

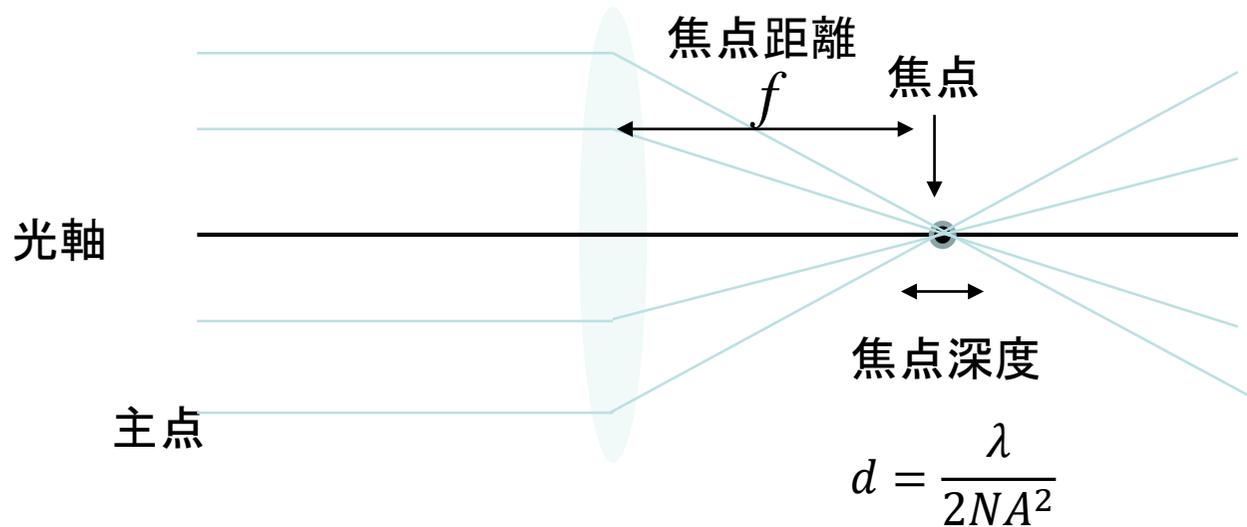
# 超焦点深度伸長光学素子の設計と ライトシート顕微鏡への応用

愛媛大学大学院理工学研究科  
准教授 齋藤卓

2024年9月12日

# 焦点深度とは？

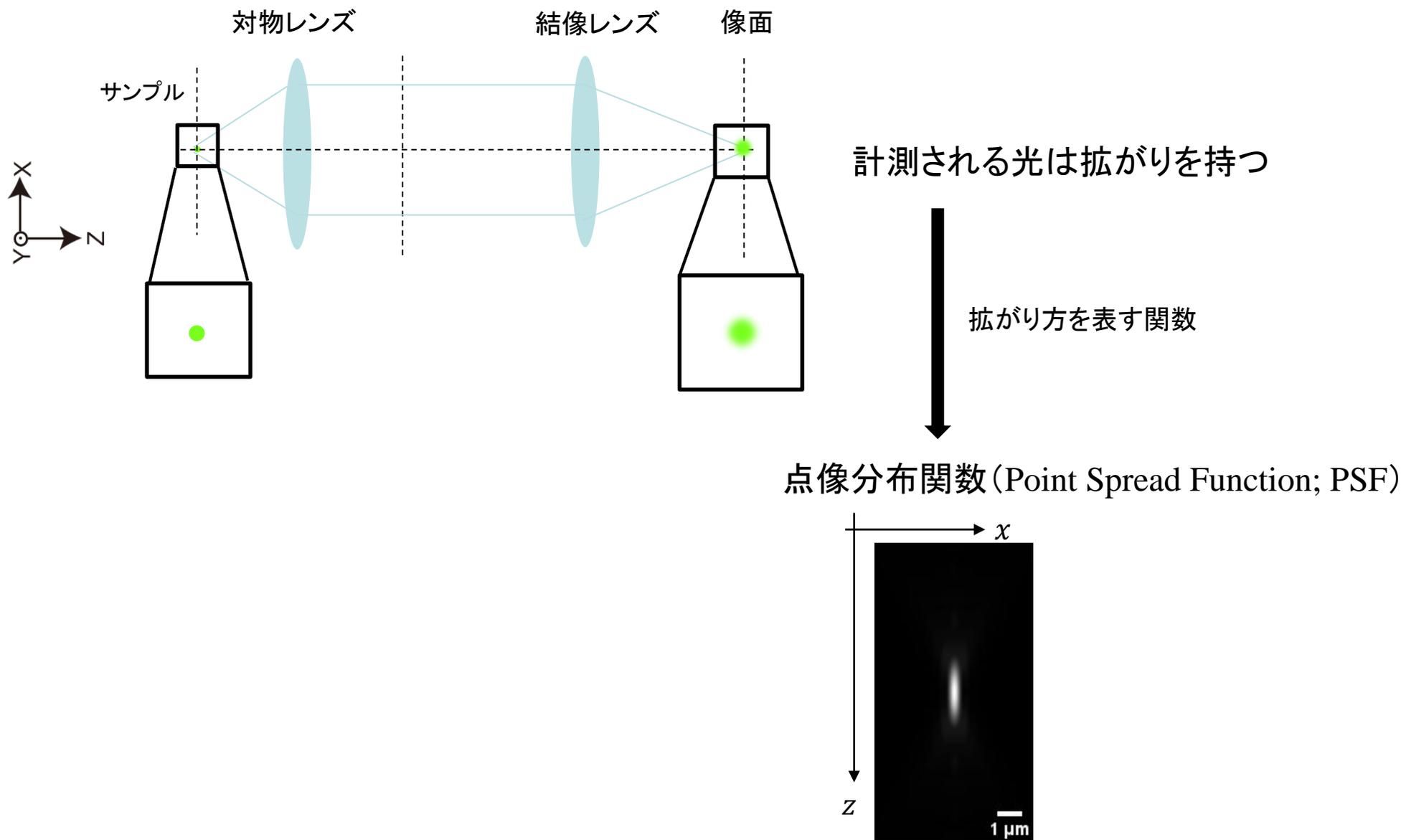
被写界深度とも呼ばれ、ピントが合う領域を指す



顕微鏡の焦点深度はとても小さい～数 $\mu\text{m}$

→焦点深度を伸ばすことができるとぼけを無くして厚みのある試料の画像を取得することができる

# 焦点深度とは？



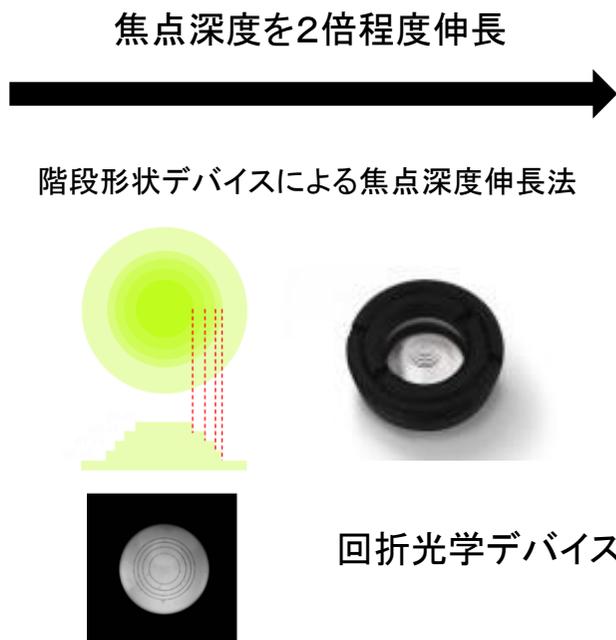
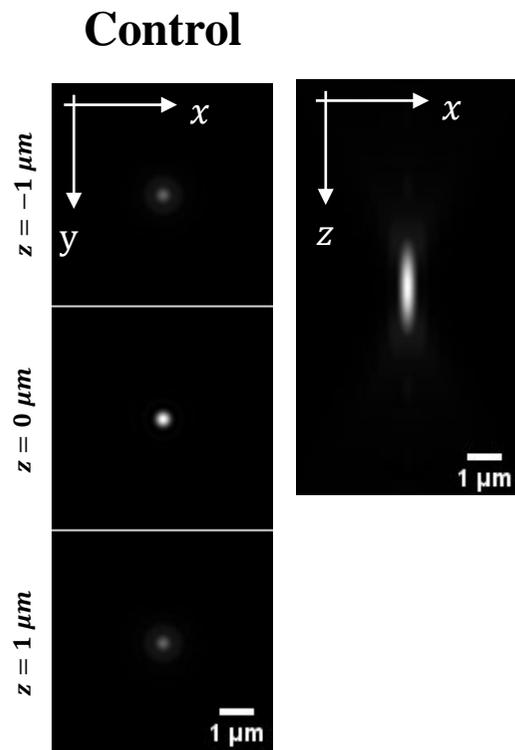
# 従来技術とその問題点

