

生体コラーゲン SHG (第 2 高調波発生光) 顕微鏡

徳島大学 大学院 ソシオテクノサイエンス研究部
大阪大学 大学院 基礎工学研究科
安井武史

1. はじめに

最近の健康に対する意識の高まりと共に、日々の暮らしの中でコラーゲンという言葉をよく耳にする。「食べるコラーゲン」、「飲むコラーゲン」、「塗るコラーゲン」、「打つコラーゲン」など、コラーゲンという言葉を目にした日は無い。その真偽はさておき、このようなコラーゲン産業隆盛の背景には、コラーゲンが生体にとって極めて重要であることはもちろん、それ以外にコラーゲンを『生きたありのまま』の状態で見える技術がこれまで存在しなかったことも少なからず影響していると考えられる。

コラーゲンは、真皮、靭帯、腱、骨、軟骨などを構成する生体構造タンパク質で、ヒトでは全タンパク質の約 30% (全体重の約 6%) を占める。ヒトを形作る生体組織を超高層ビルに例えると、コラーゲンは鉄筋に相当し、その濃度分布や配向構造は生体組織の形態・機能・機械的特性に深く関与している。骨や軟骨ではびっしりと詰め込まれたコラーゲン細線維が組織の弾力性を増すことにより衝撃で骨折などが起こることを防いでおり、皮膚では張りや弾性に深く関与することから美容の観点でも重要とされている。このような背景から、生体組織におけるコラーゲンを生きたありのまま状態で選択的に可視化する手段が強く望まれている。

皮膚の診断に話を限定すると、通常は組織切片のコラーゲンを特異的に染色し (ワンギーソン染色等)、光学顕微鏡で組織診断をするが、さらにコラーゲン構造や配向を評価する手段として、電顕観測¹⁾、X線回折²⁾、マイクロ波法³⁾、機械的特性法⁴⁾なども報告されている。しかしいずれも侵襲的あるいは破壊的測定手法であり、生体から細胞・組織を外科的に採取する生検が必要である。このような生検に基づいた手法はコラーゲン構造の異常を実際に識別する上では信頼性が高いが、臨床応用を考えた場合、患者に対して非常に大きな負担を強要することになる。そこで臨床応用を考慮し、迅速簡便に毛穴の観察からコラーゲンの配向を知る方法が提案されている⁵⁾。さらに高度の診断をめざすためには、コラーゲン濃度や配向の局所情報を非接触・低侵襲で得る方法の開発が強く望まれる。

そのような要求を満たす可能性を有する 1 つの手段が光プローブ法である。生体における最外殻組織である皮膚は光学的アプローチが比較的容易であり、これまでも様々な光学的皮膚計測法が報告されている。光コヒーレンストモグラフィ(OCT)では、多重散乱光の中からコヒーレンス (可干渉性) を保持する後方散乱光のみをコヒーレント検出することにより得られた散乱係数空間分布から組織の断層構造を可視化する⁶⁾。例えば、コラーゲン計測に関しては、コラーゲンの有する複屈折性を偏光感受型 OCT で抽出することにより、火傷深度診断への応用が試みられている⁷⁾。反射共焦点顕微計測では、生体組織中で後方散乱されたレーザー反射光に対して、共焦点配置を導入することにより、3次元の空間分解能を達成する⁸⁾。また近年、2光子蛍光顕微鏡を用いた生体組織観察に関する研究も活発に行われており、特に組織や細胞の自家蛍光を利用することにより無染色で組織観察する試みも行われている⁹⁾。これら光学的手法は生体組織全体の構造を可視化するという点では優れているが、その中からコラーゲン情報のみを抽出し詳細に測定することは困難であった。

