

ハイブリッド型フィルタを用いたレンズレス蛍光イメージング

Lensless fluorescence imaging using a hybrid filter



笹川 清隆 (Kiyotaka SASAGAWA, Ph. D.)

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科 物質創成科学領域 准教授

(Associate Professor, Division of Materials Science, Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology)

電子情報通信学会、映像情報メディア学会、IEEE 他

受賞：NAIST 学術奨励賞 (2019年)

応用物理学会 Poster Award (2018年)

映像情報メディア学会 鈴木記念奨励賞 (2011年)

日本光学会 光学論文賞 (2009年) 他 光工学 集積回路工学 バイオメディカルイメージング

研究専門分野：光工学 集積回路工学 バイオメディカルイメージング

あらまし

レンズレス顕微イメージングデバイスに適用可能な高性能励起光除去フィルタを開発した。レンズレスイメージングは簡便な構成の小型デバイスで細胞観察等が可能な空間分解能を得られることから様々な応用が期待されている。しかし、その多くは明視野観察用であり、蛍光観察についての研究例は多くなかった。本研究では、レンズレス系において高い励起光除去性能を実現するフィルタを提案した。このフィルタは、干渉フィルタと吸収フィルタから構成されており、それぞれの欠点を補うように配置される。フィルタを作製する手法として光ファイバの束から構成されるファイバオプティックプレートに干渉フィルタの基板として用いる手法、および、干渉フィルタを紫外レーザーのパルスによって剥離、転写する手法の開発を行った。それぞれの手法は、それぞれ大面積観察用デバイス、および、薄型の刺入型デバイスに適用可能であり、レンズレス蛍光イメージングの応用範囲が広がるものと期待される。

1. 研究の目的

レンズレスデバイスによる顕微観察技術は、レンズを用いない単純な光学系と画像処理を用いることによって微細な観察対象の撮像を行うものである[1]。この手法は、近年のイメージセンサおよびコンピュータの高性能化によって、実用性が向上されてきた。また、レンズを用いないことにより、小さなデバイスで広い撮像範囲を実現できることや、例えば生体組織の極近傍に設置するような極小デバイスが実現可能といった特長がある。しかし、明視野の研究がほとんどであり、蛍光観察の例はほとんど報告されていなかった。

そこで本研究では、レンズレスイメージングデバイスにおける高感度な蛍光イメージングを可能とすることを目的とした。そのために、レンズレス系における従来の励起光除去フィルタの問題点を解決し高い性能を実現するハイブリッドフィルタを形成した。また、これを薄型化するための技術を確認し、刺入型のイメージングデバイスへの適用を行った。

2. 研究の背景

生体組織観察において蛍光色素や蛍光タンパク質を用いたラベルは非常に重要なツールであり、様々な活動を観察するために広く用いられている。しかし、先に述べたようにレンズレスイメージングにおける蛍光観察デバイスの報告は少なかった。これは、一般的に蛍光顕微鏡で用いられている高性能な干渉フィルタをそのまま用いてもレンズレスイメージングでは高い性能が得られず、蛍光検出感度が低くなってしまうことが要因の一つであった。

干渉フィルタは、その原理上、透過波長帯が光入射角によって変化する。垂直入射において励起光を十分に除去できる高い性能を持つフィルタも、斜めに入射する励起光は透過してしまう。レンズを用いた蛍光顕微鏡の光学系では、観察対象からの光は対物レンズによってほぼ平行な光線となってフィルタを透過するため、このフィルタの特性は問題とならない。しかし、レンズレス光学系では、観察対象によって光が散乱され、様々な入射角でフィルタに到達する。そのため、干渉フィルタでは斜め入射成分を除去できず実効的な性能が低下してしまう。

ハイブリッド型フィルタを用いたレンズレス蛍光イメージング

Lensless fluorescence imaging using a hybrid filter

一方、吸収型のフィルタはそのような入射角依存性はなく、レンズレスイメージングに適している[2]。吸収フィルタの場合フィルタ厚さを増すとともに指数関数的に透過率は低下する。しかし、フィルタ自体が蛍光を発するということが問題となる。微弱な蛍光を観察する場合、この自家蛍光が問題となり、実効的な励起光透過率には下限がある。特にレンズレス蛍光イメージングの光学系では励起光除去フィルタが検出器であるイメージセンサの極近傍に配置されるため、検出されやすい。

これを回避する手法として、プリズムを用いて励起光を斜めに入射させ試料を封入した観察対象のガラス底面で全反射させる手法なども提案されたが[3]、デバイス寸法が大きくなり、小型デバイスを作製するという点では課題が残っていた。

