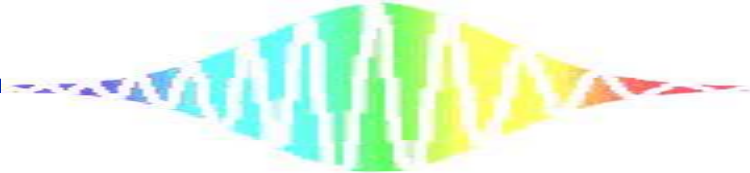


波長可変フェムト秒レーザー
を用いた非線形光学顕微鏡の開発
～生体組織のSHG・THGイメージ
ング～

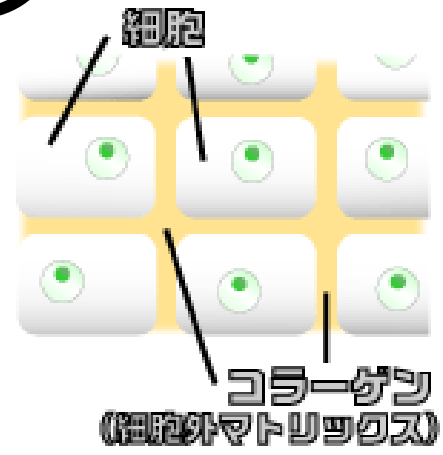
安井研究室 小谷 洸平



コラーゲンとエラスチン

コラーゲンの役割

- ①体全体および臓器その他を形作り、それらを支え、結合したり境界を作ったりする。
- ②細胞の足場として働く。この足場によって細胞は分裂し増殖する

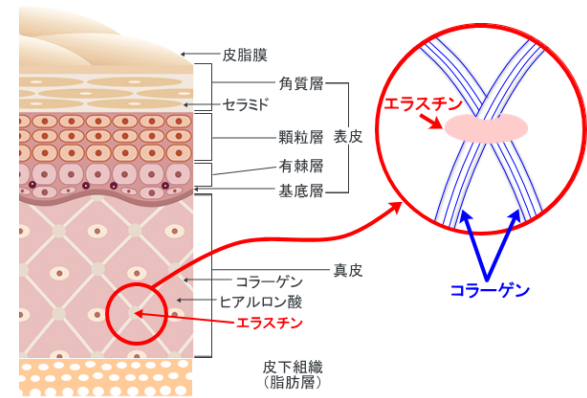


<http://www.hopec.biz-web.jp/collagen/collagentoha/>より抜粋

エラスチンの役割

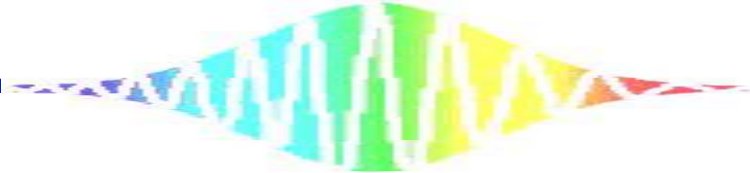
→弾力性が強く、コイル状にコラーゲンに巻き付いて形成を補助する

- コラーゲンの比率が高いと
→組織が硬くなる
- エラスチンの比率が低いと
→しわやたるみの原因、動脈硬化などになりやすい



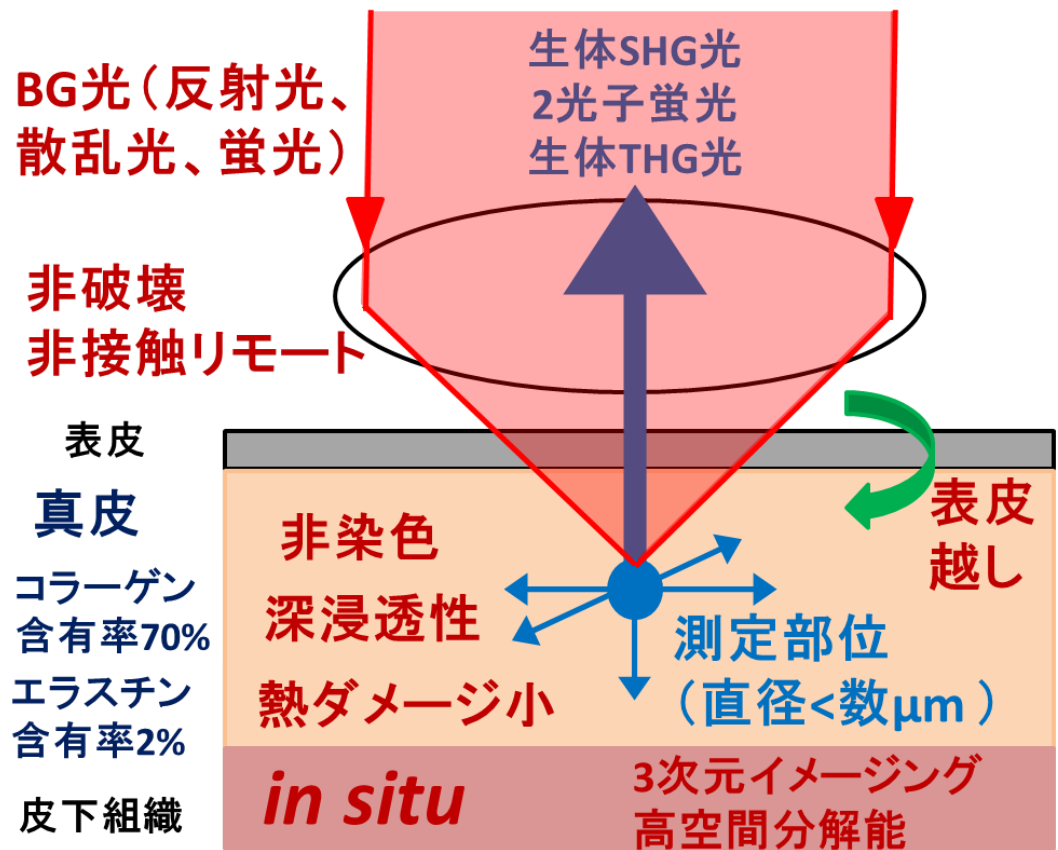
<http://collagen-laboratory.com/collagen/>より抜粋

