

## Tripling the maximum imaging depth with third-harmonic generation microscopy

### THG 顕微鏡を用いた 3 倍の最大イメージング深度

11/10 B4 小谷

#### 1. Introduce

多光子非線形イメージング顕微鏡はしっかりと焦点を当てたフェムト秒パルスを用いた細胞内の分解能で、非侵襲で 3 次元深さ組織イメージングを行うことができる。標準的なレーザー走査型蛍光顕微鏡よりも、優れた軸分解能と改善された信号バックグラウンド比と分かった。

最近、散乱長さを減らすためにより長い励起波長を実装し、バックグラウンド信号発生確率を減らすために 3 光子過程を利用することで、より深いイメージング深さがうまく示されている。例えば、1280nm の励起波長において TPM を用いることは、より短い 775nm の励起波長と比較するとマウスの脳の血管に分類される蛍光のイメージング深さをおよそ 2 倍にした。別の研究で同じグループが 1.3mm のイメージング深さに達するとき、775nm におけるの 2 光子顕微鏡と比較して、1675nm の波長でマウスの脳における *in vivo* での 3 光子顕微鏡は最大イメージング深さを 1.8 倍まで強めると示した。脳の実際の減衰長さ(300 から 350  $\mu\text{m}$ )の推定を考えると、正規化されたイメージの深さは 3.5 から 4.5 に対応している。

より長い励起波長を使って最大イメージング深さを改善することは SHG、THG 顕微鏡のように、非線形イメージング技術を利用することで達成できる。原則としてこれらの技術は組織サンプルの上にエネルギーを堆積させないと、このように光毒性の確率を減少させる。SHG はコラーゲン線維のような非中心対称分子組織をもつ高度に分極性物質を通過する強いフェムト秒レーザーパルスが必要とする。一方、THG は基本周波数における 3 光子は第 3 高調波周波数において 1 光子に変換されることは全ての分子に当てはまる。THG の信号強度は屈折率と 3 次の感受率の変化に非常に敏感だ。前の関連研究はイメージングニューロンとその過程、植物の種子の脂質体とショウジョウバエの胚、ゼブラフィッシュの胚と幼生、心筋梗塞、エラスチンとコラーゲン線維、マラリア寄生虫、脊椎中枢神経系、そして人間の角膜のように、THG の異なった応用が示された。

イメージングのために内因性 THG の使用は、外部のフルオロフォアは侵襲性と毒性であるとみなすことができる応用は重要だ。ピンボケした体積の 3 光子吸収の減少した確率、より長い励起波長の減少した散乱確率、そしてサンプル上にエネルギーが堆積していないことによって、THG 顕微鏡は濁った組織において最大イメージング深さを著しく改善することができる。THG 顕微鏡は $\sim 900\mu\text{m}$ の深さにある薄いゼブラフィッシュの胚やマウスの脳の外部皮膜の全体的に薄いもののイメージをとると示された一方、ハムスターの頬袋、固定された人間の皮膚、マウスの筋肉、そしてマウスの肌のようなすぐく散乱する組織サンプルは 100 $\sim$ 300  $\mu\text{m}$  の間の最大深さをイメージすることができた。これらの研究における対応する正規化されたイメージング深さは 4.5 にまで達した、理論的に予想される最大イ

イメージング深さにおいてイメージングが可能になるための改善の余地はまだあると示した。

したがって、この研究の目的はすごく散乱する組織において最大イメージング深さでの THG イメージングを示すことだ。具体的には、1552nm の励起波長を使い、776nm の波長における TPM と比較すると、結果的に THG イメージは 3 倍の深さを示した。最終的な最大イメージング深さを達成するために、イメージング条件を慎重に設計し、最適化された回収効率をもったホーム組み込みシステムが使われた。我々が以前開発していた新規の切除ベースの方法に基づいて、組織の光学的特性を測定し、そして、分析的にそして最大イメージング深さのモンテカルロモデリングを行った。さらに重要なことは、1552nm において深い組織イメージ中で組織が熱くなるのを避けることで、私たちは組織の熱特性を分析し、数値的にそして実験技術を利用することで深さ分解温度分布を推定した。我々のグループは以前声帯の瘢痕化を示したとき、臨床応用の高速レーザー手術のために十分なパルスエネルギーと平均パワーを供給できるので、THG イメージングのための高い繰り返し率、高出力フェムト秒ファイバーレーザーを使用するための実用的な重要性があります。全体的にこの研究は精密なレーザーマイクロサージェリーを誘導する能力を備えた傷を負った声帯のようなすごく濁った組織において深い組織イメージングを形成するために新しいイメージモダリティとして、1552nm の励起波長において THG 顕微鏡が、どのように使うことができるのかを示す。

