■受領№.1412

光学的手法による定量機械物性顕微鏡の開発に関する基礎検討

代表研究者
田村　和輝　浜松医科大学 光尖端医学教育研究センター　助教

1. 研究目的

形態的な培養細胞の観察は古来より行われてきた．より先鋭なコントラストをつけるために蛍光標識を導入することで分子の局在を画像化することが可能である．更なる空間分解能を目指した超解像技術やラベルフリーで分子情報を取得する質量顕微技術など，様々な計測手法が実用化されている．一方で，分子の局在ではなく細胞内の機械物性（硬さ分布）に着目した，がん化や薬効の機序解明に関する研究が報告されている．（Keisuke Iida et.al., Scientific Reports 7, 17770, 2017）細胞構造スケールでの機械物性の計測には原子間力顕微鏡を用いることが一般的であり．生物・細胞計測向けの計測装置や手法が多数開発されている．しかし，一般的な光学顕微鏡と計測手法が全く異なり，探針を計測対象（細胞）に近接させる必要があるため，細胞の汚染などの課題がある．つまり，数日単位での長期観察やiPS細胞などの希少な細胞を扱うには不適当であり，汚染を低減するために細胞培養用のディッシュを密閉した状態で機械物性を計測する手法が不可欠である．

超高周波（320 MHz程度，一般的な臨床用超音波診断装置は2 MHz前後）の超音波を用いた超音波顕微鏡技術は数マイクロメートルオーダーで細胞内の機械物性を計測可能であり（Soon et.al, Jpn. J. Appl. Phys., 56, 2017），シャーレを介した計測が可能であることから，計測に汚染が伴わないため，有望視されている．しかし，機械的に超音波センサを走査する必要があるため計測時間が頭打ち(3分/細胞)であることと，計測のための空間分解能に関係する送受信周波数が超音波センサの材料特性・設計上の限界から500 MHz程度で頭打ちとなり5 マイクロメートル以下の空間分解能の達成が難しいことから，既存の計測方法の延長では抜本的な性能向上は難しい．よって，培養細胞の機械特性を汚染なく（コンタミフリー）で計測するためには，既存の超音波顕微鏡の基本原理を継承しつつ，機械走査と計測超音波周波数の制限を解決するための技術開発が不可欠である．

本提案では現状の計測の問題点を解決するために光学的な計測手法を提案する．光学計測を用いることで，従来型超音波顕微鏡の空間分解能の限界である5マイクロメートルを超えることを達成し細胞以下の構造の基礎理解に貢献する．原理的には一般的に培養細胞観察で用いられる光学顕微鏡と同等の空間分解能を達成可能であり，光学顕微鏡を用いて観察される細胞小器官のスケールで観察可能である．

2. 研究内容

倉田奨励金の支援を受け光学的振動計測装置の構築と将来的に計測対象なる機械物性計測のための生体組織処理法を検討した．

2.1　光干渉計を用いた超音波振動計測

本課題で提案する計測手法の模式図を図1に示す．赤色で示すパルスレーザー光を用いて細胞培養用シャーレ底面に高周波振動を発生させ，緑色で示す試料とシャーレの界面まで伝搬させる．発生した界面の振動を光干渉計により読み取る．培養用シャーレの材質のポリスチレンの固有音響インピーダンスの絶対値を与えることで試料の固有音響インピーダンスを推定する．

振動を計測するためにマイケルソン干渉計（図2）を構築した．細胞観察用の倒立顕微鏡に干渉計の光路の一部を入れることで，顕微鏡視野内の高周波振動を観察可能にした．光音響波の計測に先立ち，アクリル水槽と中心周波数15 MHzの集束超音波振動子を用いて光学系を評価した．超音波振動子の焦点を水槽底面に合わせ，パルス波を使って水槽底面を加振し発生した振動を計測した．同時に水槽底面での音波の反射を同じ超音波振動子で計測した．水槽底面の振動を計測した結果を図3に示す．干渉光の光量を赤線，アクリル底面で反射した音波を青線に示す．水槽底面の振動は振動子と水槽底面の位置関係から，超音波パルスが水槽底面で反射して再び振動子に到達する時間の半分の時間で観測されることは明らかであり，本計測では底面振動の検出に成功したと言える．今後さらに中心周波数の高いパルス振動の計測のために，干渉光を計測するフォトディテクタを改善して100MHz帯の計測を可能にする．この基礎検討を通して計測手法について特許出願を果たし，学会発表や論文報告を通して成果を公開する準備を行なっている段階にある．

2.2 機械物性計測のための生体試料処理方法の検討

生体組織を光学的に観察する場合，一般的には化学的に固定をして組織の形態を保持する．病理観察ではホルマリンを用いた化学固定が一般的であり，臨床や動物実験などでは日常的に使用され

