

A102

第 26 回 バイオフロンティア講演会

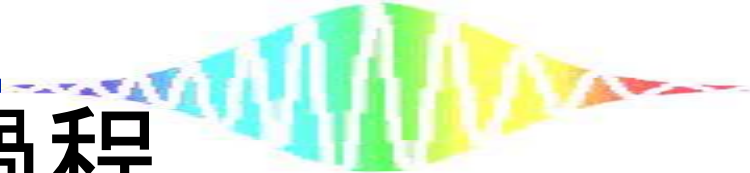
非線形光学顕微鏡を用いたラット 創傷治癒過程の時系列モニタリング

厚田耕佑¹, 田中佑治², 長谷栄治¹,
福島修一郎², 荒木勉², ○安井武史^{2,3}



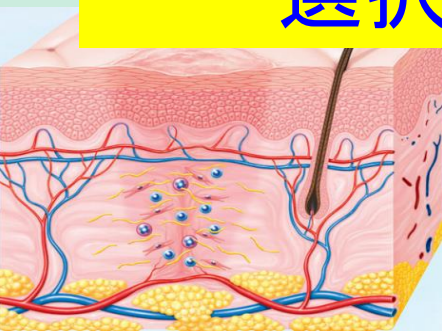
1 徳島大学大学院先端技術科学教育部

2 大阪大学大学院基礎工学研究科

3 徳島大学大学院STS研究部



創傷治癒過程

| | 創部 | 表皮 | 真皮 |
|-----|--|-------------|---|
| 炎症期 |  <ul style="list-style-type: none"> 創部の洗浄 治療の開始 | 出血 | |
| 増殖期 |  | | |
| 成熟期 |  <p>組織が締まり 丈夫になる</p> | 表皮が 傷を塞ぐ | <p>コラーゲン 再構成により、 規則的配列</p> |