既に実用化されている技術には、階段形状光学素子と円錐レンズによる方法等があるが、

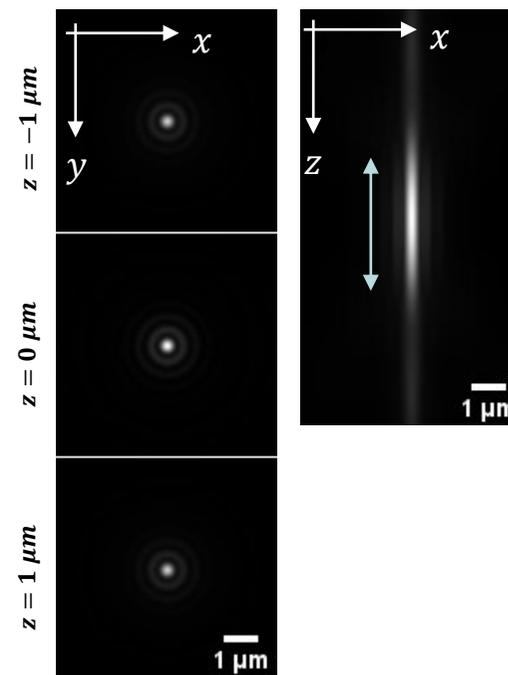
階段形状光学素子は焦点深度伸長効果が数倍程度

円錐レンズではサイドローブにより画像のSN比が低下等の問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

# 従来技術：階段形状光学素子



## 階段形状光学素子

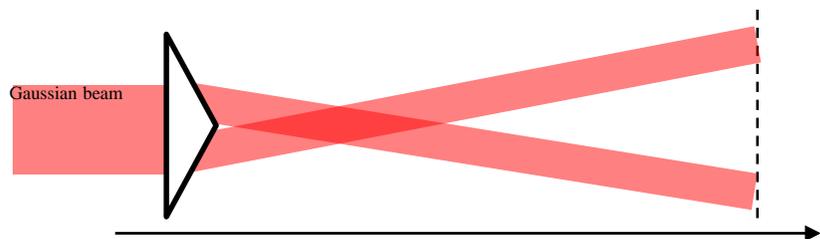


Saitou, Imamura, *Int. J. Mol. Sci.* 2023

浜松ホトニクス社から製品化されている  
レンズを最適化した場合でも3~5程度の伸長効果

# 従来技術：円錐レンズ

円錐レンズはベッセルビームを形成するのに一般的に使用される



ビーム形成

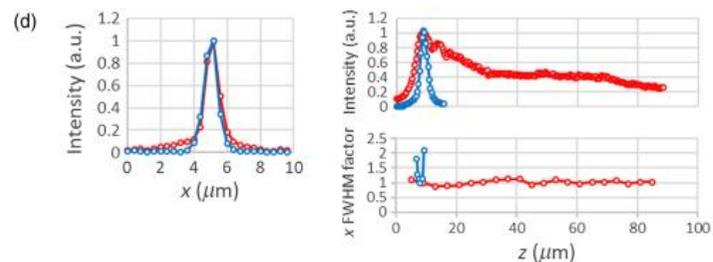
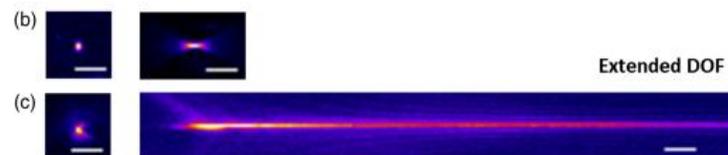
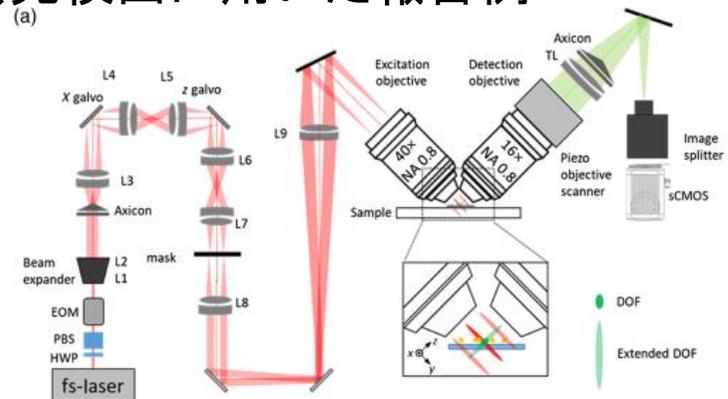
Bessel beam



Cf) Gauss beam



蛍光検出に用いた報告例



Lin et al, *Journal of Biomedical Optics* 26:116503, 2021

20倍程度の伸長効果があるがサイドローブがあるために分解能が低下する

# 新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術である円錐レンズの問題点であった、サイドローブを抑制して伸長効果を2.7倍程度まで向上させることに成功した。
- 従来は伸長効果、また分解能の点で応用範囲が限られていたが、性能が向上できたため、ライトシート顕微鏡をはじめとするバイオイメージングへの応用可能性が広がった。

# 新技術の特徴・従来技術との比較

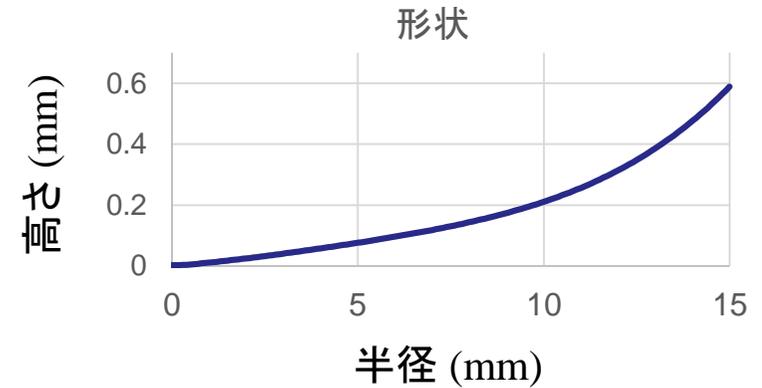
顕微鏡光学系の最適化によって焦点深度を伸長するFreeFormレンズを設計

- 形状を回転対称に制限して多項式で展開

高さ  $H(x, y) = \sum_{n=1}^N c_n \sqrt{x^2 + y^2}^n$

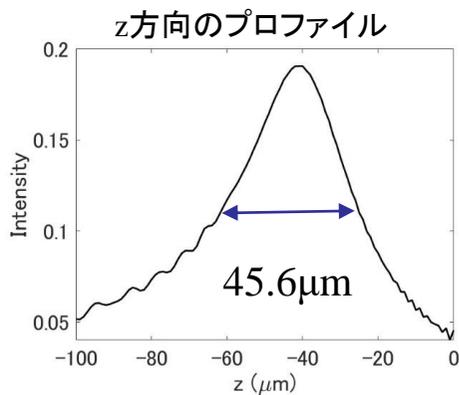
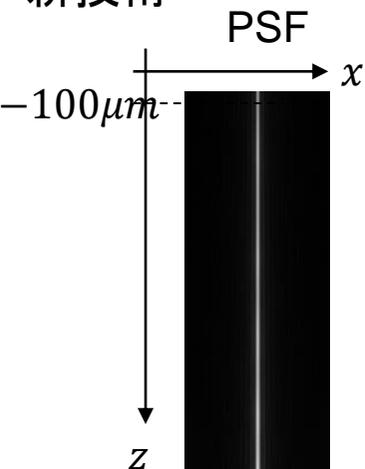
↑  
中心と周辺部の輝度比の最小化  
■

評価関数 (PSFのz方向輝度値)

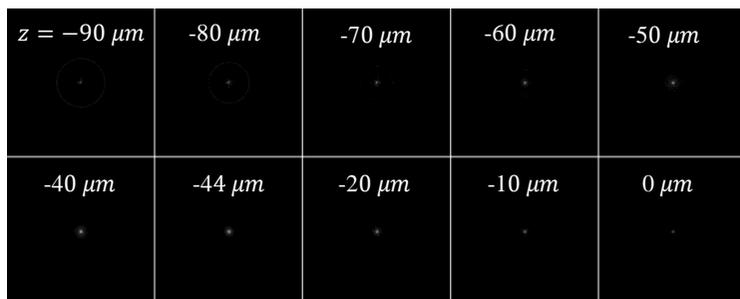
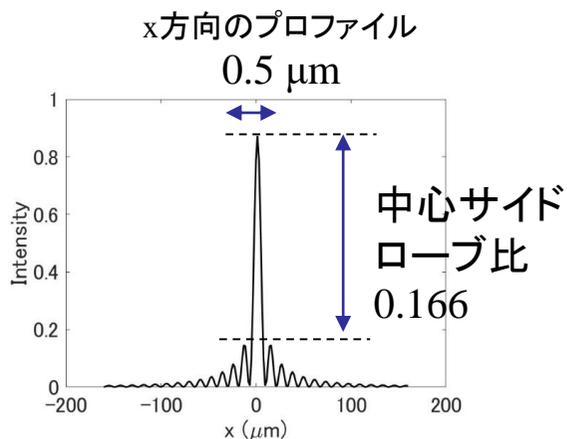


