

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650297

研究課題名(和文)超微細中空ファイバーバンドルを用いた生体深部の非線形光学イメージング

研究課題名(英文)Nonlinear optical imaging for deep tissue using hollow fiber bundle

研究代表者

大嶋 佑介(Yusuke, Oshima)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号：10586639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光標識による分子イメージングは、生命機能や疾患メカニズムを細胞レベル、分子レベルで解明するために必要不可欠な技術である。本研究では、医療応用を見据えて、2光子励起蛍光や第2次高調波発生などの非線形光学効果を利用した深部イメージング技術と内視鏡との組み合わせによる新しい技術の開発を目指し、その要素技術として中空ファイババンドルを開発し、非線形光学イメージングに応用した。その結果、2光子顕微鏡とカップリング光学系を構築し、生体試料の画像取得に成功した。さらに、生体試料を用いた評価実験を行い、マウス脳や大腿骨の非線形光学イメージングに成功し、中空ファイババンドルの実用化につながる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Optical imaging technique with a fluorescent label is a common tool to understand the mechanism of pathogenesis and the vital functions in cellular and molecular level. In this study, We developed a hollow fiber bundle as a basic technique for medical application of the optical imaging that combined deep tissue imaging with nonlinear optics such as two-photon excited fluorescence and second harmonic generation (SHG) and endoscopic technique. In the result, the fiber coupling system was constructed and evaluated in biological samples. Two-photon fluorescence images and SHG images of the tissues in mice were successfully obtained using the hollow fiber bundle. These results suggest that the hollow fiber bundle technique is a promising as a practical tool for endoscopic application in the future.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：深部イメージング 非線形光学 中空ファイバ 多光子励起蛍光 診断システム

### 1. 研究開始当初の背景

基礎生物・医学分野において、蛍光標識した分子を細胞レベルで可視化するイメージング技術が広く普及している。近年、生体組織の深部を生きたまま観察する *in vivo* イメージングが国内外で注目されており、研究代表者らは多光子励起蛍光顕微鏡を利用してマウス大脳皮質の表層から 1 mm 以上深部の神経細胞のイメージングに成功している。

研究代表者らはこれまで補償光学や長波長光源を利用した深部イメージング技術の開発を行ってきた。しかしながら、生体組織深部では収差や散乱、吸収のため像の劣化は避けられない。対物レンズの作動距離によって観察範囲が制約される、などの基本課題が残されていた。生体のより深部において十分な明るさと高分解能を実現するには、画像を深部から取り出すための新しい画像伝送素子が必要である。そこで、研究分担者(東北大学桐原崇史教授)が研究開発を行っている中空ファイババンドルに着目した。

中空ファイババンドルはハニカム状の断面構造を有するガラスファイバである。研究分担者らの最近の研究で、ハニカム構造を形成する壁厚を極めて薄くすることにより、干渉効果により光が空気コア内に閉じ込められ低損失に伝搬することが明らかとなった。この新規導波原理に基づくファイババンドルは、コアが空気であるがゆえ、あらゆる非線形効果が低減され、超短パルス光源を用いた非線形イメージングに有効であると考え、本研究テーマの着想に至った。

### 2. 研究の目的

基礎生物・医学分野において、蛍光標識した分子を細胞レベルで可視化するイメージング技術が広く普及している。しかしながら、生体組織深部のイメージングは、収差や散乱、吸収による像の劣化や、対物レンズの作動距離による制約により困難である。研究分担者らの最近の研究によって、ハニカム状の断面構造を有する中空ファイババンドルが提案され、これにより低損失な画像伝送が実現できることが明らかとなった。本研究では、この新規画像伝送素子の超短パルス伝送特性を調査し、2光子励起イメージングへの適用性を評価することにより、生体深部より十分な品質のイメージを取得するための新たなデバイス開発に資する指導原理を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 中空ファイババンドルを用いた新規画像伝送素子の開発

内視鏡応用のための要素技術として、ハニカム状の断面構造を有する中空ファイババンドルを用いた新規画像伝送素子を開発し、

非線形光学イメージングへの適用性の評価を行った。試作した中空ファイババンドルを用いて、蛍光ビーズの2光子励起蛍光イメージの取得を試みた。

#### (2) 2光子顕微鏡へのカップリング光学系の構築

外径約 1.2 ミリメートル、コア径約 80 マイクロメートル中空ファイババンドルと既存の2光子励起顕微鏡をカップリングさせるための光学系を構築した。具体的には、対物レンズの瞳位置周辺にミラーを設置し、中空ファイババンドルと開口数をマッチングさせるようにアクロマティックレンズを用いて、励起光を入射させた。また、中空ファイババンドルの出射端に非球面レンズを設置することで、試料に励起光を集光させ、2光子励起蛍光や第2次高調波発生(SHG)を発生させ、後方散乱した信号を同一の光学系によって、2光子励起顕微鏡の検出光学系へと導くように設計した。