未だ完全には解明されていない
 (表皮と真皮コラーゲンが重要！)
 ↓
 表皮と真皮コラーゲンの
 選択的かつ非侵襲な観察が必要

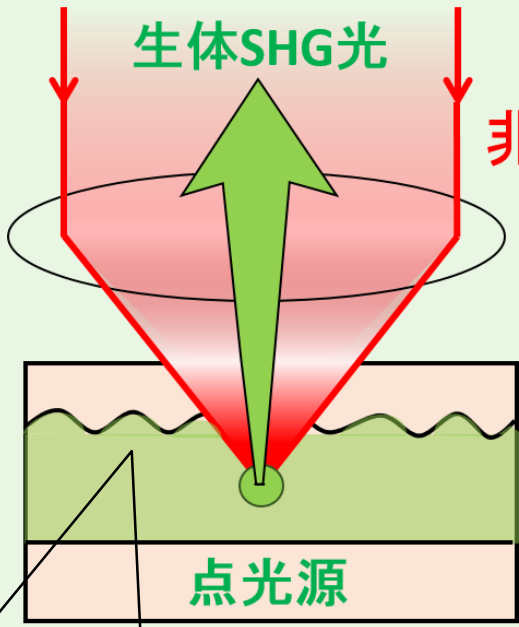
SHG顕微鏡

Second Harmonic Generation
第二高調波発生

フェムト秒パルスレーザー光

THG顕微鏡

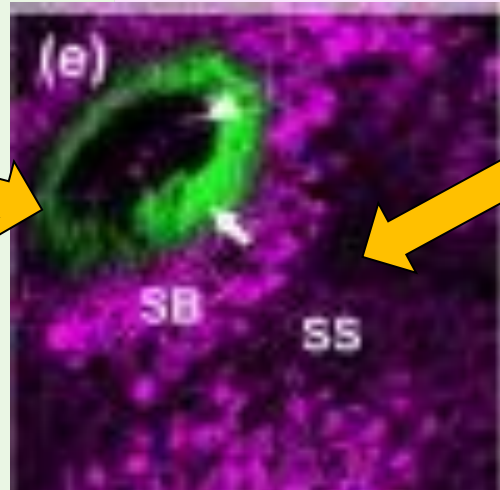
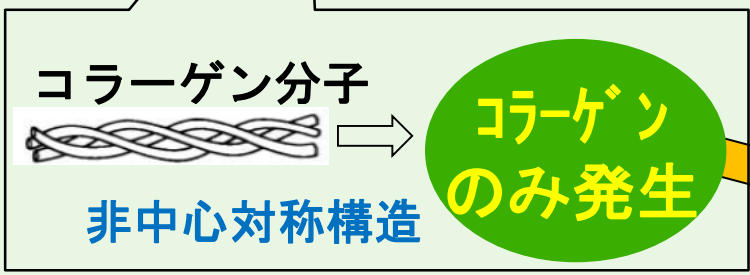
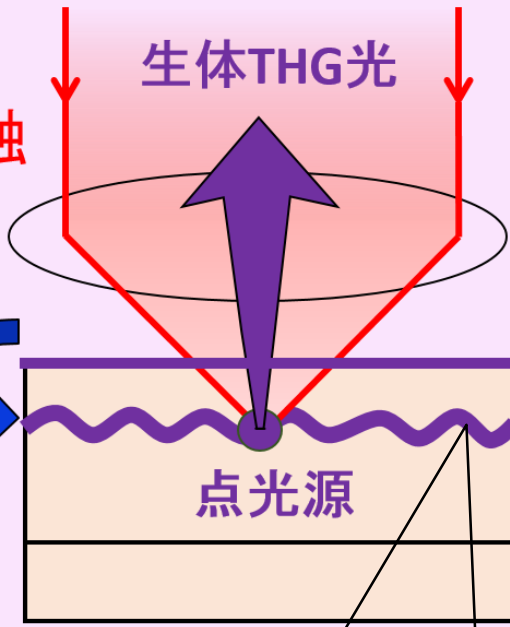
Third Harmonic Generation
第三高調波発生



非染色
非侵襲・非接触

in vivo

表皮越し
三次元
イメージング
熱ダメージ小



THG光：屈折率境界でのみ発生

特に表面で高強度
創部表面の状態など

表皮(紫)と真皮コラーゲン(緑)

Ref.) S.-Y. Chen, J. Biomed. Opt. 14, 060505 (2009).

動物モデル

大阪大学大学院基礎工学研究科動物実験委員会の承認 (承認番号: 動基工25-1-0)の下, 大阪大学との共同研究により実施

イソフルランによる吸入麻酔



三種混合麻酔を腹腔内投与

(メデトミジン・ミタゾラム・ブトルファノール)



外科用メスによる切創作成

長さ5mm, 深さ2mm(皮下組織)



