

○Abstract 要約

入射楕円形偏光のためのコラーゲン繊維からの二次調波発生信号の空間分布はモデル化されました。その光線は顕微鏡対物レンズを通して水平繊維上に集中すると仮定された。ポアンカレ球の垂直軸に沿って位置している楕円形の偏波状態のために、SHG 強度は入射波長と物体の開口数の関係において最適化されている。結果は偏光は SHG 信号を調整すると示した。入射波長と開口数の適切な値を混合するとき、楕円の偏光は高い信号を作ることができる（直線偏光と一致しているそれらよりも随分よい）。一方、特別な楕円分極状態、それはコラーゲン繊維の超分極率にまったく依存しない状態であるが、にとつて SHG 強度もまた同じくゼロかもしれない。入射波長や開口数が増える時の縮小によって、伝達方向に沿ってあちこちに SHG 信号分布が起こる。さらに、最大 SHG 放出の方向は入射波長の変化よりも開口数の変化により敏感であると分かった。これらの発見は多光子顕微鏡の実験状態の最適化とコラーゲンを含む生物学的な問題から SHG 信号の増加をもたらした。

○Introduction 導入

昨年間に生物応用のための多光子顕微鏡の使用における興味が増えてきている。特に、SHG イメージングはエネルギーを維持し、光学的組織において有益な情報を供給し、光学 3-D 部門と深い侵入を許している拡張しない技術である。しかし、SHG 信号はコラーゲンのような中心非対称組織に基づいている、この非直線過程は局所的な異方性や分子の超分極率の分布や、位相整合特性に敏感である。SHG は位相整合動機に関係のある干渉性のある過程であり、その放出は主に等方性よりむしろまっすぐである。SHG の方向性は非線形過程が起こっている限局的な量の中に誘発された双極子の分布に依存している。動物のコラーゲン構造の SHG イメージングが関係している臨床応用はよく B-SHG を必要としている。さらに、細胞外コラーゲンの構造は癌の過程（腫瘍の発達）や老化、傷の治癒に重要な役割を果たす。いくつかの作用は子宮内膜組織や腱、角膜基質、肌、腫瘍やその他に含まれる異なった試料にイメージングしている F-SHG や B-SHG を比較している。これらすべての研究は構造にイメージされた SHG は顕微鏡の記録構成に強く依存している。一方、F-SHG と B-SHG 信号間の違いを論じている理論上の作業もまた報告されている。直線の偏光は SHG 顕微鏡によって映像化されたとき、コラーゲンを含んだサンプルの異なった特徴を可視化することが示された。ところが実験と optical モデルは SHG イメージ上の入射線形偏光の影響を研究するのを制限し、また分子適応を監視したり、表面や皮膜からの SHG 信号を分析するために楕円偏光の使用を調査しているのがあります。いくつかの研究は SHG 強度における円と楕円偏光の影響を報告している。特に、Schon et al.は顕微鏡の集光光学系に使用されているダイクロイックミラーは入射光（楕円反応においてひどいねじれを起こす）において高レベルの楕円率を引き起こしうる。これらのねじれは 1/4 板と 1/2 板を合わせることで修正できる。この研究の目的は集中楕円偏光でコラーゲンから発する SHG 信号の空間分布のモデルを作り、特徴を

知ることである。セクション 2 において、理論モデルは発展している。結果として、偏光の入射状態の機能として SHG 強度信号 $I_{2\omega}$ 、基礎波長 λ_ω 、そして顕微鏡対物レンズの開口数の分析的表現を得ることである。 $I_{2\omega}$ の広い数字で表した分析はこの研究の議論と主な結論を含むセクション 3 とセクション 4 の間に描かれている。さらに、入電子場 (付加物 A) 同様遠場近似 (付加物 B) において総放出 SHG 信号によって引き起こされる双極子モーメントの推定において細かい 2 つの付加物はまた含まれる。(?)

