

〈シンポジウム II〉「環境と皮膚」

体内環境と皮膚 細胞外マトリックスと皮膚

生体 SHG 光(第 2 高調波発生光)イメージングを用いた真皮コラーゲン線維の観察

安井 武史

Observation of Dermal Collagen Fiber with Second-Harmonic-Generation Imaging

Takeshi YASUI

Abstract

Second-harmonic-generation (SHG) imaging 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 transmission-mode SHG microscope equipped with a mode-locked Ti : sapphire laser having a center wavelength of 800 nm. Furthermore, we have developed a reflection-mode SHG microscope equipped with a mode-locked Cr : forsterite laser having a center wavelength of 1250 nm for optical-sectioning of dermal collagen fiber in thick porcine skin every 20- $\mu$ 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, microscope.

1. はじめに

ヒト身体における最大の臓器と言われる皮膚は、表皮・真皮・皮下組織の3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、張りや弾性といった皮膚の形態的及び機能的特性を決定する上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、皮膚性状を探る上で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美容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<sup>1)</sup>、X線回折<sup>2)</sup>、マイクロ波法<sup>3)</sup>、機械的特性法<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>。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。

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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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、3次元の空間分解能を達成する。また近年、共焦点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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。我々は、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 光を用いて様々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<sup>10-12)</sup>。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 wt%)、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 光を用いた皮膚疾病診断<sup>13)</sup>や真皮コラーゲン配向計測<sup>10)</sup>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。本論文では、動物試料に対して真皮コラーゲン線維の詳細な構造分布測定を行ったので報告する。

2. 生体 SHG 光を用いた真皮コラーゲン測定

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。Fig. 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、入力と出力が1対1の対応を示しており、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)も同時に発生し、もはや1対1の対応を示さなくなる(Fig. 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、超短パルス光が力一杯叩くことに相当する(Fig. 1 右下側)。すなわち、赤色の超短パルス光(周波数= $\omega$ , 波長= $\lambda$ )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= $2\omega$ , 波長= $\lambda/2$ )が発生し、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三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(三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<sup>14)</sup>、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ので、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. 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 光を発生させるが<sup>8), 15)</sup>、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、

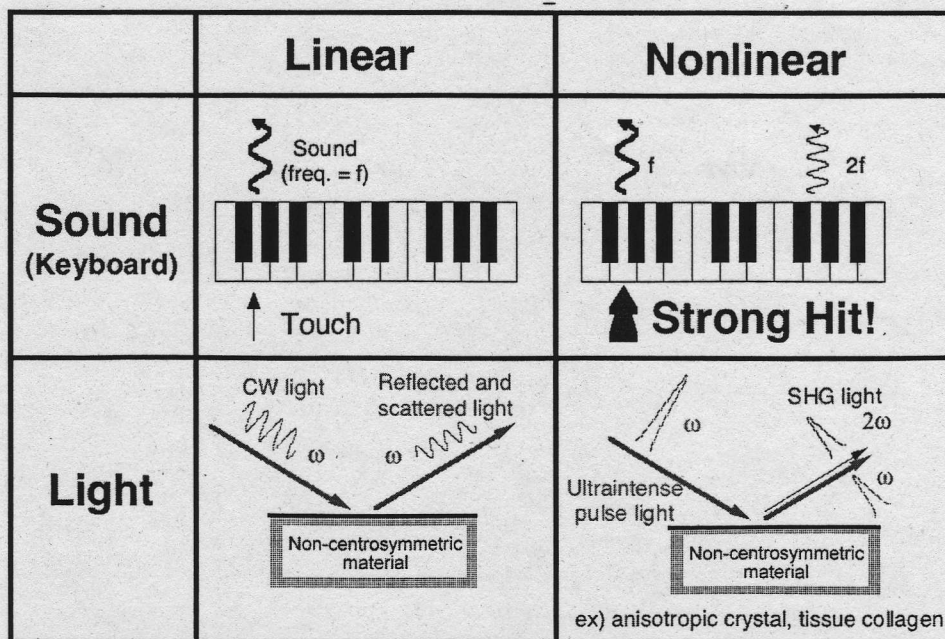


Fig. 1. Linear and nonlinear phenomena in sound and optical regions.

