

SHG (第二高調波発生光) 顕微鏡を用いた真皮コラーゲン線維分布の観察

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**

* 大阪大学大学院基礎工学研究科 〒560-8531 豊中市待兼山町 1-3

** (株)資生堂 ライフサイエンス研究センター 〒224-8558 横浜市都筑区早渕 2-2-1

Observation of Dermal Collagen Fiber Distribution by Second-Harmonic-Generation Microscopy

Masahiro ITO*, Takeshi YASUI*, Syuichirou FUKUSHIMA*, Tsutomu ARAKI*, Toyonobu YAMASHITA**, Naomi KUNIZAWA** and Motoji TAKAHASHI**

* Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka 560-8531

** Life Science Research Center, SHISEIDO Co., Ltd., 2-2-1 Hayabuchi, Tsuzuki-ku, Yokohama 224-8558

Second-harmonic-generation (SHG) microscopy has been applied to observe collagen fiber structure in porcine dermis. Difference of collagen fiber structure among different sliced samples is clearly visualized as high contrast SHG images using a sample-scanning SHG microscope based on a transmission configuration. 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. Furthermore, we have employed a beam-scanning SHG microscope based on the reflection configuration for optical-sectioning of dermal collagen fiber in thick porcine skin every 10- μ m depth and confirmed that the collagen fiber structure in the dermis is spatially evolved along the depth direction.

Key words: second-harmonic-generation, collagen, femtosecond laser, dermis, skin, microscope

1. はじめに

ヒト身体における最大の臓器といわれる皮膚は、表皮(epidermis)・真皮(dermis)・皮下組織(subcutis)の三層構造からなる。これらの中で、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、皮膚における中心的役割を担っている。真皮には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、真皮の形態的および機能的特性を決定するうえで重要な役割を果たしている。このような真皮コラーゲン(dermal collagen)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うえでも重要と考えられることから、真皮コラーゲンの変化を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。通常は、皮膚

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、解剖学的皮膚生検が必要である。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うえでは信頼性が高いが、医療現場での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、コラーゲン濃度と配向の局所断層情報を非接触で得る方法の開発が強く望まれる。

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

そのような要求を満たす可能性を有するひと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、これまでもさまざま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ー (OCT) では、多重散乱光の中からコヒーレンスを保持する後方散乱光のみをコヒーレンスゲー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⁾。反射共焦点顕微鏡計測では、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、三次元の空間分解能を達成する。同時に、このような空間フィルタリング法は、大多数の多重散乱光を除去し比較的散乱程度の小さい後方反射光のみ抽出可能とするため、多重散乱による画像ぼけの少ない三次元画像取得を可能にする。また近年、二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⁸⁾。これら従来法は、生体組織全体の構造を可視化するという点ではすぐれているが、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、入射レーザー光の半波長 (あるいは2倍の周波数) の光が第二高調波発生光 (生体 SHG 光) として発生する⁹⁾。筆者らは、この生体 SHG 光がコラーゲン情報を非接触リモートで測定する手段として有効であることに注目し、生体 SHG 光を用いてさまざまなヒト組織のコラーゲン配向測定法に関する研究を行っている¹⁰⁻¹²⁾。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のみ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。これまでも、生体 SHG 光を用いた真皮コラーゲンの構造計測¹³⁾ や配向計測¹⁰⁾ 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はほとんど報告されていない。そこで本研究では、動物試料に対して真皮コラーゲンの詳細な構造分布測定を行ったので報告する。

