

生体皮膚「質感」「機能」二光子イメージングによる化粧品作用の評価システムの確立

自治医科大学分子病態研究部

西村 智

We visualized skin-lesions in living mice by two photon microscope, and observed inflammatory responses after scratch injuries. We also developed hand-held skin imaging device which can cover broad time-and-space scale. System can be minimized to hand-held size, and weighs less than 300g. This device can replace current pathological and radiographic examination, and daily outpatient skin lesion observations. Skin barrier or immune functions can be recorded with outlooks in real-time, after skin treatment or drug administrations.

1. 緒言

我々は非線型光学現象を用いたイメージングシステムにより、多様な疾患領域でのバイオイメージングを行っている。基礎的には、血管イメージングでは生体スキャンの高速性を活かして、リアルタイムで広視野・高解像度でのイメージングを行っている。本研究ではまず生体皮膚に特化して二光子顕微鏡をベースとしたイメージングデバイスの作り込みを行った。元来、生体皮膚はイメージングの良い適応であり、皮膚疾患の治療から化粧品作用の検証まで広く用いることができた。二光子顕微鏡では生体親和性が高く、平均エネルギーの低い近赤外レーザーで局所的に光励起が可能であり、生体皮膚の良好な画像が我々のシステムでも得られた。同時に、生体皮膚に傷害をくわえ、創傷治癒の全過程をイメージングするなど、皮膚機能や外観の解析が行われた。

一方で、皮膚科外来診療での皮膚病変の観察・記録や、あるいは、美容分野での皮膚観察に焦点をあて、最小化した顕微鏡システムを開発した。本システムでは、手持ちサイズで、完全オートフォーカス、完全オートシャッター、無限焦点可変、無限倍率可変を実現した。一見、荒唐無稽にみえる広スケールのイメージングを新規光学デザインにより可能にしているため、独自性が高く今後の展開に期待が持たれた。

2. 二光子顕微鏡による生体皮膚観察について (方法・結果)

まず、我々は、血管イメージングで実績のある二光子顕



Development of two photon microscope and imaging system for evaluation of skin outlooks and functions after treatment.

Satoshi Nishimura
Jichi Medical University

微鏡を用いて皮膚観察を行った。マウスの広い皮膚を観察対象とする際でも、三次元的な取得情報を増やしていく際には、生物用の瞳の小さい顕微鏡レンズや光学系、現在のサイズの素子を用いるとかならず一定の理論的限界が存在することが初期検討で明らかになった。生体の質感を十分に表すことはしばしば困難であった。皮膚外観はミクロでの質感と、マクロでの大きな形態情報、の両者が重要であり、二光子顕微鏡での視野の狭さは大きな限界であった。従来の観察システムは、高解像度では0.1mm視野であり、サイズを広げていくと画質・解像度の劣化が著明であった。

皮膚全体、マクロ・ミクロの統合的な外見解析のためには、広視野・高解像度の光学的な両立が欠かせない。従来の顕微鏡では、光路がわずかφ25mmに固定されており、なおかつ視野範囲と解像度にはトレードオフが存在していた。ダーマトグラフィとして使用するためには視野範囲の拡大が必須と考えられるため、その制約を外すことを検討した。一眼レフカメラ、半導体用レンズ、あるいは、天体望遠鏡のようなサイズの光学系を考えると、マウスのマクロ観察に必要な要件を達成することができる。そこで、我々は、

- ・広視野・低倍率・高NAレンズによる顕微鏡ミクロイメージング
- ・低F値・高倍率・低収差マクロレンズによる体表スキャン

を行った。

三次元的な光線追跡再現まで視野にいれ生体皮膚質感のミクロ情報は主に二光子顕微鏡を用いてスキャンを行った。皮膚に最適化を行い、空間解像度200nm、30fpsでのリアルタイム4色イメージングを皮膚で達成した。

図1・図2のように手指や腹部皮膚のイメージングを行い、体表面から皮膚角質全層、さらには、皮下結合組織・血管まで可視化が可能であった。画質は観察部位に大きく依存したが、皮膚前処置や皮膚表面のコーティング、液浸レンズの使用により改善が可能であった。

