

偏光分解 SHG (第 2 高調波発生光) 顕微鏡を用いた光老化真皮におけるコラーゲン線維変性の観察

The observation of photoaged dermal collagen fiber by the polarization-resolved second-harmonic-generation (SHG) microscopy

○高橋由, 安井武史, 荒木勉

○Yu Takahashi, Takeshi Yasui and Tsutomu Araki

大阪大学大学院 基礎工学研究科

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

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

Photoaged skin which caused by UV exposure often shows deep wrinkles. However, it's still unclear why photoaged skin makes wrinkle. We measured collagen orientation in the normal and photoaged skin of hairless mouse by the polarization-resolved SHG microscopy with Cr:Forsterite laser. As the result, normal skin without wrinkles indicated collagen orientation parallel to the backbone, while photoaged skin with wrinkles indicated collagen orientation parallel to the wrinkle direction.

1. はじめに

皮膚は表皮・真皮・皮下組織の 3 層構造からなり, 真皮の 80% を占めるコラーゲン線維は, 張り・弾性といった皮膚の形態的・機能的特性を決定する重要な役割を担っている. そのため, コラーゲン線維の質や量の変化が, しわやたるみなどの皮膚の形態的な異常を引き起こす原因となる. このようなコラーゲン線維状態の変化は特に紫外線への露光によって急激に進行し, これを光老化と呼ぶ. 光老化が進行した皮膚では顕著にしわが増加することが知られており, 皮膚美容分野では光老化におけるしわ発生メカニズムの解明が進められている.

我々はしわが方向性をもった線状の形態を有することから, コラーゲン線維配向の変化がしわの発生に関与しているのではないかと考えた. これを明らかにするため, コラーゲン線維の配向状態を特異的に観察できる偏光分解 SHG 顕微鏡を用いて, 光老化をコントロールしたマウス皮膚の観察を行った.

2. 偏光分解 SHG 顕微鏡

コラーゲン分子は波長オーダーでの非中心対称構造から 2 次の非線形光学特性を有しているため, 生体構成物質の中で特異的に SHG 光を発生する¹⁾. コラーゲン線維から発生する SHG 信号強度は, レーザーの偏光方向とコラーゲン線維の配向方向が一致したときに最も強くなるため, レーザー光源の偏光を制御することによってコラーゲン線維の配向情報を得ることができる. 具体的には, 垂直偏光を入射したときの SHG 信号強度 I_V と, 水平偏光を入射したときの SHG 信号強度 I_H を測定し, 配向性パラメータ $\alpha = (I_V - I_H) / (I_V + I_H)$ を求める. α は -1 から 1 までの値を取り, α が 1 に近いときはコラーゲン線維の配向が垂直に近く, -1 に近いときは水平に近いことを表す. このような偏光制御機能を備えた SHG 顕微鏡を用いることで, 皮膚内のコラーゲン線維の配向性を定量的に評価することができる²⁾.

Fig.1 に実験装置を示す. 光源にはフェムト秒モード同期 Cr:Forsterite レーザー (中心波長 1250 nm, パルス幅 150 fs, 繰り返し周波数 90 MHz) を用いる. レーザー光の偏光方向は $\lambda/2$ 板によって制御され, 油浸対物レンズ (OL, N.A.=0.9, W.D.=350 μ m) を通ってサンプル上に集光される. サンプルから発生した生体 SHG 光は, ハーモニックセパレーター (反射波長=625nm) と赤外カットフィルターによって基本波成分 (中心波長 1250 nm) を除去した後に, フォトンカウンティング型光電子増倍管で高感度計測される. レーザーポットの高速 2 次元走査 (X 軸, Y 軸) には, ガルバノミラーと 2 枚のリレーレンズを用いている. また, 対物レンズをピエゾ駆動ステージ (移動ストローク 350 μ m) で光軸方向 (Z 軸) に移動させることにより, SHG イメージを取得する深さを選択することができる.

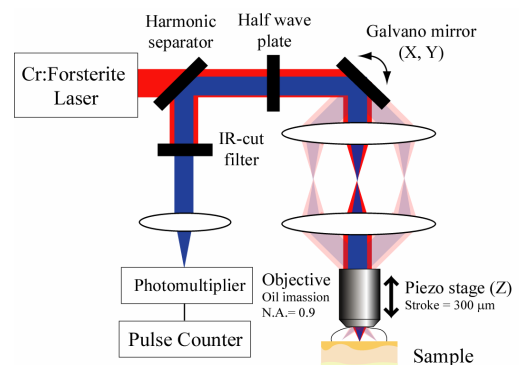


Fig.1 Experimental set up.

3. 実験サンプル

サンプルには 4 頭分のヘアレスマウス背中皮膚を用いた. サンプルの外観を Fig.2 に示す. 4 頭の内の 2 頭は紫外線の当たらない環境で飼育を行い, それぞれ生後 16 週齢と生後 22 週齢のコントロールマウスとした. これらの背中皮膚サンプルではしわは一切確認できず, 皮膚の形状に違いはほとんど見られなかつ

