

第2 高調波発生光顕微鏡を用いた
コラーゲン線維の *in situ* 可視化とバイオ応用

2017 年 3 月

長谷 栄治

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

目次

1. イントロダクション	1
参考文献	9
2. 第2高調波発生光顕微鏡	
2.1 イントロダクション	12
2.2 コラーゲンとその可視化手法	
2.2.1 コラーゲン	13
2.2.2 コラーゲンの可視化手法	15
2.3 SHG とは	
2.3.1 線形分極と非線形分極	17
2.3.2 位相整合条件と生体 SHG 光	20
2.4 まとめ	23
参考文献	24
3. 静置培養骨芽細胞産生コラーゲン線維の <i>in situ</i> 時系列モニタリング	
3.1 イントロダクション	25
3.2 SHG 光発生における平均パルス・エネルギーとパルス幅の影響	26
3.3 実験サンプルと実験装置	
3.3.1 実験サンプル	28
3.3.2 SHG 顕微鏡のセットアップ	31
3.4 実験結果	
3.4.1 骨芽細胞産生コラーゲン線維の SHG イメージングにおけるパルス幅の影響	33
3.4.2 骨芽細胞産生コラーゲンの時系列 SHG イメージング	35
3.4.3 コラーゲン成熟度の定量評価	38
3.5 考察	41
3.6 まとめ	44
参考文献	45
4. 平均 SHG イメージ強度と引張試験を用いた腱修復の組織学・力学的評価	
4.1 イントロダクション	48
4.2 実験サンプルと装置	
4.2.1 実験サンプル	51
4.2.2 SHG 顕微鏡のセットアップ	52

4.2.3 引張試験	53
4.2.4 統計解析	54
4.3 実験結果	
4.3.1 正常及び修復サンプルの SHG イメージング	54
4.3.2 正常及び修復サンプルの引張試験	59
4.3.3 平均 SHG 強度とヤング率の相関	61
4.4 考察	63
4.5 まとめ	64
参考文献	65
5. SHG 画像解析を用いた腱修復程度の評価	
5.1 イントロダクション	68
5.2 実験サンプルと装置	
5.2.1 実験サンプル	69
5.2.2 SHG 顕微鏡のセットアップ	69
5.3 実験結果	
5.3.1 SHG イメージング	69
5.3.2 2次元フーリエ変換 (2D-FT) SHG イメージ	74
5.4 考察	76
5.5 まとめ	77
参考文献	79
6. まとめ	80

本研究に関する業績

その他の研究に関する業績

謝辞

1章 イントロダクション

最近の健康に対する意識の高まりと共に、日々の暮らしの中でコラーゲンという言葉をよく耳にする。「食べるコラーゲン」、「飲むコラーゲン」、「塗るコラーゲン」など、コラーゲンという言葉を目にしない日は無い。その効能の真偽はさておき、このようなコラーゲン産業隆盛の背景には、コラーゲンが生体にとって極めて重要であることはもちろんであるが、それ以外にコラーゲンを「生きたありのまま (*in situ*)」で可視化する技術がこれまで存在しなかったことも、少なからず影響していると考えられる。

コラーゲンは、各種生体組織を構成する生体構造タンパク質であり、ヒトでは全タンパク質の約 30% (全体重の約 6%) を占める。ヒトの体を高層ビルに例えると、細胞はコンクリート、コラーゲンは鉄筋に相当するとよく言われる。これは、コラーゲンの濃度や配向が、生体組織の形態や力学的特性を決定する上で極めて重要な役割を担っているからである。コラーゲンがこのような機能を担える理由は、コラーゲン特有の規則性の高い高次構造に起因している。コラーゲンの最小構成単位は、3本のポリペプチド鎖 (α 鎖) がらせんを巻いて構成されるトロポコラーゲン (コラーゲン分子、直径約 1.5 nm、長さ約 280 nm) である。コラーゲン分子には約 30 種類の型が存在し、I 型コラーゲン $[\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)]$ のように 2 種類の α 鎖からなるヘテロ 3 量体や、III 型コラーゲン $[\alpha 1(III)_3]$ のように同一の α 鎖からなるホモ 3 量体が存在する[1]。このようなコラーゲン分子は、生体内において分子間の相互作用により高次構造を形成する。形成される高次構造は型によって様々であり、I, II, III, V 型などの線維形成型、IV, VIII お

よび X などのネットワーク形成型などがある[2]. 特に, 生体組織において最も多く存在する線維形成型コラーゲンでは, 分子が規則正しく一定の距離だけずれて会合し, それぞれの分子間で共有結合を形成するため, 高い力学的強度を持っている. ゆえに, このような線維形成型コラーゲンは, 体を支える骨, 体を覆う皮膚, 骨と筋肉とを結びつける腱などに多く含まれており, これらの部位において形態や力学的特性の決定において重要な役割を担っている.

また, コラーゲンは生体組織を維持する構造骨格としてだけでなく, 細胞の発生・分化・形態形成などを調節し, 組織工学的培養組織で細胞の足場としても重要な役割を果たしている. 現在, 培養系で一つの細胞から組織を再構成する組織工学が盛んに行われているが[3], これらの培養組織において細胞が存在するだけでは組織および臓器の再生は望めない. 所望の組織や臓器を構築するためには, 細胞の数を単純に増やすだけでなく, コラーゲンの量や質を適切に制御し, 細胞が増殖・分化しやすい環境を再現することが必要不可欠である.

このように, コラーゲンは我々の生命活動に直結していることから, 基礎医学, 臨床医学, さらには組織工学的観点において極めて重要である. 生体組織におけるコラーゲンの振る舞いを正しく理解するための手段として, 生体組織におけるコラーゲンを可視化する技術が強く望まれている.

17 世紀にフックが光学顕微鏡を用いて細胞を観察して以降, 光学顕微鏡は, 生体組織や細胞を可視化し, 生命活動を理解するための極めて強力なツールである. 一般に, 生体軟組織は無色透明であるため, 光学顕微鏡を用いてそのままの状態の組織を観察しても, コントラストが低く観察しづらい. そこで, 染色法による光学顕微鏡観察が広く利用されている. 染色法では, 生体組織を観察する際, 組織を薄切

り（切片化）し，特定の分子に結合する色素を用いて染め分け，光学顕微鏡によって透過像を観察する

[4]. 例えば，ヘマトキシリン・エオジン（HE: Hematoxylin-Eosin）染色[4]では，細胞核をヘマトキシリンで青色に染め，エオジンで細胞質やコラーゲンなどの細胞外マトリックスをピンク色に染め分けることにより，組織における各種構成物質の選択的観察を可能にする．HE 染色は，手法が比較的シンプル・簡便なため，幅広く使われている．染色法では，通常，パンチバイオプシーで採取した生検組織を切片化し，染色後，光学顕微鏡で組織観察する．しかし，切片化や染色といった侵襲性のため，ヒト組織の *in vivo* 計測や，培養組織における時系列モニタリングなど，生きたありのままのコラーゲンを可視化することには適していない．

コラーゲン構造や配向を評価する他の手段として，電顕観測[5]，X 線回折[6]，機械的特性法[7]なども報告されているが，いずれも侵襲的あるいは破壊的測定手法であり，生検が必要である．このような生検に基づいた手法は，コラーゲン構造を識別する上では信頼性が高いが，*in vivo* 計測や時系列的可視化といった観点からは応用不可能である．一方，非侵襲な生体観察手段である MRI を用いると，組織が含有する水分量分布から，コラーゲン配列を反映したパラメーターを間接的に抽出することが出来る[8]．MRI では，フーリエ・イメージング法などを用いてサンプルの 3 次元空間分解能を非侵襲で得ることが出来るが，計測時間が長いことや，空間分解能が数百 μm 程度に制限されており，コラーゲンに対する直接的な分子選択性を持たないという問題点がある．このような現状から，低侵襲かつ高空間分解に 3 次元のコラーゲン分布を選択的に可視化する手段が強く望まれている．

光を用いると，非接触リモートかつ低侵襲に生体情報を抽出することが出来ることから，光学的手法

は1つの有望な手段である。蛍光顕微鏡は、医学・生物学を中心として細胞や組織の解析に必要不可欠なツールとして広く普及している[4]。蛍光顕微鏡では、特定のタンパク質などを蛍光標識することにより、測定する物質の選択的可視化が可能である。近年、生きたままの細胞でもタンパク標識可能な GFP 等の蛍光タンパク質が開発されているものの、一般的にこのような蛍光標識は細胞へダメージを与える可能性があるとともに、その毒性からヒトへの応用は困難である事が多い。また、3次元空間分解能を有さないため、薄い測定サンプルにおける面内情報の可視化手段に使用が限られる。次に、レーザー共焦点顕微鏡[9]では、対物レンズの焦点と結像関係になるようにピンホールを設置することで、3次元の空間分解能を付与できる。光源に生体透過性の高い近赤外光を用いることにより、非侵襲的に *in vivo* 計測を行うことが可能であることから、皮膚計測の分野ではすでに実用されている技術である。同様に、非侵襲的に *in vivo* 計測を行う手法として、Optical Coherence Tomography (OCT) がある[10]。OCT では、多重散乱光の中からコヒーレンスを保持する後方散乱光のみをコヒーレント検出することにより、得られた散乱係数空間分布から組織の断層構造を可視化する。本手法でも3次元分解能を有しており、眼底検査を始めとしてすでに広く実用されている技術である。レーザー共焦点顕微鏡や OCT では、染色や蛍光標識等の前処理を行うことなく生体組織を可視化することが可能であるが、両者においてイメージ・コントラストはサンプル内における屈折率の違いにより得ているため、分子識別能を持たない。偏光感受型 OCT[11]では、コラーゲンの有する複屈折性を利用することにより、コラーゲンの選択的可視化が可能となるが、この手法で得られる断層像は特定の深さまで積分された複屈折情報であるため、3次元の空間分解能を持たず、イメージ・コントラストも低いことが知られている。このようなことから、

生体組織における 3 次元的コラーゲン分布を，選択的かつ非侵襲に計測する光学的手法はこれまで存在しなかった。

近年のフェムト秒レーザー技術の進展と共に，新しい光学顕微鏡として，非線形光学顕微鏡が注目されている[12]。非線形光学顕微鏡は，共焦点レーザー顕微鏡と類似の装置構成を有しているが，光源に近赤外フェムト秒レーザーを用いることにより，非線形光学過程を介して，イメージ・コントラストを付与する。更に，生体透過性の良好な近赤外光の利用により，低侵襲に生体深部を可視化することが出来る。これまでに，多光子蛍光顕微鏡[12]，高次高調波発生光顕微鏡[13]，非線形ラマン散乱顕微鏡[14]などが報告されている。特に，高次高調波発生光顕微鏡の 1 つである SHG（SHG: second-harmonic-generation, 第 2 高調波発生）顕微鏡では，非中心対称構造物質と超短パルス光が有する高ピーク光電場の非線形相互作用により波長変換が起こり，入射レーザー光の半波長となる SHG 光が発生する。この SHG 光を観測することにより，非中心対称構造を有する生体構成物質（コラーゲン，ミオシン，チューブリンなど）を選択的かつ高コントラストに可視化できる[13]。

1986 年に，Freund らによって，SHG 顕微鏡が初めて生体組織へ応用された。この報告では，ナノ秒 Q スイッチ Nd: YAG レーザーを用いて，ラット尾腱の SHG 光を *ex vivo* (*ex situ*) 測定することにより，コラーゲン分子の非対称性が SHG 光の発生源であることが示された[15]。しかし，実験に用いられたナノ秒レーザー光を生体組織に照射すると，熱的ダメージによる生体侵襲性が無視できず，*in situ* 計測への応用は困難であった。その後，1990 年代初頭に近赤外フェムト秒モード同期チタン・サファイアレーザーが開発/市販され，SHG 顕微鏡のバイオ応用が一気に加速した。これは，ナノ秒パルス光の代わり

にフェムト秒パルス光を用いることにより、生体の熱的ダメージを大幅に抑制しながら効率的に非線形光学効果を誘起できる為である。

このような SHG 顕微鏡は、コラーゲン観察という観点で、従来法に対して多くのアドバンテージを持つ。まず、SHG 光は、コラーゲン分子構造固有の非線形光学特性に由来しているため、染色が不要となり、侵襲性を大幅に低減できる。更に、光電場が時空間的にエネルギー集中した領域でしか誘起されない SHG 光は、その発生が焦点近傍の直径 1 μm 前後のボリューム領域に限定されるので、焦点をサンプル内で 3 次元的に走査することにより、1 μm 前後の空間分解能での 3 次元イメージングが可能である。更に、近赤外光の利用により、熱的ダメージの抑制や生体深部の可視化といった特徴を追加することが出来る。

これまでの SHG 顕微鏡のバイオ応用に関する先行研究では、皮膚/骨/腱/血管/角膜などの結合組織、または肺/肝臓/腎臓などの内部器官における線維形成型コラーゲンの病理診断など、生検組織を切片化し、染色すること無く、「コラーゲンの選択的可視化」能力を利用して、顕微鏡下で組織観察する研究が主流であった[13]。さらに、SHG 顕微鏡が有する「コラーゲンの選択的可視化」と「*in situ* 計測特性（非破壊、非染色、低侵襲性）」の両特徴を活かして、ヒト皮膚の *in situ* 可視化も報告されている[16]。しかし、医療との関連性の高いバイオ応用に関する研究は、国内外においてほとんど報告されていない。

本研究では、「コラーゲンの選択的可視化」と「*in situ* 計測特性」という両特徴を活かしたバイオ応用という観点から、組織工学と整形外科に関連した 3 つのトピックスに関する研究を行った。

まず、骨形成（再生）過程をコラーゲン動態の観点から明らかにするため、培養骨芽細胞が産生した

コラーゲン線維の動態を時系列で SHG イメージングし、同一サンプルの培養過程におけるコラーゲン構造変化の可視化を行った[17]. 骨は力学的刺激に反応して常に作り替えられているが、骨芽細胞は周囲を硬組織に覆われている環境のため、組織化過程の生きた骨の中で骨芽細胞がどのような振る舞いをするのかは未だ解明されていない. 特に、この組織化過程ではコラーゲンが極めて重要な役割を果たしているが、これをその場観察することはこれまで不可能であった. 本手法を用いることにより、同一サンプルの時系列的なコラーゲン構造変化のダイナミクスを追跡することが可能となる.

次に、兔腱修復モデルを用いて、断裂腱における修復度合いの定量的評価を試みた[18]. 腱断裂は日常生活でも比較的起こりやすい一方で、断裂前の状態に戻りにくい外傷であるため、その修復を評価する手法が強く求められている. 従来、組織学的修復の評価には染色法が、また力学的修復の評価には引張試験が用いられてきたが、どちらの手法も破壊的もしくは侵襲的手法であった. ここで、染色法の代わりに SHG 顕微鏡を用いると、同一サンプルに対して、SHG 顕微鏡による組織学的修復と引張試験による力学的修復の両方を評価することが可能となり、組織学的修復と力学的修復の関連性に関する知見を得ることが可能になる. さらに、SHG 光発生強度が、コラーゲン濃度のみならず、コラーゲン高次構造性に強く依存することを考えると、SHG 顕微鏡は組織学的修復と力学的修復の双方の観点から、腱修復の度合いを定量的に評価出来る可能性を有している. そこで、正常腱および修復腱における平均 SHG イメージ強度とヤング率の相関を評価し、平均 SHG イメージ強度が修復度合いの定量的評価ツールとして利用可能かどうかの検討を行った.

上述の平均 SHG イメージ強度では、断裂腱の修復度合いの定量評価において、実験条件等の影響を

受け易い。そこで、平均 SHG イメージ強度に代わる再現性の高い代替評価パラメーターとして、SHG 画像解析の利用を検討した。正常腱および修復腱におけるコラーゲン線維の特徴的構造を、2次元フーリエ変換に基づいた SHG 画像解析から抽出し、サンプル間のコラーゲン構造分布の違いを定量的に評価した[19].

参考文献

- [1] 小出隆規, ”コラーゲン様三重螺旋ペプチドを利用した生化学研究”, 生化学 **82**, 474 (2010).
- [2] M. D. Shoulders and R. T. Raines, “Collagen structure and stability”, *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929 (2009).
- [3] Robert Langer and Joseph Vacanti. “Tissue engineering“, *Science* **260**, 920 (1993).
- [4] 野島博 編, ”顕微鏡の使い方ノート—はじめての観察からイメージングの応用まで”, 羊土社, (2011).
- [5] B. Eyden and M. Tzaphlidou, “Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy”, *Micron* **32**, 287 (2001).
- [6] V. J. James, L. Delbridge, S. V. McLennan, and D. K. Yue, “Use of X-ray diffraction in study of human diabetic and aging collagen”, *Diabetes* **40**, 391(1991).
- [7] B. K. Milthorpe, G. J. Rogers, and K. Schindhelm”, Microcomputer-based system for tensile testing of biological materials”, *Med. Biol. Eng. Comput.* **26**, 161 (1988).
- [8] M. E. Schweitzer and D. Karasick, “MR Imaging of disorders of the Achilles tendon”, *Am. J. Roentgenol.* **175**, 613 (2000).
- [9] P. Davidovits and M. D. Egger, “Scanning laser microscope”, *Nature* **223**, 831 (1969).
- [10] 春名正光, “光コヒーレンストモグラフィ (OCT) ”, *Medical Photonics* **1**, 2 (2010).
- [11] Y. Yang, M. Ahearne, I. Wimpenny, J. G. Leach, and J. Torbet, “Investigation of a tissue engineered tendon model by PS-OCT” *Proc. SPIE* **6858**, 75660A (2010).

- [12] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", *Science* **248**, 73 (1990).
- [13] P. J. Campagnola and C. Y. Dong, "Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis", *Laser Photon. Rev.* **5**, 13 (2011).
- [14] A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, "Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering", *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4142 (1999).
- [15] I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, "Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon", *Biophys J.* **50**, 693 (1986).
- [16] T. Yasui, Y. Takahashi, M. Ito, S. Fukushima, and T. Araki, "*Ex vivo* and *in vivo* second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:forsterite and Ti:sapphire lasers", *Appl. Opt.* **48**, D88 (2009).
- [17] E. Hase, O. Matsubara, T. Minamikawa, K. Sato, and T. Yasui, "*In situ* time-series monitoring of collagen fibers produced by standing-cultured osteoblasts using a second-harmonic-generation microscope", *Appl. Opt.* **55**, 3261 (2016).
- [18] E. Hase, T. Minamikawa, K. Sato, D. Yonekura, M. Takahashi, and T. Yasui, "Evaluation of histological and mechanical recovery in rabbit model of tendon healing using second-harmonic-generation imaging and tensile testing", *Bone & Joint Research* **5**, 577 (2016).
- [19] 長谷栄治, 南川丈夫, 佐藤克也, 米倉大介, 高橋光彦, 安井武史, "第2高調波発生光 (SHG) 顕微

鏡を用いた腱修復の観察”, 生体医工学 **54**, 253 (2016).

2章 第2高調波発生光顕微鏡

2.1 イントロダクション

フェムト秒 (10^{-15} 秒) オーダ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光学特性によって、入射レーザー光の一部が波長変換され、入射レーザー光の半波長（あるいは2倍の周波数）の光が SHG 光として発生する[1]。このような SHG 光は線形光学効果（反射や吸収）とは本質的に異なるメカニズムで発生し、波長オーダーの物質構造や局所環境の変化に敏感であるという特徴を有している。コラーゲンの基本構造はポリペプチド鎖3重らせん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[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（3重らせん構造）ゆえに、高い2次の非線形光学特性を有しているため、生体 SHG 光が特異的に発生する[3]。さらに、コラーゲンはきわめて規則的な高次配向構造を有しているため、発生した SHG 光がコヒーレンスを失う前に各コラーゲン分子からの SHG 光が強め合う干渉し、増強され検出される[4]。本手法では、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測定ができる。さらに、SHG 波長は入射レーザー光の半波長であるので、拡散反射光や蛍光との分離が容易である。また、発生する 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といった特徴がある[1]。

本章では、このような SHG 光の発生源となるコラーゲンとその従来の可視化手法、および生体 SHG

光の発生原理について記述する。

2.2 コラーゲンとその可視化手法

2.2.1 コラーゲン[2, 5]

生体構造タンパク質であるコラーゲンは、動物の細胞外マトリックスの主成分であり、直径 1.5 nm、長さ 280 nm のトポロコラーゲン（コラーゲン分子）という可溶部と不溶部とをもつ単量体で構成されている高分子である。結合組織細胞ほか各種の細胞で分泌され、皮膚や骨の主成分として、ほ乳類では最も大量に存在するタンパク質であり、全タンパク質の 25 %を占める。分子量はおよそ 30 万であり、分子量およそ 10 万のポリペプチド鎖から構成されている。コラーゲン分子には約 30 種類の型が存在し、I 型コラーゲン $[\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)]$ のように 2 種類の α 鎖からなるヘテロ 3 量体や、III 型コラーゲン $[\alpha 1(III)_3]$ のように同一の α 鎖からなるホモ 3 量体が存在する。ポリペプチド鎖は、グリシン-x-y という繰り返し構造で構成されていることから、コラーゲンは全アミノ酸の 1/3 がグリシンである。また、この x にはプロリン、y にはヒドロキシプロリンが頻繁に出現する構造をとっており、このアミノ酸配列がコラーゲン分子の 3 重らせん構造を作る要因として考えられている。

I, II, III, V 型などの線維形成型コラーゲンでは、コラーゲン分子がおよそ 4 分の 1 ずつずれながら規則正しく会合することにより、線維を構成していると考えられている。その線維は、図 2-1 に示すように、線維束、線維、原線維、マイクロフィブリルという単位で、規則正しい高次構造を取っている。

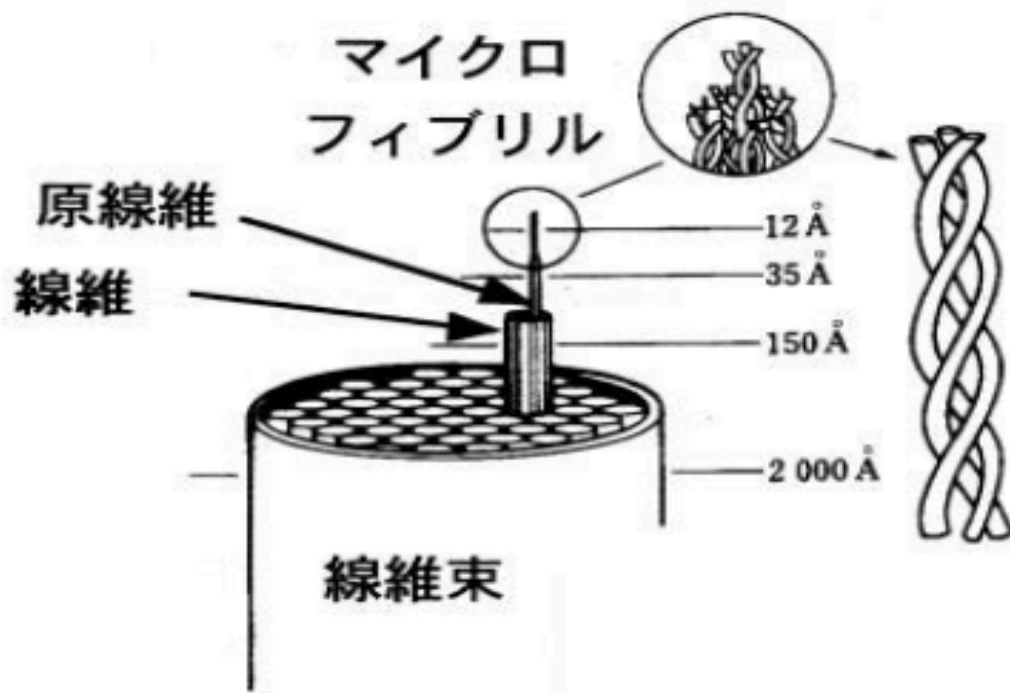


図 2-1 コラーゲンの高次構造

コラーゲンは弾性係数が大きいので、生体において主として組織や器官を力学的に支持する機能を果たしている。ゆえに体を支える骨、体を覆っている皮膚、骨と筋肉とを結びつける腱などにはコラーゲンが多く含まれている。単に力学的に強いだけでなく、しなやかさ、柔軟性、伸縮性なども必要であり、これらの強さや柔軟性などを決める大きな因子は、線維の太さである。一般的に基底膜に近いところほど線維は細く、基底膜から離れるほど太い線維が分布している。各部位におけるコラーゲンの含有量は多様であるが、体のコラーゲンのうち約 40%は皮膚に、10~20%は骨と軟骨に、7~8%は血管に含まれている。また生体内では部位によってコラーゲンの型が異なる。現在 30 種以上の型のコラーゲンが知られているが、体内に含まれるコラーゲンの大部分は線維形成型の I 型コラーゲンである。

2.2.2 コラーゲンの可視化手法

コラーゲンは我々の生命活動に直結していることから、基礎医学、臨床医学、さらには組織工学的観点において極めて重要である。生体組織におけるコラーゲンの振る舞いを正しく理解するための手段として、生体組織におけるコラーゲンを可視化する技術が強く望まれている。

従来の培養組織におけるコラーゲンの可視化手法として染色法が多く用いられてきた[6]。通常の光学顕微鏡観察では、形態を知るため、組織を薄切りした切片を用いる。生体組織の構成要素は、光に対してどれも同様な透過性があり、そのままでは互いの識別が困難であるため、染色を行うことによる各種構成物質の選択的観察が必要となる。表 2-1 にコラーゲンを検出対象とした主要染色法をまとめる[6]。

図 2-2 はエラスチカ・ワンギーソン染色を行った皮膚の顕微画像である。皮膚におけるコラーゲン構造を識別する上で、生検に基づいた信頼性の高い情報が得られている。しかし、切片化や染色といった侵襲性のため、ヒト組織の *in vivo* 計測や、培養組織における時系列モニタリングなど、生きたありのままのコラーゲンを可視化することには適していない。

表 2-1 コラーゲンの主要染色法

染色法	検出対象	染色結果
ヘマトキシリン・エオジン染色	全体	青藍（細胞核）、赤（細胞質ほか）
エラスチカ・ワンギーソン染色	コラーゲン エラスチン	赤 黒
アザン染色	コラーゲン	青
マッソン・トリクローム染色	コラーゲン	緑

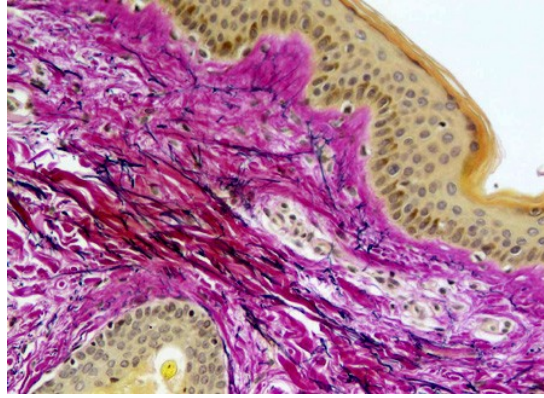


図 2-2 エラスチカ・ワンギーソン染色[5]

次に、サンプルの前処理無しでコラーゲンを選択的に可視化出来る光学的手法である偏光感受型 OCT (PS-OCT: Polarization-sensitive optical coherence tomography) について記述する。眼科における実用 OCT が開発されて以降、OCT は眼科で必要不可欠な診断機器として普及しており、網膜を中心とする診断に利用されている[7]。OCT では組織の断層情報が、非破壊・非侵襲かつ 3 次元イメージングが可能で、高い浸透力 (数 mm オーダー) を持って可視化する事ができる。通常の OCT では、屈折率分布から可視化を行うため、屈折率が一樣な場所では情報が得られず、物質特定も困難である。一方、コラーゲンの有する複屈折性を利用した偏光感受型 OCT では、コラーゲンの選択的計測が可能となり、腱組織の培養過程のモニタリングに応用されている[8]。図 2-3 (a) の画像は、培養腱の偏光感受型 OCT イメージである。この画像において、細胞播種密度が増えるにつれて、複屈折量 (コラーゲン量) が増加する様子が可視化されている。また (b) では培養時間の経過により、サンプルの厚みが減少していることから、培養腱組織において播種密度と培養時間の経過がコラーゲンの組織化や配向量に影響するということが示唆されている。このように、偏光感受型 OCT を用いれば、非染色・非破壊でコラーゲンの選択的可

視化を行うことが出来るが、イメージ・コントラストが悪く、詳細なコラーゲン産生量（複屈折量）の違いを見分けることは困難であるということや、この手法で得られる断層像は特定の深さまで積分された複屈折情報であるため、3次元の空間分解能を持たないといったことがこの手法のデメリットであると考えられる。

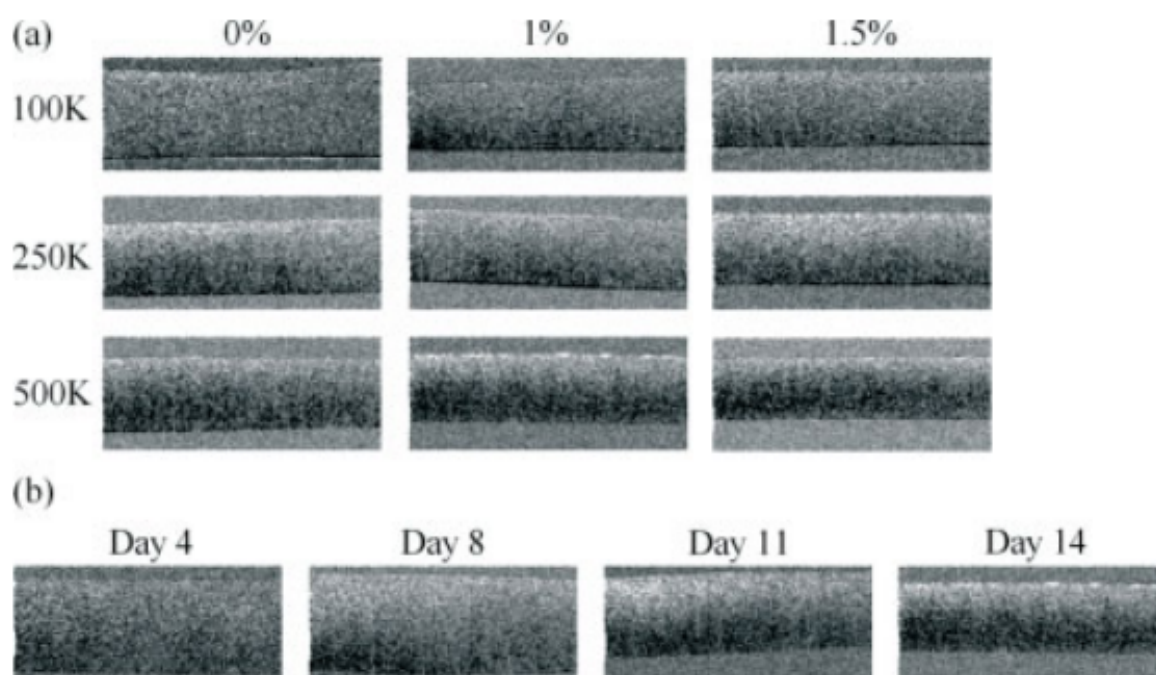


図 2-3 培養臍の PS-OCT イメージ[8] (a) それぞれ臍細胞播種 2 週間後の播種密度 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 cells/ml また、毎日 1 時間 1 Hz の周期的な伸展をそれぞれ 0%, 1%, 1.5% のひずみ量を与えたもの
(b) 播種密度 5×10^5 cells/ml で 1.5% のひずみ量を与えたサンプルの時系列モニタリング

2.3 SHG とは

2.3.1 線形分極と非線形分極

物質に光が入射されると、入射光の電場により分極波が物質中で誘起されて物質内を伝搬し、物質/自

由空間の境界で分極波と同じ周波数の光波に変換される．通常の光による線形分極 P_L は入射電場強度 E に比例する（図 2-4） [9].

$$P_L = \chi^{(1)} E \quad (2-1)$$

ここで、 $\chi^{(1)}$ は線形感受率である．すなわち、発生した分極波は入射光と同じ時間波形で歪むことなく物質内を伝搬し、物質/自由空間の境界から分極波（入射光）と同じ時間波形の光波が自由空間に出射される．したがって、透過や屈折等の線形分極に由来する現象では、その前後において光周波数（波長）が変化しない．

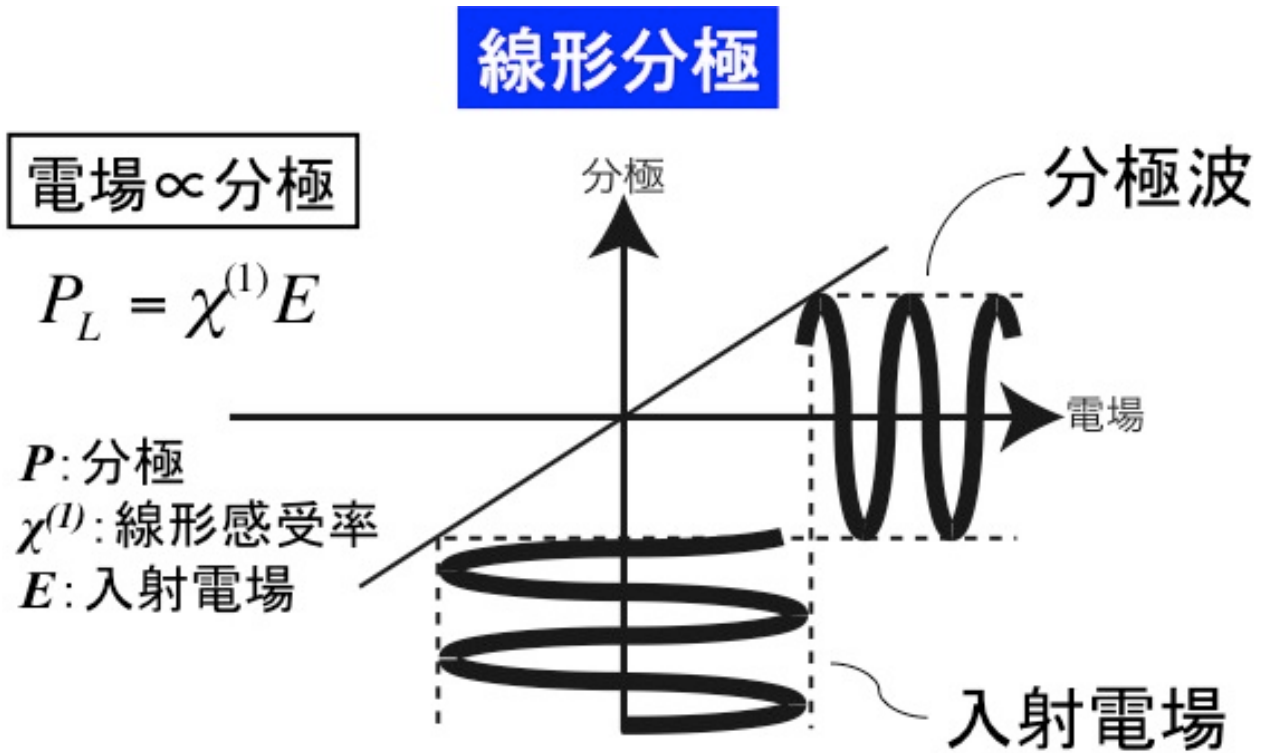


図 2-4 線形分極

一方、超短パルス光のように非常に高いピークパワーを持つ光を入射すると線形性が崩れ、非線形の項が含まれる非線形分極 P_{NL} で表すことが出来る。

$$P_{NL} = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}EE + \chi^{(3)}EEE + \dots \quad (2-2)$$

ここで、 $\chi^{(2)}$ および $\chi^{(3)}$ は2次及び3次の非線形感受率である。分極波が歪むと、入射光波の基本波成分 (ω) 以外に高調波成分 ($2\omega, 3\omega, \dots$) が含まれることになる。このような非線形分極波が物質を伝搬し、物質/自由空間の境界から出射されると、出射光波は分極波同様に歪む。このような出射光波の歪みは、出射光波が入射光波の基本波成分と高調波成分を含むことを意味しているので、光周波数 (波長) が物質入射の前後で変化することになる。SHG 光は2次の非線形分極 $\chi^{(2)}EE$ によって非中心対称性物質のみで誘起され、周波数 ω の光を入射したとき、 2ω の光が発生する。図 2-5 は、非中心対称性物質において誘起される非線形分極の様子を表した図を示している。高いピークパワーを持つ光が非中心対称構造物に入射する場合、正負の方向で分極波が非対称となるため、図中分極波の上半分が歪む。この分極波形をフーリエ級数展開すると、入射電場周波数の偶数次の高調波成分 ($2\omega, 4\omega, \dots$) が含まれ、2次の高調波成分が SHG 光となる。一方、中心対称構造物の物質の場合、分極波は正負の方向で中心対照的な非線形分極応答となり、奇数次の高調波成分 ($3\omega, 6\omega, \dots$) が含まれ、3次の高調波成分が THG 光 (第3高調波発生, third-harmonic-generation) となる。

非線形分極@非中心対称物質

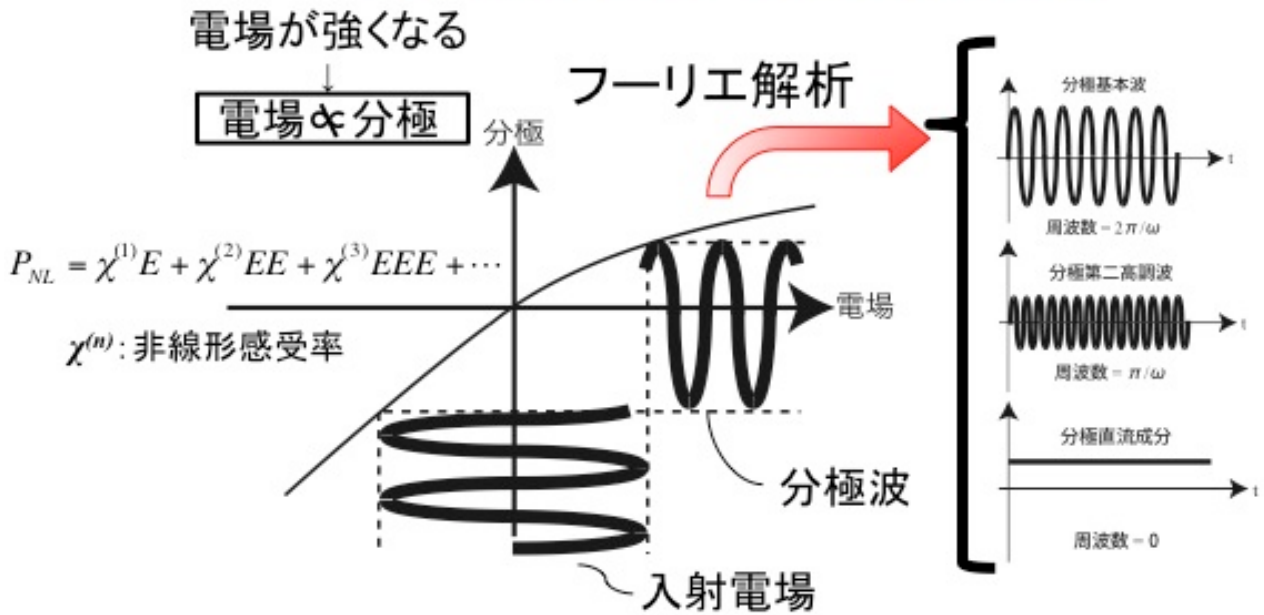


図 2-5 非中心対称物質で起こる非線形分極

2.3.2 位相整合条件と生体 SHG 光

SHG という現象は、SHG 顕微鏡のみならず、レーザーおよび電気光学の分野において幅広く利用されている[9]. その代表的なものが、レーザー光源の波長変換である. BBO (barium metaborate) 結晶や DAST (*N,N*-diethylaminosulfur trifluoride) 結晶など、高い非線形感受率を有する結晶をレーザーキャビティ内部もしくは出射後の光路内に挿入することで、レーザー光の波長変換が可能となる. これらの結晶内部において、高強度な SHG 光を発生させるために重要であるのは、入射した光と発生した SHG 光の位相速度を合わせる位相整合を達成することである. 各種のパラメーターと発生する SHG 光強度は式(2-3), (2-4) と図 2-6 のように表すことができる[4].

$$P_{2\omega} = 2 \left(\frac{\mu_0}{\epsilon_0} \right)^{3/2} \frac{\omega^2 d^2 l^2 \sin^2(\pi l / l_c)}{n^3 (\pi l / l_c)^2} \frac{P_\omega^2}{A} \quad (2-3)$$

$$l_c = \frac{2\pi}{k_1 - 2k_2} = \frac{\lambda}{2[n_2 - n_1]} \quad (2-4)$$

ここで、 μ_0 : 真空の透磁率, ϵ_0 : 誘電率, d : 非線形感受率, n : SHG 光屈折率, A : ビーム断面積, P_ω : 基本波のビーム強度, $P_{2\omega}$: SHG 光強度, δ : 結晶の長さ, l_c : コヒーレンス長, ω : 入射光の角周波数, k_1 : 基本波の波数, k_2 : SHG 光の波数, n_1 : 基本波の屈折率, n_2 : SHG 光の屈折率である. 図からも分かるように, $k_2 - 2k_1 = 0$ の時, つまり $n_1 = n_2$ となる時, SHG 光強度 $P_{2\omega}$ は最大となる. この条件を位相整合条件という. 位相整合を達成するためには, 通常, 結晶の複屈折を利用する.

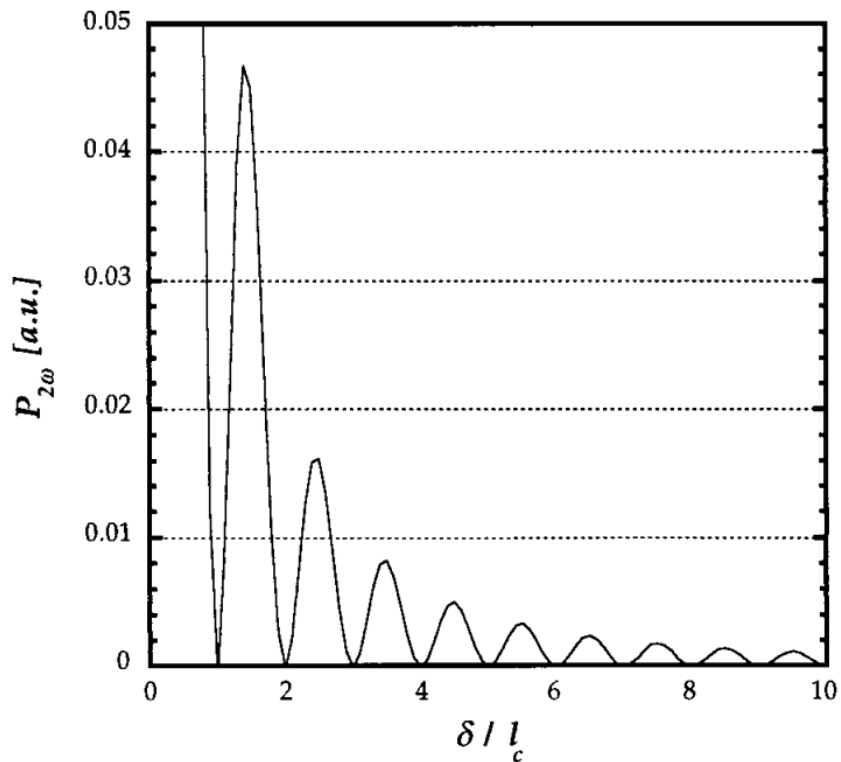


図 2-6 δ / l_c に準じた発生 SHG 光強度の変化[4]

次に生体組織から SHG 光が発生する場合を考える. 対物レンズを用いて生体内に超短パルス光を照射すると, SHG 光を発生 (または検出) するのに十分高い電場強度になる領域が焦点近傍に限られ, 焦

点からのみ SHG 光が発生する。通常の結晶から発生する SHG 光の場合、複屈折を用いて位相整合条件を満足させるが、コラーゲン線維における複屈折は 0.003 と微小であるため、仮にコラーゲン線維が一方向に配向していたとしても、生体組織内で位相整合を達成することは難しい。そこで、生体組織から発生する SHG 光のメカニズムは、図 2-7 のような非位相整合型の多重散乱モデルによって説明される [4]。ピークパワーが高い超短パルス光を生体組織に集光すると、焦点近傍に存在する各々のコラーゲン分子から SHG 光が発生する。このとき、コヒーレンス長 l_c （生体組織では 5~13 μm ）が散乱係数 μ_s の逆数より大きいという条件 ($l_c > 1/\mu_s$) が満たされると、各々のコラーゲン分子から発生した SHG 光はコヒーレンスを失う前に別のコラーゲン分子から発生（または散乱）した SHG 光と干渉する。その結果、SHG 光は焦点内で次々と強め合う干渉が起こり、増強した生体 SHG 光を検出することができる。

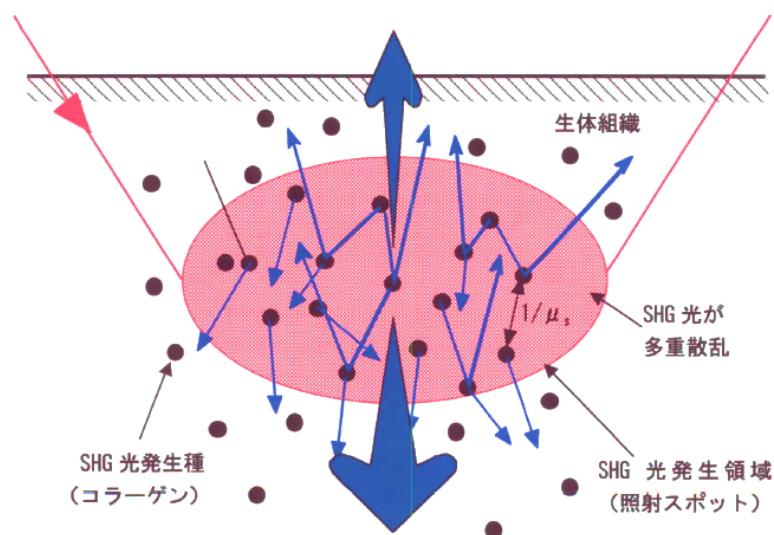


図 2-7 非位相整合型の多重散乱モデル

2.4 まとめ

本章では、生体 SHG 光の発生源となるコラーゲンとその従来の可視化手法、および生体 SHG 光の発生原理について記述した。我々の生命活動に直結するコラーゲンを可視化する従来法には一長一短があり、生きたありのままのコラーゲンを高コントラスト・高空間分解に可視化することは難しかった。一方、SHG 顕微鏡では、コラーゲン分子固有の構造に依存して発生する SHG 光を観測することにより、非染色・非破壊かつ高コントラスト・高空間分解に生体組織中のコラーゲンの選択的可視化が可能となる。次章からは、この SHG 顕微鏡が有する「コラーゲンの選択的可視化」と「*in situ* 計測特性」という両特徴を活かしたバイオ応用について記述する。

参考文献

- [1] P. J. Campagnola and C. Y. Dong, “Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis”, *Laser Photon. Rev.* **5**, 13 (2011).
- [2] M. D. Shoulders and R. T. Raines, “Collagen structure and stability”, *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929 (2009).
- [3] I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, “Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon”, *Biophys J.* **50**, 693 (1986).
- [4] B. M. Kim, J. Eichler, and L. B. Da Silva, “Frequency doubling of ultrashort laser pulses in biological tissues”, *Appl. Opt.* **38**, 7145 (1999).
- [5] 小出隆規, ”コラーゲン様三重螺旋ペプチドを利用した生化学研究”, *生化学* **82**, 474 (2010).
- [6] 野島博 編, ”顕微鏡の使い方ノート—はじめての観察からイメージングの応用まで”, 羊土社, (2011).
- [7] 春名正光, “光コヒーレンストモグラフィ (OCT) ”, *Medical Photonics* **1**, 2 (2010).
- [8] Y. Yang, M. Ahearne, I. Wimpenny, J. G. Leach, and J. Torbet, “Investigation of a tissue engineered tendon model by PS-OCT” *Proc. SPIE* **6858**, 75660A (2010).
- [9] 服部利明: 非線形光学入門, 裳華房 (2009).

3章 静置培養骨芽細胞産生コラーゲン線維の *in situ* 時系列モニタリング

3.1 イントロダクション

骨は、我々が動く時の要（かなめ）になる組織であり、その変形・痛み・骨折は、QOL（Quality of life : 生活の質）を著しく低下させる。一方、骨代謝のスピードは極めて遅く、1年で数%程度のサイクルでしか行われぬ。例えば、皮膚が1ヶ月弱で新しくターンオーバーされていくのとは対照的に、10年程度を掛けて少しずつ新しい骨に入れ替わっていく。したがって、代謝の低下した高齢者が丈夫な骨組織を維持することや、骨折後に骨機能を回復させることは困難である。そのため、高齢化が進行する我が国において、骨の再生エンジニアリングのニーズは高まっている[1, 2].

骨は、骨芽細胞がコラーゲンを産生し、コラーゲンが高次構造（骨基質）を構築し、そこにミネラルが沈着することにより形成（再生）されていく。現在、iPS細胞や間葉系幹細胞を用いると骨芽細胞を作ることは可能であるが[3, 4]、その組織化過程には未解明な部分も少なくない。骨は力的刺激に反応して常に作り替えられているが、骨芽細胞は周囲を硬組織に覆われているため、組織化過程の生きた骨の中で骨芽細胞がどのような振る舞いをするのかは未だ解明されていない。特に、この組織化過程ではコラーゲンが極めて重要な役割を果たしているが、これをその場観察することはこれまで不可能であった。従来の組織工学におけるコラーゲン可視化手法として、染色法が主に用いられているが[5]、細胞や組織の固定や染色が必要なため、侵襲的な方法であり、培養過程を時系列モニタリングしながらコラーゲン線維の品質評価を行うことは出来ない。

一方、SHG 顕微鏡は、コラーゲン選択性／低侵襲性／染色不要といった特徴を有することから、ヒト皮膚等の生体組織におけるコラーゲン線維を生きたありのままの状態でも可視化する手段として注目されている[6]。これらの特徴は、コラーゲン動態を時系列モニタリングする手段としても、有用である。

例えば、先行研究では、皮膚における熱傷や切創の動物モデルにおいて、治癒過程を時系列モニタリングし、創傷部におけるコラーゲン動態を生きたありのままの状態でも可視化することに成功している[7]。

本研究では、19 fs パルス光と 110 fs パルス光を用いた SHG 顕微鏡を構築し、培養骨芽細胞産生コラーゲン線維の可視化を試みた。更に、静置培養された骨芽細胞産生コラーゲン線維の時系列モニタリングを4週間に渡って行った。最後に、得られた SHG イメージの画像解析により、コラーゲンの成熟度合いに関する定量情報の抽出を行った。

3.2 SHG 光発生における平均パルス・エネルギーとパルス幅の影響

SHG 顕微鏡を培養細胞モデルの時系列モニタリングに適用するにあたっては、細胞産生コラーゲン線維の SHG 発生効率が低いことを考慮する必要がある。コラーゲンの非線形光学特性は、ポリペプチド鎖3重螺旋構造の非中心対称性と規則的高次構造に起因しているが、細胞産生コラーゲンは一般組織と比べ構造的に未成熟なため（高次構造化が進んでいない）、非線形光学特性が小さく SHG 光が微弱となる。このようなことから、SHG 顕微鏡を培養細胞産生コラーゲン線維の観測に応用するためには、SHG 顕微鏡の高感度化が必要になる。

ここで、検出器によって実際に検出される SHG 信号強度について考える。SHG は瞬時の過程であり、

レーザーパルス光が存在する時間領域でのみ発生する。つまり、2次の非線形分極 $\chi^{(2)}EE$ をパルス幅の時間間隔だけ積分した信号が検出される。ここで $\chi^{(2)}$ は2次の非線形感受率、 E は入射レーザー電場である。従ってSHG信号強度と発生に起因するパラメーターは、簡単に以下の様に見える[8]。

$$I_{2\omega} \propto \left[\chi^{(2)} \frac{P_{\omega}}{\tau_{\omega}} \right]^2 \tau_{\omega} \quad (1)$$

ここで P_{ω} はレーザーの持つパルス・エネルギー (= 平均パワー/繰り返し周波数) , τ_{ω} はレーザーパルス幅である。上式より、SHG信号強度はレーザー平均パワー (P_{ω}) を上昇させることで、SHG発生効率の低いサンプルでもSHG強度が平均パワー (パルス・エネルギー) の2乗に比例して増大し (図3-1(a)) , イメージ・コントラストを向上させることができる。しかし、この場合、レーザーによるサンプルへのダメージはレーザー平均パワーに比例して大きくなるため、レーザー平均パワーを上昇させることによる組織へのダメージの増加や細胞のバイアビリティの減少が起こる。一方、レーザー平均パワー (パルス・エネルギー) を維持したままパルス幅を狭窄化すれば (すなわち τ_{ω} のみ小さくすれば) , レーザー照射によるサンプルへの影響を最小限に抑えつつ、SHG発生強度をパルス幅に反比例して増大 (図3-1(b)) することが可能となる。

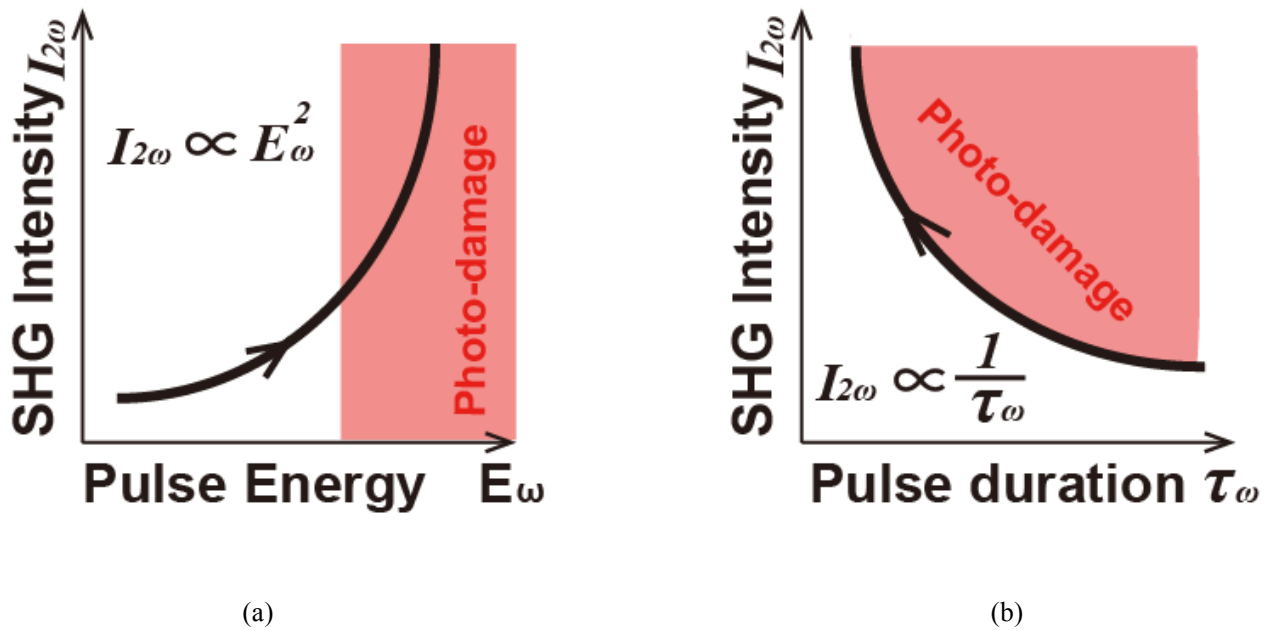


図 3-1 (a) 入射パルス・エネルギーと発生する SHG 光強度の関係. (b) 入射パルス幅と発生する SHG 光強度の関係.

3.3 実験サンプルと実験装置

3.3.1 実験サンプル

本研究で使用した細胞はマウス頭蓋冠由来の細胞株である骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 である. フラスコにて 10%の濃度で FBS (Fetal Bovine Serum) を添加した MEM- α (Minimum Essential Medium- α) 培地 (Nacalai Tesque Co. Ltd.) を用いて培養密度が約 80%になるまで培養し, その後にストレッチチャンバー (ストレックス社製) へと播種する. この時から, 骨芽細胞に分化させるために分化誘導培地で培養する. 分化誘導培地の組成は, 通常の MEM- α 培地に 1%の濃度でアスコルビン酸, 0.2%の濃度でヒドロコルチゾン, 2%の濃度で β -グリセロフォスフェートを添加したものである. また, 細胞培養の際に細

部に渡る滅菌処理が困難であるため、ペニシリン/ストレプトマイシン溶液を1%の濃度で添加した。ストレッチチャンバーは、使用前にオートクレーブ滅菌装置を使用して20分間120°Cで滅菌した後、培養面の細胞接着性を高めるためにフィブロネクチン溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いて4時間以上コーティング処理を行い、その後 DPBS で2回リンスしたものを実験に用いた。

SHG イメージングを行う前に、まず静置培養下の骨芽細胞が産生するコラーゲン線維を確認するため、異なる培養期間で培養させたサンプルをシリウスレッドで染色し、位相差顕微鏡で観察を行った。この染色法では、コラーゲンと細胞核をピンクに染色することができる[9]。図 3-2 に実験結果を示す。それぞれ、静置培養骨芽細胞サンプルを(a)0日後(播種直後)、(b)1週間後、(c)2週間後、(d)3週間後、(e)4週間後に組織固定し、染色したものである。イメージサイズはすべて1mm×1mmである。はじめに、(a)0日後のイメージでは、細胞をチャンバーに播種し、接着した後すぐに染色しているためコラーゲンは産生されていないはずである。したがって、このイメージでは細胞核のみが染色されていると考えられる。次に、(b)1週間後のイメージでは、細胞数の増加および細胞によるコラーゲン産生のため、全体においてピンクの色合いが濃くなっていることが確認できる。しかし、このイメージからは細胞核とコラーゲンを見分けることが出来ないため、現時点ではコラーゲンの産生量を知ることは出来ない。(c)2週間後のイメージでは、ピンクに染まった部分が部位ごとに濃淡を持っている様子が確認できる。骨芽細胞は1週間目ですでにコンフルエントであるので、イメージで見られるピンクの濃淡は、細胞(細胞核)数の増加ではなく、主にコラーゲン線維の産生によりその密度が向上した結果であると考えられる。次に、(d)3週間目のイメージでは、場所ごとのピンクの濃淡がさらに明確になっている。一方で(e)

4週間目のイメージでは、(d)3週間目のイメージとほとんど違いがないことが確認できる。これは、コラーゲンの産生がほとんど飽和していることを示唆していると考えられる。このように、異なる培養期間で培養させたサンプルの染色をすることで、骨芽細胞がコラーゲンを産生していることを確認できた。したがって、このプロトコルに従って骨芽細胞を静置培養し、骨芽細胞産生コラーゲン線維の動態をSHGイメージングで *in situ* で可視化した。

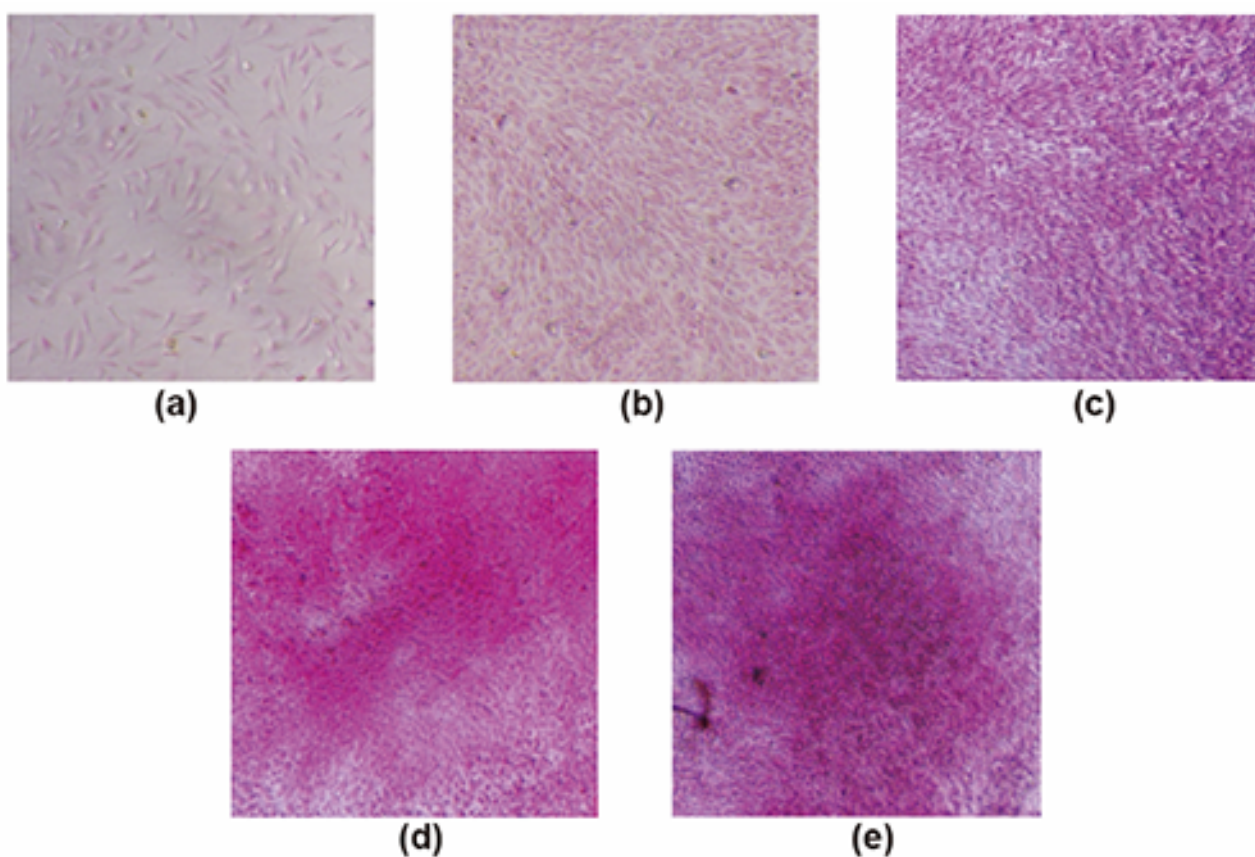


図 3-2 静置培養骨芽細胞産生コラーゲンの染色像。(a)0日後(播種直後)、(b)1週間後、(c)2週間後、(d)3週間後、(e)4週間後。イメージサイズ:1mm×1mm、本染色法では、コラーゲンと細胞核がピンクに染まっている。

3.3.2 SHG 顕微鏡のセットアップ

図 3-3 に構築した SHG 顕微鏡のセットアップを示す。ここでは、110 fs パルス光および 19 fs パルス光というパルス幅が異なる 2 つのフェムト秒レーザーをそれぞれ SHG 顕微鏡の光源として用いている。中心波長 780 nm の 110 fs パルス光は、Er 添加ファイバーレーザーの 2 倍波 (FD-ML-ErF, Toptica 社製, FFS. SYS-SHG; スペクトル幅 : 10 nm, 繰り返し周波数 = 100 MHz) から出射される。ここでは、2 光子蛍光自己相関計[10]を用いることにより対物レンズ焦点面におけるパルス幅が、レーザー出射直後 (110 fs) と同じであることを確認している。一方、19 fs パルス光は Ti:Sapphire レーザー (ML-Ti:S, FEMTOLASERS 社製, Femtosource Scientific Pro; パルス幅 : 10 fs, 中心波長 : 787 nm, スペクトル幅 : 103 nm, 繰り返し周波数 : 81.8 MHz) からの出射光を、負分散ミラー (NDC, FEMTOLASERS 社製, MOSAIC PRO V, 群遅延量 : -900 to -6270 fs²) を用いて対物レンズ焦点面において精密に分散補償することによって得られている。フリッパーミラーを用いて、110 fs パルス光または 19 fs パルス光のどちらかを光学系に導いた後、レーザー光はガルバノミラーと 2 枚のリレーレンズにより高速 2 次元走査され、水浸対物レンズ (OL; N.A. = 0.90, WD = 2 mm) を用いてサンプル上に照射される。サンプルから前方に伝搬した SHG 光は、コリメーターレンズによって集められ、ガラスフィルターを用いて基本波成分を除去した後、電子冷却フォトンカウンティング型光電子増倍管 (PMT, 浜松ホトニクス社製, H8259-01) により検出される。このようなレーザー走査光学系を用いることにより、256 × 256 ピクセルから成る 260 × 260 μm の領域を 0.1 秒/フレームで可視化できる。また、機械式ステージを用いて測定サンプルを左右に動かすことにより、4 行 4 列の 16 枚の SHG イメージから成る大面積 SHG イメージ (イメージサイ

ズ : 1.04 mm × 1.04 mm, ピクセルサイズ : 1024 × 1024 ピクセル) の取得が可能である.

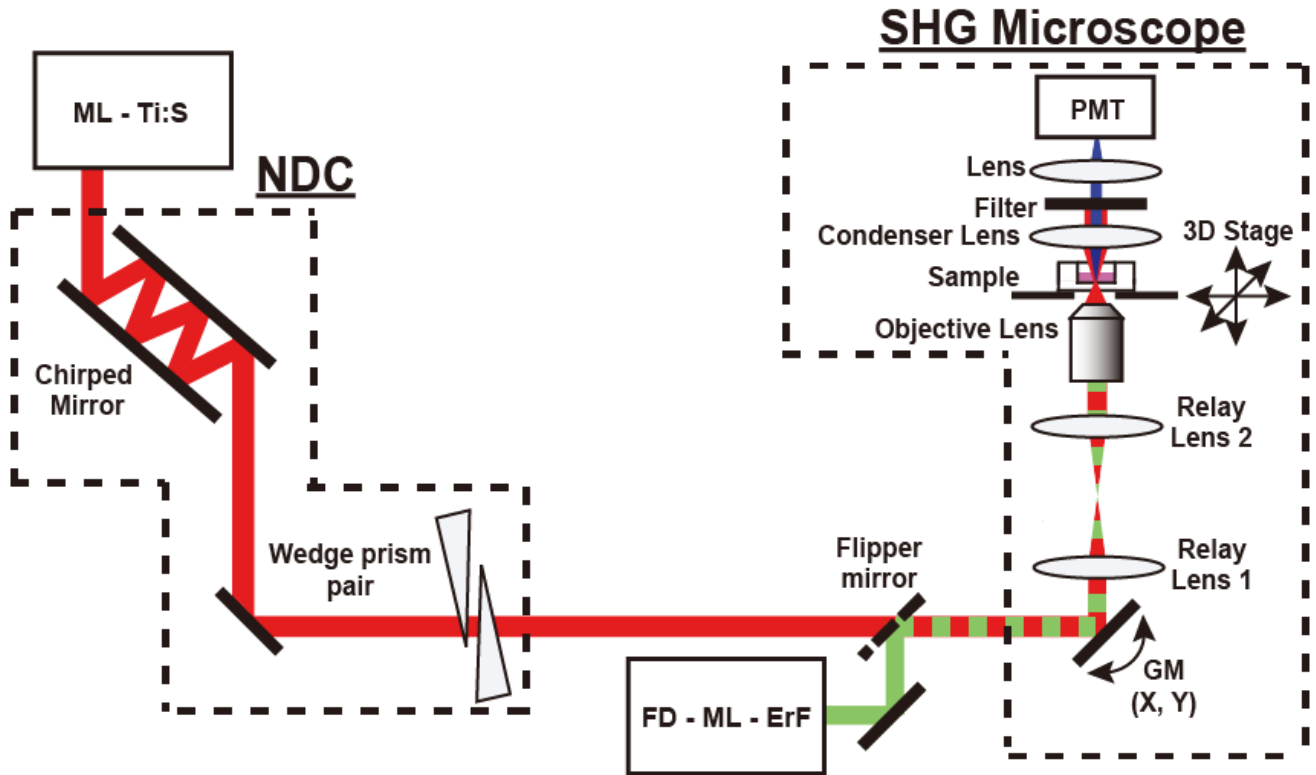


図 3-3 SHG 顕微鏡のセットアップ. ML-TiS: パルス幅 10 fs, 中心波長 787 nm のモード同期 Ti:Sapphire レーザー; NDC: 負分散コントローラー. FD-ML-ErF: パルス幅 110 fs, 中心波長 775 nm の周波数通倍モード同期 Er ファイバーレーザー. GM: ガルバノミラー. PMT: 光電子増倍管.

3.4 実験結果

3.4.1 骨芽細胞産生コラーゲン線維の SHG イメージングにおけるパルス幅の影響

SHG 顕微鏡を用いて、静置培養 3 週間目の骨芽細胞産生コラーゲン線維の可視化を行った。図 3-4(a) および図 3-4(b)は、110 fs パルス光と 19 fs パルス光をそれぞれ光源とした場合の SHG イメージを示す。ここで、レーザーパワーはどちらの場合でも 20 mW に調節している。両 SHG イメージのグレースケールは、レーザー繰り返し周波数の違い (110 fs: 100 MHz, 19 fs: 81.8 MHz) を反映させ修正しているため、ここでは両イメージにおけるグレースケール値の直接比較が可能である。両イメージを比較すると、まず図 3-4(a)の 110 fs パルス光を用いて取得した SHG イメージでは、コントラストが低く、詳細なコラーゲン分布を確認することが出来ない。一方、図 3-4(b)の 19 fs パルス光を用いた場合の SHG イメージでは、パルス幅の狭窄化によりピークパワーが向上した結果イメージコントラストが向上し、視野全体に渡って鮮明なコラーゲン分布を可視化出来ていることがわかる。このような対物レンズ焦点面での分散補償を行ったパルス光を用いれば、深さ方向における SHG 発生領域の縮小により、焦点面以外の面から発生する背景光の抑制により、SN の向上も期待できるが、今回のように薄いサンプルの場合はこの影響は顕著に見られていない。

このようなパルス幅の狭窄化による SHG 光強度の向上度合いを定量確認するため、両 SHG イメージのそれぞれのピクセルにおける強度比を用いて作製したレシオ・イメージを図 3-4(c)に示す。このレシオ・イメージの、任意の位置において 16 の ROI (64 ピクセル × 64 ピクセル) を抽出し、その平均値を

算出したところ、 3.81 ± 0.11 (平均 \pm 標準偏差) という結果が得られた。一方、SHG 光強度は、入射レーザー光のパルス・エネルギーが一定である条件であれば、パルス幅の逆数に依存し増大するため[11]、純粋に 110 fs と 19 fs というパルス幅から計算すれば、理論上は 8.7 倍の増大を見込むことができる。この実測値と理論値の違いの原因として、19 fs パルス波形を分散補償した際に発生した余剰チャープおよびペDESTAL成分によりパルス波形が歪み、ピークパワーが低下したことが挙げられる。また、19 fs パルス光の場合、スペクトル帯域が 110 fs パルス光に対して約 10 倍広いため、色収差により焦点スポットが広がっていることも原因の一つであると考えられる。しかしながら、3.81 倍の高感度化により、わずか数 μm の厚みしかない単層の骨芽細胞産生コラーゲン線維が無染色で可視化されているため、コラーゲン動態を評価するには十分であると考えられる。

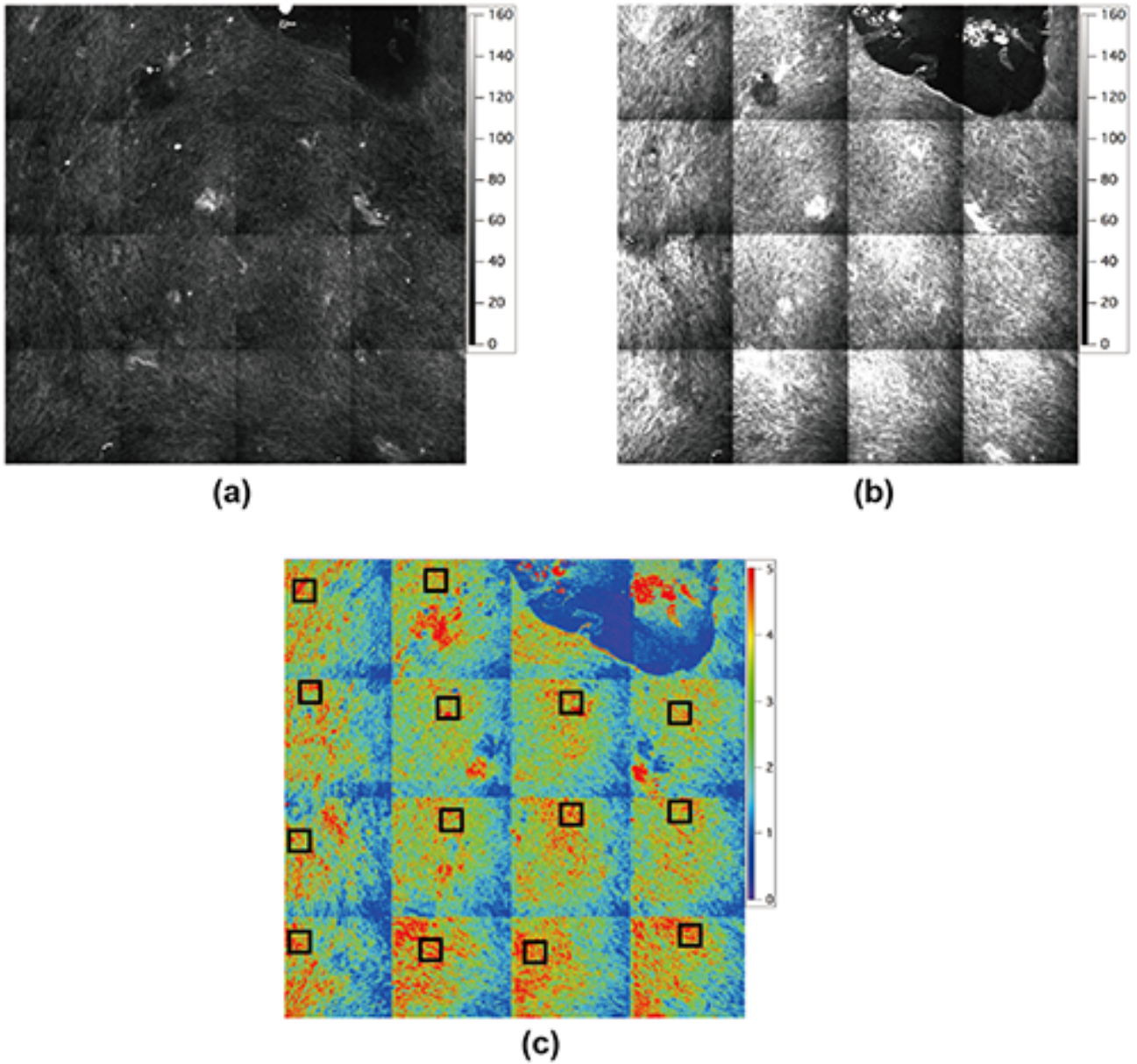


図 3-4 (a)110 fs パルス光, (b) 19 fs パルス光を用いて取得した骨芽細胞産生コラーゲン (培養 3 週間) の SHG イメージ. (c) (a) と (b) のイメージを割ることにより得られたレシオ・イメージ. イメージサイズ: 1040 μm \times 1040 μm .

3. 4. 2 骨芽細胞産生コラーゲン線維の時系列 SHG イメージング

19 fs パルス光を光源とした SHG 顕微鏡を用いて, 静置培養された骨芽細胞産生コラーゲンの SHG イ

メージングを行った。サンプルは同一個体であり、1週間毎に4週にわたって計測した。図3-5にそれぞれ、(a)細胞播種直後、(b)1週間後、(c)2週間後、(d)3週間後、(e)4週間後に取得したSHGイメージングの結果を示す。まず、(a)の細胞播種直後のSHGイメージでは、コラーゲンの産生がないため、なにも信号が得られていないことがわかる。SHG光は、細胞内に存在する微小管からも発生することが知られているが[12]、この結果より本実験のSHGイメージには微小管からのSHG光は寄与していないと言える。一方、(b)から(e)までのSHGイメージでは、培養時間が経過していくにつれて、コラーゲン線維の産生及びその分布の変化が確認できる。まず(b)の1週間後のSHGイメージでは、円環のような形でコラーゲンが可視化出来てきており、骨芽細胞で合成されたコラーゲンが、細胞内に存在している様子を反映していると考えられる。このような非常に低輝度のSHG信号の原因として、このSHGイメージで可視化されているコラーゲンは細胞内に存在しているため、線維形成されていないコラーゲンであるということが考えられる。次に(c)の2週間後のSHGイメージでは、コラーゲンが1週間目と同様の構造を持って分布しているものの、その輝度値が向上していることがわかる。これは培養時間の経過によりコラーゲン産生量が増えた結果、細胞内においてコラーゲンの密度が高くなったということを反映していると考えられる。(d)の培養3週間目のSHGイメージでは、1,2週間目と同様に細胞内において円環状に分布しているコラーゲンに加えて、画像中心付近において細胞外に分泌された線維状のコラーゲン同士が、ネットワーク構造を形成されている様子が可視化されている。最後に、(e)の4週間目のSHGイメージでは、更なる培養により、細胞外に分泌されたコラーゲンの線維径が太くなり、さらに密なネットワーク構造を形成している様子が可視化出来ている。このようにSHGイメージングに

より可視化できた培養過程におけるコラーゲン動態は、図 3-2 の染色イメージから得られる知見とよく一致しており、かつ染色イメージにおけるものより高コントラストなので、更に詳細なコラーゲン構造変化を捉えることができた。

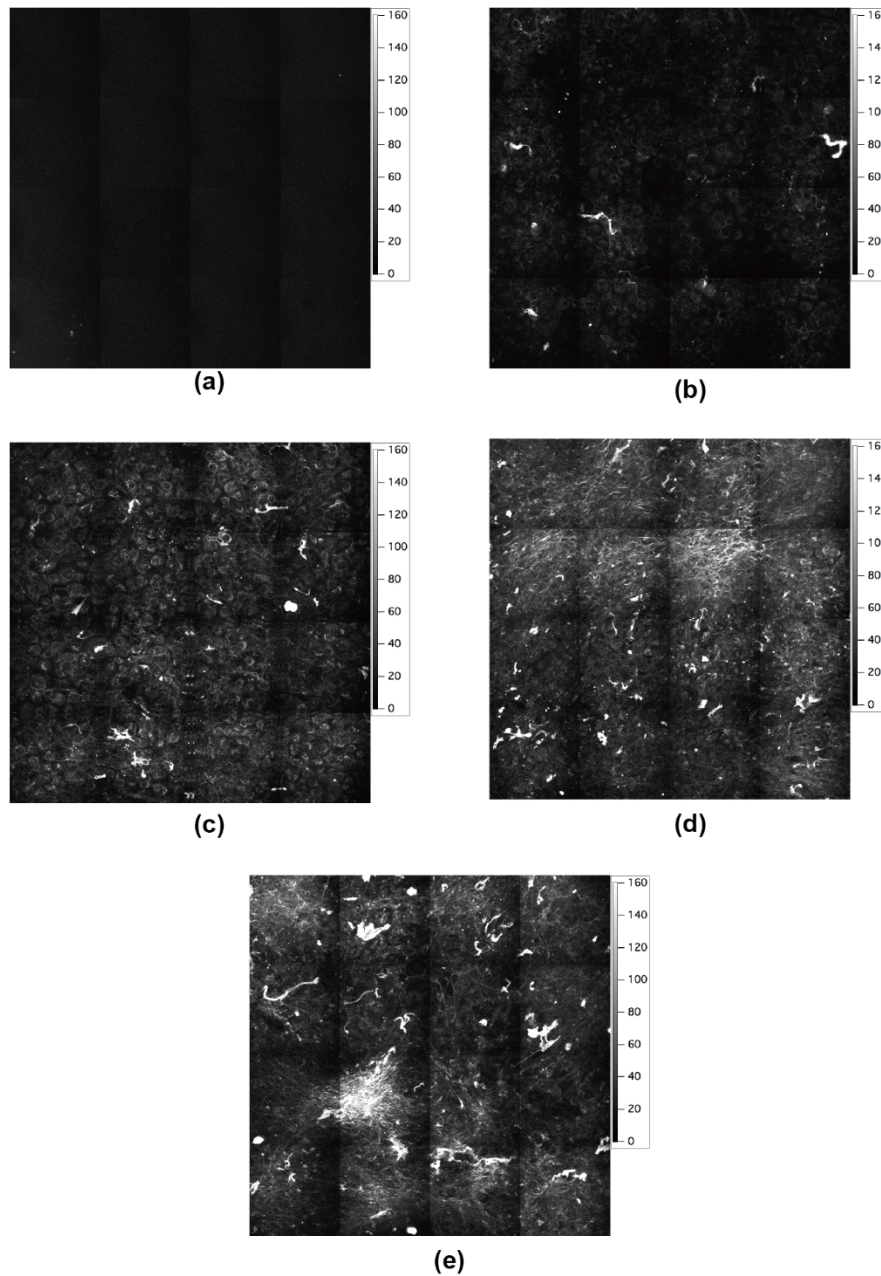


図 3-5 静置培養骨芽細胞産生コラーゲンの同一サンプル *in situ* 時系列モニタリング. (a) 細胞播種直

後, (b)1 週間後, (c)2 週間後, (d)3 週間後, (e)4 週間後. イメージサイズ: 1040 μm \times 1040 μm .

