

ワンショット共焦点光学顕微鏡による病理組織観察法の創出

One-shot confocal microscopy for histopathological diagnosis

2161024



研究代表者

徳島大学大学院
社会産業理工学研究部

講師

南川 丈夫

[研究の目的]

病理組織診断では、高精細に組織を観察するため、光学顕微鏡のボケが出ない程度に病変の極一部（厚さ4~5 μ m）を切り出して診断する。その為、切り出した部位が不適切であると、病変が切片に含まれず、誤診してしまう可能性がある。

そこで本研究の目的は、病変が確実に含まれるであろう厚い組織であっても、光学顕微鏡のボケがなく、かつ病理組織診断に師匠がないほどの観察速度を有する病理組織観察法の創出を目指す。本研究では、空間情報を光の波長へ変換する波長/空間次元変換に基づいたワンショット共焦点光学顕微鏡の開発を行った。共焦点光学顕微鏡の有する高い光軸分解能により厚い組織であってもボケがないイメージを取得可能である。また、波長/空間次元変換によるワンショットイメージングにより、従来の共焦点光学顕微鏡に内在した時間分解能の限界を大幅に改善し、病理診断に支障がないほどのイメージングの高速化が実現可能となる。

以上から、本研究では病理検査の高精度化に伴う人間の健康寿命の増進とともに、病気を診断する病理医の視点に立ったユーザビリティに基づいた病理観察法を実現し、人間と機械の調和による医療の進歩を目指す。

[研究の内容, 成果]

1. ワンショット共焦点光学顕微鏡の開発

共焦点光学顕微鏡は、共焦点効果による深さ分解能と迷光除去能力を持つことから、広く非接触表面形状計測やバイオイメージングで利用されている。共焦点効果を得るためには、光源ピンホール、サンプル焦点、検出ピンホールがそれぞれ結像している必要がある。その為、一般的には、上記の各焦点が結像関係にある光学系を作製し試料を走査するサンプル走査法、あるいはビーム走査光学系を通して試料へ集光し発生した散乱光が同じ光路を通りビーム走査しても元の光路に戻ることを利用したデスキャンシステムが用いられてきた。従来、高速なイメージングを実現するためには、ビーム走査によるデスキャンシステムが用いられ、ビーム走査にはガルバノミラー、ポリゴンミラー、MEMSミラー、マイクロレンズアレイといった機械的走査機構が用いられている。しかし、これらの機械的走査機構は、振動などの外乱に弱く、またイメージング速度は機械的走査による限界があった。

そこで本研究では、回折格子を用いた波長/空間変換によるワンショット共焦点光学顕微鏡の開発を行った。従来のビームスキャン部を波長分散素子に変更することで、機械的可動部を排除し、ワンショットで共焦点イメージを取得

することが可能となる。

図1に開発したワンショット共焦点光学顕微鏡の概念図を示す。ここで、光軸方向をZ軸、光軸に直交した2次元平面をXY面となるような3次元座標を定義した。光源には広帯域光源(中心波長:780 nm, 帯域:10 nm)を用いた。光源から出射された光は、空間フィルタリングされた後、シリンダリカルレンズを用いてラインビームに整形した。これは、Y軸方向のスキャンレス化を行っていることとなる。さらに、このラインビームを回折格子(溝本数:1200本/mm)に照射することで、X軸方向には波長で展開され、Y軸方向には同じ波長が空間的に広がっている照明光(Vertical rainbow)を作り出す。これを対物レンズ(倍率:×60, NA:0.95)で集光することにより、サンプル上にはVertical rainbowの2次元焦点群が生成される。サンプルの情報を反映した反射・散乱光は、同じ光路を逆から辿ることで再び同じ回折格子に集光され、空間/波長変換が起こる。空間/波長変換によって、空間に展開されていた波長の情報は再び重ねあわせられ、シングルビームに戻る。この光は、ビームスプリッタによってマルチチャンネル分光器に導かれる。マルチチャンネル分光器の入射スリット上にライン集光された光は、この入射スリットによって共焦点性を持たされた後にマルチチャンネル分光器によって分光され、CMOSカメラ(1280×1024ピクセル)によって検出した。

