

# 目次

第1章 緒言	1
第2章 皮膚	
2.1 皮膚構造	3
2.2 コラーゲン	5
2.3 エラスチン	7
2.4 皮膚老化とコラーゲンおよびエラスチンの関係	8
第3章 皮膚計測手法	
3.1 染色法	9
3.2 超音波計測	9
3.3 レーザー共焦点顕微鏡	10
3.4 光コヒーレンストモグラフィ	12
第4章 非線形光学顕微鏡	
4.1 線形分極と非線形分極	13
4.2 多光子蛍光	14
4.3 高調波発生光(第 2 高調波発生光, 第 3 高調波発生光)	16
4.4 多光子顕微鏡を用いた皮膚計測に関する先行研究	19
第5章 波長可変フェムト秒レーザーを用いた非線形光学顕微鏡の構築	
5.1 出力パワーの波長依存性	22
5.2 最適分散量の決定	23
5.3 パルス幅の波長依存性	27
第6章 SHG 顕微鏡の基本特性評価	
6.1 実験装置	32
6.2 分散補償量の違いによる SHG イメージの違い	33
第7章 コラーゲン/エラスチンの可視化	
7.1 皮膚切片サンプルの計測	35
7.2 バルク皮膚サンプルの計測	47
第8章 結言	52
参考文献	53
謝辞	55

## 第1章 緒言

表皮・真皮・皮下組織の三層構造を有する皮膚において皮膚の形態や機械的特性を決定する上で重要な役割を担っているのが、真皮中に存在する2つの生体構造タンパク質『コラーゲン』と『エラスチン』である。コラーゲンは、細胞の真皮の約70%を占めており、皮膚の力学的強度に深く関連している。一方、エラスチンは真皮の約5%を占めており、コラーゲンに絡みつくようにして皮膚に弾力性を与えている[1]。例えば、コラーゲンの比率が高いと組織が硬くなり、エラスチンの比率が低いと皺やたるみの原因になると言われている。このようなことからコラーゲンとエラスチンの比率を知ることは重要であり、臨床応用や美容の分野において、コラーゲンとエラスチンを同時に可視化する技術が求められている。

皮膚におけるコラーゲンやエラスチンを選択的に可視化する手法として、組織染色法が広く用いられてきた。例えば、コラーゲン染色法としてワンギーソン染色やアザン・マロリー染色[2]、エラスチン染色法として、レゾルシン・フクシン染色や orcein 染色[3]が利用可能である。しかし、これらの組織染色法は、皮膚生検を行い、生検組織を切片化した後に染色を行う侵襲的手法であるため、*in vivo* 計測に応用できない。一方、生体組織を非侵襲的に可視化する手法として、レーザー走査型共焦点顕微鏡がある。生体透過性の良好な近赤外レーザー光を用いることにより、皮膚内部の3次元構造を *in vivo* 計測することが可能であるが、分子選択性は有さないため、得られるイメージは様々な各種生体構成物質が重畳したものとなり、コラーゲンやエラスチンのみを選択的に可視化することは困難である。

レーザー走査型共焦点顕微鏡の良好な内部浸達性や3次元イメージング性を維持しながら、分子選択性を付与する手段として、非線形光学顕微鏡がある。超短パルス光と生体構成物質の非線形相互作用によって発生する多光子蛍光や高調波発生光を利用することにより、非染色かつ非侵襲に分子選択性を有したイメージングが可能になる。真皮におけるコラーゲンは SHG (Second Harmonic Generation : 第2高調波発生) 光によって高コントラストに可視化でき、エラスチンは TPEF (Two Photon Excitation Fluorescence : 2光子蛍光) 光が利用可能である。先行研究では、フェムト秒チタン・サファイアレーザーを光源として SHG 光と TPEF 光を同時計測することにより、コラーゲンとエラスチンの分布を *in vivo* で可視化している。しかし、波長 800nm 帯のフェムト秒チタン・サファイアレーザーを用いた非線形光学顕微鏡で生体深部を可視化する場合、生体組織の散乱や吸収による光減衰のため、良好なコントラストで可視化することは困難であった。生体組織内では、散乱効率が波長の4乗に反比例するレイリー散乱が支配的であるため、入射レーザー光の長は超過によりその影響を軽減できる。我々の研究では、これまでに波長 1250 nm 帯のフェムト秒クロム・フォールステライトレーザーを用いた SHG 顕微鏡により、皮膚真皮深部のコラーゲン線維分布を可視化することに成功している[5]。しかし、波長 1250nm 帯が本当に生体深部、一光では、TPEF 光を励起できないため、エラスチンは可視化出来なかった。

そこで本研究では、フェムト秒可変波長レーザー(可変範囲 680~1300nm)を用いた非線形光学顕微鏡を構築し、コラーゲン SHG イメージの波長依存性を評価し、生体深部計測に最適な波長の検討を行った。さらに、異なるレーザー励起波長で取得されたエラスチンの TPEF イメージ、THG(Third Harmonic Generation : 第 3 高調波発生)イメージを比較し、生体深部のエラスチン可視化に関する検討を行った。

## 第2章 皮膚

### 2.1 皮膚構造[1] [6]

皮膚は身体を被い，外界との境界を成す．しかし，単なる隔壁ではなく，生命保持に不可欠な様々な機能を持つ重要な臓器である．成人では平均  $1.6\text{m}^2$  の面積を持ち，皮膚のみの重量は  $3\text{kg}$  弱，皮下組織も加えると約  $9\text{kg}$  にも達し，体重の約  $14\%$  を占め，人体最大の臓器と呼ばれる．皮下組織を除いた皮膚の厚さは  $1.5\sim 4\text{mm}$ ，一般に女性よりも男性，屈側よりも伸側，幼児よりも成人の方が厚いとされる．部位による違いでは，手掌足底のみは  $0.6\text{mm}$  と厚い．

皮膚構造図を Fig.2-1 として示す．外界の境界側から，表皮，真皮，皮下組織と大別される．表皮は被覆表皮と付属器表皮（毛包とエクリン汗管）とから成る．真皮表面には乳頭が林立し，これに対する表皮下面は凹窩を生じ，逆に真皮に向かって突出する部分を表皮突起という．したがって，表皮真皮境界は波形を呈し，境界部には基底膜と呼ばれる帯状構造がみられる．

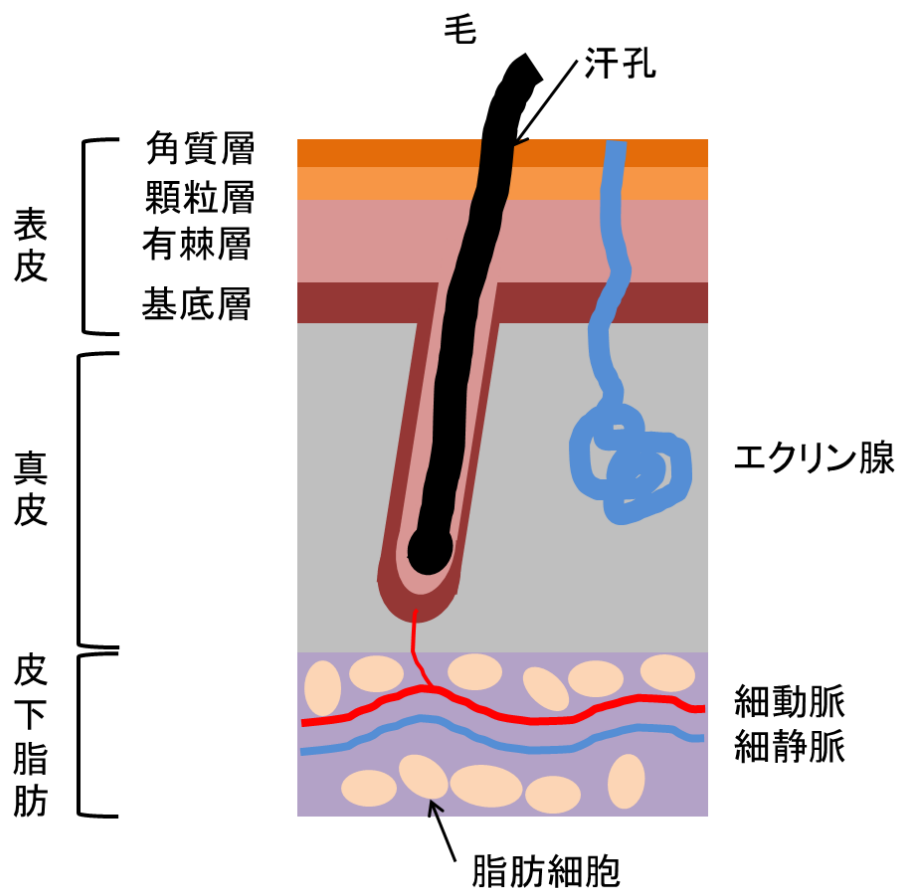


Fig.2-1 皮膚構造図

大別すると、皮膚機能としては対外保護作用・体温調節作用・知覚作用・分泌排泄作用・合成作用・呼吸作用・吸収作用等が挙げられる。すべての機能が不可欠であるが、主機能の一つであり、皮膚構造と大きく関わる対外保護作用について説明を加える。対外保護作用を細分化すると、

#### **I. 柔軟性を有し、機能的な外力を防ぐ作用**

真皮弾力線維による弾力性、皮下脂肪組織のクッションとしての役割、慢性刺激に対する角質層の肥厚等による。

#### **II. 水分の内部侵入を防ぐ作用**

脂質が角質層表面に膜をなし、角質層はイオン篩の役を成し、角質層・顆粒層間部のタンパク質水素濃度が等電点で防止柵の役割を果たすことによる。

#### **III. 細菌・真菌の侵入を防ぐ作用**

表皮は弱酸性（pH5.5~7.0）で、細菌・真菌の侵入を防ぐことによる。

#### **IV. 物理的・化学的刺激を防ぐ**

角質層蛋白は物理化学的侵襲に対抗する。異物には肉芽腫性が反応し、あるいはこれを排出する。アルカリ中和能を有し表面 pH を一定とすること等による。

#### **V. 体液の喪失を防ぐ**

皮膚が生体組織全体を覆うことで、生体の維持には欠かせない体液の流出を防ぐ。

#### **VI. 光線の防御**

表皮の凹凸により、大部分の可視光線・赤外光に近い長波長光線は反射される。表皮内で散乱される。表皮中様々な場所で吸収されるが、特にメラニンが紫外線を吸収して即時暗色化し、また基底細胞の核の上方に集まって核を保護する等のことによる。

表皮の成分の大部分は角化細胞（ケラチノサイト）で、これに色素細胞（メラノサイト）、ランゲルハンス細胞、 $\alpha$ -樹枝状細胞およびメルケル細胞が少数混在している。ケラチノサイトは角化という分化をする細胞で、最下層（基底層）で分裂し、ケラチンを形成しながら上行していき、最終的には表層から脱落していく。

表皮をさらに細分化すると、外界との境界側から角質層・顆粒層・有棘層・基底層の4層に分かれ、角質層以外は核を有している。なお、これ以後、上側は外界と接する側、下側は皮下組織側とする。また、結論として表皮にはコラーゲンは分布しておらず SHG 光は発生しない。よって、表皮は皮膚病理学的には重要な組織ではあるが、ここでは基本的な部分に触れるだけにする。

角質層は表皮最上層であり、核や小器官は自己消化により失われて存在しない。硬いタンパク質であるケラチンが細胞内に充満しており、下方の表皮層及び真皮層を保護する。

顆粒層では細胞は扁平で 1~数層を成し、原形質中に小顆粒（ケラトヒアリン顆粒）が多数出現する。

有棘層では表皮の大部分を占める。細胞は下方ほど多角形で上昇するに従って次第に横に扁平となりモザイク形に 5 ないし 10 層に並ぶ。

基底層は 1 層の基底細胞より成る。基底細胞は縦に長く円柱形で、1~2 個のよく発達した核小体を持つ。基底細胞の底面の真皮に接する部分はヘミデスモゾームで基底板に対している。

真皮は皮膚の厚さの大部分を占め、上から乳頭層・乳頭下層・網状層の 3 層に分けることができる。構成成分として線維・基質・細胞・脈管系・筋肉系・神経系を有する。

線維としては膠原線維（コラーゲン）・弾力線維（エラスチン）・細網線維（レチクリン）が存在し、線維・基質・細胞で構成される真皮結合組織の約 90%をコラーゲンが占める。また、膠原線維と細網線維は本質的には同じである。

基質とは繊維及び細胞間を満たす無定形成分で、有機成分・血漿蛋白・電解質・水分からなる。基質は親水性が強く水分量の調節、水溶性物質の組織への浸透・拡散に重要な役割を果たし、有機成分の一つであるヒアルロン酸は粘稠性が強く、組織の可塑性を保つとともに侵入した異物の拡散を防ぐ。

細胞成分としては線維芽細胞・マクロファージ（組織球）・肥満細胞・形質細胞が存在し、線維芽細胞がコラーゲン（およびエラスチン）を生産する。

## 2.2 コラーゲン[2][6]

コラーゲンはその構造（アミノ酸配列順序）により、数種類に細分化されている。真皮全体に含まれるコラーゲンの大部分はⅠ型コラーゲンであり、膠原線維の主成分もⅠ型コラーゲンである。また、皮膚全体に含まれるコラーゲンはⅠ型、Ⅲ型、Ⅳ型、Ⅴ型、Ⅶ型、Ⅷ型、ⅩⅦ型がある。真皮においては基本となる線維としてⅠ型コラーゲンがあり、そのところどころにⅢ型コラーゲン、Ⅴ型コラーゲンが入れ替わって分布している。

Ⅰ型コラーゲンは線維状コラーゲンで、人体で最も多く分布しており、真皮においても大部分を占め、コラーゲンといえばⅠ型コラーゲンを指すのが一般的である。

Ⅲ型コラーゲンは線維状コラーゲンでベビーコラーゲンとも呼ばれ、成人では真皮コラーゲンの 10%を占める程度だが、新生児で 20%、胎児では 50%まで増える。ゆえに、発生・成長のプロセスとの関係性が考えられている。また、レチクリンはⅢ型コラーゲンの割合が比較的多い膠原線維であり、表皮直下・毛包周囲・血管周囲に認められ、マクロファージ・線維芽細胞が増殖する時に増加する。また、Ⅰ型コラーゲンとの違いでは分子を構成しているポリペプチド鎖に関して、Ⅲ型は同一種三つで構成されているのに対し、Ⅰ型はそのうちの一つが異なるポリペプチド鎖に入れ替わっている。よって、大きさ・形等は同一である。

Ⅳ型コラーゲンは非線維状コラーゲンで、表皮真皮境界部である基底膜中の基底板に含まれている。

Ⅴ型コラーゲンは線維状コラーゲンで、コラーゲン線維の太さに関係していると考えられている。表皮側に行くほど線維は細くなっていくが、それにつれてⅤ型コラーゲンの割合が増加していることが分かっている。

Ⅶ型コラーゲンは基底膜中の係留線維に含まれている。係留線維の不全が先天性表皮水疱症の原因と考えられている。

Ⅷ型コラーゲンはコラーゲン線維の表面に分布しており、線維の表面の性質に関わっていると考えられている。

XⅦ型コラーゲンは基底膜と表皮細胞の結合に関与していると考えられている。ただ、コラーゲンは細胞外マトリックスの一つで、通常細胞外に存在している。しかし、XⅦ型コラーゲンは半分細胞内に埋まっており、特殊なコラーゲンといえる。また、水疱性類天疱瘡との関係が考えられている。

網状層では太い膠原線維が層に対して網目のように分布しており、下の方ほど線維が太く、上に向かうほど線維が細くなっていく（Ⅴ型コラーゲンの含有率増加が伴う）。網状層ではⅠ型コラーゲンが大部分で、ついでにⅢ型コラーゲンとなるが、Ⅲ型コラーゲンでもコラーゲン全体の 10%程度に過ぎず、ほとんどがⅠおよびⅢ型コラーゲンである。したがって、Ⅴ・Ⅶ型コラーゲンは存在しているものの SHG 光発生の主因とは考えられず、網状層での SHG 光発生の主因はⅠ・Ⅲ型コラーゲンであると考ええる。

乳頭層では、コラーゲン線維は細く、粗に垂直方向に走っている。ここでも、SHG 光発生の主因はⅠ・Ⅲ型コラーゲンと考えられるが、網状層と比べると線維の太さ、繊維方向の違いから SHG 光は弱くなると考えられる。

表皮真皮境界の基底膜に関しては、先に述べているようにⅣ・Ⅶ型コラーゲンが含まれる。ただ、Ⅳ型コラーゲンが含まれている基底板は幅が約 60~80nm、Ⅶ型コラーゲンを含む係留線維は基底版より下方に 150~200nm ほど走っている程度である。仮にⅣ・Ⅶ型コラーゲンから SHG 光の主因になるとは考えにくい。

以上より、真皮における SHG 光発生の主因となるのは網状層・乳頭層ともにⅠ・Ⅲ型コラーゲンである。しかしながら、Ⅰ型コラーゲンとⅢ型コラーゲンを比較すると、分子の大きさ、形ともに変わらず、理論的には同程度の SHG 光が発生するため、Ⅰ型コラーゲンとⅢ型コラーゲンを SHG 強度によって区別することは不可能である。

### 2.3 エラスチン[3]

エラスチンは硬タンパク質の一種で、構成するアミノ酸の約 80%はロイシン、アラニン、グリシン、プロリン、バリンの 5 種から成る。哺乳動物の軟骨や腱、靱帯などの結合組織にコラーゲンなどのタンパク質と共に広く存在し、ゴムのような弾性体としての性質を持つ。エラスチンは骨と骨をつなぎ関節を形作る人体に多く含まれる。項靱帯と呼ばれる頭を支える人体に最も多く含まれ、約 80%を占める。動脈では乾燥重量の約 50%がエラスチンで、血管の真ん中にある中腹でコラーゲンと共に存在し、動脈の強度と弾力性を担う。

人体の皮膚の真皮においてエラスチンは約 5%を占め、コラーゲン間を縫うように存在し、コラーゲン線維を結び束ねる役割を担っている。Fig.2-2 に真皮におけるエラスチンの図を示す。エラスチンとコラーゲンの存在量の比率が変わると性質が変わる。例えばエラスチンの比率が低いとシワやたるみの原因、動脈硬化になりやすくなる。コラーゲンの比率が高いと組織が硬くなるといった問題を引き起こす。

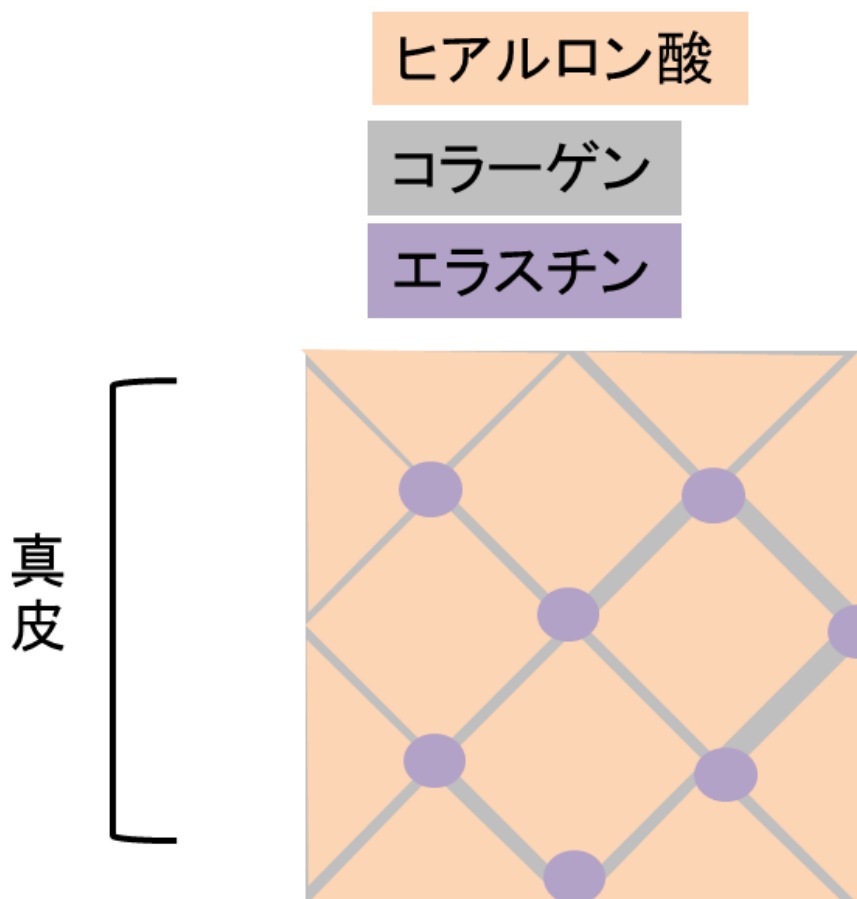


Fig.2-2 真皮におけるエラスチン



## 2.4 皮膚老化とコラーゲンおよびエラスチンの関係[7]

真皮では、コラーゲン線維とエラスチン線維が様々な構造集合体を形成し、機械的特性を決定する。しかし経年とともに、皮膚の機械的特性は徐々に減衰し老化することが知られる。その代表的な老化現象として、しわやたるみ・皮膚乾燥・皮膚疾患等が挙げられる。この老化は誰もが発現し、避けることができない特性変化である。しかし皮膚の老化の発現時期には個人差があり、環境因子に大きく影響される。そこで、皮膚老化には年齢に伴う自然老化と紫外線照射等による光老化に分けられ研究がなされている。

