

平成 27 年度 修士論文

SHG(第二高調波発生光)顕微鏡の  
小型化に関する研究

指導教官 安井 武史 教授

平成 28 年 2 月 8 日 提出

徳島大学大学院 先端技術科学教育部

知的力学システム工学専攻 機械創造システム工学コース

厚田 耕佑

# Miniaturization of SHG microscopy for clinical application

## Abstract

Our whole body is covered by skin. In the skin, dermal collagen fibers play important role for morphology and functional properties. Second-harmonic-generation (SHG) microscopy enables us non-invasive observation of dermal collagen fibers and is expected to apply for skin measurements and wound healing diagnosis. However, the conventional SHG microscopy is large and complicated. One of this solution is all-fiber SHG microscopy. I constructed a compact-SHG-scope-head using MEMS (micro electro mechanical system) mirror. In parallel, using Galvano mirror. As results, compact SHG-microscope-head was constructed and performed imaging of conventionally SHG microscopy. Next, in order to realize a flexible operation of the SHG microscope, by laser light transmission of optical fiber to introduce the photonic crystal fiber (PCF) technology, an ultra-short pulse optical fiber propagation. Finally, we developed a portable probe SHG microscope by combining these techniques. It was subjected to various applications measured using this.

# 目次

第1章	緒言	1
第2章	皮膚とコラーゲン	3
	2-1. 皮膚組織とコラーゲン	3
	2-2. 従来の観察手法	7
第3章	第二高調波発生光 (SHG) 顕微鏡	12
	3-1. 第二高調波発生光 (SHG) 顕微鏡の原理	12
	3-2. 従来の SHG 顕微鏡	13
	3-3. SHG 顕微鏡の応用例	14
	3-4. 可搬型 SHG ファイバースコープ	16
第4章	小型フェムト秒レーザー	20
	4-1. モード同期チタン・サファイアレーザー	20
	4-2. モード同期クロム・フォルステライトレーザー	21
	4-3. エルビウム添加ファイバーレーザー	22
	4-4. イッテルビウム添加ファイバーレーザー	24
	4-5. 特性比較	26
第5章	超短パルス光のファイバー伝播	27
	5-1. 超短パルス光のファイバー伝播に関する問題点	27
	5-2. フォトニック結晶ファイバー(PCF)	30
	5-3. 基本特性評価	33
第6章	可搬型 SHG ファイバースコープ	39
	6-1. SHG 顕微鏡ヘッド	39
	6-2. MEMS ミラーを用いた手法	40
	6-3. ガルバノミラーを用いた手法	47
	6-4. 基本特性評価	48
第7章	ヒト皮膚 <i>in situ</i> 計測への展開	51
	7-1. 可搬型プローブ SHG 顕微鏡	51
	7-2. ハンドヘルド計測	51
	7-3. 大面積イメージング	55
	7-4. 深さ分解イメージング	57
	7-5. 偏光分解イメージング	59
第8章	結言	63

参考文献

謝辞

# 第1章 緒言

コラーゲンは生体構造タンパク質であり、タンパク質としては生体組織において最も含有率が高い。コラーゲンは主に角膜や骨・軟骨、腱、皮膚など多くの組織に含まれている。生体組織を超高層ビルに例えるとコラーゲンは鉄筋に相当し、その濃度や配向は、生体組織の形態や機械的特性を決定する上で極めて重要な役割を担っている。

皮膚は表皮層・真皮層・皮下組織の3層構造を有し、コラーゲンは真皮層のみに含まれ、その比率は約70wt%に達する。したがって真皮コラーゲンは、皮膚の形態および機械的特性を決定する上で重要な役割を担っている。したがって、真皮コラーゲンを選択的観測することが強く求められている。

従来の皮膚組織の観察手段として、一般的に染色法が広く用いられている[1]。染色法では、特定の分子にのみ反応する色素を利用すること（アザン染色、ワンギーソン染色など）により、生体組織中のコラーゲンのみをラベリングし、光学顕微鏡で観測する。この手法により、コラーゲンの選択的観察が可能になり、真皮層の変化を捉えることが出来る。しかし、このような組織学的手法は、人体や実験動物に適用する場合、生検組織を必要とするため、侵襲的で *in vivo* 計測が不可能であるため、理想的な手法とは言えない。

一方、光学的手法の代表として、レーザー共焦点顕微鏡が挙げられる[2]。レーザー共焦点顕微鏡は、皮膚透過性の高い波長帯のレーザー光源を用いることにより、非侵襲な計測を行うことを可能とするが、取得イメージには各種生体構成成分の情報が重畳しているため、選択的にコラーゲンを可視化することは容易でない。また、光コヒーレンストモグラフィ(OCT: optical coherence tomography)では、低コヒーレンス光源からの光を信号光と参照光に分け、それらの光を干渉させることによって散乱光を除去しながら深さ情報を取得し、非接触かつ非侵襲で断層像を取得する事が可能である[3]。生体組織の複屈折分布を測定する偏光感受型OCTでは、コラーゲンが特異的に有する複屈折を計測することにより、コラーゲン分布を可視化できるが、複屈折変化が小さいため、得られるイメージのコントラストは低い。また、生体組織の自家蛍光を用いた二光子蛍光顕微鏡[4]では、近赤外レーザー光の利用による良好な物質浸透性と高い3次元空間分解能であるが、各生体物質の蛍光スペクトルがオーバーラップすることも多く、蛍光による選択的計測には限界がある。

近年、真皮コラーゲンのみを特異的に可視化する手段として、生体コラーゲン SHG (second harmonic generation : 第2高調波発生光) 顕微鏡が注目されている[5]。フェムト( $10^{-15}$ )秒オーダーの光を非中心対称物質に照射すると、高ピーク光電場と物質構造との非線形相互作用により、焦点近傍のみで SHG 光が発生し、その波長は入射レーザー光の半分(光周波数は2倍)の光である。生体コラーゲン SHG 顕微鏡は、コラーゲン分子特有の

ポリペプチド三重螺旋構造（非中心対称構造）と規則的高次配向構造に起因する高い 2 次の非線形光学特性を用いることにより、生きたありのままの状態でもコラーゲン分子を可視化できる。このような特徴から、皮膚計測[6]や再生医療[7]を始めとしたコラーゲン関連分野での利用が期待されている。また、生体コラーゲン SHG 顕微鏡を用いた皮膚計測の新しい応用として創傷治癒モニタリング[8]も報告されている。

一方、現状の SHG 顕微鏡は、レーザー光源が大型・複雑である上に、自由空間光学系を用いた顕微鏡を利用しているため、装置が大がかりとなり、実験室での利用に制限されていた[9]。臨床応用を考えた場合、医者や患者への負担軽減から、小型・簡便・ロバスト・フレキシブル・メンテナンスフリーといった特徴が SHG 顕微鏡に望まれる。そのような特徴は、ファイバー内視鏡のような構成を SHG 顕微鏡に導入することにより（SHG ファイバースコープ）、実現可能であろう。そのためには、①レーザー光源の小型化、②光ファイバーによるレーザー光伝送、③SHG 顕微鏡ユニットの小型化、という 3 つの技術要素によって実現可能である。①については、既に小型レーザーが市販されており、これを利用可能である。②についても、最近のフォトニクス結晶ファイバー技術の進展により、これまで困難とされた超短パルス光ファイバー伝播が可能になりつつある。したがって、SHG ファイバースコープを実現する上で肝となるのは、③ということになる。

③の SHG 顕微鏡ユニットの小型化する上で重要となるのは、どのような機械的ビーム走査機構を利用するか依存する。MEMS(micro electro mechanical system)ミラーは、ミラー・センサ・アクチュエータ・駆動電子回路を一つのシリコン基板上に集積化した微小デバイスであり、レーザー走査光学系を小型化できる可能性がある。MEMS ミラーは、共振タイプであるため高速スキャンも可能であるが、原理上、リサージュスキャンとなるため、イメージ再構成に手間がかかる。MEMS ミラーを用いた THG(third-harmonic-generation)光ファイバー顕微鏡の開発も行われており、MEMS ミラーを用いた小型スコープで測定部位を測定することを可能にしている[10]。しかしながら、高速イメージングには、高速データ取得および処理を行う新しいシステムの構築が必要となり、導入には技術面・コスト面での解決すべき問題も発生する。

一方、従来の SHG 顕微鏡でよく用いられているガルバノミラーも、堅牢設計のため長期的な安定駆動が期待でき、フィードバック制御による高い位置（ミラー角度）安定性が優れているといった利点を有している。また、ラスタースキャンが可能なので、直接的なイメージ再構成が可能である。

以上の現状を踏まえ、本研究では、③の技術要素を実現するため、MEMS ミラーとガルバノミラーという 2 つのアプローチにより、SHG 顕微鏡ユニットの小型化（SHG 顕微鏡プローブ）を試みた。次に、②と③を融合するため、開発された SHG 顕微鏡プローブに対して、超短パルス光のファイバーデリバリーを行い、その特性を評価した。最後に、このファイバープローブ化された SHG 顕微鏡のフレキシブルな特徴を生かして、ヒト皮膚の *in situ* 計測を行った。

## 第2章 皮膚とコラーゲン

### 2.1. 皮膚組織とコラーゲン

皮膚は、人体全体を覆っており、成人で総面積が $1.6\text{m}^2$ 、重量は体重の約14%を占めるため、人体最大の臓器とも呼ばれる。皮下組織上部の皮膚の厚さは $1.5\sim 4\text{mm}$ 、一般に女性よりも男性、屈側よりも伸側、幼児よりも成人の方が厚いとされる。また、部位による違いでは、手掌足底が最も厚く、一方で顔が最も薄い。そのうち表皮は通常、 $0.06\sim 0.2\text{mm}$ とされるが、手掌足底のみは $0.6\text{mm}$ と厚くなっている。皮膚の機能は、対外保護作用・体温調節作用・知覚作用・分泌排泄作用・合成作用・呼吸作用・吸収作用等到大別されるが、この節では、本研究に最も関係の深い対外保護作用について述べる。体外保護作用を細分化すると、以下のようになる。

#### [1] 柔軟性を有し、機械的な外力を防ぐ作用

真皮弾力線維・皮下脂肪組織による弾力性や慢性刺激に対する角質層の肥厚等のクッションとしての役割。

#### [2] 水分の内部侵入を防ぐ作用

脂質が角質層表面に膜を生成し、角質層はイオン篩の役割を果たし、角質層・顆粒層間部の蛋白質水素濃度が等電点で防止柵の役割を果たす。

#### [3] 細菌・真菌の侵入を防ぐ作用

表皮は弱酸性 (pH  $5.5\sim 7.0$ ) で、細菌・真菌の侵入を防ぐ。

#### [4] 物理的・化学的刺激を防ぐ

角質層蛋白は物理化学的侵襲に対抗する。異物には肉芽腫性が反応し、排出する。アルカリ中和能を有し表面pHを一定とすること等による。

#### [5] 体液の喪失を防ぐ

皮膚が生体組織全体を覆うことで、生体の維持には不可欠な体液の流出を防いでいる。

#### [6] 光線の防御

表皮の凹凸により、大部分の可視光線・赤外光に近い長波長光線は反射される。表皮内を透過する光線は表皮中の様々な場所で吸収されるが、特にメラニンは紫外線を吸収して暗色化し、基底細胞の核の上方に集まって核を保護する。

皮膚構造を図2.1に示す[11]. 皮膚は、外界との境界から、表皮・真皮・皮下組織に大別される.

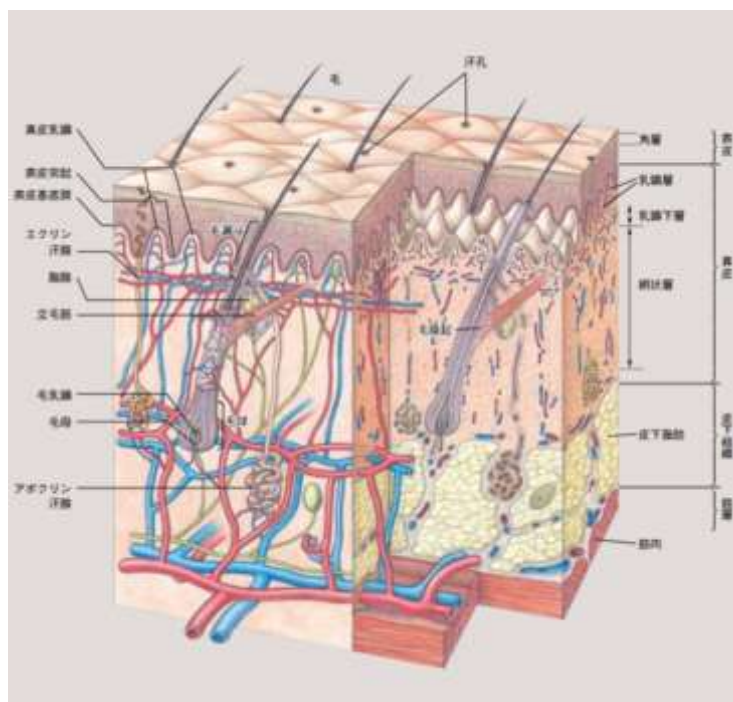


図2.1 皮膚構造図

表皮に存在する細胞の95%は角化細胞(ケラチノサイト)で、残りの5%を色素細胞(メラノサイト), ランゲルハンス細胞,  $\alpha$ -樹枝状細胞およびメルケル細胞が少数混在している. 表皮をさらに細分化すると、外界との境界から角質層・顆粒層・有棘層・基底層の4層に分かれ、角質層以外は核を有する. 以上の構成より、表皮にはコラーゲンは含まれておらず、SHG光は発生しない. 以下に、表皮の基本的な構成と役割を述べる.

基底層は、表皮の最下層にある細胞の集まりで、ケラチノサイト、メラノサイトおよびランゲルス細胞から構成される1層の基底細胞から成る. 基底細胞の中で最も多いケラチノサイトは、細胞分裂することで次々に新しい細胞を生成し、そのうち一部の細胞は、上層の有棘層に移り、有棘細胞となる. メラノサイトは、色素細胞とも呼ばれ、必要に応じてメラニンを作り、ケラチノサイトに配分する. 一方、ランゲルハンス細胞は、皮膚の免疫を保つ役割を有する.

有棘層に存在する細胞は、互いに棘状の細胞間橋(デスモソーム)で接着している. 有棘層は5~10層から成る表皮の中で最も厚い層であり、有棘細胞が細胞間橋で強く結びつくことで皮膚の丈夫さを担っている. 有棘細胞では、後に角質細胞となるケラチンと呼ばれるタンパク質を生成するとともに、上層の顆粒層へと移動し、上層へと達した有棘細胞は、細胞内でケラトヒアリン顆粒と呼ばれる顆粒を生成し、顆粒層へ移行する.

顆粒層は、2~3層から成り、有棘層から移動してきた細胞は、水分を失い、扁平な顆粒

細胞になる。顆粒細胞は、ケラトヒアリン顆粒は、ケラチン線維およびフィラグリンから成り、角質細胞に含まれる成分の素となる。

角質層は、皮膚の上層部にあり、顆粒層から移動してくる際に核およびミトコンドリアなどの細胞内器官が失われて存在しない(自己消化)。硬いタンパク質であるケラチン細胞内に充満しており、レンガのように層状に重なっている。そして、セラミドというタンパク質が、レンガの間を埋めるセメントのように繋ぎ合わせ角質層を形成している。この構造により、下層の表皮層および真皮層は保護されている。角質層の上層に達した角質細胞は、やがて剥がれ落ちる。

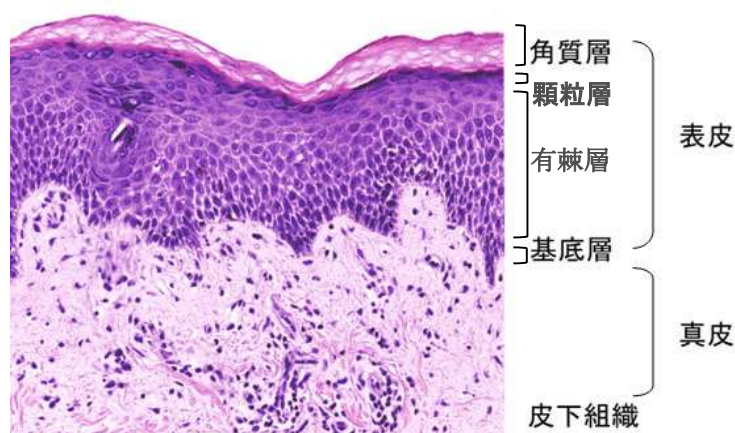


図2.2 皮膚の構成 (<http://skin.netget-tools.com/010/ent681.html>より抜粋)

表皮層の下層に、真皮層がある。真皮層は皮膚の厚さの大部分を占め、およそ2mmに及ぶ。構成成分として、大部分を占める線維および基質の他、細胞・脈管系・筋肉系・神経系を有する。

線維性組織は間質成分(細胞外マトリックス)により形成される。線維は、膠原線維(コラーゲン)・弾力線維(エラスチン)・細網線維(レチクリン)が存在し、線維・基質・細胞から構成される真皮結合組織の約90%をコラーゲンが占める。基質は、線維および細胞間を満たす無定形成分であり、有機成分・血漿蛋白・電解質・水分から成る。基質は親水性が強く水分量の調節、水溶性物質の組織への浸透・拡散に重要な役割を果たし、有機成分の一つであるヒアルロン酸は粘稠性が強く、組織の可塑性を保つとともに侵入した異物の拡散を防ぐ。

産生細胞などから構成される細胞成分としては、線維芽細胞・マクロファージ(組織球)・肥満細胞・形質細胞が存在し、線維芽細胞がコラーゲン(およびエラスチン)を生産する。

真皮層の構成は、上層から乳頭層・乳頭下層・網状層の3層に分けることができる。以下に、真皮層の3層構造について説明する。

乳頭層は、表皮突起間に食い込むように存在する真皮部分(真皮乳頭)をさす。線維成分は疎で、毛細血管・知覚神経末端・細胞成分に富む。乳頭下層は、乳頭層直下の部分であ



り、成分は乳頭層と本質的には同じである。

網状層は、真皮の大部分を占め、線維成分が密に詰まった結合組織である。下方は、皮下組織と接する。血管や神経は存在するが、乳頭層に比べると局所的である。

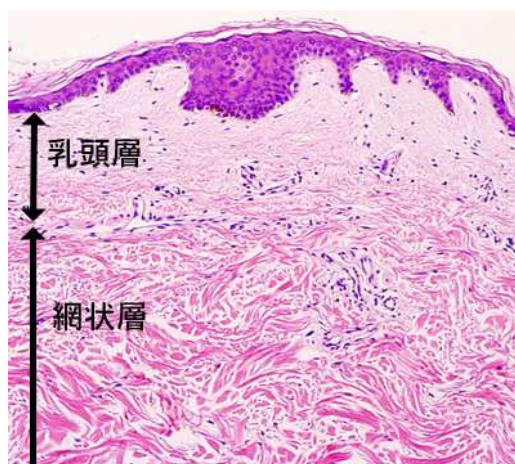


図2.3 真皮層 (<http://hycol.net/collagen.html>より抜粋)

コラーゲンは、その構造であるアミノ酸配列順序により、数種類に細分化されている。真皮全体に含まれるコラーゲンの大部分はI型コラーゲンであり、膠原線維の主成分もI型コラーゲンである。また、皮膚全体に含まれるコラーゲンはI型・III型・IV型・V型・VII型・XII型・XVII型がある。真皮においては、基本となる線維としてI型コラーゲンがあり、そのところどころにIII型コラーゲンおよびV型コラーゲンが入れ替わり分布している。

I型コラーゲンは線維状コラーゲンで、人体で最も多く分布しており、真皮においても大部分を占め、コラーゲンというと通常、I型コラーゲンのことを指すのが一般的である。

III型コラーゲンは線維状コラーゲンでベビーコラーゲンとも呼ばれ、成人では真皮コラーゲンの10%を占める程度だが、新生児で20%、胎児では50%まで増える。ゆえに、発生・成長のプロセスとの関係性が考えられている。また、レチクリンはIII型コラーゲンの割合が比較的多い膠原線維であり、表皮直下・毛包周囲・血管周囲に認められ、マクロファージ・線維芽細胞が増殖する時に増加する。また、I型コラーゲンとの違いでは分子を構成しているポリペプチド鎖に関して、III型は同一種三つで構成されているのに対し、I型はそのうちの二つが異なるポリペプチド鎖に入れ替わっている。よって、大きさ・形等は同一である。

IV型コラーゲンは非線維状コラーゲンで、表皮真皮境界部である基底膜中の基底板上に含まれている。また、V型コラーゲンは線維状コラーゲンで、コラーゲン線維の太さに関係していると考えられている。表皮側に行くほど線維は細くなっていくが、それにつれてV型コラーゲンの割合が増加していることが分かっている。

網状層では太い膠原線維が層に対して網目のように分布しており、下に向かうにつれて

線維が太く、上に向かうほど線維が細くなっていく。網状層では、I型コラーゲンが大部分で、ついでIII型コラーゲンとなるが、III型コラーゲンでもコラーゲン全体の10%程度に過ぎず、ほとんどがIおよびIII型コラーゲンである。したがって、V型およびXII型コラーゲンは存在しているもののSHG光発生の主因とは考えられず、網状層でのSHG光発生の主因は、I型およびIII型コラーゲンであると考えられる。

乳頭層では、コラーゲン線維は細く、粗に垂直方向に走っている。ここでも、SHG光発生の主因はI・III型コラーゲンと考えられるが、網状層と比べると線維の太さ、線維方向の違いからSHG光は弱くなると考えられる。

表皮真皮境界の基底膜に関しては、先に述べているようにIV・VII型コラーゲンが含まれる。ただし、IV型コラーゲンが含まれている基板は、幅が約60~80nm、VII型コラーゲンを含む係留線維は、基板より下方に150~200nm程度である。仮に、IV・VII型コラーゲンからSHG光が発生するとしても、付近のコラーゲン線維に比べると少なく、今回のSHG光の主因になるとは考えにくい。

以上より、真皮におけるSHG光発生の主因となるのはI型・III型コラーゲンであると考えられる。一般に、真皮に含まれるコラーゲンはI型コラーゲンが主で、III型コラーゲンなどのタイプの異なるコラーゲンは、若干混在している程度である。しかし、真皮表皮境界に近づくにつれてIII型コラーゲンの比率が上昇することがわかっており、乳頭層と網状層におけるSHGイメージの相違は、コラーゲンタイプの含有率の違いによるコラーゲン線維構造の違いを反映していると考えられる。このように、SHGイメージングを用いることで、組織コラーゲン線維の詳細な分布情報のみを特異的に抽出することも可能である [12].

