

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560214

研究課題名(和文)超小型高空間解像度ライン分光イメージングによるパーソナル・フローサイトメトリー

研究課題名(英文) Personal flow cytometry by ultra-compact high-spatial-resolution line spectroscopic imaging

研究代表者

石丸 伊知郎 (ISHIMARU, Ichiro)

香川大学・工学部・教授

研究者番号：70325322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が提案しているワンショットフーリエ分光イメージング技術は、小型化及び低価格化を必要とするスマートフォンにも搭載可能となる超小型分光装置の実現を可能にする。しかし、提案技術には視野絞りとして光学系に導入しているスリットが原因の感度不足という課題が存在していた。低倍率の光学系では、対物レンズ側の焦点距離を長くすることで光路長が長くなってしまい、小型化が難しくなってしまう。そのため、我々はスリット幅を広げて光量を確保し、同時に回折角の減少を補う為に平凹シリンドリカルレンズにより平行光束径を拡張することで、光学系を等倍率で構築したワンショットフーリエ分光イメージング技術の高感度化を実現した。

研究成果の概要(英文)：We proposed the snapshot-type Fourier spectroscopic imaging for smartphone. For spectroscopic components analysis, such as non-invasive blood glucose sensors, the diffuse reflection lights from internal human skins are very weak for conventional hyperspectral cameras, such as AOTF (Acousto-Optic Tunable Filter) type. For improving sensitivity of our spectroscopic imager, the wide-field-stop & beam-expansion method was proposed. We installed concave-cylindrical lens between the wider slit and objective lens as a beam expander. We successfully obtained the spectroscopic characters of hemoglobin from reflected lights from human fingers.

研究分野：光医用計測

キーワード：分光 ハイパースペクトルカメラ 高感度化 蛍光標識

1. 研究開始当初の背景

フローサイトメトリー (Flow Cytometry) とは、細胞を狭い流路に流して、個々の細胞を成分毎に光学的に弁別し、選択的に分収する手法のことである。細胞を、成分毎に光学弁別する機能をアナライザー、選択的に分収する機能をソーターと呼ぶ。従来、弁別には予め注目成分に蛍光標識を施しておき、これを単色光 (レーザー) で励起する。例えば、図 1 左端の様に、それぞれの蛍光色素に対応した励起レーザーを個別に設置して、波長選択フィルターにより励起光を除去して光電子増倍管 (PMT: PhotoMultiplier Tube) で蛍光を検出していた。しかし、同時に使用できる蛍光標識の種類が限定されることから、多成分の弁別はできなかった。近年、多成分同時弁別を実現する、蛍光分光特性から多色染色細胞を判別するスペクトラル・アナライザーが注目されている。しかし、極微弱蛍光を分散して分光する為、受光面積の広い高感度 PMT を 32 個並べて検出しなくてはならない。そのため、波長分解能に相当する広い受光領域に光束径を広げるために、光路長を長く確保して光束を広く分散しなくてはならない。プリズムアレイなどで、U 字型に折り曲げてコンパクト化する工夫はしているが、原理的に小型化の隘路となっている。

2. 研究の目的

iPS 細胞による再生医療や創薬研究などの生化学分野では、細胞を成分ごとに弁別分収するフローサイトメトリーは必須である。そこで、各研究者が個別に机上に所有できる手のひらサイズで、かつ、細胞の多成分を同時に弁別して分収可能な、パーソナルな高機能フローサイトメトリーの、アナライザー (細胞弁別) の基礎研究を行った。我々が有する世界初の各画素の分光特性を取得できる、小指サイズの超小型高感度分光イメージングによる蛍光やラマン散乱光の分光弁別技術 (アナライザー) である。

3. 研究の方法

我々が提案しているワンショットフーリエ分光イメージング技術は准共通光路型位相シフト干渉計であるため、機械振動に対する頑健性を有しており、光学系が極めてシンプルな構成である。そのため、提案手法は小型化及び低価格化を必要とするウェアラブル端末、特にスマートフォンにも搭載可能となる超小型分光装置の実現を可能にする。しかし、提案技術には視野絞りとして光学系に導入しているスリットが原因の感度不足という課題が存在していた。低倍率の光学系を構築することで、感度の改善を図ることも可能であるが、対物レンズ側の焦点距離を長くすることで光路長が長くなってしまい、小型化が難しくなってしまう。そのため、我々はスリット幅を広げて光量を確保し、同時に回折角の減少を補う為に平凹シリンドリカルレンズにより平行光束径を拡張することで、光学系を等倍率で構築したワンショットフ

