

イントロダクション

近年, 第二高調波発生(SHG)や蛍光顕微鏡を含む非線形光学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, 現状の非線形光学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プローブ化[1,2]の必要がある. もし, ファイバー内視鏡のような構成の非線形光学顕微鏡が実現できれば, その実用性は大きく向上し, 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 Large field of view MEMS-based confocal laser scanning microscope for fluorescence imaging

1.1 イントロダクション

蛍光共焦点レーザー走査顕微鏡 (F-LSM) は, 基本的な生物学的および医学的研究において広く使用されていると同時に強力なイメージング技術を有する. 光広視野顕微鏡とは対照的に, 共焦点蛍光顕微鏡はいくつかの利点を提供する. 効果的にフォーカス光のうち抑制することにより増加した深さ分解で厚い試料の蛍光イメージングを行うことを可能にする. この能力による選択的, 非侵襲的に皮膚の断面を調査する F-LSM は皮膚科診断において有望なツールであることが証明されている. このイメージング技術は, 定性的に動的皮膚プロセスを評価し, *in vivo* および瞬時局所的に対象物の分布などの研究を行うことができる. 測定に必要なのは, 蛍光試料剤の付加のみであるため, 生検の減少につながることもかかわらず, この技術はこれまでに医療実践が行われてこなかった. この要因には, 高コスト, システムの大きさが問題となっている. 細胞イメージングの解決に適切な省スペースと適度な広視野が皮膚科の診断において望まれる.

F-LSM のいくつかのアプローチの小型化を達成するために過去 10 年以内に追求されてきた. 中でもファイバースキャンニング内視鏡は顕著な例であり, これらの内視鏡は, 人体や局所的な制限された視野内の *in vivo* イメージングのために設計されている. しかしな

がら、皮膚科学において広視野に高い関心がある。2次元 MEMS ミラーを用いることにより、広い視野のイメージングが可能となり、小型化も可能であるため携帯型システムへの応用が期待されている。

本稿では、横方向および軸方向の解像度だけでなく、検出器に到達する蛍光光子の数なども考慮し、選択されたコンポーネントとの関係を設定した。さらに我々は、波面収差などのパフォーマンスへの影響を詳細に分析した。予測された性能と実際のイメージにおける生体試料への適用性を実証するために、デモシステムで撮影されたイメージを示した。

1.2 システム設計

使用する MEMS ミラーは、ミラー径 $D=2\text{mm}$ で、それぞれ、低速および高速軸に 200 Hz から 1.336kHz の共振周波数で速い走査速度を維持する。一緒に最大走査角度 $\phi=\pm 5^\circ$ でリサージュパターンがスキャンされる。コリメートビーム径と組み合わせたこれらの仕様は、画素当たりの総点灯時間と解像スポットの最大数に大きな影響を与える。ガウスレーザービームの変化出現の決定要因は、開口対ビーム半径の比(式 1)。範囲内の開口対ビーム半径であっても特性の変化は遠視野では弱い回折のために発生する

$$1.6 < \frac{r_{eff}}{r_0} < 3$$

ここで r_{eff} は開口半径を表す、 r_0 は開口面における $1/e^2$ 強度ビーム半径である。これらのケースでは、ビームは遠い領域ではサイドローブが現れる。幾何学的制約のため、入ってくる光とミラーの法線面で囲まれた最小角度 $\alpha=30^\circ$ 、有効ミラー径であるため、開口部減衰を考慮すると

$$D_{eff} = \cos(30^\circ) D = 1.73\text{mm}$$

ガウスビームを確保するために、後で述べるが後続のリレー光学系を最小限にするために、 1.1mm のビーム径を決定した。これは、開口部の対ビーム半径に相当し

$$T = \frac{r_{eff}}{r_0} = 1.6$$

スキャナ用の解像スポットの数 N は、全光走査角 θ の 2 倍の 2ϕ の合計ミラー走査角度比および、与えられた分解可能な最小スポットサイズによって与えられる

$$\Delta\phi = k\lambda \frac{1}{D_{eff}}$$

ここで、 k は $\pi/4$ に等しい開口形状係数を示す。このように、解像スポットの総数 $N\theta$ はミラー用 θD -積に比例し、光の波長に $\lambda \text{em}=520\text{ nm}$ および開口形状係数 k に反比例する：

$$N_\theta = \frac{\theta D_{eff}}{k\lambda} \approx 990$$

直接相関 $N\theta$ 数の解像スポット画素滞留時間である。共振型 MEMS ミラーの正弦波運動のために、スキャンの中心画素点灯時間(最も停滞時間が短いため必要)は次式で与えられる。

$$t = \frac{1}{\pi f_{fast} N_{\theta}} = 2.4 \times 10^{-7} s$$

高速軸 1336 ヘルツの走査周波数を表す。この画素滞留時間後に見られるように、検出のために利用可能なプロトン数に大きな影響を与える。

顕微鏡対物レンズは、蛍光試料に照射ビームを集束放射される蛍光のフラクシオンを収集し、走査ユニットに戻る。蛍光アプリケーション用の顕微鏡対物レンズの重要な光学特性は、所定の波長に対する回折限界の光学系の解像限界を決定する開口数 (NA) である。より大きな NA は、蛍光標本によって放出される光のより高い画分を収集することを可能にする。三次元計測を含む生物学的用途の分野でさらなる重要な要件として、加えて、合理的な作動距離、色収差補正、高透過率が必要となる。特に重要であるのが、色補正が原因で、蛍光試料の励起及び発光波長の違いが生じることである。我々は焦点距離 $f = 10\text{mm}$ 、作動距離 $WD=1\text{mm}$ の $NA0.75$ 、 $20\times$ を決め、これらの要件を考察した。達成可能な $NA = 0.75$ の対物レンズは、以前取り組んだの $NA = 0.4$ よりも大きく、3次元セクショニングを実行するために十分である。 $NA=0.4$ のスポット半径 ω_0 とレイリーレンジ Z_R (焦点深度) は

$$\omega_0 = 0.5k \lambda_{ex} f / \# = 0.49 \mu m$$

$$Z_R = \frac{\pi}{\lambda_{ex}} (\omega_0)^2 = 1.54 \mu m$$

これを達成するためには 7mm のミラー直径が必要であった、これは客観的な瞳の下に充填で効果的になる。その結果、中間光学系で 1.1mm の直径の照明ビームを 7mm まで拡大するために、少なくとも 6.4 倍のビーム拡大率を提供しなければなりません。 $M=7$ の倍率で視野は

$$d_{im} = 2f \tan\left(2\frac{\phi}{M}\right) = 500 \mu m$$

の直径を持つように与えられている。ここで、 ϕ は走査角 5° を表す。

1.3 光学設計

生物学的用途に適した性能を持つポータブルおよび低コストの走査顕微鏡を開発するような問題のために、最小限のスペースおよび市販の構成要素の使用率などの設計プロセスのいくつかの制約を、設計・適用しました。最適な配置を達成するために、ソフトウェアを用いて光学装置のシミュレーションを行った。設計と光学系の分析で、ビームは異なる視野角および波長に対して対物レンズの射出瞳の中間光学中のミラーを介して平面に無限遠からのため追跡しました。顕微鏡対物レンズは、通常、非常に良好に補正レンズであるので、対物レンズを 10mm の焦点距離を持つ理想的なレンズとしてモデル化される。波長は、それぞれレーザーの 488nm および蛍光発光波長の 520nm に応じて選択した。

