

偏光分解 SHG 顕微鏡を用いた ケロイド異常産生コラーゲン線維の定量評価 Quantitative evaluation of abnormally produced keloid collagen fibers using polarization-resolved SHG microscope

徳島大 pLED¹, 徳島大医², 徳島大院理工³, 徳島大院医歯薬⁴

°鈴木昭浩¹, 李雅希², 長谷栄治¹, 佐藤克也³, 峯田一秀⁴, 橋本一郎⁴, 安井武史^{1,3}

pLED, Tokushima Univ.¹, Grad. Sch. Med. Sci., Tokushima Univ.², Grad. Sch. Technol, Ind & Soc. Sci.,
Tokushima Univ.³, Grad. Sch. Biomed. Sci., Tokushima Univ.⁴

°Akihiro Suzuki¹, Masaki Ri², Eiji Hase¹, Katsuya Sato³, Kazuhide Mineda⁴, Ichiro Hashimoto⁴, and
Takeshi Yasui^{1,3}

E-mail: suzuki.akihiro.2@tokushima-u.ac.jp

ケロイドは、創傷治癒過程の炎症期が長引きコラーゲン線維が異常産生・蓄積されることにより生じる。当初の創傷範囲を超えて正常な皮膚にも炎症が広がり、痛みやかゆみ、審美的な問題などを引き起こし患者の QOL (生活の質) を著しく低下させる。しかし、発生メカニズムは未だ不明とされているため、ケロイドの発生メカニズムを明らかにし、治療指針を得ることが強く望まれている。コラーゲン動態を生きたありのままの状態での非侵襲に可視化可能なイメージング手段として、『SHG 顕微鏡』¹がある。この方法では、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、非染色・非低侵襲でコラーゲン線維を可視化できる。加えて、SHG 光の発生強度が入射レーザー偏光状態に対して敏感に変化することを利用した偏光分解 SHG 顕微鏡^{2,3}を用いれば、局所的なコラーゲン配向角度とその構造異方性を測定することが可能である。本研究では、SHG 顕微鏡を用いたケロイド評価の原理検証実験として、ヒト皮膚の正常/ケロイド/肥厚性癬痕の各部位 (切片組織) におけるコラーゲン線維構造を可視化し、その違いを定量的に評価することを目的とする。

測定サンプルには、正常皮膚とケロイド組織、肥厚性癬痕組織を使用した。5 μ m の厚みで連続組織切片を作製し、これを SHG 顕微鏡および組織染色を用いて観察した。また、SHG 画像取得には、光源にフェムト秒レーザー (中心波長 800 nm、パルス幅 120 fs、繰返し周波数 80 MHz) を用いた SHG 顕微鏡を使用した。光源から出射したレーザー光は、ガルバノミラーとリレーレンズにより高速 2 次元走査された後、対物レンズ (N.A. = 0.95, WD = 150 μ m) を用いてサンプルに照射される。サンプルから発生する光は SHG 光成分のみを抽出した後、光電子増倍管により検出することで SHG 画像を取得した。続いて、コラーゲン線維定量評価を行うため、偏光分解 SHG 解析を行った²。ここでは、直線偏光の方位角を回転させながら複数枚の偏光分解 SHG 画像を取得し、各ピクセルにおける SHG 強度を理論的にフィッティングした際のフィッティングパラメーターとしてコラーゲン配向角度と異方性を抽出した。

SHG 画像では、コラーゲン線維が選択的に可視化され、真皮コラーゲン線維構造の違いを確認できた。また、ケロイド進行過程で生じるコラーゲン線維凝集 (硝子化) と思われるコラーゲン線維塊を確認した (図 1)。また、各サンプルの偏光分解 SHG 解析によるコラーゲン構造異方性の測定結果を図 2 に示す。この結果から、ケロイド組織は正常皮膚と比較し、コラーゲンの構造異方性が低下していることが確認された。

- 1) T. Yasui *et al.*, *J. Biomed. Opt.* **9**, 259 (2004).
- 2) I. Gusachenko *et al.*, *Biophys. J.* **102**, 2220 (2012).
- 3) Y. Tanaka *et al.*, *Biomed. Opt. Express* **5**, 1099 (2014).

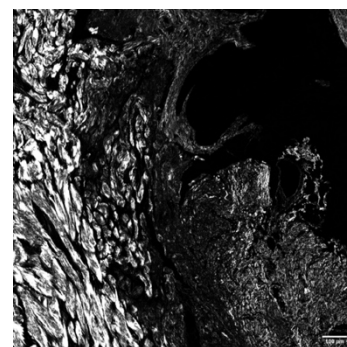


Fig. 1 SHG image of Keloids. Image size = 1.4*1.4mm.

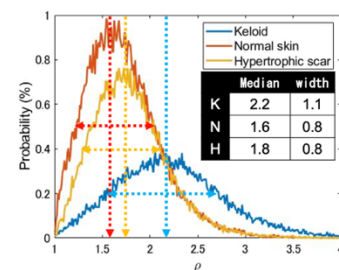


Fig. 2 Results of polarization SHG analysis.