

バイオイメージングの性能強化につながる顕微鏡の改変

ジャスティン・マーフィー

コーディッドタイコグラフィは、本質的に定量的な性質を備えてさまざまな測定に対応する、新しい光学機器の実現につながるかもしれない。

ある新しい顕微鏡プロトタイプは、標準的なタイコグラフィを新たな深みへと導き、かつてないほど大きな開口数(Numerical Aperture: NA)と、他の既存機器よりも数ケタ高いイメージングスループットを達成している。

「これは、本質的に定量的な性質を備えてさまざまな測定に対応する、新しい光学機器を実現するものだ」と、米コネチカット大(UConn)医用生体工学部のUTC准教授を務めるグォアン・

ツェン氏(Guonan Zheng)は述べた。

「コーディッドタイコグラフィ」(coded ptychography)というこの新しい手法は、ツェン氏率いるチームが開発したもので、コンピュータアルゴリズムで大規模なデータセット(物体の位置をずらしながら取得した多数の推論パターンで構成される)を反転させて画像を生成する、顕微鏡イメージングの1つの手法に基づいている。標準的なタイコグラフィ顕微鏡法は、基

礎科学と応用科学の両方に適用されるコヒーレント回折イメージング手法だが、現時点では光学顕微鏡法にはそれほど適していない。ACS Photonics誌に公開されたUConnチームの研究論文によると、イメージングスループットが低く、解像度が限られているために、光学顕微鏡法に適用するには不十分だという。

従来の顕微鏡装置は、対物レンズが大きくて分厚い。また、標準の対物レンズでサンプルを観察する場合は通常、解像度とイメージング視野の間のトレードオフが必要である。

「このデバイスを開発する動機は、その両方を両立させることにあった。従ってこれにより、高い解像度と非常に広い視野が同時に得られるようになった」とツェン氏は述べた。

コーディッドタイコグラフィのプロトタイププラットフォームに対して、研究者らは、分厚い対物レンズを極薄の散乱レイヤに置き換えることにより、基本的に独自のイメージングシステムを構築した。これによって、サンプルを無秩序加工された表面を通して変換し、レンズレスで回折データを取得することができた。この表面は、化学エッチングされたミクロンレベルの位相散乱器とプリントされたサブ波長の光強度吸収器で構成されており、「既存のどのタイコグラフィシステムよりも大きな開口数を達成」する。

図1は、コーディッドタイコグラフィのプロトタイプの構造を示したものである。イメージセンサのカバーガラ

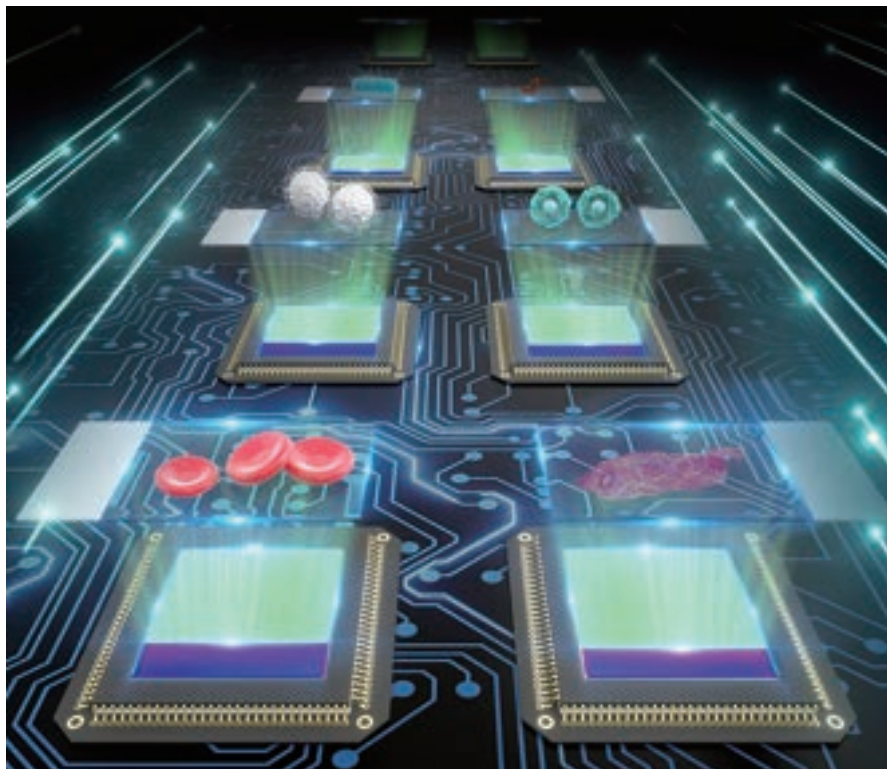


図1 コーディッドタイコグラフィ顕微鏡法の構造。イメージセンサのカバーガラスが無秩序加工面に置き換えられている。この加工面を通して標本を変換することで、レンズレスで回折データを取得する。(画像提供:グォアン・ツェン氏)

