Osaka University Knowledge Archive

Title	加齢に関連した象牙質コラーゲン蛋白質の非酵素的糖化修飾
Author(s)	清水, 真人
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56125
rights	© 2015 Optical Society of America
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

学位論文

加齢に関連した象牙質コラーゲン蛋白質の非酵素的糖化修飾

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻
療護歯科保健学講座　顎口腔総合医療学教室

清水　真人

目次

緒言 3

材料と方法----------6

１．象牙質からのコラーゲンの抽出および抗 AGEs 抗体用いた
ウェスタンブロットによる AGEs 化コラーゲンの検出----------6

１）象牙質コラーゲンの抽出方法の検討----------6

２）象牙質コラーゲンの SDS-ポリアクリルアミド電気泳動
（SDS-PAGE） ----------7

３）銀染色による象牙質抽出タンパク質の検出 ----------7

４）コラーゲンの定量----------8

５）ウェスタンブロット法における試料の PVDF 膜への転写
ならびに抗原抗体反応----------9

６）抗 AGEs 抗体（抗 CML 抗体と抗ペントシジン抗体）による
AGEs 化コラーゲンの検出 ---------- 10

２．抗 AGEs 抗体による脱灰象牙質の免疫組織染色。高齢者、若年者の比較
---------- 10

３．抗 AGEs 抗体による免疫電子顕微鏡解析---------- 11

４． 蛍光強度ならびに蛍光寿命測定---------- 13

１）Type I コラーゲンゲルの糖化と蛍光スペクトル---------- 15

２）ヒトの歯の蛍光寿命測定蛍と光強度測定 ---------- 17

５．象牙質中のペントシジンの高速液体クロマトグラフィー
（HPLC）による分離、同定 ---------- 17

結果 ---------- 19

１． 象牙質からのコラーゲンの抽出および抗 AGEs 抗体用いた
ウェスタンブロット ---------- 19

２．抗 AGEs 抗体による脱灰象牙質の免疫組織染色、高齢者、若年者の比較
---------- 19

３．抗 AGEs 抗体による免疫電子顕微鏡解析 ---------- 20

４． 蛍光強度ならびに蛍光寿命測定 ---------- 20

５．象牙質中のペントシジンの高速液体クロマトグラフィー
（HPLC）による分離、同定 ---------- 21

考察 ---------- 23

結論 ---------- 30

謝辞 ---------- 31

参考文献 ---------- 32

緒言

生体内における糖化反応は、ヒトの加齢変化の１つとして考えられているが、一方で、糖は生体にとって有効なエネルギー源となるため、常に体内に取り込む必要がある。生体内に入った糖は、非酵素的にタンパク質のアミノ基と反応し、メイラード反応と呼ばれる一連の反応を経て糖化最終産物（Advanced Glycation End products: 以下AGEs）を形成する[1)2)]（図１）。AGEsは不可逆的にタンパク質を修飾するため、そのタンパク質が代謝されない限り生体内に蓄積する。

現在、体内におけるAGEsの蓄積に関する研究が進んでいる分野として糖尿病研究があげられる。糖尿病の診断指標として利用されているヘモグロビンA1c（以下HbA1c）は、メイラード反応による糖とタンパク質の反応が不可逆であることを利用している。HbA1cは、血中ヘモグロビンAのβ鎖N末端アミノ基の糖化反応生成物で、糖化されたHbA1cは赤血球が代謝されるまで血中に存在し続ける。赤血球の寿命は約４ヵ月間であり、血中に余剰の糖があればヘモグロビンは次々と糖と結合するので、HbA1cの値は１～２ヵ月間の平均血糖値の目安として用いられている[3)4)]。糖尿病の血管合併症の疫学調査では、１型糖尿病おける初期の6.5年間に血糖コントロールが不良である場合、その後の血糖コントロールが良好であっても血管合併症の発症率は高いことが示されてい

る[5]。一方、２型糖尿病では、初期から血糖コントロールをすることで、血管合併症のリスクが抑制されることが明らかにされている[6]。これらのことから高血糖状態においては、AGEsが容易には代謝されず、長期にわたり多くの臓器に様々な障害を与えることが考えられる。一例として、高血糖下では神経繊維も糖化され、糖尿病患者における神経系不調の主な原因となることが知られている[7][8]。また、AGEsがコラーゲンなどを直接修飾する経路とは別にAGEsレセプター（以下RAGE）との相互作用によって血管内壁の石灰化が誘導されるといった報告もある[9]。歯科に関連したものでは、血糖コントロールされていない患者において、歯髄内でRAGE を介したシグナル伝達により石灰化反応が亢進し、糖尿病に特徴的な歯髄内結石が生じるといわれている[10][11]。またAGEsはアルツハイマー症や[12]~[14]、腫瘍の浸潤転移への関与が疑われており[15]（図2）、老化と全身疾患を絡めた研究も報告されている[16]。

加齢変化として糖化を考えた場合、皮膚や骨においてコラーゲンが糖化されAGEs がコラーゲン内に蓄積することで、皮膚では弾力を低下させて皺やたるみとなり [17]、骨においてはコラーゲンの質が低下することで骨折リスクが増加すると考えられている [18]。AGEs には、タンパク質のアミノ酸側鎖一つに付加する Carboxymethyllysine（CML: カルボキシメチルリジン）や Carboxyethyllysine（CEL:カルボキシエチルリジン）などの付加型 AGEs と

pentosidine（ペントシジン） や crossline（クロスリン）といった二つのアミノ酸の間を架橋する架橋型 AGEs がある。架橋型 AGEs には芳香環を有し、蛍光性を持つものが多い[19]（図３）。また、骨において架橋型 AGEs は、コラーゲン分子間の非生理的架橋を増加させるため、コラーゲンの柔軟性が低下し、本来のしなやかで強靭な構造から，硬く脆弱な構造に変化することが報告されている[20]（図４）。

象牙質コラーゲンにおいても、糖化による修飾は象牙質の靭性を低下させ、歯の破折の一因となっていることが示唆されている[21]。しかしながら、象牙質では、他の組織に比べてコラーゲン間の架橋が多く[22]コラーゲンの抽出が困難であるため、糖化の状態を調べた研究報告は少なく、象牙質コラーゲンの糖化レベルに加齢による違いが認められたとの報告があるものの[23]、定量的な評価法によってその差を評価した報告はない。本研究では、形態学的な手法、物理化学的手法、生化学的手法、および分析化学的手法を用いて象牙質基質タンパク質であるコラーゲンの糖化修飾を検出し、象牙質における加齢による糖化現象の評価を行った。

材料と方法

本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の審査を受けて承諾を得て行った。（H24-E25-1 号）

歯科医学的見地から保存不能で抜歯に至った患者に、実験の目的と方法を説明し了承を得た。

１．象牙質からのコラーゲンの抽出および抗 AGEs 抗体を用いたウェスタンブロットによる AGEs 化されたコラーゲンの検出

１）　象牙質コラーゲンの抽出方法の検討

若年者（３０歳以下）と高齢者（６５歳以上）の歯を、低速ダイヤモンドソー（MC201、マルトー社、東京）にて 1mm 厚にスライスカットした後、10％EDTA (pH7.4) に 3 週間室温で浸漬し脱灰を行った。脱灰後の象牙質試料からコラーゲンを抽出する手法を確立するため、ペプシン[24)−26)]および 3N-HCl[27)28)]にて溶出を行い、その抽出効率の比較を行った。象牙質試料を 1 mm 角に切断し、液体窒素で凍結させた後に、乳棒、乳鉢で粉砕した。ペプシン抽出では、凍結粉砕した試料を 0.5N 酢酸に懸濁し、2500units/mg になるようにペプシンを加え、4 ℃にて 12 時間反応させた。一方、3N-HCl 抽出では、凍結粉砕後の試料に 3N-HCl

を 500μl 加え、37℃にて 12 時間反応させた。反応後、それぞれの試料に含まれるタンパク質成分を TCA/アセトン沈殿法[29]にて回収した。

２）　象牙質コラーゲンの SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）

タンパク質の電気泳動は通法通り Laemmli 法[30]で行った。１）で得られた象牙質抽出物に、SDS-PAGE 用のサンプルバッファー（×１濃度）を 30μl 加えて再溶解し、SDS ポリアクリルアミドゲル（ミニプロテアン TGX ゲル 4－15%グラディエントゲル、Bio-rad、USA）に１レーンあたり 20μl 試料をゲルにロードした。電源装置（パワーパック HC、Bio-rad、USA)にて 200mV 定電圧、約 30 分間電気泳動し、ダイフロントが陽極バッファー液中に出る直前で電気泳動を止めた。総蛋白質の検出には銀染色を用いたタンパク質の染色、AGEs は、マウス抗 CML モノクローナル抗体（6D12、Transgenic Inc. 福岡）、およびラビット抗 type I コラーゲンポリクロナール抗体（Anti-Collagen Type I AntibodyHuman, Rabbit-Poly、Acris Antibodies、Germany）を１次抗体として、後述するウェスタンブロット法によって検出を行った(図 5)。

３）　銀染色による象牙質抽出タンパク質の検出[31]

電気泳動したゲルを 10%酢酸－50%メタノール－40%水で固定した後、銀染色試薬（2D-銀染色試薬･II、コスモバイオ、東京）を用いて染色を行った[31]。

４）　コラーゲンの定量

象牙質コラーゲン中に含まれる AGEs の量を比較するためには抽出物中のコラーゲンを定量的に取り扱う必要がある。天然の Type I コラーゲンにはヒドロキシプロリンが平均で 13%ほど含まれているため [32]、ヒドロキシコラーゲンを定量することでコラーゲンの量を見積もることができる。ヒドロキシプロリンの定量法のひとつに Kivirikko らの開発した化学定量法がある [33]。これは、クロラミン T によってヒドロキシプロリンを酸化し、脱炭酸反応を経て生じたピロールを p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを含む試薬（エールリヒ試薬）で発色させることで定量を行う方法である。Kivirikko らの原法は操作が煩雑で試料も大量に必要なため、本研究では、Kivirikko 改良法である Reddy らの方法 [34]を用いてコラーゲンを定量した。

Reddy らの方法に基づき、ヒドロキシプロリンを含む試料(ヒドロキシプロリンとして 2-20μg 範囲で含むもの) 50μl を、最終濃度 2N の水酸化ナトリウムに溶解し、テフロンシールのついた耐圧バイアル瓶中で 120℃、20 分間オートクレーブ（EX Clave、モリタ製作所、京都）にかけ、試料をアミノ酸レベルにまで分解した。0.056M クロラミン T 溶液（酢酸－クエン酸緩衝液 pH6.5 にクロラミン T を溶解）溶液を 450μl をアルカリ分解した試料に加えた。25 分間室温に放置したのち、500μl の *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1M 溶液（n-

プロパノール : 過塩素酸=2:1 に溶解）を加え、65℃、20 分間反応させた後、550 nm の吸光度を紫外可視分光光度計（DU 530、ベックマンコールター、USA）で測定した。標準のヒドロキシプロリンとして、定量用のヒドロキシプロリン（和光純薬、大阪）を希釈して検量線（図 6）を作製した後、試料の定量を行った。

5） ウェスタンブロット法[35]における試料の PVDF 膜への転写ならびに抗原抗体反応

ウェスタンブロットの SDS-PAGE 試料のロード量は、4）でのコラーゲン定量に基づきコラーゲン量として 5μg に揃えた。PVDF 膜への転写はセミドライブロッティング法で行った。セミドライブロッティング法はサブマリンブロッティング法に比べ短時間で転写ができ、緩衝液の使用量も少なくてすむ。しかし一方で、高分子量のタンパク質の転写効率が悪いことが知られている。高分子量の転写効率改善のため、陽極と陰極に異なる組成の緩衝液を用いる不連続緩衝液系転写法が開発されており、本研究でも Laurière らの不連続緩衝液系を用いた[36]。15%メタノールを含む Tris60mM/CAPS40mM 緩衝液 pH9.0 を陽極液とし、0.1% SDS を含んだ Tris60mM/CAPS40mM 緩衝液 pH9.0 を陰極液とした。陽極液、陰極液それぞれを厚手のろ紙（ブロットアブソーベントフィ

ルターペーパー極厚 2.45mm、Bio-rad、USA）にしみ込ませ、陰極側をゲル、陽極側を PVDF 膜（イミュン-ブロット PVDF メンブレン、Bio-rad, USA）にそれぞれ密着させて挟みこみ、1.5mA/cm^2 の定電流、１時間でパワーパック HC(High Current、Bio-rad、USA)にて転写を行った。転写後のポリアクリルアミドゲルにクーマシーブリリアントブルー染色をし、電気泳動のみ行ったゲルの染色と比較し、転写効率を確認した[37]。

６） 抗 AGEs 抗体（抗 CML 抗体、抗ペントシジン抗体）による AGEs 化コラーゲンの検出

タンパク質を転写した PVDF 膜をブロッキング試薬（EzBlock Chemi、ATTO、東京）でブロッキングした後、ブロッキング液にて 1/5000 希釈した 1 次抗体（anti-CML mouse monoclonal antibody：6D12、anti-pentosidine mouse monoclonal antibody：PEN12、Transgenic Inc.、福岡）液を反応させた。2 次抗体としてヤギ抗マウス抗体（goat anti-mouse IgG＋HRP、Bio-Rad、USA）を１次抗体と同じくブロッキング溶液で 1/5000 希釈したものを反応させた。検出は TMB 発色（Ez West Blue、 ATTO、東京）（図 7b）と、化学発光（ECL 発光：Ez West Lumi plus、ATTO、東京）を用いた（図 7c）。ECL 発光の検出には化学発光検出装置（Gene Genome 5、Syngene、UK および Versa Doc 5000、

