レーザースペckル顕微鏡による単一細胞イメージング

平川 靖之

久留米工業高等専門学校 電気電子工学科 (〒830-8555 福岡県久留米市小森野1-1-1)

Imaging of Single Cell by Laser Speckle Microscopy

Yasuyuki HIRAKAWA

Department of Electrical and Electronic Engineering, Kurume National College of Technology,
1-1-1 Komorino, Kurume, Fukuoka 830-8555

(Received May 29, 2006)

Laser speckle microscopy was developed to observe a single living cell without any troublesome labeling preparation. The system consists of an optical microscope, a laser source, and a video camera. The technique has an advantage that cellular conditions can be instantaneously determined by observing speckle fluctuations. In the experiments, living and fixed HeLa cells were compared on the basis of speckle fluctuation and frequency spectra. By applying this technique to cell observations, it is expected to estimate not only cellular activity but also real-time movements of intercellular materials including the cytoplasm without fluorescence observation.

Key Words: Laser speckle, Cell observation, Microscope, Cellular activity

1. はじめに

レーザースペckルは、ホログラムと同じ範疇に属する光の干渉現象一つであり、ランダムな縞模様として観察される。レーザースペckルは、観察する側の光学系により、objective speckleとsubjective speckleに大きく分けられるが¹⁾、殆どの応用の場合、光学系により結像してスペckルを観察することから、subjective speckleを観察していることになる。レーザースペckルは現在、産業的には物理的な変異や表面のスムーズさ、歪みを検出する装置に应用されており^{1,2)}、また、医療分野では、レーザードップラー流速計と同様な血流モニタリングなどに利用されている³⁻⁶⁾。これらのレーザースペckルを利用した計測法の利点は、他のレーザー応用計測同様、非接触、非侵襲、非破壊という点にあるのはもちろん、CCDカメラにより画像を取得すれば、2次元イメージが容易に得られるという点に大きな特徴がある。

医療分野及びバイオ研究の分野では、細胞観察は非常に基本的なものであり、細胞培養は欠くことのできない作業である。しかしながら、細胞培養は手間暇がかかる上に、専門的な知識が要求される。培養している細胞が、ある程度増えた時に新たな培養フラスコに移し替える継代(けいだい)作業では、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡による細胞状態の観察が必要不可欠である。この顕微鏡による細胞状態の評価は、細胞形状のみしか判断材料がないため、オペレーターには十分な経験が必要とされる。

著者は、細胞内生体分子の一分子イメージングに関する研究^{7,8)}を行っていた際に、偶然、単一細胞上においてもレーザースペckルが観察され、そのスペckルの縞模様が細胞状態に応じて時間的な変化をすることを見いだした⁹⁾。これまで、ヒトの組織や植物細胞のレーザースペckルによる観察は報告されているが^{6,10-12)}、レーザースペckルによる単一細胞観察は、著者の知る限り、著者らによるものだけである。

実験では、まずレーザースペckル画像の処理法について検討を行った後、生細胞と固定化細胞(死細胞)において観察されるスペckル揺らぎについて比較を行った。その結果、レーザースペckルの揺らぎが両者で全く異なり、その周波数解析を行うと、生細胞特有の周波数ピークが存在することが明らかとなった。この周波数ピークを処理することにより、定量的な細胞活動評価実現の可能性がある。本レーザースペckル顕微鏡を利用することで、煩雑な蛍光分子によるラベリング処理や特別な技量無しで細胞状態を評価でき、蛍光分子を利用することの難しい用途、例えば再生医療に利用する細胞の評価等への応用が期待される。

2. 実験装置

実験装置の概略図をFig. 1に示す。顕微鏡(Zeiss, Axioplan)のステージ上に、試料の入った35 mmディッシュをセットし、ほぼ水平横方向(入射角80~85度)からレーザを照射する。この入射角は、試料と対物レンズ間の空間など

Fig. 1 Experimental setup.

