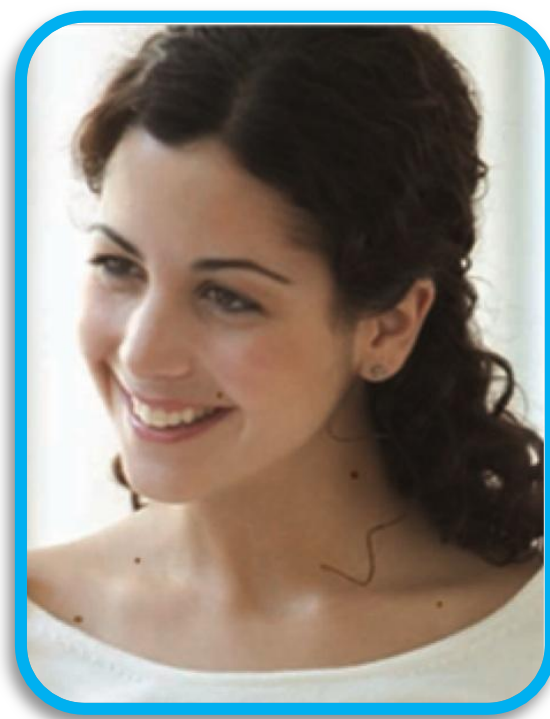


共焦点レーザ生体顕微鏡 ビバ스코ープ 1500/3000

アプリケーション シリーズ 2: 角層



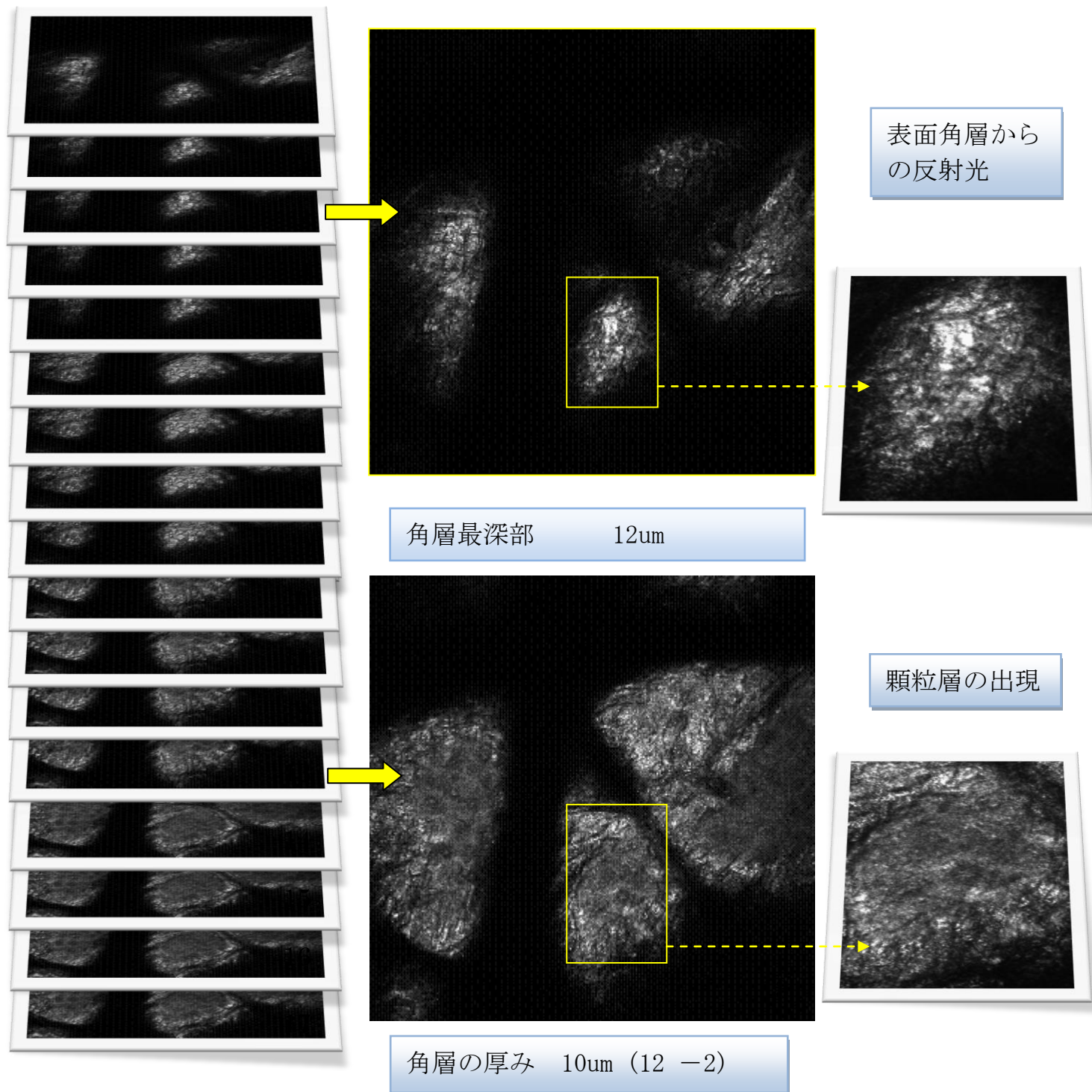
 LUCID®

角質層のバリア機能により体は守れている

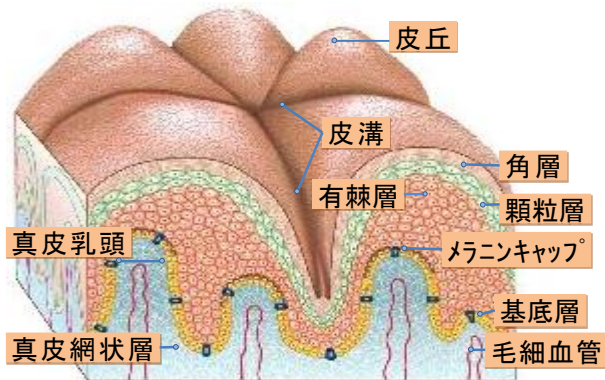
角層の厚さ

角層は体と外部を分ける最前線にあり、角質細胞が何層にもなり体内の水分が蒸散し失われない様、また外部の環境変化や病原菌から体を防いでいる。