

S0210103

生体コラーゲン SHG (第 2 高調波発生) 顕微鏡を用いた 骨芽細胞産生コラーゲンの可視化*

長谷 栄治^{*1}, 佐藤 克也^{*2}, 藤澤 正一郎^{*2}, 安井 武史^{*2}

Visualization of collagen produced by osteoblasts using collagen-sensitive SHG microscopy

Eiji HASE^{*1}, Katsuya SATO, Shoichiro FUJISAWA, and Takeshi YASUI

^{*1} Univ. of Tokushima, Graduate School of Advanced Technology and Science
Minamijosanjima-cho 2-1, Tokushima, 770-8506, Japan

Second-harmonic-generation (SHG) microscopy is a new tool for observing the collagen in tissue *in vivo*. However, conventional SHG microscopy equipped with a 100-fs laser can not visualize specific samples such as low-order-structured, immature collagen produced by cultured cell because of considerably weak SHG light. One possible method to visualize such the sample is to use a fs laser with shorter pulses because of enhanced optical nonlinear effect. Based on this idea, we constructed sensitive SHG microscopy equipped with a 10-fs Ti:Sapphire laser and applied it for visualizing collagen fiber produced by osteoblasts. Precise dispersion compensation based on combination of a negative chirp mirror with a positive wedge prism enables us to maintain the pulse duration of 20 fs at the focal point even after passing through a thick objective lens. As a result, we successfully visualized the distribution of low-order-structured collagen produced by osteoblasts.

Key Words : Laser techniques, Optical Engineering, Biomedical measurement

1. 結 言

骨は、体の中でも我々が動く時の要になる組織である。骨の変形・痛み・骨折は、QOL (Quality of life : 生活の質) を著しく低下させるため、高齢化社会が進行する我が国において、骨の再生エンジニアリングのニーズは極めて高い。骨は、骨芽細胞がコラーゲンを産生し、コラーゲンが高次構造 (骨基質) を構築し、そこにミネラルが沈着することにより形成 (再生) されていく。現在、iPS 細胞や間葉系幹細胞を用いると骨芽細胞を作るとは可能であるが、その組織化過程には未解明な部分も少なくない。骨は機械的刺激に反応して常に作り替えられているが、骨芽細胞は周囲を固い組織に覆われている環境のため、組織化過程において生きた骨の中で細胞がどのような振る舞いをするのかは未だ解明されていない。特に、細胞外マトリックスであるコラーゲンが組織化過程において重要な役割を果たしていると考えられているが、これをその場観察することはこれまで不可能であった。

近年、生体組織における生きたありのままの状態のコラーゲンを可視化する手段として生体コラーゲン SHG (second harmonic generation : 第 2 高調波発生光) 顕微鏡が注目されている。SHG 顕微鏡では、コラーゲン分子固有の非線形光学特性を用いることにより、生きたありのままの状態のコラーゲン分子を可視化できる⁽¹⁾。従来の SHG 顕微鏡では、パルス幅 100 fs 前後のモード同期 Ti:Sapphire (Ti:S) レーザーが広く使われてきたが、コラーゲンの構造成熟度が低い生体サンプル (例えば、細胞産生コラーゲンやコラーゲングル) では、一般に SHG 発生効率が低く、良好なコントラストのイメージを得ることは困難である。SHG 光は 2 次の非線形光学効果であり、SHG 発生強度は入射光ピーク強度の 2 乗に比例する一方で、ピークパワーに対しては線形比例する⁽²⁾。レーザー照射による生体ダメージを考慮すると、レーザー平均パワーを増大するのではなく、平均パワーを維持したま

^{*1} 非会員, 徳島大学 大学院先端技術科学教育部 (〒770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1)

^{*2} 正員, 徳島大学 大学院ソシオテクノサイエンス研究部
E-mail: hase@femto.me.tokushima-u.ac.jp

まパルス幅を狭窄化することにより、ピーク強度を高くすることが望ましい。その結果、SHG 発生効率の低いサンプルでも、サンプルダメージを引き起こすことなく、SHG 光強度が増大させることが可能になる。最近では、パルス幅 10 fs 以下の Ti:S レーザーも市販されているが、このようなレーザー光源をそのまま SHG 顕微鏡に用いると、対物レンズ等の光学素子の分散により、パルス幅が数百 fs まで容易に広がり、ピークパワーを逆に大きく低下させる。本研究では SHG 顕微鏡の骨再生エンジニアリング分野への応用に向けて、負分散チャープミラーと正分散ウェッジプリズムで分散補償することにより、対物レンズ焦点位置においてパルス幅を最短化し、SHG 顕微鏡の高感度化を試みた。その後、SHG 顕微鏡を用いて骨形成（再生）過程をコラーゲン動態の観点から明らかにするため、骨芽細胞培養サンプルのイメージングを行い、コラーゲン構造の可視化を行った。