## 2.2. 従来の観察手法

従来の皮膚観察手法の代表として挙げられるのが、染色法である。通常の光学顕微鏡を用いる場合、細胞の形態を知るために細胞組織を薄切りにした切片を用いる。しかし、組織の構成要素は、光に対してそれぞれ同程度の透過性があるため、そのままでは互いの識別ができず、選択的観察が困難であるため、染色が必要となる。染色は、特定の分子のみ反応する色素を利用する。図2.4[13]に示すように、エラスチカ・ワンギーソン染色では、膠原線維(コラーゲン)が赤色、筋線維、細胞質が黄色、細胞核が黒褐色のように染め分けることが可能で、コラーゲン選択性の点で、信頼性の高い情報が得られる。しかし、染色法では解剖学的皮膚生検が必要なため、侵襲的あるいは破壊的な手法である。したがって、重大疾病の確定診断などでは必須の技術であるが、予備診断や定常診断という観点では、患者に対して大きな負担となる上、多くの部位を同時に計測できず、同一部位の時系列モニタリングも困難である。



図2.4 エラスチカ・ワーギンソン染色

侵襲性の低い光学的手法の代表的なものとして、反射型レーザー共焦点顕微鏡(図2.5)[14]がある。レーザー走査顕微鏡のポイントは、点光源・対物レンズ焦点・検出ピンホールが共役な関係にあることである。レーザー出力光は、光源側ピンホールを通過することにより、点光源として用いられる。レーザー光は対物レンズによって集光され、そこから反射、散乱(または蛍光)が再び同じ対物レンズを通り、もとの経路を通る。そして、途中にビームスプリッターやダイクロイックミラー(DM)を配置することで、得たい情報を含む光の一部が光検出器側に反射される。その後、検出器前にピンホールを配置することで、焦点近傍からの光のみを通過させ、焦点外からの光はピンホールを通過させない。これにより、3次元空間分解能を有することになる。共焦点顕微鏡から得られたヒト皮膚*in vivo*イメージを図2.6に示す[15]。図2.6の2B-1に示される強い反射散乱光はメラニンによるものと考えられ、その下層にある顆粒状ケラチノサイトの層(2B-2)および、棘状ケラチノサイト(2B-3)と思われる構造が確認できる。さらに深層では、真皮乳頭層および真皮上層(2B-6)で確認できるのがコラーゲン線維であると推測される。しかしながら、これらのイメージ情報は、各種生体構成成分の反射光および散乱光の情報が重畳しているため、選択的にコラーゲンを可視化することは困難である。

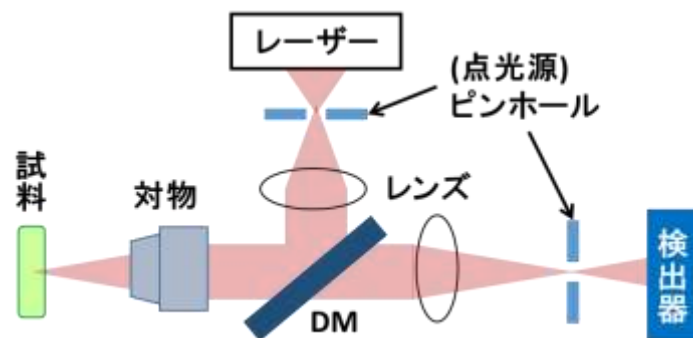


図2.5 共焦点顕微鏡の構成

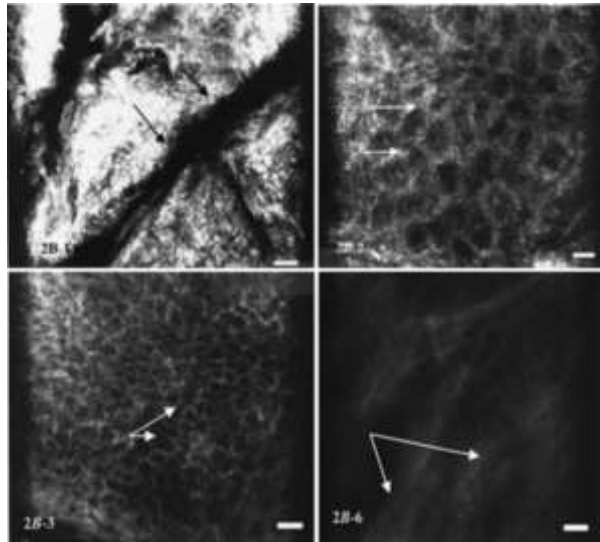


図2.6 ヒト皮膚*in vivo*共焦点イメージ表皮角質層(2B-1)，顆粒層(2B-2)，有棘層(2B-3) および，(2B-6)真皮上層コラーゲン線維

光コヒーレンストモグラフィー(OCT: optical coherence tomography)は低コヒーレンス干渉を利用した断層イメージングである。基本的な光学系を図2.7に示す。光源には、低コヒーレンス光源が用いられる。光源からの光はビームスプリッターで信号光と参照光に分けられ、参照光はミラー側へ、信号光は生体に入射し、生体内の様々な深さから光が反射される。これらの参照光および信号光は再びビームスプリッターで空間的に重ね合わされ、光路長が一致したときに干渉する。2つの光が干渉したとき、検出信号強度は強くなる。サンプル内の屈折率境界で後方散乱光が信号光として戻ってくるので、ミラーを動かすことで順々に後方散乱光と参照光が干渉する反射光の深さが変化する。このため、OCTによるイメージはサンプル内の屈折率の深さ分布を表しており、物質ごとの境界を示す。通常、反射光の情報を生じた手法では、信号光の大部分を占めイメージ情報（コヒーレンス）を失った多重散乱光が問題となるが、干渉を用いたOCTでは多重散乱光は参照光と干渉しないため、コヒーレンスを失っていない後方散乱光の情報のみ取得することが可能である[16]。また、後方散乱光は屈折率の異なる物質同士の界面から得られるため、コラーゲン計測において、コラーゲンが特異的に有する複屈折を計測することでコラーゲン分布の情報(図2.8) [17]を取得することも可能であるが、複屈折変化は小さいため分子選択性に優れているとは言えない。

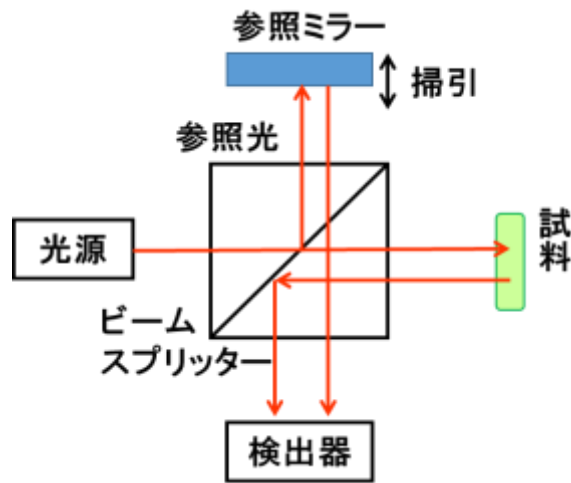


図2.7 OCTの光学系

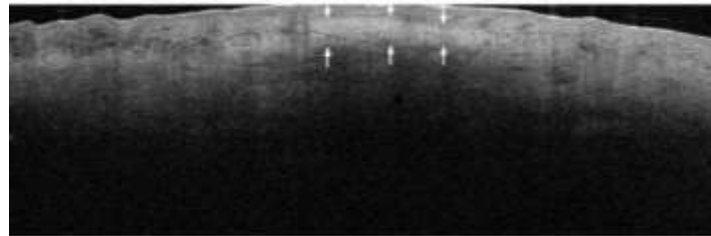


図2.8 コラーゲン沈着した創部のOCT画像

二光子蛍光顕微鏡の原理について簡単に説明する[18]. 二光子顕微鏡は、1つの蛍光分子が2つの光子を同時に吸収して励起状態となる非線形光学現象を利用している. その励起状態から基底状態に戻る際に、エネルギーが蛍光として放出され(図2.9)[18], その蛍光強度を測定することにより画像化する. 蛍光吸収波長の倍程度の波長をもつ近赤外光を集光することで、図2.9(b)に示すように、光子密度の高い焦点近傍の蛍光分子のみを励起することができ、光学的な3次元切片像を取得でき、ピンホールなしでも共焦点顕微鏡と同等の3次元空間分解能を得ることができる.

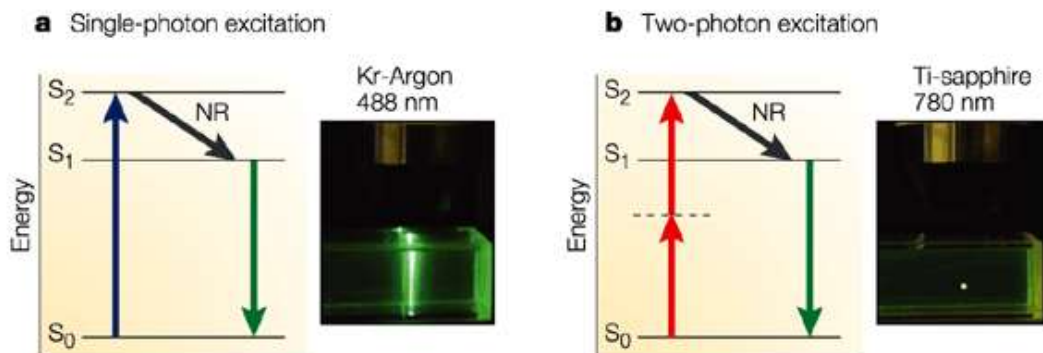


図2.9. 一光子励起と二光子励起

二(多)光子蛍光顕微鏡を皮膚計測に応用する場合、生体構成物質の自家蛍光を利用することが出来る。多光子蛍光顕微鏡による自家蛍光を取得したイメージを図2.10に示す[4]。ブタ角膜上皮の自家蛍光イメージであり、特有の構造が確認できる。自家蛍光（緑色）は細胞質固有のものであり、細胞核の部分は黒く抜けている。ここで使用されたブタの目は構造的に無傷であり、低侵襲でのイメージングに成功している。また、この手法では、自家蛍光の情報が選択的に取得されることから、検出器により取得された信号強度(光子カウント)によって定量評価を行うことが可能である。一方で、自家蛍光を観測する場合、特定の条件下では、各生体物質の蛍光スペクトルがオーバーラップし、選択性に制限をもつ場合があるという問題もある。

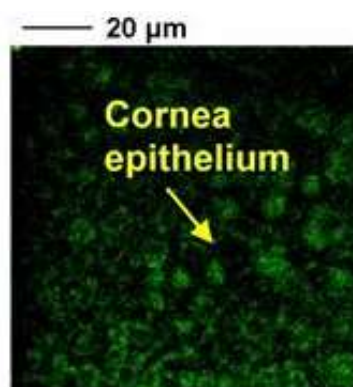


図2.10 多光子蛍光顕微鏡によるブタ角膜上皮の自家蛍光イメージ

本節で紹介した従来の観察手法の性能を表 2.1 にまとめる。それぞれ、サンプルに対する低侵襲性・人体や実験動物に対する *in vivo* 計測の可否および分子(コラーゲン)選択性をまとめた。これを見れば、従来の観察手法では、皮膚のコラーゲンを低侵襲で *in vivo* かつ選択的といった条件の全て満たした観察をすることは非常に困難であるということがわかる。

表2.1 従来の皮膚観測手段の特性

観察手法 / 性能	低侵襲性	<i>in vivo</i> 計測	コラーゲンの選択的観察
染色法	×	×	○
共焦点顕微鏡	○	○	×
OCT	○	○	△
多光子蛍光	○	○	△

## 第3章 生体SHG光

### 3.1. 第二高調波発生光(SHG)顕微鏡の原理

フェムト( $10^{-15}$ )秒レーザーのような光電場ピークパワーの高い超短パルスレーザー光を集光すると、焦点近傍では光子密度が非常に高くなる。このような状態下では、ひとつの分子に二個の光子が同時に作用するという現象が起こる。これを二光子状態と呼ぶ。通常、一光子励起過程では、基底状態の電子が光子を1個吸収し、励起状態となり瞬間的にエネルギーは緩和され、散乱光(または蛍光)となって放射されるが、二光子過程においては、同時に2個の光子によって励起されるため、分子は二光子によって仮想準位まで励起される。この状態において、蛍光物質の場合はある特定の波長の光を吸収し、それより長い波長の光(蛍光)を放出する。一方、非中心対称性構造を持ち吸収が小さい物質の場合、基底状態の電子は、仮想準位に励起され、エネルギー緩和の際に、光の励起光波長に対して半波長(あるいは2倍の周波数)を持つ光が発生する(図3.1)[19][20]。この光を第二高調波発生(SHG)光と言う。SHG光の発生強度は、二次の非線形光学現象によるものであることから、SHG光は励起光強度の2乗に比例する(例えば励起光強度を2倍にした場合、SHG光強度は4倍になる)。非中心対称性構造を持つ物質のみから選択的に発生するといった特徴を持つ。

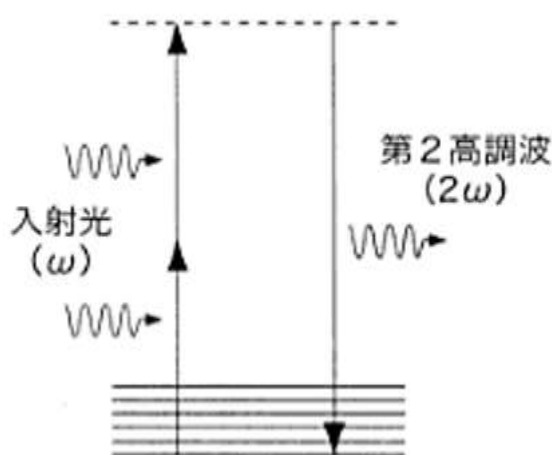


図 3.1 SHG 光発生過程

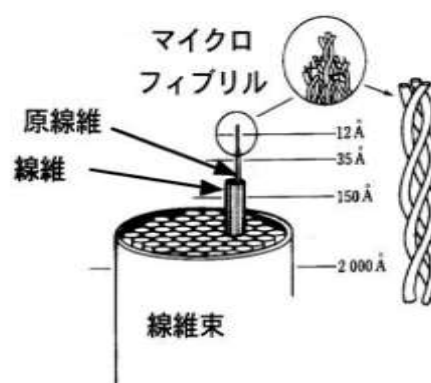


図 3.2 トロポコラーゲン

この現象を応用したものが、SHG顕微鏡である。生体組織中に存在するコラーゲン分子は、非中心対称性構造を有するため、フェムト( $10^{-15}$ )秒レーザーの超短パルスレーザー光を生体組織に照射すると、光電場とコラーゲン分子の非線形相互作用により、SHG光が発



生ずる。コラーゲンの基本構造はポリペプチド鎖3重螺旋構造からなるトロポコラーゲン(コラーゲン分子)であり、これが規則的に順次集合して階層的に太くなっていく図3.2 [2.2]。このようなコラーゲンは、その光波長オーダーでの非中心対称性構造を有しており、高い二次の非線形光学特性を有しているため、体内においてコラーゲンから生体SHG光が特異的に発生する。さらに、コラーゲンはきわめて規則的な高次構造を有しているため、コヒーレンスを失う前に各コラーゲン分子からのSHG光が干渉し、増強された信号が検出される。皮膚真皮層は、大部分がコラーゲンで構成されており、コラーゲンから発生するSHG光を観測することで真皮コラーゲンの選択的計測が可能となる。SHG顕微鏡では、コラーゲン分子固有の非線形光学特性を利用するため組織染色が不要であり、生きたありのままの状態での観測が可能である。さらに、SHG光は、波長が入射レーザー光の半波長であるため、拡散反射光や蛍光との分離が容易であることや、SHG光は焦点近傍でしか発生しないことから、高い空間分解能での3次元イメージングが可能であるといった特徴がある。

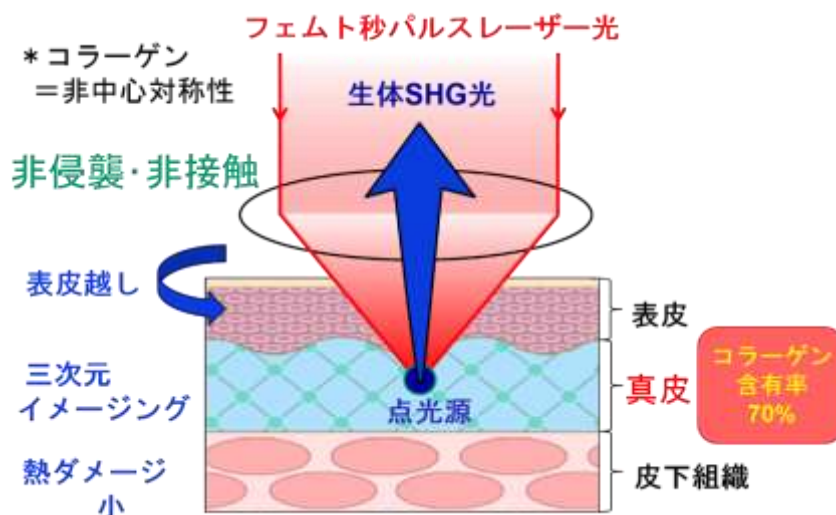


図3.3 SHG顕微鏡

### 3.2. 従来のSHG顕微鏡

SHG顕微鏡の基本的な構成を図3.4に図示にて説明する。基本的な構成はレーザー光源・レーザー走査光学系から成る。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やモード同期クロム・フォルステライトレーザーなどの近赤外フェムト秒固体レーザーが用いられてきた。レーザー走査光学系は、ガルバノミラー(GM)などの走査ミラー・リレーレンズ(焦点距離： $f_1$ および $f_2$ )および対物レンズから成り、走査ミラーと対物レンズの瞳が共役に配置されている。レーザー光源から出た光は、レーザー走査光学系により2次元走査され、サンプルへと照射される。サンプルから発生したSHG光および反射光・散乱光は再び同じ対物レンズを通り、もとの経路を通る。SHG光は、励起光の半波長であるため、ダイクロイックミラー(DM)および波長フィルター(バンドパスフィルター：BPF)な



どで分離可能であり，分離されたSHG光は光電子倍增管(PMT)により検出される．

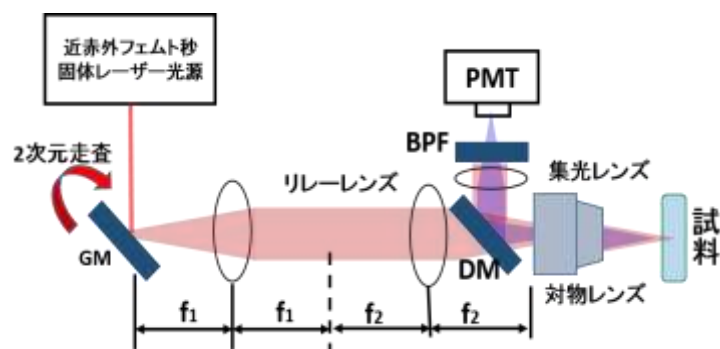


図3.4 SHG顕微鏡の構成

しかしながら，従来のSHG顕微鏡は，実際のSHG顕微鏡の構成は，レーザー光源が大型・デリケートである上，自由空間光学系を用いたベンチトップの顕微鏡を利用しているため，装置が大がかりとなり，その利用が実験室レベルに制限されている(図3.5)．臨床応用を考えた場合，医療現場への光学系の移設，計測時の医者や患者への負担軽減から，小型・簡便・ロバスト・フレキシブル・メンテナンスフリーといった特徴がSHG顕微鏡に望まれる．

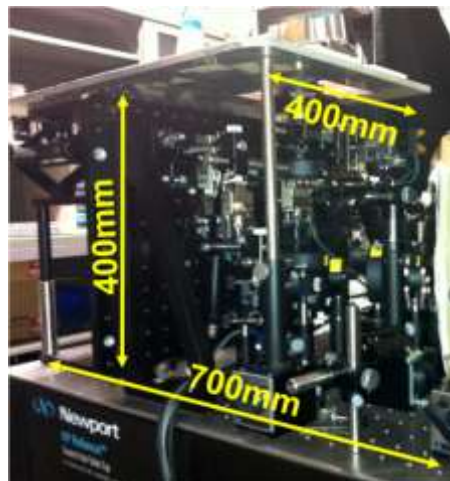


図3.5 従来のSHG顕微鏡の顕微鏡部

### 3.3. SHG顕微鏡の応用例と問題点

先行研究では，SHG顕微鏡を用いた様々な計測が行われている．美容形成の分野においては，18歳から90歳の年齢層のヒト皮膚*in vivo*計測による皮膚老化の内因性老化（太陽光などの影響によらない）および外因性老化の評価が行われている[21]．SHG顕微鏡システムは多光子顕微鏡システムに組み込まれ，ヒト前腕の同一計測領域での，SHG信号とAF(自家蛍光)信号を比較する新しいパラメーター(SAAID :  $(SHG-AF)/(SHG+AF)$ )で表され

る)を考案し、皮膚老化の非侵襲的定量評価を行っている。この結果より、SAAIDが年齢とともに減少することを発見し、保護なく日光に晒された皮膚領域では、さらに老化中に増大することを実証している。また、このデバイスは、皮膚老化における細胞外マトリックスの変化を可視化することにも成功している(図3.6)。一方、ここでは特に議論はされていないが、これらの計測に要する時間は1回の計測につき、25秒という時間がかかっている。これは、計測時間(拘束時間)としては、やや長い時間であり、比較的計測の容易な腕を特別な計測用ホルダーに固定することで計測を行っているが、高齢の被験者にとっては肉体的・精神的負担となりうる事は否定できない。もし、SHG顕微鏡がさらなる簡便・フレキシブルな計測を可能とするならば、計測用ホルダーには固定しにくいが見た目の皮膚老化が著しい部位(例えば顔など)の計測も可能となり、非侵襲的定量評価の実用性が向上すると考えられる。

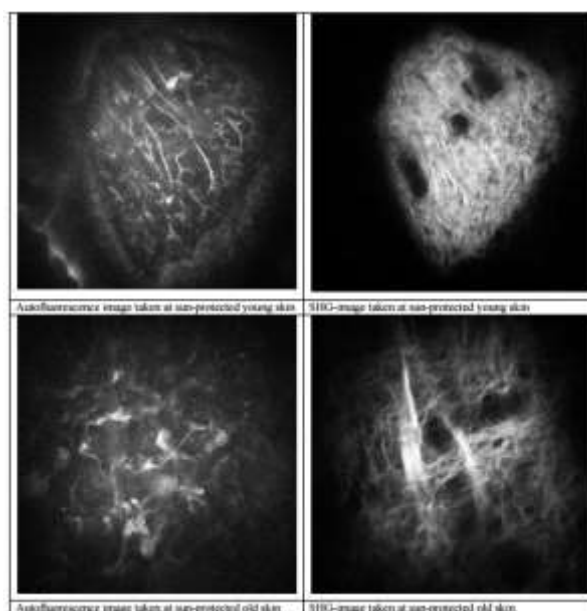


図3.6 若年(上)および高齢(下)ヒト皮膚のAFイメージ(左)とSHGイメージ(右)

医療分野においてもSHG顕微鏡の応用が期待できる。解剖学的皮膚生検の不可能な創傷治癒過程における、治癒過程の*in vivo*時系列モニタリングも行われている[8]。欠損型の創傷治癒過程モニタリング多光子顕微鏡を用いた蛍光寿命測定とSHG顕微鏡計測により、蛍光寿命は細胞内のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)から細胞の細胞代謝率(活性状態)をモニタリングし、組織内の細胞の生理学的状態を特徴づける。一方、SHG顕微鏡による創傷治癒モニタリングでは、増殖期・組織再生(リモデリング)期に対応したSHGイメージを示し(図3.7)、コラーゲン再生の研究を比較的容易とした。創傷治癒におけるコラーゲン強度および再生方向は、臨床診断において重要な情報を提供する。ここで重要であるのは、SHG顕微鏡の非侵襲的能力は、簡便かつ無痛な方法で被測定対象を診断可能であることである。しかしながら、実際は、怪我を負った患者に対する実験室レベルでの計測は困難である。その

ため、医療現場に設備可能なシステムの構築が求められる。

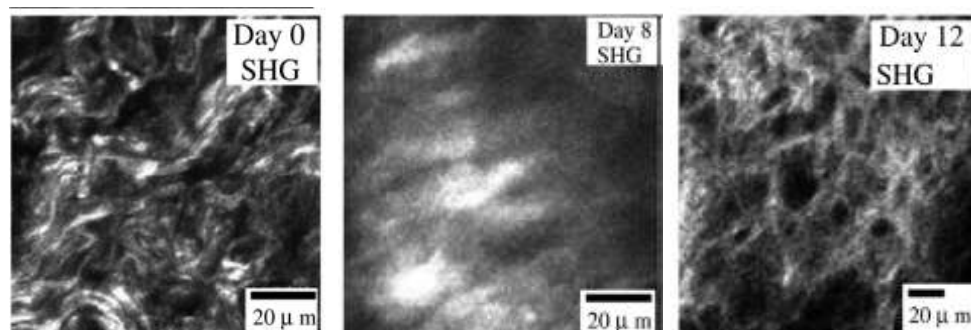


図3.7 創傷治癒過程のSHGイメージ

### 3.4. 可搬型SHGファイバースコープ

前節でも述べた通り、従来の SHG 顕微鏡には、大型・デリケート・複雑構成であるといった問題を抱える。この問題を解決する手段として挙げられるのが、図 3.8 に示すような SHG 顕微鏡のファイバースコープ化である。

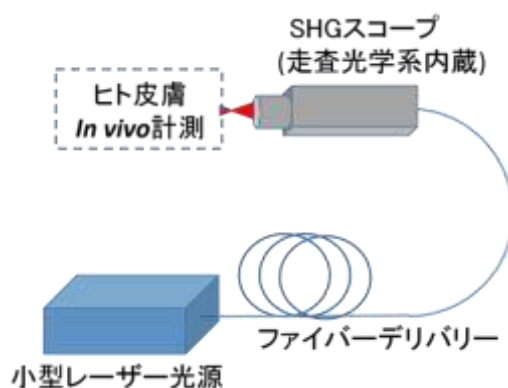


図3.8 SHGファイバースコープ

SHG ファイバースコープを実現する技術要素は、①小型フェムト秒レーザー光源、②超短パルス光のファイバー伝送、③小型 SHG プロブである。①について、従来、フェムト秒レーザー光源が装置を大型化する大きな要因であったが、最近では手のひらサイズの小型フェムト秒レーザー光源も市販され、この利用により大幅な小型化が可能になる。②について、従来の自由空間光学系は高い自由度を有するが複雑・大型・デイリーメンテナンスといった問題があったが、ファイバー伝送により小型・簡便・ロバスト・フレキシブル・メンテナンスフリーと言った特徴を期待できる。特に、最近のフォトニクス結晶ファイバーの技術進展により、これまで困難とされた超短パルス光のファイバー伝送が容易になりつつある。③については、従来は固定された顕微鏡に測定部位をセットする必要があ

ったため測定部位に制限があったが、ハンドヘルドサイズまで小型化することにより、測りたい任意の場所を計測可能になる。このように、提案する、SHG ファイバースコープは、小型・簡便・ロバスト・フレキシブル・メンテナンスフリーといった特徴を提供する。

SHGファイバースコープの技術要素の中で、①と②は市販品を利用可能であるので、③を実現できれば、SHGファイバースコープの実現が可能である。

先行研究では、小型化された高調波発生光(SHG, THG)ファイバー顕微鏡で高いサブミクロンの分解能とビデオレートでの計測が報告されている[10]. このシステムでは、血流が正常に観察された. モジュール全体の外径は 3cm に収まるように設計され、ハンドヘルド計測も可能なサイズとなっている. MEMS ミラーの共振周波数による高速走査(高速軸 16.41kHz,低速軸 1.71kHz)でのイメージングは、サンプル入射パワー108mW という高出力により、高調波発生効率が非常に高いため、イメージ内に十分なコントラストを充填することにより実現できる. しかしながら、ファイバーデリバリーには LMA PCF が用いられているが、ファイバー長が 12cm であり、依然としてフレキシブルさに問題があるとも考えられる.

