

## Non-Staining Observation of Collagen in Extracellular Matrix with a Second-Harmonic Generation Microscope

○正 福島 修一郎 (阪大院・基礎工) 安井 武史 (阪大院・基礎工)  
正 荒木 勉 (阪大院・基礎工)

Shuichiro FUKUSHIMA, Osaka University, 1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka

Takeshi YASUI, Osaka University

Tsutomu ARAKI, Osaka University

*Key Words:*, Second-Harmonic Generation Light, Collagen, Femtosecond Laser, Microscopy

## 1. はじめに

コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分として生体内の至る所に存在する線維性タンパクである。従来は支持構造としての物理的性質が重要であると考えられていたが、細胞の発生、分化、形態形成などにおいて生物学的な影響を及ぼすことが明らかになってきた。コラーゲンの形態やその構造変化を明らかにすることは、細胞機能を制御するうえで重要であり、再生医療などを目的とした細胞・組織工学の発展に大きく寄与すると考えられる。

生体組織にピークエネルギーの高い超短パルス光を照射すると、光と物質の非線形相互作用により、入射光波長の半分の波長の第2高調波発生光(SHG光)が誘起される<sup>(1)</sup>。SHG光は反転対称性を有する物質からは発生せず、非対称構造を有する生体構造タンパク(コラーゲンなど)がSHG光発生の主因と考えられている。

著者らはコラーゲン由来のSHG光に注目し、フェムト秒パルスレーザーを用いたコラーゲン配向測定法を開発して組織レベルでコラーゲンの分布・配向の計測してきた<sup>(2,3)</sup>。従来法(電子顕微鏡観察, X線回析, 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法であるのに対し, SHG光を測定する本手法は非侵襲的であるのみでなく, 非染色, 分子レベルの構造配向に敏感, 高い空間分解能, 3次元分布計測が可能, バックグラウンド光(入射光や蛍光)との分離が容易といった特徴をもつ。

本研究では, コラーゲンの分布・配向の動態を細胞レベルで非染色観察できるSHG顕微鏡の構築を目的とする。従来法によるコラーゲンの動態観察には多くの問題があるのに対し, SHG光による観察では染色の必要がないために本来のコラーゲン動態を観察できる可能性が高い。特に, 培養細胞を用いた*in vitro*実験系でコラーゲンの産生や架橋構築の過程を明らかにすることは, コラーゲンによる細胞機能制御機構の解明に有益と考えられる。そこで, SHG顕微鏡による培養試料観察の有効性について検討した。

## 2. 方法

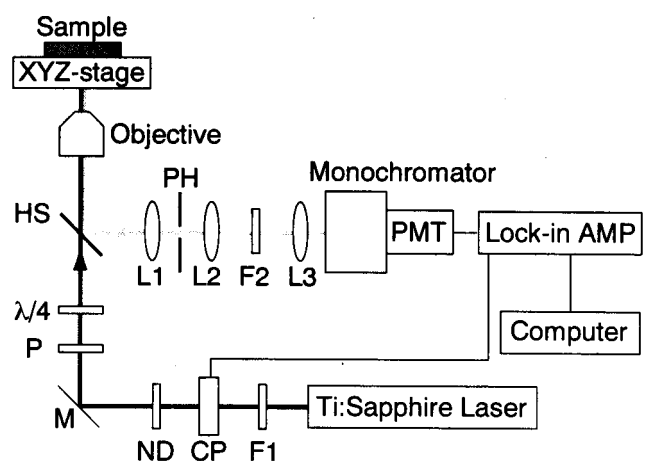
### 2.1 試料

ヒト胎児肺由来の線維芽細胞(TIG-1, 東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター)をコラーゲングル内で培養した。コラーゲングルは, 酸性コラーゲン溶液(Cellmatrix

