

[研究助成 (A)]

多数の細胞を長期診断するレンズレスイメージング サイトメトリの創生

Development of lensless imaging cytometry for long term observation of many cells

2191013



研究代表者

奈良先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科
物質創成科学領域

准教授

笹川 清 隆

[研究の目的]

本研究ではレンズレス蛍光イメージングにおいて、スペクトル情報を得るためのフィルタ構成の開発を目的としている。レンズレスイメージングは、小型かつ大面積な顕微イメージングを実現することが可能であるが、蛍光観察についての研究についての研究は比較的少ない。これは、レンズレス系に適用可能な高性能な励起光除去フィルタが提案されておらず、一般的な蛍光顕微鏡と比較して蛍光検出性能が低いことが問題の一つであったと考えられる。近年、我々はこれを解決する手法であるハイブリッドフィルタを提案し、レンズレス系においても高感度蛍光イメージングを可能とする基礎技術を確立した。

本研究では、これを更に発展し、レンズレス系において色情報を得るためのフィルタ構成を提案する。

[研究の内容, 成果]

・研究背景：レンズレス蛍光イメージングデバイス

レンズレスイメージングによる顕微観察は、レンズを用いた顕微鏡と比較して非常に小型化できることから、細胞を培養するインキュベータ内や実験室の外での利用が可能であり様々な応用が期待される。

近年、イメージセンサの画素数や感度等の性能向上、および、画像処理を行うための手法やコンピュータ性能の向上によりレンズレスイメージング技術の研究が進展した。特に、コヒーレンスの高い照射光を観察対象に照射した場合のホログラフィー像から元画像を復元する手法は、簡便な光学系で広い観察範囲と高い空間分解能を実現できることから、多くの研究報告がなされている[1, 2]。

しかし、この手法は明視野観察を行う手法であり、バイオイメージングにおける一般的な手法の一つである蛍光観察に適用することができない。レンズレス光学系における蛍光観察は以前より報告はあったものの、蛍光顕微鏡と比較すると検出性能が低いという課題があった。これは、一般的蛍光顕微鏡に用いられている励起光除去用の高性能干渉フィルタが、レンズレス光学系では最適な条件で利用できず、励起光除去が不十分となるためである。干渉フィルタは、透過波長スペクトルが角度依存性を持つため、レンズ等を用いてほぼ平行な光にして入射させる必要がある。レンズレス系では観察対象によって散乱された励起光の一部が干渉フィルタを透過して、背景成分として重畳した結果、蛍光観察性能が低減する。

励起光を除去するために、色素等による吸収フィルタを用いる手法もある[3, 4]。吸収フィルタは角度依存性をほとんど持たないので、上記のような問題は発生しない。しかし、色素で

吸収されたエネルギーの一部はフィルタ自体の蛍光として放射される。多くの場合、観察対象の蛍光と波長が重なるため、検出感度の低下につながる。特にレンズレスイメージング系では、フィルタと検出器であるイメージセンサが近接するため、影響が大きい。

この課題を解決する手法として、近年、我々は干渉フィルタと吸収フィルタを組み合わせたハイブリッドフィルタによって、レンズレス系においても高い励起光除去性能が実現できることを実証した[5-7]。レンズレス系でも高感度な蛍光観察が実現されることで様々な応用展開の可能性はある。

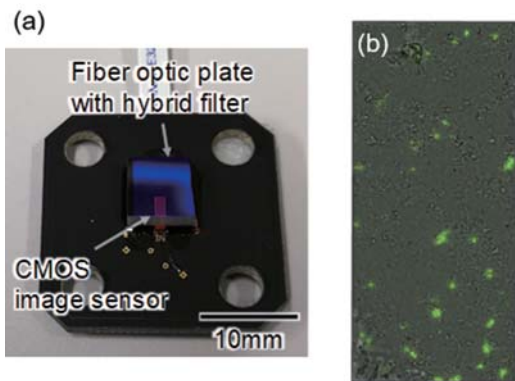


図1 (a) ハイブリッドフィルタを用いたレンズレス蛍光イメージングデバイス。(b) 撮像例。明視野像と蛍光像を合成している。

・オンチップ分光技術

これまでに開発したハイブリッドフィルタは単色の蛍光観察を対象としていた。一方、例えば細胞における様々な指標を比較するために多重染色を行い、多色での蛍光観察によって評価する手法もある。

