総説**REVIEW ARTICLE****針の孔から深部を覗く**寺川 進¹, 櫻井 孝司¹, 井上 卓²¹ 浜松医科大学 光量子医学研究センター² 浜松ホトニクス 中央研究所

(平成 23 年 1 月 11 日受理, 平成 23 年 1 月 13 日掲載決定)

Looking into the Depths of Tissue through the PinholeSusumu Terakawa¹, Takashi Sakurai¹, Takashi Inoue²¹ *Photon Medical Research Center, Hamamatsu University School of Medicine*² *Research Center, Hamamatsu Photonics*

(Received January 11, 2011, Accepted January 13, 2011)

要旨

脳や肝臓などの臓器の奥深くで活動する細胞の生理学的な反応や、がん細胞の転移や炎症のような病理的な反応を、生きた動物個体において、分子のレベルで捉えることが、これまでわからなかった生命や難病の理解を飛躍させる。このことを実現するために、細いイメージング・ファイバー・バンドルを組織内に注射針のように刺入して、蛍光画像を得る方法(ファイバー結合式共焦点顕微鏡)を開発した。深さは 10 cm 程度、観察視野の広さは 500 μm 幅が得られる。このような装置の性能は、標準的な共焦点顕微鏡に比べて、未解決の課題を多く含んでいるが、いずれの課題もまだ限界に達しているわけではなく、常に解決の糸口があり、性能の向上が進展している。時間的・空間的分解能、光学的切断能など、光学顕微鏡としての基本的な能力について解説し、それらの次なる改善について検討を加えた。

キーワード : 顕微内視鏡, 蛍光観察, 生体内顕微鏡, がんの細胞診断**Abstract**

In order to understand the physiological function and pathological reactions of cells, microscopic observations of cellular activities at their molecular level deep inside the tissue in the living animal are necessary. To this end, we developed a fiber-coupled confocal microscope which sends a fine imaging bundle to the deep part of the tissue by a penetrating action just like that of an injection needle. Microscopic view can be obtained by the fiber system from the field of 500 μm in width, and 10 cm or more in depth. There are still many problems remaining unsolved. However, none of the problems face the physical limit, and thus are improving rapidly. Several problems associated with temporal and spatial resolutions, and optical sectioning capability were explained, and discussed toward further advancements of the method.

Key word : micro endoscopy, fluorescence imaging, *in vivo* microscopy, cellular diagnosis of cancer

1. はじめに

生体内で起こる現象をよく理解しなければ、各種疾患に対する治療戦略が立たない。これまでは、生体から組織や細胞を取り出して、薄い切片とした標本を顕微鏡観察し、実際に生体内で起こることを想像していた。また、細胞や組織のレベルで培養し、細胞の活動を捉えて、生体内の様子を再構築する手立てを取っていた。しかし、腫瘍を初めとする難病に対決するには、それだけで得られる情報では、まだ不足しているものと思われる。腫瘍は、原発巣の他に転移巣においても大きな障害をもたらす、一度転移が生ずると、手に負えないほど悪化が進む。この転移の機構すらなかなか分かりにくい、そのような現象を解析するには、薄切り標本や培養標本を使うのではなく、実際の個体内での解析が必要である。しかし、これまでは、個体内の観察は無侵襲タイプ的大型装置による構造透視や、肉眼レベルの画像を得る内視鏡による解析に限られ、分子レベルの活動を個々の細胞で観察することは極めて困難であった。我々は、これに対する解決策として、イメージング・ファイバーを使用した顕微内視鏡の開発を進め、その性能向上に努めてきた。正に、小さな針の孔を通して生体の奥深くを見ようとするものである。ここでは、その開発の成果を解説し、さらに、将来展開の戦略について触れてみたい。

