

分光法が示す アルツハイマー病のバイオマーカー

今世紀の最初の10年だけでも、アルツハイマー病 (AD) による死亡数は68%上昇した。今やADは米国内の死因第6位であり、相当な科学研究にもかかわらず治療法は存在しない。事実、ADの分子機序ですらわれわれは理解できていない。しかし、新たな研究によって、ラベルフリーの光学分光法が洞察を可能とするかもしれないと示されている。さらには初期の診断によって、患者の認知機能があるうちに意思決定をしたり、悪化を遅らせるための治療を開始したりできるかもしれない。しかしながら、それまでの間、ADを有する多くの人々は未診断のまま。

1984年、米ニューヨーク市立大 (City University New York) のロバート・アルファノ氏 (Robert Alfano) とその仲間は、組織にある内因性の有機生体分子の蛍光度を読み解くことで、腫瘍

を検出するラベルフリーの光学分光法の利用を開発した。後に研究室のメンバーはこの研究を広げ、ある種の腫瘍を診断するために、通常組織と病変組織にあるトリプトファン、還元型ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NADH)、フラビン、コラーゲンの基準を決定するために分光法を導入した。アルファノ氏と、現在は米コロンビア大 (Columbia University) のレイガン・シー氏 (Lingyan Shi) が率いる国際チームが開発したラベルフリー光学分光法の新たな応用によって、脳組織の分子の構成要素と、それらがほかの組織と異なる理由が明らかになっている⁽¹⁾。

分光法による ミトコンドリア異常の計測

エネルギー産生に欠かせないミトコンドリアの機能不全は、ADまたはそのほ

かの疾患と相関する。ADの脳組織では、トリプトファンのキヌレニン代謝と同様に、NADH関連のミトコンドリア酵素の所見が認められている。ミトコンドリアの機能不全が初期に同定できれば、ADの機序をより理解できるだけでなく、初期の疾患の検出にもつながる。

研究者は、細胞の酸化還元 (レドックス) 反応に重要な細胞内補酵素などが、代謝活性やミトコンドリア機能不全の内因性バイオマーカーになりうると仮説を立てた。

NADH、フラビン・アデニン・ジヌクレオチド (FAD)、ADを示すトリプトファンの可能性を調べるため、通常または初期ADのマウスにおける脳組織の標本を評価、比較する蛍光分光法を使用した。通常または疾患マウスの脳組織における、これら主要な分子の構成要素の蛍光スペクトルが初めて示された。

表 アルツハイマー病と通常組織における発光ピーク

励起波長	組織	ピーク1の正規化強度	ピーク2の正規化強度	比(ピーク1/ピーク2)
266nm		331nmにおけるトリプトファン発光	435nmにおけるNADH発光	
	AD平均	1.000	0.268	3.73
	N平均	0.497	0.169	2.93
300nm		335nmにおけるトリプトファン発光	492nmにおけるNADH発光	
	AD平均	1.000	0.161	6.21
	N平均	0.532	0.100	5.33
340nm		462nmにおけるNADH発光	557nmにおけるFAD発光	
	AD平均	1.000	0.352	2.84
	N平均	0.606	0.207	2.928

ADはアルツハイマー病組織、Nは通常組織
ADとNの脳組織において標的分子に対する平均発光波長は励起波長によって異なる。

研究者は、ADサンプルと通常サンプルにおいて、トリプトファンとNADHのより高い蛍光スペクトルのプロファイルレベルを発見した(表を参照)。また、通常組織よりもAD組織で、3つすべての蛍光強度が高いこともわかった。これは、ADの脳において無放射緩和過程が減少していることを意味する。最後に、NADHに対するトリプトファンの強度比と、それぞれの波長における蛍光強度の変化率が、AD標本において増加したことも明らかにした。

