

皮膚中の自家蛍光測定技術の開発

食品・環境科 主任研究員 三木伸一

本研究では、分光分析による光学特性（蛍光、散乱、吸光）の測定データを基に、光伝播シミュレーションを実施し、皮膚等の散乱体の蛍光測定技術の確立を目指す。そのための基礎的知見として、蛍光性タンパク（糖化生成物）、脂質など、目的物質に加え、夾雑成分、散乱成分を含んだサンプルを調整し、これらの吸光及び蛍光に関する光学特性を調べた。また、拡散近似などの解析法による理論的な検証を実施した。

1. 緒言

ヘルスケアに関する測定機器は、体を傷つけないこと、簡便であること、などが機器の仕様として要求される。そのため、生体計測には、人体への影響が少なく、化学的な前処理が不要な光技術の利用が効果的であり、脂肪、タンパク、血糖などの測定や、癌診断や組織活性の評価、老化の評価などに用いられている^[1]。一方、生体の強い多重散乱性により生体を伝搬する光は散乱し、分光情報はゆがめられる。そのため、生体内の物質を正確に定量することは容易ではない。生体計測においては、多重散乱の影響を如何に補正するかが肝要である。

筆者らは、これまでに散乱補正技術を用いた近赤外光による生体分析に取り組んできた^[2]。散乱補正は、分析値の確からしさの向上に加え、適用する光情報の最適化、最小化につながり、分析装置の小型化、簡便化に寄与する。

本研究は、こうした生体計測、散乱補正技術等のノウハウ、知見を、蛍光測定へと活用を図る。蛍光性を有する生体物質の中には、生体にとって重要な役割を持ち、健康状態の指標となるものが数多く含まれる。平成26年度は、蛍光性を有する糖化タンパク質をターゲットとし、基礎データとなる生体成分の分光データの取得、解析等を行った。

2. 実験方法

2.1 試薬

分光特性の検証用として、市販のタンパク質、アミノ酸、グルコース等の試薬を用いた。また、生体の散乱性を疑似するため、イントラリピッド(脂質)を用いた。

2.2 蛍光性物質の調整

蛍光性を示す糖化タンパク質を調整するために、ヒト血清アルブミンにグルコースを添加し、緩衝溶液を用いて中性及びアルカリ条件とした後、60℃で数日

インキュベーションし、糖化タンパク質を生成した。また、比較に用いるため、蛍光性を示すアミノ酸であるトリプトファン溶液を調整した。

2.3 分光測定

分光スペクトルは紫外可視分光光度計、蛍光光度計を用いて測定した。紫外可視分光光度計の測定波長の範囲は200～1000nmとした。蛍光分光光度計においては、220～750nmの波長範囲の三次元蛍光スペクトルを取得した。

3 結果と考察

3.1 吸光スペクトル

吸光に関する光学特性評価を実施するために、紫外～可視域にかけて生体の構成成分の吸光係数を調べた。測定結果の中から生体計測の妨げになることが予想されるメラニン及びヘモグロビン、また、主要成分の水分の吸光スペクトルを示す(図1)。ヘモグロビンについては酸化型及び還元型があり、酸化型の比率を60%として換算している。メラニンの吸光係数については、不溶性で分光光度計による正確な測定ができないため、外部データベースの近似式^[3]を用いた。生体には多くの水が存在するが、可視、紫外域の吸光係数

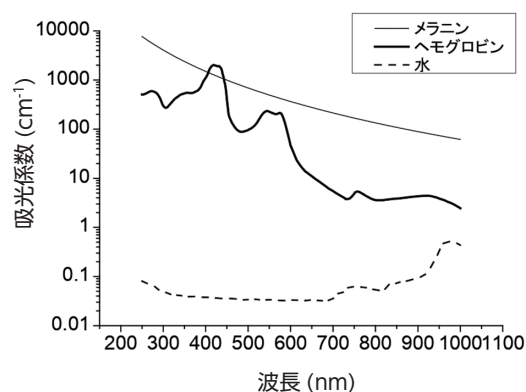


図1 表皮付近の生体成分の吸光係数

は相対的に小さく、水の影響はほぼ無視できる。一方、ヘモグロビン、メラニンが蛍光の発光領域に吸収があるため、蛍光測定に影響を与える。とりわけ、メラニンは、一部の波長域を除いて、ヘモグロビンより吸光係数は大きく、また、表皮付近の存在量も多いことから、吸光に基づく誤差の支配的要因になることが予想される。

3.2 散乱係数

生体の表皮に含まれる成分及びその量を、人体を破壊して調べることはできないので、疑似サンプルを用いた評価を実施する。人体の散乱性を近似する物質として通常、イントラリピッド(脂質)が用いられる。表皮付近の散乱性とよい一致を示すイントラリピッド濃度を求めるため、所定の濃度のイントラリピッド溶液を調整し、拡散近似、ミー理論を用いて等価散乱係数を求めた(図2)。拡散近似、ミー理論ともに他の文献値¹⁴⁾と良い一致を示しており、計算結果の正しさの裏

