

生体 SHG（第 2 高調波発生光）イメージングを用いた

ヒト真皮コラーゲン線維の *in vivo* 計測

安井武史*、高橋由*、東野義之**、荒木勉*

*大阪大学大学院基礎工学研究科（〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3）

**奈良県立医科大学（〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 番地）

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

<http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/>

要旨

真皮コラーゲン線維は皮膚性状を決定する上で重要な役割を果たしているが、その観察手段はこれまで染色法や電顕観測のような組織学的手法であった為、*in vivo* 計測への拡張が困難であった。本講演では、コラーゲン分子の非線形光学特性によって誘起される生体 SHG 光（第 2 高調波発生光）に着目し、生体 SHG イメージングを用いたブタ皮膚及びヒト皮膚における真皮コラーゲン線維の *in vivo* 計測を報告する。

1. はじめに

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、張りや弾性といった皮膚の形態的・機能的特性を決定する上で重要な役割を果たしている。このような真皮コラーゲンの構造異常や構造的変化を観察することは、皮膚性状を探る上で重要と考えられることから、真皮コラーゲンの変化をモニターするための診断技術が皮膚美容を始めとした皮膚科学分野で望まれている。通常は皮膚組織切片をコラーゲン染色し（ワンギーソン染色等）光学顕微鏡で組織観察を行うが、この場合は皮膚生検が必要である。一方、超音波エコーのような臨床診断法は皮膚組織全体の構造を *in situ* で可視化するという点では優れているが、その中からコラーゲン情報のみを抽出し詳細に評価することは困難であった。このような現状から、コラーゲン濃度や配向の局所断層情報を非接触で得る方法の開発が強く望まれている。

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すると、コラーゲン分子の非線形光学特性によって入射レーザー光の一部が波長変換され、半分の波長を有する第 2 高調波発生光 (SHG; second-harmonic-generation) が発生する[1]。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、生体 SHG 光を用いて様々なヒト組織のコラーゲン配向測定法に関する研究を行っている[2-4]。皮膚組織の場合、コラーゲンは真皮のみに豊富に含まれ(含有量 70wt%)、表皮および皮下組織にはほとんど含まれないことに注目すると、真皮コラーゲンの分布情報のみを特異的に抽出する手段として、生体 SHG 光が有効であると考えられる[5]。本講演では、ブタ皮膚及びヒト皮膚における真皮コラーゲン線維の *in vivo* 生体 SHG イメージングを報告する。

2. 生体 SHG 光を用いた真皮コラーゲン測定

コラーゲンの基本構造はポリペプチド鎖 3 重らせん構造からなるトロポコラーゲン (コラーゲン分子) であり、これが規則的に順次集合して階層的に太くなっていく。このコラーゲン特有の構造により、生体においてはコラーゲンから特異的に SHG 光が発生する。ここで皮膚に超短パルスレーザー光を照射する場合を考えると、コラーゲンが真皮のみに局在しているので、生体 SHG 光を用いることにより真皮コラーゲン構造の選択的計測が可能になる (図 1)。また、近赤外超短パルス光の良好な生体透過性を利用すると表皮越しに生体 SHG 光を誘起し、その後方散乱光を検出できる。それ以外にも、バックグラウンド光 (拡散反射光, 蛍光) との分離が容易、低侵襲、

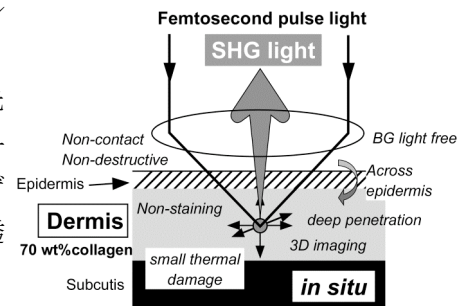


図 1 測定原理

深浸透性、熱的ダメージが小さい、3次元イメージングが可能といった特徴を有している。また、コラーゲン固有の非線形光学特性を利用するため組織染色が不要であり、生きたありのままの状態での *in situ* 測定も可能である。

3. 実験装置

図2に実験装置を示す。フェムト秒レーザー（波長 800nm もしくは 1250nm）からのレーザー光は、ガルバノミラー（GM）とリレーレンズ光学系（L）を経た後、対物レンズ（OL）でサンプル照射することにより生体 SHG 光を発生させる。透過配置計測では、生体 SHG 光の前方直進成分をコンデンサーレンズ（CL）で集め、フィルター（F）でレーザー光成分を除去した後、光電子増倍管（PMT1）で検出する。一方、反射配置計測では、生体 SHG 光の後方散乱成分を同じ対物レンズで集光し、ハーモニクセパレーター（HS）とフィルター（F）で抽出した後、別の光電子増倍管（PMT2）で検出を行う。

