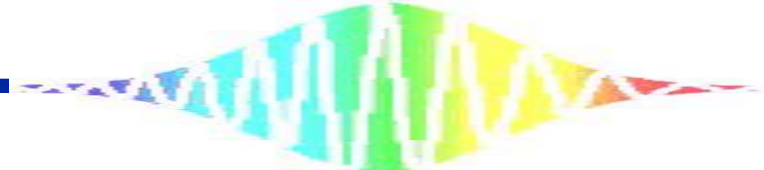


# 4chストークスパラメータを用いた SHG偏光分解イメージング法

2014/09/12

B4 宮本



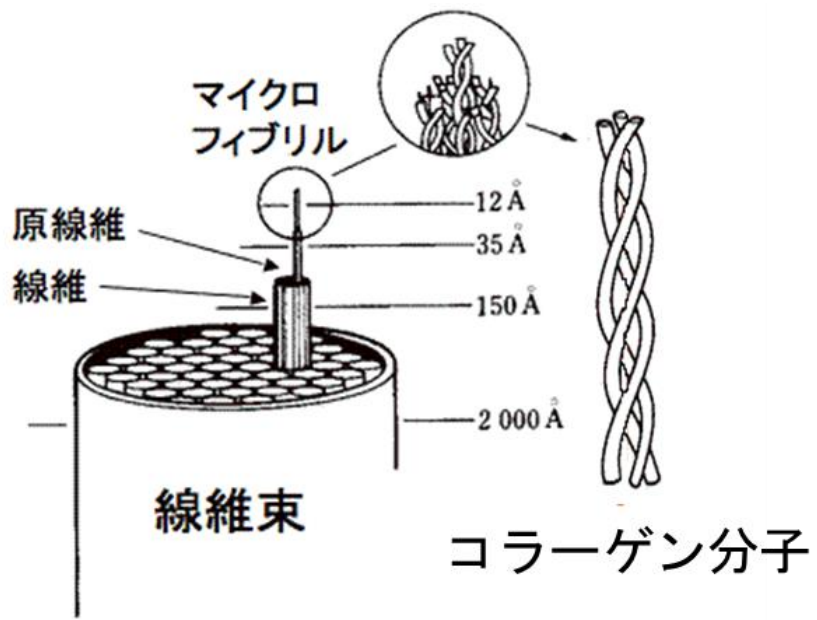
N. Mazumder, J. Qiu, M. R. Foreman,  
C. M. Romero, C. Hu, H. Tsai, P. Török,  
and F. Kao,

“Polarization-resolved second harmonic  
generation microscopy with a four-  
channel Stokes-polarimeter”

Optics Express **20**, 14090 (2012).

# 従来のSHG偏光分解顕微鏡

## 従来のSHG偏光分解顕微鏡@コラーゲン



入射偏光方向 コラーゲン 線維配向		
SHG強度	Strong	Weak

### SHG発生効率

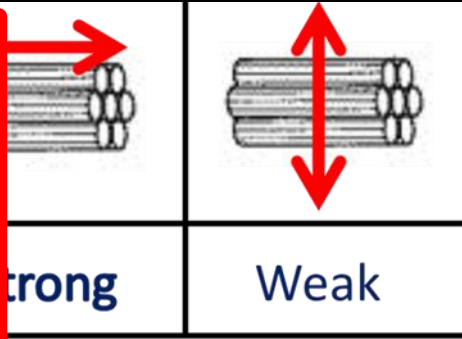
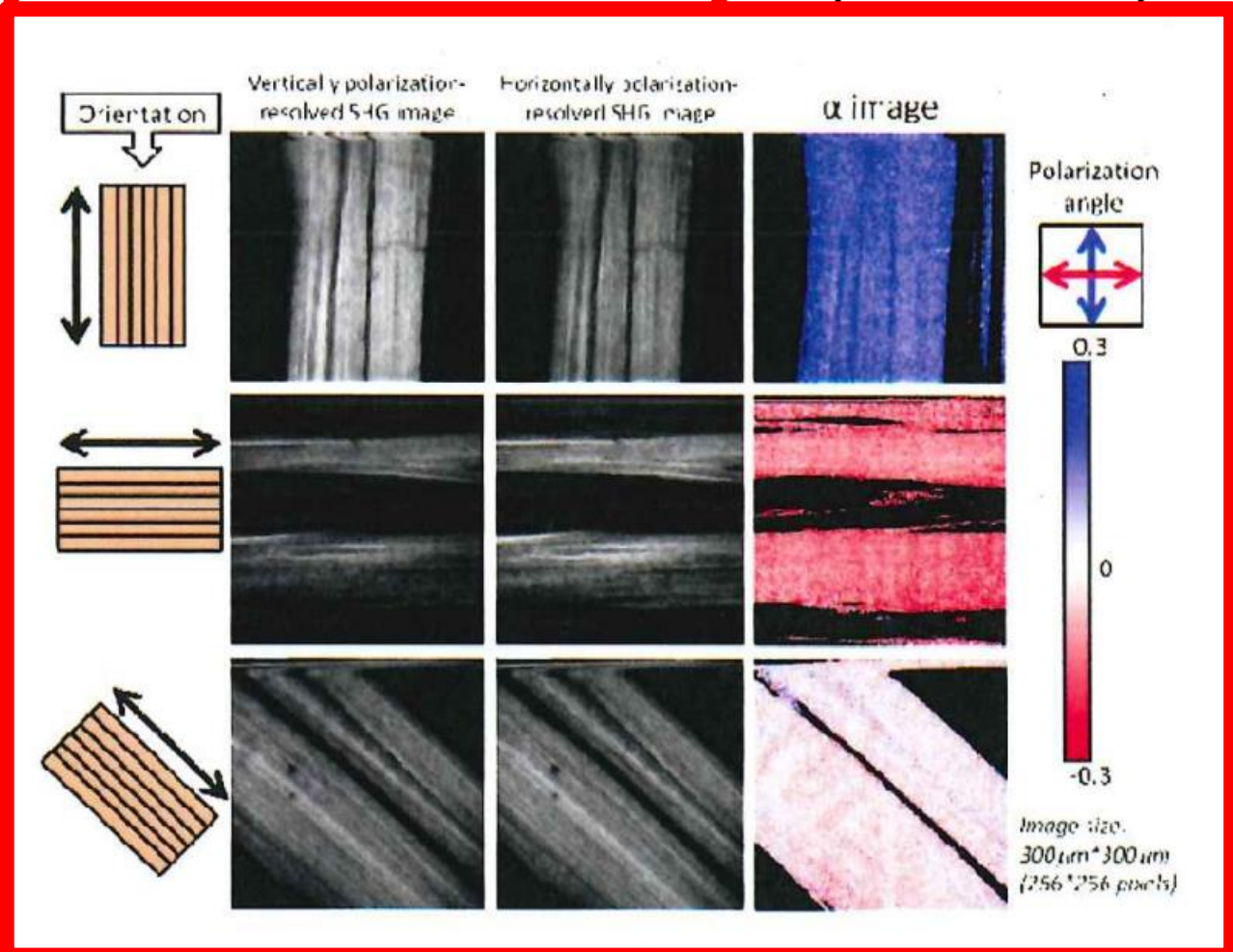
入射レーザー偏光  
 コラーゲン配向 } に依存