3.4.3 コラーゲン成熟度の定量評価

19 fs パルス光を光源とした SHG 顕微鏡を用いることにより、培養過程において骨芽細胞産生コラーゲンが細胞内で合成された後に細胞外へ分泌され、細胞外において線維同士がネットワーク構造を形成していく様子を非染色で可視化することが出来た。このようなコラーゲンの特徴的な構造変化は、コラーゲンの成熟度に密接に関係していると考えられる。このような SHG イメージにおけるコラーゲン構造変化を定量する画像解析手法として、2次元フーリエ変換が有力である[13]。しかしながら、本実験結果のように、成熟したコラーゲン線維がランダムな分布を形成する場合、イメージの2次元フーリエ変換により得られる方位角や空間周波数の情報のみでは定量評価することが難しい。そこで本研究では、2次元フーリエ変換に SHG 光強度の情報を加えて解析を行った。

まず、11×11 ピクセルの ROI を SHG イメージから抽出し、2次元フーリエ変換によりパワースペクトルを取得する。次に得られたパワースペクトルに対して2次元ガウス関数でフィッティングを行い、得られたフィッティングカーブを楕円近似することにより、長軸と短軸の比を算出する (FT-L/S ratio)。この処理を、5 ピクセル間隔で SHG イメージの左下から右上まで繰り返し行うことにより、FT-L/S ratio の 2D マッピングである FT-L/S イメージが取得できる (ピクセルサイズ: 202×202 ピクセル)。FT-L/S イメージでは、SHG 光強度の情報を含まないため、コラーゲンの密度ではなくネットワーク構造の情報を含んでいる。コラーゲンの線維構造のみがサンプルに存在している場合、FT-L/S イメージはコラーゲン配向性を示す有用な解析となるが、今回のサンプルでは、培養1～2週のイメージのように、線維構造を持っていないコラーゲン (細胞内に産生されているもの) も可視化されている。次に、イメージ

中のコラーゲン密度の情報を抽出するため、SHG イメージにおける輝度値の情報を FT-L/S イメージに
乗算する。ここで、元の SHG イメージと FT-L/S イメージのピクセルサイズが異なっているため、元の
SHG イメージにおけるピクセルデータをビニングしリサイズを行う (Resized SHG image)。このように
処理したイメージをコラーゲン成熟度 (CMF : collagen maturity factor) イメージと呼び、この CMF イメ
ージは、コラーゲン線維密度とネットワーク構造の両方の情報を含んでいる。次に、このような CMF イ
メージ (ピクセルサイズ : 202 × 202 ピクセル) を 16 枚のイメージ (ピクセルサイズ : 50 × 50 ピクセル)
に区分けし、区分けされた 16 枚のイメージにおける平均 CMF 値を計算する。最後に、異なる培養期間
で取得したそれぞれの CMF イメージ間において、有意差検定を行う。

図 3-6 に、異なる培養期間における、元の SHG イメージ、FT-L/S イメージ、リサイズされた SHG イ
メージ、CMF イメージを並べて示す。この結果から、CMF イメージは、コラーゲンの時間的成熟を正
しく反映したイメージとなっていることが確認できる。また、図 3-7 に、培養時間の違いとそれぞれの
平均 CMF 値の関係を表した図を示す。この図から、平均 CMF 値が時間経過ごとに増加していく様子が
わかり、播種直後、1 週間後、2 週間後、3 週間後の間には有意差があることが確認できる。一方、3 週
間後と 4 週間後の間には有意差が確認出来なかったことから、この段階においてコラーゲンの成熟が飽
和していることを示唆していると考えられる。

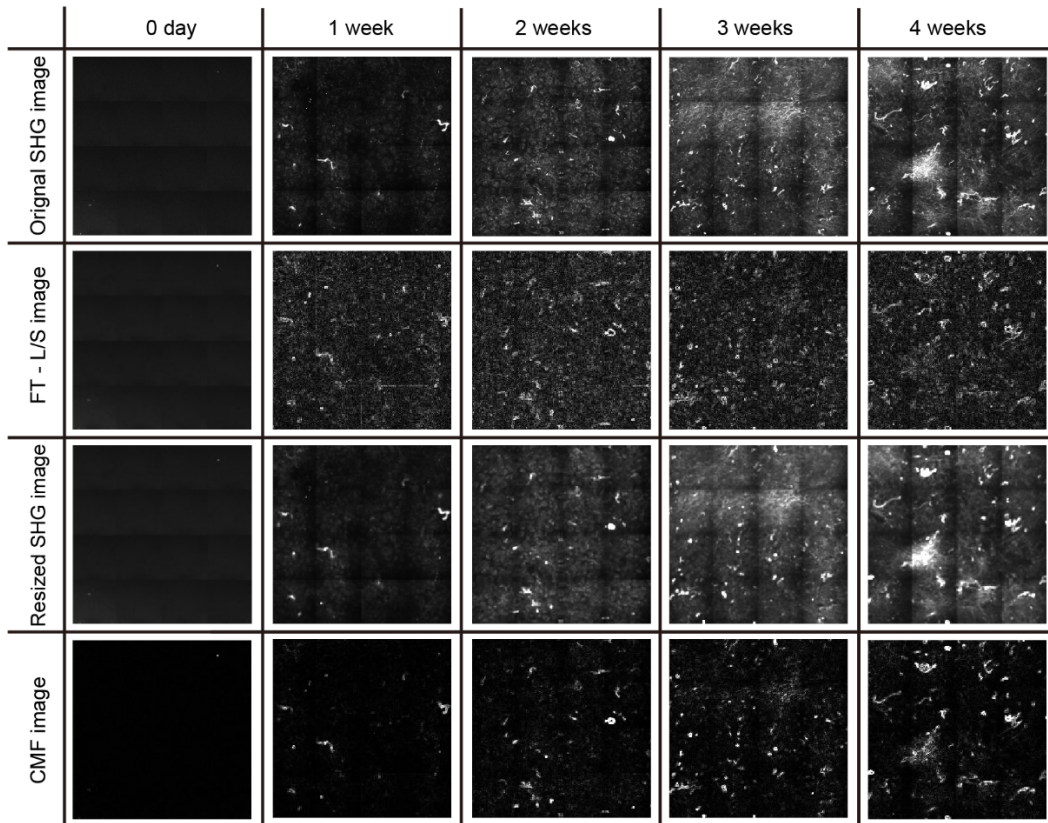


図 3-6 異なる培養期間における，元の SHG イメージ，FT-L/S イメージ，リサイズされた SHG イメージ，CMF イメージの比較.

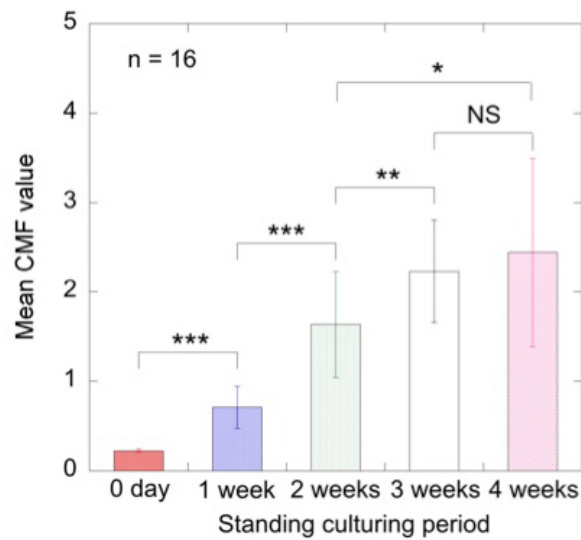


図 3-7 培養時間の違いと平均 CMF 値の関係. p 値は Student の t 検定を用いて計算している (*, $p < 0.05$;

** , $p < 0.01$; *** , $p < 0.001$; NS, 有意差なし).

3.5 考察

本研究では、19 fs パルス光を光源とした SHG 顕微鏡を用いることにより、静置培養された骨芽細胞産生コラーゲン線維の *in situ* 時系列モニタリングに成功した。このような高感度化された SHG 顕微鏡は、培養過程における細胞産生コラーゲンの時系列モニタリングを行うツールとして有力であることから、今後の骨再生エンジニアリング分野の発展に貢献すると考えられる。本手法では、高コントラストにコラーゲンのみの選択的可視化が可能となり、これにより細胞が産生したコラーゲン動態を直接的に観察することができる。また、SHG イメージは、高コントラストかつ背景光なしで取得できるので、定量評価の際の画像解析にも有用である。本手法におけるこのような特徴は、細胞核とコラーゲンを見分けることが出来ない染色法と比較して、アドバンテージを有していると言える。更に、本手法では、非染色・非破壊でのコラーゲン可視化により、同一サンプルの時系列モニタリングが可能であるという点も、今後の骨再生エンジニアリング分野の研究において重要である。骨芽細胞は、力学[14]または化学的刺激[15]によりコラーゲン産生量を変化させるということがよく知られているが、SHG 顕微鏡によるコラーゲン動態の時系列モニタリング結果に基づいて、培養過程にけるそれらの刺激をフィードバック制御することで、適切な質と量を持った培養骨組織が構築できるようになると考えられる。

次に、コラーゲンの成熟度合いと骨の石灰化について考察する。骨芽細胞は、産生したコラーゲン上にアパタイト結晶を産生することにより、ナノ複合体構造を形成することが知られている[16]。図 3-8 に、培養 1 週間後、3 週間後、31 日後に撮影した静置培養骨芽細胞サンプルの位相差イメージを示す。このイメージにおいて、黒い領域は石灰化した部分を示しており、ピンクの部分は培地の色の影響であ

る。図 3-8 (a)では、細胞播種から 1 週間の経過により、骨芽細胞が増殖しコンフルエントな状態になっているが、石灰化はほとんど進んでいない様子がわかる。次に、2 週間が経過した図 3-8 (b)のイメージでは、イメージ中心部において石灰化が始まる様子が可視化されている。さらに、時間が経過した図 3-8 (c)のようにイメージでは、全体において石灰化している。このような石灰化の時系列的変化は、SHG イメージから抽出した CMF 値により得られた、コラーゲン産生の飽和タイミングとよく一致していることから、CMF 値は骨芽細胞の培養過程において、石灰化の開始する指標になりうると考えられる。一方でこのような石灰化したサンプルの SHG イメージを取得したところ、信号が得られなかった。この原因は、石灰化により目視でも確認できるほどサンプルが白濁していたため、入射光および発生 SHG 光が散乱の影響により減衰したためと考えられる。従って、このような骨芽細胞培養サンプルを SHG 顕微鏡で観察する際には、細胞播種から石灰化の手前までが有効な利用期間であると考えられる。

本研究では、19 fs パルス光を光源とした SHG 顕微鏡を用いることにより、SHG 発生効率の低い骨芽細胞産生コラーゲン線を可視化することに成功した。しかしながら、このようなサブ 20 fs パルス光を生体組織に照射する際に、フォトダメージについて再考する必要がある。サンプルに照射するレーザー光のパルス幅を 100 fs 以下に狭窄化した際、ピークパワーが上がり、非線形的フォトダメージのリスク向上や生細胞のバイアビリティ減少を引き起こす。例えば、チャイニーズハムスターの卵巣細胞を用いた先行研究において、フォトダメージがパルス幅の逆数に比例することが報告されている[17]。また、同様にウシ副腎髄質細胞を用いた実験でも同様の結果が得られているが[18]、骨芽細胞に対するフォトダメージの評価に関する研究は未だ行われていない。本研究では、4 週間の培養期間において、SHG 顕

微鏡での観察とともに位相差顕微鏡を用いて骨芽細胞の形態学的変化を観察したが、顕著な構造変化は確認されなかった（データ省略）。しかし、これはあくまでも preliminary な実験結果であり、今後の展望として、サブ 20 fs パルス光照射時の骨芽細胞に対するフォトダメージの有無について、骨産生マーカーである ALP 活性等[19]を定量的に評価する必要がある。

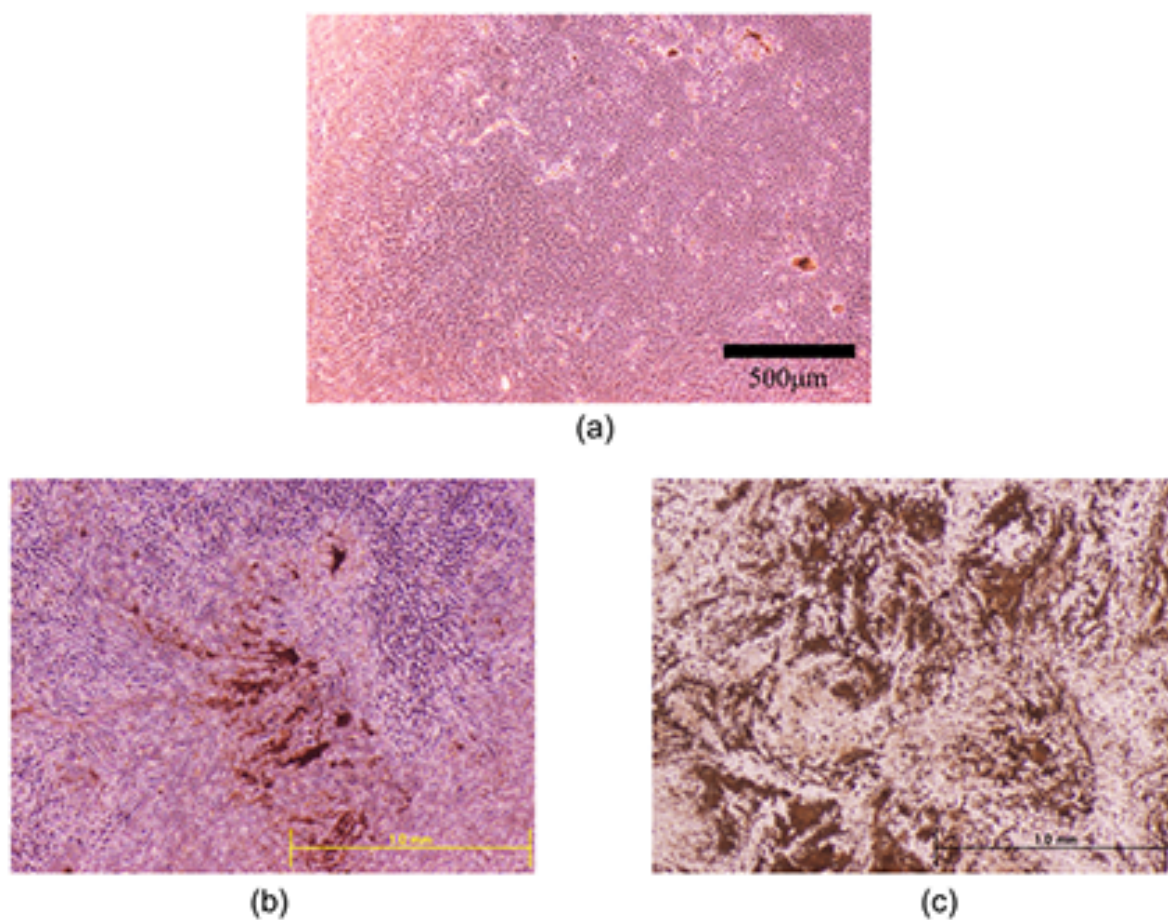


図 3-8 静置培養骨芽細胞の位相差イメージ。それぞれ細胞播種から (a) 1 週間後, (b) 3 週間後, (c) 31 日後。黒い領域は石灰化した部分を示しており、ピンクの部分は培地の色の影響である。

3.6 まとめ

本研究では、SHG 発生効率の低い骨芽細胞産生コラーゲン線維を可視化するため、19 fs パルス光を SHG 顕微鏡の光源に用いて、SHG 顕微鏡を高感度化した。この SHG 顕微鏡を、静置培養骨芽細胞産生コラーゲンの時系列モニタリングに適用し、極薄単層構造を形成する骨芽細胞産生コラーゲン線維を高コントラストに可視化することに成功した。SHG 顕微鏡は 3 次元の光学セクショニング能力を持つため、人工的な足場材料やコラーゲンをを用いた 3 次元培養システムにも応用可能である。SHG 顕微鏡により得られたコラーゲンの時系列的形態変化は、染色イメージと比較して、より詳細かつ *in situ* で捉えることが出来るという利点を確認できた。さらに、2次元フーリエ変換に基づいた画像解析により、コラーゲン成熟度を定量的に抽出できることが確認できた。このような SHG 顕微鏡による骨芽細胞産生コラーゲンの *in situ* での可視化と定量解析は、今後の骨再生エンジニアリングにおいて、適切な質と量を持った再生組織を構築するための培養コントロールの際に、極めて有力なツールとなると考えられる。

参考文献

- [1] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone tissue engineering: state of the art and future trends" *Macromol. Biosci.* **4**, 743 (2004).
- [2] K. E. Healy and R. E. Guldberg, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **7**, 328 (2007).
- [3] K. Kanke, H. Masaki, T. Saito, Y. Komiyama, H. Hojo, H. Nakauchi, A. C. Lichtler, T. Takao, U. Chung, and S. Ohba, "Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions" *Stem Cell Reports* **2**, 751 (2014).
- [4] J.-H. Hong, E. S. Hwang, M. T. Mcmanus, A. Amsterdam, Y. Tian, R. Kalmukova, E. Mueller, T. Benjamin, B. M. Spiegelman, P. A. Sharp, N. Hopkins, and M. B. Yaffe, "TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation" *Science* **309**, 1074 (2005).
- [5] L. E. Smith, R. Smallwood, and S. Macneil, "A comparison of imaging methodologies for 3D tissue engineering" *Microsc. Res. Tech.* **73**, 1123 (2010).
- [6] P. J. Campagnola and C. Y. Dong, "Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis" *Laser Photon. Rev.* **5**, 13 (2011).
- [7] T. Yasui, R. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, and T. Araki, "In vivo time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy", *Proc. SPIE.* **8948**, 89480B (2014).
- [8] S. Tang, T. B. Krasieva, Z. Chen, G. Tempea and B. J. Tromberg, "Effect of pulse duration on two-photon excited

- fluorescence and second harmonic generation in nonlinear optical microscopy" J. Biomed. Opt. **11**, 020501 (2006).
- [9] H. Tullberg-Reinert and G. Jundt, "In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate", Histochem. Cell Biol. **112**, 271 (1999).
- [10] J. B. Guild, C. Xu, and W. W. Webb, "Measurement of group delay dispersion of high numerical aperture objective lenses using two-photon excited fluorescence", Appl. Opt. **36**, 397 (1997).
- [11] P. J. Campagnola, H. A. Clark, W. A. Mohler, A. Lewis, and L. M. Loew, "Second-harmonic imaging microscopy of living cells", J. Biomed. Opt. **6**, 277 (2001).
- [12] P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler, "Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues", Biophys. J. **82**, 493 (2002).
- [13] R. A. Rao, M. R. Mehta, and K. C. Toussaint, "Fourier transform-second-harmonic generation imaging of biological tissues", Opt. Express **17**, 14534 (2009).
- [14] A. Matsugaki, N. Fujiwara, and T. Nakano, "Continuous cyclic stretch induces osteoblast alignment and formation of anisotropic collagen fiber matrix," Acta Biomater. **9**, 7227 (2013).
- [15] W. N. Addison, "Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: An ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone", Bone **71**, 244 (2015).
- [16] S. Boonrunsimane, E. Gentleman, R. Carzaniga, N. D. Evans, D. W. McComb, A. E. Porter, and M. M.

Stevens, "The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **109**, 14170 (2012).

[17] K. König T. W. Becker, P. Fischer, I. Riemann, and K. J. Halbhuberet, "Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes", Opt. Lett. **24**, 113 (1999).

[18] A. Hopt and E. Neher, "Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy", Biophys. J **80**, 2029 (2001).

[19] H. Sudo, H. A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, and S. Kasai, "Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria", Jpn. J. Oral Biol. **23**, 899 (1981).

4章 平均 SHG イメージ強度と引張試験を用いた

腱修復の組織学・力学的評価

4.1 イントロダクション

運動器は人の日々の生活の質の維持に必須である。運動器において腱は、骨格筋の発生した張力を骨に伝達する働きを担っている[1]。腱の構成要素は、腱芽細胞、腱細胞、および細胞外基質である。細胞外基質はコラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、糖タンパク質から構成されている。腱の乾燥質量の内 65~75%がコラーゲンであることから、コラーゲンが腱の形態や力学的特性を決定する最も重要な因子である[2]。腱組織におけるコラーゲンは、線維束・線維・細線維といった階層的な高次構造を有しており、腱の長軸方向に規則的に配列し、互いに組み合わさるような単一配向構造を取る。この極めて規則的な高次配向構造により、引っ張り・剪断・捻れといった負荷に対して力学的特性が実現されている [3]。

腱に過大な負荷が作用すると、部分的な損傷の発生や完全な断裂を引き起こす。腱の断裂の内、アキレス腱断裂は最も多い症例であり、その 80%はスポーツ活動中に発生している [1]。損傷腱の修復は、断裂部腱で腱芽細胞などが増殖し、細胞外基質を形成し、ランダムなコラーゲン線維の細胞外基質が構造上成熟することで進んで行く。しかし、断裂した腱が十分に修復する前に過剰な負荷がかかると、再断裂を引き起こす。また、修復後の腱が必ずしも損傷前の強度に戻らない場合も多い[4]。腱修復は、組織学的形態および力学的強度の両方を回復させることが最終的な目標であることから、腱の修復状態を、

組織学的形態と力学的強度の双方から定量評価出来る手法が強く望まれている。

腱修復部においてコラーゲンの配向・密度・高次構造が正常腱と同様な状態に戻ることが、腱の形態的修復と考えると、コラーゲンの組織学的観察がその直接的な評価方法である。このような観点から、広く用いられてきた手法が染色法である。HE 染色法[5]や他のコラーゲン染色法[6]を用いて、コラーゲンを選択的に染色することにより、修復した腱における組織学的特性を、コラーゲン量やその分布といった観点で詳細に評価することが出来る。染色法にて腱組織学的評価は可能であるが、その結果は腱の力学的評価とは必ずしも一致しない。力学的修復を直接的評価する手法として、引張試験[7]が用いられている。この手法では、採取した腱組織サンプルの応力-ひずみ曲線からヤング率等のパラメーターを抽出することで、力学的強度の回復を評価する。

これらの手法を用いると、損傷腱の形態的修復もしくは力学的回復を評価することが可能であるが、形態的修復と力学的回復の両方を同時に評価することは、これまで困難であった。これは、染色法と引張り試験が侵襲的もしくは破壊的手法であったためである。例えば、染色法は組織バイオプシーされたサンプルを切片化した後に染色を行うが、切片化サンプルされたサンプルは引張り試験が実施可能なほどの力学的強度を有していない。一方、引張り試験後のサンプルは、引張り試験によって印加された力学的負荷により組織が完全に破壊されており、その状態を組織学的に観察しても、形態的修復の度合いを探ることは出来ない。もし、形態的修復を非侵襲に可視化出来れば、引張り試験との併用により同一サンプルにおける形態的修復と力学的回復の関連性を評価可能となり、腱修復の過程に関する新たな知見を得られるかもしれない。非侵襲な組織観察手段である MRI を用いると、組織が含有する水分量分布

から、コラーゲン配列を反映したパラメーターを間接的に抽出することが出来る [7]。しかし、空間分解能は数百 μm 程度に制限され、コラーゲンに対する直接的な分子選択性も持たない。

近年、生体組織におけるコラーゲンを、生きたありのままの状態でも可視化する方法として、SHG 顕微鏡が注目されている [8]。SHG 顕微鏡では、非中心対称構造物質であるコラーゲン分子に対して高ピーク光電場を有する超短パルス光を入射すると、コラーゲン分子との非線形相互作用により波長変換が起こり、入射レーザー光の半波長となる SHG 光がコラーゲン分子から特異的に発生する。この SHG 光を観測することにより、コラーゲンを選択的かつ高コントラストでも可視化できる。さらに、SHG 顕微鏡は、非染色、低侵襲、深浸透性、熱的ダメージが小さい、高い空間分解能、3 次元イメージングが可能といった特徴を有するため、これまでに皮膚 [9]、角膜 [10]、骨 [11]、軟骨 [12]、腱 [13] 等の様々な組織コラーゲンの観察に応用されている。近年、非侵襲観測の特徴を利用し、熱傷や創傷の治癒過程のモニタリングにも応用されている [14, 15]。

SHG 光の発生強度はコラーゲン濃度のみならず、コラーゲンの構造的成熟性（高次構造型）にも依存する。腱の修復過程では、構造的に未熟な（低次構造）コラーゲンが新生された後、リモデリングによって構造的に成熟した（高次構造）のコラーゲンへと置換されていく。従って、SHG 光強度は、腱修復の度合いをコラーゲンという観点で反映した光プローブとして利用出来る可能性を有している。また、切片化することなく、非染色で組織コラーゲンを選択的に可視化出来るので、SHG イメージングで形態的修復を評価した後に、引張り試験による力学的回復を評価することが出来る。その結果、同一サンプルに対して、形態修復と力学的回復の両方の情報を取得することが可能になることが期待される。

本研究では、ウサギ腱損傷モデルを用いて、正常腱および修復腱の SHG イメージングにより、形態的修復をコラーゲン動態の観点から評価した。次に、SHG イメージング後のサンプルに対して、力学的回復を評価するための引張試験を行い、得られた応力-ひずみ曲線からヤング率を算出した。最後に、SHG 強度とヤング率の相関関係を評価し、形態的修復と力学的回復の関連性について考察した。本研究の最終目的としては、これまで破壊的検査でしか評価できなかった腱修復の組織学・力学的評価を、低侵襲的 SHG イメージングで代替できることを示すことである。低侵襲的な SHG イメージングが腱修復過程を明らかにできれば、修復状態に応じた運動負荷の決定など腱断裂の臨床に有用なツールとなることが期待できる。

4.2 実験サンプルと装置

4.2.1 実験サンプル

動物実験及び準備に関しては、徳島大学動物実験倫理委員会（徳動物 12133）の承認を得た。本実験では、先行研究に基づいた実験プロトコル[16] を用いて兔腱断裂モデルを作成し、実験を行った。飼育環境への適応のため、3羽の日本白色家兔（8-10 週齢、体重 = 2.0-2.5 kg、北山ラベス株式会社）を実験開始 1 週間より搬入し、恒温恒湿の下飼育した。腱断裂の外科的作成のため、イソフルランによる吸入麻酔（導入 5%，維持 2%）下で、右足を除毛クリームで脱毛した後、長母指屈筋腱を露出させ、No. 11 の外科用メスにより鋭利に切断した。その後、断裂部をループナイロン縫合糸により縫合し、個体ごとにそれぞれケージで飼育した。術後 4 週間飼育した後、ソムノペンチルの過剰投与により屠殺し、両

足からそれぞれ腱を正常サンプル (n = 8) および修復サンプル (n = 8) として採取し, -15 °Cで冷凍保存した. サンプルは実験日に室温で解凍し, SHG イメージング後に速やかに引張試験を行った.

4. 2. 2 SHG 顕微鏡のセットアップ

図 4-1 に実験のセットアップを示す. 光源に生体透過性の高いフェムト秒モード同期 Cr:forsterite レーザー (Cr-F-65P, Avesta 社製, 中心波長 1250 nm, パルス幅 70 fs, 繰返し周波数 73 MHz) を用いた SHG 顕微鏡を使用している[17]. 光源から出射したレーザー光は, $\lambda/2$ 板 (HWP) と偏光子 (P) によりサンプル表面において平均パワーが 20 mW となるように調整される. また, ここでは SHG 発生効率の偏光依存性をキャンセルするため, $\lambda/4$ 板 (QWP) を用いてレーザー偏光を円偏光に変換している. サンプル上のレーザースポットは, ガルバノミラー (GM) とリレーレンズ (RL) および油浸の対物レンズ (OL; CFI Plan 50 × H, ニコン社製, N.A. = 0.90, W.D. = 350 μm) により, 高速 2 次元走査される. 発生した SHG 光は同じ対物レンズによって集光され, ハーモニックセパレーター (HS; LWP-45-Runp625-Tunp1250-B-1013, Lattice Electro Optics 社製, 反射波長 = 625 nm) とバンドパスフィルター (BPF; 625/26 nm BrightLine, Semrock 社製, 透過波長 = 612 - 638 nm) を用いて SHG 光成分のみを抽出した後, 電子冷却フォトンカウンティング型光電子増倍管 (PMT; H7421-40, 浜松ホトニクス社製) によって検出される. このようなレーザー走査光学系を用いて, 256 × 256 ピクセルからなる 400 μm × 400 μm の測定領域を測定時間 2 秒/イメージで可視化出来る. 本実験では, イメージング領域の拡大のため, 機械式ステージを用いてサンプルを上下左右に動かすことにより計 64 枚の SHG イメージを取得し, それぞれを繋ぎ

合わせることで、測定領域 $3.2\text{ mm} \times 3.2\text{ mm}$ の大面積 SHG イメージを取得している。また、イメージングの際、サンプルの乾燥を避けるため、自作のガラスディッシュボトムを用いてサンプルを生理食塩水に浸したまま計測している。

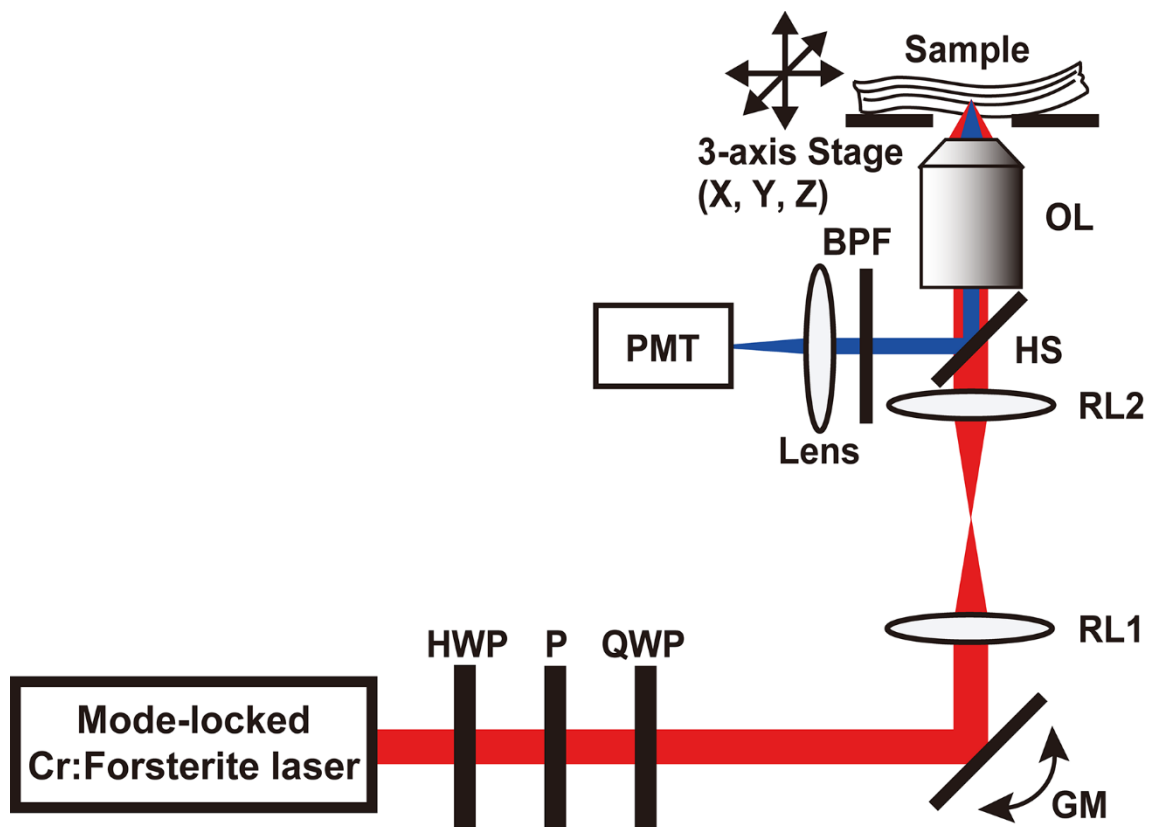


図 4-1 SHG 顕微鏡のセットアップ。HWP: $\lambda/2$ 板, P: 偏光子, QWP: $\lambda/4$ 板。GM: ガルバノミラー。RL1, RL2: リレーレンズ, HS: ハーモニックセパレーター, OL: 対物レンズ。BPF: バンドパスフィルター, PMT: 光電子増倍管。

4.2.3 引張試験

次に、同一サンプルの組織学・力学的特性を得るため、SHG イメージングを行った後、速やかに引張

試験を行った。引張試験には、市販の卓上引張試験機（EZ-S、島津製作所製、負荷荷重容量 = 500 N、ロードセル精度 = ±1 %）を用いて、正常および修復サンプルの力学的特性を評価した。サンプルを引張試験の治具で挟み込んだ後、腱の長・短軸を測定し、腱の断面を楕円近似することにより断面積を算出した。引張では、同様なサンプルを用いて行われている先行研究に乗っ取り、速度 2 cm/min の定ひずみを与えている[3]。また、ここでは応力の値として公称応力を採用し、得られた応力-ひずみ曲線からヤング率を算出した。

4.2.4 統計解析

取得した SHG イメージから計算した平均 SHG 強度は、平均±標準偏差で示している。また、有意差検定は、正常サンプル群と修復サンプル群の間で Student の t 検定を用いて比較し、平均 SHG 強度およびヤング率の値の有意差を調べた。最後に、平均 SHG 強度とヤング率間の相関については、決定係数 (R^2) を用いた。

4.3 実験結果

4.3.1 正常および修復サンプルの SHG イメージング

はじめに、コントロールの SHG イメージングを行った。本実験における測定深さは、もっとも高いイメージ・コントラストが得られた 100 μm に統一している。図 4-2 (a) にコントロール 3 サンプル（コントロール(A), (B), (C)）の大面积 SHG イメージ（イメージ領域 = 3.2 mm × 3.2 mm）を示す。これらの

SHG イメージから、上下方向に規則的に配向したコラーゲン線維分布が確認でき、これは腱の長軸方向に一致している。また、図 4-2 (a)のうちの赤枠で囲われた $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ の領域を拡大したイメージである図 4-2 (b)において、単一軸配向を示す腱に特徴的な、太いコラーゲン線維の crimp 構造が確認出来る。これらの特徴は、腱におけるコラーゲン線維の組織学的所見と一致していることから、SHG イメージを用いることで腱におけるコラーゲンの組織学的な情報を切片化せずに非染色で観察出来ることを確認できた。

次に、腱断裂・修復モデルの SHG イメージングを行った。断裂後 4 週の修復腱では、新たに産生された癒痕組織により断裂部が修復されており、この修復部分の SHG イメージングを行っている。図 4-3 に 8 つの異なる修復サンプルの大面积 SHG イメージの比較を示す。左列にはイメージ・コントラストを正常サンプルのイメージと合わせた際のイメージ（イメージ領域 = $3.2\ \text{mm} \times 3.2\ \text{mm}$, 2048×2048 ピクセル）、中列にはイメージ・コントラストを強調したイメージ（イメージ領域 = $3.2\ \text{mm} \times 3.2\ \text{mm}$, 2048×2048 ピクセル）、右列には中列イメージにおける黄四角枠の領域を拡大したイメージ（イメージ領域 = $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$, 256×256 ピクセル）を示す。まず、図 4-3 左列の修復サンプルのイメージを、図 4-2(a)(b)(c)のコントロールサンプルと比較すると、全てのサンプルにおいて SHG 強度が顕著に低下していることが確認できる。この原因として、修復部分におけるコラーゲン濃度が低いだけでなく、コラーゲン線維が構造的に未熟であるため、SHG 発生効率が低いということが関連していると考えられる。修復部のコラーゲン線維構造を明確に可視化するため、図 4-3 左列の SHG イメージのグレースケールを 3 倍強調させた（中列）後、黄四角枠の $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ の領域を拡大したものが図 4-3 右列である。

修復サンプルにおける修復部のコラーゲン線維構造は、配向が揃っておらず、crimp 構造も確認できないことから、図 4-2 の正常サンプルと比較して明らかに異なる構造を持っていることがわかった。このようなコラーゲン線維構造の違いの要因としては、正常腱の主成分は構造的成熟度が高く、配向性も高いタイプ I コラーゲンであるのに対して[18]、修復部（癒痕組織）の主成分であるタイプ III コラーゲンは構造成熟度が低く[19]、配向も良く揃っていないことが考えられる。

ここで、両サンプルの SHG 画像を簡単に定量比較するため、各画像の平均 SHG 信号強度を算出し、比較を行った。図 4-4 は、コントロールサンプル (n=8) と腱断裂・修復サンプル (n=8) の平均 SHG 信号強度の比較を示している。コントロールサンプルの平均 SHG 信号強度は 201 ± 37 であったのに対して、腱断裂・修復モデルでは 36 ± 21 であった。両者には顕著な有意差が確認され ($p < 0.001$)、腱断裂・修復モデルの平均 SHG 信号強度はコントロールと比較して 17.9%であった。この結果から、断裂から 4 週間経過し、外観は癒合しているような腱でも、コラーゲン構造という観点から見ると組織学的修復がまだまだ不完全であると言える。

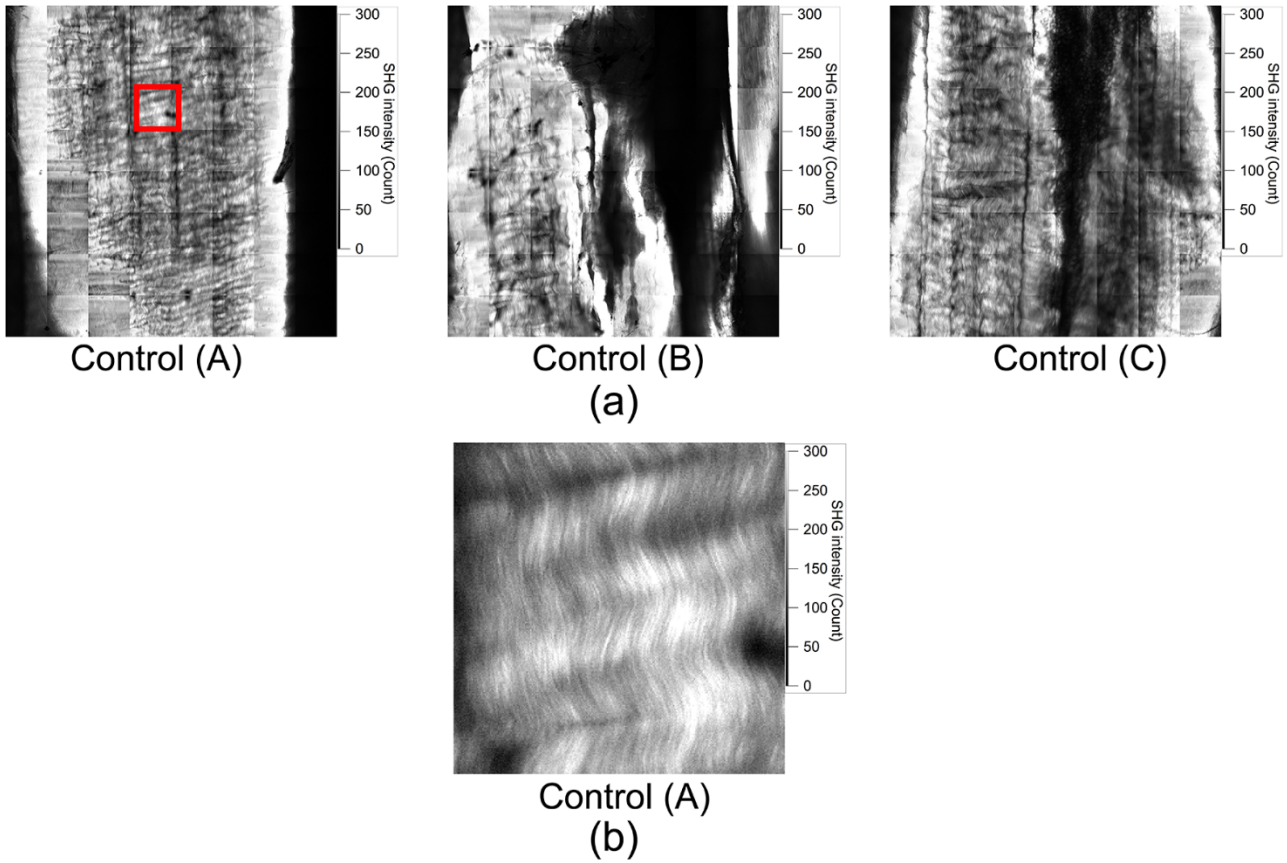


図 4-2 (a) 3つの正常サンプル ([control (A), (B), and (C)]) の大面積 SHG イメージの比較. イメージサイズ = $3.2 \text{ mm} \times 3.2 \text{ mm}$, ピクセルサイズ = $2,048 \times 2,048$ ピクセル (b) 図 4-2(a)中の赤枠における拡大図. イメージサイズ = $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$. ピクセルサイズ = 256×256 ピクセル.

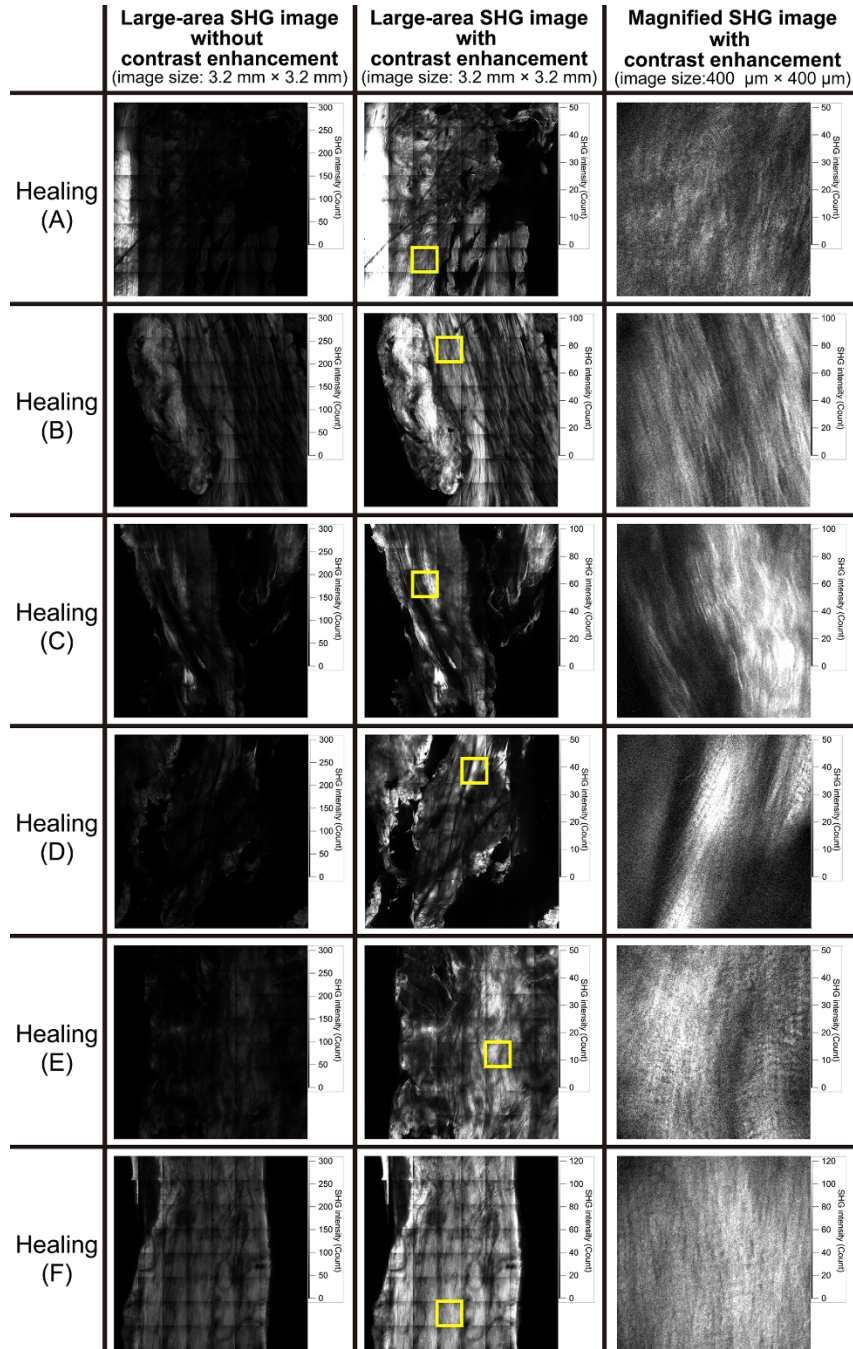


図 4-3 (a) 6つの修復サンプル ([Healing (A) - (F)]) における大面積 SHG イメージの比較。左列：コントラスト調整をしていない大面積 SHG イメージ。イメージサイズ = 3.2 mm × 3.2 mm, ピクセルサイズ = 2,048 × 2,048 ピクセル。中列：コントラスト増大した大面積 SHG イメージ。イメージサイズ = 3.2 mm × 3.2 mm, ピクセルサイズ = 2,048 × 2,048 ピクセル。右列：図 4-3 中列中黄四角枠の拡大図。イメージサイズ = 400 μm × 400 μm。ピクセルサイズ = 2,048 × 2,048 ピクセル。

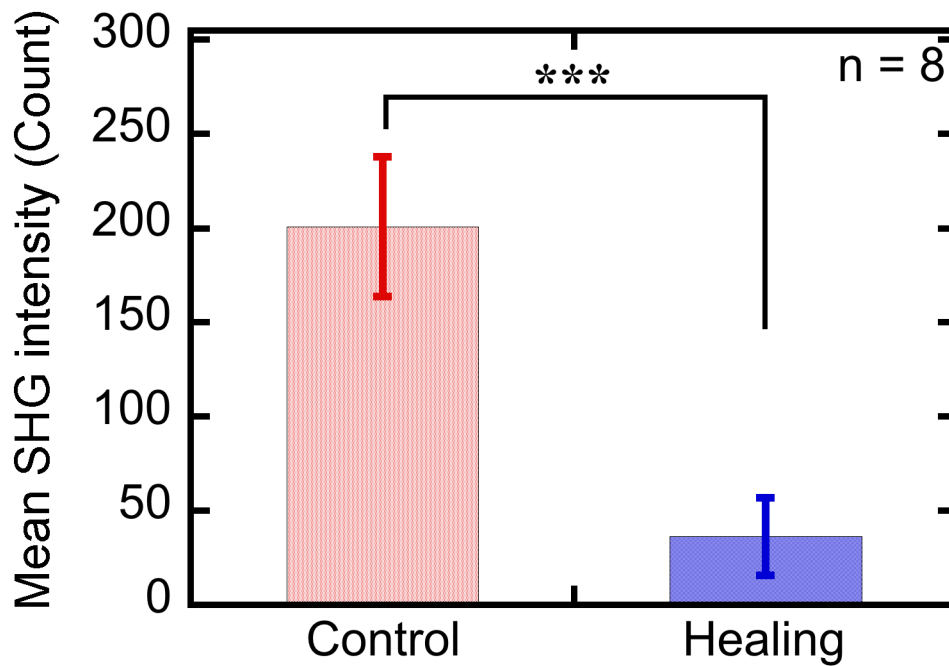


図 4-4 正常サンプル (n=8) と修復サンプル (n=8) の平均 SHG 強度の比較. エラーバー : 標準偏差.

***, $p < 0.001$. p 値は Student の t 検定を用いて計算した.

4.3.2 正常および修復サンプルの引張試験

上述の SHG イメージングを行ったサンプルに対して、引き続き引張試験を行った。図 4-5 (a)(b)(c)は、コントロール(A), (B), (C)のサンプルに対応する応力-ひずみ曲線を示している。いずれの応力-ひずみ曲線においても、同様な振る舞いが確認できる。低負荷応力状態において非線形にひずみが増大した後、応力とひずみは線形関係を示した。これが、腱組織の弾性変形の領域を示していることになる。その後、降伏に到達すると、再び非線形な振る舞いの塑性変形を示し、最終的に破断に到る。これらの振る舞いは、先行研究[7]と良く一致しているものの、本実験における弾性変形後のピークは降伏点でなく、引張試験機の治具からサンプルが滑ったことを表している。したがって、今回はピーク点以前のデータのみ

を採用し、ultimate strength などヤング率以外のパラメーターは解析していない。

次に、腱修復サンプルのサンプルの引張試験を行った。図 4-6 (a)(b)(c)は、腱断裂・修復モデル(A),(B),(C)のサンプルに対応する応力-ひずみ曲線を示している。いずれのサンプルにおいても、同様な振る舞いが確認された。図 4-5 (a)(b)(c)のコントロール同様、低負荷応力状態にける非線形ひずみ領域、その後引き続く線形ひずみを示す弾性変形領域、非線形挙動を示す塑性変形領域が確認された。

次に、応力-ひずみ曲線の線形上昇スロープ部分に対して、線形フィッティングを行い、その傾きをヤング率として算出した。図 4-7 は、コントロールサンプル (n = 8) と腱断裂・修復サンプル (n = 8) のヤング率の比較を示している。コントロールサンプルのヤング率は 0.63 ± 0.15 MPa であったのに対して、腱断裂・修復モデルのヤング率は 0.36 ± 0.23 であった。両者には有意差が確認され ($p < 0.05$)、腱断裂・修復モデルのヤング率はコントロールのヤング率と比較して 57.1%であった。これは、断裂から 4 週間経過しても、組織学的回復と同様、腱断裂・修復モデルの力学的回復は不完全であることを示している。

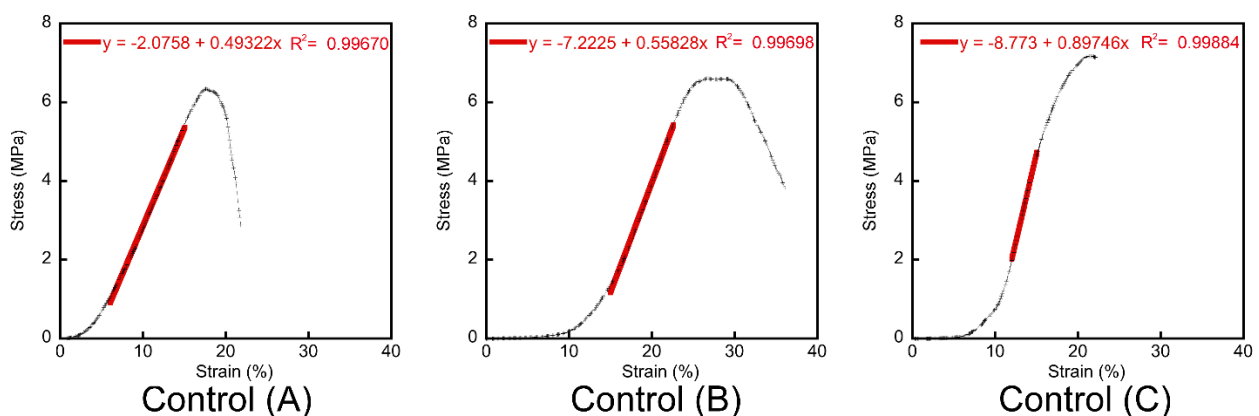


図 4-5 正常サンプル(control (A), (B), (C))の応力-ひずみ曲線。赤線：応力-ひずみ曲線における線形領域のフィッティング曲線。

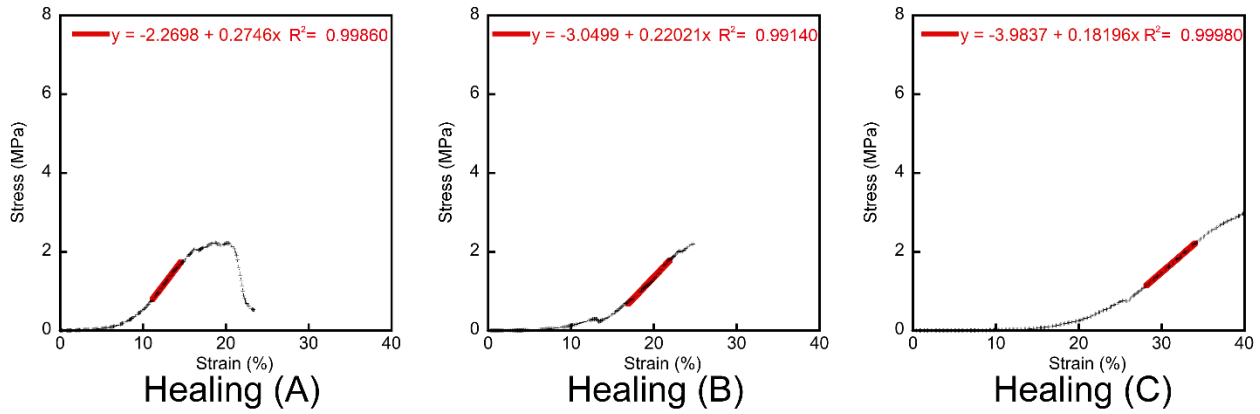


図 4-6 修復サンプル(Healing (A), (B), (C))の応力-ひずみ曲線. 赤線：応力-ひずみ曲線における線形領域のフィッティング曲線.

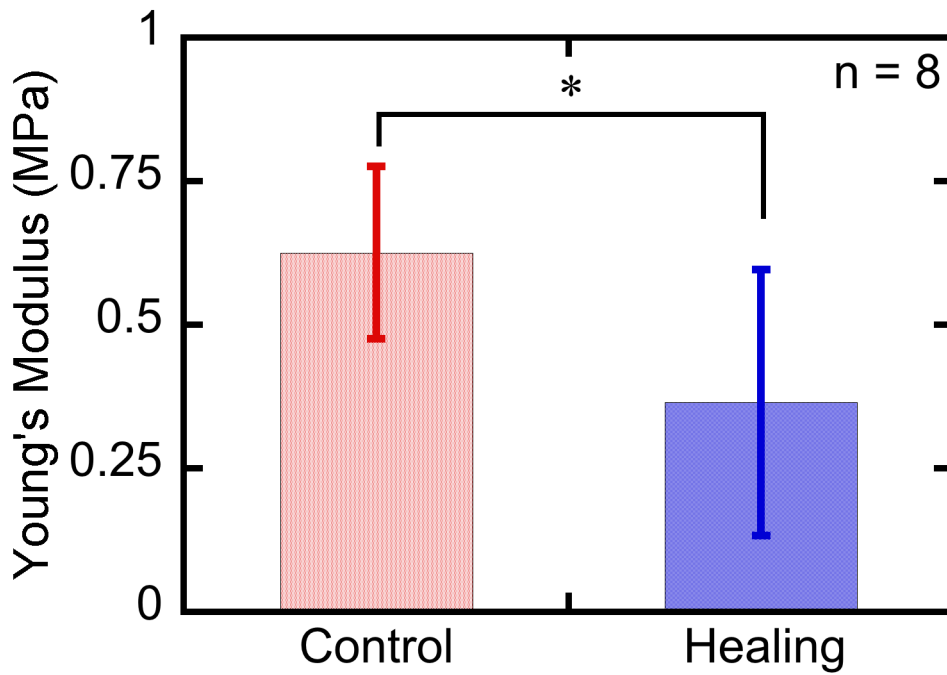


図 4-7 正常サンプル (n = 8) と修復サンプル (n = 8) のヤング率の比較. エラーバー：標準偏差,

*, $p < 0.05$. p 値は Student の t 検定を用いて計算している.

4.3.3 平均 SHG 強度とヤング率の相関

本研究では、同一サンプルの平均 SHG 強度とヤング率が得られたので、これら両者の相関を調べた。

図 4-8 に計算結果を示す。ここで、青四角プロットは正常 8 サンプルの、緑丸プロットは修復 8 サンプルのプロットを示している。図から、正常サンプルではプロットが平均 SHG 強度・ヤング率ともに高い領域に分布しているのに対して、修復サンプルでは平均 SHG 強度が低い領域、ヤング率に関してはばらつきを持って分布している事がわかる。これらの結果から正常サンプルと修復サンプルの決定係数を求めたところ、0.37 (R^2) が得られた。

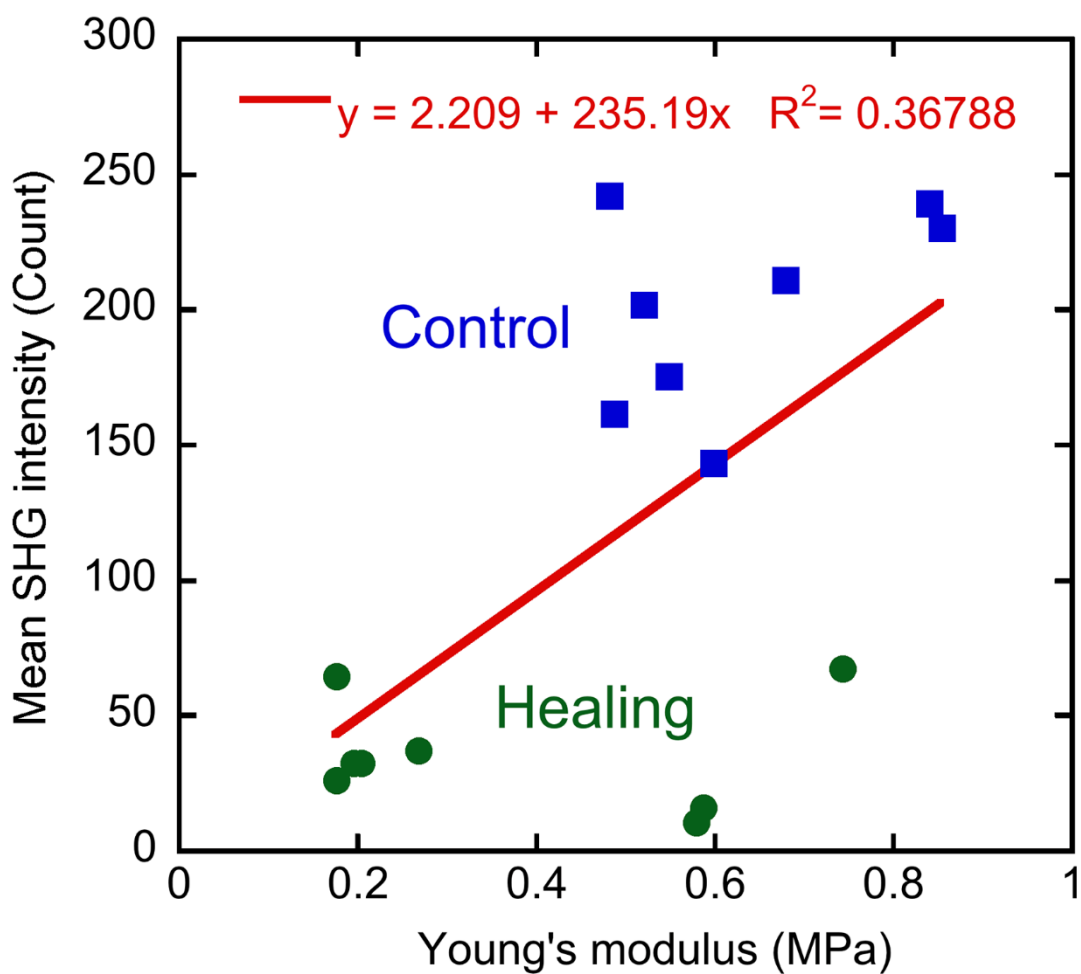


図 4-8 平均 SHG 強度とヤング率の相関。青四角プロット：正常サンプル (n = 8)，緑丸プロット：修復サンプル (n = 8)，赤線：両プロットの線形フィッティング。

4.4 考察

本実験では、修復サンプルの SHG イメージを取得の際、癒痕組織を取り除いて計測を行った。ここで、このようなアプローチが腱修復モニタリングにおける臨床応用の際に行うことができるか、考察する必要がある。腱の治癒は、腱内部からの修復と、腱を包んでいる周辺組織からの外部的修復という 2 つに分類することができ、後者は癒痕組織形成に関連している。この癒痕組織が成熟すると、腱の組織として取り込まれることがあるため、癒痕組織の除去は外部的修復の進行を阻害する可能性がある。本研究で用いた断裂後 4 週間のサンプルでは、癒痕組織が腱組織と完全には一体化していなかったため、今回のイメージングの際には、腱組織におけるコラーゲン線維を正確に可視化するため、癒痕組織の除去を行った。一方で、これ以上の治癒期間を与えると、組織のリモデリングのため、腱組織と癒痕組織を見分けることが難しくなる上、癒痕組織自体が修復の度合いに関する情報を与える可能性もある。もし SHG イメージングにより、内部・外部からの修復の両方を見分けることが出来るようになれば、腱修復を評価する有用な手法となることが期待できる。本実験では、*ex vivo* で腱の修復を評価したが、近年発展が目覚ましい光ファイバースコープ技術[20]と SHG 顕微鏡を組み合わせることができれば、臨床への応用の可能性も開けてくると考えられる。このようなファイバースコープ SHG 顕微鏡は臨床応用のみならず、小型化により引張試験を行ないながらの画像取得への応用も可能であると考えられる。SHG イメージは、ビデオレート取得も可能であるため、コラーゲン線維が力学的負荷を受けてどのように変化するかを観察することも可能になると考えられる。

SHG イメージから得られる定量情報の抽出の際、今回は簡便な評価パラメーターである SHG 光強度

の情報を生じたが、光強度はコラーゲンの濃度や構造成熟度のみならず、レーザー光の強度ゆらぎや測定深さ、サンプルの光学特性、サンプルの表面状態などにも依存する。このような要因が今回の実験におけるエラーバーや決定係数が 0.37 となったことに影響を与えたと考えられる。また、サンプル数が少なかったことや、断裂後 4 週間という一つの実験エンドポイントを持つサンプルのみを計測に用いたことが要因として考えられる。したがって、今後は、SHG パラメーターとして偏光解析や画像解析などの光強度に依存しない解析から評価パラメーターを抽出することや、サンプル条件およびその数を考慮することで、SHG パラメーターとヤング率との相関係数を向上できると考えられる。

4.5 まとめ

本研究では、兎腱修復モデルを作成し、SHG 顕微鏡と引張試験を用いて腱の修復を組織学・力学的観点から評価した。SHG 顕微鏡を用いることにより、非染色での組織学的観察が可能となった結果、同一サンプルの組織学・力学的情報を得ることが可能となった。SHG 顕微鏡により可視化したコラーゲン動態と腱の力学的特性の間には関係性があるため、SHG 光強度とヤング率の相関を計算すると、中程度の決定係数 0.37 が得られた。このような結果から、SHG 顕微鏡は腱断裂において組織学・力学的修復を評価する手法として有用であることが示唆された。

参考文献

- [1] J. B. Møller , S. P. Magnusson, L. R. Rasmussen, M. Kjeaar, and P. Aafaard, “Muscle performance during maximal isometric and dynamic contractions is influenced by the stiffness of the tendinous structures”, *J. Appl. Physiol.* **99**, 986 (2005).
- [2] J. Kastelica., A. Galeskiab, and E. Baera, “The multicomposite structure of tendon”, *Connect. Tissue Res.* **6**, 11 (1978).
- [3] C. A. Carlstedt, K. Madsen, and T. Wredmark, “Biomechanical and biochemical studies of tendon healing after conservative and surgical treatment”, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **105**, 211 (1986).
- [4] P. Sharma, N. Maffulli, “Tendon injury and tendinopathy: healing and repair”, *J. Bone Joint Surg. Am.* **87**, 187 (2005).
- [5] U.G. Longo, F. Franceschi, L. Ruzzini, C. Rabitti, S. Morini, N. Maffulli, and V. Denaro, “Characteristics at haematoxylin and eosin staining of ruptures of the long head of the biceps tendon”, *Br. J. Sports Med.* **43**, 603 (2009).
- [6] R. Cetti, J. Jung, and M. Vyberg, “Spontaneous rupture of the Achilles tendon is preceded by widespread and bilateral tendon damage and ipsilateral inflammation: A clinical and histopathologic study of 60 patients”, *Acta. Orthop. Scand.* **74**, 78 (2003).

- [7] M. E. Schweitzer and D. Karasick, "MR Imaging of disorders of the Achilles tendon", *Am. J. Roentgenol.* **175**, 613 (2000).
- [8] P. J. Campagnola and C. Y. Dong, "Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis" *Laser Photon. Rev.* **5**, 13 (2011).
- [9] T. Yasui, Y. Takahashi, M. Ito, S. Fukushima, and T. Araki, "*Ex vivo* and *in vivo* second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:forsterite and Ti:sapphire lasers", *Appl. Opt.* **48**, D88 (2009).
- [10] H. Y. Tan, S. W. Teng, W. Lo, W. C. Lin, S. J. Lin, S. H. Jee, and C. Y. Dong, "Characterizing the thermally induced structural changes to intact porcine eye, part 1: second harmonic generation imaging of cornea stroma", *J. Biomed. Opt.* **10**, 054019 (2005).
- [11] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 7075 (2003).
- [12] J. C. Mansfield, C. P. Winlove, J. Moger, and S. J. Matcher, "Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy", *J. Biomed. Opt.* **13**, 044020 (2008).
- [13] R. A. Rao, M. R. Mehta, and K. C. Toussaint, "Fourier transform-second-harmonic generation imaging of biological tissues", *Opt. Express* **17**, 14534 (2009).
- [14] J. B. Sereysky, N. P. Andarawis, K. J. Jepsen, and E. L. Flatow, "Structural and mechanical effects of *in vivo* fatigue damage induction on murine tendon", *J Orthop. Res.* **30**, 965 (2012).
- [15] T. Abraham, G. Fong, and A. Scott, "Second harmonic generation analysis of early Achilles tendinosis in

response to in vivo mechanical loading”, *BMC Musculoskelet Disord.* **12**, 26 (2011).

[16] J. Leppilahti, J. Puranena, and S. Oravab, “Incidence of Achilles tendon rupture”, *Acta Orthop. Scand.* **67**, 277 (1996).

[17] T. Yasui, M. Yonetsu, R. Tanaka, Y. Tanaka, S. Fukushima, T. Yamashita, Y. Ogura, T. Hirao, H. Murota, and T. Araki, "In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser", *J. Biomed. Opt.*, **18**, 031108 (2013).

[18] T. W. Lin, L. Cardenas, and L. J. Soslowsky, “Biomechanics of tendon injury and repair”, *J. Biomech.* **37**, 865 (2004).

[19] S. W. Chang, S. J. Shefelbine, and M. J. Buehler, “Structural and mechanical differences between collagen homo- and heterotrimers: relevance for the molecular origin of brittle bone disease”, *Biophys. J.* **102**, 640 (2012).

[20] Y. Zhang, M. L. Akins, K. Murari, J. Xi, M. J. Li, K. L. Phelps, M. Mahendroo, and X. Lia, “ A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 12878 (2012).

5章 SHG 画像解析を用いた腱修復程度の評価

5.1 イントロダクション

第4章では、SHG 光の発生強度がコラーゲン濃度のみならず、コラーゲンの構造的成熟性（高次構造性、配向）にも依存する[1]ということに着目し、SHG 顕微鏡を、損傷した腱における修復度合いの評価に応用した。腱の修復過程では、構造的に未熟な（低次構造）コラーゲンが新生された後、リモデリングによって構造的に成熟した（高次構造）コラーゲンへと置換されていく。従って、SHG 光は、コラーゲン高次構造という観点から腱修復の度合いを反映した光プローブとして利用出来る可能性を有している。さらに、SHG 顕微鏡では切片化することなく非染色で組織コラーゲンを選択的に可視化できるので、SHG イメージングで腱の形態的修復を評価した後に、引張り試験（ヤング率）によりその力学的回復を評価できる。その結果、従来困難であった同一サンプルに対して、形態的修復と力学的回復の両方の情報が得られる。もし、SHG パラメーターとヤング率の間に良好な相関が得られれば、破壊的な引張り試験を行わずとも力学的回復の評価が可能になり、臨床応用への展開が開けてくる。第4章の実験では、兔腱正常/損傷モデルの平均 SHG 光強度とヤング率の相関関係を評価し、両者の間に適度な相関があることを確認した。しかし、SHG 光強度はコラーゲンの濃度や構造成熟度のみならず、入射レーザー強度や、サンプルの光学特性（吸収や散乱、表面反射等）等にも依存するため、SHG パラメーターとして必ずしも適しているとは言えない。従って SHG 光強度情報とは独立な SHG パラメーターの利用が望まれる。

SHG 光強度情報とは独立な SHG パラメーターとして利用可能と考えられるのが、SHG 画像解析である。そこで本章では、兎の正常腱および腱断裂モデルを用いた修復腱の SHG イメージに対して、2次元フーリエ変換 (2D-FT) に基づいた画像解析法[2]を適用し、断裂腱の修復度合いの定性的評価法について検討した。

5.2 実験サンプルと装置

5.2.1 実験サンプル

動物実験及び準備に関して、徳島大学動物実験倫理委員会（徳動物 12133）の承認を得た。実験で用いた動物モデルは、第4章と同じであるので、ここでは詳細な説明は割愛する。

5.2.2 SHG 顕微鏡のセットアップ

実験装置は、第4章と同じであるので、ここでは詳細な説明は割愛する。

5.3 実験結果

5.3.1 SHG イメージング

採取した正常サンプル及び修復サンプルの SHG イメージングを行った。事前に、異なる測定深度の SHG イメージング（深さ分解 SHG イメージング、サンプル表面から深さ 250 μm まで 10 μm 刻み）を行ったところ、コラーゲン線維構造の深さ依存は確認されなかったため、SHG 光強度が高くイメージ・

コントラストも良好な測定深度 100 μm (サンプル表面から深さ 100 μm) において、全てのサンプルの SHG イメージを取得し、比較を行った。また、入射光パワーは、対物レンズ出射直後に 20 mW となるように設定した。図 5-1 (a-1), (a-2), (a-3) は、コントロールとして 3 つの異なる個体から得られた正常サンプル[正常サンプル①, ②, ③]の大面积 SHG イメージ (イメージサイズ = 1.6 mm \times 1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel \times 1,024 pixel) を示している。全ての正常サンプルにおいて、視野全体において高強度の SHG 光強度が観測され、コラーゲンが腱長軸 (紙面上下方向) に沿った規則正しい配向分布となっていることが確認出来る。図 5-1 (b) は、図 5-1 (a-1) における赤四角枠内を拡大したイメージを示している (イメージサイズ = 400 μm \times 400 μm , ピクセルサイズ = 256 pixel \times 256 pixel)。拡大図から、腱組織に特徴的な波打ち構造を持っていることが確認出来る。このような特徴は、腱組織において一般的に観察される組織学的特徴とよく一致していることから、SHG イメージングを行うことで腱組織を非染色・非破壊で観察出来たと言える。

次に、修復サンプルの SHG イメージングを行った。術後 4 週が経過した修復サンプルでは、新たに産生された癒痕組織により断裂部周辺が覆われていたため、これらの組織を除去した後 SHG イメージングを行った。図 5-2 (a-1), (a-2), (a-3) に、3 つの異なる個体から得られた修復サンプル[修復サンプル①, ②, ③]の大面积 SHG イメージ (イメージサイズ = 1.6 mm \times 1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel \times 1,024 pixel) を示す。測定条件は正常サンプルと同様である。図から、全ての修復サンプルにおいて、図 5-1 の正常サンプルと比較して、平均 SHG 光強度が 18% の著しい低下を確認出来た。これは、コラーゲン濃度が低だけでなく、構造的に未熟な (低次構造の) コラーゲンであるため、個々のコラ

ーゲン分子から発生した SHG 光がコラーゲンの規則的な階層構造によって増強されるプロセス[17]が不十分であったためであると考えられる。

修復サンプルにおけるコラーゲン線維構造を確認するため、イメージ・コントラストを調整したものを、図 5-2 (b-1) , (b-2) , (b-3) に示す (イメージサイズ = 1.6 mm × 1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel × 1,024 pixel) . また、図 5-2 (b-1) , (b-2) , (b-3) の黄枠のイメージ領域を拡大したものを図 5-2 (c-1) , (c-2) , (c-3) に示す (イメージサイズ = 400 μm × 400 μm, ピクセルサイズ = 256 pixel × 256 pixel) . 修復サンプルにおけるコラーゲン線維構造は、コラーゲンの配向が整っておらず、その濃度分布にもムラが見えており、正常サンプルとは明らかに異なる構造を持っていることが、SHG イメージより確認出来た。

図 5-1 と図 5-2 の比較から、SHG 光強度及び SHG イメージにおいて、正常サンプルと修復サンプルにおいて、明確な差異を確認した。したがって、これらの SHG イメージから、関連した定量的パラメーターを抽出することにより、腱修復度合いを定量的に評価することが可能になると考えられる。しかし、SHG 光強度は、レーザー光源の強度揺らぎや生体組織の光学特性 (吸収, 散乱など) などの影響を受けやすく、再現性の高い評価パラメーターとは、必ずしも言えない。そこで、SHG イメージの画像解析を用いることにより、SHG 光強度とは独立した評価パラメーターの抽出を試みる。

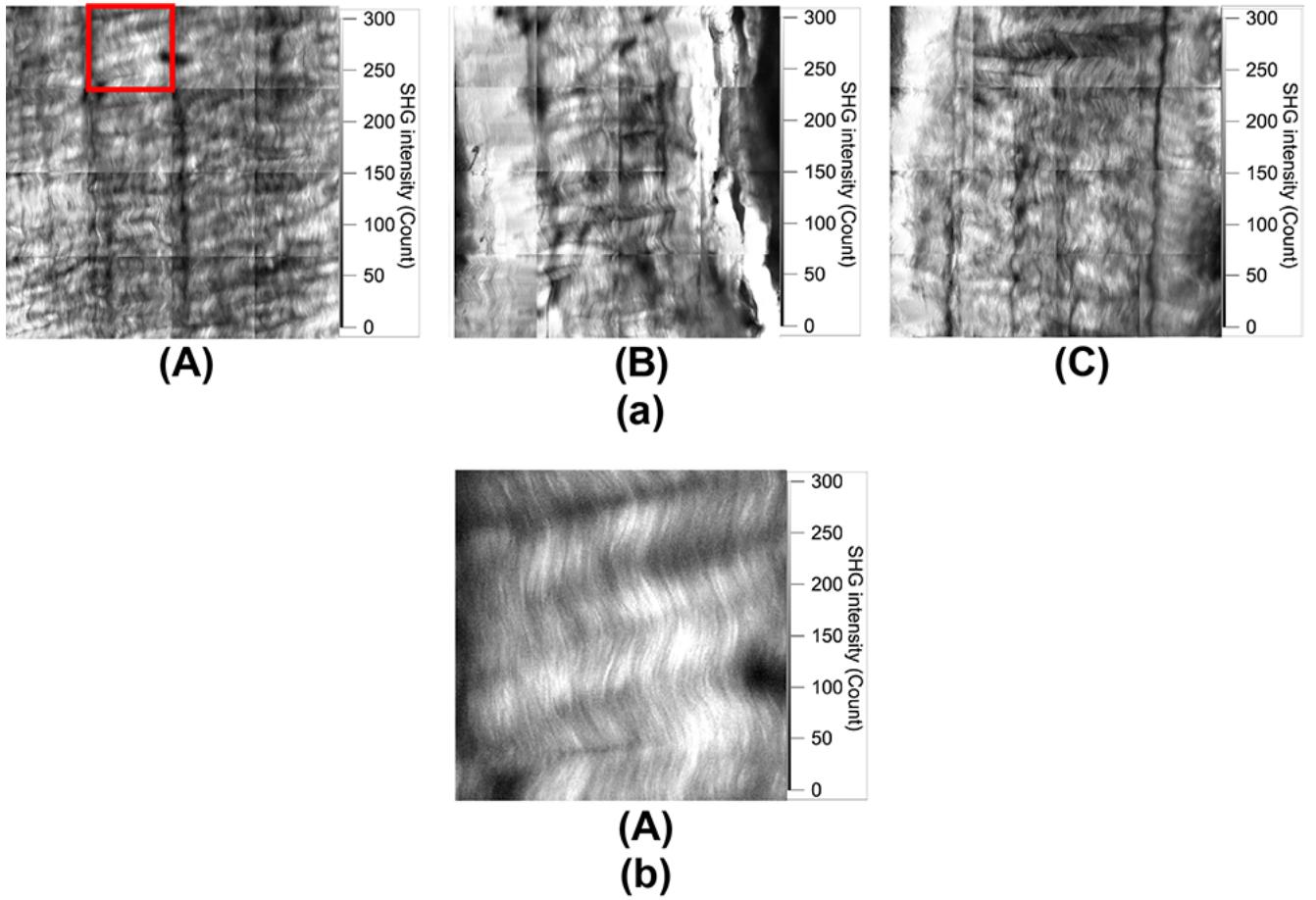


図 5-1 (a) 3つの正常サンプル (正常①, ②, ③) における大面積 SHG イメージ (イメージサイズ = 1.6 mm × 1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel × 1,024 pixel). (b) (a-1) の赤枠領域の拡大図 (イメージサイズ = 400 μm × 400 μm, ピクセルサイズ = 256 pixel × 256 pixel).

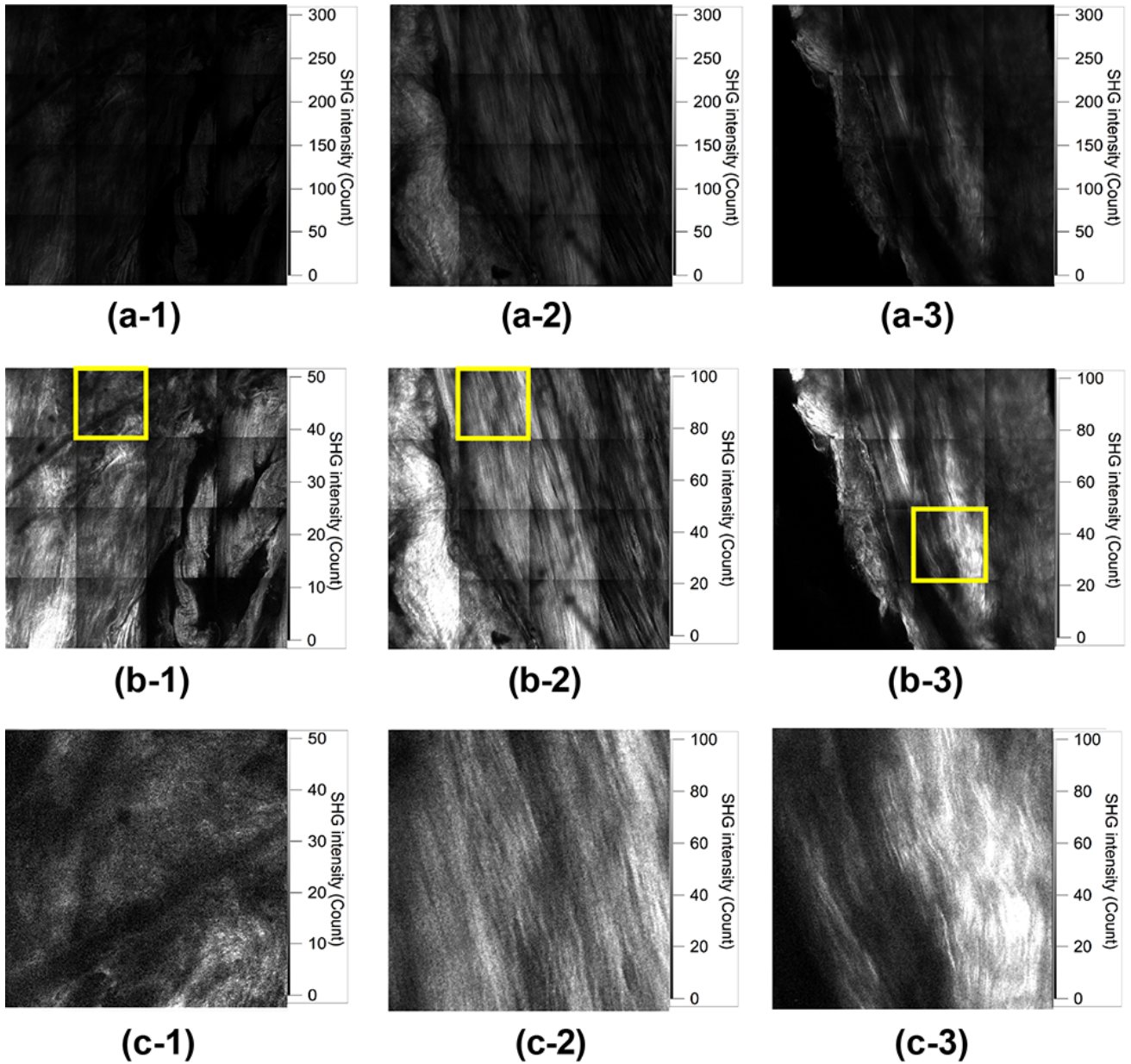


図 5-2 3つの修復サンプル（修復サンプル①，②，③）の (a) コントラスト調整無し大面積 SHG イメージ（イメージサイズ = 1.6 mm × 1.6 mm，ピクセルサイズ = 1,024 pixel × 1,024 pixel），(b) コントラスト調整有り大面積 SHG イメージ（イメージサイズ = 1.6 mm × 1.6 mm，ピクセルサイズ = 1,024 pixel × 1,024 pixel），(c) (b)における黄枠領域の拡大図（イメージサイズ = 400 μm × 400 μm，ピクセルサイズ = 256 pixel × 256 pixel）。

5.3.2 2次元フーリエ変換 (2D-FT) SHG イメージ

各々の SHG イメージに対して、2D-FT を用いてパワースペクトルを取得し (2次元フーリエ変換 SHG イメージ), 腱修復の度合いに関連した定量情報を抽出することを検討する. 図 5-3 (a) に, 図 5-1 (b) の正常サンプルに関する 2次元フーリエ変換 SHG イメージ (2D-FT-SHG イメージ) を示す. 得られた 2D-FT-SHG イメージを r - θ 座標系で見た際, r 方向は空間周波数 (中心側ほど低空間周波数) を, θ 方向は角度を示す. その際に, 一方向に規則正しく並んだコラーゲン線維構造では線維配向方向と垂直な方向に強い振幅を持ち, ランダムに並んだコラーゲン線維構造では円に近い形となると予想される. 図 5-3 (a) の正常サンプルでは, 波打つように配向したコラーゲン線維分布構造に対して, それぞれ直交した θ 方向に強い振幅があることが確認出来る (×印を数十度回転させたような構造). さらに, その r 方向は極めて大きい空間周波数領域 ($286 \mu\text{m}^{-1}$ 程度) まで伸びていることが確認できる. これは, 配向を持ったコラーゲン線維が, 極めて密に存在していることを反映していると考えられる.

