

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650261

研究課題名（和文） 病的血管リモデリングに伴うコラーゲン線維の三次元構造変化

研究課題名（英文） Three dimensional measurements of collagen structure in a vascular tissue subject to abnormal mechanical remodeling

研究代表者

和田 成生 (WADA SHIGEO)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：70240546

研究成果の概要（和文）：

高度光学計測技術である第 2 高調波発生 (SHG) 法により、血管組織内部のコラーゲン線維の 3 次元的な分布および配向状態を計測できることを示した。また、脳動脈瘤の病理組織標本の分析および動脈瘤における血行力学解析から、血管壁に作用する複雑な応力場が、SHG 法により計測されるコラーゲン線維の 3 次元構造に関与していること明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study experimental showed that the optical measurements using second harmonic generation (SHG) enable to observe the three dimensional distribution and orientation of collagen fibers in a vascular tissue. It was speculated from pathological analysis of the tissue specimen and the computational hemodynamic analysis of cerebral aneurysms that the complex stress field applied to the vascular tissue involves the 3D collagen structure measured with the SHG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス，生体光計測，SHG，血管組織，コラーゲン，リモデリング，計算力学解析

## 1. 研究開始当初の背景

血管の組織構造は血液循環状態の変化に伴って適応的に変化する。しかし、これが破綻すると、血管病を招来する。血管形状が劇的に変化する動脈瘤などの病的リモデリングが起こる場合には、血管強度要素であるコラーゲンを含む外膜の組織構造に変化が生じていると考えられる。しかしながら、組織切片を観察する組織学的評価では、繊維の 3 次元分布や分量を評価することが困難である。

## 2. 研究の目的

高度光学計測技術である第 2 高調波発生 (SHG) 法を用いて、種々の血管における壁内

コラーゲン線維の 3 次元分布を計測し、病的リモデリングによって生じるコラーゲン線維構造の変化を調べる方法を確立する。

## 3. 研究の方法

計測装置の基本構成を図 1 に示す。画像の取得には、Cr:Fr レーザ (CrF-65P, Avesta Project) を光源とした SHG (Second Harmonic Generation) 顕微鏡を使用した。Cr:Fr レーザのような強力な光を非中心対称物質であるコラーゲン分子に照射することで、第 2 高調波と呼ばれる光が発生する。よって第 2 高調波の発生の有無で、コラーゲン分子の存在の有無を確認できる。更に、各コラーゲン分子

が照射したレーザーの偏光角度に整理しているときに、発生する第2高調波が強くなるため、第2高調波の強度を観察することで分子の配向情報を取得することが可能である。また、SHG顕微鏡を用いることで垂直方向に一定間隔で連続断層画像を取得することができる。

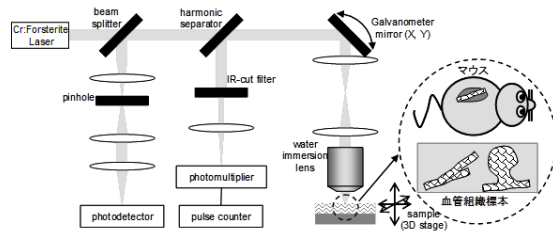


図1 計測装置の基本構成

#### 4. 研究成果

まず、ウサギの大動脈血管を用いて深度方向のSHG画像を取得し、コラーゲン構造の3次元計測の可能性について検討を行った。試料として、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール、大日本製薬）を過剰投与してウサギを安楽死させた後、胸部を正中切開し、大動脈を30mm程度の長さで摘出した。摘出した大動脈はホルマリン処理を施した。

偏光方向を一方向に定め、60×油浸対物レンズを用いて試料を観察し600×600 μm, 256×256 pixelのBitmap形式のグレースケール画像を血管表面から深さ180 μmまで10 μm間隔で取得した。結果の一部を図2に示す。