Bio-Rad、USA）を使用した。

２．抗 AGEs 抗体による脱灰象牙質の免疫組織染色。高齢者、若年者の比較。

コラーゲン抽出時と同様に、1mm 厚にスライスカットした試料を３週間 10% EDTA、室温で脱灰し、2% パラホルムアルデヒド（以下 PFA)にて浸漬固定処理を行った。 続いてエタノール上昇系列で脱水を行い、パラフィン包埋した後、回転式ミクロトーム（RM2125RT、LEIKA、Germany）を用い、厚さ４μmの準超薄切片を作製した[23]。各切片をキシレンで脱パラフィンを行い、トリス緩衝生理食塩水（Tris-Buffered Saline : 以下 TBS)で洗浄した。ブロッキングにはウサギ血清（和光純薬、大阪）、１次抗体として抗 AGEs マウスモノクローナル抗体（anti-CML mouse monoclonal antibody : 6D12、Transgenic Inc.、福岡）、２次抗体としてビオチン標識ラビット抗マウス抗体（Biotinylated rabbit anti-mouse IgG 、DAKO Cytomation、Denmark)を使用し、ジアミノベンジジン（3,3'-Diaminobenzidine:以下 DAB）発色反応を用いて光学顕微鏡（CX41、OLYMPUS、東京)で染色像を観察した(図 8)。

３．抗 AGEs 抗体による免疫電子顕微鏡解析

免疫組織染色と同様に、EDTA で脱灰した象牙質試料を 4% PFA と 0.5% グ

ルタルアルデヒド（以下 GA）で固定した後、エタノール上昇系列で脱水。LR-Gold resin（London Resin Company LTD.、UK）に浸漬し、－30℃で紫外線重合装置 TUV200（Dosaka EM CO. LTD.、京都）を用いて 24 時間紫外線照射を行い低温紫外線重合樹脂包埋した。樹脂硬化後にウルトラミクロトーム（Ultrotome V、LKB、Sweden）及びダイヤモンドナイフ（ナノトーム、酒井電子顕微鏡応用研究所、埼玉）で 70nm 厚の超薄切切片を作製した。切片をニッケルグリッド（VECO グリッド#100、VECO、Nederland）にマウントし、TBS にて洗浄した。ロバの血清（1/10 希釈）を用いてブロッキングを行い、抗 CML マウスモノクロナール抗体：6D12 を 1/100 希釈（TBS＋0.2 %tween20+5% albumin）し、4℃、12 時間で反応させた。２次抗体として金コロイド標識ロバ抗マウス IgG 抗体（Donkey anti-mouse IgG antibody gold conjugate： φ18nm、Jackson、USA）を 1/10 希釈したものを用いた。2% グルタルアルデヒドで固定した後、2% 酢酸ウランにて染色を行い、透過型電子顕微鏡（H800、日立ハイテクノロージーズ、東京）にて加速電圧 200kV で観察した [22]（図 9）。さらに、若年者と高齢者それぞれ３人（各１歯）の試料を観察し、各試料の歯髄側の象牙細管を４箇所、エナメル質側の象牙細管を４箇所、それぞれを無作為に選び、細管周囲の４つの等面積エリアで金コロイド粒子数をカウントした（図 10、11）。

4.　蛍光強度ならびに蛍光寿命測定

架橋型 AGEs であるペントシジンは蛍光分子なので、蛍光強度測定ならびに蛍光寿命測定によるペントシジンの検出を行った。蛍光は、入射光によって励起された蛍光分子のエネルギーが基底状態に戻る際に放出される光であり、　励起、分子内緩和、発光というプロセスに沿って発生する。励起、分子内緩和はピコ秒単位の時間で終了し、発光過程はナノ秒～数 10 ナノ秒程度かかるので、励起から発光過程のトータルの時間は、ほぼ発光過程に要する時間である（図 12a）。

時刻　$t = 0$で励起状態である蛍光分子が、単位体積中にN_0個あるとすると、発光遷移及び無輻射遷移（格子振動などで近接した周囲へエネルギーを与えて減衰し、光子を発しない遷移過程）の速さを表す速度定数をそれぞれk_f、 k_{nr},（f:fluorescence, nr: nonradiative）とすると、時刻 tにおいて励起状態である単位面積当たりの分子数を$N(t)$個としたとき、微小時間Δtの間に減少する励起分子数は一次減衰であるので以下の式で表される.

発光遷移由来の励起分子減少数　　：$-\Delta N_f = k_f N(t)\,\Delta t$

無輻射遷移由来の励起分子減少数　：$-\Delta N_{nr} = k_{nr} N(t)\,\Delta t$

単位面積当たりの励起分子の総減少数はこれらの和で表される。

$$-\Delta N = (k_f + k_{nr})N(t)\,\Delta t$$

微分方程式を解くと以下のようになる。

$$N(t) = N_0 e^{-(k_f + k_{nr})t}$$

ここで定数　$\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}}$　とすると、

$t = \tau$の時点で励起状態にある分子数は$t = 0$の時の$1/e$となる。

$N(\tau) = \frac{1}{e} N_0$　　この定数τを蛍光寿命と定義する。

蛍光強度の時間変化$F(t)$は時刻 t に放射する蛍光光子数に比例するので以下のように表せる。

$$F(t) = -\frac{\Delta N}{\Delta t}$$

$$= k_f N(t)$$

$$= k_f N_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

蛍光強度は、励起分子数の減少と同様に指数関数的に時間減衰することが分かる。

蛍光寿命　τ　はk_f、k_{nr}のみで定まる蛍光物質特有の値であり、蛍光物質の量や入射光の強度には依存しない。そのため定常状態を測定する蛍光強度測定とは違って被検体の表面性状や、夾雑物の影響が少ない。

蛍光強度が初期強度の 1/e の強度になるまでの時間を測定し、これを蛍光寿命とするのであるが、入射時からナノ秒時間単位で減少していく光の強度を時間を追って受光部で正確に計測することは困難である。そこで時間相関単一光子計数法（Time Correlated Single Photon Counting:以下 TCSPC）を用いて蛍光寿命を測定した。この方法は蛍光の発光現象を光子一つの単位でとらえ、繰り返し測定した後に、数学的に重ね合わせることで放射光子全体のマクロな蛍光強度減衰曲線を得るものである。具体的には蛍光物質を入射光パルスで極短時間で励起する。１回の入射パルスで放出される光子の数が高々１個になるように入射パルスの強度をコントロールし、光パルスの入射から光子が放出されるまでの時間を測定する。パルスを繰り返して、入射から光子が放出されるまでの時間を横軸、光子数を縦軸にしたヒストグラムを作成し、蛍光減衰曲線を得る計測法である[38]（図 12b）。

象牙質コラーゲンの蛍光寿命測定に先立ち、Type I コラーゲンゲルを糖化した際に生成する AGEs の量と蛍光強度、蛍光寿命の相関を調べた。

１）　Type I コラーゲンゲルの糖化と蛍光スペクトル[39]

ブタ腱由来ペプシン可溶化 Type I コラーゲン、3mg/ml （Cellmatrix Type I-P、新田ゼラチン、大阪）に 10×リン酸緩衝生理食塩水（以下 PBS）を 9（コ

ラーゲン溶液）：1（10×PBS）で混合し、200μl ずつ 12 穴のプレートに分注し、37℃30 分でゲル化させた。コラーゲンゲルに 0.1M リボース溶液（カコジレート緩衝液 pH7.4 に溶解）を 1ml 重層し、0～6 週、1 週間間隔で試料を作製した。0，1，2，6 週の試料をピックアップし、測定を行った。試料をそのままブラックライト（中心波長 365 nm）で励起し、蛍光をデジタルカメラで蛍光強度の変化を記録した（図 13）。150μg のコラーゲンゲルを超音波破砕機（VP-050、TAITEC、東京）で粉砕し、さらに 1 ml PBS/0.1%SDS にて可溶化した後、PBS に対して透析を行い、未反応のリボースや SDS を除去した。この試料を蛍光測定用の石英キュベットに入れ、蛍光強度測定は分光蛍光光度計（RF-5300、Shimadzu、京都）を用いゲルの散乱光の影響を避けるため,ペントシジンの最大吸収波長の 325nm より長波長の励起波長 350nm で測定した（図 14a）。蛍光寿命測定には、大阪大学基礎工学部生体計測学講座（荒木研究室）で開発された生体試料用の時間相関単一光子計測（TCSPC）蛍光寿命測定装置を用いた。蛍光強度測定と同様、試料の散乱光を抑制するため励起波長は 375nm に設定した。この設定波長では、励起光と蛍光の波長が近接するため、励起光に 405nm カットオフフィルターを挿入した。また、試料は 5 MHz の間隔で励起を繰り返し、データの取り込みを行った（図 14b）。

ウェスタンブロットの試料はリボース添加後の 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 週の試料を

用いた。ゲルを約 20μg 回収し、先端をつぶしたピペットチップで粉砕し、等量の SDS-PAGE サンプルバッファーを加え SDS-PAGE を行い、引き続きウェスタンブロットによって AGEs の生成量を確認した(図 15a－c)。

２）　ヒトの歯の蛍光寿命測定と蛍光強度測定[39)]

蛍光顕微鏡と TCSPC 装置を組み合わせて蛍光寿命のイメージング測定と蛍光強度測定を行った。蛍光寿命イメージング測定には、歯を低速ダイヤモンドソーで垂直方向に 1 mm 厚でスライスした未脱灰試料を用い、表面をスキャンしデータを取得した。蛍光顕微鏡による高倍率の蛍光強度、蛍光寿命測定には、免疫組織染色と同様に、脱灰準超薄切片を用いた。

5. 象牙質中のペントシジンの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分離、同定

一定体積の象牙質試料を採取するため、1mm 厚にスライスした脱灰試料を皮細工用の直径 1 mm のパンチ（ストロングツール差替式パンチセット、ミツトモ製作所、兵庫）で打ち抜き、象牙質試料とした。試料を硬質ガラス試験管に移し、一つの試料に対し 6 N－HCl、100μl を加え、試験管を減圧下封管し 110℃、27 時間でアミノ酸レベルにまで加水分解を行った。試料を減圧乾燥した後、0.1% TFA (trifluoroacetic acid) を含む水 60μl に再溶解させ、孔径 0.22μm

のフィルターでろ過し、HPLC 分析の試料とした。HPLC は（Gulliver 2 ポンプシステム、日本分光、東京）、ディテクターは紫外・可視検出器（日立 L－4250、日立ハイテクサイエンス、東京）を用い、記録にはインテグレーター（807-IT、日本分光、東京）を用いた。カラムは C18 逆相カラム（COSMOSIL　C18、φ 2mm－長さ 150mm、ナカライテスク、京都)を用い、分離用の溶液として初期溶液 A:2% アセトニトリル－水、0.1% TFA、分離用溶液 B : 99.9% アセトニトリル、0.1% TFA で流速 0.2ml/min 、１回の試料ロード量を 20μl とし、カラムに結合しない夾雑物を除くため試料ロード後 10 分間は A 溶液のみ流した。その後 B 溶液の 1%/min の直線グラディエントで溶出を行った。溶出試料に対し、ペントシジンの吸収極大である 325nm の吸光を記録した（図 18)。

標準試料として合成ペントシジン（pentosidine 純度：≧ 98%、CaymanChemical、USA）用い、HPLC での保持時間を測定した。蛍光寿命測定に用いた糖化ブタ腱 Type I コラーゲンゲル、高齢者の脱灰象牙質、および若年者の脱灰象牙質の酸加水分解物をそれぞれ HPLC にて分析を行った。また高齢者の試料において、標準試料と同じ保持時間で溶出してくるピークを集め、蛍光スペクトル分析（図 19a）と蛍光寿命測定を行った（図 19b)。酸加水分解時にアーティファクトとしてペントシジンが生成し増加することがないかを確認するため、ペントシジン生成阻害剤[40)-42)]であるアミノグアニジン添加（アミノ

グアニジン最終濃度 100mM)、非添加での酸加水分解の比較を行った (図 20)。

結果

１． 象牙質からのコラーゲンの抽出および抗 AGEs 抗体によるウェスタンブロット

象牙質コラーゲンの抽出はペプシンと 3N-HCl による加水分解で行った。ペプシン抽出では若年者、高齢者とも象牙質を完全に分解することは困難で、残渣が確認された。銀染色で抽出タンパク質量を確認したところ、若年者の方が高齢者より抽出効率が良好であった。3N-HCl 抽出では、脱灰象牙質は、残渣なく全て可溶化しており、抽出効率において若年者と高齢者の差はなかった。

抗コラーゲン抗体、抗 CML 抗体を用いたウェスタンブロットおいて、抗コラーゲン抗体はペプシン抽出物とは結合したが、3N-HCl 抽出物には結合しなかった。一方、抗 CML 抗体は、ペプシン抽出物に結合せず、３N-HCl 抽出物には結合した。また、抗 CML 抗体の結合量は高齢者の方が若年者に比べて多かった（図 5）。3N-HCl 抽出物では、抗 CML 抗体、抗ペントシジン抗体 ともに高齢者の方に多く結合した。抗 CML 抗体の結合状態は TMB 染色でも確認できる量であったが(図 7b)、抗ペントシジン抗体の結合量は抗 CML 抗体より微量であったため、TMB 染色では検出困難で、ECL 発光、検出システムが必要であった（図 7c）。

