

# 生体組織の動的蛍光特性の加齢による変化 — AGE に着目して —

## Kinetic Change of Tissue Fluorescence Characteristics by Aging (Focuced on AGE)

○学 相木一磨 (大阪大), 正 橋本 守 (大阪大), 正 荒木 勉 (大阪大)  
松本 林 (徳島大), 北村清一郎 (徳島大)

Kazuma AIKI, Mamoru HASHIMOTO and Tsutomu ARAKI  
Graduate School of Engineering Science, Osaka Univ, Toyonaka, Osaka  
Hayashi MATSUMOTO and Seiichiro KITAMURA  
Dept. of Oral Anatomy, School of Dentistry, Univ. of Tokushima, Tokushima

### 1. はじめに

細胞外基質であるコラーゲン線維において、加齢や糖尿病によって、線維が硬くなる、水溶性が減少する、自己蛍光の強度が増加するといった変化が見られることが報告されている。これらの変化はコラーゲン線維に AGE (Advanced Glycation End product) と呼ばれる分子間クロスリンクが形成されるためであると考えられている。

AGE とは糖と蛋白質の化合物であるアムドリ生成物の生成後に見られる最終的な糖-蛋白結合物である。遊離還元糖のアルデヒド基と蛋白質のアミノ基が反応して Schiff 塩基を形成する。更に、Schiff 塩基が分子内水素転移 (アムドリ転移) によりアムドリ生成物となる。このアムドリ生成物が、さらに酸化、脱水され AGE を形成すると考えられている。AGE は蛍光性 (励起ピーク波長 370 nm / 発光ピーク波長 440 nm) の黄褐色の物質であり、非酵素的に生成する。すなわち、適当な温度下で蛋白質が長時間糖にさらされることにより生成する物質である。このような性質により、AGE は老化情報の指標に、また、糖尿病の診断への利用が可能である。

これまで我々は、ヒト歯牙や動脈において、加齢に伴い自己蛍光の蛍光寿命が変化し、それをもとに老化情報が得られることを報告した [日本機械学会第3回バイオエンジニアリングシンポジウム講演論文集, p. p. 42-43 (1994)] [日本機械学会第10回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, p. p. 483-484 (1998)]。前回までの研究で得られたヒト歯牙についての蛍光減衰波形と年齢の関係を Fig. 1 に示す。しかし、年齢と蛍光寿命の相関の原因については言及していなかった。そこで今回この原因を追求するために AGE に着目し、コラーゲン溶液に対し還元糖としてグルコースとリボースを使用してモデル実験を行った。

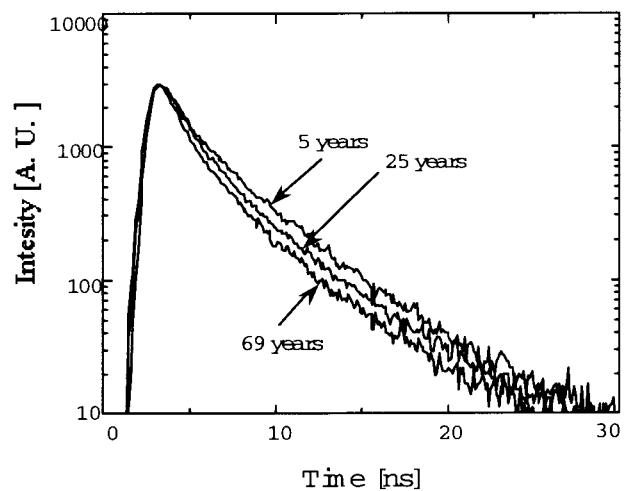


Fig. 1 : Change of fluorescence decay curve of human dentin by aging.

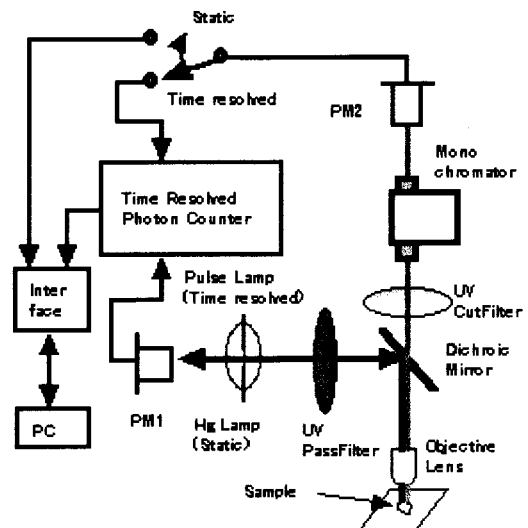


Fig.2 : Schematic block diagram of the time resolved fluorescence microscope photometer

(330 ~ 350nm) が組織蛍光の励起ピーク波長 (335nm) に一致している。母体となる蛍光顕微光学系は、Nikon 落射蛍光顕微鏡 (XF-EF) である。通常の静的落射蛍光測定に加え

### 2. 顕微蛍光装置

Fig. 2 に測定装置を示す。励起光源として、発光時間幅 1.0ns、発光繰り返し周波数 20kHz の自走式ナノ秒パルス空気放電管を使用した。本光源の主発光線スペクトル

て、随時、時間分解測光に切り替える。時間分解測定には、時間相関単一光子計数法を採用した。時間分解能は25psである。

### 3. 実験

コラーゲン溶液としてウシアキレス腱由来のタイプ1コラーゲン (Sigma) を使用した。溶液試料をグルコースを加えたもの、リボースを加えたもの、何も加えないものに分け、5日間37℃で恒温振とうした。

