細胞集合組織の巨視的変形過程における
ひずみ複屈折の顕微鏡観察*海老澤 瑞枝^{*1}, 佐久間 淳^{*2}, 大谷 幸利^{*2}Microscopic Observation of Strain-Induced Birefringence
on Macroscopic Deformation Process of Biological TissueMizue EBISAWA^{*3}, Atsushi SAKUMA and Yukitoshi OTANI^{*3} Graduate School of Mechanical Systems Engineering, Tokyo University of A & T,
2-24-16 Nakacho, Koganei-shi, Tokyo, 184-8588 Japan

Macroscopic deformation of biological tissue shows the various behaviors of nonlinear, aeolotropic and so on. The mechanics of the deformation generally depend on the character of the microscopic cells which have complicated structures like substratum, membrane and wall. In the cells, the strain caused by macroscopic deformation is unevenly distributed because of its structures. But the structures cause difficulty in the observation of the strain distribution and the study on the deformation mechanics of the tissue. In this study, birefringence microscope is applied to observe the uneven distribution of the strain. The technique of the microscope with CCD has abilities to evaluate the phase difference and the azimuthal direction, and to observe the value distribution. The uniaxial and biaxial tensile testings and the some consideration are carried out to investigate the deformation mechanics of the tissue of a plant by using the microscope system.

Key Words: Biomechanics, Mesoscopic, Optical Measurement, Experimental Mechanics, Stress-strain Measurement, Biological Soft Tissue, Biaxial Tensile Test, Birefringence Microscopy

1. 緒 言

すべての生物体構造の基本単位である細胞は，細胞質基質およびこれを内包する細胞膜や細胞壁などで一般に構成されている．この細胞の集合組織の変形挙動について考えると，組織は基本的に同種の形状や機能をもつ細胞が周期性を持って配列しており，その巨視的変形はこれら細胞変形の積算として表れるものとなるから，そのメカニズムは細胞レベルの現象が重要な役割を果たすと考えられる．このような細胞の観察技術に関しては，まず一般的な光学顕微鏡の活用が想定できるが，屈折率をコントラストとして観察できるのみであり，変形による内部状態の変化までも観察することはできない．また，試料の複屈折に注目し，分子配向や内部応力を視覚化する偏光顕微鏡が古くから存在するが，定量的に欠け微小な複屈折の検出が困難であるため，力学的

挙動の観察に対しては不十分である．

しかし近年，生体組織の微小な配向状態や内部情報を定量的に観察できることから，顕微鏡型複屈折計測装置（以後 複屈折顕微鏡）⁽¹⁾ が観察技術として期待されている．特に CCD カメラを用いる複屈折顕微鏡では，観察像の画素毎に位相検出および複屈折位相差と主軸方位の解析が可能であることから，細胞集合組織におけるひずみ分布，或いは細胞内部のひずみ分布の検出も原理的に可能である．さらに，細胞集合組織に巨視的変形を与えた際の細胞レベルの複屈折挙動を観察する技術は，その変形メカニズムの解明には非常に有用と考えられる．

そこで本研究は，顕微鏡下で利用可能な細胞集合組織の引張試験機を製作した上で，観察が比較的容易な植物組織に与えた巨視的な変形挙動と細胞レベルの複屈折位相差の変化を観察することによって，組織の変形メカニズムを考察することを目的とする．特に，引張試験機を 2 軸負荷可能なものとすることで，細胞集合組織の異方性によって生じる細胞レベルの変形挙動に関しても考察する．

* 原稿受付 2006 年 5 月 19 日．

^{*1} 学生員，東京農工大学工学府 (☎ 184-8588 小金井市中町 2-24-16)．^{*2} 正員，東京農工大学工学府．

E-mail: 50004833203@st.tuat.ac.jp

2. 計測原理

2.1 ひずみ複屈折現象 内部に分子配向や組織構造の粗密などによって異方性が存在する物質について、さらにこれが偏光の向きによって異なる屈折率を有する場合、1つの透過光が2つに分けられることを複屈折 (birefringence) と呼ぶ。さらに、図1に示すように、外部からの力学的刺激に起因するひずみ等によって物質内部で異方性が励起されると、例えば負荷方向のその垂直方向の屈折率 n_1 , n_2 とで差が生じこれにより観察される複屈折を特にひずみ複屈折 (strain-induced birefringence) と呼ぶ。応力分布を実験的に計測する方法として広く知られている光弾性法も、この複屈折現象を利用したものである。

