



フェムト秒レーザーを利用した高機能生体計測

荒木 勉 ・ 安井 武史

フェムト秒レーザーが身近なものになり、その超短パルス特性を利用した新しい計測法が容易に実現できるようになった。本稿では、初めにコラーゲンの分子配向を近赤外フェムト秒レーザーで誘起された生体第2高調波発生光(生体 SHG 光)から同定する手法について解説する。ここでは、共焦点反射顕微光学系を構成することでコラーゲン情報に関する断層分布画像が得られるようになった。次に、テラヘルツ電磁波パルス (THz パルス) の生体計測応用について解説する。ここでは、THz パルスエコーの時間と強度の変化から皮膚水分と皮膚構造の情報を同時に得ている。

Keywords : femtosecond laser, second harmonic generation light, collagen, terahertz electromagnetic pulse, biomedical measurement, human tissue

1. ま え が き

文献を探ってみれば、生体計測に限ってみても多くの論文が出ている。しかし「生体」という仕掛けは複雑・多様で「科学的」に解明するのは不可能に近い。新聞、テレビをはじめとするメディアで連日のように「画期的な・・・」、 「近年にない発見・・・」などが取り上げられている。それらが本当に正しく、普遍的なものであるなら、とくに難病は治癒されているし、生体自体ももっと合理的に理解されているはずである。多分、われわれが出す研究成果の多くは「たいしたことない」ものなのであろう。そう本音をいってしまうと夢がなくなるので、「地道な研究の積み重ねが重要である」とはいつているが、「道」がつかねば単なる「地味」な研究になってしまう。このような自戒もこめて、本稿ではわれわれが現在行っている研究と、日ごろ感じていることを中心に話を進めたい。

生体計測の主目的は生体構造変化を可視化して機能を解析し、診断・治療に役立てることである。生体計測にとって光は優秀なプローブであり、イメージング手法と結合することでより多くの機能情報が得られる。ベテラン電子機器技術者は電流値と波形のみでかなりの故障診断をする。電流に相当するものは生体ではやはり血流であろう。血流を調べることは生体機能の正常・異常を知るうえできわめて有効である。幸い近赤外光は経皮的に生体組織を透過し、多くはヘモグロビンで吸収される。分光法を用いれば酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの量比を指標とし組織活動の情報も得られる。しかし生体組織は光にとって強散乱体であるので、深部あるいは厚層の情報を得るのは容易ではない。このような難題があるが、近赤外光の性質をうまく利用してパルスオキシメトリ、光トポグラフィー、

近赤外分光法、光 CT、OCT などが実用化されている。経皮的な血流速度計測としてはレーザードップラー法 (LD) が利用されている。また LD と OCT を結合した ODT (Optical Doppler Tomography) も提案されている¹⁾。このように生体機能研究への近赤外光計測の貢献は大きい。近赤外光を利用した生体計測については特集文献を参考にされたい²⁾。また脳活動計測については本誌³⁾ もあわせて参照されたい。

以上の手法はいずれも定常光源あるいは変調光源を利用したものである。しかし最近では、近赤外領域をはじめとした各波長領域においてフェムト秒レーザー (fs レーザー) を利用した超短パルス特性 (高ピークパワー、超短パルス幅) を積極的に利用することにより、生体光計測の分野でも技術革新が行われようとしている^{4,5)}。そこで、われわれは近赤外超短パルス光による生体 SHG (Second Harmonic Generation) 光を利用したコラーゲンの配向計測と、テラヘルツ電磁波パルス (THz パルス) を利用した皮膚水分量計測という二つの研究に同時に着手したので経過を紹介したい。

2. 生体 SHG 光による組織コラーゲン配向のマッピング

2.1 コラーゲン構造と生体 SHG 光

コラーゲンの基本構造は、図1に示すようにポリペプチド三重らせんからなる分子であり、これが順次集合して階層的に太くなる。その配列が崩れたり本来の組織分布からずれると、引きつれをはじめさまざまな生体構造の変化や機能の変化を引き起こす。これまでコラーゲン階層各段階においてその配向を調べる手法が報告されているので、いくつかを紹介すると、X線解析、電顕観察、コラーゲン

