

東海大学大学院平成27年度博士論文

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

指導 永井竜児 准教授

東海大学大学院生物科学研究科

生物科学専攻

山中 幹宏

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

生物科学専攻

山中 幹宏

## 目次

緒論	1
第1章 糖尿病合併症の進展とともに上昇する経皮蛍光測定	
1. 簡便な AGEs 測定の必要性	6
2. 実験方法	
2-1. 腎症患者血清における蛍光スペクトルの測定	8
2-2. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) による血清中の N <sup>δ</sup> -(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1)の測定	8
2-3. 動物実験	10
2-4. 肌メラニン測定	11
2-5. 指尖測定	12
2-6. ヒト臨床試験	13
2-7. 統計解析	14
3. 実験結果	
3-1. 透析患者血清の蛍光測定結果	15
3-2. 糖尿病マウスの耳介を利用した罹病進行状態のモニタリング	19
3-3. 経皮蛍光測定に適した部位の検討	21
3-4. 指尖測定装置の開発	24
3-5. 指尖における経皮蛍光強度と糖尿病合併症の進行	25
4. 考察	29

## 第2章 スッポン卵エキスによる AGEs 生成抑制試験に関する研究

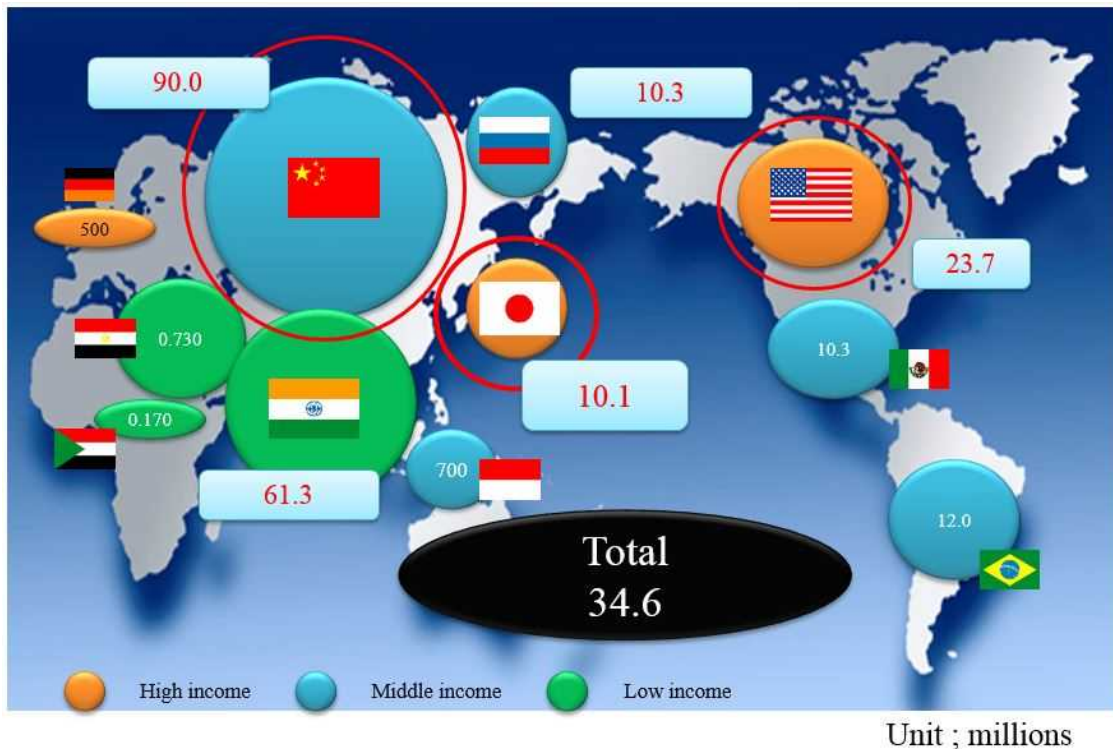
1. 機能性食品としてのスッポン卵	32
2. 実験方法	
2-1. CML について	34
2-2. スッポン卵エキス	34
2-3. 動物実験	35
2-4. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) による 血清中 CML の測定	35
2-5. 蛍光強度測定	36
2-6. 統計解析	36
3. 結果	
3-1. ラットにおける体重と血糖値の変化	37
3-2. ラット血液成分分析	38
3-3. LC-MS/MS によるラット血清中の CML 濃度測定	38
3-4. ラット耳介と歯茎 (下顎) の蛍光強度測定	40
4. 考察	41
総括	44
謝辞	45
参考文献	46

## 1. 略語一覧表

AGEs	Advanced Glycation Endproducts
DM	diabetes mellitus
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
CML	N <sup>ε</sup> -(carboxymethyl) lysine
MG-H1	N <sup>δ</sup> -(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine
STZ	Streptozotocin
STE	soft shelled turtle eggs

## 2. 緒論

近年、摂取エネルギー過剰、極端な運動不足等に原因のある生活習慣病患者が増加し、深刻な医学的、社会的問題となっており、例えば、国際糖尿病連合（IDF；International diabetes federation）が報告した糖尿病アトラス第6版2014年アップデートによると、世界での糖尿病有病者数は3億8,670万人（有病率8.3%）に上り、日本を含む西太平洋地帯にその36%が集中している。糖尿病有病数の多い国としては、第1位中国（9,629万人）、第2位インド（6,685万人）、第3位米国（2,578万人）となっており、日本は第10位（721万人）となっている。また、さらに問題なのは、糖尿病を発症している可能性が高いにもかかわらず、未受診者の数は全世界で1億7,900万人に上ることである。この数は中国で5,127万人、インドで3,550万人、米国で714万人、日本で389万人となり、先ほどの既に糖尿病と診断されている患者数と合わせると1,100万人に上る。このことは、アジア系人種は遺伝的にインシュリン分泌が低下しやすい体質を持っていることも影響している。さらに20歳以上の3人に1人以上が、俗に「隠れ糖尿病」と言われる糖尿病前症（Prediabetes）といわれており、糖尿病予備軍まで含めると、わが国の糖尿病患者数は2,000万人に上る(Fig. 1) (1)。



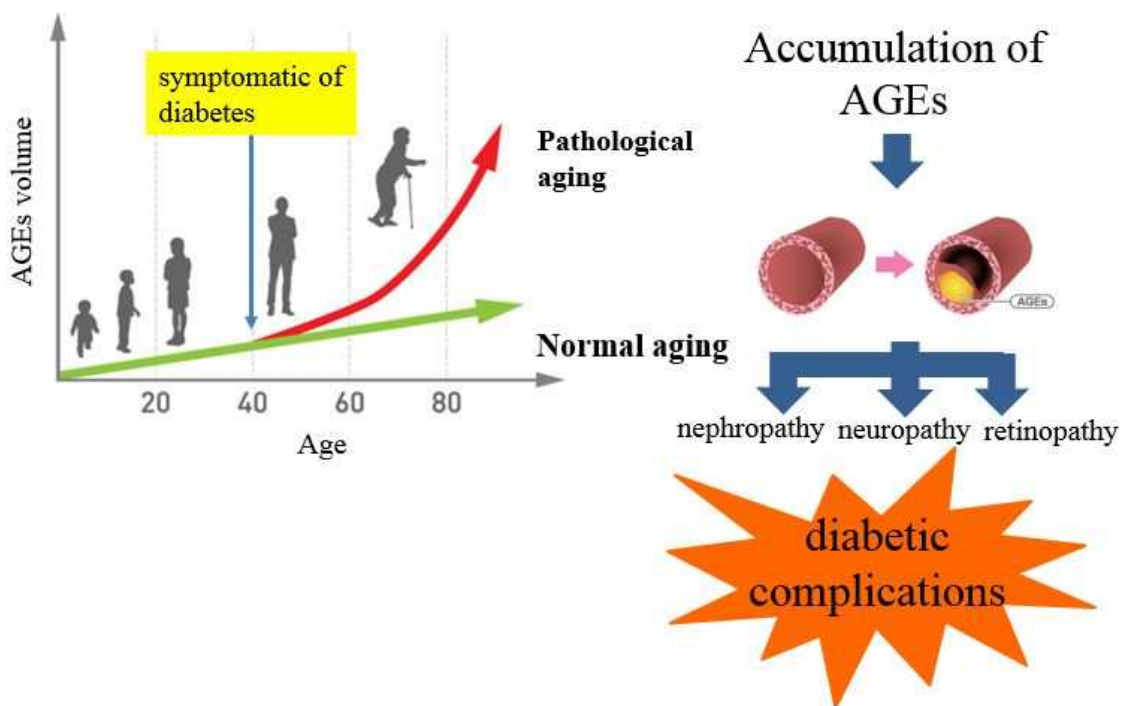
**Fig. 1. The number of diabetic patients in the world.** Number of diabetic patients runs 10.1 millions, and numbers in the 20 millions when numbers of pre-diabetes are added in Japan.

