

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 30 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700474

研究課題名（和文）第 2 高調波発生顕微鏡とマイクロ・ナノ力学試験を用いた 3 次元応力・歪み分布顕微鏡

研究課題名（英文）Three-dimensional stress strain measurement by micro/nano mechanical test under second harmonic generation microscope

研究代表者

吉木啓介（YOSHIKI KEISUKE）

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60432548

研究成果の概要（和文）：

皮膚などの生体軟組織の強度を担う細胞外マトリクスの応力分布を非接触、低侵襲に計測するため、細胞外マトリクスの主成分の一つであるコラーゲン線維にかかる応力を第 2 高調波発生光によって計測する手法の開発を行った。超短パルスレーザーをコラーゲンに入射した時発生する第 2 高調波発生光の強度がコラーゲンに印加された応力によって変化する様子を、顕微引張試験機下で観察することで、応力の計測が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a second harmonic generation (SHG) microscope technic for non-contact and low-invasion observation of internal stress of collagen fibers, which is main components of extracellular matrix, and gives mechanical strength to soft tissue like skin. We demonstrated the potential of the technic by showing that the intensity of SHG light from collagen fibers had a dependence on the internal stress induced by tensile tester on SHG microscope, which focus ultra-short pulsed laser on collagen fibers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,900,000	870,000	3,770,000
23年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：コラーゲン、第 2 高調波発生、応力、MEMS

1. 研究開始当初の背景

生体組織の力学特性はクリープ、緩和等、特有の性質を示すことが知られている。特に、コラーゲンや微小管、アクチンフィラメントなどの線維状蛋白質は、組織の力学負荷を担う分子として力学特性が詳細に調べられており、バルク試料はもちろん、微小線維や分子スケールで AFM、マイクログリッパー、

MEMS デバイスを用いたナノ・マイクロ力学試験が行われている。しかし、これらの手法は非侵襲、非接触な *in situ* 計測への展開は不可能である。一方、これらの力学特性は、モノマーが重合し構造化された高分子のものであるため、その配列の向きや秩序度(結晶性)で力学特性が評価できると考えられる。しかし、X線回折による結晶構造評価は少なく

とも数十 μm 程度のバルク結晶が必要であり細胞スケールの顕微計測は難しい。そして近年、微結晶の結晶性、サイズ検出が可能であることが示された第2高調波発生 (SHG) 顕微鏡による力学的パラメータの検出に注目している。SHG 顕微鏡とは生体中の力学負荷を担う有極分子(コラーゲン, 微小管, ミオシンなど)に超短パルスレーザーを入射した時発生する2倍の周波数の光を観測する顕微鏡で、微結晶の結晶性を低侵襲、非染色に観察できる。また、これらの高分子は微結晶の集合体とみなせるため、その平均的な向きや秩序度も評価することができる。さらに、高分子に生じた歪みも微結晶の結晶性や配列の変化として可視化することが原理的に可能である。我々は偏光モード変換器(PMC)を装着したSHG顕微鏡により、いかなる向きに配向した高分子も計測可能なSHG顕微鏡を構築した。よって本顕微鏡で得られたSHG顕微像から、3次元的に入り組んだ高分子中の力学的パラメータを3次元ベクトル場として可視化することが可能と考えられる。また、本技術をマクロスコープへと展開することで、医療用の *in situ* 計測技術への発展が可能となる。

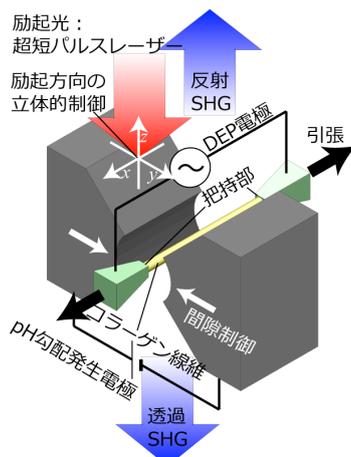


Fig. 1 マイクロ力学試験機による SHG 顕微鏡上力学試験

そこで Fig. 1 に示すように、線維一本のナノ・マイクロ力学試験により、正確な力学的パラメータを計測しながら、SHG 顕微計測を行うことで較正を行い、SHG 顕微イメージを力学的パラメータの分布に変換することで非侵襲、非接触、非染色な *in situ* 可視化を実現する。

2. 研究の目的

生体組織内の応力・歪み分布をベクトルの可視化する3次元応力場顕微鏡の開発を目的とし、マイクロ力学試験機とSHG顕微鏡のハイブリッドシステムの構築を行う。高精度マイクロ力学試験によってコラーゲン線

