皮膚の機能・特性と物理計測

高橋元次

エムティーコンサルティング ☎ 236-0005 神奈川県横浜市金沢区並木 2-12-1-303

(2013年9月29日受付; 2013年10月26日掲載決定)

Functions/Characteristics of the Skin and Physical Measurements

Motoji TAKAHASHI

MT Consulting, 2-12-1-303 Namiki, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0005

(Received September 29, 2013 ; Accepted October 26, 2013)

Many bioengineering techniques to elucidate functions and characteristics of the skin have been developed until now. They measure the water content of stratum corneum, transepidermal water loss (TEWL), skin surface contour, mechanical properties, blood flow, sebum secretion rate, wrinkles, skin pigmentation and so on. These instrumental measurements are applied to validation of the efficacy of the cosmetics. Recently, a few *in vivo* bio-microscopes which non-invasively visualize horizontal image or vertical cross section of the skin with subcellular resolution, have been developed by using non-linear optics phenomenon. In this paper, I describe how skin measurement technologies have been changed with time and applied to cosmetic science, and also review *in vivo* bio-microscopes, they are optical coherence tomography (OCT), confocal laser scanning microscope (CLSM), second harmonic generation (SHG) microscope, multi photon microscope (MPM), and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS), which will be very helpful to examine the effects of the cosmetics on the skin.

KEYWORDS : skin bioengineering, efficacy test, bio-microscope, skin measurement, non-invasive method

1. はじめに

皮膚の機能や生理特性, さらには内部構造に関して皮膚を傷つけずに表面から, 接触あるいは非接触で測定する機器が多く開発されている。測定対象は皮膚の保湿機能やバリア機能, キメやシワなどの皮膚表面形状, 力学特性, 光学特性, 発汗, 皮脂分泌, 皮膚血流, 代謝活性など幅広い。これらは主に機器を用いた物理計測であるが, これ以外に非侵襲的に肌状態を調べる方法として, 粘着テープで皮膚表面の角層を1層剥がして角層中のサイトカインや酵素活性を調べるなど生物化学的なやり方もある。いずれの方法も化粧品研究において肌状態や有効性の評価などに広く用いられている。

皮膚の物理計測に関しては Table 1 に示すように計測技術の進歩とともに大きく変化した。たとえば, 角層水分量測定において以前は皮膚表面の電気特性から間接的

に推定していたが, 最近では *in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡によって水分子を測定し, 角層・表皮の深さ方向における分布状態について詳細に検討できるようになってきた。また, 皮膚内部の観察においては, 超音波や MRI (Magnetic Resonance Imaging) を用いた断層撮影以外に, OCT (Optical Coherence Tomography: 光干渉断層撮影法), *in vivo* 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (confocal laser scanning microscope: CLSM), SHG 顕微鏡 (Second Harmonic Generation: 第二高調波発生), 多光子 (励起蛍光) 顕微鏡 (multi photon microscope: MPM), CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) 顕微鏡など, 生体顕微鏡とよばれる新しい測定機器が多く開発され, 皮膚の組織構造だけでなく皮膚内の成分分析も可能になってきている。

本稿では Table 1 に掲げた項目の中から化粧品の機能評価において基本と考えられている保湿 (角層水分量), バリア, キメ, 力学特性, シワ, シミの測定について述べるとともに, 最近, 進歩が目覚ましい生体顕微鏡の活

Table 1. Skin functions/characteristics and *in vivo* measurements.

skin functions/characteristics	1 st generation methods	2 nd generation methods	3 rd generation methods
skin hydration (water content of stratum corneum)	• electrical properties (Skicon, Corneometer)	• ATR—FTIR • NIR	• <i>in vivo</i> confocal Ramann spectroscopy
Skin barrier (TEWL)	• closed chamber (Meeco, Vapometer, AquaFlux)	• open chamber (Evaporimeter, Tewameter)	
skin surface topology (texture, scaling, wrinkle)	• replica 2D analysis • Dermascope	• replica 3D analysis (laser 3D profilometer)	• <i>in vivo</i> 3D analysis (PRIMOS, Derma-Top Blue)
skin mechanical properties	• Stress-strain curve • forced oscillation • suction cup(Cutometer) • mechanical impedance	• resonance frequency (Venustron) • acoustic impedance • air pressure (non-contact)	
skin internal structure	• ultrasonography • MRI	• OCT (functional OCT) • <i>in vivo</i> CLSM	• SHG • MPM • CARS
skin color pigmentation erythema	• (L* a* b*) • (H, V, C)	• melanin content in skin • hemoglobin content in skin (ex. Mexameter)	• melanin distribution in epidermis (CLSM MPM)
skin blood flow	• laser Doppler (single point measurement)	• laser Doppler • laser speckle (2D measurement)	Doppler-OCT (functional OCT)
epidermal cell proliferation	• turnover time of stratum corneum (dansyl chloride, surface area of corneocyte)	• <i>in vivo</i> fluorescence spectrum (tryptophan, NAD(P)H)	
anti-oxidation ROS, AGE	• EPR • chemiluminescence • AGE Reader		

