出器を用いた場合より、分割検出器を用いた微分位相コントラスト像の方が高いコントラストが得られた。また、シミュレーション結果でも同様の結果を得た。無染色のHeLa細胞の観察においては、単一検出器では、ほとんどコントラストがなく何も見えないが、分割検出器の場合は、コントラストが改善されて、構造を観察することができた。このように、開発した微分位相コントラスト超解像顕微鏡は、高いコントラストで観察像を取得できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光の回折限界を超えた空間分解能を有する微分位相コントラスト超解像光学顕微鏡を開発した例はほとんどない。そのため、本顕微鏡は、顕微鏡の観察できる対象を拡大するものであり、これまで利用できなかった様々な分野に進出できる。微分位相コントラスト超解像光学顕微鏡は、細胞に染色などの操作を加えずに、よりそのままに近い状態の試料を超解像観察することができる。そのため、本顕微鏡は、幹細胞応用研究や創薬の分野に大きく貢献する。

また、工業分野にも応用展開が可能である。ブレンドした高分子材料の相分離やタンパク質などの結晶化の機構解明への応用にも期待できる。

研究成果の概要(英文)：The differential phase contrast method was introduced into an electron beam excitation assisted super resolution optical microscope to improve the contrast of the microscope image. From the observation results of the small particles, the differential phase contrast image with the split detector provided higher contrast than the image with a single detector (conventional method). In addition, same results were obtained from simulation results. When unstained HeLa cells were observed, the image has very low contrast with single detector, but with split detector the image contrast was improved and the structure was observed. Thus, it was found that the developed differential phase contrast super resolution optical microscope can obtain an image with high contrast.

研究分野：顕微光学

キーワード：微分位相コントラスト法 超解像顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

無色透明で透過光に対して位相変化のみを与える位相物体である細胞の観察には位相差顕微鏡が幅広く用いられている。しかし、位相差顕微鏡の空間分解能は光の回折限界により制限されている。そのため、より細かい構造やその動きについて解析することはできなかった。本研究では、微分位相コントラスト超解像光学顕微鏡を開発し、この問題を克服する。

空間分解能の高い顕微鏡には、環境制御透過型電子顕微鏡、X線顕微鏡、超解像蛍光顕微鏡がある。環境制御透過型電子顕微鏡とX線顕微鏡は非常に高い空間分解能を有しているが、電子線やX線の照射による試料へのダメージが避けられない。近年開発された超解像蛍光顕微鏡は光を用いているが、試料を蛍光染色する必要がある。

試料を染色することなく観察できる光学顕微鏡には、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、ラマン顕微鏡、デジタルホログラフィー顕微鏡などがある。しかし、これらの手法の空間分解能は、光の回折限界によって制限されている。無染色の試料を観察可能で、観察による試料ダメージがなく、光の回折限界を超えた空間分解能で細かい構造を明瞭に観察できる顕微鏡はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光の回折限界を超えた空間分解能を有する微分位相コントラスト超解像光学顕微鏡の開発である。その光学系を構築し、その結像特性を明らかにし、位相物体である細胞を高感度、高分解能で観察できるようにする。さらに、本顕微鏡を高分子化学や結晶学分野などに応用展開し、その有益な点や改善点を検討する。

3. 研究の方法

電子ビームを用いた超解像光学顕微鏡に分割型検出器を導入した微分位相コントラスト法の光学系のシミュレーションを行い、光学系を設計する。そして、実際に電子ビームを用いた超解像光学顕微鏡に分割検出器を導入し、微分位相コントラスト超解像顕微鏡を構築する。それを用いて、シリカの微小球を観察し、微分位相コントラスト像を得ることができることを示す。さらに、空間分解能や位相の検出感度について測定する。また、細胞を観察し、微分位相コントラスト超解像顕微鏡の有効性を示す。

