

イントロダクション

生検による病理学的診断がスタンダードであるが、物理的な生検による侵襲的サンプリングは、感染・血腫・出血・外傷のリスクを含む。また、採取された組織は、生きたありのままの生命活動が失われてしまう。早期の決定的な診断を行うためには、非侵襲でありながらも *in vivo* を維持した技術が必要とされる。 [1,2,3]

近年、第二高調波発生(SHG)や第三高調波発生(THG)を含む光高調波顕微鏡を用いた生物医学的イメージングは新たな可能性を提供している。しかしながら、現状の光高調波顕微鏡を臨床応用で利用するためには、レーザー光源が大型・複雑である上に、自由空間光学系を用いた顕微鏡を利用しているため、装置が大がかりとなり、その利用が実験室レベルに制限されていた。臨床医療の場での応用を考えた場合、医者や患者への負担軽減から、小型・簡便・ロバスト・フレキシブルな特徴が SHG 顕微鏡に望まれる。そのためには、レーザー光源の小型化と共に、顕微鏡部分も光ファイバー光学系と微小走査光学系を組み合わせたファイバースコープ化の必要がある。もし、ファイバー内視鏡のような構成の SHG 顕微鏡が実現できれば、その実用性は大きく向上し、現代の医療技術をもってしても依然として死亡率の高い病気や回避困難な健康状態の異常が存在するが、それらを解決するために早期診断や時系列モニタリングによるメカニズムの解明が期待できる。

本論文紹介では、SHG および THG 技術を用いた内視鏡などのバイオイメージング技術について述べる。

1. Miniaturized video-rate epi-third-harmonic-generation fiber-microscope[1]

1.1 イントロダクション

SHG および THG の高調波を用いた生物医学イメージングが新たな可能性を提供する。これは、光学非線形性の特性によりピンホールを用いずともオプティカルセクショニング能力(3次元分解能)を提供する。また、高調波発生(HG)は、比較的小さいエネルギーで計測を行えるため、被験者へのエネルギー付与をほとんど全く与えない真の非侵襲的モダリティと考えることができる。epi-THG 顕微鏡検査は、サイズ、形状、および基底細胞の分布を含む情報、を 300 μm の高い浸透性、サブ μm の空間分解能で詳細に組織形態学的 *in vivo* 画像を提供しながらも、いくらかのフォトダメージは報告されなかった。加えて、毛細血管内の赤血球の移動も染色を必要とせず明確に観察することができる[4]。

多くの研究グループは、小型のレーザー走査プローブの開発に焦点を当てている。もし、生体の動的な生物学的活性を小型プローブで追跡することができれば生体内の悪性腫瘍などの早期診断が可能となる。

本研究では、悪性腫瘍の早期確定診断を行うことを目的とした、非侵襲な *in vivo* 顕微鏡を開発するために、MEMS ミラーを用いた小型プローブ顕微鏡をサブ μm 分解能かつ高フレームレートで実証している。

1.2 システム

1.2.1 MEMS ミラー

MEMS ミラーは 2D-scanning MEMS mirror (PE100011, OPUS Microsystems corp., Taiwan)で共振周波数はそれぞれ高速軸で 16.41kHz,低速軸では 1.71kHz である。70V の矩形波を入力した場合、ビームは正弦的に走査され、ミラーの高速軸は x 方向に 19 度、低速軸は y 方向に 15 度傾く。焦点面上の走査領域は 512 \times 512 ピクセルの画像に再建された。検出されたアナログ 電圧信号は、データ収集カード (PCI-5105, NI) によってサンプリングされた 外部サンプリングクロックは 36.111 MHz. すべての電子信号は、FPGA ボードで生成された基準クロックで同期化された(108.333MHzの周波数). FPGA ボードは、4 つの生成された制御信号(MEMS ミラーの両軸、フレーム・トリガのための駆動信号、およびサンプリングクロック)を同期するために用いられた。駆動信号を増幅してから共鳴周波数で MEMS ミラーを駆動した。正弦波の性質を考え、スキャンは画像のエッジの周りのピクセルは、中央部のピクセルよりもはるかに多くの時間を通過させた。サンプリングクロックは十分に高く、31Hz と高いフレームレートを実現した。Fig1.1 は各ピクセルにおけるレーザースポットの通過数を表している。端部では通過回数が非常に多く、中央に進むにつれて回数は減少しているが、中心部でも数回の通過が見られ、全ピクセルを埋めることが出来ていることがわかる。