用について紹介する。なお, *in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡, CLSM, SHG 顕微鏡, MPM については, 本誌, 皮膚計測技術の最新動向 (平尾哲二他) を参考にしたい。

2. 角層水分量測定

外気が乾燥すると皮膚の最外に位置する角層中の水分量は低下し, 表皮ターンオーバーが亢進して機能の劣った角層が形成される。その結果, 皮膚バリア機能や保湿機能が低下し, 角層はさらに乾燥してキメは悪化し, 表面には鱗屑が生じざらつき, 肌の透明感や柔軟性が失われる。このように角層中の水分量は皮膚の恒常性や美しさを維持するうえで重要な役割を果たしており, その測定には様々な機器が用いられている。

2.1 高周波電流法

MHz 程度の高周波電流を皮膚表面に流し皮表コンダクタンスあるいはキャパシタンスを測定する。皮表の水分量が多いほど測定値が高くなることを利用した測定器で, skicon™ や Corneometer™ など多くのものが市販されている。測定深度, 再現性, ダイナミックレンジ (測定域) などにおいてそれぞれ特徴があるものの機種間の

相関は高い¹⁾。電極を一定の圧力で数秒間皮膚に押しつけるだけで容易に測定できるが, 周囲の環境条件に影響されやすいので温度 20~22℃, 湿度 50% 前後など発汗の影響のない一定環境下で行う。測定値は NMF (Natural Moisturizing Factor。角層中に存在する遊離アミノ酸を主成分とする吸湿性の高い物質) 量ときわめて良い相関²⁾があるが, 測定深度は明確ではなく角層および表皮生細胞層の一部を測定していると考えられている。

2.2 ATR-FTIR 法 (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared)

赤外線吸収スペクトルを用いた方法である。皮膚に対する測定深度は 1 μm 程度で角層表面の水分を測定している。アミド I (1645 cm⁻¹) の吸収は蛋白と水分の影響を受けるが, アミド II (1545 cm⁻¹) は蛋白の影響だけなので二つの吸収の比 (アミド I/アミド II; MF moisture factor) を用いて相対的な水分量が測定できる。アミド I, II のピーク以外では, 2100 cm⁻¹ 近辺のブロードな水の吸収ピークを用いる³⁾。

赤外吸収によるこの方法は角層水分量だけでなく角層細胞間脂質の規則性や量的な検討, また結晶構造についても情報が得られるのでテープストリッピングを繰り返

しながら測定すれば深さ方向において、水、脂質に関して様々な観点から検討できる⁴⁾。

2.3 近赤外線分光法 (Near Infrared Spectroscopy : NIRS)

近赤外の波長領域で水分子は二つの明瞭な吸収帯 (1450 nm と 1940 nm) をもつ。皮膚による吸収が小さい 1100 nm (比較するための基準値) と水分子による吸収の大きい 1940 nm のピーク差は SkiconTM で測定した値やドライスキンの臨床スコアと良く対応することが報告されている⁵⁾。しかし、近赤外光は皮膚内への到達深度が深く (数百 μm 程度)、1940 nm のピーク強度は角層の水分だけでなく表皮生細胞層や真皮層の水分の影響も受けるので、この方法を用いて角層水分量を推定する場合は注意しなければいけない。一方、短時間 (1~2 時間程度) におけるワセリンやクリーム塗布による皮膚水和効果を調べる場合は、表皮生細胞層や真皮層における水分の変動は小さいので、測定された水分量の変化は塗布によって生じたと考えてよい。NIRS は皮膚に接触せずに測定できるので塗布物が表面に残っている場合でも評価可能である。

以前から顔面全体における水分の分布状態を NIR 画像で撮影されてきたが、専ら用いる光の波長領域は 1000~1700 nm で感度が低かった。最近、1000~2200 nm の波長領域で撮影可能な NIR カメラが開発され、水による吸収の最も大きい 1950 nm 近辺のピークから水分を、1775 nm 近辺のピークから油分を測定する方法が提案され、素顔だけでなく化粧品塗布による水分、油分の変化を同時に調べる事が可能である⁶⁾。

