

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288055

研究課題名(和文)3次元弾性イメージングによる囊内調節のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Confocal Brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging

研究代表者

安中 雅彦(ANNAKA, MASAHIKO)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40282446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：光の音波による非弾性散乱であるブリュアン散乱は、物質の粘弾性的な性質を非侵襲的に測定することが可能である。我々はこの方法論をポイントサンプリングからイメージングに拡張するために、共焦点光学系にVIPA(virtually imaged phased array)を導入することで、計測効率を従来の約100倍に高めることに成功した。本研究で検討された新たな方法により、生体系、特に豚の水晶体の弾性率のイメージング、さらに架橋反応過程における高分子ゲルの弾性率変化のリアルタイムモニターに成功した。

研究成果の概要(英文)：Acoustically induced inelastic light scattering allows non-contact, direct readout of the viscoelastic properties of a material. Extending the Brillouin technique from point sampling spectroscopy to imaging modality would open up new possibilities for mechanical imaging, but has been challenging because rapid spectrum acquisition is required. We demonstrate a confocal Brillouin microscope based on a fully parallel spectrometer-a virtually imaged phased array-that improves the detection efficiency by nearly 100-fold over previous approaches. Using the system, we show the first cross-sectional Brillouin imaging based on elastic properties as the contrast mechanism and monitor fast dynamic changes in elastic modulus during polymer crosslinking. Furthermore, we report the first in situ biomechanical measurement of the crystalline lens in a mouse eye. These results suggest multiple applications of Brillouin microscopy in biomedical and biomaterial science.

研究分野：高分子物理化学

キーワード：水晶体 弾性率 ブリュアン散乱

## 1. 研究開始当初の背景

生体組織の物性は、その機能と密接に関連しており、生命現象において非常に重要な役割を担っている。すなわち、その物性が生体の状態を反映するため、医学的に重要であり、さらに疾患の診断方法としての利用も期待されている。しかしながら、その構造・物性は通常の単純な高分子化合物とは大きく異なり、生体機能を考える上で鍵となる超分子構造体である。通常、多成分複合系であるために、その内部に階層的な構造を有しており、そのマイクロレベルでの構造・物性の理解が必要である。そのためには医学的なアプローチに加えて、分子物理化学的なアプローチが必須となるが、後者の立場からの研究例は極めて少ない。

眼球中の水晶体はゲルに類似した構造体で、上皮細胞と上皮細胞が脱核してできた線維から構成され、生涯タンパク質代謝はないという極めて特異な器官である。線維は新旧の形成に応じ、それぞれ水晶体皮質と水晶体核に分かれる(図1)。水晶体は毛様体筋およびチン氏小帯によって眼球内に懸架・支持されており、毛様体筋の収縮弛緩に応じてその形状(厚さ)を変化させ、屈折力を変えることで光を網膜上で結像させる機能、すなわち調節作用(accommodation)を担う重要な眼球組織である。人類にとって避けることが出来ない老視(presbyopia)の原因は、水晶体が加齢により硬化し、その弾力性を低下させるために変形できず、その結果調節機能を低下させることが原因であるという考えが主流である。この水晶体の硬化は、臨床的には長く認識されてきたにも関わらず、その物性変化の分子レベルでの理解は不十分であり、水晶体皮質と水晶体核それぞれの物性変化の調節への影響についても全く解明されていないのが現状である。さらに通常正常眼の調節巾である15ジオプター(無限遠~約5cm)は水晶体の変形のみでは対応できず、水晶体繊維細胞の能動的関与(囊内調節)が提案されているが、この検証も全く行われていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