ブプレノルフィンにより鎮痛

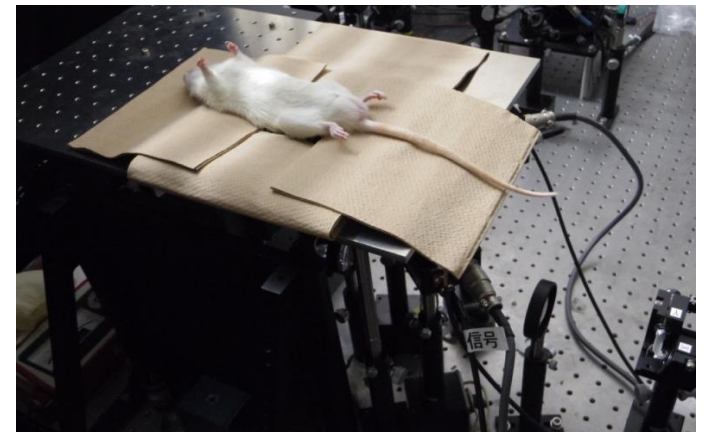


創傷被覆材で傷を覆い, 湿潤療法

創傷形成日から5,10,20,30,40日目の切創をin vivoで時系列モニタリング



wistar系ラット
(日本SLC, オス, 8-10 週齢)
実験開始時100g



計測風景

実験装置

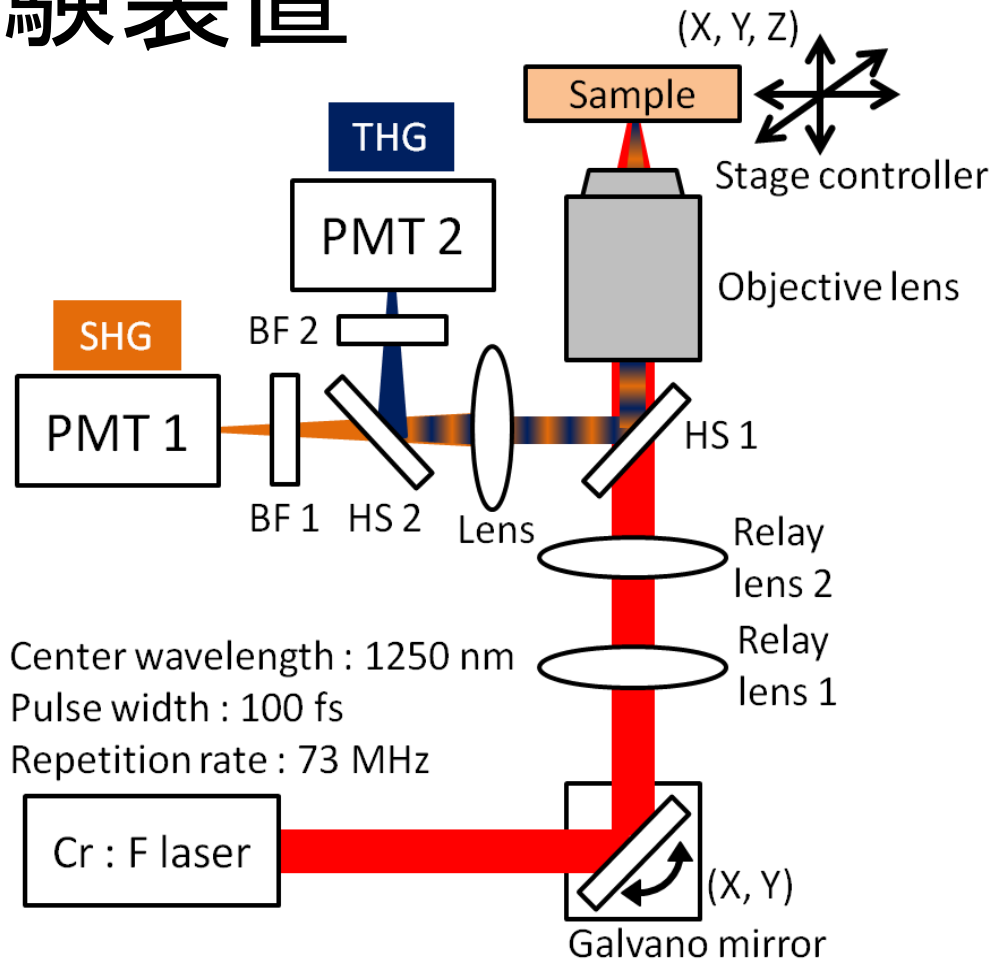
光源：生体透過性に優れた
フェムト秒近赤外レーザー

パルス幅100 fs
中心波長1250 nm
繰り返し周波数73 MHz

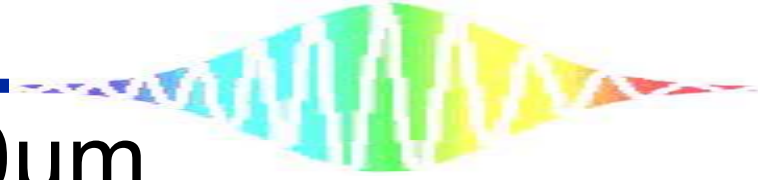
2台の検出器：
フォトンカウティング式
光電子増倍管(PMT)
SHG, THG同時検出