入射レーザー光の偏光方向を回転させてSHG光強度を取得

## コラーゲン配向の定量評価が可能

# 従来のSHG顕微鏡

入射光の偏光と出射SH信号の強度のみを観測



効率

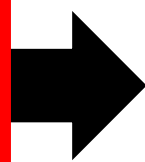
レーザー偏光  
繊維配向に依存

SHG偏光異方性

$$\alpha = \frac{I_{90} - I_0}{I_{90} + I_0}$$

# 本手法

SHG偏光分解  
顕微鏡+4chPSA



ストークスベクトルを用いて出射SHG光の  
**偏光状態**を解析

メリット

組織や結晶中の不純物や分子の配向を詳細に解析できる  
(コラーゲンやミオシン等)

- ①入射光の偏光状態を回転させる必要がない
- ②サンプル中のコラーゲンの複屈折特性 (DOP, DOLP, DOCP, 偏光異方性) を解析できる

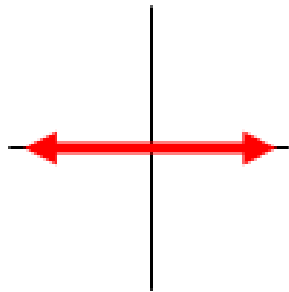
# ストークスベクトル

$$S = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_0 + I_{90} \\ I_0 - I_{90} \\ I_{45} - I_{-45} \\ I_{RCP} - I_{LCP} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{(平均光強度)} \\ \text{(水平・垂直偏光強度差)} \\ \text{(45°・-45°偏光強度差)} \\ \text{(右・左回り円偏光強度差)} \end{bmatrix}$$

完全偏光 :  $S_0^2 = S_1^2 + S_2^2 + S_3^2$   
 部分偏光 :  $S_0^2 > S_1^2 + S_2^2 + S_3^2$

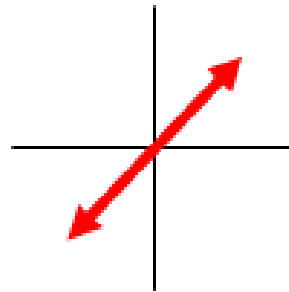
水平直線偏光

$$\begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$



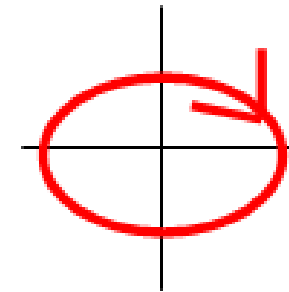
45度直線偏光

$$\begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix}$$



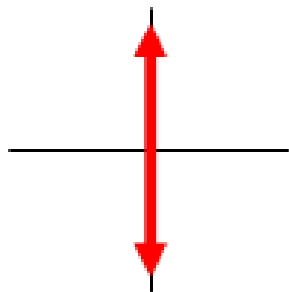
楕円偏光

$$\begin{bmatrix} 1 \\ 0.86 \\ 0 \\ 0.5 \end{bmatrix}$$



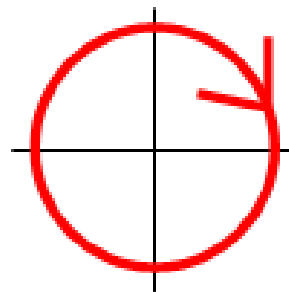
垂直直線偏光

$$\begin{bmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$



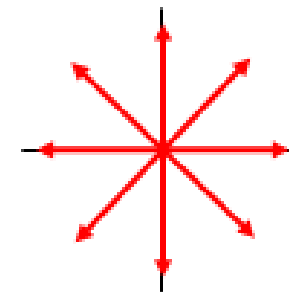
右回り円偏光

$$\begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix}$$



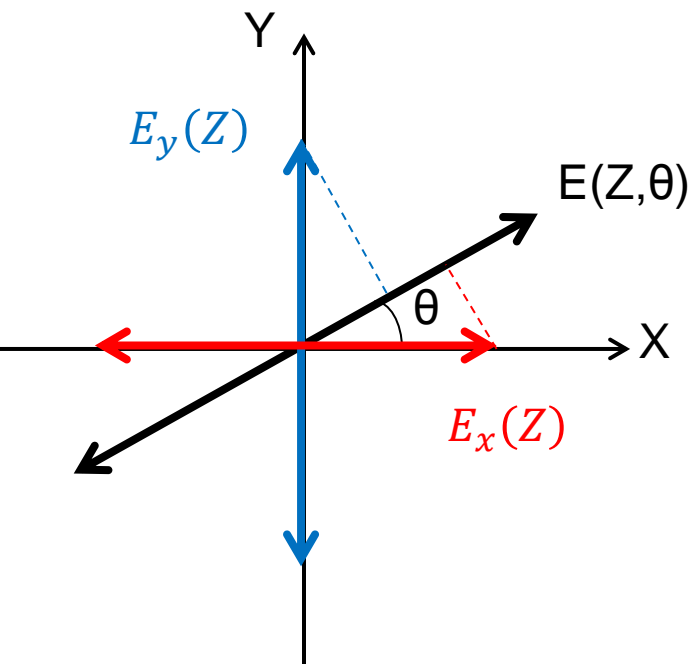
ランダム偏光 (偏光成分なし)

$$\begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$



# ストークスベクトル

(電場の式による偏光強度の表し方)