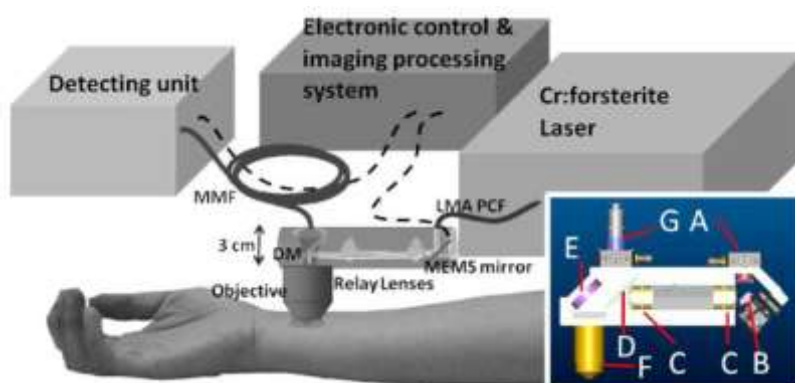


図 3.9 高速 MEMS ベースシステム高調波発生光ファイバー顕微鏡

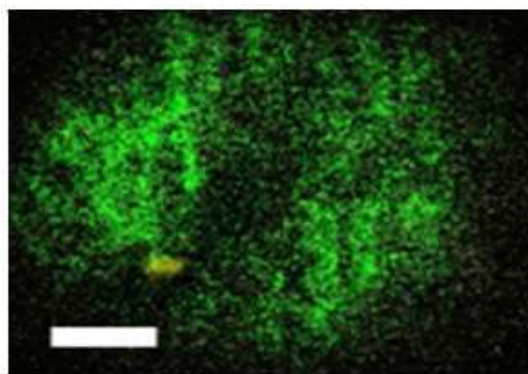


図 3.10 血流のビデオレート動画中のイメージ画像

また、MEMS ミラーを用いた多光子顕微鏡として、ジンバルレスミラー(図 3.11)を用いた手法も報告されている[22]. 楕形駆動フィンガにより駆動する 4 つのバンクの中心にミ

ラーが取り付けられることで、静電気力を用いた中央板の  $x$  と  $y$  軸の回転角を可能にし、ラスタースキャンでもリサージュスキャンでも走査可能である。この MEMS ミラーと GRIN レンズ・非球面レンズを組み合わせた外側直径 1cm、長さ 14 cm のプローブ(図 3.12)により、解像度は  $2\mu\text{m}$ 、視野  $200\mu\text{m}$  多光子イメージングが実現されている。解像度は理論値には達しておらず、非球面レンズの焦点距離、フォーカスレンズの色収差などの改善が必要である。また、多光子発生効率の問題から、ラスタースキャンでのイメージングしか実現されていない。



図 3.11 ジンバルレス MEMS ミラー

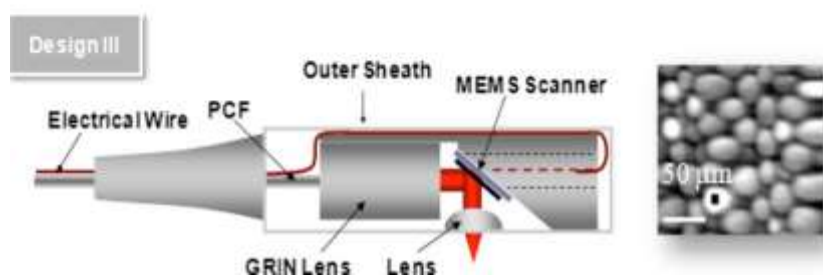


図 3.12 ジンバルレスミラー多光子顕微鏡プローブおよび取得イメージ

MEMS ミラー以外を用いた手法で、 piezoelectric 素子を用いた SHG 内視鏡プローブ(図 3.13)が開発されている[23]。その構成は、(1)四象限 PZT、(2)カンチレバー(3)GRIN レンズの 3 つの要素から構成される。四象限 PZT をカンチレバーアクチュエーターのために用いた。ダブルクラッドファイバー(DCF)の片端が PZT チューブの端部に貫通し、融着されることでカンチレバーとして機能し、螺旋状の軌道を描くように高速 2 次元ビーム走査を実行する。MEMS ミラー(走査ミラー)のようなビームの折り返しを必要としないため、細長い設計が可能であり、直径 1.4mm のプローブを実現した。現在は、組織切片および無傷上皮と組織中の子宮頸部コラーゲンの *ex vivo* での SHG イメージング(図 3.14)に留まっているが、この非常に細い構成は、将来的な内視鏡 SHG 顕微鏡による *in vivo* バイオイメージングの実現するものとして期待される。

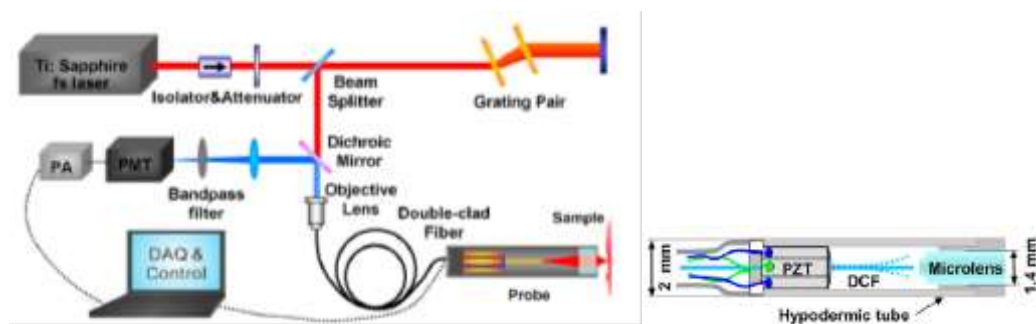


図 3.13 SHG 内視鏡プローブのセットアップ(左)およびプローブの詳細図(右)

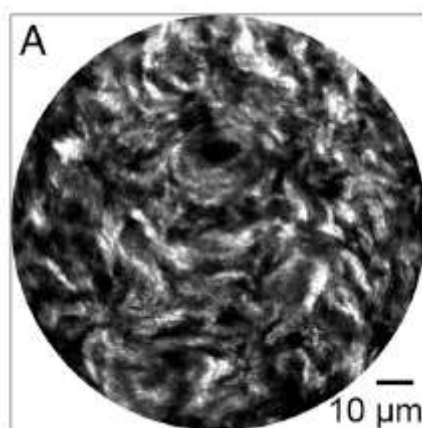


図 3.14 マウス子宮頸部組織切片の SHG イメージ

上記の 3 つの先行研究を紹介したが、自身の研究の位置づけとしては、皮膚計測の観点から、1 つ目に紹介した皮膚計測用のセットアップを目指す。さらに、この研究では、実現できていない広い稼動距離のプローブを開発することを目指す。そのためには、比較的長距離のファイバーデリバリーを行わなければならない。また、2 つ目の研究のように、ラスタースキャン(ガルバノミラー)とリサーチスキャン(MEMS ミラー)のどちらの走査が、イメージングに適切か検討する必要があると考えられる。そして、最終的には 3 つ目に紹介した内視鏡プローブのような内視鏡レベルでの使用も可能な小型化を目指していく。



## 第4章 フェムト秒レーザー光源

### 4-1. モード同期チタン・サファイアレーザー

チタン・サファイアレーザー(Ti:サファイアレーザー)は、吸収スペクトル幅(図 4.1)が、緑色から青色にかけて非常に広い大域を有しており、吸収のピークは 490nm に存在する[24]。チタン・サファイアレーザーは、他のレーザーに比べ、誘導放出断面積が 1 桁以上も大きいいため、発振させやすい。また、母材が硬く、YAG レーザーに用いられる YAG よりも熱伝導が良好なことから、高い繰り返し周波数・高出力を実現する。CW でもパルスでも励起が可能で、700~1000nm の広い波長が可変であり、モードロックにより超短パルス発生も可能としていることから、非常に実用的なレーザーであると言える。一般に市販されているものは、パルス幅 20~100fs 程度、繰り返し周波数 70~80MHz で、数 mW の出力程を有する。しかしながら、その構成は、大型であり、実験室レベルでの利用に制限される。また、ファイバーレーザーに比べると、非常に高価であるため、臨床応用のためのシステムでは、これらの欠点が問題となる。

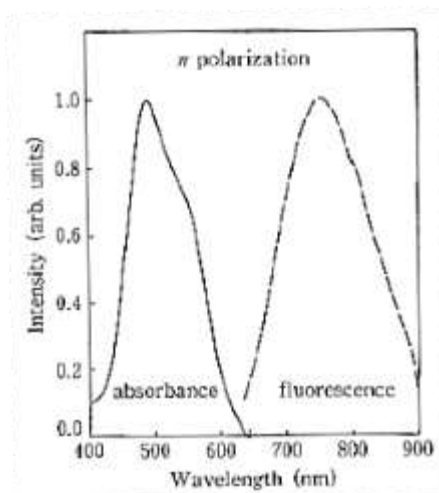


図 4.1 Ti:サファイアの吸収および発光スペクトル

近年、小型の Ti:サファイアレーザーも発売されている。gigajet(Laser Quantum Inc.)(図 4.2)は、サイズ: 320mm×200mm×106mm、重さ 13kg にまで小型・軽量化されている。サイズとしては許容できる範囲内ではあるが、可能であれば、さらに小型・軽量のものが望ましい。



図 4.2 チタン・サファイアレーザー(gigajet : Laser Quantum Inc.)

#### 4-2. モード同期クロム・フォルステライトレーザー

クロムを添加したフォルステライト( $\text{Cr: Mg}_2\text{SiO}_4$ )は、波長域1170~1350nmのスペクトル範囲をカバーする波長可変レーザー材料であり、モード同期クロム・フォルステライトレーザーは、レーザー媒質にクロム・フォルステライト結晶を用いており、中心波長1250nmで発振される[25]。この波長帯は生体組織の吸収と散乱特性から「生体の分光の窓」(800nm~1300nm)とも呼ばれ、その中でも特に浸透性の優れた波長帯と言われている。そのため、様々な生体光計測への応用が期待される。生体浸透性の観点から、本稿にて登場する従来系の光源としても採用されている。近年、Cr:フォルステライトレーザーのパルス幅は、SHG光で30fsまで短縮されたという報告もされている[26]。生体計測において優良な中心波長を有しているものの、Cr:フォルステライトレーザーも構成が大型・高価であるため、臨床応用にはこれらの問題を解決する必要がある。現在、市販のもので、サイズは小さいものでも300×200×500[mm]程度の大きさである

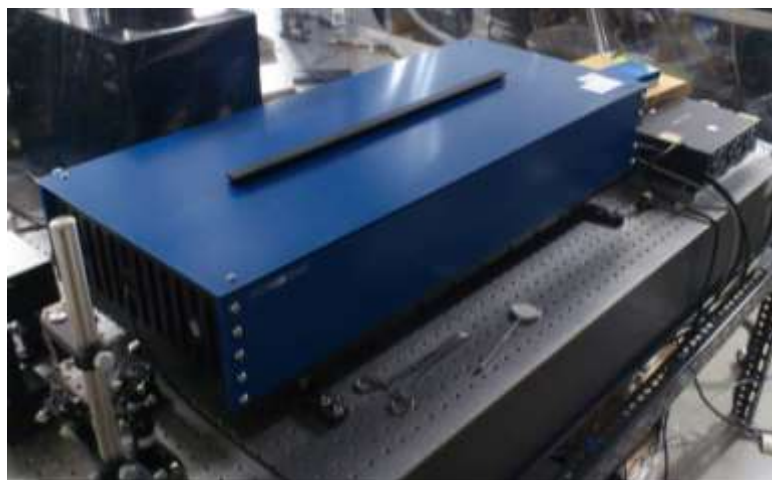


図4.3 クロム・フォルステライトレーザー(CrF-65P : AVESTA PROJECT Ltd.)



### 4-3. モード同期エルビウム添加ファイバーレーザー

ファイバーレーザーは、希土類添加光ファイバーを増幅媒質として用いたレーザーである[27]。光路を光ファイバー化することで小型軽量化が可能である。そのため、小型レーザー光源に最適の性質を有する。また、ファイバーレーザーは従来のレーザーと比較して価格も安価であり、臨床応用も含めた各種応用分野への導入で問題となる低コストもクリアできると考えられる。ファイバーレーザーの一般的な構成は、固体レーザー同様、励起光源・利得媒質・モード同期機構から成る。

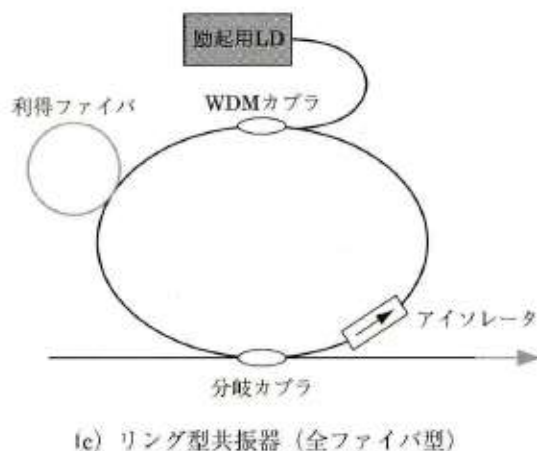
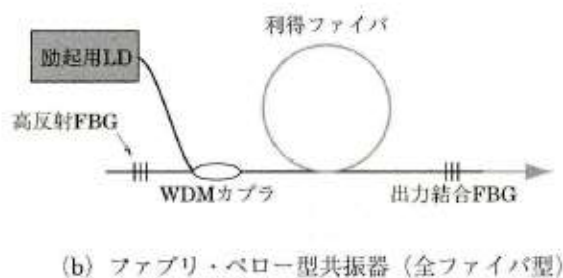
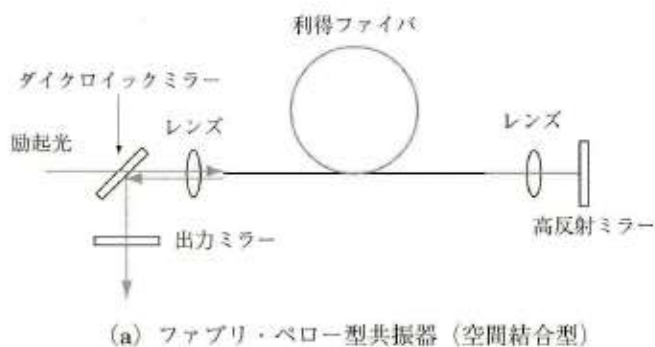


図4.4 ファイバーレーザーの基本構成

ファイバーレーザーの利得媒質には、一般的に希土類添加ファイバーが用いられ、エルビウムを添加したエルビウム (Er) 添加ファイバーレーザーやイットルビウムを添加したイットルビウム (Yb) ファイバーレーザーなどがある。これらを添加したファイバーレーザーの特徴として、超短パルス発生が可能であることが挙げられる [28]。利得媒質に用いられる希土類ファイバーの吸収断面積と誘導放出断面積の違いにより、発光波長域が決定される(図4.5)[27]。

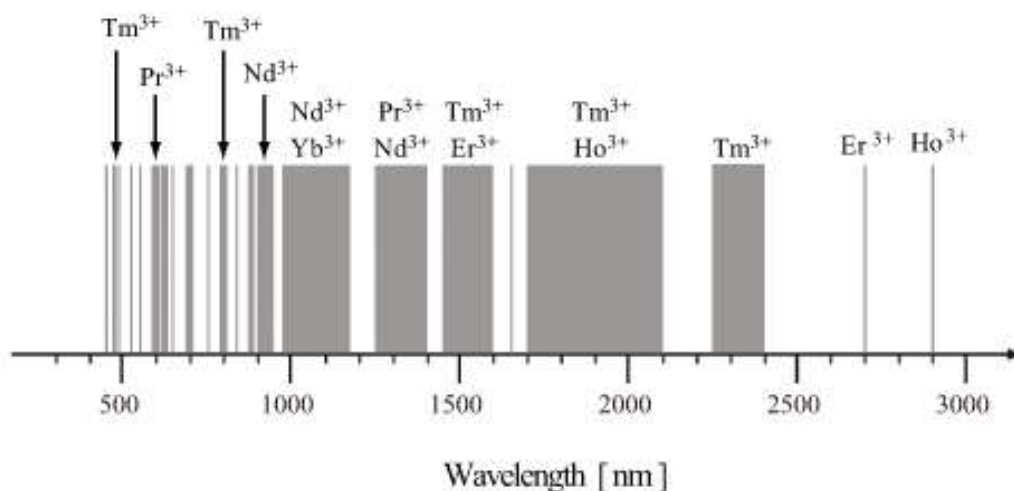


図4.5 希土類添加ファイバーの発光波長

エルビウム(Er)添加ファイバーレーザーは、エルビウム(Er)を利得媒質としたファイバーを用いている。Erの吸収断面積と誘導放出断面積を図4.6に示す[27]。励起波長は、一般的に、980nmおよび1480nmであり、発振波長は1550nmまでとされている。それぞれの励起波長によって異なる特徴を有しており、980nm励起では、1480nm励起と比較する

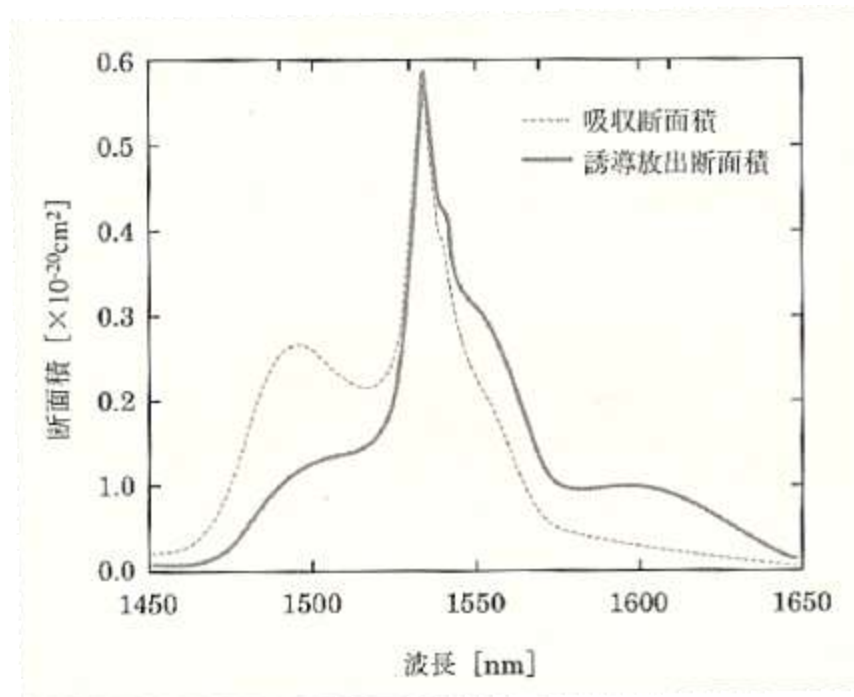


図4.6 Erの吸収断面積と誘導放出断面積

CNT-1550-TK series (K Photonics Inc.)は、 $90 \times 120 \times 32$  [mm], 非常に小型軽量を実現している。しかしながら、 $1.5\mu\text{m}$ は水の吸収が強く、顕微鏡での用途には問題がある。SHGの $775\text{nm}$ なら利用可能であるが、分散補償を外部的に行う必要がある。



図4.7 CNT-1550-TK (K Photonics Inc.)

#### 4-4. モード同期イッテルビウム添加ファイバーレーザー

イッテルビウム(Yb)添加ファイバーレーザーは、Yb(イッテルビウム)を利得媒質としてファイバーを用いている。図4.8に吸収断面積と誘導放出断面積を示す[27]。吸収スペクト

ルのピークは、975nmおよび915 nm付近の波長に存在する．よって、Ybファイバーの励起波長も975nmおよび915nmとなる．915nm励起の場合、975nm励起の場合に比べ、吸収が3倍程度も低下するため、励起効率が低下する．そのため、同じ励起パワーであっても、915nm励起の場合は、より長い利得ファイバー長が必要となるが、非線形光学効果の影響が大きくなる．また、アスペクト比が高くなることによる冷却能力の向上といった利点もある．また、915nm付近は吸収帯域幅が広く、励起波長の安定性が良好である．一方、975nm付近では吸収帯域幅が狭く、励起波長の安定性に注意が必要となる．Ybファイバーの励起波長は、975nmにおいて励起波長安定性の問題があるものの、975nmが高効率であり、かつコスト面においても優位である．

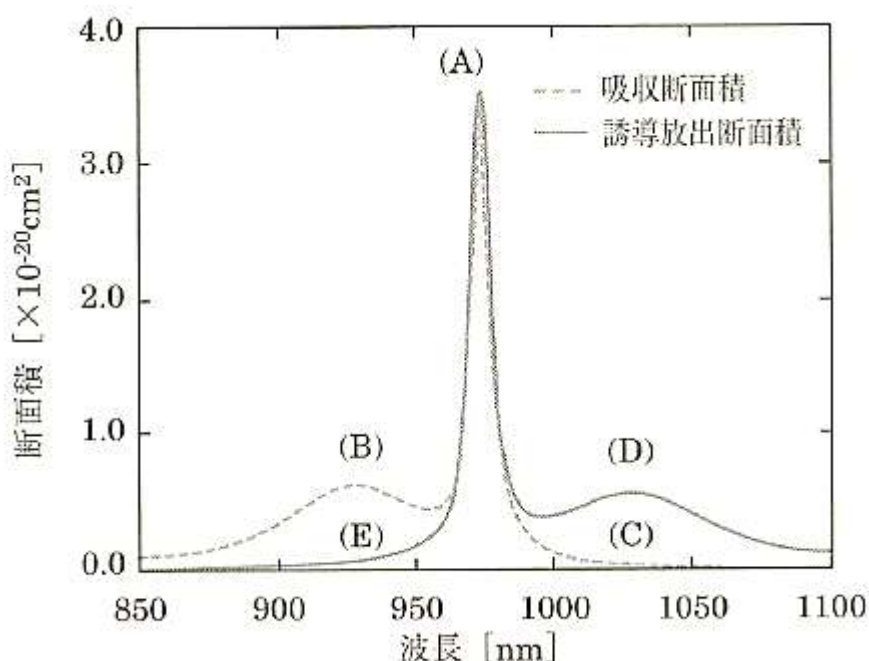


図4.8 Ybファイバーの吸収断面積と誘導放出断面積

Ybは、1000nm付近において短パルス・高エネルギーを伝播する競合イオンであり、パルス継続時間は、他のファイバーよりも短パルスである数十フェムト秒にすることが可能で、Ybファイバー増幅器は、固体レーザーでは設定できない高ピーク出力パルスで数十MHzの高い繰り返し周波数を提供する[29]．近年では、オールファイバーのYb添加ファイバーレーザーも報告されている[30]．また、市販の製品においても、面積の小さいブレッドボード上に設計されたモード同期Ybファイバーレーザーキット(Kokyo, Inc.)なども販売されており、従来のパルスレーザーと比べて比較的安価に購入することも可能である．サイズは、130 × 280 × 90 mm(ただし、LDを含まないと、こちらも非常に小型である．

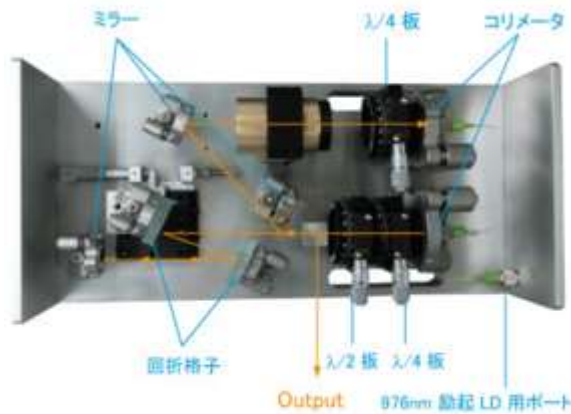


図4.9 モード同期Ybファイバーレーザーキット(Kokyo, Inc.)

