

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34412

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12769

研究課題名（和文）実時間コンフォーカル位相差顕微鏡の開発と組織細胞観察

研究課題名（英文）Development of real-time confocal phase-contrast microscope and observation of tissue cells

研究代表者

日坂 真樹（Hisaka, Masaki）

大阪電気通信大学・医療健康科学部・教授

研究者番号：40340640

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：現代においても先端かつ重要な基礎研究分野として位置付けられている位相差顕微鏡観察法は、近年、iPS細胞などの細胞をを活きたまま観察できる手法として特にその重要性が増しています。本研究では、組織細胞の吸収像や透明な屈折率画像を同時に観察でき、さらにレンズによる画像の歪みや細胞内での光の多重散乱の影響を低減した3次元構造観察が可能な新しい共焦点位相差顕微鏡の開発を進めてきました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

共焦点位相差顕微鏡は、フリー空間における空間周波数抽出フィルタを適用することで、観察試料の位相構造のみを選択的に観察することができます。さらに、画像再生に必要な回折光のみを効率的に抽出することで、組織細胞内で生じる多重散乱光の多くを除去できる特徴を持ちます。この顕微鏡は、iPS細胞観察だけでなく、表層組織および表層近傍に発生した癌細胞などの早期発見にも適用可能な新しい医療診断機器として期待できます。

研究成果の概要（英文）：Phase-contrast microscopy is regarded as an advanced and important basic research field. In recent years, it has become especially important as a method to observe cells, such as iPS cells, while they are still alive. In this study, we have developed a new confocal phase contrast microscope. This microscope enables simultaneous observation of absorption and transparent refractive index images of tissue cells, and also reduces the effects of lens-induced image distortion and multiple scattering of light within the cells.

研究分野：医用光学

キーワード：位相差顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体組織の光学顕微鏡観察は組織細胞の吸収構造や屈折率構造を観察でき、生物学・医学での組織観察や臨床検査における重要な組織評価法として使用されている。2014年には「超高解像度の蛍光顕微鏡開発」の研究がノーベル賞を受賞し、光学顕微鏡は現代においても学術的に先端かつ重要な研究分野の1つとして評価されている。

(2) 近年、iPS細胞（人工多能性幹細胞）や細胞シートを評価するための位相差観察法の重要性が増し、デジタルホログラフィック顕微鏡やヒルベルト位相顕微鏡などの開発が積極的にされている。そのような状況の中で、動的輪帯照明と能動的画像処理とを融合した新しい原理に基づく顕微鏡が生田^[4]によって考案された。この顕微鏡は傾斜照明と輪帯絞りを用いて結像光の一部を制限し、抽出フィルタによる能動型画像処理を適用することで、① 観察試料の振幅と位相コントラスト像の分離観察、② 球面収差等の回転不変型収差の無収差観察、③ 光散乱や高次回折光による非線形結像光の低減・除去、などの特徴を有しており、この特徴は医用光学や生体医学の分野で大きく貢献できると期待されている。

(3) 本手法は、傾斜照明による位相物体の回折特性の差異を積極的に利用し、フーリエ空間で空間周波数抽出フィルタを適用することで屈折率構造のみを選択的に分離観察できる点にある。従来の位相差顕微鏡では、弱屈折率構造をコントラスト像として可視化できるが、吸収構造および屈折率構造を分離観察できない。また、散乱性の強い生体組織観察において、8の字状周波数フィルタで画像再生に必要な線形結像光のみを抽出することで多重散乱光や高次回折光の多くを除去可能な点にも大きな特徴がある。このような中で、輪帯照明を用いたコンフォーカル位相差顕微鏡は、レーザー光源を用いた位相構造観察を実現でき、この新しい位相差顕微鏡は医学や生物学の分野のみでなく、物理学や工学においても新しい技術開拓として学術的に意義が高いと期待される。

(4) 3次元位相差構造観察は、観察が難しいバルク材料深部の屈折率構造も観察でき、新しい位相構造の可視化技術として産業的にも意義がある。本顕微鏡の開発は、これまで生体組織の光計測では難しい厚い生体組織の光学的構造観察の可能性もあり、再生したiPS細胞評価はもとより、組織表層深部に発生した癌細胞などの早期発見や早期診断が可能となる新しい医療診断機器の開発に貢献できると期待されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、高速な能動型画像処理を用いた実時間コンフォーカル位相差顕微鏡の構築を目指し、さらにコンフォーカル位相差顕微鏡の3次元結像特性を実験的に評価することを目的として研究を開始した。そのため、実験用システムを構築するための新しい光源および検出器の開発を実施し、構築システムによる評価実験を試みた。

