

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82675

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21836

研究課題名（和文）データ同化を蛍光顕微鏡イメージングに適用する試み

研究課題名（英文）Data assimilation via fluorescence imaging

研究代表者

渡部 匡己（Watabe, Masaki）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（機構直轄研究施設）・生命創成探究センター・特任准教授

研究者番号：70599480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体細胞内での光の伝播は、電磁力学理論に基づき、屈折や散乱を含む複雑な光学現象として記述される。光線追跡による細胞内での光の伝播は、屈折率や透過・反射の電磁力学的作用に依存し、幾何光学の法則とマクスウェル方程式の近似解から導かれる。しかし、光の干渉や回折などの光学現象は波動力学的であり、特に、光線追跡では波動関数の位相の変動に対応できない。本研究では、近軸波動方程式を用いて、細胞内の屈折率乱流による光伝播の物理プロセスをモデル化し、特に、モデルから導出される数学的特性を利用して、生細胞光学イメージングのデータ解析から細胞内部の光学パラメータを再構築することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、生体細胞内の光伝播の詳細なモデル化とシミュレーションにより、光の干渉や回折といった波動光学現象を解明し、細胞内の光学特性（屈折率、減衰係数など）の測定・再構築を実現した点にある。これにより、生細胞蛍光イメージングデータから、より正確な細胞内の屈折率分布や減衰係数の分布を得ることが可能となった。社会的意義としては、医療画像解析において、より高精度な細胞内観察や診断技術の向上に寄与し、病気の早期発見や新たな治療法の開発に繋がる可能性がある点が挙げられる。

研究成果の概要（英文）：Transport of light through living cells is a complex optical phenomenon involving index refraction fluctuation and scattering (i.e., optical turbulence), treated with electromagnetic mechanical theory, classically. Ray tracing through intracellular media depends on the geometric optic effects of refractive index, transmission, and reflection, which are approximate solutions of Maxwell's equations. However, optical phenomena such as interference and diffraction of light are wave mechanical, and, in the context of intracellular optical turbulence, we expect the phase of wave functions to be significantly involved in biological cell imaging. In this study, we use the paraxial wave equation and then derive intracellular optical properties that interconnect between the phase of wave functions and optical turbulence inside cells. We then demonstrate to directly reconstruct intracellular optical parameters (e.g., refractive index and attenuation coefficient) from live cell imaging.

研究分野：生物物理

キーワード：生物画像シミュレーション 細胞モデリング 光学イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞内のオルガネラや生体分子などの特性や動態を測定するには、GFPなどの蛍光分子を細胞内の生体分子にタグして観測する「蛍光顕微鏡イメージング」がよく使われている。しかし、これらの方法ではタグされた生体分子が存在する領域の要素の分布や動態について知ることはできるが、それ以外の細胞内領域は観測できていないため、その構成要素の分布や動態を解析することはほとんどできていない。また、タグされた生体分子が、どのようにして観測できていない領域に存在する要素と相互作用しているのかは、ほとんど明らかになっていない。

本研究計画書を申請した2019年度の時点では、幾何光学をベースに「データ同化」を実装し、光学顕微鏡イメージングで直接観測できていない細胞内領域の物理情報、特に「屈折率」と「吸収係数」を再構築することを計画していた。しかし、細胞内の屈折率揺らぎと散乱（すなわち、光乱流）の影響による光の伝搬を計算するには、光の波動的性質を含めた計算を実現する必要がある。幾何光学的アプローチだけでは、十分に細胞内の複雑性を加味したデータ同化を実現することにはならない。したがって、本研究では、波動力学をベースにした細胞モデリングを行い、生細胞光学イメージングのデータから細胞内の光学パラメータを再構築するアルゴリズムの開発に焦点を当てた研究にシフトすることにした。このような変更は、これまでの研究で開発している「蛍光顕微鏡シミュレータ」の機能拡張や改良に直接繋がっているため、私の研究テーマの大きな逸脱にはならない。

