

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

田中 佑治*・長谷 栄治**・福島 修一郎*,†・荒木 勉*・安井 武史*,***,†

In vivo Imaging of Collagen Fiber Orientation with Rapid, Orthogonally Polarization-resolved SHG Microscopy

Yuji TANAKA,* Eiji HASE,** Shu-ichiro FUKUSHIMA*,† Tsutomu ARAKI,* Takeshi YASU*,***,†

Abstract Polarization-resolved second-harmonic-generation (SHG) microscopy is a powerful tool to visualize distribution of collagen fiber orientation in tissue with little invasion. However, long image acquisition time, resulting from mechanical rotation of a half-wave plate, makes this microscopy easy to suffer from motion artifact of a sample and hence has limited its use to *in vivo* application. In this paper, we constructed rapid, polarization-resolved SHG microscopy by combination of an electro-optics-modulator-based polarization modulation with improved data acquisition method. The constructed SHG microscopy enables us to visualize orientation mapping of dermal collagen fiber in rat skin *in vivo* without influence of motion artifact. This microscope will open the door for *in vivo* measurement of collagen fiber orientation in tissue.

Keywords : second-harmonic-generation, microscopy, polarization, collagen, orientation, *in vivo*.

1. はじめに

コラーゲンは多細胞動物に見られる線維状のタンパク質の集合であり、ほ乳類の総タンパク質量の25%を占めている。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、その濃度や構造は生体組織の形態や機械的特性を決定する上で、重要な役割を担っている[1]。特に、線維状の高次構造を有するコラーゲンにとって、その配向は重要である。例えば、アキレス腱はコラーゲン線維が規則的に単一軸配向することにより極めて高い引張り

強さを実現している一方で、骨組織ではコラーゲン線維が等方的メッシュ構造を持つことにより衝撃に対する機械的強さを保っている。また、最外殻組織である皮膚の場合、コラーゲン線維は真皮のみに含まれるが、乳頭層と網状層で異なるコラーゲン配向を有することで、生体内部を保護するプロテクターとしての機械特性を維持している。また、真皮コラーゲンがアンチエイジングや皮膚美容の分野でも注目されているのは周知の事実である。もしこのようなコラーゲン配向を定量的に評価できれば、生体組織内のコラーゲン線維構造を詳細に知ることが可能となり、バイオメカニクス[2]を始めとした分野で重要知見を与えるであろう。さらに、このようなコラーゲン配向評価が非侵襲・非接触・リモートに実現できれば、『生きたありのままの状態』のコラーゲン配向を可視化することが可能になり、コラーゲンが豊富に含まれる真皮や角膜などの臨床診断への応用が期待できる。

組織学の分野では、染色法が広く用いられている。コラーゲン観察の場合、ワンギーソン染色やアザン・マロリー染色を用いることにより、生体組織中のコラーゲン線維を光学顕微鏡下で選択的に観察できる[3]。しかし、染色法は組織生検が必要な侵襲的手法である上に、組織染色像からコラーゲン線維の配向を定量的に評価することは困難である。

生体医工学シンポジウム2012発表(2012年9月,大阪)
2012年8月6日受付,2012年10月26日改訂,2012年12月13日再改訂
Received August 6, 2012; revised October 26, 2012, December 13, 2012.

*大阪大学大学院基礎工学研究科
Graduate School of Engineering Science, Osaka University

**徳島大学大学院先端技術科学教育部
Graduate School of Advanced Technology and Science,
University of Tokushima

***徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
Institute of Technology and Science, University of
Tokushima

†奈良県立医科大学第一解剖学講座
Graduate School of Medicine, Nara Medical University

光学的手法は、非侵襲・非接触・リモートな生体計測を可能にするが、コラーゲン計測という観点で考えた場合、組織コラーゲンが有する構造複屈折性を利用すると、その観測が可能になる。例えば、偏光顕微鏡や位相差顕微鏡を用いると、コラーゲン構造を非染色で可視化できるが、対象は組織切片に制限される[4]。また、偏光感受型光コヒーレンス・トモグラフィ（PS-OCT; polarization sensitive optical coherence tomography）[5]を用いると、コラーゲン分布を *in vivo* で可視化できるが、小さな複屈折のためイメージ・コントラストは相対的に低い。一方、非線形光学効果の1つである第2高調波発生光（SHG; second-harmonic-generation）を用いると、コラーゲン分布を *in vivo* かつ高コントラストで可視化できる[6, 7]。SHG 光は、超短パルスレーザー光によって実現される極めて高い瞬時電場と物質の非線形相互作用により発生し、生体構成物質の中ではコラーゲンから特異的に発生することが知られている。このようなコラーゲン固有の非線形光学特性を用いることにより、非侵襲かつ選択的なコラーゲン濃度分布の可視化が可能になる。例えば、円錐角膜という疾病において角膜コラーゲン線維のメッシュ状構造が失われること[8]、腱組織においてコラーゲン熱変性により SHG 強度が低下すること[9]、血管外膜は主にコラーゲンで構成されているのに対し、内膜はほとんどコラーゲンがないこと[10]などが確認されている。さらに、我々は、ヒト真皮におけるコラーゲン線維を *in vivo* 計測し、『生きたありのまま』の状態でのコラーゲン濃度の3次元分布を可視化することに成功している[11]。

