

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

阪大院・基礎工、奈良医大*)

安井武史、佐々木邦彦、荒木勉、東野義之*)

第30回レーザー顕微鏡研究会シンポジウム
『生体の無染色イメージング』

イントロ

コラーゲン

生体構造タンパク質：生体組織の骨組み

→ **並び方（コラーゲン配向）が重要**

→ 生体組織の形態的及び機能的特性

コラーゲン 配向測定

従来法）解剖学的手法@生検組織（電顕観測、X線回折他）

→ **非侵襲・非破壊・非接触・3次元空間分布**

生体コラーゲンの非線形光学特性

第2高調波発生光 (生体SHG光)

- ・超短パルス光との非線形相互作用

- ・コラーゲンから特異的に発生

ref) S. Roth et al, *J. Chem. Phys.* **70**, pp.1637-1643 (1979).

- ・コラーゲンの密度や配向に敏感

→ **SHG偏光解析法**

T. Yasui et al, *Appl. Opt.*, Vol. 43, pp. 2861-2867 (2004).

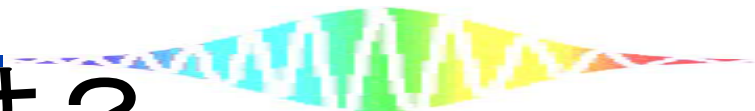
T. Yasui et al, *J. Biomed. Opt.*, Vol. 9, pp. 259-264 (2004).

Present talk

ヒト組織コラーゲン線維配向の3次元分布

@SHG偏光解析&SHGイメージング

SHG光とは？



	線形効果	非線形効果
音	音 (freq. = f) ↑ さわる	f $2f$ 強く叩く！
光	CW光 反射 & 散乱光 非中心対称物質	SHG光 超短パルス光 フェムト秒パルスレーザー 非中心対称物質 例) 組織コラーゲン

生体SHG光発生 の原理

SHG phase matching
is impossible in tissue!

No-PM SHG condition

$$P_{2\omega} = 8 \left(\frac{\mu_0}{\varepsilon_0} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{\omega^2 d^2 \delta^2}{n^3} \frac{P_\omega^2}{A} \frac{\sin^2(\pi \delta / l_c)}{\pi \delta / l_c}$$

δ : 散乱光路長 = $1/\mu_s$ (μ_s 散乱係数) = 20~50 μm @tissue

l_c : コヒーレンス長 = $l_\omega / [2 \cdot (n_{2\omega} - n_\omega)] = 5 \sim 13 \mu\text{m}$ @tissue

ω : 角周波数, A: 照射エリア

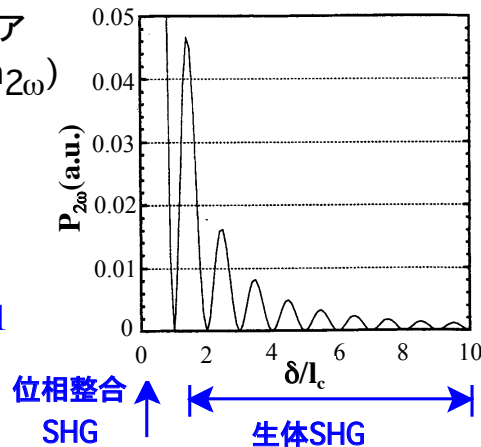
P: 入射パワー, $n = (n_\omega + n_{2\omega})$

d: 平均非線形光学定数

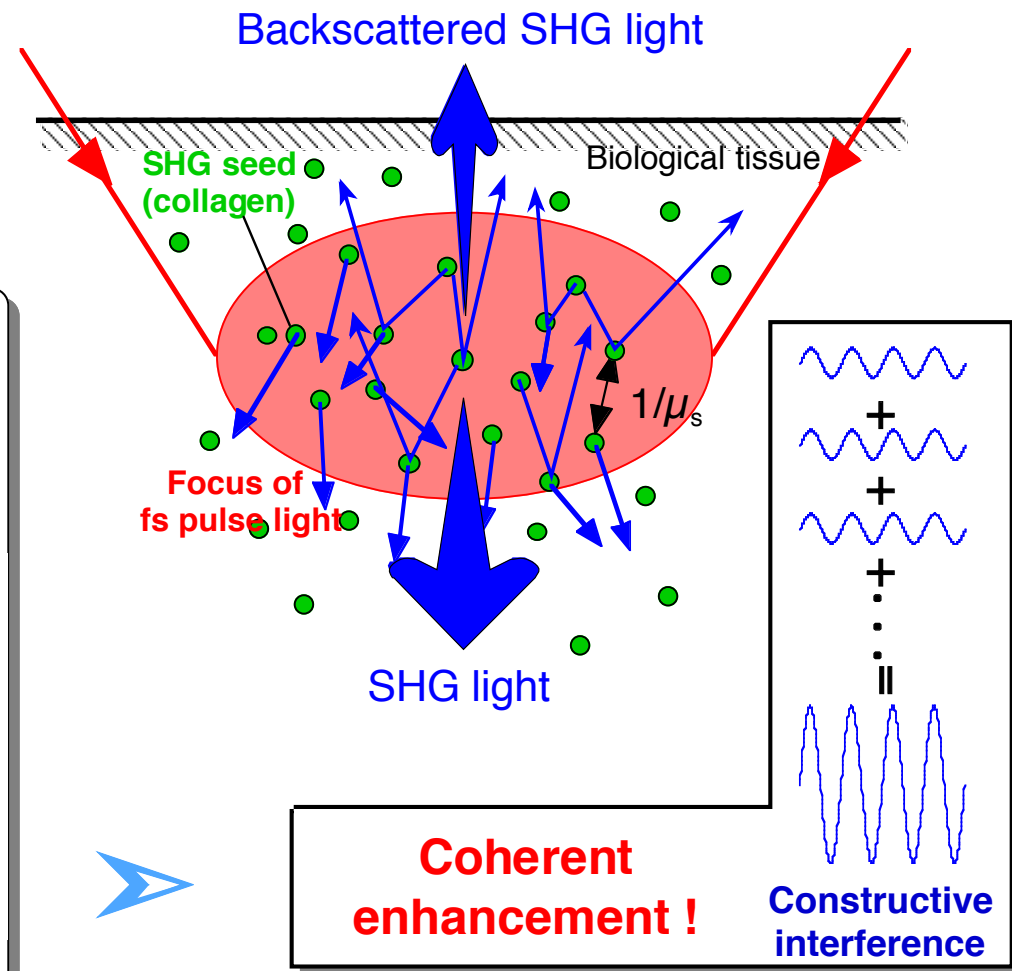
(1) $l_c > \delta$

(2) $\delta / l_c \neq 1, 2, \dots, m$

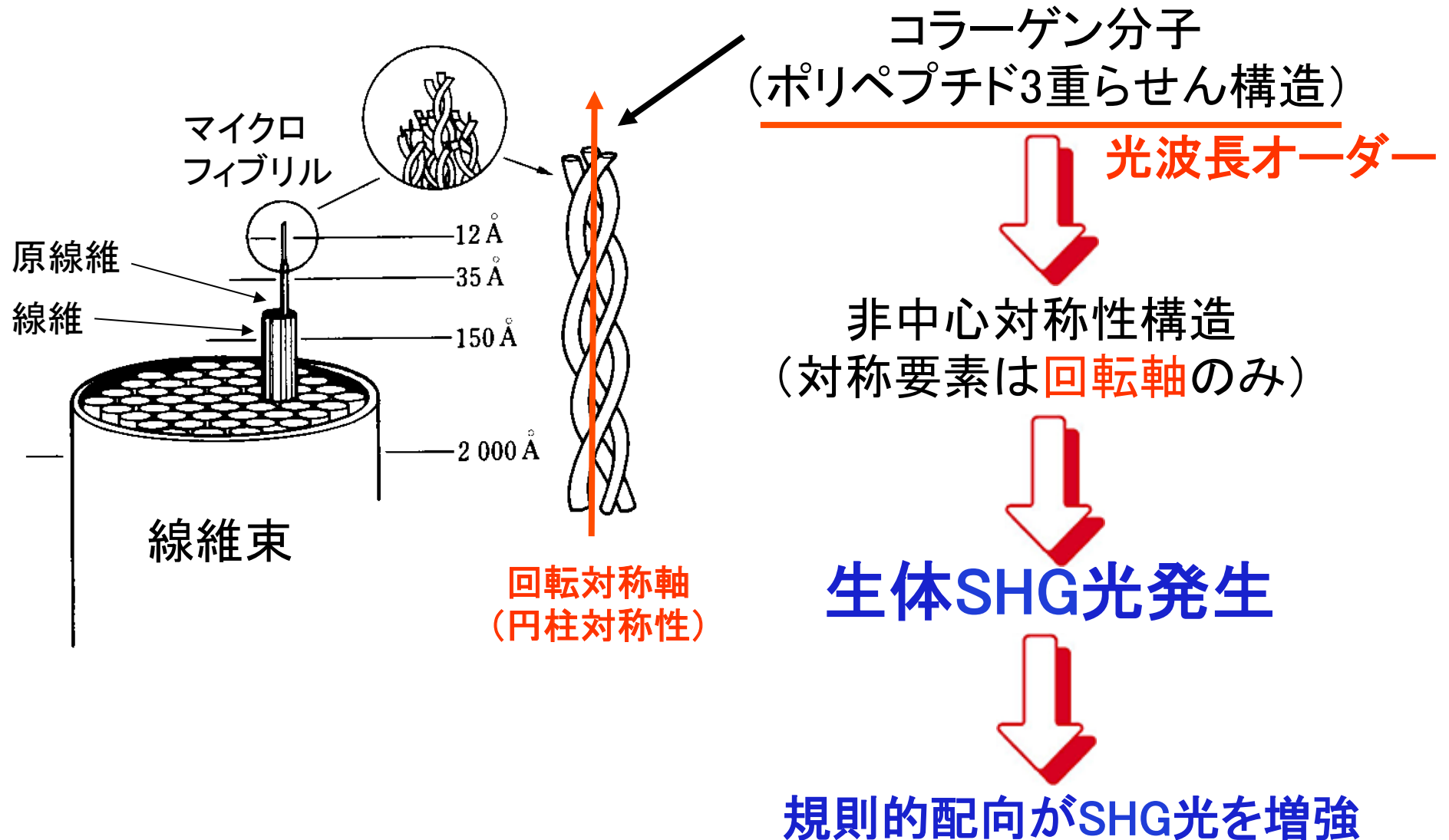
@ $\delta / l_c > 1$



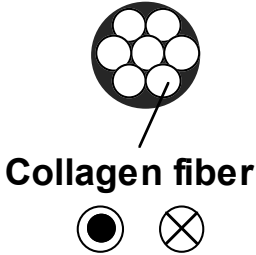
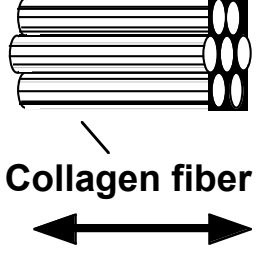
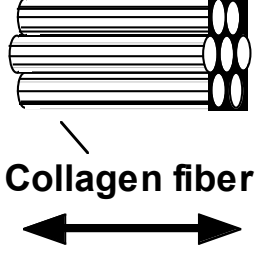
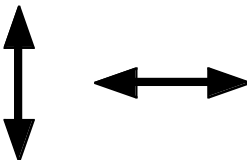
Ref) B.M. Kim, Appl. Opt., Vol. 38, p.7145 (1999).



