偏光分解 SHG (第2高調波発生)顕微鏡による真皮コラーゲン配向の

イメージング

安井 武史^{1,2)、}荒木 勉²⁾

1) 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

(〒770-8506 徳島市南常三島 2-1)

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

Visualization of dermal collagen orientation with

polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy

Takeshi Yasui^{1,2)} and Tsutomu Araki²⁾

¹⁾ Institute of Technology and Science, The University of Tokushima,
2-1, Minami-Josanjima, Tokushima 770-8506, Japan
²⁾ Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3,
Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531, Japan

<u>Abstract</u>

Polarization-resolved second-harmonic-generation (SHG) microscopy is a powerful tool to visualize orientation in dermal collagen fiber. We reviewed the application of this microscopy for investigation of the relation between wrinkle direction and collagen orientation in ultraviolet-B-exposed (UVB-exposed) skin. A polarization anisotropic image of the SHG light indicated that wrinkle direction in UVB-exposed skin is predominantly parallel to the orientation of dermal collagen fibers. Furthermore, collagen orientation in post-UVB-exposed skin with few wrinkles changed from that of UVB-exposed wrinkled skin to that of no-UVB-exposed skin. This microscopy has the potential to become a powerful non-invasive tool for assessment of cutaneous photoaging.

Keywords: second-harmonic-generation, collagen, orientation, photoaging, wrinkle.

<u>1. はじめに</u>

最近の健康に対する意識の高まりと共に、日々の暮らしの中でコラーゲンと 言う言葉をよく耳にする。「食べるコラーゲン」、「飲むコラーゲン」、「塗るコラ ーゲン」、「打つコラーゲン」など、コラーゲンと言う言葉を耳にしない日は無 い。その真偽はさておき、このようなコラーゲン産業隆盛の背景には、コラー ゲンが生体にとって極めて重要であることはもちろん、それ以外にコラーゲン を『生きたありのまま』で可視化する技術がこれまで存在しなかったことも少 なからず影響していると考えられる。

コラーゲンは、真皮、靱帯、腱、骨、軟骨などを構成する生体構造タンパク 質で、ヒトでは全タンパク質の約 30% (全体重の約 6%)を占める。ヒトを形作 る生体組織を超高層ビルに例えると、コラーゲンは鉄筋に相当し、その濃度分 布のみならず、配向構造も生体組織の形態・機能・機械的特性に深く関与して いる。骨や軟骨ではびっしりと等方的に詰め込まれた(配向された)コラーゲ ン細線維が組織の弾力性を増すことにより衝撃で骨折などが起こることを防い でおり、アキレス腱では太く発達したコラーゲン線維が規則的に単一軸配向す ることにより極めて高い引張り強さを実現している。また、皮膚ではシワの発 生とコラーゲン配向が関連している可能性があることから、美容の観点でも重 要とされている。通常、組織切片のコラーゲンを特異的に染色し(ワンギーソ ン染色等)、光学顕微鏡で組織診断をするが、生体から細胞・組織を外科的に採 取する生検が必要であるため患者に対する負担が大きい。さらに、このような 生検組織の染色光顕像を用いたとしても、コラーゲン配向を定量的に評価する ことは容易でない。このような背景から、生体組織におけるコラーゲン配向を 『生きたありのまま』で可視化する手段が強く望まれている。

近年、超短パルスレーザー光と生体の非線形相互作用を可視化する『非線形 光学顕微鏡』が、非接触・低侵襲な生体可視化手段として注目されている[1]。 例えば、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、光電場とコラーゲン分子の非線形相互作用によって入射レーザー光 の一部が波長変換され、入射レーザー光の半波長(あるいは2倍の光周波数)の 光が第2高調波発生光(SHG; second-harmonic-generation)として発生する[2]。 コラーゲン分子特有の非線形光学特性によって発生する生体 SHG 光を利用すれ ば、生体組織におけるコラーゲン線維のみを『生きたありのままの状態』で可 視化できることから、我々は真皮コラーゲン線維分布を SHG 顕微鏡で可視化し、 皮膚科学分野への応用を行っている[3-6]。さらに、SHG 発生効率が入射レーザ ー偏光とコラーゲン配向の関係に大きく依存する特徴を利用すれば、SHG 顕微鏡 に偏光解析を導入した偏光分解 SHG 顕微鏡により、生体組織のコラーゲン配向 分布を定量的に評価することが可能になる[7-10]。本解説では、偏光分解 SHG 顕微鏡を用いたコラーゲン配向イメージングの応用例として、光老化性シワと コラーゲン配向の関連性評価に関する研究成果[10]を紹介する。