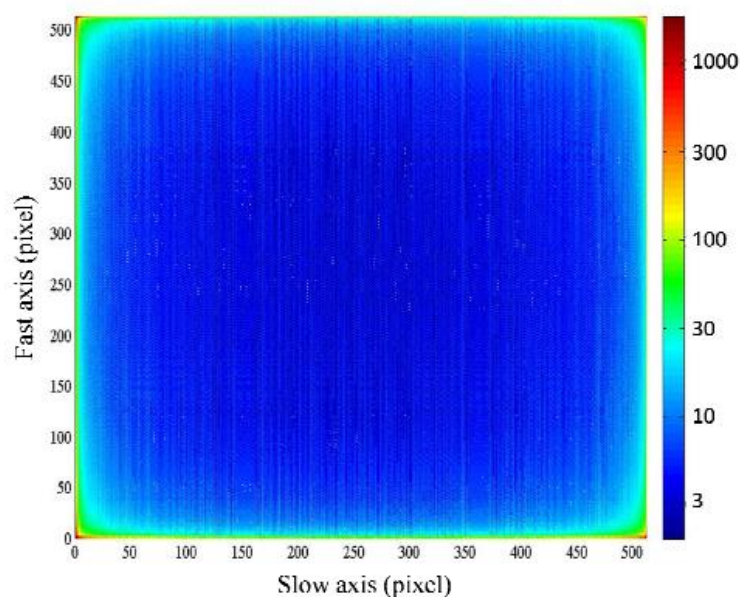


Fig1.1 The counts of sampling points per pixel in a frame trigger period

1.2.2 リレーレンズ

微細構造のイメージングのために

は空間分解能を犠牲にすることなく、システムを小型化することが必要であり、そのためには高 NA による収差低減、サブ μm の空間分解能を達成するため、市販の GRIN ロッドの代わりに、小型化された球状のリレーレンズを自作した。1 枚目のレンズは SF11 を用いて入射側曲率半径を 9.98mm、焦点距離 5mm で作成し、2 枚目のレンズは BK7 で入射側曲率半径 80.03mm、焦点距離 65mm と設定した。これらを用いたスキヤニングシステム的设计結果を Fig1.2 に示す。最大波面差は $\lambda/4$ よりも小さく、入射方向による解像度の影響は小さいことがわかる。

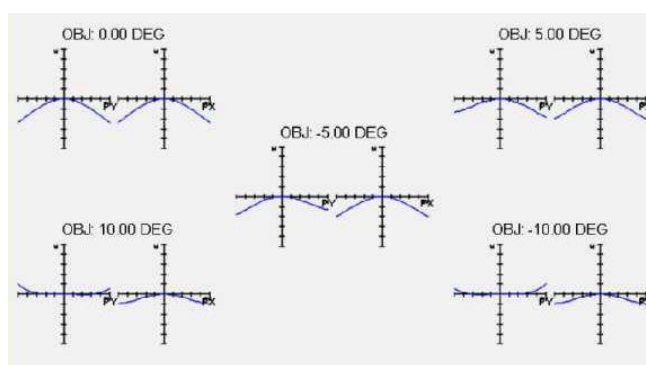


Fig1.2 The optical path differences of the designed result.

1.2.3 光源

一般に使用される Ti:S レーザーの代わりに自家製の Cr:F レーザーを光源として用いた。85MHz の繰返し周波数を有する。Cr:F レーザーの中心波長は Ti:S レーザーの中心波長に比べ、石英ファイバーのゼロ分散に近いので、余分な分散補償なしでファイバーベースの非線形光学顕微鏡を構築することができた。光源後は LMA-PCF (Large Mode Area-Photonic Crystal Fiber) を用いた。PCF 特有のシングルモード伝搬が可能で、曲げ損失・カップリング損失が小さいという特徴に加え、大面積モードエリアにより材料損失や不要な非線形効果を発生させることなく高いパワーでの伝搬を可能としている。

1.3 セットアップ

セットアップを fig1.2 に示す。ファイバーベースの光源と MEMS ミラーにより小型化されたプローブからなる。MEMS ミラー後には波長 1250nm 周辺にコーティングされたリレーレンズ対、ダイクロイックミラーを共役に配置した。レーザービームを走査し、対物レンズ 1.2NA x60 の対物レンズにより試料上に集光される。発生した高調波光は同じ対物レンズを通り MMF により検出部に導かれ、410nm と 615nm のフィルターにより THG 光と SHG 光に分けられる。モジュール全体の外径は 3 センチメートル内になるように設計され

た. このシステムは, 手持ちで *in vivo* ヒト皮膚の観察を行うに十分にコンパクトであった.

