

## 真皮コラーゲンの SHG（第 2 高調波発生光）イメージング と皮膚老化診断への応用

### Second-Harmonic-Generation imaging of dermal collagen and its application for evaluation of skin aging

○伊藤誠啓<sup>1)</sup>, 朝稻嘉文<sup>1)</sup>, 安井武史<sup>1)</sup>, 荒木勉<sup>1)</sup>, 山下豊信<sup>2)</sup>, 松永由紀子<sup>2)</sup>, 高橋元次<sup>2)</sup>

○Masahiro Ito<sup>1)</sup>, Yoshifumi Asaine<sup>1)</sup>, Takeshi Yasui<sup>1)</sup>, Tsutomu Araki<sup>1)</sup>, Toyonobu Yamashita<sup>2)</sup>, Yukiko Matunaga<sup>2)</sup> and Genji Takahashi<sup>2)</sup>

阪大院基礎工<sup>1)</sup>, 資生堂ライフサイエンス研究センター<sup>2)</sup>

Grad. Sch. Engg. Sci., Osaka Univ.<sup>1)</sup>, Life Science Research Center, SHISEIDO CO., LTD.<sup>2)</sup>

E-mail: t-yasui@me.es.osaka-u.ac.jp

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

We investigate a potential of second-harmonic-generation (SHG) microscopy as an optical probe for skin aging. Dermal collagen fiber in aging-controlled mice is clearly visualized as high contrast SHG images. From comparison of the SHG image between a photo-aged mouse and natural-aged one, we confirm decrease of SHG light intensity of dermal collagen fiber at an epidermis-dermis boundary.

#### 1. はじめに

老化は、誰しものが発現し、しかも避け得ない不可逆的な生理現象である。例えば皮膚の場合、その機械的特性（張り、弾性ほか）が年月を経て徐々に減退し、シワや皮膚のたるみ等が発生する。近年の皮膚美容に対する意識の高まりと共に、皮膚老化を評価する手法が強く望まれている。皮膚では、真皮に豊富に含まれるコラーゲン線維が生体構造タンパク質として皮膚の機械的特性を決定する上で重要な役割を果たしているため、真皮コラーゲン線維の配向や分布状態をモニターすることが皮膚老化を評価する上で有効とされている。例えば、組織学的手法として、真皮コラーゲン線維を特異染色し（ワンギーソン染色等）光学顕微鏡で観察を行うことにより、皮膚老化に伴う変化を捉えることが可能である。しかし、このような評価方法は皮膚生検組織に対してのみ有効であり、*in vivo* 計測への拡張は困難である。我々は、超短パルス光照射時、生体コラーゲンの非線形光学特性によって誘起される第 2 高調波発生光（生体 SHG 光）に着目し、様々なヒト組織のコラーゲン配向計測に関する研究を行ってきた[1-3]。本研究では、生体 SHG 光計測を用いた皮膚老化診断に関する基本特性を評価した。

#### 2. 皮膚老化とコラーゲン[4]

皮膚の老化が出現する時期・程度にはかなりの個人差があり、環境因子に大きく左右される。そこで、皮膚の老化は加齢に伴う生理的自然老化と外部環境（紫外線照射）による光老化に分けられる。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ことに起因する老化現象である。例えば真皮では、コラーゲン線維の全量が加齢と共に約 1%ずつ減量する。この変化は、加齢に伴い線維芽細胞の機能が低下する事が要因であると考えられている。コラーゲン線維は老化に伴い細くなり、線維の走行に規則性を失い、互いの間隙が拡大する。線維束が細くなっていく事が皮膚の張力の減退と萎縮を反映していると考えられる。一方、光老化は、紫外線を照射された皮膚組織において自然老化とは異なる過程で起こる老化現象である。コラーゲン線維の場合、長期紫外線被曝により発生したコラーゲン分解酵素によって分解され、コラーゲン線維が減少する。非露光部（例えば、尻）では自然老化だけが起こるが、露光部（例えば、顔面）においては自然老化と光老化の両方が進行するので、非露光部に比べて機械的特性を失い易い。このような事から光老化は自然老化と並び皮膚美容分野で重要な問題である。

#### 3. 実験装置

市販のレーザ共焦点顕微鏡（ニコン、DIGITAL ECLIPSE C1）の光源としてフェムト秒モード同期 Ti:Sapphire レーザ（コヒーレント社 Chameleon, 中心波長 800nm, パルス幅 140fs, 繰り返し周波数 90MHz）を用いることにより、透過型 SHG 顕微鏡を構築した。SHG 発生効率の偏光依存性をキャンセルするため偏光解消板（DP）によりランダム偏光とされたレーザ光は、ガルバノミラー（GM）とリレー・レンズ光学系（L1, L2）を経た後、対物レンズ（OL. ×40, N.A.=0.90, Dry）によりサンプルに集光される。サンプルで発生した前方直進 SHG 光はコンデンサ・レンズ（CL）により集められ、ブルーパスフィルタ（BPF）を通過した後、光電子増倍管（PMT）により検出される。

#### 4. サンプル

実験では、市販のヘアレス・マウスを購入し、育成と紫外線照射によって老化進行度がコントロールされた自然老化マウス（16 週齢）及び光老化マウス（16 週齢，生後 6 週から約 10 週間 UVB を断続的照射）を用いた。マウス背中から切り出された皮膚部位を表皮に対して垂直な断面でスライスした切片組織（17 $\mu$ m 厚）をサンプルとして用いる。また、コントロールには 6 週齢の通常マウスを用いた。コントロール・マウスと自然老化マウスの比較から自然老化の影響を、また自然老化マウスと光老化マウスの比較から、光老化の影響を評価する。

