

非線形光学現象を利用した 真皮コラーゲン分布 in vivo 可視化法の開発

大阪大学大学院基礎工学研究科

荒木 勉

Second-harmonic-generation (SHG) microscopy has been applied to observe collagen fiber structure in porcine dermis. Collagen fiber structure in the samples is clearly visualized as high contrast SHG images using a sample-scanning SHG microscope based on a transmission configuration equipped with a mode-locked Ti:sapphire laser. From comparison of the SHG images between the transmission detection mode and reflection one, we have confirmed that the reflection-mode SHG imaging is also applicable to observation of the collagen fiber structure in the porcine dermis. In order to apply the SHG measurement to human skin, we have used a mode-locked Cr:forsterite laser with a long wavelength and compared its imaging characteristics with that of the Ti: sapphire laser-based microscope for the measurement of dermal collagen fiber. The results indicate that the applicability of the Cr:forsterite laser-based SHG microscope for in vivo imaging of human skin.

1. 緒 言

真皮は皮膚の張り・弾性・水分保有の機能に深く関与しており、その主成分はコラーゲンである。したがって、皮膚の形態的及び機能的特性を決定する上でコラーゲンが重要な役割を果たしているといえる。日常生活においても化粧過や過度の日照によって光老化が引き起こされるなど皮膚は様々な刺激にさらされており、これら刺激によって真皮性状は変化すると思われる。このような真皮コラーゲン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きわめて重要と考えられることから、真皮コラーゲンの変化を迅速にモニターするための診断技術が皮膚科学の分野で強く望まれている。そこで我々はこれまで生体計測ではほとんど用いられることの無かった非線形光学現象と超高速光技術を積極的に導入することで、真皮コラーゲン分布の in vivo 可視化を試みる。

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、入射レーザー光の半波長 (あるいは2倍の周波数) の光が第2高調波発生光 (生体SHG光) として発生する¹⁾。皮膚組織の場合、コラーゲンは真皮のみに豊富に含まれ (含有量70%)、表皮および皮下組織にはほとんど含まれないことに注目すると、真皮コラーゲンの分布情報を特異的に抽出する手段として、生体SHG光が有効であると考えられる²⁾。これまでも、生体SHG光を用いた皮膚疾病診断³⁾や真皮コラーゲン配向計測⁴⁾

が提案されているが、真皮コラーゲンの詳細な構造分布測定についてはほとんど報告されていない。またレーザー光のヒト皮膚への影響についての検討も皆無である。そこで本研究では、はじめにブタ真皮コラーゲンの詳細な構造分布測定を行い、その結果をもとにヒト皮膚測定への応用の可能性について考察する。

2. 実 験

コラーゲンの基本構造はトロポコラーゲン (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。トロポコラーゲンは光波長オーダーで非中心対称性構造をとり、2次の非線形光学特性を有している。そのため、非常に高い瞬時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に照射すると、非位相整合型SHG発生過程を介して⁵⁾、SHG光が特異的に発生する。特にコラーゲンは真皮のみに局在しているので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。また、その後方散乱光を検出することで表皮越しに生体SHG光を取得し、in situ観察が可能となる。

図1に実験装置を示す。光源にはモード同期チタン・サファイアレーザー (Ti:S レーザー、中心波長800nm、パルス幅100fs、繰り返し周波数80MHz) を用いた。レーザービームは、ガルバノミラー (GM) とリレーレンズ光学系 (RL1, RL2) を経た後、対物レンズ (OL) でサンプル照射することにより生体SHG光 (中心波長400nm) を発生させる。反射配置計測とするため、生体SHG光の後方散乱成分を同じ対物レンズで集光し、ハーモニクセパレータ (HS, 反射波長400nm) と青色透過フィルター (F, 透過波長=300-500nm) で抽出した後、光電子増倍管 (PMT) で検出を行う。なお、基本は反射光学配置であるが、透過型の光学配置へも随時転換できるようにしている。さらに自動ステージによるサンプル走査あるいはガルバノミラーによるビーム走査を用いて、SHGイメージング計測を行った。本システムの面内分解能と深さ分解能はそれぞれ