3. 研究の方法

(1) 高速能動型画像処理を用いたコンフォーカル位相差顕微鏡の構築

能動型画像処理を用いた走査型位相差顕微鏡の光検出システム前面にピンホールを組み込み、輪帯照明を用いた共焦点位相差顕微鏡[図1]を構築する。輪帯に射出したレーザーを高開口数の乾燥系対物レンズで試料に円環照射し、試料からの射出光を輪帯絞り付き対物レンズでピンホール上に結像し、ピンホールからの透過光が形成する円環状光強度分布を円環状光検出器で撮像する。観察試料をピエゾ素子でxy面走査しながら円環状光強度分布を撮影し、多方向の傾斜照明画像を描出する。画像処理装置で2次元8の字状位相抽出フィルタで試料の位相コントラスト像を再生する。

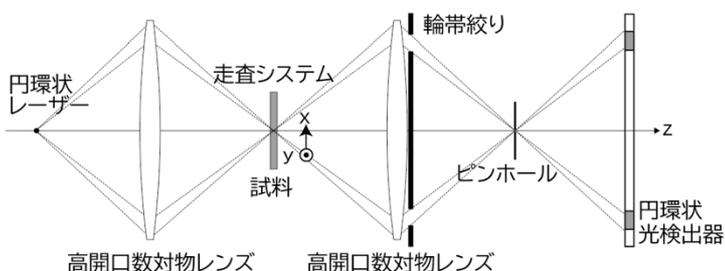


図1. コンフォーカル位相差顕微鏡の実験光学系

(2) 円環状RGBレーザー光源システムの構築と円環状高速光検出器アレイの試作

走査型顕微鏡の1つであるコンフォーカル位相差顕微鏡の実時間観察を実現するために、2次元ガルバノミラーによる輪帯状集光ビームの高速走査システムを構築する。さらに、観察試料の定量位相観察を実現するために、光源の多波長化を検討する。さらに、円環状光検出器基板を設計し、高速走査された試料からの透過回折光を高速検出可能なSiフォトダイオードによる60ch

円環状光検出アレイを製作し、試作したコンフォーカル位相差顕微鏡に組み込む。

(3) 弱位相構造を持つ微粒子試料を用いた試作顕微鏡の性能評価

顕微鏡用油浸オイルの屈折率に近い直径 $1\ \mu\text{m}$ 以下の標準微粒子を油浸オイルに埋包し、無染色弱位相微粒子に対する位相コントラスト像から試作顕微鏡の位相点像分布の特徴を評価する。また同時に試作顕微鏡で吸収構造を観察し、位相構造試料に対する吸収点像分布の特徴も合わせて評価する。微小球に対する面内および光軸方向の空間分解能を実験的に評価し、特に共焦点化に伴う深さ方向の点像特性を明らかにすることを検討する。

(4) 試作システムによる弱位相構造を持つ生体組織の画像観察

お椀型 8 の字形状の 3 次元位相抽出フィルタで試料の線形結像成分を選択的に抽出し、多重散乱による非線形結像光を除去する。厚さ $1\ \text{mm}$ 程度厚の組織試料から透過した光から微弱な線形結像成分のみを抽出し、位相画像と多重散乱光の除去性能を評価する。

4. 研究成果

(1) 顕微システム用の円環状 RGB レーザー光源システムを構築した。RGB レーザーには MEMS 技術を用いたレーザー走査モジュールを導入した [図 2(a)]。このレーザーモジュールは、静電駆動式 2 軸ラスタースキャンミラーで輝度変調された RGB レーザーを結合する。このレーザーモジュールは輝度 $23\ \text{lm}$ 、コントラスト $80,000:1$ の表示性能を持つ。このモジュールを Windows 版 LabVIEW から制御するために、シリアル通信で連動させた。LabVIEW からの制御で円環状レーザーの大きさや色を制御可能である。この円環状レーザー光を構築したレンズ系で観察試料に照射するように設計した。