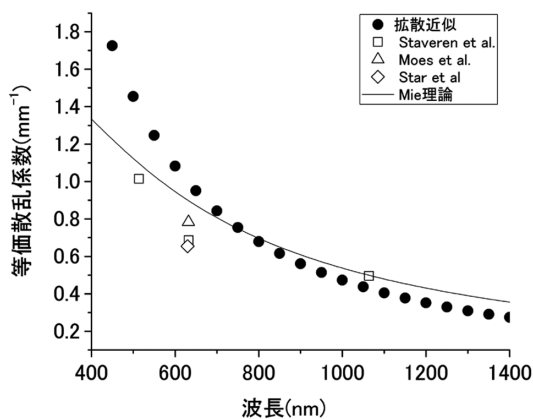


図2 イントラリピッドの等価散乱係数

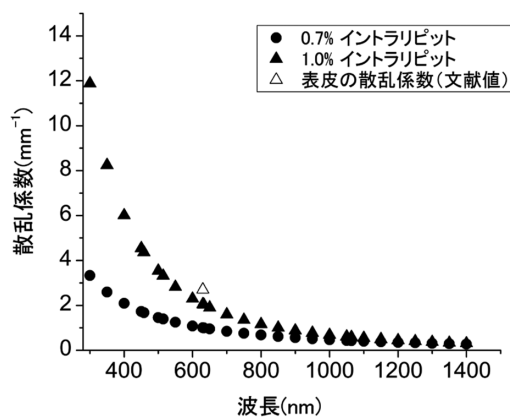


図3 表皮及び濃度の異なるイントラリピッドの散乱係数

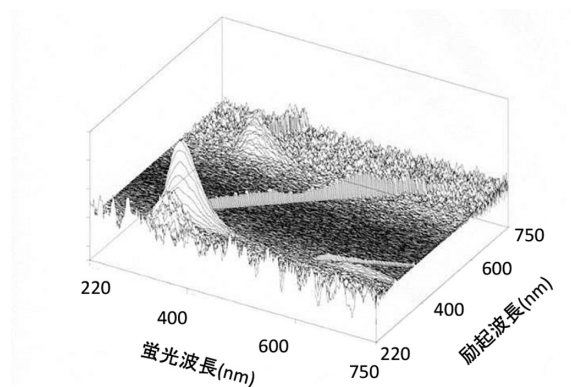
付けとなる。そこで、イントラリピッドの濃度を変化させ、表皮の散乱係数(等価散乱係数に非等方散乱因子を考慮した値)に近い濃度を求めた。イントラリピッド1.0%付近で一致していることから(図3)、表皮を疑似的に表す濃度として1.0%を設定した。

3.3 蛍光検出

糖化タンパク質とアミノ酸の3次元蛍光分析を実施した。図4Aにトリプトファン、図4Bに糖化タンパク質(ヒト血清アルブミン)の蛍光スペクトルを示す。これらは同一濃度であるが、トリプトワンの蛍光は強く、糖化タンパク質の蛍光は弱いことがわかる。なお、アルカリ性と中性条件で糖化タンパク質を生成させたが、生成速度は違いがあるものの、検討した条件化において蛍光スペクトルに大きな差異はなかった。

糖化タンパク質を正確に定量するには、こうした光学特性の検討結果を踏まえ、夾雑物質の蛍光・吸光の影響、散乱性の違いによる強度低下の影響などを考慮した解析手法を検討する必要がある、現在、これらのデータを用いたシミュレーションに取り組んでいる。

A トリプトファン



B 糖化ヒト血清アルブミン

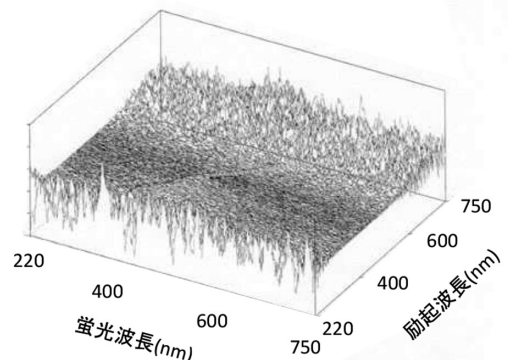


図4 3次元蛍光スペクトル

4. 結 言

吸光分析により、生体に含まれる主たる成分の吸光特性、また、散乱係数の測定・計算により、表皮の散乱性と疑似サンプル調整における条件設定、さらには、蛍光分析により、糖化タンパク質とアミノ酸の蛍光性の差異等について知見が得られた。これらの知見、データをもとに、今後、最適な測定システムについて検討を行っていく。

参考文献

- [1] 小川誠二, 上野照剛, 非侵襲・可視化技術ハンドブック, (株)エヌ・ティー・エス (2003)
- [2] S. Miki, Y. Shimomura, Pittcon 2009 Conference Proceedings, 920-5 (2009)
- [3] Oregon Medical Laser Center, Optical Absorption of Melanin, <http://omlc.org/spectra/melanin/> (アクセス日:2015.05.07)
- [4] H.J.Staveren, C.J.M.Moes, J.van Marle, S.A.Prahl and M.J.C.van Gemert, Appl.Opt. 30, 4507-4514 (1991)