人間にとって重要な情報手段である視覚を司るバイオハイドロゲル(眼球組織)が関わる生体現象を、構造・物性の観点から総合的に理解することは重要である。その中でも本研究では、眼球中の水晶体に注目する。水晶体は加齢による硬化に伴い弾力性が低下するために、光を網膜上に結像させる調節力が低下し老視(老眼)が発生すると考えられている。この水晶体の硬化は、臨床的には長く認識されてきたにも関わらず、その分子レベルでの理解、さらに調節のメカニズムは十分に解明されていないのが現状である。そこで本研究では、水晶体ゲルの物性の測定・評価方法を確立し、①調節のメカニズム、さらに②加齢に伴い調節機能がどの様に変化する

のかを分子レベルで明らかにすることを目指す。「水晶体ゲルの分子物理化学」から得られる知見を基に、バイオハイドロゲルが関わる様々な生命現象の分子レベルでの理解を深化させる。

## 3. 研究の方法

本研究の基本的な構想は、人類の高齢化が急速に進む現在、加齢に伴う生体機能の変化、疾病による異常を分子レベルで理解することにある。生体機能場として重要なバイオハイドロゲルが関わる生体現象を、構造・物性・ダイナミクスの観点から、分子レベルで総合的に理解する。本研究では、特に水晶体に注目し、以下の3つの達成目標を掲げる。

(1) 高速・高分解能 *in situ* かつ *in vivo* 条件下で3次元弾性イメージングを可能にする分光器を作製する。

(2) 水晶体ゲルの生体力学物性(biomechanical character)の生きたままの状態での観測から調節機能、囊内調節機構、さらに老視のメカニズムを解明する。

(3) 水晶体ゲルの囊内調節(水晶体繊維細胞の能動的関与)のメカニズムを明らかにする。

### 平成25年度・26年度

#### (1) 高速・高分解能3次元弾性イメージング装置の作製

調節は、水晶体の力学物性に大きく依存しており、また加齢により低下(老眼)する。これまで、水晶体の力学物性は、摘出試料を用いて侵襲的に検討されてきたが、房水と水晶体上皮細胞との間の代謝が遮断されることによる水晶体の構造、形状の変化は、水晶体物性に対して大きな影響をもたらすと考えられる。そこで「生きたままの状態」で水晶体の力学物性を解明することは極めて重要である。非弾性散乱法であるブリルアン散乱法は、試料の粘弾性的性質を非侵襲的に直接測定可能な方法として有用であり、物質の特性解析に広く用いられてきた。しかしながら、Fabry-Perot干渉計、grating-basedモノクロメーター、あるいは光ビート法を用いる従来の光学系は、計測に長時間を有するため、計測をpoint samplingからイメージングへ拡張することは実用上不可能であった。この問題を解決するために、ブリルアン散乱に高速かつ高空間分解能計測が可能な仮想的な回折格子(Virtually Imaged Phased Array, VIPA etalon)をタンデム型で導入した分光器(Scarcelli & Yun, 2007, 2011)を用いた。さらに、共焦点顕微鏡にこの分光器を組み込むことで、オプティカルセクションングにより深さ方向の情報の取り込み可能な共焦点ブリルアン顕微鏡システム構築し、高速・高分解能で3次元弾性イメージングを行い、試料の局所的な粘弾性情報とその空間分布計測を実現するための検討を行った。

## 平成 27 年度

### (2) 水晶体の 3 次元弾性イメージング 1 (摘出水晶体の in vitro 測定)

水晶体線維は新旧の形成に応じ、周辺部の水晶体皮質と中心部の水晶体核に分けられる。水晶体皮質には水晶体線維が形成するラメラ構造が確認されるのに対して、水晶体核では水晶体線維が古く明確なラメラ構造は消失している。従って、水晶体核をコア、水晶体上皮をラメラ構造型シェルとするコア・シェル構造を有する超分子構造体ゲルと捉えることが出来る。水晶体の硬化は、加齢による調節力の低下と密接に関連していると考えられる。そこで、研究計画(1)で作成したブリルアン散乱システムを利用して、まず豚正常眼の摘出水晶体を試料として、水晶体表面方向 100 $\mu\text{m}$  ステップ、さらに共焦点光学系を利用して光軸方向 100 $\mu\text{m}$  ステップで 3 次元弾性イメージング計測を行い、水晶体ゲルの粘弾性情報の空間分布を明らかにする。特に水晶体皮質と水晶体核の力学物性の違いを非侵襲的に明らかにした。