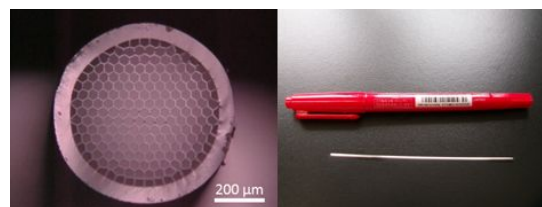
#### (3) 生体試料の非線形光学イメージング

構築した評価システムを用いて、生体試料を用いた評価を実施した。生体試料としては大脳皮質の神経細胞において、黄色蛍光蛋白質(EYFP)を発現しているトランスジェニックマウス(YFP-H マウス)の脳スライス標本を用いて、大脳皮質の錐体細胞の細胞体やその樹状突起のYFPの2光子励起蛍光によるイメージングが可能かどうか、検討した。さらに、2光子励起蛍光と同様の非線形光学過程であるSHGイメージングによる評価についても行った。サンプルとしては、マウス大腿骨の皮質骨の観察を行い、骨マトリックス中に含まれるコラーゲンに由来するSHGシグナルに基づくイメージングが可能かどうか、検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 中空ファイババンドルを用いた新規画像伝送素子の開発

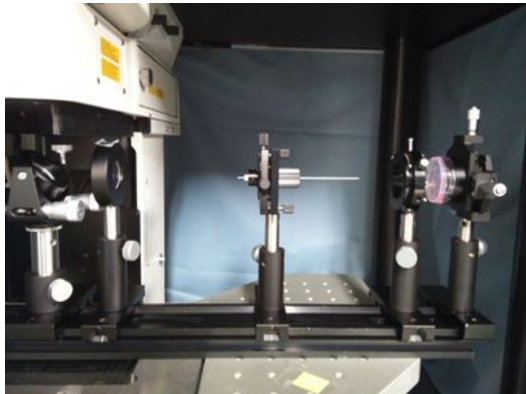
外径約 1.2 ミリメートル、コア径約 80 マイクロメートルのハニカム状の断面構造を有する中空ファイババンドルを作成した(図1参照)。また、近赤外フェムト秒レーザー光伝送時の損失、非線形特性、分散特性、クロストークを理論シミュレーションによる検討の結果、伝送素子としての有用性が示唆された。



(図1) 中空ファイババンドルの断面と概観

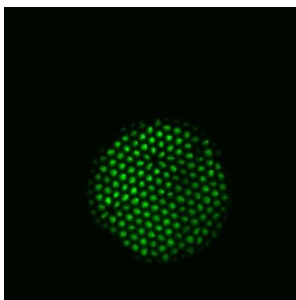
## (2) 2光子顕微鏡へのカップリング光学系の構築

既存の2光子励起蛍光顕微鏡の筐体を利用した評価系の構築においては、焦点距離( $f=100\text{ mm}$ )の色収差補正を施したアクロマティックレンズを用いて、中空ファイババンドルとのカップリングを行った(図2参照)。



(図2) カップリング光学系の概観

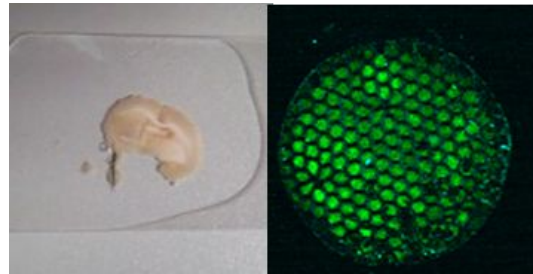
カップリングのための光学系としては、中空ファイバとカップリングレンズの開口数のマッチングを考慮し、さらにバンドルの近赤外領域の励起光と可視光領域の蛍光シグナルを同一の素子で集光できる仕様とした。また、中空ファイババンドルの出射端には、試料表面で十分な光子密度を得るため、そして発生した2光子励起蛍光シグナルを効率的に集光するため、非球面レンズ( $f=8.5\text{ mm}$ )を配置した。このようにして構築したカップリング光学系を用いて、標準試料(蛍光板)を用いた2光子励起蛍光イメージングに成功した(図3参照)。