Fig.1 Strain-induced birefringence

これに対して、位相検出法を用いた複屈折計測法では、入射光の偏光状態を複数回変化させ、光強度を検出し解析を行う。これにより光弾性法では検出することのできない1フリンジ以下の微小な光学的異方性を定量的に検出することが可能となり、工業分野においては透明材料の品質検査にも用いられてきた⁽²⁾。さらに、微小な位相変化を検出する手法として、局所サンプリング法が提案されている⁽³⁾。これによってディテクタのダイナミックレンジに対して、わずかな位相変化による光強度の差が十分大きく得られるため、CCDを用いた2次元分布の計測においても高精度化が実現された。また、2次元計測で使用するレンズ系による光強度や偏光特性の空間的な不均一性については、位相減算による補正法を行うことで、全ての計測領域において定量的な複屈折計測が可能である⁽¹⁾。

一方で、光学フィルムや射出成形品の製造分野においては、面内の分布ではなく、ある1点から得られる分子の3次元的な屈折率情報に注目し、高分子材料の管理および評価を行う手法なども研究されている⁽⁴⁾⁻⁽⁶⁾。

2.2 複屈折の分布計測法

2.2.1 光学系の基本構成 図2に複屈折計測の光学系を示す。光源から出射された光は偏光子 P_{45° と $1/4$ 波長板 Q_{90° によって円偏光となった後、位相変調素子 $R_{\delta, \theta}$ によって任意の複屈折位相差と方位を与えられる。これを初期偏光状態とする。この光を試験片 $X_{\Delta, \phi}$ に透過させると、試験片の持つ複屈折により未知の偏光状態となるが、さらに検光子 $A_{\theta+45^\circ}$ を透過することで、光強度としてディテクタで検出させる。この検出光に次の解析を施すことによって、試験片の複屈折位相差 Δ と主軸方位 ϕ を導出することが可能となる。

Fig.2 Optical system

次に、この導出法について示す。入射光の偏光状態を表す Stokes パラメーター S について、これを素子毎に Mueller マトリクスによって変換することによって、出射光の Stokes パラメーター S' を求める。これと入射光強度 I より、位相変調素子を i 回変調させたときの位相差 δ_i および方位 θ に対応する出射光の検出強度 I_i の理論値が次式で表される。

$$I_i = \frac{1}{2} I [1 - \sin\{\tan^{-1}(\Delta \cos(2\theta - 2\phi)) + \delta_i\}] \quad (1)$$

2.2.2 局所サンプリング法 ここで、式(1)中の試料の複屈折位相差と主軸方位を含む位相 Φ_θ を

$$\Phi_\theta = \tan^{-1} \Delta \cos(2\theta - 2\phi) \quad (2)$$

とおき、式(1)を次式のように書き直す。

$$\begin{aligned} I_i &= \alpha(1 + \beta \sin(\Phi_\theta + \delta_i)) \\ &= a_0 + a_1 \cos \delta_i + a_2 \sin \delta_i \end{aligned} \quad (3)$$

$$a_0 = \alpha, a_1 = \alpha\beta \sin \Phi_\theta, a_2 = \alpha\beta \cos \Phi_\theta$$

試料のもつ複屈折位相差が微小な場合、図3(a)のような通常のサンプリングでは、試料無しの初期状態の点線と位相変化後の実線それぞれに対するサンプリング点○、●の光強度差が小さくなり、結果としてディテクタのノイズの影響を受けやすくなる。そのため局所サンプリング法では、位相変調素子 $R_{\delta, \theta}$ によって複屈折位相差 δ_i を $270^\circ \pm \alpha$ の範囲

に変化させて、さらに試料のもつ複屈折に合わせ検出器のダイナミックレンジを最大に利用可能な検出範囲を図(a)の破線領域の様に定義する。この領域に対して位相検出を行うと、図3(b)に示すように、ディテクタのダイナミックレンジに対してわずかな光強度の差が十分大きく得られ、高分解能な計測が可能となる。