自然老化は細胞自体の老化や数の減少に伴い代謝速度が減退する老化現象である。この変化は、加齢に伴い線維芽細胞の機能が低下することが要因とされる。コラーゲン線維は老化に伴い細くなり、線維の配向に規則性を失う。エラスチン線維はたるみや皺に大きく関与し、加齢に伴い線維の太さにバラつきが生じ、配向に規則性を失う。

光老化は紫外線の照射によって皮膚組織が自然老化とは別の過程でおこる老化現象である。コラーゲン線維の場合、長期間において UV 被曝により発生したコラーゲン分解酵素が過剰に分泌されることにより分解と産生のバランスが崩れ、コラーゲン線維が減少する。エラスチン線維の場合、紫外線照射によって真皮内部で炎症が起こり、様々な酵素が分泌される。発生した変性エラスチン線維（ソーラーエラストーシス）は生体のメカニズムによって真皮下方に移動し分解される。しかし、紫外線照射が長期にわたると炎症持続により分解速度を上回り、変性エラスチン線維は蓄積し、塊状に成形される。

臀部皮膚は紫外線に晒されることがほぼないので自然老化による影響しか受けないが、顔面皮膚は自然老化と光老化による影響を受け同時に老化が進行するので、機械的特性を失いやすいというのがわかる。このようなことから光老化は美容の観点で重要な問題となっている。

## 第3章 皮膚計測手法

### 3.1 染色法[8]

染色法とは特定の細胞などを特殊な色素を用いて染色する手法である。組織内の特定の1種類の細胞を観測する際、形態を識別することで染色せずに観測することも可能だが、染色法は顕微鏡での観測をより簡単にするために考案された。

皮膚計測における染色法は、皮膚にある観測目的の分子を直接染色することで分子選択性が得られる長所がある。しかし分子を直接染色するので侵襲的な観測となる。また用途が皮膚生検に限定されるので *in vivo* 計測には利用できないといった短所もある。

エラスチカ・ワンギーソン染色法による皮膚の瘢痕組織のイメージを Fig.3-1 に示す。Fig.3-1 は膠原線維(コラーゲン)と弾性繊維(エラスチン)を同時に染色することができるエラスチカ・ワンギーソン染色法を用いた染色結果である。コラーゲンは赤色に、エラスチンは黒紫色に染色された。

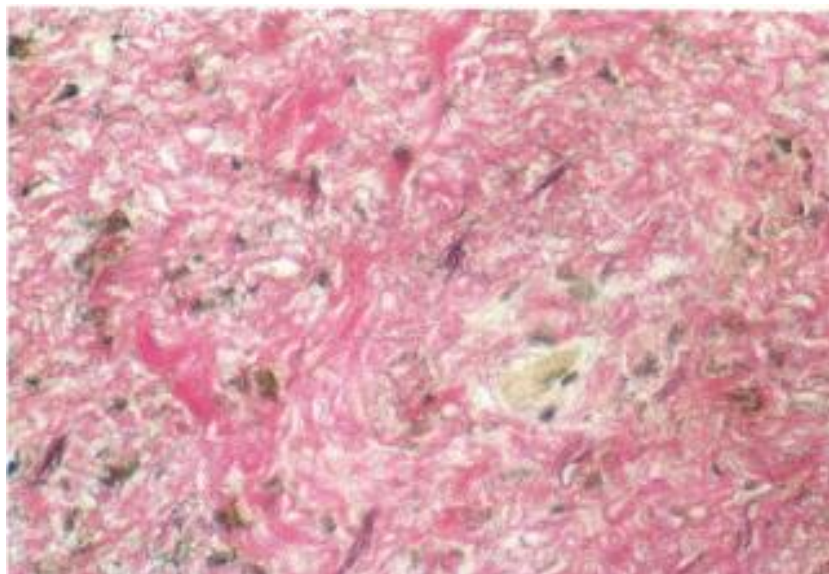


Fig.3-1 染色法による皮膚イメージ[8]

### 3.2 超音波計測[9]

周波数数十MHzの超音波を用いて生体内の1~2mmの領域を特定する技術はすでに超音波診断装置で確立されている。超音波は液体から固体、もしくは固体から別の固体に伝わる時にその境界面で屈折や反射、回折等が起こる特性がある。探触子という超音波を発生または受信するセンサーは振動子を組み込んでおり、この振動子が振動することで超音波の振動を電気信号に変えることができます。この電気信号をイメージに変換することで超音波によって得た情報を画像化することができる。

Fig.3-2 に正常人および強皮症患者の前腕伸側の超音波像を示す。Fig.3-2 のイメージは

前腕伸側の表皮と皮下脂肪組織が見えている。強皮症皮膚とは皮膚の硬化性変化を主徴とし、肺や心臓などの内臓諸臓器にも同様の変化をきたす系統的疾患である。イメージから正常な皮膚と比較すると強皮症皮膚は明らかに皮膚の表面の性質が異なっていることが分かる。

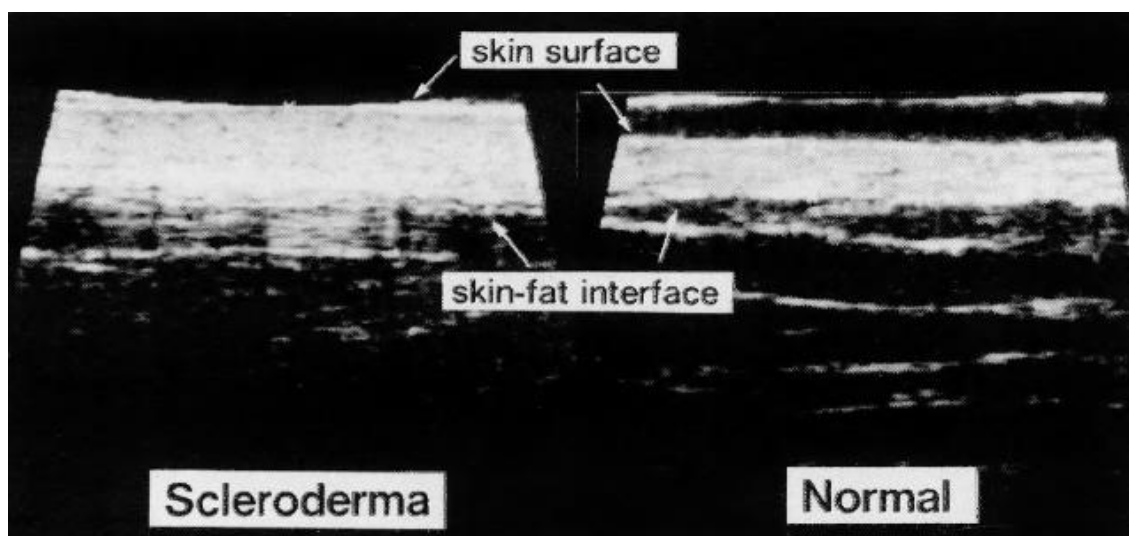


Fig.3-2 超音波診断装置を用いた強皮症皮膚およびコントロール皮膚の超音波像[9]

### 3.3 レーザー共焦点顕微鏡[10]

レーザー共焦点顕微鏡の大きな特徴の一つは、共焦点光学系を実現することによって試料の 3 次元構造の観察および高分解能化を実現できることである。典型的なレーザー共焦点顕微鏡の光学系を Fig.3-3 に示す。共焦点光学系では、対物レンズの焦点と共役な位置にピンホールを配置し、ピンホールを透過した反射光（または蛍光）のみを検出する。共焦点光学系では、ピンホールを配置することによって、レーザーからの光を試料上の 1 点に集光し試料からの蛍光強度を検出器で検出する。よってピンホールの働きで光軸方向の分解能および面内の分解能を向上させることができる。

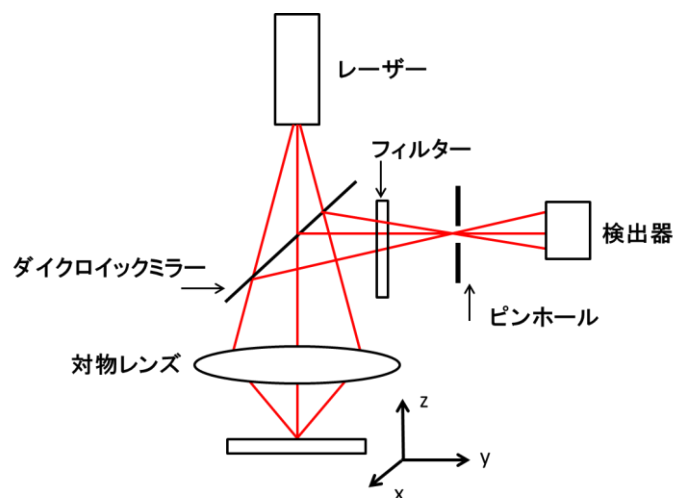


Fig.3-3 レーザー共焦点顕微鏡の光学系

皮膚計測においてレーザー共焦点顕微鏡を用いると、皮膚内部構造を非侵襲および非破壊的で *in vivo* 計測を行うことができる、また 3 次元的イメージングを取得することができる。しかし人体における観測の際、観測目的の物質以外に表皮の細胞やメラニン等を同時に観測してしまうので分子選択性がない問題点がある。

Fig.3-4 に深さ  $80\mu\text{m}$  の女性頬のイメージを示す。小さい円状に光っているのがメラニンで、線維状に光っているのがメラノサイトである。焦点距離がバラバラになるような厚い皮膚でも高コントラストなイメージを得ることができる。

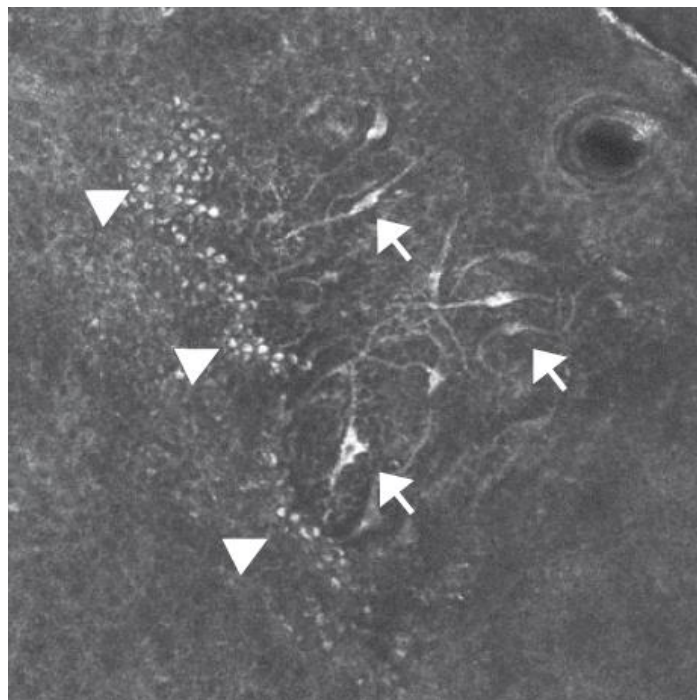


Fig.3-4 レーザー共焦点顕微鏡による皮膚イメージ[17]

### 3.4 光コヒーレンストモグラフィ [11][16]

光の時間的または空間的な一様性の度合いをコヒーレンスという．時間的なコヒーレンスの低い光を生体表皮から入射し，生体表面近傍から戻ってくる反射光の中から，散乱の影響を受けない反射直進光を選択的に検出して表皮下の断層イメージングを行う技術を光コヒーレンストモグラフィ（Optical Coherence Tomography : OCT）という．OCTでは表皮下わずか 1~2mm の深さで断層イメージを得られるにすぎないが，空間分解能は既存の超音波エコーよりも 1 桁以上高く，すでに OCT は網膜疾患の診断など眼下の分野で実用化されている．

Fig.3-5 にヒト上腕内側の 0.8 $\mu$ m 帯 OCT を示す．皮膚組織では一般に表皮は散乱が多く明るくイメージングされるのに対して，毛細血管やリンパ腺が錯綜する真皮は光透過率が高くなるので暗くなる．その結果，表皮と真皮の境界は明瞭に見えている．

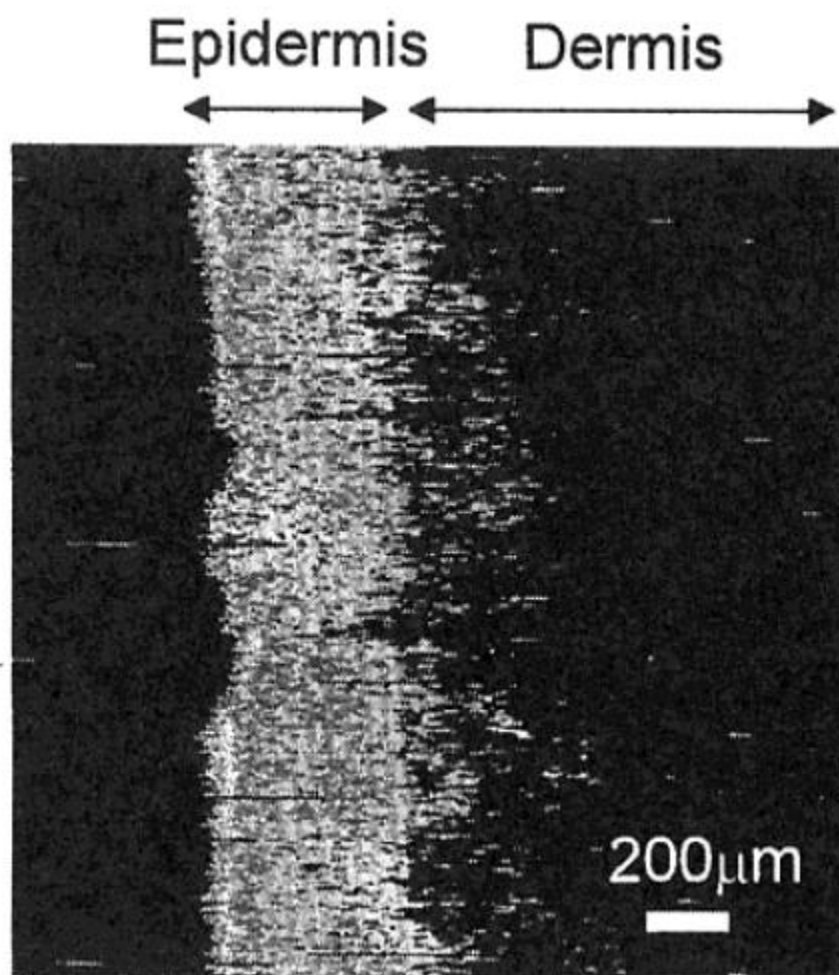


Fig.3-5 ヒト上腕内側の 0.8 $\mu$ m 帯 OCT[11]

## 第4章 非線形光学顕微鏡

### 4.1 線形分極と非線形分極[12]

光（周波数  $\omega$ ）を物質に入射すると、光と物質の相互作用により物質内部では光電場の周波数  $\omega$  で電子的振動（電子双極子モーメント）が起こり、入射光と同じ振動数で電子が振動する．これを電子分極という．物質に光が入射されると入射光の電場により分極波が物質中で誘起され、この分極波が物質から自由空間に射出されるとき同じ周波数の光波となって伝搬を続ける．通常の光による線形分極  $P_L$  は入射電場強度  $E$  に比例する．式で表すと  $P_L = X^{(1)} E$  となる．ここで  $X^{(1)}$  は線形感受率である．この式より線形分極は入力に対する応答（出力）が入力強度に比例する現象だと分かる．線形現象の線形分極波を Fig.4-1 に示す．この場合、入射波と分極波は全く同じ正弦波波形なので、含まれる周波数は基本成分のみである．

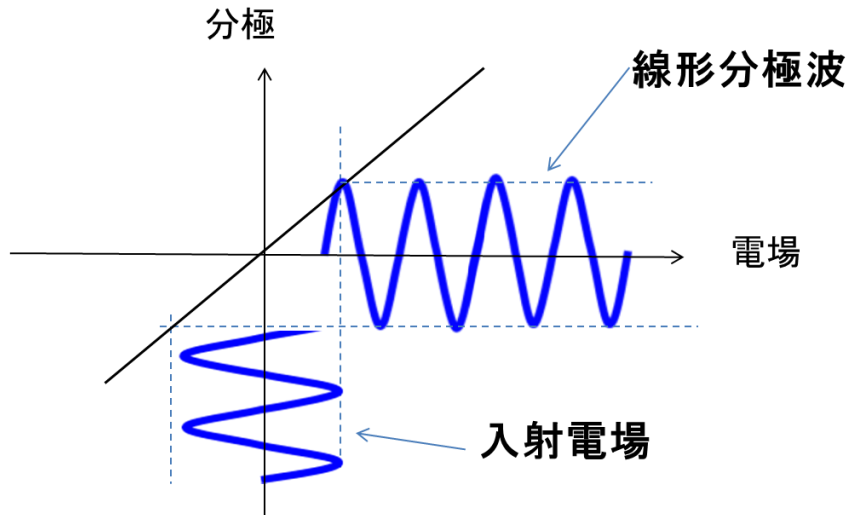


Fig.4-1 線形分極波

しかし、超短パルス光のように非常に高いピーク強度をもつ光を入射すると誘起される分極の振動は入射電場の振動に追従できなくなり、ひずみを持つ振動となる．そして線形性が崩れ、非線形な分極波が発生する．式で表すと  $P_{NL} = \chi^{(1)} E + \chi^{(2)} EE + \chi^{(3)} EEE + \dots$  となる．ここで  $\chi^{(2)}$  および  $\chi^{(3)}$  は 2 次および 3 次の非線形感受率である．第 2 項以上の非線形分極が無視できなくなり、また物質によっては大きな非線形感受率をもつものもあり、入射電場と分極が Fig.4-2 に示すように入射光の電場が正弦波状に振動しても分極は歪みを生じ、正弦波から歪む．電場の正の方向では振幅が小さくなっているが、負の方向では大きな振幅となっている．歪んだ波形をフーリエ級数展開すると、入射電場周波数  $\omega$  のみで表すことができず、入射電場周波数  $\omega$  の高調波成分 ( $2\omega$ ,  $3\omega$ ...) が含まれることになる．SHG 光は 2 次の非線形分極  $\chi^{(2)} EE$  によって非中心対称性物質のみで誘起され、周波数  $\omega$  の光を入射

したとき、 $2\omega$  の光が発生する． 同様に、THG 光は 3 次の非線形分極  $\chi^{(3)}EEE$  によって誘起され、 $3\omega$  の周波数を持つ光が発生する．

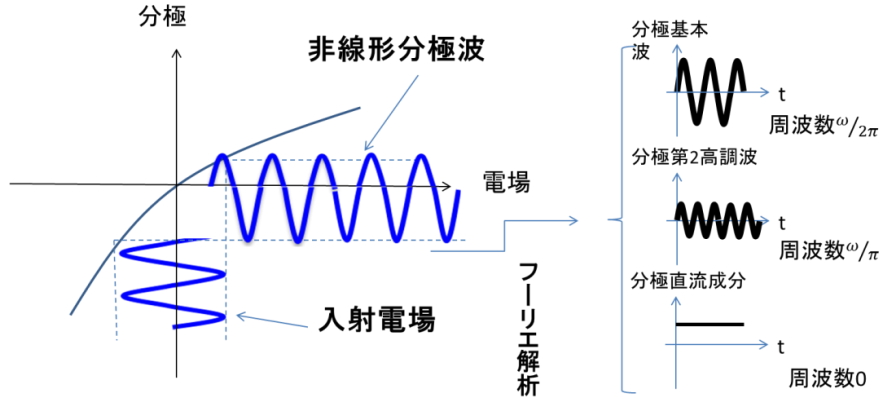


Fig.4-2 非線形分極波

#### 4.2 多光子蛍光[13]

Fig.4-3 に 1 光子励起過程と 2 光子励起過程および 3 光子励起過程の原理を示す．

通常の 1 光子励起過程では、基底状態に存在する電子が周波数 $\omega_1$ の光子 1 個を吸収して励起状態に遷移する．そしてその励起電子が緩和し、基底状態に戻る際に周波数 $\omega_f$ の蛍光を発する．