コラーゲン線維の組織構造



入射光偏光とコラーゲン配向の関係

	Cross-sectional (Centrosymmetric)	Axial (Non-centrosymmetric)	
		Parallel	Perpendicular
Collagen orientation	 Collagen fiber	 Collagen fiber	 Collagen fiber
Laser polarization			
SHG light	None	Strong	Weak

- ・SHG光はコラーゲン線維配向に敏感
- ・偏光解析が有効

SHG光偏光解析 (理論値)

Ref) P. Stoller et al, J. Biomed. Opt.,
Vol. 7, pp. 205-214 (2002).

単一軸配向

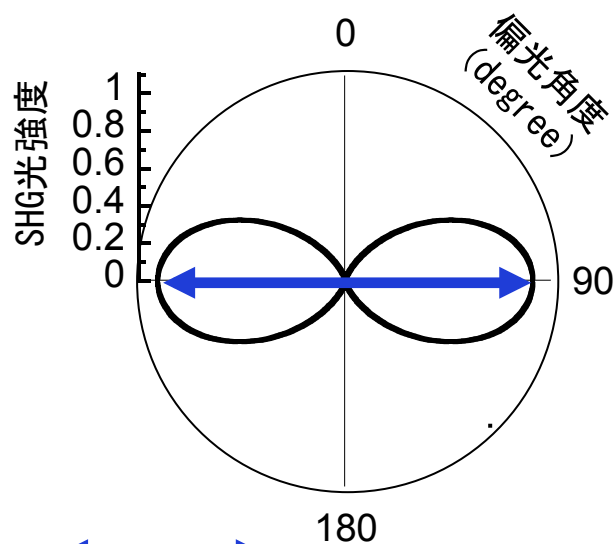


入射光スポット

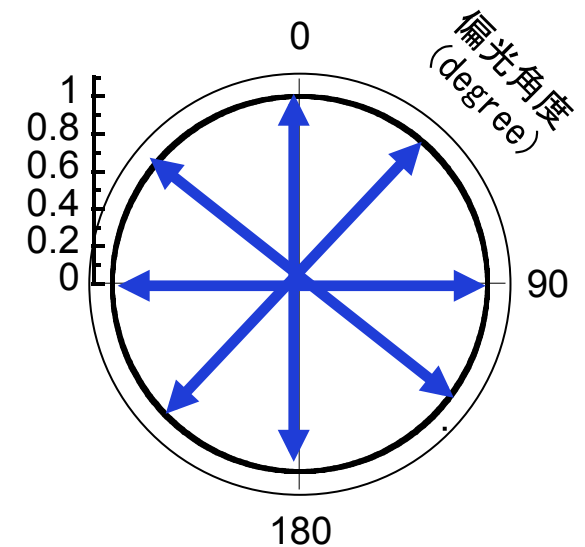
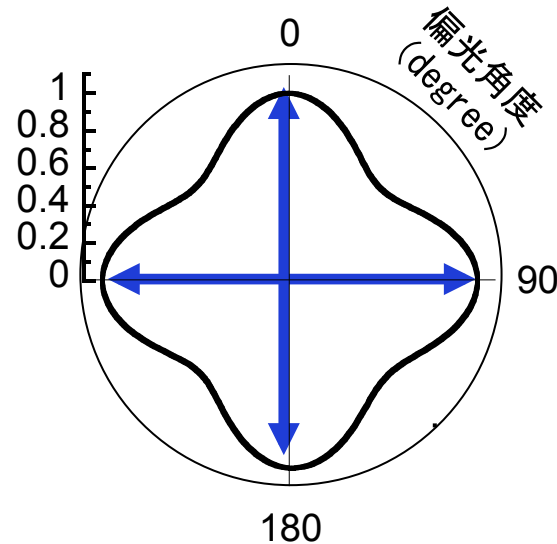
直交2軸配向



ランダム配向

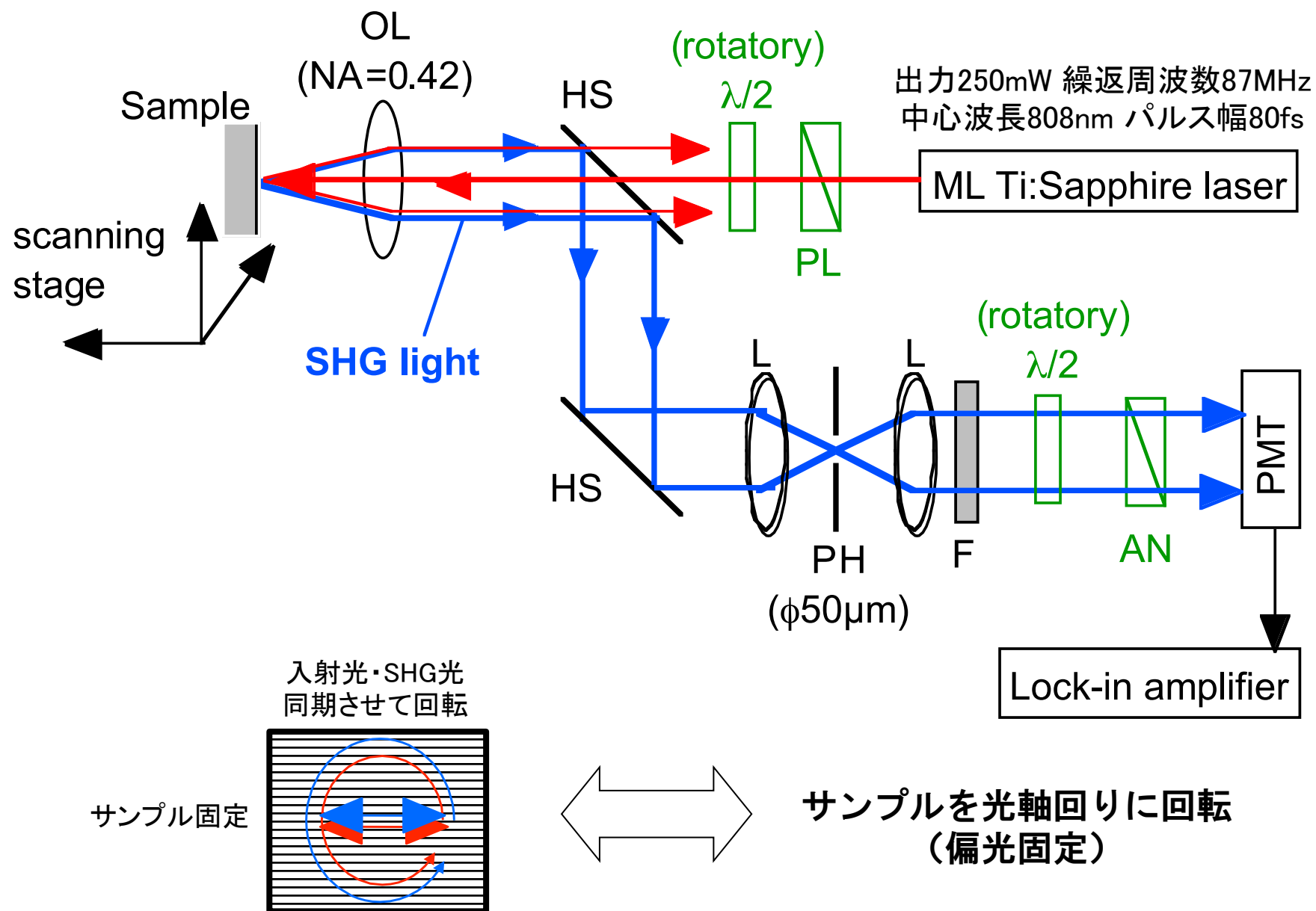


予測される
コラーゲン配向



SHG強度レーダーグラフ
(配向方位: 主軸角度、配向度: 形状)

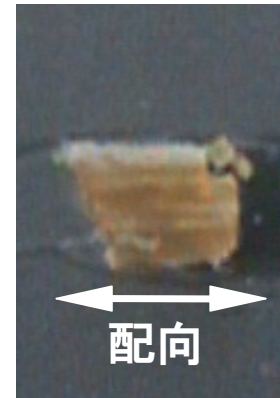
実験装置(反射配置)



サンプル

(1) ヒトアキレス腱

76歳女性、厚さ約2mm
ホルマリン固定後、乾燥
線維と平行方向にスライス



アキレス腱



歯牙切片

(2) ヒト皮膚真皮（背中）

厚さ約1mm
ホルマリン固定後、乾燥
皮膚表面と平行方向スライス



皮膚真皮



距骨

(3) ヒト歯牙象牙質

20歳男性、厚さ約1mm
歯牙軸方向にスライス

(4) ヒト距骨

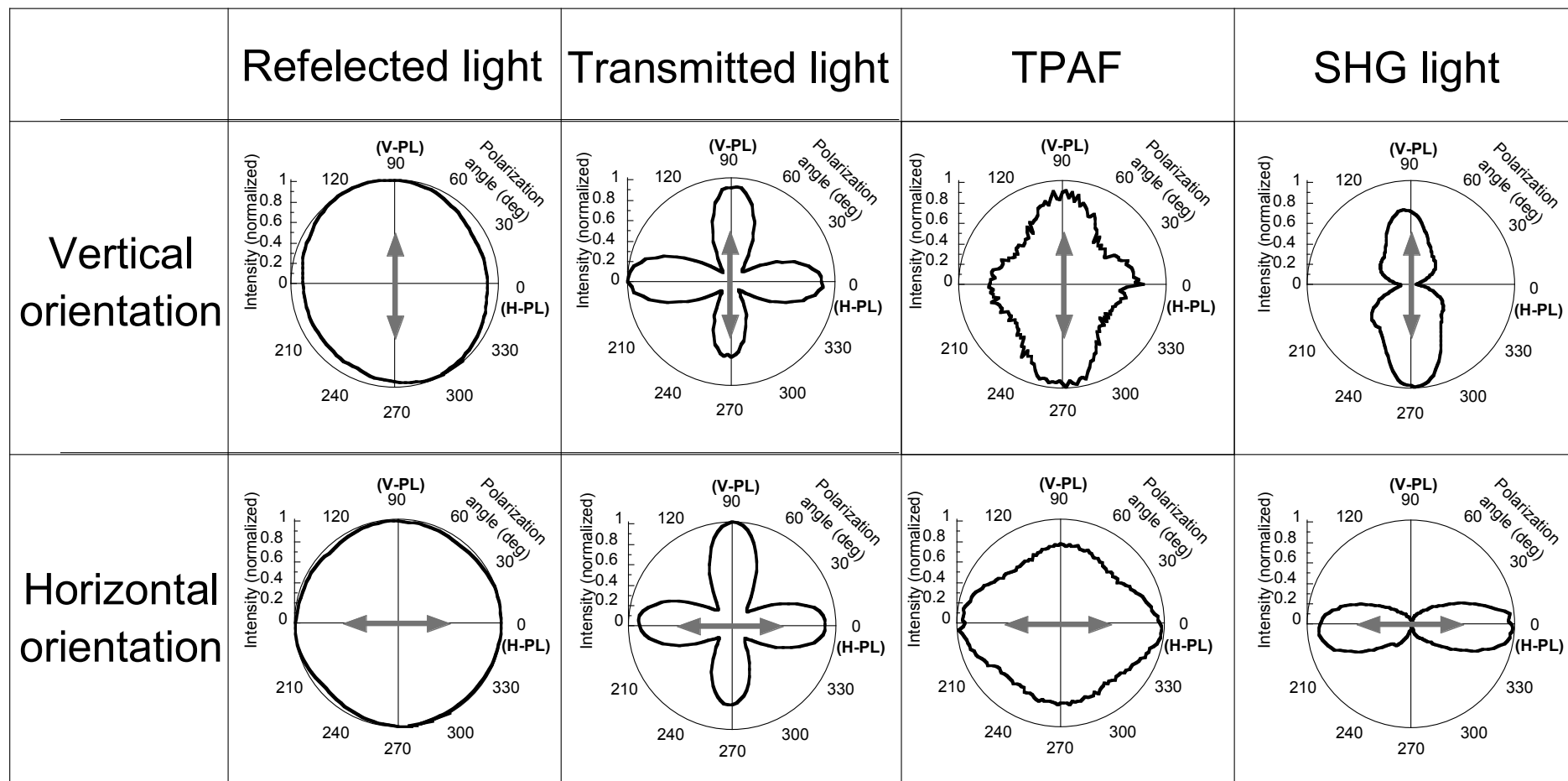
厚さ約1mmにスライス

(5) コラーゲンスポンジ（牛アキレス腱）

組織培養用コラーゲン

SHG偏光解析vs他の偏光解析

@ヒトアキレス腱(単一軸コラーゲン配向)