Fig.3 Light intensity against phase difference

さらに、実際に検出される光強度 I'_i と上述の理論値 I_i の差が最小となるような a_0, a_1, a_2 を決める最も確からしい位相 Φ_θ を求める。特に最小二乗法によっては、行列を用いて式(4)が得られる。

$$\begin{bmatrix} N & \sum_i \cos \delta_i & \sum_i \sin \delta_i \\ \sum_i \cos \delta_i & \sum_i \cos^2 \delta_i & \sum_i \sin \delta_i \cos \delta_i \\ \sum_i \sin \delta_i & \sum_i \sin \delta_i \cos \delta_i & \sum_i \sin^2 \delta_i \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \sum_i I'_i \\ \sum_i I'_i \cos \delta_i \\ \sum_i I'_i \sin \delta_i \end{Bmatrix} \quad (4)$$

式(4)と式(3)より位相 Φ_θ が得られ、さらに位相変調素子によって与える複屈折位相差 δ_i を 90° で対称となるように N 回変化させることで、位相 Φ_θ は次式で表される。

$$\begin{aligned} \Phi_\theta &= \tan^{-1} \left(\frac{a_1}{a_2} \right) \\ &= \tan^{-1} \frac{[N \sum_i \sin^2 \delta_i - (\sum_i \sin \delta_i)^2] \sum_i I'_i \cos \delta_i}{[N \sum_i I'_i \sin \delta_i - \sum_i I'_i \sin \delta_i] \sum_i \cos^2 \delta_i} \end{aligned} \quad (5)$$

式(2)より θ を $0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ と変化させた $\Phi_0 \sim \Phi_{3\pi/4}$ から、複屈折位相差 Δ と主軸方位 ϕ は式(6), (7)で求められる。

$$\begin{aligned} \Delta &= \frac{1}{2} \sqrt{(\Phi_{\pi/2} - \Phi_0)^2 + (\Phi_{3\pi/4} - \Phi_{\pi/4})^2} \quad (6) \\ \phi &= \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{\Phi_{\pi/4} - \Phi_{3\pi/4}}{\Phi_0 - \Phi_{\pi/2}} \right) \quad (7) \end{aligned}$$

2.3 細胞集合組織の変形挙動観察 生命体の様々な活動を司る細胞は、必然的に複雑な内部構造を有するため、力学的にも非線形性や異方性など

を示して挙動評価が容易ではない。また、細胞内の原形質が有する流動性のため、ひずみによって励起される異方性が比較的小さくなるので、ひずみ複屈折に関しても微小な値が検出できる手法が有効と考えられる。

そこで次節では、微小な値が検出できる前節で示した局所サンプリング法による計測法を用いて、植物細胞組織を試験片としてひずみ複屈折を計測した結果を示す。特に、この組織が光学的に固有の異方性を有することから、顕微鏡下で試験片に変位を与えられる引張試験機を用いて、観察過程で変位を加えて得られる複屈折位相差を比較することにより、細胞レベルで生じるひずみ分布の観察を実施する。さらに、多軸応力状態にある生体組織の力学的挙動に関しても考察を加えるために、ここでは等2軸負荷の観察結果についても示す。

3. 植物組織の変形過程の観察

3.1 複屈折顕微鏡 本研究で使用する波長635nmのスーパーluminescentダイオード(super luminescent diode, SLD)を光源とした複屈折顕微鏡は、図4に示す様に、複屈折計測のための主要光学系として偏光子、1/4波長板、位相変調素子等を用い、さらに顕微鏡部として対物レンズと引張試験機を設置する試料ステージ等から構成している。本装置では50倍までの対物レンズまで対応でき、このときの空間分解能は $0.71\mu\text{m}$ である。

Fig.4 Birefringence microscope

3.2 2軸引張試験機 生体組織の力学試験を行う上で、実験環境や目的に合わせた試験機が重要となり、生体内に近い環境で組織片に2軸引張試験を行った例も報告されている⁽⁷⁾。本研究では、顕微鏡下で本格的な引張試験を行える2軸引張試験機を製作して使用した。この試験機の外観を図5(a)に、また機構を同図(b)に示す。

(a)

(b)

Fig.5 Biaxial tensile test machine

Fig.6 Displacement direction to specimen

この試験機は、図4の試料ステージ上に設置する必要性から、装置の設置面積を100mm×120mm以内に製作している。観察する試料は、試験機の中央にある台に設置された上で、加重直交方向の変位を拘束しないようにスリットを入れたアルミ箔を用いて、4方向から接着剤で固定してチャッキングを実現する。ただし図に示すように、この箔は観察の妨げにならないよう測定範囲から離れた位置で接着することとした。またこれは、測定部中心を原点とした直交軸上に設置した2対のリニアガイドの直動ステージにネジ固定され、また対向するステージは図(b)のようなSUS301箔を用いたプーリ型の等変位機構により、試験片の中心位置が保たれる仕組みとしている。さらに2対の直動ステージは、それぞれ

