微小部分における微小な複屈折変化の実時間検出

越 川 和 忠*・佐 藤 驍*

Real-Time Detection of Very Small Change in Birefringence at a Small Area

Kazutada KOSHIKAWA* and Takeshi SATO*

This paper is related to an optical measurement as a means of noncontact detection of a certain phenomenon observed in a birefringence change.

Here the matter of great concern is whether or not the measurement is eventually practical for use under given conditions.

The example presented here is the case of detecting a nerve excitation through a very small and relatively rapid change in phase-difference, say 10^{-5} rad in a few milliseconds, occurring in the small area of a nerve membrane during its activity.

First, an equation was derived to give a limiting condition among such parameters as the size of phase-difference, the bandwidth, the number of iterations and the output level of photodiode.

Then, measurements were carried out on a crab nerve through the polarizing microscope. And, an investigation was made on the dependence of signal detectability on the area under measurement.

1. はじめに

神経膜には非興奮時小さい複屈折が存在する。興奮すると、それがごくわずか（位相差にしてたかだか 10^{-5} ラジアンほど）変化し、活動電位とよく似た時間経過をたどる。この現象は、L. B. Cohen らにより定量的に明らかにされ¹⁾、その後も同種の研究が発展している²⁾。これらはいずれも興奮膜のミクロな動的構造をさぐる目的で行われている。

筆者らは、文献 1) を知って、この複屈折変化を興奮の有無を知る目的に利用できるかどうかに関心をもち³⁾。

一般に、調べようとする対象内で部分的に起こる状

態の変化を非接触的に検出したい場合、その変化が複屈折の変化を伴うならば、このように光学的に監視する方法をまず考えるであろう。

その方法で目的を達成できるかどうかは、複屈折変化の大きさや速さ、被検部の大きさ、繰返し測定可否、実時間測定の有無などの条件によって左右される。

たとえば、文献 1) では、変化波形を知ることが重要であったことから、試料（イカの巨大軸索）の少なくとも $90\mu\text{m} \times 2\text{mm}$ ほどの部分について繰返し測定を行い、数千回の加算平均によって、信号を得ている。

しかし、神経回路網内の部分的な興奮を検出する目的には、さらに小さい部分に起こる微小で比較的速い変化（パルス的で幅数ミリ秒ほど）の存在を、一過性の現象として実時間で検出できることが要求される。

複屈折現象をこのように対象の状態把握に利用した技法は、位相差やその変動が干渉縞やその移動として視覚的にとらえられるほど大きい場合には、光弾性法がある。しかし、ここで扱うような対象への一般的な応用は取残されているようである。

そこで、神経膜に限らず、複屈折変化に着目した検出方法の適用を検討するとき、このような条件間の関係がどのように効いてくるかを明らかにしておくことは有意義であると考ええる。

以下では、特に、複屈折の変化が微小なパルスである場合、このような測定で検出できる限界を与える条件間の関係を導き、カニの神経束の微小部分で行った例について報告する。

2. 複屈折と透過光強度

位相差変化を知るには、ふつう、偏光板間に試料を置き、光強度変化を測定する。

これを最も有効に行うには、偏光板の振動軸を互いに直交させ、それらの方向に対して試料の光軸が 45° をなすように置く。

* 電子技術総合研究所 東京都千代田区永田町 2-6-1

* Electrotechnical Laboratory, Chiyoda-ku, Tokyo
(Received October 19, 1976)

このとき、位相差 δ の被検部から光検出器受光面にはいる単位時間当りの光量(注1) F は、

$$F = F_0 \sin^2 \frac{\delta}{2} \quad (F_0: \text{比例定数}) \quad (1)$$

で表わされる。

また、 δ の十分小さい変化 $\Delta\delta$ に対する光量の変化 ΔF は、(1)式の微分で近似でき、

$$\Delta F = 2F_0 \cdot \sin \frac{\delta}{2} \cdot \cot \frac{\delta}{2} \cdot \frac{\Delta\delta}{2} \quad (2)$$

あるいは、

$$\Delta F = F \cot \frac{\delta}{2} \cdot \Delta\delta \quad (3)$$

となる。

3. 光検出器

光検出器として、ここでは、PIN形フォトダイオードを短絡モードで OP アンプと組合せたもの(Fig. 1)を用いた。可視光領域での光強度のミリ秒程度の変化を測定する場合、フォトダイオードは、量子効率が高い、動作範囲が広い、線形性がよい、小形である、取扱いがらくである、などの利点がある。

