

研究、生体医学に活力を与える 超広帯域光源

フセイン・イマム

現在多くの分野に普及している超広帯域光源(スーパーコンティニウム光源)によって生命科学者は前例のない柔軟性を手に入れることができる。この技術によって可能になるアプリケーションは研究と臨床の両方に広がり、これには細胞レベルの分解能を持つ業界初の OCT システムも含まれる。

スーパーコンティニウムレーザーが登場してきてから、生命科学システムのメーカーやユーザは、「ランプと同様に広帯域でありながら、レーザーのように高輝度」なこの光源の力に引きつけられた。スーパーコンティニウム光源が提供するレーザーの利点は、高出力、回折限界出力、またランプとしては光周波数の2オクターブ以上をカバーする非常に広帯域のスペクトラムを持つ。現在、多くのベンダがUVから赤外(IR)まで広がるスーパーコンティニウム光源を販売しており、これにより研究者や臨床医は生物学的材料や薬品を照射、調査、励起してその複雑な機能を理解しようとしている。

標本検査に利用できる種々の光学特性のそれぞれが、波長スペクトラムの様々な領域を必要とする(図1)。蛍光では、一般に可視波長が蛍光色素やラベル励起に

必要となるが、OCTでは組織に深く浸透することから近赤外(NIR)波長が好まれる。広いスペクトラル範囲が使えると、研究者は光でサンプルを調べる際に最も適切なモード、あるいは多数のモードを柔軟に選択することができる。重要な点は、スーパーコンティニウム光源が回折限界であり、細胞レベルで高解像度分析ができることである。さらに、スーパーコンティニウム光源がパルス化されているので、時間を識別子に加えており、この点は寿命研究では重要である。

生体外応用：顕微鏡

スーパーコンティニウム光源を生命化学で活用する好例は、共焦点顕微鏡である。ライカ・マイクロシステムズ(ドイツ、ベツラ)のSP8x共焦点顕微鏡システムは、蛍光寿命イメージング顕微鏡(FLIM)、

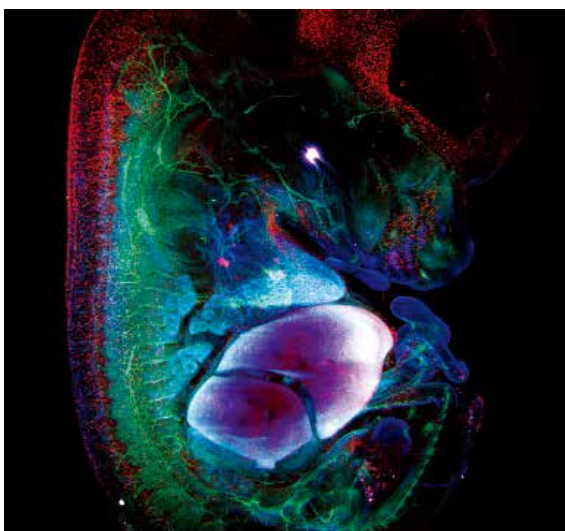
蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、ゲート誘導放出抑制(g-STED)動作にSuperKスーパーコンティニウム光源(NKTフォトニクス;デンマーク、ビルケレズ)を使っている。

キョロショウジョウバエ幼虫のライトシート顕微鏡画像を可能にするスーパーコンティニウム光源。緑色蛍光タンパク質(GFP)と自己蛍光を示している(頁右上)。マウス胚の3D最大強度画像、スタックサイズ3450 μm 、ステップサイズ10 μm (右)。(LaVision BioTec 提供画像)



ここでは、可視光スペクトラムの任意の波長が使えるため、波長をその最大吸収に調整することで蛍光信号の最適化ができる。多数の色素を使う場合、コントラスト最大化とクロス励起最小化が確実にできるように最適調整ができる。光源がパルスであり、波長の選択が幅広いので、FLIM, FRET, g-STEDに別の側面が加わる。時間相関シングルフォトンカウンティング(TCSPC)のようなライフタイムアプリケーションでは、励起波長のパルス幅がサンプルの寿命よりも遙かに短く、励起するためのパルスエネルギーは十分である。