Visualization of in vivo dermal collagen fiber distribution by non-linear optical effect

Tsutomu Araki

Graduate School of Engineering Science,
Osaka University, Machikaneyama,
Toyonaka, Osaka 560-8531

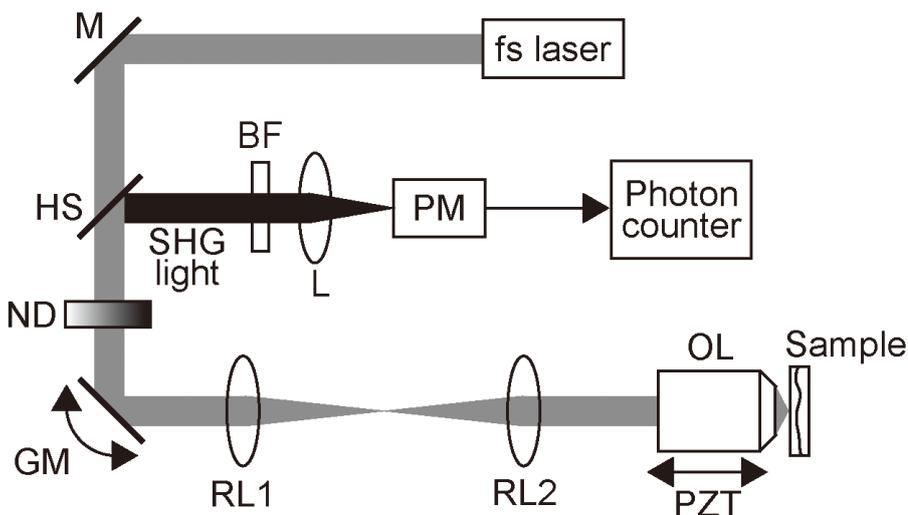


図1 実験装

M：ミラー、ND：減光フィルター、BF：ブルーパスフィルター、HS：ハーモニクセパレーター、GM：ガルバノミラー、L：レンズ、RL：リレーレンズ、OL：対物レンズ、PM：光電子増倍管

1.5 μ m と 14 μ m である。

サンプルには、様々な動物の中で比較的ヒト皮膚に類似した構造を有する市販ブタ皮膚 (Yucatan Micropig、米国チャールズ・リバー社) の背中部分を用いた。採取された皮膚組織は表皮剥離後OCTコンパウンド (サクラファインテックジャパン社) で包埋された後、液体窒素で凍結され保存される。このような凍結豚真皮組織ブロック (厚さ3mm) を解冻しサンプルとして用いた。透過型光学系で測定する場合、凍結皮膚組織ブロックをマイクロームによって皮膚表面と平行方向に連続スライスすることにより、各皮膚深さでの切片サンプル (厚さ16 μ m) を作成した。

3. 結果と考察

3.1 組織切片のSHGイメージング

組織の詳細を知るため、はじめに空間的、時間的に焦点

の変化しないステージスキャンにより切片サンプルの透過SHGイメージングを行った。ここでは、真皮上層 (乳頭層付近)、真皮中層 (網状層上部) 及び真皮下層 (網状層下部) をそれぞれ測定した。得られたSHGイメージ (400 μ m \times 400 μ m) を図2に示す。この結果を見るとコラーゲン線維分布が高コントラストなSHGイメージとして可視化できていることが分かる。特に真皮上層部では、非常にキメの細かいコラーゲン線維が密に分布している様子が分かる。これらの像をHE染色光顕像と比較し考察した。図2(a)で表皮が真皮に落ち込んだ表皮突起部分は、表皮がコラーゲンを含有していないため、SHG光の全く検出されない