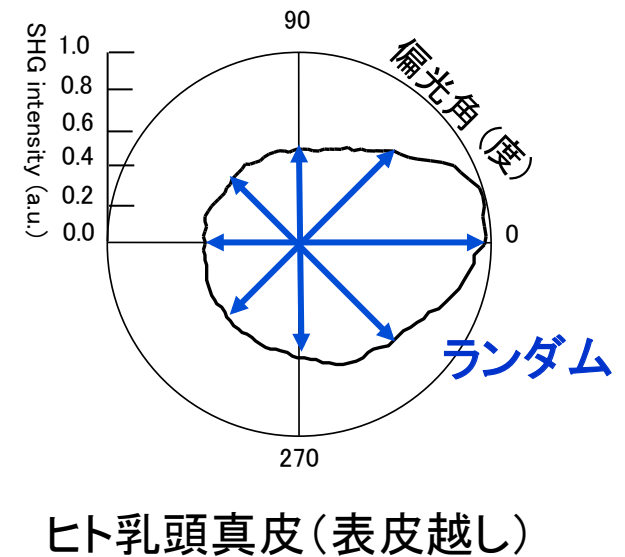
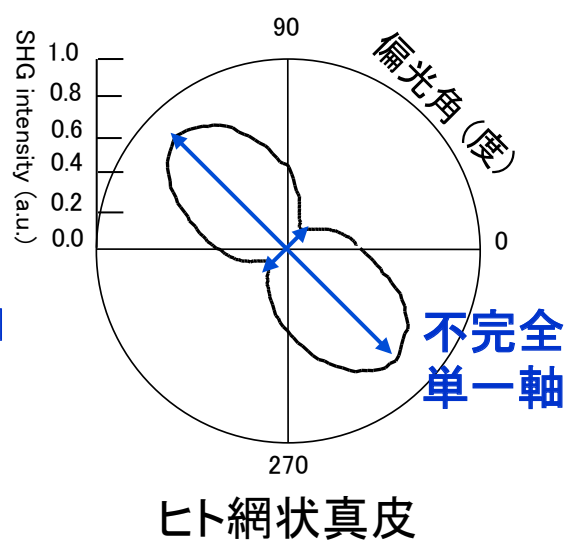
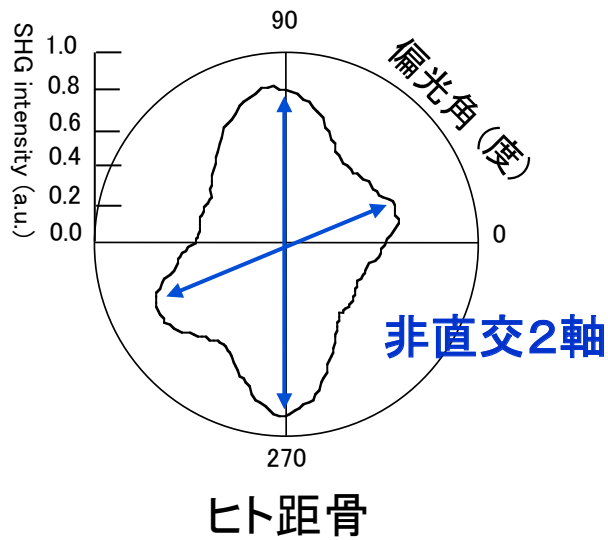
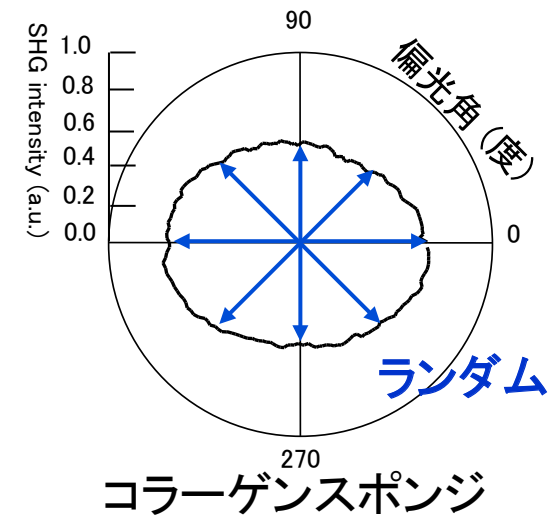
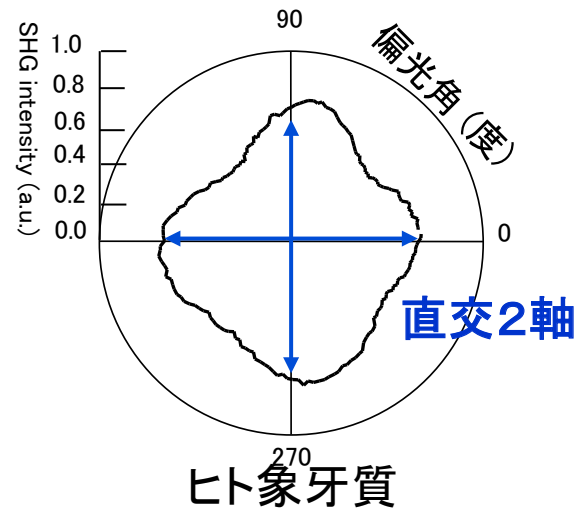
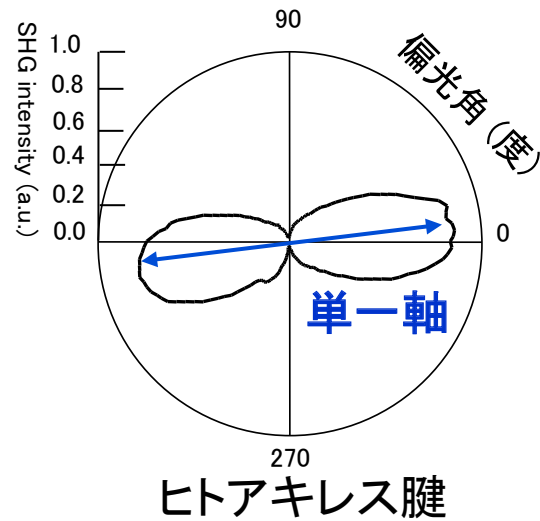
複屈折
異方性吸収

線形散乱特性

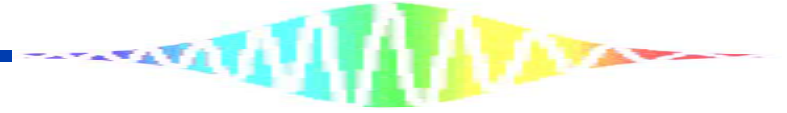
他のTPAFの
分離

鋭い偏光依存性

SHGレーダーグラフ



コラーゲン配向の組織依存性



コラーゲン配向の 面内分布測定

配向評価パラメーター

(1) 配向方位@主軸方位角: θ_{maj}

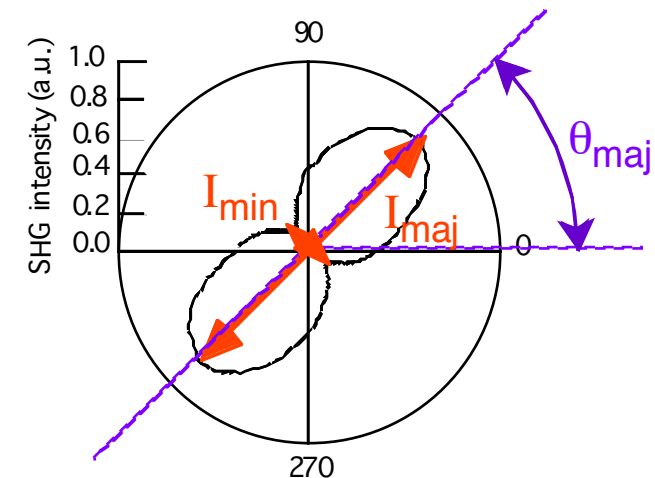
(2) 配向度@ SHG偏光異方性: PA

$$PA = \frac{|I_{\text{maj}} - I_{\text{min}}|}{I_{\text{maj}} + I_{\text{min}}}$$

PA=1 : 単一配向 (8の字)

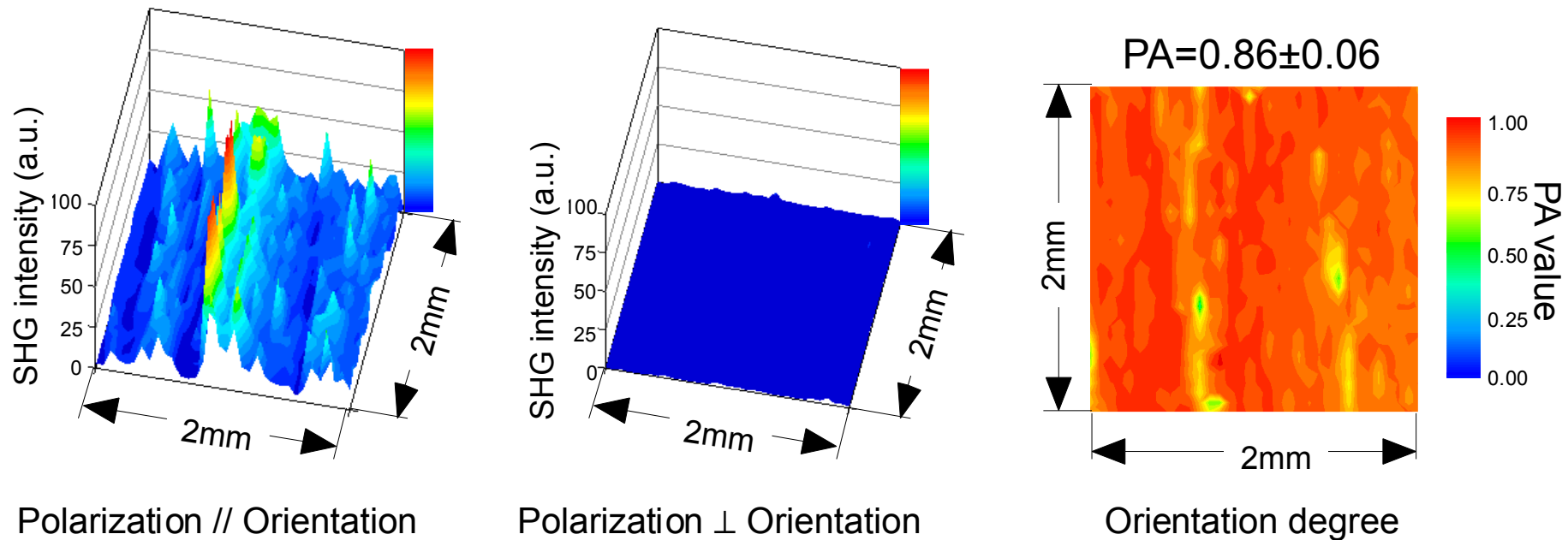
PA=0 : 完全ランダム配向 (円形)

