

# 骨再生エンジニアリングに向けた知的コラーゲン計測・制御 手法に関する研究開発

安井 武史<sup>1\*</sup>, 佐藤 克也<sup>1</sup>, 高橋 光彦<sup>2</sup>

## Intelligent Measurement and Control of Tissue Collagen for Bone Tissue Engineering

by

Takeshi YASUI, Katsuya Sato, Mitsuhiko TAKAHASHI

Second-harmonic-generation (SHG) microscopy is a new tool for observing the collagen fiber in tissue *in vivo*. However, conventional SHG microscopy equipped with 100-fs pulse laser is insufficient to visualize collagen fiber produced by cultured cell with high contrast because of low nonlinear susceptibility  $\chi(2)$  in low-order-structured, immature collagen. To enhance the image contrast while avoiding the sample damage, one has to increase a peak power of the laser light while maintaining the same average power as the 100-fs laser. In this paper, we enhanced the sensitive of SHG microscopy by use of a 10-fs Ti:Sapphire laser and succeeded to visualize collagen fibers produced by the cultured osteoblasts *in vivo*.

**Key words:** bone, collagen, osteoblasts, tissue engineering, second-harmonic-generation

### 1. はじめに

日本では、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎え、労働力不足が深刻化している。この状況に対応するためには、高齢者世代が心身の機能の衰えや障害を乗り越えて、社会で活躍できる環境が望まれる。骨は、体の中でも我々が動く時の『要』になる組織であり、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。しかし、骨の代謝のスピードは極めて遅く、1年で数%程

度のサイクルでしか行われず(肌が1ヶ月弱で新しい皮膚に変えられていくのとは対照的に、10年程度を掛けて少しずつ新しい骨に入れ替わっていく)、高齢者で骨組織を十分に増加させることは困難である。このような背景から高齢化社会における骨再生エンジニアリングの重要性が急速に増大している。

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骨組織が形成(再生)されていく。現在、iPS細胞や中胚葉系細胞から、骨芽細胞に分化・再分化させることが可能になっている。しかし、骨芽細胞を単純に大量生産するだけでは、骨組織への高次構造化は進まない。骨細胞から骨組織へスケールアップしていくためには、両者を繋ぐ中間段階としてのコラーゲンの役割(骨芽細胞が増殖分化するための足場、骨の石灰化の基質など)が極めて大きい。更に、身体を支える支持体である骨は、形態のみな

1 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部  
Institute of Technology and Science,  
Tokushima University

2 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部  
Institute of Health Bioscience,  
Tokushima University

\*連絡先:

〒770-8506 徳島市南常三島町 2-1  
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

らず、その3次元的な機械特性が極めて重要であり、骨の質が近年特に注目されている。骨質には細胞外マトリックスであるコラーゲンの濃度や配向が深く寄与してくる。このように、骨の再生エンジニアリングを骨細胞から骨組織の段階に進めるためには、骨生成・形成過程におけるコラーゲン動態の解明が必要不可欠である。しかし、コラーゲンを生きたありのままの状態でも可視化することは、容易ではなかった。

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[1-5]。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。従来の SHG 顕微鏡では、パルス幅 100fs 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など) 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ため、SHG 顕微鏡の高感度化を行う必要がある。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 光強度を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、10fs レーザー光に対し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ける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 SHG 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. SHG 顕微鏡

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、音と光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左上側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、音が歪む。音が歪むということは、基本音以外に2倍の周波数を有する倍音 (周波数=2f) も同時に発生することを意味する (図1右上側)。このような音の領域の非線形現象は、ピアノ構造の非線形な機械応答に起因している。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) がピアノ鍵盤、超短パルス光が力一杯叩くことに相当する (図1右下側)。例えば、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、物質内で誘起された非線形分極波により、サンプルから出射される光電場が歪み、基本波以外に、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 =  $\lambda/2$ ) が発生する。これが SHG 光である。このような SHG 光は、反射・屈折といった線形光学効果とは本質的に異なるメカニズムで発生し、波長オーダーの物質構造や局所環境の変化に敏感であるという特徴を有している。

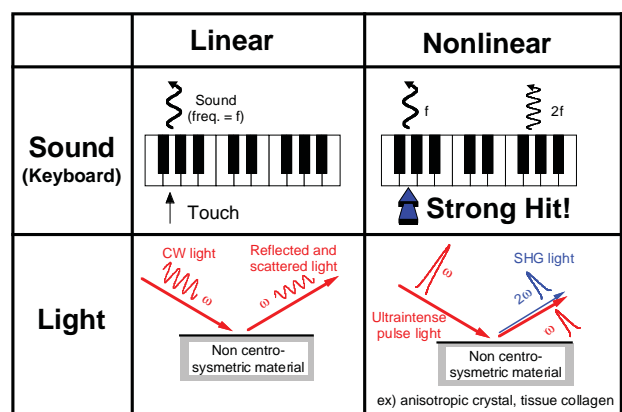


Fig. 1. Principle of second-harmonic-generation light.