丸い領域として現われている。真皮中層部では、比較的太いコラーゲン線維が直交方向にゆるやかに交叉した網状分布が部分的に確認できた。しかし真皮下層部では、網状のコラーゲン線維分布は確認できなかった。また、真皮各層でSHGイメージを比較すると、乳頭層と網状層ではコラーゲン線維分布の相違が確認できたが、網状層上部と下部では明確な相違は確認できなかった。

in vivo 計測への拡張を考慮した場合、反射配置が現実的であるが、信号強度が小さくなりSN比の劣化が懸念される。そこで実用性を検討するため、反射配置に光学系をアレンジし、豚真皮組織ブロックの深さ分解SHGイメージング計測を行った。ここでは皮膚の非接触リモート計測という観点からドライの対物レンズを用い、入射レーザーパワーを30mWに固定して測定を行った。さらにin vivo計測を目指す点から、測定時間の短縮は必須であり、今回

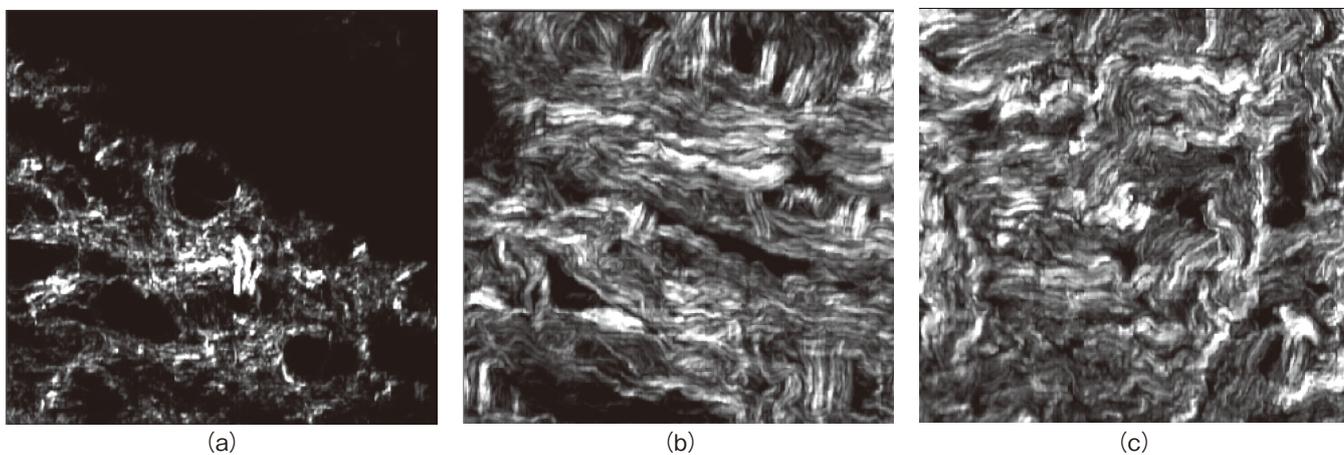


図2 ブタ皮膚切片試料のSHG画像 (画像サイズ: 400 μ m \times 400 μ m)
(a)真皮上層、(b)真皮中層、(c)真皮下層

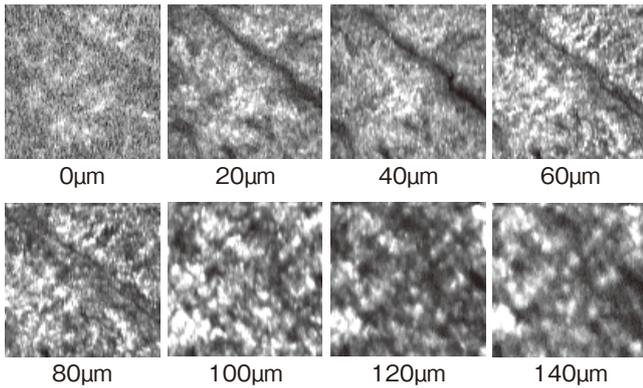


図3 豚真皮ブロック試料の反射 SHG 画像 (画像サイズ: $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$)

の測定はビームスキャンモードで計測を行った。図3は各測定深度 ($20\mu\text{m}$ 毎) で得られた SHG イメージ ($100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$) を示している。反射配置における測定 SN 比の低下によりイメージが若干ぼけているが、オブティカル・セクションングされた SHG イメージが連続的に変化している様子が確認できる。しかしながら、実際の応用計測を考慮した場合、現在の測定可能深度ではまだ十分とは言えない。