糖尿病の医療コストは、全世界で 71 兆円に上り、日本では糖尿病患者 1 人当たりの平均年間医療費は 57 万円程度、総額では 4,500 億円を超える医療費が支払われている。糖尿病の治療は、血糖をコントロールすることが全ての基本となり、食事療法、運動療法、薬物療法の 3 つがその手段となるが、基本は食事療法と、運動療法であり、薬物治療は付加的な位置づけとなる。糖尿病にかかると排尿の回数や量が多い、のどが渇く等の症状が現れるが、決定的に病気を自覚させる症状が現れず、病院等で

の検査により発覚することが殆どである。適切な治療を続けていけば、脳卒中、失明、腎臓病、足病変といった合併症の多くは予防可能であるにもかかわらず、自覚症状がないため病院等で合併症による異常な症状が診断されてからでは既に病状が進行していることが多く、完治することは難しくなる。特に、合併症は一度進展すると治療が困難なものが多く、他の生活習慣病と同様に予防が重要視されている。予防を行なうためには早期発見と治療効果判定が不可欠であり、それを目的とした糖尿病の検査が多数存在している。例えば、過去1-2ヶ月の血糖値を反映する有用なマーカーであることが知られる Hemoglobin A1c (HbA1c)は、そのレベルを7%以下に抑えることが望ましいと、日本糖尿病学会の「熊本宣言 2013」で述べられている。しかし実際は、糖尿病合併症のマーカーとはならず、自覚症状が出た時点ではすでに合併症が進行していることが多い。糖尿病の細小血管障害の3大合併症は、網膜症、腎症、神経障害であり、それぞれ、失明、腎不全、自律神経障害、神経痛などを引き起こすことが知られている。この生活習慣病を対象とした、簡単に且つ精度良く測れる予防診断ツールのマーカーとして、糖化反応後期生成物 (AGEs: Advanced Glycation Endproducts)が注目されている (2)。血中に異常な量の糖質や脂質が存在する環境下では、糖質に存在するカルボニル、または過酸化脂質から産生したカルボニル化合物がタンパク質と反応し、AGEs が生成される。本反応は発見者の名前 Louis Camille Maillard に由来してメイラード反応、あるいはタンパク質に糖が結合することから糖化(glycation)とも呼ばれる。AGEs は最終的に産生される化合物群の総称であり、現在までに生体からおおよそ40種類程度のAGEs が同定されている(3)。メイラード反応は大きく前期及び後期反応に分けられる。前期反応では、還元糖のアルデヒド基がN末端アミノ基やリジン残基のε-アミノ基と反応してシッフ塩基を形成した後、1,2-エナミノールを経てアマドリ



転位生成物を形成する(4)。これらの前期反応生成物は、酸化・脱水・縮合などの複雑な反応を経て、褐色化・蛍光・架橋形成などの物理化学的特徴や、AGEs 受容体によってリガンドとして認識されるという生物学的特徴を有する AGEs へと変化する(4)。生体内で生成された AGEs は血管壁に沈着し、免疫システムの一部を担うマクロファージに作用してタンパク質の一種であるサイトカインを放出させ、炎症を惹起することにより動脈硬化を促進させることが報告されている(5)。生体において AGEs は加齢とともに増加するが、動脈硬化や腎症等の疾病リスクに応じて、その濃度が著しく高くなる物質である (Fig. 2)。



**Fig. 2. The correlation with the accumulation of AGEs and the symptomatic state of diabetes.** AGEs accumulate in our bodies with aging and are enhanced by the pathogenesis of diabetic complications, including nephropathy, neuropathy and retinopathy.

本研究によって開発された経皮蛍光測定装置は、数十種類以上存在する AGEs の中で、特定の光を照射することにより発する自家蛍光 (Autofluorescence) の強度を利用することによって、AGEs の蓄積量を光センサにてモニタリングするものである。本原理を用いることで、採血することなく、外からの励起光で、生活習慣病との関連が報告されている組織等に蓄積した AGEs 量を非侵襲的に測定することが可能となる。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。

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言われている。AGEs は加齢に伴って蓄積し (6)、さらに DM (diabetes mellitus) 合併症 (7)、腎症 (8)、動脈硬化等 (9) で蓄積が増加することから加齢関連疾患との関与が注目されており、メイラード反応後期生成物である AGEs を抑制することによって生活習慣病を予防する食品成分の探索も行われている。第 2 章では機能性素材の抗糖化試験を通じて、経皮蛍光装置が機能性素材の探索・開発において、どのような役割を果たすことができたのかについて述べる。

## 第1章 糖尿病合併症の進行とともに上昇する経皮蛍光測定

### 1. 簡便な AGEs 測定の必要性

すでに AGEs の重要性は糖尿病分野で浸透しているが、生体における AGEs の測定は依然として困難である。Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)法により、血中の AGEs を検出することは既に報告されているが(10)、全ての AGEs 種が構造決定されている訳ではなく、各種夾雑物の中で「如何なる AGEs 構造」を「どのような手法」で測定したかが問題となる。例えば AGEs の一種であるペントシジンを利用した体外診断用薬ペントシジンキットにおける血漿中の参考正常範囲は 9.15~43.1 (ng/mL)である。このような測定対象物質の存在濃度の低さは、患者の臨床背景データ（ペントシジン値が顕著に上昇する腎症を罹患している場合、ペントシジン値では糖尿病合併症の判断ができない等）にも大きく影響を及ぼし、正確な診断ツールにならないことは自明である。なお、本医薬品を用いてカットオフ値 0.35 ng/mL で判断した場合、健常者を初期腎症として診断する率は 13.2%である。市販されている ELISA kit の検量線カーブを確認しても、低濃度から高濃度までの直線性の高い検量線を示しているキットは殆どなく、ELISA 法における検出精度の誤差はかなり大きいものと予想される。また、臨床検査会社が行っている加熱を伴う血清/血漿中 AGEs の測定では、N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine (CML) (10)やペントシジン(11)などの AGEs が人工的に生成し、過剰に見積もられる問題も指摘されている。このような極微量の AGEs 濃度を測定するためには質量分析装置を用いた AGEs の絶対定量が欠かせないが、装置が高価、熟練した測定者が必要、ランニングコストが高いといった問題から、糖尿病合併症などの進行度合いを「見える化」する目的に対しては、誰でも「簡便・迅速」に疾患リスクの可能性を手軽に評価できれば、上述した以上にその存在価値が高まることにな

る。経皮蛍光を用いた AGEs 測定装置は Meerwaldt (12, 13)らによってすでに開発されている。しかしながら、前腕を測定部位に用いる彼らの手法では特に有色人種に多く含まれるメラニン量（肌の色）、または測定部位およびその周辺を走向している血管の有無により、測定値が大きく影響を受け、再現性の高いデータが得にくいという問題がある。さらに本装置は元々オランダで開発され白人での測定をベースにしているため、皮膚の色が大きく異なるアジア人での糖尿病診断においては制限がある。また測定部位が前腕であり、測定部位を再現性良く測ることは困難である。

そこで本章では、まず、装置の測定対象とする蛍光物質の波長選定、動物実験による経皮蛍光強度と病態との相関確認、ヒト皮膚での自家蛍光測定の課題解決と、臨床研究におけるその応用確認を行い、AGEs の蓄積と伴に増加する経皮蛍光強度測定技術が、糖尿病合併症等の予測に利用できることを説明する。

## 2. 実験方法

### 2-1. 腎症患者血清における蛍光スペクトルの測定

腎機能障害患者の血清中には AGEs が多く含まれていることが以前より知られている (14, 15)。皮膚における蛍光物質の含量は極めて低く、蛍光物質測定の波長選定には不向きであると考え、透析患者の血清に着目して蛍光スペクトルの分析を行った。8 名(平均年齢  $61.9 \pm 10.5$  歳, 男/女:3/5) の透析患者の血清を福岡大学附属病院から提供頂き、最適励起波長とその際に得られる蛍光スペクトルの波長を確認した。被験者サンプルのうち 2 人は慢性腎疾患(CKD; chronic kidney disease)のステージ 3、もう 1 人はステージ 5 であり、透析治療を受けている。血液サンプルは一晩絶食後のものを集め、血液細胞から分画された血清を  $-80^{\circ}\text{C}$  で実験に利用するまで保管した (東海大学倫理承認番号 14035)。

各血清サンプルから  $100 \mu\text{l}$  を蛍光分光光度計 FL-4500 (日立、日本) にて励起光と蛍光をそれぞれ独立して  $2,400 \text{ nm/min.}$  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。詳細な蛍光スペクトルの取得には  $240 \text{ nm/min.}$  の走査速度を利用した。

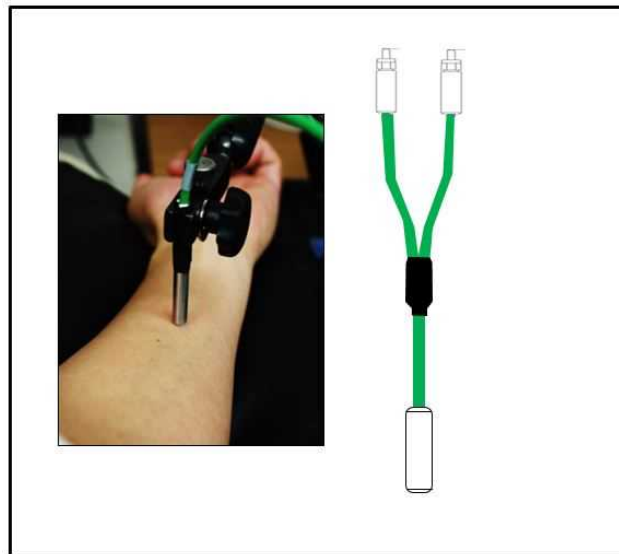
### 2-2. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) による血清中の $\text{N}^{\delta}$ -(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1) の測定

血清  $50 \mu\text{l}$  に等量の蒸留水を加えて 1/2 に希釈し、分子量 3000 カットフィルターである VIVASPIN 500 (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) を用いて濾過し、濾液 (約  $50 \mu\text{l}$ ) を回収してサンプルとして用いた。サンプルに等量の  $200 \text{ mM}$  sodium borate buffer (pH 9.1) (終濃度:  $100 \text{ mM}$ ) および 1/10 量の  $2 \text{ M}$   $\text{NaBH}_4$  溶液 (終濃

