

# 生体組織コラーゲンからの第2高調波発生光を用いた 火傷診断に関する基礎研究

佐々木邦彦\*、安井武史\*、東野義之\*\*、荒木勉\*

\*大阪大学大学院基礎工学研究科機能創成専攻

\*\*奈良県立医科大学医学部第1解剖学教室

e-mail: t-yasui@me.es.osaka-u.ac.jp

## 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。例えば、代表的な皮膚疾病である火傷では、その程度により治療方法が異なる。火傷の程度はその範囲（面積）だけでなく火傷深度（皮膚のどの深さまで障害が及んでいるか）が問題となる場合が多い。火傷深度は、Ⅰ度（表皮だけにとどまっているもの。発赤をきたすが、数日で治る）、Ⅱ度（真皮に達するもの。水疱をきたし、痛みが強い）、Ⅲ度（皮下組織まで達するもの。痛みがなく、羊皮紙様の皮膚となる。毛が簡単に抜ける）に大別できる。Ⅱ度はさらに到達深度によってⅡ<sub>s</sub>度（真皮上層）とⅡ<sub>d</sub>度（真皮下層）に大別できる。この火傷深度によって治療方法が異なり、Ⅱ度であれば皮膚組織・毛根・汗腺などから皮膚の再生が期待できるが、Ⅲ度では再生が期待できないため植皮などが必要となる。従来は医師による視覚・触覚によって判断されてきたが、受傷直後のⅡ度とⅢ度の識別は容易ではなく、数日してからはっきりすることが多い。感染症や過形成性傷痕（火傷のあと）の減少、コスト削減、入院時間の短縮などを実現するためには、非接触リモートで正確かつ速やかな火傷診断法が強く望まれる。

フェムト秒（ $10^{-15}$ 秒）オーダーの超短パルスレーザー光を生体組織に照射時、光電場

とコラーゲン分子の非線形相互作用の結果、入射レーザー光の半波長（あるいは2倍の周波数）の光が第2高調波発生光（生体 SHG 光）として発生する<sup>1)</sup>。我々は、この生体 SHG 光がコラーゲン情報を非接触リモートで測定する手段として有効であることに注目し、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>2, 3)</sup>。さらに本手法を真皮計測に応用し、その有効性を確認している<sup>4)</sup>。本講演では、生体 SHG 光を用いた真皮計測の応用例として、生体 SHG 光を用いた非接触リモート火傷診断法に関する基礎研究を報告する。

## 2. コラーゲンと生体 SHG 光

図1に示すように、コラーゲンは生体組織中において様々なサイズの構造集合体を構成しており、大きい方から線維束、線維、原線維、マイクロフィブリルとなっており、その基本単位がコラーゲン分子（トロポコラーゲン）である。ここで、コラーゲン分子を構成するポリペプチドの3重らせん構造が、光波長オーダーの非中心対称性構造を示すことになる。生体 SHG 光はこのような光波長オーダーで非中心対称性構造を有する物質において誘起され、生体組織ではコラーゲンからのみ特異的に発生する。したがって、この生体 SHG 光を計測することにより、生体組織中のコラーゲン情報を抽出することが可能になる。

このようなコラーゲン分子に熱を加えた場合、熱変性が始まってポリペプチド3重らせん構造がほどけ始めると生体 SHG 光強度が弱くなり、約 65°C を超すと生体 SHG 光は完全に消失する<sup>5)</sup>。したがって、このような生体 SHG 光の特徴を利用すると、真皮における火傷状態を生体 SHG 光から推測することが可能になる。