美容や臨床応用の分野において同時に可視化する技術が求められる



非線形光学顕微鏡

フェムト秒パルスレーザー光

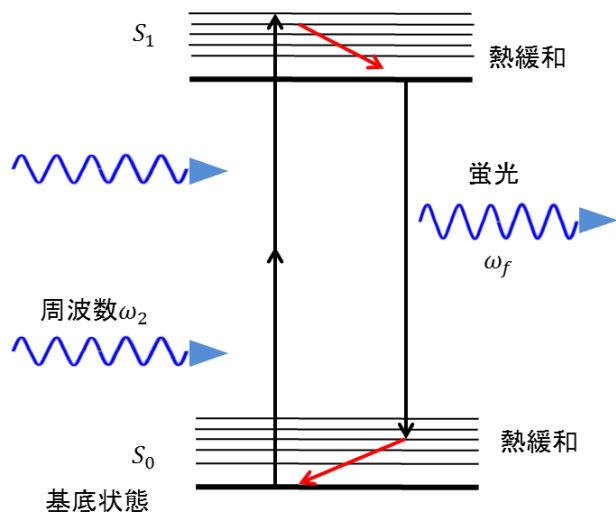


- SHG光はコラーゲン (非中心対称性物質) からのみ発生
- 2光子蛍光 (TPEF), THG光はエラスチンから発生

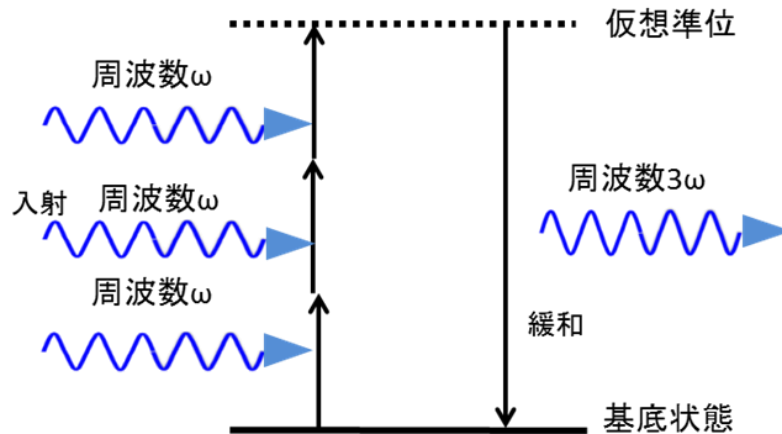
コラーゲンとエラスチンを *in vivo* で可視化

TPEFの代わりにTHGを用いる理由

TPEFの原理



THGの原理



先行研究

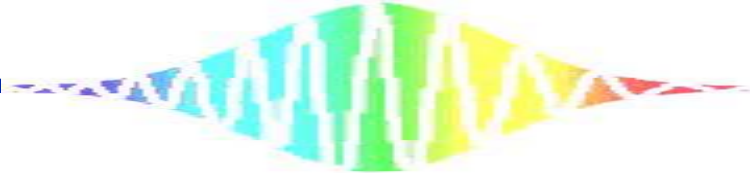
入射波長800nmでTPEF

生体組織内で受ける吸収と散乱により強く減衰する
→生体深部を高コントラストで可視化は困難

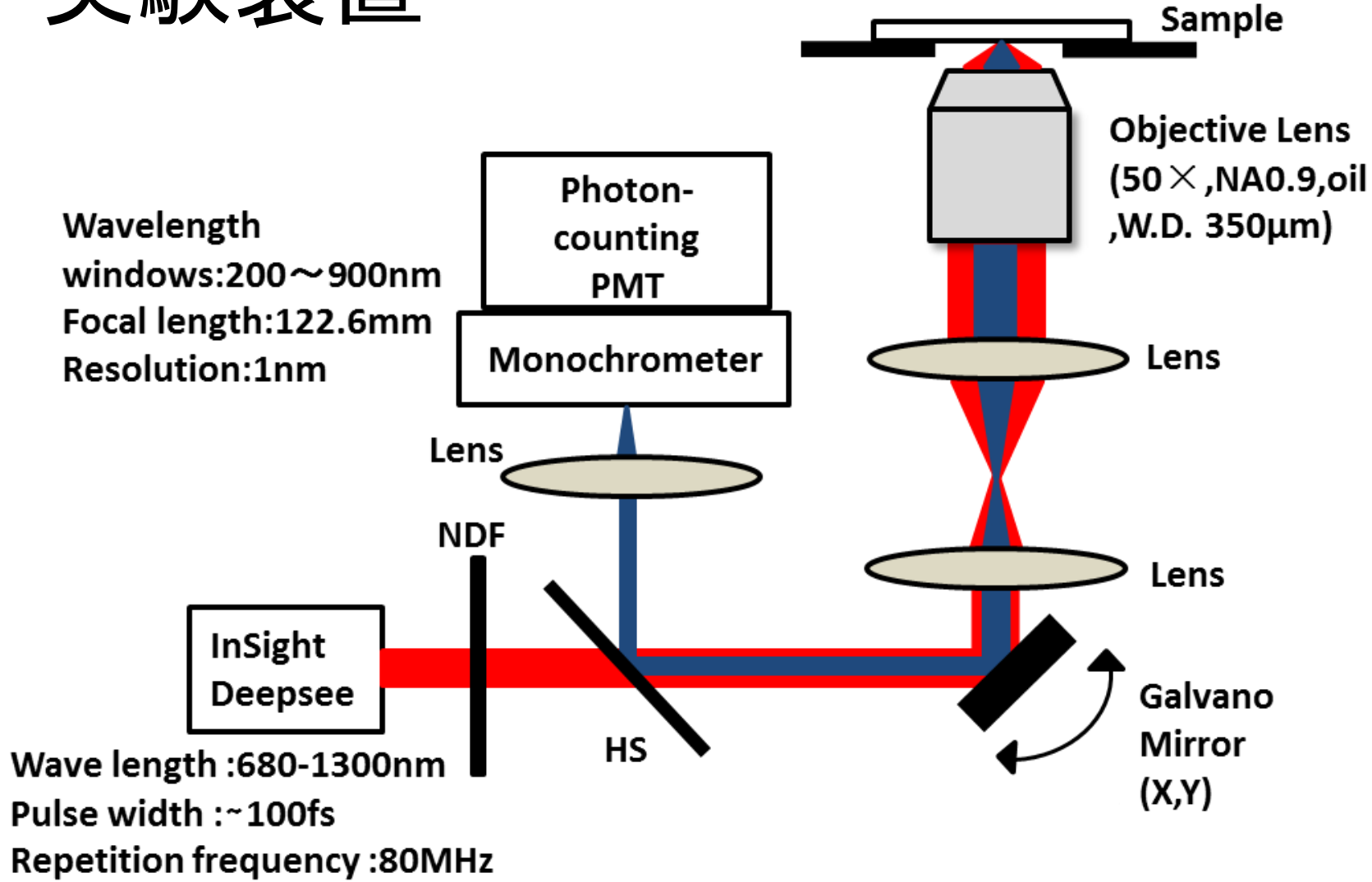
入射波長1100nmでTHG

