

337 グリコシル化反応したコラーゲン線維の蛍光を指標とした老化の検出
 Fluorescence detection of aging focused on the glycosylation of tissue collagen

○学 相木一磨 (阪大院) 正 橋本守 (阪大院) 正 荒木勉 (阪大院)

Kazuma AIKI, Mamoru HASHIMOTO and Tsutomu ARAKI

Graduate School of Engineering Science, Osaka Univ., Toyonaka, Osaka

1. はじめに

結合組織のコラーゲン線維において、グリコシル化反応によってA.G.E. (Advanced Glycation End product) と呼ばれる蛍光性 (励起ピーク波長370 nm / 発光ピーク波長440 nm) の黄褐色の物質が加齢に伴って生成、蓄積することが多く報告されている。組織内にA.G.E.が蓄積することで組織の硬変、水溶性の減少、蛍光強度の増大と言った変化が起こる。A.G.E.とは糖と蛋白質の化合物であるアマドリ生成物の生成後に見られる糖-蛋白質結合物である。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シッフ塩基を形成する。さらにシッフ塩基が分子内水素転移 (アマドリ転移) により、アマドリ生成物となり、酸化、脱水されA.G.E.を形成する。A.G.E.は適当な温度下で蛋白質が長時間等にさらされることにより生成する物質であるため、生体のいたるところで産生される。

我々はこれらの変化のほかに加齢に伴ってヒト象牙質とヒト動脈において自己蛍光の蛍光減衰時間が減少することを報告した[日本機械学会第3回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 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)]。Fig.1にヒト象牙質の蛍光減衰波形を示す。Fig.1から蛍光の減衰時間が加齢に伴って減少しているのがわかる。この加齢に伴う蛍光減衰の原因がA.G.E.の産生・蓄積によると考えた。そこでコラーゲンプレート、ヒト象牙質に対して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・比較を行った。なお、使用した還元糖はリボースである。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。

2. 顕微蛍光装置

Fig.2に測定装置を示す。時間分解蛍光励起用光源として、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)が組織蛍光の励起波長と重なる。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0.2nsである。

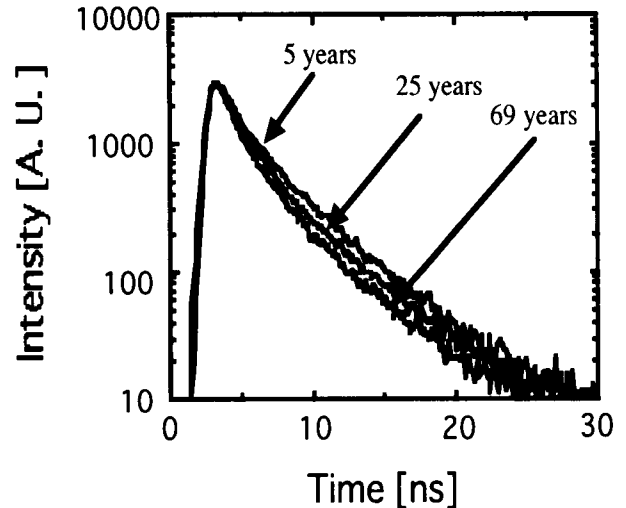


Fig.1 Change of fluorescence decay curve of human dentin by aging

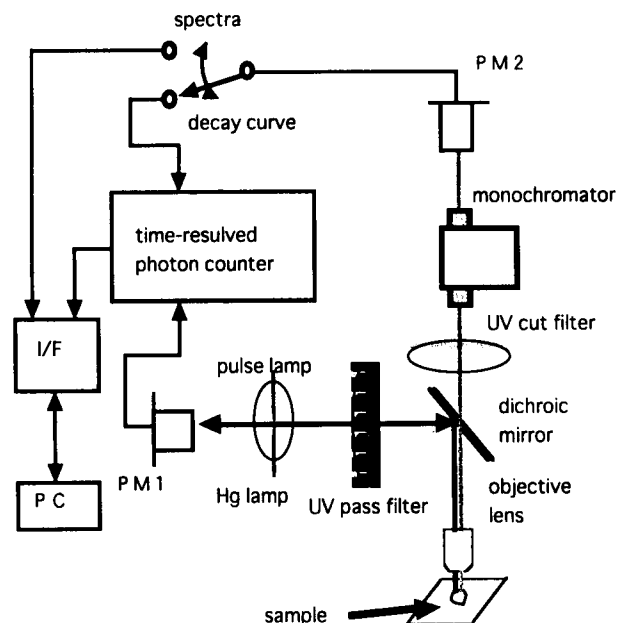


Fig.2 Schematic block diagram of the time resolved fluorescence microscope photometer