## 2. Methods and Materials

### 2.1 Experimental Setup

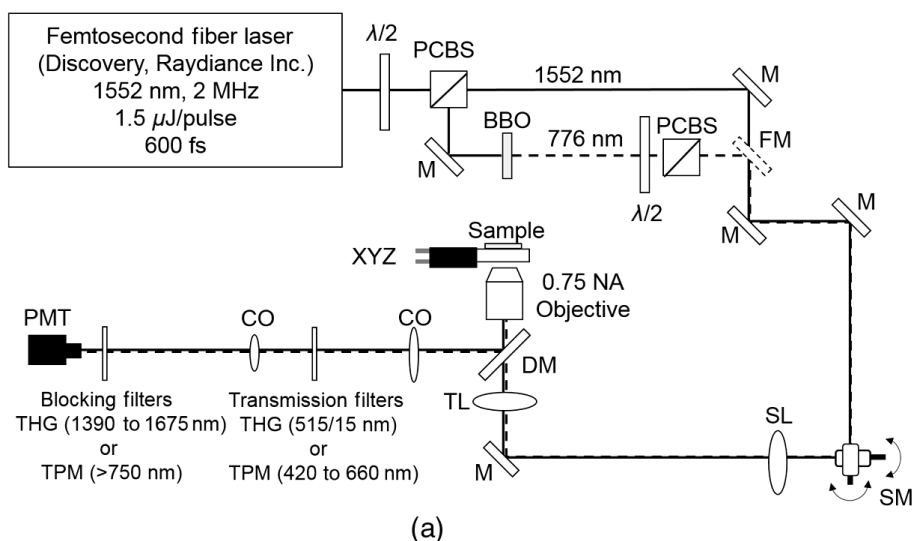
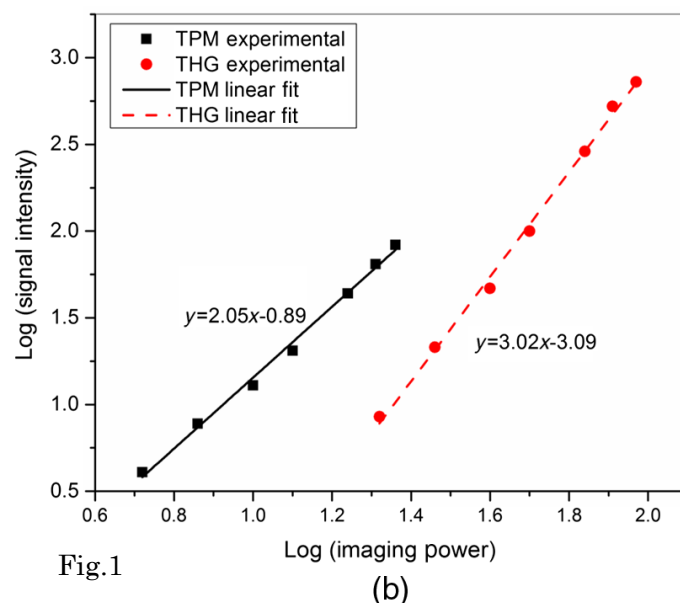


Fig.1 非線形イメージングと切除のための転置した顕微鏡系の図



- (a) フェムト秒レーザーパルスは基本波長(1552nm)でコンパクトレーザー系から得られ、半波長板( $\lambda/2$ )からなるエネルギー減衰器と偏光立方ビームスプリッター(PCBS)を通過する。周波数 2 倍パルスは第 2 級ホウ酸バリウム結晶を使って達成した。両方のビームはガルバノスキャニングミラー(SM)のペアを使ってスキャンした、そしてそれはスキャンレンズ(SL)とチューブレンズ(TL)の両方を使って開口数 0.75、倍率 20 倍の対物レンズの後ろの穴にイメージを映す。サンプルは非線形イメージのために 3 軸モーターステージ(P280,nanocube,PI)上に置く。放出された光はダイクロイックミラー(DM)、コレクションオプティクス(CO)、レーザーブロッキングフィルター(Edmund Optics)と THG フィルター(515/15nm)もしくは TPM フィルター(420 to 660nm)によって光電子増倍管(PMT)(H10770 PA-40,Hamamatsu)の中に集光される。
- (b) イメージングパワーに対する信号強度の勾配には log-log 目盛座標上の TPM と THG イメージングの非線形過程のオーダーを確かめた。

フェムト秒 Er 添加ファイバーレーザー(Discovery , Raydiance Inc)使用

1552nm において平均 3W のパワー、波長が倍の 776nm で 600 フェムト秒パルス幅で 2MHz のとき 1W。私たちは、50~500 $\mu\text{m}$  の様々な深さで寒天ゲル内に埋め込まれた 100nm の直径のポリスチレンビーズ (Invitrogen 社、F8803) を撮像することにより、スポットサイズを測定しました。測定範囲 150 $\mu\text{m}$ \*150 $\mu\text{m}$ ,測定時間 3.3s,512\*512pixel。ダイクロイックミラー (Semrock、FF735-DI01) は、試料に励起光を透過し、集光光学素子に試料から放射された信号を反射するために使用されました。光電子増倍管は集光光学系とレーザー遮断フィルタと発光フィルタを介して信号を収集する。

## 2.2 Ex Vivo Tissue Preparation

豚の声帯の LP は研究され、エラスチンとコラーゲン分布において人間の LP に最も似ていると分かった。優れた豚の声帯は私たちが興味のある深さにおいて劣った豚の声帯と比

較すると人間の声帯と似ている線維構造をもつと私たちの以前の研究は示した。新鮮な豚の気管標本は地域の屠殺場から取得し、喉頭は動物が犠牲になる 2 時間以内に室温の塩浴で分離した。切除後、ガラスカバーで覆うことで上面を平坦にした。臨床応用において、切除の一定の深さを維持し、ガラスカバースリップはサンプルと接触する顕微プローブの窓に似ている。新鮮な組織サンプルと蛍光ビーズの短命な自己蛍光は TPM イメージングの間サンプルの表面を認識するのを助けた。THG イメージングで、空気とガラスの境界面での高いコントラストは簡単に組織表面を認識することができる。