物質の境界で強いTHG信号が発生
→生体深部を高コントラストで可視化

より長い波長にすることで生体深部を観察する



実験装置



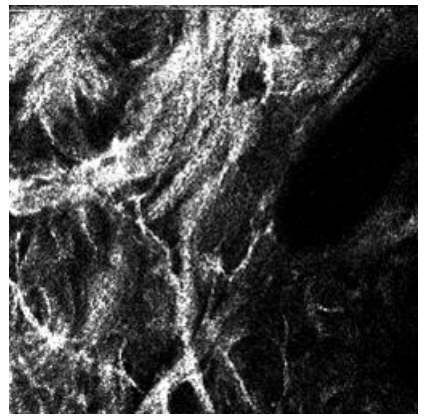
SHGイメージの波長ごとの比較

コラーゲン

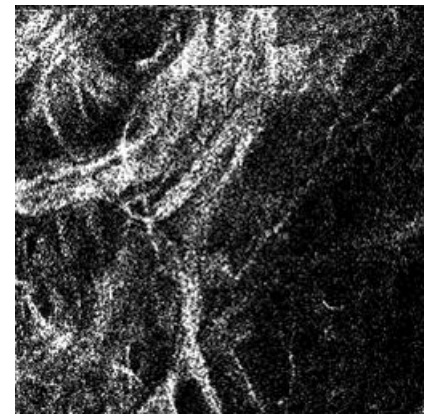
800nm



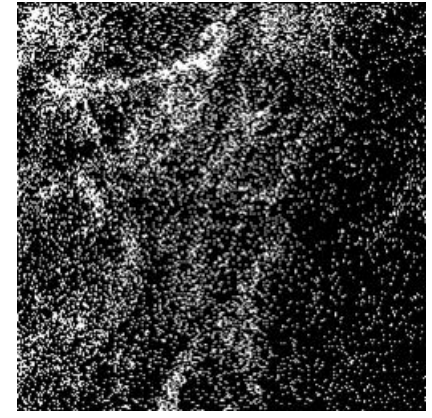
1100nm



1200nm



1300nm



サンプル：86歳女性臀部皮膚の切片(厚さ100μm)

- 入射波長800nmと1100nmのSHGイメージではコントラストに大きな違いなし
- 1300nmではSHG信号が非常に小さくなった
→水の吸収の影響？

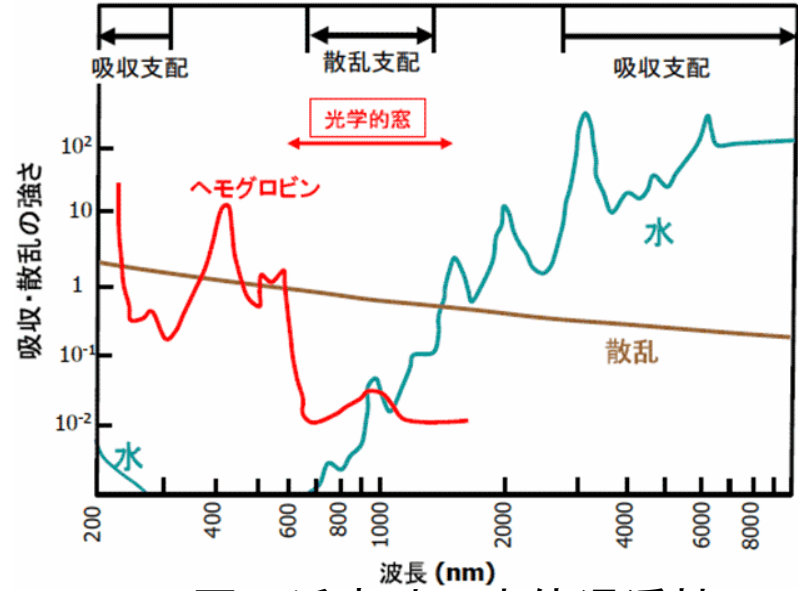
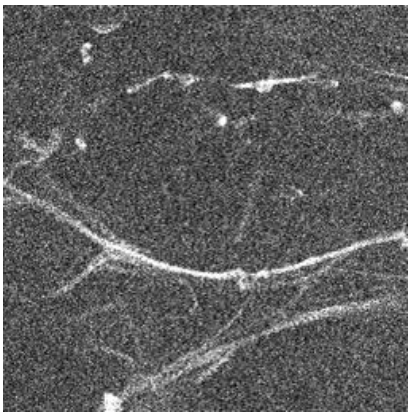


