

組織コラーゲンの SHG（第 2 高調波発生光）イメージングを用いた

皮膚老化診断に関する基礎研究

伊藤誠啓*, 朝稲嘉文*, 安井武史*, 荒木勉*, 山下豊信**, 松永由紀子**, 高橋元次**

*阪大院基礎工 大阪府豊中市待兼山町 1-3

**資生堂ライフサイエンスセンター 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1

ito@sml.me.es.osaka-u.ac.jp

要旨

皮膚の張りや弾性といった機械的特性は年月が経つにつれ徐々に減退し、老人特有の症状すなわち老化が見られるようになる。このような老化現象は、生理的变化に伴う自然老化と紫外線照射による光老化に分類されるが、いずれにおいても真皮コラーゲン線維が深く関与していると考えられている。一方、皮膚に超短パルス光を照射すると、コラーゲン分子が有する非線形光学特性により第 2 高調波発生光（生体 SHG 光）が真皮より特異的に発生する。この生体 SHG 光を用いることにより、真皮におけるコラーゲン情報のみを抽出し評価することが可能になる。我々は、これまでに生体 SHG 光を用いた真皮コラーゲン計測に関する研究を行っており、本手法がコラーゲン線維構造や配向状態を評価する上で有効であることを確認している。今回、老化制御マウスの皮膚切片サンプルに対して SHG イメージングを適用し、皮膚老化診断に関する基本特性の評価を行った。

1. はじめに

表皮・真皮・皮下組織の 3 層構造を有する皮膚において、真皮は張り・弾性・水分保有等の機能を果たしており、皮膚全体の性質に大きな影響を与えている。真皮には構造タンパク質であるコラーゲン線維が豊富に含まれており、弾性線維であるエラスチン線維と共に様々な構造集合体を形成し、真皮の機械的特性（皮膚の張り等）を決定している。しかし、このような皮膚の機械的特性は年月が経つにつれ徐々に減退し、老人特有の症状すなわち老化が見られるようになる。皮膚の代表的老化症状として皺・皮膚のたるみ・皮膚乾燥・皮膚疾患（色素異常、血管の異常、脂線の異常）等が挙げられる。これらの老人性皮膚変化は、誰しものが発現し、しかも避け得ない不可逆変化である。しかし、皮膚の老化が出現する時期・程度にはかなりの個人差があり、環境因子に大きく左右される。そこで、皮膚の老化は加齢に伴う生理的自然老化と外部環境（紫外線照射）による光老化に分けられ、それぞれの老化現象が研究されている。

自然老化は誰もが避けることの出来ないものであり、細胞自体の老化や数の減少に伴い代謝速度が減退することに起因する老化現象である。例えば真皮では、コラーゲン線維の全量が加齢と共に約 1%ずつ減量する。この変化は、加齢に伴い線維芽細胞の機能が低下する事が要因であると考えられている。コラーゲン線維は老化に伴い細くなり、線維の走行に規則性を失い、互いの

間隙が拡大する。線維束が細くなっていく事が皮膚の張力の減退と萎縮を反映していると考えられる。エラスチン線維は、皮膚の皺やたるみに大きく関与しており、老化程度の浅いエラスチン線維は、比較的均一な太さを持ち表皮に水平に規則正しく走行する。しかし、加齢に伴い線維の太さにバラつきができ、走行も不規則になる。

光老化とは、紫外線を照射された皮膚組織が自然老化とは異なる過程で起こる老化現象である。太陽光の1%にも満たないUVB（波長 280nm～320nm）被曝が主要因であるが、UVA（波長 321nm～400nm）の関与も確認されている。コラーゲン線維の場合、長期 UV 被曝により発生したコラーゲン分解酵素によって分解され、コラーゲン線維が減少する。一方、エラスチンの場合、紫外線照射により真皮内部で炎症が起こり種々の酵素が分泌されるため、通常と異なる変化が発生する。発生した変性エラスチン線維は、生体のメカニズムによって真皮下方に移動し分解される。しかし、紫外線照射が長期にわたる場合、炎症持続により分解速度を上回り変性エラスチン線維は蓄積し、塊状に形成される。非露光部（例えば、尻）では自然老化だけが起こるが、露光部（例えば、顔面）においては自然老化と光老化の両方が進行するので、非露光部に比べて機械的特性を失い易い。このような事から光老化は自然老化と並び皮膚美容分野で重要な問題である。