独立した小型サーボモーター(双葉電子社製 S3103)によって制御しており、単軸及び2軸で任意の変位を試験片に与える事が可能である。なお、モータと周辺装置の仕様より、可動変位は6.3mmで制御できる最小変位は0.005mmである。

3.3 実験条件 本報では、薄層の試料を安定して得られることから、試験片には玉葱の鱗片葉を用いることとし、これから約10×10mmの正方形試験片を切り出して観察することとした。この鱗片葉は、楕円体状の細胞の集合組織であることから、この細胞の長軸をx方向として以後の観察および考察の基準とする。

またここでは、図6に示すように、長軸方向のみの負荷(図(a))および短軸方向のみの負荷(図(b))に加えて、図(c)の様に等2軸負荷条件下で観察される複屈折現象についても考察することとした。この場合において、チャック用アルミ箔の先端間距離は5mmであって、これを便宜上の評点間距離とした。なお観察領域は、図6中では□枠にて模式的に表すが、本報では1×1mmで空間分解能は1.7μmである。

3.4 実験結果及び考察

3.4.1 長軸方向の単軸負荷 図7に長軸方向($u_x : u_y = 1 : 0$)へ引張りを実施した際の複屈折観察結果を示す。図中の矢印は引張方向を表している。

図(a)は負荷前の状態であってグレースケールは位相差を表している。この中で、格子状の白い部分は形状から細胞壁と考えられ、特に位相差が大きことから繊維質が配向した構造を有していると考えられる。これに対して格子形状の内部は位相差が比較的小さいことから、細胞壁と考える領域より繊維状物質が少ない光学的に等方的な状態と考えることができる。

負荷を加えていった図(b)および(c)の状態について観察すると、先の格子状の部分で位相差が増えているのに対して、その内部では減っていることが分かる。これは、格子部では繊維配向が顕著になっているのに対して、内部でも負荷前に存在した配向が与変位によって緩和されたと考えられる。つまり、細胞内部にも配向性を有する物質が存在し、それが特に長軸方向に対して直交する配向性を有する可能性が考えられる。

3.4.2 短軸方向の負荷結果 図8に短軸方向($u_x : u_y = 0 : 1$)へ引張りを実施した際の複屈折観察結果を示す。

負荷前の図 (a) と負荷を加えた図 (b) および (c) の結果を比較すると、長軸方向へ引張った図 7 の結果とは異なり、細胞壁と考えられる格子部での変化と比較して格子形状の内部で明らかに位相差が増加している事が分かる。

これは、負荷方向と直交して配向する格子部が引張りで生じる力を負担できず、結果として格子部での局所的なひずみ生成が少なかったと考えることが出来る。また格子内部での位相差増加については、

ここに配向性物質が存在するとの仮定で考えると、その配向程度が増して位相差増加に繋がったと考察可能である。特に、格子部とその内部境界周辺で不連続性が小さいことから、内部の物質は格子部と比較的強い結合を有している可能性がある。

3・4・3 等 2 軸負荷の結果 図 9 には、等 2 軸負荷 ($u_x : u_y = 1 : 1$) を実施した際の複屈折観察結果を示す。

負荷前が図 (a)、負荷を加えた図が (b) および (c)

(a) $u_x = 0$ mm
($\varepsilon_x = 0$)

(b) $u_x = 0.26$ mm
($\varepsilon_x = 0.052$)

(c) $u_x = 0.52$ mm
($\varepsilon_x = 0.104$)

Fig.7 Phase difference distribution(major axis)

(a) $u_y = 0$ mm
($\varepsilon_y = 0$)

(b) $u_y = 0.26$ mm
($\varepsilon_y = 0.052$)

(c) $u_y = 0.52$ mm
($\varepsilon_y = 0.104$)

Fig.8 Phase difference distribution(minor axis)

であるが、これまでの図 7-8 の結果と比較すると、負荷を加えていっても格子部およびその内部の両方で複屈折位相差の顕著な変化は観察されなかった。これは、試料の集合組織内の細胞が適切に配列されており、外部からの比較的等方な負荷に対しては組織を構成する全細胞が均等にひずむ構造を有しているためと考える事ができる。したがって、対象とした試料の玉葱の鱗片葉は、細胞の向きに方向性を有

