

# 生体組織の非線形光学効果を用いたコラーゲン配向測定

## Determination of collagen orientation based on optical nonlinear effect in biological tissue

大阪大学大学院基礎工学研究科、奈良県立医科大学\*

安井武史、佐々木邦彦、荒木勉、東野義之\*

T. Yasui, K. Sasaki, T. Araki, and Y. Tohno\*)

Grad. Sch. Engg. Sci., Osaka Univ., Nara Med. Univ.\*\*)

生体組織内のコラーゲン配向を評価する新しい光プローブ法が提案された。コラーゲン配向に対する特異的なプロービング特性は、コラーゲン分子の非線形光学特性により誘起される生体SHG光の偏光解析により実現される。このような概念に基づいた反射型偏光分解SHGイメージング装置が試作され、ヒト組織のコラーゲン配向分布測定に応用された。その結果、コラーゲン配向分布の組織依存性を確認した。

### 1. はじめに

コラーゲン分子はヒト身体に豊富に含まれる生体構造タンパク質の1つであり、生体組織や器官はコラーゲン分子及び構造集合体（マイクロフィブリル、原線維、線維、線維束）の立体的構造によって構成されている。その役割は、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、コラーゲンの並び方（コラーゲン配向）の3次元的分布が、組織・器官の形態的あるいは機能的特性を決定する上で重要な役割を担っている。したがって、コラーゲン配向の評価は医科学やバイオメカニクス関連分野において重要とされているが、従来法（電顕観測、X線回折、マイクロ波法、機械的特性、生化学分析、組織学的分析など）はいずれも侵襲的あるいは破壊的測定手法であり、解剖学的生検が必要であった。これ故、これらに替わる非侵襲・非破壊的コラーゲン配向測定法が強く望まれている。このような計測を実現する有力な手段が光プローブ法であるが、光コヒーレンストモグラフィーをはじめとした従来法ではコラーゲン配向の状態を詳細に測定することは困難であった。

我々は、フェムト秒（ $=10^{-15}$ 秒）オーダーの超短パルス光を生体組織に照射時、生体コラーゲン自身が有する2次の非線形光学特性によって発生する第2高調波発生光（生体SHG光）[1]に注目し、これを用いたコラーゲン配向測定法に関する研究を行っている[2-3]。生体SHG光を用いたコラーゲン配向測定法の特徴は、その低侵襲性以外に、分子レベルの構造配向に敏感、高い空間分解能、3次元分布測定が可能、染色不要、バックグラウンド光（散乱光や蛍光など）との分離が容易、といった特徴を有している。ここでは、生体SHG光を用いたコラーゲン線維の配向分布測定に関して紹介する。

## 2. 生体 SHG 光とは

SHG光は物質の構造非中心対称性に起因する非線形光学現象の1つである。ここでは、音の領域における線形・非線形現象と対比しながら、SHG光発生メカニズムを説明する。まず音の領域における現象の例として、ピアノ鍵盤を考える。図1(a)に示すようにピアノの鍵盤に軽く触れると、その鍵盤に対応した基本音(周波数= $f$ )が発生する。これは音の領域における線形現象と言える。しかし同じ鍵盤を力一杯叩くと、基本音以外に1オクターブ上の倍音(周波数= $2f$ )も同時に発生する。このような音の領域の非線形現象は、ピアノ構造の機械的非線形性に起因している。同様な現象は光の領域でも起こり、この場合には非中心対称性構造物質(非線形光学結晶やコラーゲン分子)がピアノ、超短パルス光が力一杯叩くことに相当する。すなわち、赤色の超短パルス光(周波数= $\omega$ 、波長= $\lambda$ )を非中心対称性構造物質に入射すると、周波数が2倍(波長が半分)の青色パルス光(周波数= $2\omega$ 、波長= $\lambda/2$ )が発生し、これがSHG光である。このようなSHG光は線形光学効果(反射や吸収)とは本質的に異なるメカニズムで発生し、波長オーダーの構造非中心対称性に関する情報を特異的に与える。