２．抗 AGEs 抗体による象牙質の免疫組織染色

高齢者、若年者ともに歯髄側の象牙細管周囲の基質部位に抗 CML 抗体で強い DAB 発色を認めた。しかしながら、その発色のパターンは高齢者では歯髄から歯冠表面に向かって徐々に薄くなっていく分布であったのに対し、若年者では歯髄から歯冠へ 0.5mm 進んだ付近で急激に発色が減少し、エナメル質側では、ほとんど発色が認められなかった（図 8）。

３．抗 AGEs 抗体による免疫電子顕微鏡解析

エナメル質側、歯髄側ともに高齢者の方が、抗原に結合した金コロイド粒子数が多く認められた。高齢者では若年者に比較して歯髄側で約３倍、エナメル質側で約２倍であった。高齢者において、歯髄側でエナメル質側の約 1.5 倍の金コロイド粒子数を認めたが、若年者では、歯髄側、エナメル質側における金コロイド粒子数の差は認められなかった（図 9、11）。

４．蛍光強度ならびに蛍光寿命測定

１）　Type I コラーゲンゲルの糖化と蛍光スペクトル

TypeI コラーゲンゲルの蛍光強度は、365nm のブラックライトによる励起下ではリボースとの浸漬時間が長いほど強くなった（図 13）。また蛍光強度スペク

トルでも、リボースとの浸漬時間が長いほど強度が強くなり（図 14a)、蛍光寿命も短縮していた（図 14b)。同様にウェスタンブロットでも４週間までは抗 CML 抗体、抗ペントシジン抗体ともにリボースの浸漬時間が長いほど AGEs 化されたコラーゲンの量が増加していた。本研究では、リボース浸漬時間４週間で糖化反応が飽和した（図 15b,c)。

２）　ヒトの歯の蛍光寿命測定と蛍光強度測定

蛍光寿命のイメージングでは高齢者は若年者に比べて歯根付近に蛍光寿命の短縮がみられた（図 16)。拡大率をあげた顕微鏡像で、蛍光強度は、高齢者、若年者ともに管間象牙質で大きく、若年者と高齢者の蛍光強度を比較すると、若年者の方が大きかった。蛍光寿命の短縮は主に象牙細管周囲に観測され、高齢者の蛍光寿命の方が若年者に比べてより短縮していた。また高齢者では象牙細管を中心に若年者よりも広いエリアに蛍光寿命の短縮が観測された（図 17)。

５．象牙質中のペントシジンの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分離、同定

各試料とも、標準の合成ペントシジンとほぼ同一の保持時間 20 分付近に溶出ピークを認めた。また高齢者試料のクロマトグラムのピークは、若年者よりも

大きなピークであった(図 18)。溶出ピークの蛍光スペクトルを計測したところ、標準の合成品サンプルと、同一形状の蛍光スペクトルを得た（図 19b)。また蛍光寿命もほぼ一致した（図 19b)。ペントシジン生成の阻害剤であるアミノグアニジンの添加および非添加において、酸加水分解物のクロマトグラムに差は認められなかった（図 20)。

考察

象牙質では他の組織に比べ、コラーゲンが密に存在し架橋も多いため[43]、脱灰した後でも抽出が困難である。本研究ではペプシンと 3N-HCl を用いたコラーゲン抽出法を比較した。ペプシンを用いたコラーゲン抽出法は、組織中のコラーゲンの 3 本鎖構造の末端領域で構造が比較的ルーズな部分を分解し、コラーゲンを長さの揃ったアテロコラーゲンとして抽出する穏和な抽出方法である[24]−[26]。そのため象牙質では若年者、高齢者ともに完全に溶解、抽出することは困難であった。特に高齢者においては、加齢により増加する生理的架橋と[22]、AGEs 架橋の増加によってペプシンによる抽出に抵抗性に示した可能性がある。一方 3N-HCl 抽出は高齢者、若年者とも残渣なく抽出することができた。

ペプシン抽出物にコラーゲン抗体が結合し、3N-HCl 抽出物には結合しなかった。本研究で使用した抗コラーゲン抗体は、コラーゲンの３本鎖構造を認識する。SDS－PAGE では SDS によって個々のコラーゲン分子は変性されるが、コラーゲンの分子間架橋は維持される。各コラーゲン鎖は分離せず架橋で結合しているため、PVDF 膜に転写され SDS が除去されれば、膜上でコラーゲンの３本鎖構造が復活し本抗体によって認識される[44]。ペプシン抽出においてはコラーゲン分子間架橋は破壊されないため抗体が結合したが、3N-HCl 抽出においては生理的架橋が加水分解され[27][28]、コラーゲン分子が解離し３本鎖構造を回復する

ことができず、抗コラーゲン抗体の認識が困難になったと思われる。また、抗CML抗体による認識はHCl抽出物にしか認められなかった。これは、3N-HCl抽出物にはCML修飾されたコラーゲンが存在し、ペプシン抽出されたコラーゲンにはCMLがほとんど存在しないことを意味する。 AGEs修飾されたコラーゲンは何らかの構造変化によって、ペプシンによる分解、抽出に抵抗性を示した可能性がある。 象牙質コラーゲンの糖化修飾の解析には、象牙質試料を残渣なく完全に抽出でき、かつ抗AGEs抗体が認識される抽出物が得られたことから、以後、3N-HCl抽出法を採用することにした。

ウェスタンブロットでは、さらに抗ペントシジン抗体によってペントシジン修飾されたコラーゲンが検出された。CML, ペントシジンともに、高齢者の方が多く検出されたことから、歯が完成した後でも加齢により象牙質コラーゲンのAGEsの蓄積量が増えていることがわかった。

付加型のAGEsであるCMLは塩基性のアミノ酸残基がひとつあれば、容易に形成されるが、ペントシジンはLys, Argと２つの塩基性アミノ酸側鎖が糖化産物によってクロスリンクできる位置関係になくては反応しない。ペントシジンはコラーゲン分子１分子に高々数個と報告されており[45]、CMLとペントシジンの検出量の違いは、生成しやすさの差を反映していると考えられる。

免疫組織染色では、高齢者と若年者を比較すると高齢者の方がエナメル質側

に向かって広い範囲で染色されていた。また、免疫電子顕微鏡解析において、高齢者では若年者の２倍以上の数の金コロイド粒子が歯髄側、エナメル質側で観察された。これらのことから、加齢によって CML が蓄積していくものと考えられる。高齢者の試料の中で歯髄側、エナメル質側を比較すると、免疫組織染色では、歯髄側からエナメル質側に向かって徐々に染色が薄くなり、免疫電子顕微鏡解析では歯髄側の金コロイド粒子数がエナメル質側に比べて約 1.5 倍多かった。これら高齢者の実験結果から、歯髄側からエナメル質側へと糖が拡散し AGEs が蓄積されていると推測される。若年者において、歯髄側とエナメル質側を比較すると、免疫組織染色では歯髄側のみが濃く染色された。一方、免疫電子顕微鏡解析では、歯髄側、エナメル質側ともに金コロイド粒子数の差はほとんど認められず、少数しか観測されなかった。免疫電子顕微鏡解析が、象牙細管周辺の 2μm 四方の狭いエリアにおける高分解能な解析であるのに対し、免疫組織染色では、歯髄からエナメル象牙境まで含めた全体のエリアが DAB 染色されるため、局所的な AGEs 量だけではなく、歯髄側とエナメル質側の象牙細管密度の違い[46]が DAB の濃淡に影響を与えている可能性が考えられた。

本研究では象牙質コラーゲンの AGEs に蛍光寿命測定法を用いるにあたって、まず、Type I コラーゲンゲルを糖化し、蛍光強度の増加や蛍光寿命の短縮が、AGEs 修飾されたコラーゲンの量と相関があることを示した。コラーゲンの自

己蛍光の蛍光寿命と比較して、蛍光を発する AGEs の蛍光寿命は短いため、AGEs が増加すると全体の蛍光寿命が短縮すると考えられる。

象牙質のイメージング測定では高齢者の歯根部に著明な蛍光寿命の短縮がみられた（図 16）。このことから、歯根部から歯冠側へ供給された糖によって AGEs が蓄積されていると考えられる。顕微鏡像では象牙細管周辺に蛍光寿命短縮が高齢者で著明に認められ、象牙細管を移動した糖によって AGEs が蓄積していると思われる（図 17）。顕微鏡での蛍光強度測定では若年者の象牙質の方が高齢者より強く観測されたが、これは蛍光物質の量としては大量にある象牙質コラーゲンの自己蛍光が計測され、ペントシジンなどの AGEs の蛍光強度をマスクしてしまったためと考えられる。予備実験として行った Type I コラーゲンゲルでは不純物が少ないので蛍光強度が直接 AGEs の量の指標となり得たが、様々な夾雑物がある実際の生体試料では強度測定では誤差が大きく、生体内に微量に存在する蛍光物質をターゲットとすることはできない。これに対し蛍光寿命測定は、蛍光物質によって定まる固有の蛍光減衰時間を測定するため、蛍光強度測定とは違ってその存在が微量であっても、表面性状や共存する蛍光物質による影響はほとんど受けない。とくに本研究で用いた時間相関単一光子計数法（TCSPC 法）は、弱い励起光強度で繰り返し測定することから、試料へのダメージが少なく感度が高いといったメリットがあり、損傷を受けやすい生体試料

に適した方法であるといえる。

現在、組織中や血中、尿中の AGEs の量が種々の疾患の病態と相関していると考えられている。とくに骨粗鬆症の骨折リスクや関節リウマチの重症度と相関があることが報告されており[20)47)]、生体内の AGEs を迅速かつ簡便に定量できることが望まれている。ペントシジンは架橋型 AGEs のひとつではあるが、生体内では比較的多く生成され、蛍光性を持つため検出の選択性や感度が優れており、現在、総 AGEs 量を反映するサロゲートマーカーとしての利用が進んでいる[48) 49)]。非侵襲的な総 AGEs の診断装置として、皮膚の AGEs の量を蛍光強度で測定する装置が実用化されている[50)51)]が、皮膚の色などによっても値に違いが生じやすく測定誤差も大きいと言われている。本研究で用いた蛍光寿命測定法はこうした表面性状や共存する物質には左右されない絶対量を指標としているため、蛍光強度のみを指標としている既存の測定方法の弱点を補えるものと考えられる。また、蛍光強度においては一定量のサンプルが必要となるのに対して、本研究で用いた TCSPC 法はごく微量なサンプルの分析が可能となる蛍光寿命測定法である。

近年、血漿や尿中のペントシジンの量を計測する方法が実用化され、抗ペントシジン抗体を用いた ELISA や HPLC 分離による定量検査が行われている[52)]。

ところが、ELISA 法と HPLC 法は加熱処理時の pH に違いによって、ELISA

法ではアーティファクトとしてペントシジンが生成してしまうことが指摘されている[53]。　中野らは、ELISA 法では、内在性のプロテアーゼを失活させる過程で、試料を中性領域（pH7.4）で 100℃15 分間加熱処理するためペントシジンがアーティファクトとして生成しやすく、一方 HPLC 法の試料では、6N－HCl、酸性条件下で 110℃加熱処理するので、アーティファクトは生じないと報告している[53]。本研究において、アーティファクト産生の有無を検証するため、象牙質コラーゲンを酸加水分解する際に AGEs 化阻害剤[40)-42)]であるアミノグアニジンを共存、非共存下の加熱分解処理を行い比較した。その結果、ペントシジンのクロマトグラムに差がないことが確認できた（図 20）。これらのことから、6N-HCl 完全分解と HPLC による AGEs の定量法は、象牙質内の AGEs の分布、糖尿病の象牙質への影響、齲蝕変性の様相の解明などに応用が可能であると考えられる。

象牙質内の AGEs は加齢とともに増加していたが、骨においても加齢に伴って AGEs、特にペントシジンが増加しており、骨折リスクと正の相関があることが報告されている[48]。骨はリモデリングにより代謝しているが、糖尿病の糖化ストレス、その他生活習慣病による酸化ストレスが高い状態では、ペントシジンの蓄積が加速することが知られている[54]。象牙質はリモデリングがないため糖化よる影響はより深刻であり、象牙質糖化による歯の脆性増加は歯の破折リス

クの上昇につながることが示唆されている[21]。また、齲蝕によって露出した象牙質では細管内液の透過性が亢進し、摂取した食物由来の糖の影響を受けるようになるため急激に糖化反応が起こる、と Kleter らが報告している[55]。齲蝕象牙質における褐色化も糖化に関連した現象であり[55]、蛍光寿命測定法を用いることで、齲蝕罹患象牙質の検出も可能であると考えられる。

さらに、加齢に伴う齲蝕の進行速度低下に、コラーゲン分子間の AGEs 架橋の増加が影響している可能性がある。これまで象牙質の齲蝕抵抗性の議論は細管内の石灰化に関する研究が中心であり[56]、基質コラーゲンの加齢修飾の報告はほとんどない。本研究の結果は、高齢者に多いとされる慢性齲蝕病変の解明につながると考えられる。

一旦生体内でタンパク質が AGEs に修飾されてしまうと、現状では、修飾されたタンパク質が除去されない限り AGEs を取り除くことはできない。AGEs 修飾の初段階である糖との結合を阻害する物質として、食料に含まれるイリドイド中のカテキンや[57]，茶葉[58]、生薬[59]が報告されている。また豆科オウギの根より抽出された *astragaloside* 類に、CML、ペントシジンの生成を抑制する効果があることが報告されている[60]。

現在、様々な分野で AGEs に関連した研究が進められており、本研究で確立した AGEs の検出手法が、これらの研究に大きく寄与できると考えられる。と

くに象牙質においては、皮膚や骨などと異なり組織が一度作られると代謝されないという特徴を利用して、生体における AGEs の積算を評価することが可能となる。今後、糖尿病をはじめとする全身疾患患者の象牙質内の AGEs の種類や分布を知ることで、糖化反応が長期的に生体に与える影響を明らかにできるのではないかと考えている。

結論

１．象牙質では加齢とともに AGEs が蓄積することが明らかになった。

２．AGEs の分布状態から、歯髄を経て供給される糖によって管周象牙質が AGEs 修飾されると考えられる。

３．架橋型 AGEs のひとつであるペントシジンが、象牙質内に存在することを確認するとともに、分離回収することが可能となった。

４．AGEs と蛍光寿命短縮の相関が見いだされたことで、蛍光寿命測定が生体組織内の AGEs 検出のインジケーターになることが明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻 竹重文雄教授および三浦治郎博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、御協力御助言を賜りました大阪大学基礎工学研究科生体計測学研究室の荒木努教授に心より感謝申しあげます。さらに、本研究を行うにあたり多大なるご協力とご教示を戴いた大阪大学蛋白質研究所 北條裕信教授に深謝申し上げます。　実験方法の示唆や、多くの研究機器使用の機会を与えて下さいました、熊本大学医学研究科　玉置治彦博士、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門　上垣浩一博士、大阪大学歯学研究科口腔科学フロンティアセンター　吉良新太郎博士に深謝いたします。

最後に、本研究に種々の御配慮、御援助、御助言を頂いた口腔総合診療学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1) Maillard, L.C.（1912）：Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoïdines par voie méthodique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* , **154**, 66-68 .

