

閉ループフィードバック制御による高精度 2次元位相イメージング

Two-dimensional Phase Imaging Based on Closed Loop Feed-back Control

渡邊 恵理子[‡], [○]遠島 未希[†], 今井 元[†]Eriko Watanabe[‡], Miki Toshima[†], Hajime Imai[†][‡](独)物質・材料研究機構, [†]日本女子大学[‡]NIMS MANA, [†]Japan Women's Univ.

E-mail: presto@fourier.jwu.ac.jp

Abstract

我々のグループではフィードバック制御技術を導入した光干渉計測システムを構築し、1 nm 以下の微小な光路長変化から数波長を越える光路長変化まで高精度に計測できることを確認している。本稿では、液状媒体に対しても高精度に 2 次元計測が可能な位相計測システムを構築し、様々な生体細胞の位相計測を行い、光路長変化の 2 次元分布を得たので報告する。光路長変化量は試料の屈折率が既知であれば、光軸方向の厚みに換算できる。細胞の体積情報などの定量値や内部構造が取得できれば、生物学・医学診断分野における新たな解析手法として役立つと期待できる。

1 はじめに

光導波路型デバイスや、サブミクロンの微細構造を持つ屈折率変調型の光学素子である高分散分光用の Volume Phase Holographic (VPH) グレーティング^[1]などは表面凹凸の構造を持たないことから、触針法や SEM ではその内部構造を評価できず、FFPパターンや回折効率などの特性をシミュレーション結果と比較することによって構造を推定している。そのためこれら微細構造をもつ光学素子の屈折率分布を直接測定できる簡易な方法が求められている。

我々はこれまでに厚みが一定の試料を想定し、屈折率分布を位相変化として検出する走査式マッハツェンダー型干渉計を開発しており、閉ループフィードバック制御技術を導入することにより、光源波長の数分の 1 以下の微小な位相変化から数波長を越える位相変化まで、線型に検出できることを確認している^{[2][3]}。

一方、近年、生体・医用計測分野において、非侵襲診断の観点から細胞などの微小な機能の解明を進める

ために、透明な位相物体の定量計測に関心が高まってきている。現状では生体細胞のような無色透明位相物体の形状の観察を行うために、蛍光剤を用いて位相情報を強度情報に変換する蛍光顕微鏡や、相対的な位相情報を強度に変換する位相差顕微鏡、あるいは微分干渉顕微鏡などが一般に用いられている。これらの計測手法に対し、絶対的な位相情報を取得できれば、生体細胞の形状や体積情報を定量測定が可能となる。

さらに、自己細胞を培養して治療に用いる再生治療の研究が活発化している。安定した品質の培養細胞を医療機関に提供するためには、生きた細胞の前処理なしでの直接計測が重要となる。細胞培養には多額の人件費も要するため、このような最先端の医療を安価で安定して提供する為には、細胞培養の品質管理の自動化が必須である。我々がこれまでに構築している光データベースを用いた超高速画像検索システムと組み合わせることにより、位相物体識別システム等の構築が可能と期待している。

本稿では、生体細胞などの液状媒体に対して高精度に 2 次元位相計測が可能な縦位相計測システムを構築し、間葉系幹細胞の計測を行い、再生医療への応用として良好な基礎評価結果を得たので報告する。

2 位相計測システム

図 1 にマッハツェンダー型干渉計に閉ループフィードバック制御を導入した位相計測システムを示す。光源には He-Ne レーザ ($\lambda = 633 \text{ nm}$) を用い、2 光束に分けた一方に試料を挿入し光軸方向に対して垂直にスキャンして透過光を参照光と干渉させて、位相変化による干渉縞の強度変化を検出する。微小領域を計測するために、レーザを顕微鏡用対物レンズで試料上に集光させ、透過光をもう一方の対物レンズで平行光に戻している。

分解能は集光したビームの直径より決まる。本システムでは直径約 $0.97 \mu\text{m}$ の面積内において平均屈折率を検出することができる。高精度な計測を行うためにフォトディテクタでの受光強度が最小になるように閉ループフィードバック制御を施し、光路中に設置したミラーに付けた piezo 素子への印加電圧を 16 bit の AD ボードを用いて取得する。これを予め計測した piezo の半波長電圧(半波長の光路長変化をもたらす電圧)と比較することにより位相の変化量を求める。フィードバック制御を用いない位相算出方法では、スキャンした場合に位相変化($\Delta\phi$)が光強度 $P=(P_0/2)(1+\cos \Delta\phi)$ として表れるので、 \arccos を利用して位相変化 $\Delta\phi$ に変換しなければならない。この際、 \arccos の非線形型性によって精度が低下してしまう場合があり、さらに多価関数であるために $\Delta\phi$ の値は不定性が残る。本研究では、フィードバック制御により piezo の印加電圧を計測しているため、逆関数を利用せずに直接位相変化を算出することが出来る。これにより、局所的な精度低下はなくなり均一な測定が可能となる。

