

## Observation of collagen fiber in dermis by second-harmonic-generation light

○伊藤誠啓 (大阪大学)

安井武史 (大阪大学)

正 荒木 勉 (大阪大学)

Masahiro Ito, Takeshi YASUI, and Tsutomu ARAKI

Osaka University, 1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka

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

http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/

Key Words: collagen, dermis, second-harmonic-generation light, femtosecond light

## 1. はじめに

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、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光学顕微鏡で組織診断をするが、皮膚生検が必要である。そこで、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。

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2高調波発生光 (生体 SHG 光) として発生する。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 [1-3]。皮膚の場合、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。本講演では、動物試料における真皮コラーゲンの詳細な構造分布測定を報告する。

## 2. 実験装置

図1に実験装置を示す。モード同期チタン・サファイアレーザー (中心波長 800nm、パルス幅 100fs、繰り返し周波数 80MHz) から出力されたレーザー光は、音響光学変調器 (AOM) で強度変調された後、ガルバノミラー (GM) とリレーレンズ光学系 (L1, L2) を経て、対物レンズ (OL) でサンプルに照射する。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。薄切片サンプルの場合、透過配置を用いて発生した生体 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 (BPF1、透過波長 = 300-500nm) 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、厚みのあるサンプルでは反射配置を利用し、生体 SHG 光の後方散乱成分を同じ対物レンズで集光し、ハーモニクセパレーター (HS、反射波長 400nm) と青色透過フィルター (BPF2、透過波長 = 300-500nm) 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 $\mu$ m) とレンズ (L4) を用いた共焦点配置を導入している。最終的に、ステッピング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 $\mu$ m と 14 $\mu$ m である。

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。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 $\mu$ m) をコントロールとして用意した。反射配置計測では、表皮を剥離した凍結豚真皮組織ブロック (厚さ 3mm) をサンプルとして用いた。

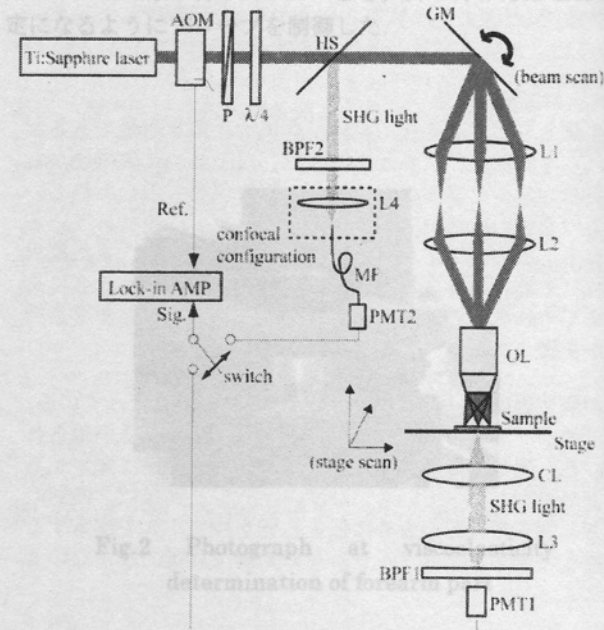


Fig. 1 Experimental setup.

### 3. 実験結果

組織切片サンプルの測定には、長作動距離対物レンズ (N.A.=0.42、倍率=20倍、作動距離=20mm、ドライ) を用い、入射レーザーパワーは5mWに設定した。得られたSHGイメージ(400 $\mu$ m\*400 $\mu$ m)を図2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。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2(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2(b)]。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、図2(b)では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叉した網状分布が部分的に確認できる [図2(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2(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のみを特異的に抽出することが可能になる。

次に、豚真皮組織ブロック(厚さ3mm)の深さ分解

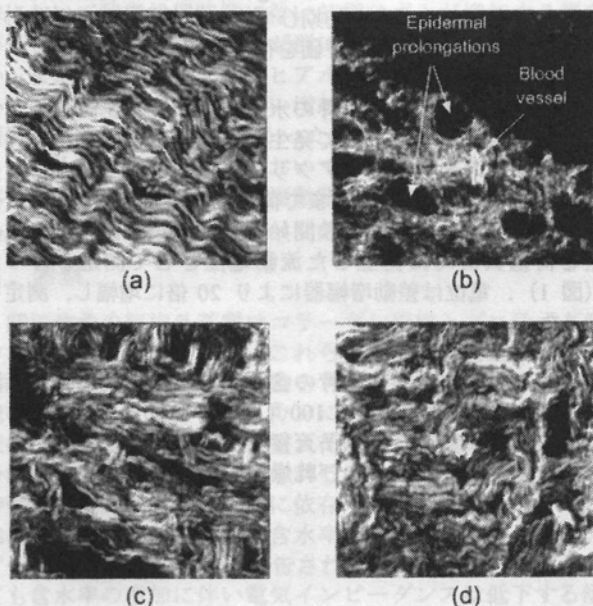


Fig. 2 SHG images of sliced samples.

SHGイメージングを反射共焦点配置で行った。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・セクショニング)を行った。図3は各測定深度(10 $\mu$ m毎)で得られたSHGイメージ(100 $\mu$ m\*100 $\mu$ m)を示している。反射配置における測定SN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キメの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(図2)と一致しており、真皮コラーゲン線維の3次元の特徴が本手法によってとらえられている。

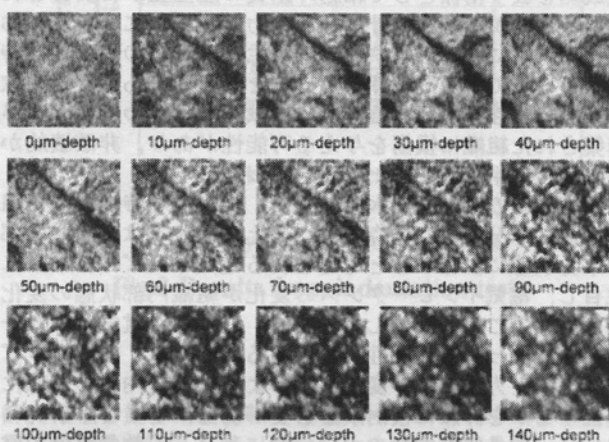


Fig. 3 Optical-sectioning SHG images of porcine dermis.

### 4. まとめ

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、本手法が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。

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

### 参考文献

- [1] 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**, pp. 259-264 (2004).
- [2] 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**, pp. 2861-2867 (2004).
- [3] 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**, pp. 1397-1408 (2005).