2. 生体 SHG 光を用いた真皮診断

コラーゲンの基本構造はポリペプチド鎖三重らせん構造

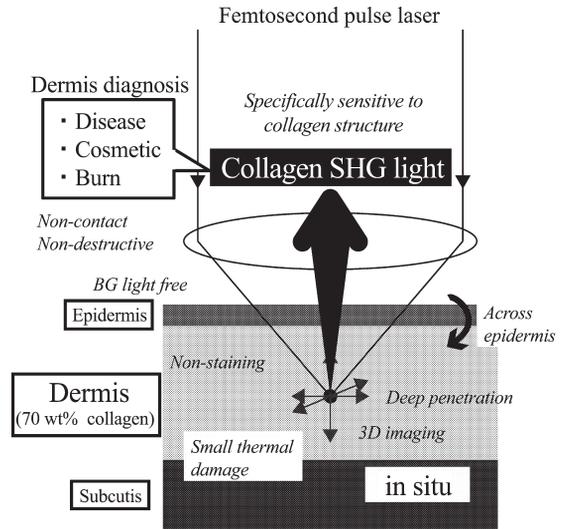


Fig. 1 *In situ* observation of dermal collagen fiber with SHG imaging.

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ゆえに、高い二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¹⁴⁾、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 (Fig. 1)。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 光を発生させるが^{8,15)}、特にコラーゲンが高い SHG 発生効率を有しているうえに、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 光は真皮コラーゲン由来のものであるといえる。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、三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、真皮コラーゲン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、*in situ* 測定が可能のため、火傷診断¹⁶⁾ や光老化診断¹⁷⁾ といった臨床応用分野で有用なツールになることが期待される。

3. 実験装置およびサンプル

Fig. 2 に実験装置を示す。光源にはモード同期チタン・

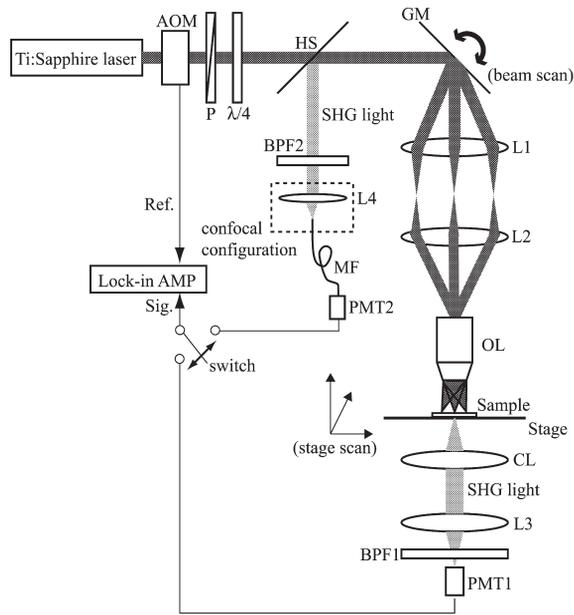


Fig. 2 Experimental setup. AOM: acousto-optic modulator, P: polarizer, $\lambda/4$: quarter-wave plate, HS: harmonic separator, GM: galvano mirror, L1, L2, L3, and L4: lenses, OL: objective lens, CL: condenser lens, BPF1 and BPF2: blue-pass filters, PMT1 and PMT2: photomultiplier tubes.

サファイアレーザー（中心波長 800 nm, パルス幅 100 fs, 繰り返し周波数 80 MHz）を用いる。音響光学変調器（AOM）で強度変調され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（L1, L2）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 400 nm）を発生させる。なお、入射レーザー光は SHG 光発生効率の偏光依存性をキャンセルするため、偏光子（P）と $1/4$ 波長板（ $\lambda/4$ ）を用いて円偏光にしている。透過配置計測では、生体 SHG 光の前方直進成分をコンデンサーレンズ（CL）で集め、青色透過フィルター（BPF1, 透過波長 300~500 nm）でレーザー光成分を除去した後、光電子増倍管（PMT1）でロックイン検出を行う。一方、反射配置計測では、生体 SHG 光の後方散乱成分を同じ対物レンズで集光し、ハーモニックセパレーター（HS, 反射波長 400 nm）と青色透過フィルター（BPF2, 透過波長 300~500 nm）で抽出した後、別の光電子増倍管（PMT2）でロックイン検出を行う。また反射配置では、空間分解能向上と多重散乱光除去の目的で、マルチモードファイバー（コア径 $50 \mu\text{m}$ ）とレンズ（L4）を用い共焦点配置を導入している。最終的に、ステップモーター駆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 $1.5 \mu\text{m}$ と $14 \mu\text{m}$ である¹²⁾。