度：200 mM) を添加し、室温で4時間の還元処理を行った。還元処理後、MG-H1 の内部標準である $[^2\text{H}_2]$  MG-H1 (PolyPeptide Laboratories, Strasbourg, France) および L-lysine の内部標準である $[^{13}\text{C}_6]$  L-lysine (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA, USA) を 10 pmol 添加し、蒸留水 (800  $\mu\text{l}$ ) を加えた。内部標準を添加したサンプルは陽イオン交換カラム Strata X-C (Phenomenex, Torrance, CA, USA) を用い、2%ギ酸 (3 ml) で洗浄し、7%アンモニア液 (3 ml) で溶出した。得られた溶出面分を乾固し、0.1%ギ酸を含む20%アセトニトリルで溶解後、0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過し、LC-MS/MS 用の低吸着バイアルに入れ、測定を行った。LC-MS/MS は東海大学農学部所有する装置を用いた。本装置は、MS/MS 部に高感度定量分析用トリプル四重極質量分析計 TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を採用し、インターフェースには ESI プローブを用い、ポジティブモードで検出した。LC 部には Accela Pump、オートサンプラーは Thermo PAL (Thermo Scientific) を採用し、Xcalibur ver 2.0 を用いて各装置の制御および解析を行った。LC 部のカラムには ZIC®-HILIC 150 x 2.1 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を採用し、移動相を 0.1%ギ酸水溶液および 0.1%ギ酸アセトニトリルによるグラジュエントとして流速 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  で検出を行った。検出は多重反応モニタリングを用いた。各構造の溶出時間は、MG-H1 および $[^2\text{H}_2]$  MG-H1 は約 12 分、Lysine および $[^{13}\text{C}_6]$  Lysine は約 13 分であった。MG-H1 および $[^2\text{H}_2]$  MG-H1 の検出のために使用した親イオンはそれぞれ 229 (m/z) および 232 (m/z) であり、これらの親イオンから得たフラグメントイオン 114 (m/z)、117 (m/z) をそれぞれ検出し、解析を行った。L-lysine および $[^{13}\text{C}_6]$  L-lysine の親イオンはそれぞれ 147 (m/z) および 153 (m/z) であり、これらの親イオンから得たフラグメントイオン 84 (m/z)、89 (m/z) をそれぞれ検出し、解析を行った。

### 2-3. 動物実験

膵臓のランゲルハンス島の  $\beta$  細胞を特異的に破壊してインスリンの分泌を停止させる薬物である Streptozotocin (STZ: シグマ - アルドリッチジャパン製) をマウス及びラットに注射して、1 型糖尿病モデル動物を作製した。5 週齢の雄マウス(ddy; 体重 $\sim$ 20 g)は日本エスエルシー株式会社より購入した。糖尿病は STZ を 0.05M のクエン酸緩衝液(pH 4.5)で 150 mg/kg-body weight (200  $\mu$ L/匹) で腹腔注射することにより作製した。同じ飼育期間のコントロールマウスは、STZ を含まないクエン酸緩衝液のみを腹腔注射することによって準備した。マウスは感染防止設備の中で、12 時間毎の昼夜サイクル、温度 25 $^{\circ}$ C で飼育され、マウス専用の AIN-93M 固形食 (クレア社製) を給餌した。マウスの体内に蓄積する AGEs は耳介を測定場所とした経皮蛍光強度の測定で評価した。測定装置は、光源として 365 nm の LED ; light emitting diode 光源、2048 ピクセルからなるリニア CCD ; charge - coupled device センサとバンドル型同軸石英製 Y 型フレキシブルなポリエチレンでコートされたファイバースコープからなる。測定部位はおおよそ直径 0.38 mm の領域となる。ファイバーは 2 つのコアからなり、LED 光源の光を伝えるプローブと、励起されて蛍光を発した光をセンサに伝えるためのそれぞれが直径 0.6 mm のファイバーを束ねた構造を取っている(Fig.3)。動物実験については、日本女子大の動物実験倫理規定に従って実施した (許可番号 II 09-10)。



**Fig. 3. The structure of the fiber-type sensor**

#### 2-4. 肌メラニン測定

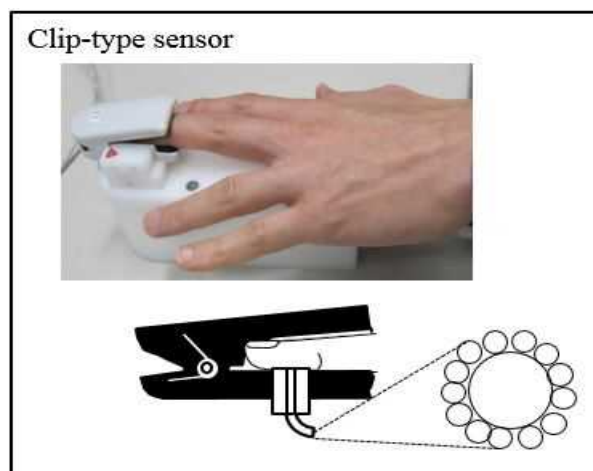
肌のメラニン量を測るためにメグザメータ (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) を用いた。被験者は 49 名 (平均年齢  $46.6 \pm 9.1$  歳, 男/女:26/23) の健常者からなるボランティア試験を行った (総合医科学研究所試験番号 SRDB)。メラニンインデックスは各ボランティアにおいて左右の前腕 2 点ずつ、計 4 点測定した。経皮蛍光測定は、メラニンを測定した全く同じ位置に、第 1 章 2-3 で述べたプローブをセットして測定した。被験者は、試験実施責任機関に登録しているボランティアの中から、本試験の被験者となることを自発的に志願し、試験責任医師により本試験参加に相当と判断された者で、本試験の内容について十分な説明を受け、文書により本試験参加の同意をした、20 歳以上 65 歳以下の成人男女 54 名とした。試験の実施に際しては、千里中央駅前クリニック倫理審査委員会 (IRB) の承認のもとに行われ、ヘルシ



ンキ宣言（1964 採択,'75,'83,'89,'96, 2000 修正、2002 年、2004 年注釈追加）の主旨に従い実施した。試験実施期間は 2011 年 1 月 15 日、22 日、29 日の 3 日間で行った。

## 2-5. 指尖測定

肌メラニンの無い場所で経皮蛍光を測定するために、海外でも酸素飽和度計( $SpO_2$ 計)で測定に用いられている指尖を選択し、再現性良く経皮蛍光強度が測定できるセンサを準備した。測定中の微妙な体動を避けるために、5.5~6.0 Nの力を指にかけられるようにクリップ構造を開発した。利き手と利き手ではない各3本ずつ、第2指（人差し指）、第3指（中指）、第4指（薬指）を測定し、SDの最も低い指を選択することとした。経皮蛍光測定ユニットは先述のY型光ファイバー構造で、蛍光を受光するファイバー径は0.6 mmと同一であるが、そのファイバーの円周上に、0.19 mm径の励起光を伝える13本の光ファイバーが取り囲む形でレイアウトしたものを用了（Fig. 4）。



**Fig. 4. The structure of the clip-type sensor**

## 2-6. ヒト臨床試験

合計 168 名（82 名の 2 型糖尿病患者、86 名の 2 型糖尿病を発症していない患者）の被験者は熊本大学医学部附属病院にて募られた方々である。2 型糖尿病の診断は the World Health Organization criteria (16)に沿って行われ、今回 1 型糖尿病患者は除外された。重篤な肝疾患、悪性腫瘍、急性、慢性胃炎、炎症性疾患患者も除外された。本臨床試験は熊本大学倫理規定番号 1737 に準拠され、全てインフォームドコンセントが得られた後に行われた。各血液サンプルは一晩絶食後の早朝に採取され、空腹時血糖 (FPG)、糖化ヘモグロビン(HbA1c)、血清全コレステロール (TC)、中性脂肪(TG)、HDL コレステロール(HDL) cholesterol は通常の方法で測定された。LDL コレステロール (LDL) は Friedewald の式(17)を用いた。HbA1c (%) は NGSP ; National Glycohemoglobin Standardization Progamequivalent (%)の値 計算式 ;  $HbA1c (\%) = 1.02 \times HbA1c [Japan Diabetes Society (JDS)] (\%) + 0.25\%$ を用いた (18)。糖尿病性網膜症は眼科医が評価し、グレードは国際基準である International Clinical Classification of Diabetic Retinopathy(19)に準拠した。糖尿病腎症はアルブミン/クレアチニン比が  $\geq 30 \text{ mg/g}$  となる微量アルブミン尿測定により決定した(20) 糖尿病性神経障害は糖尿病神経障害研究グループの診断基準を用いた(21)（下肢や足の自覚症状、アキレス腱反射減弱や消失、両側内踵の振動覚低下）。現在の細小血管合併症の診断は微量アルブミン尿、神経障害、網膜症の判断基準を用いて決定されている。他被験者の臨床データとしては、年齢、性別、Body Mass Index (BMI)、血圧を取得した。

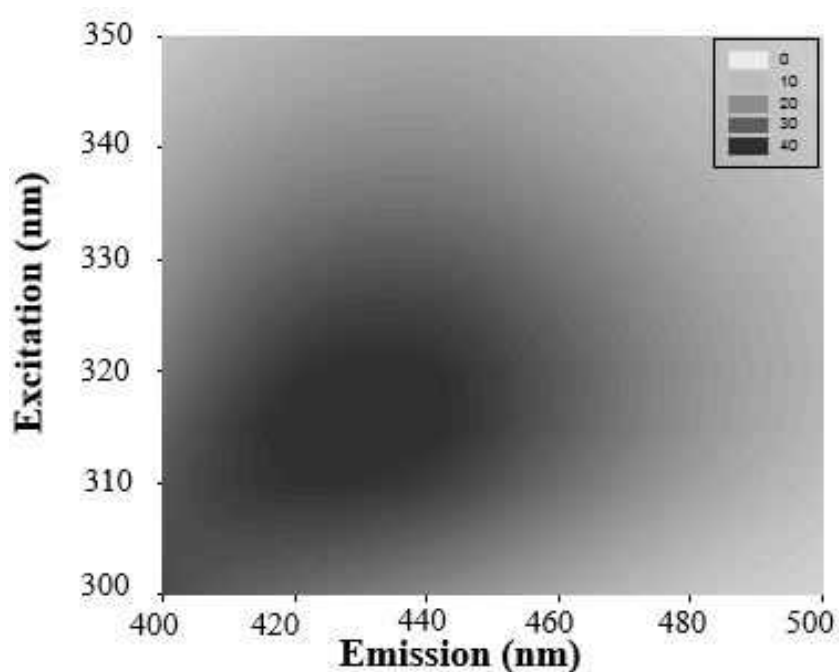
## 2-7. 統計分析

統計分析には SPSS ソフトウェアバージョン 20 (SPSS 社、米国)により、Mann-Whitney U test、chi-square test、Student's *t*-test を用いた。P 値は<0.05 有意水準とした。