○SHG Intensity Signal for Elliptically Polarized Light Focused on a Collagen Fiber

楕円偏光の SHG 強度信号はコラーゲン線維に集中する。

Z 軸方向に伝播する基礎周波数 ω の楕円偏光のビームが開口数 $NA=n_\omega \sin \Theta$ の顕微鏡対物レンズを通して X 軸方向に沿って横たわるコラーゲン線維状に集光することを考えましょう。 Θ は光線が対物レンズに入るときに最大角度になり、 n_ω はコラーゲンの屈折の指標として表される。入射光の基礎波長 λ_ω との n_ω の依存は

$$\lambda_\omega(n_\omega)=1426+\frac{19476}{\lambda_\omega^2}-\frac{1131066900}{\lambda_\omega^4} \quad (1)$$

であると報告されている、そして λ_ω は nm で表される。

楕円偏光 $E_{\omega,x}$ と $E_{\omega,y}$ の垂直成分は

$$E_{\omega,x}(x,y,z)=-iE_{\omega,x}^{(0)} \exp\left[-\left(\frac{x^2+y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2}\right)\right] \exp[i\xi k_\omega z] \quad (2)$$

$$E_{\omega,y}(x,y,z)=-iE_{\omega,y}^{(0)} \exp\left[-\left(\frac{x^2+y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2}\right)\right] \exp[i(\xi k_\omega z + \delta)] \quad (3)$$

と書かれ、 δ はこれらの成分と屈折率 n_ω にともなう中波数 $k_\omega=(2\pi n_\omega)/\lambda_\omega$ 間の位相差である。 ξ は焦点近傍にガウスビームによっておこる位相変位を特徴づける波数ベクトル減少要因である。1.2 より低い開口数だと、 ξ は $\cos\left(\frac{\theta}{\sqrt{2}}\right)$ によって近くなりうる。一方、 w_{xy} と w_z は側面と軸方向において $\frac{1}{e}$ 半径の焦点楕円をそれぞれ

$$w_{xy}=\frac{0.32\lambda_\omega}{n_\omega \sin \theta} \quad w_z=\frac{0.53\lambda_\omega}{n_\omega(1-\cos \theta)} \quad (4) \quad \text{と表す。}$$

Fig.1 で示されるように、 ϕ (プシー) は入射光の楕円率を象徴付ける。楕円率のために、偏光の楕円方位角は 0 に近いところ選ばれる。この光の状態は可偏光状態は Poincare 球の 0 度経線の間位置している、そしてそれは液体結晶によって供給される実験用の偏光状態のセットに矛盾しない。入射場 $E_{\omega,x}$ と $E_{\omega,y}$ のそれぞれの内容はコラーゲン線維(x 方向)の間で SHG 双極子モーメントを引き起こすので、この仮説は著しく理論模型を簡単にする。付加物 A は双極子モーメント $\mu_{2\omega,x}$ をはっきりと示し、電場 $E_{\omega,x}$ と $E_{\omega,y}$ によって引き起こされる $\mu_{2\omega,x}$ はそれぞれ

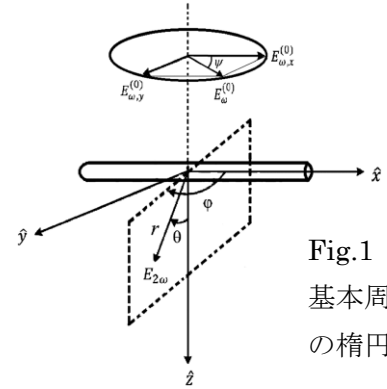


Fig.1
基本周波数 ω
の楕円偏光

$$\mu_{2\omega,x}^{(x)}(x,y,z) = \frac{1}{2} E_{\omega,x}^2 \beta_{xxx} \quad , \quad (5)$$

$$\mu_{2\omega,x}^{(y)}(x,y,z) = \frac{1}{2} E_{\omega,y}^2 \beta_{xyy} \quad , \quad (6)$$

と表される。そして β_{xxx} と β_{xyy} はSHG場に貢献する最初の超分極率に一致する。

両方の量を加えると、総SHG双極子モーメントの表現は

$$\mu_{2\omega,x}(x,y,z) = \mu_{2\omega,x}^{(x)}(x,y,z) + \mu_{2\omega,x}^{(y)}(x,y,z) = \frac{1}{2} (E_{\omega,x}^2 \beta_{xxx} + E_{\omega,y}^2 \beta_{xyy}) \quad , (7) \quad \text{となる。}$$