# 新技術の特徴・従来技術との比較

新技術

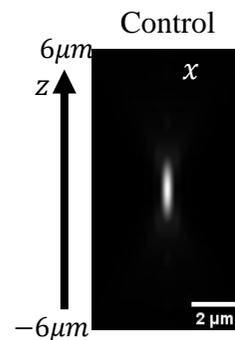
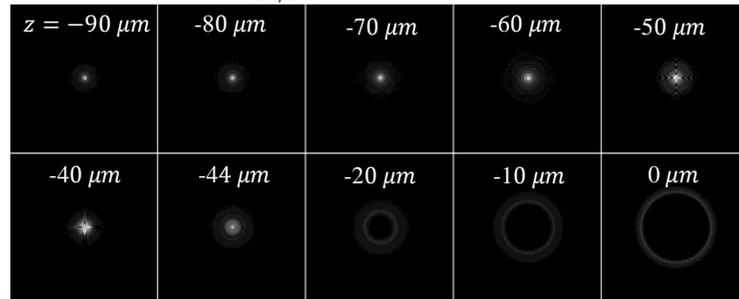
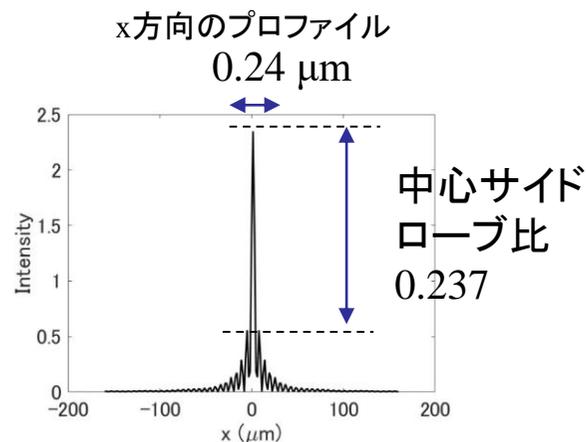
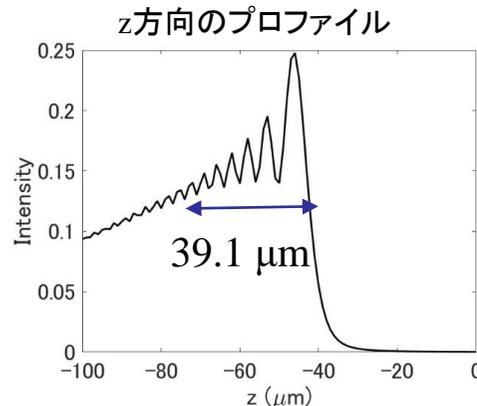
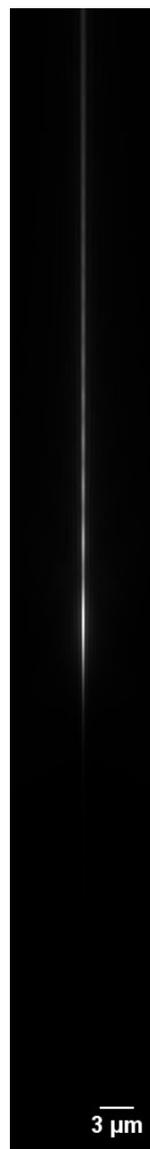