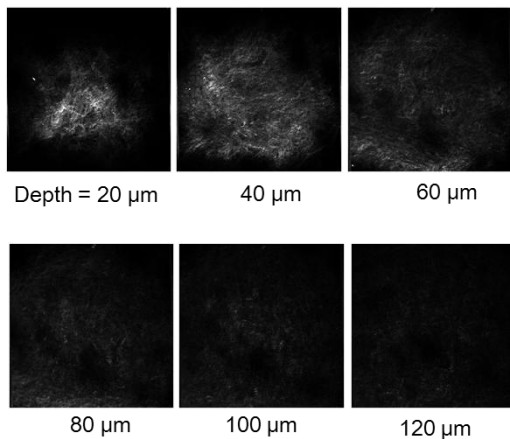


図2 SHG計測画像

血管表面から取得したグレースケール画像では輝度値の分布が存在した。また、血管表面から深さ180 μmまで10 μm間隔で取得した連続断層画像においても輝度値の分布が存在した。しかし、測定深さが70 μmより深くなると取得画像内の輝度値の大きさ、輝度値の存在する領域がともに小さくな

り始め、測定深さが130 μmより深くなると微小となった。グレースケール画像で輝度値の分布が存在したため、コラーゲン分子が存在するといえる。また、各コラーゲン分子が照射したレーザーの偏光方向に整理しているとき、発生する第2高調波が強くなるため取得した画像内で大きな輝度値を持つ領域は、レーザーの偏光角度に近い配向角度を持つコラーゲン分子が多いことが分かる。このことから、一つの試料に対して、レーザーの偏光角度を変更して計測することでコラーゲンの詳細な配向情報を取得できると考えられた。

次に、血管壁内のコラーゲンの配向状態を観測するためのSHG画像取得の高速化と定量的な評価手法の確立を行った。従来のSHG顕微鏡では入射光の偏光を波長板で機械的に制御していたため測定時間が長いという問題があった。そこで、電気光学変調器を用いてSHG観測の高速化を実現した。測定時間は従来法の1/10程度まで改善され、画像構成アルゴリズムの改良も行ったことより、*in vivo*計測における体動による誤差がないSHG画像の取得に成功した。図3は入射光の偏光を2方向に制御して体動のあるラット皮膚を観測した結果である。直交する2方向の入射偏光で取得したSHG画像(Vertical, Horizontal)からコラーゲンの配向指標( $\alpha = (I_V - I_H) / (I_V + I_H)$ ,  $I$ : SHG光強度)をピクセルごとに算出した。従来の機械的な偏光制御では体動の影響により2画像間のピクセルの対応がとれないために適切な配向指標を得ることはできないが、電気光学的に偏光制御した場合は各ピクセルの配向指標は妥当な値となっている。

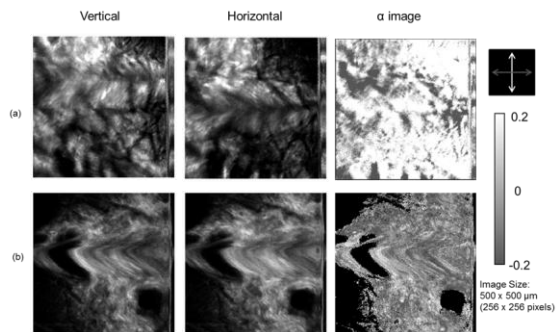


図3 *in vivo*ラット皮膚の直交偏光SHG画像とコラーゲン配向度の分布

(a) 機械的制御, (b) 電気光学的制御

さらに、評価指標として配向ベクトルを定義し、従来の光学顕微鏡では可視化ができないサブミクロンスケールのコラーゲン構造の定量解析が可能となった。図4は摘出したヒト関節軟骨組織に15%の1軸圧縮を負荷