維の力学試験を行うと同時に結晶の構造変化をSHG顕微鏡で検出し、前者から得た応力-ひずみ線図と後者から得たSHG光信号の相関をとることで、SHG顕微イメージを応力、歪みの分布へと変換する。また、これらを3次元的な方向を含んだ3次元ベクトルイメージとして可視化する。これにより、応力の立体分布を非侵襲、非接触、非染色に *in situ* 計測する装置を完成させ、力と生体の関係を解明するための基礎技術とする。

3. 研究の方法

SHG顕微鏡上に、Fig. 1のような2対の電極をコラーゲン溶液中に配置するマイクロデバイスを考案した。一对はpH勾配発生電極で、電極間に発生するpH勾配によりコラーゲン線維を形成し、それをDEP電極の把持部へと導き、接着する。そして、偏光制御された励起光を入射し、反射、透過SHG光強度をモニタしながら引張試験を行う。両電極とも間隙の制御には楕円電極を用いた静電式アクチュエーターを用い、印加電圧と駆動力、変位は、ピエゾアクチュエーターとロードセルを用いた力学試験機を用いて較正を行う。

(1) コラーゲン線維試験片の形成、サイズ制御

コラーゲン線維の形成には至適なpHが必要である。そこで、Fig. 1のpH勾配発生電極間に電圧を加え、電気分解によって電極間にpH勾配を与え、至適pHの領域に配向したコラーゲン線維を形成した。この手法は電気化学法とよばれ、本手法によるコラーゲン線維の太さの制御を行う。

(2) コラーゲン線維試験片の把持

形成されたコラーゲン線維を高周波電圧によるDEP法により操作し、線維両端を電極に付着させる。さらに、泳動される分子が電界強度、周波数、溶媒の誘電率によって選別できることを利用して、コラーゲン線維形成とDEP法の併用により、特定の構造のコラーゲン分子のみを分離、抽出して線維化し、形成される線維の配向度を制御する手法も検討する。引張用電極には、必要に応じてコラーゲンを結合させる表面処理を施す。

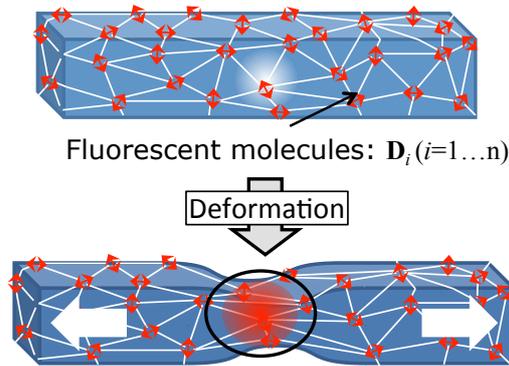
(3) 高感度SHG顕微鏡によるコラーゲンの構造検出

Fig. 2に示す通り、コラーゲン線維は微結晶の集合体とみなすことが出来るため、力学刺激による構造変化によってSHG強度が変化すると予想されるため、これを検証する。試験可能なコラーゲン線維のサイズは、力学試験の限界もさることながら、SHG顕微鏡の感度にも依存する。SHG光は双極子同士の

干渉により強めあうため、分子数が減ると極端に信号強度が減少する。そのため、より細い線維を検出するために高感度な顕微鏡を制作する。

Fig. 2 応力によるコラーゲンの構造変化による SHG 強度の増加

また、Fig. 3 のように、コラーゲン線維に単一蛍光分子を分散付着させ、変形解析をするシステムを構築する。



Fluorescent molecules: $D_i (i=1 \dots n)$

Deformation

Fig. 3 単一分子追跡による微小変形解析

(4) SHG 立体配向顕微鏡+力学試験

Fig. 1 に示すシステムで応力・歪みと SHG 強度の相関を取った。

1. 引張試験を行いながら SHG 信号強度と応力-歪線図を計測することで歪み-SHG, 応力-SHG の較正曲線を得た。応力はプローブの引張力とコラーゲン線維断面積から求めることができた。ひずみは引張電極の変位から画像解析によって求める。較正曲線の取得は分子配向と励起偏光の関係を含めて検証しなければならないため、入射偏光と線維方向は同じとした。

2. 作製条件によって分子構造が異なる場合や、コラーゲン線維の微細化によるサイズ効果によって、較正曲線が変わる可能性は高く、実際の SHG 力学パラメーター画像において、どの較正曲線を用いればいいのかを判断する必要がある。そこで、SHG の反射、透過強度も指標に加えた。

4. 研究成果

光整流による微小デバイスの圧電駆動の可能性を検証するため、顕微鏡上で試料を確認しながら超短パルスレーザーを照射し、電氣的、機械的、光学的測定を同時に行えるデバイスを開発した。Fig. 2 にその外観を示す。本装置は 2 対の電極を持ち、そのうち 1 対を試料把持に用いた。また、もう 1 対は試験片を