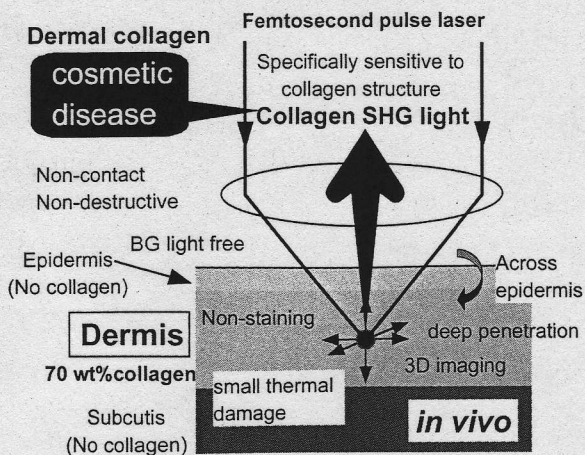
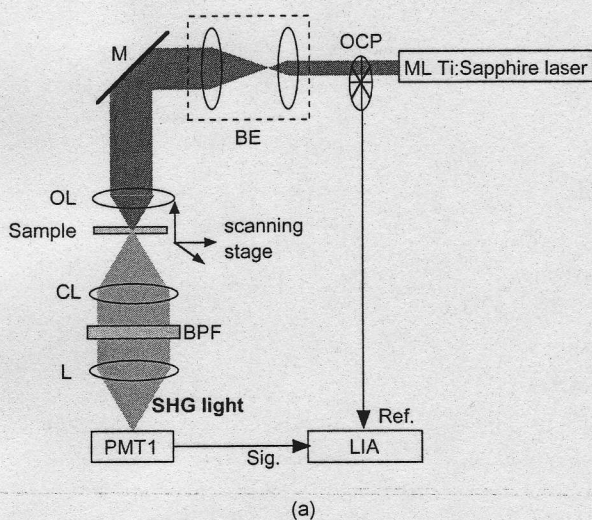
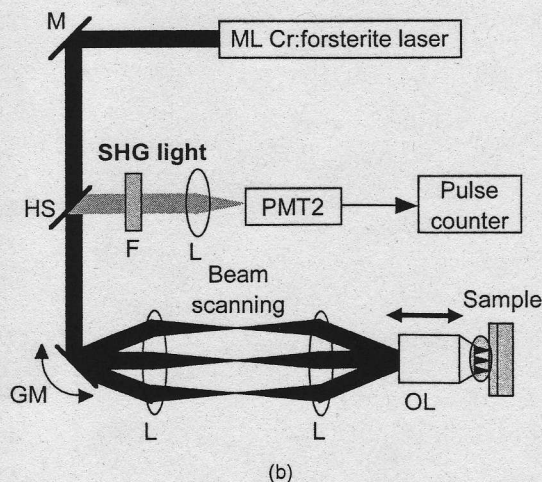


Fig. 2. Observation of dermal collagen fiber with SHG light.



(a)



(b)

Fig. 3. Experimental setups of (a) transmission-mode SHG microscope and (b) reflection-mode SHG microscope. OCP: optical chopper; BE: beam expander; M: mirror; OL: objective lens; CL: condenser lens; BPF: blue-pass filter; L: lens; PMT 1 and PMT2: photomultipliers; LIA: lock-in amplifier; HS: harmonic separator; GM: galvano mirror; F: IR cut filter.

