

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19560041  
 研究課題名（和文） 生体に優しいレーザースペckル顕微鏡の開発  
 －蛍光に依らない細胞観察法の完成－  
 研究課題名（英文） Development of laser-speckle microscopy for a harmless biological observation - maturity of non-fluorescent laser microscopy -  
 研究代表者  
 平川 靖之(HIRAKAWA YASUYUKI)  
 久留米工業高等専門学校・電気電子工学科・准教授  
 研究者番号：80238344

研究成果の概要：本研究は、蛍光に依らない生体顕微観察を実現できるレーザースペckル顕微鏡の開発を行った。その結果、観察光学系、レーザー照射光学系それぞれについて最適条件が明らかになったと共に、レーザースペckル像の画像処理方法としては、差分法を基礎とするGD法が最適であることも分かった。また、照射レーザーとしては、分解能を上げる観察の場合には短波長光源を、詳細な生体活動可視化に重点を置く場合には、近赤外光源が好ましくことも明らかとなった。レーザー光源については、用途に応じて波長を変えられることが好ましいため、その光源として波長可変プラスチックレーザーの開発にも取り組み、専用励起源のマイクロチップ YAG レーザーの開発も行い、励起に必要な高調波発生の準備まで整った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 応用光学・量子光工学

キーワード：レーザースペckル、レーザー顕微鏡、生体観察、非侵襲観察、可視化、解析・評価、バイオ機器

## 1. 研究開始当初の背景

現在、医療分野等で多用されているレーザー顕微鏡観察では、蛍光タグを付けるなどの煩雑な前処理やタグ自身の毒性による細胞への悪影響、タグ自身の物理的な大きさによる観察系への影響、フェムト秒レーザー光集光による光損傷などが懸念されている。また、位相差・微分干渉顕微鏡は、細胞の外観が強調される顕微鏡であり、その形状をオペレータが主観的に評価し、細胞培養を行っている

のが現状である。一方、レーザースペckル顕微鏡は、細胞や組織に前処理を施す必要は一切ない上に、光強度による悪影響もなく、細胞や組織の「生（なま）」の状態をそのまま評価できる、他の顕微鏡にはない特徴を有する。本顕微鏡を細胞活動状態の評価に適用できる可能性は、これまでの研究により示すことができたものの、顕微鏡の装置構成・スペckル画像処理法等に課題が残っていると同時に、適用できる範囲に関しても未知の

領域が多く、本顕微鏡の研究をより発展させる際の障害となっている。これらの基礎となる点を明確にすることで、本顕微鏡の研究をより発展させたいと常々強く考えていた。

## 2. 研究の目的

レーザースペックル顕微鏡は、単一細胞の状態をレーザースペックルにより評価でき、生物顕微鏡であれば、全てレーザースペックル顕微鏡として構成できるユニークな顕微鏡である。試料である細胞・組織に関しては、蛍光ではなく、散乱光の干渉現象を観察するため、細胞等に対して何も有害な前処理を施す必要がないため、試料に対して非常に優しい観察法である。本研究では、具体的な以下の課題、

- ・最適な光学系の決定、
- ・最適なCCDカメラの解像度の決定、
- ・最適なスペックル画像処理法の決定、
- ・最適なレーザーの検討、
- ・実験データの蓄積

を解決し、レーザースペックル顕微鏡を、将来的な臨床分野等への適用を目指した生体細胞・組織のリアルタイムモニタリング法として確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は以下の手順で行った。

(1) 最適な光学系・解像度については、数種類の対物レンズを用意し、カメラについては、通常利用していた30万画素CCDカメラに加え、130万画素CMOSカメラを準備して検討を行った。

(2) 最適なスペックル画像処理法については、これまで利用してきた高速Fourier変換(FFT)法と差分を基本としたGeneralized Difference(GD)法の詳しい比較を行った。