#### 5. 測定結果

コントロール・マウス (A)，自然老化マウス (B)，光老化マウス (C) の SHG イメージを Fig. 2 に示す。真皮コラーゲンの断層分布の様子が高コントラストな SHG イメージとして可視化されている。コントロール・マウスでは、太く発達したコラーゲン線維がほぼ横方向に層状に分布している様子が確認された。また、SHG 光強度はその発生領域でほぼ一様であった。自然老化マウスでは、若干、コラーゲン線維分布に乱れが生じているように見えるが、コントロール・マウスと比較して顕著な構造分布の違いは確認されなかった。自然老化の場合、線維芽細胞の機能低下に伴い、コラーゲン線維は細くなり互いの間隙が拡大するとされているが、SHG イメージではそのような変化は見られなかった。一般にマウスの寿命は 1-2 年とされているが、今回測定に用いた自然老化サンプルは 16 週齢である。すなわち、16 週齢では線維芽細胞の活性が低下するほど老化が進行しておらず、自然老化マウスと呼ぶには『まだ若い』ということが考えられる。その結果、コントロール・マウスと自然老化マウスに明確な相違が観測されなかったと考えられる。一方、光老化サンプルでは表皮直下の真皮乳頭層付近に SHG 光強度の弱い部分（丸囲い部）が確認できる。光老化では、長期 UV 被曝によって発生したコラーゲン分解酵素によってコラーゲンが分解され、コラーゲン線維が減少する。コラーゲン分解酵素の発生量は UV 到達量に依存するので、真皮深さによって異なる。すなわち、真皮において一様にコラーゲン線維が減少する自然老化と対照的に、光老化ではコラーゲン線維減少量が真皮深さに依存し、特に表皮-真皮境界付近で最も顕著に減少すると考えられる。今回の測定結果は、これらの現象を反映した結果であると思われる。

#### 6. おわりに

老化コントロール・マウスの背中皮膚組織切片の SHG 断層イメージングから光老化に関連していると思われる変化を検出することができた。今後は、これのイメージング結果を画像解析することにより、光老化度を定量的に示すパラメータを抽出する必要がある。

本研究は文部科学省科学技術研究費補助金 16300155 及び 17200032 より援助を受けた。

文献

- [1] T. Yasui, *et al.*, J. Biomed. Opt. **9** (2004) 259-264.
- [2] T. Yasui, *et al.*, Appl. Opt. **43** (2004) 2861-2867.
- [3] T. Yasui, *et al.*, Opt. Quantum Electron. **37** (2006) 1397-1408.
- [4] 藤本 大三郎, 老化のメカニズムと制御 アイピーシー

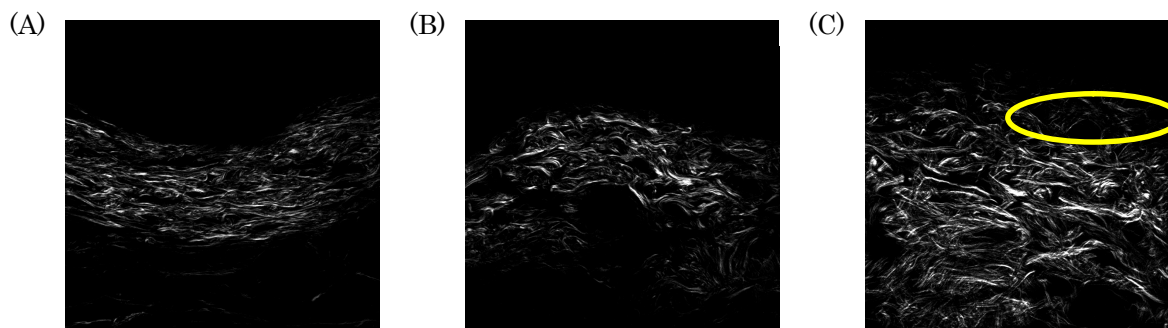


Fig. 2 SHG images A : control mouse, B : natural-aged mouse, C : photo-aged mouse, Image size = 250 $\mu$ m  $\times$  250 $\mu$ m

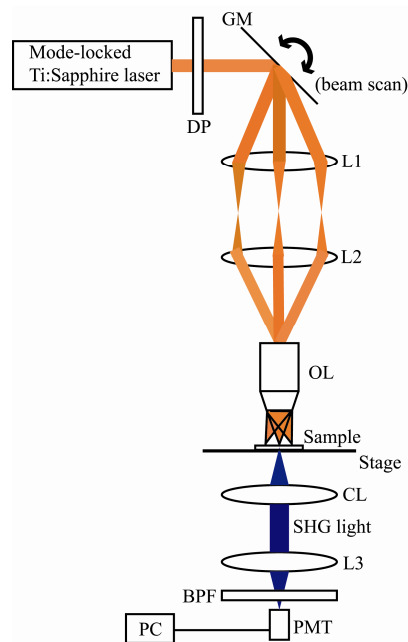


Fig. 1 Setup  
DP : depolarization plate, GM : galvano mirror, L : lens, OL : objective lens, CL : condenser lens, BPF : blue pass filter, PMT : photomultiplier tube