次に, 図 5-2 (c-1), (c-2), (c-3) の修復サンプルに関する 2D-FT-SHG イメージを, 図 5-3 (b-1), (b-2), (b-3) に示す. 個体ごとに異なる形状の振幅分布になっていることが確認できる. 図 5-2 (c-1) の修復サンプル①では, 全体的にランダムなコラーゲン分布になっていることにより, 図 5-3 (b-1) の 2D-FT-SHG イメージでも空間周波数の分布がランダムとなり, 円に近い形となっている. 図 5-2 (c-2) の修復サンプル②では, 順調な修復により, コラーゲン線維の配向性が向上した結果, 図 5-3 (b-2) の 2D-FT-SHG イメージにおいて, 単一方向にのみ配向している (一軸性) 線維と直交する方向に強い振幅が見られる. 最後に図 5-2 (c-3) の修復サンプル③では, さらに順調な修復により, 正常サンプルの

ような波打ち構造が形成された結果，図 5-3 (b-3) の 2D-FT-SHG イメージにおいて，線維に直交する方向のみならず，それに直交する方向にも空間周波数が分布し始めていると考えられる．しかし，修復サンプル②，③と正常サンプルの r 最大値を比較すると，それぞれ 41.2%，64.2%程度の値となっており，正常サンプルの方が高い値を持っていることがわかる．これは，修復サンプルにおいては波打ち構造を形成したコラーゲン線維が組織全体においては分布しておらず，修復が特に進行した一部領域にのみ分布しているためであると考えられる．

このように，2D-FT-SHG イメージを用いると，正常サンプルと修復サンプルの違いのみならず，修復サンプル間でも修復度合いの違いを示すことができた．腱の修復過程では，損傷後に新たに産生されたコラーゲンが，ランダム配向から一軸性の配向となり，それが波打ち構造に変化することにより，正常な腱のコラーゲン分布に戻っていくと考えられる．今回の実験では，修復サンプルの修復具合の個体差及び部位差により，そのような一連の過程の形態変化を判別できていると考えられる．したがって，このような 2D-FT-SHG イメージから定量的情報を抽出すれば（例えば， θ 方向の r 積算値を画像ごとに算出するなど），腱修復における定量的パラメータの抽出が可能になると考えられる．

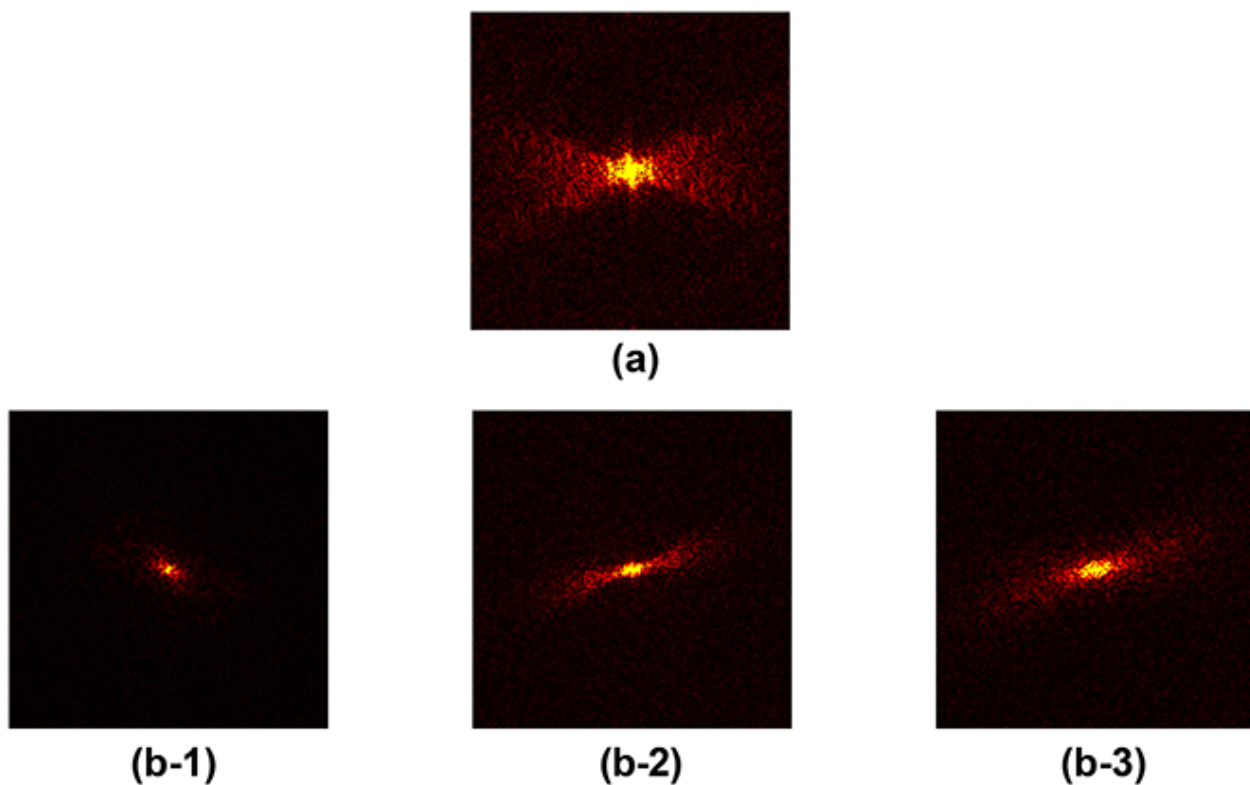


図 5-3 (a) 正常サンプル[図 5-1 (b)]の 2D-FT-SHG イメージ (イメージサイズ = $400 \mu\text{m}^{-1} \times 400 \mu\text{m}^{-1}$, ピクセルサイズ = $256 \text{ pixel} \times 256 \text{ pixel}$). (b) 3つの修復サンプル[図 5-2 (c)]の 2D-FT-SHG イメージ (イメージサイズ = $400 \mu\text{m}^{-1} \times 400 \mu\text{m}^{-1}$, ピクセルサイズ = $256 \text{ pixel} \times 256 \text{ pixel}$).

5.4 考察

腱修復の評価は、組織学的修復と力学的修復の両視点から行う必要があり、これまでは染色法と引張試験がそれぞれ利用されてきた。しかし、これらの手法は、侵襲的あるいは破壊的手法であるため、修復過程を時系列で *in situ* モニタリングすることは、困難であった[3]。一方、SHG 顕微鏡を用いると、非染色かつ低侵襲に組織コラーゲンを選択的に可視化できる。更に、可視化されたコラーゲンが、腱組織における主要な細胞外マトリックスであるだけでなく、腱の力学特性を決定する上で重要な生体構造タ

ンパク質であることを考慮すると、腱修復の新しい評価ツールとしての利用が期待できる。例えば、図 5-1 や図 5-2 に示した高コントラストな SHG イメージから、組織学的所見に基づいた組織学的修復の評価が可能である。一方、腱の力学特性は、コラーゲン線維の濃度分布・構造的成熟度（高次構造）・配向特性に深く関連しているが[4]、SHG 顕微鏡を用いると、SHG 光強度からコラーゲン濃度と構造的成熟度（高次構造的性）を、また図 5-3 の 2D-FT-SHG イメージからコラーゲン配向特性を評価できる。したがって、これらのパラメーターを総合的に評価することにより、組織学的修復のみならず、力学的修復も併せて、非染色かつ低侵襲に評価可能になることが期待される。今後は、SHG イメージングと染色法/引張試験との相関性を評価し、組織学的修復と力学的修復を非侵襲・非破壊に評価可能な光学的手法としての有用性を確認することが望まれる。

5.5 まとめ

本章では、生体組織におけるコラーゲン線維を非破壊かつ低侵襲に可視化できる SHG 顕微鏡を用いて、ウサギ腱損傷モデルにおける正常腱および修復腱の SHG イメージングを行った。SHG イメージから、非染色かつ組織切片化することなく、腱断裂の組織学的修復をコラーゲン動態の観点から観察した。さらに、SHG イメージの 2次元フーリエ変換により算出した 2D-FT-SHG イメージから、コラーゲン配向に基づいた腱の修復度合いを定性的に評価可能であることを示した。

本研究の最終目的は、これまで侵襲的・破壊的検査でしか評価できなかった腱修復評価方法を、低侵襲的 SHG 顕微鏡で代替できることを示すことである。今後は、SHG 顕微鏡に基づいた組織学的修復と

力学的修復の定量的評価手法を確立すると共に、SHG 内視鏡[5]に関する研究を進める予定である。最終的には、腱修復過程の *in vivo* 時系列モニタリングや、修復状態に応じた運動負荷の決定など、腱断裂の臨床医療に有用なツールとすることを旨とする。

参考文献

- [1] P. J. Campagnola and C. Y. Dong, "Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis", *Laser Photon. Rev.* **5**, 13 (2011).
- [2] R. A. Rao, M. R. Mehta, and K. C. Toussaint Jr., "Fourier transform-second-harmonic generation imaging of biological tissues", *Opt. Express* **17**, 14534 (2009).
- [3] P. Sharma, N. Maffulli, "Tendon injury and tendinopathy: healing and repair", *J. Bone Joint Surg. Am.* **87**, 187 (2005).
- [4] J. Kastelica., A. Galeskiab, and E. Baera, "The multicomposite structure of tendon", *Connect. Tissue Res.* **6**, 11 (1978).
- [5] K. König, "Two-photon autofluorescence/FLIM/SHG endoscopy to study the oral cavity and wound healing in humans", *Proc. SPIE.* **9691**, 96910B (2016).

6章 まとめ

本研究では、SHG 顕微鏡が有する「コラーゲンの選択的可視化」と「*in situ* 計測特性」という両特徴を活かしたバイオ応用という観点から、組織工学と整形外科に関連した3つのトピックスに関する研究を行った。

まず、骨形成過程をコラーゲン動態の観点から明らかにするため、培養骨芽細胞が産生したコラーゲン線維の動態を時系列で SHG イメージングし、同一サンプルの培養過程におけるコラーゲン構造変化の可視化を行った。SHG 発生効率の低い骨芽細胞産生コラーゲンの可視化のため、19 fs パルス光を光源に用いた高感度 SHG 顕微鏡を構築することにより、単薄層構造を形成する骨芽細胞産生コラーゲンを高コントラストで可視化することができた。SHG 顕微鏡により得られたコラーゲンの時系列的形態変化は、染色イメージと比較して、より詳細かつ *in situ* で捉えることが出来るということが確認できた。

さらに、2次元フーリエ変換に基づいた画像解析により、コラーゲン成熟度を定量的に抽出できることが確認できた。このような SHG 顕微鏡による細胞産生コラーゲンの *in situ* での可視化と定量解析は、今後の骨再生エンジニアリングへの応用のみならず、線維芽細胞や軟骨細胞など、コラーゲンを産生するすべての培養系に適用可能である。さらに、SHG 顕微鏡は3次元の光学セクショニング能力を持つため、人工的な足場材料やコラーゲンゲルを用いた3次元培養システムにも応用できる。これまでの骨再生エンジニアリングでは、骨芽細胞レベルの再生を主眼として研究が進められてきた一方、本研究では、細胞外マトリックスであるコラーゲンを評価対象とすることにより、組織レベルでの再生を視野に入れ

た研究となっている。骨形成（再生）過程，コラーゲン動態，外部環境因子との関連性を本研究によって明らかにできれば，コラーゲン動態から骨形成（再生）過程を推測することが可能になり，外部環境因子による再生骨制御が現実的になる。本研究によって良好な結果が得られれば，将来的に力学的特性に優れた（すなわち質の高い）骨組織を再生することが可能になると考えられる。

次に，本手法の整形外科分野への応用のため，兔腱修復モデルを作成し，SHG 顕微鏡と引張試験を用いて腱の修復を組織学・力学的観点から評価した。SHG 顕微鏡を用いることにより，非染色での組織学的観察が可能となった結果，同一サンプルの組織学・力学的情報を得ることが可能となった。SHG 顕微鏡により可視化したコラーゲン動態と腱の力学的特性の間には関係性があるため，SHG 光強度とヤング率の相関を計算すると，中程度の決定係数 0.37 が得られた。本研究の最終目的は，これまで破壊的検査でしか評価できなかった腱修復の組織学・力学的評価を，低侵襲的 SHG イメージングで同時取得可能であることを示すことである。SHG イメージにより，腱の組織学的特性が得られることは明確であるが，もしなんらかの SHG パラメーターと引張試験の間に強い相関が得られれば，破壊的な力学的評価はもはや不要となる。本段階では，腱を計測する際に組織を採取する必要があったが，光ファイバースコープと SHG 顕微鏡を組み合わせることができれば，例えば直径数百 μm の注射針の中に顕微鏡プローブを構成でき，測定したい部位に針を刺すのみの，低侵襲的計測が行えるようになると考えられる。その結果，ヒト臨床にも応用可能な，最低限の侵襲性で腱の組織学・力学的修復評価を行うことが出来るようになることが期待できる。このような非線形光学顕微鏡と光ファイバースコープの融合は，すでに報告されている技術である上，近年研究が加速しているトピックスであり，遠い未来の話ではない。しかしなが

ら、ヒト臨床応用のためには、このようなハードウェアの進歩のみならず、適切な SHG パラメーターの抽出および引張試験との相関を高めることが必須であると考えられる。

最後に、上述の断裂腱の修復度合いの定量評価において、実験条件等の影響を受け易い平均 SHG イメージ強度に代わる代替評価パラメーターとして、SHG 画像解析の利用を検討した。正常腱および修復腱におけるコラーゲン線維の特徴的構造を、2次元フーリエ変換に基づいた SHG 画像解析から抽出し、サンプル間のコラーゲン構造分布の違いを定量的に評価することが可能であることを示した。腱の修復において重要な要素は、**crimp** 構造が存在しているかということと、その配向の度合いが高いかということであると考えられる。本研究で用いた SHG イメージの2次元フーリエ変換により、 θ 方向の r 積算値を画像ごとに算出すれば、 r のピーク数により **crimp** 構造の有無が、 r のピーク値により配向の度合いが定量的に取得できると考えられる。このような2次元フーリエ変換法では、ROI を広く取ることにより、ある程度マクロな視点から定量情報を取得できるため、同じくマクロな視点から力学的修復を評価する引張試験との相関が向上すると考えられる。一方、SHG 偏光解析を用いれば直径 $1\ \mu\text{m}$ オーダーのミクロな視点からコラーゲン配向解析が可能である。そこで、SHG 偏光解析の結果とミクロな視点から力学的特性を評価可能な超音波法との相関を調査し、最終的にマクロな腱修復とミクロな腱修復を相互リンクさせることができれば、本手法は単なる修復評価ツールとしてのみならず、解剖・病理学的に意味のあるツールとなると考えられる。どちらにせよ、マクロ・ミクロ両視点で腱修復を評価できる本手法は今後のこの分野の発展に貢献すると期待される。

上記3つの研究結果から、本手法の持つ「コラーゲンの選択的可視化」と「*in situ* 計測特性」という

両特徴は、バイオ分野におけるコラーゲン動態を評価する手法として有用であることが示唆された。

本研究に関する業績

3 章

原著論文

1. E. Hase, O. Matsubara, T. Minamikawa, K. Sato, and T. Yasui, "In situ time-series monitoring of collagen fibers produced by standing-cultured osteoblasts using a second-harmonic-generation microscope," *Appl. Opt.*, Vol. 55, Issue 12, 3261-3267 (2016).

国際会議論文

2. E. Hase, K. Sato, and T. Yasui, "In vivo visualization of collagen fiber produced by cultured osteoblasts using sensitive second-harmonic-generation microscopy equipped with a 10-fs mode-locked Ti:sapphire laser ", *BiOS 2015 (Photonic West 2015)*, San Francisco, USA, Feb. 8, 9329-95 (2015). *Proc. SPIE. 9329, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XV, 93292Q.* (March 05, 2015).
3. E. Hase, K. Sato, and T. Yasui, "In situ visualization of collagen fiber produced by cultured osteoblasts using sensitive second-harmonic-generation microscopy equipped with a 10-fs mode-locked Ti:sapphire laser, *CLEO Pacific Rim 2015*, Busan, Korea, Aug. 24-28, 26H3-5 (2015).

国内学会発表

4. 長谷 栄治, 佐藤 克也, 高橋 光彦, 安井 武史, 『10フェムト秒レーザーを用いた生体コラーゲン SHG 顕微鏡の高感度化』, 生体医工学シンポジウム 2013, 2-2-06 (2013/9/20-21 九州大学).
5. 長谷 栄治, 佐藤 克也, 高橋 光彦, 安井 武史, 『10fs レーザーを用いた生体コラーゲン SHG 顕微鏡の高感度化』, 第 61 回応用物理学会春季学術講演会予稿集, 17p-E6-10 (2014/3/17-20 青山学院大学).
6. 長谷 栄治, 佐藤 克也, 藤澤 正一郎, 安井 武史, 『生体コラーゲン SHG(第 2 高調波発生)顕微鏡を用いた骨芽細胞産生コラーゲンの可視化』, 日本機械学会 2014 年度 年次大会 (2014/9/7-10 東京電機大学).
7. 長谷 栄治, 佐藤 克也, 安井 武史, 『高感度 SHG 顕微鏡を用いた骨芽細胞産生コラーゲンの可視化』, 生体医工学シンポジウム 2014, 2A-35 (2014/9/26-27 東京農工大学).
8. 長谷 栄治, 佐藤 克也, 安井 武史, 『SHG (第 2 高調波発生光) 顕微鏡を用いた骨芽細胞産生コラーゲンのその場観察』, *Optics & Photonics Japan 2014*, 6pA3 (2014/11/5-7 筑波大学東京キャンパス文京校舎).

4 章

原著論文

9. E. Hase, K. Sato, D. Yonekura, T. Minamikawa, M. Takahashi, and T. Yasui, "Evaluation of the histological and mechanical features of tendon healing in a rabbit model with the use of second-harmonic-generation imaging and tensile testing," *Bone & Joint Research*, Vol. 5, No. 11, pp. 577-585 (2016).

国際会議論文

10. E. Hase, T. Minamikawa, K. Sato, M. Takahashi, and T. Yasui, "Observation of tendon repair in animal model using second-harmonic-generation microscopy", *BiOS 2016(Photonic West 2016)*, San Francisco, USA, Feb. 14, 9712-70 (2016). *Proc. SPIE. 9712, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVI, 97121R.* (March 14, 2016).

国内学会発表

11. 長谷 栄治, 高橋 光彦, 安井 武史, 『生体コラーゲン SHG 顕微鏡を用いた腱修復のモニタリング』, 日本機械学会 第 27 回バイオエンジニアリング講演会, 1G44 (2015/1/9~10, 朱鷺メッセ).
12. 長谷 栄治, 高橋 光彦, 佐藤 克也, 安井 武史, 『第二高調波発生光(SHG)顕微鏡を用いた腱修復のモニタリング』, 生体医工学シンポジウム 2015, 1A-19 (2015/9/25-26 岡山国際交流センター).
13. 長谷 栄治, 南川 丈夫, 佐藤 克也, 高橋 光彦, 安井 武史, 『SHG(第 2 高調波発生光)顕微鏡を用いた腱修復状態の観察』, *Optics & Photonics Japan 2015*, 28aC9 (2015/10/28-30 筑波大学東京キャンパス文京校舎).

受賞

14. Student Poster Session Competition for the conference on Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVI (BiOS2016 in Photonic West 2016, San Francisco), Poster Award (2016 年 2 月).

5章

原著論文

15. 長谷 栄治, 南川 丈夫, 佐藤 克也, 米倉 大介, 高橋 光彦, 安井 武史, 『第2高調波発生光 (SHG) 顕微鏡を用いた腱修復の観察』, 生体医工学, Vol. 54, No. 6, , (2016).

国際会議論文

16. E. Hase, T. Minamikawa, K. Sato, D. Yonekura, M. Takahashi, and T. Yasui, "Orientation analysis of collagen fibers in healing tendon by using second-harmonic-generation microscopy," BiOS2017 in Photonics West 2017, 10069-8, Jan. 29, 2017 (San Francisco, USA, 2017/1/28-2/2).

国内学会発表

17. 長谷 栄治, 南川 丈夫, 佐藤 克也, 米倉 大介, 高橋 光彦, 安井 武史, 『SHG 顕微鏡を用いた腱修復の観測』, 生体医工学シンポジウム 2016, 2P-5-6, 2016/9/18 (2016/9/17-18, 旭川市大雪クリスタルホール国際会議場).
18. 長谷 栄治, 南川 丈夫, 佐藤 克也, 米倉 大介, 高橋 光彦, 安井 武史, 『偏光分解 SHG (第2高調波発生光) 顕微鏡を用いた修復腱におけるコラーゲン配向解析』, 第39回日本生体医工学会中国四国支部大会, I-7 (2016/10/15, 徳島大).
19. 長谷 栄治, 南川 丈夫, 米倉 大介, 佐藤 克也, 高橋 光彦, 安井 武史, 『SHG 顕微鏡を用いた腱修復におけるコラーゲン配向解析』, Optics & Photonics Japan 2016, 2aA4 (2016/10/31-11/2, 筑波大学東京キャンパス文京校舎).

受賞

20. 生体医工学シンポジウム 2016 ベストリサーチアワード (2016年9月).
21. 第39回日本生体医工学会中国四国支部大会 若手研究奨励賞 (2016年10月).

その他の研究に関する業績

原著論文

22. 田中 佑治, 長谷 栄治, 福島 修一郎, 荒木 勉, 安井武史, 『高速・直交偏光分解第 2 高調波発生光顕微鏡を用いた コラーゲン配向の in vivo イメージング』, 生体医工学, Vol.51(1), pp. 38-45(2013).
23. Y. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, Y. Ogura, T. Yamashita, T. Hirao, T. Araki, and T. Yasui, "Motion-artifact-robust, polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy based on rapid polarization switching with electro-optic Pockells cell and its application to in vivo visualization of collagen fiber orientation in human facial skin," Biomed. Opt. Express, Vol. 5, Iss. 4, pp. 1099–1113 (2014).
24. 宮本 周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 謝 宜達, 水谷 康弘, 岩田 哲郎, 安井 武史, 山本 裕紹, 『スリット共焦点と波長/空間変換を用いたスキャンレス・フルフィールド共焦点顕微鏡』, 精密工学会誌, Vol. 82, No. 7, pp. 679-682 (2016).
25. 小倉有紀, 厚田 耕佑, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 安井武史, 『第 2 高調波発生顕微鏡の小型化』, 生体医工学, Vol. 55, 印刷中 (2017).

総説・解説

26. 安井 武史, 宮本 周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 山本 裕紹, 『ライン集光スリットと波長-空間変換を用いたスキャンレス・フルフィールド共焦点レーザー顕微鏡』, 光アライアンス, Vol. 27, No. 11, pp. 10-13 (2016).

国際会議論文

27. T. Yasui, R. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, T. Araki, "In vivo imaging of dermal collagen in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy", BiOS 2013 (Photonic West 2013), San Francisco, USA, Feb. 2-7, 8588-106 (2013). Proc. SPIE. 8588, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIII, 85882W. (February 22, 2013).
28. Y. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, T. Yasui, T. Araki, "In vivo imaging of collagen fiber orientation with rapid polarization-resolved SHG microscopy", BiOS 2013 (Photonic West 2013), San Francisco, USA, Feb. 2-7, 8588-107 (2013). Proc. SPIE. 8588, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIII, 85882X. (February 22, 2013).
29. Y. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, T. Yasui, and T. Araki, "Fast polarization-resolved SHG microscopy for in vivo imaging of collagen orientation," Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics 2013 (CLEO/Pacific Rim 2013), Kyoto, Japan, June 30-July 4 (2013).
30. T. Yasui, R. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, and T. Araki, "In vivo time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy", BiOS 2014(Photonic West 2014), San Francisco, USA, Feb. 2, 8948-81 (2014). Proc. SPIE. 8948, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIV, 89480B. (February 28, 2014).
31. K. Atsuta, E. Hase, and T. Yasui, "Compact Probe Head of Second-Harmonic-Generation Microscopy for Dermatological Applications,"CLEO Pacific Rim 2015, Busan, Korea, Aug. 24-28, 27P2-92(2015).
32. T. Yasui, E. Hase, R. Tanaka, T. Iwata, S. Fukushima, and T. Araki, "In situ visualization of dermal collagen dynamics during skin burn healing using second-harmonic-generation microscopy,"SPIE Biophotonics South America 2015, Rio de Janeiro, Brazil, May 23-25 Technical Digest (CD), 9531-142 (2015). Proc. SPIE. 9531, Biophotonics South America, 95313U. (June 19, 2015).
33. S. Miyamoto, E. Hase, T. Minamikawa, H. Yamamoto, and T. Yasui, "Scanless, full-field confocal microscopy by combination of wavelength/1D-space conversion with line-imaging configuration," The Asian Student Meeting On Photonics & Optics (Asian CORE Student Meeting 2015), Osaka, Japan, Dec. 7-8 (2015).
34. T. Yasui, E. Hase, S. Miyamoto, Y.-D. Hsieh, T. Minamikawa, and H. Yamamoto, "Scan-less, line-field confocal microscopy by combination of wavelength/space conversion with dual optical comb", BiOS 2016(Photonic West 2016), San Francisco, USA, Feb. 13, 9720-5 (2016). Proc. SPIE. 9720, High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy: Toward Big Data Instrumentation and Management, 972006. (March 07, 2016).
35. S. Miyamoto, E. Hase, R. Ichikawa, T. Minamikawa, T. Yasui, and H. Yamamoto, "One shot confocal microscopy based on wavelength/space conversion by use of multichannel spectrometer", BiOS 2016(Photonic West 2016), San Francisco, USA, Feb. 14, 9720-47 (2016). Proc. SPIE. 9720, High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy: Toward Big Data Instrumentation and Management, 97201C. (March 07, 2016).
36. O. Matsubara, E. Hase, T. Minamikawa, T. Yasui, and K. Sato, "In situ quantitative evaluation of osteoblastic collagen synthesis under cyclic strain by using second-harmonic-generation microscope", BiOS 2016(Photonic West 2016), San Francisco, USA, Feb. 14, 9712-71 (2016). Proc. SPIE. 9712, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVI, 971222. (March 14, 2016).
37. E. Hase, S. Miyamoto, Y.-D. Hsieh, T. Minamikawa, H. Yamamoto, and T. Yasui, "Scan-less, Line-field, Confocal

- Microscopy Based on Dimensional-Conversion Optical Frequency Comb," Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2016, Technical Digest (CD), SW1H.3, June 8, 2016 (June 5-10, 2016/San Jose, USA).
38. S. Miyamoto, E. Hase, T. Minamikawa, T. Yasui, and H. Yamamoto, "Video-rate volume imaging confocal microscope based on wavelength / space conversion by use of multichannel spectrometer," Frontier in Optics (FiO) 2016, Technical Digest (CD), JTh2A.128, Oct. 20, 2016 (Oct. 17-20, 2016/Rochester, USA).
 39. K. Atsuta, Y. Ogura, E. Hase, T. Minamikawa, and T. Yasui, "In situ monitoring of collagen fibers in human skin using a photonic-crystal-fiber-coupled, hand-held, second-harmonic-generation microscope," BiOS2017 in Photonics West 2017, 10069-81, Jan. 29, 2017 (San Francisco, USA, 2017/1/28-2/2).
 40. E. Hase, T. Minamikawa, S. Miyamoto, H. Yamamoto, T. Yasui, "Scan-less confocal phase imaging with dual comb microscopy," BiOS2017 in Photonics West 2017, 10076-32, Jan. 31, 2017 (San Francisco, USA, 2017/1/28-2/2).

国内学会発表

41. 田中 佑治, 長谷 栄治, 田中 亮介, 福島 修一郎, 安井 武史, 荒木 勉, 『電気光学的高速偏光変調を用いた 偏光分解 SHG(第 2 高調波発生光)顕微鏡』, Optics & Photonics Japan 2011, PD-11 (2011/11/28-30 大阪大学).
42. 田中佑治, 長谷栄治, 田中亮介, 福島修一郎, 安井武史, 荒木 勉, 『電気光学の偏光変調による偏光分解 SHG (第 2 高調波発生光) 顕微鏡の高速化』, 第 59 回応用物理学関係連合講演会予稿集, 16p-B9-8 (2012/3/15-18 早稲田大学).
43. 田中 佑治, 長谷 栄治, 福島 修一郎, 安井 武史, 荒木 勉, 『高速偏光分解 SHG(第二高調波発生光)顕微鏡を用いたラット皮膚 in vivo コラーゲン配向イメージング』, 生体医工学シンポジウム 2012 (2012/9/7-8 大阪大学).
44. 田中 佑治, 長谷 栄治, 福島 修一郎, 安井 武史, 荒木 勉, 『高速偏光分解 SHG (第 2 高調波発生光) 顕微鏡 を用いた真皮コラーゲン配向の in vivo イメージング』, Optics & Photonics Japan 2012, 25aA3 (2012/10/23-25 タワーホール船堀).
45. 長谷 栄治, 田中 亮介, 福島 修一郎, 荒木 勉, 安井 武史, 『SHG (第 2 高調波発生光) 顕微鏡を用いた熱傷 治癒過程における真皮コラーゲン動態の可視化』, Optics & Photonics Japan 2012, 25aA4 (2012/10/23-25 タワーホール船堀).
46. 長谷 栄治, 田中亮介, 福島修一郎, 荒木勉, 安井武史, 『SHG (第二高調波発生) 顕微鏡を用いた熱傷 治癒過程における真皮コラーゲン動態の可視化』, 第 36 回日本生体医工学会中国四国支部大会 (2013/10/19 愛媛大学).
47. 田中 佑治, 長谷 栄治, 福島 修一郎, 安井 武史, 荒木 勉, 『電気光学の偏光分解 SHG 顕微鏡を用いた ヒト真皮コラーゲン配向の in vivo 計測』, 第 61 回応用物理学学会春季学術講演会予稿集, 17p-E6-9 (2014/3/17-20 青山学院大学).
48. 厚田 耕佑, 田中 佑治, 長谷 栄治, 福島 修一郎, 荒木 勉, 安井 武史, 『生体コラーゲン顕微鏡を用いた創傷治癒過程の in vivo 時系列モニタリング』, 生体医工学シンポジウム 2014, 1P-04 (2014/9/26-27 東京農工大学).
49. 厚田 耕佑, 田中 佑治, 長谷 栄治, 福島 修一郎, 荒木 勉, 安井 武史, 『非線形光学顕微鏡を用いたラット創傷モデルの治癒過程モニタリング』, 第 37 回日本生体医工学会中国四国支部大会 (2014/10/4 岡山大学).
50. 長谷 栄治, 『生体コラーゲン SHG 顕微鏡』, 国際光年記念シンポジウム ～国際光年記念式典～ (2015/4/21, 東大安田講堂).
51. 長谷 栄治, 宮本 周治, 南川 丈夫, 謝 宜達, 山本 裕紹, 安井 武史, 『次元変換光コムを用いたスキャンレス・フルフィールド 共焦点顕微鏡の開発 (1) ～共焦点ラインイメージの取得～』, 第 76 回応用物理学学会秋季学術講演会予稿集, 13p-2G-14 (2015/9/13-16, 名古屋国際会議場).
52. 宮本 周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 謝 宜達, 山本 裕紹, 安井 武史, 『波長/1D 空間変換によるビーム走査フリーなラインフィールド共焦点顕微鏡』, 第 76 回応用物理学学会秋季学術講演会予稿集, 14a-2E-8 (2015/9/13-16, 名古屋国際会議場).
53. 松原 央樹, 長谷 栄治, 安井 武史, 伊藤 伸一, 藤澤 正一郎, 佐藤 克也, 『経時的その場観察における繰り返し伸縮刺激下の骨芽細胞産生コラーゲン評価』, 日本機械学会 2015 年度年次大会, S0210102 (2015/9/13-16, 北海道大学).
54. 厚田 耕佑, 長谷 栄治, 安井 武史, 『第二高調波発生(SHG)顕微鏡の小型化』, 生体医工学シンポジウム 2015, 1A-20 (2015/9/25-26 岡山国際交流センター).
55. 厚田 耕佑, 田中 佑治, 長谷 栄治, 福島 修一郎, 荒木 勉, 安井 武史, 『非線形光学顕微鏡を用いたラット創傷治癒過程の時系列モニタリング』, 第 26 回バイオフィロンティア講演会, A102 (2015/10/2-3 九州大学伊都キャンパス).
56. 宮本 周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 謝 宜達, 山本 裕紹, 安井 武史, 『波長/空間変換に基づくマルチチ

ャネル分光器型ワンショット共焦点顕微鏡』, Optics & Photonics Japan 2015, 30pD2 (2015/10/28-30 筑波大学東京キャンパス文京校舎).

57. 松原 央樹, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 安井 武史, 佐藤 克也, 『繰り返し伸縮刺激下における骨芽細胞産生コラーゲンの SHG イメージングによる評価』, Optics & Photonics Japan 2015, 28aC8 (2015/10/28-30 筑波大学東京キャンパス文京校舎).
58. 長谷 栄治, 宮本 周治, 南川 丈夫, 謝 宜達, 山本 裕紹, 安井 武史, 『光コムを用いたスキャンレス共焦点顕微鏡の開発 —共焦点ラインイメージングへの応用—』, Optics & Photonics Japan 2015, 28aC3 (2015/10/28-30 筑波大学東京キャンパス文京校舎).
59. 宮本 周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 山本 裕紹, 安井 武史, 『波長/空間変換を用いたワンショット・フルフィールド共焦点光学顕微鏡の開発』, 第 38 回日本生体医工学会中国四国支部大会 (2015/11/28 広島市立大学) .
60. 安井 武史, 宮本 周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 水谷 康弘, 山本 裕紹, 『共焦点スリットと波長/空間変換を用いたスキャンレス・フルフィールド共焦点レーザー顕微鏡の開発』, 2016 年度精密工学会春季大会学術講演会, T66 (2016/3/15-17, 東京理科大) .
61. 厚田 耕佑, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 吉木 啓介, 安井 武史, 『SHG(第二高調波発生)顕微鏡の小型化』, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会予稿集, 21p-S422-7 (2016/3/19-22, 東工大) .
62. 長谷 栄治, 宮本 周治, 謝 宜達, 南川 丈夫, 山本 裕紹, 安井 武史, 『次元変換光コムを用いたスキャンレス・フルフィールド共焦点顕微鏡の開発 (2) ~ 2 次元波長分散光学系の構築~』, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会予稿集, 21a-H116-11 (2016/3/19-22, 東工大) .
63. 宮本 周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 山本 裕紹, 安井 武史, 『波長/1D 空間変換および共焦点スリットを用いたフルフィールド・スキャンレス共焦点レーザー顕微鏡の開発』, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会予稿集, 20p-H116-9 (2016/3/19-22, 東工大) .
64. 南川 丈夫, 長谷 栄治, 宮本 周治, 謝 宜達, 水谷 康弘, 山本 裕紹, 安井 武史, 『光コムの波長/空間次元変換を援用したスキャンレス共焦点光学顕微鏡』, 2016 年度精密工学会秋季大会学術講演会, B18, 2016/9/6 (2016/9/6-8, 茨城大).
65. 長谷 栄治, 宮本 周治, 山本 裕紹, 安井 武史, 南川 丈夫, 『共焦点レーザー走査型光コムの開発』, 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会予稿集, 15p-C32-8 (2016/9/13-16, 新潟朱鷺メッセ).
66. 長谷 栄治, 宮本 周治, 南川 丈夫, 山本 裕紹, 安井 武史, 『次元変換光コムを用いたスキャンレス・フルフィールド 共焦点顕微鏡の開発(3)~2 次元共焦点イメージの取得~』, 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会予稿集, 15a-C42-6 (2016/9/13-16, 新潟朱鷺メッセ).
67. 長谷 栄治, 南川 丈夫, 佐藤 克也, 米倉 大介, 高橋 光彦, 安井 武史, 『SHG 顕微鏡を用いた腱修復の観測』, 生体医工学シンポジウム 2016, 2P-5-6, 2016/9/18 (2016/9/17-18, 旭川市大雪クリスタルホール国際会議場).
68. 小倉 有紀, 厚田 耕佑, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 安井 武史, 『第 2 高調発生光顕微鏡の小型化』, 生体医工学シンポジウム 2016, 2P-5-8, 2016/9/18 (2016/9/17-18, 旭川市大雪クリスタルホール国際会議場).
69. 小倉 有紀, 田中 佑治, 長谷 栄治, 山下 豊信, 安井 武史, 『画像解析手法を用いた第二高調波発生によるコラーゲン in vivo イメージングの定量化と, 肌弾力性との関連』, 生体医工学シンポジウム 2016, 2P-5-7, 2016/9/18 (2016/9/17-18, 旭川市大雪クリスタルホール国際会議場).
70. 松原 央樹, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 安井 武史, 佐藤 克也, 『偏光分解 SHG 顕微鏡を用いた繰り返し伸縮刺激を受ける骨芽細胞産生コラーゲンの線維配向に関する in vivo 解析』, 第 27 回バイオフロンティア講演会, (2016/10/22-23, 北大).
71. 宮本周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 山本裕紹, 安井武史, 『波長/空間変換およびマルチチャンネル分光器を用いたワンショット・フルフィールド共焦点光学顕微鏡の開発』, 第 39 回日本生体医工学会中国四国支部大会, II-1 (2016/10/15, 徳島大) .
72. 松原 央樹, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 安井 武史, 佐藤 克也, 『偏光分解 SHG 顕微鏡を用いた繰り返し伸縮刺激を受ける骨芽細胞産生コラーゲンの in vivo 線維配向解析』, 第 39 回日本生体医工学会中国四国支部大会, I-6 (2016/10/15, 徳島大) .
73. 坂上 卓也, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 安井 武史, 『偏光分解第 2 高調波発生光顕微鏡を用いた組織コラーゲン配向の計測』, 第 39 回日本生体医工学会中国四国支部大会, I-5 (2016/10/15, 徳島大) .
74. 長谷 栄治, 南川 丈夫, 宮本 周治, 山本 裕紹, 安井 武史, 『スキャンレスデュアル光コム顕微鏡を用いた 共焦点位相差イメージング』, Optics & Photonics Japan 2016, 2aA7 (2016/10/31-11/2, 筑波大学東京キャンパス文京校舎).
75. 長谷 栄治, 宮本 周治, 山本 裕紹, 安井 武史, 南川 丈夫, 『光コムを用いた共焦点レーザー走査型顕微鏡の開発』, Optics & Photonics Japan 2016, 2aA8 (2016/10/31-11/2, 筑波大学東京キャンパス文京校舎).
76. 宮本 周治, 長谷 栄治, 南川 丈夫, 山本 裕紹, 安井 武史, 『波長分散素子を用いたスキャンレス共焦

点レーザー顕微鏡の開発』, 第1回フォトニクス研究会「光の境界を開拓する!!」(2016/12/2-3, 沖縄県青年会館).

77. 宮本 周治, 長谷 栄治, 山本 裕紹, 安井 武史, 南川 丈夫, 『波長/空間変換を用いたスキャンレス共焦点レーザー顕微鏡の開発』, レーザー学会学術講演会第37回年次大会 (2017/1/7-9, 徳島大).
78. 長谷 栄治, 南川 丈夫, 宮本 周治, 山本 裕紹, 安井 武史, 『スキャンレスデュアル光コム顕微鏡による共焦点位相イメージング』, レーザー学会学術講演会第37回年次大会 (2017/1/7-9, 徳島大).

受賞

79. 第36回日本生体医工学会中国四国支部大会 若手研究奨励賞 (2013年10月).
80. 徳島大学 機械工学奨励賞 (2014年3月).
81. Optics & Photonics Japan 2015 第1回OPJ優秀講演賞 (2015年11月).
82. 徳島大学 日垂賞 (2017年3月).

謝辞

本論文を執筆するにあたり、徳島大学工学部・安井武史教授には、指導教員として学部4年から6年もの長きに渡り、終始ご指導、ご鞭撻を頂きました。徳島大学工学部・南川丈夫講師には、実験から論文投稿まで研究全般においてご指導頂きました。

本論文の審査にあたっては、徳島大学工学部・岩田哲郎教授に主査を、徳島大学工学部・松本健志教授に副査をお願いし、本論文の内容についてご検討頂くとともに、ご教示を賜りました。

培養骨芽細胞サンプルの作成にあたっては、徳島大学工学部・佐藤克也講師、ウサギ腱断裂サンプルの作成では、徳島県立中央病院・高橋光彦博士にご指導頂きました。ウサギ腱断裂サンプルの引張試験においては、徳島大学工学部・米倉大介教授にご指導頂きました。

徳島大学先端技術教育部・宮本周治氏には、実験の際に様々なお世話をして頂きました。

上記の方々に対してここに深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

平成 29 年 3 月 1 日

博士論文公聴会



”第2高調波発生光顕微鏡を用いた
コラーゲン線維の*in situ*可視化とバイオ応用“

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

2017/2/7

長谷栄治

コラーゲンとは①

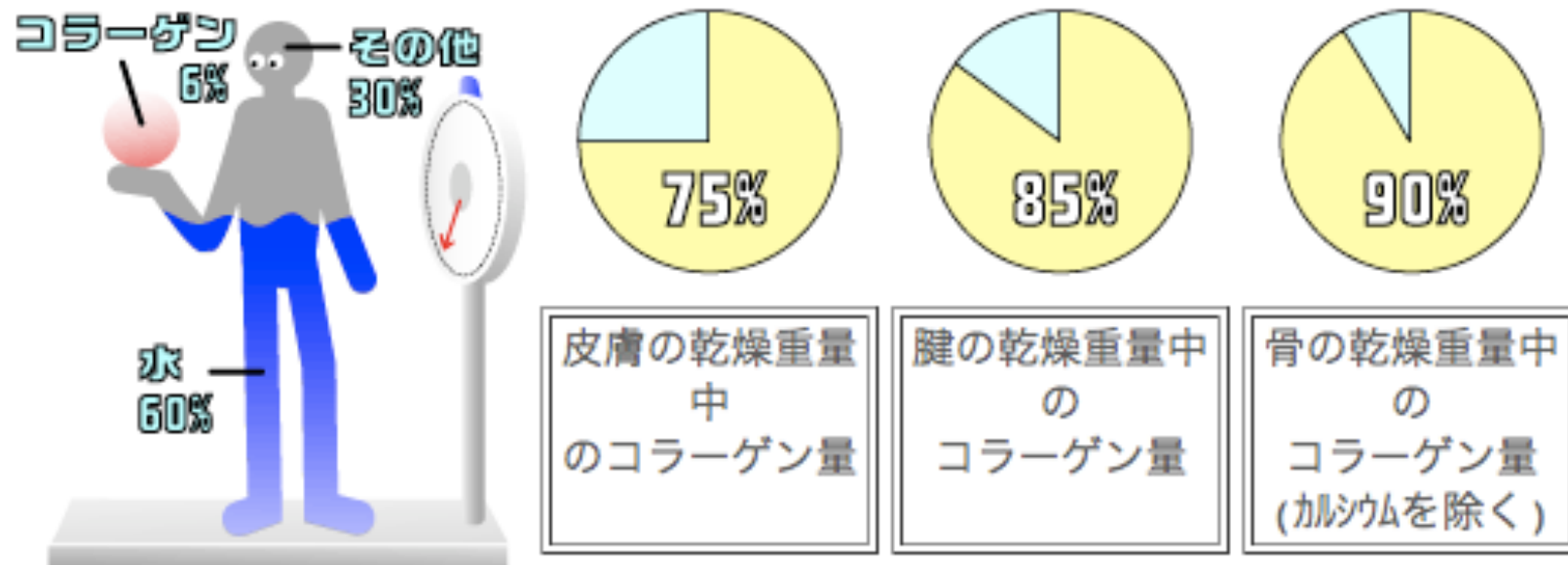


細胞と細胞を糊のようにくっつけたり、細胞を正しい位置に整然と配列させる区画や仕切りを作る



- ①体全体および臓器その他を形作り、それらを支え、結合したり境界を作ったりする。
- ②細胞の足場として働く。この足場によって、細胞は分裂し増殖する。

コラーゲンとは②



<http://www.hopec.biz-web.jp/collagen/collagentoha/>より抜粋

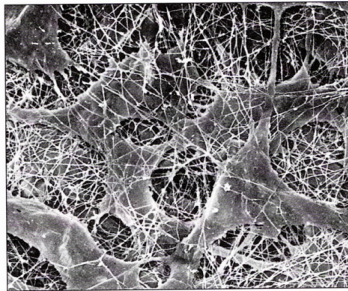
コラーゲン
が減ってく
ると？

皮膚：張りと弾力性が失われてタルミやしワの増加。
骨、軟骨：骨密度の減少や関節痛。
歯茎：歯茎がおとろえ、歯周病の原因。
血管：柔軟性が失われ高血圧の原因。

コラーゲンは生命活動に深く関係

コラーゲンとは③

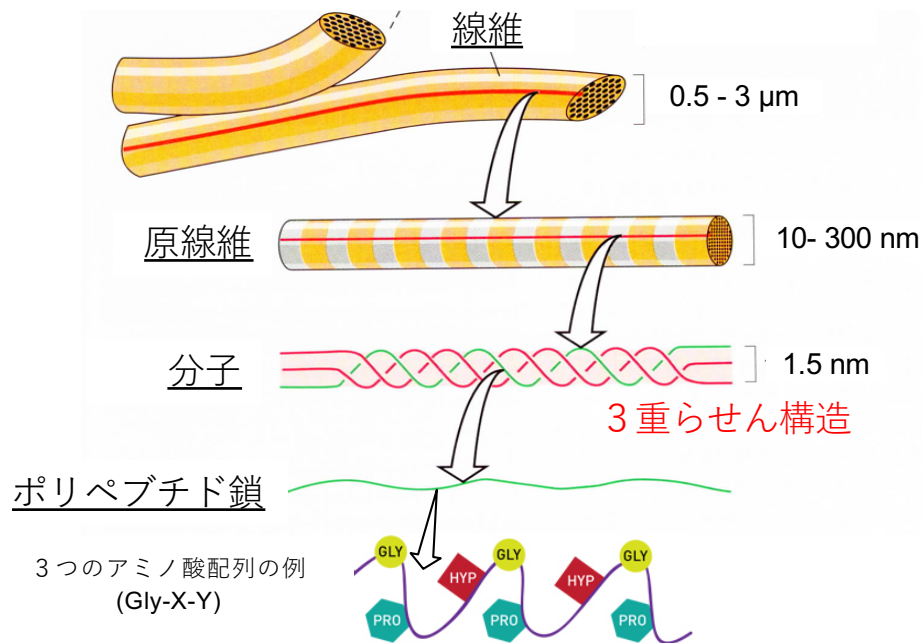
- 細胞による産生・再構築



10 μm

線維芽細胞と細胞外マトリックス

コラーゲンの高次階層構造



コラーゲンのタイプ

・線維形成型

I型: 体内に最も大量に存在する
皮膚, 骨, 腱, 靭帯などに存在

II型: 軟骨など

III型: 皮膚, 血管など

V型: 骨, 角膜など

・ネットワーク形成型

IV型: 基底膜など

VI型: 軟骨など

コラーゲンに関する研究

生体組織におけるコラーゲンが、
どこに (分布)
どの程度 (濃度)
どのように (構造)
存在しているかを可視化することが重要

コラーゲン観察手法：光学顕微鏡（染色法）

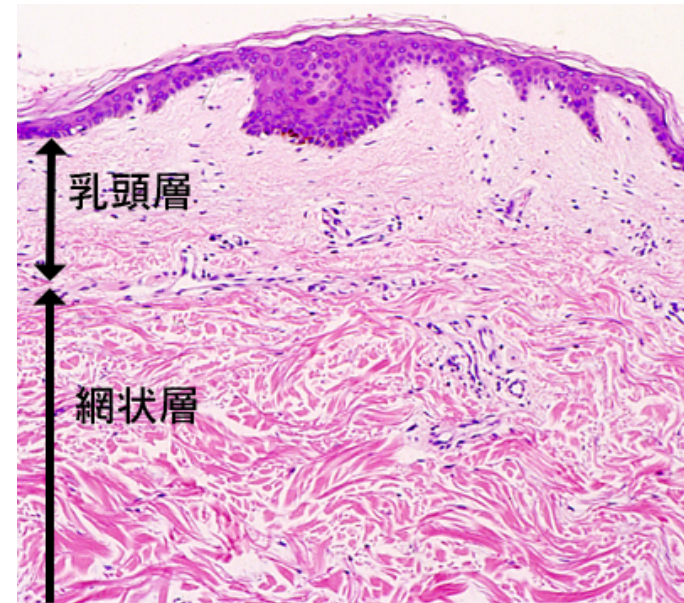
光学顕微鏡



<http://www.olympus.co.jp/>

生体組織→無色透明

染色法



選択的な観察が可能
破壊・侵襲的

カラーゲン観察手法: 共焦点光学顕微鏡

*In situ*皮膚計測



<http://www.vivascope.de>

*In situ*計測が可能
選択的観察が困難

コラーゲン観察手法: OCT (Optical Coherence Tomography)

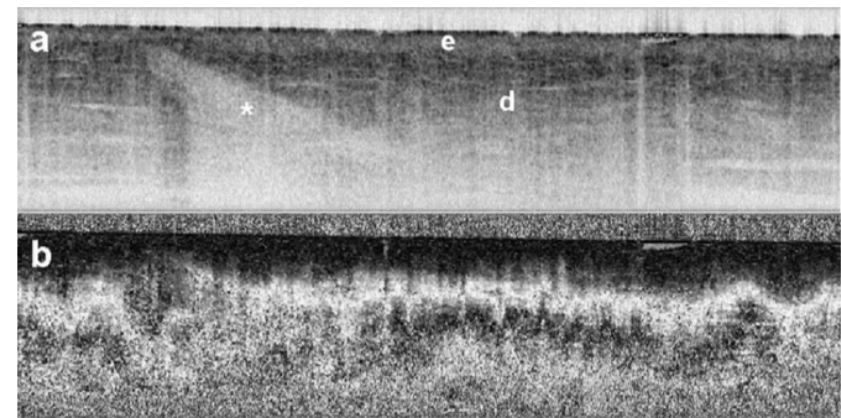
Ref) Opt. Express **12**, 5940 (2004).
J. Biomed. Opt. **9**, 287 (2004).

In situ皮膚検査の様子



<http://www.canon-lcs.co.jp/>

皮膚計測像



A:通常のOCT像

B:偏光感受型OCTによる位相遅延像

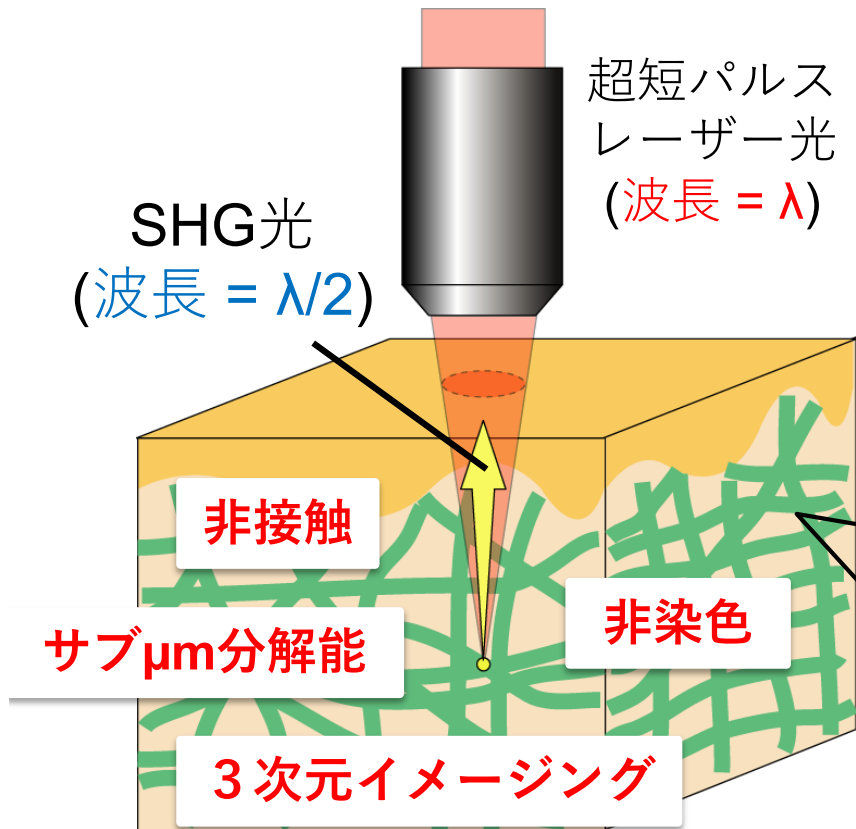
*In situ*計測が可能

複屈折量の可視化▶線維状組織の選択的可視化

低いイメージ・コントラスト

SHG顕微鏡

ref) *Biophys J.* **50**, 693 (1986). *Nature protocols* **7**, 654 (2012).



SHG (第2高調波発生)

超短パルス光を, 非中心対称性の物質に入射した際, 半波長 (周波数が2倍) の光が発生する現象

例

コラーゲン分子



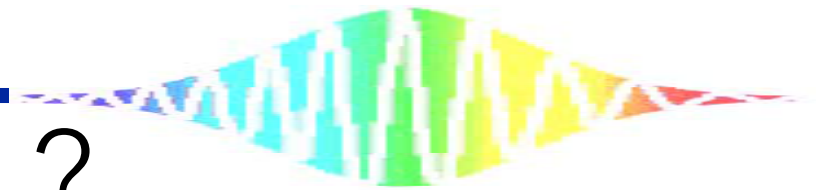
非中心対称性構造



SHG光の発生源

「コラーゲンの選択的可視化」

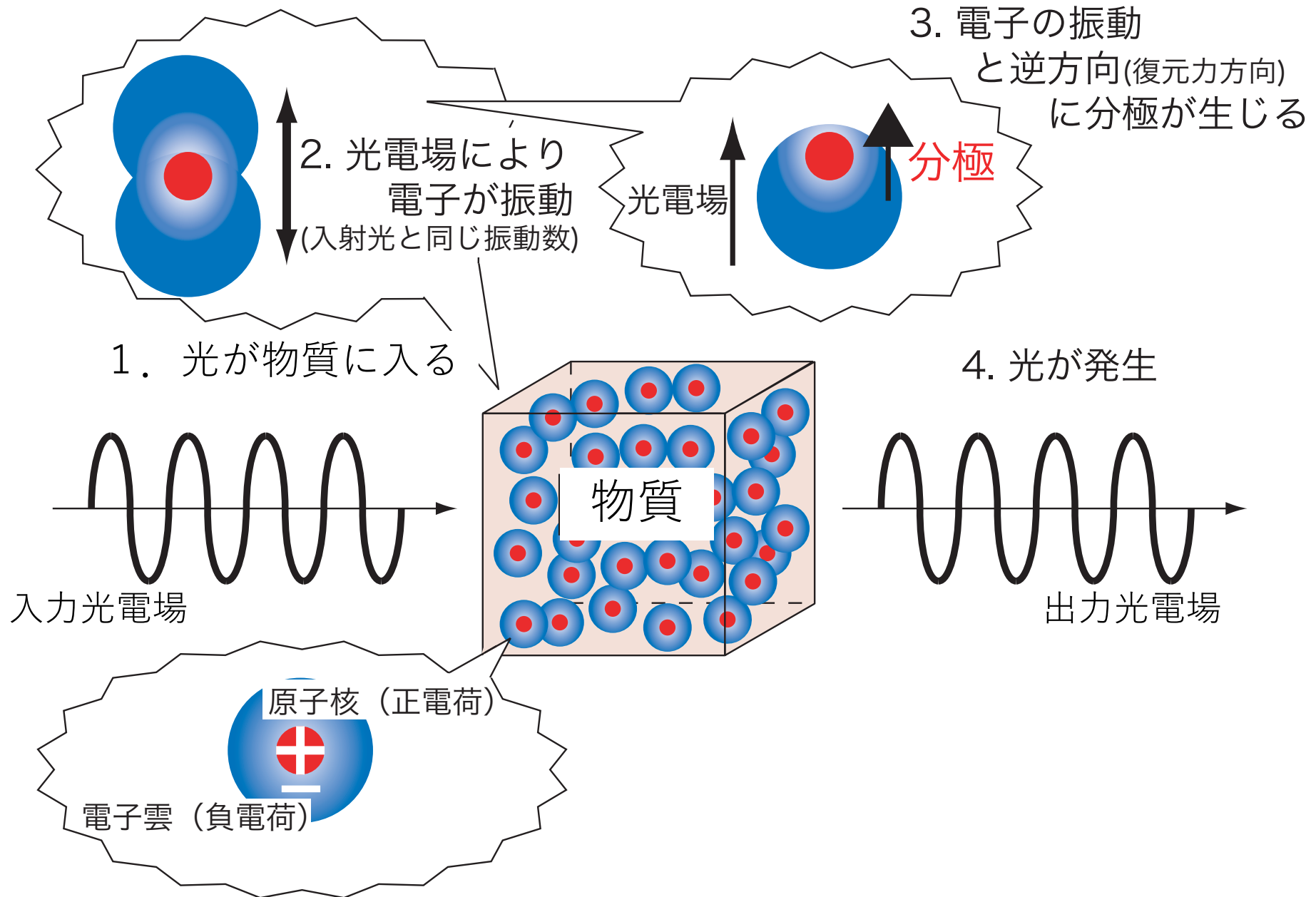
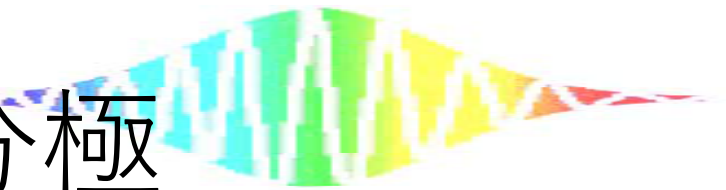
「*in situ*計測特性」



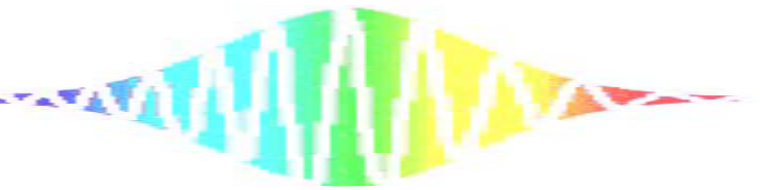
SHGとは？

	線形効果	非線形効果
音	<p>基本音 (freq. = f)</p> <p>さわる</p>	<p>基本音 f 倍音 $2f$</p> <p>強く叩く!</p>
光	<p>CW光 反射&散乱光</p> <p>非中心対称物質</p>	<p>超短パルス光 SHG光</p> <p>↑ フェムト秒パルスレーザー</p> <p>非中心対称物質 例) 組織コラーゲン</p>

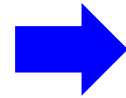
光と物質：分極



線形分極



線形分極



屈折, 反射, 回折, 干渉 . . .

通常の光

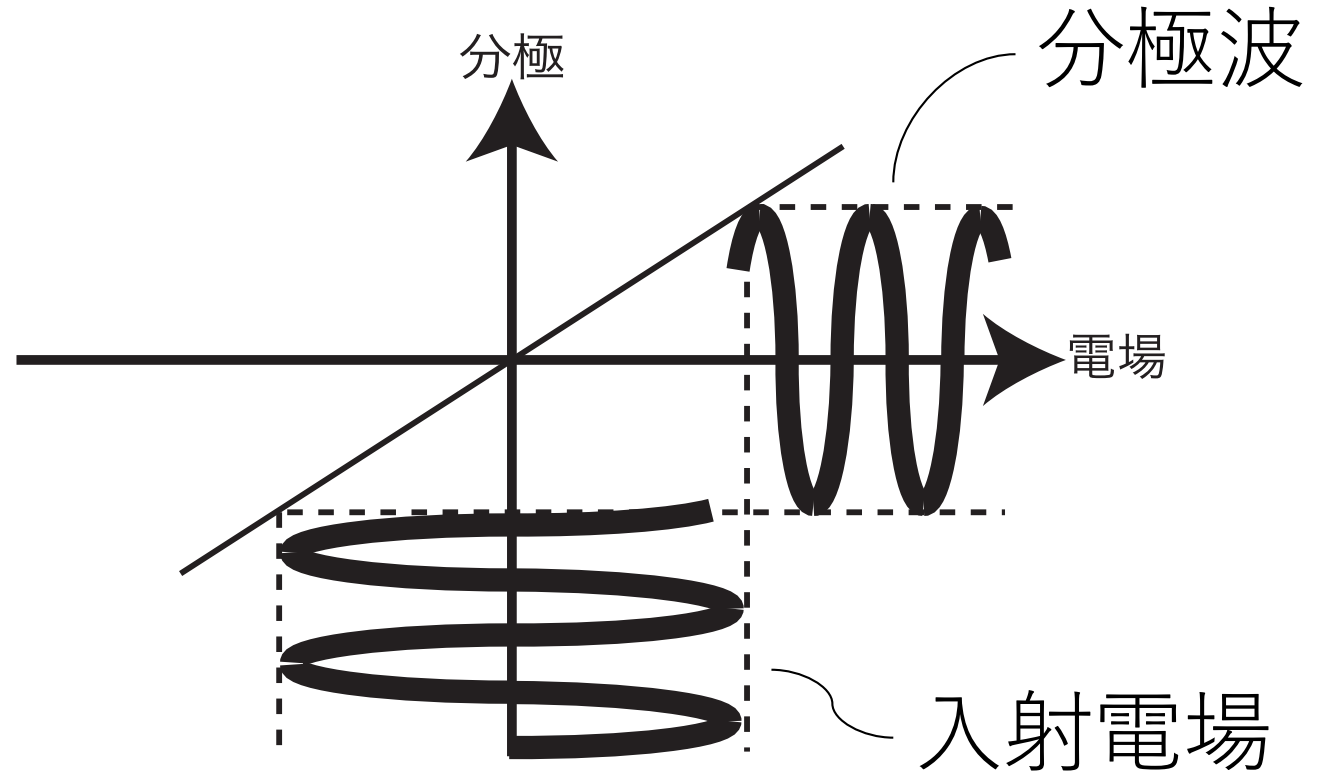
電場 \propto 分極

$$P_L = \chi^{(1)} E$$

P : 分極

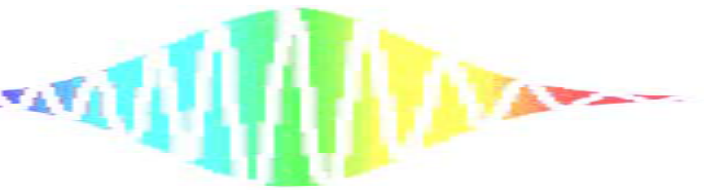
$\chi^{(1)}$: 線形感受率

E : 入射電場



線形分極では, 波長(周波数)は変化しない

非線形分極



非線形分極@コラーゲン

フェムト秒レーザーの利用

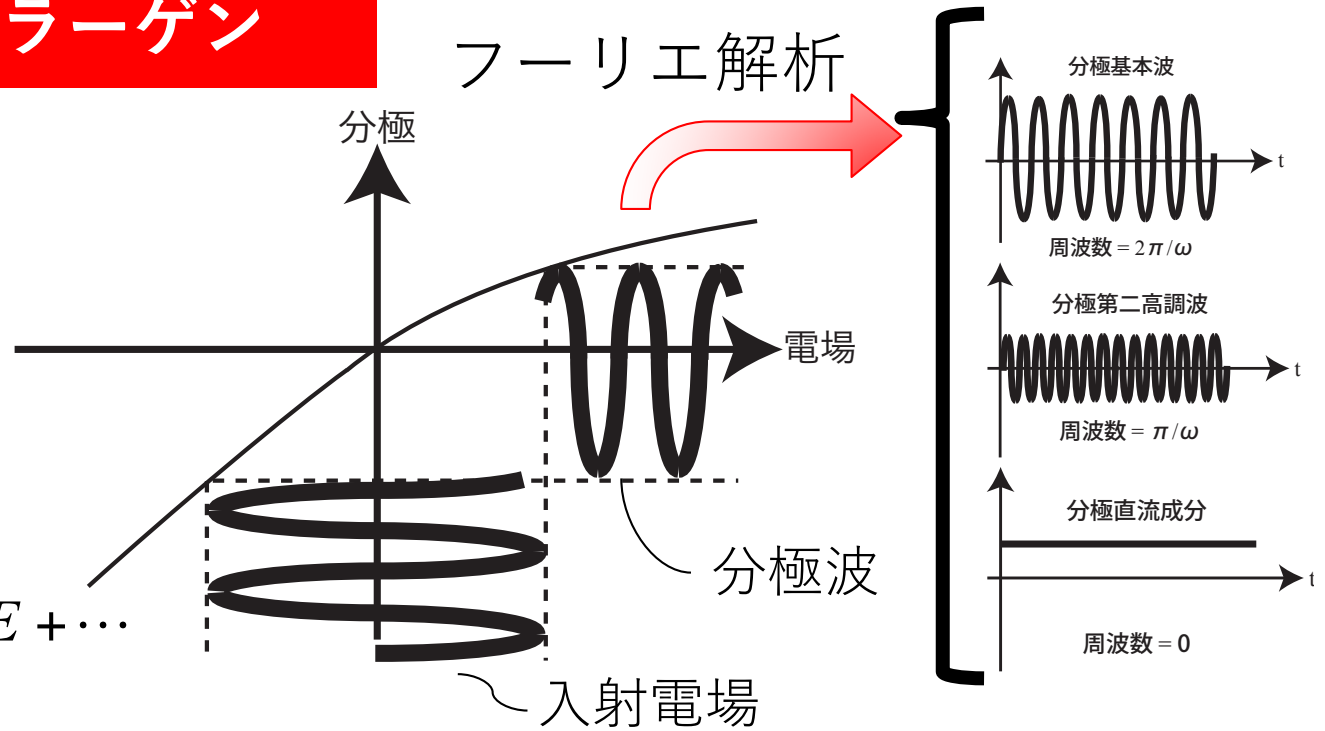
ピークパワーが高い

電場が強くなる

↓
電場 \propto 分極

$$P_{NL} = \chi^{(1)} E + \chi^{(2)} EE + \chi^{(3)} EEE + \dots$$

$\chi^{(n)}$: 非線形感受率

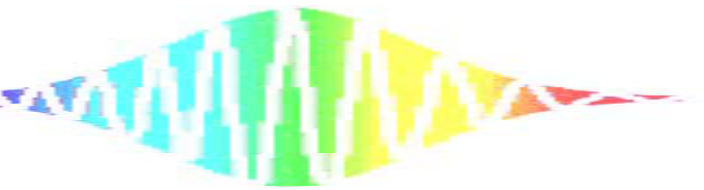


分極波に非線形な項が現れる → 分極波が歪む → 高調波の成分を含む

- ・ 非中心対称物質の場合，正負の方向で分極波が非対称

非線形分極では，波長(周波数)変換が起こる

非線形分極



非線形分極@コラーゲン

フェムト秒レーザーの利用

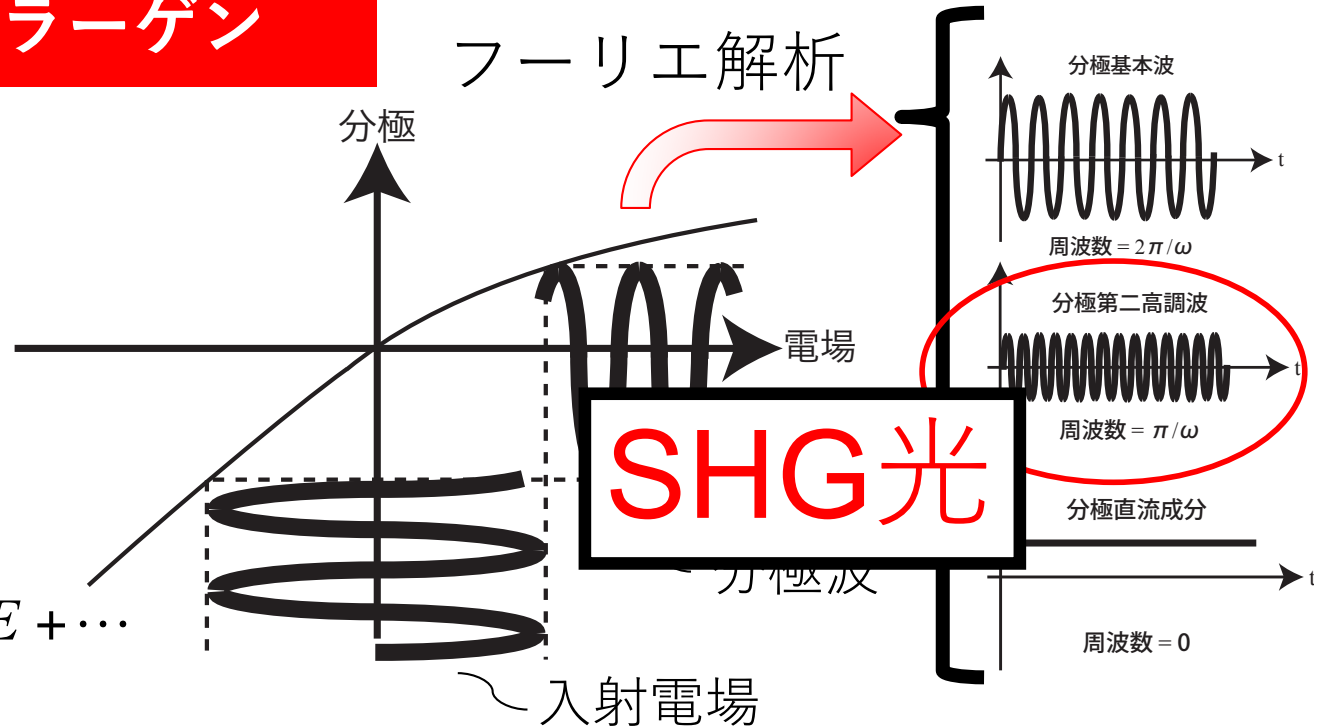
ピークパワーが高い

電場が強くなる

↓
電場 \propto 分極

$$P_{NL} = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}EE + \chi^{(3)}EEE + \dots$$

$\chi^{(n)}$: 非線形感受率

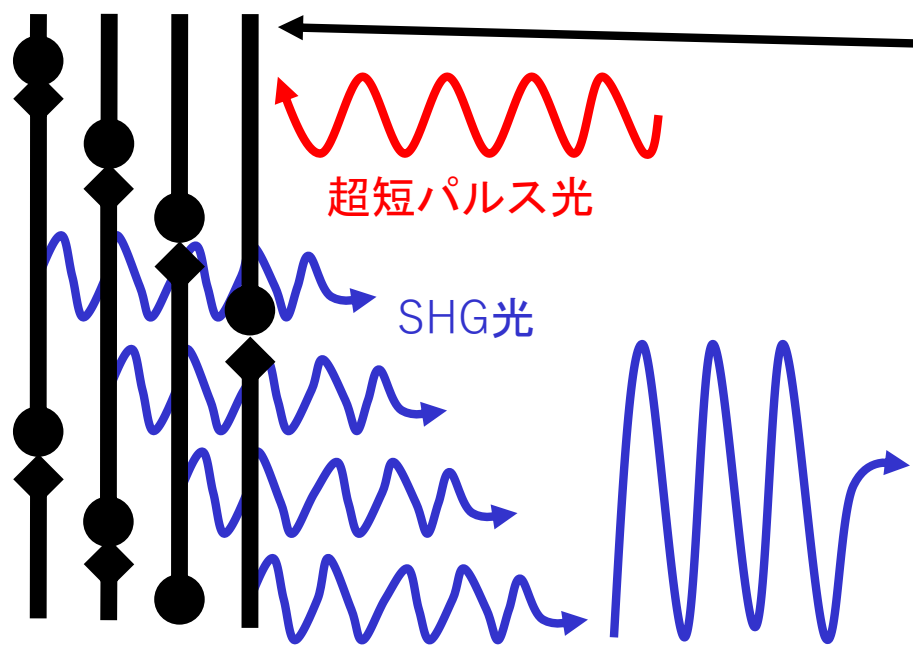


分極波に非線形な項が現れる → 分極波が歪む → 高調波の成分を含む

- ・ 非中心対称物質の場合，正負の方向で分極波が非対称

非線形分極では，波長(周波数)変換が起こる

コラーゲン線維の組織構造とSHG光



コラーゲン分子
(ポリペプチド3重らせん構造)



光波長オーダーの
非中心対称性構造



生体SHG光発生



規則的配向がSHG光を増強

コラーゲンのタイプ

・線維形成型

I型: 体内に最も大量に存在する
皮膚, 骨, 腱, 靭帯などに存在

II型: 軟骨など

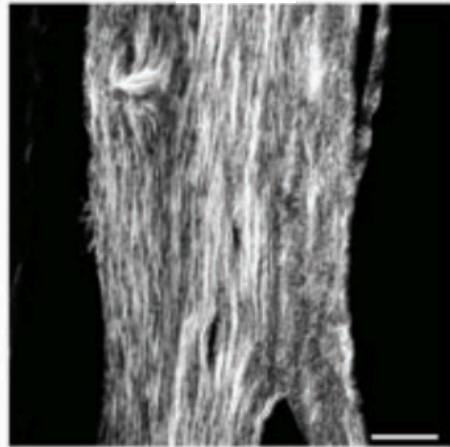
III型: 皮膚, 血管など

V型: 骨, 角膜など

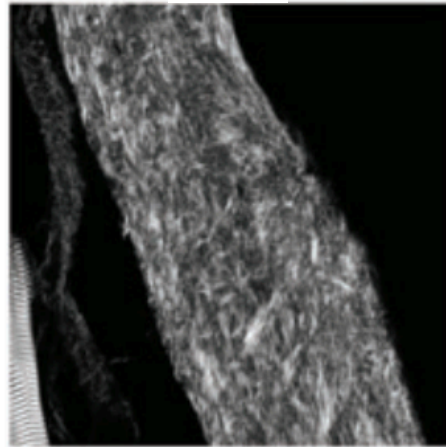
SHG顕微鏡の応用例

骨形成不全症 マウス骨切片

正常

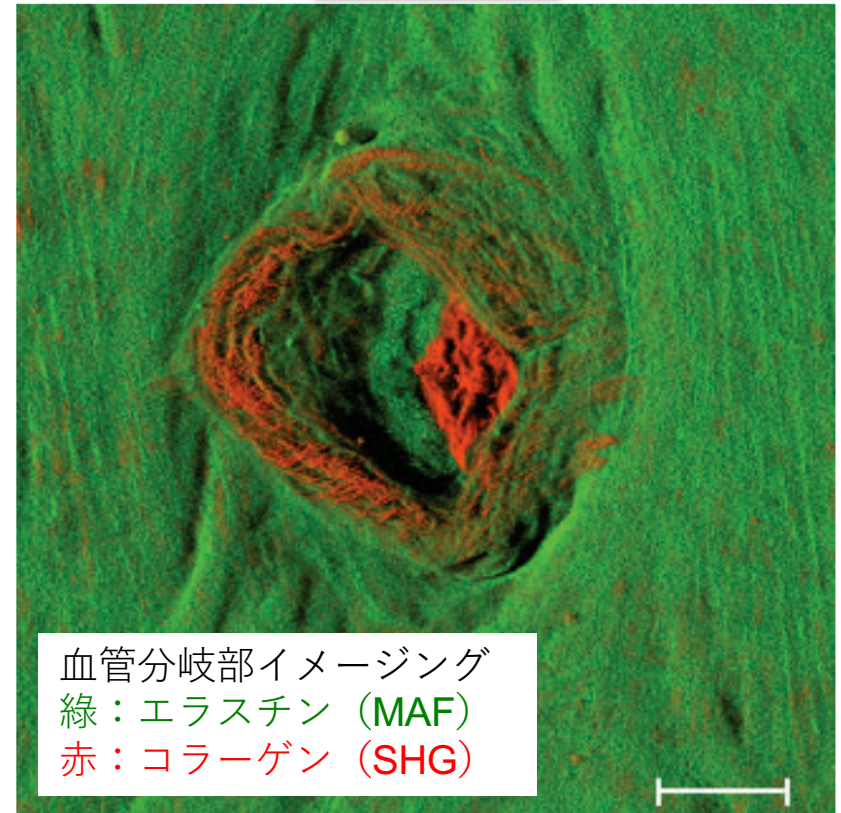


異常



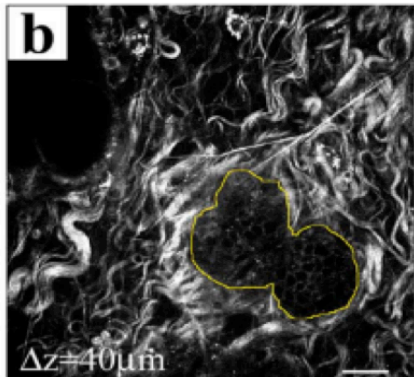
コラーゲンの構造の違いを可視化

動脈硬化



分岐部 (応力集中部) にコラーゲンが産生

乳ガン早期診断

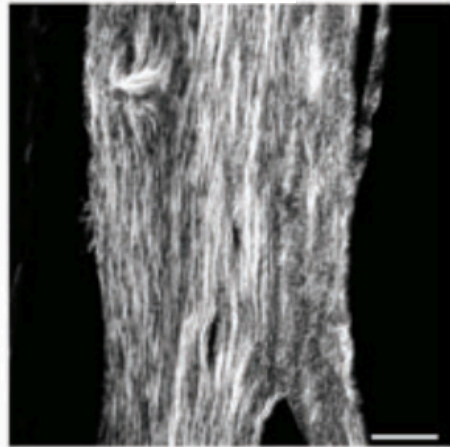


ガン形成初期の小さい腫瘍の周りに密なコラーゲンが分布

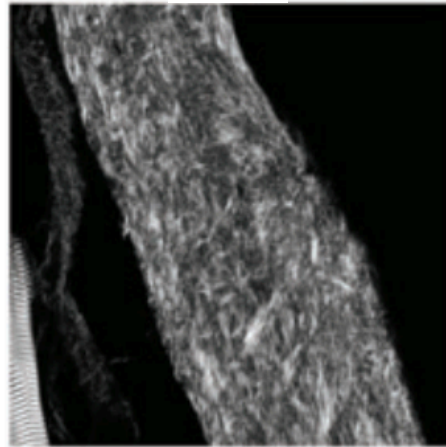
SHG顕微鏡の応用例

骨形成不全症 マウス骨切片

正常

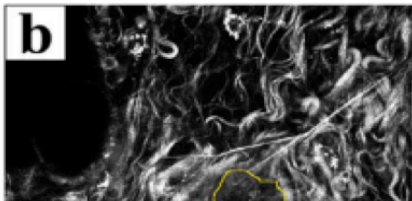


異常

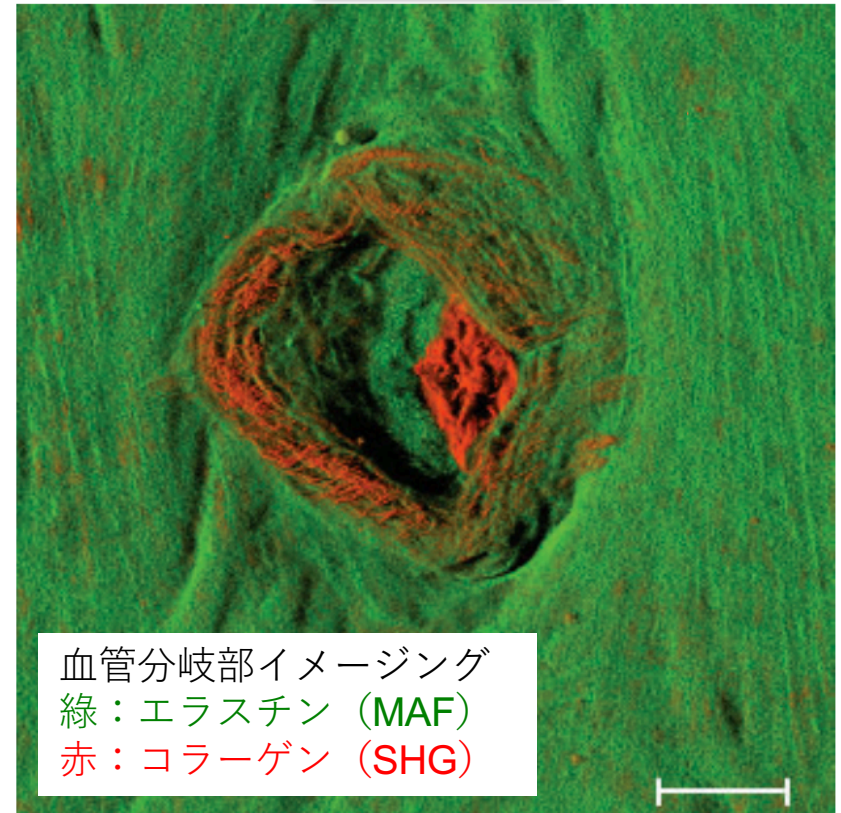


コラーゲンの構造の違いを可視化

乳ガン早期診断

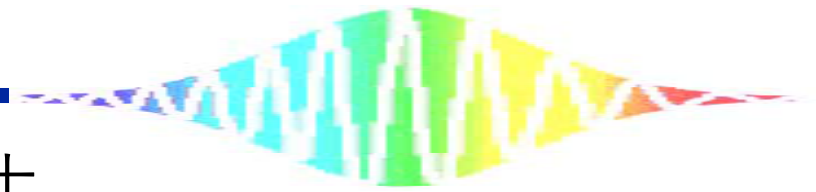


動脈硬化



分岐部 (応力集中部) にコラーゲンが産生

「コラーゲンの選択的可視化」能力を利用して、顕微鏡下で組織観察する研究が主流



これまでのSHG顕微鏡利用法

「**コラーゲンの選択的可視化**」能力を利用して、
顕微鏡下で組織観察する研究が主流

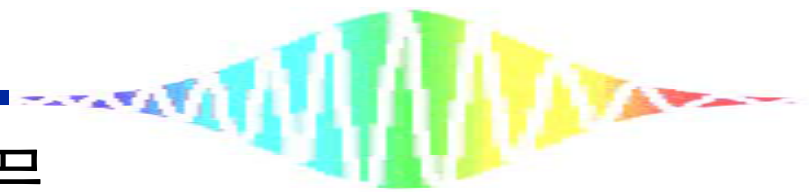
本研究内容

「**コラーゲンの選択的可視化**」と「**in situ計測特性**」という両特徴を活かしたバイオ応用

1. 骨芽細胞産生コラーゲンの時系列可視化
2. 腱修復における組織学・力学的修復評価

バイオ分野におけるコラーゲン動態を評価する手法としての有用性を検討

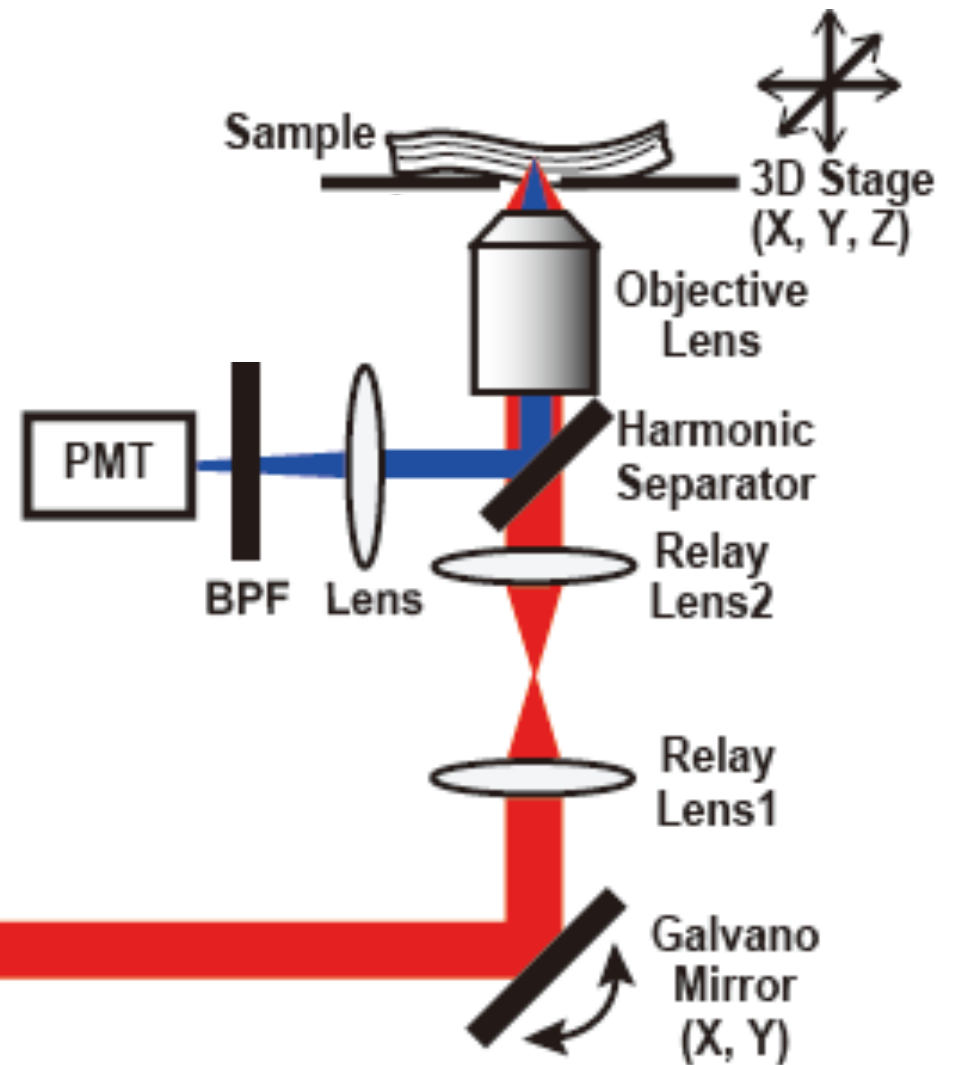
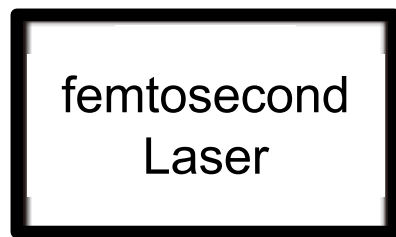
実験装置



