

金ナノ粒子 / 誘電体多層膜と極短パルスレーザを用いた 生体コラーゲン SHG 顕微鏡におけるイメージ・コントラストの超増強

徳島大学 ポスト LED フォトニクス研究所 山口堅三

Ultra-enhancement of Image Contrast in Biological Collagen SHG Microscopy
using Gold Nanoparticles/dielectric Multilayer Film and Ultra-short Pulse Lasers

Institute of Post-LED Photonics, Tokushima University
Kenzo Yamaguchi

第2高調波発生(SHG)は、生体組織中のコラーゲンの非染色かつその場観察を可能にする。これまでに、本技術を用いたラットの真皮層のコラーゲン繊維の2次元可視化に成功している。一方、局在表面プラズモン(LSP)は、生体イメージの信号光を増強させることのできる技術として注目されている。本研究では、反射SHG顕微鏡と金ナノ粒子(Au-NP)によるLSP共鳴を組み合わせ、ラットの真皮層のコラーゲン繊維からのSHG信号光の増強を明らかにした。ここでは、Au-NPを用いることで、SHG信号光を4倍増加させることに成功した。

Second harmonic generation (SHG) allows for non-staining, *in situ* imaging of collagen in biological tissues. We successfully achieved two-dimensional visualization of collagen fibers in rat dermis using this technique. A localized surface plasmon (LSP) is paid attention to one of key techniques as enhanced SHG contrast agents for biological imaging. In this research, we present the enhanced SHG signals from collagen fibers in rat dermis by combining a reflection-mode SHG microscope with LSP resonance using gold nanoparticles (Au-NPs). The SHG signal with Au-NPs was increased by a factor of 4 times compared to without Au-NPs.

1. はじめに

近年、超短パルスを有するレーザ光と生体の非線形相互作用を可視化する非線形光学顕微鏡が、非接触・低侵襲な生体可視化手段として注目されている。例えば、フェムト秒オーダーの超短パルス光を生体組織に照射すると、光の電場とコラーゲンの分子の非線形相互作用により、入射光の一部が波長変換され、光の半波長(あるいは2倍の光周波数)の光が第2高調波発生(second-harmonic generation: 以下SHG)光として発生する。生体中の非線形光学特性では、コラーゲンが特異的な高値を示すことから生体コラーゲンSHG顕微鏡(以下SHG顕微鏡)として、生体組織におけるコラーゲン線維のみを『生きたありのままの状態』で可視化できる。これは、コラーゲンの組織構造を維持する骨格のみならず、細胞の発生・分化・形態形成などを調節し、典型的な組織工学のアプローチとして目標な臓器の構造や再生医療の分野において有用である。このため、細胞から組織、器官へと高次構造化を進める上で非侵襲・非染色にコラーゲン動態を可視化する手段が望まれている。

先述のコラーゲン特有の高い非線形光学特性は、分子の3重螺旋構造の非中心対称性と、分子-細線維-線維-線維束といった規則的高次構造に起因する。一方で、培養組織や再生組織中のコラーゲンは、一般組織と比べ構造的に未成熟なため、非線形光学特性が小さく、SHG光が微弱となる。SHG画像は、発生したSHG光強度により画像化を行うため、本手法を再生医療分野へ展開するには、イメージ・コントラストの大幅な増強が望まれる(図1参照)。

コントラストの増強を達成する方法の1つとして、極短パルスレーザーのパルスエネルギーを維持したままパルス幅のみを狭窄化する方法があり、SHG光の発生効率は、パルス幅に反比例して向上する。しかしながら、試料への熱的ダメージは、パルスエネルギーに比例して増加する。したがって、侵襲性を低く維持したままイメージ・コントラストのみを増大することができる。このような考えに基づき、我々の研究グループでは、従来型の100fsオーダのパルス幅を持つレーザー光源に対し、5倍程度パルス幅が狭窄化された19fsのパルス光源を用い、発生効率の低い培養骨芽細胞産生コラーゲンの時系列可視化を行っている¹。この結果、SHG顕微鏡を用い、初めて同一個体におけるコラーゲン産生を時系列的に可視化することが可能となった。これに加え、3および4週目において、細胞外に分泌された線維状のコラーゲン同士がネットワーク構造を形成する様子など、従来の染色法では可視化困難であったコラーゲン動態を捉えることに成功している。しかしながら、1、2週目の培養初期のコラーゲン動態を可視化するには、コントラスト増強が不十分である。原理的には、パルス幅の更なる狭窄化によるコントラスト増強が可能であるのに対し、市販の極短パルスレーザーの性能や顕微鏡光学系における極短パルスの取り扱い(群速度分散によるパルス広がり)などを考慮すると、パルス狭窄化によるこれ以上のコントラスト増強は実現可能性に欠ける。