2. 研究の目的

生体細胞内における屈折率乱流の影響による光の伝播は、一般に電気力学の理論によって記述することができ、光線や電磁波は古典的に扱われる。細胞内媒体を通る光線を追跡するには、媒体の組成と、光の屈折に関するスネルの法則や光の透過と反射に関するフレネルの方程式などの電磁力学的作用に依存する。これらは、時空間的細胞モデリングの限られた波長範囲とボクセルサイズにおけるマクスウェル方程式の近似解であり、特に幾何光学の基本的な法則と原理から導き出されたものにふさわしい。しかし、光の干渉や回折などの光学現象は波動力学的であり、細胞内の光乱流の文脈では、波動関数の位相が生細胞光学イメージングに大きく関与することが想定される。

光場を記述する波動関数の複素振幅は、一般的に「強度」と「位相」の2つの物理量で構成されており、強度（または実振幅）の変動は、人間の目や科学用CMOSカメラなどの感光性検出器によって直接捉えることができるが、位相の変動は、光の散乱や屈折率や光学的厚みなどの目では直接見ることができない空間分布による揺らぎに敏感である。このような位相の変動は、近軸波動方程式から導出できる強度輸送方程式 (Transport of Intensity Equation: TIE) と位相輸送方程式 (Transport of Phase Equation: TPE) に定式化されており、医療画像（例えば、X線CTや光学CT）などの解析によく利用されている。特に、これらの方程式は、波長と中間場（すなわち光子と電子）の強度と位相の変動に依存しており、単色コヒーレント波動関数が近軸方向（z-軸）に沿って伝搬するとき、どのようにして強度分布と位相分布が相互作用しているのかを表現している。

近軸波動方程式は、広い波長範囲にわたる中間場の強度と位相の相互変化を表しており、光学顕微鏡と電子顕微鏡の間に横たわる大きな分解能のギャップを埋める上で重要な役割を果たしている。これまでの定式化では、中間場を記述する複素平面波動関数が自由空間内の任意の位相分布を通して伝搬することを仮定しているため、細胞内部の複雑な屈折率乱流を介した時の波動関数における強度と位相の輸送については、依然として明らかにされていない。本研究では、光が細胞内の屈折率乱流を伝搬する際に関わる物理プロセスをモデル化し、光の伝搬シミュレーションから細胞内の光伝搬の特性を明らかにした。また、モデルから細胞内部の光学特性（屈折率、減衰係数など）の測定や再構成に直結する数学的特性を導き、生細胞蛍光イメージングのデータから細胞内の屈折率分布や減衰係数の分布などの光学パラメータを再構築することに成功した。

3. 研究の方法

ここでは、光が細胞内の屈折率乱流を伝搬する際に関わる電磁気学の原理をベースに光学モデリングを行った。

4. 研究成果

(1) 近軸波動方程式の再公式化からのTIEとTPEの導出

ある波長 λ を持つ中間場に対して、細胞内媒質の複素屈折率分布を用いてエネルギー保存の

法則（すなわち、ヘルムホルツ方程式）を変換させることで近軸波動方程式を再公式化した。複素屈折率の空間分布は、

$$n(r_{\perp}, z) = n_0[1 + \Delta n(r_{\perp}, z) + i\kappa(r_{\perp}, z)]$$

として表現することができ、 n_0 と $\Delta n(r_{\perp}, z)$ は屈折率の平均値、及び、空間ゆらぎを示す。また、虚数項にあたる $\kappa(r_{\perp}, z)$ は、減衰率の空間的分布を示している。この定式化では、波数 $k(=2\pi/\lambda)$ に対して近軸(z-軸)方向に沿った屈折率分布を伝搬する単色コヒーレント波動関数が、

$$\psi(r_{\perp}, z) = A(r_{\perp}, z) e^{ikz}$$

として与えられ、 $A(r_{\perp}, z)$ はスカラー複素振幅を示している。上記の2つの式をヘルムホルツ方程式に代入することで近軸波動方程式を再導出できる。

$$\left[\nabla_{\perp}^2 + 2kn_0i \frac{\partial}{\partial z} + 2kn_0 \frac{\partial}{\partial z} (\beta(r_{\perp}, z) + i\alpha(r_{\perp}, z)) \right] A(r_{\perp}, z) = 0$$