フェムト秒(10^{-15} 秒)オーダーの超短パルスレーザー光を生体組織に照射すると、光電場とコラーゲン分子の非線形相互作用によって入射レーザー光の一部が波長変換され、入射レーザー光の半波長(あるいは2倍の周波数)の光が第2高調波発生光(SHG; second-harmonic-generation)として発生する¹⁰⁾。我々は、コラーゲン分子特有の非線形光学特性によって発生する生体 SHG 光を利用すれば、生体組織におけるコラーゲン線維のみを『生きたありのままの状態』で可視化できることを見出し、これに基づいた『生体コラーゲン SHG 顕微鏡』を開発した¹¹⁻¹³⁾。さらに、動物やヒトの皮膚におけるコラーゲン線維の濃度分布や配向分布を3次元マッピングし^{14,15)}、光老化^{16,17)}や熱傷¹⁸⁾など皮膚特有の事象の評価にも利用可能であることを示した。ここでは、生体コラーゲン SHG 顕微鏡の光老化診断や熱傷診断への応用例を紹介する。

2. 生体コラーゲン SHG 顕微鏡

SHG 光は物質の構造非中心対称性に起因する非線形光学現象の1つである。ここでは、音と光の領域における線形・非線形現象と対比しながら、SHG 光発生メカニズムを説明する。まず音の領域における現象の例として、ピアノ鍵盤を考える。図1左上側に示すようにピアノの鍵盤に軽く触れると、その鍵盤に対応した基本音(周波数=f)が発生する。これは、音の領域における線形現象と言える。しかし同じ鍵盤を力一杯叩くと、基本音以外に1オクターブ上の倍音(周波数=2f)も同時に発生する(図1右上側)。このような音の領域の非線形現象は、ピアノ構造の機械的非線形性に起因している。同様な現象は光の領域でも起こり、この場合には非中心対称性構造物質(非線形光学結晶やコラーゲン分子)がピアノ鍵盤、超短パルス光が力一杯叩くことに相当する(図1右下側)。例えば、赤色の超短パルス光(周波数= ω , 波長= λ)を非中心対称性構造物質に入射すると、周波数が2倍(波長が半分)の青色パルス光(周波数= 2ω , 波長= $\lambda/2$)が発生する。これがSHG光である。このようなSHG光は線形光学効果(反射や吸収)とは本質的に異なるメカニズムで発生し、波長オーダーの物質構造や局所環境の変化に敏感であるという特徴を有している。

コラーゲンの基本構造はポリペプチド鎖3重らせん構造からなるトロポコラーゲン(コラーゲン分子)であり、これが規則的に順次集合して階層的に太くなっていく。このようなコラーゲンは、その光波長オーダーでの非中心対称性構造(3重らせん構造および規則的配向構造)ゆえに、高い2次の非線形光学特性を有している。そのため、非常に高い瞬間ピークパワーを有するフェムト秒パルスレーザー光をコラーゲン含有生体組織に照射すると、非位相整合型SHG発生過程を介して、生体SHG光が特異的に発生する。例えば、皮膚にフェムト秒パルスレーザー光を照射した場合、コラーゲンは真皮のみに局在しているため、生体SHG光を用いることにより真皮コラーゲン構造の選択的計測が可能になる(図2)。厳密には、コラーゲン以外に筋肉フィラメントや微小管といった生体構成物質もSHG光を発生するが^{9,19)}、特にコラーゲンが高いSHG発生効率を有している上に、皮膚におけるこれらの物質の含有率を考慮すると、皮膚からの生体SHG光は真皮コラーゲ

