

H.26 前期

研究報告

SHG (第2高調波発生光) 顕微鏡の応用

2014/9/23 長谷

研究テーマ@長谷

SHG顕微鏡

- 骨芽細胞産生コラーゲンの可視化
- 腱リモデリング
- 黄色靭帯

ホログラフィ

研究テーマ@長谷

SHG顕微鏡

- 骨芽細胞産生コラーゲンの可視化
- 腱リモデリング
- 黄色靭帯

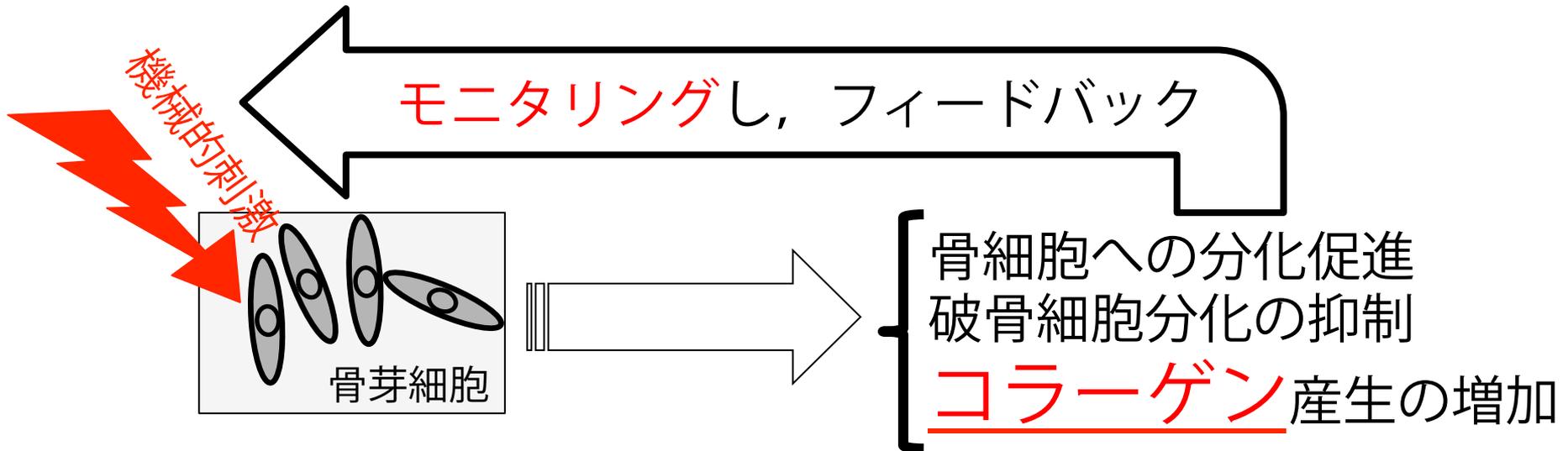
ホログラフィ

イントロダクション

再生医療の実現化のために、多細胞・組織レベルでの技術開発が求められている

研究目的

機械的刺激を制御因子として、骨組織化を制御する



所望の機械的特性(骨質)を実現するためには、
コラーゲンのモニタリングが必須！

従来のコラーゲン観測手法

	選択的観測	組織染色	3次元	時系列
染色観察	可	要	不可	不可
共焦点顕微鏡	可	要	可	不可
位相差顕微鏡	不可	不要	不可	可

培養組織におけるコラーゲン分布を
非染色・時系列でモニタリングすることは不可能

SHG顕微鏡を用いたコラーゲン計測

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

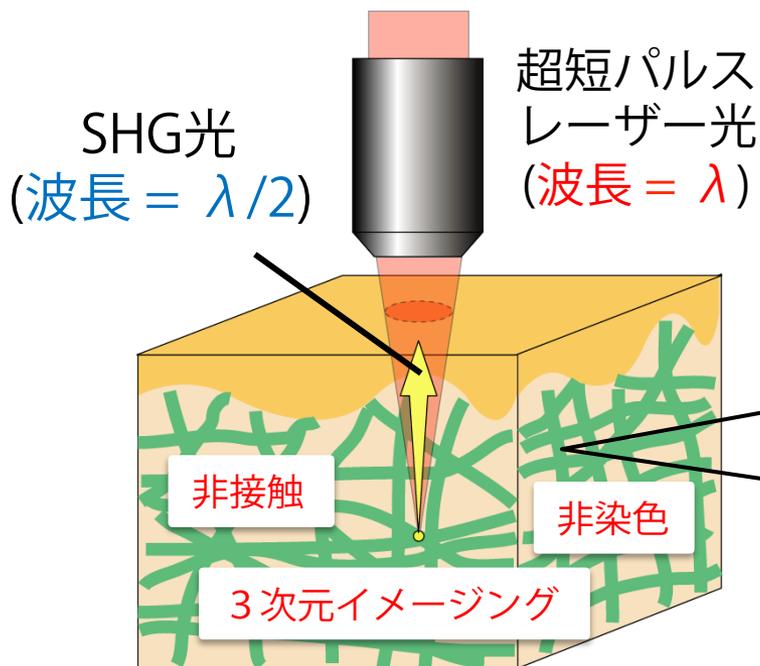
コラーゲン分子



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、チューブリンなどを“**生きたありのまま**”の状態で、観測出来る

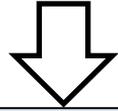
Application



- ▶ 皮膚計測
- ▶ 再生医療
- ▶ がん診断
- ▶ リモデリング

10 fsレーザーを用いたSHG顕微鏡の高感度化

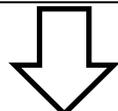
細胞産生コラーゲンでは、
低密度・高次構造が未熟・絶対量が少ない



SHG発生強度が小さい

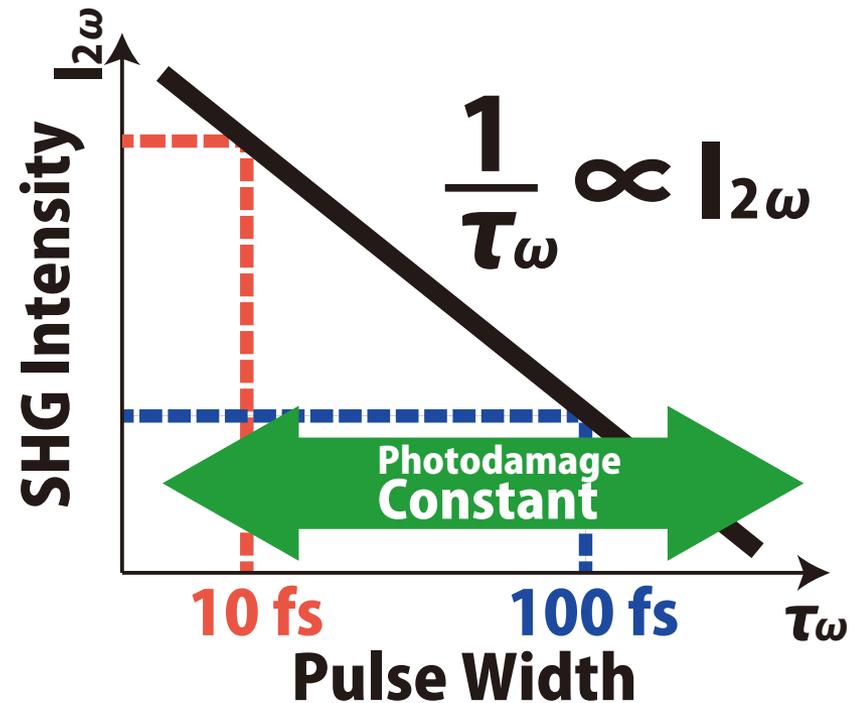


イメージ・コントラストが低下



高感度化が必要

- ・パルス幅を狭窄化
(平均パワーは同じ)
ダメージリスク \propto 平均パワー



平均パワーを維持したまま、パルス幅を狭窄化 \rightarrow ピークパワーを増大

高感度SHG顕微鏡

・測定条件
照射パワー = 20 mW 大面積イメージ：
約800 μm *800 μm

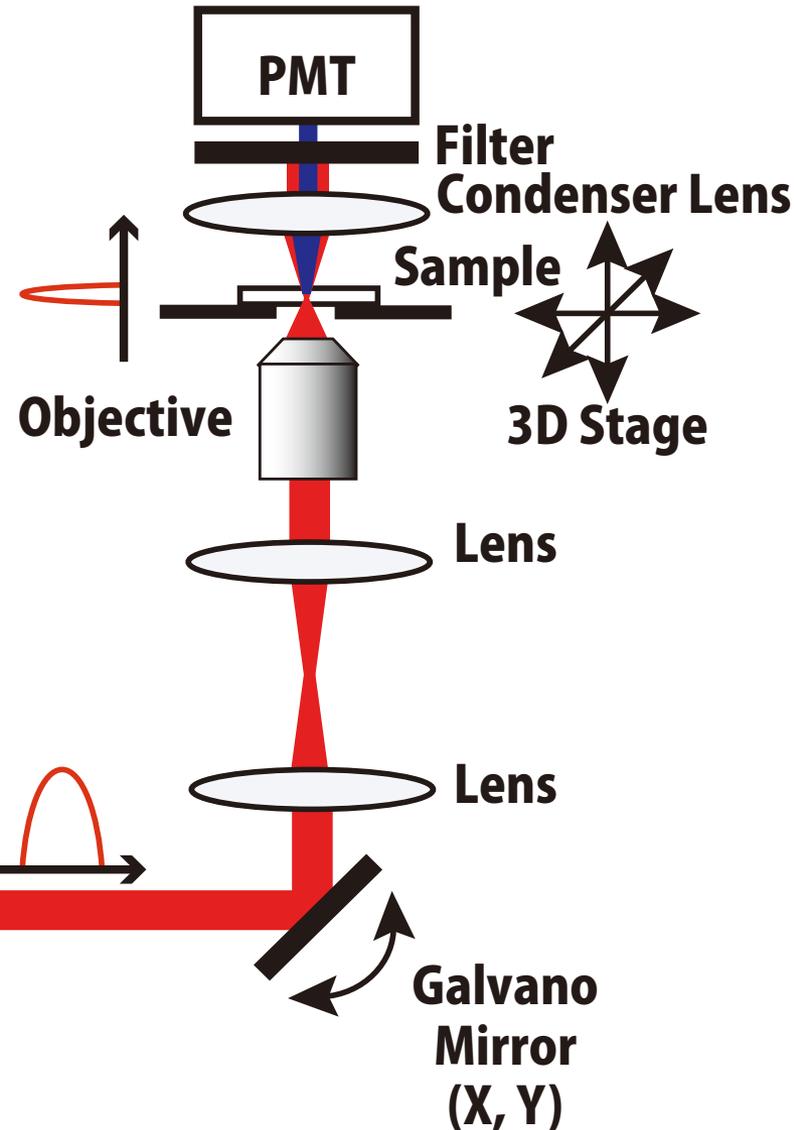
測定領域：
約200 μm *200 μm

測定時間 = 10秒

**ML
Ti:Sapphire
Laser**

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

**Dispersion
Compensation
Unit**



Galvano Mirror

PMT+Filter

Condenser Lens

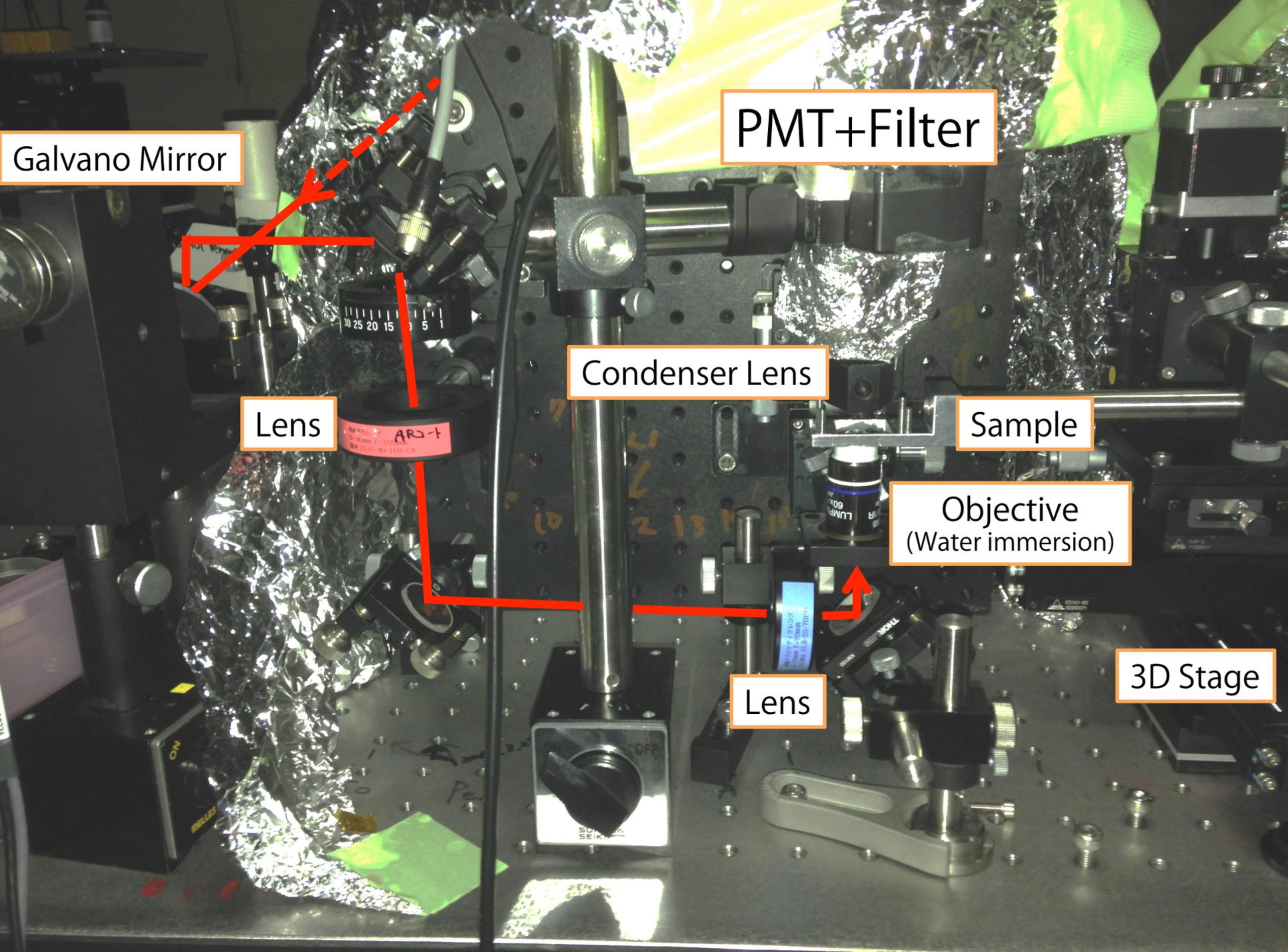
Lens

Sample

Objective
(Water immersion)