2 光子励起過程では、基底状態の電子が励起状態に励起される際に、同時に 2 個の光子を吸収する．この場合、光子 1 個がもつエネルギーは 1 光子過程の場合の半分なので光の周波数 $\omega_2$ については、

$$\omega_2 = \frac{\omega_1}{2} < \omega_f$$

が成立する． よって、2 光子励起過程では励起光より短波長の蛍光が発光する．

3 光子励起過程の場合も同様に、基底状態の電子が励起状態に励起される際に、同時に 3 個の光子を吸収する．

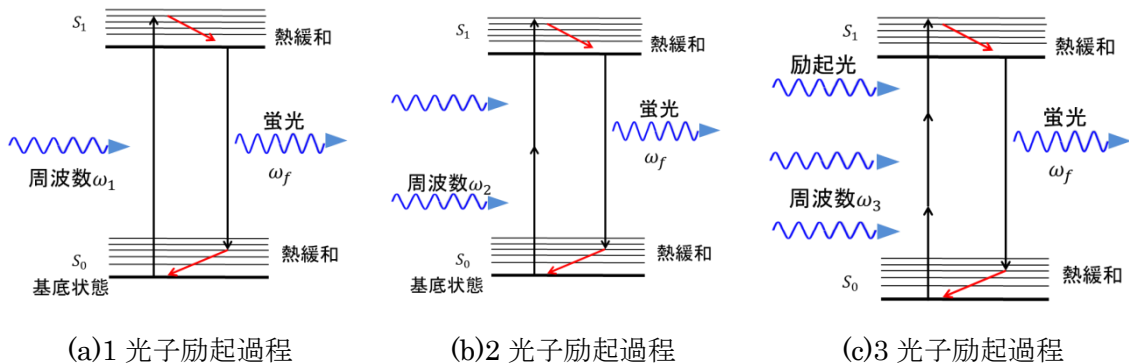


Fig.4-3 エネルギー準位図



Fig.4-4 に 2 光子蛍光顕微鏡の光学系を示す。この光学系の特徴は光源に超短パルスレーザーを用いているところである。2 光子励起過程は光強度の 2 乗に比例するため、ピーク値の大きな超短パルスレーザーを用いることによって効率よく励起することが可能である。対物レンズを用いて 3 次元走査ステージ上の試料に集光する。非線形光学効果によって生じる 2 光子蛍光は対物レンズによって集められる。そしてダイクロイックミラーによって特定の波長の光子を反射する、つまり 2 光子蛍光の光子を反射する。しかし反射した光には基本波が含まれている場合もある。そこで干渉フィルターを用いて特定の性質をもつ光だけを透過させて PMT(光電子増倍管)によって検出する。こうして発生した 2 光子蛍光を観測することが可能となる。

2 光子励起過程の遷移確率を  $W$ 、入射光のパワーを  $P$ 、光子 1 個のエネルギーを  $h\omega$  とおくと、2 光子過程の吸収断面積  $\sigma$  は

$$\sigma = W \left( \frac{h\omega}{P} \right)^2$$

となる。単位は GM で表される。生物試料の観察に用いられる代表的な色素である DAPI や indo-1 の 2 光子吸収断面積はそれぞれ 0.16, 1.5GM 程度である。2 光子励起過程の吸収断面積は 1 光子吸収の断面積に比べて 30 桁以上も小さい。そのため 2 光子励起を効率よく起こすためにも超短パルスレーザーの使用は不可欠である。

2 光子励起過程を利用すれば、生物試料や蛍光材料の 3 次元構造を観察することができる。2 光子励起過程は光強度の 2 乗に比例して発生するため、光電場が時空間的に局在化された集光スポット近傍では発生するが、集光位置からずれた位置では蛍光は生じない。通常の 1 光子励起過程では焦点位置以外でも励起光が通過する領域全体で蛍光が発生する。光軸に沿って発生する蛍光を積分して検出すると、光軸上の場所によらず一定になり光軸方向の分解能を有していないことが分かる。

また長波長の光を用いて蛍光試料を励起できるので、1 光子励起光に大きな吸収を持つ材料でも長波長領域に吸収の少ない材料なら、深部まで光を伝播させ観察することができる。その他にも近赤外光を用いることで、励起波長が紫外線の蛍光分子を励起することができ、波長領域を拡大することが可能である。また励起光と生じる蛍光との波長域が大きく離れているため、励起光と蛍光との分離が容易で、バックグラウンドノイズを除去することができるといった長所がある。



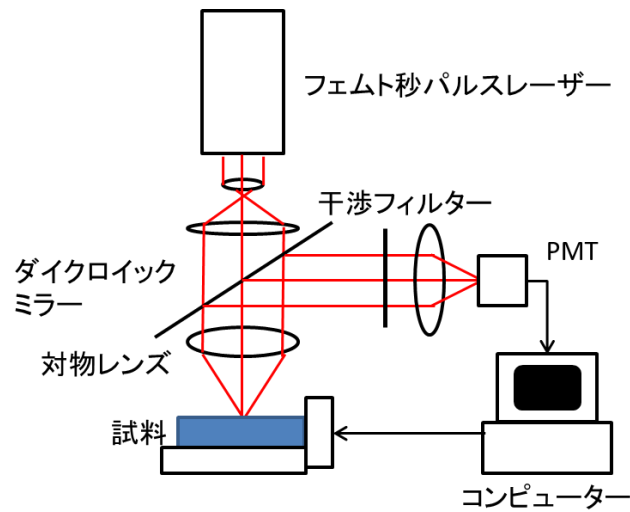
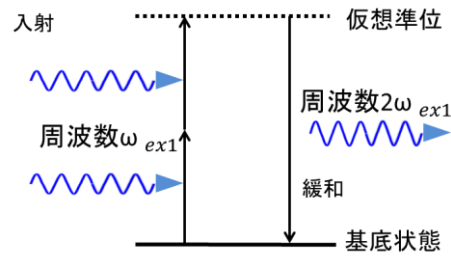


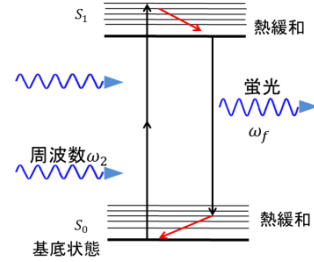
Fig.4-4 2光子励起蛍光顕微鏡の光学系

#### 4.3 高調波発生光（第2高調波発生光，第3高調波発生光）[13]

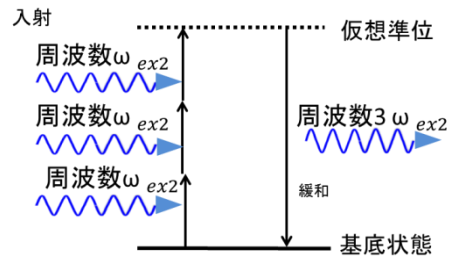
Fig.4-5 に SHG, THG, 2光子励起過程および3光子蛍光の原理を示す. SHG の原理を説明する. 周波数 $\omega_{ex1}$ の超短パルス光を試料に入射すると, 基底状態の電子は2個の光子を同時に吸収して仮想準位に励起される. 仮想準位には, 吸収・緩和過程は存在しないので, 直接, 基底状態に遷移する際に周波数 $2\omega_{ex1}$ の光子を放出する. THG も同様に, 周波数 $\omega_{ex2}$ の光を試料に入射すると基底状態の電子は3個の光子を同時に吸収して仮想準位に励起, そして基底状態に遷移する際に周波数 $3\omega_{ex2}$ の光子を放出する. SHG 光/THG 光では, 入射光と高調波発生光の間にはエネルギー保存則が成り立ち, SHG だと入射波長のちょうど半波長, THG だと入射波長のちょうど 1/3 波長の光が発生する. 一方, 2光子蛍光や3光子蛍光では, 吸収・緩和過程によるエネルギー損失が必ず伴うので, エネルギー保存則は成り立たず, SHG 光/THG 光よりも長波長側に2光子蛍光/3光子蛍光が発生する. また, 2光子蛍光/3光子蛍光は蛍光のためブロードなスペクトル範囲(スペクトル幅 $\approx 300\text{nm}$ )で発生するが, SHG 光/THG 光のスペクトル幅は入射レーザー光のスペクトル幅に近い.



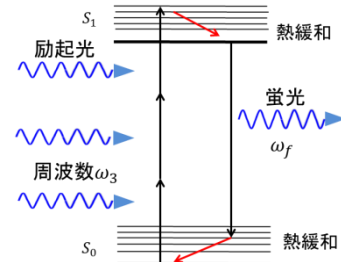
(a) SHG(第2高調波発生)の原理



(c)2 光子励起過程の原理



(b) THG(第3高調波発生)の原理



(c)1 光子励起過程の原理

Fig.4-5 エネルギー準位図

仮想準位への励起確率は、SHG 光では光強度の2乗、THG 光では光強度の3乗に比例する。超短パルス光は非常に強いピーク強度を生み出すことができ、これを用いると、生体に熱的ダメージを与えることなく、SHG や THG といった非線形光学現象を効率的に起こすことができる。SHG の発生効率は、2次の非線形感受率によってその発生効率が決定され、非中心対称性物質からのみ発生する。また SHG 光は構造的に中心対称性物質からは発生せず、コラーゲンのような非中心対称性物質からのみ発生する。THG は3次の非線形光学効果であり、SHG のような非中心対称性物質の選択性も持たず、全ての物質の境界部で発生する。また、物質の境界で強い THG 信号が検出されるため、異なる物質間のコントラストが高いことが知られている。

SHG を分かりやすく解釈するためにピアノの鍵盤を例に説明する (Fig.4-6)。鍵盤を軽くたたくと「ド」の音が発生するとする (Fig.4-6 (a))。これは線形応答である。しかしもし非常に非常に強く叩くとする「ド」の基本音に加えて1オクターブ上の「ド」の高調波音が発生する (Fig.4-6(b))。これが音における非線形応答である。光の領域におけるこのような応答が SHG 光発生である。SHG 光の場合は、組織コラーゲンが鍵盤、フェムト秒パルスレーザーのような超短パルス光が鍵盤を強く叩く役割をもつ。

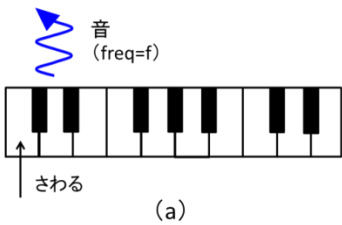
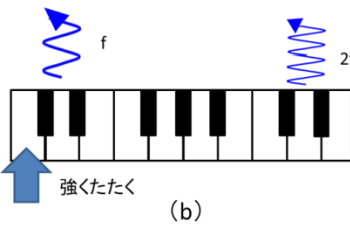
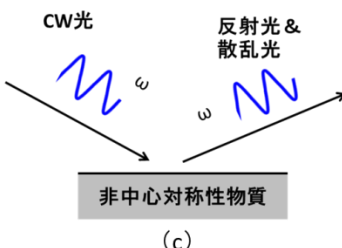
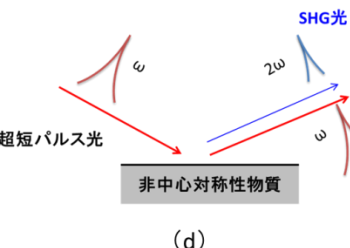
	線形効果	非線形効果
音	 <p>(a)</p>	 <p>(b)</p>
光	 <p>(c)</p>	 <p>(d)</p>

Fig.4-6 SHG 発生の原理

超短パルス光が生体組織に集光されると、焦点近傍のコラーゲンより SHG 光が誘起される。一方、入射基本波光の一部はコラーゲンにより散乱を受ける。このとき、コヒーレンス長 $l_c$ （生体組織では  $5\sim 13\mu\text{m}$ ）が散乱係数 $\mu_s$ の逆数より大きいという条件（ $l_c > 1/\mu_s$ ）が満たされると、散乱された基本波光は、コヒーレンスを失う前に次のコラーゲンと相互作用し、結果として各コラーゲンから発生する SHG 光にはコヒーレンスが保たれることになる。その結果、SHG 光は次々と干渉し、基本波光の多重散乱によってコヒーレント的に増強され、最終的にサンプル表面からコヒーレント増強 SHG 光を観察することができる。

Fig.4-7 に SHG 顕微鏡の光学系を示す。レーザー光源としてフェムト秒パルスレーザーを用いている。フェムト秒( $10^{-15}$ 秒)レーザーとは、いろいろな周波数の光の位相を同期することでピーク強度が非常に強くなっているレーザーである。ピーク強度が非常に強いので非線形光学効果を効率的に使うことができる。ガルバノミラーを用いることでサンプル上にレーザー光を振ることができる。サンプルを透過した光には基本波のほかに、非線形光学効果により生じた SHG 光が含まれる。SHG 光のみを抽出するためにフィルターを用いて特定の波長のみを透過させ、PMT に入れることにより検出する。SHG 顕微鏡と 2 光子励起顕微鏡の大きな違いは、SHG 顕微鏡は非中心対称性をもった構造のみを観察することができる。

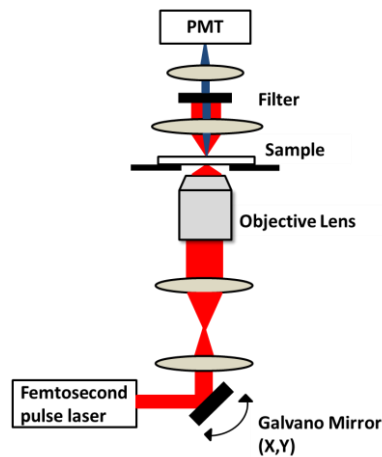


Fig.4-7 SHG 顕微鏡の系

#### 4.4 多光子顕微鏡を用いた皮膚計測に関する先行研究[4][14][16]

これまでの多光子顕微鏡では，光源に波長 800 nm 帯のフェムト秒レーザーが用いられてきた．入射光の強度に対し，2 光子蛍光，SHG 光が含まれた光が発生する．光学フィルターを用いてその光を分離・画像化することで表皮ではメラニンやミトコンドリア，真皮ではエラスチンやコラーゲンを観測することができる．

先行研究で多光子顕微鏡を用いて取得した 20 代女性光老化頬皮膚におけるコラーゲンとエラスチンのイメージを Fig.4-8 に示す．イメージサイズは  $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$  である．波長 760nm の超短パルスレーザー光を入射することで真皮中のコラーゲンから 380nm の SHG 光が発生する．また，波長 740nm の光を入射することで真皮中のエラスチンから 410-490nm の 2 光子蛍光が発生する．発生する光を取得して画像化したものを Fig.4-8 に示す．H&E 染色において，エラスチンとコラーゲンはピンク染色の度合いが変わる．エラスチン染色ではエラスチン線維を青黒く，コラーゲン線維を赤く染めた．表皮に近い位置の真皮にある灰色がかった曲線線維を青色に染めることでソーラーエラストーシスであると特徴づけた．染色結果と SHG イメージ結果を見比べると，SHG イメージより，コラーゲンとエラスチンを観測できていると考える．

しかし入射レーザー光，発生 SHG 光および TPEF（Two Photon Excitation Fluorescence：2 光子蛍光）が生体組織内で受ける吸収と散乱により強く減衰するため，生体深部を高コントラストで可視化することは困難であった．生体組織で受ける光の散乱はレイリー散乱であるため，減衰の影響を考えると入射光を長波長側にシフトさせることが望ましいが，2 光子励起スペクトル範囲の制限がある．



Fig.4-8 H&E 染色(左図)とエラスチン染色(中図)と SHG イメージ(右図)の図[14]

レーザー光源励起チタンサファイアレーザーを用いてラウルダン処理された角質層の偏光分解イメージングをとる先行研究について調べた. Fig.4-9 の丸く見える構造が角質層である. 繊維の配向方向が偏光方向と同じになると, 同じ向きの線維のみが反応を示し, 発生光が増大する.

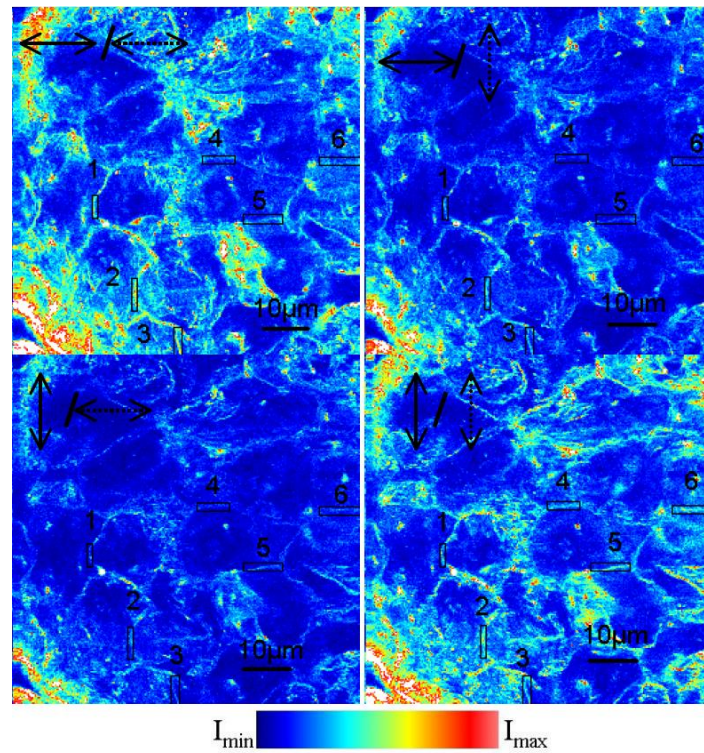


Fig.4-9 ラウルダン処理された角質層の偏光分解イメージング[4]

レーザー光源にフェムト秒レーザー(Ti:S@800nm,Cr:F@1250nm)を使用する先行研究について記述する. 豚の皮膚の真皮コラーゲン線維の深さ分解 SHG イメージングを取得する研究である. Fig.4-10(a)は Ti:S @800nm を光源としたときの深さ分解能 SHG イメージを, Fig.4-10(b)は Cr:F@1250nm を光源としたときの深さ分解能 SHG イメージを示す. Ti:S で表皮下深さ 80 $\mu$ m で最初に SHG イメージが現れた. しかし, 深さが 110 $\mu$ m を過ぎるとピントが合わなくなり, 200 $\mu$ m より深くなると SHG 光はほとんどなくなった. Fig.4-10(b)は Cr:F@1250nm を光源としたときの深さ分解 SHG イメージを表す. 深さ 80 $\mu$ m の深さでコラーゲン線維が現れ始め深さ 120 $\mu$ m ほどでも十分な空中分解能を維持していた. イメージのコントラストが劣化しつつあるが, 深さ 350 $\mu$ m でも SHG 信号を検出することができた.

Fig.4-10 より, 波長が長いほど生体の散乱の影響を受けにくくなるので生体深部の観測に向いていることが分かる.

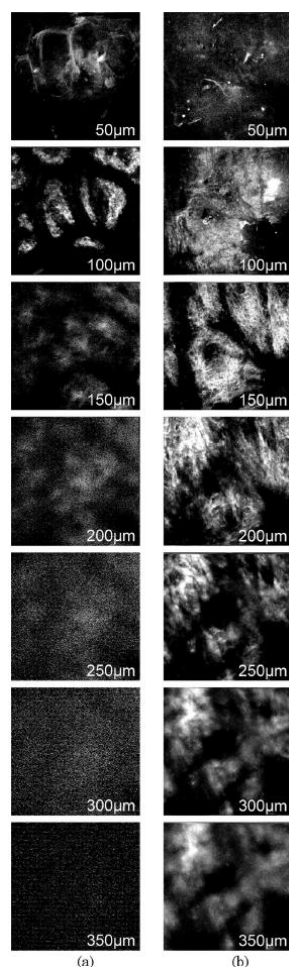


Fig.4-10 (a)Ti:S@800nm,(b)Cr:F@1250nm の深さ分解 SHG イメージ[16]

## 第5章 波長可変フェムト秒レーザーの特性評価

### 5.1 出力パワーの波長依存性

本研究では、スペクトラフィジックス社の InSight DeepSee (可変範囲: 680nm ~ 1300nm) を波長可変フェムト秒レーザーとして用いた。Table.5-1 にレーザーの仕様を示す。

Table.5-1 レーザーの仕様

モデル名	InSight DeepSee
波長可変範囲	680nm-1300nm
平均パワー	600mW @ 700nm 1.0W @ 900nm 800mW @ 1000nm 600mW @ 1200nm 500mW @ 1300nm
パルス幅	<120fs
繰り返し率	80MHz $\pm$ 1MHz
空間モード	TEM <sub>00</sub> , M <sup>2</sup> <1.2
偏光	水平(>500:1)
出力安定性	< $\pm$ 1%
ビーム拡がり角	<1.5mrad
ビーム径	<1.1 $\pm$ 0.2mm
ビーム真円度	0.8–1.2
ビーム位置安定性	<350 $\mu$ rad
分散範囲	
680nm	–12,000 fs <sup>2</sup> to –40,000 fs <sup>2</sup>
800nm	0 fs <sup>2</sup> to –25,000 fs <sup>2</sup>
1050nm	0 fs <sup>2</sup> to –10,000 fs <sup>2</sup>
1300nm	–3000 fs <sup>2</sup> to –8,000 fs <sup>2</sup>

実際に、レーザー出射口直後および対物レンズ後の平均パワーを計測した。その結果を Fig.5.1 に示す。Fig.5.1 からどの波長においても出射口直後と対物レンズ直後のパワーを比較すると、パワーが著しく低下しているのが分かる。レーザー光が実験系に組み込んでいる偏光子やミラー、ガラスを通ることで徐々にパワーが落ちるからだと考える。