2.4 磁気共鳴画像法 (MRI : Magnetic Resonance Imaging)

プロトン (^1H) のシグナルを検出して皮膚深さ方向における水の分布状態を断層像で示す方法である。通常の MRI では深さ方向の分解能が 50 μm 程度で顔面や前腕などの角層 (10~20 μm 程度の厚さ) をターゲットにして測定することは難しく、指先や踵のように厚い部位 (角層厚は 100 μm 程度) に限られ、ワセリン塗布の影響や水浸漬による変化などが検討されてきた⁷⁾。最近、GARfield (Gradient At Right angles to field) MRI を用いて 10 μm 以下の分解能で測定できるようになり、緩和時間 T_1 から水分を、 T_2 から NMF を求め、深さ方向における分布状態が調べられている⁸⁾。後述する *in vivo* 共焦点ラマン分光法で得られた結果とも比較的良い対応が認められており、また水分量だけでなく水の特性 (結合水など) や ^{31}P についても調べることができるので、今後、肌評価への適用が期待される。

2.5 *in vivo* 共焦点ラマン分光法 (Confocal Raman Spectroscopy : CRS)

ある物質に振動数 ν_0 の光が照射されると入射光と等しい振動数をもつ散乱光 (レイリー散乱) 以外に振動数が $\nu_0 - \nu$ (ストークス) あるいは $\nu_0 + \nu$ (アンチストークス) の弱い光 (ラマン散乱光) が散乱される。入射光とラマン散乱光の振動数の差 (ν) をラマンシフトといい、この値は分子構造 (官能基) に固有の値を示すので ν の分布状態 (ラマンスペクトル) から物質の構造がわかる。一般的には入射光より振動数の小さいストークス散乱光が解析され、共焦点ピンホールを装着することにより深さ方向の情報が得られる。

近年、*in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡⁹⁾を用いて、角層を含む表皮中の深さ方向における水分や NMF の分布状態が調べられている。前腕における角層中の水分分布は皮膚表面から内部に向かって増加し、約 15~20 μm の深さではほぼ一定になる。この値が角層の厚さに相当する。これまで角層水分量測定に使われてきた高周波電流法も NIRS も測定深度が明確でなくどこまでの深さの水分を測っているのかについては不明であったが、初めて *in vivo* で角層・表皮の深さ方向における水分量変化を調べることが可能になった。また、水分や NMF 以外の生体成分や皮膚に塗布された薬剤の分布状態などについても調べることができる。

3. 皮膚バリア機能測定

皮膚には様々な防御機能があり、これらのほとんどは角層が担っている¹⁰⁾。防御機能はそれぞれの作用に対応して抗酸化 (バリア) 機能、抗微生物 (バリア) 機能などとよばれているが、その中で最も重要な機能が「透過に対するバリア機能」なので、これを単にバリア機能と略することが多い。透過に対するバリア機能には外界からの異物の侵入に対する防御作用 (out-in barrier) と体内からの過剰な水分の蒸散を抑え乾燥から生体を守る防御作用 (in-out barrier) がある。両方を合わせて透過に対するバリア機能とよんでおり、角層と表皮顆粒層にあるタイトジャンクションが関与している。in-out barrier は角層水分量とならんでスキンケアを考えるうえで重要な皮膚特性で、体の内側から外側に向かって単位時間、単位面積あたりに蒸散する水分量 [$\text{g}/\text{m}^2/\text{hr}$]、すなわち、TEWL (transepidermal water loss : 経表皮水分損失量) で表され、測定には様々な機器が用いられている¹¹⁾。

一方、out-in barrier を測定する市販機器はないが、最近、水溶性着色料を皮膚に一定時間、接触させた後の皮膚色を測定し、その変化から皮膚のバリア機能を簡便に調べる方法が提案されている¹²⁾。皮膚色の変化が大きい

ほど皮膚バリア機能が劣っていると考える。タートラジンを生理食塩水に溶解させ、その水溶液を皮膚に接触させた後、皮膚色 (b^*) を測定し、 b^* の増加率からバリア機能を評価する。この方法はいくつか問題点を残してはいるものの、TEWL 測定とは違う原理で外部からの物質の浸透性を調べ、バリア機能を評価しているため両者を平行して行えば皮膚バリアに対する新たな切り口になると思われる。

4. キメ測定

皮溝と皮丘で織りなされた皮膚表面の紋様はキメとよばれる。キメが整っていると皮膚内部反射光が増え、肌の透明感が上がり、キメの良さは美しい肌の条件の一つである。また、皮膚が伸展されたときキメはその応力を緩和して簡単に角層が破断されないように働く。