(図3) 蛍光板の2光子励起蛍光イメージ

## (3) 生体試料の非線形光学イメージング

中空ファイババンドルと2光子励起蛍光顕微鏡をカップリングさせた光学系を用いて、生体試料の計測を行うことによって、非線形光学イメージングのための伝送素子としての有用性、実用性を検討した。黄色蛍光蛋白質(YFP)を発現しているマウス脳のスライス標本を中空ファイババンドルの出射端の非球面レンズの先に置いて、励起波長 $950\text{ nm}$ でイメージングを行った結果、YFPの2光子励起蛍光の画像を取得することに成功した(図4参照)。



(図4) 脳スライス標本(右)と蛍光像(左)

また、マウス大腿骨についても同様の実験を行った。その結果、観察用のフィルタを交換することでSHGシグナルを検出することが可能であり、中空ファイババンドルを用いた生体のSHGイメージングに成功した。これらの研究成果より、2光子励起蛍光イメージングやSHGイメージングなど、近赤外超短パルスレーザーの伝送と可視光の伝送を同一の素子で行うことには、様々な障壁があるにもかかわらず、中空ファイババンドルは非線形光学イメージングの伝送素子としての機能を果たすことが明らかとなった。非線形光学イメージに基づく画像診断技術や内視鏡への応用に向けて、空間分解能や感度の向上が今後の課題であるが、実用化への大きな一歩となる研究成果が得られた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Oshima Y, Horiuchi H, Ogata T, Hikita A, Miura H, Imamura T, "In vivo imaging of spinal cord in contusion injury model mice by multiphoton microscopy," (2014) SPIE Proceedings, Vol. 8947 DOI: 10.1117/12.2041042 (査読有)

2. Kobayashi S, Katagiri T, Matsuura Y, "Microstructured tube-leaky glass waveguide for delivery of high-powered Er:Yag laser," (2014) Journal of Lightwave Technology, 32 (5), art. no. 6693705, pp. 986-990 DOI:10.1109/JLT.2013.2295838 (査読有)

3. Kobayashi S, Katagiri T, Matsuura Y, "Infrared tube-leaky optical fibers with microstructured glass supports," (2013) 2013 Optical Fiber Communication Conference and Exposition and the National Fiber Optic Engineers Conference, OFC/NFOEC 2013, art. no. 6532583 (査読有)

[学会発表](計6件)

1. Kobayashi S, Katagiri T, Matsuura Y, "Large-core tube-leaky

waveguide for delivery of high-powered Er:YAG laser,” Photonics West 2014, Biomedical Optics (BIOS 2014) Progress in Biomedical Optics and Imaging, 89381A, San Francisco, California USA (口頭) 2014 年 2 月 1~6 日

2.Oshima Y, Horiuchi H, Ogata T, Hikita A, Miura H and Imamura T, “ In vivo imaging of spinal cord in contusion injury model mice by multi-photon microscopy,” Photonics West 2014, Biomedical Optics (BIOS 2014), Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomeules, Cells, and Tissues XII 8947-7, San Francisco, California USA (口頭) 2014 年 2 月 1~6 日

3.大嶋佑介,「種々のバイオイメージング技術の構築について」,第 11 回医用分光学研究会「診断画像構築と増感治療開発の基礎技術としての医用分光」三国観光ホテル(福井県) 2013 年 12 月 7~8 日(招待講演)

4.Oshima Y, Katagiri T, Matsuura Y, Hikita A and Imamura T, “ Development of nonlinear optical imaging technique for medical applications by the new optical devises,” 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ 異分野連携が拓く新規光学デバイスを駆使したバイオイメージングと医療応用への展開」ポートピアホテル(兵庫県) 2013 年 12 月 3~6 日(招待講演)

5.小林駿, 片桐崇史, 松浦祐司, 「赤外イメージング用全誘電体中空光ファイババンドルの提案」平成 25 年度電子通信情報学会ソサイエティ大会, 福岡工業大学(福岡県) 2013 年 9 月 17~20 日

6.大嶋佑介, 本蔵直樹, 正田温彦, 今村健志 「In vivo イメージングのための非線形光学顕微鏡の開発と医療応用」第 39 回レーザー顕微鏡研究会講演会 シンポジウム「新規光源を用いた顕微鏡」理化学研究所 和光本所(埼玉県) 2013 年 7 月 31 日(招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大嶋 佑介(Oshima, Yusuke)  
愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院  
教員)  
研究者番号: 10586639

### (2) 研究分担者

片桐 崇史(Katagiri, Takashi)  
東北大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 90415125

### (3) 連携研究者

今村 健志(Imamura Takeshi)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70264421

正田 温彦(Hikita Atsuhiko)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 60443397