第2高調波発生顕微鏡によるアキレス腱内の応力分布の定量計測

^O吉木 啓介¹,生津 資大¹,井上 尚三¹(1.兵庫県立大学)

[°]Keisuke Yoshiki¹, Takahiro Namazu¹, Shozo Inoue¹(1. University Of Hyogo)

E-mail: yoshiki@eng.u-hyogo.ac.jp

1. 諸言

生体組織は外力に応じて形状を組み替える ことによって応力環境に適応する.生体軟組織 において外力を担うのは細胞外マトリクスで あるコラーゲンであり、それを足場にして分布 している線維芽細胞は、コラーゲンにかかる応 力に応じて遊走,再構築を繰り返す.この力学 負荷に応じた組織の再構築のメカニズムは完 全に解明されてはおらず,現在も多くの研究が 行われている. 我々はこのような生体組織内の 応力,特に細胞スケールでの線維東レベルの応 力を非接触, 非破壊, 非染色で計測する手段と して SHG (Second Harmonic Generation: 第2高 調波発生)顕微鏡下で引っ張り試験を行い,光 学計測の結果と負荷応力の相関をとることに よって,アキレス腱コラーゲン中の応力分布の 定量的な計測を行った.

2. 実験方法

SHG 顕微鏡下でコラーゲンの応力ひずみ状 態を制御するために. 顕微鏡試料台に乗るサイ ズのマイクロ引張り試験装置を開発した. Fig. 1 にその構造を示す. 本装置は, SOI ウェハを MEMS 加工技術を用いエッチング加工したも ので,1 対のアームでコラーゲン線維の両端を 把持し,一方を荷重負荷アーム,他方を張力測 定アームとした.前者はマイクロメーターによ り強制変位を与え,後者は板ばね構造を介して フレームと接続されており,引張り負荷を行う 際,ばねのたわみを測定することにより,線維 に負荷された張力の測定ができる.



Fig. 1 Micro-tensile tester 試料はヒトアキレス腱の試料をミクロトーム を用いて薄片に処理した後,包埋用パラフィン をキシレンで除去し, PBS 内で超音波ホモジナ イザーを用いて破砕したものから最適なサイ ズの試験片を選別した. その結果,長さ 200 μm, 幅 33.5μm,厚み 10.0μm の試験片を得た.

Fig. 2 に応力と SHG 光の校正に用いた顕微鏡 の光学系を示す¹⁾. SHG 顕微計測は試料のコ ラーゲンの線維方向に対して平行に偏光した パルスレーザーをコラーゲン線維に集光し,発 生する SHG 光を入射光に対して透過側,反射 側で受光することで行った. SHG 光の偏光は 線維に対して垂直な方向,水平な方向の偏光に 分けて検出し,これを透過反射側双方から行う ことで,合計4チャンネルの計測を行った.



Fig. 2 Schematic of micro-tensile test system on SHG microscope

3. 実験結果

コラーゲンにおける SHG 信号の応力負荷に 伴う変化の仕方は, 負荷応力の大きさによって 異なり, 1MPa 以下では SHG 光の偏光に変化 が現れた.一方, 1MPa 以上では光強度の変化 が顕著であった.これらの結果より, SHG 画 像を低応力領域, 高応力領域の2領域にわけて 観察することにより, 応力分布の定量化を行っ た. Fig. 3 にアキレス腱内に負荷された応力 の分布を可視化した結果を示す.ひずみの増加 に伴い, 応力分布が全体的に高応力側にシフト している様子が画像として観察された.



Fig. 3 Stress distribution of mechanical stress in Achilles' tendon

参考文献

1) K. Yoshiki et al., Proc. of SPIE, 81130E, 1-6 (2012).