本研究では、ガラス基板上への金ナノ粒子を成膜することで、SHG顕微鏡におけるイメージ・コントラストの飛躍的な向上を目的とした。ここで、100fsのパルス幅で行った。

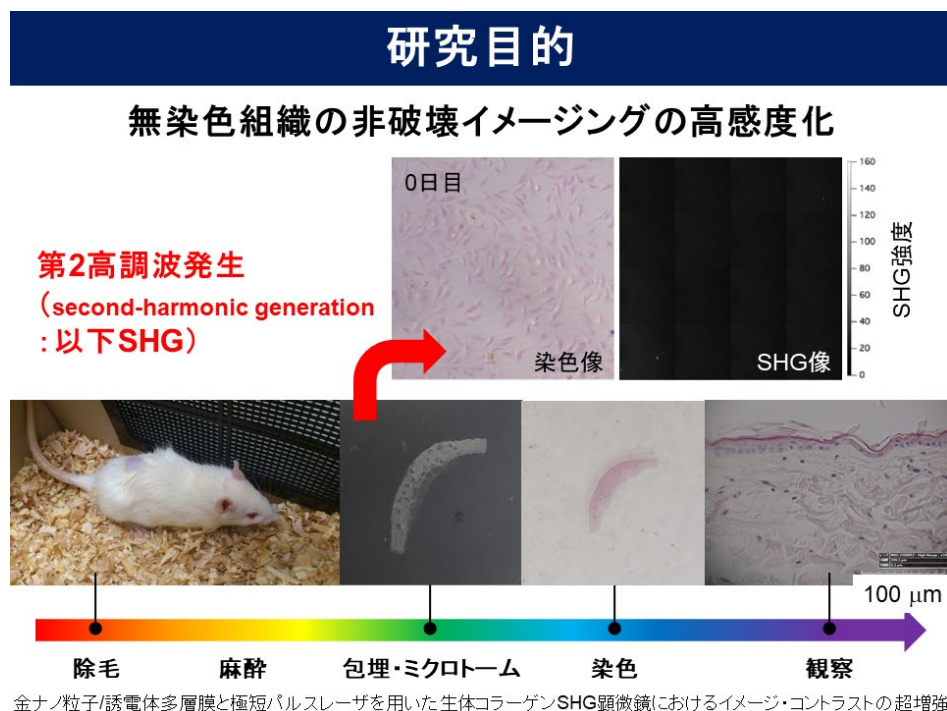


図1. SHGイメージングの高感度化.

2. 実験方法

金ナノ粒子内の自由電子と光の相互作用による増強電場(表面プラズモン)により、粒子近傍のコラーゲンから強い SHG 光を得る(図2参照)。つまり、図2の模式図のように、生体試料上に金ナノ粒子を2次元的に配列させ、反射 SHG によるイメージングを行い、表面プラズモンによるコントラストの増強を狙う。