<u>2. 測定原理</u>

SHG 光は物質の構造非中心対称性に起因する非線形光学現象の1つである。ここでは、音と光の領域における線形・非線形現象と対比しながら、SHG 光発生

のメカニズムを説明する。まず音の領域における現象の例として、ピアノ鍵盤 を考える。図1 左上側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 と言える。しかし同じ鍵盤をカー杯叩くと、音が歪み、基本音以外に1オクタ ーブ上の倍音(周波数=2f)も同時に発生する(図1 右上側)。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、光の領域でも起こり、この場合には非中心対称性構造物質(非線形光学 結晶やコラーゲン分子)がピアノ鍵盤、超短パルス光がカー杯叩くことに相当 する(図1 右下側)。例えば、赤色の超短パルス光(周波数=ω、波長= λ)を 非中心対称性構造物質に入射すると、物質と非線形相互作用して分極波が歪み、 周波数が2倍(波長が半分)の青色パルス光(周波数=2ω、波長=λ/2)が発生 する。これが SHG 光である。このような SHG 光は、光の波長が変化しない線形 光学効果(反射や吸収など)とは本質的に異なるメカニズムで発生し、波長オ ーダーの物質構造や局所環境の変化に敏感であるという特徴を有している。

生体 SHG 光の強度は、コラーゲン線維の濃度分布のみならず、入射レーザー 偏光方向とコラーゲン配向方向の関係にも依存する。例えば、偏光方向とコラ ーゲン配向方向が平行の場合には強い SHG 光が観測されるが、両者が直交する と SHG 光は極めて弱くなる(図2)。また、コラーゲン分子軸方向から入射する と、SHG 光の発生は禁制になる。これは、 SHG 光がコラーゲンに含まれる発色 団による発光ではなく、コラーゲン分子固有の非中心対称性構造(ポリペプチド 3 重螺旋構造)による波長変換の結果であり、その構造軸の方向に敏感であるた めである。したがって、入射レーザー光の偏光方向を回転させながら生体 SHG 光を取得することにより、コラーゲン配向の定量評価が可能になる。例えば、 偏光回転による SHG 光強度変化を極グラフ表示した SHG レーダーグラフの長軸 方向と楕円率から、コラーゲン配向の方位と揃い具合を詳細に評価することが 可能である(連続偏光分解 SHG 顕微鏡)[7-9]。一方、より単純な方法としては、 水平と垂直の直線偏光のみを用い、各々の偏光分解 SHG 光強度のコントラスト から、迅速にコラーゲン配向情報を取得することも可能である(直交偏光分解 SHG 顕微鏡)[9,10]。本解説で紹介する直交偏光分解 SHG 顕微鏡では、コラーゲ ン線維の配向を定量的に評価する指標として、以下に示す SHG 偏光異方性 α を 用いる。

$$\alpha = \frac{I_V - I_H}{I_V + I_H} \tag{1}$$

ここで、*I_νと I_µ*は, 垂直偏光と水平偏光のレーザー光を入射した場合の SHG 光 強度である。このα値は±1の範囲内の値をとり、正符号では垂直方向のコラー ゲン配向が優位、負符号では水平方向の配向が優位ということを示している。α =0付近では、45°方向あるいは等方的(完全ランダム)に配向していることを示 している。また、α値の絶対値は線維の配向度合を示しており、値が大きいほど ー方向によく揃って配向していることを表している。

