

H.25前期

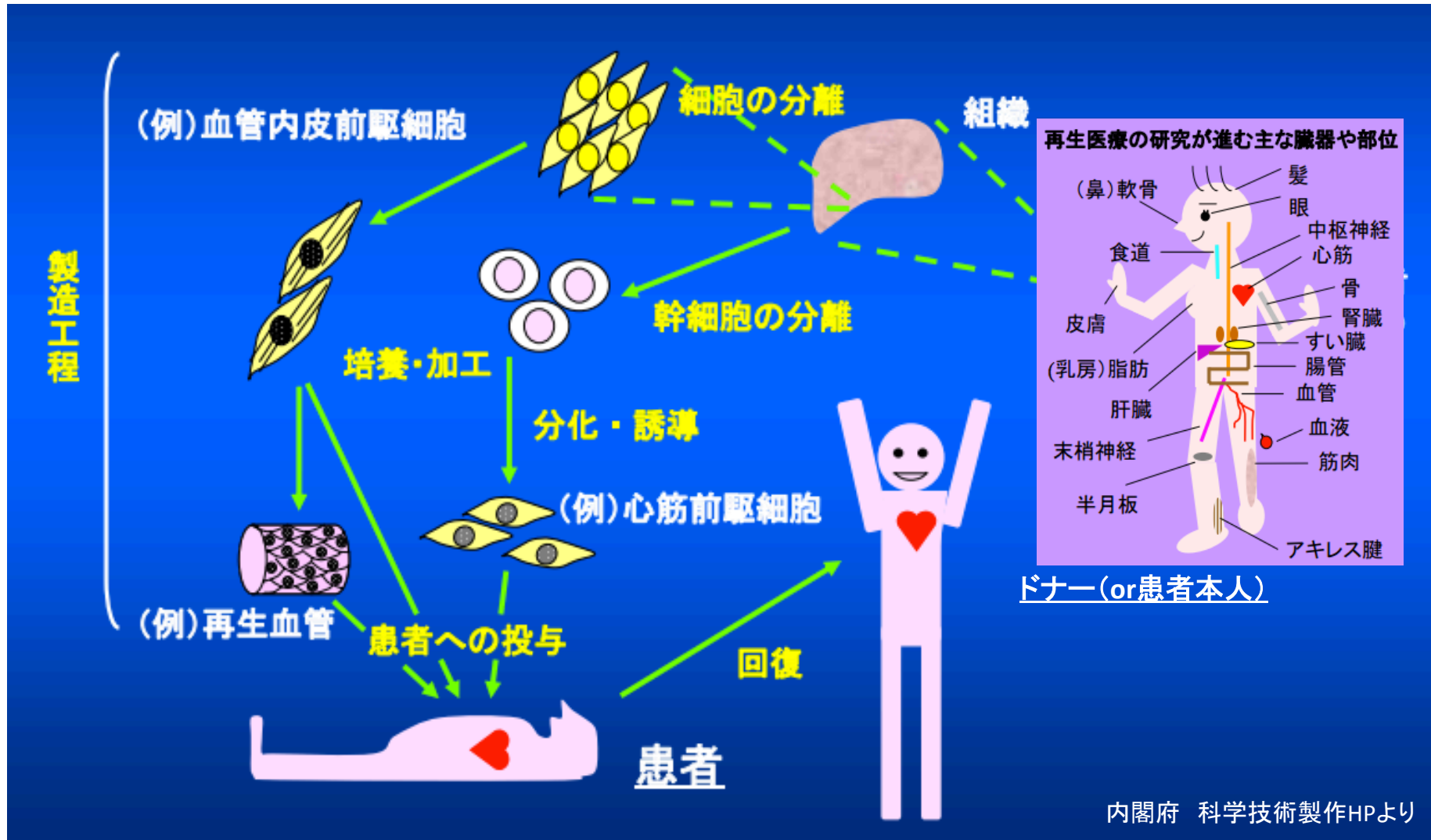
研究報告

生体コラーゲンSHG 顕微鏡
の高感度化と再生医療への応
用

8/9 長谷

再生医療

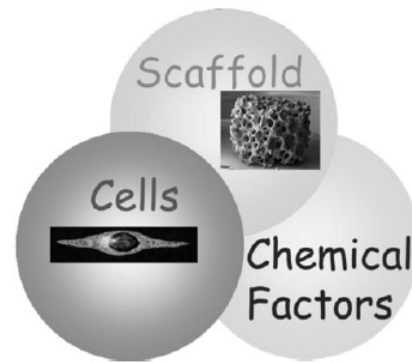
再生医療・・・機能が損なわれた場所に必要な細胞を補う



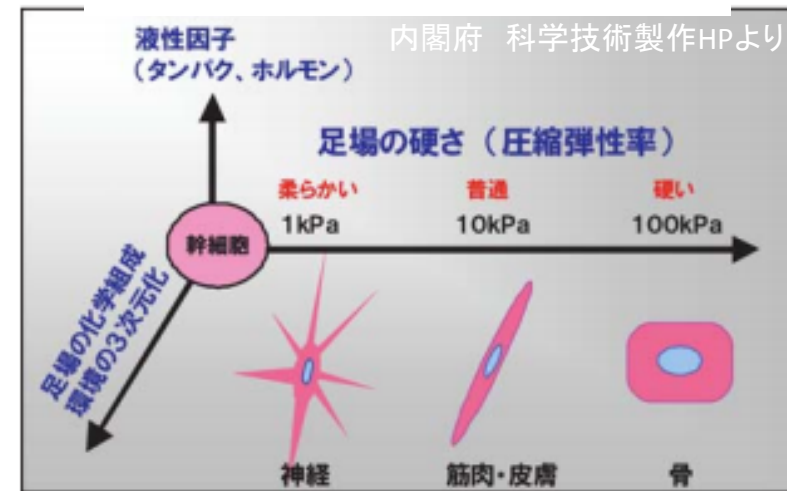
細胞の足場とコラーゲン

製造工程

足場に細胞を播種
成長因子を添加



足場の硬さと分化誘導の関係



コラーゲン・・・生体構造タンパク質



・体全体および臓器その他を

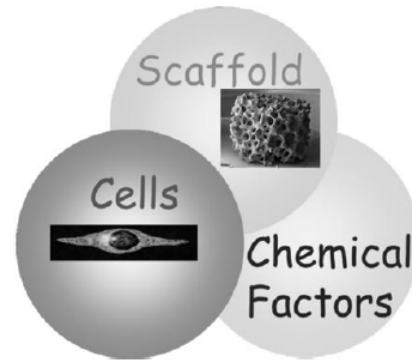
・細胞の足場として働く

形作る
支える
結合する
境界を作る

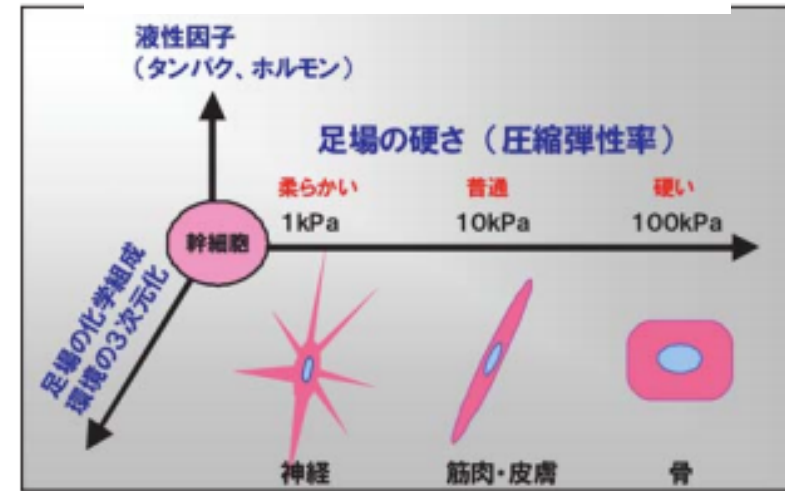
細胞の足場とコラーゲン

製造工程

足場に細胞を播種
成長因子を添加