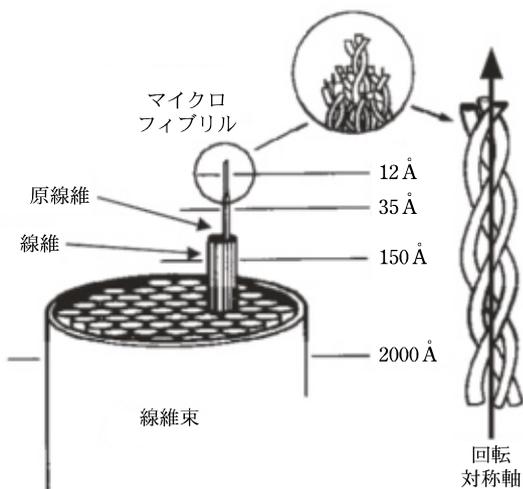


図1 コラーゲンの階層構造.

線維染色, 力学的異方性計測⁶⁾, マイクロ波応用⁷⁾, 毛穴形状観察⁸⁾などがある. しかしいずれも観測部位が限られたり, サンプル切り出しや前処理が必要であるなどの欠点がある. そこでわれわれは SHG 光を利用してコラーゲン配向計測を試みた^{9~11)}.

コラーゲン分子は非中心対称性をもつ. このような物質にピーク強度がきわめて大きな fs レーザー光を照射すると, コラーゲン自身の非線形光学現象によって生体 SHG 光が発生する. この場合, 入射光の偏光方向とコラーゲン配向方向とが一致したときに強い SHG 光強度が得られ, 直交したときには微弱となる¹²⁾. したがって SHG 偏光測定を行えば, コラーゲンの配向方向に関する情報が得られる.

2.2 実験装置

レーザー光源にはモード同期チタンサファイアレーザー (中心波長 800 nm, パルス幅 80 fs, 繰り返し周波数 80 MHz) を使用した. 光学系は測定対象によって透過型と共

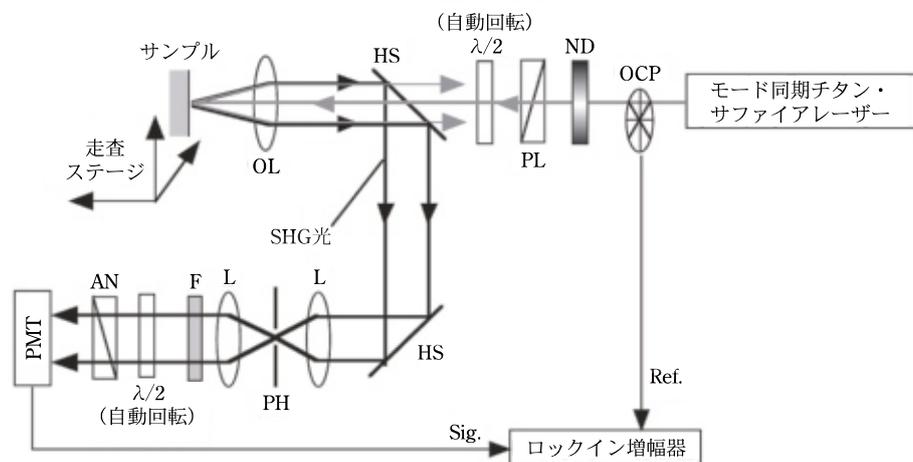


図2 生体 SHG 光によるコラーゲン配向計測装置 (共焦点反射光学系の配置例).

焦点反射型の 2 通りを使い分けている. 図 2 には共焦点反射型光学配置を記す. レーザー光は対物レンズ (OL) で集光され試料に照射される. 試料上のスポット径は $1.5 \mu\text{m}$ である. 偏光計測においては入射レーザー光束および SHG 光束に挿入した 2 枚の $\lambda/2$ 板を同期回転させて偏光子および検光子で偏光解析し, レーダーグラフとして配向方位を表示する. また試料ステージを三次元的に走査して各断面における配向方位のマッピングを行う. その場合, 平面方向に約 $5 \mu\text{m}$, 深さ方向約 $15 \mu\text{m}$ の分解能を得ることができる.