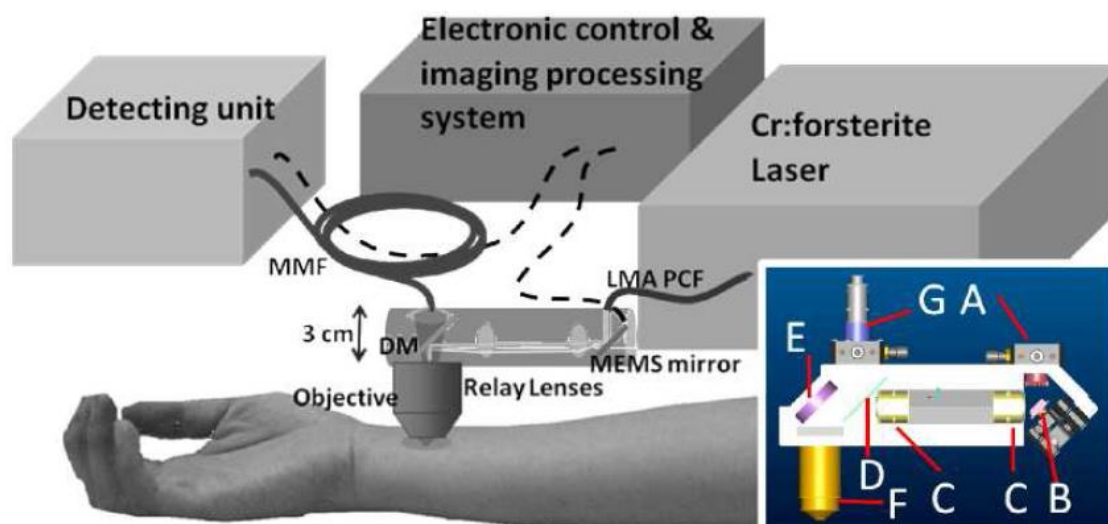


Fig1.3 Setup

1.4 結果

小型化された顕微鏡を人間の皮膚に適用するための生検内試験のため, ヒト皮膚の *in vivo* 計測を行った. アジア女性の腹側前腕の皮膚を計測した. 表皮から真皮にかけて異なる層の epi-THG(黄)および epi-SHG(緑)水平切片イメージを fig1.3 に示す. (a)は角質層, (b)は有棘層の形態, 基底層の(c)上層および(d)深層, (e)および(f)は真皮乳頭層におけるコラーゲン分布を示す. 画像サイズは 512 ピクセル×512 ピクセル, 100 μ m×70 μ m であり, 積分時間は 0.33 秒(b)のみ 2 秒である. 表皮では, epi-THG の鮮明な細胞質イメージにより内部の異なる層の細胞形態を識別することができた. 真皮では, epi-SHG により明確な膠原線維を観測することができた. SHG イメージはサブミクロンの分解能を示し, 200 μ m の浸透能力が達成された.

さらに, 酸化ヘモグロビン移動の共振動作向上のため, 真皮内部の血流を可視化し, 毛細血管中の赤血球の epi-THG イメージの動画を取得した. この動画は 31 フレーム/秒のレートで得た(Fig1.5). 血流中の単一の赤血球を 300 μ m/s までの速度での可視化にも成功している.

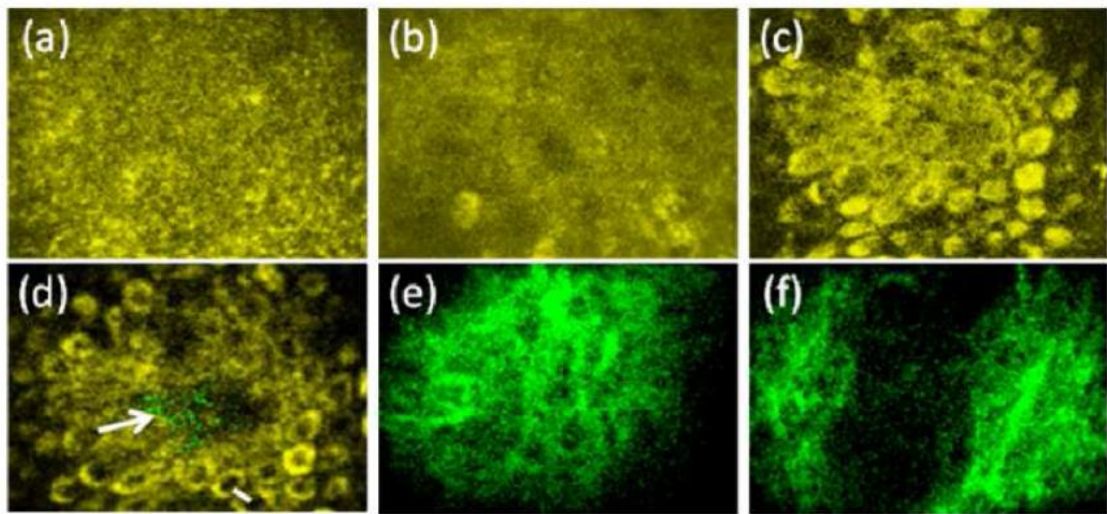


Fig1.4 In vivo horizontal-sectioned epi-THG and epi-SHG images of Asian forearm skin in different layers