### 3. Results and Discussion

我々の研究で扱われる臨床応用は声帯癒着に関連がある。これは、音声障害の主要な原因の一つであり、乱用または術後創傷治癒から生じる可能性があります。声帯と表面の粘膜固有層(SLP)の最外側の振動層の粘弾性を回復する目的として、ある有望な治療はソフトな生体材料の注入を使用する。注入用材料の外科的使用に直面している共通の未解決な問題は傷痕声帯の表皮層においてのその正確で効率的な配置です。最近の実験では、豚の声帯の表面の基底層において上皮下のくぼみ $\sim 100 \mu\text{m}$ 深さを切除することで、我々は生体材料の局在化を達成した。しかし、2光子蛍光と SHG 顕微鏡を用いると、組織内の最大イメージング深さは  $100\sim 150 \mu\text{m}$  深さに制限された。SLP の異なった層においてこのような高精度顕微手術をガイドするために、表皮の下で傷ついた組織の位置を特定し、切除の有効性を評価するために声帯中の高分解イメージング深さを必要とする。そこで、顕微手術に使用するために同じ高繰り返し率ファイバーレーザーの基本波長( $1552\text{nm}$ )を使って豚の声帯を *ex vivo* でより深いイメージをとるために THG 顕微鏡の特徴の調査を本稿は示す。

#### 3.1 Extinction Properties of Tissue

励起波長( $776$  と  $1552\text{nm}$ )で新鮮な豚の声帯の消衰特性を決定するために、新たな切除ベースの方法が使われた。この方法で SLP( $72,90,108 \mu\text{m}$ )にある表皮の下の 3 つの異なった深さで切片が作られ、最初の切片に必要な最小パルスエネルギー測定された表皮厚さ  $z_{ep}$  を元に式(1),(2)として選ばれ、

$$F_{th} = \frac{E_{th,surface}}{\pi w^2} \exp\left(\frac{-z_{ep}}{l_{ext,ep}}\right) \exp\left[-\left(\frac{z_{ab}-z_{ep}}{l_{ext,LP}}\right)\right] \quad , (1)$$

$$F_{th} = \frac{E_{th,surface}}{\pi w^2} \exp\left[-\left(\frac{z_{ep}}{l_{ext,ep}} + \frac{z_{ab}-z_{ep}}{l_{ext,LP}}\right)\right] = \frac{E_{th,surface}}{\pi w^2} \exp\left(\frac{-z_{ab}}{l_{ext}}\right) \quad , (2)$$

$F_{th}$  は SLP の切片しきい流量と知られており、 $E_{th,surface}$  は組織表面で測定されたパルスエネルギー、 $w$  は焦点面のレーザービームの半径 $\frac{1}{e^2}$ であり、 $l_{ext,ep}$  は表皮励起長さを知られ、 $l_{ext,LP}$  は SLP 励起長さとして知られている。それぞれの切片深さに当てはまる 3 つの等式を解くと、3 つの未知数  $l_{ext,ep}$ ,  $l_{ext,LP}$ ,  $F_{th}$  が決定する。最大イメー

ジング深さ $z_m$ において組織の効率的な励起波長 $l_{ext}$ は式(2)から $z_{ab}$ を $z_m$ に置き換えることによって(3)のように推論できる。

$$l_{ext} = \frac{z_m * l_{ext,ep} * l_{ext,LP}}{z_{ep} * l_{ext,LP} + (z_m - z_{ep}) * l_{ext,ep}}, \quad (3)$$

776nm の励起波長で、無視できる組織吸収のために組織励起長さは散乱長さと等しいと言える。しかし、1552nm において吸収は考慮に入れられる。1552nm において励起長さの散乱と吸収成分を認識するために、散乱長さは線維が柔らかい組織のために次の実験の相互関係を使うことを最初に推測される。

$$l_{sca,\lambda_2} = l_{sca,\lambda_1} \left( \frac{\lambda_2}{\lambda_1} \right)^{1.627 \pm 0.115}, \quad (4)$$

結果的に散乱した長さは式(4)より 1552nm 波長において  $108 \pm 8 \mu m$  だった、そして吸収長さは  $135 \pm 15 \mu m$  と推測できた。いくつかの研究は純水での吸収長さは 1552nm 波長において 200 から  $250 \mu m$  だと分かった。これらの数字を確かめるため、異なった深さで 1552nm レーザー光を集光して、焦点面で気泡形成する最小パルスエネルギーを測定することで蒸留水の吸収長さを計測することができる。上に描かれた方法を応用すると、この研究は 1552nm 波長において吸収波長は  $200 \pm 50 \mu m$  と決まった。したがって、われわれはこれらの組織実験の結果は声帯に関連する数字を表し、水と生体間の吸収波長の数値のわずかな違いはコラーゲン、エラスチンや水に加えられたヒアルロン酸のような生体組成に由来しうる。これらの数値はモンテカルロや熱伝達シミュレーションに使用された。すべての励起長さの概要は、そしてそれは両方の励起波長の文献に報告された数値と一般的に一致しており、表 1 にまとめている。

### 3.2 Maximum Imaging Depth

切除された新鮮な優れた豚の声帯は 776-1552nm 励起波長において最大イメージング深さを比較するために TPM と THG イメージングの両方を使用してイメージングした、それぞれ図 2 に示す。組織表面は TPM 内の外部から印加される蛍光ビーズの存在と THG における組織表面とガラスカバー間の境界面における大信号コントラストの存在によって確認される。コラーゲン線維が最初に現れる深さはイメージングの場所や表面下の  $40 \sim 70 \mu m$  の範囲の間で変わる。イメージング深さが増えると、TPM と THG 信号は異なった組織成分から起こると検出され、上皮と SLP を区別するのを助ける。例えば、776nm 励起波長での TPM はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェートおよび上皮のフラビンと SLP のコラーゲンおよびエラスチン線維を検出できた[図 2(b)]。一方、THG は優れた豚の声帯の上皮細胞と ECM 線維をイメージングできた。THG 信号は屈折率の変化、幾何学的形状、組織内の三次感受性の違いから起こった。