の物理的な条件によって決まり、市販のレーザー顕微鏡のように、対物レンズを通して照射しても支障はない。レーザーには、半導体レーザー（シグマ光機、LDH2-635-3, 635 nm, 3 mW）、及び半導体レーザー励起YAGレーザー（Crystalaser, Model BCL-005-M, 473 nm, 5 mW）の2種類を使用した。また、偏光状態による影響を避ける場合には、光ファイバー（Thorlabs, SM500）を通してランダム偏光とし、試料近傍までファイバーで導いて照射した。観察したレーザースペckル像はCCDカメラ（SONY, SSC-DC430）を使って、デジタルビデオレコーダー（SONY, DSR-30）に動画として記録した。その後、コンピューターに取り込んだ後に静止画に落とし、画像解析を行った。

観察試料には、35 mmディッシュ内のカバーガラス上でフェノールレッド入り培地（Sigma-Aldrich, D6046）を使って培養したHeLa細胞を用いた。細胞を観察する際には、明瞭な像を得るために、フェノールレッド抜き培地（Sigma-Aldrich, D5921）に交換した。細胞培地の温度を変化させながら観察を行う場合には、細胞が乗ったカバーガラスを直接電気ヒーター上のシリコンゴムに置いて実験を行った。温度はセンサーヘッド部が独立した温度計（Custom, CT-110）を使って直接培地にヘッドを挿入して測定した。固定化細胞（死細胞）は、ホルムアルデヒド（Nacalai tesque, 371-52）に10分間浸すことで用意し、生細胞と同じ培地を用いて観察を行った。

本レーザースペckル顕微鏡の主な特徴として、以下の5点を挙げることができる。

- (1) 装置が単純である、
 - (2) 微弱なレーザー光で照明可能、
 - (3) 観察対象は散乱光の干渉現象であるので、高感度な検出器が不要、
 - (4) 観察光は照明光であるので、適切に照明波長を選択すれば、蛍光同時観察も可能、
 - (5) 試料である細胞には一切前処理が必要ない。
- (1)については、照明光源がレーザーであれば良いので、全ての市販の生物顕微鏡をspeckル顕微鏡として構成することが可能である。また、レーザーも連続動作

(CW)、パルス動作、波長、出力等のパラメータに殆ど制限がない。観察光に科せられる制限としては、空間的コヒーレンスがある程度あり、試料に光損傷を与えないという条件だけある。このため、(2)に示すように、mWオーダーの微弱なレーザー（例えば半導体レーザーなど）でも問題なく光源として利用できる。観察する対象は散乱されたレーザー光同士の干渉光であるため、蛍光等と比べると数桁強度は高い。そのため、(3)に示したように高感度な検出器は不要で、一般に市販されている通常感度のCCDカメラで十分である。また、観察する光は照明光であるため、照明光（励起光）とは通常異なる波長で発生する蛍光も、検出器さえ高感度なものを用意すれば、同時観察が可能である。そして、最も重要な特徴が、(5)の細胞に一切の前処理が不要である点である。これは、殆どの場合、蛍光分子の結合や遺伝子的な導入が必要になる蛍光観察に対する大きな利点である。同じく前処理の不要なレーザー顕微鏡として、多光子顕微鏡が挙げられるが、フェムト秒レーザーが必要なためどうしても装置が高額となる上、フェムト秒レーザーの高尖頭出力による光損傷が必ずしも無視できるわけではない¹³⁾ため、慎重に光強度を調整する必要がある。もちろん、蛍光観察や多光子顕微鏡による高感度観察では到底敵わないが、前処理が一切不要で微弱な光源で容易に細胞観察が行える点は、レーザースペckル顕微鏡が従来のレーザー顕微鏡に対する優位点になりうると考えられる。

3. 実験結果

レーザースペckル顕微鏡で得られるデータはビデオイメージであるので、speckルの揺らぎを定量的に評価する方法について検討を行った。speckle contrast法^{4,14,15)}、average difference法¹⁶⁾はレーザースペckルを解析する際によく使われる方法である。この二つの手法と、単純なフーリエ変換を用いた解析法で、同じspeckル動画データの解析を行ったところ、フーリエ変換を利用する解析法が、肉眼で得られる印象に最も近い結果が得られたこと、計算時間も高速フーリエ変換を利用することで短縮できることから、フーリエ変換処理を本研究では採用することとした。Fig. 2に、本研究で採用した動画像処理法の流れ図を示す。コンピューターに動画を取り込んだ後に、フレーム毎に静止画として保存する。コンピュータのメモリや処理時間の制限から、元画像の解像度を以下の要領で下げた。すなわち、保存した静止画を適切な大きさの画素単位で区切り、その画素内で画像輝度の平均値をとることで解像度の低減を行った。低解像度化した後、注目する画素の輝度の時間変化を取り出し、高速フーリエ変換することで周波数スペクトルを得る。更に、周波数軸に渡って積分することで、その注目した画素の輝度変化のパワーに相当するものを算出した。なお、これらの処理は、市販アプリケーションによるブラックボックス的な処理を避け、輝度情報や解像度の保存を図るため、全て自作のプログラムを用いて行った。