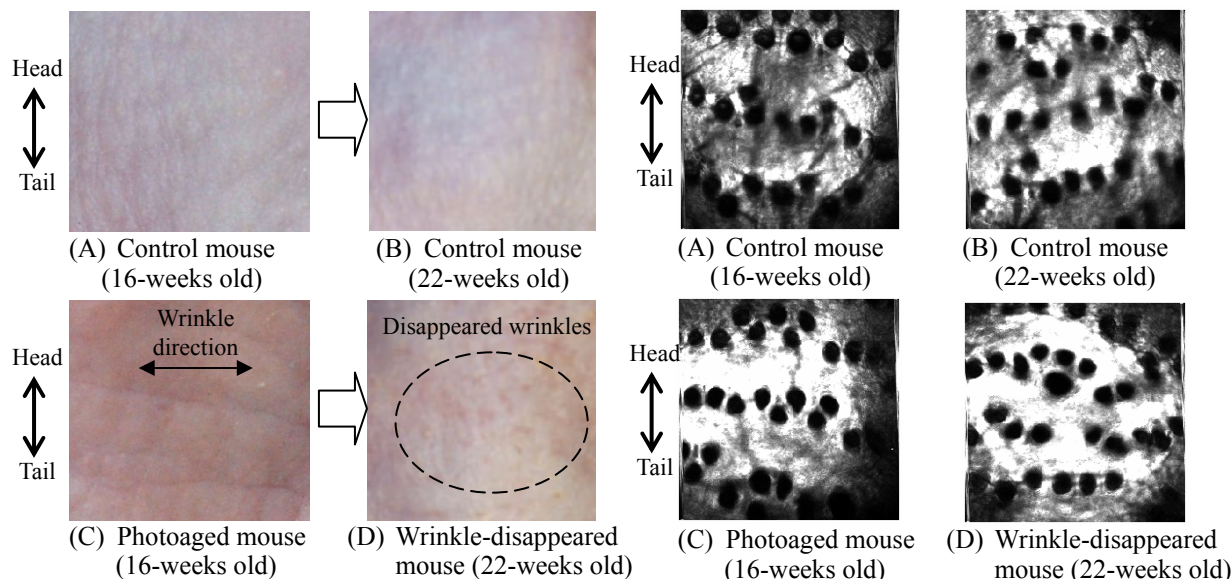


Fig.2 Back skin of hairless mouse.

Fig.3 SHG image of mouse skin at depth of 150 μm . Images size: 800 μm \times 800 μm .

た. 残りの2頭は生後6週から紫外線(UVB)を10週間断続的に照射し, 1頭は光老化マウス(生後16週齢)とし, もう1頭はさらに6週間紫外線の当たらない環境で飼育してしわ消失マウス(22週齢)とした. 光老化マウスの背中皮膚では, 体軀の左右方向に深いしわが走行しているのが確認できる(Fig.2(C)). 一方で, しわ消失マウスは皮膚組織の再生期間を与えることによってしわが顕著に減少していた. 今回の実験ではサンプルの表皮側からレーザー光を入射し, コラーゲン線維の配向状態を解析した. サンプルは, レーザーの垂直偏光とサンプルの正中線(頭→尾方向)が一致するように配置した.

4. 実験

Fig.3に, 皮膚表面から深さ150 μm のSHGイメージを示す. イメージサイズは800 μm \times 800 μm (256ピクセル \times 256ピクセル)であり, 各イメージの測定時間は10秒である. SHGイメージ上で明るく表示されている組織は全て真皮に含まれるコラーゲン線維であり, 真皮の大部分にコラーゲン線維が分布している様子が確認できる. しかし, 各サンプルの比較から光老化によるSHGイメージの明確な変化は確認できない.

真皮コラーゲン線維の配向性を定量的に評価するため, 深さ5 μm 毎に偏光分解SHGイメージを取得し, それらから配向性パラメータ(α)の2次元分布(α イメージ)を算出した. さらに, 各深さの α イメージから平均 α 値を算出し, これを深さごとにプロットしたものをFig.4に示す. Fig.4より, どのサンプルも深さによって α の値が大きく変化していないことがわかる. 16週齢, 22週齢コントロールマウスの α はほぼ同じ正の値を示しており, それぞれ 0.034 ± 0.004 (平均値 \pm 標準偏差)と 0.031 ± 0.004 で分布していた. 一方, 光老化マウスの α は -0.027 ± 0.005 と負の分布を示しているのに対し, しわ消失マウスの α は 0.0068 ± 0.005 と0に近い値を示した. 今回の実験では垂直偏光が正中線方向と平行になるように調整しているため, α が正の場合はコラーゲン線維が頭→尾方向に配向していることを表し, 負の場合は体軀の左右方向に配向していることを表す. Fig.4の結果と照らし合わせると, しわの状態とコラーゲン線維の配向状態にはある程度相関が見られ, 特にコラーゲン線維が体軀の左右方向に強く配向しているとき(α が小さいとき)にしわが生じているような傾向が見られた.

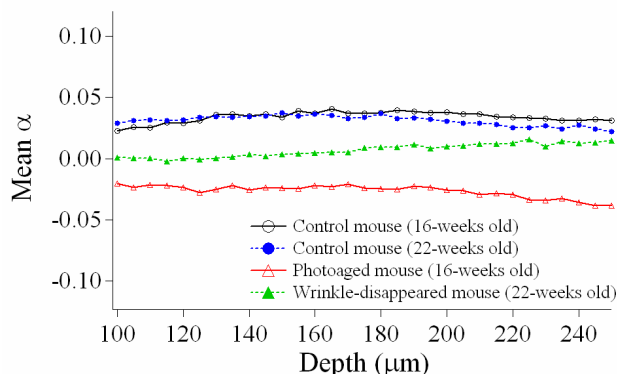


Fig.4 Depth dependence of collagen orientation.

5. まとめ

偏光分解SHG顕微鏡を用いることで, 光老化によって生じたしわの状態とコラーゲン線維配向には, ある程度の相関があることがわかった. 今後は, 光老化におけるしわの形成過程のコラーゲン線維配向にも注目し, 観察を行っていく予定である. 本研究は科学技術研究費補助金20240044より援助を受けた.

文献

- 1) S. Roth et al., "Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon", *Biopolymers* **20**, pp.1271-1290 (1981)
- 2) T. Yasui, *Opt. Quantum Electron.* **37**, pp.1397-1408 (2005).