2. ファイバー結合顕微鏡

生体深部を観察するためにイメージング・バンドルを使う方法は、すでに、色々な試みがなされている¹⁻⁴⁾。生体は比較的透明な材料でできているが、やはり、10 mmを超えるような深さに対しては、直接レンズによる像形成では、散乱による影響が著しく、ボケた画像しか得られない。複雑な構造が集積した細胞、また、そのような細胞が多層に重なった構造のために、屈折率の不連続性が著しく、光の直進性は望めない。長波長の光を使っても、この点では事情は変わらない。組織の奥深くにイメージング装置を直接的に送り込むことが唯一の方法に思われる。呑み込むことができるカプセル型の内視鏡も登場しているから、組織内に潜入していく小型の顕微鏡もありうるが、やはり、現在のところ、ファイバーを使うのが近道であろう。我々も、高速の走査装置を組み合わせたファイバーによるイメージング装置を開発した⁵⁾。実際に、イメージング・ファイバーと顕微鏡とを組み合わせようとすると様々な問題点があり、実用的なものを作るには多くの課題をクリアする必要があった。

3. ファイバーでどう見るのか

基本的な方針は、イメージング・ファイバー・バンドルを組織内に注射針のように刺入し、その断端から画像を得ようとするものである。画像は顕微鏡像であり、細胞の観察が可能な分解能を持つことが条件である。まず、問題は、組織内には光が届きにくいことである。すなわち、光源の問題がある。これを解決するには、別の光ファイバーを使って深部に光を送り込む方法があるが、できれば、イメージを取るファイバーを光を送り込むのにも使用したい。次の大きな問題は、画像を得るためのコ

Fig.1 Tumor cells (HeLa cells) transplanted under the skin of a nude mouse observed via an imaging-fiber bundle penetrating through the skin. Cells were stained with Photofrin prior to the observation.

ントラストをどのように付けるかである。通常の内視鏡の様に、照明光を送りビデオカメラで対象を観察するという明視野の方法では、無色透明な散乱体が配列した生きた細胞組織という対象では、コントラストが取れず、画像にならない。単一の細胞や薄い組織標本では、位相差法や微分干渉法によってコントラストを付けられるが、いずれも、透過照明をしなければならず、組織深部では難しい。このようなことから、顕微鏡モードとしては、落射照明型が適していると判断される。落射型の照明で可能な方法は、蛍光法(二光子励起法を含む)、燐光法、ラマン法などである。中でも、蛍光法は、バリエーションが広く、特異的な色素の開発や遺伝子操作による発色法が使える点で、応用価値が高い(Fig.1)。

4. 落射照明蛍光法

ファイバーに励起光を供給し、組織内の蛍光分子を励起して、その蛍光を同じファイバーを通して観察する方式で問題となるのは、ファイバー自身の蛍光の発生、すなわち自家蛍光による背景蛍光の増大である。ファイバー素子は、ある程度の長さを持ち、それがメリットであるが、蛍光発生の観点からは、極めて厚いガラスの層を通過するので、自家蛍光が高くなりがちである。多くのイメージング・バンドルがこの点で使用できないものであった。様々な種類のバンドルを探し、やっと低蛍光のイメージング・バンドルに巡り合い、なんとか像を得られるようになった。過去数年の間このファイバーを用いていたが、最近になって、さらに自家(背景)蛍光が低いファイバーが見つかり、画質がよくなった(Fig.2)。自家蛍光が下がることで、細胞の蛍光像のダイナミックレンジが上がり、その結果、コントラストが大きく改善した。従来、細胞内の構造があまり区別できなかったが、核を染めない染色法では、核の存在が明瞭に判るようになった(Fig.3)。もちろん、これには下記に述べる分解能や光学切断能の良し悪しも関係しているが、それらに加えて大きく関係していたのは、ファイバー自体の自家蛍光であった。

Fig.2 Comparison of autofluorescence of imaging bundles: Top; images of window surface observed with a coupling lens. Bottom; Fluorescence intensity profiles of images obtained with bundles from company A (left) and company B (right). Bar, 100 μm .

