

文章编号:1004-4213(2011)12-1767-4

# 小型化望远式激光共焦扫描显微内窥镜

杜立辉<sup>a</sup>, 王立强<sup>a</sup>, 杨天领<sup>a</sup>, 陆祖康<sup>a</sup>, 段会龙<sup>b</sup>

(浙江大学 a. 现代光学仪器国家重点实验室; b. 生物医学工程研究所, 杭州 310027)

**摘 要:**研制了一种激光共焦扫描显微内窥镜,采用望远式显微内窥光学系统,同时实现长距离的图像中继传输、远心  $f$ -theta 光学扫描和显微内窥成像功能. 二维共焦扫描由双振镜实现,低噪音扫描控制信号由嵌入式系统产生. 为实现便携式应用,激光共焦扫描显微内窥镜采用小型化设计方案. 首先,体内的显微内窥成像光学系统,外径尺寸为 8 mm,工作长度为 250.3 mm,可通过标准腹腔镜手术孔进行体内显微内窥成像;其次,采用 3 mm 通光孔径的小尺寸平面反射镜实现体外共焦扫描,摆动频率为 100 Hz,实现快速共焦扫描;最后,激光控制和荧光探测仅通过电缆和光纤与共焦扫描显微内窥镜前端连接,减小了显微内窥镜的前端尺寸和重量. 通过实验验证,本系统的成像视场为  $\varphi$  600  $\mu\text{m}$ ,光学分辨率为 2.2  $\mu\text{m}$ ,可采用手持式或者其他方式工作,进行体内组织的共焦扫描成像,实现微创、在体的荧光显微内窥术.

**关键词:**小型化设计;共焦显微内窥术;望远式传像物镜; $f$ -theta 扫描

**中图分类号:**TH741

**文献标识码:**A

**doi:**10.3788/gzxb20114012.1767

## 0 引言

癌症严重威胁人类健康,早期诊断和治疗对提高患者的生存率和生活质量有非常重要的意义. 传统内窥镜仅能观察黏膜表面的宏观图像,如需确诊需要将可疑组织钳取到体外,再固定、切片、染色,进行显微成像分析,伴随着出血、感染、早期漏诊等风险. 激光共焦显微内窥镜无需取样活检即可实现体内器官的实时高分辨率显微成像诊断,并可使用荧光对比剂,特异性强,是早期病变微创诊断的重要方法,尤其对于常规内窥镜难以发现的癌变早期诊断具有重大意义,近年来一直是国际先进医疗器械的研究热点之一<sup>[1-4]</sup>.

目前的激光共焦显微内窥镜均采用光纤束或单根光纤将激光和荧光信号分别导入体内和导出体外<sup>[5-6]</sup>. 采用光纤束允许将共焦扫描机构放置在体外,内窥镜探头细小,但视场小,图像的清晰度受到光纤束本身栅格排列的严重影响,分辨力较低,而且由于相邻芯径的光线串扰,图像的对比度难以提高,像差大<sup>[7-8]</sup>. 采用单根光纤时,共焦扫描机构必须放置在体内,虽然采用微电系统(Micro-Electro-Mechanical System, MEMS)技术可以缩小扫描机

构尺寸,但目前的技术状况下还无法兼顾小尺寸和大扫描范围<sup>[9]</sup>. 还有一些内窥镜采用 Hopkins 传像系统,其数孔径均在 0.1 以下,导致分辨率不高,且由几十片透镜组合起来,光能损耗大,装配困难<sup>[10]</sup>.

鉴于采用光纤束、单根光纤以及 Hopkins 传像系统的不足,本文设计望远式传像系统实现长距离的图像中继功能,将激光耦合进体内组织,并将荧光信号耦合至体外探测器,在获得高分辨率和高对比度荧光图像的同时,缩小内窥镜探头直径. 同时,考虑到目前的激光共焦显微系统需要大尺寸、笨重的扫描机构,无法满足内窥镜应用所要求的便携式或手持式操作,本文进一步对显微内窥镜探头进行小型化设计,将扫描机构放置在体外,仅通过电缆和光纤将激光控制和荧光探测与显微内窥镜前端连接,减小了探头尺寸和重量.