ーリエ分光イメージング技術の高感度化を実現した。更に、従来計測が困難であったヘモグロビンの吸収スペクトルを取得できたことで蛍光標識計測の可能性を実証した。

4. 研究成果

4.1 ワンショットフーリエ分光イメージング技術の高感度化手法

我々が提案しているワンショットフーリエ分光イメージング技術とは、二次元アレイデバイスの 1 軸を位相シフト量に割り当てた空間的位相シフト干渉法であり、対物レンズと結像レンズであるシリンドリカルレンズの間に平面ガラスと傾斜ガラスを組み合わせた相対傾斜位相シフターを導入しただけの極めてシンプルな構成をしている。この干渉計では、Fig.1 に示すように、試料面におけるライン上の 1 つの輝点から生じた物体光束が相対傾斜位相シフターを経た後、シリンドリカルレンズでアレイデバイス上の 1 方向のみに集光されることで、干渉縞としてインターフェログラムを取得することができる。また、鉛直方向の 1 次元の計測領域上の輝点ごとに、結像面の水平方向にインターフェログラムを空間的に展開することができるため、1 ラインのフーリエ分光特性を 1 画像で取得することができる。しかし、提案手法が波面分割位相シフト干渉法であることから、輝点の打消し合いという問題が発生し、インターフェログラムを観測することが困難となる。そこで、開口間隔を画素サイズに合わせて作製したスリットを光学系に挿入しているため感度不足という問題が新たに生じた。高感度化を実現させるには、光学系に入射する光量の増加を図るためスリット幅を広げる必要があった。輝点の打消し合いが起こることから、開口間隔である鉛直方向のスリット幅を広げることができなかつたので、視野絞りの役割を果たす水平方向にのみスリット幅の拡大を行うことにした。しかし、Fig.1 に示すように、スリット幅を広げたことで入射光の回折角が減少し、対物レンズで平行にされた物体光束径が小さくなり、相対傾斜位相シフターによって位相差が与えられた上側の光束と位相差が与えられていない下側の光束がアレイデバイス上で重ならないことから干渉現象が見られなくなるという問題が生じた。そこで、私達は減少した光束径の拡大のため、ビームエキスパンダー技術を導入した。ビームエキスパンダーにはガリレオ式とケプラー式の 2 種類が存在するが、将来的に本干渉計をスマートフォンに搭載することを考慮し、光軸を短くするため、ガリレオ式を選択した。通常、ガリレオ式ビームエキスパンダーでは平凹レンズを使用するが、Fig.1 に示すように、光束径を水平方向のみの拡大を目的としているため、平凹シリンドリカルレンズを導入した。以上から、私達はスリット幅の拡大と平凹シリンドリカルレンズを用いたガリレオ式ビームエキスパンダーの導入によってワンショットフ

ーリエ分光イメージング技術の高感度化を図った。また、Fig.1 に示すように、スリット幅拡張による空間解像度劣化は複数ライン画像の差分処理等により高解像度化が可能である。

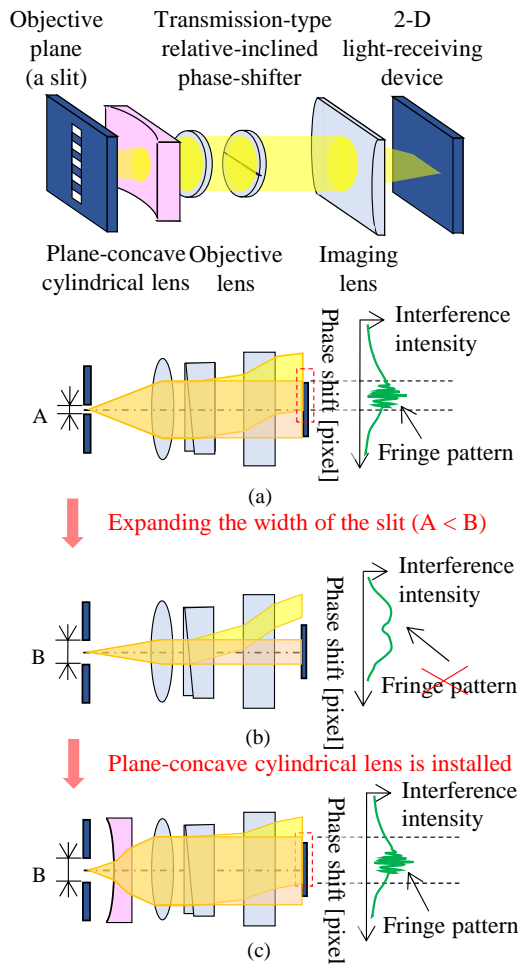


Fig. 1 Principle of sensitivity enhancement of the one-shot Fourier spectroscopic imager