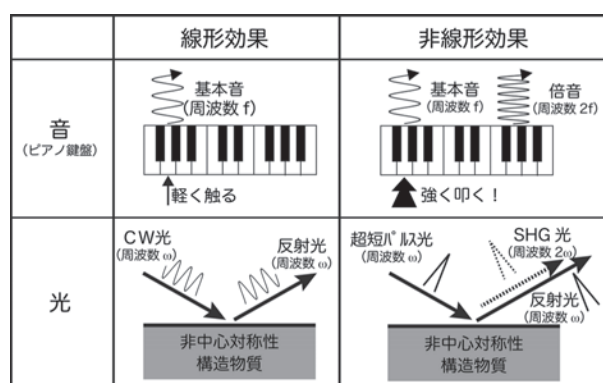


図1 生体 SHG 光

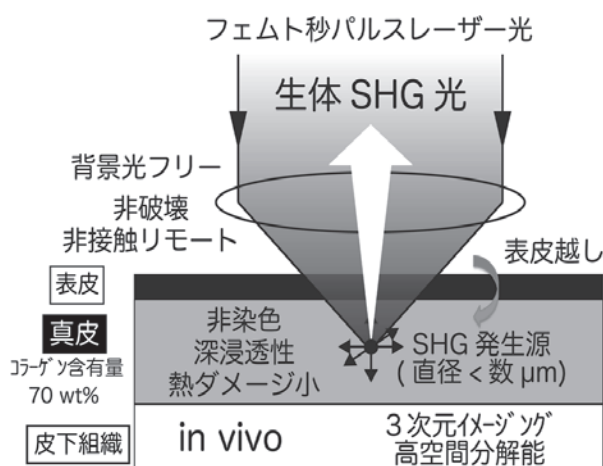


図2 生体コラーゲン SHG 顕微鏡

ン由来のものであると言える。また、近赤外超短パルス光の良好な生体透過性を利用すると表皮越しに生体 SHG 光を誘起し、その後方散乱光を検出できる。それ以外にも、バックグラウンド光（拡散反射光，蛍光）との分離が容易，低侵襲，深浸透性，熱的ダメージが小さい，3次元イメージングが可能といった特徴を有している。また，コラーゲン分子固有の非線形光学特性を利用するため組織染色が不要であり，生きたありのままの状態での測定が可能のため，皮膚科学関連分野における有用なツールになることが期待される。

3. 実験装置

図3に実験装置を示す。光源にはフェムト秒モード同期 Cr:Forsterite レーザー（中心波長 1250 nm, パルス幅 100 fs, 繰返し周波数 73 MHz）を用いる。1250nm 付近は，生体組織における散乱特性と吸収特性のバランスから，最も生体透過性の良い『生体の窓』とされており，これにより表皮越しでも真皮コラーゲン線維の画像がクリヤーに取得できる。レーザー光の偏光方向は 1/4 波長板によって円偏光にされ，油浸対物レンズ（OL, N.A.=0.9, W.D.=350 μm）を通してサンプル上に集光される。サンプルから発生した生体 SHG 光は，ハーモニックセパレーター（反射波長 625 nm）と赤外カットフィルターによって基本波成分（中心波長 1250 nm）から分離された後に，電子冷却光子カウンティング型光電子増倍管で高感度計測される。レーザースポットの高速 2次元走査（X 軸，Y 軸）には，ガルバノミラーと 2 枚のリレーレンズを用いている。さらに，3次元走査サンプルステージで皮膚取り付けリングを走査することにより，深さ分解 SHG イメージング（600μm*600μm*250μm 深さ）と大面積 SHG イメージング（2.4mm*2.4mm）が可能である。

