

## 1P099

### 定量位相顕微鏡を用いた生細胞の高速動態計測：明視野観察との融合

(広島市大院・情報<sup>1</sup>，パイフォニクス(株)<sup>2</sup>，就実大・薬学<sup>3</sup>)

○藤原 久志<sup>1</sup>，石渡 孝<sup>1</sup>，池田 貴裕<sup>2</sup>，洲崎 悦子<sup>3</sup>

**【序】** 定量位相顕微鏡<sup>1)</sup>は、試料透過光の位相情報を定量的に計測可能であり、様々な微小位相物体(生細胞や有機超薄膜など)の観測に応用できる。我々は、この定量位相顕微鏡に明視野像観察機能を付与した定量位相-明視野顕微鏡システムを開発し、好中球の貪食過程を観測した。

**【定量位相顕微鏡の概要】** 定量位相顕微鏡は、非侵襲に生きている細胞(近似的な位相物体)の定量情報を測定することを目的に開発された顕微鏡である<sup>2,3)</sup>。定量位相顕微鏡は、図1に示す「定量位相イメージング(QPI)ユニット」を通常の顕微鏡に接続することで容易に構成可能である<sup>4)</sup>。

定量位相顕微鏡の原理は、次の通りである。まず、QPIユニット内の透過型回折格子に、顕微鏡による試料像を結像させる。すると結像された試料の物体光は回折格子により複数の光波面に分離される。このとき0次回折光(実線)は、位相情報を保持したままで空間フィルタの開口部を通過し、撮像素子上に再結像する。一方、1次回折光(点線)は空間フィルタのピンホール部にて点光源に変換され、その後レンズにて平面参照波となって撮像素子に照射される。その結果、撮像面には図2の干渉縞画像が形成される。

何も物体がない時には、干渉縞は、撮像面に等間隔で形成される。そして、試料(位相物体)が存在する場合、図2のように干渉縞にズレが生じ、これを解析することにより試料通過による光の位相遅れを算出することが可能である。そして、ユニット内の回折格子に結像させる試料像の拡大倍率、および撮像面での干渉縞間隔を適切に調節することで、対物レンズの分解能(開口数に依存)と同等の空間分解能で定量的な位相情報を取得できる<sup>2)</sup>。実際の位相情報の抽出(定量位相画像の作成)には、ヒルベルト変換を利用する<sup>2)</sup>。得られた位相遅れからナノメートル分解能で試料の光路長変化を追跡可能である<sup>3)</sup>。

**【定量位相-明視野顕微鏡システム】** 生細胞の観測を定量位相顕微鏡で行う際に、従来の顕微鏡観測も並行すれば、これまで蓄積された知見との比較・検討が容易になり、より有用な情報が得られるはずである。この考えに基づき、我々は定量位相-明視野

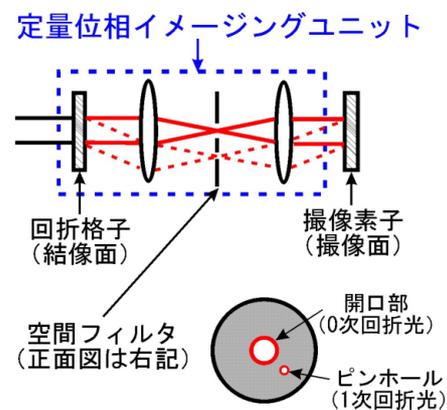


図1 定量位相顕微鏡の原理

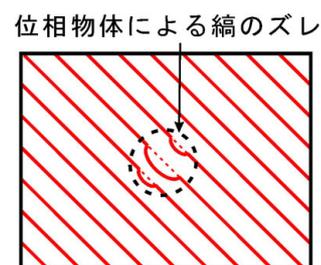


図2 撮像面に形成される干渉縞画像

顕微鏡システム(図3)を開発した。

開発したシステムでは、定量位相情報の取得は従来通りの方法<sup>5)</sup>で行った。すなわち光源にはレーザーダイオード(638 nm)を用い、倒立顕微鏡(オリンパス製 IX71)の出力ポートにQPIユニットを接続した。干渉縞画像は高速 CMOS カメラ(浜松ホトニクス製 8201-50)により 500 枚/秒で撮影・記録した。

