

平成27年度修士論文公聴会

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

安井研究室

厚田耕佑

コラーゲン計測

- ・細胞外マトリックスの主要成分
- ・組織構造を維持する骨格
- ・細胞の発生，分化，形態形成の調節
- ・組織工学的培養組織で細胞の足場となる

コラーゲンは生命活動に深く関係

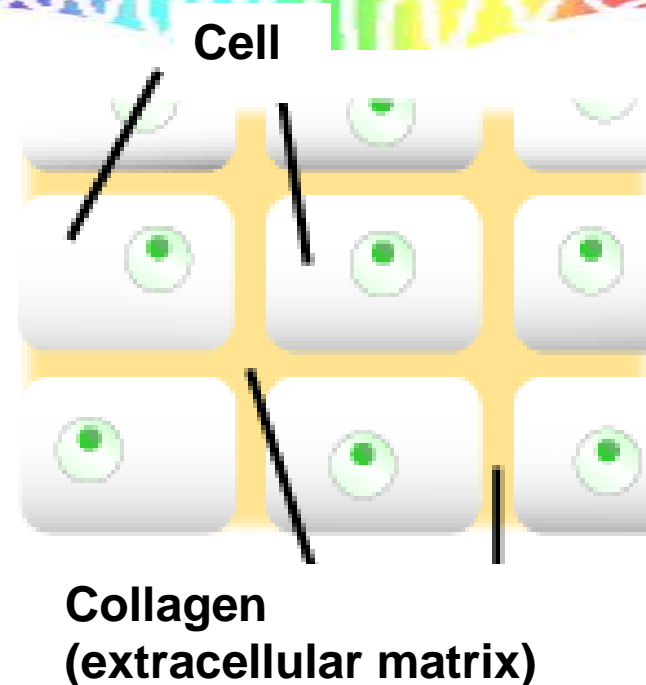
近年の研究では...

老化：様々な部位でのコラーゲンの減少が要因となる

肝硬変：コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生が過剰となる

心筋梗塞：心筋細胞の壊死後，コラーゲンの蓄積が生じる

コラーゲン動態の観察は美容・医療分野
において重要な役割を持っている！！



従来のコラーゲン観察

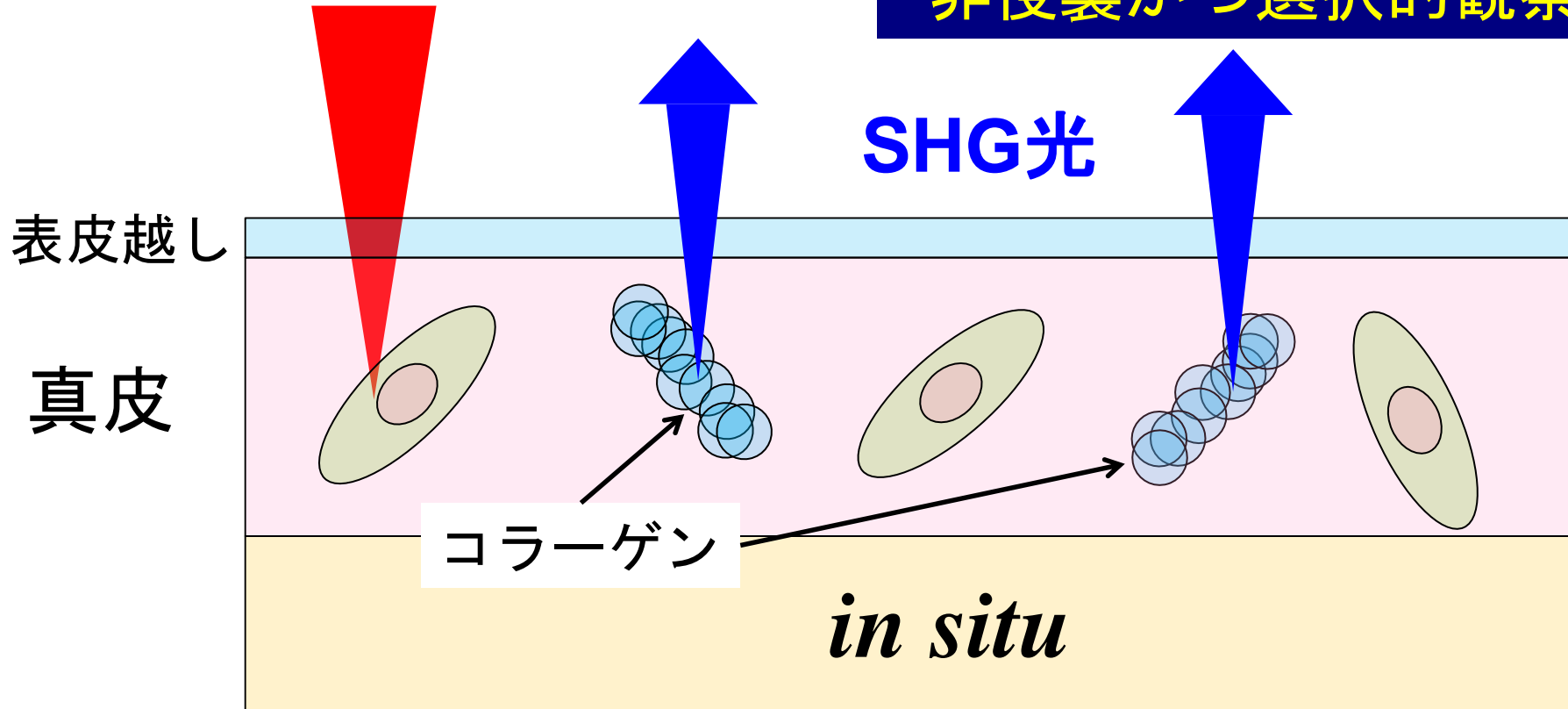
観察手法 / 性能	<i>in situ</i> 計測	コラーゲン選択性
染色法	×	○
共焦点顕微鏡	○	×
OCT	○	×
多光子顕微鏡	○	△

従来法では“生きたありのまま”の
コラーゲンの選択的観察は困難！！

生体コラーゲンSHG顕微鏡

フェムト秒レーザー光

非侵襲かつ選択的観察！



観察手法 / 性能

in situ 計測

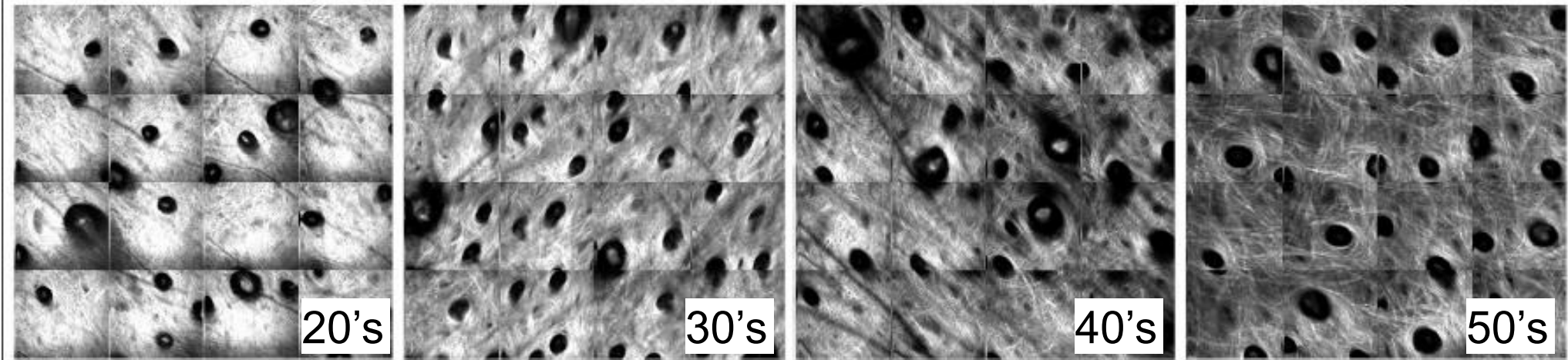
コラーゲン選択性

SHG顕微鏡



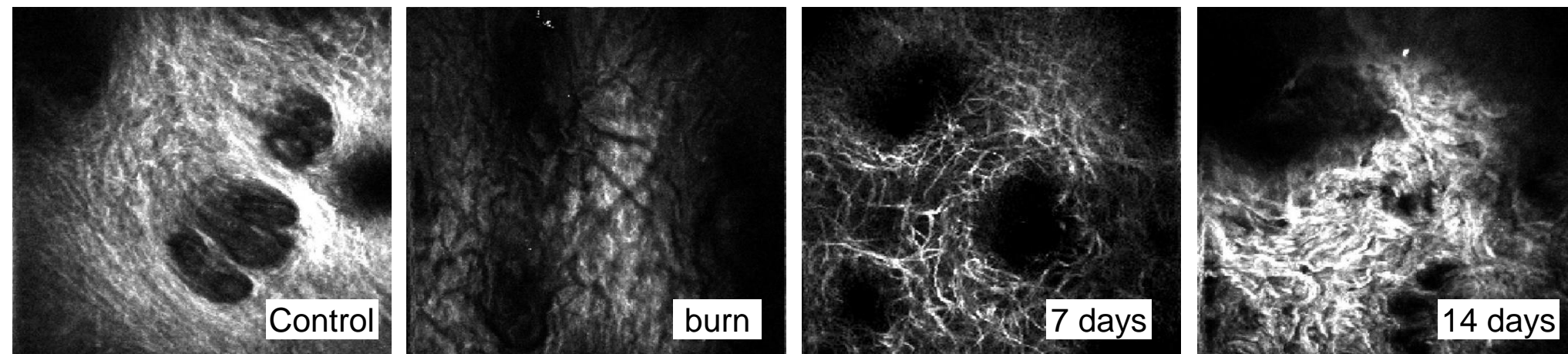
SHG顕微鏡の*in situ*観察

加齢によるヒト頬皮膚コラーゲンの構造変化



ref) T. Yasui et al. , *J. Biomed. Opt.* **18**, 031108 (2013).

