

## 解 説

# レーザー走査法の医学・生物学への応用

大頭 仁

早稲田大学理工学部応用物理学科 〒160 東京都新宿区大久保 3-4-1

(1988年3月16日受理)

## Bio-Medical Application of Laser Scanning Technique

Hitoshi OHZU

Department of Applied Physics, School of Science and Engineering, Waseda University,  
3-4-1, Ohkubo Shinjuku-ku, Tokyo 160

### 1. はじめに

レーザー走査による顕微鏡的観測の技術はこの数年来急速に発達し、とくに半導体表面層の検査などに有効であることが示されている<sup>1)</sup>。たとえば、従来の光学顕微鏡では困難であった OBIC (optical beam induced contrast) 法は、結晶内転位の観測などに電子顕微鏡とは異なる有利な侧面を示すものである。一方、レーザー光のコヒーレンシにより、光ヘテロダイン法も可能であるため特長ある信号検出を利用した画像化<sup>2)</sup>、さらに、将来は非線形的な画像技術として興味深い多くの応用が期待される。

生物試料に対しては、細胞内の遺伝子構造の観測などが重要な課題であるが、従来の蛍光顕微鏡では細胞膜あるいは周囲の物質による散乱光の影響が強く、核内の構造を見極めることは困難であった。これに対して、共焦点型のレーザー走査法による顕微鏡では、高効率、高分解能、高コントラストという特長に加えて、三次元情報が得られるので、細胞を破壊せずに生きたまま観測するという可能性も有しており、画期的な進歩と思われる。

走査型の場合、出力は時系列の電気信号として得られるので、計算機によるディジタル画像処理が目的に応じて容易に遂行されることも非常に有利と考えられる。たとえば、生体眼底計測に走査法を用いることにより、眼底網膜上に照射するエネルギーを少なく、安全性を高めて、かつ画像処理を施すことによって目的とする診断を正確にできるという利点もある。

これらの利点をすべて生かして走査法を完成させるた

めには今後いくつかの技術的障害を克服しなくてはならない。本稿では、まずレーザー走査法の原理と問題点をまとめ、蛍光観測用として生物学研究への応用例と、最近われわれのグループで試作した患者診断臨床用を主目的とした眼底検査法について解説する。

### 2. レーザー走査法の特長

#### 2.1 基本的な考え方と特長

古く、フライング・スポットによる光学像の形成は CRT の輝点をネガフィルム上に投影して、その透過光で画像を作ることがなされた。インコヒーレントな光であり、試料上に投影される小輝点を十分に小さくすることは困難で、分解能に関して不利であった。

一方、レーザー光源を用いて、通常の結像光学系を使用する場合には、よく知られているように一般にコントラストは向上するが分解能は低下し（図2参照）、さらに干渉によりスペックルノイズの影響などが無視できなくなる。また、三次元情報を得るためにホログラフィ技術を導入した顕微鏡も研究されたが同様な原因で実用的ではなかった。そこで、無限小光源と等価と考えられる平行レーザー・ビームを用いてフライング・スポット光学系を用いれば、試料面上に理論的には回折限界に近い集光像が得られ、時系列のサンプリングにより他の部分からの光の干渉もなくなる。さらに試料上の小輝点に対応する受光側にピンホールを置くなどして、実空間上でいわゆるアボディゼイションを行なえば、分解能とコントラストの向上、およびフレアの除去が可能であろうと考えられた。1970年代後半に、C. Sheppard らが

積極的に解析を行ない、いわゆる共焦点 (confocal) 型レーザー顕微鏡の利点を明らかにした。その結果、高分解能、高コントラストになる可能性が確認され、1980年に入って実用装置の開発が行なわれるようになった。

このような光学系は、対象試料を平面上で二次元的に動かして走査する場合（試料走査型）には、その構成は実験室にも容易であり、共焦点型も構成が簡単で、かつ光学系を最も有利な条件で使用することができる。当初は半導体表面検査に代表されるように固体試料で、OBIC 法や光ヘテロダイシン顕微鏡に適用されて性能が評価されたが、走査速度に限度があることが大きな問題点である。

