

全光学的手法を用いた老化皮膚における力学特性変化の解析

徳島大学ポストLEDフォトンクス研究所

長谷 栄治

Extracellular matrices such as collagen and elastin are important factors that determine the mechanical properties of the skin. Therefore, to analyze the mechanical properties of the skin, it is desirable to visualize their distribution and measure the mechanical properties at those locations. In response to this need, we developed a new all-optical multimodal imaging technique that combines nonlinear optical microscopy with Brillouin scattering microscopy. This novel imaging technique allows for the simultaneous visualization of three key microscale information, such as collagen, elastin, and elastic modulus, within the same field of view. This approach not only facilitates a detailed understanding of the structural and mechanical aspects of skin but also enhances our ability to assess how these properties change in various conditions, including aging. Such insights are vital for advancing our knowledge of skin biology and could lead to improved strategies for diagnosing and treating skin disorders.

1. 緒言

皮膚の老化とは、皮膚を構成している個々の細胞の機能低下であり、表皮、真皮やその結合部、付属器の機能低下に加え、形態に異常が出ることで定義できる。代表的な症状として、シワ・タルミの形成やハリ不足、乾燥、疾患（色素異常、血管異常、脂腺異常）等が挙げられる。ここで、シワ・タルミ・ハリという老化による皮膚の外観変化に着目すると、これらは皮膚の力学特性の変化が強く影響するものである。したがって、これらの形成や不足のメカニズムを調査する、あるいはそれらを抑制・軽減する方法を検討する上では、皮膚の力学特性を詳細に計測する手法が望まれる。皮膚の真皮層は、皮膚全体の厚さの大部分を占めており、真皮層の約70wt%は細胞外マトリックスであるコラーゲンが占める。したがって、このコラーゲンの分布や配向、線維の太さは、皮膚の力学特性を決定する上で極めて重要な役割を担っている。老化皮膚においては、内因性の自然老化によりコラーゲンが変性・消失する上、外因性の老化である光老化では、弾性線維であるエラスチンの蓄積・変性が起こる。これらのことから、老化皮膚の力学特性を詳細に調査するためには、直径数 μm 程度のコラーゲン線維およびエラスチン線維の分布やその状態を高空間分解で把握した上で、その位置における力学特性を同様に高空間分解で計測することが望まれる。

そこで本研究では、非線形光学顕微鏡（多光子顕微鏡）

とブリルアン散乱顕微鏡を融合した新たなマルチモーダル光学顕微鏡を開発し、老化皮膚の詳細な力学の可視化を目指す。非線形光学顕微鏡では、SHG（第2高調波発生）光と2光子蛍光という2つの非線形光学現象を画像コントラストとしたイメージングがかねてより皮膚科学・皮膚計測の分野において着目されている¹⁾。SHGではコラーゲン分子の構造に由来する固有の2次非線形感受率を利用し、2光子蛍光ではエラスチン分子の自家蛍光特性をそれぞれ利用することで、真皮層を構成する主要な細胞外マトリックスを選択的に可視化することが可能となる。また、光の音波による非弾性散乱現象を用いたブリルアン散乱顕微鏡では、その散乱光スペクトルから測定対象の粘弾性情報を得られることから近年バイオイメージング分野で注目されている²⁾。本研究ではこれらのモダリティを融合し、コラーゲン・エラスチンの選択的観察を行って皮膚力学特性に大きく寄与する2つの物質の情報を得た後、ブリルアン散乱顕微鏡により同一位置の粘弾性率を測定する。これらの計測を若年皮膚および老化皮膚に対して行い、両者の比較から老化皮膚における力学特性変化の原因となる構造や物質の同定を行うことを研究の最終目標とする。本研究ではその前段階として非線形光学顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡それぞれを独立に開発し、正常な皮膚組織における同一箇所マルチモーダルイメージングを行った結果について報告する。

2. 方法

非線形光学顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡から成るマルチモーダル光学顕微鏡の開発の前段階として、それぞれの顕微鏡を独立に構築して同一試料のイメージングを行う。図1(a)に開発した顕微鏡装置の概略図を示す。はじめに、非線形光学顕微鏡の光源として波長可変のフェムト秒パラメトリック光発振器を用いた（中心波長可変幅



