

加齢による組織コラーゲンのナノ秒自己蛍光特性の変化
 —象牙質より抽出したコラーゲンによる検証—
 Age-related change of nanosecond autofluorescence of tissue collagen
 —Examination of extracted collagen from human tooth—

○中本和伸, 安井武史, 荒木 勉
 Kazunobu Nakamoto, Takeshi Yasui, Tsutomu Araki

大阪大学大学院基礎工学研究科
 Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Tissue collagen reacts with reduction sugar, resulting in formation of crosslinks. Resultant crosslink of collagen fluoresces blue emission under excitation with UV light. the fluorescence life time is in nanosecond range. We suppose that crosslinks accumulate with age. Therefore the fluorescence informs us aging of tissue. Then we measured nanosecond fluorescence of tissue collagen in human tooth and research the relation between fluorescent properties and aging.

1. はじめに

生体組織は加齢に伴って硬くなったり、水溶性が減少する。これは加齢とともに結合組織においてコラーゲン線維が還元糖と反応することによりクロスリンクが形成し蓄積されるからであると考えられている。この反応をグリコシル化反応といい、この反応により最終的に生成される物質を総称して AGE (Advanced Glycosylation End-products) という。生体組織の AGE には紫外線を照射すると青白い蛍光を発するという自己蛍光特性を持つものがある。

これまで皮膚や血管など軟組織においては、加齢による蛍光特性の変化が調べられてきたが、硬組織においてはあまり報告がない。そこで我々は、蛍光性 AGE が加齢により増加すると仮定して、ヒト象牙質よりコラーゲン成分を抽出し、その蛍光特性を測定した。また、加齢と蛍光特性の関係について切片試料の測定結果と比較し検証した。

2. 実験方法

ナノ秒時間分解蛍光測定の光学配置を Fig. 1 に示す。励起光源に半導体パルスレーザー (Nanolase, 波長 355 nm, 平均出力 50mW, 線返し周波数 46kHz, パルス幅 0.5 ns) を使用した。サンプルにレーザー光を照射し、フィルターで蛍光成分を選択して光電子増倍管で検出した。その信号をデジタルオシロスコープ (LeCroy, 帯域 500MHz) で測定し、蛍光減衰波形を得た。

試料はヒト歯牙切片を EDTA で脱灰しその後、象牙質部分を取り出して細く碎き、酢酸可溶性成分を酢酸溶液中に抽出した。そして Fig.1 の装置で蛍光減衰波形を測定した。また蛍光分光光度計 (Shimadzu, RF-5300PC) で蛍光スペクトルを測定した。

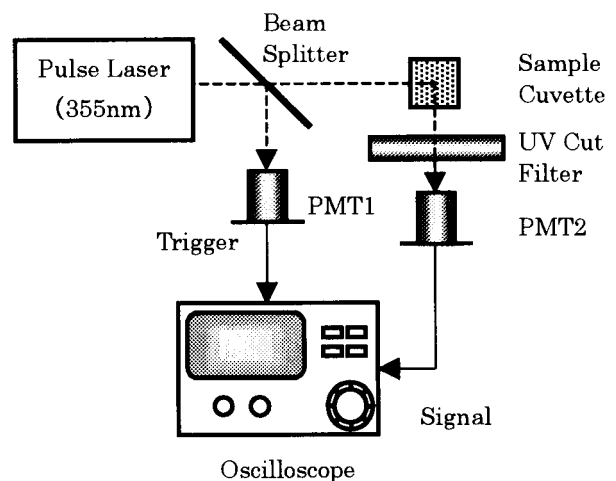


Fig.1 Schematic diagram of the nanosecond fluorescence measurement system

3. 実験結果

酢酸溶液試料の蛍光スペクトルの測定結果を Fig.2 に示す。また、歯牙切片を顕微鏡下で測定した結果を Fig.3 に示す。ここでは、年齢と蛍光強度の関係を示してある。蛍光スペクトルから蛍光のピーク波長が約 420nm であり、加齢に伴って蛍光強度が増大するということが分かった。溶液の測定では顕微鏡下

で歯牙切片を測定したとき (Fig.3) よりもより強い相関が得られた。

次に、オシロスコープで測定した蛍光減衰波形を Fig.4 に示す。歯牙切片の測定結果 (Fig.5) と同様の波形が得られた。しかし、切片試料においては加齢により蛍光の減衰時間が短縮したが、酢酸溶液においては加齢により減衰時間が長くなる傾向が見られた。この原因は歯牙切片は測定方法の違い (オシロスコープとフォトンカウンティング) が考えられる。さらに、象牙質全体の成分を見た切片試料に対して、溶液試料は酢酸に溶解する成分を観測したので、象牙質全体とは違う成分の蛍光特性が得られたとも考えられる。

