

非 ○厚田耕佑 (徳島大) 安井武史 (徳島大)

Kosuke ATSUTA, Tokushima University  
Takeshi YASUI, Tokushima University

Key words : Microscopy, SHG, Collagen

1. はじめに

近年、コラーゲンの新しい観察手段として、生体コラーゲン SHG (second harmonic generation : 第2 高調波発生光) 顕微鏡が注目されている[1]. SHG 顕微鏡は、非接触・非侵襲でのコラーゲンの選択的観測が可能であるため、皮膚計測[2]や再生医療[3]を始めとしたコラーゲン関連分野での利用が期待されている. しかし、従来の SHG 顕微鏡は、大型・複雑で、その利用は実験室レベルに限定されていた (図 1). SHG 顕微鏡を、臨床応用も含めた各種応用分野で幅広く利用するためには、レーザー光源も含めた装置の小型化が強く望まれる. もし、光ファイバー技術を SHG 顕微鏡に上手く導入できれば、ファイバーベース SHG 顕微鏡が可能になり、大幅な小型化が実現できる. 本発表では、ファイバーベース SHG 顕微鏡用の小型プローブヘッドの開発し、小型化を試みた.

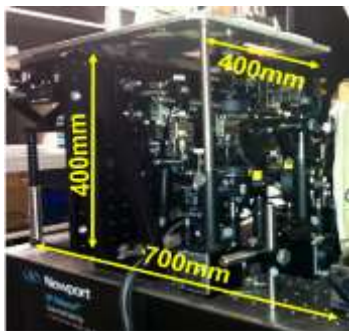


Fig.1 Conventional SHG microscope

2. 小型プローブ SHG 顕微鏡

従来の SHG 顕微鏡では、レーザー光源が大型・複雑である上に、自由空間光学系に基づいた顕微鏡配置となっていたため、小型化が困難であった (図 1). もし、小型ファイバーレーザーを光源とする一方で、顕微鏡部分を小型プローブヘッドに納め、その両者間を光ファイバーで結合することが出来れば (図 2)、装置の小型化だけでなく、ロバスト・アライメントフリー・フレキシブルなどの実用性を付与することが出来、臨床現場でも利用可能になる. 小型ファイバーレーザー光源及び超短パルス光伝播用光ファイバーは市販されているが、小型プローブヘッドは自作する必要がある.

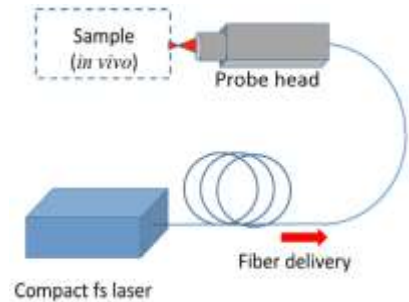


Fig.2 Fiber-based SHG microscope

3. 小型顕微鏡ヘッド

図 3 にセットアップを示す. Cr:F レーザー( $\lambda_c = 1250 \text{ nm}$ ,  $\Delta\tau = 90 \text{ fs}$ ,  $P_{\text{mean}} = 250 \text{ mW}$ ,  $f_{\text{rep}} = 73 \text{ MHz}$ )から出た励起光は、プローブ外部のガルバノ走査ミラーにより反射後、プローブのヘッド部分に導かれ、リレーレンズ対とダイクロイックミラー (DM) を通過し、対物レンズ (油浸,  $\text{NA}=0.9$ ,  $\text{WD}=350\mu\text{m}$ ) で試料上に集束される. サンプルからの後方散乱 SHG 光は DM で反射され、バンドパスフィルタ (透過波長=625 nm) でフィルタリングされ、最後に SHG 信号が光電子増倍管 (PMT) によって検出される. プローブの光学系はレンズチューブシステムに収まった構成である (図 4).

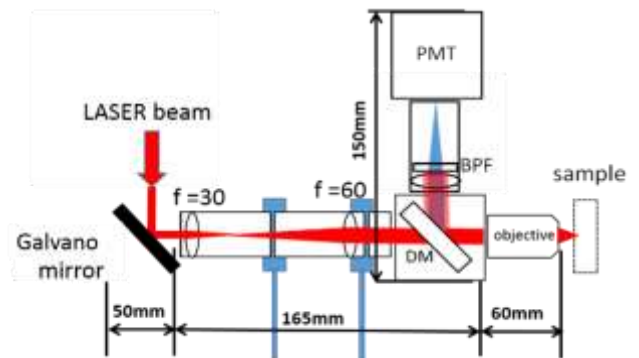


Fig.3 Setup



Fig.4 The microscope head

#### 4. リサージュスキャン再構成イメージング

従来のレーザー走査顕微鏡では走査ミラーとしてガルバノミラーが一般的に用いられ、直感的に分かり易いデータ配列でイメージデータを取得できるラスタースキャン(図 5(a))でのミラー走査によるイメージングが行われてきた。一方で、より高速走査が可能な小型 MEMS ミラーの走査方式にはリサージュスキャン(図 5(b))が採用されていることが多い。この方式では、ふたつの正弦波に対応した複雑な軌道を描く。また、リサージュスキャンでは座標毎に通過する回数が異なる。そのため、イメージングを行う際に、あるタイミングにおけるピクセル座標(位置情報)を知る必要がある。そのため、ガルバノミラーの駆動信号である正弦波を同時に取り込み、その電圧情報を座標(位置情報)の変換に用いた。取得した駆動信号の値をピクセル数に対応する 0~255 の整数値をとるよう処理した。以上より、ピクセルの列番号および行番号は、