2. 高感度 SHG 顕微鏡

物質に光が入射されると、入射光の電場により分極波が物質中で誘起され、これが源となって新たな光が発生する。通常の光による線形分極 P_L は入射電場強度 E に比例する。

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

ここで、 $\chi^{(1)}$ は線形感受率である。上式より、線形分極に由来する屈折等ではその前後において波長が変化しない。一方、超短パルス光のように非常に高いピークパワーを持つ光を入射すると線形性が崩れ、非線形の項が含まれる非線形分極 P_{NL} で表すことが出来る。

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

ここで、 $\chi^{(2)}$ および $\chi^{(3)}$ は 2 次及び 3 次の非線形感受率である。このように分極波に非線形な項が現れると、分極波が歪み、入射電場周波数 ω の高調波成分 ($2\omega, 3\omega, \dots$) が含まれる。SHG 光は 2 次の非線形分極 $\chi^{(2)} EE$ によって非中心対称性物質のみで誘起され、周波数 ω の光を入射したとき、 2ω の光が発生する。SHG は瞬時の過程であり、レーザーパルス光が存在する時間領域でのみ発生する。つまり、2 次の非線形分極 $\chi^{(2)} EE$ をパルス幅の時間間隔だけ積算した信号が検出される。従って SHG 信号強度と発生に起因するパラメーターは、簡単に以下の様に見える⁽²⁾。

$$I_{2\omega} \propto \left[\chi^{(2)} \frac{P_\omega}{\tau_\omega} \right] \tau_\omega = \left[\chi^{(2)} \right]^2 \frac{P_\omega^2}{\tau_\omega} \quad (3)$$

ここで P_ω はレーザーの持つパルスエネルギー (= 平均パワー/繰り返し周波数)、 τ_ω はレーザーパルス幅である。上式より、SHG 信号強度はレーザー平均パワー (P_ω) を上昇させることで、SHG 発生効率の低いサンプルでも SHG 強度が平均パワーの 2 乗に比例して増大し、イメージ・コントラストを向上させることができる。しかし、この場合、レーザーによるサンプルへのダメージはレーザー平均パワーに比例して大きくなるため、レーザー平均パワーを上昇させることによる組織へのダメージの増加や細胞のバイアビリティ（生存能）の低下は避けられない。一方、レーザー平均パワーを維持したままパルス幅を狭窄化すれば（すなわち τ_ω のみ小さくすれば）、レーザー照射によるサンプルへの影響を現状維持のまま、SHG 発生強度をパルス幅に反比例して増大することが可能となる。SHG 顕微鏡において、100 fs レーザーよりも 10 倍パルス幅が狭窄化された 10 fs レーザーを用いると、SHG 光強度も 10 倍向上できる。

3. 対物レンズ焦点位置におけるパルス幅測定

10 fs オーダーの極短フェムト秒パルスレーザーを SHG 顕微鏡に用いる際の問題点として、対物レンズ等のチャープによるパルス広がりがある。光学素子の群速度分散によるチャープである媒質分散では、ガラスのような屈折率が正の分散を持つ物質を透過したパルスが、短波長（青）側の成分が長波長（赤）側の成分に対して遅れ、パルスが広がりピークパワーの低下を引き起こす。SHG 顕微鏡において 10 fs レーザーのスペックをフルに活用するためには、対物レンズ焦点位置でパルス幅が最短となるよう分散補償を行う必要がある。