2.3 コラーゲン配向トモグラフィ

生体構成物質の中でコラーゲンのみが特異的に SHG 光を発生させることを検証するため, さまざまな組織にレーザー光を照射したが, コラーゲン含有物のみ SHG 光が検出された. レーダーグラフの形状では, アキレス腱では線維が同一方向に規則正しく並んでいるため特徴的な 8 の字形となった. 真皮は少し乱れるもののほぼ 8 の字形になった. 一方, 象牙質は直交 2 軸配向をもつ結果となったが, これはコラーゲン線維がメッシュ状の構造で存在するためと考えられる. またコラーゲンスポンジでは, ランダム配向のため楕円形状のグラフとなった.

トモグラフィ (断面分布像) の可能性を検証するため, 図 3(a) のようにアキレス腱のスライスを 2 枚用意し, 互いの線維方向が直交するように重ね合わせた. この試料に対し, 測定ビームの焦点位置を深さ方向に移動させながら SHG 偏光解析を行った. その結果, 上層の表面に焦点が位置するときは横方向に長軸をもつグラフが得られ, 上層表面から $300 \mu\text{m}$ の境界部では縦横の方向が混在し, 下層にある $350 \mu\text{m}$ の部位では縦方向に長軸が変わった (図 3(b)).

次に, 硬組織の実例として, 人の距骨切片の断面 SHG 偏光画像を測定した. 図 4 は深さ方向に $50 \mu\text{m}$ ずつ焦点を移動させた画像である. ここでは配向度 ($A: -1 \sim +1$) を定義し, その値をカラーマッピングで表している. 図中赤色 ($A=0.2$ 付近) はコラーゲン配向が紙面でほぼ上下, 青 ($A=-0.2$ 付近) はほぼ左右に方位している状態, 白 ($A=0$) は 45 度あるいはランダム状態であり, 黒は無信号である. これら三次元断面配向度マッピングからいずれも骨梁に沿ってコラーゲンが分布し, その線維方向は骨梁方向を向いていることがわかる.

2.4 今後の発展

これまで示した例はすべて解剖検体や固定された生体試料である. われわれの体を対象に *in vivo* 生体計測を行う場合, fs レーザーによる生体ダメージの有無を調査しておく必要がある. また測定時間の短縮も急

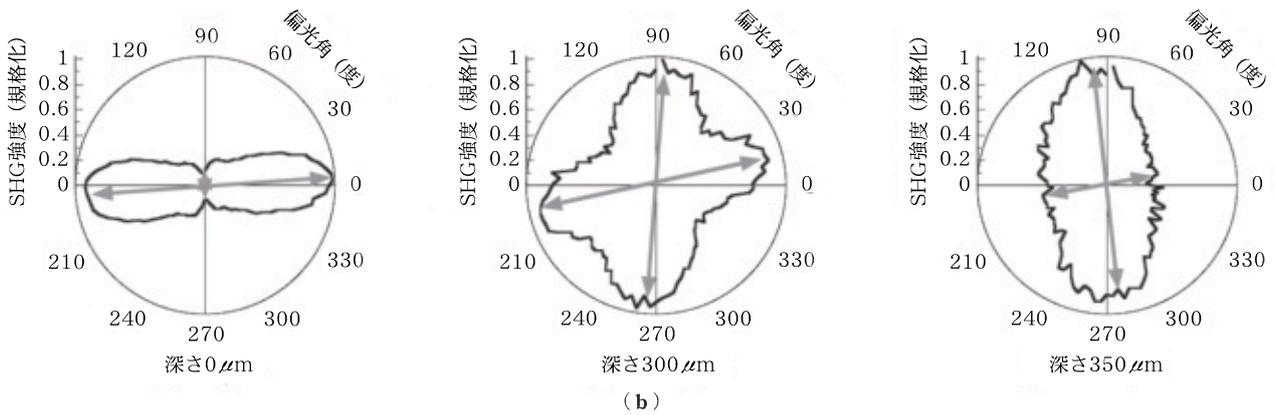
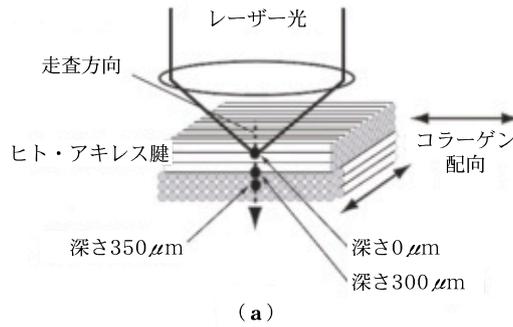