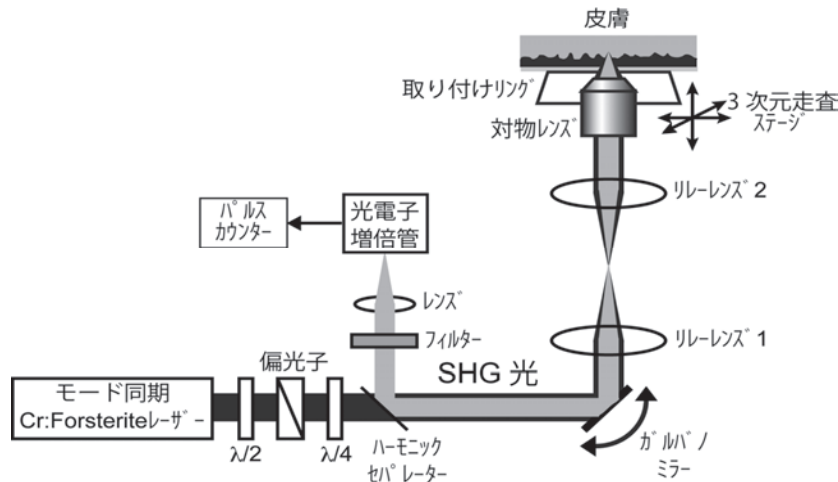


図3 実験装置

4. 光老化による真皮コラーゲン線維構造の変化

真皮コラーゲン線維は，張り・弾性といった皮膚の形態的・機能的特性を決定する上で重要な役割を担っている。そのため，コラーゲン線維の質や量の変化が，シワやたるみなど皮膚の形態的な異常を引き起こす原因となる。このようなコラーゲン線維状態の変化は特に紫外線の曝露によって急激に進行し，これを光老化と呼ぶ。光老化が進行した皮膚で真皮コラーゲン線維が減少することは，皮膚生検による組織学的研究からは確認されているが，それを *in vivo* で観察した報告例はない。

実験は大阪大学大学院基礎工学研究科ヒト試験倫理委員会の承認を受け（承認 No.21-1），同意を得た 20代～60代の被験者に対して行った。皮膚に入射するレーザーパワーは 40mW に設定した。光源として用いた Cr:Forsterite レーザー光の生体照射に対する安全性に関しては，我々が平成 20年度に同条件で実施したヒト試験（承認 No. 20-3）において，皮膚科医がレーザー照射前後の皮膚観察を行ったところ，全ての被検部位において異常は認められなかった。

図4は、日焼けしていない色白の50代男性と慢性的な日焼けによって光老化が進行した50代男性における頬のコラーゲン線維分布を大面積SHGイメージングで可視化した結果である。両者を比較すると、光老化していない皮膚ではキメの細かいコラーゲン線維が密に分布しているのに対し、光老化が進行した皮膚では太く発達したコラーゲン線維が粗に分布しており、コラーゲン線維分布の様相が顕著に異なることが分かる。一般に、皮膚に紫外線が照射されると、コラーゲン分解酵素によってダメージを受けたコラーゲン線維が分解される一方で新生コラーゲン線維が産生され、両者が置換されることにより健全な状態のコラーゲン線維構造が維持される。しかし、紫外線を長年浴び続け光老化が進行すると、この置換メカニズムが崩れ、新生コラーゲン線維の産生が追いつかなくなる。その結果、真皮コラーゲン線維（特にキメの細かいコラーゲン線維）が異常に減少し、シワの発生や張りの減少が起こりやすくなる。図4における違いは、このような過程を反映していると考えられる。

