

## 23aMO8 組織コラーゲンの自己蛍光を指標にした生体老化の検出

### Detection of Physiological Aging Informed by Auto-fluorescence in Tissue Collagen

○荒木 勉、相木一磨、橋本 守、東野義之\*、山田 源\*\*

Tsutomu ARAKI, Kazuma AIKI, Mamoru HASHIMOTO, Yoshiyuki TOHNO\*, Gen YAMADA\*\*

大阪大基礎工学研究科、奈良医大第一解剖\*、熊本大動物資源開発研究センター\*\*

Osaka Univ., Nara Medical Univ.\*, Kumamoto Univ.\*\*

Stationary and dynamic characteristics of auto-fluorescence in human dentin and arterial tissues were studied. With aging, fluorescence intensity of tissue increased whereas the decay time decreased. As the fluorescence substance of tissue, we have focused on AGE (Advanced Glycation End product) that is produced by non-enzymatic reaction of tissue collagen with glucose. To produce AGE in vitro, collagen solution, collagen plate and dentin tissue were incubated in ribose solution. The fluorescence intensity of all samples increased after incubation with ribose. Fluorescence decay time of both the collagen solution and collagen plate decreased, but that of the dentin tissue increased.

#### 1. はじめに

加齢や糖尿病によって組織がもろくなる。その原因としてコラーゲン線維に形成されるAGE (Advanced Glycation End product) と呼ばれる分子間クロスリンクが考えられる。AGE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。AGEは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、生体のいたるところで産生され、生体を硬化させる。このようなAGEは紫外線の照射によって蛍光(励起ピーク波長370nm/発光ピーク波長440nm)を発することが知られている。われわれはこれまで象牙質と血管組織の自己蛍光に対しナノ秒域の時間分解測光を行い、加齢とともに蛍光強度が増加し、蛍光減衰時間が短くなることを報告した(1, 2)。Fig.1に象牙質の蛍光減衰波形と年齢との関係を示す。このような蛍光の変化はAGEによると考えた。そこで、コラーゲン溶液、コラーゲンプレート及び象牙質に対し還元糖を添加したモデル実験を行い、これまでの実験結果と対比・考察を行った。なお、リボースは水溶液中で直鎖型構造をとるため、環状構造をとるグルコースよりも反応性が高いので、糖としてリボースを使用した。

#### 2. 顕微蛍光装置

時間分解蛍光励起光源として、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(330~350nm)が組織蛍光の励起プロフィールと重なる。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

コラーゲン試料として(1)ウシアキレス腱由来のタイプ1コラーゲンを溶液としたもの、(2)コラーゲンプレート、(3)人の象牙質切片を用意した。これらにリボースを加えた場合と加えない場合について、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。

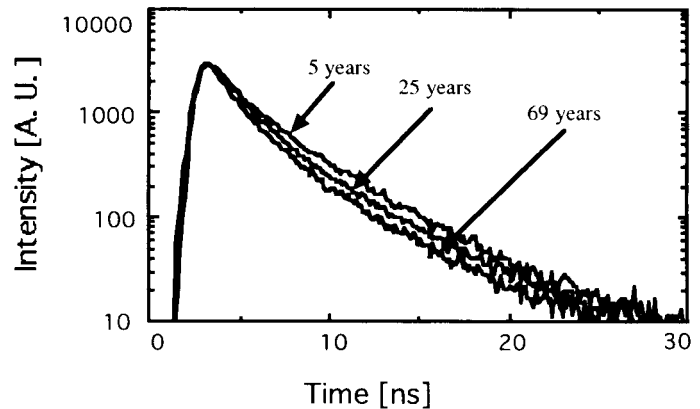


Fig. 1 Relation between fluorescence decay time and age of human dentin

#### 4. 測定結果

リボースを加えた試料すべてで励起スペクトル、発光スペクトルのピーク強度が増大した。励起最大値波長、発光最大値波長はそれぞれ、380nm、440nmであった。この値はAGEのものとはよく一致している。Fig.2に恒温振とうしたコラーゲンプレートの発光スペクトルを示す。

