

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18076

研究課題名(和文) 培養細胞観察のための光学式機械物性顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of an Optical-Based Mechanical Properties Microscope for Observing Cultured Cells

研究代表者

田村 和輝 (Tamura, Kazuki)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：40822614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体の「硬さ」を軸にした疾患評価が臨床で使われている。一方、基礎研究に目を向けると、細胞や組織オーダーで簡単に硬さを計測する手法が少ない。我々は、既存の光学顕微鏡を用いて簡単な硬さ計測を実現するために、光学的な加振と振動計測を組み合わせた硬さ顕微鏡の開発を目指している。本研究では、光学的な振動計測を光干渉計によって実現するために、偏光マイケルソン干渉計と偏光サニアック干渉計を構築し、光学的加振によって生じるパルス振動を計測可能であることを示した。得られた成果をもとに、細胞計測用の二次元計測を高速・正確に実現することを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、生体計測における硬さ計測の簡便化に寄与し、非侵襲かつ簡便な計測の実現に貢献すると考えられる。また、本研究で使用した光加振と光振動計測を組み合わせた手法は、レーザー超音波技術として1980年代に大規模構造物向けに開発された技術である。本研究の成果は、従来よりも小さなエネルギーでかつ顕微鏡観察下の小さなサンプルに対して当該技術を応用する基盤となり得る。よって、今後微細構造等へのレーザー超音波技術の応用に活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Clinical evaluations of diseases based on the "stiffness" of living tissues are commonly used. However, in the field of basic research, there are few simple methods for measuring the stiffness of cells and tissues. We aim to develop a stiffness microscope that combines optical excitation and vibration measurement to achieve simple stiffness measurements using existing optical microscopes. In this study, we constructed a polarization Michelson interferometer and a polarization Sagnac interferometer to realize optical vibration measurement through optical interferometry. We demonstrated that it is possible to measure pulse vibrations induced by optical excitation. Based on these findings, we aim to achieve high-speed and accurate two-dimensional measurements for cell analysis.

研究分野：計測工学

キーワード：計測工学 生体計測 光音響効果 熱弾性波 硬さ計測 レーザー超音波

1. 研究開始当初の背景

超音波診断装置や MRI を用いた”硬さ”を軸にした疾患評価方法が臨床で幅広く行われている。近年、粘性と弾性を区別して評価精度を高める試みが報告されている。しかし、これらの評価は cm オーダーの空間分解能しか持たず”硬さ”と”病変進行”の本質的な理解が困難である。細胞スケールの硬さに注目した研究では、がん化や多機能幹細胞の分化に関係する硬さの変化について研究が進められているが、計測系の制約から繰り返し長期間での計測が難しい。特に最終的にヒトに移植されることが前提である多機能幹細胞研究では、分化誘導の過程で染色を行うことができず微分干渉像や位相差像などの形態情報による観察や、一部をサンプリングして品質を管理する必要がある。よって今後の再生医療産業の発展には形態情報以外の情報を非侵襲的に、大量に収集することが求められる。

2. 研究の目的

本研究プロジェクトの目的は、非侵襲的な計測が難しかった細胞スケールの機械物性をベンチトップでかつ生物学者にとって簡単に計測可能な計測システムを構築し、生物分野の研究者に提供可能な状態にすることである。この成果により、硬さを軸にした基礎研究が盛んとなり、硬さが新たな視点として生体の状態を評価し研究の発展に貢献することが期待できる。

簡便な硬さ計測の実現のために機械物性計測を構成する加振と振動計測を光学的手法に置き換え、細胞培養用顕微鏡の視野内を計測する。図1は光学的にサンプルの硬さ(固有音響インピーダンス, $z = \text{縦波音速} \times \text{密度}$)の計測方法を示す。加振レーザー(ナノ秒パルスレーザー)は基板表面(境界A)で光音響波(PA波)の波源を形成する。PA波は基板を厚み方向に伝搬し基板とサンプルの境界面(境界B)で反射する。境界面で反射した波は再び基板を厚み方向に伝搬し、基板の表面に面外振動を起こす。面外振動は光干渉計の観測光を使って検出される。境界面Bで発生する反射波の振幅と位相はサンプルと基板の複素固有インピーダンスの比で決定されるため、固有音響インピーダンスが既知な基板を使うことでサンプルの固有音響インピーダンスを得る。