#### 4-5. 特性比較

以上の内容を踏まえて、性能比較を行う。モード同期チタン・サファイアレーザー(Ti:S)、モード同期クロム・フォスフェイトレーザー(Cr:F)、モード同期エルビウム添加ファイバーレーザー(Er)およびの性能をそれぞれ表4.1にまとめた。これを見ると、比較的性能の良い固体レーザーはサイズ・コストなどに問題を抱える。一方、ファイバーレーザーは出力や波長選択性の問題をもつ。しかしながら、年々、Ybファイバーレーザーは出力を上げてきており、可搬型SHGファイバースコープの小型レーザー光源としても利用可能であるかもしれない。

表4.1 特性比較表

	Ti : S	Cr : F	Er	Yb
サイズ	×	×	○	○
コスト	×	×	○	○
簡便(安定)性	○	△	△	△
出力	◎	○	×	△
パルス幅	◎	○	○	○
波長選択性	◎	×	△	△
生体計測	○	◎	×	○

## 第5章 超短パルス光のファイバー伝搬

### 5-1. 超短パルス光のファイバー伝搬に関する問題点と先行研究

ファイバーの構成を図5.1に示す。ファイバーは芯となるコアと外側のクラッド、それらを覆う被覆から成る。クラッドの屈折率をコアよりも高くすることで、光伝搬が全反射および屈折により中心部のコアだけになる構造となっている。

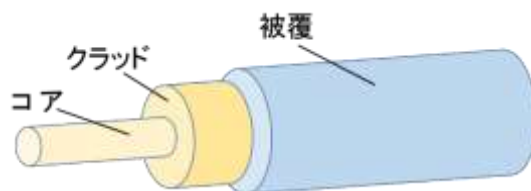


図5.1 光ファイバーの構造

フェムト( $10^{-15}$ )秒レーザーから発せられるような超短パルス光をファイバー伝搬させると、分散より、パルス幅が広がりがながら伝搬される。また、ファイバー内の光閉じ込め効果により、光電場が十分に高くなると、不要な非線形光学効果（自己位相変調など）が起こる。その結果、パルス幅を広げたり、時間波形を歪ませる原因となる。分散により広がったパルスを復元するためには、ファイバーによる分散を相殺するように、分散補償を行う。ファイバー伝搬における分散の種類には、モード分散、偏波モード分散(PMD)、および波長分散がある。

モード分散はマルチモードファイバー(MMF)において、それぞれの伝搬モード(伝搬光路)による光到達時間の差異から生じる。ひとつの基本モードしか有さないシングルモードファイバー(SMF)を用いれば、モード分散は生じない。

偏波モード分散は、それぞれの偏波間にもモードの群遅延が生じることにより起こる分散である。ファイバーの光弾性に起因する複屈折より、ファイバーの歪みや外力などが原因となる。

波長分散は、波長ごとの光の伝搬時間に遅延が生じることによる分散である(図5.2)[27]。一般に、分散というと波長分散のことを指す。モード分散の生じないSMFでの波長分散は、材料分散と導波路分散に大別される。導波路分散は、コアとクラッドの導波路構造によることから構造分散とも呼ばれる。コアとクラッドの屈折率差が小さい場合、光はクラッドへしみ出すようにして全反射する。このクラッドへのしみ出す割合は波長によって異なるため、波長によって伝搬時間も異なり分散が生じる。屈折率差とコア径を変化させること

で、クラッドへしみ出す割合を制御でき、分散を解決することができる。一方、材料分散は、ファイバーの原料である石英ガラスの複屈折などによる物質固有のものであり、コントロールするのは困難である。一般の光学材料は、正の材料分散を有している。

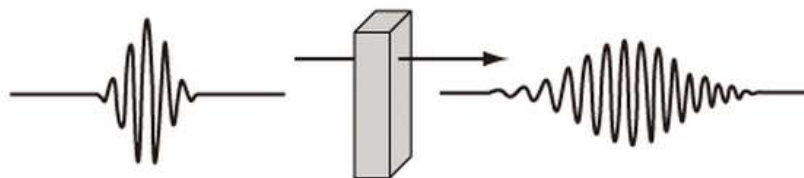


図5.2 分散の概念図

図5.3[31]に示すように、シングルモードファイバーでは、 $1.3\mu\text{m}$ 付近に、零分散を持ち、それを境界に異常分散と正常分散が存在する。例えば、 $1.5\mu\text{m}$ 帯の中心波長をもったレーザーであれば、ファイバーを選別することで、異常分散と正常分散を生じさせ、それらの組み合わせで零分散を実現することで分散補償が可能となる。自由空間光学系を必要とせず、ファイバーのみで分散補償が出来ることは、実用的に極めて有用である。

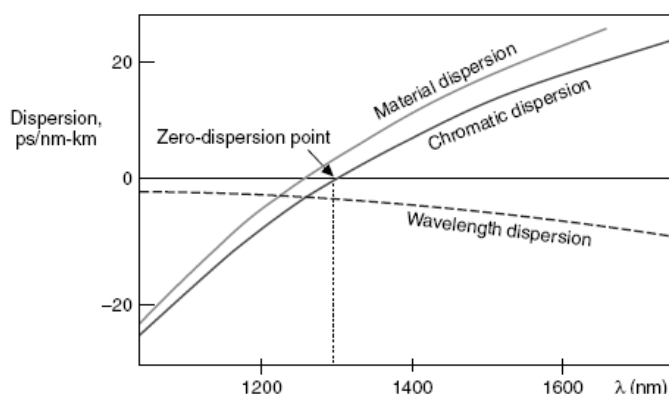


図5.3 SMFの波長分散と零分散

しかしながら、その他の波長帯( $1.3\mu\text{m}$ 帯以下の中心波長など)では、ファイバーのみでの分散補償は不可能である。そのため、外部的な自由空間光学系を用いた分散補償が必要となる。このような外部的な分散補償の手法は、回折格子対、プリズム対、チャープミラーなどが一般的である。回折格子対(グレーティングペア)の原理を図5.4に示す。回折格子対は互いに平行に配置される。パルス光が、グレーティング1に入射したとき、パルス内のそれぞれの周波数成分は少しずつ異なった方向に回折され、プリズム2へ入射する。短波長成分が長波長成分より短い時間で伝搬するため、負の分散を与える。回折格子対は、パルス圧縮器(パルスコンプレッサー)の中で最も一般的とされる。ペア間の距離が数十ミリ~数センチと短い距離で行えるため、負の分散を比較的容易に作り出せるという利点を有する。しかし、回折格子を用いるため回折損失を避けることができないという欠点もある。



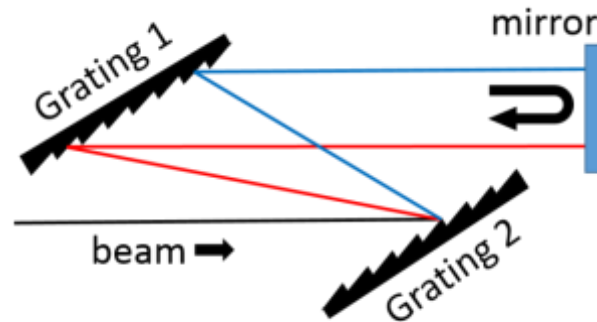


図 5.4 回折格子

プリズム対の原理を図5.5に示す。プリズムでは、光の短波長成分が長波長成分よりも大きく回折する。プリズム1とプリズム2の間において、入射したパルス光のそれぞれの波長成分のうち、短波長成分は長波長成分よりも長い光路を伝搬し、長波長成分は時間的に早く伝搬するため、正の分散となる。一方、プリズム2では短波長成分が早く伝搬するため負の分散となる。トータルで、負の分散を与えることができる。プリズムペアでは、回折格子対に比べ損失が少ないという利点が挙げられる。しかし、補償が小さいためプリズム間の距離を大きくとることが必要とされる。また、分散の波長依存性が、非直線性を有する。

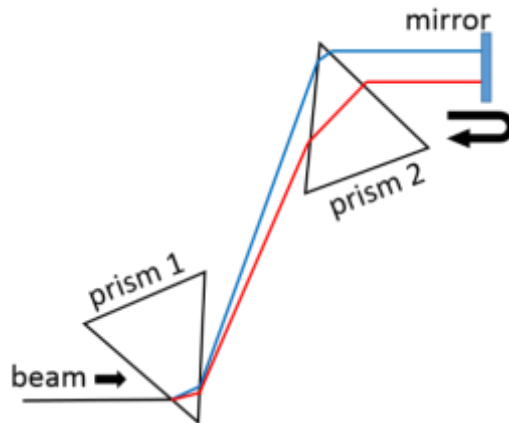


図5.5 プリズム対

チャープミラー(図5.6)は、高屈折率の膜と低屈折率の膜から成る誘電体多層膜ミラーである。誘電体多層膜では、長波長成分ほどミラー表面より遠い(深い)面で反射されるため、パルス光に負の分散を与えることができる。数枚のチャープミラーを使用することで、ビームがチャープミラー間を何度も行き来する構成にすることが可能であるが、その調整は難易度が高く、技術が必要とされる。また、反射回数に依存した離散的分散補償となるので、通常は連続分散補償が可能なウェッジプリズム(正の分散)とペアで用いることが多い。



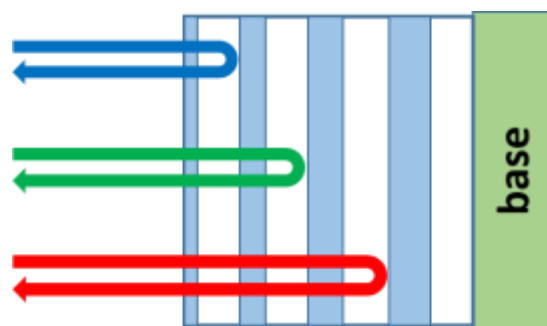


図5.6 チャープミラー原理の模式図

## 5-2. PCFファイバー

上述のように、分散補償を外部的に行う場合、どうしても小型や簡便性といった特徴が損なわれてしまう。パルス拡がり避けるもう一つのアプローチは、ファイバー伝播におけるパルス拡がり抑制することである。そのためには、分散が極めて小さく、非線形光学特性の小さなファイバーが望ましい。通常の光ファイバーでは、上述したように分散は避けることが出来ない問題である。一方、フォトニック結晶ファイバー(Photonic Crystal Fiber: PCF) は、コア-クラッド間の屈折率差および実効屈折率を非常に大きくかつ自由度高くに設計できる。PCFは、石英中に空孔の配列構造を持った光ファイバーである[27]。PCFの基本構造を図に示す。ここで、格子間隔(ピッチ)を $\Lambda$ 、空孔(エアホール)径を $d$ とすると、コア径 $D$ および空隙率(高屈折率媒質に対するエアの割合) $F$ は、それぞれ

$$D = 2\Lambda - d$$

$$F = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} \left(\frac{d}{\Lambda}\right)^2$$

で表される。比エアホール径  $d/\Lambda$  はクラッドの実効的な屈折率と関係するため構造の規格化パラメータとして用いられ、 $\Lambda/\lambda$  は波長に対するエアホール中心間隔の相対的な大きさを示す規格化周波数を示す。PCFでは、空孔の配列やコア径の選別より、これらのパラメータが自由度をもって人工的に変えることができるため、広帯域シングルモード動作・高非線形性・低非線形性・分散制御性・偏波保持性および低曲げ損失性等といった、通常の光ファイバーでは実現不可能な特性を持たせることができる。

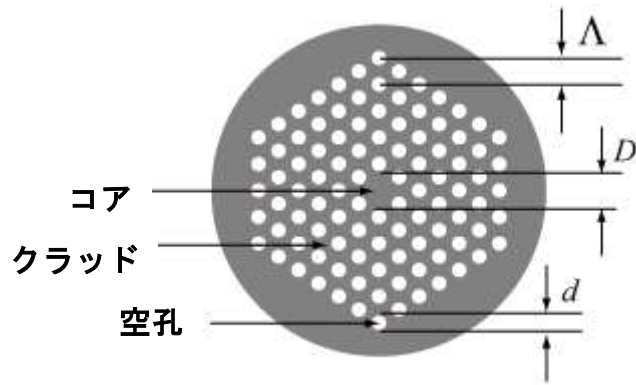


図5.7 PCFの基本断面構造

PCFは導波原理により、フォトニックバンドギャップ型と屈折率導波型の2つに分類される。フォトニックバンドギャップ型(図5.8(a),(b),(c))は二次元ブラッグ反射構造を有し、コア部がエア(空気)であっても光を導波することができる。光の波長と同程度の周期で空孔が配置された比較的大きな屈折率変化がある媒質中では、特定の波長の光は浸入できないが、波長の異なる光は、この媒質中を通過することができる。一方、屈折率導波型(図5.8(d))はクラッドに空孔が存在することで、実効的な屈折率がコアより低くなる。これにより全反射が起こり、光を閉じ込める効果を有する。「マイクロストラクチャーファイバー」とも呼ばれる。いずれのタイプでも、ファイバー中の周期構造を変化させることで、さまざまな光の伝播特性を制御することが可能である。

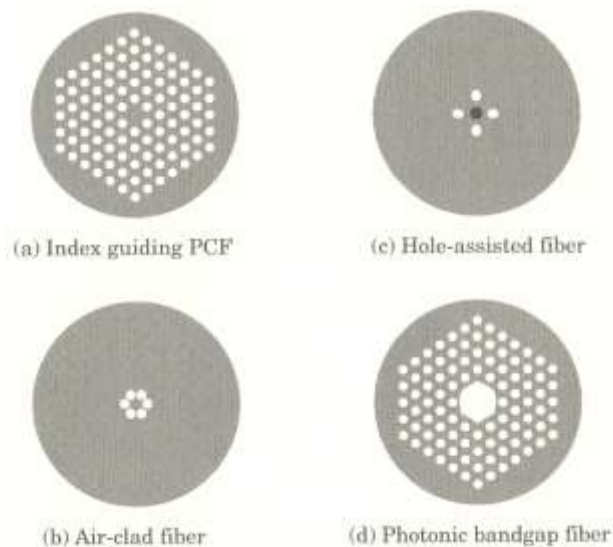


図5.8 各種PCFの断面図

現在、導入可能な市販のPCFを、以下に簡単にまとめる。

(1) 中空コアPCF(PBF)

従来の光ファイバーは光が伝播するコア部も石英ガラスで構成されているが、中空コアPCFは、コア部がエアであるため、ファイバー伝播中に損失を受けにくく、さらに非線形特性を抑制することも可能である。非線形特性が低いことで、長距離伝播にも用いられる。

(2) 大モード面積PCF (Large Mode Area PCF : LMA-PCF)

本来のファイバーは、モードフィールド径(MFD)が大きくなるとマルチモード伝搬をするが、大モード面積PCF (Large Mode Area PCF : LMA-PCF) は大きなMFDであっても、シングルモード伝搬が可能である。MFDが大きいため、ファイバー中での非線形特性や材料損傷の影響を受けず、ハイパワーでの光伝播が可能である。

(3) 高非線形PCF (Highly Non-Linear PCF :HNL-PCF)

高非線形PCF (Highly Non-Linear PCF :HNL-PCF) は、非線形係数が高いため、可視域から近赤外域まで広がるスーパーコンティニューム(Supercontinuum : SC) 光を生成することが可能である。

(4) エンドレスシングルモードPCF(Endless Single Mode PCF : ESM-PCF)

従来のシングルモードファイバーでは、カットオフ波長より短波長の光は、マルチモード伝搬するが、エンドレスシングルモードPCF (Endless Single Mode PCF : ESM-PCF) は、波長やコア径に関係なくシングルモード伝搬が可能である。

(5) 偏波保持型フォトニック結晶ファイバー (PM-PCF)

従来の偏波保持(PM)ファイバーは、応力付与部から発生した応力によって大きな複屈折を生じさせ、偏波を保持しているが、偏波保持型PCF (PM-PCF) は、空気-ガラス間の大きな屈折率差と楕円形により、強い複屈折を発生させる。これにより、ビート長が短くなり、曲げによる偏光の乱れが軽減され、温度変化に対しても強くなる。

SHG顕微鏡におけるファイバーデリバリーでは、パルス光を比較的長い距離伝搬するため、シングルモード伝搬が好ましい。また、この過程において非線形効果を受けず、分散や特性の変化を最小限に抑えることが重要である。また、実用性を考えると、SHG顕微鏡の対物後に数十mWを実現するようなパワーが必要であるためカップリング効率を捨てることもできない。そこで本研究では、大きいモードフィールド径でありながら、シングルモード伝搬が可能で、非線形特性や材料損傷の影響を受けにくく、かつハイパワー伝播が可能な大モード面積PCF (Large Mode Area PCF : LMA-PCF)を用いた。

### 5-3. 基本特性評価

本研究では、大モード面積PCF(LMA-25: Thorlabs, Inc.)を用いた。仕様は、コア径=25 $\mu\text{m}$ , NA = 0.05であり、中心波長は800nm-1700nmをカバーしている。フォトリソグラフィ型PCFで、前節でも述べたとおり、大きなMFDでありながらシングルモード伝搬が可能で、モード分散が発生しにくい。また、空孔の配列やコア径の選別により、ファイバー内の屈折率を広い範囲で自由に設計できるため、導波路分散における正常分散および異常分散の調整によりレーザー光源の中心波長に合わせた波長分散の影響も低減できる。PCFの特性は空孔の周期構造に依存するため、入射面・出射面の整形が必要である。そこで、ファイバーカッターを用いてPCFを切断した後、断面を明視野顕微鏡で観察した(図5.7)。これより、PCF断面から特有の周期構造が確認できる。

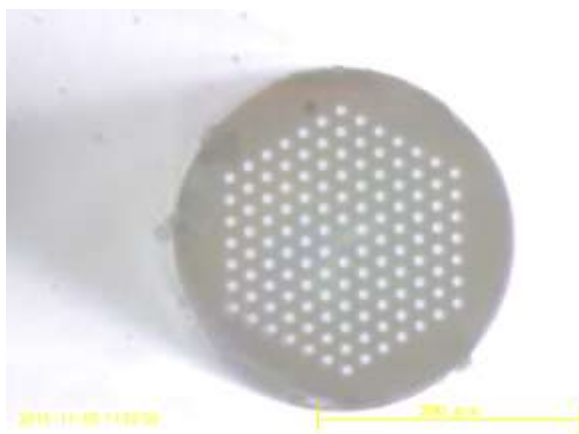


図5.9 実際に用いたPCF断面の明視野顕微鏡画像

このファイバーを用いて、自由空間からのカップリングを行った。光学系を図5.10に示す。以後、PCF入射前の光路を①、PCF出口の光路を②と表記する。PCFの入射レンズには対物レンズ(CFI Plan 4X, NA = 0.1 : Edmund Inc.)を使用し、PCFは、ファイバー入射システム(MAX361D/M : Thorlabs Inc.)に固定され、このシステムの3軸調整のステージマイクロメーター(分解能1 $\mu\text{m}$ )により微調整された。この時のビーム径は直径3mmであった。これは、対物レンズの瞳径の半分程度であるが、PCFのNA(0.05)を考慮したものである。アライメント時のレーザーモニタリングには通常用いるIRカードではなく、IRレーザースコープを用いた。IRカードを用いない理由は、IRカードがPCFと接触し、PCFが破損することを避けるためである。IRレーザースコープでPCF断面に反射光が強く見える位置までステージマイクロメーターのミリ目盛つまみで移動し、その後、マイクロ目盛つまみでPCF内が強く光るまで微調整を行った。カップリングの結果、ファイバー長は75cmで、カップリング効率は32.5%([Input] : [Output] = 252mW : 82mW)であった。

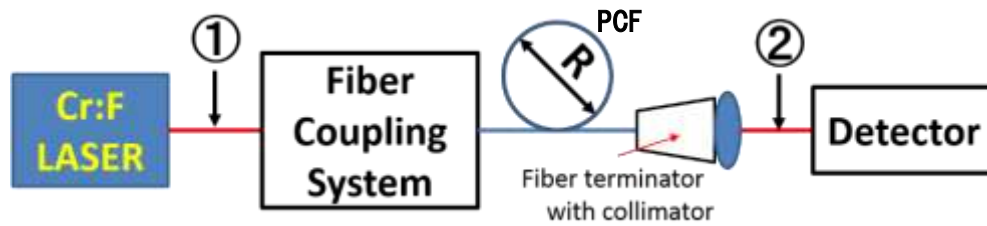


図5.10 PCFカップリングセットアップ

次に、ファイバー伝送前後における超短パルス光のスペクトル幅およびパルス幅の特性評価を行った。なお、ファイバーデリバリーを行う際、ファイバーの曲げ具合により特性が変化する可能性があるため、ファイバーの曲げ具合の異なる2パターン(曲率半径： $R=15\text{cm}$ および $R=8\text{cm}$ )で、それぞれ計測を行った。曲率半径 $R=15\text{cm}$ は、後にSHG顕微鏡として構築する際に予測される位置にセットした状態であり、曲率半径 $R=8\text{cm}$ は、ファイバーを1回転させた状態で、ファイバーに曲げ負荷をかけた状態(実際の計測では用いない)である。すなわち、実際に使用する $R=15\text{cm}$ の状態を評価し、そこからファイバーに曲げ負荷をかけた状態での変化を見た。

はじめに、スペクトル波形とパルス幅の計測を行った。各結果を図5.11および表5.1に示す。スペクトル波形は、光スペクトルアナライザー(Laser Spectrum Analyzer : IST Inc.)を検出器位置に置き、取得した。これより、どのスペクトルもスペクトル幅は $26\text{nm}$ 程度であることがわかる。パルス幅は、フェムト秒オーダーの極めて短い時間間隔であるため、パルス幅を直接、計測することはできない。そのため、オートコリレーター (Mini-IR/PMT : APE Inc.) を用いて、ディレイを与えた自己相関波形より算出される。オートコリレーターを検出器位置に置き、②の位置に $\lambda/2$ 板を置き、入射光の水平成分が最も大きくなるように入射させた。図5.11に、自己相関波形(赤線)およびフィッティング波形(青線)を示す。フィッティング波形は、ガウス型パルスと仮定し、パルス幅は自己相関幅を $\sqrt{2}$ で割ることにより求められる。入射側の自己干渉幅は $113\text{fs}$ となり、パルス幅は、 $80\text{fs}$ となる。一方、出口側は、 $R=15\text{cm}$ のとき、自己相関幅は $116\text{fs}$ となり、パルス幅は $82\text{fs}$ で、 $R=8\text{cm}$ のとき、自己相関幅は $122\text{fs}$ で、パルス幅は $87\text{fs}$ であった。この計測結果を踏まえて、フーリエ限界パルス幅を考える。光周波数 $\nu$ は、

$$\nu = c / \lambda$$

と表される。ここで、中心波長 $\lambda$ 、光速 $c=3.0 \times 10^8 [\text{m/s}]$ である。これより、

$$|\Delta\nu| \cong \frac{c}{\lambda^2} |\Delta\lambda|$$

ここで、周波数領域、時間幅 $|\Delta t|$ は、ガウスパルスの場合、

$$|\Delta t| = \frac{0.441}{|\Delta \nu|}$$

となり、これよりスペクトル幅(26nm)からフーリエ限界パルス幅は85fsである推測され、フィッティング結果とほとんど一致している。これより、超短パルス光のファイバー伝送において最も問題とされる分散によるパルス広がりがほとんど発生していないことが確認された。すなわち、SHG顕微鏡にPCFを通過したパルス光を用いて、分散補償を行わなくても、パルス幅の変化による発生効率の低下などの恐れはないということが言える。