足場の硬さと分化誘導の関係



コラーゲン・・・生体構造タンパク質



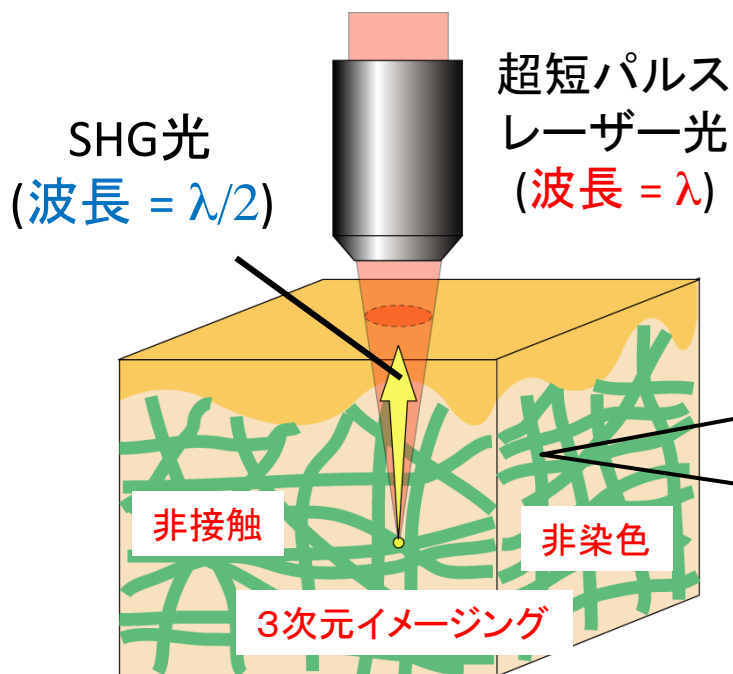
・体全体および臓器その他を

・細胞の足場として働く

形作る
支える
結合する
境界を作る

コラーゲン動態(分布・濃度・高次構造)が重要

第2高調波発生(SHG)顕微鏡



SHGとは

超短パルス光を、非中心対称性の物質に入射した際、半波長(周波数が2倍)の光が発生する現象

例

コラーゲン分子



非中心対称性構造



SHG光の
発生源

SHG顕微鏡の特徴

- 分子構造に依存した選択性を持つ
- 生体組織の場合、コラーゲン、ミオシン、チューブリンなどが観測可能

コラーゲン動態という観点から培養組織の評価が可能

SHG発生強度

$$P_{NL} = \chi^{(1)} E + \chi^{(2)} EE + \chi^{(3)} EEE + \dots$$

SHG

・発生強度を決めるパラメーター

E : レーザー電場 (ピーク)