26.4倍の  
伸長効果



円錐レンズ $0.3^\circ$

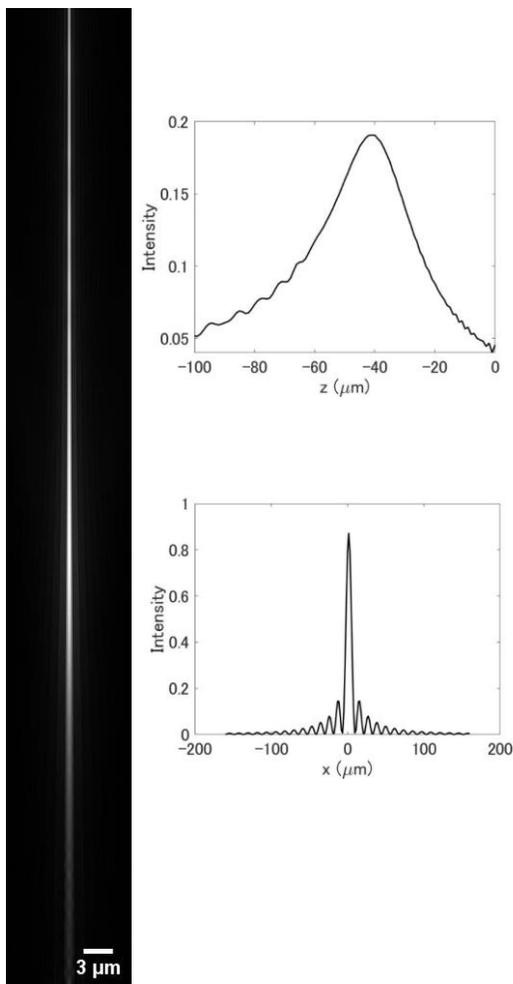
PSF



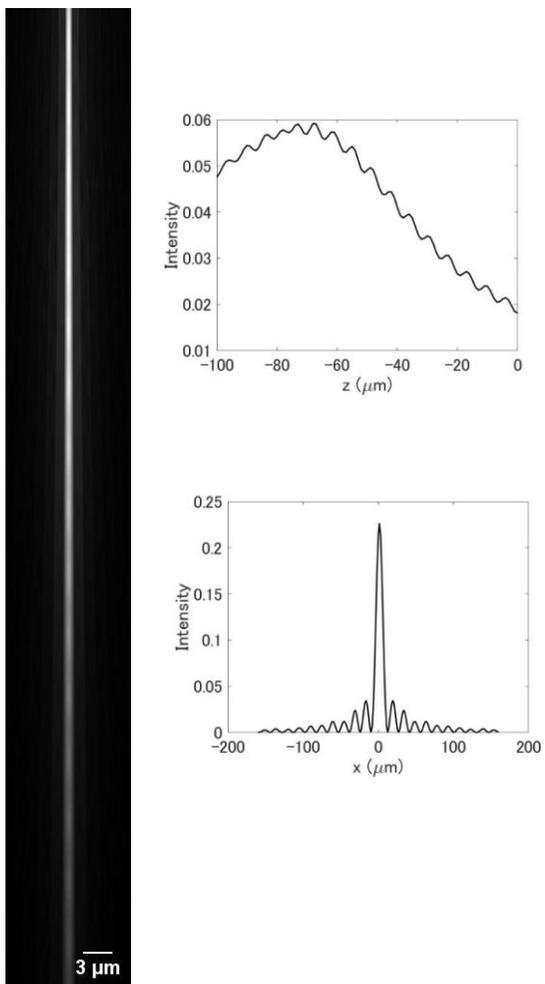
# 新技術の特徴・従来技術との比較

汎用性の検証 対物レンズを変えた時のPSF

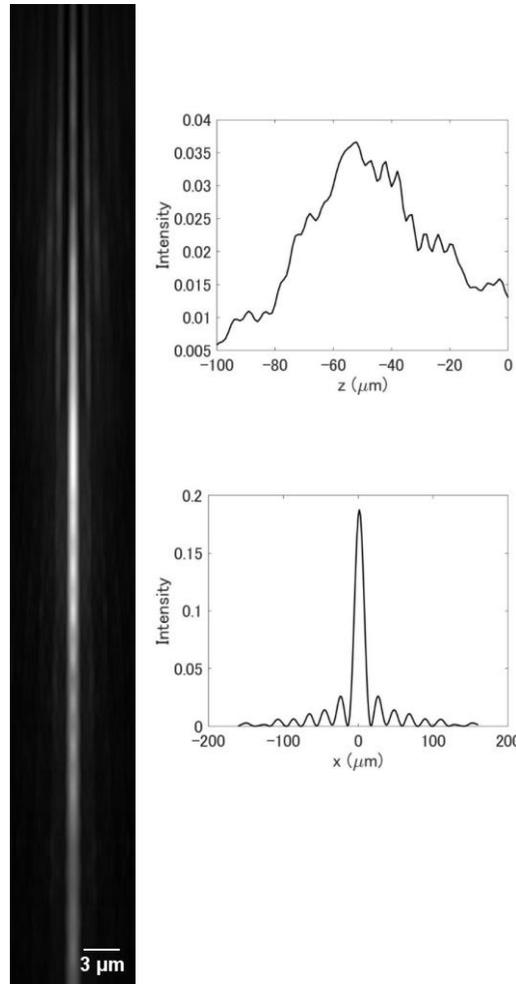
16X, NA0.8, n1.33



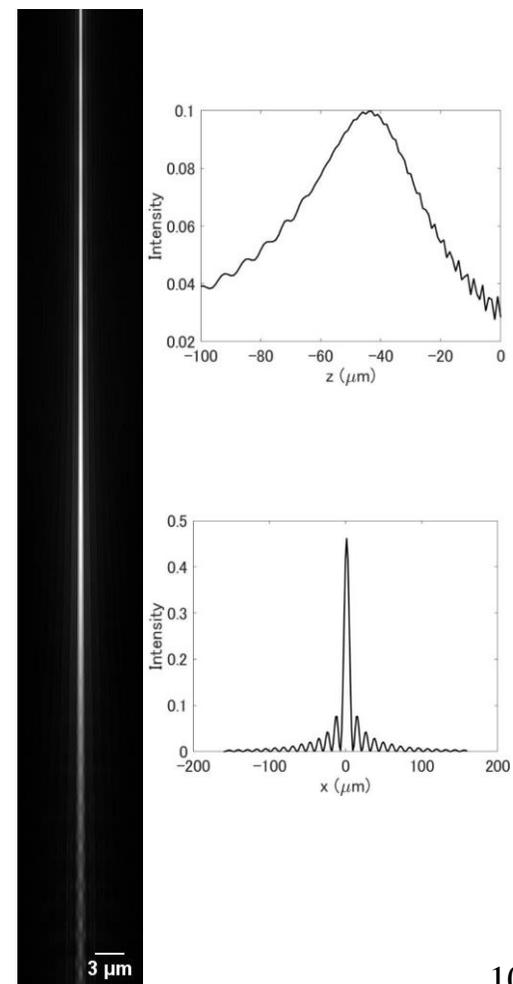
16X, NA0.6, n1.33



20X, NA0.6, n1.33



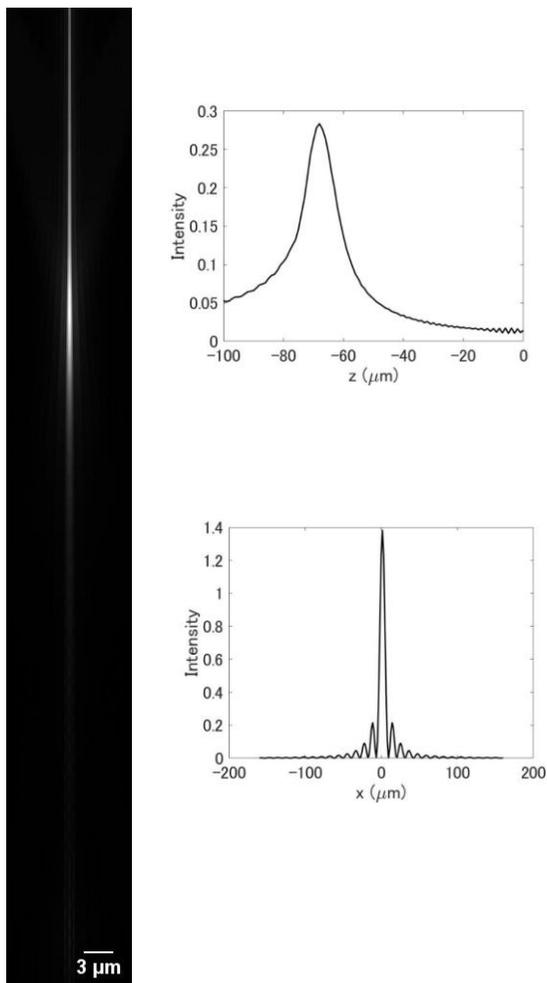
16X, NA0.8, n1.5



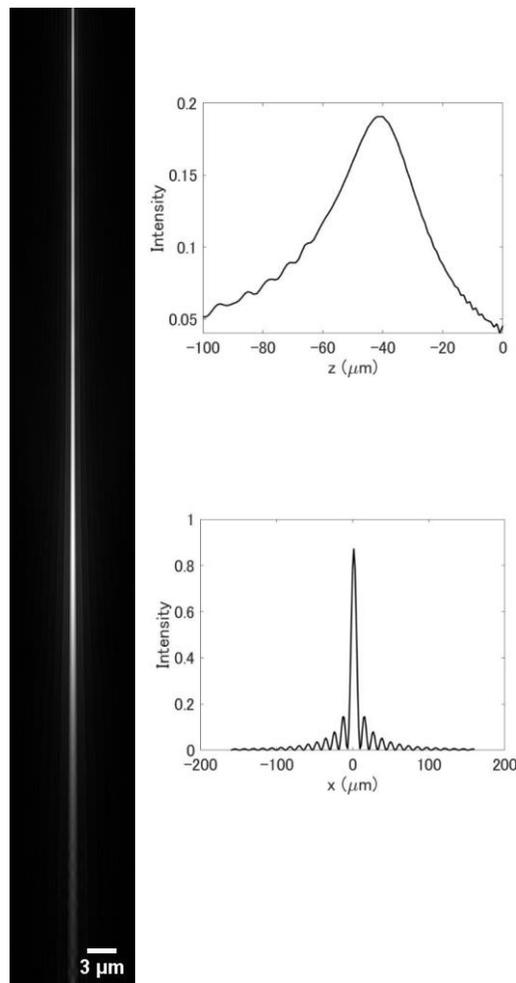
# 新技術の特徴・従来技術との比較

汎用性の検証 波長を変えた時のPSF

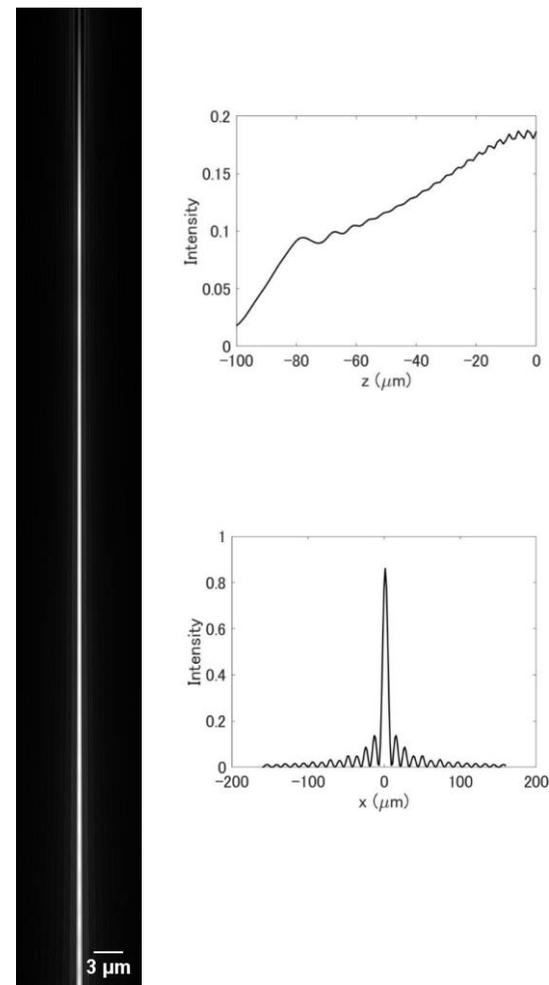
475nm