スが無秩序加工面に置き換えられている。この加工面によって、大きな角度の回折光が、それよりも小さな複数の検出角にリダイレクトされる。これにより、他の方法では観察できない物体の細部を、ピクセルアレイを使用して取得することができる。

論文によると、同チームは、現行のレンズレスのタイコグラフィシステムの2倍以上の解像度と開口数を達成したという。「その独特の作製プロセスも、従来のメタ表面とは異なり、光学リソグラフィや電子リソグラフィを利用することなく、費用対効果の高い製造が可能だ」とツェン氏は述べた。

加工面は、顕微鏡用カバースリップの上に作製される。イメージセンサに取り付けると、加工面がセンサのピクセルアレイに面することになる。この配置によって、外部物体と散乱レイヤが直接接触することが回避される。従来の散乱レンズの安定性とアライメントの問題も解決される。

ツェン氏は、物理的なものではなくコンピューティング上の対物レンズを使用することにより、「解像度を向上させた並列コーディッドタイコグラフィ手法」を確立したと述べている。研究者らによると、このプロトタイプは「従来のレンズベースの光学系を使用する場合は観察できない、空間的広がりや周波数成分を持つ光学空間を解明することを目的に、設計されている」という。

レンズベースのシステムには通常、機械的安定性の厳しい要件が課される。ミスアライメントや環境的变化によって、画像の焦点ボケが簡単に生じてしまう。同チームは、この新しいタイコグラフィデバイスにおいて、加工面上の何もない領域を位置トラッキング用に符号化することにより、この問題を克服している。このデバイスは、



図2 並列コーディッドタイコグラフィのプロトタイプデバイス。

機械式ステージからのフィードバックなしで動作可能で、開ループの光学取得を実現する。図2は、UConn チームが開発したプロトタイプデバイスである。

研究者らは、ピクセル読み出しの空間と角度の両方の応答を考慮して、コヒーレント回折イメージングモデルの開発に取り組んでいる。「われわれの低コストのプロトタイプは、開口合成を行うことなく、解像対象上の308nmの線幅を直接解像することができる。有効視野240mm²のギガピクセルの高解像度顕微鏡画像が、15秒で取得できる」とツェン氏は述べた。

同氏は、光学プリズム、凸レンズ、細菌コロニーなど、多くの2 π ラップを伴う、変化が緩やかな3D位相物体を復元できることも実証した。「そうした物体の低周波位相成分は、他の既存のレンズレス手法で取得するのは難しい」と同氏は付け加えた。

コーディッドタイコグラフィ 顕微鏡法の適用例

この技術は、複数の生物医学用途に有効で、その中の1つがデジタルパソロジーである。コーディッドタイコグラフィは、組織片の高解像度のホールスライドイメージ(WSI)を診断用に取得することができる。

「通常、病院では、生体サンプルを採取し、ガラススライドの上に塗布し、顕微鏡で観察する。全体構造を理解するには、このサンプルをさまざまな位置でスキャンする必要がある。われわれのデバイスは視野が非常に広いいため、サンプル全体を1度に撮像することができる」とツェン氏は述べた。

ツェン氏によると、従来のホールスライドスキャナとは異なり、撮像後に厚みのある3Dサンプルのデジタルリフォーカスを行うことができるという。この機能によって、レンズの断面を測定して、ペトリ皿の上の細菌コロニーの3D形状を観察することも可能である。

通常の光学顕微鏡では、8台の顕微鏡を並列に動作するように設定するのは難しい。「われわれのケースでは、対物レンズはなく、8つのコーディングされたイメージセンサがあるだけだ。われわれの研究では、8つのセンサをすべて同時に動作させている。このプラットフォームを使用することにより、1つのセンサを使用する場合の8倍のスループットを達成することができる」とツェン氏は述べた。