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, 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, 生きたありのままの状態での *in situ* 測定が可能のため, 火傷診断<sup>16)</sup>や光老化診断<sup>17)</sup>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

透過型 SHG 顕微鏡の実験装置を Fig. 3(a) に示す。光源にはモード同期チタン・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。光チョッパー(OCP)で強度変調されたレーザー光は, ビームエキスパンダー(BE)でビーム径が対物レンズの瞳径に一致するようにビーム径が拡大された後, 対物レンズ(OL; NA=0.42, 作動距離=20 mm, ドライ)に入射される。レーザー光を対物レンズ(OL)でサンプルに集光することにより, 生体 SHG 光(中心波長 400 nm)が発生する。発生した生体 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(BPF, 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)とロックイン増幅器(LIA)を用いて検出を行う。組織切片サンプルをステップモーター駆動ステージで走査することにより, SHG イメージング計測を行う。本システムの面内分解能は 1.5  $\mu\text{m}$  である。

Fig. 3(b) は反射型 SHG 顕微鏡の実験装置を示している。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, 反射配置では微弱な後方散乱 SHG 光を検出する必要がある。そこで, ①生体透過性の良好なモード同期クロム・フォルステライトレーザー(中心波長 1250 nm, パルス幅 150 fs, 繰り返し周波数 90 MHz)を光源とし, ②サンプル表面での屈折率ミスマッチングによる表面反射を防ぎ効率的にレーザー光を生体組織内に送り込めるように油浸対物レンズ(NA=0.9, 作動距離=350  $\mu\text{m}$ )を用い, ③光子レベルの高感度検出が可能な単一光子計数型光電子増倍管を検出器とすることにより, 微弱な後方散乱 SHG 光の高速計測を実現する。レーザー光は, ガルバノミラー(GM)とリレーレンズ光学系(L)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 光を発生させる。発生した生体 SHG (中心波長 625 nm) 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(HS)と IR 除去フィルター(F)で抽出した後, 光電子増倍管(PMT2)で検出する。また, OL を piezo 駆動ステージ(移動ストローク 350  $\mu\text{m}$ )で光軸方向に移動させることにより, 各深さ位置でのコラーゲン線維構造分布を取得する。

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 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、規則的な単一配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。反射配置計測では、凍結皮膚組織ブロック (厚さ 5 mm) をそのままサンプルとして用いた。

4. 組織切片サンプルの透過 SHG イメージング

組織切片サンプルの透過 SHG イメージ (400  $\mu\text{m}$   $\times$  400  $\mu\text{m}$ ) を Fig. 4 に示す。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 イメージのコントラストが屈折率分布の 2 乗依存性を示すため<sup>18)</sup>、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。ブタ皮膚サンプルに関しては、真皮上層 (乳頭層付近)、真皮中層 (網状層上部) および真皮下層 (網状層下部) をそれぞれ測定した。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 (Fig. 4(b))。また、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緩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 コラーゲンは肌のキメ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

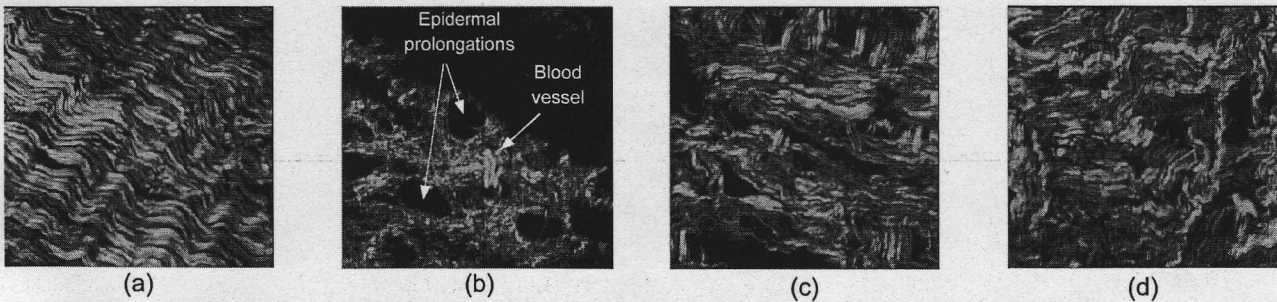


Fig. 4. Transmission SHG image of sliced specimens. (a) mouse tendon, (b) papillary layer, (c) upper reticular layer, and (d) lower reticular layer of porcine dermis. Image size is 400- $\mu\text{m}$  by 400- $\mu\text{m}$ .