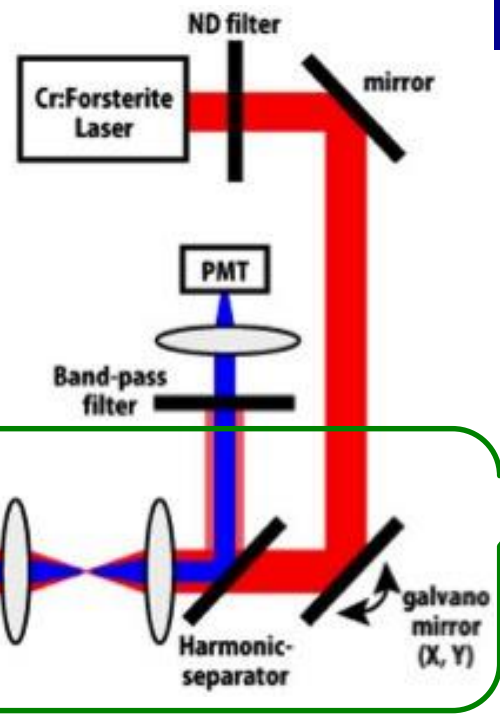
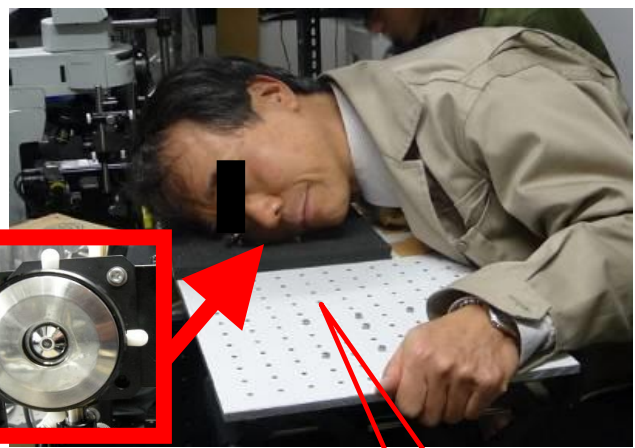
動物モデルを用いた熱傷治癒過程モニタリング



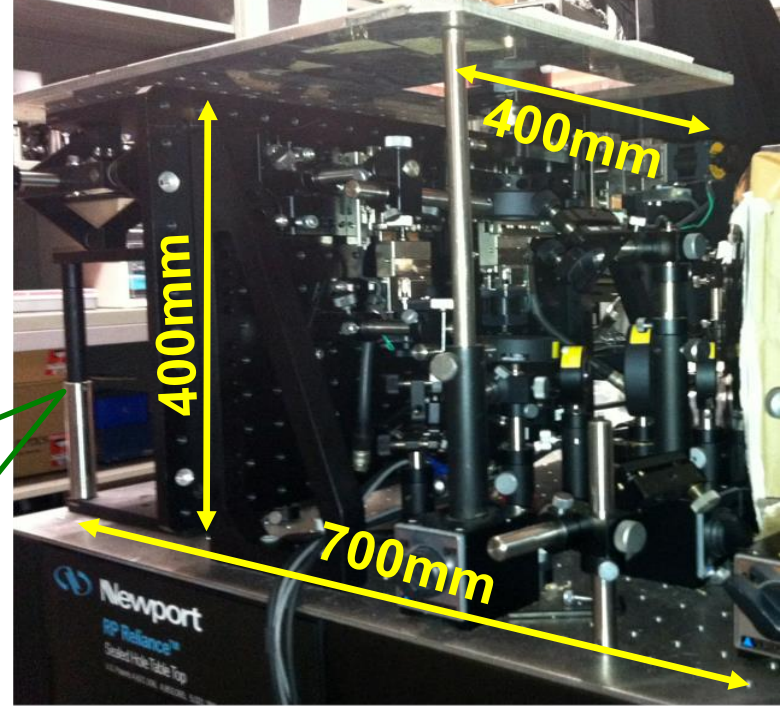
ref) T. Yasui et al. , *Proc. SPIE.* **8948**, 89480B (2014).