図 近赤外の生体浸透性

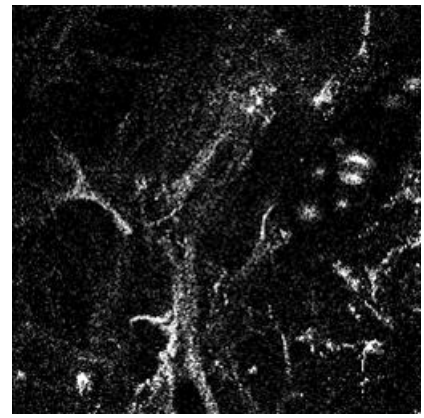
TPEF/THGイメージの波長ごとの比較

エラスチン

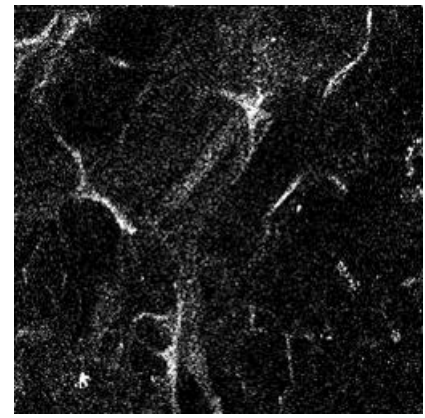
800nm



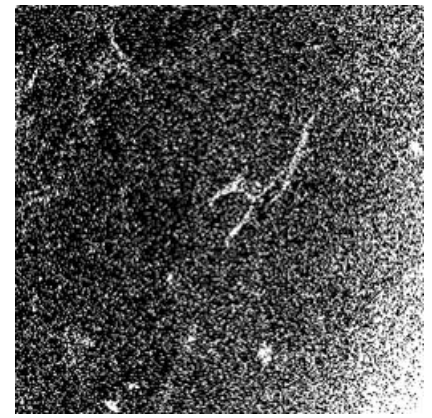
1100nm



1200nm



1300nm



- 800nmのTPEFイメージと1100nmのTHGイメージのコントラストに大きな違いなし
→THGでエラスチンを特異的に観察できる
- 1300nmではTHG信号が非常に小さくなった
→水の吸収の影響？

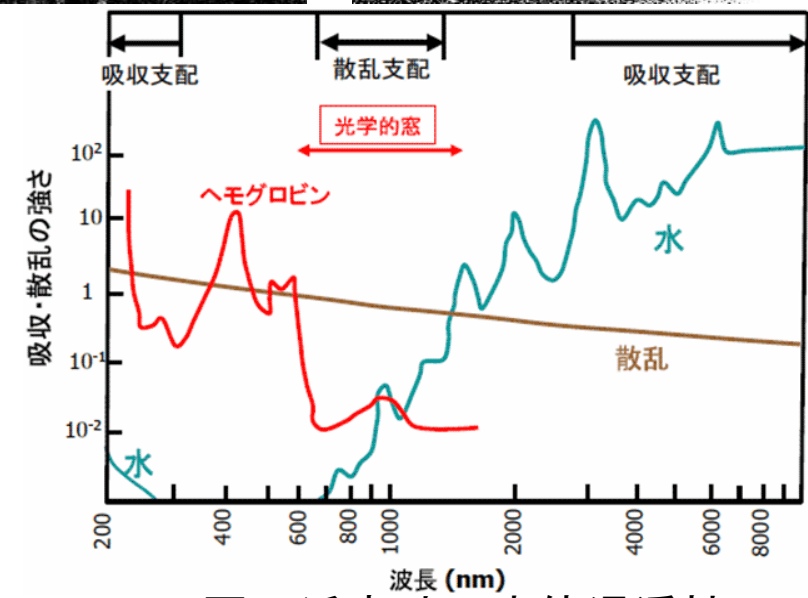
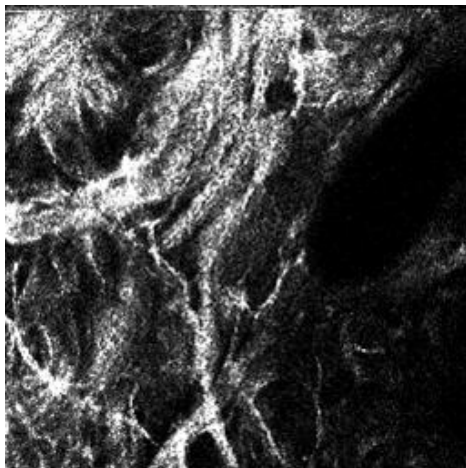