3. 2 長波長レーザーによる測定深度の向上

以上実施した測定においては 800nm のレーザーを用い、 400nm の青色 SHG 光を得ていた。このような青色光は生体内多重散乱を受けやすい波長帯に位置しており、散乱による信号減衰が測定可能深度を制限している。したがって $150\mu\text{m}$ より深部の画像は極めて不明瞭であった。一般に多重散乱効果は波長の4乗に反比例するため、レーザー波長を長波長化することで得られる赤色 SHG 光が測定可能深度の向上に有効である。このような点を踏まえて波長 800nm の Ti:S レーザーの代わりに、フェムト秒モード同期クロム・フォルステライトレーザー (Cr:F レーザー、中心波長 1250nm) と油浸対物レンズを用いたシステムを使用し、両レーザーの測定能を比較した。ここでは豚皮を測定資料として、表面から $50\mu\text{m}$ ごとに深さ $350\mu\text{m}$ までの SHG 画像を取得した。レーザーパワーは試料面上でいずれも 40mW に設定した。1画面あたりの試料の大きさは $400 \times 400\mu\text{m}$ であり、1画面あたりの取得時間を10秒にした。図4に測定結果を示す。この図からも明らかのように Cr:F レーザーを使用することで $300\mu\text{m}$ まで鮮明な画像が得られており、レーザーの長波長化の有効性が確認できた。

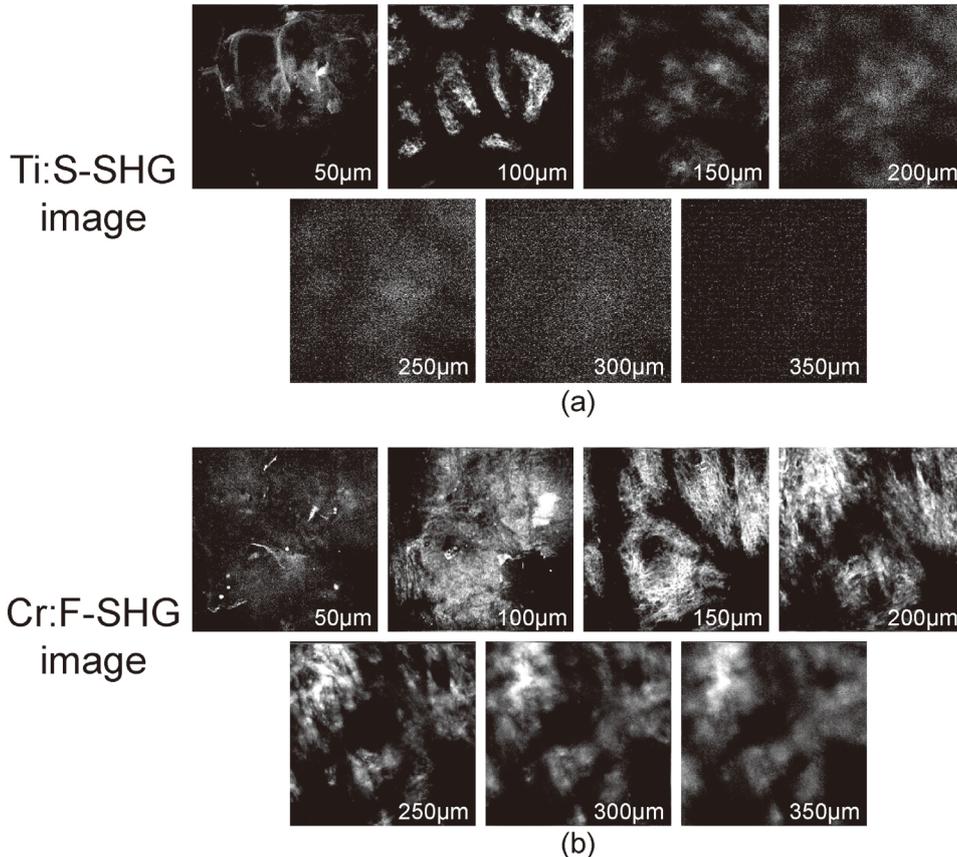


図4 深さ方向に $20\mu\text{m}$ ステップで分解した豚真皮ブロックの反射 SHG 画像 (画像サイズ: $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$) .

