

第3節 皮膚（真皮）のコラーゲン量を測定したい

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、腱では太く発達したコラーゲン線維や線維束が一方に規則的に並ぶことにより極めて高い機械的強度を実現している。

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。真皮にはコラーゲンが豊富に含まれており、約70%を占める。したがって、真皮コラーゲンが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。また、皮膚の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重要と考えられることから、真皮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、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ー（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⁾。共焦点レーザー走査型顕微鏡では、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、皮膚内部組織の3次元イメージングを可能にする⁸⁾。また近年、非線形光学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、組織や細胞の自家蛍光を利用した2光子蛍光顕微鏡による無染色観察の試みも行われている⁹⁾。これらの光学的手法は、生体組織構造を*in vivo*で可視化する手段として既に市販され、実用レベルでの使用が可能になっている¹⁰⁻¹²⁾。しかし、生体組織におけるコラーゲン情報のみを選択的に抽出し詳細に測定することは容易でない。

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¹³⁾。この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（第2高調波発生光）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』で可視化する『生体コラーゲン SHG 顕微鏡』が可能になる。我々は、これまでに、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¹⁴⁻¹⁸⁾、皮膚老化^{19,20)}や熱傷²¹⁾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 顕微鏡の原理と応用例を紹介する。

1. 測定原理

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、音が歪み、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、物質と相互作用した光電場が歪み、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、反射や吸収といった線形光学効果(図1左下側)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。

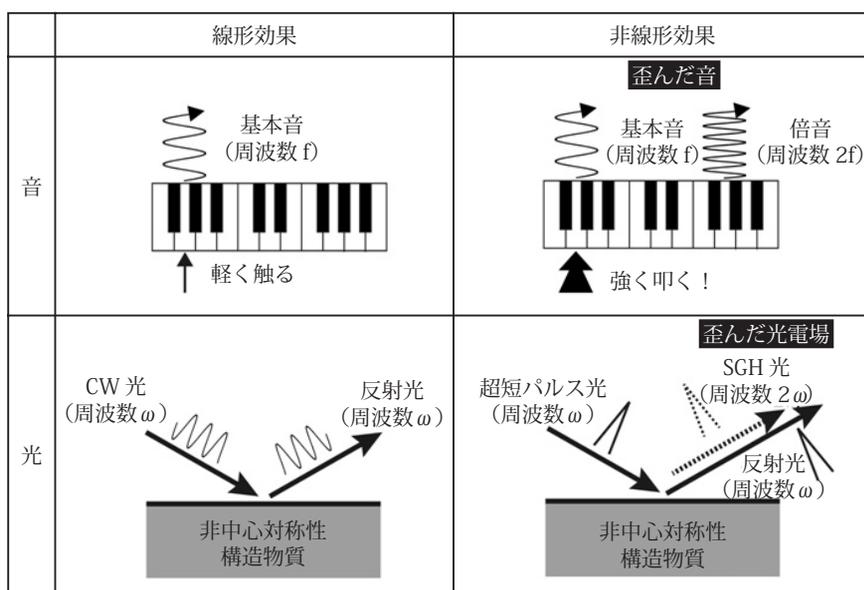


図1 SHG 光発生原理

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、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^{9,22)}、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、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。最も重要なのは, 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。

