

令和元年度学内公募研究（萌芽型）
〔研究紹介〕

酸化ストレスが関与する 生体情報（酸化還元状態）の非侵襲計測法

多田 美香¹⁾, 薄井 晶子²⁾

Non-invasive Methods for Measuring biomarkers of Oxidative stress related to Redox status

Mika TADA¹⁾, Shoko USUI²⁾

Abstract

Conventional oxidative stress markers, such as lipid-derived free radicals have been studied to cause damages to cell membranes, proteins and other biomolecules. *In vivo* ESR measurements are used to observe redox status related to oxidative stress. In addition, decompositions of lipid hydroperoxides are known to release excited triplet states of biomolecules composed with carbonyl groups. Our previous study suggested that ultra-weak photon emissions composed with various wave lengths. On the other hand, more detailed investigations on the *in vivo* redox status are needed to elucidate the mechanisms contributing to damage caused by stress. Recently, glycation stress related to accumulation of advanced glycation products (AGEs) might be important to monitor in the redox status because AGEs have been used as biomarkers for non-invasive measurement techniques. In this study, we investigated mechanisms of photon emissions from human finger including fluorescent oxidation products. A case study suggested that increasing fluorescence around finger might be related to a delayed type of allergic reaction of the skin.

1 はじめに

近年、TV番組や広告などで酸化ストレスや糖化ストレスという言葉を目にするが、一般の方々にわかりやすく伝えるために専門用語や科学的根拠は省かれた説明になるため、誤解を招くことがある。そもそも、ストレスとは何か。本研究紹介では、本題に入る前に筆者らの専門分野で使われているストレスの概念を述べる。次に、酸化ストレスを代表とする生体情報を非侵襲で計測するための計測技術開発の歴史と現状を述べる。最後に、計

1) 環境応用化学科, 生体医工学研究所

Department of Applied Chemistry and Environment Faculty of Engineering, Biomedical Engineering Research Laboratory

2) 電子工学専攻

Graduate Department of Electronics

測データから読み取れる生体情報について報告する。

2 ストレスとは

ストレスは物理学用語で「物体の歪み」を意味する。この概念を医学の分野にはじめて取り入れたのがカナダの生理学者のハンス・セリエ博士で、1936年、ストレスを「外部環境からの刺激（ストレッサー）によって起こる歪みに対する非特異的反応」と表現した [1]。ストレス学説の最初の論文だが、文中にストレスという言葉は使わず、その代わりに「全身適応症候群」と表現している。新しいホルモンを抽出する研究をおこなっていたセリエ博士は、寒さ、過剰な筋トレ、外科的損傷や脊髄ショック、薬物投与、など複数の刺激を別々に暴露した後、必ず共通して現れる3つの症状（警告反応期（6-48hr）、抵抗期（48hr以降）、疲憊期）を発見した。これらの3つの症状を「全身適応症候群」とよぶ。抵抗期にストレッサーやその影響がなくなれば、健康な状態に戻りストレッサーに対する抵抗力（ストレス耐性）が衰える疲憊期には入らない。また、副腎を摘出したマウスはこの3つの症状は起こらず、副腎皮質から出るステロイドホルモンが重要な働きを示していることを証明した。副腎皮質から放出されるステロイドホルモンには、現在、ストレスホルモンや酸化ストレス疾患のバイオマーカーとしても注目されているコルチゾールが含まれる。ハンス・セリエ博士が残した「It's not stress that kills us, it is our reaction to it.」という言葉は、コロナ渦の今を生き抜くためにも重要な考え方である。一方、科学の進歩によってストレスの種類が異なれば生体の反応は異なることが明らかになった。ストレッサーに対する反応は、年齢、性別、過去の経験に応じて異なり、刺激がストレッサーとして働くかどうか個人によって異なる [2, 3]。このようにストレスに対する反応は多種多様で、定義することが難しい。ゆえに、ストレスを種類ごとに可視化する計測技術（ストレスの種類を定性的かつ定量的に観察するための技術）を開発することの難しさは一目瞭然である。