測定時間：0.5枚 / 秒
4枚*4枚：32秒

面内空間分解能：
1.5 μ m / ピクセル



1枚128*128ピクセル,
400 μ m*400 μ mの視野で4枚*4枚
測定領域 1.6mm*1.6mm



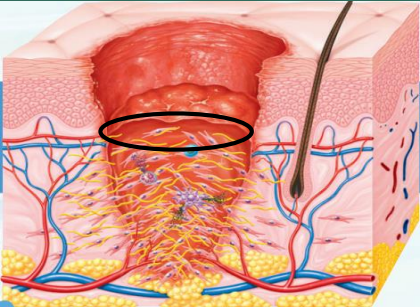
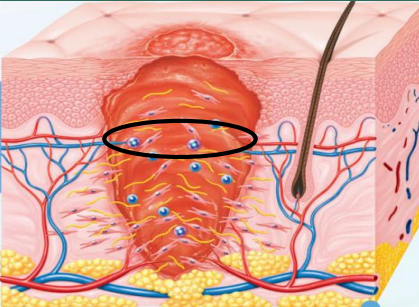
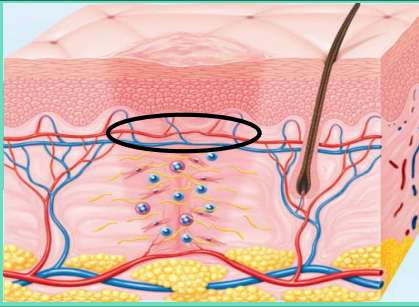
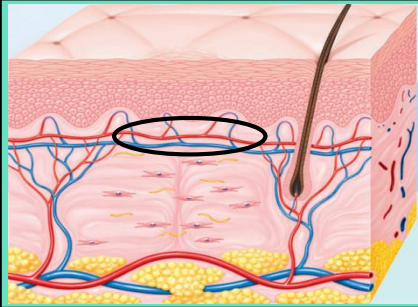
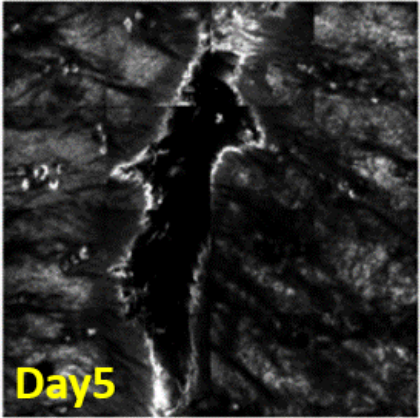
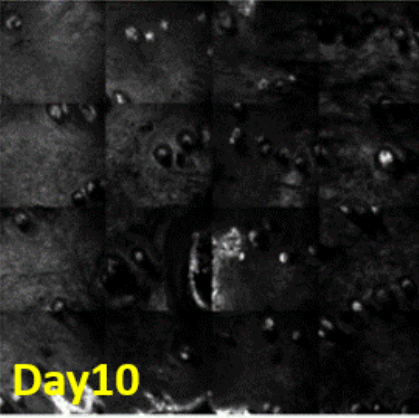
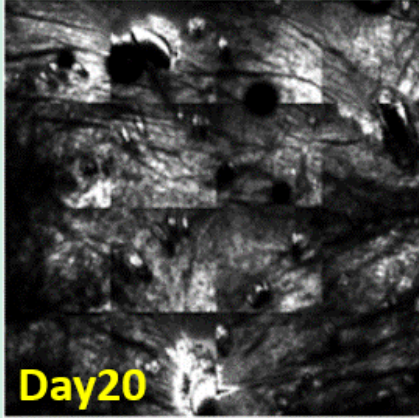
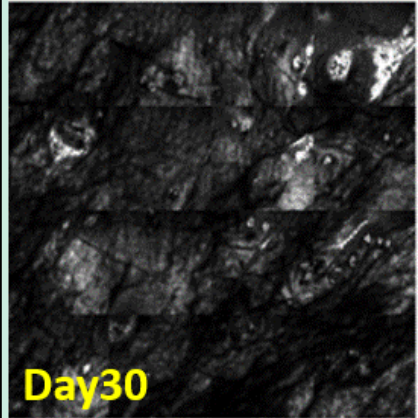
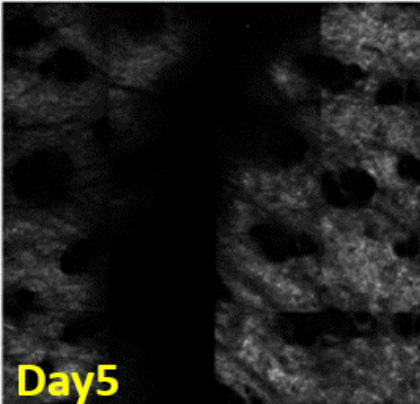
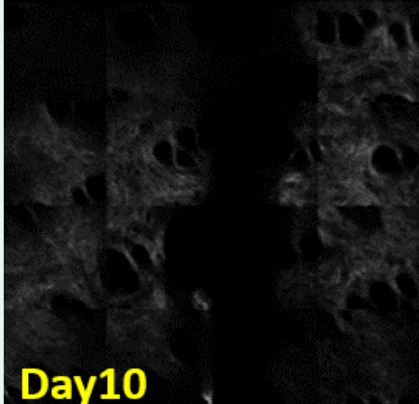
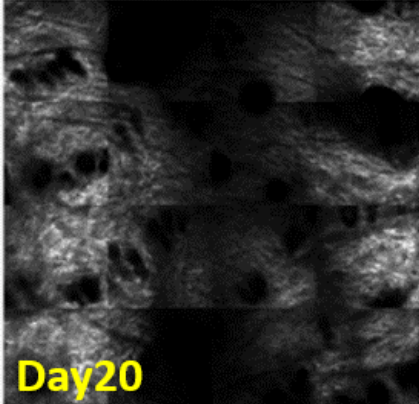
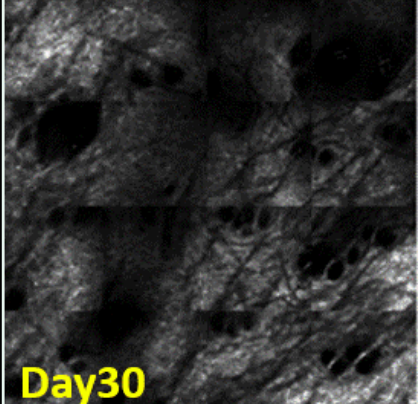
計測結果(時系列)@深さ60μm