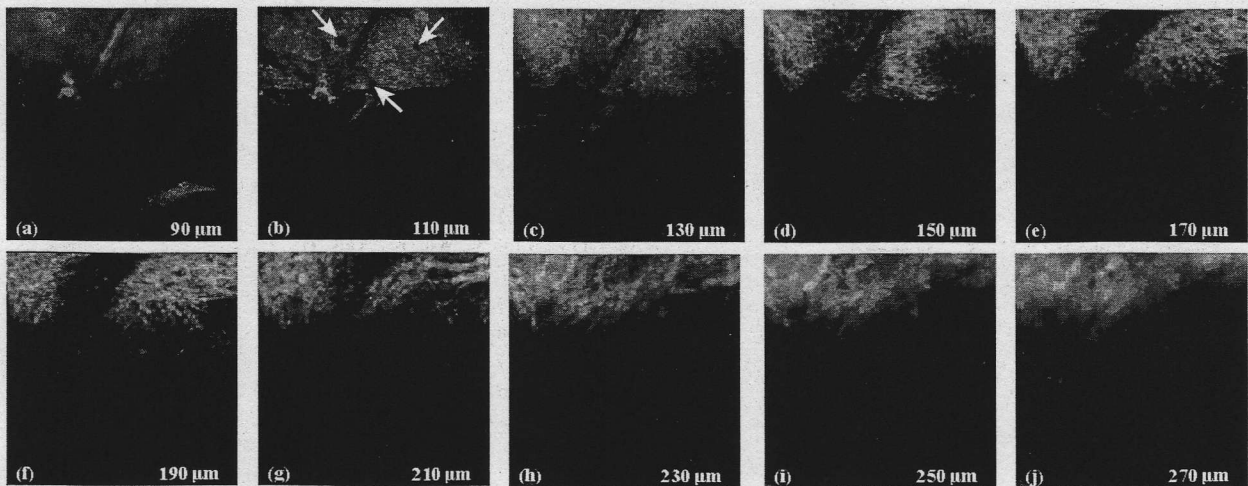


Fig. 5. Optical-sectioning SHG images of porcine dermis every 20- $\mu\text{m}$  depth (image size = 200  $\times$  200  $\mu\text{m}$ ).

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。

### 5. 組織ブロックサンプルの反射SHGイメージング

実際の *in situ* 計測を考えた場合、上述の透過配置よりも反射配置での計測が現実的である。そこで、凍結ブタ皮膚組織ブロックの深さ分解SHGイメージングを反射配置で行った。Fig. 5は、皮膚表面を基準とした場合の各測定深度(20  $\mu\text{m}$ ごと)で得られたSHGイメージ(200  $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ )を示している。生体SHG光は深さ90  $\mu\text{m}$ 付近から観測され始め、この付近が表皮と真皮の境界付近であると思われる。それ以降では、オプティカル・セクショニングされたSHGイメージが深さ方向に連続的に変化している様子が分かる。例えば、真皮上層部(深さ90~150  $\mu\text{m}$ )ではコラーゲン線維がキメ細かく分布している一方で、真皮下層部(深さ170~210  $\mu\text{m}$ )では発達した太いコラーゲン線維が確認できる。また、真皮上層部の毛細血管と思われる黒い領域も確認できる(Fig. 5(b)中の矢印)。深さ250  $\mu\text{m}$ 以上でも生体SHG光の信号は確認できるものの、生体組織内の多重散乱によりイメージがぼやけている。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3次元的な特徴が本手法によって非接触リモートでとらえられている。