All-Optical Analysis of Mechanical Properties in Aged Skin

Eiji Hase

Institute of Post-LED Photonics,
Tokushima University

=680-1300nm, パルス幅=120fs, パルス繰り返し周波数=80MHz)。エラスチンからの2光子自家蛍光を取得することを考慮し, レーザー中心波長は800nmに設定した。レーザー光は1/2波長板(HWP)と偏光子(P)から成る出力調整器を経た後, SHG光の偏光依存性をキャンセルするため1/4波長板(HWP)により円偏光となるよう設定した。レーザー光の焦点は, ガルバノミラー(GM), リレーレンズ, 対物レンズ(OL)によりサンプル上で2次元スキャンされる。焦点において発生した前方透過SHG光成分は, コンデンサーレンズにより集められ, ダイクロイックミラーおよび光バンドパスフィルター(透過波長中心400nm, 透過幅10nm)でレーザー基本波成分を除去した後, パルスカウンターに接続されたフォトンカウンティング型光電子増倍管(PC-PMT)によってその光強度が計

測される。また, 2光子自家蛍光の計測に関しては反射配置を用いて計測した。サンプルから発生した2光子自家蛍光は, 入射側と同じ対物レンズによって集められ, 同一光路を逆方向に伝播した後, SHG光検出側と同様にダイクロイックミラーと光バンドパスフィルター(透過波長中心450nm, 透過幅40nm)でレーザー基本波成分を除去した後, パルスカウンターに接続されたフォトンカウンティング型光電子増倍管によって光強度を計測する。上記セットアップを用いることで, サブ秒~数秒程度で数百 μm 四方の視野におけるSHGおよび2光子自家蛍光強度分布をサブ μm 程度の空間分解能で画像化できる。