ここでの $\alpha(r_{\perp}, z)$ と $\beta(r_{\perp}, z)$ は複素屈折率に依存する強度の減衰と位相の変動を表している。

$$\alpha(r_{\perp}, z) = kn_0 \int [1 + \Delta n(r_{\perp}, z)] \kappa(r_{\perp}, z) dz$$

$$\beta(r_{\perp}, z) = kn_0 \int \left[\Delta n(r_{\perp}, z) - \frac{1}{2} \kappa(r_{\perp}, z)^2 \right] dz$$

更に、スカラー複素振幅に強度 $I(r_{\perp}, z)$ と位相 $\phi(r_{\perp}, z)$ の関数 $A(r_{\perp}, z) = \sqrt{I(r_{\perp}, z)} e^{i\phi(r_{\perp}, z)}$ を近軸波動方程式に代入し変換することで、TIEとTPEの修正形を導出することができる。

$$\text{TIE: } \frac{\partial I(r_{\perp}, z)}{\partial z} = -\frac{1}{kn_0} \nabla_{\perp} \cdot [I(r_{\perp}, z) \nabla_{\perp} \phi(r_{\perp}, z)] - 2 \frac{\partial \alpha(r_{\perp}, z)}{\partial z} I(r_{\perp}, z)$$

$$\text{TPE: } \frac{\partial \phi(r_{\perp}, z)}{\partial z} = \frac{\partial \beta(r_{\perp}, z)}{\partial z} - \frac{1}{2kn_0} [\nabla_{\perp} \phi(r_{\perp}, z)]^2 + \frac{1}{2kn_0} \frac{\nabla_{\perp}^2 \sqrt{I(r_{\perp}, z)}}{\sqrt{I(r_{\perp}, z)}}$$

TIEの左辺はz軸に沿った強度伝搬を導く近軸方向の強度微分を表し、右辺は近軸方向の強度分布における全エネルギー変動を示しており2つの項からなる。初項は、屈折率と減衰率の空間的位相の変動から生じる強度分散を表し、第2項は不均一媒質における強度減衰（主に、吸収と散乱による）を意味するランベルト＝ベールの法則に関連しており、特に細胞内媒質を進行する中間場のエネルギーの減衰を示している。また、TPEの左辺はz軸に沿った位相伝搬を導く近軸方向の位相微分を表し、右辺は近軸方向の位相分布における変動を示しており3つの項からなる。初項は、屈折率と減衰率の空間的位相の変動から生じる位相伝搬を意味し、第2項と3項は、不均一媒質と独立して生じる位相分布と強度分布の非線形輸送を示している。

(2) 光が細胞内部の屈折率乱流を伝搬する物理プロセスのシミュレーション

細胞内部の複雑な構造は、構成要素が様々な離散的粒子で密に充填され、その表面が押し合って連続した構造を形成しているという仮定のもとにモデル化されることが多い。特に、モデルをミー散乱理論と組み合わせることで、媒質内での波動関数の伝搬を計算することができるが、限られた波長範囲と離散粒子のボクセルサイズにより、伝搬計算に強い制約がかかっている。そのため、これらのモデリングの前提となる仮定を破ることなく、単色インコヒーレントな波動関数と離散粒子間の相互作用から生じる空間揺らぎの計算は、強度輸送理論の微視的レベルでの光の伝搬計算と同列にして比べることはできない。