SuperKのパルス幅は、通常使われているパルスダイオードよりも狭く、波長あたりのパワーは遙かに大きい(図2)。3重に染色した細胞の共焦点蛍光像は多波長チューニングの力を示すものであり、特にオレンジでは、使えるレーザーが課題になっている。これらの色素の各々で、パルスを発して寿命の減衰を計測できる。比較的に新しい技術、ライトシート顕微鏡もスーパーコンティニウム技術の恩恵を受けるようになってきている。先頃、ラビジョン・バイオテック(ドイツ、ビーレフェルト)が、SuperKスーパーコンティニウム光源で動く多数のウルトラマイクロスコプをフィールド導入した(参照:BioOptics 01/22/2014記事 "The planar truth about light-sheet microscopy," p. 40)。この技術の原理は、極めて薄いシート状の光(5~40 μm × 0.1~10mm)で横からサンプルを照射し、ライトシートに垂直となっている顕微鏡



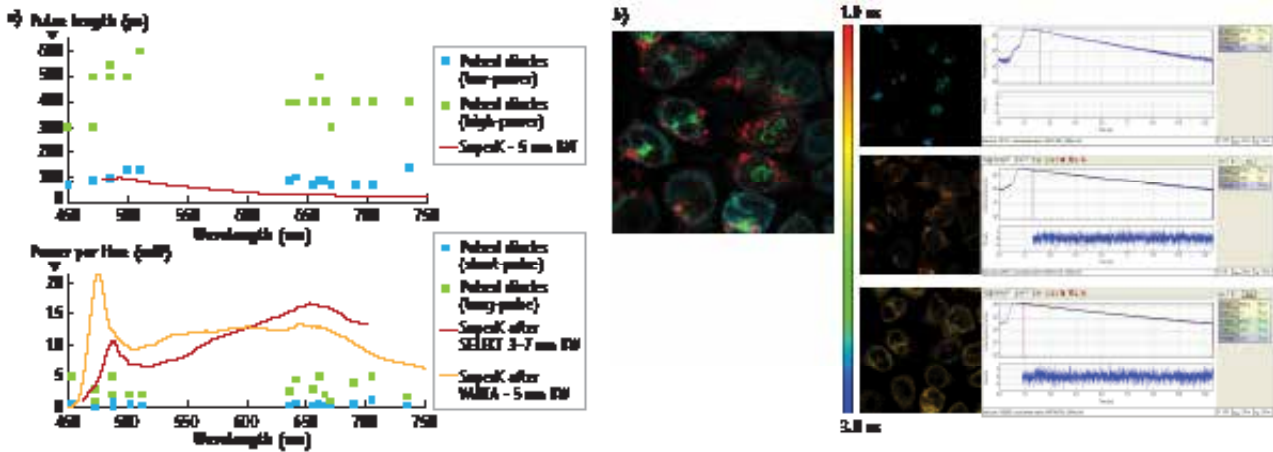


図2 スーパーコンティニウムのパルス幅は、通常使われているパルスダイオードよりも狭く、波長あたりのパワーも大きい(a)。スーパーコンティニウム光源を使うことで、ライカ・マイクロシステムズの SP8x で蛍光寿命イメージング顕微鏡 (FLIM) の結果が得られる (b)。(ドイツ、ハイデルベルク、分子細胞生物定量分析センターグループ、マチアス・バイス提供画像)