次に, 図1(b)に構築したブリルアン散乱顕微鏡のセットアップを示す。光源には波長532nmの狭線幅かつ単一モード発振の半導体レーザー励起固体レーザー

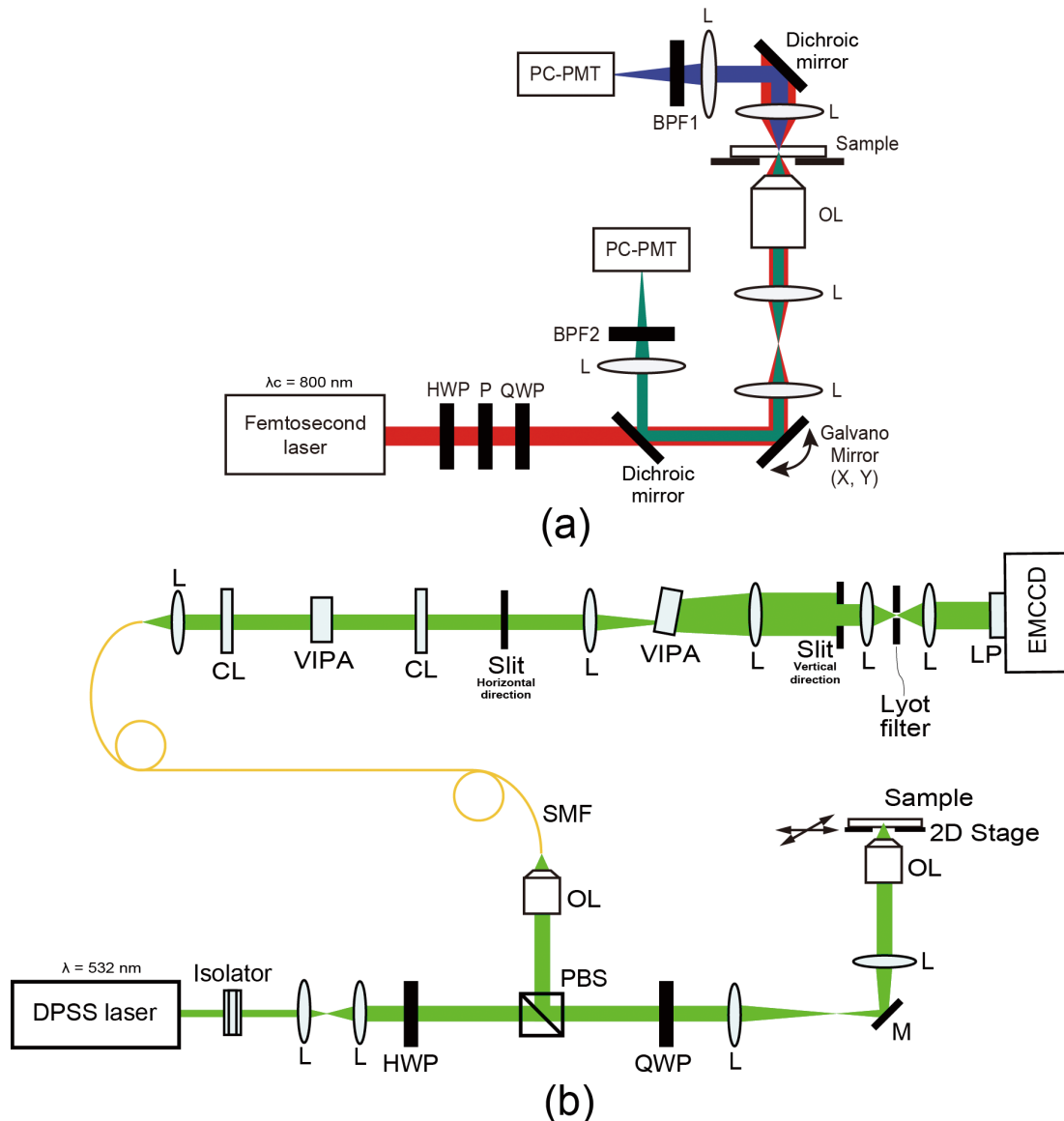


図1 構築した実験装置の概略図
(a) 非線形光学顕微鏡 (SHG および 2 光子自家蛍光), (b) ブリルアン散乱顕微鏡

(DPSSLaser)を用いた。レーザー光はレーザー共振器への戻り光を除去するためのアイソレーターを通過した後、そのビーム径が拡大され、出力調整される。レーザー光は対物レンズによってサンプルに集光され、発生したブリルアン散乱光は入射側と同じ対物レンズによって集められる。この際に集められた反射光には、その大部分を占める弾性散乱成分であるレイリー散乱光と、典型的にはそれより6~8桁程度光強度が低いブリルアン散乱光成分が含まれている。次に、入射側光路を逆方向に伝播し、1/4波長板と偏光ビームスプリッター(PBS)により反射光成分を分岐する。分岐された光は対物レンズによりシングルモードファイバー(SMF)に入射され、自作のタンデムVIPA(virtuallyimagedphasedarray)型の分光計に入射する³⁾。VIPAは傾けたファブリ・ペローエタロンと考えることができ、回折格子に比べて高いスペクトル分解能を持つ一方、その自由スペクトル範囲(FSR)は回折格子に比べて狭く、典型的な製品では数十GHz程度である。一方、生体試料からのブリルアン散乱による光周波数シフトは可視光を用いた場合、典型的に数GHzから十数GHz程度であることから、これを分光するために適切な素子となる。通常、VIPAには線状に集光したレーザー光を入射させ、対向する反射面により波長に応じて背面から異なる出力角を持つ複数のビームが生じる。また、前述のようにレイリー散乱に対して極めて弱いブリルアン散乱光の検出においてSN比(信号対雑音比)あるいはSB比(信号対背景比)をよく測定するため、VIPAのタンデム型直交配置やスリット、リヨフィルターなどの空間マスク・フィルターを設置している。このような分光計により空間分散された後方散乱光スペクトルは高感度な電子増倍CCDカメラ(EMCCD)によって計測される。この計測について顕微鏡XYステージを走査しながら行うことで、2次元イメージングを行った。カメラの露光時間は1点(ピクセル)あたり100msに設定した。ここで、ブリルアン散乱光によるスペクトル解析では、その光周波数シフト Ω を測定する。

$$\Omega = 2 \sin \frac{\theta}{2} \frac{n \omega_i}{c} v \quad (1)$$

ここで、 θ は入射光と散乱光のなす角であり、今回用いた反射配置の場合は $\theta = 180^\circ$ となる。 n は測定領域の屈折率であり、 ω_i は入射光の光周波数である。また、 v は音速であり、このようにブリルアン散乱による周波数シフトは幾何学的・光学的情報に加えて音響学的情報が含まれている。ここで、音速 v は、

$$v = \sqrt{\frac{M'}{\rho}} \quad (2)$$

と書ける。 ρ は密度であり、 M' は縦波弾性率と呼ばれる縦波音波の伝播に関係するばね定数である。ここで、生体試

料の大部分は水分であること、また、たんぱく質など特定の物質においては式(1)、(2)において屈折率と密度の増減が打ち消し合うことから、この周波数シフトの測定から対象のばね定数に関する情報を得ることが可能となる。

