

| | | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------|
| 氏 名 | LIYANAARACHCHI KANKANAMGE THANUJA SRIMAL | | |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（工学） | | |
| 学位記号番号 | 博理工甲第 986 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 27 年 3 月 24 日 | | |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 学位論文題目 | Development of functional optical coherence tomography (fOCT) for monitoring environmental effects on plants (植物への環境影響モニタリングのための機能的 OCT の開発) | | |
| 論文審査委員 | 委員長 | 教授 | 門野 博史 |
| | 委員 | 教授 | 川合 真紀 |
| | 委員 | 准教授 | 吉川 宣一 |
| | 委員 | 連携准教授 | 三輪 誠 |
| | 委員 | 東洋大学助教 | UMA MAHESWARI RAJAGOPALAN |

論文の内容の要旨

Processes such as cytoplasmic streaming, organelle movement, cell growth and division, and biochemical reactions are the functional activities occurring inside of plant leaf. These activities are changed under the influence of environmental effects. Since we wanted to monitor those functional changes, we proposed to utilize a biospeckle signal to achieve a functional optical coherence tomography (fOCT), and studied in this thesis. When a laser light illuminates leaf, the resultant speckle pattern shows dynamic nature due to moving elements within the sample. This dynamic speckle pattern is characteristic for leaf and its functional activities and has been called a biospeckle.

Optical coherence tomography (OCT) is an emerging optical modality, and performs high resolution, cross-sectional imaging of internal microstructure in biological tissues by using backscattered light. The OCT technique has generated numerous biological applications, most commonly in the fields of ophthalmology and dermatology. More recently, OCT has also been used in the area of botany to visualize the inner structure of botanical samples with conventional structural OCT imaging. However, its potential in monitoring functional changes, in other words, biological activities inside tissue was not well developed.

To examine the biospeckle fOCT, OCT cross-sectional images were acquired successively with a time period of 0.1 seconds. Two different approaches were employed to analyze biospeckle signals coming from different spatial positions of the cross-sectional image. In first approach, magnitude of biospeckle signal, in other words, standard deviation (SD) of the signal was calculated along time axis of each spatial position from the array of OCT cross-sectional images. Then a fOCT biospeckle image was constructed from the SDs of biospeckle signals. In our second approach, temporal characteristics of the biospeckle signals were analyzed by acquiring biospeckle signals of different depth positions at fixed lateral positions. Autocorrelation functions of fOCT biospeckle signals coming from different depth positions on the plant leaf were calculated and correlation lengths (CLs) were calculated to quantify the characteristics. SD and CL of the time varying biospeckle signal were proposed as measures to evaluate the change in

biological activity against ozone (O₃) stress on plants.

The majority of methods for investigating O₃ stress on plants are invasive. They caused to damage the tissue under study, thus, limit their application for *in-vivo* monitoring. In addition, the analysis cannot be performed in real time. There is a need of fast and reliable technique to assess the effect of O₃ stress on plants. We proposed and developed fOCT biospeckle imaging and signal analysis method to monitor the effect of O₃ on plants well.

Chapter 1:

Introduction to this thesis including the main objectives and the outline of the thesis is provided. The importance of developing a functional optical coherence tomography (fOCT) for environmental stress on plants, evaluation of existing techniques to monitor the effects of O₃ on plants, their limitations, and the need of developing more non-destructive, real time, and reliable techniques, application of developed fOCT to monitor O₃ stress on plants are discussed.

Chapter 2:

Basic concepts of optical interferometry such as light interference and low coherence interference are briefly described. The main purpose of this chapter is to explain the mathematical treatments of OCT and the way of acquiring OCT images.

Chapter 3:

To overcome limitations in conventional methods, we proposed fOCT biospeckle imaging and signal analysis method to monitor the effect of O₃ on plants. In the experiments, *Allium tuberosum*, commonly known as Chinese chives was exposed to 0, 80, 120, and 240ppb O₃ concentrations, and the effects to both back and front side of the leaf were observed to evaluate the developed fOCT biospeckle imaging and signal analysis for functional changes inside the leaf. Here, first approach was employed to analyze biospeckle signals. In addition, the experiments were conducted with Chinese chives under 240ppb of O₃ exposure, and biospeckle signals from different depth positions were analyzed with our second approach. Increment of fluctuation in epidermal layer with O₃ exposure was seen with first approach, while the change in biospeckle signal coming from mesophyll cell layer could be seen with second approach of analysis. In addition, cell structure became more clear in the fOCT biospeckle image.