$\chi^{(n)}$: 非線形感受率

コラーゲン分子の構造に依存

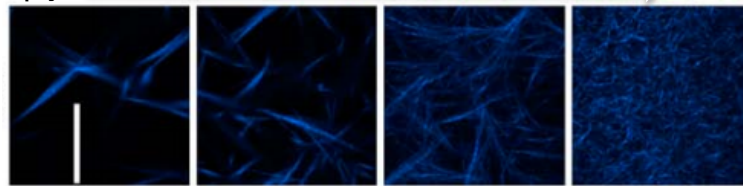
・構造成熟度

コラーゲンゲルのSHGイメージング

構造成熟度

高 低

SHG



a

4°C

14°C

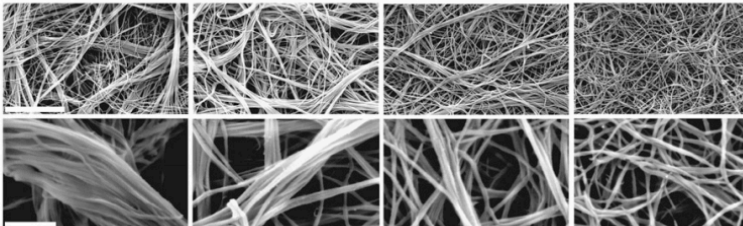
24°C

37°C

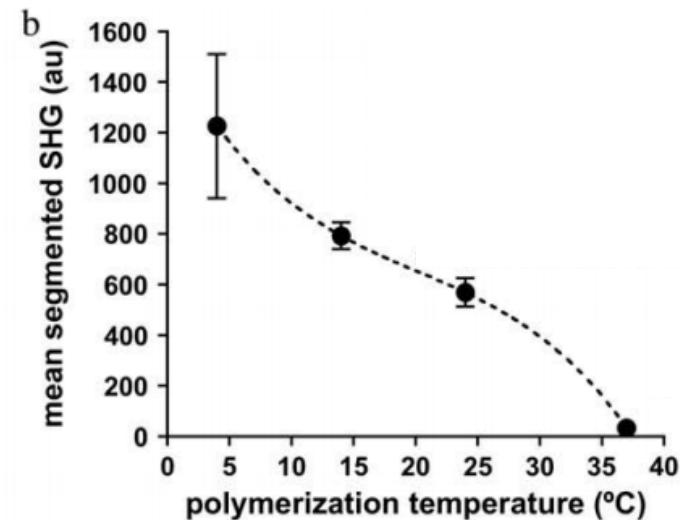
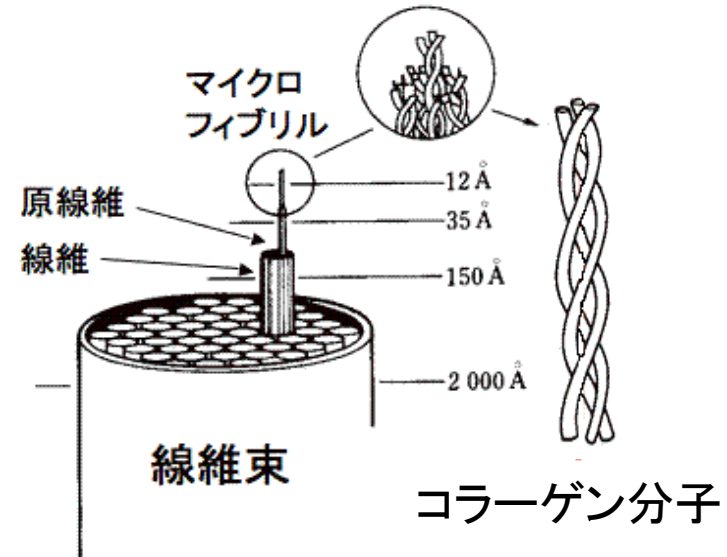
電顕

20,000x

100,000x



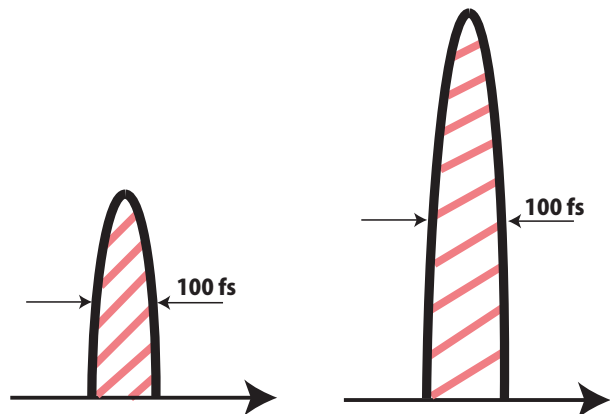
コラーゲンの高次構造



Ref) Christopher B. Raub et.al, Biophysical Journal 92, 2212 (2007)

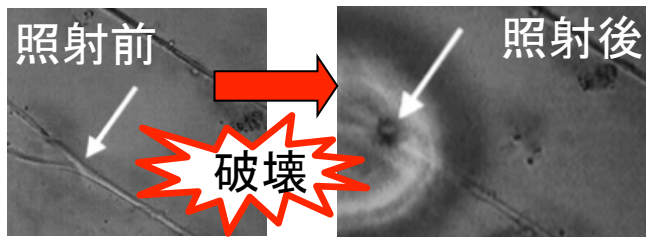
10fsレーザーを用いたSHG顕微鏡の高感度化

- 平均パワー(面積)を上げる



生体組織への影響

Ti:Sapphireレーザー ($\lambda=800$ nm)を照射

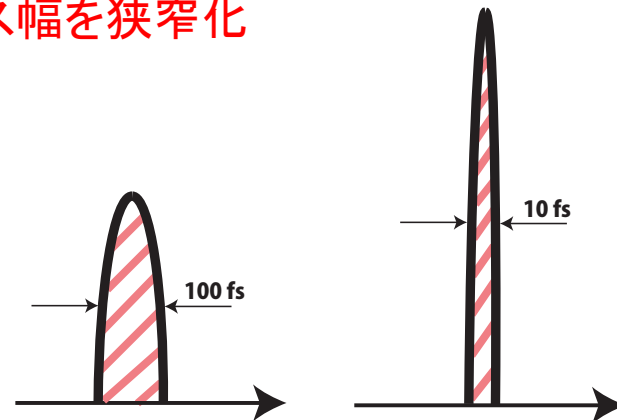


0.7-0.8秒照射後にタマネギの細胞壁の破壊が観測

Ref.) Chen *et al.*, Optical and Quantum Electronics 34, 1251 (2002)