イメージセンサチップ上で多色観察を行うための分光技術として、狭線幅のバンドパス干渉フィルタを用いる手法を検討した。提案フィルタ構成を図2に示す。先に述べたように、干渉フィルタの透過スペクトルが角度依存性を持つことはレンズレス系で蛍光観察をする上で問題点となっていたが、本提案手法ではこれを積極的に利用する。バンドパスフィルタを透過する波長は角度によって異なるため、フィルタ基板

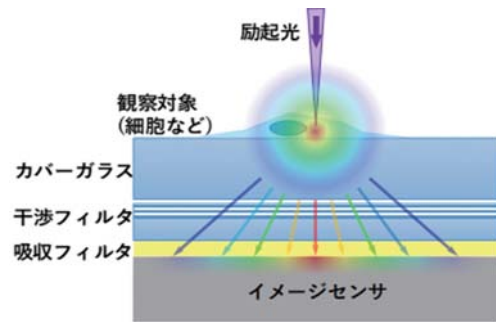


図2 オンチップ分光技術の概念図。バンドパス干渉フィルタによって分光を行う。

を透過し拡がることによって位置情報に変換されてイメージセンサによって検出される。すなわち空間的なパターンから波長分布を推定することが可能になる。

微弱な蛍光を観察するため、低蛍光材料である石英ガラス基板上に高精度な誘電体多層膜を成膜することによってフィルタを形成した。フィルタの透過波長帯は垂直入射時に中心波長600 nm、波長幅10 nmとした。また、基板厚は150 μm とした。作製した干渉フィルタの透過スペクトルを図3に示す。角度を10度ずつ変化させて、スペクトル測定を行った。入射光の角度が傾くことによって透過スペクトルが短波長側にシフトしていることがわかる。本フィルタでは、赤色から、緑色までの波長帯を検出可能であることが示唆されている。

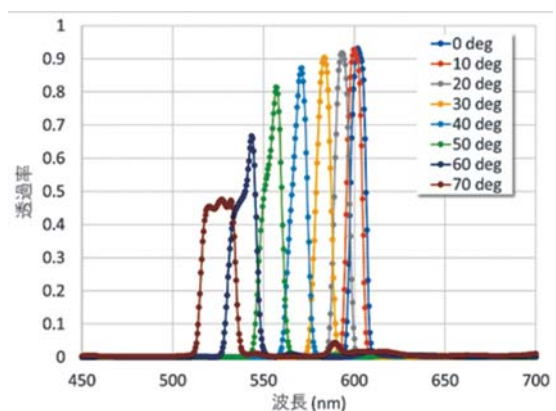


図3 試作した干渉フィルタ透過スペクトルの角度依存性。角度によって緑色帯から赤色帯まで分布している。

・ レンズレス蛍光イメージングの高空間分解能化

前節で提案した分光手法では、蛍光が観察対象から等方的に放射されて拡がるという効果を用い、一点の観察に複数の画素を利用する。そのため、取得画像一枚では高い空間分解能が得られない。これに対する解決方として、励起用レーザー光源から多数の微小なレーザースポットアレイを生成し、これを走査して高空間分解能を実現する。

図4に提案する光学系の模式図を示す。青色レーザーダイオードを光源に用い、拡大して平行光とした後に、マイクロレンズアレイに入射させる。このマイクロレンズによってレンズから焦点距離 Z_f だけ離れた位置にスポットが形成されるため、レーザースポットのアレイを生成することが可能となる。また、更に $Z_T/4$ だけ離れた位置にもアレイが形成される。これは、隣接するマイクロレンズからの光同士の干渉が起きるためであり、Talbot 効果の一種といえる。 Z_f はマイクロレンズの焦点距離によって決定されるが、 Z_T はアレイのピッチによって決定されるため、作動距離を大きくとることができる。図5に形成されたレーザースポットアレイのパターンを示す。使用したマイクロレンズアレイのピッチは $100\ \mu\text{m}$ であり、このスポットアレイのピッチも同じである。