直交2軸配向 (ひし形)



SHGレーダーグラフ

Polarization-resolved SHG imaging @ human Achilles tendon

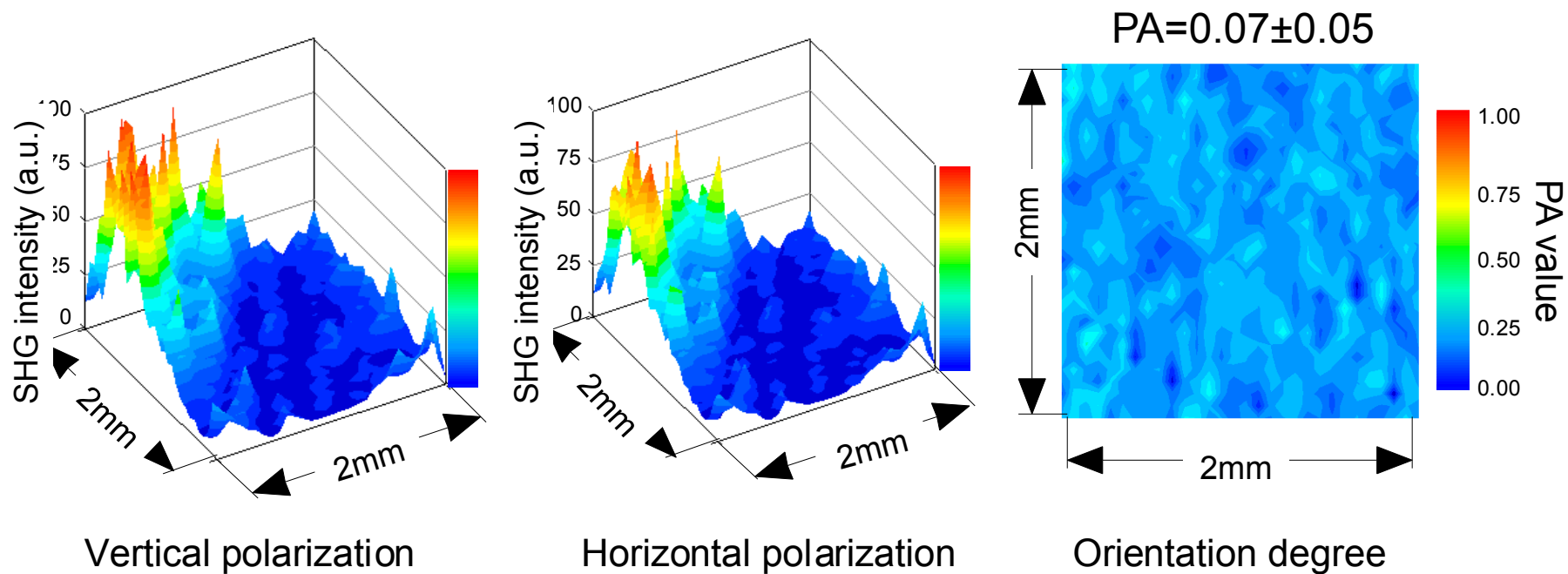


Uniform distribution of high PA values



Collagen orientation arranged with high organization

Polarization-resolved SHG imaging @ collagen sponge

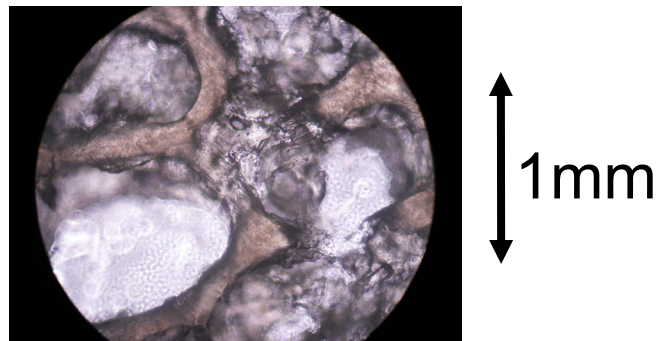
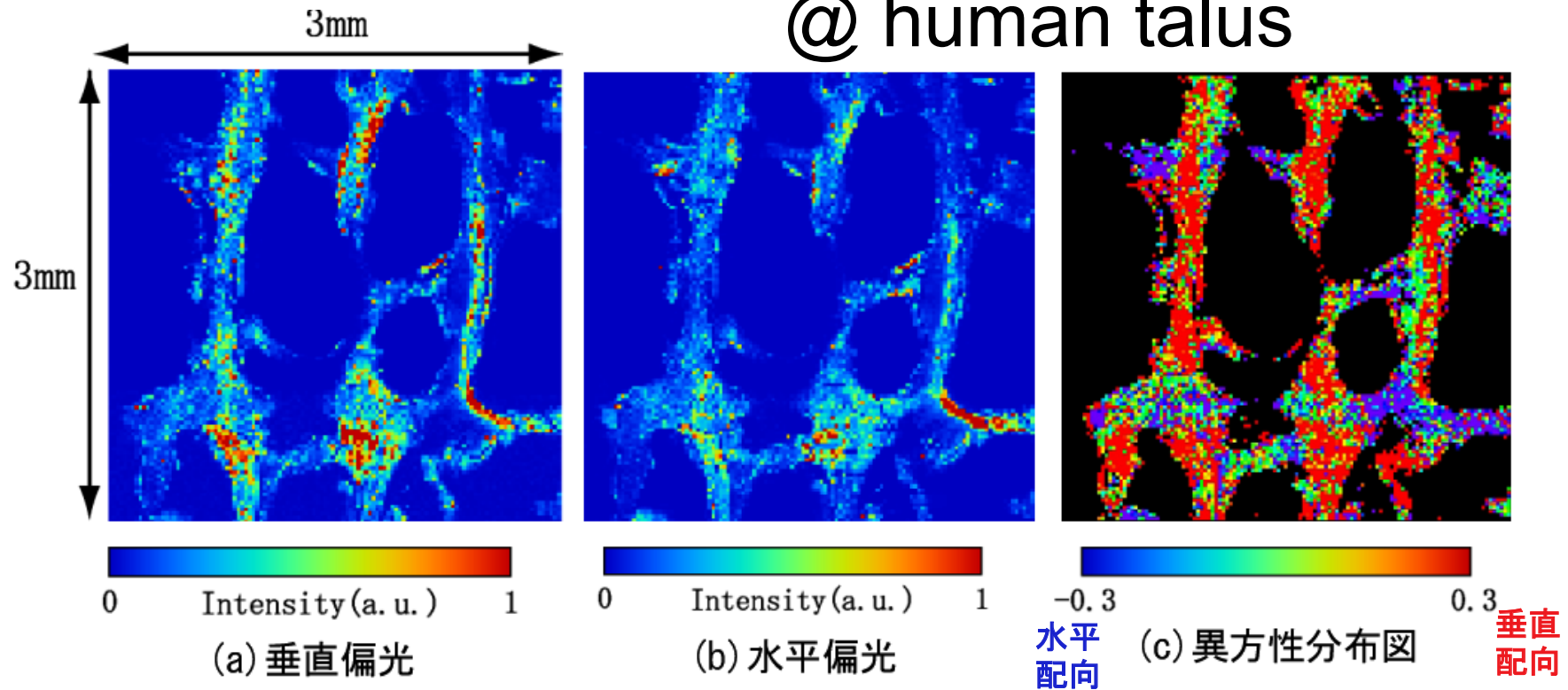


Uniform distribution of low PA values



Collagen orientation distributed equally in all directions

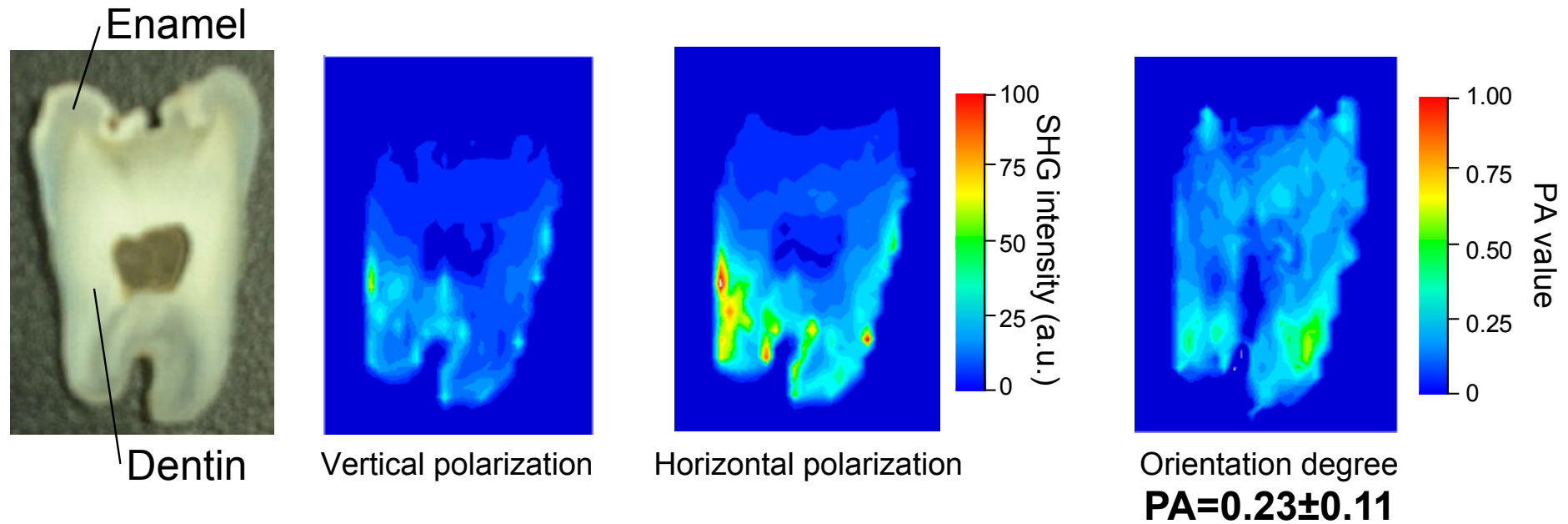
Polarization-resolved SHG imaging @ human talus



