

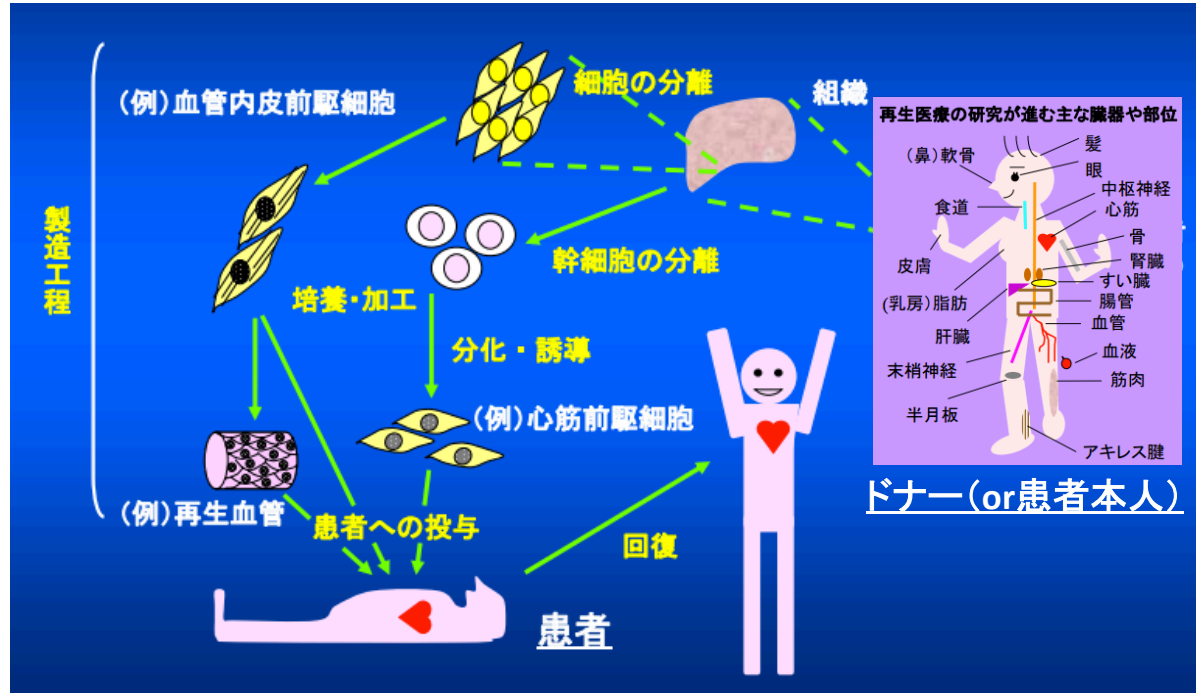
H25前期雑誌会

SHG顕微鏡の再生医療への応用

4/24 長谷

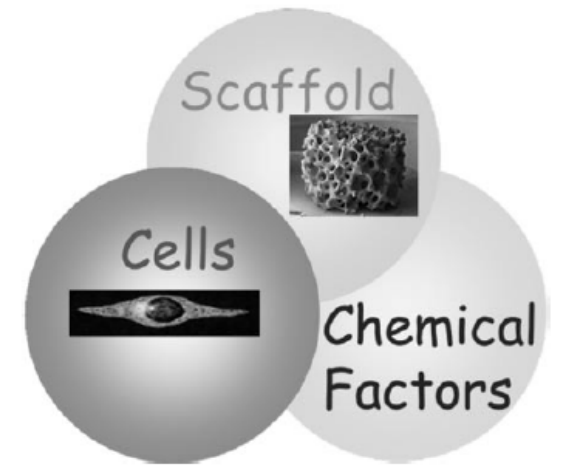
# イントロダクション

再生医療・・・機能が損なわれた場所に必要な細胞を補う

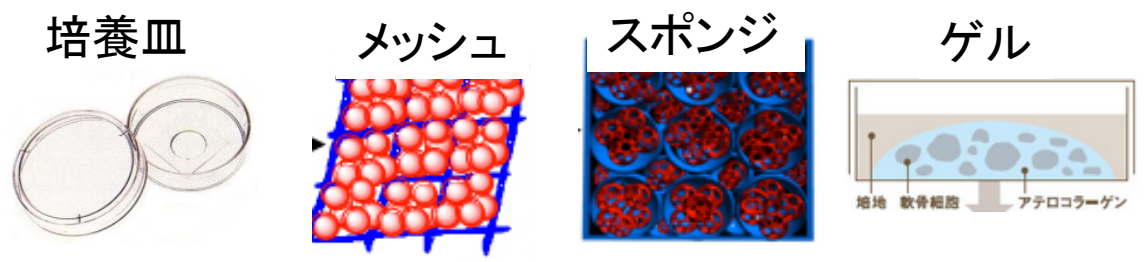


## 製造工程

足場に細胞を播種  
成長因子を添加

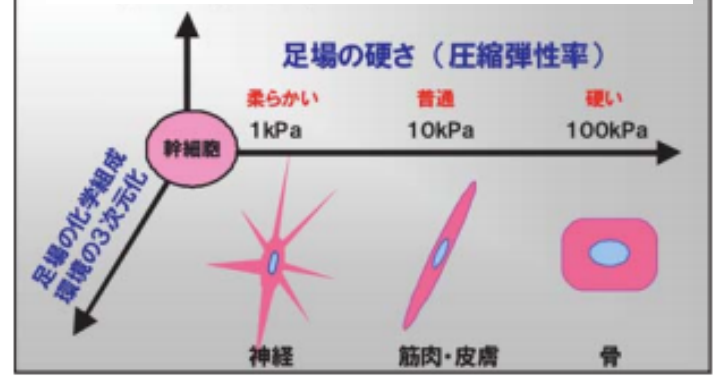


## 足場



細胞が接着する足場が分化にとって重要

## 足場の硬さと分化誘導の関係

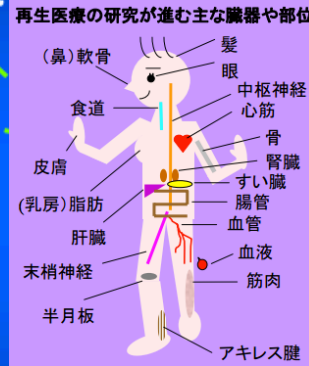
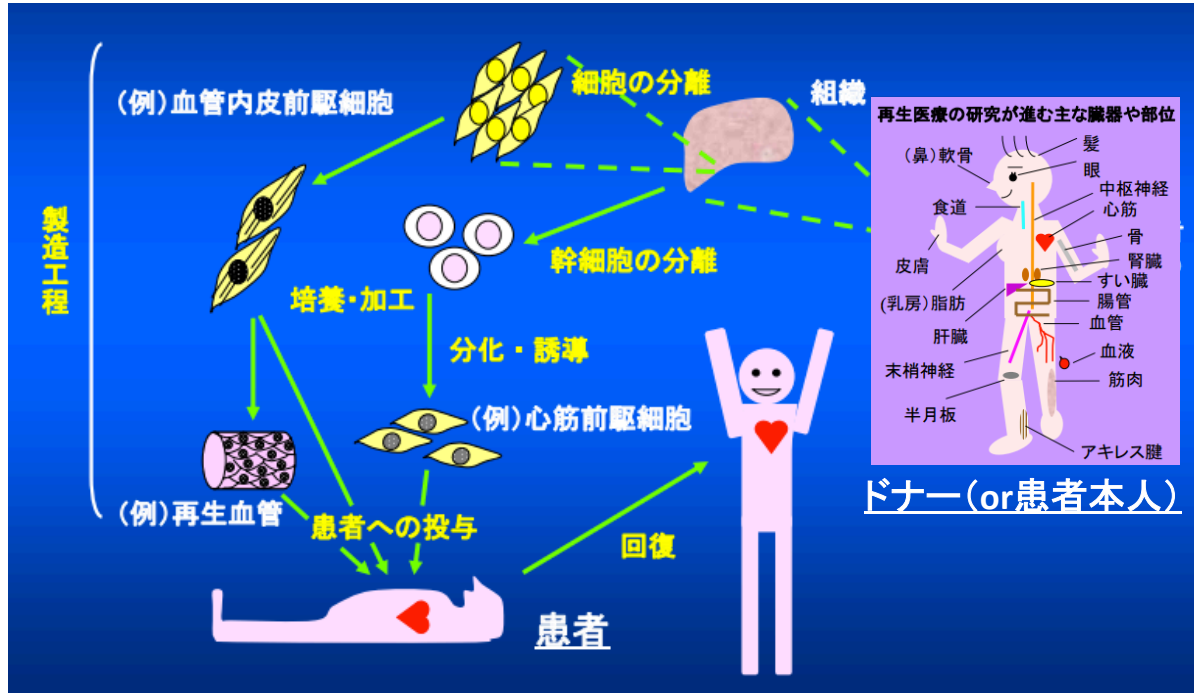
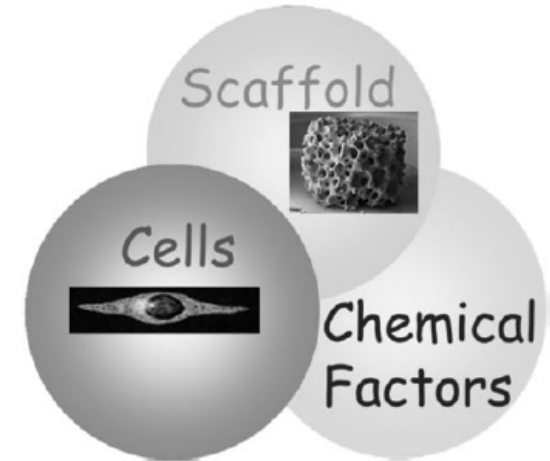


# イントロダクション

再生医療・・・機能が損なわれた場所に必要な細胞を補う

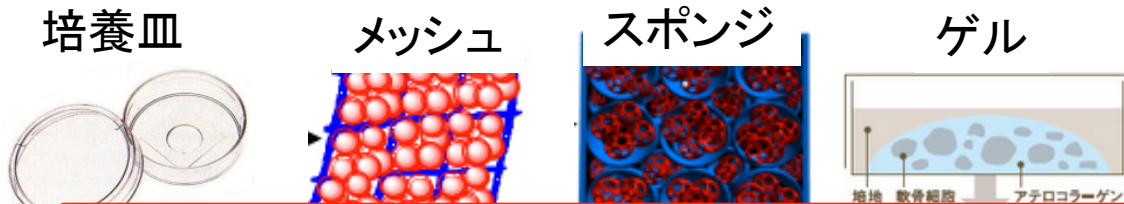
## 製造工程

足場に細胞を播種  
成長因子を添加

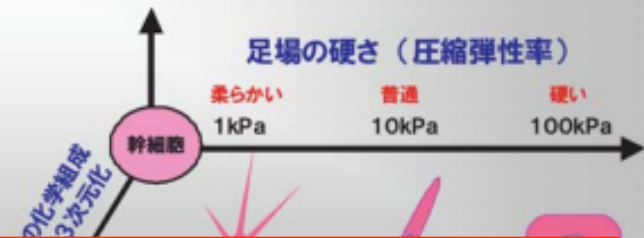


ドナー(or患者本人)

## 足場



## 足場の硬さと分化誘導の関係



足場および培養細胞の評価が求められる

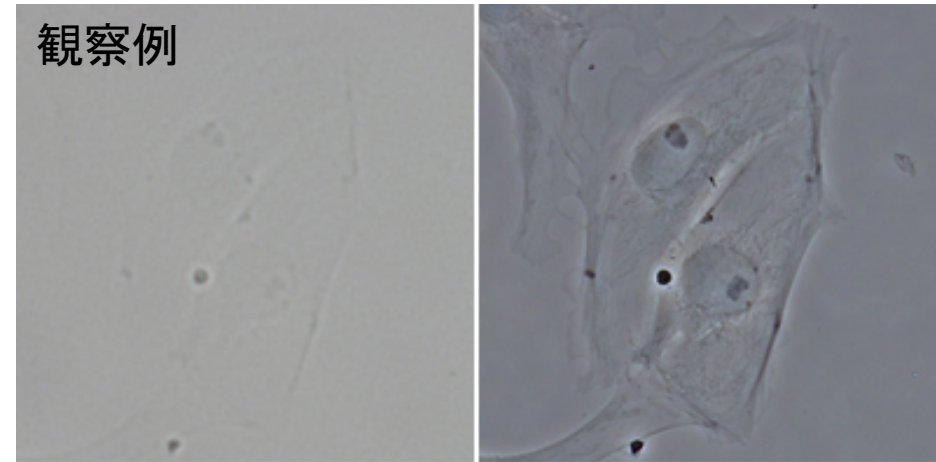
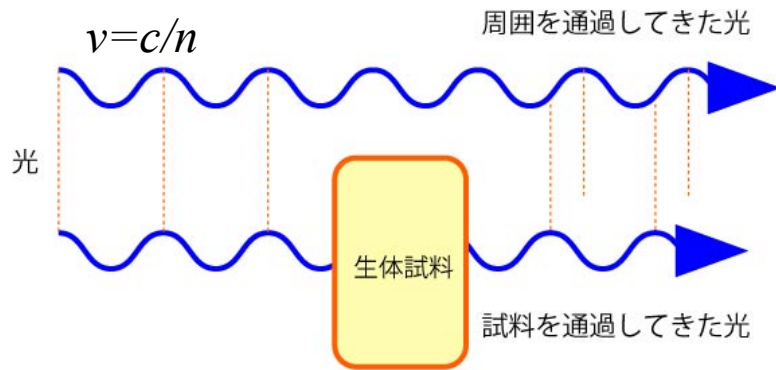
# 紹介雑誌

- ① LOUISE E. SMITH, ROD SMALLWOOD, AND SHEILA MACNEIL. “A Comparison of Imaging Methodologies for 3D Tissue Engineering”. MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 73, 1123 (2010)
- ② Visar Ajeti, Oleg Nadiarnykh, Suzanne M. Ponik, Patricia J. Keely, Kevin W. Eliceiri, and Paul J. Campagnola. “Structural changes in mixed Col I/Col V collagen gels probed by SHG microscopy: implications for probing stromal alterations in human breast cancer”. BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS 2, 2307 (2011)
- ③ Wei-Liang Chen, Chi-Hsiu Huang, Ling-Ling Chiou, Te-Hsuen Chen, Yi-You Huang, Ching-Chuan Jiang, Hsuan-Shu Lee, and Chen-Yuan Dong. “Multiphoton Imaging and Quantitative Analysis of Collagen Production by Chondrogenic Human Mesenchymal Stem Cells Cultured in Chitosan Scaffold”. TISSUE ENGINEERING: Part C 16, 913 (2010)

① A Comparison of Imaging Methodologies for  
3D Tissue Engineering

# 位相差顕微鏡

- ・生体サンプル＝無色透明→通常の明視野観察では、明暗・色の情報が見えない
- ・物体の部分的な厚さや屈折率によって透過光に生ずる位相差を明暗の差に変えて可視化



