



非線性顯微影像術

——光學虛擬切片檢查

文・照片提供／孫啟光

癌症（惡性腫瘤）是世界性的嚴重疾病，同時也是目前國人十大死因之首。每年全球有超過6百萬的人死於癌症，同時有超過1千萬的人被發現罹患癌症。透過早期準確的篩選以發現可能發展成癌症的腫瘤可大幅減少癌症的發生率及致死率。舉例來說，臺灣人每年口腔癌發生率非常高，占臺灣癌症死因的第六位，口腔癌一直也是國人男性十大癌症中，罹癌人數及死亡率上升最快的癌症。如果能在癌症早期發展就被診斷出來，癌症都可以有效的治療。目前的癌症檢查必須透過傳統病理切片手續的確認。傳統病理切片檢查需從病患身上將疑似癌症的組織切下來，透過切片、固定、染色的方式，並利用高倍率的光學顯微鏡去觀察細胞以及細胞核的外觀去分辨。然而現有的方法不容易分辨早期口腔癌與一些良性的腫瘤。而且傳統病理切片檢查法具侵入性，不易為早期健檢所接受，加上要取出組織，選取的範圍有限，

更何況病人必須冒著癌症組織擴散的風險。活組織中之重要生化訊息在複雜的準備過程中也常常難以保存。因此發展一個在臨床上能快速且非侵入式的分辨出良性與惡性腫瘤的技術，不但能大幅降低癌症檢測的成本，同時能夠減少許多癌症的致死率。

非侵入性的檢查技術

目前學術界正在努力的創造出”光學虛擬切片檢查”技術，希望在無須取出組織與染色的情況下，使用雷射光主動於受試者體內取得一張與傳統病理切片同樣解析度（次微米）的虛擬切片影像。因為其非侵入式特性，若能發展成功，勢將成為未來早期檢查之趨勢。在國家衛生院與臺大校方的贊助下，過去數年本院生醫光電研究室一直致力於發展一臨床用、光纖雷射激發、光纖輸出、小型可攜式、高功率、高重複率之飛秒紅外光路：貴橄欖石雷射，其可調輸出波長涵蓋生物光學穿透窗口於1,200至1,300奈米波長之間，並利用此套雷射發展出一套最低侵入式的倍頻式光學顯微系統（已獲得臺灣與美國專利）。此技術主要是利用位於生物穿透窗口波長之超快雷射在生物體內所產生二倍頻與三倍頻作為影像的信號來源。與目前最先進的共軛焦顯微術與雙光子顯微術比較，此技術不會在生物體內產生光破壞，且不需外加染劑輔



孫啟光小檔案

1987 臺大電機學系畢，哈佛大學碩士（1991）、博士（1995）。1996年回母校服務迄今。主要研究集中在超快光電及其應用。研究領域包含飛秒雷射與光學操控量測、半導體超快帶電載子與聲子現象、世界紀錄頻寬超快光電元件，與非侵入式奈米生醫光電技術。

助，因此也不會有光漂白和染劑毒性的問題。再加上雷射波長落在生物體的穿透窗口上，可以大幅增加穿透深度在活體內取得較深層的組織影像。目前正持續縮小此倍頻式光學顯微鏡體積，以發展出具有即時、非侵入並可在活體內取像功能的倍頻式光學內視鏡，以符合臨床診斷的需求。發展此光學虛擬切片檢查技術的主要目的在於偵測出潛在可能威脅生命的疾病、非侵入式的診斷出臨床上各種疾病、降低傳統病理切片時取樣的錯誤率、在手術前及手術中準確並即時的診斷出應該被切除的區域，以及在治療後能夠非侵入的從事後續診斷工作以了解治療效果。

目前的實驗進度包含建立完成以微機電鏡組與微光學元件所組成之微型顯微鏡系統，其取樣速度為每秒24張，解析度達到次微米等級，均是目前全世界最好的結果。我們也已經在許多固定的人體樣本與活體動物模型中成功的利用光學倍頻顯微術取得高解析度的三維光學切片影像以了解成相原理。目前正著手與臺大醫院合作進行人體皮膚及口腔的活體診斷實驗。

此一新型顯微技術包含3大部分，第一為雷射光源，第二是顯微掃描系統，第三則是導光之光纖。本實驗室發展鉻貴橄欖石雷射作為激發光源，中心波長1,230奈米（約百分之1頭髮粗細）、10兆分之1秒（100飛秒）的脈衝寬度，穿透過表皮或黏膜組織，在表皮層或黏膜組織準備顯微掃描的地方產生足夠的倍頻信號亮度。實驗顯示，以1,230奈米飛秒脈衝，對活體胚胎的破壞度，比起現行被廣泛使用的雙光子顯微術（800奈米飛秒脈衝）至少低1萬倍，足證此類雷射光源的優越性。目前本實驗的導光光纖是使用與莫斯科大學合作開發的光子晶體光纖，已可成功傳導1,230奈米飛秒脈衝。