まず、マイケルソン干渉計とローダミン 6 G を用いた 2 光子蛍光自己相関計を構築し (図 1), 対物レンズ焦点位置のパルス幅を計測した. 光源にはモード同期 Ti:S レーザー (パルス幅 10 fs, 中心波長 787 nm, スペクトル幅 103 nm, 繰り返し周波数 81.8 MHz) を用いた. レーザー出射直後の負分散可変チャープミラー (群遅延分散量: $-900 \sim -6270 \text{ fs}^2$) と正分散可変ウエッジプリズム (群遅延分散量: $50.8 \sim 356 \text{ fs}^2$) を用いて最適化することにより, 対物レンズ焦点位置でパルス幅 20 fs が得られた (図 2). 比較のため, レーザー出射直後の自己相関波形を図 2 挿入図に示す. 分散補償後の自己相関波形が, レーザー出射直後のパルス幅 (10 fs) まで戻らず時間波形がいびつになっている理由は, チャープミラーの 3 次分散が原因であると考えられる.

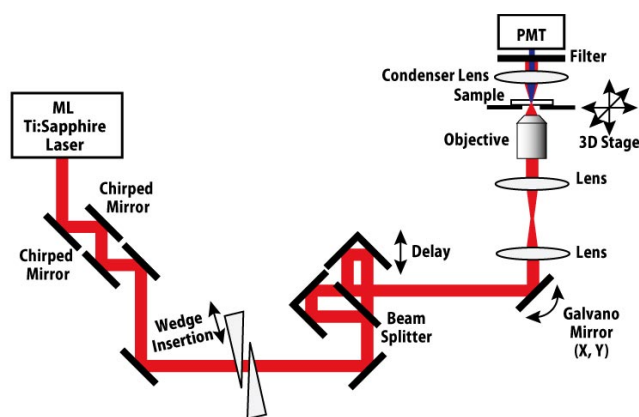


Fig.1 Experimental Setup.

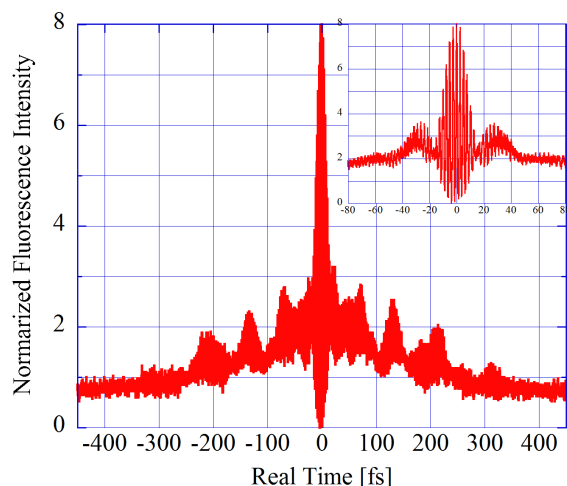


Fig.2 Interferometric autocorrelation traces at the focal plane. The inset shows traces after the laser output.

4. 骨芽細胞産生コラーゲンの可視化

図 1 のセットアップは対物レンズ焦点位置のローダミン 6 G をサンプルに置き換えるだけで, SHG 顕微鏡として利用出来る. モード同期 Ti:Sapphire レーザーからの出射光は, 油浸の対物レンズ (N.A.=0.90, W.D.=350 μm) によってサンプル上に集光される. サンプル上のレーザースポットは, ガルバノミラーと 2 枚のリレーレンズにより, 約 210 $\mu\text{m} \times 210 \mu\text{m}$ の測定領域を 2 次元走査できる (測定時間 10 秒/イメージ). また, 機械式ステージを用いて, 測定を左右に動かすことにより, 大面積 SHG イメージング (840 $\mu\text{m} \times 840 \mu\text{m}$), さらに上下に測定を動かすことにより, 深さ分解 SHG イメージングの取得も可能である. サンプルから発生した SHG 光はコンデンサーレンズによって集光され, バンドパスフィルターを用いて SHG 光成分のみを抽出した後, フォトンカウンティング型光電子増倍管によって検出される.

