

前臨床および臨床分野への 超短パルスレーザーの応用と展開

マルコ・アリゴーニ、ナイジェル・ギャラハ

新しい世代の1055nm超短パルスファイバレーザーは、非線形顕微鏡システムの稼働率を飛躍的に高める。このレーザーは、SHGのようなラベルフリー技術の前臨床応用、ひいては臨床診断への導入を約束するものである。

2次高調波発生(SHG)顕微鏡は、構造的および機能的マッピング情報を作る3次元画像を得るために生命科学研究では広く用いられている非線形顕微鏡イメージング技術の1つである。これらの画像によって、生体検査の組織サンプルの顕微鏡的病理(検査および精査)、また生検や患者の生体内直接

観察(in situ検査)が可能になるので、非線形顕微鏡は前臨床応用、究極的に臨床応用で使われるようになる。この移行トレンドをサポートするのは、新しいタイプの超短パルスファイバレーザーである。このレーザーは、必要不可欠の長波長(1055nm)を、コンパクトかつ堅牢なパッケージでメンテナンスフ

リーで提供する。

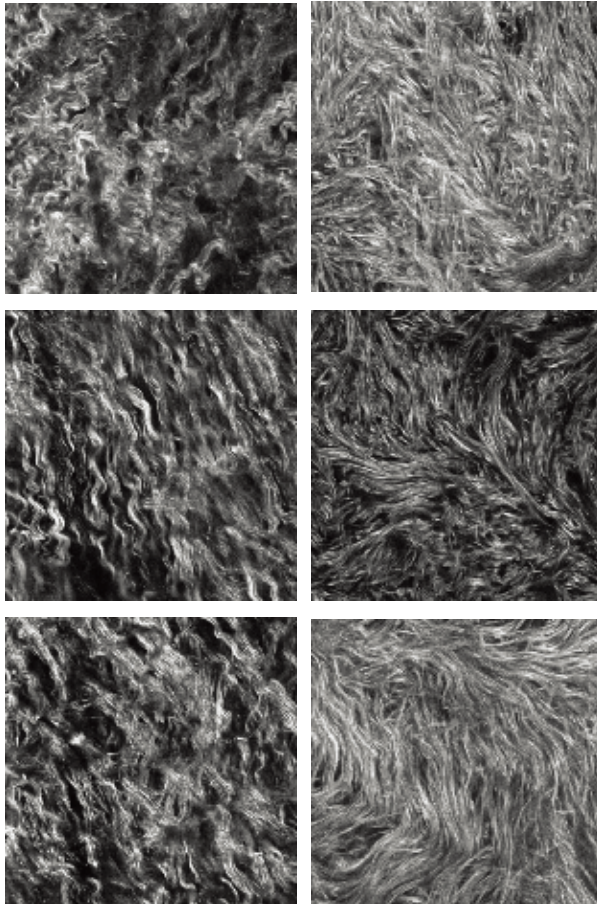
超短パルス3D MPE顕微鏡

超短パルスレーザーを用いた非線形顕微鏡の最初の実証は、蛍光の多光子励起(MPE)に関係していたので、様々な関連技術がまとめてMPEという言葉で表現されることがよくある。これらMPEは、生命科学の光学顕微鏡に革命を起こした。と言うのは、MPEが生きた試料にほとんど、あるいは全く損傷を与えることなく、本来備わっている3次元(3D)解像度を提供できるからである。2光子吸収(または3光子吸収)プロセスにより、ビーム強度が丁度ビームウエストで非線形効果を促進する(図1)。これにより、1光子共焦点顕微鏡で行っているようにアパーチャを使ってシグナルからの背景光を空間的に除去する必要がなくなっている。3D画像は、レーザービームを結像面(x-y)に走査し、試料もしくは対象をz方向に動かすことで形成される。

非線形イメージングの一般例には、蛍光の2光子(または3光子)吸収(MPE)、コヒレントアンチストークラマン散乱(CARS)、2次高調波発生(SHG)、3次高調波発生(THG)が含まれる。さらに、こうした技術の実装では実用的なバリエーションが増えつつある。例えば、空間光変調器やマルチビーム光学系を用いて、全体画面(断面像)の取得、あ