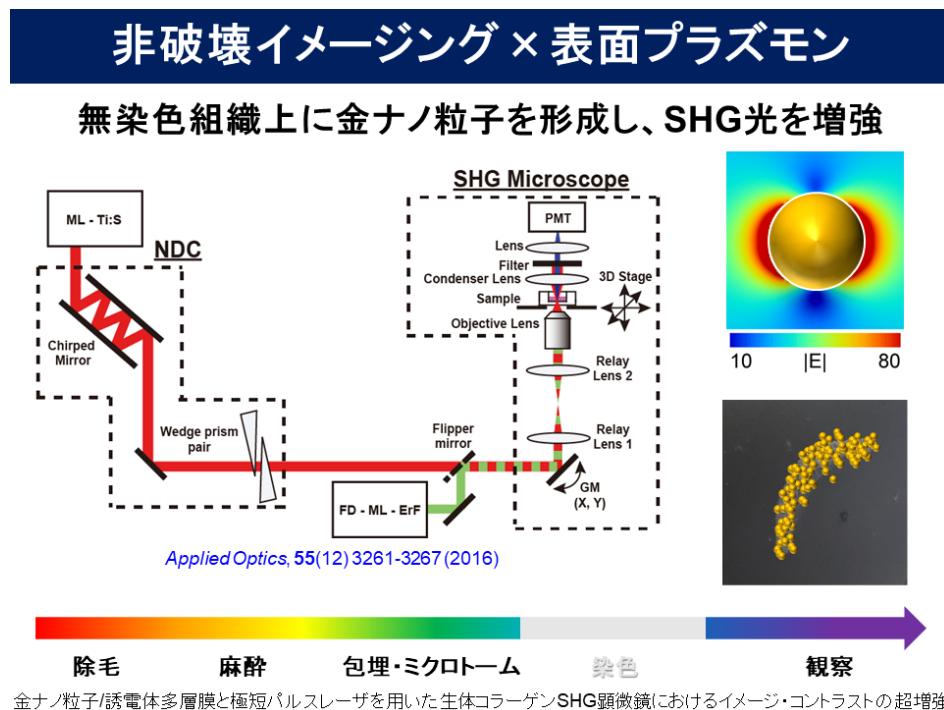


図2 金ナノ粒子を用いた SHG イメージ・コントラストの増強.

金ナノ粒子は、クエン酸還元法で、テトラクロロ金(Ⅲ)ナトリウム二水和物とクエン酸三ナトリウム、超純水を用い、合成した²。以下に、その合成手順を示す。

1. テトラクロロ金(Ⅲ)ナトリウム二水和物を超純水で、60mM に調整した(種粒子)。
2. クエン酸三ナトリウムを超純水で、3w/v% に調整した。
3. 80℃の超純水 100mL に、手順2で調整した溶液を 3.5mL 加えた後、手順1の種粒子 0.5mL を滴下し、80℃で3時間攪拌した。混合直後は、無色透明な溶液であったが、3～5分後に薄い赤色を示し、時間経過とともに徐々に濃い赤色となった。
4. 3時間後、自然下で常温に戻した。

コラーゲン SHG を一様に増強するには、生体試料上に表面プラズモンを誘起する金ナノ粒子を均一に分散させ、着ける必要がある。そこで、金ナノ粒子の配列手法には、移流集積法による自己集積化を用いた²。本手法は、金ナノ粒子の単相膜を最密構造で形成できることが報告されている。ここでは、n-ヘキササンと、n-オクチルアミン、超純水、合成した金ナノ粒子分散液をそれぞれ用いた。図3は、移流集積法による金ナノ粒子の配列法を示す。

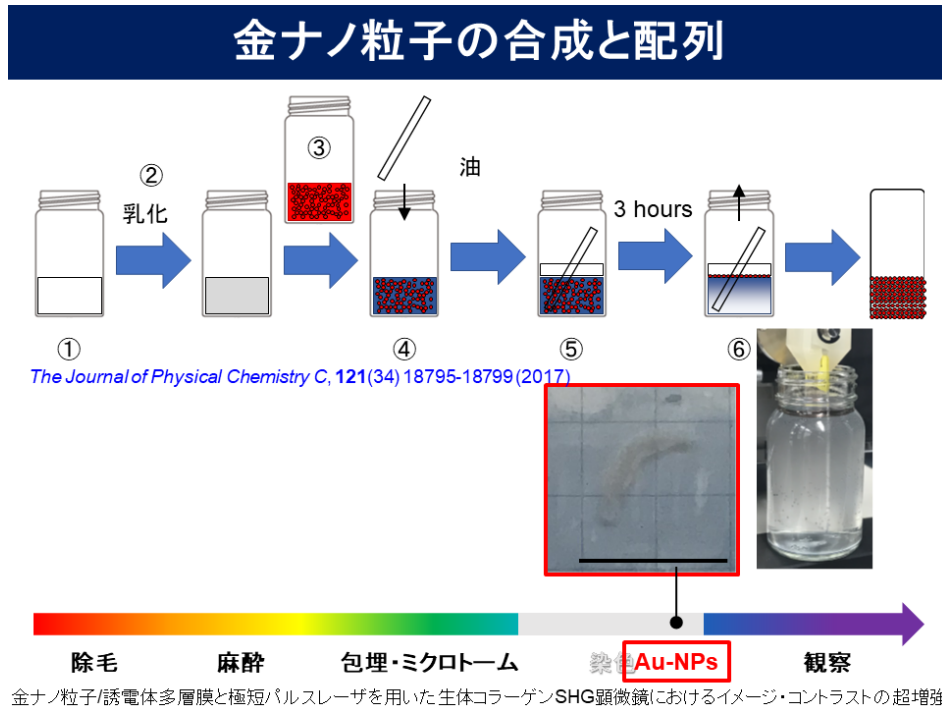


図3 化学的手法による金ナノ粒子の合成と、ディップコート法による2次元粒子配列.

