

Distribution measurement of collagen fiber orientation using polarization-resolved imaging of second-harmonic-generation light

○ 安井 武史 (阪大院・基礎工) 正 荒木 勉 (阪大院・基礎工)
東野 義之 (奈良医大・第1解剖)

Takeshi YASUI^{a)}, Tsutomu ARAKI^{a)}, and Yoshiyuki TOHNO^{b)}

a) Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka

b) Department of 1st Anatomy, Nara Medical University, Kashihara, Nara

Key Words: collagen, orientation, second-harmonic-generation light, femtosecond laser, polarization

1. はじめに

コラーゲン分子はヒト身体に豊富に含まれる生体構造タンパク質の1つであり、生体組織や器官はコラーゲン分子及び構造集合体(マイクロフィブリル、原線維、線維、線維束)の立体的構造によって構成されている。その役割は、例えば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、コラーゲンの並び方(コラーゲン配向)の3次元的分布が、組織・器官の形態的あるいは機能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、コラーゲン配向の評価は医科学やバイオメカニクス関連分野において重要とされているが、従来法(電顕観測、X線回折、マイクロ波法、機械的特性、生化学分析、組織学的分析など)はいずれも侵襲的あるいは破壊的測定手法であり、解剖学的生検が必要であった。これ故、これらに代わる非侵襲・非破壊的コラーゲン配向測定法が強く望まれている。このような計測を実現する有力な手段が光プローブ法であるが、光コヒーレンストモグラフィーや蛍光測定をはじめとした従来法ではコラーゲン配向の状態を詳細に測定することは困難であった。

我々は、フェムト秒($=10^{-15}$ 秒)オーダーの超短パルス光を生体組織に照射時、生体コラーゲン自身が有する2次の非線形光学特性によって発生する第2高調波発生光(生体SHG光)[1]に注目し、これを用いたコラーゲン配向測定法に関する研究を行っている[2-4]。生体SHG光を用いたコラーゲン配向測定法の特徴は、その低侵襲性以外に、分子レベルの構造配向に敏感、高い空間分解能、3次元分布測定が可能、非染色、バックグラウンド光(入射光や蛍光など)との分離が容易、といった特徴を有している。ここでは、生体SHG光を用いたコラーゲン線維の配向分布測定に関して報告する。

2. 実験装置及びサンプル

図1に実験装置を示す。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(AVESTA社TiF-Kit-100、パルス幅=60fs、平均パワー=300mW、繰返周波数=87MHz、中心波長=808nm)を用いる。レーザーから出射された超短パルス光は、レンズによりサンプルに直径15 μ mスポットで照

射される。発生した生体SHG光は再びレンズによって集光され、残存した赤色レーザー光を青色フィルターによって除去した後、モノクロメーターで分光測定される。偏光分解測定では、偏光光学系(偏光子、1/2波長板、検光子、偏光消板)を用いて入射レーザー光と検出SHG光の偏光状態が一致するように同期回転させながら、その強度変化を測定する。これは、偏光を固定した状態でサンプルを回転し、その強度変化を測定することに相当する。またコラーゲン配向の分布測定では、サンプルを3次元的に走査することにより、3次元SHGイメージを得ることが可能である。

ここで用いたサンプルは、ヒトアキレス腱(ホルマリン固定後乾燥)および組織培養用コラーゲンスポンジである。

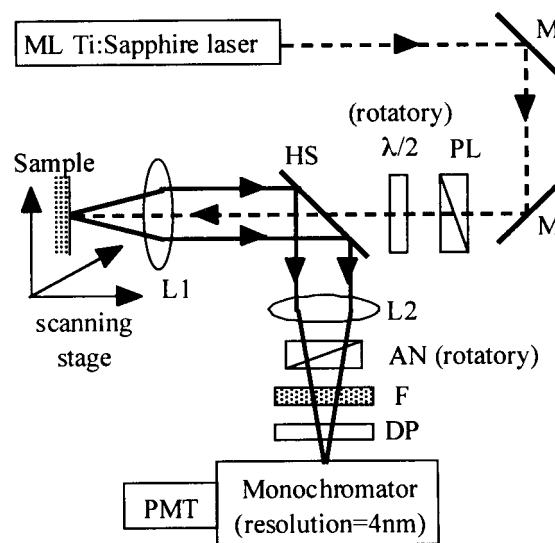


Fig. 1 Experimental setup. M: mirror, P: polarizer, $\lambda/2$: half waveplate, HS: harmonic separator, L1 and L2: lenses, A: analyzer, F: blue pass filter, DP: depolarizer, PMT: photomultiplier.

3. 測定結果

生体SHG光は、入射レーザー偏光とコラーゲン配向が平行な場合に強く発生し直交の場合にはほとんど発生しない性質を有しているため、コラーゲン配向情報の抽出には偏光解析が有効である。図2(a)及び(b)はヒトアキレス腱における垂