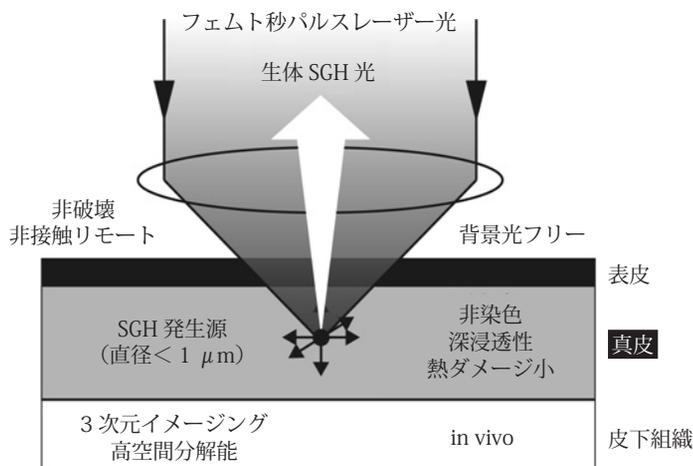


図2 生体コラーゲン SHG 顕微鏡

2. 実験装置

図3に実験装置を示す。基本的には, 一般的なレーザー走査型顕微鏡と同様な構成となっているが, レーザー光源としてフェムト秒レーザーを用いる点が異なる。従来の非線形光学顕微鏡では, 波長帯 800nm のフェムト秒モード同期チタン・サファイアレーザーが広く使われているが, 表皮越しに真皮コラーゲン線維を *in vivo* 計測する場合を考えると, 十分な測定深度を得ることが困難である。そこで, 今回の装置では, 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, パルス幅 100 fs, 繰返し周波数 73 MHz) を用いている。波長 1250 nm 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アに取得できる。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 (開口数 0.9, 動作距離 350 μm) を通っ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, 電子冷却フォトンカウンティング型光電子増倍管で高感度計測される。サンプル上でレーザースポットを高速2次元走査 (X軸, Y軸) するために, 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次元走査ステージで測定部位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 (600 μm *600 μm *250 μm 深さ) と大面積 SHG イメージング (2.4 mm*2.4 mm) が可能である。

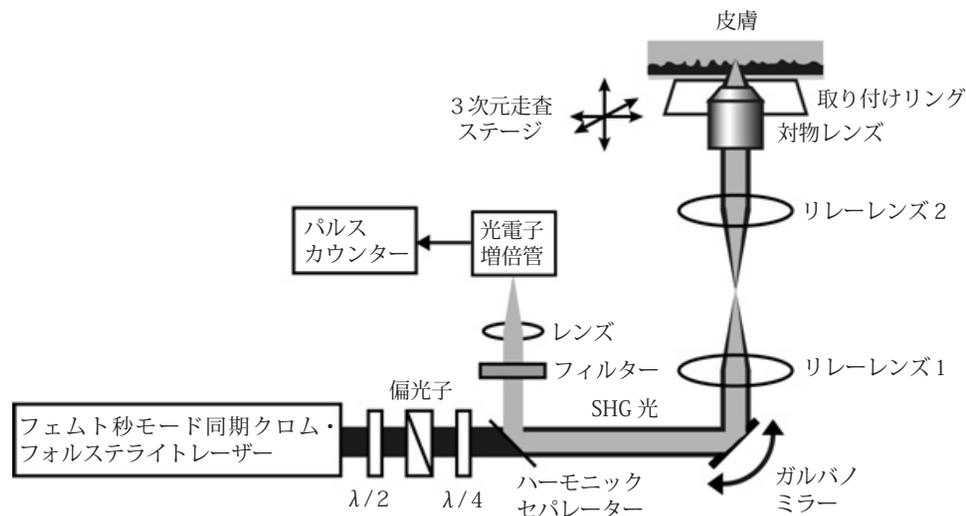


図3 実験装置

3. 実験結果

3.1 切片サンプルの計測

まず、動物切片サンプルのSHGイメージングを行った。得られたSHGイメージ ($400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$) を図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SHGイメージとして可視化できていることが分かる。これは、コラーゲン自身の高い非線形光学特性以外に、SHGコントラストが屈折率分布の2乗依存性を示すため、従来の屈折率分布に対して線形な光イメージング法と比較すると、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 [図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。豚皮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) 及び真皮下層 (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 [図4 (b)]。図4 (b) において、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。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差した網状分布が部分的に確認できる [図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 [図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を選択的かつ高コントラストに可視化することが可能になる。