一方、SHG 光の発生効率が、入射レーザー偏光とコラーゲン配向の関係に依存する特徴を利用すると、コラーゲン配向の定量的マッピングも可能になる（偏光分解 SHG 顕微鏡）。我々は、これまでに、各種組織サンプルのコラーゲン配向やその分布を定量評価し、各種生体組織においてコラーゲン配向分布が大きく異なることを確認している[12, 13]。さらに、偏光分解 SHG 顕微鏡を光老化性マウス皮膚に適用し、シワ走行方向とコラーゲン配向が意義深く平行であることを明らかにしている[14]。しかし、従来の偏光分解 SHG 顕微鏡では、入射レーザー光の偏光方向を変化させながら複数枚の SHG イメージを逐次取得していたため、モーション・アーチファクト（測定対象の拍動や振動など）の影響を受け易く、*in vivo* 計測への応用が制限されてきた。

本論文では、高速偏光変調方式の導入とデータ取得方法の改善により、モーション・アーチファクトの影響を受け難い偏光分解 SHG 顕微鏡の開発を行った。さらに、モーション・アーチファクトを有するラット皮膚の *in vivo* 計測に適用し、その有用性を確認したので報告する。

2. 測定原理

2.1 SHG 顕微鏡

フェムト秒 (10^{-15} 秒) オーダーの超短パルスレーザー光を対物レンズで生体組織に集光すると、光電場とコラーゲン分子の非線形相互作用により、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）の光が発生する。これが、生体 SHG 光である。例えば、図1のように、超短パルスレーザー光を皮膚に照射した場合、コラーゲンは真皮のみに分布しているので、この SHG 光から真皮コラーゲンの情報を抽出することができる。この生体 SHG 光は、電場強度が空間的に極めて高くなる焦点近傍の限定されたスポット領域（直径 < 数 μm ）で発生するので、その焦点スポットをサンプル内で3次元走査することにより、高分解3次元イメージングを得ることが出来る。また、背景光（拡散反射光、蛍光など）との分離が容易、良好な生体侵襲性、熱的ダメージが小さいなどの特徴も併せ持つ。そして、最も重要なことは、コラーゲン分子固有の非線形光学特性によってイメージコントラストを得ているので、非染色かつ高コントラストでコラーゲン線維のみを選択的に可視化できる特徴である。これらの特徴を利用することにより、生体組織における『生きたありのまま』のコラーゲンを可視化できる。

2.2 偏光分解 SHG 顕微鏡

生体 SHG 光強度は、コラーゲン線維の濃度分布のみならず、入射レーザー偏光方向とコラーゲン配向方向の関係にも依存する。例えば、偏光方向とコラーゲン配向方向が平行の場合には強い SHG 光が観測されるが、両者が直交すると SHG 光は極めて弱くなる。これは、SHG 光がコラーゲンに含まれる発色団による発光ではなく、コラーゲン分子固有の非中心対称性構造（ポリペプチド3重螺旋構造）による波長変換の結果であり、その構造軸の方向に敏感であるためである。したがって、入射レーザー光の偏光方向を回転させながら生体 SHG 光を取得することによ

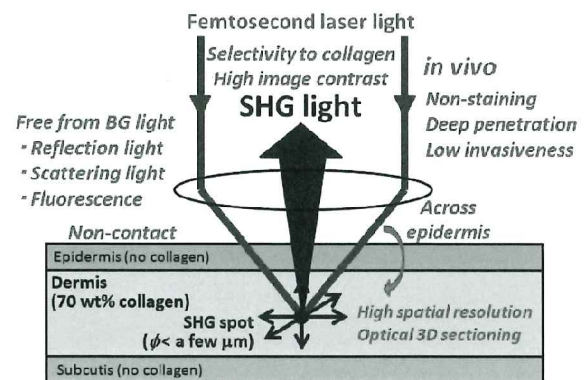


図1 生体コラーゲン SHG 顕微鏡。
Fig. 1 Collagen-sensitive SHG microscopy.