## 1 系统设计

### 1.1 总体结构

激光共焦显微内窥镜的总体结构方案如图 1,下方虚线框内为激光控制与荧光探测部分,包括激光光源、二维共聚焦扫描信号产生及光电倍增管(Photo Multiplier Tube, PMT)荧光成像等;左上方

基金项目:国家自然科学基金(No. 60808030)和国家科技支撑计划(No. 2011BAI12B06)资助

第一作者:杜立辉(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向为生物光子学. Email: dulihui1986@163.com

导师(通讯作者):王立强(1977-),男,副教授,主要研究方向为生物光子学. Email: wangliqiang@zju.edu.cn

收稿日期:2011-08-04;修回日期:2011-09-02

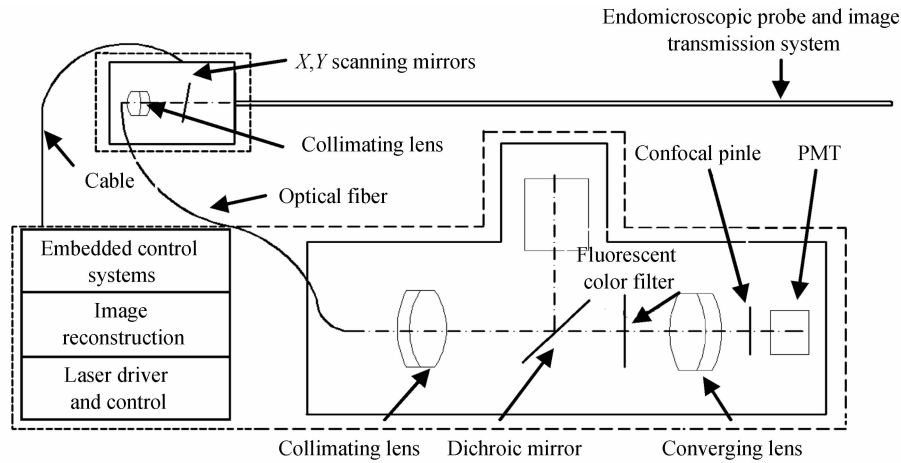


图1 系统结构

Fig. 1 The system architecture

虚线框内为手持式操作部件,仅包括激光准直系统和XY扫描振镜,体积小、重量轻;右上方为外径8 mm,长度250.3 mm的望远式内窥镜探头.激光控制与荧光探测部分虽然体积大,但仅通过电缆和光纤与内窥镜探头连接,因此内窥镜探头的操作非常方便.

激光器发射出来的光束透过二色分光镜(激光反射,荧光透射),经准直物镜的准直,形成光斑形状和发散角符合一定要求的光束,耦合进单模光纤中.光纤的另一端是手持操作部分,激光从光纤出射后经过准直透镜准直后先后入射到X向振镜和Y向振镜,这两个扫描振镜按照特定的方式组合,通过控制信号驱动两个振镜的快速旋转摆动,形成XY方向的扫描模式.此扫描模式将入射的激光束反射至内窥镜探头,由望远式传像系统耦合进显微物镜,聚焦在体内组织的某一位置,此位置与振镜的摆动角度相互对应.内窥镜探头为直径8 mm,长度250.3 mm的硬性内窥镜.组织细胞由荧光染料标记,在激光的照射下发出荧光,此荧光信号由内窥镜探头的显微物镜收集,经望远式传像系统导出,经准直物镜后耦合进光纤,出射后再一次经过准直物镜,然后透过二色分光镜并由荧光滤色片滤去杂散光,再由荧光会聚镜聚焦,通过共焦针孔后到达PMT.体内组织仅激光焦点处所发射的荧光能通过共焦针孔,进入PMT,而其它部分的荧光或杂散光将被阻挡,不能到达PMT,大大减小了背景荧光和杂散光,提高了荧光图像的信噪比.PMT转化后的电信号由数据采集卡获得后,经过软件重建,得到共焦扫描的图像.

## 1.2 望远式光学系统设计

大视场、大数值孔径、长距离图像中继传输是激光共焦显微内窥镜的整体性能要求,在满足上述要求的同时,还要求内窥镜探头的外径尺寸尽可能小,

视场内照明均匀.考虑到实际的腹腔镜使用条件和现有显微内窥镜的技术指标,光学系统的具体要求为成像视场600  $\mu\text{m}$ ,数值孔径0.35,外径尺寸小于10 mm,工作距离大约250 mm,且在可见光波长范围内,全视场的分辨率优于2.2  $\mu\text{m}$ .