キメを調べるには大別して2通りの方法がある。一つはシリコンラバーなどの印象剤を用いて皮膚表面のレプリカをとり、それを解析する方法（レプリカ法）と、もう一つはレプリカを介さずに直接、皮膚表面形状を調べる方法（*in vivo* 法）である。さらにレプリカ法は、CCDカメラでレプリカを拡大撮像して画像を解析する方法（二次元画像解析法¹³⁾）とレーザー光を用いてレプリカ表面の凹凸を精度よく三次元計測する方法（三次元解析法^{14~16)}）に分かれる。*In vivo* 法においても同様で、マイクロスコープを用いて皮膚表面を撮影し画像解析する方法（二次元画像解析法¹⁷⁾）と格子状のパターンを皮膚に投影しその画像の歪みから皮膚の三次元情報を得る方法（三次元解析法^{18, 19)}）に分かれる。それぞれ操作法、操作時間、測定精度などにおいて特徴があり、二次元画像解析法は深さ方向の精度が劣ること、三次元 *in vivo* 法は脈動や体動の影響を受けやすく測定精度が上がらないことなどから、レプリカ三次元計測法がよく用いられている。

キメの異方性は加齢変化、あるいはスキンケアによる肌状態の変化を調べるうえで有効な指標である。若年の肌ではキメはどの方向にも均一に走向しているが、加齢とともに一方向に流れ異方性が強くなる¹³⁾。また、ドライスキンの程度が進むほど異方性が目立つようになる。キメの異方性は二次元画像解析からも測定可能であるが、三次元形状データからFFT（Fast Fourier Transform：高速フーリエ変換）を行い、キメの方向性を解析するのが一般的である^{14~16)}。

5. 皮膚力学測定

皮膚力学特性は皮膚の柔らかさ、硬さなどの感触やはり・たるみなどを評価するうえで重要で、皮膚の応力—歪特性や音波の伝播速度、反発力などを利用した様々な

測定原理に基づいた機器が開発されている²⁰⁾。*In vivo* の測定では角層、表皮、真皮に分けてその力学特性を調べることは難しいが、皮膚に与える変位量を変えることにより、ある程度皮膚深さ方向における違いを検討することができる。変位を小さくすれば主として皮膚表面（角層・表皮）の特性が測定でき、変位が大きい場合には真皮や皮下組織の影響が強くなる。

数多くある機器の中でもセンサー内部を減圧して隆起した皮膚の高さから力学特性を調べる cutometer（Courage + Khazaka 社、ドイツ）は一般的に広く用いられている²¹⁾。減圧状態（100~500 mb の範囲で可変）を2秒間保ち、その後、開放したときの時間に対する変位（皮膚の隆起）曲線から多くのパラメータが測定される。Uf（減圧2秒後の変位量）やUv（遅延的変位量）などは角層水和測定に、Ur/Uf や Ua/Uf などは皮膚の加齢変化やはり・たるみの測定に適している。Ur は減圧を解除したときに瞬時的に戻った変位量を、Ua は2秒後に戻った変位量を示す。プローブの口径や減圧の程度を変えることにより皮膚に与える変位が変わり、皮膚深さに応じた力学特性が測定できる。

皮膚は皮膚割線（Langer line、ランガー割線）とよばれる方向に張力が高いため力学的異方性を示す。この方向は真皮中のコラーゲンやエラスチン線維の配向に基づいている。力学的異方性を調べるには音波の伝播速度を利用した Reviscometer（Courage + Khazaka 社、ドイツ）が用いられ、ランガー割線に沿った方向では弾性率が高いことや、加齢にともなう異方性が増すことが報告されている²²⁾。

6. シワ測定

シワ測定にはキメ測定と同様、大別するとレプリカを介してその凹凸を調べる方法とレプリカを取らずに直接、皮膚を三次元計測する方法（*in vivo* 法）とがある。キメと同一の手法を用いるものの、キメ測定では皮溝、皮丘のパターンの変化が重要であるのに対し、シワ測定では個々のシワの深さ、長さ、数などが対象となり用いる解析パラメータが異なる。また、シワ改善評価においては施術前後における部位の厳密なマッチングが必要である。なお、シワ測定に関しては日本香粧品学会よりガイドラインが作成されている²³⁾。

6.1 斜光照明によるレプリカ二次元画像解析法（斜光照明法）

簡便で一般的に用いられる方法である。シワを強調した画像を作るため、キメ測定とは異なりレプリカに対し斜め一方向（伏角 20~30 度）から光を照射し影を作り、二値化処理して得られた影の部分の高さ、長さなどからシワの深さ、大きさを算出する。深いシワの陰に隠れた