角層は基底細胞から変化して作られ、最後に垢となりはがれおちる。足の裏や手の平、指等接触の多い場所は厚い。

スタック画像 0.98um ステップ 角層表面(1枚目より) 深さ 2um



表皮の構造



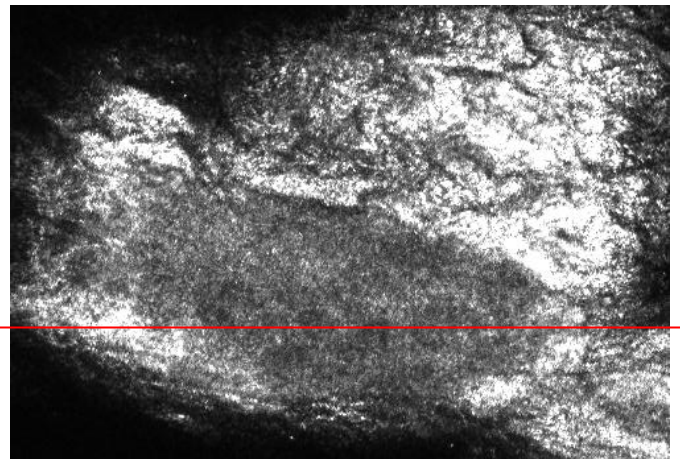
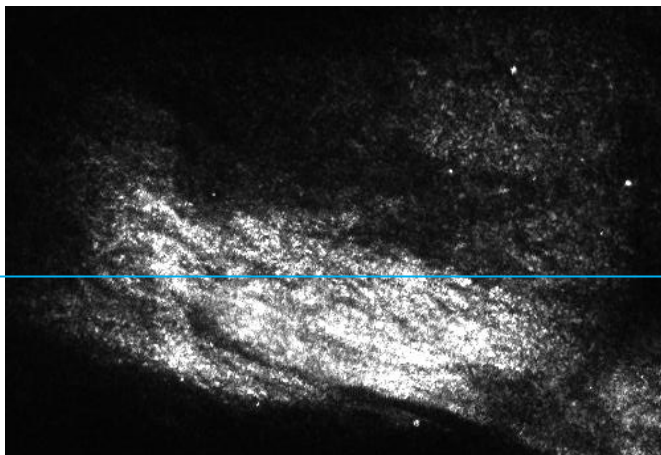
断層画像より角層の厚さを測る

ビバスコープで皮膚の表面より内部へ観察すると。皮膚の表面の角層からの反射により、角層の部分は白く見えます。さらに内部へ進むと細胞細が黒く、胞膜の輪郭が白く見える顆粒細胞が現れます。