生体サンプルによっては、
レーザー照射による
熱的ダメージが無視できない

- パルス幅を狭窄化



SHGは2次の非線形光学効果であるため、

$$P_2 = \chi^{(2)} EE \quad \text{より、}$$

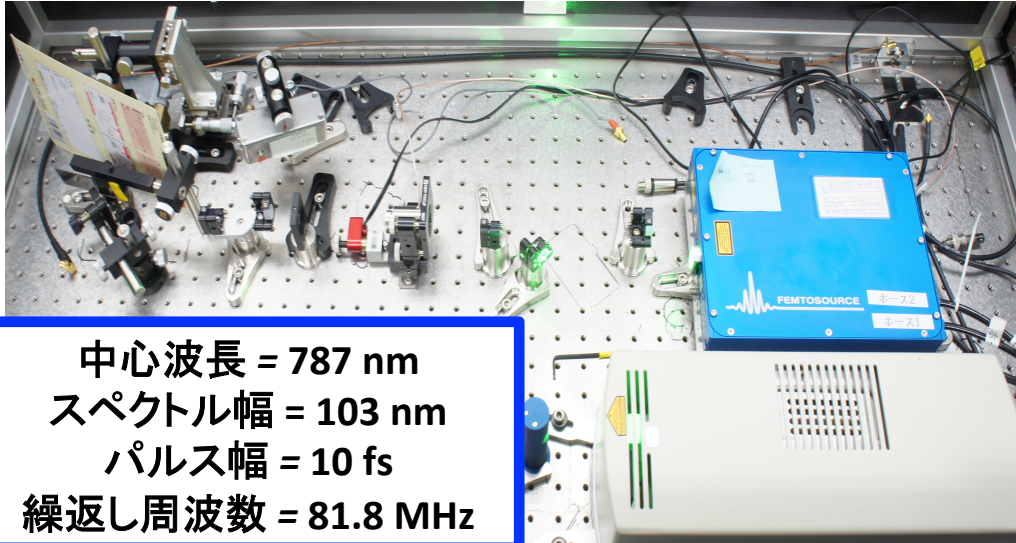
SHG強度はピーク電場の2乗に比例



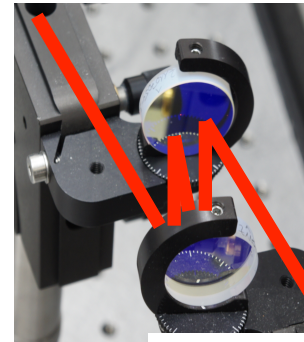
従来の100 fsレーザーに対して、
SHG強度は100倍となる

平均パワーを保ちつつ
高感度化が達成可能

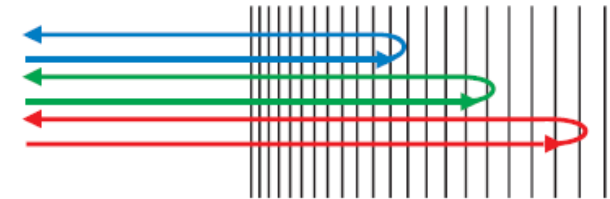
10 fsレーザー



中心波長 = 787 nm
スペクトル幅 = 103 nm
パルス幅 = 10 fs
繰返し周波数 = 81.8 MHz

