

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

「後期糖化生成物(AGEs)を用いた健康状態モニタリング技術に関する研究」

学位申請者 山中 幹宏

キーワード：糖化反応後期生成物 (AGEs: Advanced Glycation Endproducts)

糖尿病合併症 非侵襲 経皮蛍光 予防医療

近年、生活習慣病患者が急増し、普段の食事から本疾患を予防する重要性が高まってきている。糖化反応後期生成物 (AGEs: Advanced Glycation Endproducts)は加齢に伴って蓄積し、さらに糖尿病合併症、腎症、動脈硬化等で蓄積が増加することから、AGEs の測定は加齢関連疾患のマーカーとなる可能性、さらには生活習慣病を予防する目的で AGEs 生成を抑制する食品成分の探索も行われている。数十種類以上存在する AGEs の中には、特定の光を照射することにより、自家蛍光 (Autofluorescence)を発するものが存在する。この自家蛍光の強度によって生体 AGEs の蓄積量がモニタリング可能となると、採血等の侵襲的な手法を用いずに、外からの励起光で血管壁等に蓄積した蛍光性 AGEs 蓄積量を非侵襲的に測定することが可能になると考えられる。

そこで本研究では、血管壁に蓄積した AGEs の量を、経皮蛍光として「非侵襲」「簡便」「再現性良く」測定できる装置の開発を行い、生体における機器の有用性を評価した。

まず、装置の測定対象とする蛍光物質の波長選定を行った。皮膚における蛍光物質の含量は極めて低く、波長選定には不向きであったため、AGEs 含量が高いことが報告されている腎機能疾患患者の血清を用いて蛍光スペクトルを分析した。各血清サンプルから蛍光分光光度計にて励起光と蛍光をそれぞれ独立して 2,400 nm/min.の速度で走査し、等高線様の励起波長と蛍光波長の相関図を確認することで最適励起波長と最適蛍光波長を決定した。その結果、腎症患者の血清では、励起波長 330~350 nm 蛍光波長 420~450 nm の範囲で蛍光強度が最も強いことが確認され、得られた結果をより詳細に解析することで最適励起波長を 340 nm、最適蛍光波長を 440 nm と決定した。決定された波長を検出器にて測定したところ、健常者の血清に比べ透析患者血清において蛍光強度が有意に高値を示すことが明らかとなった。さらに、マウスの耳介を測定した結果、健常マウスに比べ糖尿病マウスにおいて高値を示すことが明らかとなり、決定された波長が病態と相関して上昇することが示された。しかし、ヒトの皮膚において自家蛍光を測定する際には、メラニンやヘモグロビン等の色素が励起光の侵入を阻害するため、安定的な測定が困難であることが知られている。そこで、色素の影響が少なく安定的に自家蛍光が測定可能な箇所を選定を行った。その結果、指

尖において最も測定値にバラつきが少ないことが明らかとなり、特に利き手と逆の手の中指で最も安定していたことから、従来のプローブタイプのセンサを改良し、指尖が安定して測れるクリップ構造を有する経皮蛍光測定装置を作製した。本測定装置を用いて 2 型糖尿病患者の経皮蛍光強度を測定したところ、糖尿病合併症の保有数の増加に伴って有意に増加した。本結果は、AGEs 構造の一つであり液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) で測定された N<sup>δ</sup>-(5-hydroxy-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1) の血中濃度と相関しており、本装置で測定される蛍光物質が既知の AGEs 構造と同様の変化を示すことが確認された。本実験では、過去 1-2 ヶ月の血糖値を反映し、糖尿病の指標として用いられている HbA1c も同時に測定したが、HbA1c では有意な変化が認められなかった。以上のことから、AGEs 構造は糖尿病合併症等の予測に利用できる診断マーカーとなる可能性が示され、本研究にて開発された装置を用いた経皮蛍光の測定によって簡便に糖尿病合併症を測定・予測できると考えられる。

さらに、本研究において開発された経皮蛍光測定装置は、生体で AGEs 生成抑制作用を示す食品成分の探索にも活用できると期待される。そこで今回、古来より滋養強壮や生活習慣病予防に利用されてきたスッポン卵(soft shelled turtle eggs: STE)の AGEs 生成抑制効果を評価した。ストレプトゾトシンで誘発した糖尿病のモデルラットに 1% STE, 5% STE 混餌食を投与、また AGEs 生成抑制の陽性コントロールとして 2%クエン酸溶液を投与し、3 ヶ月飼育した。解剖後、AGEs 構造の一つである N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine (CML)の血清濃度を LC-MS/MS で測定し、さらに耳介および下歯茎の AGEs を経皮蛍光で測定した。その結果、糖尿病罹患において上昇した血中 CML 値はクエン酸投与同様、スッポン卵の投与によって減少していることが明らかとなった。さらに耳介および下歯茎の AGEs もスッポン卵の投与によって有意に減少していることが経皮蛍光測定で明らかとなった。スッポン卵の投与によって糖尿病ラットの CML は低下したが、糖化反応の前期生成物であるグリコアルブミンは変化しなかった。CML は酸化反応で生成する AGEs であることから、スッポン卵の効果は単に血糖値を改善したのではなく、生体において酸化反応や炎症反応を改善した可能性が高い。

以上の結果から、糖尿病の罹患期間に伴って生体 AGEs の蓄積が増加することが経皮蛍光測定および LC-MS/MS で明らかとなり、さらに経皮蛍光測定は生活習慣病予防に有効な食品成分の探索を行う際に簡便かつ信頼性の高い評価系として使用できることが明らかとなった。

本研究によって開発された経皮蛍光測定装置は、非侵襲的で簡便であり、再現性も良好であるため、生活習慣病のプレ診断装置としての使用できる可能性が示された。本測定装置による診断は、増加の一途を辿る生活習慣病罹患患者に対し、「一人一人への予防への気付き」を促すことに繋がり、将来の健康寿命の増進が期待されるため、医療費の削減効果も大いに期待され、その医学的利用価値は非常に高いものと考えられる。