Fig.3 Cells cultured in the dish and stained with calcein. Images were taken with the coupling lens just focused on the window surface of imaging bundle (left). The same image was further processed with a Gaussian blurring algorithm which maintained the sharpness at high contrast edges. Bar, 30 μm .

5. 空間分解能

イメージング・バンドルを構成する素線としての光ファイバーは3 μm の直径である。そのうちの1 μm ほどが実際に光が通るコアであり、残りがクラッドを形成している。使用する光の波長は約0.5 μm であるから、コアの直径をさらに細くすることは物理的に難しそうである。したがって、イメージング・バンドルを用いて画像を伝送しようとする、3 μm がその分解能の限界となる。細胞の大きさは20～30 μm 、核の大きさは通常5 μm であるから、3 μm の分解能でも、個々の細胞の蛍光強度は測定できることになる。

バンドル断端にフォーカスを合わせて、その画像を撮ると、素線ファイバーが配列して蜂の巣のような構造があるのが分かる。これは周期構造であるので、フーリエ

変換してから周期構造に対応するフィルタリングをすると、見かけ上は消すことができる。しかし、その結果として得られる画像は、バンドル断端を画像化する結合レンズの焦点をわずかにずらせることによって画像をぼかした場合と全く変わらないものであった。Fig.3のように、条件付きのぼかしフィルタリングをすることで、素線ファイバーの配列を目立たなくさせるほうが効果的である。

分解能の向上については、さらなる手段がないわけではない。イメージング・バンドルの断端にある光ファイバーの素線は緻密に配列されているが、決して連続的なものではない。そこで、この面に投影される(入力される)画像をあらかじめ拡大したものにすれば、総合的な分解能は向上する。そのために、バンドルの先端にレンズを組み込むことが考えられる。強度分布が画像となるのであるから、拡大した画像を投影すれば、実質の解像度は拡大倍率分だけ向上する。

拡大倍率を持つレンズにはメニスカス型、ボール型、屈折率分布型(GRIN レンズ)などがある。イメージング・バンドルの直径は実用的には500 μm ほどがよいので、レンズも小さいものでなければならない。直径が500 μm を切るようなレンズだけを使って、像の拡大をすることは可能であるが、その像の収差を低く分解能を高く維持するのは難しい。円筒型のGRIN レンズがイメージング・バンドルと組み合わせるには使いやすいが、このレンズでも1 μm の分解能で画像を投影するには、円筒の内部の屈折率分布をミクロン精度で正確にコントロールしなければならず、やはり困難さがあって、分解能の向上にはもう少し時間がかかりそうである。

6. 光学的切断能

組織内に刺入したファイバーでその進行方向の先を見ようとする場合には、細胞などの層が重なっており、厚い組織全体から蛍光が発せられていると、得られる画像も蛍光が重なったものとなり、結果としてコントラストのないものとなる。そのため、分解能の上がない画像となりやすい。対象物がまばらであれば、問題はないが、できるだけ、薄い領域のX-Y面からの画像を得ることが分解能の向上につながる。共焦点走査法はそのような光学切断像を得るために有用な方法である。

ファイバー光学系でも共焦点走査をすることができる。イメージング・バンドルの素線となっているファイバーは、直径が3 μm であり、そこでの光の出入となるので、実質上ピンホールの役割を果たす。一本の素線である光ファイバーから出た光を標本上にフォーカスし、それによって励起された蛍光を同じ光ファイバーによって、集めるならば、ファイバー先端の出入力点は共焦点系を構成することになる。Z軸上で焦点から外れた部位から発生する蛍光はこの同じ光ファイバーでは効率よく集光することができないので、画像形成には貢献しない。このような働きをする光ファイバーの位置をX-Yの方向に走査すれば、光学的に切断した断層像が得られる。イメージング・バンドル内の各ファイバー素線に、次々にそしてある空間的間隔において光を入射させ、同時に光を取るためには、ニポー板を使うことができる。マイクロレンズを備えたニポー板であれば、

Fig.4 Optical sectioning capability of the fiber-coupled confocal microscope. Fluorescent beads of 0.2 μm in diameter were imaged with the focus shifted as indicated (top). The intensity of fluorescence was plotted against the shift in focus (bottom).