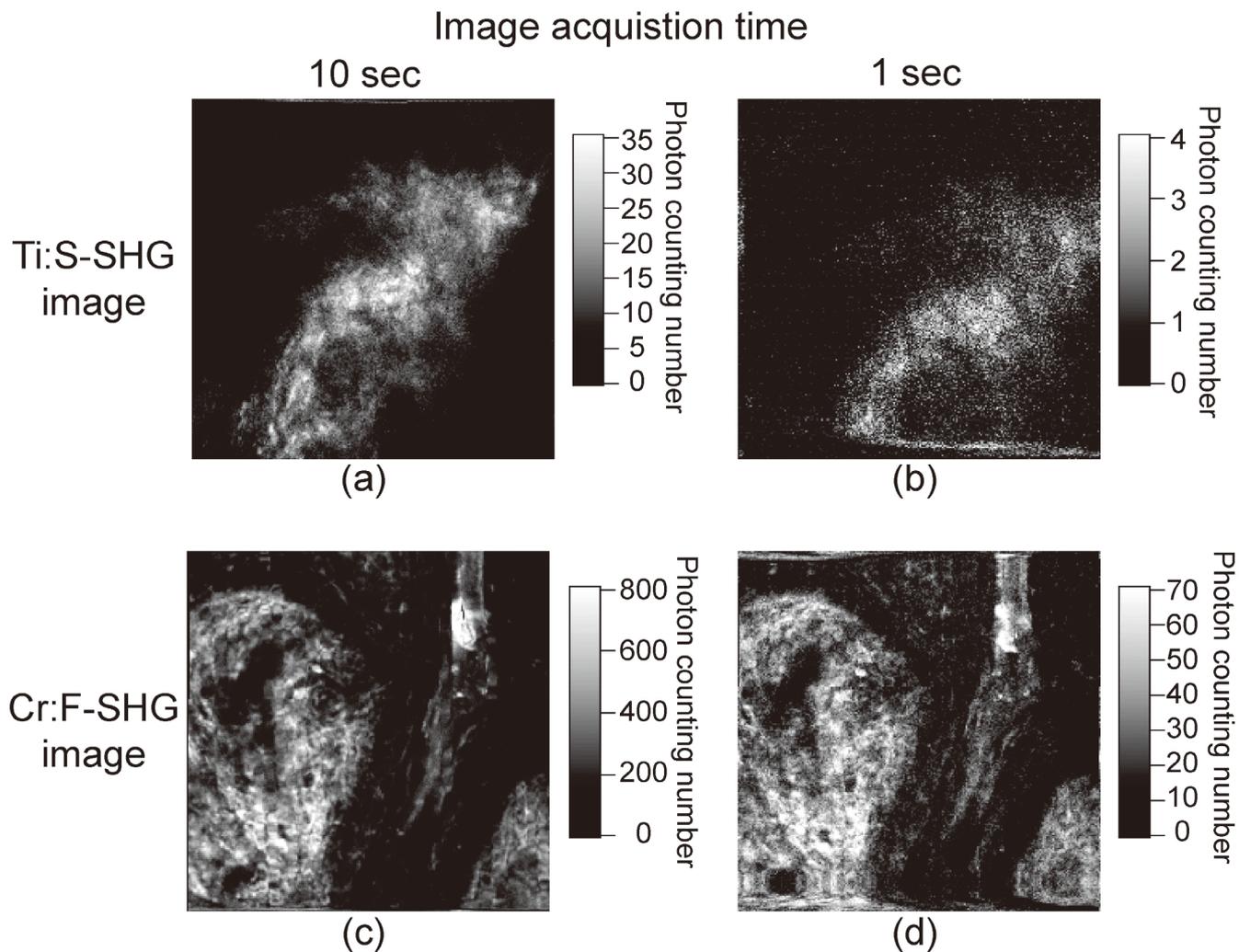


図6 Ti:SレーザーとCr:FレーザーによるSHG画像の比較(2)