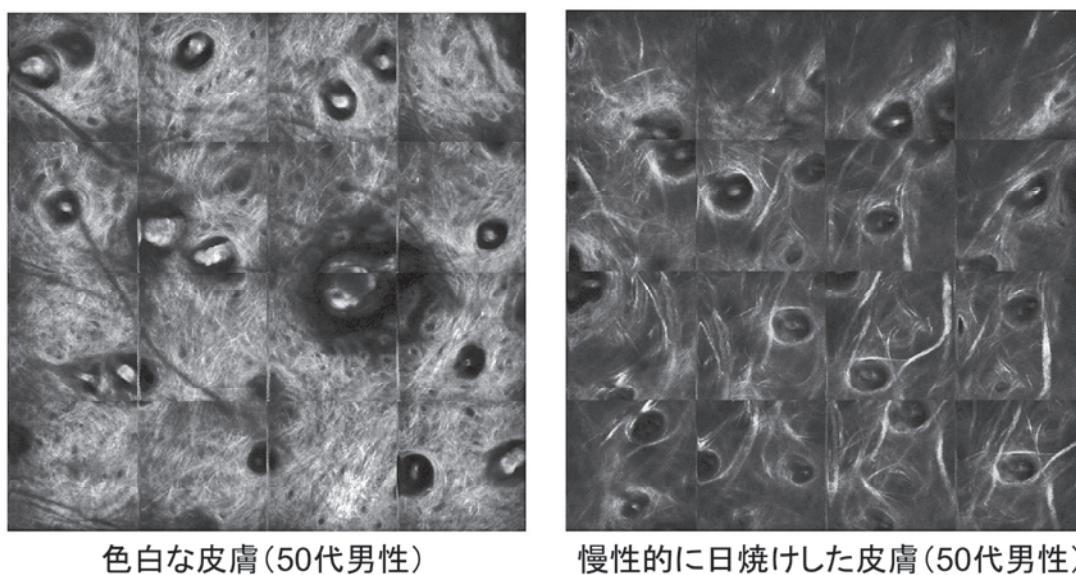


図4 ヒト頬における真皮コラーゲン線維の *in vivo* イメージング
(イメージ領域 = 2.4mm*2.4mm)

5. 光学的熱傷診断への応用

代表的な皮膚疾患である熱傷は、受傷深度に応じてI度 (epidermal burn : EB), 浅II度 (superficial dermal burn : SDB), 深II度 (deep dermal burn : DDB), III度 (dermal burn : DB) の4種類に分類され、それぞれ表皮, 真皮上層, 真皮深層, 皮下組織まで熱傷が到達している。治療方法は熱傷深度に応じて大きく異なり、例えば深II度熱傷は感染による受傷深度拡大の防止, III度熱傷は皮膚組織全層が破壊され自己修復が行われなため、植皮が必要とされる。従って、熱傷受傷後早期における正確かつ迅速な熱傷深度診断が必要とされるが、現状としては医師による患部の肉眼での観察, pin prick test と呼ばれる痛覚テストなどが主とされ、客観性に欠ける。レーザードップラー血流計²⁰⁾や光音響法²¹⁾など、血液分布を介した光学的熱傷診断も報告されているが、正確な熱傷診断に十分な精度が得られているとは言い難い。

ここで、視点を変えて、生体SHG光の発生メカニズムとコラーゲン熱変性の関係に注目すると、生体コラーゲンSHG顕微鏡が光学的熱傷診断法としても有用であると考えられる。コラーゲン分子は非中心対称性を有するポリペプチド鎖3重螺旋構造をとるため、コラーゲン分子に超短パルスレーザー光を照射することで生体SHG光が発生する。一方、生体内のコラーゲン分子は60~70℃で熱変性による分子構造変化を起こすことが知られている。この熱変性により、3重螺旋構造がほどけ、ランダムなコイル状の構造へと変化する。この構造変化によりコラーゲン分子の非中心対称性構造が失われると、SHG光の発生が禁制となる。そこで、ラット熱傷モデルにおける真皮コラーゲン線維分

布を SHG イメージングで可視化し、熱傷診断用光プローブとしての有用性を検証した。

実験に先立ち、大阪大学大学院基礎工学研究科動物実験倫理委員会の承認を得た（承認番号：動基工 21-2-0）。実験動物には wistar 系ラット（日本 SLC，オス，250-300 g，10 週齢）を用い、動物飼育室で一定環境下にて飼育し、1 週間順応させた後、健康なラットを実験に用いた。飼育期間中、飲水および固形飼料は自由摂取させる。熱傷作製前日、イソフルラン（導入濃度 4-5 %，維持濃度 2-3 %）による吸入麻酔下で、ラット背部を安全カミソリ及び除毛クリームで広く除毛する。熱傷作製時は鎮痛及び麻酔のため、イソフルランによる導入麻酔下で、ドミツール（0.15 mg/kg），ドルミカム（2 mg/kg），ベトルファノール（5 mg/kg）の 3 種混合麻酔を腹腔内注射した後、熱傷作製を行った。熱傷作製は Walker-Mason のテンプレートを用いて行われ、SDB（70 °C の湯に 10 s），DDB（78 °C の湯に 10 s），DB（90 °C の湯に 10 s）の各熱傷を作製した²²⁾。熱傷面積は 1 %TBSA (total body surface area) 以内とし、熱傷作製後、水分補給のため、生理食塩水（50 cc/kg）を腹腔内投与した。SHG イメージングは *in vivo*にて行い、測定終了後はソムノペンチルの過剰投与（75 mg/kg）による安楽死処置を行った。