優れた豚の声帯の非線形イメージ間の比較は長波長(1552nm)の THG は質的に最大イメージング深さを十分改善するとはっきり示した。最大イメージング深さにおいて、適応する最大イメージングパワーは TPM と THG それぞれにおいて 10~55mW だった。

定量的に最大イメージング深さを分析するために、我々はどのように SBR(信号/バックグラウンド比)がどのようにイメージング深さを変えるのかを分析した。Image J ソフトウェアを用いてそれぞれのイメージにおいて異なった場所で改造可能な特徴を横切るピクセルの行を選ぶことで SBR は算出された。これらの分解可能な機能は SLP で上皮または細胞外マトリックス線維の上皮細胞だった。そして、比率が最大信号強度の  $1/e^2$  の右および左端で 10 ピクセルの平均までの最大信号強度と決定した。各イメージングモダリティ用の SBR は図 3(a)の半対数でイメージング深さに対して提示される。最大イメージング深さ  $z_m$  は SBR が 1 まで落ちる深さと定義された。加えて、SBR は組織消滅長さを正規化するイメージング深さに対してプロットされた。

THG イメージングはイメージング深さを  $140 \mu\text{m}$ (TPM776nm)から  $420 \mu\text{m}$ (THG1552nm)に増やすことで 3 倍の深さイメージングを供給すると図 3(a)は定量的に示した。SBR は TPM と THG イメージングモダリティのためにそれぞれおよそ 4 や 7 励起長さの正規化されたイメージング深さのひとつになったと図 3(b)は示す。無次元の深さ(~1.7 倍)のそのような改善は 3 光子過程でのアウトオブフォーカス発生確率の減少だけでなく長波長側で発生する信号の吸収の減少の直接の結果だった。全体的に、より長い励起波長と放出波長と 3 光子過程は 1552nm 励起波長において THG 顕微鏡の最大イメージング深さを改善した。この最大イメージング深さの改善はイメージング傷痕人間声帯、そしてそれは豚の声帯と比べて厚い上皮を持っている、の潜在的なアプリケーションを明らかにする。

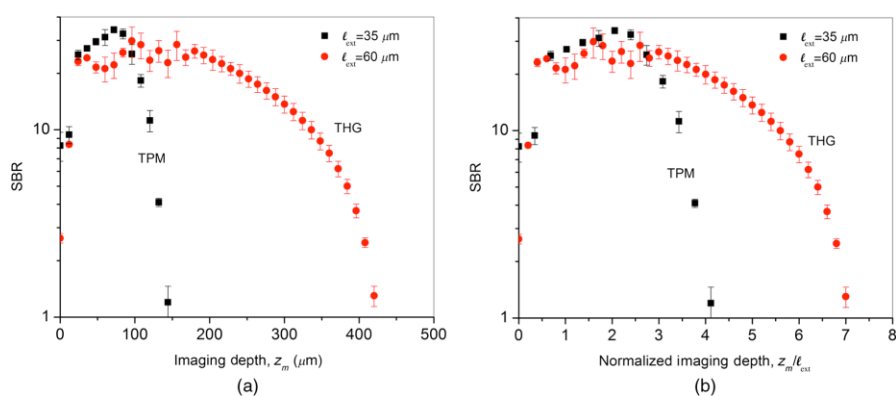


図 3 SB 比は両方の非線形イメージモダリティを評価する (a)イメージング深さ  $z_m$  に関する SB 比 (b)正規化されたイメージング深さ  $z_m/l_cot$  に関する SB 比

### 3.3 Analytical and Monte Carlo Modeling of Maximum Imaging Depths

図 4 はモンテカルロシミュレーションの結果と異なった励起長さの分析的計算結果を表す。Beer-Lambert の法則によって予測した通り、TPM イメージングのために、正規化されたイメージング深さは消滅長さの対数依存性を持っていた。モンテカルロシミュレーションは分析計算とよく相関していた。正規化されたイメージング深さは組織で期待されていた散乱長さの範囲 25 から 62 の  $\chi$  範囲に 4 と 5 の間の励起波長であると推定された(吸収が 776nm で最小消滅に等しい)。これらの計算は図 4(a)の破線の円形ボックスに示された実験結果と一致した。

TPM の場合と同様に、THG 顕微鏡の正規化された最大イメージング深さは消滅長さの対数依存を示し、すべての消滅長さの  $\chi$  の増加に伴って増加した(図 4(b))。実験で測定された消滅長さは  $60 \mu\text{m}$  で、対応する最大イメージング深さは 7.0 消滅長さの範囲にあると推定された。この結果は 25 から 62 の  $\chi$  の範囲のシミュレーション結果に一致した。図 4(b)から引き出されたもう一つの重要な結論は、THG 顕微鏡は全ての不均一性の数値について同じ消滅長さでの TPM 顕微鏡と比較するとおよそ 2 倍の最大イメージング深さを改善した。この結論はバックグラウンド信号を減らし、SBR 値を増やす上で 3 光子過程の影響に起因する可能性がある。

