

非 ○厚田耕佑 (徳島大)  
福島修一郎 (大阪大)

非 田中佑治 (大阪大)  
荒木勉 (大阪大)

非 長谷栄治 (徳島大)  
安井武史 (徳島大)

Kosuke ATSUTA, Tokushima University  
Eiji Hase, Tokushima University  
Tsutomu ARAKI, Osaka University

Yuji TANAKA, Osaka University  
Syuichiro HUKUSHIMA, Osaka University  
Takeshi YASUI, Tokushima University

**Key words:** Microscopy, wound, healing, collagen, second-harmonic-generation

## 1. はじめに

創傷治癒とは、何らかの外的要因により損傷を受けた組織を、本来の状態に修復する機能のことであり、その過程は、炎症期・増殖期・組織再生期という一部重複する3段階に分類される[1]。これらの過程においては、細胞外マトリクスであるコラーゲン動態がきわめて重要な役割を担っているが、それを可視化することはこれまで容易でなかった。その結果、創傷治癒過程におけるコラーゲン動態は未だ完全には解明できていない。また、創傷の治癒段階や異常治癒などを判断する上でも、コラーゲン動態を観察することは重要である。

我々は、コラーゲン分子固有の非線形光学特性によって発生する第二高調波発生光 (SHG 光) を検出することにより、生体組織におけるコラーゲンを『生きたありのままの状態』で可視化できる非線形光学顕微鏡 (SHG 顕微鏡) をこれまでに開発し[2]、ヒト皮膚の老化診断[3]や動物皮膚の光学的熱傷診断[4]に応用してきた。本研究では、非線形光学顕微鏡を動物切創モデルに適用し、治癒過程におけるコラーゲン動態を *in vivo* 時系列で可視化したので報告する。

## 2. 創傷治癒とコラーゲン

創傷治癒とは皮膚に切り傷、刺し傷、熱傷等の外相が形成された際に、損傷皮膚を本来の機能的性質に修復する機能のことである。創傷の治癒過程は、炎症期・増殖期・組織再生期の異なる、または重複する段階に分類される[5]。

中でも増殖期から組織再生期におけるコラーゲンの働きは、創傷治癒において非常に重要な役割を有する。また、コラーゲンの形態や配向なども様々なため、創傷治癒におけるコラーゲン観察は、治癒段階や異常治癒などを判断する材料となり得る。

創傷治癒観察の従来手法は、皮膚表面の観察から組織内部の様子を推察する手法あるいは利尿を介した手法など外因的な観察が主とされ、正確性に欠けると言われている。一方、SHG 顕微鏡は、組織内の構造を非接触・非侵襲かつ *in vivo* での計測が可能であるため、SHG 顕微鏡を利用した創傷治癒時系列モニタリングは、従来手法にかわる新たな手段として期待される。

## 3. 実験装置と動物モデル

装置図を Fig.1 に示す。装置構成は反射型レーザー走査型顕微鏡と同様であるが、光源に生体透過性の優れたフェムト秒 Cr:Forsterite レーザー (中心波長 1250nm, パルス幅 100fs, 繰り返し周波数 73MHz) を用い、その SHG 光 (波長 625nm) を検出している点が異なる。レーザー光は、ガルバノミラーとリレーレンズペアを用いたレーザー走査光学系を経て、生

体サンプルに集光される。後方散乱された SHG 光は、ハーモニクセパレーターで反射され、バンドパスフィルター (BPF:625nm 透過) により、SHG 光のみが光電子増倍管 (PMT) によって検出される。レーザー走査光学系を用いてサンプル上の集光スポットを 2 次元面内走査することにより、SHG イメージを取得した。

本研究で用いた実験プロトコルは、大阪大学大学院基礎工学研究科動物実験委員会の承認を得ている (承認番号: 動基工 25-1-0)。被実験動物には、Wistar 系雄性ラット (8~10 週齢, 体重 100g) を用いた。ラットに対して全身麻酔を行い、外科用メスにより長さ 5mm, 深さ 2mm (皮下組織までを完全に切った状態) の切創を形成した。切創は縫合せず、計測時以外は感染症防止のための創傷被覆材で覆いながら (湿潤療法)、経過観察を行った。

