

## Development of burn diagnosis using depth-resolved second-harmonic-generation

○ 佐々木 邦彦 (阪大院基礎工)  
東野 義之 (奈良医大)

安井 武史 (阪大院基礎工)  
正 荒木 勉 (阪大院基礎工)

Kunihiko SASAKI, Osaka University, 1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka  
Takeshi YASUI, Osaka University  
Yoshiyuki TOHNO, Nara Medical University  
Tsutomu ARAKI, Osaka University

E-mail: [t-yasui@sml.me.es.osaka-u.ac.jp](mailto:t-yasui@sml.me.es.osaka-u.ac.jp)

<http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp>

## 1. 緒言

皮膚は表皮・真皮・皮下組織の3層構造を有しており、特に真皮は、皮膚の張り・弾性・水分保有といった皮膚の重要な機能に深く関与している。したがって、真皮の構造異常や構造的変化を観察することは、皮膚性状を探るだけでなく皮膚疾患に関する情報を得る上でも重要と考えられる。例えば、代表的皮膚疾患である火傷は一般的な診断手法が未だに確立されていない。火傷の治療法は、受傷面積だけでなく、受傷深度により変化する。火傷の受傷深度はⅠ度(表皮のみ)、Ⅱ度(真皮まで及ぶ)、Ⅲ度(皮下組織まで及ぶ)と大別される。受傷深度Ⅱ度までは再生が期待できるが、Ⅲ度では植皮が必要となる。受傷深度の判断は、現在では医師の経験と勘で行われているが、専門医でもⅡ度とⅢ度の判断は容易ではなく、また数日~数週間経過した後にはっきりすることも多い。このため、皮膚真皮における受傷面積や到達深度を非接触リモートで客観的に評価できれば、その治療方法に関して重要な指針を得ることができ、感染症や過形成傷痕(火傷の跡)の防止やコスト・入院期間の削減等、患者のリスクを軽減させることが可能となる。

## 2. コラーゲンと生体SHG光

上記で述べた皮膚真皮には生体構造タンパク質であるコラーゲンが豊富に含まれており、コラーゲンはマイクロフィブリル・原線維・線維・線維束といった様々なサイズの構造集合体を形成している。この構造集合体の基本単位がコラーゲン分子(トロポコラーゲン)である。コラーゲン分子はポリペプチド鎖3重らせん構造を有しており、その光波長オーダーでの非中心対称構造ゆえに、超短パルス光照射時に第2高調波発生光(SHG光)を特異的に発生することが知られている<sup>1)</sup>。この生体SHG光を用いると、生体組織中のコラーゲン分布情報のみを非接触リモートで可視化できることから、新しいプローブ法として注目されている<sup>2-4)</sup>。一方、火傷という観点で考えた場合、コラーゲン分子を構成するポリペプチド鎖の3重らせんは加熱と共にほどけ始め、熱変性温度である約60℃で各々のポリペプチド鎖が糸まり状となったゼラチンに変性する。このようなコラーゲン分子の熱的構造変化は生体SHG光に敏感に反映され、生体SHG光強度の減少及び

消失として観測される<sup>5)</sup>。したがって、このような生体SHG光の特性を用いると火傷診断用プローブとして有用であると考えられる。本講演では、生体SHG光を用いた光学的火傷診断法に関する基礎研究を報告する。

## 3. 実験装置

図1に実験装置を示す。レーザー光源にはモード同期チタン・サファイアレーザー(パルス幅=100fs、平均パワー=800mW、繰り返し周波数80MHz、中心波長800nm)を用いる。レーザーから出射された超短パルス光は、ロックイン検出の為に電気光学変調器(AOM)で強度変調された後、対物レンズ(OL、×50、NA=0.42)によりサンプルに集光される。後方散乱した生体SHG光(波長400nm)は、ハーモニクセパレーター(HS)、青色透過フィルター(BPF)、分光器(Monochromator)によって基本波光から分離され、光電子増倍管(PMT)でロックイン検出される。サンプルを、3次元機械式ステージで走査することにより、イメージング測定を行う。さらに深さ分解能向上のため、ピンホール(PH、直径50 $\mu$ m)を用いた共焦点配置を導入している。本システムの面内分解能は約1.5 $\mu$ m、深さ分解能は約15 $\mu$ mである。

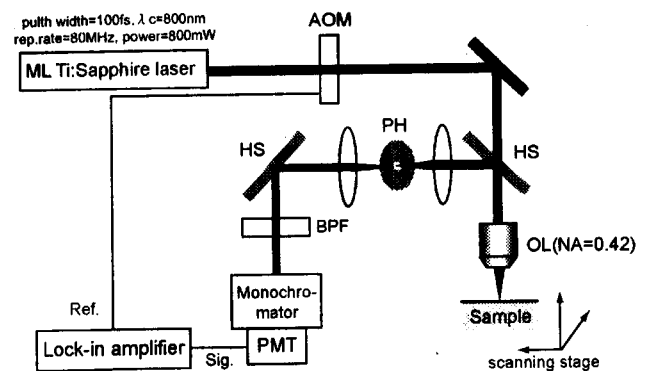


Fig.1 Experimental setup.

AOM: acousto-optic modulator, OL: objective lens, PH: pinhole( $\phi$  50 $\mu$ m), HS: harmonic separator, PMT: photomultiplier tube, BPF: blue pass filter.