Fig. 2 Procedure for derivation of speckle fluctuation power.

まずはじめに、観察される細胞上のレーザースペckルが、照明波長・レーザ光入射角度により大きな影響を受けないことを確認した。しかし、レーザ光に直線偏光を用いる場合には、その偏向方向が観察されるspeckルに影響を及ぼすことが実験的に明らかになった。そこで、以下の実験では、照明光導入の簡便化も図るために、光ファイバーにレーザ光を入射してランダム偏光とし、試料近傍までレーザ光を導き照明することとした。

Fig. 3には、生細胞と固定化細胞のspeckル揺らぎを比較した結果を示す。Fig. 3の(a)と(b)は、生細胞と固定化細胞それぞれのハロゲンランプ照明による明視野像である。レーザースpeckルの静止画像は(c)と(d)に示す。(e)と(f)は、上述の手順により導出したレーザースpeckル

Fig. 3 Observed laser speckle on a living cell (left column) and fixed cell (right column). (a), (b) bright field images, (c), (d) speckle still images, and (e), (f) speckle fluctuation power. The scale bars in (e) and (f) are 10 μm . In (a) and (b), sampling points are also indicated for calculating fluctuation spectra for active (bright) part (black square), nucleus part (white circle), and medium part (white triangle) in Fig. 5.

ル揺らぎのパワーを示している。この結果は具体的には以下の手順により導出した。まず、17.07秒間のビデオ画像を512枚の静止画に変換する。本来の解像度は、 720×480 ピクセルであるが、これを一つの細胞だけの画像となるように 448×336 ピクセルに切り抜き、 4×4 ピクセル単位で平均化して切り分けて、 112×84 ピクセルに変換した。この後、同じ行・列のピクセルの輝度の時間変化を取り出し、高速フーリエ変換を使って周波数領域に変換し、周波数に関して積分することで、相対的なレーザースpeckルの揺らぎパワーを算出した。異なる条件で撮影したspeckル像は、明るさやコントラスト等を補正するために、輝度から直流成分を取り除き、更に細胞の存在しない細胞培地部分を基準にして、細胞部分のspeckルを評価した。なお、使用したCCDカメラのフレームレートは30 frames/sなので、Nyquist周波数より、この解析により評価できる周波数域は15 Hzが上限である。この操作により得られた典型的な結果が先のFig. 3 (e)と5 (f)である。この図では、白い点ほどspeckル揺らぎが大きく、黒い点ほど動かないことを示している。平均的なレーザースpeckル揺らぎのパワーは、生細胞の方が固定化細胞よりも明らかに高いことが分かる。この差異は動画を見れば一目瞭然であるが、このように静止画としても定量化できることが示された。この生細胞と固定化細胞におけるspeckル揺らぎの差がどのような周波数成分に主に依るものなのかを調べてみたところ、Fig. 4に示すような結果が得られた。すなわち、生細胞ではスペクトル領域全体に渡って強度が大きく、固定化細胞との差異がはっきりしているばかりではなく、*で図中に示した数Hzの低周波域に生細胞特有のピークが存在することが明らかとなった。これをより分かりやすく示したのが、Fig. 5のカラーで示した周波数スペクトルの時間変化のグラフである。これらの6つのグラフは、Fig. 3(a), (b)中に示した■(Fig. 3 (e), (f)で明るく表示される揺らぎの大きい部分), ○(核の部分), △(培地の部分)に対するものをそれぞれ示しており、約30秒間の動画データを

Fig. 4 Frequency spectra of speckle fluctuation for active (bright) points in living/fixed cell.

Fig. 5 Temporal variation of speckle fluctuation spectra for three-different points, bright (active), nucleus, and medium points.