悪性腫瘍

正常



これらの2次高調波発生(SHG)画像は、ヒトの卵巣組織の生体外光学一断面を表示している。この悪性腫瘍は、病理学的に高悪性漿液腫瘍に分類されている(左縦列)。各例の視野サイズは170×170 μm。画像は、前方検知890 nm励起を使い40×0.8NA、ズーム2、バンドパスフィルタで分離、シングルフォトンカウンティング光電子増倍管で取得(画像提供、ウイスコンシン・マジソン大学キャンパノラ研究所)。

るいは3次元像取得にかかる時間を減らすことを目標にしている。

3次元的識別性の他に、組織イメージングに適した非線形顕微鏡には別の優位点がある。まず、これら非線形効果の低確率の意味するところは、サンプルが光路に沿って入射する光のほんの一部を吸収し、残りは多方向に散乱することである。これとは対照的に、共焦点顕微鏡では、ほとんどの光が光路で吸収される。このように低吸収であることは、サンプルを危うくする、あるいは死に至らしめる可能性がある光損傷を大幅に制限することである。

次に、固定組織は必要に応じて任意に分割できるが、生きた組織のイメージングは通常、組織深部のイメージン

グを必要とする。これはヒト組織の生体内直接観察を目的とする非線形顕微鏡の最近の利用法として確実に言えることである。深部でイメージングを可能にする際に制限要因となるのは光の散乱である。ほとんどの材料で、散乱は波長に反比例する。波長が長ければ長いほどイメージングの深度はより深くなる。このことは、通常の顕微鏡、あるいは共焦点顕微鏡で使用される可視光よりも2倍あるいは3倍長い波長を使う非線形顕微鏡がより優れている。

なぜSHGか

ほとんどの2光子励起、3光子励起顕微鏡は、蛍光染色液や染料を使用する。ごく最近では、遺伝的に組込まれた蛍

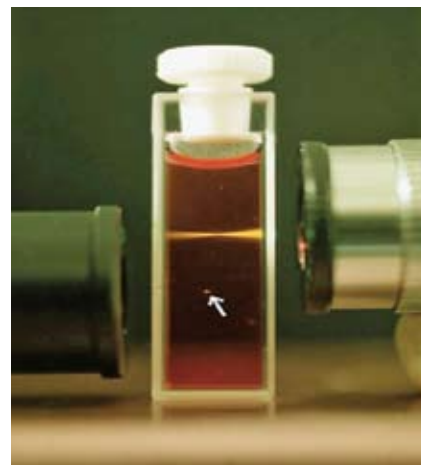


図1 非線形顕微鏡には3D機能が備わっている。右から来る緑色ビーム(532nm)によりシングルフォトン吸収が光路全体に沿って蛍光を励起している。しかし左からの近赤外(NIR)ビーム(1057nm)では、2光子吸収は矢印で示した小さな焦点で蛍光を励起するだけとなる(ロンドン、サイエンスフォトライブラリ、ブラッド・アモス提供)。

理科学用レーザーにおける産業革命

最高水準のパルス幅を供給し、コンパクトで耐久性が高く、メンテナンスフリーの超短パルスレーザーは、現在のトレンドである「理科学用レーザーにおける産業革命」の傑出した一例である。この高耐久化の達成は、産業製品の幅広い世界から重要コンセプトと試験手順を不可欠な要素として採用している。際立った例は、促進ストレス性能試験 (HASS) の利用である。ここでは全てのレーザーが、工場出荷前に、一連の厳しい温度サイクルと振動テストに合格しなければならない (図A)。

この産業革命から、これまでの理科学実験では漠然としていたコンセプトが生まれようとしている、つまりデータスループットである。産業用レーザーのユーザは、稼働時間あたりに製造できる製品数量を知りたいが、理科学用レーザーのユーザは、限られた時間の中で自分のシステムがどれだけ多くのデータ取得ができるかについてこれまでほとんど考えた