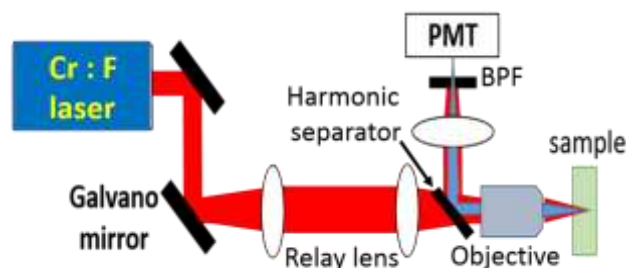


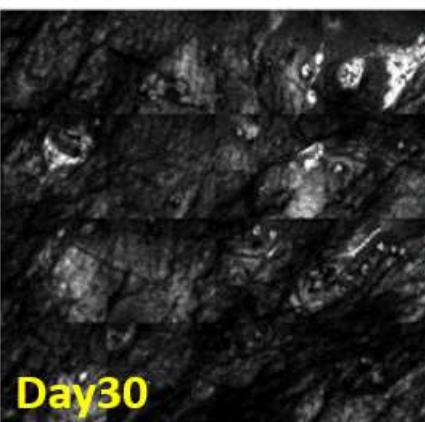
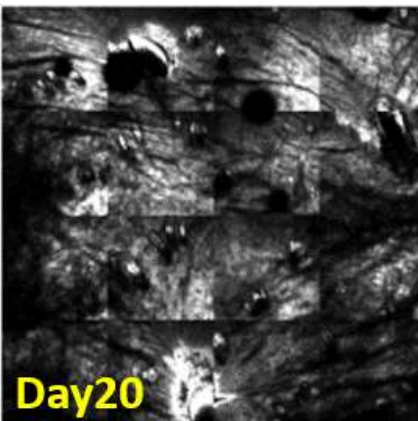
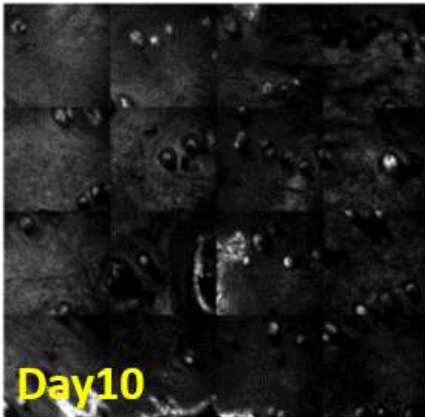
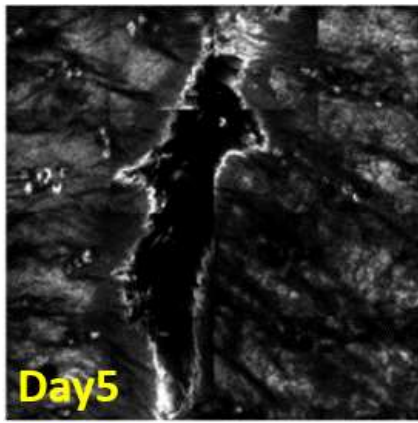
Fig.1 Experimental setup.

## 4. 計測結果

切創治癒過程の SHG イメージを Fig.2 に示す。イメージサイズは 1.6 mm\*1.6 mm である。創傷形成から間もない 5 日目には、切創が SHG 信号の観測されない溝のように確認でき、増殖期後期にあたる 10 日目には溝の縮小が見られることから、創部の修復が進行していることがわかる。組織再生期の 20 日目には、創部の一部が塞がれ、30 日目には完全に塞がっているのが確認できた。このように、日数経過に伴う創傷治癒の様子を SHG イメージより観察することができた。

## 5. まとめ

非線形光学顕微鏡を用いて動物切創モデルの治癒過程におけるコラーゲン動態を *in vivo* かつ時系列でモニタリングすることに成功した。SHG イメージからラット皮膚切創治癒の増殖期や組織再生期に対応したコラーゲンの日数経過における変化のイメージを選択的かつ明瞭に取得することに成功した。この手法では非侵襲性の観点から、医療分野における臨床応用が期待される。



#### 参考文献

- (1) G. Deka, W.-W. Wu, and F.-J. Kao, "In vivo wound healing diagnosis with second harmonic and fluorescence lifetime imaging", *J. Biomed. Opt.* **18**, 061222 (2013).
- (2) 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.* **48**, D88-D95 (2009).
- (3) T. Yasui, M. Yonetsu, R. Tanaka, S. Fukushima, T. Yamashita, Y. Ogura, T. Hirao, H. Murota, and T. Araki, "In vivo observation of age- related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250nm mode-locked Cr:Forsterite laser", *J. Biomed. Opt.* **18**, 31108 (2013).
- (4) R. Tanaka, S. Fukushima, K. Sasaki, Y. Tanaka, H. Murota, T. Matsumoto, and T. Araki, "In vivo visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy ", *J. Biomed. Opt.* **18**, 61231 (2013).
- (5) G. Deka, W.-W. Wu, and F.-J. Kao, "In vivo wound healing diagnosis with second harmonic and fluorescence lifetime imaging", *J. Biomed. Opt.* **18**, 061222, (2013).

Fig.2 SHG images