### 3. 実験結果

#### 3-1. 透析患者血清の蛍光測定結果

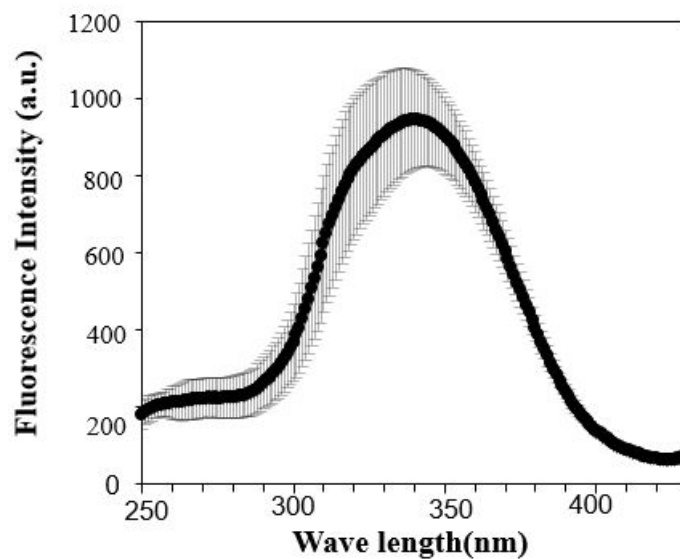
腎症患者の血清100  $\mu$ lを用いて、励起光と蛍光をそれぞれ独立して2400 nm/minの速度で走査することで、等高線様の励起波長と蛍光波長の相関図を確認した。その結果、腎症患者の血清では、励起波長 310~340 nm 蛍光波長 420~450 nmの範囲で蛍光強度が最も強いことが確認された (Fig. 5)。



**Fig. 5. Fluorescence measurement of human sera.** To detect fluorophores in physiological samples, the maximum excitation and emission wavelengths of human serum were measured by a fluorometric detector.

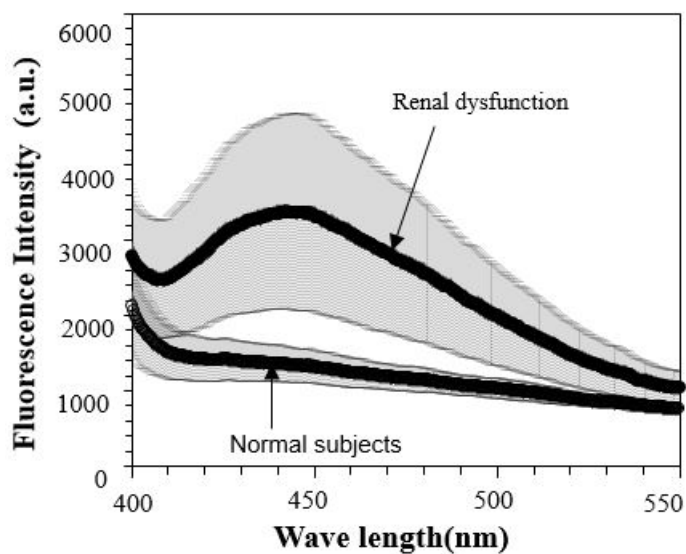
さらに、Fig. 5. で得られた結果をより詳細に解析するために、検出器の位置を 440 nm に固定して、励起光を 200~600 nm まで 240 nm/min の条件で走査し、最適励起波

長を確認した。その結果、440 nm の蛍光を得るための最適励起波長は 340 nm であることが確認された (Fig. 6)。



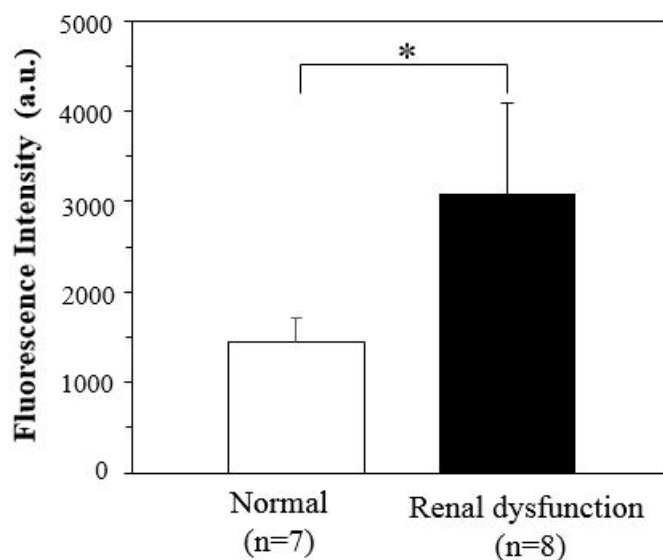
**Fig. 6. The optimization of the excitation wavelength.** To clarify the maximum wavelength for excitation, fluorescent properties in the sera of patients (n = 8) with renal dysfunction were measured. To acquire the optimum excitation wavelength, the detection position was fixed at 440nm and surveyed the excitation wavelength. Data are presented as the means  $\pm$  SD. Average 946.333, SD; 128.139.

健常者（被験者数7名）と透析患者（被験者数8名）の血清について、その平均蛍光スペクトルを確認した結果、透析患者では蛍光強度が有意に高いことが確認された（Fig. 7）。



**Fig. 7. The comparison of a fluorescence intensity of the normal subjects and nephropathy subjects.** Both groups showed fluorescent spectra with an excitation maximum at 340 nm and emission maximum at 440 nm. Data are presented as the means  $\pm$  SD. (Normal / Average 1366.430, SD; 253.242, Nephropathy subjects / Average 3385.500, SD; 1284.490)

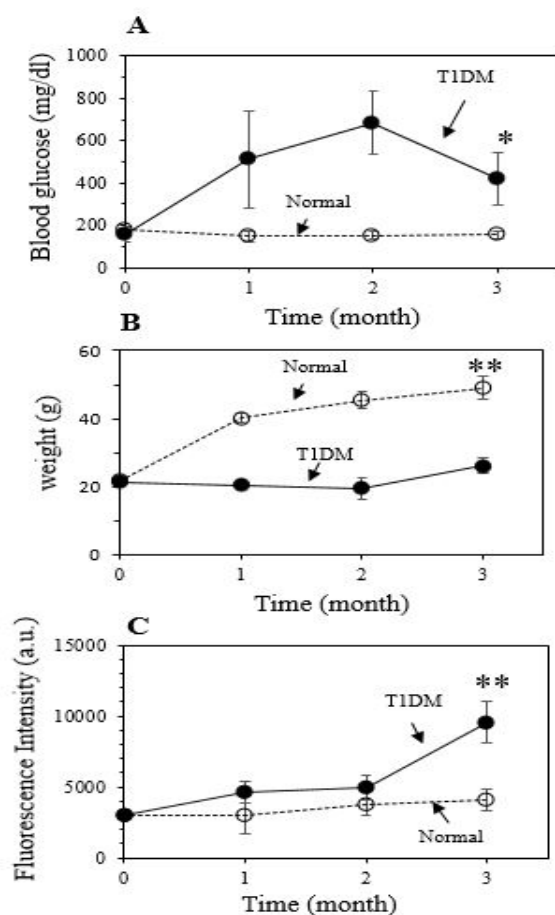
健常者（被験者数7名）と腎症患者（被験者数8名）の血清から得られた最大蛍光スペクトルの平均値は健常者で1442.14(a.u.; arbitrary unit, SD ; standard deviation 276.37)、腎症患者で3084.57(a.u. SD ; 1007.86)であり、両者の有意差検定結果は $p < 0.01$ であった (Fig. 8)。



**Fig. 8. The comparison of a fluorescence intensity of the normal subjects and nephropathy subjects.** The fluorescent intensities by excitation at 340 nm and emission at 440 nm were compared. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.01$  vs. normal subjects.

### 3-2. 糖尿病マウスの耳介を利用した罹病進行状態のモニタリング

非侵襲的に糖尿病マウス（8匹）とノーマル群（6匹）の血糖値、体重と耳介を用いた蛍光強度の経時変化を確認した結果、個体が高血糖状態に一定期間曝された後で蛍光強度が急激に上昇する様子が確認された（Fig. 9）。



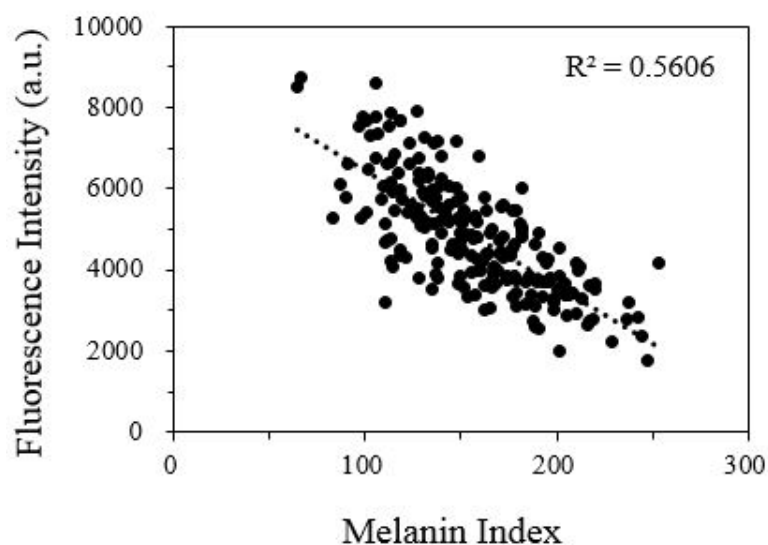
**Fig. 9. Change in the blood glucose, body weight and auricle fluorescence intensities in diabetic mice.** Diabetes was induced in mice by streptozotocin and changes in the blood glucose (A), body weight (B) and fluorescence intensities on the auricle (C) of normal mice (n=8, open circle) and diabetic mice (n=8, closed circle) were measured. Data are presented as the means  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$  vs. normal mice.