一方、明視野像の取得には、照明用光源として 530 nm の集光型 LED 光源(パイフォニクス製 HL03G)を導入した。その理由は、明視野照明に 638 nm レーザー光を流用した場合、画像にスペックルノイズが発生するなどの問題が生じるためである。530 nm 光による明視野像は、高速 CCD カメラ(IMPERX 製 IPX-VGA210-LM)により 200 枚/秒で撮影・記録した。なお、このとき 638 nm レーザー光はカメラ前方のカラーフィルタで遮断した。

**【好中球の貪食過程の観測】** 好中球は白血球系の細胞の一つであり、異物の貪食能(異物を取り込み、処理する能力)を有し、生体防衛で重要な働きをする。開発したシステムで、ザイモサン(酵母抽出物)を貪食する好中球を観測・記録した。

図4に取得したデータの一例を示す。①は明視野像であり、好中球内部にはザイモサンが確認できる。一方、②は定量位相画像であり、ザイモサンの右下方向で高い光路長の領域(赤色)が見られ、高屈折率を有する顆粒が多く存在することが推測できる。このような情報は、試料透過光の位相情報を定量的に計測してこそ得られるものであり、定量位相顕微鏡の有用性を示している。

**【参考文献】**

- 1) <http://www.piphotonics.co.jp/qpm/index.html>
- 2) T. Ikeda et al., *Opt. Lett.*, **30**, 1165 (2005).
- 3) G. Popescu et al., *Opt. Lett.*, **31**, 775 (2006).
- 4) <http://www.piphotonics.co.jp/qpm/unit.html>
- 5) 池田、宅見、豊田、第14回画像センシングシンポジウム、IN3-13 (2008).

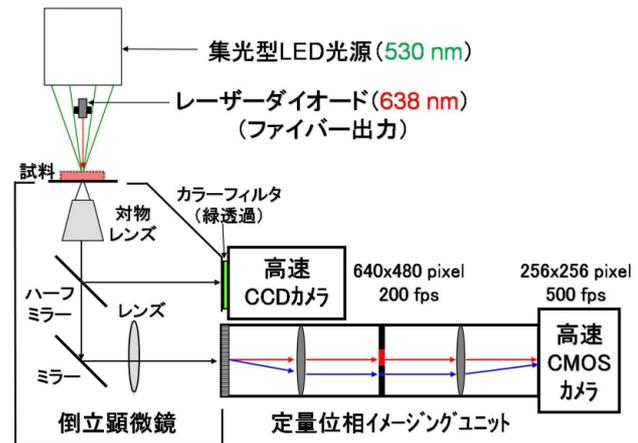


図3 定量位相—明視野顕微鏡システム

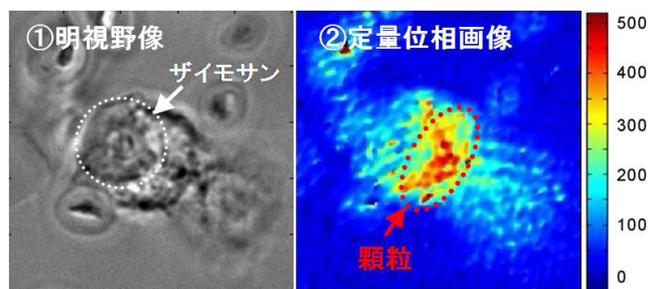


図4 好中球貪食時における同時観測画像データ：  
① 明視野像；② 定量位相画像。位相変化量を光路長(nm)に変換・表示している(カラーバー参照)。