

## 生体の非線形光学効果を用いた組織コラーゲン線維の *in situ* 配向分布測定

### *In situ* distribution measurement of collagen fiber orientation based on optical nonlinear effect in biological tissue

○安井武史<sup>1)</sup>、荒木勉<sup>1)</sup>、東野義之<sup>2)</sup>

○Takeshi Yasui<sup>1)</sup>, Tsutomu Araki<sup>1)</sup> and Yoshiyuki Tohno<sup>2)</sup>

阪大院基礎工<sup>1)</sup>、奈良医大<sup>2)</sup>

Grad. Sch. of Engg. Sci., Osaka Univ.<sup>1)</sup>, and Nara Med. Univ.<sup>2)</sup>

E-mail: t-yasui@me.es.osaka-u.ac.jp

We have proposed a new optical probe that can be used to characterize the orientation of collagen fibers in tissues. A specific probing ability for collagen results from the use of second-harmonic-generation (SHG) light induced by collagen molecules in the tissue. We have applied a polarization-resolved SHG imaging to orientation mapping of collagen fiber in human Achilles tendon and collagen sponge, and confirmed difference of collagen orientation distribution between them.

#### 1. はじめに

コラーゲン分子は重要な生体構造タンパク質の1つであり、生体組織や器官内ではコラーゲン分子とその構造集合体（マイクロフィブリル、原線維、線維、線維束）が立体構造を構成する。例えば、生体組織を超高層ビルに例えるとコラーゲンは鉄筋に相当し、コラーゲンの並び方、すなわちコラーゲン配向の3次元的分布が、組織・器官の形態的あるいは機能的特性を決定する上で重要な役割を担っている。したがって、コラーゲン配向の評価は医科学関連分野において重要とされているが、従来法（電顕観測、X線回折、マイクロ波法、機械的特性、生化学分析、組織学的分析など）はいずれも侵襲的あるいは破壊的測定手法であり、解剖学的生検が必要であった。これ故、これらに代わる非侵襲・非破壊的コラーゲン配向測定法が強く望まれている。このような計測を実現する有力な手段が光プローブ法であるが、光コヒーレンストモグラフィーや蛍光測定をはじめとした従来法ではコラーゲン配向の状態を詳細に測定することは困難であった。

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

#### 2. 実験装置及びサンプル

図1に実験装置を示す。レーザー光源にはモード同期チタン・サファイアレーザー（AESTA社 TiF-Kit-100、パルス幅=60fs、平均パワー=300mW、繰返周波数=87MHz、中心波長=808nm）を用いる。レーザーから出射された超短パルス光は、レンズによりサンプルに直径10 $\mu$ mで照射される。発生した生体SHG光は再びレンズによって集光され、残存した赤色レーザー光を青色フィルターによって除去した後、モノクロメーターで分光測定される。偏光分解測定では、偏光光学系（偏光子、1/2波長板、検光子、偏光消光板）を用いて入射レーザー光と検出SHG光の偏光状態が一致するように同期回転させながら、その強度変化を測定する。またコラーゲン配向の分布測定では、サンプルを2次元的に走査することにより、2次元SHGイメージを得る。

ここで用いたサンプルは、ヒトアキレス腱および組織培養用コラーゲンスポンジである。

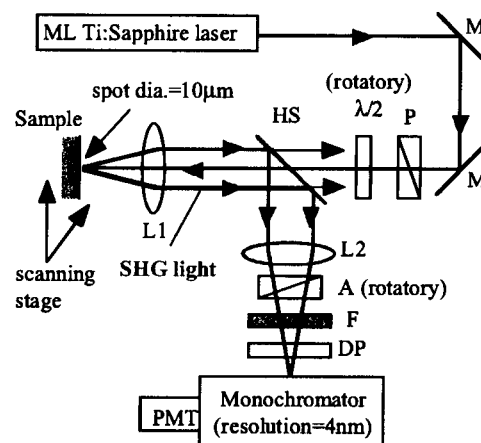


Fig.1 Experimental setup. M: mirror, P: polarizer,  $\lambda/2$ : half waveplate, HS: harmonic separator, L1 and L2: lenses, A: analyzer, F: blue pass filter, DP: depolarizer, PMT: photomultiplier.

### 3. 測定結果

生体SHG光は、入射レーザー偏光とコラーゲン配向が平行な場合に強く発生し直交の場合にはほとんど発生しない性質を有しているため、コラーゲン配向情報の抽出には偏光解析が有効である。図2(a)及び(b)はヒトアキレス腱における垂直及び水平の偏光分解SHGイメージを示しており、垂直偏光では強いSHG光が観測される一方で水平偏光ではSHG光は観測されていない。すなわちヒトアキレス腱では、コラーゲン線維が垂直方向に単一軸配向している。この配向程度を定量的に評価するため、配向異方性(OA)として $OA = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + I_{\parallel})$  ( $I_{\perp}$ :垂直SHG強度、 $I_{\parallel}$ :水平SHG強度)を定義し、その分布イメージを図2(c)に示す。これより、ヒトアキレス腱では測定部位全体にわたって、高い配向性( $OA = 0.86 \pm 0.06$ )が保たれていることが分かる。