コラーゲンの基本構造はポリペプチド鎖3重らせん構造からなるトロポコラーゲン (コラーゲン分子) であり、これが規則的に順次集合して階層的に太くなっていく。このようなコラーゲンは、その光波長オーダーでの非中心対称性構造 (3重らせん構造および規則的配向構造) ゆえに、

高い2次の非線形光学特性を有している。そのため、非常に高い瞬時ピークパワーを有するフェムト秒パルスレーザー光をコラーゲン含有生体組織に照射すると、非位相整合型 SHG 発生過程を介して、生体 SHG 光が特異的に発生する。例えば、骨組織にフェムト秒パルスレーザー光を照射した場合、生体 SHG 光を用いることにより骨組織におけるコラーゲン構造の選択的計測が可能になる (図2)。厳密には、コラーゲン以外に筋肉フィラメントや微小管といった生体構成物質も SHG 光を発生するが、特にコラーゲンが高い SHG 発生効率を有している上に、骨組織におけるこれらの物質の含有率を考慮すると、骨組織からの生体 SHG 光はコラーゲン由来のものであると言える。それ以外にも、バックグラウンド光 (拡散反射光, 蛍光) との分離が容易、低侵襲、深浸透性、熱的ダメージが小さい、3次元イメージングが可能といった特徴を有している。最も重要なのは、コラーゲン分子固有の非線形光学特性を利用するため組織染色が不要であり、生きたありのままの状態での測定が可能のため、コラーゲン関連分野における有用なツールになることが期待される。

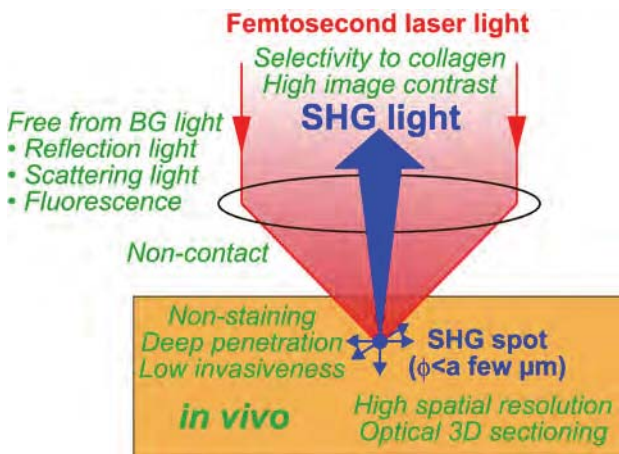


Fig. 2. Collagen-sensitive SHG microscopy.

### 3. 10fs レーザーを用いた SHG 顕微鏡の高感度化

レーザー光源には極短モード同期 Ti:S レーザー (パルス幅 10fs、中心波長 787nm、スペクトル幅 103nm、繰り返し周波数 81.8MHz) を用い、負分散可変チャープミラー (群遅延分散量:  $-900 \sim -6270 \text{ fs}^2$ ) と正分散可変ウェッジプリズム (群遅延分散量:  $50.8 \sim 356 \text{ fs}^2$ ) による群遅延分散補償により、対物レンズ焦点位置でのパルス幅を最短化した。SHG 顕微鏡の対物レンズ (水浸、NA=0.90、動

作距離=2mm) 焦点位置におけるパルス幅を評価するため、マイケルソン干渉計を組み込み、サンプル位置に蛍光色素溶液 (ローダミン 6G 溶液) を配置した 2 光子蛍光 (TPEF) 自己相関計を構築した。マイケルソン干渉計の一方のアームの光路長を走査しながら、発生した 2 光子蛍光を検出することにより、自己相関波形を取得した。

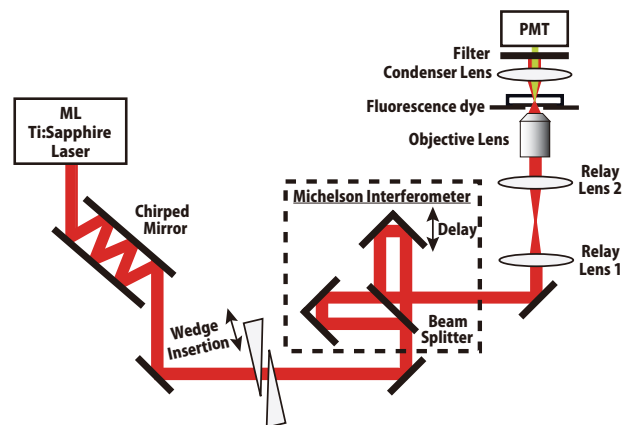


Fig. 3. Experimental setup for pulse duration measurement at the focal point of SHG microscopy by TPEF interferometric autocorrelator.