4. 研究成果

(1) 微分位相コントラスト超解像顕微鏡の構築

電子ビームを用いた超解像光学顕微鏡は、下部の走査型電子顕微鏡と上部の光学顕微鏡から構成される。微分位相コントラスト用の分割検出器は光学顕微鏡の上部に設置する。また、上部の光学顕微鏡の対物レンズの瞳面を分割検出器の受光面に結像するようにレンズを追加した。さらに、分割検出器の中心と光軸を調整できるようにした。分割検出器には、微弱な光を検出可能な4チャンネルのマルチアノード光電子増倍管(浜松ホトニクス社製)を用いた。この信号をコンピュータに取り込み、画像を取得するシステムを構築した。マルチアノード光電子増倍管の出力を低雑音アンプ(FEMTO社製)に接続し、各信号を増幅する。増幅した信号は、4チャンネル同時変換可能なアナログ-デジタル変換回路に入力する。取り込んだ信号の差をとり、試料の微分位相コントラスト情報を得ることができる。電子プローブを2次元に走査し、微分位相コントラスト像を得る。

次に構築した微分位相コントラスト超解像顕微鏡を用いて、試料を観察した。図1に(a)単一検出器と(b)分割検出器で取得した顕微鏡像を示す。試料には、直径1マイクロメートルのシリカ粒子を用いた。従来の単一検出器で得られた画像では、1つの明るい粒子が見える。分割検出器を用いた微分位相コントラスト法では、球の中心で白黒が反転していることがわかる。試料のシリカ粒子の頂点で勾配の上り下りが変わるために、微分の符号が反転したためである。図1(b)は縦方向に差分した画像である。横方向に差分すれば、左右方向の微分像が得られる。図1に(c)、(d)に画像(a)と(b)の粒子像の強度プロファイルを示す。図1(c)では、粒子エッジ部で強度が少し低下した後、強度が増加し粒子中心で最大となっている。図(d)では、強度は、はじめ下がり一度ピークを迎えた後、増加し再びピークを迎え、減少する。これは、粒子を微分した強度プロファイルになっている。また、差分検出と単一検出との像のコントラストを比較すると、差分検出による像のコントラストの方が1.4倍程度高くなった。