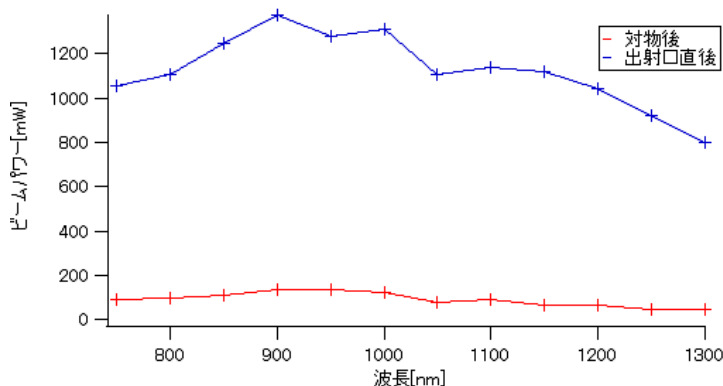


Fig.5.1(a) 波長毎のレーザーパワー

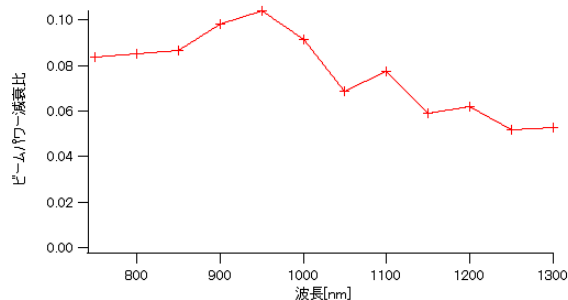


Fig.5.1(b) 波長ごとのビームパワー減衰比

## 5.2 最適分散量の決定

本実験で用いる波長可変フェムト秒レーザーは、正チャープを有する各種光学素子からなる顕微鏡光学系において、波長毎にチャープフリーなフーリエ変換限界パルスを達成できるように、任意量の負チャープを印加出来る機構を内蔵している (Table.5-1 参照)。しかし、非線形光学顕微鏡の対物レンズ焦点位置でフーリエ変換限界パルスを達成するためには、今回の顕微鏡において印加すべき負チャープ量の波長依存性を予め知っておく必要がある。そこで、今回の非線形光学顕微鏡における最適チャープ量の算出を行った。

実験装置を Fig.5-2 に示す。ここでは、対物レンズ焦点位置に蛍光溶液サンプルをセットし、各波長における 2 光子蛍光が最大となるような印加負チャープを求めた。1/2 波長板 ( $\lambda/2$  板) と偏光子 (水平偏光) の組み合わせを光減衰器として用いることで、対物レンズ後のパワー、つまりサンプルに集光するレーザー光のパワーを調整する。その後設置したガラス棒 (厚み 100mm) と  $\alpha$ -BBO 結晶 (厚み 15mm および 20mm) は正のチャープを与えるために利用する。レーザー光を対物レンズで蛍光溶液サンプルに集光することにより発生した 2 光子蛍光は、ハーモニクセパレーターにより分離され、波長可変のバンドパスフィルターとして用いた分光器の入射スリット上に集光される。そして外部的に取り付けたフォトンカウンティング型光電子増倍管によって検出される。

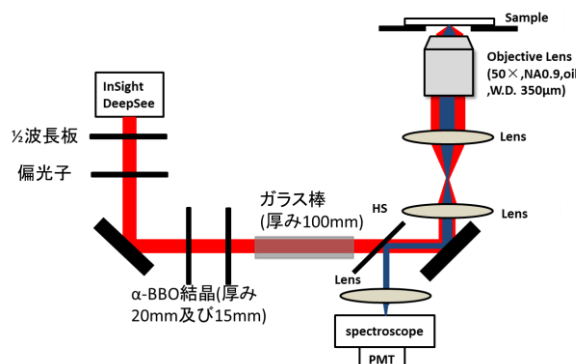


Fig.5-2 実験装置

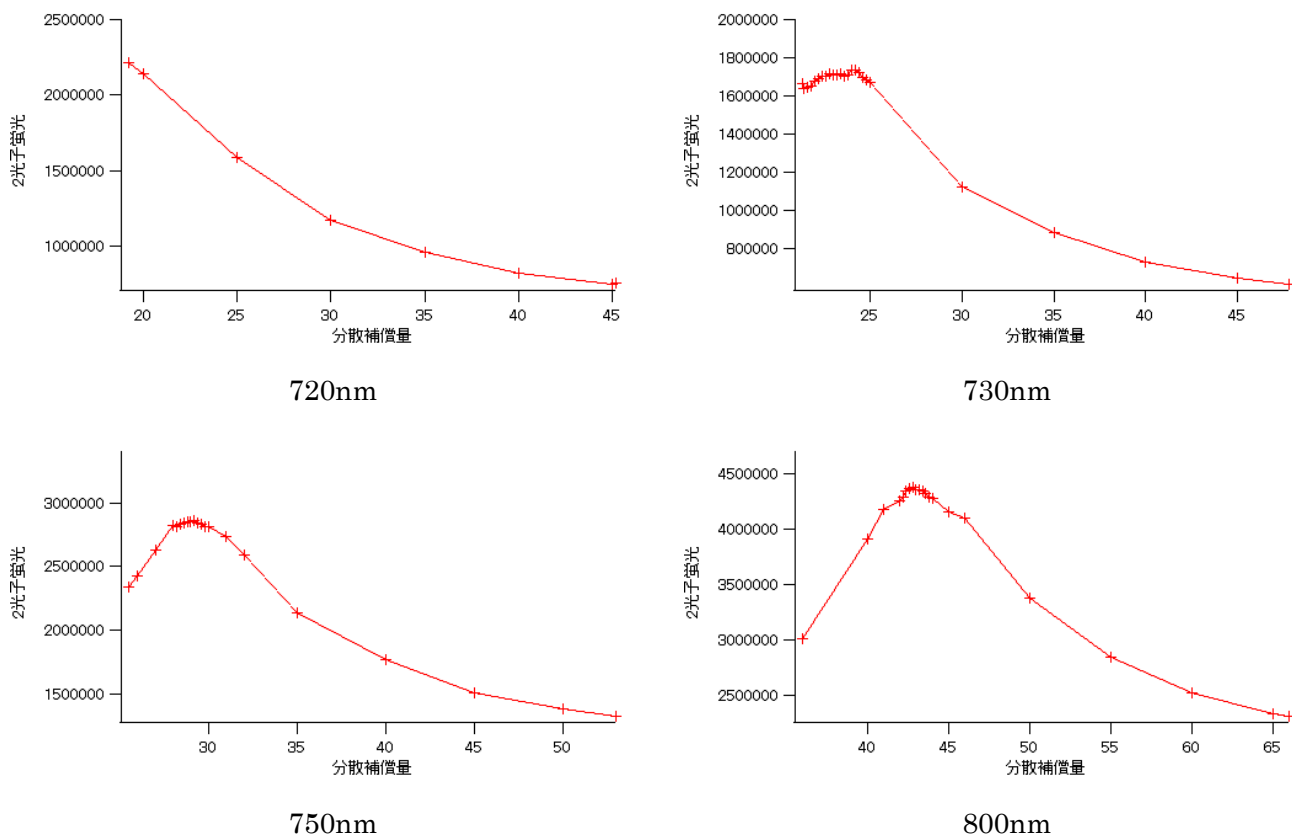


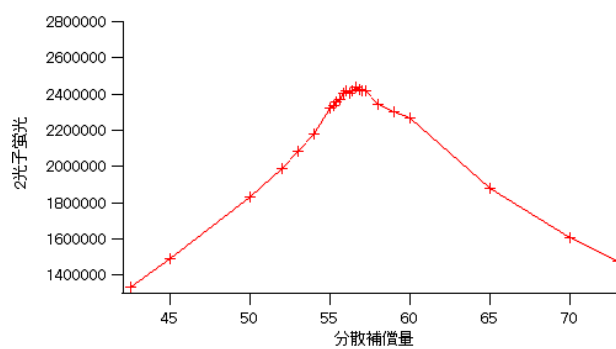
今回の実験では、720nm～1300nm の範囲で 50nm 刻みずつレーザー波長を変化させながら特性評価を行った。波長毎に、分光器の設定やサンプルを設定した。実験条件を Table.5-2 に示す。

Table.5-2 実験条件

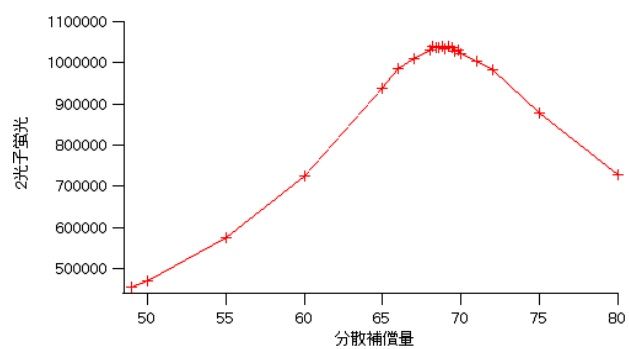
入射波長	分光器波長域	分解能	サンプル
700nm～1100nm	580nm	0.7nm	ローダミン 6G 水溶液 607 $\mu$ mol/L
1150nm	600nm	3nm	スルホローダミン 101 水溶液 20 $\mu$ mol/L
1200nm	630nm	3nm	
1250nm～1300nm	580nm	0.7nm	ローダミン B 水溶液 1mmol/L

Fig.5-3 は、各波長における印加した負チャープ量（相対値）と 2 光子蛍光強度の関係を示している。各グラフのピークは、その印加負チャープ量でフーリエ変換限界パルスが達成できていることを示している。730nm 以上ではピークが確認されたが、720nm 以下ではピークが確認されず、今回の実験装置ではフーリエ変換限界パルスが達成できない。そこで、次章のイメージング実験では、730nm 以上のフェムト秒レーザー光を利用することにする。

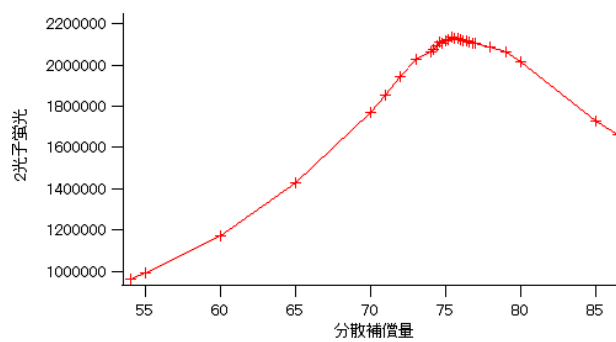




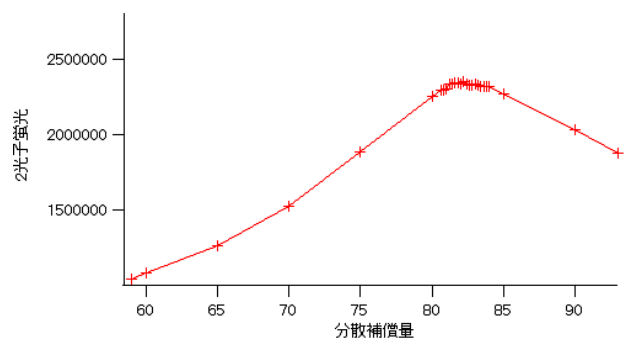
850nm



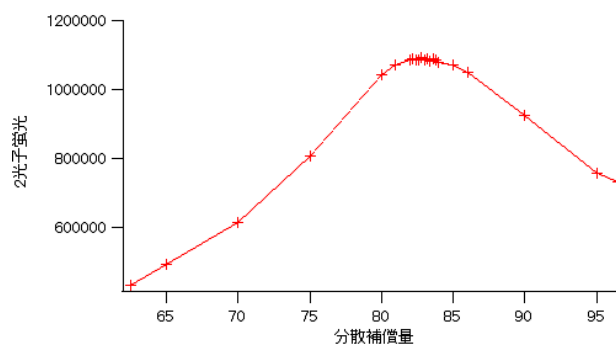
900nm



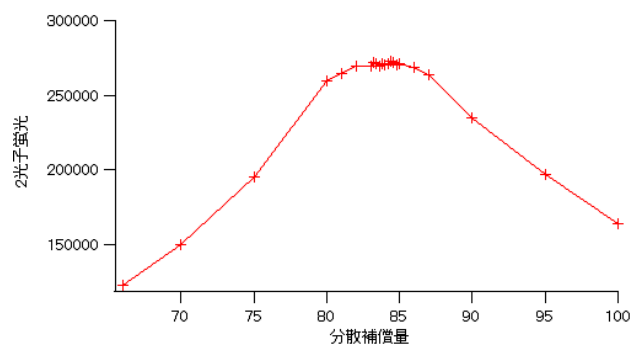
950nm



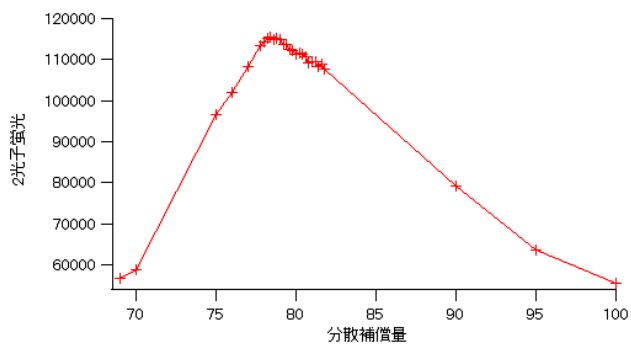
1000nm



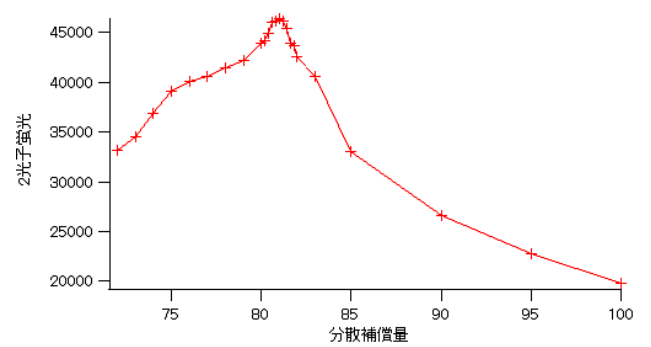
1050nm



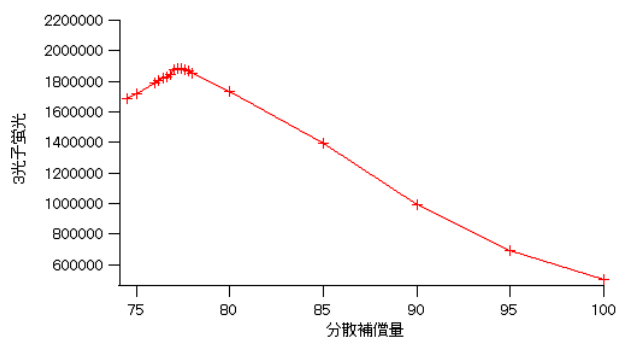
1100nm



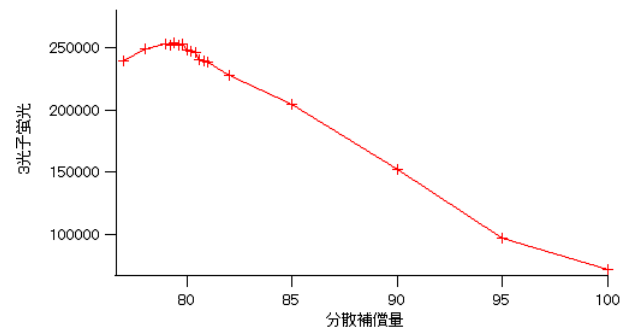
1150nm



1200nm



1250nm



1300nm

Fig.5-3 波長ごとの分散補償量対蛍光強度のグラフ

Fig.5-4 は、Fig.5-3 の最適印加負分散量の波長依存性を示している。Fig.5-3 は、Fig.5-2 の最適印加負チャープ量の波長依存性を示している。最適値は波長毎で異なり、短波長側ほど分散補償量が小さく、長波長側ほど大きくなっている。また、短波長では波長依存が大きい、長波長側では小さくなっている。これは、ガラス材料の正の分散特性の逆プロファイルと良く一致していることから、パルス幅を拡げる要因が主に対物レンズを始めとした透過光学素子であることを示唆している。

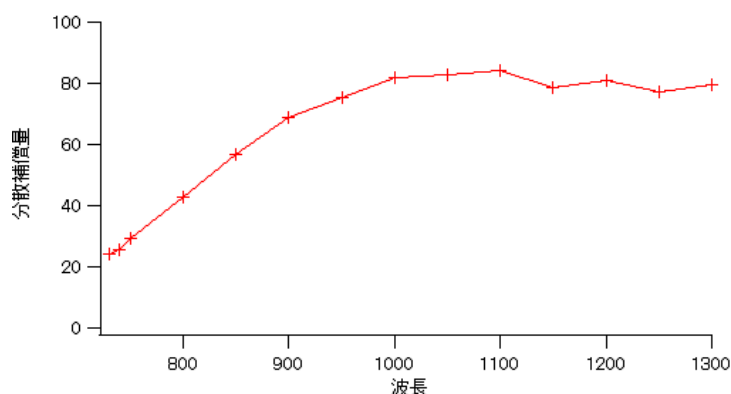
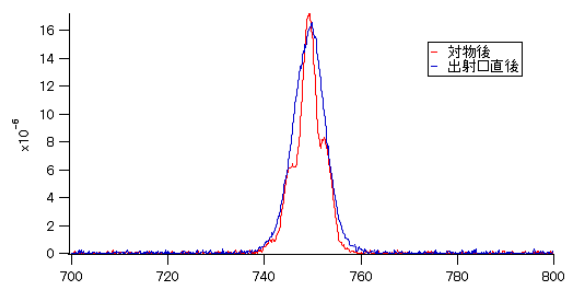


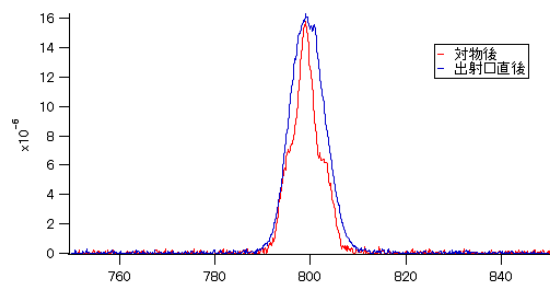
Fig.5-4 最適印加負分散量の波長依存性

### 5.3 パルス幅の波長依存性

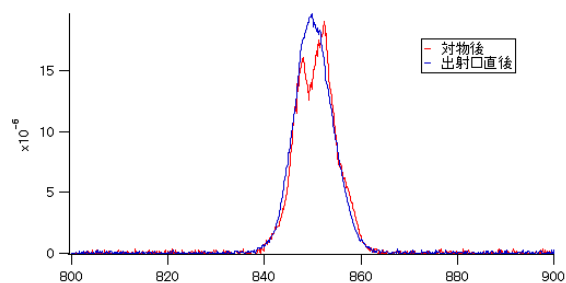
前節の実験から、730nm 以上の波長において、フーリエ変換限界パルスを実現できることを確認した。フーリエ変換限界パルスでは、光スペクトル波形のスペクトル幅から、一義的にパルス幅を決定できる。そこで、スペクトル幅からパルス幅を算出し、その波長依存性を評価した。まず、光スペクトルアナライザ（型番：AQ-6315A/B，メーカー：横河電機株式会社）を用いて、レーザー射出口直後および対物レンズ後のスペクトル波形を計測した。計測した波形を Fig.5-5 に示す。上記より、各波長におけるスペクトル幅は、Table.5-3 および Table.5-4, Fig.5-6 のようになった。波長表示のスペクトル幅  $\Delta\lambda$  は  $c\frac{\Delta\lambda}{\lambda_0^2}$  によって、周波数表示のスペクトル幅  $\Delta\nu$  に変換できる（ $c$ ：光の速さ， $\lambda_0$ ：中心波長）。



