

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650260

研究課題名(和文)コラーゲンの光学情報に基づいた生体老化測定装置の開発

研究課題名(英文)Development of aging inspection system based optical property of collagen

研究代表者

荒木 勉 (ARAKI, Tsutomu)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：50136214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：歳をとると皮膚の張りの低下、水晶体の黄濁、動脈の硬化などの症状が現われるが、これは生体のコラーゲン線維が血糖の働きで非酵素的なメイラード反応を起こした結果、Advanced Glycation Endproducts(AGE)と呼ばれる分子間架橋が形成され、ヤング率が増加したことが原因である。そこでAGE産生を光学的に検出するシステムを開発した。ここではAGEが発する自己蛍光を産生量の指標とするが、従来の静的蛍光に加えて、ナノ秒時間分解蛍光特性の測定を導入した。またAGE抗体による免疫染色によってAGEの存在を確認した。次に歯の象牙質をモデルとしてAGEが象牙質に及ぼす影響を考察した。

研究成果の概要(英文)：Aging is unavoidable phenomenon in human body. In aged persons, their collagen tissue such as the skin is harder than that in young ones. The collagen reacts with blood glucose non-enzymatically, resulting in production of advanced glycosylation endproducts (AGEs). The AGEs bind to collagen and acts as a cross-link between collagen fibrils, and resultant cross-link causes a change of mechanical property of the collagen tissue.

Aim of this research project is to develop a simple and effective method that can sense AGEs optically. For this purpose, we have focused on nanosecond time-resolved fluorescence of AGEs. Observed fluorescence lifetime of collagen tissue informs degree of accumulation of AGEs in the tissue. To confirm the accumulation of AGEs, we also carried out immuno-staining of AGE. Using these technique we have examined the aging of dentinal collagen.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、生体医工学・生体材料学

キーワード：老化 蛍光 コラーゲン 皮膚 分子間架橋

### 1. 研究開始当初の背景

歳をとると皮膚の張りの低下、水晶体の黄濁、動脈の硬化、骨密度が低下しないのに骨折しやすいなどの症状が現われるが、これにはコラーゲンが大きく関与している。骨を例にとれば、骨のコラーゲン線維が血糖の働きで非酵素的なメイラード反応を起こした結果、Advanced Glycation Endproducts(AGE)と呼ばれる分子間架橋が形成され、ヤング率が増加したことが骨折しやすくなった原因である。皮膚の硬化、血管の脆性増大も同様な反応が一因である。したがってコラーゲン量と同時にその質的な変化をモニターできれば老化の指標が得られ、病変予知にもつながる。

これまでに、次のような研究を行ってきた。

(1) 生体の各種組織に紫外或の極短パルスレーザーを照射すると、ナノ秒或の動的蛍光が発生した。この蛍光はコラーゲン由来であることがわかった。

(2) 硬組織である歯の象牙質で加齢とともに蛍光減衰時間(蛍光寿命)が減少した。また軟組織である動脈についても同様な結果を得た。さらに文献的にも、メイラード反応によって蛍光強度が上昇することが知られているが、蛍光寿命についての言及はない。これらを総合して加齢(老化)と蛍光寿命との相関を考察した。したがって蛍光寿命波形を解析することで架橋の増加を知ることができると予測した。

### 2. 研究の目的

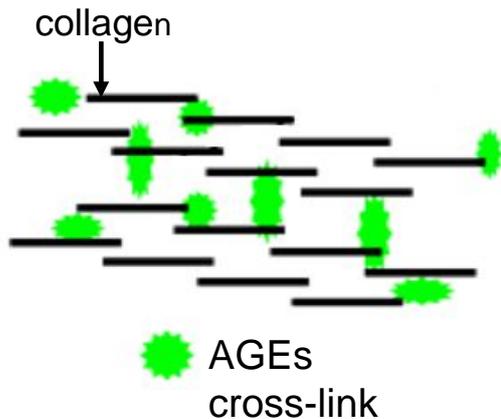


図 2-1 コラーゲン架橋による機械特性変化

我々は老化指標として AGE に着目した。図 2-1 のように AGE はコラーゲン間に架橋づくり、弾力性を低下させるなどコラーゲンの機械的特性を変化させる。AGE は紫外線照射で青い蛍光を発する。そこで本研究では、申請者が得意とするレーザーフォトンクスによって、加齢によるコラーゲンの量と質の