小じわの解析ができないこと、シワの深さに関する精度が低いこと、二値化の条件によって抽出されるシワが異なることなど欠点はあるが、照明および撮影装置があればよいので安価で手軽に評価できる。

6.2 レプリカを用いた三次元解析法

キメ測定と同様、共焦点顕微鏡法やレーザー光切断法、パターン投影法などがある。三次元座標が求まるので、斜光照明による画像解析法よりも正確に、またシワ体積、シワ横断面（深さのプロフィール）など二次元画像解析では求められない有用なパラメータも計算できる。三次元表示が可能なのでシワ改善の程度を明瞭に表示することができる。

6.3 *In vivo* 三次元計測法^{18,19)}

シワはキメよりも溝が深いので *in vivo* での三次元計測が可能である。レプリカ剤の粘稠度によってはシワの奥まで入らず皮膚表面形状を正しく再現していないケースが稀にあること、レプリカ剤による閉塞にともなう皮膚水和によって表面形態が変わる可能性などが考えられ、レプリカ作成の巧拙によらず非接触で測定できる本方法は有用である。

7. シミ測定

シミはメラニン色素が皮膚に沈着し褐色を呈する斑で明度や色調が周囲と異なることから、これまで評価には色彩色差計が広く用いられてきた。専ら L^* 値から調べられているが L^* 値は皮膚の赤みの影響を受けるので微妙な変化を論じることは難しい。この影響を避けるため2波長における皮膚の反射率を利用してメラニン指数を測定する Mexameter (Courage + Khazaka 社, ドイツ) や Deraspectrometer (Cortex Technology 社, デンマーク) が開発されているが、まだ若干ヘモグロビン (赤み) の影響を受ける。この欠点を改良するため 500~700 nm の範囲で皮膚分光反射率曲線をメラニン、ヘモグロビン (酸化型および還元型) のスペクトルで重回帰し、それぞれの量を推定する方法が考案されている²⁴⁾。また、デジタルカメラで撮影した画像の RGB から各画素におけるメラニン指数や紅斑指数を簡便に算出する方法もある²⁵⁾。

8. 皮膚内部を調べる *in vivo* 生体顕微鏡

体内の組織を非侵襲的に観察する方法として超音波断層撮影や MRI, X 線 CT などは医療分野で広く用いられているが、厚さわずか 1 mm 程度の皮膚に対しては分解能が低く、そのままの条件では適用が難しい。近年、光バイオプシーとよばれ非侵襲的に皮膚内部の構造や構成成分を高分解能で調べることでできる技術、*in vivo* 生体顕微鏡、が開発されている。非線形光学現象を利用した

多光子顕微鏡や SHG 顕微鏡, CARS 顕微鏡などは皮膚内部の観察だけでなく、経皮吸収測定にも活用され組織と併せて調べることができる。

8.1 超音波断層撮影 (ultrasonography)

皮膚の測定には 20 MHz~50 MHz の高周波数の機器が用いられている。空気と角層、表皮と真皮、真皮と脂肪層の界面など密度の異なる二つの層が接する界面では超音波の反射が強く起こるため、皮膚表面から入った超音波の反射強度 (エコー強度) から皮膚深さ方向における断層像を作ることができる。エコー強度の違いから表皮、真皮、皮下脂肪が識別でき、皮膚厚や脂肪厚の測定、セルライトや加齢に伴う真皮の状態変化 (コラーゲンの粗密) の観察などに使われている。

非露光部では加齢とともに表皮厚、皮膚厚は薄くなる。一方、露光部においては subepidermal low-echogenic band (SLEB)²⁶⁾ とよばれる真皮上層のエコー強度の弱い領域が加齢とともに広くなる。これは日光を長い間、浴びたことによって真皮上層におけるコラーゲンが変性・分解するのでエコーが弱くなるためである。このコラーゲンの分布状態に着目してコラーゲンスコアとして簡便に測定する機器 (DermaLab, Cortex Technology) が市販されており、サプリメントの効果評価などに使われている²⁷⁾。

8.2 光コヒーレンス・トモグラフィー (optical coherence tomography : OCT)

OCT は生体に入射された光が組織によって反射され戻ってくる位置と強度を光の干渉から測定する装置である。いってみれば超音波の代わりに光を用いた断層撮影法であり、超音波や MRI と比べて分解能は高い。OCT を用いて表皮-真皮界面の形状、表皮厚などが調べられている。また、手掌のように角層の厚い部位では汗管の観察や角層厚の測定が可能である。