根据上述要求,光学系统设计为如图2所示的三部分结构,第一部分为光学扫描透镜,实现体外激光共焦扫描.为保证成像视场内均匀一致的图像分辨率、激光照度以及荧光发射率,光学扫描透镜设计为 $f$ -theta平场远心光学结构,使像方主光线始终

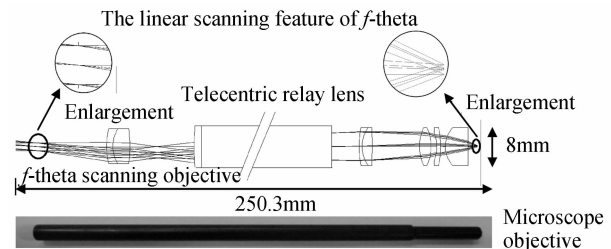


图2 望远式光学系统

Fig. 2 Telecentric optical system

垂直于扫描平面.由于振镜扫描角度与驱动电压成线性关系,为使重建的图像坐标与激光扫描坐标一致,激光在体内组织的扫描位移 $\Delta x$ 应与振镜转角 $\theta$ 成线性关系,即 $\Delta x = f \cdot 2\theta$ ,但是一般光学系统的理想扫描位移为 $f \cdot \tan 2\theta$ .因此,为了准确定位不同扫描角度的激光点位置,光学扫描透镜设计为具有负畸变的线性成像系统.矫正的畸变量 $\Delta x'$ 为

$$\Delta x' = f \cdot 2\theta - f \cdot \tan 2\theta = f(2\theta - \tan 2\theta)$$

第二部分是望远式传像透镜(长度和直径比大于20),主要实现长距离的图像中继,并且克服了传像光纤或光纤束固有的栅格状缺点,获得高清晰度的共焦扫描图像.整个透镜仅使用2个胶合镜组,减少了光线的损失和像差的产生,并且便于加工、组装.

第三部分是显微物镜,放大倍率为10 $\times$ ,具有

较大的数值孔径,经过光学优化设计,分辨率接近衍射极限。

上述三个部分作为一个完整的光学系统进行设计,通过前两个光学部件进一步校正显微物镜的残留像差,实现光学性能最佳的内窥镜探头。 $f$ -theta 透镜和二维扫描机构的配合使用实现了照明光路和成像光路的合二为一,并且扫描机构设置在体外,在获得高性能共焦扫描的同时,缩小了内窥镜探头的尺寸,能够与现有内窥镜兼容。

利用 CODE-V 光学设计软件,对  $f$ -theta 线性扫描、长距离图像中继和显微成像三个部分进行综合的像差校正和优化设计,获得 10 倍物镜系统,数值孔径 0.35,物像共轭距 250.3 mm,外径 8 mm 的设计结果。

### 1.3 二维共焦扫描系统

二维共焦扫描系统采用双振镜实现。振镜的转动惯量非常小,因此具有体积小、扫描速度快、震动小、重复准确度高的优点。其中 X 轴为快轴,扫描频率为 100 Hz,即每秒采集 100 行图像,采用正程和回程之比为 4:1 的三角波进行驱动(占空比为 0.8,其中正程是有效扫描行程),波形由 ARM 芯片控制 12 位的高速并行数字/模拟转换器(Digital to Analog Converter, DAC)产生。驱动信号的幅度由扫描的范围决定,可以根据不同的扫描视场选择不同的驱动信号幅值,本系统中 600  $\mu\text{m}$  视场对应于 0~3 V 的电压幅度。Y 轴为慢轴,频率为 1/4 Hz,同样采用三角波进行驱动,波形由串行的 12 位高速 DAC 产生。正程和回程之比也为 4:1。X、Y 轴的驱动波形如图 3。荧光信号由高灵敏度的 PMT 探测,经过数据采集卡的模拟/数字转换器(Analog to Digital, ADC)之后,由计算机重建图像。扫描时, X 轴快速扫描一行,在控制扫描 X 轴的同时,驱动信号也控制 Y 轴振镜缓慢转向下一行扫描。当完成一行扫描后也即三角波信号达到正程的最大值,控制信号通过三角波的回程控制 X 轴振镜回到初始位置,以便进行下一行的扫描,此时 Y 轴振镜也在控制信号的驱动下到达下一行的起始位置。不断重复这一过程,从而完成二维共焦扫描。当一副图像扫描