光顕像

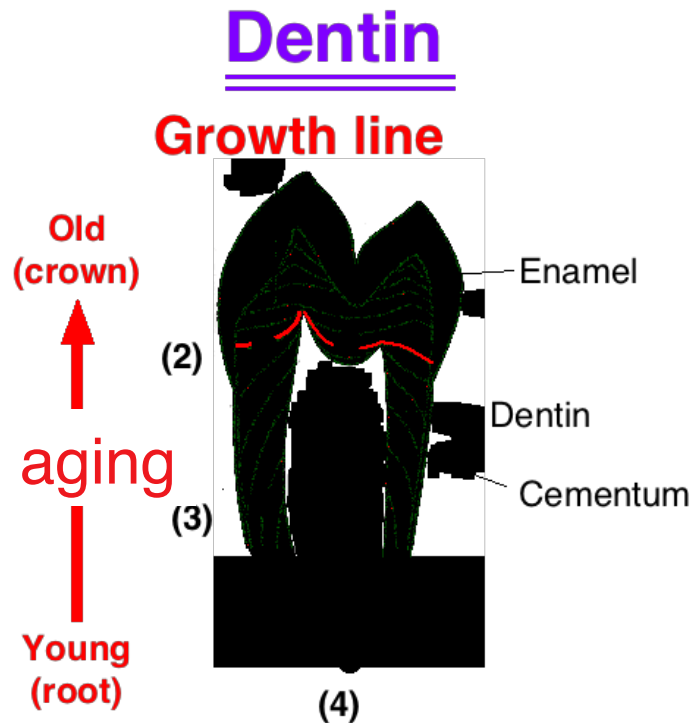
骨髄に沿った
コラーゲン配向

Polarization-resolved SHG imaging @ human dentin



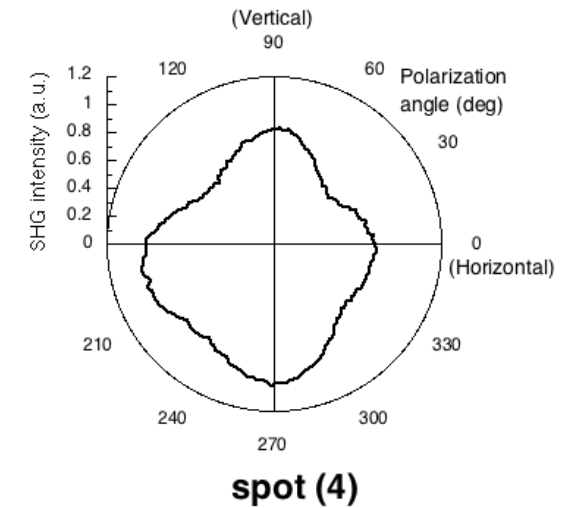
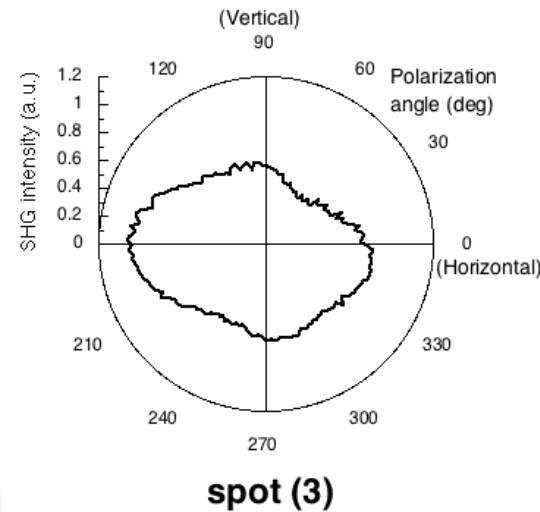
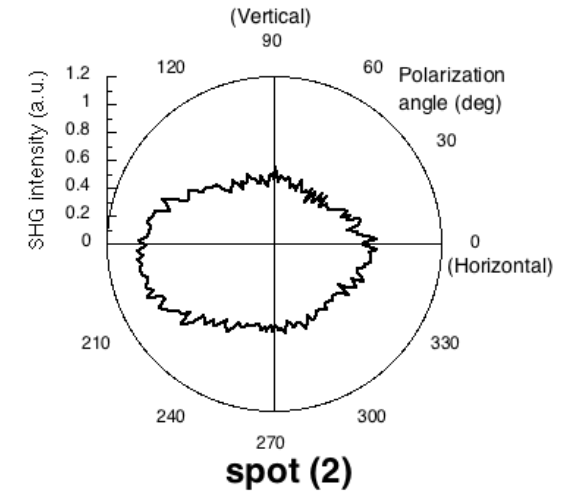
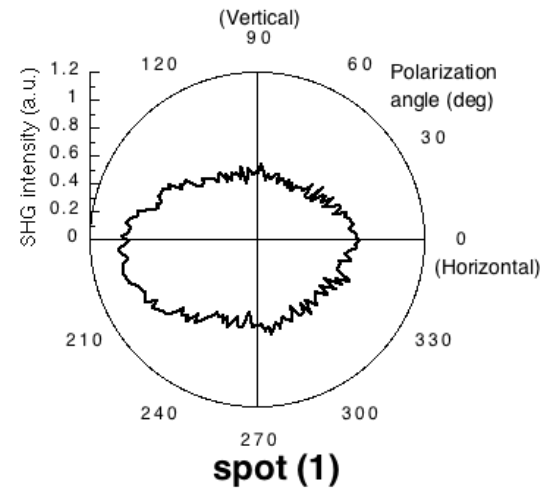
コラーゲン配向の部位依存性

2D SHG polarimetry @ human dentin

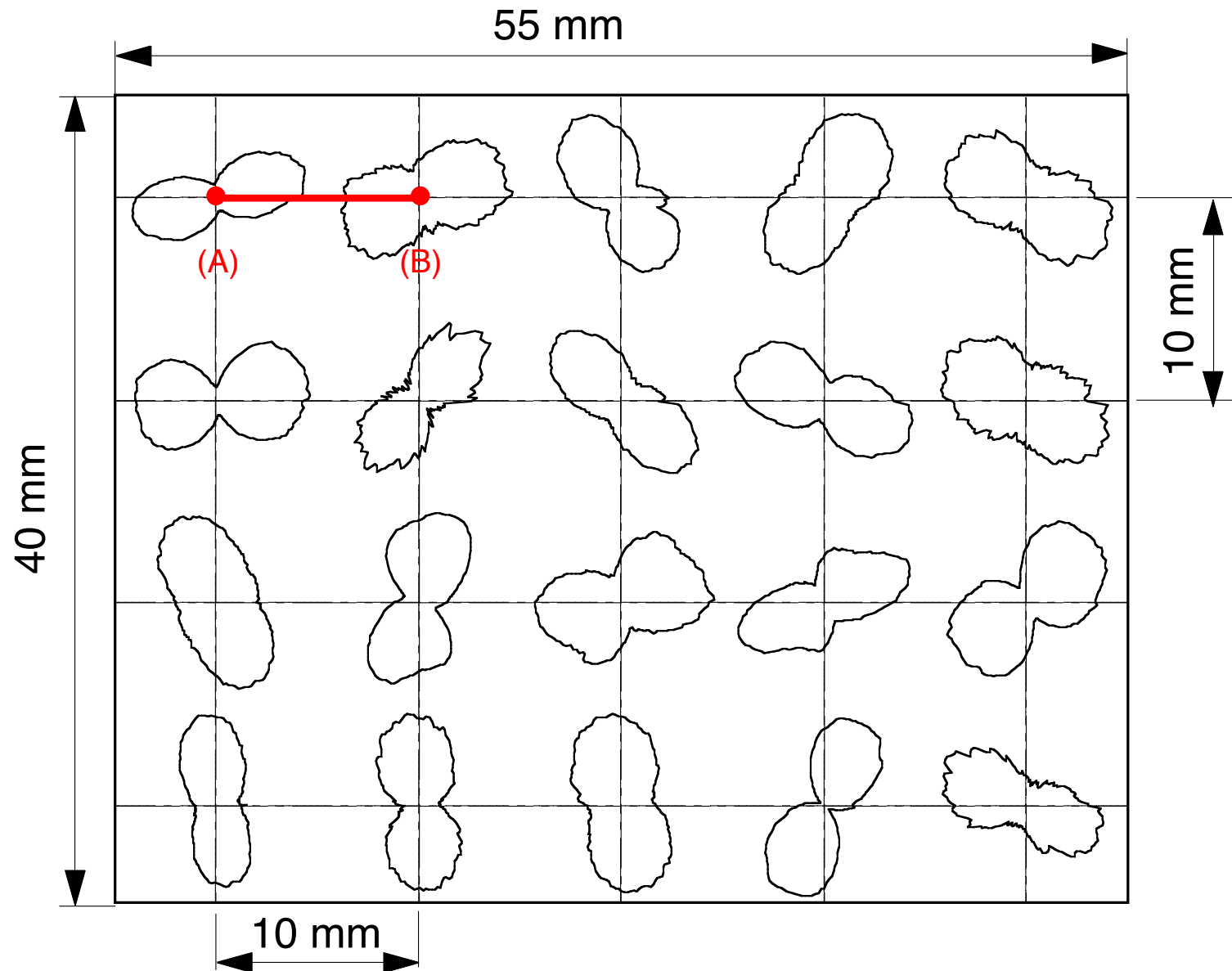


Regional dependence

Change of collagen structure during growth



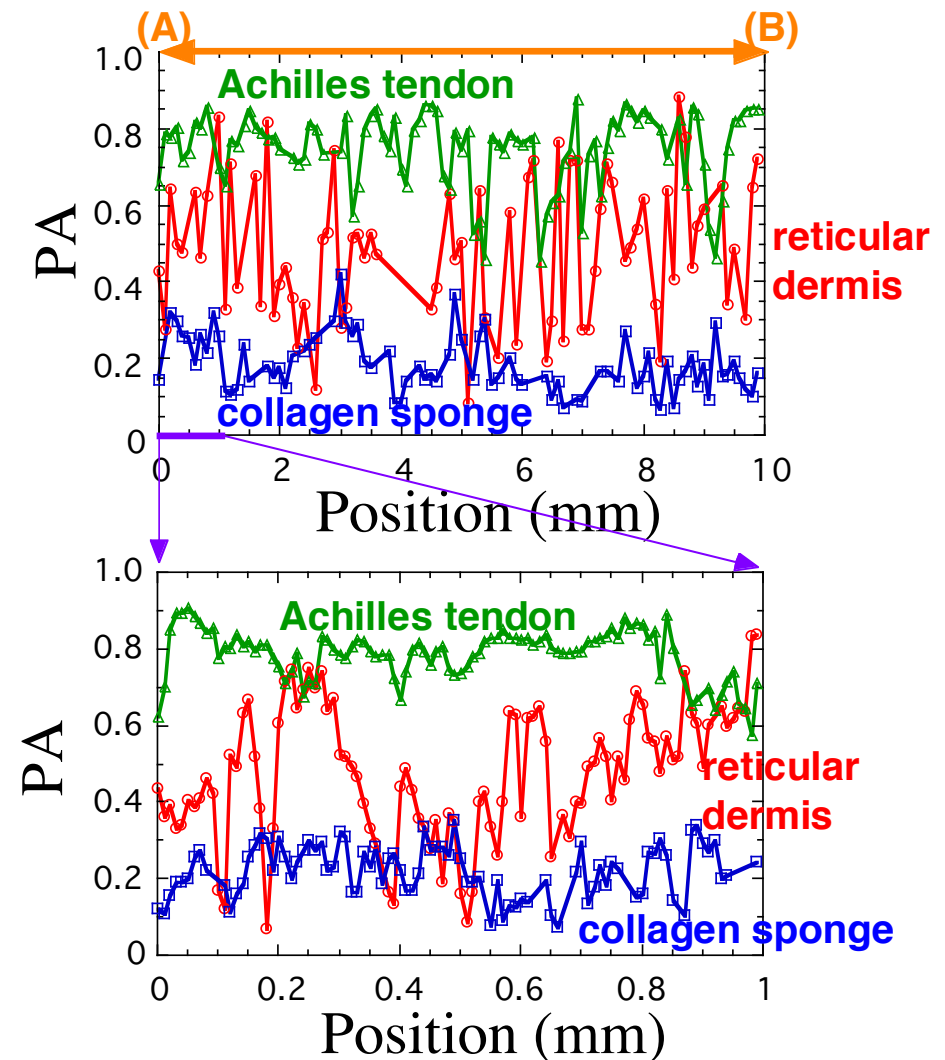
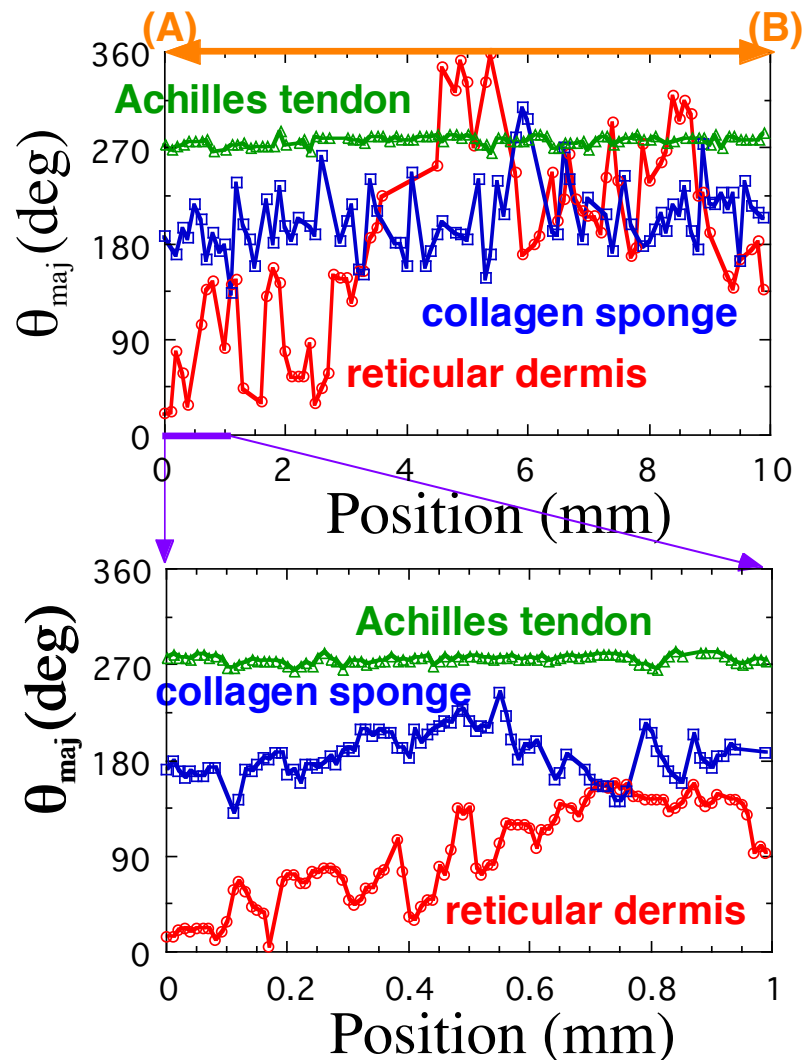
ヒト網状真皮の面内配向分布@離散的マクロ