Type I-A, 新田ゼラチン), 5倍濃縮培養液(DMEM, GIBCO), 再構成用緩衝液(0.05N水酸化ナトリウム溶液 100ml)に対し, 重炭酸ナトリウム 2.2g, HEPES 4.77gを溶解し, ウシ胎児血清(FBS, MP Biomedicals)を7:2:1:1の割合で混合した溶液に線維芽細胞を分散し, CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C)内でゲル化させて作成した。測定には細胞を播種してから24時間以上経過したコラーゲングルを用いた。

### 2.2 SHG顕微鏡

SHG顕微鏡の光学系をFig. 1に示す。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(パルス幅: 80 fs, 平均パワー: 300 mW, 繰り返し周波数: 87 MHz)を用いた。レーザーから射出された超短パルス光はチョッパーで変調後に偏光子(P)と1/4波長板( $\lambda/4$ )で円偏光に変換し, 対物レンズ(20x, NA=0.4)で試料に集光した。試料から発生したSHG光はハーモニクセパレーター(HS)で基本波から分離してから共焦点配置のピンホール(PH)を通過させ, モノクロメーターで分光後に光電子増倍管(PMT)でロックイン検出した。ステージを移動させて試料を走査することによりSHG光強度分布を取得した。



**Fig. 1 Experimental Setup of SHG Microscope**

F1: red pass filter, F2: blue pass filter, CP: chopper, ND: neutral density filter, P: polarizer, PH: Pinhole,  $\lambda/4$ : quarter-wave plate, L1, L2 and L3: lenses, HS: Harmonic Separator, PMT: Photomultiplier

### 3. 結果および考察

培養用コラーゲンゲルから SHG 光が発生するかを、細胞を播種していないゲルを用いて確認した。Fig. 2 にコラーゲンゲルから発生した測定光のスペクトルを示す。スペクトルはピーク強度で規格化した。光源のレーザーの中心波長の測定値は 788 nm であり、その半波長の光が発生していることが確認できた。ピーク波長付近の測光波長帯には 2 光子励起による蛍光スペクトルはみられなかった。また、入射光強度を変化させると、測定光のピーク強度は入射光強度に対して 2 乗依存性を示した (Fig. 3)。以上の結果から培養用コラーゲンゲルからの発光は SHG 光であるといえる。

Fig. 4 にコラーゲンゲル(a)と線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル(b)の SHG 光強度分布を示す。ゲル内のコラーゲンの分布は一様ではなく、SHG 光はコラーゲン含有量に対応した不均一な強度分布を示した。線維芽細胞を包埋した場合は、細胞の存在する領域から SHG 光は発生しないために輝度の低い領域がみられた。細胞のみを培養した試料からは SHG 光は検出されなかった。

生体組織からの SHG 光の発生は現在のところコラーゲン、ミオシン、微小管で確認されている。今回測定した試料ではコラーゲンゲルからのみ SHG 光が検出され、微小管を含む細胞からの SHG 光は検出できなかったが、これは含有量や分子配向度の違いであると考えられる。皮膚や腱などの組織を用いた SHG 光の測定結果と比較すると、培養用コラーゲンゲルの SHG 光発生効率は低かった。生体組織中のコラーゲンと細胞播種直後のコラーゲンゲルでは高次の架橋や配向構造が異なることがその原因と考えられる。さらに培養を