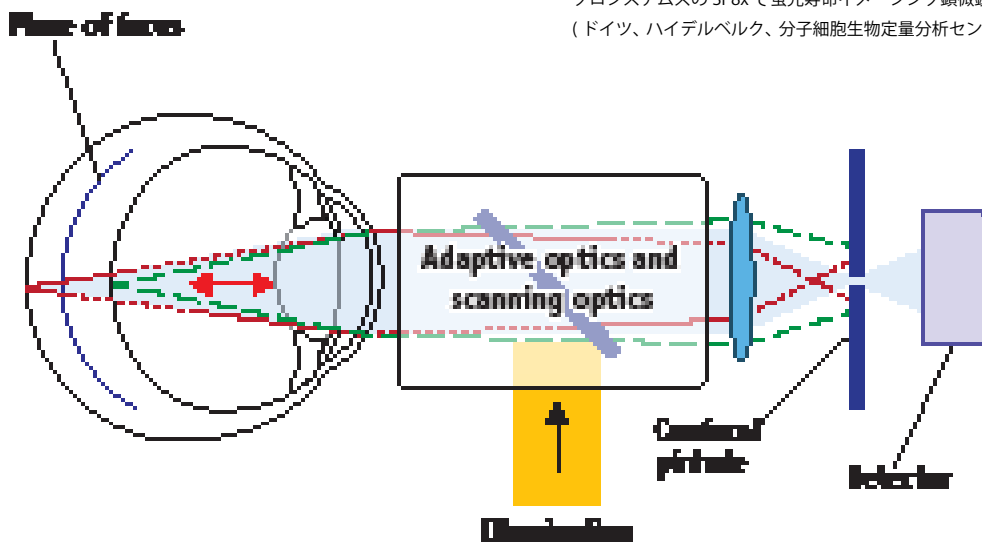


図4 照射光は網膜の特定面に焦点を絞っているが、光は網膜の厚さ全体に散乱する(明確にするため誇張している)。オプティクスは、焦点面から散乱される光が焦点のピンホールを透過するように設計されている(出典 A. Roorda, Optom. Vis. Sci., 87, 4, 260-288 [2010])。

同時生理学的記録で、錐体タイプの特定ができる。

細胞レベル OCT

光断層映像法 (OCT) は、組織、臓器の横断面解析を生体で非侵襲的に行う技術として急速に普及している。これは、音波の代わりに光波を用いており、超音波の光アナログ版とすることができる。超音波と同様に、OCT は組織の異なる深さからの反射光の時間遅延で、サンプルの 3D イメージングを可能にする。したがって今では、波長を数ミリメートル (音) から約 $1\mu\text{m}$ (光) に変えることで分解能が向上している。OCT の $1 - 10\mu\text{m}$ は、超音波では $> 150\mu\text{m}$ に相当する。

一般的に、スペクトラルドメイン OCT (SD-OCT) (2) では、広帯域の非干渉性の光源が必要とされる。SD-OCT では、撮像の軸解像度は光源のコヒレンス長によって決まる。干渉性が低ければ低いほど、短コヒレンスがゲートとして働くの

で、サンプルのより薄い部分にわたってますます微細な画像が得られる。広帯域光源は低コヒレンス長である (図 5)。生体内で組織に浸透するために、光散乱や自家蛍光は有害であるので、OCT に必要とされる波長は重要である。診断波長域、治療波長域は $700 - 1300\text{nm}$ にある。この波長域で主に 2 つの波長が OCT で用いられている。眼科では、血管の血液の光吸収が画像解像度を高めるので 800nm が主に用いられる。皮膚の深部組織の画像化あるいは内視鏡では、侵入度が向上することから 1300nm が好まれる。

OCT の臨床応用が最も広がっているのは眼科であり、ここでは網膜層内部のイメージングが行われている。解像度が向上していることから、加齢性黄斑変性症 (AMD) や糖尿病性網膜症 (DR) の早期診断、より効果的な処置が可能になっている。

スーパーluminescentダイオード (SLEDs) は、従来 SD-OCT 向けの光源だっ

た。高解像度にするには SLEDs は多数の狭帯域 SLEDs を統合することによってしか広帯域化できないため、スペクトラル形状が極めて不均一になり、出力も低い。スーパーコンティニウムにより高解像度 OCT が実証されたが (3)、イメージング品質を限界づけるスーパーコンティニウム光源のノイズパフォーマンスが常に問題になっていた。眼科用 OCT の先駆者、Bioptigen (米国ノースカロライナ州、リサーチ・トライアングル・パーク) は黄斑高解像度画像を撮るためにスーパーコンティニウム技術で実験を行った (図 6)。この結果に基づいて Bioptigen は新しい Envisu XHR OCT システムを発表した。SuperK システムの広い帯域をフルに利用できるように同社の市販の SD800 XHR 300nm 分光計を用いた。結果は、軸分解能が $1\mu\text{m}$ に達した初の商用システムとなり、真の細胞レベル生体光組織学を研究者に提供するものだった (図 7)。アプリケーションによっては、異なる光

