

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390088

研究課題名(和文) 広視野かつ深さ識別が可能な生体深部のラベルフリー反射型光学顕微鏡

研究課題名(英文) Wide-field, depth-resolved, label-free optical microscope in biological cells

研究代表者

渡邊 歴 (Wataru, WATANABE)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：90314377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会において健康状態を維持しQOLの向上を目指すためには、病気を未然に防ぐ技術やその兆候を早期に診断する技術の確立が急がれている。本研究では、広視野かつ高い空間分解能をもつ光学顕微鏡の構築を目指し、光源であるLEDアレイ、液晶プロジェクタの点灯パターンの変更により明視野像、暗視野像、差分位相コントラスト像を取得し、細胞の深さの識別を行い、分光情報の取得することができた。

研究成果の概要(英文)：An active illumination microscope provides simultaneous acquisition of multi-contrast images such as bright-field, dark-field, and differential phase-contrast using various illumination patterns. We experimentally demonstrate the multi-contrast images of cells. The multi-contrast images of structural modifications were obtained by changing illumination patterns with an LED array and a projector for microscopic contrast enhancement. We present a method to obtain bright-field, dark-field, and DPC images and to discriminate depth structures by controlling spatial coherence of light sources. We acquired bright field, dark field, and DPC of biological cells as well as spectroscopic images and fluorescence images.

研究分野：応用光学

キーワード：光学顕微鏡 LEDアレイ 傾斜照明 マルチコントラスト像

### 1. 研究開始当初の背景

社会において健康状態を維持し QOL(Quality of Life)の向上を目指すためには、がんなどの病気を未然に防ぐ技術やその兆候を早期に診断する技術の確立が急がれている。また、うつ病・痴呆等に代表される精神疾患・記憶障害の解明のためには、脳や臓器の深部を観察する技術が望まれている。光を用いたイメージング技術は、非侵襲のイメージング手法として有望である。現状では、光学システムの収差、生体組織の散乱により、組織深部の観察が難しい。光による生体イメージングへの応用を鑑みると、拡散トモグラフィ、光干渉トモグラフィ(Optical Coherence Tomography; OCT)、共焦点顕微鏡、非線形光学顕微鏡などの研究が行われている。しかし、広視野かつ高い空間分解能、特に、深さ分解能を有する顕微鏡の取り組みはほとんどなされていない。本研究では、生体深部のイメージングを目的に、広視野かつ深さ識別が可能な光学顕微鏡を実施する。

### 2. 研究の目的

高齢化社会において健康状態を維持し QOL の向上を目指すためには、病気を未然に防ぐ技術やその兆候を早期に診断する技術の確立が急がれている。光を用いたイメージング技術は、高い空間分解能と高い時間分解能を併せ持つ。近年、生体組織の構造や特性を高速で観察する必要性が求められている。従来の光学顕微鏡では目的に合わせた試料の観察を行うために異なる顕微鏡を用いる必要や、同一の顕微鏡において光学部品を変更する必要がある。例として明視野顕微鏡、暗視野顕微鏡、位相コントラスト顕微鏡などがあげられる。それらの観察を高速で行うために LED アレイ顕微鏡が提案されている。LED アレイ顕微鏡を用いて観察した場合、明視野像、暗視野像、位相コントラスト像の取得が一つの光学系で可能であり、低コスト化などが期待できる。本研究では、生体深部のイメージング技術の確立を目的に、広視野かつ深さ分解能を有する位相差顕微鏡に関する研究を行った。

### 3. 研究の方法

光学顕微鏡において、光源となる LED アレイ、あるいは、液晶プロジェクターの点灯パターンを時間的、空間的に制御することにより、照明方法を変化させることができる。試料への照明角度を変えることにより、様々な観察が可能である。例えば LED アレイの中央部分(図 1(a))を点灯させることにより、明視野像を得ることができる。また、LED アレイの周辺部分(図 1(b))を点灯させることにより、暗視野像を得ることができる。LED アレイの中央付近を左右に分け、LED アレイの左側を点灯させた場合(図 1(c))に撮像素子で取得する光強度を  $I_L$ 、同様に右側を点灯させた