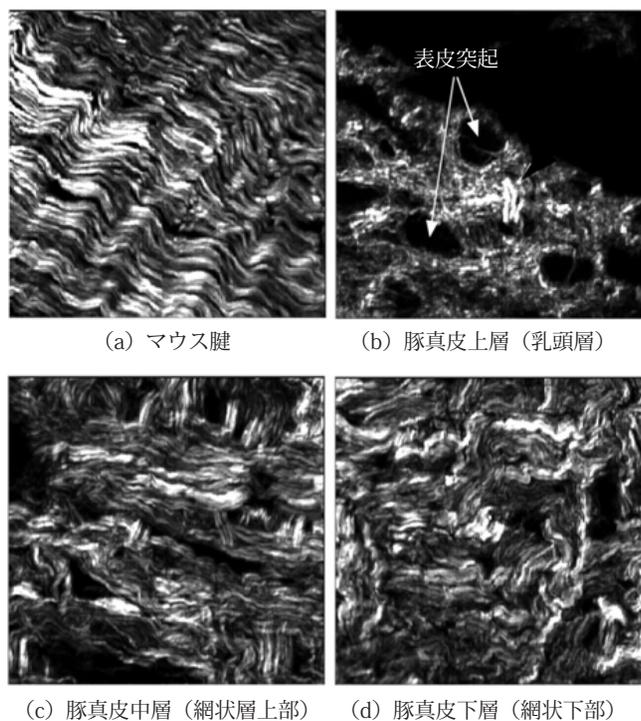


図4 切片サンプルのSGHイメージ (サイズ 400 μm *400 μm)

3.2 ヒト頬における真皮コラーゲンの *in vivo* 計測¹⁸⁾

次に、ヒト頬の真皮コラーゲン線維を *in vivo* で可視化した。実験に先立ち、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、同意を得た 20 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。レーザー光の生体照射に対する安全性に関しては、過去に同条件で実施したヒト試験において、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ことを確認している。図 5 (a) は、実験風景を示している。計測時、被験者は椅子に座り、頭を計測台に載せて取り付けリングと頬を密着させた。取り付けリングは、図 5 (b) のような構成となっており、中心穴部に円形カバーガラスを置き、その周縁部と頬を両面テープで密着させることにより、計測部位のモーション・アーチファクトを抑えている。計測部位は、図 5 (c) の丸で囲んだ、頬骨下部である。

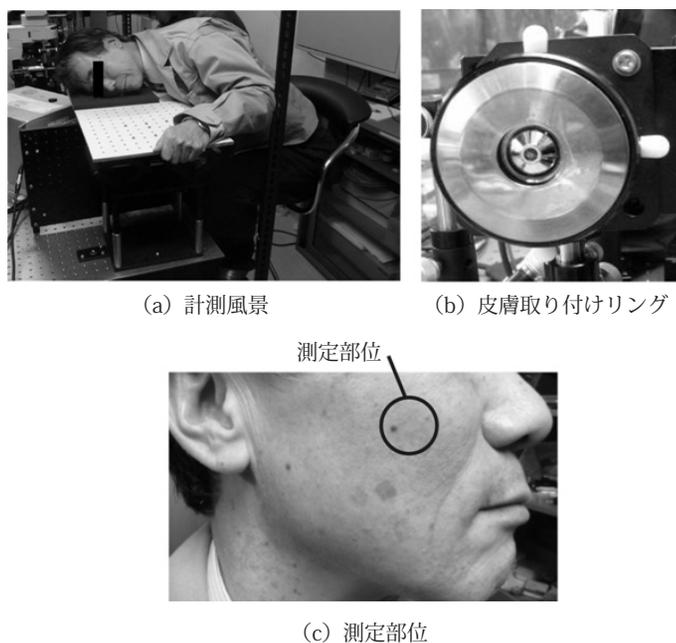
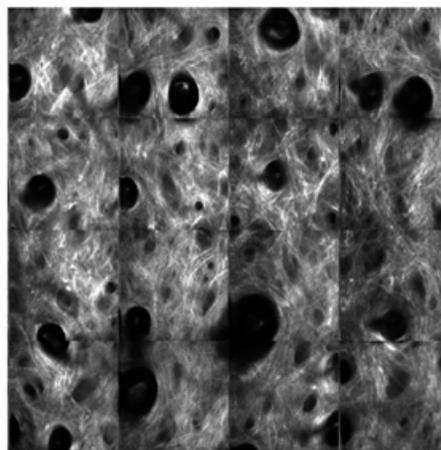
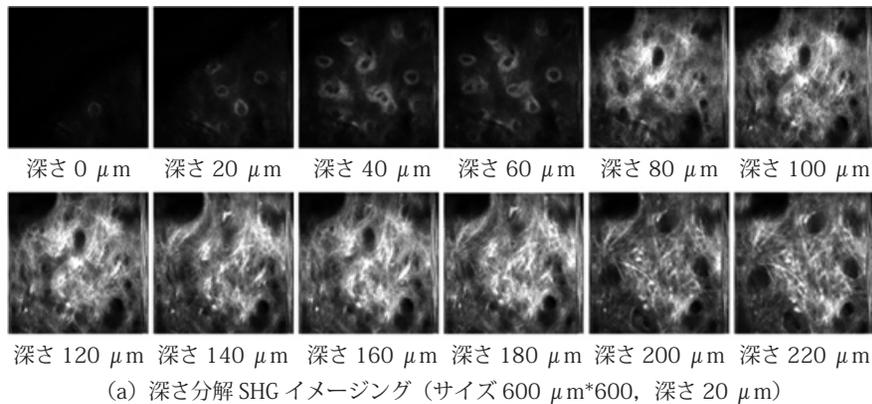