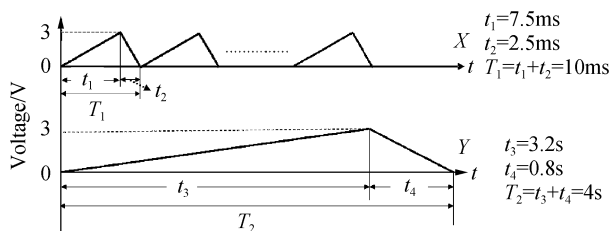


图 3 X-Y 轴振镜驱动波形

Fig. 3 The driving waveforms of X-Y scanning mirrors

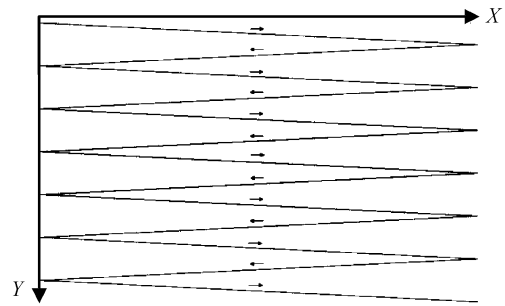


图 4 X-Y 轴振镜扫描过程

Fig. 4 The processes of X-Y scanning mirrors

完成后, Y 轴三角波信号达到正程的最大位置,然后在回程信号的控制下 X、Y 轴振镜回到初始位置。两个方向扫描时,回程过程均不进行数据采集。扫描过程如图 4。在本系统中采集得到的图像分辨率为  $512 \times 320$ ,每 4 s 采集一帧图像。

## 2 实验验证

实验中使用本系统对 USAF 标准鉴别率板进行成像,所获得的图像如图 5。图中箭头所指是鉴别率板的第 7 组第 6 条的线对,对应于 228 lp/mm 的分辨率,相应的线宽为 2.2  $\mu\text{m}$ 。表明激光扫描荧光显微内窥镜的光学分辨率为 2.2  $\mu\text{m}$ 。

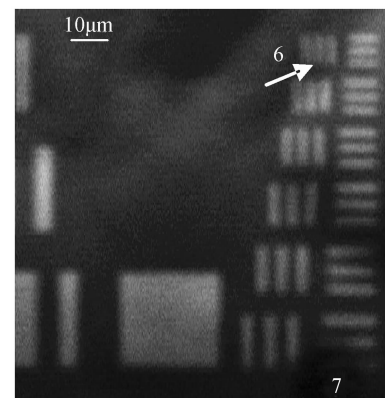


图 5 对 USAF 标准鉴别率板成像的图像

Fig. 5 Image of a united states air force resolution target

对荧光标记的小鼠膈肌切片进行荧光成像,获得图像如图 6,箭头所指为突触囊泡,其内部及周围的大量颗粒状物体为乙酰胆碱受体。本切片采用罗丹明 6G 进行荧光标记,532 nm 激光激发,荧光探

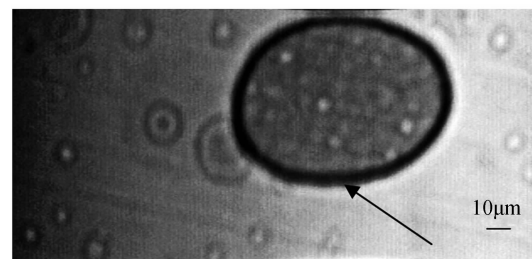


图 6 对小鼠膈肌中的乙酰胆碱受体成像图

Fig. 6 Image of acetylcholine receptor in mouse musculus diaphragm

测采用 590/40 nm 的带通荧光滤色片。

### 3 结论

本文设计了一种小型化激光共焦扫描显微内窥镜系统,采用望远式显微内窥光学系统,实现了小尺寸的内窥镜探头.外径尺寸为 8 mm,工作长度为 250.3 mm,可通过标准腹腔镜手术孔进行体内显微内窥成像.将扫描机构放置在体外,仅通过电缆和光纤将激光控制和荧光探测与显微内窥镜前端连接,减小了探头尺寸和重量. $f$ -theta 扫描方式保证了激光激发和荧光成像的均匀性.经实验验证,本系统的最大分辨率为 2.2  $\mu\text{m}$ ,视场范围直径 600  $\mu\text{m}$ ,能够实现微弱荧光成像.