ヒト網状真皮の配向分布@連続的ミクロ

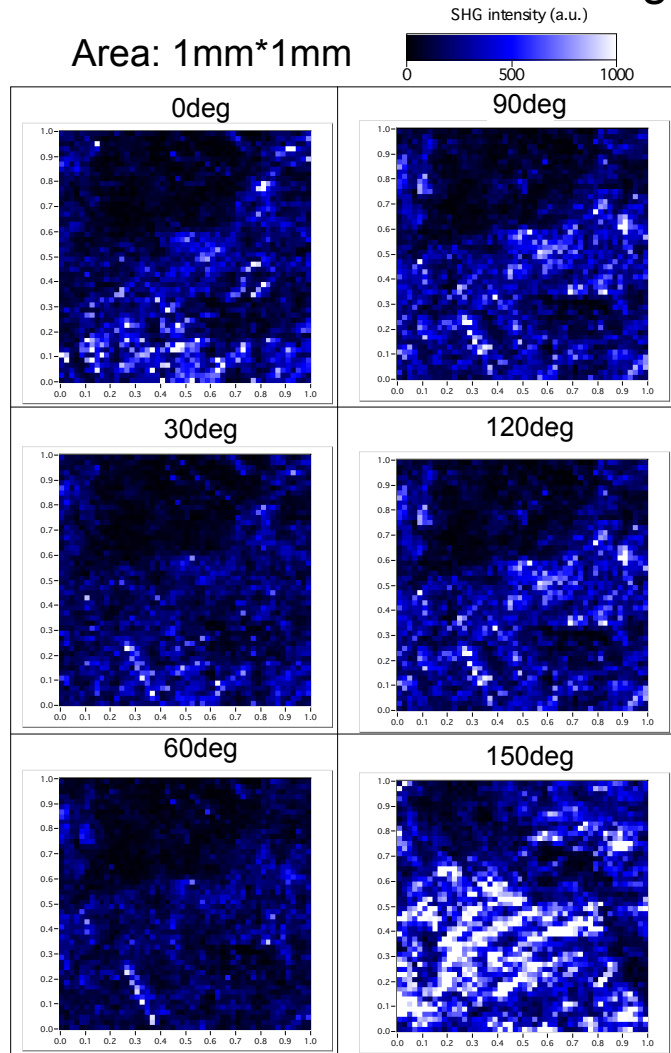
配向方位： θ_{maj}

配向度：PA

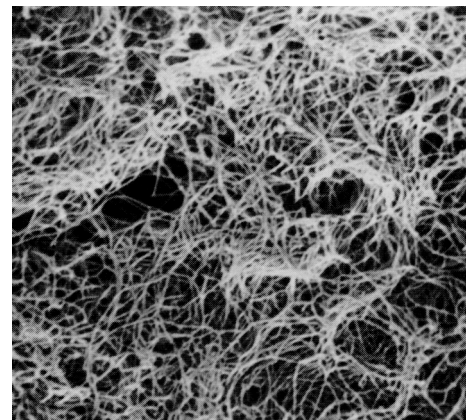
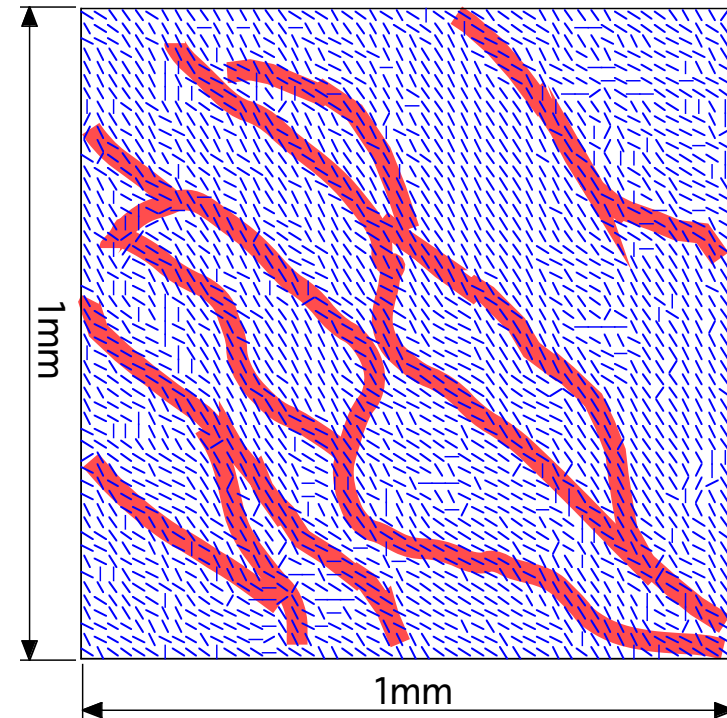


Microscopic 2D distribution of collagen orientation angle @reticular dermis

Polarization-resolved SHG image

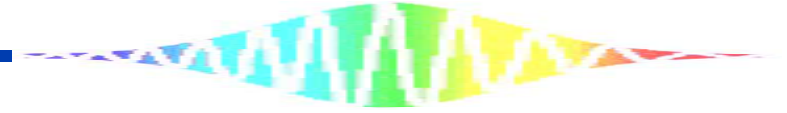


2D mapping of orientation angle

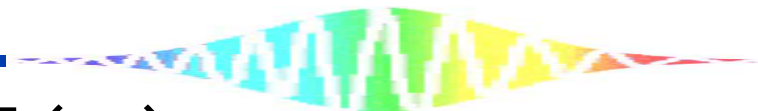


Entangled structure
of collagen fiber

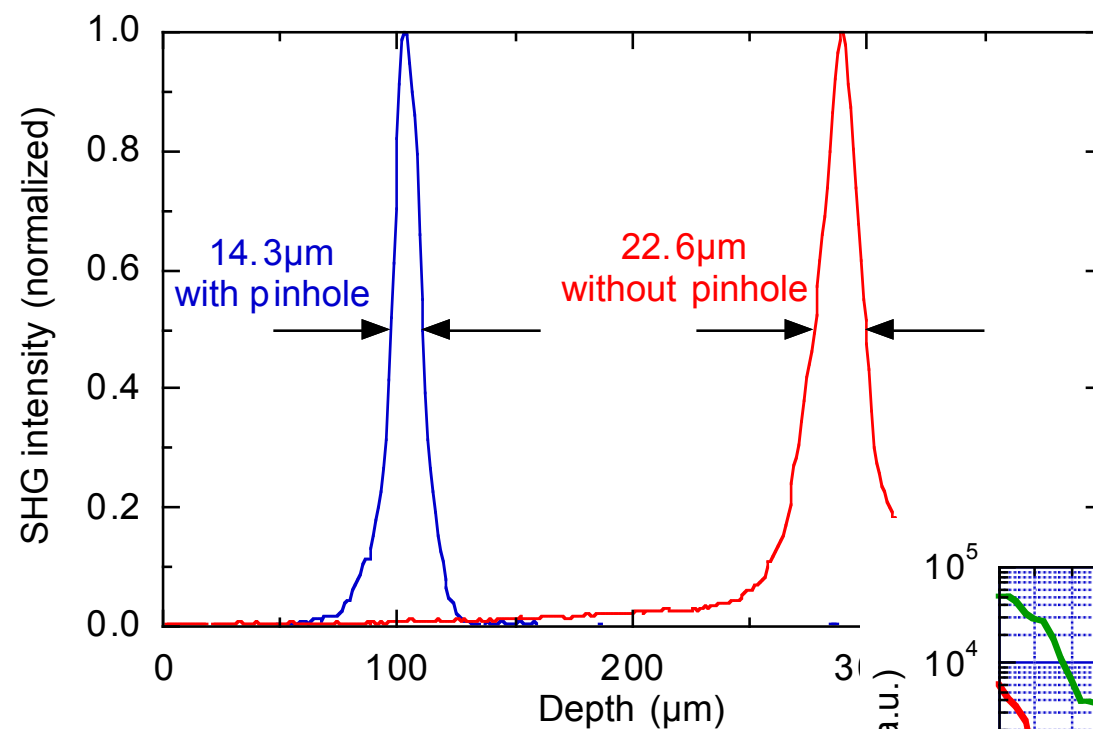
Microphotograph of bovine dermis



コラーゲン配向の 断層分布測定

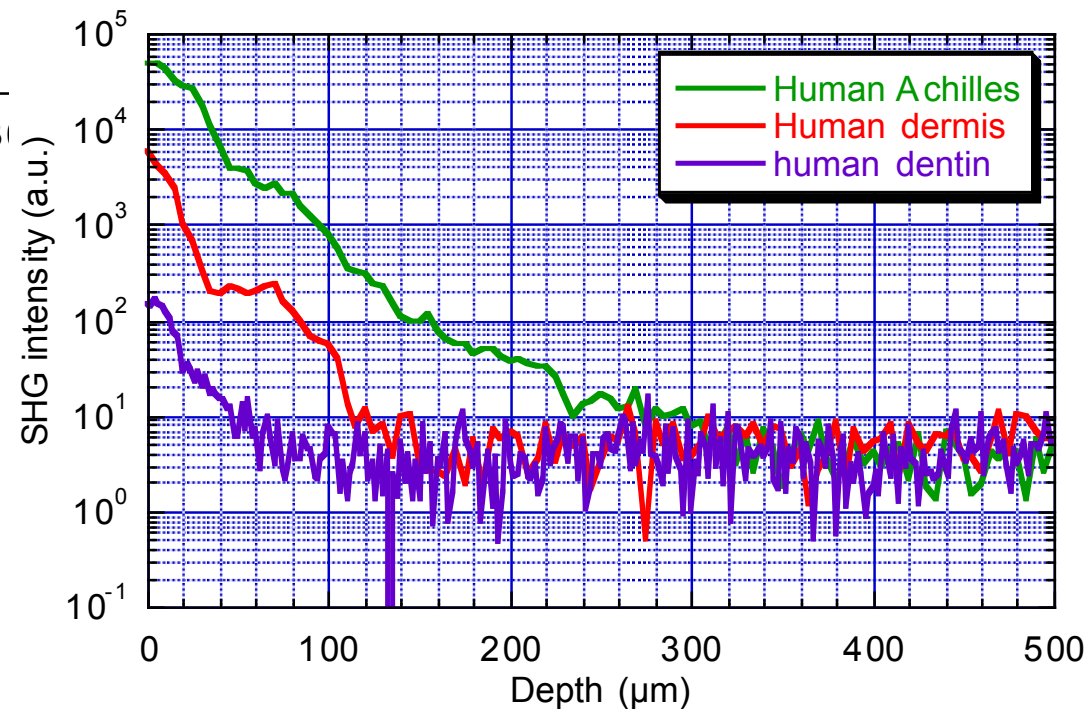


基本特性評価(1)