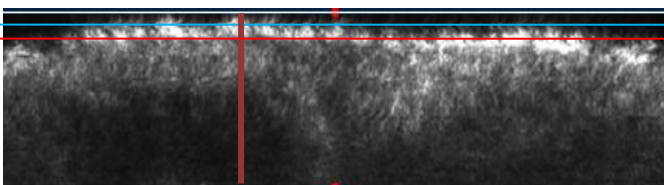
表面から顆粒細胞までの間が角層の厚さです。それぞれの層での光の屈折率の違いにより反射光が生じます。

各々の屈折率の違いが高いほど反射率も高くなり、ビバスコープでは白く見えます。

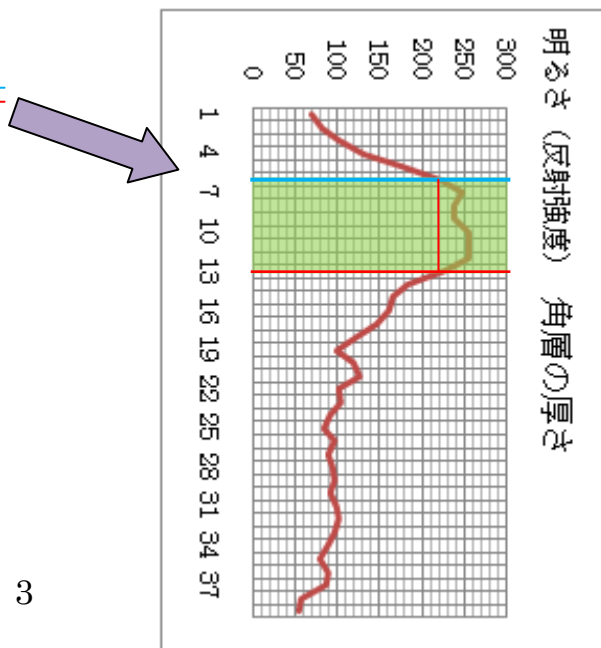
屈折率は水 1.33、細胞質 1.34、オイル 1.44、角層(ケラチノサイト)1.5、メラニン 1.7。