構築した微分位相コントラスト超解像顕微鏡で画像を取得し、微分位相コントラスト像を得ることに成功し、像のコントラストが向上することを示した。

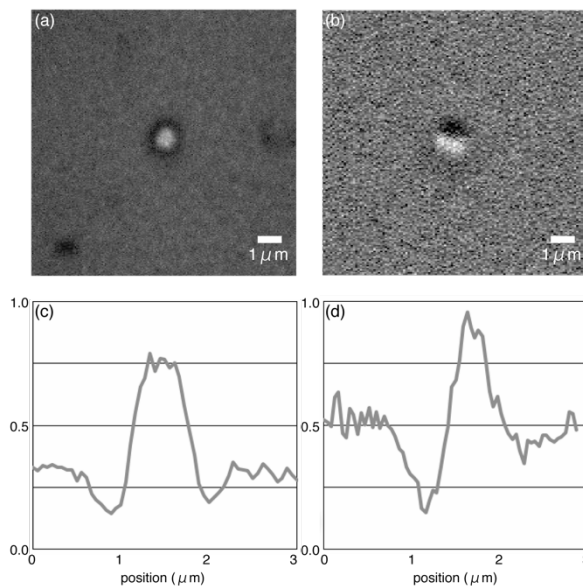


図 1. (a)単一検出器と(b)分割検出器での顕微鏡像の違い。(b)(c)画像(a)と(b)の粒子像の強度プロファイル

(2) シミュレーションによる観察像のコントラスト評価

本顕微鏡の結像特性を解析するため、シミュレーションを開発し、計算結果と実験結果を比較した。計算は、FDTD (Finite Difference Time Domain) 法を用いた。照明光は点光源として、その点光源の位置を走査し、微分位相コントラスト超解像光学顕微鏡像を計算した。試料は水中(屈折率 1.34)のシリカ粒子(屈折率 1.4)とした。図2にシリカ粒子の顕微鏡像のシミュレーション結果を示す。図2(a)は単一検出器の場合、図2(b)は分割検出器の場合である。図2(a)より、単一検出で得られた強度分布は粒子の中心部で一つのピークをもっていることがわかる。図2(b)より、差分検出で得られた像の強度分布では、粒子のエッジ部分で差分信号が強くなっている。また、微分の符号は、左右のエッジで逆転した。そして、粒子のない位置で2つの検出面の光強度の差を取ると、輝度値はゼロになった。これは、実際に構築した微分位相コントラスト超解像光学顕微鏡を用いて取得した画像(図1(a)(b))と一致している。数値計算からも、通常の見視野顕微鏡像と比べて微分位相コントラスト顕微鏡像はコントラストが高いことがわかる。また、粒子とその周囲の屈折率の差が減少したときの、微分位相コントラスト顕微鏡像のコントラストの低下は、通常の見視野光学顕微鏡像に比べ、少ないことがわかった。

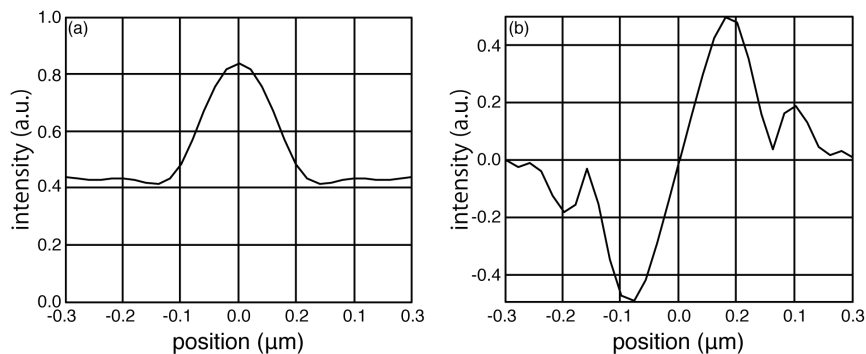


図 2. 微粒子の顕微鏡像のシミュレーション結果(a)単一検出器、(b)分割検出器

(3) 無染色細胞の観察

無染色 HeLa 細胞を開発した微分位相コントラスト超解像光学顕微鏡で観察を行った。液中観察は細胞と液体との屈折率差が小さい。差分検出を用いることで像のコントラストが改善し、より微細な変化を可視化することが可能となる。

蛍光膜である酸化亜鉛は細胞に対して毒性を持つ。そのため、細胞を培養する側の反対側に酸化亜鉛を製膜した窒化シリコン基板を用いた。HeLa 細胞は PBS 溶液中に設置した。PBS の屈折率は 1.33 から 1.36 である。また、細胞の屈折率は 1.36 から 1.40 であるため屈折率差は 0.1 以下となる。図3に HeLa 細胞の観察結果を示す。図3(a)は単一検出器の場合、図3(b)は分割検出器の場合である。分割検出と単一検出により取得した観察像を比較すると、分割検出器により得られた画像の方が高コントラストであることがわかる。単一検出では検出できない細胞構造を分割検出器の場合は可視化することができた。