光源

①Ti:S レーザー
中心波長: 800 nm
パルス幅: 10 fs

②Cr:F レーザー
中心波長: 1250 nm
パルス幅: 100 fs



実験装置の最適化の検討

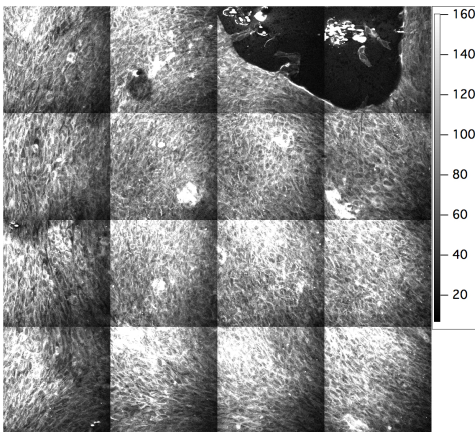
レーザーパルス幅: Δt

$1/\Delta t \propto$ SHG発生強度

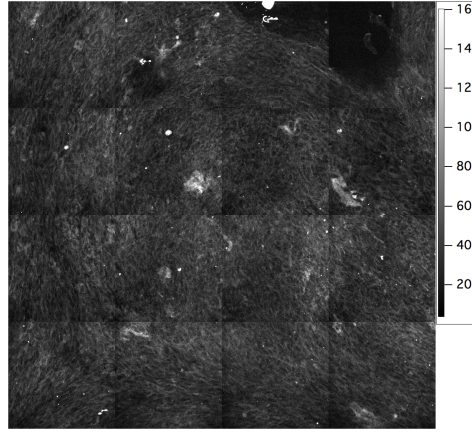
①Ti:S レーザー
中心波長: 800 nm
パルス幅: 10 fs

②Cr:F レーザー
中心波長: 1250 nm
パルス幅: 100 fs

10-fs pulse light @ 20 mW



110-fs pulse light @ 20 mW



低SHG発生効率サンプル
▶ 10 fs レーザー

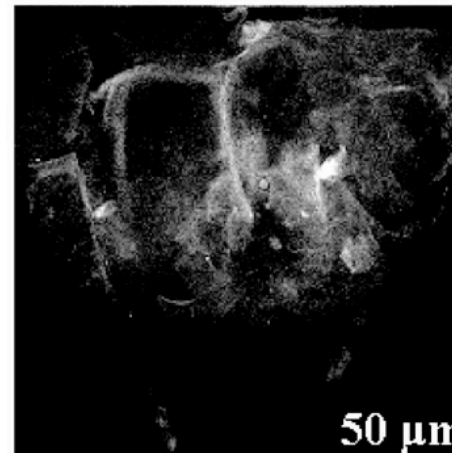
レーザー中心波長: λ

$1/\lambda^4 \propto$ 散乱強度

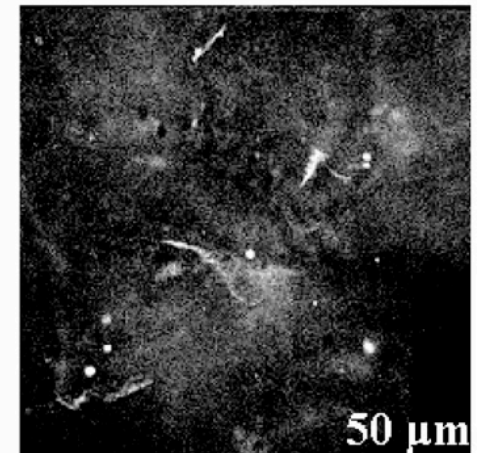
①Ti:S レーザー
中心波長: 800 nm
パルス幅: 10 fs

②Cr:F レーザー
中心波長: 1250 nm
パルス幅: 100 fs

Ti:S-SHG image

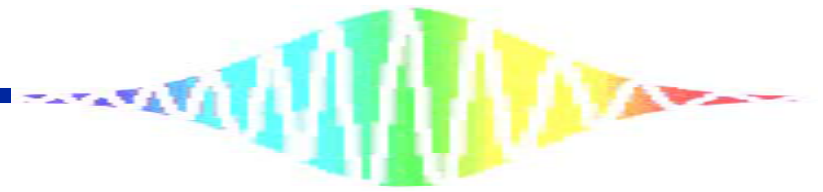


Cr:F-SHG image



厚みのあるサンプル
▶ 長波長レーザー

骨芽細胞産生コラーゲン ▶ 10 fs Ti:S レーザー (800 nm)
腱修復評価 ▶ 100 fs Cr:F レーザー (1250 nm)



1. 骨芽細胞産生コラーゲンの時系列可視化

Introduction

Bone injuries largely reduces QOL in elder people.
Metabolism of bone tissue is quite slow

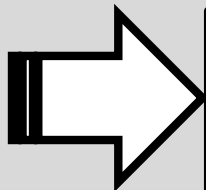
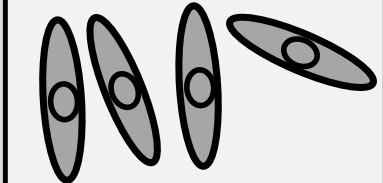


Bone tissue engineering is required in **aging society**

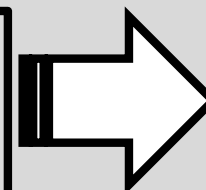
Bone formation and regeneration

iPS cell ,
MSC, etc

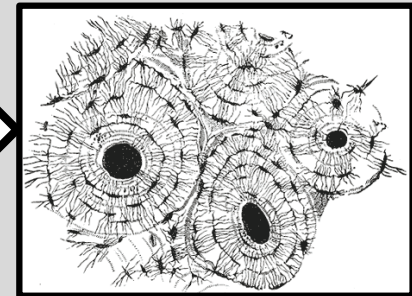
Osteoblasts



- collagen production
- mineral deposition



Bone tissue



Introduction

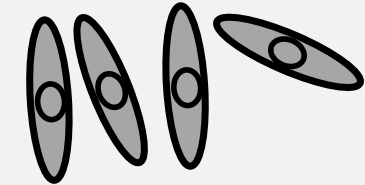
Bone injuries largely reduces QOL in elder people.
Metabolism of bone tissue is quite slow

Bone tissue engineering is required in **aging society**

Bone formation and regeneration

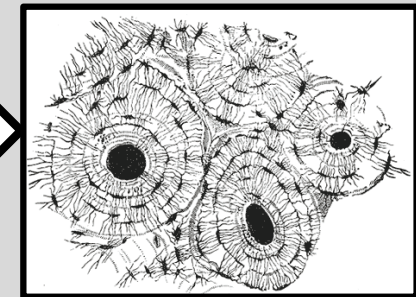
iPS cell ,
MSC, etc

Osteoblasts



- collagen production
- mineral deposition

Bone tissue



Mechanical stimulus

Introduction

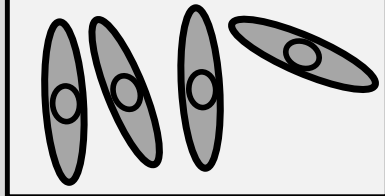
Bone injuries largely reduces QOL in elder people.
Metabolism of bone tissue is quite slow

Bone tissue engineering is required in **aging society**

Bone formation and regeneration

iPS cell ,
MSC, etc

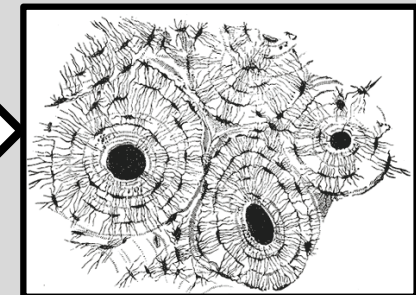
Osteoblasts



Monitoring without invasion

- collagen production
- mineral deposition

Bone tissue



Mechanical stimulus

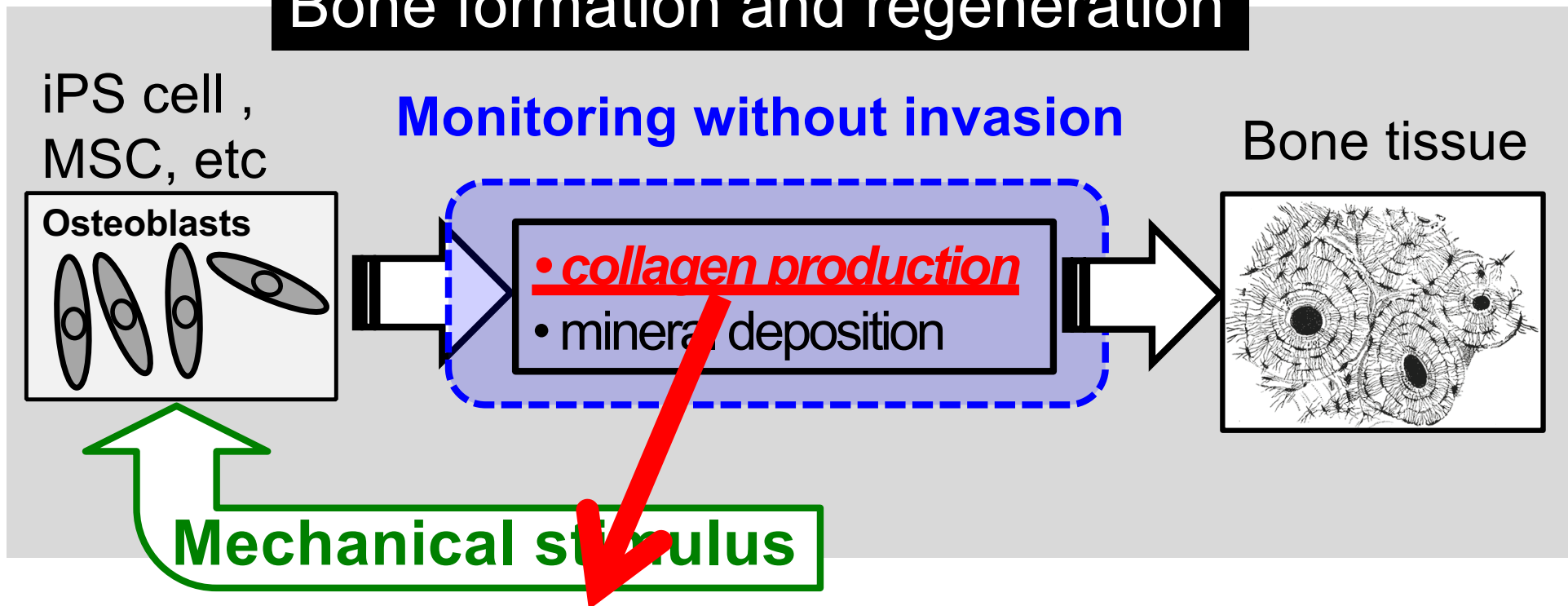


Introduction

Bone injuries largely reduces QOL in elder people.
Metabolism of bone tissue is quite slow

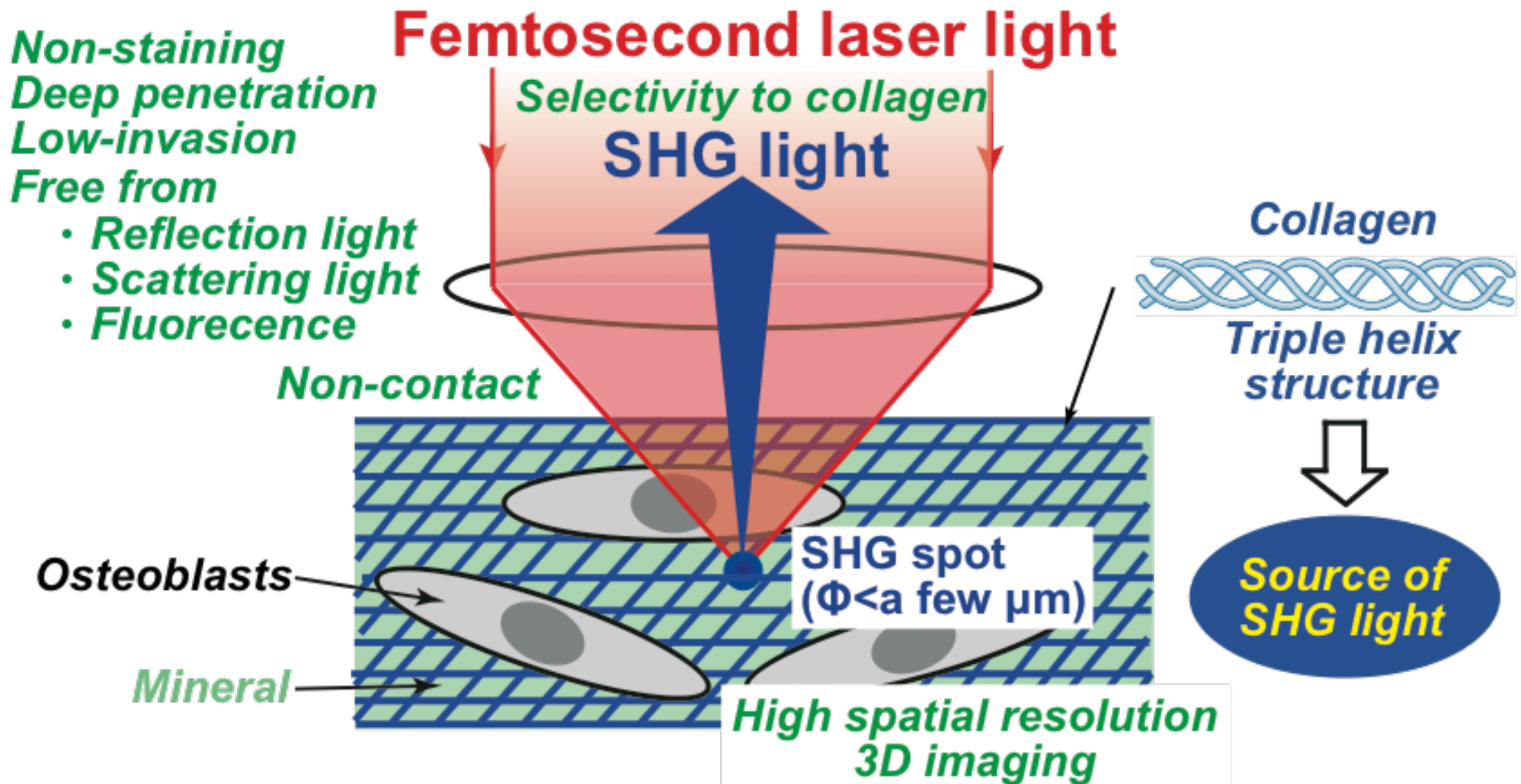
Bone tissue engineering is required in **aging society**

Bone formation and regeneration



Difficult to visualize collagen dynamics without staining

Selective visualization of collagen fiber *in vivo* by SHG microscopy (SHG-M)



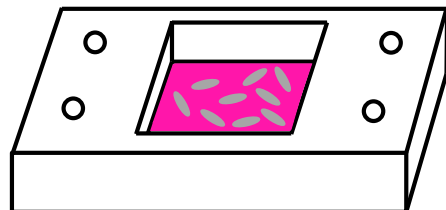
Sample preparation

Cell : MC3T3-E1 murine calvaria-derived osteoblast-like cells

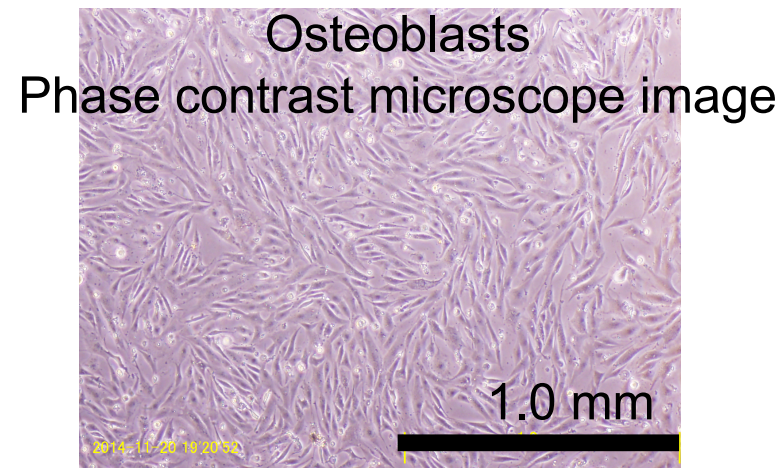
Medium : α -MEM + 10% FBS + 1% ascorbic acid + 100-
(Life technologies, Inc.) 0.2% hydrocortisone + 100 μ g/mL
2% β -glycerophosphate + penicillin-
(TakaraBio inc.) streptomycin

Coating : fibronectin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Culture condition : 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂
Chamber made of silicone (STREX Inc.) was used for cell seeding.



4 cm² Chamber

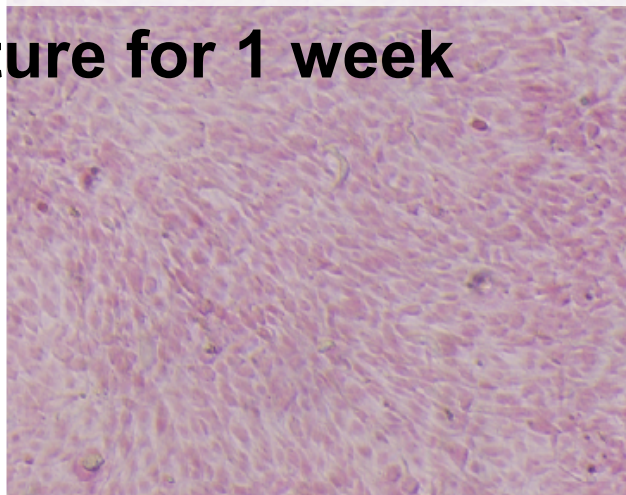


1.0 mm

Sirius-Red-stained images of collagen fiber produced by cultured osteoblast

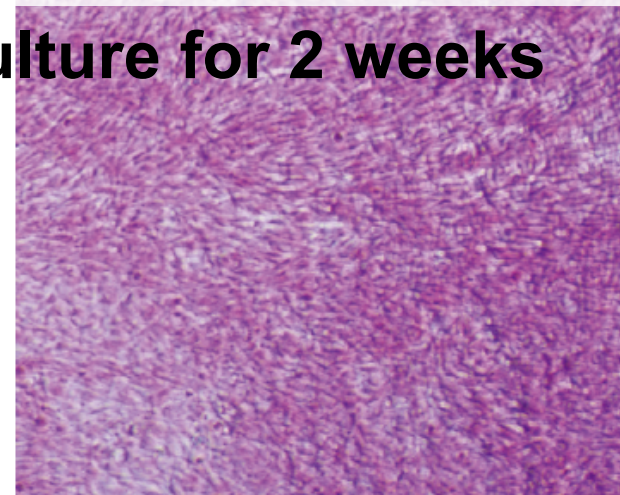
Pink : collagen
nuclear

Culture for 1 week



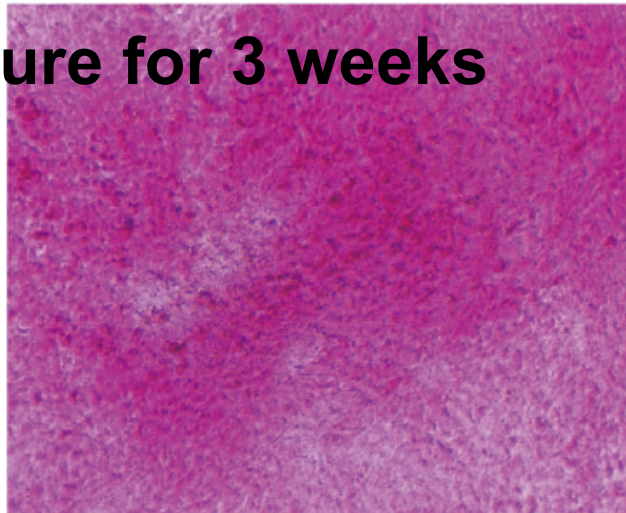
Collagen distributes into cells

Culture for 2 weeks



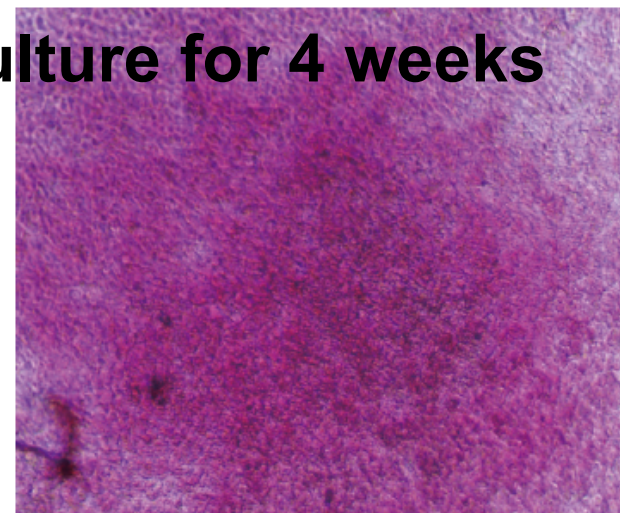
Collagen accumulates into cells

Culture for 3 weeks



Collagen fiber structure appears

Culture for 4 weeks



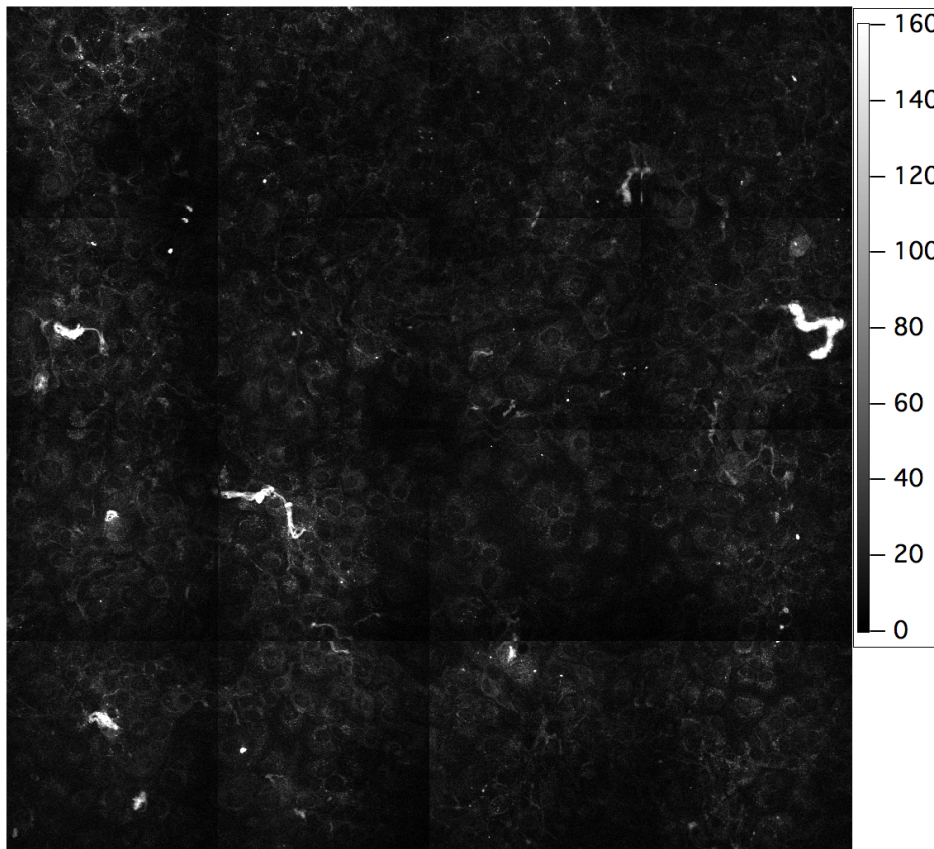
No change from 3 weeks

Image size:
1040×1040 μm

SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast

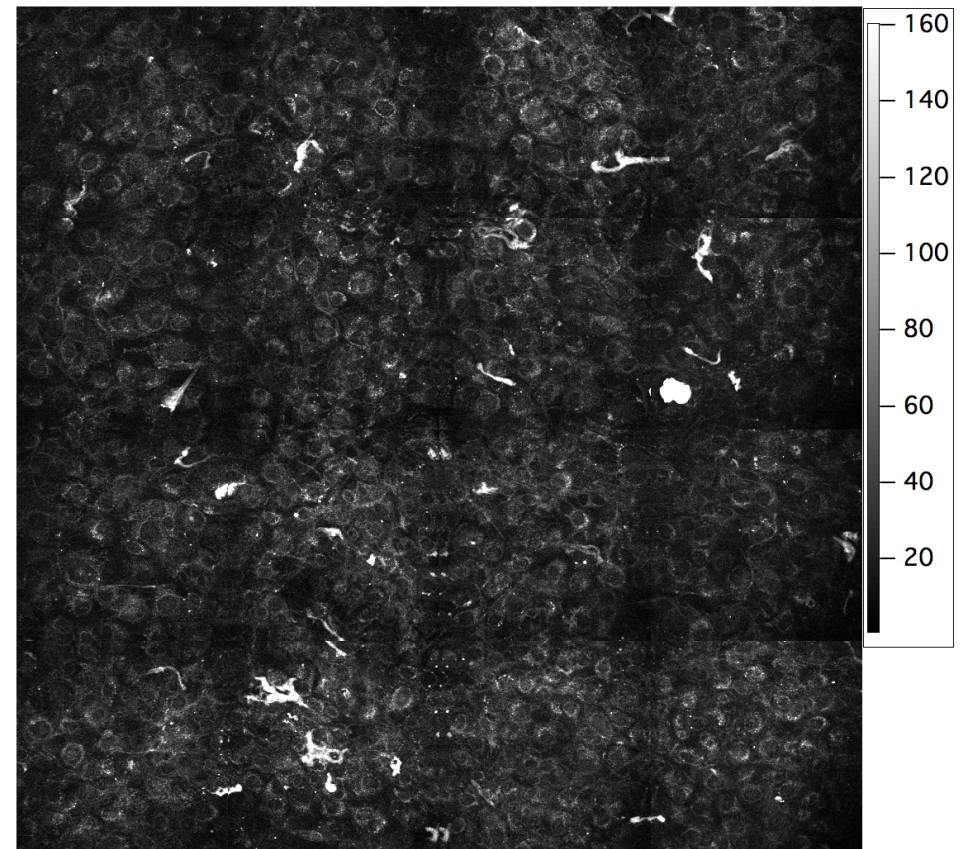
Image size:
1040×1040 μm

Culture for 1 week



Collagen distributes only into cells

Culture for 2 weeks

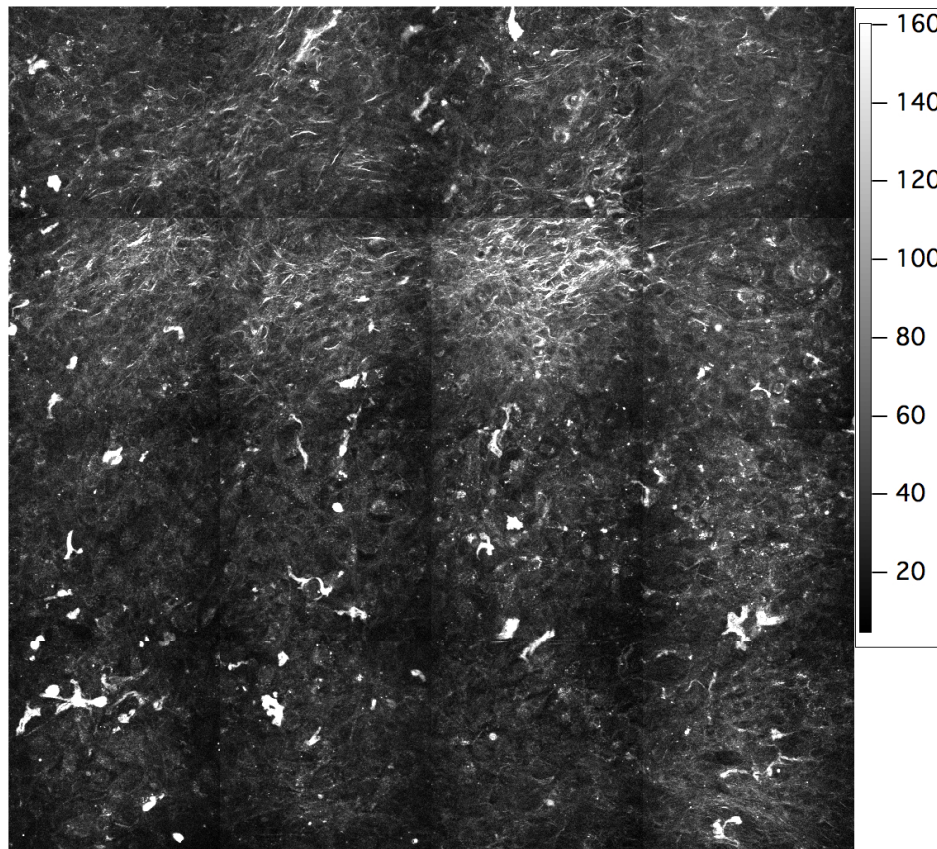


Increased density of collagen fiber inside cells

SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast

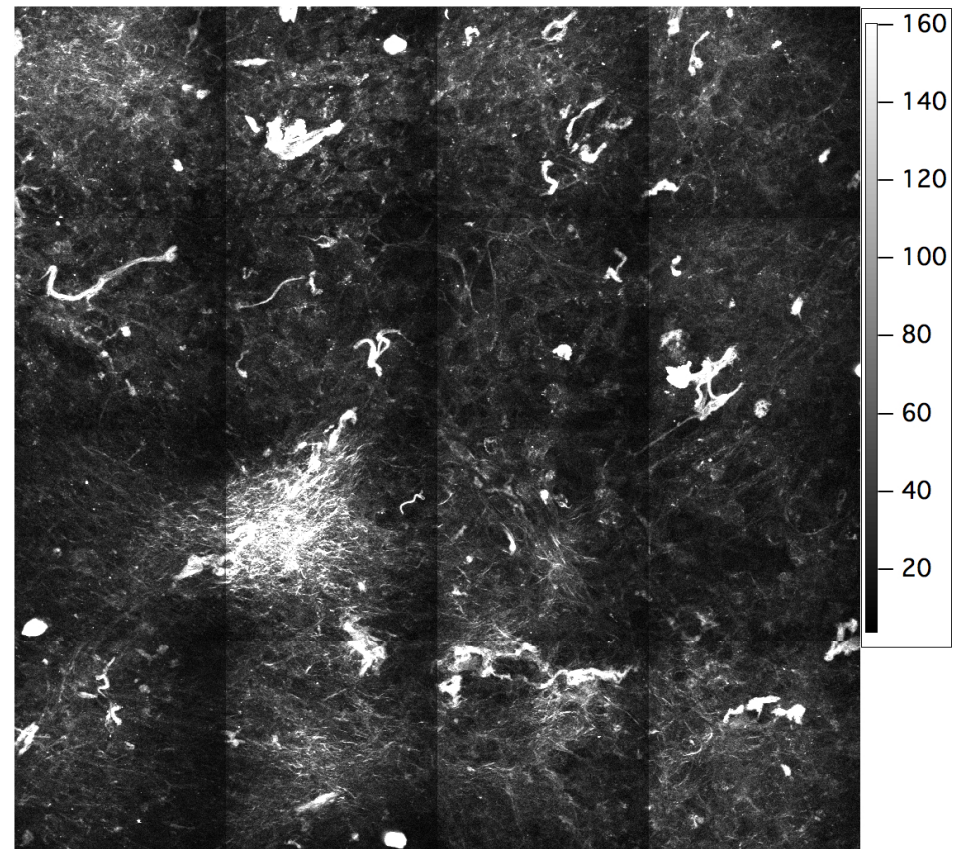
Image size:
1040×1040 μm

Culture for 3 week



Thin collagen fiber structure appears

Culture for 4 weeks



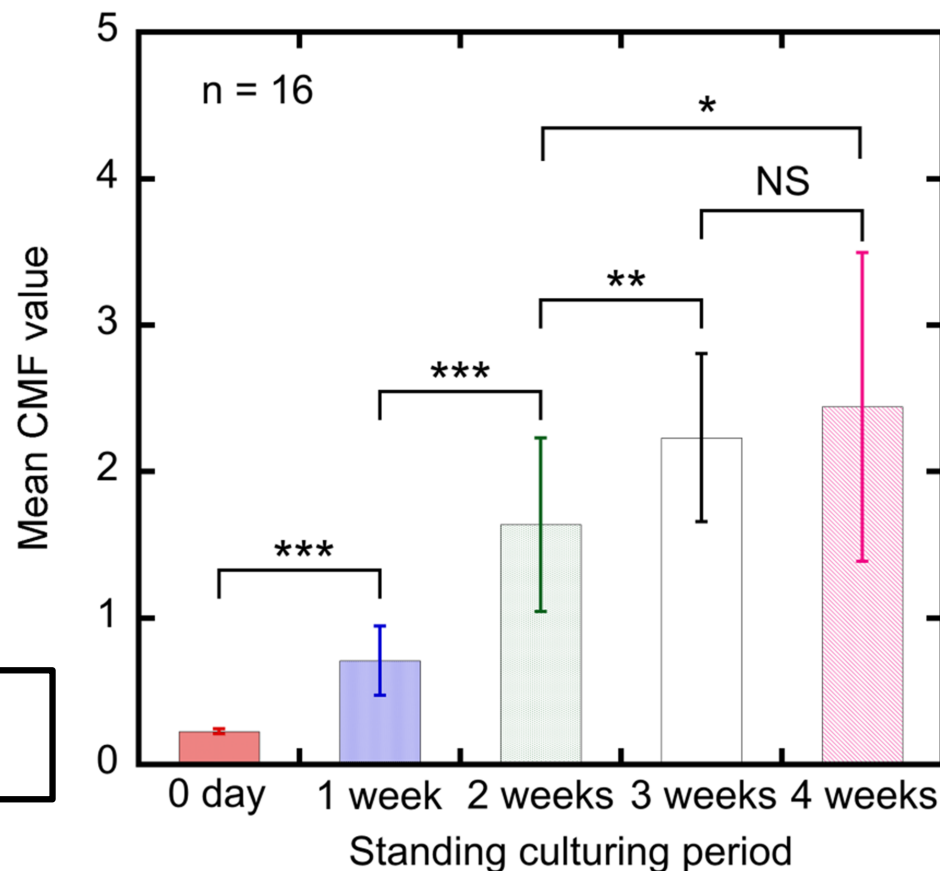
Collagen fiber became thicker and more densely

画像解析によるコラーゲン成熟度の定量評価

コラーゲン成熟度

- ・ 線維のネットワーク構造
2次元フーリエ変換後,
パワースペクトルを楕円近似
楕円の長軸・短軸比を取る
- ・ コラーゲン濃度
SHG光強度

コラーゲン成熟度 (CMF value) =
長軸・短軸比 × SHG光強度



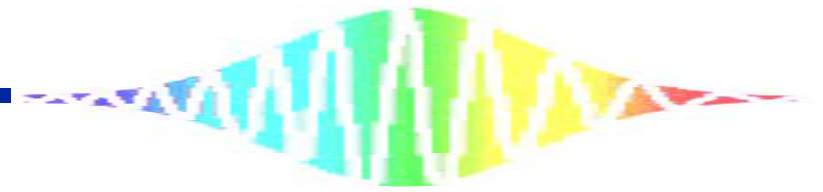
時系列的なコラーゲンの成熟が定量的に評価できた

Conclusion

- Collagen produced by the cultured osteoblasts was visualized with high contrast
- *in situ* time-lapse imaging **of the same sample**
- Collagen maturity factor

Future plans

- *in situ* monitoring of collagen synthesis and calcification process under mechanical stress application aimed at bone tissue engineering



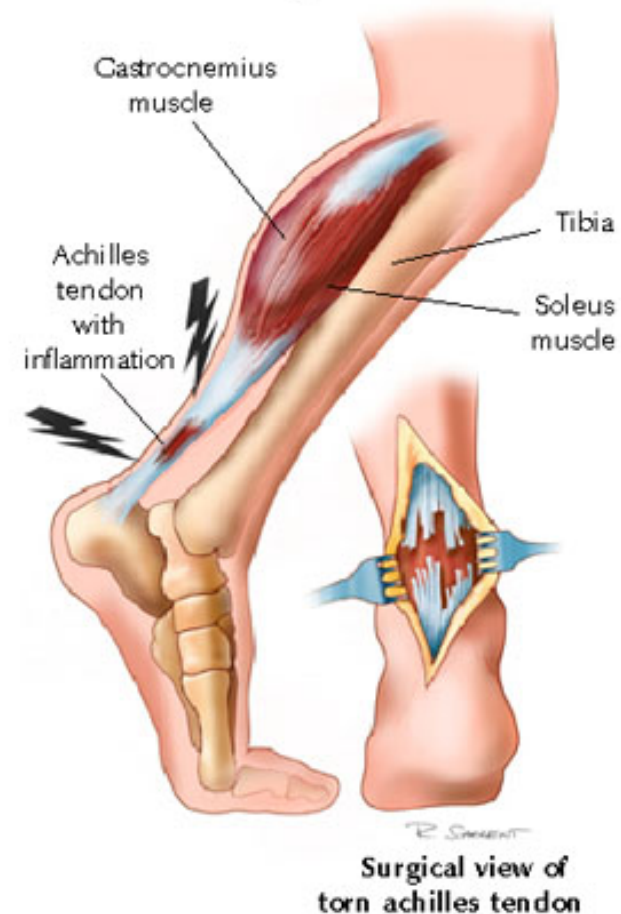
2. 腱修復における組織学・力学的修復評価

代表的な腱損傷（アキレス腱断裂）

殆どにおいて、
強い張力により断裂する

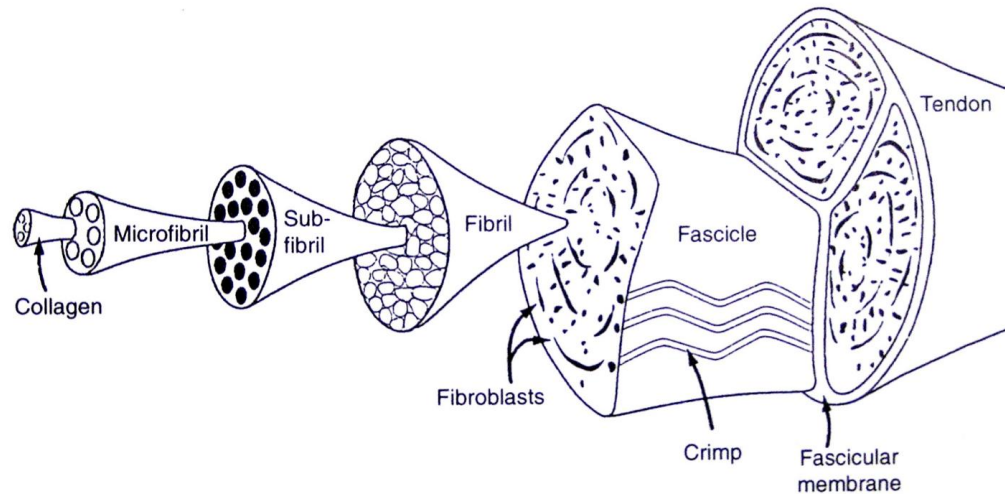


Side view of lower leg



腱損傷後の修復は、時間を要する、
または不完全で終わることが多い

腱の構造と修復過程



構成要素

(i) 細胞

腱細胞
腱芽細胞

(ii) 細胞外基質

コラーゲン ~80wt%

エラスチン 2 wt% など

腱の修復過程や治療に必要な期間は未解明な点が多い

腱の修復過程

腱の損傷

- 断端において細胞が増殖

瘢痕組織の形成

- 肉芽組織が成長
- 構成要素は type3コラーゲン
- 線維径: type3 < type1

見かけ上の癒合

- 損傷後 4 ~ 6 週
- 瘢痕組織により癒合
- 力学的特性が悪い

コラーゲンの合成と分解

- type3 ▶ type1へ
- 配向性・力学的特性が良くなっていく

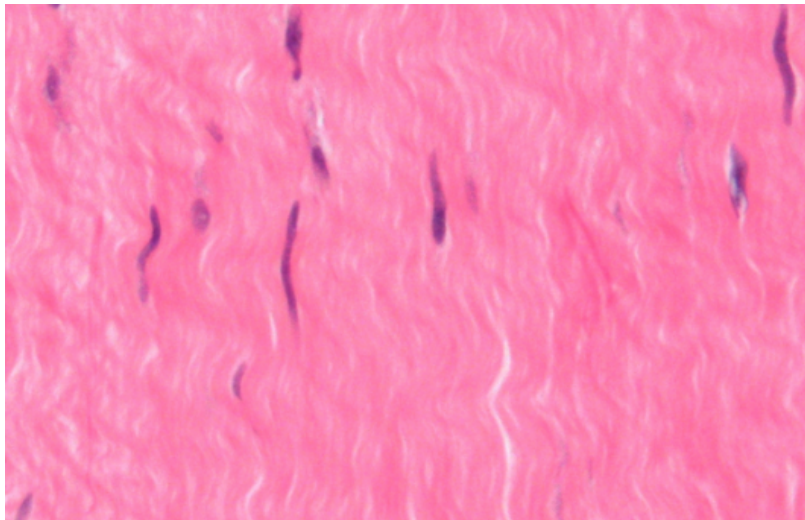
腱の修復では、**力学的特性の回復**が最終的な目標

👉 **コラーゲン動態**が重要な役割を持つ

従来の腱修復評価手法

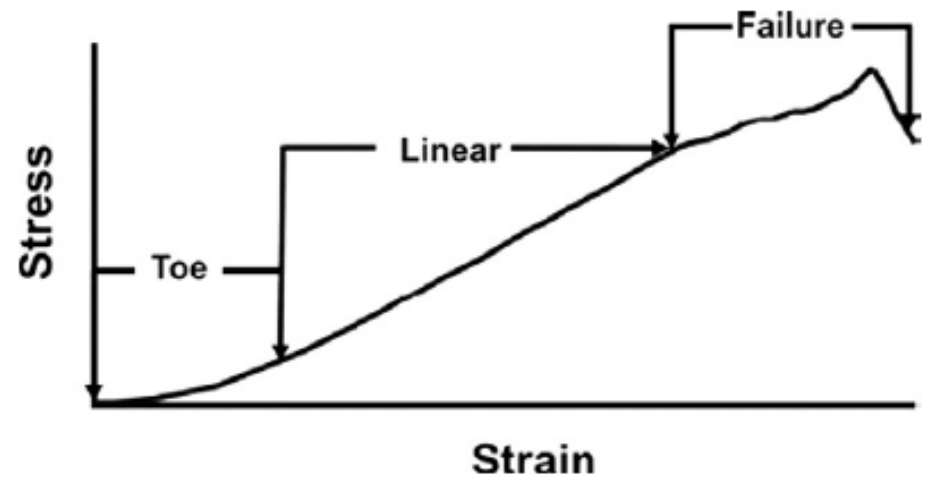
染色法：組織学的所見

腱切片の染色像，ピンク：コラーゲン



引張試験：力学的特性

腱の応力-ひずみ曲線



破壊的手法

同一個体の組織学的所見と力学的特性を同時に得ることは不可能

従来の腱修復評価手法

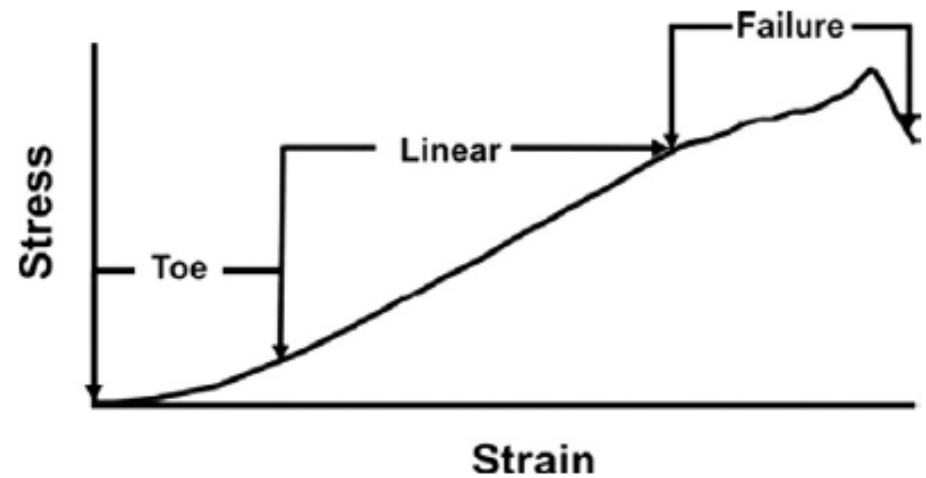
染色法：組織学的所見

腱切片の顕微鏡像，ピンク色はコラーゲン



引張試験：力学的特性

腱の応力-ひずみ曲線

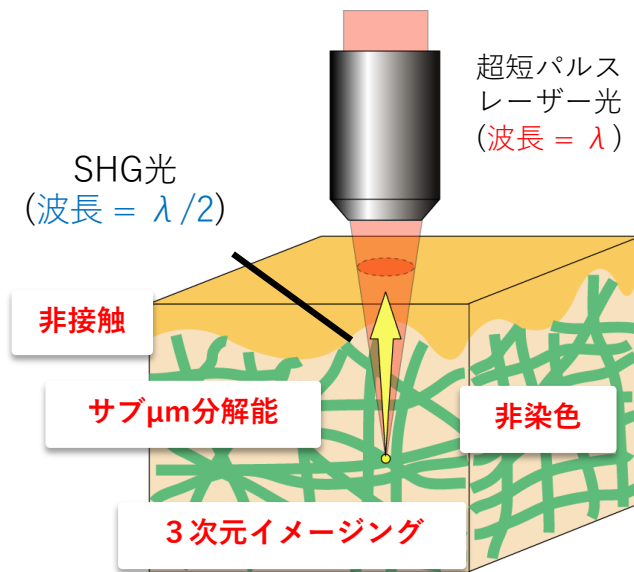


破壊的手法

同一個体の組織学的所見と力学的特性を同時に得ることは不可能

従来の腱修復評価手法

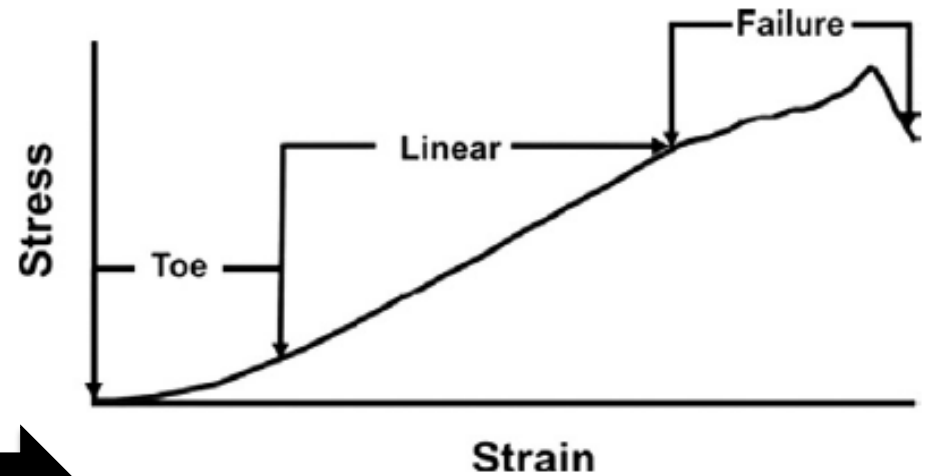
SHG顕微鏡：組織学的所見



非侵襲で観察可能！！

引張試験：力学的特性

腱の応力-ひずみ曲線



同一個体の組織学的所見と力学的特性の同時取得が可能

実験サンプル：兔腱断裂モデル

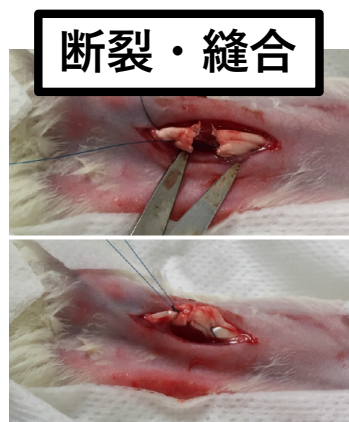
徳島大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施（承認 NO: 徳動物12133）

動物モデル・・・白色家兔（幼若，手術時月齢3～4か月，2～2.5 kg）

動物実験プロトコル

麻酔 ➡ 断裂 ➡ 縫合 ➡ 飼育 ➡ 採取

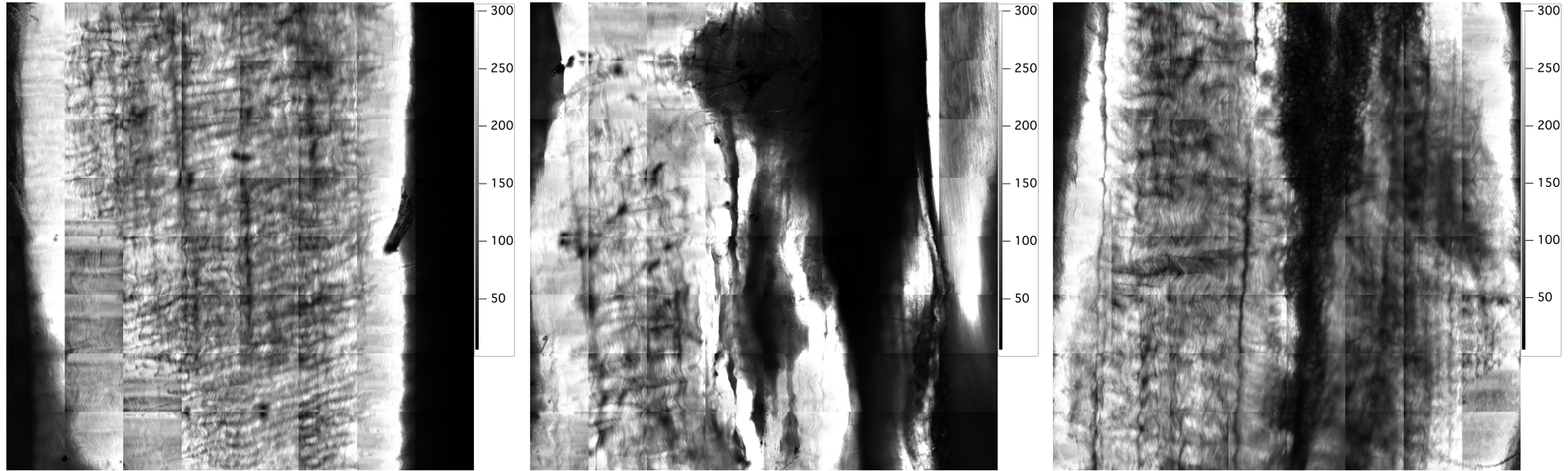
- ・ 注射麻酔下で外科用メスを用い，後足屈筋腱を鋭利に断裂させ，縫合した。
- ・ 創部をギプスで保護した後，断裂作成後4週間目に採取した。
- ・ 手術した足の腱を修復サンプル，反対側を正常サンプルとして用いた。



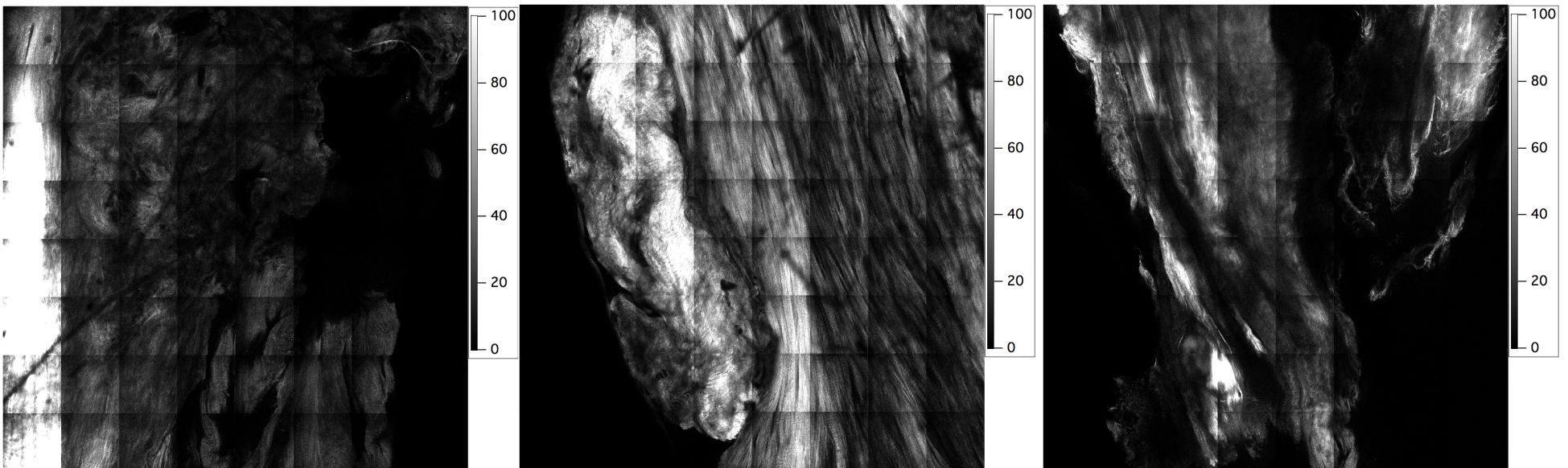
SHGイメージの比較

イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm

正常サンプル



腱修復サンプル

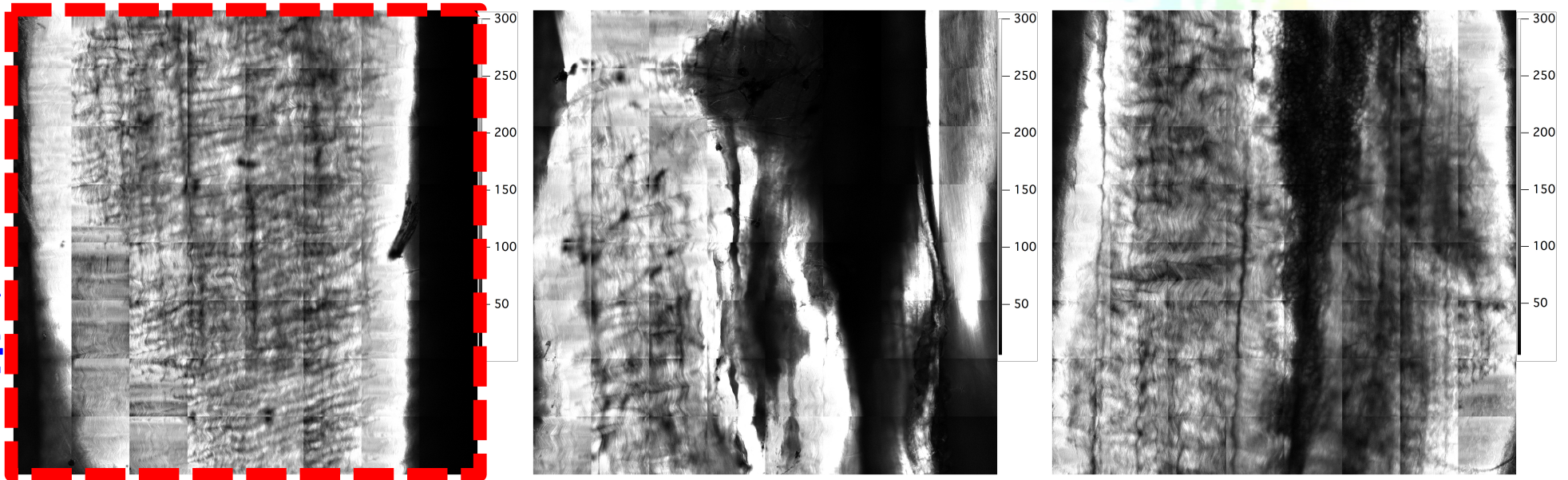


SHG光の強度に大きな相違（修復サンプルは画像コントラストを3倍強調させて表示）
☞ コラーゲンの密度や構造成熟度（修復の程度？）の違いを反映

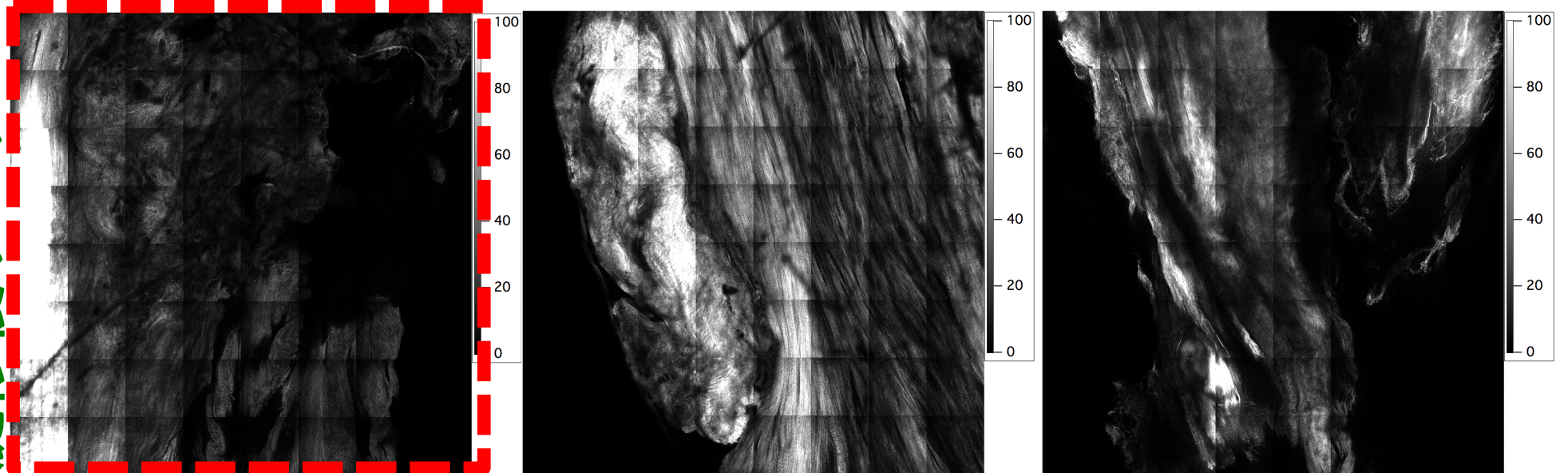
SHGイメージの比較

イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm

正常サンプル



腱修復サンプル

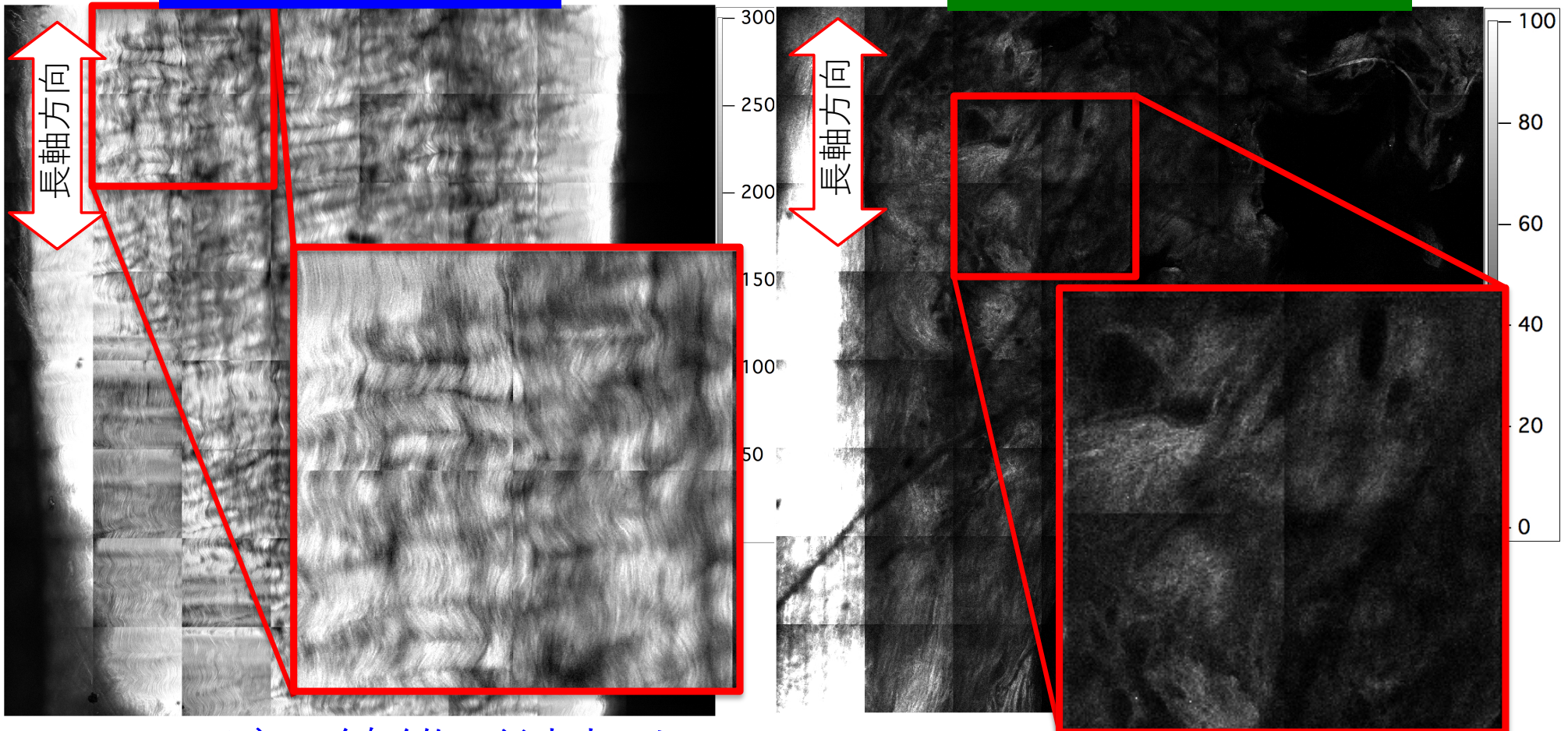


SHG光の強度に大きな相違（修復サンプルは画像コントラストを3倍強調させて表示）
☞ コラーゲンの密度や構造成熟度（修復の程度？）の違いを反映

SHGイメージの比較

正常サンプル

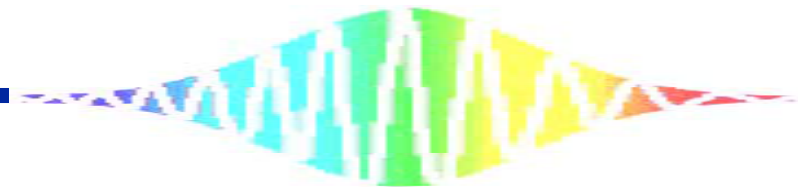
腱修復サンプル



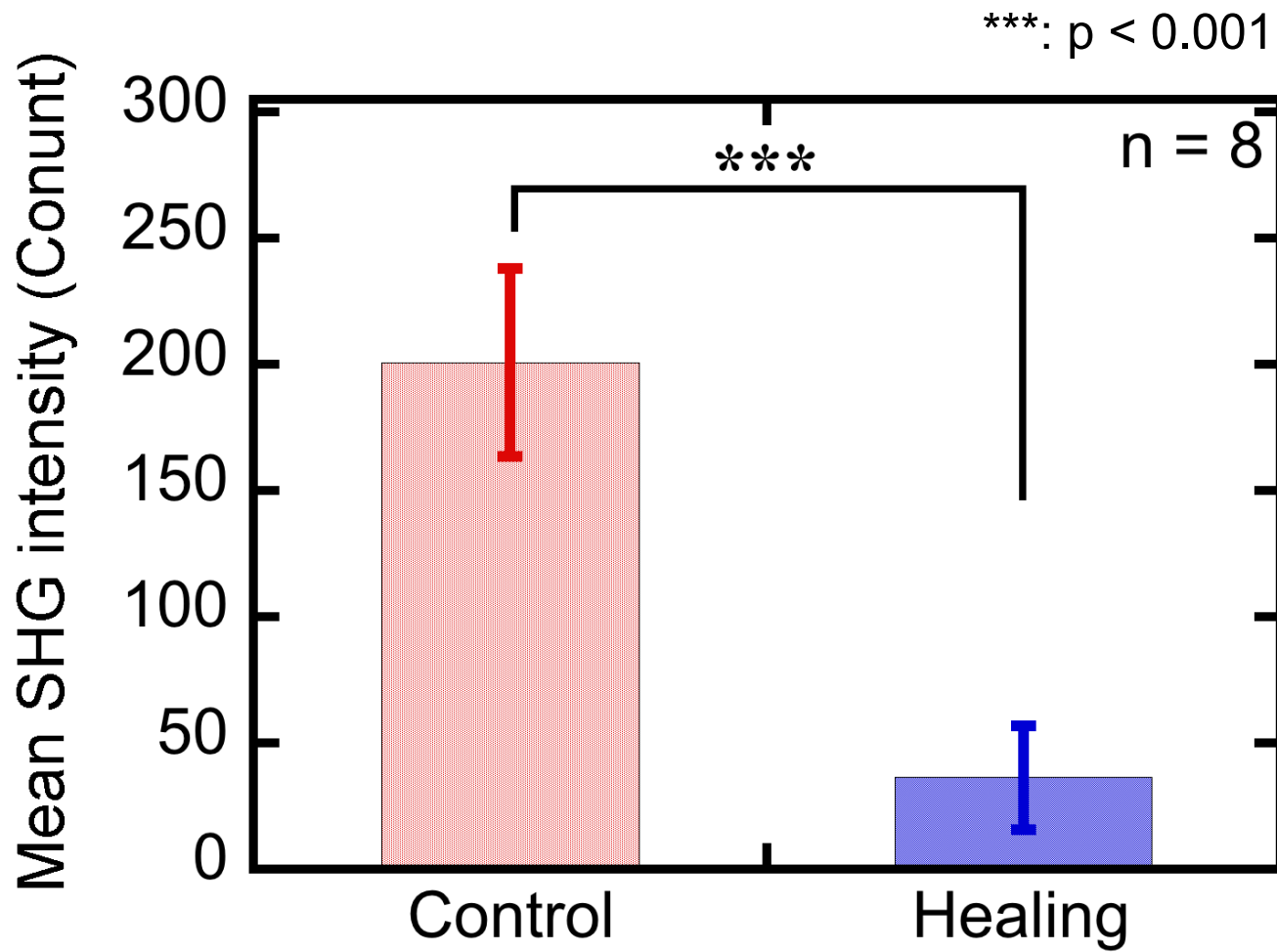
コラーゲン線維が波打ちながら縦方向に規則配向

線維分布にムラがあり、明らかに配向が揃っていない

組織学的所見の違いを確認



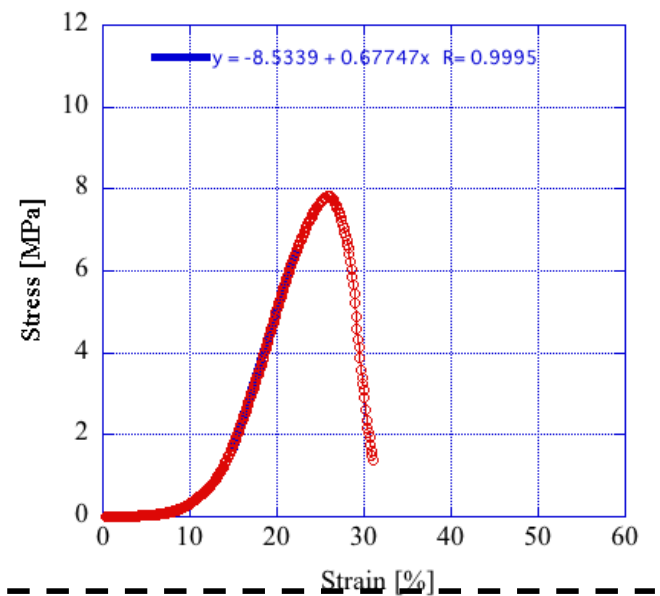
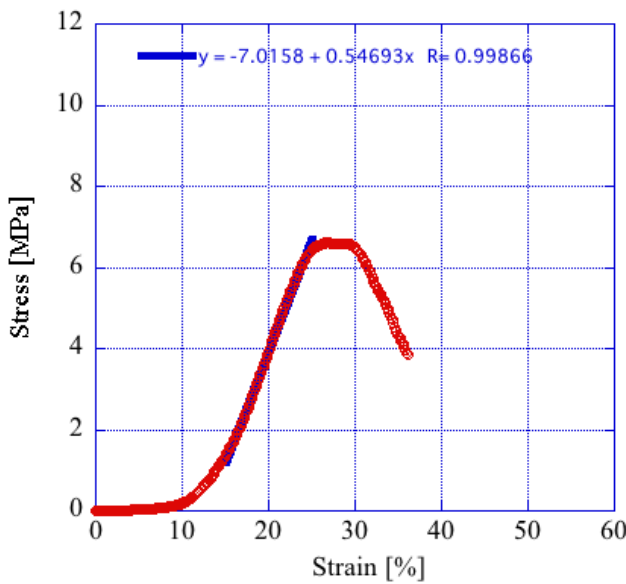
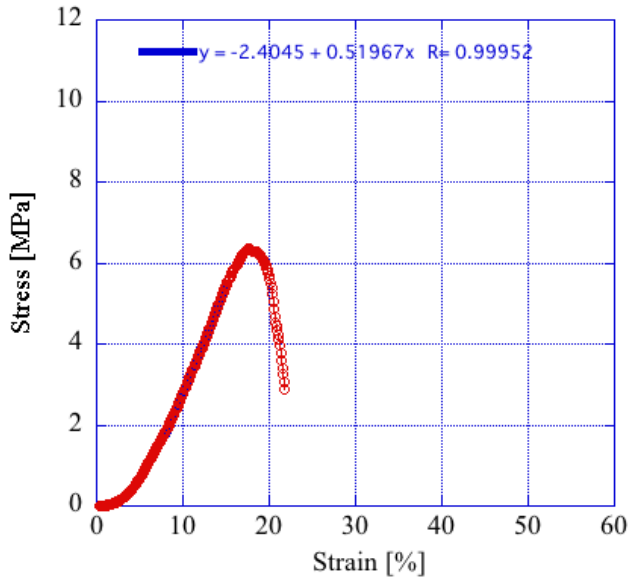
平均SHG強度



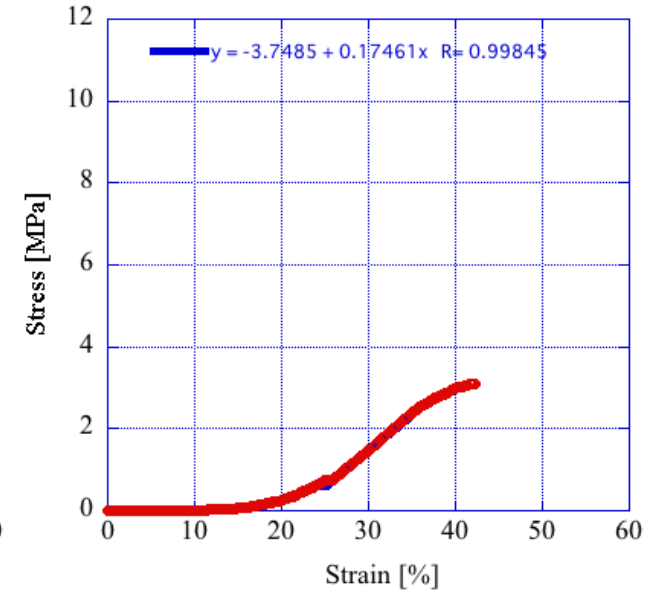
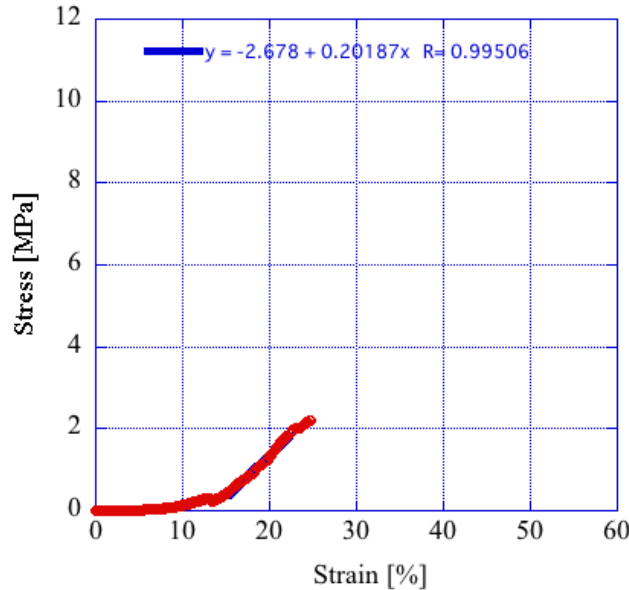
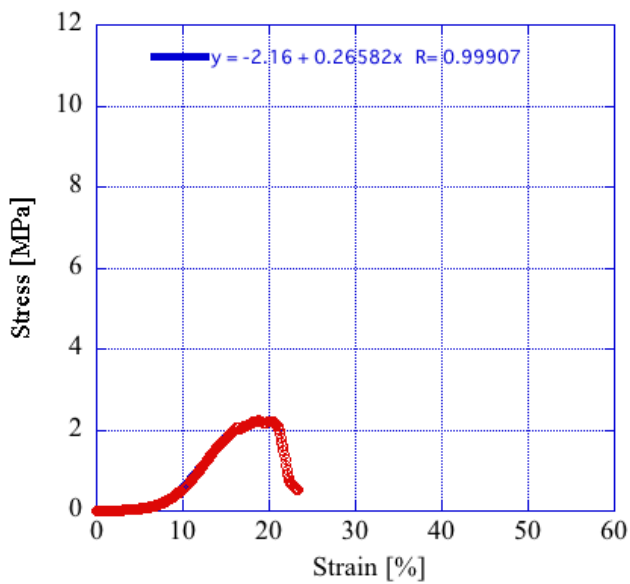
有意差を確認