Day5:炎症期-増殖期

Day10:増殖期後期

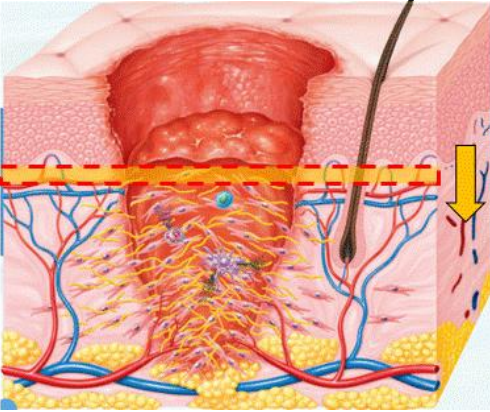
Day20:成熟期

Day30

| 創部 |  |  |  |  |
|-----|---|---|--|--|
| THG |  <p>Day5</p> |  <p>Day10</p> |  <p>Day20</p> |  <p>Day30</p> |
| SHG |  <p>Day5</p> |  <p>Day10</p> |  <p>Day20</p> |  <p>Day30</p> |

増殖期前期

測定結果(深さ分解)@5日目

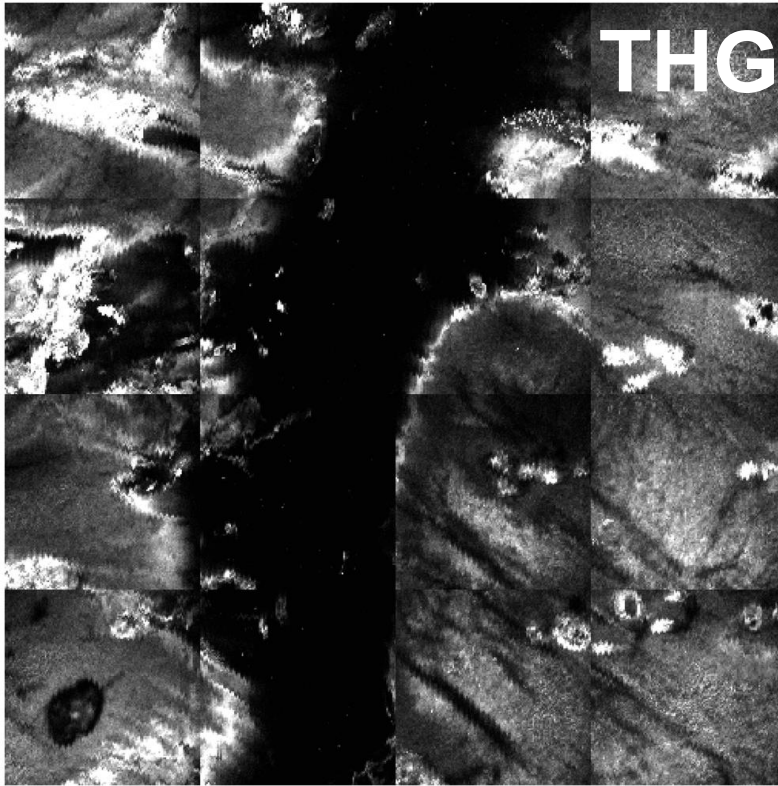


THG : 140μm ~ 確認 →

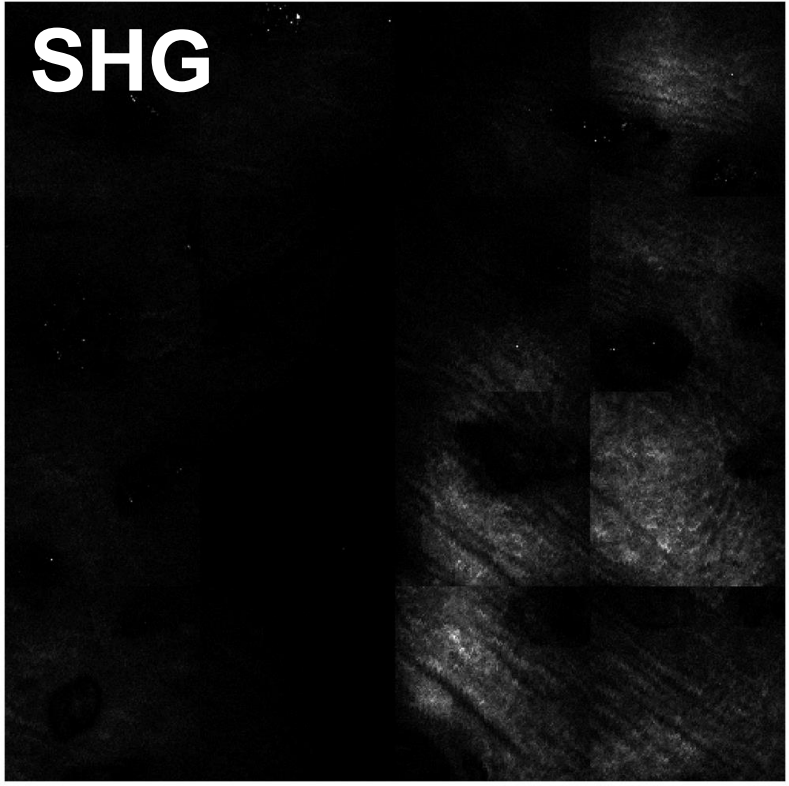
創部表面
修復段階

SHG : 信号無し →

コラーゲン
未生成