さらに図3のように固定処理を行えば、特定のタンパク

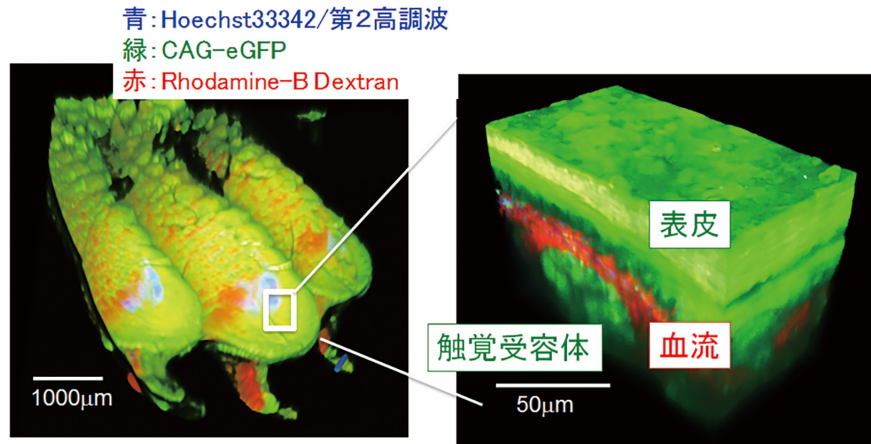


図1 マウスの足の指表面の二光子励起顕微鏡画像

CAG-eGFP マウスに Rhodamin-B デキストランを静脈注射後、麻酔下で顕微鏡ステージに乗せ、足指先皮膚の深部観察を行った(緑: 表皮・機械受容器、赤: 血流)。指先の皮膚は0.2mm程の厚い表皮に覆われており、その下には触覚受容器様の小体(被包神経終末)と思われる構造物が観察できた。

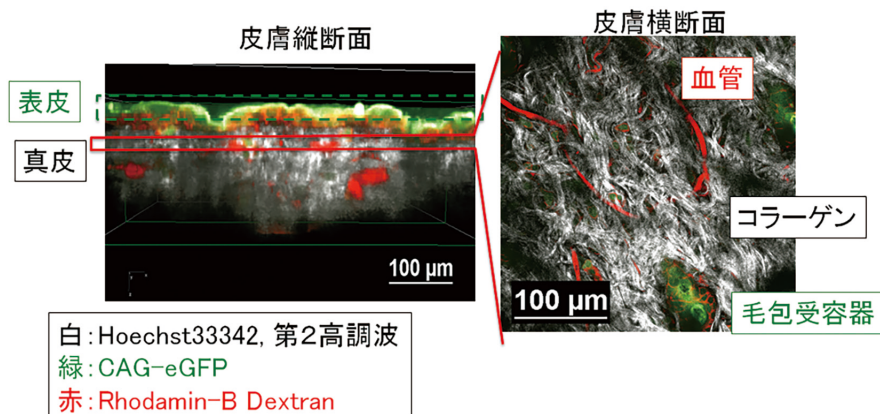


図2 マウス腹部の皮膚の二光子励起顕微鏡画像

CAG-eGFP マウスに Rhodamin-B デキストランを静脈注射後、腹部を脱毛し、麻酔下で腹部皮膚の深部観察を行った。図1の指先の画像とは異なり、腹部では皮膚真皮のコラーゲン線維網(白)が、第2高調波測定により詳細に観察できた。また、コラーゲン線維に密に包まれて点在する毛包受容器(緑)や血管の走行(赤)も詳細に観察できた。

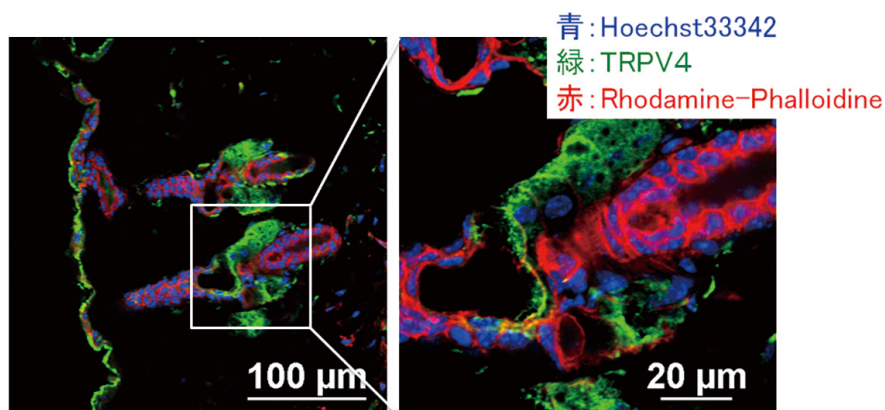


図3 皮膚の免疫染色画像

マウスの脚を脱毛処理した後、4mm角の皮膚を採取して凍結標本を作成した。免疫組織化学により皮膚断面の構造を共焦点顕微鏡により観察した(青: 核、緑: TRPV4 チャンネル、赤: アクチン)。触覚受容体の1つであるTRPV4 チャンネルを染色したところ、表皮・毛包受容器もふくむ皮膚構造だけでなくチャンネル分布もイメージングが可能であった。毛根部位は細胞骨格のアクチンフィラメントを多く発現しており、Rhodamin-phalloidine 色素により観察可能であった。