1. n-ヘキサン溶媒に、n-オクチルアミンを滴下し、20mM に調整した。
2. 超純水 42mL に手順1で調整した溶液を 700 μ m 滴下した。次に、手で軽く振り混ぜた後に、超音波洗浄機で1分以上かけ、無色透明な溶液から白濁させた(乳化)。この工程が不十分な場合、金ナノ粒子を滴下した際に粒子が分散しない。
3. 手順2で調整した溶液に 14mL の金ナノ粒子分散液を滴下し、混ぜる。このとき、元々赤色の金ナノ粒子分散液が、オクチルアミンに修飾され青色に変化したことを確認した。ここで、粒子は疎水性の膜で覆われる。
4. ディップコーターを用いて、洗浄済みスライドガラスを手順3の溶液に垂直に浸す。
5. 手順4に、n-ヘキサンを 6mL を滴下し、3時間待つ。この間に金ナノ粒子が、水(超純水)と油(n-ヘキサン)の界面に浮上する。金ナノ粒子の水層から油層への相関移動は、n-オクチルアミン以外のアルキルアミンや各種アルキルチオールでも報告されている。
6. ディップコーターを用い、任意の速度で基板を引き上げる。一般的な移流集積法では、粒子が溶液中に一様に分散している。これに対し、提案手法は、水と油の境界に金ナノ粒子の層を形成するため、粒子膜形成モデルが異なる。

合成した金ナノ粒子や、金ナノ粒子を成膜したラット皮膚の光学ならびに電子顕微鏡や光学特性を評価した。そして、ラット皮膚コラーゲンに対する金ナノ粒子依存反射 SHG を計測した。

3. 結果と考察

合成した金ナノ粒子は、形成した粒径と形状を電子顕微鏡で観察した(図3参照)。直径20nm程度の球形の粒子が観測できた。また、ランダムに選択した粒子100個の粒径測定をヒストグラム化し、粒径のばらつきは正規分布に帰着すると考え、正規分布でフィッティングした結果、平均粒径は19.3nm、最頻値は18~19nm、標準偏差は3.3であった。なお、正規分布の確率分布関数は次の式を用いた。

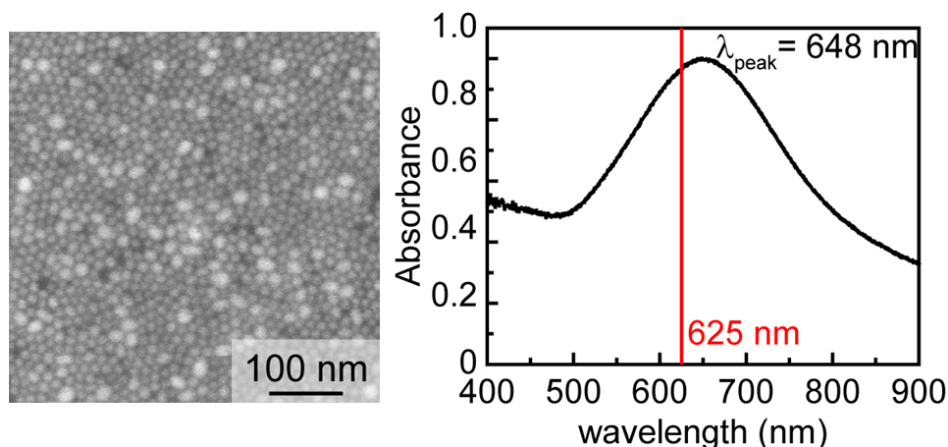
$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)$$

ここで、 σ と μ は、それぞれ標準偏差と平均である。

次に、合成した金ナノ粒子を用い、紫外可視赤外分光で吸光度を測定した(図4参照)。ここで、超純水をベースラインとした。波長648nmで吸光度ピークとなり、ブロードな共鳴波長を示した。これは、表面プラズモン由来の共鳴波長であり、ブロードさは先の粒径のバラつきに起因すると考える。