利用し解析を行ったものである。グラフでは、赤い部分ほどスペクトル強度が高く、青に移るにつれて強度が下がっていることを示す。細胞の存在しない培地部分のスペクトル時間変化(Fig. 5 (c))が、生細胞・固定化細胞、どちらの場合も殆ど差がないのに対し、生細胞のスペックル揺らぎの大きな部分(Fig. 5 (a)左)及び核部分(Fig. 5 (b)左)のスペクトル時間変化はともに、黄色で示される比較的強度の大きな部分が多いことが分かる。固定化細胞の場合は、解析に使用したデータに観察時のノイズが多少乗っているが、生細胞と比較すると黄色の部分が明らかに少なく、この図からも生細胞のスペックル揺らぎが大きいことが確認できる。生細胞の核部分も、スペックル揺らぎの大きな箇所とはほぼ同じような傾向を示すが、そこと比較すると若干強度が低い様子が分かる。

細胞活動とレーザースペックル揺らぎの相関をより明確にするために、レーザースペックル揺らぎのパワーについて更に詳しく検討を行った。Fig. 6は生細胞と固定化細胞のレーザースペックル揺らぎの培地温度依存性を調べた結果である。グラフにプロットしたデータは生細胞は10個の、固定化細胞は2個の細胞の平均値である。固定化細胞のサンプル数が少ない理由は、固定化細胞におけるレーザースペックルは生細胞に比較して非常に安定しており、データの揺らぎが少なかったためである。Fig. 6に示すように、固定化細胞に関しては、レーザースペックル揺らぎの温度との相関性は殆ど見られないのに対し、生細胞では、温度とともに単調に増加する傾向が見

Fig. 6 Temperature dependences of speckle fluctuation for living cells and fixed cells.

られる。使用した温度制御装置が冷却機能を有しない上に、45℃以上では、カバーガラスから細胞が剥がれてしまったため、25～45℃の範囲外におけるレーザースペックル像を得ることはできなかったが、45℃以上における生細胞のレーザースペックルは、目視では明らかに45℃以下のそれよりも活動度は低いことが確認できた。このことは、細胞培養のための最適温度が37℃であることに符合しており、生細胞におけるレーザースペックル揺らぎの度合いは細胞活動と密接に関係していることを強く示唆している^{10,11)}。

4. 考 察

Fig. 3の結果からも分かるように、生細胞のレーザースペックル揺らぎは強く、固定化細胞のそれは殆どない。しかしながら、どちらの状態でも細胞構造は明視野像でもレーザースペックル静止画でも像の明暗として観察できる。例えば、細胞核でのスペックルは、Fig. 3 (c)と(d)のように常にその周辺部よりも暗く観察される。一方、Fig. 6から分かるように、培地温度上昇による細胞活動の活発化に伴って、レーザースペックル揺らぎが激しくなっている。これらのことを総合的に勘案すると、細胞上で観察されるスペックルは、2つの異なるタイプから構成されているという可能性が考えられる。一つのスペックルは活動的な型で、もう一つは動かない型のスペックルである⁴⁾。この動かないスペックルは、中間径フィラメントなどの細胞構造を反映して決定されると考えられ、そのため固定化細胞でもスペックルが観察されていると考えられる。一方、活動的なスペックルは、細胞膜の動き、並びに細胞内の小器官やATP(adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸)産生活動に関係する生体分子の動きを反映している¹²⁾と考えられる。これまで、植物の葉緑素の動きに応じたスペックル揺らぎの観察が報告されてい

る¹⁰⁾ことから、細胞内小器官や生体分子がレーザースペckルに影響を及ぼしていると考えるのは自然である。今回の実験では、装置の空間的な制限からレーザ光入射角度が80度程度となったが、レーザースペckルについて、入射角度依存性について調べたところ、入射角の大きな影響は観察されないことが分かった。更に、細胞膜の屈折率(1.37程度)と培地の屈折率(殆ど水で構成されると考えると1.33程度)を考慮すると、細胞膜での全反射は起こらないため、観察されているspeckルは、大きなレーザ入射角による細胞膜上での反射により、細胞膜の情報を含んでいることは当然考えられるが、そればかりではなく、細胞内部に光が入り込み、内部構造や内部物質により散乱され生じたspeckルが観察されていると推測される。細胞核部分のspeckル揺らぎが少なく評価される原因については、細胞核が存在する部分は、細胞の他の部分に比べて空隙が少なく、細胞質等の物質移動が少なくなっていることを示している可能性も考えられる。また、Fig. 4の周波数スペクトルからは、低周波域に特徴的な周波数ピークのあることが分かるが、これは細胞質などの流体の比較的ゆったりした動きに依る可能性も示唆しているとも考えられる。これらの現象を確認するには、ある特定分子に蛍光タグを結合させて観察する蛍光顕微観察を同時に行って検討する必要がある、これからの課題である。