サンプルには、市販ブタ皮膚（Yucatan Micropig、米国チャールズ・リバー社）の背中部分を用いた。採取された皮膚組織は OCT コンパウンド（サクラファインテックジャパン社）で包埋した後、液体窒素で凍結される。透過配置計測では、凍結ブタ皮膚組織ブロックをマイクロームによって皮膚表面と平行方向に連続スライスすることにより、各皮膚深さでのブタ真皮切片サンプル（厚さ 16 μ m）を作成した。また、規則的な単一配向のコラーゲン構造を有するマウス腱（厚さ 10 μ m）をコントロールとして用意した。反射配置計測では、凍結ブタ皮膚組織ブロック（厚さ 5mm）をサンプルとして用いた。

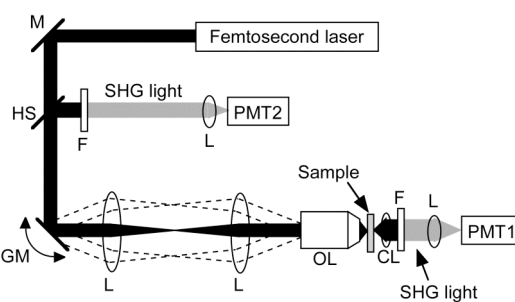


図2 実験装置

4. 測定結果

組織切片の透過 SHG イメージ（レーザー波長 800nm、イメージサイズ 400 μ m*400 μ m）を図3に示す。いずれのサンプルにおいても、コラーゲン線維分布が高コントラストな SHG イメージとして可視化できていることが分かる。マウス腱では、太く発達したコラーゲン線維が単一軸方向に規則性高く配向分布している様子が確認できる [図3(a)]。真皮サンプルに関しては、真皮上層（乳頭層付近）、真皮中層（網状層上部）及び真皮下層（網状層下部）をそれぞれ測定した。真皮上層部では、非常にキメの細かいコラーゲン線維が密に分布している様子が分かる [図3(b)]。表皮が真皮に落ち込んだ表皮突起部分は、表皮がコラーゲンを含有していないため、SHG 光の全く検出されない丸い領域として現われている。次に真皮中層部では、比較的太いコラーゲン線維が直交方向にゆるやかに交叉した網状分布が部分的に確認できる [図3(c)]。真皮下層部では、真皮中層部と同様に、太いコラーゲン線維が分布しているが、網状のコラーゲン線維分布は確認できない [図3(d)]。一般に真皮に含まれるコラーゲンはタイプ I コラーゲンが主であり、タイプ III コラーゲン等のタイプの異なるコラーゲンが若干混在している程度である。しかしながら、真皮表皮境界に近づくにつれタイプ III コラーゲンの比率が上昇する。タイプ

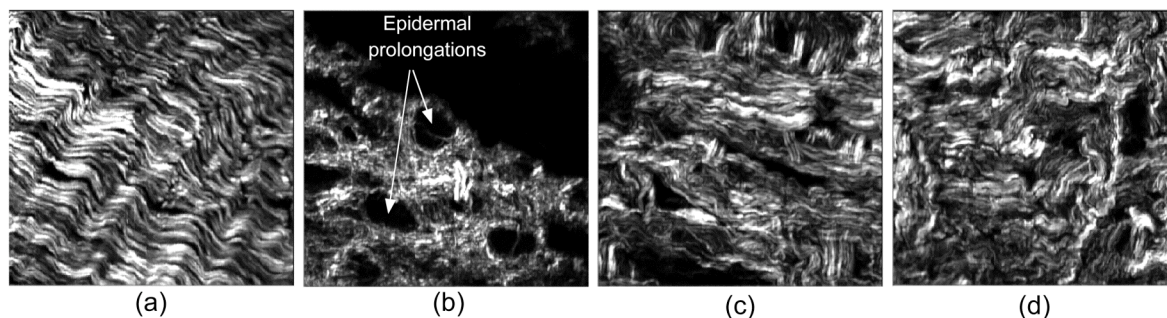


図3 組織切片の透過 SHG イメージ (400 μ m*400 μ m)