引張試験（応力-歪み曲線）の比較

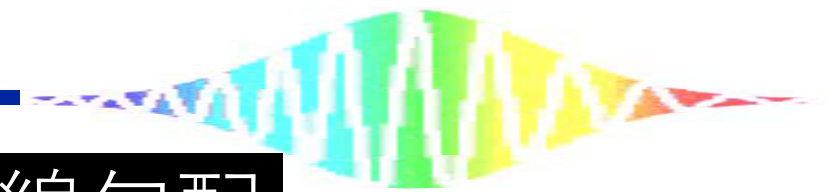
正常サンプル



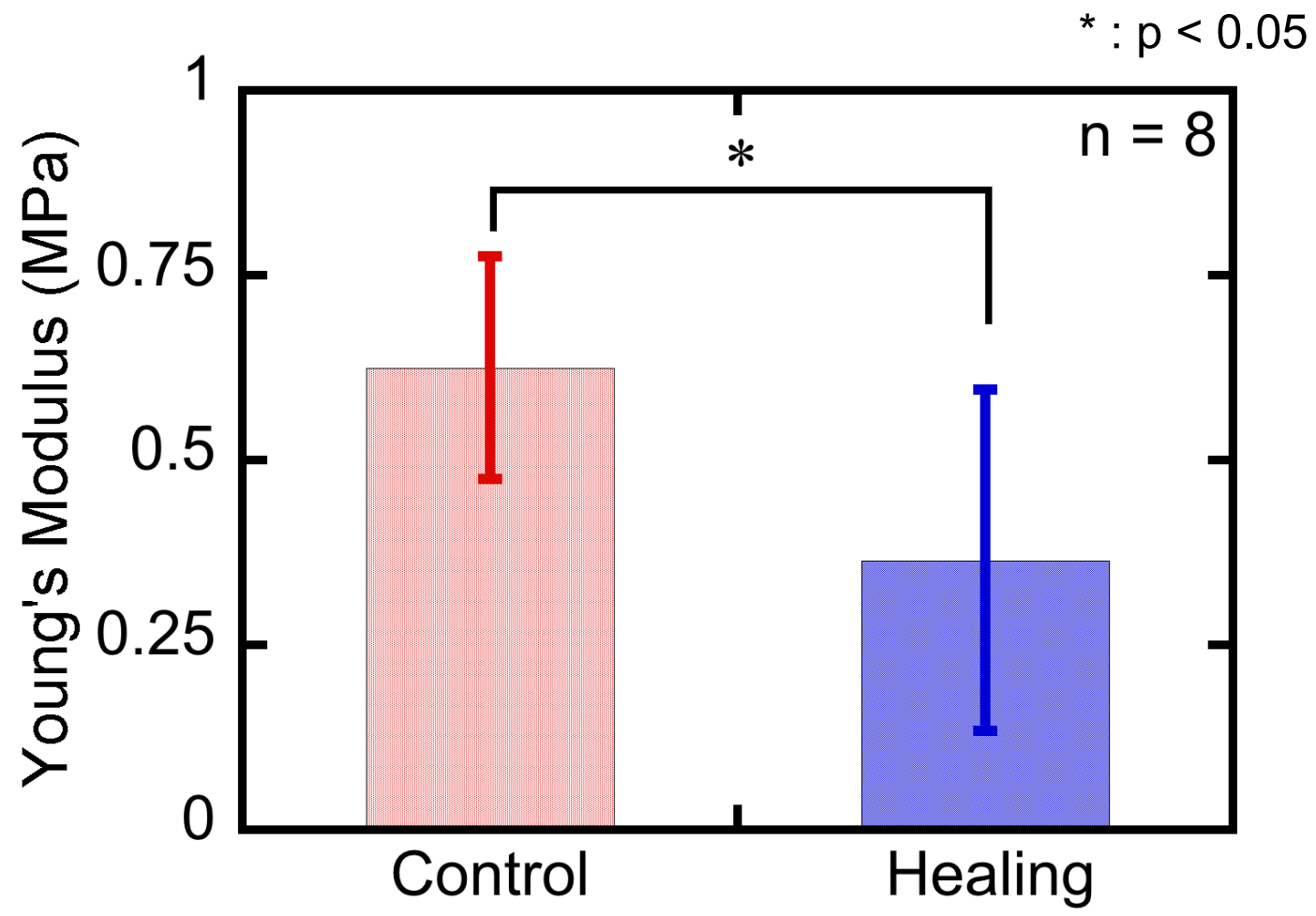
腱修復サンプル



応力-歪み線図における、線形領域の傾き（ヤング率）に大きな相違
☞ コラーゲンの密度や構造成熟度（修復の程度）の違いを反映



応力-歪み曲線勾配

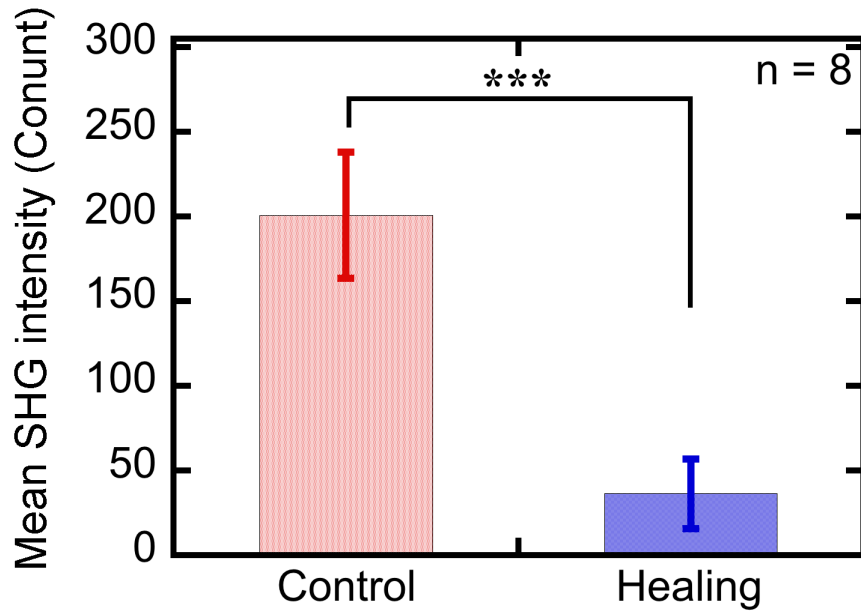


有意差を確認

統計学的解析

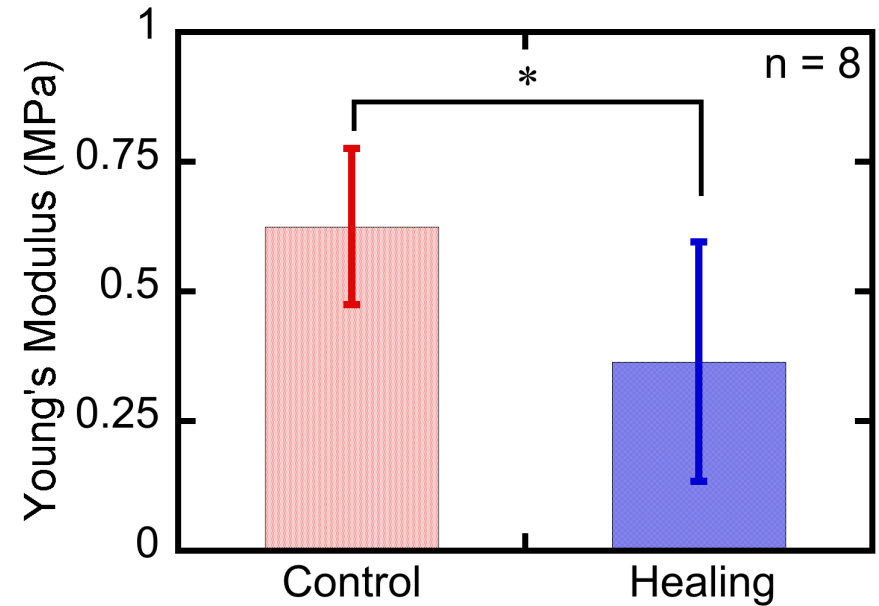
平均SHG強度

***: $p < 0.001$

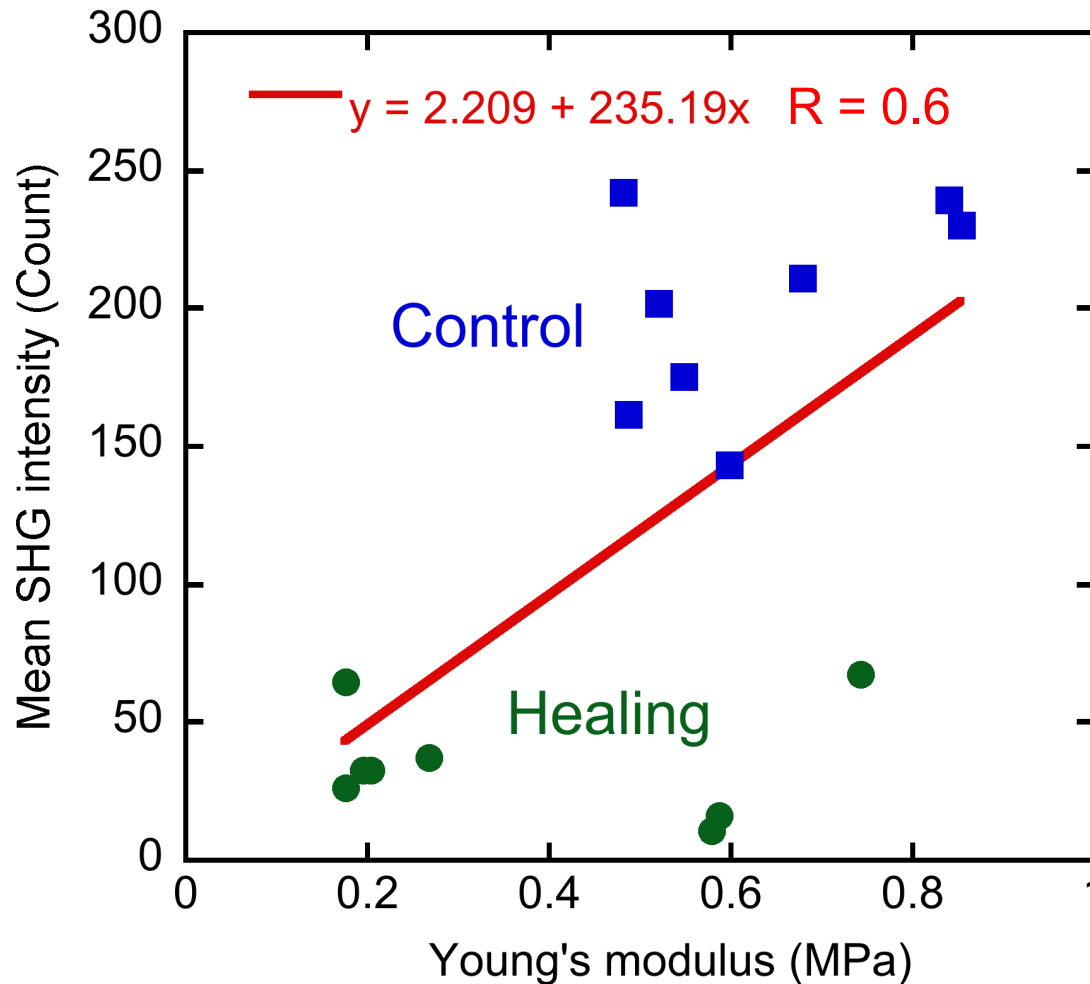


応力-歪み曲線勾配

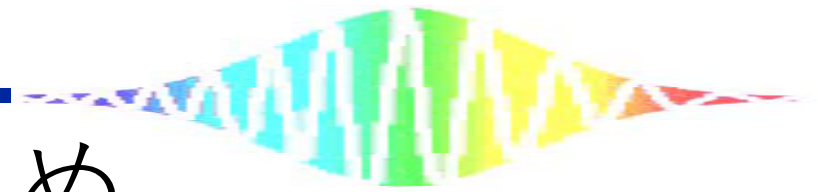
* : $p < 0.05$



平均SHG強度と応力-歪み曲線勾配の相

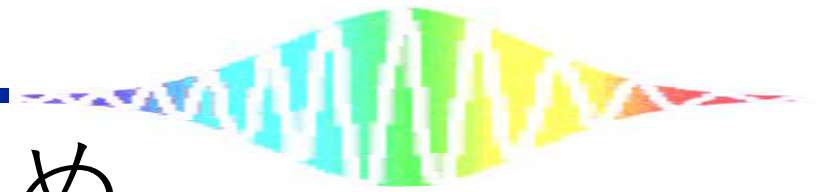


両者の間に相関 ($R = 0.6$) があることを確認
 SHG顕微鏡のみで組織学・力学的特性を抽出可能？



中間まとめ

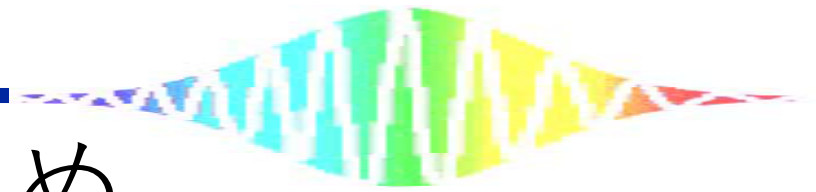
比較項目	正常サンプル	腱修復モデル
平均SHG強度	強い	弱い
SHGイメージ	波打ち構造 規則的線維配列	線維分布にムラ 配向は不均一
応力-歪み曲線 の傾き	急	緩やか



中間まとめ

比較項目	正常サンプル	腱修復モデル
平均SHG強度	強い	弱い
SHGイメージ	波打ち構造 規則的線維配列	線維分布にムラ 配向は不均一
応力-歪み曲線 の傾き	急	緩やか

平均SHG強度と応力-歪み曲線傾きに相関 ($R = 0.6$)



中間まとめ

比較項目	正常サンプル	腱修復モデル
平均SHG強度	強い	弱い
SHGイメージ	波打ち構造 規則的線維配列	線維分布にムラ 配向は不均一
応力-歪み曲線 の傾き	急	緩やか

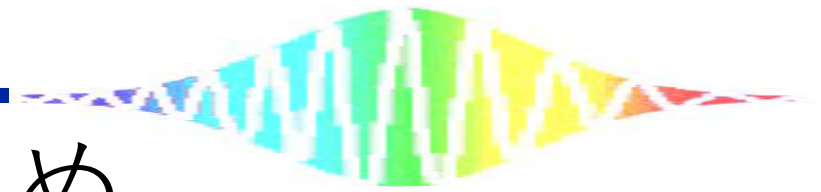
平均SHG強度と応力-歪み曲線傾きに相関 ($R = 0.6$)

光強度

- ・レーザー光源の強度揺らぎ
- ・生体組織の光学特性（吸収,散乱など）
- ・サンプルの表面状態

等の影響を受けやすいため、
再現性の高い評価パラメーターとは必ずしも言えない

▶SHG光強度とは独立した評価パラメーターの利用が好ましい



中間まとめ

比較項目	正常サンプル	腱修復モデル
平均SHG強度	強い	弱い
SHGイメージ	波打ち構造 規則的線維配列	線維分布にムラ 配向は不均一
応力-歪み曲線 の傾き	急	緩やか

SHG イメージから定量情報を抽出するため、

2次元フーリエ変換 (2D-FT) による画像解析

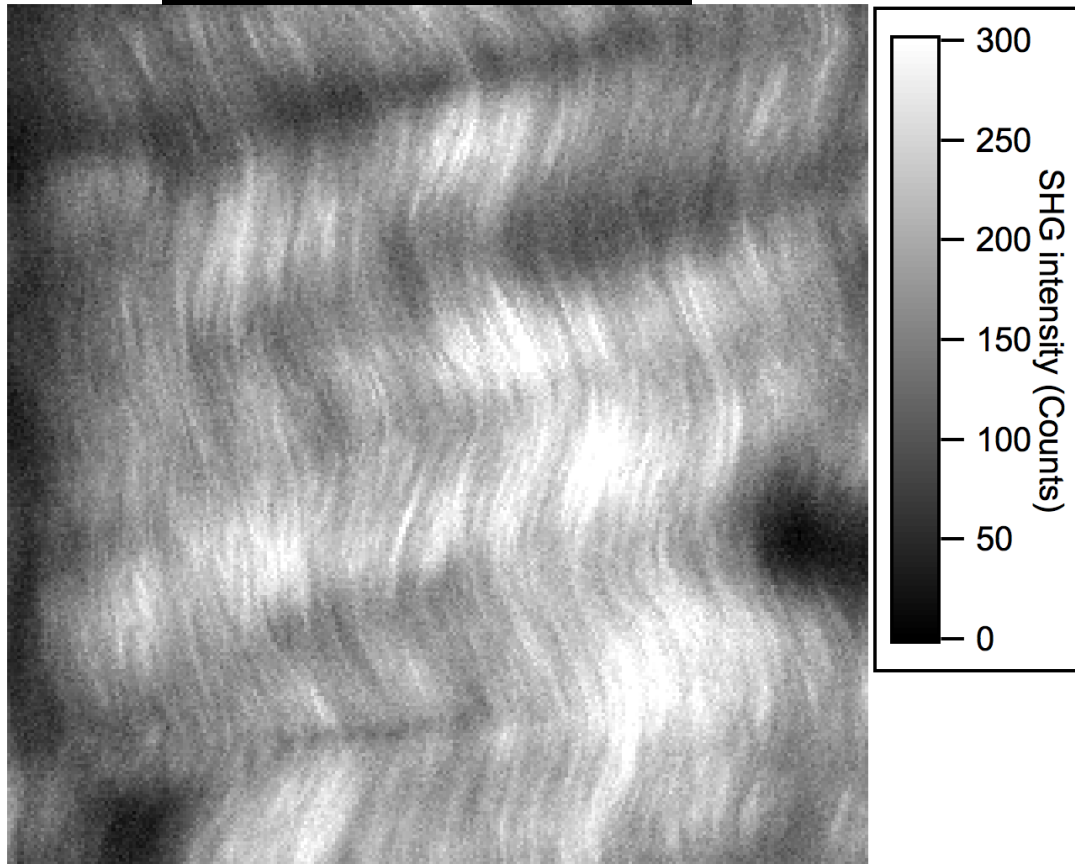
SHGイメージの画像解析

正常サンプル

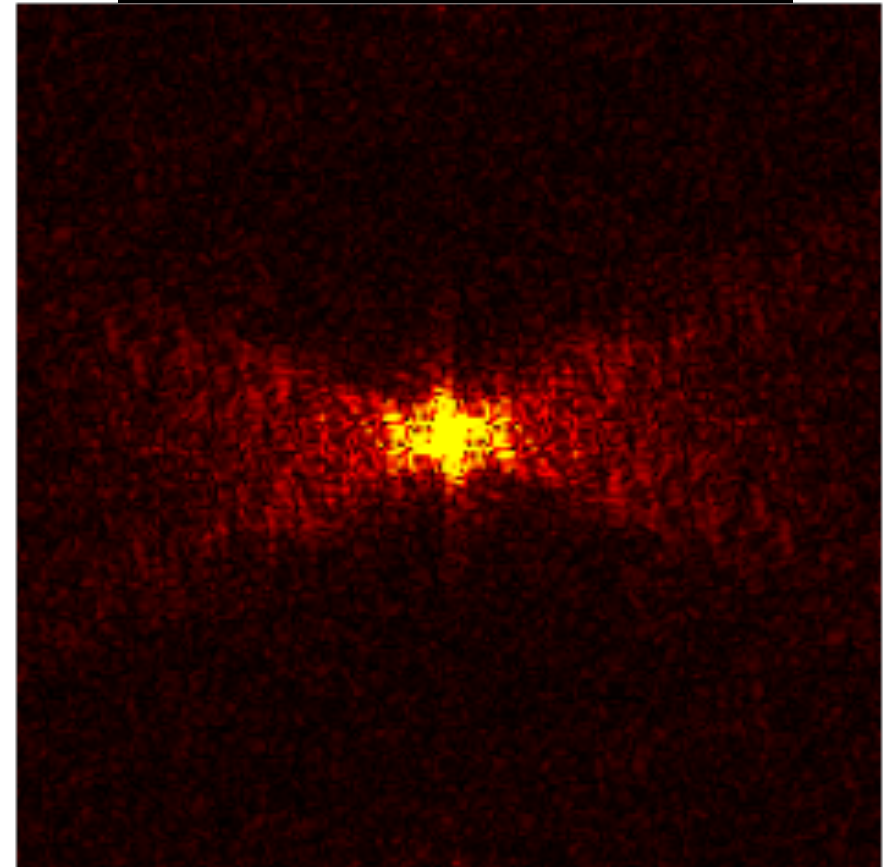
SHGイメージの2D-FTによりパワースペクトルを算出

イメージ視野：
400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



パワースペクトルでは、波打つように配向したコラーゲン線維分布に対して、それぞれ直交した θ 方向に強い振幅を持っている

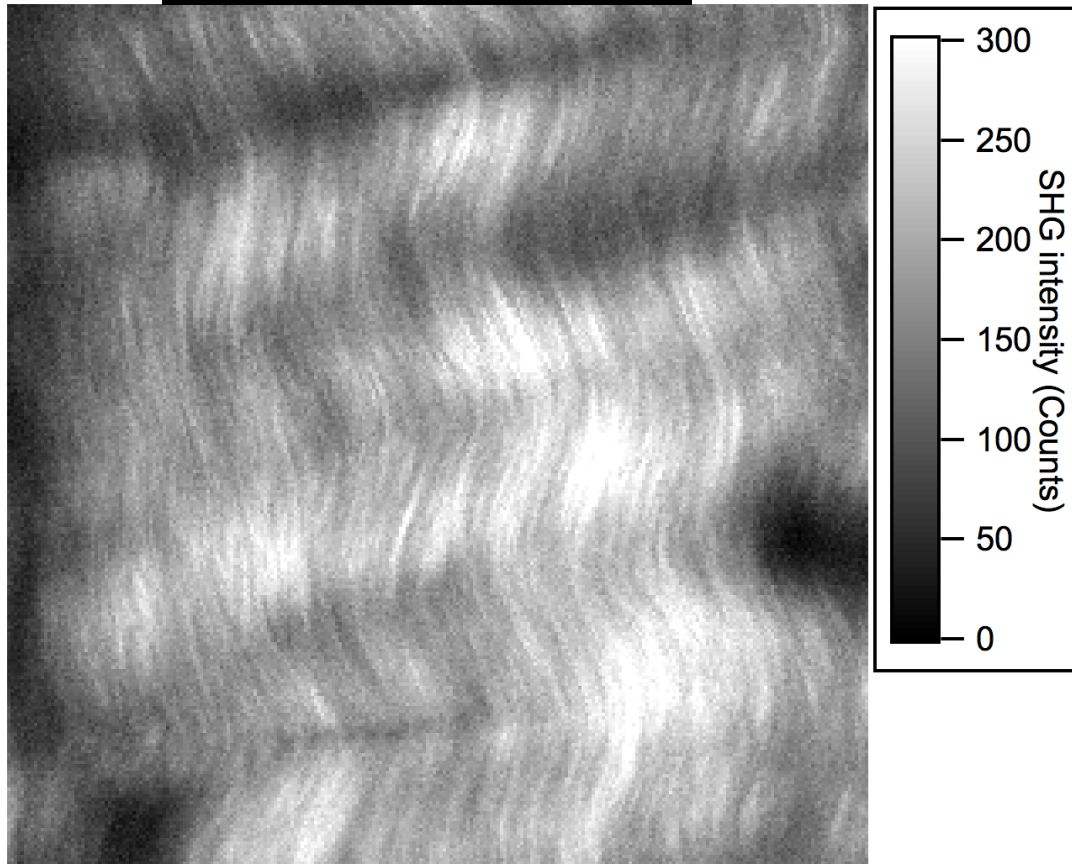
SHGイメージの画像解析

正常サンプル

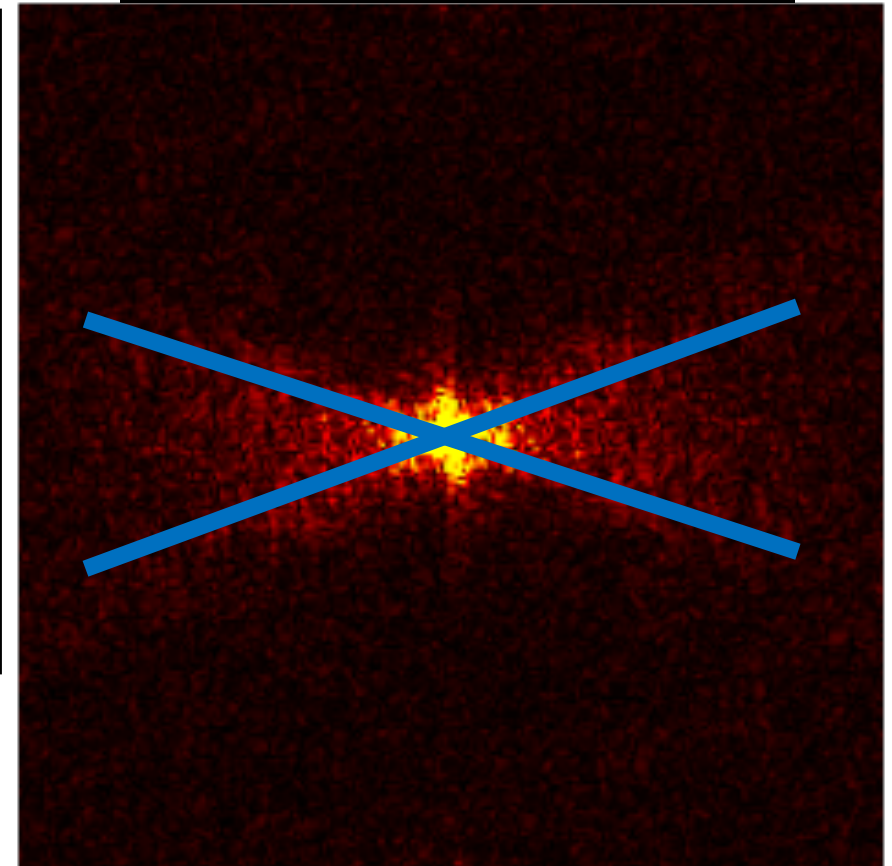
SHGイメージの2D-FTによりパワースペクトルを算出

イメージ視野：
400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



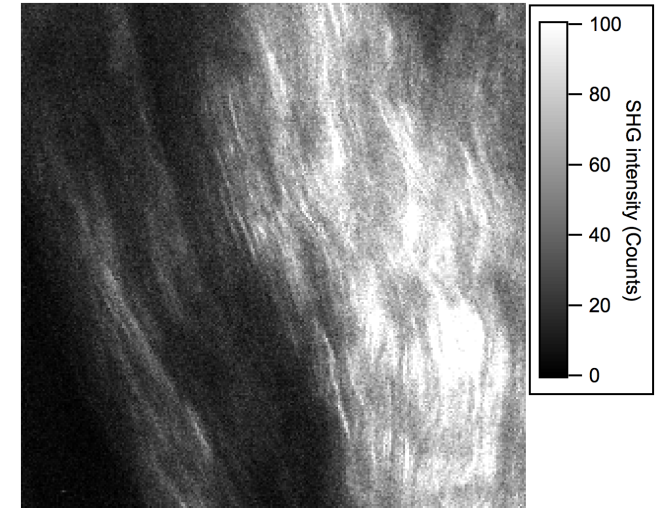
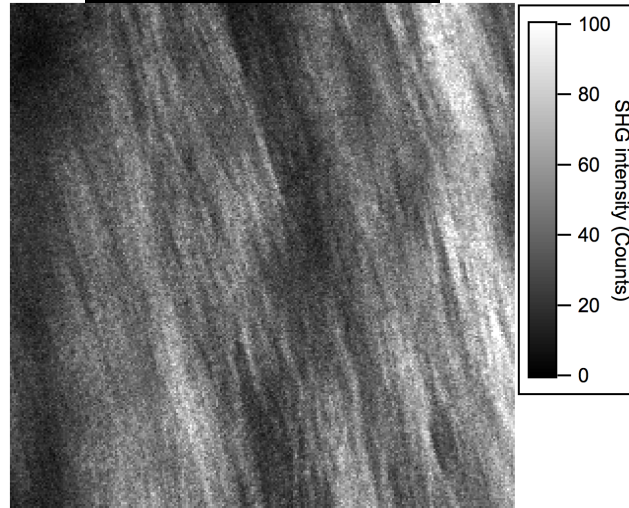
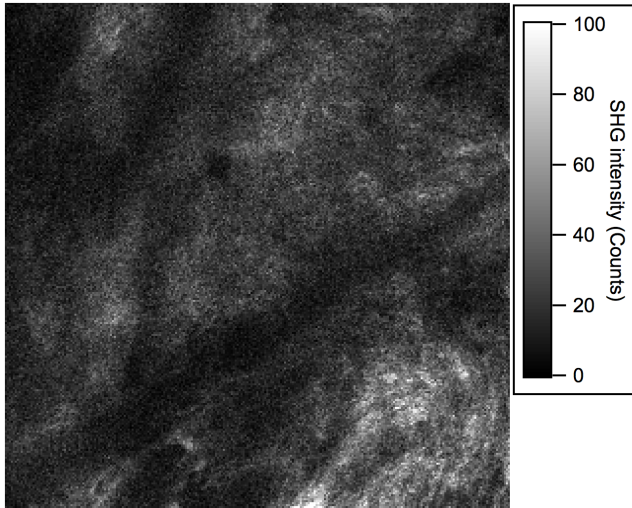
パワースペクトルでは、波打つように配向したコラーゲン線維分布に対して、それぞれ直交した θ 方向に強い振幅を持っている

SHGイメージの画像解析

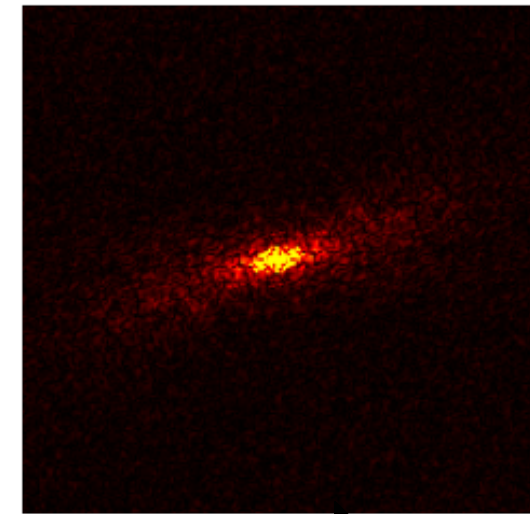
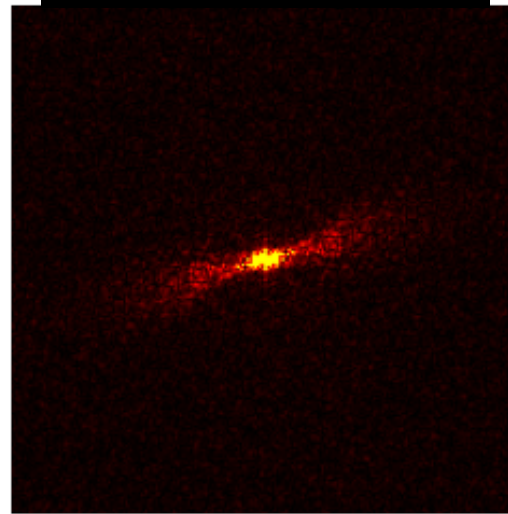
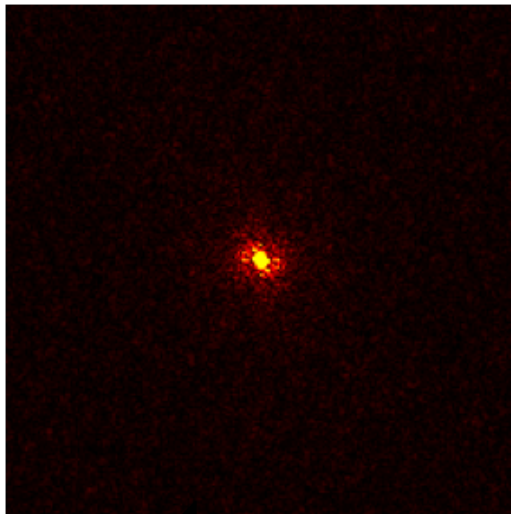
修復サンプル

イメージ視野：400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



遅

修復度合い

進

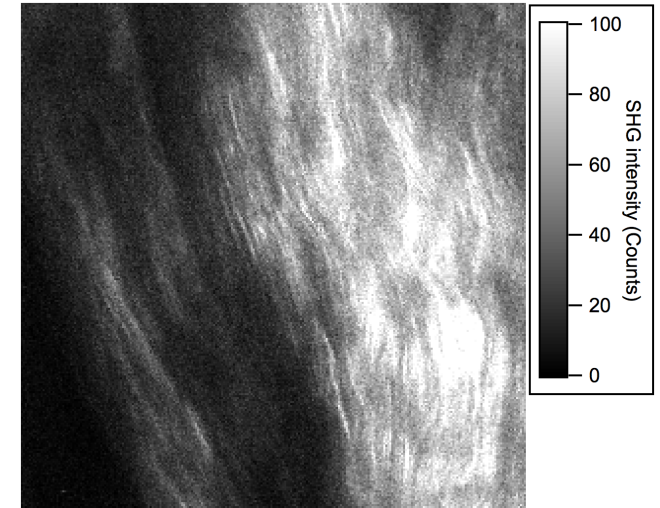
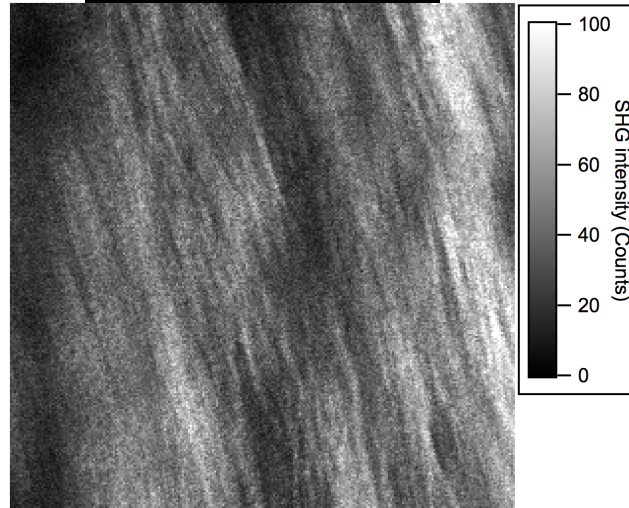
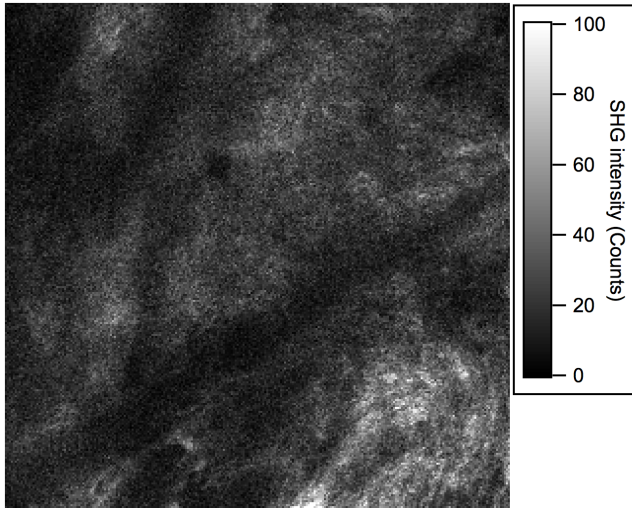
修復具合により、パワースペクトルの振幅ピーク数が増減する

SHGイメージの画像解析

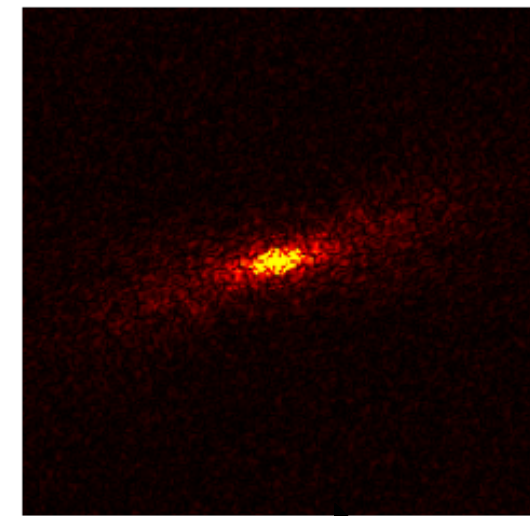
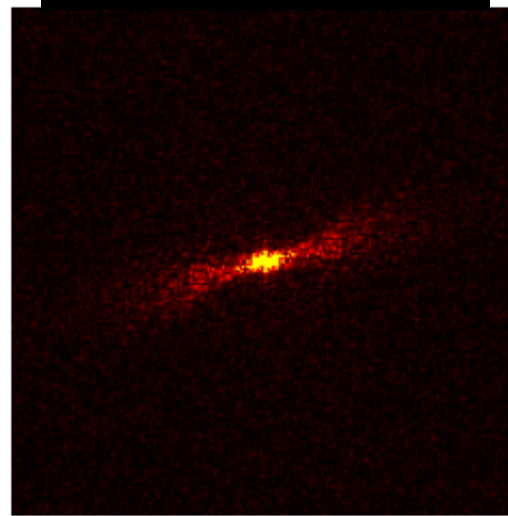
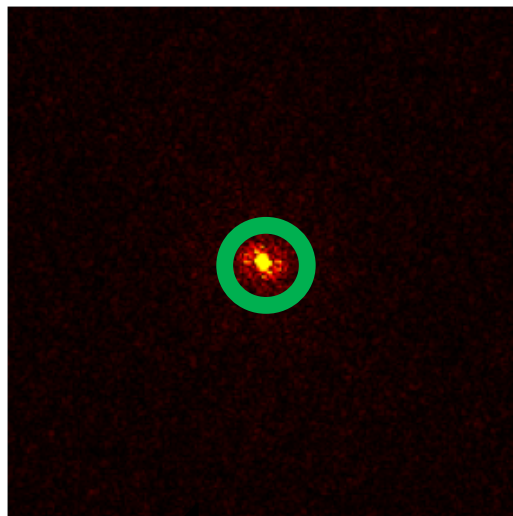
修復サンプル

イメージ視野：400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



遅

修復度合い

進

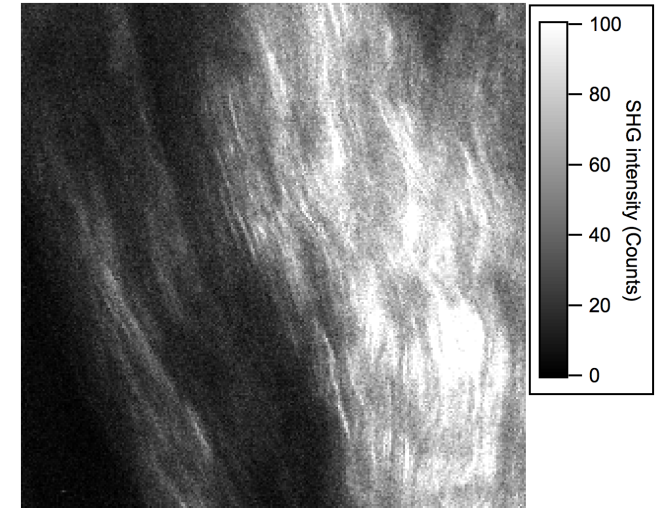
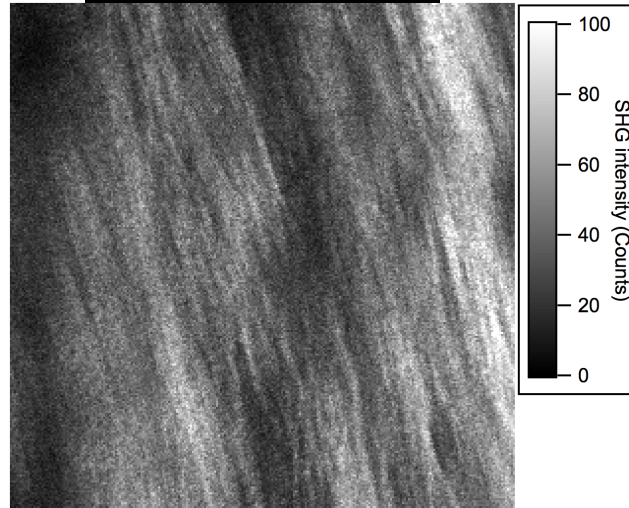
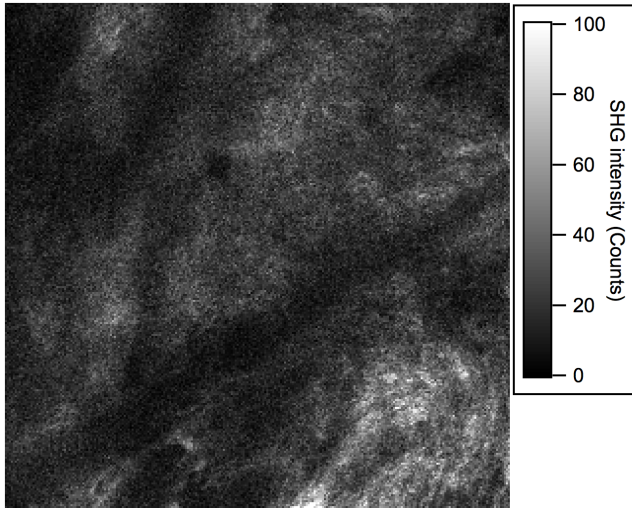
修復具合により、パワースペクトルの振幅ピーク数が増減する

SHGイメージの画像解析

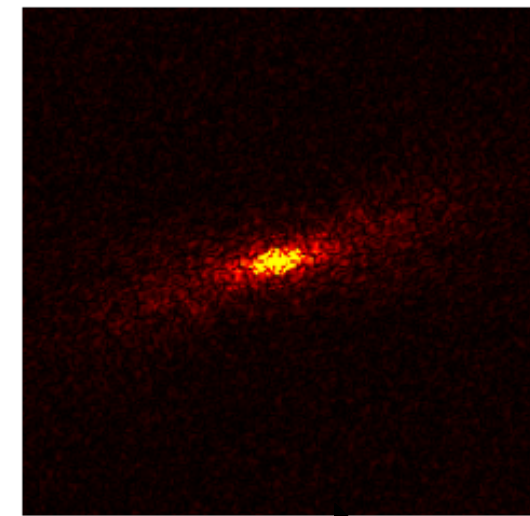
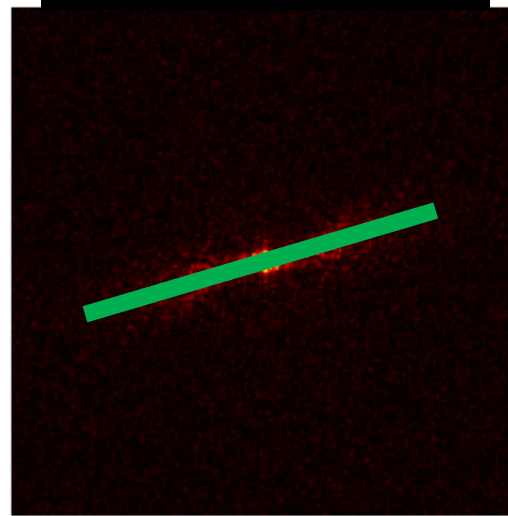
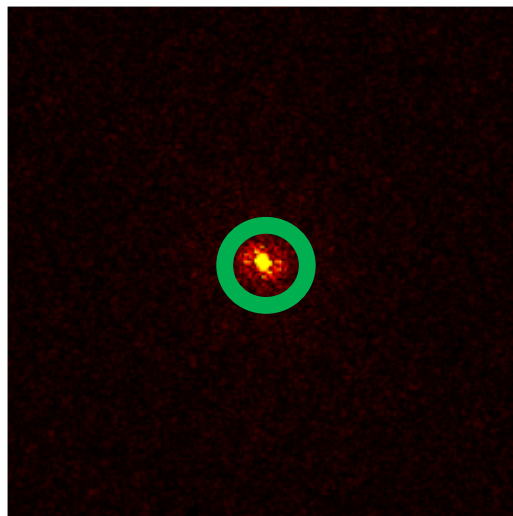
修復サンプル

イメージ視野：400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



遅

修復度合い

進

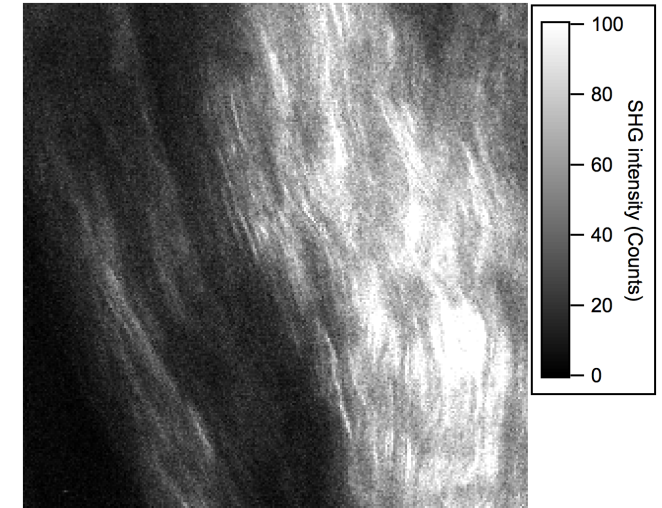
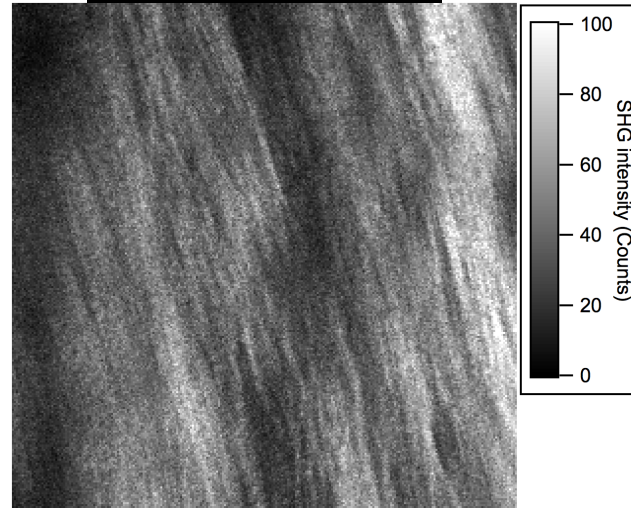
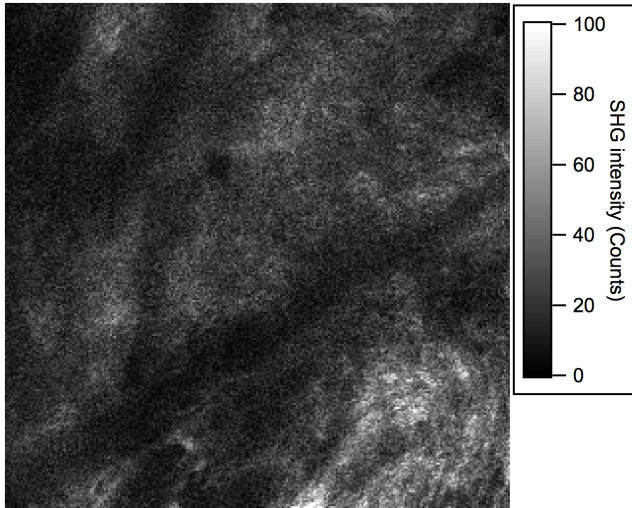
修復具合により、パワースペクトルの振幅ピーク数に変化

SHGイメージの画像解析

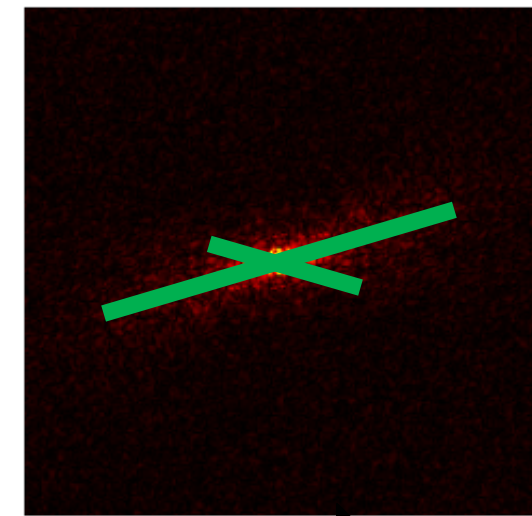
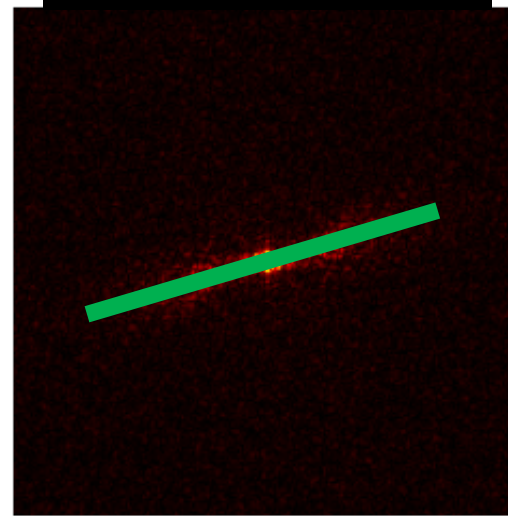
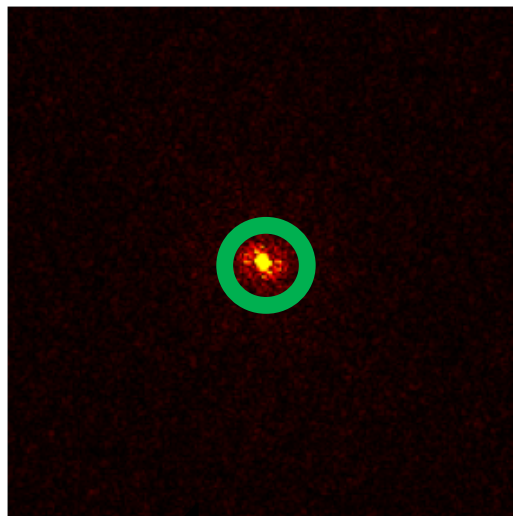
修復サンプル

イメージ視野：400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



遅

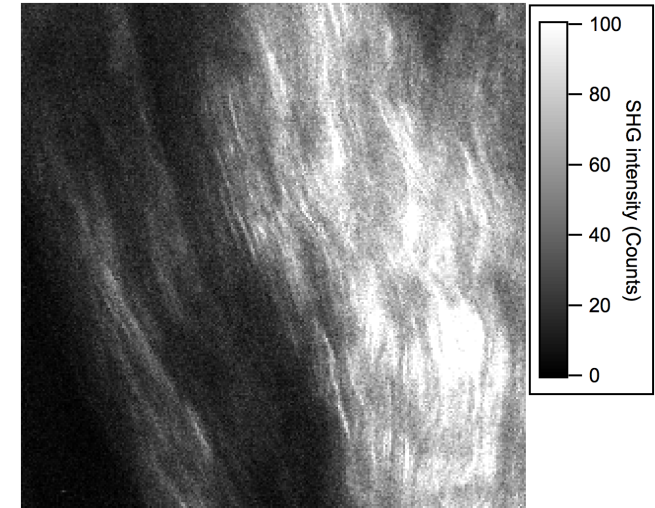
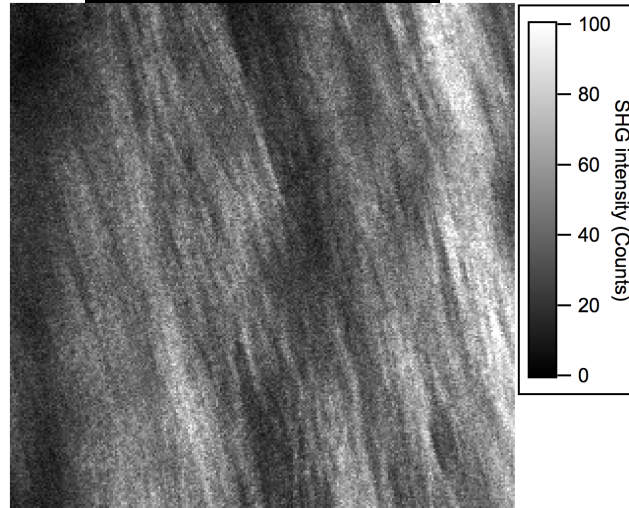
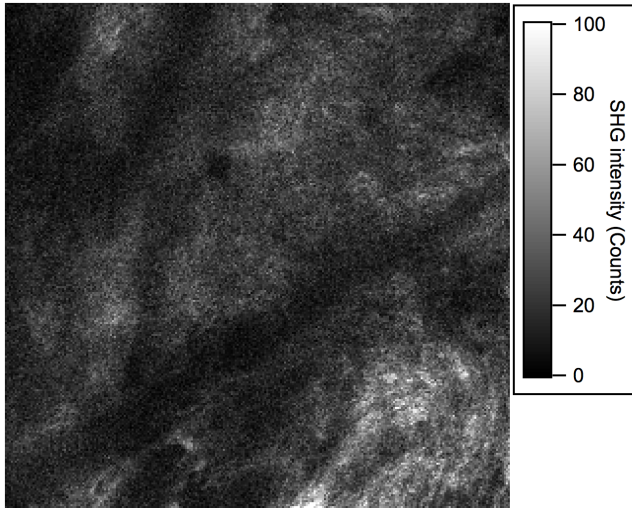
修復度合い

進

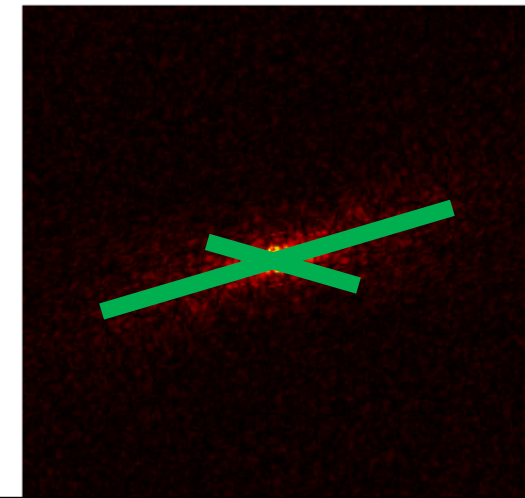
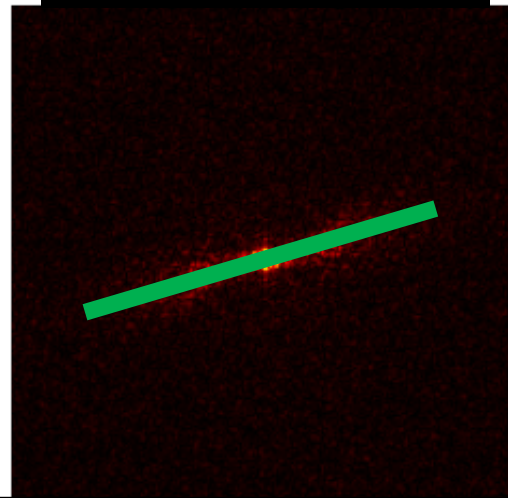
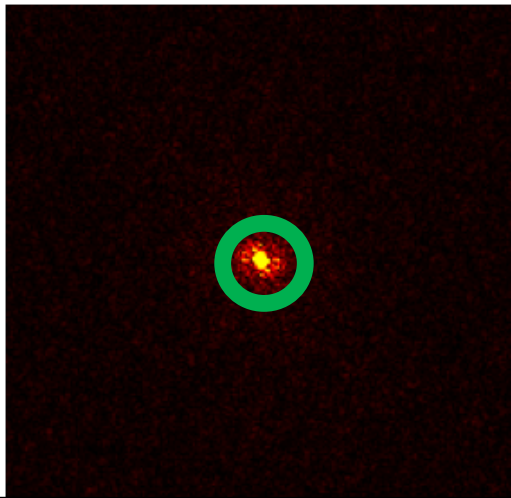
修復具合により、パワースペクトルの振幅ピーク数が増減する

イメージ視野：400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



2D-FTイメージから定量情報を抽出すれば、腱修復における定量的パラメーターの抽出が可能！

SHG顕微鏡を用いた腱修復評価

SHG顕微鏡



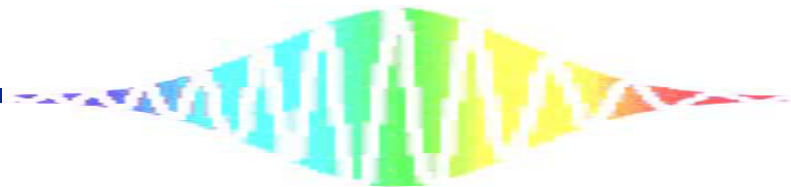
組織学的所見と力学的特性を非侵襲に同時取得

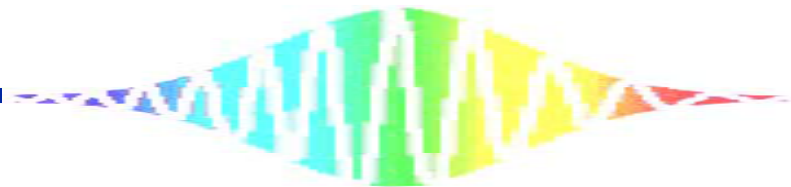
本博士論文のまとめ

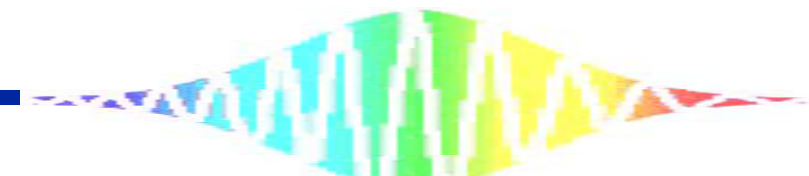
「**コラーゲンの選択的可視化**」と「**in situ計測特性**」という
両特徴を活かした**SHG顕微鏡**のバイオ応用

1. 骨芽細胞産生コラーゲンの時系列可視化
2. 腱修復における組織学・力学的修復評価

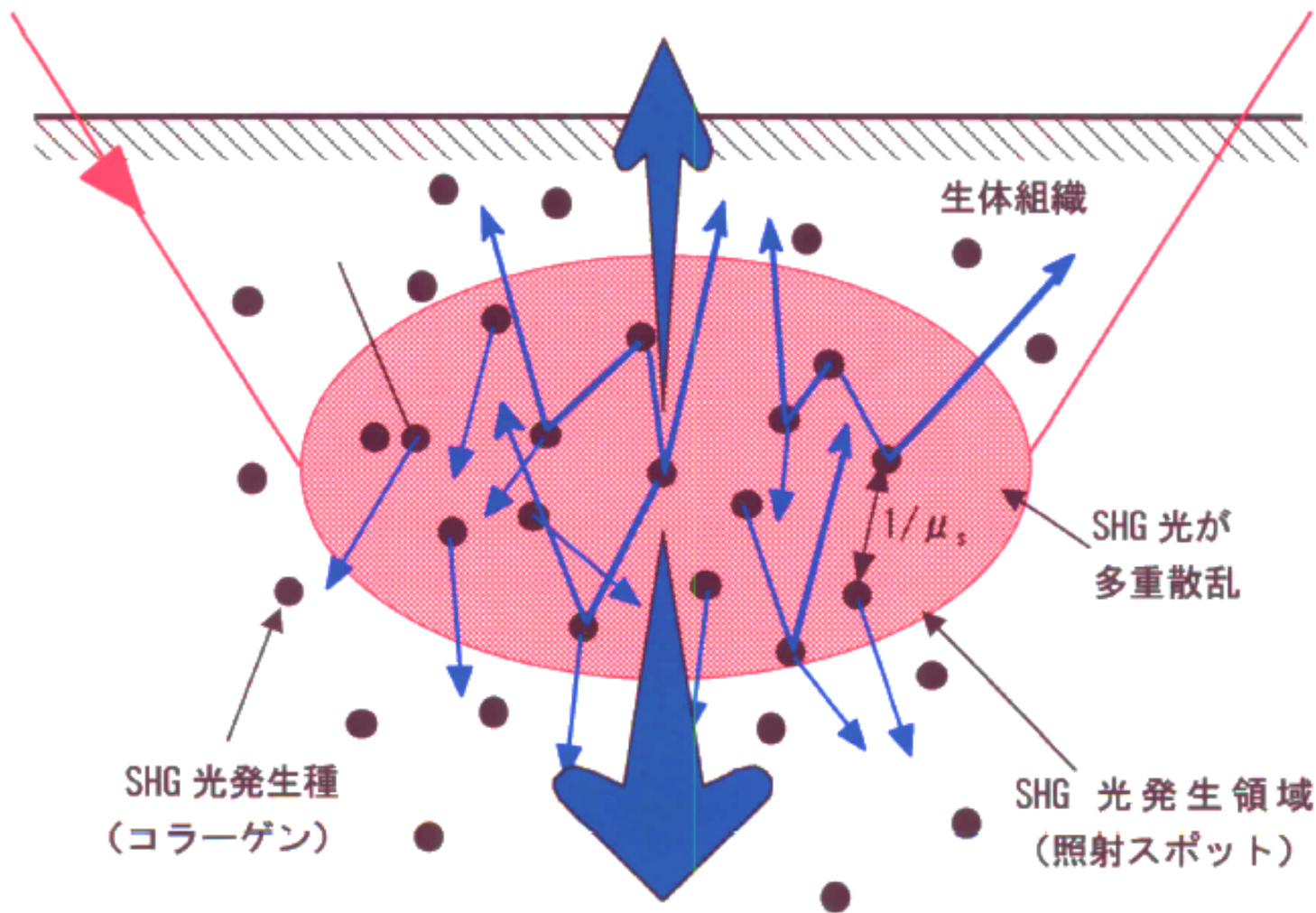
SHG顕微鏡は、バイオ分野におけるダイナミックなコラーゲン組織学
という学術分野の展開につながることを示唆された







非位相整合型の多重散乱モデル



博士論文公聴会



”第2高調波発生光顕微鏡を用いた
コラーゲン線維の*in situ*可視化とバイオ応用“

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

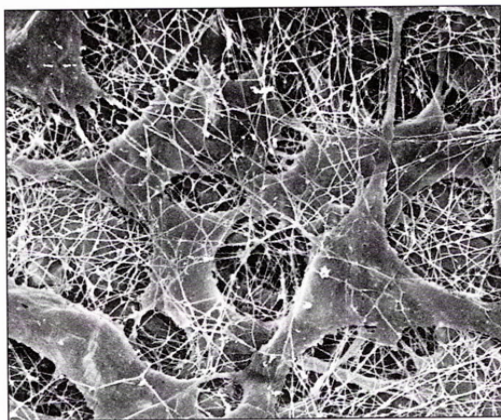
2017/2/7

長谷栄治

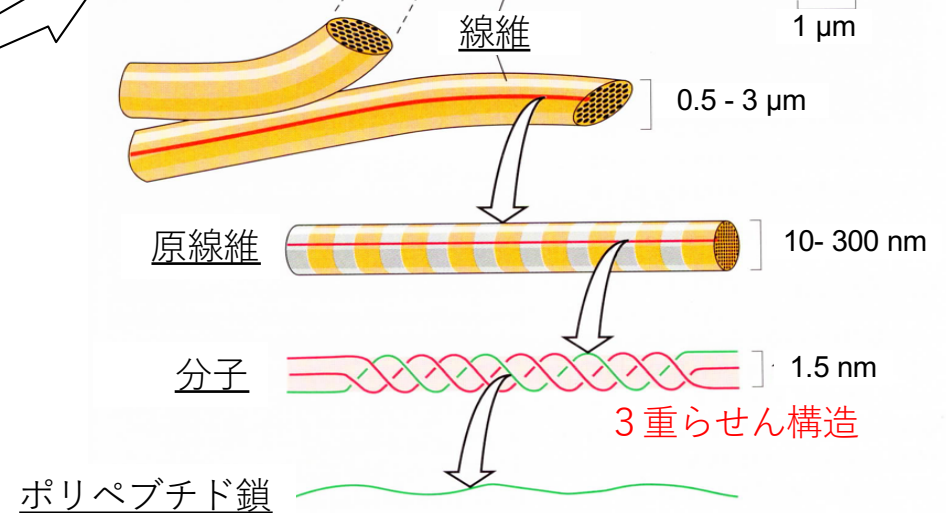
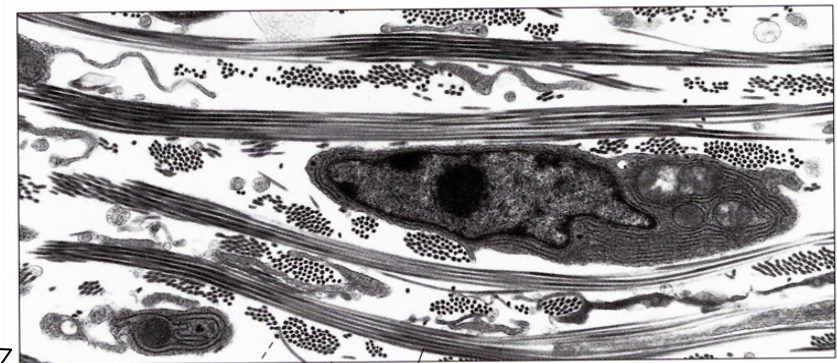
コラーゲンとは①

コラーゲンの高次階層構造

- 細胞外マトリックスの主要成分として最も大量に存在するタンパク質
- 細胞による産生・再構築



線維芽細胞と細胞外マトリックス



極めて規則正しい
高次階層構造

コラーゲンとは②



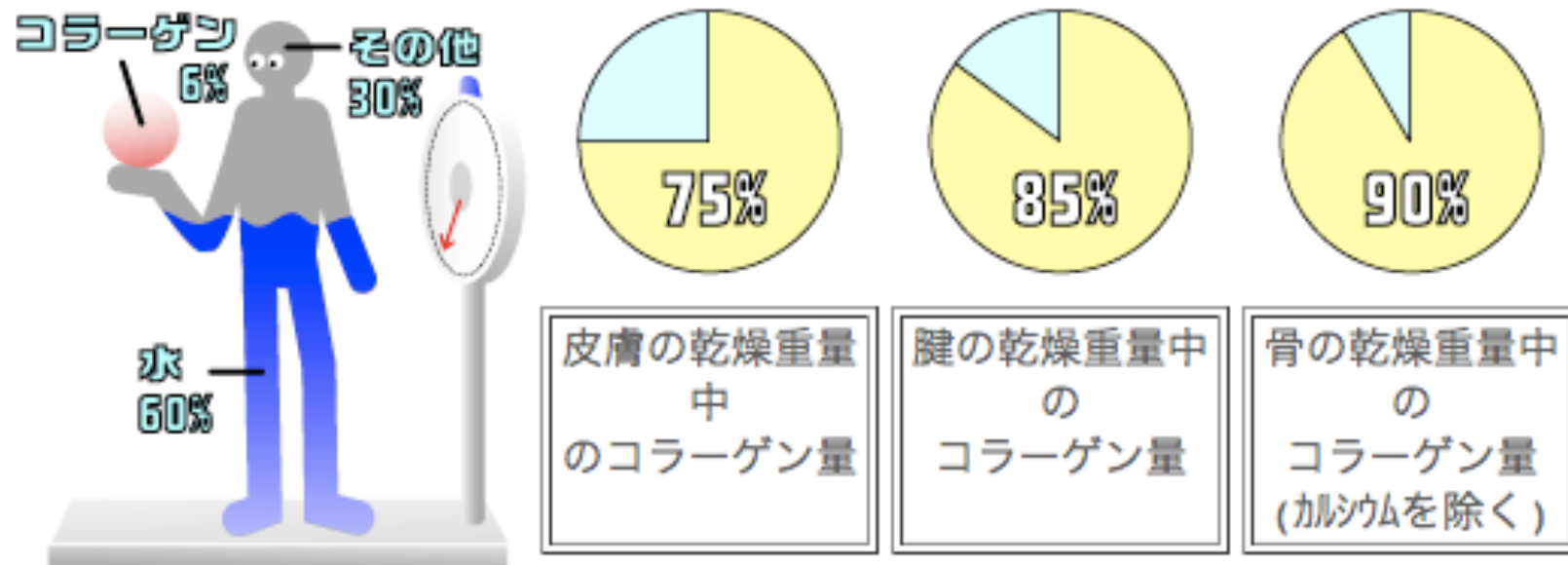
細胞と細胞を糊のよう
にくっつけたり、細胞を正
しい位置に整然と配列さ
せる区画や仕切りを作る



- ①体全体および臓器その他を形作り、それらを支え、結合したり境界を作ったりする。
- ②細胞の足場として働く。この足場によって、細胞は分裂し増殖する。

コラーゲンは生命活動に深く関係

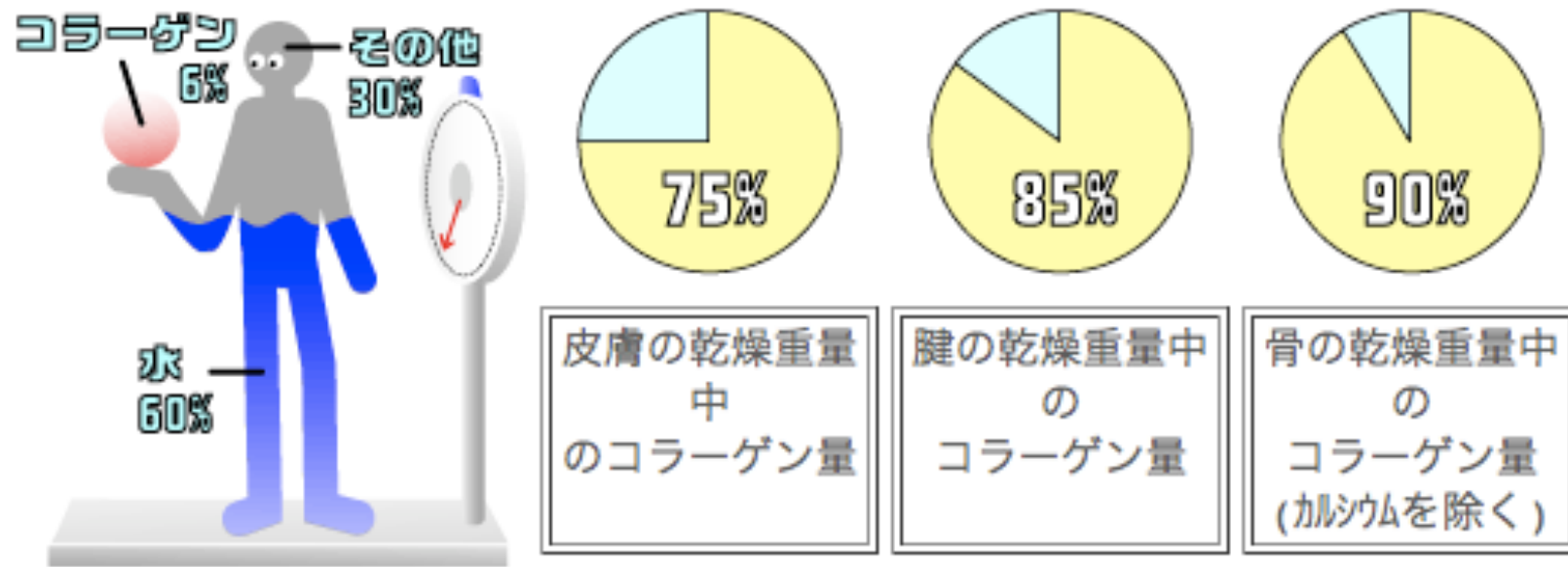
コラーゲンとは③



コラーゲン
が減ってく
ると？

- ①皮膚：張りと弾力性が失われてタルミやしワの増加。
- ②骨、軟骨：骨密度の減少や関節痛。
- ③髪：やせたり細くなる。
- ④歯茎：歯茎がおとろえ、歯周病の原因。
- ⑤血管：柔軟性が失われ高血圧の原因。
- ⑥爪：欠けたり、割れやすくなる。

コラーゲンとは③



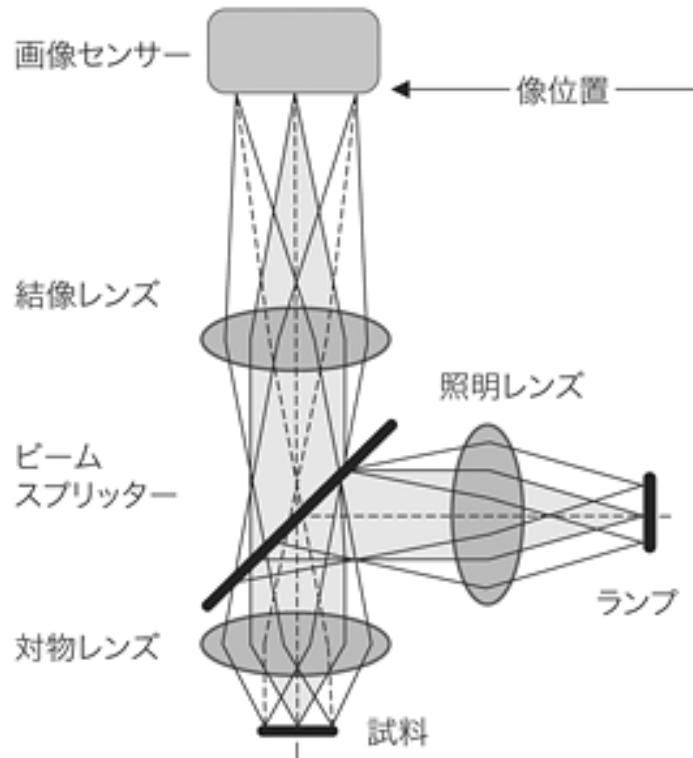
コラーゲン
が減ってく
ると？

- ①皮膚：張りと弾力性が失われてタルミやしワの増加。
- ②骨、軟骨：骨密度の減少や関節痛。
- ③髪：やせたり細くなる。
- ④歯茎：歯茎がおとろえ、歯周病の原因。
- ⑤血管：柔軟性が失われ高血圧の原因。
- ⑥爪：やせたり割れやすくなる。

生体組織におけるコラーゲンの振る舞いを正しく理解するためには、
生体組織におけるコラーゲンを可視化する技術が望まれる

カラーゲン観察手法：光学顕微鏡（染色法）

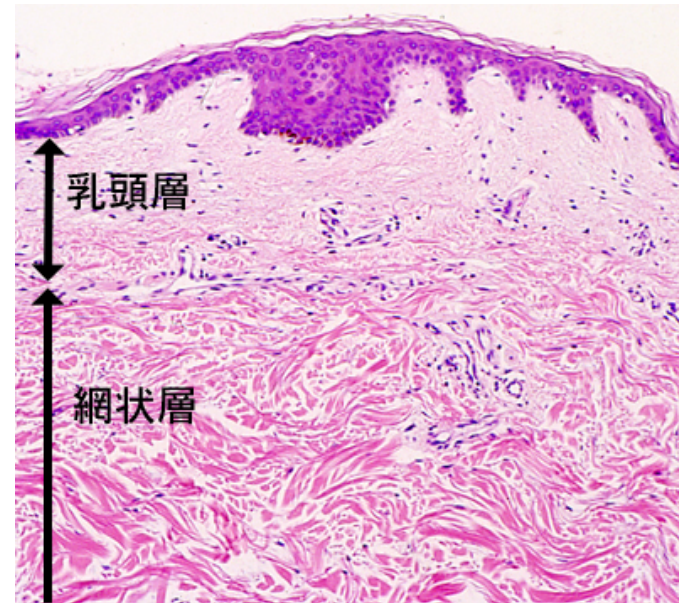
光学顕微鏡



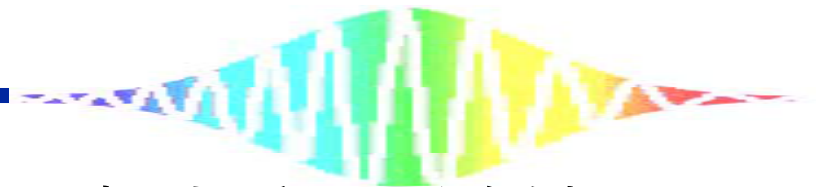
<http://bioimaging.jp/learn/023/>

生体組織→無色透明

染色法



選択的な観察が可能
破壊・侵襲的



コラーゲン観察手法: 共焦点光学顕微鏡

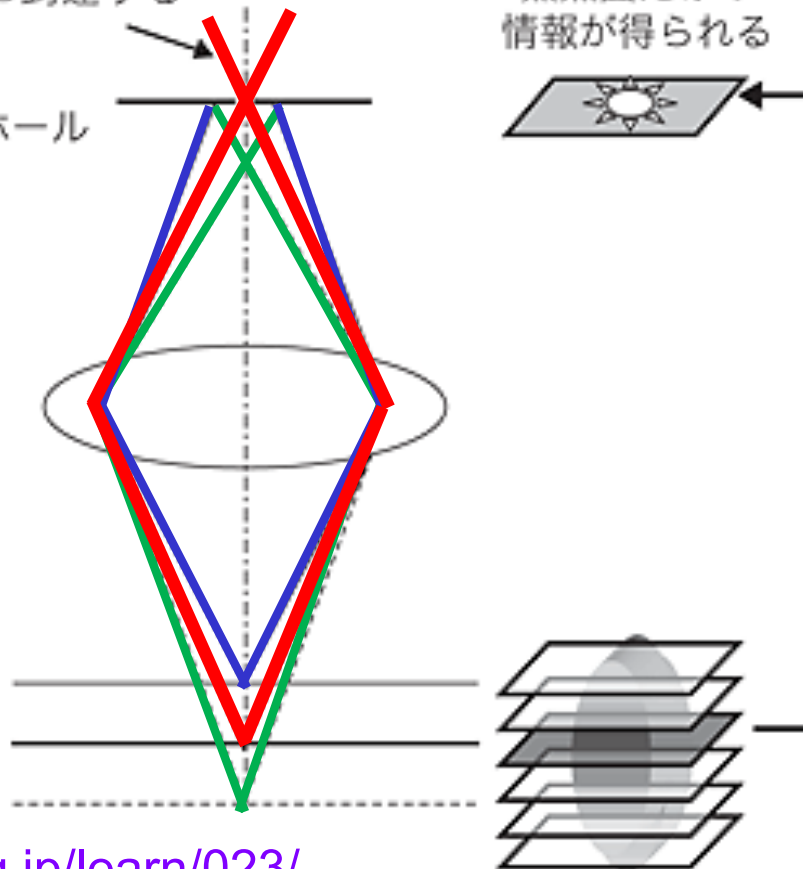
計測概念図

対物レンズの焦点面からの光のみが共焦点ピンホールを通過して検出器に到達する

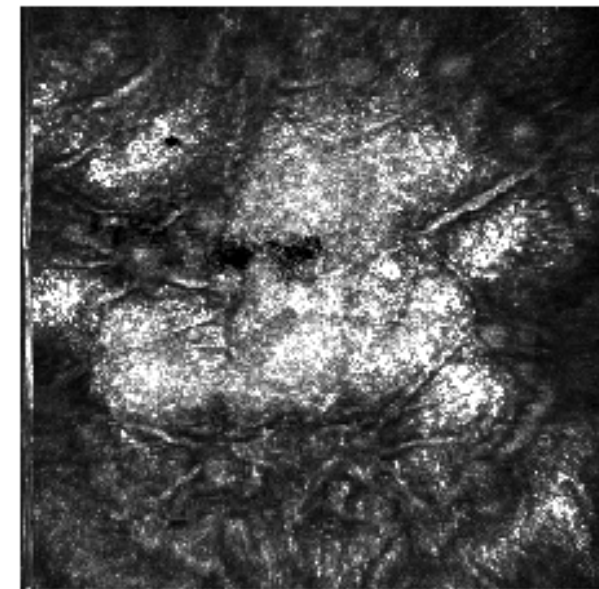
共焦点ピンホール

焦点面だけの情報が得られる

対物レンズの焦点面
(ピントの合った面)



In situ 皮膚計測像



In situ 計測が可能

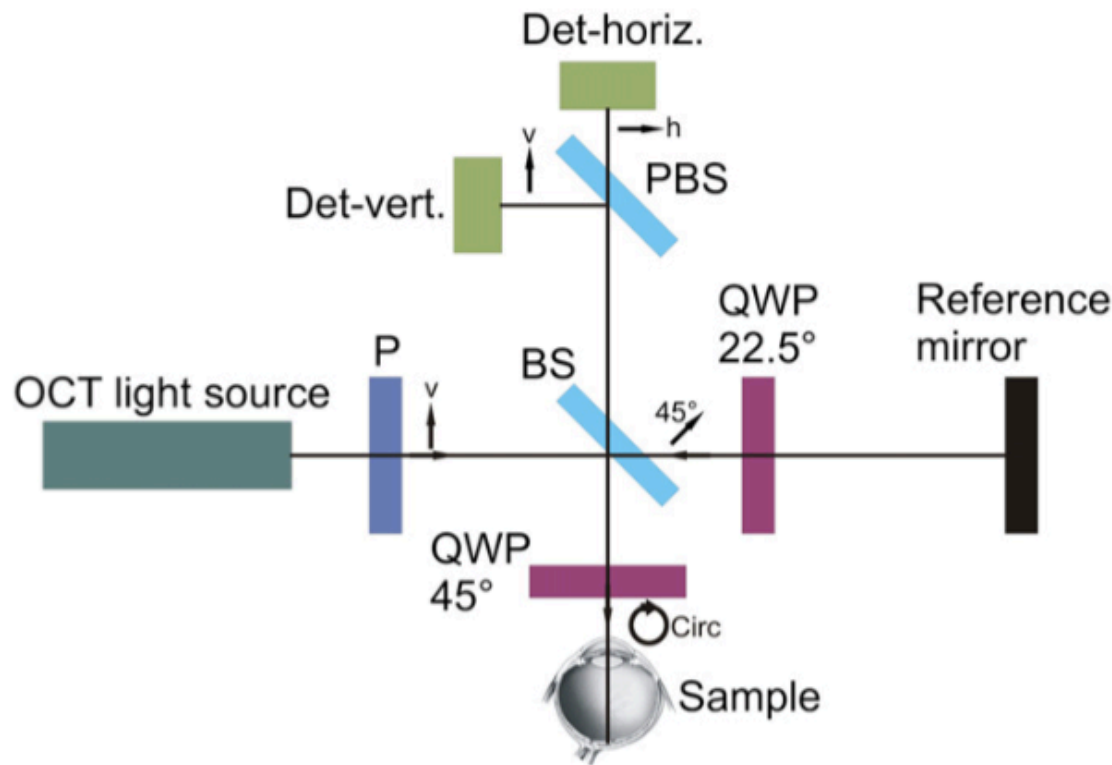
3D空間分解能

コラーゲンのみ可視化困難

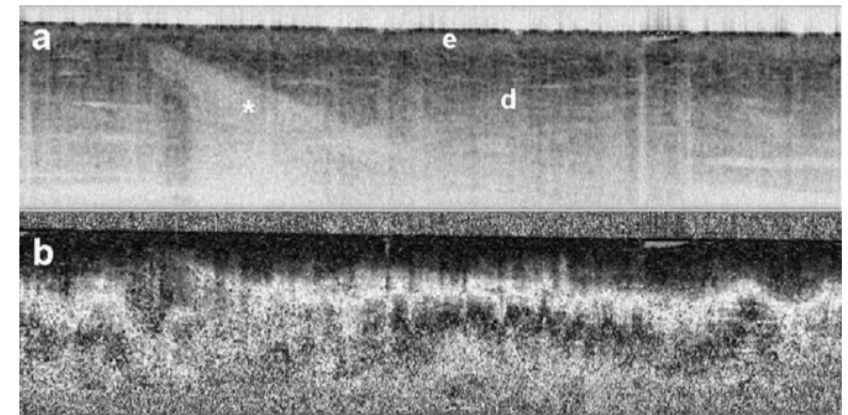
カラーゲン観察手法:偏光感受型 OCT (Optical Coherence Tomography)

Ref) Opt. Express **12**, 5940 (2004).
J. Biomed. Opt. **9**, 287 (2004).