してはいるが、力学的には均一な等 2 軸負荷条件に適応した構造との考察が出来る。

3・4・4 巨視的変形との関連性 図 7-9 の観察結果においては、細胞レベルでの挙動は負荷方向に応じて大きな差異が確認できた。本報で用いた引張試験機は、変位を与える機構のみで、スペースの制限から荷重を計測することが出来なかったが、既に長軸と短軸の負荷方向で巨視的な変形特性に差異がある事が確認されている⁽⁸⁾。

今後、この様な巨視的観察に関する研究に本報で示した手法を併せることによって、巨視的な変形に影響する細胞レベルの変形メカニズムについて従来より詳細に考察が可能となることが期待できる。

3・4・5 複屈折観察の可能性 複屈折とは量(複屈折位相差)と方向(主軸方位)をもつベクトル量であり、本報の複屈折計測法でも両パラメータを得ることができる。内部に構造を持たない試料については、本実験で使用した引張試験機を用いて 2 軸負荷を与え、その変位量と複屈折位相差および負荷方向と主軸方位での対応を確認している⁽⁹⁾。しかし、細胞集合組織である玉葱の鱗片葉では引張負荷に対して主軸方位に有意な差異は見られなかった。そのため本報では複屈折位相差のみに注目したが、組織固有の複屈折と力学的刺激によって生じた複屈折との関係をより厳密に考察するために、複屈折位相差と併せて主軸方位についても検討を行うことが今後の課題である。

4. 結 言

顕微鏡下で利用可能な 2 軸引張試験機を開発した上で、特に植物組織の引張り前後の複屈折位相差の変化を観察することにより、細胞集合組織の巨視的変形挙動に影響する細胞レベルの変形メカニズムを明らかにすることを目指した成果について示した。その結果については、以下のようにまとめられる。

- ・複屈折顕微鏡により、細胞集合組織の巨視的変形過程におけるひずみ分布の変化が比較的容易に観察できる。

- ・局所サンプリング法による位相検出を行うことで、細胞の変形過程で生じる微小な複屈折を検出することが可能である。

- ・試料とした植物組織である玉葱の鱗片葉では、負荷形態によって細胞レベルでの位相差分布に大きな差異があり、これにより細胞レベルの力学的構造の考察も理論的には可能である。

なお本研究を行うにあたっては、東京農工大学大学院 金廣 精一 君、および東京大学大学院 西村 浩

Fig.9 Phase difference distribution(biaxial)

一君に多大な協力を頂きましたので、この場をお借りして深謝申し上げます。

また本研究は、学術振興会・科学研究費(基盤研究C)17560064の援助の下で実施いたしました。

文 献

- (1) M. Ebisawa et al., Microscopic system for birefringence mapping, Journal of the Japan society for precision engineering, Vol.70, No.6(2004)828-832.
- (2) Y. Otani et al., Two-dimensional birefringence measurement using the phase shifting technique, OptEng., Vol.21, No.1-2(1994)1604-1609.
- (3) Y. Otani et al., The local-sampling phase shifting technique for precise two dimensional birefringence measurement, OptRev., Vol.1, No.1(1994)103-106.
- (4) Richard and S. Stein, Measurement of birefringence of biaxially oriented films, Journal of polymer science, Vol.24(1957)383-386.
- (5) N. Utsumi and T. Wada, Measurements of three principal birefringences of polymer films by inclination method, Journal of the society of fiber science and technology, Vol.28, No.11(1972)431-439.
- (6) H. Ito and Y. Kikutani, On-line measurement of molecular orientation in extension process (Review), Polymer processing, Vol.5, No.14(2002)287-292.
- (7) T. Tsuta et al., Computer simulation of facial expression(1st Report, Finite deformation analysis of hyper-elastic soft-tissue by the finite element method and identification of mechanical properties), Journal of the Japan society of mechanical engineers, Vol.58, No.551(1992)1107-1114.
- (8) S. Kanehiro et al., Observation of strain distribution in a cell of plant tissue systems under macroscopic deformation using birefringence microscope, Proceedings of 17th bioengineering conference (2005)285-286.
- (9) M. Ebisawa et al., Observation of gelatin under stress condition by birefringence, Proceedings of 18th computational mechanics conference, No.05-2(2005) 497-498.