した時のコラーゲン配向を定量化した結果である。入射偏光を 10°ごとに回転させて取得した 38 枚の SHG 画像からピクセルごとに算出した配向ベクトルの大きさ ( $I_{\max} - I_{\min}$ ) /  $I_{\text{ave}}$ ) を算出して度数分布を示した。関節軟骨ではサブピクセルオーダーの直径をもつ 2 型コラーゲンがランダムな方向に配向している。圧縮負荷によりコラーゲン線維が 1 方向に揃うように変形することを定量的に示すことができた。

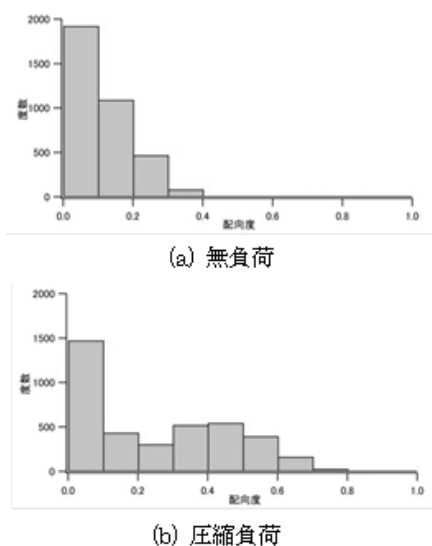


図 4 多軸偏光分解 SHG 観測により算出した配向度の度数分布

さらに、SHG により計測される血管コラーゲン線維の 3 次元構造と血管リモデリングとの関係を追及するために、本研究では実験計測および計算解析を行い、以下の知見が得られた。

病理解剖により摘出されたヒト脳動脈瘤の病理組織標本（ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色）を作製し、動脈瘤壁の中でのコラーゲンの配向状況を調べた。その結果、動脈瘤のネック部でコラーゲンの配向が乱れ、ところどころで線維が不連続となっていることがわかった。

動脈瘤内の力学場を明らかにするため、臨床で得られた動脈瘤を有するヒト脳血管の CT 画像から様々な動脈瘤の実形状モデルを構築し、壁の応力解析および瘤内の血流解析を行った。その結果、動脈瘤のネック部では、主応力およびミーゼス応力とも変化が大きく、また、血圧による等方引張変形だけでなく、比較的大きなせん断変形も生じていることがわかった。また、動脈瘤のネック部では血流が乱され、他の部位より大きな壁せん断応力が作用することがわかった。こうした壁に作用する応力場が、組織のリモデリング

による複雑なコラーゲンの配向を引き起こしている可能性が示唆された。

以上の結果から、血管内視鏡で SHG によるコラーゲン配向の計測が可能になると、医用画像に基づく計算力学解析とを組み合わせることにより、臨床において脳動脈瘤の進行予測が可能になると考えられる。

#### 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 2 件)

Yasui T, Yonetsu M, Tanaka R, Tanaka Y, Fukushima S, Yamashita T, Ogura Y, Hirao T, Murota H, Araki T, In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser, J. Biomed. Opt., 18, 11 pages, 2013.

Otani T, Nakamura M, Fujinaka T, Hirata M, Kuroda J, Shibano K, Wada S, Computational fluid dynamics of blood flow in coil-embolized aneurysms: effect of packing density on flow stagnation in an idealized geometry, Medical & Biological Engineering & Computing, in press, 2013.

[学会発表] (計 14 件)

Wada S, Soga M, Ujihara Y, Nakamura M, Koshiyama K., Miyazaki H, Computational studies on the strain transmission from a biological tissue to a cell and cytoskeletons, ASME 2011 Summer Bioengineering Conference, 2011 年 6 月, Farmington, USA.

Tanaka R, Yasui T, Fukushima S, Araki T, In vivo observation of skin burn using collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy, Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics 2011, 2011 年 8 月, Sydney Australia.

大谷智仁, 中村匡徳, 藤中俊之, 平田雅之, 黒田淳子, 芝野克彦, 越山顕一朗, 宮崎浩, 和田成生, 血管分岐部に発生した脳動脈瘤に対するコイル充填率の流体力学的検討, 日本機械学会 2011 年度年次大会, 2011 年 9 月, 東京.