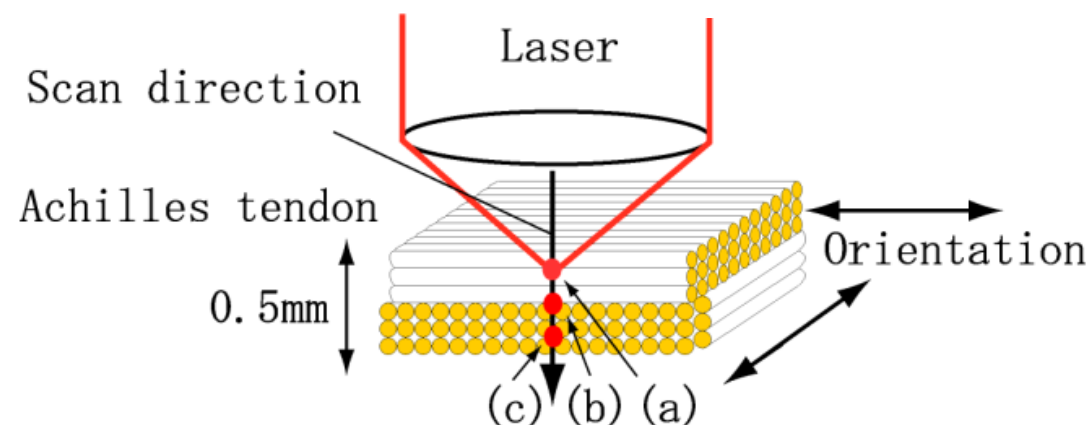


深さ分解能
(薄アキレス腱)

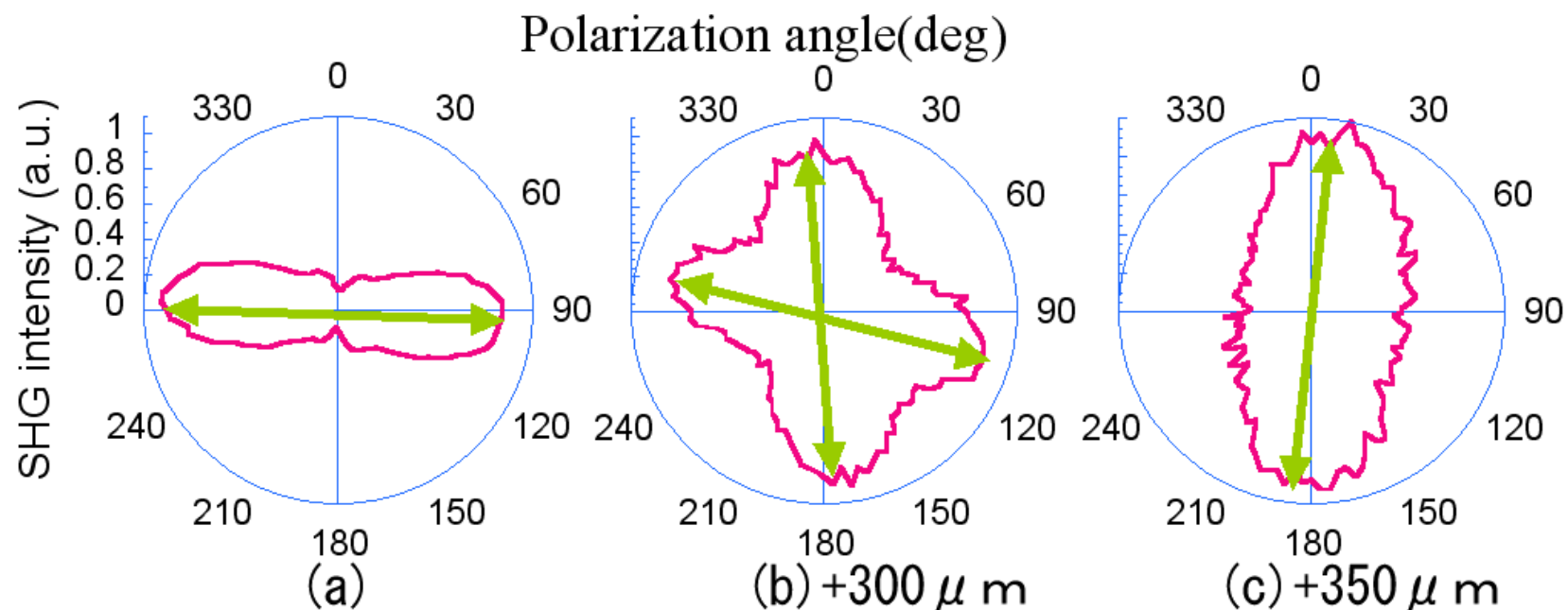
ダイナミックレンジ



基本特性評価(2)



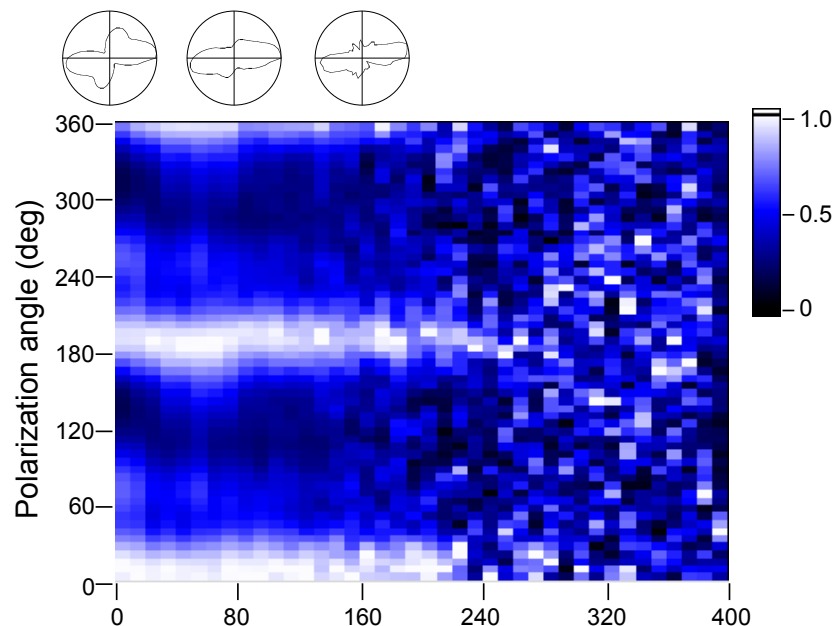
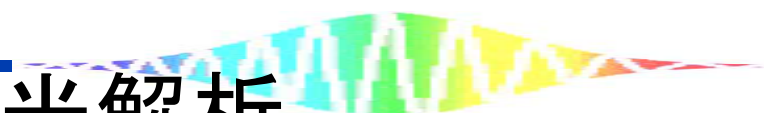
深さ方向に
コラーゲン情報を
分解することに成功



