

生体の非線形光学効果を用いた組織コラーゲン線維の 配向分布測定

Distribution measurement of collagen fiber orientation using nonlinear optical effect in biological tissue

○安井武史¹⁾, 佐々木邦彦¹⁾, 東野義之²⁾, 荒木勉¹⁾

○Takeshi Yasui¹⁾, Kunihiko Sasaki¹⁾, Yoshiyuki Tohno²⁾ and Tsutomu Araki¹⁾

阪大院・基礎工¹⁾, 奈良県立医科大²⁾

Grad. Sch. Engg. Sci., Osaka Univ.¹⁾, Nara Med. Univ.²⁾

E-mail: t-yasui@me.es.osaka-u.ac.jp, http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/

We propose a nonlinear optical probe to evaluate collagen orientation in biological tissue. Specific probing sensitivity of the proposed method to collagen orientation is achieved by polarization measurement of second-harmonic-generation light induced as a second-order nonlinear optical effect in tissue collagen. In this paper, we demonstrate distribution measurement of collagen fiber orientation in human tissue.

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、これらに替わる非侵襲・非破壊の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^{2,3)}。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、染色不要、バックグラウンド光（散乱光や蛍光など）との分離が容易、といった特徴を有している。本講演では、生体 SHG 光を用いたヒト組織コラーゲン線維の配向分布測定に関して紹介する。

2. 実験装置

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（Spectra Physics, MaiTai, パルス幅=100fs、繰返周波数=80MHz、中心波長=800nm）を用いる。レーザーから出射された超短パルス光は、対物レンズ（OL、 $\times 20$ 、NA=0.42）によりサンプルに照射される。発生した生体 SHG 光のうち後方散乱した成分を再び対物レンズによって集光し、光電子増倍管（PMT）によりロックイン検出する。混在した赤色後方散乱光はハーモニクセパレーター(HS)と青色フィルター（F）によって除去される。さらに深さ分解能向上のため、ピンホール（PH、直径 50 μ m）を用いた共焦点配置を導入している。SHG 偏光解析では、偏光子（PL）、1/2 波長板 ($\lambda/2$)、検光子（AN）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、その強度変化をレーダーグラフとして測定する。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、イメージング測定を行う。

3. 実験結果

3-1. SHG 偏光分解イメージングを用いたコラーゲン配向の面内分布測定⁴⁾

ヒト真皮の面内コラーゲン配向分布を評価するため、配向方位角の2次元分布測定を行った。ここでは、偏光角 30 度毎に偏光分解 SHG イメージを取得し、各ピクセル毎に最大 SHG 強度を示す偏光角をコラーゲン配向方位角とした。図 2 は配向方位角の分布を2次元ベクトルマッピングで表示したものであり、配向方位角のうねりが確認できる。真皮ではコラーゲン線維が絡み合った状態で存在しているというのが一般

的な解剖学的所見であり、これらの結果はこの事実を反映していると考えられる。

3-2. 深さ分解 SHG 偏光解析法を用いたコラーゲン配向トモグラフィ⁵⁾

次に、コラーゲン配向の断層分布測定に関する基礎実験を行った。本システムでは、共焦点配置の導入により $15\mu\text{m}$ の深さ分解能が得られている。ここでは、深さ方向に異なるコラーゲン配向を有するサンプルとして2枚のスライスしたヒトアキレス腱切片を配向方向が直交するように重ね合わせ、焦点位置を深さ方向に移動させながら深さ分解 SHG 偏光解析を行った。図3に示すように、深さ方向に測定スポットを走査すると偏光解析結果が変化した。測定スポットが第1層のアキレス腱表面(深さ $0\mu\text{m}$)ではコラーゲン線維は縦配向を示しているのに対し、第2層(深さ $350\mu\text{m}$)ではコラーゲン配向が横向きであることが確認できる。また、両者の境界付近(深さ $300\mu\text{m}$)では縦と横の配向が混在している。これらの結果から、本手法により深さ方向のコラーゲン配向分布測定が可能なが分かる。