装置構成



皮膚計測像



A:通常のOCT像

B:偏光感受型OCTによる位相遅延像

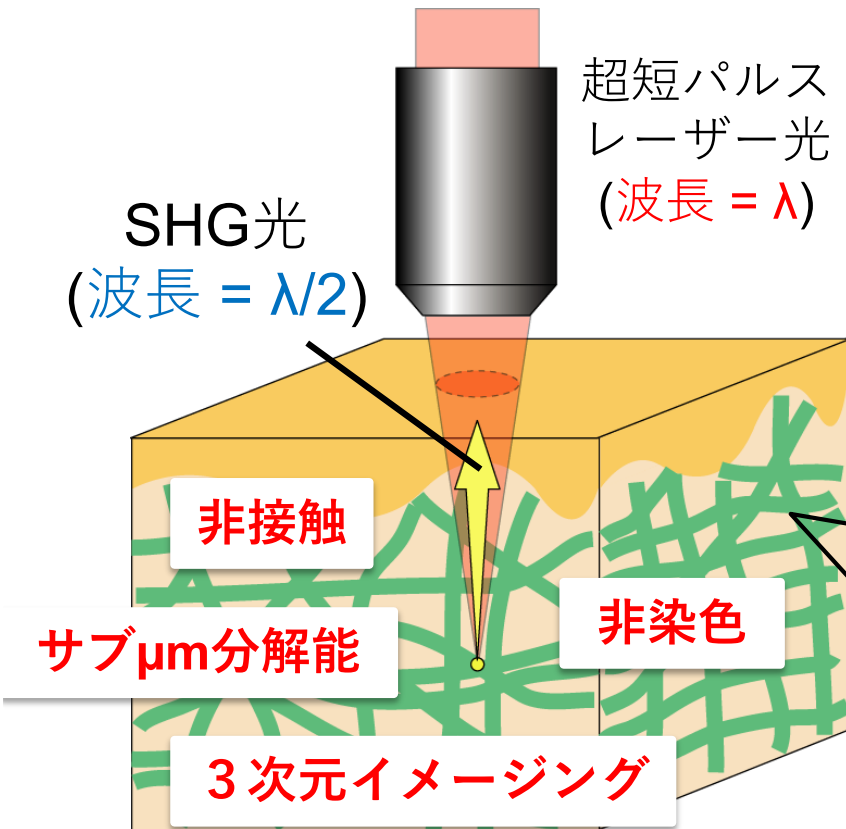
複屈折量の可視化 ▶ 線維状組織の選択的可視化
分子選択性無し, 低いイメージ・コントラスト

SHG顕微鏡

ref) Appl. Opt. 43, 2861 (2004); J. Biomed. Opt. 9, 259-264 (2004); Appl. Opt. 48, D88 (2009).

SHG (第2高調波発生)

超短パルス光を、非中心対称性の物質に入射した際、半波長（周波数が2倍）の光が発生する現象



例

コラーゲン分子



非中心対称性構造

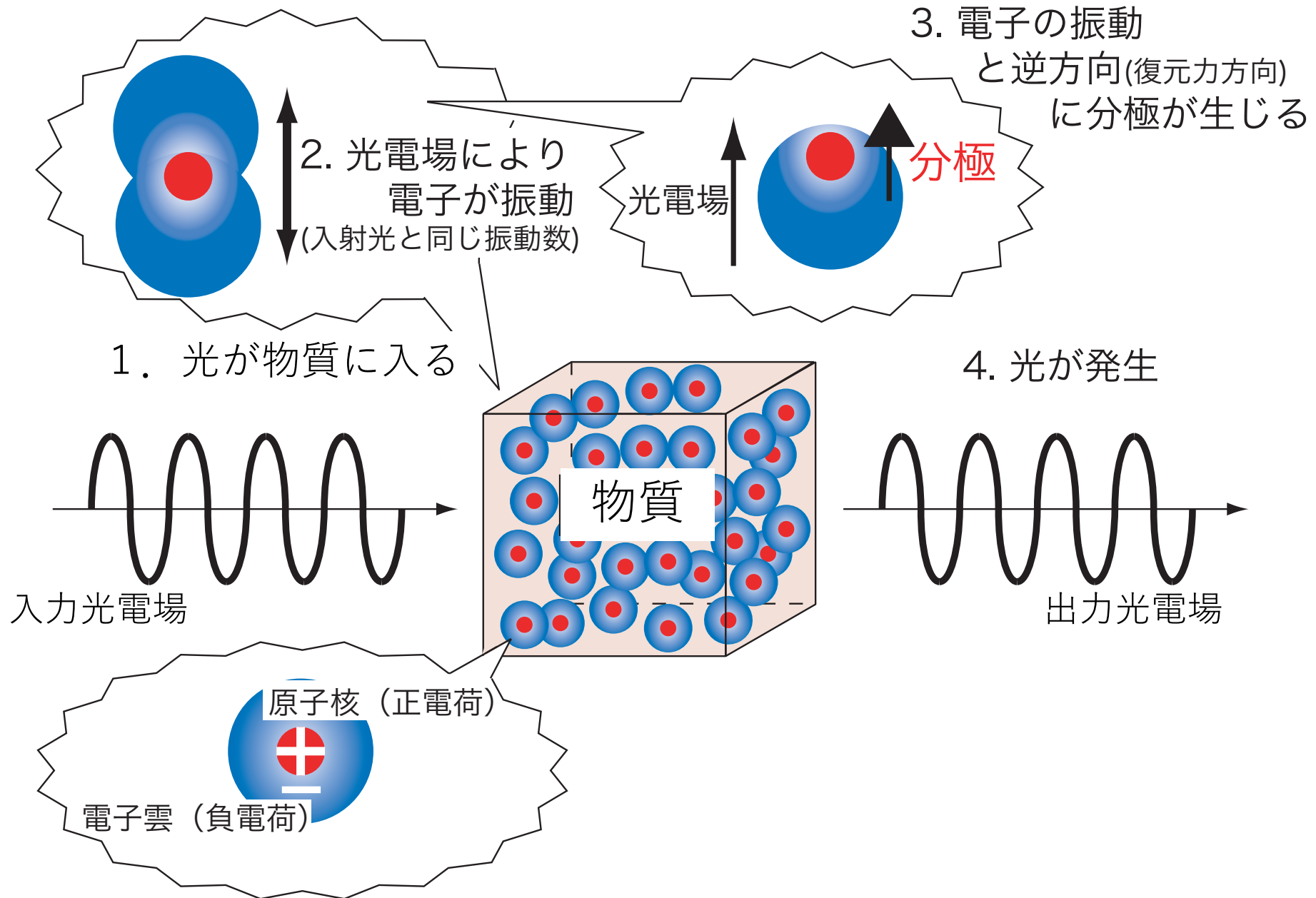
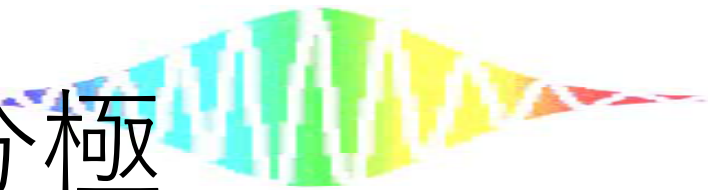


SHG光の
発生源

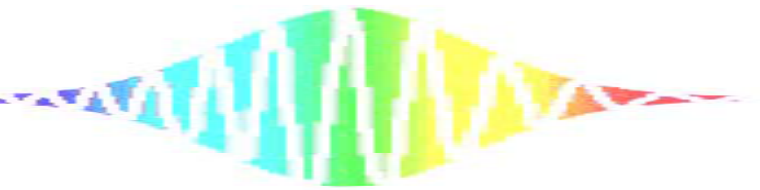
「コラーゲンの選択的可視化」

「*in situ*計測特性」

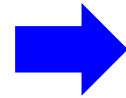
光と物質：分極



線形分極



線形分極



屈折, 反射, 回折, 干渉 . . .

通常の光

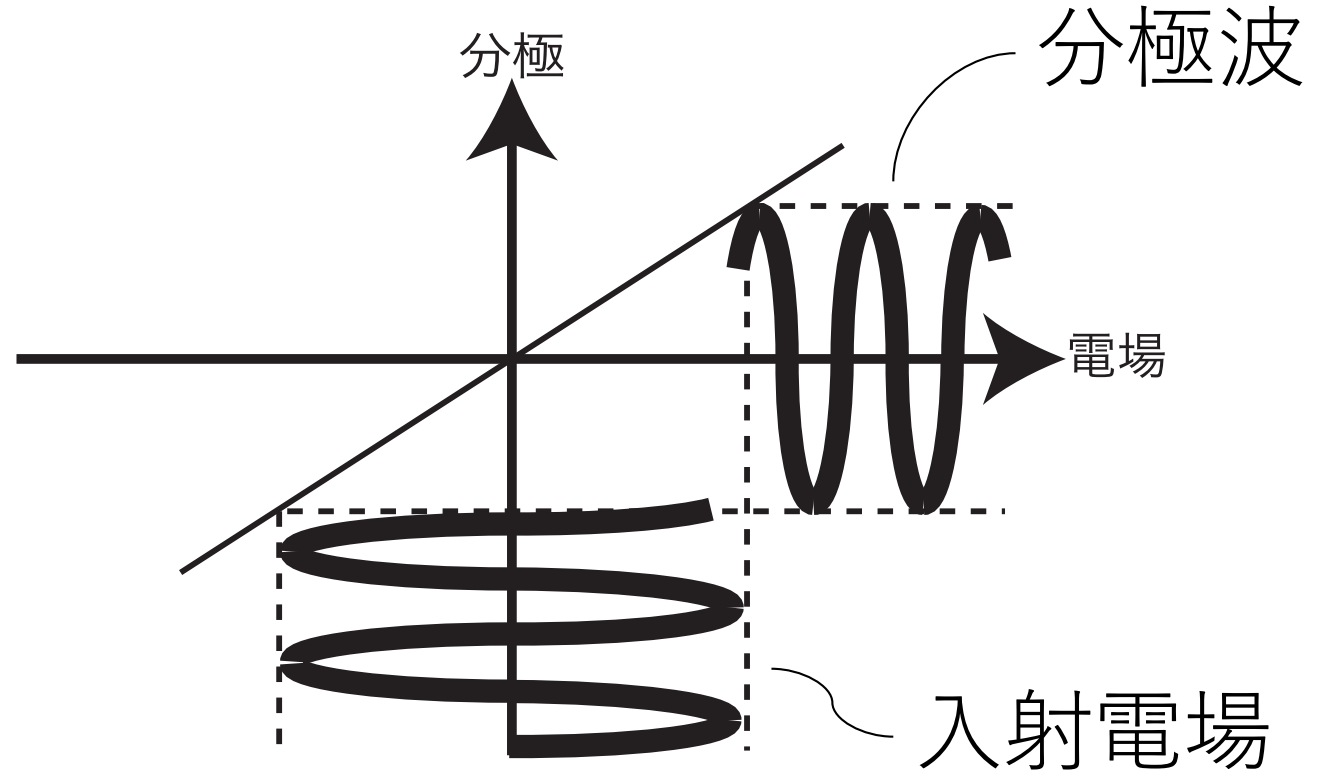
電場 \propto 分極

$$P_L = \chi^{(1)} E$$

P : 分極

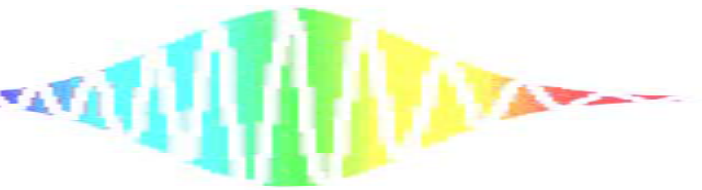
$\chi^{(1)}$: 線形感受率

E : 入射電場



線形分極では, 波長(周波数)は変化しない

非線形分極



非線形分極@非中心対称物質

フェムト秒レーザーの利用

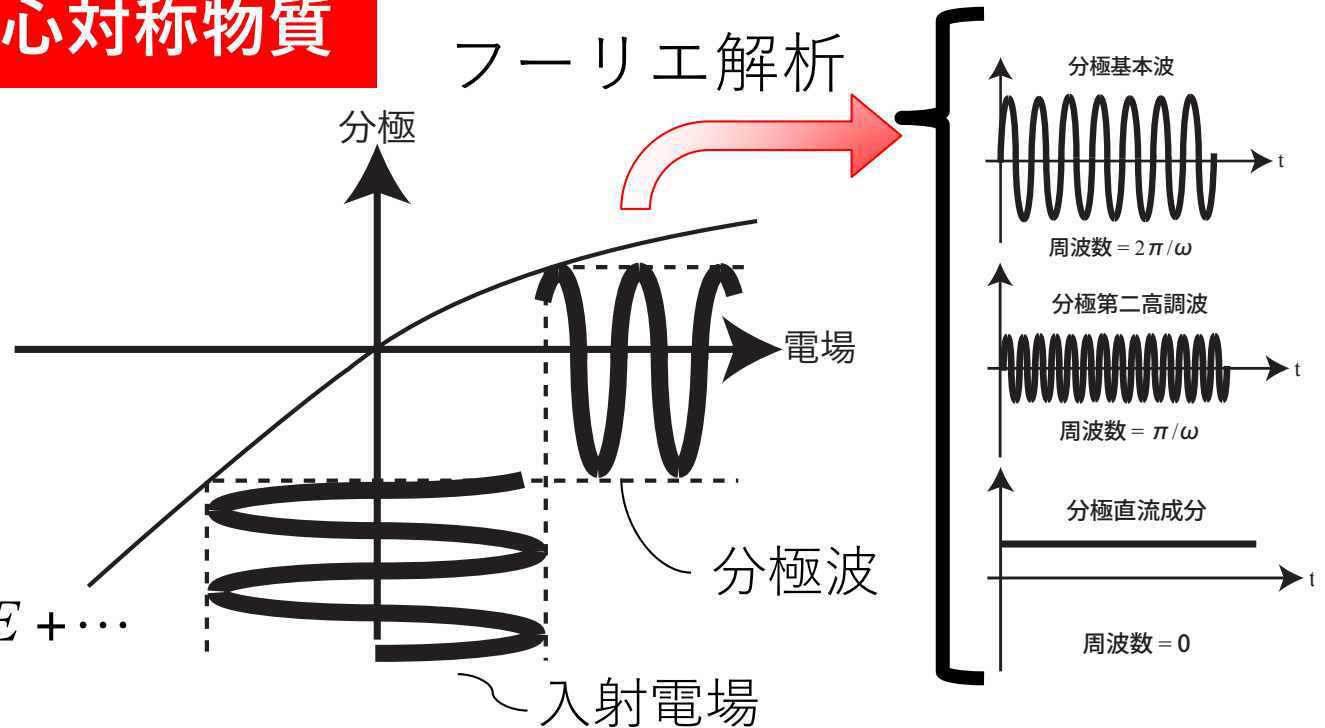
ピークパワーが高い

電場が強くなる

↓
電場 \propto 分極

$$P_{NL} = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}EE + \chi^{(3)}EEE + \dots$$

$\chi^{(n)}$: 非線形感受率

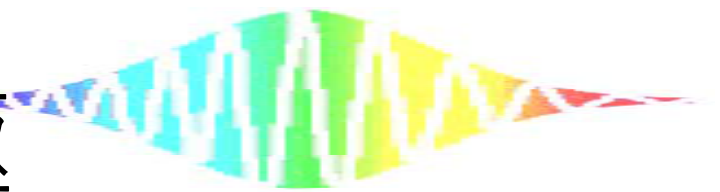


分極波に非線形な項が現れる → 分極波が歪む → 高調波の成分を含む

- ・ 非中心対称物質の場合，正負の方向で分極波が非対称

非線形分極では，波長(周波数)変換が起こる

非線形分極



非線形分極@非中心対称物質

フェムト秒レーザーの利用

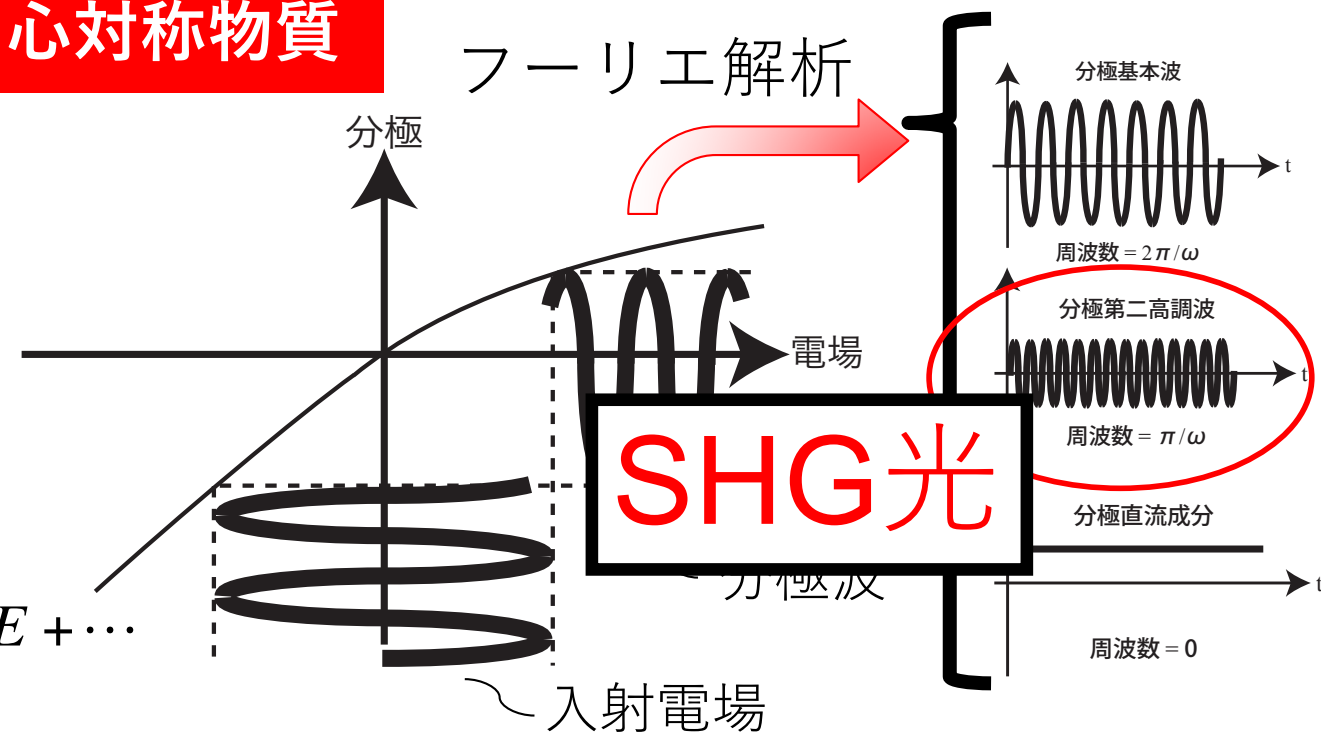
ピークパワーが高い

電場が強くなる

↓
電場 \propto 分極

$$P_{NL} = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}EE + \chi^{(3)}EEE + \dots$$

$\chi^{(n)}$: 非線形感受率

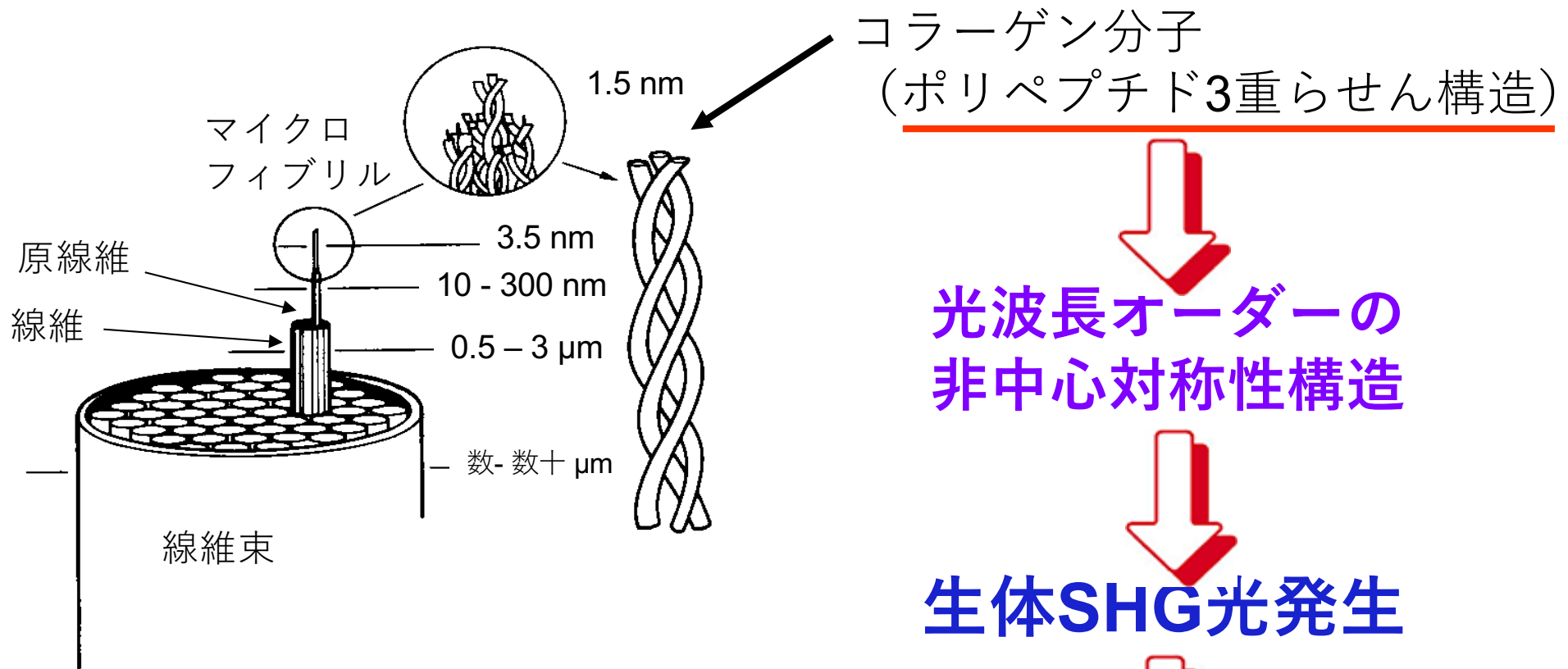


分極波に非線形な項が現れる → 分極波が歪む → 高調波の成分を含む

- ・ 非中心対称物質の場合，正負の方向で分極波が非対称

非線形分極では，波長(周波数)変換が起こる

コラーゲン線維の組織構造とSHG光

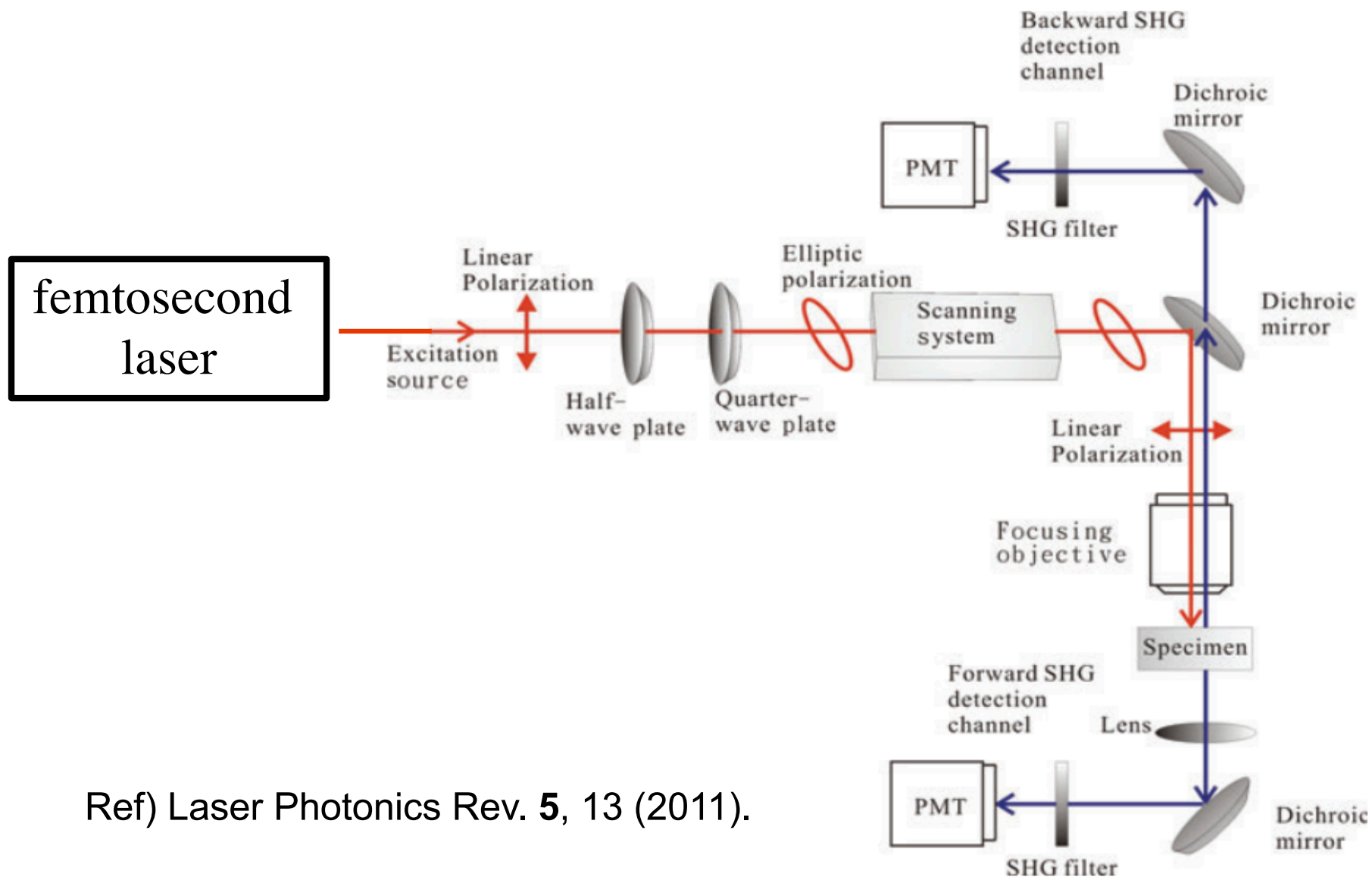


光波長オーダーの
非中心対称性構造

生体SHG光発生

規則的配向がSHG光を増強

SHG顕微鏡のセットアップ



Ref) Laser Photonics Rev. 5, 13 (2011).

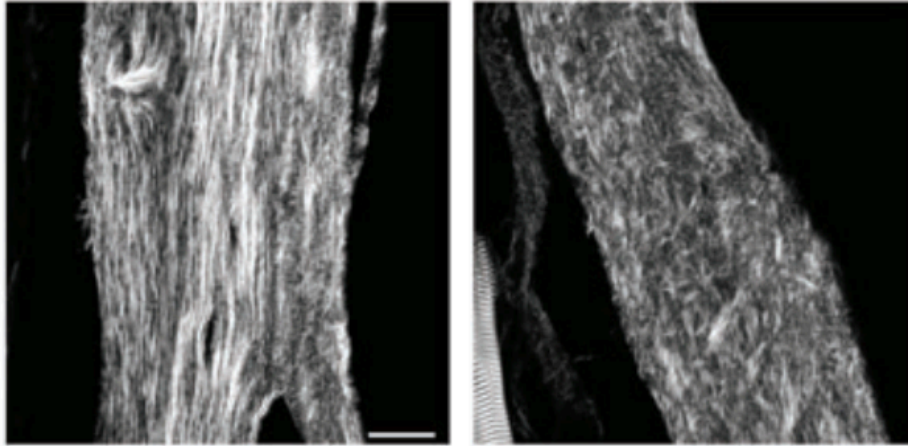
SHG顕微鏡の応用例①

骨形成不全症

マウス骨切片

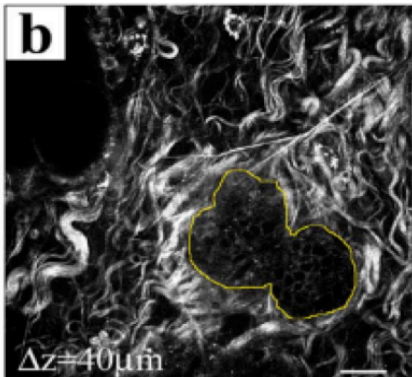
WT

oim



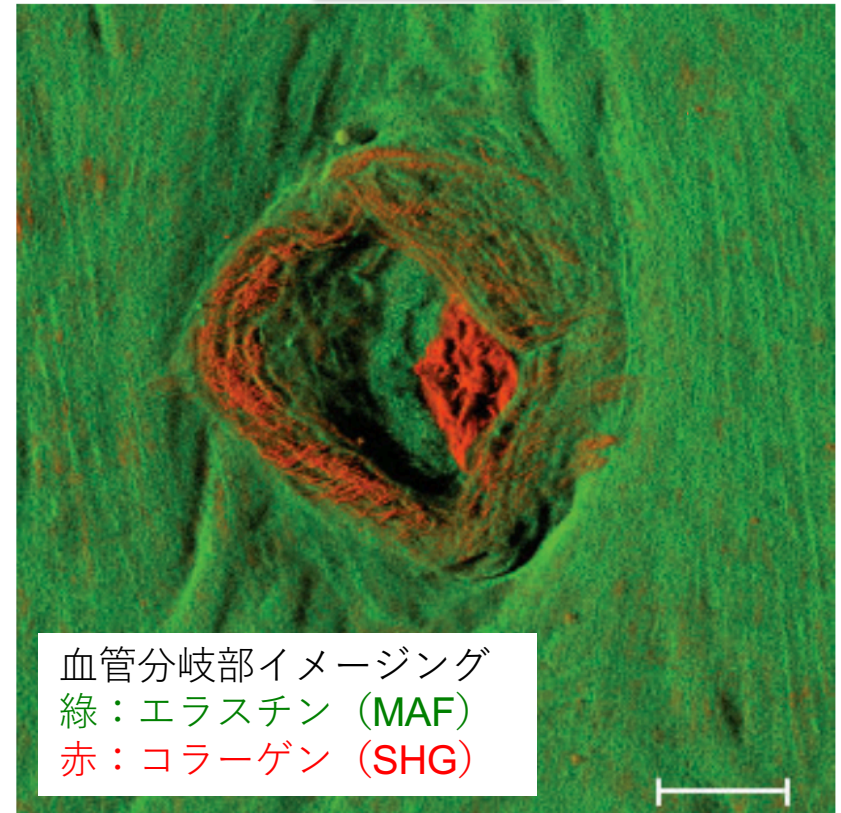
コラーゲンの構造の違いを可視化

乳ガン早期診断



ガン形成初期の小さい腫瘍の周りに密なコラーゲンが分布

動脈硬化



血管分岐部イメージング
緑：エラスチン (MAF)
赤：コラーゲン (SHG)

分岐部（応力集中部）にコラーゲンが産生

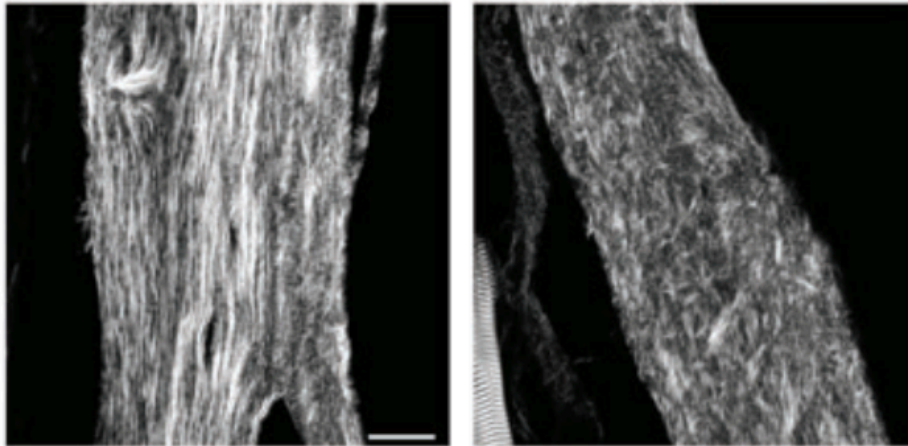
SHG顕微鏡の応用例①

骨形成不全症

マウス骨切片

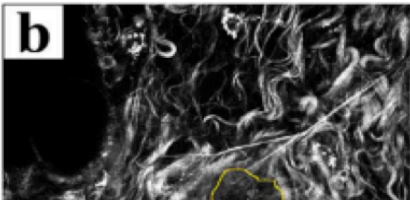
WT

oim



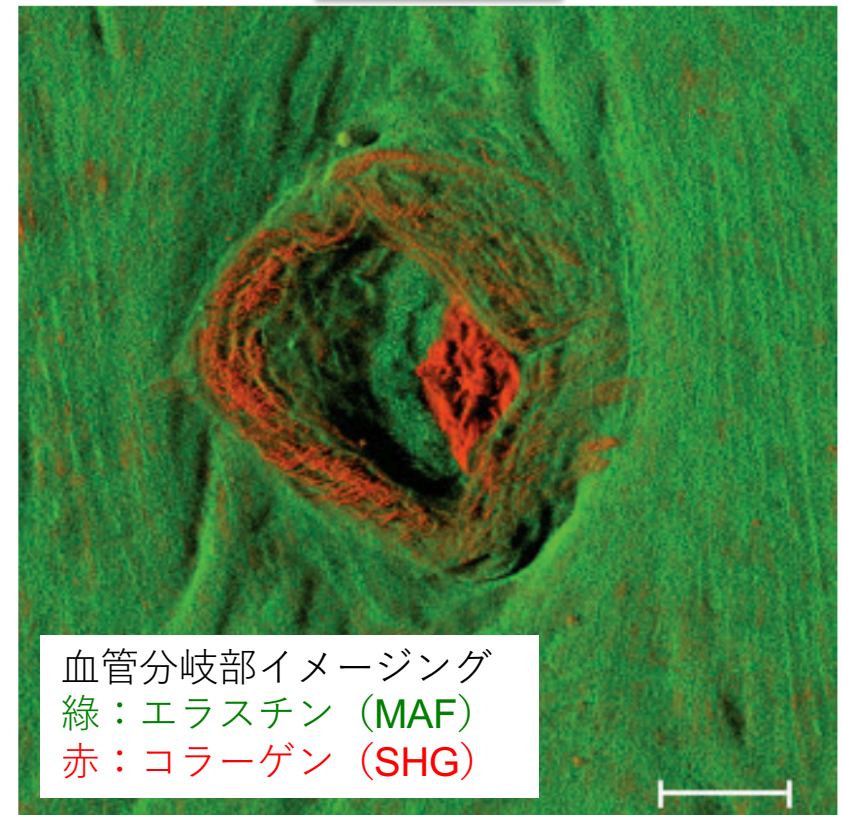
コラーゲンの構造の違いを可視化

乳ガン早期診断



「コラーゲンの選択的可視化」能力を利用して、顕微鏡下で組織観察する研究が主流

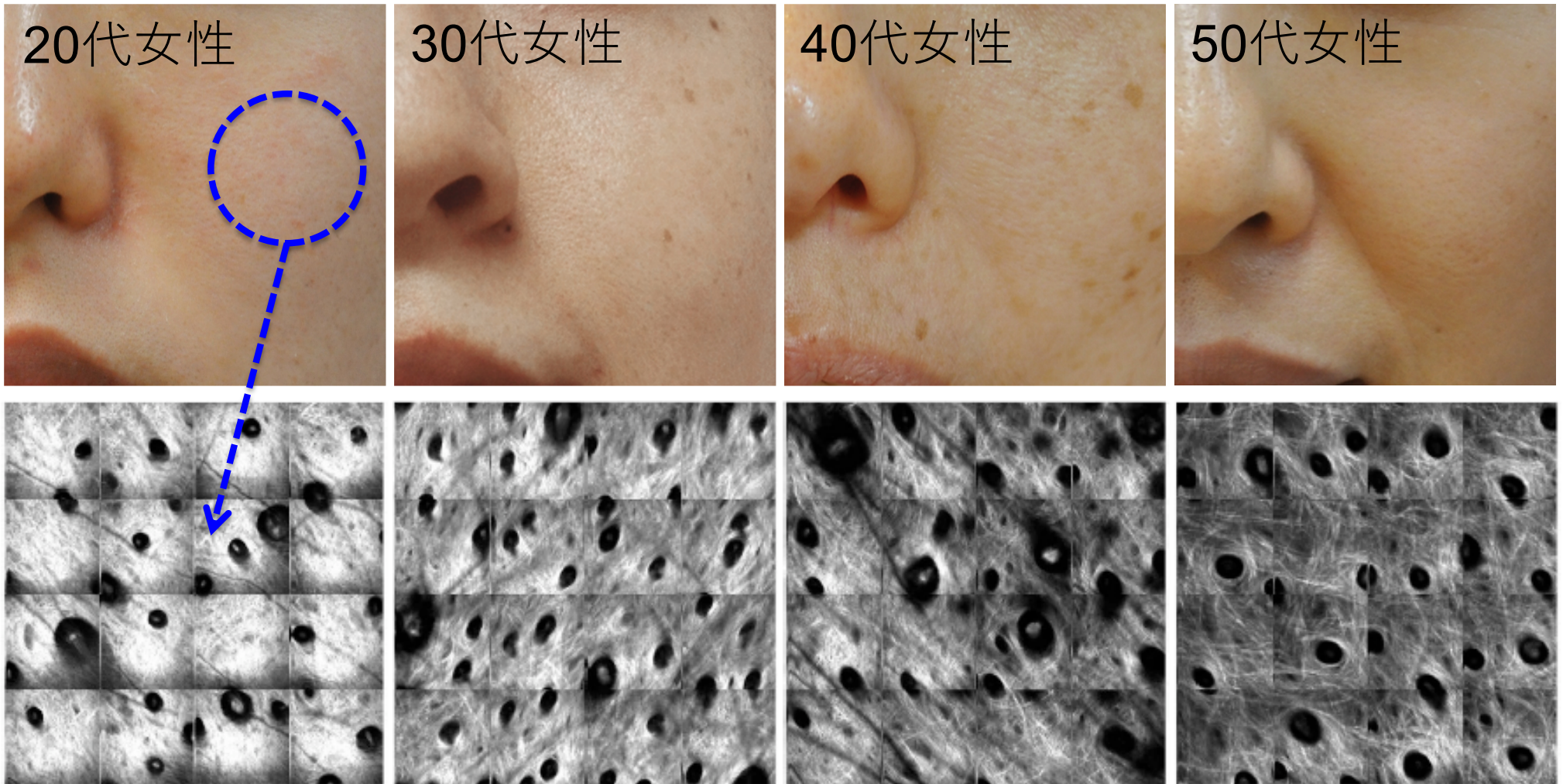
動脈硬化



分岐部（応力集中部）にコラーゲンが産生

SHG顕微鏡の応用例②皮膚老化度の診断

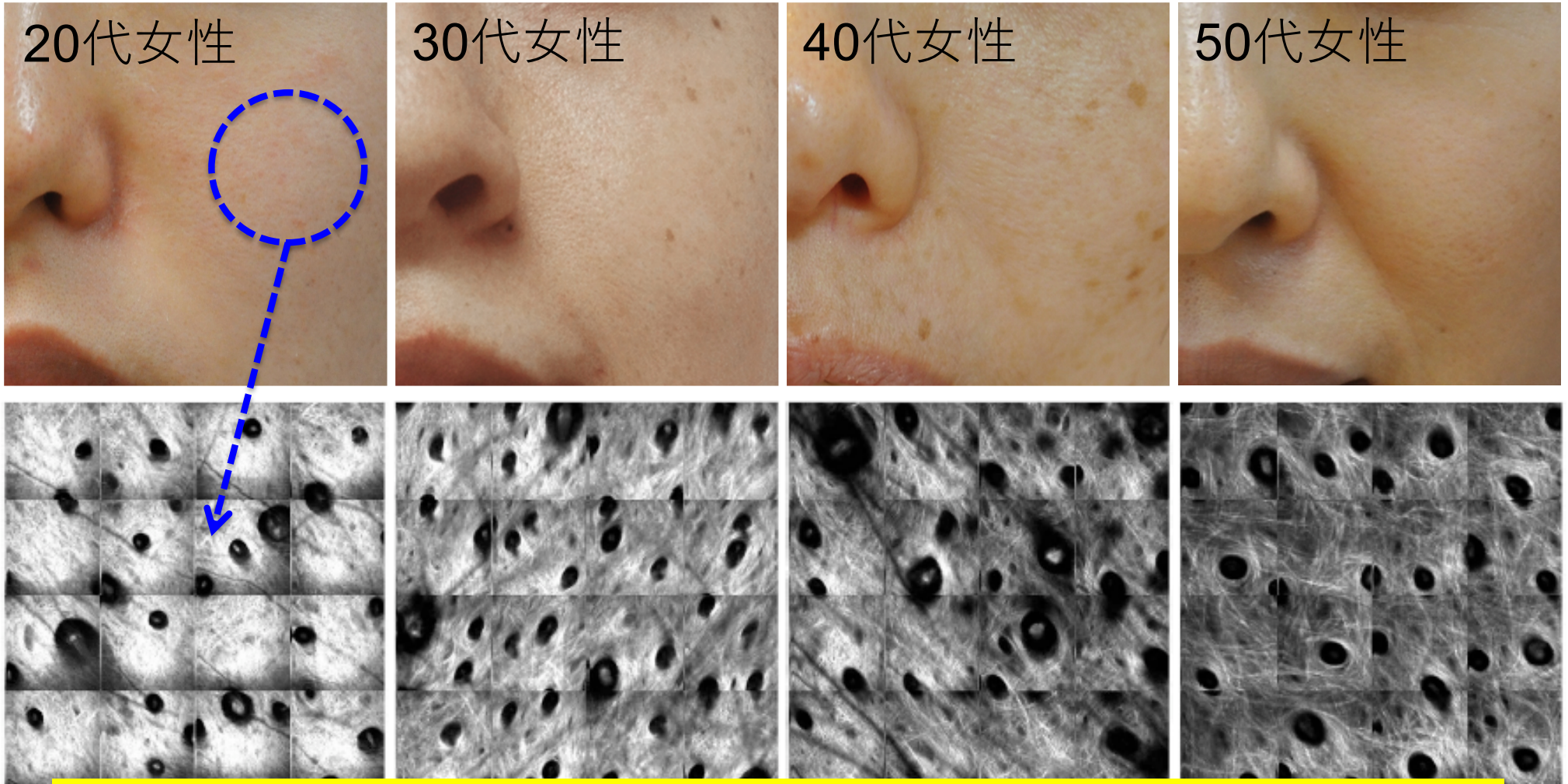
Ref) T.Yasui *et al.*, J. Biomed. Opt. **18**, 031108 (2012).



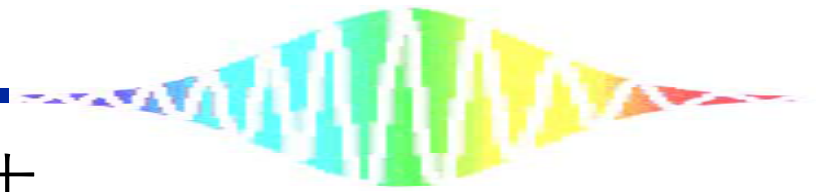
加齢と共にSHG光(コラーゲン)が減少する様子が可視化出来る！！

SHG顕微鏡の応用例②皮膚老化度の診断

Ref) T.Yasui et al., J. Biomed. Opt. **18**, 031108 (2012).



SHG顕微鏡が持つ「コラーゲンの選択的可視化」と「*in situ*計測特性」という両特徴を活かした応用



これまでのSHG顕微鏡利用法

皮膚計測分野を除けば、

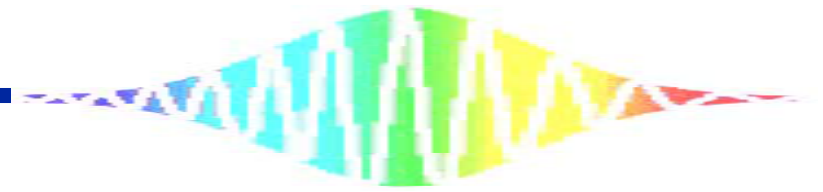
「**コラーゲンの選択的可視化**」能力を利用して、
顕微鏡下で組織観察する研究が主流

本研究内容

「**コラーゲンの選択的可視化**」と「**in situ計測特性**」という両特徴を活かしたバイオ応用

1. 骨芽細胞産生コラーゲンの時系列可視化
2. 腱修復における組織学・力学的修復評価
3. SHG画像解析を用いた腱修復評価

バイオ分野におけるコラーゲン動態を評価する手法としての有用性を確認



1. 骨芽細胞産生コラーゲンの時系列可視化

Introduction

Bone injuries largely reduces QOL in elder people.
Metabolism of bone tissue is quite slow

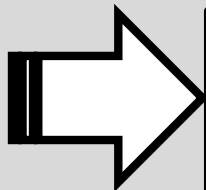
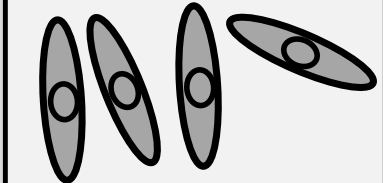


Bone tissue engineering is required in **aging society**

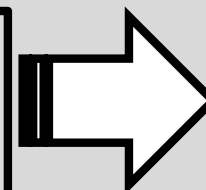
Bone formation and regeneration

iPS cell ,
MSC, etc

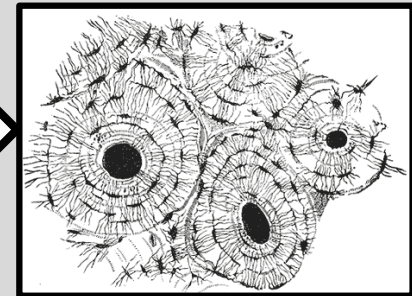
Osteoblasts



- collagen production
- mineral deposition



Bone tissue



Introduction

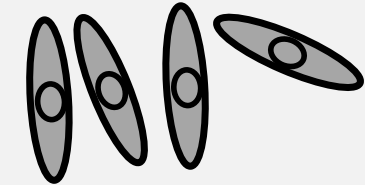
Bone injuries largely reduces QOL in elder people.
Metabolism of bone tissue is quite slow

Bone tissue engineering is required in **aging society**

Bone formation and regeneration

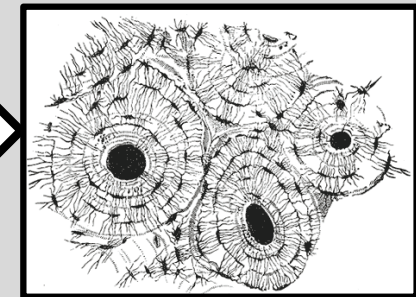
iPS cell ,
MSC, etc

Osteoblasts



- collagen production
- mineral deposition

Bone tissue



Mechanical stimulus

Introduction

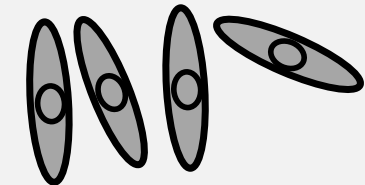
Bone injuries largely reduces QOL in elder people.
Metabolism of bone tissue is quite slow

Bone tissue engineering is required in **aging society**

Bone formation and regeneration

iPS cell ,
MSC, etc

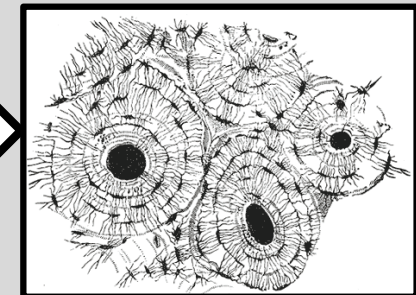
Osteoblasts



Monitoring without invasion

- collagen production
- mineral deposition

Bone tissue



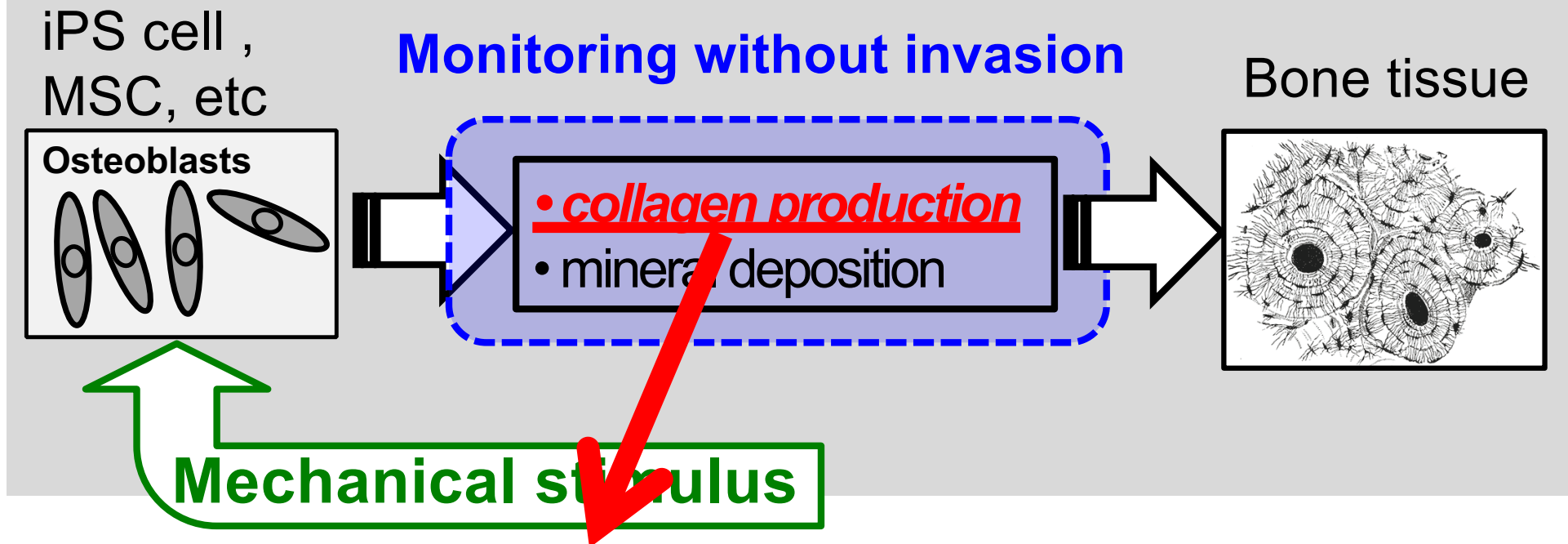
Mechanical stimulus

Introduction

Bone injuries largely reduces QOL in elder people.
Metabolism of bone tissue is quite slow

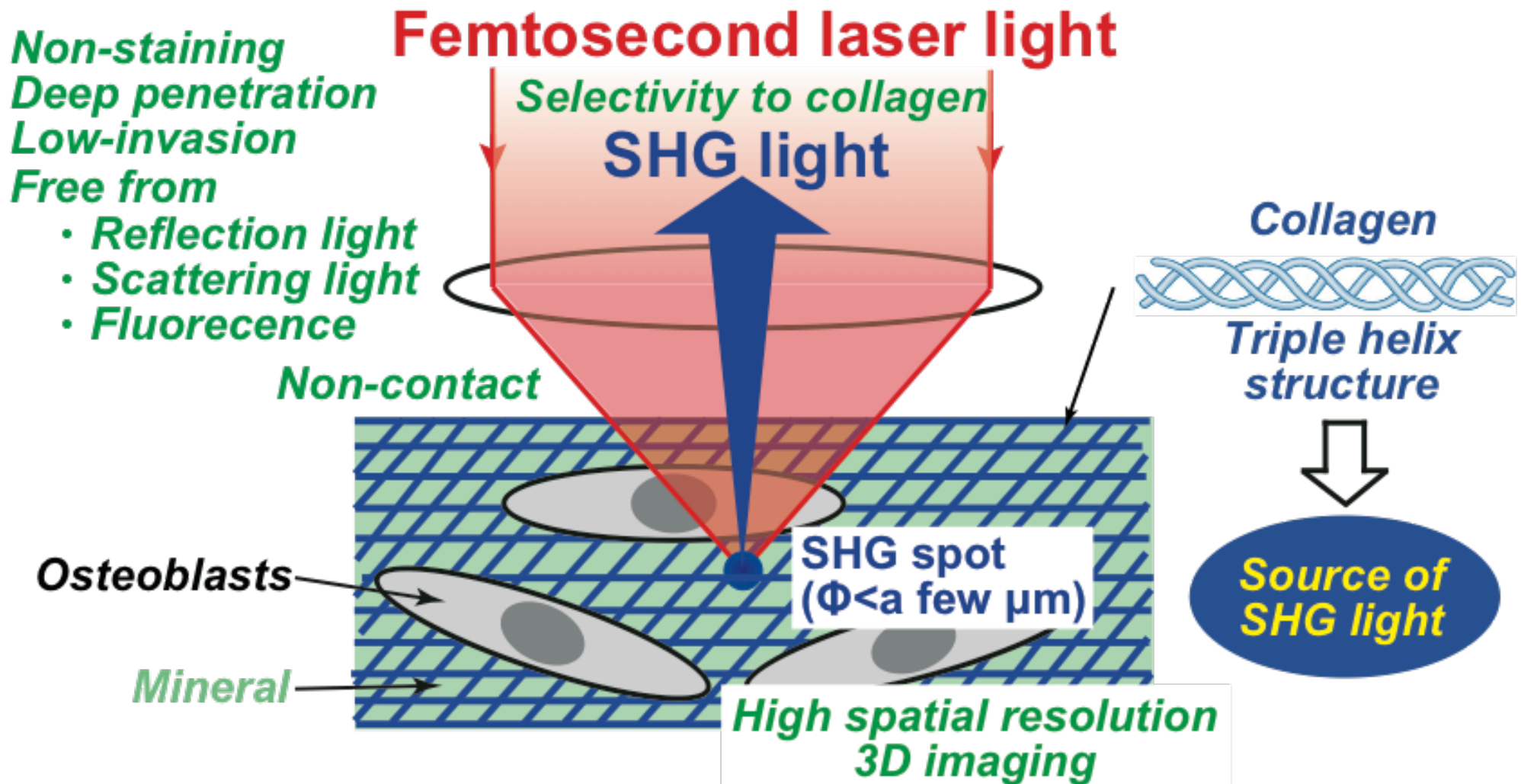
Bone tissue engineering is required in **aging society**

Bone formation and regeneration



Difficult to visualize collagen dynamics without staining

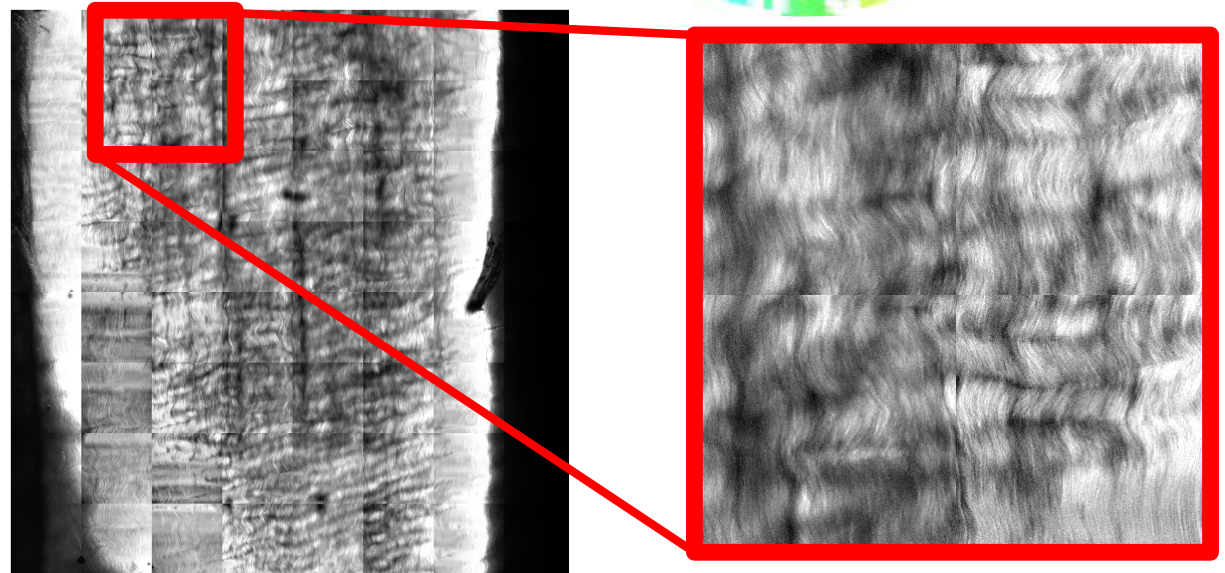
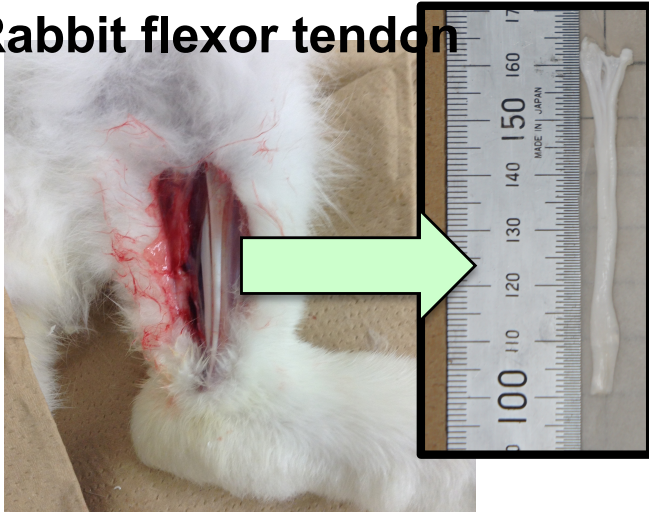
Selective visualization of collagen fiber *in vivo* by SHG microscopy (SHG-M)



Previous research of SHG-M using a **100-fs** laser

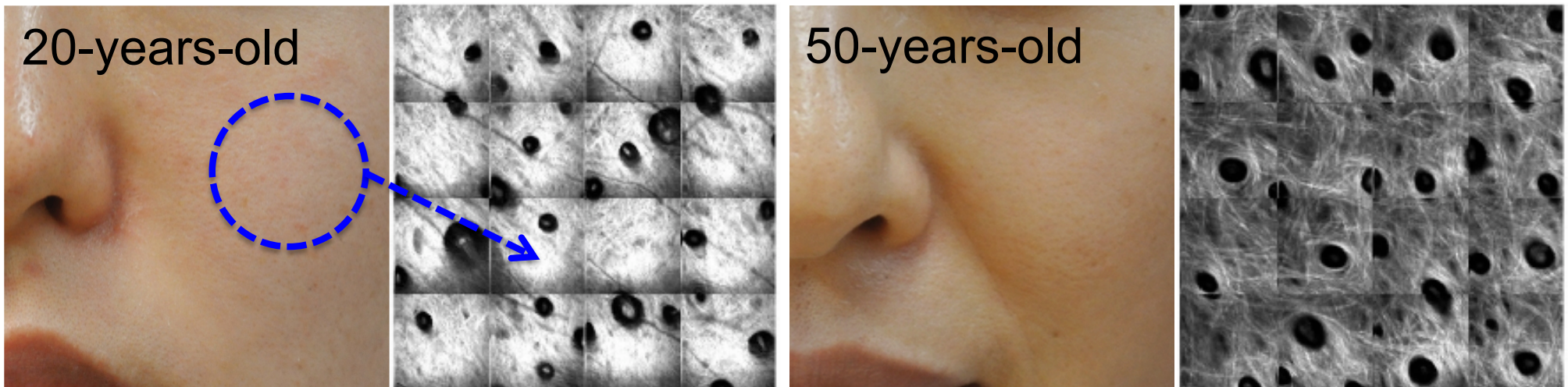
Tendon (*ex vivo*)

Rabbit flexor tendon



Dermal collagen (*in situ*)

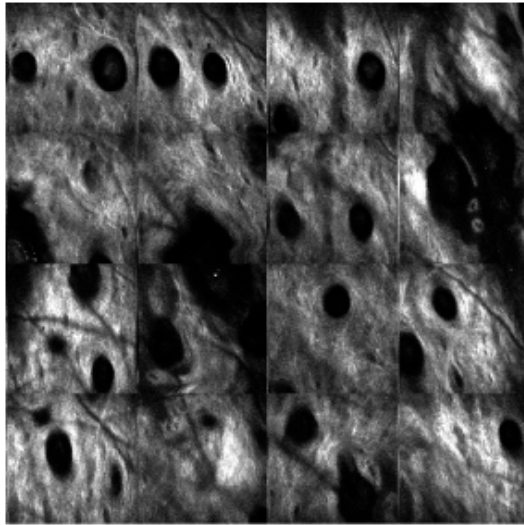
Ref) T.Yasui et al., *J. Biomed. Opt.* **18**, 031108 (2012).



Selective visualization of collagen fiber in tissue

Conventional SHG-M equipped with a 100-fs laser

Dermal collagen

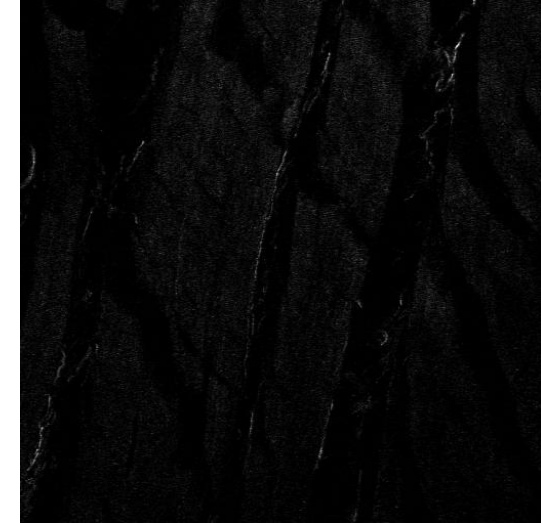


High $\chi^{(2)}$

Low $\chi^{(2)}$ sample in SHG imaging

- myosin
- collagen produced by cultured cell
- collagen gel

Muscle myosin

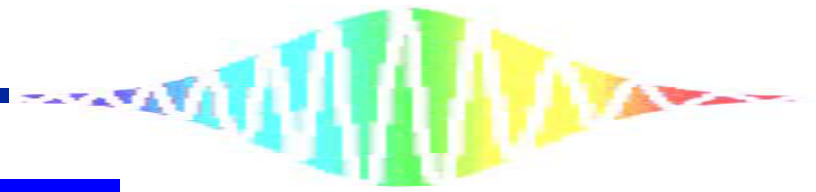


Low $\chi^{(2)}$

Problem in application of SHG-M for bone tissue engineering

SHG light is considerably weak in collagen fiber produced by cultured cell because of low $\chi^{(2)}$.

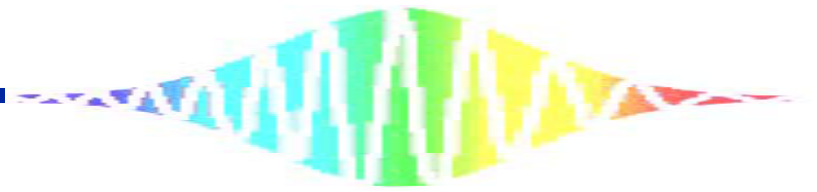
Essential to enhance the sensitivity of SHG-M



Present talk

(1) Enhanced sensitivity in SHG-M by use of 19-fs pulse light at the focal point

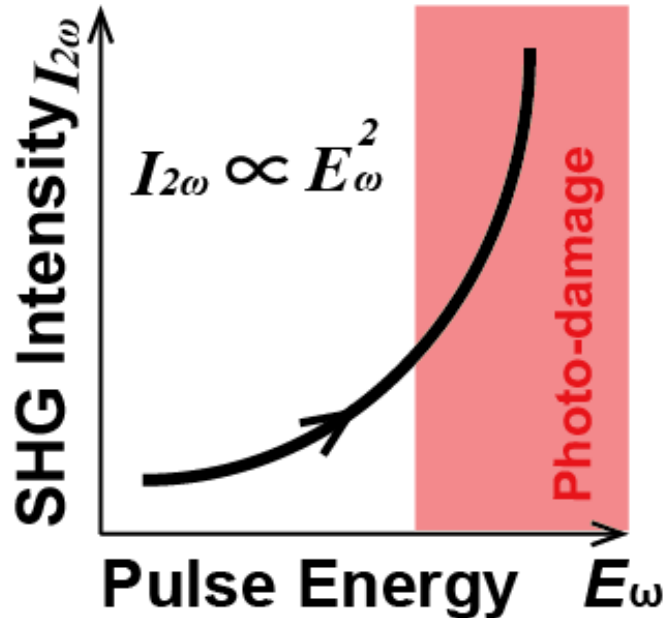
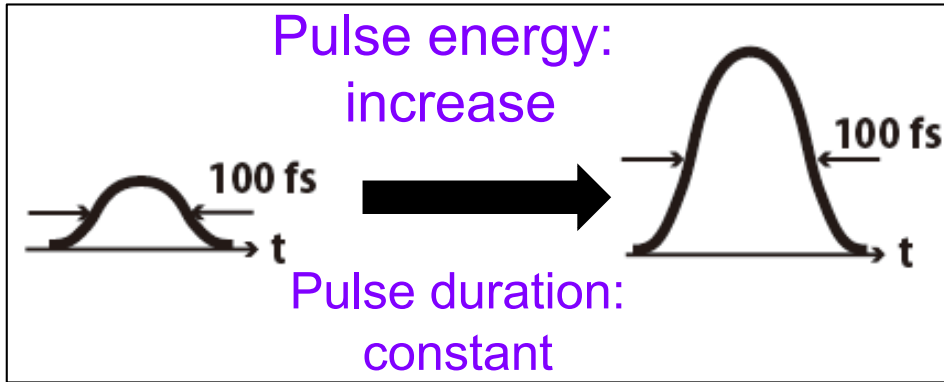
(1) *in situ* time-lapse imaging of collagen fiber produced by cultured osteoblasts in the same sample



(1) Enhanced sensitivity in SHG-M by use of 19-fs pulse light

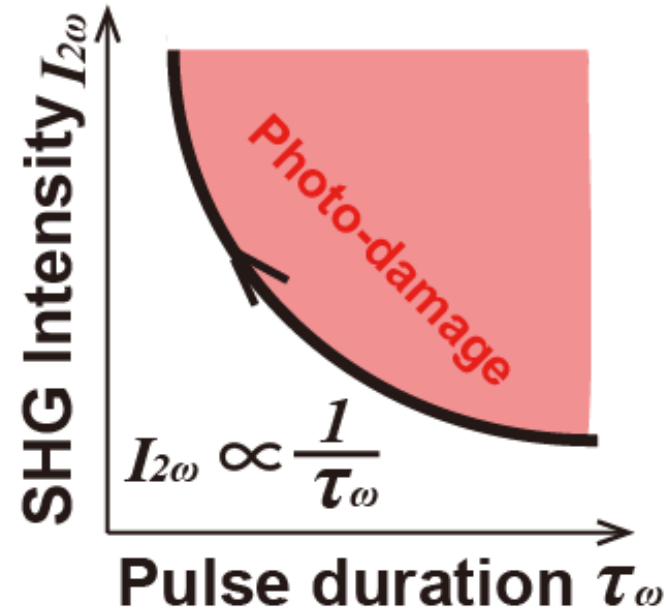
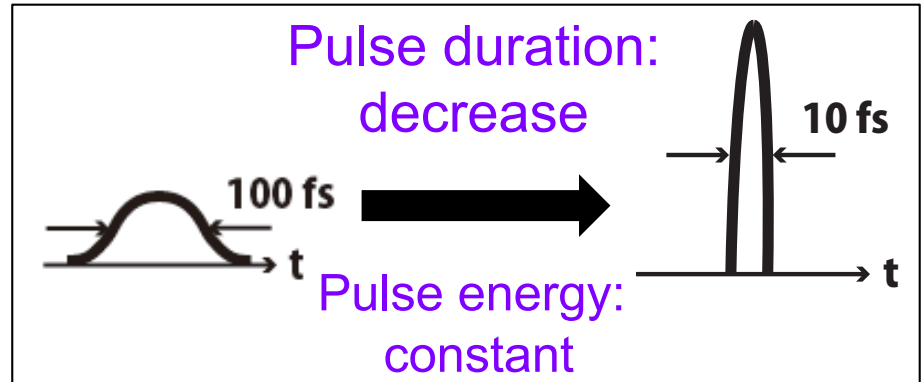
Enhancement of SHG light intensity

Increase of pulse energy



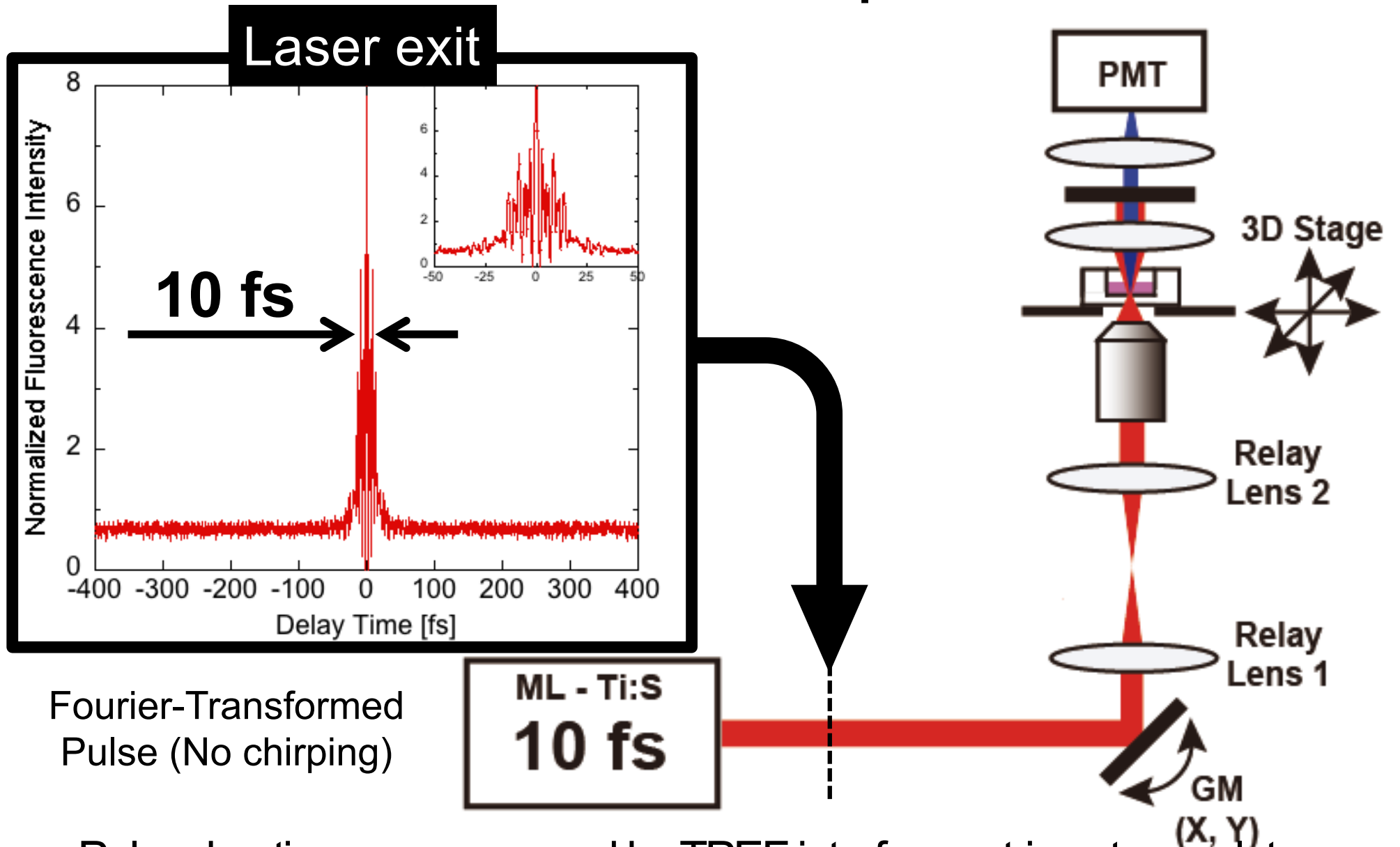
Increased risk for sample damage

Reduction of pulse duration



Enhanced SHG intensity while avoiding sample damage

Pulse duration at the focal point of SHG-M



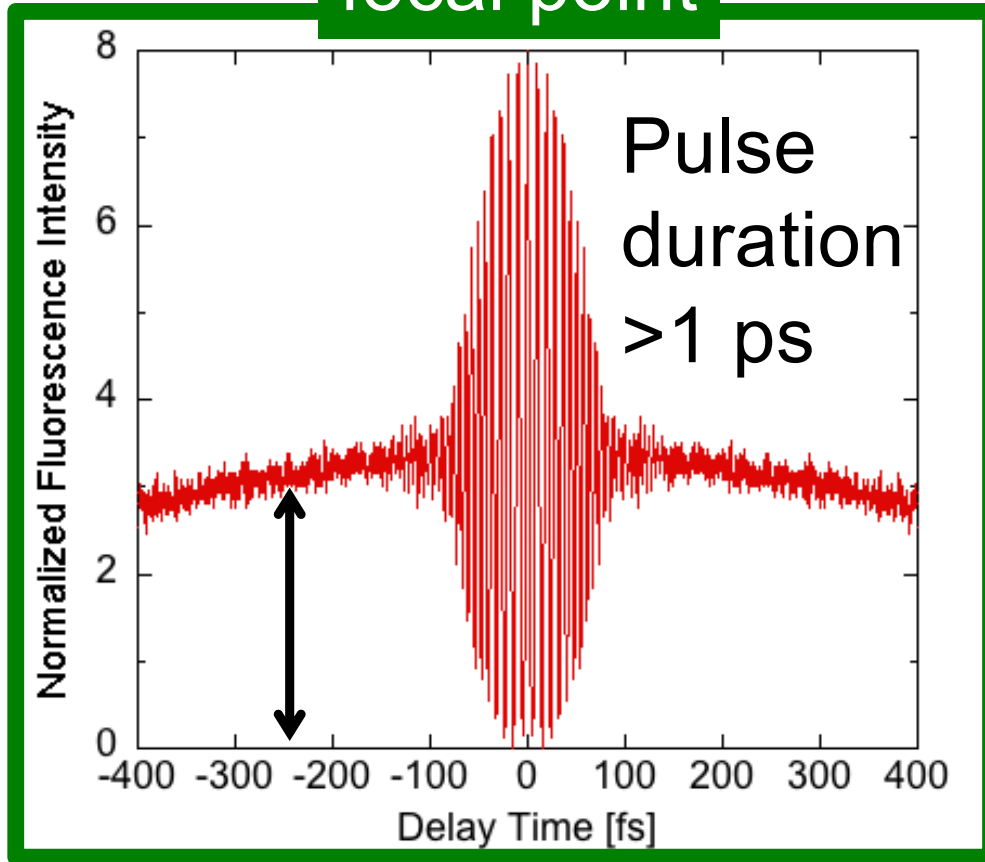
Fourier-Transformed Pulse (No chirping)

ML - Ti:S
10 fs

Pulse duration was measured by TPEF interferometric autocorrelator

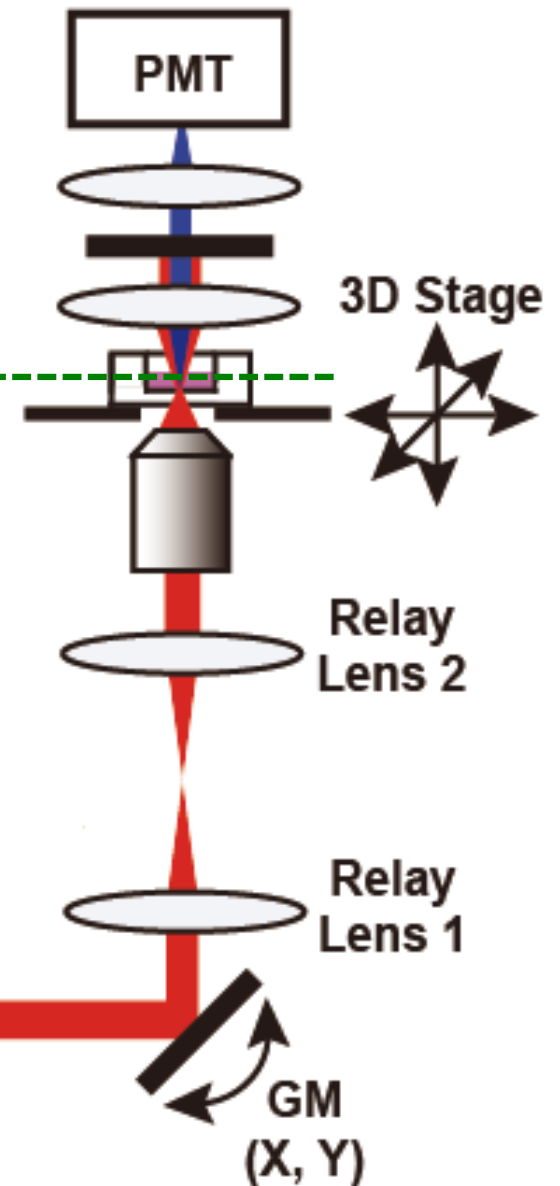
Pulse duration at the focal point of SHG-M

focal point

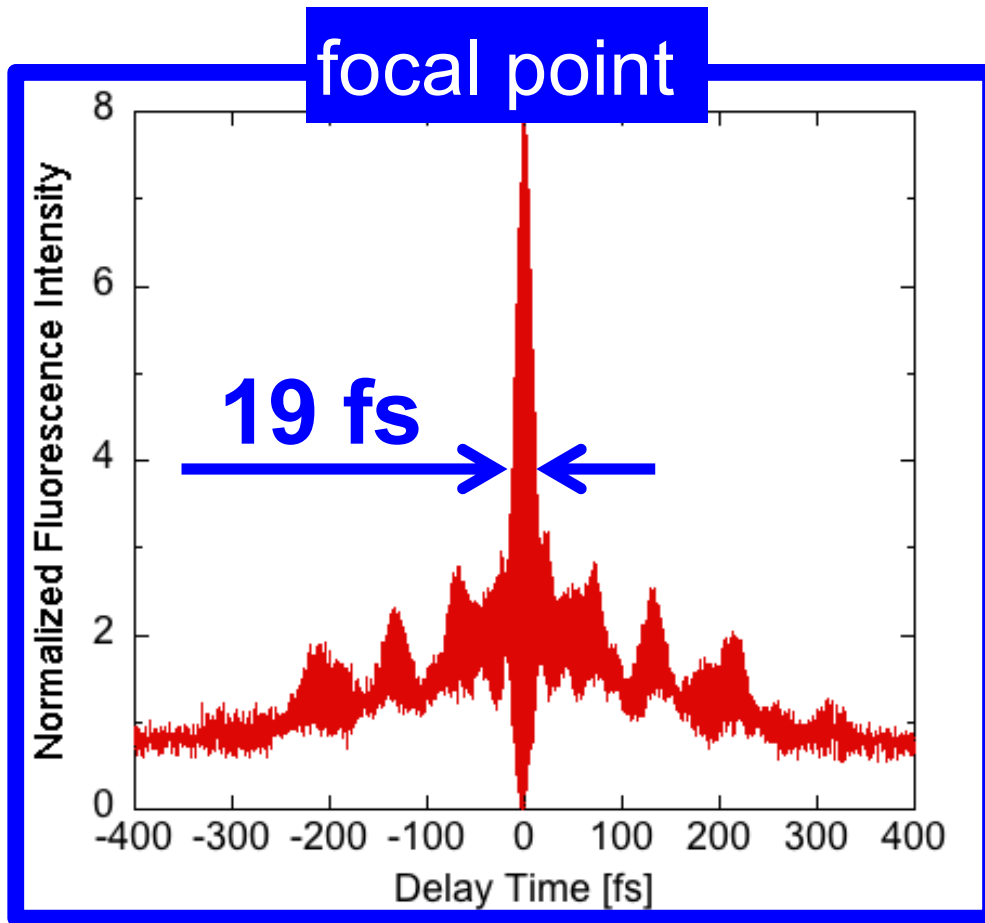


Largely positive chirping in the objective lens

ML - Ti:S
10 fs



Pulse duration at the focal point of SHG-M

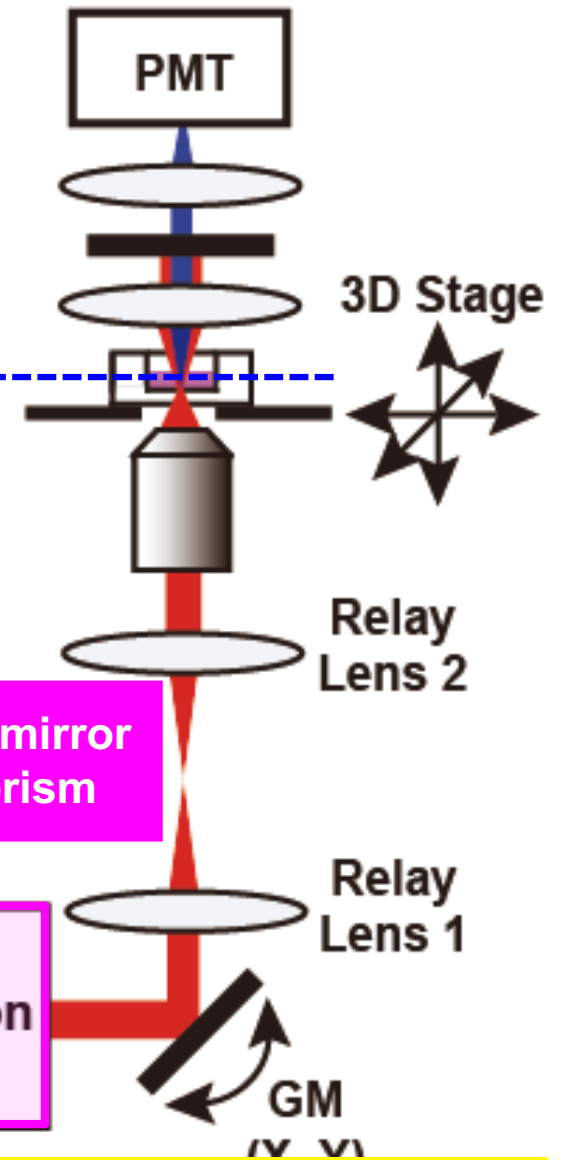


3rd-order dispersion in the negative chirped mirror is still remained.