## 4. 実験結果

測定に用いたサンプルは、生の若鶏手羽先の皮を用いた。カッターによってスライスされたサンプル(2mm厚)の半分の領域に対して、80度に加熱されたアルミ板を約1秒間押し当てて火傷部位を作成した。火傷部位は、熱により軽く赤みを帯び、変色していることが肉眼で確認された。このようにして作成されたサンプルは、表面をフラットにするために2枚のスライドガラスに挟み込まれた。0 $\mu$ m(仮に、サンプル表面とする)、40 $\mu$ m、80 $\mu$ m、100 $\mu$ m、120 $\mu$ mの各深さにおいて、SHG光の深さ分解2次元イメージング測定を行った。図2は、得られたSHGイメージを示しており、測定領域は6mm $\times$ 6mmである。測定イメージの左側が正常部位、右側が火傷部位を示している。サンプル表面では、正常部位からは強いSHG光が観測されているのに対し、火傷部位からはSHG光はほとんど観測されていない。このため、火傷の有無が、高いコントラストではっきりと示されていることがわかる。さらに、このシステムは高い、奥行き分解能を備えているため、火傷の受傷面積だけでなく、受傷深度も測定することができる。実際に測定深度を40 $\mu$ m、80 $\mu$ mと深くしていても、表面部と同様に、火傷部位と正常部位においてSHG光強度に高いコントラストが保たれていることから、これらの深さまで火傷が到達していることが推測される。一方、測定深度100 $\mu$ m、120 $\mu$ mでは左右両部位のイメージコントラストの差異が若干小さくなっていることが確認できる。これは、アルミ板を押し付けた表面100 $\mu$ mまではコラーゲンの熱変性が起こっているが、それ以上の深さでは熱変性の度合い、つまり火傷の程度が軽いと考えられる。また、サンプルから測定深度に関係なく、全くSHG光が発生しない円形の部位が存在した。これは鶏皮膚に存在する直径1mm程度の羽毛の抜け跡だと考えられる。

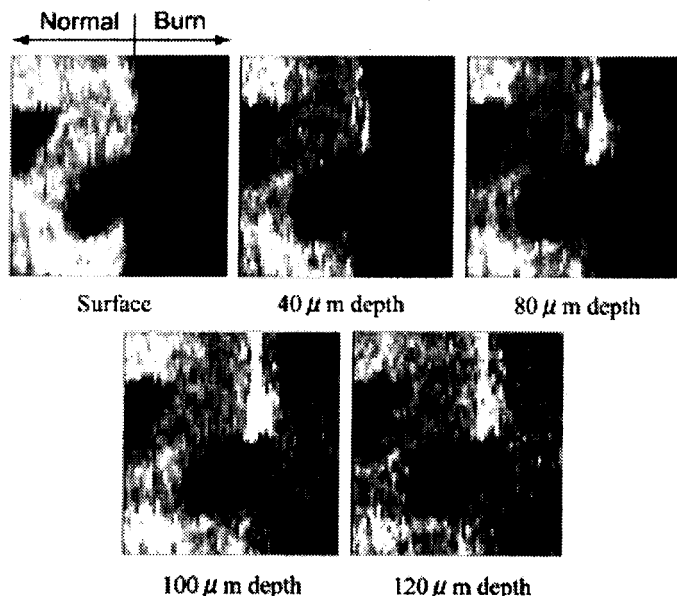


Fig.2 Confocal SHG images of fresh chicken at five different depths (Surface, 40 $\mu$ m, 80 $\mu$ m, 100 $\mu$ m, 120 $\mu$ m in depth). Image size: 6mm $\times$ 6mm.

## 5. 結言

コラーゲンの熱変性に伴う生体SHG光の強度減少を利用した非接触リモート火傷診断に関する基礎研究を行い、火傷深度の評価に関しては、深さ分解SHGイメージングが有効であることを確認した。今後は、共焦点反射イメージとSHGイメージの同時取得により、組織構造と火傷部位の同時測定を可能とした上で、様々な火傷を起こした皮膚サンプルを測定・検証し、火傷診断におけるSHG光を用いた測定法の有効性を確かめる予定である。

## 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学技術研究費補助金16300155及び17200032による援助のもとに行われた。ここに記して謝意を表する。

## 文献

- 1) S. Roth and I. Freund, "Second harmonic generation in collagen", *J. Chem. Phys.*, **70**, pp. 1637-1643 (1979).
- 2) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, "Determination of collagen fiber orientation in human tissue by polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light", *Appl. Opt.*, **43**, pp. 2861-2867 (2004).
- 3) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, "Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry", *J. Biomed. Opt.*, **9**, pp. 259-264(2004)
- 4) T. Yasui, K. Sasaki, Y. Tohno, and T. Araki, "Tomographic imaging of collagen fiber orientation in human tissue using depth-resolved polarimetry of second-harmonic-generation light", *Opt. Quantum Electron.*, (in print).
- 5) T. Theodossiou, G. S. Rapti, V. Hovhannisyan, E. Georgiou, K. Politopoulos, and D. Yova, "Thermally induced irreversible conformational changes in collagen protein probed by optical second harmonic generation and laser-induced fluorescence" *Lasers Med. Sci.*, **17**, pp. 34-41 (2002)