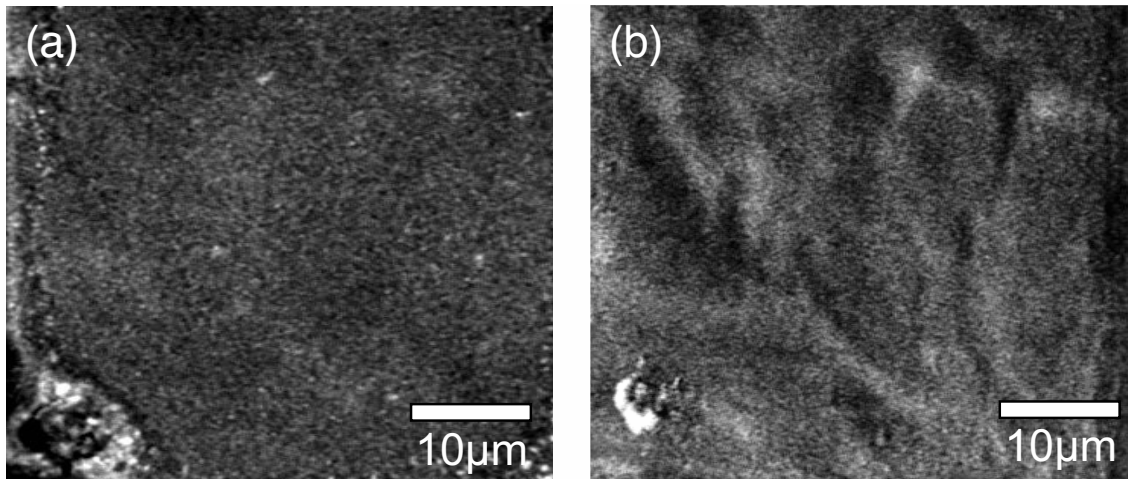


図 3. HeLa 細胞の観察結果. (a) 単一検出器、(b) 分割検出器

(4) まとめ

光の回折限界を超えた空間分解能を有する電子線励起超解像光学顕微鏡に微分位相コントラスト法を導入し顕微鏡像のコントラストを向上させることができた。微粒子の観察結果より、単一検出器を用いた場合より、分割検出器を用いた微分位相コントラスト像の方が高いコントラストが得られた。微粒子の微分位相コントラスト像は、粒子のエッジ部分に信号のピークがある。このピークの符号は、左右のエッジで逆転した。そして、粒子のない位置で2つの検出面の光強度の差を取ると、輝度値はゼロになった。また、シミュレーション結果でも同様の結果を得た。無染色の HeLa 細胞の観察においては、単一検出器では、ほとんど何も見えないが、分割検出器の場合は、コントラストが改善されて、構造を観察することができた。このように、開発した微分位相コントラスト超解像光学顕微鏡は、高いコントラストで観察像を取得できることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Mykyta Kolchiba, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, “Highly luminescent YAlO₃: Gd³⁺ thin films as a nanoscale optical source for super-resolution bioimaging”, 査読あり, Optical Materials Express, Vol.9, No.4, pp. 1803-1814 (2019).
2. 川田善正, 居波涉, “電子線励起による超解像バイオイメージング”, 査読あり, レーザー研究, Vol. 46, No. 9, pp. 500-505 (2018).

[学会発表] (計 7 件)

1. Mykyta Kolchiba, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, “Highly luminescent YAlO₃:Gd³⁺ thin films as a nanoscale optical source for super-resolution microscopy”, The 5th International Symposium toward the Future of Advanced Researches (2019).
2. 居波涉, “極薄蛍光体薄膜を用いた超解像光学顕微鏡”, 日本材料学会第 52 回生体・医療材料部門委員会 (2019).
3. 渡辺一翔, 居波涉, 川田善正, “差分検出による EXA 顕微鏡像のコントラスト向上”, 日本光学会年次学術講演会(OPJ) (2018).
4. Mykyta Kolchiba, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, “Fabrication of YAlO₃:Gd³⁺ Thin Films for Nanoimaging”, FiO+LS (2018).
5. 渡辺一翔, 居波涉, 川田善正, “分割ディテクターを用いた EXA 顕微鏡の観察像の高コントラスト化”, ナノオプティクス研究グループ・第 24 回研究討論会 (2017).
6. 渡辺一翔, 居波涉, 福田真大, 川田善正, “差分検出による EXA 顕微鏡の観察像のコントラスト向上”, レーザー学会中部支部 2016 年度若手研究発表会 (2017)
7. 渡辺一翔, 居波涉, 福田真大, 川田善正, “差分検出による EXA 顕微鏡の観察像のコントラスト向上”, 第 11 回情報フォトンクス研究会関東学生研究論文講演会(2017).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし
6. 研究組織
なし

(2) 研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。