3 酸化ストレスとその計測技術

筆者は、1996年から数年間、工学と医歯薬系や農芸化学（食品）との横断研究：生体情報の酸化還元（レドックス）状態の研究を行っていた [4]。学生時代は、生命化学反応の1つである酸化還元反応を観察するための方法論の確立がメインテーマで、4年生の卒業研究では今まで捉えられなかったレドックス状態をリアルタイムで観察することによって、食品や生薬に含まれる成分の新しい機能性を見出すことが目標であった。酸化ストレスとは、光増感反応や自動酸化によって脂質過酸化反応が進行した状態で動脈硬化などの原因である。広義には脂質過酸化反応の引き金になる活性酸素の過剰生成や酸化的修飾も酸化ストレスに含まれる。一部の研究分野では、酸化反応＝酸化ストレス、と解釈されていたが、筆者は酸化還元平衡（レドックスバランス）が酸化側に傾いている状態＝酸化ストレス、を捉えることが重要だと考えた。酸化ストレスが学術論文で頻繁に登場しはじめたのが1985年頃で、約10年後には企業での食品・飲料開発で抗酸化をキーワードにした機能性の研究が注目された。当時、生体計測用の電子スピン共鳴（Electron spin resonance；ESR）または電子常磁性共鳴（Electron paramagnetic resonance；EPR）とよばれる分光法を利用した装置開発を進めていた研究室に入り、ループギャップ共振器と生体のレドッ

クス状態を可視化するためのスピンプローブ剤（造影剤のような試薬）を組み合わせた動物実験を行っていた。ESRとは、1945年ロシアのザボイスキー博士によって初めて観測された現象で、不対電子をもつ分子種を検出するための分光法であり、核の遷移を測定するのではなく磁場に置かれた不対電子の遷移を検出するものである。ループギャップ共振器とは、試料挿入空間が300-350g程度のラットの頭部や約30gのマウスの全身を挿入でき、700MHz（L-バンド）の電磁波を生体に照射してESR現象を観察するために開発された生体計測用ESRの試料測定部である [5]。遷移金属イオンや材料の電子欠陥などを観察するために汎用されていたX-band ESR装置では、生体試料の計測は不向きであり、植物中のアスコルビン酸ラジカルの光応答を観察するためには葉を薄切する必要がある。生体計測に不向きなX-band ESR装置は、共鳴周波数が9-10GHzのマイクロ波（電磁波）を用いるため、水分を多く含む試料に照射すると誘電損失の影響を受けて常磁性物質（不対電子をもつ分子、フリーラジカルともいう）の検出感度が低下する。電磁波は、電界成分と磁界成分からなり、誘電損失は電界成分と誘電体との接触によって起こる。電界成分をギャップ側に集中させてループ内は磁界成分で満たされるように工夫されたループギャップ共振器によって、磁気共鳴に必要な磁界成分を集中して生体試料に照射できる。しかしながら、生体のフリーラジカルの濃度は、代謝過程で生成する活性酸素や脂質由来のフリーラジカルなど既知の分子種に限定すると $10^{-7} \sim 10^{-6}$ mol/Lといわれている [6]。ただし、生体の常磁性物質を非侵襲的に計測する方法がないので、生化学や分子生物学の従来研究から想定した濃度である。また、反応性が高いため寿命が短いこと、親水性や親油性、酸素濃度などの反応場の条件によって励起状態の電子スピンの緩和時間がかかる。このような局所のレドックス状態を観察できるような装置の性能（時間分解能や空間分解能）が追いつかず、非侵襲で短寿命のフリーラジカルを検出することは実現されていない。すでに核磁気共鳴やX線CTが臨床で活躍する中、なぜESRが注目されたのか。生活習慣病や老化の原因として注目されていた過酸化脂質反応をリアルタイムで観察する方法がなく、不安定な反応中間体を介して連鎖的に反応が進む脂質の酸化反応を停止するための機能性成分の検証が必要だった。平田教授らによって開発された表面コイル型共振器 [7] を内視鏡または聴診器のように動物に留置し、臓器別のレドックス状態を観測することで臓器ごとに異なった機能性成分の効能評価が実現した [8, 9]。一方、脂質ラジカルや脂質ペルオキシドラジカルは不対電子を有する分子構造なので、ESRの原理にしたがえばESR信号波形から分子種を同定でき、かつ、信号面積に相当する電子スピン数からラジカル量を定量することも可能なはずだが、前述のように、生きたままでの生体計測には限界があり、研究の方向性が変化している。たとえば、ラットやマウスの小動物実験では、内視鏡のように使用する表面コイル型共振器からアレイ型の共振器 [10, 11] などが開発され、ピラジカル構造を有する分子状酸素の特性を生かした酸素濃度を測定する目的でのESR研究も進んでいる [12]。また、体内のレドックス状態を可視化するためのスピンプローブ剤を生かした研究は飛躍的に進歩し、現在ではスピンプローブを改良した蛍光プローブを用いた抗酸化の研究やリピドミクスの研究が進められている [13, 14]。さらに、生体での過剰な求核物質の蓄積はレドックスバランスを乱すことで疾患リスクを高めることが明らかになり、「酸化ストレス」に対して「還元ストレス」という概念が提唱されている [15-17]。酸化ストレスの研究がはじまってから35年経ち、ようやく酸化ストレスに囚われずレドックス状態を可視化することの重要性が定着したのである。