生物学的研究や医学の場では、1) 試料をあまり早く動かしたりできない、2) 実時間あるいはそれに近い高速走査で動的に観測したい、3) 細胞などは透過型で観測したい、4) 試料の交換などが容易にできてほしい、などの特殊な要求を満たさなくてはならない<sup>3)</sup>。これらの要求を満たすためには、試料は固定して容易に交換可能にし、レーザー光の高速走査を行ない（光束走査型）、かつ、共焦点型にする必要がある。生物研究への実用化はその有用性が非常に高いだけに今後の技術開発が重要と考えられる。

## 2.2 共焦点型 (Type II)

Sheppard らは、図 1(a)透過型、(b)反射型、および落射螢光型に示したように、照明点光源と共に受光面側にピンホールを設置してアポディゼイションを行なうながら走査する方式を共焦点型 (Type II) と名付け

た。反射型(b)は光ディスク用光学系とまったく似たものであり（この光学系は  $z$  軸方向への分解度が高い）、照明および集光光学系に通常は等価なものを用いる。試料が両光学系の焦点面上にあるとき、試料の一点を透過、反射あるいはそこで螢光発光があれば、その光のみを集光光学系で集めて、ピンホールを通して検出する。画像化は、照射光束あるいは試料の二次元走査で行なう。

容易に理解できるように、この系の利点を要約すると以下のようにになる。

- (1) 試料上の一点のみを透過する光あるいは反射する光、さらには螢光発光を集束して、ピンホールを通し、時系列で画像形成するため、周囲からの散乱光や干渉効果が除去され、コントラストの向上やフレアの除去に顕著な効果がある。
- (2) 集光光学系により結像された光エネルギーの中、中央部のみ（主としてエアリ・ディスクのみ）を透過させることができる。
- (3) 時系列画像形成であるために、コヒーレント光を用いても点像分布関数はインコヒーレント系と同様に振幅の 2 乗となる。したがって、空間周波数特性 (MTF) で考えると、インコヒーレント結像系と同等のものとなり、コヒーレント結像系である通常のレーザー顕微鏡に比して分解能は 2 倍になる。図 2 に概念的にこの比較を示す。同図(a)は通常のコヒーレント結像系であり、共焦点走査型は(b)のごとくなる。
- (4) さらに、たとえば集光光学系に輪帯開口を用いるなどの工夫をして、開口関数におけるアポディゼイションを併用すると、光量の絶対値は低下するが、同図(c)のようにコントラストの向上も期待され

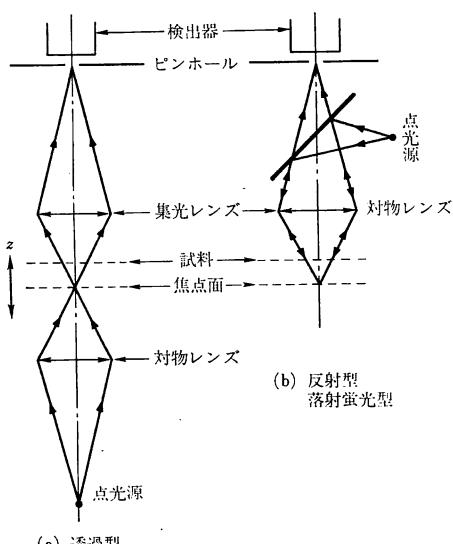


図 1 共焦点レーザー走査顕微鏡の光学系

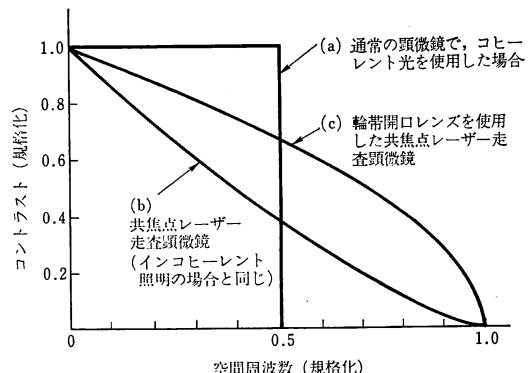


図 2 共焦点レーザー走査顕微鏡の空間周波数特性 (MTF)