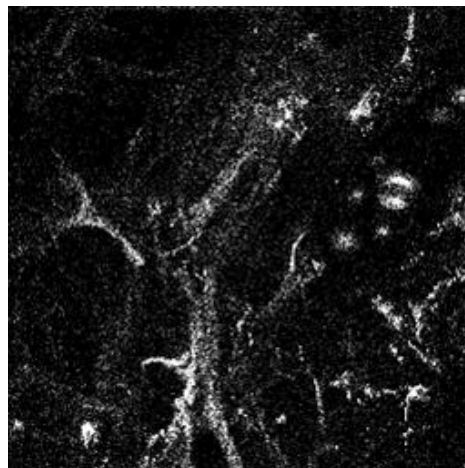
図 近赤外の生体浸透性

入射波長1100nmにおいての SHG, THG, マージイメージ

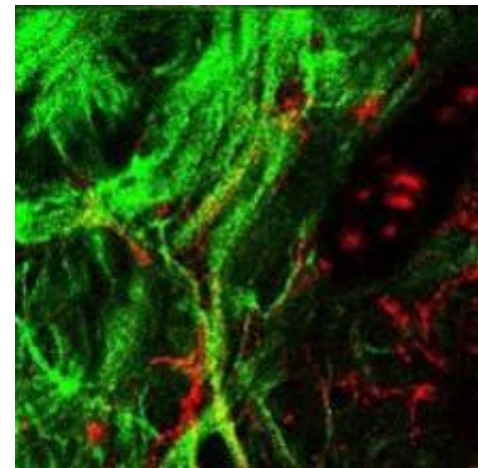
SHG



THG



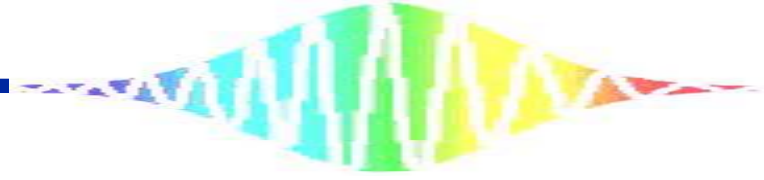
マージイメージ



コラーゲン線維 : 広範囲に分布している

エラスチン線維 : 数が少なくバラバラに分布している

マージイメージよりエラスチン線維はコラーゲン線維の間に分布していると確認できる

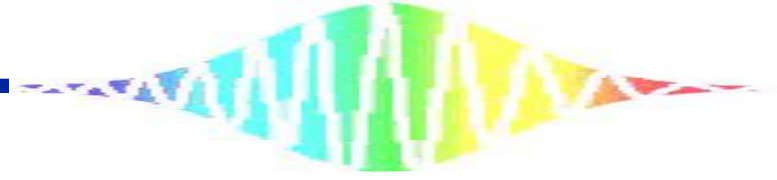


まとめ

- コラーゲンとエラスチンの同時計測を目的とした非線形光学顕微鏡を構築
- THGによるエラスチン計測の可能性を確認

今後の予定

- 散乱の影響を受けやすい厚みのあるサンプルを用いて、THG計測に有効な入射レーザー波長を検討



実験結果

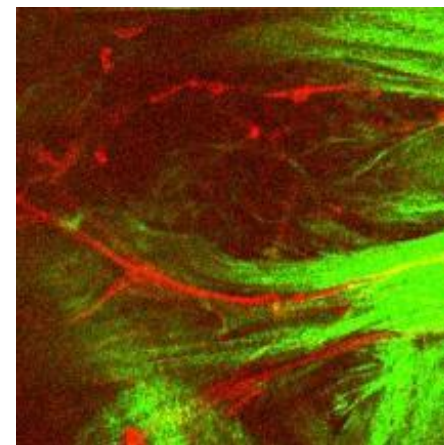
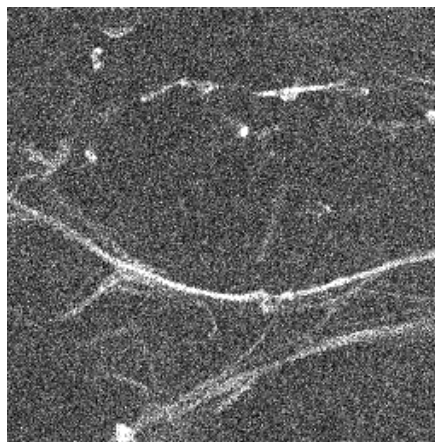
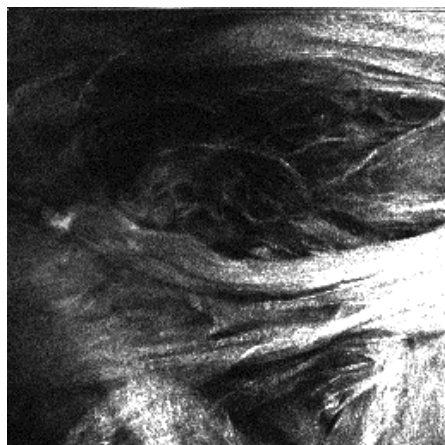
サンプル:86歳女性臀部皮膚の切片(厚さ:100 μ m)

800nm

SHG:400nm
(コラーゲン)

TPEF:450nm
(エラスチン)

マージ画像

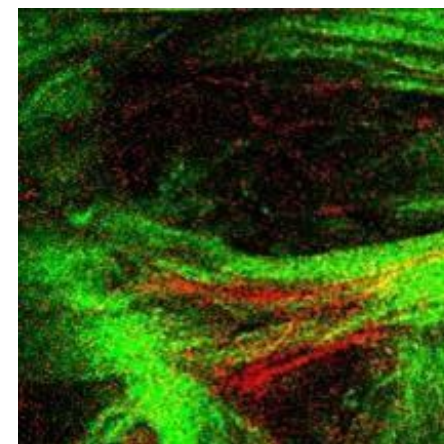
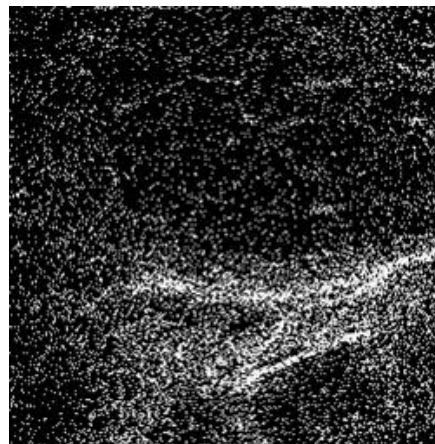
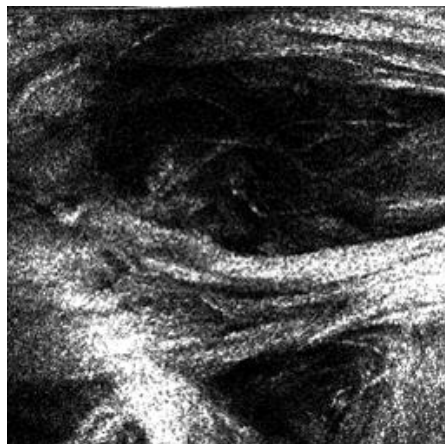