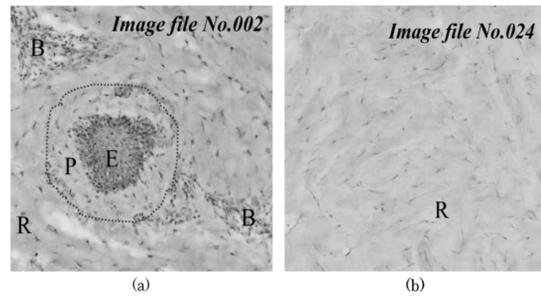


Fig. 3 Microphotograph of HE-stained porcine dermis (image size: $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$). (a) upper porcine dermis, (b) lower porcine dermis. R: reticular dermis, P: papillary dermis, E: epidermis, B: blood vessel.

サンプルには、さまざま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 OCT コンパウンド（サクラファインテックジャパン社）で包埋した後、液体窒素で凍結される。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、各皮膚深さでのブタ真皮切片サンプル（porcine dermis, 厚さ $16 \mu\text{m}$ ）を作成した。また、規則的な単一向向のコラーゲン構造を有するマウス腱（mouse tendon, 厚さ $10 \mu\text{m}$ ）をコントロールとして用意した。Fig. 3 (a) および (b) は、真皮上層部および下層部の切片サンプルの光学顕微鏡像 [$400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$, ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色] を示している。HE 染色では、細胞核が青紫色、線維・細胞質・赤血球等はそれぞれの性質に応じ濃淡各種の赤色に染まる。真皮上層部では、表皮が真皮に落ち込んだ表皮突起（E: epidermis）、血管（B: blood vessel）、乳頭真皮（P: papillary dermis）および網状真皮（R: reticular dermis）が混在している様子が確認できるが、乳頭真皮と網状真皮の違いは明確ではない。一方、真皮下層部では、規則的構造をもたない網状真皮が分布している様子が確認できる。反射配置計測では、表皮を剥離した凍結ブタ真皮組織ブロック（厚さ 3 mm）をサンプルとして用いた。

4. 測定結果

4.1 組織切片の SHG イメージング

ここでは組織の詳細を知るため、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 SHG イメージングを行った。測定には、長作動距離対物レンズ（ $NA=0.42$, 倍率 20 倍, 作動距離 20 mm, ドライ）を用い、入射レーザーパワーは 5 mW に設定した。得られた SHG イメージ（ $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ ）を Fig. 4 に示す。

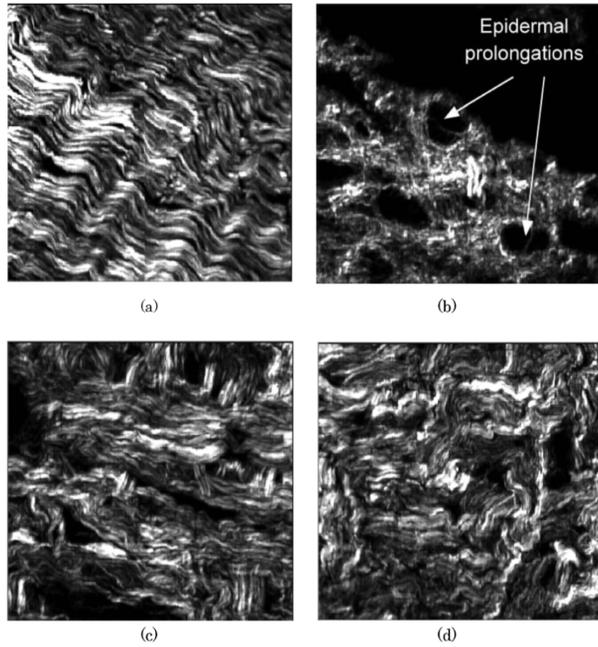


Fig. 4 SHG images of sliced samples (image size: $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$). (a) mouse tendon, (b) papillary layer, (c) upper reticular layer, (d) lower reticular layer in porcine dermis.