520nm

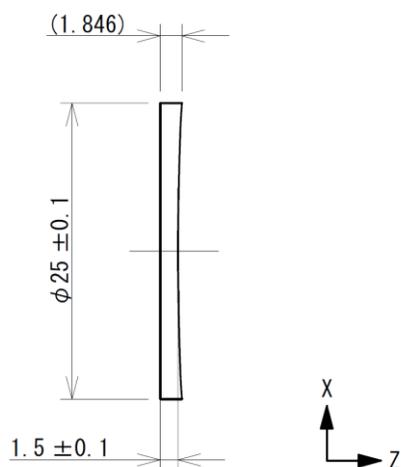


600nm



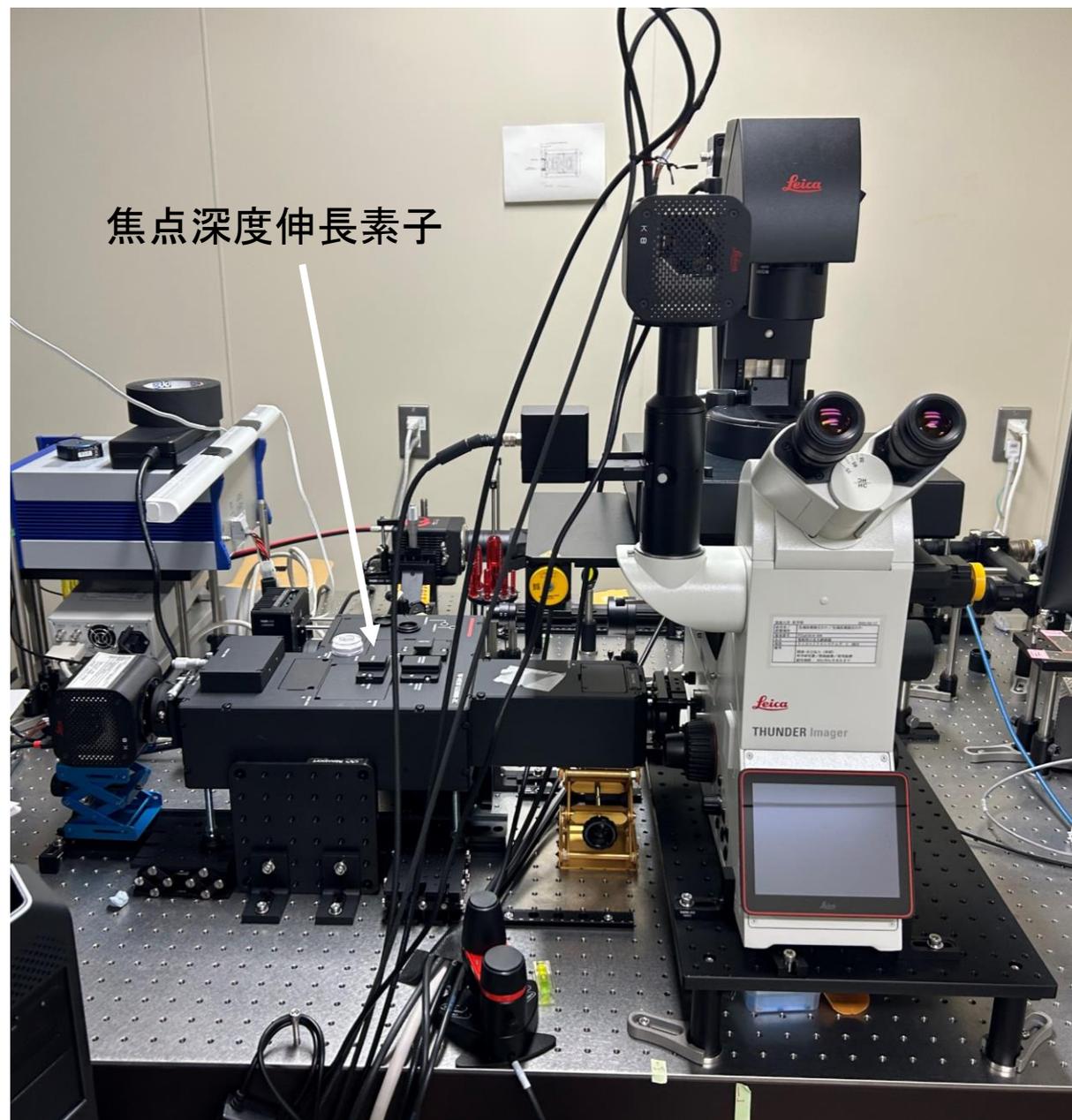
# 新技術の特徴・従来技術との比較

夏目光学社に製作依頼



顕微鏡に導入し計測 ⇒

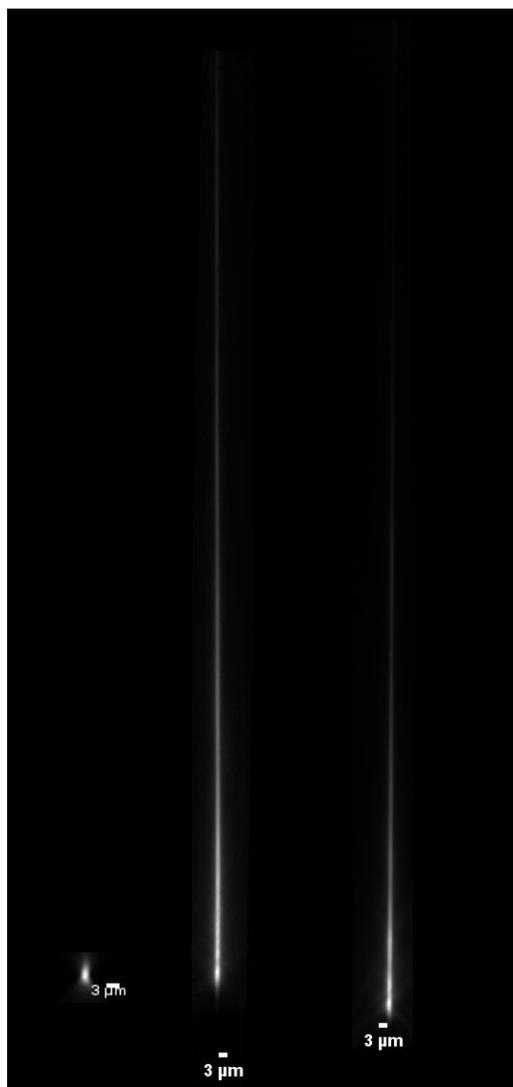
※使用方法は、従来型の顕微鏡に2次光学系を設置し、その瞳面に素子を導入するだけ



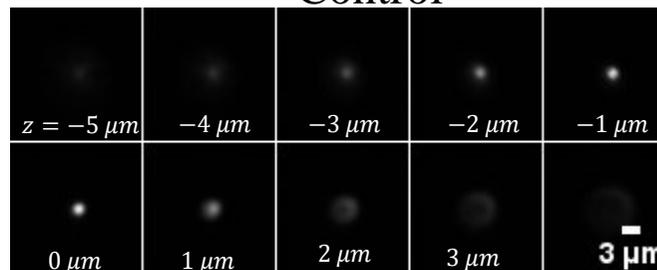
# 新技術の特徴・従来技術との比較

実測(2 $\mu$ m径蛍光ビーズ)データ

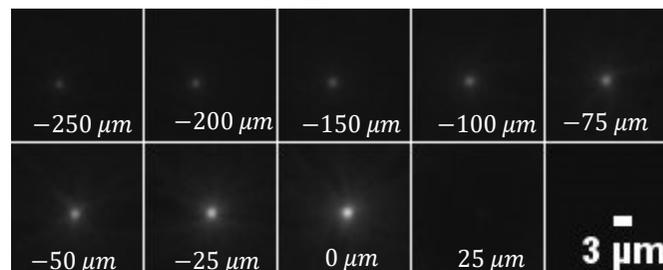
Control 新技術 凹Axicon0.5°



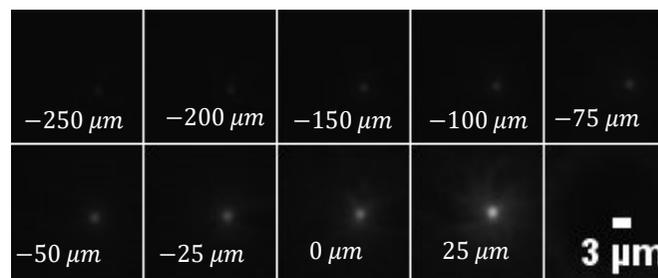
Control



新技術



凹Axicon0.5°

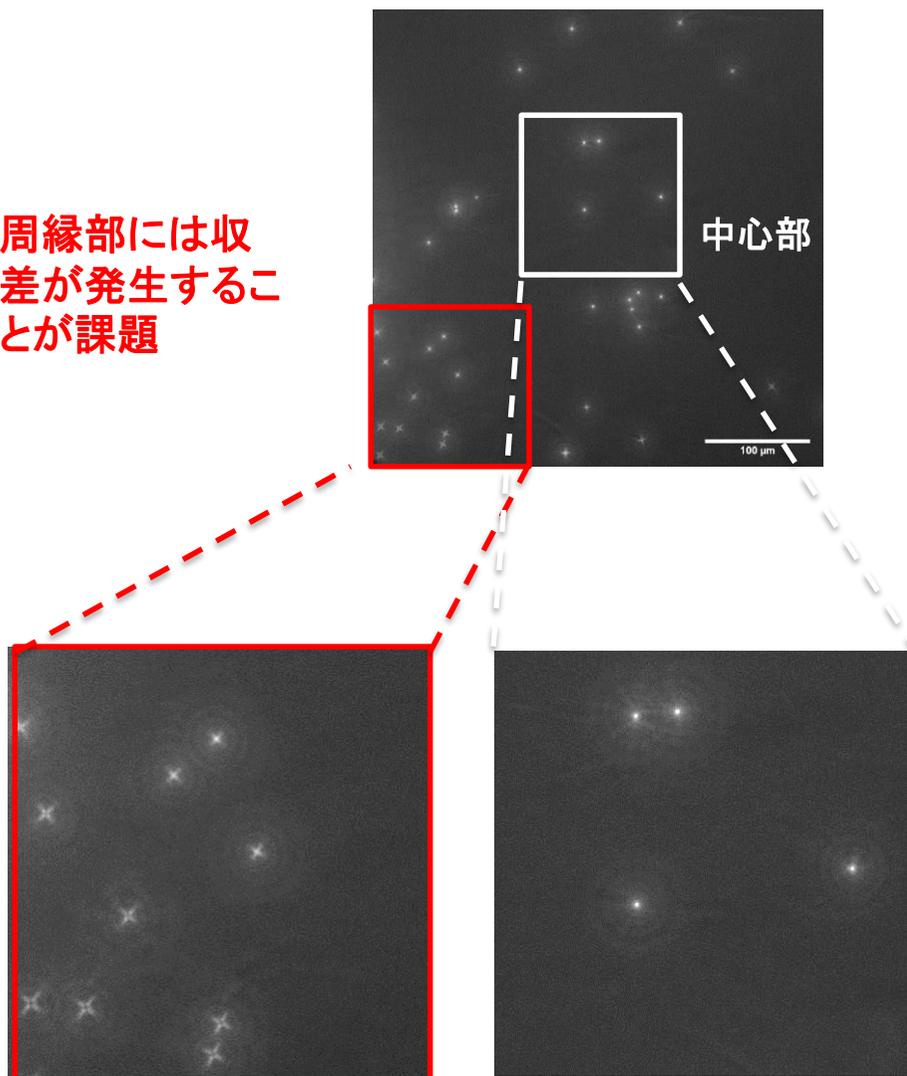