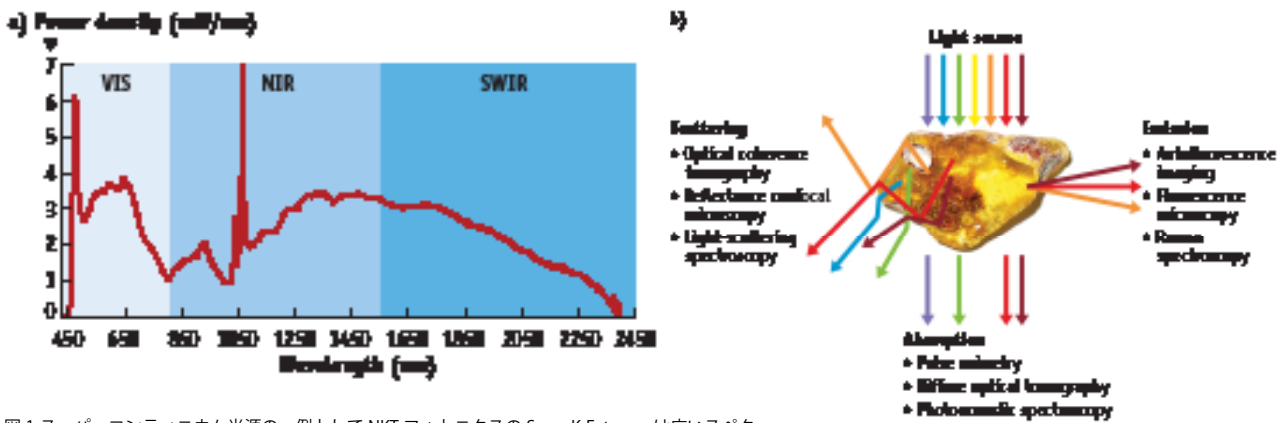


図1 スーパーコンティニウム光源の一例としてNKT フォトニクスの SuperK Extreme は広いスペクトラル範囲をカバーする (a)。組織の多様な光学特性は様々な技術に関連している (b)。(提供画像)

を使って励起された面を画像化する。ライトシートを通してサンプルを動かすことで画像のスタックができ、サンプルの3D表現を作ることができる(口絵参照)。この技術は、組織構造や形態を見るのに理想的であり、マウスの脳全体、リンパ節、腫瘍が短時間で画像化できる。この点は薬学研究では重要である。蛍光励起用の広い可視光、各波長での高出力、回折限界出力によって、可視光と NIR スペクトラムの任意の波長でライトシートが生成可能となる。

生体内：網膜像と精神物理学

生体外応用に加えて、スーパーコンティニウム光源は生体内でも利用範囲が広がっている。例えば、網膜画像化によって、緑内障、黄斑変成、その他の網膜疾患の診断で役立つ情報が得られる。また、目に関連する精神物理学的研究もできる、つまり目と脳がどのように相互作用するかということである(視覚神経科学)。網膜と視神経は神経組織、脳組織の拡張をなすので、目を調べると、早期の神経障害、病気の初期兆候についての情報が得られる。

高い空間分解能を持つ網膜画像は、網膜の血管、個々の錐体、受容体のような構造を見るために必要である。適応光学スキャニングレーザ検眼強(AOSLO)一般的に言うと、目の画像化のための共焦点顕微鏡—は異なる波長のレーザ光を使って網膜を照射し、適応光学が波面を変え、角膜とレンズによる収差を補償する(図4)。

従来の共焦点顕微鏡と同様に、画像は異なる焦点面から得られ、網膜の層を調べることができる。スーパーコンティニウム光源の多波長を使うことで、蛍光分光計(網膜血管造影向け)や網膜分光計(目の血流における酸素含有量計測のため)を利用する際に網膜の異なる部分の刺激ができる。これは、緑内障のような病気の診断で究極的な臨床応用を目指して現在研究が進められている。

従来のレーザでは高いコヒレンス長はスペクル(斑点)の原因となり、微細な網膜特性に対する分解能を厳しく限界づけている(図3b)。可視光の任意の波長を選択できることで、網膜回路および細胞規模の健康状態をテストすることができる。さらに、単に出力帯域を選択することで

コヒレンス長を変えられるため、光受容体の外側部で視覚過程がどのようにはじまるかについての最近の仮説の一部をテストすることもできる。現状では、外側部は干渉計のように振る舞い、反射されて瞳孔に戻ってきた信号が外側部の長さに応じて時間的に変化すると考えられている。多波長同時使用により、これらの細胞の絶対長を1回のスナップショットで計測でき、強力な診断ツールになる可能性がある。