2) Hodge, J. E. (1953)：Dehydrated Foods, Chemistry of BrowningReactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.,* **1**, 928-943.

3) Koenig, R. J. , Peterson, C.M. , Kilo,C. , Cerami, A., Williamson, J.R. (1976)：Hemoglobin AIc as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes* , **25**, 230-232.

4) Koenig, R. J., Peterson, C. M., Jones, R. L., Saudek, Lehrman,C., Cerami, M. A. (1976)：Correlation of glucose regulation and hemoglobin AIc in diabetes mellitus. *N . Engl. J .Med. ,* **295**, 417-420.

5) Nathan, D. *et al.* (2005) ： Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *N. Engl. J. Med.,* **353**, 2643-2653,.

6) Holman, R.R., Paul, S.K., Bethel. M. A. *et al.* (2008)：10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.,* **359**, 1577-1589.

7) Vlassara, H., Brownlee, M. and Cerami, A. (1981) : Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **78**, 5190-5192.

8) Williams, S. K. *et al.,* (1982) : Structural and Functional Consequences of Increased Tubulin Glycosylation in Diabetes Mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 6546-6550.

9) Gawdzik, J. , Mathew,L., Kim ,G. , Puri, T. S. and Hofmann, M. A. Bowman, (2011) : Vascular Remodeling and Arterial Calcification Are Directly Mediated by S100A12 (EN-RAGE) in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Nephrology,* **33**, 250-259. .

10) Inagaki, Y. *et al.* (2010) : High Glucose Levels Increase Osteopontin Production and Pathologic Calcification in Rat Dental Pulp Tissues. *Journal of Endodontics ,* **36** , 1014-1020.

11) Nakajima, Y., Inagaki, Y. , Hiroshima, Y. , Kido, J. and Nagata, T. (2013) : Advanced glycation end-products enhance calcification in cultured rat dental pulp cells. *J. Endod.,* **39**, 873-878.

12) Takeuchi, M. and Yamagishi, S. (2008) : Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* , **14**, 973-978.

13) Sasaki, N., Fukatsu, Tsuzuki, R. K. *et al.* (1998) : Advanced Glycation End Products in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *The American Journal of Pathology,* **153**, 1149–1155.

14) Smith, M. A., Taneda, S., Richey, P. L. *et al.* (1994) : Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5710-5714,.

15) Abe, R., Shimizu, T. *et al.* (2004) : Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE–AGE receptor interactions. *Journal of Investigative Dermatology*, **122**, 461-467.

16) Nagai, R., Mori, T., Yamamoto, Y. , Kaji,Y. and Yonei, Y. (2010) : Significance of Advanced Glycation End Products in Aging-Related Disease. *Anti-Aging Med.,* **7**, 112-119.

17) Okano, Y. *et al.* (2002) : Dysfunction of dermal fibroblasts induced by advanced glycation end-products (AGEs) and the contribution of a nonspecific interaction with cell membrane and AGEs. *Journal of Dermatological Science ,* **29** ,171 -180.

18) Saito, M. and Maumo,K. (2010) : Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteroporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.*, **21**, 195-214.

19) Singh,R., Barden, A., T. Mori, Beilin, L.(2001) : Advanced glycation end-products: a review." *Diabetologia,* **44**, 129-146.

20) Shiraki, M., Kuroda, T., Tanaka,S., Saito,M., Fukunaga,M. and Nakamura, T. (2008) : Nonenzymatic collagen cross-links induced by glycoxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *J. Bone Miner. Metab.,* **26**, 93-100.

21) Kubo, M., Miura, J., Sakata, T., Nishi, R. and Takeshige, F. (2013) : Structural modifications of dentinal microcracks with human aging. *Microscopy*, **62**, no. 6, 555-561.

22) Waiters, C. and Eyre, D. R. (1983) : Collagen crosslinks in human dentin: Increasing content of hydroxypyridinium residues with age. *Calcif. Tissue Int.* **35**, 401-405.

23) Miura, J., Nishikawa, K., Kubo, M., Fukushima, S., Hashimoto, M., Takeshige, F. and Araki, T. (2014) : Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Arch. Oral Biol.,* **59**, 119-124.

24) Tan, C. C., Karim, A. A., Latiff, A. A., Gan,C. Y. and Ghazali, F. C. (2013) : Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from the body wall of crown-of-thorns Starfish (*Acanthaster planci).* *Int. Food Res. J.,* **20**, 3013-3020.

25) Mocan, E., Tagadiuc, O. and Nacu, V. (2011) : Aspects of collagen isolation procedure. *Clin. Res. Stud.,* **320**, 8-10.

26) Munksgaard, E. C. and Moe, D. (1980) : TYPES OF COLLAGEN IN AN EXTRACT OF BOVINE TEETH. *Archs, oral Biol.,* **25**, 485-489.

27) Longin, R. (1971) : New method of collagen extraction for Radiocarbon Dating. *Nature,* **230**, 241-242.

28) Maspero, F., Sala,S., Fedi, M. E. , Martini, M. and Papagni, A. (2011) :

A new procedure for extraction of collagen from modern and archaeological bones for ^{14}C dating. *Anal. Bioanal. Chem.,* **401**, 2019-2023.

29) Sagar, A.J. and Pandit, M.W. (1983) : Denaturation studies on bovine pancreatic ribonuclease. Effect of trichloroacetic acid. *Biochim Biophys Acta.* **743**, 303-309.

30) Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

31) Oakley, B. R. , *et al.* (1980) : A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal,Biochem.,* **105**, 361-363.

32) Ignat'eva, N. Yu., Danilov, N. A. and Averkiev, S. V. (2007) : Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues. *Journal of Analytical Chemistry,* **62**, l51-157.

33) Kivirikko, K., Laitinen, I. O. and Prockop, D. J. (1967) : Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal Biochem,* **19**, 249-255,.

34) Reddy, G. K. and Enwemeka,C. S. (1996) : A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin. Biochem.,* **29**, 225-229.

35) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **76**, 4350-4354.

36) Lauriere, M. (1993) : A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE," *Anal. Biochem.,* **212**, 206-211.

37) Stephano,J. L., Gould, M. and Rojas-Galicia, L. (1986) : Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.,* **152**, 308-313.

38) Dysli,C., Quellec,G. M., Abegg, Menke, M. N., U. Wolf-Schnurrbusch, J.Kowal, J. Blatz, A. B. La Schiazza, O., Leichtle,, Wolf, S. and Zinkernagel, M. S. (2014) : Quantitative analysis of fluorescence lifetime measurements of the macula using the fluorescence lifetime imaging ophthalmoscope in healthy subjects. *Invest. Ophthalmol. Vis.*

Sci. , **55**, 2106-2113,

39) Fukushima, S., Shimizu, M., Miura, J., Matsuda, Y., Kubo, M., Hashimoto, M., Aoki, T., Takeshige, F. and Araki, T. (2015) : Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin. *Biomed. Opt. Express,* **6**, 1844-1856..

40) Brownlee, M., Vlassara, H. Kooney, Ulrich,A. P., and Cerami, A. (1986) : Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science,* **232**, 1629-1632.

41) Dyer, D. G., Blackledge, J. A., Thorpet, S. R. and Baynes, J. W. (1991) : Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose: Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J. Biol. Chem.,* **266**, 11654-11660.

42) Méndez,J. D., Xie,J. and García-Pérez, E. (2007) : Urea Inhibits the In vitro Formation of Fluorescent Advanced Glycation End Products. *World Appl. Sci. J.,* **2**, 90-98.

43) Fratzl, P. (2008) : Collagen: Structure and Mechanics. *Technology and Engineering*, Springer Science, Berlin.

44) Hazra, S., Xiong, S., Wang,J., Rippe, R. A., Chatterjee, V. K. K. and Tsukamoto, H.(2004) : Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Induces a Phenotypic Switch from Activated to Quiescent Hepatic Stellate Cells, *J. Biol. Chem.*, **279**, 11392–11401.

45) Beisswenger,P. J., Moore, L. L., Brinck-Johnsen, T. and Curphey, T. J. (1993) : Increased collagen-linked pentosidine levels and advanced glycosylation end products in early diabetic nephropathy. *J. Clin. Invest.,* **92**, 212-217.

46) Coutinho, E. T., d'Almeida, J.R.M. and Paciornik, S.(2007) : Evaluation of microstructural parameters of human dentin by digital image analysis,n *Mater. Res.,* **10**, 153–159.

47) Miyata, T., Ishiguro, N., Yasuda, Y., Ito, T., Nangaku, M., Iwata, H., Kurokawa, K. (1998) : Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers," *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **244**, 45-49.

48) Yamamoto, M., Yamaguchi, T., Yamauchi, M., Yano, S. and Sugimoto,T. (2008) : Serum pentosidine levels are positively associated

with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **93**, 1013-1019.

49) Tanaka,S., Kuroda,T., Saito, M. and Shiraki, M. (2011)：Urinary pentosidine improves risk classification using fracture risk assessment tools for postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.,* **26**, 2778-2784.

50) Koetsier, M., Lutgers, H. L., Smit, A. J. *et al.* (2009)：Skin autofluorescence for the risk assessment of chronic complications in diabetes: a broad excitation range is sufficient," *Opt Express*, **17**, 509-519.

51) Nomoto,K., Yagi,M. and Hamada, U. (2013)：dentification of advanced glycation endproducts derived fluorescence spectrum in vitro and human skin. *Anti-Aging Med.,* **10**, 92-100.

52) 木田吉城， 斎藤充， 曽雌茂， 丸毛啓史 (2010)：非侵襲的骨質 （材質）評価法の確立 皮膚AGEsリーダー・血/尿 中ペントシジンおよび腎機能を指標として，" *Osteoporo Jpn,* **18**, 639-642.

53) Nakano,M., Kubota, M., Owada, S., Nagai, R. (2013)：The pentosidine concentration in human blood specimens is affected by heating. *Amino Acids,* **44**, 1451-1456.

54) Tsukahara, H., Sekine,K., Uchiyama, M., Kawakami, H. Hata,I., Todoroki,Y., Hiraoka, Kaji, M., M., Yorifuji, T., Momoi,T. ,Yoshihara, Beppu,K. M. and Mayumi, M. (2003) : Formation of advanced glycosylation end products and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr. Res.*, **54**, 419-424.

55) Kleter, G. A., Damen, J. J., Buijs, M. M. J. and Ten Cate, J. M. (1998) : Modification of Amino Acid Residues in Carious Dentin Matrix. *J. Dent. Res.,* **77,** 488-495.

56) Tagami, J., Hosoda, H., Burrow M. F. and Nakajima, M. (1992) : :Effect of aging and caries on dentin permeability. *Proc Finn Dent Soc.*, **88**, 149- 154.

57) West, B. J.. Uwaya, A., Isami, F., Deng, S., Nakajima, S. and Jensen, C. J. "Antiglycation Activity of Iridoids and Their Food Sources (2014) : *International Journal of Food Science,* **2014**, 1-8.

58) Kinae, N., Yamashita, M., (1990) : Inhibitory effects of tea extracts of the formation of advanced glyction Products. *The Maillard reaction in food processing human nutrition and physiology* (Point PA ed), Birkhauser, Basel, Boston, Berlin, 221-226.

59) Yokozawa, T., Nakagawa, T. and Terasawa, K. (2001) : Effect of oriental medicines on production of advanced glycation end products. *Journal of Traditional Medicines* , **18**, 107-112.

60) Motomura, K., Fujiwara, Y. , Kiyota, N., Tsurushima, K., Takeya,M., Nohara, T., Nagai, R. and Ikeda, T.(2009) : Astragalosides isolated from the root of astragalus radix inhibit the formation of advanced glycation end products. *J Agric Food Chem.*, **57**, 7666-7672.

