

高速連続偏光分解 SHG 顕微鏡を用いた *in situ* 真皮コラーゲン配向解析

In situ orientation analysis of dermal collagen fiber by use of fast, continuously, polarization-resolved SHG microscopy

JASRI/SPring-8¹, 徳島大理工²

○長谷 栄治^{1,2}, 南川 丈夫², 水野 孝彦², 小倉 有紀², 安井 武史²

JASRI/SPring-8¹, Tokushima Univ.²

○Eiji Hase^{1,2}, Takeo Minamikawa², Takahiko Mizuno², Yuki Ogura², Takeshi Yasui²

E-mail: hase@spring8.or.jp

<http://femto.me.tokushima-u.ac.jp/>

生体組織におけるコラーゲンを生きたありのままの状態で見ることができる SHG (SHG: second harmonic generation, 第2高調波発生) 顕微鏡[1]では、非中心対称構造物質であるコラーゲン分子と、高ピーク光電場を有する超短パルス光との非線形相互作用により波長変換が起こり、入射レーザー光の半波長となる SHG 光が特異的に発生する。この SHG 光を観測すれば、コラーゲンを選択的・高コントラストかつ *in situ* で可視化できるため、皮膚、角膜、骨、軟骨、腱等の様々な組織におけるコラーゲン観察に応用されている[1]。加えて、SHG 光の発生強度が入射レーザー偏光状態に対して敏感に変化することを利用した偏光分解 SHG 顕微鏡を用いれば、直径数 μm オーダーの焦点スポット内における局所的な分子配向角度とその構造異方性を測定することが可能である[2]。このような偏光分解 SHG 顕微鏡では、入射レーザー偏光を変化させながら偏光分解 SHG 画像を 10 枚程度取得し、各ピクセルにおける SHG 強度を理論式にフィッティングした際のフィッティングパラメーターとして配向角度と異方性を抽出する[2]。しかしながら、従来の機械的偏光回転法では偏光回転のための長い測定時間のため、体動によるモーション・アーチファクトが存在するヒト真皮の *in situ* 計測への適用は容易ではなかった。我々はこれまでに、電気光学結晶を用いた高速な直交偏

光変調により、直交偏光分解 SHG イメージングをヒト皮膚の *in situ* 計測に適用可能とした[3]。今回は、電気光学結晶を用いた高速偏光回転による連続偏光分解 SHG 顕微鏡を構築し、ヒト皮膚の *in situ* 計測に適用したので報告する。

図1に実験装置の概略図を示す。光源には中心波長を 1250 nm に設定したフェムト秒光パラメトリック発振器 (繰り返し周波数: 80 MHz, パルス幅: 100 fs) を用いた。ガルバノミラー等のレーザー走査光学系からなる自作の SHG 顕微鏡の直前で、電気光学変調器 (EO-PC) とバビネソレイユ補償板により直線偏光を 15° 刻みで回転させながら 12 枚の偏光分解 SHG 画像を取得する。また、レーザー出射直後には、電気光学変調器で発生するパルス広がり補償するためプリズムペアを挿入している。図2に *in situ* ヒト真皮コラーゲン配向解析結果を示す (ヒト試験倫理委員会承認番号: 14003)。図2(b)の配向角度画像は、赤矢印で示す配向角度解析結果を図2(a)の平均 SHG 画像に重ね合わせたものであり、毛穴の縁に平行に沿うようにコラーゲン線維が配向していることがわかる。また、図2(c)では、得られた異方性パラメーター ($\rho = \chi_{xxx}/\chi_{yyy}$) 画像により、ヒト真皮コラーゲンでは、同じ装置を用いて測定した腱コラーゲン (データは割愛) より異方性が低くなっていることがわかった。

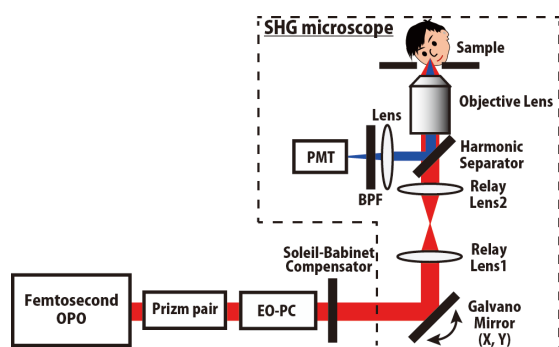


Fig.1. Experimental setup of fast, continuously, polarization-resolved SHG microscopy.

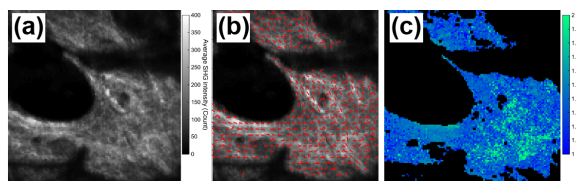


Fig.2. *In situ* orientation analysis of dermal collagen fiber in human facial skin. (a) Average SHG image, (b) Orientation map, and (c) SHG anisotropic image. The image size is 300 μm * 300 μm (120 pixel * 120 pixel).

[1] P.J. Campagnola *et al.*, Laser Photon. Rev. **5**, 13 (2011).

[2] I. Gusachenko *et al.*, Biophys. J. **102**, 2220 (2012).

[3] Y. Tanaka *et al.*, Biomed. Opt. Express **5**, 1099 (2014).