り、コラーゲン配向の定量評価が可能になる。例えば、偏光回転による SHG 光強度変化を極グラフ表示した SHG レーダーグラフの長軸方向と楕円率から、コラーゲン配向の方位と揃い具合を詳細に評価することが可能である（連続偏光分解 SHG 顕微鏡）[12, 13]。一方、より単純な方法としては、水平と垂直の直線偏光のみを用い、各々の偏光分解 SHG 光強度のコントラストから、迅速にコラーゲン配向情報を取得することも可能である（直交偏光分解 SHG 顕微鏡）[14]。本論文では、*in vivo* 計測に適した後者の直交偏光分解 SHG 顕微鏡の高速化に関して報告する。

直交偏光分解 SHG 顕微鏡では、コラーゲン線維の配向を定量的に評価する指標として、以下に示す SHG 偏光異方性 α を用いる。

$$\alpha = \frac{I_V - I_H}{I_V + I_H} \quad (1)$$

ここで、 I_V と I_H は、垂直偏光と水平偏光のレーザー光を入射した場合の SHG 光強度である。この α 値は ± 1 の範囲内の値をとり、正符号の場合は、垂直方向のコラーゲン配向が優位、負符号では水平方向の配向が優位ということを示している。 $\alpha = 0$ 付近では、 45° 方向あるいは等方的（完全ランダム）に配向していることを示している。また、 α 値の絶対値は線維の配向度合を示しており、値が大きいほど、一方向によく揃って配向していることを表している。

2.3 偏光分解 SHG イメージング

直交偏光分解 SHG 顕微鏡を用いてコラーゲン配向マップを取得するためには、垂直および水平の直線偏光レーザー光を入射した時の偏光分解 SHG イメージをそれぞれ取得し、2枚の偏光分解 SHG イメージから、式(1)に基づいて、 α イメージを算出する。従来は、偏光回転光学素子である $1/2$ 波長板を機械的に回転させることにより、垂直及び水平方向の偏光分解イメージを順次取得していた。すなわち、図 2(a)のように、垂直偏光分解 SHG イメージの全ピクセルデータ（強度値）を取得した後、偏光を回転させ、水平偏光分解 SHG イメージの全ピクセルデータを取得する方法をとっていた。しかし、この手法では、2枚の偏光分解イメージを取得する間に、機械的偏光回転のための待ち時間（数秒程度）が必要になる。動きのない測定対象（例えば、組織切片）の *ex vivo* 計測では、このような計測手法でも問題ないが、ヒトの *in vivo* 計測のように動きのある場合にはモーション・アーチファクトの問題が生じてくる。正確な α イメージを取得する為には、2枚の偏光分解 SHG イメージの測定部位を単一ピクセル単位で一致させる必要があるが、偏光回転の間、測定部位の動きを単一ピクセル（数 μm ）内で抑制するのは不可能である。その結果、2枚の偏光分解 SHG イメージ間でピクセル間の対応が取れず、モーション・アーチファクトの影響を大きく受けてしまう。

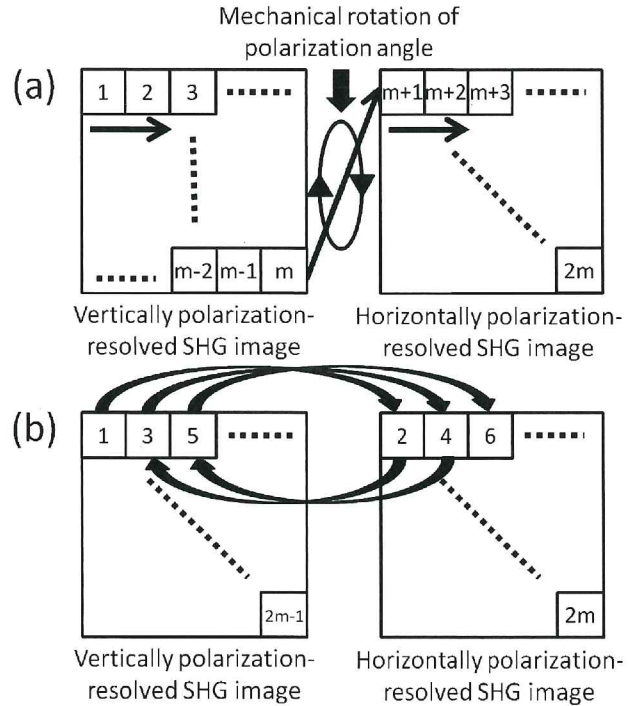


図 2 直交偏光分解 SHG イメージングにおけるピクセルデータの取り込み方法。(a)機械式偏光回転に基づいた従来法と(b)高速偏光変調による提案手法。

Fig. 2 Acquisition method of pixel data in orthogonally polarization-resolved SHG imaging. (a) Conventional method based on mechanical rotation of a half-wave plate and (b) proposed method based on rapid polarization modulation.

このような問題を避けるためには、図 2(b)のようにピクセル毎に垂直および水平の偏光分解 SHG 強度値を連続取得し、その繰り返しによって2枚の偏光分解 SHG イメージを取得する必要がある。もし、十分に高速 (kHz オーダー) な直交偏光のスイッチングが実現できれば、少々動きのあるサンプルでもピクセル間の対応が取れ、モーション・アーチファクトの影響を抑えることが可能となる。その結果、偏光分解 SHG イメージングが *in vivo* 計測に拡張できるであろう。しかし、機械的偏光回転では高速偏光スイッチングが不可能である。そこで、高速偏光変調を実現するための手段として、電気光学変調器 (EOM) に着目した[15]。EOM を利用すれば、最大で MHz オーダーの電氣的偏光変調が可能になり、この問題を解消できる。本研究では、EOM を偏光変調光学素子として用い、図 2(b)に示したようなデータ取り込みを実行することにより、モーション・アーチファクトの影響を受けない高速偏光分解 SHG 顕微鏡の開発を行った。