素性の分からないある位置Zでの  
電場成分  $E_x(Z), E_y(Z)$  を複素表示を  
用いて以下の式で表す.

$$E_x(Z) = E_{0x} \exp(-ikZ)$$

$$E_y(Z) = E_{0y} \exp(-ikZ + i\phi)$$

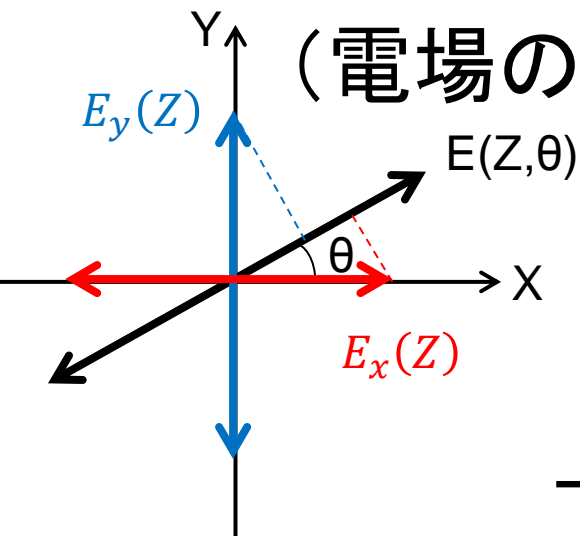
$$\left\{ \begin{array}{l} E_{0x}, E_{0y} : \text{最大の電場} \\ k : \frac{2\pi}{\lambda} \text{ (波数)} \\ \phi : E_x \text{ に対する } E_y \text{ の位相差} \end{array} \right.$$

角度  $\theta$  の電場成分  $E(\theta)$  は

$$\begin{aligned} E(Z, \theta) &= E_x(Z) \cos \theta + E_y(Z) \sin \theta \\ &= E_{0x} \exp(-ikZ) \cos \theta + E_{0y} \exp(-ikZ + i\phi) \sin \theta \end{aligned}$$

# ストークスベクトル

(電場の式による偏光強度の表し方)



$$E(Z, \theta) = E_{0x} \exp(-ikZ) \cos \theta + E_{0y} \exp(-ikZ + i\phi) \sin \theta$$

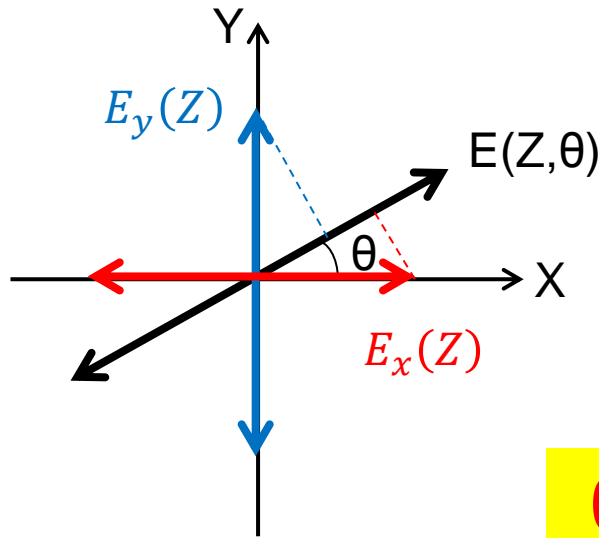
上式より,  $\theta$ 方向の強度 $I(\theta)$ を求める

$$\begin{aligned} I(Z, \theta) &= |E(Z, \theta)|^2 = \{E_x(Z) \cos \theta + E_y(Z) \sin \theta\} \\ &\quad \{\overline{E_x(Z) \cos \theta + E_y(Z) \sin \theta}\} \\ &= |E_x(Z)|^2 \cos^2 \theta + |E_y(Z)|^2 \sin^2 \theta + \\ &\quad \{E_x(Z) \overline{E_y(Z)} + \overline{E_x(Z)} E_y(Z)\} \sin \theta \cos \theta \\ &= E_{0x}(Z)^2 \cos^2 \theta + E_{0y}(Z)^2 \sin^2 \theta + 2E_{0x} E_{0y} \sin \theta \cos \phi \\ &= \frac{E_{0x}^2 + E_{0y}^2}{2} + \frac{E_{0x}^2 - E_{0y}^2}{2} \cos 2\theta + E_{0x} E_{0y} \sin 2\theta \cos \phi \end{aligned}$$

( $\bar{X}$ は $X$ の共役複素数とする)



