勾配野顕微鏡による ラベルフリーな疾病診断

テウ・キム、シャミラ・スリドハルン、ガブリエル・ポペスク

透明サンプルの透過率を利用する内因性コントラスト法によって、臨床病理学が変化していくことは周知の通りである。これらの方法は、蛍光染色のようなラベルを必要としない非侵襲な技術であり、生物学の標本サンプルを生きたまま研究したり、癌などの疾病を診断したりすることが可能になる。

非染色のライブセルや組織の薄い切片の観察（生体組織検査）は構造物が透明でコントラストが低いため、イメージングが非常に困難である。過去400年の間、半透明な標本の高コントラスト化という目標を掲げることで、光学顕微鏡は大きく発展してきた[1]。

顕微鏡でコントラストを作り出す方法は2つに分けられる。外因性のものと内因性のもので、コントラストを発生させるためのアプローチに外部要因を必要とするかどうかで分けられる。外因性アプローチとしては、標準的な臨床病理学で使われる固定染色法や、細胞生物学で頻繁に使われる蛍光染色法などがある。内因性アプローチとしては、位相差顕微鏡や微分干渉（DIC：differential interference contrast）顕微鏡が含まれる[2]。内因性アプローチは、対象となる構造物へ吸収剤や排出剤を添付するというよりも、光と組織の間に起きる特定の干渉を利用している。そのため、内因性コントラスト法は細胞や組織を破壊しない状態で研究できるという利点がある。

定量的位相イメージング（QPI：Quantitative phase imaging）は、標本サンプルで視野の各位置において光がどの程度遅延するかを計測する内因性コントラスト法として注目されている[3]。ここでの光路長や位相情報は、標本サンプルの屈折率や厚みに関係しており、それゆえ新たな生物学、特に細胞の構造やダイナミクスの研究を可能にしている[4]～[6]。近年、米イリノイ大学（University of Illinois）の我々のグループは、QPIが臨床病理学に対して価値ある将来性を持っていることを発見した。それは、空間光干渉顕微鏡（SLIM：spatial light interference microscopy）を利用して、生体組織検査に関連する光学距離マップが癌診断に活用できるというものである[7]。

SLIMはゼルニケの位相差顕微鏡とガボールのホログラフィ顕微鏡を組み合わせて定量的な位相画像を描画するもので、空間的には0.3nm、一時的に0.03nmの光学距離の変化も検出できる[8]。我々は、40倍（開口数0.65）の対物レンズを用いて、病理学者が前立腺上皮内高度腫瘍形成（HGPIN：high-grade prostatic intraepithelial neoplasia）と診断した前立腺の生体組織検査の中心画像を得ることができた（**図1**）。

勾配野顕微鏡

注目すべきは、この顕微鏡において

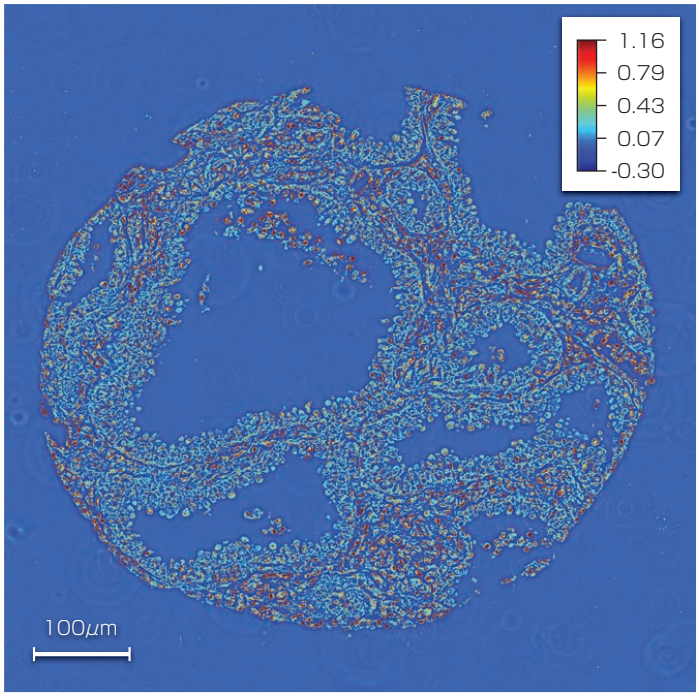

図1　前立腺の生体組織検査の定量的位相画像を、100枚（10×10枚）の小さい視野の画像から組み合わせた。定量的データは異なる色（赤は長い光路長、青は短い光路長）で示している。カラーバーは位相シフトのラジアンを示す。HGPINの中心において、基底細胞層がクリアに見える。