生体SHG光は、コラーゲン分子の構造的な非中心対称性に起因しているため、コラーゲン分子の中心軸すなわち配向状態に敏感である。図1(b)は、生体SHG光の発生に関する入射レーザー光の偏光状態とコラーゲン線維配向の関係を示している。レーザー光をコラーゲン線維断面に入射する場合、あらゆる偏光に対して構造が中心対称性配置となるため( $C_{\infty}$ 対称性)、SHG光は禁制である。一方、それ以外の方向からの入射に対しては、生体SHG光が発生する。さらに、SHG光の発生効率はレーザー偏光とコラーゲン配向の関係に強く依存し、両者が平行な場合には強い生体SHG光が発生するのに対し、直交した場合には非常に微弱となる。したがって、偏光解析によりコラーゲン線維の配向状態を評価することができる。

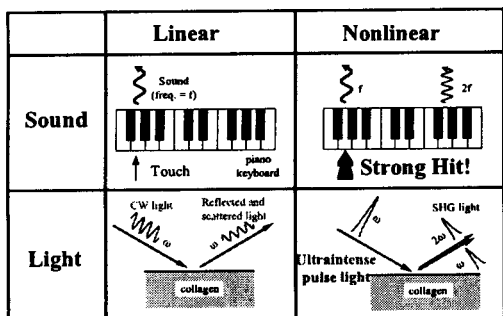


Fig. 1(a) Nonlinear phenomenon in sound and optical regions.

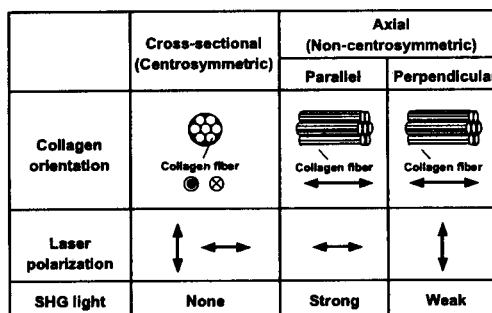


Fig. 1(b) Relationship between collagen orientation and laser polarization with respect to generation of SHG light.

## 3. 実験装置

図2に実験装置を示す。レーザー光源にはモード同期チタン・サファイアレーザー(Avesta Project, TiF-Kit-100、パルス幅=80fs、平均パワー=250mW、繰返周波数=87MHz、中心波長=808nm)を用いる。レーザーから出射された超短パルス光は、対物レンズ(OL、

×20、NA=0.42)によりサンプルに照射される。発生した生体SHG光のうち後方散乱した成分を再び対物レンズによって集光し、光電子増倍管(PMT)によりロックイン検出する。混在した赤色後方散乱光はハーモニックセパレーター(HS)と青色フィルター(F)によって除去される。さらに深さ分解能向上のため、ピンホール(PH、直径50 $\mu$ m)を用いた共焦点配置を導入している。偏光解析では、偏光子(PL)、1/2波長板( $\lambda/2$ )、検光子(AN)、偏光解消板(DP)を用いて入射レーザー光と検出SHG光の偏光状態が一致するように同期回転させながら、その強度変化を測定する。これは、偏光を固定した状態で、サンプルを光軸回りに回転させることと等価である。またコラーゲン配向の分布測定では、サンプルを3次元的に走査することにより、イメージング測定を行う。

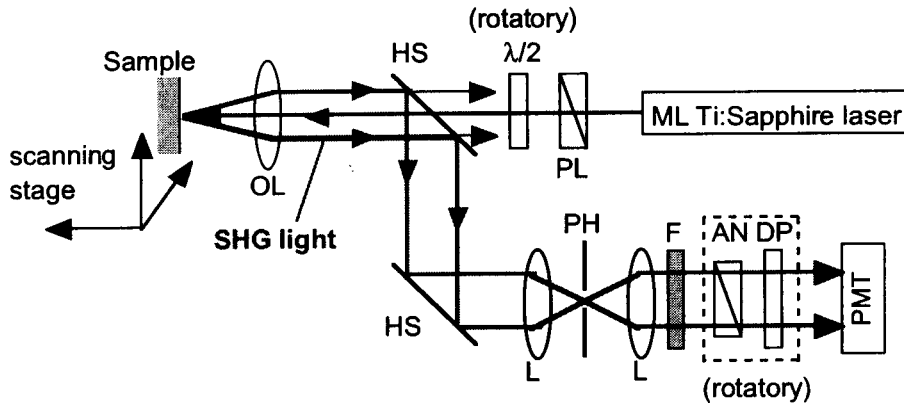


Fig. 2 Experimental setup. PL: polarizer,  $\lambda/2$ : half waveplate, HS: harmonic separator, OL: objective lens, L: lens, PH: pinhole, F: blue pass filter, AN: analyzer, DP: depolarizer, PMT: photomultiplier.