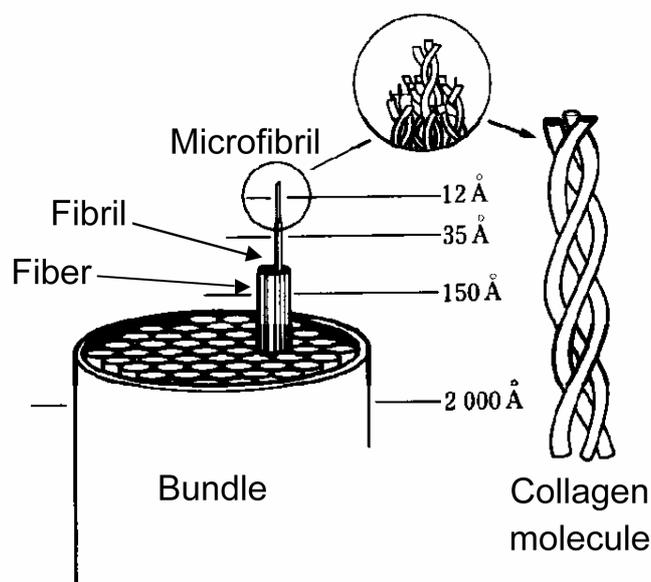


Fig. 1 Collagen molecule and aggregate

### 3. 実験装置

図 2 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 (Avesta Project, TiF-Kit-100、パルス幅=80fs、平均パワー=250mW、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、電気光学変調器 (AOM) で強度変調された後、対物レンズ (OL、 $\times 20$ 、 $NA=0.42$ ) によりサンプルに照射される。サンプルを、3次元機械ステージで走査することにより、イメージング測定を行う。後方散乱した生体 SHG 光 (波長 404nm) 及び基本波光 (波長 808nm) を再び対物レンズによって集光し、ビーム・スプリッター (BS) によって反射させる。青色 SHG 光と赤色基本波光は、ハーモニック・セパレーター (HS) によって分離される。青色 SHG 光は青色透過フィルター (BPF) を通過した後、光電子増倍管 (PMT) でロックイン検出される。一方、赤色基本波光は赤色透過フィルター (RPF) を通過した後、フォトダイオード (PD) でロックイン検出される。さらに深さ分解能向上のため、ピンホール (PH、直径  $50\mu\text{m}$ ) を用いた共焦点配置を導入している。このようにして、サンプル同一部位の共焦点 SHG イメージ及び共焦点反射イメージを同時取得する。本システムの面内空間分解能は約  $1.5\mu\text{m}$ 、深さ分解能は約  $15\mu\text{m}$  である。

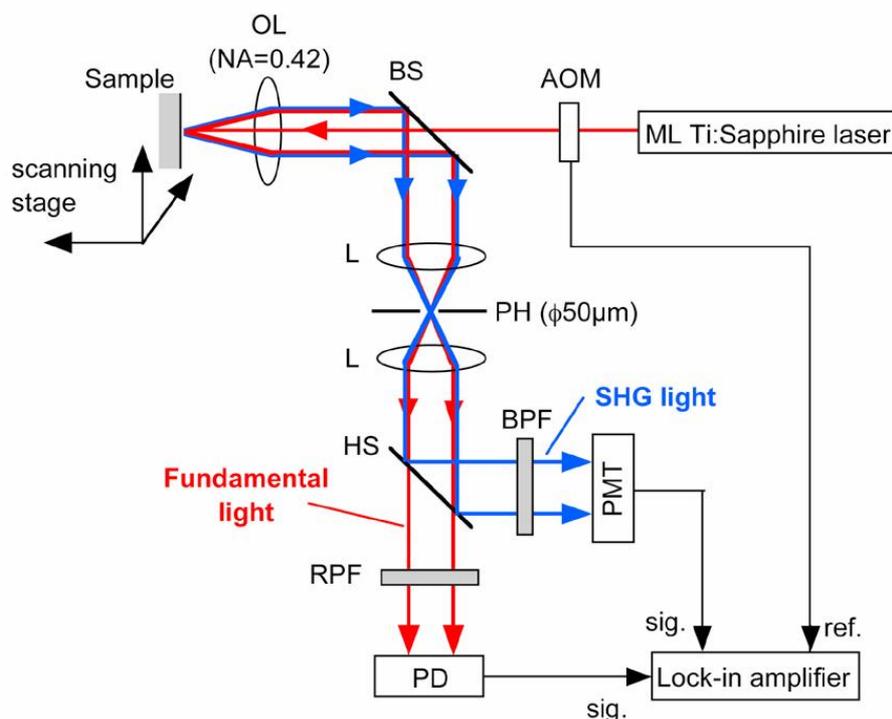


Fig. 2 Experimental setup. AOM: acousto-optics modulator, BS: beam splitter, OL: objective lens, L: lens, PH: pinhole, HS: harmonic separator, BPF: blue pass filter, PMT: photomultiplier, RPF: Red pass filter, PD: photodiode.

#### 4. 測定結果

測定に用いたサンプルは、生の若鶏手羽先を用いた。カッターによってスライスされたサンプル（2mm 厚）の半分の領域に対して、80 度に加熱されたアルミ板を約 10 秒間押し当てて火傷部位を作成した。火傷部位は、熱により軽く赤みを帯び、変色していることが肉眼で確認された。このようにして作成されたサンプルは、表面をフラットにするために 2 枚のスライドガラスに挟み込まれた。0 $\mu\text{m}$ （サンプル表面）、20 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、60 $\mu\text{m}$  の各深さにおいて、反射光（赤色基本波）及び SHG 光の 2 次元イメージング測定を行った。図 3 は、共焦点反射イメージを示しており、測定領域は 6mm\*6mm である。測定イメージの左側が正常部位、右側が火傷部位を示している。サンプル表面では火傷部位の信号が若干弱くなっているのが確認できるが、測定深度が深くなるとその差異が小さくなっている。同一部位の共焦点 SHG イメージは図 4 に示されている。サンプル表面では、正常部位からは強い SHG 光が観測されているのに対し、火傷部位からは SHG 光は観測されていない。また、火傷の有無が、高いコントラストではっきり示されている。さらに測定深度を 20 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$  と深くしていても、高いコントラストが保たれていることから、これらの深さまで火傷が到達していることが推測される。一方、深さ 60 $\mu\text{m}$  では左右両部位のイメージコントラストの差異が若干小さいことから、この深さでは火傷程度が若干緩和されていると考えられる。