Chapter 4:

We applied fOCT biospeckle imaging and signal analysis method to monitor the effect of water stress on plants. In the experiments, Japanese Koshihikari rice cultivar, was used. Two kind of experimental series were conducted. In the first series, one Japanese rice cultivar, namely Koshihikari plants were kept without watering for 6 days.

OCT imaging data were acquired with, and without water for 1, 2, 3, 4, 5, and 6 days at the same area of same leaf of a plant. Six experiments were conducted for data analyzing purposes. In the second series, another set of Koshihikari plants were kept without watering for 6 days. After 6 days, plants were watered while OCT imaging data were acquired before and after 1, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 minutes of adding water. However we could not see significant results in above two experimental series. Gas exchange meter readings showed that some changes can be seen after 7 hours. So, our future experiments will be planed to conduct long hours after adding water.

We proposed, developed and applied fOCT biospeckle imaging and signal analysis technique for investigating the immediate impact of environmental stresses, specially O₃ stress, in very short span of time such as a number of seconds or a few minutes quantitatively and qualitatively, which is not possible with conventional experimental methods and even with conventional OCT imaging.

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、当該論文の発表会を平成27年2月23日に公開で開催し、約45分の発表の後、本論文に関する詳細な質疑を行い、論文内容を審査した。以下に、論文内容を示すとともに、学位論文審査の結果を要約する。

当学位論文では、植物への環境影響モニタリングのための光学的断層画像法の開発・研究を行った。特に機能構造を可視化するためバイオスペckルと呼ばれる信号に着目し機能的断層画像法（以下 fOCT と呼ぶ）を研究した。

第1章では、序論として研究の背景と目的について記述している。研究手法の核となる光断層画像法(OCT法)に関して他の断層画像法との比較を行い本手法の位置づけが述べられている。次に、本研究で新規に注目するバイオスペckルについて、生体組織内の散乱体の運動を反映したスペckルの生成過程を基にその特徴が述べられている。すなわちバイオスペckル信号を解析することにより生体の活性状態に関する情報が得られることを指摘している。続いて、後の章で取り上げられている、大気汚染物質の植物へのモニタリングに関して、オゾンについて取り上げ、その近年の傾向と植物への影響について論述しており、本研究の意義を明確にしている。

第2章では、本研究において中心となる光技術である光断層画像法（OCT法）について原理と得られる信号の理論解析が記述されている。OCT法は干渉法の一つである。初めにいくつかの基本的な干渉光学系を取り上げその原理を要約している。次に、OCT法の特徴である、低コヒーレンス光源を用いたいくつかの基本的なOCT法について議論している。最も最初に実用化されたTime Domain OCT法について概説し、その問題点を指摘している。続いて、この問題点を解決するために提案されたSpectral Domain OCT法について詳細に議論している。Time Domain OCT法とその特性を比較することにより本研究に使用するSpectral Domain OCT法の有効性を、得られる信号を理論解析することにより示している。結果としてSpectral Domain OCT法ではTime Domain OCT法において必要となる参照ミラーの機械的な掃引が必要とされないため、断層画像の取得において高速性が保たれる点および高いS/N比を実現することができるためより深部まで観察可能であることを示している。この点は特に、吸収・散乱係数の大きな植物の観測において重要である。

さらに、本章では、期待される深さ方向および横方向の光学系の分解能について理論により評価している。用いた低コヒーレンス光源の特性の結果提案した実験システムの深さ分解能および横分解能はそれぞれ6mmと22mmとなる。

第3章では、本研究を通して使用するOCTシステムを光ファイバーを用いることにより構築した。光源として中心波長836.1nmの高輝度発光ダイオード(SLD)を用いている。波長幅は55.2nmであり反射光に対して深さ分解能の設計値である約6mmを達成している。信号の取り込みおよび解析にはLabViewを用いて操作性のよいシステムを構成し、1024 x 2500pixelの断層画像を10frames/secのスピード取り込むことを可能とした。また、高い時間分解能が要求される測定においては、ガルバノミラーを固定することにより1固定点において25,000lines/secの深さプロファイルが得られる性能を実現している。