# ストークスベクトル



$$I(\theta, \phi)$$

$$= \frac{E_{0x}^2 + E_{0y}^2}{2} + \frac{E_{0x}^2 - E_{0y}^2}{2} \cos 2\theta + E_{0x} E_{0y} \sin 2\theta \cos \phi$$

$$\theta = 0^\circ, 90^\circ$$

のときを考えると,

$$I(0, \phi) = E_{0x}^2 \quad (\text{水平成分強度})$$

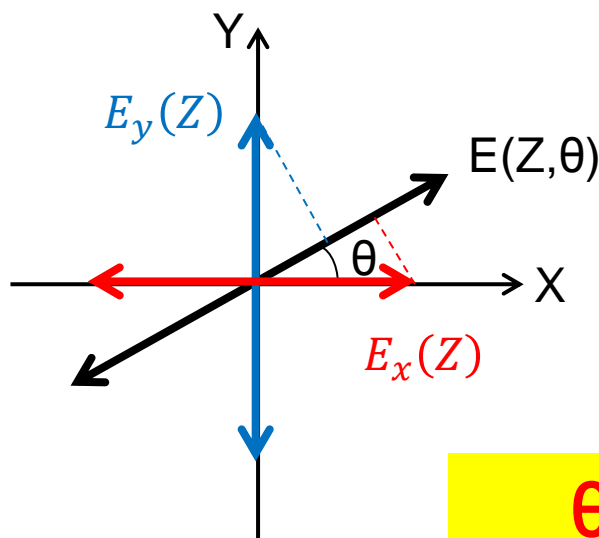
$$I(90, \phi) = E_{0y}^2 \quad (\text{垂直成分強度})$$

この二つの和と差を取り,

$$I(0, \phi) + I(90, \phi) = E_{0x}^2 + E_{0y}^2 = (\text{平均光強度}) = S_0$$

$$I(0, \phi) - I(90, \phi) = E_{0x}^2 - E_{0y}^2 = (\text{水平・垂直偏光強度差}) = S_1$$

# ストークスベクトル



$$I(\theta, \phi) = \frac{E_{0x}^2 + E_{0y}^2}{2} + \frac{E_{0x}^2 - E_{0y}^2}{2} \cos 2\theta + E_{0x}E_{0y} \sin 2\theta \cos \phi$$

$\theta=45^\circ, -45^\circ$  のときを考えると,

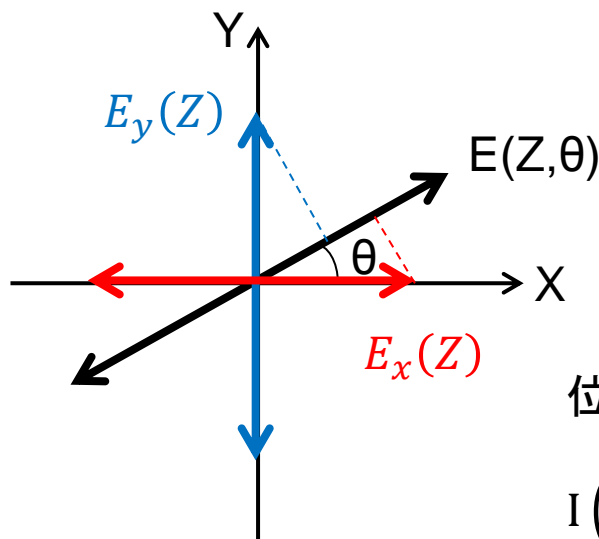
$$I(45, \phi) = \frac{E_{0x}^2 + E_{0y}^2}{2} + E_{0x}E_{0y} \cos \phi \quad (45^\circ \text{成分強度})$$

$$I(-45, \phi) = \frac{E_{0x}^2 + E_{0y}^2}{2} - E_{0x}E_{0y} \cos \phi \quad (-45^\circ \text{成分強度})$$

この二つの差を取り,

$$I(45, \phi) - I(-45, \phi) = 2E_{0x}E_{0y} \cos \phi = (45^\circ \cdot -45^\circ \text{偏光強度差}) = S_2$$

# ストークスベクトル



$$I(\theta, \phi) = \frac{E_{0x}^2 + E_{0y}^2}{2} + \frac{E_{0x}^2 - E_{0y}^2}{2} \cos 2\theta + E_{0x}E_{0y} \sin 2\theta \cos \phi$$

位相差 $\phi$ を決定するため,  $\cos(\phi - \frac{\pi}{2}) = \sin \phi$  を用いて,

$$I\left(45, \phi - \frac{\pi}{2}\right) = \frac{E_{0x}^2 + E_{0y}^2}{2} + E_{0x}E_{0y} \sin \phi \quad (45^\circ \text{成分強度})$$

$$I\left(-45, \phi - \frac{\pi}{2}\right) = \frac{E_{0x}^2 + E_{0y}^2}{2} - E_{0x}E_{0y} \sin \phi \quad (-45^\circ \text{成分強度})$$

この二つ差を取り,

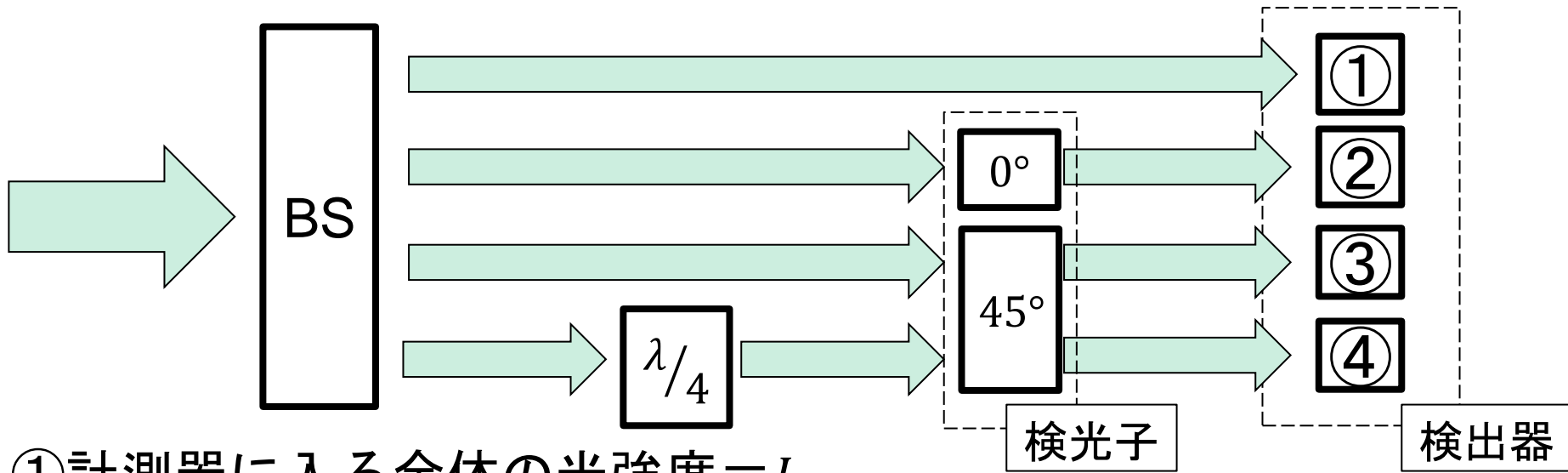
$$I\left(45, \phi - \frac{\pi}{2}\right) - I\left(-45, \phi - \frac{\pi}{2}\right) = 2E_{0x}E_{0y} \sin \phi = (\text{右} \cdot \text{左周} \text{り円偏光強度差}) = S_3$$