図3 奥行き分解を検証するための実験。アキレス腱切片を互いに線維方向が直行するよう2枚重ねて試料としている。

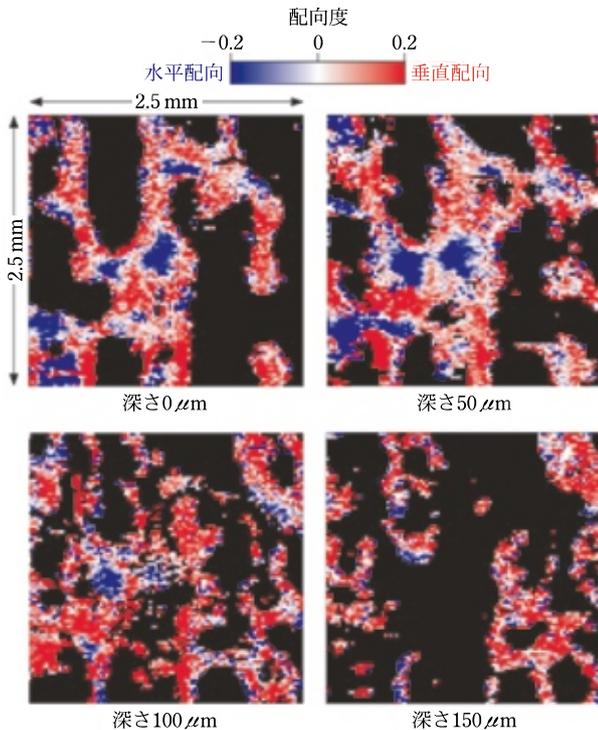


図4 ヒト距骨の海綿質に存在するコラーゲンの断層SHG画像。コラーゲン配向方位を色分けしている。

務である。現在は1測定点あたり約1秒の時間を要するが、長時間の照射で火傷の診断をして火傷になったのでは困る。また現在の手法では偏光解析面が光軸に直交しているためコラーゲン方位の二次元射影的な情報しか検出できていない。ここで、光軸方向のコラーゲン方位が検出できるようになれば線維配向ベクトルの情報が取得でき、診断と治療への応用性が飛躍的に増大する。また、SHGと他の手法を組み合わせることで相補が可能となる。これまでもSHGとOCTを結合したSHG-OCT¹³⁾や2光子励起レーザー顕微鏡を利用してコラーゲンSHGと自己蛍光を観測した報告¹⁴⁾がある。しかし、顕微鏡システムでは対象は細胞や局所組織など顕微ステージにマウントできるものに限定される。医用生体計測では観測物体の大きさが多様なので、実用に則した装置開発が必要である。

3. テラヘルツ電磁波パルスによる皮膚水分量の測定

3.1 皮膚の水分と機能

皮膚は発汗による体温調節のほか、異物、雑菌、光線、機械刺激などの外部刺激から生体内部を保護する機能をもつ。角質層と表皮の水分含有量が皮膚機能と大きく関係するとされており、アトピー性皮膚炎によるドライスキンも保水機能が低下した状態である。したがって皮膚機能評価では、水分含有量は重要な検査項目である。従来より皮膚水分量は抵抗率や誘電率を求める電気的手法が主流であっ