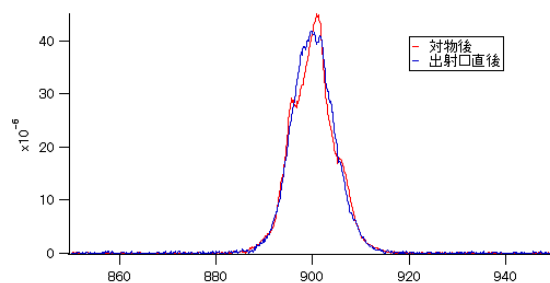
750nm



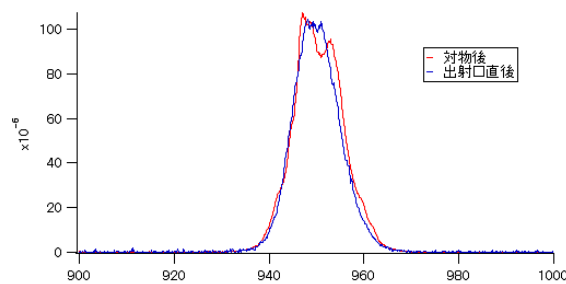
800nm



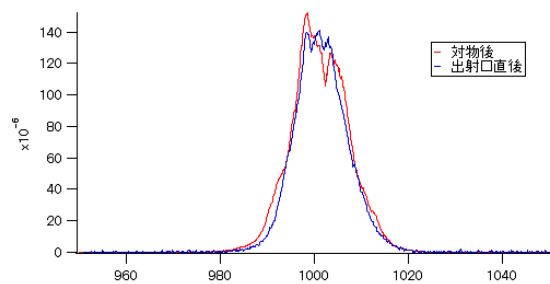
850nm



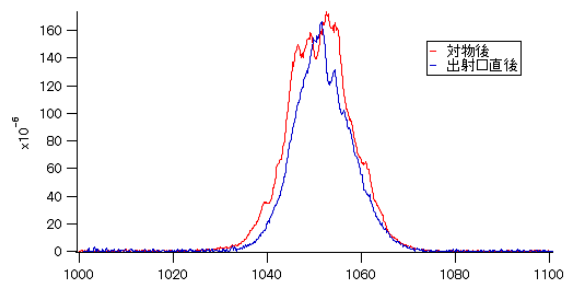
900nm



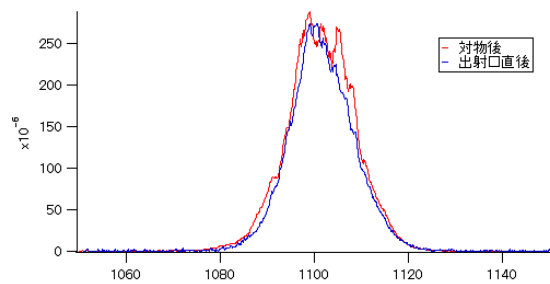
950nm



1000nm



1050nm



1100nm

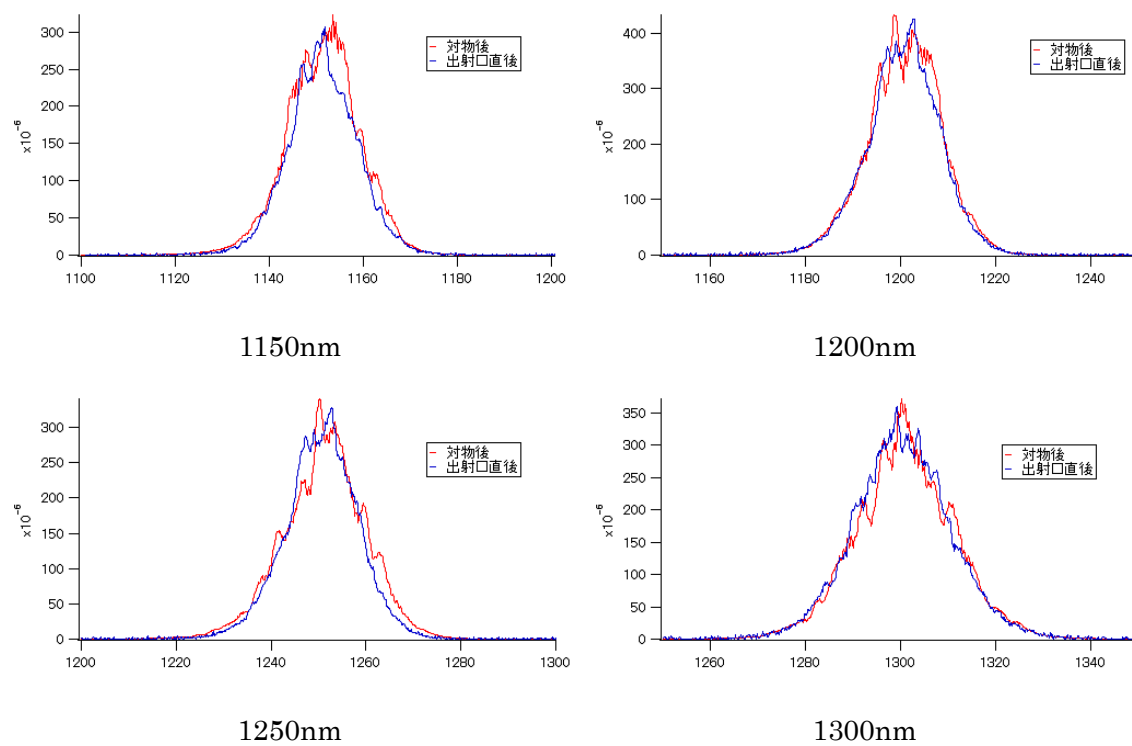


Fig.5-5 DeepSee 射出口直後および対物レンズ直後のスペクトル幅

Table.5-3 レーザー射出口直後の各波長の半値幅およびスペクトル幅

波長	半値幅	スペクトル幅
750nm	7.6669nm	4.096THz
800nm	8.3909nm	3.939THz
850nm	9.1868nm	3.813THz
900nm	10.016nm	3.709THz
950nm	11.113nm	3.695THz
1000nm	12.443nm	3.731THz
1050nm	13.787nm	3.747THz
1100nm	15.112nm	3.744THz
1150nm	16.241nm	3.682THz
1200nm	16.795nm	3.493THz
1250nm	18.469nm	3.542THz
1300nm	21.222nm	3.765THz

Table.5-4 対物レンズでの各波長の半値幅およびパルス幅

波長	半値幅	スペクトル幅
750nm	6.8179nm	3.642THz
800nm	7.3791nm	3.476THz
850nm	9.8343nm	4.077THz
900nm	10.348nm	3.832THz
950nm	12.135nm	4.031THz
1000nm	13.907nm	4.162THz
1050nm	15.591nm	4.232THz
1100nm	16.272nm	4.023THz
1150nm	17.36nm	3.926THz
1200nm	17.498nm	3.638THz
1250nm	19.152nm	3.667THz
1300nm	22.885nm	4.056THz

## スペクトル幅

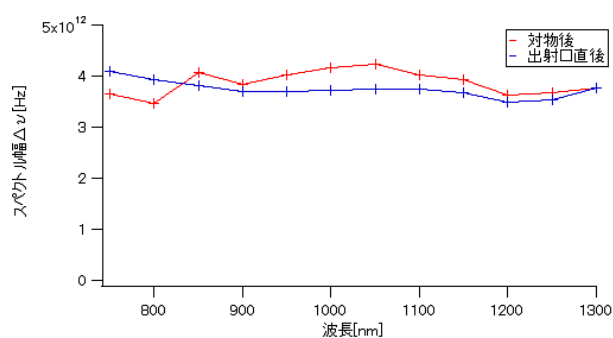


Fig.5-6 射出口直後および対物レンズ後の波長ごとのスペクトル波形

Fig.5-6 より，波長ごとに出射口直後のスペクトル幅が連続的に移行しているのに対し，対物レンズ後のそれはところどころ不規則な移行を示している．実験系に含まれている偏光子やガラスを透過する時，またミラーに反射する時に超短パルス光の性質が若干変わってしまっているからだと考える．

次に，スペクトル幅  $\Delta \nu$  から，パルス幅  $\Delta \tau$  は  $\frac{0.441}{\Delta \nu}$  で表される．射出口直後および対物レンズ後におけるパルス幅の計算結果をまとめたものを Fig.5-7 に示す．これからパルス幅については，大きな波長依存性は確認されなかった．パルス幅はスペクトル幅の逆数に比例するので，パルス幅のグラフがスペクトル幅のグラフと同じ挙動をしているのは，上で挙げたような理由だと考える．

## パルス幅

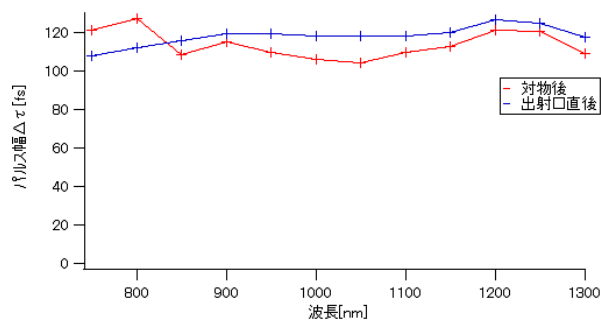


Fig.5-7 射出口直後および対物レンズ後の波長ごとのパルス幅



## 第6章 SHG 顕微鏡の基本特性評価

### 6.1 実験装置

実験装置を Fig.6-1 に示す. 本実験では波長可変のフェムト秒レーザー InSight DeepSee (可変範囲: 680nm~1300nm) を用いて, 波長 750nm~1300nm から 50nm 刻みずつ使用する. 方向を固定した偏光子 (CASIX, PGL8610,  $<5 \times 10^{-6}$ , 700-300nm) に対して 1/2 波長板 (波長 800nm, Edmund Optics) を回すことで, 対物レンズ後のパワー, つまり生体サンプルに集光するレーザー光のパワーを調整する. 偏光子を水平方向で固定することで, レーザー光を水平偏光に統一する. ハーモニックセパレーター前に設置した 2 つの  $\alpha$ -BBO 結晶 (厚さ 20mm および 15mm) とガラス棒 (長さ 100mm) で正のチャープを与え, レーザー内蔵の分散補償装置で負のチャープを印加することにより, 波長毎にフーリエ変換パルスに対物レンズ焦点位置で達成する. ガルバノミラー (6210H, Cambridge Technology) を用いてレーザー光をサンプル上に広範囲に振らせる. リレーレンズ ( $f=100\text{mm}$  および  $f=80\text{mm}$ , S51C-40-100-CA および S51C-40-80-CA, 駿河) でレーザー光の径を対物レンズ (倍率 50 倍, NA=0.90, 油浸, W.D.0.35, Nikon) の入射瞳に合わせる. サンプルからの基本波, SHG 光, THG 光, 2 光子蛍光が対物レンズによって集められる. いろいろな波長成分を含んだ光をハーモニックセパレーター (FF705-Di01, 蛍光帯域の反射率  $R>98\%$ : 350-690nm, レーザー帯域の透過率  $T>93\%$ : 720-1600nm) に通すことで, SHG 光, THG 光または 2 光子蛍光を抽出することができる. 抽出した光はレンズを通して波長可変のバンドパスフィルターとして用いた分光器 (島津製作所 SPG-120S, 波長範囲 200nm-900nm) の入射スリット上に集光させる. 分光器の射出スリットを通過した光は外部的に取り付けられたフォトンカウンティング型光電子倍增管 (浜松ホトニクス H8259-01) によって検出する.

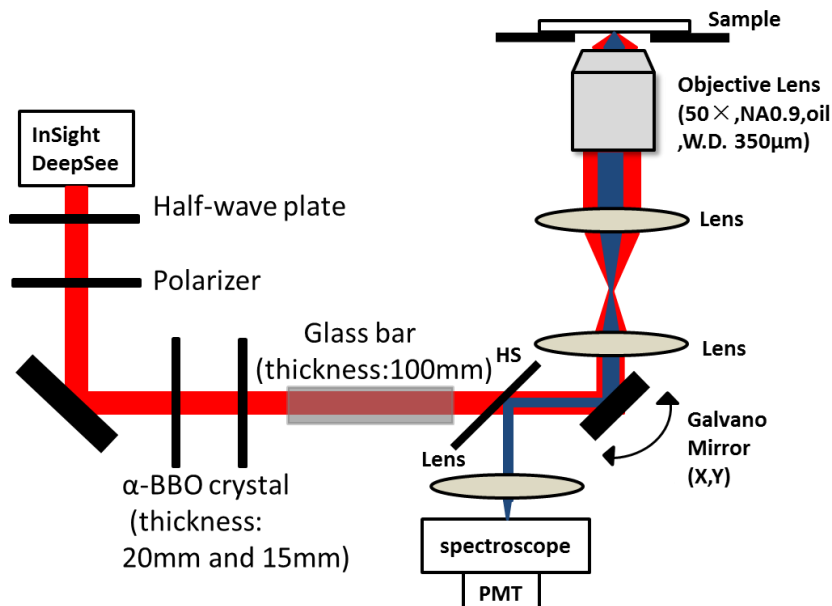
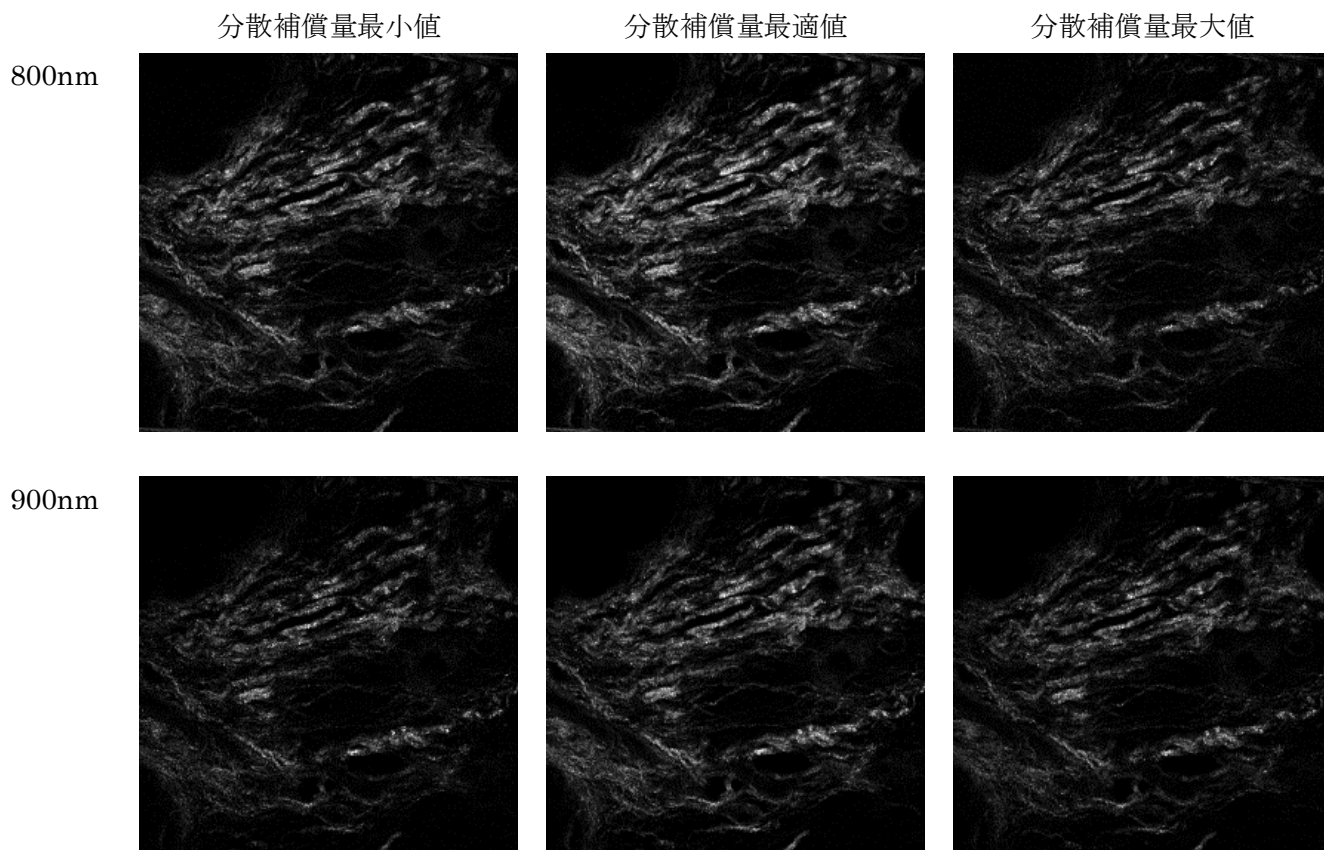


Fig.6-1 実験装置

## 6.2 分散補償量の違いによる SHG イメージの違い

前章において、蛍光色素サンプルからの2光子蛍光を用いて、フーリエ変換限界パルス光を達成可能なことを確認した。そこで実際に、フーリエ変換限界パルス光とそうでないパルス光における SHG イメージの違いを確認した。サンプルには、光老化皮膚切片サンプル（厚さ  $100\mu\text{m}$ ）を用いた。対物レンズ後のパワーを  $30\text{mW}$ 、分光器の分解能は  $12\text{nm}$  に設定した。Fig.6-2 は、波長  $800\text{nm}$ 、 $900\text{nm}$ 、 $1000\text{nm}$  の波長帯において、フーリエ変換限界パルス光（分散補償量最適値）とそうでないパルス光（分散補償量最小値および最大値）における SHG イメージ（イメージサイズ  $560\mu\text{m} \times 560\mu\text{m}$ ）の比較を示している。フーリエ変換限界パルス光のイメージが最もイメージコントラスト良い様子が確認できるが、より定量的に評価するため、イメージ全画素の光子量の総計を比較したグラフが Fig.6-3 である。すべての波長において分散補償量が最適な場合の発生光子量が最大となった。よって分散補償量の最適化に成功したと考える。



1000nm

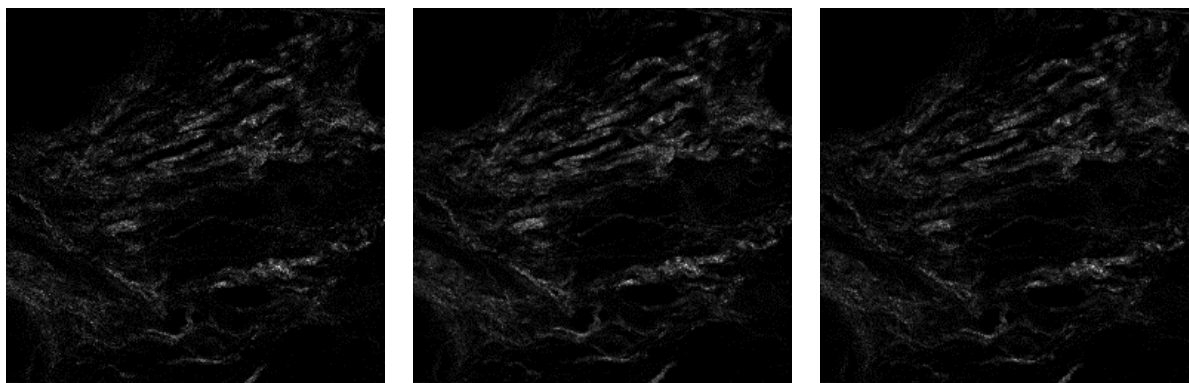


Fig.6-2 ある波長における分散補償量ごとのイメージ

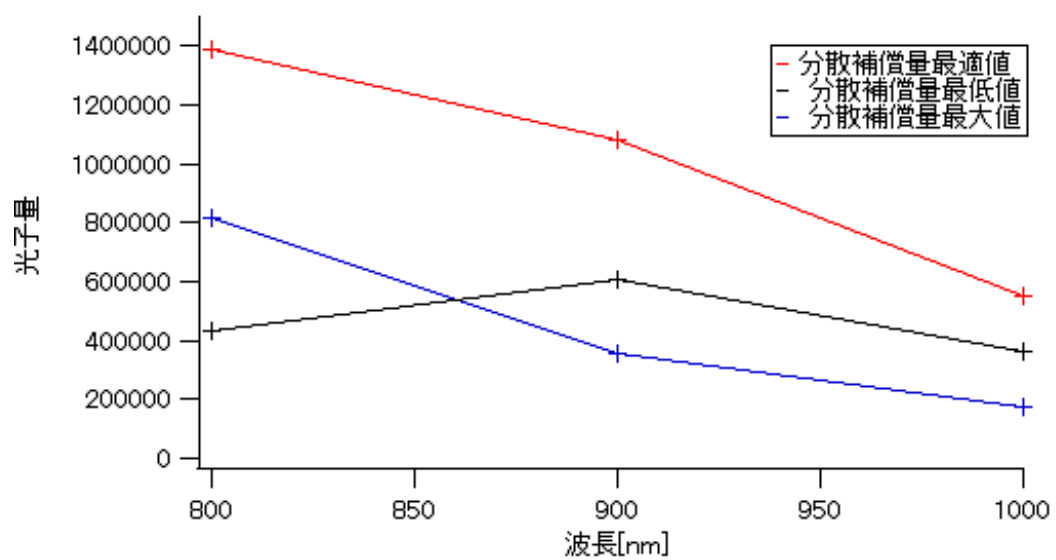


Fig.6-3 波長ごとの分散補償量と総光子量の関係のグラフ

## 第7章 コラーゲン/エラスチンの可視化

### 7.1 皮膚切片サンプルの計測

まず，生体散乱の影響の無い条件下で，TPEF/THG/SHG イメージの波長依存性を評価するため，光老化皮膚である84歳女性顔面皮膚切片サンプル（厚さ60 $\mu$ m）を計測した．

Fig.6-4は，切片サンプルのリゾルシンフクシン染色像（サイズ：2mm\*2.5mm）を示している．皮膚は長期間紫外線に曝されると，マトリックス分解酵素(MMPs)の発現が亢進されて，真皮マトリックス(特にコラーゲン)が分解されるだけでなく，真皮上層部に異常なエラスチン沈着が生じる．このような現象をソーラーエラストーシス(光老化)と称されており，特に紫外線に曝される頬などの露光部において高齢者の皮膚においてはエラスチン線維の肥厚化，繊維形をもたない無定形なエラスチンの沈着が見られることが分かっている．Fig.6-4をみると肥厚したエラスチン線維と無定形なエラスチンの塊など，エラスチン沈着が見られた．

また表皮直下はエラスチン沈着が見られないコラーゲンの層が存在する．光老化皮膚では表皮近傍において表皮，コラーゲン線維，エラスチンをイメージングすることができると考えた．