明視野観察

位相差観察

透過光＝透過直進光＋回折光

0次光と±1次光の干渉縞

0次光と±1次光の位相差＝ $\pi/2$

干渉縞が横ずれ

↓  
全体として $\pi$ ずれる

干渉縞が打ち消し合い、一様の強度  
屈折率分の像は形成されない

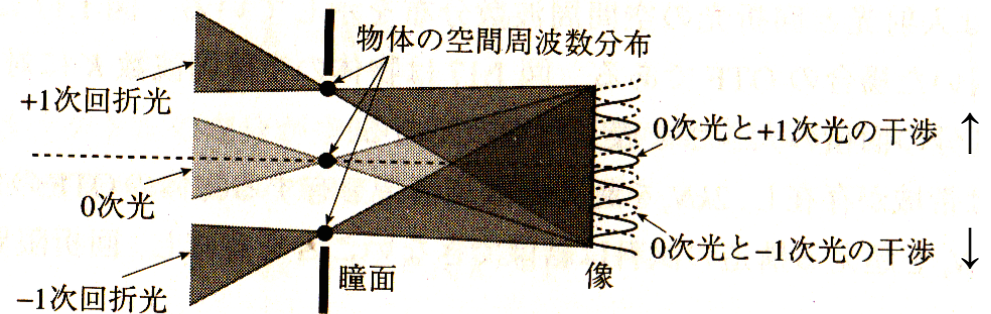


図 1.18 位相物体の結像

位相物体・・・光を吸収しない

# 位相差顕微鏡

0次光の位相を制御

位相板( $\lambda/4$ 板)で0次光の位相を $\pi/2$ ずらす  
2つの干渉縞の位相を揃える  
位相差による明暗が可視化

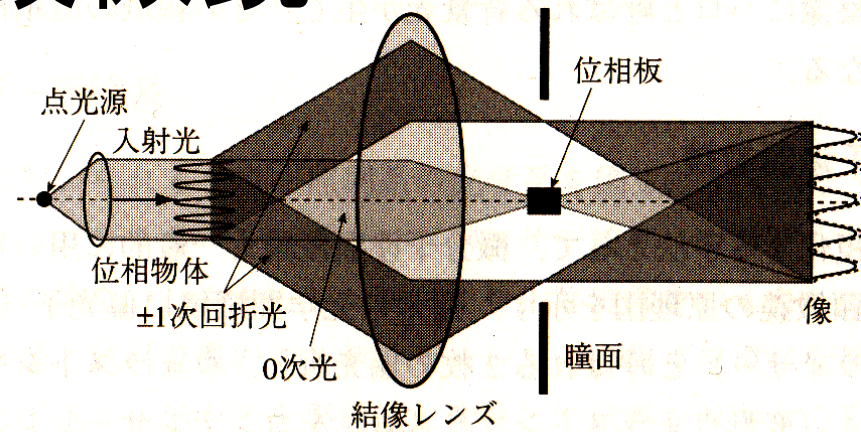
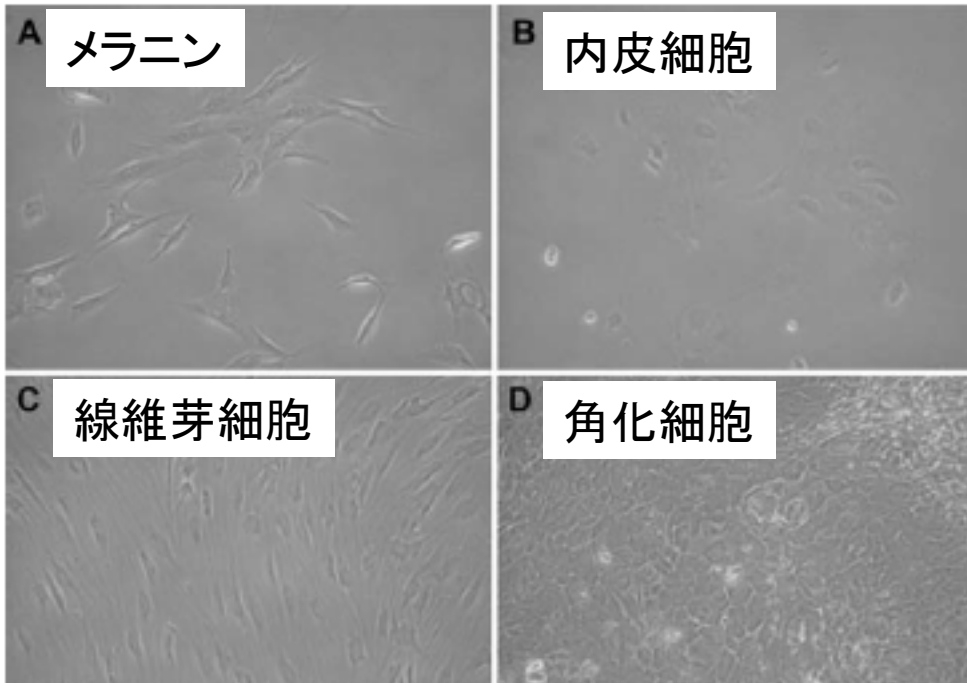


図 1.19 位相差顕微鏡の原理

単層培養中のヒト皮膚細胞



コラーゲンゲル中の線維芽細胞 (矢印)



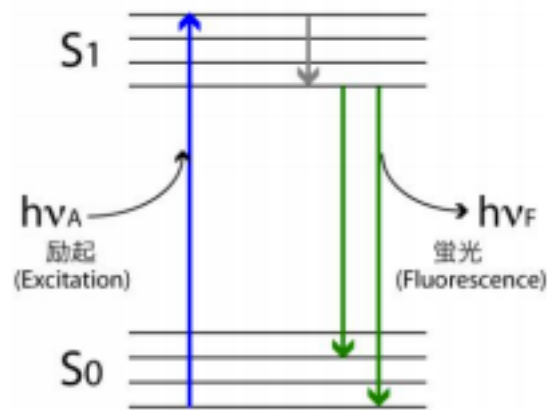
回折光の通り道, 試料の厚み・屈折率・周期構造のあるなしによって $\pi/2$ のずれが変化  
→コントラストの低下

# 蛍光顕微鏡

- ・試料から発する蛍光を検出する  
 蛍光試薬・蛍光タンパク質で標識  
 試料自身の蛍光

## 生体組織の励起・発光スペクトル

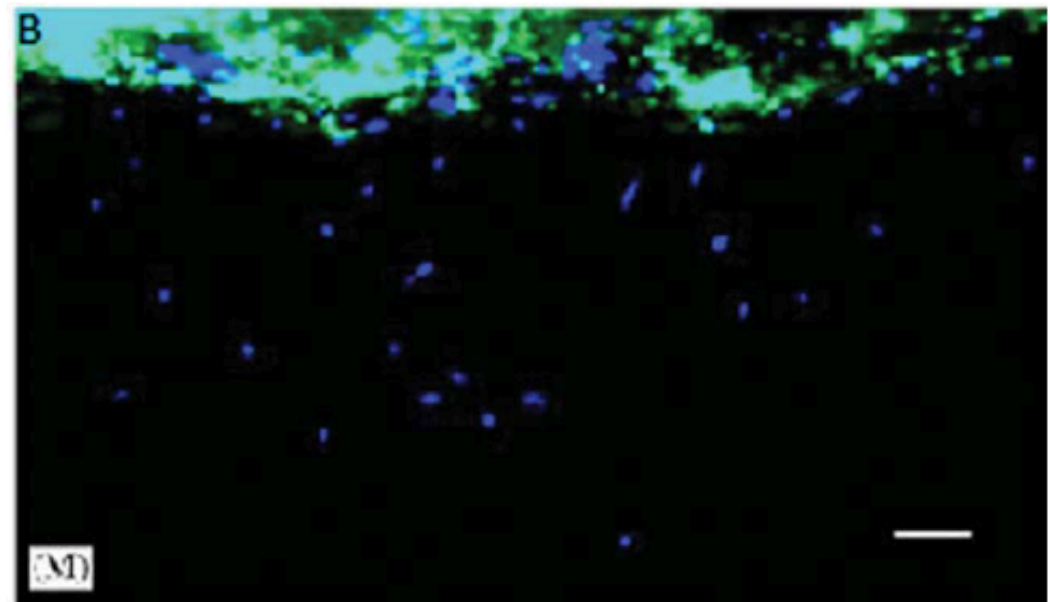
Fluorophore	Excitation wavelength $\lambda_{ex}$ (nm)	Emission wavelength $\lambda_{em}$ (nm)
Keratin		525
NAD(P)H	340	450-470
Flavins	370, 450	530
Melanin	UV/VIS	440, 520, 575
Elastin	300-340	420-460
Collagen	300-340	420-460
SHG	720-960	360-480
Lipofuscin	UV/VIS	570-590
Protoporphyrin IX (PPIX)	405, 630	635, 710



$$E = h\nu = hc/\lambda$$

E:光のエネルギー h:プランク定数  
 v:光の周波数 c:光速  $\lambda$ :光の波長

コラーゲン中の  
 緑:角化細胞 (cell tracker green)  
 青:線維芽細胞 (DAPI)



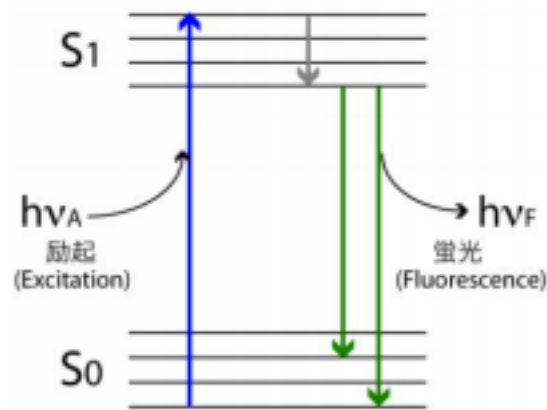


# 蛍光顕微鏡

- ・試料から発する蛍光を検出する  
 蛍光試薬・蛍光タンパク質で標識  
 試料自身の蛍光

## 生体組織の励起・発光スペクトル

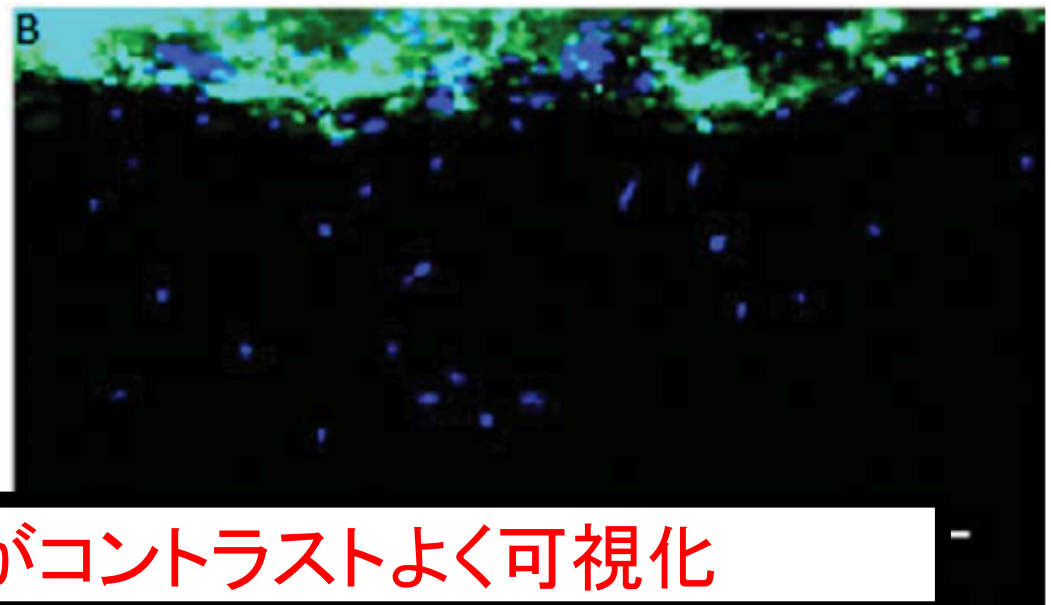
Fluorophore	Excitation wavelength $\lambda_{ex}$ (nm)	Emission wavelength $\lambda_{em}$ (nm)
Keratin		525
NAD(P)H	340	450-470
Flavins	370, 450	530
Melanin	UV/VIS	440, 520, 575
Elastin	300-340	420-460
Collagen	300-340	420-460
SHG	720-960	360-480
Lipofuscin	UV/VIS	570-590
Protoporphyrin IX (PPIX)	405, 630	635, 710



$$E = hv = hc/\lambda$$

E:光のエネルギー h:プランク定数  
 v:光の周波数 c:光速  $\lambda$ :光の波長

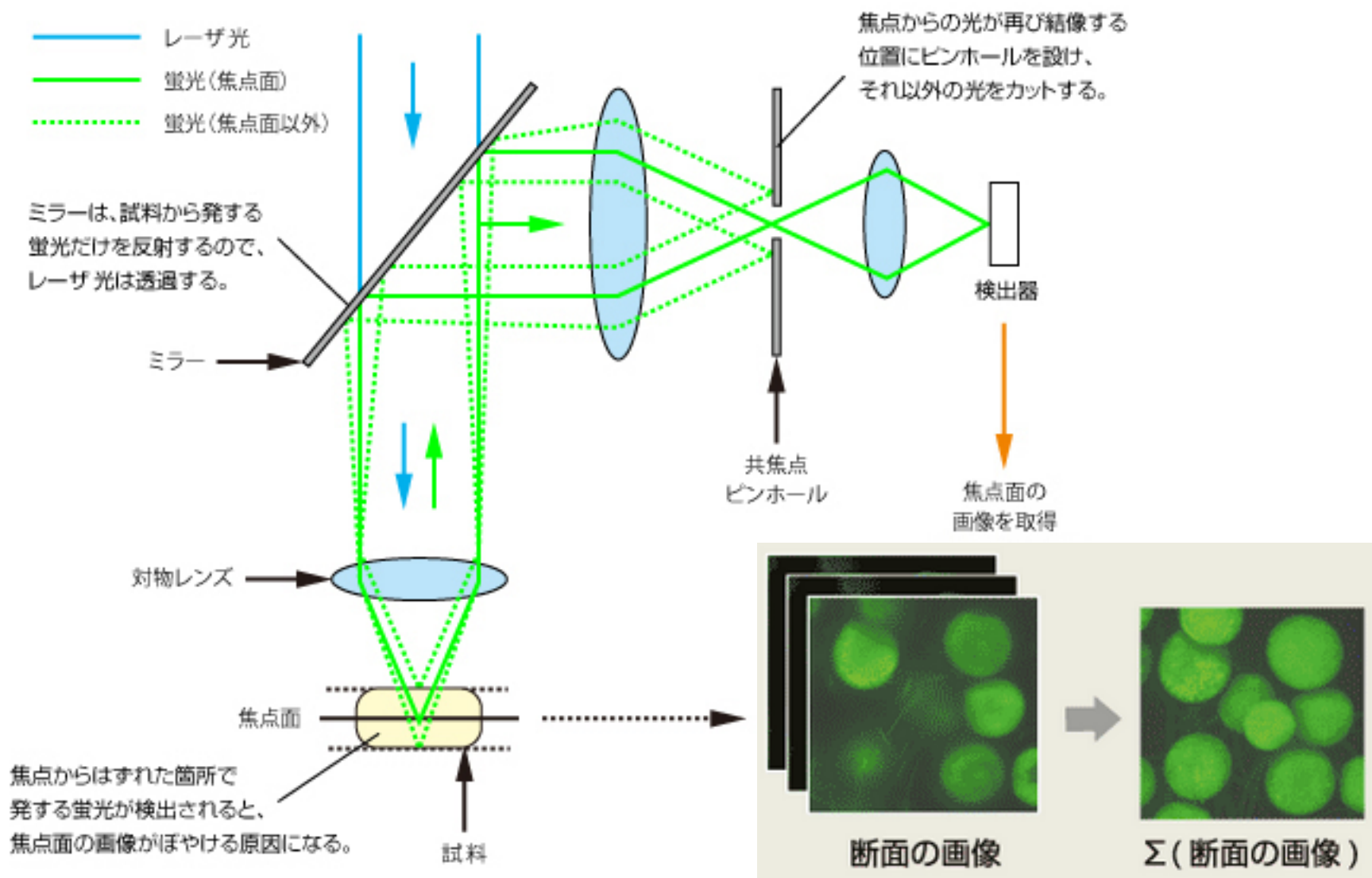
コラーゲンゲル中の  
 緑:角化細胞 (cell tracker green)  
 青:線維芽細胞 (DAPI)