金ナノ粒子(Au-NPs)の特性

直径20 nmの金ナノ粒子の光吸収ピーク波長648 nm



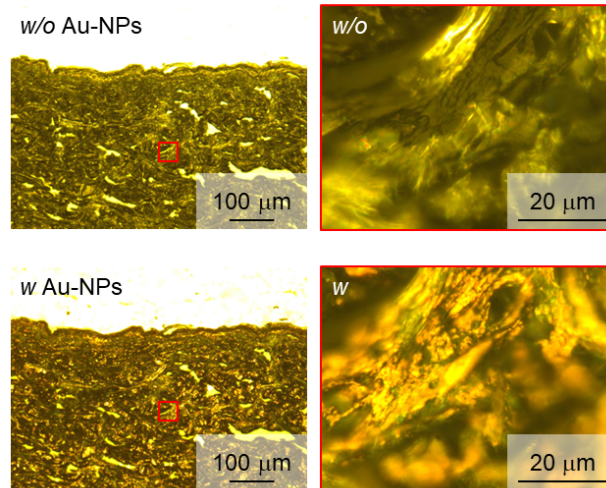
金ナノ粒子/誘電体多層膜と極短パルスレーザーを用いた生体コラーゲンSHG顕微鏡におけるイメージ・コントラストの超増強

図4 金ナノ粒子の電子顕微鏡像と吸光度特性

ラット皮膚上への金ナノ粒子配列前後での明視野顕微鏡像を図5に示す。ここで、赤枠部分と同一箇所での高倍率な顕微鏡像を取得した。金ナノ粒子を配列した結果、全体的に金属光沢な輝きが見られることから、金ナノ粒子がラット皮膚上を覆っていると考える。しかしながら、色が変わっていない部分もあったことから、不均一に金ナノ粒子が着いていると考える。

ラット皮膚上の粒子配列前後光学顕微鏡像

ラット皮膚コラーゲンリッチな真皮層上にAu-NPsを配列



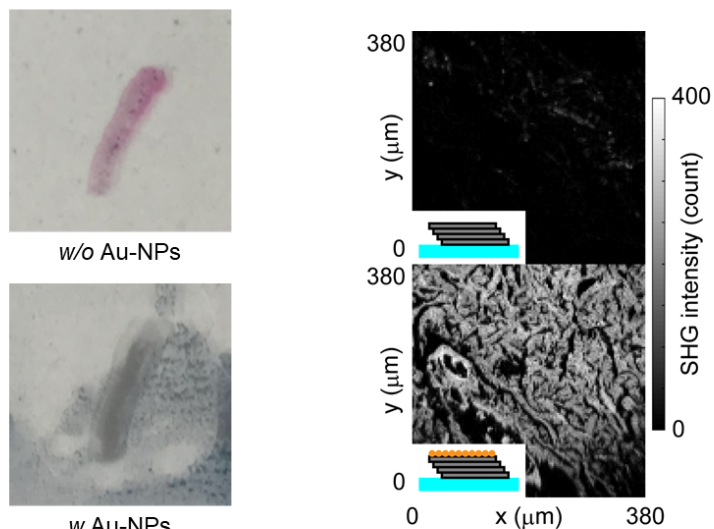
金ナノ粒子/誘電体多層膜と極短パルスレーザを用いた生体コラーゲンSHG顕微鏡におけるイメージ・コントラストの超増強

図5 金ナノ粒子有無/ラット皮膚の明視野顕微鏡像。

金ナノ粒子により増強されたコラーゲン由来のSHG増強度を求めるには、先にコラーゲン単体のSHG像を取得しなければならない。真皮層は、表皮側と皮下組織側で異なる組成をとるが、組織組成学において表皮側の真皮層での議論が多い。本実験では、表皮側でコラーゲンが密集する部分を測定箇所とした。図6は、金ナノ粒子配列前後における入射光波長1250nmにおけるSHG像を示す。なお、画像は、256×256pxの一辺246μmで、グレースケールは、光電子増倍管の光強度(count/px)を表す。金ナノ粒子配列前のSHG像から、白く見える部分で線維形状を確認した。このことから、SHGによってコラーゲンの可視化ができたと判断した。ただし、先にも説明したように、SHG光強度がかなり弱い。一方、金ナノ粒子配列後のSHG像では、コラーゲン特有の線維形状が僅かに確認できる程度であったが、SHG光強度が非常に強く現れた。また、同様な計測を他波長810nmと1040nmでも検討したが、入射光波長1250nmのSHG像が最も強く表れた。