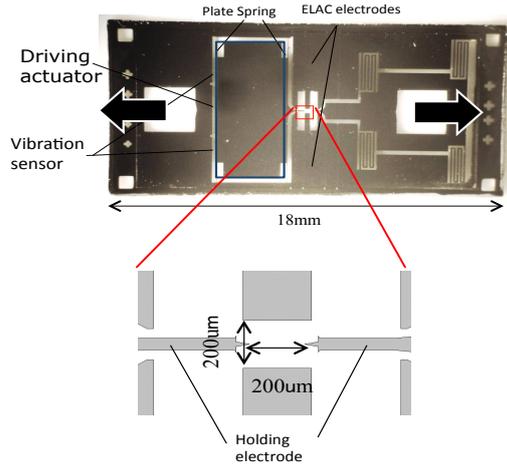
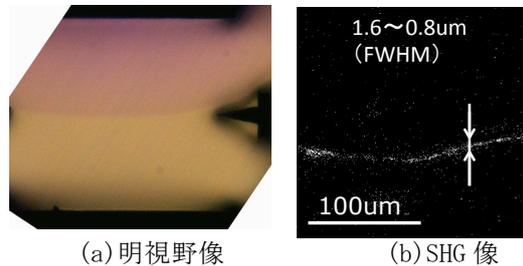


Fig. 3 マイクロ引張試験機

作成するために用いた。なお、電極間隔はどちらも $200 \mu\text{m}$ とした。溶液からコラーゲン線維を抽出する電気化学法を用いたコラーゲン線維 (ELAC) を作成した。まず、電極間をコラーゲン酸性溶液で満たし、直流電圧を印加する。すると印加電圧による電気泳動のため、電極間に pH の分布が出来る。この時、電極間の中間領域は中性となるため、コラーゲンが析出する。この時、空間的な閉じ込め効果によって、コラーゲンは電圧印加方向に対して垂直方向に配向し、配向の揃ったコラーゲン線維ができた。

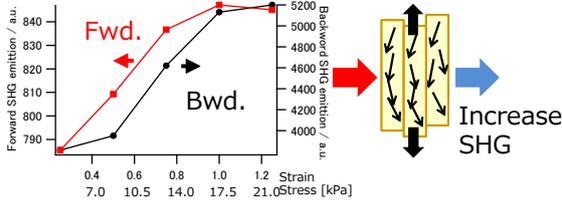


(a) 明視野像 (b) SHG 像
Fig. 4 コラーゲン引張試験片

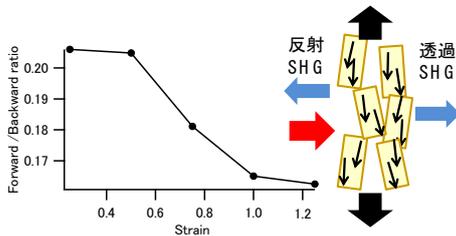
Fig. 4 に電圧 3V を 20 秒間印加した時にされたコラーゲン線維を示す。細いため明視野像では計測が難しいが、SHG 顕微鏡で観察すると、一本の線維が形成されていることがわかる。太さを計測すると $0.8 \sim 1.6 \mu\text{m}$ であることがわかる。入射光の波長が 800nm であるため、光の回折限界に近いサイズを達成した。

こうしてできた試験片に発生した圧電変形を計測するために、本デバイスは把持電極に接続されたばねの変形量を計測することで発生力が計測できる。ここで、ばね定数はばねに接続している重りが振動する時の共振周波数を計測することによって行った。その結果、バネ定数は 114N/m となった。本デバイスでコラーゲングルに引張負荷を与えた時の SHG 観測結果を示す。引張負荷の

増大に伴い、反射、透過双方の SHG 光強度が増加しており、コラーゲン線維の配向が応力によって揃っていることがわかる。また、透過側と反射側の SHG 強度の比も同時に変化しており、これはクリープ変形などによるコラーゲン線維の構造が変化したことを示していると考えている。



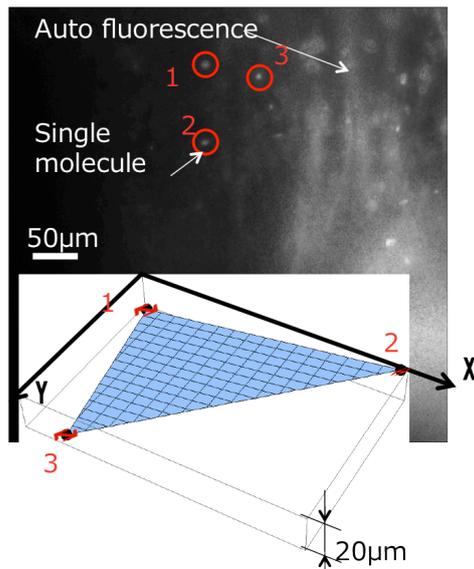
(a) 透過、および反射 SHG 強度



(b) 透過/反射比

Fig. 5 引張負荷による SHG 信号の変化

また、単一分子を散布し、それを単一分子観測によって追跡することによって、コラーゲングルの変形の配向を含んだ位置情報の追跡を行った。3分子で構成される三角形の変形を解析した結果、応力負荷方向に伸びるだけでなく、湾曲が確認された。このように、本手法によって、標識分子間隔より小さいスケールの変形分布が観測可能となった。



