

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670276

研究課題名(和文) 光学的断層撮影型顕微鏡の開発と病理組織観察への応用評価

研究課題名(英文) Applied evaluation to development and the pathological observation of the microscope based optical tomogram

研究代表者

谷 重喜 (TANI, SHIGEKI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：80217116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：光学的顕微鏡サイズの観察試料対象において、一定角度毎に撮影した透過平面画像からコンピュータトモグラフィ手法により断層像や立体像を構築する研究を行った。この研究では、試料サンプルは微細ではあるが、光学的透過像から断層像の画像再構築を行うことが可能となった。画像再構築には、バックプロジェクション法と逐次近似法を利用した。分光機能に関しては、透過像が得ることができれば断層像を得ることは可能であるが、光源と受光素子との間に入る機材の光透過性に依存するため、波長ごとの光透過性強度を揃えることが可能な試料条件では、RGBの特性3波長による合成に限定された疑似的カラー断層像を試験サンプルにて再構築できた。

研究成果の概要(英文)：It was a study to build dislocation image and a stereoimage by computer attendant graph technique from a transmission image photographed every constant angle, and the sample sample was minute in this study, but the image rebuilding of the dislocation image was performed by a transmitted image photographed optically, and it was thought that the back projection method and the consecutive approximation method were used and could get dislocation image if a transmitted image was clear about the spectrophotometric function, but, in an observation sample object of the optical microscope size, image rebuilding was able to rebuild pseudocolor dislocation image limited to the composition by the characteristic 3 wavelength of ,RGB on the sample condition that could prepare the optical transparency strength every wavelength with an examination sample to depend on the optical transparency of machine parts to enter between a source of light and a light receiving element.

研究分野：医療情報科学

キーワード：画像再構築 光学的CTスキャン 光学顕微鏡 光学的断層撮影

1. 研究開始当初の背景

(1) 複雑に入り組んだ組織の微細構造や病変部位を精査観察する場合には、ウルトラミクロトームによる観察試料の連続した超薄切片標本を作製する必要がある。しかし、正確な試料切片標本の作成には時間を要することや撮影した多量の光学的平面観察画像から立体画像の作成には、各切片の位置合わせや歪み補正等に困難を要するため迅速な観察や診断には不向きであった。

(2) 従来の実態顕微鏡の視差角を利用した立体画像観察や構築も視差の角度が微小であるため十分ではない。また、レーザ共焦点顕微鏡による細胞の立体構成では、波長が単一であるため、連続した可視光領域波長による観測は限定されていた。さらに多焦点の合成により焦点深度を深めたマルチフォーカス観察も二次元合成像からの仮想的立体視の域を出ていない。

2. 研究の目的

(1) 医学分野における断層像の撮影検査は、人体の頭部、胸部、腹部、四肢など躯体を対象とするものであった。本研究では、観測対象をマクロな視点をミクロな視点へと移し、光学的透過性が十分にある組織細胞切片や遊離細胞（血球など）を対象とした。これらは、光学顕微鏡領域の微小試料サイズではあるが、三次元による微細構造の観察や断層像の再構築が十分可能である。

(2) 観察を行う光の波長を可視光領域だけでなく赤外線領域にまで広げ組織透過性を向上することにより対象となる試料の厚みの選択範囲が広がる。これとは対照的に光の波長を紫外線領域へ広げることにより蛍光抗体試薬などの組織内における、より精密な空間分布位置の観測や、顕微分光スペクトル分析法との融合による物質分布の空間定量化の可能性がある。このような光による断層撮影装置の開発と、その検証や病理組織観察における三次元断層装置の可能性などは、まだ、その臨床的意義や技術的意義は十分には評価されていない。そのため光学的断層撮影型顕微鏡の開発と微小三次元断層像と三次元分光スペクトル画像の臨床的応用を探索することや、診断への実用的応用が期待できる。また、一般的な微小動物の形態解析や植物細胞の形態解析など生物学への応用や波及効果も期待できる。

3. 研究の方法

(1) 観察試料に対して光源・視野軸が周囲から断層平面上位置からの観察が可能にするために、試料ステージに対して、顕微鏡光源と鏡頭レンズ系との光軸が傾斜方向に回転する構造を有した光学顕微鏡を製作する。

(2) 上記(1)で製作した顕微鏡に装着する光

軸制御用スポット光源装置と平面透過用光源装置、及び CMOS 画像センサ装置、または CCD 画像センサ装置の製作する。

(3) 上記(1)に(2)を取り付けた顕微鏡から得られる透過画像から平面断層像を再構築するコンピュータモグラフィのプログラムを開発する。

(4) 簡易的手法として分光した画像を評価するために、電気的分光機能として RGB カラーの画像センサからの映像信号を FFT 変換し特定波長の画像を表示するプログラムを開発する。

(5) 試料内部を通過する光の散乱は、画質の劣化が生じるため、フォトンマッピング法による光の散乱計算から画質の改善と評価を行うプログラムを開発する。

(6) 上記(1)、(2)、(3)、(4)、(5)で製作した顕微鏡とプログラムにより光透過性と画像表示精度を検証するために血液細胞や肝細胞、神経細胞、皮下組織など代表的な組織細胞の切片の厚さ（光透過度）と画像描画の検証する。