る。

(5) 光検出には光電子増倍管など感度の優れたものが用いられ、また試料移動型では光学系のディティングの影響もなく画面特性を一様にすることが容易である。

対物および集光レンズに収差のある場合、試料を固定して、光ビームを走査する場合、あるいは完全に共焦点でない場合 (Type I) については複雑な要因により幾分上記の特長が変化するが、一般的傾向は同様である。

### 2.3 三次元情報

図1(a)の透過型の場合、対物レンズの焦点面から試料がはずれていると、当然コントラストも分解能も低下し、通常の顕微鏡観測における焦点はずれと同様に像は不鮮明になる。これに対して、同図(b)の場合には、試料が焦点面からはずれると反射光のごく一部しかピンホールを通過しないため、観測画像のコントラストは(a)の場合よりもさらに極端に低下する。したがって、試料に厚みがある場合には、焦点の合った面のみが鮮明に観測される。その他の部分は、ぼけで重畳するのではなく、むしろ消滅すると考えてよい。生物試料の場合、たとえば細胞膜を通して、生きたまま内部を観測できることになる。また、試料を上下して $\zeta$ 方向にサンプルし、各焦点面で画像をメモリーさせることにより三次元構造を知ることができる。この方式を焦点移動メモリー型と呼ぶことにする。

とくに、螢光観測の場合には、試料の焦点はずれにある面での螢光はピンホールにはまったく結像しないため、焦点面上の光源と共に微小部分のみの螢光が検出される結果、感度、コントラストの上昇とともに三次元的空間分解能が非常に高くなる。河田ら<sup>4)</sup>は、共焦点型の走査顕微鏡について三次元 OTF の計算を行ない、通常の螢光顕微鏡に比較して、焦点面内分解能は2倍、さらに光軸 $\zeta$ 方向分解能はあらゆる面内周波数に対してコントラストが2倍以上になることを示している。

### 2.4 走査法

いずれにしても、対物レンズによって結ばれる小輝点を試料上で二次元的に走査する必要がある。電界や磁界により偏向できる電子線と異なり、レーザー光の偏向技術は未完成のものに近い。簡単なのは試料走査型であり、光源、光学系、ピンホール、検出器はそれぞれ固定しており、試料台を二次元的に移動するものである。スピーカーのボイスコイルなどで走査するが、1フレームの画面を得るのに約10秒近くかかることになる。前述のように、とくに生物試料、生体計測などには不向きである。

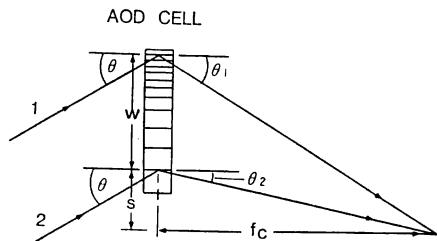


図3 AODセルによる光偏向の原理とシリンドリカルレンズ効果

ある。

光束走査型は、ポリゴン回転鏡あるいはガルバノ振動鏡を用いる機械的方式と、超音波光偏向素子（以下 AOD と略す）を用いるものが主流となっている。前者は機械的振動や回転を利用するので、高速制御が困難である。しかし、光学的性能の点では AOD 方式より優れた面を有する。現在は主走査にポリゴン回転鏡、副（垂直方向）走査用にガルバノ振動鏡という組合せで、通常の NTSC 方式ビデオレートの走査が可能となっている。

後者の AOD 方式は電気的に制御できて、小型になり走査速度も早く、安定した同期がとれるという利点がある。二酸化テルル ( $\text{TeO}_2$ ) などの結晶に超音波を導入すると位相格子が形成され、それによって入射光が回折されることを利用するものである。駆動超音波周波数を変調して回折光の方向を制御するが、図3のように高速で周波数を変えると、超音波の速度がおそいために格子間隔が一定でなくなる。このため、いわゆるシリンドリカルレンズ効果<sup>5)</sup>と呼ばれているように、入射平行光束が集束したり発散したりして、点像分布が拡がり分解能の低下を招く。また回折効果を利用してするために、波長依存性があり励起光と観測光の波長が異なる螢光測定、あるいはカラー化に困難が伴う。