3. 実験装置

図 3 に実験装置を示す。基本的には、一般的なレーザー走査型顕微鏡と同様 な構成となっているが、レーザー光源としてフェムト秒レーザーを用いる点が 異なる。従来の非線形光学顕微鏡では、波長帯 800nm のフェムト秒モード同期 チタン・サファイアレーザーが広く使われているが、表皮越しに真皮コラーゲ ン線維を in vivo 計測する場合を考えると、十分な測定深度を得ることが困難 である。そこで、今回の装置では、フェムト秒モード同期クロム・フォルステ ライトレーザー(中心波長 1250 nm, パルス幅 100 fs, 繰返し周波数 73 MHz) を用いている。波長1250nm付近は、生体組織における散乱特性と吸収特性のバ ランスから、最も生体透過性の良い『生体の窓』とされており、これにより表 皮越しでも真皮コラーゲン線維の画像がクリヤーに取得できる。レーザー光は、 偏光子と 1/2 波長板によって所望の角度の直線偏光とした後、油浸対物レンズ (開口数 0.9,動作距離 350 µm) によ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 625 nm)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)から分離された 後に、電子冷却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。 サンプル上でレーザースポットを高速2次元走査(X軸, Y軸)するために、ガ ルバノミラーと2枚のリレーレンズを用いている。更に、サンプルを光軸方向 に機械式ステージで移動させることにより、所望の測定深度での SHG イメージ (深さ分解 SHG イメージ)を取得した。最終的に、垂直直線偏光と水平直線偏 光のレーザー光をそれぞれ入射した時の偏光分解 SHG イメージを取得し、式(1) に代入することによりαイメージを算出した。

4. サンプル

紫外線(UVB: 波長 270~400nm)を照射したアルビノ・ヘアレスマウスを光老 化モデルとして用いた。光老化性シワは、Kligmanの提案手法[11]に従い、生後 6週齢のヘアレスマウスに対して、1週間3回の頻度で照射を行い、照射エネル ギーを 1 週間ごとに 36~216mJ/cm²まで徐々に増加させながら、10 週間紫外線 を照射した。このような UVB 照射過程を経たマウスを、ここでは光老化マウス と呼ぶ。図4(a)および(b)は光老化マウスと、同週齢で UVB 照射を行っていな いコントロールマウスの、背中皮膚の写真を示している。両者を比較すると、 光老化マウスでは、正中線(背骨)方向と直交した方向に深いシワが形成され ているのが確認できる。次に、10週間の紫外線照射後、紫外線照射を6週間停 止したヘアレスマウス(22 週齡)の背中皮膚の写真を図 4(c)に示す。図 4(a) の光老化マウスと比較すると、深いシワが消失している様子が確認できる。こ のマウスをシワ消失と呼ぶ。図 4(d) はシワ消失マウスと同週齢のコントロール マウスの背中皮膚の写真を示しているが、16 週齡のコントロールマウス同様、 シワは観測されていない。最終的に、各マウスの背中皮膚部分を 2-3cm 四方(厚) さ 2-3mm 程度) で切り取り、偏光分解 SHG 顕微鏡による観察を行った。

5. 実験結果

図5は、垂直直線偏光レーザー光を入射した場合の、(a)光老化マウス(16週 齢)、(b)コントロールマウス(16週齢)、(c)シワ消失マウス(22週齢)および (d)コントロールマウス(22週齢)における深さ分解 SHG イメージング(イメー ジ領域 800µm*800µm、256 ピクセル*256 ピクセル、測定深度 50µm 刻み)の結果