4. おわりに

生体コラーゲンの非線形光学効果を利用したコラーゲン線維の配向分布測定法を提案し、ヒト組織のコラーゲン配向評価に応用した。その結果、本手法がコラーゲン配向の3次元分布測定に有効であることを確認した。本手法は、コラーゲン線維配向の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(B)16300155 及び萌芽 15650094 の援助を得た。

文献

- 1) S. Roth and I. Freund, "Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon", *Biopolymers*, Vol. 20, pp. 1271-1290 (1981).
- 2) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, "Determination of collagen fiber orientation in human tissue by polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light", *Appl. Opt.*, Vol. 43, pp. 2861-2867 (2004).
- 3) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, "Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry", *J. Biomed. Opt.*, Vol. 9, pp. 259-264 (2004).
- 4) T. Yasui, K. Shimabayashi, Y. Tohno, T. Araki, "Polarimetric imaging of SHG light for spatial distribution measurement of collagen orientation in biological tissue", *Proc. 5th Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics*, pp. 361 (2003, Taipei).
- 5) 佐々木邦彦、安井武史、東野義之、荒木勉、"第2高調波発生光の深さ分解偏光解析法を用いたコラーゲン線維配向の断層分布測定", 平成 16 年秋季応物学会予稿集, 1p-7V-10, pp. 907.

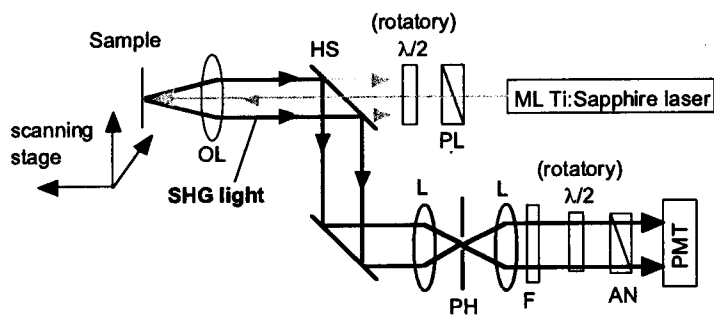


Fig. 1 Experimental setup.

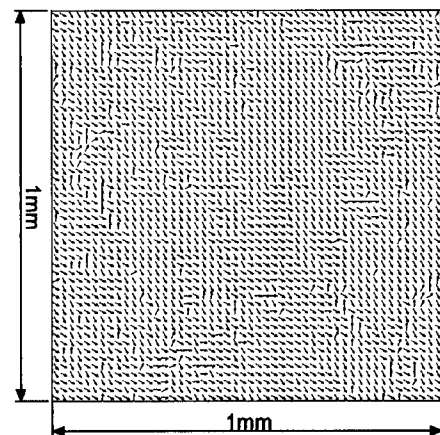


Fig. 2 2D distribution of collagen orientation angle in human dermis.

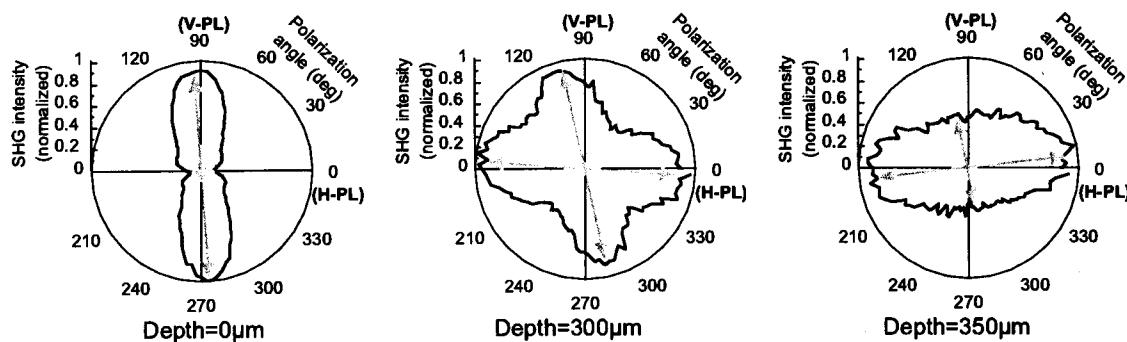


Fig. 3 Results of depth-resolved SHG polarimetry in human Achilles tendon.