最終的な最適化および分析の段階では、[ストレール比](#)は、性能指数として用いた。レイリー基準によれば、回折限界性能が $\pi/4$ よりも小さい波面収差の山から谷までの値に対応するストレール数より大きい 0.8 で与えられている。同図に示すように Fig.4b は、ほぼ回折限界性能をフルフィールドの上に与えられている。

また、Fig. 4a の対応する点広がり関数 (PSF) は 10deg の最大角度のためのスポットサイズは $1.2\mu\text{m}$ 程度であることを示している。これは $6\mu\text{m}$ の直径を有する画像の細胞核へのシステムの能力を実証する。生物学における細胞イメージングのために、この光学配置は適切なツールある。

より密接な光路差 (OPD) は、異なる視野角のために、[Fig.5a](#) にプロットされているシステムに存在する わずかな異常を調べる。これは、より大きな視野角のためのコマ収差が幾何学で支配的な収差であることは明らかである。主な理由は、スキャンレンズの前の MEMS ミラーの配置による特定のリモート停止位置である。これは、[コマ収差](#)、[ディストーション](#)および[倍率色収差](#)を低減するために役立つであろう励起光における光学系の対称性を排除する。選択したヘイスティングストリプレットは無染色の用途を目的としているという事実とは、「ピンクッション」歪み、倍率色収差や球面収差の低減を重視して設計されている。適度に平坦なフィールドが要求されたときにコマ収差及び球面収差の同時補正は残念ながら、この場合には不可能である。したがって、私たちは球面収差の補正よりも高いコマ収差に対処する必要がある。我々の場合には、球面収差の補正が不要であったにもかかわらず、これは増加していた。その理由は、適切な値に球面収差を保持する走査レンズの焦点距離に比べて相対的にビーム径が小さいためであると考えられる。本システムの重要な別の特徴は、走査レンズによる比較的短い焦点距離の像面湾曲である。

このシステムは $1.8\mu\text{m}$ の像面湾曲を有しているが、ピンホールの設置により、大幅に画質に影響を与えることはない。合計ではこれらの収差は、最大走査角度を $\pm 10^\circ$ 制限する。 10° の画角の最大スポットサイズは、直径で約 $1.2\mu\text{m}$ である。

結論として、この設計は細胞イメージングの対処アプリケーションの直径 0.5 ミリメートルの視野全体にわたって十分な性能を示すことが期待される。

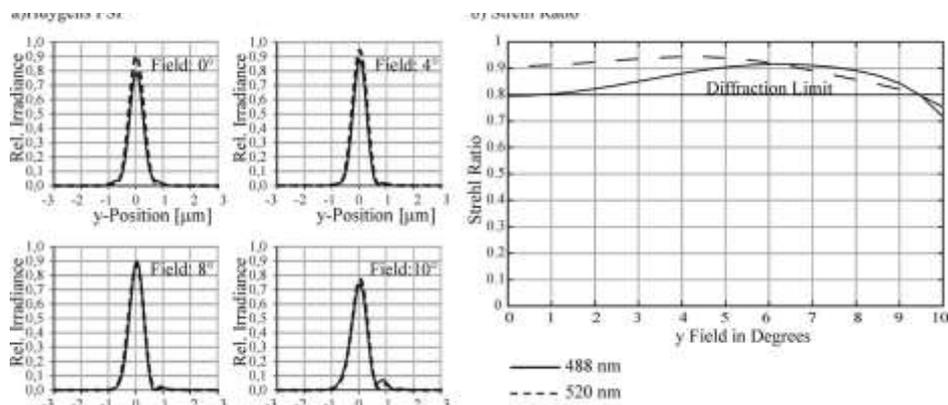
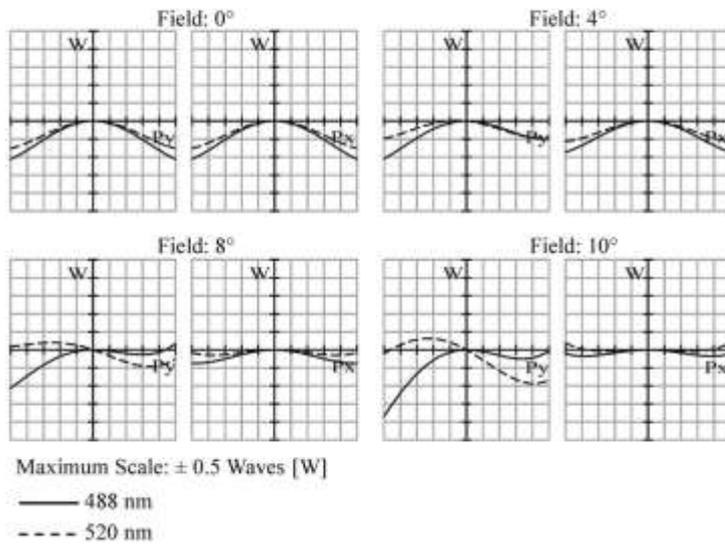


Fig. 4(a) and (b)

a) Optical Path Difference



b) Field Curvature

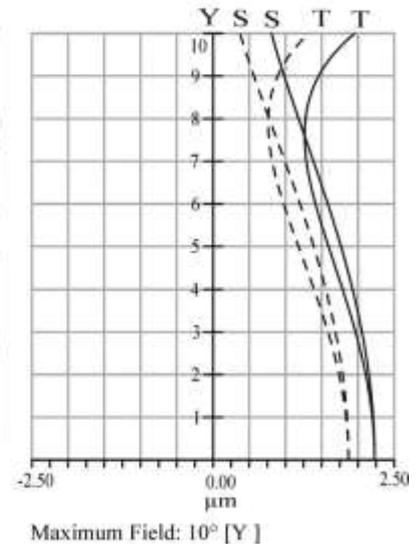


Fig.5(a) and(b)

1.4 実験装置および実験結果

セットアップの CAD モデルと最終デモシステムを Fig.7 に示す. 集積電子モジュールを有するラップトップ, リモート接続された電源及び制御ユニットと顕微鏡システムを示す. 光源には, 中心波長 488nm が用いられ, この波長は, 典型的には, フルオレセインの励起のために使用されるので, 照明のために 488nm の波長のレーザーは, 設計プロセスで使用される. レーザー光は, シングルモードファイバに結合し, 続いてディスタルエンドにコリメータによりコリメートされます. 二軸 MEMS ミラーでビームが二方向に角度的に偏向する. リレー光学系, 走査レンズと結像レンズとからなるレーザービームと画像顕微鏡対物レンズの入射瞳における走査ミラーを拡張する. 焦点面内の焦点の横方向の動きが達成される入射瞳の充填ビームの角運動に基づき, 励起されたフルオロフォアによって放出される光の一部が対物レンズによって収集され, 元の光路に沿ってデスキャンする. 最後に, 蛍光がピンホール上に集束される前に, ダイクロイックミラーによって励起光から分離される. 検出のために, アバランシェフォトダイオードは, ピンホールの後方に配置され, 画像は, 測定強度と位置の情報を相関させることによって再構築される.