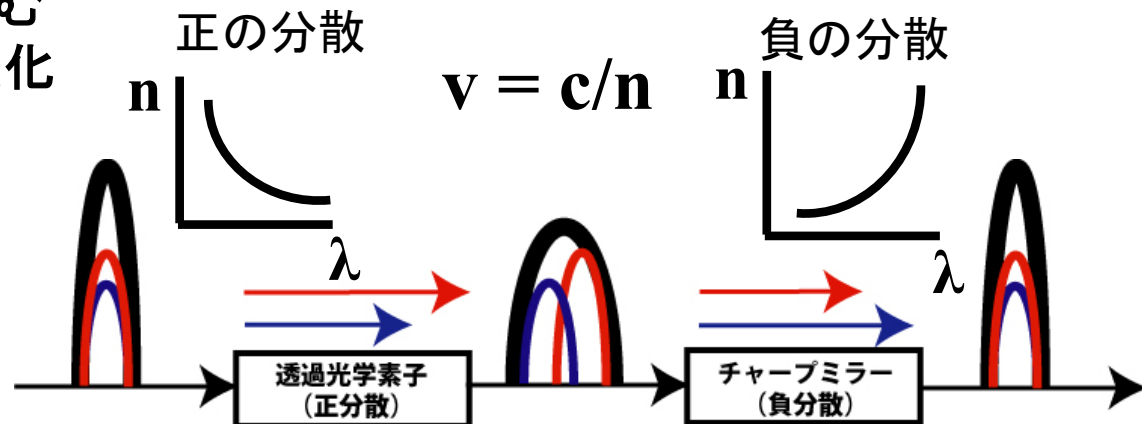


チャープミラー



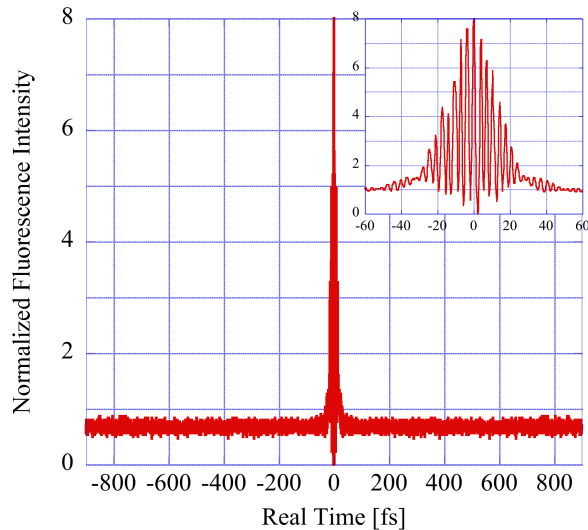
分散補償

- ①パルス波 = 様々な波長を含む
- ②波長(λ)により屈折率(n)が変化
- ③伝播速度に差ができる
- ④パルス幅が広がる
→ピークパワーの低下

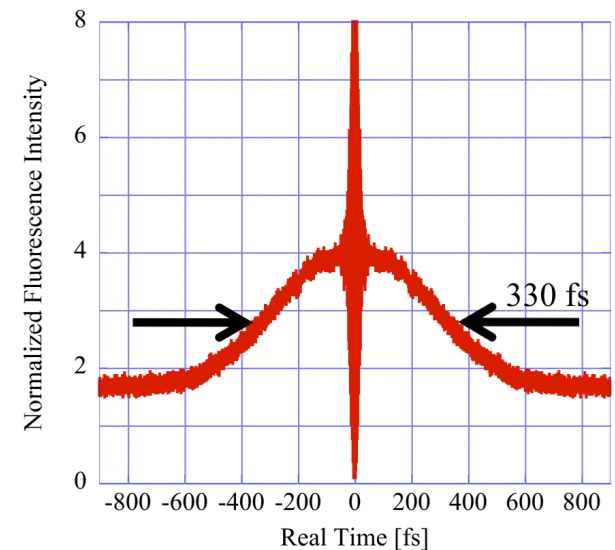
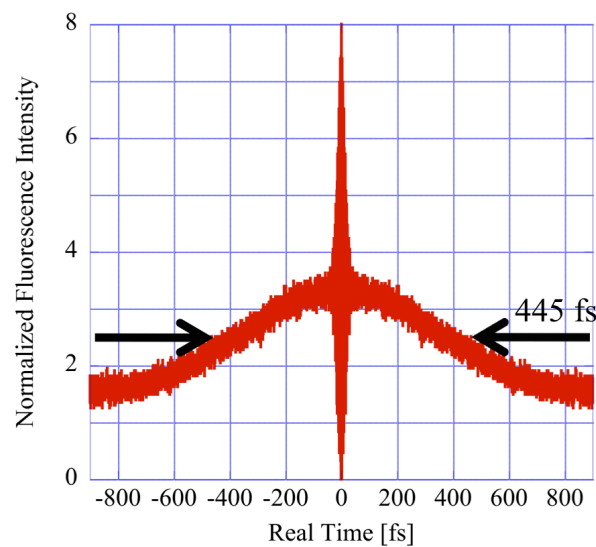


パルス幅の測定

レーザー出射時(分散無し)



対物レンズ後(分散補償無し) 対物レンズ後(分散補償有り)



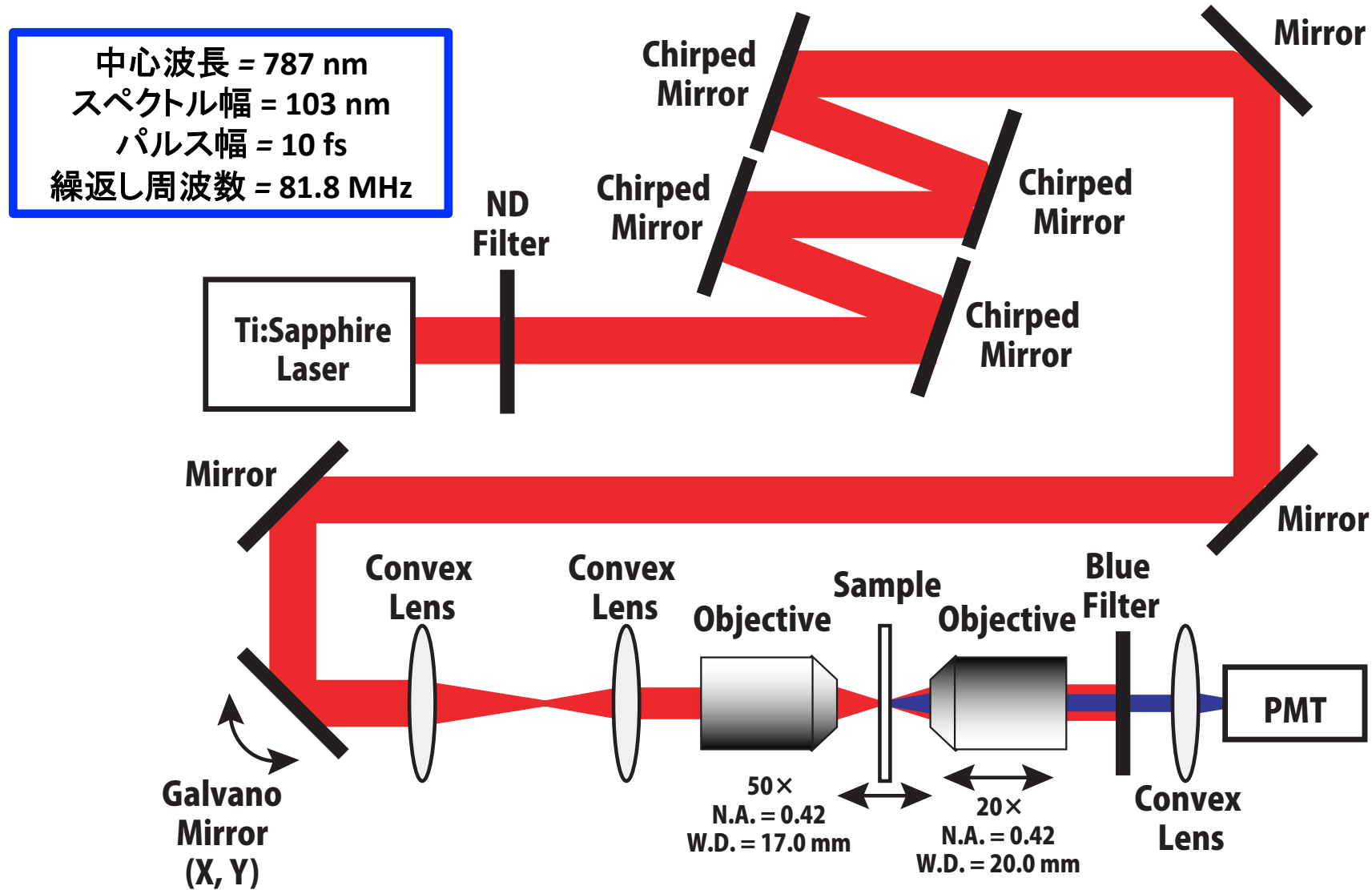
- ・放物面鏡を用いて測定
- ・フリッジ波形の裾に盛り上がり(ペDESTAL)は見られない