図 5

図 6 (a) は、SHG イメージ (イメージ領域 $600 \mu\text{m} \times 600 \mu\text{m}$, 取得時間 2 秒) を取得しながら、測定深度を逐次変化させた深さ分解 SHG イメージング結果を示している。測定深度の走査は、取り付けリングを機械式ステージで動かすことによって行い、皮膚表面を深さ $0 \mu\text{m}$ とした。生体 SHG 光が、焦点近傍の局在領域 (直径 $1 \mu\text{m}$ 以下) で発生するという特徴を利用することにより、機械的な切り出しを行わなくとも、皮膚内部の 3 次元コラーゲン構造を可視化できる。測定深度が増加するにつれてコラーゲン線維構造が徐々に変化する様子を捉えることができ、真皮乳頭層から真皮網状層でのコラーゲン構造が確認できる。例えば、乳頭層ではキメの細かいコラーゲン線維が毛包付近で高密度に分布しているのに対し、網状層では太く発達したコラーゲン線維が全般的に分布している様子が確認できる。また、黒い円形の暗部は毛包で、その内部に毛が存在していると思われる。

次に、ヒト皮膚の大面积 SHG イメージングを行った。ここでは、SHG イメージ (イメージ領域 $600 \mu\text{m} \times 600 \mu\text{m}$, 取得時間 2 秒) を取得しながら、測定部位を $600 \mu\text{m}$ 刻みで面内方向の左右上下に移動させて 16 枚の SHG イメージを取得し、これらのイメージを 4 枚 \times 4 枚のマトリックス状に並べることで、大面积 SHG イメージ ($2.4 \text{ mm} \times 2.4 \text{ mm}$) を取得した。面内方向の移動は取り付けリングを機械式ステージで動かすことによって行い、測定深度は $200 \mu\text{m}$ に固定した。測定結果を図 6 (b) に示す。よりマクロな領域における真皮コラーゲン線維構造の様子が明確に可視化できている。この測定深度では、真皮網状層に独特な太く発達したコラーゲン線維の分布の様子が確認できるが、その分布状態は一様でなく、濃度にムラがあることが分かる。



(b) 大面积 SHG イメージング (サイズ $2.4 \text{ mm} \times 2.4 \text{ mm}$, 測定深度 $200 \mu\text{m}$)