各細胞の分布がコントラストよく可視化

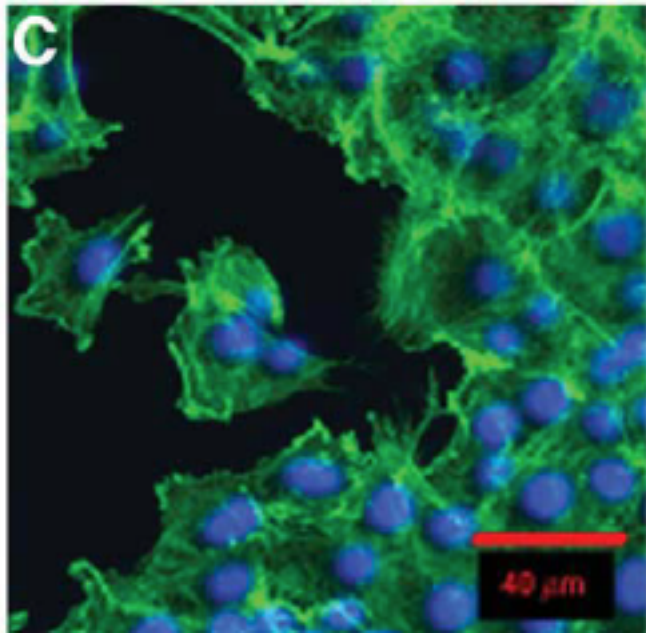
# 共焦点顕微鏡

・厚みのあるサンプルでもボケのないイメージが得られる

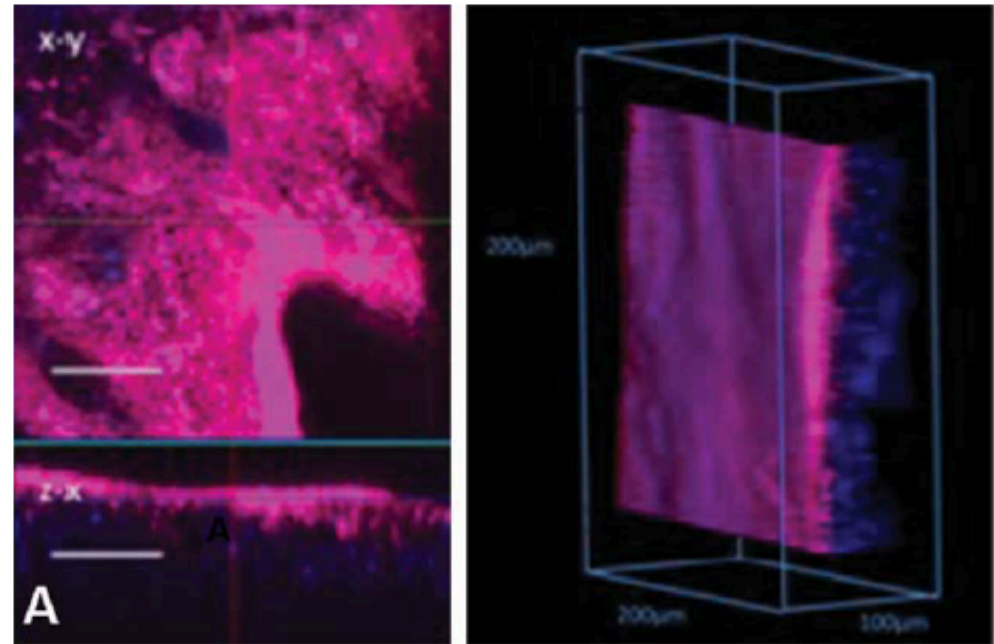


# 共焦点顕微鏡

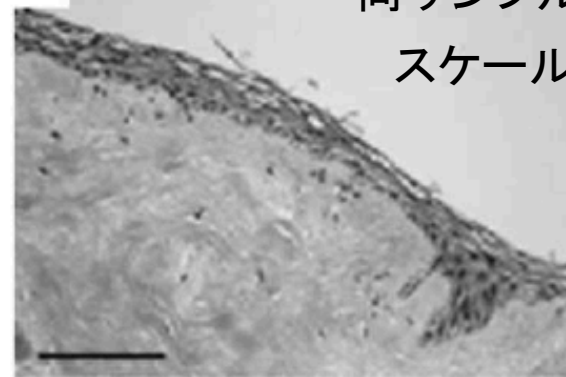
単層培養中の神経鞘腫細胞  
緑:細胞骨格(Phalloidin)  
青:細胞核(PAPI)



培養口腔粘膜(rhodamine) スケールバー 50 μm



B

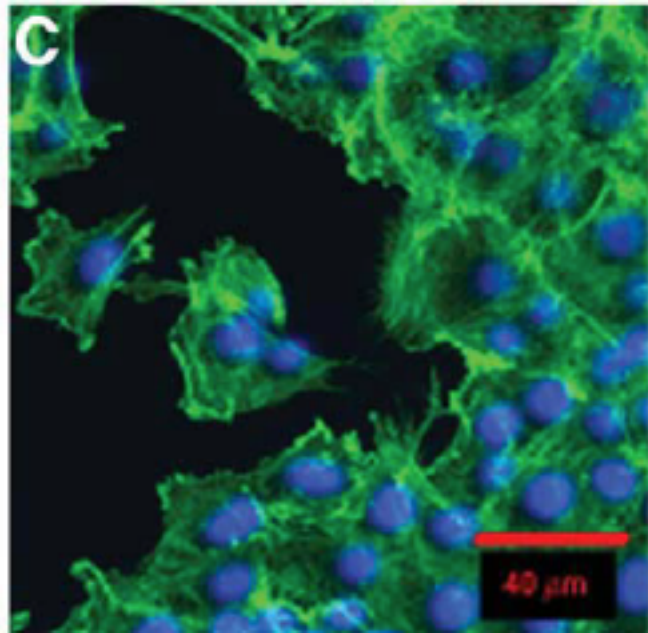


同サンプルのHE染色

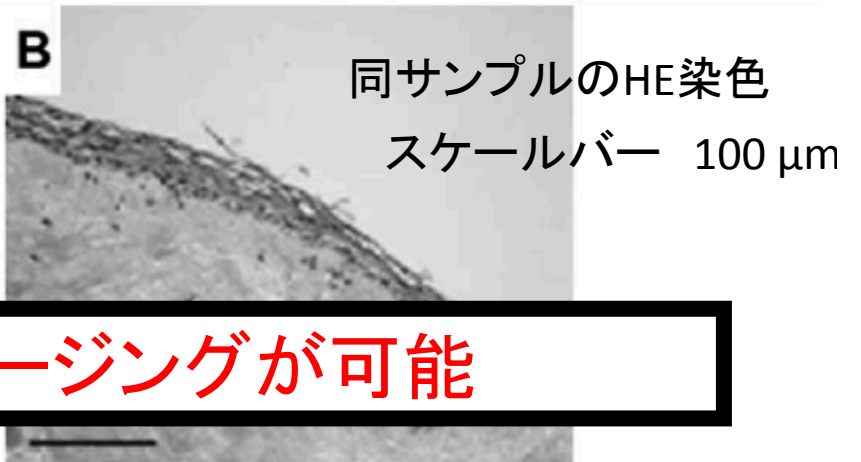
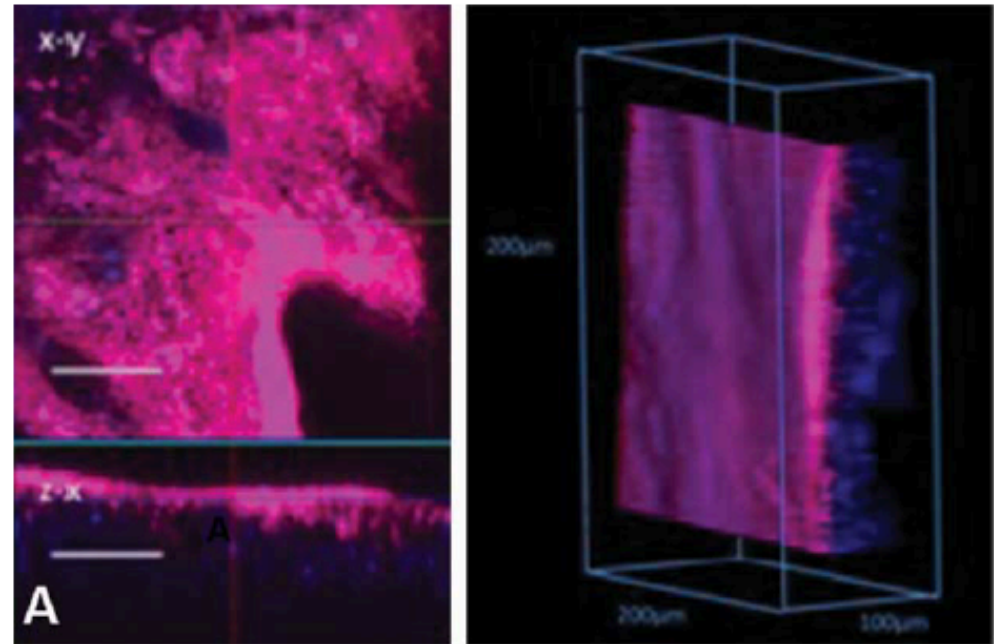
スケールバー 100 μm

# 共焦点顕微鏡

単層培養中の神経鞘腫細胞  
緑:細胞骨格(Phalloidin)  
青:細胞核(DAPI)



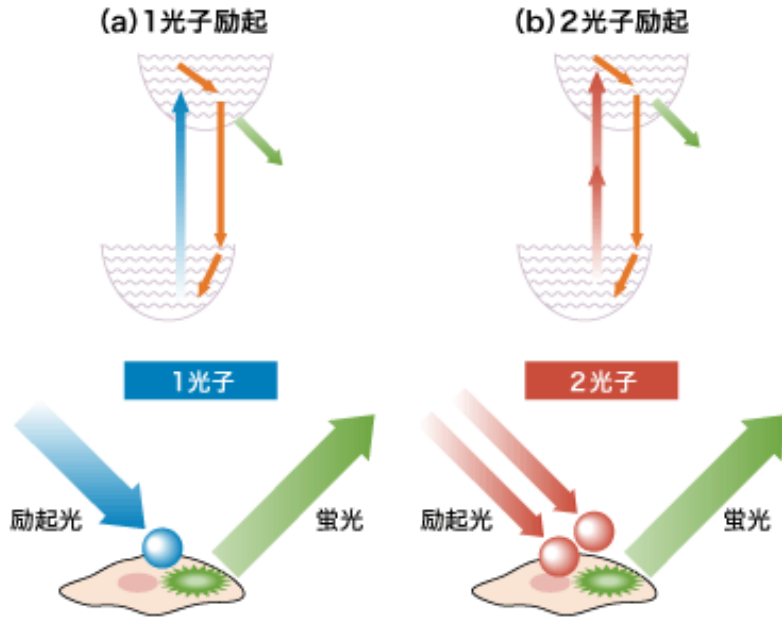
培養口腔粘膜(rhodamine) スケールバー 50 μm



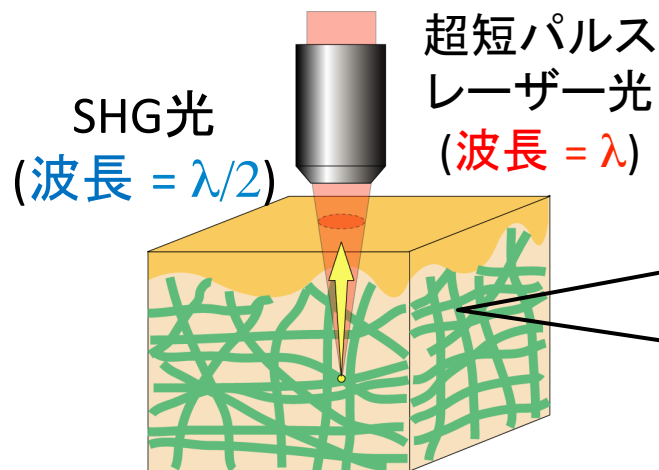
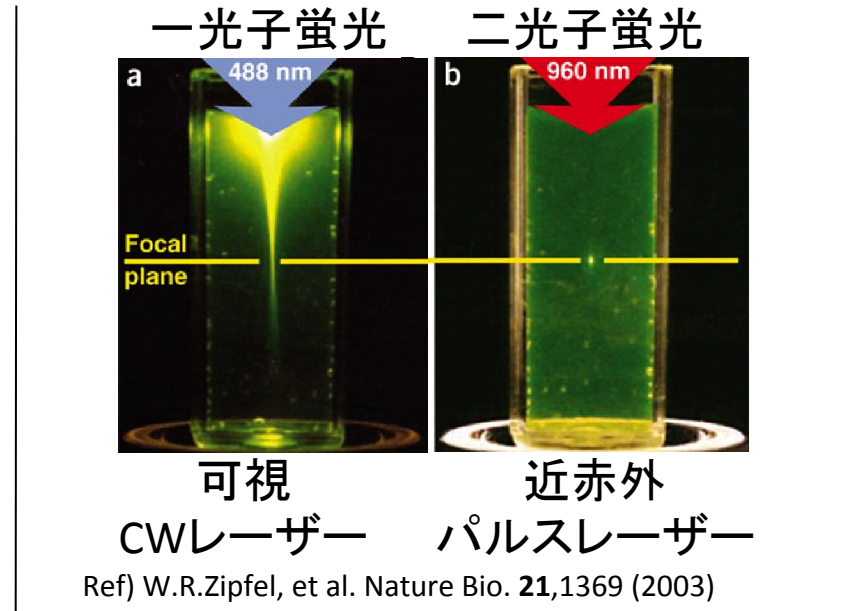
高コントラスト・3Dイメージングが可能