このように、走査方式のそれぞれに一長一短があり目的に応じて方式を選ぶ必要がある。とくに光束走査方式の場合には共焦点型にするためにいろいろな工夫が必要である。たとえば、落射方式の場合には観測光も照明光と同じ走査光学系を逆に通過させてピンホールに導いたり、あるいは CCD アレイなどを用いて、ピンホール効果を兼ねるなどの工夫がなされている。

### 3. 生物試料と螢光顕微鏡

生物試料においては、標本密度が小さいためにコント

ラストが低いとか、生体のまま3次元的に観測したい要求の強いときに走査法の特長が發揮され、高解像、高コントラスト像が得られる。染色標本でも対象部位に対する背景や周辺とのコントラスト差が小さいとき、あるいは逆に染色過度であるときでもコントラストを強調して画像形成が可能である。いくつかの観測例を以下に示す。

まず、図4は最近西ドイツで商品化されたレーザースキャン顕微鏡の解像力を示すものである<sup>6)</sup>。この装置は共焦点型でなく、光束走査にガルバノ振動鏡を用いたものである。He-Ne レーザーで、通常顕微鏡の分解能を検出する試料としての珪藻を撮影したものである。観測されている小孔径は約 0.45 μm であるが、コントラストが高くおよそ 4000 本/mm の解像力が得られている。

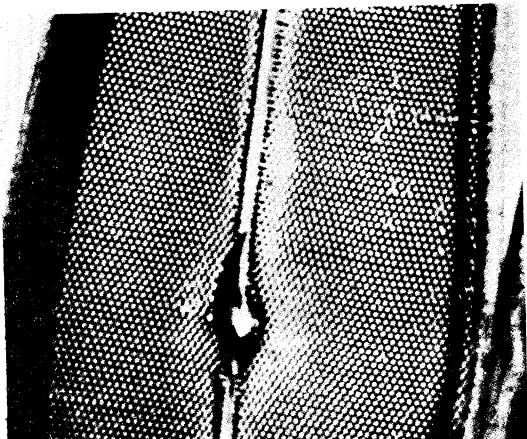


図4 珪藻 “*Pleurosigma Angulatum*”  
 $\lambda=633 \text{ nm}$ , 小孔径 0.45 μm

図5は国内メーカーの共焦点型のもので、焦点移動メモリーを利用して焦点深度を大きくし、鮮明に画像を出した例である。試料は生体の蝶の複眼である<sup>7)</sup>。対物レンズは 100 倍、He-Ne を用い、TeO<sub>2</sub> 結晶の AOD 光束走査、光検出には CCD アレイを用い解像限界は約 0.25 μm である。複眼レンズの曲率半径、表面精度などを生体のまま、かなり定量的に計測することができる。

細胞レベルの研究には蛍光分析法が大変重要である。カルシウムイオンの細胞内密度、pH 濃度あるいは細胞膜電位の計測や、さらに遺伝子本体の DNA の核内分布状況の生体観測など、従来の蛍光顕微鏡では困難であった問題が走査法により可能になると考えられている。この要求に応ずるために、共焦点型で高感度の光電子増倍管を使用し、検出光路部に蛍光波長域を透過するフィルターを挿入する。現在のところ、Ar イオンレーザー (488 nm) を励起光とした、いくつかの観測例が報告されている。