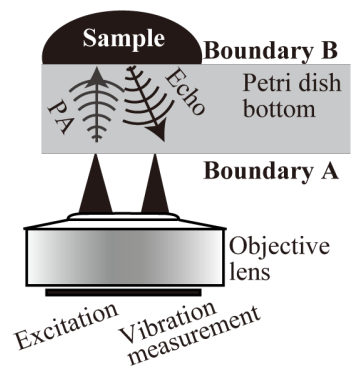


図1：硬さ計測手法

本研究期間では光学的に振動を検出する光干渉計を構築し光学的加振に利用する光音響波の検出を実現する。

3. 研究の方法

光音響波の伝搬によって生じるパルス状の微小変位を計測するための光干渉計を構築する。特性の異なる偏光マイケルソン干渉計と偏光サニャック干渉計を構築した。

偏光マイケルソン干渉計(図2)はレーザービームを試料と参照鏡の方向に分け、反射波の位相差を検出する。マイケルソン干渉計は試料の光路と参照鏡の光路が独立しているため、外乱の影響を受けやすい弱点がある。光源は633 nmの連続波レーザーを使用した。

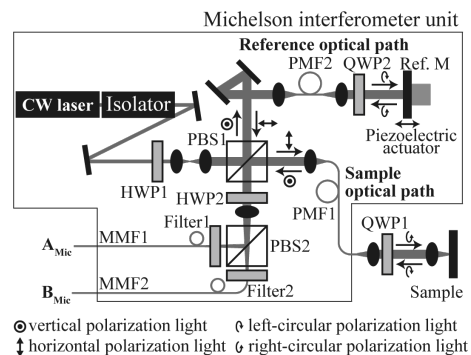


図2：偏光マイケルソン干渉計

偏光サニャック干渉計(図3)はループ状の光路を作り、同一の光路を異なる順番で計測光を伝搬させる。光源(488 nm 連続波レーザー)から出力された光は、直線方向(Optical path 1)とその直交方向(Optical path 2)に光路に分岐する。直線方向の光に注目すると試料で反射してPBS2に戻る。戻ってきた光は偏光素子によって偏光方向が異なるためPBS2で方向が変えられ、Optical path 2を通過して出力される。つまり光路を時計回りに伝搬していることから、時計回り伝搬と同時に反時計回り伝搬も存在し、二つ光路の伝搬時間差が干渉計の出力となる。偏光サニャック干渉計の出力はサンプルが静止している時に一定の干渉光を出力し、変位速度に関係した干渉光を出力する。光路差を使ってハイパスフィルタを構築するイメージで、環境的な低周波振動の影響を光学的に打ち消すことができる。

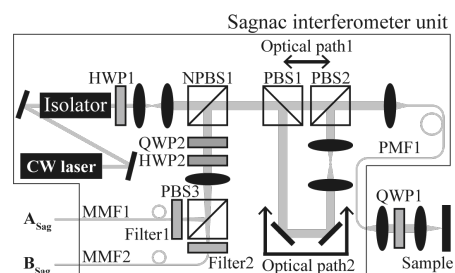


図3：偏光サニャック干渉計

試料を加振用のパルスレーザーと顕微鏡用対物レンズでは挟む透過配置で試料を厚さ方向に伝搬する縦波を計測した. 図4に実験の概略図を示す. 熱弾性波の励起には 527 nm のナノ秒パルスレーザーを使用し, 凸レンズ ($f = 100$ mm) でサンプル表面に収束させた. サンプル表面の光エネルギーは $16 \mu\text{J}/\text{pulse}$ でパルス繰り返し周期 2 kHz で, サンプルに照射した. サンプルは厚さ 1 mm のポリスチレン板 (縦波伝搬速度: 2330 m/s) で作られた水槽である. 図5は光音響効果を生じさせるためのサンプルで, 熱弾性波を効率よく発生させるために, 黒色のインク, シリコンエラストマー, アルミニウムホイルで構成されている. シャーレ底部上面で発生した熱弾性波が底部下面まで伝搬し, 底部下面に面外変位が発生したことをマイケルソン干渉計とサニャック干渉計で計測した.