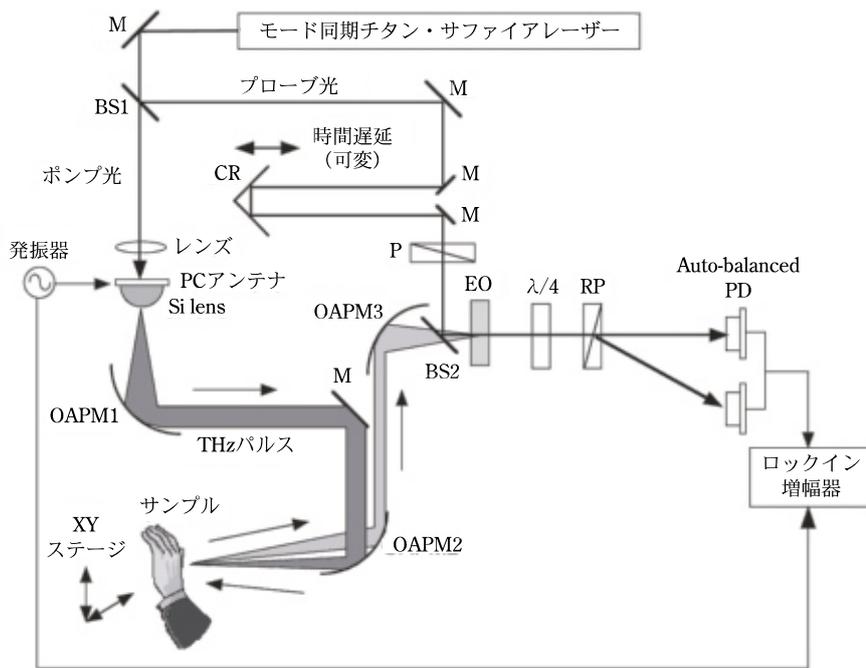


図5 THzパルスによる皮膚水分量計測装置.

たが、接触法であるため汗などの電解質の影響を受けるなどの欠点もある。このような背景で微小領域の高精度・非接触水分計測法の開発が待たれていた。

3.2 皮膚水分計測装置

THz電磁波(周波数0.1~10 THz; 波長30~3000 μm)の生体応用もすでにいくつか報告されている^{15~17)}。THz電磁波は水との相互作用(吸収および屈折)が大きいので皮膚水分計測に利用することができる。さらにパルス状にすればエコー観測によって皮膚断層情報を得ることもできる。そこでわれわれはTHzパルスを用いて皮膚表層の水分含有量と皮膚断層像の同時計測に着手した¹⁸⁾。

図5に測定装置の模式を示す。THzパルスの発生と検出にはfsレーザーを用いる。レーザー光はビームスプリッターによってTHzパルス用ポンプ光とTHz検出用プローブ光に分けられる。光伝導アンテナ(PCアンテナ)にはポンプ光が入射した瞬間に電流が流れ、その結果半値幅約0.5 psのTHzパルスが生成される。放射されたTHzパルスは測定試料表面に集光され、その反射光が電気光学結晶(EO結晶)に集められる。ここでEO結晶には光学的遅延を受けたプローブ光が入射し、THzパルスとプローブ光のタイミングが一致したときに複屈折性が現れる。複屈折量はTHzパルスの電場強度に比例するため、プローブ光の遅延時間を走査すれば、プローブ光を通してTHzパルス電場波形を再現することができる。また、試料を二次元的に走査することで、イメージング計測が可能となる。