発光スペクトルの調査

266nmの励起波長では、ADとN組織のいずれも同じ波長(330nm付近)で蛍光ピークを示した。これはトリプトファンの発光ピークと一致する。しかし、ADとNの間でトリプトファンのピークにおいて有意差が認められた(P=0.001)。次に、弱いピークがNADHによる430~460nmにあり、266nmからの2つ目の一重項励起と、励起したトリプトファンからNADHへの蛍光共鳴エネルギー移動の結果と思われる。平均ピーク強度はNよりもAD組織で高く、それぞれトリプトファンでは2.01倍(1.000 vs 0.497)、NADHでは1.58倍(0.268 vs 0.169)だ。

300nmの励起でも、結果は同様だ。ADとN組織の発光強度はいずれも330~350nmにピークがあり、トリプトファンの発光ピークに一致する。また、より弱い第2のピークが430~460nmにあり、NADHに関連する。NよりAD組織のほうが、トリプトファンとNADHの平均ピーク強度がそれ

ぞれ1.88倍(1.000 vs 0.532)、1.61倍(0.161 vs 0.100)高い。

最後に、340nmの励起では、ADとNの発光ピークが430~460nmにあり、NADHの発光ピークに一致する。次に、弱いピークが530~560nmにあり、FADと関連する。NよりADのほうが、NADHとFADの平均ピーク強度がそれぞれ1.65倍(1.000 vs 0.606)、1.70倍(0.352 vs 0.207)高い。

NADHに対するトリプトファンの強度比を比較すると、266nm励起では平均の比がADは3.73でNは2.93、300nm励起ではADは6.21でNは5.33であることがわかった。FADに対するNADHの比はADとNで有意差はなかったが、トリプトファンとNADHのスペクトルピークの比較と、トリプトファンの吸光に近いピークの相対比によって、AD診断の有用な測定法になるかもしれない。

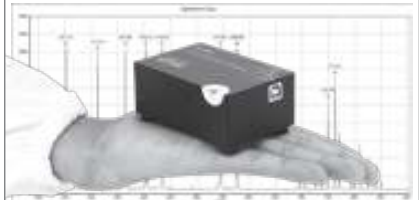
この研究によって、トリプトファン、NADH、FADがADのバイオマーカーとして確かに有用であることが示されただけでなく、ADと通常の脳組織における蛍光組成の差異を計測し、スペクトルプロファイルを比較することで、初期のADを検出できる有効な光学法の存在も証明された。ストリークカメラを用いて蛍光を時間分解した実験では、AD組織で無放射過程が減少していることが確認されており、ADにおいて緩和発光寿命がより遅くなることも示された⁽²⁾。これらの変化を局在化する時間分解の蛍光寿命を計測、そしてより深い組織の浸透度をもたらす長波長の多光子励起が、今後の研究では使われるだろう。(Barbara Gefvert)

参考文献

- (1) L. Shi et al., Sci. Rep., 7, 2599 (2017); doi:10.1038/s41598-017-02673-5.
 (2) B. Das, L. Shi, Y. Budansky, A. Rodriguez-Contreras, and R. Alfano, J. Biophoton., 1864-0648 (2017); doi:10.1002/jbio.201600318.

低価格&高い費用対効果
ファイバ・マルチチャンネル分光器

BroLight



- ▶ 標準タイプ BIM-60 シリーズ
¥198,000~(税抜)
- ▶ 高分解能タイプ BIM-66 シリーズ
¥373,000~(税抜)

光計測機器は
日本レーザーまで
ご相談ください

高精度・高分解能
波長計&スペクトラムアナライザ

Bristol
Instruments



- ▶ 671 シリーズ 高精度 CW 波長計
- ▶ 871 シリーズ 高測定レート・高精度 CW&パルス波長計
- ▶ 771 シリーズ レーザースペクトラムアナライザ

<http://www.japanlaser.jp/>

E-mail: jlcc@japanlaser.jp

JLC 株式会社 日本レーザー
JAPAN LASER

本社 〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1
TEL: 03-5285-0863 (直)

大阪支店 TEL: 06-6323-7286
名古屋支店 TEL: 052-205-9711