ML - Ti:S
10 fs

• Negative chirped mirror
• Positive wedge prism

Dispersion Compensation Unit



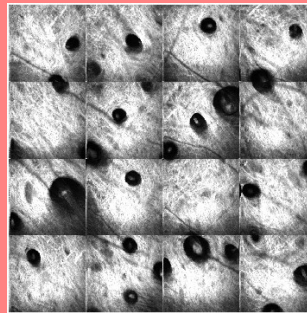
Pulse duration of 19 fs was achieved at the focal spot

SHG-M either 19-fs or 110-fs

Experimental condition

Average power: ~ 20 mW
 Image size: 260×260 μm
 Acquire time: 10 sec/frame

Large-area



1 mm

Center wavelength: 775 nm
 Bandwidth: ~ 10 nm
 Pulse width: **110 fs**
 Repetition Frequency: 100 MHz

Center wavelength: 787 nm
 Bandwidth: ~ 100 nm
 Pulse width: **10 fs (19 fs)**
 Repetition Frequency: 81.8 MHz

ML - Ti:S
10 fs

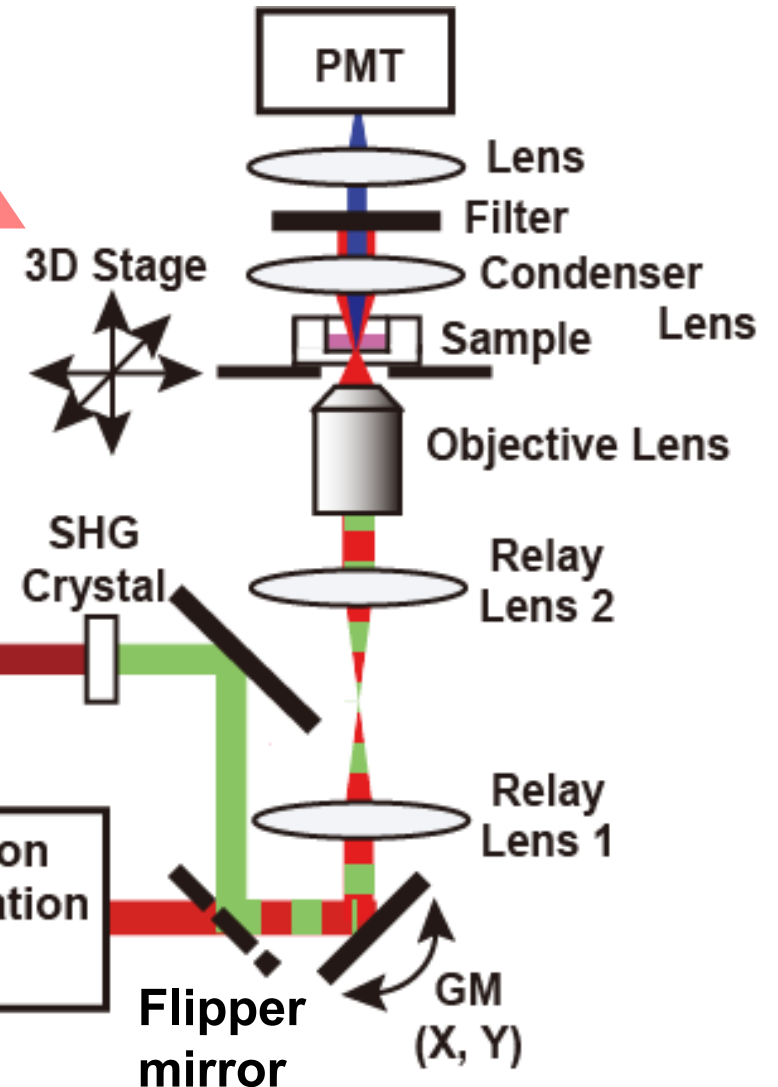
Dispersion
 Compensation
 Unit

ML - ErF
110 fs

SHG
 Crystal

Flipper
 mirror

GM
 (X, Y)



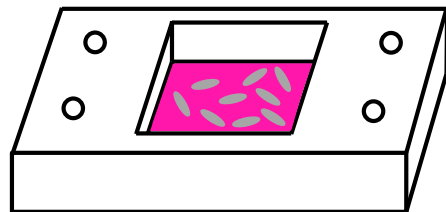
Sample preparation

Cell : MC3T3-E1 murine calvaria-derived osteoblast-like cells

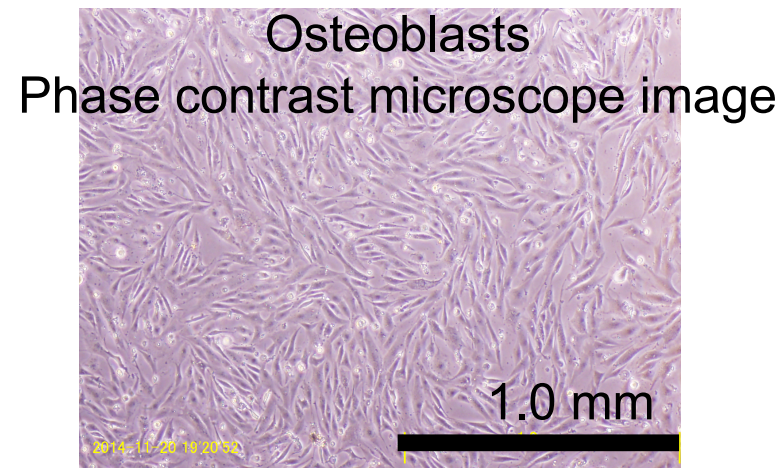
Medium : α -MEM + 10% FBS + 1% ascorbic acid + 100-
(Life technologies, Inc.) 0.2% hydrocortisone + 100 μ g/mL
2% β -glycerophosphate + penicillin-
(TakaraBio inc.) streptomycin

Coating : fibronectin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Culture condition : 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂
Chamber made of silicone (STREX Inc.) was used for cell seeding.



4 cm² Chamber

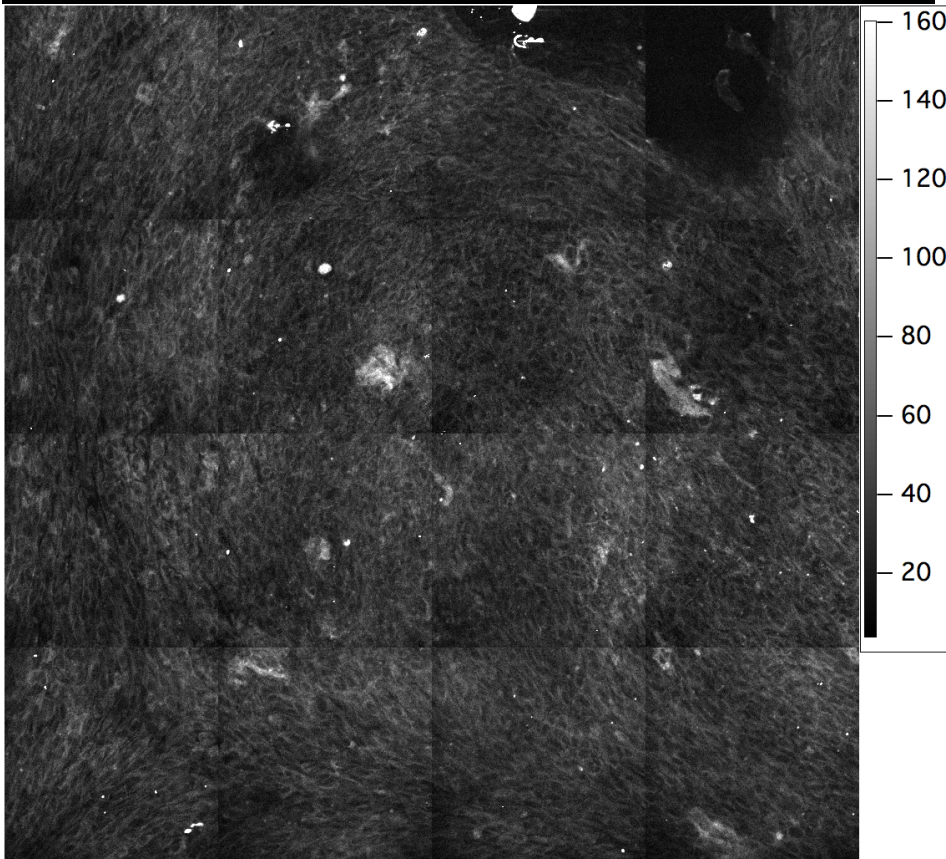


Comparison of SHG image between 110-fs light and 19-fs light

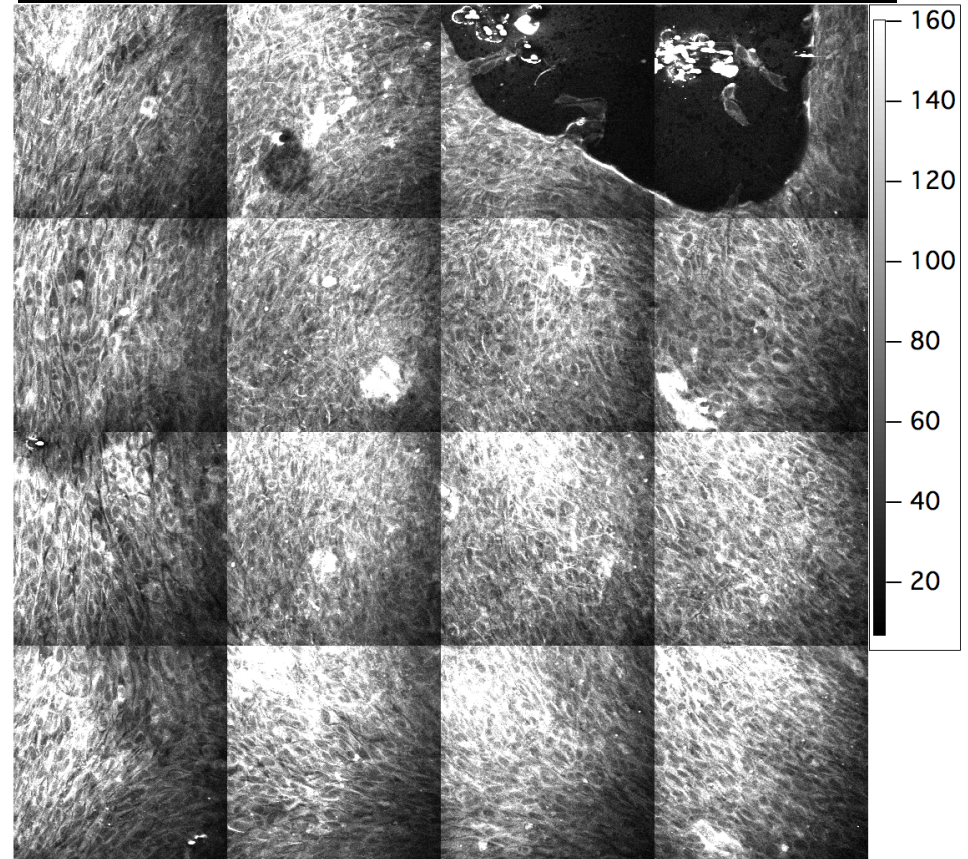
Sample: standing-cultured osteoblasts for 3 weeks

SHG image size:
1 mm*1 mm

110-fs pulse light @ 20 mW



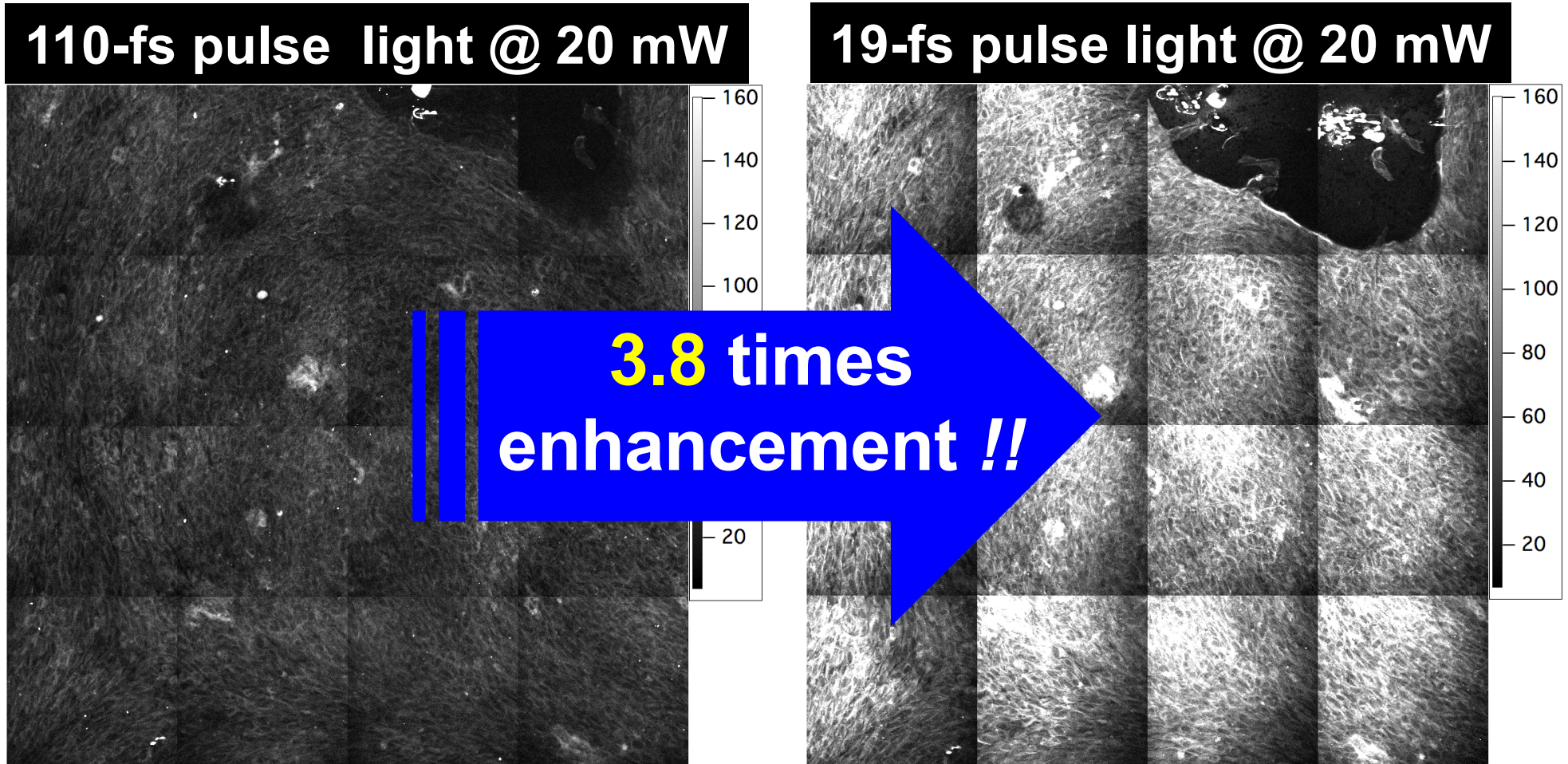
19-fs pulse light @ 20 mW



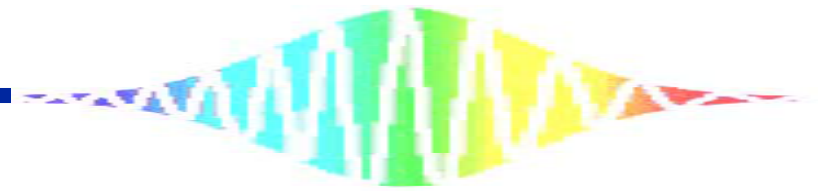
Comparison of SHG image between 110-fs light and 19-fs light

Sample: standing-cultured osteoblasts for 3 weeks

SHG image size:
1 mm*1 mm



Collagen fiber produced by cultured osteoblasts was visualized in high-contrast

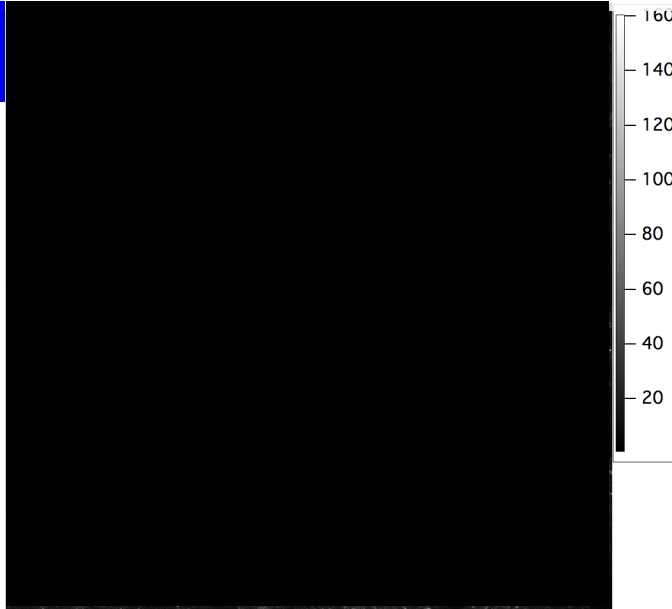


**(2) *in situ* time-lapse
imaging of collagen fiber
produced by cultured
osteoblasts **in the same
sample****

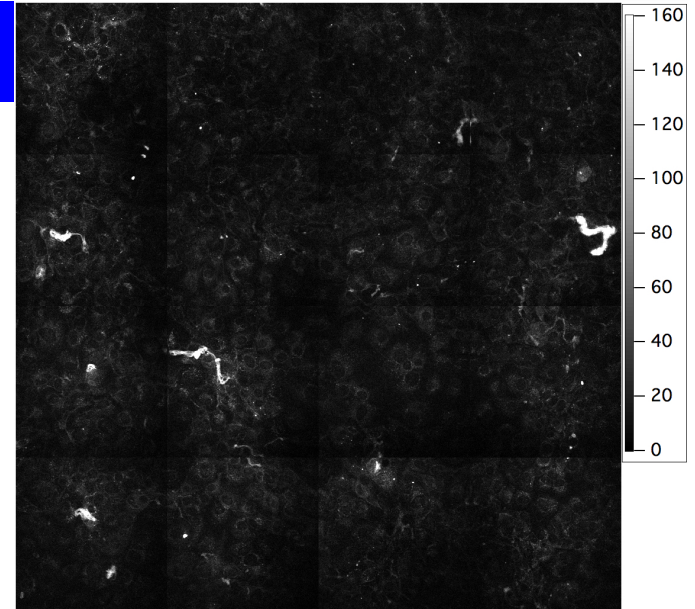
SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast **in same sample**

SHG image size:
1 mm*1 mm

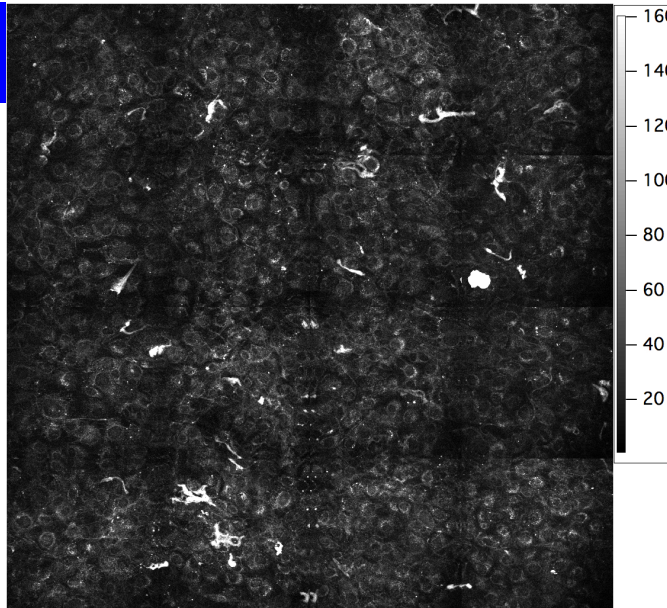
day 0



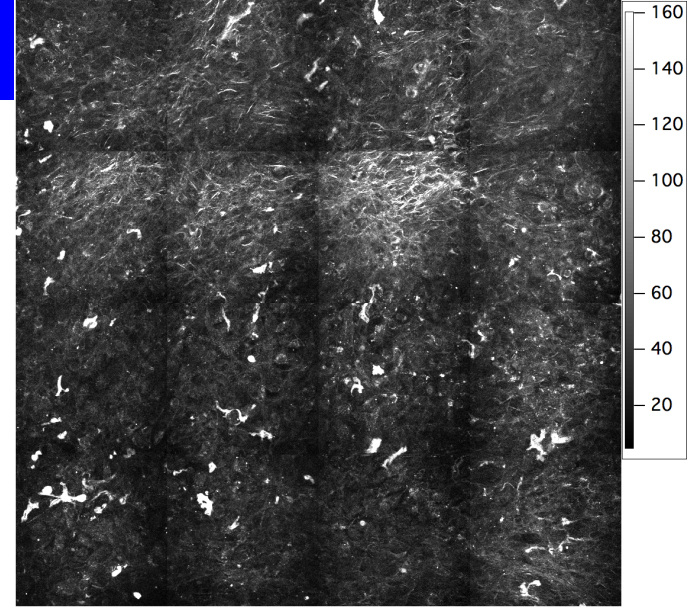
1 week



2 weeks



3 weeks



Tokushima University
SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast

day 0



1 week

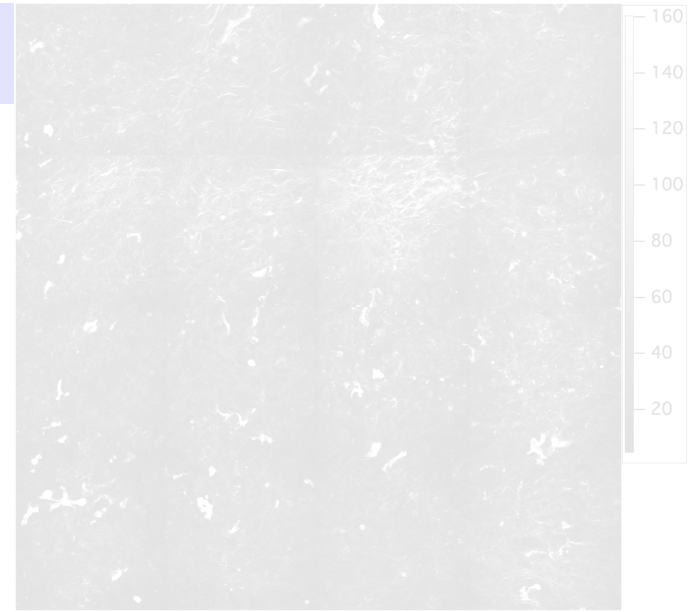


2 w

No SHG light because of no collagen



3 weeks



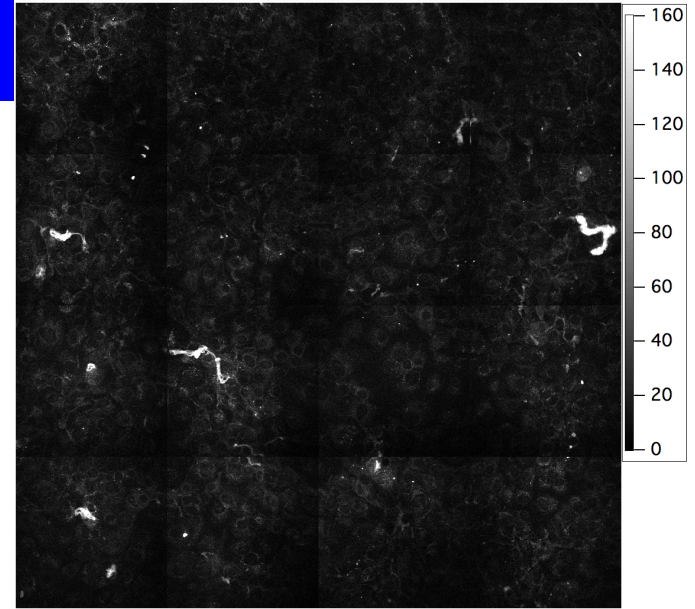
Tokushima University

SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast

day 0



1 week



2 weeks

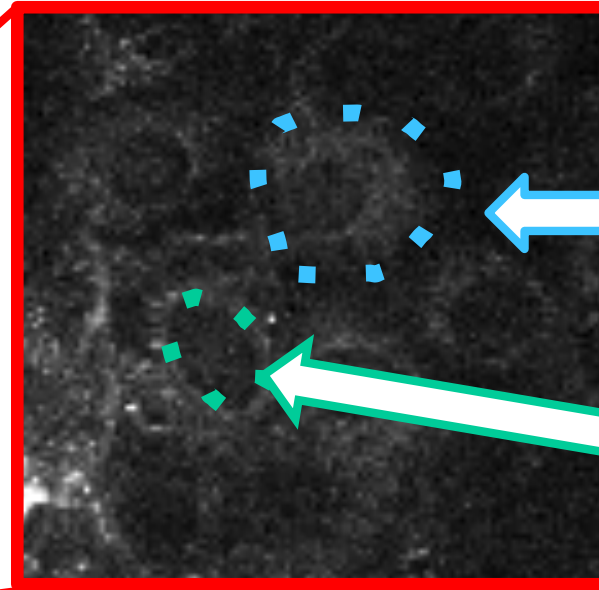
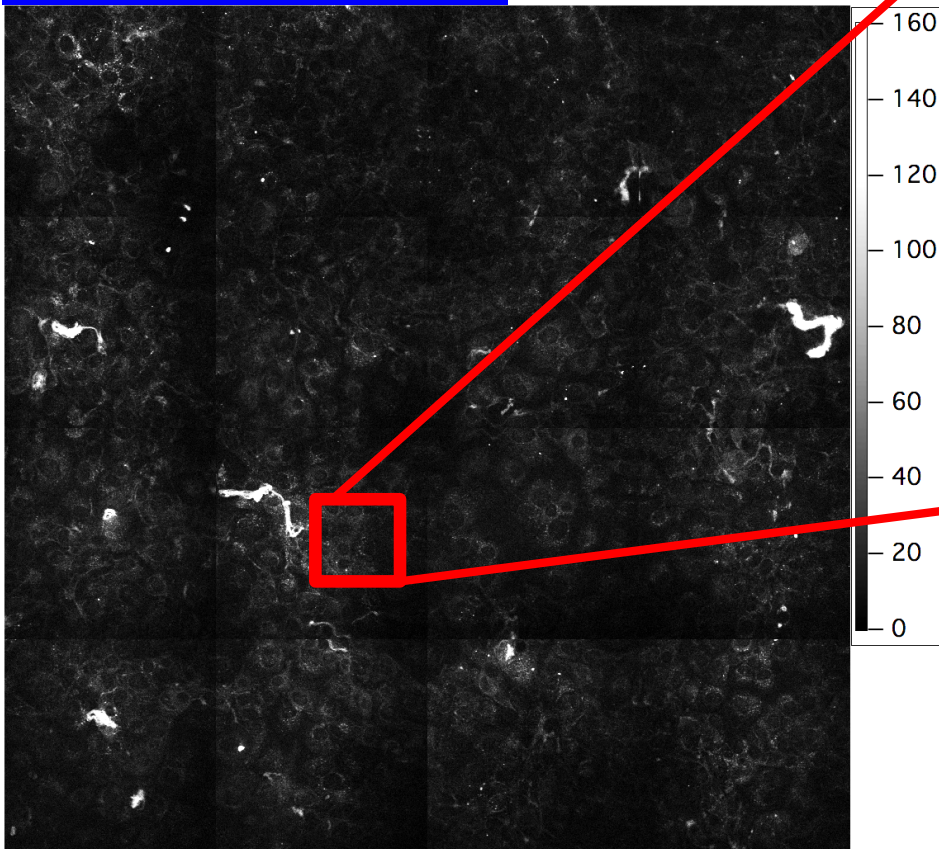


3 weeks



SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast: 1 week cultured

SHG images



SHG image size:
1 mm*1 mm

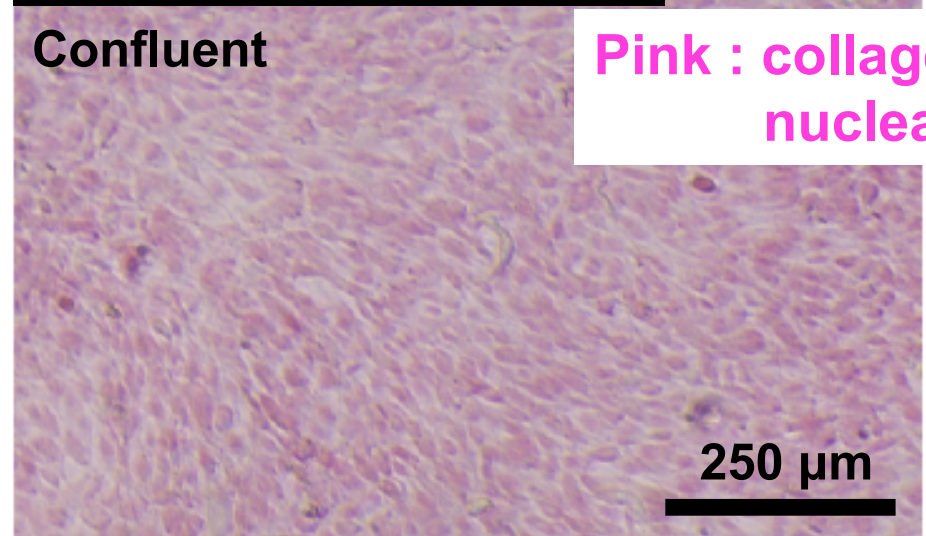
cell
(SHG appear)

nuclear
(No SHG)

Sirius-Red-stained image

Confluent

Pink : collagen
nuclear



Collagen distributes
into the cells except
the nuclear

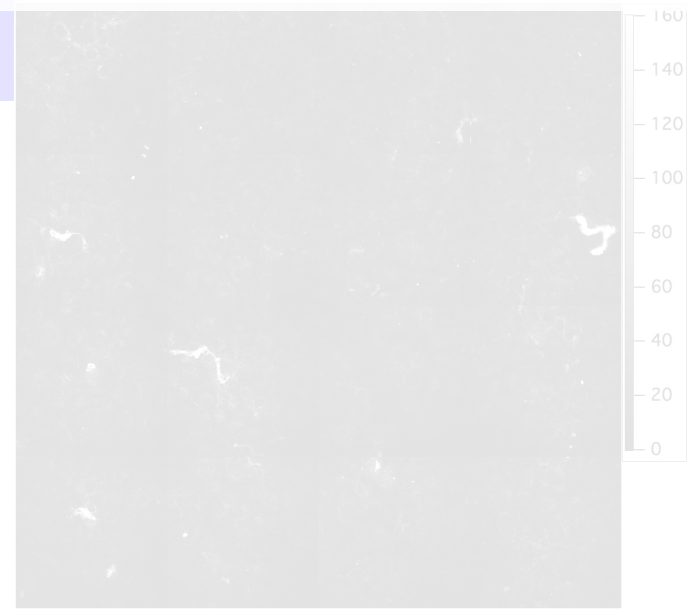
Tokushima University

SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast

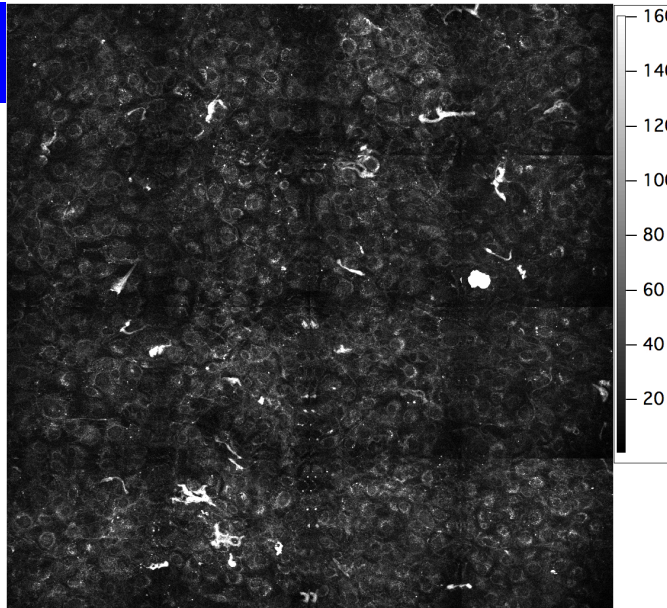
day 0



1 week



2 weeks

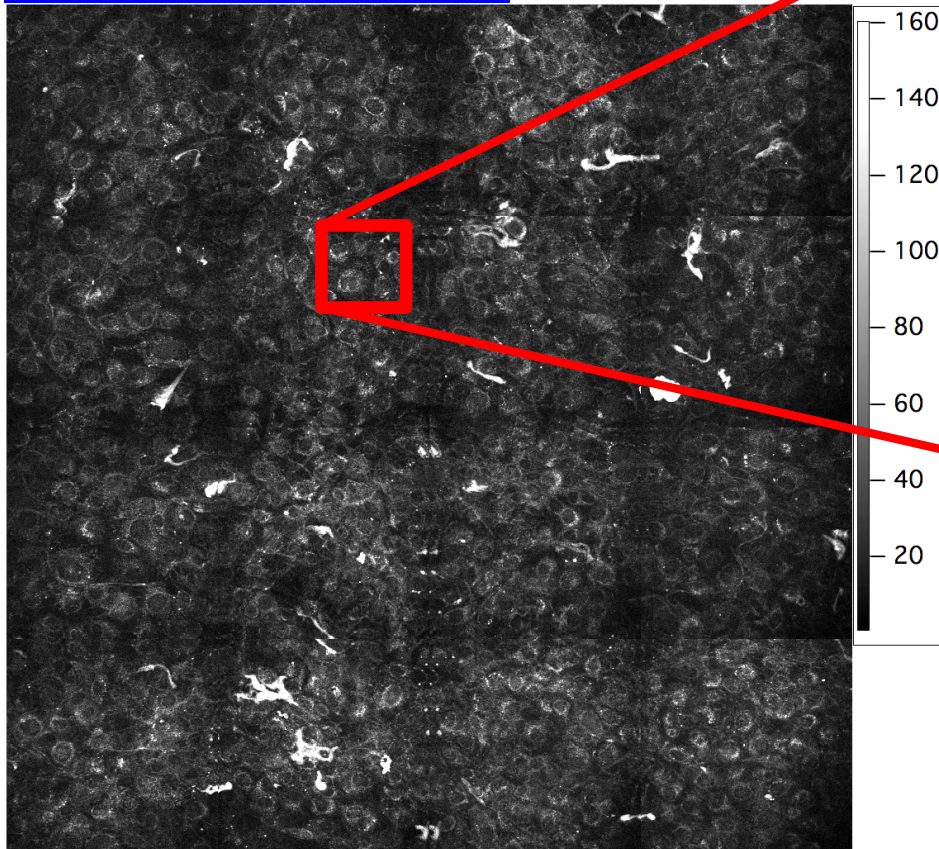


3 weeks

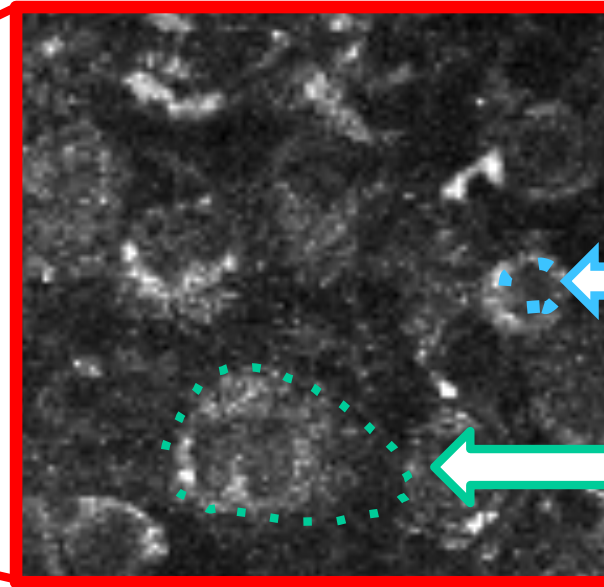


SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast: 2 weeks cultured

SHG images



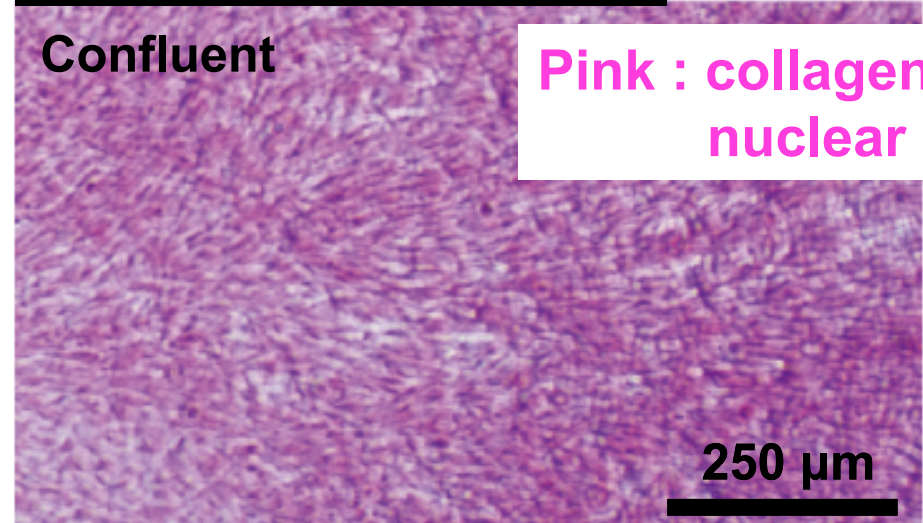
SHG image size:
1 mm*1 mm



Sirius-Red-stained image

Confluent

Pink : collagen
nuclear



Increased density of
collagen fiber inside cells

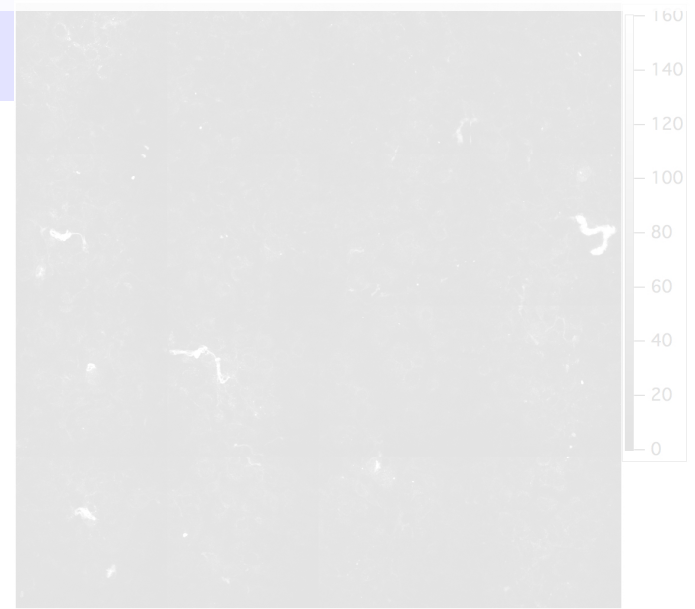
Tokushima University

SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast

day 0



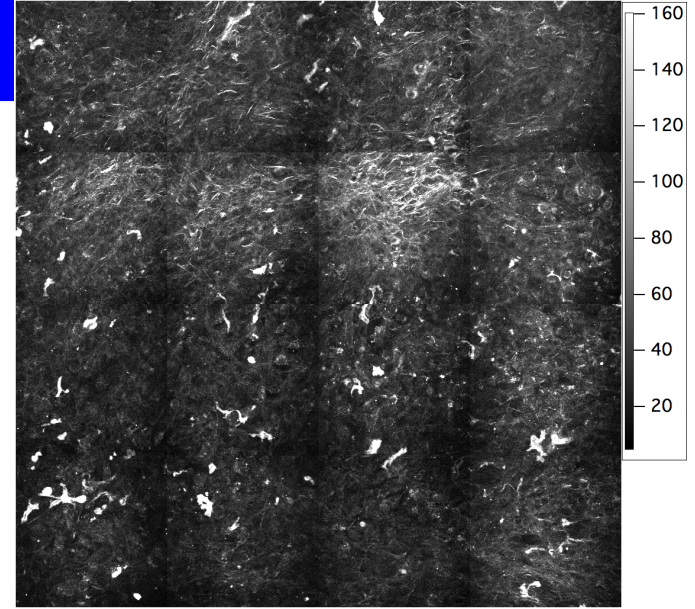
1 week



2 weeks

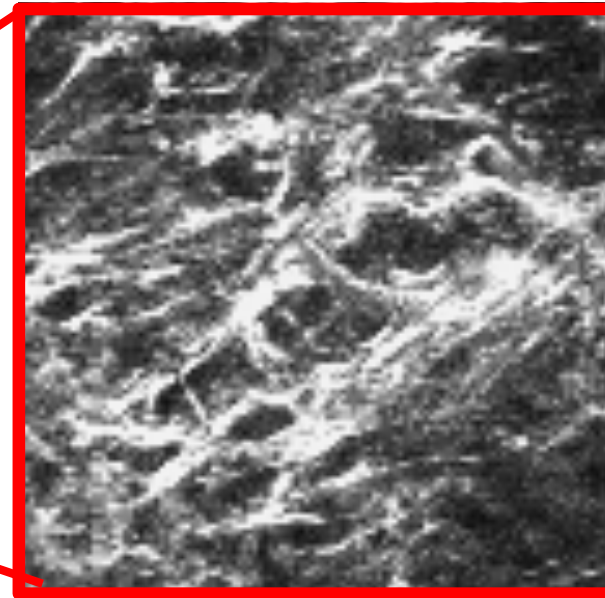
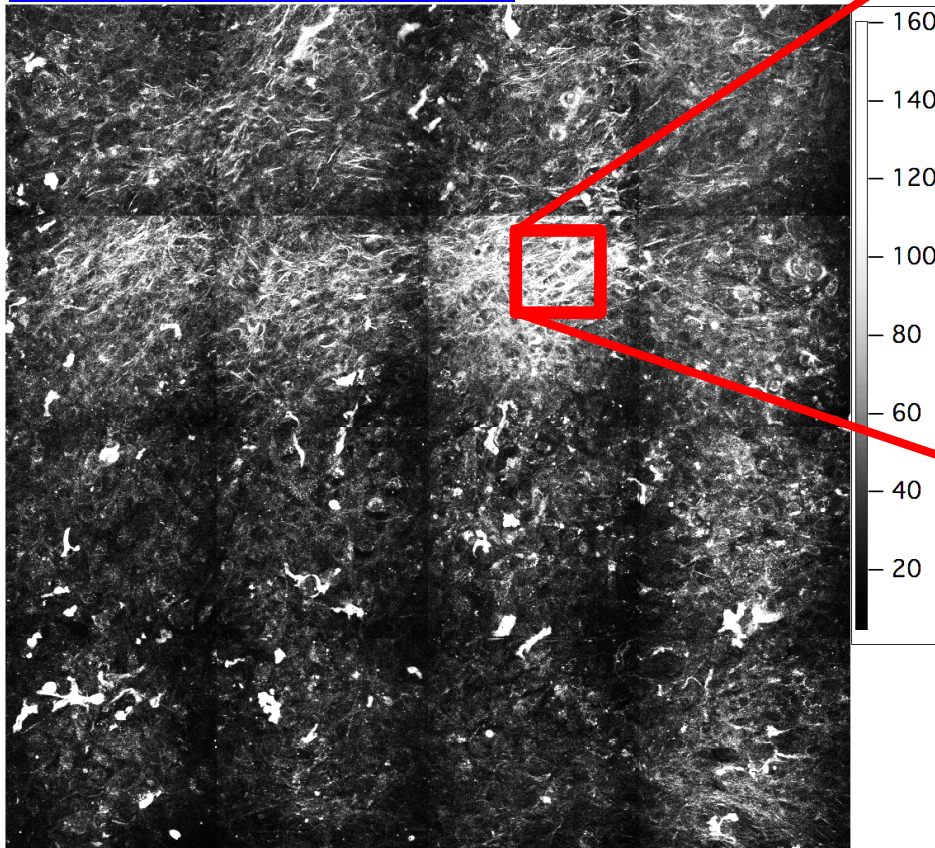


3 weeks



SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast: 3 weeks cultured

SHG images

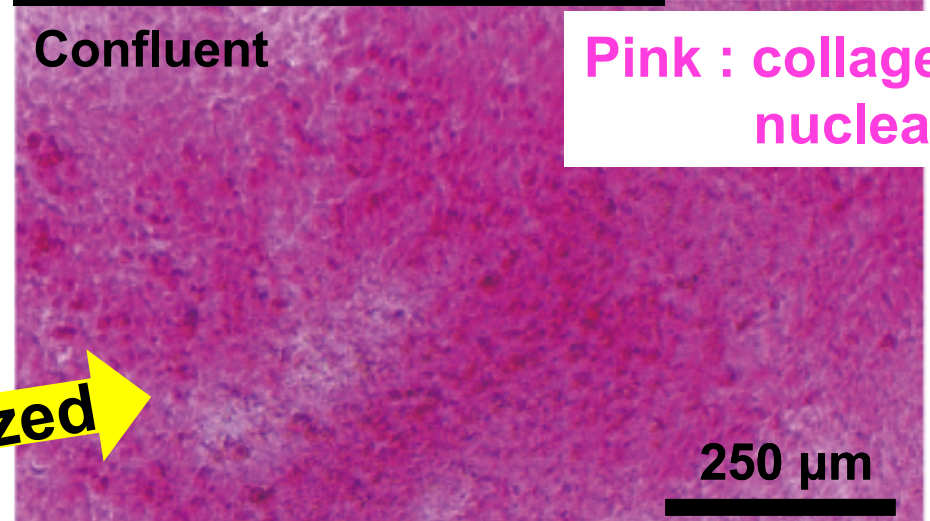


SHG image size:
1 mm*1 mm

Sirius-Red-stained image

Confluent

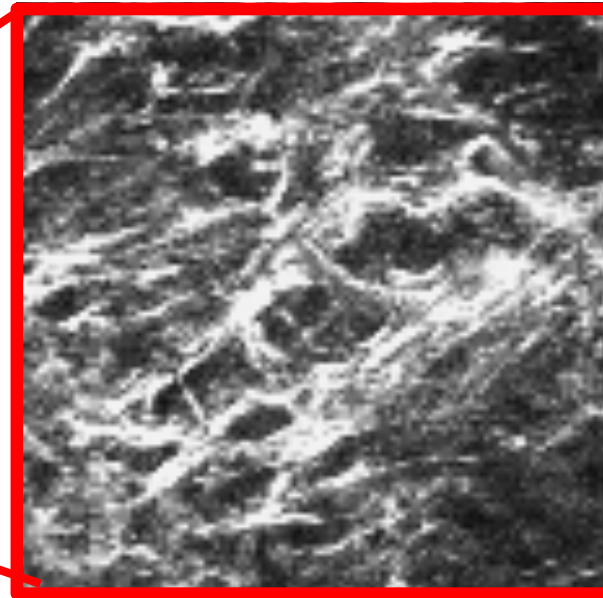
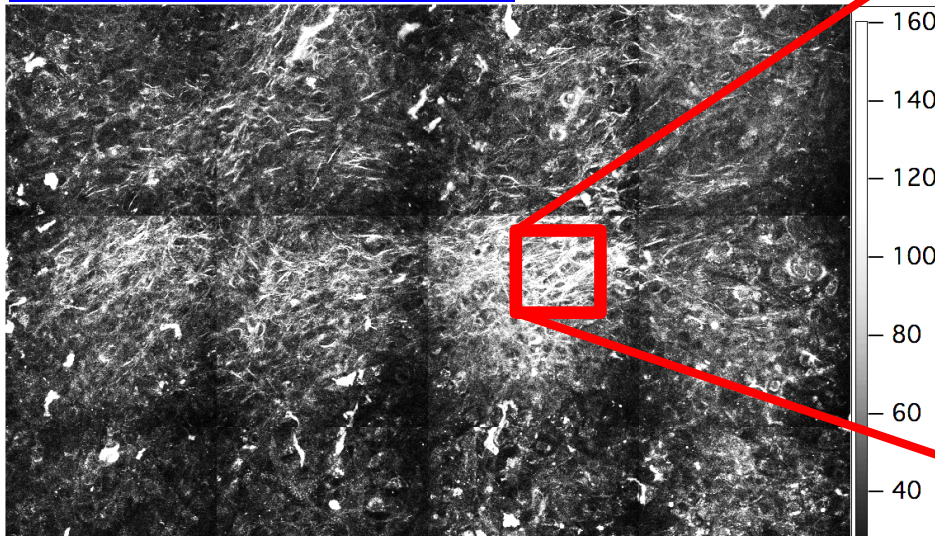
Pink : collagen nuclear



Thin collagen fiber structure appears ~~not visualized~~

SHG images of collagen fiber produced by cultured osteoblast: 3 weeks cultured

SHG images

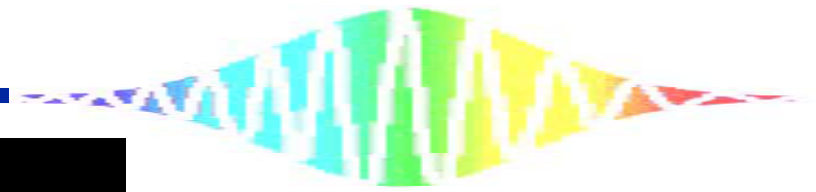


SHG image size:
1 mm*1 mm

Temporal changes of the collagen fiber distribution produced by osteoblasts were visualized with high image contrast.

T

Structure appears

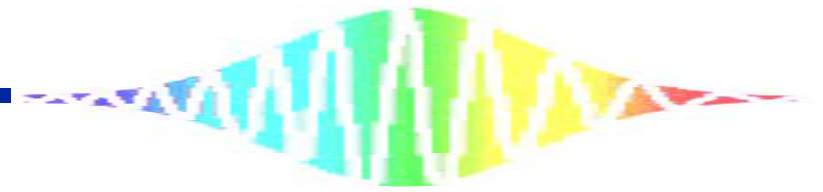


Conclusion

- Sensitive SHG-M using a 19-fs pulse light
- 3.8-times enhancement of SHG light compared with SHG-M using 110-fs pulse light
- Collagen produced by the cultured osteoblasts (Low $\chi^{(2)}$) was visualized with high contrast
- *in situ* time-lapse imaging **of the same sample**

Future plans

- *in situ* monitoring of collagen synthesis and calcification process under mechanical stress application aimed at bone tissue engineering



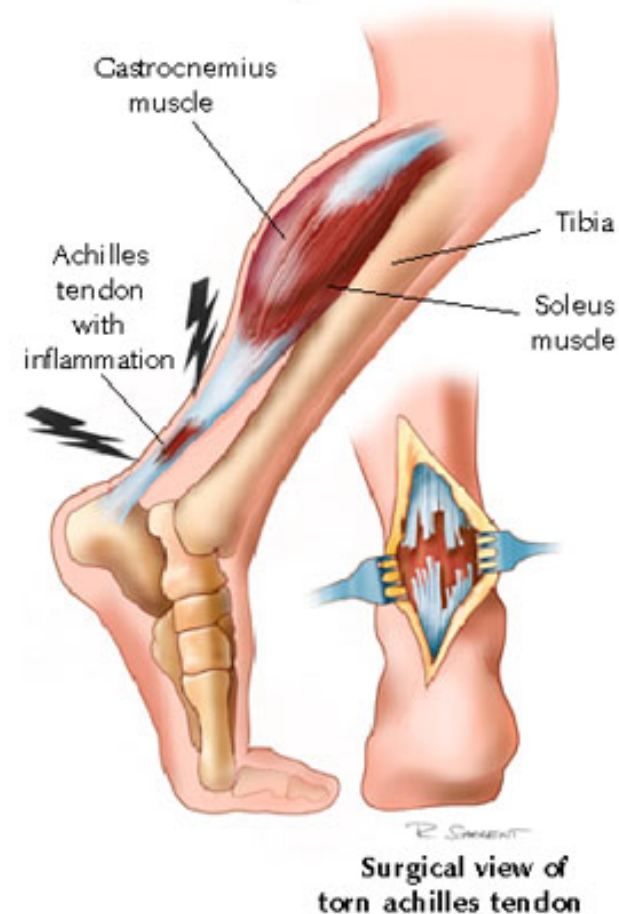
2. 腱修復における組織学・力学的修復評価

代表的な腱損傷（アキレス腱断裂）

殆どにおいて、
強い張力により断裂する

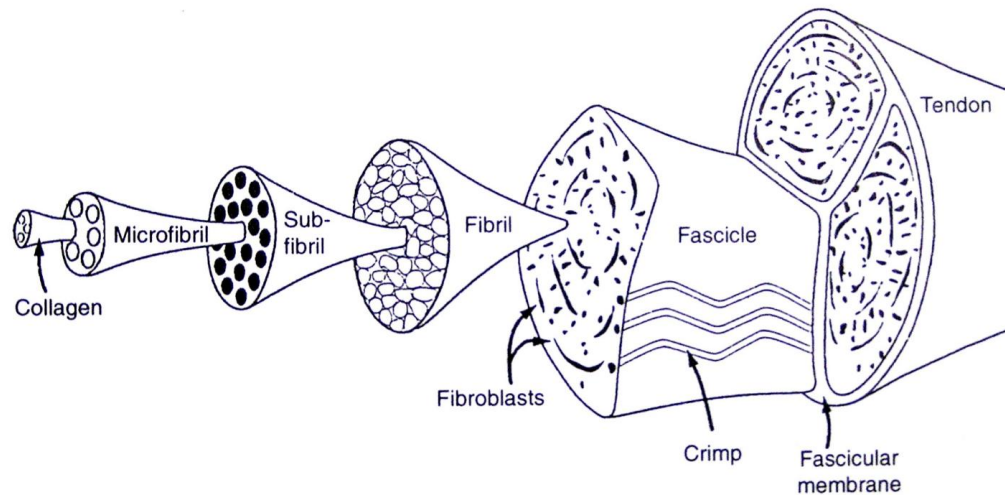


Side view of lower leg



腱損傷後の修復は、時間を要する、
または不完全で終わることが多い

腱の構造と修復過程



構成要素

(i) 細胞

腱細胞
腱芽細胞

(ii) 細胞外基質

コラーゲン ~80wt%
エラスチン 2 wt% など

腱の修復過程や治療に必要な期間は未解明な点が多い

腱の修復過程

腱の損傷

- 断端において細胞が増殖

瘢痕組織の形成

- 肉芽組織が成長
- 構成要素は type3コラーゲン
- 線維径: type3 < type1

見かけ上の癒合

- 損傷後 4 ~ 6 週
- 瘢痕組織により癒合
- 力学的特性が悪い

コラーゲンの合成と分解

- type3 ▶ type1へ
- 配向性・力学的特性が良くなっていく

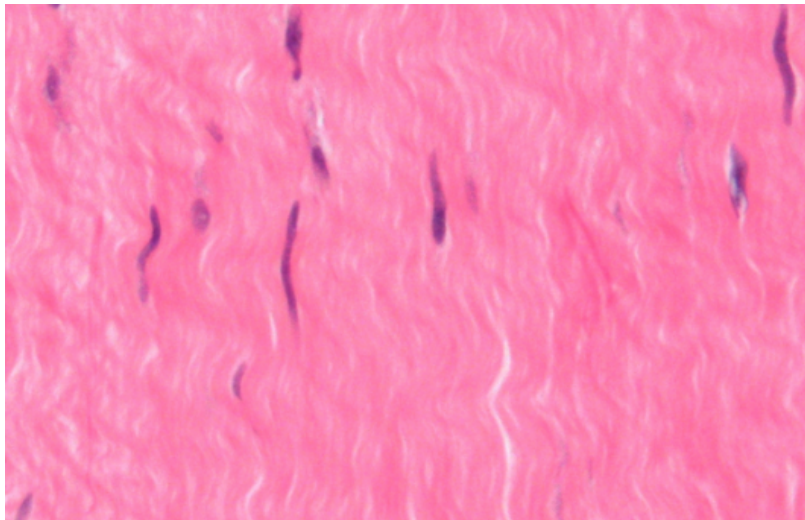
腱の修復では、**力学的特性の回復**が最終的な目標

👉 **コラーゲン動態**が重要な役割を持つ

従来の腱修復評価手法

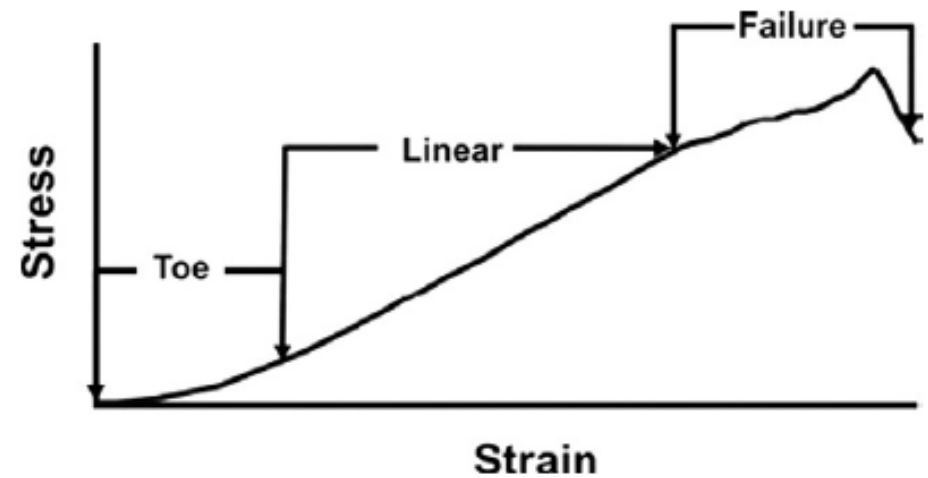
染色法：組織学的所見

腱切片の染色像, ピンク：コラーゲン



引張試験：力学的特性

腱の応力-ひずみ曲線



破壊的手法

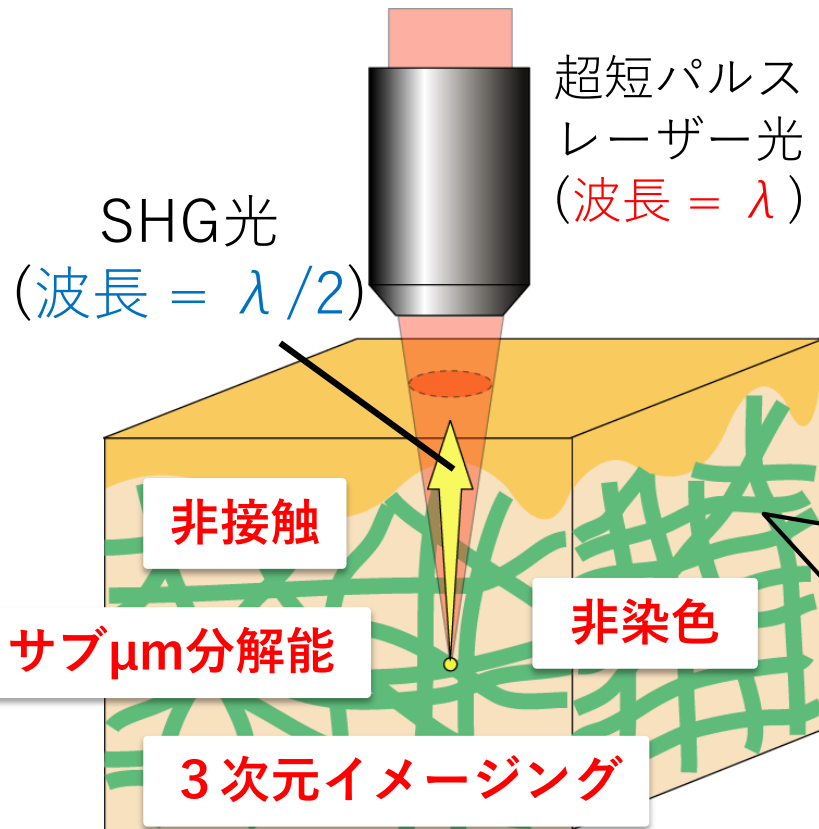
同一個体の組織学的所見と力学的特性を同時に得ることは不可能

生体コラーゲンSHG顕微鏡

Ref) Appl. Opt. 43, 2861 (2004); J. Biomed. Opt. 9, 259-264 (2004); Appl. Opt. 48, D88 (2009).

SHG (第2高調波発生)

超短パルス光を、非中心対称性の物質に入射した際、半波長 (周波数が2倍) の光が発生する現象



例

コラーゲン分子



非中心対称性構造



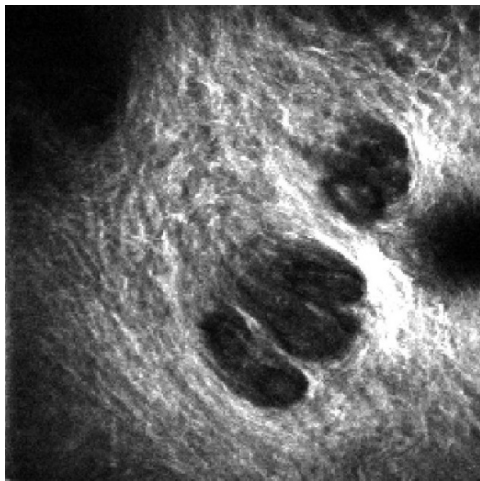
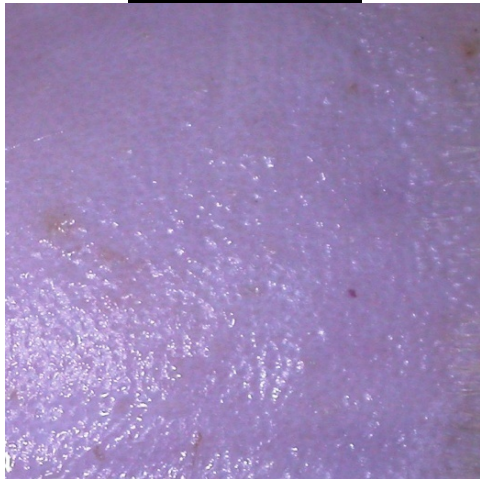
SHG光の発生源

コラーゲンを生きたありのまままで可視化
同一個体の時系列モニタリングが可能

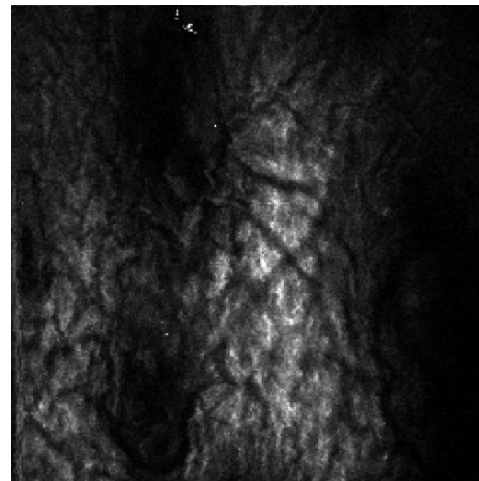
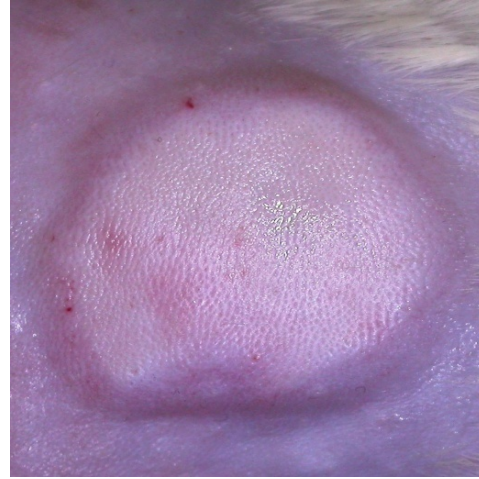
先行研究：熱傷治癒過程のSHGイメージング

長谷他, 『SHG (第2 高調波発生光) 顕微鏡を用いた熱傷 治癒過程における真皮コラーゲン動態の可視化』, *Optics & Photonics Japan* 2012, 25aA4, 2012年.

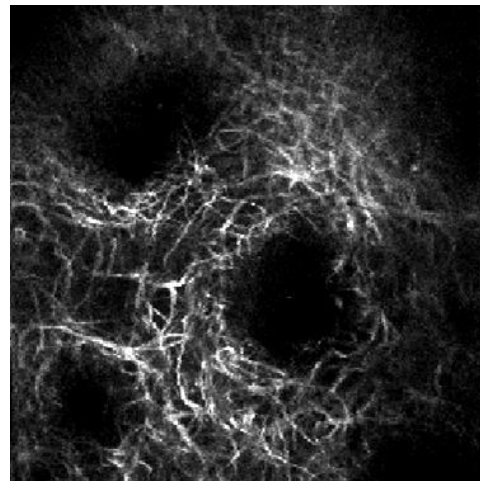
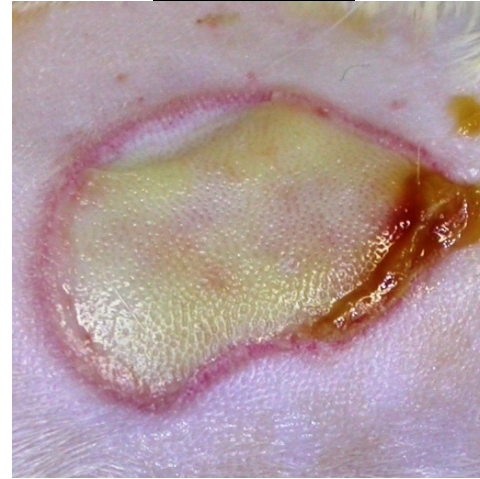
control



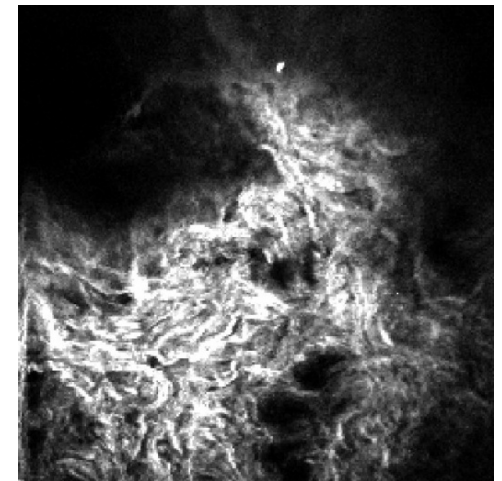
熱傷作製直後



7日後



14日後



損傷コラーゲンの分解、コラーゲン新生と成熟化を可視化

SHG顕微鏡を用いた腱修復評価

生体コラーゲンSHG顕微鏡

SHG画像

コラーゲン線維分布

組織学的所見

SHG光強度

コラーゲン濃度
構造成熟度
(高次構造)

力学的特性

組織学的所見と力学的特性を非侵襲に同時取得
同一個体で腱修復過程の時系列モニタリング

研究目的と本研究の内容

研究目的

SHG顕微鏡を用いて，腱修復過程における組織学的所見と力学的特性変化を同一個体で時系列でモニタリングする

本研究の内容

正常サンプルサンプルおよび腱修復サンプルを用いて，SHGイメージングと引張試験結果の整合性を同一個体で確認する

実験サンプル：兔腱断裂モデル

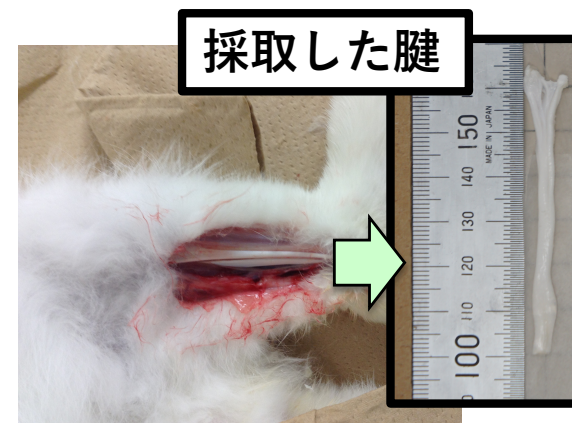
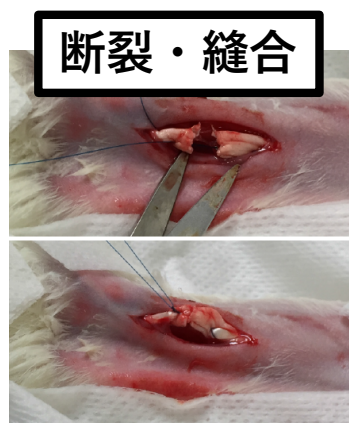
徳島大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施（承認 NO: 徳動物12133）

動物モデル・・・白色家兔（幼若，手術時月齢3～4か月，2～2.5 kg）

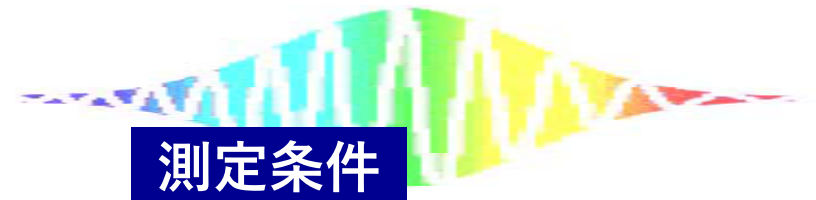
動物実験プロトコル

麻酔 ➡ 断裂 ➡ 縫合 ➡ 飼育 ➡ 採取 ➡ 冷凍保存 ➡ SHG

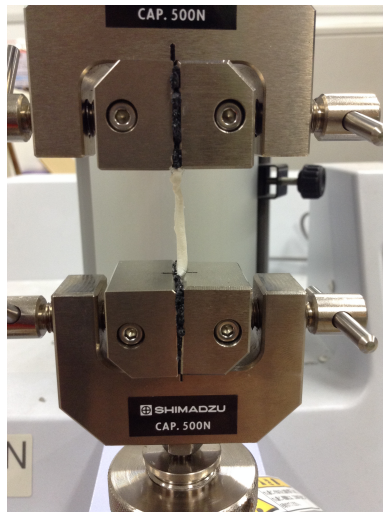
- ・ 注射麻酔下で外科用メスを用い，後足屈筋腱を鋭利に断裂させ，縫合した．
- ・ 創部をギプスで保護した後，断裂作成後4週間目に採取し，冷凍保存した．
- ・ 手術した足の腱を修復サンプル，反対側を正常サンプルとして用いた．
- ・ 室温で解凍し，速やかにSHGイメージングを行った．



実験装置



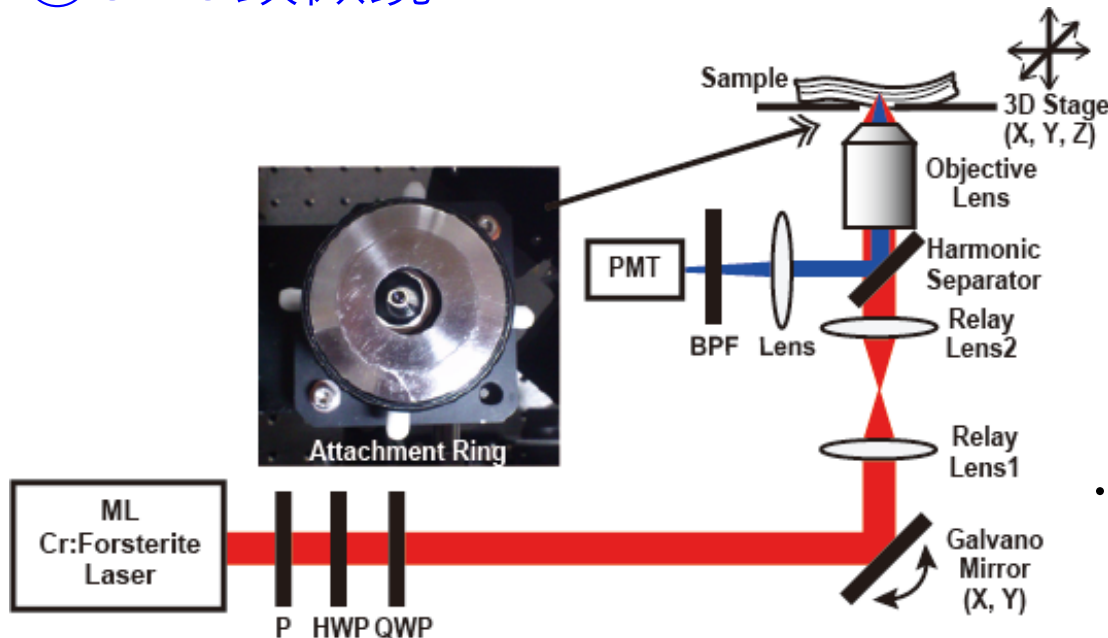
①引張試験



- ・ 卓上引張試験機（島津製作所，EZ-S）を用いる。
- ・ サンプル厚さを直交2方向から測定し，
楕円近似により断面積を算出す
- ・ 負荷速度2 cm/minにて試験を行い，応力-ひずみ
曲線における線形部分の傾きにより比較する
- ・ 断面積の変化を考慮しない公称応力および
公称ひずみを用いている。

測定条件

②SHG顕微鏡



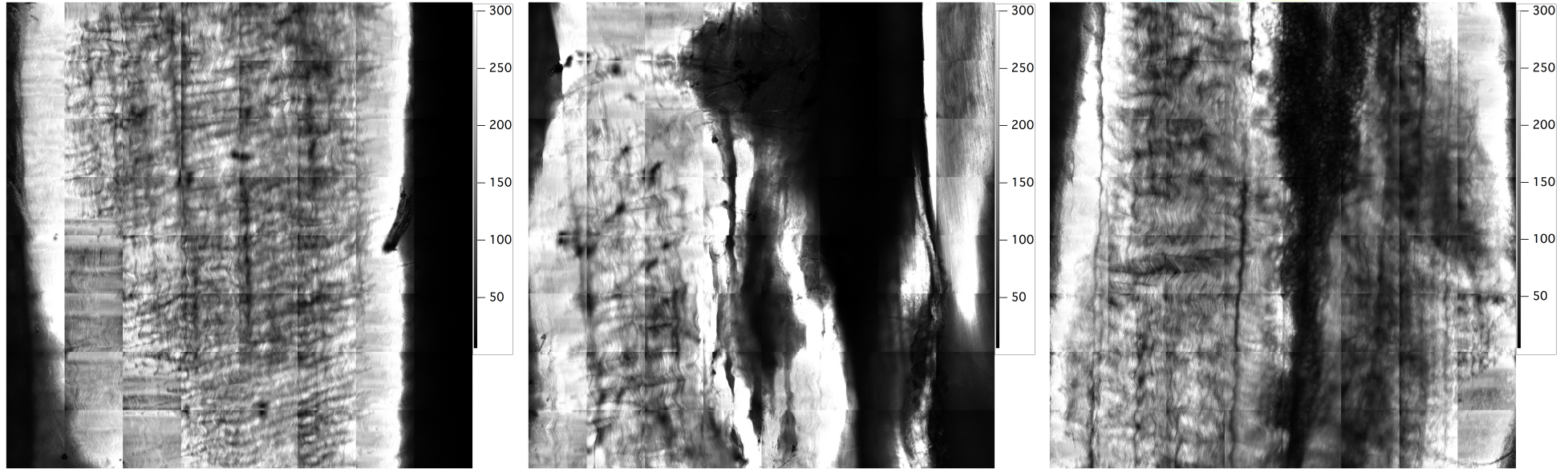
- ・ レーザーパワー：～ 20 mW
- ・ 視野：～ 400 μm \times 400 μm
- ・ イメージ取得時間：2 sec / 枚
- ・ 大面積イメージ：8*8 枚
▶ 3.2 \times 3.2 mm