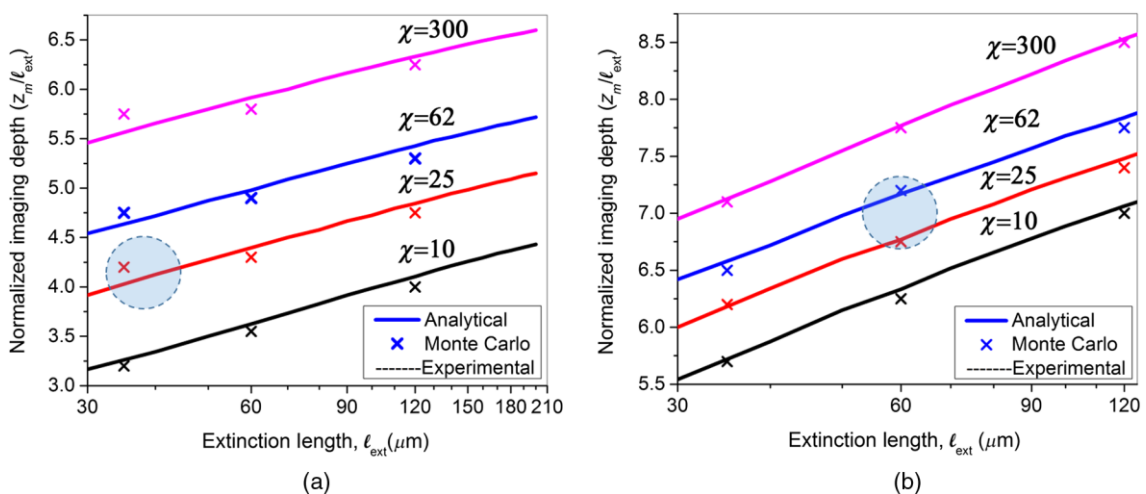


図 4 最大イメージング深さの分析と数値モデリング

(a) TPM で 776nm 励起と 515nm 放出波長と (b) THG で 1550nm 励起と 515nm 放出波長 最大イメージング深さは効率的な消滅長さ  $l_{ext}$  の関数と異なった組織不均一性  $\chi$  として計算された。消滅長さは、異なった組織の種類を表し、776nm における無視できる吸収波長と 1552nm における  $l_{abs} = 135 \mu\text{m}$  を仮定する異なった散乱長さを変える。THG の結果は消滅長さは  $120 \mu\text{m}$  より小さく、 $600 \mu\text{m}$  の最大散乱長さとも一致する(1552nm における脳組織の予測された数値)と表された。バツ印はモンテカルロシミュレーションの結果と破線の円は実験結果のおおよその範囲を示す。

### 3.4 Tissue Heating Properties During Third-Harmonic Generation Imaging

THGイメージング中に熱損傷を避けるために、組織の熱特性は赤外線サーマルカメラ (FLIR, A325SC) を使って組織表面温度を測定することで調査した。熱伝達シミュレーションは表面下の温度分布を予測するために行った。サーマルカメラの映像の鮮明な視界を維持するために、表面温度測定用の長作動距離対物レンズ (Nikon, Plan Apo, 10×, 0.3NA) を使ってレーザー光を組織表面に集光した。

これらの表面温度測定から、研究はレーザーが停止した後温度の最大値  $1/e$  に低下する時間として定義される  $\tau$  の熱緩和時間を特徴とする。このパラメーターの知識は特性冷却時間の間、異なったイメージ平面間のレーザーをブロックすることで実質的な組織加熱を引き起こすことなく THG イメージングを実行することができた。バルク組織の熱緩和時間は異なったレーザー励起状態、それは組織がカバーガラスに対して並置されていること、とレーザーは組織内で  $420 \mu\text{m}$  の最大イメージング深さにおいて4秒間集光してスキャンすることで測定される。シングルイメージングセッション (図5(a)) で測定された温度分布はイメージングパワーは  $120\text{mW}$  から  $480\text{mW}$  まで増えたように最大温度は  $1^\circ\text{C}$  から  $6^\circ\text{C}$  まで増えたと示した。表2にまとめた熱緩和時間  $\tau$  はわずか15秒ほどで変化した、そしてそれは様々な組織の種類の文献に引用された値の範囲だった。平均数値は緩和時間の簡易式を使うことで得られた14秒の推定数値と一致した、

$$\tau \sim \frac{\rho V c}{h A_s}, \quad (5)$$

そして  $\rho = 1050 [\text{kg}/\text{m}^3]$  は組織密度、 $c = 3940 [\text{J}/\text{kgK}]$  は組織の比熱、 $A_s = 9.1 \times 10^{-8} [\text{m}^2]$  はスポットサイズの範囲、 $V = 3.1 \times 10^{-12} [\text{m}^3]$  はレーザースポットの体積、 $h = 10 [\text{W}/\text{m}^2\text{K}]$  は環境空気の対流性熱伝達係数。

最大温度は温度が図れない表面下で焦点体積に近づくと予想されたので、熱伝達シミュレーションは深さ分解温度分布を推定するために実施された。数値解析は放射輸送方程式 (RTE) を使うことで組織中の強度分布を計算した。Pennes エネルギー方程式を非フーリエ減衰熱状態方程式と結合することで温度分布を計算した。非フーリエ双曲線熱状態モデルは組織の緩和時間を考慮に入れると、より正確なモデルであると以前示された。加えて、フーリエ放射線熱伝達モデルは媒体の熱関係の時間より短い時間スケールの熱伝達現象を研究しながら、実験測定値から著しくそれていることが分かった。

