

多光子顕微鏡を使用した、 骨コラーゲン線維のSHGイメージングと定量解析

骨は、体を支える硬い組織であるが、無機成分（カルシウムなど）は重量比で45%しかなく、その半分以上はコラーゲンを主成分とする有機質および水で構成されている。骨は、コラーゲン分子が束ねられたコラーゲン線維に、カルシウムとリン酸を主体とした無機結晶が沈着したものである。折れにくい丈夫な骨は硬くてしなやかだが、硬さは無機成分が、しなやかさはコラーゲンが担っている。北海道大学大学院 歯学研究院 薬理学教室の飯村浩忠先生、佐藤孝紀先生は、骨粗鬆症治療薬のひとつであるPTH製剤（テリパラチド）の薬理作用について研究されている。本アプリケーションノートでは、多光子顕微鏡によるSHG (Second Harmonic Generation)イメージングとAI技術を組み合わせ、骨のコラーゲン線維の配列を定量評価した例を紹介する。

研究の概要

飯村先生らはこれまでに、骨のコラーゲン線維を無染色で可視化し、その長さや角度を計測することにより、骨形成を評価する方法を確立した。さらに、骨粗鬆症モデルのカニクイザルにPTH製剤を投与すると、骨コラーゲン線維の配列を整える薬理作用を持つことを明らかにした（参考文献）。

実験内容と結果

まず、骨全体の特徴をとらえるため、正常なサル（マカク）の骨切片を用いて、その全体像のSHGイメージングを行った（図1）。骨はリン酸カルシウムの結晶で覆われているため、通常の組織観察ではミネラルを取り除く脱灰の手順が必要である。しかし、SHGイメージングでは、骨内のコラーゲン線維を脱灰せずにしかも無染色でイメージング可能である（図1中の青い蛍光シグナル）。今回観察した骨切片は、縦1.5 cm×横1.0 cmと大きく、かつ表面は平らではないため、イメージングの際はフォーカス位置の調整や厚みの相違の補正がポイントになる。このため、画像タイリングとZスタックを組み合わせることで撮影したが、これには膨大な時間がかかるため、撮影時間の短縮が課題であった。

新モデルの多光子共焦点レーザー顕微鏡システムAX R MPIは、従来モデルの約1.4倍の広い面積を撮影できるため、取得枚数を大幅に減らし、撮影時間を短縮することができた。対物レンズLambda Dシリーズは、視野の端まで均一でつなぎ目のないタイリング画像が取得できるため、今回のような大型標本の観察には最適であった（図1）。さらに、高速レゾナントスキャナーとDenoise.aiを組み合わせることで、平均化処理なしで低ノイズ画像が得られた（図2）。これにより、従来の数倍の速さで全体像が撮影でき、本実験においても、これまで数時間を要していた撮影が、数十分で実行できた。

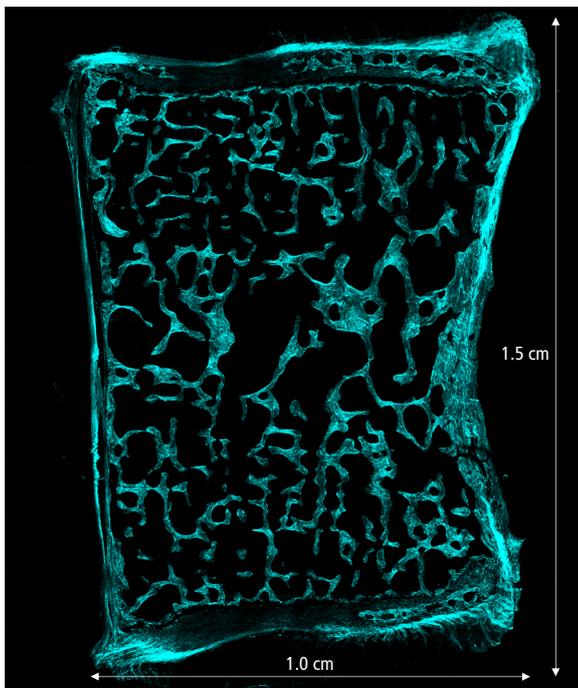


図1. サル非脱灰骨切片のSHG観察

画像取得：レゾナント1K + Denoise.ai
 対物レンズ：CFI プランアポクロマート Lambda D 10X (NA 0.45, WD 4.00)
 撮影枚数：1,320枚（画像タイリング：120枚×Zスタック（光学切片）：11枚）
 励起波長：920 nm