4.2 高感度化検証実験

Fig.2 はヘモグロビンの吸収スペクトルを示している。赤色のグラフは、手の平を反射照明で観察した際に得られた吸光スペクトルを表しており、青色のグラフは分散型分光器で液セルに入れたラットの血液を透過照明で測定した際に得られた吸収スペクトルを示している。光源は豆電球程度のハロゲンランプを使用した。感度改善後のワンショットフーリエ分光イメージング装置で測定した手の平のスペクトルは 700[nm] から 900[nm]にかけて吸光度が徐々に増加しており、ラットの血液のスペクトルと同じ傾向が見られた。以上より、生体内の血液成分の吸光度計測の実現可能性を実証した。

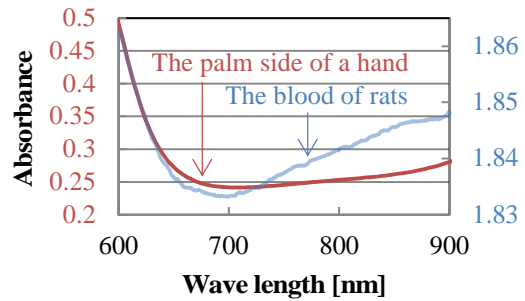
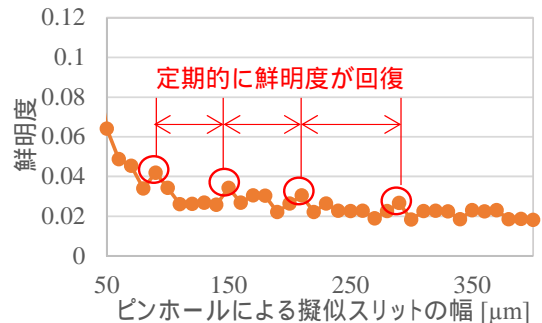


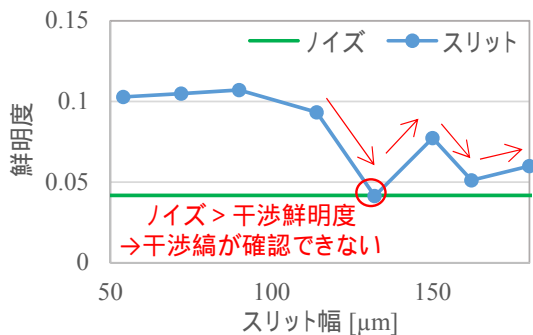
Fig. 2 Absorbance of the hemoglobin

4.3 感度改善限界に関する検証実験

ビームエキスパンダー式高感度化手法における回折格子であるスリット幅拡大による感度改善の限界を検証する実験を行った。光源はメタルハイドランプ (Maker: SIGMAKOKI、Type: IMH-250)を使用し、回折格子は幅が 24 [μm]から 5 [mm]まで約 20 [μm]から 500 [μm]の間隔で拡大されたスリットパターンが掘られたものを用いた。サンプリング間隔は 35 [μm]、波長分解能は 4.1 [nm]である。実験結果は Fig.3(b)の青色のグラフに示す。目視ではスリット幅が 3 [mm]の干渉縞を確認することができたが、Fig.3(b)の緑色のグラフに示すノイズの鮮明度より干渉縞の鮮明度が低いため、スリット幅 180 [μm]以降は解析時に干渉縞のインターフェログラムを取得することができなかった。



(a)



(b)

Fig.3 感度改善に伴う鮮明度の推移

そこで、Fig.3(b)の青色のグラフにおいて、スリット幅が 100 [μm]以上で見られる鮮明度の強弱の推移に注目した。ここで、径が 10 [μm]のピンホールから得られる干渉縞を、マ