従来のSHG顕微鏡

大型・複雑・自由空間伝播による利用制限

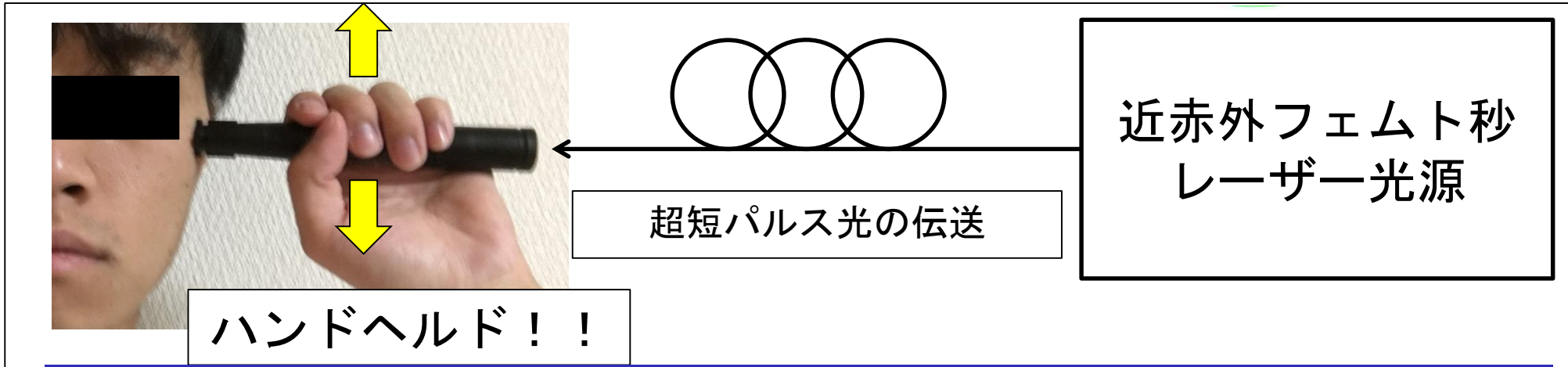


従来の大型実験系



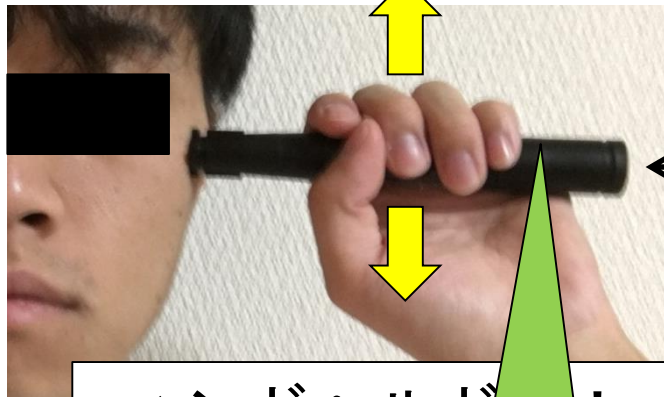
医療現場などにおける応用が困難

ハンドヘルドSHGファイバースコープ

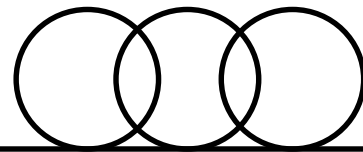


小型化・ロバスト・フレキシブル・アライメントフリー

- ① SHG顕微鏡部の小型プローブ化
- ② 超短パルス光のファイバー伝送



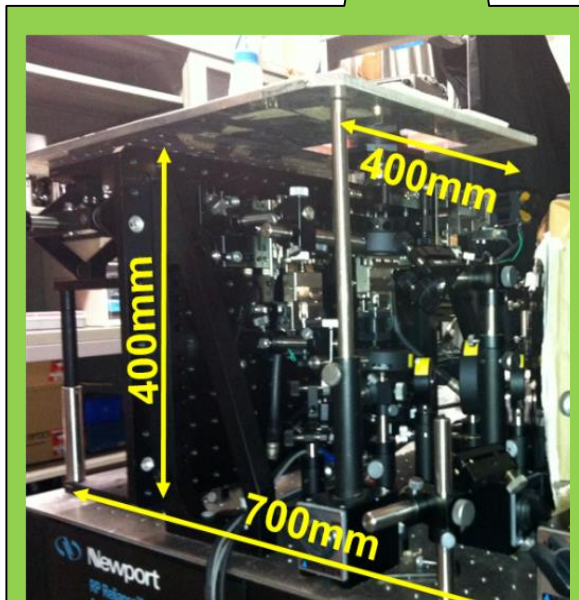
ハンドヘルド！



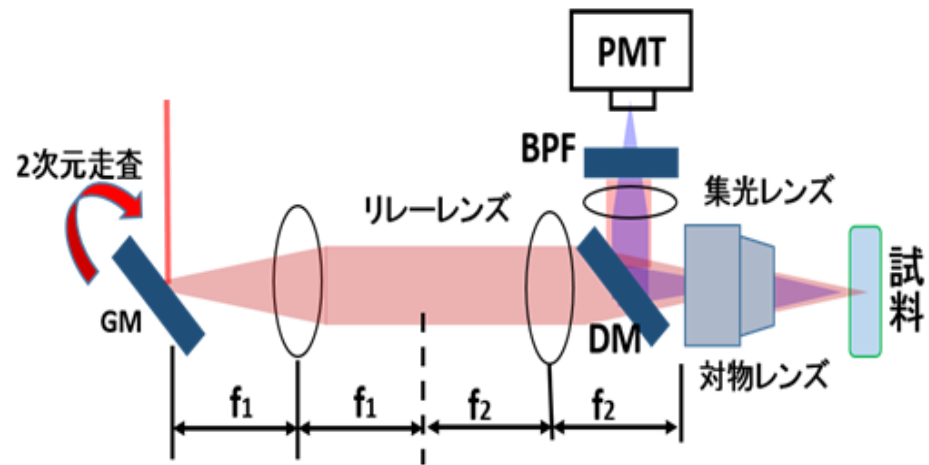
超短パルス光の伝送

近赤外フェムト秒
レーザー光源

小型化・ロボット・フレキシブル・アライメントフリー

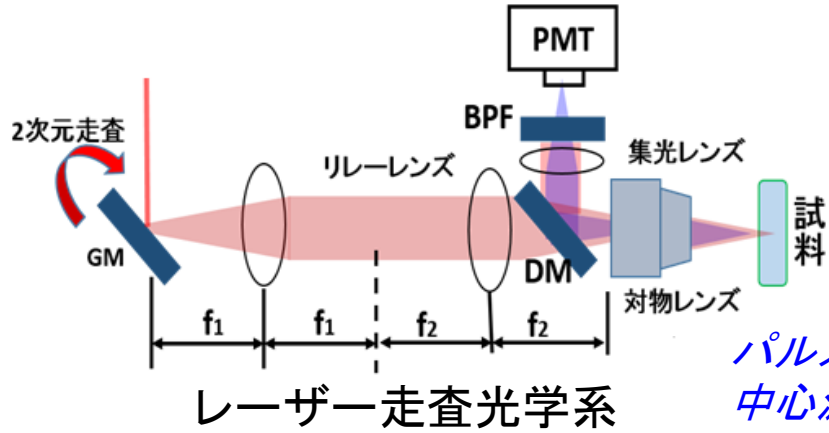


従来の大型実験系



レーザー走査光学系

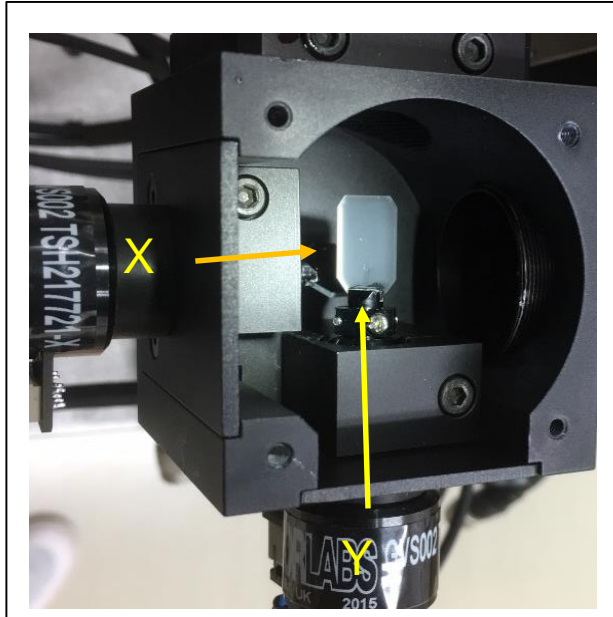
SHG顕微鏡用小型プローブ



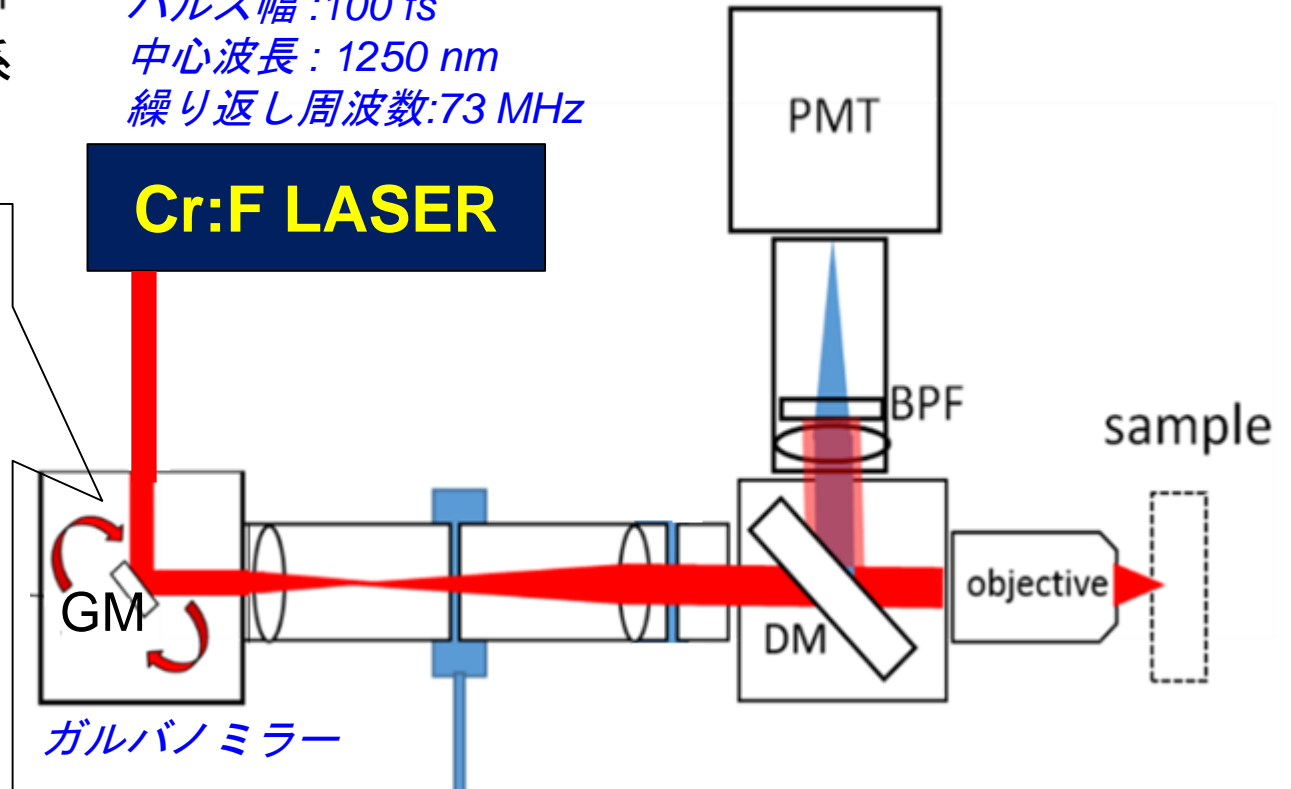
パルス幅: 100 fs
中心波長: 1250 nm
繰り返し周波数: 73 MHz

検出器: PMT
(光電子増倍管)

