

非線形光学顕微鏡を用いた光老化部位における  
ヒト真皮構造変化の *in vivo* 評価に関する研究

2018 年 9 月

小倉 有紀

# 目次

## 第1章 はじめに

## 第2章 皮膚と老化

### 2.1. 皮膚の構造

### 2.2. 皮膚の老化

## References

## 第3章 皮膚計測

### 3.1. 染色法

### 3.2. 皮膚粘弾性測定装置 (Cutometer)

### 3.3. 2光子蛍光顕微鏡

### 3.4. 第2高調波発生光 (SHG) 顕微鏡

## References

## 第4章 SHG 画像解析を用いたヒト真皮コラーゲン線維構造の定量評価

### 4.1. イントロダクション

### 4.2. 実験方法

#### 4.2.1. SHG 顕微鏡

#### 4.2.2. 2次元自己相関法 (2D-AC 法)

#### 4.2.3. 弾力性評価

#### 4.2.4. ヒト皮膚計測

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. 加齢による SHG 画像変化の特徴

#### 4.3.2. テクスチャ解析によるコラーゲン線維構造評価

#### 4.3.3. コラーゲン線維評価と皮膚弾力性との関連

### 4.4. 考察

## References

### 第5章 SHG 顕微鏡の小型化

#### 5.1. イントロダクション

#### 5.2. 実験方法

##### 5.2.1. 可搬型 SHG 顕微鏡

##### 5.2.2. ヒト皮膚計測

#### 5.3. 実験結果

##### 5.3.1. 超短パルス光のファイバー伝送

##### 5.3.2. 小型 SHG 顕微鏡ユニットのイメージング特性評価

##### 5.3.3. ヒト皮膚 *in situ* 計測

#### 5.4. 考察

## References

### 第6章 まとめ

# 第1章 はじめに

老化は、誕生/成長/成熟/退行という生物ライフサイクルにおいて成熟期以降におこる心身の変化をさし、「普遍性（必ず起こる）」、「内在性（発現が遺伝的に決定されている）」、「進行性（必ず進行し後戻りはしない）」、「有害性（必ず身体に不利をもたらす）」という特徴を有していることから、避けることの出来ない生理的現象である。特に、身体の外側を覆い外部刺激から保護している皮膚では、内因性と外因性の老化が複合された複雑な挙動を示す。皮膚の老化は、大別すると2つのタイプに分けられる。内因性の老化は自然老化（intrinsic aging）と称され、紫外線に曝されることで生じる外因性老化（extrinsic aging）は光老化（photo aging）と呼ばれる。自然老化は被服に覆われて紫外線に露光されていない部位（腹部、上腕内側部、臀部など）で支配的であるのに対し、外因性（光）老化は被服に覆われず紫外線に露光されている部位（顔面、頸部、後耳介部など）で顕著である。例えば、露光部皮膚ではシワなどの老徴が被服に覆われている非露光部皮膚よりも早期かつ顕著に現れる。

光老化が最も顕著に現れる部位は「顔」である。皮膚は身体において最も面積が広い（約  $1.6\text{m}^2$ ）臓器と言われているものの、「顔」を占める皮膚の面積は皮膚全体のわずか  $4.5\%$ （ $0.09\text{m}^2$ 、 $30\text{cm}\times 30\text{cm}$  程度）にすぎない[1]。しかし身体の中では最も日光に曝されている部分のため最もダメージを受ける一方で、他人の目に最も晒されることから本人が最も気に掛ける部位である。これまで、顔に現われる皮膚の老化は時間の流れには抗えないもので、年をとれば誰もが避けることができずシワたるみができるものと思われてきたが、「顔」で見られる老化の多くは実は長年にわたり日光を浴びてきたことによる光老化の影響が大きいことが明らかになってきた。シワなどの老徴の約8割は光老化によるものであるとの指摘もある[2]。もちろん、日常生活の中で、紫外線を全く浴びずに過ごす

ことはできないので、平均的には年齢層が高くなるほど紫外線によるダメージは蓄積する。しかし加齢スピードを遅くすることは可能である。その証拠に、近年の美白ブームによりサンスケアの概念が浸透している日本人女性と比較して、小麦色の肌を長期間バカンスに行ける富の象徴として日焼けを好む欧米人女性は、シワ、しみなどの老徴が現れるのが日本人よりも、格段に早い。また日本の北と南では年間の紫外線照射量が 1.5 倍～2 倍程度異なるが、秋田と鹿児島的女性を比較すると、シワの発生率が 6 歳程度異なると言った報告もある[3]。更に、光老化は単なる外見の見てくれだけでなく、過剰な光老化が皮膚ガンの発生リスクを高めることから、皮膚医療という観点でも重要である。

皮膚は、表皮/真皮/皮下組織という 3 層構造を有しており、表皮が外界からの刺激から身体を防御しているのに対し、真皮は皮膚の形態や機械的性質を決定する上で重要な役割を担っている。真皮は、主にコラーゲンとエラスチンと呼ばれる主要な構造タンパクから構成されており、これらがシワやたるみといった皮膚老化と深く関連している。例えば、紫外線を過剰に浴びた顔皮膚では、真皮コラーゲン線維が著しく減少するだけでなく、減少したスペースを占有するかのように真皮エラスチン線維が異常に沈着する。この現象は日光弾性線維症（Solar elastosis/Actinic elastosis）として知られており、非露光部では全く生じず、露光部位のみで生じる現象である。これらのことから、顔皮膚では、自然老化と光老化が異なる時間進行軸で混在しながら進んでおり、実年齢よりも紫外線曝露履歴が高感度に反映される。したがって、実年齢とは独立した手法で、真皮におけるコラーゲン線維やエラスチン線維の老化性構造変化を定量的に評価することが、アンチエイジングや皮膚美容といった皮膚科学領域で望まれている。

しかし、これまで、顔の皮膚老化に関する研究は、あまり進んでこなかった。なぜならば、顔は「最も注目される部位」であるため、「最も傷をつけてはいけない部位」だからである。皮膚老化は生理現象ではあるが疾病ではないので、侵襲的なサンプリング

(生検)は好まれない。特に、健全な若年女性の顔面皮膚生検はほとんど不可能であることから、健全・若年女性の「顔面」における光老化の進行についての知見は未だ十分に蓄積されていない。また、光老化を受ける「顔面」は、個人の生活環境/居住地域の影響が大きいと推測されるものの、皮膚内部にどの程度、ダメージを与えるかといった知見もない。これらのことから侵襲性の低い皮膚計測手法で評価する必要性が高まっている。

近年、超音波や光を用いた様々な低侵襲皮膚観察方法が開発され、化粧品・医薬品の肌への効果の検証のみならず、再生医療、臨床応用等を含めて、幅広い分野での応用が検討されている。超音波エコー、共焦点レーザー顕微鏡、光コヒーレンストモグラフィ(OCT: optical coherence tomography)といった計測手段は、すでに医療現場で使用されている。超音波エコーは、超音波パルスの伝搬時間から生体断層構造を可視化し、その良好な生体深達度により、皮膚よりも更に深部の生体組織(筋肉、心臓や肺など)の可視化が可能である。日常的にも馴染み深い機器であり、胎児の診断や、しこり、ガンの発見など、様々な医療診断に使われている。しかし、一般の超音波エコー装置で利用される低周波数の超音波では解像度が不十分で、皮膚内部構造を詳細に認識することが難しかった。近年、超音波を高周波化(20~50MHz)することにより解像度が向上し[4]、皮膚分野の応用は広がり始めている。レーザー共焦点顕微鏡は、点光源/焦点/点検出器を共役な配置として画像に共焦点性(深さ分解能、迷光除去など)を付与している。皮膚透過性の高い波長帯のレーザー光源を用いることにより、光波長オーダーの解像度での3次元イメージングが可能である。レーザー治療によるメラニン破壊の観察や悪性黒色腫(メラノーマ)の診断の診断などに用いることができる[5,6]。光コヒーレンストモグラフィ(OCT: optical coherence tomography)は、光源の低コヒーレンス性を利用して、散乱光を除去しながら深さ情報を取得する。非接触/非侵襲/高解像度/高速に断層イメージングを取得できる。皮膚科領域では、ドップラーシフトに基づいた血流の可視化から、血管領域を選択的に計測する方法として

利用されている[7]。また、コラーゲン線維が構造複屈折を有するので、皮膚組織の複屈折分布を偏光感受型 OCT で計測することで、コラーゲン分布を可視化する試みも報告されている[8,9]。しかし、これらの手法で取得できるのは各種生体構成成分の情報が重畳した空間分布情報であり、特定成分を選択的に可視化することは容易でなかった。もし、皮膚性状や皮膚老化に深く関連した真皮コラーゲン線維や真皮エラスチン線維を非侵襲に可視化出来れば、皮膚老化に関する詳細な知見を得ることが出来る。PS-OCT は、コラーゲン線維構造の複屈折性に基づいたコラーゲン選択性を有していると言えるが、複屈折性が極めて小さいため、高コントラストに可視化することは困難であった。

近年、新しいバイオイメージング手段として非線形光学顕微鏡が注目されている。非線形光学顕微鏡は、近赤外超短パルス光電場と物質の非線形相互作用に基づいた光学顕微鏡であり、非接触リモート/ $\mu\text{m}$  空間分解/ optical sectioning/ 3次元イメージング/低侵襲/深浸透性といった特徴を有している。これまでに、多光子蛍光顕微鏡[10]、高調波発生光顕微鏡[11]、非線形ラマン散乱顕微鏡[12]などが報告されている。特に、真皮におけるコラーゲン線維とエラスチン線維の可視化という観点からは、2次の非線形波長変換過程を利用する第2高調波発生光(SHG)顕微鏡と、2光子吸収過程を利用する2光子蛍光(TPF)顕微鏡が興味深い。SHG 顕微鏡は、コラーゲン分子を構成するポリペプチド三重螺旋構造に選択性を有するので、真皮コラーゲン線維を可視化する手段として利用できる。これまでに皮膚[13,14]、角膜[15]、骨[16]、軟骨[17]、腱[18]等の様々な組織コラーゲンの観察に応用されている。また、非侵襲観測の特徴を利用し、熱傷/創傷の治癒過程モニタリング[19]や骨芽細胞培養モデルのコラーゲン産生過程モニタリング[20]にも応用されている。一方、TPF 顕微鏡は、2光子励起波長の選択により自家蛍光性の生体構成物質を選択的に可視化出来るので、真皮エラスチン線維を可視化する手段として利用でき正常皮膚における加齢などの変化の指標[21-23]としてだけではなく、体幹部位の変化[24,25]、ケロイドや癬痕の

評価の指標[26,27]としても検討されている。しかし、これらの顕微鏡を顔面における皮膚老化の定量評価に適用した報告例は少ない。

本博士研究では、生検が特に困難で知見が得られにくかった健常女性の顔面における老化変化を観察対象とし、主に SHG 顕微鏡を用いた非侵襲計測を実施した。ここでは、以下の項目に焦点を絞り、「美容を対象とする皮膚評価」や「皮膚老化の予見などの診断」に応用できる評価方法と基礎知見を得ることを目的とした。

- ・ SHG 画像解析を用いたヒト頬真皮コラーゲン線維構造の定量的評価
- ・ 可搬型 SHG 顕微鏡の開発

本論文では第 1 章で序論を述べたのち、第 2 章では皮膚老化に関して概説する。第 3 章では、各種皮膚計測手法についてレビューし、先行研究と本研究の差別化のための知識を与える。引き続き、第 4 章では SHG 画像解析による真皮コラーゲン線維構造の定量的指標の抽出について、第 5 章では真皮コラーゲン線維計測の実用化を加速する可搬型 SHG 顕微鏡について述べ、顔面露光部における真皮老化の新しい観察手法および評価方法について提案する。最終章において、本研究のまとめおよび今後の展望について述べる。



## References

- [1] M. W. Mann, D. R. Berk, D. L. Popkin, S. J. Bayliss, *Handbook of Dermatology: A Practical Manual*. 2009.
- [2] 宮地良樹, “皮膚のフォトエイジング (光老化)”, *眼科*, vol. 50, no. 4, pp. 421–428, 2008.
- [3] 市橋正光, “皮膚の光老化とサンケアの科学“, フレグランスジャーナル社, 2000.
- [4] J. P. Woodcock, *Ultrasonics Medical Physics Handbook*, Vol.1. 1979.
- [5] T. Yamashita, T. Kuwahara, S. González, M. Takahashi, “Non-invasive visualization of melanin and melanocytes by reflectance-mode confocal microscopy”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 124, no. 1, pp. 235–240, 2005.
- [6] T. Yamashita, H. Akita, S. Astner, M. Miyakawa, E. A. Lerner, S. González, “In vivo assessment of pigmentary and vascular compartments changes in UVA exposed skin by reflectance-mode confocal microscopy”, *Exp. Dermatol.*, vol. 16, no. 11, pp. 905–911, 2007.
- [7] U. Baran, W. J. Choi, R. K. Wang, “Potential use of OCT-based microangiography in clinical dermatology”, *Ski. Res. Technol.*, vol. 22, no. 2, pp. 238–246, 2016.
- [8] Y. Yasuno, S. Makita, Y. Sutoh, M. Itoh, T. Yatagai, “Birefringence imaging of human skin by polarization-sensitive spectral interferometric optical coherence tomography”, *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 20, pp. 1803–1805, 2002.
- [9] S. Sakai, M. Yamanari, A. Miyazawa, M. Matsumoto, N. Nakagawa, T. Sugawara, K. Kawabata, T. Yatagai, Y. Yasuno, “In vivo three-dimensional birefringence analysis shows collagen differences between young and old photo-aged human skin”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 128, no. 7, pp. 1641–1647, 2008.
- [10] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, “Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy”, *Science.*, vol. 248, no. 4951, pp. 73–76, 1990.
- [11] P. J. Campagnola C.-Y. Dong, “Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis”, *Laser Photon. Rev.*, vol. 5, no. 1, pp. 13–26, 2011.
- [12] A. Zumbusch, G. R. Holtom, X. S. Xie, “Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering”, *Phys. Rev. Lett.*, vol. 82, no. 20, pp. 4142–4145, 1999.
- [13] K. Lu, J. Chen, S. Zhuo, L. Zheng, X. Jiang, X. Zhu, J. Zhao, “Multiphoton laser scanning microscopy of localized scleroderma”, *Ski. Res. Technol.*, vol. 15, no. 4, pp. 489–495, 2009..

- [14] R. Cicchi, D. Kapsokalyvas, V. De Giorgi, V. Maio, A. Van Wiechen, D. Massi, T. Lotti, F. Pavone, “Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy”, *J. Biophotonics*, vol. 3, no. 1–2, pp. 34–43, 2010.
- [15] L. Kowalczyk, G. Latour, J. L. Bourges, M. Savoldelli, J. C. Jeanny, K. Plamann, M. C. Schanne-Klein, F. Behar-Cohen, “Multimodal Highlighting of Structural Abnormalities in Diabetic Rat Human Corneas”, *Transl. Vis. Sci. Technol.*, vol. 2, no. 2, p. 3, 2013.
- [16] R. Ambekar, M. Chittenden, I. Jasiuk, K. C. Toussaint, “Quantitative second-harmonic generation microscopy for imaging porcine cortical bone: Comparison to SEM and its potential to investigate age-related changes”, *Bone*, vol. 50, no. 3, pp. 643–650, 2012.
- [17] J. C. Mansfield, C. P. Winlove, J. Moger, S. J. Matcher, “Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy”, *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 4, p. 44020, 2008.
- [18] C. Y. Park, J. K. Lee, M. Y. Kahook, J. S. Schultz, C. Zhang, R. S. Chuck, “Revisiting ciliary muscle tendons and their connections with the trabecular meshwork by two photon excitation microscopic imaging”, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 57, no. 3, pp. 1096–1105, 2016.
- [19] T. Yasui, R. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, T. Araki, “In vivo time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy”, *Proceedings of SPIE*, 2014, p. 89480B.
- [20] E. Hase, O. Matsubara, T. Minamikawa, K. Sato, T. Yasui, “In situ time-series monitoring of collagen fibers produced by standing-cultured osteoblasts using a second-harmonic-generation microscope”, *Appl. Opt.*, vol. 55, no. 12, p. 3261, 2016.
- [21] M. Kaatz, A. Sturm, P. Elsner, K. König, R. Buckle, M. J. Koehler, “Depth-resolved measurement of the dermal matrix composition by multiphoton laser tomography”, *Ski. Res Technol*, vol. 16, no. 2, pp. 131–136, 2010.
- [22] S. J. Lin, R. Jr Wu, H. Y. Tan, W. Lo, W. C. Lin, T. H. Young, C. J. Hsu, J. S. Chen, S. H. Jee, C. Y. Dong, “Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy”, *Opt Lett*, vol. 30, no. 17, pp. 2275–2277, 2005.
- [23] M. J. Koehler, K. König, P. Elsner, R. Buckle, M. Kaatz, “In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography”, *Opt Lett*, vol. 31, no. 19, pp. 2879–2881, 2006.
- [24] M. J. Koehle, A. Preller, N. Kindler, P. Elsner, K. König, R. Bückle, M. Kaatz, “Intrinsic, solar and sunbed-induced skin aging measured in vivo by multiphoton laser tomography and biophysical methods”, *Ski. Res Technol*, vol. 15, no. 3, pp. 357–363, 2009.