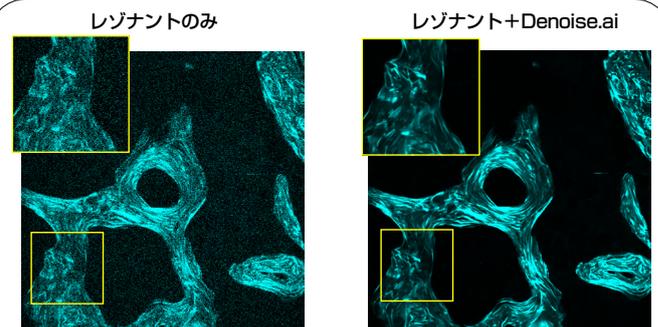
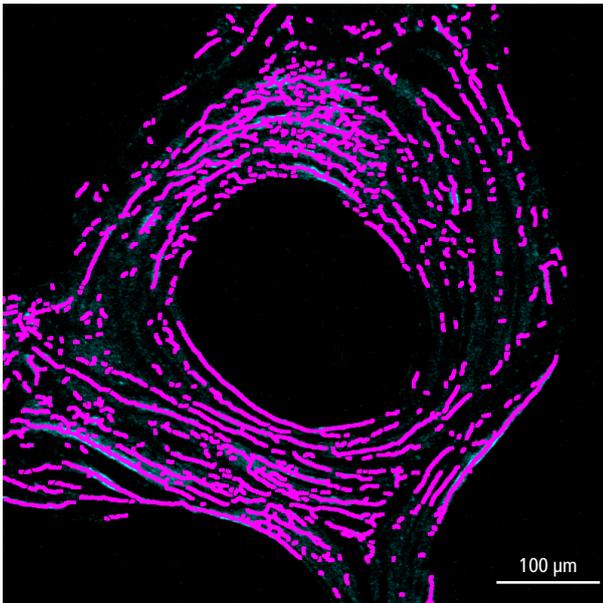


図2. Denoise.aiを使用したS/Nの改善

Denoise.aiは、事前学習済みのAIソフトウェアモジュールであるため、レゾナントスキャン画像のショットノイズを自動的に低減できる。

骨切片中央部



骨切片辺縁部

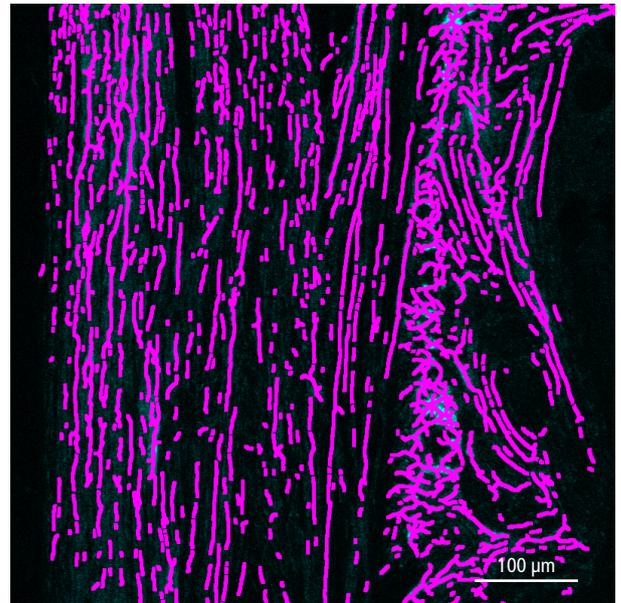


図3. SHG画像を用いた、コラーゲン線維の二値化画像

画像取得：レゾナント2K

対物レンズ：CFI75 アポクロマート LWD 20XC W (NA: 1.00, WD: 2.8 mm)

