

SHG(第2高調波発生光)顕微鏡の小型化に関する研究

Miniaturization of SHG microscopy for clinical application

機械創造システム工学コース 厚田 耕佑 (Kohsuke Atsuta)

This paper describes a compact second-harmonic-generation (SHG) microscopy. SHG microscopy enables us non-invasive observation of dermal collagen fibers. However, the conventional SHG microscopy is large and complicated. In this study, we introduced optical fiber technology to miniaturize SHG microscopy. Finally, we succeeded fiber delivery of pulse laser light without dispersion and developed portable-probe-SHG-microscopy. This result indicates the possibility of clinical application using SHG microscopy.

1. 緒言

コラーゲンは生体構造タンパク質であり、生体組織において最も含有率の高いタンパク質である。コラーゲンは主に角膜や骨・軟骨、腱、皮膚など多くの組織に含まれており、その濃度や配向は、生体組織の形態や機械的特性を決定する上で極めて重要な役割を担っている。また、人体最大の臓器とも呼ばれる皮膚においては、真皮層のみにコラーゲンが含まれており、真皮コラーゲンの選択的観測は皮膚組織の観測において重要な意義をもっているといえる。

近年、非接触・非侵襲でコラーゲンの選択的観測が可能である SHG (second harmonic generation: 第2高調波発生光) 顕微鏡が注目されている[1]。フェムト(10^{-15})秒レーザーのような光電場ピークパワーの高い超短パルスレーザー光を非中心対称性構造の物質に集光すると光の励起光波長に対して半波長の光が発生する。この光を SHG 光と言う。この現象を用いた SHG 顕微鏡は、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制限されていた(図1)。

SHG 顕微鏡に臨床応用を考えた場合、装置の小型化が重要である。ここで、①小型レーザー光源の小型化、②ファイバー光学系(ファイバーデリバリー)、③SHG 顕微鏡ユニットの小型化、という3つの技術要素の導入を実現できれば、小型・フレキシブル・ロバスト・メンテナンスフリーといった特徴を付与した SHG ファイバースコープが実現できる可能性がある。本発表では、上記技術要素の①は市販品で利用可能であるため、②および③を試みたので報告する。

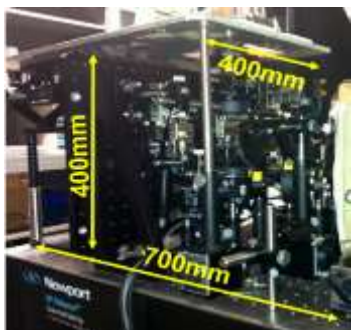


Fig.1 Conventional SHG microscope

2. 実験装置及び実験方法

2.1 ファイバー伝送

ファイバー伝送において、超短パルス光の場合、分散によるパルス広がりが生じる。分散の解決には、分散を相殺するように、分散補償を行う必要がある。本研究で用いられる中心波長 1250nm では、外部的な分散補償のみ有効であり、光学系の小型化を考えた場合、外部的な分散補償は不適である。そのため、ラージモードエリア・フォトリソス結晶ファイバー(LMA-PCF)(LMA-25:Thorlabs, Inc.:コア径=25 μ m, NA=0.05)を用いた。LMA-PCF は、ラージモードエリアにより、モード分散が発生しにくく、空孔の配列やコア径の選別により、導波路分散を調整でき、波長分散の影響も低減できる。カップリングの結果、ファイバー長は 75cm で、カップリング効率は 32.5%([Input]:[Output]=252mW:82mW)であった。ここで、PCF 入射前と PCF カップリング後のスペクトル波形とパルス幅の計測を行った(図2)。光スペクトルアナライザーにより取得されたスペクトル幅はどちらも 26nm 程度であることがわかる。オートコリレーターによる、自己相関波形(赤線)からフィッティング(青線)された自己相関幅は、入射側で 113fs、出口側は、116fs となり、ガウス型パルスと仮定し、自己相関幅を $\sqrt{2}$ で割ることによりパルス幅は求められ、パルス幅はそれぞれ入射側で 80fs、出口側は、82fs となった。この結果より、パルス広がり(分散)をほとんど発生させることなく、超短パルス光をファイバー伝送することに成功した。

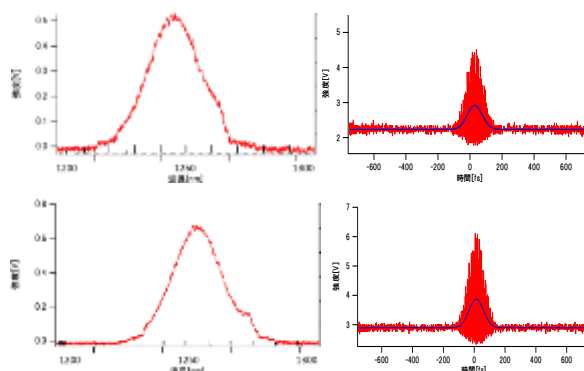


Fig.2 Spectrum waveform and autocorrelation waveform: before PCF (upper) and after (lower).