ことはなかった。学術と商用研究の両方で、増え続ける圧力と研究コストの上昇から今やこれが基準となる時代が到来したと考えられる。

SHG イメージングアプリケーション向けの超短パルスレーザーにとってこのことは何を意味するか。衝突パルスモードロック (CPM) 色素レーザーをベースにした元来のフェムト秒レーザーは、無数のコンポーネントを載せた大きな光テーブルで構成されており、高度な技術を持つレーザーの専門家が常に微調整し、繰り返し最適化する必要があった。次に来るのが Ti:Sapphire で、これは最初はイオンレーザーで励起したが、次に DPSS レーザ、さらに光励起半導体レーザー (OPSL) で励起するようになった。各世代毎に、レーザーは段々と小さく、シンプルに、より高信頼性になっていった。今では、新しい世代の超短パルスファイバレーザーがパルス幅 70fs を実現している。工業試験をパスした小さなパッケージで、わずか



図A 産業グレードの信頼性提供の決め手になるのは、HASS 試験である。ここでは、レーザーを包括的な「シェイク&ベイク」テストにかける前に、コヒレント社の技術者が環境テストチャンパ内の除振台に固定している。

318×318mm のサイズである。オプトジェネティクスのような研究用途では、この超短パルスファイバレーザーは結果的にデータスループットを向上する。さらに重要なことは、この新しい世代のファイバレーザーは、これらの研究技術が前臨床、究極的には臨床市場向けにパッケージされることを可能にするということである。

光プローブ、蛍光指示薬によって一連の新技术が可能になった。これらの新技术は、生物学のいくつかの問題を解くことに貢献しつつある。

染料あるいは遺伝子組み換えはヒトの被験者には使えないので、ヒトの被験者のリアルタイム、生体内観察はできない。一般に、高濃度のこれら蛍光染色液や染料のほとんどはヒト被験者に注入することは現実的でもなく安全でもない。また、遺伝子組み換えを使うことは一層非現実的であり、非倫理的である。したがって、ヒトや臨床サンプルに使用するにふさわしい候補である MPE だけが、組織内在の蛍光材料として利用できるものとなる。例えば、SHG や THG のような高調波発生法は NADH 撮像に用いることができ、CARS/ SRS 技術は

脂質のイメージングで卓越している。

簡便さと、より低コストの自動テストへの道は、今後の臨床利用への移行を想定したどんな方法でも必要不可欠である。この点は、CARS には多少制限要因となる。CARS はすべての MPE 技術のなかで最も複雑であることはほぼ間違いない。CARS は、特別な光学配置と時間的に同期した 2 つの異なる波長の超短パルスビームを必要とするからである。さらに、CARS 波長の 1 つは一般に 800nm 付近であるので、組織への浸透に限界があり、損傷が始まる前に使えるパワーにも限界がある。同様にして、NADH のような内在蛍光は一般に 710~800nm での励起を必要とする。こうしたことから SHG や THG が、前臨床および臨床目的の潜在的候

補として残る。

その名が示すように、SHG や THG では入射光の一部が、ある光学的条件が一致したときに、2 次高調波、3 次高調波に変換される。理論的には、THG はほとんどの異なる屈折率の界面で起こり、細胞構造の境界あるいは脂質と水との界面をイメージングするのに役立つ。しかし、THG で可視光域のシグナルを生成するには単純なレーザー共振器で作り出すことが難しい波長 (1.2~1.5 μm) で励起しなければならない。したがって、前臨床利用は、このような波長生成への経済的な方向性が出てくるまで制約を受けることになる。

SHG は、高いピークパワーのレーザーを非中心対称構造分子にフォーカスすることでいつでも起こる。これらの中

には自然に起こるものもある。最も一般的な例では、筋肉や多くの他の組織に見られるコラーゲンだ。同様に重要なことは、SHGは事実上波長依存性がなく、使いやすい波長で新たに使えるようになった簡素な超短パルスレーザー光源が利用できる。このような優位性があるので、SHGは前臨床研究向けの最有力候補になった。恐らく、前臨床生体内非線形イメージングで、現状の研究の約80%を占めると思われる。