- ・ サンプルの乾燥防止のため，生食プールに馴染ませてからイメージング

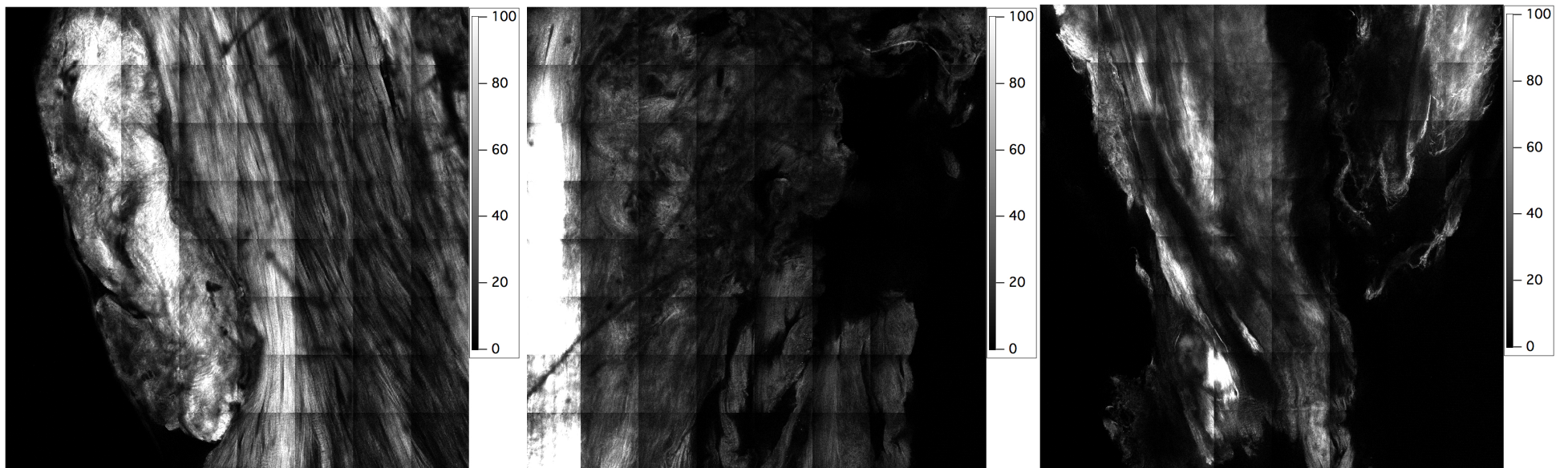
SHGイメージの比較

イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm

正常サンプル



腱修復サンプル

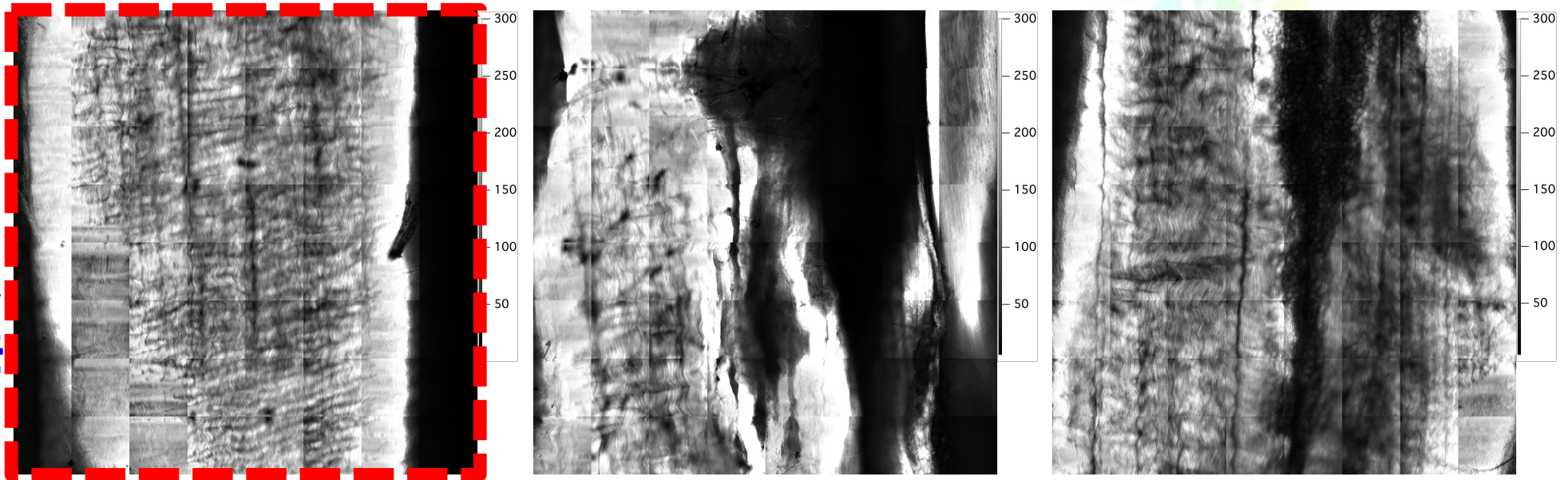


SHG光の強度に大きな相違（修復サンプルは画像コントラストを3倍強調させて表示）
☞ コラーゲンの密度や構造成熟度（修復の程度？）の違いを反映

SHGイメージの比較

イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm

正常サンプル



腱修復サンプル

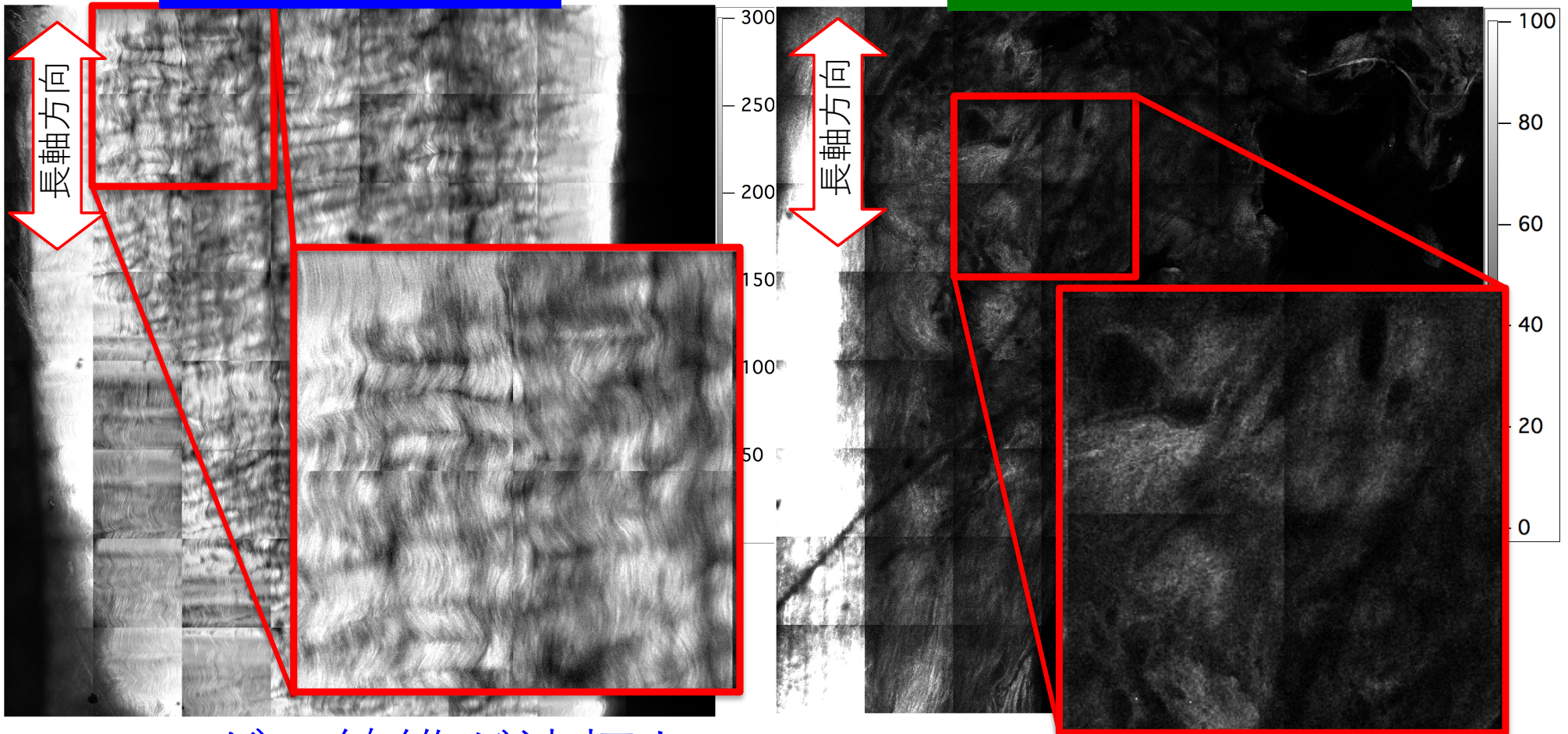


SHG光の強度に大きな相違（修復サンプルは画像コントラストを3倍強調させて表示）
☞ コラーゲンの密度や構造成熟度（修復の程度？）の違いを反映

SHGイメージの比較

正常サンプル

腱修復サンプル

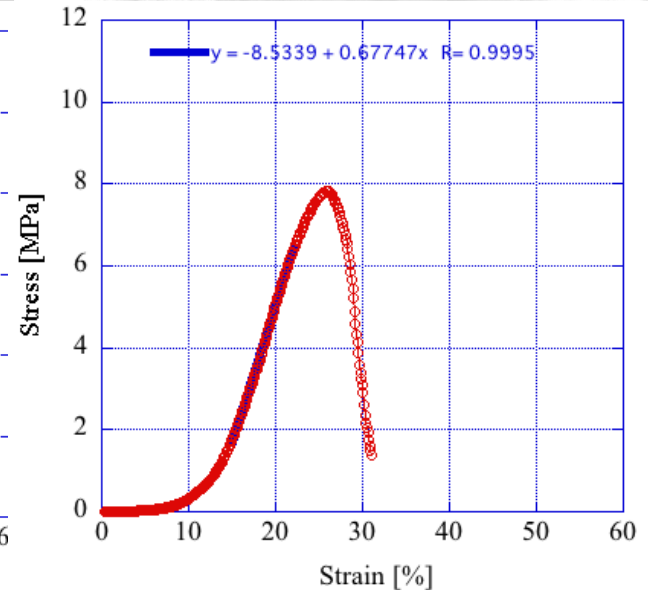
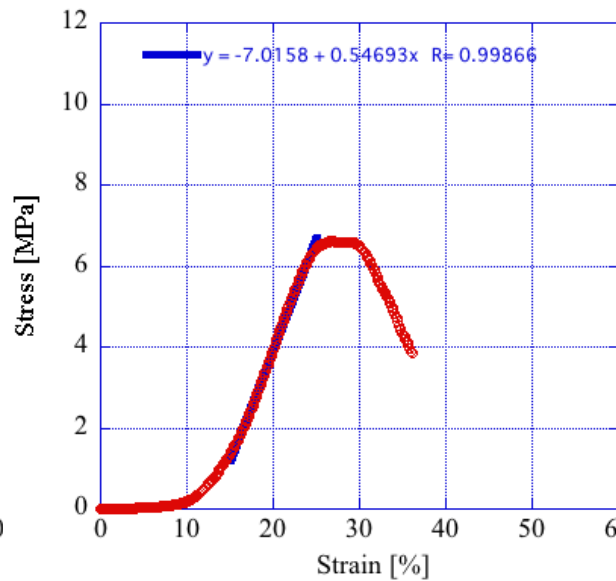
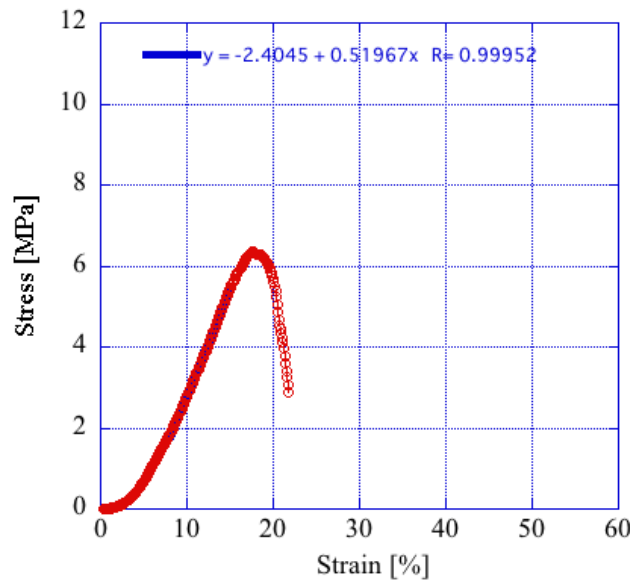
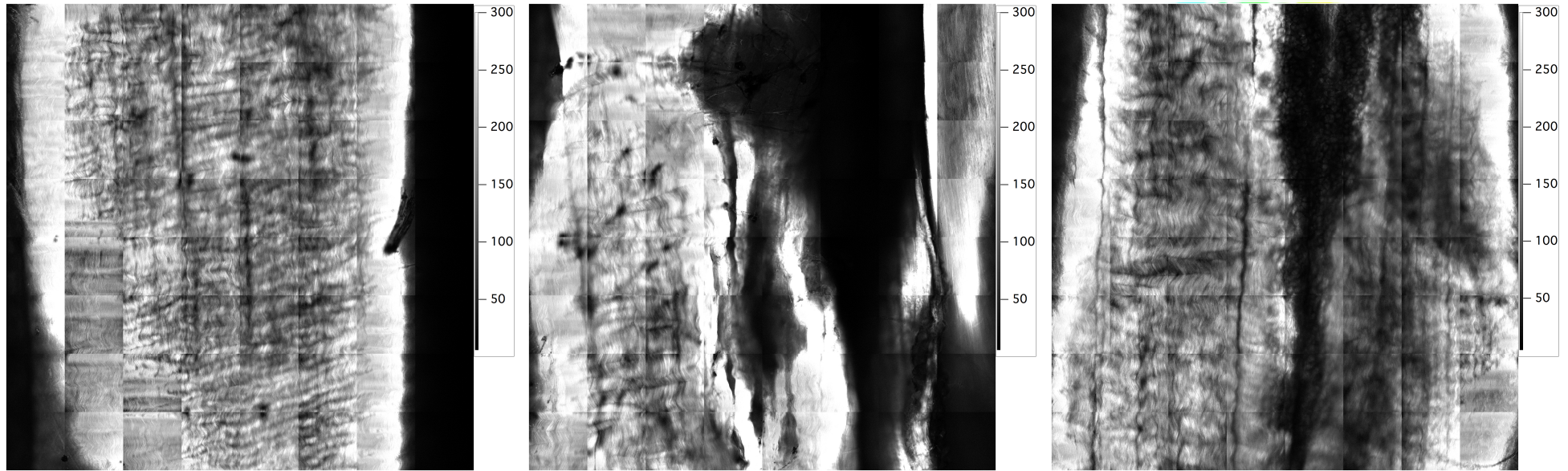


コラーゲン線維が波打ちながら縦方向に規則配向

線維分布にムラがあり、明らかに配向が揃っていない

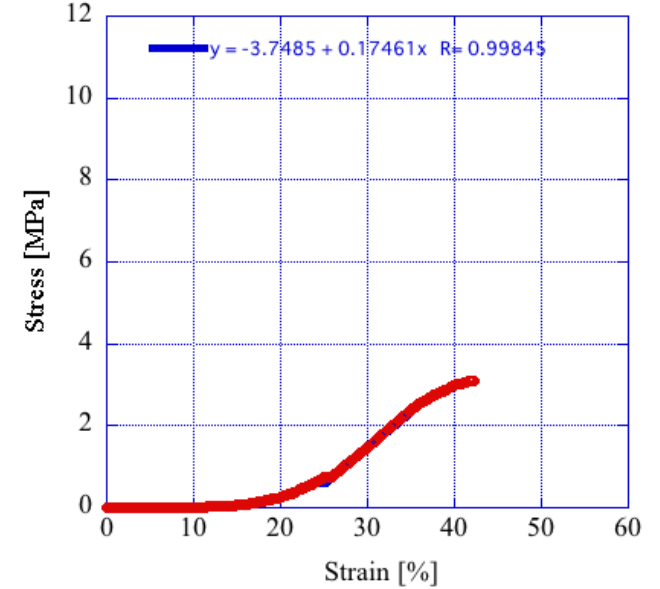
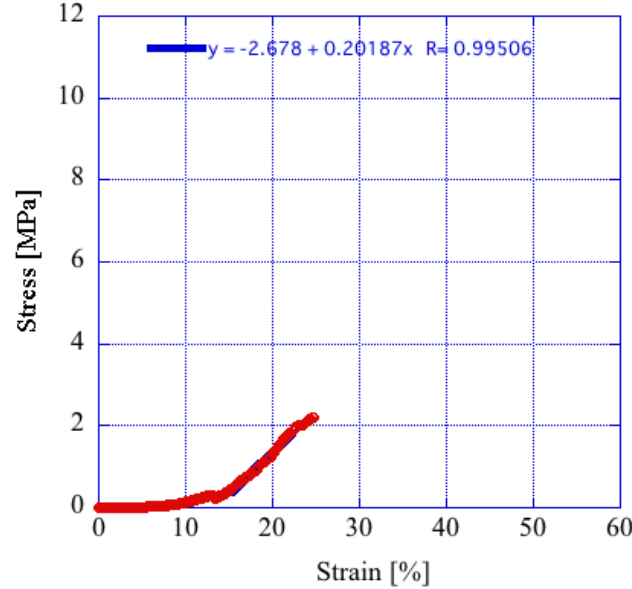
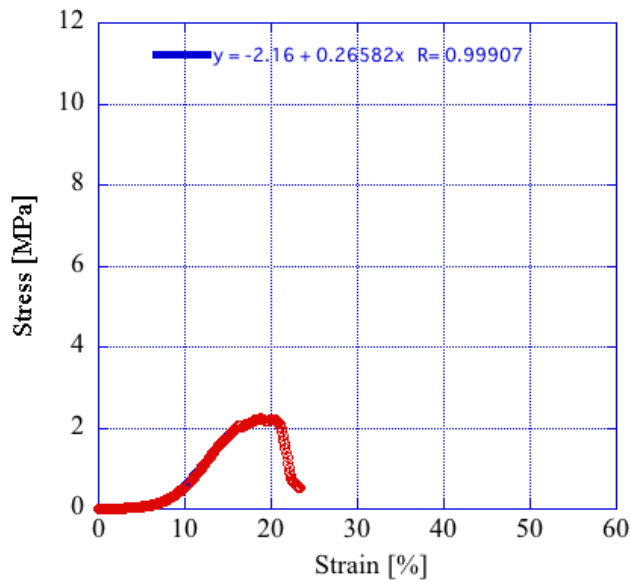
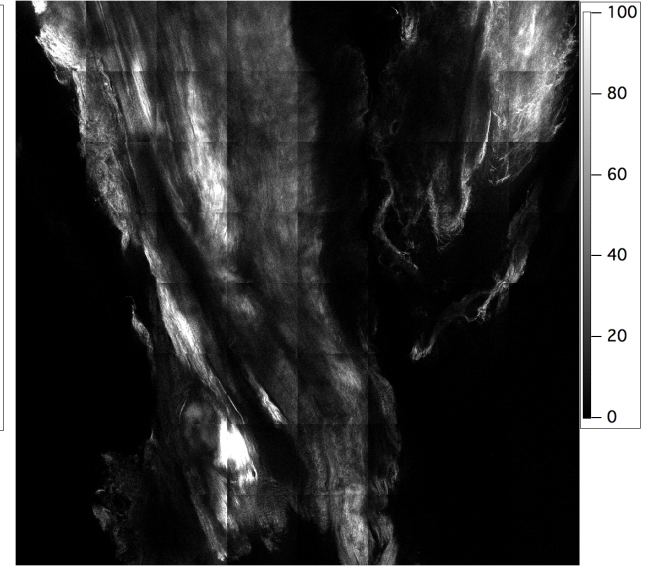
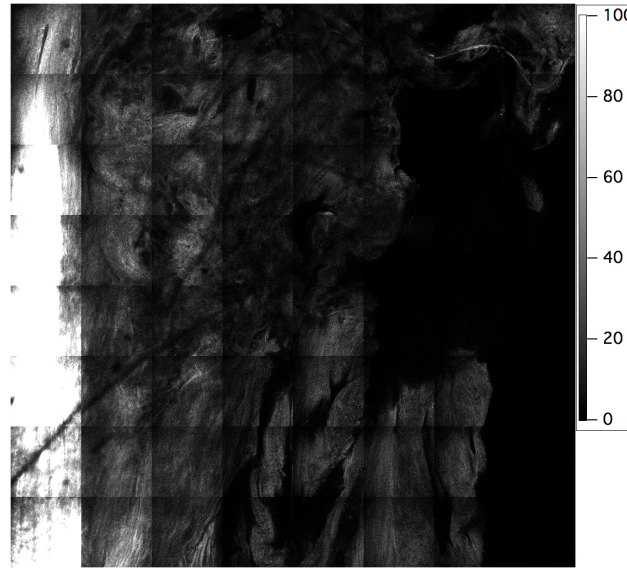
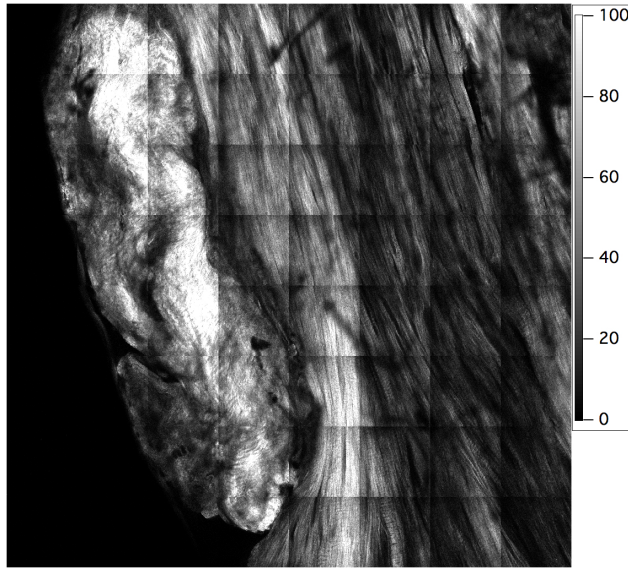
組織学的所見の違いを確認

SHGイメージと引張試験の相関 正常サンプル

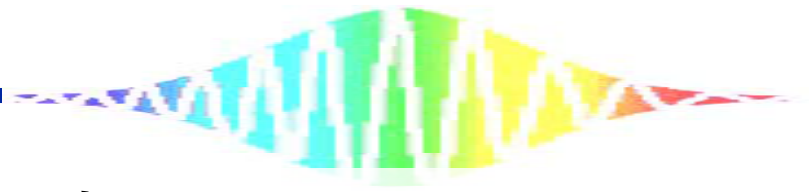


SHG光強度は強い@SHGイメージング
応力-歪み曲線の傾きが急@引張試験

SHGイメージと引張試験の相関 修復サンプル



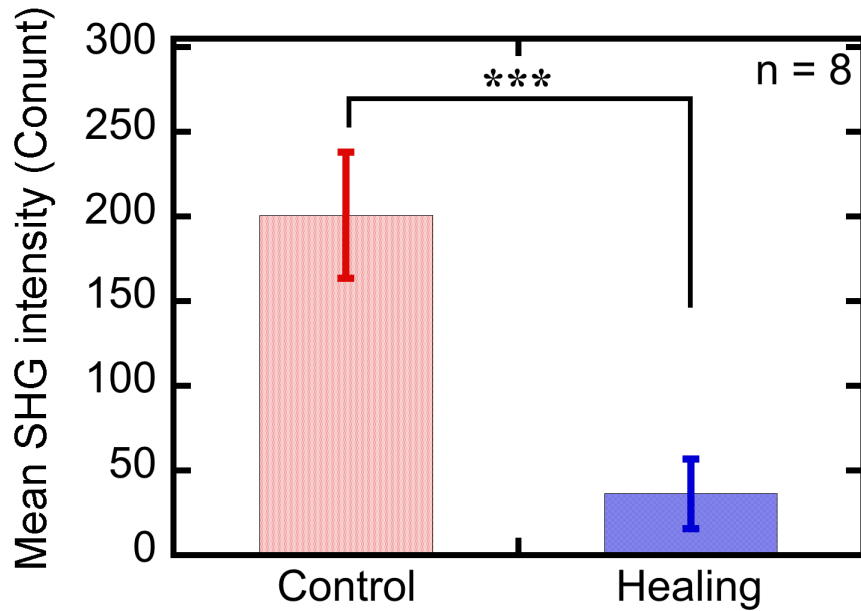
SHG光強度は弱い@SHGイメージング
応力-歪み曲線の傾きが緩やか@引張試験



統計学的解析

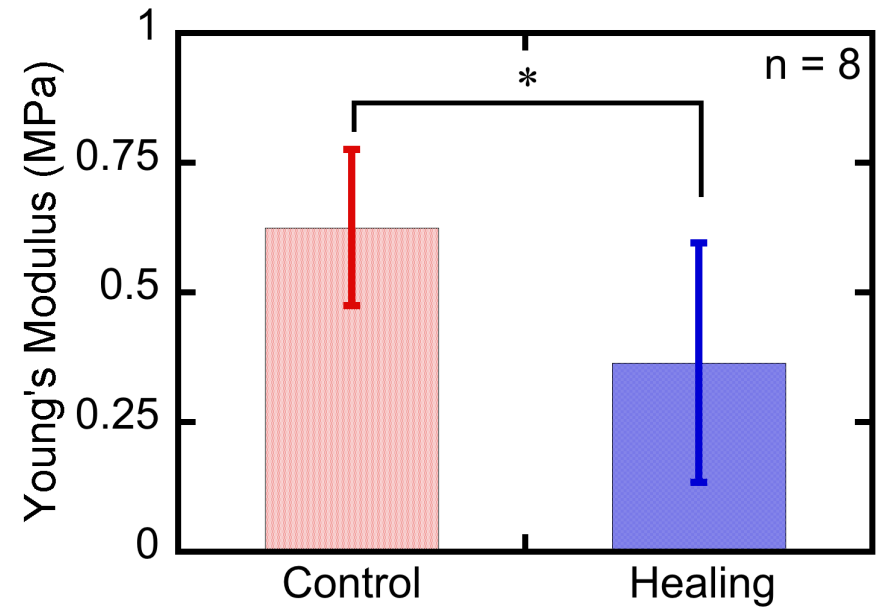
平均SHG強度

***: $p < 0.001$

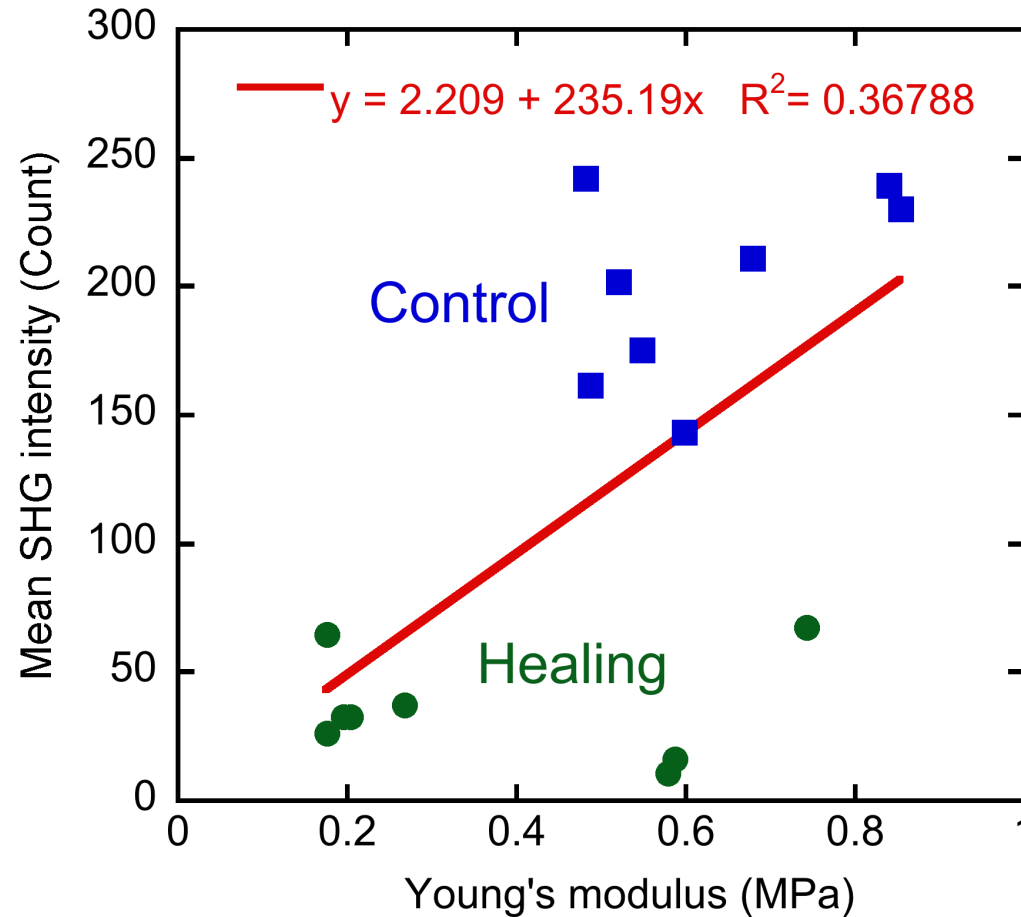


応力-歪み曲線勾配

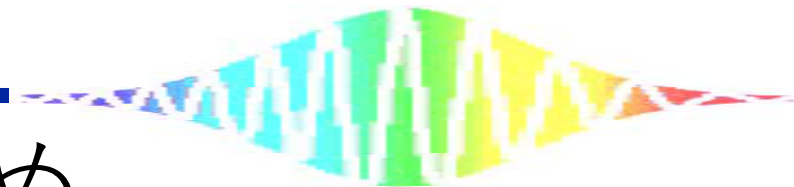
* : $p < 0.05$



平均SHG強度と応力-歪み曲線勾配の相



実験条件の影響を受けやすいSHG光強度情報の利用が相関係数を制限している？



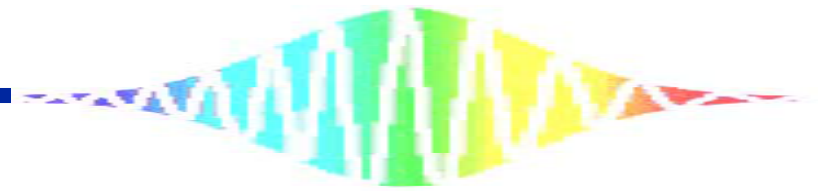
2のまとめ

比較項目	正常サンプル	腱修復モデル
平均SHG強度	強い	弱い
SHGイメージ	波打ち構造 規則的線維配列	線維分布にムラ 配向は不均一
応力-歪み曲線 の傾き	急	緩やか

平均SHG強度と応力-歪み曲線傾きに相関
($R^2 = 0.37$)

今後の予定

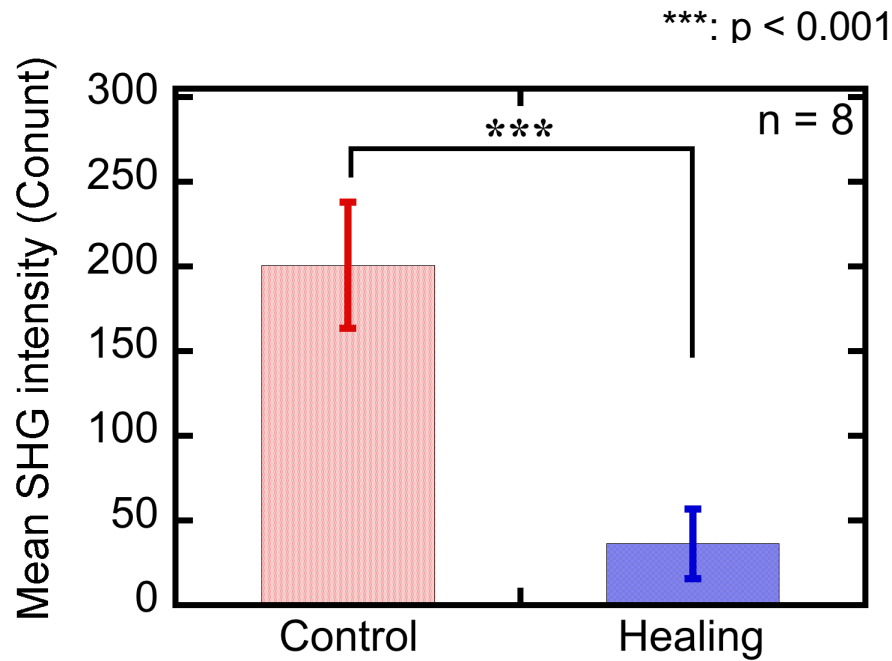
強度情報に依存しないSHGパラメーター
(偏光解析、画像解析) の利用



3. SHG画像解析を用いた腱修復評価

腱修復評価における 平均SHG強度の統計解析

平均 SHG 強度の比較



正常 v.s. 修復サンプルにおいて
有意差が見られた

光強度

- レーザー光源の強度揺らぎ
- 生体組織の光学特性（吸収, 散乱など）
- サンプルの表面状態

等の影響を受けやすいため、
再現性の高い評価パラメーターとは必ずしも言えない



SHG光強度とは独立した
評価パラメーターの利用が好ましい

2D-FTによる画像解析

実験サンプル：兔腱断裂モデル

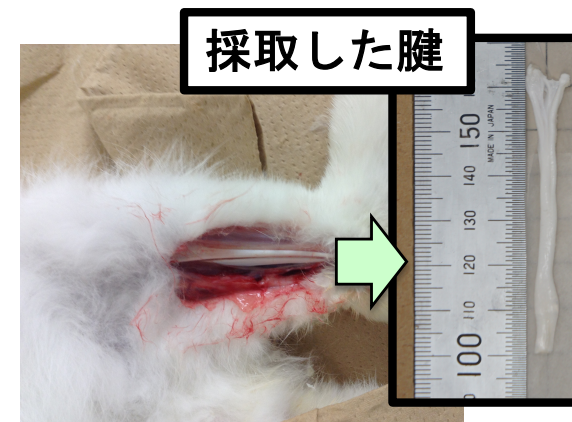
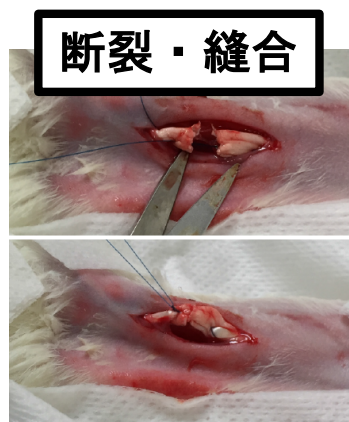
徳島大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施（承認 NO: 徳動物12133）

動物モデル・・・白色家兔（幼若，手術時月齢3～4か月，2～2.5 kg）

動物実験プロトコル

麻酔 ➡ 断裂 ➡ 縫合 ➡ 飼育 ➡ 採取 ➡ 冷凍保存 ➡ SHG

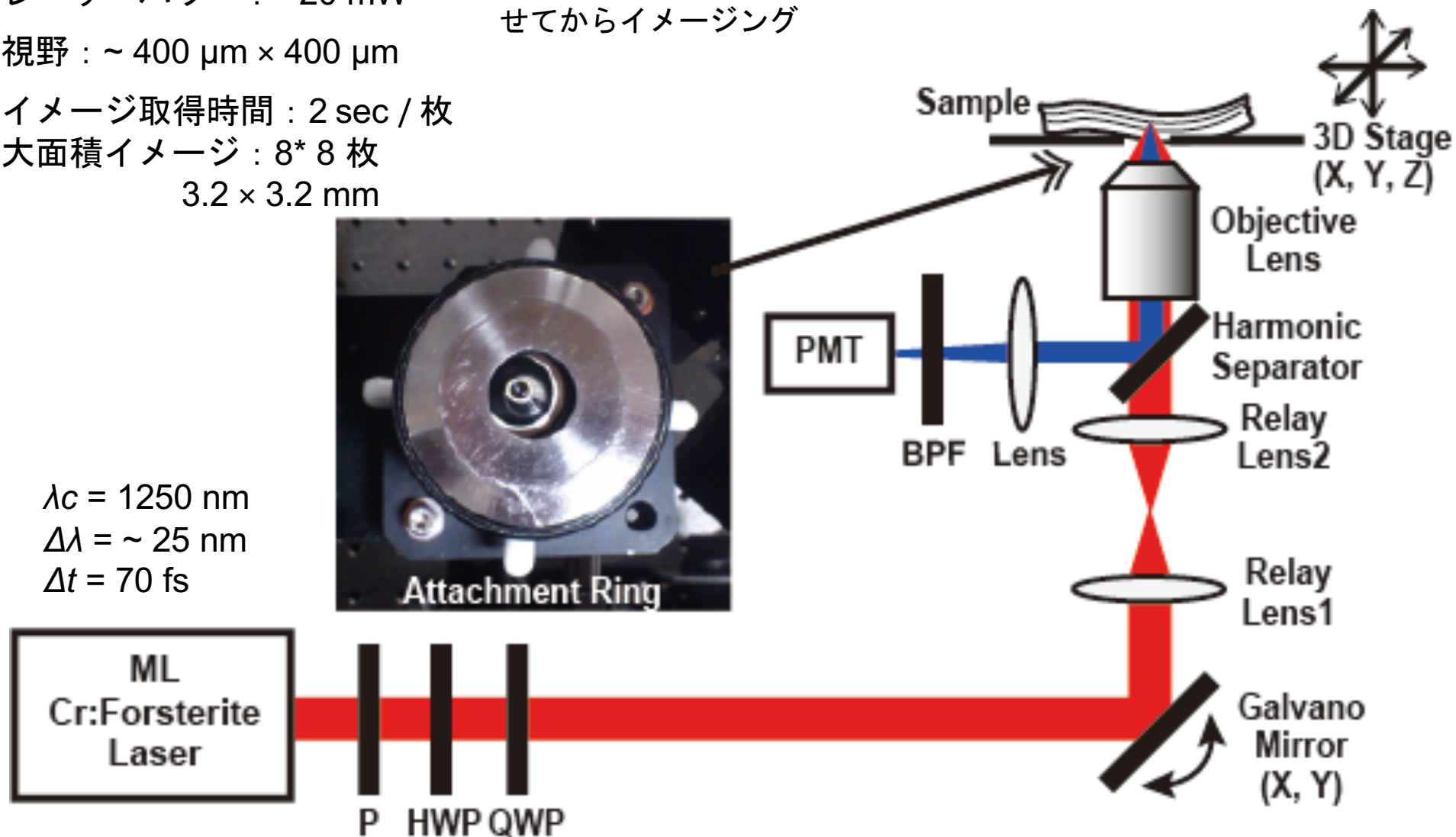
- ・ 注射麻酔下で外科用メスを用い，後足屈筋腱を鋭利に断裂させ，縫合した。
- ・ 創部をギプスで保護した後，断裂作成後4週間目に採取し，冷凍保存した。
- ・ 手術した足の腱を修復サンプル，反対側を正常サンプルとして用いた。
- ・ 室温で解凍し，速やかにSHGイメージングを行った。



SHG顕微鏡

測定条件

- ・ レーザーパワー : ~ 20 mW
- ・ 視野 : ~ 400 μm \times 400 μm
- ・ イメージ取得時間 : 2 sec / 枚
- ・ 大面積イメージ : 8*8 枚
3.2 \times 3.2 mm
- ・ サンプルの乾燥防止のため、生食プールに馴染ませてからイメージング



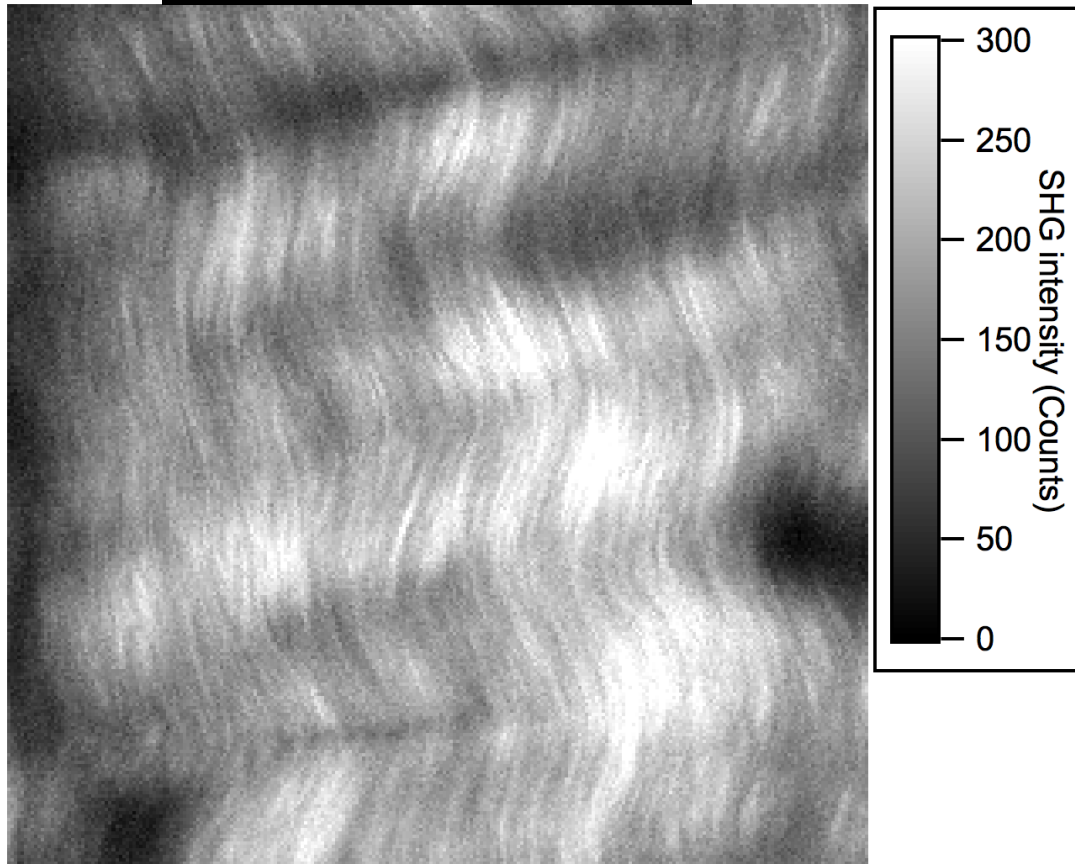
SHGイメージの画像解析

正常サンプル

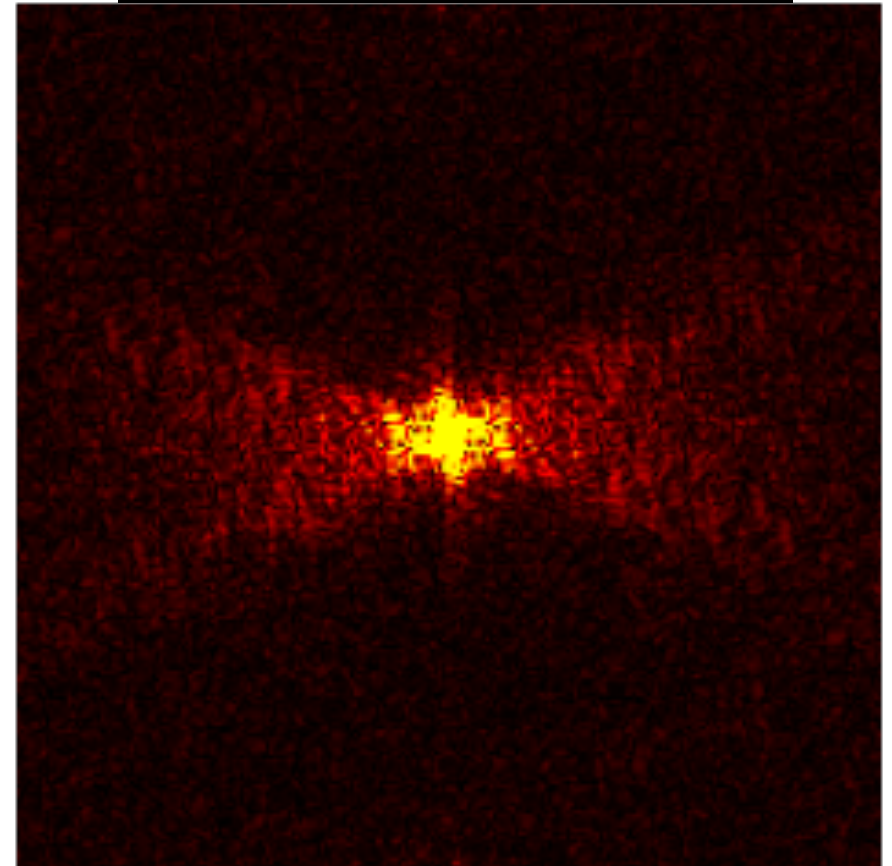
SHGイメージの2D-FTによりパワースペクトルを算出

イメージ視野：
400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



パワースペクトルでは、波打つように配向したコラーゲン線維分布に対して、それぞれ直交した θ 方向に強い振幅を持っている

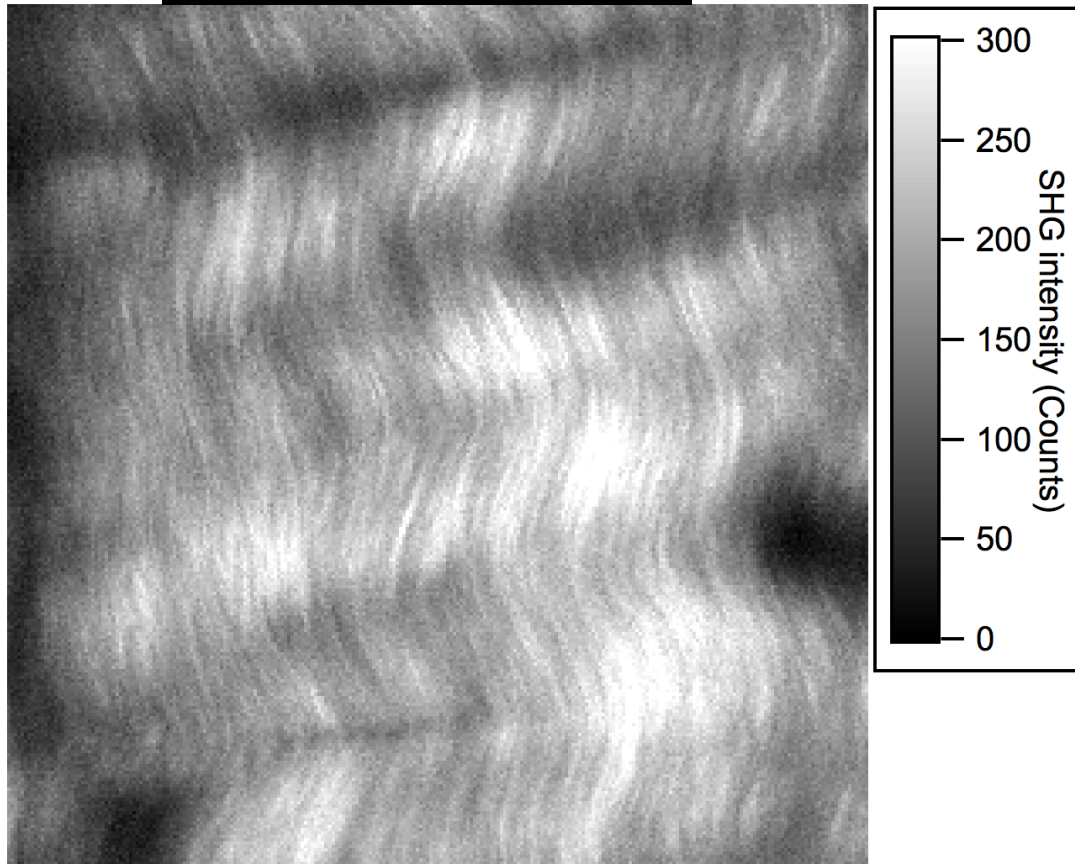
SHGイメージの画像解析

正常サンプル

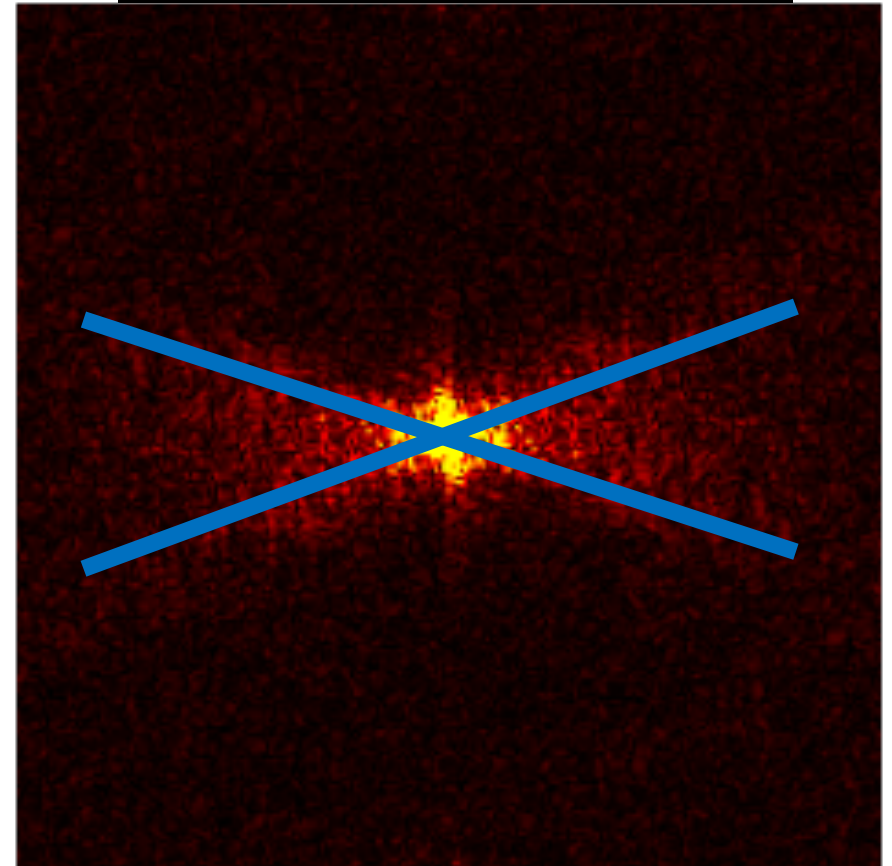
SHGイメージの2D-FTによりパワースペクトルを算出

イメージ視野：
400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



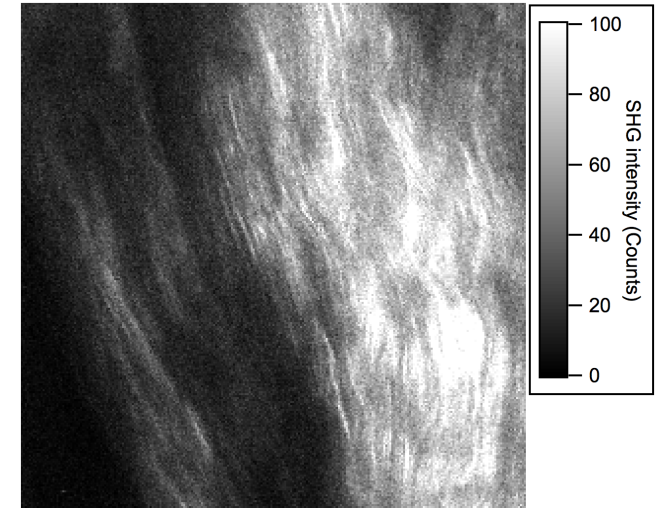
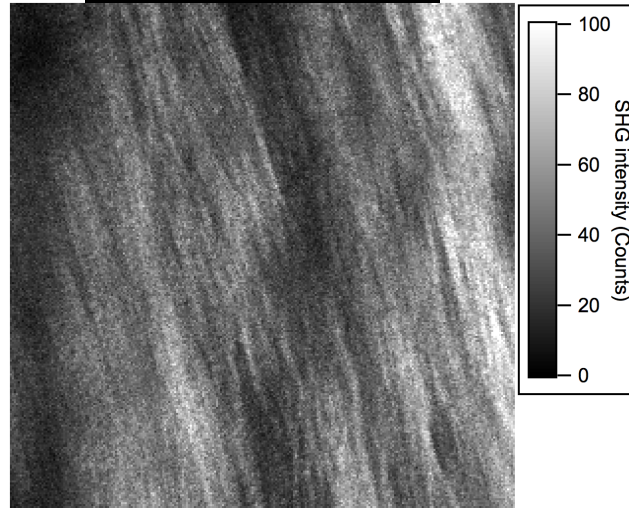
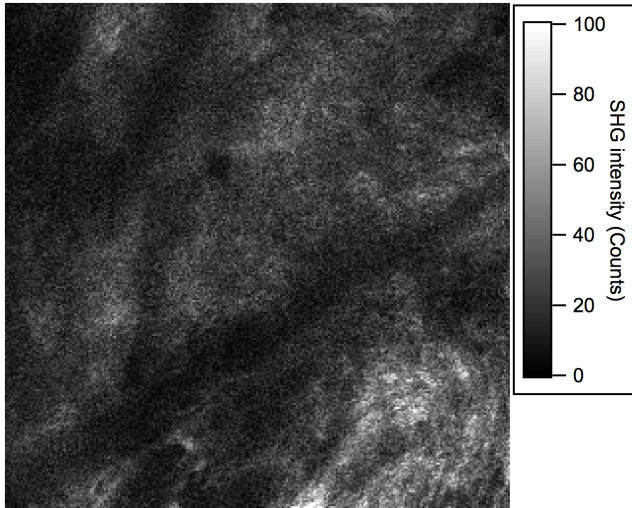
パワースペクトルでは、波打つように配向したコラーゲン線維分布に対して、それぞれ直交した θ 方向に強い振幅を持っている

SHGイメージの画像解析

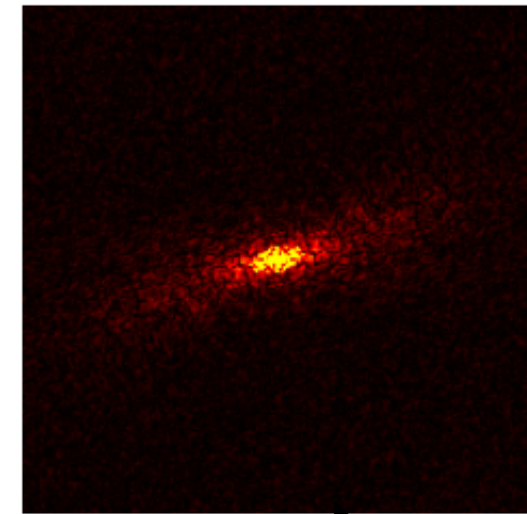
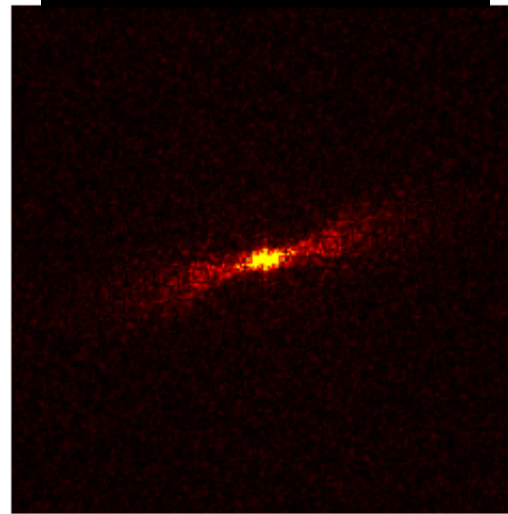
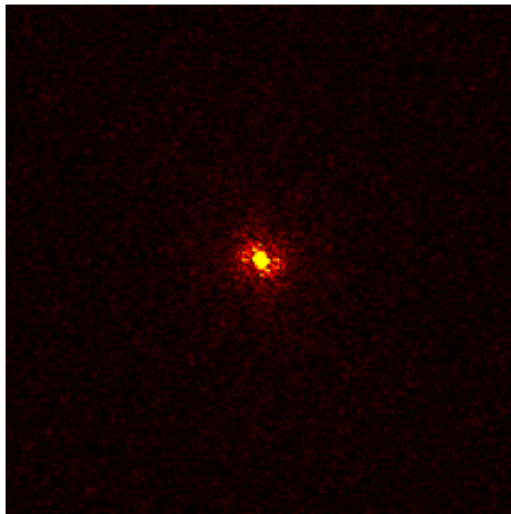
修復サンプル

イメージ視野 : 400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



遅

修復度合い

進

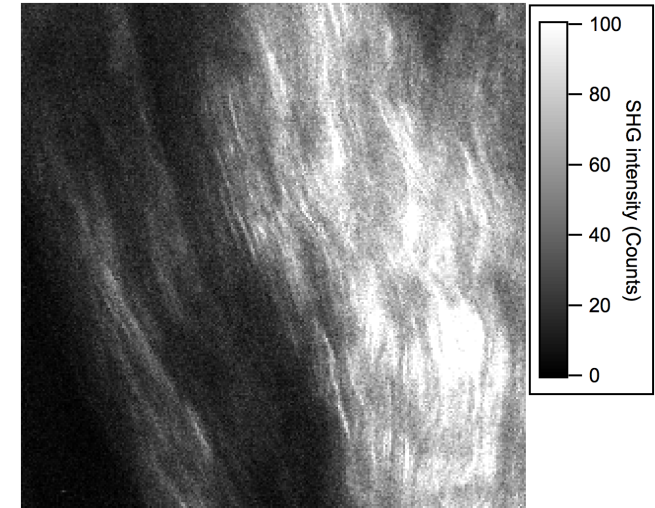
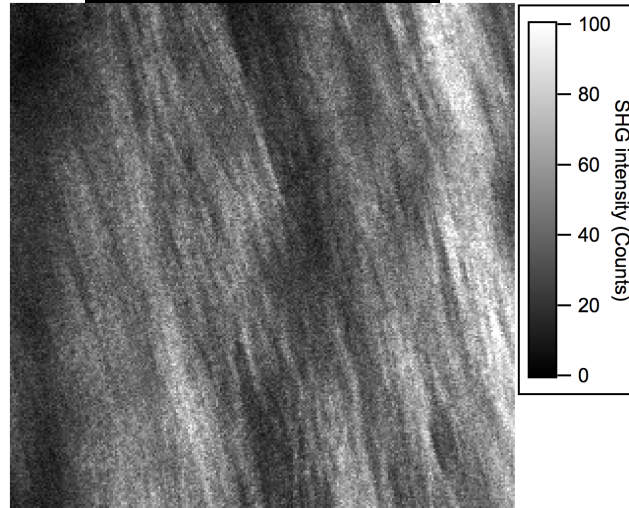
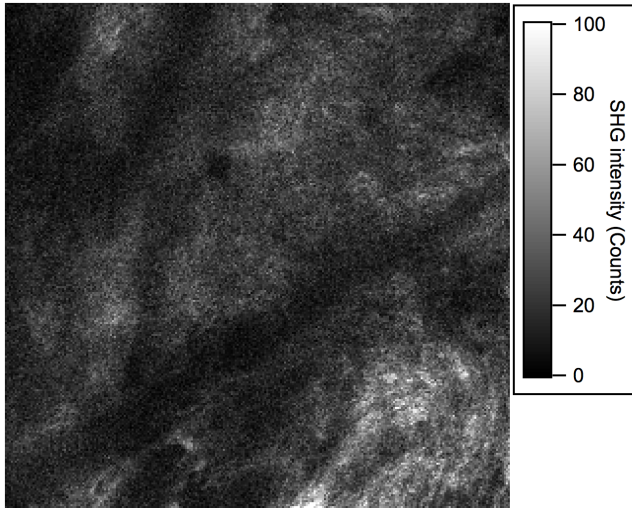
修復具合により、パワースペクトルの振幅ピーク数に変化

SHGイメージの画像解析

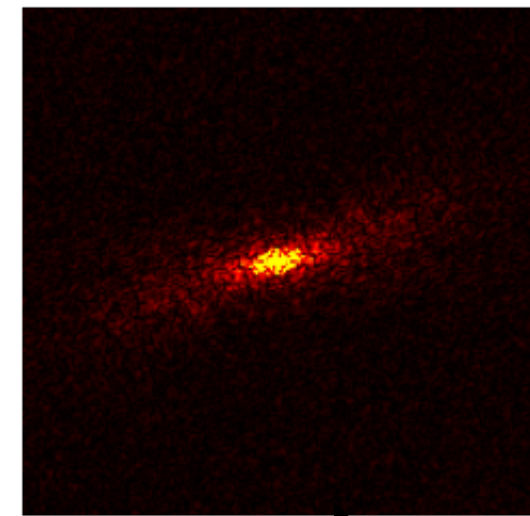
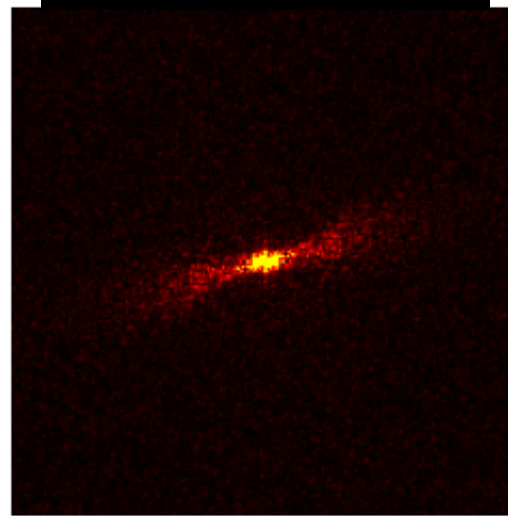
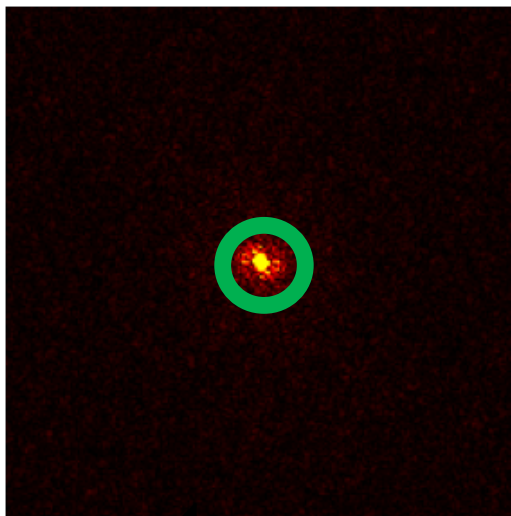
修復サンプル

イメージ視野 : 400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



遅

修復度合い

進

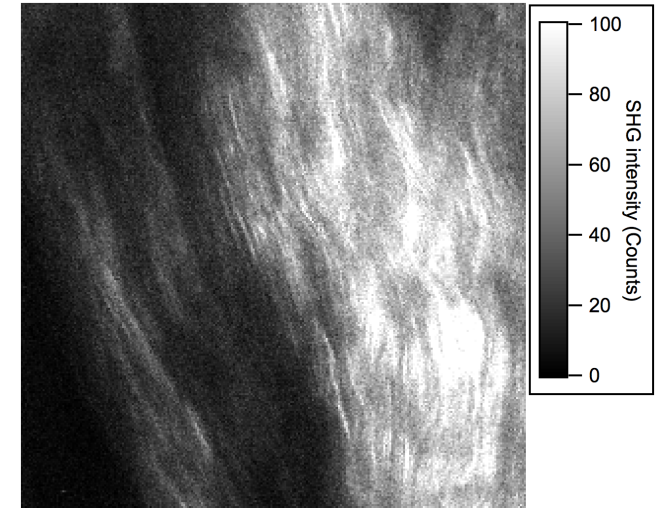
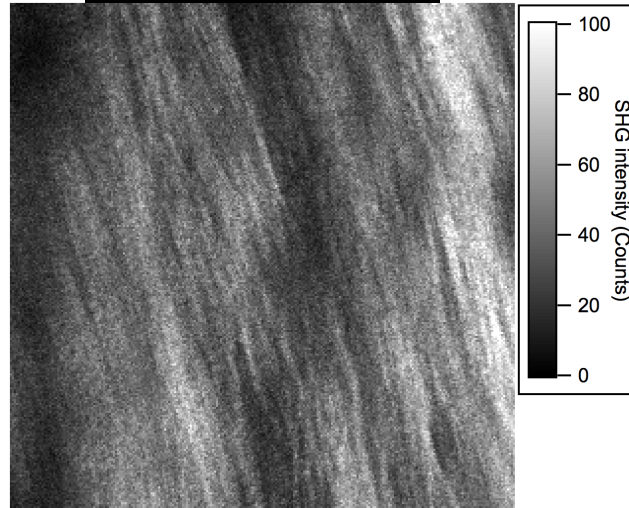
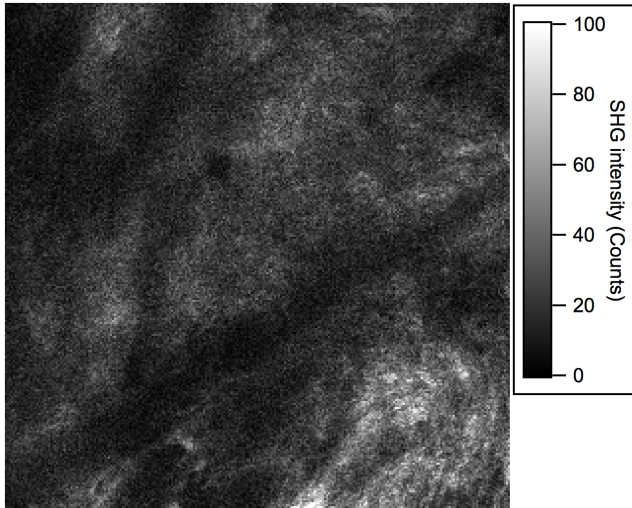
修復具合により、パワースペクトルの振幅ピーク数が増加

SHGイメージの画像解析

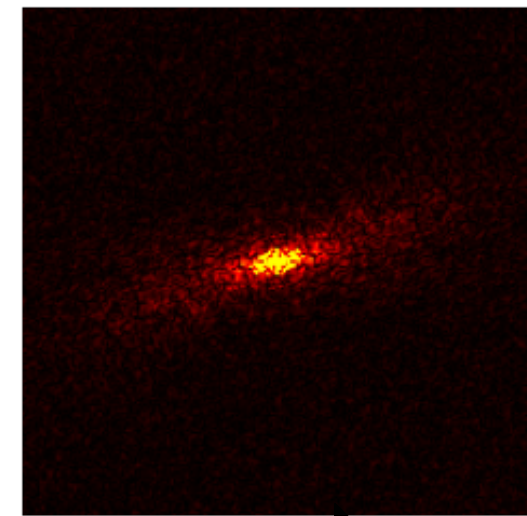
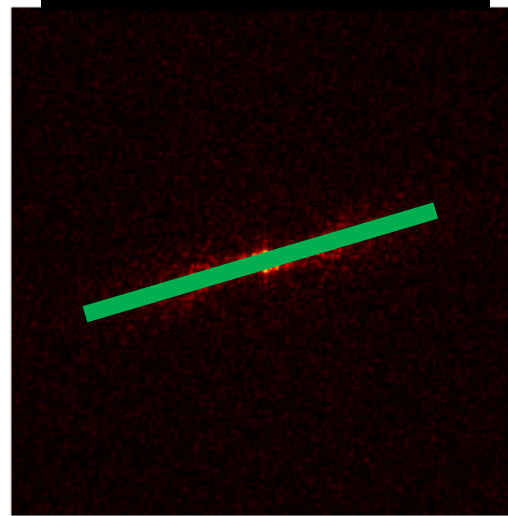
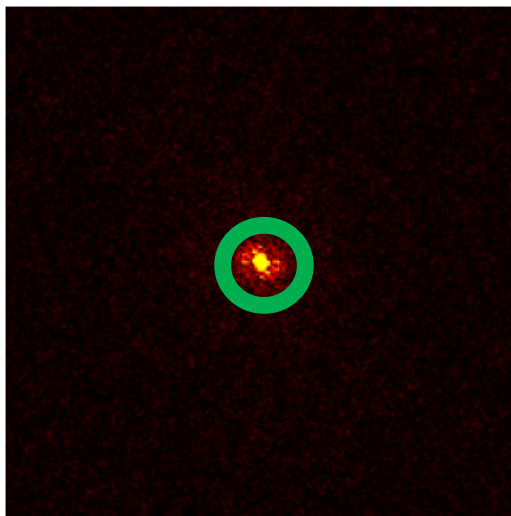
修復サンプル

イメージ視野 : 400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



遅

修復度合い

進

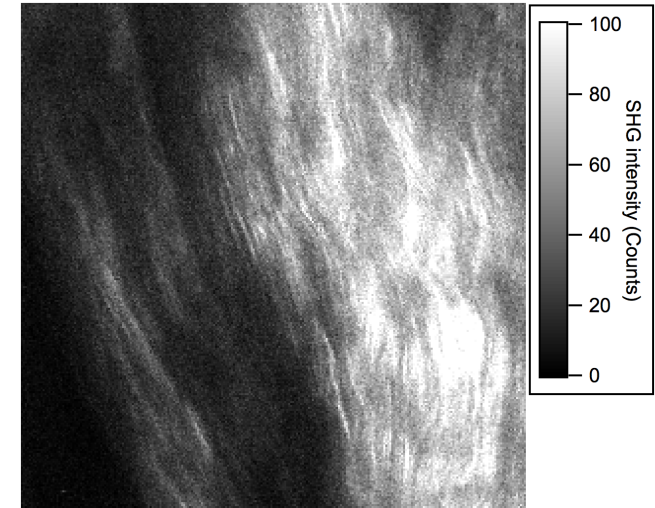
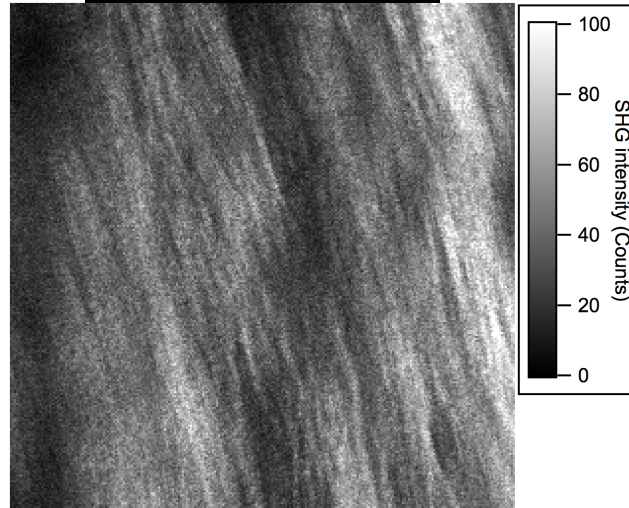
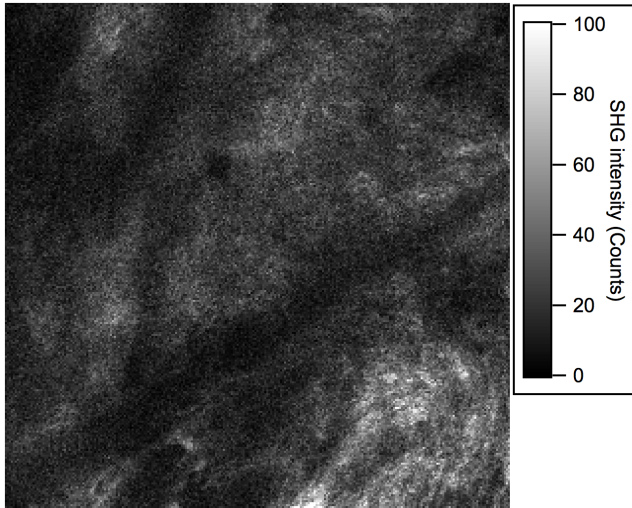
修復具合により、パワースペクトルの振幅ピーク数に変化

SHGイメージの画像解析

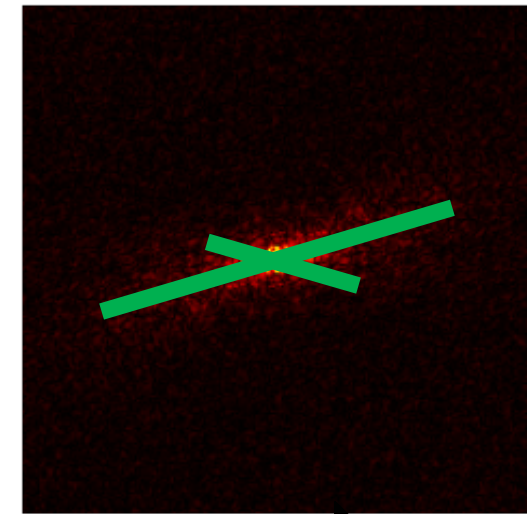
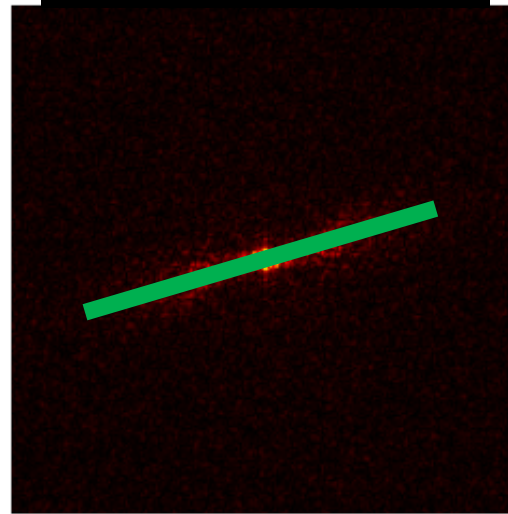
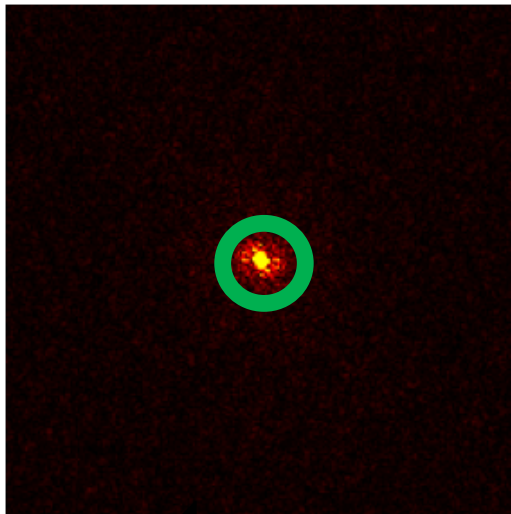
修復サンプル

イメージ視野 : 400 μm * 400 μm

SHGイメージ



パワースペクトル



遅

修復度合い

進

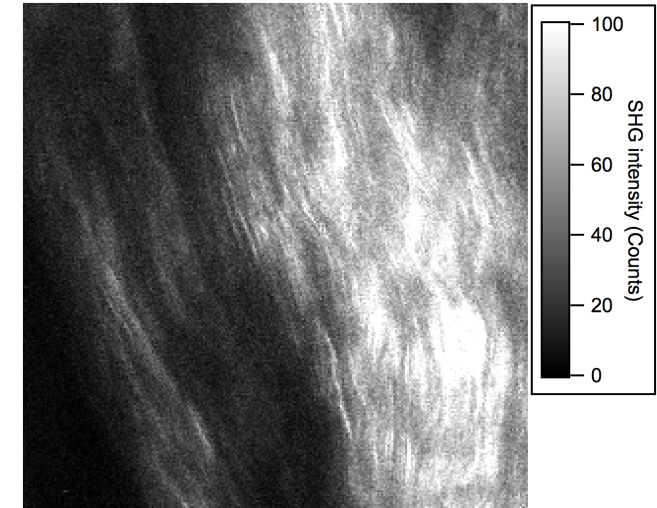
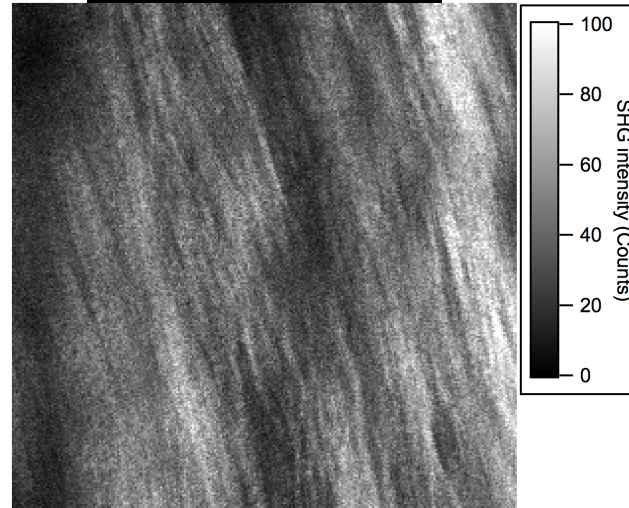
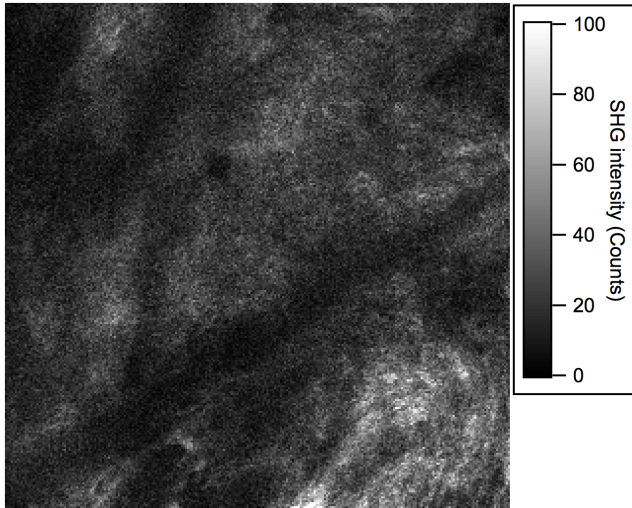
修復具合により、パワースペクトルの振幅ピーク数に変化

SHGイメージの画像解析

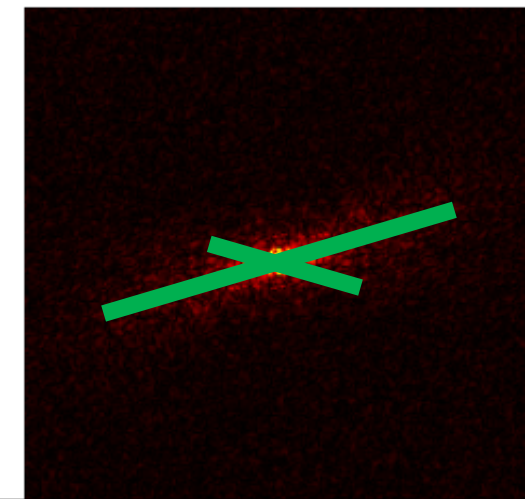
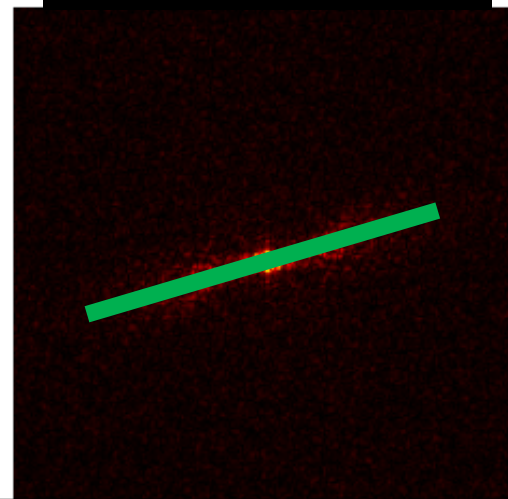
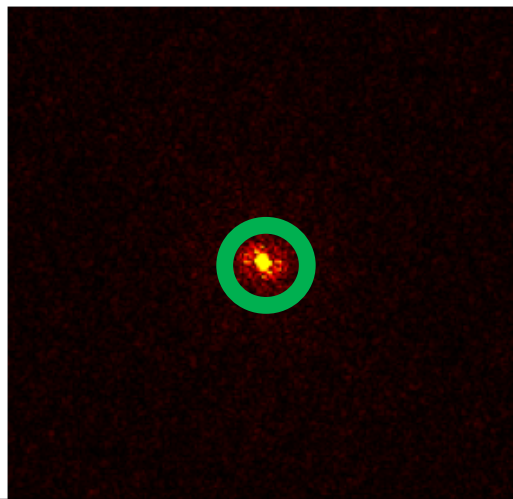
修復サンプル

イメージ視野 : 400 μm * 400 μm

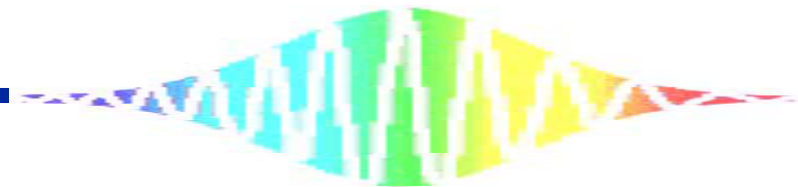
SHGイメージ



パワースペクトル



2D-FTイメージから定量情報を抽出すれば、腱修復における定量的パラメーターの抽出が可能！



3のまとめ

比較項目	正常サンプル	修復サンプル
画像解析 (FFT)	4方向に 強い振幅	修復度合いにより 0~3方向に振幅

今後の予定

- ・ 力学試験とSHGイメージから得られる情報の相関
- ・ 更なる定量的SHGパラメーター（偏光解析）の利用

本博士論文のまとめ

「**コラーゲンの選択的可視化**」と「**in situ計測特性**」という
両特徴を活かした**SHG顕微鏡**のバイオ応用

1. 骨芽細胞産生コラーゲンの時系列可視化
2. 腱修復における組織学・力学的修復評価
3. **SHG**画像解析を用いた腱修復評価

SHG顕微鏡は、バイオ分野におけるコラーゲン動態を
評価する手法として有用であることが示唆された