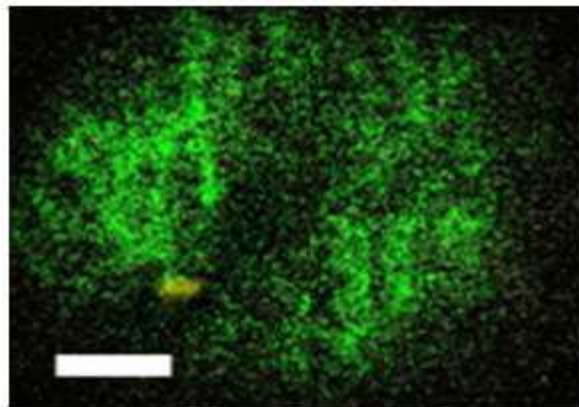


Fig1.5 The five times slower movie showing the in vivo blood flow with a speed of ~ 300 $\mu\text{m/s}$. Yellow: THG; Green: SHG. Image size: $100\mu\text{m} \times 70\mu\text{m}$. Scale bar: $20 \mu\text{m}$. Actual size of the recorded movie: 512×512 pixels.

1.5 まとめ

小型化された epi-THG ファイバー顕微鏡で高いサブミクロンの分解能とビデオレートを初めて実証した。1秒あたりサブ mm の速度で血流を正常に観察した。この結果は、高速 MEMS ベースのシステムに適用することができることを示唆している。生体内での動的な生物学的活性を観察することができる。サブ μm の解像度およびビデオレート撮像が同時に実現された。これは、生体内の動的な生物学的活性をリアルタイムに可視化できることを示している。

2. A 0.4-mm-diameter probe for nonlinear optical imaging [2]

2.1 イントロダクション

近赤外光を用いた多光子励起蛍光顕微鏡は、組織深下部の表面の細胞構造を識別することができる。しかし、臨床応用や動物研究を考えると、その有用性は、実験室における柔軟性のない自由空間光学系であるため、応用が制限されている。これらの問題は光ファイバーを用いることにより解消された。低信号により、近赤外光および可視蛍光シグナルを効率よく伝搬できないシングルモードファイバーの問題はダブルクラッドファイバーにより解消され、さらにシグナルを増加させるために大きなコアをもつ DCPCF(double-clad photonic crystal fiber)が適用された[5]。

本論文ではフレキシブルな 2 光子励起蛍光イメージングのため、0.4mm の直径を有する小型プローブを開発した。小型プローブは空孔の溶融および融着器から発せられる電気アークを用いて DCPCF の先端にレンズを形成することにより作成した。このプローブは $10\mu\text{m}$ の直径を明確な 2 光子励起蛍光画像を提供している。

2.2 セットアップ

セットアップを fig.2.1 に示す。励起光の中心波長は 800nm でバンド幅の半値幅は 12nm である。超短パルス維持のために回折格子対で分散補償を行っている。図中の左下に DCPCF の構造を示す。中心に半径 $16\mu\text{m}$ のコアが六角形の並んだ気孔で囲まれている。その六角形を取り囲むように円に並んだ気孔があり、その中が半径 $160\mu\text{m}$ までの DCPCF の内側クラッドであり、円に並んだ気孔の外が外側クラッドで $350\mu\text{m}$ の直径を有する。

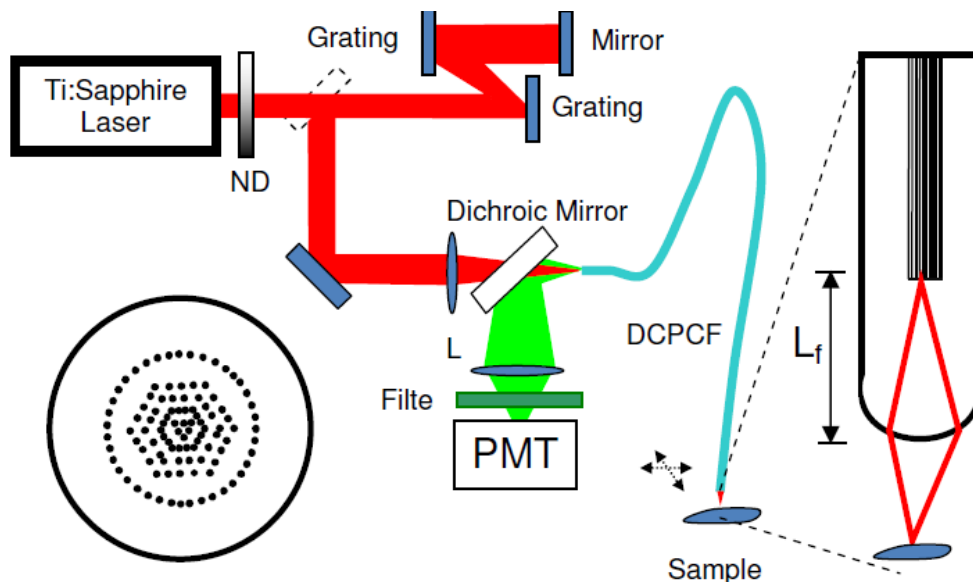


Fig 2.1 Schematic setup using a 0.4-mm-diameter optical fiber probe

DCPCF先端の構造を図の右側に拡大する。このDCPCF先端(Fig2.2)は、従来用いられる融着器の電気アーク放電を利用して、半球状に形成される[6]。電気アーク放電がDCPCFの先端を溶かし、徐々に半球状に形作られる。焦点スポットのFWHM, DCPCF先端レンズの焦点距離および開口数は L_f とDCPCF先端の形状(曲率半径)により決定される(Fig2.3)。