View from the top



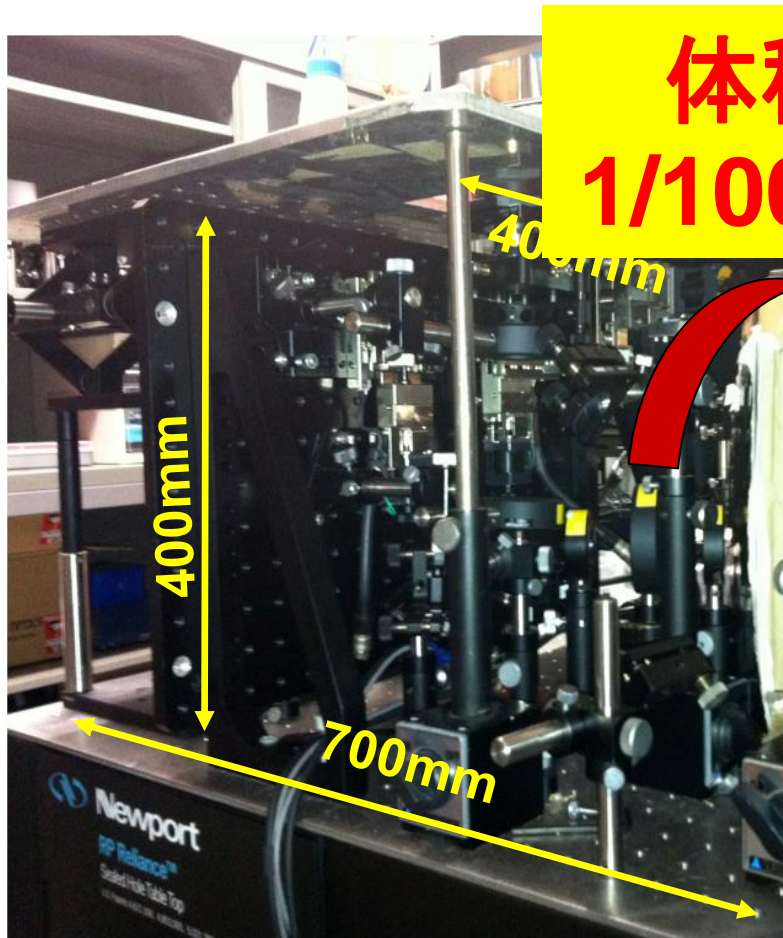
Cr:F LASER



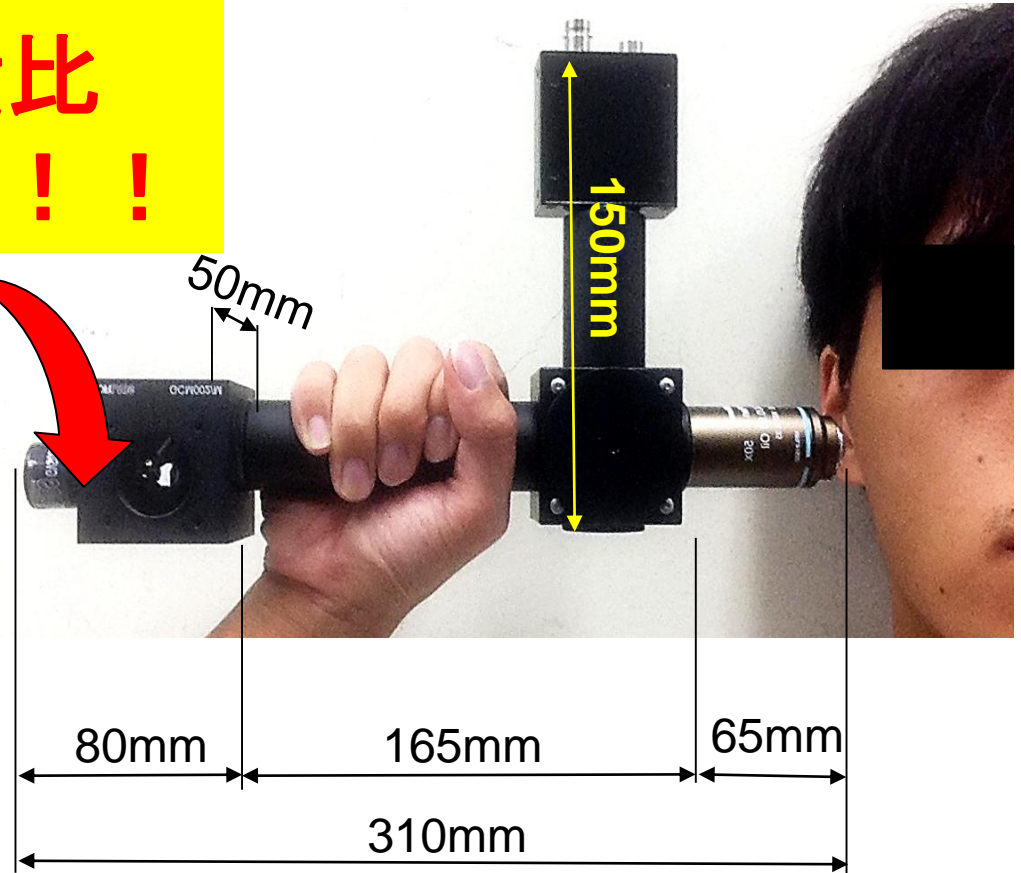
SHG顕微鏡プローブ

従来の大型実験系

SHG顕微鏡プローブ

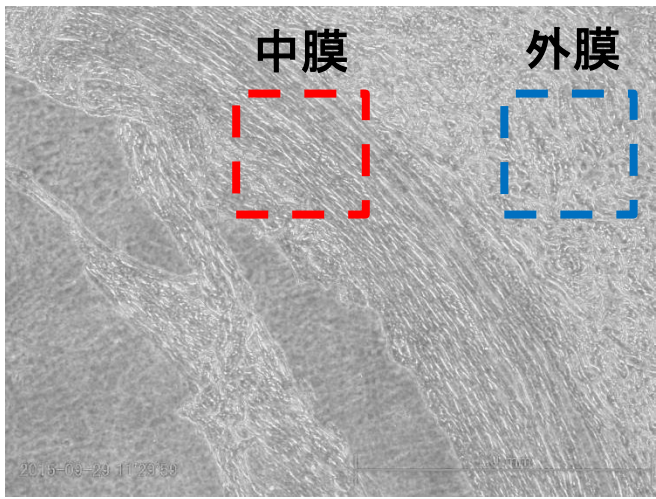


体積比
1/100 !!



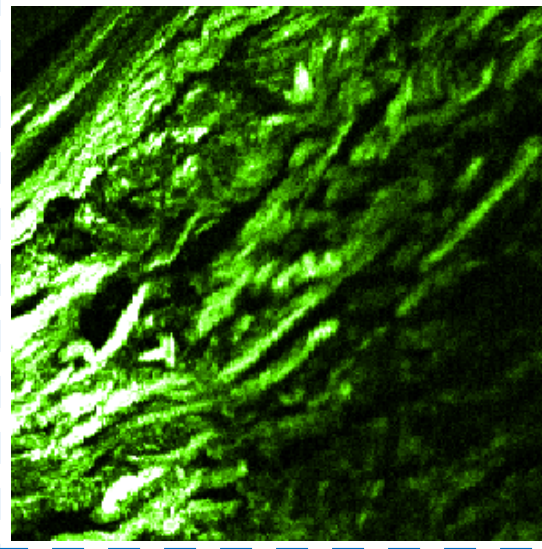
切片サンプル “*ex vivo*” 計測

サンプル：ヒト総腸骨動脈 切片

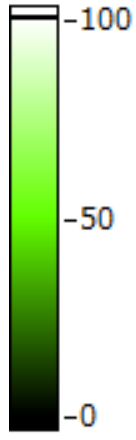
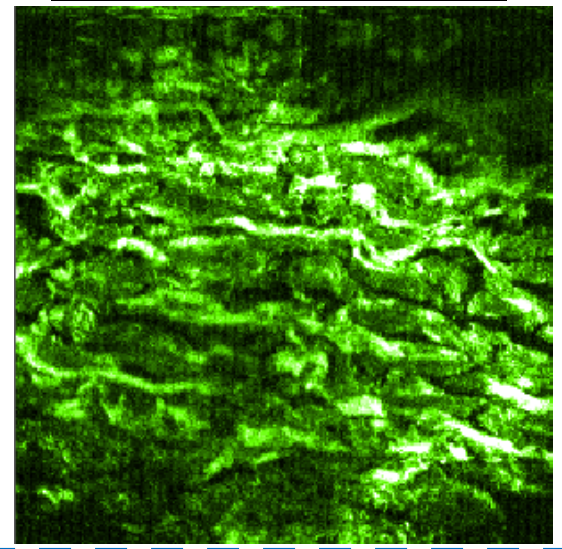


明視野画像

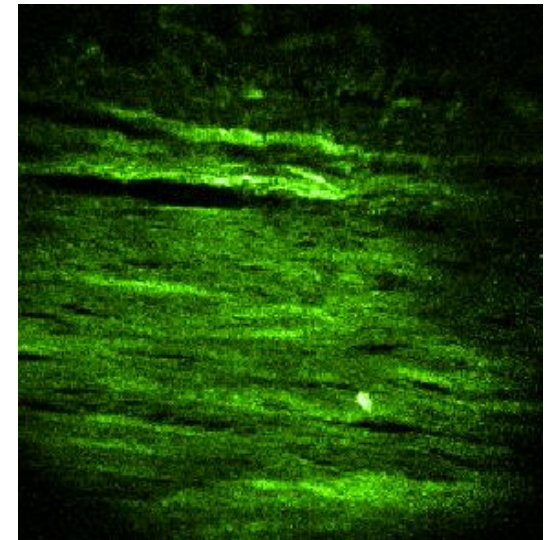
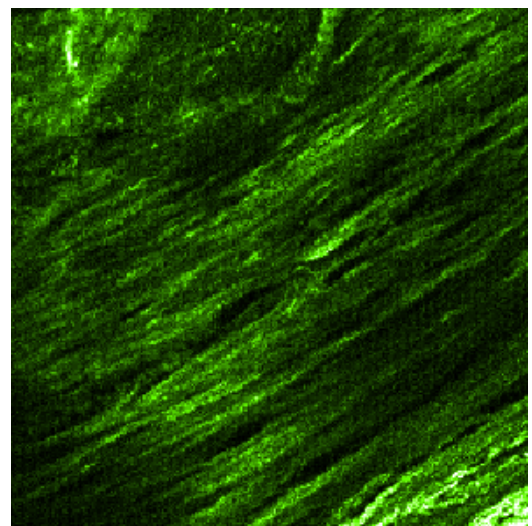
従来の大型実験系



小型プローブ系



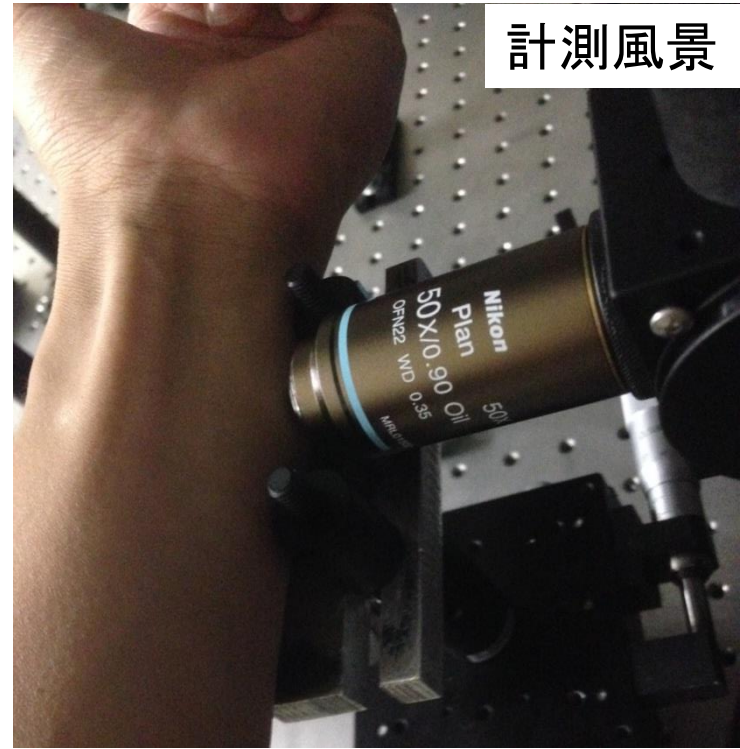
SHGイメージ
視野：400 μ m*400 μ m
取得時間 = 2秒
照射パワー30mW