- [25] K. Sugata, O. Osanai, T. Sano, Y. Takema, “Evaluation of photoaging in facial skin by multiphoton laser scanning microscopy”, *Ski. Res Technol*, vol. 17, no. 1, pp. 1–3, 2011.
- [26] M. E. Darvin, H. Richter, S. Ahlberg, S. F. Haag, M. C. Meinke, D. Le Quintrec, O. Doucet, J. Lademann, “Influence of sun exposure on the cutaneous collagen/elastin fibers and carotenoids: negative effects can be reduced by application of sunscreen”, *J Biophotonics*, vol. 7, no. 9, pp. 735-743. 2014.
- [27] C. Czekalla, K. H. Schönborn, N. Döge, S. Jung, M. E. Darvin, J. Lademann, M. C. Meinke “Body regions have an impact on the collagen/elastin index of the skin measured by non-invasive in vivo vertical two-photon microscopy”, *Experimental Dermatology*, vol. 26, no. 9, pp. 822–824, 2017.

## 第2章 皮膚と老化

### 2.1 皮膚の構造

身体で最大の面積を持つ皮膚は、大別すると表皮・真皮・皮下組織の三層構造からなる。表皮は水分保持および外界から生体を保護するバリア機能の役割を担っているのに対して、真皮は皮膚の形態や力学特性を決定する役割を担っている。真皮の主要な、構成成分はコラーゲンであり、その量は乾燥重量で70%以上に達する。次に多い構成成分はエラスチンであるが、コラーゲンに比べて少なく、0.6~2%といった報告もある[1]

コラーゲンは、しめ縄のように何重にも結われた高次構造（線維束と呼ばれる状態）で存在している。すなわちコラーゲン分子（トロポコラーゲン）がより集まって細線維を形成し、細線維がより集まって線維を形成し、それがさらにより集まって線維束を形成することで、線維束が形成されている。さらにこの線維束は、格子（網目）状、すなわちコラーゲン線維ネットワークパターンを形成することで皮膚の土台となる強靱な真皮構造を形成している（図2-1）。動きを伴う部位においては、真皮は強靱なだけでなく、力学負荷に応じた変形と、変形が元の形に戻る柔軟性も併せ持つ必要がある。特に顔面は、表情筋による複雑な方向への運動がもたらされ、様々な大きさ・方向から力学負荷を受けるため、真皮コラーゲン線維の太さ及び走行（配向）は複雑で、部位差も大きい[2]。

一方、皮膚においてコラーゲンの次に多く含まれる構成成分であるエラスチンは、正常皮膚においては、比率はわずか0.2~3%である。大動脈、肺、声帯、項靱帯など伸縮性に富む器官に多く存在することから、組織に伸縮性を与える重要な役割を果たしていると考えられている。エラスチン線維は細い線維状の形態でコラーゲン線維の間を縫うよう

に存在しており（図 2-2 左図），強靱な土台構造を形成するコラーゲン線維に対して，エラスチン線維は組織に柔軟性と可塑性を与える役割を果たしていると考えられている。

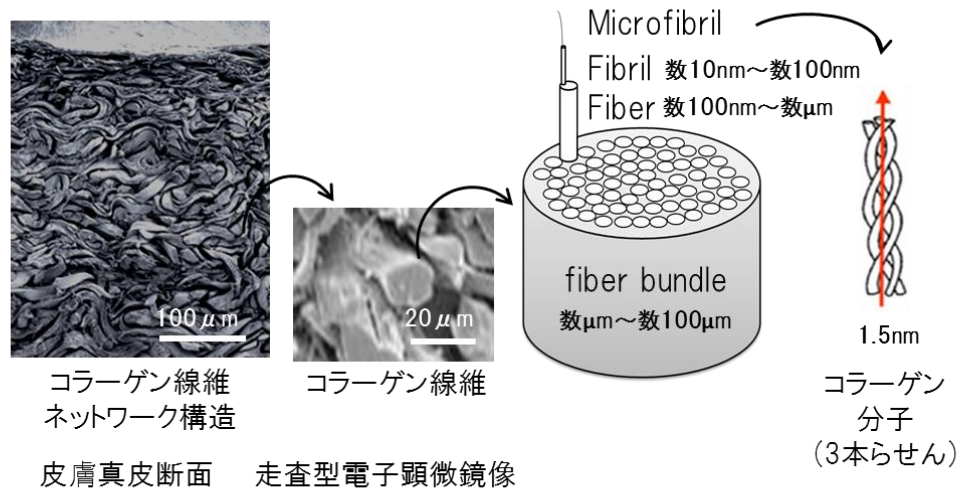


図 2-1 コラーゲンの高次構造

## 2.2 皮膚の老化

コラーゲンは線維芽細胞によって産生されるが，加齢に伴って線維芽細胞の数が減少すると共に活性も低下するので，コラーゲン代謝が遅くなり，コラーゲン量が減る [3]. また，エラスチンは真皮の中層である網状層においてはあまり大きな加齢変化は見られないが，真皮の表層である乳頭層において表皮に向かって垂直に走行する細い線維（オキシタラン線維と呼ばれる）は加齢に伴って減少することが報告されている[4]. これらの変化は紫外線に曝されない部位においてみられる加齢変化であり，自然老化（または内因性老化）と称され，紫外線に曝されている部位で見られる老化（光老化）とは区別される．紫

外線に曝されている部位、顔面などの露光部位では、表皮細胞および真皮線維芽細胞から産生されるコラーゲン分解酵素群である MMPs（マトリックスメタロプロテイナーゼ群）の発現/活性が上昇するため[5]、自然老化に伴う代謝の低下と平行して、コラーゲンの分解が進む。紫外線ダメージを受ける頻度が高く、ダメージが繰り返されると分解はさらに亢進して、著しいコラーゲン線維の減少および線維構造の変化がみられる [4][6,7]。一方でコラーゲンの次に皮膚に多く含まれる構成成分であるエラスチンは、自然老化（エラスチンが減少および退縮する）とは全く逆の現象が生じることが知られている。すなわちコラーゲン線維が著しく減少した空間を占有するように異常に沈着（凝集）することが病理組織学的に確認されている（図 2-2）（光老化）。これは皮膚科においては日光弾性線維症と呼ばれ、最も有名な症例の 1 つである[1][8-10]。漁師や農家の方など、アウトドアでの作業が長時間・長期間にわたるケースにおいて、顔面や首筋などの深いシワを形成する主要因と考えられている。特に項部（首の後ろ）は、症状が進むと、深い皮溝（しわ）が斜めに交差し、皮溝に囲まれた部位が菱形に見えるため、項部菱形皮膚（*cutis rhomboidalis nuchae*）とも呼ばれる。こういった深刻な症状のみならず、エラスチン線維の沈着は、通常の生活においても生じる現象であることから、沈着の仕方を指標に、皮膚がどれだけ紫外線に曝されてきたかを測る紫外線暴露履歴のマーカーとしても用いられている。その方法としては 1969 年にクリーグマンが提唱した、G0～G4 の 5 グレードに分類する方法が有名である[11]。すなわち G0：正常（細い線維状態）、G1：肥厚化を伴わない線維の増加、G2：肥厚化・湾曲化を伴う過形成、G3：肥厚化・湾曲化、分岐を伴う顕著な過形成、G4：線維密度上昇によるもつれた形状、および配向のない無定形な塊の沈着、といったエラスチンの形態を指標にして、光老化の進行度を分類する方法である（図 2-3）。この分類方法はエラスチン沈着が高頻度で見られる真皮中層（真皮乳頭下層から真皮網状層上層）を対象としており、最上部（真皮乳頭層）における変化は対象としていない。このため *in vivo*

多光子顕微鏡で観察されるエラスチン画像の評価に適しているかは不明である。また、病理学的には、表皮直下は、光老化が進行した皮膚でもエラスチンが沈着しないといった認識があり、この一見正常に見えるコラーゲンで構成される層は「グレンツゾーン」(図 2-2)と呼ばれ、皮膚科的知見として良く認識されている。このことから表皮直下(真皮乳頭層)におけるエラスチンの変化にはほとんど注意が払われることがなかった。特に光老化診断の対象とはなりにくい若年者における変化はほとんど注目されていなかった。しかしながら、この領域は *in vivo* 多光子顕微鏡で最も鮮明に観察できる領域であることから、微細な変化を捉えることができれば皮膚老化の徴候を評価する手段として期待できる。

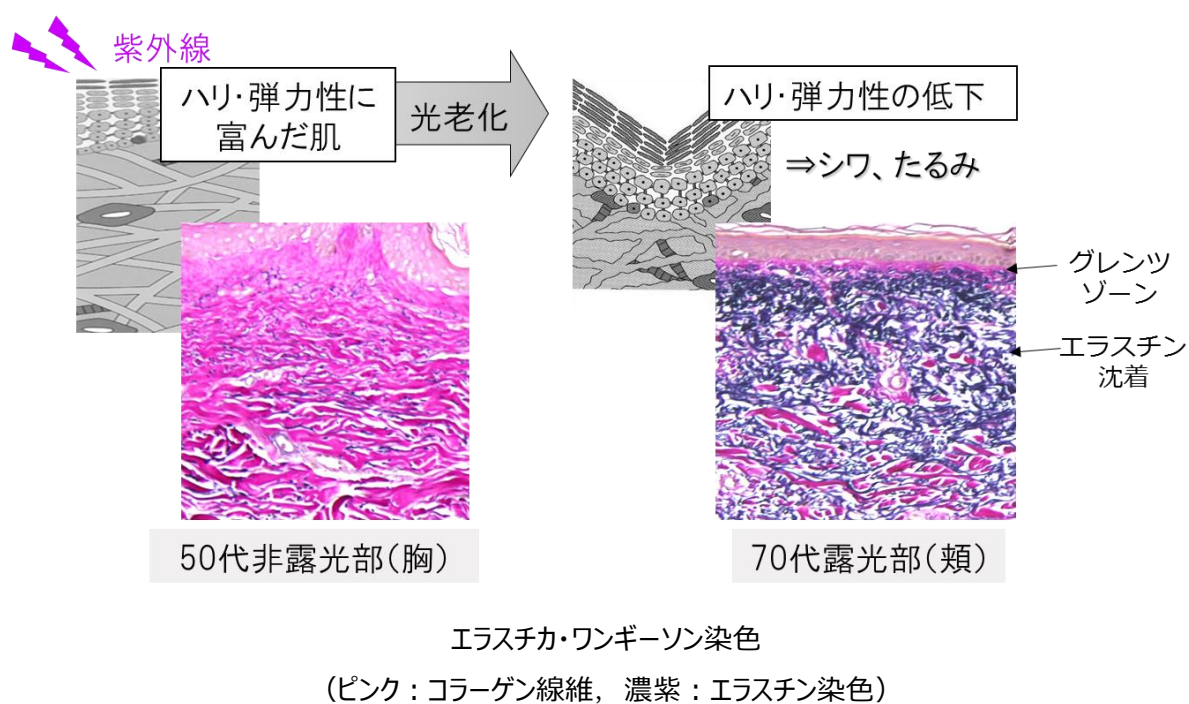
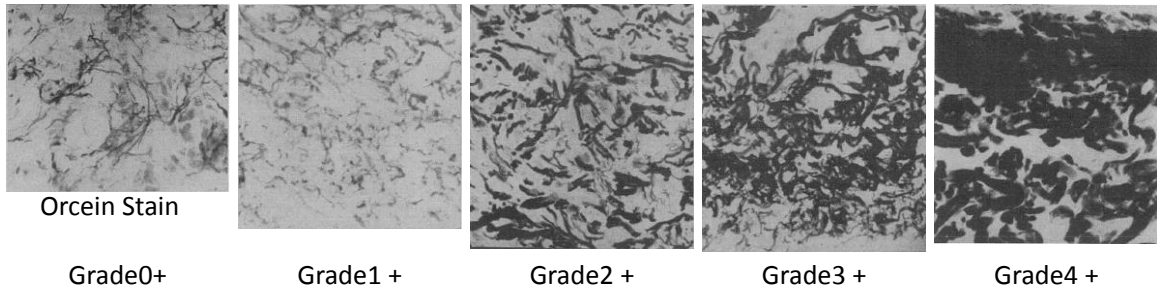


図 2-2 光露光部位におけるエラスチンの変化  
(異常沈着と真皮最上層におけるグレンツゾーンの出現)



Kligman, A. M.: Early destructive effect of sunlight on human skin. JAMA 210: 2377-2380, 1969より抜粋

図 2-3 クリーグマンによるエラスチンを指標とした光老化進行度の分類



## References

- [1] J. Uitto, "Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin", *Dermatol. Clin.*, vol. 4, no. 3, pp. 433–446, 1986.
- [2] A. F. Borges, "Relaxed Skin Tension Lines (RSTL) versus Other Skin Lines", *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 73, no. 1, pp. 144–150, 1984.
- [3] E. Kohl, J. Steinbauer, M. Landthaler, R. M. Szeimies, "Skin ageing", *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 25, no. 8, pp. 873–884, 2011.
- [4] M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, J. Uitto., "Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin", *Exp. Dermatol.*, vol. 11, no. 5, pp. 398–405, 2002.
- [5] G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, J. J. Voorhees, "Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid", *Photochem. Photobiol.*, vol. 69, no. 2, pp. 154–157, 1999.
- [6] R. M. Lavker, "Structural Alterations in Exposed and Unexposed Aged Skin", *J. Invest. Dermatol.*, vol. 73, no. 1, pp. 59–66, 1979.
- [7] C. Edwards, A. Pearse, R. Marks, Y. Nishimori, K. Matsumoto, M. Kawai, "Degenerative Alterations of Dermal Collagen Fiber Bundles in Photodamaged Human Skin and UV-Irradiated Hairless Mouse Skin: Possible Effect on Decreasing Skin Mechanical Properties and Appearance of Wrinkles", *J. Invest. Dermatol.*, vol. 117, no. 6, pp. 1458–1463, 2001.
- [8] C. Frances L. Robert, "Elastin and elastic fibers in normal and pathologic skin", *Int J Dermatol*, vol. 23, no. 3, pp. 166–179, 1984.
- [9] V. L. Chen, R. Fleischmajer, E. Schwartz, M. Palaia, R. Timpl, "Immunochemistry of elastotic material in sun-damaged skin", *J Invest Dermatol*, vol. 87, no. 3, pp. 334–337, 1986.
- [10] S. L. Mera, C. R. Lovell, R. R. Jones, J. D. Davies, "Elastic fibres in normal and sun-damaged skin: an immunohistochemical study", *Br J Dermatol*, vol. 117, no. 1, pp. 21–27, 1987.
- [11] A. M. Kligman, "Early destructive effect of sunlight on human skin", *JAMA*, vol. 210, no. 13, pp. 2377–2380, 1969.