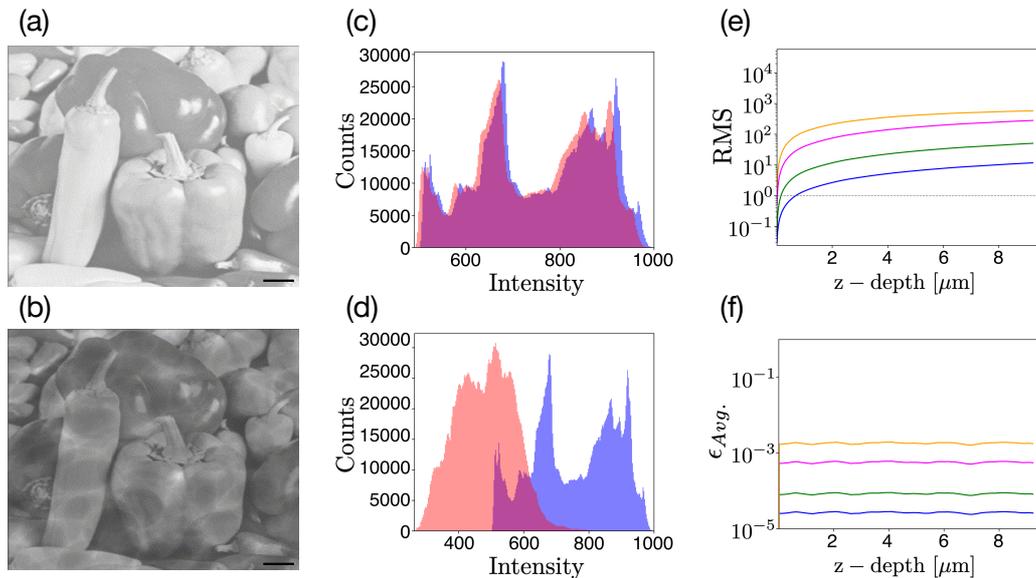


図1. 可視光によるTIEのシミュレーション. 標準画像”Pepper”からなる平面波 (波長 507nm) が、TIE に従って細胞内の光学フラクタルメディア (約 $10\mu\text{m}$) を伝播するプロセスをシミュレーションした結果。(a) 次元が3.25のフラクタルメディアを介したときの強度分布。スケールバーは $1.00\mu\text{m}$ を表す。(b) フラクタル次元が4.00の媒質を介したときの強度分布。(c) フラクタル次元が3.25のときの初期強度分布 (青) と最終強度分布 (赤) のヒストグラム比較。(d) フラクタル次元が4.00のときの強度ヒストグラムの比較。(e) 強度伝搬の距離に対するRMS変動を表している。フラクタル次元が高くなると強度分散も高くなることを示している。フラクタル次元と色の対応: $D_f = 5.00$ (Orange), 4.00 (Magenta), 3.75 (Green), 3.25 (Blue). (f) 伝搬距離に対する相対誤差の変動を表しており、計算が発散することなく安定していることを示している。

波動関数と細胞内の不均一構造との相互作用は、空間的ゆらぎがフラクタルな性質を持つ屈折率分布の乱れに関連している。ここでは、細胞内成分は様々な離散粒子の集合体ではなく、連続的なフラクタル媒体としての細胞モデルを考える。具体的には、フラクタル次元 D_f (通常、複雑さを定量化することによってフラクタルパターンや規則性を特徴付けるための数学的指標を表す) に対して、屈折率ゆらぎの連続ランダム場 $\Delta n(r_{\perp}, z)$ のWhittle-Matérn(WM)共分散関数を用いて、広範囲の波長領域(pm $\sim\mu\text{m}$)における光強度の伝搬シミュレーションの実装を行なった (図1を参照)。TIEのシミュレーションの結果は、成果論文[Watabe, M. et al. Phys. Rev. Research (2023)]を参照。また、強度と位相の同時輸送のシミュレーション結果については、新たに論文を執筆している途中である。

(3) 細胞内の光学パラメータの再構築

モデリングのモチベーションの一つに、細胞内部の光学特性 (屈折率、減衰係数など) の測定や再構成に直結する数学的特性を導くことにある。例えば、近年のバイオイメージングによるTIEを用いた実験的研究[M. Mitome, Microscopy (2021); S. K. Rajput et al. IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron (2021)]では、屈折率乱流をモデル化することなく細胞内の位相分布を再構成している。同様に、2018年のRogersらによる研究では、電子顕微鏡画像などからWM共分散関数と走査型電子顕微鏡画像間のパワースペクトル密度の見かけ上の類似性を検証している[J. D. Rogers et al. IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron (2013)]。これらの検証結果は示唆的で非常に参考になるが、生物顕微鏡イメージングなどによる細胞内の光学特性の定量的な測定には有効ではない。しかし、近軸波動方程式を導出する過程で得られた $\beta(r_{\perp}, z)$ の空間的自己相関を計算することで、生物イメージングにおける定量的な比較・計測を可能にする数学的関係を導き出すことに成功した。