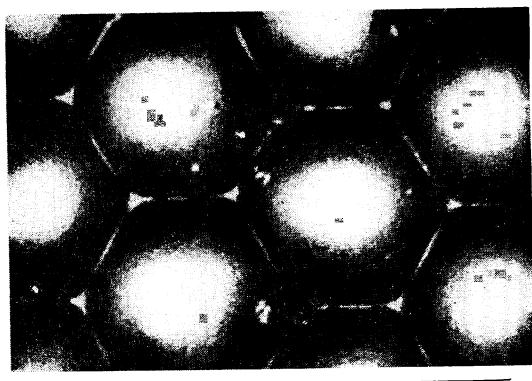


図5 蝶の複眼（焦点移動メモリー使用）

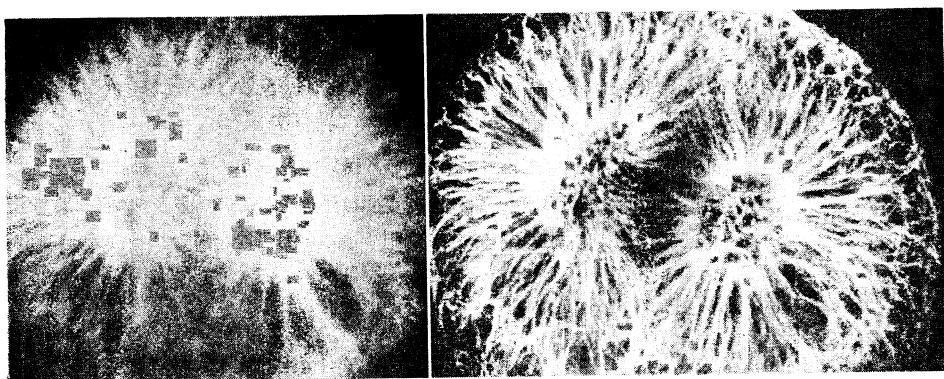


図6 ウニ受精卵の蛍光像  
(A) 通常の蛍光顕微鏡、(B) 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡

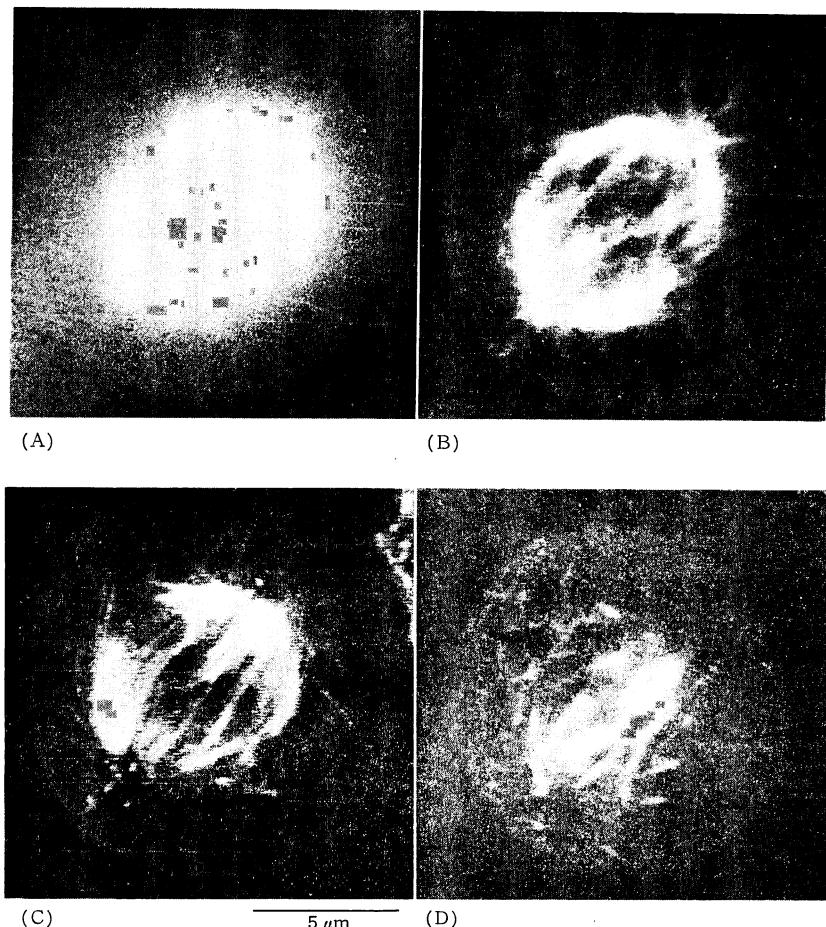


図7 子宮ガン細胞 (HeLa cell) の蛍光顕微鏡像

- (A) 通常の蛍光顕微鏡像  
 (B) (A)と同じ焦点位置で撮影した共焦点レーザー蛍光顕微鏡像  
 (C), (D)は焦点位置をずらしたもの

図6はウニ受精卵の細胞分裂時に現われる纖維状のチューブリン結合抗体の蛍光像を得たものである<sup>8)</sup>。同図(A)は通常の蛍光顕微鏡によるもので、纖維構造などが不鮮明であるのに対し、(B)は共焦点型光束走査法による蛍光顕微鏡(英國製)像である。周辺部や中央の細胞分裂中心部さらに纖維構造が非常によく観測される。

図7は子宮ガン細胞培養系のHeLa細胞について比較したものである<sup>8)</sup>。(A)が通常のものに対し、(B)は同じ焦点面で共焦点走査法で得たもので、図6と同様に解像力に優れていることは明らかである。(C)と(D)は試料をわずかに上下させて得た像であるが、これにより解像力やコントラストの向上のみでなく、3次元的構造解析の可能なことが判明する。また試料標本を作成するために薄片にスライスすることなく、生きたまま細胞膜を通して内部構造を観測できることはすばらしい進歩で

ある。

これらの新しい生物学的知見は従来ではほとんど得られなかつたものであり、とくに細胞生物学、遺伝子工学の研究などに画期的な手法を与えるものといえよう。現在のところ、Arイオンレーザーの488 nmで励起できる蛍光についてDNAなど限られた分野の研究が開始されている段階であるが、さらに励起波長を変えて、生体内で重要な働きをしているカルシウムイオンの動きなどを観測することも可能と思われる。さらに極微弱光の検出技術を適用するなど、技術的援助による今後の成果が非常に期待される。

#### 4. 眼底検査法

レーザー走査法を直接人間の患部診断に用いる臨床医学的な例として、最近開発された眼底検査法について述

べる<sup>9)</sup>。図8に示すように、従来眼底を観測する方法としては(A)のように生体眼の入射瞳を通して眼底を一様に照明し、眼底からの反射光を眼球光学系(水晶体、角膜)および撮影用の光学系によって結像する、いわゆる眼底カメラ(fundus camera)がある。この方式の利点は、同時に全体像をカラー撮影できることであるが、欠点としては次のようなことが挙げられる。(1) 照射光量が多く、とくに蛍光眼底検査を行なったときは、注入する蛍光剤も多量でかつストロボ撮影が必要になり患者の苦痛も大きい。(2) 眼球光学系の収差や眼底および眼内での散乱光の影響により、解像力およびコントラストの低下が生ずる。(3) 結像の際に焦点合わせが困難

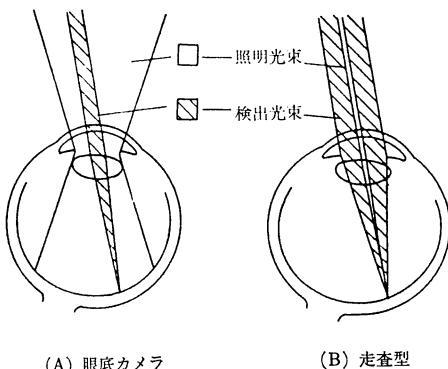


図8 普通の眼底カメラとレーザー走査型の比較

である。(4) 角膜前面での反射光の除去が必要である。これに対し、レーザー走査法を適用すると同図(B)のように、コリメートした細いレーザー光を入射するので、眼球光学系の収差を少なく眼底上に小輝点を形成でき、またビームウエスト長があるために焦点深度も大きくなる。受光系は各小輝点からの反射光量検出であって、瞳全体を有効に利用し眼球光学系の収差の影響を少なくて済む。また、光電子増倍管を使って感度を高められるので照射光量を極小にし、患者の負担を軽減できるなどの利点が考えられる。