本系统方便用于早期病变的体内微创诊断,并可以进一步扩展为三维层析成像,对于癌变早期诊断有重要意义.

#### 参考文献

- [1] KERRY B D, MARCIA I C. Confocal endomicroscopy[J]. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 2010, **12**(2): 90-99.
- [2] ZHANG Wei, TIAN Wei-jian, ZHANG Hong-jian. A method of bifocal zoom endoscope system design[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(1): 105-108.  
张薇, 田维坚, 张宏建. 二元变焦内窥镜光学系统设计[J]. *光子学报*, 2010, **39**(1): 105-108.
- [3] YE Bin, WANG Li-qiang, SHI Yan, *et al.* High resolution miniaturized cmos camera module for medical electronic endoscope[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(11): 1951-1955.
- [4] JIANG Shi-hong, JOHN W. Differential high-speed digital micromirror device based fluorescence speckle confocal microscopy[J]. *Applied Optics*, 2010, **49**(3): 497-504.
- [5] CAMERON M L, CHRISTOPH J E. Scanning fiber endoscopy with highly flexible, 1 mm catheterscopes for wide-field, full-color imaging[J]. *Journal of Biophotonics*, 2010, **3**(5-6): 385-407.
- [6] SHUO T, WOONGGYU J, DANIEL M. Design and implementation of fiber-based multiphoton endoscopy with microelectromechanical systems scanning [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, **14**(3): 4005-4011.
- [7] MAITLAND K C, SHIN H J, RA H, *et al.* Fiber confocal microscope with a two-axis gimbaled MEMS scanner for cellular imaging[J]. *Optics Express*, 2006, **14**(19): 8604-8612.
- [8] YELIN D, RIZVI I, WHITE W M, *et al.* Three-dimensional miniature endoscopy[J]. *Nature*, 2006, **443**(19): 765.
- [9] LIU J T C, MANDELLA M J, RA H, *et al.* Miniature near-infrared dual-axes confocal microscope utilizing a two-dimensional microelectromechanical systems scanner [J]. *Optics Letters*, 2007, **32**(3): 256-258.
- [10] TOMKINSON T H, BENTLEY J L, CRAWFORD M K, *et al.* Rigid endoscopic relay systems; a comparative study[J]. *Applied Optics*, 1996, **35**(34): 6674-6683.

## Miniature Telecentric Confocal Laser Scanning Endomicroscopy

DU Li-hui<sup>a</sup>, WANG Li-qiang<sup>a</sup>, YANG Tian-ling<sup>a</sup>, LU Zu-kang<sup>a</sup>, DUAN Hui-long<sup>b</sup>

(a. State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation; b. Biomedical Engineering Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract:** A confocal laser scanning endomicroscopy is developed, which employs a telecentric endomicroscopic optical system to achieve long-distance relay transmission of images, telecentric  $f$ -theta optical scanning and endomicroscopic imaging functions. Two-dimensional confocal scanning is realized through two scanning mirrors, and low-noise control signals are generated by the embedded system. Miniaturized design is adopted in the confocal laser scanning endomicroscopy in order to easily use for portable applications. Firstly, the outer diameter of the optical system is 8 mm, and working length of which is 250.3 mm, so in-vivo endomicroscopic imaging can be realized through standard laparoscopic surgery port. Secondly, two small mirrors with aperture of 3mm are employed to achieve in vitro confocal scanning, with the maximum frequency of 100 Hz. Finally, laser system and fluorescence detection are connected with the distal end of the confocal laser scanning endomicroscopy through an optical fiber and a cable, and the size and the weight of the distal end are minimized by this method. The experimental results show that the system's filed of view reaches  $\varphi 600 \mu\text{m}$ , and its optical resolution is 2.2  $\mu\text{m}$ . This system can be used under handheld operation or other ways to realize minimally invasive in-vivo fluorescence endoscopic surgery since its miniature size and low weight.

**Key words:** Miniaturized design; Confocal laser scanning endomicroscopy; Telecentric relay lens;  $f$ -theta scanning