2. 2 可搬型プローブ SHG 顕微鏡

ケージシステム内に収められた SHG 顕微鏡とファイバ光学系を組み合わせることにより、フレキシブルな特徴を付与した可搬型プローブ SHG 顕微鏡の開発に成功した(図 3).

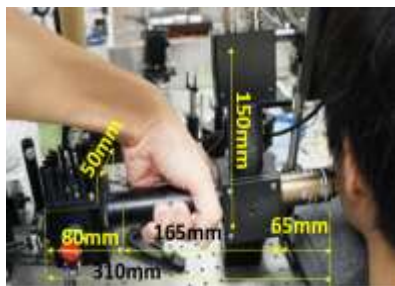


Fig.3 Handheld measurement

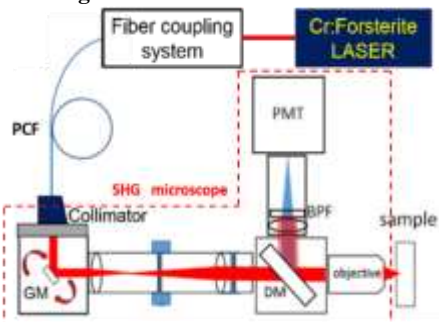


Fig.4 Experimental setup

光源のモード同期 Cr:F レーザー光は、レンズを用いて LMA-PCF に入射される。レーザー光は PCF を伝播した後、プローブ化された SHG 顕微鏡ユニットに導かれる。プローブ内のガルバノ走査ミラーで反射後、リレーレンズ対とダイクロイックミラー (DM) を通過し、油浸対物レンズ (NA=0.9, WD=350 μ m) で試料上に集光される。サンプルから後方散乱した SHG 光は DM で反射され、バンドパスフィルタ (透過波長=625 nm) で抽出された後、フォトンカウンティング型光電子増倍管 (PMT) によって検出される構成となっている。

3. 実験結果

3. 1 基本特性評価

開発した可搬型プローブ SHG 顕微鏡(図 4)を用いて SHG イメージを取得した。従来系のイメージと比較するために、同一の条件にて取得されたイメージをそれぞれ示す(図 5)。取得条件は、入射パワー20mW、計測時間2秒、400 μ m \times 400 μ m のイメージ領域で、サンプルには腱の切片サンプルを用いた。腱のコラーゲン線維は単一方向の配向を示している。また、従来系と可搬型プローブ SHG 顕微鏡のイメージは、どちらも類似したイメージを示し、また、体積比 1/50 もの小型化に成功したにも関わらず、同等の輝度値を実現した。

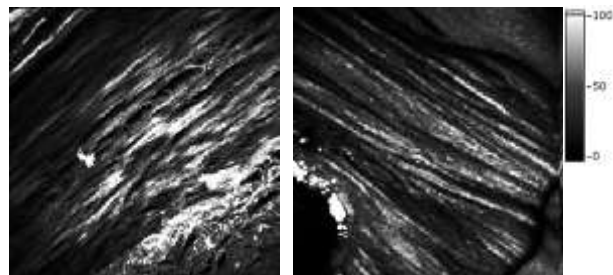


Fig.5 SHG image: conventional(left) and present(right)

3. 2 ヒト皮膚 *in situ* 計測

可搬型プローブ SHG 顕微鏡のフレキシブルな特徴を発揮するため、同じ取得条件でハンドヘルドでのヒト皮膚 *in situ* 計測を行った。従来の自由空間光学系のベンチトップ SHG 顕微鏡では、計測部を顕微鏡まで運ばなければならなかった。しかし、ハンドヘルドを行うことで、計測部がプローブの稼動域(PCF 長 75cm)の範囲内であれば、顕微鏡部を計測部に運ぶことで計測が可能となる(図 3)。プローブをヒトの頬へ運ぶことによりイメージングを行った。イメージ(図 6)から、ヒト頬の真皮コラーゲンの様子や毛穴などの構造を観察することができる。これより、ハンドヘルドでのイメージング取得に初めて成功した。

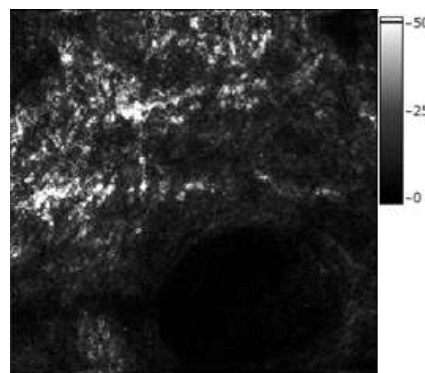


Fig.6 SHG image of human cheek

4. まとめ

ファイバ光学系と小型 SHG 顕微鏡ユニットの利用により、SHG 顕微鏡を大幅に小型化すると共に、フレキシブル・ロバスト・メンテナンスフリーといった実用性を付与した。これは、皮膚計測機器として重要な技術進歩であり、実験室外の様々な現場での SHG イメージングも期待できる。

参考文献

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