また、測定試料としては、関連するすべての法律、倫理規定、規制を遵守し、Obio, LLCより提供された健康な白人女性の正常な腹部皮膚をマイクロームで厚さ8 μm の凍結切片に切り分けた皮膚切片を用いた。測定の際にはPBS(リン酸緩衝生理食塩水)を試料切片に滴下し、ウェットな状態で測定した。

3. 結果と考察

3.1. 皮膚断面切片のブリルアンイメージング

これまでに、SHGおよび2光子蛍光を用いた皮膚試料の観察に関する様々な研究が行われており、コラーゲン・エラスチン分布の選択的観察ができる特徴の有用性がex vivo, in vivoの両面から確認されている。一方、ブリルアン散乱顕微鏡による生体試料の観察については、その大部分が胚やin vitro培養細胞における観察への応用であり、皮膚組織の観察に用いられた例はほとんどない。そこで、準備実験としてブリルアン散乱顕微鏡を用いた皮膚断面切片の観察を実施した。図2に実験結果を示す。図2(a)および(b)は皮膚断面切片の明視野像であり、画像上方向が表皮側である。図2(b)の拡大像において、表皮から真皮の範囲の皮膚組織が視野内に存在していることがわかる。次に、図2(c)は図2(b)中の赤破線枠の領域をブリルアン散乱顕微鏡で測定し、各点のブリルアンスペクトルからブリルアン散乱の周波数シフト量を非線形カーブフィットで得た後、その値をプロットしたブリルアンシフト画像である。現状の装置では1点(1ピクセル)あたりに露光時間とステージ移動時間を含めて数百ms程度要することから60 μm *150 μm の領域を20ピクセル*50ピクセルで粗く画像取得した。実際にはNA=0.7の対物レンズを波長532nmにて用いているため焦点スポット径はサブ μm となっていると考えられ、音響フォノンの平均自由行程も生体試料の場合はそれと同程度であることから、この条件は離散的な空間サンプリングとなっている。図から、表皮の角質層ではブリルアンシフトが高くなっており、顆粒層-有棘層-基底層にかけてはシフト量が次第に減少していく様子が可視化されている。一方、真皮層では視野内において最もブリルアンシフトが高くなっていることが確認できた。また、最上部の青色の部分は試料が存在しない箇所である。以上のような結果は、先行研究において原子間力顕微鏡や超音波顕微鏡を用いた皮膚断層の弾性率イメージングを行った結果とよく一致していた^{4,5)}。そのため、ブリルアンシフトイメージングで得られた結果についても、ブリルアンシフト量がその位置における弾性率に比例して