場合(図 1(d))に撮像素子で取得する光強度を  $I_R$  とする。明視野像の光強度  $I_{BF}$  は、

$$I_{BF} = I_R + I_L \quad (1)$$

である。また、差分位相コントラスト像の光強度  $I_{DPC}$  は、

$$I_{DPC} = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L} \quad (2)$$

から計算することができる。LED アレイの左右を点灯させた場合の 2 枚の画像から水平方向の差分位相コントラストを得ることができる。同様に、LED の中央付近の上下に分けて(図 1(e)、(f))点灯させた場合に得られる 2 枚の画像により、垂直方向の差分位相コントラスト像を得ることができる。この様に LED アレイの点灯パターンを時間的に変化させ、実時間で明視野像、暗視野像、差分位相コントラスト像の取得が可能である。

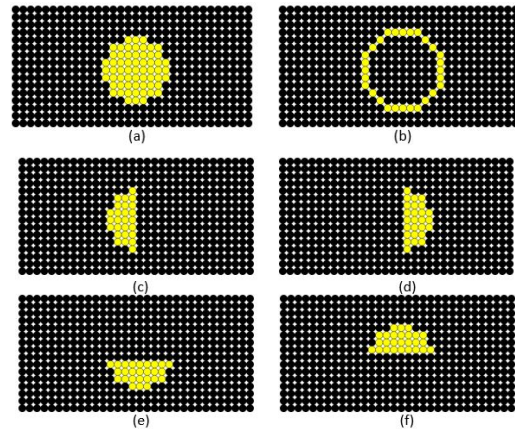


図 1 マルチコントラスト像取得用 LED 点灯パターン

- (a) 明視野観察 (b) 暗視野観察
- (c)、(d) 左右差分位相コントラスト観察
- (e)、(f) 上下差分位相コントラスト観察

### 4. 研究成果

試料(タマネギの表皮)を LED アレイ顕微鏡を用いて観察した結果を図 2 に示す。図 2 より対物レンズの倍率が 10 倍と 20 倍と 50 倍において明視野像、暗視野像、差分位相コントラストの観察が可能であることがわかる。

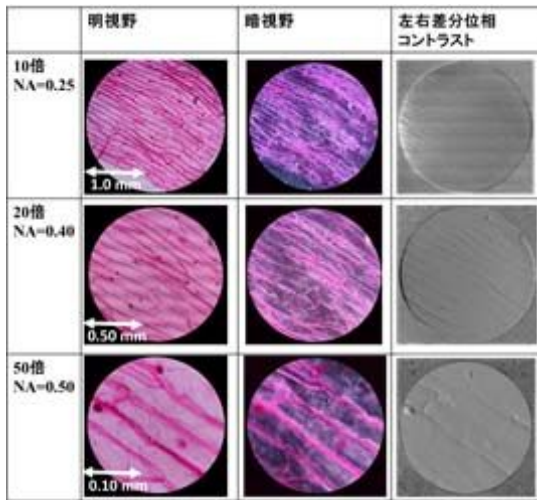


図2 LED アレイスマートフォン顕微鏡によるマルチコントラスト画像

LED アレイを光源に用いた光学顕微鏡において、明視野像、暗視野像、位相差情報の形状情報だけでなく、試料の蛍光像を取得し生体組織の形態情報、機能情報の同時取得を行った。LED アレイの点灯パターンを制御して得られた明視野像、暗視野像を図3(a)、(b)に示す。また式(2)から計算して得られた差分位相差像の結果を図3(c)に示す。試料は植物細胞を用いた。また試料を染色後、高輝度LEDを試料に照射により得られた蛍光像を図3(d)に示す。

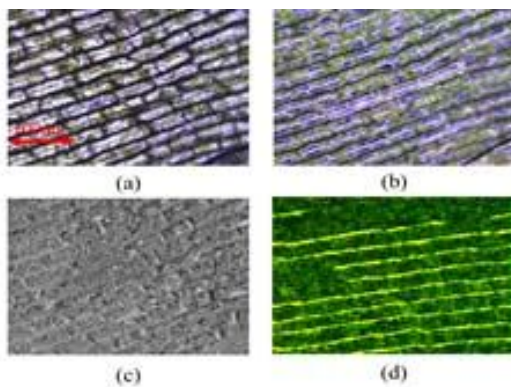


図3 (a) 明視野像、(b) 暗視野像、(c) 差分位相差像、(d) 蛍光像

マルチコントラスト像と同時に分光画像を取得し、試料の吸収情報の取得を試みた。液晶チューナブルフィルターを用いて光源から照射される光の帯域幅を制限した。明視野観察用照明において液晶チューナブルフィルターを用いて、中心波長を選択した。中心波長450 nm、550 nm、650 nmの分光画像を図4(a)、(b)、(c)に示す。中心波長を選択すること