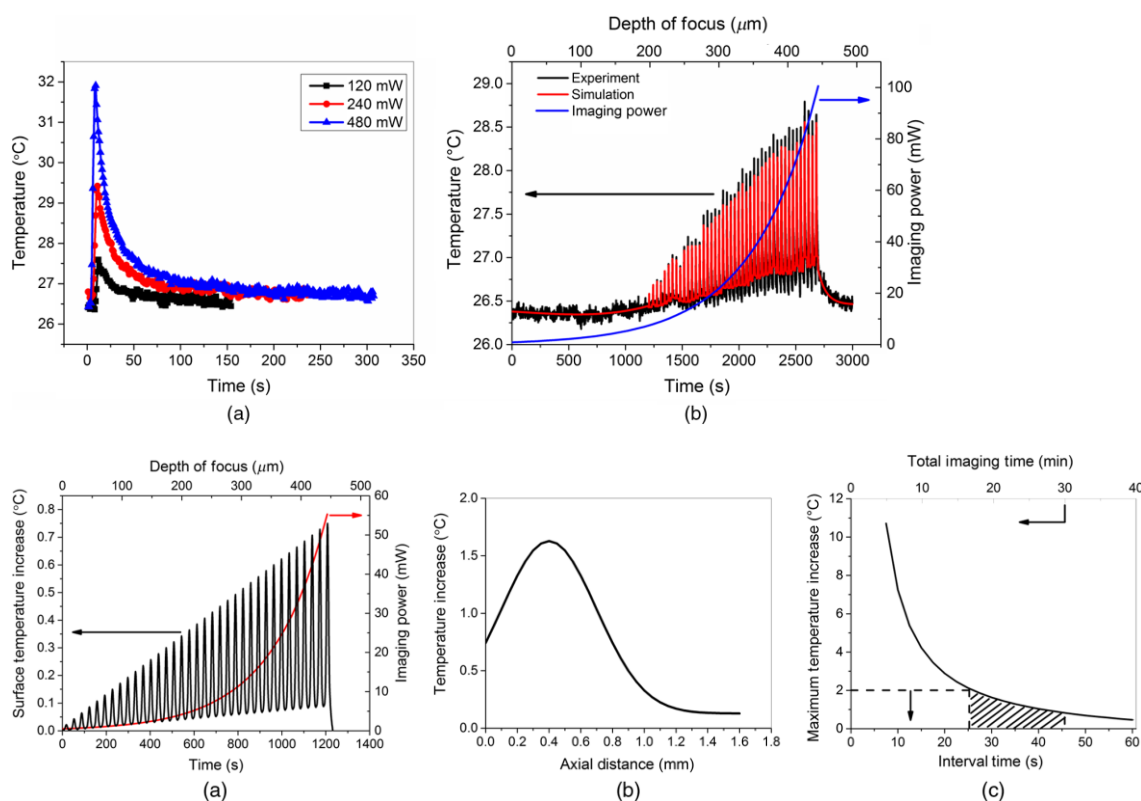
数値結果を確認するために、深さ分解 THG イメージングの持続にわたって表面温度とイメージングパワーの循環を測定した (図5(b))。組織の加熱を避けるために、2つの熱緩和期間 (30秒) のために異なったイメージ平面 ( $12 \mu\text{m}$  ステップで分ける) 間でレーザーをブロックする。測定した表面温度分布は測定したデータと一致した15秒の熱緩和時間を仮定した数値温度分布に最も関連していた。対応する結果は最初の部屋の温度から  $5.5^\circ\text{C}$  の増加を示し、最大表面温度は  $32^\circ\text{C}$  を超えないと示した。これらの結果は長作動距離対物レンズを用いて得られた、表面での  $1\text{mW}$



から420  $\mu\text{m}$ の最大イメージング深度での100mWの範囲の平均励起パワーである。この結果はTHGイメージングのための深さ分解組織温度分布を決定するための実験的および数値的な方法の両方を検証した。

この確認の後、数値分析は高NA対物レンズ(0.75NA,20 $\times$ ,Nikon)を使い、図2に示すように励起パワーは深さを変え、典型的な3-D THGイメージングに適応した。実験の期間にわたって推定される表面温度とイメージングパワーは図6(a)に示す。図6(b)は推定された深さ分解温度分布を表す。2 $^{\circ}\text{C}$ 以内での最大温度増加は420  $\mu\text{m}$ の最大イメージング深さ、それはイメージングパワーが最大(55mW)である、において生じる。この温度増加は組織成分に有害でないと思なされた。この温度モデルは線形吸収に基づいていた。焦点での一時的な温度発展において非線形吸収の影響を解明するために、Vogelと同僚のモデルが使用された。子の非線形吸収分析は単一パルスと一連パルスの両方のための0.3 $^{\circ}\text{C}$ の温度増加をもたらした。このように、非線形吸収は安全に提示熱モデルにおいて無視された。この結果は、一方が熱緩和時間を測定し、THGイメージングにおいてレーザーシャッター時間を操作することで温度上昇を制御できるかを正確に示した。

最後に、最大温度は12  $\mu\text{m}$ ステップで分けられた連続したイメージ平面間で時間の異なる指定された期間の焦点面で組織内部で推定された。30秒のインターバル時間(2回熱飽和時間)は実際に実験期間と焦点面の温度増加の観点から最適な条件を提供する。これらの条件から、実験期間は20分以内で最大温度増加は2 $^{\circ}\text{C}$ 以内だ。



#### 4 Discussion

全体的に、熱伝達シミュレーションは、1552nmのイメージングは組織への熱損傷を

避けるために異なったイメージ面間の正確な時間間隔を選択することに特別な注意を必要とすると結論付けた。組織熱の適切な管理にともなって、 $400\mu\text{m}$ の理論上の最大イメージング深さまでの重要な組織をイメージングすることができる。