- ・ガラス基板を用いて負分散をキャンセルし測定
- ・対物レンズにより裾が大きく広がっている

- ・チャープミラーを用いて(往復)負分散を与えて測定
- ・裾の広がりがわずかながらも抑制

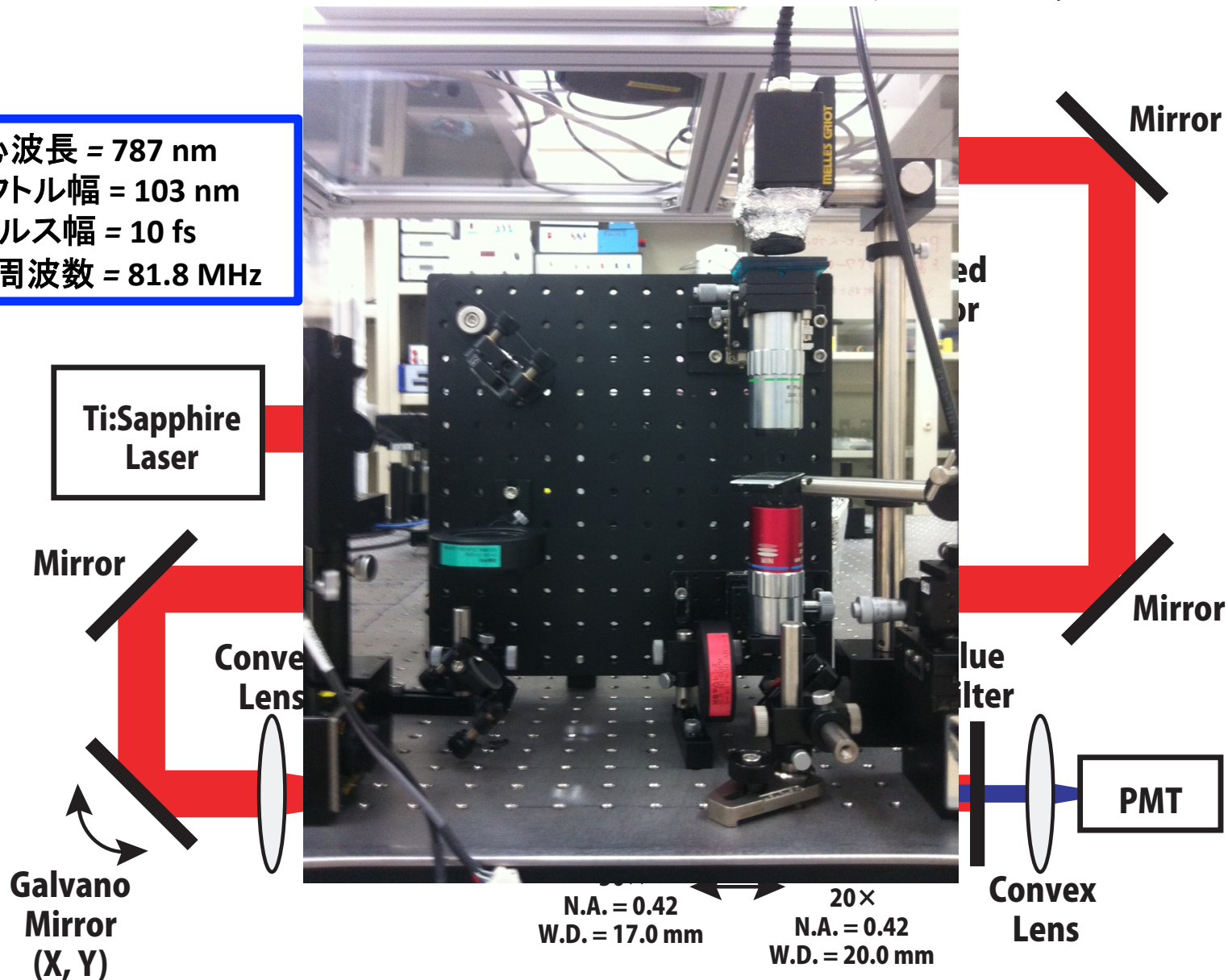
分散補償によりパルスの広がりが抑制

生体コラーゲンSHG顕微鏡

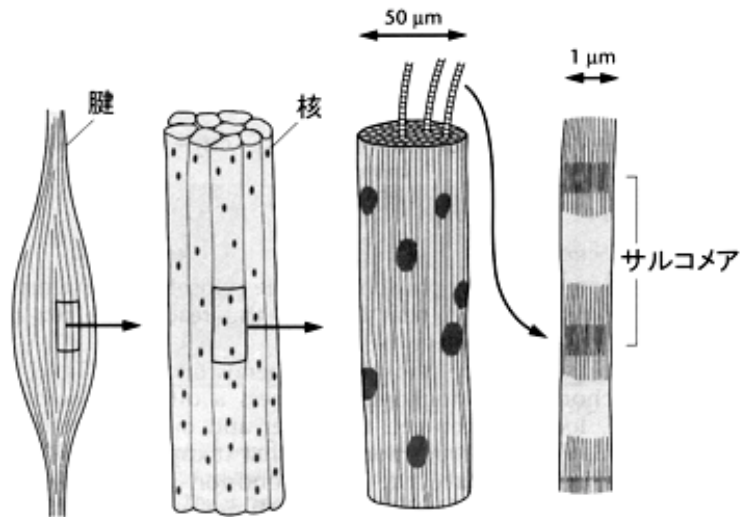


生体コラーゲンSHG顕微鏡

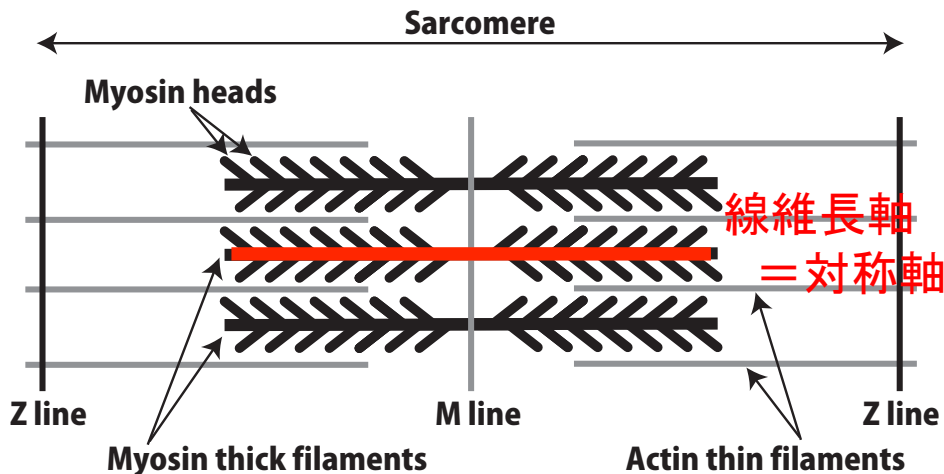
中心波長 = 787 nm
スペクトル幅 = 103 nm
パルス幅 = 10 fs
繰返し周波数 = 81.8 MHz