ESRと並行して進められていた生命化学反応の計測技術開発には、光計測がある。暗

所では、光電子増倍管や CCD を具備した装置によって体表の自家蛍光を検出することができるため、ヒトでも造影剤を使用せずに非侵襲計測ができる [18]。フリーラジカルの検出のために光計測よりも ESR が中心的になった背景は、定量・定性分析ができると考えられ、光計測ではターゲットから放出されるマーカ分子の特定が難しく、分子種の同定は難しいとされていた。しかしながら、分子生物学の研究が進み、酸化ストレスマーカであるカルボニル化タンパク質や糖化最終産物 (advanced glycation end-products: AGEs) は皮膚に蓄積し、一部の AGEs は紫外領域の光を吸収して蛍光を放出することが明らかになった。皮膚の老化機構を考える上で光老化による酸化ストレスと糖化ストレスは大きな要因となっている。活性酸素やフリーラジカルを介して皮膚に酸化ストレスを与え、色素細胞のメラニン産生刺激と角化細胞の遺伝子損傷はシミ形成に、線維芽細胞刺激はシワ形成に関わることで、さらに AGEs は糖化ストレスとして色素細胞を刺激し、メラニン産生を助長することが明らかになった [19]。国内では 2014 年以降、安価なフォトダイオードを用いることで飛躍的に非侵襲センサ開発が進み、タブレットやスマートフォンを組み合わせることで誰でも簡単に計測できる簡易型の皮膚での蛍光測定機器が開発された。これらの装置は、AGEs を選択的に測れるような商品名ではあるが、皮膚に含まれる蛍光物質は複雑に存在するのでパンフレットや広告の情報を鵜呑みにせず、詳細に装置特性を調べる必要がある [20]。また、測定装置の機種のみならず、測定部位の皮膚の構造によっては AGEs 由来の蛍光を吸収しうる励起カルボニル類や生体色素 (たとえば、メラニン)、および血流の影響が考えられる。一方、極微弱発光のリアルタイムの画像計測技術の進歩によって、薄井らが発表した昆虫の脱皮変態に伴うバイオフィオンの経時変化から、発光の増大には脳で産生されているペプチドホルモンによる代謝量の変化を反映していることが推察された [21]。過去の研究では、ホルモンの分泌によって変化する生体情報を非侵襲かつリアルタイムで観察した例はなく、生命活動では外部からのストレスがなくとも生きるために酸化ストレス状態になったり定常状態に戻ったりすることを裏付ける重要な報告である。脱皮直後から脱皮 2 時間後にかけて腹部から頭部に広がっていく発光は、新しいクチクラの硬化・着色過程の反応と関連していると考えている。硬化・着色過程では、フェノール酸化酵素を触媒としてオルトジフェノール類が酸化されてオルトキノロン類となり、重合反応によって起こる。オルトキノロン類は非常に反応性の高い物質で不安定な電子構造をもつため、ラジカル反応や発光に関与することが考えられる。すでに筆者らは、フェノール類のチロシンやオルトジフェノール類の L-ドーパがフェノール酸化酵素のチロシナーゼと反応中間体を形成するメラニン形成の初期段階で、反応性の高い活性酸素のヒドロキシルラジカルを生成することを発表した [22]。着色過程で形成されるメラニン色素が励起状態となり発光に繋がることも推定される。メラニンは蛍光性物質で、紫外・可視領域の光を吸収する。皮膚の光保護作用では、メラニンが紫外線を吸収することが知られているが、試験管レベルでの検証ではメラニンが 480 nm 近傍の可視光を吸収して 625 nm 近傍の蛍光を放出することを確認した [23]。また、リノール酸の酸化物によってメラニンの自家蛍光が増大することを報告した [23]。他にも、極微弱発光の因子として励起カルボニル状態になりうる分子種が考えられるが、その 1 つに脂質やタンパク質の酸化物が考えられ、蛍光性 AGEs も該当する。たとえば、タンパク質のコラーゲン、ケラチン、エラスチンの蛍光波長領域をまとめると約 350-560 nm [23]、蛍光性 AGEs のペントシジンの蛍光極大は 385 nm、糖化コラーゲンの蛍光は 440 nm 前後である。