血糖値レベルは1型糖尿病の進行とともに上昇した (Fig. 9. -A) 。1型糖尿病マウスの体重は3か月後も殆ど増減がないのに対し、ノーマル群の体重は時間に依存して増加した (Fig. 9. -B) 。耳介で測定された経皮蛍光強度は、罹病期間を経て3か月後急激に増加した (Fig. 9. -C ノーマル群と糖尿病群での経皮蛍光強度の有意差検定  $p < 0.01$ ) 。

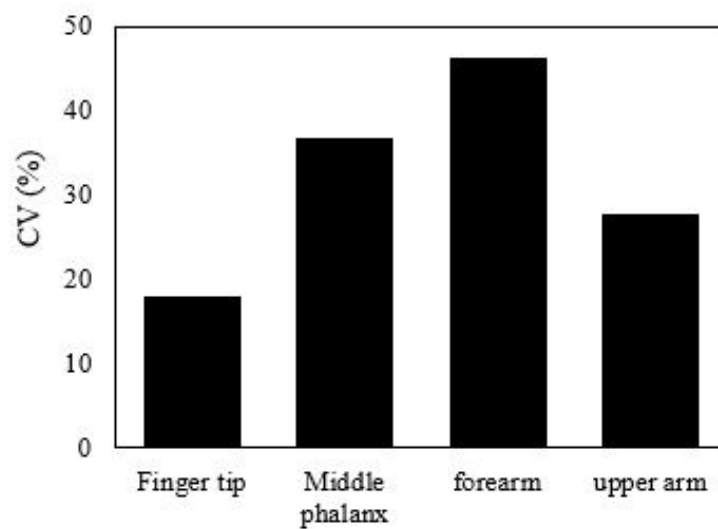
### 3-3. 経皮蛍光測定に適した部位の検討

メラニンやヘモグロビンの様な皮膚に存在する色素は、励起光の侵入を阻害するため、メラニン量と経皮蛍光強度は強い負の相関を持ち、メラニンインデックスが大きくなると、経皮蛍光強度が低下した (Fig. 10)。



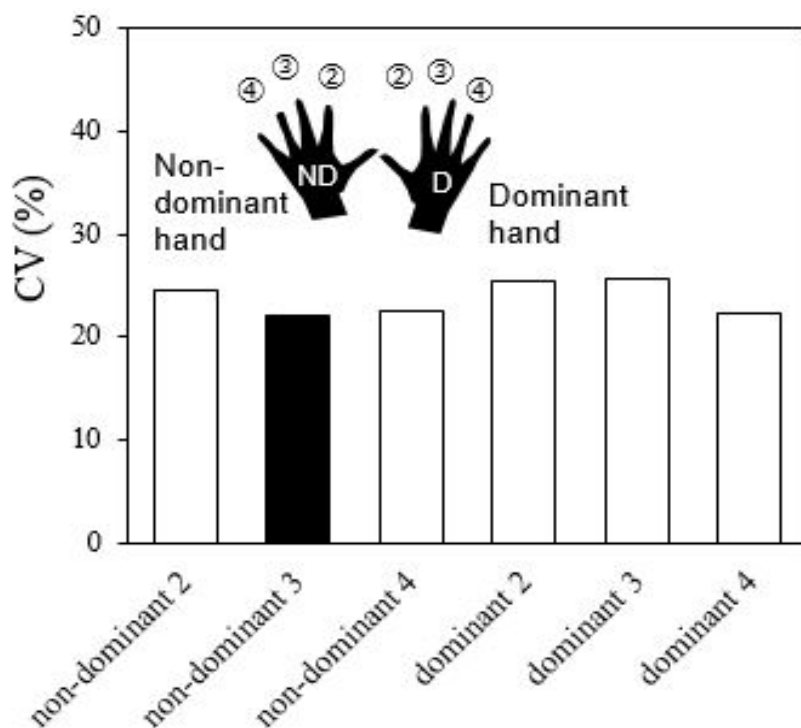
**Fig. 10. The comparison between melanin contents of the forearm and the fluorescence intensity of same positions.** The melanin content of the forearm was compared with the fluorescence intensities (n=49) (A). The fluorescence intensities of the forearm decreased with increasing melanin index (MI), strongly demonstrating that the measurement of skin fluorescence intensities is significantly affected by melanin contents in control subjects.

容易に測定可能な体の各部位として、指尖、中節、前腕、上腕を選択し、各部位での測定ばらつきを確認した (Fig. 11)。その結果、指尖において個体差ばらつきが最も小さく、他の部位では指尖のばらつきに対して、1.6~2.6 倍ほど大きな値を示した。



**Fig. 11. The comparison of the fluorescence intensity among several regions.** The fluorescence intensities of several regions such as the fingertip, middle phalanx, forearm and upper arm were evaluated to clarify which regions show low accidental error. The noise of the fluorescence intensity in several regions such as the fingertip, middle phalanx, forearm and upper arm (n=11) were evaluated.

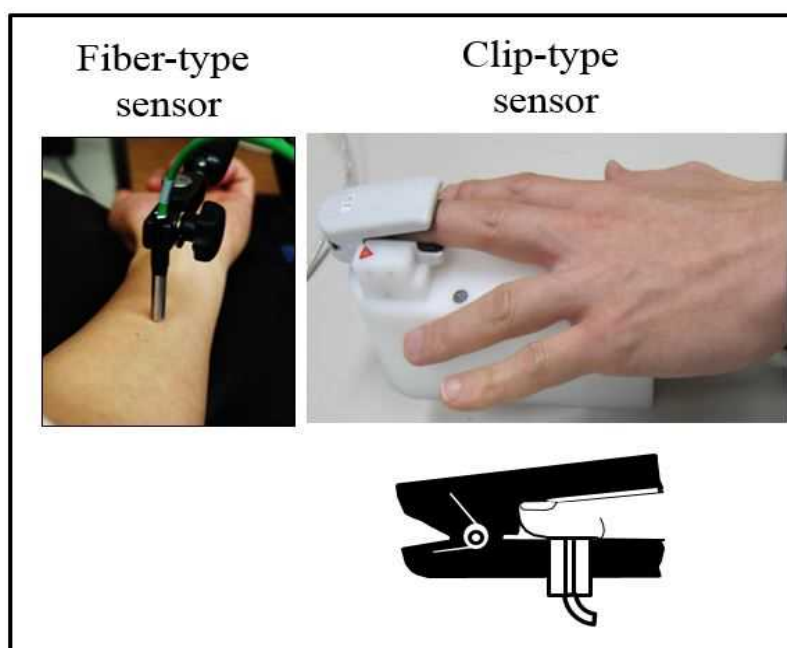
指尖での測定に優位性が見い出せたため、2型糖尿病ではない被験者（平均年齢  $53.9 \pm 17.1$ 、男性 30 名、女性 56 名、平均 BMI:  $23.2 \pm 4.5$ ）の利き手と利き手ではないそれぞれ 3 本ずつ、第 2~4 指の経皮蛍光強度を測定し、その全個体における測定誤差を確認した。その結果、利き手と反対の中指の測定誤差が最もばらつきが小さいことが確認された(Fig. 12)。



**Fig. 12. The standard deviation of the fingertip fluorescence intensity on the six fingers.** The fluorescence intensity were measured by the clip-type sensor. Because the thickness of the skin fingertip is altered by its frequency of use, the hands were divided by the dominant vs. non-dominant side, and the fluorescence intensities of the fingertips on the index finger, middle finger and annular finger was measured by the clip-type sensor.

### 3-4. 指尖測定装置の開発

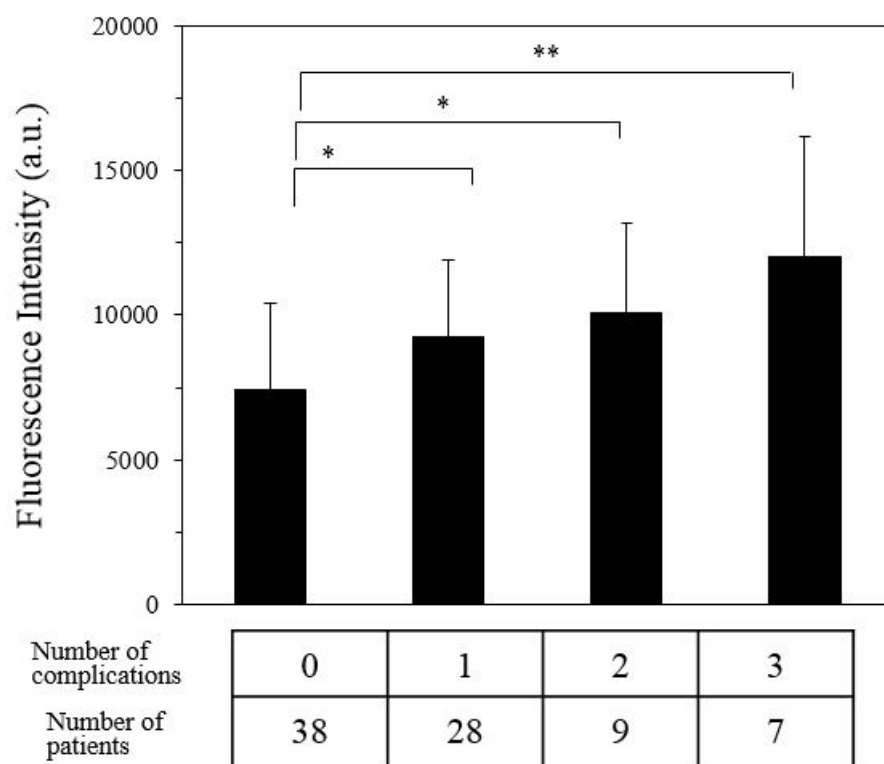
指尖で経皮蛍光を安定的に測定するために、従来のプローブタイプのセンサを改良し、指尖が安定して測れる経皮蛍光測定装置を作製した (Fig. 13)。プローブタイプのセンサは色々な個所が測れる、動物実験に応用できるといったメリットはあるが、ヒト臨床実験においては、測定安定性、簡便性を第一に考え、指尖測定に特化し、5.5～6.0 Nの力を指にかけられるように、クリップ構造を開発した。



**Fig. 13. The comparison with structures two type sensors.** The fluorescence intensity in the human fingertip was measured by the clip-type sensor because the fingertip is one of the less melanin-containing regions in our body and the clip makes it possible to clamp the fingertip with the same pressure.