金ナノ粒子でSHGコントラストを増強

波長1250 nmのとき、コラーゲンの反射SHGが最大

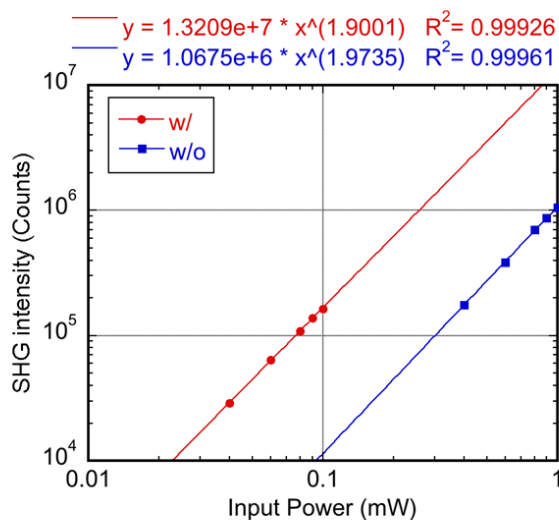


金ナノ粒子/誘電体多層膜と極短パルスレーザを用いた生体コラーゲンSHG顕微鏡におけるイメージ・コントラストの超増強

図6 金ナノ粒子によるSHGイメージ・コントラストの増強@ λ_{in} 1250nm.

金ナノ粒子有無/ラット皮膚に生じる入射光強度依存SHG光強度特性を図7に示す。ここで、ラット皮膚単体と金ナノ粒子/ラット皮膚を測定した。測定データは、最小二乗法で1次関数フィッティングを行い、傾きaを算出した。傾きが2に近いことから、SHG光を取得できたと判断した。また、金ナノ粒子有無でのSHG光のコントラスト増大を確認した。

入射光強度依存SHG光強度特性



金ナノ粒子/誘電体多層膜と極短パルスレーザを用いた生体コラーゲンSHG顕微鏡におけるイメージ・コントラストの超増強

図7 金ナノ粒子有無/ラット皮膚の入射光強度依存SHG光強度特性.

4. 結論

ディップコート法によるガラス基板上への金ナノ粒子を成膜することで、SHG 顕微鏡における生体組織のイメージ・コントラストの飛躍的な向上を実現した。本研究では、コラーゲンの非染色かつその場観察に加え、従来の4倍となるSHG信号光増強を観測した。ここでは、SP共鳴の中心波長648nm@直径20nmの金ナノ粒子が、入射波長1250nmのSHG波長625nmを網羅した。ただし、本結果が計測する上での最適な条件ではなく、金ナノ粒子の粒径つまり、共鳴波長の制御やパルス幅の狭窄化を検討することで、さらなるイメージ・コントラストの向上と、医用画像への応用を展開する。

5. 引用文献

1. Eiji Hase, Oki Matsubara, Takeo Minamikawa, Katsuya Sato, and Takeshi Yasui, “*In situ* time-series monitoring of collagen fibers produced by standing-cultured osteoblasts using a second-harmonic-generation microscope”, *Appl. Opt.* **55**, 3261 (2016).
2. Nobuyuki Takeyasu, Kenzo Yamaguchi, Ryusuke Kagawa, Takashi Kaneta, Felix Benz, Masamitsu Fujii, and Jeremy J Baumberg, “Blocking Hot Electron Emission by SiO₂ Coating Plasmonic Nanostructures”, *J. Phys. Chem. C.* **121** (34), 18795 (2017).
3. 山口堅三、長谷栄治、金村洋平、高成広起、岡本敏弘、原口雅宣、安井武史、『金ナノ粒子を用いたバイオイメージングにおけるコントラストの増強』、生体医工学シンポジウム 2019、2A-30、2019年9月。
4. Kenzo Yamaguchi, Eiji Hase, Toshihiro Okamoto, Masanobu Haraguchi and Takeshi Yasui, “Gold nanoparticles as enhanced SHG contrast agents for biological imaging”, Photonics West 2020: BiOS 2020, 11257-39, Feb. 2020
5. 関洋伸、山口堅三、長谷栄治、安井武史、岡本敏弘、原口雅宣、『金微粒子を用いた生体コラーゲン第2次高調波増強』、第69回応用物理学会春季学術講演会、23p-E303-6、2022年3月
6. 関洋伸、山口堅三、長谷栄治、安井武史、岡本敏弘、原口雅宣、『金微粒子を用いた生体コラーゲン第2次高調波増強の定量特性』、第69回応用物理学会春季学術講演会、22p-P01-13、2022年3月