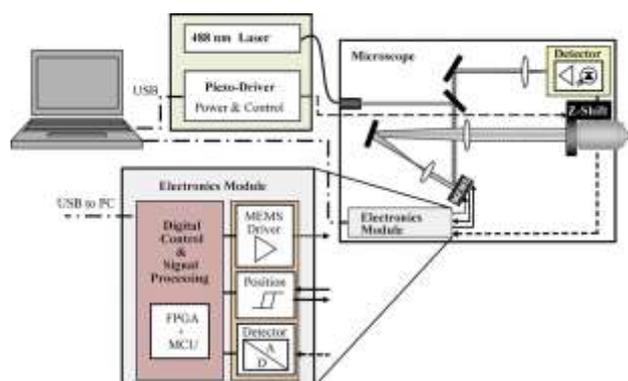


Fig. 7 setup

顕微鏡の分解能測定のため、テストターゲットは、蛍光基準スライド上に置き、イメージングを行った。これらの蛍光スライドはプラスチック製であり、連続的な蛍光の場を提供する。この TC ではグループ 7 の最小要素が $2.2\mu\text{m}$ の線幅に対応し、228 ラインペア/mm を持っている。この画像内に存在する円錐形の歪みは、MEMS ミラーの通常の表面に入射するレーザービームの角度から生じる周知のアーチファクトである。この歪みは、後処理によって補正することができる。

蛍光染色されたスズランの「厚い」の生物学的サンプルを用いて、イメージングを行った。容易に分かるように細胞のみの 1 層に結像されており、図中の画像の深さの差は $3\mu\text{m}$ であり、したがって深さ分解能が明らかである。これらの画像は有望であり、解像度が細胞イメージングのために実際に十分であることを示している。

Cross-sectional images of a Convalaria sample

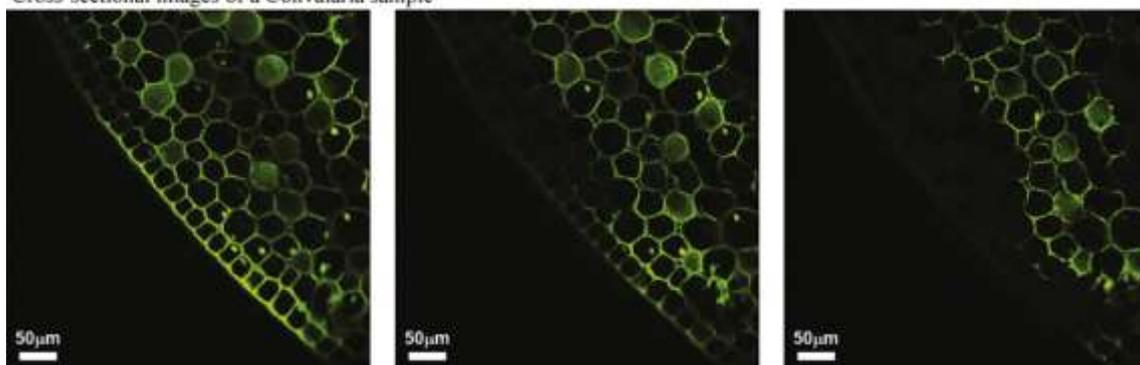


Fig.9 Cross-sectional images of a Convalaria sample with depth differences of $3\mu\text{m}$.

1.5 まとめ

共焦点蛍光レーザー走査型顕微鏡は、広く生物学的および医学的研究に使用されている。選択的に「厚い」サンプルからの個々の層の断面を調査する能力は、皮膚科診断における有望なツールにもなり得る。本稿では、コスト集約的で複雑な実験室システムかつ、小さ

い視野の問題を解決した共焦点レーザー走査型蛍光マイクروسコープを開発した。我々は、設計のための光学部品相互関係を示し、検出経路における光子損失も含め全体としてのパフォーマンスへの影響を議論した。より詳細な分析では細胞ベースの蛍光測定の要件を満たすことが見出された。最初の測定は、それぞれ $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ の視野と、 $2.2\mu\text{m}$ の横方向および $3\mu\text{m}$ の軸方向の分解能を示している。我々は既製のコンポーネントとケージシステムで低コストの共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を実現する可能性を示している。次のステップは、ハンドヘルド顕微鏡システムにこのデモの設定を適用することである。

② Design and implementation of fiber-based multiphoton endoscopy with microelectromechanical systems scanning

2.1 イントロダクション

多光子顕微(MPM)は高解像度で厚い生体組織の非侵襲的イメージングのための重要なツールである。MPM は、同時に細胞および細胞外マトリックス構造の画像と区別することができる。従来、MPM システムは主に自由空間光学系および顕微鏡のプラットフォームを使って開発されてきた。in vivo イメージングおよび臨床用途のため、光ファイバーを介したミニチュアプローブを用いてイメージ取得が可能な光ファイバーMPM の内視鏡が望ましい。ファイバーを介したフェムト秒パルス供給と小型の走査プローブを設計することがMPM 内視鏡検査における2つの課題である。フェムト秒パルスは、DCPCF ダブルクラッドフォトニック結晶ファイバーやシングルモードのコアによって送達され、他のグループは、フェムト秒パルス供給とMPM 信号収集のための独立したマルチモードファイバ用の中空コアフォトニックバンドギャップファイバPBFを使用している。

微小電気機械システムのMEMSアクチュエータやミラーを含むマイクロデバイスを実現することが可能な新技術です。最近では、2次元MEMS スキャナを使用したMPM プローブが示された。しかし、それらのMEMS スキャナは、電気駆動であったため走査速度は数百Hzの遅い共振周波数であった。

本稿では、多光子内視鏡は、MEMS ミラーとDCPCFにより開発され、さらなる高分解能を目指し、GRIN レンズおよび非球面レンズの2種類のレンズを用いて、3通りの構成を構築し、その性能を比較した。コリメートレンズおよびフォーカスレンズの2種類のレンズを用いた構成は、最適なイメージングとパッケージングの柔軟さを提供する。

2.2 設計およびセットアップ

本研究で使用されるジンバルレスMEMS ミラーは、ミラー径2mmでアルミコーティングされ、MPMのため、高解像度・効率的な光子収集要件を満たすように設計されている。

大きいミラー径で、高速かつ広い走査角を実現するためにはMEMSの設計に特別な設計が必要となる。我々のMEMS ミラーは、ジンバルレス設計を使用している。ジンバルレス設計は、同等に速い走査速度が両方の軸について達成されることを可能にする。この構造は低速軸の問題だけでなく、電氣的・機械的クロストークを排除する。MPMの内視鏡検査のために設計されたMEMS ミラーは、ミラー開口部は25 μm の厚い補強トラスと240 μm の背の高い台座でサポートされている。1~5 μm の薄いミラー膜からなる低慣性の単結晶シリコン構造で構成されている。薄いミラーは、高速スキャンのための最小限の慣性を提供し、背の高い台座は、広い走査角度に対応している。Alコーティングされた鏡面開口部は80%の高反射率を提供する。これにより、MPMの内視鏡検査のために最適化することができる。

MPM の画像解像度は、フォーカスレンズの集光能力と、どれだけレンズ背面開口部にレーザービームが充填されるかによって決定される。レーザービーム径が十分に小さくなく、レンズがアンダーフィルされた場合、内視鏡の解像度が低くなる。したがって、レンズの後部開口部に大きなビーム径を最適に小さな焦点までの光を集束することが必要である。識別可能な焦点の最大数は、

$$N = \frac{\theta_{max}}{\delta\theta} = \frac{\theta_{max}D}{1.22\lambda}$$

で表される(ここで、 θ_{max} : 最大走査角, $\delta\theta$: MEMS 回折パターンの ローブ半値角, D : MEMS ミラー径). MEMS ミラーの直径は 2mm, 最大走査角はミラー台座の高さに依り、20deg であるため、識別可能な焦点の最大数は 720*720 である。