## 第3章 皮膚計測

### 3.1. 染色法

古くから、コラーゲン線維やエラスチン線維を染め分ける様々な病理染色法が試みられてきた。コラーゲン線維の代表的な染色法には、エラスチカ・ワンギーソン染色{図 3-1(a):ピンク色}, シリウスレッド染色{図 3-1(b)}, アザン染色, マッソン・トリクローム染色などが挙げられる。またコラーゲンタイプに特異的な抗体を用いることで、コラーゲンタイプ別の染色も可能である{図 3-1(c)}.

エラスチンの代表的な染色法にはワイゲルトのリゾルシンフクシン染色{図 3-1(a):濃紫色}, ビクトリア青染色, アルデヒド・フクシン染色等が挙げられる。エラスチンについてもエラスチン構成成分ごとの抗体を用いることで、コアタンパクであるトロポエラスチンのみならず、エラスチン線維の骨格であるマイクロフィブリルを形成するフィブリリン, フィビュリンなど成分ごとに染め分けることが可能である。

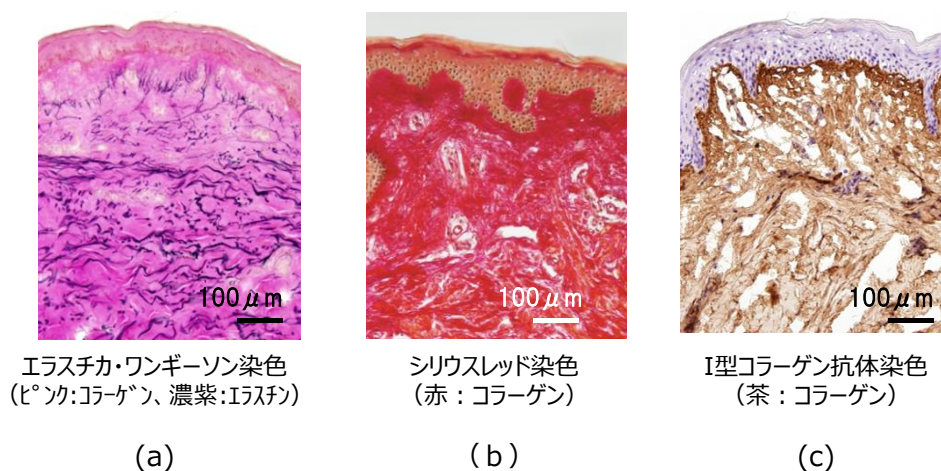


図 3-1 コラーゲンの代表的な染色方法

### 3.2 皮膚粘弾性測定装置 (Cutometer)

古典的な *in vivo* 計測としては、皮膚を表面から力を加えて、皮膚全層の応答を見る皮膚弾力性計測器が挙げられる。切除した皮膚の力学特性との関連を検討することで、吸引法による皮膚弾力性計測が真皮構造と関連する可能性を示した報告もある[1]。これから、皮膚全層における力学特性に対して、真皮は一定の役割を果たしていることが推測される。このため皮膚弾力性は真皮の力学的特性を間接的に反映するパラメータとして利用されてきた。中でも円筒状のプローブを皮膚に密着させ、プローブ内を瞬時に減圧し、の状態を数秒（通常 2 秒）保持した後、瞬時に開放するときの皮膚の変異を測定する方法が良く用いられている。この方法は安定してデータが取れることからよく利用されてきており、皮膚を吸引した後の戻り率  $U_r/U_f$  は加齢変化が再現性良く得られることが知られている[2-4]。しかしながら、表皮を介して皮膚弾力性を計測するため、真皮コラーゲン線維構造情報のみが得られているわけではなく、真皮以外の加齢変化による弾力性低下も重畳されたパラメータであった。このような力学的アプローチでは、角層／表皮／真皮の情報を選択的に選出することは困難である。

### 3.3 2光子蛍光 (TPF) 顕微鏡

通常の蛍光（1光子蛍光）では、基底状態に存在する電子が、励起準位に到達可能なエネルギーの光子 1 個（周波数  $\omega_1$ ）を吸収して励起状態に遷移したのち、励起電子が熱緩和し、最低次の励起状態に遷移する。そこから基底状態に戻る際、周波数  $\omega_f$  の蛍光が発せられる。一方、2光子蛍光では、基底状態に存在する電子が、励起準位に到達しないエネルギーの光子 2 個（周波数  $\omega_2$ ）を同時に吸収して励起状態に遷移することで生じる（図

3-1) . その励起電子が熱緩和し、最低次の励起状態から基底状態に戻る際に2光子蛍光が発生する。この場合、光子1個がもつエネルギーは1光子過程の場合の半分であるので光の周波数  $\omega_2$  については、

$$\omega_2 = \frac{\omega_1}{2} < \omega_f$$

が成立する。よって、2光子励起過程では励起光より短波長の蛍光が発生する。

2光子蛍光顕微鏡は、近赤外の超短パルス光による2光子吸収蛍光を使うことで、生体内部（数百  $\mu\text{m}$  の深部まで）の蛍光強度（蛍光性生体構成物質の濃度）分布を三次元的に画像化する技術である。通常の共焦点顕微鏡（1光子吸収）では、散乱と吸収のため、観察深さの限界は数十  $\mu\text{m}$  に制限されるが、2光子励起では100  $\mu\text{m}$  を超える深部観察が可能であり、低侵襲性や良好な生体透過性といった特徴も得られる。また、2光子励起はサンプル焦点近傍に限定されるため、 $\mu\text{m}$  空間分解/optical sectioning/3次元イメージングが可能といった特徴もある。カールツァイス社、オリンパス社、ニコン社などの顕微鏡メーカーからの2光子蛍光顕微鏡が市販されている。また、自家蛍光を利用すると無染色での観察も可能であることから、ヒト皮膚計測用にも市販されている。現在、ヒト用途として、安全性が担保されている多光子蛍光顕微鏡はドイツの JenLab 社から市販された DermaInspect/MPTflexTM であり、皮膚疾患診断や正常皮膚観察に用途を特化している (<http://www.henlab.de>)。

皮膚にはケラチン、メラニン、NADH,エラスチン、コラーゲン、リボフスチンなど多くのフルオロフォア（蛍光性物質）が存在するので、これらの自家蛍光を検出することで、皮膚を切らずに非侵襲で画像を得ることができる。また、これらの励起スペクトル特性と発光スペクトル特性は個々に異なるので、励起波長と蛍光波長の選択により、フルオロフォアの選択的可視化も可能である。

現在市販の2光子蛍光顕微鏡のレーザー光源のほとんどは、波長的に各種物質の2光子蛍光を発生に発生できることからフェムト秒( $10^{-15}$  秒)チタン・サファイアレーザー (Ti-Sapphire laser, 波長 700-900nm) が利用されている (TiS-TPF 顕微鏡) [5]. しかし、この波長領域では、表皮越しに真皮最表面までしか到達することができず、皮膚性状に関連の高い真皮上層から中層を真皮深部の鮮明な観察に不向きであるという課題がある.

### 3.4 第2高調波発生光 (SHG) 顕微鏡

TPF 顕微鏡と同じく、フェムト秒( $10^{-15}$  秒)オーダーの超短パルスレーザー光を用いる顕微鏡として第2高調波発生光 (SHG) 顕微鏡が挙げられる. SHG とは、超短パルスレーザー光が物体に入射された際、入射レーザー光の一部が高ピークパワー光電場と光波長オーダーの非中心対称性分子との非線形相互作用によって波長変換され、入射レーザー光の半波長(あるいは2倍の周波数)の光が発生する現象である (図 3-2). 生体組織への照射においては、コラーゲン分子固有の三重らせん構造に起因した第2高調波発生光が効率よく生じるため、この選択的な発生光を利用することにより、非染色で真皮コラーゲン線維の選択的な可視化を行うことができる. すなわち、生きたありのままの状態でコラーゲン線維を可視化できる. このような特徴から、皮膚計測や再生医療を始めとしたコラーゲン関連の医療バイオ分野での応用が期待されている. 2光子蛍光励起と同様、第2高調波発生もサンプルの焦点近傍に限定されるため、 $\mu\text{m}$  空間分解/ optical sectioning/ 3次元イメージングが可能である. また2光子蛍光励起が生じる波長領域よりも更に、長波長領域においても SHG の発生効率は保たれるため、非接触リモートでの深浸透性/低侵襲性が非常に優れている. また背景光 (反射散乱光, 蛍光など) との分離が容易であるといった特徴も有する.

従来の SHG 顕微鏡用レーザーには、 TPF 顕微鏡と同じく中心波長 800nm のフェムト秒( $10^{-15}$  秒)チタン・サファイアレーザーが使用されており (TiS-SHG 顕微鏡) , 皮膚 [6,7], 角膜[8], 骨[9], 軟骨[10], 腱[11]における組織コラーゲン分布の観察に応用されている. また非侵襲観測の特徴を利用し, 骨芽細胞産生コラーゲンの時系列モニタリング[12] など再生医用分野への応用展開も進んでいる. しかし, 皮膚計測という観点からは, 光深達度が浅い問題が避けられない. そこで我々は, 皮膚の光学特性 (吸収, 散乱) から, チタン・サファイアレーザーよりも生体浸透性が良好なフェムト秒クロム・フォルステライトレーザー (中心波長 1250nm) を光源とした高深達型 SHG 顕微鏡 (CrF-SHG 顕微鏡) [13] を構築しており, 真皮コラーゲンの *in situ* 可視化に関する研究を行ってきた. これまでに, 皮膚の老化[13-16], シワ形態[17], 熱傷[18], 熱傷治癒[19], 切創治癒[20]におけるコラーゲン構造を, 高コントラストな SHG イメージで可視化することに成功している. また, CrF-SHG 顕微鏡を用いた創傷治癒モニタリングといった新しい応用も始めており[21], 実用化に向けた技術開発が進み始めている.

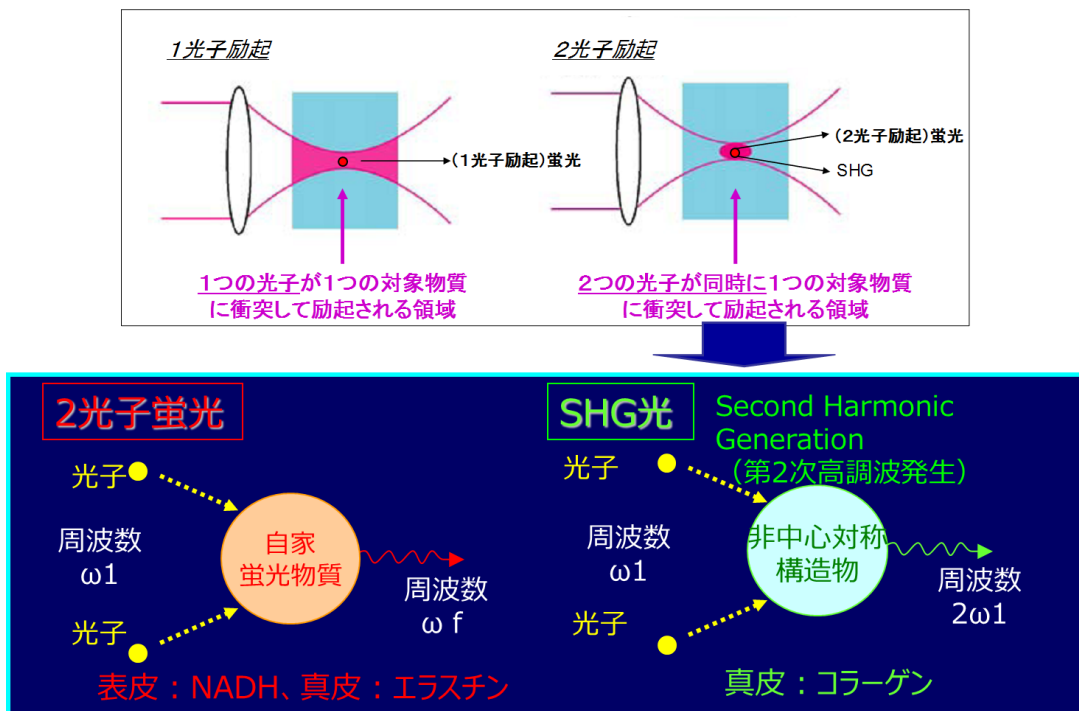


図 3-2 SHG および TPF の発生原理の概念

本論文の第 4 章と第 5 章では、真皮深部の網状層コラーゲン線維を可視化して評価すること目的に、CrF-SHG 顕微鏡を用いた。また、真皮表層のコラーゲンとエラスチンの分布を同時に可視化するためには、TiS-TPF 顕微鏡を用いる必要がある。この手段としては市販の TiS-TPF/TiS-SHG 顕微鏡（独 JenLab 社 DermaInspect）を用いた検討方法が有効である。これらの顕微鏡は光源の違いにより、得られる画像やその特徴に違いがあるため、違いをまとめた表を、表 1 に示す。これら 2 つの顕微鏡を併用して皮膚老化の観察を行うことができると、コラーゲンおよびエラスチンを対象とする複数の視点での皮膚老化の評価が可能になる。

表 1 TiS-TPF/TiS-SHG 顕微鏡と CrF-SHG 顕微鏡との違い

	TiS-TPF/TiS-SHG 顕微鏡	CrF-SHG 顕微鏡
光源波長	Ti:Sapphire レーザー 710-920 nm	Cr : Forsterite レーザー 1250 nm
深達度 (画像としての評価が 可能な達度)	約 100 $\mu$ m 以内 (真皮乳頭層~乳頭下層まで観察可能)	約 250 $\mu$ m (真皮網状層まで観察可能)
測定範囲	200×200 $\mu$ m (狭い領域のみ)	600×600 $\mu$ m 4 枚タイリング : 約 2.2×2.2 mm (視野の変更が可能)
検出可能	SHG (コラーゲン) TPF (エラスチン)	SHG (コラーゲン)



## References

- [1] C. Edwards, A. Pearse, R. Marks, Y. Nishimori, K. Matsumoto, M. Kawai, “Degenerative Alterations of Dermal Collagen Fiber Bundles in Photodamaged Human Skin and UV-Irradiated Hairless Mouse Skin: Possible Effect on Decreasing Skin Mechanical Properties and Appearance of Wrinkles”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 117, no. 6, pp. 1458–1463, 2001.
- [2] P. J. Frosch A. M. Kligman Eds, *Noninvasive method for the quantification of skin functions; An update*. Springer-Verlag, 1993.
- [3] Y. Takema, Y. Yorimoto, M. Kawai, G. Imokawa, “Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin”, *Br. J. Dermatol.*, vol. 131, no. 5, pp. 641–648, 1994.
- [4] S. Luebberding, N. Krueger, M. Kerscher, “Mechanical properties of human skin in vivo: A comparative evaluation in 300 men and women”, *Ski. Res. Technol.*, vol. 20, no. 2, pp. 127–135, 2014.
- [5] J. Chen, A. Lee, J. Zhao, H. Wang, H. Lui, DI. McLean, H Zeng, “Spectroscopic characterization and microscopic imaging of extracted and in situ cutaneous collagen and elastic tissue components under two-photon excitation”, *Ski. Res. Technol.*, vol. 15, no. 4, pp. 418–426, 2009.
- [6] K. Lu, J. Chen, S. Zhuo, L. Zheng, X. Jiang, X. Zhu, J. Zhao, “Multiphoton laser scanning microscopy of localized scleroderma”, *Ski. Res. Technol.*, vol. 15, no. 4, pp. 489–495, 2009.
- [7] R. Cicchi, D. Kapsokalyvas, V. De Giorgi, V. Maio, A. Van Wiechen, D. Massi, T. Lotti, F. Pavone, “Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy”, *J. Biophotonics*, vol. 3, no. 1–2, pp. 34–43, 2010.
- [8] L. Kowalczyk, G. Latour, J. Bourges, M. Savoldelli, JC. Jeanny, K. Plamann, MC. Schanne-Klein, F. Behar-Cohen, “Multimodal Highlighting of Structural Abnormalities in Diabetic Rat and Human Corneas”, *Transl. Vis. Sci. Technol.*, vol. 2, no. 2, p. 3, 2013.
- [9] R. Ambekar, M. Chittenden, I. Jasiuk, K. C. Toussaint, “Quantitative second-harmonic generation microscopy for imaging porcine cortical bone: Comparison to SEM and its potential to investigate age-related changes”, *Bone*, vol. 50, no. 3, pp. 643–650, 2012.
- [10] J. C. Mansfield, C. P. Winlove, J. Moger, S. J. Matcher, “Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy”, *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 4, p. 44020, 2008.