図4は、群遅延分散を十分に補償した状態で計測した自己相関波形であり、これよりパルス幅が 18.9fs であることを確認した。レーザー出射直後のパルス幅 (=10fs) に比べて、パルス幅が完全に戻っていない理由は、高次分散が今回の分散補償装置では十分に補償できないためであると考えられる。しかし、従来に 100fs レーザーと比べると 5 倍程度までパルス幅を狭窄化できているので、SHG 顕微鏡の高感度化が期待できる。

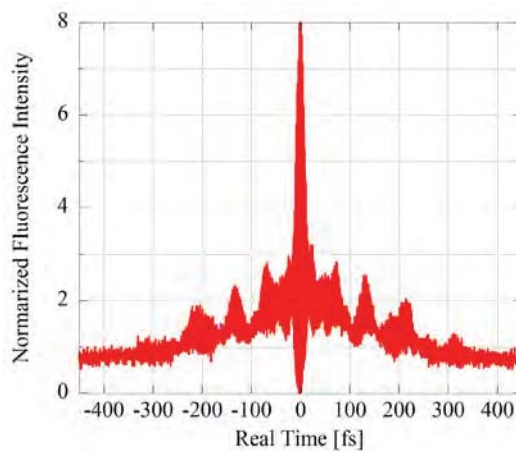


Fig. 4. Pulse duration at the focal point of SHG microscopy.

#### 4. 骨芽細胞産生コラーゲンの可視化

SHG 顕微鏡の実験配置図を図 5 に示す。図 4 と同様な配置となっているが、マイケルソン干渉計とサンプル位置の蛍光色素溶液を省いた。サンプルから発生した前方 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。ガルバノミラーと 2 枚のリレーレンズを用いて、サンプル上の焦点スポットを 2 次元走査することにより、 $200\mu\text{m}\times 200\mu\text{m}$  の SHG イメージを取得できる。さらに、機械式ステージとの併用により、大面積 SHG イメージング ( $800\mu\text{m}\times 800\mu\text{m}$ ) の取得も可能である。比較のため、同じ測定部位を、110fs レーザー光源 (モード同期エルビウム・ファイバーレーザーの SHG 光) を用いて、同一測定部を計測出来るようにしている。

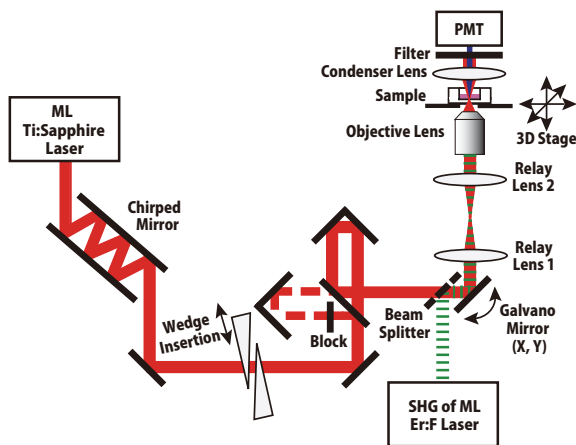
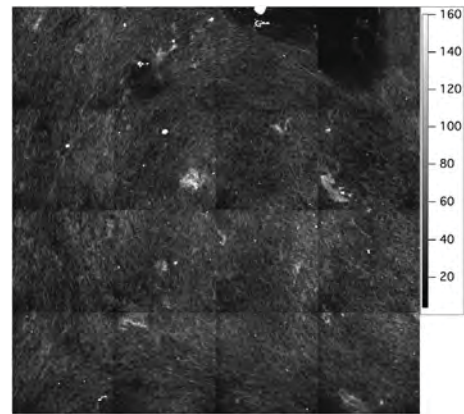
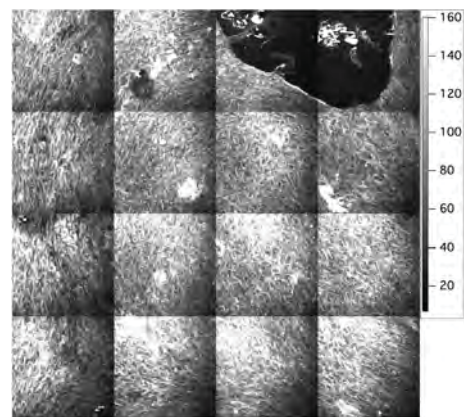


Fig. 5. Experimental setup for pulse duration measurement at the focal point of SHG microscopy by TPEF interferometric autocorrelator.