2.4 実験装置

図 3 に、開発した高速・直交偏光分解 SHG 顕微鏡の装置構成を示す。SHG 顕微鏡は、レーザー走査型顕微鏡と同様な構成を有しているが、唯一の違いはレーザー光源と

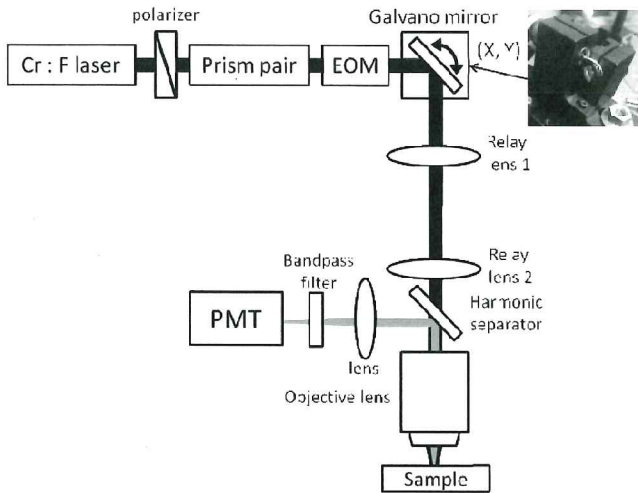


図 3 実験装置. EOM: 電気光学変調器, PMT: 光電子増倍管.
 Fig. 3 Experimental setup. EOM: Electro-optic modulator, PMT: photomultiplier.

してフェムト秒パルスレーザーを用い、サンプルで波長変換された SHG 光を検出している点である。我々の SHG 顕微鏡の特徴は、生体透過性の良好な 1250 nm 帯フェムト秒 Cr: Forsterite レーザー (繰返し周波数 73 MHz, パルス幅 100 fs) を光源とすることにより、表皮越しの真皮コラーゲン計測が可能な程度の測定可能深度を実現している点である。顕微鏡の詳細は先行文献に示されているので [10, 13], 簡単な装置説明と主要な変更点を示す。

レーザー光は、プリズム対 (後述), EOM (後述), ガルバノミラー, リレーレンズを通り, 対物レンズ (N.A. = 0.9, 倍率 50 倍, 作動距離 350 μm , 油浸) によりサンプルに集光される。サンプルに照射するレーザーパワーは 28 mW に設定した。サンプル内で発生し後方散乱された SHG 光は, 同じ対物レンズで集められた後, ハーモニクセパレーター (反射波長: 705 nm 以下) およびバンドパスフィルター (透過波長: 625 nm) によって拡散反射光から分離抽出され, 光電子増倍管で検出される。ガルバノミラーを用いて, サンプル上の焦点スポットを 2 次元走査することにより, SHG イメージを高速取得する。本装置を用いることにより, 300 μm \times 300 μm あるいは 500 μm \times 500 μm のイメージ領域 (256 ピクセル \times 256 ピクセルまたは 128 ピクセル \times 128 ピクセル) を計測時間 2 秒で取得でき, 面内方向および深さ方向の空間分解能は 1 μm である。

第 1 の変更点は, 高速偏光スイッチングのための EOM の導入である。EOM とは, 電気光学効果により, 印加電圧に比例した複屈折を生じる結晶によって構成されている [15]。ここで, その複屈折量が入射レーザー波長の 1/2 となるように印加電圧を調整すると (半波長電圧), レーザー偏光を 90 度回転させることが可能になる。したがっ

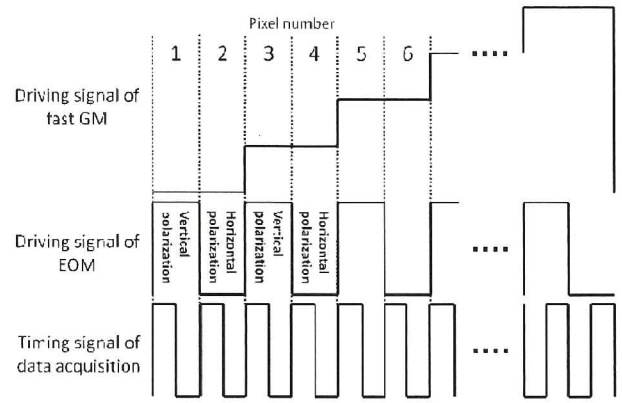


図 4 EOM 駆動信号, ガルバノミラー駆動信号 (高速軸), およびデータ取り込み用タイミング信号のタイミングチャート.
 Fig. 4 Timing chart of driving signals for EOM and galvano mirrors and timing signals for data acquisition.