3. 研究の方法

3. 1 研究の進め方

干渉フィルタと吸収フィルタにおける問題点を解決する手法として、両者を積層したハイブリッド型のフィルタを作製することを提案した[4,5]。ここで、干渉フィルタを上層、吸収フィルタを下層とする。すなわち、励起光は先に干渉フィルタによって低減され、残りが吸収フィルタによって除去される。両者の目的は、ともに励起光の除去であるので、その透過スペクトルは同じであることが望ましい。干渉フィルタは、入射光を反射するために自家蛍光はほとんど発生しない。また、観察対象の細胞等での散乱成分は透過するが、その成分は入射光に対しては1%以下程度である。その散乱成分のみを吸収フィルタによって除去することで、励起光が直接吸収フィルタに入射した場合と比較して自家蛍光を著しく低減することが可能となる。

3. 2 現在までに得られた成果

提案するハイブリッドフィルタを実現するためには、干渉フィルタを吸収フィルタ上に形成する必要がある。本研究で用いた吸収フィルタ高い吸収特性を示す薄型フィルタであるが、高濃度の色素を添加した樹脂であるため、その上に高品質な干渉フィルタを構成することが難しい。そこで本研究では提案構造を実現する2

種の方法を開発した。

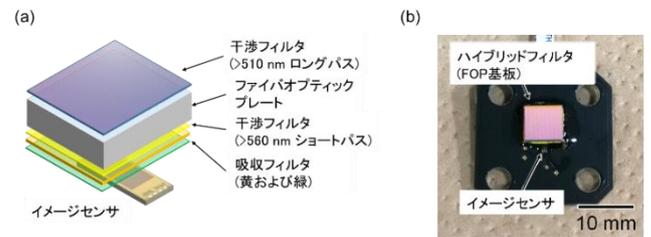


図1 (a)ハイブリッドフィルタの構造。

(b)ハイブリッドフィルタ搭載イメージセンサの例。

1つ目は、干渉フィルタの基板としてファイバオプティックプレート(Fiber Optic Plate; FOP)を用いる方法である(図1)。FOPは光ファイバの束で構成される板状のデバイスであり、一方の面からの入射像が光ファイバを介して他方の面に伝搬する。像の空間分解能はコアピッチによって決定され、厚いFOPを通しても数 μm 程度の空間分解能の像を伝搬する事が可能である。また、通常のガラス板に近い強度を有しているため、干渉フィルタを形成する基板として用いる事が可能である。干渉フィルタの両面にそれぞれ、ロングパスフィルタおよびショートパスフィルタを形成して、バンドパス特性を持たせた。更に、色素添加樹脂によって構成される吸収フィルタを転写して、自立可能なハイブリッドフィルタ構成を実現した。

図1(b)は試作したハイブリッドフィルタ搭載レンズレスイメージングデバイスである。イメージセンサには市販のものを用いている。FOPによる厚さがあるため、イメージセンサのパッケージ部よりも撮像面を上面にすることができる。図2は、このデバイスを用いてマウス脳スライスを撮像した例である。レンズレスデバイスを用いて1つの細胞からの蛍光を検出することができている。

ハイブリッド型フィルタを用いたレンズレス蛍光イメージング

Lensless fluorescence imaging using a hybrid filter

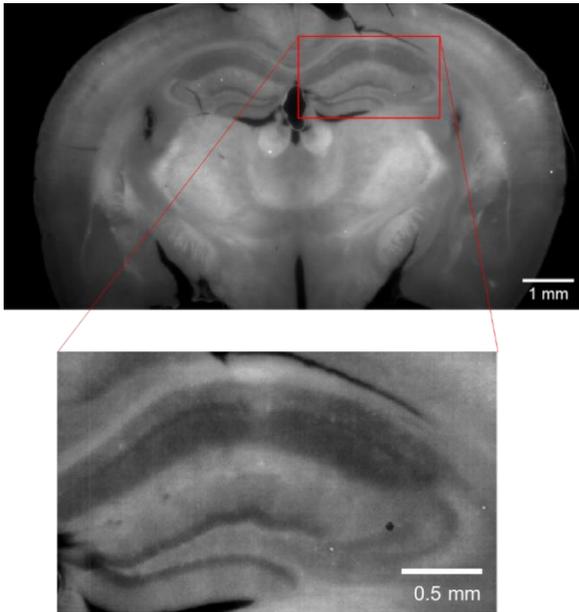


図2 FOPを利用したハイブリッドフィルタ搭載デバイスによるマウス脳スライスの蛍光観察例。(撮像面積 11.3 mm×6.0mm)脳スライスは緑色蛍光タンパクが導入されている。

2つ目の方法は、干渉フィルタを転写する手法である[7]。本手法では、干渉フィルタを石英ガラス基板上に形成し、さらに吸収フィルタをスピコート法によって塗布した。吸収フィルタ面をイメージセンサの撮像面に対向するように接着し、その後、紫外線のパルスレーザーを走査しながら照射することによって石英ガラス基板から剥離した。この手法によってハイブリッドフィルタ構造が実現される。本手法では、1つ目の手法と比較して FOP を用いないため、デバイスの厚さを非常に薄くすることができる。この特徴は、特に生体に刺入するような生体埋植型のイメージングデバイスに適している。図3は、本手法によって作製したハイブリッドフィルタ搭載イメージセンサの例である。デバイスの厚さは約 0.2 mm である。