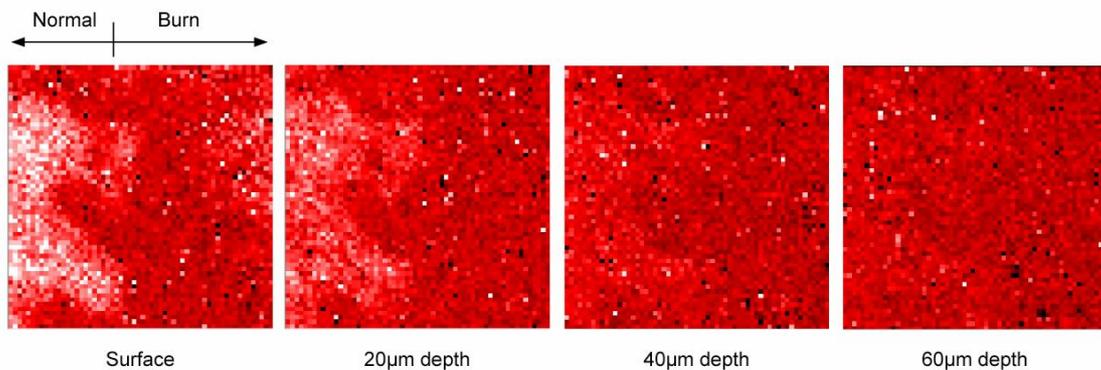


Fig. 3 Confocal reflected image of fresh chicken skin.

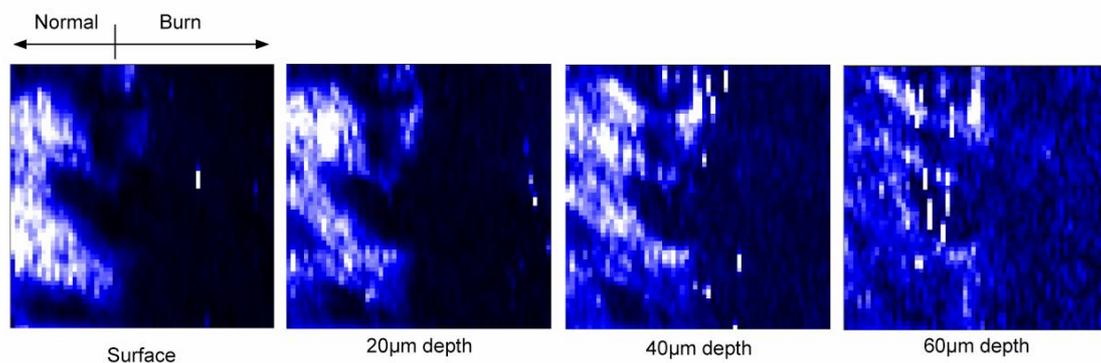


Fig. 4 Confocal reflected image of fresh chicken skin.

## 5. まとめ

コラーゲンの熱変性に伴う生体 SHG 光の強度減少を利用した非接触リモート火傷診断に関する基礎研究を行った。火傷深度の評価に関しては、深さ分解 SHG イメージングが有効であることを確認した。今後は、共焦点反射イメージと共焦点 SHG イメージの同時取得により、組織構造と火傷部位の同時測定を行う予定である。

本研究は文部科学省科学技術研究費補助金 16300155 及び 17200032 より援助を受けた。

## 参考文献

- 1) S. Roth and I. Freund, "Second harmonic generation in collagen", J. Chem. Phys., Vol. 70, pp. 1637-1643 (1979).
- 2) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, "Determination of collagen fiber orientation in human tissue by polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light", Appl. Opt., Vol. 43, pp. 2861-2867 (2004).
- 3) 荒木 勉, 安井武史, 『フェムト秒レーザーを利用した高機能生体計測』, 応用物理, Vol. 74, pp. 731-735 (2005).
- 4) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, "Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry", J. Biomed. Opt., Vol. 9, pp. 259-264 (2004).
- 5) T. Theodossiou, G. S. Rapti, V. Hovhannisyan, E. Georgiou, K. Politopoulos, and D. Yova, "Thermally induced irreversible conformational changes in collagen protein probed by optical second harmonic generation and laser-induced fluorescence" Lasers Med. Sci., Vol. 17, pp. 34-41 (2002).