# 多光子顕微鏡

## 2光子蛍光



線形光学効果と非線形光学効果の発生領域



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

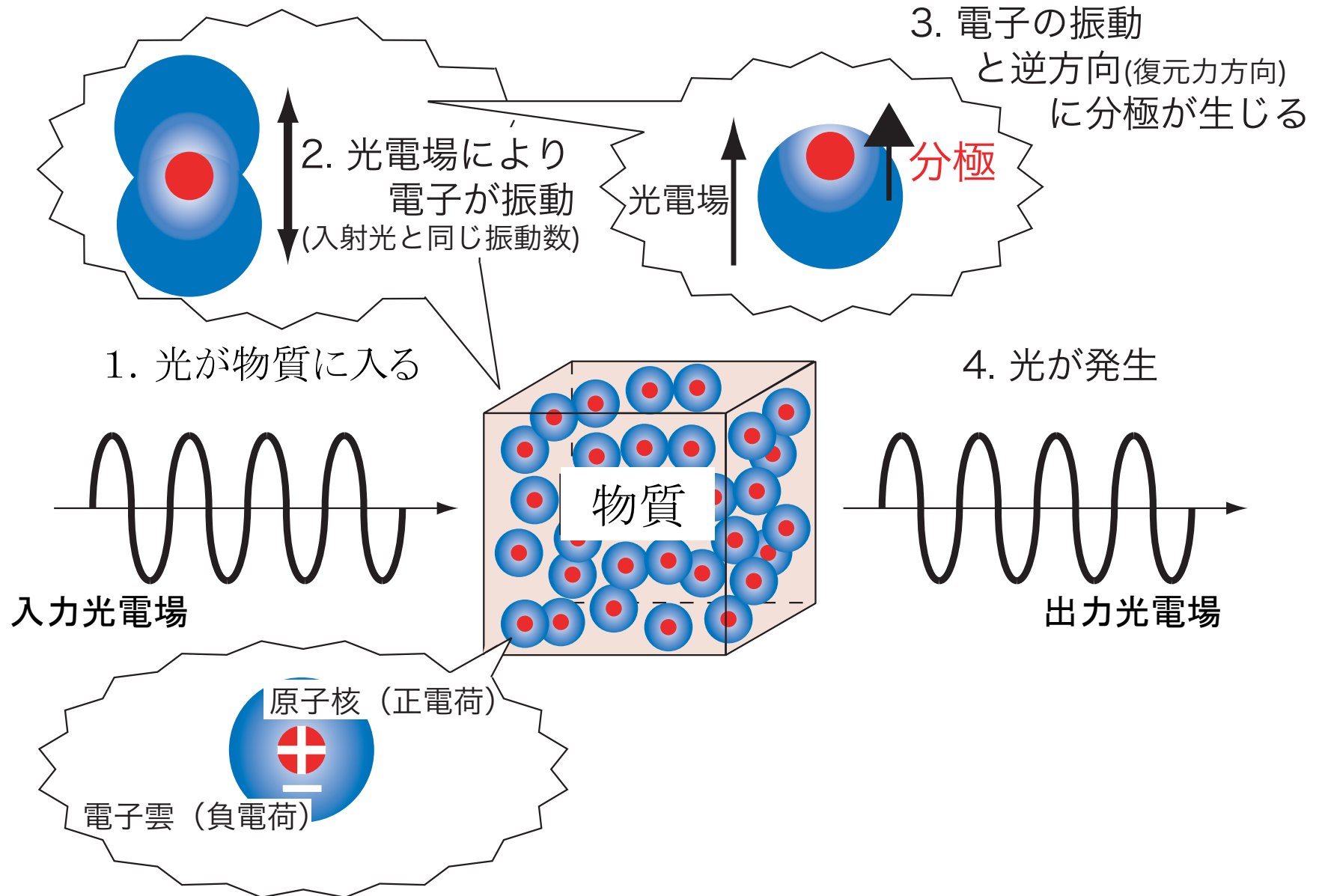


非中心対称性構造

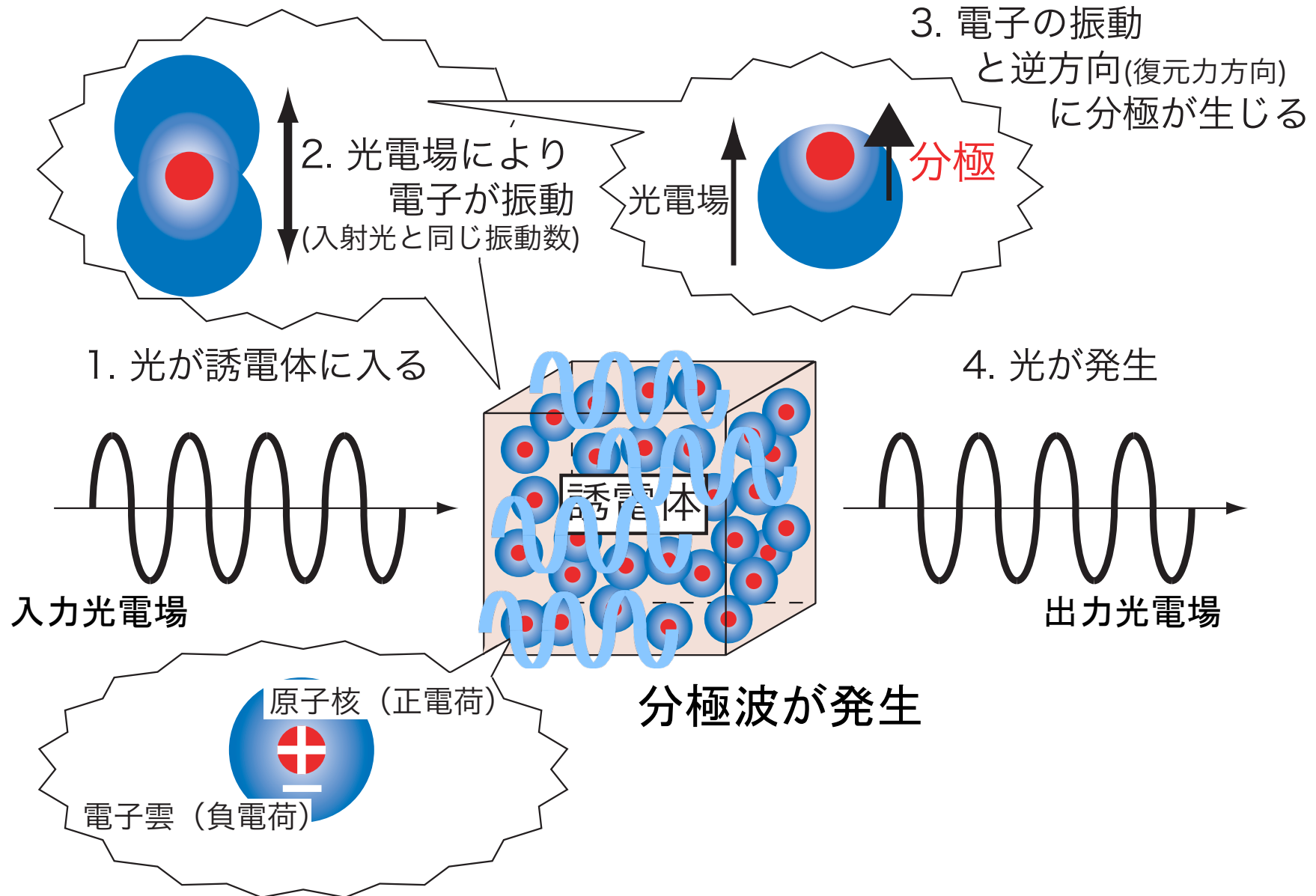


SHG光の発生源

# 光と物質：分極

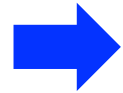


# 光と物質：分極



# 線形分極

## 線形分極



屈折, 反射, 回折, 干渉...

通常の光

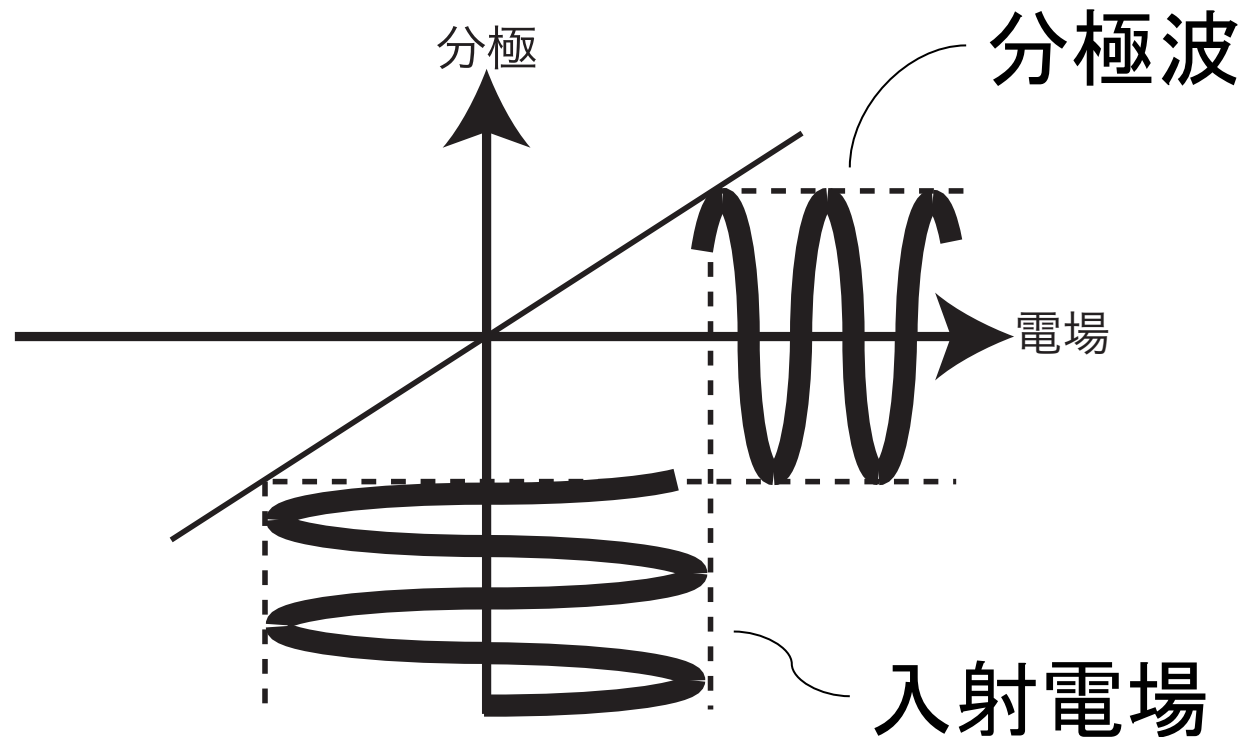
電場  $\propto$  分極

$$P_L = \chi^{(1)} E$$

$P$ : 分極

$\chi^{(1)}$ : 線形感受率

$E$ : 入射電場



線形分極では, 波長(周波数)は変化しない



# 非線形分極

## 非線形分極@非中心対称物質

フェムト秒レーザー

ピークパワーが高い

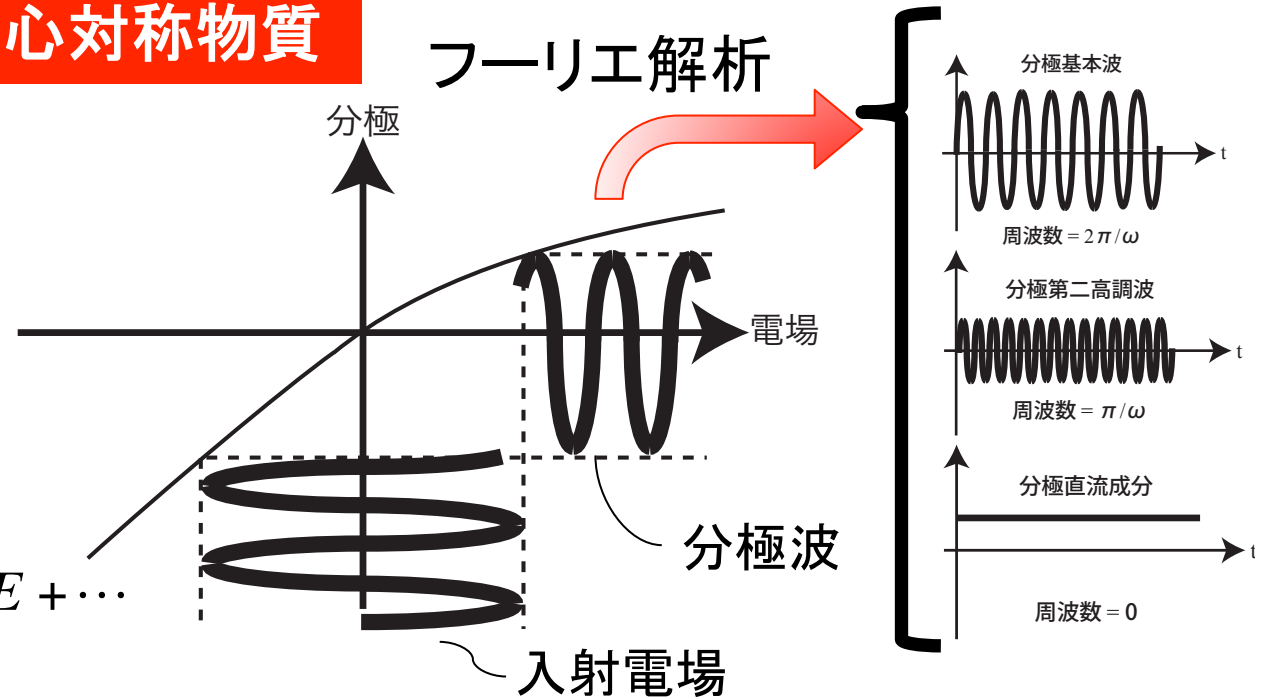
電場が強くなる



電場  $\propto$  分極

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

$\chi^{(n)}$ : 非線形感受率



分極波に非線形な項が現れる → 分極波が歪む → 高調波の成分を含む

- ・非中心対称物質の場合，正負の方向で分極波が非対称

非線形分極では，波長(周波数)変換が起こる

# 非線形分極

## 非線形分極@非中心対称物質

フェムト秒レーザー

ピークパワーが高い

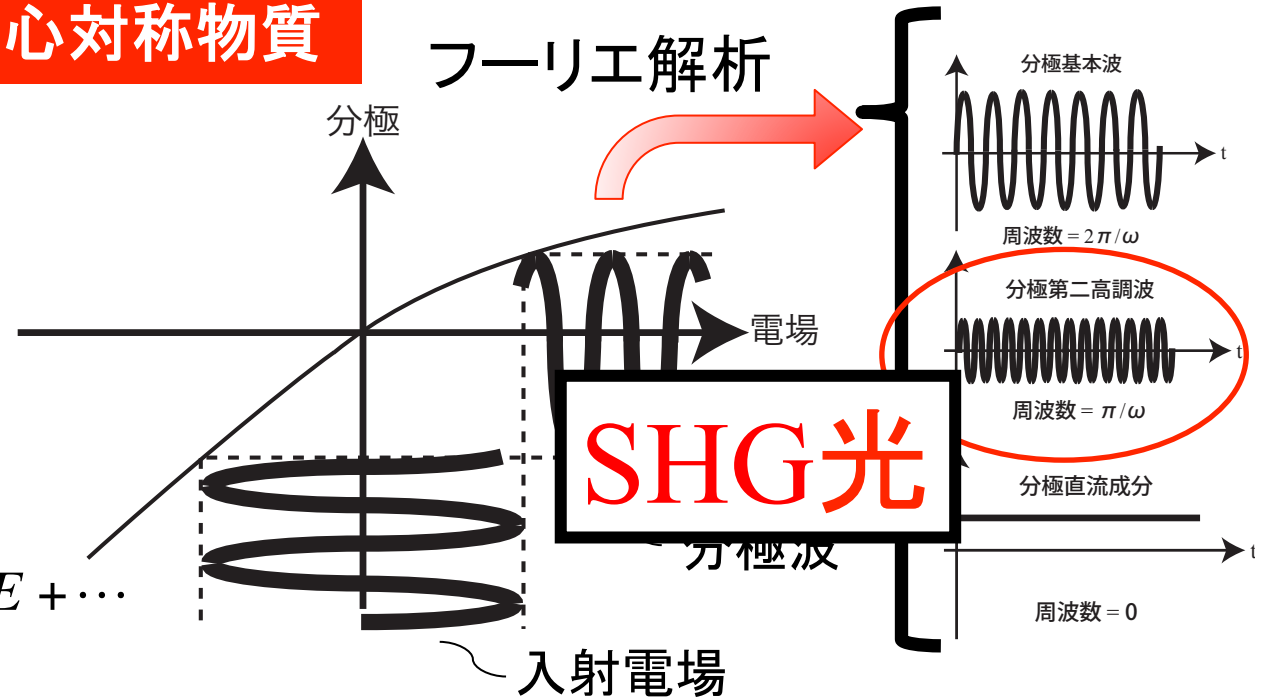
電場が強くなる



電場  $\propto$  分極

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

$\chi^{(n)}$ : 非線形感受率



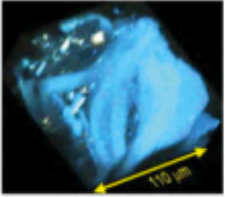
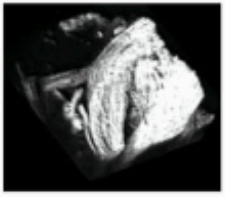
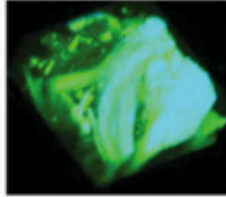
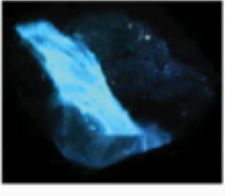
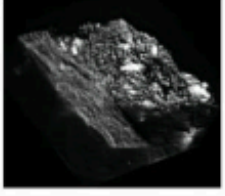
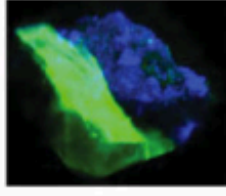
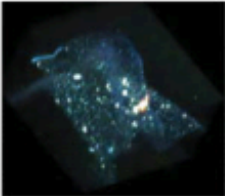
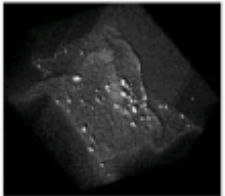
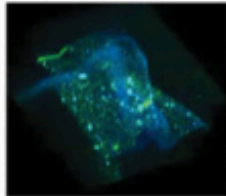