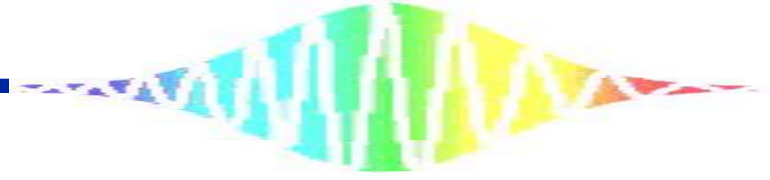
1100nm

SHG:550nm
(コラーゲン)

THG:366nm
(エラスチン)

マージ画像





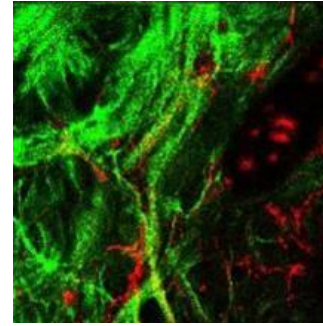
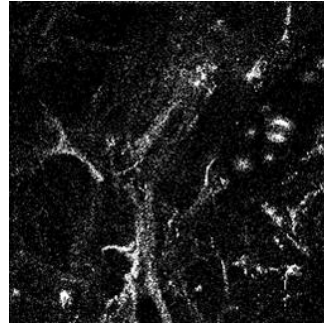
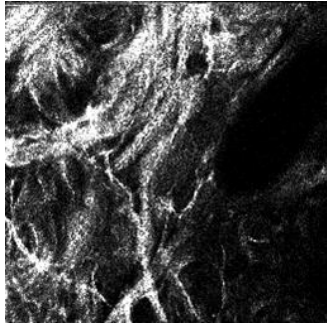
実験結果

SHG
(コラーゲン)

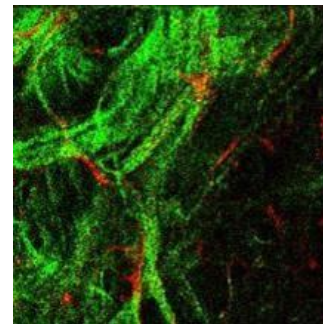
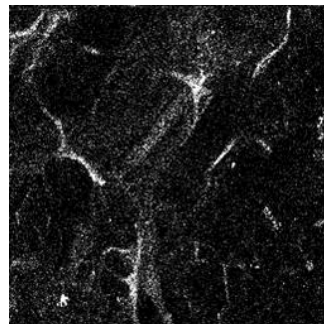
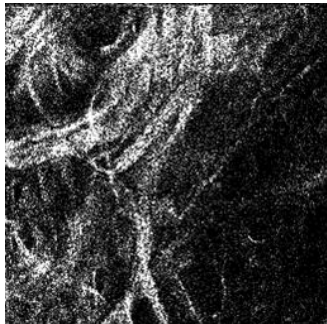
THG
(エラスチン)

マージ画像

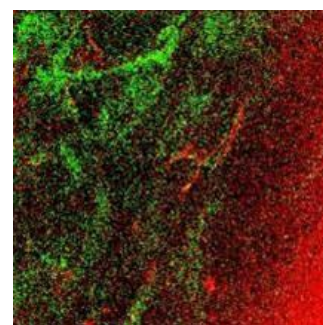
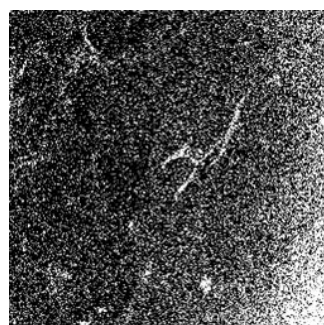
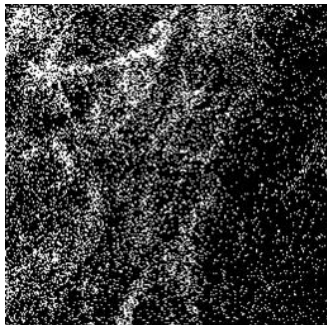
1100nm