- [11] C. Y. Park, J. K. Lee, M. Y. Kahook, J. S. Schultz, C. Zhang, R. S. Chuck, “Revisiting ciliary muscle tendons and their connections with the trabecular meshwork by two photon excitation microscopic imaging”, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 57, no. 3, pp. 1096–1105, 2016.
- [12] E. Hase, O. Matsubara, T. Minamikawa, K. Sato, T. Yasui, “In situ time-series monitoring of collagen fibers produced by standing-cultured osteoblasts using a second-harmonic-generation microscope”, *Appl. Opt.*, vol. 55, no. 12, p. 3261, 2016.
- [13] T. Yasui, M. Yonetsu, R. Tanaka, Y. Tanaka, S. Fukushima, T. Yamashita, Y. Ogura, T. Hirao, H. Murota, T. Araki, "In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser", *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 3, pp. 031108, 2013.
- [14] T. Yamashita, T., Ogura, Y., Tanaka, Y., Tanaka, R., Yasui, “Noninvasive in situ assessment of structural alteration of human dermis caused by photoaging using a novel collagen-specific imaging technique”, *IFSCC Mag.*, vol. 16, no. 1, pp. 3–7, 2013.
- [15] T. Yasui, M. Yonetsu, R. Tanaka, Y. Tanaka, S. Fukushima, T. Yamashita, Y. Ogura, T. Hirao, H. Murota, T. Araki, "In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser", *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 3, p. 031108, 2012.
- [16] 小倉有紀, 田中佑治, 長谷栄治, 山下豊信, 安井武史, “SHG(第二高調波発生光)イメージの2次元自己相関解析に基づいたヒト真皮コラーゲン線維構造の定量化”, *生体医工学*, vol. 55, no. 1, pp. 97–102, 2017.
- [17] T. Yasui, Y. Takahashi, S. Fukushima, Y. Ogura, T. Yamashita, T. Kuwahara, T. Hirao, T. Araki, “Observation of dermal collagen fiber in wrinkled skin using polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy”, *Opt. Express*, vol. 17, no. 2, p. 912, 2009.
- [18] R. Tanaka, S. Fukushima, K. Sasaki, Y. Tanaka, H. Murota, T. Matsumoto, T. Araki, T. Yasui, "In vivo visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy", *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, pp. 61231, 2013.
- [19] T. Yasui, R. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, T. Araki, “In vivo time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy”, *Proceedings of SPIE*, 2014, p. 89480B.
- [20] G. Deka, W. Wu, F. Kao, “In vivo wound healing diagnosis with second harmonic and fluorescence lifetime imaging”, *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, p. 61222, 2013.

- [21] E. Hase, K. Sato, D. Yonekura, T. Minamikawa, M. Takahashi, T. Yasui, “Evaluation of the histological and mechanical features of tendon healing in a rabbit model with the use of second-harmonic-generation imaging and tensile testing”, *Bone Joint Res.*, vol. 5, no. 11, pp. 577–585, Nov. 2016.

## 第4章 SHG 画像解析を用いたヒト真皮コラーゲン線維構造の定量化

### 4.1. イントロダクション

SHG 顕微鏡は、非侵襲・非染色で選択的にコラーゲンを可視化可能であることから、ヒト真皮コラーゲン線維を「生きたありのまま」の状態でも可視化する手法として、近年、注目されている。特に、生体組織の光学特性から、生体浸透性が良好なフェムト秒 Cr:Forsterite レーザー（中心波長 1250 nm）を光源とすることにより、比較的深部の真皮コラーゲン線維を可視化できる。これまでに、皮膚の老化[1,2]、熱傷[3]、熱傷治癒[4]、切創治癒[5]におけるコラーゲン線維構造を、高コントラストな SHG イメージとして定性的に可視化することに成功している。次のステップとしては、その SHG イメージに基づいて真皮コラーゲン構造や皮膚老化度を数値化することが望まれるが、*in vivo* 計測で取得された SHG イメージは、生体組織の散乱特性、測定部位や深さによって、測定部位に到達するレーザー強度が変化することから、単純な SHG 強度の比較による定量化は精度を欠くと考えられる。

そこで我々は、SHG イメージを用いたコラーゲン線維構造の定量化手段として、画像全体の明るさ/暗さによる変化を受けにくいと考えられるテクスチャ解析に着目した。テクスチャ解析は、従来、複雑な模様を分析する手段として開発された方法で、デジタル画像データそのものを模様（テクスチャ）として分析する手段である。テクスチャの粗さ/細かさ/周期性/方向性など、画像のどの特徴の抽出を目的にするかで、様々な手法が提唱されている[6-8]。皮膚の SHG 画像は、皮膚内部のコラーゲン線維構造による模様が画面全体に広がった画像となるため、画像そのもののパターンの一様性や濃淡コントラストの変

化に基づいた画像特徴を統計量として抽出することは、線維構造を評価するのに適していると考えられる。実際、皮膚における SHG 画像をテクスチャ解析で解析しようとした報告が複数存在する。特に、病態皮膚におけるコラーゲン線維を正常皮膚におけるコラーゲン線維と区別しようとした試みが多く、その方法は抽出したい線維の特徴によってさまざまである。例えば、2次元フーリエ解析法は最も古くから活用されている解析方法の1つであるが、皮膚癌の1種である皮膚線維肉腫（*Dermatofibrosarcoma protuberans*）のコラーゲン線維の特徴と正常コラーゲン線維の特徴の差を識別するのに周期性と異方性のパラメータが効果的であるといった報告がある[9]。また癬痕やケロイドと正常皮膚の分類についてはローカル差分・ローカルバイナリーパターンやウェーブレット変換を用いて局所特徴を抽出する方法[10]や2次元フーリエ変換の示す異方性や、グレーレベルの同時生起行列（GLCM）（特定の値をもち指定された空間関係にあるピクセルのペアがイメージ内で発生する頻度を表すマトリックス）を用いた均質性や相関等が有望なツールとなりうると評価した報告がある[11]。しかしながらこれらの解析方法は正常なコラーゲン線維と異常なコラーゲン線維を区別することを目的としており、正常皮膚の範囲内で生じる変化を対象とする評価方法ではなく、顔面における皮膚コラーゲン構造の老化変化の特徴抽出を試みた報告例はほとんどない。

本章では、イメージを構成するテクスチャの粗さ細かさを評価するテクスチャ解析法として知られる2次元自己相関法（2D-AC法）を、ヒト頬真皮コラーゲン線維のSHGイメージに適用し、コラーゲン線維の光老化性構造変化を抽出する手段として用いることが可能であるか検討した。更に、SHGテクスチャ解析によって抽出した数値指標の妥当性を評価するため、SHG評価法とは独立した解析方法である皮膚に力学的負荷を与えて皮膚の力学的な性質を測定するキュートメータ®によって測定した皮膚弾力性との相関を評価し、その相関からコラーゲン線維評価方法としての妥当性も検討した。

## 4.2. 実験方法

### 4.2.1. SHG 顕微鏡

顕微鏡のセットアップは図 4-1 に示す。光源には、フェムト秒モード同期 Cr:Forsterite レーザー (中心波長 1250nm) を採用し、入射レーザー光及び SHG 光の長波長化による皮膚深達度増加を図ると共に[12], 生体への光ダメージを回避した[13]. 光源から出た光は, 1/4 波長板 ( $\lambda/4$ ) で円偏光に変換された後, ハーモニックセパレータ, ガルバノミラー, リレーレンズを通り, 対物レンズによってヒト真皮に集光される。ヒト真皮内の集光点で発生した SHG 光は, 同じ経路を戻り, ハーモニックセパレータで反射された後, IR カットフィルターにより入射光成分を除去した後, フォトンカウンティング型光電子倍增管 (PMT) によって検出した。ガルバノミラー走査で SHG イメージを高速取得しながら, サンプルステージを XY にステップ駆動させ, 複数の SHG イメージ (イメージサイズ = 0.4mm × 0.4mm, 画素サイズ = 128 pixel × 128 pixel) をつなぎ合わせることで, 大面積 SHG イメージ (イメージサイズ = 1.6mm × 1.6mm, 画素サイズ = 512 pixel × 512 pixel) を取得した [1, 3, 12, 14].

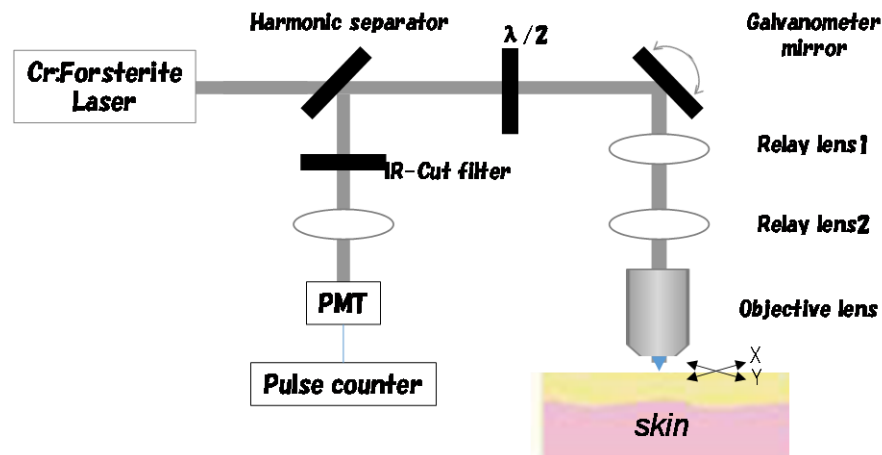


図 4-1 実験装置セットアップ

#### 4.2.2. 2次元自己相関法 (2D-AC 法)

2D-AC 法は、同じ画像を 2 枚用意し、2 次元的に少しずつずらしながら重なった領域内の相関を求める方法で、画像内で似たような模様（テクスチャ）が続く場合は相関が失われにくく、画像内が異なる模様（テクスチャ）で構成されている場合は相関が失われやすい。自己相関値の 2 次元行列を比較すると、その広がり度でテクスチャが細かいか、粗いかを評価することができることから、イメージの粗さ細かさ（粗野性）を評価するテクスチャ解析法として用いられている [1,13]。本解析では毛穴などの付属器を含まない、コラーゲンのみの領域を、 $N_d \text{ pixel} \times N_d \text{ pixel}$  の範囲で（本論文では  $64 \text{ pixel} \times 64 \text{ pixel}$ ,  $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$  のイメージ領域に相当）、1 人あたり 5 か所ずつ抽出して解析に用いた（図 4-5）。抽出した SHG 画像  $A(i, j)$  において、図 4-2 左に示すように原点  $(0, 0)$  を基準点とする近傍の  $N_d \text{ pixel} \times N_d \text{ pixel}$  の領域と、これから  $(m, n)$  だけずれた領域、つまり点  $(m, n)$  を

基準点とする  $N_d \text{ pixel} \times N_d \text{ pixel}$  の領域を対象として、簡略化した 2D-AC 関数  $B(m,n)$  として以下の式で求めた．ここではあえて正規化を行わない形式を用いた．

$$B(m,n) = \sum_{i=0}^{N_d-1} \sum_{j=0}^{N_d-1} A(i,j)A(i+m,j+n)$$

$m, n$  を

$$m, n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm N_d$$

の範囲でずらすと、図 4-2 右に示すようにそれぞれの  $B(m,n)$  値を要素とする 2D-AC 関数行列が求められる．なお、抽出した画像の範囲外 ( $i < 0$  または  $i \geq N_d$  または  $j < 0$  または  $j \geq N_d$ ) にある点  $A(i, j)$  は 0 とした．このため、まったく同じテクスチャが続く画像の場合は、移動した先での相関は移動前とほぼ等しくなるので、計算に用いる領域（重なった領域）が一定量ずつ減少した分だけ計算値は減少するので、2D-AC の値は中心から離れるほど一定量で減少する二等辺三角形に近い曲線（直線）になる（図 4-3(a)参照）．一方で移動した先での相関が大きく崩れる場合は二等辺三角形よりも凹む直線となる（図 4-3(b)参照）．

各画像の評価を行うため、得られた 2D-AC 行列から、代表として  $m$  軸 ( $n=0$ ) 及び  $n$  軸 ( $m=0$ ) に沿った分布曲線（2D-AC 曲線）を取得し、両者の平均分布曲線に対してローレンツ関数でカーブフィッティングを行い、分布曲線の半値全幅（Full width at half maximum : FWHM）を算出し、平均値を取得した．なお、ここでローレンツ関数を利用する物理的な理由は特になく、2D-AC 曲線形状との類似性という観点で選択した．図 4-3(a), (b)は、それぞれ 20 代および 60 代の典型例である．図 4-3(a)に示すように、20 代 SHG 画像は SHG シグナルが比較的、どこも高い状態にある画像（すなわち高い輝度値が分散して配置している画像）であった．このため画像を二次元的にずらした際、元画像との相関が失われにくいため、2D-AC 曲線はなだらかになり半値全幅は広がったと考えられる．図



4-3(b)に 60 代の画像を示す. 画素の濃淡がはっきりした画像 (すなわち高い輝度値がある領域が偏って分布する) の場合, 画像をずらした際の相関は失われやすく 2D-AC 曲線は凹むことで半値全幅は狭くなったと考えられる. この特徴をもとに SHG イメージの特徴を求めて, コラーゲン線維構造の評価を行った.

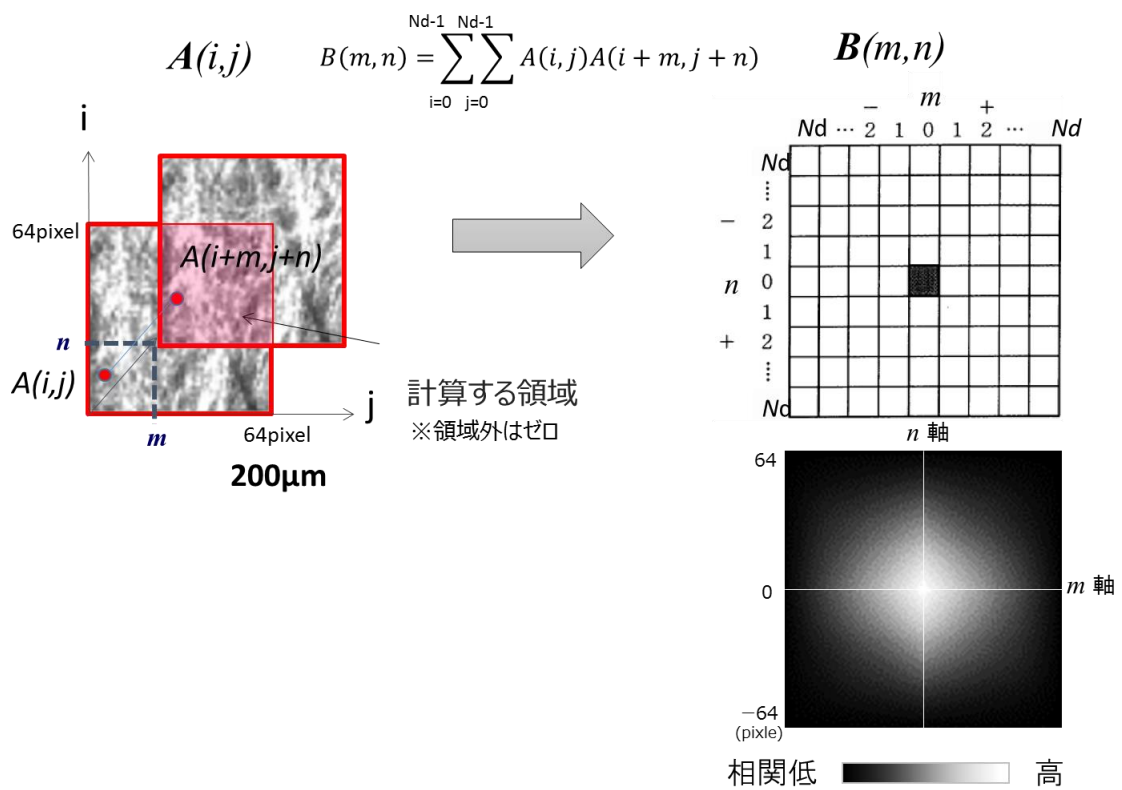


図 4-2 2D-AC の計算概念図 (左) と 2D-AC 行列 (右)