“*in situ*” イメージング

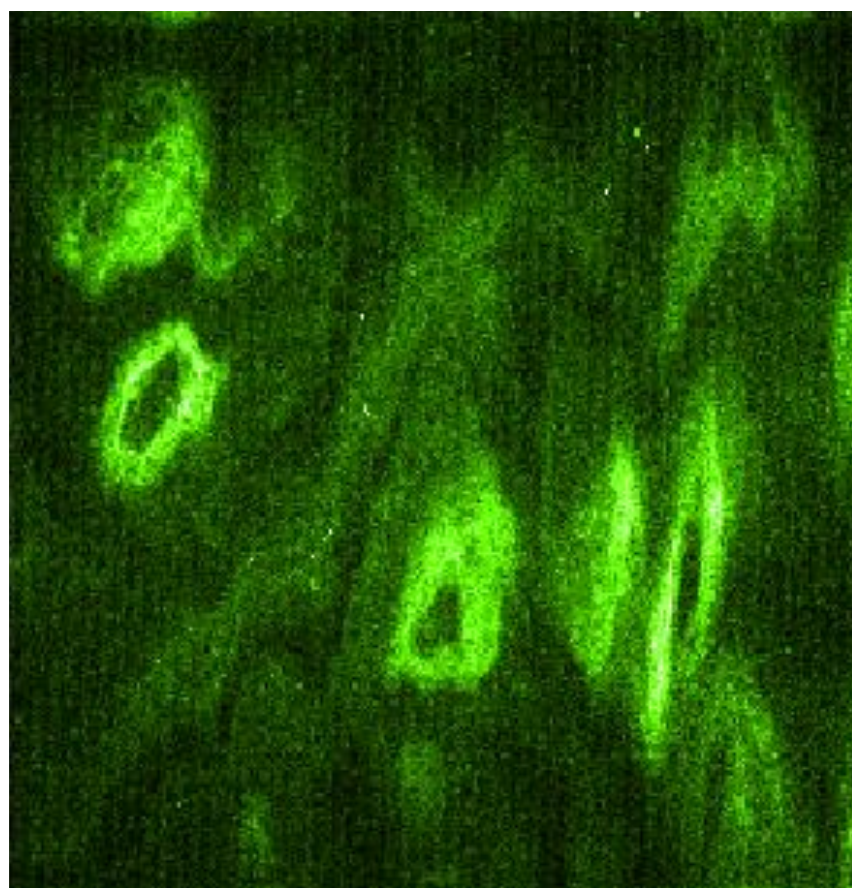
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部倫理委員会の承認(#14003)を得て実施

ヒト皮膚 (上腕) @40mW



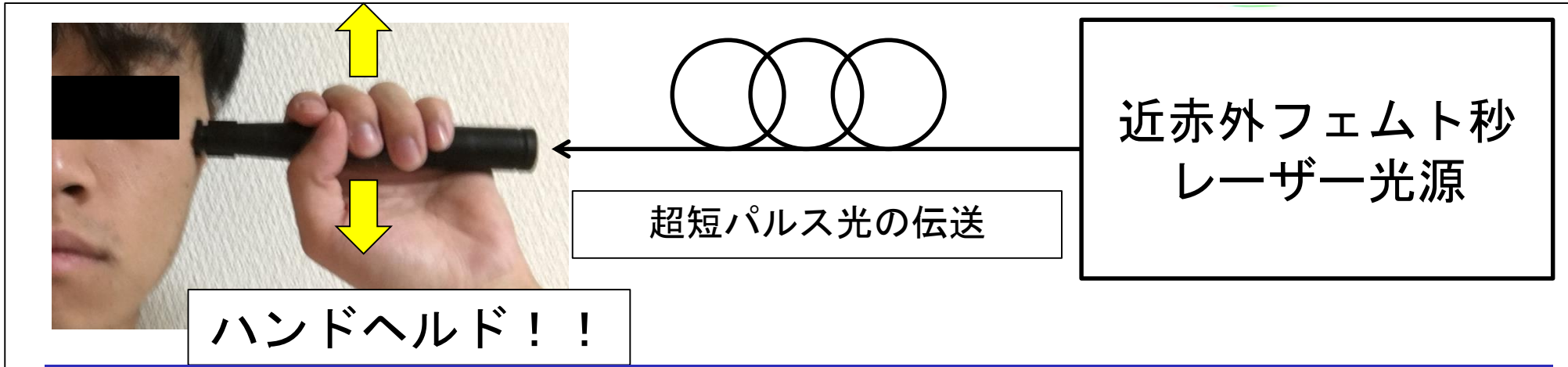
計測風景

視野 : 400 μ m*400 μ m
画像取得時間 = 2秒 / 枚



ヒト皮膚内の “生きたありのまま” のコラーゲンを可視化

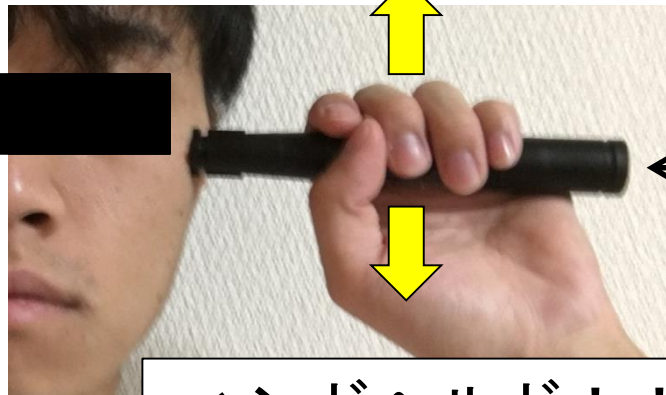
ハンドヘルドSHGファイバースコープ



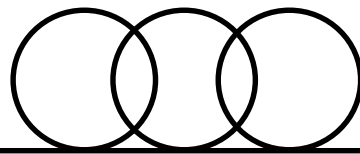
小型化・ロバスト・フレキシブル・アライメントフリー

① SHG顕微鏡部の小型プローブ化

→ ② 超短パルス光のファイバー伝送



ハンドヘルド！！



超短パルス光の
ファイバー伝送

近赤外フェムト秒
レーザー光源

小型化・ロバスト・フレキシブル・アライメントフリー

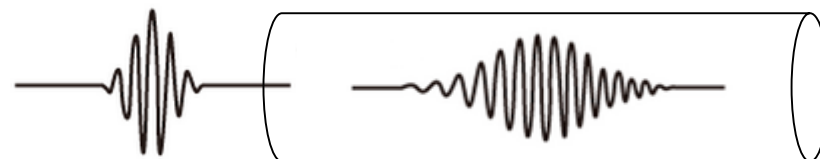
超短パルス光のファイバー伝送

分散

パルス拡がりの原因

相殺するような分散補償が必要

↓
外部的な分散補償 = 小型化 ×
ファイバーでの分散補償@1250nm ×



パルス拡がり

↓
SHG発生効率の低下

分散を最小限に抑えるようなファイバー選別が必要

ファイバーデリバリー

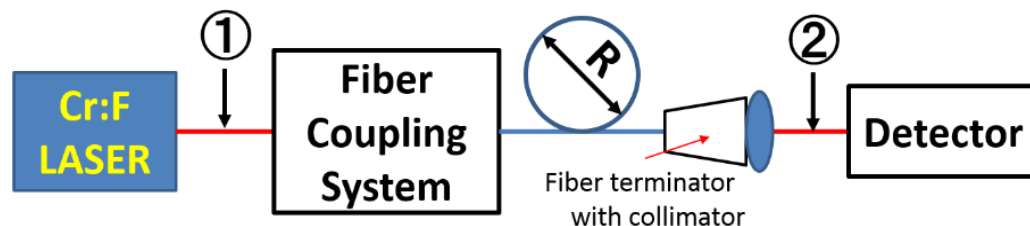
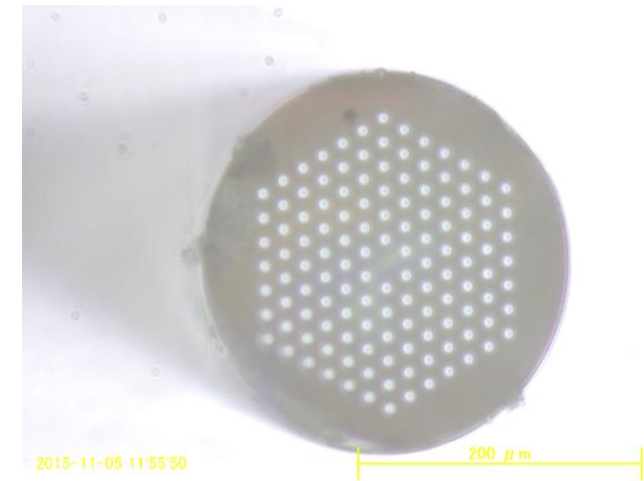
大モード面積フォトニック 結晶ファイバー

LMA-PCF

(LMA25 / Thorlabs)

- ✓ 大きいモードフィールド径
- ✓ シングルモード伝搬が可能
- ✓ ハイパワー伝搬が可能
- ✓ 空孔の配列やコア径により導波路分散を低減

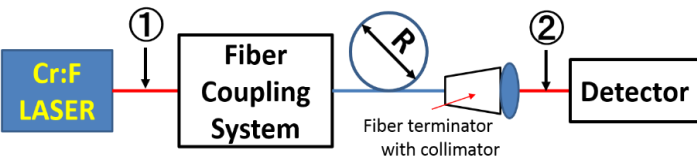
PCF	LMA25
コア径	25 μ m
NA	0.05
帯域	800nm-1700nm
損失	< 2dB / km