Fig.5 The sinus of liver visualized with dye injection in a living rat. The image was relatively sharp in a still mode, but unstable in the movie mode, due to the respiratory movement. Bar, 50 μm .

光源の有効利用が可能である。ニポー板にあるピンホールの大きさは 50 μm となっているが、20 倍の対物レンズを介してイメージング・バンドルに投影すれば、2.5 μm となり素線の太さに見合ったものとなる。

以上のような構成で、ファイバー先端での共焦点効果を評価することができる。直径 0.2 μm の蛍光ビーズを標本として、ファイバー先端からの距離を変えて蛍光像を撮像し、焦点の移動距離とビーズ像の蛍光強度の関係を調べると (Fig.4)、蛍光強度は、ジャストフォーカスの時に最も明るくなり、オーバーフォーカスでもアンダーフォーカスでも暗くなる。この蛍光強度曲線の半値幅で光学切断の能力を見積もると、6 μm となった。これは、通常の顕微鏡での共焦点走査で得られる半値幅の 1 μm に比してかなり悪いが、数 cm の深さのところの画像であるとすれば、十分薄い切断面といえる。走査装置を用いずにファイバーを落射蛍光顕微鏡に結合させて蛍光像を得ようとする、画像は数百ミクロン程度の厚みの層からの重なりを持つようになる。

7. 時間分解能

画像を得るために走査が必要な場合、一コマの画像を得るには通常時間がかかる。これは、生体内部のミクロン精度の画像を撮影するには好ましくない。なぜなら、動物は、その名のとおりに、体内もまた様々な動きに満ちているからである。特に問題となるのは呼吸性の動きである。脳の中でさえもリズムカルに揺れて見える。したがって、なるべく高速の走査装置を用いて、フレームレートを上げ、ひとつひとつのコマの画像ではぶれが含まれないように記録する必要がある (Fig.5)。画面内の観察対象がその位置を変えて不安定に動く場合、細胞レベルの画像は見にくいものとなる。特に、動画としては、見苦しくなる。ニポー板走査のようにフレームレートが高く (ビデオレート以上)、コマ画像が鮮明で、観察対象の動く範囲が限られているならば、画像処理によって、動画での画像ぶれを補正して安定化させることができる。

動きが、X-Y の方向にあれば、連続している 2 枚の画像を重ねた画像を作り、その合成画像の 2 次元フーリエ変換を行う。変換像においては、画像のぶれに対応する縞模様が現れる。原画像の一枚からフーリエ変換した画像をこの縞模様が入った画像から減算し、その結果を逆フーリエ変換して実画像に戻すと、その縞の間隔と方向に対応したところに原点に対称な 2 点が現れる。これが 2 枚の原図の間のずれの方向と大きさを示すベクトルである。このベクトルを知って、最初に用いた 2 枚の連続画像のうち、時間的に後に相当する画像全体の位置のずれを元に戻す操作を施す。これを時間を追って各コマに繰り返していけば画面は安定化し、その画面の中に現れている細胞などの形態の変化を安定した動画として見るができる。一コマの画面の中で画像が流れている手ぶれとは少し違うが、フレームレートを速くとることができる場合には、このような画像処理で画面の揺れを大きく改善できる。我々は、実際にそのようなプログラムを作り、ほぼリアルタイムでの処理が可能であることを確かめた。対象が Z 方向に不安定に動く場合はこのアルゴリズムは使えない。デコンボリューションを含む処理で対処できそうであるが、まだ、プログラムを作るところまでに至っていない。

8. 多点走査

多数のピンホールを持つニポー板による走査は、励起用輝点の連続的な動きによってなされる。しかし、イメージング・ファイバー・バンドル内の素線ファイバーの配列はディスクリットであり、ニポー板による輝点像が素線の中心に入射している時間は短く、素線同士の間落ちて有効に使われないということも起こる。これは、蛍光信号の低下と背景光の増大にも繋がっている。素線の配列に確実に合致した輝点の配列によって、素線の組合せに光を送り込めることが理想である。そのようなことを実現するには、照明光を多点化し、それらの配置パターンを電子的に任意の形に制御するか、素線ファイバー自体に電子的なオン・オフの能力を持たせるほかな

Fig.6 Two dimensional array pattern produced by an LCOS-SLM.