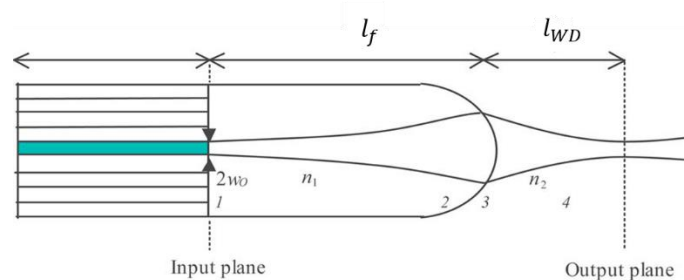


Fig2.2 Implementation (top) and schematic diagram (bottom) of the lensed PCF.

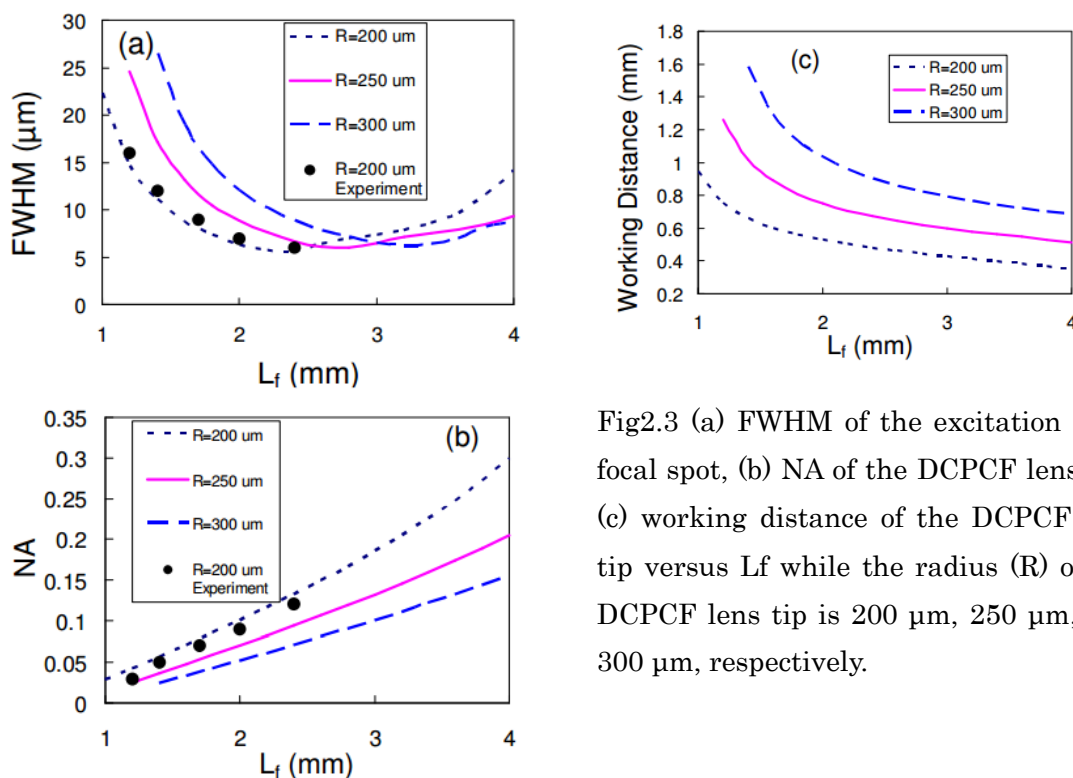


Fig2.3 (a) FWHM of the excitation laser focal spot, (b) NA of the DCPCF lens and (c) working distance of the DCPCF lens tip versus L_f while the radius (R) of the DCPCF lens tip is $200 \mu\text{m}$, $250 \mu\text{m}$, and $300 \mu\text{m}$, respectively.