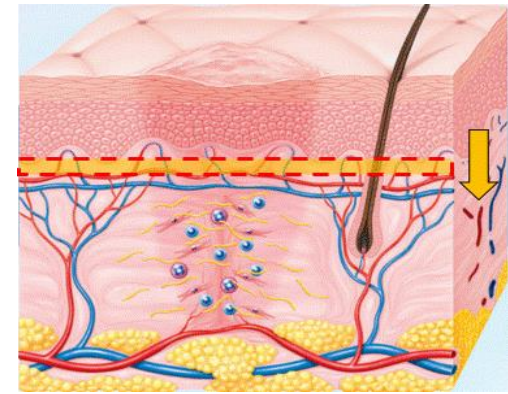


| THG | 深さ |
|-----|-------|
| | 20μm |
| | 80μm |
| | 140μm |
| | 200μm |

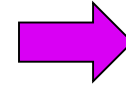


成熟期

測定結果(深さ分解)@20日目

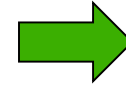


THG : 20 μ m ~ 発生



創部表面が
塞がれる

SHG : 80 μ m ~ 発生
低強度

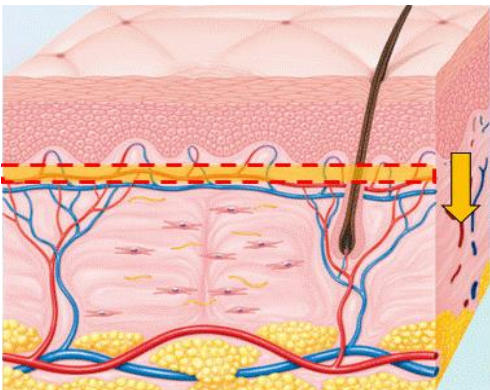


コラーゲン生成
未発達・ばらばら

| THG | 深さ | SHG |
|-----|-------------|-----|
| | 20 μ m | |
| | 80 μ m | |
| | 140 μ m | |
| | 200 μ m | |