45° の直線偏光成分に対し  $\frac{1}{4}$  波長板を通過させるという操作に対応する



円偏光成分

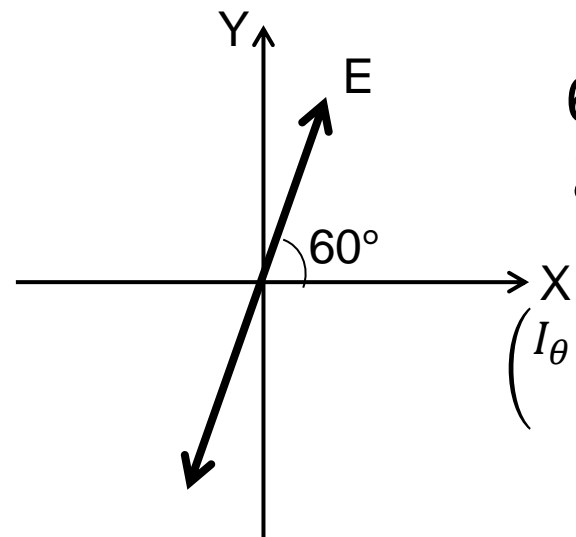
# ストークスベクトルの計測



- ①計測器に入る全体の光強度 =  $I_t$
- ②4分岐光の1つが $0^\circ$  の偏光子を通過した光強度 =  $I_0$
- ③4分岐光の1つが $45^\circ$  の偏光子を通過した光強度 =  $I_{45}$
- ④4分岐光の1つが $\lambda/4$  板と $45^\circ$  の偏光子を通過した光強度 =  $I_{q45}$

$$S = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{(平均光強度)} \\ \text{(水平・垂直偏光強度差)} \\ \text{(45^\circ \cdot -45^\circ 偏光強度差)} \\ \text{(右・左回り円偏光強度差)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} E_{0x}^2 + E_{0y}^2 \\ E_{0x}^2 - E_{0y}^2 \\ 2E_{0x}E_{0y} \cos \phi \\ 2E_{0x}E_{0y} \sin \phi \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_t \\ 2I_0 - I_t \\ 2I_{45} - I_t \\ 2I_{q45} - I_t \end{bmatrix}$$

# ストークスベクトル(60°の直線偏光)



60°の直線偏光について考える．完全偏光であるとして，全体の強度 $I_t = 1$ とする．

$$I_\theta = I_t \cos^2 \omega$$

( $I_\theta$ : 求めたい強度  $\omega$ : 元の直線偏光成分と求めたい偏光強度成分の相対角度)

より，

$$I_t = 1, \quad I_0 = 1 * \cos^2(60) = 0.25,$$

$$I_{45} = 1 * \cos^2(60 - 45) = 0.93, \quad I_{q45} = 0.5$$

よって， $S_0 = I_t = 1, \quad S_1 = 2 * 0.25 - 1 = -0.5,$

$$S_2 = 2 * 0.93 - 1 = 0.86, \quad S_3 = 2 * 0.5 - 1 = 0$$

$$S = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ -0.5 \\ 0.86 \\ 0 \end{bmatrix}$$



# ストークスベクトルから分かる情報

$$S = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{(平均光強度)} \\ \text{(水平・垂直偏光強度差)} \\ \text{(45°・-45°偏光強度差)} \\ \text{(右・左回り円偏光強度差)} \end{bmatrix}$$