このSHG双極子モーメントはSHG遠場 $E_{2\omega}(\theta, \phi)$ 方向

$$E_{2\omega}(\Psi) = \eta \mu_{2\omega} \sin(\Psi) \exp[-ik_{2\omega} \cdot r] \Psi, \quad (8) \quad \text{に直接照射する、}$$

そして $\eta = \omega^2 / \pi \epsilon_0 c^2$ と Ψ はコラーゲン線維のx軸とSHG場の放出rの方向の間の角度を表

す。 ϵ_0 は自由場誘電率、cは光の真空速度、 $k_{2\omega} = (2\pi n_{2\omega}) / \lambda_{2\omega}$ はSHG信号の波数である。

遠場接近の総照射SHG信号は $\xi' = \xi (n_{\omega} / n_{2\omega})$ を使って N_v (付加物B)

$$E_{2\omega,x}(r, \theta, \varphi) = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{\pi}{2} \right)^3 w_{xy}^2 w_z \right] \times N_v \frac{\eta}{r} (\sin^2 \theta \sin^2 \varphi + \cos^2 \theta)^{1/2} \times \exp \left[-\frac{k_{2\omega}^2}{8} (w_{xy}^2 \sin^2 \theta + w_z^2 (\cos \theta - \xi')^2) \right] \times \left[\left(E_{\omega,x}^{(0)} \right)^2 \beta_{xxx} + \left(E_{\omega,y}^{(0)} \right)^2 \beta_{xyy} \exp[i2\delta] \right] \quad , (9)$$

によって定義された双極子体積密度をもつすべての散乱体の統合によって得られる。

さらに、SHG強度信号 $I_{2\omega}$ は

$$I_{2\omega,x}(r, \theta, \varphi) = \frac{1}{2} n_{2\omega} \epsilon_0 c |E_{2\omega,x}|^2 \\ = \left[\frac{1}{8} n_{2\omega} \epsilon_0 c (N_v V)^2 \right] \left(\frac{\eta}{r} \right)^2 (\sin^2 \theta \sin^2 \varphi + \cos^2 \theta) \times \exp \left[-\frac{k_{2\omega}^2}{4} (w_{xy}^2 \sin^2 \theta + w_z^2 (\cos \theta - \xi')^2) \right] \times \\ \left[\left(E_{\omega,x}^{(0)} \right)^4 \beta_{xxx}^2 + \left(E_{\omega,y}^{(0)} \right)^4 \beta_{xxx} \beta_{xyy} \cos(2\delta) \right] \quad , (10) \quad \text{という電場関係式を書くことができ、}$$

VはアクティブSHG体積 $V = \left(\frac{\pi}{2} \right)^3 w_{xy}^2 w_z$, (11) である。

Fig.1 から、入射振幅 E_{ω} の垂直成分は

$$E_{\omega,x}^{(0)} = E_{\omega}^{(0)} \cos \psi \quad E_{\omega,y}^{(0)} = E_{\omega}^{(0)} \sin \psi \quad , (12)$$

と簡単に表せられ、そして、(10)は(13)に変わる。

$$I_{2\omega,x}(\phi, r, \theta, \varphi) = \left[\frac{1}{8} n_{2\omega} \epsilon_0 c (N_v V)^2 \right] \left(\frac{\eta}{r} \right)^2 (\sin^2 \theta \sin^2 \varphi + \cos^2 \theta) \times \exp \left[-\frac{k_{2\omega}^2}{4} (w_{xy}^2 \sin^2 \theta + w_z^2 (\cos \theta - \xi')^2) \right] \times \left| E_{\omega}^{(0)} \right|^4 \left[\cos^4 \psi \beta_{xxx}^2 + \sin^4 \psi \beta_{xyy}^2 + \frac{1}{2} \sin^2(2\psi) \cos(2\delta) \beta_{xxx} \beta_{xyy} \right] \quad , (13)$$