3 縦型位相計測システムの構成

上記の従来我々が構築してきた位相計測システムでは定盤上に水平に光学系を組んでいたため試料を垂直に設置する必要があった。そのため、生体細胞など液中に存在するものの測定は重力の影響により試料がずれてしまったり、形状が変化する可能性があった。そ

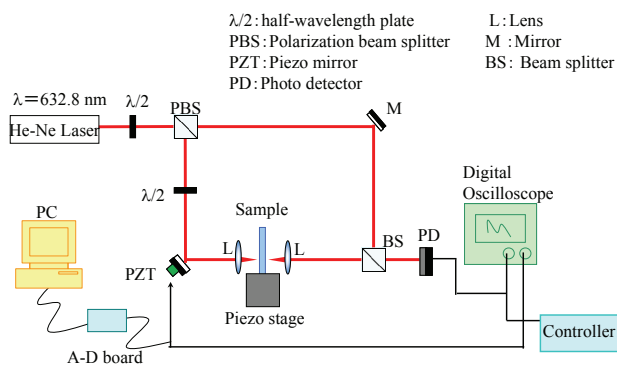


図 1 位相計測システム光学系

こで、試料を光学顕微鏡観察と同様に水平に設置可能な piezo 試料ステージを導入することにより、生体細胞などの液中の物体観察に向けた装置の改良を行った。同時に図 2 に構築した縦型位相計測システムの写真を示す。2 次元スキャンが可能な piezo ステージにより、最大 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ の面積内において、自動 2 次元計測が可能となった。

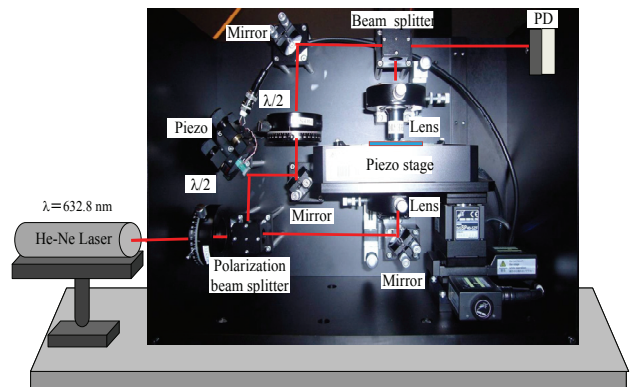


図 2 縦型位相計測システム

4 光デバイスの位相計測結果

4-1. VPH グレーティングの計測結果

構築した縦型 2 次元位相計測システムの基礎評価として、格子周期 $2.2 \mu\text{m}$ 、厚さ $29 \mu\text{m}$ の VPH グレーティングの 2 次元計測を行った。 $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ の面積内を x 軸方向に $0.1 \mu\text{m}$ 間隔、y 方向に $0.2 \mu\text{m}$ 間隔でスキャンした。このとき屈折率変化による光路長変化を補正するために生じた piezo への印加電圧 V を検出した。piezo への印加電圧 V と 1 波長分の印加電圧 V_λ より光路長変化 $L = V\lambda / V_\lambda$ を算出した。光路長変化に試料の厚みを考慮することにより電圧値を屈折率変化に変換した。測定結果を図 3 に示す。微細周期 $2.2 \mu\text{m}$ で正弦波状に分布する屈折率分布の計測に成功した。これにより、理論空間分解能 $0.97 \mu\text{m}$ に近い高分解能 $1.1 \mu\text{m}$ で測定できていることを確認した。