フェムト秒パルスは、ピーク励起パワーに依存する二次非線形信号である TPEF と SHG 信号を励起するために必要とされる。しかしながら、光ファイバー内を伝搬しピコ秒パルスまで広がり得るとき、フェムト秒パルスは激しい色分散を受ける。これにより MPM 信号の励起効率を低下させる。したがって、分散および分散補償の適切な実装の管理は、MPM の内視鏡の設計において重要な問題である。

ここでは、ファイバーの 3 つのタイプがテストされ、それらの伝搬特性が特徴付け標準シングルモードファイバ (SMF), 中空コアの PBF, および DCPCF は、すべて 800 nm の波長で動作するように設計した。ファイバーを試験するために、12-fs のパルス幅と 100 nm の帯域幅 (Femtolasers) の光源が使用された。Fig.3 は以前、自己相関分光計により測定したファイバーを通して伝播した後のパルス幅とスペクトルを示す。Fig.3a および 3b は、レーザーから直接測定したデータを示す。パルス幅はこの場合、12 fs は正確に干渉縞の数で超短パルスの幅を測定することができるインターフェログラムの自己相関に示されている。レーザー帯域幅は 100nm であることが示されています。Fig.3c および 3d は、1.3m の SMF を介して伝搬した後のパルス幅とスペクトルを示す。広がったパルスの強度自己相関を測定した。Fig.3c は、パルスが 0.09ps/ nm/m の分散係数に対応する 12 ピコ秒に広がっていることを示しています。スペクトルがシフトし、短波長側に広がりを示しており、帯域幅はわずか 110nm まで増加します。この現象は、おそらく 1.3m の中空コア PBF を通って伝搬した後にパルス幅とスペクトルを示す Fig.3e は SMF における非線形効果によって誘導される。パルス幅は 0.005ps / nm/m の分散係数に対応し、0.7ps に広がることを示されている。予想されたように、ほとんどの光が中空コアを伝播するため、中空コアの PBF は、SMF よりも 20 倍低い分散を示す。しかし、スペクトル帯域幅は、低損失伝播の狭い窓により 60nm に縮小される。DCPCF には、SMF として動作するソリッドコアとマルチモードファイバとして機能する構造化空気孔の内側クラッドがあり、フェムト秒パルスは伝播開始時、シングルモードコア内を伝播する。したがって、パルス伝搬特性は SMF に類似している。

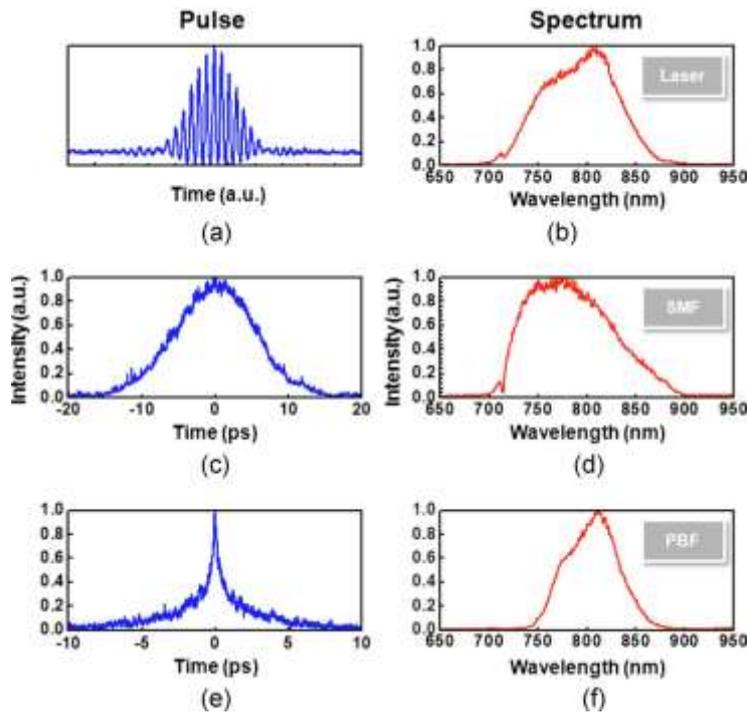


Fig3

MPM 信号の励起効率を分散，パルス広がりの影響を受けている間に，励起された MPM 信号の収集効率はファイバーの開口数 (NA) によって影響されます. SMF は，モードフィールド径は $5\mu\text{m}$ で，NA は 0.13 です. 中空コア PBF の場合，モードフィールド径も $5\mu\text{m}$ で，NA は 0.2 です. DCPCF については，シングルモードコアは，0.04 の NA および $16\mu\text{m}$ のモードフィールド径を有し，およびマルチモード内側クラッドは直径 $160\mu\text{m}$ と 0.6 の NA を有す. DCPCF は，高 NA のファイバーと内側クラッドの大径(外側クラッド)の二種類の構造により MPM 信号を収集することができるので，収集効率をより高くすることができます. ファイバー長は，内視鏡のような 1~2 メートルである場合，SMF と DCPCF における信号の減衰はごくわずかです. しかし，信号の減衰は 800nm の中心波長~ 90nm の狭い波長範囲のためにのみ設計されている中空コア PBF はシビアになり得る. その低損失ウィンドウ内で，減衰は 0.3dB/m であるが，窓の外では減衰が急激に増加する. したがって，このような 800nm の波長で励起された TPEF($450\sim 650\text{nm}$)および SHG (400nm) のような短波長の信号の SMF よりもはるかに高い損失を有す. 収集効率を高めるために，ダブルクラッドファイバは，いくつかのグループによって使用されている. フェムト秒パルスは DCPCF のシングルモードコアを伝播でき，コアおよび内部クラッドの両方が MPM 信号を収集することができる. よって，コアと高 NA 内側クラッド (NA=0.6) の両方の光を収集することによって収集効率を大幅に増加させることができる. DCPCF の大きなコアサイズもファイバー内部の非線形効果を最小限に抑えることができる.

本稿の MPM のプローブ設計では，その高い収集効率の DCPCF を選択した. DCPCF

から分散は格子対によって補償することができる。分散を最小化するために、Ti: サファイアレーザー(170fs のパルス幅と 10 nm の帯域幅)を使用しています。1200 本/mm の金被覆回折格子対を利用し分散前補償部を構成している。図 4 は、分散前補償なしの 2 メートルの長さの DCPCF を伝搬した後、分散前補償に伝搬後、それぞれ同じファイバーを経由するが、レーザーの直後に測定された光パルスを示している。これからわかるように、パルス幅が 170 fs である。全く分散前補償が適用されていない場合の分散は 2.5ps にパルスが広がる。ファイバー後にフェムト秒レジームにパルス幅を圧縮するための、回折格子対は、分散を予め補償するために、ファイバーの前に挿入されている。パルスは、格子プリチャープユニットとファイバー端で 200fs に圧縮され、戻る。プリチャープユニットのスループットは 60%であった。

プローブデザインは、GRIN レンズと DCPCF の使用により、多様な選択性を持つ。Fig. 0 に異なる 3 つの構成を示し、これらの長所と短所を比較する。NA・視野・解像度の情報をサンプルイメージの取得により実証した。