3. 実験

コラーゲン試料として(1)コラーゲンプレート、(2)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。

4. 測定結果

リボースを加えた試料すべてで発光スペクトルのピーク強度が増大した。発光最大値波長は440nmであった。この値はA.G.E.のものとはよく一致している。Fig.3にリボースを加え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.4)。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)式を用い、最

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

小二乗曲線あてはめ法によって近似した。

次に、その結果得られた C_j 、 τ_j から各成分の強度割合($i_j = C_j \cdot \tau_j$, $I = \sum i_j$)を算出した。また、リボースを加えて恒温振とうした試料とリボースを加えてない試料の蛍光スペクトルから、そのピーク強度の比(Fig.3中のB/A)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とを比較した結果と蛍光強度比(B/A)である。これよりコラーゲンプレート、ヒト象牙質において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A.G.E.が寿命 $\tau = 2.8\text{ns}$ の成分に相当すると考えられる。このようにA.G.E.が増加することによって、寿命 $\tau = 2.8\text{ns}$ の成分が増加することが分かった。

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、A.G.E.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、A.G.E.は寿命2.8nsの成分に相当し、A.G.E.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A.G.E.の組織内蓄積が主因であると考えられる。

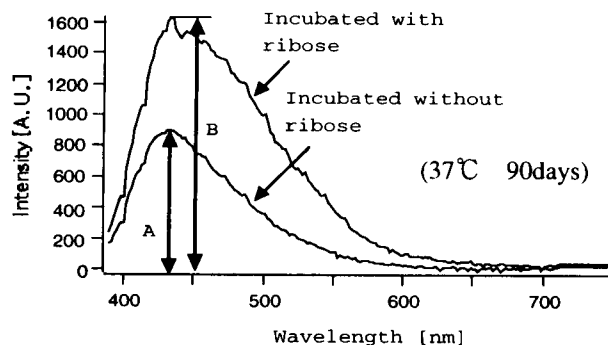


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of human dentin

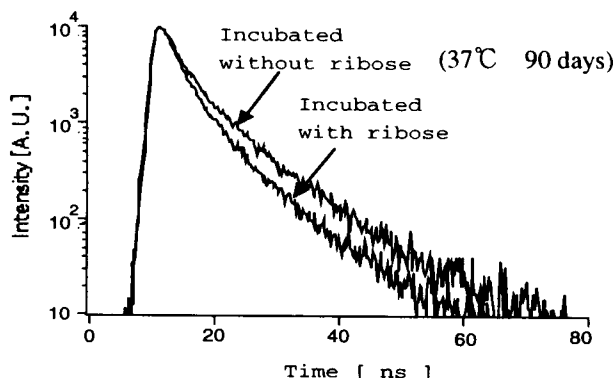


Fig. 4 Fluorescence decays curve of human dentin

しかし、この点を明確にするためには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し、A.G.E.を分離し蛍光減衰波形を測定する必要がある。また、腱や軟骨のようにコラーゲン線維が豊富にある組織においても、年齢と蛍光強度及び蛍光減衰時間に相関があることを検証する必要がある。

謝辞

本研究において、貴重な生体試料を提供下さった、東野義之教授(奈良医科大学)、及び松本林博士(徳島大学歯学部)に感謝いたします。

本研究に対し文部省科学調査研究費基盤研究(B)11480257の援助を受けた。

Table 1 Parameters of fluorescence decay curve

Specimen incubated at 37°C	With ribose		Without ribose		B/A
	i_1/I	i_2/I	i_1/I	i_2/I	
Plate @ (7 days)	0.64	0.36	0.51	0.49	1.48
Dentin (90 days)	0.61	0.39	0.41	0.69	1.77

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