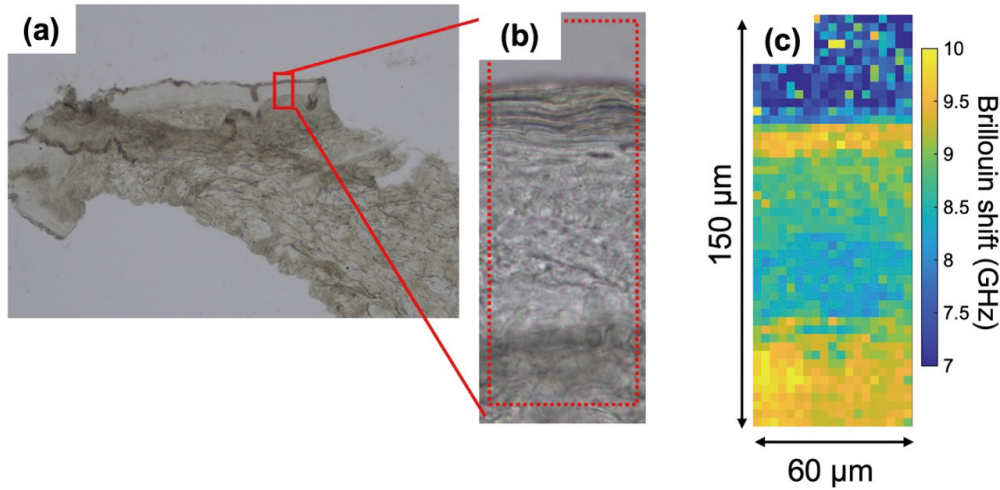


図2 皮膚断層切片のブリルアンイメージング結果
(a) 明視野像, (b) 明視野拡大像, (c) ブリルアンシフト画像

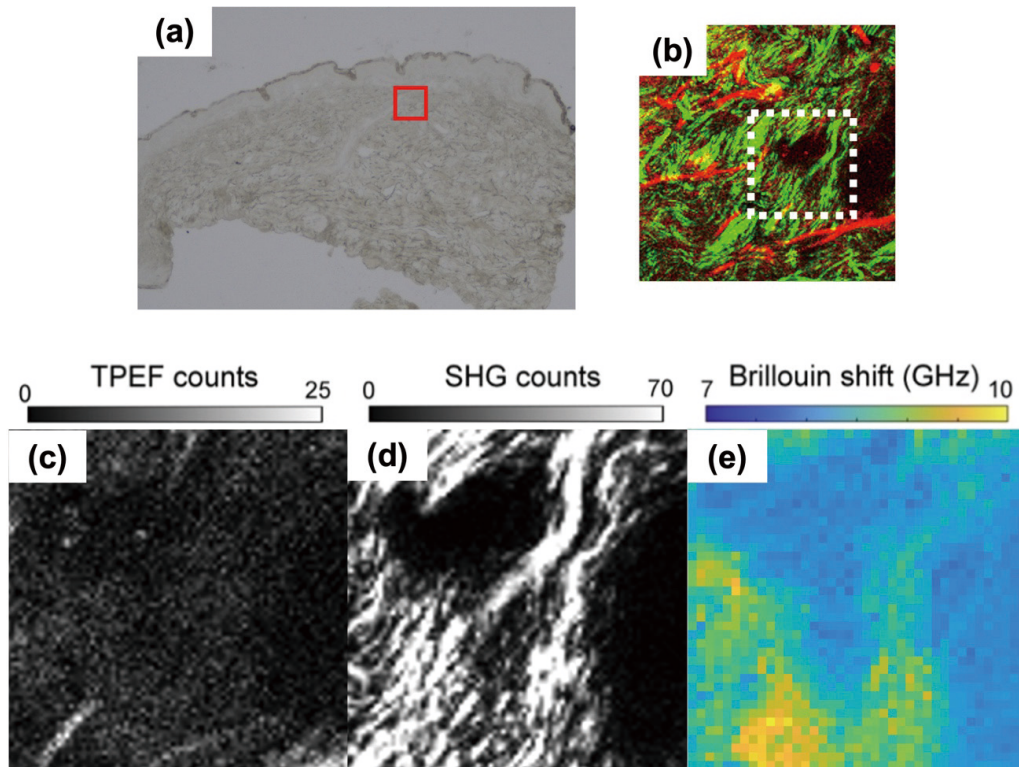


図3 皮膚断層切片のマルチモーダルイメージング結果
(a) 明視野像, (b) SHG(緑)および2光子蛍光(赤)画像, (c) 2光子蛍光画像, (d) SHG画像, (e) ブリルアンシフト画像.

おり、ブリルアンシフト量を指標とすることで皮膚の弾性率分布の可視化に応用できることがわかった。

3. 2. 真皮断面切片のマルチモーダル光学イメージング

ブリルアンシフトを用いた皮膚弾性率イメージングにおいてその有用性が確認できたので、同一の試料の同一箇所

におけるSHG、2光子蛍光およびブリルアンイメージングを行った。試料は先程と同様に皮膚断面切片を用いたが、コラーゲンおよびエラスチンの可視化のため真皮層に着目してイメージングを行った。図3に実験結果を示す。図3(a)は皮膚切片の明視野画像であり、赤枠をSHGおよび2光子蛍光により非線形光学イメージングしたものが図3(b)である。画像視野は137 μ m四方、画像サイズは128