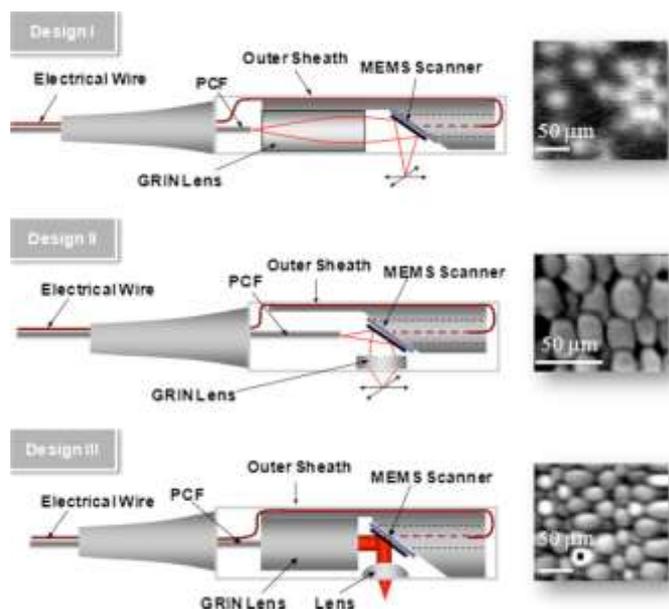


Fig.5 Probe design

デザイン I は最もシンプルなケースです。このデザインの長所は、アライメントの簡単さとパッケージングの際のサイズ効率が良いということである。しかしながら、この設計では、サンプルに到達するためには、長 WD(動作距離)のレンズが必要となり、その長 WD が分解能の低下をもたらす。

デザイン II は、MEMS ミラーの後に GRIN レンズを配置した。サンプルとレンズの距離を近付けることができるため、WD を短くすることができたため、分解能の問題を解決でき、2 μ m 程度まで改善された。しかしながら、単レンズを使う場合は、ファイバー出口-GRIN

間の距離および GRIN-サンプル間の距離は制限され、MEMS ミラーを含めた調整を考える場合、フレキシブルさに欠ける。また、MEMS ミラーと GRIN レンズ間ではビームは発散しているため、走査可能な領域が制限される。また、ファイバーと GRIN レンズとの間の距離も、ガウシアンビームの伝搬に基づいて、ビーム径に影響を与える。そのため、視野は小さく($\sim 100\mu\text{m}$)、最適化が困難となる。

デザインⅢは、GRIN レンズによりファイバーから照射された光がコリメートされている。コリメートされた光は 45° に配置された、MEMS により垂直に反射される。名目上、ラスタースキャンにて走査されるが、デュアルタイム(リサージュスキャン)または一定速度走査(ラスタースキャン)のいずれかを選択しても良い。MEMS ミラー後のレーザービームは非球面レンズにより小さなスポットで集光される。この設計では、GRIN レンズと非球面レンズ間のビームがコリメートされているため、MEMS 後のビーム特性を変化させることなく距離を変えることができる。これによりプローブ内の設計が独立して変更させることができフレキシブルさを有する。解像度は $2\mu\text{m}$ であり、かつ $200\mu\text{m}$ の視野が実現された。プローブは、外側直径 1cm 、長さ 14cm であり、このサイズは主に MEMS ミラーおよび集束レンズを保持するために使用される機械的なハウジングによって制限される。

2.3 実験結果

セットアップを Fig. 7 に示す。光源には、Ti:S レーザー(790nm 、バンド幅 10nm 、パルス幅 170fs)を用いた。 1200line/mm のグレーティングペアで分散保証されたビームは低 NA 対物レンズ($\text{NA}=0.1$, $5\times$)にてファイバコアへのカップリング効率 30% でカップリングされ、プローブに入射される。サンプルより帰ってきた光は、ダイクロイックミラー(550nm)によって、基本波と発生光に分けられ、蛍光は PMT により検出される。

取得されたイメージを Fig.8 に示す。サンプルには、ウシ膝軟骨が用いられた。イメージには楕円形の小孔と軟骨細胞が見られる。多光子内視鏡で鮮明に観察された。 $128*128$ ピクセルで取得され、XY 軸に印加される電圧は $0\sim 90\text{V}$ により調整される。周波数は、 64Hz および 0.25Hz で走査された。このフレームレートは、多光子蛍光が低信号であることにより制限されている。現在の解像度はまだ最大限に達していない(分解能 $2\mu\text{m}$)。考えられる理由として、非球面レンズの焦点距離が長いこと、フォーカスレンズの色収差が高く、かつ MEMS ミラーの開口部を完全に照らされていないことが挙げられる。

今後、焦点距離の短いアโครマティックフォーカスレンズを用いることにより、分解能を $1\mu\text{m}$ 程度にまで改善できると考える。

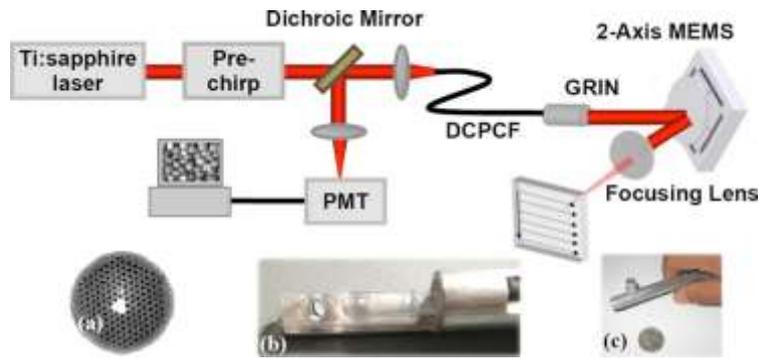


Fig.7 Setup

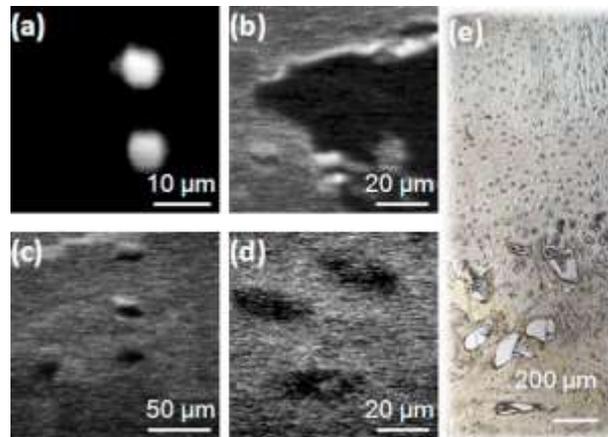


Fig.8 MPM images

2.4 結言

2軸ジンバルレスMEMSスキャナとDCPCFを用いた内視鏡MPMシステムを設計した. 3種のファイバーの性能を比較し, DCPCFのパルス伝播能力, 高い収集効率などを実証した. また, 3つのプローブの設計を比較し, コリメートおよびフォーカスレンズを用いた最適な結像性能およびパッケージングの柔軟性を提供する構成を見出した. これらの適切な性能を持つデザインを用いて, 蛍光マイクロスフェアおよびウシ膝関節軟骨からのMPMの画像を取得し, MPM内視鏡の実用性を実証した.

③ Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors

3.1 イントロダクション

線維芽細胞および他の組織の細胞のクロール運動は、それらが付着するオブジェクトと材料の収縮牽引力の働きから結果付けられる。この牽引力および再編成コラーゲンの配向は、比較的大規模な解剖学的構造を形成するために、他の形態形成の重要な機能を果たす。これらの細胞牽引力は細胞質アクチンとミオシンのネットワークによって生成されることが知られているが、多くは、これらのアクトミオシンネットワークの組織と収縮状態を制御するメカニズムについて長年、研究されている。

それは、組織、細胞の運動性のいくつかの制御役割を果たしているとして、[微小管](#)は関与している。：微小管脱重合薬は運動している細胞の方向性の損失または極性、リンパ球におけるレクチン誘導性のキャッピングを促進するために、コラーゲングル中に懸濁ニワトリ胚細胞の短縮させる神経成長の後退を引き起こすことが示されている。リンパ球および3T3細胞内とアクチン中毒薬によって、レクチン誘導性のキャッピングを促進し、このキャッピングの阻害を低減する。本研究では、微小管が牽引力の発揮によりどのような役割を決定するかを解明するために行われた。

3.2 実験手法

実験サンプル

C3H10T1/2 マウス胚線維芽細胞を、10%ウシ胎仔血清、100unitsml⁻¹ ペニシリン、100 μgml⁻¹ ストレプトマイシン、および 7-5mM-Hepes を補充したハンクス塩イグレル MEM で培養した。細胞をトリプシン-EDTA 溶液で短時間処理により組織培養フラスコから除去し、カバーガラスやシリコンゴム基質のいずれかの上にプレーティングした。細胞は、プレーティング後 1~5 日の実験に使用した。

ハリスらによって記載されるようにシリコンゴム基材を作製しました。30000センチポアズ (1 poise =10⁻¹Pas) の薄い層でシリコン流体はカバーガラス上に広げられ、約 1 秒間火炎滅菌された 35mm のペトリ皿に配置した。細胞を、ゴム基質で上に 0.5 ml 直接播種した。細胞が付着した後、medium 3.0ml を注意深くディッシュに加えた。

タイムラプス画像

シリコンゴム基板前および種々の薬剤を添加した後の細胞の挙動は、オリンパス倒立顕微鏡に取り付けられたセージタイムラプス装置を使用して、コダックプラス-X リバーサルフィルムに記録した。フレームは、1 分間隔で採取した。温度をセージエアカーテンインキュベーターにより 37°C に維持した。

蛍光画像

F-アクチンの単一標識：細胞をカバーガラス上で増殖させ、室温で 10 分間、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3~7%ホルムアルデヒドで固定し、洗浄し、次いでローダミンとファロイジン、F-アクチン (Molecular Probes, Eugene, OR) で特異的に結合するキノコの毒素(微小管阻害薬)とともに 45 分間 37°Cでインキュベートした。

アクチンおよびチューブリンの二重標識：ガラスカバースリップ上で増殖させた細胞を、PHEM 緩衝液中の 2%ホルムアルデヒドおよび 0~1%のグルタルアルデヒド (60mm のパイプ, 25mM Pipes, 5-10mM-EGTA の混合物中 10 分間室温で固定した。そして 1mM の $-MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、および 2 分間 PHEM 緩衝液中で 0-5%の Triton X-100 で抽出した。カバーガラス、 β チューブリンを認識したモノクローナル抗体を用いて 37°Cで 1 時間インキュベートした。これは、ローダミン結合ヒツジ抗マウス抗体を加えた。NBD-ファラシジンの混合物を 1 時間インキュベーションした。カバーガラスを gelvatol または MOWIOL のいずれかで、顕微鏡スライド上にマウントして、落射蛍光のためにツァイス IM-35 倒立顕微鏡の対物レンズを装備したツァイス 63x, NA=1.4 用いて調べた。

3.3 実験結果

シリコンゴム培養基質を使用して、線維芽細胞の収縮は、培養培地への微小管阻害薬剤の添加後のタイムラプス撮影によりモニターした。コルセミドは、ノコダゾールおよびビンブラスチンは、それぞれ異なる濃度の範囲で培養物に加えた。得られたタイムラプスフィルムは、これらの薬剤のすべての 3 つは、それらがゴム基層に及ぼす収縮力の強度を高めるために、線維芽細胞を引き起こすことを示しています。細胞収縮性の強化は、このゴムシートのしわのサイズと数の顕著な増加として表示される (図 1)。これらの増加は、薬物の導入後 3-5 分以内に目に見えるようになりました。これは、基層しわでこれらの増加は、細胞 - 基層接着に作用する正味の収縮力の増加を表していることに留意する。後述するように、正味の力のこの増加は、アクチンの収縮の実際の強化から、または任意の内部押す力の弱体化のいずれかから生じる可能性が発揮される細胞質アクチンの収縮を相殺するように作用する。

微小管脱重合薬によって増加した収縮力のこの刺激は、研究線維芽細胞のタイプのすべてで観察されました。ニワトリの心臓およびラット歯肉、および確立されたライン IMR-33 (スナネズミ線維腫) および C3H/10T1/2 (マウス胚線維芽細胞) の細胞のこれらは、初代培養(継代数 P0)。これらの線維芽細胞のすべての応答が実質的に同じであったが、特に断りのない限り、以下の説明では、細胞株の C3H/10T1/2 (マウス胚線維芽細胞) に特異的である。微小管阻害薬によって引き起こされる収縮の相対的な増加を定量化する手段として、測定は、薬物治療の連続した段階で、シリコンゴム基層で生産しわの総合計した長さの (タイムラプスフィルムから) 行われた; 4 つの例で、しわの増加が広がり緩やかに続いて、増加は、細胞の収縮を関与する 3 つの中で発生し、この拡散の多くの場合、ゴムシートの再

しわを伴っていた。

微小管阻害薬の効果を妨害するタキソールの能力も調べました。細胞は、最初に長期間（6-15時間）のためのタキソールでインキュベートし、次に 5/ Ugm1 へのノコダゾール（タキソールの継続的な存在で）で、他の実験では、1 ml のコルセミドで灌流した。これらの細胞は、コルセミドまたはノコダゾールに反応して収縮性の明らかな変化を受けない。しかし、タキソールを含む培地プラスノコダゾールは、媒体がノコダゾール単独で含有することを、洗い出しと交換した際に、細胞収縮性の顕著な増加は、30 分以内に見られた。このように、微小管安定化薬物タキソールは、それ自体で、減少も細胞収縮性の増加も原因となるが、それ以外は微小管阻害薬によって引き起こされる細胞収縮性の増加をブロックする。

細胞は、14-16 時間 10 μ m タキソールで処理し、次いで固定し、チューブリン及び F-アクチンのための蛍光プローブで染色した。このような細胞は、細胞の中心に集中して、多数の密に充填された微小管を含有していた。これらの微小管は、細胞質の薄い、周辺領域から除外されるように見えた。これは、多くの場合、セルの全長をスパンアクチン含有ストレスファイバーとは対照的であった。タキソールで処理した細胞はまた、固定の前に微小管阻害薬で処理した場合には、微小管の外観や分布に明らかな変化がなかった。

我々は、微小管阻害薬による治療から得られた細胞収縮の増加が TPA によって変更することができるかどうかという問題を検討した。実験の二つの平行な組を実施した：細胞を、TPA に 30~90 分間露出し、次いでさらに（TPA の継続的な存在下で）微小管阻害薬で処理された細胞、一方は微小管阻害薬で最初に 30-90 分処理した後、（微小管阻害薬の継続的な存在で）TPA に曝露した細胞。固定した細胞の免疫蛍光顕微鏡は、細胞骨格の組織（図 7）の変化に関する情報を提供しながら、微速度撮影フィルムは、細胞収縮（図 6）のいずれかの結果の変化を記録した。