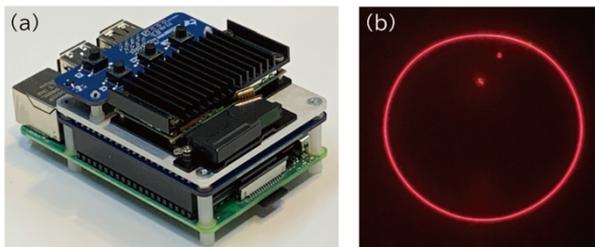


図 2. (a) 円環状 RGB レーザー光源 と (b) 赤色円環状レーザー光源

(2) 顕微システム用の円環状光検出システムを開発した。円環状光検出器に使用した検出素子には、大きさ $15\ \text{mm} \times 2.7\ \text{mm}$ 、受光部の大きさは $6.0\ \text{mm} \times 1.0\ \text{mm}$ 、感度波長 $340\sim 1100\ \text{nm}$ の Si フォトダイオードを選定した。この素子を図 3 に示すように中心角度 6° の間隔で 60 個配置することで、60ch 円環状光検出器を製作した。また、観察試料からの傾斜した射出透過光を効率よく検出するために、回路基板に対してフォトダイオードを 33° 傾けて配置した。また、円環状の射出透過光を効率よく検出するために、基板の中心部に近い位置にフォトダイオードを配置した。検出システムを評価すると、60 素子からの光検出信号を順次計測できた。しかしながら、各素子の校正用回路を実装していないため、測定信号の均一性を調整することはできなかった。また、光検出器と増幅器の入力端子との間に距離があり、微弱光に多くの雑音が重畳した。

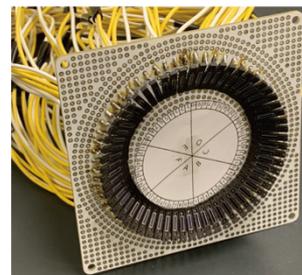


図 3. 円環状 Si 光検出器

(3) 円環状レーザーと円環状光検出システムを走査型位相差顕微鏡システムに導入した。光検出器前面にピンホールを組み込み、輪帯照明を用いた共焦点位相差顕微鏡を構築した。輪帯絞りを取り付けた高開口数の乾燥系対物レンズで輪帯照射した射出レーザー光を輪帯絞り付きの同一の対物レンズでピンホール上に結像し、透過光が形成する円環状光強度分布を円環状光検出器で計測することを試みた。しかし、一様光に対して、60ch の素子感度の不均一性により、円環状光強度分布に均一でない分布が生じた。一方、各光検出器の補正係数を数値化したため、信号補正は可能であった。

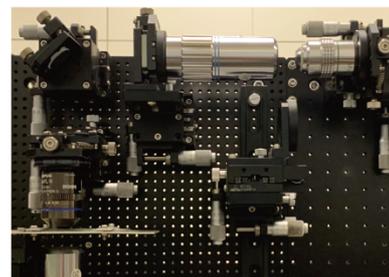


図 4. 構築した実験光学システム

(4) システムによる画像再生を実現するために、微粒子試料を用いた 60 方向の傾斜照明画像の撮像を試みた。光検出感度不足の影響もあり、雑音が主の取得画像となり、画像再生は実現しなかった。光検出回路および増幅回路の再検討を試みたが、現状、解決には至らなかった。

引用文献：

[1] T. Ikuta: An aberration-free imaging technique based on focal depth extension, J. Electron Microsc., **47**, pp. 427-432 (1998)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masaki Hisaka
2. 発表標題 Phase-contrast optical microscopy using active image processing
3. 学会等名 BISC2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日坂真樹
2. 発表標題 動的ホローコーン照明を用いた位相差顕微鏡
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第41回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Masunari and Masaki Hisaka
2. 発表標題 Optical microscopy using annular full-color LED for quantitative phase and spectroscopic imaging of biological tissues
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference (BISC 2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増成 太郎, 日坂 真樹
2. 発表標題 表面実装型円環状RGB LED光源を用いた位相差顕微鏡の開発
3. 学会等名 Optics & Photonics 2019 (OPJ2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増成 太郎, 日坂 真樹
2. 発表標題 60分割表面実装型円環状フルカラーLEDを用いた生物組織細胞の観察
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------