この検出器の受光面にはいる光量およびその変化を F , ΔF , 変換効率を μ とすると、光電流の直流分 i_L および変化分 Δi_L は、それぞれ、

$$i_L = \mu F \quad (4)$$

$$\Delta i_L = \mu \Delta F \quad (5)$$

である。

また、ノイズについては、つぎの関係式がよく用いられている。

$$\overline{\Delta i_n^2} = 2efi_L \quad (6)$$

$\overline{\Delta i_n^2}$: 電流ノイズの2乗平均値

e : 電荷 f : 帯域幅

実用上は、2乗平均値より、むしろ、尖頭値間の値

Fig. 1 Circuit of photodetector unit

(注1) 以後、表現を簡略にするため、'単位時間当りの光量'の意味で'光量'の語を用いる。

Δi_{pp} のほうが役立つ。その換算を、適当に選んだ係数 r により、

$$\Delta i_{pp} = r \sqrt{\overline{\Delta i_n^2}} \quad (7)$$

で行うと、ノイズによる変動の大きさは、結局、

$$\Delta i_{pp} = r \sqrt{2efi_L} \quad (8)$$

と見積ることができる。

4. 検出可能条件

目的の変化を検出できる限界のひとつの目安として、ここでは、対応する光電流の変化の大きさが、ノイズ電流の大きさに等しいときを探る。

また、 n 回の繰返し測定が許されるとすれば、加算平均を行うことにより、ノイズの大きさは、ほぼ、 $1/\sqrt{n}$ に減ると考えられる。

これらのことから、検出可能条件はつぎのように表わせる。

$$|\Delta i_L| \geq \frac{\Delta i_{pp}}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

(9)式に、(5)、(8)、(3)、(4)式の関係式を代入して整理すると、

$$|\Delta\delta| \geq \frac{r \sqrt{2ef/n} \cdot \tan \delta/2}{\sqrt{i_L}} \quad (10)$$

あるいは、

$$i_L \geq \frac{r^2 \cdot 2ef/n \cdot \tan^2 \delta/2}{\Delta\delta^2} \quad (11)$$

あるいは、

$$n \geq \frac{r^2 \cdot 2ef \cdot \tan^2 \delta/2}{i_L \cdot \Delta\delta^2} \quad (12)$$

を得る。

これらの関係式を利用することにより、たとえば、(10)式からは、定常位相差 δ の試料について光電流 i_L が得られているとき、帯域幅を f として n 回の加算平均によって検出する微小位相差変化 $|\Delta\delta|$ の最小値を見積ることができる。(12)式は、予想される $\Delta\delta$ の存在が明らかになるまでに必要なおよその繰返し回数を与える。

5. 光学的バイアスについて

(10)~(12)式に現われる変数のうち δ だけは、適当な位相差板をそう入することによって、任意に決めることができる。そこで δ の最適値について触れておく。

単に Δi_L を大きく取出す目的には、(2)式からわかるように、 $\delta/2 = 45^\circ$ とすればよい。このとき、背景光したがってノイズも増すため、限界が問題となる測定にも適切とは限らない。

(10)式に(4)、(1)式の関係式を用いて整理すると、

$$|\Delta\delta| \geq \frac{r \cdot \sqrt{2ef/n}}{\sqrt{\mu F_0}} \cdot \frac{1}{|\cos \delta/2|} \quad (13)$$

となるから、むしろ $\delta/2=0$ のときが最もよいことになる。

実際には、 δ が非常に小さくなると、これらの関係式の誘導にあたって無視してきた量が影響してくるため、0に近い値で最適値に達する（付録参照）。

しかし、 δ が小さいとき $\cos \delta/2$ はほとんど 1 であるから、(13)式で δ によるちがいは小さい。

したがって、試料にすでに小さい定常位相差が存在するとき、光学的バイアスによる最適化を図っても、実用上大きな効果は期待できない。

6. 測定例

実際の例として、カニの脚部神経束の興奮に伴う複屈折変化の場合を述べる。

神経束は、長手方向に光軸をもつば一様な複屈折体とみなすことができ、非興奮時定常的に存在する小さい位相差が神経インパルスの通過部分だけごくわずかに一時的に減少する¹⁾。(注2)。