測定サンプル (兎下腿骨格筋)



筋肉 線維束 筋線維 筋原線維
<http://khatori.yz.yamagata-u.ac.jp/>より抜粋



骨格筋

筋肉 - 線維束 - 筋線維 - 筋原線維

筋原線維

サルコメアの規則正しい周期構造

サルコメア

アクチン+ミオシンで形成

ミオシン

タンパク質

筋肉の収縮に寄与

ヘッドを持つ



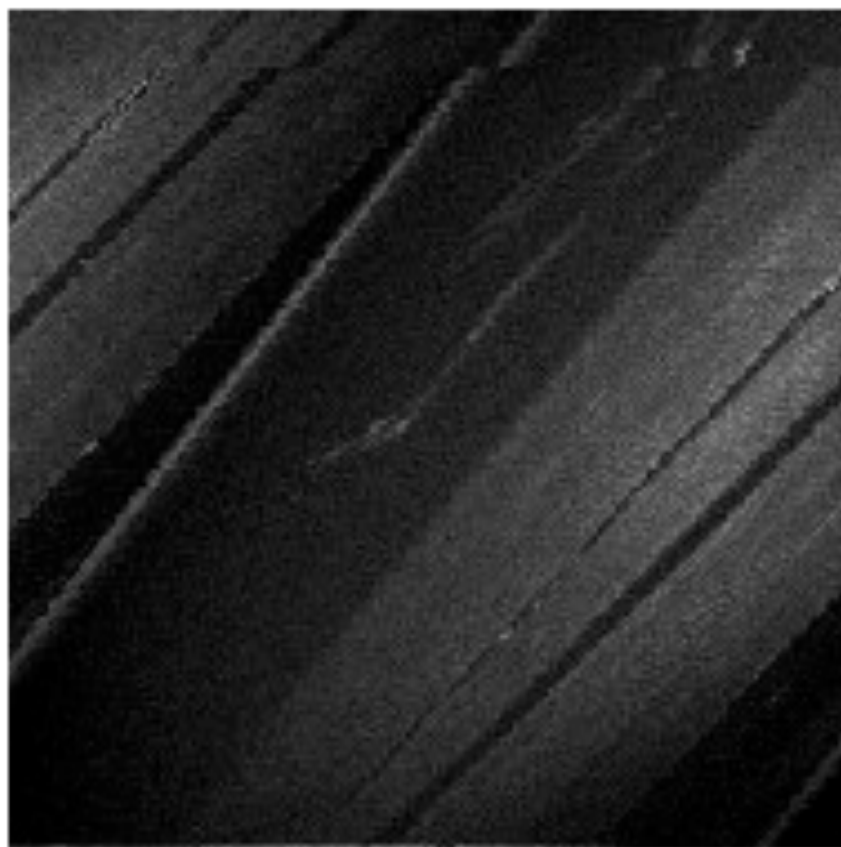
ミオシン = 非中心対称構造

SHG光の発生源となる

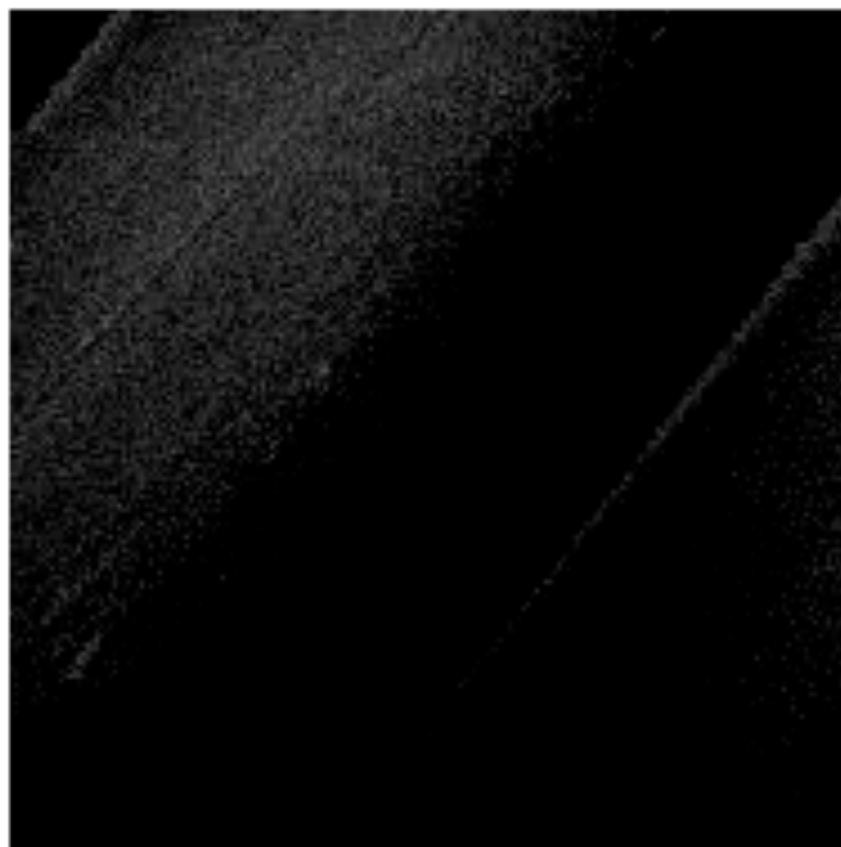
実験結果：生体組織のイメージング

- ・ドライ対物レンズ (N.A.=0.42, W.D.=17 mm) を使用
- ・レーザー平均パワー 20 mW
- ・画像サイズ約 $430\ \mu\text{m} \times 430\ \mu\text{m}$