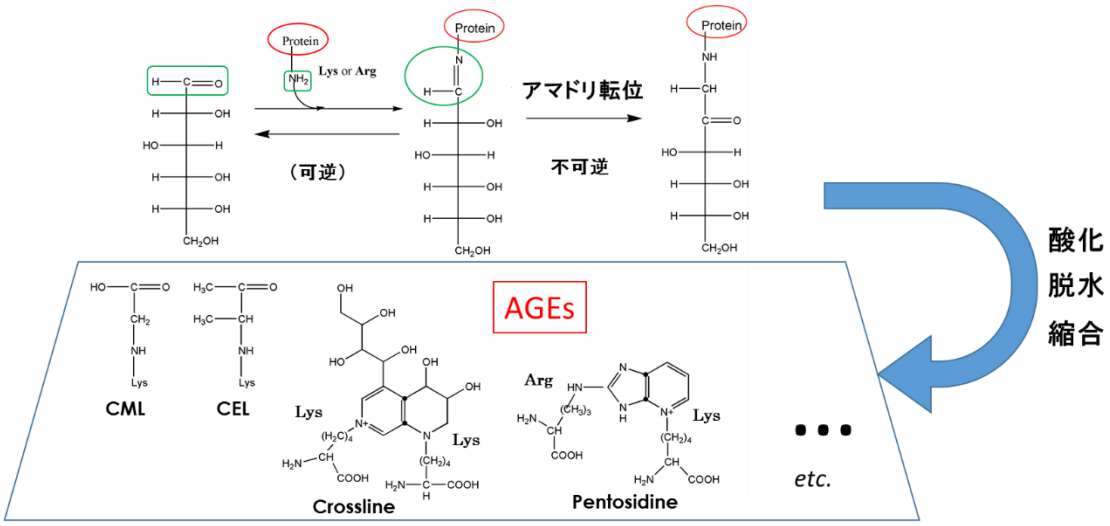


図１　糖化最終産物（AGEs）の生成経路

還元糖のアルデヒド基に蛋白質のアミノ基が結合し、シッフ塩基を形成する。
シッフ塩基からアマドリ転位によって不可逆な糖化修飾物が作られ、酸化、脱水、縮合の反応を経て糖化最終産物（AGEs）が生成される。

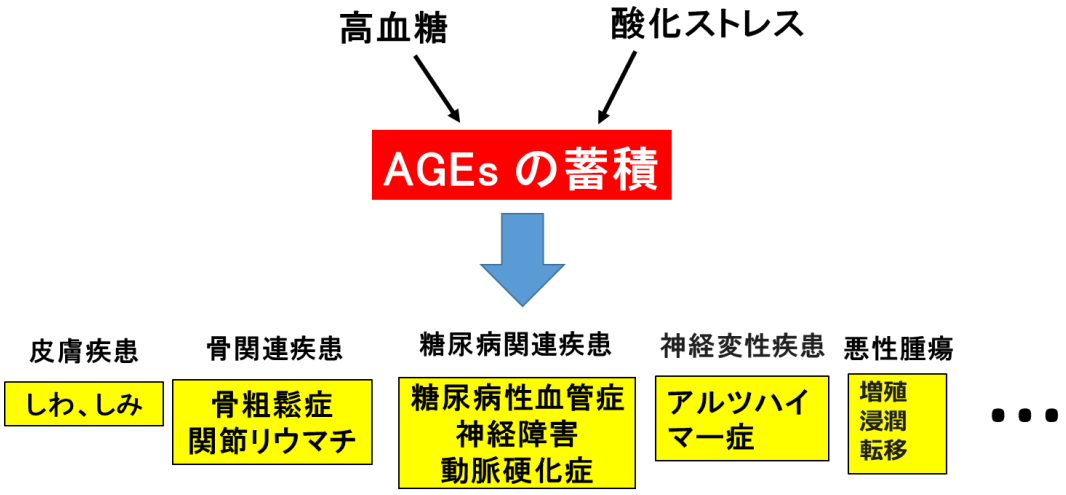


図２　AGEs と様々な疾患

皮膚疾患を初めとした、様々な疾患に AGEs の蓄積が関連していると考えられている。

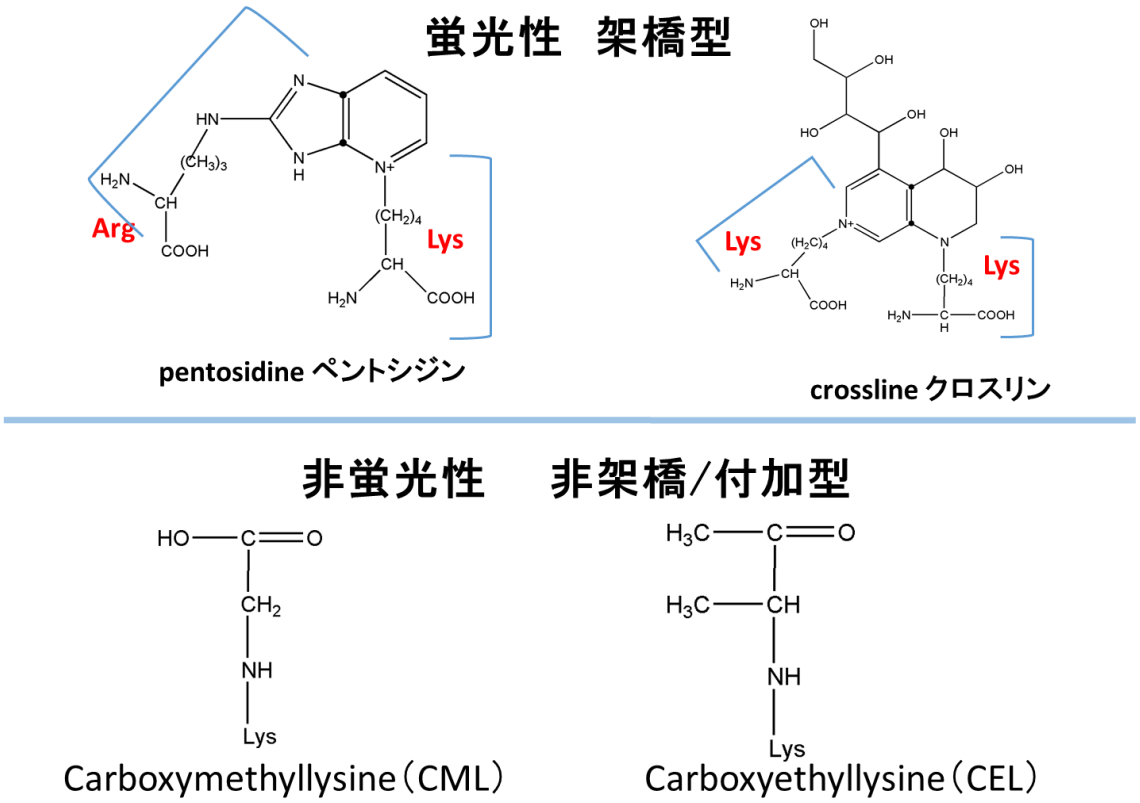


図３　架橋型（上段）AGEs と付加型（下段）AGEs の構造

AGEs には２つのアミノ酸側鎖間を架橋する架橋型 AGEs と、１つのアミノ酸側鎖のみに付加する付加型 AGEs がある。架橋型 AGEs には芳香環を持つ物があり、これらは蛍光性を持つ。

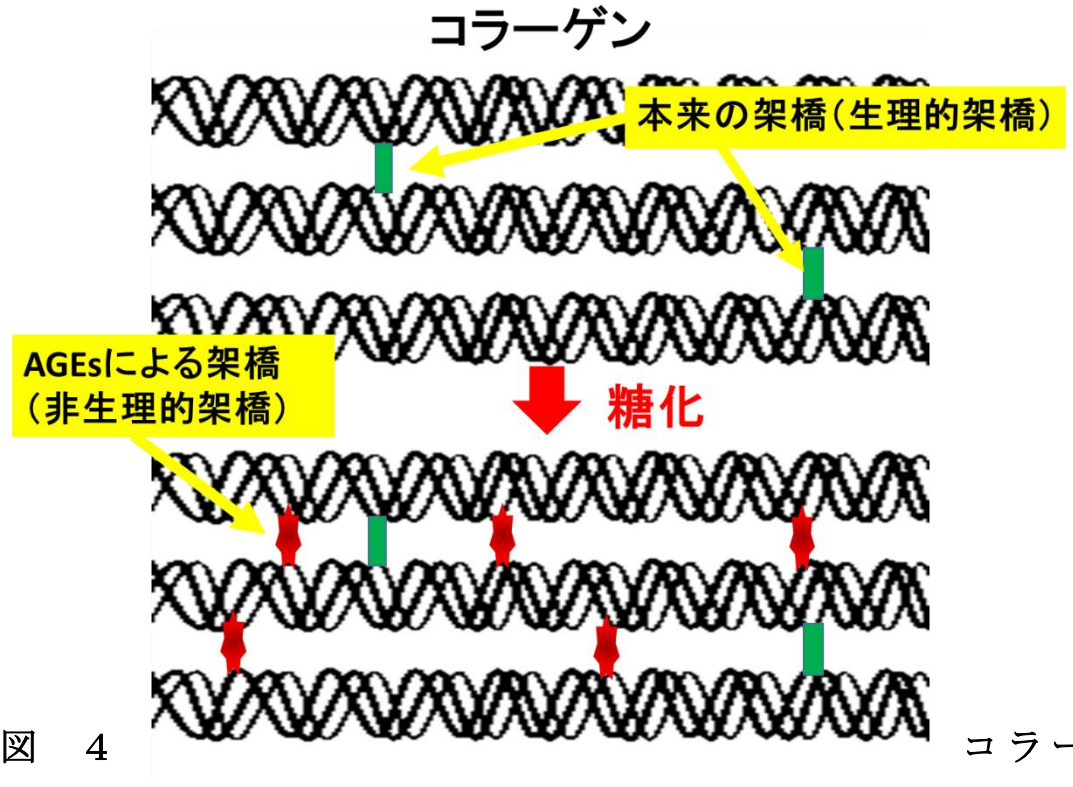


図　4　コラーゲンの非生理架橋による質の低下

糖化によって生成した AGEs 架橋は、生理的架橋と異なり不可逆に架橋し、コラーゲンの柔軟性を損ない硬くもろいものに変化させるとともに、コラーゲンの代謝を阻害する。

