

# 第二高調波発生光の偏光解析を用いた生体コラーゲンの配向計測

## Measurement of the tissue collagen orientation using polarization measurement of second-harmonic-generation light

○学 島林 啓太 (阪大院・基礎工)

安井 武史 (阪大院・基礎工)

東野 義之 (奈良医大)

正 荒木 勉 (阪大院・基礎工)

K. Shimabayashi<sup>a)</sup>, T. Yasui<sup>a)</sup>, Y. Tohno<sup>b)</sup>, and T. Araki<sup>a)</sup><sup>a)</sup>Grad. Sch. of Engg. Sci., Osaka Univ., Osaka, Japan,<sup>b)</sup>Dept. of 1st Anat., Nara Medical Univ., Nara, Japan

Key Words: collagen, orientation, SHG light, biological tissue, femtosecond laser

### 1. はじめに

コラーゲンは生体構造たんぱく質の1つであり、人体に豊富に含まれている。またコラーゲン分子や線維の配向特性は生体組織や器官の形態や機械的特性を決定する重要な因子である。これまでにコラーゲン配向測定法として機械的手法<sup>1)</sup>やマイクロ波法<sup>2)</sup>、電子顕微鏡観測<sup>3)</sup>などが報告されているが非破壊・非接触でコラーゲン線維配向を測定することは困難であった。

我々は超短パルスレーザー光をコラーゲン含有生体組織に入射すると入射光の半波長(2倍周波数)で放射される第二高調波発生光(SHG光)<sup>4)</sup>に注目し、これを用いたコラーゲン配向測定法に関する研究を行っている<sup>5)~8)</sup>。このような生体SHG光は光と物質の非線形相互作用によるもので、非中心対称物質からのみ発生する。よって非中心対称構造を有するコラーゲン分子(ポリペプチド鎖3重らせん構造)が生体組織から発生するSHG光の主因であり、SHG光強度はコラーゲン分子配向と量に依存する。本研究では生体組織から発生したSHG光を偏光解析することで様々な生体組織のコラーゲン配向を計測した。

### 2. 実験装置

Fig. 1に実験装置図を示す。光源としてモード同期Ti:Sapphireレーザー(パルス幅80fs、中心波長810nm、繰り返し周波数87MHz、パワー200mW)を用いた。このような超短パルス光は生体に熱的ダメージを与えにくく、高いピークパワーを持つため効率よく生体SHG光を発生させることができる。レーザー光は集光レンズ(L1、 $f=35$ )で集光され、スポット径は約 $10\mu\text{m}$ である。発生したSHG光はハーモニックセパレーター(HS)とブルーパスフィルター(F)で基本波から分離され、モノクロメーターにより分光されて光電子増倍管(PMT)でロックイン検出される。偏光解析の場合、偏光子(P)、 $1/2$ 波長板( $\lambda/2$ )、検光子(A)、偏光消滅板(DP)を用いて入射レーザー光と検出SHG光の偏光状態を平行に保ちながら同期回転させ、その強度変化を測定する。

### 3. サンプル

測定に用いたサンプルはヒト組織(アキレス腱、皮膚真皮及び表皮、歯牙象牙質及びエナメル質)、鶏組織(皮、ムネ肉、軟骨)、コラーゲンスポンジである。アキレス腱

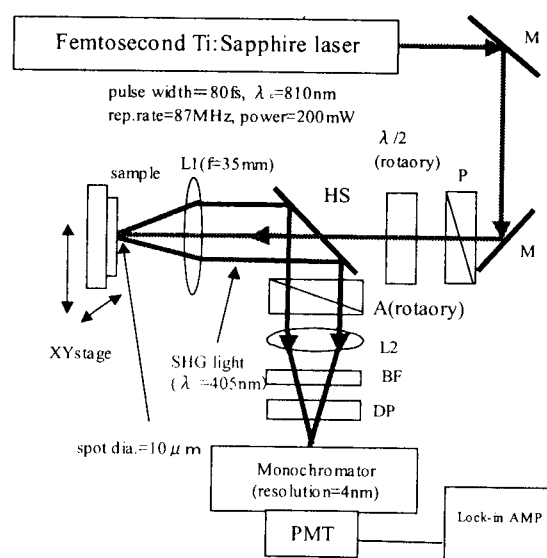


Fig.1. Experimental setup: M, mirror;  $\lambda/2$ , half wave plate; CP, optical chopper; L, lens; P, polarizer; HS, harmonic separator; A, analyzer; BF, blue cut filter; DP, depolarizer; PMT, photomultiplier

と皮膚はホルマリン固定後乾燥させたもので、いずれも厚さ1mm程度にスライスしたものをを用いた。また歯牙切片は厚さ $500\mu\text{m}$ に薄切りにした。鶏組織は生のものをを用いた。またコラーゲンスポンジ(高研、S-35、タイプ1)は牛アキレス腱の不溶性コラーゲンを凍結乾燥してポラスなスポンジ状にした細胞培養用のものである。

### 4. 測定結果

#### 4-1. SHG光強度

各サンプルから発生するSHG光スペクトルのピーク強度を測定し、各サンプルのコラーゲン含有量との関係を調べた(Fig.2)。コラーゲンを含有しない歯牙エナメル質、皮膚表皮からはSHG光は観測されず、含有量の多いアキレス腱からは強いSHG光強度を確認した。しかしSHG光強度はコラーゲン含有量以外にも密度や配向といった複数の因子にも依存すると考えられる。