図 6 ヒト頬における真皮コラーゲンの *in vivo* 計測

3.3 皮膚老化による真皮コラーゲン線維構造の変化²⁰⁾

老化によって真皮コラーゲン線維の状態が変化すると、皮膚の形態的变化や異常が引き起こされ、しわやたるみといった外観上の特徴が現れるようになる。皮膚の老化現象は加齢による老化である自然老化と、紫外線照射による光老化とで区別され、体の非露光部では自然老化のみが起こるが、顔面等の露光部においては自然老化と光老化の両方が進行する。自然老化では、加齢に伴う細胞活性の減退によってコラーゲンの合成が低下することが知られている。光老化のメカニズムは明確ではないが、紫外線への露光によって、皮膚組織内でコラーゲン線維を分解する酵素 (MMP) が活性化され、コラーゲン線維の量や質に異常を生じるのが原因であるといわれている。紫外線による光老化はコラーゲン線維状態を大きく変化させ、皮膚老化を急速に促進させるため、露光部では非露光部に比べて著しく機械的特性を失いやすい。したがって、光老化は皮膚美容やアンチエイジング分野で重要な問題となっている。

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、同意を得た 20 代～ 60 代の被験者に対して行った。まず、20 代から 60 代の男性被験者における真皮コラーゲン線維を大面積 SHG イメージングで計測した。測定結果を図 7 に示す。20 代と 60 代の被験者を比較すると、きめ細かいコラーゲン線維が減少し、太く粗いコラーゲン線維が顕著になっている様子が確認できる。これは、加齢に伴う細胞活性の減退によってコラーゲンの産生が低下し、キメの細かい新生コラーゲン線維の総量が減少しているためと思われる。しかし、その様子は加齢と共に一様というわけではなく、例えば 40 代と 50 代の被験者を比較すると、コラーゲン密度は 40 代の方が低い結果となっている。これは、個々人によって紫外線履歴が異なり、それによる紫外線ダメージの影響が混在しているためであると考えられる。

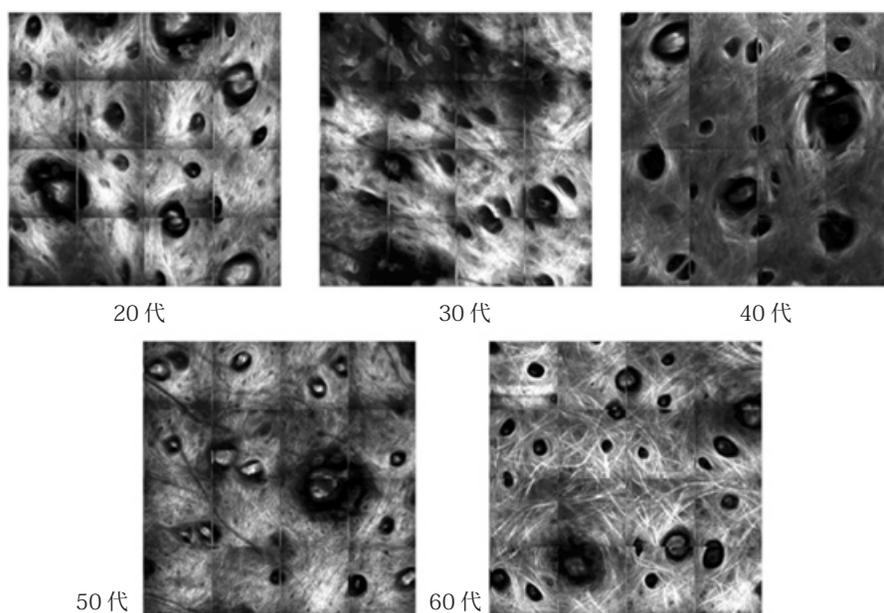


図7 20代から60代の男性の真皮コラーゲン線維 (2.4 mm*2.4 mm, 測定深度 200 μm)