いずれのサンプルにおいても、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わかる。これは、コラーゲン自身の高い非線形光学特性以外に、SHG 光強度が屈折率分布の 2 乗に反比例するため¹⁸⁾、従来の屈折率分布に対して線形な光イメージング法 (例えば、OCT) と比較すると、メリハリのきいた高コントラスト像を取得することが可能となる。マウス腱では、太く発達したコラーゲン線維が非常に規則性高く配向分布している様子が確認できる (Fig. 4 (a))。一般に腱組織のコラーゲン線維は単一軸配向を示すとされており、このようなコラーゲン構造が腱組織の配向方向に沿った高い機械的強度を支えている。ブタ皮サンプルに関しては、真皮上層 (乳頭層付近; papillary layer)、真皮中層 (網状層上部; upper reticular layer) および真皮下層 (網状層下部; lower reticular layer) をそれぞれ測定した。真皮上層部では、非常にきめの細かいコラーゲン線維が密に分布している様子がわかる (Fig. 4 (b))。Fig. 4 (b) は、Fig. 3 (a) の HE 染色光顕像と 1 対 1 で対応はしていないが両者を比較すると、表皮が真皮に落ち込んだ表皮突起部分 (epidermal prolongation) 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れている。次に真皮中層部では、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る (Fig. 4 (c))。真皮下層部では、真皮中層

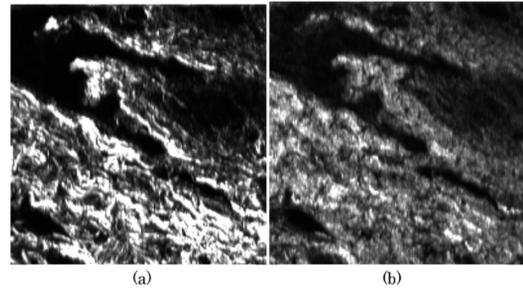


Fig. 5 (a) Transmitted SHG image, (b) reflected SHG image of porcine reticular dermis (image size: $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$).

部と同様に、太いコラーゲン線維が分布しているが、網状のコラーゲン線維分布は確認できない (Fig. 4 (d))。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。一般に真皮に含まれるコラーゲンはタイプ I コラーゲンが主であり、タイプ III コラーゲン等のタイプの異なるコラーゲンが若干混在している程度である。しかしながら、真皮表皮境界に近づくにつれタイプ III コラーゲンの比率が上昇する。タイプ III コラーゲンは肌のきめの細かさを決定する重要なファクターであり、別名ベビーコラーゲンともいわれ新生児では 50% 程度の構成比となっている。乳頭層と網状層における SHG イメージの相違は、コラーゲンタイプの含有率の違いによるコラーゲン線維構造の違いを反映していると考えられる。このように、SHG イメージングを用いることにより、組織コラーゲン線維の詳細な分布情報のみを特異的に抽出することが可能になる。

一般に、コヒーレントな非線形光学過程として発生する生体 SHG 光の大部分は前方直進成分であるため、薄い切片サンプルの SHG イメージを高 S/N 比で取得するためには上述のような透過配置が適している。一方、本手法の *in situ* 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、その場合には微弱な後方散乱 SHG 光を用いる必要がある。そこで、透過配置と反射配置における SHG イメージの違いを確認するため、ブタ皮切片サンプル (真皮中層部) を用いて、透過配置と反射配置の同時 SHG イメージング計測を行った。前述の実験と同様の実験条件で取得した透過および反射 SHG イメージを Fig. 5 (a) および (b) に示す ($200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$)。透過 SHG イメージでは、左上部から切り込んだ皮溝部分以外の領域から発生した SHG 光より、コラーゲン線維の分布状態が明確に確認できる。一方、反射 SHG イメージでは、検出 SHG 光の微弱化による測定 S/N 比低下のためコントラストが低下