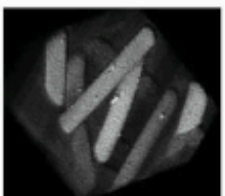
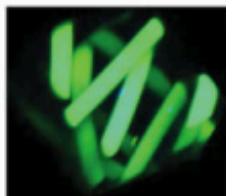
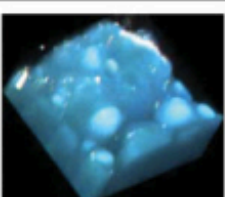
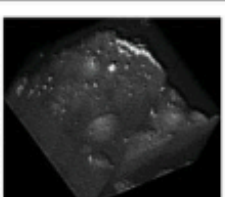
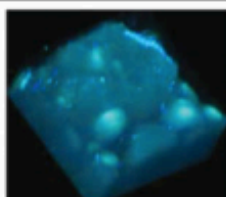
分極波に非線形な項が現れる → 分極波が歪む → 高調波の成分を含む

- ・非中心対称物質の場合, 正負の方向で分極波が非対称

非線形分極では, 波長(周波数)変換が起こる

# 多光子顕微鏡

様々な足場複合材料の3Dイメージ

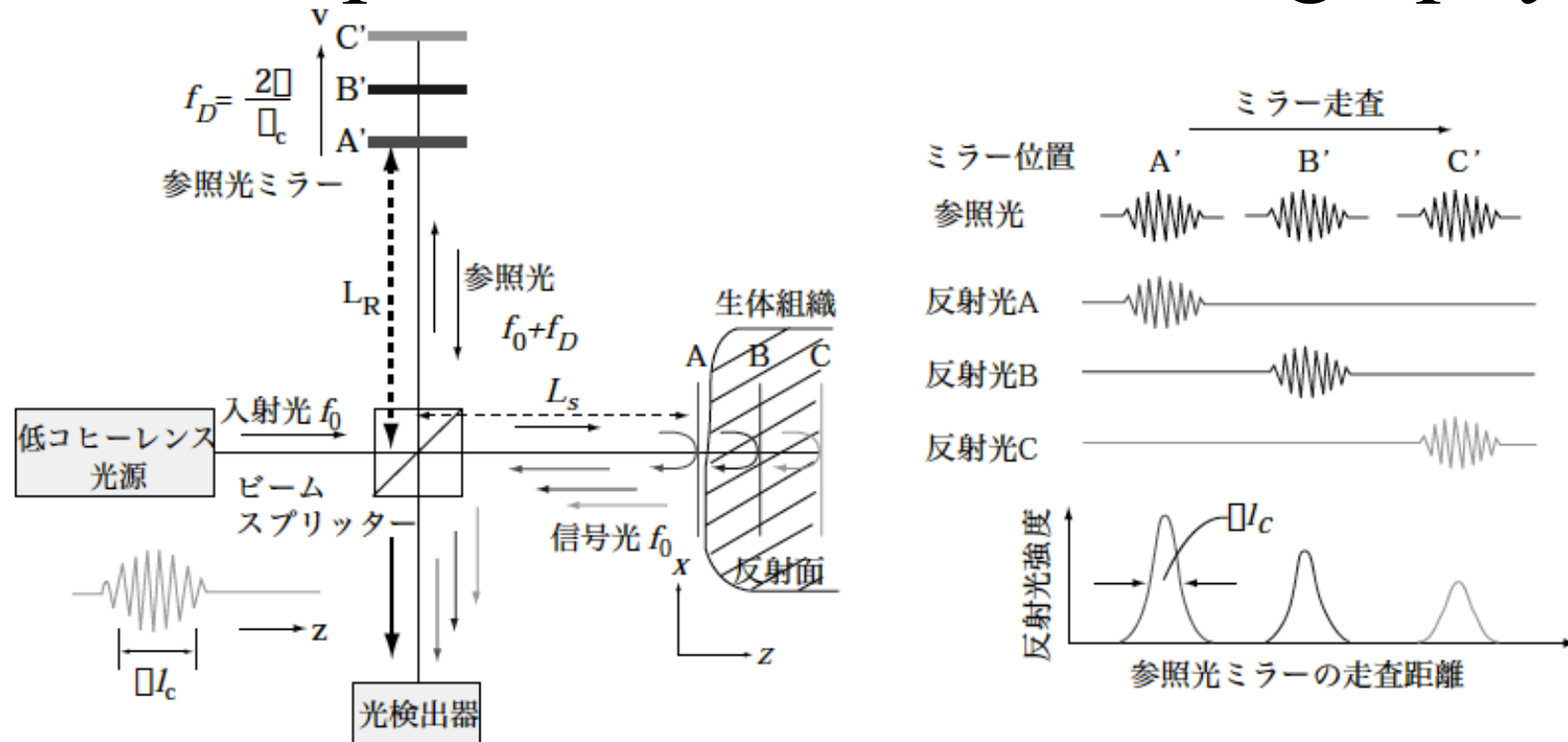
	Autofluorescence	SHG	Combined
Collagen scaffold			
Collagraft bone graft matrix strip			
OPLA			
PGA			
Nylon			

## 生体組織の励起・発光スペクトル

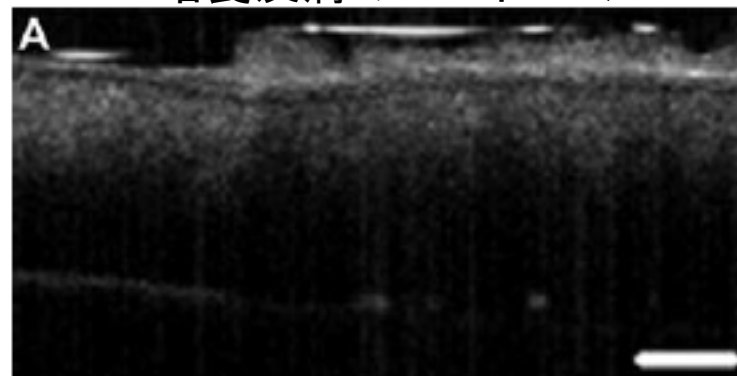
Fluorophore	Excitation wavelength $\lambda_{ex}$ (nm)	Emission wavelength $\lambda_{em}$ (nm)
Keratin		525
NAD(P)H	340	450–470
Flavins	370, 450	530
Melanin	UV/VIS	440, 520, 575
Elastin	300–340	420–460
Collagen	300–340	420–460
SHG	720–960	360–480
Lipofuscin	UV/VIS	570–590
Protoporphyrin IX (PPIX)	405, 630	635, 710

色および蛍光プローブなしで  
異なる物質の分布の3次元情報を得る

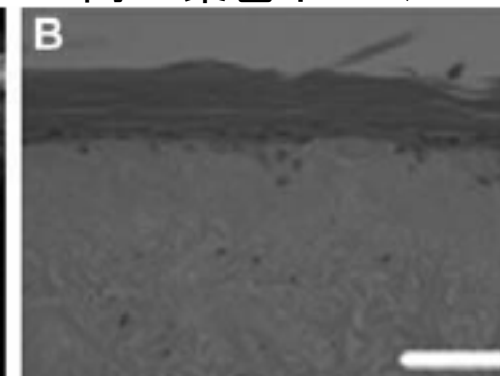
# OCT (Optical Coherence Tomography)



培養皮膚のOCTイメージ



同HE染色イメージ



# 各手法の比較

方法	長所	短所	非破壊	3D
位相差顕微鏡	培養室内でも使用可能 取り扱いが容易	高分解なイメージ(写真)を取るのが困難	○	×
蛍光顕微鏡	高コントラスト	高価 染色が必要	△	×
共焦点顕微鏡	高分解	高価 染色が必要 浸透深さは試料依存	△	○
多光子顕微鏡	高分解 染色不要	高価 浸透深さは試料依存	○	○
ヒストロジー	組織の詳細な可視化	破壊的	×	×
電子顕微鏡	超高分解	破壊的	×	×

# ①まとめ

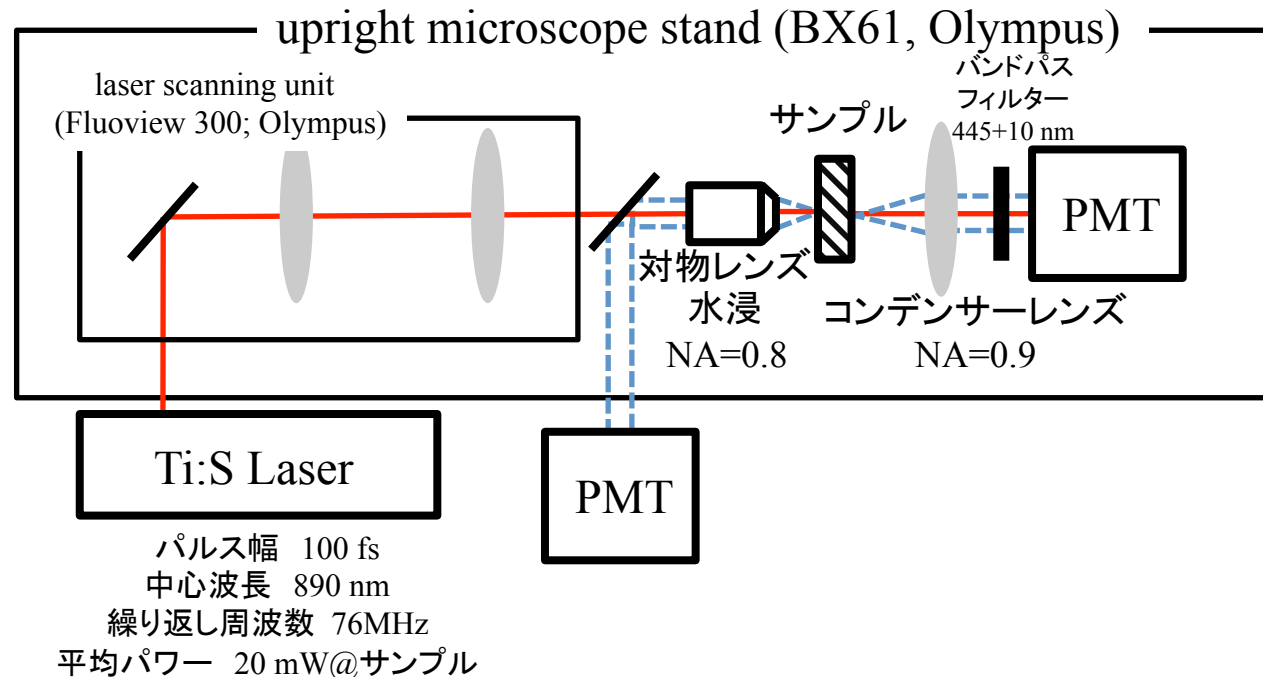
- ・5つの光学的評価手法
- ・求められるもの → 非破壊・非侵襲で  
様々な組織の3次元情報
- ・OCTが今後最も有力なツール？

## ② Structural changes in mixed Col I/Col V collagen gels probed by SHG microscopy: implications for probing stromal alterations in human breast cancer

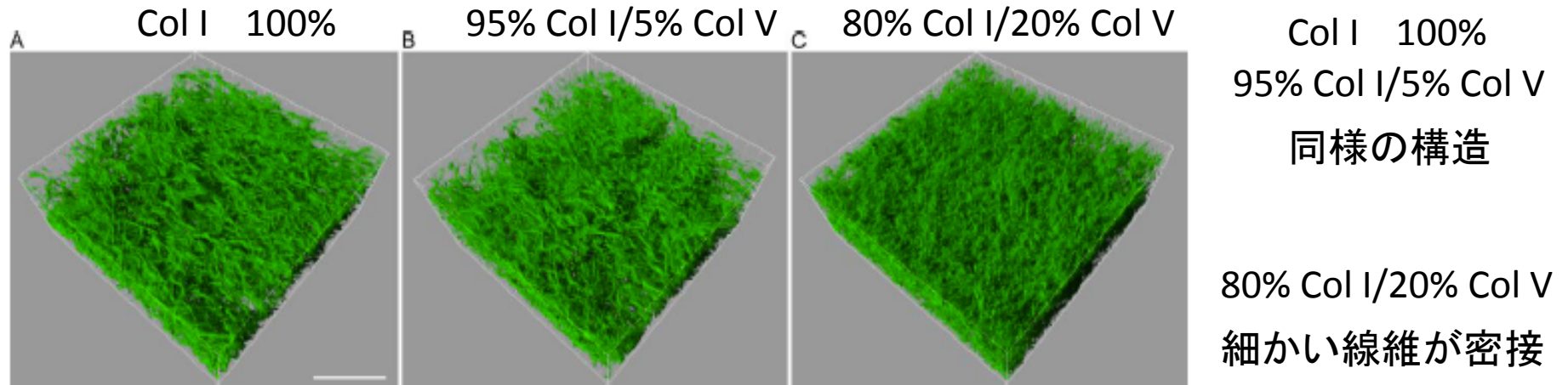
### コラーゲンのSHGイメージング 前方散乱SHG光vs後方散乱SHG光

コラーゲンゲル=タイプ1コラーゲン+タイプ5コラーゲン

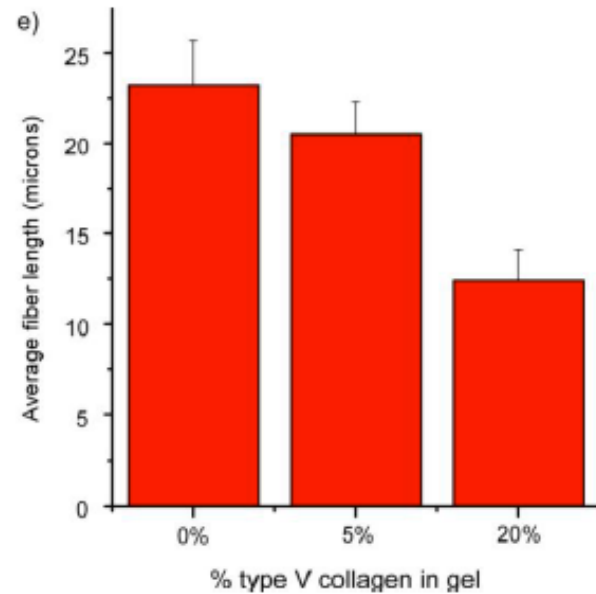
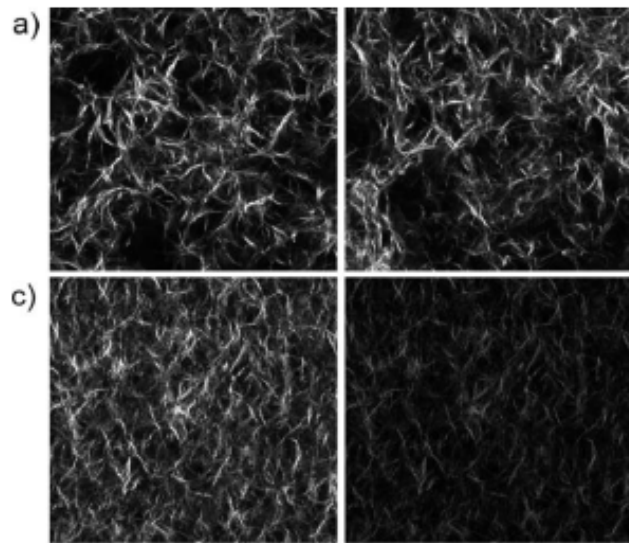
乳がん診断に利用可能