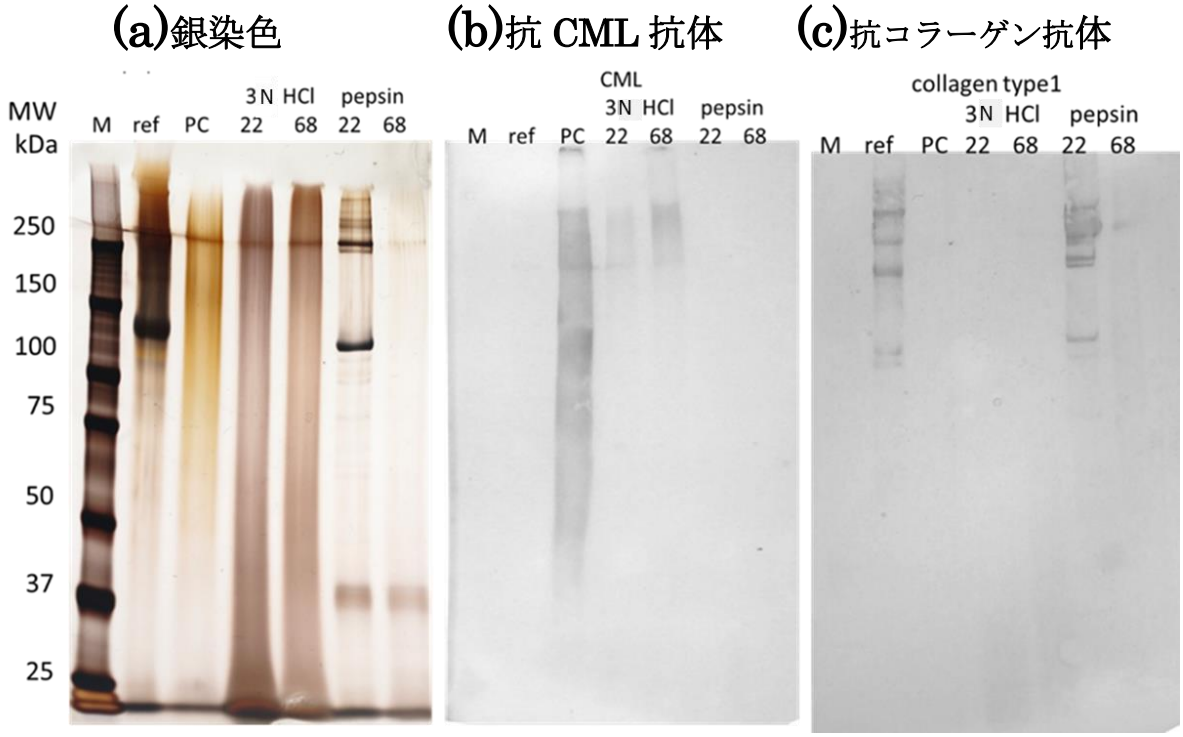


図５　象牙質化コラーゲンの抽出方法の検討

M：分子量マーカー　ref：Calf sikin コラーゲン

PC：リボース糖化 Calf skin コラーゲン

22：22 歳

68: 68 歳

3N-HCl：塩酸抽出

pepsin：ペプシン抽出

（a）　銀染色　（抽出物全体の検出）

(b) 抗 CML 抗体によるウェスタンブロット

(c) 抗 type I コラーゲン抗体によるウェスタンブロット

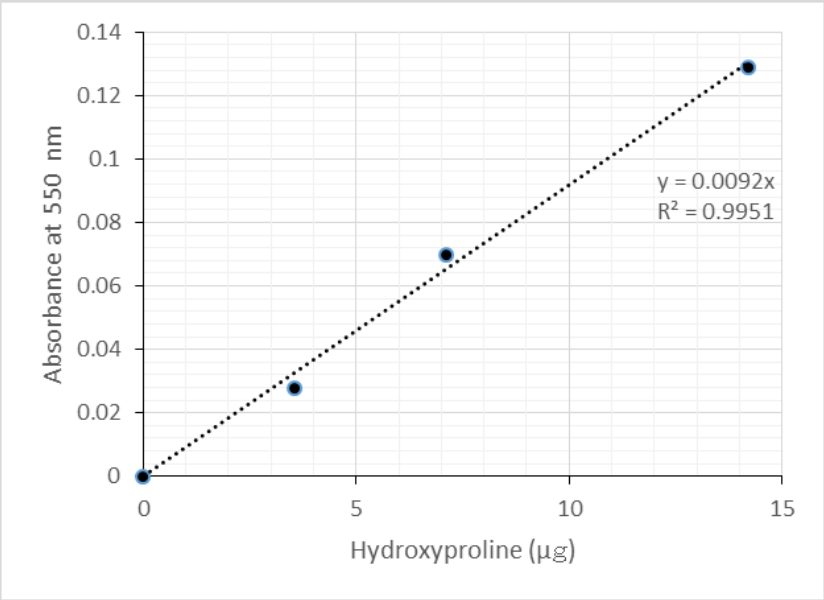


図６　ヒドロキシプロリンの定量：検量線

コラーゲン定量に用いる試薬は不安定なため、試料の定量時ごとに
標準のヒドロキシプロリンの検量線を作成した。検量線の一例を示した。

(a) 銀染色　　(b) 抗 CML 抗体　　(c) 抗ペントシジン抗体

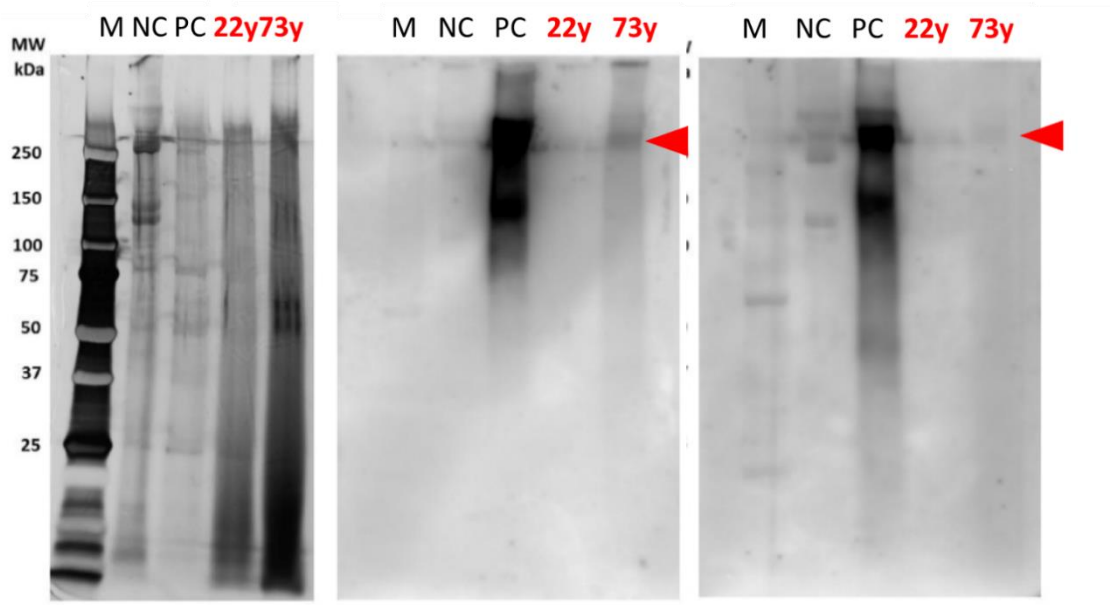


図 7　抗 AGEs 抗体によるウェスタンブロット

M: 分子量マーカー　NC: Calf skin コラーゲン

PC: リボース糖化の Calf skin コラーゲン

22y: 22 歳、　73y: 73 歳

(a) 銀染色（総抽出蛋白質の検出）

(b) 抗 CML 抗体によるウェスタンブロット

(c) 抗ペントシジン抗体によるウェスタンブロット

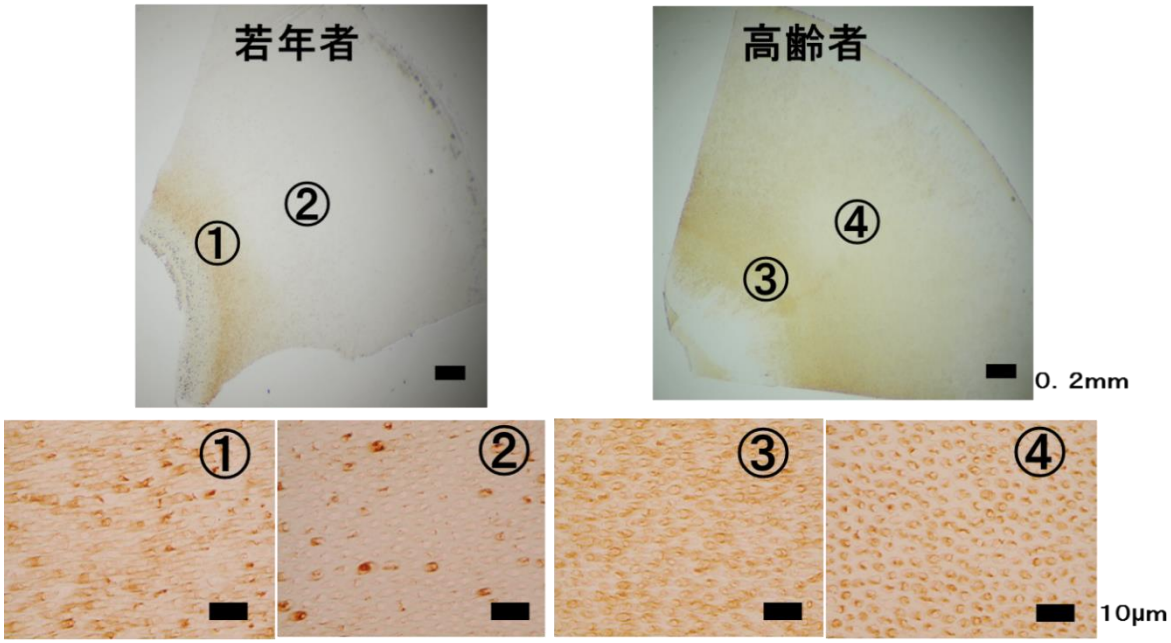


図８　抗 AGEs (CML) 抗体による免疫組織染色

スケールバー　上段：0.2mm　下段：10μm

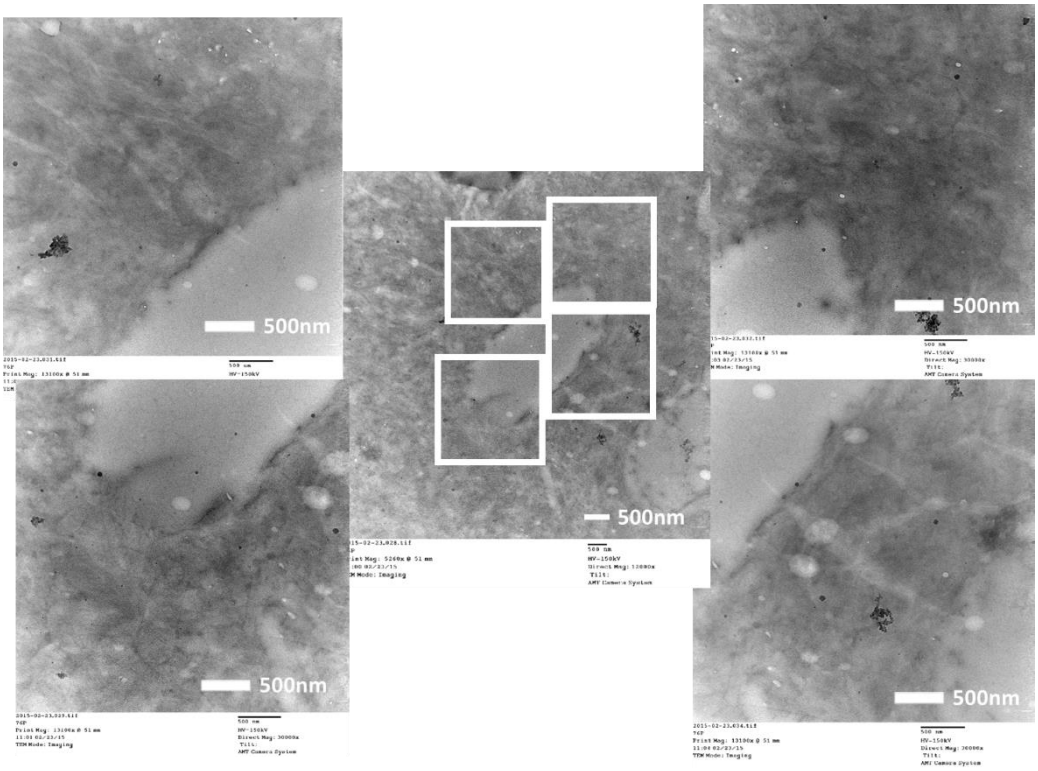


図９　抗 AGEs (CML)抗体による免疫電子顕微鏡解析

高齢者７６歳の歯髄側の象牙細管周辺

同一面積４エリアで金コロイド粒子をカウントした。

スケールバー：500 nm

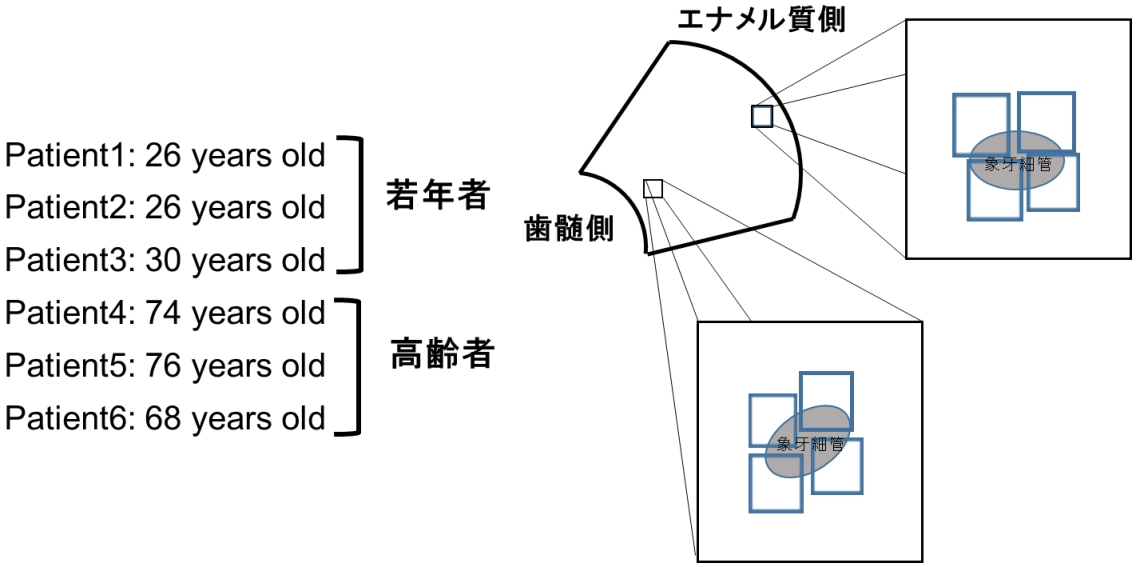


図１０　免疫電子顕微鏡解析における金コロイド粒子の

カウント方法

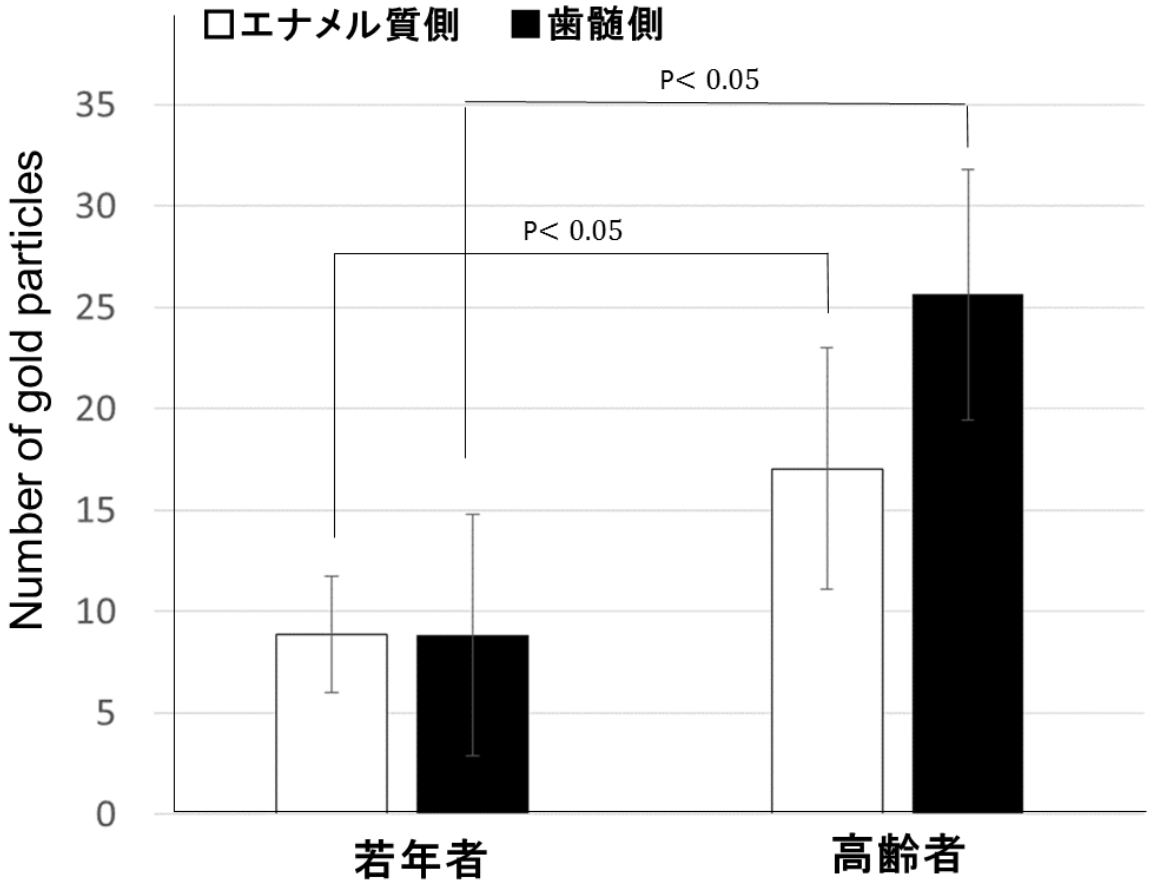


図１１　免疫電子顕微鏡解析　金コロイド粒子のカウント結果

若年者３名、高齢者３名　歯髄側、エナメル質側それぞれ４つの象牙細管をピックアップ。
４エリアずつカウントし平均をとった。

若年者…歯髄側　N=３、エナメル質側　N=３
高齢者…歯髄側　N=３，エナメル質側　N=３
ｔ検定により歯髄側、エナメル質側それぞれにおいて、有意差をもって若年者より高齢者の方が金コロイド粒子が多いことを認めた。