OCT プローブ光には強度信号だけでなく位相信号も含まれているので、これを解析することによって皮膚断層像と同時に種々の情報を得ることができる。ドップラーシフトから血流状態を調べる Doppler-OCT²⁸⁾ や偏光を用いて真皮コラーゲンの状態 (光老化^{29,30)}、熱傷^{31,32)}、基底細胞癌の侵入³³⁾ など) を調べる偏光 OCT (Polarization Sensitive-OCT ; PS-OCT) など機能的 OCT とよばれる方法が開発されている。今やただ単に皮膚の断層像を撮るだけでなく、他の情報も含めた解析が行われるようになってきている。

8.3 *In vivo* 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)

皮膚内に焦点をあててレーザー光を照射し皮膚の中から返ってくる反射光を検出・撮像し、皮膚水平断面像を得る。数 μm ごとに焦点位置を変えながら皮膚表面から内部に向かって観察すると、角層、顆粒層、有棘層、基

底層とその特徴的な細胞が観察される。角層では反射が強く特徴的な画像は得られないが、角層から顆粒層への移行は核の有無によって、また基底層においてはキラキラ輝くメラニンキャップ（メラニンの集合塊）の輝度の高い画像が得られることから、その位置がわかる。表皮－真皮界面では凹凸（表皮突起、真皮乳頭）があるためところどころ基底層に混じって真皮（ほとんど映像のない暗い部分）が認められる³⁴⁾。真皮では血管や血球の動き³⁵⁾、走行したコラーゲンも観察される。

8.4 多光子顕微鏡 (MPM)

多光子顕微鏡は近赤外光（波長 700～1100 μm ）を励起光として皮膚に照射し、存在する物質の蛍光特性（蛍光波長や蛍光寿命）から皮膚組織を観察する。フェムト秒オーダーの超短パルスレーザーを光源とするため焦点位置に存在する物質だけが励起される（非線形光学現象を利用した多光子励起）ので、その蛍光を検出すれば共焦点装置を使わずに任意の深さの皮膚水平断面像が得られる。皮膚にはケラチン、メラニン、NAD(P)H、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（蛍光を放つ物質）が存在するので、これらを基に皮膚組織像が得られる。測定深度を変えて、皮膚各層における水平断面像を調べると、角層ではケラチンによる強い蛍光と六角形を基調とする細胞が観察され、顆粒層では細胞質が NAD(P)H とケラチンによる蛍光によって明るく、また中央の核は暗く見える。有棘層では核が二つに分裂している像が時々見られ、細胞の大きさは顆粒層から基底層に向かうに従って小さくなる。基底層ではメラニンによる強い蛍光が観察される。さらに真皮においては真皮乳頭でコラーゲンやエラスチンが観察され、網状層ではこれらの線維はより鮮明になる³⁶⁾。このように多光子顕微鏡は生体成分特有の蛍光特性を利用して非侵襲的に皮膚内部構造を細胞レベルで調べることができる。

皮膚内に存在する物質に対してその蛍光寿命を用いて画像化する技術、FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy)、はより鮮明な画像を示す。たとえば、ケラチノサイト（主に NAD(P)H の蛍光寿命特性を示す）とメラノサイト（主にメラニンの蛍光寿命特性を示す）の蛍光減衰曲線の違いからメラノーマのイメージングが行われている³⁷⁾。また、FLIM を用いてナノ粒子酸化亜鉛（粒径が 200 nm 以下）の経皮吸収性が調べられている。Leite-Silva ら³⁸⁾は酸化亜鉛を 10% 濃度で基剤に分散させ、前腕屈側に 6 時間塗布（塗布量は SPF 測定と同程度の 2 mg/cm^2 ）し、NAD(P)H の自家蛍光と酸化亜鉛のフォトルミネッセンスの蛍光寿命から皮膚内における酸化亜鉛の分布状態を画像化している。限定的ではあるが、ナノ粒子酸化亜鉛は顆粒層まで入ること、しか

し、細胞の酸化還元状態には影響せず必ずしも細胞毒性を引き起こすわけではないことが報告されている。

8.5 SHG 顕微鏡

多光子顕微鏡と同様に、フェムト秒オーダーの超短パルスレーザーを皮膚組織に照射するとコラーゲンは入射光の半分の波長の光 (SHG 光) を発生する。SHG 光も非線形光学現象で、焦点の合った位置でしか発生しない。焦点位置を変えながら SHG 光を検出すれば任意の深さにおけるコラーゲンの分布状態が水平断面像で観察できる。