直及び水平の偏光分解SHGイメージ(面内イメージ)を示しており、垂直偏光では強いSHG光が観測される一方で水平偏光ではSHG光は観測されていない。すなわちこの場合のヒトアキレス腱サンプルでは、コラーゲン線維が垂直方向に単一軸配向している。この配向程度を定量的に評価するため、配向異方性(OA)として $OA = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + I_{\parallel})$ (I_{\perp} :垂直SHG強度、 I_{\parallel} :水平SHG強度)を定義し、その分布イメージを図2(c)に示す。これより、ヒトアキレス腱では測定部位全体にわたって、高い配向性($OA = 0.86 \pm 0.06$)が保たれていることが分かる。一方、コラーゲンスポンジの測定結果を図2(d)-(f)に示す。ヒトアキレス腱とは対照的に、垂直偏光及び水平偏光でほぼ同じ偏光分解SHGイメージが得られており(図2(d)および(e))、OA値分布は 0.07 ± 0.05 となった(図2(f))。これは、コラーゲンスポンジが特定の配向を有さない完全ランダム配向であることを示している。また、同一イメージ内の強度分布(図2(d)および(e))は、コラーゲン線維の量的(密度)分布を反映している。

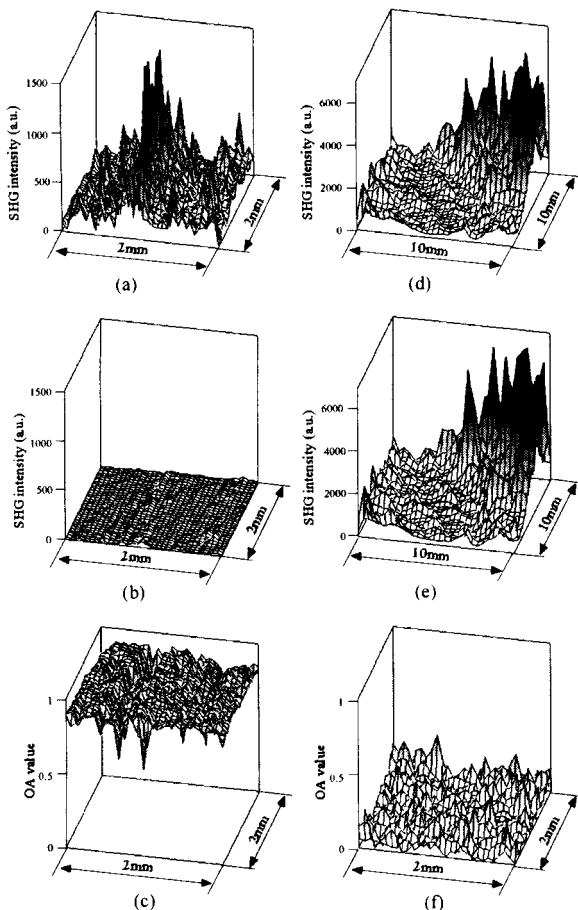


Fig. 2 Polarization-resolved SHG images and distribution of OA value. (a) and (d) horizontal polarization, (b) and (e) vertical polarization, and (c) and (f) OA value for human Achilles tendon and collagen sponge, respectively.

生体SHG光や2光子励起蛍光のような非線形光学効果を利用した光プローブ法では、検出光が焦点近傍からしか発生しないのが特徴である。すなわち、これらを利用したイメー

ジング計測では、面内だけでなく深さ方向にも空間分解能を有することになり、3次元イメージングが可能になる。そこで、生体SHG光の深さ分解イメージングを行った。測定サンプルはヒトアキレス腱で、サンプル位置を深さ方向に5 μ m刻みで走査したときの生体SHG強度を測定した。測定結果は、図3に示されている。垂直偏光入射及び水平偏光入射において明らかな強度分布の違いが確認でき、OA値分布も0.8以上となった。このように、ヒトアキレス腱は面内だけでなく深さ方向に対してもコラーゲン線維が垂直方向に単一軸配向しており、3次的に均一な単一軸配向がその機械的特性に大きく寄与していると考えられる。

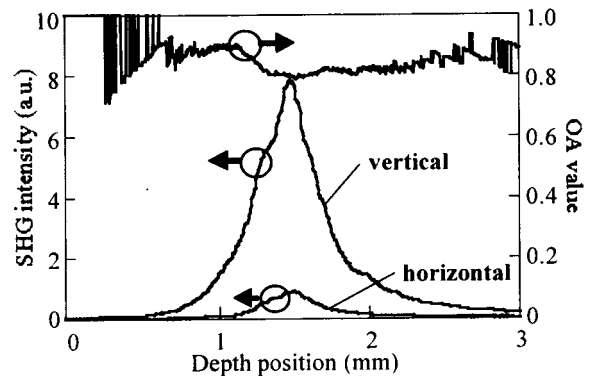


Fig. 3 Depth distribution of polarization-resolved SHG intensity and OA value.

4. まとめ

偏光分解SHGイメージングを用いたコラーゲン線維配向法を提案し、コラーゲン・サンプルの配向評価に応用した。その結果、異なるコラーゲンサンプルにおいて、配向分布の相違を確認した。本手法は、コラーゲン線維の配向分布に関する定量的評価方法として期待される。

本研究は文部科学省・科学研究費補助金基盤研究(B) 15300161 及び萌芽研究 15650094 の援助を得た。

参考文献

- [1] S. Roth et al, Biopolymers Vol. 20 pp. 1271-1290(1981).
- [2] 島林他, "第二高調波発生光の偏光解析を用いた生体コラーゲンの配向計測", 第15回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp. 139-140 (2003).
- [3] 安井他, "生体の非線形光学効果を用いた皮膚真皮コラーゲンの配向測定", 日本機械学会 2003 年度年次大会講演論文集(V), pp. 49-50 (2003).
- [4] T. Yasui et al, "Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry", J. Biomed. Opt., Vol. 9(2), (in press), (2004).