原理的には、より短いパルスおよび/またはより低い繰り返し率のレーザーを使うことで連続イメージング間の熱を避けることができるべきだ。この方法を理解するために、

$$\langle I_{f3P}(t) \rangle \sim \frac{P_{ave}^3}{(\tau_p f_p)^2} \left( \frac{NA^2}{hc\lambda_{exc}} \right) \quad (6)$$

として与えられた3光子ベースの顕微鏡技術における時間平均の信号発生に影響するパラメーター間の関係を分析する必要がある。

ここで、 $I_f$ は発生非線形信号強度を表し、 $P_{ave}$ は平均レーザーパワー、 $\tau_p$ はパルス幅、 $f_p$ はレーザーの繰り返し率、 $NA$ は対物レンズの開口数、 $\lambda_{exc}$ は励起波長を表す。対物レンズ $NA$ の増加や $\tau_p$ や $f_p$ の減少によって $P_{ave}$ が低く保つことができるのはこの式から明らかである。実験条件( $\tau_p=600\text{fs}$ ,  $f_p=2\text{MHz}$ , 実効 $NA\sim 0.5$ ,)を考慮すると、 $\tau_p$ を $<100\text{fs}$ まで減少させると最大イメージングパワーは約3倍に減らすことができる。考慮すべき第2パラメーターは焦点対物レンズの $NA$ です。この波長での吸水率は高いので、水浸漬レンズを利用することは可能ではなかった。したがって、可能な限り最高の $NA(0.75NA)$ 空気対物レンズは $1552\text{nm}$ を使って深いイメージングのための唯一の選択肢だった。 $NA$ の増加は平均パワーの使用において著しい減少を供給できた。

熱を避けるために第三のオプションは繰り返し率を減らします。一方で、 $f_p$ は現実的な臨床応用のために高速イメージング速度(最低でも $1\text{fps}$ )を提供するために十分高い( $\sim\text{MHz}$ レベル)ことが求められる、もう一方で、 $f_p$ が減ることは組織熱を減らす。例えば、我々のファイバーレーザーで利用できる繰り返し率である $2\text{MHz}$ から $300\text{kHz}$ まで繰り返し率を減少させることは $P_{ave}$ を $3.5$ 倍まで減らす。実際に、 $\text{THG}$ イメージングはレーザーのパルス期間が $1.5\text{ps}$ にかわる $300\text{kHz}$ の繰り返し率においてテストされ、平均パワーの約半分は $\text{THG}$ イメージを得るのに必要で、式(6)の期待される関係と矛盾しない。しかし、減少した平均パワーが組織熱影響を減らす間、高いピーク強度においての増加は我々がより深いイメージをしたように組織で開始する光学破壊が始まった。迅速な計算は、低い繰り返し率において焦点面の流量(fluence)が $\sim 1\text{ J/cm}^2$ に達することができる $300\mu\text{m}$ の深さにおいて、組織切除を引き起こすかもしれない。 $2\text{MHz}$ の繰り返し率はこのようにイメージング面の間の冷却が組織熱を避ける一方でイメージング条件のために選択された。

同様の現象が最近の研究、それは $1045\text{nm}$ のレーザーを使ってマウスのミエリンをイメージするために $\text{THG}$ が使われた、でも観察された。励起波長においての最大イメージング深さは組織の $50$ から $75\mu\text{m}$ である2散乱長さ以下に制限があると研究でわかった。とても短く、非常に吸収し、紫外線発生波長( $350\text{nm}$ )で、浅いイメージング深さにおい

てでさえ、THG信号が発生するのに高いレーザーパワー(25から50mW)が必要で、選ばれたレーザーの繰り返し率において非線形光学破壊や組織熱依存を引き起こす。

結論として、すべての非線形イメージングモダリティのように、THG顕微鏡において、組織への損傷を避ける一方、最大イメージング深さを能率的に利用するために平均パワー、パルス幅、繰り返し率、開口数や励起波長のような光学的パラメーターとレーザーを活用する方法を理解することは特に重要だ。たとえ1552nmの励起波長が強い組織吸収を示すとしても、注意深くイメージングパラメーターを選ぶことによって、組織への熱損傷を起こさずに深い組織イメージングを作ることができる。もちろん、すべてを一緒に組織熱を避け、顕著な収集効率を有するように可視範囲内の光子を放出すると強い水吸収と $\lambda_{exc}$ を避けることができる。このように、1.3~、1.4~、または1.7  $\mu\text{m}$ の波長範囲はこの目的のためによくフィットである可能性があります。繰り返し率の関係で、所与の平均パワーのために大きなTHG信号を供給する一方、~2MHzは妥当なフレームレート(~1fps)を供給するのに十分高くあるべきだ。最後に、パルス幅はイメージング中に熱損傷と光学破壊を避けるために<100fsの安定状態に調整されるべきだ。

## 5 Conclusions

この研究の主な目的は2光子蛍光顕微鏡と比較して、THG顕微鏡を使って声帯のような組織内の達成可能な最大イメージング深さを理解することだ。実験結果は776nmでのTPMと比較すると1552nmでの励起波長においてTHG顕微鏡を使うと、最大イメージング深さは140  $\mu\text{m}$ から420  $\mu\text{m}$ まで改善したと明らかになった。この最大イメージング深さの改善は長波長を使って上げた増加した総消滅長さとthird-order processを開発した結果減ったピンボケの信号の直接的な結果だ。