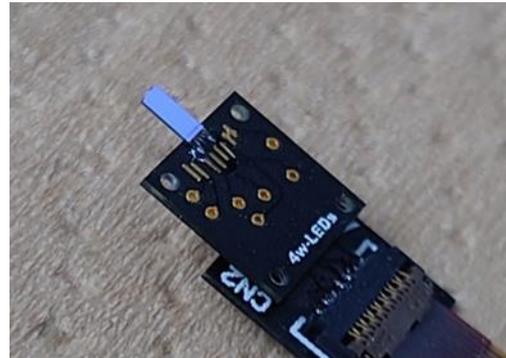


図3 転写法によるハイブリッドフィルタを搭載した刺入用イメージセンサ。

4. 将来展望

FOP を用いた手法では、市販のイメージセンサを用いて、大面積の撮像が可能な小型デバイスを構成することができる。一般的な蛍光顕微鏡系では大型となってしまう装置も小型化することが可能である。これにより、例えばインキュベータ内で培養されている細胞のタイムラプスイメージングへの応用が期待される。多数のデバイスを庫内に配置し、様々な条件で細胞の活動する条件を観察することが可能になる。また、蛍光ラベルを用いた分子計測等への応用も考えられる。従来、試料を検査機関に送付していたような検査も現場で即時に行える可能性がある。

転写手法を用いた手法では、本稿で示した生体刺入型デバイスのように非常に薄型かつ軽量のデバイスが実現可能である。観察対象に対して低侵襲なデバイスにより、自由行動下での活動計測を大きな負担を与えることなく行うこと可能になる。近年では、マウスの頭部に搭載することができるような小型顕微鏡デバイスが開発されているが[7]、特に脳深部の観察を行う場合など、生体への負担が大きい。本研究で開発した手法を用いることにより、これを改善し、より自然な状態に近い生体機能計測を行えるものと期待される。

おわりに

本研究では、ハイブリッドフィルタ構造とその形成手法を提案し、レンズレスイメージングデバイスでも高い蛍光検出性能を実現可能であることを示した。本稿では、励起光除去フィルタへの利用について述べた

ハイブリッド型フィルタを用いたレンズレス蛍光イメージング

Lensless fluorescence imaging using a hybrid filter

が、本手法は励起フィルタにも応用することが可能である[8]。これらを組み合わせて、小型かつ高性能なレンズレス蛍光イメージングシステムを実現し、様々な玄能の観察への適用を目指して行いたい。

本研究における動物実験は奈良先端科学技術大学院大学のガイドラインに従って行われた。

参考文献

- [1] A. Ozcan, A. and E. McLeod, "Lensless imaging and sensing," *Annual Rev. Biomed. Eng.* vol. 18, pp.77-102 (2013).
- [2] S. A. Lee, X. Ou, J. E. Lee and C. Yang, "Chip-scale fluorescence microscope based on a silo-filter complementary metal-oxide semiconductor image sensor," *Opt. Lett.*, vol. 38, no. 11, pp.1817-1819 (2013).
- [3] A. F. Coskun, I. Sencan, T. W. Su and A. Ozcan, "Lensless wide-field fluorescent imaging on a chip using compressive decoding of sparse objects," *Opt. Express*, vol. 18, no. 10, pp. 10510-10523 (2010).
- [4] K. Sasagawa, A. Kimura, M. Haruta, T. Noda, T. Tokuda, J. Ohta, "Highly sensitive lens-free fluorescence imaging device enabled by a complementary combination of interference and absorption filters," *Biomed. Opt. Express*, vol. 9, no. 9, pp. 4329-4344, Sep. 2018.
- [5] K. Sasagawa, Y. Ohta, M. Kawahara, M. Haruta, T. Noda, T. Tokuda, J. Ohta, "Wide field-of-view lensless fluorescence imaging device with hybrid bandpass emission filter," *AIP Advances*, vol. 9, no. 3, 035108, Mar. 2019.
- [6] E. Rustami, K. Sasagawa, K. Sugie, Y. Ohta, M. Haruta, T. Noda, T. Tokuda, J. Ohta, "Needle-type image sensor with band-pass composite emission filter and parallel fiber-coupled laser excitation," *IEEE Trans. Circ. Sys.*, vol. 67, no. 4, pp. 1092-1091, Apr. 2020.
- [7] K. K. Ghosh, L. D. Burns, E. D. Cocker, A. Nimmerjahn, Y. Ziv, A. Gamal, and M. J. Schnitzer, "Miniaturized integration of a fluorescence microscope," *Nat. Methods*, vol. 8, no. 10, 871.
- [8] M. I. Azmer, K. Sasagawa, E. Rustami, K. Sugie, Y. Ohta, M. Haruta, H. Takehara, H. Tashiro, J. Ohta, "Miniaturized LED light source with an excitation filter for fluorescent imaging," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 60, no. SB, SBBG07, Mar. 2021.

この研究は、平成29年度SCAT研究助成の対象として採用され、平成30～令和元年度に実施されたものです。