ここでは、被検部を小さくしようとすると光量が少なくならざるを得ない(注3)ことから生じる検出限界を問題にする。

実験は、摘出した神経束（長さ 30 mm 前後、太さ 1 mm くらい）の偏光顕微鏡像（対物レンズは 10 倍）

Fig. 2 Schematic diagram of measuring system

(注 2) 波長による差は、可視光範囲ではほとんど認められない¹⁾。

(注 3) ここでは、被検部がほぼ一様に照らされているとし、被検部の大小とそこからの光量とが比例関係にあるとみなすことにする。

Table 1 Some specifications of photodetector unit

Name	LPD	MPD	SPD
Photodiode	PIN-10	(509-10)	PIN-020 A
Responsivity (peak)	0.3 $\mu\text{A}/\mu\text{W}$	0.4 $\mu\text{A}/\mu\text{W}$	0.42 $\mu\text{A}/\mu\text{W}$
Op Amp	OP-07 EJ	(built in)	142901
R_f	1 M Ω	10 M Ω	2 G Ω
C_f	200 pF	20 pF	—
Active area	125 mm ²	10 mm ²	0.2 mm ²
radio	1	0.08	0.0016

位置にフォトダイオード受光面を置いて測定した (Fig. 2)。

興奮は、神経束の一端を電氣的に刺激して起こさせ、他端でインパルスの到達をやはり電氣的にモニタした。

光源は、輝度が高く特にその変動のきわめて小さいこと (0.001% 以下) が要求されるため、直流点灯したタングステンハロゲン球 (24 V 150 W) を用い(注 4)、熱線をできるだけ除いてケーラー照明した。

受光面に対応する試料部分を被検単位とみなし、受光面積の異なる 3 種のフォトダイオードを比較のため用いた。他の部分を通る光の影響を減らすため、視野絞りを調節して、ほぼ目的の部分だけ照明した。

光検出器の諸元を Table 1 に、光検出器出力点でみた等価受光量とノイズの関係を Fig. 3 に示す。比較の便宜上、電流に換算して表わしてある。図中、○△□は実測値、一点鎖線は (8) 式で $f=700 \text{ Hz}$ (100~800 Hz) として r を測定曲線に合わせたものである (LPD で 4.4, 他は 4.0)。ノイズが正規分布的であるとすれば、この尖頭値を越える確率は 0.04 程度と計

Fig. 3 Relations between output current level and its fluctuation

(注 4) 実験用光源としてレーザーが入手しやすくなっている。しかし、強度変動は 2 桁ほど大きい。

Fig. 4 Comparison of waveforms measured on a crab nerve through (a-lower) LPD, (b-lower) MPD, (c) MPD ($n=60$), (d) SPD ($n=550$) and (e-lower) LPD (a certain phase plate inserted); the upper records in (a), (b) and (e) are action potentials.

算される。

同じ試料について各検出器で測定した波形を Fig. 4 に示す。各波形の左端が刺激時刻に対応する。(a), (b), (e) の上の波形はモニタした活動電位で、左端にみえる微分波形は刺激 (1 ミリ秒幅の方形パルス) のアーチファクトである。

(a) は、LPD によるもので、直径約 1.2 mm の比較的大きい部分から測っている。このときの定常出力 i_L に対して変化 Δi_L を Fig. 3 中で示すと、L 点になる。また、定常位相差は、 $\delta/2 \approx 14^\circ$ であった (セナルモン法, λ 546 nm)。

(3), (4), (5) 式の関係を利用して $\Delta\delta$ を計算すると、

$$\Delta\delta \approx 1 \times 10^{-5} \text{ (rad)}$$

となる。

(a) で変化の存在は認められるけれども、 Δi_L はノイズより小さい。両者が、この δ および $\Delta\delta$ に対して、ほぼ等しくするには、(11) 式を用いて、

$$i_L \geq 2.7 \text{ (}\mu\text{A)}$$

すなわち、測定された定常光量 ($i_L \approx 0.8 \mu\text{A}$) の 3 倍以上の光量が必要であったことになる。

(b) は、MPD での 1 回だけの測定波形で、変化の存在ははっきりしない。そこで、毎秒 2 回の割合で刺激を与えて繰返し測定し、60 回の加算平均により得たものが (c) である。Fig. 3 中の M 点がこのときの i_L と Δi_L との関係を表わす。繰返し測定は、試料をなるべくもたせるため、光量変化の存在が明らかになり次第適宜打ち切り、刺激の強さも最小限におさえてある。

SPD では明らかに 1 回の測定では検出できない。

(12) 式を用いて n の最小値を求めると、

$$n \geq 1.7 \times 10^3$$

すなわち、少なくとも 1,700 回ほどの繰返し測定を必要とする。

このときの測定では、すでに 550 回までの加算平均によって、(d) に示すような変化をとらえることができた。前と同様に Fig. 3 中に示すと S 点に相当する。この場合、ノイズが、予想される値

$$\frac{2 \text{ pA}}{\sqrt{550}} \approx 85 \text{ fA}$$

の半分ほどの 50 fA に減少している。

なお、このような変化が電氣的なアーチファクトでなく、位相差変化に起因する光量変化であることは、適当な位相差板をそう入することによって、変化の極性が反転することから、直接証明できる。(e) は、試料に対して $\delta/2 \approx -29^\circ$ の位相差板を入れて負バイアスし、LPD により (a) と同様にして得たものである。