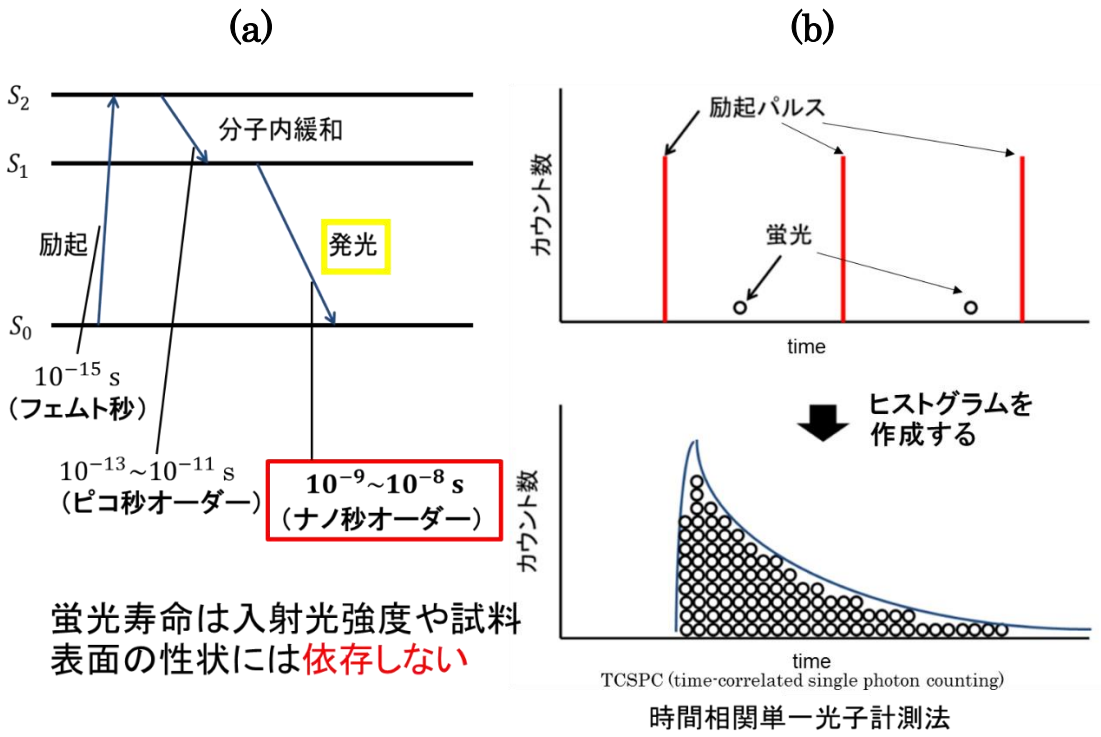


図１２　(a) 蛍光発光のエネルギー準位と時間オーダー

蛍光の発光時間は他の段階より 100 倍以上長いので蛍光寿命とほぼ同一とみなせる。

(b) 蛍光寿命の計測，時間相関単一光子計測法（TCSPC）

弱い強度のレーザーパルスで励起し発生する光子の発生時間を記録し、励起からの時間と光子数のヒストグラムを作成し、蛍光寿命の減衰曲線を得る。

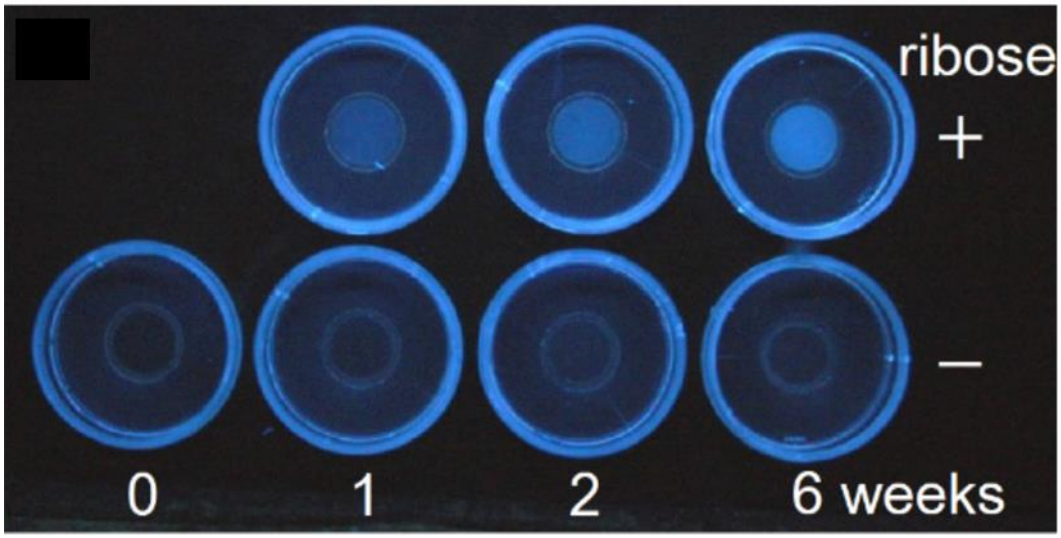


図１３　Type I コラーゲンゲルの糖化と蛍光強度

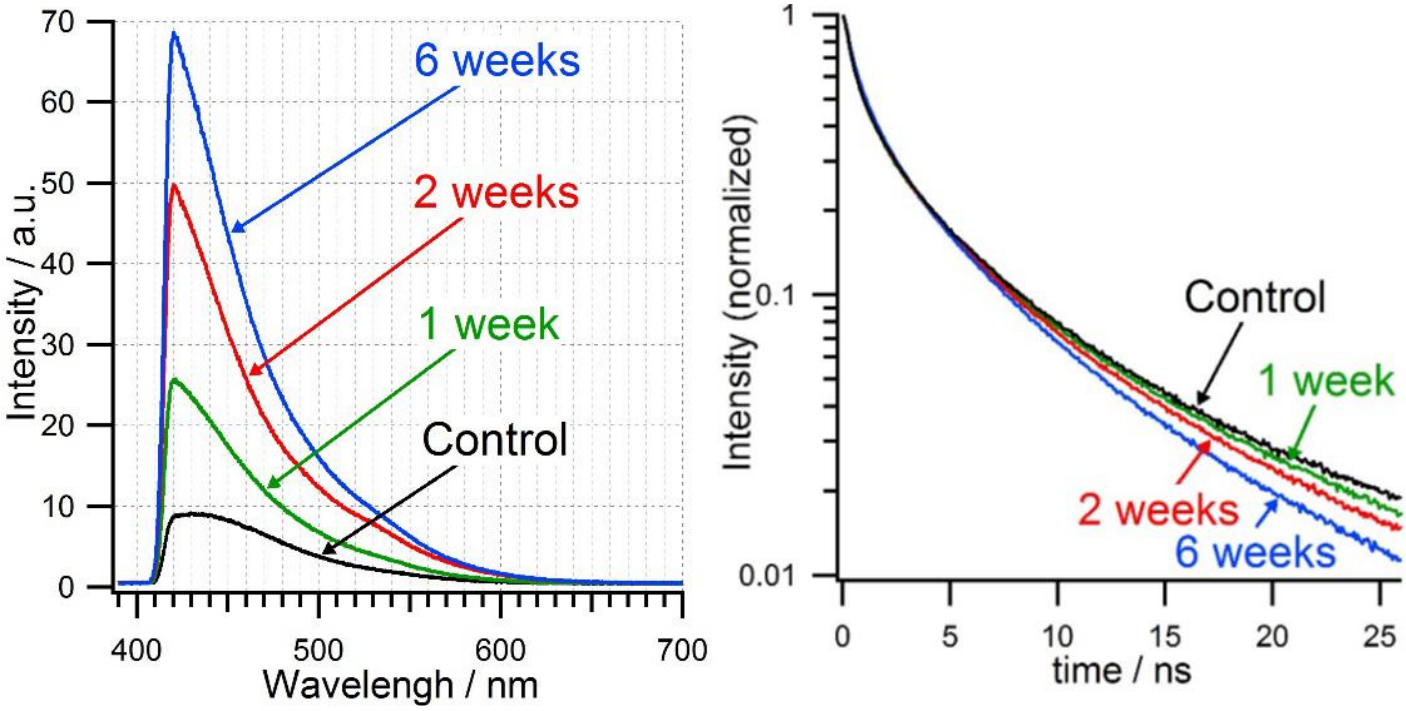
365 nm 紫外線ランプによる励起

上段：リボース添加あり

下段：リボース添加なし

リボース添加により、インキュベート期間が長いほどコラーゲンの蛍光強度の増加が認めらる。

(a)　蛍光強度スペクトル　　(b)　蛍光寿命



Fluorescence decay curves of collagen gel incubated with ribose for 0-6 weeks

図１４

(a)　Type I コラーゲンゲルの励起波長 350 nm における蛍光強度スペクトル

(b)　Type I コラーゲンゲルの励起波長 375 nm による蛍光寿命

※Control はリボース添加した直後の Type I コラーゲンゲル

インキュベート時間の増加により蛍光強度の増加と蛍光寿命の短縮が認められた。

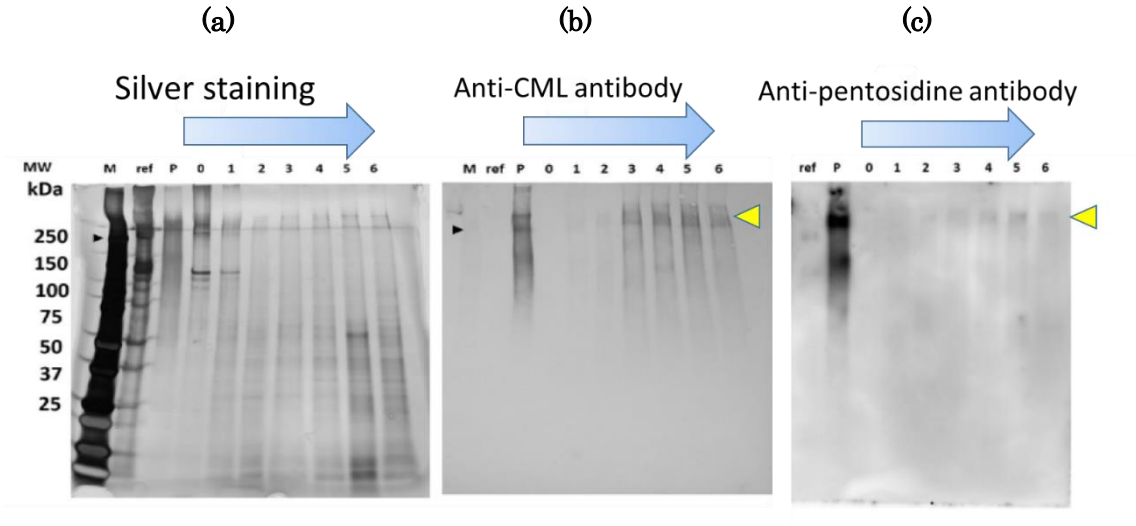


図１５　糖化 Type I コラーゲンゲルの AGEs 検出

M: 分子量マーカー　ref: Calf skin コラーゲン

P：リボース糖化 calf skin　コラーゲン