# 新技術の特徴・従来技術との比較

## 未解決問題

焦点深度伸長素子を用いた  
イメージングにおける周縁部収差

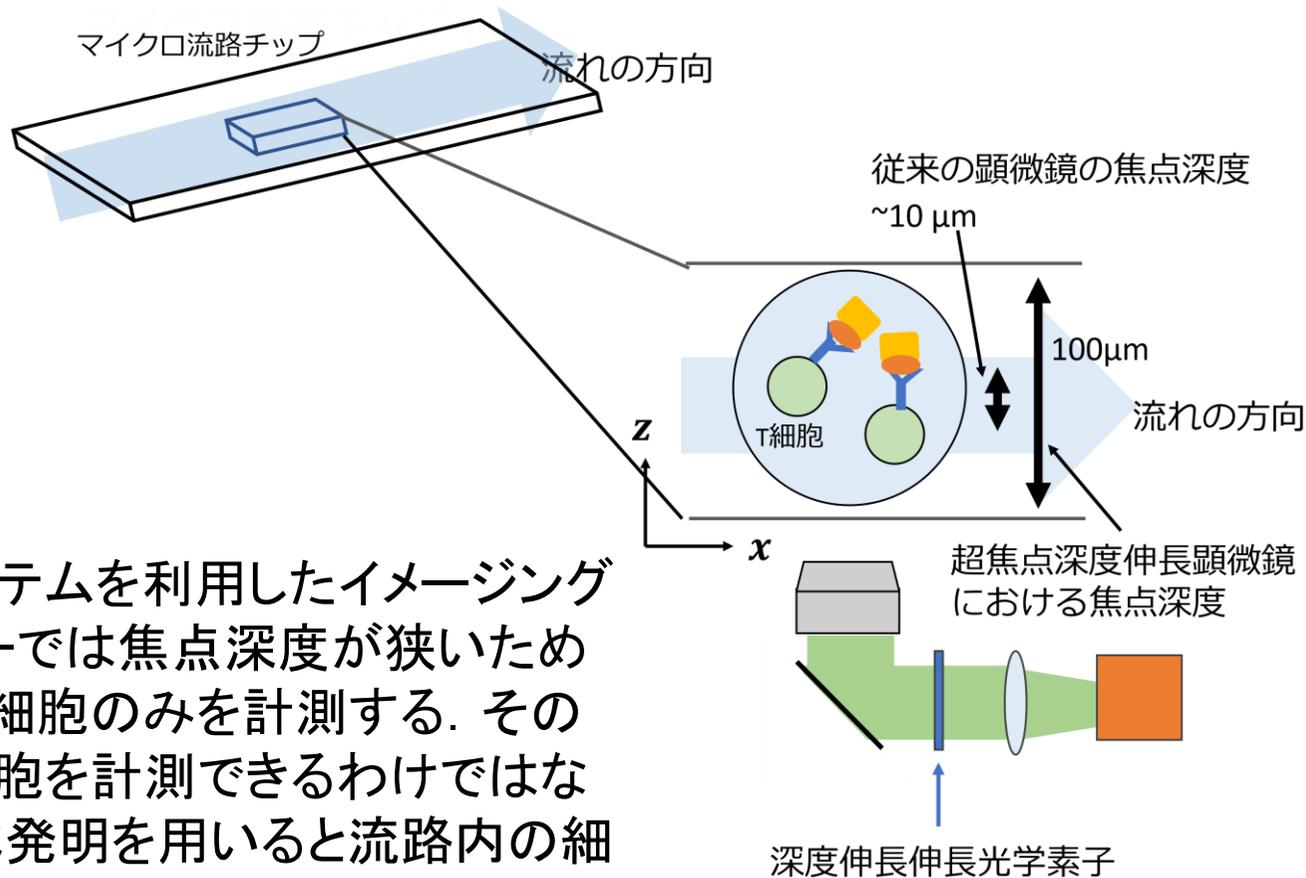
周縁部には収  
差が発生するこ  
とが課題



# 想定される用途

- 本技術は光学素子を既存の光学系に挿入するだけで利用でき、どのような顕微鏡にも応用可能である
- 特に、厚みのある試料を高速に撮影する、また、対物レンズの物理的な制約を除去する用途が考えられる。
- 具体的には、イメージングフローサイトメトリーやライトシート顕微鏡への応用を想定している。

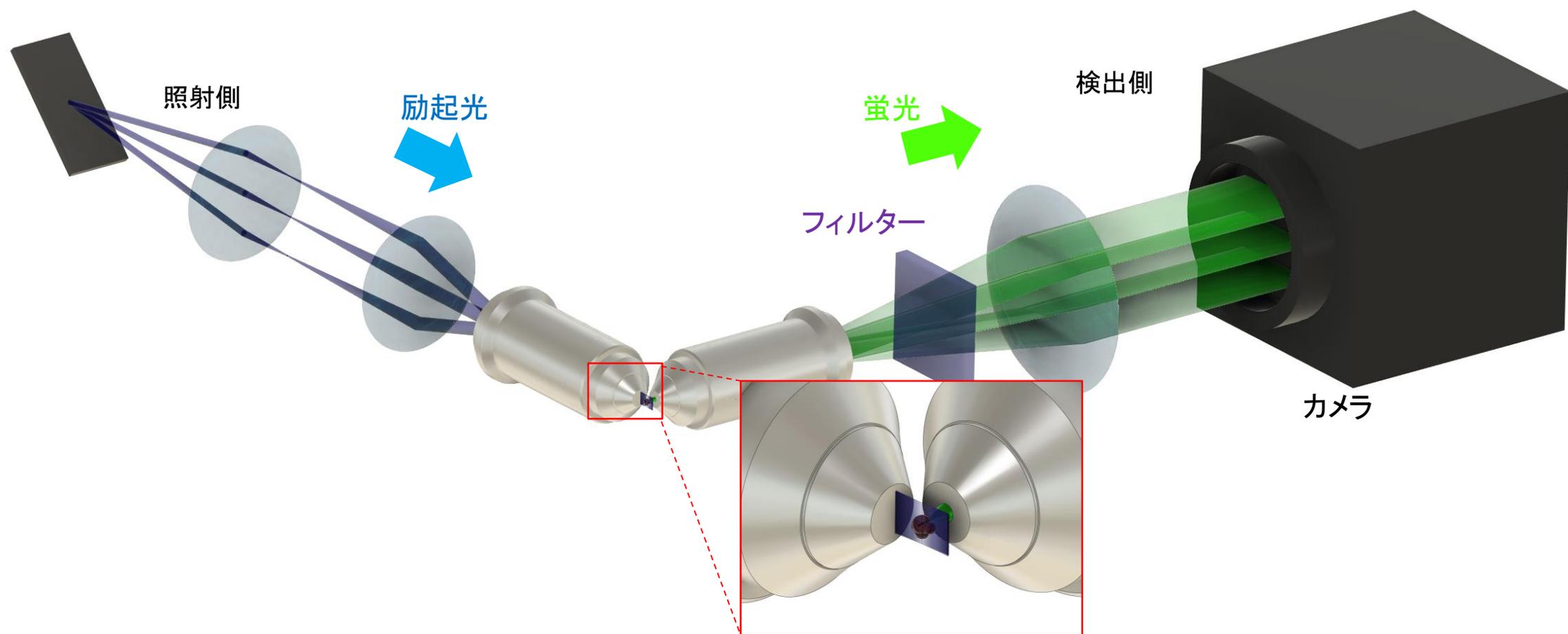
# 想定される用途： イメージングフローサイトメトリー



通常の顕微鏡システムを利用したイメージングフローサイトメトリーでは焦点深度が狭いため、焦点付近ききた細胞のみを計測する。そのためにすべての細胞を計測できるわけではなく非効率である。本発明を用いると流路内の細胞がどの高さに位置していても全ての細胞を計測することができ効率的な細胞計測装置へと発展する。