このような皮膚老化は、コラーゲン線維やエラスチン線維を特異染色し光学顕微鏡で観察を行うことにより、その変化を捉えることが可能である[1]。しかし、このような評価方法は皮膚生検組織に対してのみ有効であり、*in vivo* 計測への拡張は困難である。このような現状から、皮膚真皮における両線維分布情報を *in vivo* で取得する手法が皮膚美容分野で求められている。このような *in vivo* 計測を実現する1つの有用な手法が、コラーゲン由来 SHG 光とエラスチン由来 2光子自己蛍光（TPF 光）の利用であると考えられる[2]。例えば、生体内のコラーゲン線維に様々な処理（熱処理、糖化、酵素分解）を加える事でコラーゲンの非線形感受率が低下し、SHG 光が発生しにくくなる事が報告されている[3]。また、年齢の異なる光老化皮膚組織切片（首筋）では、コラーゲン SHG 光とエラスチン TPF 光の強度コントラストが異なることが報告されている[4]。ここでは、光老化及び自然老化によるコラーゲン線維構造の変化を SHG イメージングにより観察した。

2. 方法

測定には、市販のレーザー走査型共焦点顕微鏡（ニコン、DIGITAL ECLIPSE C1）に波長可変型フェムト秒モード同期チタン・サファイアレーザー（コヒーレント、Chameleon, パルス幅=150fs, 波長可変範囲=750nm～950nm, 繰り返し周波数=90MHz）を光源として組み込むことにより、SHG イメージングや TPF イメージングが可能な多光子顕微鏡を用いた。測定装置を図1に示す。レーザー光は、ND フィルター（NDF）によって強度が調整された後、SHG 光発生効率の偏光依存性をキャンセルするため偏光解消板（DPL）を用いてランダム偏光にしている。ダイクロイック・ミラー（DM）で反射されたレーザービームは、ガルバノミラー（GM）とリレーンズ光学系を経た後、対物レンズ（OL, N. A.=0.95, ×40）でサンプル照射する。サンプルより発生した生体 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=300nm-500nm) でレーザー光成分を除去した後、光電子増倍管 (PMT) で検出する。一方、TPF 光は反射配置で観測可能である。TPF 光の後方散乱成分を同じ対物レンズで集光し、ダイクロイック・ミラー (DM) と青色透過フィルター (BPF) で抽出した後、別の光電子増倍管 (PMT) で検出を行う。最終的に、ガルバノミラーによるビーム走査を用いることにより、高速 SHG イメージング計測を行った。