て, 印加電圧を半波長電圧でパルス駆動することにより, 水平及び垂直の高速偏光スイッチングが可能になる。今回は, 半波長電圧 160 V および周波数 32,768 Hz でパルス駆動することにより, 高速偏光スイッチングを行った。

ここで, 注意しなければならないのは, パルスレーザー光が厚い EOM 結晶 (120 mm) を伝搬すると, EOM 結晶材料固有の屈折率分散 (正) の影響を大きく受け, 出射後のパルス幅がかなり広がってしまうことである (1000 fs)。このようなパルス拡がりによるピーク電場強度の低下は, SHG 発生効率を低下させ, 測定時間短縮の障害となる。そこで, EOM が有する正の屈折率分散を相殺するよう, プリズム対 [16] を用いて負の屈折率分散を予め与えることにより, トータル分散がゼロとなるよう分散補償を行った。その結果, EOM 透過後でも, 100 fs のパルス幅を保たれている。

第 2 の変更点は, 図 2 (b) に示すようなイメージ・データ取り込みを実現するため, EOM 印加信号, ガルバノミラー駆動信号, およびデータ取り込みタイミング信号の同期を取っていることである。まず, 高速軸のガルバノミラーを図 4 に示すように, 階段波形状の信号 (周波数 128 Hz, 振幅: 2 V, 階段数: 256) で駆動する。ここで, ガルバノミラー駆動電圧が一定に保たれる間 (30 μs) に, 垂直偏光から水平偏光に高速偏光スイッチングを行う必要があるため, EOM を 32,768 Hz でパルス駆動する。さらに, 垂直偏光と水平偏光の SHG 光強度を連続取得するために, データ取り込みタイミング信号の周波数を EOM パルス周波数の 2 倍 (65,536 Hz) とした。最終的に, 連続取得データ列を, 垂直偏光分解 SHG イメージと水平偏光分解 SHG イメージに分割する。このようなタイミングチャートで計測することにより, モーション・アーチファクトが存在しても, ピクセル間の対応が取れた α イメー

ジの取得が可能になる。

3. 実験方法

3.1 試料

本研究では、ヒト腓骨筋腱（切片試料）の *ex vivo* 計測とラット皮膚の *in vivo* 計測を行った。ヒト腓骨筋腱は、コラーゲン線維が単一軸方向によく揃って配向しているため[17]、コラーゲン配向が既知のサンプルとして用いることで、開発装置のコラーゲン配向計測に関する基本特性を評価した。ラット皮膚では、*in vivo* 計測におけるモーション・アーチファクトに対する有効性を確認するため、wistar 系ラットを用いて動物実験を行った。動物実験および動物サンプルの準備に関しては、「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 1 日 文部科学省告示）」を遵守すると同時に、大阪大学大学院基礎工学研究科動物実験倫理委員会の承認を得た。

3.2 計測方法

まず、ヒト腓骨筋腱切片を用いた *ex vivo* 計測では、コラーゲン線維配向が垂直方向、水平方向、45° 方向の 3 方向に向くようサンプルを配置した場合の偏光分解 SHG イメージングにより特性評価を行った。次に、ラット皮膚における *in vivo* 計測は全身麻酔下で行った。計測風景を 図 5 に示す。計測前に、イソフルランによる吸入麻酔下（導入濃度 4-5%）で、メドミジン（ドミツール 0.15 mg/kg）、ミダゾラム（ドルミカム 2 mg/kg）、ブトルファノール（ベトルファノール 5 mg/kg）の三種混合薬を腹腔内投与し、全身麻酔を施した。その後、ラット背部の一部をハサミで剃毛した後、除毛クリームによって脱毛する。全身麻酔下でも、心拍や血液循環によりラット皮膚は拍動しており、これがモーション・アーチファクトの原因となる。このモーション・アーチファクトの影響を確認するため、まず従来の機械的偏光回転に基づいた直交偏光分解 SHG 顕微鏡を用いて、ラット皮膚の *in vivo* 計測を行った。次に、電氣的偏光変調に基づいた高速・直交偏光

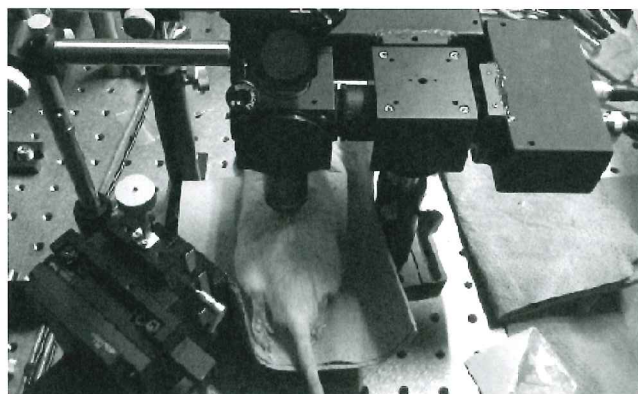


図 5 計測風景。

Fig. 5 Experimental landscape.