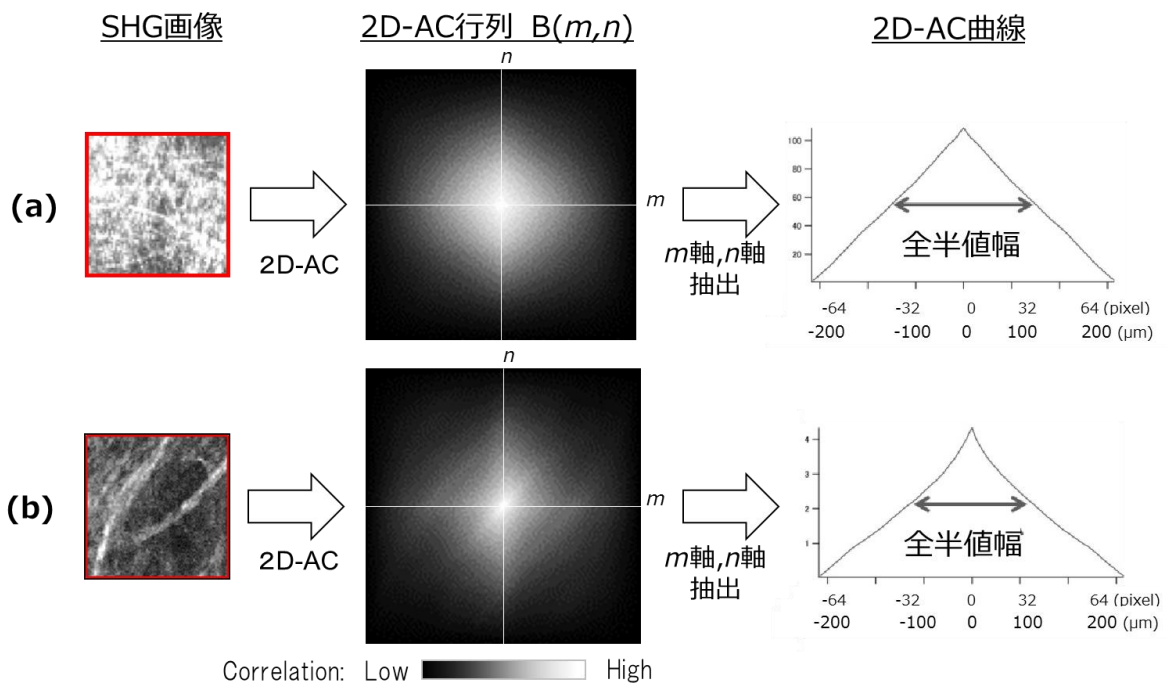


図 4-3 2D-AC による画像解析（典型例）

#### 4.2.3. 弾力性評価

皮膚の弾力性は、皮膚粘弾性測定装置（独 Courage and Khazaka 社，Cutometer MPA580）を用いて評価した。この装置では、陰圧により、プローブ先端の開口部から皮膚表面を一定時間吸引し、その後開放した場合の皮膚表面高さの時間的変化を計測する（図 4-4）。本実験では、直径 2mm のプローブを用い、200mbar で 2 秒吸引/2 秒解放の条件で測定を行い、吸引解放後の皮膚が瞬間的に戻る戻り率（瞬間的回復率  $U_r/U_f$ ）で皮膚の弾力性を評価した（図 4-4）。

これまでに、加齢に伴う皮膚弾力性の低下[15]、皮膚弾力性とコラーゲン線維構造との関連性[16]、有限要素法との比較[17]などに皮膚粘弾性測定が利用されており、皮膚の弾力性を取得する測定方法として利用可能である。

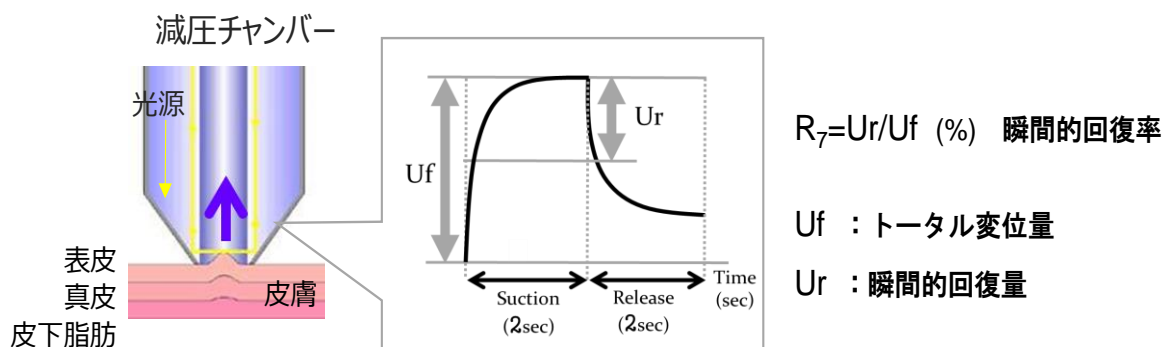


図 4-4 皮膚粘弾性測定による皮膚弾性率評価パラメータ (R7 : 瞬間的回復率)

#### 4.2.4. ヒト皮膚計測

SHG イメージング実験は、大阪大学大学院基礎工学研究科ヒト試験倫理委員会 (No.基工-22-1) 及び資生堂倫理委員会 (試験 No.C01019) の承認を受け、同意を得た 20 代, 40 代, 60 代の女性被験者各 4 名に対して行った。皮膚に入射するレーザーパワーは 30mW 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、我々が平成 20 年度に同条件で実施したヒト試験 (No.基工-20-3) 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[1]。被験者の頬に対して、SHG 顕微鏡を用いて真皮乳頭下層から網状層上層におけるコラーゲン線維の大面積 SHG イメージング (イメージサイズ=1.6mm×1.6mm, 画素サイズ=512 pixel×512 pixel) を行った。次いで、SHG イメージを取得した同部位頬の皮膚弾力性( $U_r/U_f$  : 瞬間的回復率)を、Cutometer®を用いて計測した。

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. 加齢による SHG 画像変化の特徴

図 4-5 に 20 代, 40 代, 60 代女性における頬の大面積 SHG イメージ (イメージサイズ=1.6 mm×1.6 mm, 画素サイズ=512 pixel×512 pixel) と, 典型的な ROI 画像 (イメージサイズ=200 μm×200 μm, 画素サイズ=64 pixel×64 pixel) を示す. コラーゲン線維が高コントラストな SHG イメージとして, 選択的に可視化されている. ここで, 大面積 SHG 画像で見られる穴はコラーゲンが存在しない毛穴等の付属器を示している. 今回は毛穴レベルのテクスチャの評価を行うのが目的ではないため, 毛穴を含まない領域が選択できるサイズに ROI を絞って評価をおこなった. 毛穴以外を含まない部位で ROI を比較すると, 20 代では, 細いコラーゲン線維が空間を埋めるように縦横に縦走し, 線維形態の認識が困難なほど密に分布していた {図 4-5(a), (d)}. 40 代では, 20 代ほどは細くないが, 線維は疎になりつつあり, 線維形態が認識できる程度の疎な密度になっていた {図 4-5(b), (e)}. 一方, 60 代では, 細いコラーゲン線維はほとんど見られず, 代わりに, 太い線維が際立って見られた. 線維は線維束形態が認識できる程度に, 疎であった {図 4-5(c), (f)}. 過去に男性の被験者を測定した際は, 年齢との相関は必ずしも明確ではなく, むしろ紫外線暴露履歴による差が大きく見られた [1]. これに対し, 本研究における女性被験者では年齢による差が大きく現れたことから, 女性は紫外線防止に対する意識が男性に比較すると高く, 日常的に日焼け対策を行っている人が多いため, 紫外線暴露履歴による個人差が男性よりも小さいのではないかと推察される.

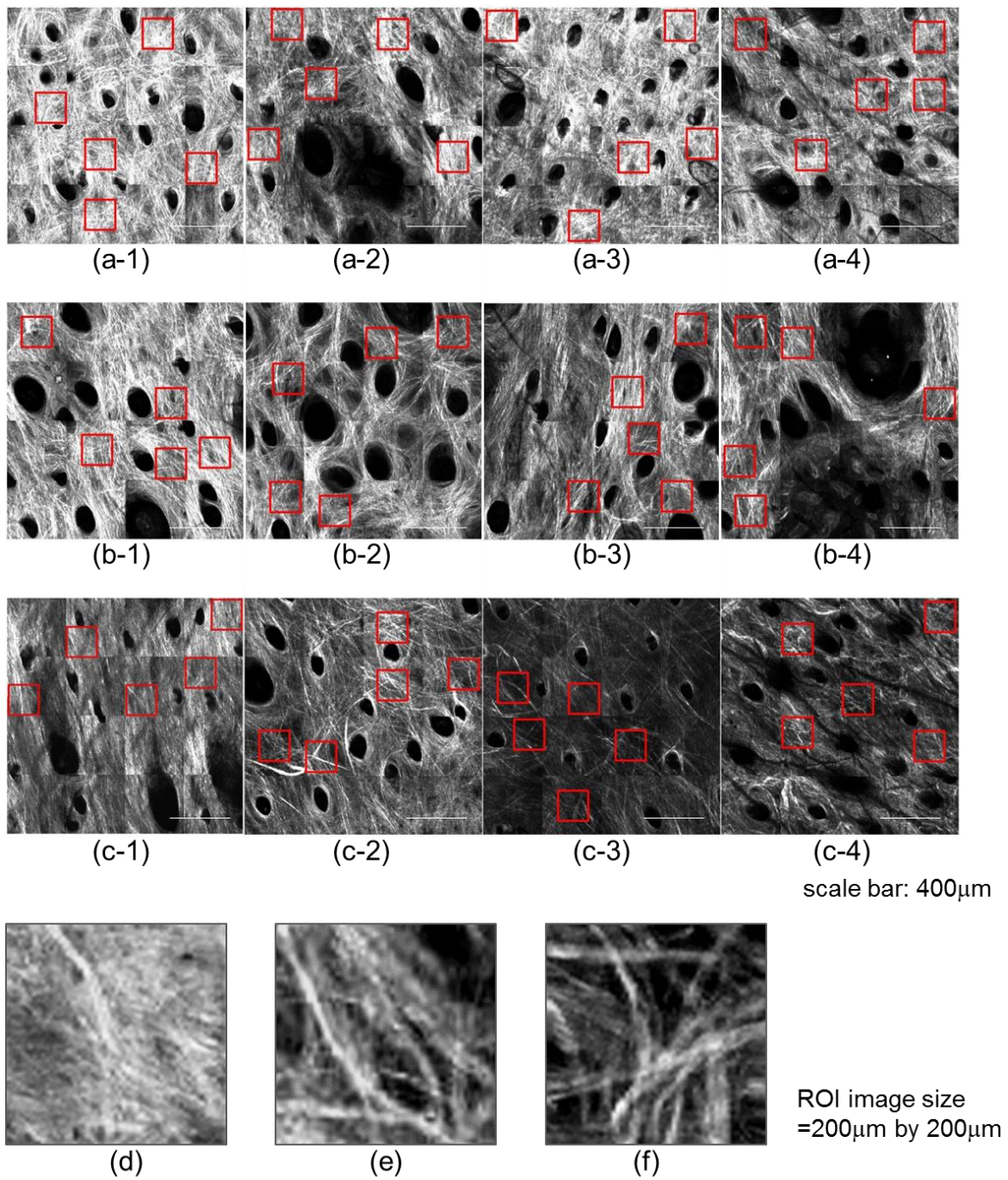


図 4-5 各年代被験者における頬皮膚の大面積 SHG イメージと画像解析に用いた領域 (赤枠 : ROI) {20 代(a), 40 代(b), 60 代(c)}. および各年代被験者の ROI の典型画像 {20 代(d), 40 代(e), 60 代(f)}.

#### 4.3.2. テクスチャ解析によるコラーゲン線維構造評価

図 4-5 における比較から、加齢に伴うコラーゲン線維構造の変化が、SHG イメージに反映されていることを確認した。この認識に沿った定量化が 2D-AC 法で解析可能か検討を行った。図 4-5 の典型例に示すように、20 代 (d) と 60 代 (f) の SHG イメージの違いは、20 代では一様に明るい輝度が分布する細かいテクスチャを持つ画像であるのに対して、60 代では画素の輝度の差が大きく、コントラストのはっきりした部位が局所的に目立つ画像である。この特徴的相違を抽出するため、各 SHG イメージにおける 2D-AC 曲線を求め、その広がり分布から、テクスチャの差として定量評価を行った。具体的には 2D-AC 曲線値の算出には、付属器を含まない平均的な箇所  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$  ( $64\ \text{pixel} \times 64\ \text{pixel}$ ) を 5 箇所ランダムに抽出した。抽出した領域 (ROI) を赤枠で示す。一人あたり 5 か所のイメージにおける二次元 2D-AC 曲線の半値全幅を算出し、その平均値を各個人におけるコラーゲン線維構造の評価値 (コラーゲン線維指標: Collagen fiber index) とした。5 箇所の画像の 2D-AC 曲線の全半値幅の平均値と標準偏差値を図 4-6 に示す。その結果 20 代:  $43.1 \pm 1.3$  (pixels), 40 代:  $40.6 \pm 0.7$  (pixels), 60 代:  $39.9 \pm 1.5$  (pixels) となり、20 代と 40 代、および 20 代と 60 代では有意な低下が見られた。一方、40 代と 60 代の間では有意差がみられなかった。これは、パネル数が限定されていたためと考えられる。これらの結果から、2D-AC 曲線の半値全幅は、若年層と中高年層のコラーゲン線維構造分布の違いを認識できる可能性が示された。

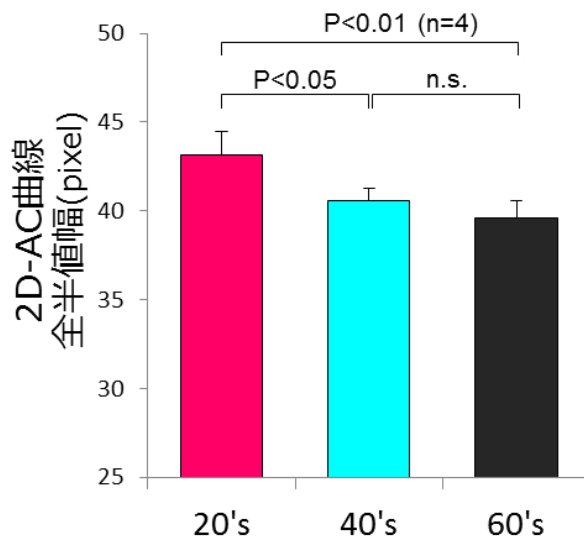


図 4-6 コラーゲン線維評価値と年齢との関連

#### 4.3.3. コラーゲン線維評価と皮膚弾力性との関連

続いて、SHG 顕微鏡で観察した同部位を皮膚粘弾性測定装置にて測定を行い、吸引解放後の皮膚の変異から瞬間的回復率  $U_r/U_f$  を調べた。  $U_r/U_f$  は皮膚の弾力性を反映するパラメータとされ、加齢に伴う減少が再現性良く取得できることが知られている [18, 19]。したがって、両者を比較することで、2D-AC 曲線によって抽出したコラーゲン線維指標が、皮膚の弾力性を反映しているかどうかを検証することができる。本試験においては、20代：  $0.66 \pm 0.07$  (%), 40代：  $0.46 \pm 0.07$  (%), 60代：  $20.4 \pm 0.9$  (%)となり、20代と40代、20代と60代で、有意な低下が見られた。一方、40代と60代では有意な差がみられなかった(図 4-7)。40代と60代で有意差がみられなかったのは、パネル数が限定されていたためと考えられる。