顆粒層断面

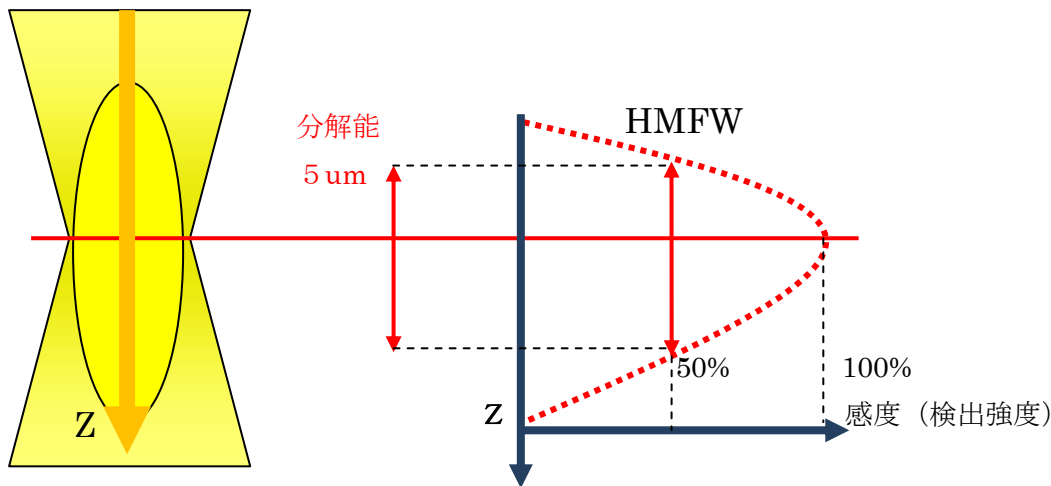


断層画像白い部分が角層



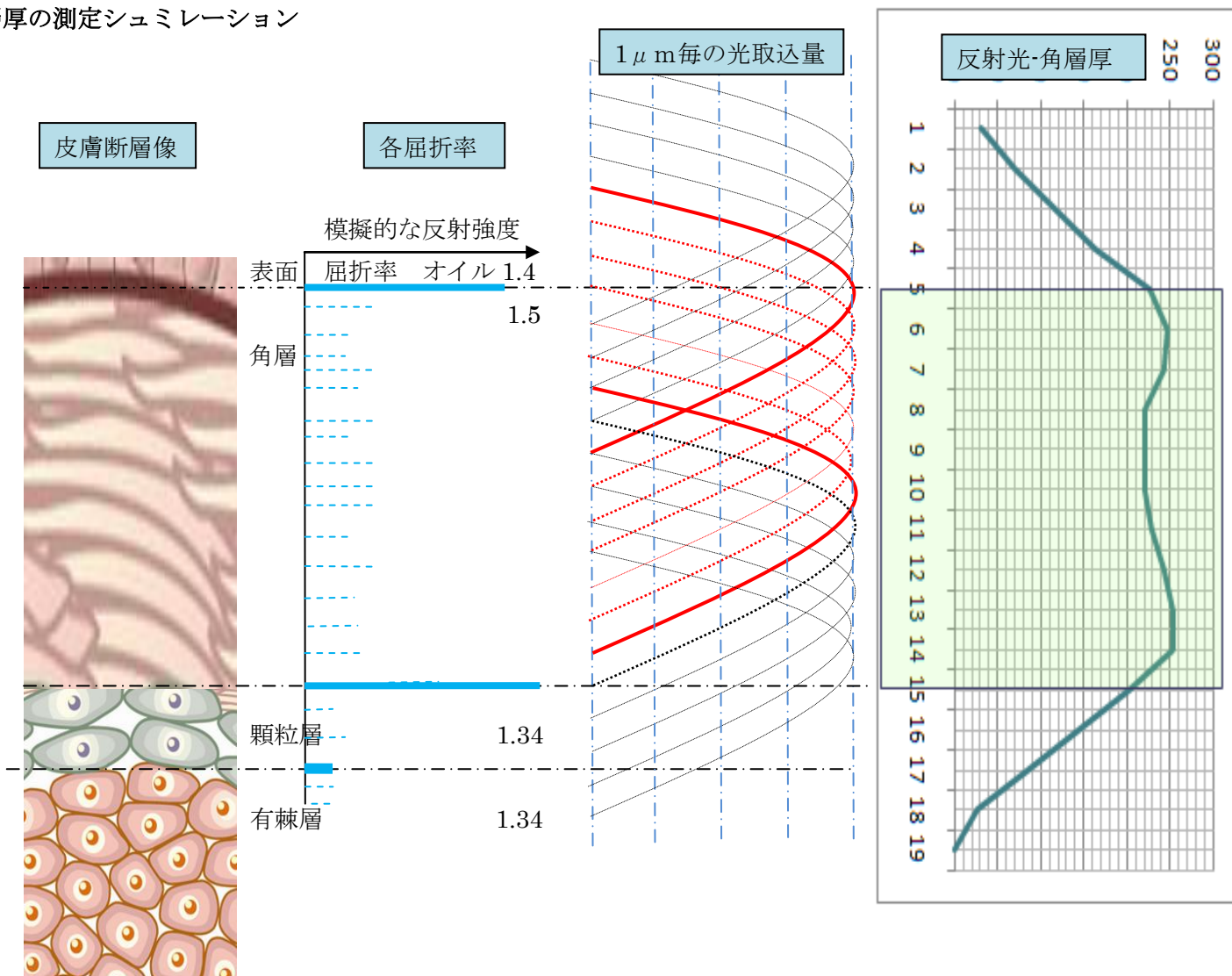
ビバ스코ープのZ方向分解能 (830um)

ビバ스코ープの深さ方向に対する感度は下右のような釣鐘型をしている。感度は中央部が一番高く上下に離れるに従い感度は落ちる。従って中央部での反射光が強くなり、画像が明るく、上下の画像は離れるに従い暗くなる。共焦点顕微鏡では対物レンズをZ方向に連続して動かし、Z方向の断層画像をつくり。最高感度の半分 HMFW (half maximum full width) をZ方向の分解能と定義する。