現在の装置的な課題として、使用しているCCDカメラのフレームレートが30 frames/sであるため、解析可能な周波数が15 Hzが上限であることが挙げられる。そのため、高速度カメラを用いた、より高い周波数領域の解析を検討している。細胞内生体分子の多くは、細胞内で激しいブラウン運動をしていると考えられるため、高速度カメラによる高周波領域の解析により、前処理の何ら施されていない生(なま)の細胞の情報を、蛍光観察に依ることなしに明らかにできる可能性がある。また、ある特定の分子の吸収線に適した波長のレーザ光を照射光として用いることで、細胞内生体分子を追跡する可能性も考えられる。

5. まとめ

レーザースペckル顕微鏡によりヒトの単一細胞の観察を行った。生細胞と固定化細胞を比較すると、生細胞でのレーザースペckル揺らぎは明らかに固定化細胞よりも活発であり、揺らぎの周波数スペクトル解析を行うと、低周波域に生細胞特有のピークが存在することが分かった。また、レーザースペckル揺らぎの温度依存性を計測したところ、生細胞のレーザースペckル揺らぎは、温度に比例して活発になり、細胞活動を反映していることを確認することができた。本研究により、レーザースペckル顕微鏡が、ラベリングなどの前処理が不要であり、細胞に損傷を全く与えずに細胞状態を定量的に評価できるユニークな細胞観察法となる可能性を示すことができた。

謝 辞

この研究は2004-2005年度文部科学省科学研究費補助金基盤研究(C)16590028による一部補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) R. Jones and C. Wykes: *Holographic and Speckle Interferometry* (Cambridge University Press, Cambridge, 1989) Chap. 7.
- 2) 岡本 卓, 朝倉 利光: 計測と制御 **32** (1993) 667.
- 3) Y. Aizu and T. Asakura: Opt. Laser Tech. **23** (1991) 205.
- 4) J. Briers: Opt. Eng. **32** (1993) 277.
- 5) B. Choi, N. Kang, and J. Nelson: Microvasc. Res. **68** (2004) 143.
- 6) J.S. Paul, A.R. Luft, E. Yew, and F.-S. Sheu: NeuroImage **29** (2006) 38.
- 7) Y. Hirakawa, M. Suzuto, H. Ohnishi, T. Shingaki, E. M. Eyring, M. Tokunaga, and T. Masujima: Analyst **128** (2003) 676.
- 8) M. Suzuto, Y. Hirakawa, H. Ohnishi, S. Tachino, T. Shingaki, E. M. Eyring, and T. Masujima: Anal. Sci. **19** (2003) 43.
- 9) Y. Hirakawa, T. Hasegawa, and T. Masujima: Jpn. J. Appl. Phys. **44** (2005) L85.
- 10) J. Briers: Optic. Commun. **13** (1975) 324.
- 11) A. Oulamara, G. Tribillon, and J. Duvernoy: J. Mod. Optic. **36** (1989) 165.
- 12) P. Yu, L. Peng, M. Mustata, J. Turek, M. Melloch, and D. Nolte: Opt. Lett. **29** (2004) 68.
- 13) Y. Hirakawa: in *Recent Developments in Lasers and their Applications* ed. N. J. Vasa (Research Signpost, Kerala, 2006) Chap. 7.
- 14) J. Briers, and S. Webster: Optic. Commun. **116** (1995) 36.
- 15) A. Fercher, and J. Briers: Optic. Commun. **37** (1981) 326.
- 16) H. Fujii, K. Nohira, Y. Yamamoto, H. Ikawa, and T. Ohura: Appl. Opt. **26** (1987) 5321.