マイクロメータで 10 [μm]おきに水平方向に移動させて計測した。実験で得られた干渉縞を移動した座標分だけずらして加算することで、スリット幅拡大時に取得できる干渉縞のシミュレーション実験を行った。実験結果から得られた干渉鮮明度の推移グラフを Fig.3(a)に示す。Fig.3(a)より一定間隔で干渉鮮明度が回復する傾向を確認することができた。スリット上に並ぶように位置する輝点から生じる干渉縞のインターフェログラムは水平方向のずれを伴いながら結像面上の位置に形成され、重なり合う。インターフェログラムの平均周期を λ とした時に結像位置のずれが位相差として干渉縞に影響し、光学的に弱め合い及び強め合いという干渉現象を引き起こしていることが原因で、鮮明度の劣化と回復を繰り返す現象が起きていると考えられる。

4.4 干渉鮮明度シミュレーション

インターフェログラムと見立てたサイン波を合成させたグラフを用いて干渉縞が重なり合った際の鮮明度評価シミュレーションを行った。干渉縞の平均周期を λ とした時、位相差 0 のインターフェログラムに、位相差を $\lambda/2$ ずつ与えたインターフェログラムを積算した結果を Fig.5 に示す。波形の凹凸が逆転した状態で重なるため、弱め合う作用を与える位相差 $\lambda/2$ のインターフェログラムを積算した時は鮮明度が明らかに減少し、波形の凹凸が揃うために強め合う作用を与える位相差 λ を積算した時は鮮明度が回復する様子が確認できた。以上から、スリット幅を拡大していく過程で干渉鮮明度が劣化と回復を繰り返す現象が起こることが証明された。また、位相差を $9\lambda/2$ 与えたインターフェログラムを積算した結果、鮮明度はいずれ位相差 0 の半分程度という一定の値で収束することがわかった。次に、弱め合う作用を位相差 0 のインターフェログラムにもたらず位相差 $n\lambda/2$ (n は整数)を省き、強め合う作用をもたらず位相差 $n\lambda$ だけを積算するシミュレーションを行った。結果を Fig.5 に示す。位相差 0 のインターフェログラムに、位相差 λ を積算すると鮮明度は向上し、更に強め合う影響を与える位相差 2λ を積算することで約 2.5 倍の鮮明度の改善が確認できた。同様に、位相差が 8λ を積算するところまでシミュレーションを行った結果、鮮明度は位相差 0 の時の約 5 倍の値でいずれ収束することが判明した。以上の結果から、弱め合う位相差 $n\lambda/2$ のインターフェログラムを間引くことで、鮮明度の一定の改善が期待できることが証明された。

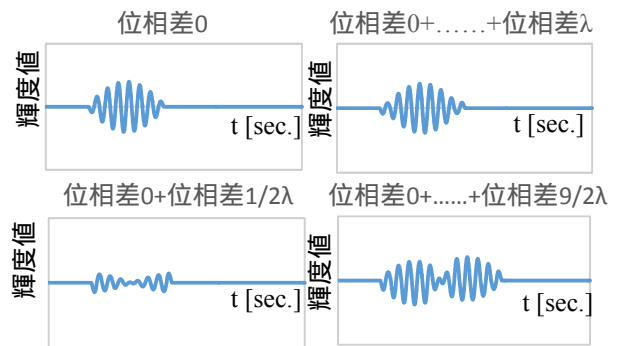


Fig.4 位相差を $\lambda/2$ ずつ与えた干渉縞の積算結果

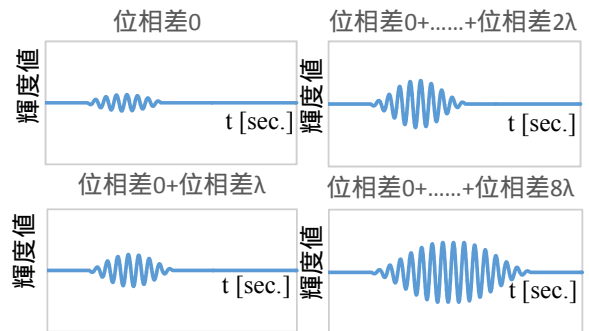


Fig.5 位相差を λ ずつ与えた干渉縞の積算結果

4.5 マルチスリット式高感度化手法

ビームエキスパンダー式高感度化手法の感度改善過程に生じる干渉鮮明度劣化現象の改善案として、Fig.6 のようなマルチスリットを物体面に導入するマルチスリット式高感度化手法を提案する。光源の波長や反射光によって、インターフェログラムの形状が変化するため、ワンショットフーリエ分光法の光学系から光線追跡法にて、スリット上の輝点ごとに形成するインターフェログラムの位相差を計算する。その際に得られた値から、光学的に弱め合う作用を位相差 0 のインターフェログラムに与える位相差 $n\lambda/2$ のインターフェログラムを形成する輝点を間引くマルチスリットのピッチを導き出すことができる。以上の設計指標から作製したマルチスリットによって、インターフェログラムの鮮明度を維持及び向上させ、ビームエキスパンダー式高感度化手法と組み合わせることでワンショットフーリエ分光法の更なる高感度化が可能となると考えられる。