等式(13)はどれほどSHG信号が明白に入射光の楕円率 ϕ に依存しているかを示す。

相 δ はここで使われた 0 方位の楕円偏光の $\pm\pi/2$ に等しいので、SHG 強度信号の最終表現形式は(14)となり、 $I_\omega = (1/2)n_\omega\epsilon_0c |E_\omega^{(0)}|^2$ は入射光の強度に一致する。

$$I_{2\omega}(\psi, \theta, \varphi) = \left[\frac{I_\omega^2}{2} \frac{n_{2\omega}}{n_\omega^2 \epsilon_0 c} (N_v V)^2 \right] \left(\frac{\eta}{r} \right)^2 (\sin^2 \theta \sin^2 \varphi + \cos^2 \theta) \times \exp \left[-\frac{k_{2\omega}^2}{4} (w_{xy}^2 \sin^2 \theta + w_z^2 (\cos \theta - \xi')^2) \right] \times \left[\cos^4 \psi \beta_{xxx}^2 + \sin^4 \psi \beta_{yyy}^2 - \frac{1}{2} \sin^2(2\psi) \beta_{xxx} \beta_{yyy} \right] \quad (14)$$

式(14)の末項は入射光 ψ の楕円率によって $I_{2\omega}$ に貢献する偏光を含む。この要因は SHG 強度の詳細を考慮に入れなければならない、次のセクションに詳細を示す。

3 SHG 強度信号の分析

一度楕円偏光の SHG 強度信号の一般式が得られると、異なったパラメータの機能として、この大きさの数の分析、入射光や入射波長 λ_ω や対物レンズの開口数の偏光状態を実行する。両方のグラフ (曲線) は大きさが違った似た形をしていると観察される。

Fig.3 に示される結果を分析すると、疑問が浮上する、 $I_{2\omega}$ は単に入射光の偏光状態を修正することによってゼロに等しくなる。この疑問に答えるために、式(14)の根源 (核心) を分析的に計算した。 $I_{2\omega}$ は次の楕円率 ψ_0 の数値のために消える。

$$\psi_0 = \cos^{-1} \left(\frac{\pm 1}{\sqrt{1+\rho}} \right) \quad (15)$$

この表現は超分極率 ρ の割合にもつぱら依存している。よって、式(15)によって計算された ρ の機能として Fig.4 は ψ_0 の数値をプロットする。 ρ の修正された数値のために、SHG 強度を消す 2つの楕円率数値 (また同様に、ポアンカレ球の 0 方位の経線上の 2つの偏光状態) が存在すると観察できる。式(15)の単純な検査から簡単に推測できるので、このような偏光状態の存在はもつぱら $\rho > -1$ の数値に制限される。