(3) 最適なレーザーについては、最適波長について調べた後に、どのようなレーザーが最適化について検討した。

(4) 実験データの蓄積については、数種類の試料について、データの蓄積を行った。

## 4. 研究成果

実験装置は、図1に示す通りで、本研究では図中の赤い文字で示された箇所について、主に研究を行った。

### (1) 光学系と解像度に関して

観察の妨げとなる振動を取り除くための

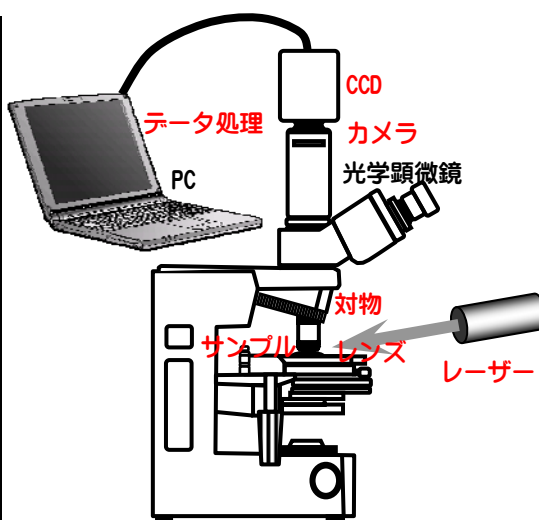


図1 実験装置

光学除振台を用意し、対物レンズとしては、10×、20×、40×の3種類を試した。その結果、組織観察の場合には、広い領域も観察するため、40×よりも20×の方が好ましいが、単一細胞観察の場合には、40×以上の倍率が好ましいことが分かった。倒立顕微鏡で観察する場合には、水浸レンズが液面での照射レーザー光の散乱に影響されずに、観察が容易になること、通常のレーザー顕微鏡のように、観察軸と同軸上に照射レーザーを入射すると、レーザースペックルは観察されるものの、背景が強くなり、肉眼での観察には向かないことが分かった。また、撮像素子については、130万画素のCMOSカメラを用意し、ソフトウェア上で解像度を調整することで、解像度の効果を検討したが、どの程度の解像度が最適であるかは、観察対象の注目している部位の寸法等により、一義的には決められず、対象によって、適宜使い分けるのが最適であることが分かった。

光学系については、具体的なサンプルに対する条件についても検討した。大腸菌懸濁液を観察する場合に、うまくレーザースペックル像が得られず、照射条件が不明であった。そこで、懸濁液のどの位置にレーザーを照射すればよいのか調べたところ、顕微鏡の焦点よりも下側100~200 $\mu\text{m}$ の位置にレーザー光を照射し観察することで、均一なレーザースペックルが観察でき、懸濁液の評価を行いやすくなった。

### (2) 画像処理法に関して

従来の解析は、高速Fourier変換(FFT)を利用した方法を用いていたが、レーザーが強くと当たっている部位が、過大に評価されてしまう等の問題があった。この点を解決するために、動画の各フレーム間の差分を取ることに伴った評価法が、FFTによる方法の問題を解決できるとともに、より高速に解析できること

も明らかとなった。表には、この2つの手法にかかる時間を計測・比較した結果を示す。この手法は、詳しく調べてみると、Generalized Differences (GD)法の中で、データに重みをつけない最も簡単な手法として報告されていることも分かった。

表1 2つの手法による処理時間の比較

フレーム数 [frames]	処理時間 [s]	
	FFT 法	差分法
64	63.99	12.38
128	77.08	22.55
256	98.10	43.19
512	145.47	86.00
1024	241.50	170.00

### (3) 照明光源用レーザー

波長可変プラスチックレーザーを光源として利用できるよう、その励起源であるマイクロチップ YAG レーザーの開発を九州大学の興の指導の下で行った。波長 810 nm、平均出力 7 W、繰返し周波数 110 Hz の半導体レーザー光の 500 μs の矩形波パルスで励起したところ、波長 1320 nm でのロングパルス発振を確認した。出力は 50 mW であった。この状態で過飽和吸収体を挿入し、Q スイッチ発振を試みたところ、パルス幅 20 ns のパルスが発生したことを確認した。この時の先頭出力は、約 1.5 kW であった。図には装置構成と計測したパルス波形を示す。この状態を最適化することで、高調波発生は容易に達成できると期待され、プラスチックレーザーの励起が可能になると考えられる。

上記 YAG レーザー開発に加え、今回は最適波長について3種類の波長 (405, 635, 780 nm) で照射して比較を行った。その結果、理論通りにレーザーस्पекルの縞模様はレ

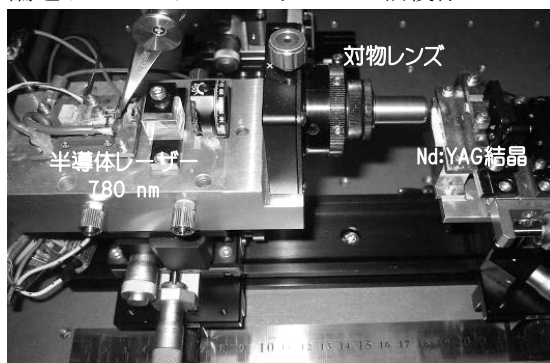


図2 開発を行ったプラスチックレーザー励起用マイクロチップ YAG レーザー

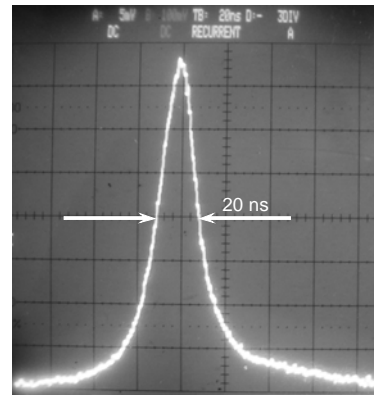


図3 YAG レーザーパルス波形

ーザー波長に比例して細かくなり、紫色レーザーを用いることで実質的な分解能を上げることはできるが、生態活動の様子を詳細に観察するには、生態の透過率の高い、赤外レーザー光の方が好ましいことが分かった。その結果を図4のグラフに示す。