### 6. まとめ

本論文では、生体SHGイメージングが真皮コラーゲン線維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次元分布が可視化できた。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・セクショニング像が得られ、本法が3次元のコラーゲン構造の *in situ* 計測に有効な手法であることを確認した。今後は、ヒト皮膚の *in situ* 計測を行い、光老化をはじめとした皮膚美容関連分野への応用を行う予定である。

本研究の一部は、科研費・基盤研究(A)17200032より援助を受けた。

### 参考文献

- 1) Eyden, B., Tzaphlidou, M.: Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. *Micron*, 32: 287-300, 2001.
- 2) James, V. J., Delbridge, L., McLennan, S. V., Yue, D. K.: Use of X-ray diffraction in study of human diabetic

- and aging collagen. *Diabetes*, 40: 391-394, 1991.
- 3) Osaki, S.: Distribution map of collagen fiber orientation in a whole calf leather. *Anat. Rec.*, 254: 147-152, 1999.
- 4) Milthorpe, B. K., Rogers, G. J., Schindhelm, K.: Micro-computer-based system for tensile testing of biological materials. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 26: 161-166, 1988.
- 5) Osaki, S.: Use of hair pores to determine the orientation of collagen fiber in skin. *Anat. Rec.*, 263: 161-166, 2001.
- 6) Huang, D., Swanson, E. A., Lin, C. P., Schuman, J. S., Stinson, W. G., Chang, W., Hee, M. R., Flotte, T., Gregory, K., Puliafito, C. A., Fujimoto, J. G.: Optical coherence tomography. *Science*, 254: 1178-1181, 1991.
- 7) de Boer, J. F., Milner, T. E., Nelson, J. S.: Determination of the depth-resolved Stokes parameters of light back-scattered from turbid media by use of polarization-sensitive optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, 24: 300-302, 1999.
- 8) Zipfel, W. R., Williams, R. M., Christie, R., Nikitin, A. Y., Hyman, B. T., Webb, W. W.: Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 7075-7080, 2003.
- 9) Roth, S., Freund, I.: Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon. *Biopolymers*, 20: 1271-1290, 1981.
- 10) Yasui, T., Tohno, Y., Araki, T.: Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry. *J. Biomed. Opt.*, 9: 259-264, 2004.
- 11) Yasui, T., Tohno, Y., Araki, T.: Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light. *Appl. Opt.*, 43: 2861-2867, 2004.
- 12) Yasui, T., Sasaki, T., Tohno, Y., Araki, T.: Tomographic imaging of collagen fiber orientation in human tissue using depth-resolved polarimetry of second-harmonic-generation light. *Opt. Quantum Electron.*, 37: 1397-1408, 2006.
- 13) König, K., Riemann, I.: High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J. Biomed. Opt.*, 8: 432-439, 2003.
- 14) Kim, B. M., Eichler, J., da Silva, L. B.: Frequency doubling of ultrashort laser pulses in biological tissues. *Appl. Opt.*, 38: 7145-7150, 1999.
- 15) Campagnola, P. J., Millard, A. C., Terasaki, M., Hoppe, P. E., Malone, C. J., Mohler, W. A.: Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophys. J.*, 82: 493-508, 2002.
- 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*: 34-35, 2005.
- 17) Lin, S., Wu, R., Tan, H., Lo, W., Lin, W., Young, T., Hsu, C., Chen, J., Jee, S., Dong, C.: Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Opt. Lett.*, 30: 2275-2277, 2005.
- 18) Guo, Y., Ho, P. P., Savage, H., Harris, D., Sacks, P., Schantz, S., Liu, F., Zhadin, N., Alfano, R. R.: Second-harmonic tomography of tissues: errata. *Opt. Lett.*, 23: 733, 1998.