### (3) 水晶体の 3 次元弾性イメージング 2 (In-situ & in vivo 測定)

これまで水晶体の力学物性は、摘出試料を用いてレオメーターにより侵襲的に検討されてきたが、房水と水晶体上皮細胞との間の代謝が遮断されることによる水晶体の構造、形状の変化は、水晶体物性に対して大きな影響をもたらすと考えられる。そこで「生きたままの状態」で水晶体の力学物性を解明することは極めて重要である。これは、この方法論を将来的に臨床に応用展開する上でも重要である。そこで本申請課題では、ブリルアン散乱用分光計にタンデム VIPA 利用することで、これまでブリルアン散乱を生体物質の弾性イメージングに拡張することを妨げていたサブ GHz 分解能とハイスループットを実現することが期待できる。ここでは、「生きたまま」の水晶体の 3 次元弾性イメージング、および力学物性の加齢効果を検討した。具体的には以下の通りである。

①摘出眼を用いた in vivo 測定実験：光軸方向（角膜→房水→水晶体→硝子体の方向）で高速・高分解弾性イメージングの検証を行うと共に、その個体年齢依存性を解明した。

②白色家兎およびマウスを用いた in situ & in vivo 測定実験：調節時、非調節時の力学物性の変化、さらに個体年齢の違い（加齢効果）による調節時、非調節時の水晶体力学物性の変化を解明した。

