

# 449 生体の非線形光学効果を用いた皮膚真皮コラーゲンの配向測定

## Determination of collagen orientation in skin dermis based on optical nonlinear effect in biological tissue

○ 安井 武史 (阪大院・基礎工)      東野 義之 (奈良医大・第1解剖)  
 正 荒木 勉 (阪大院・基礎工)

Takeshi YASUI<sup>a)</sup>, Yoshiyuki TOHNO<sup>b)</sup>, and Tsutomu ARAKI<sup>a)</sup>

a) Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka

b) Department of 1st Anatomy, Nara Medical University, Kashihara, Nara

We have proposed a new optical probe that can be used to characterize the orientation of collagen fibers in dermis. A specific probing ability for collagen results from the use of second-harmonic-generation (SHG) light induced by collagen molecules in the tissue. Based on the concept of tissue SHG light, a reflection-type polarization measurement system (named SHG polarimetry) with a probe light spot of 10  $\mu\text{m}$  in diameter has been constructed, and human dermis has been measured using this system. Resultant data exhibits that the dermis possesses approximately uniaxial orientation of collagen fibers. Furthermore, we have extended the SHG polarimetry to two-dimensional measurement. By the two-dimensional SHG polarimetry, we have observed a tangled structure of collagen fibers, which is highly consistent with the result of anatomical examination of the skin. The proposed method will be a powerful diagnostic tool for monitoring the structural change of collagen fibers in dermis.

Key Words: dermis, collagen, orientation, second-harmonic-generation light, femtosecond laser, polarization

### 1. はじめに

ヒト身体における最大の臓器と言われる皮膚は、表皮、真皮、皮下組織の3層構造からなる。これらの中で、真皮は皮膚の張り・弾性・水分保有の機能に深く関与している。このような真皮には構造タンパク質であるコラーゲンが豊富に含まれており、これが真皮の形態的及び機能的特性を決定する上で重要な役割を果たしている。コラーゲン分子とその集合体(マイクロフィブリル、原線維、線維、線維束)の構造的変化は疾病(皮膚ガン、コラーゲン病、火傷等)に関する重要な情報を与えるので、これらの変化をモニターするための診断技術が臨床及び基礎医学の分野で強く望まれている。

これまでにも、コラーゲン構造や配向を評価する手段として、電顕観測、X線回折、マイクロ波法、機械的特性、生化学分析、組織学的分析などが報告されているが、これらはいずれも侵襲的あるいは破壊的測定手法であり、解剖学的皮膚生検が必要である。このような生検に基づいた手法はコラーゲン構造の異常を実際に識別する上では信頼性が高いが、患者に対して非常に大きな負担を強要することになる。これ故、このような皮膚生検が本当に必要かどうかを判断するための予備診断が可能な非侵襲・非破壊的皮膚診断法が、強く望まれている。

このような非侵襲皮膚診断法を実現するための有力な手段が光プローブ法であるが、光コヒーレンストモグラフィーや蛍光測定をはじめとした従来法ではコラーゲン構造や配向の状態を詳細に測定することは困難であった。我々は、非線形光学特性を有するコラーゲン分子と超短パルス光の相互作用の結果として誘起される第2高調波発生光(SHG光)に注目し、この生体SHG光を用いたコラーゲン配向測定法に関する研究を行っている<sup>1)</sup>。ここでは、本手法を用いたヒト真皮のコラーゲン配向測定に関して報告する。

### 2. SHG光とは

SHG光は物質の構造非対称性に起因する非線形光学現象の1つである。SHG光の発生メカニズムは、音波における非線形現象と同様なメカニズムである。ここでは、まず音の領域