TPA で処理した細胞培養物は、単独で、8-15 分（Fig.6A, B）内のすべての基層のしわを失った。これらの TPA 処理した細胞は、その後、5/ igml ノコダゾールにさらされたとき、収縮が急激に（Fig.6C）に回復した。基層しわが TPA の継続的な存在にもかかわらず、ノコダゾールの添加 10 分以内に表示される。この効果は可逆的であった。通常の組織培養培地によってノコダゾールを含む培地と交換の除去が 30 分以内に基層しわの損失、および TPA で処理した細胞の細胞形態学的特性の回復（Fig.6D）。この後者の結果は、通常、媒体からの物質を除去した後 6~8 時間持続する TPA の長期的な影響に対応する。

微小管阻害薬によって引き起こされる TPA 処理細胞における細胞収縮性の回復が免疫蛍光顕微鏡で見られるように、細胞骨格の組織の変化を伴っていました。TPA 処理が大幅にアクチン含有ストレス繊維の本数減少させること（Fig.7D.）ことが示されている。しかし、TPA 処理細胞の曝露は、前ストレスファイバーの改革（図 7F, HJ）で固定結果に 30~60 分間、微小管阻害薬の投与量を解重合する。新鮮な培地で十分に洗浄することにより TPA と微小管阻害薬を含む培地、および交換の除去は、これらのストレスファイバー（Fig.7L）

の破壊をもう一度もたらず.