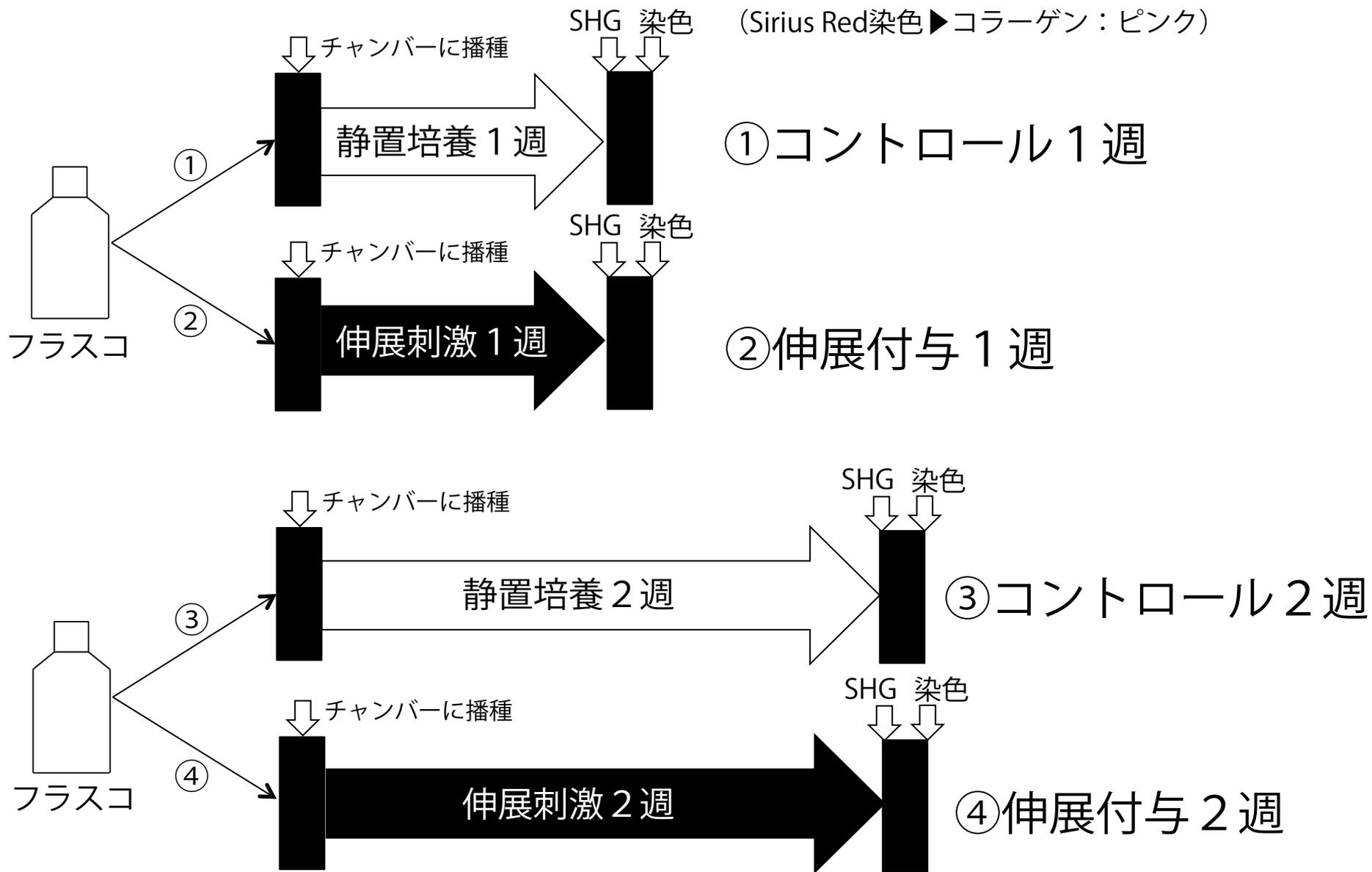
Lens

3D Stage



実験プロトコル

(Sirius Red染色▶コラーゲン：ピンク)