励起波長：920 nm

図3は、骨切片の中央部と辺縁部を20倍対物レンズで撮影し、コラーゲン線維を二値化処理した画像である。レゾナントスキャナーで高速Zスタック撮影することにより、光退色を最小限に低減できた。またAX R MPのレゾナントスキャナーは、画像解像度を最大2Kまで選択できるため、線維一本一本をクリアに検出できた。

骨形成の特徴は、線維を長さや面積などのパラメータで計測することにより定量評価できる。線維の向き（角度）を計測した例を図4に示す。コラーゲン線維の角度を、水平方向を0°として6つの角度パターン（0-30°/30-60°/60-90°/90-120°/120-150°/150-180°）に分類し、それぞれの割合を求めた。この結果から、骨切片の中央部では、さまざまな角度でコラーゲン線維が走っており、垂直方向（90°）のものが少ないことがわかる。その一方で、骨切片辺縁部では、主に垂直方向に走る線維が大きな割合を占める。

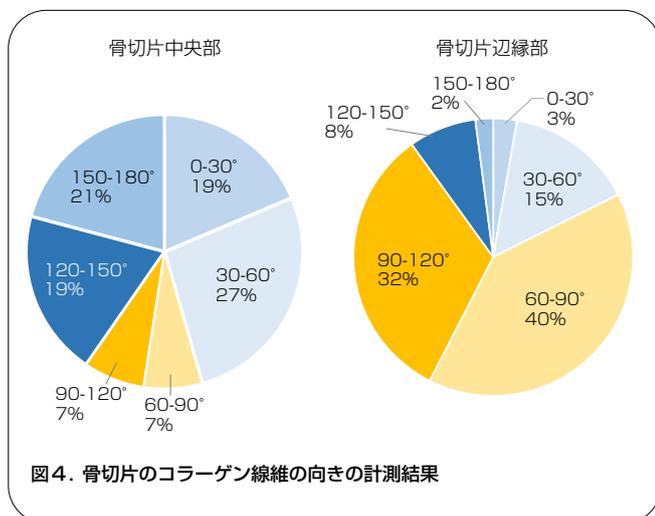


図4. 骨切片のコラーゲン線維の向きの計測結果

まとめ

飯村先生と佐藤先生の論文では、PTH製剤を投与した骨切片において、コラーゲン線維が直線状に規則正しく並び、太く長いコラーゲン線維が形成されることが示されている。PTH製剤の投与によって、骨にかかる力を逃す機構が働きやすくなり、しなやかな折れにくい骨が形成される。このように、SHGイメージングを用いた観察手法は、骨粗鬆症治療薬の新たな評価基準として非常に有益である。

参考文献

Microscopy (Oxf), 2021 Nov 24; 70(6): 498-509. doi: 10.1093/jmicro/dfab020.

A quantitative analysis of bone lamellarity and bone collagen linearity induced by distinct dosing and frequencies of teriparatide administration in ovariectomized rats and monkeys
Takanori Sato, Aya Takakura, Ji-Won Lee, Kazuaki Tokunaga, Haruka Matsumori, Ryoko Takao-Kawabata, Tadahiro Iimura

製品情報

高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム AX R MP

広視野・高速・高解像度の深部イメージングを実現。柔軟なサンプル設置を可能にする広いスペースを確保。

- ・ 広視野：視野数22
- ・ 高速：最速毎秒720フレーム（2048 x 16画素）/レゾナント
- ・ 高解像度：最大8K画素/ガルバノ、2K画素/レゾナント