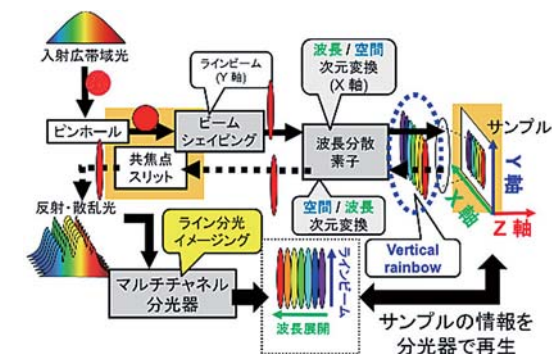


図1 波長/空間次元変換によるワンショット共焦点光学顕微鏡の概念図

2. 基礎特性評価

開発したワンショット共焦点光学顕微鏡の基礎特性評価を行った。図2に試料にテストチャート(1951 USAF Resolution Target, Edmund Optics)を用い画像化した結果を示す。Y軸方向はライン照明(空間)により画像化している軸である。即ち、同一波長のラインビーム内における位置ごとの強度の違いによって画像化されている。一方、X軸方向は空間/波長変換により、空間情報が波長に展開することにより画像化している軸である。即ち、波長ごとの強度の違いによって画像化されている。以上のことから、図2aは一見すると一般的な2次元反射イメージのようであるが、実際にはサンプルの情報を反映したvertical rainbowのライン分光イメージングによって取得された画像である。

測定した部位は、グループ7の要素4(181 line pairs/mm)、要素5(203 line pairs/mm)、要素6(228 line pairs/mm)である。このことから、視野は $68\ \mu\text{m} \times 156.2\ \mu\text{m}$ であった。また、画像は露光時間2.84 ms、フレームレート22.09 fpsで取得した。このイメージングは、機械的走査をおこなわずにワンショットで計測しているため、各ピクセルの測定タイミングの同時性が担保されている。

図2の断面プロファイルを用い空間分解能の評価を行った。その結果、本システムではX方向において $1.18\ \mu\text{m}$ 、Y方向において1.15

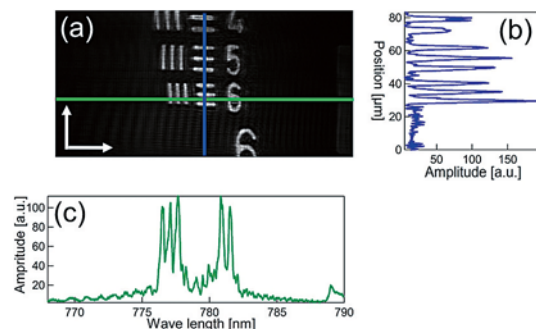


図2 ワンショット共焦点光学顕微鏡による画像化。(a) ワンショット共焦点画像。(b) Y軸プロファイル(ライン照明軸方向)。(c) X軸プロファイル(空間/波長次元変換方向)。

μm の空間分解能を有していることがわかった。

開発したワンショット共焦点光学顕微鏡の空間分解能は、回折理論により考察可能である。今回、ライン型共焦点光学系を応用していることから、回折限界に基づく X, Y 軸方向の理論的空間分解能 δX , δY はそれぞれ、

$$\delta X = 0.51 \frac{\lambda}{NA}$$

$$\delta Y = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

となる。ここで、 λ は波長、NA は対物レンズの開口数である。回折限界に基づく理論空間分解能は、それぞれ $\delta X = 0.42 \mu\text{m}$, $\delta Y = 0.5 \mu\text{m}$ である。ただし、X 軸方向の空間情報は波長軸に展開されていることから、空間分解能 δX は、使用したマルチチャンネル分光器の波長分解能にも制限される。波長分解能に基づく理論空間分解能は $\delta X = 0.71 \mu\text{m}$ であった。このことから、開発したワンショット共焦点光学顕微鏡の面内分解能において、X 軸方向に対してはマルチチャンネル分光器の波長分解能、Y 軸方向については対物レンズの回折限界に制限されると考えられる。本実験で実際に得られた X 軸、Y 軸空間分解能は、理論空間分解能に対し、2 倍程度悪い結果となった。この差は、光学系のアライメント、対物レンズ瞳面での強度プロファイル等の影響を受けていると考えられる。このことから、さらなる光学系の改良により、理論空間分解能程度の空間分解能を得られると考えられる。

次に、開発したワンショット共焦点顕微鏡の Z 軸空間分解能について評価を行った。図 3 に試料にミラーを用いた場合の結果を示す。対物レンズの焦点位置にサンプルがある場合を $Z = 0 \mu\text{m}$ と定義した。共焦点スリットを Open 状態にした場合、Z 軸強度プロファイルの半値全幅は $30 \mu\text{m}$ となった (図 3a 緑, 図 3c)。そのため、 $Z = 0 \mu\text{m}$ (In-focus) の場合と、 $Z = -12 \mu\text{m}$ (Out-of-focus) の場合で同様の画像が取得された。一方、共焦点スリットを狭めた場合