レンズレスイメージングデバイスおよび観察

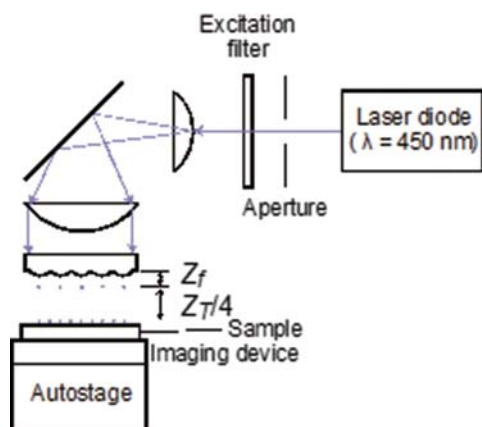


図4 試作したレーザースポットアレイ走査光学系。

Z_f (Focal plane)

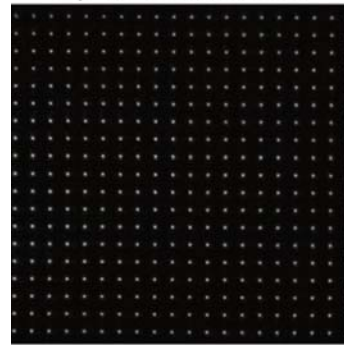


図5 マイクロレンズアレイを用いて形成されたレーザースポットアレイパターン。

対象の試料を、超音波駆動の自動ステージ上に配置し、これを走査して複数の画像を得る実験系を構築した。レンズレスイメージングには、我々がこれまでに開発したハイブリッドフィルタを搭載し、高感度な蛍光観察を可能とした。

高空間分解能イメージングの実証を行うため、蛍光ビーズ (F8844, Thermo-Fisher) を用いて蛍光観察実験を行った。この蛍光ビーズは $505\ \text{nm}$ と $515\ \text{nm}$ にそれぞれ吸収および蛍光のピークを有する。これをカバーガラス上に分散した。

図6に撮像結果を示す。図6(a)は励起光を一樣照射した結果である。使用した蛍光ビーズの直径は約 $15\ \mu\text{m}$ であるが、蛍光は等方的に放射されるためカバーガラスを透過した像では $50\ \mu\text{m}$ 程度に広がっている。 $10\ \mu\text{m}$ ずつ2次元的に走査した画像から合成した像が図6(b)である。この結果から、空間分解能が大きく改善できていることがわかる。

図6(c)は比較用に4倍の対物レンズを用いて蛍光顕微鏡で取得した同じ試料の撮像結果である。合成処理によって得られた画像が、顕微鏡像に近いものになっており、空間分解能の改善に成功していることが確認された。