血液検査も、コーディッドタイコグラフィ顕微鏡法の潜在的用途の1つである。例えば、この手法で取得したギガピクセル画像を白血球分類計数に使

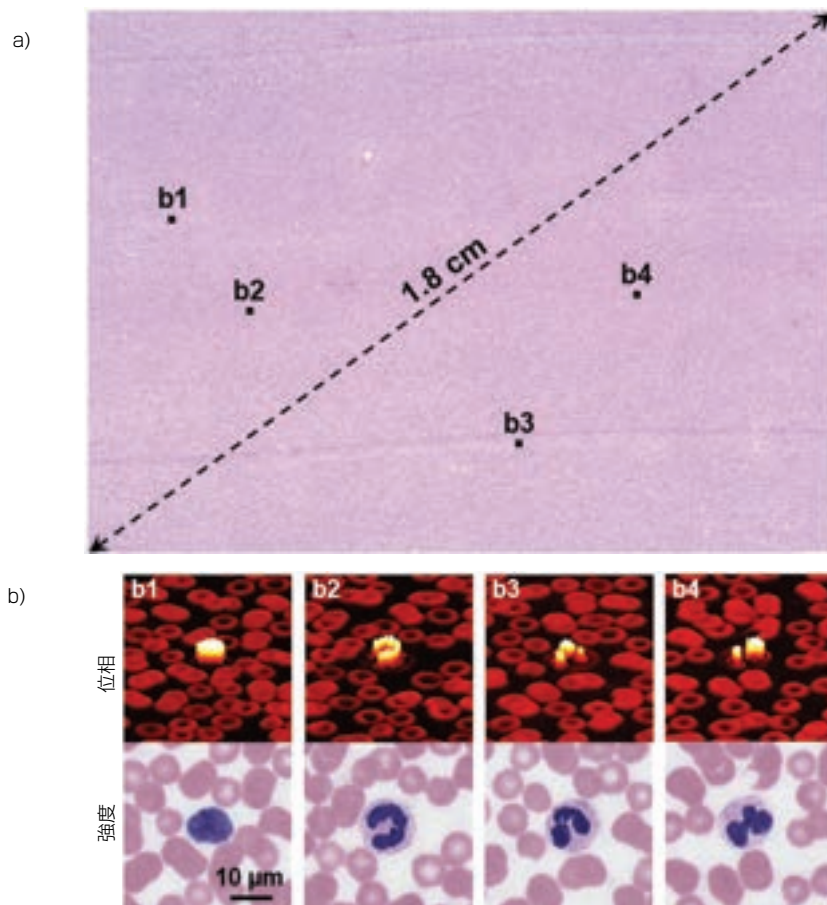


図3 (a)は、血液塗抹標本の復元ギガピクセル画像、(b)は、復元された位相と強度の拡大図。

用したり、リソースが限られている場合は、この新しいプラットフォームを使用して、血液塗抹標本内のマラリア原虫を検出したりすることができる。図3(a)は、このプロトタイププラットフォームを使用して復元した、血液塗抹標本のギガピクセル画像である。図3(b)は、白血球の位相と強度の復元画像を拡大したものである。

研究または臨床検査施設における培養実験に対し、この新しい技術は、ペトリ皿全体の細胞培養の定量化が可能である。哺乳類の細胞株を複数の異なるウェルで観察して、薬剤検査を行うことができる。また、異なる濃度や種類の抗生物質に対する細菌増殖の反応を観察することもできる。

「さまざまな種類の抗生物質に反応

する細菌の画像を観察しようとしている。正しい抗生物質を添加すると、細菌細胞が直ちに分裂を停止するのが観察できる。しかし、抗生物質が有効でなければ、時間とともに細菌が増殖する様子が観察される。そこで、どの抗生物質が最も有効かを判断するための薬剤検査に、このコーディッドタイコグラフィを使用する」と同氏は述べた。

現在、ペトリ皿の中の細菌コロニーの大きさを観察することによって、病院でこれを行うことができる。しかし、ツェン氏のチームは、単一細胞の細菌を検出することができるので、分裂している細胞としていない細胞を簡単に判別することができる。

同チームは、この新しい技術が臨床現場に適用できるようになるまで、

UConn ジョンデンプシー病院 (UConn John Dempsey Hospital) とともに、このような用途の研究を続けていくと、ツェン氏は述べている。

バイオ業界以外では、光計測の分野にコーディッドタイコグラフィを適用できる可能性がある。さまざまな光学素子の3D形状と表面形状を正確に測定することができるためである。

今後の計画

UConn チームはこれまでに、他の超解像度イメージング手法の研究を行っている。例えば、フーリエタイコグラフィでは、さまざまな入射角でサンプルを照らして解像度の改善を図った。

「われわれが今行っているのは、このコーディッドタイコグラフィプラットフォームに角度を変化させた照明を当てることである。これを行うことで、開口合成によって解像度をさらに改善し、厚みのある標本の断層撮像を行うことができる。この結果については、まもなく報告するつもりだ」とツェン氏は述べた。

タイコグラフィは、世界中の多くのシンクロトン研究施設において、なくてはならないイメージング手段となっている実現技術である。現在は初期段階にある、高スループットの光学イメージングにおけるその応用は、今後さらに規模と範囲を拡大し続けていくと考えられる。UConn チームの研究と成果は、その方向に向けた最初の一步の1つである。

参考文献

- (1) S. Jiang et al., ACS Photonics, 8, 11, 3261-3271 (2021); doi:10.1021/acsp Photonics.1c01085.
- (2) G. Zheng, C. Shen, S. Jiang, P. Song, and C. Yang, Nat. Rev. Phys., 3, 207-223 (2021); doi:10.1038/s42254-021-00280-y.