2.3 結果

10 μm の蛍光マイクロスフェアの集合体を用いて、2光子励起蛍光イメージングを行った。マイクロキャナでサンプルを走査することによりイメージを得た(fig2.2)。入力電圧が34mWで、光ファイバプローブからの出力は10mWである。DCPCF 自体のカップリング効率は82%であるが、カップリング比はDCPCF プローブの入力電力に対する出力電力の比として29%であった。DCPCF のNAはコアと内側クラッドでそれぞれ0.04と0.62である。

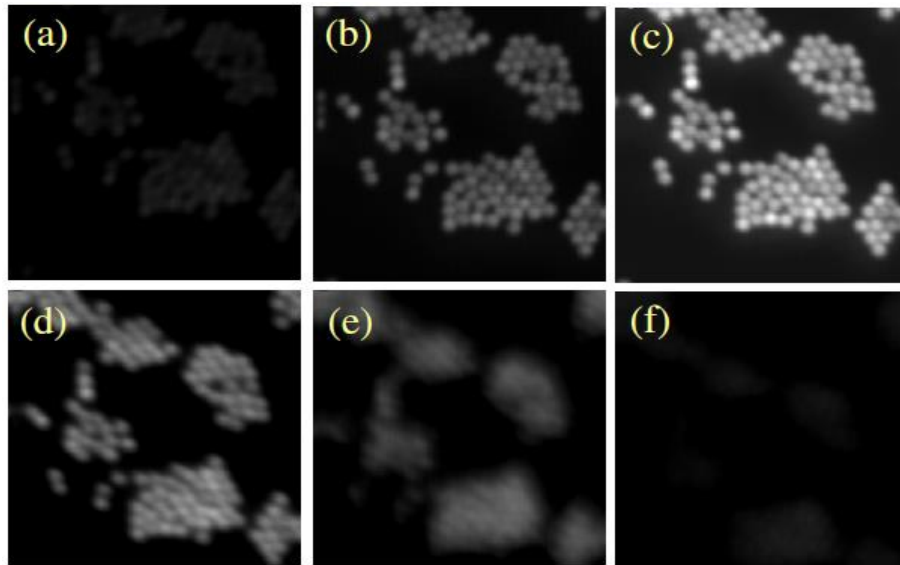


Fig2.4 A set of two-photon-excited fluorescence images of 10- μm -diameter fluorescent microspheres. Size of the images: 200 μm \times 200 μm . (a) D = 530 μm (b) D = 490 μm (c) D = 450 μm (d) D = 410 μm (e) D = 370 μm (f) D = 330 μm

2.4 まとめ

直径0.4mmの小型光ファイバプローブが実証された。2光子蛍光の励起および収集のために余分なカップリングが必要とされないように、DCPFCの端部に直接、NAが1.2におよぶマイクロレンズを形成した。このシステムにより、10 μm の蛍光マイクロスフェアの明瞭な2光子励起蛍光イメージングを取得した。このような軽くて硬いプローブは、未来の*in vivo*非線形光学内視鏡のためのアドバンテージになることが期待できる。

3. A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy [3]

3.1 イントロダクション

米国では、すべての出生の 12.7%を早産 (PTB) が占めており、乳児死亡原因の第 2 位である。多くの研究がなされているにもかかわらず、症例の 50%において PTB の原因は不明のままであり、PTB の危険性のある女性を検出するための診断方法もまた限定されている。妊娠中の子宮頸部の適切な改変は、出生過程の必須成分である。この変化は、特定の繊維状コラーゲンにおける子宮頸部の結合組織の大規模な再編成を必要とする。先行研究では、従来のベンチトップ SHG 顕微鏡を用いた正常および PTB マウスの子宮頸部の *ex vivo* 観察が為されており、妊娠期間におけるコラーゲン動態の実質的な変化を明らかにした[7]。また、SHG 顕微鏡による観察は、肉眼による診察や触診による変化よりも早い段階で、妊娠期間の変化過程を可視化することを可能にした。

本研究では、内視鏡のための小型ファイバー-SHG 顕微鏡を構築した。正常な妊娠の異なる段階でのマウス子宮頸部組織切片の内視鏡 SHG 画像は、ベンチトップ SHG 顕微鏡と同様の解像度を有し、子宮頸部コラーゲン形態の漸進的な、定量化可能な変化を明らかにする。無傷の上皮を介して *ex vivo* でのマウスおよびヒト子宮頸部組織の SHG の内視鏡撮像も行われている。この結果は、正常な妊娠のステージング用の SHG 内視技術の実現可能性を実証し、早産に関連する異常な子宮頸部リモデリングの臨床評価のための低侵襲ツールとしての応用の可能性を示唆している。

3.2 セットアップ

開発したコンパクト SHG レーザー内視鏡を Fig 3.1 に示す。本質的に、3つの主要部[(1)四象限 PZT, (2)カンチレバー (3)小型対物レンズ]から構成される。四象限 PZT をカンチレバーアクチュエーターのために用いた。片端が PZT チューブの端部に貫通し、融着されることでカンチレバーとして機能し、高速 2 次元ビーム走査を実行する。PZT アクチュエーターの外表面上の電極の二つの直交対が振幅変調された正弦波と余弦波で駆動したときに開閉し、螺旋状のパターンで走査され、各タイミングでのカンチレバーのたわみの程度から位置情報を検出し、それらを並び替えることによりイメージングが可能となる。また、小型対物レンズは励起ビームをサンプルに集光し、プローブの遠位端で SHG 信号を収集する。