における非線形現象を考えてみる。図1に示すようにピアノの鍵盤に軽く触れると、その鍵盤に対応した基本音(周波数 $=f$ )が発生する。これは音の領域における線形現象である。しかし同じ鍵盤を力一杯叩くと、基本音以外に1オクターブ上の2倍音(周波数 $=2f$ )も同時に発生する。このような音の領域の非線形現象は、ピアノ構造の機械的非線形性に起因している。同様な現象は光の領域でも発生し、この場合には、生体組織中のコラーゲン分子がピアノ、超短パルス光が力一杯叩くことに相当する。すなわち、赤色の超短パルス光(周波数 $=\omega$ 、波長 $=\lambda$ )をコラーゲン含有組織に入射した場合、周波数が2倍(波長が半分)の青色パルス光(周波数 $=2\omega$ 、波長 $=\lambda/2$ )が発生し、これをSHG光と呼ぶ。

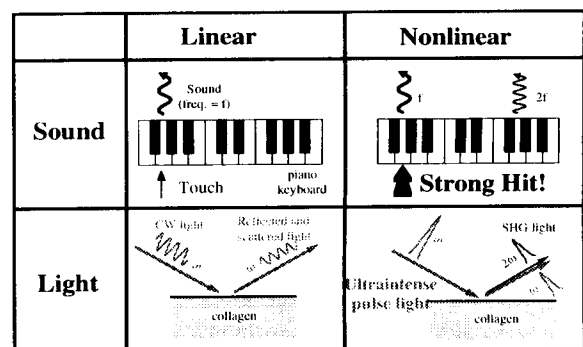


Fig. 1 Nonlinear phenomenon in sound and light.

このようにして発生する生体SHG光は、波長オーダーにおけるコラーゲン分子の構造的非対称性に起因しているため、コラーゲン分子(あるいは線維)の配向状態に敏感である。図2は、生体SHG光の発生における入射レーザー光の偏光状態とコラーゲン線維配向の関係を示している。すなわち、レーザー偏光とコラーゲン線維配向が平行な場合のみ生体SHG光は発生し、これらが直交した場合には発生しない。したがって、入射レーザー光の偏光解析によりコラーゲン線維の配向状態を評価することができる。

	Parallel	Perpendicular	
Polarization of incident light			
Collagen orientation	axial 	axial 	cross sectional 
SHG light			

Fig. 2 Relationship between laser polarization and collagen orientation with respect to generation of SHG light.

### 3. 実験装置及びサンプル

図3に実験装置を示す。レーザー光源にはモード同期チタン・サファイアレーザー（パルス幅=60fs、平均パワー=300mW、繰返周波数=87MHz、中心波長=808nm）を用いる。レーザーから出射された超短パルス光は、レンズによりサンプルに直径10 $\mu$ mで照射される。発生した生体SHG光は再びレンズによって集光され、残存した赤色レーザー光を青色フィルターによって除去した後、モノクロメーターで分光測定される。偏光解析では、偏光光学系（偏光子、 $\lambda/2$ 板、検光子、偏光解消板）を用いて入射レーザー光と検出SHG光の偏光状態を同期して回転させながら、その強度変化を測定する。またコラーゲン配向の分布測定では、サンプルを2次元的に走査することにより、2次元SHGイメージを得る。

ここでサンプルとして用いたヒト真皮は、ホルマリン固定されたヒト背中皮膚から上皮及び皮下組織を除去したもので、サイズは44mm $\times$ 55mm $\times$ 1mm厚である。また、比較のため、単一軸配向を示すヒトアキレス腱と等方的配向を示す組織培養用コラーゲンスポンジも準備した。

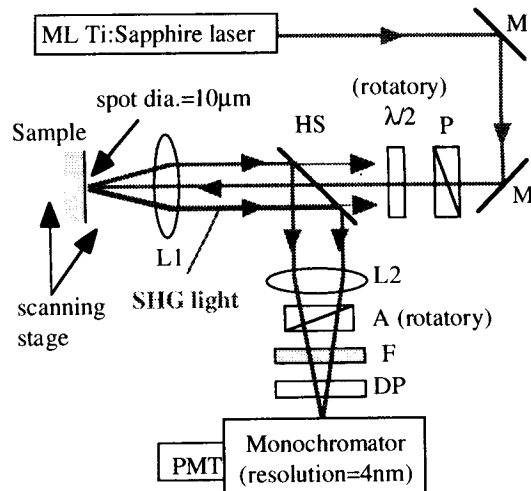


Fig. 3 Experimental setup. M: mirror, P: polarizer,  $\lambda/2$ : half waveplate, HS: harmonic separator, L1 and L2: lenses, A: analyzer, F: blue pass filter, DP: depolarizer, PMT: photomultiplier.