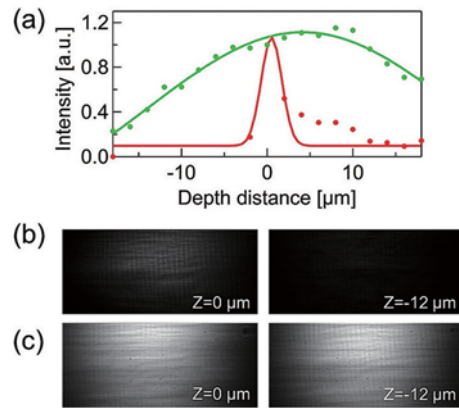


図 3 ワンショット共焦点顕微鏡の光軸分解能評価。(a) Z 軸プロファイル。緑、共焦点スリットを Open 状態で測定したプロファイル (非共焦点光学系)。赤、共焦点スリット幅を狭めた場合のプロファイル (共焦点光学系)。(b) 共焦点光学系における $Z = 0 \mu\text{m}$ および $Z = -12 \mu\text{m}$ 位置でのイメージ。(c) 非共焦点光学系における $Z = 0 \mu\text{m}$ および $Z = -12 \mu\text{m}$ 位置でのイメージ。

(共焦点光学系)、焦点からのみ信号が得られ、 $Z = -12 \mu\text{m}$ とした場合は信号が減衰された (図 3b)。この時、Z 軸強度プロファイルの半値全幅は $2.41 \mu\text{m}$ であった (図 3a 赤)。以上のことから、開発したワンショット共焦点光学顕微鏡は高い Z 軸空間分解能を有していることがわかる。この時得られた Z 軸空間分解能は、通常の病理組織診断で用いられる組織切片厚 $3 \sim 5 \mu\text{m}$ に対して、十分小さい値が得られた。

3. 3次元形状計測への応用

開発したワンショット共焦点光学顕微鏡を 3次元形状計測へ応用した。図 4 にチップコンデンサの 3次元形状計測応用の例を示す。露光時間は 9.15 ms 、フレームレート 25 fps で計測した。また、チップコンデンサ表面を $Z = 0 \mu\text{m}$ と定義した。 $Z = 0 \mu\text{m}$ においては、チップコンデンサ表面、特に電極部が可視化されている様子がわかる。 $Z = -150 \mu\text{m}$ 位置では、焦点に試料がないため信号が減弱している様子がわかる (チップコンデンサ上部)。 $Z = 600 \mu\text{m}$ では、基板表面が可視化されている様子がわかる。これらを 3次元再構築することで、チップコンデンサの 3次元形状を高い 3次元空間分解能で可視化できていることがわかる。

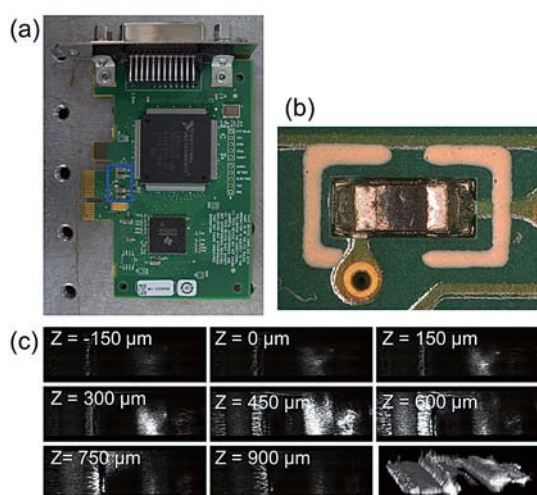


図4 電子部品の3次元形状計測への応用。(a) 全体像。(b) チップコンデンサ部。(c) 3次元形状計測。

4. 植物細胞観察への応用

次に、開発したワンショット共焦点光学顕微鏡を植物細胞観察へ応用した。図5にトマトの葉の観察結果を示す。通常の光学顕微鏡像では、深さ方向に積分された画像となっている。そのため、葉の厚い組織のために、焦点外からのボケた像も重畳し、不鮮明な画像となっている事がわかる。

一方、開発した共焦点光学顕微鏡像では、焦点面のみの情報が得られるため、植物細胞の形態を高いコントラストで測定できていることがわかる。この時、露光時間は 29.12 ms、フレームレートは 22.67 fps とし、高速に Z 軸方向に走査しながら観察することで、3次元形態の1ボリューム毎秒程度でビデオ観察が可能であった。このことは、本手法のワンショット画像化能と共焦点効果による高い3次元分解能を同時に実現していることで初めて実現される。

5. 生体組織観察への応用

最後に、開発したワンショット共焦点光学顕微鏡を生体組織観察へ応用した。図6にマウス筋組織の観察結果を示す。筋組織は、複数の筋細胞（図6b、円状のピンク色に染色されている部分）と間質（図6b、透明部および線維状のピンク色に染色されている部分）が主な構成