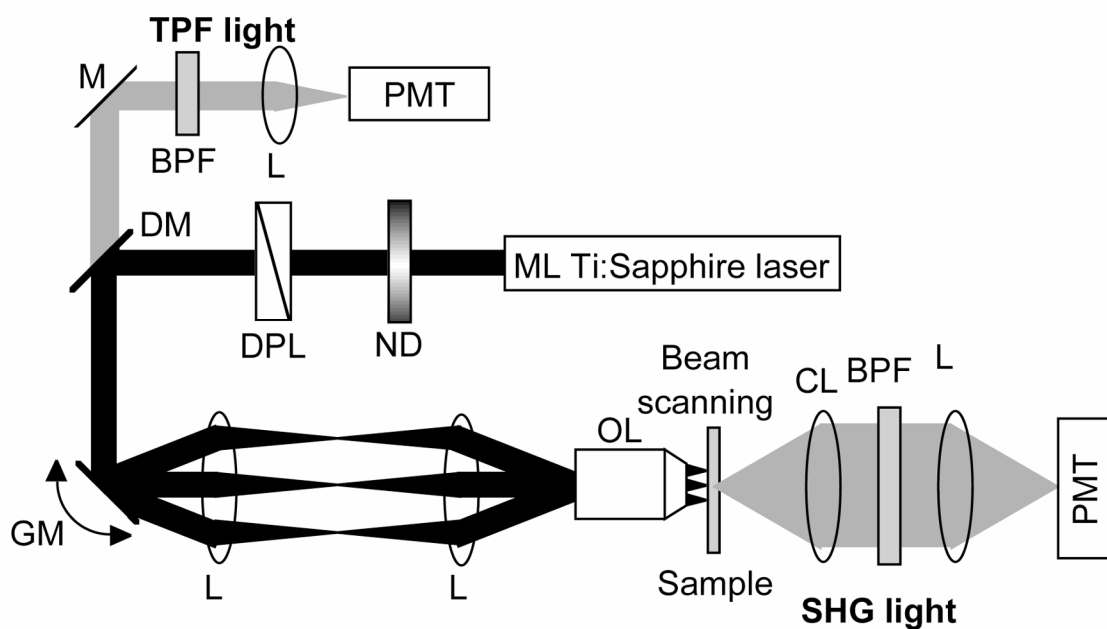


図1 レーザー走査型多光子顕微鏡

測定には、マウス背中皮膚の断層組織切片サンプルを用いた。使用したマウスは、6週齢 (正常マウス)、16週齢 (自然老化マウス)、生後6週から約10週間UVBを持続的 (総計4J) に照射された16週齢 (光老化マウス) である。測定サンプルの光学顕微鏡像 (HE染色) を図2に示す。