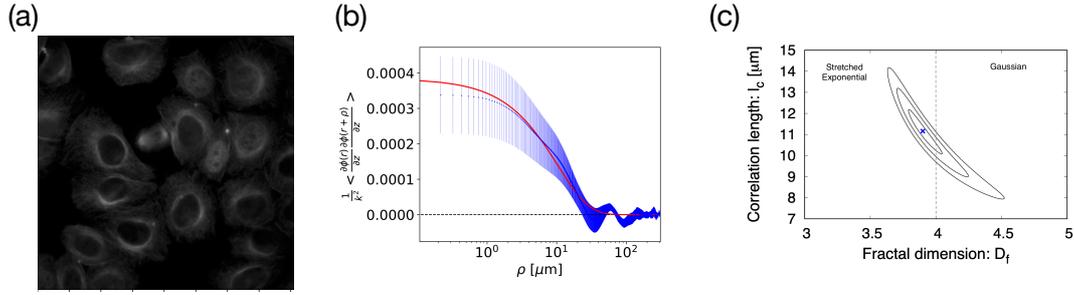


図2. 蛍光画像における位相微分の自己相関解析の結果. (a) HeLa細胞の蛍光画像（提供：大阪大学、平野泰弘）。(b) 位相微分の空間自己相関関数フィッティングの結果：データ（青）関数フィット（赤）(c) フィッティングの結果からフラクタル次元 D_f と相関距離 ℓ_c の χ^2 -マッピング：等高線は、内側から 1σ , 2σ , 3σ の信頼区間を示している。

$$\left\langle \frac{\partial\beta(r)}{\partial z} \frac{\partial\beta(r+\rho)}{\partial z} \right\rangle = (kn_0)^2 B_n(\rho) + \left(\frac{\langle \mu_s(kn_0) \rangle}{\sqrt{2kn_0}} \right)^4$$

右辺の $B_n(\rho)$ は屈折率ゆらぎ場のWM共分散関数を表しており、近軸方向に沿った位相微分自己相関の形状を意味している。二項目のオフセットは平均散乱係数 $\langle \mu(kn_0) \rangle$ によって全体を上下させる。図2に、HeLa細胞の蛍光イメージングにおける位相微分の自己相関解析の結果の一部を載せた。特に、フラクタル次元と相関距離との間に強いパラメータ相関が見られ、フラクタル・パターンのサイズが大きくなると次元が下がる現象を確認した。つまり、相関距離によって強度分散が減少することを示唆しており、非常に強深い結果が得られた。フラクタル解析の詳細は、成果論文を参照。また、局所領域における屈折率乱流場のパラメータ解析の結果については、論文を執筆中である。

(4) 今後の展望

光イメージングによるほとんどの生細胞計測では、経験的（あるいは、帰納的、データ駆動型）アプローチに特化しており、その主な機能は、計測系の光感受性デバイスで捉えた細胞内特性の規則性やパターンを抽出できるようにすることである。これらの規則性は、主に観察可能な細胞内成分の関数として、ネットワークモデルに定式化されることが多い。しかし、実際の細胞内イメージングでは、不均一な細胞内構造を通過する光の伝搬と変動は、光の波長だけでなく、屈折率、光学的厚さ、減衰係数などの細胞内光学特性にも依存しているため、細胞モデルが観察過程を通じて保存されるのか破れているのかどうかの疑問が残る。本研究により、基礎光学の観点から、新たな問いに光を当てるとともに、特に、細胞内光学特性の不均一な空間分布によって引き起こされる光散乱とゆらぎを含んだ光学計算の方法を確立することに成功した。具体的な顕微鏡シミュレータの実装は、今後の研究に持ち越すことになったが、生物画像シミュレーションの更なる発展と拡張につながる確実な成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaki Watabe, Yasuhiro Hirano, Atsuko Iwane, Osamu Matoba and Koichi Takahashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Optical dispersions through intracellular inhomogeneities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physical Review Research	6. 最初と最後の頁 L022043-1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevResearch.5.L022043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaki Watabe
2. 発表標題 Physical constraints to phase retrieval using the transport of intensity equation in fluorescence microscopy imaging
3. 学会等名 The 1st Conference for Sensing and Imaging Through Scattering and Fluctuating Field in Biol- ogy, Telecommunication and Astronomy (SI-Thru2022)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Watabe
2. 発表標題 一分子イメージングにおけるコロナグラフ的解析
3. 学会等名 第6回「散乱透視学」領域会議（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Watabe
2. 発表標題 現象論的細胞モデリング
3. 学会等名 ExCELLSセミナー（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------