次に、紫外線曝露の影響を調べた。図 8 は、20 代男性被験者における日焼けの有無による真皮コラーゲンの大面積 SHG イメージ (サイズ 2.4 mm*2.4 mm, 測定深度 200 μm) の比較を示している。顕著に日焼けした被験者の方が、若干、コラーゲン濃度が薄く、太く発達したコラーゲン線維が強調されているように感じるが、その差は 20 代では顕著でない。一方、50 代男性被験者に関して、日焼けによる真皮コラーゲン線維構造を比較した結果が図 9 である (サイズ 2.4 mm*2.4 mm, 測定深度 200 μm)。50 代被験者は、日焼けの有無による明確な相違が確認された。日焼けしていない被験者では比較的キメの細かいコラーゲン線維が確認されたが、日焼けの顕著な被験者ではキメの細かいコラーゲン線維の濃度は極めて低く、太く発達したコラーゲン線維のみが強調されている。この被験者は、毎日昼休みに屋外でテニスをしており、一年を通して常に日焼けした状態の紫外線履歴を有していた。また、図 8 と図 9 から、若い間は紫外線ダメージに対するコラーゲン産生のターンオーバーが比較的順調なので日焼けによる相違が小さいが、加齢と共に

細胞活性が低下してくると紫外線ダメージに対するコラーゲンのターンオーバーが間に合わなくなり、キメの細かいコラーゲン線維が極度に減少した状態になると解釈できる。

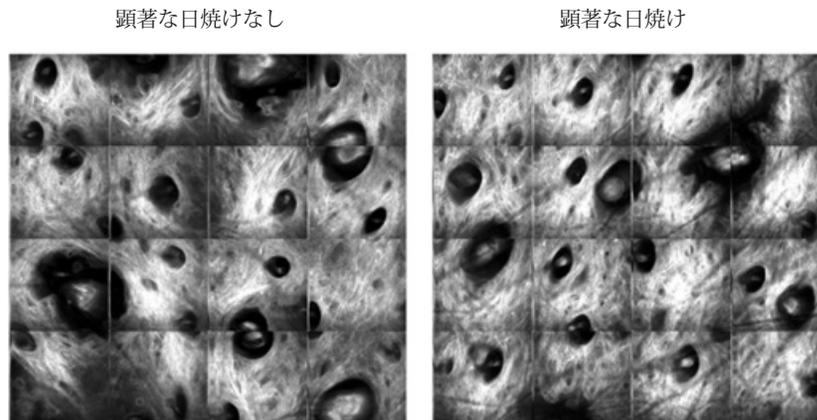


図8 日焼けの有無による20代男性の真皮コラーゲン線維の比較 (サイズ2.4 mm*2.4 mm, 測定深度200 μm)

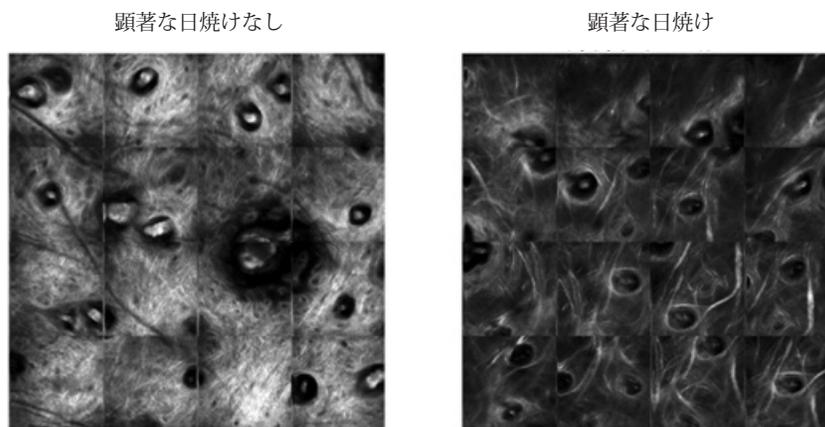


図9 日焼けの有無による50代男性の真皮コラーゲン線維の比較 (サイズ2.4 mm*2.4 mm, 測定深度200 μm)