染色イメージ

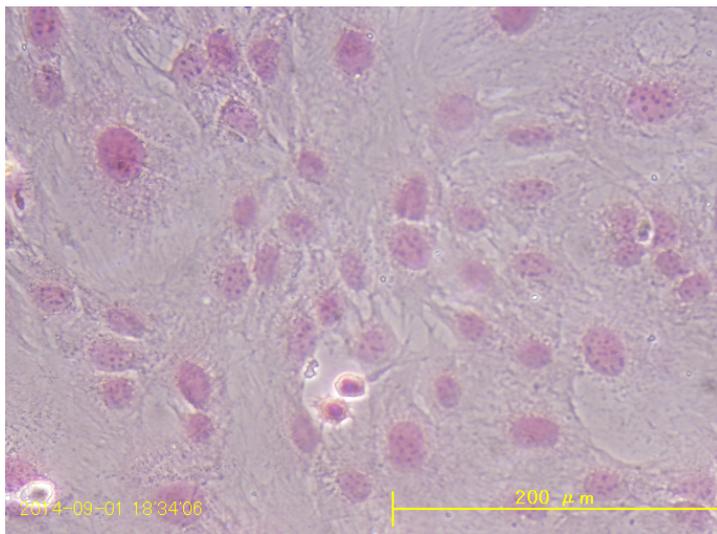
Sirius Red染色 ▶ コラーゲン：ピンク

コントロール

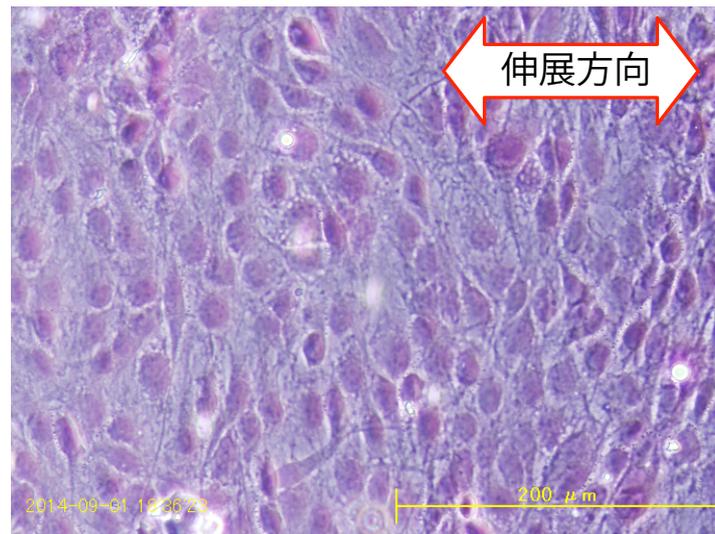
伸展付与

培養1週

①

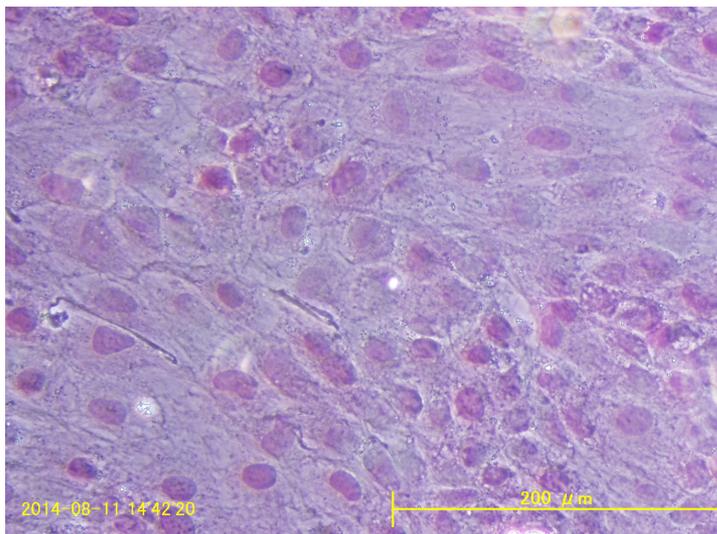


②

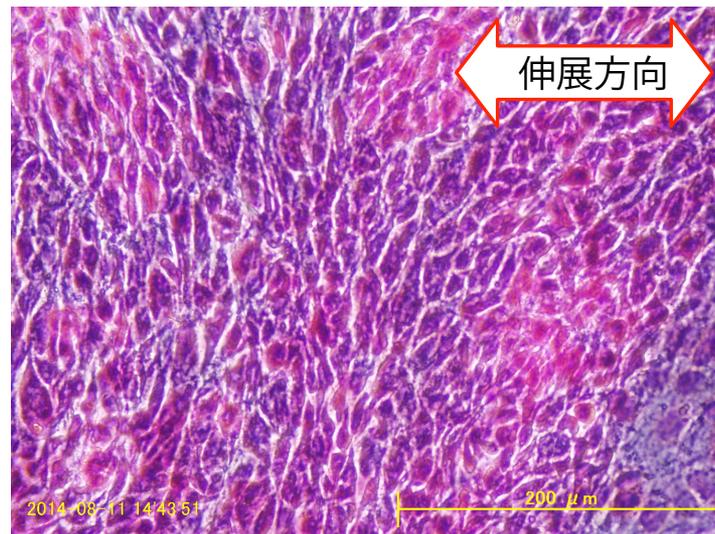


培養2週

③



④



培養 1 週サンプル

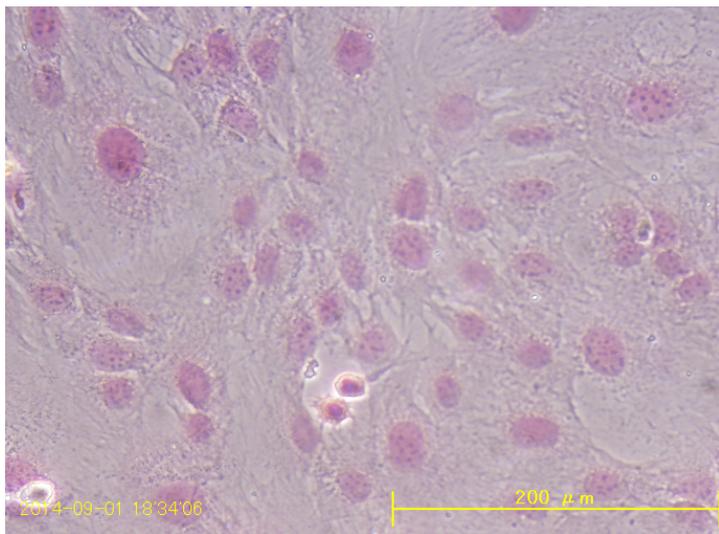
染色 vs SHG

コントロール

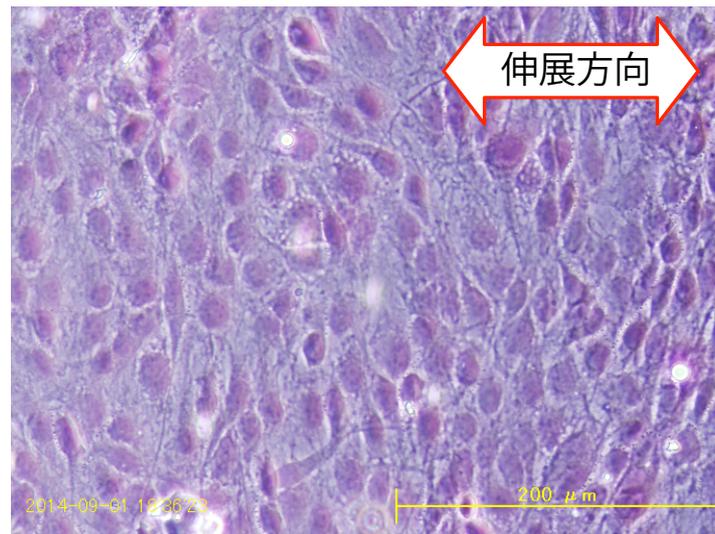
伸展付与

染色イメージ

①

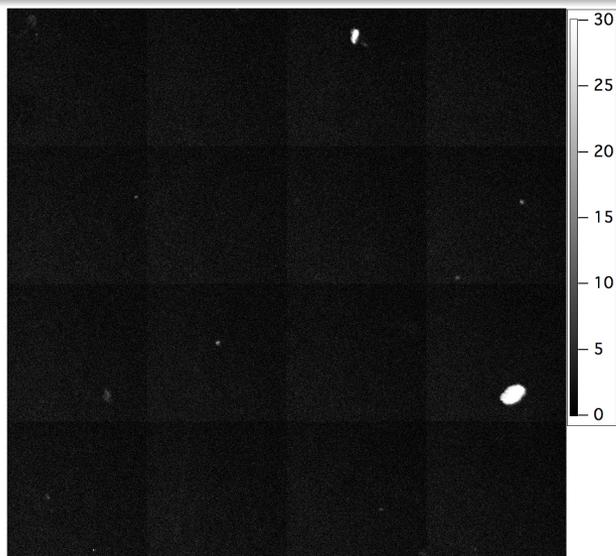


②

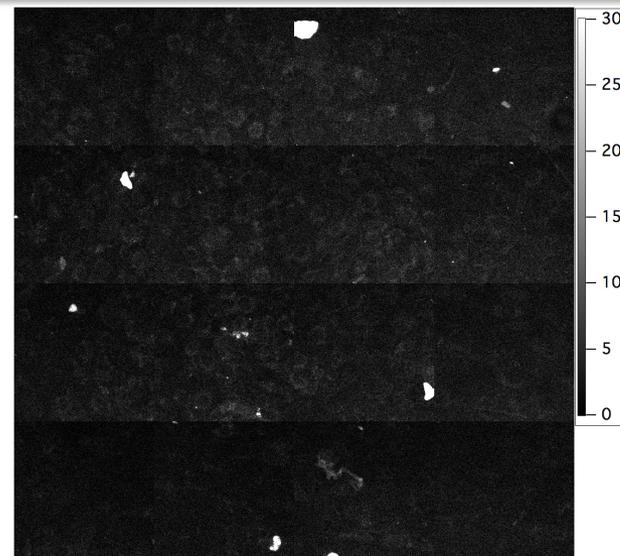


SHGイメージ

①



②



培養 1 週サンプル

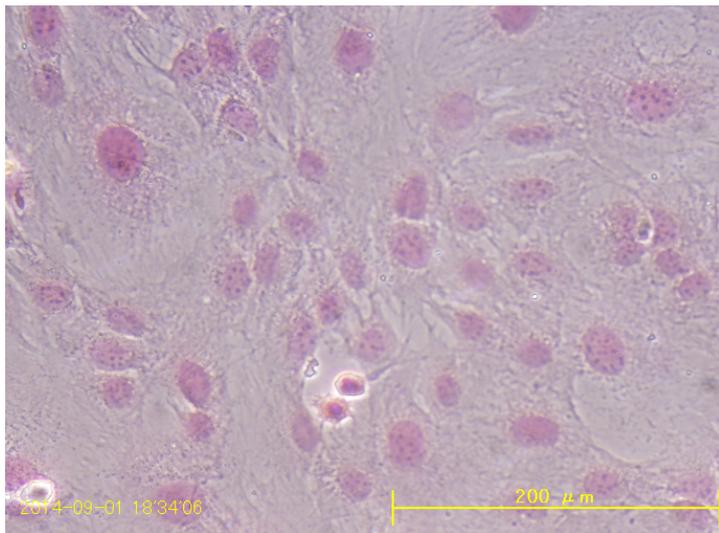
染色 vs SHG

コントロール

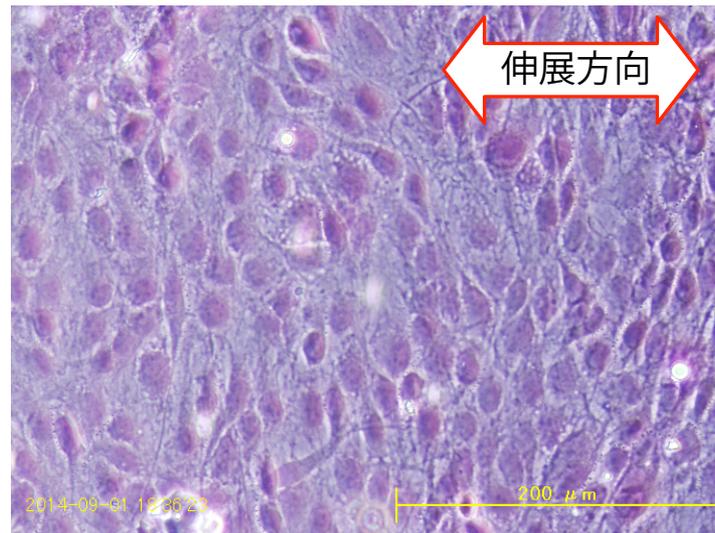
伸展付与

染色イメージ

①

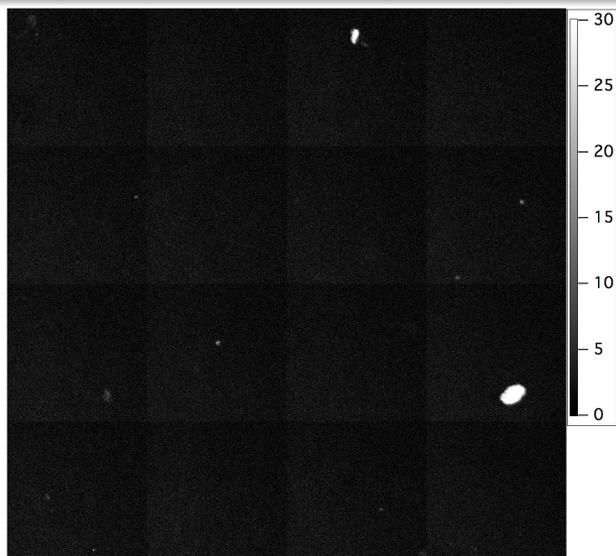


②

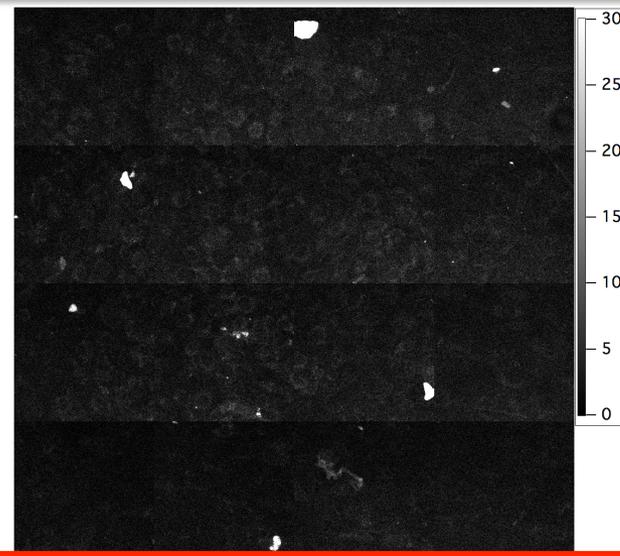


SHGイメージ

①



②

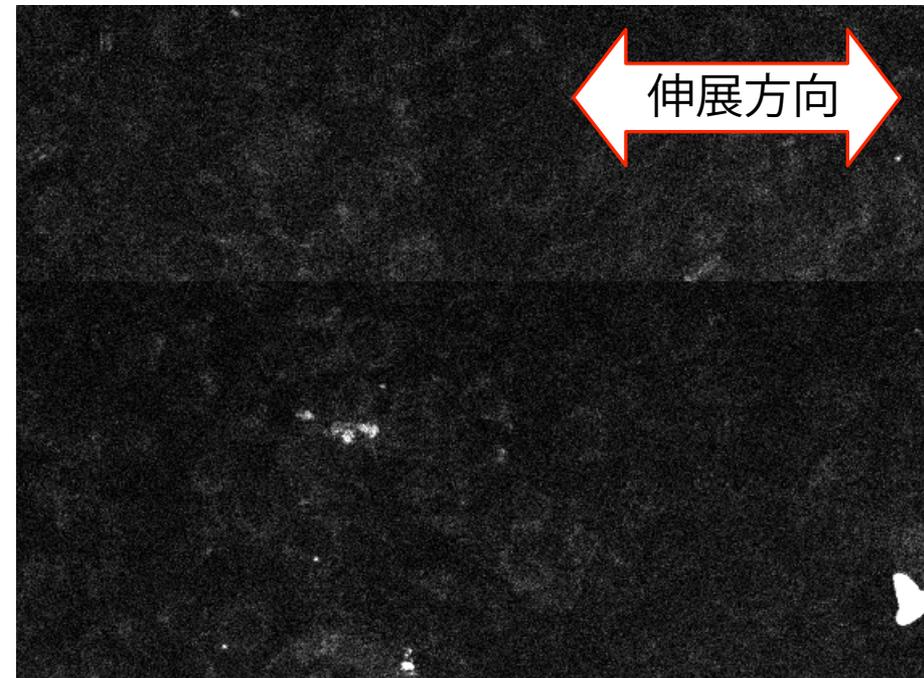
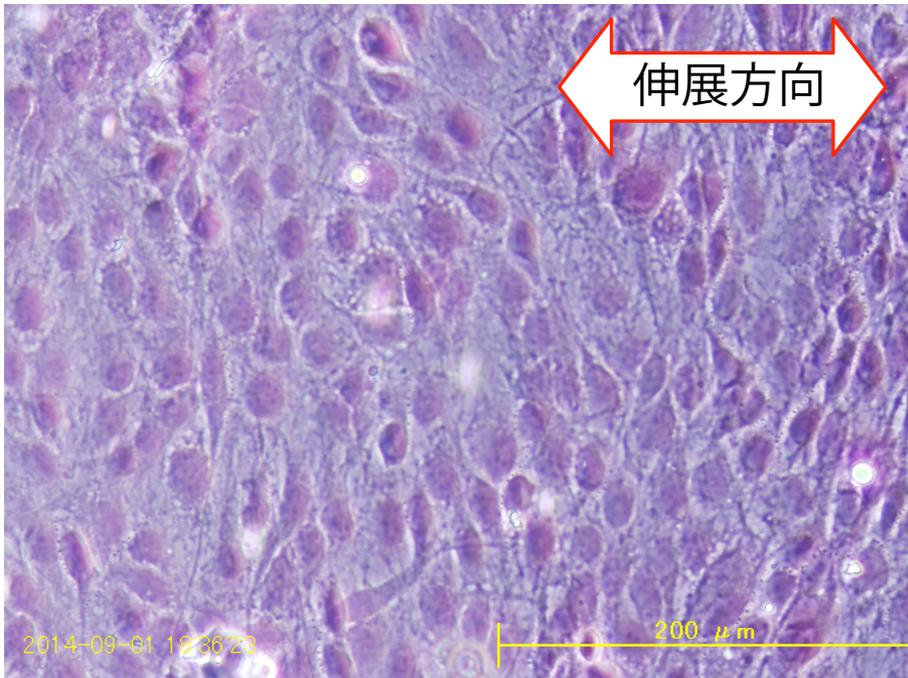


培養1週サンプルSHG vs 染色イメージ

同スケール
(異なる位置)

伸展：染色

伸展：SHG



細胞内に産生された円形のコラーゲン分布を確認
伸展刺激によってコラーゲン産生が増加

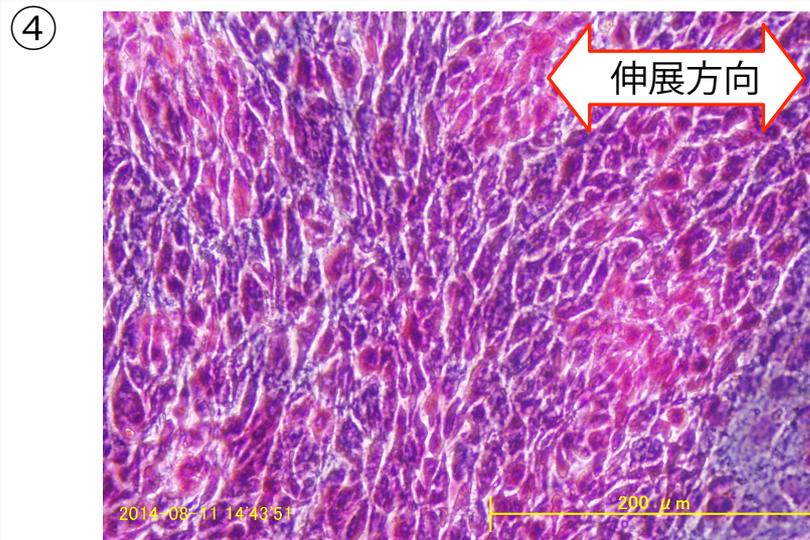
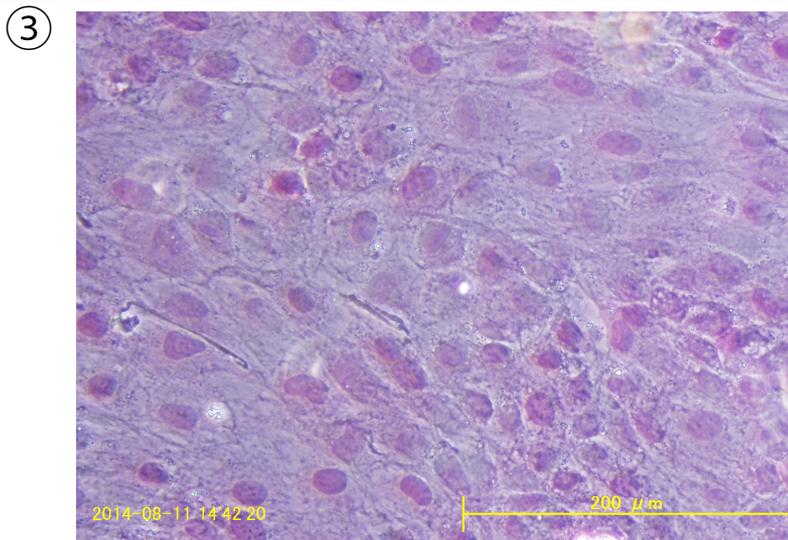
培養 2 週サンプル