変化の関係を調査し、その知見を基にして、エージングチェック法の基礎を築きたい。具体的には生体組織にパルスレーザーを照射し、得られる第二高調波発生光(SHG 光)とナノ秒自己蛍光をもとに老化情報を得る。この研究では、光学的計測を基礎とし、非接触で老化の情報を取得する手法をとる。また、光学系を顕微光学系とすることで局所の情報を得る。

### 3. 研究の方法

(1) 蛍光寿命画像取得システムを試作し、効率よく細胞組織レベルでのナノ秒蛍光寿命マッピングを行う。

(2) 生体第二高調波発生光(SHG 光)を検出する。これまでに開発した装置ではコラーゲンの量あるいは密度の分布を取得できた。しかし、SHG 光はコラーゲンの量と分子配列に依存するため、SHG 信号が大きいということは、量が多いのかあるいは配向がそろっているのかがあいまいになる。そこでコラーゲン分子配向を検出できる測定システムを完成させる。そのうえで、加齢にともなうコラーゲン分布画像の変化を測定する。

(3) *in vitro* においてコラーゲンと糖を反応させ蛍光減衰波形を詳細解析する。このようにしてコラーゲンの架橋による蛍光変化の検証を行う。

これらの具体的方法については、次項の成果の欄で述べるため、本項では略記した。

### 4. 研究成果

(1) ナノ秒蛍光寿命画像システムの試作

図 4-1 に本研究で試作したナノ秒蛍光寿命イメージング装置の構成を示す。現有のニコン C1 レーザー顕微鏡を基にし、単一光子相関時間分解計測法である(TCSPC 法)が可能なように改良を加えている。図に示すようにガルバノミラーを制御することで微小領域を高速にスキャンすることができるようになった。

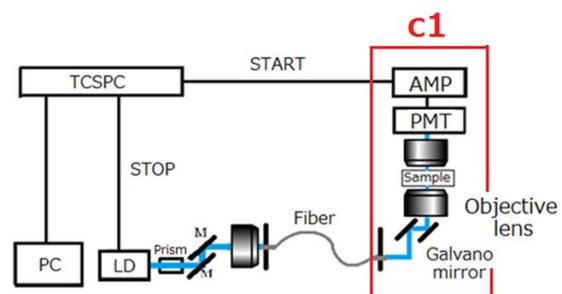


図 4-1 微小領域蛍光寿命イメージング装置

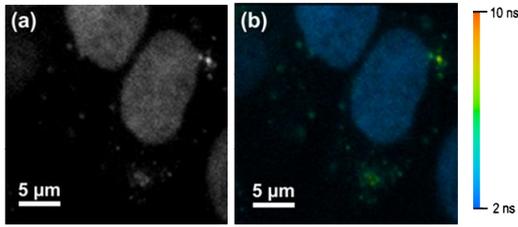


図 4-2 染色した HeLa 細胞の (a) 蛍光強度イメージ (青: Hoechst, 緑: 量子ドット) と (b) 蛍光寿命イメージ

この装置の性能を評価するため、蛍光染色した HeLa 細胞を測定した。HeLa 細胞にまず食作用によって量子ドット (Invitrogen, 直径 15~20 nm, em: 525 nm) を導入し、Hoechst 33342 (Invitrogen, em: 460 nm) によって核を染色した。計測は 1 点当たり 1 s で行った。そのイメージ取得は 128 × 128 ピクセルであり 4 時間の計測を行った。測定の結果を図 4-2 に示すが、図から分かるように HeLa 細胞の核と量子ドットがイメージできている。ヘキストの蛍光寿命は 2.7 ns から 3 ns 程度であり、量子ドットの蛍光寿命は約 7 ns であった。

従来の静的な蛍光強度イメージではヘキストと量子ドットの分離がうまく行えないが蛍光寿命イメージからヘキストと量子ドットの 2 物質をうまく分離できており、本手法の有効性を確認した。

### (2) SHG によるコラーゲン密度および分子配向測定システムの構築

コラーゲン線維から発生する SHG 光には入射偏光方向と線維配向の間に偏光依存性がある。これを利用すればコラーゲン線維の線維配向方向が測定可能である。具体的には、そこで、ある配向をもったコラーゲン線維に対し、コラーゲン配向に垂直な偏光と水平な偏光のレーザー光をそれぞれ入射する。その際に発生する SHG 強度をもとに 値 という数値を算出すると、値はコラーゲン線維配向を反映しており、この値が正符号であると垂直方向の配向が優位であり、負符号では水平方向の配向が優位ということになる。各ピクセルの 値にカラスケール(正なら青、負なら赤)を設けることでコラーゲンの線維配向を イメージで簡易表示した。