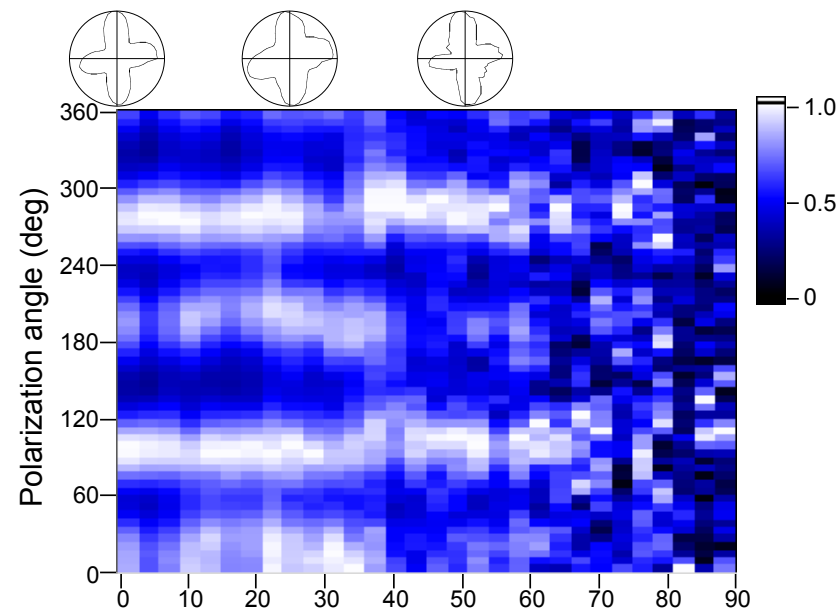
SHG光レーダーグラフ



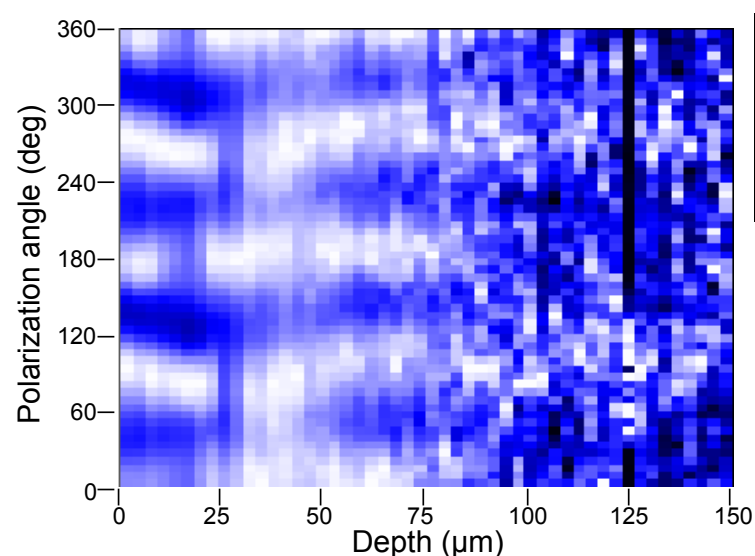
深さ分解SHG偏光解析



アキレス腱

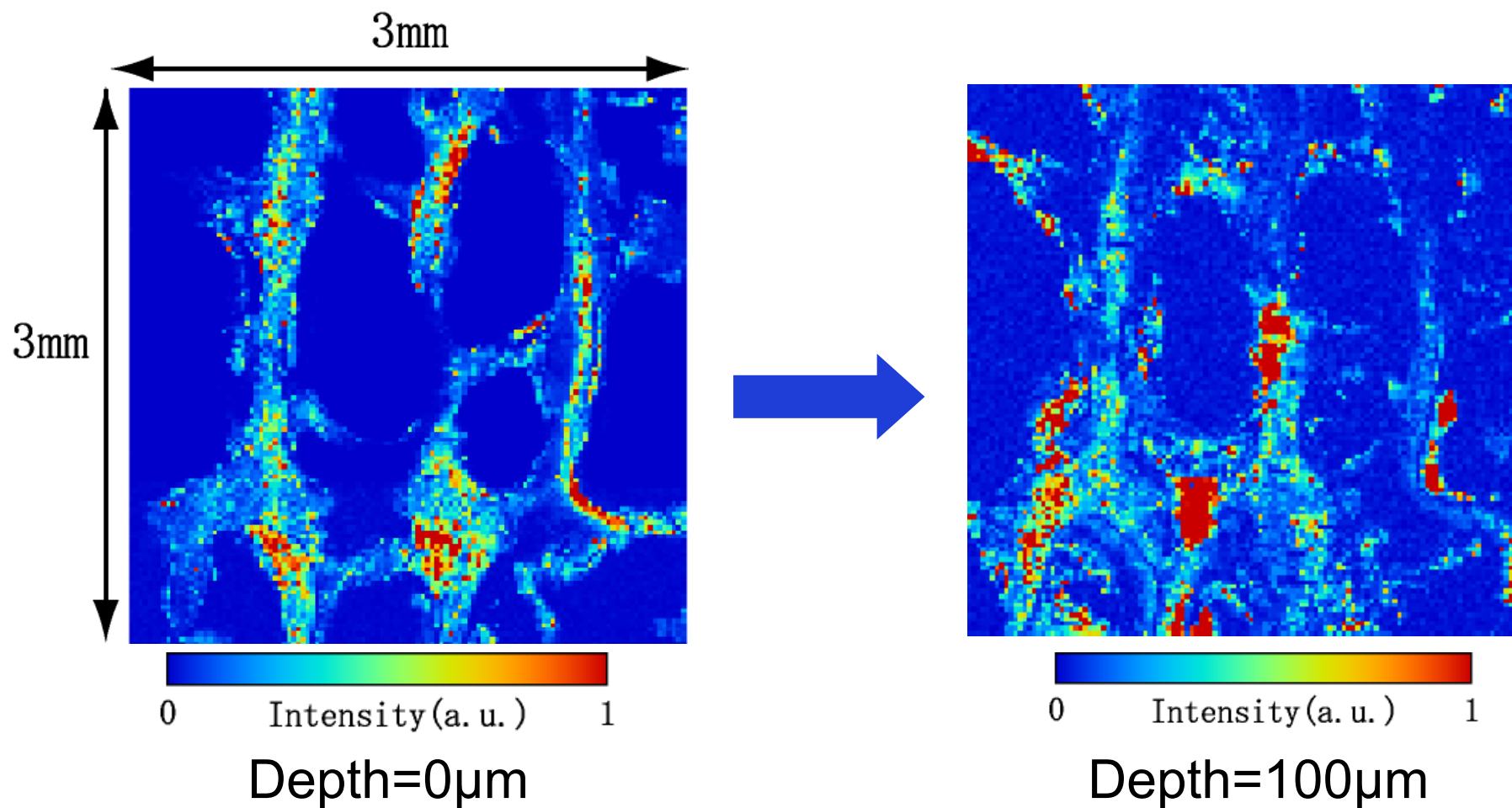


象牙質



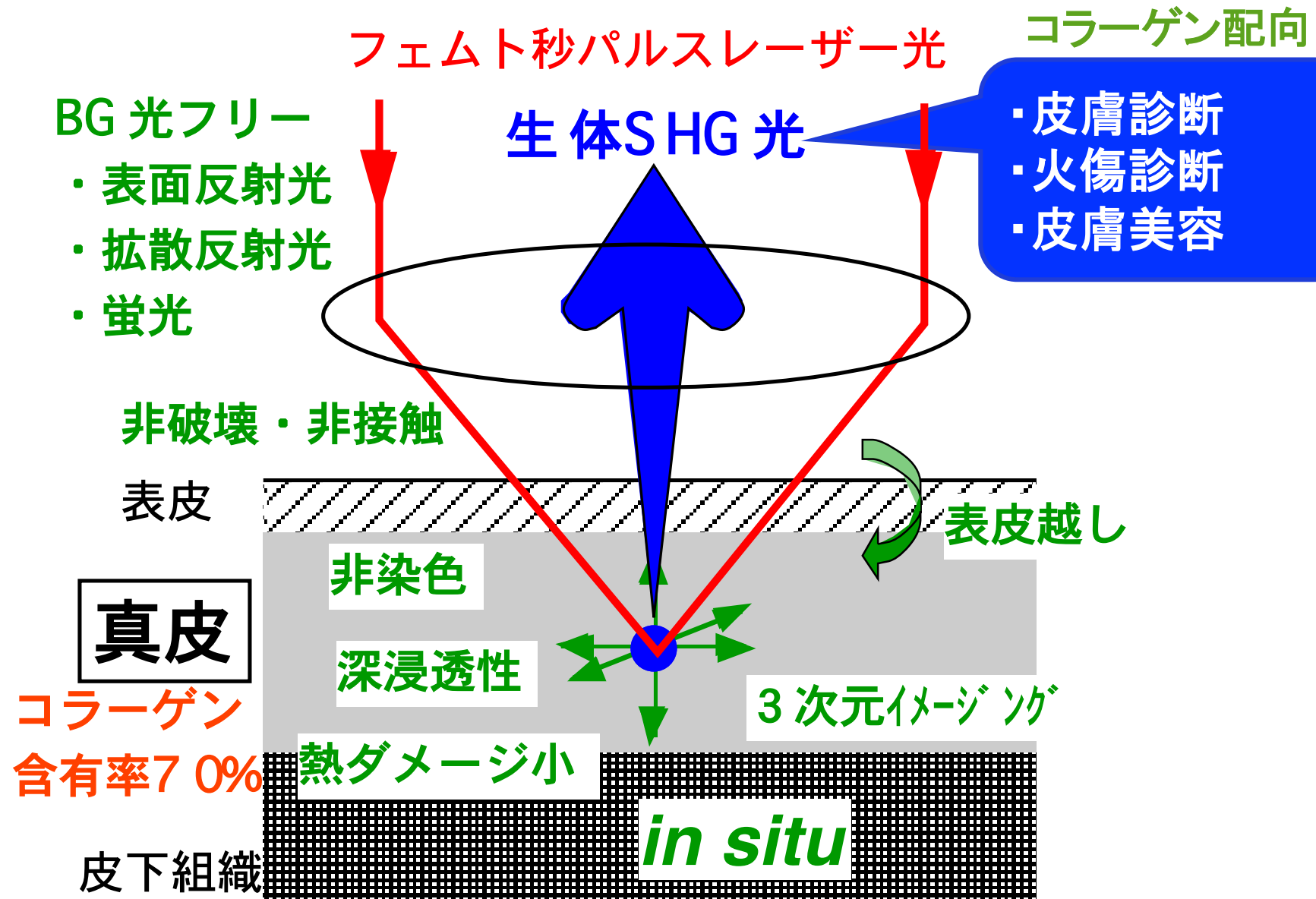
網状真皮

面内イメージの深さ分解測定@ヒト距骨

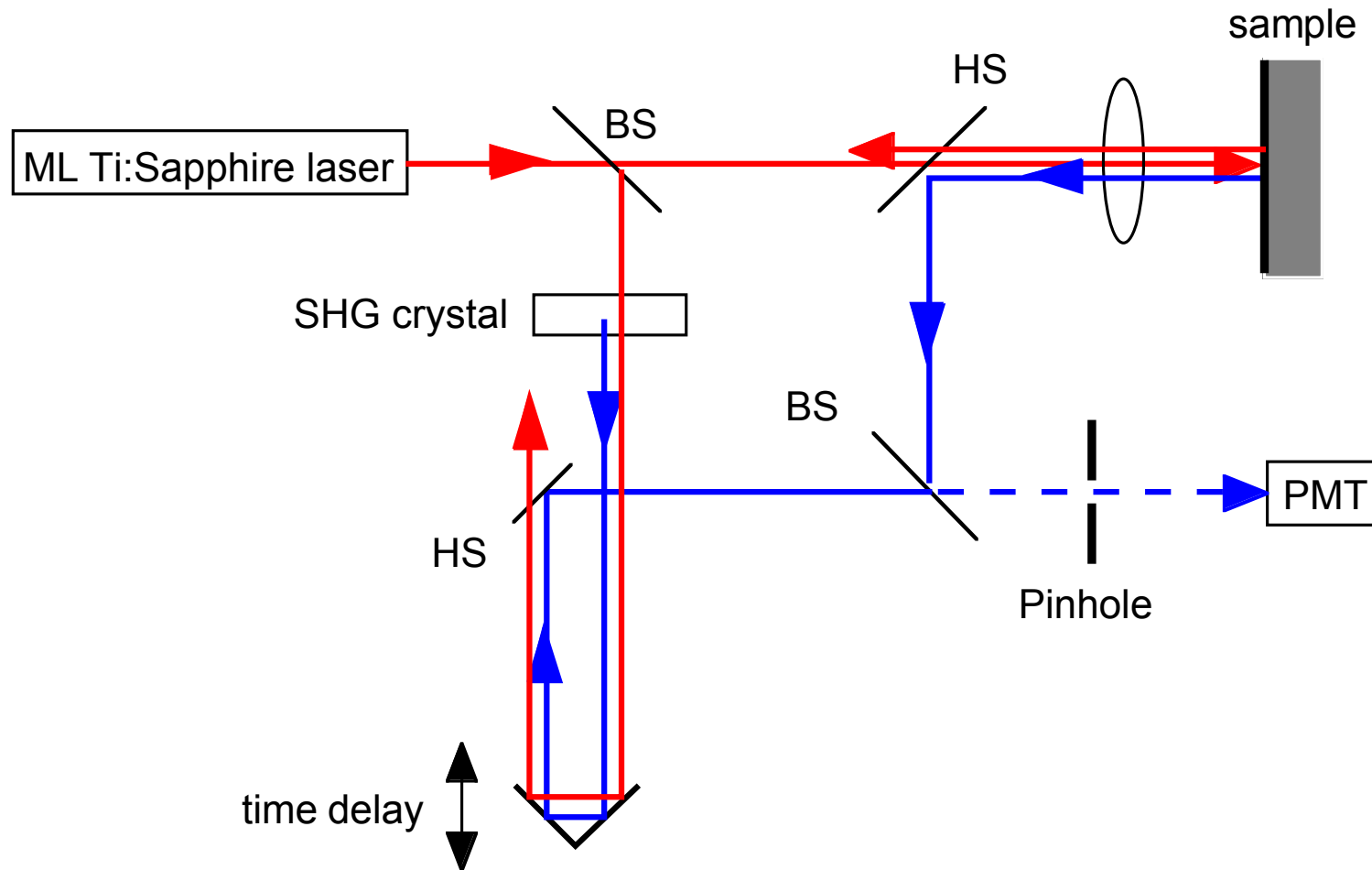


コラーゲン配向の3次元分布

生体SHG光を用いた皮膚真皮計測



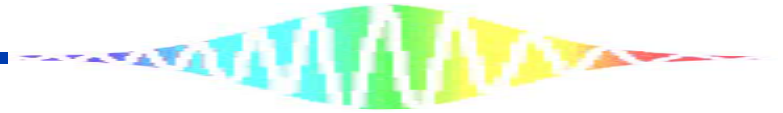
SHGコヒーレンストモグラフィ



コヒーレントなSHG過程
低コヒーレンス干渉
ヘテロダイン検出



微弱SHG光増強、多重散乱光除去
断層測定



まとめ

- ・生体SHG光の偏光解析を用いた
コラーゲン配向測定
- ・コラーゲン配向の3次元分布測定
@SHG偏光分解イメージング