創新研究－倍頻顯微術

顯微掃描系統則主要運用倍頻光做為顯影方式並輔以多光子螢光顯微術。倍頻顯微術包含二倍頻及三倍頻顯微術。二倍頻及三倍頻的影像產生機制遵守能量

守恆定律，不會累積能量於被觀察的物體上，擁有臨床診斷所需要的非侵入性。基於其非線性特性，倍頻顯微術提供極佳的三維光學切片解析度，結合鉻貴橄欖石飛秒雷射做為激發光源，可同時降低生物體內之光破壞並提高影像的穿透度。具有介面敏感性的三倍頻可用來描述生物組織內的細胞與次細胞結構的型態，而二倍頻則好發生於非中心對稱且排列整齊的奈米結構上，例如第一型的膠原蛋白纖維、肌肉纖維、神經管束等較大的細胞組織。本實驗室已成功在臺大醫院及成大醫院所提供的人體皮膚標本、口腔癌標本、口腔纖維瘤標本、肺癌檢體、肝癌檢體及活體實驗小鼠皮膚與活體實驗倉鼠口腔中，拍攝到這些組織表皮層、上表皮層、上表皮層，甚至是軟骨組織的3D影像，有利於研究皮膚癌、口腔癌、肺癌等癌症組織與正常組織，在結構上以及各種分子蛋白表達上的差異，臨床上將有助於在不取出組織的情況下，診斷出癌化細胞。利用倍頻顯微術來觀察成大醫院所提供的人體口腔癌標本，如圖1所示可由反射式三倍頻的訊號（影像由黃色表示）得到癌化細胞的密集增生影像，二倍頻訊號（影像由綠色表示）則成功反映出癌細胞週遭膠原纖維凌亂的分布情形。圖2是利用反射式倍頻顯微鏡在活體倉鼠口腔黏膜組織內非侵入式取得的血流影像，黏膜下層毛細管中的紅血球流動清晰可見（如箭頭所指處）。三倍頻的訊號（影像由黃色表示）反映出黏膜組織細胞（包含紅血球細胞）分布的影像，二倍頻訊號（影像由綠色表示）則反映

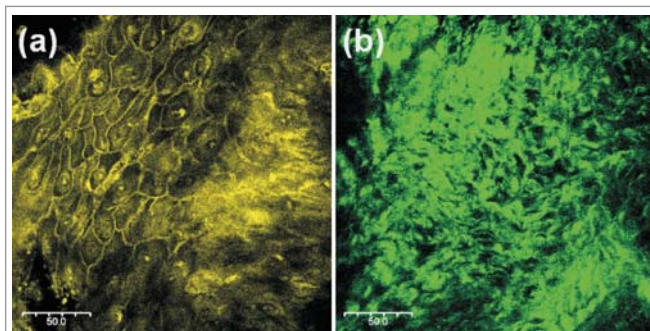


圖1：人體口腔癌標本反射式倍頻顯微影像。圖(a)可由三倍頻影像觀察到口腔癌細胞不規則且密集的增長。圖(b)為二倍頻的訊號，可看出在癌細胞中的膠原蛋白分布較為雜亂，並且呈現不規則的生長。比例尺：50微米。

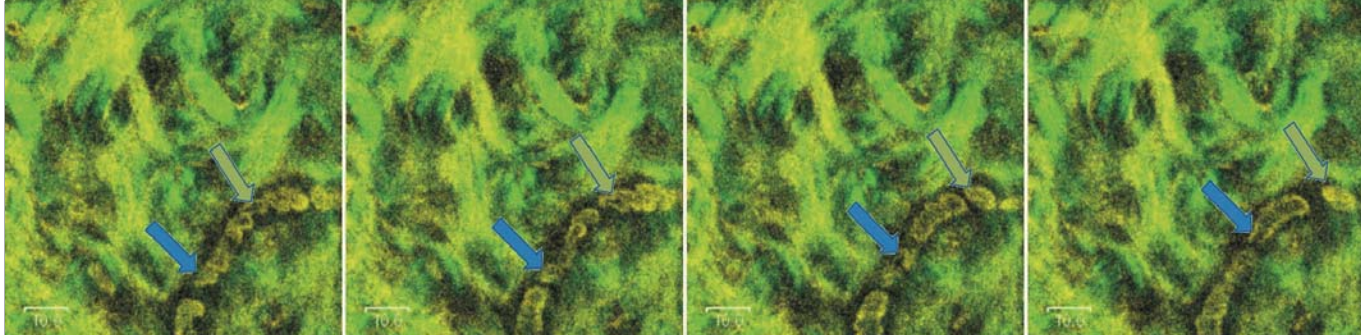


圖 2：利用反射式倍頻顯微鏡在活體倉鼠口腔內取得的紅血球流動連續影像，黏膜下層毛細管中的紅血球流動清晰可見（如箭頭所指處）。黃色：三倍頻；綠色：二倍頻；影像間隔：0.5 秒；比例尺：10 微米。