染色 vs SHG

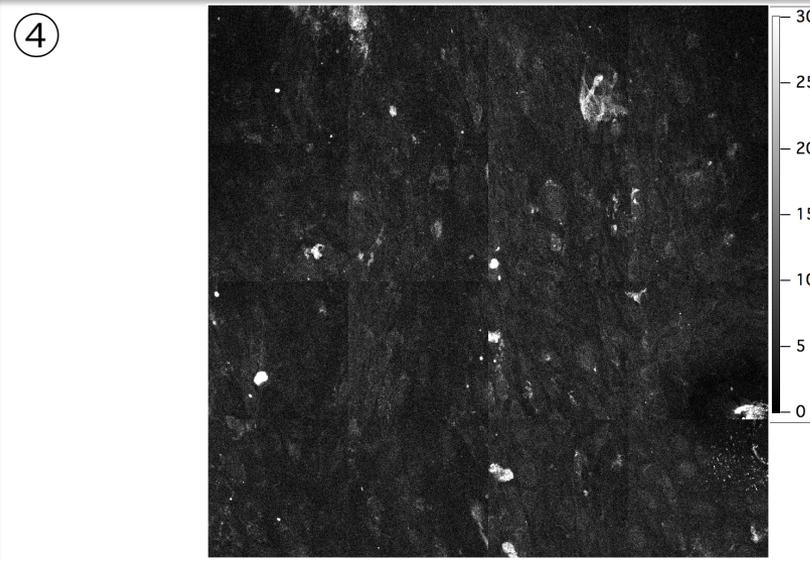
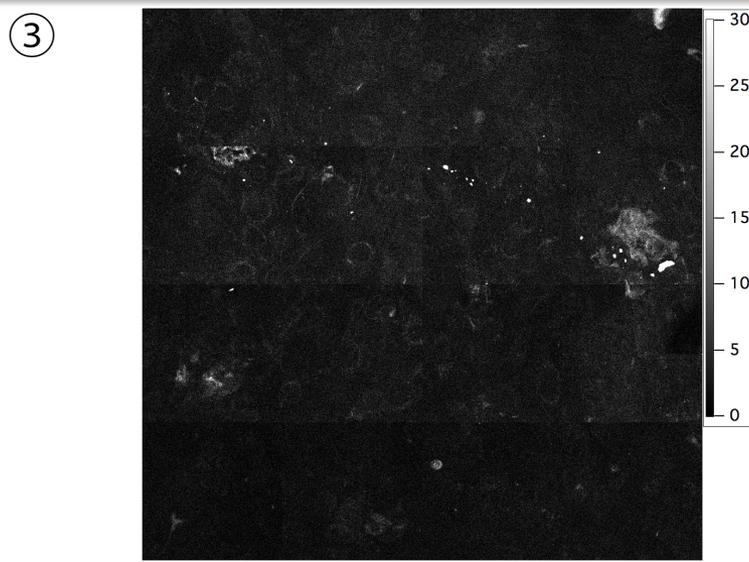
コントロール

伸展付与

染色イメージ



SHGイメージ



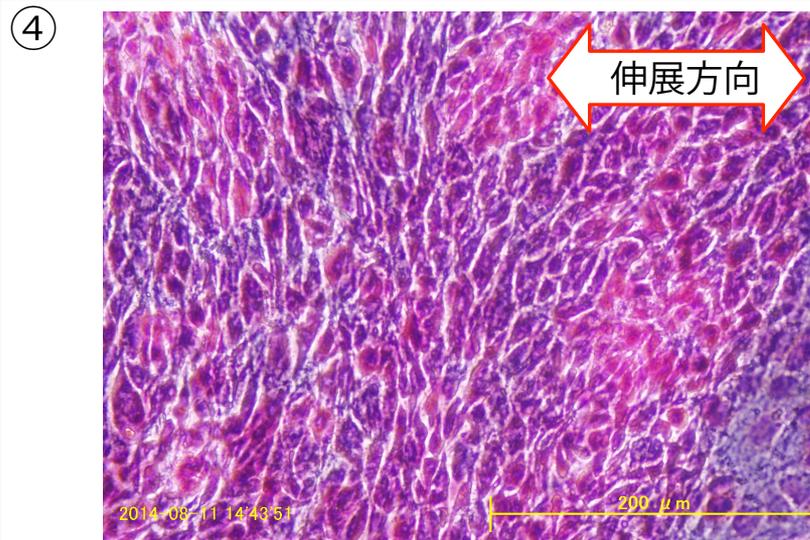
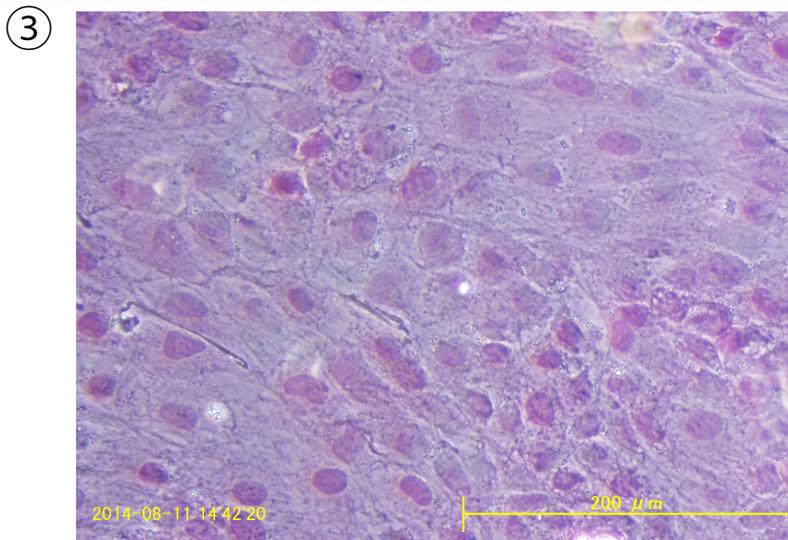
培養 2 週サンプル

染色 vs SHG

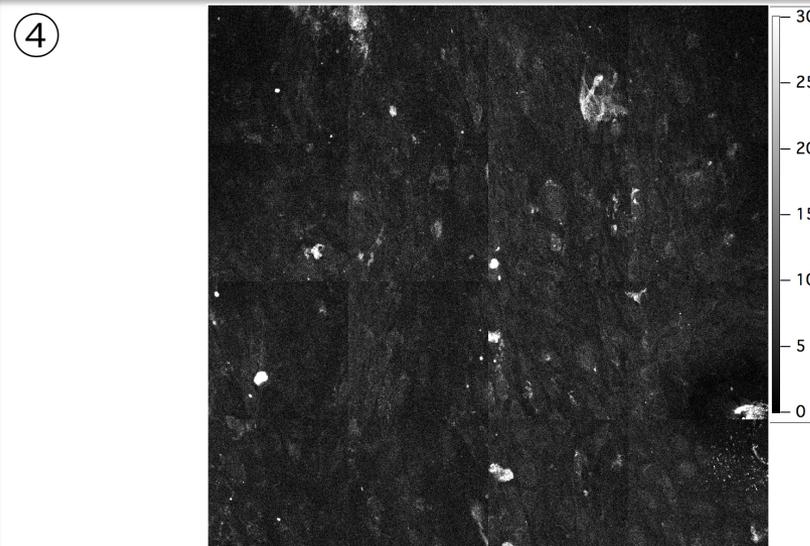
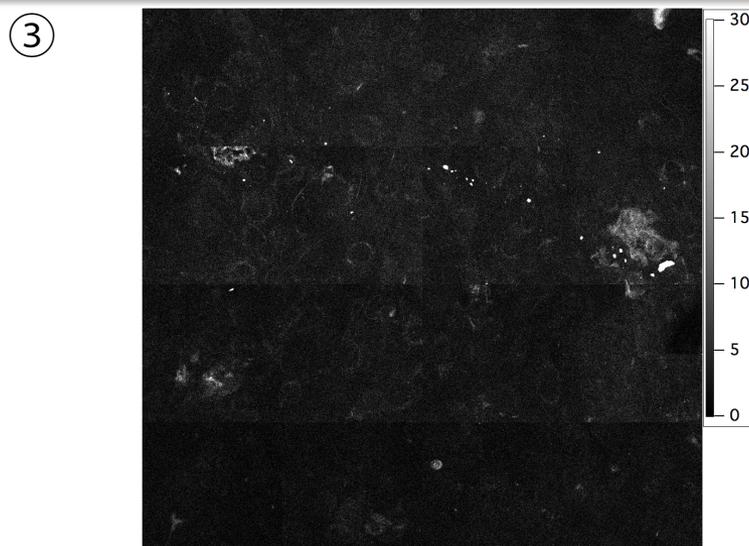
コントロール

伸展付与

染色イメージ



SHGイメージ



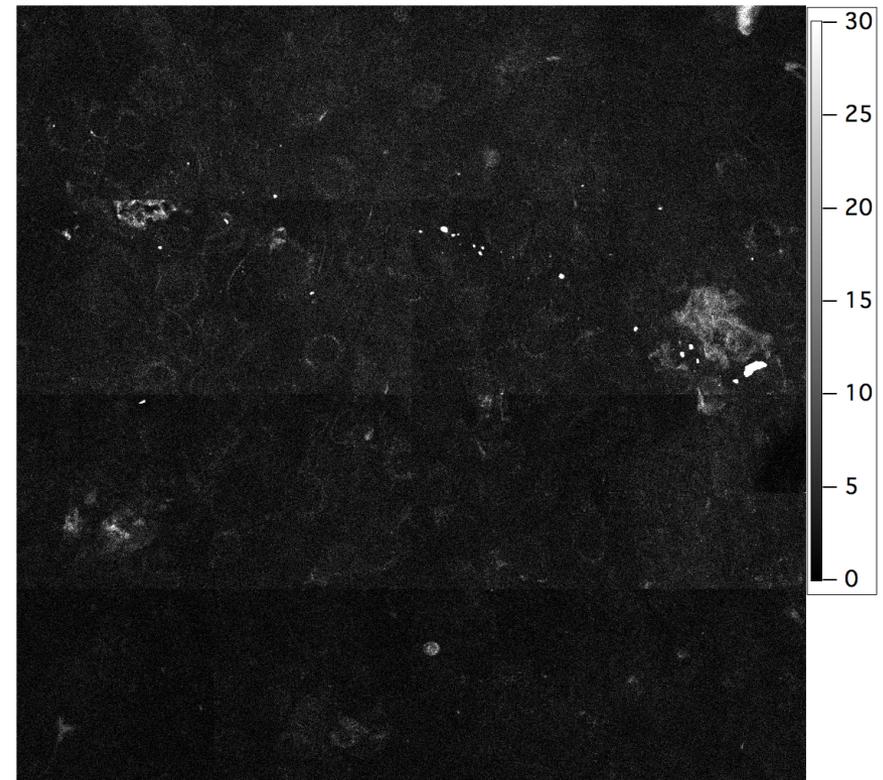
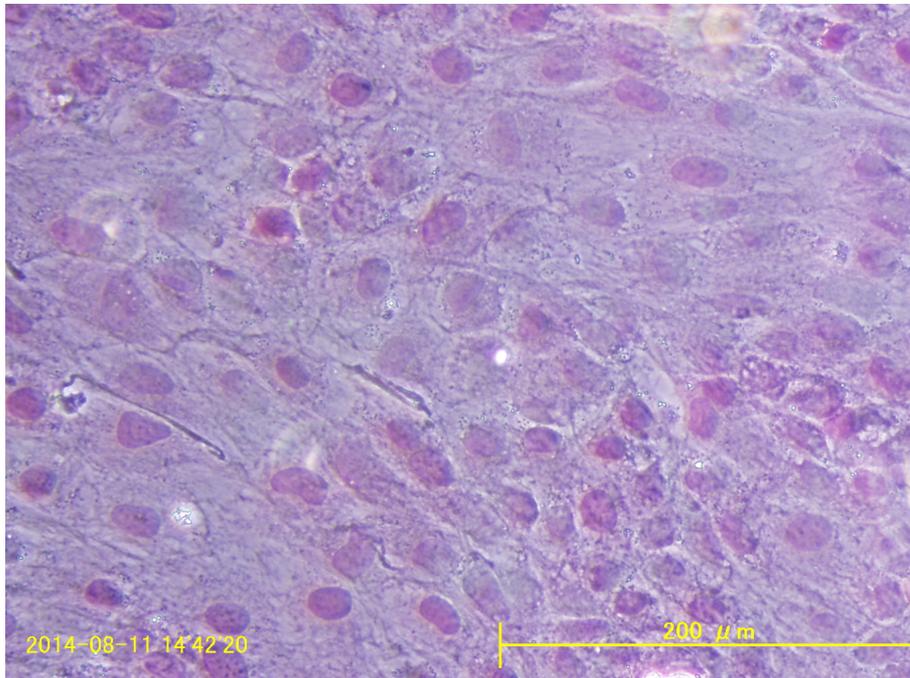
培養 2 週サンプル染色イメージ