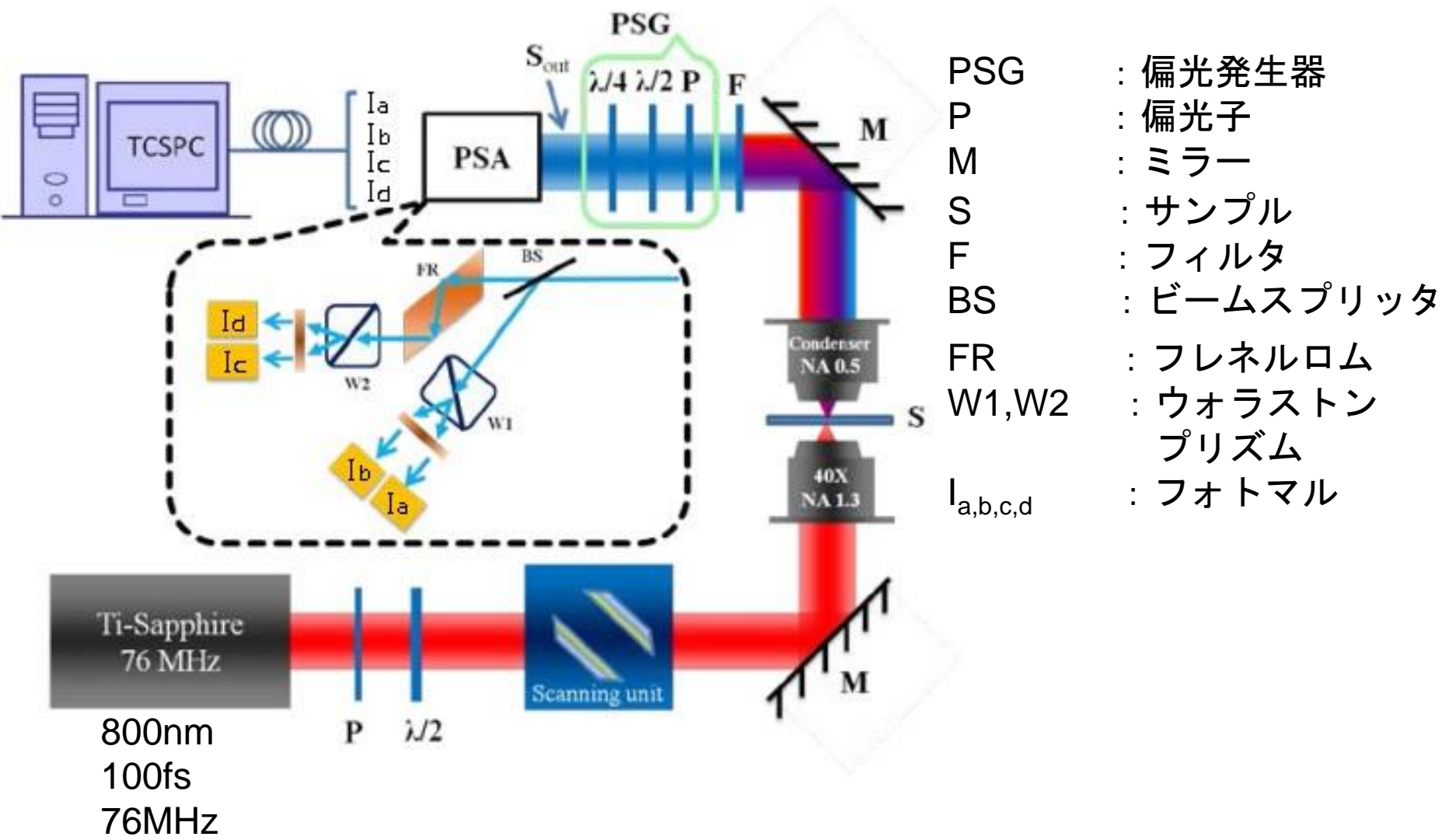
$$\text{偏光度DOP} = \frac{\sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}}{S_0} = \frac{\text{偏光成分の強度}}{\text{検出された全体の光強度}}$$

$$\text{直線偏光度DOLP} = \frac{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}}{S_0} = \frac{\text{直線偏光成分の強度}}{\text{検出された全体の光強度}}$$

$$\text{円偏光度DOCP} = \frac{|S_3|}{S_0} = \frac{\text{円偏光成分の強度}}{\text{検出された全体の光強度}}$$

$$\text{偏光異方性比r} = \frac{2S_1}{3S_0 - S_1} = \frac{\text{平行偏光成分} - \text{垂直偏光成分}}{\text{平行偏光成分} + 2 * \text{垂直偏光成分}} \left( = \frac{I_0 - I_{90}}{I_0 + 2I_{90}} \right)$$

# セットアップ



# キャリブレーション

出射SH光の偏光成分にはPSAによる測定時の偏光の歪みを含む

**正確なストークスベクトルが得られない**

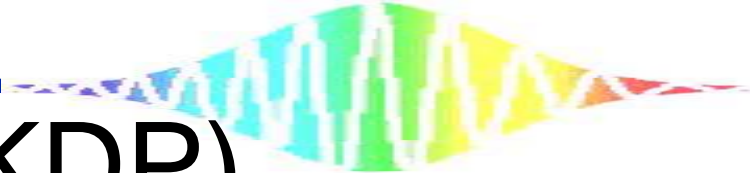


PSGで作りに出した既知の偏光状態の入射光@400nmをPSAに入射し、その時の $S_{OUT}$ ,  $I$ の入射偏光からの歪みから機器行列 $A_{4 \times 4}$ を求め補正する.

$$A_{4 \times 4} = \begin{bmatrix} 292.88 & -209.49 & -216.62 & -0.75 \\ 213.26 & -60.71 & 166.99 & 19.41 \\ 267.48 & 84.15 & -78.93 & -209.49 \\ 250.91 & 72.30 & 32.95 & 247.98 \end{bmatrix}$$

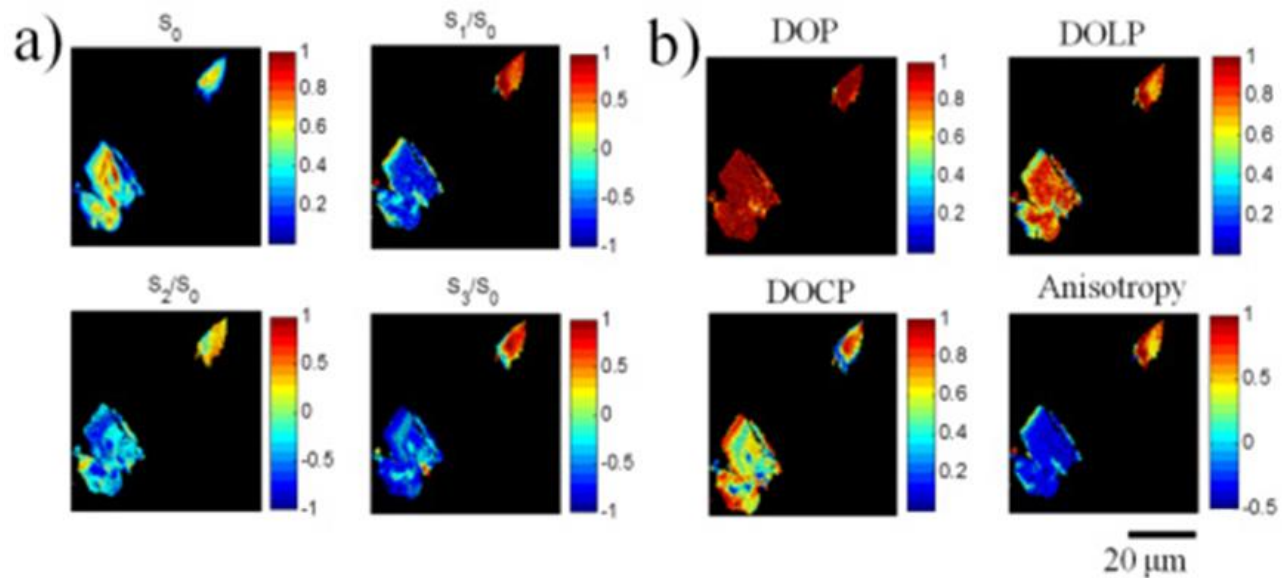
$$S_{OUT} = (A_{4 \times 4})^{-1} \cdot I$$





