

第2 高調波発生光の深さ分解偏光解析法を用いたコラーゲン線維配向の分布測定

(阪大院・基礎工) ○佐々木邦彦、安井武史、荒木勉

(奈良医大) 東野義之

[緒言] コラーゲンの配向特性は生体組織や器官の形態及び機械的特性を決定する重要な因子である。しかし従来の測定方法では非破壊・非接触でコラーゲン配向情報を取得することは困難であった。我々はコラーゲンからの第二高調波発生光(生体SHG光)¹に注目し、これを用いたコラーゲン配向測定に関する研究を行っている²。今回は生体SHG光が焦点近傍のみから発生することに注目した深さ分解SHG偏光イメージングの提案をし、ヒト組織のコラーゲン配向断層分布測定に応用する。

[実験装置] Fig. 1に実験装置を示す。光源にはフェムト秒モード同期Ti:Sapphireレーザー(パルス幅80fs, 平均パワー1W, 中心波長800nm, 繰返周波数80MHz)を用いる。レーザー光は対物レンズで集光され、サンプルから発生した生体SHG光はハーモニックセパレーター(HS)とフィルターによって基本波光と分離され、光電子増倍管(PMT)によりロックイン検出される。生体SHG光が入射光偏光方向とコラーゲン線維配向の関係に強く依存することから、我々は偏光子と $\lambda/2$ 板、検光子を用いて、入射レーザーとSHG光の偏光状態が一致したまま回転させSHG光強度変化を観測するSHG偏光解析法を用いてコラーゲン配向を測定してきた³。今回は深さ分解能向上のため、対物レンズ($\times 20$, N.A.=0.42)とピンホール(50 μ m)を用いた共焦点配置を導入している。

[実験結果] 深さ方向に異なるコラーゲン配向を有するサンプルとして2枚のスライスしたヒトアキレス腱の配向方向が直交するように重ね合わせ、焦点位置を深さ方向に移動させながら深さ分解SHG偏光解析を行った(Fig. 2)。その結果を Fig. 3に示す。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な場合には発生しない。したがって、アキレス腱のようにコラーゲンが単一方向を向いている組織では Fig. 3(a)のようなレーダーグラフを用いて表すと8の字型になる(図中の矢印は予想される配向方向)。深さ方向に焦点を走査すると偏光解析結果が変化した。測定スポットが第一層のときはコラーゲン線維が横向きを示しており[Fig. 3(a)], 第二層ではコラーゲン配向が縦方向であることを示している[Fig. 3(c)]。深さ位置が境界付近になると両者の混在が確認できる[Fig. 3(b)]。

[結論] 本手法よりヒト組織のコラーゲン配向の深さ分布が非接触で測定可能であることがわかった。

本研究は文科省・科研費・基盤(B)15300161及び萌芽15650094の援助を得た。

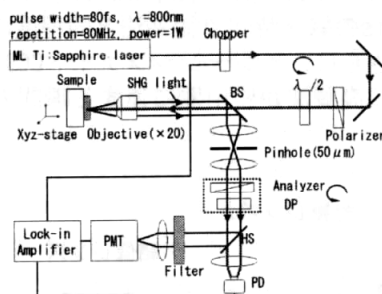


Fig.1 Experimental setup. M:mirror, BS:beam splitter, HS:harmonic separator, PMT:photomultiplier tube, $\lambda/2$:half waveplate DP:depolariser, PD: photodiode

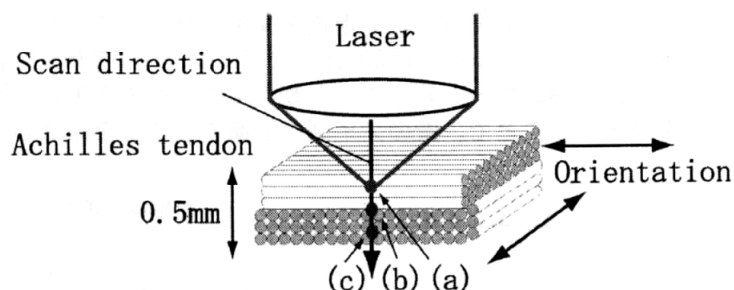


Fig.2 Sample of perpendicularly-overlapped human Achilles tendon.

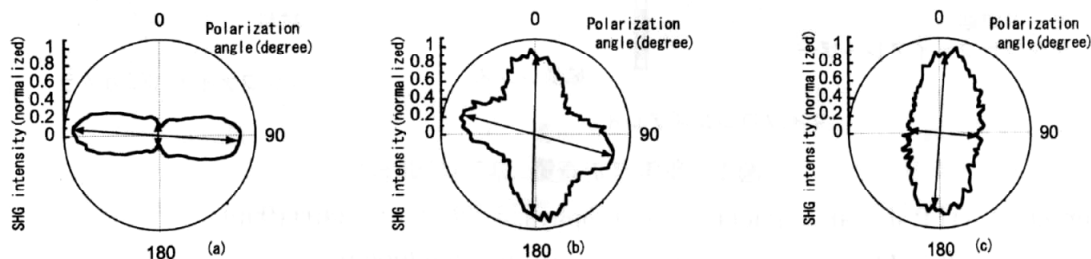


Fig.3 Depth-resolved SHG radar graph.(a)100 μ m (b) 400 μ m and (c) 450 μ m in depth.

- 1)S.Roth et al, *Biopolymers* Vol.20,pp.1271-1290(1981).
- 2)T.Yasui et al, *J.Biomed.Opt.*Vol.9,pp.259-264(2004).
- 3)T.Yasui et al, *Appl.Opt.*Vol.43(2),(in press)(2004).