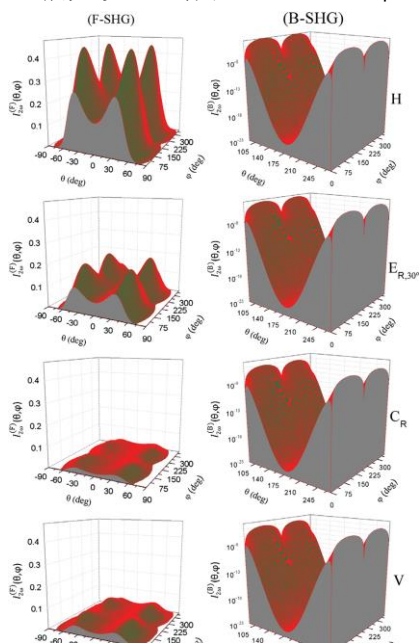


Fig.2 入射光の楕円率 ψ において SHG 強度の強い依存性

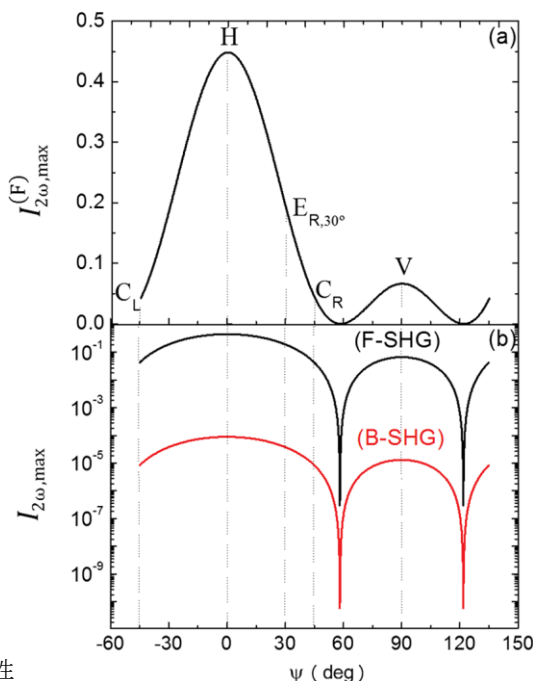


Fig.3
(a)最大 F-SHG 強度数値
(b)最大 F-SHG 及び B-SHG 強度信号

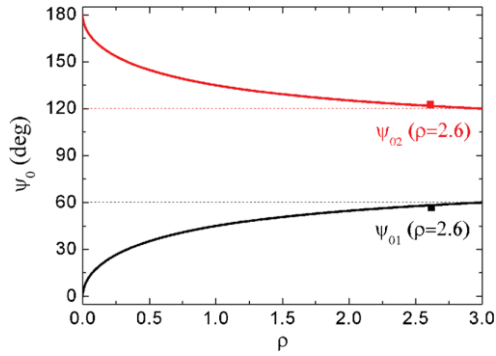


Fig.4
超分極率 ρ の比と楕円率 ψ_0 のグラフ

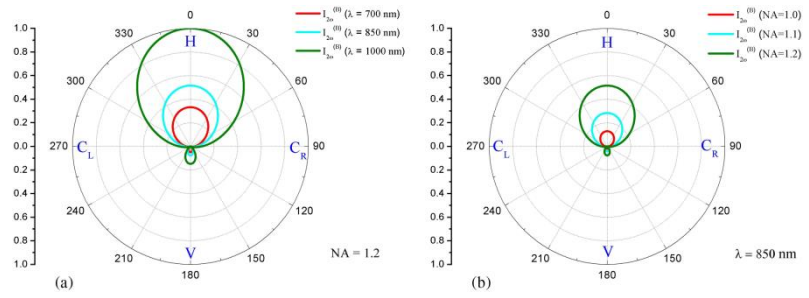


Fig.5 B-SHG 信号強度

3.1 基礎波長と $I_{2\omega}$ 上の開口数の影響

Fig.2-4 に示されている結果は $\lambda_\omega=700\text{nm}$ と $\text{NA}=1.2$ を得た。しかし、入射波長と NA がどれほど異なった入射偏光状態の SHG 信号に影響を与えるかを調べるのは面白い。特に、Fig.5 の(a)と(b)は B-SHG 信号が λ_ω と NA の異なった数値の 2ϕ の機能としてプロットされている 2 つの極座標図を描く。より良い比較として、グラフ (曲線) は最大 B-SHG 強度数値 ($\lambda_\omega=1000\text{nm}, \text{NA}=1.2$) を正常化している。予想通りに、波長と開口数の修正された数値のために、最大 B-SHG 強度は水平偏光 H を起こす (Fig.2 と Fig.3)。しかし、選ばれた NA の数値のために、Fig.5 に示されるように、 $I_{2\omega}$ は λ_ω とともに増加する。すなわち、最大 B-SHG 強度数値は入射波長数値に強く依存する。例として、 $2\phi=15^\circ$ と $\lambda_\omega=850\text{nm}$ 、開口数 1.2 の対物レンズに使われる楕円偏光は $\lambda_\omega=700\text{nm}$ の平行偏光によって作られる信号より 1.4 倍大きい B-SHG 信号を作る。Fig.5(b)から楕円偏光は開口率 1.0 の一致する H 偏光より 3.4 倍大きい B-SHG を生成する。直接的な結果として、開口数と λ_ω の適切な数値を混合した楕円光を使うことによって B-SHG 信号の最適化された数値は達成される。似た結果が F-SHG 強度信号 (この研究には含まれない) にも見られた、そしてこれらの結論は SHG コレクション幾何学に展開されうる。

一方、式(14)から F/B SHG 比 $I_{2\omega}^{(F)}/I_{2\omega}^{(B)}$ は入射光の偏光状態に依存しないと分かる (最後の