分解 SHG 顕微鏡を用いてイメージングを行った。

4. 結果と考察

4.1 単一軸配向サンプルの *ex vivo* 計測

図 6 は、電氣的偏光変調に基づいた偏光分解 SHG 顕微鏡による 3 方向に向けられて配置したサンプルの垂直偏光分解 SHG イメージ、水平偏光分解 SHG イメージ、および α イメージを示している（イメージ領域：300 μm \times 300 μm 、ピクセル数：128 ピクセル \times 128 ピクセル）。いずれのサンプルにおいても、垂直偏光分解 SHG イメージと水平偏光分解 SHG イメージの間に大きな相違は見られない。一方、 α イメージでは明確な違いが確認できる。例えば、垂直方向に向けられたサンプルでは、全体的に α 値が正符号の青色イメージとなっており、これは垂直配向が優位であることを示している。一方、水平方向に向けられたサンプルでは、全体的に α 値が負符号の赤色イメージとなっており、これは水平配向が優位であることを示している。さらに、45° 方向に向けられたサンプルでは、青色（正符号）と赤色（負符号）が入り混じって全体的な白色の中立的な分布となっている。これは、図 7 に示した従来の機械的偏光回転に基づいた偏光分解 SHG 顕微鏡による結果（イメージ領域：300 μm \times 300 μm 、ピクセル数：256 ピクセル \times 256 ピクセル）と一致しており、実際のコラーゲン配向とも良く一致していることがわかる。これらの結果から、EOM を用いた高速・直交偏光分解 SHG 顕微鏡によって、サンプルのコラーゲン配向が正確に計測で

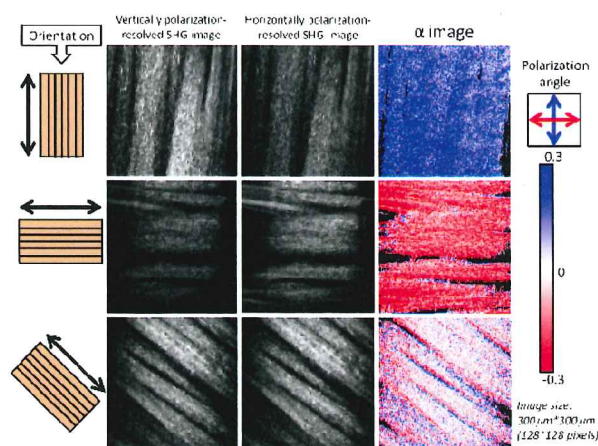


図 6 高速偏光変調による提案手法を用いた単一軸配向サンプル（ヒト腓骨筋腱切片）の直交偏光分解 SHG イメージ（左：垂直偏光分解 SHG イメージ，中：水平偏光分解 SHG イメージ，右： α イメージ）。

Fig. 6 Orthogonally polarization-resolved SHG imaging of sliced human peroneal tendon with uniaxial orientation of collagen fiber using proposed method based on rapid polarization modulation (left: Vertically polarization-resolved SHG image, middle: horizontally polarization-resolved SHG image, and right: α image).

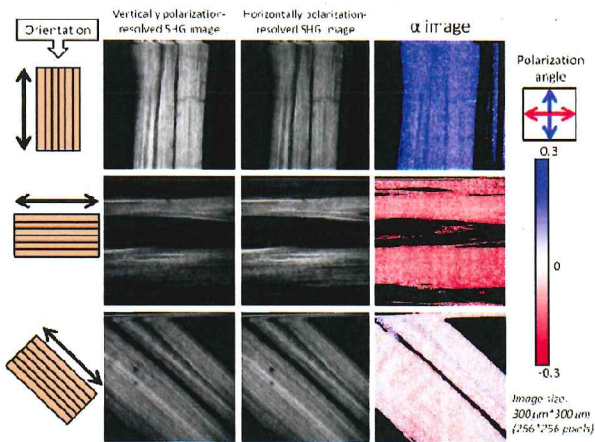


図 7 従来の機械的偏光回転法を用いた単一軸配向サンプル（ヒト腓骨筋腱切片）の直交偏光分解 SHG イメージ（左：垂直偏光分解 SHG イメージ，中：水平偏光分解 SHG イメージ，右： α イメージ）。

Fig. 7 Orthogonally polarization-resolved SHG imaging of sliced human peroneal tendon with uniaxial orientation of collagen fiber using conventional method based on mechanical rotation of a half-wave plate (left: Vertically polarization-resolved SHG image, middle: horizontally polarization-resolved SHG image, and right: α image).