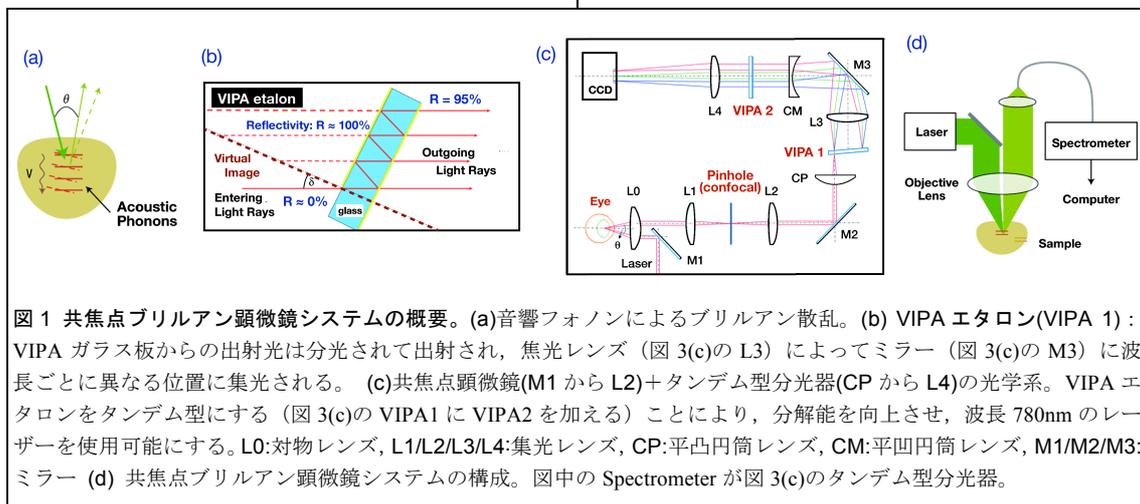
## 4. 研究成果

### (1) 高速・高分解能 3 次元弾性イメージング装置の作製

非弾性散乱法であるブリルアン散乱法は、試料の粘弾性的性質を非侵襲的に直接測定可能な方法として有用であり、物質の特性解析に広く用いられてきた（図 1a）。しかしながら、Fabry-Perot 干渉計、grating-based モノクロメーター、あるいは光ビート法を用いる従来の光学系は、計測に長時間を有するため、計測を point sampling からイメージングへ拡張することは実用上不可能であった。この問題を解決するために、ブリルアン散乱に高速かつ高空間分解能計測が可能な仮想的な回折格子(Virtually Imaged Phased Array, VIPA etalon, 図 1b)をタンデム型で導入した分光器（図 1c）を用いた。さらに、共焦点顕微鏡にこの分光器を組み込むことで、オプティカルセクションングにより深さ方向の情報の取り込み可能な共焦点ブリルアン顕微鏡システム（図 1d）構築し、高速・高分解能で 3 次元弾性イメージングを行い、試料の局所的な粘弾性情報とその空間分布計測を実現達成した。

試料の粘弾性特性を示す貯蔵弾性率  $M'$ 、損失弾性率  $M''$  は、それぞれ複素縦弾性率  $M^*$  の実部および虚部に対応し、測定から得られるパラメータブリルアン周波数シフト  $\nu_B$ 、スペクトル幅  $\Delta\nu_B$  (full-width at half-maximum, FWHM) を用いて以下のように記述することができる。

$$M^* = M' + iM'' = \left[ \frac{\lambda \nu_B}{2n \cos(\theta/2)} \right]^2 \rho + i\rho V^2 \frac{\Delta\nu_B}{\nu_B}$$



ここで、 $\rho$ : 試料密度,  $V$ : 音速,  $\lambda$ : 波長,  $n$ : 屈折率,  $\theta$ : 散乱角である。分光器の性能確認は、ブリルアン周波数シフト、スペクトル幅が既知の試料(水, メタノール等)の測定で実施し、ノイズレベル、周波数感度を確認した(図2)。さらに、高速計測性能の確認は、紫外線硬化樹脂(光学接着剤 Norland® 61)の硬化(化学架橋)過程の観測により実施する。本光学接着剤は、紫外線照射後、数十秒で初期硬化、数十分で完全硬化するため、性能確認に最適である。蓄積時間(integration time)は1秒を達成した(図3)。

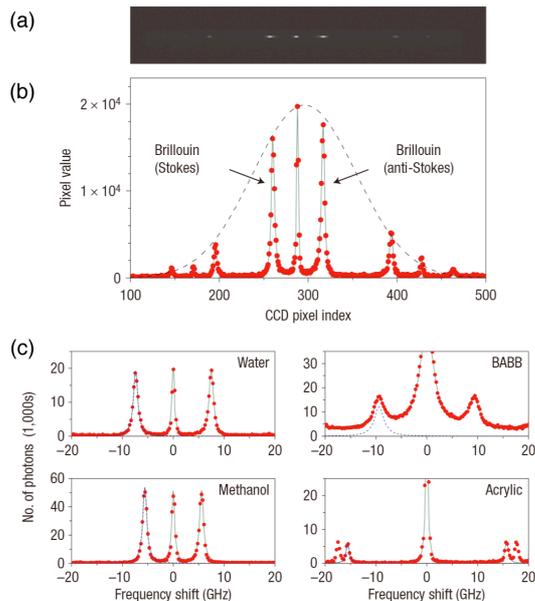


図2 (a) & (b)蒸留水のブリュアン散乱から得られた CCD アウトプットの例, (c)水, メタノール, Benzyl benzoate およびアクリルガラスからのブリュアンスペクトル