次に、コラーゲンスポンジの測定結果を図3に示す。ヒトアキレス腱とは対照的に、垂直偏光及び水平偏光でほぼ同じイメージが得られており、OA値分布は $0.07 \pm 0.05$ となった。これは、コラーゲンスポンジが特定の配向を有さないランダム配向であることを示している。また、同一イメージ内の強度分布(図3(a)および(b))は、コラーゲン線維の量的(密度)分布を反映している。これらの結果は、解剖学的所見と一致しており、生体SHG光を用いたコラーゲン配向測定が有効であることが分かる。

### 4. まとめ

生体コラーゲンの非線形光学効果によって誘起される生体SHG光を利用したコラーゲン線維の配向分布測定法を提案し、コラーゲン・サンプルの配向評価に応用した。その結果、異なるコラーゲンサンプルにおいて、配向分布の相違を確認した。

本研究は文部科学省科学研究費補助金(B)15300161の援助を得た。

### 参考文献

- [1] S. Roth et al.: Biopolymers 20 (1981)1271.
- [2] 安井他、第2回生体医用光学研究会講演論文集(2001)138.
- [3] T. Yasui, et al.: Abst. International Conference on Optics Within Life Science VII (2002) 19.

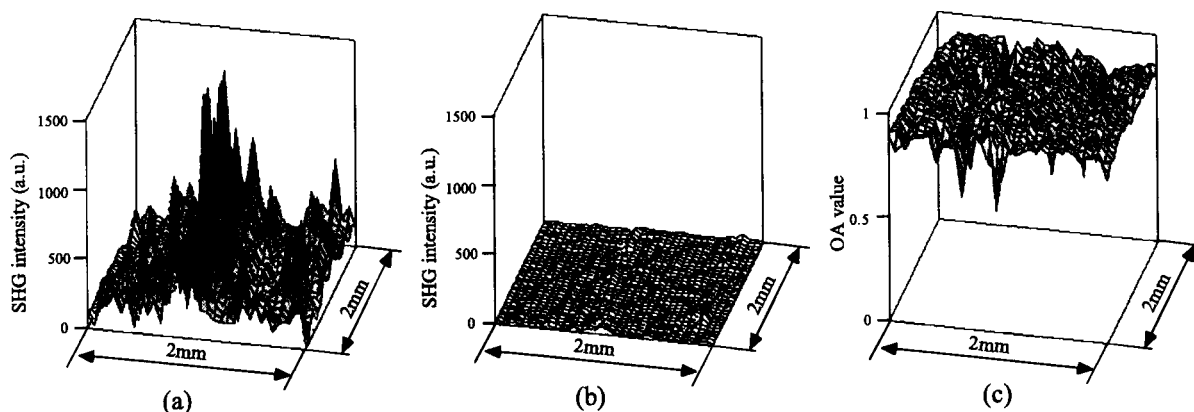


Fig. 2 Polarization-resolved SHG images of human Achilles tendon with (a) polarization // orientation and (b) polarization  $\perp$  orientation. (c) Distribution of OA value.

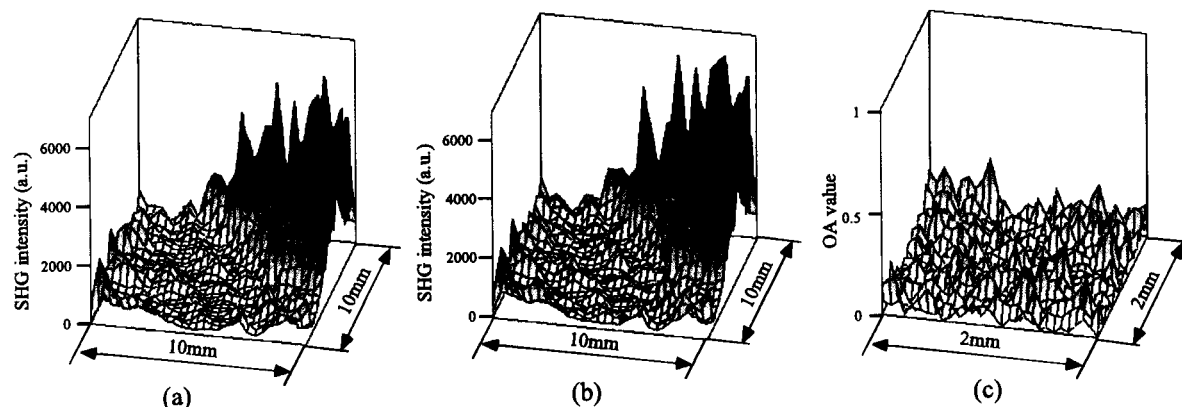


Fig. 3 Polarization-resolved SHG images of collagen sponge with (a) horizontal polarization and (b) vertical polarization. (c) Distribution of OA value.