創痕の消失

測定結果(深さ分解)@30日目



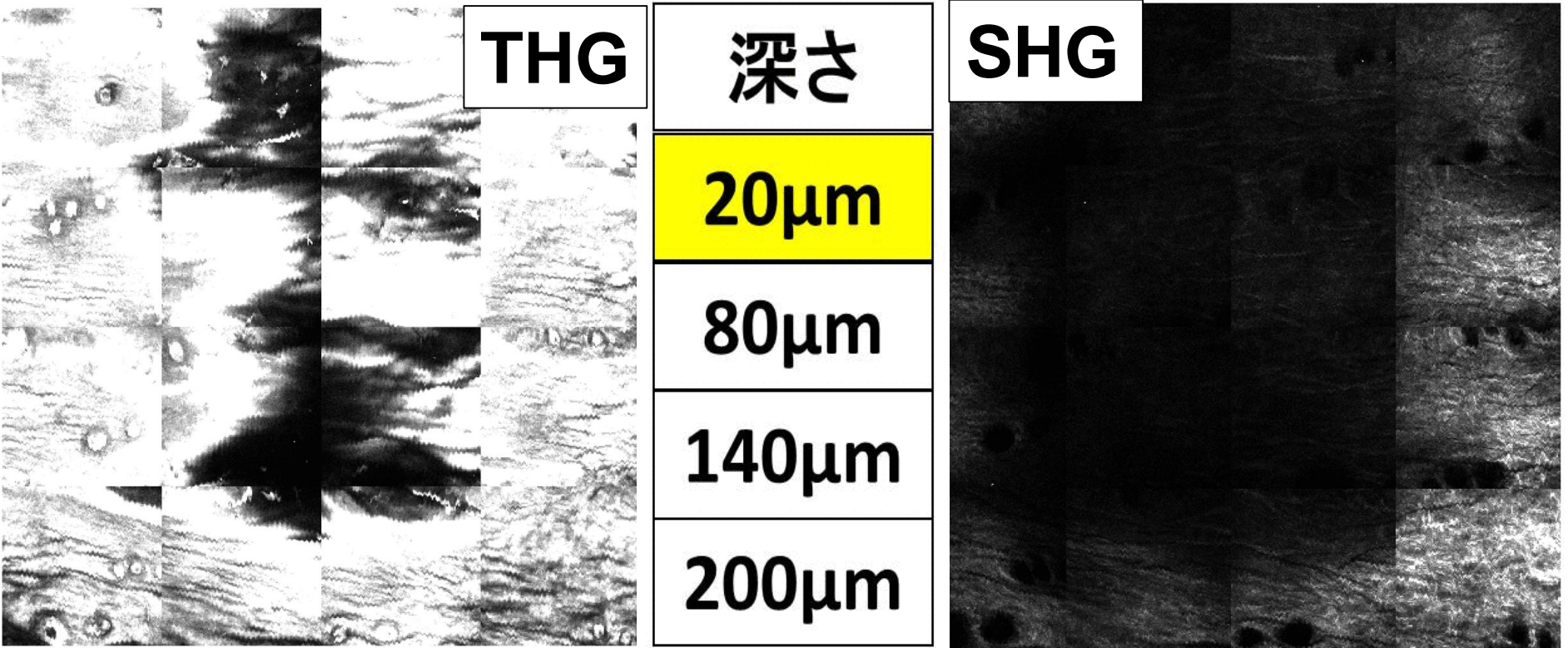
THG : 20µmで高強度

表皮と真皮の境界が
明確化？

SHG : 20µmでも確認
80µm~線維状

新生コラーゲンの
高次構造化

科研製薬株式会社HPより抜粋



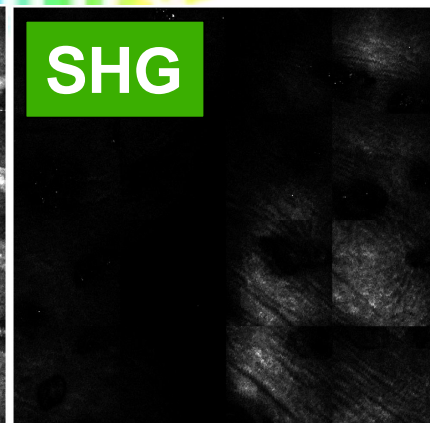
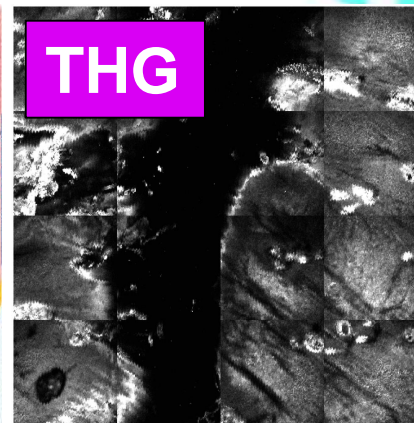
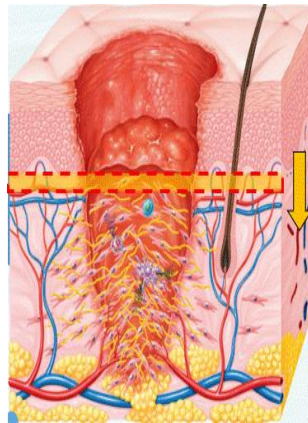
深さ分解 まとめ