# コラーゲンゲルのイメージング・線維径測定



スケールバー:50  $\mu\text{m}$

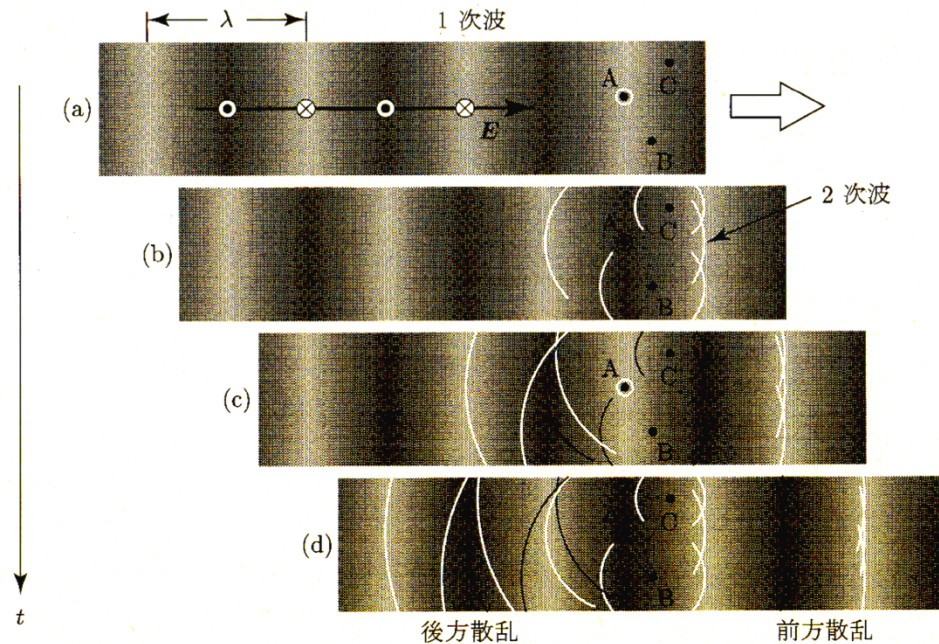
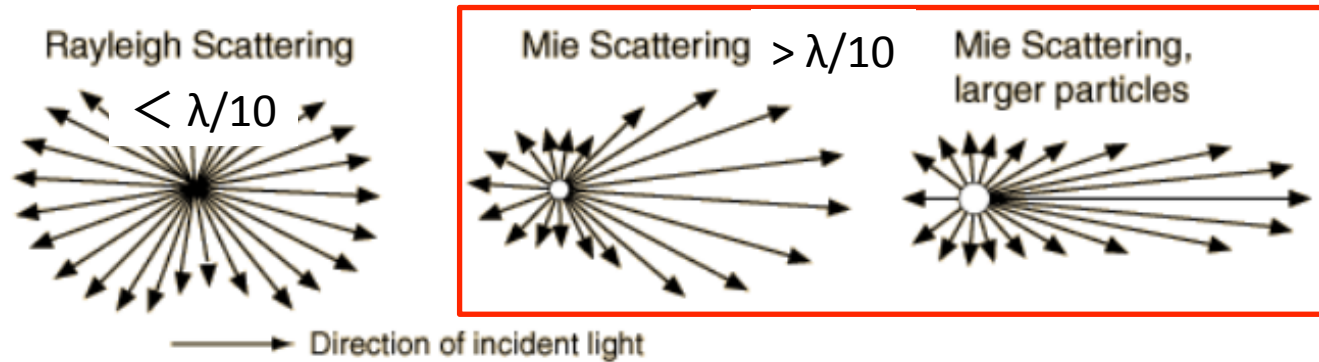




# 前方散乱 vs 後方散乱 SHG

SHG光 → 1次散乱光と同様の散乱強度分布

線維直径  
VS  
レーザー波長  
の関係

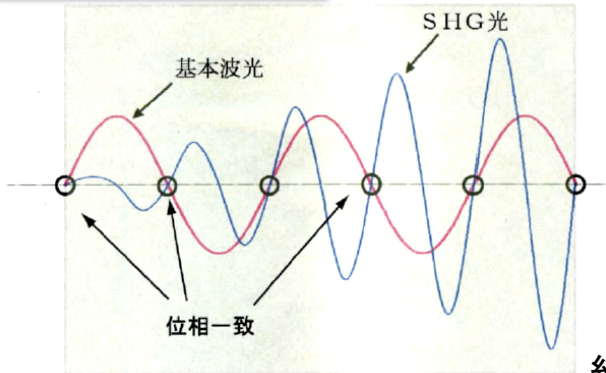


**線維径が大きくなれば  
F/B比が増加**

図 3.9 散乱 2 次波の前方伝搬

# 位相整合, 前方散乱 vs 後方散乱 SHG

## 位相整合条件



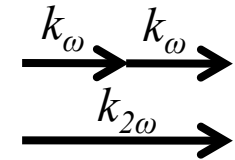
## 基本光とSHG光の位相を合わせる

打ち消し合わないためには

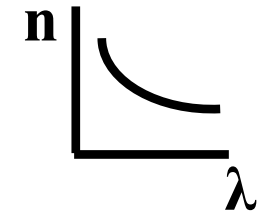
$$\Delta k = 2k_\omega - k_{2\omega} = 0 \rightarrow n_\omega = n_{2\omega}$$

となる必要がある

$k$ : 波数ベクトル  
 $k = n(\omega) \cdot \omega / c$



正の分散



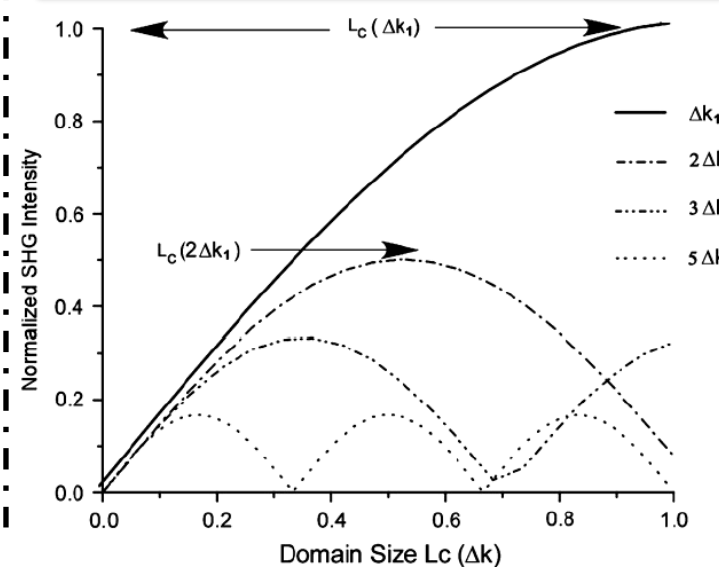
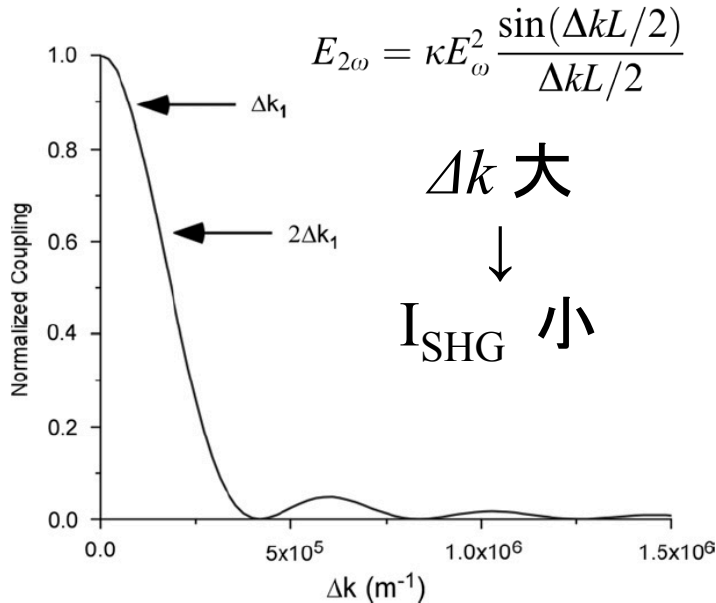
光の屈折率は波長により異なる  
 通常は満たされない

$$v = c/n$$

結晶の場合は複屈折を利用

生体組織 → 厳密な位相整合はとれない

## 長さLの均一な領域を伝搬する場合



$\Delta k$  大

$I_{SHG}$  小

$L = L_c$

$I_{SHG}$  大

←  $L_{cl} = 2\pi / \Delta k_l$  で規格化

Ref) Ronald LaComb, et al. "Phase matching considerations in second harmonic generation from tissues: Effects on emission directionality, conversion efficiency and observed morphology". Optics Communications **281** 1823 (2008)

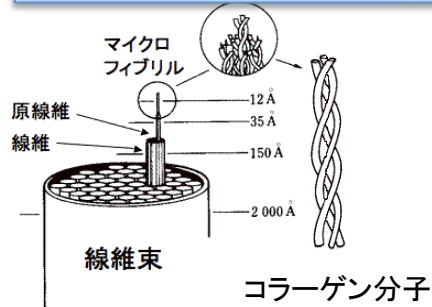
# 擬似位相整合, 前方散乱 vs 後方散乱 SHG

擬似位相整合...  $\Delta k=0$  が満足できないとき, 媒質に周期性を持たせることで位相整合条件を緩和  
 媒質: 周期  $\Lambda$ , 大きさ  $2\pi/\Lambda$  で方向が周期性の向きと同じ格子ベクトル  $K$

媒質を伝搬する波数  $k$  の波  $\rightarrow$  回折により  $K$  変化

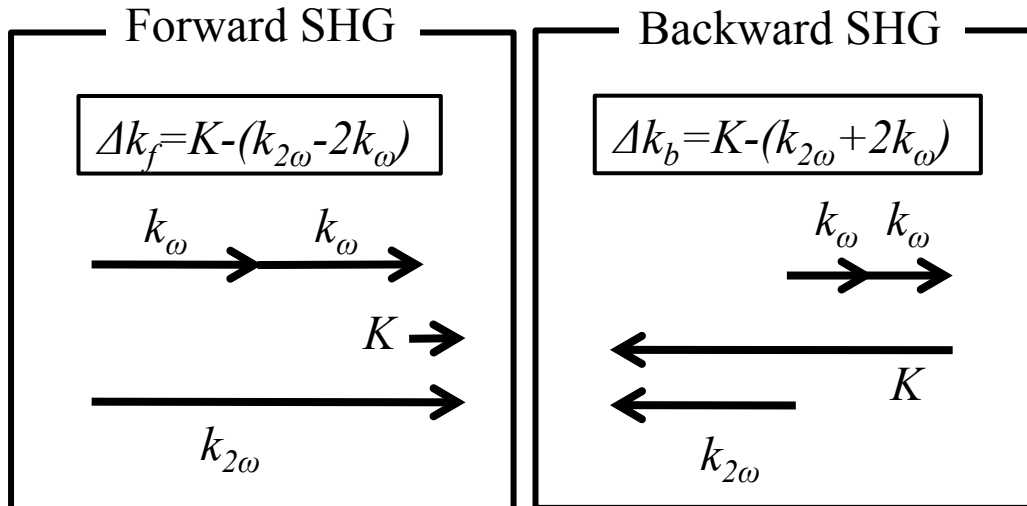
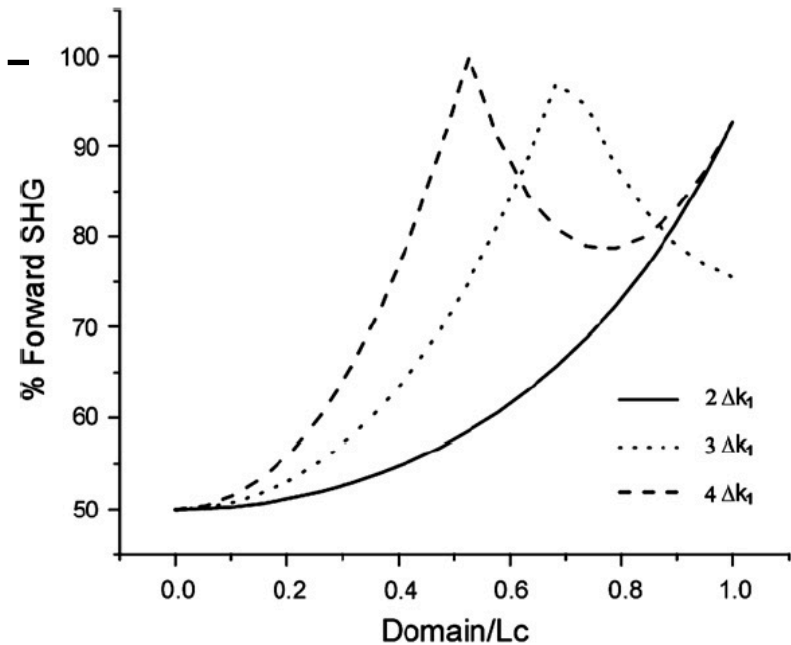
位相整合条件は  $\Delta k + K = 0$