## 4. 測定結果

### 4.1 偏光解析

SHG 偏光解析では、偏光角度に対する SHG 強度分布を図3に示すような極グラフ形式 (SHG レーダーグラフ) で表示する。ここで、0度 (または180度) と90度 (270度) はそれぞれ水平と垂直の偏光を示している。例えば、ヒトアキレス腱 (ホルマリン固定) の場合、図3(a)に示すような8の字形状が得られた (図中の矢印は予想される配向方向)。これは単一軸配向に特徴的な形状であり、長軸方向に平行な配向が規則的に並んでいる一方でそれと直交する方向にはほとんど配向が存在しないことを意味している。ヒト真皮 (ホルマリン固定) の場合、アキレス腱とよく似た8の字形状であるが節が不完全と

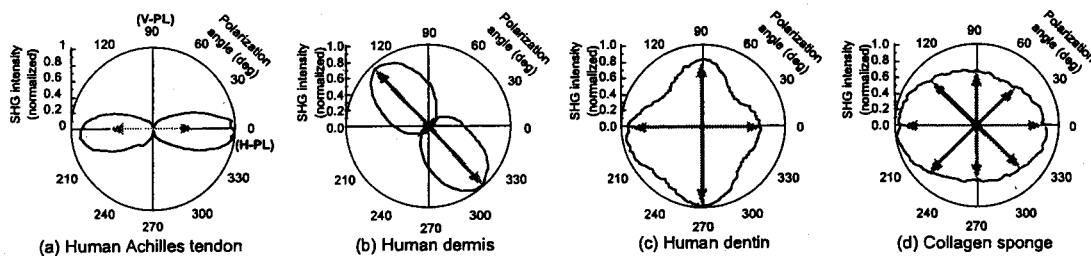


Fig. 3 SHG radar graph.

なった[図3(b)]。これは、コラーゲン線維の配向が比較的揃っているが、完全ではないことを意味している。ヒト象牙質では直交2軸配向を示す結果となっており、これはコラーゲン線維がメッシュ構造で存在するためであると考えられる[図3(c)]。一方、コラーゲンスポンジでは特徴的な主軸を有さない楕円形状となっており、これは完全ランダム配向を示唆している[図3(d)]。このように、SHGレーダーグラフの主軸と形状から、コラーゲン線維配向の絶対的方位と配向度（揃い具合）を評価することができる。

#### 4.2 偏光分解イメージング

ヒト真皮の面内コラーゲン配向分布を評価するため、2次元SHG偏光解析を行った。測定部位は10mm間隔毎の合計20点で、その結果を図4(a)に示す。いずれの部位のSHGレーダーグラフも、図3(b)と同様、ほぼ単軸的なコラーゲン配向を示しているが、その方位はかなりばらついている。すなわちヒト真皮では、微視的にはほぼ単一的なコラーゲン配向が[図3(b)]、巨視的にはランダムに分布していると言える。次に、顕微領域における配向方位角の2次元分布測定を行った。ここでは、偏光角30度毎に偏光分解SHGイメージを取得し、各ピクセル毎に最大SHG強度を示す偏光角をコラーゲン配向方位角とした。図4(b)は配向方位角の分布を2次元ベクトルマッピングで表示したものであり、配向方位のうねりが確認できる。真皮ではコラーゲン線維が絡み合った状態で存在しているというのが一般的な解剖学的所見であり、これらの結果はこの事実を反映していると考えられる。

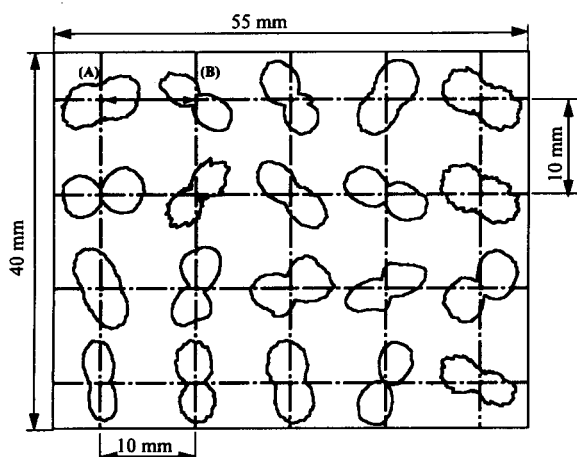


Fig. 4(a) Macroscopic 2D SHG polarimetry in human dermis.