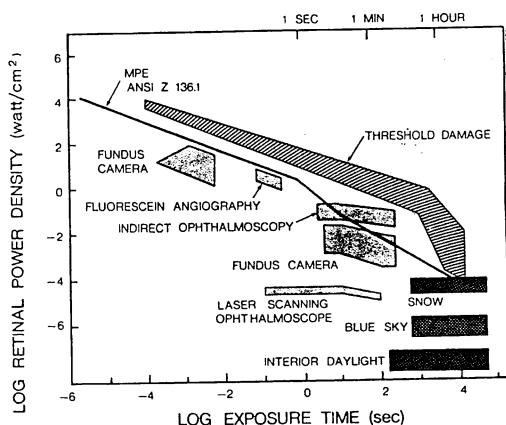


図9 眼底網膜への最大許容露光量(MPE)と各眼底検査器械の照射量の比較

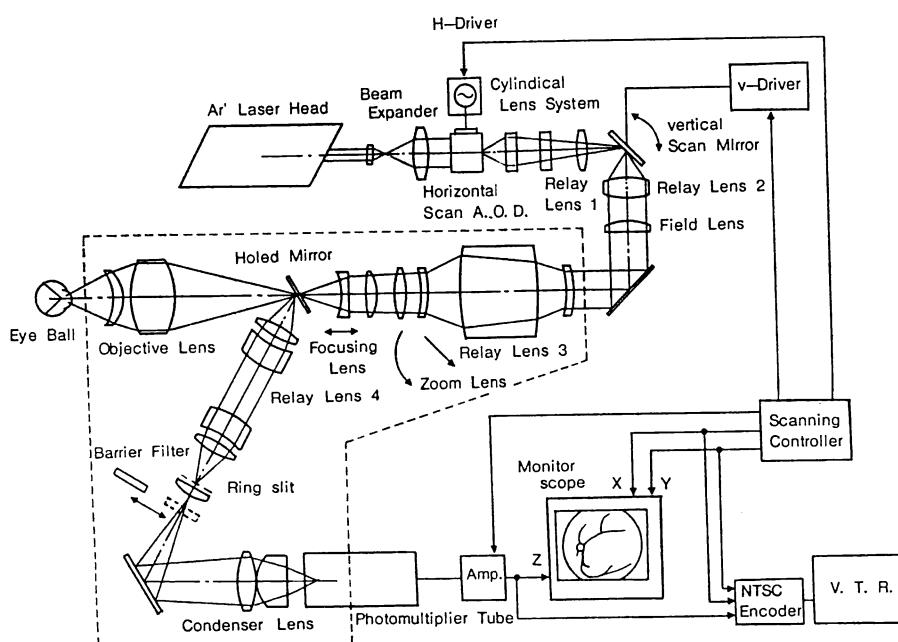


図10 レーザー走査型眼底計測装置の概略 (1985)

眼底像を得るために必要な網膜上の照明光量を概算してみると、図9のようになる。実線は米国の基準(ANSI, Z-136.1)による網膜への最大許容露光量(MPE)であり、これを越すと網膜損傷の危険がある。従来の眼底カメラ方式は許容量限度に近い光量を必要とするのに対して、走査型では非常に少なことがわかる。とくに螢光眼底観測に際して、少量の注入螢光剤、低レベルのレーザー光励起で連続的な観測が可能となり、被験者への安全性も格段に高いことが判明した。被験者としての経験からいうと、雪山の晴天時のまぶしさ程度である。

このような観点から、現在、米国と西独で試作機が作られ実験が行なわれている<sup>10)</sup>。ポリゴン回転鏡で光束走査する共焦点型のもので、視野は狭く約20度程度であるが、解像力、コントラストともに従来のものより優れていることが報告されている。われわれは1985年から実用的なものを目指してAODによるArイオンレーザー走査法を適用して、図10のような構成で小型の走査型レーザー眼底観測装置を試作した。通常の観測用には514.5 nmのレーザー光を用い、螢光観測用には488 nmが使用できる。

レーザー光をAODにより高速主走査し、垂直方向にはガルバノ振動鏡を用い1画面走査1/30秒、ノンインターレースでは1/60秒の両画面切換を可能にした。また、実用的には広画角も必要となるので、ズームレンズにより20度から60度まで広範囲に選択できるようにした。螢光観測用にはバリアーフィルタを挿入する。この光学系では共焦点型に構成し難いため、解像力の点では劣るが、臨床用として使用しやすく、従来の眼底カメラに比して多くの利点が得られることが判明した。