### 4. 測定結果

SHG偏光解析では、偏光角度に対するSHG強度分布を図4に示すような極座標形式（SHGレーダーグラフ）で表示する。ここで、0度（または180度）と90度（270度）はそれぞれ水平と垂直の偏光を示している。このSHGレーダーグラフの主軸と形状から、コラーゲン線維配向の絶対的方位と程度を評価することができる。例えば、ヒトアキレス腱の

場合、図4(a)に示すような8の字形状が得られた。これは単一軸配向に特徴的な形状であり、長軸方向に平行な配向が規則的に並んでいる一方でそれと直交する方向にはほとんど配向が存在しないことを意味している。一方、コラーゲンスポンジでは特徴的な主軸を有さない楕円形状となっており、これは等方的な配向を示唆している[図4(b)]。ヒト真皮の場合、アキレス腱とよく似た8の字形状であるが不完全である[図4(c)]。これは、コラーゲン線維の配向が比較的揃っているが、完全ではないためである。

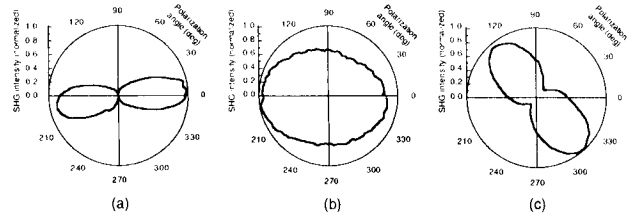


Fig. 4 Results of SHG polarimetry. (a) human Achilles tendon, (b) collagen sponge and (c) human dermis.

さらに、真皮の配向状態は測定部位に依存して、その方位及び配向程度が大きく変化した。そこで、2次元的なコラーゲン線維配向分布を評価するため、SHG偏光解析の2次元測定を行った。測定部位は10mm間隔毎の合計20点で、その結果を図5に示す。いずれの部位のSHGレーダーグラフも、図4(c)と同様、ほぼ単一軸的なコラーゲン配向を示しているが、その方位はかなりばらついている。すなわち、微視的には単一的なコラーゲン線維配向が、巨視的にはランダムに分布している。一般に真皮では、コラーゲン線維が絡み合った状態で存在しているが、これらの結果はこの事実を反映していると考えられる。

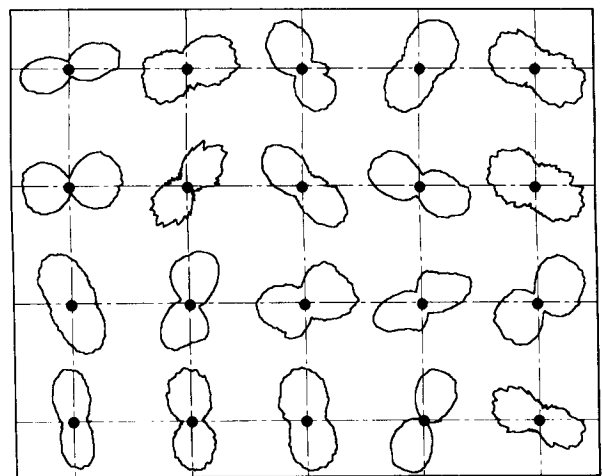


Fig. 5 Distribution of collagen orientation in human dermis.

### 5. まとめ

生体コラーゲンの非線形光学効果を利用した新しいコラーゲン線維配向測定法を提案し、ヒト真皮のコラーゲン配向評価に応用した。その結果、真皮コラーゲン線維特有の配向状態を確認した。本手法は、コラーゲン線維配向の定量的評価方法として期待される。

本研究は文部科学省科学研究費補助金(B)15300161の援助を得た。

### 参考文献

- [1]島林、安井、東野、荒木、”第二高調波発生光の偏光解析を用いた生体コラーゲンの配向計測”、第15回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp. 139-140 (2003).