# 実験結果 (KDP)

256 × 256ピクセル



KDP結晶：レーザーの波長変換に用いられる非線形光学結晶



結晶なので分子が規則正しく配向している



2つのKDP結晶における偏光成分の違いは有意差を示すと予想される

*DOP*

SH信号のほぼすべてが完全偏光されている。

*DOLP, DOCP*

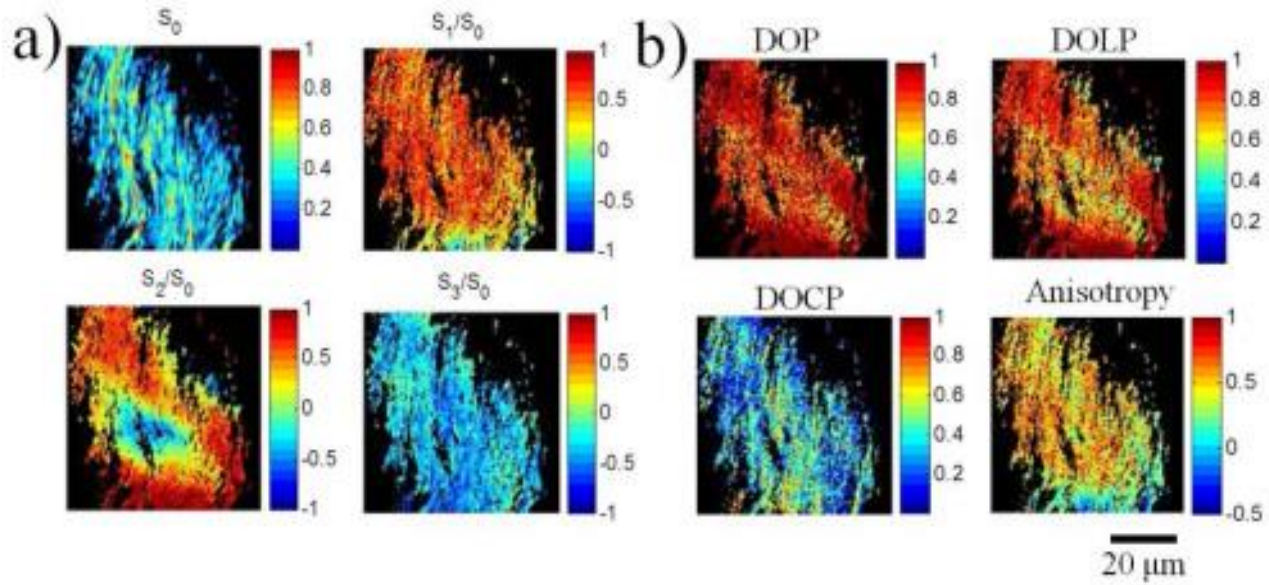
結晶の複屈折特性による直線偏光，円偏光の偏光成分が確認できる。電界成分の位相変動は伝搬深さに依存。  
→同じ入射光を入れても両結晶で同じ偏光成分は出ない。

*Anisotropy*

結晶の方位差を示す。  $r = \frac{I_0 - I_{90}}{I_0 + 2I_{90}}$  より，右上の結晶は水平偏光成分が多く，左下の結晶は垂直偏光成分が多く含まれる。

# 実験結果( I 型コラーゲン)

256×256ピクセル



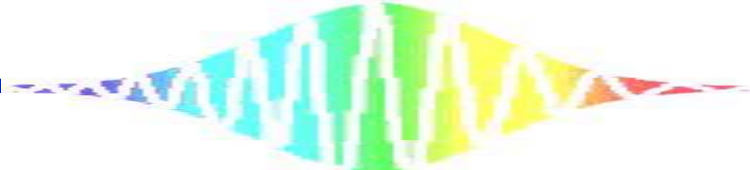
サンプルには牛アキレス腱を使用

*DOP* SHG光のほぼすべてが完全偏光されている.

*DOLP* 直線偏光成分に対し平行な分子配向を示す.

*DOCP* 左右の回転偏光の混合信号であり, 偏光をどの程度回転させたかを表す.

*Anisotropy* 高い分子配向異方性を持つことが確認できる.



# まとめ

- 4チャンネルストークスイメージを得ることによってサンプルからのSH光の偏光状態, DOP, DOLP, DOCP, SH信号の偏光異方特性が解析された.
- サンプルの複屈折特性, 及び結晶配向を特徴付けることが可能となった.

これらの特徴付けの技術は SHG, THG, CARS, 誘導放出顕微鏡に応用できる可能性がある.

蛍光の時間分解, 偏光分解の研究において前例のない分子の動態情報を解析できる可能性がある.