図 4-6 及び図 4-7 で確認された有意差は、興味深く一致している。そこで、 $U_r/U_f$  と、コラーゲン線維構造の評価値 (2D-AC 曲線半値全幅) とを比較したところ、評価値は、 $U_r/U_f$  と有意に相関する  $R=0.77$  ( $P<0.01$ ,  $n=12$ ) ことが示された(図 4-8)。すなわち、2D-AC 法は、皮膚弾力性低下を伴うコラーゲン線維状態の変化を敏感に捉えることができるパラメータである可能性が示された。

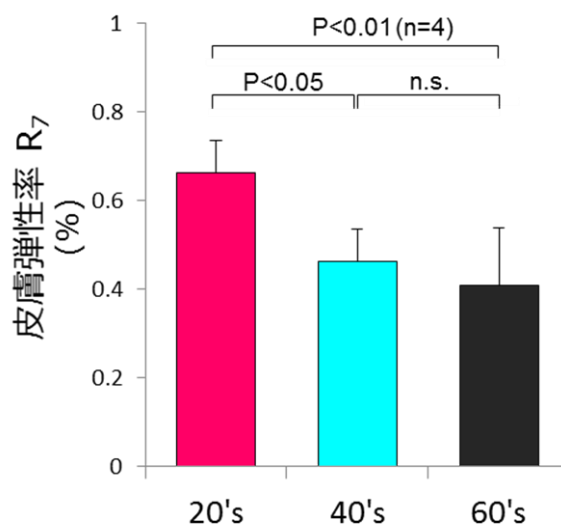


図 4-7 加齢に伴う皮膚弾力性の変化



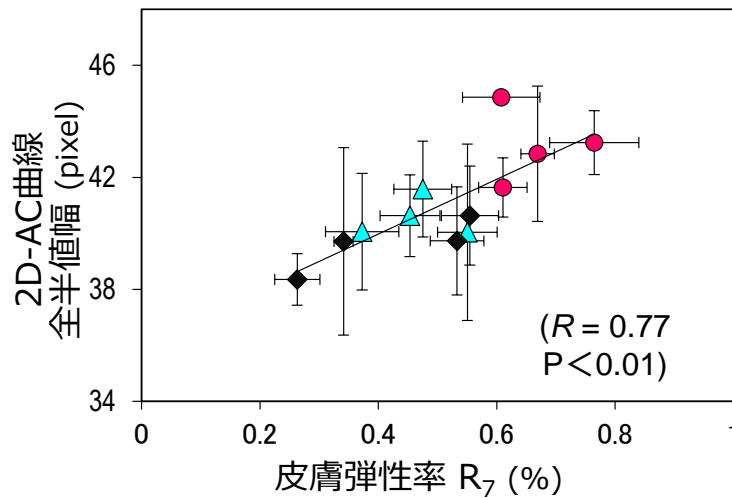


図 4-8 テクスチャ解析によるコラーゲン線維指標値と皮膚弾力性との相関

#### 4.4. 考察

これまで、SHG 顕微鏡により、ヒト真皮コラーゲン線維を「生きたありのまま」の状態でも可視化することに成功してきた。この手法によって、従来の侵襲的な観察方法ではほとんど観察不可能であった領域（特に「顔」）における真皮変化を捉えることが可能になり、アンチエイジングや美容を対象とする皮膚科領域にとって最も興味がある、「顔」の皮膚老化に関する新しい知見を提供してきた。定性的評価が可能となった次に必要とされるのは、得られたコラーゲン線維画像をどのように定量評価するかである。視覚的に判断すると、老化に伴い細い密なコラーゲン線維が失われ、比較的太い線維が残ることが皮膚老化におけるコラーゲン線維の変化であることが分かっていたが、どのように評価すると、この変化を表現するパラメータが得られるかは、検討が残されていた。今回、真皮コラーゲンの SHG イメージに対して、2D-AC 法を適用することにより、老化によるコラーゲン線維構造変化の特徴を反映した定量パラメーター（コラーゲン線維指標）が抽出でき

る可能性を初めて見出した。2D-AC法は、画像をずらした際の相関性の保たれ方を指標に画像を構築するテクスチャの粗さ/細かさの特徴を評価する画像解析方法であるが、皮膚老化に特徴的なコラーゲン線維画像のテクスチャの粗さ、細かさの変化を抽出するのにも有効な手法であることが分かった。

また、我々が最終目的とするのは「美容を対象とする皮膚評価」や「皮膚老化の予見などの診断」に応用できる評価方法評価であるため、評価方法は高精度で、皮膚老化の段階を正しく評価できる方法を開発する必要がある。そこで、我々はSHGイメージ観察とは独立した評価方法で皮膚の力学的評価方法として確立している吸引法を同時に試みて、その相関を評価した。これによりコラーゲン線維指標は、皮膚弾力性と有意に相関していることが示され、2D-ACの皮膚評価としての妥当性が示された。それと同時にこの相関関係は、コラーゲン線維構造が皮膚弾力性を決定づける上で重要な役割を果たしていることも意味する。すなわち、SHGイメージの2D-AC法は、皮膚コラーゲン線維構造を老化や皮膚弾性の視点から評価可能なパラメータになりうる。このような精度の高い定量方法は、皮膚内の老化度合の評価を可能にして、たるみの予見などの診断を実現させる上で必須の技術になると考えられる。今後、このような「高精度な定量方法」が、「コラーゲン線維のモニタリング技術」と融合することによって、コラーゲン線維の非侵襲計測がより実用化に近い技術になると考えられる。

## References

- [1] T. Yasui, M. Yonetsu, R. Tanaka, Y. Tanaka, S. Fukushima, T. Yamashita, Y. Ogura, T. Hirao, H. Murota, T. Araki, "In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser", *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 3, p. 031108, 2013.
- [2] T. Yamashita, T., Ogura, Y., Tanaka, Y., Tanaka, R., Yasui, "Noninvasive *in situ* assessment of structural alteration of human dermis caused by photoaging using a novel collagen-specific imaging technique", *IFSCC Mag.*, vol. 16, no. 1, pp. 3–7, 2013.
- [3] R. Tanaka, S. Fukushima, K. Sasaki, Y. Tanaka, H. Murota, T. Matsumoto, T. Araki, T. Yasui, "In vivo visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy", *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, p. 61231, 2013.
- [4] T. Yasui, R. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, T. Araki, "In vivo time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy", *Proceedings of SPIE*, p. 89480B, 2014.
- [5] G. Deka, W. Wu, F. Kao, "In vivo wound healing diagnosis with second harmonic and fluorescence lifetime imaging", *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, p. 61222, 2013.
- [6] M. Tuceryan, M. Tuceryan, A. K. Jain, A. K. Jain, "The Handbook of Pattern Recognition and Computer Vision (2nd Edition), Texture Analysis", *Pattern Recognit.*, pp. 207–248, 1998.
- [7] A. Materka M. Strzelecki, "Texture analysis methods-a review", *Tech. Univ. lodz, Inst. Electron.*, pp. 1–33, 1998.
- [8] G. Castellano, L. Bonilha, L. M. Li, F. Cendes, "Texture analysis of medical images", *Clin. Radiol.*, vol. 59, no. 12, pp. 1061–1069, 2004.
- [9] S. Wu, Y. Huang, H. Li, Y. Wang, X. Zhang, "Quantitative analysis on collagen of dermatofibrosarcoma protuberans skin by second harmonic generation microscopy", *Scanning*, vol. 37, no. 1, pp. 1–5, 2015.
- [10] Y. Liu, X. Zhu, Z. Huang, J. Cai, R. Chen, S. Xiong, G. Chen, H. Zeng, "Texture analysis of collagen second-harmonic generation images based on local difference local binary pattern and wavelets differentiates human skin abnormal scars from normal scars", *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 1, p. 16021, 2015.

- [11] R. Cicchi, D. Kapsokalyvas, V. De Giorgi, V. Maio, A. Van Wiechen, D. Massi, T. Lotti, F. Pavone, “Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy”, *J. Biophotonics*, vol. 3, no. 1–2, pp. 34–43, 2010.
- [12] T. Yasui, Y. Takahashi, M. Ito, S. Fukushima, T. Araki, "Ex vivo and in vivo second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:Forsterite and Ti:Sapphire lasers", *Appl. Opt.*, vol. 48, no. 10, pp. D88-D95, 2009.
- [13] I. H. Chen, S. W. Chu, C. K. Sun, P. C. Cheng, B. L. Lin, “Wavelength dependent damage in biological multi-photon confocal microscopy : A micro-spectroscopic comparison between femtosecond Ti : sapphire and Cr : forsterite laser sources”, *Opt. Quantum Electron.*, vol. 34, pp. 1251–1266, 2002.
- [14] Y. Tanaka, E. Hase, S. Fukushima, Y. Ogura, T. Yamashita, T. Hirao, T. Araki, T. Yasui, "Motion-artifact-robust, polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy based on rapid polarization switching with electro-optic Pockells cell and its application to in vivo visualization of collagen fiber orientation in human facial skin”, *Biomed. Opt. Express*, vol. 5, no. 4, pp. 1099–1113, 2014.
- [15] S. Imayama K. Nakamura, M. Takeuchi, Y. Hori, Y. Takema, Y. Sakaino, G. Imokawa , “Ultraviolet-B irradiation deforms the configuration of elastic fibers during the induction of actinic elastosis in rats”, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 32–38, 1994.
- [16] C. Edwards, A. Pearse, R. Marks, Y. Nishimori, K. Matsumoto, M. Kawai, “Degenerative Alterations of Dermal Collagen Fiber Bundles in Photodamaged Human Skin and UV-Irradiated Hairless Mouse Skin: Possible Effect on Decreasing Skin Mechanical Properties and Appearance of Wrinkles”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 117, no. 6, pp. 1458–1463, 2001.
- [17] Y. Hara, Y. Masuda, T. Hirao, N. Yoshikawa, “The relationship between the Young’s modulus of the stratum corneum and age: a pilot study”, *Skin Res. Technol.*, vol. 19, no. 3, pp. 339–45, Aug. 2013.
- [18] H. S. Ryu, Y. H. Joo, S. O. Kim, K. C. Park, S. W. Youn, “Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer”, *Skin Res. Technol.*, vol. 14, no. 3, pp. 354–358, Aug. 2008.
- [19] S. Luebberding, N. Krueger, M. Kerscher, “Mechanical properties of human skin in vivo: A comparative evaluation in 300 men and women”, *Ski. Res. Technol.*, vol. 20, no. 2, pp. 127–135, 2014.

## 第 5 章 第二高調波発生顕微鏡の小型化

### 5.1. イントロダクション

前章で示したとおり，SHG 顕微鏡をはじめとする非線形光学顕微鏡を用いた皮膚評価は，実験室レベルでは有用性が確認されているものの，臨床現場での利用は未だ制限されている．そこで我々は顕微鏡の実用的な使用を進めるべく，装置の小型化の検討を行った．臨床現場での利用を制限する 1 つの要因として，レーザー光源が大型・複雑である上に，自由空間光学系を用いた顕微鏡を利用しているため，顕微鏡装置も大がかりになってしまう点が挙げられる [図 5-1(a)および(b)]．また，ヒト皮膚計測への応用においては，固定された SHG 顕微鏡に対して測定部位を配置する必要があるため，観察時の姿勢が制限され，被験者に対する身体的負担が大きくなる．

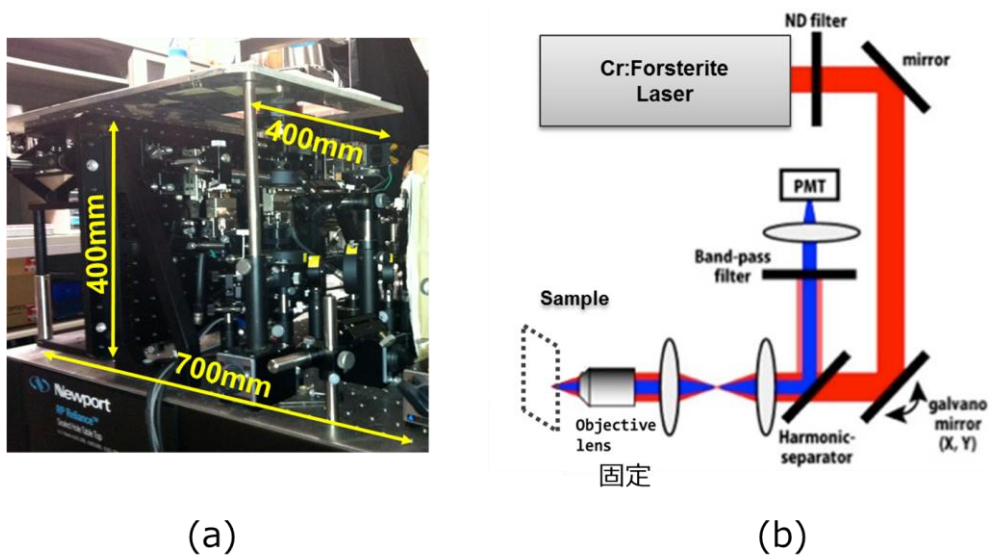


図 5-1 従来の SHG 顕微鏡(a)，およびセットアップ(b)

臨床現場での利用を考えた場合、患者への負担軽減から、小型・簡便・ロバスト・フレキシブルな特徴が SHG 顕微鏡に望まれる。そのためには①レーザー光源の小型化、②光ファイバーによるレーザー光伝送、③顕微鏡ユニット部の小型化、という3つの技術要素が必要になる [図 5-2]。①については、既に小型レーザーが市販されており、これを利用することが可能である。②については、SHG 顕微鏡の小型化とフレキシビリティに寄与するが、超短パルス光のファイバー伝送では、ファイバー内の分散によるパルス広がりを考慮する必要がある。しかし、近年の技術進展が著しいフォトニクス結晶ファイバー (PCF) を用いると、超短パルス光のパルス幅を維持したままファイバー伝送が可能である。③については、市販されているチューブレンズシステムを有効利用すれば、大幅な小型化が期待できる。

本研究では、ラージモードエリア PCF とチューブレンズシステムを用いることにより、②と③の技術要素を実現し、測りたい部位にハンドヘルドで設定可能な小型 SHG 顕微鏡を構築した。更に、ヒト皮膚の *in situ* 測定に応用し、その有用性を確認した。

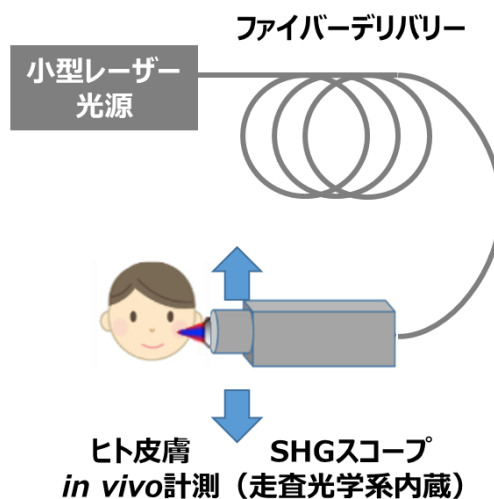


図 5-2 SHG 顕微鏡の小型化に必要なセットアップ

## 5.2. 実験方法

### 5.2.1. 可搬型 SHG 顕微鏡

光源には、モード同期クロム・フォルステライトレーザー (Avesta Project Ltd., CrF-65P, 中心波長= 1250 nm, パルス幅 = 80 fs, 平均パワー= 250mW, 繰り返し周波数=73 MHz)を用いた. 一般的なシングルモードファイバーを用いて超短パルス光の伝送を行う場合, ファイバーの分散を相殺するために, 外部的に分散補償を行う必要があった. しかし, 外部分散補償には回折光子ペアやプリズム・ペアを用いた自由空間光学系を利用する必要があるため, SHG 顕微鏡の小型化に最適な方法とは言えない. そこで, 外部分散補償を必要とすることなく超短パルス光のファイバー伝送が可能な手段として, ラージモードエリア PCF (LMA-PCF, Thorlabs Inc., LMA-25, コア径=25 $\mu$ m, NA = 0.05, 長さ=75cm)に着目した. LMA-PCF は, ラージモードエリアにより, モード分散が発生しにくく, 空孔の配列やコア径の選別により, 導波路分散を調整でき, 波長分散の影響も低減できる. 実際に用いた LMA-PCF の断面は写真に示すような周期的な空コアであった (図 5-3). さらに比較的大きなモードエリア径により, ファイバー伝搬中の不要な非線形光学効果を抑制し, パルス波形の歪みが起き難いというメリットもある.