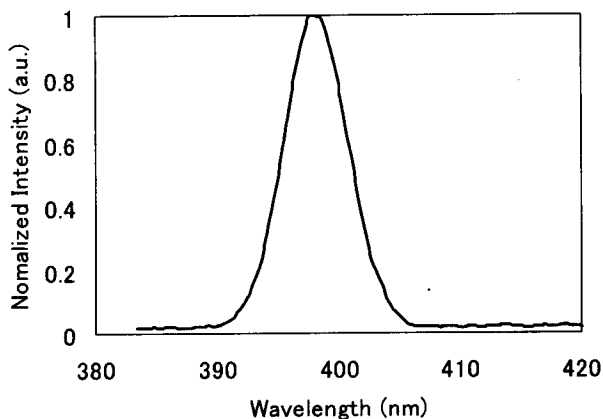


Fig. 2 SHG spectra of collagen gel

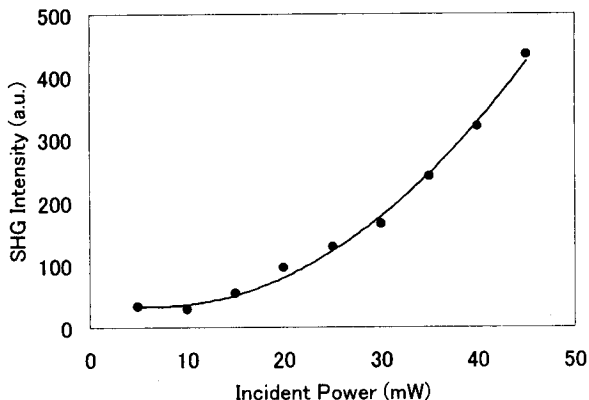


Fig. 3 Dependence of SHG light intensity on incident light power in collagen gel

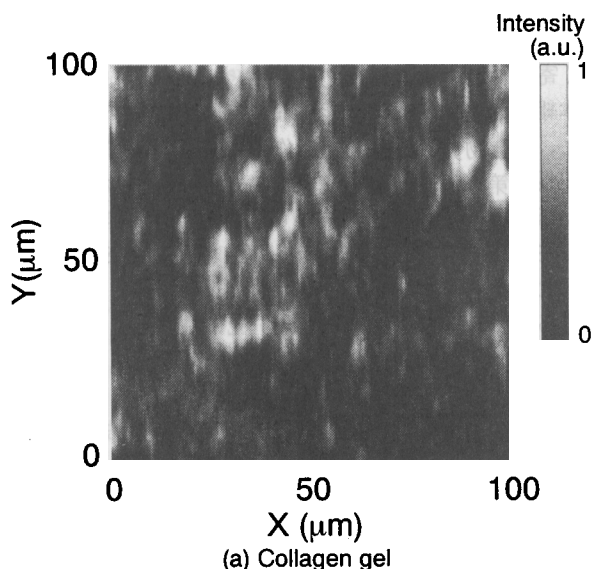
継続した場合は、細胞による細胞外マトリックスの産生・構築による SHG 光強度分布の時系列変化過程を追跡できると期待される。

### 謝辞

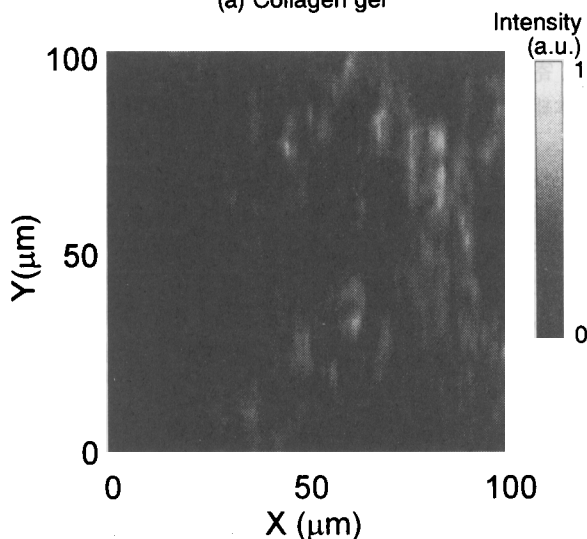
本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金(若手研究(B) 16700359)および財団法人大阪大学後援会教育・研究助成金による援助のもとに行われた。ここに記して謝意を表す。

### 参考文献

- (1) S. Roth et al., "Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon," *Biopolymers*, **20**, pp.1271-1290 (1981).
- (2) T. Yasui et al., "Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry," *J. Biomed. Opt.*, **9**, pp.259-264 (2004).
- (3) T. Yasui et al., "Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light," *Appl. Opt.*, **43**, pp.2861-2867 (2004).



(a) Collagen gel



(b) Fibroblasts in collagen gel

Fig. 4 SHG light intensity distribution