以上の結果から、生体試料を観察するには、近赤外のレーザー光で照射し、赤外カットフィルタを取り除いた CCD カメラで観察するのが最適であることが判明した。

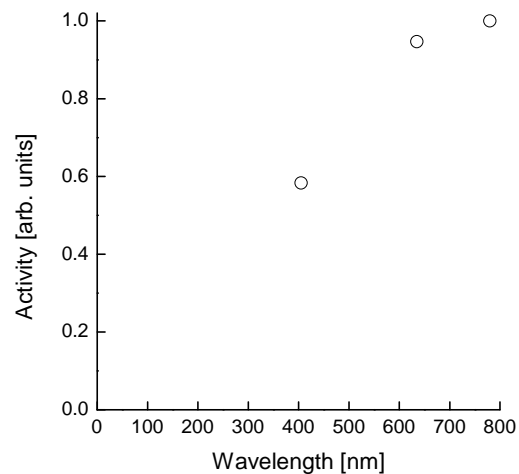


図4 生体活動度評価の波長依存性

### (4) データ蓄積に関して

データの蓄積に関しては、大腸菌懸濁液、従来から行っている植物の観察 (ミューレンベキア、アナカリス、野菜)、細胞に関しては、他大学の協力の下、ヒトの複数種類のガン細胞のデータを蓄積することができた。以下に例として、代表的なレーザーस्पекル像をそれぞれ示す。このように植物などの身の回りの生体から、高度な医学的な研究で用いられるヒトのガン細胞まで、本顕微鏡が適用可能であり、容易に状態評価が可能である潜在能力を示すことができた。

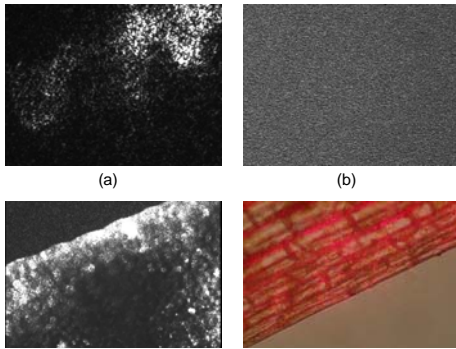


図 5 データ蓄積を行ったレーザースペckル像の典型例。(a)ガン細胞、(b)大腸菌懸濁液、(c)野菜、(d)水草(明視野でレーザー照射も行った像)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

平川靖之，「レーザースペckル顕微鏡による生体細胞・組織活動のイメージング」，日本レーザー医学会誌，第 28 巻，pp. 129-135，2007 年

Yasuyuki HIRAKAWA，Yusukem MATSUKI，“Living Plant Observation by Laser Speckle Microscopy”，the Review of Laser Engineering (APLS The Review of Laser Engineering Supplemental Volume 2008)，36，pp. 1355-1357，2008.

[学会発表] (計 5 件)

阿比留巧，山下智也，平川靖之，下川優子，中畠裕之，稲井龍二，小野守，「レーザースペckル顕微鏡の物質評価への適用」，第 13 回高専シンポジウム，2008 年 1 月 26 日，福岡県久留米市。

荻原怜央奈，玉川克樹，平川靖之，鴨川周幸，興雄司，「波長 1320nmNd:YAGマイクロチップレーザーの開発」，第 13 回高専シンポジウム，2008 年 1 月 26 日，福岡県久留米市。

平川靖之，山下智也，下川優子，中畠裕之，「レーザースペckル顕微鏡の細菌数密度評価への適用の検討」，レーザー学会学術講演会第 28 回年次大会，2008 年 1 月，愛知県名古屋市。

Yasuyuki Hirakawa，Yusuke Matsuki，“Living Plant Observation by Laser Speckle Microscopy”，The 6th Asia Pacific Laser Symposium，Jan. 31st，

2008，Nagoya，Japan.

三好憲雄，福永幸裕，平川靖之，「レーザースペckル顕微鏡で見た、5-ALA 投与ヒト前立腺癌由来培養細胞の損傷変化」，第 18 回日本光線力学学会，2008 年 6 月 15 日，愛知県名古屋市。

[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]

研究室ウェブサイト

[http://apollo.cc.kurume-nct.ac.jp/~hirakawa/world/Lab\\_Files/index.html](http://apollo.cc.kurume-nct.ac.jp/~hirakawa/world/Lab_Files/index.html) (データ更新中)

本研究がきっかけとなって、同じ久留米地区の研究者と共同研究の話が持ち上がり、21 年度から研究を行う予定である。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

平川 靖之(HIRAKAWA YASUYUKI)

久留米工業高等専門学校・電気電子工学科・准教授

研究者番号：80238344

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

興 雄司(OKI YUJI)

九州大学・大学院システム情報科学研究所・准教授

研究者番号：10243908

### (4)研究協力者

三好憲雄(MIYOSHI NORIO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40209961

福永幸裕(FUKUNAGA YUKIHIRO)

福井大学・医学部・博士研究員

研究者番号：80503812