図 5 に、各熱傷サンプルにおける *in vivo* 大面積 SHG イメージを示す。測定した皮膚深度は 80 μ m である。対物レンズ直後におけるレーザーパワーを変化させることによりコントラストを調整し、真皮層におけるコラーゲンの線維構造を明確にしている。各画像を比較すると、コントロール（熱傷無し）に関してはコラーゲンが線維状の構造を示しているのに対し、SDB，DDB では熱ダメージに伴い、線維状の構造が崩壊し、テクスチャ構造が画像全体で見られた。DDB におけるテクスチャ構造は、SDB で見られるものより細かい構造を示していた。DB に関しては、コラーゲンは完全に変性しており、SHG 信号はほとんど観測されなかった。

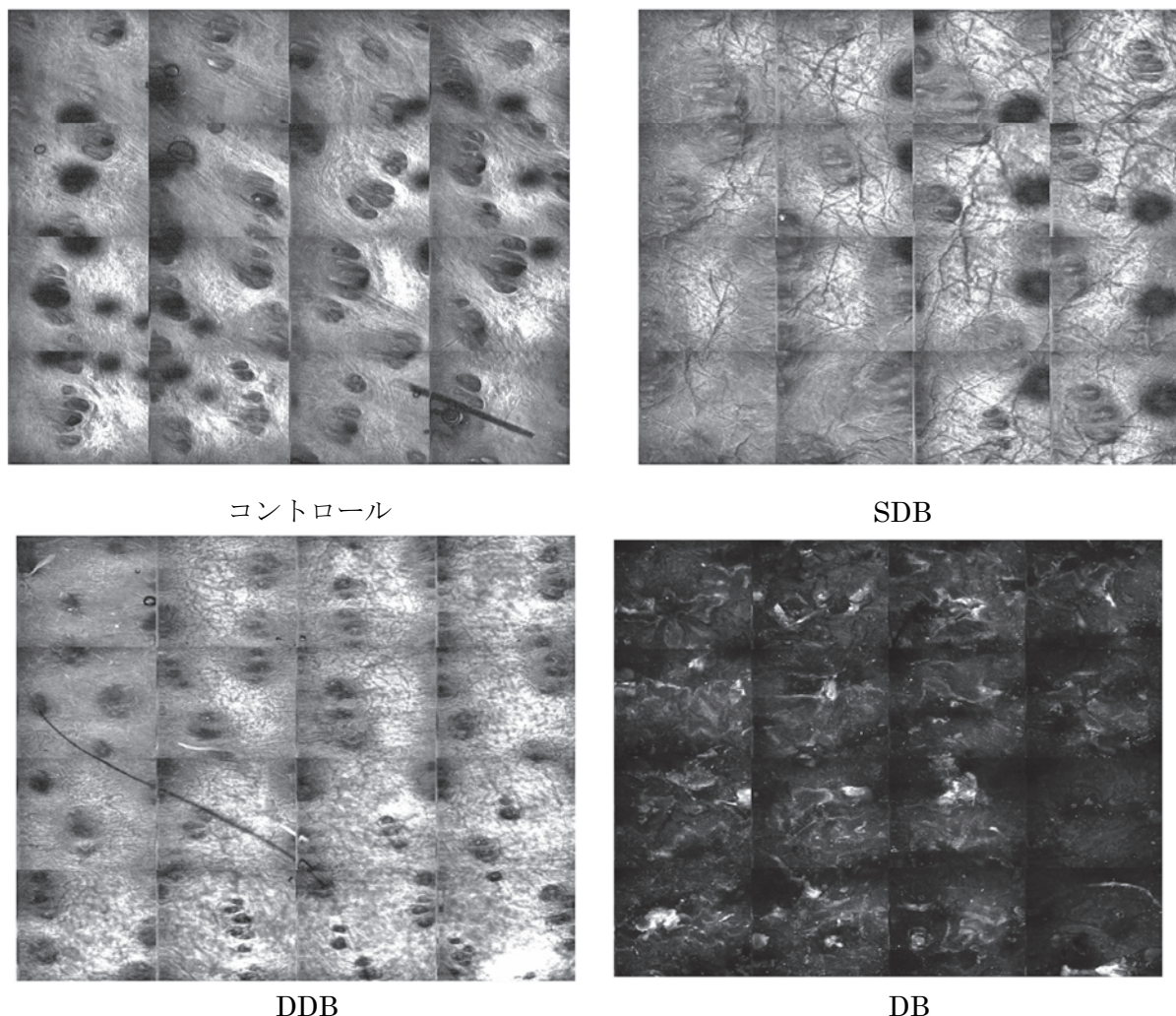


図 5 各熱傷における *in vivo* 大面積 SHG イメージ(イメージ領域 = 2.4mm*2.4mm)

また、図 6 に、各熱傷サンプルにおいて、入射レーザーパワーを同一にした場合の SHG 信号強度の深さ分布を示す。縦軸に各熱傷深度における SHG 信号強度のイメージ内平均値、横軸に皮膚表面からの深さをとっており、対物レンズ直後におけるレーザーパワーを 10 mW、個体数は n = 5 とした。