西村隆克, 越山顕一朗, 宮崎浩, 和田成生, 細胞力学モデルを用いた細胞の接着・伸展シミュレーション, 日本機械学会第 22 回バイオフロンティア講演会, 2011 年 10 月, 津.

田中健一郎, 福島修一郎, 荒木勉, 偏光分解第2高調波発生顕微鏡を用いたコラーゲン配向状態の定量評価, 日本機械学会第22回バイオフロンティア講演会, 2011年10月, 津.

田中佑治, 長谷栄治, 田仲亮介, 福島修一郎, 安井武史, 荒木勉, 電気光学的高速偏光変調を用いた偏光分解 SHG (第2高調波発生光) 顕微鏡偏光, Optics & Photonics Japan 2011, 2011年11月, 大阪.

Wada S, Ujihara Y, Nakamura M, Deformation of a cell and its internal cytoskeletons caused by the mechanical force applied to a tissue, 10th World Congress on Computational Mechanics, 2012年7月, São Paulo, Brazil.

Otani T, Nakamura M, Ii S, Fujinaka T, Hirata M, Kuroda J, Shibano K, Wada S, The effect of coil-embolized volume ratio on flow stagnation in cerebral aneurysms, 日本機械学会2012年度年次大会 KSME-JSME Joint Symposium on CM & CAE, 2012年9月, 金沢.

渡邊嘉之, 國富裕樹, 田中壽, 西澤光生, 塚部明生, 富山憲幸, 藤中俊之, 網谷隼人, 大谷智仁, 和田成生, MRI-CFD 融合解析を用いた脳血管血流動態解析の試み, 40回日本磁気共鳴医学会, 2012年9月, 京都

田中健一郎, 福島修一郎, 荒木勉, 第2高調波発生顕微鏡を用いたコラーゲンの配向解析, 生体医工学シンポジウム2012, 2012年9月, 大阪.

Otani T, Nakamura M, Fujinaka T, Hirata M, Kuroda J, Shibano K, Wada S, Effect of the extent of coil embolization on flow stagnation in cerebral aneurysm, ASME 2012 Intern. Mech. Eng. Congress & Exp., 2012年11月, Houston, USA.

Hagino S, Fukushima S, Sera T, Tohno Y, Mahakkanukrauh P, Nishi M, Araki T, Assessment of arterial calcification by using x-ray computed tomography and application to computational modeling, 2nd Intern. Anatomical Sciences & Cell Biology, Conference, 2012年12月, Chiang Mai, Thailand.

大谷智仁, 伊井仁志, 藤中俊之, 平田雅之, 黒田淳子, 芝野克彦, 和田成生, 塞栓治療用コイルの三次元幾何形状を考慮した脳動脈瘤内血流解析, 第25回バイオエンジニアリング講演会論文集, 2013年1月, つくば.

Tanaka Y, Hase E, Fukushima S, Yasui T, Araki T, In vivo imaging of collagen fiber orientation with rapid polarization -resolved SHG microscopy, BIOS 2013 (Photonics West 2013), 2013年2月, San Francisco, USA.

〔図書〕(計1件)

Tanaka M, Wada S, Nakamura M, Computational Biomechanics: Theoretical Background and Biological/Biomedical Problems. In: A First Course in "In Silico Medicine" Vol. 3, 2012, Springer.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

<https://sites.google.com/site/biomechwaldalab/>

[http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/araki\\_lab/](http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/araki_lab/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

和田成生(大阪大学・基礎工学研究科・教授)  
研究者番号: 70240548

### (2)研究分担者

中村匡徳(埼玉大学・理工学研究科・准教授)  
研究者番号: 20448046

福島修一郎(大阪大学・基礎工学研究科・助教)  
研究者番号: 40362644

越山顕一朗(大阪大学・基礎工学研究科・助教)  
研究者番号: 80467513