位相差顕微鏡 + SiriusRed染色 ▶ コラーゲン：ピンク

視野：約800 μm 四方

コントロール：染色

コントロール：SHG



同様に円形のコラーゲンの分布を確認
培養時間経過によりコラーゲン産生が増加

培養 2 週サンプル

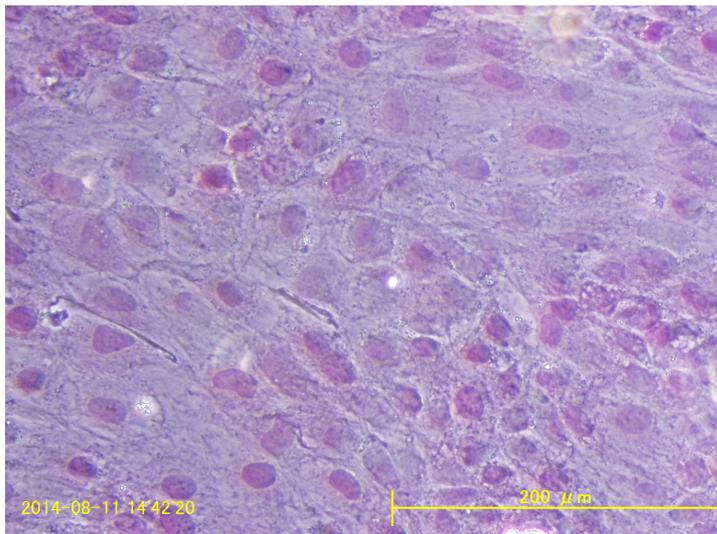
染色 vs SHG

コントロール

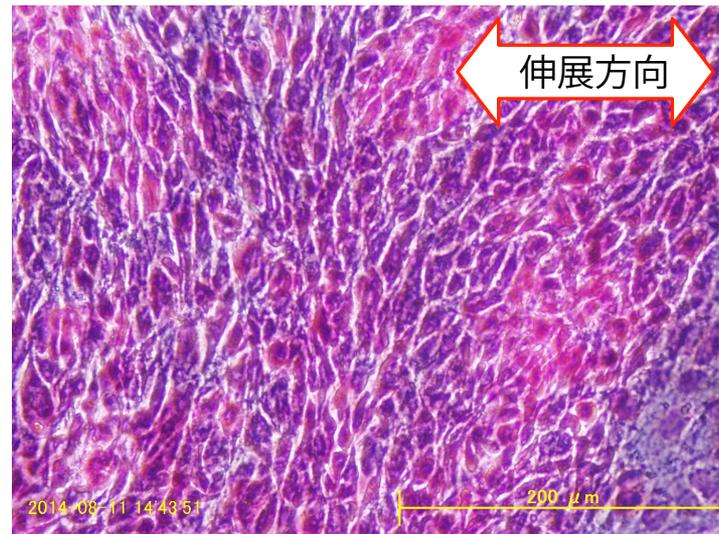
伸展付与

染色イメージ

③

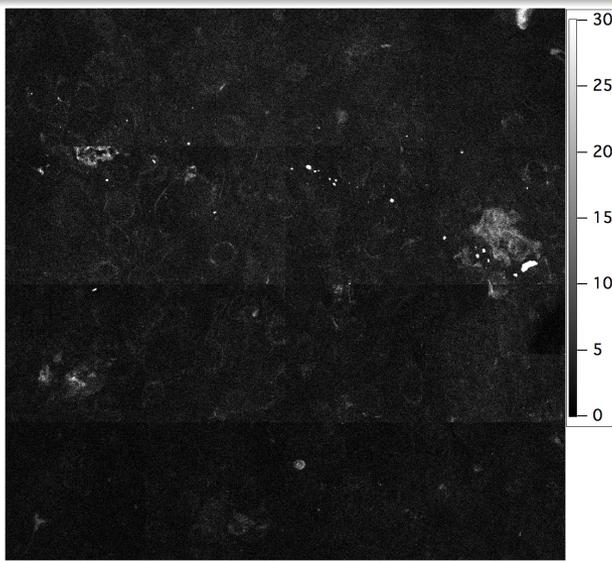


④

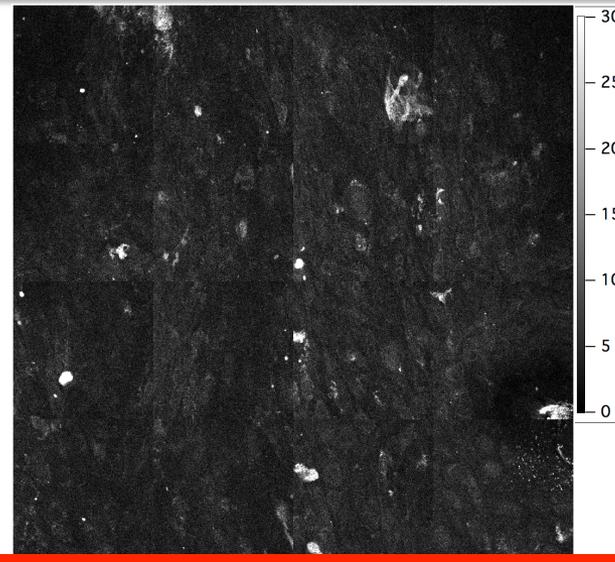


SHGイメージ

③



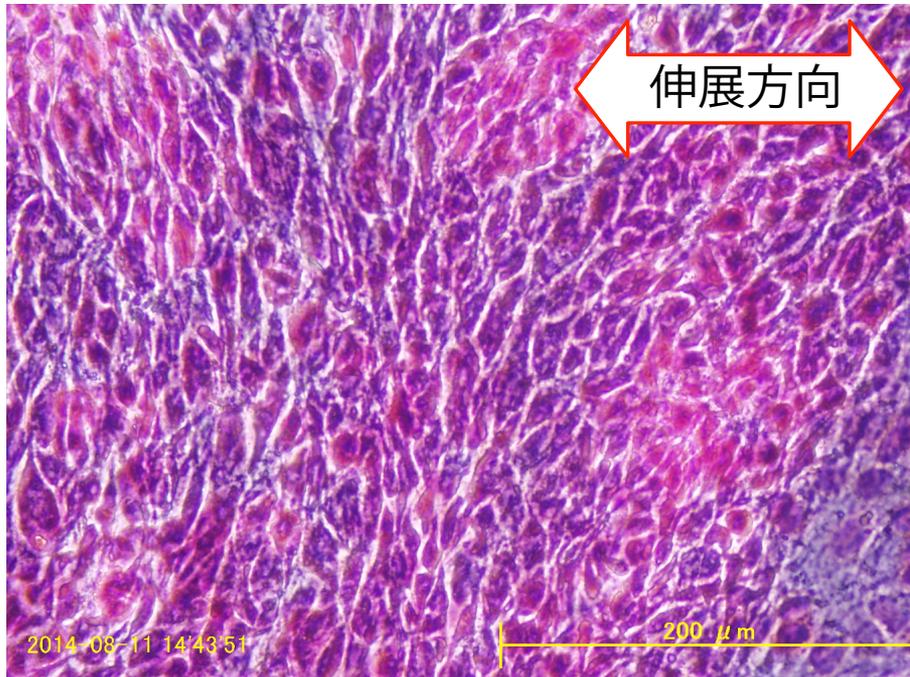
④



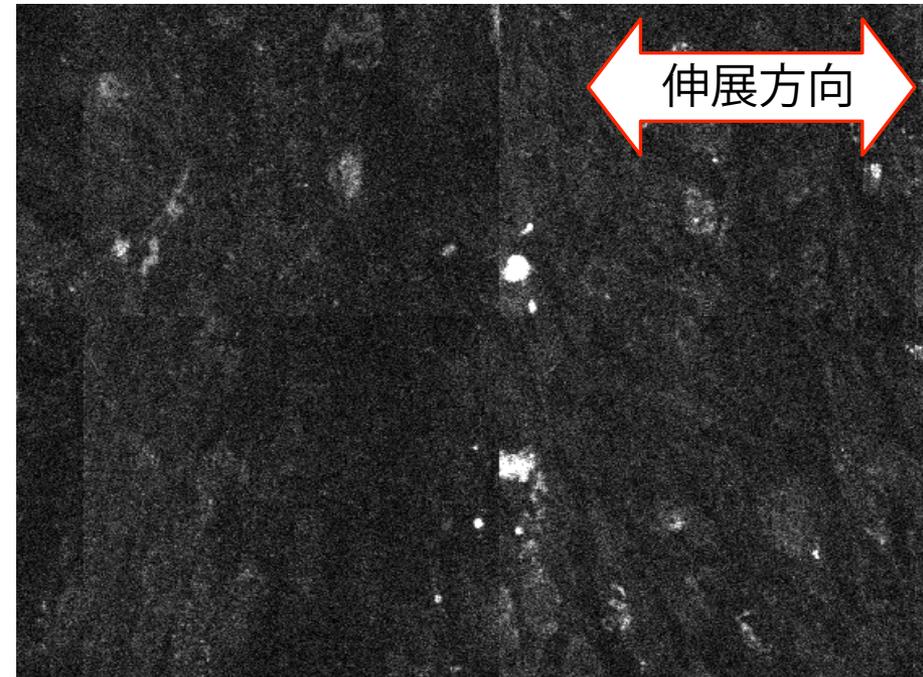
培養2週サンプルSHG vs 染色イメージ

同スケール
(異なる位置)

伸展：染色



伸展：SHG



コラーゲン産生が増加

伸展方向に直交するように細胞が配向し、コラーゲンが細胞内全体に産生

まとめ

- SHG顕微鏡の高感度化により，骨芽細胞産生コラーゲンを初めて可視化した
- 染色イメージにより，SHGイメージの妥当性を確認した
- 培養時間の経過につれて，コラーゲン産生が増加@細胞内
- 伸展方向に直交するように細胞配向 & コラーゲン産生

今後の予定

- イメージ・コントラストの向上
- 同一個体の時系列モニタリング
- 機械的刺激の条件を変化させ、
コラーゲン産生を比較
- 配向解析

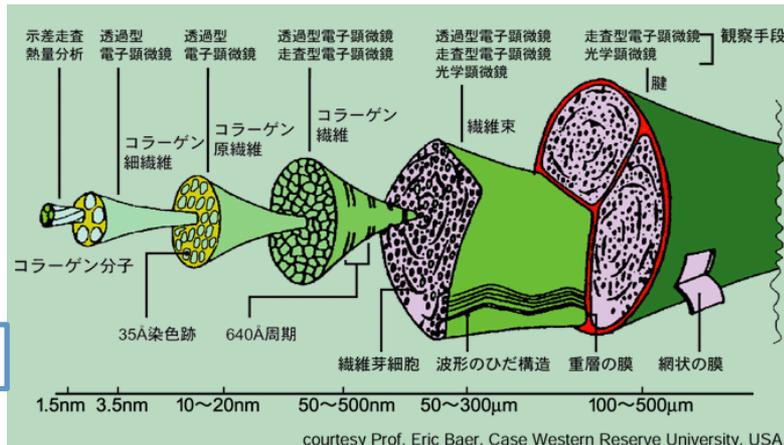
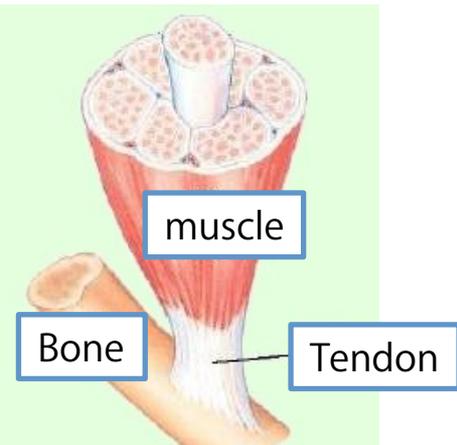
研究テーマ@長谷

SHG顕微鏡

- 骨芽細胞産生コラーゲンの可視化
- 腱リモデリング
- 黄色靭帯

ホログラフィ

イントロダクション

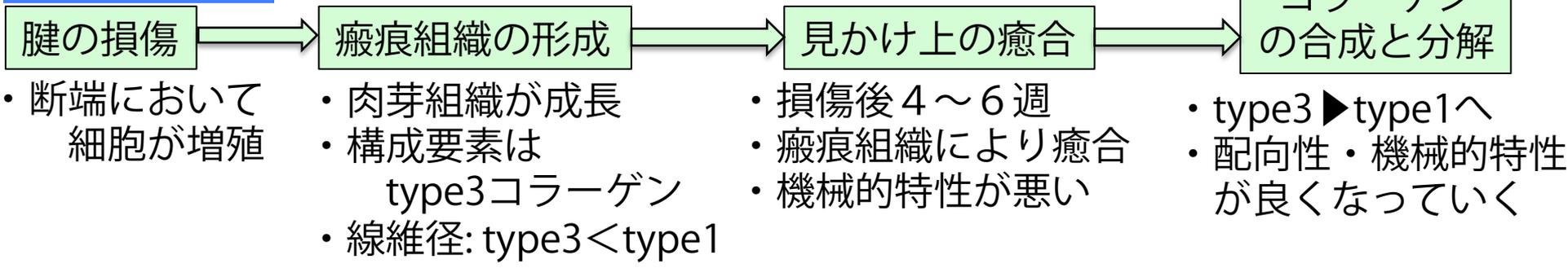


構成要素

- (i) 細胞
 - 腱細胞
 - 腱芽細胞
- (ii) 細胞外基質
 - コラーゲン ~80wt%
 - エラスチン 2 wt%
 - など

腱の修復過程や治療に必要な期間は未解明な点が多い

腱の修復過程

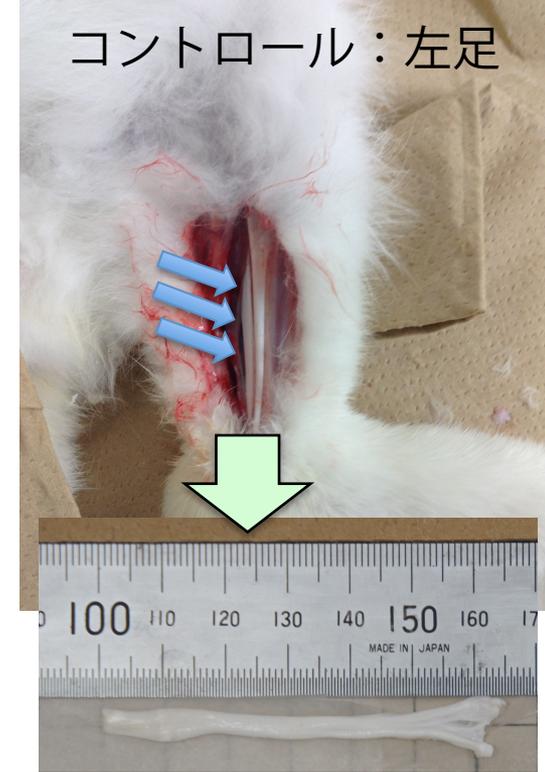


腱の修復では、**機械的特性の回復**が最終的な目標
 👉 **コラーゲン動態**が重要な役割を持つ

SHG顕微鏡
により可視化!