ピクセル四方である。疑似カラーとしてSHG強度を緑色、2光子蛍光強度を赤色で重ねて表示している。どちらの現象でも線維状に存在するコラーゲン、エラスチンが高コントラストで可視化されていることがわかる。また、ブリルアン散乱顕微鏡では図3(b)中の白破線枠で囲った領域をイメージングし、ブリルアンシフトを解析して画像化したものが図3(e)である。ブリルアンイメージングは50 μm 四方領域を50ピクセル四方で取得した。また、比較のため図3(b)の同一領域における2光子蛍光、SHG強度の分布を別々に画像化したものを図3(c)および(d)に示す。SHG、2光子蛍光、ブリルアンシフトの比較から、ブリルアンシフトの大小はエラスチン(2光子蛍光)分布よりもコラーゲン(SHG)分布を反映した分布となっていることが確認できる。実際に生体由来の単離したコラーゲンおよびエラスチン線維それぞれを引張試験した先行研究では、コラーゲンの弾性率がエラスチンの弾性率より典型的に3桁程度高い値であることが確認されている⁶⁾。したがって、今回のイメージング領域におけるブリルアンシフトの変動はコラーゲンの持つ高い弾性率に起因する分布であると考えられる。また、図3(e)では1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の高空間分解な計測によりブリルアンシフト画像において線維状の構造も確認できる。図3(d)と(e)の比較により、これはコラーゲン線維の存在を反映した分布となっていると考えられ、組織中において直径数 μm オーダーで存在するコラーゲン線維の弾性率分布が高空間分解に可視化できたと考えられる。以上のような結果から、SHG・2光子蛍光・ブリルアン散乱を用いたマルチモーダルイメージングの皮膚計測における有用性が確認できた。

4. 総括

本研究課題は、皮膚の力学特性を調査するための新規な光学顕微鏡の開発に関する研究内容である。これまで、皮膚の力学特性を測定する手法のほとんどは皮膚表面のみ(非3次元)の情報かつ低空間分解能でのマクロな測定であったことから、老化皮膚の力学特性変化に関する知見は十分に蓄積されていない。特に、力学特性計測法の空間分解能あるいは画像視野の制限から、光学顕微鏡像で得られるような形態学的情報と力学特性とを適切に関連付けることは困難であった。一方、申請研究では、全光学的手法の利用によりサブ μm ～数 μm 程度の高空間分解能で同一視野におけるコラーゲン・エラスチン・弾性率という3つのマイクロ情報の可視化に成功した。加えて、本手法は非接触、ラベルフリーで分子選択的かつ外力の付与なく力学特性が計測でき、さらに原理的には3次元空間の計測可能であることから、本研究で得られる知見の新規性は極めて

高く、かつ化粧品・薬品や美容器具開発といった皮膚老化分野において有用であると考えられる。例えば、すでに知られているような老化によるコラーゲン・エラスチンの変性・消失あるいは蓄積、真皮乳頭層の喪失といった形態学的変化が、実際に局所的な力学特性にどのような影響を与えているのかを知ることができれば、適切な薬効を持った化粧品・薬品開発に応用できると考えられる。さらに、将来的には本手法を従来の力学特性計測手法と組み合わせれば、ハリ・シワ・たるみといった老化に伴う外観のマクロな変化が、コラーゲン・エラスチンといった個々の物質のミクロな観点からどのような影響を受けているのか調査できると期待される。また、社会的な側面からは、少子高齢化が進むわが国において健康寿命の延伸、あるいは国際的に評価の高いわが国のコスメトロジー産業の更なる振興に貢献するものと考えられる。

謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団様に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Campagnola PJ, Dong CY. Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. *Laser Photonics Rev.* **5**, 13-26, 2011.
- 2) Prevedel R, Diz-Muñoz A, Ruocco G, Antonacci G. Brillouin microscopy: an emerging tool for mechanobiology. *Nat. Methods* **16**, 969-977, 2019.
- 3) Scarcelli G, Yun SH. Confocal Brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging. *Nat. Photonics* **2**, 39-43, 2008.
- 4) Miura K, Yamashita K. Evaluation of aging, diabetes mellitus, and skin wounds by scanning acoustic microscopy with protease digestion. *Pathobiol. Aging Age Relat. Dis.* **6**, 1516072, 2018.
- 5) Achterberg VF, Buscemi L, Diekmann H, Smith-Clerc J, Schwengler H, Meister JJ, Wenck H, Gallinat S, Hinz B. The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1862-1872, 2014.
- 6) Muiznieks LD, Keeley FW. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* **1832**, 866-875, 2013.