(7) 平成 26 年度に作成する光学的断層像撮影プログラムと 3 次元画像構築プログラムの空間分解能の向上を目的とし、光学的断層撮影プログラムを拡張する。

(8) 作成した光学断層撮影プログラムの利用を汎用的なシステムとするために、顕微鏡制御プログラムと画像再構築プログラムのユーザーインターフェイスの改良を行う。

(9) 利用する観察光の波長帯域を広げるために分光光源装置で波長分割された光を顕微鏡の鏡筒光軸の光源面へ誘導する光ファイバー光源装置を製作する。

(10) 従来顕微鏡試料は平面像を前提にしていたために薄片試料としてスライドグラス上に作成していた。これに代わる傾斜試料台では、試料を立体的に保持する必要があるため、その試料保持剤の実用化に向けた材質の検討を行う。

(11) 分光光学的な観測には、透過光源の均一性と等分散性を向上させることが重要である。このために均一な分散特性の高い分光光源用のオパールガラスフィルターや複数の波長特性を組み合わせたマルチスペクトルファイバーの製作と光源の変動から透過画像の変動を補正するために参照光源を誘導するファイバーの二重化を行う。

(12) 断層画像構成に必要な平面画像の撮影時間が二次元観察時に比べて長くなるため

に、顕微鏡光源の安定性と画像の安定性、ならびに画像ノイズの低減を目的とする安定化電源と低雑音画像増幅器の製作する。

(13) 光学的分解能を向上するために高感度高分解能平面 CMOS センサ装置の製作する。

(14) (10)(11) で開発を行う分光機能を利用し、この分光光源とセンサを利用し、血液細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、色素細胞など、有色や染色した各細胞の組織画像の解剖学的ならびに病理学的評価する。

(15) 平成 26 年度、27 年度の研究による組織細胞の厚み（光透過性）と画質描画の評価を従来の光学顕微鏡組織の可視光による評価と立体構築や組織細胞断層像の再構築による三次元画像観察を通じての臨床的評価を行う。

4. 研究成果

(1) 光を利用したフォトン CT などは、人体の内部組織の光吸収度の大きさや光分散の強さによる困難から実用的な装置の開発に至っていない。本研究では、観測対象をマクロな視点をミクロな視点へと移し、光学的透過性が十分にある組織細胞切片や遊離細胞（血球など）を対象とした。

(2) これらは、光学顕微鏡領域の微小試料サイズではあるが、光透過性があるゆえに光学的観測が行われている。この特性を利用できる試料サイズに限定されるが、三次元による微細構造の観察や断層像の再構築を行うものである。この実現のために鏡筒光軸と観察対象なる試料台ステージとが傾斜方向に回転構造を有する顕微鏡を製作した。これは、試料ステージの存在から考えた構造であるが、相対的な傾斜角をつける方法により全体的な観察角度を多く得る方法である設計とした。

(3) 研究方法の項目で計画記載したように、飼料ステージと光源・視野軸とが、相対的に傾斜方向に回転する構造の顕微鏡を製作した。しかし、相対的回転角を持たせた画像を撮影することが十分でないためにコンピュータプログラムによる画像再構成処理にて必要となる画像再構築情報が不足した。その対策として、より十分な観測領域を得るために、試料を従来の平面のスライドガラスから円柱形の透過性キャピラリ状チューブに変更した。この変更により、初期に製作した相対的傾斜各顕微鏡の構造から、飼料に対して、 360° 外周面から観測する構造に改良した。この改良により、光源・視野軸は試料に対して断層平面上の任意の位置から観測できる構造となった。

(3) 観測方向の自由度は増したが、光源の

誘導が光ファイバーに制約されることや、当初予定した光源帯域光の波長が光ファイバーの特性制限を受けることとなり、画像再構築に必要な光源輝度の必要性から角度毎の撮影時間を確保する必要性もあった。

(4) 観測を行う光の波長を可視光領域だけでなく赤外線領域にまで広げ組織透過性を向上することにより対象となる試料の厚みの選択範囲が広がる試みも行ったが、観察試料ホルダーであるチューブによる光干渉を削減する変更フィルターやレンズとの光学特性補正オイル、前記した光源波長域の光誘導にファイバーを利用しているために、この透過特性にも制限を受けた。また、同様に光受光素子の波長特性にも制限を受ける。

(5) 一定角度毎に撮影した透過平面画像からコンピュータトモグラフィ手法により断層像や立体像を構築するプログラムの作成は、バックプロジェクション法と、画像再構成速度を上げる目的で逐次近似法を利用した。分光機能に関しては、画像再構築においては透過像が得ることができれば断層像を得ることは可能であるが、光源と受光素子との間に入る機材の光透過性に依存するため、波長ごとの光透過性強度を揃えることができた試料条件では、RGB の特性 3 波長による合成に限定された疑似的カラー断層像を試験サンプルにて再構築は可能である。

(6) さらに実用化に向けては光散乱性を抑制するフィルター装置の光路への挿入と十分な明るさが得られる分光光源を減衰の少ない光ファイバーで誘導することが必要である。今後、透過光源の均一性と等分散性を向上させることの重要性に着眼し、多様な試料での検証を試みるものである。

(7) 改良した光学的断層撮影顕微鏡は、試料が円柱のチューブに収める構造である。この試料チューブは、光学系の中心部位に配置する構造とし、試料チューブの保持は、単一方向の一端で軸補正を行う構造とした。

(8) 試料保持液やゲル物質、チューブの材質、光学系レンズとの屈折条件を設定することが明瞭な画像を得る点であった。

(9) 前記視点から考察すると試料と光学系先端部位全体を水浸系や油浸系とする方法が有効であると思われる。また、この結果から、この水浸系などの特性を利用し培養細胞を試料対象とした光学的断層撮影の有効性が結果より考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

谷 重喜 (TANI, Shigeki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：80217116

(2)研究分担者

前川 真人 (MAEKAWA, Masato)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20190291

(3)連携研究者

梶村 春彦 (SUGIMURA, Haruhiko)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00196742