この SHG 顕微鏡と多光子顕微鏡とを組み合わせることにより、*in vivo* で真皮中のコラーゲンとエラスチンを同一画像上で示すことができる。通常、多光子顕微鏡で真皮を観察すると、コラーゲンとエラスチンの蛍光波長は近似しており両者を分離して示すことは難しいが、800 nm 以上の光源を用いて 450 nm 以上の波長の長い蛍光をロングパスフィルターで検出すればエラスチンだけが抽出される。たとえば 850 nm の光源を用いれば半分の波長である 425 nm に SHG 光が（すなわちコラーゲンが）観察され、多光子顕微鏡で 450 nm 以上の波長の光を検出すればエラスチンが観察される³⁹⁾。

SHG 光はコラーゲンだけでなくナノ粒子からも生じ、これを Hyper-Rayleigh Scattering : HRS、超レーリー散乱、とよぶ。そのためこのナノ粒子からの HRS を検出することにより皮膚中でのナノ粒子の存在を調べることができる。コラーゲンによる SHG 光は真皮で発生するので表皮でのナノ粒子からの HRS とは測定深度から区別され、多光子顕微鏡で得られた皮膚組織像と対応させればナノ粒子の存在位置が確認できる。

Darvin ら⁴⁰⁾は平均粒径が 30 nm の酸化亜鉛ナノ粒子の分散液（8%）を前腕に塗布（塗布量は 2 mg/cm^2 ）した後、MPM/SHG/HRS (DermaInspect™) を用いて粒子の皮内分布状態を調べている。その結果、ナノ粒子からの HRS 光は角層上層、皮溝、シワ、毛穴だけに観察され、酸化亜鉛ナノ粒子は表皮生細胞層には浸透しないと結論づけている。

8.6 CARS 顕微鏡

in vivo 共焦点ラマン顕微鏡 (Confocal Raman Microscope : CRM) は微弱なラマン散乱が共焦点装置のピンホールで弱められる、あるいは皮膚組織が放つ自家蛍光によって妨害される場合があるので、最近ではアンチストークス散乱光を用いた CARS 顕微鏡が使われている。CARS は CRM と同様に皮膚の深さ方向における脂質 (CH_2) や水 (OH) などの情報が得られる。しかし、CRM に比べて強いシグナルが得られること、非線形光学現象を利用しているので多光子顕微鏡と同時測定が可能であることなどメリットは大きい。W/O (water in oil)

型クリームを皮膚に塗布したときの皮内における油分の分布状態がMPM/CARS顕微鏡で調べられている⁴¹⁾。

9. 終 わ り に

皮膚計測技術はこの40年ほどの間に急速に進歩した。R. Marks と H. Blank⁴²⁾ が, 「modern electronic and other devices have become available for measurements of very small changes in physical or chemical characteristics-----, applying these new techniques to the skin-----」と記し, 第1回 International Society for Bioengineering and the Skin をマイアミで開催したのが1976年で, 以後, Table 1に見られるように多くの計測技術・機器が開発された。最近の大きな特徴は, 光の非侵襲性を利用し皮膚を切除せずに皮膚内部の構造や構成成分を調べることのできる *in vivo* 生体顕微鏡の開発である。なかでも非線形光学現象を利用した多光子顕微鏡, SHG 顕微鏡, CARS 顕微鏡などは分解能がきわめて高く細胞レベルで観察できる。今後, 可視化センサー分子の開発が進み, *in vivo* で細胞内での微小な構造や分子の動態を電子顕微鏡に迫る空間分解能で観察できる日も近いと思われる。

皮膚計測技術の発展とともに「化粧品品の効能・効果を科学的な方法によって評価し (evidence based cosmetics), より機能的で有用な化粧品品の開発」が一段と進んだ。今や皮膚生体工学測定は化粧品研究において必須の技術となっている。