# 想定される用途：ライトシート顕微鏡

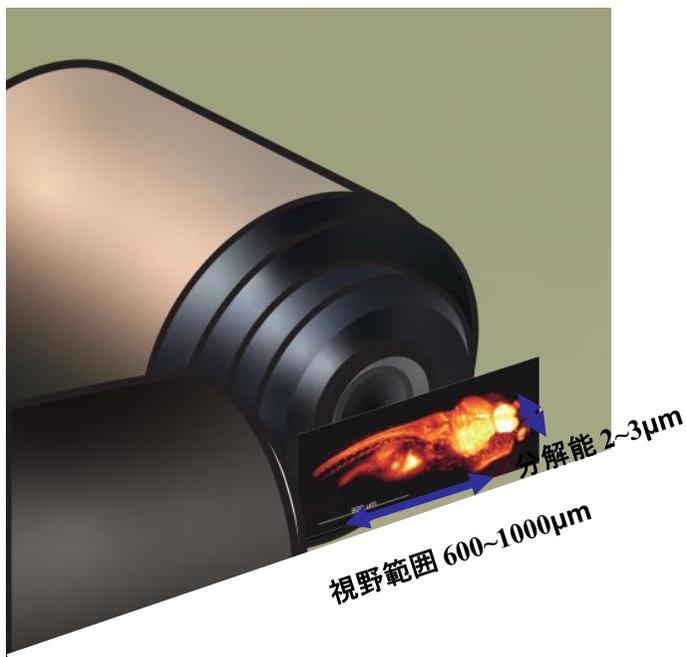
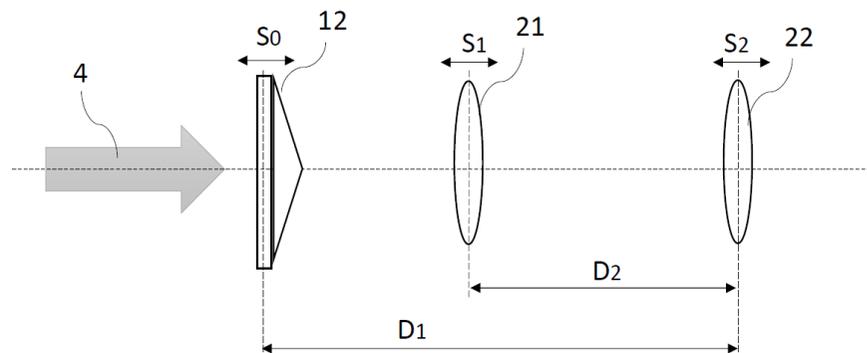
ライトシート顕微鏡はシート状にサンプルを励起し、シート面内からの蛍光像をカメラで取得する顕微鏡



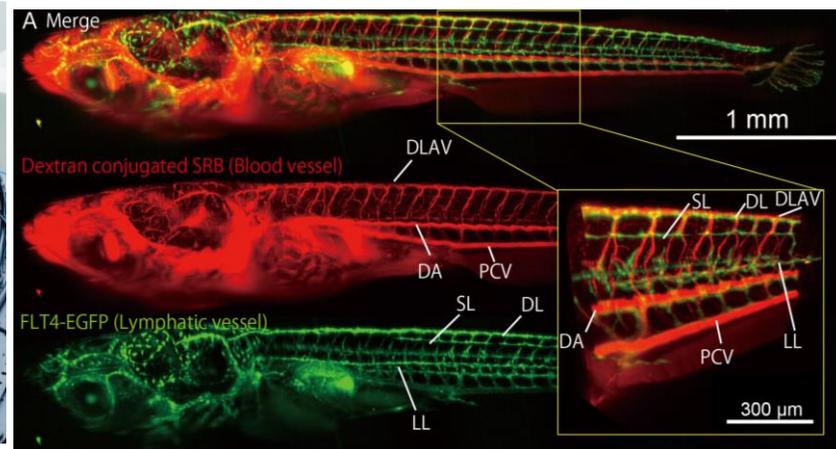
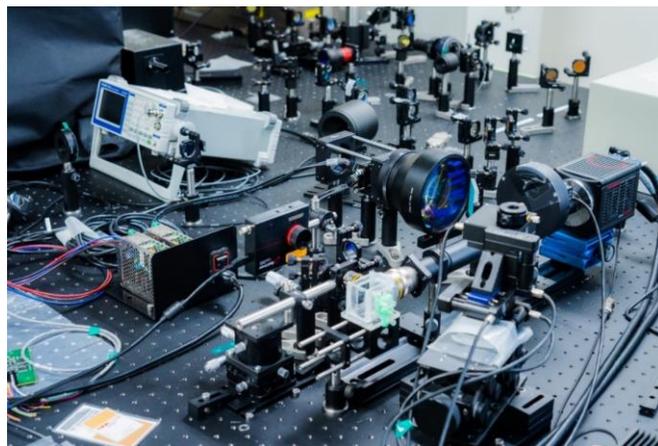
# 想定される用途：ライトシート顕微鏡

これまでに2光子励起ライトシート顕微鏡の開発を行ってきた

ライトシート顕微鏡用長距離伝搬ビーム形成レンズユニット及び長距離伝搬ビーム形成方法  
特許番号7497849



- ◆ ベッセルビームを導入した2光子励起ライトシート顕微鏡を構築
- ◆ 観察対象への低い光毒性, 広視野範囲(~1mm), 高空間分解能(2~3 µm)を達成
- ◆ メダカ全身を細胞レベルの分解能で長期間に渡って観察可能



# 想定される用途：ライトシート顕微鏡

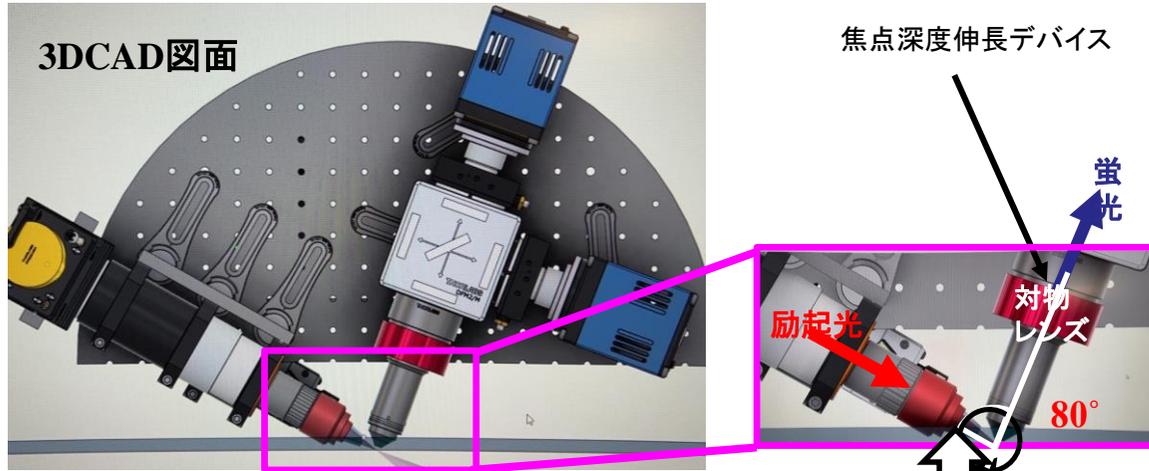
## Commercially Available Light Sheet Microscopy

	Zeiss Light Sheet 7	Zeiss Light Sheet 7	Miltenyi Biotec Ultramicroscopy	Bruker MuVi	Bruker QuVi	Bruker True Live 3D	Nikon Mizar
Type	Lateral	Inverted	Up-right	Lateral	Up-right	Inverted	Inverted
Detection Objective		Zeiss 40x			Nikon 40x NA0.8 WI	Nikon 25x NA1.1 WI Olympus 16x NA0.8 WI	