また、Fig. 5 に、別の試料について、LPD を用い 64 回の加算平均により、変化波形をよりはっきり取出

Fig. 5 Signal waveform on a crab nerve through LPD by averaging 64 sweeps

した例を示した。

7. おわりに

微小な部分から比較的速い複屈折性の微小変化を検出する必要が生じた場合、その可能性を知るための目安となる関係式を導き、実際の測定例を示した。

このような計測が必要となるのは、特定の1点だけを検査対象とする場合よりは、むしろ、各部分からの光量変化を同時に測定して、現象の発生を2次元的に把握したい場合であろう。

したがって、非常に高速にスポットを走査する方法が取れない限り、調べたい領域全体に光束を当てることになる。

このように、直接検査したい部分以外にも光束が当たると、他の部分を通った光が紛れ込んで誤差を生じる、いわゆるSV効果が出てくる。このSV効果は、検査部位が小さいほど増すほか、試料や光学系の状態によるちがいが大であり、定量的にはつかみにくいとされている²⁾。

ここでは、単純に面積の大小を考えただけでも、実際に検査対象の単位に取りうる範囲は、そこでの変化が0であるときにも他から紛れ込む光量の変化を測定上無視あるいは区別して棄却できるような最小面積でおさえられてしまうであろう。これは、個々の対象にに応じてあらかじめ調べておく必要がある。

最後に、この種の計測の機会を与えていただいた電予技術総合研究所バイオニクス研究室 杉江昇室長、エレクトロニクスで負うところの多かった同研究室山根茂技官、光学その他に多くの助言をいただいた理化学研究所 山口一郎研究員の各位に感謝の意を表する次第である。

参 考 文 献

- 1) L. B. Cohen: Changes in Axon Birefringence during the Action Potential, J. Physiol., **211**, 495/515 (1970)

- 2) 野間正喜: 顕微分光装置, 応用分光学ハンドブック (吉永弘編), 745/752, 朝倉書店 (1973)
- 3) 渡辺他: 神経線維の興奮と複屈折性変化, 生体の科学, **27**, 66/78 (1976)
- 4) 越川他: 興奮に伴なう神経膜の光学的性質の変化, 電総研集報, **36**, 482/486 (1972)

《付 録》

実際の偏光板では直交時にも出力光量 $F_{\perp}$ があり、平行時の出力光量を $F_{\parallel}$ とすると、(1)式はつぎのように修正される。

$$F = F_{\perp} + (F_{\parallel} - F_{\perp}) \sin^2 \frac{\delta}{2} \quad (\text{A.1})$$

実用上は、試料の光軸を直交偏光板のいずれかの軸方向に一致させたときの出力を $F_{\perp}$ 、平行偏光板で同様にしたときの出力を $F_{\parallel}$ と考えてもよい。

また、光検出器のノイズには光量によらない成分もあり、光量が少ないところでは、 i_L による項に対して無視できなくなる。これを i_L に対して等価的に i_d とおくと、(6)式はつぎのようにおきかえられる。

$$4i_n^2 = 2ef(i_L + i_d) \quad (\text{A.2})$$

これらを用いて、(13)式と同様な関係を導くと、

$$|\Delta\delta| \geq \frac{r\sqrt{2ef/n}}{\sqrt{\mu F_{\parallel}}} \sqrt{\frac{(1/\varepsilon + i_d/\mu F_{\parallel}) + (1-1/\varepsilon) \sin^2 \delta/2}{(1-1/\varepsilon)^2 \sin^2 \delta/2 \cdot \cos^2 \delta/2}}, \quad \left(\varepsilon \equiv \frac{F_{\parallel}}{F_{\perp}} \right) \quad (\text{A.3})$$

を得る。(A.3)式の右辺は、

$$\sin^2 \frac{\delta_0}{2} = \frac{\sqrt{1/\varepsilon + i_d/\mu F_{\parallel}}}{\sqrt{1 + i_d/\mu F_{\parallel} + \sqrt{1/\varepsilon + i_d/\mu F_{\parallel}}}} \quad (\text{A.4})$$

を満たす δ_0 のとき最小となる。

ふつう、 ε を 10^2 以上、 $i_d/\mu F_{\parallel}$ を 10^{-2} 以下にすることは可能であるから、

$$\sin^2 \frac{\delta_0}{2} \leq 0.1$$

と考えてよい。