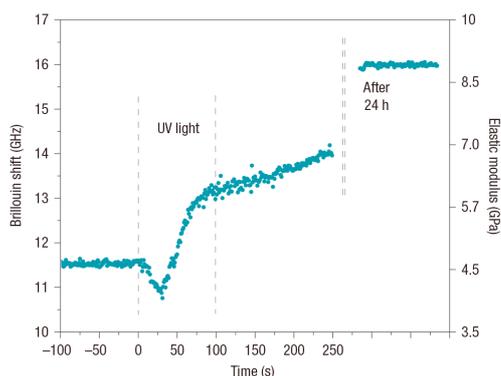


図3 光学接着剤 Norland® 61 の硬化(化学架橋)過程における弾性率変化の実時間観測

## (2) 水晶体の3次元弾性イメージング(摘出水晶体の in vitro 測定)

水晶体線維は新旧の形成に応じ、周辺部の水晶体皮質と中心部の水晶体核に分けられる。水晶体皮質には水晶体線維が形成するラ

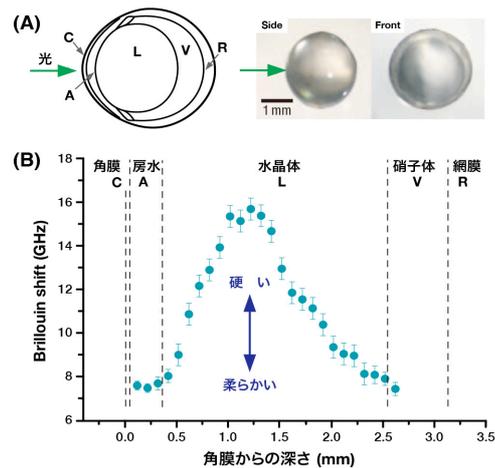


図4 マウス水晶体の in situ 測定の結果

(A)左: 眼球の断面図, 右: 測定後摘出した水晶体(矢印はレーザー光の入射方向を示している), (B)光軸に沿ったブリュアン散乱光の周波数シフト。シフトが大きい程高い弾性率を有する。測定結果は、水晶体中心部(水晶体核)が硬いことを示している。

メラ構造が確認されるのに対して、水晶体核では水晶体線維が古く明確なラメラ構造は消失している。従って、水晶体核をコア、水晶体上皮をラメラ構造型シェルとするコア・シェル構造を有する超分子構造体ゲルと捉えることが出来る。水晶体の硬化は、加齢による調節力の低下と密接に関連していると考えられる。そこで研究成果(1)で作成したブリルアン散乱システムを利用して、マウス正常眼の摘出水晶体の測定を行った。水晶体表面方向 100 $\mu$ m ステップで弾性率計測を行い、水晶体ゲルの粘弾性情報の空間分布を明らかにした。測定では、個体差を顧慮し、統計を良くするために、それぞれの条件で  $n = 20$  程度の測定を行った。図4に示すように、光軸に沿ったブリュアン散乱光の周波数シフトは中心部ほど大きくなり、水晶体中心部(水晶体核)が硬いことを非侵襲的に明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

[1] K. Mortensen, M. Annaka, Structural Study of Four-Armed Amphiphilic Star-Block Copolymers: Pristine and End-Linked Tetronic T1307, *ACS Macro Lett.*, **5**, pp.224–228 (2016). DOI: 10.1021/acsmacrolett.5b00936

[2] M. Fujiki, K. Mortensen, S. Yashima, M. Tokita, M. Annaka, Friction Coefficient of Well-Defined Hydrogel Networks, *Macromolecules*, **49**, pp.634–642 (2016). DOI: 10.1021/acs.macromol.5b01997

[3] K. Mortensen, M. Annaka, Silsesquioxane nano-particles used for modifying properties of

polymer hydrogels, and used to control X-ray contrasts. A combined X-ray and neutron scattering study, *Colloid and Polymer Science*, **293**, pp. 3353-3360 (2015).  
DOI 10.1007/s00396-015-3716-3

〔図書〕（計1件）

[1] *Rheology of Bio-related Soft Matter: Fundamentals and Applications*, Springer, 2016.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安中 雅彦 (MASAHIKO ANNAKA)

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：40282446

### (2)研究分担者

松浦 豊明 (TOYOAKI MATSUURA)

奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10238959