文 献

- 1) 江川麻里子, 高橋元次: “老化防止・美白・保湿化粧品の開発” (シーエムシー出版, 2001) p. 162.
- 2) I. Horii, Y. Nakayama, M. Obata and H. Tagami : Br. J. Dermatol. **121**, 587 (1989).
- 3) R.O. Potts, D.B. Guzek, R.R. Harris and J.E. Mckie : Arch. Dermatol. Res. **277**, 489 (1985).
- 4) F. Damien and M. Boncheva : J. Invest. Dermatol. **130**, 611 (2010).
- 5) J. de Rigal, M.J. Losch, R. Bazin et al. : J. Soc. Cosmet. Chem. **44**, 197 (1993).
- 6) M. Egawa, M. Yanai, K. Kikuchi and Y. Masuda : Appl. Spectrosc. **65**, 924 (2011).
- 7) F. Mirraashed and J.C. Sharp : Skin. Res. Technol. **10**, 14 (2004).
- 8) E. Ciampi, M. van Ginkel, P.J. McDonald et al : NMR Biomed. **24**, 135 (2011).
- 9) P.J. Caspers, G.W. Lucassen, E.A. Carter, H.A. Bruining and G.J. Puppels : J. Invest. Dermatol. **116**, 434 (2001).
- 10) P.M. Elias : J. Invest. Dermatol. **125**, 183 (2005).
- 11) 高橋元次 : COSME TECH JAPAN, **2**, No. 9 (9月号), 5 (2012).
- 12) H. Mochizuki, H. Tadaki, S. Takami et al. : Br. J. Dermatol. **160**, 972 (2009).
- 13) 高橋元次: “現代皮膚科学大系, 年刊版 '90-B” (中山書店, 1990) p. 13.
- 14) H. Zahouani, R. Vargiolu and P. Humbert : 20th IFSCC Congress, Cannes (1998).
- 15) M. Setaro : Skin Res. Technol. **7**, 159 (2001).
- 16) J.M. Lagarde, C. Rouvrais and D. Black : Skin Res. Technol. **11**, 110 (2005).
- 17) 荒川尚美, 大西浩之, 舩田勇二 : 粧技誌 **41**, 173 (2007).
- 18) S. Jaspers, H. Hopermann, G. Sauermaann, U. Hoppe, R. Lunderstadt and J. Ennen : Skin Res. Technol. **5**, 195 (1999).
- 19) M. Rohr and K. Schrader : SOFW **124**, 52 (1998).
- 20) 高橋元次 : COSME TECH JAPAN, **2**, No. 12 (12月号), 19 (2012).
- 21) A.B. Cua, K.P. Wilhelm and H.I. Maibach : Arch. Dermatol. Res. **282**, 283 (1990).
- 22) E.C. Ruvolo, G.N. Stmatas and N. Kollias : Skin Pharmacol. Physiol. **20**, 313 (2007).
- 23) 日本化粧品学会 抗老化機能評価専門委員会 : 日本化粧品学会誌 **30**, 316 (2006).
- 24) 舩田勇二, 高橋元次, 坂本哲夫, 島田美帆, 伊藤雅英, 谷田貝豊彦 : 粧技誌 **35**, 325 (2001).
- 25) T. Yamamoto, H. Takaiwaki, S. Arase et al. : Skin Res. Technol. **14**, 26 (2008).
- 26) M. Gniadecka et al. : J. Invest. Dermatol. **102**, 362 (1994).
- 27) S. De Spirt et al. : Skin Pharmacol. Physiol. **25**, 2 (2012).
- 28) L.L. Otis, D. Piao, C.W. Gibson and Q. Zhu : Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol., Endod. **98**, 189 (2004).
- 29) M.C. Pierce, J. Strasswimmer, B.H. Park and J.F. de Boer : J. Biomed. Opt. **9**, 287 (2004).
- 30) S. Sakai et al. : J. Invest. Dermatol. **128**, 1641 (2008).
- 31) S.M. Srinivas, J.F. de Boer, H. Park and K. Keikhanzadeh : J. Biomed. Opt. **9**, 207 (2004).
- 32) M.C. Pierce, R.L. Sheridan, B.H. Park, B. Cense and J.F. de Boer : Burns **30**, 511 (2004).
- 33) J. Strasswimmer, M.C. Pierce, V. Neel and J.F. de Boer : J. Biomed. Opt. **9**, 292 (2004).
- 34) 高橋元次: “美容皮膚科学” (南山堂, 2009) p. 160.
- 35) J. Hegyi, V. Hegyi, G. Messer et al. : Skin Res Technol. **15**, 476 (2009).
- 36) K. Schenke-Layland et al. : Advanced Drug Delivery Reviews **58**, 878 (2006).
- 37) E. Dimitrow et al. : Exp Dermatol. **18**, 509 (2009).
- 38) V.R. Leite-Silva et al. : Eur. J. Pharm. Biopharm, **84**, 297 (2013).
- 39) G. Chen et al. : Br. J. Dermatol. **161**, 48 (2009).
- 40) M.E. Darwin et al. : Skin Pharmacol. Physiol. **25**, 219 (2012).
- 41) H.G. Breunig, R. Buckle, M. Kellner-Hofer et al. : Micros. Res. Tech. **75**, 492 (2012).
- 42) R. Marks and H. Blank : J. Invest. Dermatol. **69**, 275 (1977).