ファイバーには、フェムト秒の励起光送達およびから SHG 信号の収集の両方に同一のダブルクラッドファイバ (DCF) が、使用された。DCF は、励起フェムト秒パルスを伝搬し、SHG 信号を収集するために、直径 185 μm , NA=0.3 の大きい内側クラッドと直径 5.5 μm , NA=0.12 のシングルモードコアを有する。高 NA 化の大きな内側クラッド径をもつカスタマイズされた DCF は、市販の DCF に比べて 4.5 倍程度、SHG 光収集効率を向上させた。他の小型の部品と一緒に単独の DCF を使用することで、全体的なプローブサイズを減らすことにも成功した。

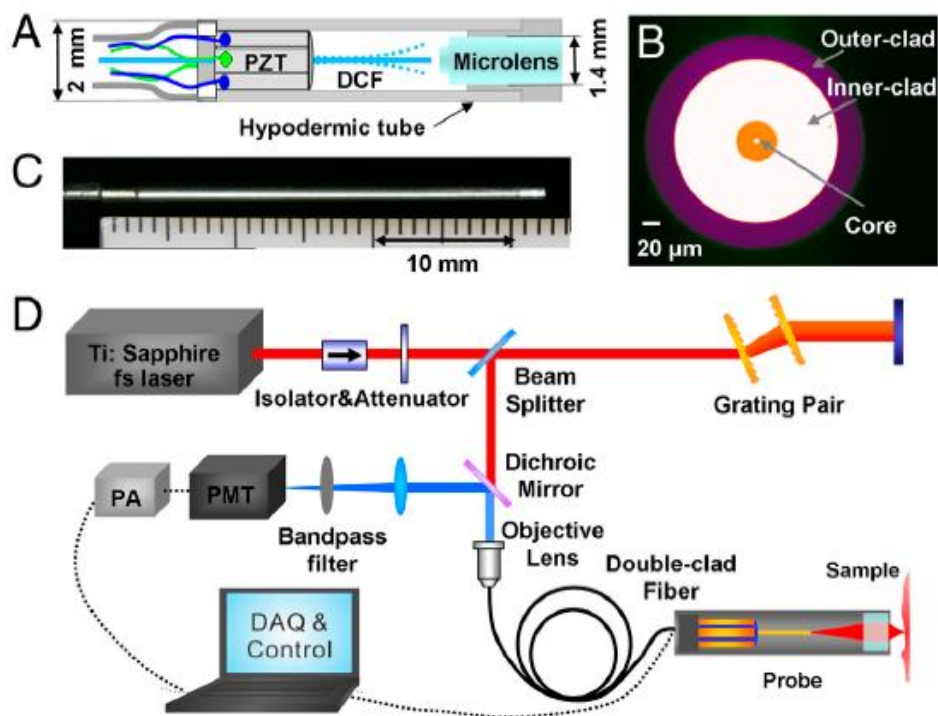


Fig 3.1 setup

3.3 結果

妊娠中のコラーゲンの変化の定量的な分析を行った。Fig3.2は妊娠 6, 12, 15, 18 日目における妊娠マウスおよび NP(妊娠していない)マウスからの子宮頸部切片の代表的な画像を示している。SHG 顕微鏡検査は、以前に妊娠早期から後期への SHG 強度の漸進的な増加があることが示されており [7], これは共焦点レーザー内視鏡データにおいても明らかであった。妊娠の同じステージを従来の(ベンチトップ)SHG 顕微鏡で得られたものと比較した。SHG 画像中のコラーゲンの形態の漸進的な変化は、妊娠の各段階におけるトリクローム染色(青:コラーゲン, 赤:ケラチン 細胞質)された子宮頸部組織切片の SHG 画像からコラーゲンマトリックス構造の細部を明らかにする。NP マウスおよび妊娠 6 日目のマウスでは細長いコラーゲン線維の分布を示すが、出産に近づくにつれて、コラーゲン線維が厚く湾曲してくる。以上より、妊娠中のコラーゲンの変化のイメージを取得することに成功した。