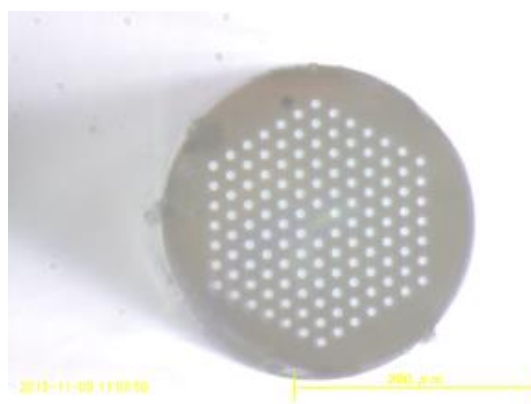


図 5-3 LMA-PCF, Thorlabs Inc., LMA-25 の断面写真

レーザー光は、ファイバーカップリングシステムによって、LMA-PCFに入射され（カップリング効率 32.5%:[Input] : [Output] = 252mW : 82mW）、ファイバー内部を伝搬した後、小型 SHG 顕微鏡ユニットに導かれる。小型 SHG 顕微鏡ユニットは、チューブレンズシステムから構成されており、内部にはガルバノ走査ミラー、リレーレンズ・ダイクロイックミラー (DM)、対物レンズ (油浸レンズ, Nikon Instruments Inc., CFI Plan 50×H, magnification = 50, NA = 0.9, working distance = 350 μm)、バンドパスフィルタ (BPF; transmitted wavelength = 625 nm)、フォトンカウンティング型光電子増倍管 (PMT; Hamamatsu Photonics K. K., H7155-01) が含まれている。LMA-PCF から出射された後にコリメートされたレーザー光は、ガルバノ走査ミラーで反射した後、リレーレンズ対と DM を通過し、対物レンズで試料上に集光される。サンプルからの後方散乱 SHG 光は DM で反射され、バンドパスフィルタでフィルタリングされた後、PMT によって検出された。図 5-4 に装置構成図を示す。図 5-5 は実際に構築した小型 SHG 顕微鏡ユニットの外観写真である。サイズは幅 310mm×高さ 150mm×奥行き 50mm で、片手で持つことが可能である。図 5-1(a)の従来型 SHG 顕微鏡 (幅 700mm×高さ 400mm×奥行き 400mm) と比べると、体積比で約 2%であり、大幅な小型化が実現化された。



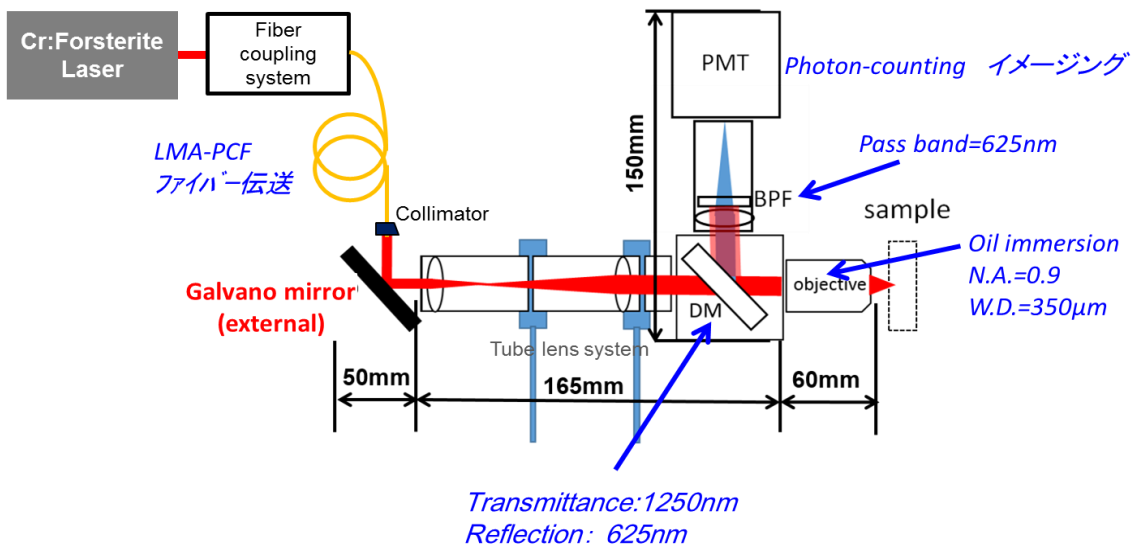


図 5-4 ハンドヘルド SHG 顕微鏡のセットアップ

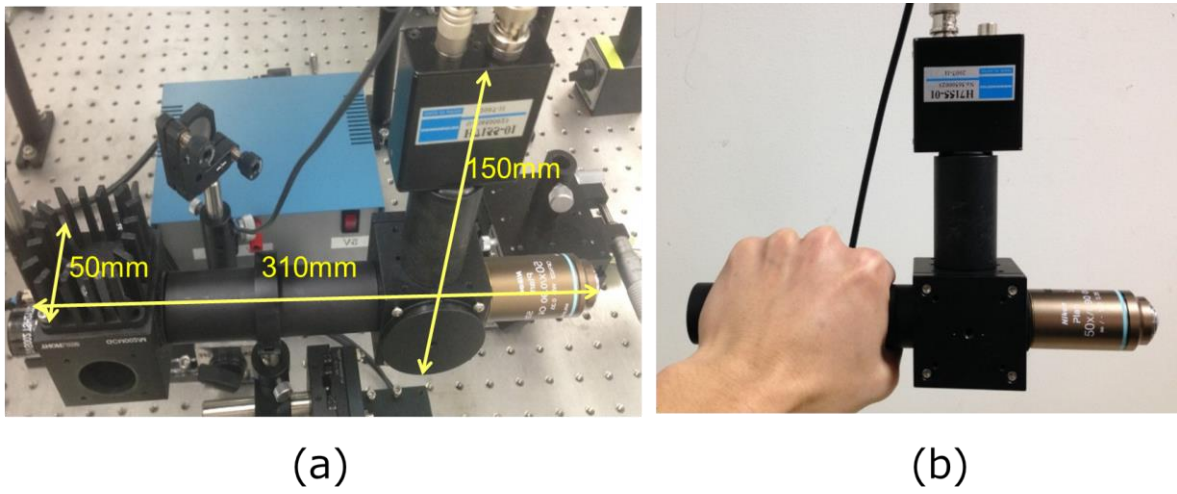


図 5-5 (a)ハンドヘルド SHG 顕微鏡の外観，サイズおよび，(b)プローブ部位の外観

### 5.2.2. ヒト皮膚計測

SHG 顕微鏡のレーザー光照射に対する生体安全性に関しては、我々が過去に実施したヒト試験において、皮膚科医立ち会いのもとレーザー照射前後で、全ての被検者皮膚において異常が認められないことを確認している[10]。本稿においては、上記先行研究で安全性が確認されている条件内で、同意を得た 20 代男性被験者の頬皮膚の観察を行った。測定深度は真皮乳頭下層から網状層上層に設定してコラーゲン線維の大面積 SHG イメージング（サイズ=1.6 mm×1.6 mm）を行った。これらのヒト皮膚計測は徳島大学大学院理工学研究部研究倫理委員会の承認(#14003)を受け行った。

## 5.3. 実験結果

### 5.3.1. 超短パルス光のファイバー伝送

まず、今回用いた LMA-PCF (LMA-25: Thorlabs, Inc.) について、超短パルス光の伝送性能を光スペクトルアナライザー(Laser Spectrum Analyzer : IST Inc.)で評価した。図 5-6(a)と(b)は、LMA-PCF 入射前の光スペクトルと自己相関波形を示している。また、図 5-6(c)と(d)は、LMA-PCF 伝搬後の光スペクトルと自己相関波形を示している。スペクトルを比較すると、図 5-6(a)と(c)の長波長側スペクトルの裾に不連続な変化が見られるが、これはスペクトル計測に用いた分光器への入射角度依存によるものと考えられる。光スペクトル幅を比較すると、LMA-PCF の入射前と伝搬後の双方において、26nm であった。これらの比較から、LMA-PCF において不要な非線形光学効果によるスペクトル拡がりや、光学素子によるフィルタリング効果はみられていないことが分かる。次に、図 5-6(b)と(d)の自己相関波形を比較すると、LMA-PCF 入射前のパルス幅は

80fs, LMA-PCF 伝搬後のパルス幅は 82fs であった。これらの結果より, LMA-PCF を用いると, 外部分散補償を行わなくとも, 最短パルス幅を維持したまま, ファイバー伝送出来ることが確認できた。なお, ここではデータを示さないが, LMA-PCF による偏光状態の変化や, LMA-PCF の曲げによるパワー損失も無視できるほど小さかった。

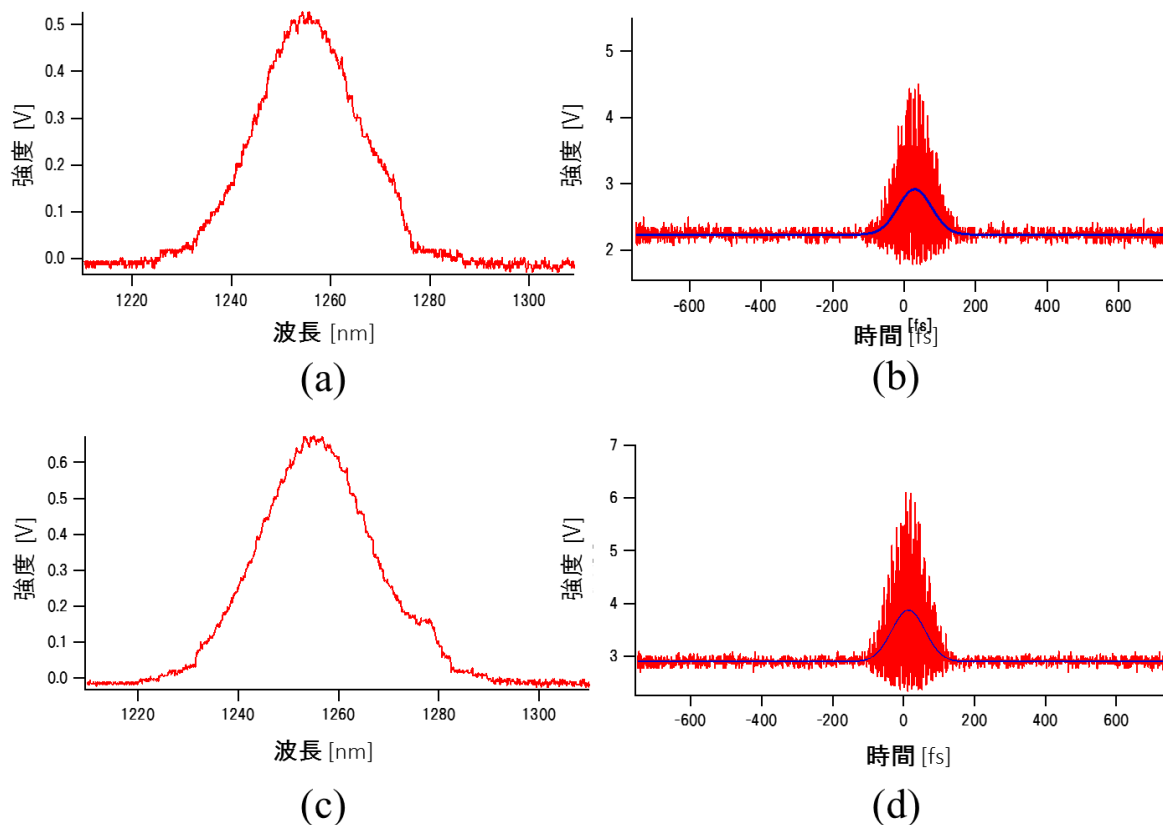


図 5-6 LMA-PCF 入射前の光スペクトル波形(a), 自己相関波形(b) , LMA-PCF 伝播後の光スペクトル波形(c)と, 自己相関波形(d)

### 5.3.2. 小型 SHG 顕微鏡ユニットのイメージング特性評価

小型 SHG 顕微鏡ユニットのイメージング特性を評価するため, 臍切片サンプル(固定標本) を小型 SHG 顕微鏡ユニットと従来型 SHG 顕微鏡の双方で取得し, SHG イメージ

の比較を行った。測定条件は、入射パワー20mW、計測時間2秒、イメージ領域400 $\mu$ m $\times$ 400 $\mu$ mで統一した。また、LMA-PCFファイバー伝送の影響を無くすため、レーザー光は、自由空間光学系を用いて、小型SHG顕微鏡ユニットと従来型SHG顕微鏡に導かれた。双方において、同じ対物レンズ（油浸, NA=0.9, WD=350 $\mu$ m）を用いた。図5-7(a)は従来型SHG顕微鏡、また図5-7(b)は小型SHG顕微鏡ユニットで取得したSHGイメージ（計測時間 = 2秒、イメージ領域 = 400 $\mu$ m $\times$ 400 $\mu$ m）を示している。測定部位が完全には一致していないため取得イメージは両者で異なるが、いずれにおいても、腱組織特有の単一軸配向したコラーゲン線維が確認できる。また、SHG光強度及びイメージコントラストに着目すると、装置の小型化に伴う解像度の低下やS/Nの低下は見られず、同等のイメージング特性を有していることが確認できた。

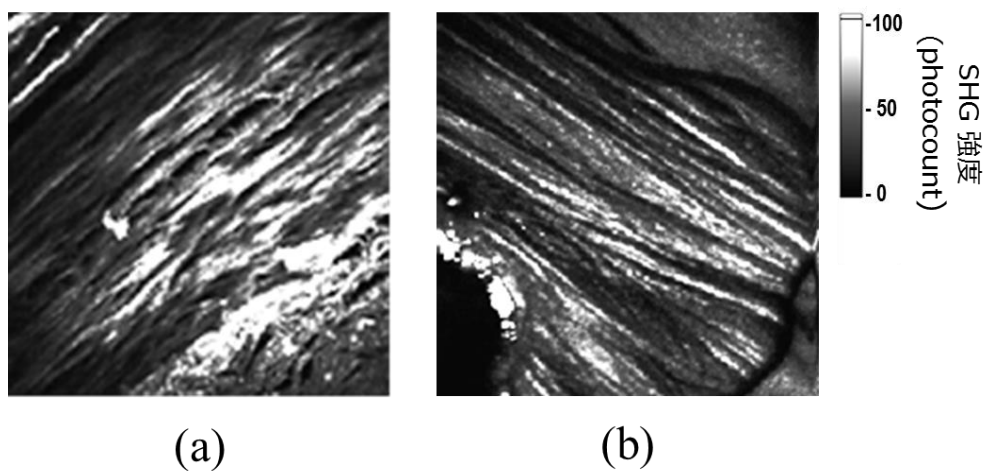


図 5-7 従来型 SHG 顕微鏡による SHG イメージ(a)と、  
小型 SHG 顕微鏡ヘッドによる SHG イメージ(b)

### 5.3.3. ヒト皮膚 *in situ* 計測

最後に、LMA-PCF と小型 SHG 顕微鏡ユニットを組み合わせたハンドヘルド SHG 顕微鏡を用いて、ヒト頬皮膚の *in situ* 計測を行った（入射パワー = 30mW, 計測時間 = 2 秒, イメージ領域 = 400 $\mu$ m  $\times$  400 $\mu$ m) 測定結果を図 5-8 に示す. 取得した SHG イメージは、先行研究において従来型 SHG 顕微鏡で取得した SHG イメージ[9,10]とほぼ同等な画質とコントラストであった. SHG 光が観測されていない部分は毛穴であり、その周囲を囲むようにコラーゲン線維が密に分布している. また、毛穴の左上部には太いコラーゲン線維が確認できた. このように、SHG 顕微鏡の操作性や簡易性を大幅に向上させながら、ヒト真皮コラーゲン線維の *in situ* 計測が可能な性能を有していることが確認できた.