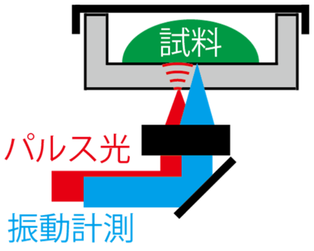

図 1：光学式物性計測の概略

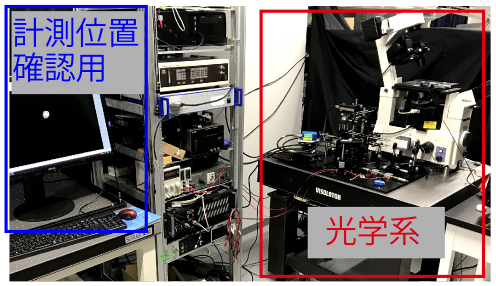

図２：構築したマイケルソン干渉計

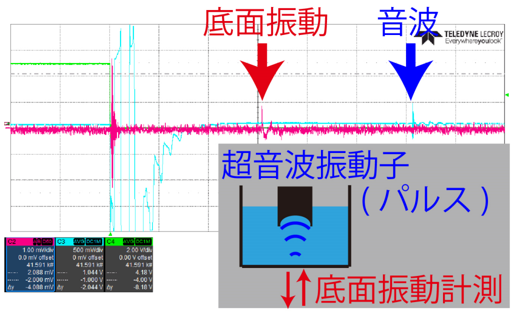

図３：振動計測結果

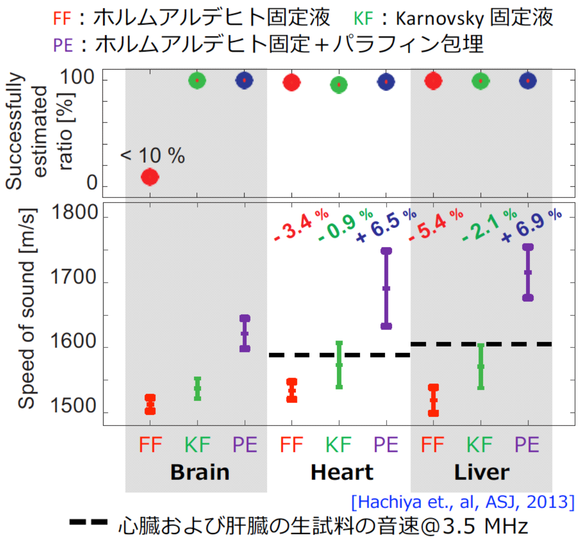

図 4:組織処理方法による縦波音速の違い

ている．しかし，生体の機械物性を計測する場合，組織や細胞によっては一般的なホルマリン固定では不適切な場合がある．そこで，物性顕微鏡が計測可能となった状態ですぐに生体組織を計測可能にするべく，生体組織の処理方法に関して検討を行った．組織試料の作成には凍結切片法で作成した試料にホルムアルデヒト(ホルマリンの主成分)固定をした場合，電子顕微鏡観察で使用するカルノフスキー固定液を使用した場合，一般的な試料作成法であるパラフィン包埋法（ホルムアルデヒト固定）の3つを比較をした．機械物性のうち体積弾性率に関係する縦波音速と化学固定法の関係を検討した．検討には超音波顕微鏡（AMS-50SI, Honda Electronics, Toyohashi）と中心周波数250 MHzの超音波振動子を用いた．縦波音速の計測結果を図4に示す．検討の結果，グルトアルデヒトを含むカルノフスキー固定液を使用することで，最も安定的（上段：計測面積あたりの縦波音速が計算可能な割合）かつ，化学固定しない場合の縦波音速に近しい計測可能（下段：縦波音速計算値）であることを明らかにした．本研究は The 40th Symposium on Ultrasonic Electronics，にて報告しYoung Scientist Awardを受賞した．

３．発表（研究成果の発表）

[国内学会]田村和輝，伊藤一陽，三浦克敏，山本清二，凍結切片法を用いた脳腫瘍組織の音速計測，日本超音波医学会 第94回学術集会(神戸，2021)

[特許出願]田村和輝，光音響計測装置、光音響計測方法、光学顕微鏡用の後付け光音響計測ユニット，特願2021-068869，2021/4/15

[国際会議] Kazuki Tamura, Kazuyo Ito, Katsutoshi Miura, Seiji Yamamoto, Differences in acoustical property between normal and tumor cells in a rat brain tumor based on cell nuclei density, The 40th Symposium on Ultrasonic Electronics(大阪, 2020), Young Scientist Award of USE2020