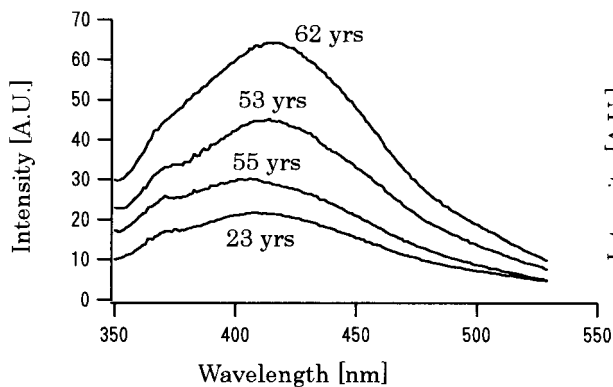


Fig.2 Fluorescence spectra of extracted collagen in human dentin

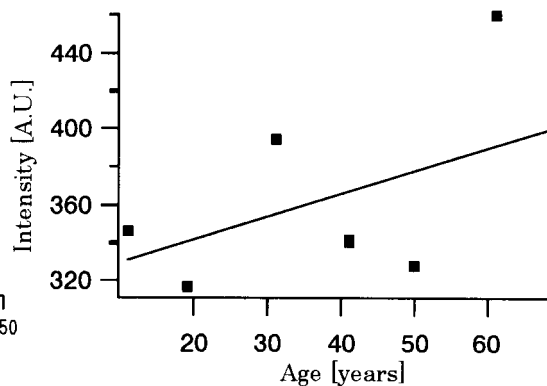


Fig.3 Relation between fluorescence intensity of human dentin tissue section and age

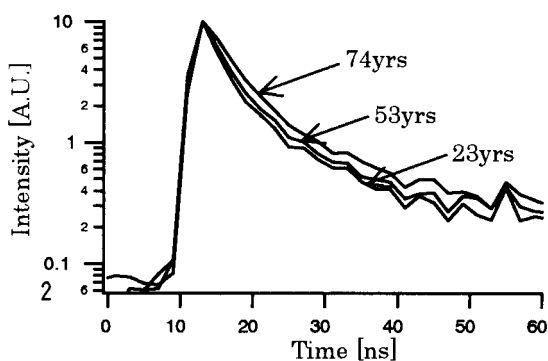


Fig.4 Fluorescence decay curve of extracted collagen in human dentin

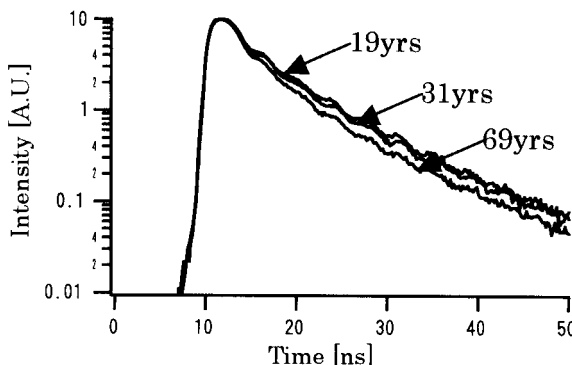


Fig.5 Fluorescence decay curve of human dentin tissue section

4. おわりに

溶液試料の蛍光減衰波形を測定した結果、加齢により蛍光減衰時間が増大した (Fig.4)。また、蛍光減衰波形において 2 成分の蛍光寿命でフィッティングすると、短寿命成分 (約 3ns)、長寿命成分 (約 20ns) とともに切片試料の測定結果 (Fig.5、短寿命: 約 1ns、長寿命: 約 7ns) より長くなった。これらの結果から、加齢によりコラーゲン中にある蛍光特性を持つ成分が生成され、溶液全体の蛍光減衰時間が加齢により変化すると考えられる。しかし、顕微鏡下で切片試料を測定したときと異なり、実際に加齢により蛍光寿命の短い生成物ができているのか長い生成物ができているのか不明で、今回の測定からはっきりしたことは分からなかった。この点に関しては検討中である。

そこで現在は加糖によるモデル実験により、蛍光特性がどう変化するかを調査している。糖により生成する蛍光性のクロスリンクが酢酸に溶ける成分であれば、コラーゲンの酢酸溶液を測定することにより組織の老化を観ることができると考えられる。またコラーゲンを含む象牙質以外の組織でも同じようなことが期待できる。

また、今回はオシロスコープで蛍光減衰波形を測定したが、より時間分解能が高い時間相関シングルフォトンカウンティング法で測定するという方法を検討している。

文献: 相木一磨他, 第 12 回バイオエンジニアリング講演会 (2000), 論文集 p.p.293-294

謝辞: 本研究に対し文部科学省科研費 B(2)12558108 の助成を得た。また、歯サンプルを提供して頂いた元徳島大学歯学部松本林博士に感謝いたします。

7a