式は除く)。だから、 F/B SHG 比の入射波長 λ_ω (すなわち、波長分散特性) の影響が調査された。Fig.6 は 3 つの異なった λ_ω 数値の F/B の空間分布 (極座標を表す) を示す。このプロットのために、開口数と ρ はそれぞれ 1.2 と 2.6 に選ばれた。最大 F/B SHG 比は到来方向 z 、つまり $\theta=0$ 沿いに観察された。さらに、 F/B SHG の異なった λ_ω の空間分布の比較は λ_ω のより大きい数値の大きさのいくつかの種類の増加を示す。

F/B SHG 比の開口数の影響は Fig.7 に描かれている。プロットは 3 つの異なった開口数数値の空間分布 $I_{2\omega}^{(F)}/I_{2\omega}^{(B)}$ を表す。この場合、 $\lambda_\omega=850\text{nm}$ と $\rho=2.6$ です。対物レンズの開口数

は SHG 信号を探すのに基礎的な役割を果たしている。特に、開口数が空間分布増幅が増え

るとき、SHG 比 F/B (光の到来方向沿いにいつも最大である) の大きさが減る。

最大 SHG 強度の角度 $\theta_{max} = \cos^{-1}[\xi(n_{2\omega}/n_{\omega})]$ がどれほど λ_{ω} と開口数に依存しているのかを研究することは価値がある。この意味において、 $\lambda_{\omega} = 850\text{nm}$ の開口数の機能として、Fig.8(a)はインボリュート角 θ_{max} をプロットする。これらの結果は示す、 θ_{max} は常に伝播角度 ($-\pi/2 < \theta < \pi/2$) より前に起こるけれど、開口数が増えるので伝播方向 z と別れている。Fig.8(b)において、このインボリュート角は開口数 = 1.2 の入射波長を表している。基礎波長 λ_{ω} の変化によって開口数の影響は分布の影響より強いと結論付けることができる。特に、開口数が 0.9 から 1.2 に変わるとき、最大 SHG 強度の角度 θ_{max} は 65% 増えた。しかし λ_{ω} が 700 から 1000nm になったとき、この角度は 4% だけ増えた。

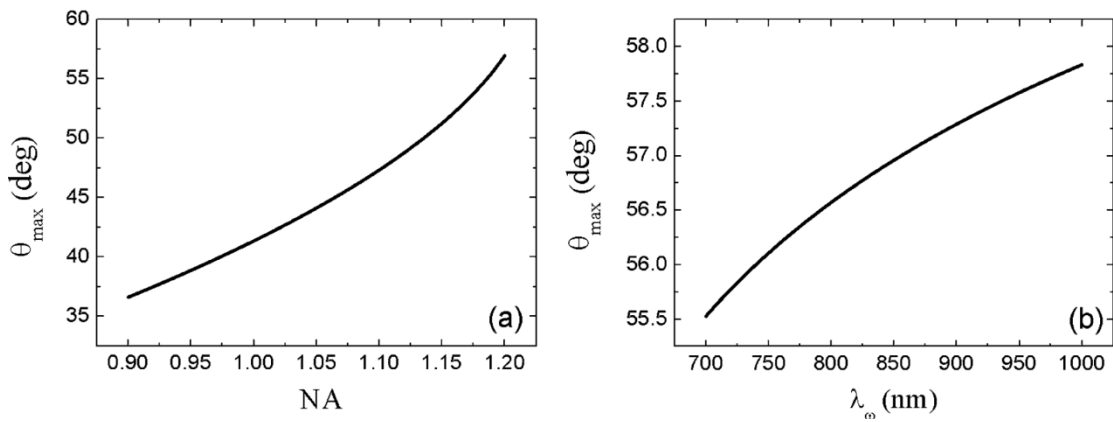


Fig.8 最大 SHG 強度の角度 θ_{max}

(a) 開口数 NA ($\lambda = 850\text{nm}$)

(b) 入射波長 λ (NA=1.2)