質の分布をホールマウントでも切片でも高解像度での皮膚表面での画像化が可能であった。

また、我々は皮膚の機械的傷害を加え実時間で、皮膚反応を観察し、炎症性の細胞浸潤を画像としてリアルタイムにとらえている（図4）。化粧品や美容処置、薬剤投与による反応観察にも活用可能と思われた。

本システムはきわめて量子効率の高い高感度検出器・フェムト秒レーザーを用いており、可視化に伴う生体への影響は最小限である。マウスにおいて安全性を担保すれば、ヒトにも理論的には用いることができる。しかし、解像度を維持するためにはある程度のサンプル側への制約がある。システムのサイズやコストからもヒトへの応用にはやや遠いと考えられた。なおかつ、極端に広い視野での画像取得は技術的に困難であり、体表面や皮膚病変全体の一度でのスキャンは困難である。そこで、次項ではマクロ・ミクロの両極端での広いスケールを網羅しながらも、手持ちサイズで運用可能なシステム開発を目指した。

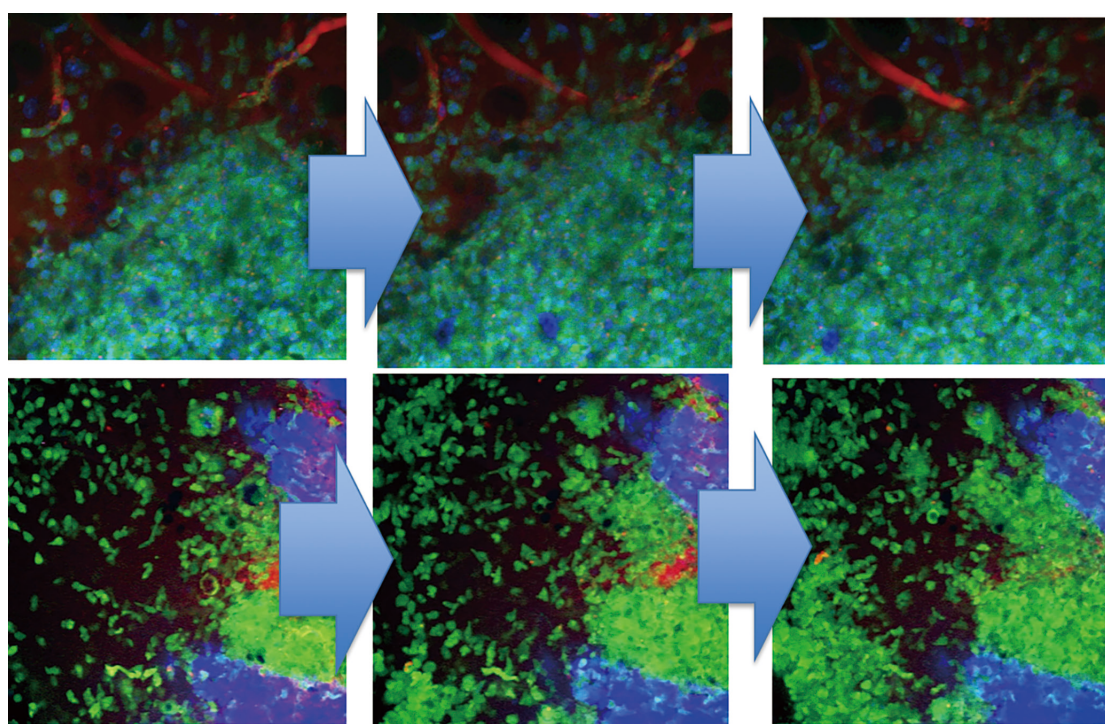
3. 手持ちサイズシステムによる生体皮膚観察について(方法・結果)

若年群と加齢群の毛包間表皮を比較したところ、表皮生体皮膚観察では、現在ダーマトスコプが頻用されている。しかし、イメージングへのニーズは幅広く十分なソリューションとはいえない。ユーザー（美容医、皮膚科医、化粧品メーカー）の声をまとめていくと、おそらく