## コラーゲンからの $F_{SHG}$ vs $B_{SHG}$



コラーゲン  $\rightarrow$  規則正しい配列  
 格子ベクトル  $K$  が影響する

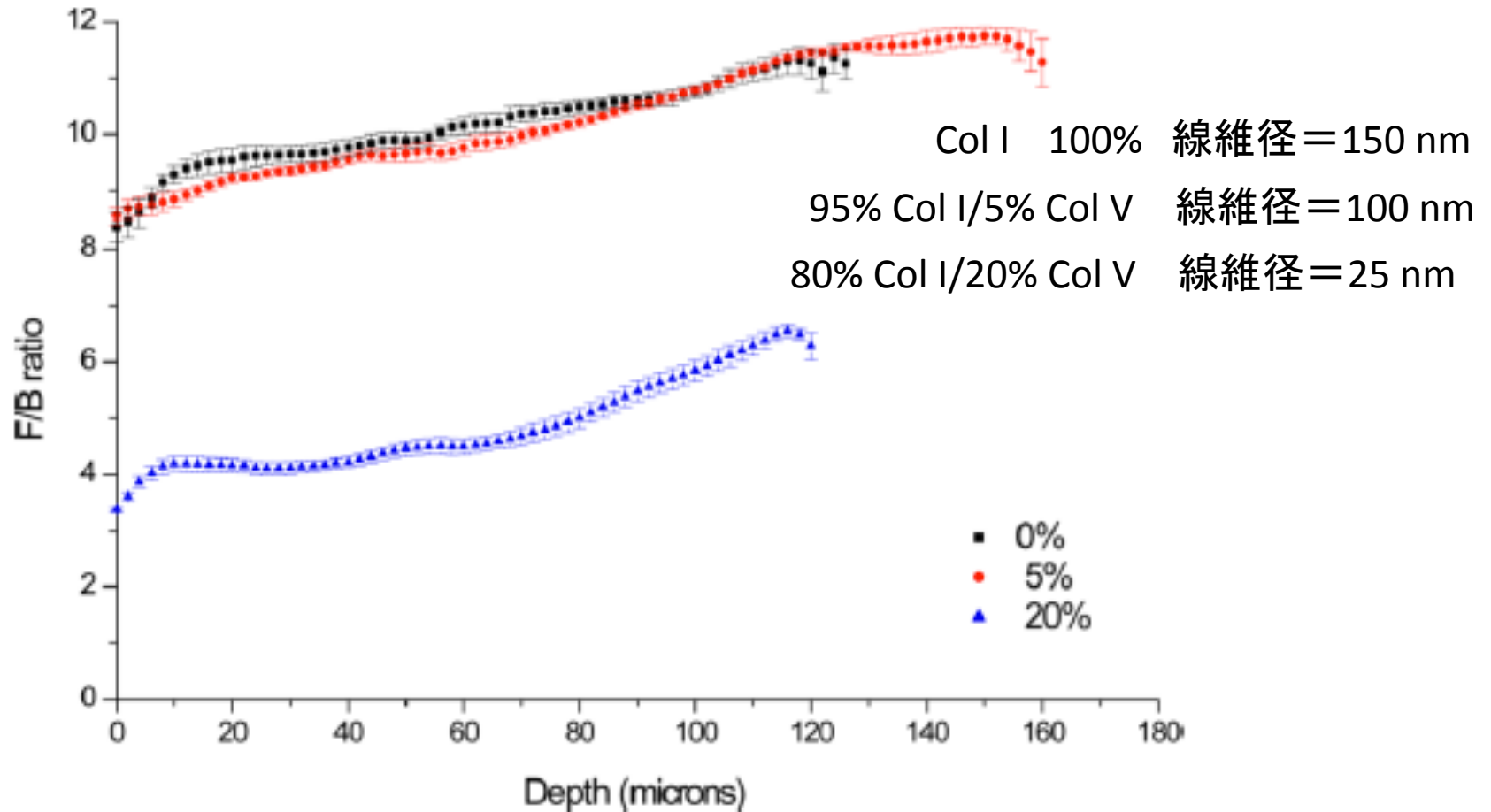
☆ 擬似位相整合条件が適用



$K$  が大きい = 線維 細  $F/B \doteq 0$   
 $K$  が小さい = 線維 太  $F/B = 大$

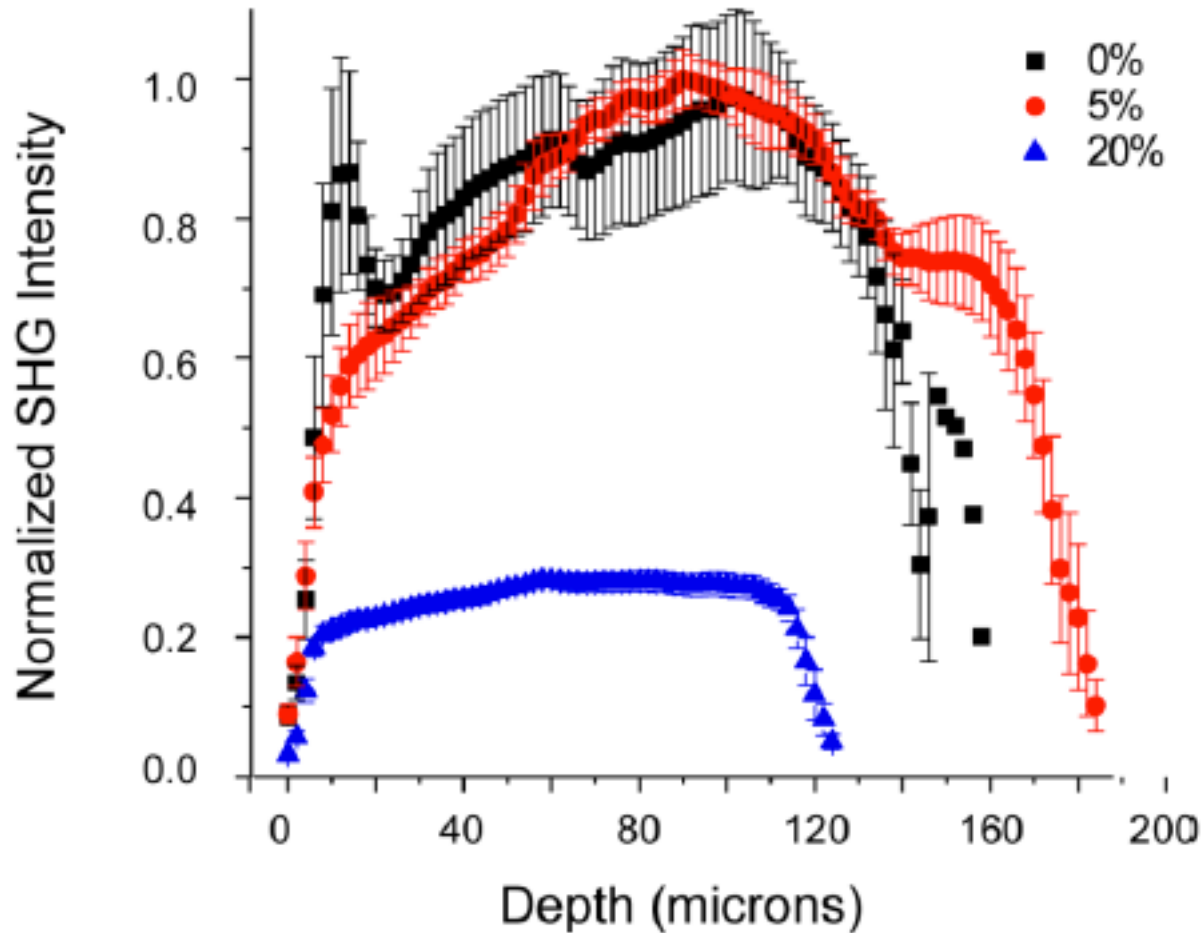
# 前方散乱vs後方散乱SHG

各コラーゲンタイプ濃度における前方・後方SHG光の比



組織内のCol I/Col V濃度を識別可能

# SHG強度の深さ依存性



・第一フィルター効果  
浅い部分で発生  
励起光の散乱

・第二フィルター効果  
深い部分で発生  
SHG光の散乱

濃度によるSHG強度深さ依存性は小さい

## ②まとめ

- 異なるタイプのコラーゲンを含むゲルのイメージング
- コラーゲン線維径でF/B比が変化
- 100fs, 76MHz, 20 mWでも高コントラストに可視化？

# ③ Multiphoton Imaging and Quantitative Analysis of Collagen Production by Chondrogenic Human Mesenchymal Stem Cells Cultured in Chitosan Scaffold

## ヒト間葉幹細胞培養における 軟骨形成プロセスの多光子蛍光(MAF)・SHGイメージング

### 間葉系幹細胞(MSC)とは？

生体内に存在し、様々な細胞に分化可能な細胞



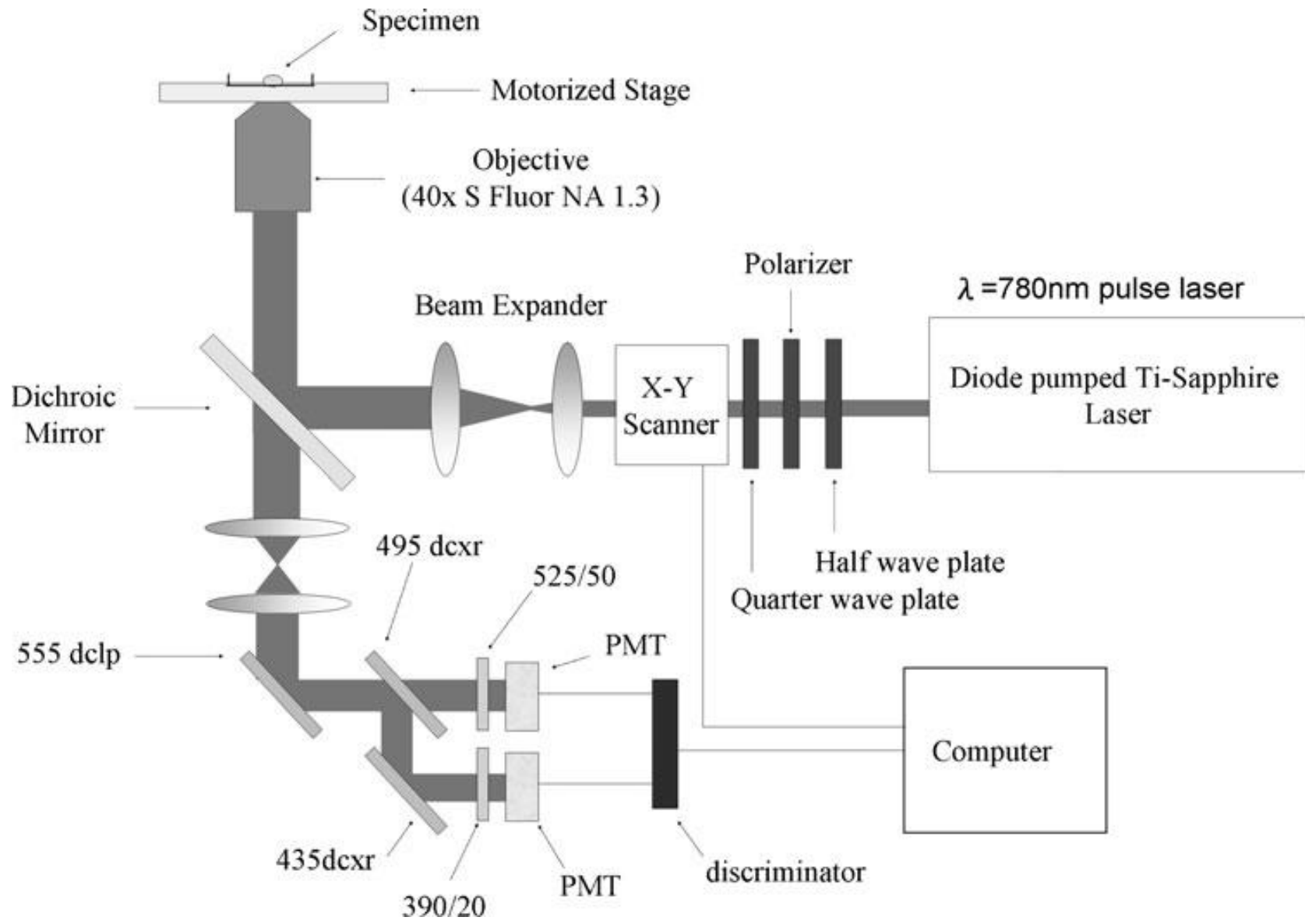
足場材料: キトサン(多糖類) → MAF  
成長因子: TGF- $\beta$ 3 を用いて培養



軟骨細胞によるコラーゲンの産出 → SHG

多光子顕微鏡による時系列モニタリングの有用性を確認

# セットアップ



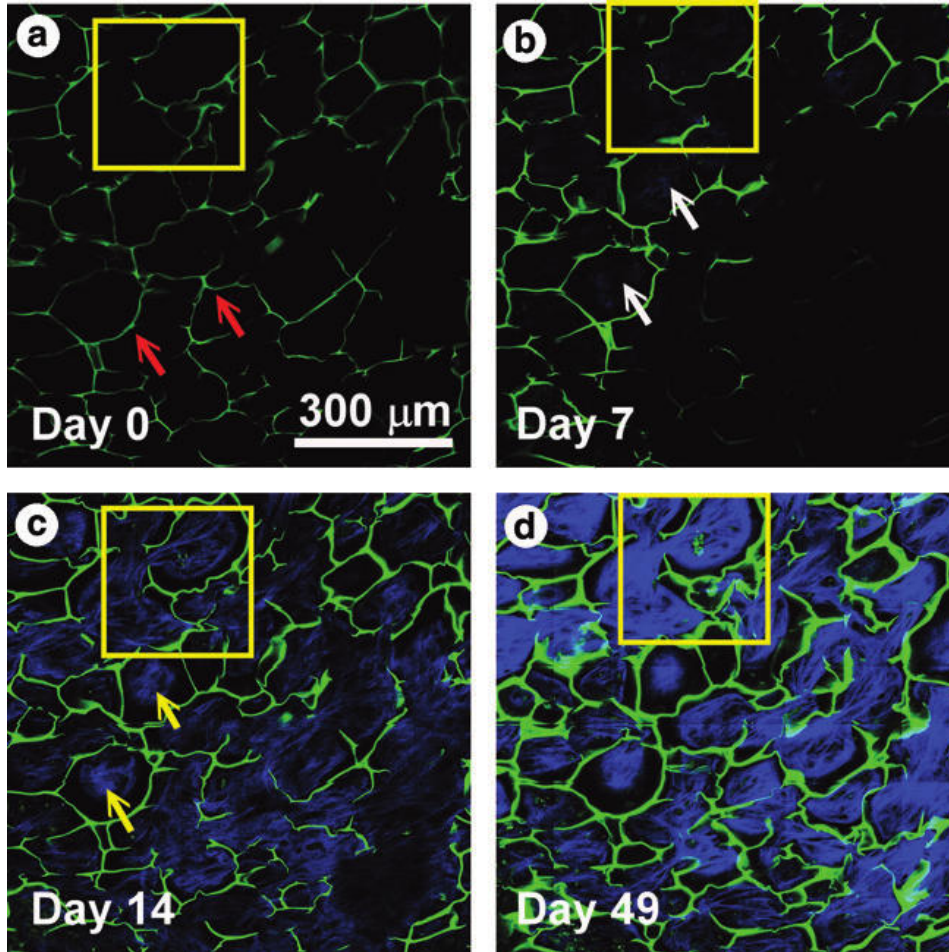


# 時系列モニタリング

培養0, 7, 14, 49日後の大面積MAF・SHGイメージ

同一サンプル  
深さ: 約15  $\mu\text{m}$

緑: MAF(キトサン)  
青: SHG(コラーゲン)