次に、顕微測光装置を用いて、蛍光減衰波形を測定した(Fig.3)。これらの蛍光減衰波形の特徴を調べるために、観測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,  $t$ : 時間

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。

Table 1は蛍光減衰波形を2成分で近似し、リボースを加えたものと加えないものを比較した結果である。これよりコラーゲン溶液とコラーゲンプレートでは蛍光寿命の短い成分の含有率が増加したことがわかる。すなわちAGEが寿命 $\tau = 2.8$  nsの成分に相当する。しかし象牙質では蛍光強度は増大したものの、長寿命成分の割合が増加し、反対に観測蛍光減衰時間が長くなった。

#### 5. 考察

蛍光強度の測定より、コラーゲンとリボースによって、AGEが生成したと考えられる。また、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は寿命2.8 nsの成分に相当し、AGEの産生によって、観測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の組織内蓄積が主因であると考えた。しかし象牙

質では加糖によって蛍光強度が増大したものの、減衰時間は長くなり、菌の蛍光と加齢との関係をうまく説明できない。加糖によって生じた長寿命蛍光物質を同定する必要がある。そのためにも今後電気泳動やクロマトグラフィなどの分析化学的手法を導入する必要がある。

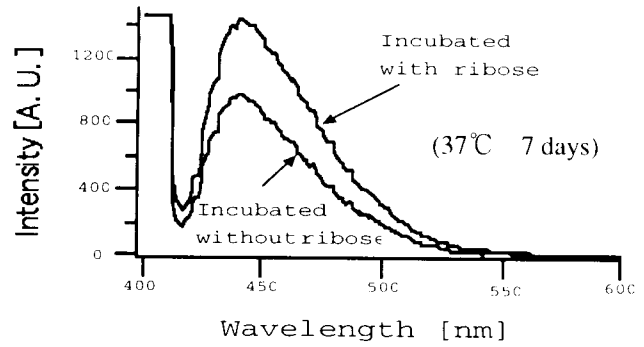


Fig. 2 Fluorescence emission spectra of collagen plate

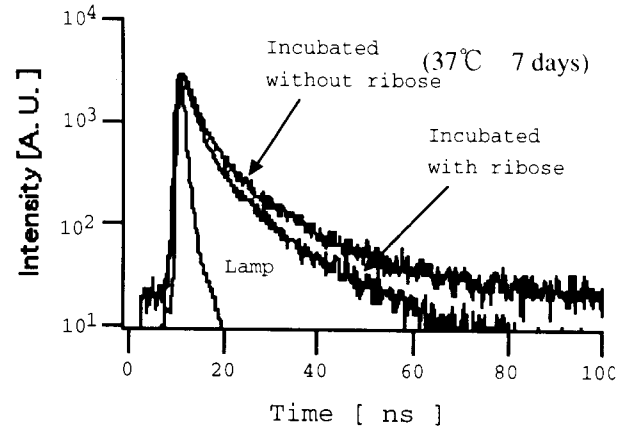


Fig. 3 Fluorescence decays curve of collagen plate

Table 1 Parameters of fluorescence decay curve  
With ribose                      Without ribose

Specimen incubated at 37°C	$i_1/I$	$i_2/I$	$i_1/I$	$i_2/I$
Solution 5 days	0.69	0.31	0.30	0.70
Plate 7 days	0.64	0.36	0.51	0.49
Dentin 21 days	0.33	0.67	0.46	0.54

$$\tau_1 = 2.8 \text{ [ns]}, \quad \tau_2 = 9.0 \text{ [ns]}$$

(1) T. Araki and Y. Tohno: Front. Med. Biol. Engin. 7, 265-273 (1996).

(2) H. Matsumoto, S. Kitamura, and T. Araki: Arch of Oral Biol. 44, 309-318 (1999).