2019 年度の公募研究から、指先で測れる蛍光からどのような生体情報を得られるのか

を考える前段階として、装置の特性について基礎検討を続けている（図1）。DiagnOptics社製品のAGEs Reader mu（前腕部）、TruAge scanner mini（前腕部）、シャープライフサイエンス株式会社で開発された指先で蛍光を計測するセンサ（現在はエア・ウォーター・バイオデザイン株式会社で販売、データは利き手と反対の中指）で測定した結果である。図1のように、7名のボランティアの指および腕の蛍光強度に相関は認められなかった（縦軸：指、横軸：腕）。理由として、DiagnOptics社製品の測定部位である上腕部や前腕部には、日光の当たり難い腕下部の皮膚でもメラニン色素が存在しているが、指先にはメラニン色素が極めて少ないことが報告されている。メラニンには光保護作用で知られるように、紫外線を吸収して光老化を防止することから、上腕部や前腕部で蛍光強度を測定するDiagnOptics社製品は、蛍光性AGEsを励起するために必要な励起光（UVA領域の光）をメラニンが吸収することが想定され、自家蛍光強度にも影響を与える可能性がある。また、前述したように、AGEsが糖化ストレスとして働くことでメラニン色素を増やしている場合、蛍光性AGEsのみならずメラニンも増加していることが考えられる。さらに、腕には皮膚のすぐ下を流れている静脈、指先には毛細血管が集中していることから、血管内の生体情報（ヘモグロビン、血中や血管壁に蓄積した蛍光性AGEs）の影響を受けやすい。また、表皮や真皮に蓄積している蛍光性物質から放出される光は体表に移動する間、つまり体表からセンサの受光部に蛍光が到達する前に、生体組織による散乱や他の蛍光物質による光吸収の影響を受けていることが推察される。