利用効率 : 30%

ファイバー長 : 75cm

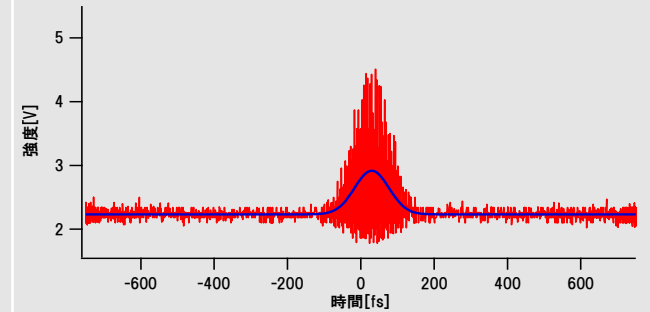
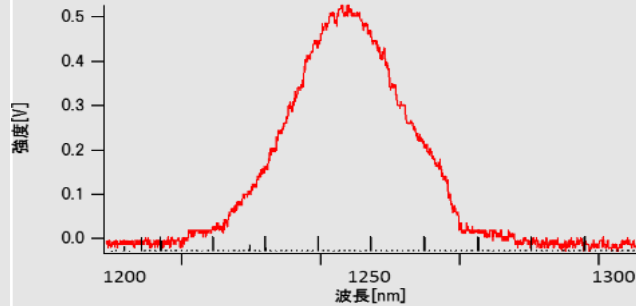
基本特性評価



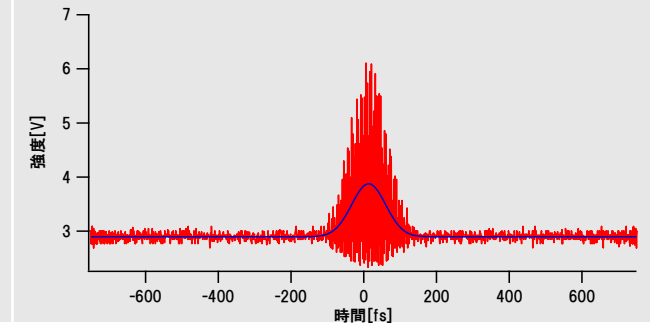
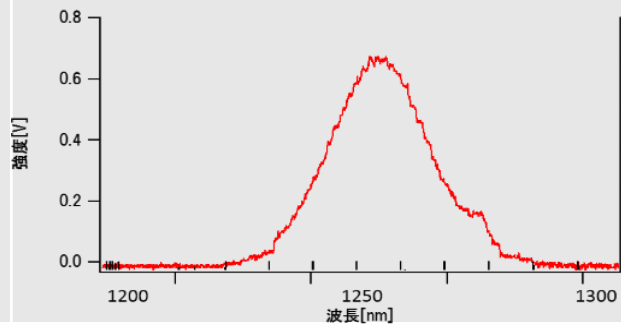
スペクトル幅

パルス幅

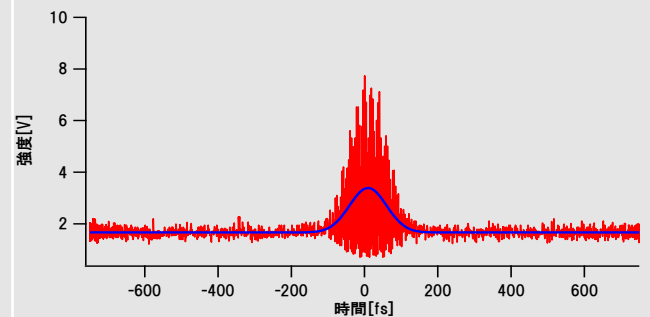
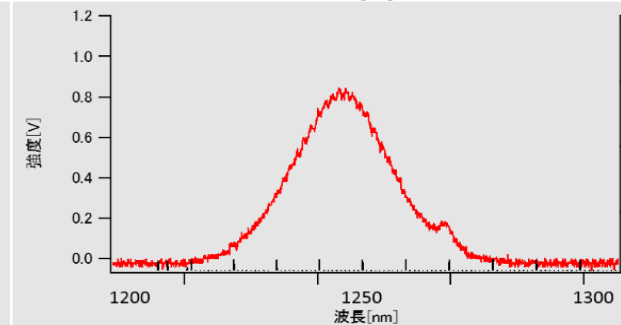
①PCF入射前
スペクトル幅：26nm
パルス幅：80fs



②PCF出射後(R=15cm)
スペクトル幅：26nm
パルス幅：82fs

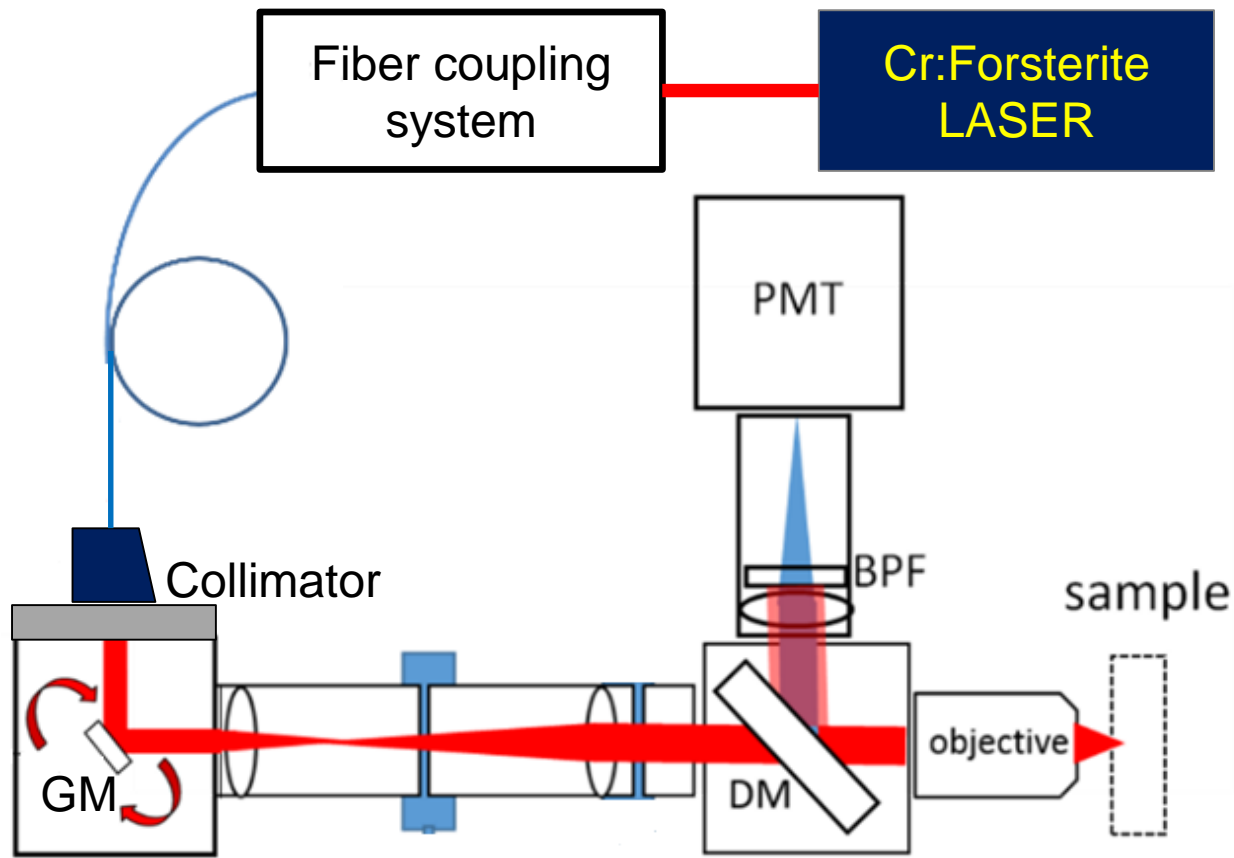


②PCF出射後(R=8cm)
スペクトル幅：27nm
パルス幅：87fs



問題とされていたパルス拡がりなし！！

① プロローブ + ② PCF



ハンドヘルドプロローブSHG顕微鏡

ハンドヘルドプローブSHG顕微鏡

セットアップ

ファイバー長：75cm

対物後出力：40mW

ヒト皮膚 *in situ* 計測を実施

(1) 3軸 機械式ステージ計測

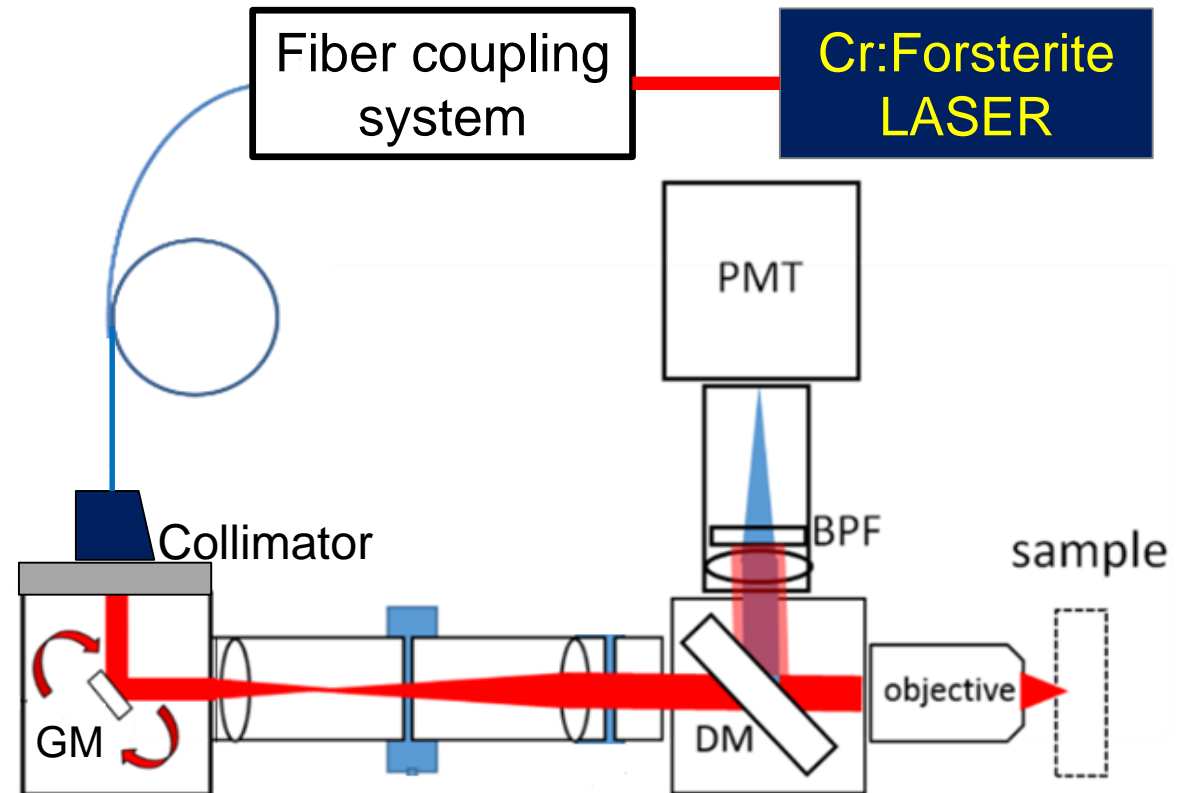
(大面積 & 深さ分解)