い。我々は、液晶型空間光変調器 (LCOS-SLM) を用いて、この課題に取り組んでいる。LCOS-SLM は多数画素の2次元配列を有する反射型の位相変調器で、レンズ光学系の瞳面に相当する位置に配置してレンズで投影するパターンを任意の形にすることができる。最近、誘電体多層膜をその反射面に使用することで、反射率が90%以上となり(井上卓ほか、浜松ホトニクス)、大変実用性が高まった (Fig.6)。この素子を用いると、1000点くらいの輝点の配列を作り出すことができ、その位置も任意にステップ状に移動させることもできる。これによる実用的な走査に向けて、各輝点の明るさの均一性を保証する方法を開発し、現在、256輝点の投影で1.6%、900輝点の投影で3.7%以内の明るさの変動率を達成した。液晶を電圧制御するので、まだ走査の速度は速いとはいえない。この点での課題は残りそうであるが、この素子ひとつで、レンズ、鏡、走査装置、光路切替え装置と多様な働きをすることができ、輝点走査だけではなく、顕微鏡対物レンズの球面収差補正や、顕微鏡の観察モードの高速切り替え、解像度の向上などに応用可能である。LCOS-SLMを組み合わせることにより、ファイバー結合式顕微鏡法もさらに進展する可能性がある。

ニポー板を用いたファイバー結合式共焦点顕微鏡の試用などについては、TAC社(さいたま市; 090-4391-6375) または電興社(浜松市; <http://www.denkosha.co.jp>)へ問い合わせさせていただきたい。

参考文献

- 1) D. Azzi, AF. Gmitro: Imaging performance of the fiber-optic image-bundle confocal microscope. Proc SPIE 2083: 139-146, 1993.
- 2) M. Hirano, Y. Yamashita, A. Miyakawa: *In vivo* visualization of hippocampal cells and dynamics of Ca^{2+} concentration during anoxia: feasibility of a fiber-optic plate microscope system for *in vivo* experiments. Brain Res, 732: 61-68, 1996.
- 3) B. A. Flusberg, E. D. Cocker, W. Piyawattanametha, J. C. Jung, E. L. M. Cheung, M. J. Schnitzer: Fiber-optic fluorescence imaging. Nat Meth, 2: 941-950, 2005.
- 4) B. A. Flusberg, A. Nimmerjahn, E. D. Cocker, E. A. Mukamel, R. P. J. Barretto, T. H. Ko, L. D. Burns, J. C. Jung, M. J. Schnitzer: High-speed, miniaturized fluorescence microscopy in freely moving mice. Nat Meth, 5: 935-938, 2008.
- 5) T. Sakurai, S. Yamamoto, A. Miyakawa, Y. Wakazono, T. O. Yoshida, E. Kohno, R. Tsuchiya-Susuki, Y. Wang, H. Hirukawa, S. Terakawa: Fiber-coupled confocal microscope (FCM) for real time imaging of cellular signals *in vivo*. Proc SPIE, 6088: 608803-1-608803-5, 2006.

著者紹介

寺川 進 (Susumu Terakawa)

昭和47年、東京医科歯科大学医学部卒業。同大助手を経て、昭和52年、米国NIH客員研究員。昭和55年、岡崎国立生理学研究所助教授。平成5年、浜松医科大学教授。バイオイメージング学会理事、生理学会評議員、神経科学会専門会員、光科学技術研究振興財団審査委員、浜松科学技術研究振興財団評議員・審査委員。医学博士。