測定に使用した細胞は、マウス頭蓋骨由来細胞株の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 である。ストレッチチャンバーに細胞を播種した後、静地培養したサンプルを計測した。図 6 は、3 週間の間、静地培養した骨芽細胞産生コラーゲンを、10fs (平均パワー20mW) レーザー及び 110fs レーザー (平均パワー20mW) を用いて計測した SHG イメージ (サイズ  $1\text{mm}\times 1\text{mm}$ ) を示している。両者を比較すると、10fs レーザーの利用により、SHG イメージのコントラストが大きく向上されていることが分かる。その結果、骨芽細胞コラーゲンの線維構造を、可視化できた。



(a)



(b)

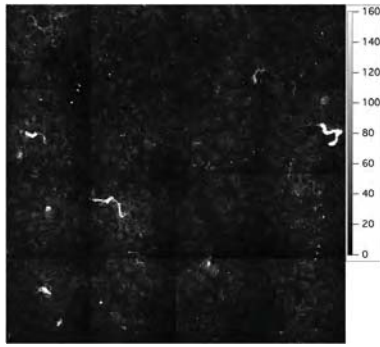
Fig. 6. SHG images of osteoblasts-produced collagen fiber by use of (a) 110-fs laser and (b) 10-fs laser.

最後に、骨芽細胞産生コラーゲンの様子を、4 週間にかけて時系列モニタリングした結果を図 7 に示す。第 1 週では、円状の微弱な SHG 光が多く観測された。これは、コラーゲンが骨芽細胞内部に分布していることを示していると考えられる。第 2 週では、SHG 光強度が増大しており、これは骨芽細胞内部のコラーゲン濃度が向上していることを反映していると考えられる。第 3 週では、コラーゲンが骨芽細胞外部に産生され、線維構造を形成している様子が分かる。第 4 週では、コラーゲン線維構造が太く成長すると共に、線維構造の局在化も確認できる。このように、SHG 顕微鏡を用いることにより、骨芽細胞培養サンプルにおけるコラーゲン動態を、同一個体で可視化することに成功した。

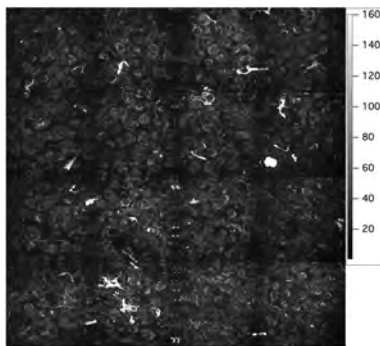


## 5. まとめ

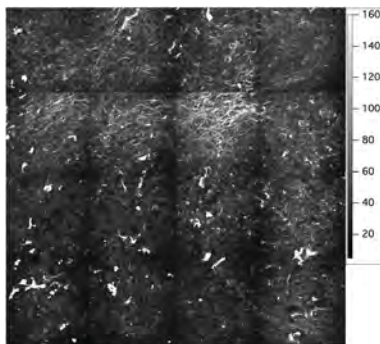
10fs モード同期 Ti:S レーザーを用いた高感度 SHG 顕微鏡の構築し、精密な分散補償により、対物レンズ集光位置でのパルス幅 18.9fs を達成した。その結果、低 SHG 発生効率の骨芽細胞産生コラーゲンの SHG イメージングに成功した。さらに、骨芽細胞培養過程におけるコラーゲン動態を時系列で可視化した。



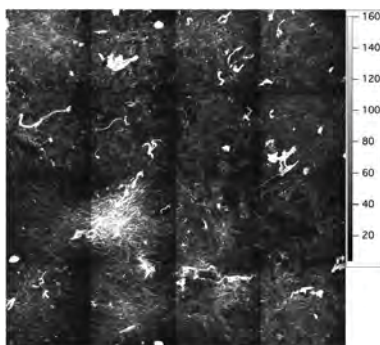
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 7. Time-series SHG images of osteoblasts-produced collagen fiber after (a) 1 week, (b) 2 weeks, (c) 3 weeks, and (d) 4 weeks.