→ 被験者の移動不要

被験者の負担を軽減

(2) ハンドヘルド計測

→ 計測部の自由度が向上

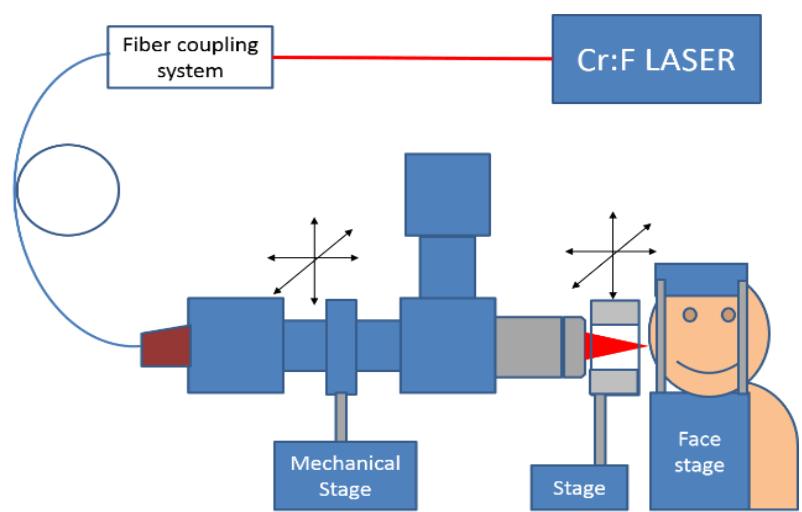


フレキシブルな計測を実現！！

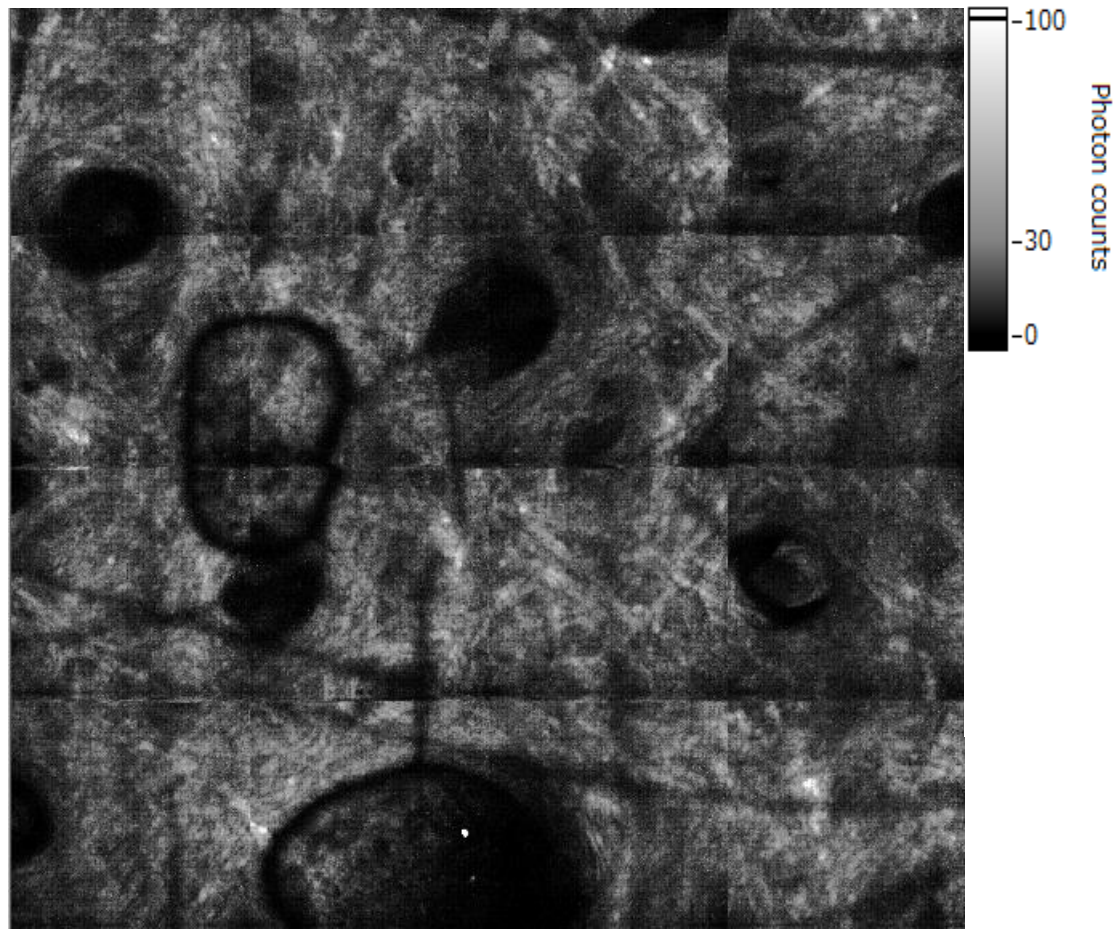
(1)大面積イメージング

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部倫理委員会の承認(#14003)を得て実施

視野 : 1.6mm*1.6mm
画像取得時間 = 2秒 / 枚
(イメージ : 4枚*4枚)



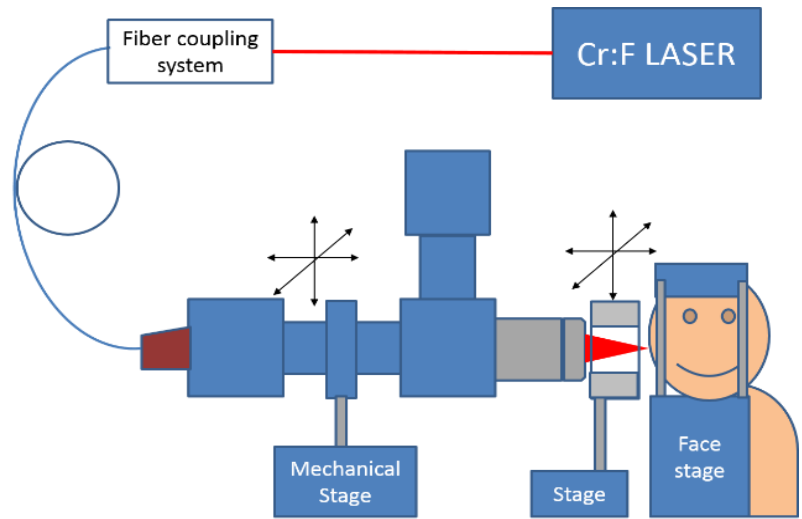
ヒト皮膚(頬)@30mW



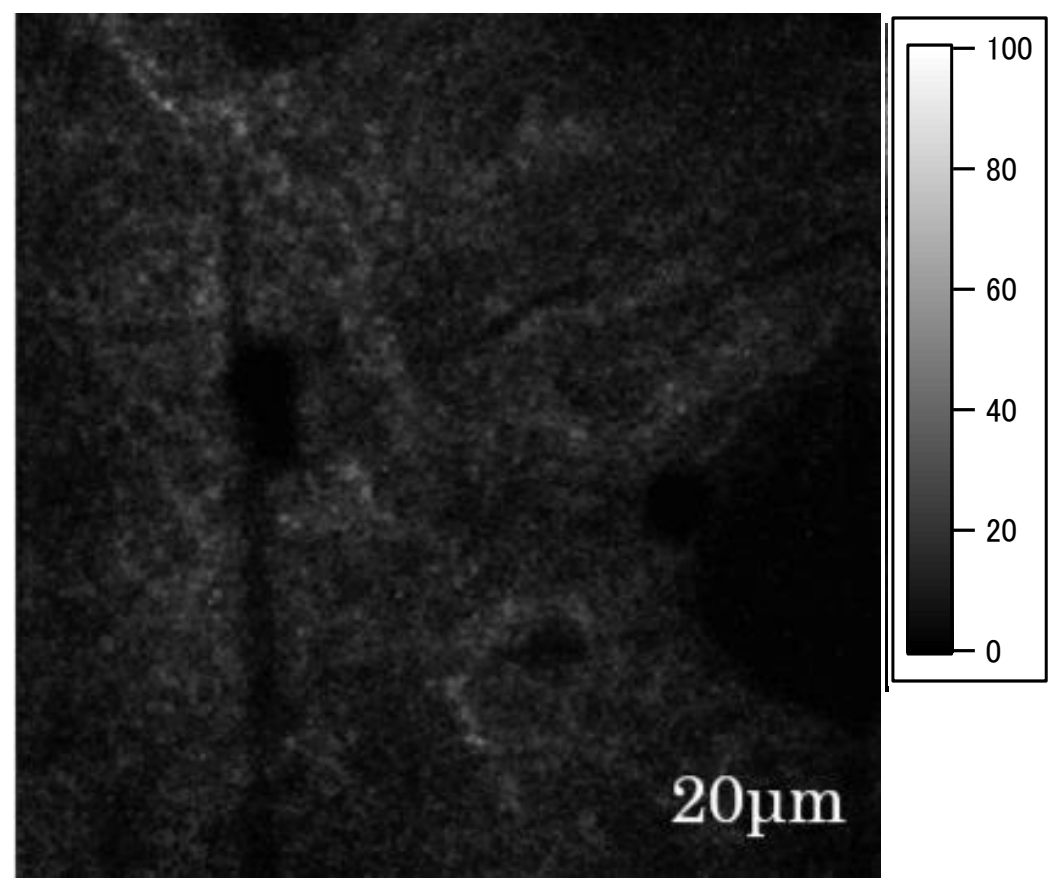
(1) 深さ分解イメージング

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部倫理委員会の承認(#14003)を得て実施

視野 : $400\mu\text{m} * 400\mu\text{m}$
画像取得時間 = 2秒 / 枚
(深さ $200\mu\text{m}$ @ $20\mu\text{m}$ / 枚)