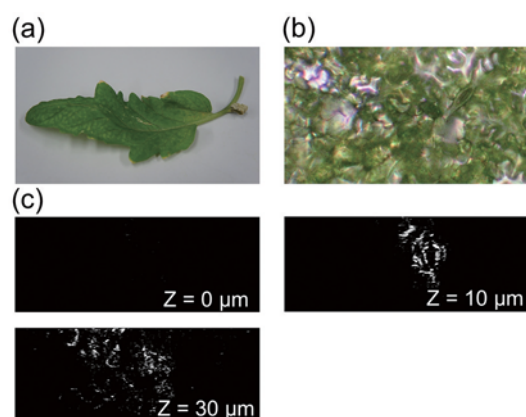


図5 植物細胞観察への応用。(a) 葉の外観図。(b) 通常の光学顕微鏡像。(c) 開発したシステムによる共焦点イメージ。

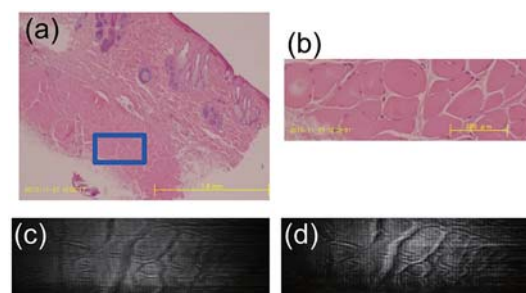


図6 マウス筋組織観察への応用。(a) 切片化した組織のHE染色像。(b) 青四角部の拡大図。(c) 共焦点スリットをOpen状態、(d) 共焦点スリットを狭めた状態にした場合のマウス筋組織の観察像。

用途である。筋組織を共焦点スリットをOpen状態で観察した場合、深さ方向に積分された画像となっているため、コントラストが低い（図6c）。

一方、共焦点スリットを狭め、共焦点を有している状態で観察すると筋細胞の形態を明瞭に確認できることがわかる。以上のことから、開発したワンショット共焦点光学顕微鏡を生体組織へ応用可能であることがわかる。今回は原理確認のため切片化した組織を用いたが、今後はブロック状の組織を用いることで、本手法の有用性を確認していく。

[今後の研究の方向、課題]

本研究では、波長/空間次元変換を援用した

ワンショット共焦点光学顕微鏡の開発を行い、その基礎特性を明らかにし、および表面形状計測応用、バイオイメージング応用により本手法の有用性を示した。本手法は、高い3次元空間分解能を持ちながらも、ワンショットで2次元共焦点画像を取得可能である。その為、高速にZ軸方向を走査することで、3次元イメージの動画観察も可能であることを示した。

本手法を病理組織切片観察へ応用することで、厚い試料切片を用いた病理組織診断を実現ことが可能である。これにより、病変部の見逃しを防止し、病理組織診断の誤診を防止することが可能となる。本研究では、その原理検証を行ったが、今後は実際の病理組織切片観察への応用が期待される。そのためには、本手法の多色化が求められる。これは、通常の病理組織切片は多重染色することにより組織の状態を観察しているためである。また、今回示した空間分解能は理論空間分解能には至っていない。そのため、今後はさらなる光学系の改良を行い、実用化に向けて検討を進めていく。

[成果の発表, 論文等]

1. 宮本周治, 長谷栄治, 南川丈夫, 謝宜達, 水谷康弘, 岩田哲郎, 安井武史, 山本裕紹, “スリット共焦点と波長/空間変換を用いたスキャンレス・フルフィールド共焦点顕微鏡”, 精密工学会誌, **82**, 7, 679-682 (2016).
2. Shuji Miyamoto, Eiji Hase, Takeo Minamikawa, Takeshi Yasui, and Hirotsugu Yamamoto, “Video-rate volume imaging confocal microscope based on wavelength / space conversion by use of multi-channel spectrometer”, Frontier in Optics (FiO) 2016, JTh2A.128, (Oct. 17-20, 2016, Rochester, USA).
3. 宮本周治, 長谷栄治, 山本裕紹, 安井武史, 南川丈夫, “波長/空間変換を用いたスキャンレス共焦点レーザー顕微鏡の開発”, レーザー学会学術講演会第37回年次大会, (2017/1/7-9, 徳島大).
4. 宮本周治, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本裕紹, 安井武史, “波長分散素子を用いたスキャンレス共焦点レーザー顕微鏡の開発”, 第1回フォトニクス研究会「光の境界を開拓する!!」(2016/12/2-3, 沖縄県青年会館).
5. 宮本周治, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本裕紹, 安井武史, “波長/空間変換およびマルチチャンネル分光器を用いたワンショット・フルフィールド共焦点光学顕微鏡の開発”, 第39回日本生体医工学会中国四国支部大会, (2016/10/15, 徳島大).