- 小さいものから大きなものまで撮影したい
- 高解像度撮影を簡単に手持ちで行いたい
- フォーカシングや位置だしから解放されたい
- 手ぶれはいやだ
- 調節ダイヤルをあつかいたくない
- コストは最小限に

といったところと予測された。

ダーマトスコプを補完するためにズームタイプのシステムが考えられる。しかし、従来のズーム型の顕微鏡やマ



青: Hoechst33342/第2高調波

緑: CAG-eGFP

赤: Rhodamine-B Dextran

図4 皮膚傷害後のリアルタイムイメージング

フレーム間隔は5分。実時間での細胞浸潤が二つの画像例からもよみとれる。より長期には、皮膚の線維化、創傷治癒、炎症反応のすべてを可視化可能とおもわれた。美容処置・化粧品や薬剤投与後のリアルタイムイメージングとしても活用可能である。

クロズームレンズでは、ズーム両端(実質的な常用域)では収差により解像度が低下し、像も明るくない。また、これらのカメラ部品は調節箇所が多く、不安定な皮膚を対象とするとハンドリングがきわめて困難である。そこで、我々はあらたな光路設計、結像設計をデザインし、マクロミクロを完全にオーバーラップした撮影を可能にした。リアルタイムで高速で像モードを切り替え、フォーカス、ズーム、像モード転換を一度に行っている。ユーザーの操作部をほぼフリーにしているが、解像度やシステム重量とのトレードオフを避け、実効的提案とした。

最小化した顕微鏡システムでの超高解像度と超広視野の両立例。生体観察をリアルタイムで行えるため、図5のように皮膚観察が可能になった。マクロミクロの網羅、全焦点位置での撮影・無限大ズームファクターの恩恵に簡単にあずかれるようになっている。一本一本の毛根、毛包構造、そこにある細胞輪郭まで無染色で可視化されている。表面

だけでなく、深部構造の情報まで得られており、顕微鏡結像の特性が生かされている。

4. 考察および総括

生体二光子顕微鏡観察がごく低侵襲な赤外レーザーでも可能であることの実証が行われた。これは、美容処置・薬剤投与を行った際の皮膚反応を実時間で観察できるということを意味している。ヒトにおいても、無染色でも同様のイメージングは理論的には可能である。残るは、長期的な安全性評価だが、理論的には自然光とかわらない範囲と予測できる。化粧品をほどこした際に、どのように皮膚のミクロな変化がおきるのか、アレルギー反応はおきていないのか、といった評価が行われるため、開発研究にも用いられる。同時に、皮膚科診療にも大きなメリットが予測される。悪性腫瘍の鑑別だけでなく、乾癬をはじめとする皮膚の機能的診断にも本システムは有用と考えられた。

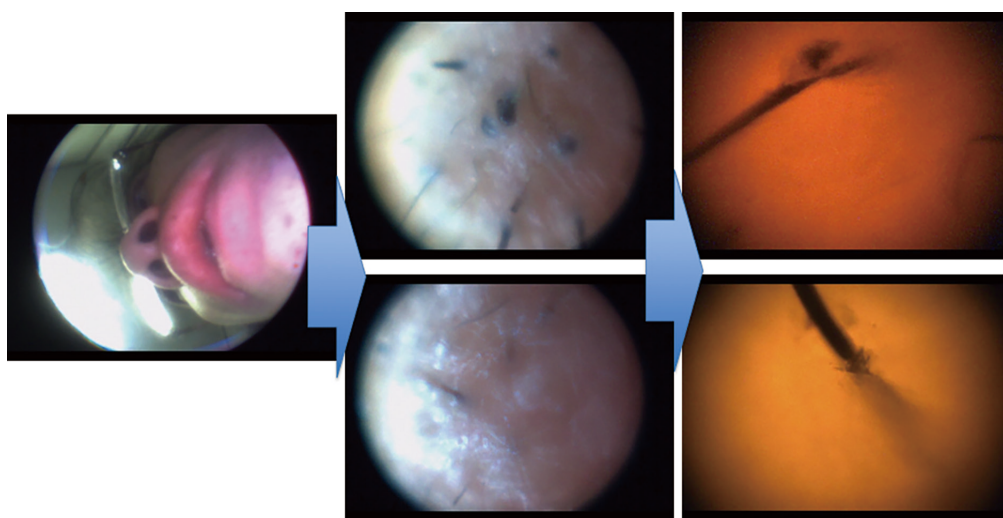


図5 生体・ヒト皮膚観察のリアルタイムイメージング