分散補償有り



分散補償無し

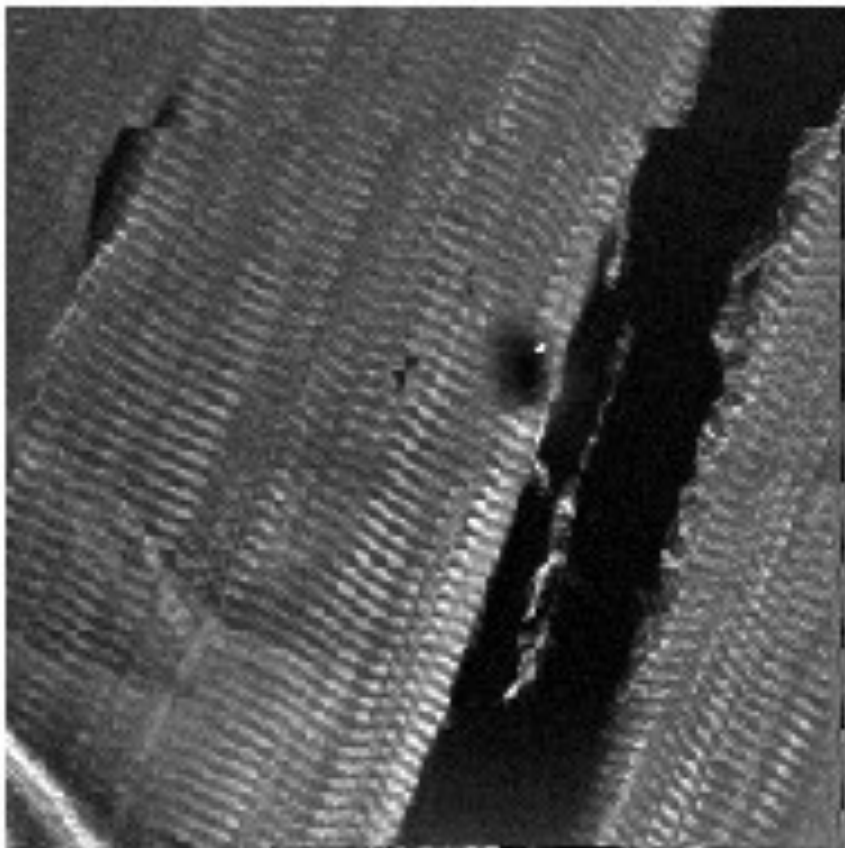


分散補償の効果を確認

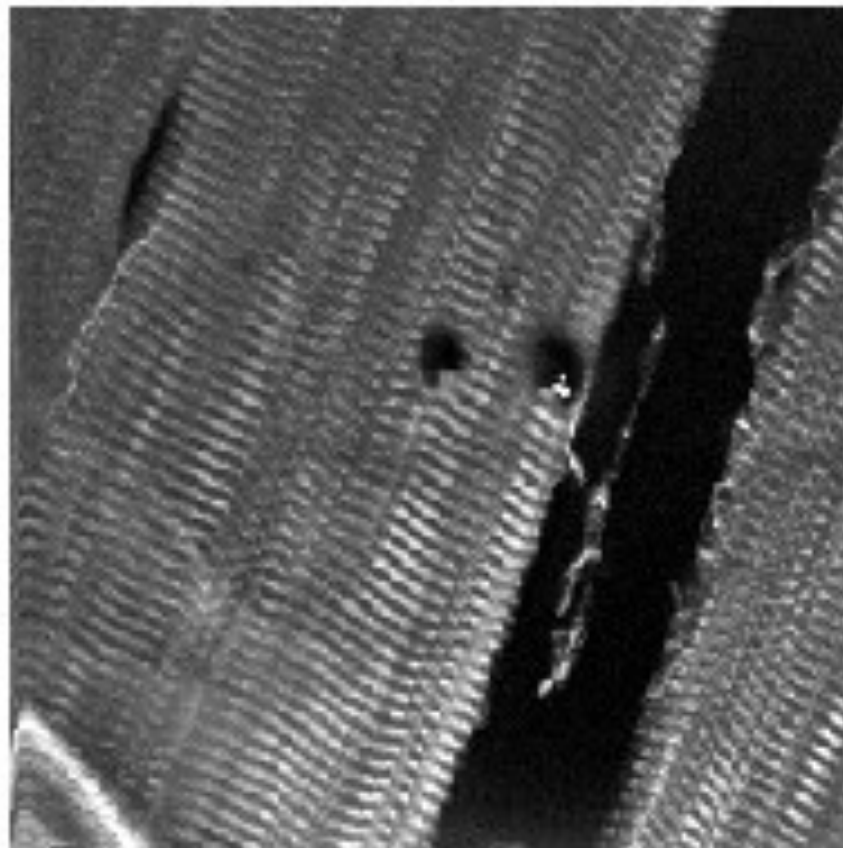
実験結果：生体組織のイメージング

- ・油浸対物レンズ (N.A.=0.90, W.D.=350 μm) を使用
- ・レーザー平均パワー 10 mW
- ・画像サイズ約210 μm *210 μm

分散補償有り



分散補償無し



油浸対物レンズのGDDが大きすぎる？

まとめ

- ドライ対物レンズを用いて, 分散補償のSHGイメージングによる効果を確認
- 油浸対物レンズを用いて, 更なる高感度化を達成

今後の予定

- さらに大きな群遅延分散を与えられるチャープミラーを用いて、対物レンズ後のパルス幅を完全に補償し、高感度化を達成する。
- 細胞産生コラーゲン、コラーゲンゲル等のイメージングを通してSHG顕微鏡を再生医療に適用する。