本章では、植物に対する環境条件として、近年その影響が顕在化している大気汚染物質の一つである光化

学オキシダントの主成分であるオゾン (O₃) に焦点を絞って研究をおこなっている。植物試料として作物植物であるニラを用いて、埼玉県において実際に起こりうる濃度である 240ppb までの種々の O₃ 濃度で3時間の短時間暴露実験をおこない、植物内部状態の変化を計測した。

信号解析においては、従来法である散乱・反射光強度に基づいて得られた断層画像と新たな提案手法である植物体からのバイオスペックル信号に基づく断層画像法を比較した。

本研究ではバイオスペックル信号の解析法として2つの手法を提案している。第1の手法は、バイオスペックル信号の揺らぎの大きさに着目した量である。すなわち、反射光強度の揺らぎの大きさを標準偏差 (SD) を用いて断層画像の各点において求め画像化する方法である。これは試料内の運動体の運動量を反映する量である。これをバイオスペックル SD 画像と呼ぶ。第2は反射光強度揺らぎの自己相関関数の相関時間に基づく方法であり揺らぎの変動速度を評価する量である。

実験の結果、バイオスペックル SD 断層画像では表皮組織下の柵状組織においてオゾン暴露とともにその柵状の組織構造が崩れて不鮮明になる様子がモニタされた。このような内部変化は従来の断層画像法では観測されなかった。さらに、表皮組織においてバイオスペックル SD 値が O₃ 暴露前後において 44% 程度増加していることを見出した。これは従来法における信号変化に対して 10 倍を超える信号の変化である。詳細な実験の結果この表皮組織での O₃ 暴露に対するバイオスペックル SD 値の増加は O₃ 濃度が高いほど大きく、葉の表面よりも裏面で顕著であることがわかった。以上のことからバイオスペックルに基づく断層画像法ではオゾン暴露の影響をより高感度に可視化できることが示された。

一方、相関時間に基づいた信号解析では、表皮組織では相関時間が長くなり柵状組織では減少した。すなわち、O₃ 暴露により表皮組織では組織内の散乱体の運動が緩慢となり、柵状組織では運動が活発化していることがわかった。これは細胞内の水分喪失による粘性の変化や、活性酸素に対する体内の防御機構の活性化などを反映しているものと推測された。

第4章では、本機能的バイオスペックル断層画像法を用いて植物の水ストレスのモニタを試みた。これはバイオスペックル現象が細胞内の散乱体の移動や運動を反映しているため、水の喪失により散乱体の輸送が影響を受けるのではないかと推測したからである。イネに2週間程度水を与えず水ストレスを加えた状態から水を与え3時間計測をおこなった。結果としてバイオスペックル信号には有意な変化が観測できなかった。これに対して、光合成速度・蒸散速度測定器を用いた測定では光合成速度、気孔コンダクタンス、葉内 CO₂ 濃度ともに約5時間は一定であり、その後大きな変化が現れることが示された。したがって、本提案手法による水ストレスに対する計測結果は必ずしも光合成速度・蒸散速度測定器による結果と矛盾するものではなく、今後の課題として、より長時間の測定をおこなう必要があることが示唆された。

以上、本研究では植物に関して新たに提案した光断層画像法を適用して大気汚染物質など環境条件が植物に与える影響のモニタリング手法を提案し研究した。本研究では信号解析法として新しくバイオスペックルと呼ばれる信号の解析法を提案し断層画像化を試みた。結果として、極短時間の大気汚染物質の暴露に対する植物内部の反応を高感度に検出することができた。提案手法は眼科などで用いられている単に解剖学的な断層画像化ではなく内部の活動状態を反映した画像化が可能であることを示した。すなわちバイオスペックルに基づく機能的断層画像法の有効性が実験により実証された。

これらの成果は3編 (1編掲載許可、1編投稿中) にまとめられている。また国際会議では基調講演として

招待されており、学術的に高い成果を上げているものと認められる。従って、本論文は博士（工学）の学位を授与するにふさわしい内容を備えていると判断し、当学位論文審査委員会は合格と判定した。