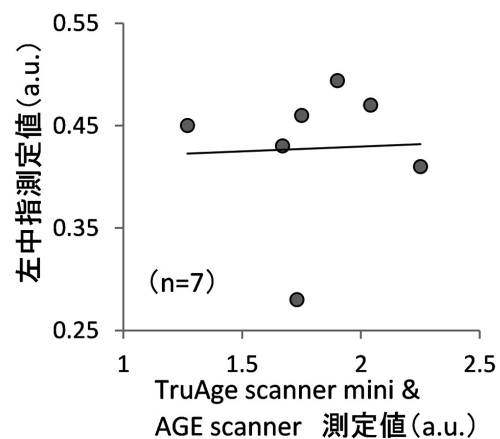
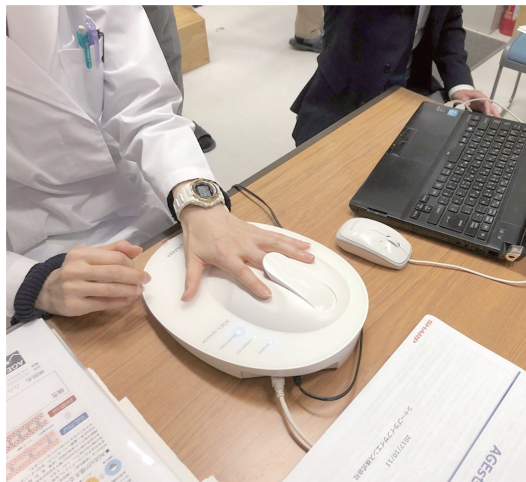


図1 指先で計測する様子（左）と市販の蛍光測定器の機種の違いと蛍光強度の関係（右）

次に、指先の蛍光測定において、遅延型アレルギー発症前の健常ボランティアの指先の蛍光強度が平均的な健常ボランティアの値よりも1.8倍以上増加した [25]。この蛍光強度の増加量は10%の測定誤差の範囲を著しく超えているが、糖尿病患者に比べれば極わずかな変化である。しかしながら、本人は全く自覚症状がないにもかかわらず、体内で何らかの変化が起きていることを示していた。いわゆる、警告である。今回の結果は、過去の臨床研究では取り上げられていないほどわずかな変化量であることから、予防医学の観点では重要な事例である。なお、遅延型アレルギー発症後、炎症が収まり症状がなくなっただけの蛍光強度は、いつもの平均的な数値に戻っていた。恩師の教えである「計測なくして評価なし」という言葉を思い出した。仮説検証はもちろん大事だが、泥臭く計測デー

タを集めることで新しい生体情報の評価基準が見つかることを期待している。

これまでの研究を振り返り、セリエ博士のストレス反応の概念を考えると、非侵襲計測で重要なことは、光計測で酸化ストレスに関与する分子種を同定できなくとも、日常生活での健康管理において指先で測れる蛍光強度の変化から、何らかのストレスを受けて警告反応期または抵抗期（病気ではないが、何か体内で異変が起きている）に該当するかもしれない、ということに気づけることである。たとえば、蛍光性物質を定性的に光で検出する場合、皮膚に存在する蛍光物質を特定波長ごとに検出するためには分光技術が必要になり、簡単でコンパクトな装置にまとめることは難しい。一方、簡易計測でも正常な蛍光強度から外れていることに気づくことができれば、生活習慣を省みて専門医に診察してもらうきっかけになる。現在、健常ボランティアのわずかな蛍光強度の変化を見逃さないよう定期的に測定を行いながら、コロナ渦前後での指先の蛍光強度の変化、および蛍光強度の変化を指標にした睡眠サイクルなどの生活習慣の改善を試みている。

4 おわりに

近年、超高齢化社会に備えて、健康増進・疾病予防・健康長寿などに関する実用研究が増え、それに関連する講演や多くの健康増進関連の商品開発が増えている。このような社会の流れから「健康長寿に貢献するべく」と記述して研究予算を申請することも多い。健康は人間が生きる上で第一番目の要件であるが、中年になって若い頃のように無理ができなくなると本当の健康の有難さには気づかないものである。筆者が20代に中断した生体情報計測の課題に再び向き合うようになったのも、中年に入って健康を気にするようになったことが理由である。健康維持には、まず予防、次に早期発見・早期治療である。今回は、心理的なストレスについては触れなかったが、心身ともに健康であることが最も重要であることを、専門性を生かしたレドックス状態の計測データから検証していきたい。