を示している。これらの SHG イメージにおいて、SHG 強度は、コラーゲン濃度、 コラーゲン高次構造、コラーゲン配向などに依存している。各イメージにおい て、黒丸の領域が多数観測されている。ヘアレスマウスでは、体毛は退化して 無毛であるが、毛穴は構造的に残っており、その部分が SHG 信号欠落部分とし て観測されている。いずれのサンプルにおいても、毛穴は体躯の左右方向(正 中線と直交方向)におおかた並んでいるが、シワが発生している光老化マウス ではその分布がより直線的に並んでいるのが興味深い。毛穴の占有率が高い部 分と低い部分では、皮膚としての機械的特性も異なり、それがシワの走行方向 を決定する一因となっても不思議でない。また、測定深度を変化させていくと、 SHG イメージが変化していく様子が確認できる。いずれのサンプルにおいても、 「深さ 50μm は表皮−真皮境界付近に相当している。深さ 200μm 以上で SHG 強度が 弱くなりイメージがぼやけ始めているのは、生体組織中の多重散乱による効果 である。各サンプルにおいて、真皮コラーゲン線維構造の深さ依存性は、明確 には観測されなかった。また、各サンプルの深さ分解 SHG イメージを比較して も、顕著な相違は確認されなかった。

次に、各サンプルの深さ分解αイメージを算出した結果を図6に示す。ここ で、青色は正中線と平行な方向のコラーゲン配向、赤色は正中線と直交方向の コラーゲン配向が優位であることを示している。また、白色は両者の中立的な コラーゲン配向であることに相当する。まず、図 6(a)の光老化マウスに注目す ると、全体的に赤色の分布をしており、これは正中線と直交方向、すなわち光 老化性シワの走行方向と平行方向のコラーゲン配向が優位であることを示して いる。一方、図 6(b)の同週齢のコントロールマウスでは、全体的に青色の分布 となっており、正中線と平行な方向のコラーゲン配向が優位であった。これは、 背中皮膚が背骨に沿った機械的負荷(引張り)を日常的に繰り返し受けている ため、線維状のコラーゲンもそれと平行方向に並びがちになると解釈できる。 次に、図 6(c)のシワ消失マウス(22 週齢)では、図 6(a)の光老化マウスよりも 赤味が薄まり中立的なコラーゲン配向となっているものの、図 6(d)の同週齢コ ントロールマウスと比較すると、コラーゲン配向に若干の違いが確認できる。

これらのコラーゲン配向の違いを統計的に評価するため、10µm 毎の深さ分解 αイメージを算出し、このαの3次元データの平均値と標準偏差を各サンプル 毎に求めたのが図7である。まず、16 週齡と 22 週齡のコントロールマウスに着 目してみると、両者間で有意差は確認されなかった。これは、本実験において 加齡に伴う自然老化の影響は含まれておらず、光老化の影響だけを評価できて いることを示している。次に、光老化マウスと同週齡コントロールマウスを比 較すると、コラーゲン配向の違いに明確な有意差が確認され、光老化性シワの 発生がコラーゲン配向に影響を与えていると言える。次に、シワ消失マウスと 光老化マウスを比較すると、こちらでも有意差が確認され、紫外線照射停止に よる生体リモデリングでシワが消失することも、コラーゲン配向に影響を与え るということになる。最後に、シワ消失マウスと同週齡コントロールマウスを 比較すると、こちらでも有意差が確認され、これは生体リモデリングによりシ ワが消失したとしても、全く光老化のない状態までは回復していないことを意 味する。 6. まとめ

偏光分解 SHG 顕微鏡を用いた真皮コラーゲン配向イメージングと光老化性シ ワ評価への応用を紹介した。SHG 発生効率が、入射レーザー偏光とコラーゲン配 向の関係に依存することを利用し、簡便な方法でコラーゲン配向が定量的に評 価出来ることを示した。光老化モデルを用いた実験では、光老化によりシワが 発生するとそれと平行なコラーゲン配向が優位になり、また生体リモデリング により皮膚表面からシワが消失したとしてもコラーゲン配向は完全に回復して いないことが示された。そうすると、興味が出てくるのは、シワ発生とコラー ゲン配向変化のどちらが先に起こるのかであるが、その後の研究でコラーゲン 配向変化が先に起こることが確認されている[12]。*in vivo* 計測が可能な偏光分 解 SHG 顕微鏡も最近開発されているので[13]、ヒト顔皮膚の *in vivo* コラーゲ ン配向イメージングからシワの発生を予測するという、女性にとっては夢のよ うなことが実現できる日が来るかもしれない。