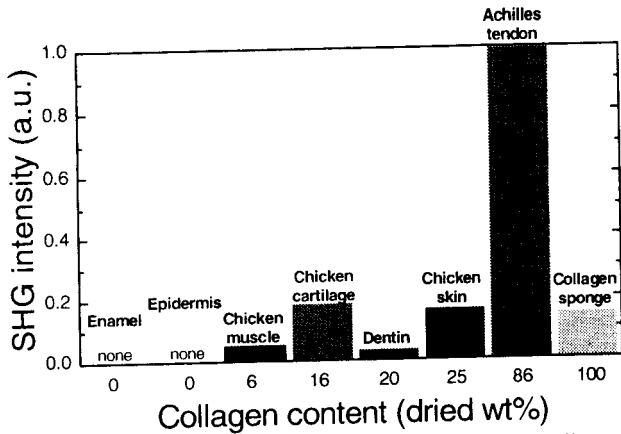


Fig.2. Comparison of SHG intensity with regard to collagen content.

#### 4-2. 入射レーザー偏光とコラーゲン配向

次に入射光の偏光とコラーゲン線維配向の関係を調べた (Table1)。サンプルとしてコラーゲン線維がほぼ一方向に配向しているアキレス腱を用いた。偏光と配向が平行の場合は強いSHG光を検出した。しかし偏光と配向が直行した場合SHG光は検出されなかった。つまり生体組織から発生するSHG光はコラーゲン配向と入射レーザー偏光に敏感に依存する。

Table1. Relation between laser polarization and collagen orientation

	Parallel	Perpendicular	
Polarization of incident light	←→	↑↓	↑↓ ←→
Collagen orientation	Axial 	Axial 	Cross sectional 
SHG light	○	×	×

#### 4-3. SHG 偏光解析

組織のコラーゲン線維の配向情報を抽出するために、アキレス腱と皮膚真皮、歯牙象牙質、コラーゲンスポンジの偏光解析を行った。Fig.3は入射レーザー光と検出SHG光の偏光を同時回転させた時の強度変化を示している。Fig.3(a)よりアキレス腱はコラーゲン組織の線維方向に強い偏光特性を示し、ほぼ単一なコラーゲン線維配向であるといえる。また Fig.3(b)より皮膚はアキレス腱ほど顕著ではないが一方向に強い偏光特性を示し、コラーゲン線維が比較的一方向に偏っていると考えられる。また Fig.3(c)では象牙質中でコラーゲンはメッシュ構造を有していることから、直交2方向に軸があらわれる。Fig.3(d)のコラーゲンスポンジはコラーゲン線維がおおよそ等方的にランダム配向しているため円に近い偏光解析結果になった。このように偏光解析の主軸角度からコラーゲン配向の絶対的方位、形状から配向の程度がわかる。

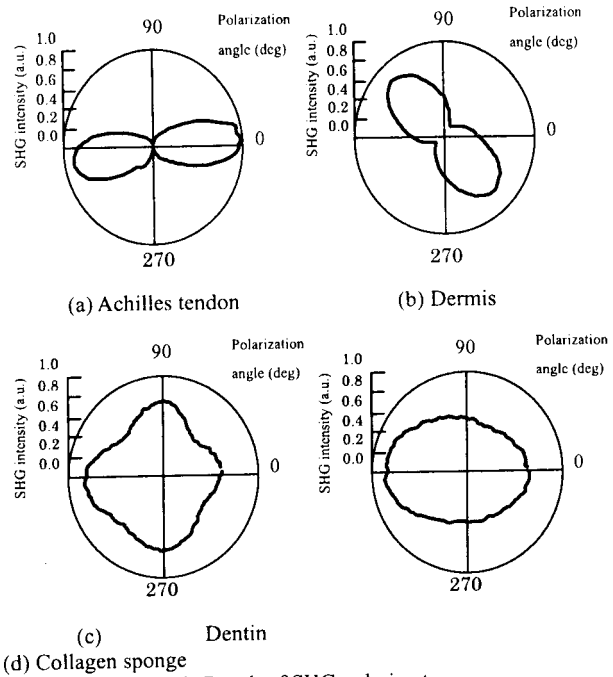


Fig.3. Result of SHG polarimetry

#### 5. まとめ

SHG 偏光解析を用いたコラーゲン線維配向測定法を開発し、コラーゲン配向の組織依存性を確認した。さらに本手法をイメージング計測まで拡張し、2次元配向分布を測定する予定である。

#### 謝辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金(B)13480294の援助を得た。

#### 参考文献

- [1] B. K. Milthorpe et al., *Med. Biol. Eng. Compt.*, **26**, pp. 161-166 (1988).
- [2] S. Osaki et al., *J. Appl. Phys.*, **67**, pp.6513-6519 (1990).
- [3] M. Green et al., *Biomaterials*, **8**, pp.427-432 (1987).
- [4] S. Roth et al., *Biopolymers* **20**, pp.1271-1290 (1981).
- [5] 安井ほか, 第2回生体医用光学研究会講演論文集, pp.138-139 (2001).
- [6] T. Yasui et al., *Proc. Switzerland-Japan Workshop on New Directions in Cellular and Tissues Biomechanics*, pp.85 (2001).
- [7] T. Yasui et al., *Abst. International Conference on Optics Within Life Science VII*, pp.19 (2002).
- [8] K. Shimabayashi et al., *Proc. Asian Symposium on Biomedical Optics and Photomedicine 2002*, pp.268-269 (2002).