しているが、透過配置と同様なイメージが取得できている。これらの結果から、測定 S/N 比の低下はあるものの、反射配置でも十分に測定が可能であることがわかった。

4.2 プタ真皮組織ブロックの深さ分解 SHG イメージング

次に、プタ真皮組織ブロック（厚さ 3 mm）の深さ分解 SHG イメージングを反射共焦点配置で行った。また、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 ($NA=0.50$, 倍率 20 倍, 作動距離 2 mm) を用い、入射レーザーパワーを 30 mW (1 ms/spot) に固定して実験を行ったが、このようなレーザービーム入射時に屈折率ミスマッチング（対物レンズ-空気境界および空気-サンプル境界）が発生する場合、イメージング深さに依存した球面収差が生じ、結果的に点像分布関数が低下するとされている¹⁹⁾。また、生体組織のような厚みのある強散乱体中においては、多重散乱によるレーザー集光ほけも三次元の空間分解能を低下させるひとつの要因である。このような空間分解能の低下を防ぐため、マルチモードファイバー（コア径 50 μm ）をピンホールとして用いた共焦点配置を導入した (Fig. 2)。また、測定時間を短縮するため、ガルバノ走査機構（ガルバノミラー）の利用により連続的かつ高速にビーム照射位置を走査することが可能なビームスキャンモードを用いた。そして、生体 SHG 光を用いることにより、機械的スライスを行うことなく、非接触リモートで生体内部のコラーゲン構造の計測（オプティカルセクションニング）を行った。Fig. 6 は各測定深度（10 μm ごと）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 S/N 比の低下によりイメージが若干ぼけているが、オプティカルセクションニングされた SHG イメージが連続的に変化している様子が確認できる。例えば、真皮上層部ではコラーゲン線維がきめ細かく分布している一方で、真皮下層部では発達した太いコラーゲン線維が確認できる。これらの特徴は、真皮切片サンプルの SHG イメージング結果 (Fig. 4) と一致しており、真皮コラーゲン線維の三次元的な特徴が本手法によってとらえられている。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はまだ十分とはいえない。今回の検出 SHG 光は、中心波長 400 nm と非常に生体内多重散乱を受けやすい波長帯に位置し、それによる信号減衰が測定可能深度を制限している。一般に多重散乱効果は波長の 4 乗に反比例するため、レーザー波長の長波長化が測定可能深度の向上に有効である。測定深度を制限する別の要因として、レーザービーム照射時の空気-サンプル境界での屈折率ミスマッチングによるサンプル表面反射があり、これがレーザー光の生体内侵入を制限している。測定

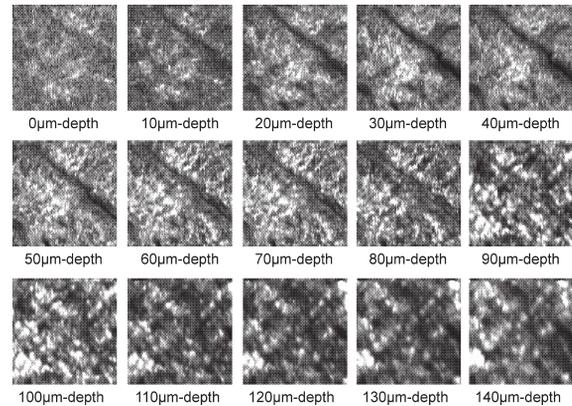


Fig. 6 Depth-resolved SHG images of porcine reticular dermis at 10 μm -depth step (image size: 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$).

深度向上だけでなく空間分解能改善という観点からも、このような屈折率ミスマッチングを解消する必要がある。油浸対物レンズ利用による屈折率マッチングが望まれる。このような点を踏まえて測定可能深度を向上させるため、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（中心波長 1250 nm）と油浸対物レンズを用いたシステムを現在開発中である。

5. まとめと今後の展望

本論文では、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二次元分布が調査できた。さらに、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ニング像が得られ、本法が三次元的コラーゲン構造の *in situ* 計測に有効な手法であることを確認した。