光干渉計は市販の倒立光学顕微鏡のカメラポートに偏波保持ファイバを使って結合した. 光学顕微鏡に入射した計測光は対物レンズによってサンプル表面に収束された. 各光干渉計の光源の出力は対物レンズから射出した光が 1.4 mW となるように調整した. 干渉計の出力はマルチモードファイバを使って光電変換器に入射し差分増幅された. 光電変換器の差分出力は低雑音増幅機で再び増幅された後に, デジタルオシロスコープで収集された.

4. 研究成果

偏光マイケルソン干渉計と偏光サニャック干渉計を構築し, 光音響波の検出に成功した. 図6は RF_{Mic} と RF_{Sag} の計測結果を示す. パルスレーザーが照射されたタイミングを基準に 16, 32, 100 回の加算平均化をして得られた結果を図6(a)と(b)に示す. 各干渉計で現れた負のピークのタイミングは平均回数によらず一致した. RF_{Mic} の負のピークは $423\sim 429$ ns の間に現れ(図6(a)), サニャック干渉計による対応する負のピークは $412\sim 414$ ns の間に現れた(図6(b)).

干渉光の DC 成分とサンプルの変位によって生じた信号の振幅の比からサンプルの最大変位は 0.0087×10^{-6} , 最大変位速度は 415 ns で 0.04 m/s と見積もられた. 偏光マイケルソン干渉計のピーク周波数は約 7.6 MHz (-6 dB 帯域幅は 5.1-14.3 MHz) だった. 偏光サニャック干渉計のピーク周波数は約 11.0 MHz (-6 dB 帯域幅は 5.5-22.6 MHz) だった.

SNR の観点で二つの光干渉計の計測結果を比較すると, サニャック干渉計の方が SNR が優れており, 1 点の振動を計測するのに要する時間が短時間で済む. 一方でマイケルソン干渉計は変位の絶対値を計測できる利点がある.

これらの成果を Ultrasonic 誌に報告し採録された. **Kazuki Tamura**, Ken-ya Hashimoto, Shinpei Okawa, Thermoelastic wave generation and its longitudinal wave propagation measurement by a microscopic optical interferometer, Ultrasonics 141 107319-1-9 (2024) 本成果によって 2 種類の光干渉計を組み合わせることでお互いの特性を補完し合い, 高速かつ絶対値振幅を多点で計測するシステムの構築が可能であることが示唆された.