◎5日目

炎症期～増殖期前期

深い部分が埋まる

コラーゲン生成は未確認



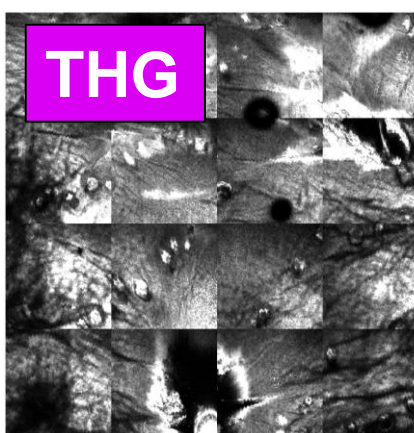
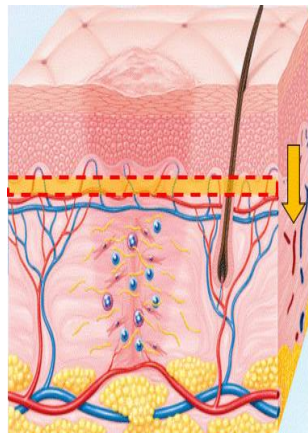
◎20日目

成熟期

表面が塞がれる

コラーゲンの生成

線維は細く,ばらばら



◎30日目

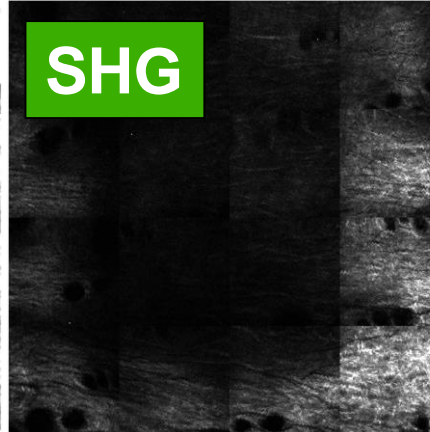
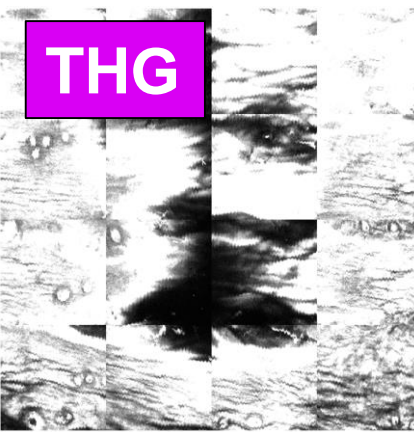
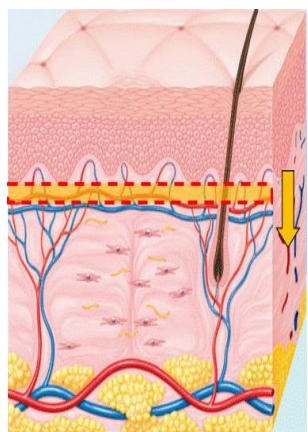
創痕の消失

表皮と真皮の明確化?

コラーゲン

浅層: 細く,ばらばら

深層: 線維化





表皮

真皮

測定結果

炎症期

出血・止血

—

増殖期

表皮修復
開始細いコラーゲ
ン線維から成
る肉芽組織

5日目:創傷底部から
表面の修復が見られる
コラーゲン生成なし
10日目:創部表面塞がる

成熟期

表皮が
傷を塞ぐコラーゲン再
構成により,
規則的配列

20日目:上層でもコラー
ゲン生成(低強度)
30日目:線維状の
コラーゲン確認
40日目:高SHG強度の
線維状のコラーゲン

治癒

まとめ

- SHG/THG顕微鏡を用いて、切創治癒過程の*in vivo*時系列モニタリングを行った
- 切創治癒過程における表皮および真皮コラーゲン線維の動態を同時に可視化
- 日数の経過に伴い、創部表皮の修復 ➡ 真皮コラーゲンの新生 ➡ 真皮コラーゲンの線維化を、同一個体サンプルで確認