ヒト皮膚(頬) @ 30mW



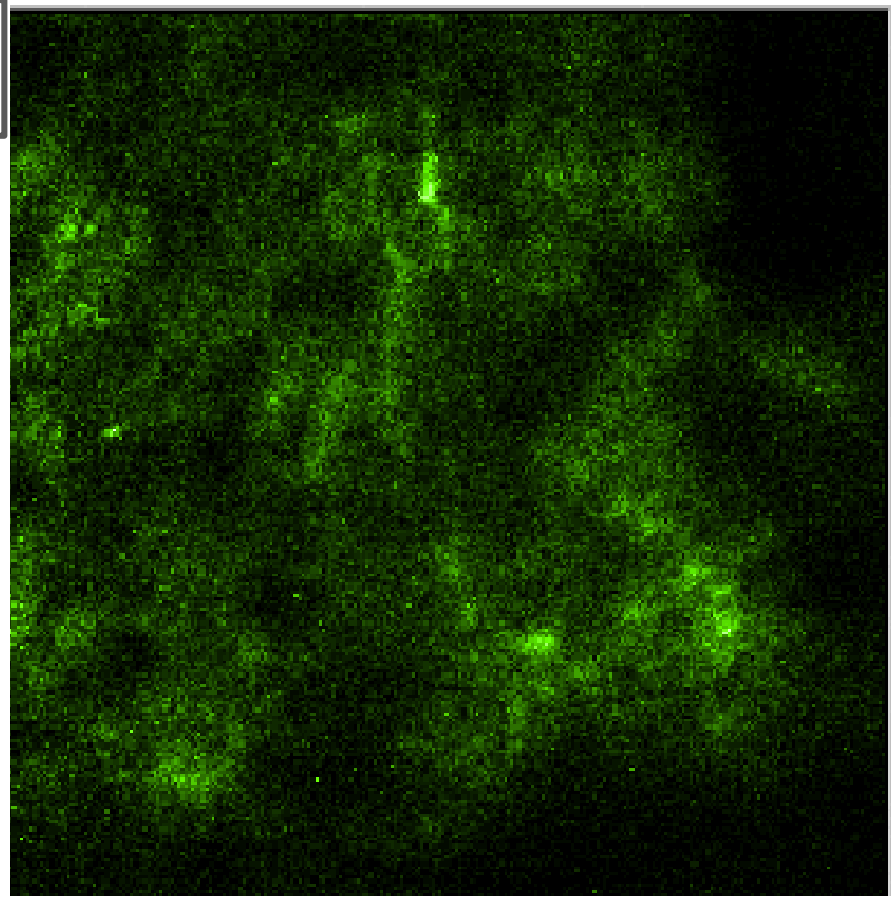
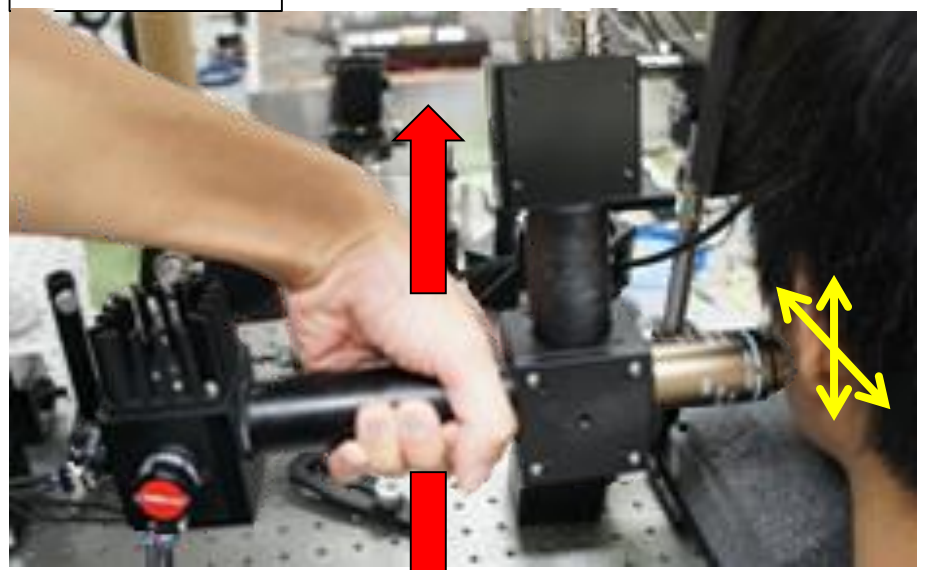
(2)ハンドヘルド計測

視野：400 μ m*400 μ m
画像取得時間 = 2秒 / 枚

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部倫理委員会の承認(#14003)を得て実施

ヒト皮膚(頬)@30mW

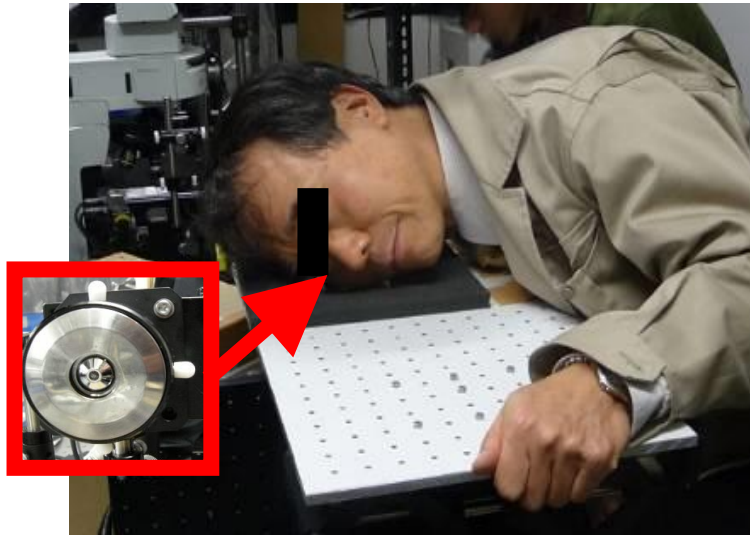
計測風景



目標とするハンドヘルド計測に成功！！

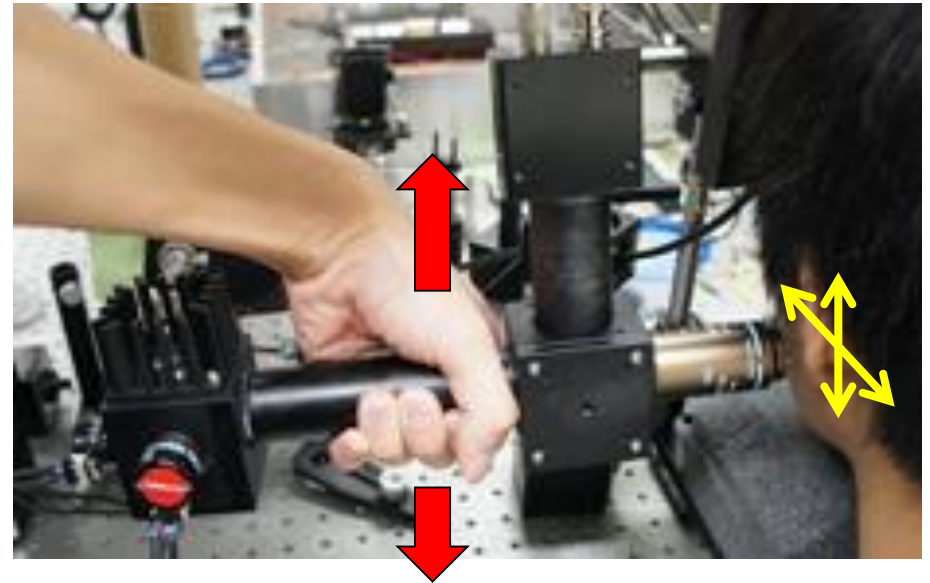
計測状況

従来の大型実験系



- ・ 顕微鏡部は固定
- ・ 被験者の移動・体勢維持
- ・ ステージが移動

小型プローブ系



- ・ 顕微鏡部が可搬
- ・ 被験者の移動が不要に
- ・ 顕微鏡部が移動

被験者の負担を大幅に軽減！！

まとめ

研究目標：SHG顕微鏡の小型化

実施内容：

- ① SHG顕微鏡用小型プローブの開発
- ② 超短パルス光のファイバーデリバリー(PCF)

結果

- ①+② ハンドヘルドプローブSHG顕微鏡の開発
- 被験者の負担を軽減した計測を実現した.
 - ハンドヘルド計測に初めて成功した.

臨床応用への可能性が大幅に高まった