高感度化した SHG 顕微鏡を用いて, 骨芽細胞播種培養組織の SHG イメージングを行った. 図 3 左に, 骨芽細胞産生コラーゲンサンプル (培養 2 ヶ月) の SHG イメージを示す. 今回のパルス幅狭窄による高感度化の結果, 培養骨芽細胞産生コラーゲン分布を可視化することに成功した. このような SHG イメージがサンプルのどのような構造を可視化しているか確認するため, サンプルを Sirius red 染色し観察した. 図 3 右に SHG イメージと同じ視野領域の染色イメージを示す. Sirius red 染色ではコラーゲンのみをピンク色に染めることが出来る. 染色イメージでも, ピンク色のコラーゲンが団子状の構造をもっており, SHG イメージで見られる団子状構造はこの構造を反映していると考えられる. 骨芽細胞が産生したコラーゲンには, リン酸カルシウムで出来た骨を構成する成分であり, ハイドロキシアパタイトを主成分とするミネラルが塊となって沈着する (石灰化) することが報告されていることから⁽³⁾, コラーゲン染色像で見られる濃ピンクまた SHG イメージで見られる団子状の塊は石灰化部分であると考えられ, 両者で整合が取れていると言える.

コラーゲン染色に対する SHG イメージの利点は, 生体 SHG 光の発生原理より, コラーゲン構造成熟度や濃度を反映した画像を高コントラストに取得できることである. また, 低侵襲で in vivo 計測できるので, 骨形成過程におけるコラーゲン動態を時系列で追跡することも可能である. そのため, 骨形成 (再生) 過程のモニタリ

ングのみならず, 再生医療分野において細胞→組織→器官という高次構造化におけるコラーゲン動態の重要な知見が得られるのではないかと期待される。

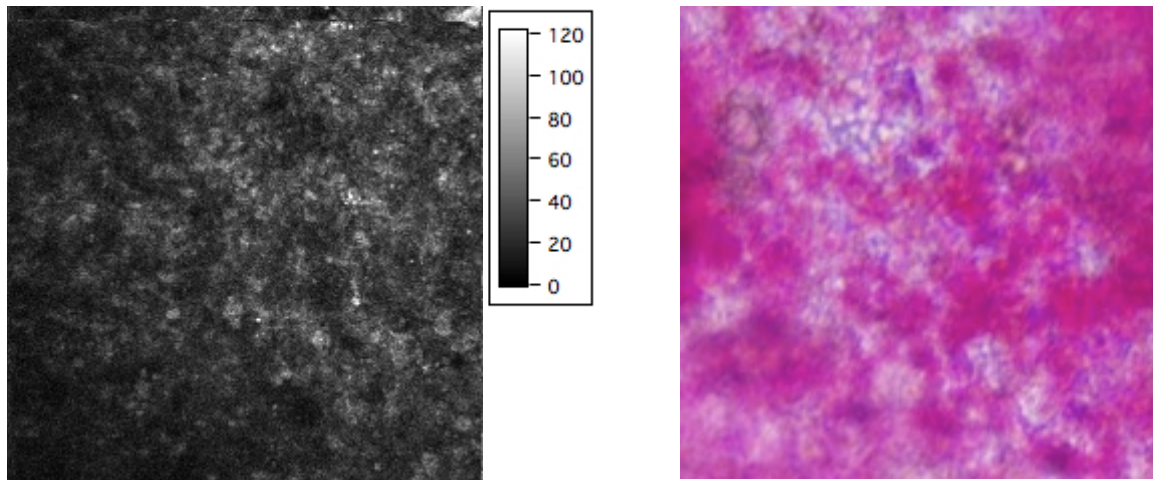


Fig.3 Osteoblasts populated collagen. Left: SHG image. Right: Stained image. The image size is 210 μm *210 μm .

5. 結 語

SHG 顕微鏡の骨再生エンジニアリングへの応用に向けて, チャープミラーによる分散補償型 10 fs モード同期 Ti:S レーザーを用いた高感度 SHG 顕微鏡の構築を行い, 低 SHG 発生効率サンプルの SHG イメージングを行った, 培養骨芽細胞サンプルのイメージングでは, イメージ・コントラストが向上し, 組織中のコラーゲン分布を可視化することに成功した。

文 献

- (1) S. Roth and I. Freund., “Second harmonic generation in collagen”, *The Journal of Chemical Physics*, Vol.70, No.7 (1979), pp.1637-1643.
- (2) P. J. Campagnola, H. A. Clark, W. A. Mohler, A. Lewis, L. M. Loew., “Second-harmonic imaging microscopy of living cells”, *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 6, No. 3 (2001), pp. 227-286.
- (3) H. Ohgushi, and A. I. Caplan., “Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 48, No. 6 (1999), pp913-927.