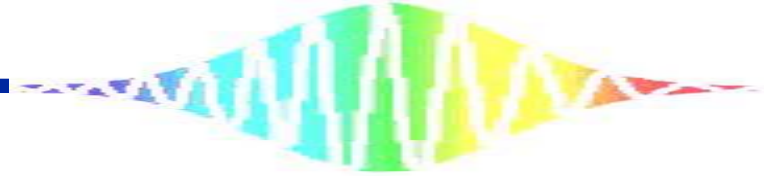
1200nm



1300nm

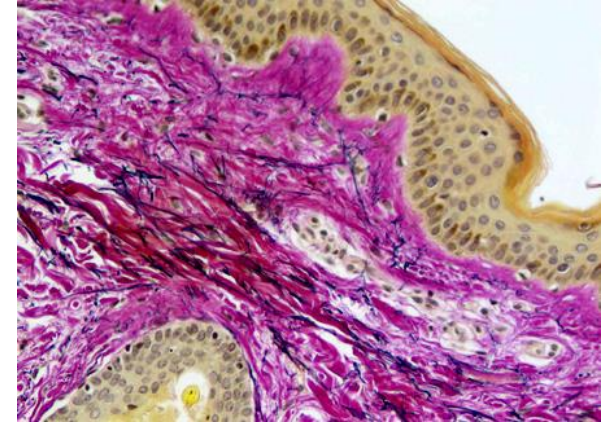


- どの波長でもエラスチン線維とみられるものが検出された
- 1300nmでは信号が非常に小さくなった



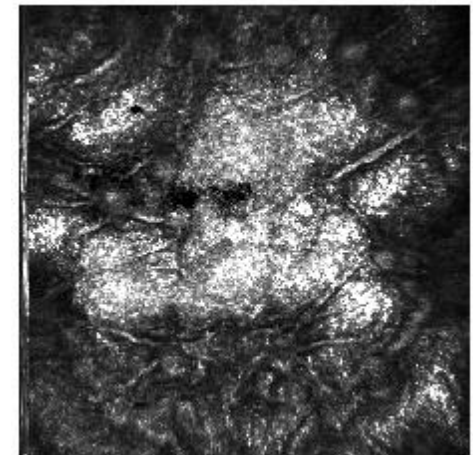
従来研究

- 組織染色法
⇒ 侵襲的、*in vivo*計測不可

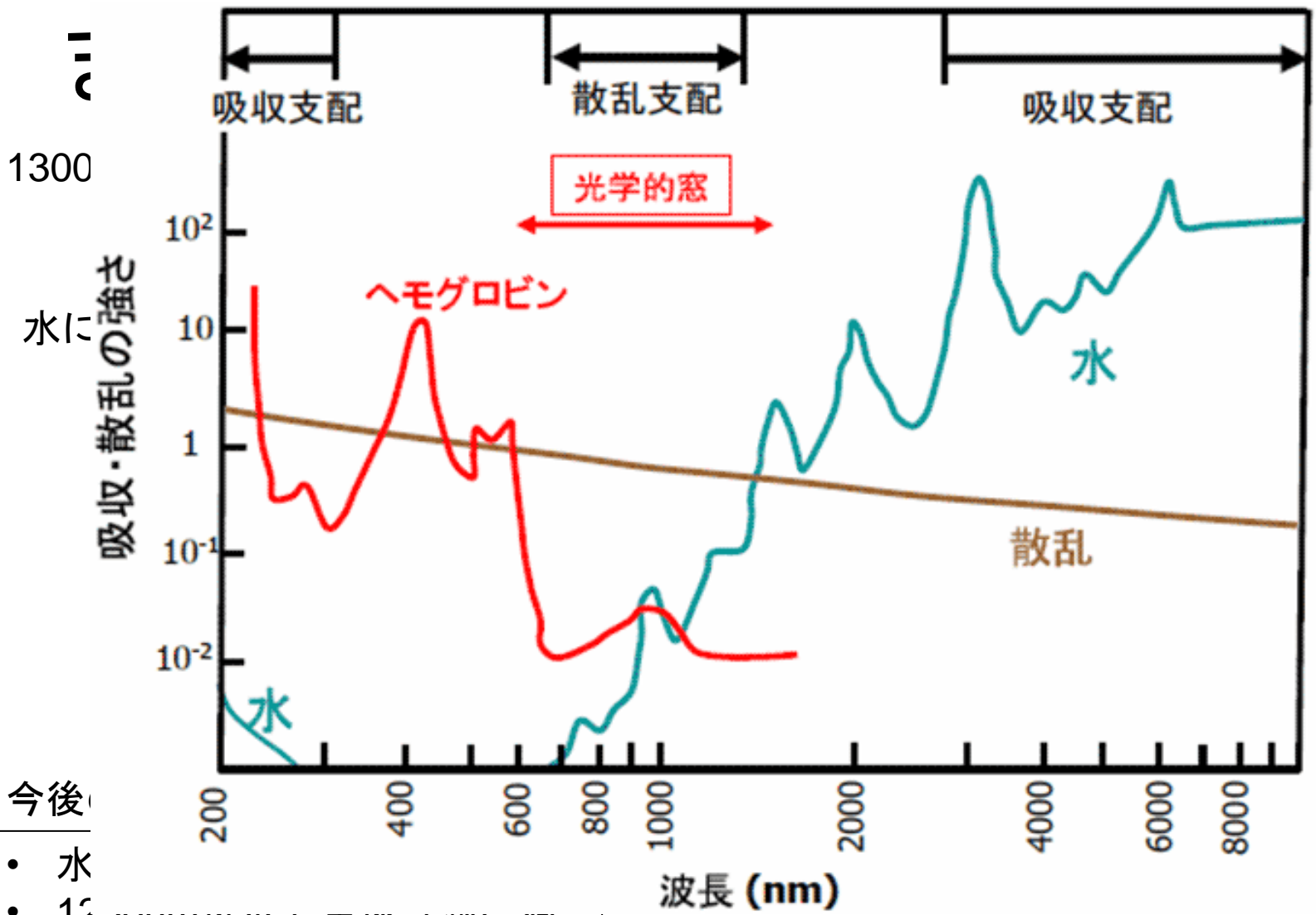
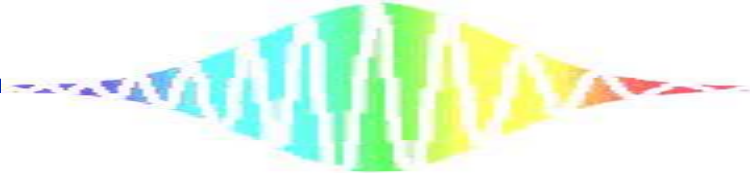