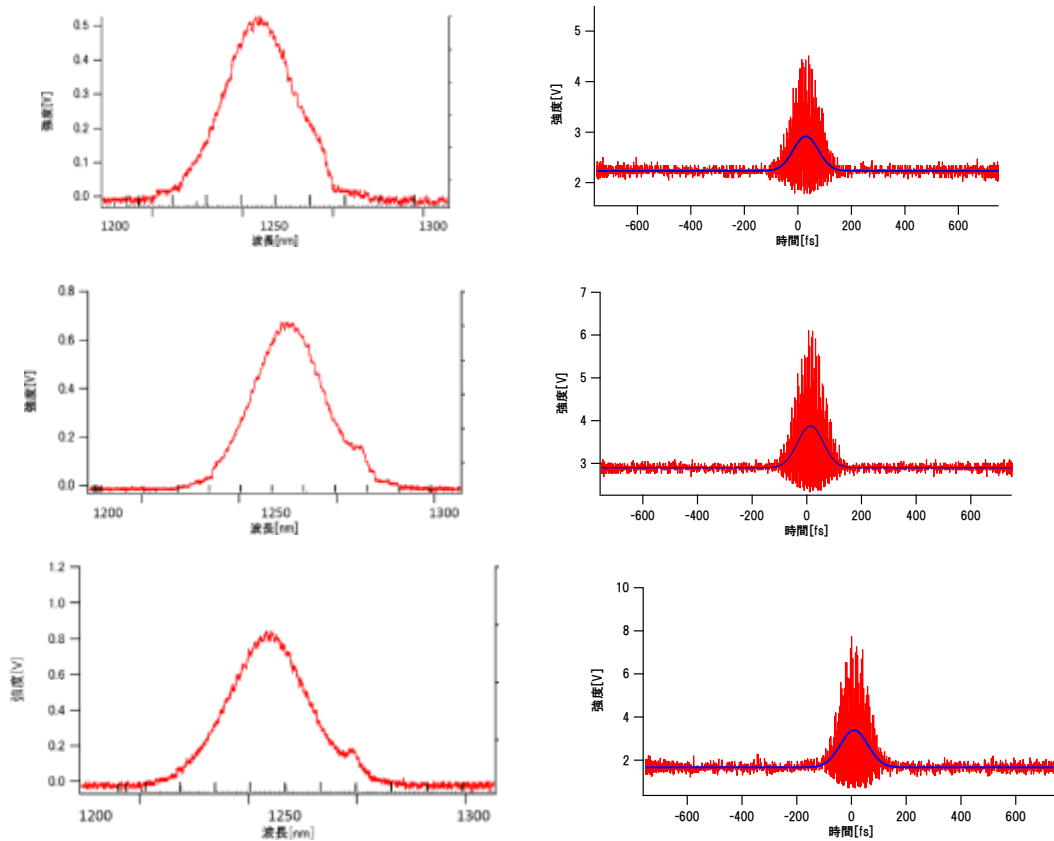


図5.11 スペクトル幅およびパルス幅(上から、PCF入射前、R=15cm、R=8cm)

表5.1 スペクトル幅およびパルス幅

	スペクトル幅	パルス幅
PCF入射前	26nm	80fs
PCF(R=15cm)出射後	26nm	82fs
PCF(R=8cm)出射後	27nm	87fs

次に、偏光特性を評価した。光源の偏光状態は直線偏光であり、直線偏光のPCF入射角度により、PCFの周期構造との成す角度が変化することで、入射パルスの受ける非線形効果などの特性が変化する可能性がある。また、この結果次第では、SHG顕微鏡に応用した際に、偏光分解イメージングの可能性も期待できる。PCF入射前の光路を①、PCF出口の

光路を②と表記する．図中①に偏光子を置き， $20^\circ$  間隔で回転角を変化させながらパワーメーターでレーザー強度の変化を読み取った．②の位置にも偏光子を置き，同様の計測を行った．入射側および出口側の偏光状態を図5.12に示す．偏光子の角度[deg.]に対する，強度[mW]を極座標グラフにプロットした．入射側および出口側ともに，直線偏光特有の極座標グラフとなっており，偏光状態に大きな変化は見られなかった．これより，入射側の偏光状態は直線偏光であり，PCF出口の偏光状態も直線偏光を保っていることがわかった．

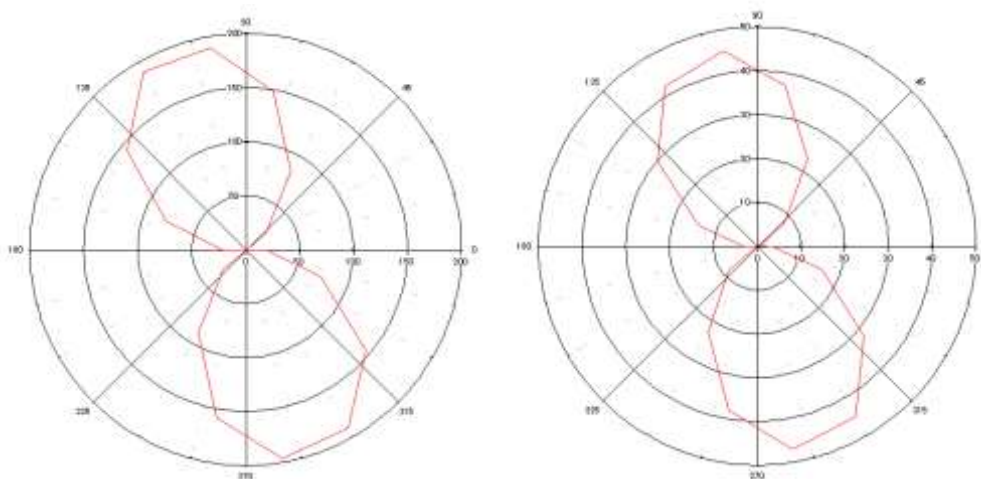


図5.12 入射側(左)および出口側(右)の偏光状態

そこで，PCF入射前の偏光回転に対して，PCF出口の直線偏光が正常に回転しているかを評価した．①に $\lambda/2$ 板を置き， $\lambda/2$ 板を $5^\circ$ （偏光角は $10^\circ$ ）ずつ回転させ，②に偏光子を置き，各回転角で最大値を示した偏光子の角度をプロットした．図5.13に，実際の偏光子の角度を赤線で示し，線形フィッティングを青線で示している．これからわかるように，PCF出口でも直線偏光が $\lambda/2$ 板に対応して回転していることがわかった．

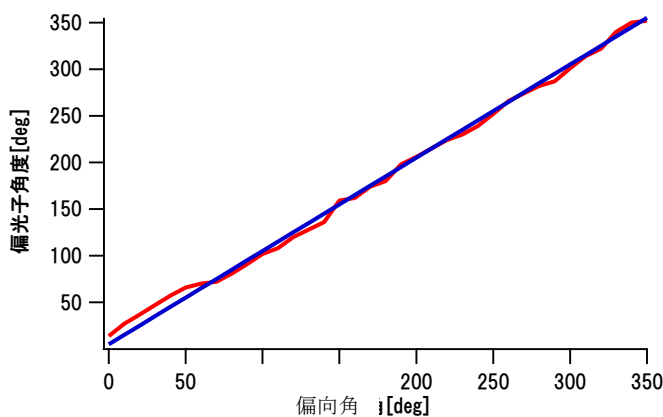


図5.13 偏光角回転に伴う出射パルス偏光方向の変化(R=15cm)

位置①の $\lambda/2$ 板により $10^\circ$ 刻みで偏光方位を変化させながら、位置②の偏光子(検光子)を回転させ、最大値と最小値をパワーメーターで読み取り、消光比の変化を見た(図5.14)。これより、消光比は、PCF入射前では、200程度であるのに対して、PCF後は大きな変動を見せた。PCF内で生じている現象は確認することが困難であるが、消光比が著しく向上する角と低下する角があることから、PCFで偏光を乱す現象が起きている可能性がある。

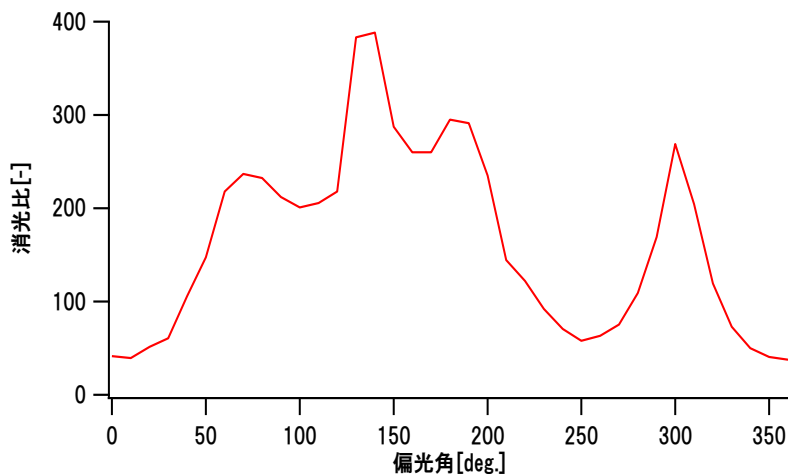


図5.14 PCF後の消光比(R=15cm)

同様な評価をPCF曲げ半径 $R=8\text{cm}$ でも行った。 $0^\circ$ から $180^\circ$ の範囲で、このときもPCF出口での直線偏光が、 $\lambda/2$ 板に対応して回転していることがわかった。しかしながら、 $R=15\text{cm}$ と比較すると、実際の回転との誤差が大きくなっている。また消光比にも、低下がみられる。これは、PCFを一巻きした $R=8\text{cm}$ のときでは、レーザー光伝搬に負荷がかかるような曲げや伸展などの負荷がPCFに加わっているからだと考えられる。そのため、計測全般(SHG顕微鏡計測時も含む)を行う際は、過大なファイバーの曲げなどが生じないように慎重に取り扱うことを心がける。

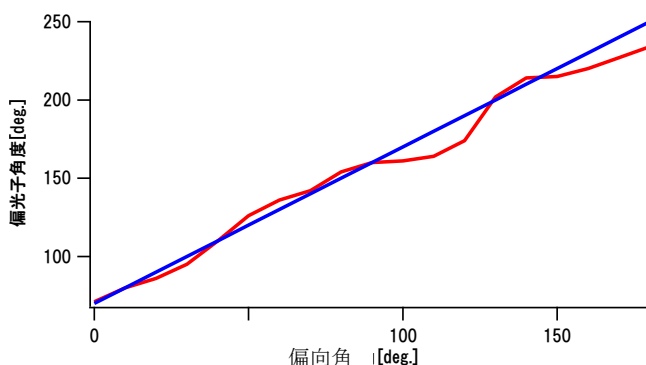


図5.15偏光角回転に伴う出射パルス偏光方向の変化(R=8cm)



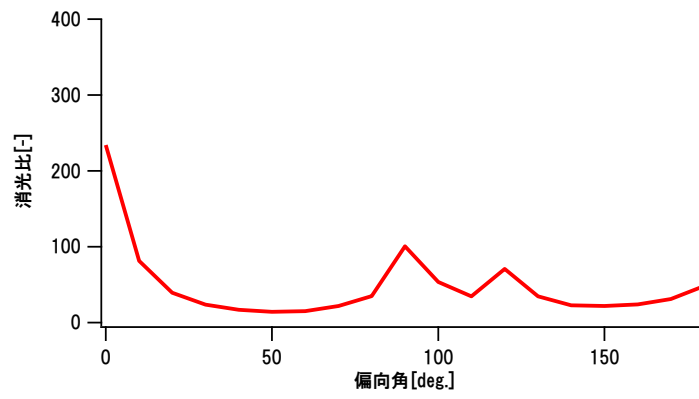


図5.16 PCF後の消光比(R=8cm)

## 第6章 可搬型SHGファイバースコープ

### 6-1. SHG顕微鏡ヘッドの設計と組み立て

本章では、SHG顕微鏡によるイメージングの主となるレーザー走査光学系を小型化することを試みた。まずはじめに、顕微鏡ヘッド部分の小型化を行った。光源にはモード同期Cr:Forsteriteレーザー（パルス幅 100 fs, 中心波長 1250 nm, 繰り返し周波数 73 MHz）を用いた。レーザー走査光学系は、走査型ミラー・リレーレンズ・対物レンズから成るが、本章では、レーザー走査光学系に検出器を組み込んだ光学系(以下、小型 SHG 顕微鏡ヘッドと呼ぶ)の構築を試みた。まず、リレーレンズの小型化として、1 インチの小口径レンズを用いた。ここで問題となるのが、小口径レンズの固定方法である。この解決策として、レンズ・チューブ・システムとケージ・システム（いずれも THORLAB 社）を用いることで、小口径レンズを固定した。さらに、レンズ・チューブ・システムを用いる利点として、チューブ先端をケージと固定することで、ケージ側面に油侵の対物レンズ（N.A.=0.90, W.D.=350 $\mu$ m : Nikon）および検出器である光電子増倍管（PMT）（H7155-01 : Hamamatsu）を取り付けることができ、ケージ内部には基本波を透過させ、SHG 光を含む光を反射させるダイクロイックミラー(DM)を設置することが可能となり、理想とするひとつの顕微鏡ヘッドとして機能する(図 6.1)。ダイクロイックミラーと検出器の間のチューブには集光用レンズおよびバンドパスフィルター(BPF)(透過波長 625nm)を設置した。

ここでは、走査型ミラーが未実装であるため、プローブとしての使用は不可能である。そのため、まだ自由空間での光学系となるため、チューブ用クランプに取り付け、定盤上に固定する形をとっている。将来的には、図 6.1 に示すようなハンドヘルドでの計測を行うべく、本章では可搬型 SHG ファイバースコープの開発を行う。

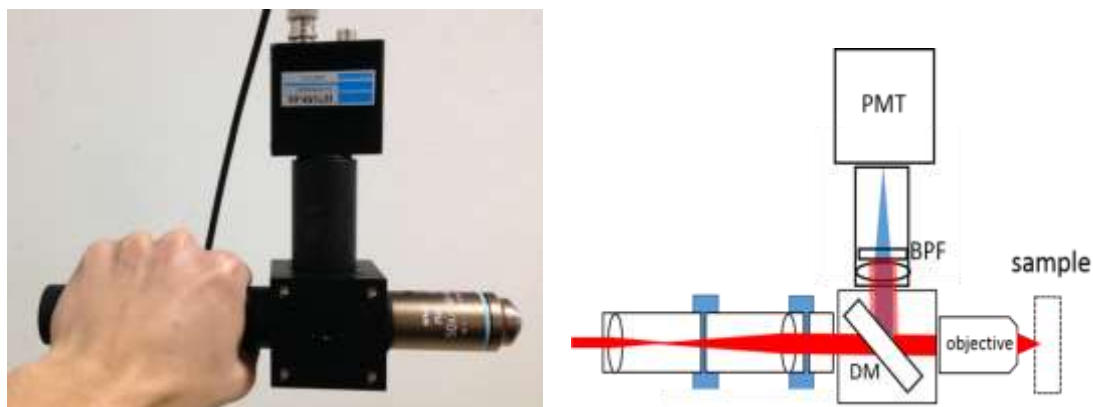


図 6.1 SHG 顕微鏡ヘッド

小型SHG顕微鏡ヘッドを用いてSHG顕微鏡を構築した。走査ミラーにはガルバノミラーとMEMSミラーの双方を利用可能である。構築した小型ヘッドを用いたSHG顕微鏡は、従来のSHG顕微鏡に比べて、小型かつシンプルな構成を実現した(図6.2)。チューブおよびケージを用いた光学系では、レンズなどが内部に固定されるため、アライメントの自由度が低下する。そのため、対物レンズからサンプルへと照射されるレーザー光の強度低下などが心配されるが、下記のセットアップで、対物後のレーザー光の強度は40mWと従来のSHG顕微鏡と同等の強度を実現することができた。

目標とするプローブにするためには、小型顕微鏡ヘッドに走査ミラーを取り付ける必要がある。走査ミラーには多くの場合、ガルバノミラーおよび共振ガルバノ、小型系ではMEMSミラーが用いられる。本章では、MEMSミラーとガルバノミラーを用いた手法を試みた。

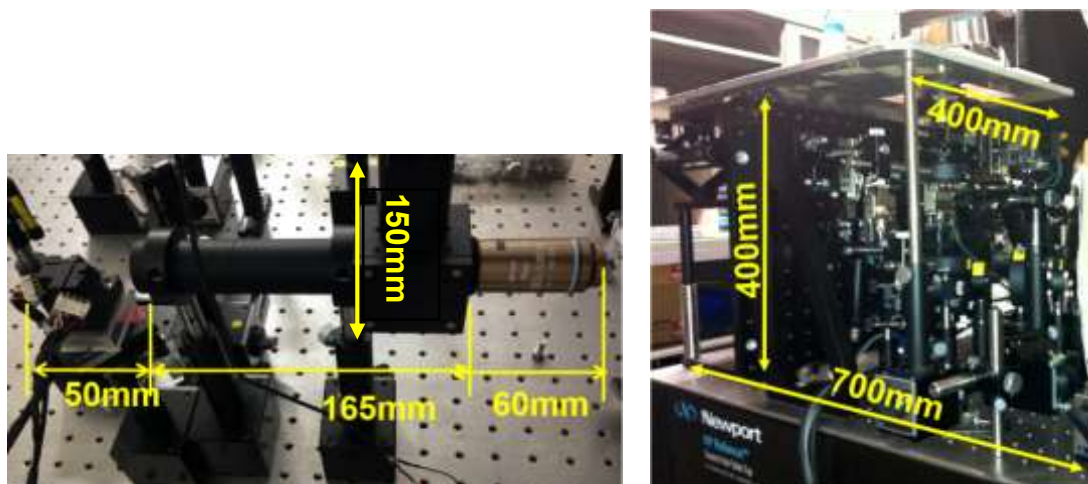


図 6.2 小型ヘッド SHG 顕微鏡(左)と従来 SHG 顕微鏡(右)

## 6-2. MEMS ミラーを用いた手法

MEMS(micro electro mechanical system)とは、ミラー、センサ、アクチュエータ、電子回路を一つのシリコン基板などの上に集積化したデバイスであり、従来のスキャナーとして一般に用いられてきたガルバノミラーよりも小型で、高速走査が可能である。

MEMS ミラーには駆動原理により、その種類がいくらか存在するが、本章では、静電型 2次元 MEMS ミラーを用いた。これは、静電力により両軸がそれぞれ独立して回転運動を行うことができる微小ミラーである。その構造は(図 6.3)、両軸の回転機構は中央に位置する微小ミラーと、それを軸支する梁および可動フレームから成る。ミラー駆動には、正弦波信号を可動フレームとミラー間に与えることで静電力を発生させ、ミラーをそれぞれの軸を中心として回転させる。駆動用の正弦波信号には、それぞれの軸の共振周波数を用いるため、非常に高速なレーザー走査を行うことができる。

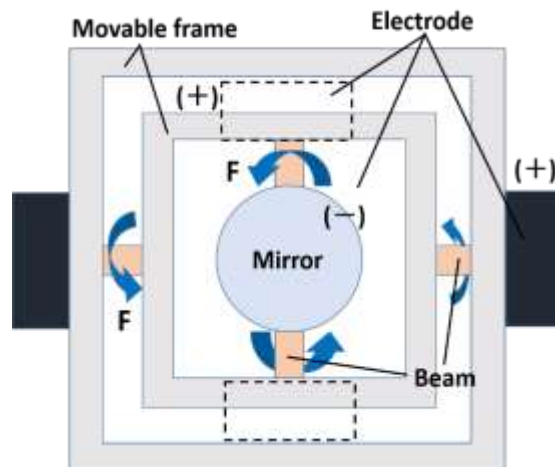


図 6.3 MEMS ミラーの構造

MEMS ミラーには OP-6111(Opus 製)を用いた。共振周波数はそれぞれ、高速軸で 22kHz、低速軸で 1.4kHz である。共振周波数の 2 倍の矩形波の信号を用いた逆起電力により、正弦波的なミラー駆動が出来る。駆動電圧は高速軸で 100V、低速軸で 64V である。振り角は高速軸で  $31^\circ$ 、低速軸で  $30^\circ$  である。なお、MEMS ミラーでは、通常、ミラー角度情報を取得できないため、何らかの手段で角度情報を取得する必要がある。そこで、MEMS ミラー駆動電圧を計測する事を試みた。しかし、これらの信号をデジタイザーなどで取得することを考えると高電圧であるため、オペアンプを減衰器として使い、それぞれの信号を +5V の TTL 信号になるように処理した。

ここで問題となるのが、スキャン方式の違いである。ガルバノミラーの走査はラスタースキャン(図 6.4)であり、高速軸で最速でも数 kHz、低速軸を数 Hz でスキャンするのが一般的であったが、MEMS ミラーは共振周波数に合わせた正弦駆動により、高速軸が数十 kHz、低速軸でも数 kHz と非常に高速なリサージュスキャン(図 6.5)が可能である。そのため、取り込みの高速化が必要となる。

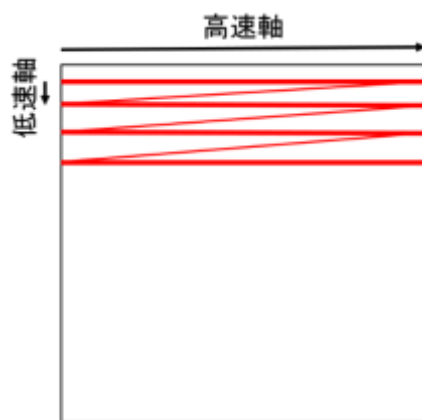


図 6.4 ラスタースキャン

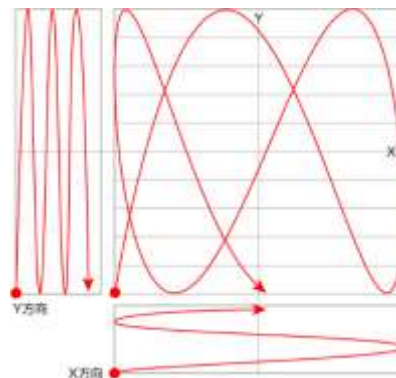


図 6.5 リサージュスキャン

(<http://www.signal.co.jp/vbc/mems/sp/ecoscan/> より抜粋)

そこで、データ取得には高速処理の可能な FPGA を用いた。FPGA (field-programmable gate array) とは、使用者が電子回路構成を任意に設計できる集積回路である PLD (プログラマブルロジックデバイス) の一種である。図 6.6[32]に示すように、外部ピンから電気的な情報により論理ブロックの論理関数および接続を変えることで、実験等の用途によってプログラム変更が可能なゲートアレイである。基板上に入力および出力が配線層に接続された複数の基本理論ゲートセルが配列されており、これらのつなぎ合わせによって論理回路を構築している[33]。

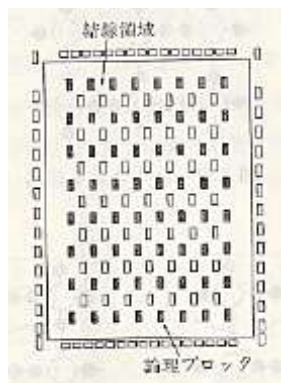


図 6.6 FPGA 方式

FPGA プログラミングおよび取り込みには、LabVIEW (National Instrument) を使用した。実際にデータを取得し、イメージングを行うには、各測定スポットにおいて、2 系統の MEMS 駆動信号および SHG フォトンカウント数の 3 信号の同時取得が必要となる。FPGA ボードとして、NI PCI-7831R R シリーズマルチファンクション RIO (National Instruments 社) を使用した。ボード上で動作する FPGA.VI では、3 信号は全て TTL として入力される。そのため、デジタル信号として処理することが可能である。二つの駆動信号は 1 か 0 で取得され、フォトンカウントは VI 内に作成したカウンターによりカウントされ、サンプリングクロック時の総カウントが FPGA 内の FIFO (Fast In Fast Out) に格納される。ここで問題となるのが、単位時間あたりのサンプリング数が非常に多くなることによる DMA 転送の際のタイムアウトである。FPGA ボードとホスト間の DMA 転送においてタイムアウトが発生しないようにしなければ取得した信号にエラーや遅延などが発生してしまい、計測が不可能となってしまふ。そこで、取得信号を TTL 入力(矩形波)にしたことを活かして、立ち上がりのタイミングのみを転送するようなプログラムを作成した(付録 1)。模式図を図 6.7 に示す。通常、サンプリングの度に連続したデータを取得する。しかし、本プログラムはデータ数削減のため、TTL 入力の図 6.7 に緑色で示された立ち上がりのタイミングのみを取得する。これにより、通常は取得されてしまう中間のデータを削減することができ、データ数(容量)を圧倒的に減らすことができる。ここで取得されたデータは、立ち上がりタイミングのみであるので、後処理として、サンプリング間隔と立ち上がりタイミングから必要となる周期(周波数)や位相の情報を計算により求めることができ