で、試料の分光画像を取得し、また点灯パターンを制御することにより、マルチコントラスト像を取得することができた。

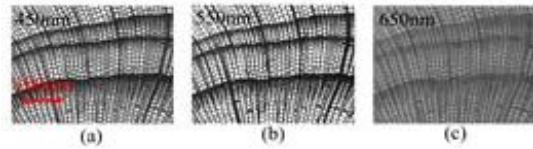


図4 中心波長(a) 450 nm、(b) 550 nm、(c) 650 nmの分光画像

光源に液晶プロジェクターを用い、マルチコントラスト像を取得した。犬の毛の明視野観察結果を図5に示す。円の直径を図5(a)では1cmとし、図5(b)では5cmとした。赤い丸で囲われているゴミは、毛から約150μm離れている。低い空間コヒーレンスをもつ照明を試料に施すことにより、試料の深さ方向の分離を行うことができることがわかる。

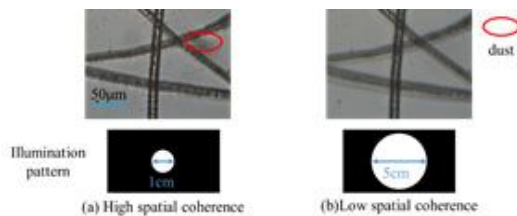


図5 液晶プロジェクターのパターンの制御による空間コヒーレンスの制御

次に、フェムト秒レーザーによりガラス内部に構造変化を誘起し、構造の明視野観察、暗視野観察および差分位相差観察の結果を図6に示す。平行に並んだ散乱性のダメージが誘起された線加工部と屈折率変化が誘起された線加工部により構成される。空間コヒーレンスにより深さの識別が可能である。また、暗視野像、差分位相差像により、散乱性ダメージと屈折率変化を識別することが可能である。

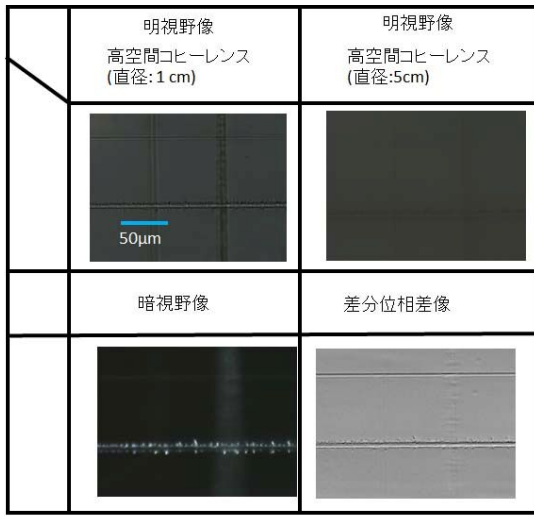


図6 パルスレーザーによりガラス内部に加工した構造変化のマルチコントラスト像。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 5件)

鳧田智基、有本英伸、渡邊 歴、カラーLED アレイ顕微鏡を用いたマルチコントラスト像と分光画像の取得、レーザー学会第37回年次大会、2017年1月7日、徳島大学、徳島市

横江遼太、渡邊 歴、DLP プロジェクターを用いた空間コヒーレンス制御可能なマルチコントラスト顕微鏡、OPJ2016 - Optics & Photonics Japan 2016、2016年11月2日、筑波大学東京キャンパス文京校舎、東京都文京区

鳧田智基、渡邊 歴、LED アレイ顕微鏡におけるマルチコントラスト像と蛍光像の同時取得、OPJ2016 - Optics & Photonics Japan 2016、2016年11月2日、筑波大学東京キャンパス文京校舎、東京都文京区

幸田和子、有本英伸、渡邊 歴、近赤外LED アレイ顕微鏡の点灯パターンの制御によるマルチコントラスト像の取得、レーザー学会学術講演会第36回年次大会、2016年1月9日、名城大学、愛知県名古屋市

幸田和子、有本英伸、渡邊 歴、近赤外領域LED アレイ顕微鏡による明視野、暗

視野、位相差イメージング、日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2015、2015年10月28日、筑波大学東京キャンパス文京校舎、東京都文京区

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 歴 (WATANABE, Wataru)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：90314377