実際にヒトへの臨床応用を実施する場合、照射レーザー光パワーに対する安全性の配慮が必須である。CW レーザーの人体に対する JIS 安全基準値は、照射時間 1 ms において 3 MW/m² であり、1 ms 以下であれば照射時間に反比例した光パワー増加が許される。現時点ではフェムト秒パルスレーザーの安全基準はまだ定まっていないが、照射スポット径を 10 μm とし、各点における測定時間を 1 ms とした場合、上記に準拠すれば 0.25 mW 程度に制限される。今回報告した計測システムのみで安全基準値を満たすには、照射光強度と照射時間の積を 120 分の 1 に減衰する必要がある。この場合問題となる S/N 比低下は光子計数法を採用することで解決できる。

また、臨床における *in situ* 計測では、光学配置は反射

型が基本となる。しかし、生体 SHG 光の後方散乱成分は前方直進成分と比較するとかなり微弱となる。さらに、今回のような顕微鏡計測は光学系の可動性が制限されるため、ただちに臨床に適用できるとはいえない。今後はより臨床応用に適応した光学設計が望まれる。例えば、真皮コラーゲンの断層構造を取得したい場合には、SHG 計測に OCT 技術を導入した SHG-OCT²⁰⁾ が有効である。SHG 光発生はコヒーレントな過程によって発生するため、低コヒーレンス干渉やヘテロダイン検出を利用することにより、微弱 SHG 光の増強、多重散乱光除去、高速測定、良好な深さ分解能といった特徴を有した OCT ライクな計測が可能になる。この場合にも光子計数方式の併用は効果的である。このような計測手法を利用することにより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、さまざまな皮膚科学分野への応用が期待できる。

本研究は科研費・基盤研究(A)17200032 および基盤研究(B)16300155 より援助を受けた。

文 献

- 1) B. Eyden and M. Tzaphlidou: "Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: Role of electron microscopy," *Micron*, **32** (2001) 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) 391-394.
- 3) S. Osaki: "Distribution map of collagen fiber orientation in a whole calf leather," *Anat. Rec.*, **254** (1999) 147-152.
- 4) B. K. Milthorpe, G. J. Rogers and K. Schindhelm: "Micro-computer-based system for tensile testing of biological materials," *Med. Biol. Eng. Comput.*, **26** (1988) 161-166.
- 5) S. Osaki: "Use of hair pores to determine the orientation of collagen fiber in skin," *Anat. Rec.*, **263** (2001) 161-166.
- 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) 1178-1181.
- 7) J. F. de Boer, T. E. Milner and J. S. Nelson: "Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, **22** (1997) 934-936.
- 8) 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) 7075-7080.
- 9) S. Roth and I. Freund: "Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon," *Biopolymers*, **20** (1981) 1271-1290.
- 10) 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) 259-264.
- 11) 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) 2861-2867.
- 12) 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** (2005) 1397-1408.
- 13) K. König and I. Riemann: "High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution," *J. Biomed. Opt.*, **8** (2003) 432-439.
- 14) B. M. Kim, J. Eichler and L. B. Da Silva: "Frequency doubling of ultrashort laser pulses in biological tissues," *Appl. Opt.*, **38** (1999) 7145-7150.
- 15) 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) 493-508.
- 16) 佐々木邦彦, 安井武史, 東野義之, 荒木 勉: "SHG (第2高調波発生光) イメージングを用いた火傷診断に関する基礎研究", *Optics Japan 2005 講演予稿集* (2005) pp. 34-35.
- 17) S. Lin, R. Wu, H. Tan, W. Lo, W. Lin, T. Young, C. Hsu, J. Chen, S. Jee and C. Dong: "Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy," *Opt. Lett.*, **30** (2005) 2275-2277.
- 18) Y. Guo, P. P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin and R. R. Alfano: "Second-harmonic tomography of tissues: Errata," *Opt. Lett.*, **23** (1998) 733.
- 19) C. Y. Dong, K. Köenig and P. So: "Characterizing point spread functions of two-photon fluorescence microscopy in turbid medium," *J. Biomed. Opt.*, **8** (2003) 450-459.
- 20) Y. Jiang, I. Tomov, Y. Wang and Z. Chen: "Second-harmonic optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, **29** (2004) 1090-1092.