る。

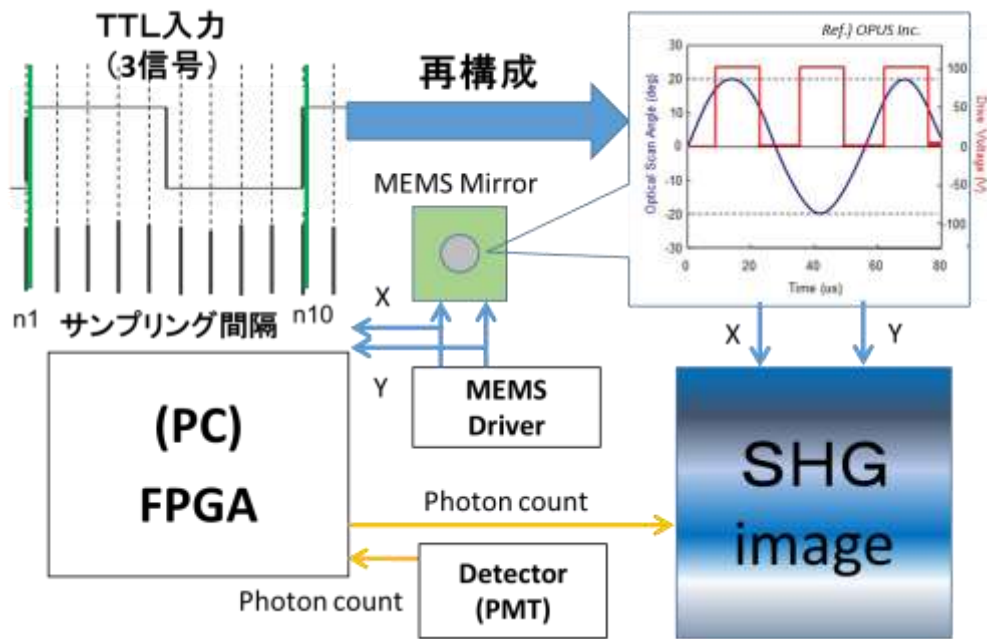


図 6.7 データ取得および処理の模式図

次に、取得したデータを処理し、イメージとしてグラフ化する必要がある。リサーチスキャンは図 6.5 でも示したとおり、2 軸の正弦波に対応した不規則な軌跡を描くため、従来の再構成法では、イメージングが不可能である。そのため、位置情報を取得し、イメージとなるように強度情報をピクセルインデックスへと正しくマッピングする必要がある。また、リサーチスキャンには厳密な 1 スキャンの概念はなく、同じピクセルを数回かつピクセルごとに異なった回数通過するため、従来どおりのデータ取り込みではイメージングが不可能である。そこで、リサーチスキャンの軌跡をマッピングするアルゴリズムを構築した。例えば、 $256 \times 256$  ピクセルで取得する場合は、MEMS ミラーから高速軸および低速軸のそれぞれ振れ角に相当する電圧信号を取得する。その情報から 2 次元平面上の位置情報を算出し、ピクセル毎に割り振る。ここで注意するのは、全てのピクセルで一様にスキャンされるラスタースキャンと異なり、リサーチスキャンではピクセル毎にスキャン頻度にムラがある点である。具体的には、中心付近では頻度が高くなり、周縁部では頻度が低くなる。そこで、総 SHG カウント数(強度情報)にもピクセル毎にムラが発生するため、総計ではなく、スキャン頻度で規格化された平均値を用いる必要がある。また、フォトンカウンティング特有の事情として、累計カウント数を取り込んで、その差分より各ピクセルのカウント数を取得するので、各データ取込タイミングは隣接したピクセルである必要がある。MEMS ミラーの駆動信号を同時に取り込み、その電圧情報を座標(位置情報)の変換に用いた。取得した駆動信号に、正の値のみのピクセル数に対応する 0~255 の値をとるように定数をかけた。さらにこれをピクセルの列番号および行番号に対応させるた



めに整数化する必要があるため、最も近い整数 (0,1,2,...255) になるように丸め込みを行った。以上より、ピクセルの列番号および行番号に対応するは、

$$x_n = 128 + 128\sin(2\pi f_x n\Delta t)$$

$$y_n = 128 + 128\sin(2\pi f_y n\Delta t)$$

として、256\*256 の各ピクセルにマッピングされる。ここで、 $\Delta t$  はサンプリング間隔、 $x_n$ と  $y_n$  はn個サンプリング時のピクセルインデックスである。ファンクションジェネレーターの仮想信号を取得し、位置情報からピクセル毎の通過回数を図 6.8 に示す。駆動信号にはそれぞれ、221Hz および 13.5Hz の周波数の正弦波を用いた。カラーバーは通過回数が 0 回から大きくなるにつれて、青から緑に変化し、しきい値付近で赤色、またそれ以上の値は白く表示される。サンプリングクロックは 120kHz, 1000,000 データ取得した。通過回数の少ないときは、リサージュ軌跡が確認できる(図 6.8(a))。回数が増加すると共に、全ピクセルがリサージュスキャンにより埋め尽くされ、図 6.8(b)のような通過回数のムラが出現する。このグラフからもわかるように、通過回数はエッジでは多くなり、中心ほど少なくなる。通過回数では、通過するたびにカウントを 1 だけ追加していくが、SHG イメージを取得する際は通過ピクセルの SHG フォトンカウント(強度)を加算していき、最後にピクセル毎の通過回数で割り平均化することにより、実際のコントラストを再現することが可能となる。

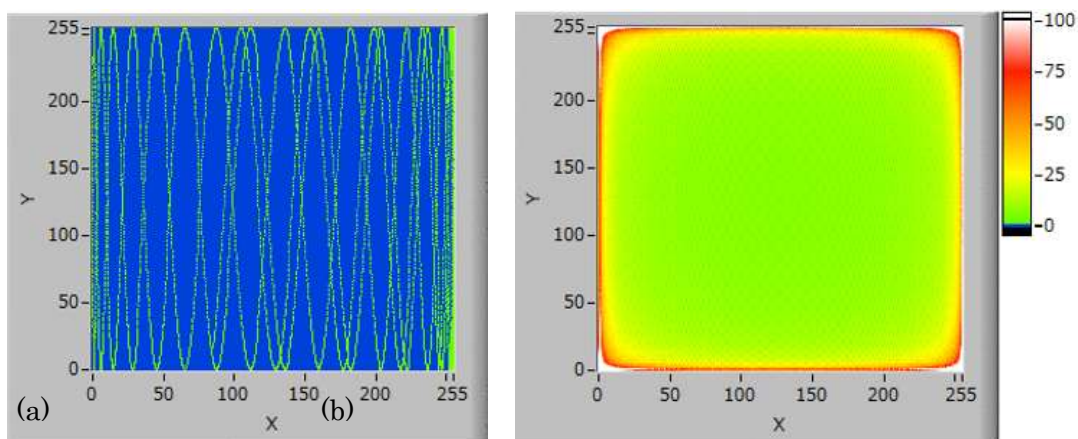


図 6.8 リサージュスキャンの通過回数増加の様子

FPGA で取得したデータから、SHG イメージを再構成するプログラムを作成し(付録 2), イメージングを試みた。セットアップを図 6.9 に示す。データ処理は、取得した駆動信号をリサージュスキャンに変換し、検出器から取得した信号をFPGA.VIで信号を取り込み、差分をとり、1ピクセル(1クロック)毎のフォトンカウント数をリサージュ軌跡にマッピングしていった。



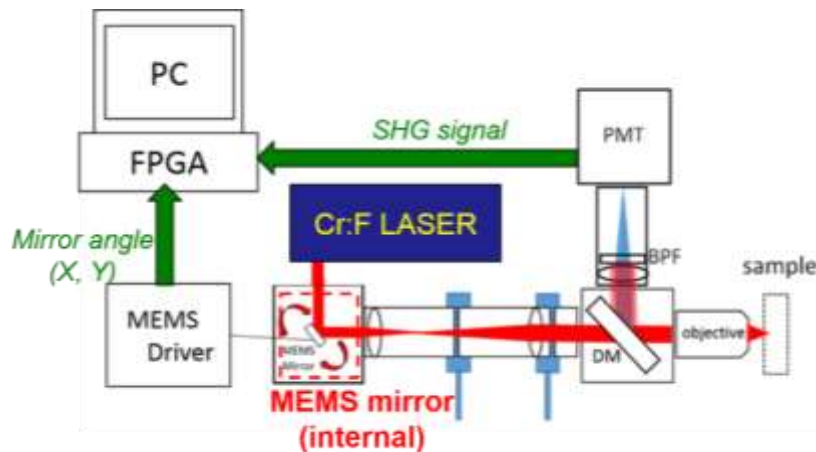


図 6.9 MEMS ミラーを用いたセットアップ

ここで、SHG イメージの再構成を評価するために、まず、従来系の SHG 顕微鏡の SHG イメージングにリサージュスキャンを用いることでイメージを取得した。ここで重要であるのが、イメージ内の位置情報のズレが十分に小さくなっているかということである。取得データから計算された位置情報は必ず誤差を含んでいる。SHG イメージングは  $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$  の領域を  $256 \times 256$  ピクセルに分割し、画像化しているため、位置情報のズレを最大でも 1 ピクセル以内 ( $1\mu\text{m}$  程度) に収めなければならない。そこで、ラスタースキャンとリサージュスキャンでの SHG イメージを比較することにより、再構成においてズレがないか確認を行った。従来系のシステムは、データ取得および処理に DAQ ボード (PCIe-6321 : National Instruments) を用い、ラスタースキャン (スキャン周波数 : 高速軸 140Hz および低速軸 0.5Hz) でイメージを取得している。一方、リサージュスキャンの軌跡は、高速軸スキャン周波数と低速軸スキャン周波数の比によって決定される。そこで、使用する MEMS ミラーのリサージュスキャン (スキャン周波数 : 高速軸 22kHz, 低速軸 1.4kHz) を再現するために、従来系でも実現可能で、かつ同等の軌跡を辿るような正弦波の駆動信号 (スキャン周波数 : 高速軸で 220Hz, 低速軸で 14Hz) をガルバノミラーにも与え、リサージュスキャンでの SHG 信号を FPGA データ取得により行った。DAQ ボードを用いた従来系のイメージは 2 秒で取得されており、40MHz のサンプリングクロックを有する FPGA ボードでは、その 2 秒分のデータに相当する 2000 万データを取得した。FPGA を用いたリサージュ再構成イメージは、従来イメージに見られる陰影の特徴を同様に反映はしているものの、全体的に粗いイメージとなっている。これは、SHG フォトンカウントのマッピングにおけるズレが 1 ピクセル内に抑えられていない可能性を含んでいることを示している。

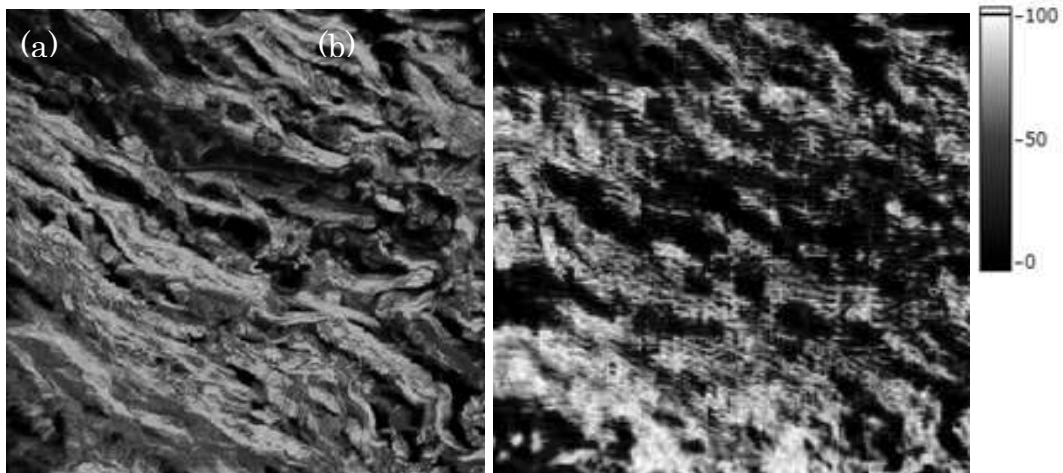


図 6.10 DAQ ボードを用いたラスタースキャン方式 SHG イメージ(a)および FPGA ボードを用いたリサージュスキャン方式 SHG イメージ(b)

実際の MEMS ミラーを用いたセットアップで取得したイメージを図 6.11 に示す。サンプルに SHG 発生効率の高いニオブ酸リチウム( $\text{LiNbO}_3$ )結晶を用いた。10mW のレーザーパワーで照射した。取得データ数は 30 万データで取得した。特徴的な構造などは確認できず、また、全体的に輝度値が低いため、これからは、SHG イメージが取得できているとは言えない。高速走査のため、1 ピクセル当たりのレーザー照射時間 (dwell time) が短くなる。そのため、1 ピクセル(1 クロック)間に発生するフォトン数も減少する。その結果、フォトンカウントをイメージ内に充填できず、かつフォトンカウント数が 1 ピクセル毎に少ないため、イメージのコントラストも十分に示せていない。そのため、SHG 信号の発生していない部分と SHG 信号が発生しているがフォトンカウントできていない部分の区別がついていない。特に、高速軸方向に対してその影響が大きく完全な再構成には至っていない。高速走査による低コントラストは、データの積算により改善できる可能性がある。しかしながら、図 6.10(b)の結果が示すように、SHG フォトンカウントのマッピングにおけるズレが 1 ピクセル内に抑えられていない可能性があり、このような場合は積算される 1 枚ごとのイメージにズレがあるということの意味するため、改善が期待できない。また、実際の MEMS ミラーを用いる場合は、MEMS ミラーのドライバーから駆動信号を読み取る必要があり、この処理の過程でさらなるズレが生じる可能性も否定できない。また、1 枚あたりの信号光が十分な強度を持っておらず、バックグラウンドノイズに埋もれていた場合も、積算によるイメージ改善は見込めない。このことから、現状では、MEMS ミラーと FPGA を用いたシステムでの SHG イメージの取得は達成できないと考えられ、他の手法を考える必要がある。

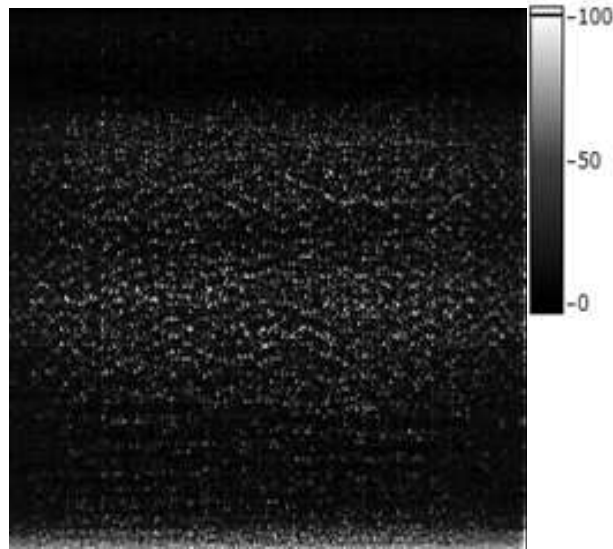


図 6.11 MEMS ミラーのリサージュスキャンで取得したニオブ酸リチウム SHG イメージ

### 6-3. ガルバノミラーを用いた手法

ガルバノミラー(サーボガルバノミラー)の構成および原理は、図6.12(a)[14]に示すように、数ミリ程度のサイズおよび厚さを有したミラーを、検流器(ガルバノメーター)に取り付けて走査する。静電容量式などの位置検出器が回転軸上に配置され、電気的なフィードバックにより制御されている。そのため、位置安定性に優れており、低速用途では特に大きな欠点がないため、レーザー顕微鏡においても広く使用されている。なお、共振ガルバノの構成もこれと似た構成であるが、図6.12(b)[14]に示されるように、長いトーションロッドに数ミリ角のミラーが取り付けられており、これらの共振によって高速走査(10kHz)程度での走査が可能である点で異なる。通常、ガルバノミラーは自由空間、ベンチトップの光学系で用いられるが、我々は構築したSHG顕微鏡に組み込みが期待できるガルバノミラー(GVSM002/M : Thorlabs Inc.)およびケージシステム(GCM002/M : Thorlabs Inc.)に着目した。

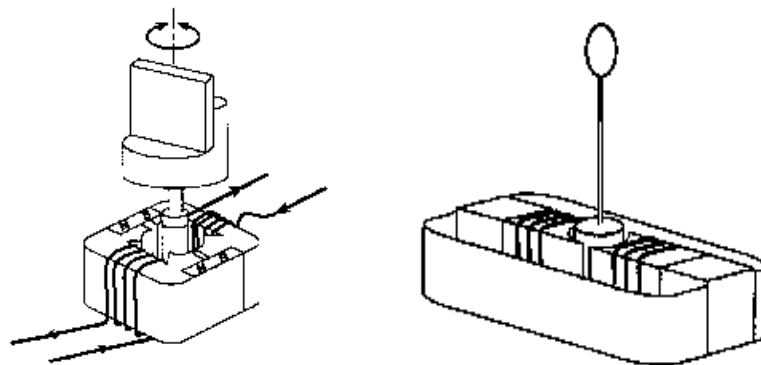


図6.12 走査ミラーの構成：(a)サーボガルバノミラーおよび(b)共振ガルバノ

#### 6-4. 基本特性評価

これを用いて、ヒト皮膚(上腕)の *in vivo* 計測を行い、従来の SHG 顕微鏡から取得したイメージとともに比較を行った(図 6.13)。比較のため、どちらの顕微鏡も対物後のレーザーパワーは 40mW、計測時間 2 秒で計測した。256×256 ピクセルの画像を取得するために、小型ヘッドを用いた SHG 顕微鏡では 300 $\mu$ m×300 $\mu$ m、従来顕微鏡では 400 $\mu$ m×400 $\mu$ m の測定領域でイメージングを行った。フォトンカウント 250 を最大値とし、1 ピクセル毎のフォトンカウントをグレースケールで表した。構築した小型ヘッドを用いた SHG 顕微鏡から 1 ピクセルあたり 200 以上のフォトンカウントを確認できた。従来の SHG 顕微鏡ではフォトンカウント 200 以上を目安にイメージングを行っていたため、小型ヘッド SHG 顕微鏡でも同等の光子カウントを実現した。イメージを比較しても、従来の SHG 顕微鏡と同等の性能を実現していることが確認できた。

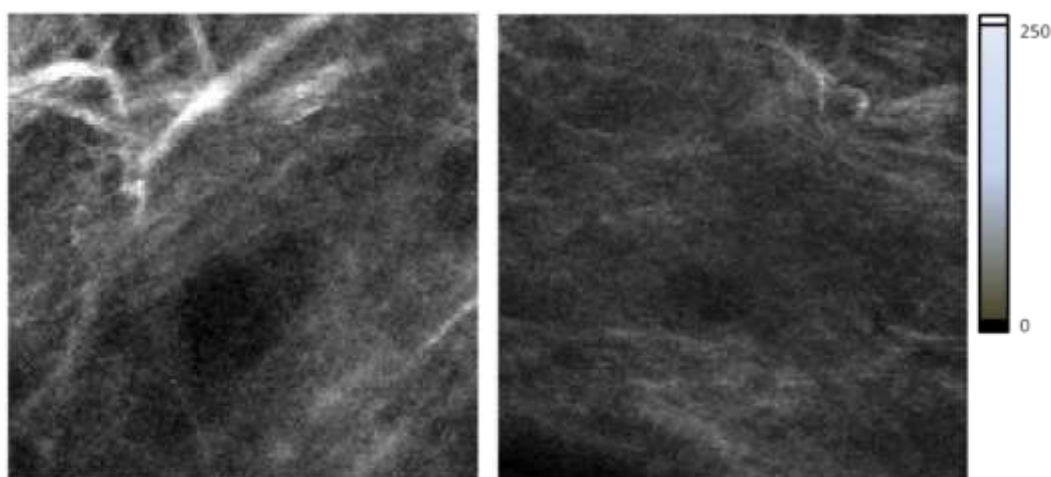


図 6.13 小型ヘッド SHG 顕微鏡(左)と従来 SHG 顕微鏡(右)のイメージ

次に、ガルバノミラーの駆動部分をケージシステムに組み込むことにより SHG 顕微鏡プローブを構築した。この SHG 顕微鏡プローブを用いた SHG 顕微鏡システムを構築した。これまでの小型 SHG 顕微鏡ヘッドにガルバノミラーを組み込みのケージを取り付けた。これにより、顕微鏡部が小型プローブ内にひとつに収められた(図 6.14)。また、セットアップ(図 6.15)は自由空間上で光源からのレーザー光をプローブに入射させたベンチトップの光学系となっている。

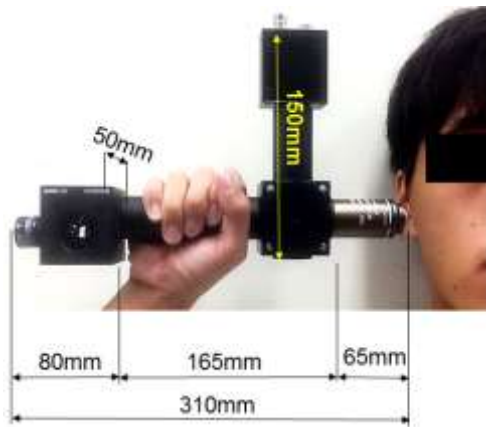


図 6.14 SHG 顕微鏡プローブ

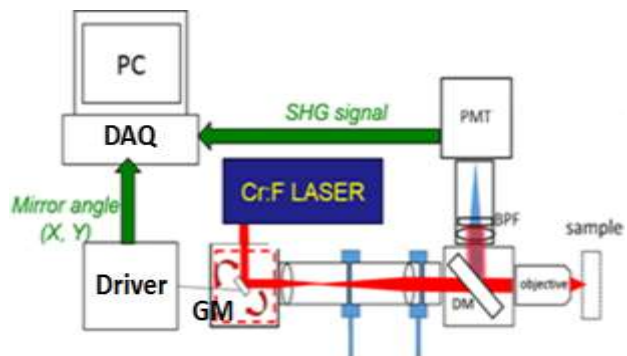
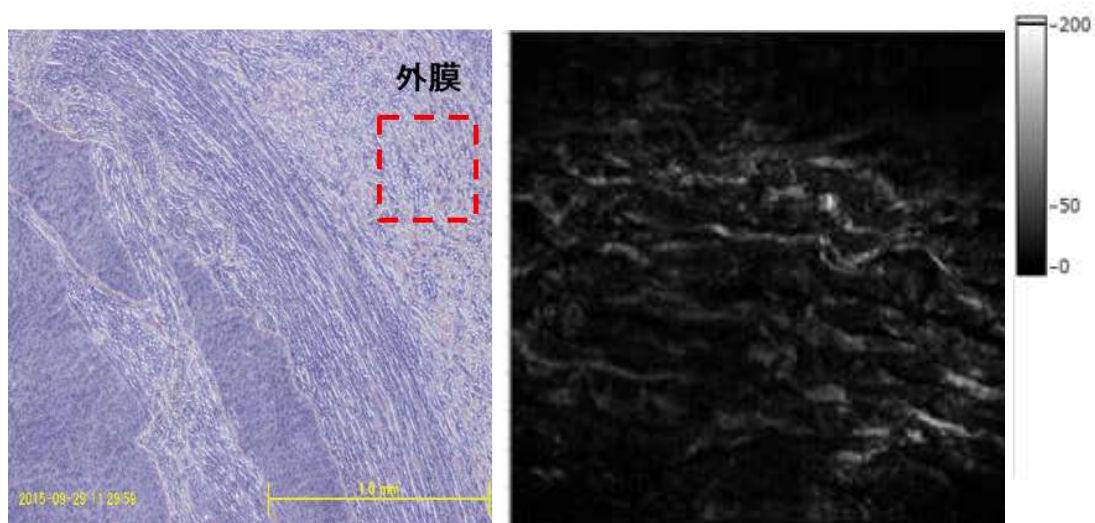