謝辞

ヒト健常ボランティアによる計測は、東北工業大学研究倫理規程に基づく審査を受けて承認されている。倫理審査においてご助言いただいた先生方に心よりお礼申し上げます。重ねて、細胞レベルでのAGEs検出やストレスホルモン分析についてご教授賜りました電気電子工学科 教授 葛西 重信 先生、准教授 辛島 彰洋 先生に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Selye H., A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents, *Nature*. 1936;138:32.
2. Selye H., Stress and disease, *Science*. 1955;122:625-631.
3. Selye H., *The Stress of Life* (revised edition, 1984, McGraw-Hill)
4. 多田美香, In vivo 局所マイクロ波 ESR 法による生体内酸化還元状態の観測手法の開発とその応用に関する研究, 博士論文 (2004.03, 山形大学大学院理工学研究科論文博士課程)
5. Fujii, H., Berliner J.L., Detection of bioradicals by in vivo L-band electron spin resonance spectrometry, *NMR Biomedicine*. 2004;17 (5) :311-318.
6. 二木悦雄, 島崎弘幸, 活性酸素 - 化学・生物学・医学 (1987, 医歯薬出版)
7. Hirata H., Ono M., Impedance-matching system for a flexible surface-coil-type resonator, *Review of Scientific Instruments*, 1997;68 (9) :3528-3532.
8. Tada M., et al., Surface-coil-type resonators for in vivo temporal ESR measurements in different organs of Nitroxide-treated rats, *Applied Magnetic Resonance*, 2000;18:575-582.

9. Tada M., et al., Evaluation of antioxidative effects of sesamin on the in vivo hepatic reducing abilities by a radiofrequency ESR method, *Analytical Sciences*, 2013; 29 (1) ;89-94.
10. Enomoto A., Hirata H., Sequential CW-EPR image acquisition with 760-MHz surface coil array, *Journal of Magnetic Resonance*, 2011;209 (2) ;244-249.
11. Enomoto A., et al., Four-channel surface coil array for 300-MHz pulsed EPR imaging: Proof-of-concept experiments, *Magnetic Resonance in Medicine*, 2014;71 (2) ;853-858.
12. Yasui H., et al., Quantitative imaging of pO₂ in orthotopic murine gliomas: hypoxia correlates with resistance to radiation, *Free Radical Research*, 2017;51; 861-871.
13. Matsuoka Y., et al., A profluorescent nitroxide probe for ascorbic acid detection and its application to quantitative analysis of diabetic rat plasma, *RSC Advances* 2016;6 (65) :60907-60915.
14. Yamada K., et al., Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals, *Nature Chemical Biology*, 2016;12;608-613.
15. Sies H., *Oxidative Stress*. Academic Press; London, UK: 1985; 507.
16. Sies H., *Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine*, *Redox Biology*, 2015;4C:180-183.
17. 西田基宏ら, 活性硫黄種によるレドックス恒常性維持機構に基づいた新規心不全治療戦略の構築, *YAKUGAKU ZASSHI*, 2014;134 (12) ; 1239-1243.
18. Tsuchida K., Kobayashi M., Oxidative stress in human facial skin observed by ultraweak photon emission imaging and its correlation with biophysical properties of skin, *Scientific Reports*, 2020; 10;9626.
19. Lee JE., et al., Advanced glycation end products (AGEs) promote melanogenesis through receptor for AGEs, *Scientific Reports*, 2016; 6; 27848.
20. Morita Y., et al., Evaluation of the glycativ stress by non-invasive skin AGEs measurement devices, *Glycative Stress Research*, 2019; 6 (2) ; 092-102.
21. Usui S., et al., Non-invasive visualization of physiological changes of insects during metamorphosis based on biophoton emission imaging, *Scientific Reports*, 2019; 9; 8576.
22. Tada M., et al., Generation mechanism of radical species by tyrosine-tyrosinase reaction, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2010; 47 (2) ; 162-166.
23. 小林正樹, 葛西重信, 多田美香, Ankush Prasad, 生体酸化ストレス非侵襲画像計測技術の研究, H25-27年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 研究報告書 (2016.05)
24. Tada M., Case Study of Photon Emissions from Human Finger including Fluorescent Oxidation Products, *Free Radical Biology and Medicine*, 2020;159, Supplement1; S33.