図11は60度視野の螢光眼底写真例である。フレーム加算せずに1画面をモニターから写真に撮影したもので解像力は、未だ十分でない。しかし螢光剤の注入(前腕部静脈から注入)量は従来の1/10程度であり、注入後約8秒で眼底内に拡がり、その動的な状況を連続的に観測することが可能になった。被験者の負担も少なく危険度が格段と低減されることがわかった。今後螢光剤の経口投与の可能性も検討する予定である。

図12は20度視野で健常者の眼底乳頭部を観測したものである。これは5枚のフレーム加算を行ない計算機による画像処理を行なって、血管部およびその背後にあらる視神経纖維を強調したものである。血管の脈動を連続的に観測したり、血流速度計測も可能となる。また通常観測困難な視神経纖維などがよく観測されることがわか

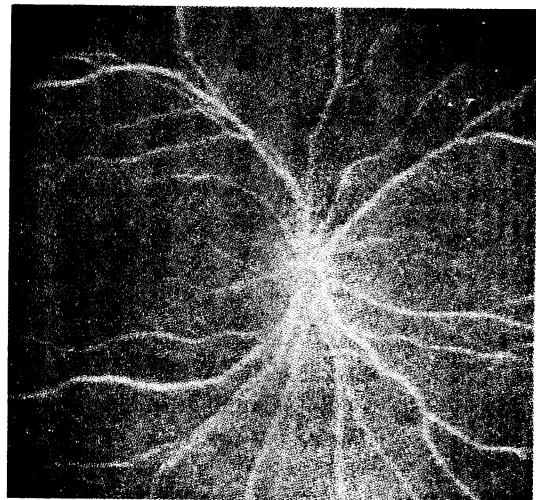


図11 60度視野螢光眼底像



図12 20度視野眼底像(画像処理済)

った。時系列電気信号をA/D変換し、容易に目的に応じた画像処理が行なわれることは臨床医学的には今後有用なものと考えられる。

## 5. おわりに

レーザー走査法の特長と、生物試料用顕微鏡としての有効性および臨床医学的応用例について述べたが、この分野での研究は未だ開始されて間もない。今後急速にこの分野での研究成果や臨床例が出てくると思われるが、重要な可能性を多く有しているだけに、より高精度の装置の開発が望まれる。なお、走査型眼底計測装置の開発については文部省科学的研究補助金、試験研究(1)

No. 60870063, 画像処理については特定研究(1) No. 61121005 の援助を受けて行なったものである。班員諸氏に感謝する。

## 文 献

- 1) T. Wilson and C. Sheppard: *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic Press. London, 1984).
- 2) 藤井陽一：“レーザー顕微鏡”，応用物理，**48** (1979) 66-69.
- 3) 鈴木達朗, 堀川喜明：“生物学的研究を目的とした実時間走査型レーザー顕微鏡の開発”，レーザー研究，**15** (1987) 636-646.
- 4) 河田聰, 中村収, 南茂夫：“レーザースキャニング顕微鏡の3次元結像”，第18回画像工学コンファレンス

資料 (1987) pp. 39-42.

- 5) L. Dickson: “Optical consideration for an acoustic deflector,” Appl. Opt., **11** (1982) 2196-2202.
- 6) カール・ツァイス社：レーザースキャン顕微鏡 カタログ (1987).
- 7) レーザーテック社：レーザー顕微鏡 写真集 4B-3166 (1987).
- 8) J. G. White, W. B. Amos and M. Fordham: “An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy,” J. Cell Biol., **105**, July (1987) 41-48.
- 9) 大頭仁：“レーザー走査型眼底検査装置の開発”，日本眼光学学会誌, **8**, No. 1 (1987) 1-7.
- 10) R. H. Webb and G. W. Hughes: “Scanning laser ophthalmology,” IEEE Trans. Biomed. Eng., **28** (1981) 488-492.