きていけると言える。

4.2 ラット真皮コラーゲン配向の *in vivo* 計測

図 8(a) は、従来の機械的手法によって取得された垂直偏光分解 SHG イメージ、水平偏光分解 SHG イメージ、および α イメージを示している（イメージ領域：500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ ，ピクセル数：256 ピクセル \times 256 ピクセル）。両偏光分解 SHG イメージに注目すると、イメージが所々で歪んでいる様子（黄色矢印部分）が確認できる。これは、毎秒 1 回程度のラット拍動に対して、イメージ取得時間が 2 秒/枚であるので、1 枚の偏光分解 SHG イメージを取得する間に 2 回程度のモーション・アーチファクトの影響を受ける為である。さらに、垂直偏光分解 SHG イメージを 2 秒で取得後、機械式偏光回転のための待ち時間（6 秒程度）を挟み、垂直偏光分解 SHG イメージを 2 秒で取得するため、両イメージ間でモーション・アーチファクトの影響の様子が異なる。その結果、モーション・アーチファクトによる歪みの様子が、垂直偏光分解 SHG イメージと水平偏光分解 SHG イメージで異なっている。モーション・アーチファクトの寄与が異なる 2 枚の偏光分解 SHG イメージから α イメージを算出すると、ピクセル間の対応が取れず、極端な青色部分（垂直偏光）と赤色部分（水平偏光）が混在した α イメージになってしまう。このような α イメージは、実際のコラーゲン配向を全く反映しておらず、*in vivo* 計測が不可能であることを示している。

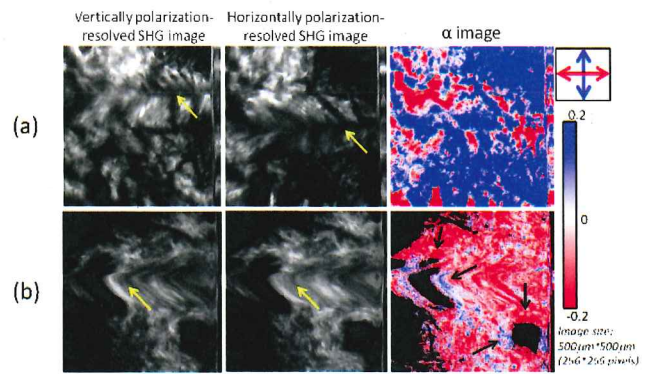


図 8 モーション・アーチファクトを有するラット皮膚の *in vivo* 直交偏光分解 SHG イメージ（左：垂直偏光分解 SHG イメージ，中：水平偏光分解 SHG イメージ，右： α イメージ）。（a）機械式偏光回転に基づいた従来法と（b）高速偏光変調による提案手法。

Fig. 8 Orthogonally polarization-resolved SHG imaging of rat skin with motion artifact (left: Vertically polarization-resolved SHG image, middle: horizontally polarization-resolved SHG image, and right: α image). (a) Conventional method based on mechanical rotation of a half-wave plate and (b) proposed method based on rapid polarization modulation.

一方、図 8(b) は今回開発した顕微鏡を用いた結果を示しており、垂直および水平の偏光分解 SHG イメージに注目すると、図 8(a) と同様に、イメージが歪んでいる様子が確認できる。しかし、各ピクセル毎に垂直偏光分解 SHG 光強度と水平偏光分解 SHG 光強度を高速連続取得してイメージを形成している（トータル計測時間 2 秒）、垂直偏光分解 SHG イメージと水平偏光分解 SHG イメージでモーション・アーチファクトの影響が同じように現れている。これにより、ピクセル間の対応が取れ、コラーゲン配向を正確に反映した α イメージの取得が可能になる。例えば、モーション・アーチファクトの影響を受けたイメージ領域（黄色矢印部分）でも、他の部分と同様なコラーゲン配向分布が得られている。また、毛穴周囲のコラーゲン線維は毛穴に取り囲むように配向しているが、 α イメージにおいても、毛穴の左右は垂直配向（青色）、上下は水平配向（赤色）が優位な結果が得られている（黒色矢印部分）。これらの結果から、高速・直交偏光分解 SHG 顕微鏡による *in vivo* 計測が可能であることが分かる。なお、ここで示されているイメージは、SHG 顕微鏡が有する 3 次元空間分解能により、焦点近傍（皮膚表面から深さ 100 μm ）の約 1 μm の深さ分解能で光学的に切り出された（オプティカル・セクションングされた）ものである。

5. おわりに

本論文では、簡便にコラーゲン配向情報が取得可能な直交偏光分解 SHG 顕微鏡に対して、EOM による高速偏光変調方式を導入すると共に、2 枚の偏光分解 SHG イメー

ジ間でピクセル間の対応が取れるようにデータ取得方法を改善することにより、モーシオン・アーチファクトの影響を受け難い偏光分解 SHG 顕微鏡の開発を行った。実際に、モーシオン・アーチファクトを有するサンプルとしてラット皮膚の *in vivo* 計測を行い、正確にコラーゲン配向が取得できることを確認した。これにより、コラーゲン線維の濃度分布だけでなく、配向分布の *in vivo* 計測も可能になった。

今後は、ヒト皮膚の目じりや口元といったしわ形成部位におけるコラーゲン配向を *in vivo* 計測し、シワ形成過程におけるコラーゲン配向の寄与を評価する予定である。また、皮膚科学分野以外では、角膜レーザー手術におけるコラーゲン配向評価手段としての利用も期待できる。

謝辞 本研究は日本学術振興会科研費・基盤研究(A) 23240069, 基盤研究(B) 22300154 及び挑戦的萌芽研究 23650260 より援助を受けた。