### 3-5. 指尖における経皮蛍光強度と糖尿病合併症の進行

利き手と反対の中指で測定された経皮蛍光強度を用いて、糖尿病合併症の進行との相関を確認した (Fig. 14)。被験者は2型糖尿病患者82名 (平均年齢 64.9±11.1, 男性39名、女性43名, 平均BMI: 25.5±11.1) で、経皮蛍光強度は合併症の保有数の増加に伴って有意に増加した (被験者情報は Table 1. に記載)。



**Fig. 14. Relationship between the fingertip fluorescence intensities and numbers of diabetic complications.** The fluorescence intensity of the fingertip in patients with diabetes was measured and compared with their number of diabetic complications. Data are presented as the means ± SD. \*, P < 0.05, \*\*, P < 0.01 vs. subjects without type 2 diabetes.

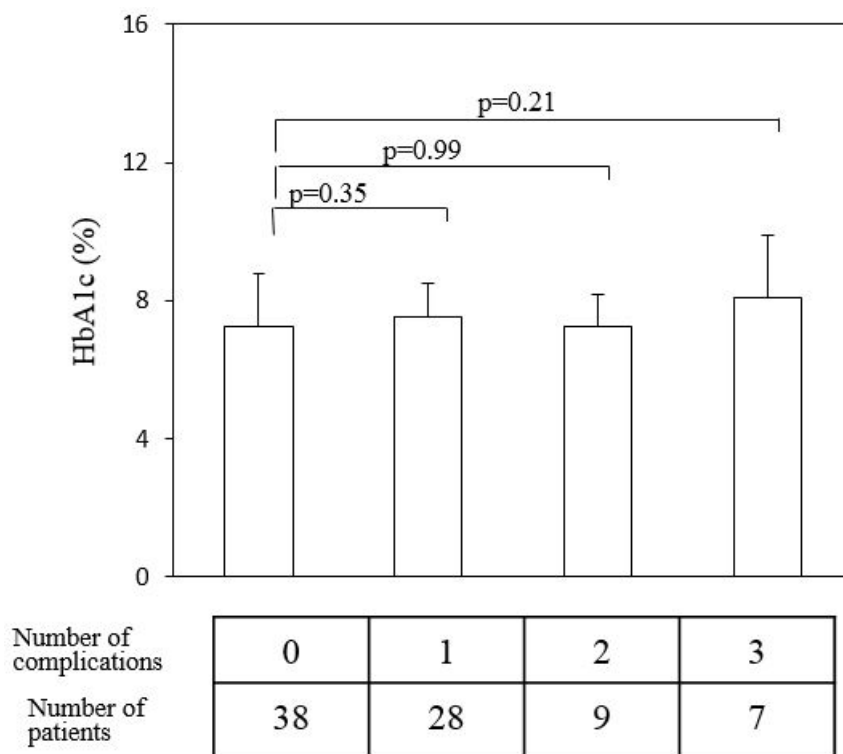
**Table 1. Characteristics of subject (n = 82)**

Age (years)	64.9 ± 11.1
Sex (% female)	52.4
Duration of diabetes (years)	12.2 ± 10.9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.5 ± 11.4
SBP (mmHg)	131.2 ± 16.0
DBP (mmHg)	75.1 ± 10.1
FPG (mmol/l)	7.02 ± 1.72
HbA1c (%)	7.42 ± 1.34
TC (mmol/l)	4.77 ± 0.95
TG (mmol/l)	1.54 ± 0.72
HDL cholesterol (mmol/l)	1.39 ± 0.34
LDL cholesterol (mmol/l)	2.67 ± 0.86
non-HDL cholesterol (mmol/l)	3.40 ± 0.96
hs-CRP (mg/l)	0.31 ± 1.13
ACR (mg/g)	171.6 ± 737.5
Hypertension (%)	64.6
Hyperlipidemia (%)	76.8
Diabetic microangiopathy (%)	
Retinopathy	19.5
Neuropathy	20.7
Nephropathy	41.5
Diabetes medication (%)	
Oral hypoglycemic agents	65.9
Insulin	8.5
Oral hypoglycemic agents + insulin	8.5
Statins (%)	56.1
ARBs and/or ACEIs (%)	53.7
CCBs (%)	48.8
Ant-platelet agents (%)	30.5

Data are means ± SD.

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; FPG, fasting plasma glucose; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; hs-CRP, high sensitive C-reactive protein; ACR, urinary albumin-creatinin ratio; ARBs, angiotensin II receptor blockers; ACEIs, angiotensin converting enzymes; CCBs, calcium channel blockers

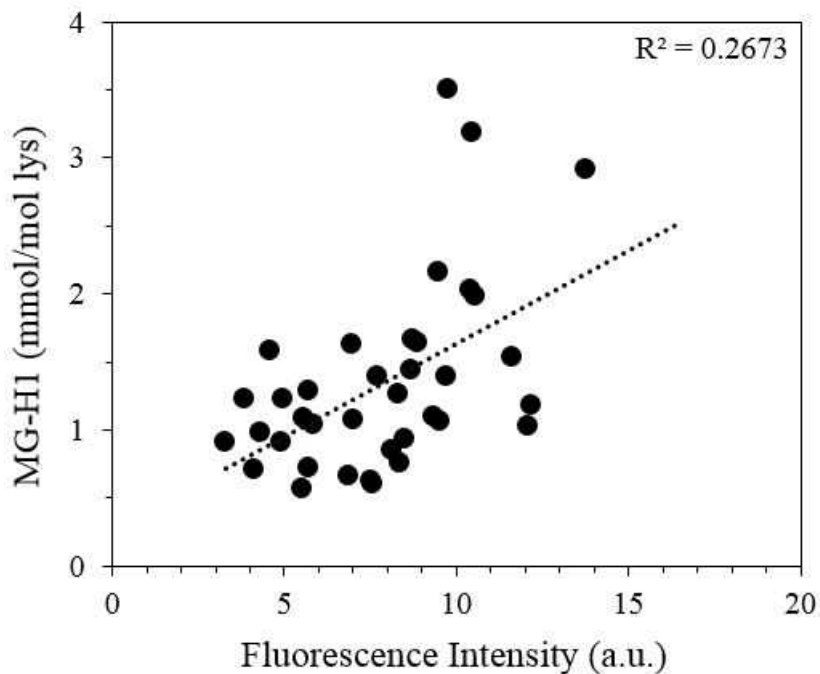
合併症の進行とHbA1cとの相関を確認した結果、経皮蛍光強度が糖尿病合併症の保有数の増加に伴って増加していく一方で、HbA1cは合併症の増加で有意な変化は認められなかった (Fig. 15)。



**Fig. 15. Relationship between HbA1c values and numbers of diabetic complications.** The HbA1c value in patients with diabetes was measured and compared with their number of diabetic complications.



LC-MS/MS を用いて測定された血清 MG-H1 濃度と、同一被験者の指尖経皮蛍光濃度との相関を確認したところ、両者に相関関係が認められた (Fig. 16.)。



**Fig. 16. Relationship between the fluorescence intensity of the fingertip serum and MG-H1 levels.** Sera were obtained from the same subjects and the MG-H1 levels in the sera were measured by LC-MS/MS as described in the materials and methods. The MG-H1 level correlated with the fingertip fluorescence intensity.

#### 4. 考察

免疫化学的な手法によって、AGEs がアテローム性動脈硬化症(22)や糖尿病合併症(23)のような加齢関連疾患で蓄積が確認されているが、血液や尿など臨床検体中のAGEs を測定するには、複雑かつ時間のかかる前処理が必要とされるため、HbA1c とは異なり臨床でAGEs が診断目的に測定されるケースは希である。Meerwaldt (12, 13) からは、経皮蛍光を利用してAGEs 蓄積を測定した結果、糖尿病患者の経皮蛍光強度が健常者に比べて高いことを報告している。しかし蛍光を用いた皮膚AGEs の測定には、依然として3つの解決すべき課題が残っている。第1に経皮蛍光強度は、皮膚に存在するメラニンやヘモグロビンといった色素により影響を受け、測定が困難になる点である。その結果、人種の違いや、日焼けなどの生活習慣による肌の色の変化は、経皮蛍光を測定するうえで測定値を大きく左右することになる。Fig. 10 で示した通り、Meerwaldt (9, 10)らが測定している上腕からの経皮蛍光強度は、メラニンの含有量と強い負の相関を示した。本結果から、経皮蛍光測定を行う上でメラニン含有量が殆どなく、言い換えると人種、性別、年齢、季節変動における日光暴露条件においても、ほとんど差のない測定部位である指尖のメリットが明確になる。このため、Fig. 11 で確認したとおり、指尖が上腕、前腕に比べて、経皮蛍光強度の測定ばらつきが低く抑えられた結果につながったものと思われる。第2の理由は測定部位における血管の走向である。指尖には、上腕で確認されるような静脈の走向は認められず、無数の毛細血管が支配的に存在している部位でもある。これまでの研究では、近赤外線カメラを用いて可視化した血管の存在部位と、そうでない部位での経皮蛍光強度の差は1.5～1.6倍あることを確認している（未報告測定結果）。本結果はヒト以外のマウス皮膚を採取して、直接、血管存在部位と非存在部位からの経皮蛍光強度を確認した実験に

においても再現性が得られている。このように、指尖測定においては、毛細血管からの平均的な情報が得られることで、測定誤差が低く抑えられる利点がある。第3の理由は、指尖の場合、5.5-6.0 N で一定の強さに規定されたクリップ構造を利用することで、測定部位を容易に且つ正確に決定でき、5秒以内の迅速な測定が可能な点である。測定部位を固定する方法は上腕でも可能ではあるが、測定システムが大がかりになってしまい現実的ではない。指尖の皮膚は、その使用条件により厚さが異なることが予想される。つまり、利き手と利き手ではない手の指尖においては、その使用頻度に依存して、皮膚の厚さが異なってくる。そのため、利き手と反対の指尖を測定に利用することで、測定ばらつきをさらに抑え込む狙いがある。利き手と反対の第3指（中指）は、手のひらの構造上、回転中心対称の位置にあり、手のひらを装置に置くことで自然と測定部位が固定され、測定ばらつきが最も低く算出されたものと思われる。これらの利点を総合的に判断して、指尖での測定では上腕での経皮蛍光強度の測定手法に対するアドバンテージが明確になったものとする。