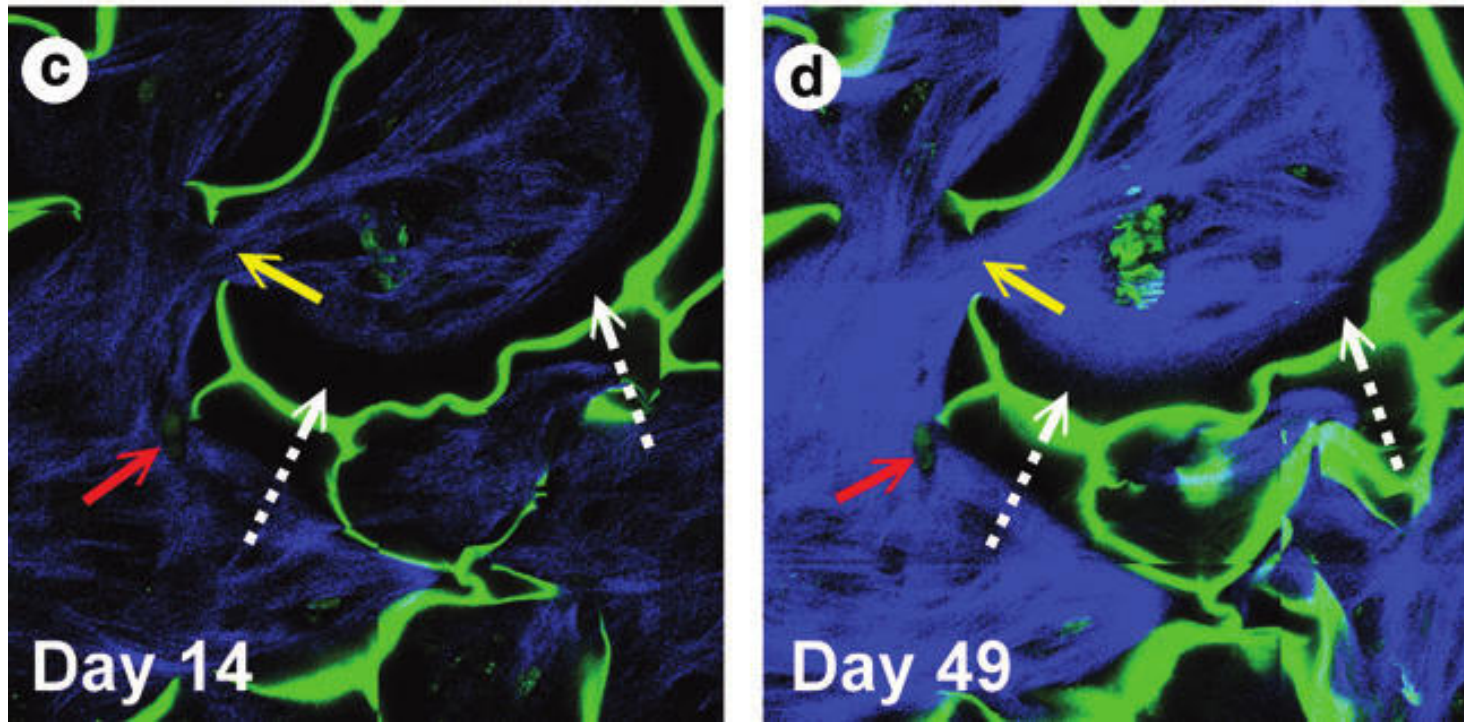
足場(キトサン)境界が高コントラストに可視化

成長因子を0,7,11,14,21,28日に追加

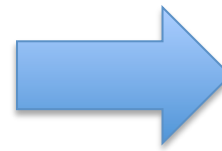
7日のイメージでは微弱なSHGが見え始める

14日以降では足場の区切りごとに  
球状のSHG光が可視化

# 時系列モニタリング



白破線: 足場とコラーゲン間にギャップ  
黄矢印: コラーゲン同士が集合

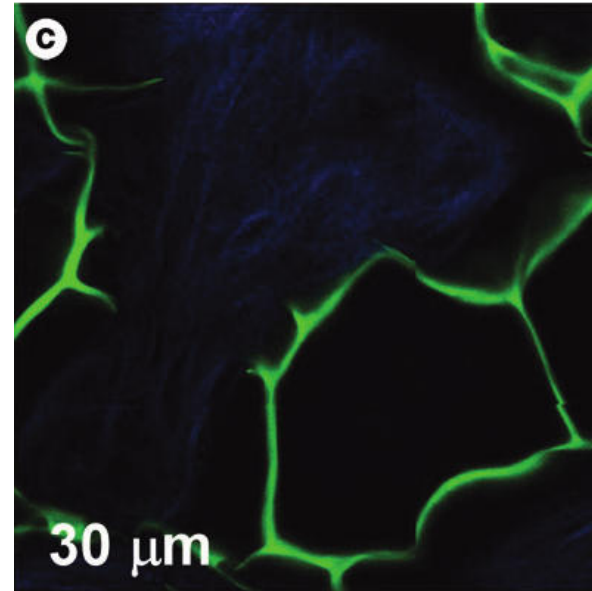
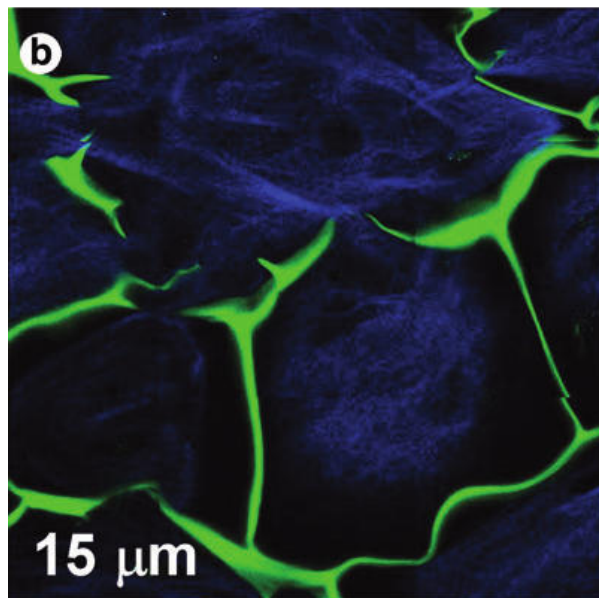
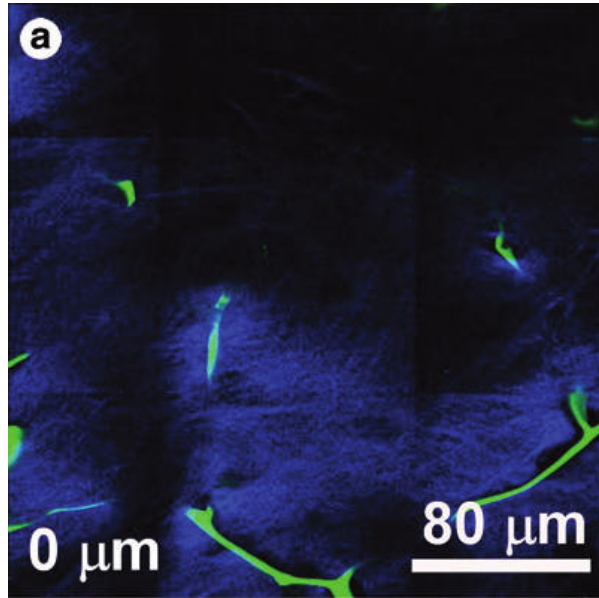


足場によってコラーゲン同士の  
集合を制限

赤矢印: SHG光の欠損 → 軟骨細胞からのMAFの可視化

**キトサン・MSC培養システムの特徴が可視化**

# 深さ分解イメージ



0μmで最大のSHG信号強度

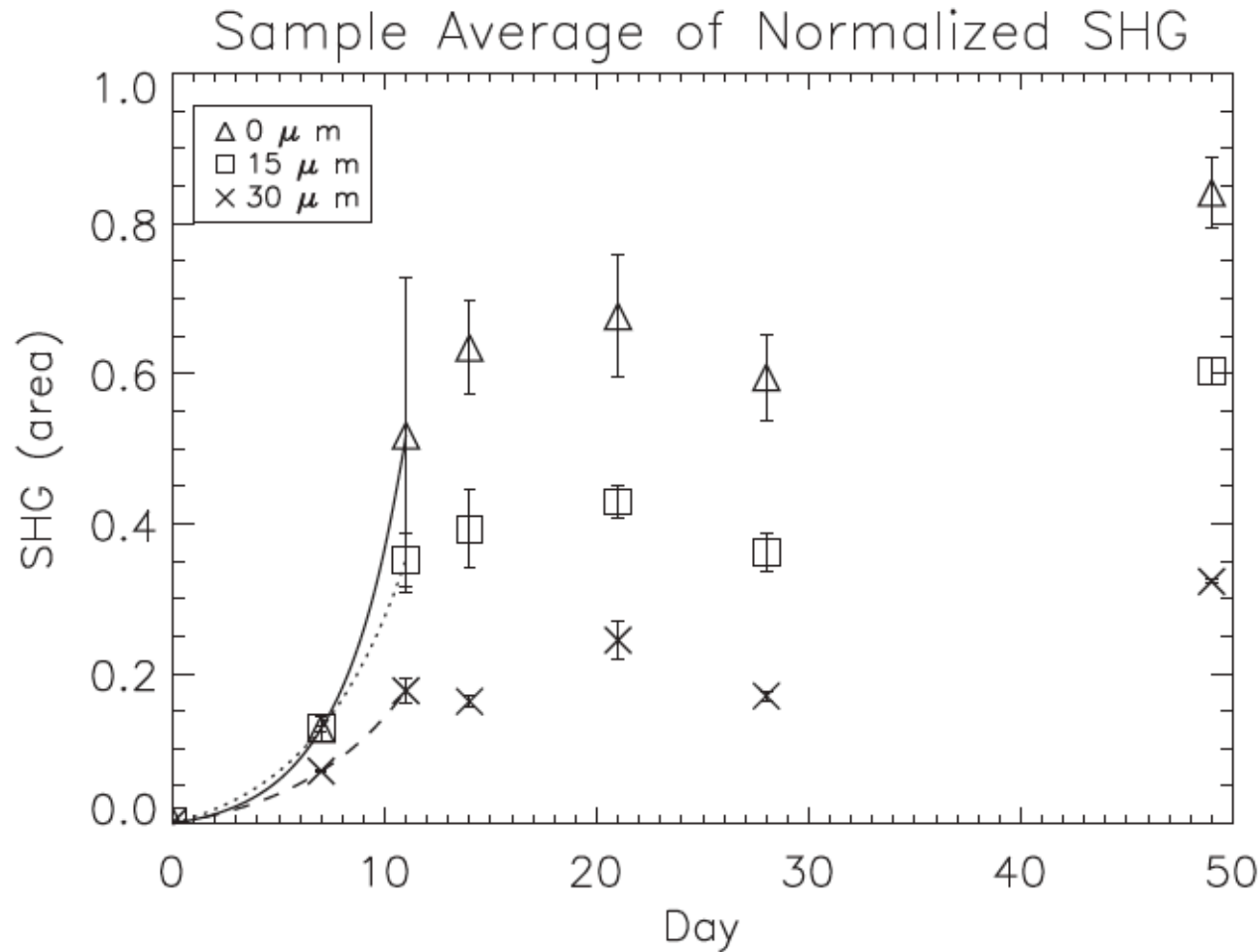
深さが増えるごとにSHGが減少



足場の構造により、深さ方向への浸透が難しい

# SHG強度による定量評価

各ピクセルでのSHG強度をプロット



信号強度が指数関数的に増加

$$SHG = a \cdot (e^{bt} - 1)$$

a: 定数

b: 成長レート

t: 時間

0 μm 0.33 ± 0.12

15 μm 0.22 ± 0.12

30 μm 0.19 ± 0.12

深度が増すごとに成長  
レートが減少

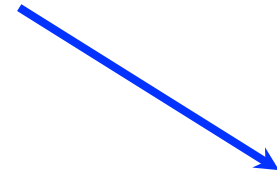
深度によらず飽和時間が  
一定

## ③まとめ

- 軟骨形成プロセスの時系列・深さ分解MAF・SHGイメージング
- キトサン・MSC培養システムの特徴を可視化
- 定量評価も可能

# まとめ

- 再生医療が注目
- 市場規模が1.6兆円
- SHG顕微鏡が有用
- 高コントラストなイメージ・定量解析



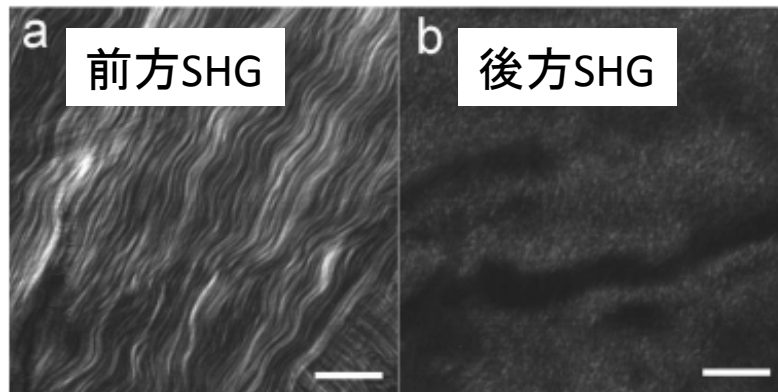
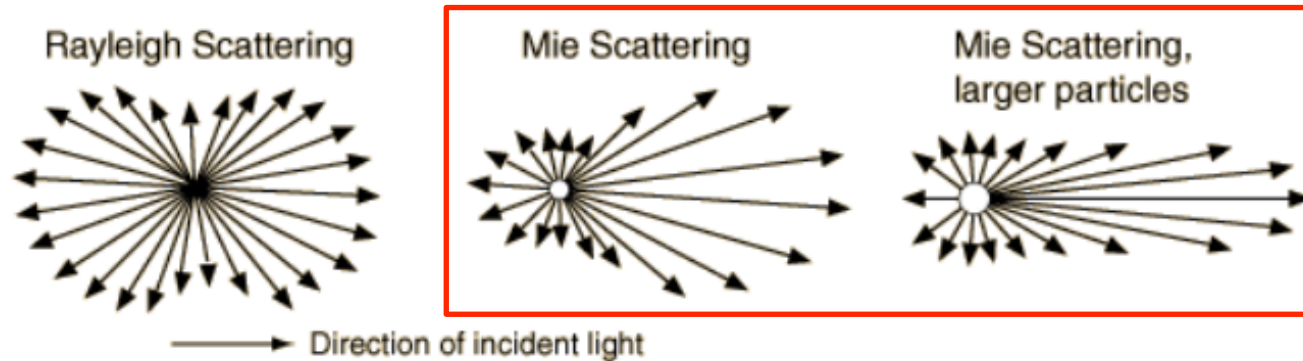
レーザー電場 $E_\omega$ によって発生する  
SHG光の電場 $E_{2\omega}$ は

$$E_{2\omega} = \kappa E_\omega^2 \frac{\sin(\Delta kL/2)}{\Delta kL/2}$$

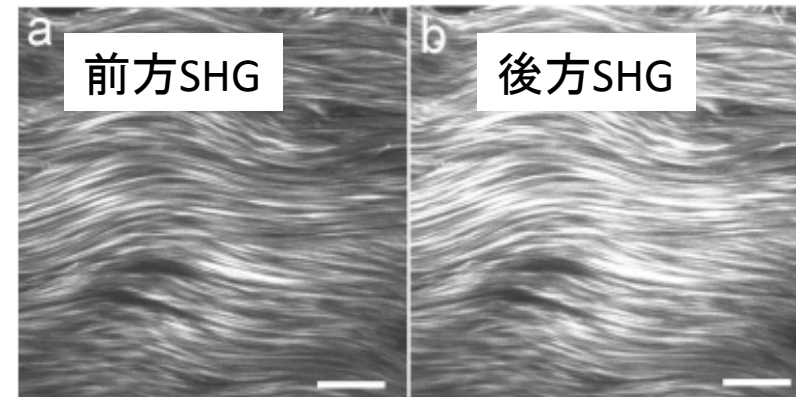
# 前方散乱vs後方散乱SHG

SHG光→1次散乱光と同様の散乱強度分布

線維直径  
VS  
レーザー波長  
の関係



角膜コラーゲンのSHGイメージ  
線維径: 30 nm



強膜コラーゲンのSHGイメージ  
線維径: 30 - 300 nm

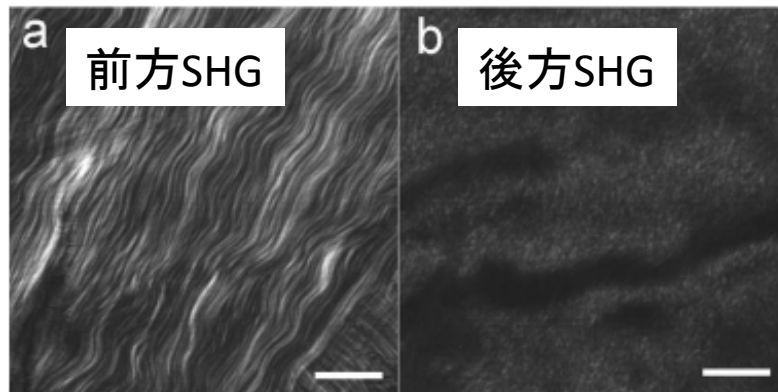
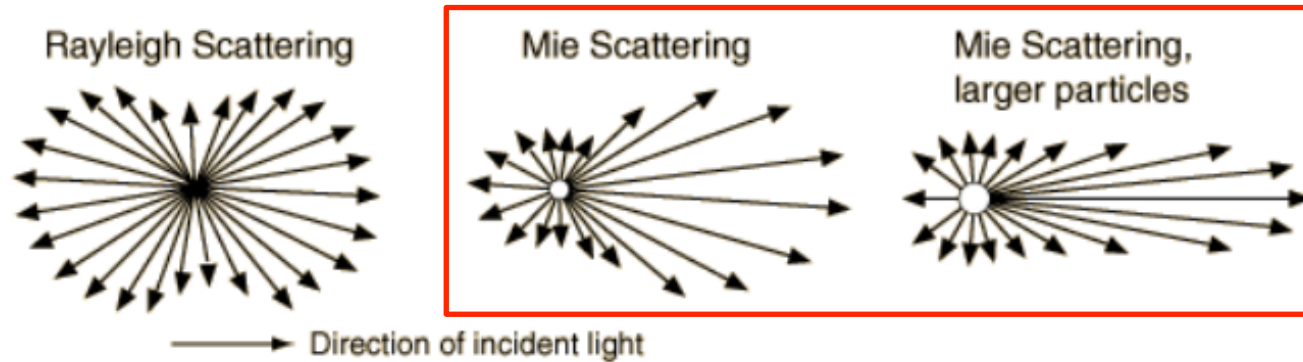
Ref) Meng Han. et al., Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera, OPTICS EXPRESS **13**, 5791(2005).



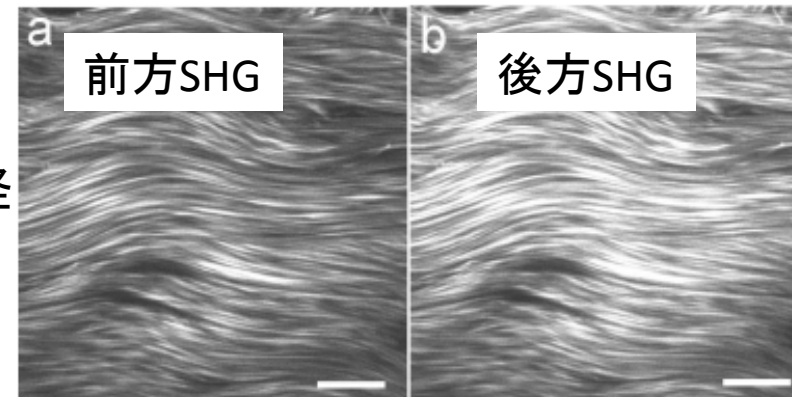
# 前方散乱vs後方散乱SHG

SHG光→1次散乱光と同様の散乱強度分布

線維直径  
VS  
レーザー波長  
の関係



角膜コラーゲンのSHGイメージ



強膜コラーゲンのSHGイメージ

線維径  
>

**線維径が大きくなればF/B比が増加**

on imaging of  
RESS 13, 5791(2005).