4-2. マルチレベルゾーンプレートの計測結果

次に、開口 5 mm 、ライン幅 $3 \sim 7 \mu\text{m}$ の 8 レベルのマルチレベルゾーンプレートの 2 次元計測を行った。

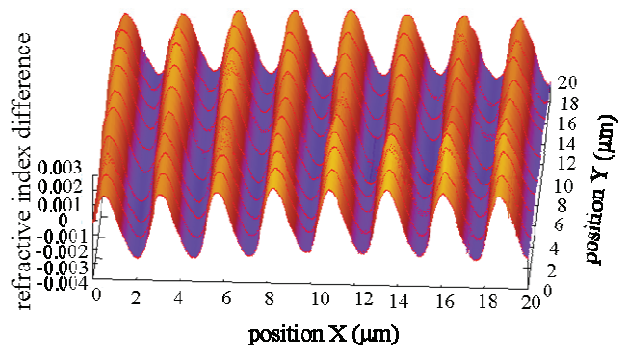


図 3 VPH グレーティング(格子周期 $2.2 \mu\text{m}$)の測定結果

100×50 μm²の面積内を x 軸方向に 0.5 μm 間隔、y 方向に 0.5 μm 間隔でスキャンした。VPH グレーティングと同様に光路長変化を補正するために生じたピエゾへの印加電圧と 1 波長分の印加電圧より光路長変化を算出し、BK7 基板の屈折率は 1.51 で一定であることを用いて $\Delta n = L/t$ より厚さ t を求めた。測定結果を図 4 に示す。8 レベルのゾンプレート的一部分(ライン幅 4~5 μm)の形状を 2 次元で計測できた。位相差が階段状に変化している形状においても位相測定が高精度にできることを確認した。

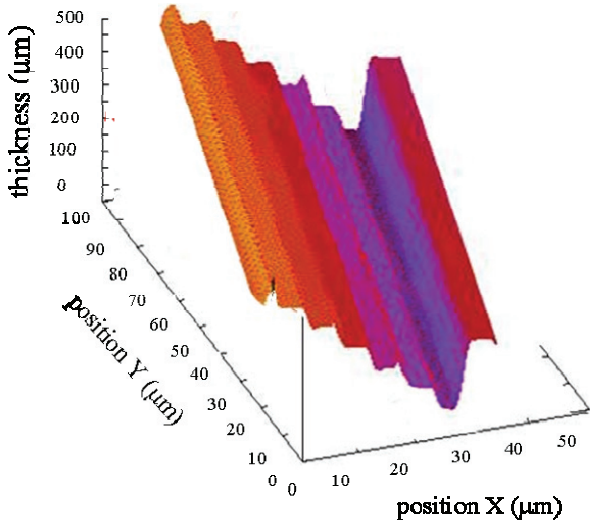


図 4 マルチレベルゾンプレートの測定結果

5 間葉系幹細胞の位相計測結果

幹細胞とは、組織や臓器の細胞に分化する細胞であり、受精卵から作られる胚性幹細胞は ES 細胞または万能細胞と言われ、さまざまな臓器・組織の細胞に成長する。一方、間葉系幹細胞とはヒトの骨髄から生成される骨髄性幹細胞の一種であり、骨や脂肪細胞、あるいは軟骨細胞へと変化可能である。図 5 に示す通り、細胞はまず培地と呼ばれる栄養により培養され、数十万個になる。培養された細胞をディッシュから取り出し、しかるべき処理が施されると、骨や脂肪細胞などが形成される。また、培養された細胞をタンパク質の酵素などで単化すると、細胞は液中で浮遊状態となる。浮遊させたものを凝集し、凝集塊にしてからしかるべき処理を施すと、軟骨細胞となる。培養された間葉系幹細胞は位相差顕微鏡で観察可能であり、上記の培養状態・浮遊状態などにより、細胞の形態は異なる。そこで、①培養後のディッシュに貼り付いている状態、②単化して浮遊している状態の、間葉系幹細胞の位相計測を行った。

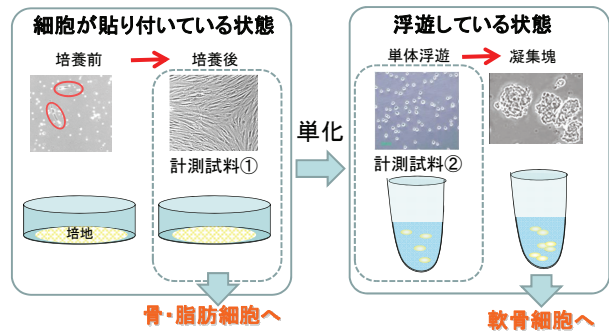


図 5 様々な状態の間葉系幹細胞

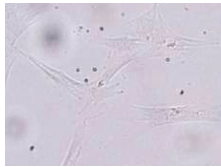
5-1. ディッシュに貼り付いている状態の間葉系幹細胞

間葉系幹細胞を培養後、ディッシュに貼り付けた状態(計測試料①)での 2 次元位相計測を行った。80×80 μm²の面積内を x 軸方向に 0.8 μm 間隔、y 方向に 0.8 μm 間隔でスキャンした。測定結果を図 6 に示す。横軸は空間方向の移動量、縦軸は光路長変化量であり、位相変化量に変換可能である。中心部分が盛り上がっている位相形状の観察に成功した。仮に細胞の屈折率が一定であれば、光軸方向の厚みに換算可能であり体積情報となる。このように、位相差を強度情報に変換して観察する位相差顕微鏡に対し、本システムでは厚さ方向の位相情報が定量的に取得可能である。また、細胞がディッシュの底に貼りついて溶液内にある状態でも測定可能であることを確認した。