図 6.15 セットアップ

構築した小型プローブSHG顕微鏡の基本特性評価を行った。まず、切片サンプルを用いた計測を行った。サンプルにはヒト総腸骨動脈の輪切り切片を用いた。サンプルへの入射パワー(対物直後)は30mWに調整した。また、計測条件は従来系と同様に、計測時間2秒、 $400\mu\text{m}\times 400\mu\text{m}$ の測定領域でイメージングを行った。ヒト総腸骨動脈には、外膜と内膜にコラーゲンが存在し、それぞれ異なる構造を有する。まず、外膜のイメージを取得した。図6.16(a)の明視野画像の破線部には、おおまかなイメージング領域が示されている。外膜では規則的な構造や配向は見られない。SHGイメージ(図6.16(b))からも波打ったランダム配列のコラーゲン線維が確認された。

一方、中膜からは異なるイメージが取得された(図6.17)。サンプル側の手動ステージをイメージに対して水平方向に移動させ、中膜のイメージを取得した。図6.17(a)の明視野画像の破線部から、中膜では規則的で直線的な構造が確認できる。SHGイメージ(図6.17(b))のコラーゲン線維も同一方向に配列していることがわかる。

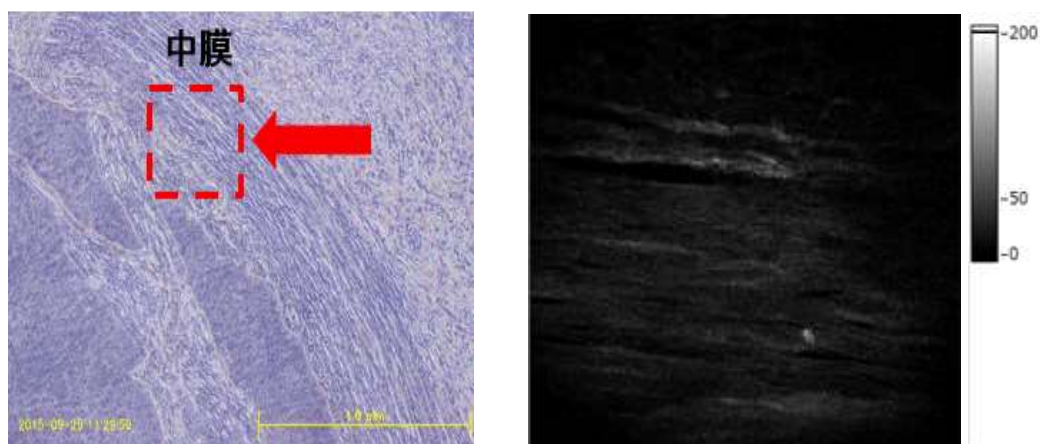


(a)明視野顕微鏡画像

(b)SHG イメージ

図 6.16 ヒト総腸骨動脈 外膜





(a)明視野顕微鏡画像

(b)SHG イメージ

図 6.17 ヒト総腸骨動脈 中膜

次に、ヒト皮膚 *in situ* 計測を試みた。サンプル台に腕を置き、上腕のイメージを取得した。なお、入射パワーは 30mW で、計測時間 2 秒、 $400\mu\text{m}\times 400\mu\text{m}$  のイメージ領域である。サンプル台をステージにより光軸方向に移動させ、深さの異なるイメージを取得した。まず、浅層では、真皮層上層の乳頭層特有の環状構造が見えた。さらに深いイメージ領域では、高強度の SHG 信号から、細かい線維状のように見えるコラーゲン線維が確認される。

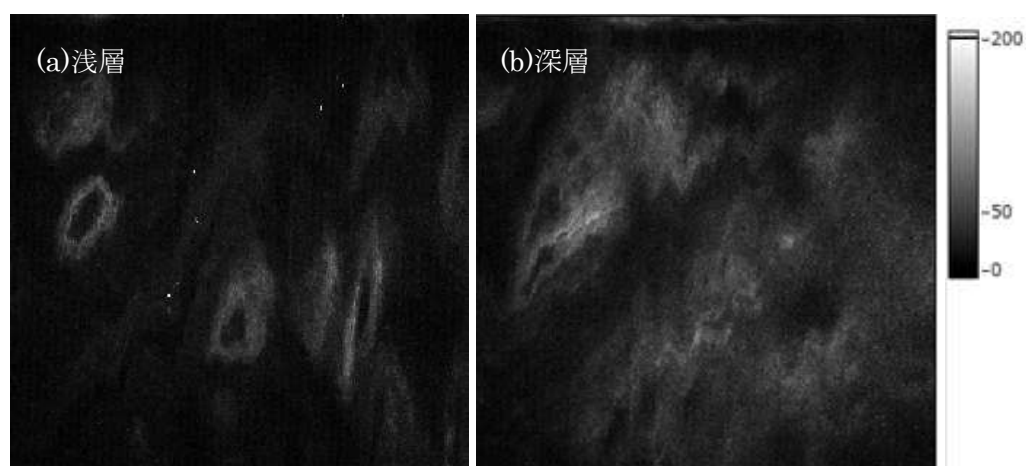


図 6.18 ヒト上腕 *in situ* イメージ

ベンチトップの構成では、被験者が計測部を顕微鏡部まで運ばなければならないため、被験者自身の微かな動きに影響され、イメージに歪みが生じている箇所が見受けられる。これは、被験者の計測時の負担が顕著に現れたものである。もし、5 章で行ったファイバーデリバリーの技術をこの小型 SHG 顕微鏡プローブに応用できれば、顕微鏡部可搬型の非常にフレキシブルな特徴を付与した SHG 顕微鏡の実現が期待される。

## 第7章 ヒト皮膚 *in situ* 計測への展開

### 7-1. 可搬型プローブSHG顕微鏡

5章で行ったPCFファイバーデリバリーの技術と6章で構築された小型SHG顕微鏡用プローブを組み合わせることにより可搬型プローブSHG顕微鏡を開発した。これにより、顕微鏡部可搬型の非常にフレキシブルな特徴を付与したSHG顕微鏡が実現された。図7.1に開発した可搬型プローブSHG顕微鏡のセットアップを示す。モード同期Cr:F レーザー光は、レンズを用いてラージモードエリア・フォトニクス結晶ファイバー(PCF, コア径25 $\mu\text{m}$ , 長さ75cm)に入射される。レーザー光はPCFを伝播した後、利用効率30% (約70mW) で小型SHG顕微鏡プローブに導かれる。プローブ内のガルバノ走査ミラーで反射後、リレーレンズ対とダイクロイックミラー (DM) を通過し、油浸対物レンズ (NA=0.9, WD=350 $\mu\text{m}$ ) で試料上に集光される。サンプルから後方散乱したSHG光はDMで反射され、バンドパスフィルタ (透過波長=625 nm) で抽出された後、フォトンカウンティング型光電子増倍管 (PMT) によって検出される構成となっている。このセットアップを用いて、ヒト皮膚 *in situ* 計測への応用を試みた。なお、ヒト皮膚 *in situ* 計測の実験に先立ち、徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部研究倫理委員会の承認(#14003)を得た。

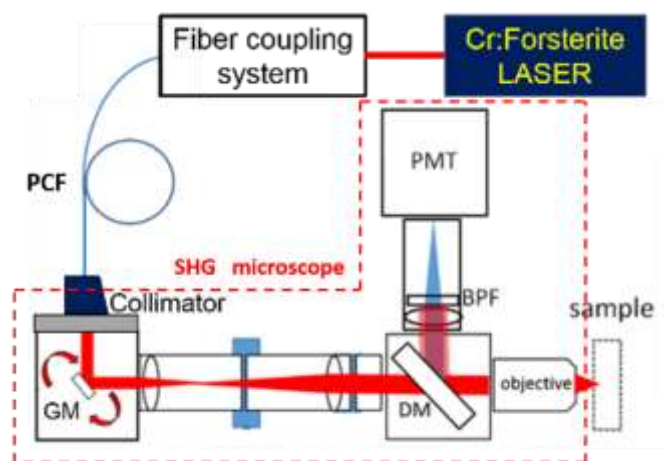


図 7.1 セットアップ

### 7-2. ハンドヘルド計測

従来のSHG顕微鏡でヒト *in situ* 計測を行う場合、アタッチメントおよび計測台を含むインターフェイスに、被験者が自ら計測部を移動させる必要があった。従来の顕微鏡はベンチトップの構成であるため、被験者もその位置や形状に合わせた体勢をとらなければならなかった(図7.2)。これは明らかに被験者への負担となっていた。体勢が整わない、体勢を



保ったまま静止できないといった場合には、計測時間中の動きがイメージの歪みなどを引き起こし、計測自体にも悪影響を及ぼすこともあった。

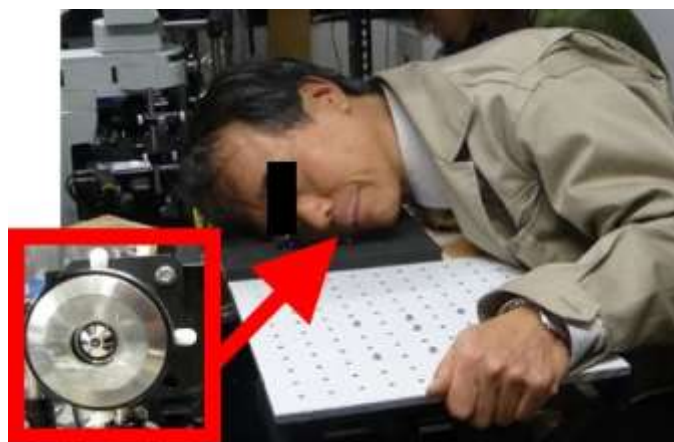


図 7.2 従来系の計測風景

可搬型プローブ SHG 顕微鏡は、そのフレキシブルな構成から測定時に被験者の負担を軽減し、上記の問題を解決することが期待される。まず、ヒト *in situ* 計測を行うにあたり必要となるインターフェイスの作成を行った。可搬型プローブのフレキシブルな特徴から、インターフェイスの位置や形状は、SHG 顕微鏡システムの構成に依存しない。また、プローブが可搬である領域内であれば、自由な位置に計測台を固定し、イメージングを行うことが可能である(図 7.3)。プローブ可搬のフレキシブルな特徴は、新規性のある計測を実現させる。そのひとつがハンドヘルド計測である。従来の自由空間光学系のベンチトップ SHG 顕微鏡では、計測部を顕微鏡まで運ばなければならなかった。しかし、ハンドヘルドを行うことで、計測部がプローブの稼動域(PCF 長に依存)の範囲にあれば、顕微鏡部を計測部に運ぶことで計測が可能となる。プローブをヒトの頬へ運ぶことによりイメージングを行った。計測風景の例を図 7.3 に示す。安定のために、アゴ置き台に頭を置くが、特別な固定などは一切不要であり、被験者にとって無理の無い体勢で計測を行うことが可能である。また、従来の計測では、計測部がアタッチメントで隠れることで正確な測定部位を判断するのが困難であった。一方、この可搬のプローブを用いた計測では、計測したい部位を特別なマーカーなしに計測することが期待できる。

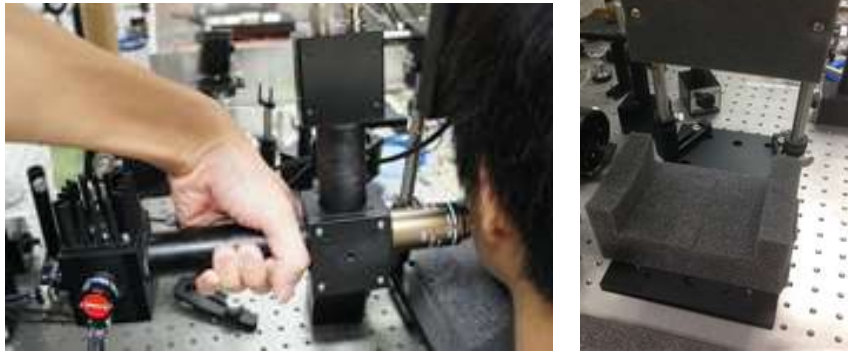


図 7.3 計測風景(左)およびアゴ置き台(右)

なお、この計測では対物レンズを測定部位に直付けして計測を行う。そこで問題となるのが、焦点位置の問題である。使用する油浸対物レンズの動作距離(WD)は、 $350\mu\text{m}$  である。表皮から  $350\mu\text{m}$  の領域は真皮コラーゲンが存在する領域ではあるが、従来の計測では、この深さでの観測は困難であった。その理由は、対物レンズからその焦点(ガラス・空気・生体組織)の間における散乱・吸収・屈折率ミスマッチングが挙げられる。散乱や吸収は解決困難な問題であるが、屈折率ミスマッチング(図 7.4)は、対物レンズから焦点が結ばれるまでの間にあるそれぞれの物質の屈折率が異なる場合に生じる。図 7.4 の右側では、液浸(ここでは油浸)により、屈折率がマッチングされ、対物レンズを通る光は通常の NA を保ったままサンプルに照射されるが、左側のように屈折率差が生じている場合は、レンズを出た光は屈折し、中心軸側に曲がってしまう。また、傾きの大きい成分は、レンズと空気の境界で全反射を起こしてしまう。これは、実際の開口(NA)をいっばいに用いていないことを示し、コントラストの低下などが生じる。

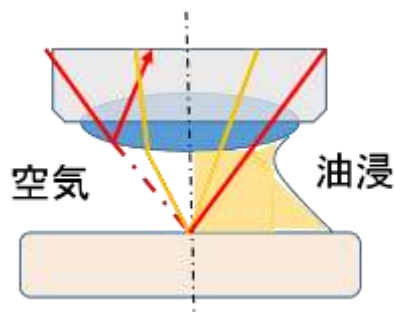


図 7.4 屈折率ミスマッチングの概略図

油浸対物レンズとカバーガラス(いずれも屈折率 1.515)の間は、イマージョンオイル(屈折率 1.5)を使用する。一方、カバーガラスと皮膚の間(図 7.5 : ②)には、グリセリンを用いた。イマージョンオイルの代わりにグリセリンを用いた理由は、生体に安全で、グリセリンが皮膚に浸透することで(図 7.5 : ③)、屈折率ミスマッチングが軽減されると考え

られるからである。ここでは、グリセリン水溶液(グリセリン P, グリセリン (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) 84.0~87.0%含有：ケンエー社、屈折率 1.47)を用いた。通常、肌荒れなどの治療といった医療用途に使用されるため、人体の影響も少ない。

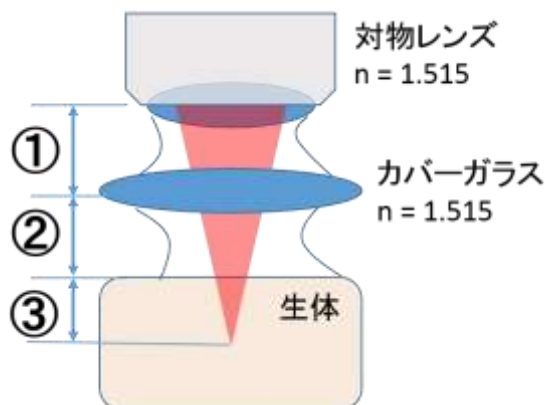


図 7.5 液浸の様子

ハンドヘルド計測により取得した SHG イメージを図 7.6 に示す。なお、ここでは、グリセリンの効果を示すために、ほとんど同一部位で計測したイマージョンオイルで液浸し取得した SHG イメージも示す。ここで、入射パワーは 30mW、計測時間 2 秒、400 $\mu$ m $\times$ 400 $\mu$ m のイメージ領域である。イメージ比較から、ヒト皮膚 *in situ* 計測では、生体組織内の屈折率マッチングの点でグリセリンを液浸として優れていると言える。また、グリセリンを用いたイメージでは、皮膚に浸透したグリセリンによる皮膚組織内の屈折率のマッチングにより高コントラストが実現され、ヒト頬の真皮コラーゲン様子や毛穴などの構造を観察することができる。これより、ハンドヘルドでのイメージング取得に初めて成功した。

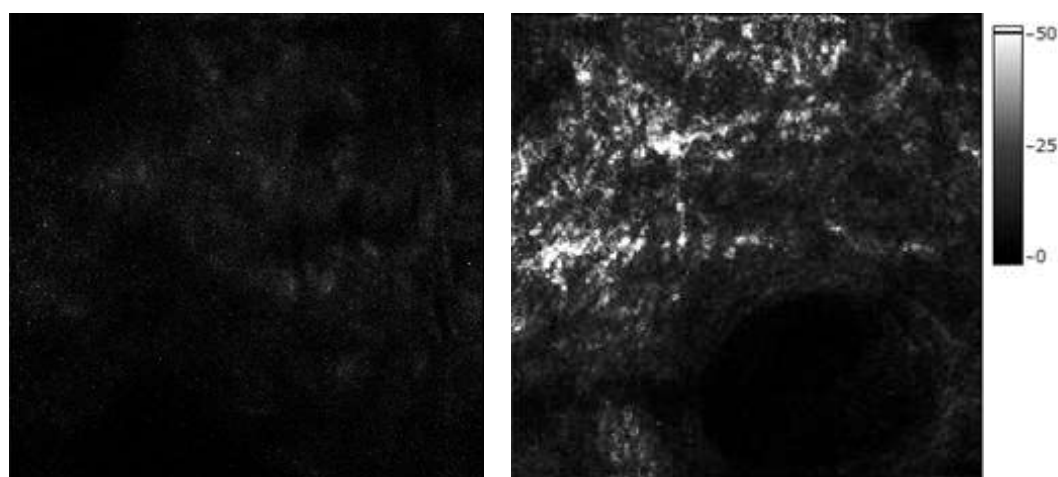


図 7.6 ヒト頬皮膚のハンドヘルド計測 SHG イメージ  
液浸：イマージョンオイル(左)およびグリセリン水溶液(右)

### 7-3. 大面積イメージング

このシステムを用いて大面積 SHG イメージを取得した。大面積 SHG イメージの際は、可搬型プローブは 3 軸に組み立てられた機械式ステージに取り付けられる(図 7.7)。イメージ 1 枚あたりの計測時間 2 秒で、測定領域  $400\mu\text{m}\times 400\mu\text{m}$ ( $256\times 256$  ピクセル)の SHG イメージを 1 枚取得し、機械式ステージでイメージ領域分(ここでは  $400\mu\text{m}$ )だけ、縦(Y)ないし横(X)方向に移動させていくことにより、空間的に連続した大面積 SHG イメージを取得する。なお、ここでは縦横 4 枚 $\times$ 4 枚の計 16 枚(イメージ領域は  $1.6\text{mm}\times 1.6\text{mm}$ 、ピクセル数は  $1024\times 1024$ )のイメージが取得された。イメージ取得時間は計 32 秒となる。機械式ステージは、1 ステップあたり  $2\mu\text{m}$  移動するため、1 枚取得ごとに 200 ステップを与えた。

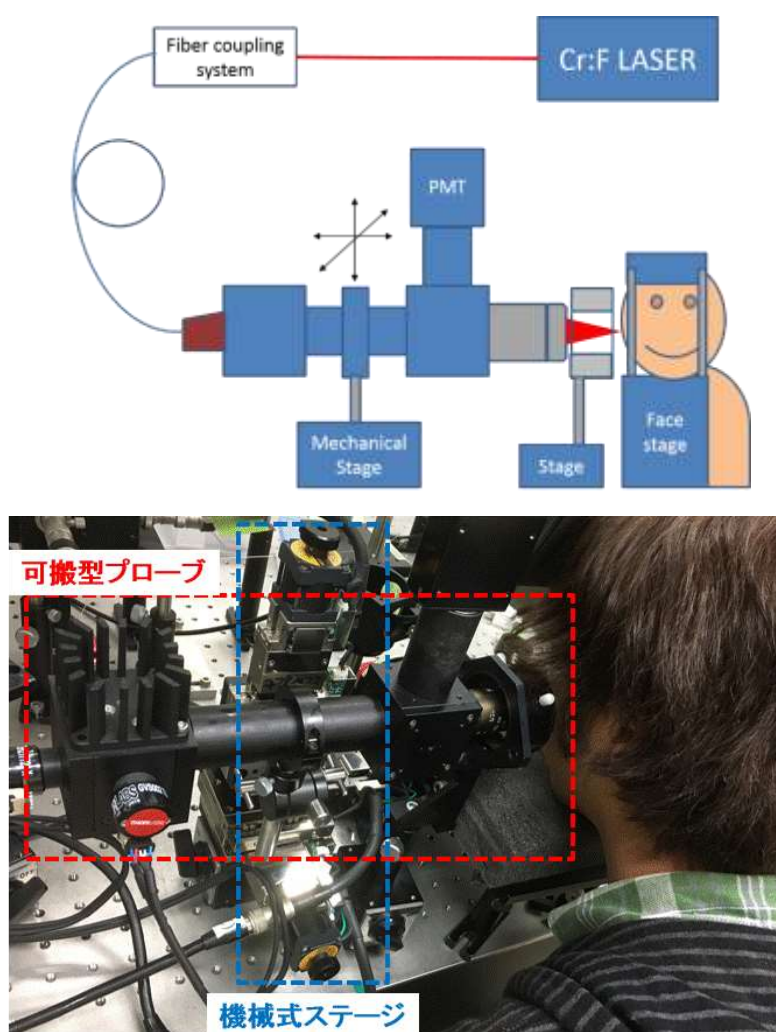


図 7.7 セットアップの模式図および計測風景

まず、腱の切片サンプルのイメージを取得した(図7.8)。腱へは、対物後は10mWのパワーを入射した。イメージ同士のつながりから、大面積のイメージの再構成に成功していることが確認できた。これより、1枚のイメージだけでは、わからなかったコラーゲン線維同士のつながりや、線維の粗密の分布が確認できる。また、左上に見える歪みおよび穴は、以前の計測にサンプルが受けた熱変性および熱ダメージを反映したものだと考えられ、外部ダメージにより構造の変化が可視化されているとも言える。

次に、ヒト頬皮膚の大面積SHGイメージ(図7.9)の取得を行った。入射パワーは30mWであった。なお、本計測では、対物レンズ/カバーガラス間にイメージジョンオイルを、カバーガラス/ヒト頬間にグリセリン水溶液を用いている。ヒト頬皮膚では、腱に比べ、密でランダム配高なコラーゲン線維が確認できる。コラーゲン線維の太さもまちまちであり、皮膚特有の毛穴などの特徴的な構造も確認できた。大面積イメージングは、1枚のイメージ領域内に収めることの出来ない構造を可視化できるだけでなく、広い領域を一度に取得できることから、ターゲットをイメージ領域内に納めることができる。