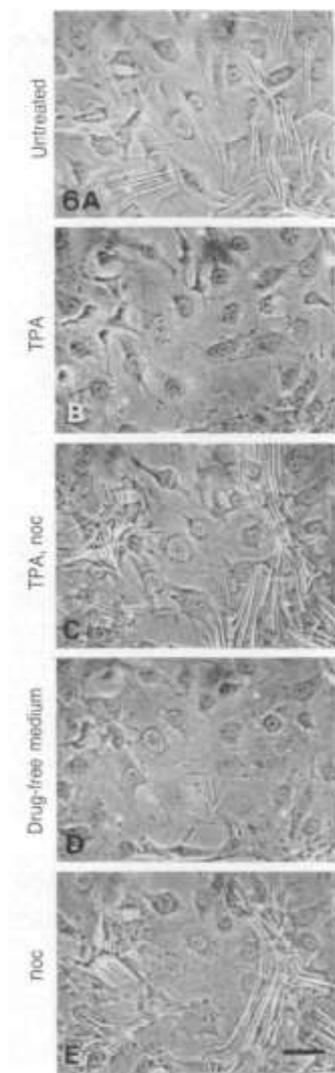


Fig.6

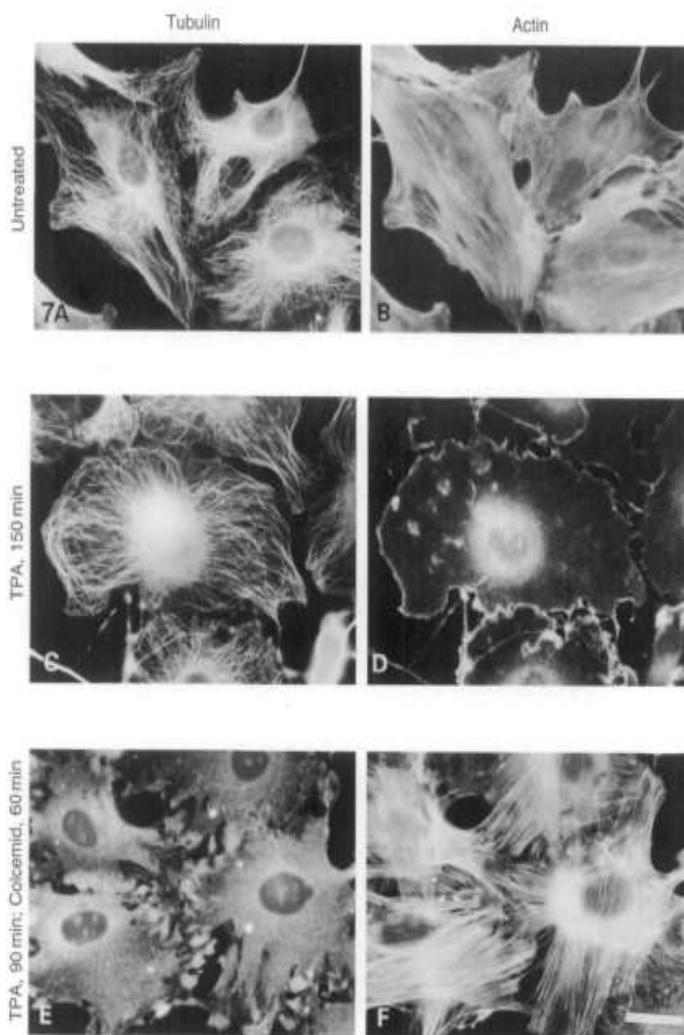


Fig.7

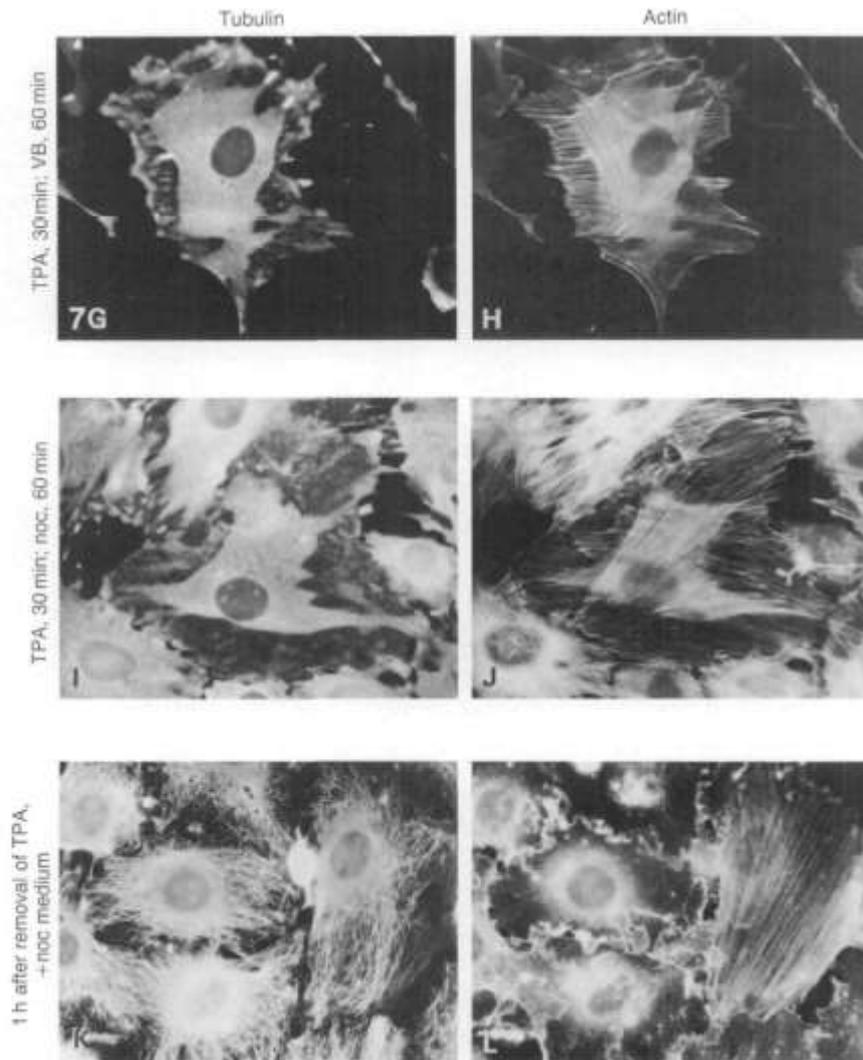


Fig.7

3.4 考察

微小管阻害薬によって引き起こされる形態学的変化の前の観察は、いくつかの段階的な線維芽細胞の収縮の方向性の低下ではなく、実際に収縮強度の急激な発生と増加を期待するものを主導している可能性があります。これらは、TPA およびその他の要因によって破壊された後でも、これらの微小管阻害剤はまた、アクチン含有ストレス繊維の急速な回復を引き起こすことが判明するのは非常に予想外でした。

これらの結果の可能な説明のいくつかの種類が検討されています。最初は増加した収縮ではなく、微小管への影響の結果より、微小管中毒薬の副作用のいくつかの種類を表すことができるということです。ただし、以下の事実が、この可能性と矛盾するよう見える：

- (1) 細胞の収縮性の同じ増加を調べ、微小管阻害剤の3つのすべてによって生成される。
- (2) 薬物の3つのすべては、非常に低い濃度で収縮性を増加生成する。
- (3) タキソールによる微小管の安定化前に大きく収縮を誘発する微小管阻害剤を防止する

ことが見出された。

収縮性の観察された増加のための第 2 の可能性の説明は、これらのフィラメントは、その微小管の微小管阻害剤によって破壊されている線維芽細胞に崩壊することが示されているので、それは、中間フィラメントの正常な細胞質配列の崩壊に起因するかもしれないということです。ここで観察された増加収縮は、これらの薬剤を用いた治療の 5 分以内に発生したのに対し、しかし、中間フィラメントのこの再分配は、微小管中毒薬に暴露した後、5 時間以上を発生します。したがって、この可能性の説明は、効果の迅速な時間経過と矛盾しそうです。

Fig.8 (a) に模式的に示す第 3 の可能な説明は、細胞質微小管は、通常、大きな押圧力を発揮することであり、このプッシュは、部分的にアクチンストレスファイバーのプルを相殺すること。微小管は、抗微小管薬により破壊された場合このように、ストレスファイバーの収縮力の大部分は、それによって増加した歪みを生成し、基層に加わることとなります。このタイプのモデルでは、細胞のアクチンとミオシンによって生成された収縮力の任意の実際の増加があるわけではありません。むしろ、主な効果は、細胞の力の再配分です。

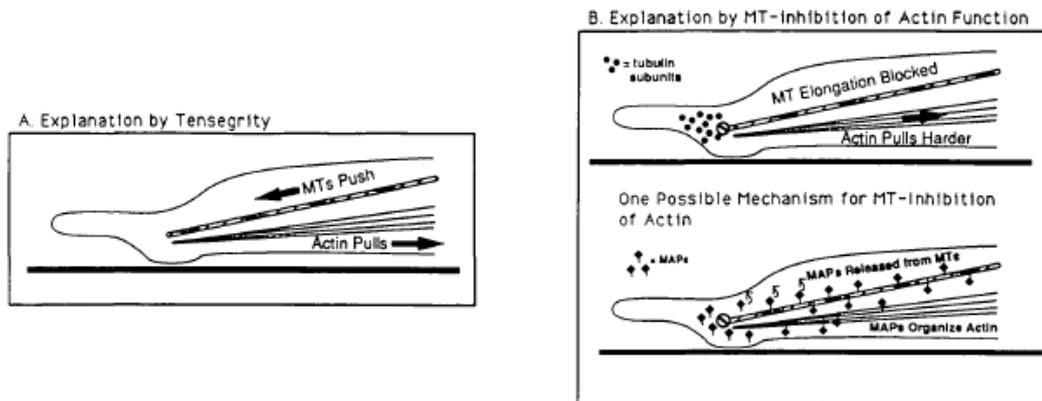


Fig. 8. Some possible explanations for the observed increase in contractility and actin organization as a result of treatment with microtubule-depolymerizing drugs.

可能な説明の第 4 のクラスは、微小管が何らかの形で調節およびアクチン組織上の抑制制御を発揮することが、我々の観察とほとんど一致するようです。基本的な考え方は、微小管の破壊は、この阻害からアクチンを放出するように、微小管が何らかの形で、阻害または単にその収縮を相殺なくアクチンの組織と収縮を弱めるだろうということです。

微小管は、比較的安定した速度で細長いですが、その後急激にかつ迅速に解重合可能な「動的不安定性」を明らかにしました。個々の微小管の動的不安定性はまた、生細胞内で起こることが観察されています。我々は収縮が微小管の単純な存在によって、むしろ彼らの動的状態によってそれほど制御されていることを示唆している場合、これは薬のような低濃度は、線維芽細胞の収縮を刺激することができる理由を説明するのに役立つだろう。これらはどちら縮小または安定しているときに Fig.8B に概略的に示されたモデルのこのタイプ

では、収縮は、微小管が伸長されたときに阻害してないであろう。微小管は、細胞内のアクチンの組織と機能の空間分布、およびこの機能を達成するの動的不安定性の役割をどのように影響するかこれは説明することができます。

微小管の不安定性は、アクチン組織と収縮をどのように刺激するのに役立つかもしれません。Fig.8 (b) の下半分に示すように答えは、特定の微小管関連タンパク質 (MAP) を含むことができます。インビトロ研究では、いくつかの MAP は、微小管の重合を促進する中間径フィラメント、および架橋アクチンフィラメントに結合することができることを示しています。いくつかの *in vivo* での証拠はまた、特定の MAP がアクチンフィラメントと相互作用することを示唆しています。微小管からの MAP の放出が (たとえ低濃度で)、微小管阻害薬によって促進され、これらの解放 MAP は次いで場合アクチンの収縮およびストレスファイバーにその組織を刺激する場合には、観測された現象が生じる。

4. まとめ

過去に紹介した顕微鏡の小型化に関する論文では、顕微鏡を小型化するにあたって視野問題となっていた。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) の小型化による NA 低下のため、どの論文でも視野が問題視されていた。本稿では、視野の問題の解決や、いくつかのシステムを比較し、さらなる改良が示された。

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技術を取り入れれば、さらに小型の顕微鏡の構築および解像度の高いイメージングができるのではないかと考える。

また、バイオイメージングにおいて、従来の細胞観察では画像による知見を得るしか方法がなかった。そのため、機械的に力を加え、非線形顕微鏡で観察することができるようになった現在、定量的評価が可能となり、また、それを進めていかなければならない。

参考文献

- [1] C. Bechtela, et al. *Optik*. **125**, 876 (2013)
- [2] S. Tang, et al. *Journal of Biomedical Optics*. **14**, 034005 (2009)
- [3] A. Danowski, *Journal of Cell Science* .**93**, 255 (1990)
- [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).