深さは同時取得した共焦点信号が出始める点を皮膚表面 (深さ 0 μ m) とし、そこから 10 μ m 毎に SHG 信号強度を取得した。熱傷程度が進むにつれ SHG 信号強度が弱くなっている様子が確認でき、生体コラーゲン SHG 顕微鏡は熱変性に伴うコラーゲンの構造変化を、高感度に反映しているといえる。

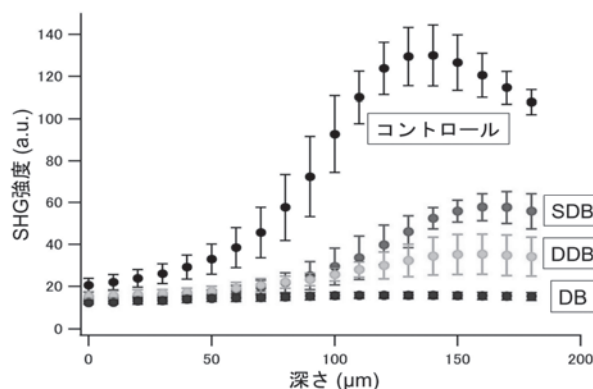


図 6 各熱傷における SHG 光強度の深さ分布

6. まとめ

生体組織におけるコラーゲン線維を『生きたありのままの状態』で可視化できる生体コラーゲン SHG 顕微鏡について紹介した。コラーゲン分子固有の非線形光学特性を利用することにより、コラーゲン分子に対して特異的に感度を有する顕微鏡を実現した。光老化や熱傷といった皮膚特有の事象に対して開発装置を *in vivo* で適用し、生体コラーゲン SHG 顕微鏡が皮膚科学関連分野において有用であることを確認した。また、コラーゲンは、皮膚のみならず、身体の各部に存在する重要な生体構造タンパク質であり、培養皮膚や再生皮膚の高品質化のためにも重要な役割を担っていることから、今後、様々なコラーゲン関連分野での利用が期待される。