出膠原纖維的正常分布情形。

本實驗室也針對其他不同的組織器官進行 3D 觀察，從活體斑馬魚胚胎、活體實驗小鼠胚胎乃至人體軟硬骨、牙齒、眼角膜、眼結膜、血管、心肌到各種內臟組織，在這些實驗中，倍頻顯微術皆展現其臨床應用的發展潛力。以應用於活體研究為考量，圖 3(a)~(d)皆以背向收集式之倍頻顯微鏡取樣。圖 3(a)呈現的是於人類牙齒琺瑯質上所取得之三倍頻顯微影像，影像由黃色表示。於琺瑯質中可見三倍頻描繪出蜂巢狀之琺瑯質柱晶體(enamel prism)，藉由在琺瑯質層中不同深度的光學切片，可在不經過繁複的切片、去鈣化、染色等樣本處理過程下觀察未經破壞的琺瑯質結構。圖 3(b)是在老鼠眼角膜之角膜基質層(corneal stroma)中所取得之二倍頻影像，影像由綠色表示。因角膜基質層主要的成分為第一型的膠原蛋白，為生物體內二倍頻訊號的主要來源，經由二倍頻可觀察到角膜基質層中膠原蛋白纖維的結構，將有機會發展為許多該層發生病變之眼科疾病的診斷工具。圖 3(c)為一在老鼠皮膚中所取得之二倍頻（綠色）及三倍頻（黃色）影像，基於不同之影像特性，於三倍頻可清楚見到皮膚表皮層之細胞組織，而二倍頻則顯示出真皮層中的膠原蛋白纖維，在皮膚不同層的組織中提供了相當明顯的對比度。因為所有的細胞均會被三倍頻觀察到，為增加影像的選擇及功能性，於部分研究中可選擇性地少量加入一些螢光物質來標定特定的細胞或分子，以擴展倍頻顯微術之應用範圍。圖 3(d)取自於一經過靜脈注射螢光染料並感染異位性皮膚炎之活體老鼠的淋巴組織，圖中以紅色表示雙光子螢光訊號，成功以螢光標定出淋巴節中的免疫細胞，結合三倍頻，可同時擁有淋巴節整體的結構型態並輕易地找出免疫細胞的分布。

前瞻

本實驗所從事的倍頻顯微鏡研究，長期受到國際的

矚目與重視，本校所發展的倍頻式光學顯微影像術不但獲得 2003 Leica Microsystem Innovation Award，被 Optical Society of America 選入 What's Hot in Optics in 2004，為 Biophotonics International 及 Photonics Showcase 雜誌多次報導，學術論文亦多次入選刊登在學術雜誌封面，如 Journal of Microscopy 及 Optics Express，更是重要的國際會議邀請演講對象。在光學顯微影像術最重要的兩個國際會議：Photonics West 及 Focus on Microscopy，個人今年（2008）分別獲邀擔任 Keynote 及 Plenary Lecturers。本計畫亦獲得國家衛生研究院傑出創新研究計畫獎的長期贊助。 [圖標]（本期本欄策畫／電機學系林茂昭教授）

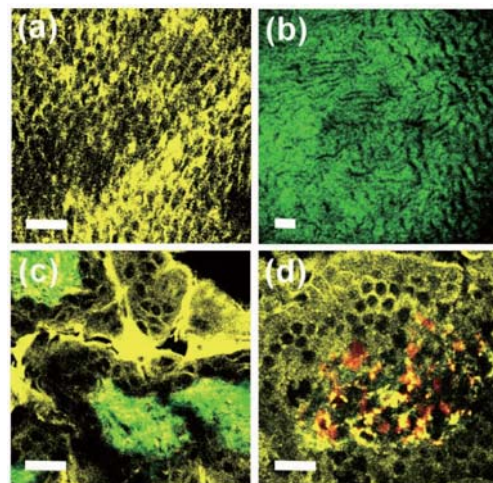


圖 3：(a)~(d)皆為以背向收集式之倍頻顯微鏡所取得的影像。(a)於人類牙齒琺瑯質所取得之三倍頻影像，清楚可見琺瑯質柱晶體蜂巢狀的結構。(b)老鼠眼角膜之角膜基質層的二倍頻影像，因角膜基質層主要組成第一型膠原蛋白纖維，二倍頻於此層擁有極佳的對比。(c)於老鼠皮膚中取得之二倍頻及三倍頻影像，表皮層中主要由三倍頻描繪出細胞的型態，真皮層則由二倍頻提供膠原蛋白纖維之結構。(d)在以螢光標定免疫細胞的老鼠淋巴節中取得之三倍頻及雙光子螢光影像，以螢光結合三倍頻，可同時擁有淋巴節整體的結構型態並輕易地找出免疫細胞的分布。圖中以黃色表示三倍頻；綠色表示二倍頻；紅色表示雙光子螢光。比例尺：20 微米。