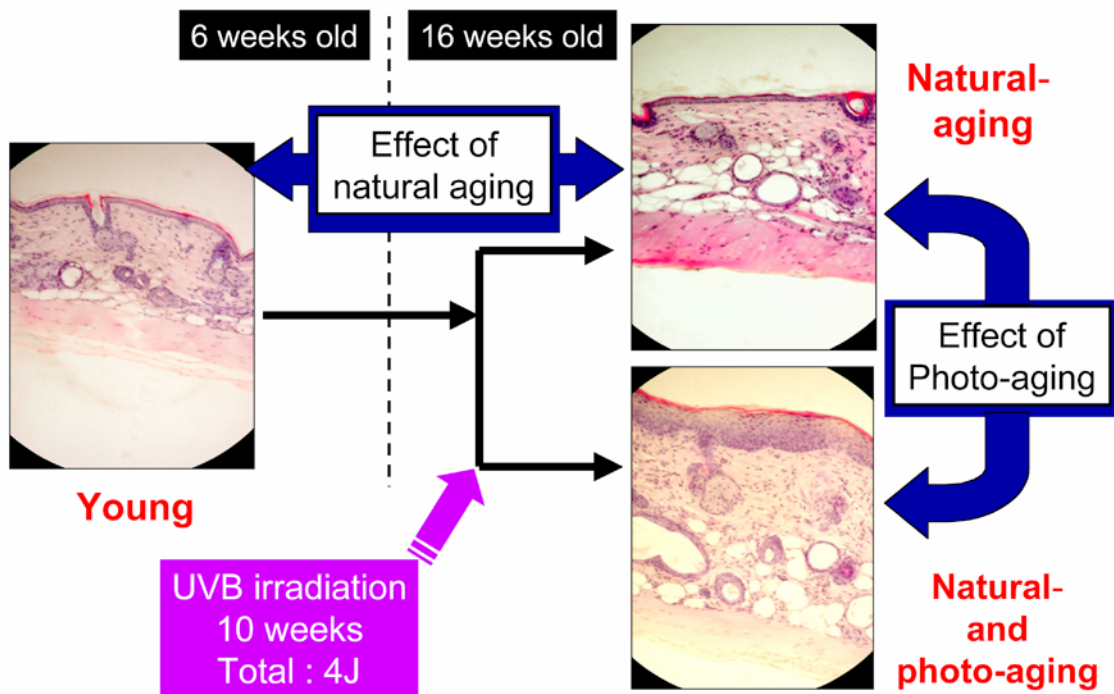


図2 測定サンプル

3. 結果

マウス背中皮膚サンプルの SHG 断層イメージング結果を図 3 に示す。正常マウスでは、太く発達したコラーゲン線維がほぼ横方向に層状に分布している様子が確認された [図 3(a)]。また、SHG 光の強度はその発生領域でほぼ一様であることも分かる。自然老化マウスでは、若干、コラーゲン線維分布に乱れが生じているように見えるが、正常マウスと比較すると顕著な構造分布の違いは確認されなかった [図 3(b)]。自然老化の場合、線維芽細胞の機能低下に伴い、コラーゲン線維は細くなり互いの間隙が拡大するとされているが、SHG イメージではそのような変化は見られなかった。一般にマウスの寿命は 1〜2 年とされているが、今回測定に用いた自然老化サンプルは 16 週齢である。すなわち、16 週齢では線維芽細胞の活性が低下するほど老化が進行しておらず、自然老化マウスと呼ぶには『まだ若い』ということが考えられる。その結果、正常マウスと自然老化マウスに明確な相違が観測されなかったと考えられる。次に、自然老化マウス [16 週齢、図 3(b)] と光老化マウス [16 週齢、図 3(c)] の SHG イメージを比較する。前述したように自然老化マウス (16 週齢) が実際にはほとんど老化していないとすると、両者の比較から光老化による影響を評価できる。実際に SHG イメージを比較してみると、光老化マウスでは表皮-真皮境界の SHG 光強度が減少しているのが特徴的である [図 3(c)の囲み部分]。光老化では、長期 UV 被曝によって発生したコラーゲン分解酵素によってコラーゲンが分解され、コラーゲン線維が減少する。コラーゲン分解酵素の発生量は UV 到達量に依存するので、真皮深さによって異なることになる。すなわち、真皮において一様にコラーゲン線維が減少する自然老化と対照的に、光老化ではコラーゲン線維減少量が真皮深さに依存し、特に表皮-真皮境界付近で最も顕著に減

少すと考えられる。今回の測定結果は、これらの現象を反映した結果であると思われる。このように、マウス背中皮膚組織切片の SHG 断層イメージングから光老化に関連していると思われる変化を検出することができた。今後は、このイメージング結果を画像解析することにより、光老化度を定量的に示すパラメータを抽出する必要がある。