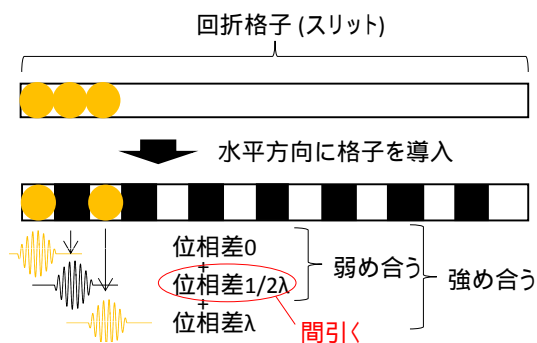


Fig.6 マルチスリット設計指標

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3件)

1. Natsumi Kawashima, Kosuke Nogo, Satsuki Hosono, Akira Nishiyama, Kenji Wada, Ichiro Ishimaru, "Sensitivity improvement of one-shot Fourier spectroscopic imager for realization of noninvasive blood glucose sensors in smartphones", Opt. Eng. 55(11) 110506 doi: 10.1117/1.0E.55.11.110506 (2016.11)査読有
2. Shun Sato, Wei Qi, Natsumi Kawashima, Kosuke Nogo, Satsuki Hosono, Akira Nishiyama, Kenji Wada, and Ichiro Ishimaru, "Ultra-miniature one-shot Fourier-spectroscopic tomography," Optical Engineering, Vol.55, pp.025106-1-025106-8, February 2016(2016)
3. Wei Qi, Yo Suzuki, Shun Sato, Masaru Fujiwara, Natsumi Kawashima, Satoru Suzuki, Pradeep Abeygunawardhana, Kenji Wada, Akira Nishiyama, and Ichiro Ishimaru, "Enhanced interference-pattern visibility using multislit optical superposition method for imaging-type two-dimensional Fourier spectroscopy," Applied Optics, Vol. 54, Issue 20, pp. 6254-6259, July 2015, doi: 10.1364/AO.54.006254(2015)査読有

[学会発表](計2件)

1. Natsumi Kawashima, Satsuki Hosono, Ichiro Ishimaru, "Built-in hyperspectral camera for smartphone in visible, near-infrared and middle-infrared lights region (second report): sensitivity improvement of Fourier-spectroscopic imaging to detect diffuse reflection lights from internal human tissues for healthcare sensors", Proc. SPIE 9855, Next-Generation Spectroscopic Technologies IX, 985505 (12 May 2016); doi: 10.1117/12.2223392(2016)査読有「ボルティモア(米国)」
2. Ichiro Ishimaru, Natsumi Kawashima,

Satsuki Hosono, "Built-in hyperspectral camera for smartphone in visible, near-infrared and middle-infrared lights region (first report): trial products of beans-size Fourier-spectroscopic line-imager and feasibility experimental results of middle-infrared spectroscopic imaging", Proc. SPIE 9855, Next-Generation Spectroscopic Technologies IX, 985504 (12 May 2016); doi: 10.1117/12.2223353 (2016)「ボルティモア(米国)」

[図書](計1件)

1. 石丸伊知郎, 超小型広視野赤外分光イメージングの基礎と応用, 光ライアンス, 第27巻, 第1号, pp. 12-17, January 2016(2016) [産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 分光測定装置
 発明者: 石丸伊知郎
 権利者: 香川大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2015-137321
 出願年月日: 2015年7月8日
 国内外の別: 国内
 PCT 出願番号: PCT/JP2016/070287
 (2016年7月8日出願)

[その他]

ホームページ等
<http://www.eng.kagawa-u.ac.jp/~ishimaru/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石丸 伊知郎 (ISHIMARU Ichiro)
 香川大学・工学部・教授
 研究者番号: 70325322