3.3 パルスエコー波形

皮膚水分測定の基本データを得るため、試料としてヒト掌の皮膚を用意した。試料はホルマリン固定された解剖実習用献体から取り出され、皮下組織を外科用メスで除去し、

蒸留水で洗浄後、自然乾燥させた。図6は掌試料から得られたTHzパルスエコー波形の例である。この波形はデコンボリューションによるインパルス応答として示されており、エコーパルスの正負および大小は組織境界前後の群屈折率の大小によって決まる。この図で(1)は空気と角質層の境界、(2)は表皮と真皮の境界、(3)は真皮と試料ホルダー境界において発生した反射パルスである。THz領域での生体試料の群屈折率は2程度である¹⁶⁾。この値とそれぞれのパルス時間間隔から算出された各層の厚みは解剖学的に求めた厚みとほぼ一致する。しかし角質層の厚みが薄いうえ、表皮と角質層の群屈折率の差が小さいため、角質層と表皮の境界からのエコーはパルス(1)に重畳してしまい、分離観測できなかった。水の群屈折率は2より大きいので¹⁹⁾、

湿潤した皮膚の群屈折率のほうが乾燥状態のものより大きい。水分蒸発とともに屈折率が2に近づく結果、空気と角質層の屈折率差が次第に小さくなり、そこで生じるエコーパルス強度も減少する。そこで湿潤した皮膚試料を空气中に放置したときの(1)のパルスピーク高さの時間変化をプロットしたものが図7であり、角質層の水分量変化を表していると考えられる。

3.4 今後の展開

水分量の絶対的な値を知るには、まだ本法では不十分であり、定量法の検討が必要である。この点をクリアし、さらに測定時間を短縮してイメージング計測を行えば皮膚診断法としても実用できる。測定時間の短縮に関してわれわれは現在、実時間二次元THz断層イメージング法の開発に取り組んでいる²⁰⁾。この技術は種々の高性能生体計測のみならず、空港などにおけるセキュリティチェックにも応用でき、新しいTHz計測の展開が期待される。しかし何よ

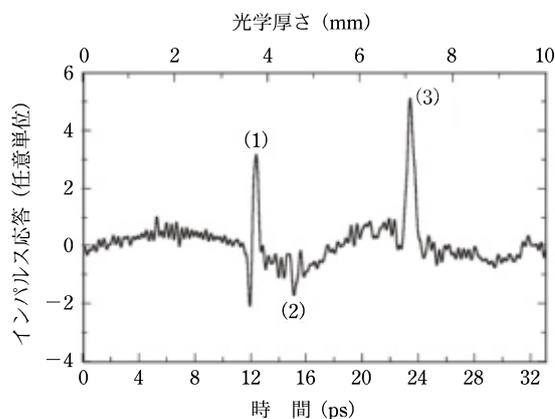


図6 ヒト掌皮膚のTHzエコーパルス波形.

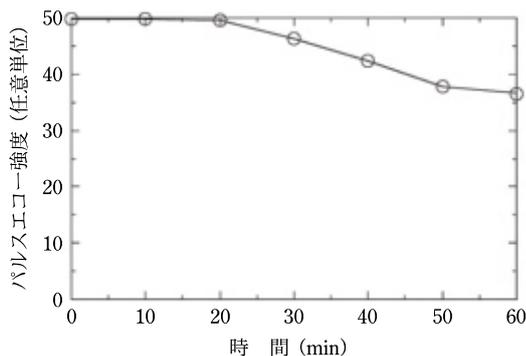


図7 THz エコーパルス(1)のピーク高さの経時変化。掌皮膚が潤滑した状態から乾燥していく過程に対応。

りも、fs レーザーの価格がもっと下がることが THz パルスや SHG 光の応用を加速する上で必須であろう。

4. お す び

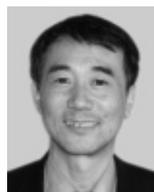
「目で診て診断できることをわざわざ光計測などという小難しい手法を使って調べることはなかろう」とよくいわれる。実は目で診ること自体光計測なのである。しかも経験という高機能フィルタリング・データ処理系を備えた計測である。ミクロの決死隊という映画があったが、生体の中をこの目で直視できれば、そのことによる知見はいかなる計測手法にも勝るであろう。消化管では内視鏡検査が医療現場で必須となっている。しかし通常の内視鏡では空腸、回腸には到達しない。また経験者は感じられたであろうが苦痛や不安も検査をちゅうちょさせる原因の一つとなる。最近カプセル内視鏡がイスラエル²¹⁾と日本²²⁾のメーカーから発売された。いずれも、直径 10 mm、長さ 25 mm 程度の大きさのカプセルを飲み込んで、およそ半日で排泄されるまで消化管内部の画像を外部へ送信し続ける。このような遊離型内視鏡の登場で、内視鏡検査のやり方も大きく変わると思われる。いわゆる応用物理という光計測の観点からは新しい点はないかもしれないが、電子技術、計装技術を付加した複合的な先端光技術である。このようなコンセプトを取り入れながら、われわれが得意とする光計測法を展開すれば、さらなる高機能生体診断が期待できるであろう。