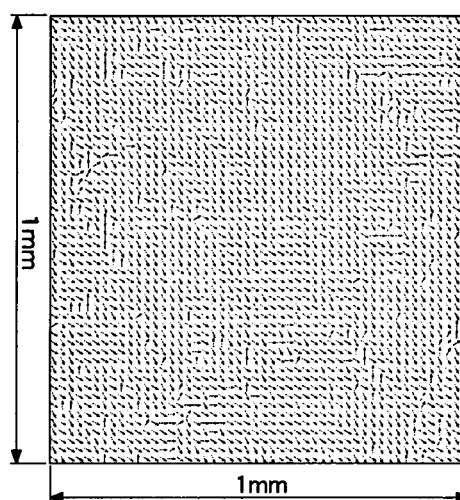


Fig. 4(b) Microscopic 2D distribution of collagen orientation angle.

#### 4.3 深さ分解イメージング

最後に、コラーゲン配向の断層分布測定に関する基本特性を評価した。共焦点配置の導入により20 $\mu\text{m}$ 程度の深さ分解能が得られている。ここでは、深さ方向に異なるコラーゲン配向を有するサンプルとして2枚のスライスしたヒトアキレス腱の配向方向が直交するように重ね合わせ、焦点位置を深さ方向に移動させながら深さ分解SHG偏光解析を

行った。図5(a)～(c)に示すように、深さ方向に測定スポットを走査すると偏光解析結果が変化した。測定スポットが第1層ではコラーゲン線維は垂直配向を示しているのに対し[図5(a)]、第2層ではコラーゲン配向が水平方向であることが確認できる[図5(c)]。また、境界付近では垂直と水平の配向が混在している[図5(b)]。

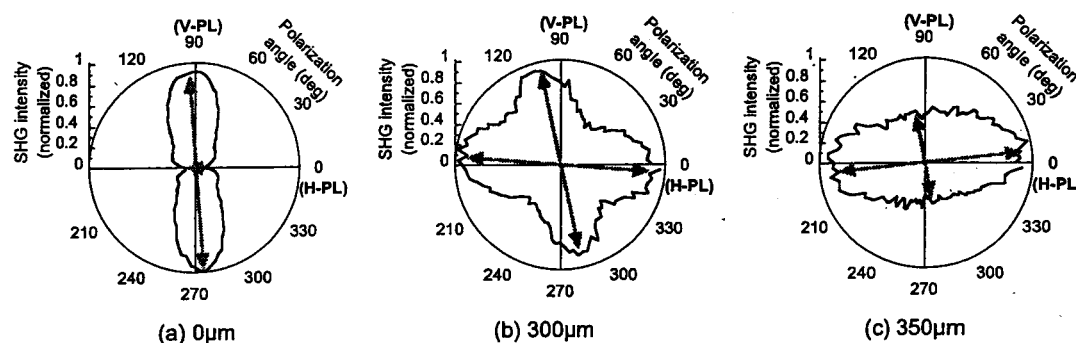


Fig. 5 Depth-resolved SHG radar graph.

## 5. まとめ

生体コラーゲンの非線形光学効果を利用したコラーゲン線維配向測定法を提案し、ヒト組織のコラーゲン配向評価に応用した。その結果、コラーゲン配向の組織依存性を確認した。本手法は、コラーゲン線維配向の定量的評価方法として期待される。

本研究は文部科学省科学研究費補助金基盤(B) 16300155及び萌芽15650094の援助を得た。

## 参考文献

- [1] S. Roth and I. Freund, "Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon", *Biopolymers* Vol. 20, pp. 1271-1290 (1981).
- [2] T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, "Determination of collagen fiber orientation in human tissue by polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light", *Appl. Opt.*, Vol. 43, pp. 2861-2867 (2004).
- [3] T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, "Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry", *J. Biomed. Opt.*, Vol. 9, pp. 259-264 (2004).