Fig. 14, 15 で示した通り、糖尿病合併症の保有数の増加に伴って、指尖からの経皮蛍光強度は有意に増加するが、HbA1c のレベルは変化がなかった。HbA1c は過去 1-2 ヶ月の血糖値を反映するが、糖尿病合併症発症との関連は認められなかったことから（Fig. 15）、メイラード反応の前期のみでは合併症との関連は説明できず、後期生成物が合併症の診断に重要であることが示された（Fig. 14）。HbA1c はメイラード反応の中間体であり、存在が不安定で、また血液クリアランスによる変動の影響を大きく受けるため、長期間の安定性を必要とする合併症マーカーとしては、不十分であることが予想される。ここに、AGEs を糖尿病合併症の診断マーカーのターゲットとして、迅速に測定する必要性が明確となった。さらに、指尖の経皮蛍光強度は糖代謝異

常により生成される AGEs 種の一つである血清の MG-H1 レベルとも相関した。またデータには示さないが、同じく糖代謝異常で生成される本結果は、指尖での経皮蛍光強度が AGEs の蓄積を示していることにも繋がる (Fig. 14)。その原因として、AGEs は比較的安定な化学物質として蓄積するため、HbA1c と比較して、糖尿病合併症の数の増加と有意な正の相関関係が確認されたものと考えられる。以上より、本研究によって、指尖の経皮蛍光強度が糖尿病細小血管合併症の診断に有益な測定方法であることが実証された。

結論として、本研究は初期診断分野における非侵襲性且つ簡便な健康状態モニタリング技術の応用面で重要な役割を示すこと、さらには生活習慣病予防に向けた有望な将来性のあるスクリーニング技術として窺知されるものである (Fig. 17)。

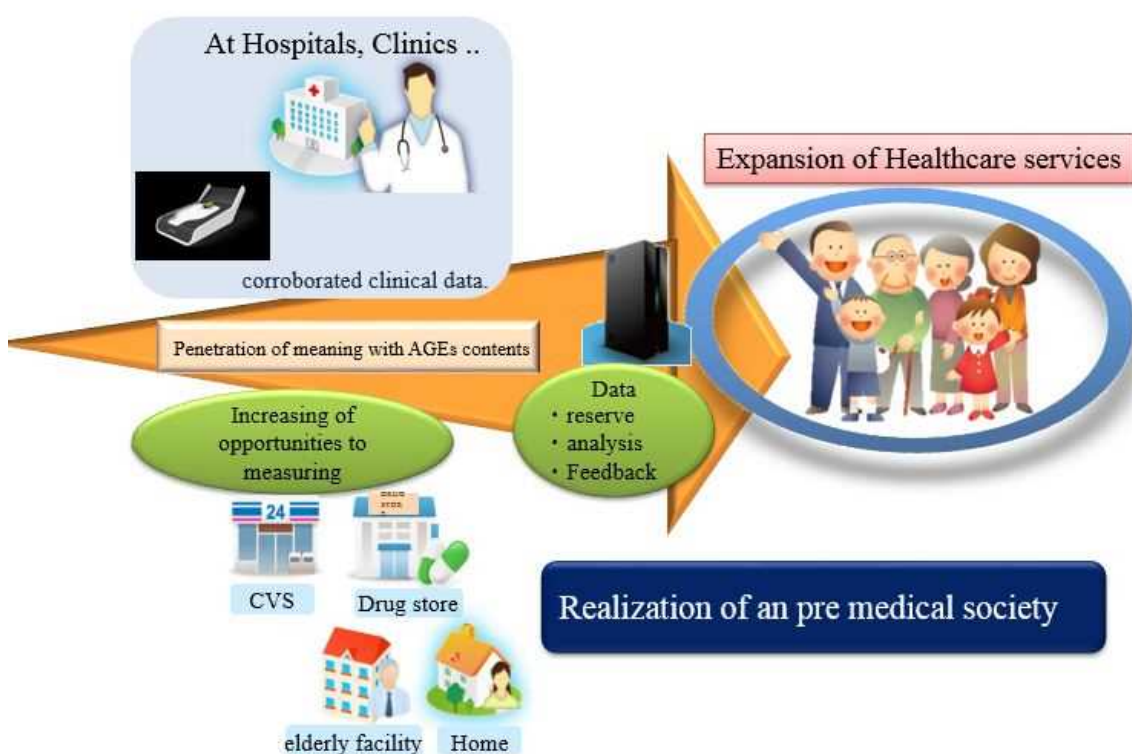


Fig. 17. An image of the pre medical society caused by non-invasive AGEs measurements.

## 第2章 スッポン卵エキスによる AGEs 生成抑制試験に関する研究

### 1. 機能性食品としてのスッポン卵

AGEs を迅速に、且つ正確に評価できる技術が確立すると、抗糖化サプリメントの臨床的な効果についての評価が短時間で行えることになる。このことは、産業界において、開発時間の短縮につながるため、開発費も抑制され、ひいては企業競争力の向上に繋がる。

スッポン卵(soft shelled turtle eggs: STE)は滋養強壮や生活習慣病予防に古来より民間薬として用いられてきたが、その科学的根拠は乏しい。本章では、STE の生体への効果を検証する目的で、糖尿病ラットに STE エキスを投与し、生活習慣病の進展で蓄積が増加することが知られる AGEs に対する抑制効果について検討を行うこととした。それぞれ 8 匹からなるラット群をノーマルコントロール、糖尿病 (DM) コントロール、DM+クエン酸 (2 g/L)、DM+STE 1%、DM+STE 5%の 5 群に分け、3 か月間クエン酸やそれぞれの濃度の STE エキスを混ぜた食事を給餌した後、全ての個体を解剖し、全血を採取し血液成分分析を行うとともに、その血清を用いて、LC-MS/MS により CML を測定した。また耳介、下あごについては蛍光強度測定を行った。クエン酸給餌による AGEs の生成阻害効果については既に報告されているため、ポジティブコントロールとして評価した (24)。その結果、STE エキスは体重変動及びグリコアルブミン、脂肪酸代謝には影響を及ぼさなかったが、投与によって血中 CML および皮膚の AGEs を低下した。主要な抗原性 AGEs である CML は hydroxyl radical (25) や peroxynitrite (26) によって生成することから、生体における酸化のマーカーともなることが報告されている。生体蛋白が AGEs 化すると、蛋白の立体構造が変化し、酵素の不活性化などがおこるため、生体に悪影響

を及ぼす (27) 。しかし生体における AGEs の正確な定量は困難であり、AGEs 生成阻害効果を示す食品の大半は試験管実験に留まる場合が多い。これまで我々は、HPLC を用いた血清中 AGEs の測定および、蛍光を用いた機器で皮膚 AGEs 蓄積を測定し、マンゴスチンの熱水抽出物には生体において AGEs 生成抑制効果を示すことを報告した (28) 。今回、新たな AGEs 生成抑制食品の探索にあたり、古来より健康促進食品として特にアジア諸国で民間的に用いられている STE エキスの AGEs 生成抑制効果に注目した。Huanling(29)らは STE 粉末がラットにてコレステロール吸収を抑制し、血中コレステロールを低下させる作用を報告している。また Rawendra ら(30)は STE の egg white の酵素加水分解物から新規の Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Tripeptide を単離している。この他にも STE には滋養強壮、動脈硬化や心筋梗塞、高血圧の予防などが期待されているものの、その作用機序は不明な点が多い。

そこで本章では、糖尿病を誘発したラットに STE エキスを投与し、血中 AGEs を質量分析装置、皮膚および歯茎に蓄積した AGEs を蛍光強度として測定し、その抑制効果を検討した。本論文はプローブ型蛍光測定装置を用いて、実際の STE エキスという食品投与によって AGEs の抑制効果が検証できたはじめての報告である。

### 3. 実験方法

#### 2-1. CML について

CML (Fig. 18.) は、アマドリ化合物の酸化的開裂やグリオキサール、グリコールアルデヒドとリジン残基の反応により生成し、主要な抗原性 AGEs 構造体として報告されている。CML の生成経路には酸化反応が必要なことから、生体における酸化反応のマーカーとしても捉えられている。加齢や糖尿病の進展に伴いヒトの水晶体クリスタンや、皮膚コラーゲンに蓄積することが報告されている (31)。

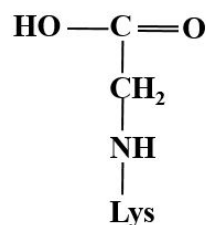


Fig. 18. A chemical structure of CML

#### 2-2. スッポン卵エキス (STE エキス)

STE はドーモコーポレイション (東京、日本) より提供を受けた。養殖したスッポン (*Pelodiscus sinensis*) のうち、3 歳以上のスッポンが産卵した卵を利用した。なお、2 歳以下と生育期間が短く、体の小さいスッポンは産む卵が小さく、産卵量も安定しないため、年齢別に養殖池を分けて管理し、3 歳以上のスッポンの卵のみを選択的に利用した。本実験に使用した STE は、殺菌から粉末化するまで全ての工程で熱を加えない非加熱を特徴としている。殻も含めた卵を丸ごと 80 メッシュ以下になるよう粉砕し、真空乾燥により水分率 3% 以下となるように調整し、-20°C で保存した。この STE 1% (v/v), 5% (v/v) 粉末をラット専用の餌に練りこんだ。その後、ペレット状に成形し 70°C で 3 時間焼いたものを飼料として準備した。

### 2-3. 動物実験

実験プロトコルは東海大学の動物実験倫理規定に従った（承認番号 141067）。

Wister ラットは九動株式会社より購入した。感染防止設備の中で、12 時間毎の昼夜サイクル、温度 25°C で飼育され、AIN-93M 固形食（クレア社製）を給餌した。糖尿病群は 8 週齢の雄ラット（体重～285g）に尻尾の静脈から STZ を 0.05M のクエン酸緩衝液（pH 4.5）で 60 mg/kg-body weight（200  $\mu$ L/匹）で注射することにより作製した。3 週間後には血糖値が  $\geq 200$  mg/dl を超え、糖尿病ラットが得られた。STZ 処理をしていない個体（Normal, n=8）と STZ 処理された 4 つのグループ（それぞれ n=8）は、①通常食、② STE 含有量 1.0%食、③ STE 含有量 5.0%食、④クエン酸水（2 g/l）摂取群に分けて飼育した。血糖値測定は 6 時間の絶食後に行い、Life Check sensor を用いて評価した（グンゼ株式会社製）。STZ 注射後 21 週間で、ペントバルビタール麻酔で殺処分し、全血、腎臓や大腿骨等の各種臓器、耳殻、下顎等全てのサンプルを - 80°C で保存した。アセト酢酸レベルは、JCA-BM 8000 automatic analyzer（日本電子株式会社製）を用いた酵素サイクリング法（standard NAD(H)-linked enzymatic methods）により測定した。グリコアルブミンレベルは血清をケトアミノキシダーゼ処理し、生成された過酸化水素をペルオキシダーゼ法で検出し、JCA-BM 8000 にて定量した。