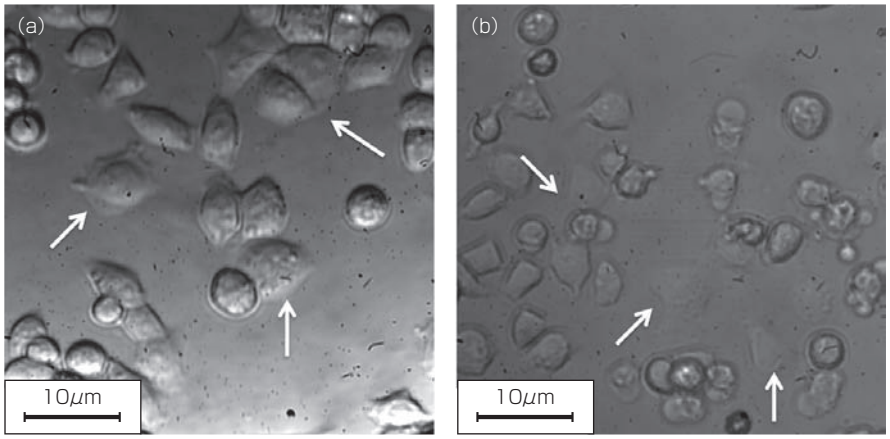

図2　ラスチック製ペトリディッシュ上のHeLa細胞培養を表示。(a)GFM、(b)従来のDIC顕微鏡。白の矢印は平坦な細胞を示す。複屈折材料のため、GFMでのみコントラストが上昇している。

光路長の空間的揺らぎ(平均値ではない)が真の診断能力を秘めていることを発見した点である。言い換えると、癌と通常の組織の位相シフトの平均値はほぼ同じだが、空間的揺らぎの統計値(分散など)は全く異なるということだ。特に前立腺癌の統計値は、平坦な分散となる通常の組織と比べて不規則になったり、広く分散したりするという特徴があることを発見した。これらの結果は、癌診断への新たな、ラベルフリーな定量的アプローチの基礎となるのかもしれない。

位相シフトの絶対値だけでなく相対的変化も組織診断に関連があるという事実は、光学的視野からも非常に重要である。必ずしも位相シフトを定量化させる必要はなく、代わりに位相マップの空間的差異を測定するという、新たな、より簡潔な方法を開発できることを示唆している。そのような方法のひとつが勾配野顕微鏡(GFM：gradient field microscopy)と呼ばれる技術で、最近我々の定量的光イメージング研究室(Quantitative Light Imaging Laboratory)で開発されたものである[9]。GFMによって、細胞や組織といった透明な標本サンプルの高コントラスト画像を得ることができる。GFMでは光学距離の空間的変化を、光が送る位相情報の一次微分係数と二次微分係数によって測定する。

現在では、GFMは業務用の明視野顕微鏡のアドオンモジュールとして提供されている。光源の可能な限り高い空間的コヒーレンスのために開口絞りを閉じる。システムは、画像フィールドのフーリエ変換にアクセスする4fシステムを作るふたつのレンズのシリーズから構成される。このフーリエ面では、空間光変調器を通じて空間振幅変調が提供される。この面で発生した変調に応じて、画像面変化における位相微分係数の種類と次数が得られる。異なる位相微分係数を得るために、3種類の異なるモデルのGFMを実装している。一方向に沿った一次係数(組成の勾配)、一次微分係数の変調(勾配の強度)、二次微分係数(ラプラシアン)である。

GFMの利点

GFMの設定には、異なる操作モードでも利用できる柔軟性に伴う素早い取得スピードや安定性といった、多くの有用な特徴がある。GFMはシングル・ショット技術で取得後に画像処理を一