(a) 変形前

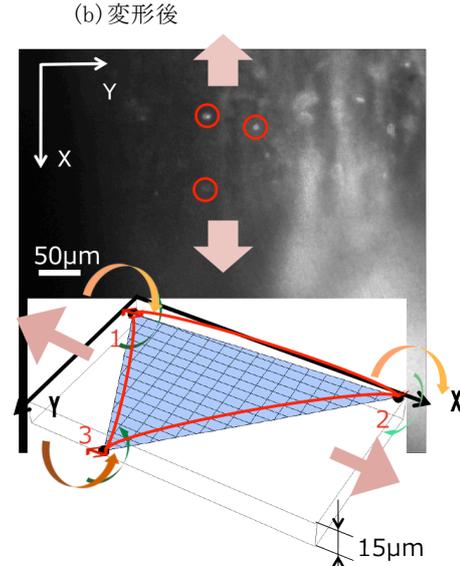


Fig. 6 単一分子追跡による変位計測

以上の結果により、機械的負荷によるコラーゲンの応力、歪の計測を光学顕微鏡で行うことが出来るようになり、コラーゲンの機械的特性の分布を非侵襲、非接触に計測することが可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

K. Yoshiki, S. Yoshida, T. Namazu, N. Araki, M. Hashimoto, M. Kurihara, N. Hashimoto, S. Inoue, "Microscopic Measurement of Strain Distribution on MEMS Device using Three Dimensional Orientation Microscope.", MEMS 2011, Cancun, MEXICO, January 23-27, 2011.

K. Yoshiki, N. Goami, T. Namazu, S. Inoue, "Measurement of stress and strain applied to electrochemically aligned collagen fibres.", Proc. of SPIE, 81130E, 1-6 (San Diego, 21 August 2011).

S. Yoshida, K. Yoshiki, T. Namazu, M. Hashimoto, S. Inoue, "Development of strain visualization system for microstructures using single fluorescent molecule tracking on three dimensional orientation microscope.", Proc. of SPIE, 81340E, 1-7 (San Diego, 21 August 2011).

K. Yoshiki, N. Goami, T. Namazu, and S. Inoue, "Microtensile Test of Electrochemically Aligned Collagen Fibres on MEMS Device under SHG Microscope,

Photonics West BIOS 2012, 8221-16 (San Francisco, 23 January 2012).

K. Yoshiki, S. Yoshida, K. Yonezawa, T. Namazu, S. Inoue, "Observation of inhomogeneous strain distribution on collagen fibers using single molecule tracer", 第 49 回日本生物物理学会年会予稿集, 655, (兵庫県立大学 9/16/2011).

吉田慎太郎, 吉木啓介, 生津資大, 荒木望, 橋本守, 井上尚三, "単一分子マーカーを用いたマイクロ構造体の歪分布可視化技術の開発", 日本実験力学学会講演論文集, 11, 132-133, (奈良県文化会館 2011/8/30).

五網信貴, 吉木啓介, 宮田篤志, 生津資大, 井上尚三, "小角 X 線散乱および SHG 顕微鏡観察下における電気化学法生成コラーゲンの引張試験", バイオエンジニアリング講演会講演論文集(大阪大学 2011/1/7)

吉木啓介, 五網信貴, 生津資大, 井上尚三, "SHG 顕微鏡下におけるコラーゲン線維の引張ひずみ試験", 第 58 回応用物理学会学術講演会講演予稿集, 1p-B-12 (2011/9/1 山形大学)

吉田慎太郎, 吉木啓介, 生津資大, 荒木望, 橋本守, 栗原誠, 橋本伸幸, 井上尚三 "単一蛍光分子標識を用いたマイクロ材料のひずみ分布計測法の開発", 第 57 回応用物理学会学術講演会講演予稿集, 25a-KT-5(2011/3/25 神奈川工科大学)

吉木啓介, 増田恭佑, 橋本守, 橋本信幸, 栗原誠, 生津資大, 井上尚三『立体配向顕微鏡を用いた非接触・非破壊歪み計測』日本機械学会 2010 年度年次大会 (2010/9/7 名古屋工業大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉木啓介 (YOSHIKI KEISUKE)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 60432548