文 献

1. P. Fratzl: Collagen: Structure and Mechanics, Springer, New York, 2005.
2. 林紘三郎: バイオメカニクス, コロナ社, 東京, 2000.
3. Vida VL, Rizzo S, Maschietto N, Boccuzzo G, Milanese O, Thiene G, Stellin G, Basso C: Age is a risk factor for maladaptive changes of the pulmonary root in rats exposed to increased pressure loading. *Cardiovas Pathol*, **21**(3), pp. 199-205, 2012.
4. Chen JL, Yin Z, Shen WL, Chen X, Heng BC, Zou XH, Ouyang HW: Efficiency of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their roles. *Biomaterials*, **31**(36), pp. 9438-9451, 2010.
5. Yasuno Y, Makita S, Sutoh Y, Itoh M, Yatagai Y: Birefringence imaging of human skin by polarization-sensitive spectral interferometric optical coherence tomography. *Opt Lett*, **27**(20), pp. 1803-1805, 2002.
6. Roth S, Freund I: Second harmonic generation in collagen. *J Chem Phys*, **70**(4), pp. 1637-1643, 1979.
7. Campagnola PJ, Dong C-Y: Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. *Laser Photon Rev*, **5**(1), pp. 13-26, 2011.
8. Morishige N, Wahlert AJ, Kenny MC, Brown DJ, Kawamoto K, Chikama T, Nishida T, Jester JV: Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea. *Invest Ophthalmology Visual Sci*, **48**(3), pp. 1087-1094, 2007.
9. Theodossiou TA, Thrasivoulou C, Ekwobi C, Becker DL: Second harmonic generation confocal microscopy of collagen type I from rat tail tendon cryosections. *Biophys J*, **91**(12), pp. 4665-4677, 2006.
10. Zoumi A, Lu X, Kassab GS, Tromberg BJ: Imaging of artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J*, **87**(4), pp. 2778-2786, 2004.
11. Yasui T, Takahashi Y, Ito M, Fukushima S, Araki T: 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**(10), pp. D88-D95, 2009.
12. Yasui T, Tohno Y, Araki T: Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry. *J Biomed Opt*, **9**(2), pp. 259-264, 2004.
13. Yasui T, Tohno Y, Araki T: Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light. *Appl Opt*, **43**(14), pp. 2861-2867, 2004.
14. Yasui T, Takahashi Y, Fukushima S, Ogura Y, Yamashita T, Kuwahara T, Hirao T, Araki T: Observation of dermal collagen fiber in wrinkled skin using polarization-resolved second harmonic-generation microscopy. *Opt Express*, **17**(2), pp. 912-923, 2009.
15. Yariv A: Optical electronics in modern communications, 5th ed. Oxford University Press, New York, 1997.
16. Fork RL, Martinez OE, Gordon JP: Negative dispersion using pairs of prisms. *Opt Lett*, **9**(5), pp. 150-152, 1984.
17. Benjamin M, Qin S, Ralphs JR: Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys. *J Anatomy*, **187**(3), pp. 625-633, 1995.

田中 佑治 (タナカ ユウジ)

2012年大阪大学基礎工学部システム科学科卒, 現在, 大阪大学大学院基礎工学研究科博士前期課程にて非線形光学顕微鏡に関する研究に従事。

応用物理学会, 日本機械学会



長谷 栄治 (ハセ エイジ)

2012年徳島大学工学部機械工学科卒業, 現在, 徳島大学大学院先端技術教育学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博士前期課程にて非線形光学顕微鏡に関する研究に従事。



福島 修一郎 (フクシマ シュウイチロウ)

2002年慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻博士課程修了。博士(工学)。同年(株)テクノバ・研究員, 2003年大阪大学大学院基礎工学研究科・助手, 2007年同大学・助教, 現在に至る。専門はバイオメカニクス, 生体光計測。



日本生体医工学会, 日本機械学会, 日本バイオレオロジー学会, 日本生理人類学会 の会員。

荒木 勉 (アラキ ツトム)

1972 年大阪大学工学部応用物理学科卒業, 1977 年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了 (工学博士 1977). 1978 年米国ウィスコンシン大学研究員. 1979 年徳島大学医学部助手 (医学博士 1986). 1987 年徳島大学工学部助教授. 1992 年同大学教授. 1997 年より大阪大学大学院基礎工学研究科教授, 現在に至る. 光学的手法を用いた生体老化情報の検出, レーザーを用いた生体計測.

日本生体医工学会, 応用物理学会, 日本機械学会, 日本光学会, 日本分光学会各会員.



安井 武史 (ヤスイ タケシ)

1992 年徳島大学工学部機械工学科卒業, 1997 年同大学大学院工学研究科博士後期課程修了. 1997 年通産省工業技術院計量研究所・博士研究員, 1999 年大阪大学大学院基礎工学研究科・助手, 2010 年徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授, 現在に至る. 博士 (工学), 非線形光学顕微鏡に関する研究に従事.

日本生体医工学会, 応用物理学会, 日本機械学会各委員.