新しいシンプルな1055nm光源

すでに触れたように、どんな非線形イメージングでもより長い波長を使うと組織浸透度が深くなり、損傷が少なくなる。生体内SHGでは、数100 μ mの浸透が極めて望ましいので、より長い波長が好まれる。一方、実際の組織構造に依存することであるが、SHGの後方散乱強度は波長が長くなるにつれて少なくなる可能性がある。ヒト組織に最適な波長はまだ正確な研究で決まっていないが、1000nmよりも長い波長がSHGと相性がよいという研究がいくつか見られる。

チタンサファイア (Ti:Sapphire) レーザは、非線形顕微鏡アプリケーションの大半を占める超短パルスレーザーとして使われている。しかし、Ti:Sapphire レーザで1080nmに届くものは少ししかなく、このレーザー媒質の基本的な限界は、1000 nmを超える波長では、比較的低いパワーレベルしか利用できないということである。このレンジを伸ばすために波長可変光パラメトリックオシレータ (OPO) を利用することは研究や最適化には極めて有用であるが、コストと複雑さから考えて、前臨床応用の限度を超えている。

幸いなことに、新しい世代の約1055nm固定出力波長が、ダイオード励起



図2 Coherent Fidelityのようなファイバ技術をベースにしたコンパクトで、耐久性が高い新しい超短パルス光源は、現在のトレンド「理科学用レーザーにおける産業革命」の典型をなす。

Yb添加ファイバをベースにして開発された。このファイバベースの技術は、Ti:Sapphire レーザよりも光学的にシンプルであり、コンパクトで非常に耐久性が高く、メンテナンス不要で、しかもシールドレーザーヘッドに経済的にパッケージすることができる。この次世代超短パルスファイバレーザーとは、新しいコヒレント社のFidelityである(図2)。

医療用レーザーツールの重要目標は、最小の照射量で最大の効果を上げることである。生体内非線形イメージングでは、レーザーの平均パワーレベルで可能な最高輝度のイメージングを達成することを意味する。SHGおよびすべての非線形技術では、画像輝度はピークパワーと平均パワーの出力に比例する。より高いピークパワーは、サンプルの損傷が回避される限りにおいて、パルスエネルギーを増やすか、パルス幅を縮小することのいずれか、またはその両方で達成可能となる。Fidelityは、生体への損傷の少ない波長を持ち、他の超短パルスファイバレーザー(一般に

100~250fs)よりも遙かに短いパルス幅(<70fs)を得られる。

言うまでもなく、実際にSHG画像の輝度を決めるのはサンプルにおけるピークパワーと平均パワーである。70fsパルスのスペクトル幅が広がることは、ビーム伝搬光学系における群速度分散(GVD)が、最初のレーザーパルス幅を広げることを意味する。このために、Fidelityはソフトウェア制御の群速度分散補償光学系を組み込んでおり、これによりユーザやシステム構築者は光学系による分散を補償し、サンプルにおけるパルス幅を最小にすることができる。さらに、この特徴により研究者はサンプルにおけるパルス幅をなめらかに変更するオプションを持つことができ、画像輝度とそれともなう光損傷がパルス幅でどのように変わるかを研究することができる。

稼働率を飛躍的に向上

最新世代の超短パルスファイバレーザーは、特に深組織のイメージングに必要とされる出力特性を提供するため、SHG顕微鏡に最適である。さらに、これら新しい光源は信頼性が強化され、使いやすさも向上しており、加えてデータ取得レートも高くなっている。これは高いパルス繰返周波数と高い平均パワーにより可能になったものである。また、こうしたことから、これらのレーザーをベースにした多光子励起顕微鏡の稼働率が飛躍的に向上し、この技術の普及も最大化するものと期待できる。

参考文献

(1) C.-Y. Dong et al., J. Biomed. Opt., 18, 3, 031101 (Apr. 5, 2013); doi:10.1117/1.JBO.18.3.031101

著者紹介

マルコ・アリゴニはコヒレント (Coherent) 社のマーケティングディレクター
ナイジェル・ギャラハはシニアプロダクトマネージャー
e-mail: marco.arrigoni@coherent.com e-mail: nigel.gallaher@coherent.com