図 4-3 光老化マウスの皮膚

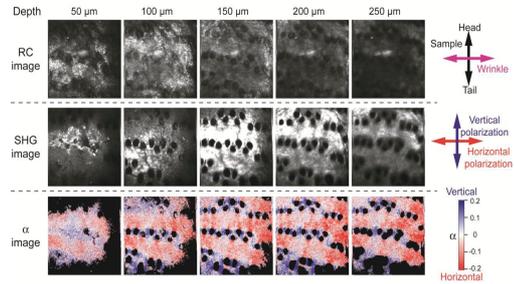


図 4-4 偏光分解 SHG イメージ

図 4-3 は評価に用いた光老化マウスの皮膚であり、この イメージを求めたものが図 4-4 である。以上の結果から、光老化マウスでは、しわの走行方向に沿って線維が配向した赤い イメージが得られており、紫外線により形成されたしわと同方向にコラーゲン線維が配向しているとわかる。このように、偏光分解 SHG 顕微鏡を用いることでコラーゲン線維の配向を定量評価できる。

### (3) 加齢による皮膚コラーゲン分布画像の取得

SHG 光を得るために、通常は波長 800nm 程度のチタン・サファイアレーザーを使うが、それから発生した SHG 光は光学窓から外れており、SHG 光を効率よく検出できない。そこで我々はフェムト秒モード同期クロム・フォルステライトレーザー (Cr:F レーザー、中心波長 1250nm、パルス幅 100fs、繰り返し周波数 73MHz) を使用した。

ここでは頬の皮膚を測定した。この場合、できるだけ広範囲なコラーゲン分布状態を観る目的で、600 μm × 600 μm の測定領域を縦横にそれぞれ 4 画面つなぎ合わせて 2.4mm × 2.4mm の拡大画面を作成した。ひとつの拡大画面を取得する時間は 32 秒である。

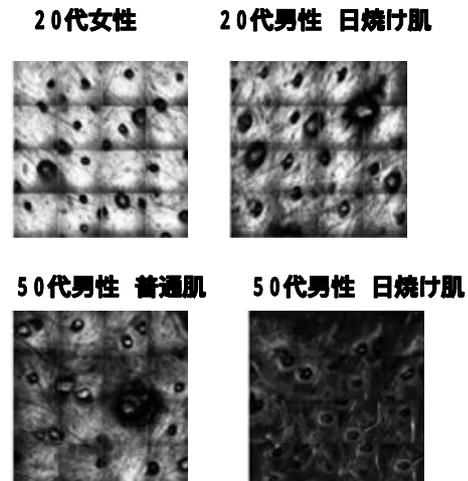


図 4-5 頬真皮 SHG 信号の加齢による変化

測定例として 20 代から 50 代にわたる皮膚の、表皮下 100 μm の SHG 光画像を図 4-5 に示すが、加齢や日焼けとともに SHG 信号が減少し

ていくことがわかる。しかし冒頭で記載したように、SHG 光強度はコラーゲン線維の配列がそろっているとき強くなる。したがって図 4-5 に示した加齢や日焼けによる SHG 信号の減少は、コラーゲン量が減少したのかあるいは線維の配列が乱れたのかを吟味する必要がある。

#### (4) AGE による歯の力学特性の変化

AGE 蓄積によるコラーゲン線維の力学特性変化のモデルとして、象牙質を対象に調査を行った。力学特性は押し込み試験機を使って測定した。ここでの押し込み試験は 1 mm に歯をスライス後 EDTA 中で 2 週間脱灰した象牙質試料を用いた。これをマイクロステージに乗せ、各ポイントの固さを計測しては移動させるといった過程を繰り返し行った。圧縮ヘッドとしては先端直径 1 mm のものを用いた。固さの評価として横軸にヘッドの変位、縦軸に発生した力を表した力-変位曲線を取得し線形近似で傾きを算出したものを用いた。この値は [N/mm] の次元で表され、いわばばね定数のようなものである。19 歳 (young) と 72 歳 (aged) の歯に対し行った押し込み試験の結果を図 4-6 に示す。