測定サンプル

コントロール：左足



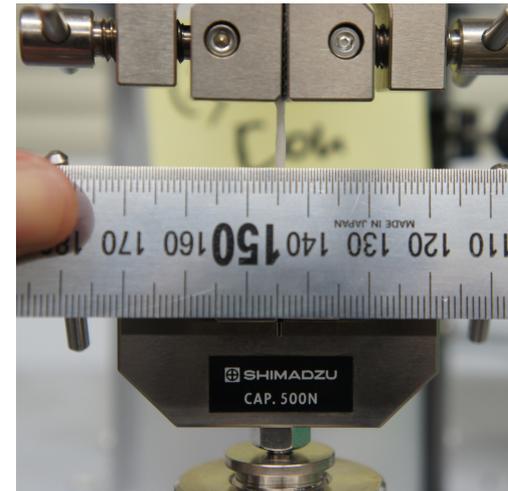
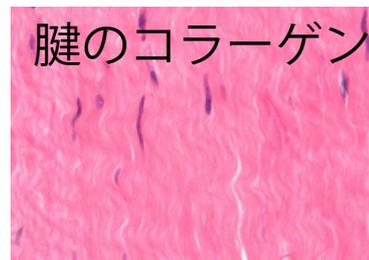
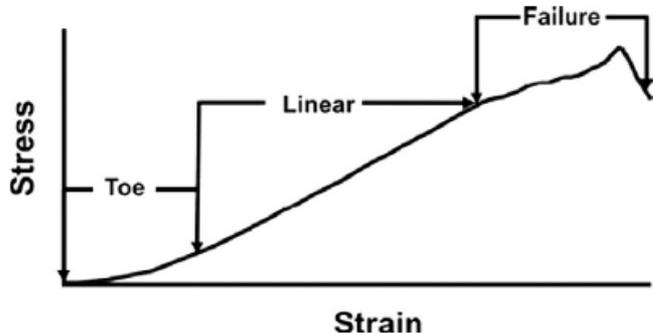
白色家兎（幼若，手術時月齢3～4か月）の屈筋腱

- ①コントロール：左後足
- ②修復モデル：麻酔下において右後足を鋭利に断裂させ，縫合し4週飼育

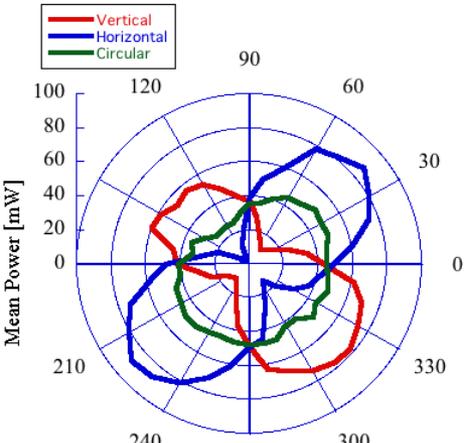
- ・屠殺後，両足から2本の腱を採取し， -15°C で冷凍保存
- ・室温で時間をかけ（8時間）解凍し，SHGイメージを取得後，速やかに引っ張り試験を行う

引っ張り試験

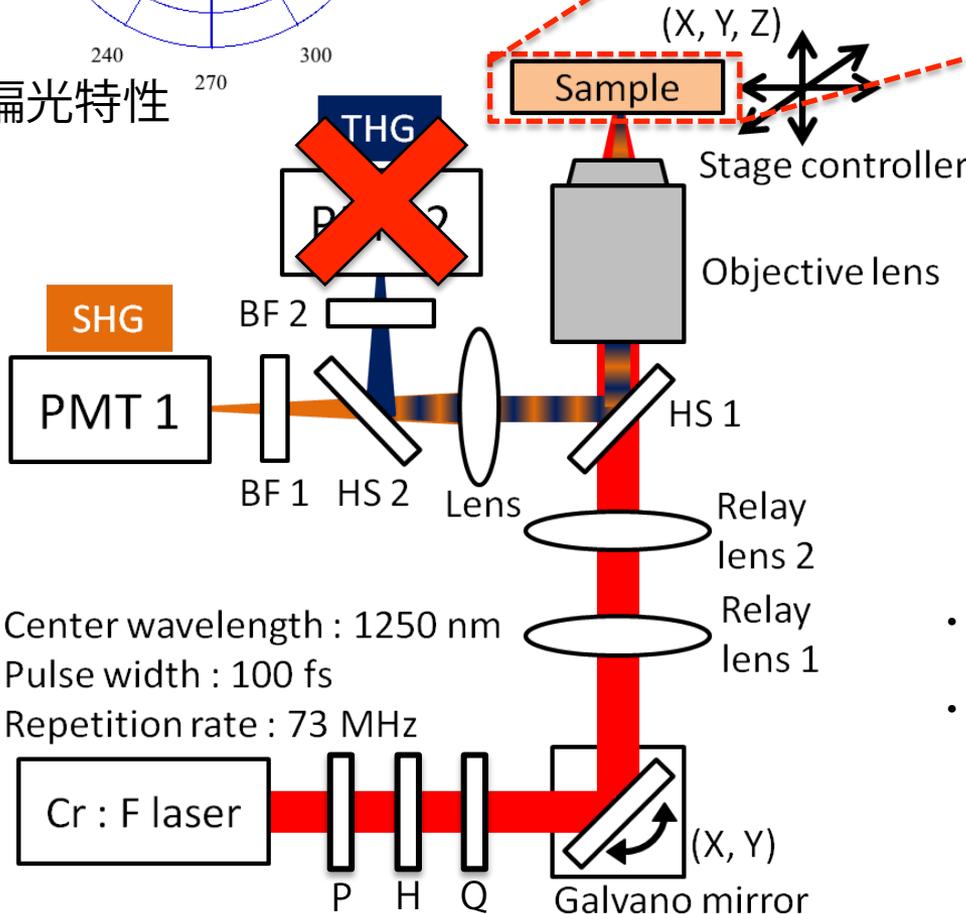
- ・卓上引っ張り試験機（島津製作所）を用いる
- ・滑り防止のため，紙ヤスリをジグの内側に張り付ける
- ・写真により直径を算出し，応力計算を行う
- ・応力-ひずみ曲線の線形な部分の傾きにより（ヤング率に相当），比較する。



SHG顕微鏡



偏光特性

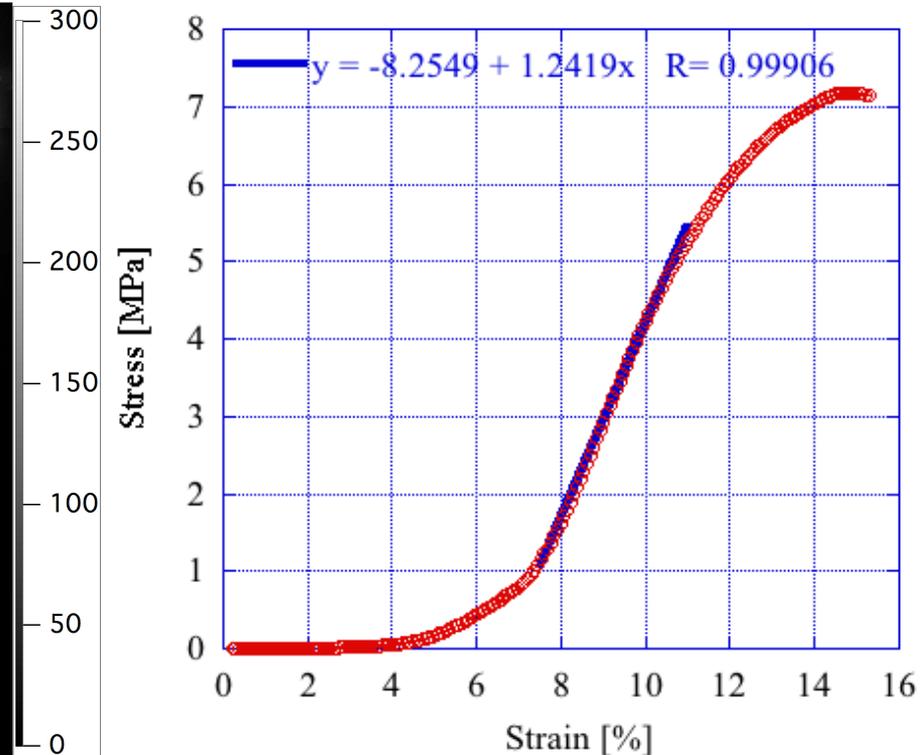
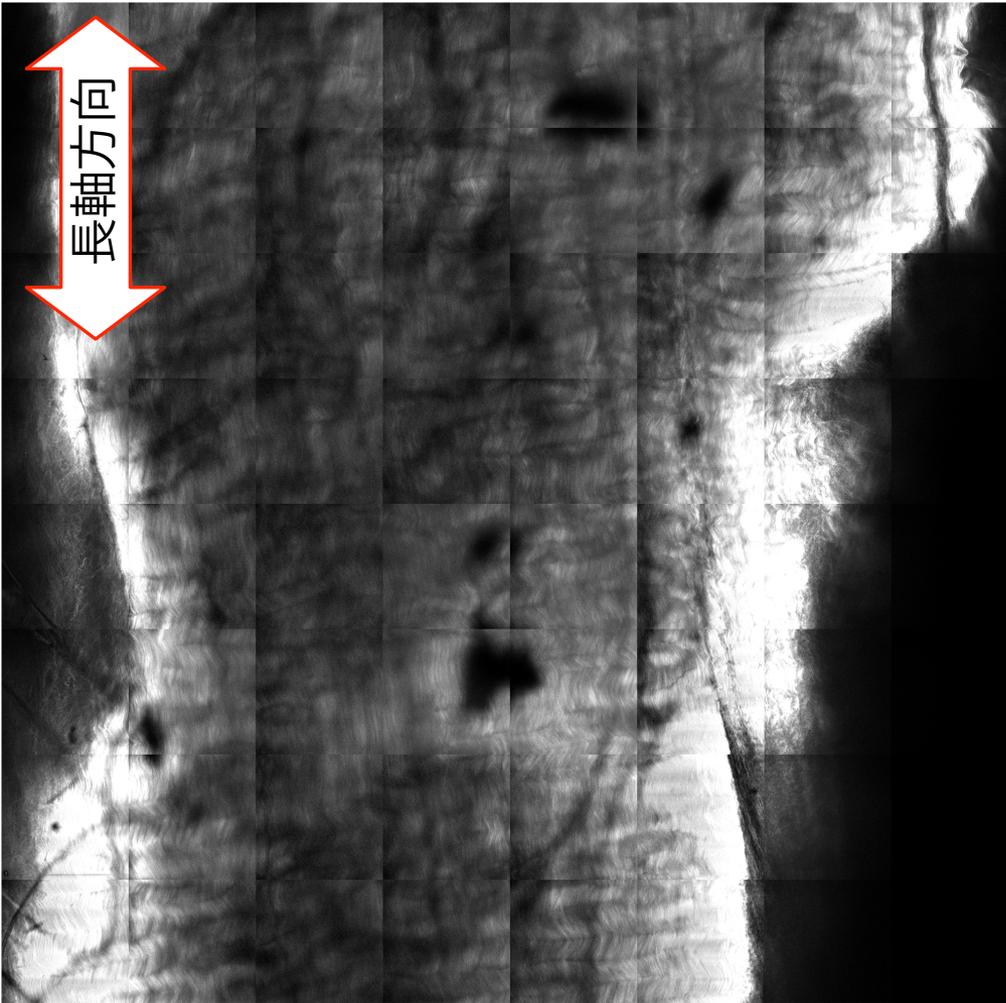


測定条件

- レーザーパワー：20 mW
- 視野：～400×400 mm
- イメージ取得時間：2 sec / frame
- 大面積イメージ：8*8 枚
- 同じ位置でサンプルに対して、レーザー偏光：水平・垂直偏光，円偏光の，3つを取得
- サンプルの乾燥防止のため，生食プールに馴染ませてからイメージング