3.4 皮膚老化による真皮コラーゲン線維構造の変化²¹⁾

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²³⁾や超音響法²⁴⁾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重螺旋構造がほどこ、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。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, ドミトール (0.15 mg/kg), ドルミカム (2 mg/kg), ベトルファンオール (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²⁵⁾。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 10 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 (サイズ 2.4mm*2.4mm)。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。イメージのグレースケールは, 入射レーザー光強度の違いを補正し, 各イメージ共通の SHG 強度となっている。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。

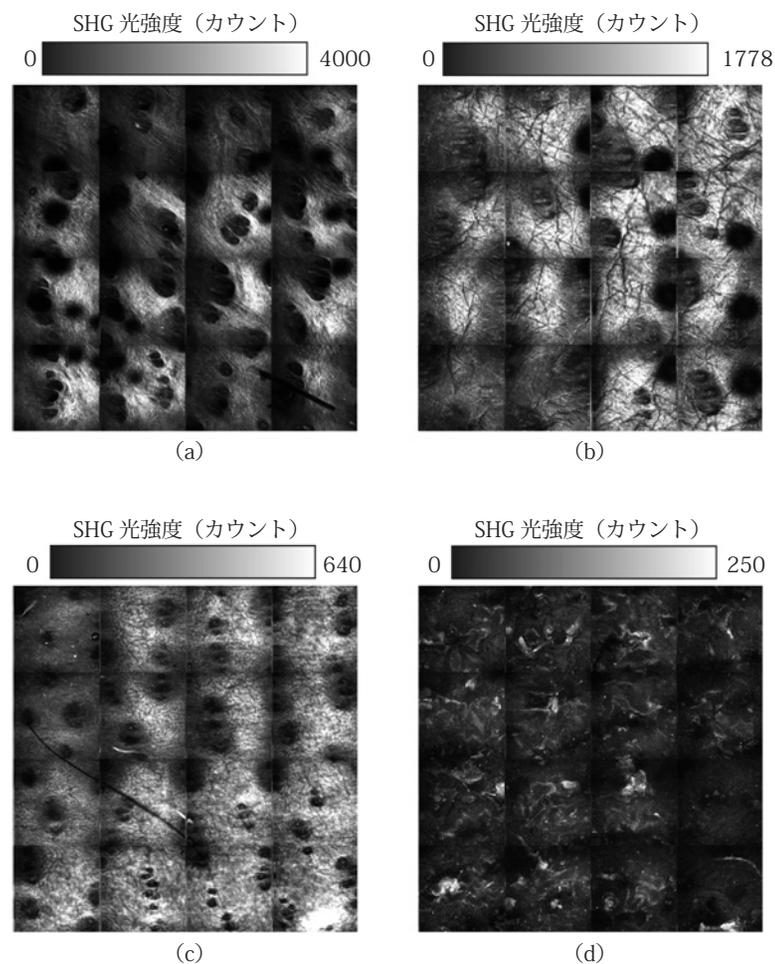


図 10 各熱傷皮膚における大面積 SHG イメージ (イメージ領域=サイズ 2.4 mm*2.4 mm, 測定深度 80 μ m)

また、図 11 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 $0 \mu\text{m}$)とし、そこから $10 \mu\text{m}$ 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。