この研究のもう1つの重要な貢献は、1552nm励起波長においてTHGイメージング中に熱損傷を避ける方法を理解したことだ。表面温度測定を行い、レーザーの繰り返し率の最適化や深さの関数として組織温度をモデル化することで、組織熱を避ける。組織の熱緩和時間は異なったイメージングパワーで特徴づけし、この緩和時間は深さ分解能温度分布を推定するために利用された。光と熱の組織特性が正確だと示唆し、実験的かつ理論的熱緩和時間(~15s)はお互いによく相関していた。そして、非フーリエ減衰熱伝導方程式とPennes生体熱方程式を結合することによって推定されたRTEと温度分布によって数値アルゴリズムが開発された組織内の強度分布が決定された。連続したイメージ面との間の30s間、レーザー光をシャットすることで、熱は避けられ、<2°Cの最大温度増加は組織内に保持された。このような温度制御は組織への損傷を避ける、そしてそれは1552nm波長においてのTHGイメージングを安全にした。

全体的に、効果的な熱管理でここに提示した最大イメージング深さの3倍の改善は上皮画像誘導手術のためのターンキーフェムト秒ファイバーレーザー、同様に私たちの研究で開発中の傷痕声帯治療の開発を案内する。

## References

1. G. S. He et al., "Observation of stimulated emission by direct three-photon excitation," *Nature* 415(6873), 767–770 (2002).
2. S.W. Hell et al., "Three-photon excitation in fluorescence microscopy," *J. Biomed. Opt.* 1(1), 71–74 (1996).
3. W. R. Zipfel, R.M. Williams, and W.W. Webb, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," *Nat. Biotechnol.* 21(11), 1369–1377 (2003).
4. E. Beaurepaire, M. Oheim, and J. Mertz, "Ultra-deep two-photon fluorescence excitation in turbid media," *Opt. Commun.* 188(1), 25–29 (2001).
5. N. J. Durr et al., "Maximum imaging depth of two-photon autofluorescence microscopy in epithelial tissues," *J. Biomed. Opt.* 16(2), 026008 (2011).
6. P. Theer and W. Denk, "On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 23(12), 3139–3149 (2006).
7. H. J. Koester et al., "Ca<sup>2+</sup> fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage," *Biophys. J.* 77(4), 2226–2236 (1999).
8. K. Konig et al., "Cell damage by near-IR microbeams," *Nature* 377(6544), 20–21 (1995).
9. A. Leray et al., "Spatially distributed two-photon excitation fluorescence in scattering media: experiments and time-resolved Monte Carlo simulations," *Opt. Commun.* 272(1), 269–278 (2007).
10. M. Yildirim et al., "Parameters affecting ultrafast laser microsurgery of subepithelial voids for scar treatment in vocal folds," *J. Biomed. Opt.* 18(11), 118001 (2013).
11. Z. Chen et al., "Extending the fundamental imaging-depth limit of multi-photon microscopy by imaging with photo-activatable fluorophores," *Opt. Express* 20(17), 18525–18536 (2012).
12. L. Wei, Z. Chen, and W. Min, "Stimulated emission reduced fluorescence microscopy: a concept for extending the fundamental depth limit of two-photon fluorescence imaging," *Biomed. Opt. Express* 3(6), 1465–1475 (2012).
13. D. Kobat et al., "Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation," *Opt. Express* 17(16), 13354–13364 (2009).
14. N. G. Horton et al., "In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain," *Nat. Photonics* 7(3), 205–209 (2013).
15. P. J. Campagnola and L.M. Loew, "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms," *Nat. Biotechnol.* 21(11), 1356–1360 (2003).
16. D. Yelin and Y. Silberberg, "Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology," *Opt. Express* 5(8), 169–175 (1999).
17. Y. Barad et al., "Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation," *Appl. Phys. Lett.* 70(8), 922–924 (1997).
18. M. Muller et al., "3D microscopy of transparent objects using third-harmonic generation," *J. Microsc.* 191(3), 266–274 (1998).
19. E. J. Gualda et al., "In vivo imaging of neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* by third harmonic generation microscopy," *J. Microsc.* 232(2), 270–275 (2008).
20. D. Debarre et al., "Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy," *Nat. Methods* 3(1),

47–53 (2006).

21. S. W. Chu et al., “In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy,” *Opt. Express* 11(23), 3093–3099 (2003).

22. C. K. Sun et al., “Higher harmonic generation microscopy for developmental biology,” *J. Struct. Biol.* 147(1), 19–30 (2004).

23. V. Barzda et al., “Visualization of mitochondria in cardiomyocytes by simultaneous harmonic generation and fluorescence microscopy,” *Opt. Express* 13(20), 8263–8276 (2005).

24. C. K. Sun et al., “Multiharmonic-generation biopsy of skin,” *Opt. Lett.* 28(24), 2488–2490 (2003).

25. C. K. Sun et al., “In vivo and ex vivo imaging of intra-tissue elastic fibers using third-harmonic-generation microscopy,” *Opt. Express* 15(18), 11167–11177 (2007).

26. J. M. Belisle et al., “Sensitive detection of malaria infection by third harmonic generation imaging,” *Biophys. J.* 94(4), L26–L28 (2008).

27. M. J. Farrar et al., “In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy,” *Biophys. J.* 100(5), 1362–1371 (2011).

28. N. Olivier et al., “Harmonic microscopy of isotropic and anisotropic microstructure of the human cornea,” *Opt. Express* 18(5), 5028–5040 (2010).

29. S. P. Tai et al., “In vivo optical biopsy of hamster oral cavity with epithird-harmonic-generation microscopy,” *Opt. Express* 14(13), 6178–6187 (2006).