0－6：反応時間（週）

(a) 銀染色　(b) 抗 CML 抗体によるウェスタンブロット

(c) 抗ペントシジン抗体によるウェスタンブロット

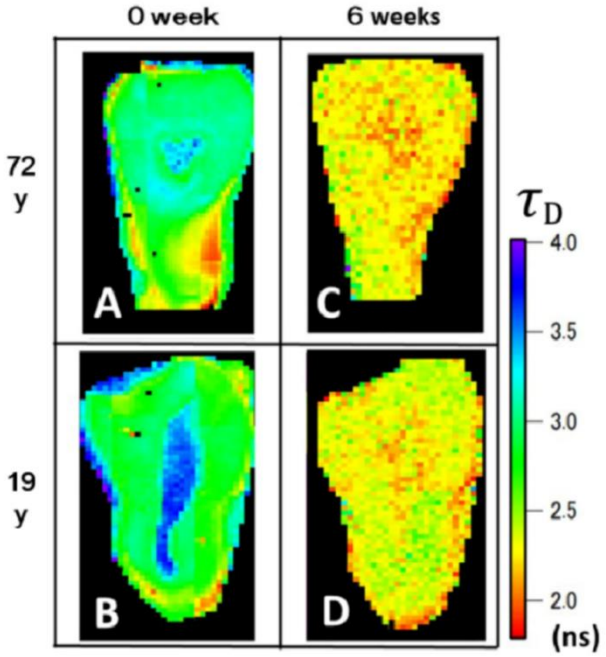


図１６　蛍光寿命イメージング

A：72 歳、B:19 歳

C、D は A, B 測定後に 200mM リボースに 6 週間浸漬。

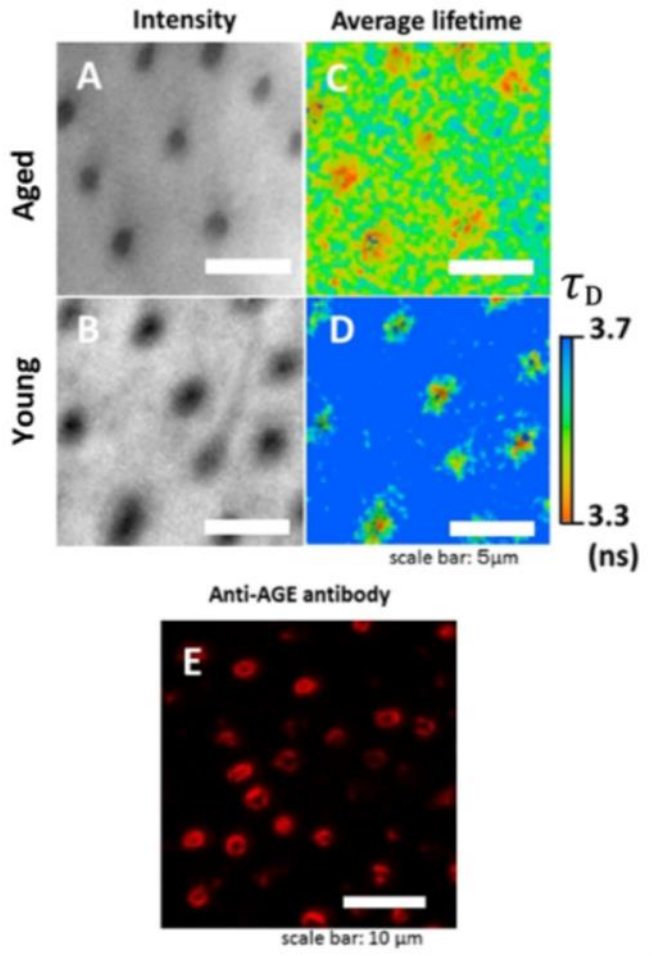


図１７　共焦点顕微鏡像

スケールバー：5μm　A　72 歳　B　19 歳　　蛍光強度

C　72 歳　D　19 歳　　蛍光寿命

スケールバー：10μm　E　抗 CML 抗体による染色

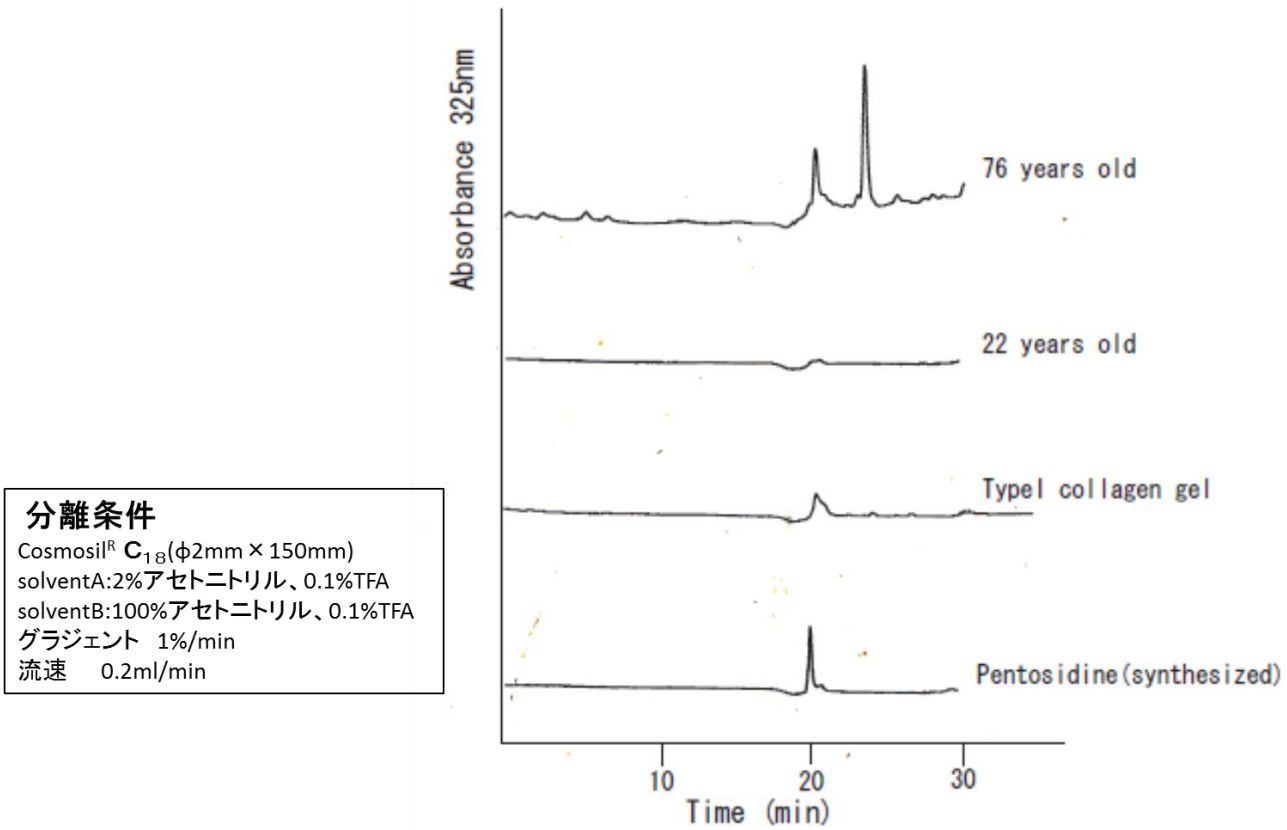
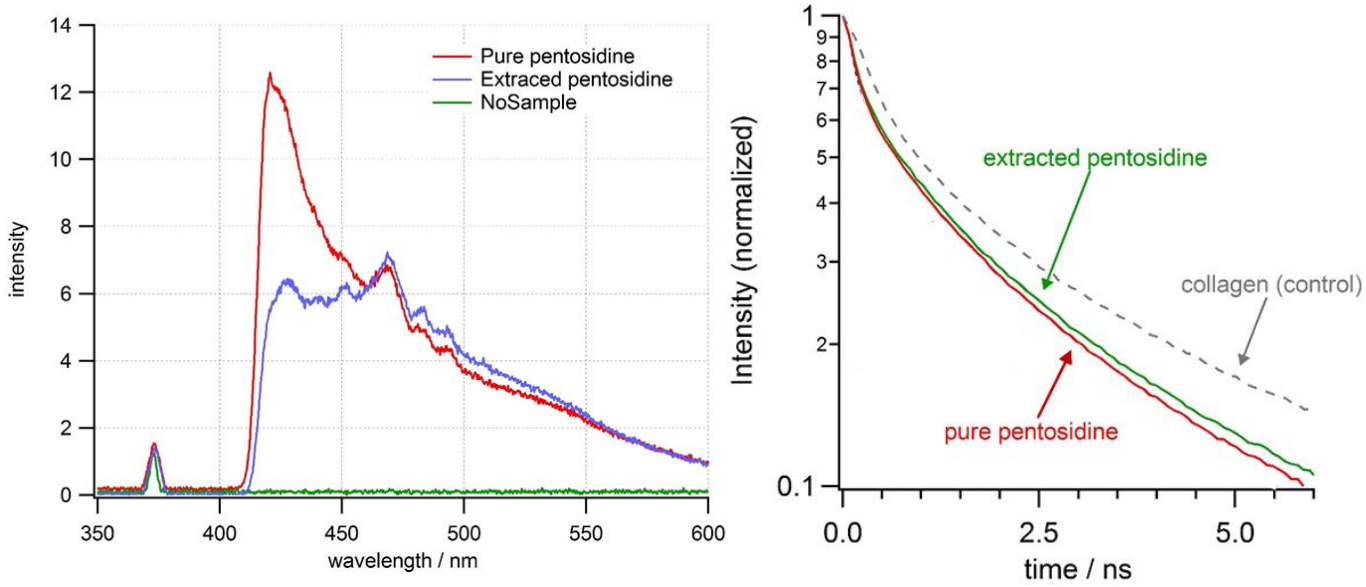


図１８ 象牙質酸加水分解物の逆相カラムによるクロマトグラム

(a)　蛍光強度スペクトル　　(b)　蛍光寿命



条件

・励起波長: 375 nm

・405nm long pass filter有り

図１９（a）　象牙質分解物のペントシジンの蛍光強度スペクトル

赤：ペントシジン標準物質（合成品）

青：76 歳　酸分解象牙質 HPLC 抽出物

(b)　蛍光寿命測定

赤：ペントシジン標準物質（合成品）

緑：76 歳　酸分解象牙質 HPLC 抽出物

灰：Calf skin コラーゲン

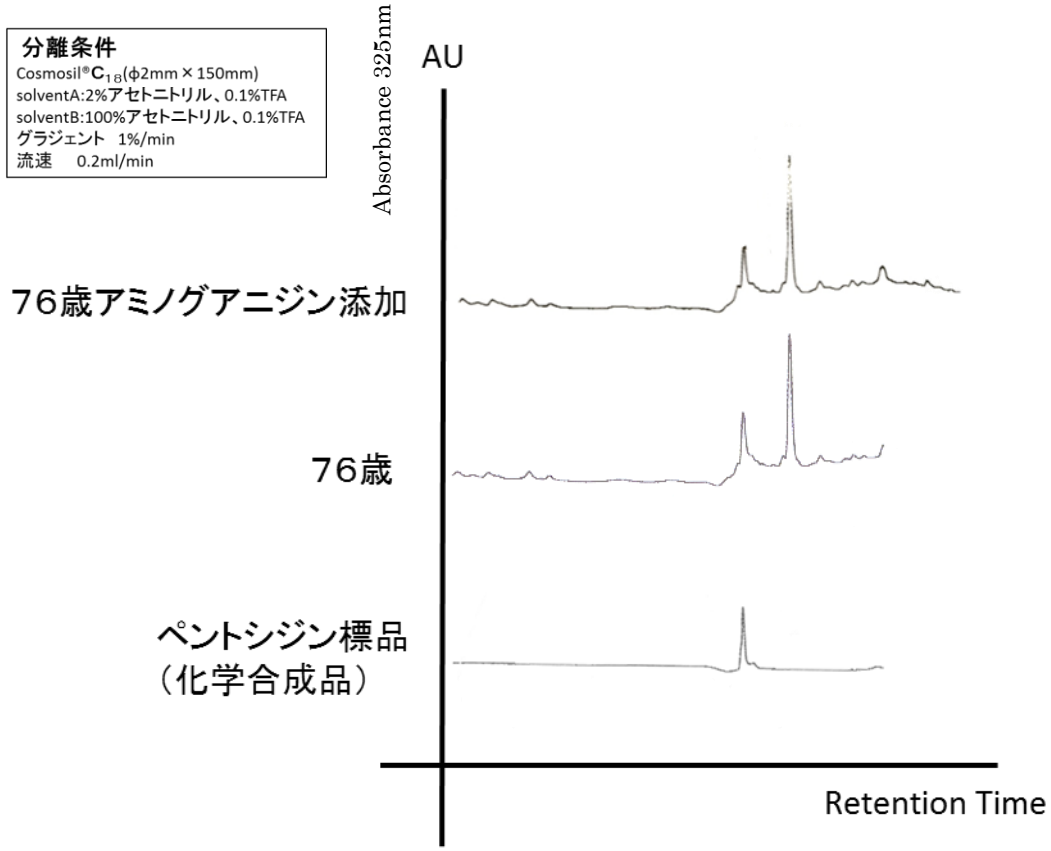


図２０　酸加水分解時におけるアミノグアニジン添加の有無

上段：７６歳象牙質を酸加水分解時に 100mM のアミノグアニジンを加えたクロマトグラム

中段：７６歳象牙質、酸加水分解物のクロマトグラム

下段：ペントシジン標品（化学合成品）