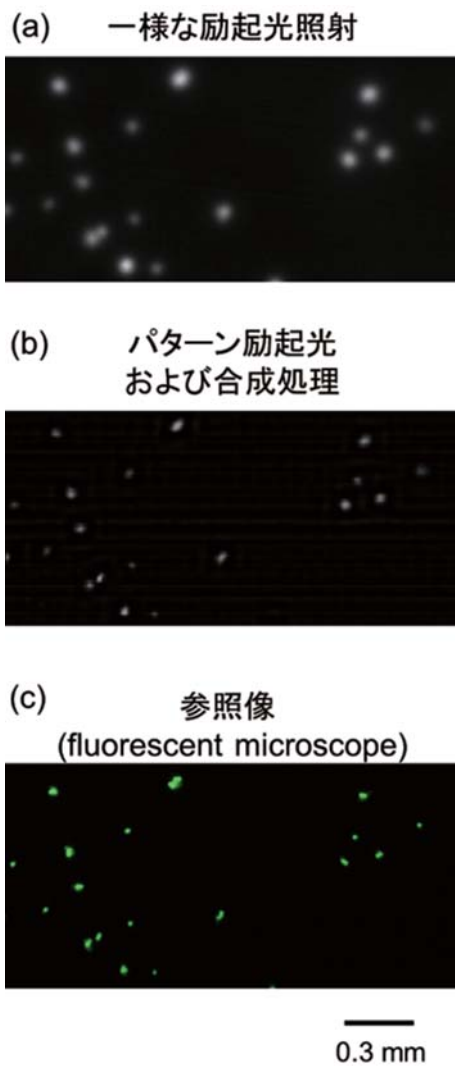


図6 (a) レンズレスイメージング光学系で取得した励起光一様照射時の蛍光観察像。(b) 提案手法によって得た高分解能合成像。(c) 蛍光顕微鏡での観察像。

[今後の研究の方向, 課題]

本研究では、レンズレス蛍光イメージング系において、パターン化された光源の走査によって空間分解能の改善が可能であること、および、干渉フィルタの波長依存性を用いた色の識別が可能であることを示した。

本技術を用いることにより、インキュベータ内等に設置可能な小型装置によって、長期間にわたって多数の細胞等の観察を行うことができると考えられる。しかし、本研究で使用した市販のイメージセンサはカメラ用に開発されたものであり、発熱が大きい。そのため、センサ上

に細胞を播種して撮像すると温度上昇により細胞が死滅することになる。これを解決する簡単な手法は、間欠的な画像取得によるタイムラプスイメージングである。しかし、速い動作に対応するためには、低電力駆動が可能なイメージセンサを準備する必要がある。

[成果の発表, 論文等]

1. Kiyotaka Sasagawa, Kenji Sugie, Yasumi Ohta, Mamiko Kawahara, Hironari Takehara, Makito Haruta, Jun Ohta, "Spatial Resolution Improvement of Lensless Fluorescence Imaging Device with Hybrid Emission Filter," The OSA Biophotonics Congress 2020, Apr. 20, 2020, Virtual Conf.
2. Kiyotaka Sasagawa, Kenji Sugie, Yasumi Ohta, Mamiko Kawahara, Makito Haruta, Jun Ohta, "Lensless Highly Sensitive Fluorescence Imaging," Biomedical Circuits and Systems Conference 2019, Oct. 17, 2019, Nara Kasugano International Forum, Nara, Japan.

[参考文献]

1. A. Greenbaum, W. Luo, T.-W. Su, Z. Göröcs, L. Xue, S. O. Isikman, A. F. Coskun, O. Mudanyali, and A. Ozcan, "Imaging without lenses: Achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy," Nat. Methods, vol. 9, pp. 889-895 (2012).
2. A. Ozcan and E. McLeod, "Lensless imaging and sensing," Annual Review of Biomedical Engineering, vol. 18, pp. 77-102, (2016).
3. S. A. Lee, X. Ou, J. E. Lee and C. Yang, "Chip-scale fluorescence microscope based on a silo-filter complementary metal-oxide semiconductor image sensor," Optics Letters, vol. 38, pp. 1817-19 (2013).
4. H. Takehara, K. Osawa, M. Haruta, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, and J. Ohta, "On-chip cell analysis platform: Implementation of contact fluorescence microscopy in microfluidic chips," AIP Advances, vol. 7, 095213, (2017).
5. K. Sasagawa, A. Kimura, M. Haruta, T. Noda, T. Tokuda, J. Ohta, "Highly sensitive lens-free fluorescence imaging device enabled by a complementary combination of interference and absorption filters," Biomed. Opt. Express, vol. 9, no. 9, pp. 4329-4344, Sep. 2018.
6. K. Sasagawa, Y. Ohta, M. Kawahara, M. Haruta, T.

Noda, T. Tokuda, J. Ohta, "Wide field-of-view lensless fluorescence imaging device with hybrid bandpass emission filter," AIP Advances, vol. 9, no. 3, 035108, Mar. 2019.

7. W. -S. Hee, K. Sasagawa, A. Kameyama, A. Kimura,

M. Haruta, T. Tokuda, J. Ohta, "Lens-free dual-color fluorescent CMOS image sensor for Förster resonance energy transfer imaging," Sens. Mater., vol. 30, no. 9, pp. 2579-2594, Aug. 2019.