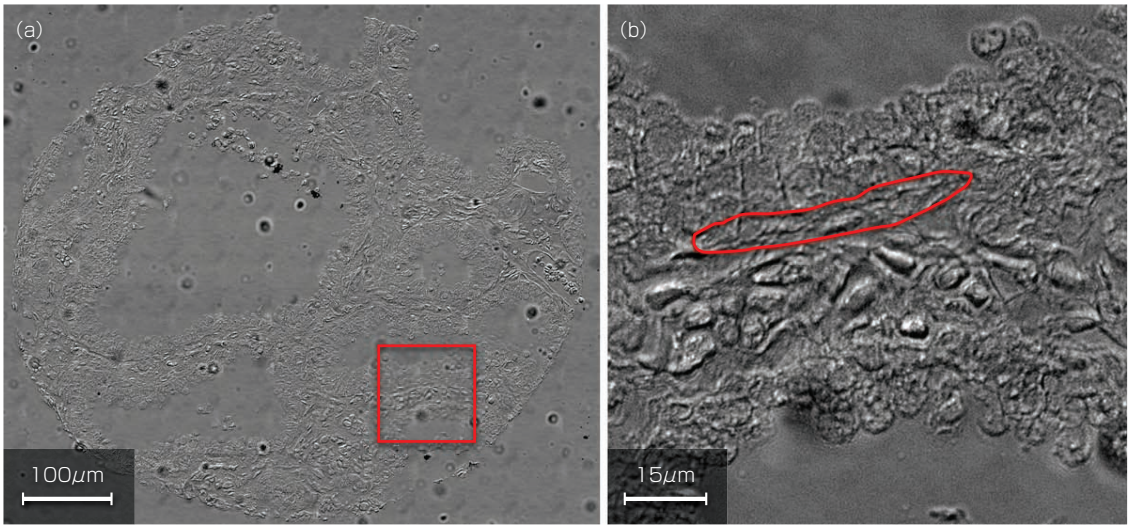

図3 (a)図1と同じ生体組織検査の標本をGFMで表示。100倍(開口数1.4)の明視野対物レンズを用い、225枚(15x15枚)の個々の画像から組み合わせて作製。(b)基底細胞層を見るために腺の領域を拡大。HGPIN状態であることが分かる。

切必要としないので、このシステムの取得スピードはカメラの性能が許す限りの速さとなっている。さらに、空間変調は電子的に変更でき、システムの機械パーツを動かさなくてよい。これは、複屈折プリズムの物理的な移動を必要とする従来のDIC顕微鏡とは対照的である。プラスチック製容器などの複屈折材料を通したイメージ化は通常DIC顕微鏡では難しいが、GFMではイメージングシステムにおいてプリズムが不要になることで可能になる(**図2**)。通常のDIC顕微鏡では低コントラストとなる細胞でも、GFMを通して目立つように表示できる。

GFMの素晴らしい特徴のひとつは、非染色の標本サンプルも表示できることであり、HGPIN状態となった前立腺上皮細胞が前立腺癌に関連した形態的な特徴、たとえば目立った核小体やローマ橋形状を持っていることを明らかにした(**図3**)[10]。さらなる研究によって、HGPINの前立腺は悪性腫瘍に関連した遺伝的、免疫組織化学的な変化を示していることが明らかになっている[11]。しかしHGPINの前立腺には基底細胞膜が存在しており、基底細胞が部分的にも存在していれば悪性腫瘍とは診断されない。現在では、サイトケラチン34BE12やp63マーカーに対する抗体を用いて基底細胞を検出できる。GFMならではの特徴に注目すると、生体組織検査において基底細胞を非染色で観察できる。さらにGFMの高速イメージングによって、リアルタイムで診断情報を得ることが基本的には可能になる。

現在は、診断や処理の自動化のための「光学マーカー」の同定に焦点を当てて研究している。このような進歩したイメージング原理に基づいた「スマート顕微鏡」が発展していき、近い将来では画像よりも情報を生み出すだろうと予測している。つまり、画像を蓄積することなくリアルタイムに分析や診断をするイメージングシステムの製作を考えている。進歩した光学イメージングと同時画像処理の連携によって、より速く、ラベルフリーな診断が可能になる革命が病理学で起き、世界規模で安価に利用できるスタンダードになると期待されている。

謝辞

本研究は全米科学財団と国立癌研究所にご支援いただいた。詳細はhttp://light.ece.illinois.edu/をご覧いただきたい。疾病学の助言をいただいたクリシュナ・タンジェラ、アンドレ・ベラに感謝する。

参考文献

(1) Editorial, "Milestones in light microscopy," Nature Cell Biol., 11, 1165(2009).
(2) M. Pluta, Advanced light microscopy, Polish Scientific Publishers, Warsaw, Poland(1988).
(3) G. Popescu, Quantitative phase imaging of cells and tissues, McGraw Hill, New York, NY(2011).
(4) Y.K. Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 107, 15, 6731?6736(2010).
(5) H.F. Ding et al., Phys. Rev. Lett., 101, 23, 238102(2008).
(6) M. Mir et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 32, 13124?13129(2011).
(7) Z. Wang et al., J. Biomed. Opt., 16, 11, 116017(2011).
(8) Z. Wang et al., Opt. Exp., 19, 2, 1016?1026(2011).
(9) T. Kim, S. Sridharan, and G. Popescu, Opt. Exp., 20, 6, 6737?6745(2012).
(10) J.I. Epstein and G.J. Netto, Biopsy Interpretation of the Prostate, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA(2007).
(11) J.I. Epstein and M. Herawi, J. Urol., 175, 820?834(2006).

著者紹介

テウ・キム(Taewoo Kim)とシャミラ・スリドハルン(Shamira Sridharan)は大学院生、またガブリエル・ポペスク准教授(Gabriel Popescu)は米イリノイ大学アーバナシャンペーン校(University of Illinois at Urbana-Champaign)の電子情報・生物工学部、およびベックマン高等科学技術研究所(Beckman Institute for Advanced Science and Technology)に所属している。
e-mail: gpopescu@illinois.edu URL: http://light.ece.illinois.edu

LFWJ