視覚神経科学に一例がある。従来のレーザを使って得るのが難しい特定の波長(545および710nm)は、目の「赤」と「緑」の錐体光受容体に対する刺激からの反応差を最大にする。545nm だけでは赤と緑の水晶体の感度は変わらない。710nm で、感度差が最大化される。スーパーコンティニウム技術は心理物理学的測定を容易にすることができる。例えば、人の錐体の地図を作る際、異なる波長を患者の個別錐体に瞬間的に照射して、見た色を患者に問う。さらに広い帯域、例えば10~20nm では干渉問題が減少し、遙かに鮮明な画像が生成されるが、これは狭帯域のレーザではできない。この機能により、

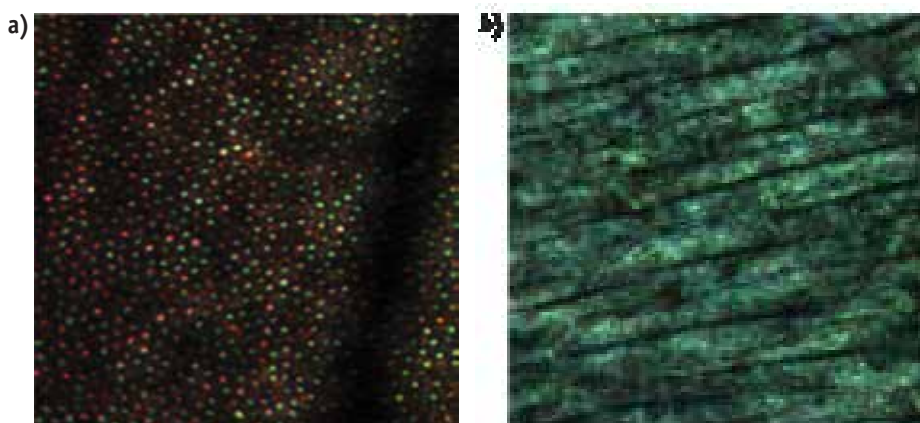


図3 網膜の光受容体(a)と神経繊維(b)を示すこれらのRGB画像を作る際に、3波長:606、480、530nmでスーパーコンティニウム光を使用した(ウイスコンシン医科大学、アルフレド・ドゥブラ提供画像)

技術あるいはモードを同時に配置することから大きなメリットが得られる。一例を挙げれば、眼科だ。上述の通り、1つのスーパーコンティニウム光源で網膜のイメージングとOCTの両方が可能になり、両方の撮像手段によって構造的および機能的情報が得られる。例えば、チャン氏らの研究はスーパーコンティニウム光源を眼科OCT向けだけでなく、酸素測定法に用いて障害早期の病態生理学の情報量を増やした(4)。

スーパーコンティニウム光源の生体医学的応用は揺籃期にあるが、多くの場合この技術によって柔軟性や解像度の向上、コスト効果の高い多様な導入が実現している。高出力スーパーコンティニウム光源は新たなアプリケーションを見だしつつあり、この光源が成長して前臨床および臨床应用到されるようになることは、見ていて胸が躍る思いがする。

参考文献

1. L.C. Sincich et al., "An adaptive optics retinal microstimulator for color vision studies," Society for Neuroscience Abstracts (2011).
2. D.D. Sampson and T. R. Hillman, "Optical coherence tomography, lasers and current optical techniques in biology," ESP Comprehensive Series in Photosciences, 481-571, Cambridge, England (2004).
3. L. Liu et al., Nat. Med., 17, 1010-1014 (2011).
4. J. Yi, Q. Wei, W. Liu, V. Backman, and H. F. Zhang, Opt. Lett., 38, 11, 1796-1798 (2013).

著者紹介

フセイン・イマム、Ph.D. NKT フォトニクス
のリージョナルマネージャー。
e-mail: hui@nktphotonics.com; www.
nktphotonics.com.