安井研HPより抜粋

- レーザー走査型反射共焦点顕微鏡
⇒ 分子選択性に難点

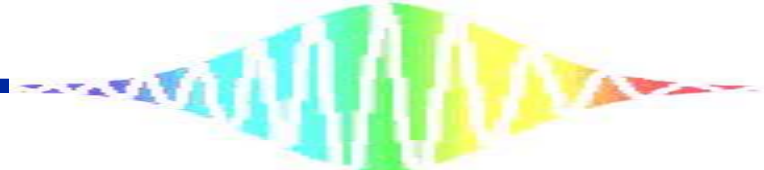


安井研HPより抜粋



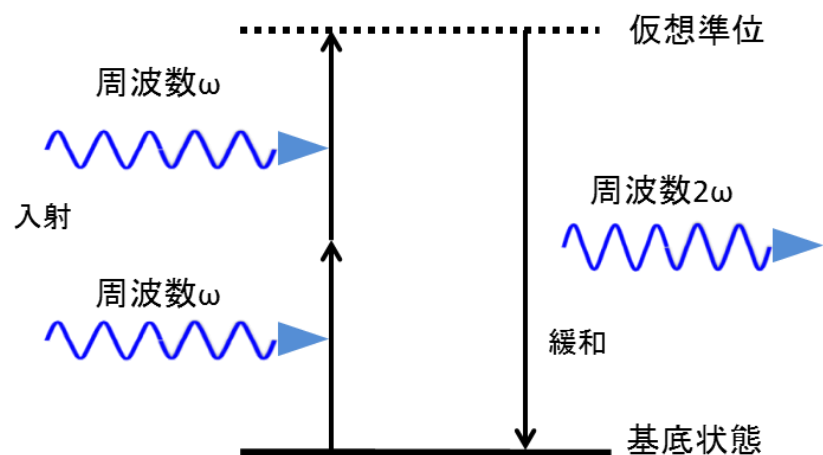
- 水
- 1250nm付近で生体可視に近い波長を探す
- 11月上旬に生体実験を予定

http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/attach/1333543.
より抜粋



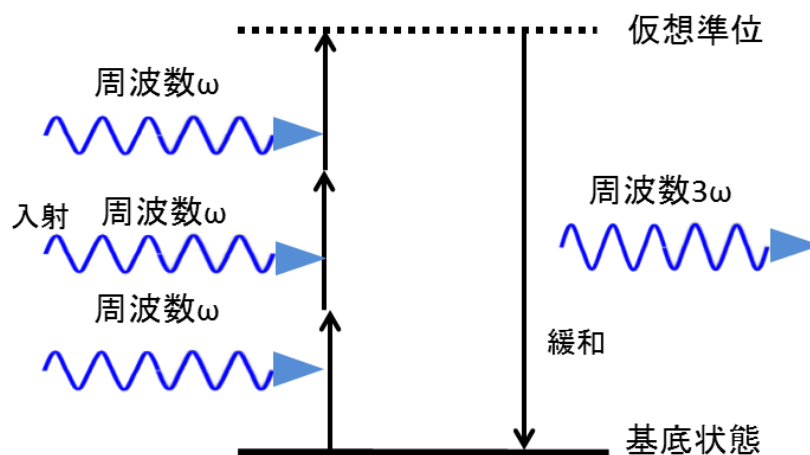
SHG, THGの原理

• SHGの原理

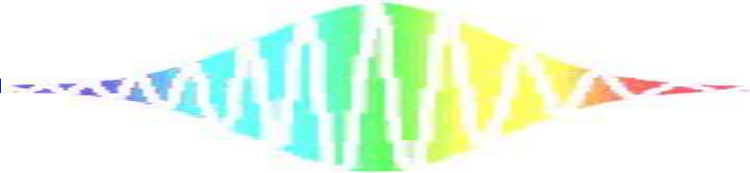


- 非中心対称性物質からのみ発生
(例) コラーゲン

• THGの原理

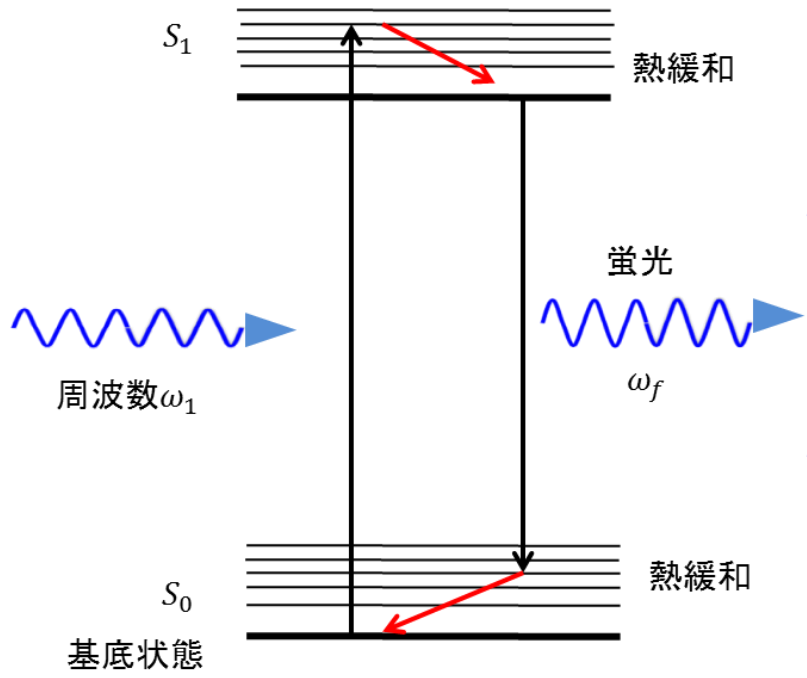


- すべての物質の境界面で発生
- 異なる物質の境界の間でコントラストが高い



多光子励起過程の原理

1光子励起過程



2光子励起過程