深さ 140 μ m における豚真皮ブロックの反射 SHG 画像 (画像サイズ: 200 μ m \times 200 μ m). Ti:S レーザーによる画像 (a: 10 秒で取得、b: 1 秒で取得)、Cr:F レーザーによる画像 (c: 10 秒で取得、d: 1 秒で取得)

3. 3 ヒトを対象とする in vivo

測定への可能性

ヒトに対する測定に必要なことは安全性の確保と迅速性である。Cr:F レーザーを用いた計測では 1 画面あたり 10 秒を要しており、数画面の取得には 1 分程度必要となる。体動の影響をなくするにはさらなる時間短縮が望まれるが、それに伴う SN 比の劣化が懸念される。そこで実用性を検討するため、200 μ m \times 200 μ m の画面を 1 秒で取得し、10 秒で取得したものと比較した。この結果を図 5 に示すが、1 秒の取得時間でも SN 比の大きな劣化はなく、実用性に問題はないことを確認した。

次に、Cr:F レーザー光が皮膚へ及ぼすダメージについて検討する。Cr:F レーザー光に関してこれまでに、120mW の光をタマネギ切片の細胞壁に 10 分間照射しても細胞壁の破壊は認められなかったとする報告⁶⁾、100mW の光をゼブラフィッシュの胚へ 12 時間照射しても正常な

幼魚に成長したとする報告⁷⁾、150mW の光をハムスターの口腔部へ 3 時間照射しても細胞の壊死は観測されなかった報告⁸⁾ などがある。我々が提唱する装置では Cr:F レーザー照射光を 40mW に設定し、照射時間も 10 秒程度であるため、測定時における被験者への光照射エネルギーは上記報告例における場合に比べて格段に小さい。したがって皮膚へのダメージは無視できると思われる。

4. 総括

本報告では、生体 SHG イメージングが真皮コラーゲン分布を抽出する手段として有効であることを示した。高コントラスト・高空間分解な透過型 SHG イメージをもとに、真皮各層の切片サンプルにおけるコラーゲン線維の詳細な 2 次元分布が調査できた。また、反射型深さ分解 SHG イメージングによってコラーゲン線維分布のオプティカル・セクション画像が得られ、本法が 3 次元のコラーゲン構

造の in vivo 計測に有効な手法であることを確認した。このような計測手法を利用することにより基礎研究だけでなく、臨床応用にも耐えうる真皮コラーゲン診断法が可能となり、様々な皮膚科学分野への応用が期待できる。

謝 辞

本研究に対して助成を賜ったコスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(参考文献)

- 1) S. Roth and I. Freund: Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon, *Biopolymers* **20**,1271-1290, 1981.
- 2) 伊藤誠啓, 安井武史, 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*、**1** 35-40, 2007.
- 3) K. König and I. Riemann: High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution, *J. Biomed. Opt.*, **8**, 432-439, 2003.
- 4) 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**, 259-264, 2004.
- 5) B. M. Kim, J. Eichler, and L. B. Da Silva: Frequency doubling of ultrashort laser pulses in biological tissues, *Appl. Opt.*, **38**, 7145-7150, 1999.
- 6) I.-H. Chen, S.-W. Chu, C.-K. Sun, P.-C. Cheng, and B.-L. Lin: Wavelength dependent damage in biological multiphoton confocal microscopy: a micro-spectroscopic comparison between femtosecond Ti:sapphire and Cr:forsterite laser sources, *Opt. Quantum. Electron.*, **34**, 1251-1266, 2002.
- 7) S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, H.-J. Tsai, and C.-K. Sun, In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy, *Opt. Express*, **11**, 3093-3099, 2003.
- 8) S.-P. Tai, W.-J. Lee, D.-B. Shieh, P.-C. Wu, H.-Y. Huang, C.-H. Yu, and C.-K. Sun: In vivo optical biopsy of hamster oral cavity with epi-third-harmonic-generation microscopy, *Opt. Express*, **14**, 6178-6187, 2006.