図 5-8 での SHG イメージの輝度値は、コラーゲン線維の濃度や高次構造のみならず、レーザー光強度揺らぎ、生体組織の光学特性、測定深度などの影響も受ける. このため、輝度値の比較による定量分析は、必ずしも再現性が高いとは言えない. 一方、SHG イメージに画像解析を導入すると、これらの影響を除去した定量的分析が可能になることが分かっている. 我々は、従来型 SHG 顕微鏡で取得した SHG イメージに対して、2次元フーリエ変換法や第 4 章で述べたような画像自己相関法を導入することで、皮膚老化[10, 14], 腱修復[15], 骨芽細胞培養[8]に伴うコラーゲン線維構造変化の定量評価を行ってきた. 今回開発した小型 SHG 顕微鏡ユニットにおいても従来型 SHG 顕微鏡と同様な SHG イメージが取得できるようになったことから、臨床応用においてもコラーゲン線維構造の定量的評価が可能である.

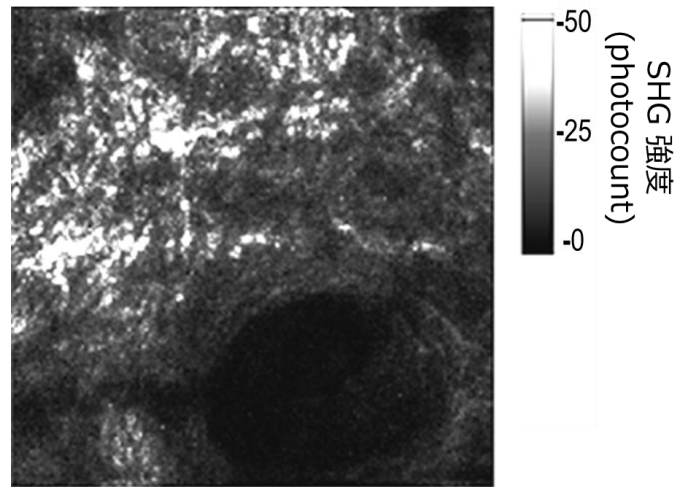


図 5-8 小型 SHG 顕微鏡ヘッドによるヒト頬皮膚の *in situ* SHG イメージ

#### 5.4. 考察

本研究では、光学定盤に据え付けて利用する必要があった従来型 SHG 顕微鏡を、ハンドヘルド可能なレベルまで小型化することに成功した。今後、臨床現場で SHG 顕微鏡を実際に使用するためには、小型レーザー光源の低価格化および顕微鏡ユニットの更なる小型化が必要であろう。小型レーザー光源の低価格化については、非線形光学顕微鏡等の応用分野で汎用化されることで、低価格化が加速すると思われる。一方、顕微鏡ユニットの更なる小型化に関しては、今回利用したガルバノミラーよりも小型で高速走査が可能な MEMS ミラーの導入も報告されている[16]。これらにより、SHG 顕微鏡の応用展開がより現実的になるとと思われる。

そこで、以下では、ハンドヘルド SHG 顕微鏡の応用展開の可能性について、考察する。皮膚科学関連分野での有力な活用先として、皮膚美容領域、特にアンチエイジング分野で活用が最も期待される。中でもしわ、たるみ、ほうれい線などの皮膚老徴は皮膚張

力などの皮膚の力学的性質の変化と密接な関わりがあると考えら、コラーゲン線維の配向と皮膚の力学的性質との関連への関心は高い。しかし機器が大型でプローブが固定されていることから、測定したい箇所に皮膚を固定することができず、測定を断念せざるを得ない箇所が存在した。例えば深いほうれい線部位の皮膚を計測しようとした場合、従来の計測機器は顔を上から乗せる方法で計測を行っていたため、顔の凸部が当たる場合は、測りたい凹部の皮膚をレンズの位置まで持って行くことはできず、観察を断念していた。しかしハンドヘルドのプローブを用いることで、形状に左右されることなく、希望箇所を測定することができる。また、測定データの信頼性向上という観点からも意味は大きい。これまで固定された顕微鏡に測定箇所が設置されるように被験者自らが動く必要があり、希望箇所を測定するため、無理な姿勢を取る場合もあったが、プローブの操作性が改善されることで、安定した姿勢で計測に臨むことができる。被験者が安定していることは、ヒト試験において、精度高いデータを取得するために欠かせない条件である。このように、ヒト計測の現場においては格段に操作性が向上するため、ハンドヘルドが可能になったことはユーザー側にとっては非常に大きな技術革新である。さらに、現時点では研究機関で行われるヒト測定は、熟練した研究員が行うことを想定しているが、将来、本機器が有用性を評価する機器などに発展した場合、熟練者以外でも機器を扱う機会が増えると考えられる。その点でも小型・軽量化、および操作の簡便性はますます重要になると考えられる。

また、皮膚医療関連分野での応用も期待できる。例えば、非侵襲観測性の利用により、熱傷や創傷の治癒状態をモニタリングする手段として有用であることは、従来型 SHG 顕微鏡を用いたラボレベルの研究において確認されている[11-13]。これをヒト計測に拡張した場合に想定されるのは、病院ベッドサイトでの利用であるが、このような臨床現場において可搬型 SHG 顕微鏡が威力を発揮するであろう。

また、皮膚科学関連分野以外での利用も期待される。例えば、整形外科領域において、腱断裂動物モデルの修復具合評価にも有用であることが、*ex vivo* 計測で報告されている[15,17]。今回のハンドヘルド SHG 顕微鏡が腱内視鏡として利用されると、腱断裂の修復状態を時系列でモニタリングすることが可能になると考えられる。更に、再生医用関連分野では、骨芽細胞産生コラーゲンの品質評価に利用可能であることが報告されている[8]。この先行研究では、SHG イメージングにあたって、培養サンプルを培養環境から取り出し、従来型 SHG 顕微鏡にセットして計測し、計測終了後に再びを培養環境に戻していた。しかし、細胞サンプルのコンタミネーション等のリスクを考えると、培養環境下でその場計測することが望ましく、それを可能にするのがファイバーカップリングされたハンドヘルド SHG 顕微鏡であると考えられる。

このように、今回開発したハンドヘルド SHG 顕微鏡は、SHG 顕微鏡の利用範囲を、応用サイドに大きく拡張する可能性を有していると言える。

## 5.5. まとめ

超短パルス光の LMA-PCF 伝送と小型 SHG 顕微鏡ユニットを組み合わせることにより、ハンドヘルド可能なレベルまで小型・軽量化し、任意の測定部位をフレキシブルに計測可能な小型 SHG 顕微鏡を開発した。開発した小型 SHG 顕微鏡は、ロバスト性やアライメントフリーな特性も併せ持っており、実験室外の様々な現場での利用が期待できる。



## References

- [1] Campagnola PJ, Dong CY: Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. *Laser Photon Rev.* vol. 5, no. 1, pp. 13-26, 2011.
- [2] Lu K, Chen J, Zhuo S, Zheng L, Jiang X, Zhu X, Zhao J: Multiphoton laser scanning microscopy of localized scleroderma. *Skin Res Tech.* vol. 15, no. 4, pp. 489-495, 2009.
- [3] Cicchi R, Kapsokalyvas D, De Giorgi V, Maio V, Van Wiechen A, Massi D, Lotti T, Pavone FS: Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophoton.* vol. 3, no. 1-2, pp. 34-43, 2010.
- [4] Kowalczyk L, Latour G, Bourges JL, Savoldelli M, Jeanny JC, Plamann K, Schanne-Klein MC, Behar-Cohen F: Multimodal highlighting of structural abnormalities in diabetic rat and human corneas. *Transl Vis Sci Technol.* vol. 2, no. 2, p. 3, 2013.
- [5] Ambekar R, Chittenden M, Jasiuk I, Toussaint KC Jr: Quantitative second-harmonic generation microscopy for imaging porcine cortical bone: comparison to SEM and its potential to investigate age-related changes. *Bone.* vol. 50, no. 3, pp. 643-50, 2012.
- [6] Mansfield JC, Winlove CP, Moger J, Matcher SJ: Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy. *J Biomed Opt.* vol. 13, no. 4, p. 044020, 2008.
- [7] Park CY, Lee JK, Kahook MY, Schultz JS, Zhang C, Chuck RS: Revisiting ciliary muscle tendons and their connections with the trabecular meshwork by two photon excitation microscopic imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* vol. 57, no. 3, pp. 1096-105, 2016.
- [8] Hase E, Matsubara O, Minamikawa T, Sato K, Yasui T: *In situ* time-series monitoring of collagen fibers produced by standing-cultured osteoblasts using a second-harmonic-generation microscope. *Appl Opt.* vol. 55, no. 12, pp. 3261-3267, 2016.
- [9] Yasui T, Takahashi Y, Ito M, Fukushima S, Araki T: *Ex vivo* and *in vivo* second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:Forsterite and Ti:Sapphire lasers. *Appl Opt.* vol. 48, no. 10, pp. D88-D95, 2009.
- [10] Yasui T, Yonetsu M, Tanaka R, Tanaka Y, Fukushima S, Yamashita T, Ogura Y, Hirao T, Murota H, Araki T: In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser. *J Biomed Opt.* vol. 18 no. 3, p. 031108, 2013.

- [11] Tanaka R, Fukushima S, Sasaki K, Tanaka Y, Murota H, Matsumoto T, Araki T, Yasui T: *In vivo* visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy. *J Biomed Opt.* vol. 18, no. 6, p. 061231, 2013.
- [12] Yasui Y, Tanaka T, Hase E, Fukushima S, Araki T: *In vivo* time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy. *Proc. SPIE.* no. 8948, p. 89480B, 2014.
- [13] 田中耕佑, 田中佑治, 長谷栄治, 福島修一郎, 荒木勉, 安井武史: 生体コラーゲン顕微鏡を用いた創傷治癒過程の *in vivo* 時系列モニタリング. 生体医工学シンポジウム 2014 予稿集, 1P-04, 東京, 2014.
- [14] 小倉有紀, 田中佑治, 長谷栄治, 山下豊信, 安井武史: SHG (第二高調波発生光) イメージの2次元自己相関解析に基づいたヒト真皮コラーゲン線維構造の定量化. 生体医工学, vol. 55, no. 1, pp. 97–102, 2017.
- [15] 長谷栄治, 南川丈夫, 佐藤克也, 米倉大介, 高橋光彦, 安井武史: 第2高調波発生光 (SHG) 顕微鏡を用いた腱修復の観察. vol. 54, no. 6. pp. 253-260, 2016.
- [16] Chia SH, Yu CH, Lin CH, Cheng NC, Liu TM, Chan MC, Chen IH, Sun CK: Miniaturized video-rate epi-third-harmonic-generation fiber-microscope. *Opt Express.* vol. 18, no. 16, pp. 17382-17391, 2010.
- [17] Hase E, Sato K, Yonekura D, Minamikawa T, Takahashi M, Yasui T: Evaluation of the histological and mechanical features of tendon healing in a rabbit model with the use of second-harmonic-generation imaging and tensile testing. *Bone Joint Res.* vol. 5, no. 11, pp. 577-585, 2016.



## 第6章 まとめ

本論文では、コラーゲン選択性を有する SHG 顕微鏡およびエラスチン選択性を有する TPF 顕微鏡を用いて、光老化部位（顔面）におけるヒト真皮構造の加齢変化を、コラーゲン線維とエラスチン線維の観点から評価した。

まず、SHG 画像解析を用いたヒト頬真皮コラーゲン線維構造の定量的評価に関する研究では、SHG イメージにテクスチャ解析を適用することにより、その定量評価を試みた。イメージの粗さ細かさを評価するテクスチャ解析法として知られる 2D-AC 法に着目し、真皮コラーゲン線維の SHG イメージに対して適用を行った。その結果、2D-AC 曲線の半値幅において、老化に伴うコラーゲン線維構造の変化が有意に確認された。このことから、2D-AC 法は、真皮のみならず、ランダムなコラーゲン線維配向を示す他の生体組織の構造評価にも有効であると思われる。例えば、培養細胞モデルが産生するコラーゲンは、低次構造で配向性も低いですが、これらの定量的評価にも使える可能性があり、今後は再生医療応用への展開も期待できる。また、2D-AC 法の抽出パラメータが、皮膚弾性率と高い相関性を示したことも興味深い。これは、真皮の力学的性質がコラーゲン線維構造に大きく依存していることを示す直接的エビデンスであり、皮膚の力学特性を評価するパラメータとしても利用できる可能性を示している。

可搬型 SHG 顕微鏡の開発に関する研究では、計測に高いフレキシビリティを付与する上で要となる超短パルス光のファイバーデリバリーを、大口径フォトニクス結晶ファイバーの利用により成功させた。更に、SHG 顕微鏡の光学系をチューブレンズシステムにパッケージ化することにより、大幅に小型化された SHG 顕微鏡プローブを開発した。これらの複合は、観察部に対する小型 SHG プローブの高いアクセシビリティを付与し、測定可

能部位の大幅な拡大及び容易なハンドリングを提供する。特に、複雑な3次元曲面形状を有する顔面の計測において、従来の管体型 SHG 顕微鏡では測定困難であった顔部位（豊麗線や頸部など）の計測が可能になる。また、従来の管体型 SHG 顕微鏡のよう、被験者が測定のために無理な体勢をとる必要も無くなる。被験者の負荷の軽減は、被験者にメリットがあるだけでなく、測定中のモーションアーチファクトを防ぐことにつながり、データの信頼性向上という観点からも意味は大きい。こういったことから SHG 顕微鏡の可搬化は、SHG 顕微鏡の操作性を大きく向上させると期待される。

これら一連の研究は、従来の侵襲的に基づいた皮膚老化研究とは異なり、非侵襲的手法であるため研究目的に応じて自由度の高い研究を行うことを可能にしている。その結果、新たな現象の解明に繋がることが期待され、さらなる技術開発および知見の蓄積の相乗的な発展が予想される。今回は、皮膚美容やアンチエイジングの観点から最も着目されている「顔」を対象として研究を進めており、老化や皮膚疾患の診断技術としての活用および、将来の老化や疾患リスクの予見などにも応用について検討してきたが、装置の小型化などを取り入れることで、将来は正常部位にとどまらず、皮膚疾患への診断技術に拡張されることが期待される。

## 本研究に関する公表論文

主論文

### 1. 第4章

SHG（第二高調波発生光）イメージの2次元自己相関解析に基づいたヒト真皮コラーゲン線維構造の定量化

小倉有紀, 田中佑治, 長谷栄治, 山下豊信, 安井武史 / 生体医工学, Vol. 55, No. 2, pp. 97-102 (2017)

### 2. 第5章

第2高調波発生顕微鏡の小型化

小倉有紀, 厚田 耕佑, 長谷栄治, 南川丈夫, 安井武史 / 生体医工学, Vol. 55, No. 2, pp. 91-96 (2017).

### 3. 第4章

Texture analysis of second-harmonic-generation images for quantitative analysis of reticular dermal collagen fiber *in vivo* in human facial cheek skin

Yuki Ogura, Yuji Tanaka, Eiji Hase, Toyonobu Yamashita, Takeshi Yasui.

Experimental dermatology (Printing Accepted for publication: 05-Apr-2018)

## 謝辞

本論文を執筆するにあたり，終始ご指導を賜りました徳島大学大学院理工学研究部・安井武史教授には深く感謝の意を表しますとともに厚くお礼申し上げます。

学位の審査におきましては，貴重なご指導とご助言を頂きました，主査の徳島大学大学院理工学研究部・岩田哲郎教授，副査の松本健志教授，南川丈夫准教授，協力者の佐藤克也講師には心より感謝申しあげます。

研究を進めるにあたり多大な協力をいただきました（公財）高輝度光科学研究センター長谷栄治氏には，大変お世話になり，厚くお礼申し上げます。

実際の実験を行うにあたりご協力いただきました徳島大学大学院理工学研究部・安井研究室の皆様並びに株式会社資生堂グローバルリサーチセンターの関係各位に，この場を借りて厚くお礼申し上げます。

最後にここまで私を支えてくれた家族に心から感謝の意を表したいと思います。

平成 30 年 9 月 27 日