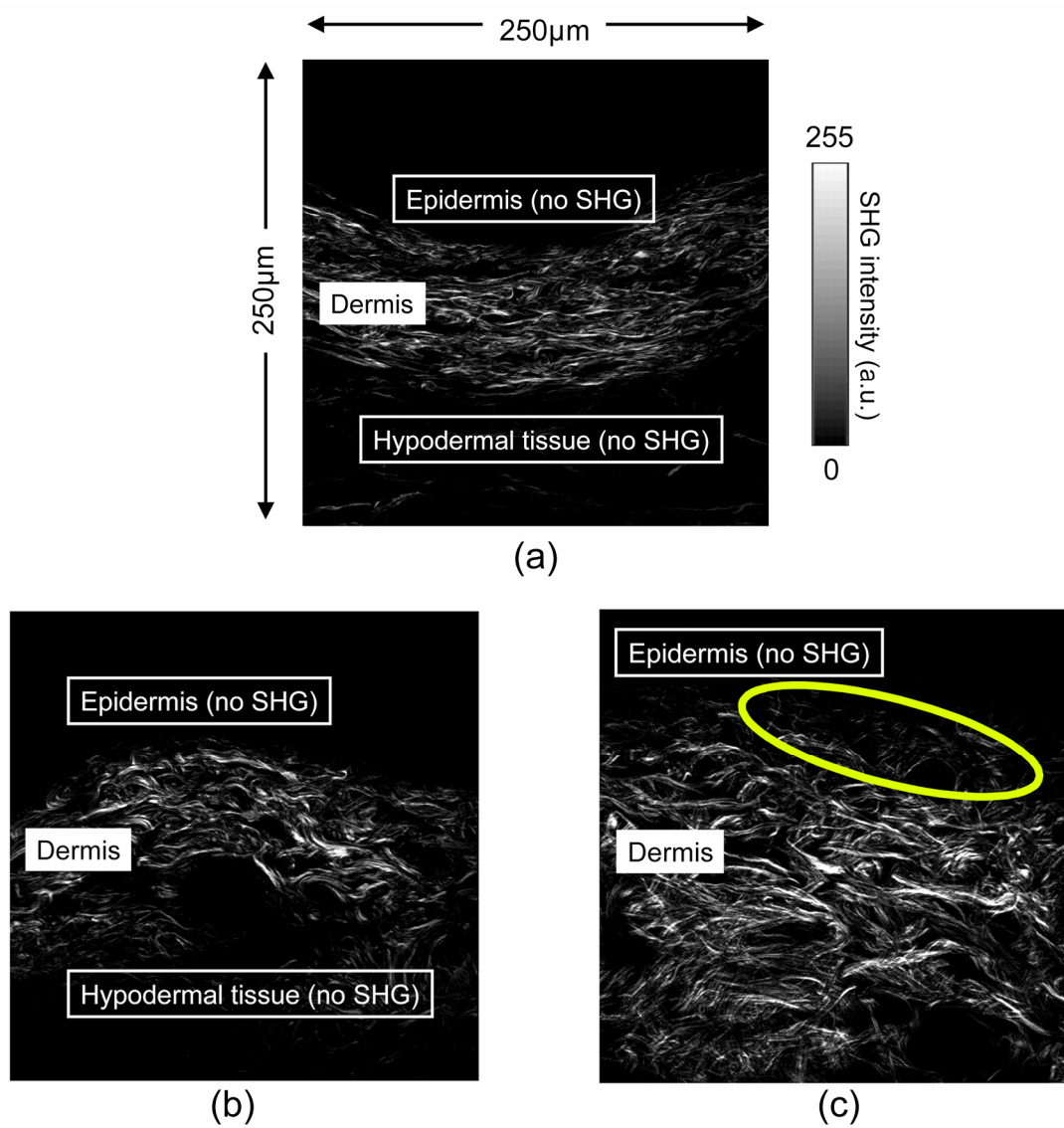


図3 SHG 断層イメージング結果

4. おわりに

生体組織コラーゲン自身が有する非線形光学特性によって誘起される生体 SHG 光を用いると、真皮コラーゲンの非接触リモート計測が可能になる。ここでは、皮膚老化診断に関する基礎研究として、自然老化及び光老化に伴う特徴的な真皮コラーゲン線維分布の変化を、SHG イメージングを用いて捉えることを試みた。その結果、光老化真皮では表皮境界付近の真皮コラーゲン線維からの生体 SHG 光が減少することを確認した。

5. 参考文献

- [1] L. H. Kligman, E. Schwartz, A. N. Sapadin, and A. M. Kligman, "Collagen loss in photoaged human skin is overestimated by histochemistry", *Photodermatology, Photoimmunology and Photomed.* **16**, pp. 224-228 (2000).
- [2] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Yu Nikitin, B. T. Hyman, W. W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation," *PNAS* **100**, pp. 7075-7080 (2003).
- [3] B.-M. Kim, J. Eichler, K. M. Reiser, A. M. Rubenchik, and B. Da Silva, "Effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity", *Lasers in Surgery and Medicine* **27**, pp. 329-335 (2000).
- [4] S.-J. Lin, R.-J. Wu, H.-Y. Tan, W. Lo, W.-C. Lin, T.-H. Young, C.-J. Hsu, J.-S. Chen, S.-H. Jee, and C.-Y. Dong, "Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy", *Opt. Lett.* **30**, pp. 2275-2277 (2005).