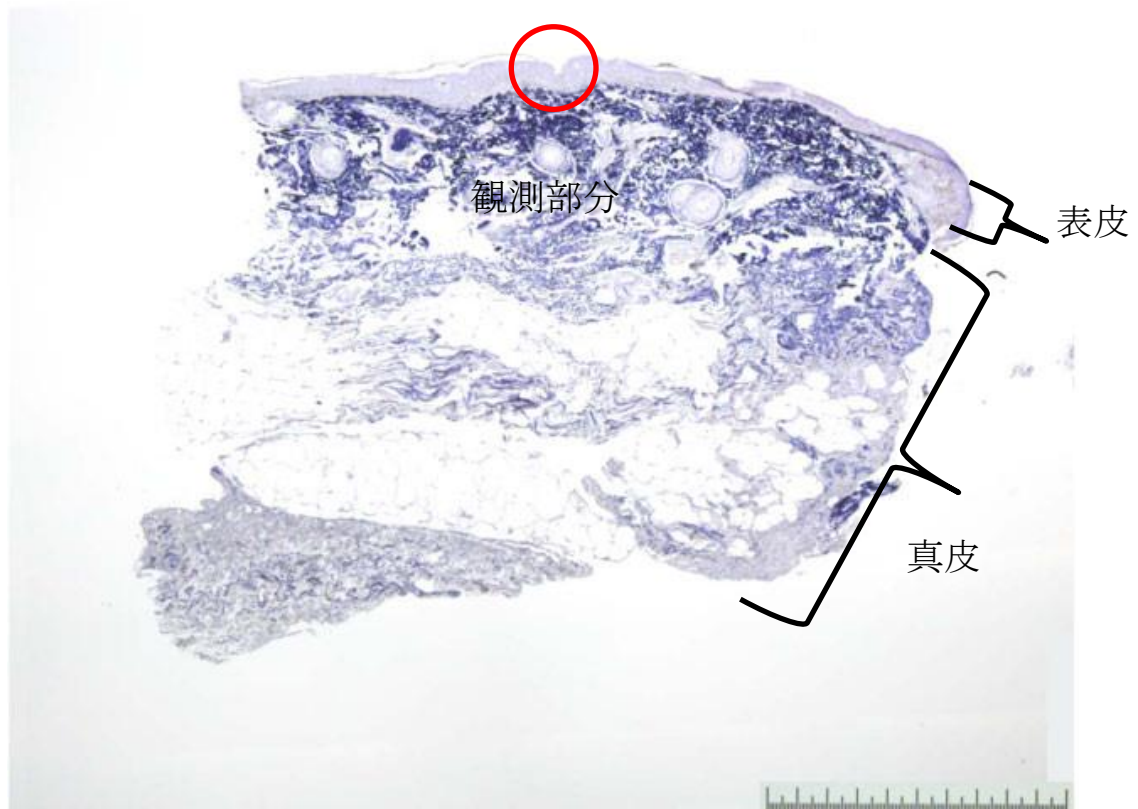
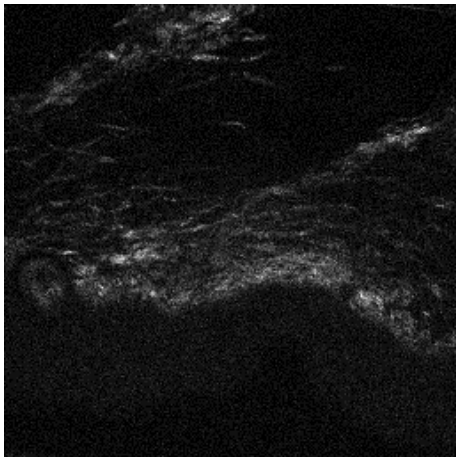
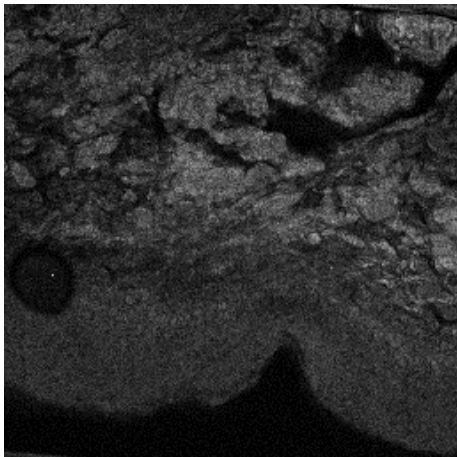
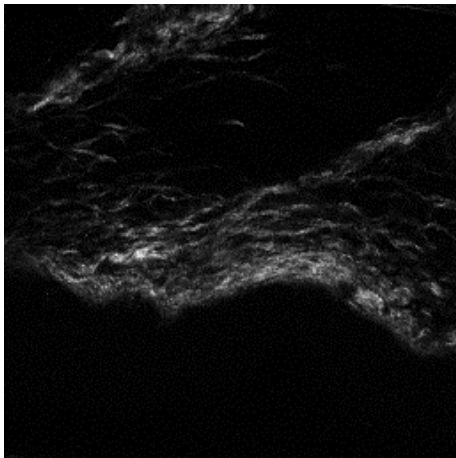
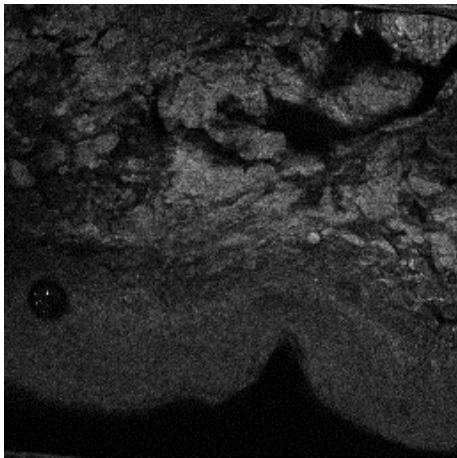
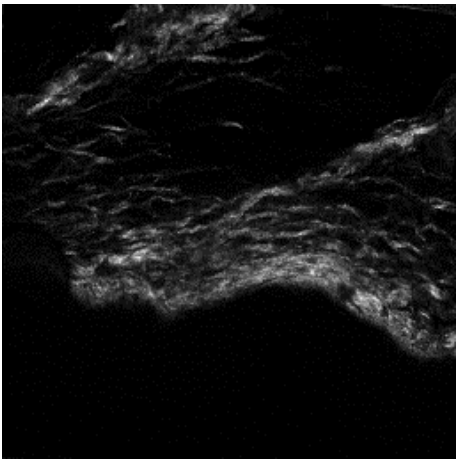
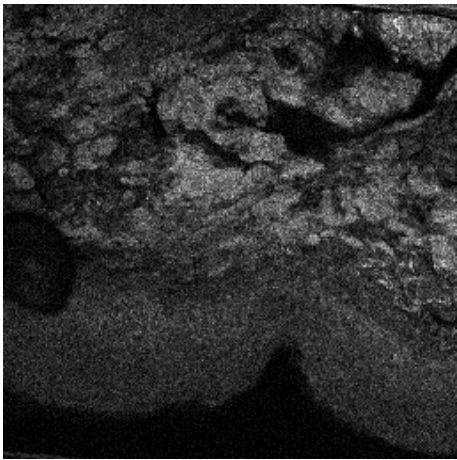
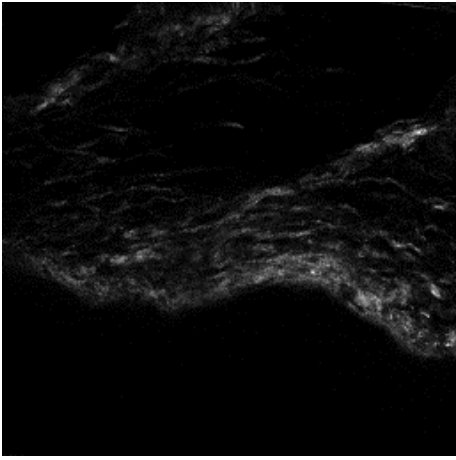
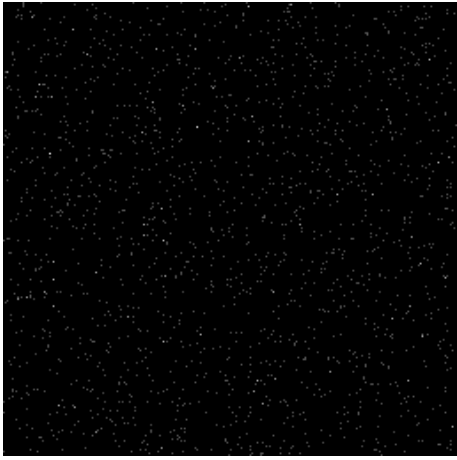
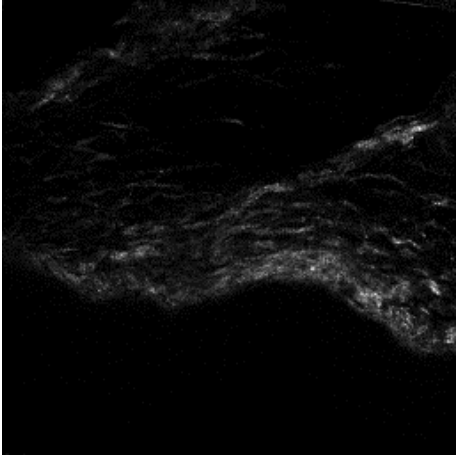

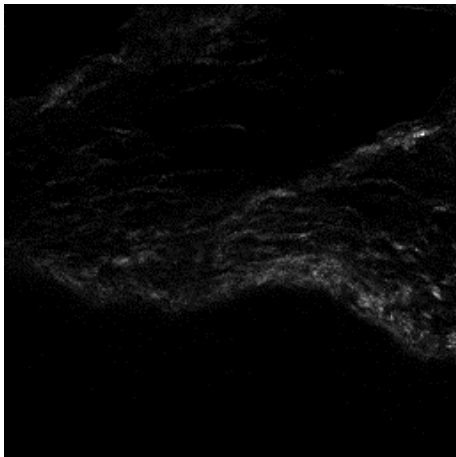
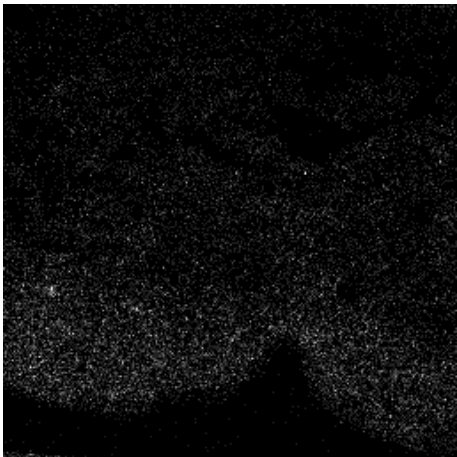
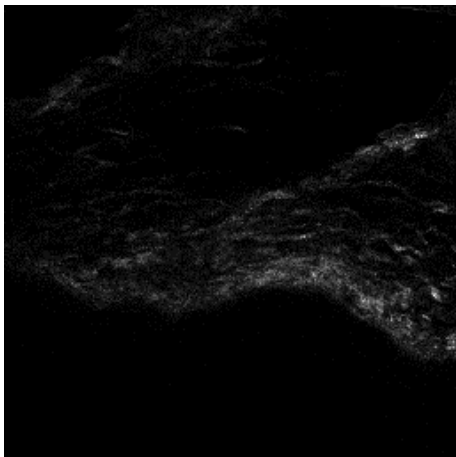
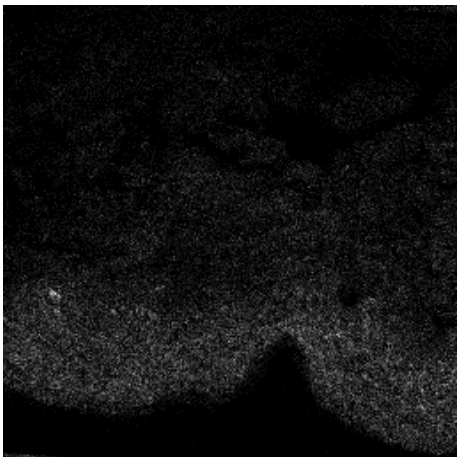
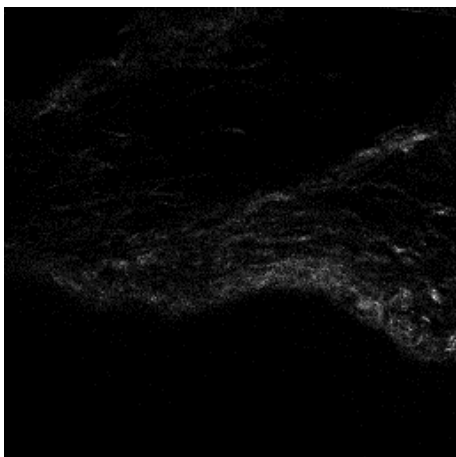
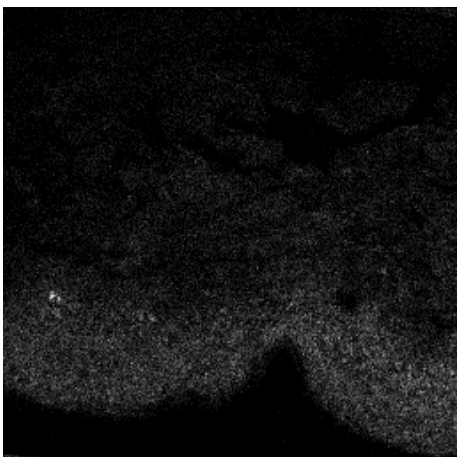


Fig.6-4 光老化皮膚切片

Fig.6-4 の赤丸が示す領域において，SHG イメージ（入射レーザー波長=730nm-800nm，1000nm-1300nm），TPEF イメージ（入射レーザー波長=730nm-800nm），THG イメージ（入射レーザー波長=1000nm-1300nm）の比較を行った．分光器の透過波長は，SHG イメージと THG イメージに関しては入射レーザー波長の 1/2 および 1/3 とし，2 光子蛍光イメージは 450nm とした（いずれも分解能は約 12nm）．なお，対物レンズ後のパワーは 30mW に設定した．

	SHG イメージ	TPEF イメージ
レーザー 波長 730nm	 <p>観測波長 365nm</p>	 <p>観測波長 450nm</p>
レーザー 波長 750nm	 <p>観測波長 375nm</p>	 <p>観測波長 450nm</p>

<p>レーザー 波長 800nm</p>	 <p>観測波長 400nm</p>	 <p>観測波長 450nm</p>
	<p>SHG イメージ</p>	<p>THG イメージ</p>
<p>レーザー 波長 1000nm</p>	 <p>観測波長 500nm</p>	 <p>観測波長 333nm</p>
<p>レーザー 波長 1050nm</p>	 <p>観測波長 525nm</p>	 <p>観測波長 350nm</p>

<p>レーザー 波長 1100nm</p>	 <p>観測波長 550nm</p>	 <p>観測波長 366nm</p>
<p>レーザー 波長 1150nm</p>	 <p>観測波長 575nm</p>	 <p>観測波長 383nm</p>
<p>レーザー 波長 1200nm</p>	 <p>観測波長 600nm</p>	 <p>観測波長 400nm</p>



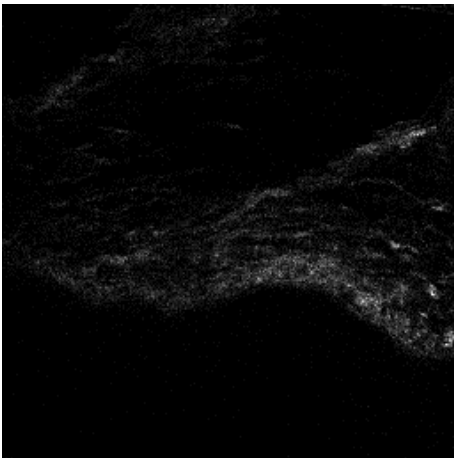
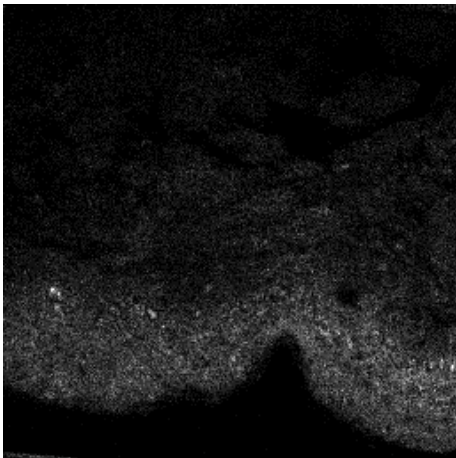
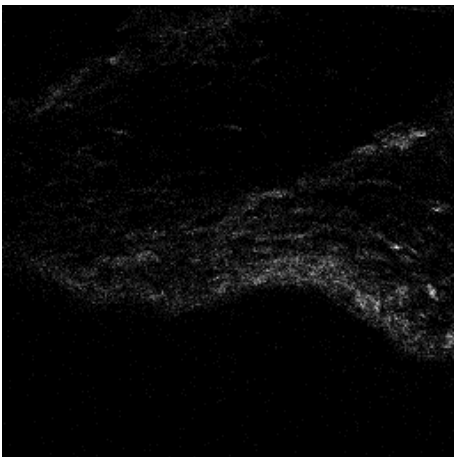
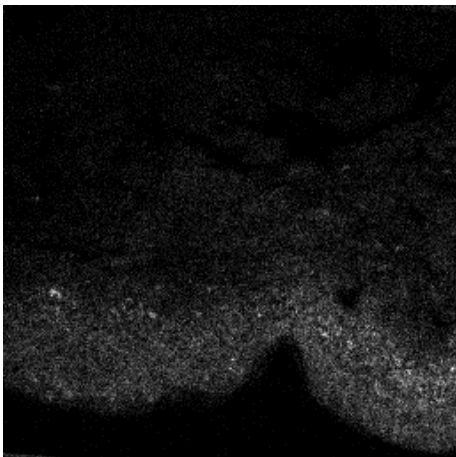
レーザー 波長 1250nm		
	観測波長 625nm	観測波長 416nm
レーザー 波長 1300nm		
	観測波長 650nm	観測波長 433nm

Fig.6-5 切片サンプル観測結果

Fig.6-5 の長波長照射条件において、表皮ケラチンから発生した強い THG 信号と真皮エラスチンから発生した弱い THG 信号が観察された。その他にも短波長照射条件において、エラスチンからの TPEF 信号が観察された。また、すべての波長条件においてコラーゲンから発生した SHG 信号が観察された。

次に、エラスチンの TPEF イメージと THG イメージを比較した。730nm の TPEF イメージと 1250nm の THG イメージを Fig.6-6 に示す。TPEF イメージより、エラスチンの塊が認められた(黄色で囲った領域)。これは THG イメージでも見られているため、長波長側の波長でもエラスチンの観測は可能だと考えられる。THG イメージの最も光っている領域は赤色の円で囲ったところである。これは Fig.6-4 より表皮であると分かる。先行研究において、表皮ケラチンから THG 光が観測されることが報告されている。エラスチンの信号が弱いのは、2 光子蛍光と THG 光の発生効率の違いに起因していると思われる。これらより、



SHG イメージは 800nm, TPEF イメージは 730nm, THG イメージは 1250nm が最もイメージのコントラストがいいと言える。以上の考察は散乱の影響をほとんど受けない切片サンプル観察によるものであるため、散乱のないサンプルの計測には、THG イメージよりも TPEF イメージが望ましいと言える。

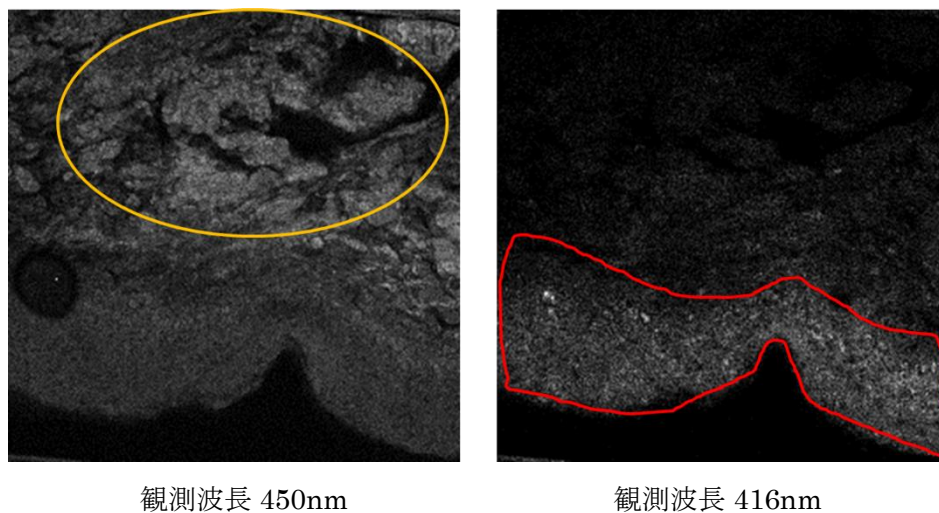


Fig.6-6 730nm の TPEF イメージと 1250nm の THG イメージ

次に、光老化していない正常皮膚、34 歳女性臀部皮膚切片(厚さ 60 $\mu$ m)を計測した。対物レンズ後のパワーは 20mW に設定した。

Fig.6-7 は、切片サンプルのレゾルシン・フクシン染色像(サイズ 3mm\*2.5mm)を示している。このサンプルは光老化皮膚との比較のために用いる。臀部皮膚は紫外線に曝されないため非露光部位であるため光老化していないと考えられる。実際エラスチン染色を行ったところ細い染色された線維状のエラスチン(正常エラスチン)が正常な皮膚に見られる。コラーゲンについても豊富なコラーゲン線維が存在すると考えられる。