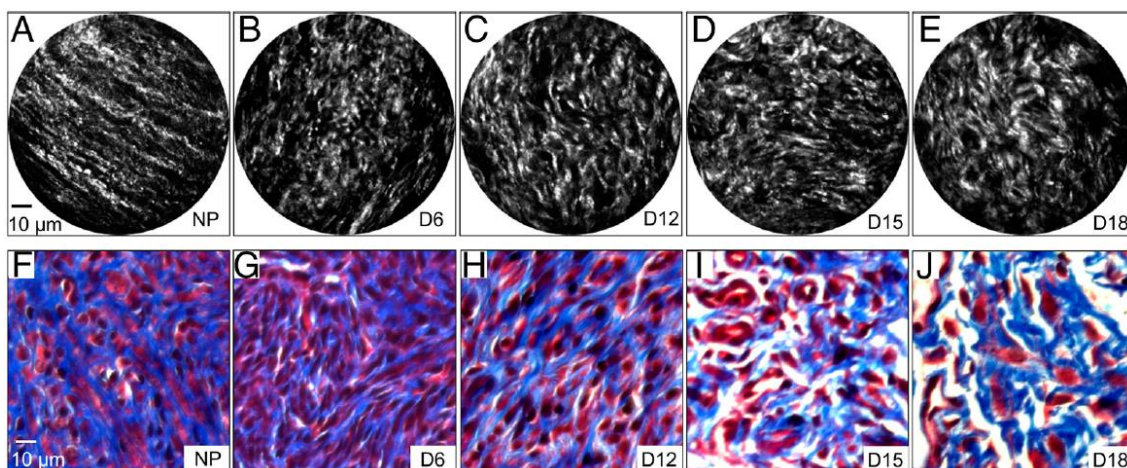


Fig3.2 SHG endomicroscopy images of cervical tissues sections from nonpregnant (NP) (A) and pregnant mice at gestation days 6 (B), 12 (C), 15 (D), and 18 (E). Significant morphological changes in cervical collagen are evident over the course of pregnancy. Microscopic images of trichrome stained samples (F–J) at the same gestational time points show gross changes in collagen morphology.

3.4 まとめ

組織切片及び無傷上皮と組織中の子宮頸部コラーゲンの SHG 画像を *ex vivo* で収集することができるコンパクトな光ファイバーSHG の共焦点レーザー内視鏡の開発を実証した。内側クラッドを大型に設計した DCF および高 NA のマイクロレンズの使用により信号収集効率の大幅な改善を提供した。MEMS ベースのプローブと比較して、プローブの構成はビーム折り返し光学系を必要としないため、全体的なコンパクトなプローブサイズを可能にした。これらの機能は、内視鏡 SHG 顕微鏡による *in vivo* バイオイメージングの実現するものとして期待される。将来的にコラーゲンの構造変化による多種多様な症状や障害の臨床評価のための SHG 内視顕微鏡の適用を可能にする。

4 まとめ

各論文の性能をまとめた表を Table4.1 に示す。1 本目の論文では、ビデオレートでのイメージングを可能にした。しかし、高速走査により SHG・THG 収集効率の低下が問題となっている。また、小型化を可能にしているが、数 cm オーダーであるため、更なる小型化も検討すべきではないかと考える。

2 本目の論文は、ファイバー先端を融着器で加工し、レンズとすることで対物レンズなど必要としないファイバースコープを実現した。しかしながら、サンプルの走査によるイメージに留まっており、プローブ自身を走査しイメージングすることには至っていない。

3 本目に紹介した論文では、ピエゾを用いてファイバー自体を走査することによりイメージングを実現している。小型化を可能にし、内視鏡とすることに適している。現段階では、

直接、体内での使用は行われていないため、さらなる改良が必要である。また、2本目の技術と組み合わせることにより、マイクロレンズが不要で、さらにコンパクトな顕微鏡を構築することができる可能性も考えられる。

顕微鏡を小型化するにあたって問題となるのは、視野である。顕微鏡を小型するためには、リレーレンズや対物レンズ(GRIN レンズ)の小型化が必須であるため、どの論も視野が狭くなってしまうことが問題でないかと考える。

現在、自身の研究で MEMS ミラーとケーシングシステムを用いた小型の SHG 顕微鏡の構築を行っているが、本雑誌会で紹介した小型のリレーレンズ作成やマイクロレンズの技術などを取り入れれば、さらに小型の顕微鏡の構築ができるのではないかと考える。

Table4.1 Performance of each SHG microscopy

	time	Field of view	Probe size	SHG	Applicati on
[1]	◎ Video rate	△ 100μm*70μm	△ 3cm thickness	△ Decrease (ultra-high- speed)	○ Practical realization
[2]	× Not practical	× Not practical	◎ Only fiber	△ The ratio of input and output is 29%	× Not practical
[3]	○ about 2s	△ 100μm diameter	○ depends on piezo	○ Collection efficiency is 8 fold with new microlens	△ Ex vivo

参考文献

- [1] S.H. Chia, et al, OPTICS EXPRESS **18**, 17382(2010).
- [2] H. Bao, et al, OPTICS EXPRESS **17**, 10098(2009).
- [3] Y. Zhanga, et al, pnas,1121495109 (2012).
- [4] S.Y. Chen, et al, J. Biomed. Opt. **14**, 060505 (2009).
- [5] L. Fu, et al, Opt. Express **13**, 5528 (2005).
- [6] G. J. Kong, et al, Opt. Letter. **31**, 894 (2006).
- [7] M.L Akins, et al, J Biomed Opt **15**, 026020 (2010).