IIIコラーゲンは肌のキメの細かさを決定する重要なファクターであり、別名ベビーコラーゲンともいわれ新生児では50%程度の構成比となっている。乳頭層と網状層におけるSHGイメージの相違はコラーゲンタイプの含有率の違いによるコラーゲン線維構造の違いを反映していると考えられる。このように、生体SHG光イメージングを用いることにより、組織コラーゲン線維の詳細な分布情報を可視化することが可能になる。

実際の *in situ* 計測を考えた場合、上述の透過配置よりも反射配置での計測が現実的である。そこで、凍結ブタ皮膚組織ブロックの深さ分解SHGイメージングを反射配置で行った。図4は、皮膚表面を基準とした場合の各測定深度(20 μm 毎)で得られたSHGイメージ(レーザー波長1250nm、イメージサイズ200 μm *200 μm)を示している。生体SHG光は深さ90 μm 付近から観測され始め、この付近が表皮と真皮の境界付近であると思われる。それ以降では、オプティカル・セクショニングされたSHGイメージが深さ方向に連続的に変化している様子が分かる。例えば、真皮上層部(深さ90 μm ~150 μm)ではコラーゲン線維がキメ細かく分布している一方で、真皮下層部(深さ170 μm ~210 μm)では発達した太いコラーゲン線維が確認できる。また、真皮上層部の毛細血管と思われる黒い領域も確認できる[図4(b)中の矢印]。深さ250 μm 以上でも生体SHG光の信号は確認できるものの、生体組織内の多重散乱によりイメージがぼやけている。これらの特徴は、真皮切片サンプルのSHGイメージング結果(図3)と一致しており、真皮コラーゲン線維の3次元的な特徴が本手法によってとらえられている。

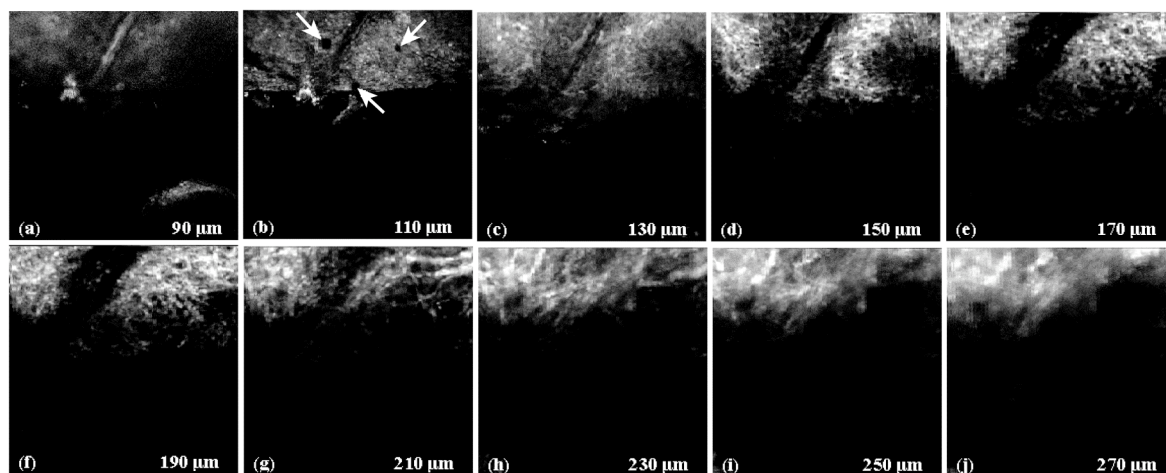


図4 真皮コラーゲン線維の深さ分解SHGイメージング(200 μm *200 μm)

5. まとめ

生体SHGイメージングを用いることにより、真皮コラーゲン線維の3次元分布をありのままの状態で見ることが確認された。さらに、ヒト皮膚の *in situ* 計測を行い、光老化を始めとした皮膚美容関連分野への応用を行う予定である。

本研究の一部は、科研費17200032及び18650121より援助を受けた。

参考文献

- [1] S. Roth *et al.*, *Biopolymers* **20**, pp. 1271-1290 (1981).
- [2] T. Yasui *et al.*, *J. Biomed. Opt.* **9**, pp. 259-264 (2004).
- [3] T. Yasui *et al.*, *Appl. Opt.* **43**, pp. 2861-2867 (2004).
- [4] T. Yasui *et al.*, *Opt. Quantum Electron.* **37**, pp. 1397-1408 (2005).
- [5] 伊藤誠啓他, *光学* **36**, pp. 35-40 (2007).