

超高速高分解能 3D 計測・操作を実現する新顕微鏡の開発

研究代表者：杉 拓磨 広島大学 准教授

共同研究者：白杵 深 静岡大学 准教授



1. 研究の背景と達成目標

通常、物体を三次元的に立体視するためには複数回のカメラ撮影による視差情報の取得や空間スキャンが必要である。しかし、本研究の準備段階において、昆虫の複眼のようなマイクロレンズアレイを用いることにより、たった1回のカメラ撮影で3D空間を再構成可能なライトフィールド(LF)光学系に着目し、その汎用化を妨げていた低解像度の問題を解決することで、ナノメートルオーダーの高分解能 LF 技術の開発に成功した。LF 技術を基盤に 3D 計測操作の新技术を開発し、ライフサイエンス分野で共焦点等の空間スキャンが必要な顕微鏡に代わるリアルタイム 3D 技術の創出をねらいとする。またカメラ産業や自動車産業、ロボット産業、内視鏡等の医療分野へ社会実装を通して貢献する。①リアルタイム 3D オプトジェネティクス技術の開発を達成する。リアルタイム 3D 全細胞追跡技術の確立、全細胞追跡技術と標的位置光照射光学系を統合した光学系の試作、固定および浮遊する蛍光粒子や線虫や哺乳類などの生体試料を用いた光操作精度の検証を行う。これにより、リアルタイム 3D オプトジェネティクスにより、5 μm 空間分解能で標的位置のみを 100 Hz の時間分解能で光照射することを達成する。②リアルタイム 3D 超解像技術の開発を達成する。レーザー多光束干渉光学系とライトフィールド光学系の統合した光学系の組立、超解像計測のリアルタイム化、固定および浮遊する蛍光粒子や線虫や哺乳類などの生体試料を用いた計測精度の検証とそれを受けた光学系およびアルゴリズムの最適化を行う。神経シナプス計測に必要な空間分解能 300 nm 以下、リアルタイム計測可能な時間分解能 100 Hz 以上を達成する。利用するカメラの量子効率 60% の場合、感度についてノイズ 10% 以下を達成する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・リアルタイム 3D オプトジェネティクス技術を実現するライトフィールド 3D 全細胞追跡技術を開発完了。
- ・選択照射光学系の開発に成功し、3D 全細胞追跡技術と組み合わせて、5 μm 空間分解能で標的位置のみを 10 Hz の時間分解能で光照射することを達成。
- ・リアルタイム 3D 超解像技術を実現する回折格子を利用した 3D 構造化照明光学系を開発完了。

3. 研究成果

本研究では独自に開発したシングルショット 3D 空間を撮像可能な高分解能ライトフィールド顕微鏡 (HR-LFM) を利用する。これを用いて、操作側技術として、①リアルタイム 3D オプトジェネティクス技術を開発し、検出側技術として、②リアルタイム 3D 超解像技術の開発を試みた。

HR-LFM では撮影した二次元のライトフィールド画像に三次元情報が埋め込まれている。これを利用して、①リアルタイム 3D オプトジェネティクス技術では、1 年目において、リアルタイム 3D 全細胞追跡技術を確立し、蛍光粒子を用いた POC を行うことを目標としていた。この計画において、蛍光粒子だけ

でなく、動く小動物の線虫 *C. elegans* の複数の神経細胞のリアルタイム 3D 追跡技術も完成させた。第二年度では、リアルタイム 3D 全細胞位置座標抽出技術で識別追跡される細胞群から、一定の蛍光強度以上の細胞を標的として、フィードバック的に光照射する光学系を開発した。具体的には、3D 空間の狙った場所だけを光照射するため、3D 座標から計算機合成ホログラム (CGH) を作成し、空間光位相変調器に表示して光照射するシステムを構築した。実験の結果、CGH を空間光位相変調器に表示し、マウス視床下部の固定スライスに対して任意の集光スポット形成が可能なことを示す結果を得た。第三年度では精度評価を行い、3D 全細胞位置座標抽出から選択照射までを $5\ \mu\text{m}$ 空間分解能で標的位置のみを 100 Hz の時間分解能で光照射することを確認した。また、ライトフィールド 3D 全細胞位置座標抽出技術と選択照射技術のそれぞれの特許出願し、後者については、国際特許出願も行なった。