文 献

1) Z. Chen, T. E. Milner, D. Dave and J. S. Nelson : Opt. Lett. **22**, 64 (1997).

2) 日本エム・イー学会雑誌(BME) **17**, No. 4 (2003).
 3) ラジャゴパラン ウママヘスリ, 谷藤 学: 応用物理 **72**, 711 (2003).
 4) 安井武史, 堀 泰明: 光学 **33**, 259 (2004).
 5) Y. Hori, T. Yasui and T. Araki: Opt. Rev. **12**, (in press) (2005).
 6) B. K. Milthorpe, G. J. Rogers and K. Schindheim: Med. Biol. Eng. Comput. **26**, 161 (1988).
 7) S. Osaki: Anat. Rec. **254**, 147 (1999).
 8) S. Osaki: Anat. Rec. **263**, 161 (2001).
 9) T. Yasui, Y. Tohno and T. Araki: Appl. Opt. **43**, 2861 (2004).
 10) T. Yasui, Y. Tohno and T. Araki: J. Biomed. Opt. **9**, 259 (2004).
 11) K. Sasaki, T. Yasui, Y. Tohno and T. Araki: Proc. APBP2004 (2nd Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics), 205 (2004).
 12) S. Roth and I. Freund: Biopolymers **20**, 1271 (1981).
 13) Y. Jiang, I. Tomov, Y. Wang and Z. Chen: Opt. Lett. **29**, 1090 (2004).
 14) W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Chritie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman and W. W. Webb: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **100**, 7075 (2003).
 15) T. Löffler, T. Bauer, K. J. Siebert, H. G. Roskos, A. Fitzgerald and S. Czasch: Opt. Exp. **9**, 616 (2001).
 16) B. E. Cole, R. Woodward, D. Crawley, V. P. Wallace, D. D. Arnone and M. Pepper: Proc. SPIE **4276**, 1 (2001).
 17) D. Crawley, C. Longbottom, V. P. Wallace, B. E. Cole, D. D. Arnone and M. Pepper: J. Biomed. Opt. **8**, 303 (2003).
 18) 安井武史, 東野義之, 荒木 勉: 生体医工学 **42**, 190 (2005).
 19) J. T. Kindt and C. A. Schmuttenmaer: J. Phys. Chem. **100**, 10373 (1996).
 20) 安田敬史, 安井武史, 荒木 勉: Optics Japan 2004 講演予稿集, 374 (2004).
 21) <http://www.givenimaging.com/Cultures/en-US/given/english>
 22) <http://www.rfnorika.com/>

(2005年3月7日 受理)



あらき 勉
荒木 勉

1977年大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻博士課程修了, 78年ウィスコンシン大学研究員, 79年徳島大学医学部助手, 87年徳島大学工学部助教授, 93年徳島大学工学部教授を経て97年4月から大阪大学大学院基礎工学研究科教授。学位: 工博・医博, 研究領域: 光応用計測, 生体計測



やすい たけし
安井 武史

1997年徳島大学大学院工学研究科生産開発工学専攻博士後期課程修了, 97年徳島大学SVBL研究員, 同年通産省工業技術院計量研究所特別研究員を経て99年4月から大阪大学大学院基礎工学研究科・助手。03年ボルドー大学・文科省短期在外研究員, 学位: 博士(工学), 研究領域: フェムト秒レーザー計測, 生体光計測, テラヘルツ計測