また、この結果は開発した可搬型プローブSHG顕微鏡が、従来のヒト *in situ* の応用計測にも適用可能であることを示している。

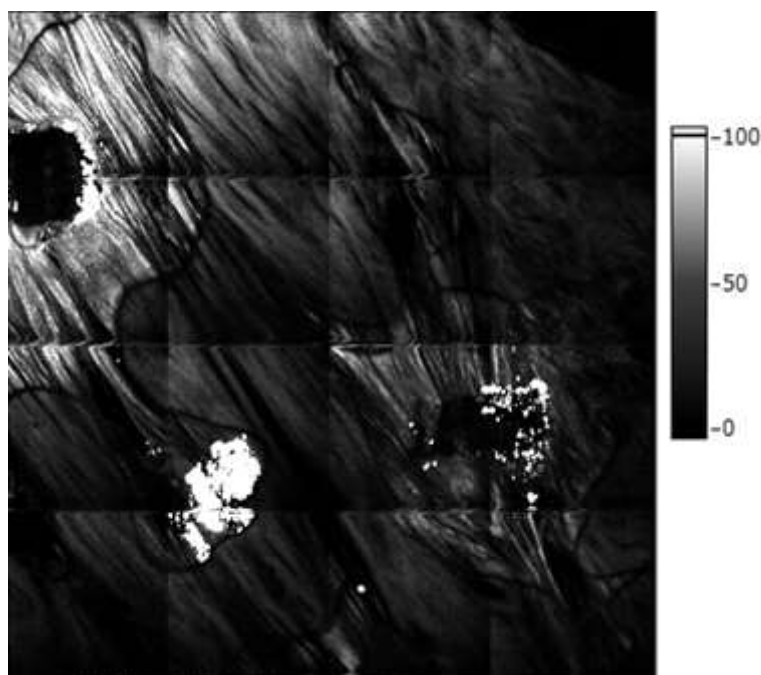


図 7.8 腱切片サンプル大面積イメージ

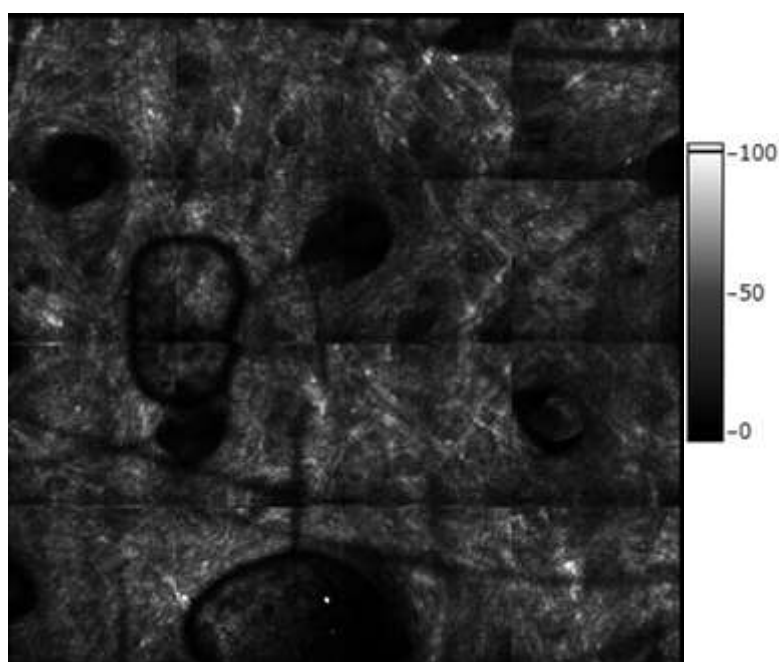


図 7.9 ヒト頬皮膚の大面積イメージ

#### 7-4. 深さ分解イメージング

このシステム(図7.7)では、深さ分解SHGイメージも取得できる。深さ分解SHGイメージは、計測時間2秒で、測定領域 $400\mu\text{m}\times 400\mu\text{m}$ ( $256\times 256$ ピクセル)のSHGイメージを1枚取得し、機械式ステージを用いて任意の深さ間隔(ここでは $20\mu\text{m}$ )だけ、Z軸(光軸)方向に変位を与えていくことにより取得される。空間的に連続した深さごとのSHGイメージを取得する。深さ分解の計測は、厚みを有するサンプル(ブロックサンプルやヒトや動物の皮膚など)の計測において重要な意義をもつ。ヒト頬皮膚で *in situ* 深さ分解イメージングを行った(図7.10)。機械式ステージは、1ステップあたり $2\mu\text{m}$ 移動するため、1枚取得ごとに10ステップを与え、 $20\mu\text{m}\times 10$ 枚の計 $200\mu\text{m}$ の深さで分解を行った。イメージ取得時間は合計で2秒 $\times$ 取得枚数(ここでは計20秒)となる。なお、ここでも大面積イメージングを同様に、対物レンズ/カバーガラス間にイマージョンオイルを、カバーガラス/ヒト頬間に、グリセリン水溶液を用いた。この深さ分解イメージから、SHG信号がわずかに観測された $20\mu\text{m}$ から浅層( $\sim 100\mu\text{m}$ )では、SHG信号は低信号であり、細いコラーゲン線維のようなものが見えるが、はっきりとしたものは確認できない。一方、深層では、コラーゲン線維の太さもまちまちであり、特に、太いコラーゲン線維からは高強度(光子カウント100程度)のSHG信号が確認された。ここで重要なことは、 $200\mu\text{m}$ の深さを連続でイメージングできることであり、グリセリンの効果で比較的深層である $200\mu\text{m}$ でも、SHG信号の低下は見られなかった。これにより、1枚のイメージでは確認不可能であった深さごとの構造変化や、イメージ領域内に存在する組織・構造がどの深さからどの程度の深さまで存在しているかといったことを推測することができる。



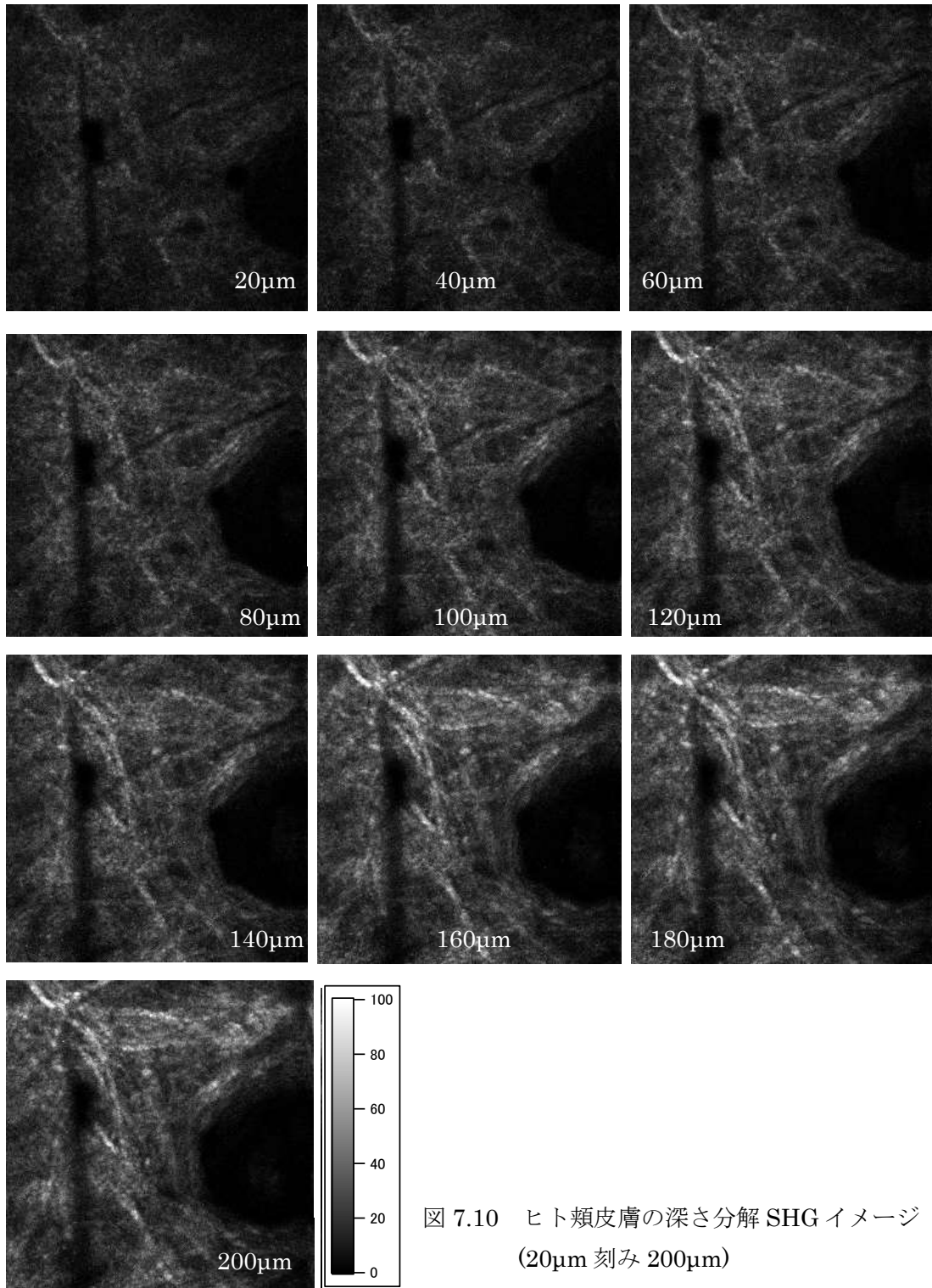


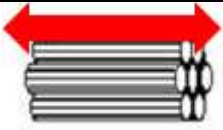
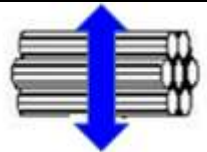
図 7.10 ヒト頬皮膚の深さ分解 SHG イメージ  
(20μm 刻み 200μm)



## 7-5. 偏光分解イメージング

入射レーザー光が直線偏光である場合、SHG発生効率は、コラーゲン線維配向に大きく依存する（表7.1）。例えば、両者が偏光な場合は強いSHG光が観測され、両者が直交する場合にはSHG光が弱くなる。したがって、偏光分解イメージングは、コラーゲン線維配向の定量的評価に有用である。

表7.1 コラーゲン線維におけるSHG発生の偏光依存性

線維配向における 入射偏光		
SHG発生強度	<b>強</b>	<b>弱</b>

このような配向性をもったコラーゲン線維の定量評価の手法として、以前、我々は $\alpha$ イメージという手法が提案している。この手法で用いられる $\alpha$ 値は、垂直偏光と水平偏光のレーザー光入射により発生したSHG強度をそれぞれ、として、SHG偏光異方性は、

$$\alpha = \frac{I_V - I_H}{I_V + I_H} \quad (7.1)$$

と定義される。この $\alpha$ 値は、コラーゲン線維配向を反映し、垂直方向の配向が優位である場合、この値は正の値をとり、水平方向の配向が優位な場合は、負符号をとることになる。垂直および水平偏光を、それぞれ入射することで取得された双方のSHG信号(光子カウント)は、SHGイメージングの際の対応するピクセルにおいて、各ピクセル毎に計算され、 $\alpha$ 値が算出される。また、この手法では算出された $\alpha$ 値の結果から、正(垂直)の成分は青色に、負(水平)の成分は赤色のカラースケールとして各ピクセルにマッピングすることで、 $\alpha$ イメージとして可視化することも可能である。これより、コラーゲンの線維配向を $\alpha$ イメージから定量的に評価できる。この手法を、上記で示した腱サンプルのSHGイメージに適応した。式(7.1)に対応するように、偏光角 $0^\circ$ （水平方向）におけるSHGイメージの各ピクセルの値を $I_H$ 、 $90^\circ$ （垂直方向）におけるSHGイメージの各ピクセルの値を $I_V$ とした。式(7.1)により、 $\alpha$ 値が算出され、各ピクセルにマッピングすることで $\alpha$ イメージとした。これを、上記の水平方向固定(図7.11(a))および垂直方向固定(図7.11(b))の腱のデータに適応し、画像化した。PCF入射前に $\lambda/2$ 板を置き、偏光の方位をPBSにより水平方向の最も強い角度を $0^\circ$ に設定し、そこから $\lambda/2$ 板を $45^\circ$ （偏光角は $90^\circ$ ）回転させた。



図 7.11 腱の線維束の画像：水平固定のとき(a)および垂直固定(b)

サンプルには腱のブロックサンプルから解いた腱の線維束(図 7.11)を用いた。線維束の幅は $400\mu\text{m}$ であり、イメージ領域内をちょうど満たす大きさであった。はじめに水平方向に固定し、計測を行った。SHG フォトン(光子)カウントは偏光角によって変動が確認された。総光子カウントは水平方向付近で最大値をとり、垂直方向付近で最小値をとった。全体(総光子カウント)の最大値と最小値の比率 ((最大値) / (最小値)の値) は、1.35 であった(ノイズカウントの平均値：1205 (横向き配置) の水平直線偏光分解 SHG イメージ ( $I_H$ ) と垂直直線偏光分解 SHG イメージ ( $I_V$ ) を取得し、 $\alpha$  イメージを算出した。全体的に赤色(水平方向成分)のイメージとなっており、これは腱組織の高いコラーゲン配向性を反映している。

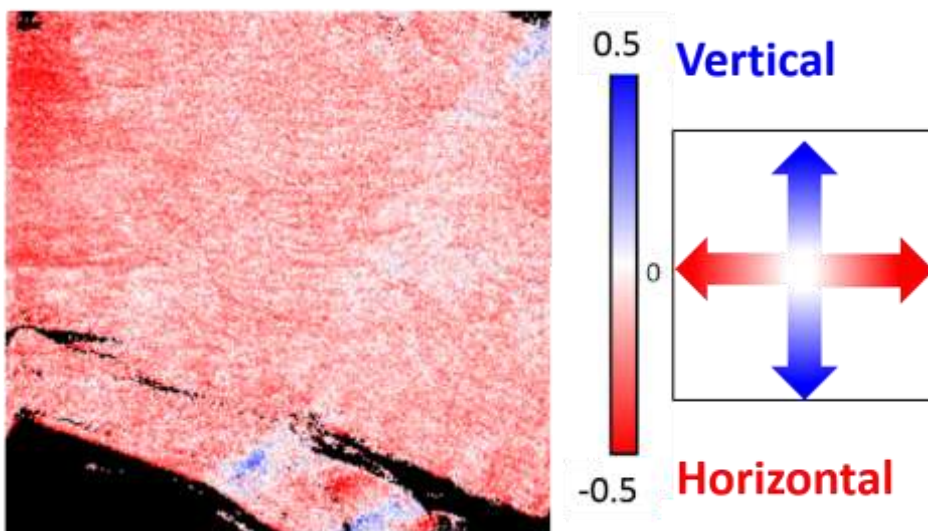
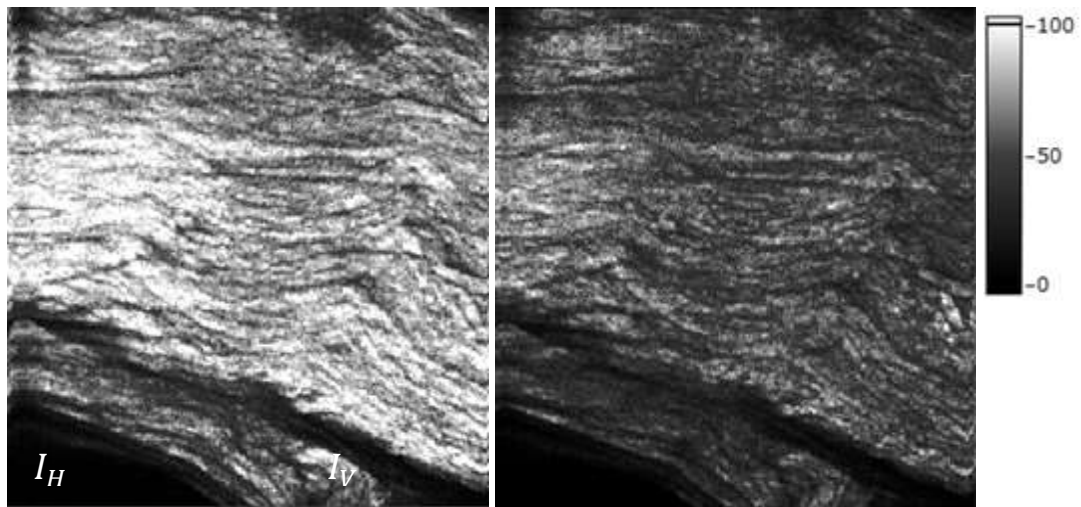


図 7.12 水平方向 SHG イメージ：水平入射，垂直入射および  $\alpha$  イメージ

一方，同じサンプルを縦向き配置にした場合，垂直方向に線維が配向している様子が見られ，対照的に  $I_V$  イメージが明るい．そのため， $\alpha$  イメージは全体的に青色(垂直方向成分)の強いイメージとなっている．これらの結果より，この計測システムは偏光依存性の有したサンプルに対して偏光解析イメージングも可能であり，コラーゲン線維の配向方向に対しても感受性をもっていると言える．

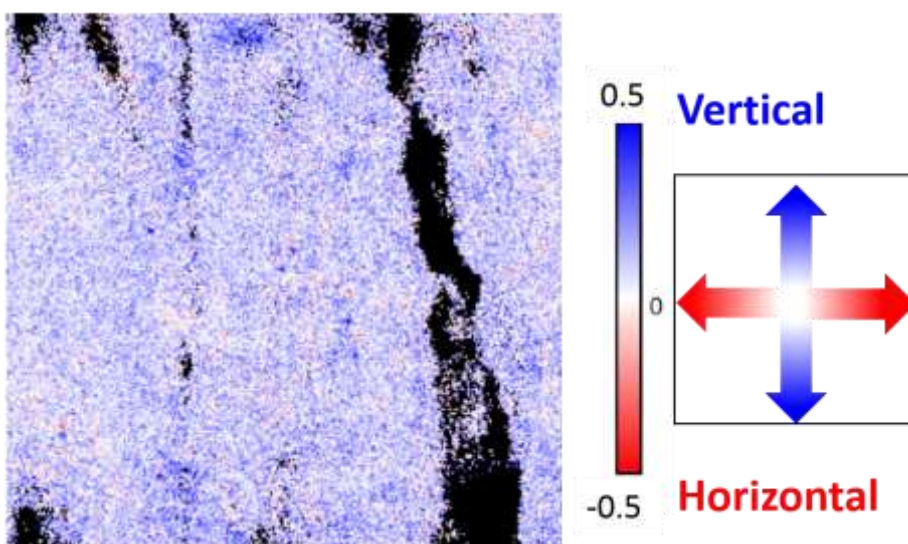
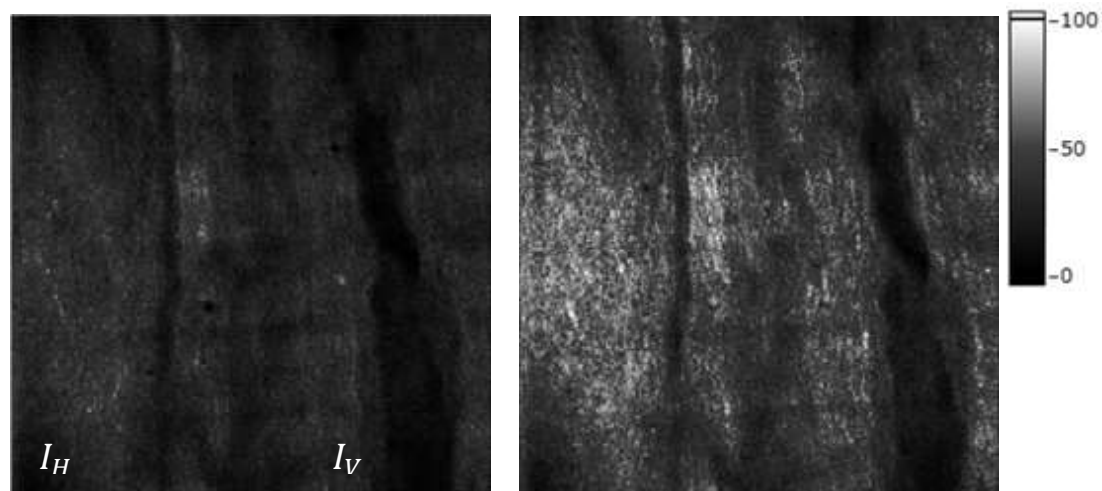


図 7.13 垂直方向 SHG イメージ：水平入射，垂直入射および  $\alpha$  イメージ

## 第8章 結言

SHG 顕微鏡は、その非侵襲性および真皮コラーゲン選択性から、皮膚計測や再生医療において新たな計測手段として活躍することが期待される。その反面、従来 SHG 顕微鏡の大型かつ複雑な自由空間光学系は臨床応用において解決の不可欠な問題である。加えて、我々の目標とするヒト皮膚 *in situ* 計測では、被験者の測定時における固定や拘束は、現実的に不可能であり、被測定部の移動や体勢維持などの負担が問題となる。

そこで、本研究では臨床応用実現に向け、小型・簡便・ロバスト・フレキシブル・メンテナンスフリーといった特徴を有した小型 SHG 顕微鏡の開発を行った。SHG 顕微鏡ユニットの小型化では、MEMS ミラーとガルバノミラーという 2つのアプローチにより、SHG 顕微鏡ユニットの小型化を試み、ガルバノミラーを採用することにより、SHG 顕微鏡ユニットを一体化したプローブを開発した。

次に、SHG 顕微鏡のフレキシブルな操作性を実現するため、光ファイバーによるレーザー光伝送をフォトンクス結晶ファイバー(PCF)技術を導入することにより、これまで困難とされた超短パルス光ファイバー伝播を実現し、その光学特性を評価した。その結果、スペクトル幅・パルス幅から超短パルス光ファイバー伝播で最も問題となる波長分散のほとんどないファイバカップリングに成功したことを示した。

最終的に、これらの技術を組み合わせることにより可搬型プローブ SHG 顕微鏡を開発した。これを用いてヒト皮膚の *in situ* 計測を行った。大面積 SHG イメージングおよび深さ分解イメージングでは、被験者が座って計測を行えるシステムを構築し、被験者の負担を大幅に低減することに成功した。また、SHG 顕微鏡部の可搬性によるフレキシブルな計測を実証するために、ハンドヘルド計測を行った。最後に偏光依存性を有したサンプルの偏光解析イメージングを実施し、水平方向および垂直方向への配向をもったコラーゲン線維の  $\alpha$  イメージングの取得にも成功し、偏光解析イメージングの可能性についても議論した。

ファイバーデリバリーによる顕微鏡部の可搬のフレキシブルな SHG 顕微鏡の開発は、皮膚計測機器において重要な技術革新といえる。将来の展望は、従来系では計測できなかった凹凸の存在する部位の計測や、偏光素子の組み込みなどを行い、臨床応用に向けたさらなる応用計測を行っていく。

参考文献

- [1] 高田邦昭, 斉藤尚亮, 川上速人, 「染色・バイオイメーjing実験ハンドブック」: 羊土社(2006)
- [2] 高田邦昭, 「共焦点顕微鏡活用プロトコール」: 羊土社(2003)
- [3] Medical photonics : オプトロニクス社(2010)
- [4] Investigative Ophthalmology & Visual Science March.**47**, 1216(2002).
- [5] T. Yasui, et, al., Appl. Opt.**48**, D88 (2009).
- [6] Stephen P. Morgan, Felicity R. Rose, Stephen J. Matcher,” Optical Techniques in Regenerative Medicine” : テイラー&フランシス社 (2013)
- [7] N. Morishige, et al., Journal of Cataract & Refractive Surgery.**32**, 1784(2006).
- [8] G. Deka, et al., Journal of Biomedical Optics.**18**, 061222 (2013).
- [9]H. Bao et al., Optics Express.**17**, 10098 (2009).
- [10] S. H. Chia, et al., OPTICS EXPRESS.**18**, 17382 (2010).
- [11] 清水 宏, 「新しい皮膚科学」第2版: 中山書店(2011)
- [12]伊藤 誠啓, 安井 武史, 福島修一郎, 荒木 勉, 山下 豊信, 國澤 直美, 高橋 元次, 「SHG (第二高調波発生光) 顕微鏡を用いた真皮コラーゲン線維分布の観察」光学 36(1) 35 (2007)
- [13] 水口國雄, 「最新 染色法のすべて」 (2011).
- [14] 藤田哲也, 「新しい光学顕微鏡 (第一巻)」 (1996).
- [15] M. Huzaira, et al., Journal of Investigative Dermatology.**116**, 846 (2001).
- [16] MEDICAL PHOTONICS No.1, オプトロニクス社
- [17] O. Babalola et al., Arch Dermatol Res.**306**, 1 (2014).
- [18] M. D. Cahalan, et al., Nature Reviews Immunology.**2**, 872 (2002).
- [19] 顕微分光法ーナノ・マイクロの世界を見る分光法ー, 日本分光学会, 講談社
- [20] 梅田倫弘, 川田善正, 羽根一博, 「ナノオプティクス・ナノフォトニクスのすべて」, フロンティア出版(2006)
- [21] S. Puschmann, et al., Proc. of SPIE.**8216**, 821608(2012).
- [22]S. Tang, Journal of Biomedical Optics.**14**, 034005(2009).
- [23]Y. Zhang, pnas.109, 12878 (2012).
- [24]小林喬郎, 「固体レーザー」, (2000)
- [25] I. Thomann, et al., APPLIED OPTICS.**42**, 1661(2003).
- [26] Y. Nagasawa, et al., Appl. Phys. B.**70**, S33 (2000).
- [27] 住村 和彦,西浦 匡則, 「解説 ファイバーレーザー-基礎編」 オプトロニクス社(2011)
- [28] 黒澤 宏, 横田光広, 「ファイバー光学の基礎」: オプトロニクス社(2003)
- [29] X. Zhou, et al., OPTICS EXPRESS.**16**, 7055(2008).
- [30] L. Liu, et al., OPTICS EXPRESS.**21**, 27088(2013).

[31] S. V. Kartalopoulos, “Optical Bit Error Rate: An Estimation Methodology 1st Edition”, (2004).

[32] 國枝博昭, 「集積回路設計入門」, コロナ社(1996).

[33] 池田哲夫, 「集積回路の基礎と応用」, 森北出版(2001).