コントロール

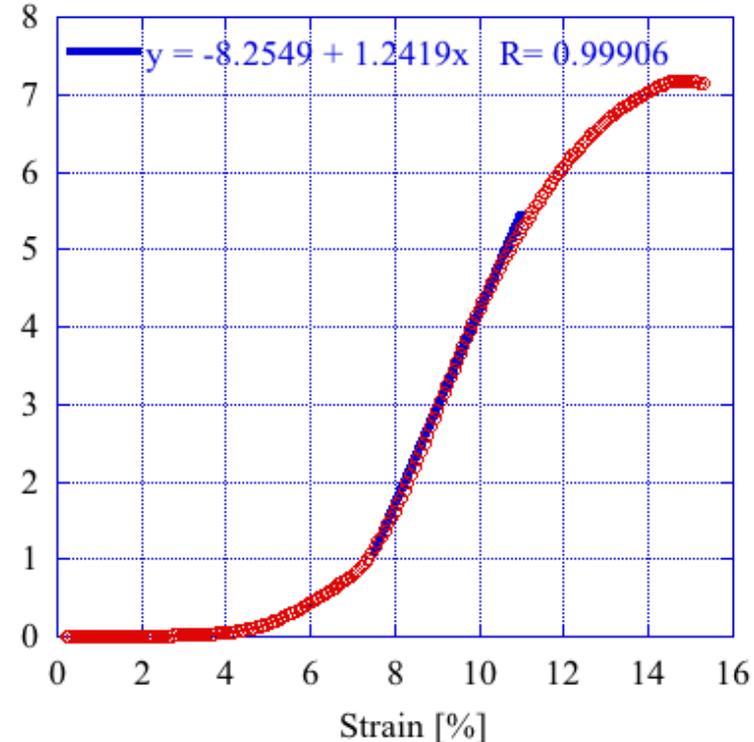
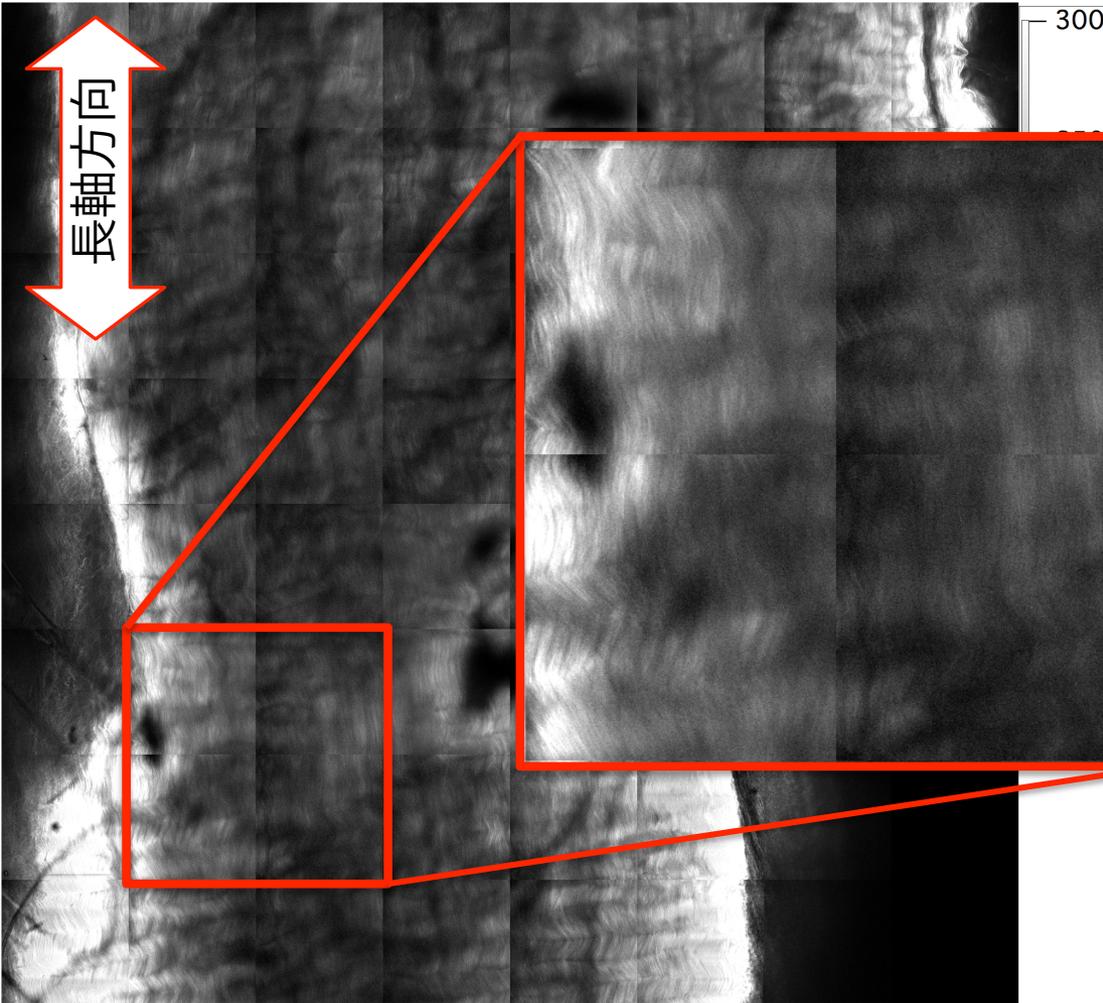
イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm



- SHGイメージ：円偏光時
- SHGイメージング引っ張り試験
ともに, コントロールと同じ条件
- 応力ひずみ曲線の終点は破断点ではない

コントロール

イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm

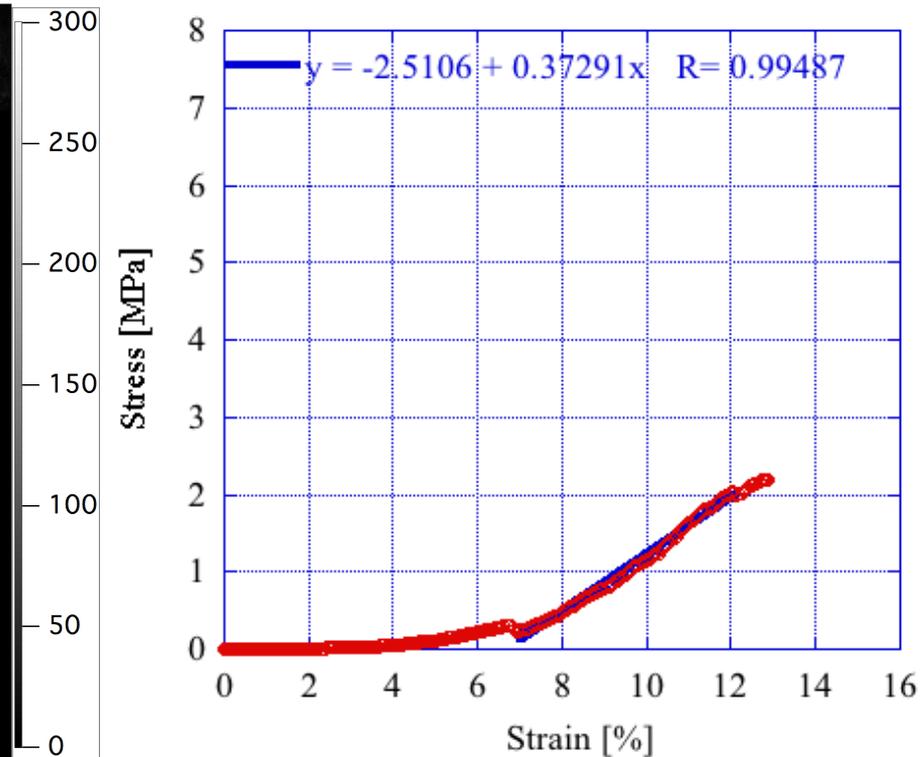
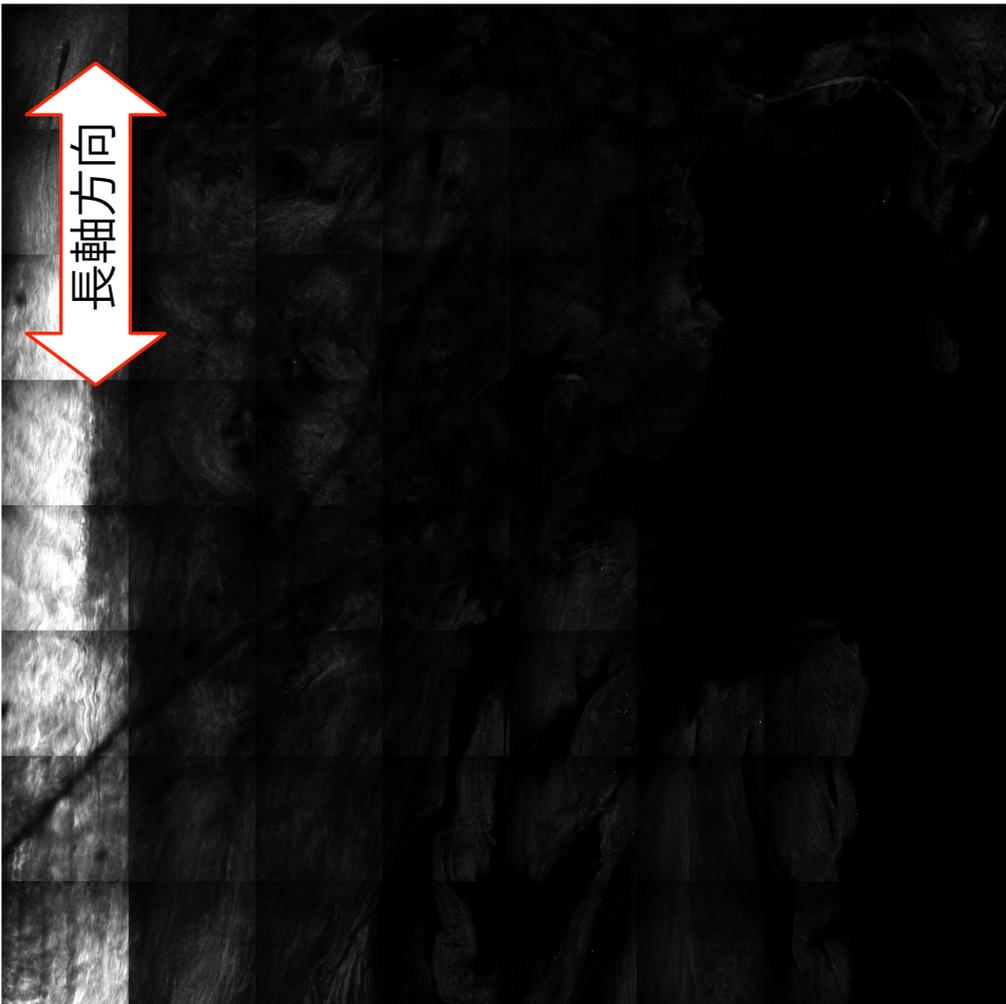


- SHGイメージ：円偏光時
- SHGイメージング引っ張り試験
ともに、コントロールと同じ条件
- 応力ひずみ曲線の終点は破断点ではない

• 視野全体において波打っているコラーゲンが確認

修復モデル

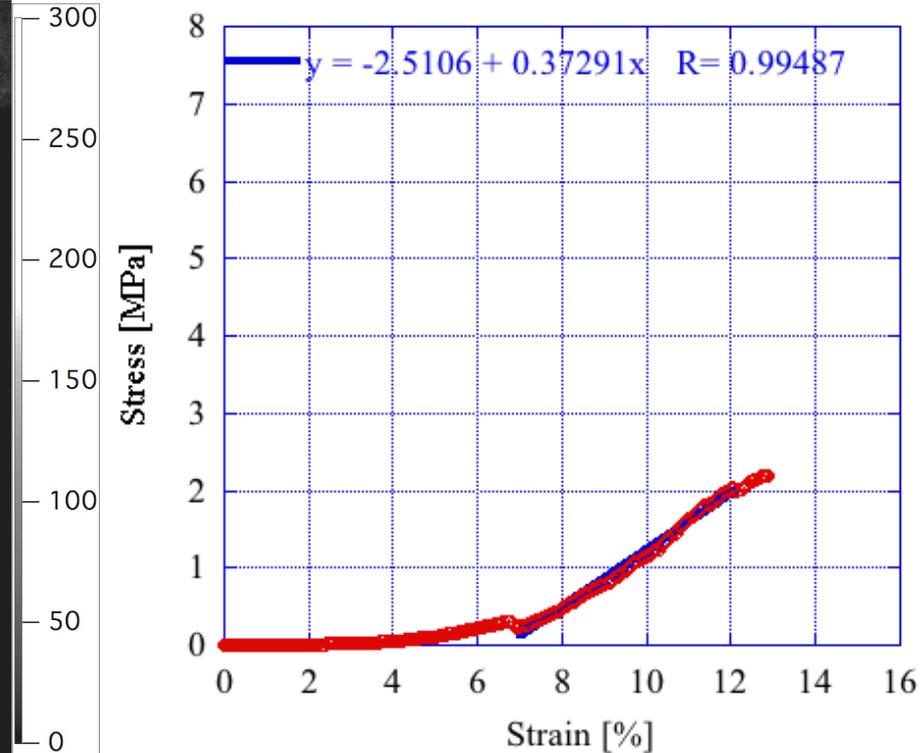
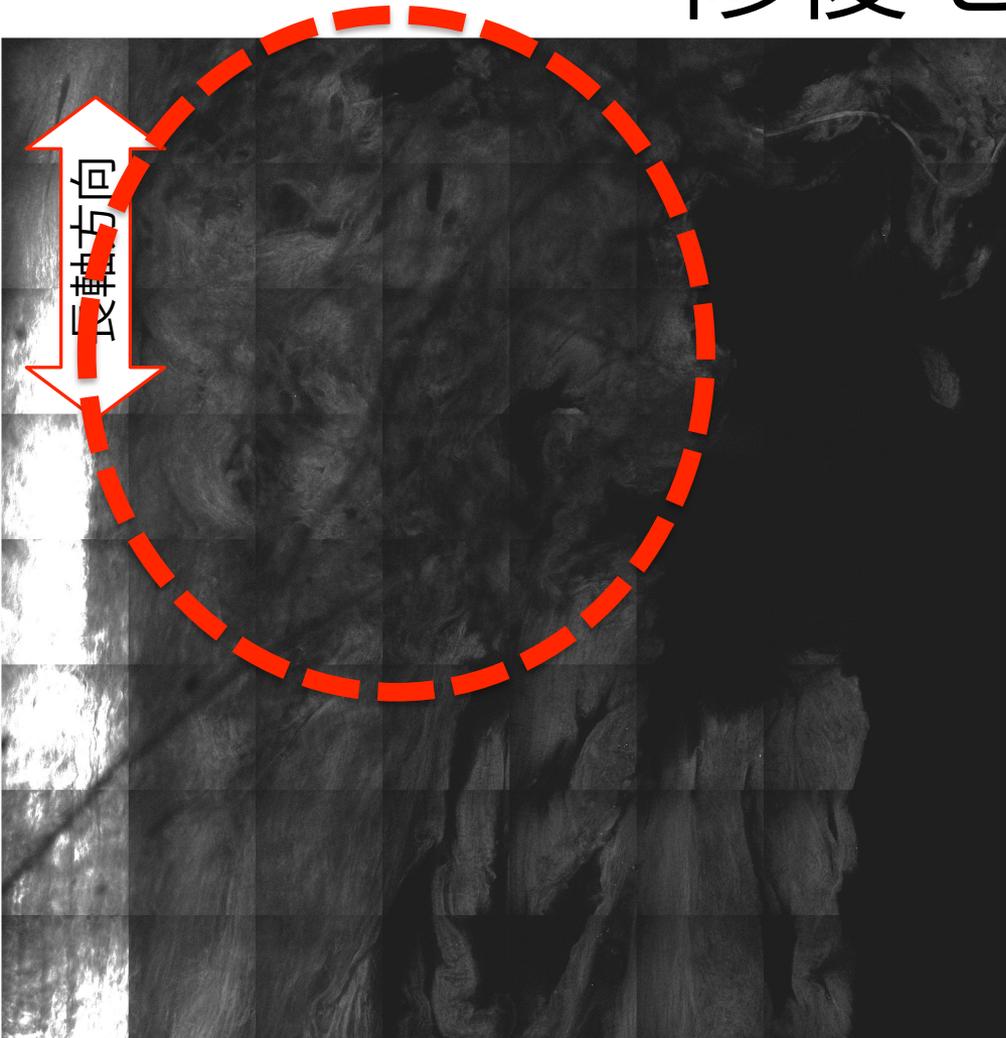
イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm