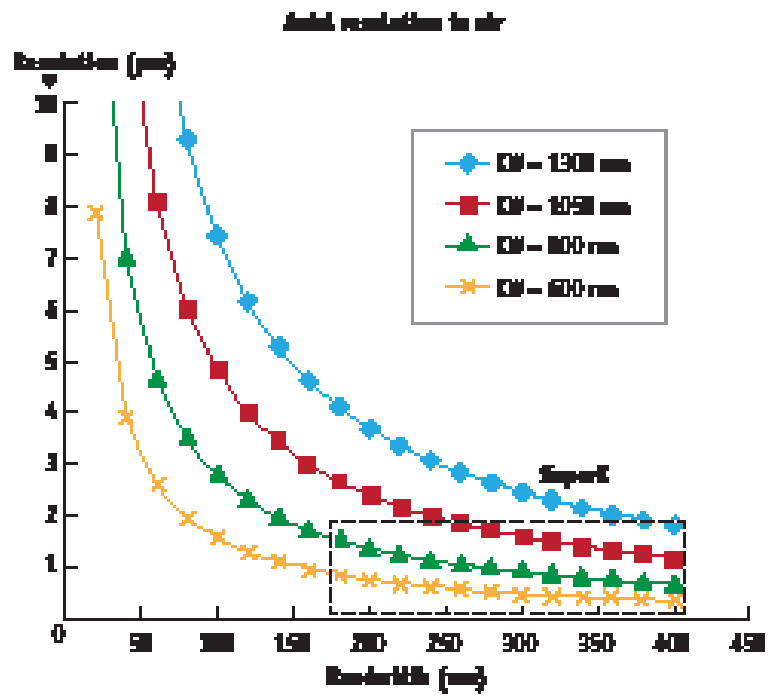


図5 帯域によるSD-OCTの軸分解能の比較(ドイツ、ハイデルベルク、分子細胞生物定量分析センタグループ、マチアス・バイス提供画像)。

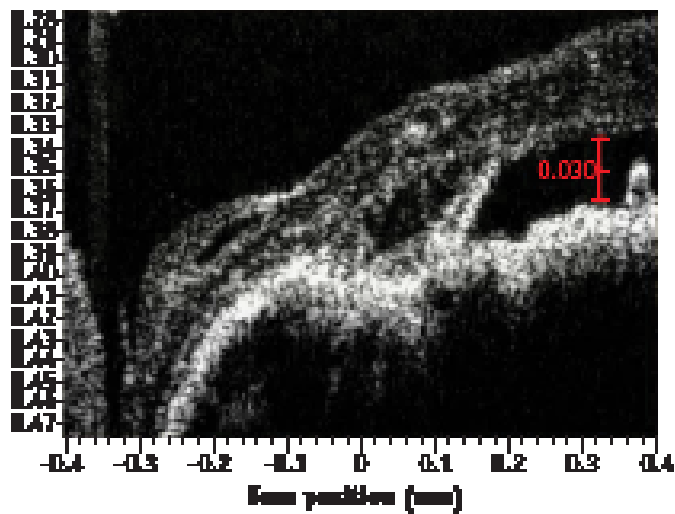


図7リアルタイムで画像化した、マウスの目のこの高分解能画像は、シェレム管の流体粒子を示している。これは眼圧調整に役立つ微細光子をもっている。この流れがどのようにコントロールされるかについての研究は、緑内障の処置では重要である。薬の効果を見るには高解像度が不可欠(デューク・アイセンタ、シナ・ファーシウ提供画像)。

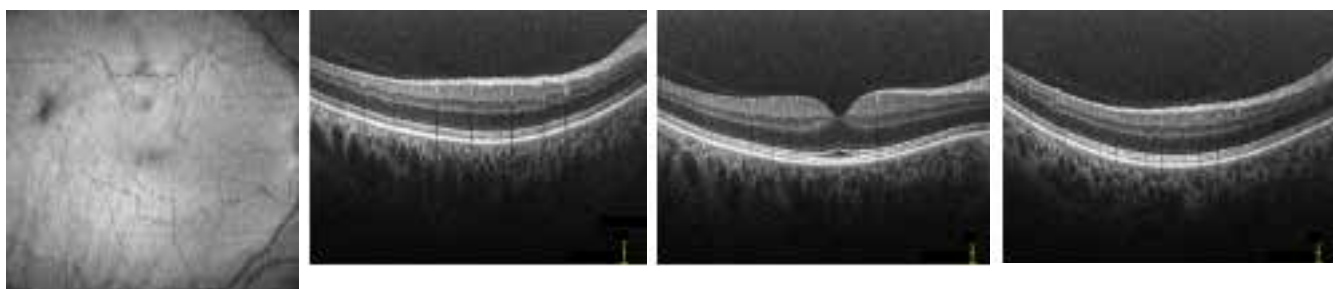


図6 BioptigenのEnvisu OCTシステムは、NKTのSuperK EXR-1スーパーコンティニウムレーザーとガウスのデュアル出力フィルタの助けを借りてこのような網膜黄斑の画像を生成した。帯域= 110nm。