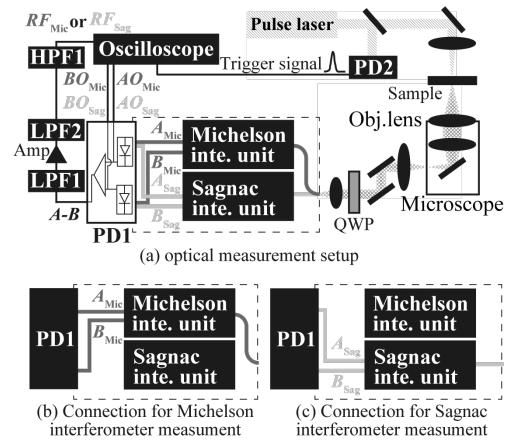


図4：透過波計測配置

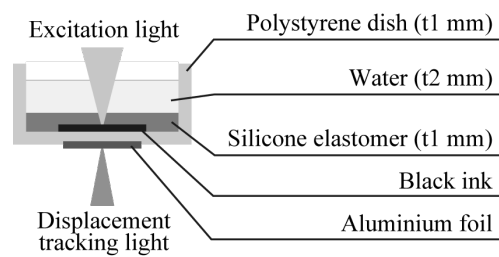


図5：光音響波発生サンプル

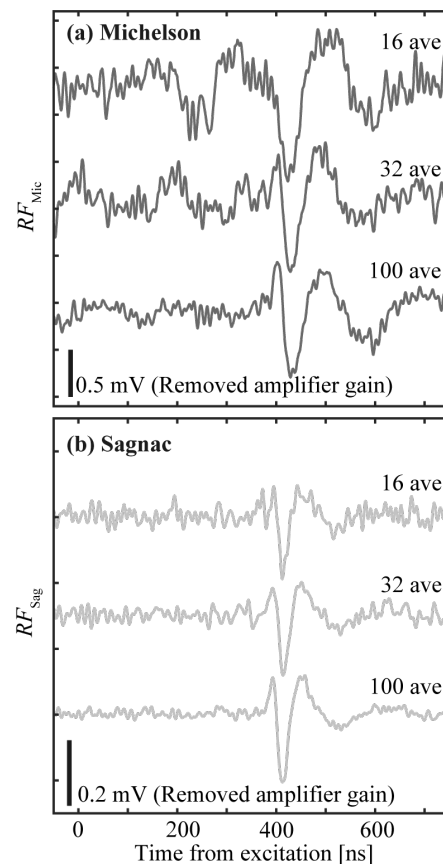


図6：干渉光出力

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamura Kazuki, Ito Kazuyo, Yoshida Sachiko, Mamou Jonathan, Miura Katsutoshi, Yamamoto Seiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Alteration of speed-of-sound by fixatives and tissue processing methods in scanning acoustic microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Physics	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphy.2023.1060296	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 該当する

1. 著者名 Tamura Kazuki, Hashimoto Ken-ya, Okawa Shinpei	4. 巻 141
2. 論文標題 Thermoelastic wave generation and its longitudinal wave propagation measurement by a microscopic optical interferometer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 107319 ~ 107319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ultras.2024.107319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 田村 和輝	4. 巻 80
2. 論文標題 〔解説〕 小さい物にこそレーザ超音波 光学計測を用いた微小領域の振動計測	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本音響学会誌	6. 最初と最後の頁 65 ~ 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20697/jasj.80.2_65	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kazuki Tamura, Ken-ya Hashimoto, Sinpei Okawa
2. 発表標題 Development of Mechanical Property Microscopy Using Photoacoustic Excitation and Optical Interferometry
3. 学会等名 47th Annual International Symposium on ULTRASONIC IMAGING AND TISSUE CHARACTERIZATION（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuki Tamura, Suguru Seto, Genta Hongo, Kazuyo Ito, Shinnosuke Hirata, Kenji Yoshida, Tadashi Yamaguchi
2. 発表標題 Speed of Sound Evaluation of cryosectioned Faty Liver Specimens Using Quantitative Acoustic Microscopy
3. 学会等名 2023 IEEE International Ultrasonics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuki Tamura, Shinpei Okawa
2. 発表標題 Fully Optic Characterization of Acoustic Impedance Implementable in Conventional Optical Microscope
3. 学会等名 Acoustics 23 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuki Tamura, Ken-ya Hashimoto, Shinpei Okawa
2. 発表標題 Development of the nanosecond pulsed photoacoustic wave detection system by using optical interferometry
3. 学会等名 The 43nd Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Suguru Seto, Kazuki Tamura, Shinnosuke Hirata, Kenji Yoshida, Tadashi Yamaguchi
2. 発表標題 Examination of temperature dependence in speed of sound evaluation of rat organs
3. 学会等名 The 43nd Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 和輝, 橋本 研也, 大川 晋平
2. 発表標題 光学式機械物性計測のための光干渉を用いた超音波検出システムの構築
3. 学会等名 日本音響学会第148回(2022年秋季)研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬戸 駿, 田村 和輝, 平田 慎之介, 吉田 憲司, 山口 匡
2. 発表標題 凍結試料の音速評価における温度依存性の検討
3. 学会等名 日本音響学会第148回(2022年秋季)研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村和輝
2. 発表標題 マイクロメートルスケールの空間分解能を持つ硬さイメージング法の開発
3. 学会等名 第4回 静岡県大学研究連携シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村和輝
2. 発表標題 生体組織用光学式機械物性顕微鏡の開発
3. 学会等名 令和4年度 電気・電子・情報関係学会東海支部連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 和輝, 橋本 研也, 大川 晋平
2. 発表標題 機械物性顕微鏡の構築を目指した光学式超音響信号の計測システムの構築
3. 学会等名 超音波研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 和輝, 橋本 研也, 山本 清二
2. 発表標題 光干渉を用いた超音響信号計測手法の開発
3. 学会等名 日本音響学会2022年春季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Tamura, Ken-ya Hashimoto, Seiji Yamamoto
2. 発表標題 Development of optical interferometer for optical-based mechanicalproperty microscope
3. 学会等名 The 42th Symposium on UltraSonic Electronics
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 超音響計測装置, 超音響計測法, 光学顕微鏡用の後付け超音響計測ユニット	発明者 田村和輝	権利者 国立大学法人浜松医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願021-068869	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 超音響波発生シート, 超音響計測方法, 光学的硬さ計測方法	発明者 田村和輝	権利者 国立大学法人浜松医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-095127	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------