レンズによる焦点の光と強度

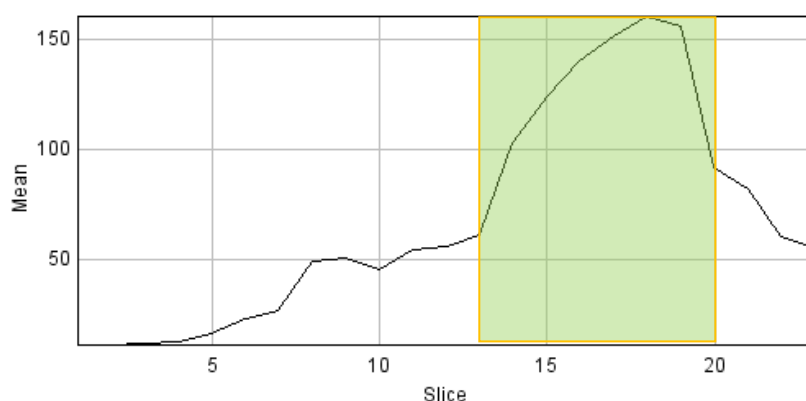
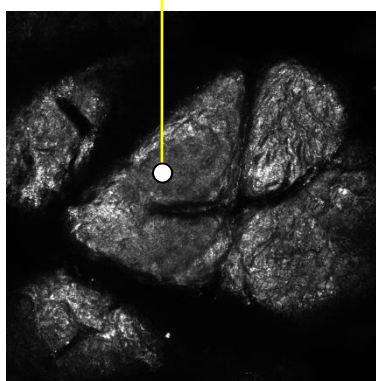
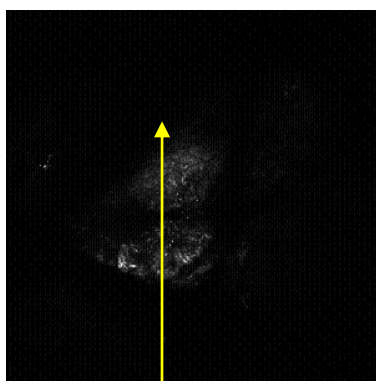
角層厚の測定シュミレーション



角層厚測定シュミレーションは角層からの反射光は、角層の表面と顆粒層との境で大きくなる。又角層の内部でも積み重なった角層からの反射もあり、これらの光を $5\mu\text{m}$ の Z 方向での取り込み量を計算し、右のグラフにしたものである。このグラフでは中央部がへこみ、2つの山があるが、中央部でへこむのは角層内部からの反射が表面や顆粒層との境からの反射光程強くない事をシュミレーションしたことによる。角層厚が $10\mu\text{m}$ 前後では実際のグラフもこの様な形となる。シュミレーションから角層表面は最初のピーク（ここでは $6\mu\text{m}$ ）になる $1\mu\text{m}$ 前（ここでは $5\mu\text{m}$ ）が角層の始まりであり、顆粒層との境目は後のピーク（ここでは $14\mu\text{m}$ ）の $1\mu\text{m}$ 後である（ここでは $15\mu\text{m}$ ）。

実際に測定すると、角層表面は平らでない為、レーザ光に対し直角に位置する面からのみの反射光を集めている。角層内からの反射も同様で、必ずしもシュミレーションの様に単純でなく、角層厚の測定を複雑にしている。

顆粒細胞から角層厚を測る



連続断層画像を撮ると、角層を上から離れた所より連続層画像をとり、顆粒層が現れたら、そこから数枚深くまでとる、顆粒細胞内を imageJ の○で選択しこの輝度プロファイルを Z 軸にそって表皮の方向に測る。

ImageJ の image/stack/PlotZ-axis profile にて行う。連続画像の Z 軸のぶれを正すため、Plugins/Stacks-Shuffling/Align /Slice in Stackなどで、各画像ズレを無くす必要がある、実際の○の大きさは右の画より小さく顆粒細胞の直径の $1/3$ 程度にする。上のプロファイルでは、表皮の始まりは急に輝度が上がり始める 13 枚目、角層の終わりは急に輝度が落ちる 20 枚目で、 $7\mu\text{m}$ である。20代女性前腕内側。

まとめ

レーザ光はオイルと角層の境界、角層細胞間、顆粒層と角層の境界で反射する。2 ページに示したように、深さ方向連続画像 VivaStack から、目視により角層の始まりと顆粒層の始まりを判断し、角層の厚みを測定することができる。あるいは、VivaStack から断層画像を作り、明るさのプロファイルより、角層の厚さを計測する方法もある。この場合最大輝度の $2/3$ を経験的に角層厚としている。P4 と P5 には Z 方向の分解能より反射光のシュミレーションをして、角層厚の計測の考え方を説明した。最後に、顆粒細胞から輝度プロファイルで角層厚を測る方法を示した。角層には表面に凹凸や傾きが有るので、すべての角層面から同じ様に反射光を検出できない。また分解能の関係でフレアーが発生するので、プロファイルを測る場所は顆粒層の暗い所より角層表面が平行な場所を選ぶ必要がある。いずれの方法でも測定には $\pm 1\mu\text{m}$ 程度の誤差がある。

キーワード：顆粒層 屈折率 角層細胞間 輝度プロファイル ImageJ フレアー



No	タイプ	レーザ	備考
1	VivaScope3000	830nm	ハンドヘルド 反射
2	VivaScope1500	830nm	フリーアーム 反射
3	VivaScope1500 マルチ	445/658/785nm	蛍光・反射