これらの試料に対し定常光励起による蛍光スペクトル測定とインパルス光励起による時間分解測定を行った。

### 4. 測定結果

はじめに、コラーゲン水溶液の蛍光について、励起スペクトルと発光スペクトルの測定を行った。グルコースを加えたコラーゲン溶液と糖を加えなかったコラーゲン溶液では変化が見られなかったが、リボースを加えたコラーゲン溶液では励起スペクトル、発光スペクトルともにピーク強度が他の溶液に比べ増大していた。リボースは水溶液中で環状構造をとるグルコースと異なり、直鎖型構造をとるためグルコースより反応性が高い。Fig. 3に5日間リボースを加え恒温振とうしたコラーゲン水溶液と糖を加えずに5日間恒温振とうしたコラーゲン水溶液の励起スペクトルと発光スペクトルを示す。Fig. 3より、励起最大値波長、発光最大値波長はそれぞれ、380nm、440nmであることが分かる。この値はAGEのものとはよく一致している。その最大値が糖を加える事により、増大することがわかる。

次に、顕微測光装置を用いて、これらの蛍光減衰波形を測定した (Fig. 4)。

これらの蛍光減衰波形の特徴を調べるために、得られた蛍光減衰波形を多成分の指数関数の和 (1) 式で近似した。

$$I(t) = \sum_j A_j \exp(-t/\tau_j) \quad (1)$$

$A_j$ : 比例定数,  $\tau_j$ : 蛍光寿命

次に、最小二乗曲線あてはめ法によって  $A_j$ 、 $\tau_j$  をもとめて、各成分の強度割合 ( $i_j = A_j \cdot \tau_j$ ,  $I = \sum i_j$ ) を算出した。

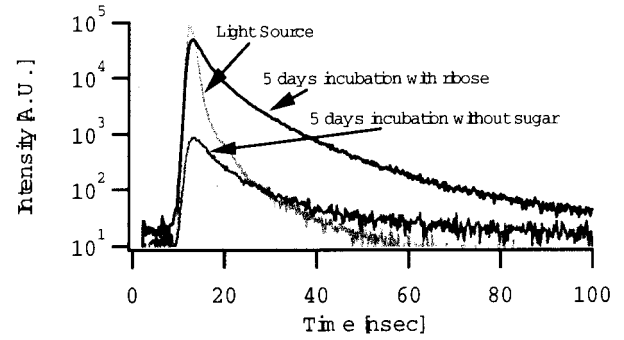


Fig. 4 : Time resolved fluorescence decay curves of collagen solution

Table. 1はFig. 4の蛍光減衰波形を2成分で近似し、リボースを加えたものと加えないものとを比較した結果である。これより蛍光寿命の短い成分の強度割合が増加したことがわかる。

Table. 1 : Decomposition of the decay curve

	$A_1$	$\tau_1$	$A_2$	$\tau_2$	$i_1/i$	$i_2/i$
5 days incubation with ribose	$2.2 \cdot 10^7$	2.1	$6.8 \cdot 10^4$	8.5	0.99	0.01
5 days incubation without sugar	$4.0 \cdot 10^4$	3.3	$7.0 \cdot 10^2$	12	0.94	0.06

### 5. 考察

Fig. 3より、コラーゲンをリボースと共に恒温振とうすることによって、AGEが生成したと考えられる。そして、蛍光減衰波形から、蛍光寿命の短い成分の割合が大きくなることが分かった。これらの結果より、AGEが増加することにより、蛍光寿命の短い成分が増加し、見かけの蛍光寿命が短くなると考えられる。したがって、生体組織の蛍光減衰時間が速くなる原因としてはAGEの組織内蓄積が考えられる。

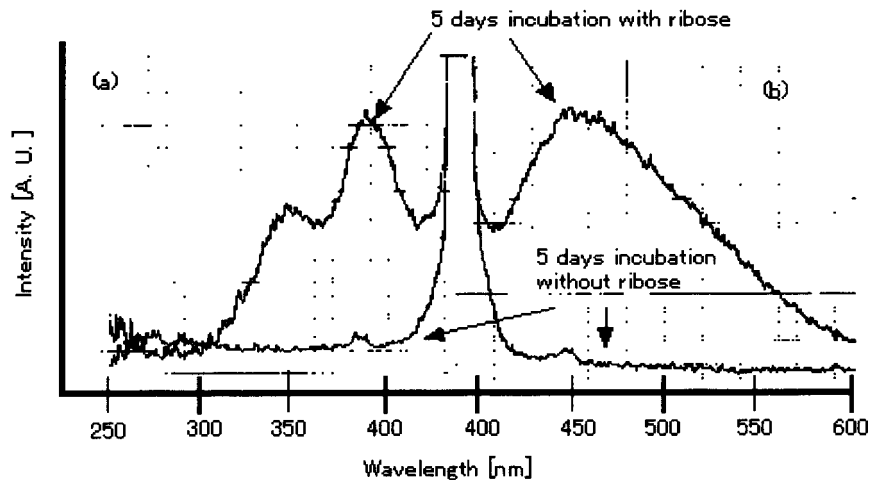


Fig. 3 : Excitation and emission spectra of collagen solution with and without sugar  
(a) : Excitation spectra, (b) : Emission spectra