5-2. 浮遊している状態の間葉系幹細胞

間葉系幹細胞を浮遊させた状態(計測試料②)で 2 次元位相計測を行った。30×30 μm²の面積内を x 軸方向に 0.2 μm 間隔、y 方向に 0.2 μm 間隔でスキャンした。測定結果を図 7 に示す。図 6 と同様に、縦軸は光路長変化を示す。球面状の位相形状を得ることに成功した。また、細かな内部構造が観察できていることからサブミクロンオーダーの高精度な位相計測が可能であることを確認した。

以上の結果より、同じ幹細胞であっても培養後のディッシュに貼り付いている状態、単化して浮遊している状態の二つの状態で、それぞれ異なる位相形状の測定に成功した。これらの結果から、簡易かつ前処理なしに生体細胞の位相情報を取得できることを確認した。



(a) ディッシュに貼り付いている状態の細胞
(光学顕微鏡にて観察)

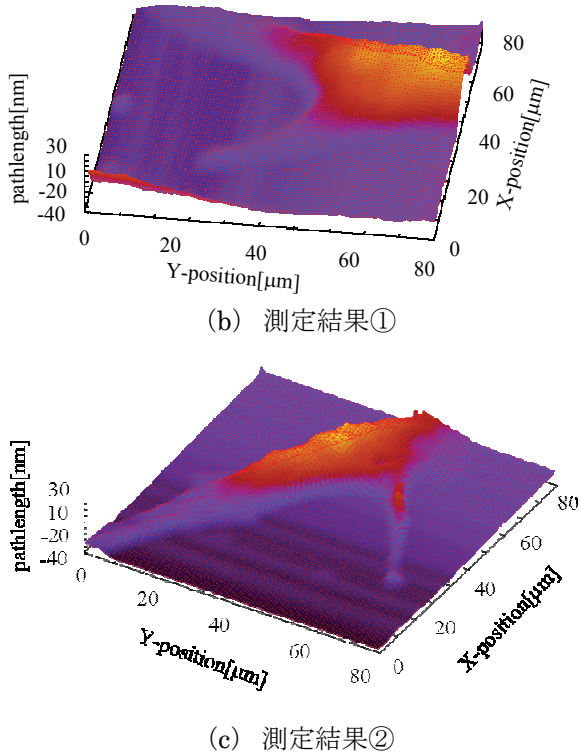


図 6 間葉系幹細胞の測定結果
(貼り付いている状態)



(a) 浮遊している状態の細胞
(光学顕微鏡にて観察)

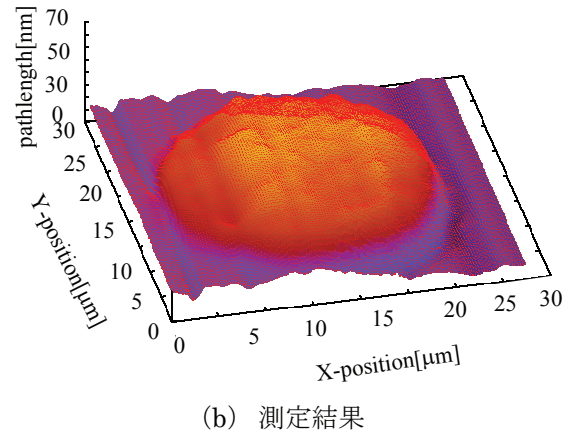


図 7 間葉系幹細胞の測定結果
(浮遊している状態)

6 まとめ

従来構築していた閉ループフィードバック制御を用いた干渉光学系全体を縦型に改良し、生体細胞のような液中試料の測定が可能なる2次元自動位相計測システムを構築した。細胞情報解析のための効果的なサンプルとして、再生医療用の間葉系幹細胞の培養後のディッシュに貼り付いた状態と浮遊状態における位相計測を行い、位相差顕微鏡では得られない光軸方向の位相情報を計測することに成功した。今後、細胞の品質管理や、その他細胞検査などへの利用できるような位相情報を追求する。

謝辞

本研究は(独)科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業個人型研究さきがけの助成金により行なっております。間葉系幹細胞は(独)物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクニクス研究拠点生体材料センターから提供していただきました。

参考文献

- [1] K.Nakajima et al, Opt. Rev., 14, 4, 201-207 (2007)
- [2] E. Watanabe et al., ODF'08, 547-548 (2008).
- [3] E. Watanabe et al., SPIE 2007 Photonics WEST, Proc. SPIE, 6488-09 (2007).
- [4] Mark F. Pittenger et al., Science 284, 143-147 (1999).
- [5] Paolo Bianco et al., Nature 414, 118-121 (2001).