謝辞

本研究は、科研費・基盤研究(A) 23240069、基盤研究(B) 22300154 及び挑戦的 萌芽研究 23650260 より援助を受けた。

参考文献

- [1] B. R. Masters and P. T. C. So (ed): <u>Handbook of Biomedical Nonlinear</u> <u>Optical Microscopy</u> (Oxford University Press, Oxford, 2008).
- [2] S. Roth and I. Freund: Biopolymers 20 (1981) 1271.
- [3] 伊藤誠啓, 安井武史, 福島修一郎, 荒木勉, 山下豊信, 國澤直美, 高橋元次:光学 36 (2007) 35.
- [4] T. Yasui, Y. Takahashi, M. Ito, S. Fukushima, and T. Araki: Appl. Opt. 48 (2009) D88.
- [5] T. Yasui, M. Yonetsu, R. Tanaka, Y. Tanaka, S. Fukushima, T. Yamashita, Y. Ogura, T. Hirao, H. Murota, and T. Araki: J. Biomed. Opt. **18** (2013) 031108.
- [6] R. Tanaka, K, Sasaki, Y. Tanaka, S. Fukushima, H. Murota, K. Matsumoto, T. Araki, and T. Yasui: J. Biomed. Opt. 18 (2013) in press.
- [7] T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki: J. Biomed. Opt. 9 (2004) 259.
- [8] T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki: Appl. Opt. 43 (2004) 2861.
- [9] T. Yasui, K. Sasaki, Y. Tohno, and T. Araki: Opt. Quantum Electron. 37 (2005) 1397.
- [10] T. Yasui, Y. Takahashi, S. Fukushima, Y. Ogura, T. Yamashita, T. Kuwahara, T. Hirao, and T. Araki: Optics Express **17** (2009) 912.
- [11] L. H. Kligman: J. Am. Acad. Dermatol. 21 (1989) 623.
- [12] 米津真人,田仲亮介,安井武史,荒木勉: Optics & Photonics Japan 2009講演予稿集(2009 年 11 月) 25pB8.
- [13] 田中 佑治, 長谷 栄治, 福島 修一郎, 荒木 勉, 安井武史: 生体医工学 51 (2013) in press.

Figure captions

Fig. 1. Linear and nonlinear effects in sound and optical regions.

Fig. 2. Dependence of SHG efficiency on incident laser polarization and collagen fiber orientation.

Fig. 3. Experimental setup. ND: neutral density filter; M: mirror; BS: beam splitter; L: HS: harmonic separator; SHG light: lens: second-harmonic-generation light; F: infrared-cut filter; PMT: photon-counting-type photomultiplier tube; $\lambda/2$: half waveplate; GM: galvano mirrors; RL1 and RL2: relay lenses; OL: oil-immersion objective lens; PZT: piezoelectric transducer.

Fig. 4. Protocol of sample preparation and optical photographs of skin surface for (a) UVB-exposed (16 weeks old), (b) age-matched control sample (16 weeks old), (c) post-UVB-exposed (22 weeks old), and (d) age-matched control sample 22 weeks old).

Fig. 5. Comparison of depth-resolved SHG images among (a) UVB-exposed sample (16 weeks old), (b) age-matched control sample (16 weeks old), (c) post-UVB-exposed sample (22 weeks old), and (d) age-matched control sample (22 weeks old).

Fig. 6. Comparison of depth-resolved α images among (a) UVB-exposed (16 weeks old), (b) age-matched control sample (16 weeks old), (c) post-UVB-exposed (22 weeks old), and (d) age-matched control sample (22 weeks old).

Fig. 7. Statistics of 3D data of α values for four kinds of skin sample (n = 5).



Fig. 1

	Parallel	Perpendicular	
Polarization of incident light	+	\$	
Collagen orientation	axial	axial	cross sectional collagen fiber
SHG light	Strong	Weak	Forbidden

Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7