$$x_n = 128 + 128\sin(2\pi f_x n\Delta t)$$

$$y_n = 128 + 128\sin(2\pi f_y n\Delta t)$$

として 256\*256 の各ピクセルにマッピングされる。

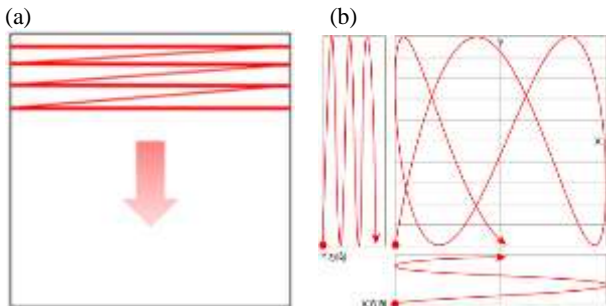


Fig.5 Raster scan (a) and Lissajous scan (b)

(引用元：<http://www.signal.co.jp/vbc/mems/sp/ecoscan/>)

このリサージュスキャン再構成を計測に適用し、リサージュスキャンによるイメージの確認を行った(図 5)。走査ミラーには従来どおりガルバノミラーを用いているが、正弦波の駆動信号を与えることでリサージュスキャンとした。サンプルにはスライスした腱を用いた。リサージュスキャン特有の様相がわずかに見受けられるが、コラーゲンの構造や腱独特の特徴的なコラーゲン線維分布が確認できる。

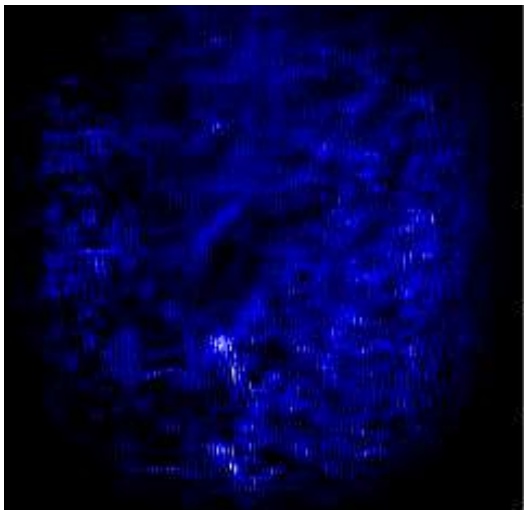


Fig.6 SHG images by Lissajous

#### 5. まとめ

SHG 顕微鏡の小型化を目指し、プローブのヘッド部分を構築した。また、MEMS ミラーに採用されるリサージュスキャンの再構成を実現し、リサージュスキャンによるイメージングに成功した。

今後の予定として、図 7 に示すような小型プローブヘッドに走査ミラーとして MEMS ミラーを導入した SHG 顕微鏡を構築する。また、MEMS ミラーの駆動信号は kHz オーダーと高速であるため、FPGA(Field-Programmable Gate Array)を用いた信号取得を行い、生体イメージングなどを試みる予定である。

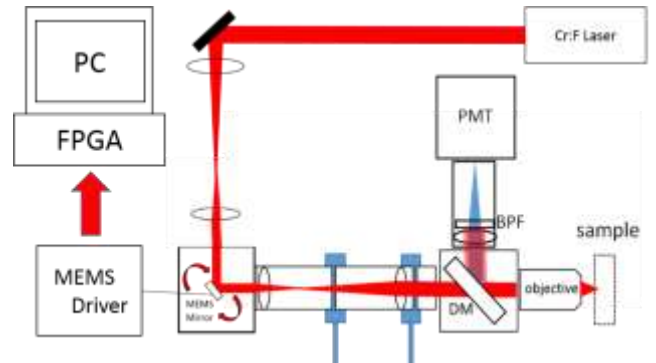


Fig.7 SHG microscope probe using MEMS mirror

#### 参考文献

- (1) P. J. Campagnola and C.-Y. Dong, Laser Photon. Rev.5, pp. 13–26 (2011).
- (2) T. Yasui et al. J. Biomed. Opt.18, art. 031108 (2013).
- (3) E. Hase et al., Proc. SPIE 9329, art. 93292Q (2015).