# 非線形光学顕微鏡

非線形光学顕微鏡・・・非線形光学現象を用いた生体組織等のイメージングツール

- 特徴
  - ・ 焦点近傍のみで試料と作用
  - ・ 光源に近赤外光を使用

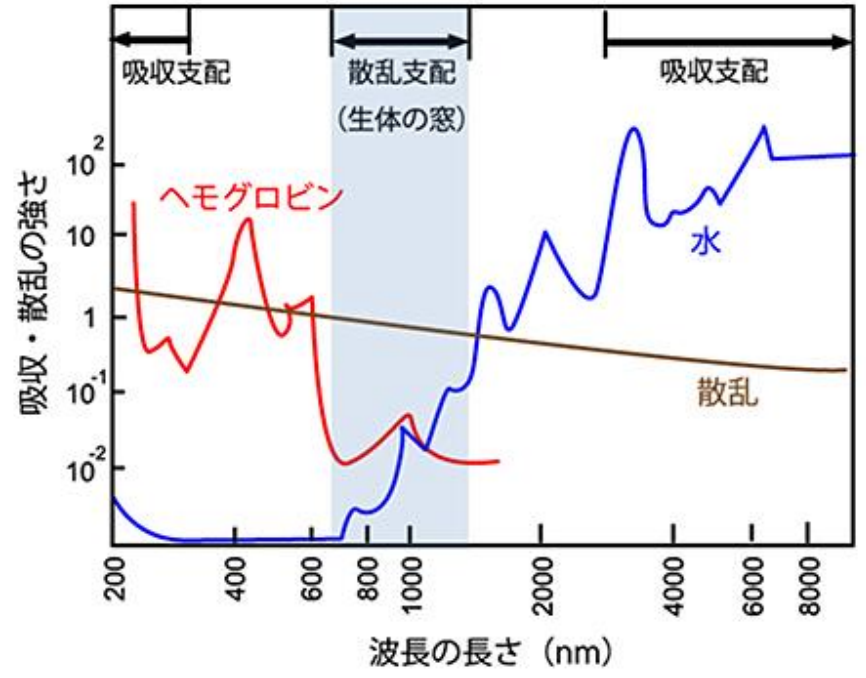
線形光学効果と非線形光学効果の発生領域

一光子蛍光      二光子蛍光

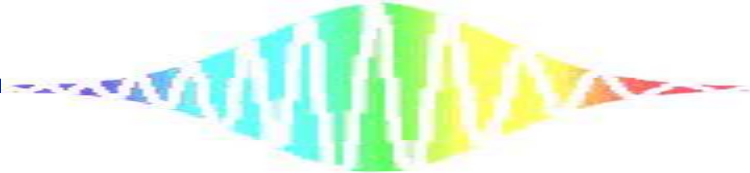
可視      近赤外

CWレーザー      パルスレーザー

Ref) W.R.Zipfel, et al. Nature Bio. 21,1369 (2003)



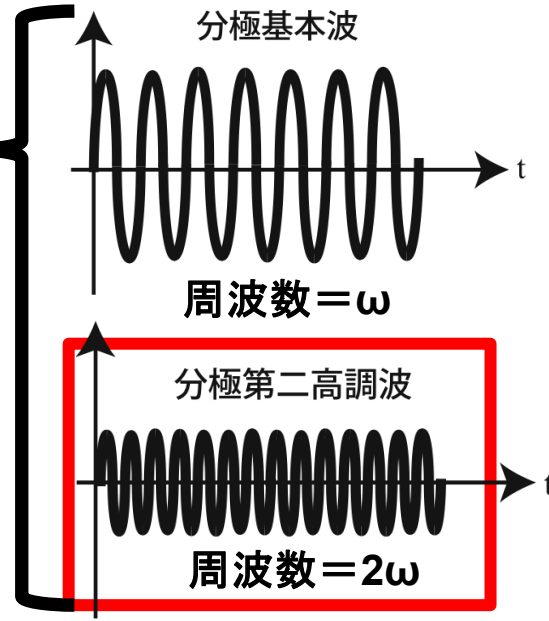
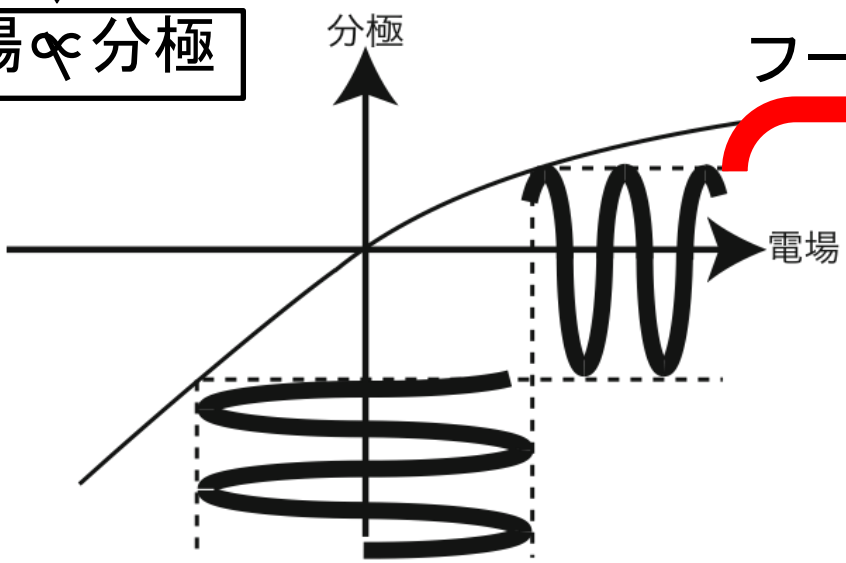
低侵襲・深侵達性・高空間分解能・3次元イメージングが可能



# 非線形分極 @ 非中心対称物質

電場が強くなる

↓  
電場 ∝ 分極



$$P_{NL} = \chi^{(1)} E + \chi^{(2)} EE + \chi^{(3)} EEE + \dots$$

$P_{NL}$  : 非線形分極  
 $E$  : 電場  
 $\chi^{(n)}$  : 非線形感受率

↓  
**SHG光**