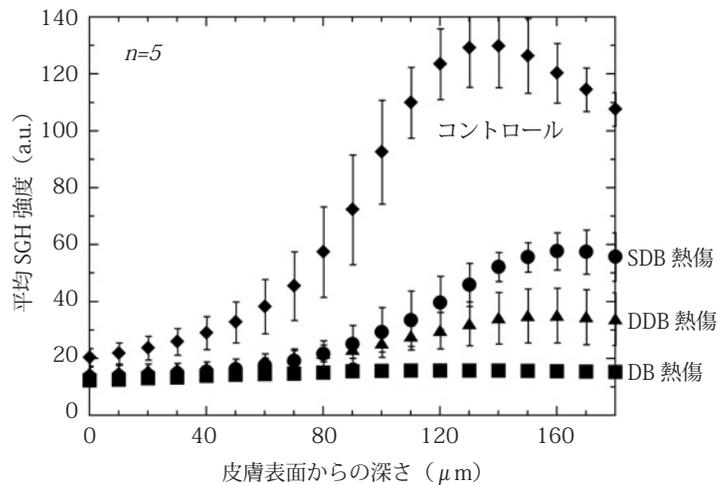


図 11 各熱傷における SHG 強度の深さ分布

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が可能になる。皮膚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。市販されている非線形光学顕微鏡は、通常、SHG 顕微鏡としても利用可能なので¹²⁾、今後は実用レベルでの利用が加速されるであろう。

文 献

- 1) B. Eyden and M. Tzaphlidou, *Micron*, **32**, 287-300 (2001)
- 2) V. J. James, L. Delbridge, S. V. McLennan, and D. K. Yue, *Diabetes*, **40**, 391-394 (1991)
- 3) S. Osaki, *Anat. Rec.*, **254**, 147-152 (1999)
- 4) B. K. Milthorpe, G. J. Rogers, and K. Schindhelm, *Med. Biol. Eng. Comput.*, **26**, 161-166 (1988)
- 5) S. Osaki, *Anat. Rec.*, **263**, 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, *Science*, **254**, 1178-1181 (1991)
- 7) J. F. de Boer, T. E. Milner, and J. S. Nelson, *Opt. Lett.*, **24**, 300-302 (1999)
- 8) T. Yamashita, H. Akita, S. Astner, M. Miyakawa, E. A. Lerner, and S. González, *Exp. Dermatol.*, **16**, 905-911 (2007)
- 9) W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7075-7080 (2003)
- 10) 例えば, <http://www.vivosight.com>

- 11) 例えば, <http://www.caliberid.com>
- 12) 例えば, <http://www.jenlab.de>
- 13) S. Roth and I. Freund, *Biopolymers*, **20**, 1271-1290 (1981)
- 14) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, *J. Biomed. Opt.*, **9**, 259-264 (2004)
- 15) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, *Appl. Opt.*, **43**, 2861-2867 (2004)
- 16) T. Yasui, T. Sasaki, Y. Tohno, and T. Araki, *Opt. Quantum Electron.*, **37**, 1397-1408 (2006)
- 17) 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, *光学*, **36**, 35-40 (2007)
- 18) T. Yasui, Y. Takahashi, M. Ito, S. Fukushima, and T. Araki, *Appl. Opt.*, **48**, D88-D95 (2009)
- 19) T. Yasui, Y. Takahashi, S. Fukushima, Y. Ogura, T. Yamashita, T. Kuwahara, T. Hirao, and T. Araki, *Opt. Express*, **17**, 912-923 (2009)
- 20) T. Yasui, M. Yonetsu, R. Tanaka, Y. Tanaka, S. Fukushima, T. Yamashita, Y. Ogura, T. Hirao, H. Murota, and T. Araki, *J. Biomed. Opt.*, **18**, 031108 (2013)
- 21) R. Tanaka, K. Sasaki, Y. Tanaka, S. Fukushima, H. Murota, K. Matsumoto, T. Araki, and T. Yasui, *J. Biomed. Opt.*, in reviewing.
- 22) P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler, *Biophys. J.*, **82**, 493-508 (2002)
- 23) E. J. Droog, W. Steenbergen, and F. Sjöberg, *Burns*, **27**, 561-568 (2001)
- 24) S. Sato, M. Yamazaki, D. Saitoh, H. Tsuda, Y. Okada, M. Obara, and H. Ashida, *J. Trauma*, **59**, 1450-1456 (2005)
- 25) H. Walker and A. Mason, *J. Trauma*, **8**, 1049-1051 (1968)