本研究は、科学研究費補助金・基盤研究(B) 22300154 より援助を受けた。

参考文献

- 1) B. Eyden and M. Tzaphlidou: "Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy," *Micron*, **32** (2001), pp. 287-300.
- 2) V. J. James, L. Delbridge, S. V. McLennan, and D. K. Yue: "Use of x-ray diffraction in study of human diabetic and aging collagen," *Diabetes*, **40** (1991), pp. 391-394.
- 3) S. Osaki: "Distribution map of collagen fiber orientation in a whole calf leather," *Anat. Rec.*, **254** (1999), pp. 147-152.
- 4) B. K. Milthorpe, G. J. Rogers, and K. Schindhelm: "Microcomputer-based system for tensile testing of biological materials," *Med. Biol. Eng. Comput.*, **26** (1988), pp. 161-166.
- 5) S. Osaki: "Use of hair pores to determine the orientation of collagen fiber in skin," *Anat. Rec.*, **263**, pp. 161-166 (2001).
- 6) D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto: "Optical coherence tomography," *Science*, **254** (1991), pp. 1178-1181.
- 7) J. F. de Boer, T. E. Milner, and J. S. Nelson: "Determination of the depth-resolved Stokes parameters of light backscattered from turbid media by use of polarization-sensitive optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, **24** (1999), pp. 300-302.

- 8) <http://www.lucid-tech.com/store.asp?pid=28542&catid=19974>
- 9) W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb: "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100** (2003), pp. 7075-7080.
- 10) S. Roth and I. Freund: "Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon," Biopolymers, **20** (1981), pp. 1271-1290.
- 11) 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** (2004), pp. 259-264.
- 12) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki: "Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light," Appl. Opt., **43** (2004), pp. 2861-2867.
- 13) T. Yasui, T. 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., **37** (2006), pp. 1397-1408.
- 14) 伊藤誠啓, 安井武史, 福島修一郎, 荒木勉, 山下豊信, 國澤直美, 高橋元次: "SHG (第2高調波発生光) 顕微鏡を用いた真皮コラーゲン線維分布の観察," 光学, **36** (2007), pp. 35-40.
- 15) 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** (2009), pp. D88-D95.
- 16) T. Yasui, Y. Takahashi, S. Fukushima, Y. Ogura, T. Yamashita, T. Kuwahara, T. Hirao, and T. Araki: "Observation of dermal collagen fiber in wrinkled skin using polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy," Opt. Express, **17** (2009), pp. 912-923.
- 17) 安井武史, 米津真人, 山下豊信, 小倉有紀, 平尾哲二, 荒木 勉: "生体コラーゲン SHG 顕微鏡を用いたヒト皮膚の in vivo 観察", Optics & Photonics Japan 2010 講演予稿集 (応用物理学会・日本光学会, 2010), 10pH6.
- 18) 田仲亮介, 安井武史, 福島修一郎, 荒木 勉: "生体コラーゲン SHG 顕微鏡を用いた光学的熱傷診断に関する研究〜ラット熱傷モデルの in vivo 計測〜", Optics & Photonics Japan 2010 講演予稿集 (応用物理学会・日本光学会, 2010), 9pH7.
- 19) P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler: "Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues," Biophys. J., **82** (2002), pp. 493-508.
- 20) E. J. Droog, W. Steenbergen, and F. Sjöberg: "Measurement of depth of burns by laser Doppler perfusion imaging," Burns, **27** (2001), pp. 561-568.
- 21) S. Sato, M. Yamazaki, D. Saitoh, H. Tsuda, Y. Okada, M. Obara, and H. Ashida: "Photoacoustic diagnosis of burns in rats," J. Trauma, **59** (2005), pp. 1450-1456.
- 22) H. Walker and A. Mason: "A standard animal burn," J. Trauma, **8** (1968), pp. 1049-1051.



安井武史 YASUI, Takeshi
 徳島大学 大学院ソシオテクノサイエンス研究部 教授
 大阪大学 大学院 基礎工学研究科 招へい教授
 〒770-8506 徳島県徳島市南常三島 2-1