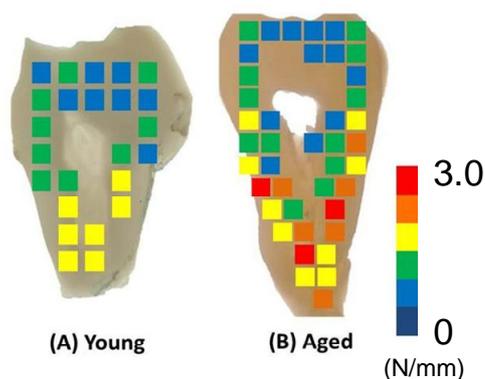


図 4-6 脱灰した象牙質の押し込み試験結果

この結果よりどちらのサンプルにおいても歯根部の方が固く、年齢比較では高齢者サンプルの方が全体的に大きな値を示した。さらに免疫染色で AGE の分布を調べると、高齢者ほど AGE が産生され、また歯根部のほうが歯冠部に比べて AGE の産生が多かった。この AGE 染色濃度と図 4-6 の硬さ分布とは大きな相関があるため、AGE が象牙質コラーゲン間に架橋したことが硬さ変化に影響しているのではないかと考えられる。

脱灰した 19 歳歯の象牙質切片をリボース溶液に浸透させて、人工的に糖化を進めたものについて同様の試験を行った結果、全体に硬さが増し、その値は 72 歳のもの (図 4-6 右) に同じになった。

#### (5) AGE による蛍光寿命減少の調査

象牙質切片を脱灰したのち、リボース液に浸し、人工的に糖化を加速させた試料の蛍光寿命が減少することを確認した。現在コラーゲンを糖化して、糖化による蛍光寿命の変化を追跡中である。

#### (5) 今後の展開

上述のように、これまでの予備実験で得られた蛍光寿命とこれらの結果をもとに AGE チェッカーの構想を提案した。しかし要素計測は完遂したが、SHG 情報と蛍光情報の結合、蛍光寿命の変化と AGE 量の関係など、融合的な研究が未完である。今回の科学研究を基に、平成 25, 26 年度の挑戦的萌芽研究課題を申請して採択されたので、この中に上述の成果を反映させて研究を進めたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Jiro Miura, Kantaro Nishikawa, Mizuho Kubo, Shuichiro Fukushima, Mamoru Hashimoto, Fumio Takeshige, and Tsutomu Araki, "Accumulation of advanced glycation end-products in human dentin by aging", Arch. Oral Biol., Vol. 59, No. 2, pp. 119-124, (2014), 査読有。

Takeshi Yasui, Shuichiro Fukushima, Tsutomu Araki, et al., "In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser," J. Biomed. Opt., Vol. 18, No. 3, 031108 (2013), 査読有。

Ryosuke Tanaka, Shuichiro Fukushima, Tsutomu Araki, Takeshi Yasui, et., al "In vivo visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy," J. Biomed. Opt., Vol. 18, No. 6, 061231 (2013), 査読有。

福島修一郎, 橋本守, 荒木勉, "SHG イメージングの組織診断への応用", 京府医大誌, Vol. 122, No. 4, pp. 189-198, (2013), 査読無。

[学会発表] (計 4 件)

Tsutomu Araki, "Non-staing, in situ visualization of collagen by femtosecond laser light and its application to tissue diagnosis", 2nd International Anatomical Sciences and Cell Biology

Conference, 2012 年 12 月 6 日 ~ 2012 年 12 月 8 日, Chiang Mai (タイ).

西川貫太郎, “糖化によるヒト象牙質の蛍光と力学特性の変化”, 第 23 回バイオフロンティア講演会, 2012 年 10 月 5 日 ~ 2012 年 10 月 6 日, 弘前市.

Jiro Miura, “Influence of glycosylation on fluorescence characteristics and mechanical properties of human dentin”, 1st International Conference on Fluorescence-based Diagnostic of Oral Diseases, 2012 年 9 月 4 日 ~ 2012 年 9 月 5 日, Montpellier (フランス).

荒木勉, “カニクスとバイオロジーとフォトニクス、あわせてメカノバイオフォトニクス –その重要性と可能性–”, 第 24 回バイオエンジニアリング講演会, 2012 年 1 月 8 日, 豊中市.

〔その他〕

ホームページ等

荒木研究室ホームページ

<http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒木 勉 (ARAKI, Tsutomu)

大阪大学・大学院・基礎工学研究科・教授  
研究者番号：50136214

### (2) 研究分担者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA, Shuichiro)

大阪大学・大学院・基礎工学研究科・助授  
研究者番号：40362644