- SHGイメージ：円偏光時
- SHGイメージング引っ張り試験
ともに、コントロールと同じ条件
- 応力ひずみ曲線の終点は破断点ではない

修復モデル

イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm

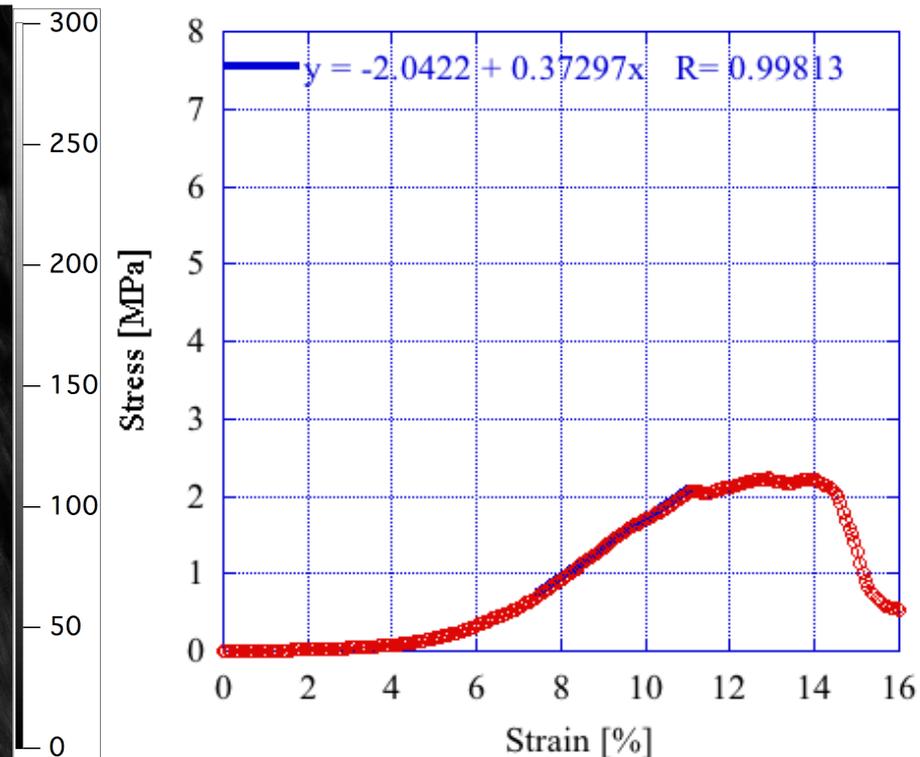
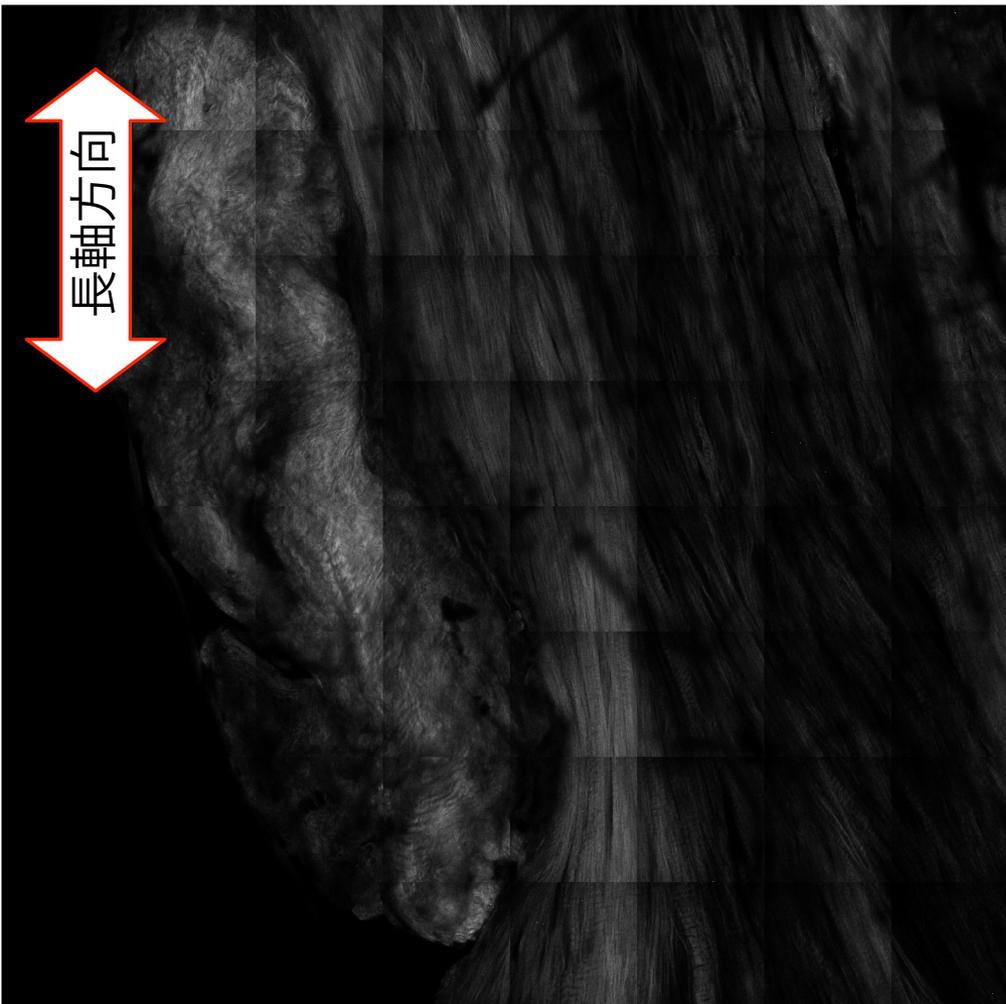


- SHGイメージ：円偏光時
- SHGイメージング引っ張り試験
ともに，コントロールと同じ条件
- 応力ひずみ曲線の終点は破断点ではない

- 明らかに配向が整っていない
- 引っ張り試験でも，傾きが小さい

修復モデル②

イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm

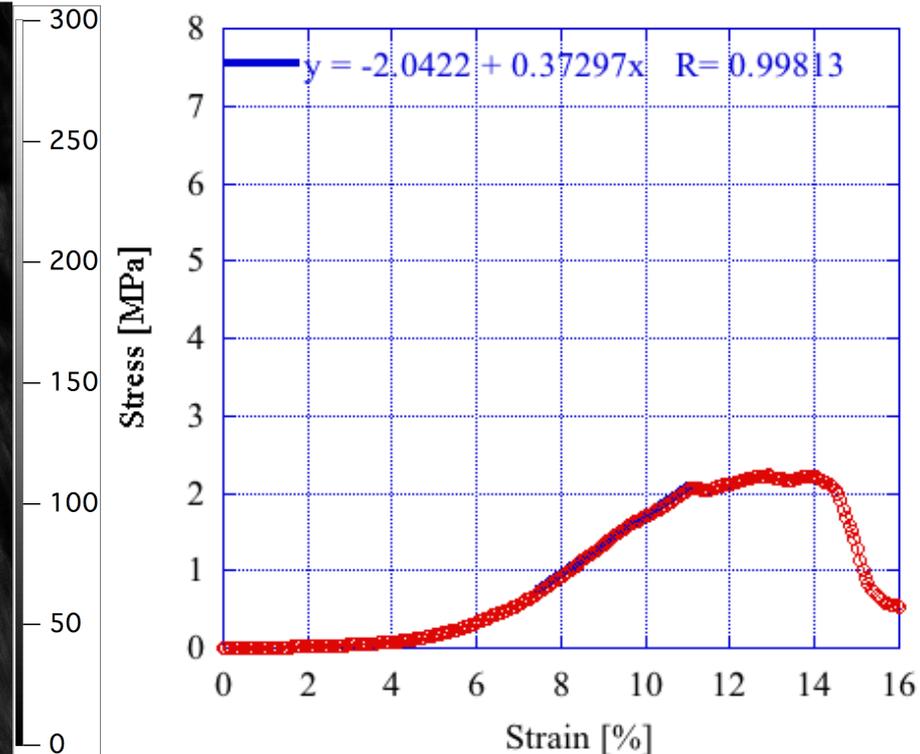
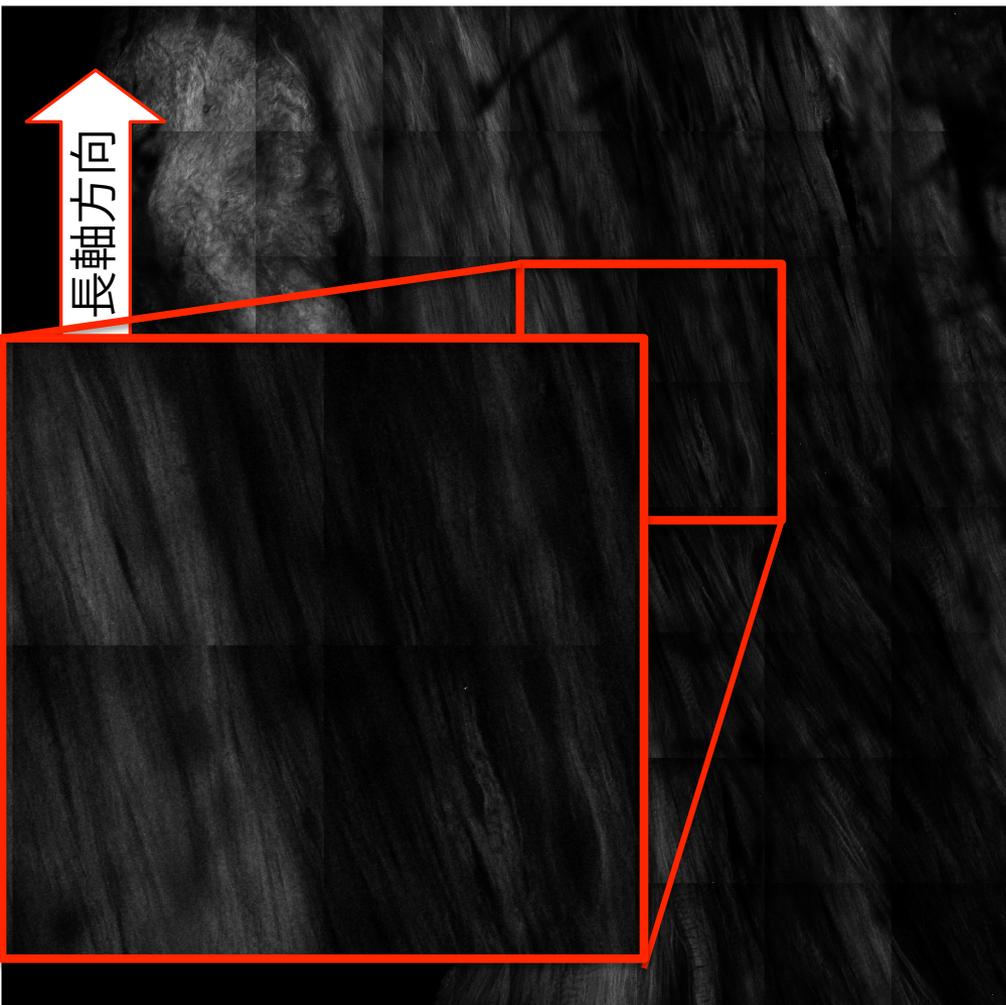


- SHGイメージ：円偏光時
- SHGイメージング引っ張り試験
ともに、コントロールと同じ条件
- 応力ひずみ曲線の終点は破断点ではない

- 配向がそろっているように見えるが、波打つ構造は見えていない
- 引っ張り試験の傾きは小さい

修復モデル②

イメージ視野：
3.2 mm* 3.2 mm



- SHGイメージ：円偏光時
- SHGイメージング引っ張り試験
ともに、コントロールと同じ条件
- 応力ひずみ曲線の終点は破断点ではない

- 配向がそろっているように見えるが、波打つ構造は見えていない
- 引っ張り試験の傾きは小さい

今後の予定

- 偏光解析
- 実験手法の再検討
- 残りのサンプルの計測