4. 議論と結論

焦点楕円偏光でコラーゲン線維の $I_{2\omega}$ の空間分布を計算するための理論モデルが開発されている。極座標 (θ, ψ) と入射波長 λ_{ω} と対物レンズの開口数と入射光 ψ の楕円率に関する一般式が得られた。簡単にするために、コラーゲン線維は x 方向にそって横たわっていると考えられた。この仮説のもと、異方性の調整は入射偏光状態に強く依存しているが、空間分布は F-SHG と B-SHG 信号の異方性を見つけた。 λ_{ω} と開口数の修正した数値のために、Fig2 と Fig.3 に示したように SHG 信号は直線偏光 H (コラーゲン線維の方向と平行) の最大数値を描いた。この結果は直線偏光の SHG 強度信号の以前の研究と矛盾していない。予想しないことに、 C_R 光はこの大きさ (SHG 強度) をかなり小さくするので (Fig.3)、垂直偏光は SHG 強度を小さくしない。しかし、 $I_{2\omega}$ は入射偏光の楕円率 ψ_0 の特有の数値のためにほとんど 0 になるかもしれない (式 (15))。超分極率 ρ の比にもつぱら依存する状態、 $\psi =$

$\cos^{-1}\left(\frac{\pm 1}{\sqrt{1+\rho}}\right)$ のとき、これは起こる。最適化する SHG 信号は特別なコラーゲン線維

由来するとき、この要因を考慮に入れなければならない。入射偏光状態はこの状態から

離さなくてはならない。入射偏光状態以外にも、 λ_ω の影響と対物レンズの開口数が詳しく調査されている。一般的に、修正された偏光状態のために、入射波長と開口数の数値が高くなればなるほど、SHG 信号は高くなる。さらに、楕円偏光は λ_ω と開口数の適切な数値が混合するとき H 偏光に対応する SHG 信号より大きい SHG 信号を作ることができる (Fig.5)。

多光子顕微鏡は F と B の両方で使える。コラーゲンを含む線維の SHG 顕微鏡イメージは異なったように collection geometry の使用に依存していると示された。これを考慮に入れると、SHG 比 F/B の空間分布の深さ分析は行われた。特に、この分布は伝播方向 ($\theta = 0$) 沿いの最大値を描き、基礎波長 λ_ω は著しく増える (Fig.6)。これは以前違う著者が提出し重要な事項である。一方、開口数が増えると、空間分布は増え、SHG 比 F/B はいくらか減る、Fig.7 に示す。これは SHG 検出器において対物レンズの開口数によって基礎的な役割を果たすと確認する。

Stoller et al.は入射波長の F-SHG ピークの依存性についての研究を報告した。空間依存性を考慮に入れないと、開口数の正常化した SHG ピーク信号の増加を得た。理論的な研究において、Chang と共同研究者は入射直線偏光と開口数の混合した影響を研究した。開口数 $NA < 0.4$ のとき、総 SHG 信号は偏光に依存しないとレポートした。しかし、開口数のより高い数値の非直線依存がある、そしてそれはそれぞれの偏光状態に特徴がある。現在の研究は F/B SHG を探求するので、偏光状態の影響を取り除く、式 (14) から簡単に推測できるので。

数値で表した結果は λ_ω と開口数値と最大 SHG 強度の角度 θ_{max} のそれぞれはインボリュート角の前に起こると最終的に示された。これは今後の実験形式の顕微鏡に利益をもたらす。さらに、この角度の開口数の影響は基礎波長の変化による分布影響より大きい (Fig.8)。

コラーゲンで構成された組織の SHG イメージは生体臨床医学にとっても興味のある話題だ。すでにレポートされているので、SHG 信号の偏光依存はコラーゲン SHG イメージングコントラストを増やす、または標本の中の SHG 信号のソースを調査する、また他のことにも使える。非侵襲の道具を使った生物学のコラーゲン製の構造体の分析は傷の影響、回復工程、手術、病理学と熱的損傷を理解するのに重要だ。ここにレポートした結果は SHG 信号を最適化するために偏光をどう使えるかの詳細な情報を供給する。さらに、開口数と入射波長の影響の分析は多光子顕微鏡を使って記録されたシグナルを最大化するのに使われるかもしれない。特に、SHG イメージング機器へのこれらの探すことの実行は光損傷 (それは ex-vivo (体外の) と生きている組織を使った実験において重要である) を最小化するために入射レーザー光のパワーを減らすのに役立つ。