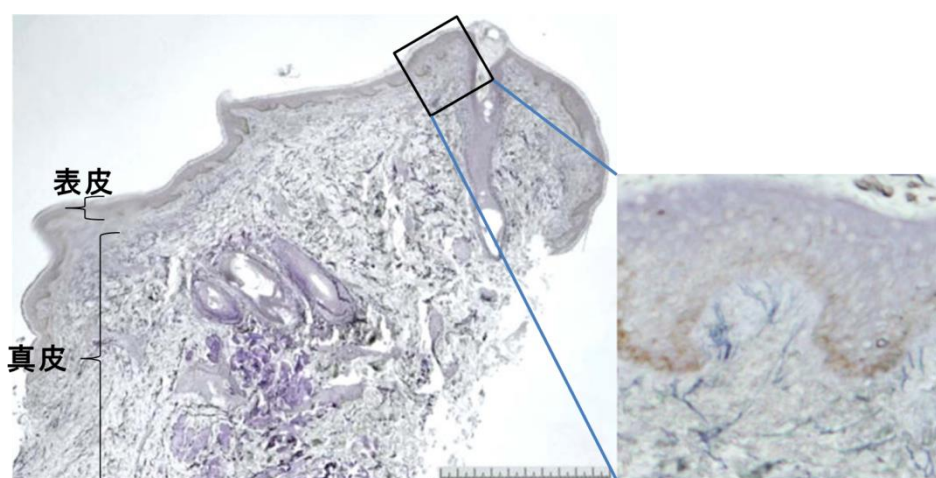
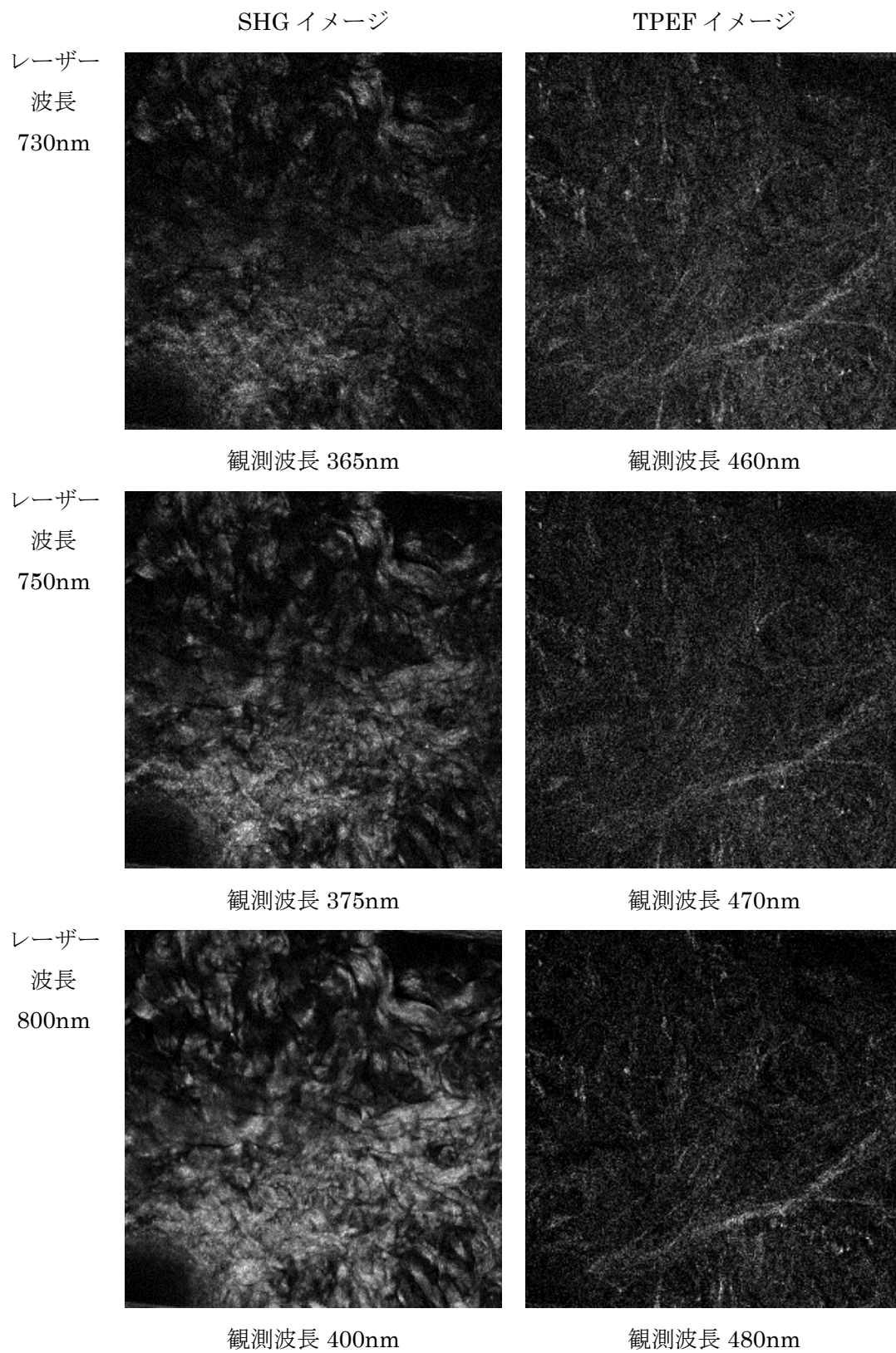
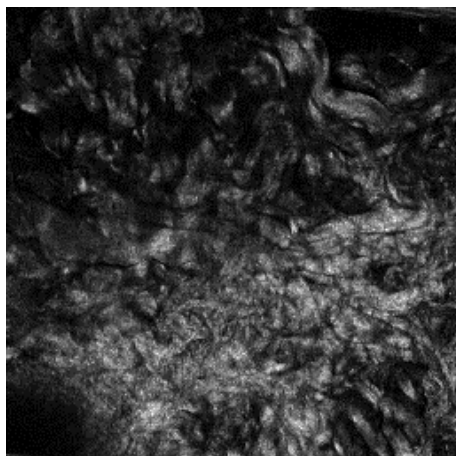


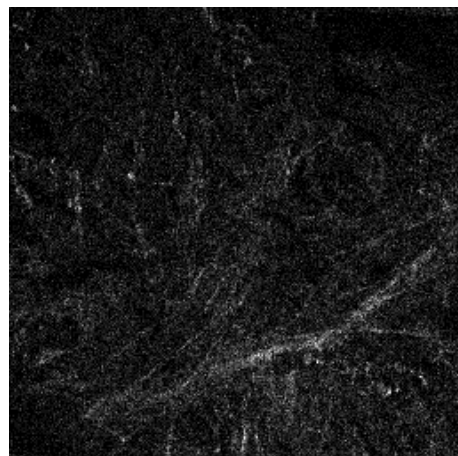
Fig.6-7 34 歳女性臀部皮膚切片



レーザー  
波長  
850nm

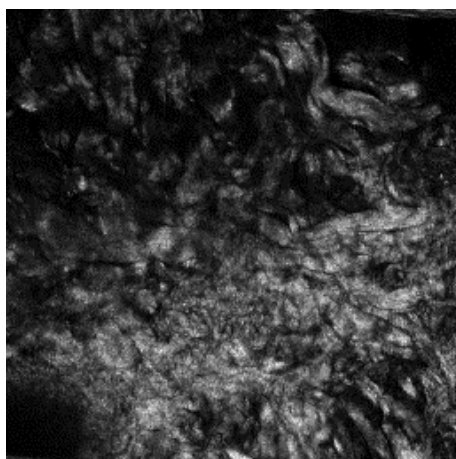


観測波長 425nm

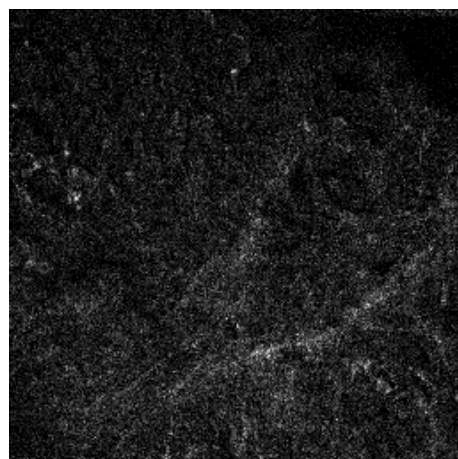


観測波長 500nm

レーザー  
波長  
900nm

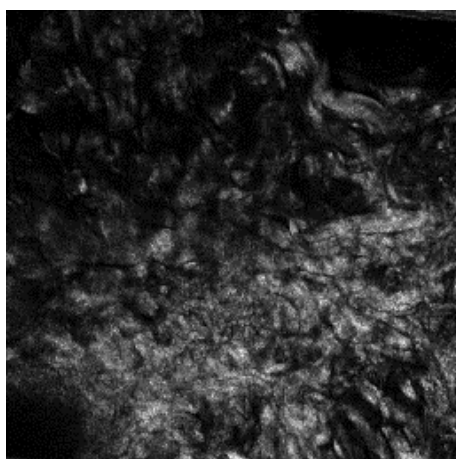


観測波長 450nm

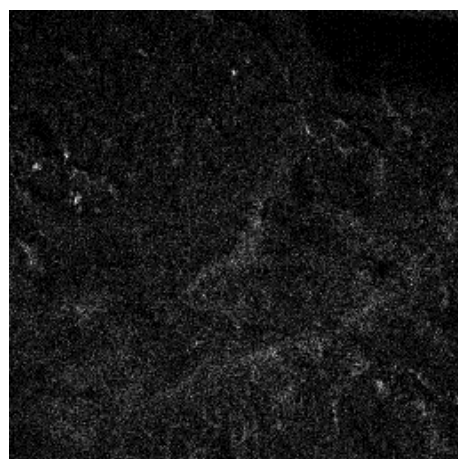


観測波長 540nm

レーザー  
波長  
950nm



観測波長 475nm

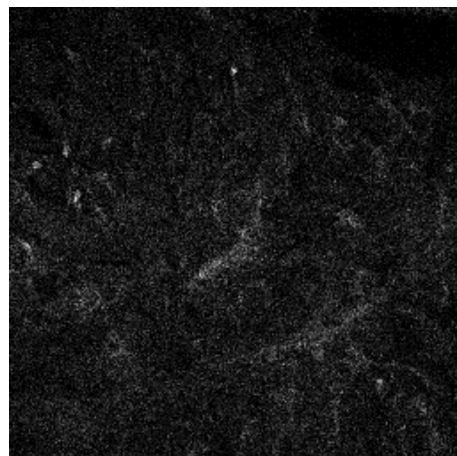


観測波長 550nm

レーザー  
波長  
1000nm

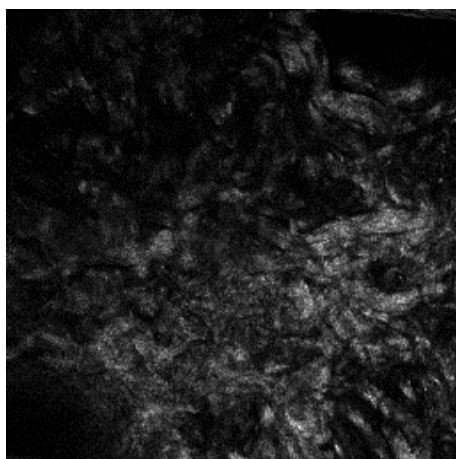


観測波長 500nm

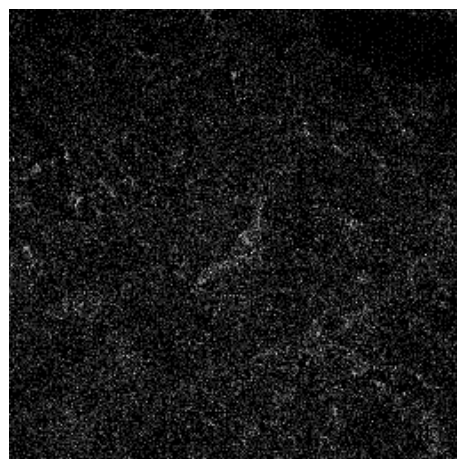


観測波長 550nm

レーザー  
波長  
1050nm



観測波長 525nm

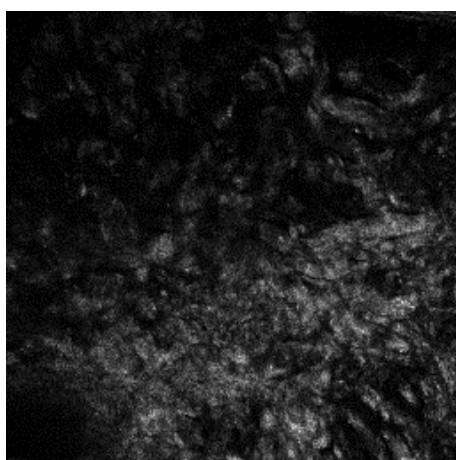


観測波長 560nm

SHG

THG

レーザー  
波長  
1100nm



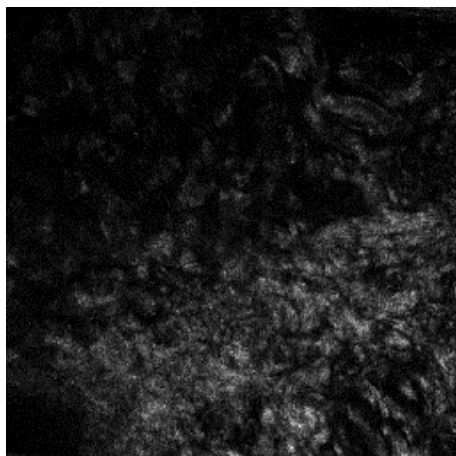
観測波長 550nm



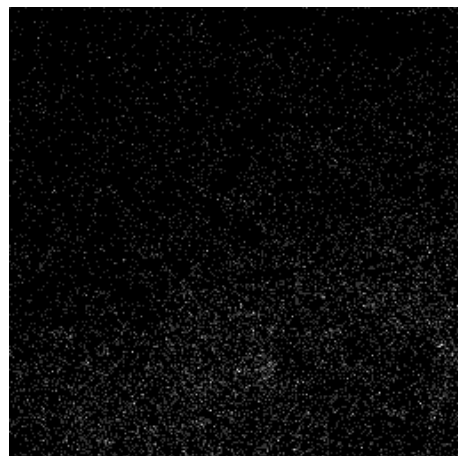
観測波長 366nm



レーザー  
波長  
1150nm

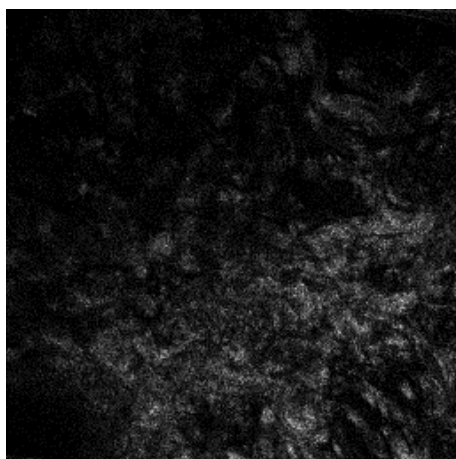


観測波長 575nm



観測波長 383nm

レーザー  
波長  
1200nm

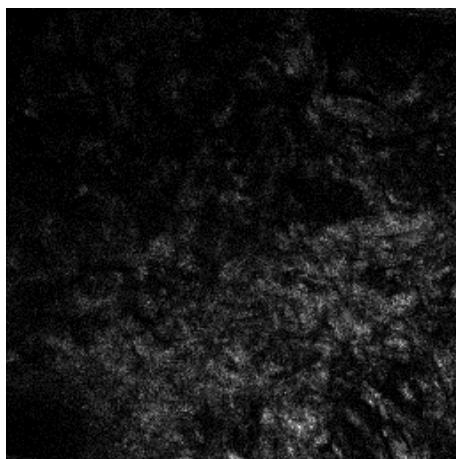


観測波長 600nm

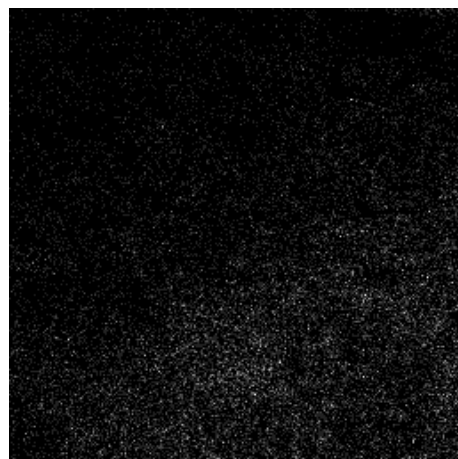


観測波長 400nm

レーザー  
波長  
1250nm

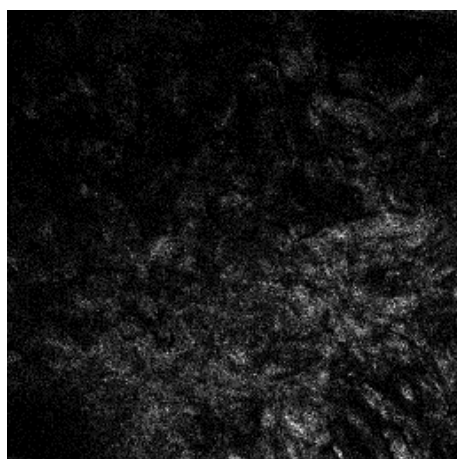


観測波長 625nm



観測波長 416nm

レーザー  
波長  
1300nm



観測波長 650nm



観測波長 433nm

Fig.6-8 30 代女性臀部皮膚切片観測結果

Fig.6-8 より，SHG イメージは 800nm が最も見えやすく，長波長側の波長になるほど見えにくくなっていた．短波長側の TPEF イメージを見ると線維状のエラスチン線維が観察されたが，長波長側の THG イメージで鮮明な線維像を観察することはできなかった．波長 1250nm の THG においてエラスチン線維が観察可能であることが報告[18]されており，エラスチン沈着の見られる光老化皮膚においてはエラスチンから発生した THG 信号が観察されていることから，本来 THG でエラスチンはイメージングが可能であると考えられる．しかしながら，今回観察した部位において観察できなかったのは，部位，画角の影響があった可能性がある．

Fig.6-5 の光老化皮膚と Fig.6-8 の正常皮膚のイメージング結果について、最もコントラストの良かった 800nm 励起の画像で比較を行った。

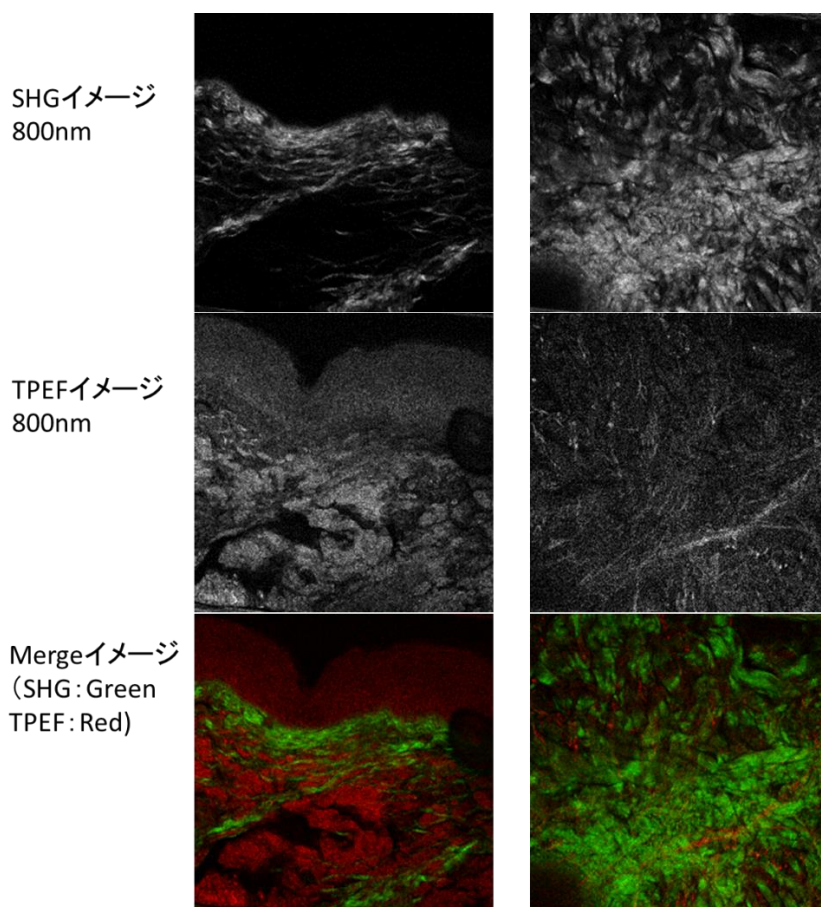


Fig.6-9 波長 800nm の時の光老化皮膚と正常皮膚のイメージング結果

正常皮膚においては、細い線維状の TPEF 信号が観察された。コラーゲン線維から発生した豊富な SHG 信号に縦走して存在していることから、正常なエラスチン線維を捉えていると考えられる。一方、光老化皮膚においては無定形で豊富な TPEF 信号が観察されたことから、ソーラーエラストーシスと称される光老化による異常なエラスチン沈着を捉えていると考えられる。また、光老化皮膚の表皮直下にはエラスチンが沈着せず、コラーゲンが存在する Grenz zoon と呼ばれる特有の領域ができることが知られているが、本画像においても TPEF 信号は表皮直下にはほとんど観察されておらず、補間する形で SHG 信号が観察されている。