②リアルタイム 3D 超解像技術では、シングルショット 3D 空間を撮像可能な高分解能ライトフィールド顕微鏡 (HR-LFM) と超解像顕微法的一种である構造化照明顕微法 (SIM) を組み合わせ、超解像ライトフィールド顕微鏡 (SR-LFM) を開発に挑戦した。1 年目においては、SR-LFM の光学系の組立、超解像画像処理アルゴリズムの開発を同時並行で行った。構造化照明生成法として当初計画していたレーザー多光束干渉光学系については、装置の大型化による振動や温度ドリフトの影響が懸念されたため、回折格子による三光束を対物レンズの像側焦点面に集光させることで物体空間において三次元構造化照明を生成する方法を採用した。この方法では、3D 構造化照明の生成・制御技術確立した。3D 構造化照明の X Y 軸方向は超解像、Z 軸方向は物理的光学セクションニング(ミッシングコーン問題解消)にそれぞれ寄与していた。超解像画像処理については、従来の連立結像方程式の逆問題と空間周波数ステッチングによるものではなく、よりロバストな方法としてフーリエタイコグラフィーに基づいたアルゴリズムを新たに開発した。定性的に超解像化によるライトフィールドイメージングの空間分解能の向上効果が確認された。現在、本技術の特許について、学内で承認され、弁理士事務所と特許出願の手続きを進めている。さらに複数画像取得時間の問題を解決し、リアルタイムイメージングを実現する。まず、3D で構造化照明を生成する際に、現在、手動で照射角度を変更しており、これを自動で高速照射させる必要がある。そのために、 piezo システムを利用して全自動照射系を構築している。また、SIM により全方向の高周波情報を再構成する場合、2D SIM では 7 枚の 2D 像、3D SIM では 13 個の 3D 像を入力する必要がある(本研究では LF 計測により 2D SIM に帰着可能)。そこで 7 枚の画像撮影後、8 枚目以降は N 枚目に撮った最新画像を $N-7$ 枚目の画像と置換・更新し、 $N-1$ 枚目から $N-6$ 枚目画像を重複利用するオーバーラップ位相シフト技術により、8 枚目以降、時間分解能の犠牲なくカメラ撮影毎に超解像を得るアルゴリズムを開発中である。

4. 今後の展開

超高速高分解能 LF 技術を基盤に 3D 計測操作技術を開発することの価値を知るため、日本医療研究開発機構 (AMED) へ先行特許・文献の調査を依頼した。その結果、特筆すべき点として①従来の空間分解能に問題を抱える LF 技術においてさえ、キャノン、アドビ、ソニー、ニコン、オリンパス等からの特許出願が 2010 年以降増加し、アカデミアではなく産業界から高いニーズがあることが示された。さらに②国内アカデミアでは馴染みの薄い技術であるが、中国アカデミアからの LF 技術の特許出願数は 2018 年以降、急増し、海外で注目されていることが示された。その中で③我々の LF 技術は光学系と再構成アルゴリズムの両方に新規性を持つことが明らかになった。物体を立体視する技術は自動運転やロボット産業でニーズの高い技術だが、視差情報を得るには 2 台以上のカメラを準備しなければならない。また従来の 3D 空間情報通信は膨大な通信量と解析時間を必要とし、その困難性から進んでこなかった。しかし我々の超高速高分解能 LF 技術はたった 1 回のカメラ撮影で物体を立体視でき、二次元 LF 像から 3

D像をミリ秒以下で再構成可能なため、二次元 LF 像として圧縮率の高い通信が可能である。このため自動運転に不可欠なリアルタイム車間通信、仮想(VR)・拡張(AR)現実など3D空間情報通信が必須な全産業で、通信・解析負荷の低い3D情報の取り扱いが可能になり、3Dデジタル通信技術に飛躍的变化をもたらす。したがって、超高速高分解能 LF 技術を基盤に3D計測操作の新技术を開発する構想により、ライフサイエンス分野で共焦点等の空間スキャンが必要な顕微鏡に代わるリアルタイム3D技術としての新たな価値を創出する。さらにカメラ産業や自動車産業、ロボット産業、内視鏡等の医療分野に社会実装し、社会の豊かさを実現する。

5. 発表実績

【論文】

1. Nakano M, Imamura M, Sugi T*, Nishimura M*, Human FAM3C restores memory-based thermotaxis of *Caenorhabditis elegans* famp-1/m70.4 loss-of-function mutants *PNAS Nexus* 1(5), 1-11, 2022
2. Imamura R, Nakane Y, Ito H*, Sugi T*
A method for the large-scale cultivation of nematodes to study their collective behaviors
J Vis Exp, Vol.198, 2023
3. Kato SY, Shimazaki Y, Chuma S, Shiraya K, Nakane Y, Sugi T, Okabe K, Harada Y, Sotoma S,
Fluorescent thermometers based on carbon quantum dots with various detection modes for intracellular temperature measurement.
Nano letters, 2025 (in press)

【学会発表】

1. Yagi R, Usuki S*, Miura K T, Sekine T, Sugi T, A new light-field microscope system for high-resolution 3D bio-imaging, The 9th International Conference of Asian Society for Precision Engineering and Nanotechnology, 2022
2. Sugi T, Development and application of 4D light-field and quantum imaging technologies, BISC2023, 2023

【特許】

1. 発明の名称：選択照射制御装置、選択照射制御方法およびプログラムならびに選択照射システム
出願番号：PCT/JP2024/040065 出願日：2024年11月12日
発明者：杉 拓磨、井上 智好、今村 隆輝、広瀬 真里枝、白杵 深 出願人：広島大学、静岡大学
2. 発明の名称：選択照射制御装置、選択照射制御方法およびプログラムならびに選択照射システム
出願番号：特願 2023-198583 出願日：2023年11月22日
発明者：杉 拓磨、井上 智好、今村 隆輝、広瀬 真里枝、白杵 深 出願人：広島大学、静岡大学
3. 発明の名称：画像解析装置、画像解析方法およびプログラム
出願番号：特願 2023-003395 出願日：2023年1月12日
発明者：杉 拓磨、今村 隆輝、広瀬 真里枝、白杵 深 出願人：広島大学、静岡大学

【その他】

該当無し。