対物レンズの制約が強い

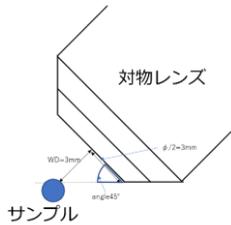
# 想定される用途：ライトシート顕微鏡

ライトシート顕微鏡は照射光学系と検出光学系が直角に配置されているために両者の物理的な制約が課題となる。本発明を用いると直角配置の制限を緩和し角度を付けた光学システムを構築することができ、ライトシート顕微鏡の柔軟性、汎用性の向上につながる。



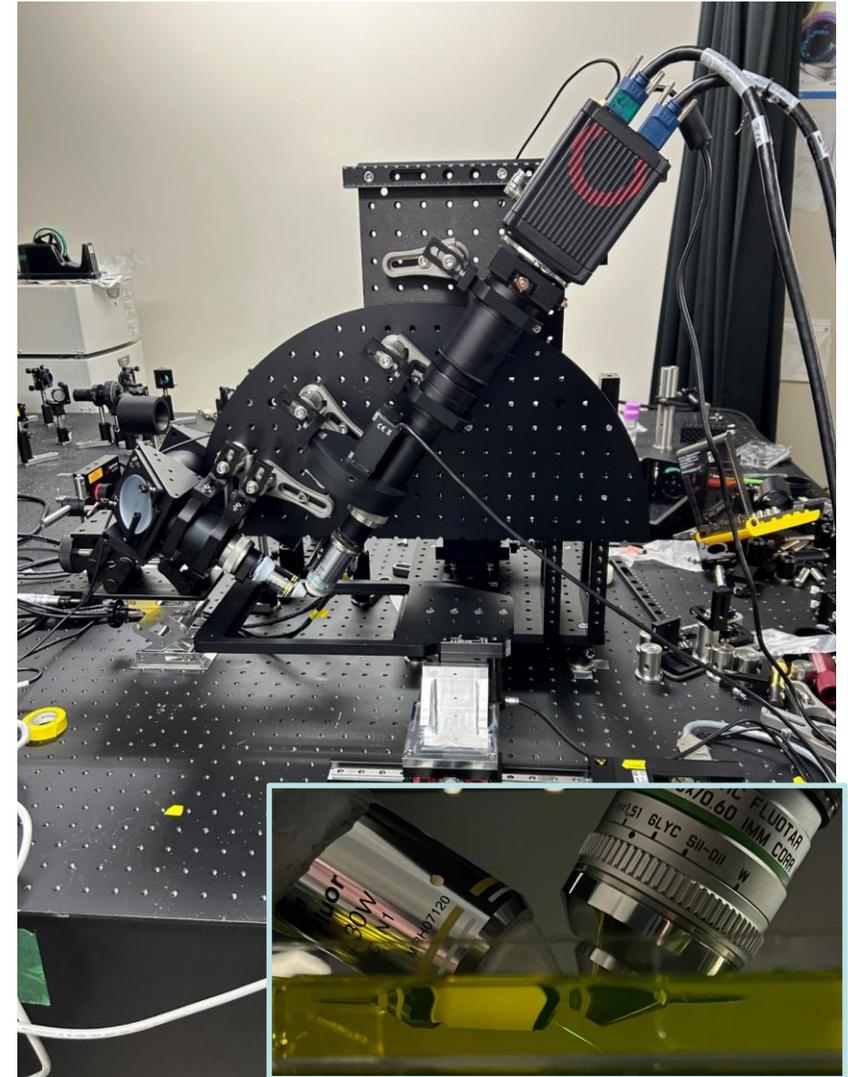
## 従来技術の問題点

レンズとサンプルの物理的干渉



レンズ角度を10-20°程度傾けることが可能となり、レンズとサンプル間の距離(>2mm)が確保でき、試料調整が容易となる

汎用性の向上、ハイコンテンツ解析の実現



# 想定される用途：ライトシート顕微鏡

Tilt角なし



Tilt角あり(~7°)



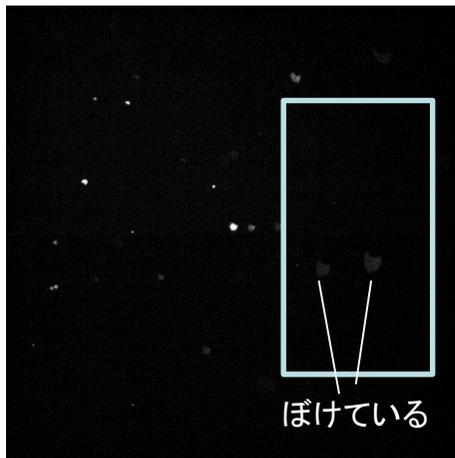
光学素子無し

光学素子有り

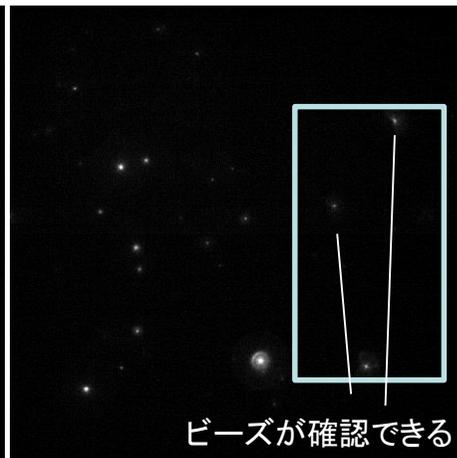


## 蛍光ビーズの計測

Tilt through

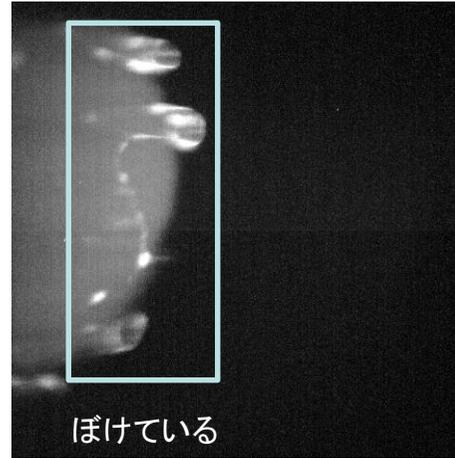


Tilt with device

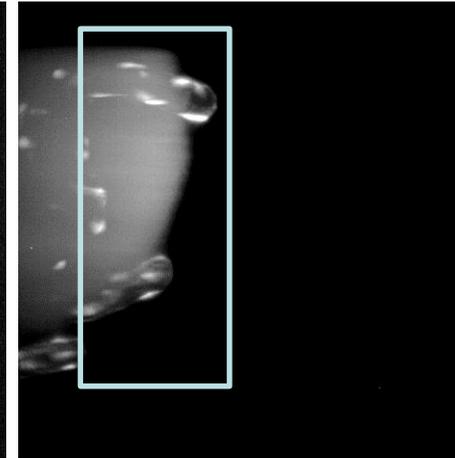


## メダカ胚の計測

Tilt through



Tilt with device



# 実用化に向けた課題

- 現在、焦点深度伸長光学素子について試作機まで開発済み。
- 今後、ライトシート顕微鏡、また、イメージングフローサイトメトリーについて実験データを取得し、応用性を検討する。
- 実用化に向けて、分解能の向上と収差補正をできる技術を確立する必要がある

# 企業への期待

- 具体的な用途と合わせてさらなる性能の向上  
また収差補正の方法を考えたい。
- イメージングフローサイトメトリーに関して  
マイクロ流路の技術を持つ企業との共同研究  
を希望する。
- マイクロ流路、蛍光顕微鏡によるバイオ系ハ  
イコンテンツ解析を開発中また展開を考えて  
いる企業には、本技術の導入が有効と思われ  
る。

## 企業への貢献、PRポイント

- 本技術は光学素子を既存の光学系に挿入するだけで利用できる汎用性の高い設計であり、既存の顕微鏡に装着するアドオン装置として販売できる。
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- ハイコンテンツバイオ解析の開発、また利用を考えている企業との共同研究がしたい

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 顕微鏡用レンズの設計方法  
およびその製造方法
- 出願番号 : 出願中
- 出願人 : 愛媛大学
- 発明者 : 齋藤卓、今村健志

# 産学連携の経歴

- 2023年- 顕微鏡メーカーと共同研究実施

# お問い合わせ先

愛媛大学

研究・産学連携推進機構コーディネーター／  
(株)テクノネットワーク四国（四国TLO）

亀井 未智

TEL 087-813-5672

e-mail [licence\\_info@s-tlo.co.jp](mailto:licence_info@s-tlo.co.jp)