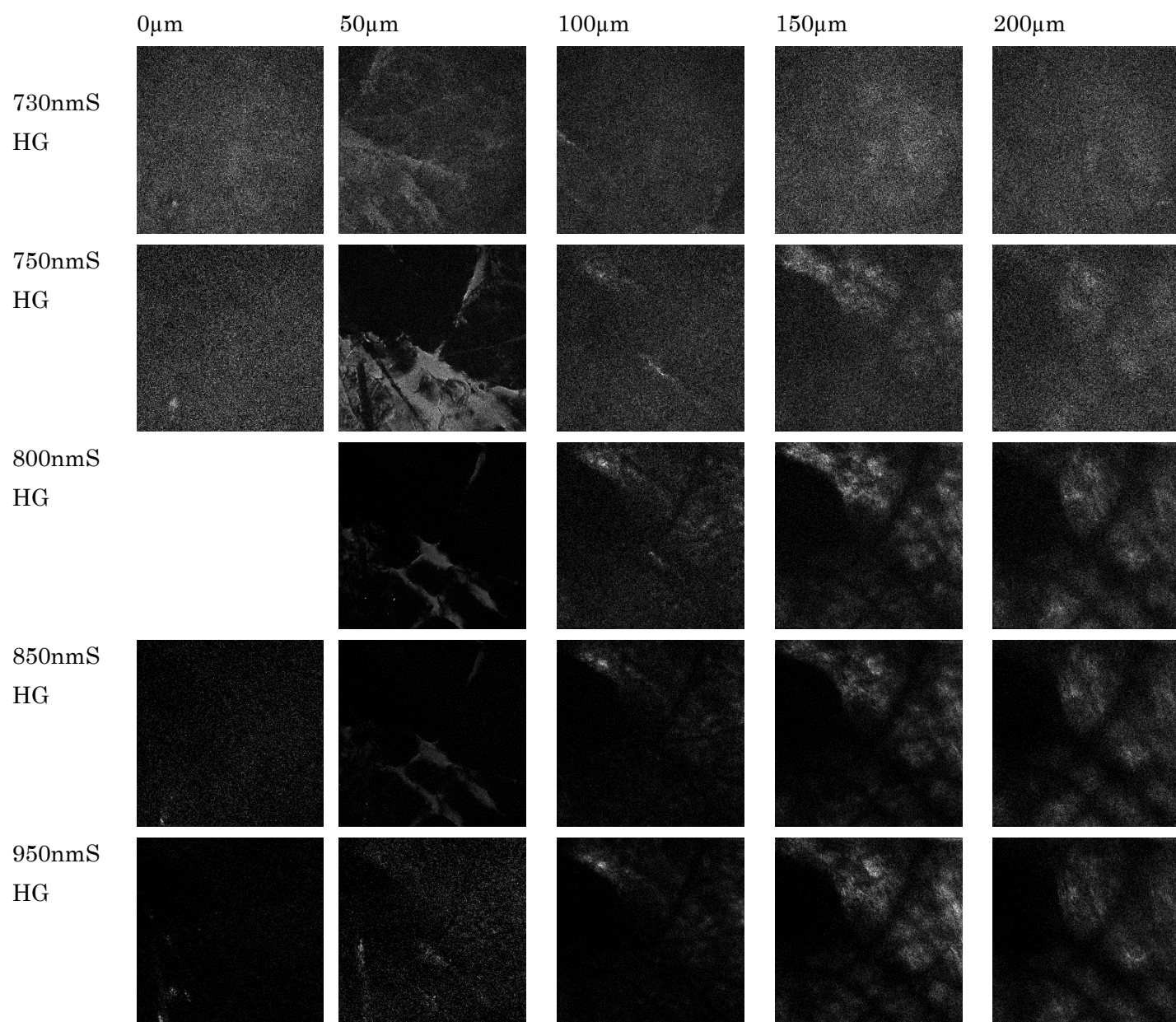
以上のように非露光部皮膚におけるエラスチンも、光老化皮膚における異常なエラスチンも両者共に検出が可能であったため、TPEF 信号はエラスチン計測において有用なツールになると考えられる。THG については光老化皮膚では観察可能であったが、正常皮膚において THG 信号検出は困難であった。絶対量が少なく線維が細いため、もともと観察困難な対象物であると考えられる。

## 7.2 バルク皮膚サンプルの計測

57歳女性顔面皮膚バルクサンプル(厚さ 3-4mm 皮膚片)の深さ分解 SHG イメージ (イメージサイズ 560 $\mu$ m\*560 $\mu$ m, 深さ 50 $\mu$ m 刻み) を計測した.

表皮を含む厚みのあるサンプルを用いて観測することで, 波長ごとに散乱による影響を与え, 信号発生効率と生体組織散乱特性の双方を含めた波長依存性を評価することができる. 先行研究により波長が長いほど生体深部の観測が有利になることが知られている. 対物レンズ後のパワーは 40mW とした.

Fig.6-11, Fig.6-12, Fig.6-13 に実験結果を示す.





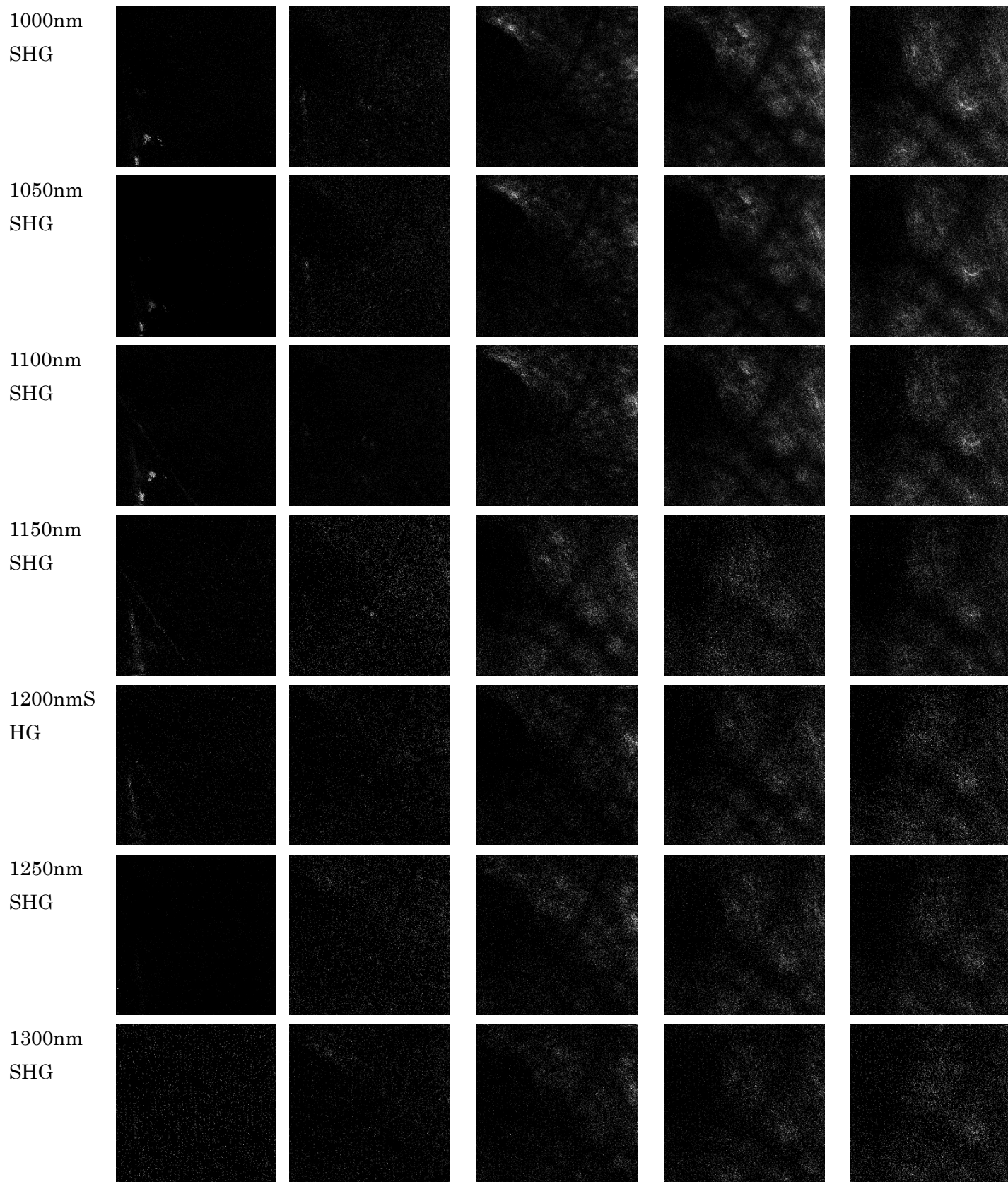
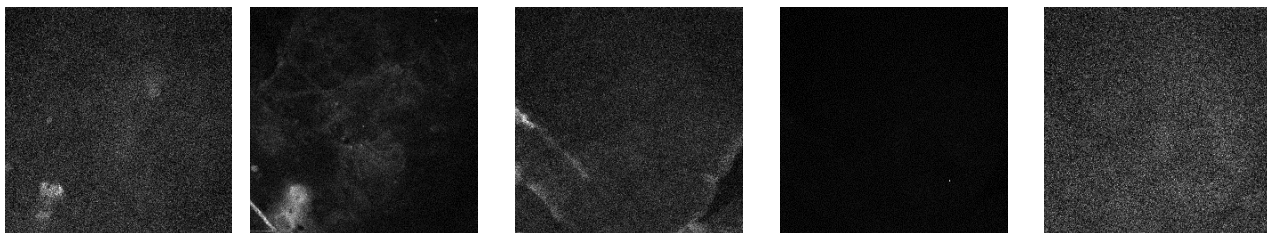


Fig.6-11 波長ごとの SHG イメージ

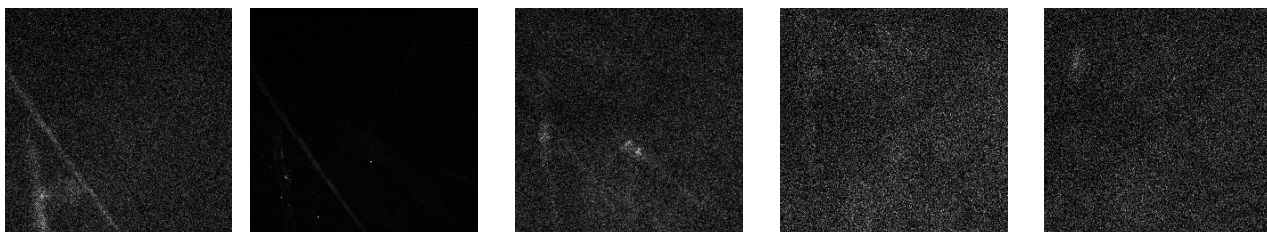
730nm  
TPEF



750nm  
TPEF



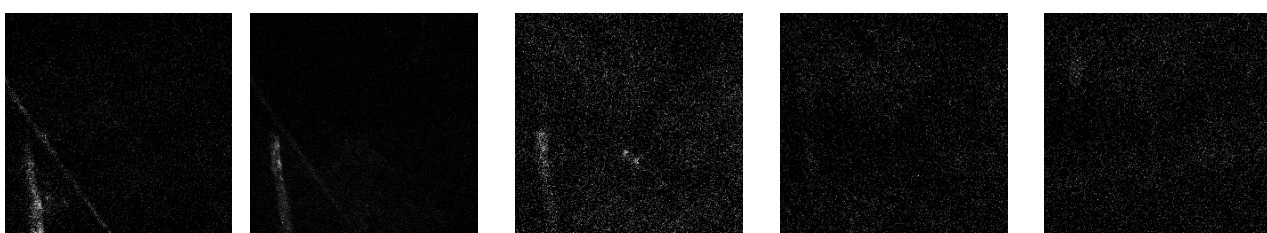
800nm  
TPEF



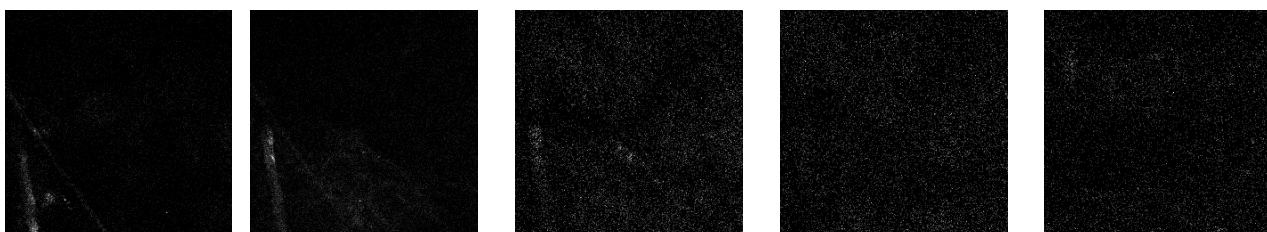
850nm  
TPEF



900nm  
TPEF



950nm  
TPEF



1000nm  
TPEF



1050nm  
TPEF



Fig.6-12 波長ごとの TPEF イメージ

1100nm  
THG



1150nm  
THG



1200nm  
THG



1250nm  
THG



1300nm  
THG



Fig.6-13 波長ごとの THG イメージ

730nm, 750nm, 800nm の SHG イメージについて、深さ 50 $\mu$ m の時 SHG 信号が最大となった。長波長側になるにつれ、深さ 100-200 $\mu$ m で SHG 信号が最も大きくなる。これは波長が長波長側になるにつれレーザー光が皮膚の散乱の影響を受けづらくなったからだと考える。このことから、皮膚深部のコラーゲン観測において、皮膚深部での長波長の優位性を確認した。

しかし今回、TPEF および THG ではエラスチンの観測はできなかった。切片サンプルではエラスチンを観測できたので光学系の問題ではないと考える。エラスチンは存在しているが、レーザー光を当てることでエラスチンから発生する TPEF/THG 光が皮膚内部で散乱することで観測が困難になったと考えられる。このことから厚みのあるサンプルの計測において、被験体のセッティングは切片サンプルよりも厳密に行う必要があると考えられる。将来 *in vivo* 計測に発展させる際には同様の問題が生じると考えられる。このため観測時の固定方法およびセッティング方法の改良は新たな課題になると考えられる。

## 第8章 結言

コラーゲンとエラスチンはヒトの体中を覆っている皮膚に多く含まれており、皮膚の形態や機械的特性を設定する上で重要な役割を担っている。コラーゲンは真皮の約 70%を占めており、皮膚の力学的強度に深く関連している。エラスチンは真皮の約 5%を占めており、コラーゲンに絡みつくようにして皮膚に弾力性を与えている。コラーゲンとエラスチンの比率を知ることは重要であり、臨床応用や美容の分野でコラーゲンとエラスチンを同時に可視化する技術が求められている。

本研究ではフェムト秒可変波長レーザー(可変範囲 680~1300nm)を用いた非線形光学顕微鏡を構築し、コラーゲン SHG イメージの波長依存性を評価し、生体深部計測に最適な波長の検討を行った。さらに、異なるレーザー励起波長で取得されたエラスチンの TPEF イメージ、THG イメージを比較し、生体深部のエラスチン可視化に関する検討を行った。

本実験で用いる波長可変フェムト秒レーザーの波長ごとにフーリエ変換限界パルスを達成するためにレーザー本体に内蔵されている任意量の負チャープを印加できる機構を利用した。730nm-1300nm の波長のフーリエ変換限界パルスを達成できた。

次に、皮膚切片サンプルの SHG/TPEF/THG イメージングを様々な波長で行った。ここでは、光老化した 84 歳女性顔面薄切切片サンプルと正常皮膚である 34 歳女性臀部薄切切片サンプルにおけるコラーゲンとエラスチンを可視化した。コラーゲン SHG イメージに関しては、長波長になるに従いイメージコントラストが減少した。一方、光老化皮膚のソーラーエラストーシス(変性エラスチン)および正常皮膚の線維状エラスチンは、TPEF イメージではクリアに可視化出来たが、THG イメージではソーラーエラストーシスのみ低コントラストに可視化でき、線維状のエラスチンは確認できなかった。

最後に、厚みのある皮膚ブロックサンプルを観測した。皮膚のコラーゲン SHG イメージングでは、皮膚深部での長波長の優位性を確認した。しかし、TPEF イメージ及び THG イメージを使ってエラスチンを観測することはできなかった。これはエラスチンから発生した TPEF/THG 光が皮膚内部で強く散乱したためであると考えられる。このことから厚みのあるサンプルの計測において、被験体のセッティングは切片サンプルよりも厳密に行う必要があると考えられる。将来 *in vivo* 計測に発展させる際には同様の問題が生じると考えられる。

## 参考文献

- [1] 上野賢一,「皮膚科学」,金芳堂(2006).
- [2] 田中佑治, 安井武史, "高速・直行偏光分解第 2 高調波発生光顕微鏡を用いたコラーゲン配向の in vivo イメージング, "生体医工学, 51 巻 1 号, pp38-45(2013).
- [3] 旗持淳, "加齢に伴う皮膚の変化-細胞外マトリックスの変化を中心に-, "Dokkyo Journal of Medical Sciences, 35(3),pp227-236(2008)
- [4] Yen Sun, "Multiphoton polarization imaging of the stratum corneum and the dermis in ex-vivo human skin,"OPTICS EXPRESS,vol.11,No.25,pp.3377-3384,203.
- [5] T. Yasui, Y.Takahashi, M. Ito, S. Fukushima, and T. Araki, "Ex vivo and in vivo second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:Forsterite and Ti:Sapphire lasers," Appl. Opt., Vol. 48, No. 10, pp.D88-D95 (2009).
- [6] 藤本大三郎,「コラーゲンの秘密に迫る ―食品・化粧品からバイオマテリアルまで―」, 裳華房,(1998).
- [7] 伊藤誠啓, 安井武史, "組織コラーゲンの SHG (第 2 高調波発生光) イメージングを用いた皮膚老化診断に関する基礎研究,".
- [8] 金沢雅弘, "十二指腸単発瘍瘻痕の病理組織学的検討, "Gastroenterological Endoscopy,Vol,32(12)pp.2820-2825(1990).
- [9] 尹浩信, "超音波診断装置による全身性強皮症の非硬化部位における皮膚厚の検討, "日皮会誌, 103(8), pp.1095-1098(1993).
- [10] 鈴木哲," 顕微分光法-ナノ・マイクロの世界を見る分光法-", 講談社, p93-115 (2009).
- [11] M.Haruna," 光 コ ヒ ー レ ン ス ト モ グ ラ フ ィ ー ( OCT ) , "Medical Photonics,No.1,pp.1-5,(2007).
- [12] 藤田克昌, "非線形光学顕微鏡の新展開, "レーザー研究, 第 34 巻第 12 号, pp.818-821, (2006)
- [13] 鈴木哲," 顕微分光法-ナノ・マイクロの世界を見る分光法-", 講談社, p93-115 (2009).
- [14] Sung-Jan Lin,"Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy,"OPTICS LETTERS,Vol. 30, No. 17,(2005).
- [15] 安井武史, "Ex vivo and in vivo second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:forsterite and Ti:sapphire lasers , "APPLIED OPTICS,Vol.48,No.10 , pp.D88-D95,2009.
- [16] 春名正光, "医療を中心とする光コヒーレンストモグラフィーの技術展開, "Laser

Review,pp.654-662,(2003).

[17] 平尾哲二, "皮膚計測技術の最新動向, "表面科学 Vol.35, No.1, pp.17-22, 2014.

[18] Che-Hang Yu, Shih-Peng Tai, and Chun-Ta Kung,"In vivo and ex vivo imaging of intra-tissue elastic fibers using third-harmonic-generation microscopy,"OPTICS EXPRESS,Vol.15,No.18,pp.11167-11177,(2007).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの人にお世話になりました。

株式会社資生堂研究員の上田有紀様には、実験サンプルの準備や実験の立会、卒業論文の添削等にあたり大変お世話になりました。皮膚科学分野の識が乏しい私に様々な助言を与えていただきました。上田様のご協力なくして本研究を終えることはできませんでした。大変感謝しております。

安井武史先生には毎週のミーティングで研究に関する助言をいただきました。卒業論文の作成にあたっては幾度にもおよぶ修正をしていただき、非常にご迷惑をかけたと思います。大変感謝しております。

南川先生には毎週のミーティングで研究に関する助言をいただきました。

中でも一番ご迷惑をおかけしたのが D2 の長谷栄治さんです。長谷さんには実験系の組み立てから資生堂の共同実験の際に立ち会って一緒に考察してくれるなど、ありえないぐらいお世話になりました。申し訳ない気持ちでいっぱいです。

M2 の厚田さんにも実験方法や器具の説明などいろいろお世話をしていただきました。

安井研究室の皆さんと研究生活を共にすることで楽しい生活が送れたと思います。結構な頻度で開催されるイベントでも楽しく参加できました。B 着手でこの研究室に配属となり他の人との能力差に肩身が狭い思いもしましたが、なんとか最後までやり遂げることができたのも、かわいがっていただいた先輩方や仲良くしてくれた同期のおかげだと思います。みなさんありがとうございました。