### 2-4. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）による血清中

#### CML の測定

血清 5  $\mu$ l を蒸留水にて 1/4 に希釈し、サンプルとして用いた。サンプルに等量の 200 mM sodium borate buffer（pH 9.1）（終濃度：100 mM）および 1/10 量の 2 M NaBH<sub>4</sub> 溶液（終濃度：200 mM）を添加し、室温で 4 時間の還元処理を行った。還元処理後、



CML の内部標準である  $[^2\text{H}_2]$  CML (PolyPeptide Laboratories, Strasbourg, France) および Lysine の内部標準である  $[^{13}\text{C}_6]$  L-Lysine (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA, USA) を 10 pmol 添加し、6 N の HCl を 1 ml 加え、 $100^\circ\text{C}$  18 時間の加水分解を行った後、サンプルを乾固させ、蒸留水 (1 ml) に溶解した。蒸留水に溶解したサンプルは陽イオン交換カラム Strata X-C (Phenomenex, Torrance, CA, USA) を用い、2 %ギ酸 (3 ml) で洗浄し、7 %アンモニア液 (3 ml) で溶出した。得られた溶出画分を乾固し、0.1%ギ酸を含む 20%アセトニトリルで溶解後、 $0.2\ \mu\text{m}$  のフィルターで濾過し、LC-MS/MS 用の低吸着バイアルに入れ、測定を行った。LC-MS/MS は東海大学農学部 の所有する装置を用いた。各構造の溶出時間は、CML および  $[^2\text{H}_2]$  CML は約 12 分、L-Lysine および  $[^{13}\text{C}_6]$  L-Lysine は約 13 分であった。CML および  $[^2\text{H}_2]$  CML の検出のために使用した親イオンはそれぞれ 205 (m/z) および 207 (m/z) であり、これらの親イオンから得たフラグメントイオン 130 (m/z) を検出し、解析を行った。Lysine および  $[^{13}\text{C}_6]$  Lysine の親イオンはそれぞれ 147 (m/z) および 153 (m/z) であり、これらの親イオンから得たフラグメントイオン 84 (m/z) 、89 (m/z) をそれぞれ検出し、解析を行った。

## 2-5. 蛍光強度測定

STE の投与が糖化の阻害に与える効果を確認するため、Fig. 3. で説明したプローブタイプの蛍光測定装置を用いて、ラットの耳介と歯茎 (下顎) の経皮蛍光強度を測定した。

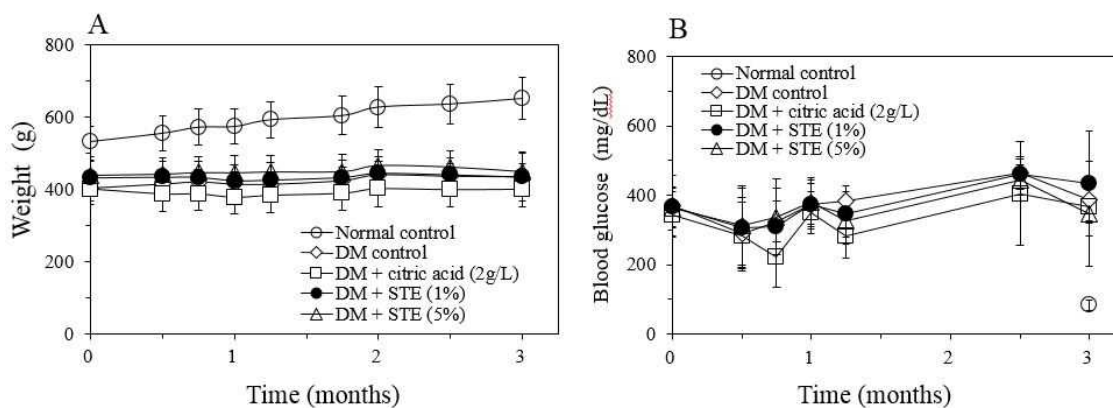
## 2-6. 統計解析

全てのデータは Mann-Whitney *U* test と non-repeated measures ANOVA.を用いて解析を行い、P values of <0.05 にて有意差検定を行った。

## 3. 結果

### 3-1. ラットにおける体重と血糖値の変化

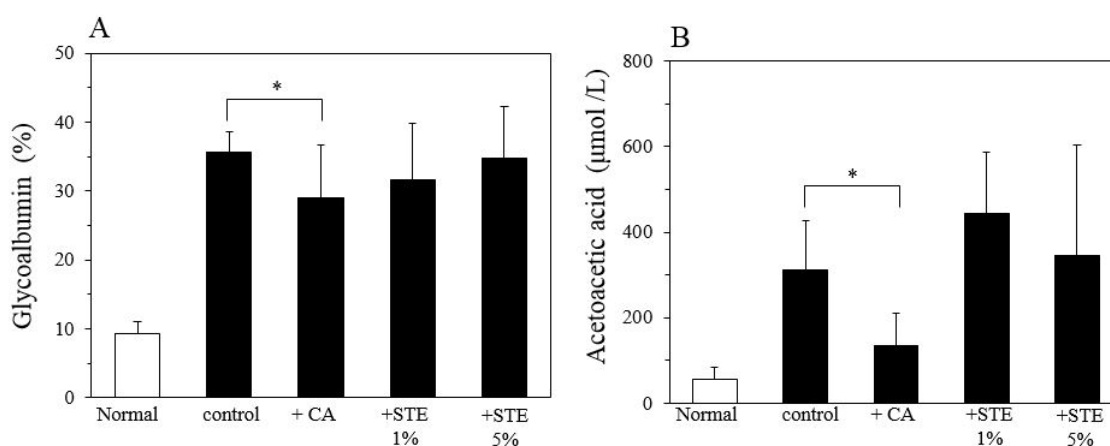
STZ 注射によって作成された糖尿病ラットの3か月間の体重変化と血糖値の変化をそれぞれ Fig. 19. -A, Fig.19. -B に示した。STZ を注射していない Normal 群が時間経過とともに体重が増加することに比べ、クエン酸給餌群、STE1%、5%投与群を含め、STZ 注射群は総じて体重が 400 g 程度で、3 か月の給餌によっても体重増加は認められなかった。



**Fig. 19. Changes in the body weight and blood glucose levels of rats.** Diabetes was induced in rats with streptozotocin and the changes in the body weight (A) and blood glucose levels (B) of normal rats (n=8) and all of the diabetic (DM) rat groups (n=8, each) were measured. The data are presented as the means  $\pm$  SD.

### 3-2. ラット血液成分分析

ラットの血液成分を分析した結果、グリコアルブミンの濃度(Fig. 20. -A)とケトン体の濃度(Fig. 20. -B)は1型糖尿病の進行とともに増加し、クエン酸の給餌によりその濃度は低下することが確認された。対比的に、1% STE や5% STE の給餌においてグリコアルブミン濃度やケトン体の濃度に変化は認められなかった。



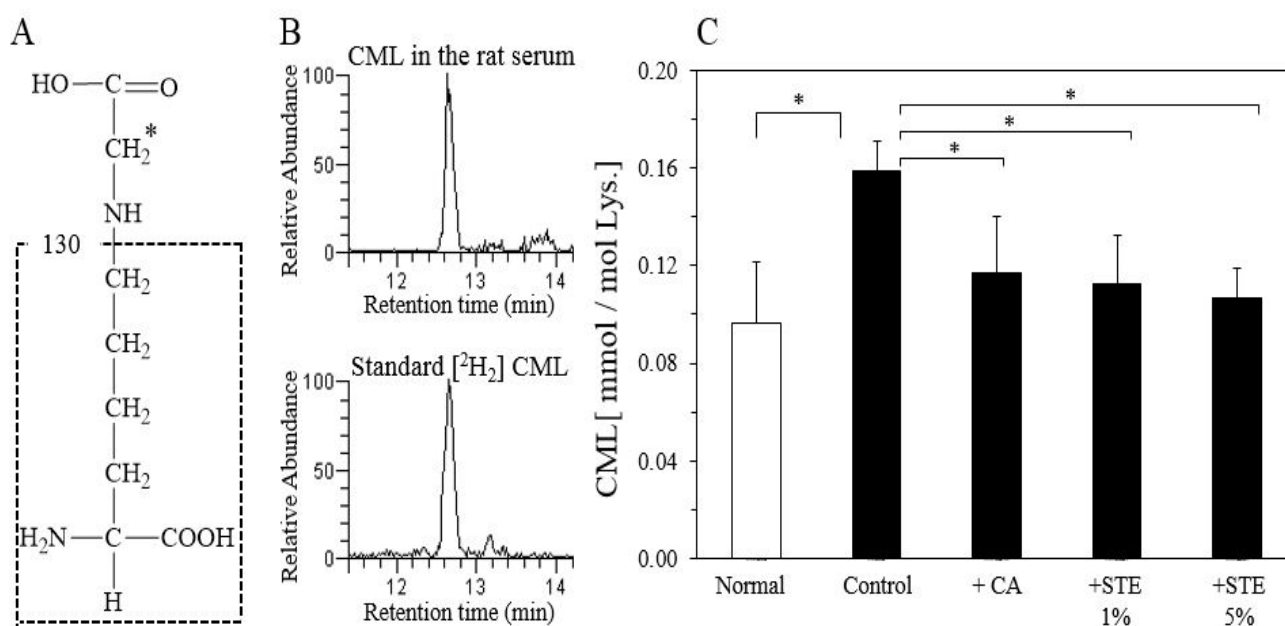
**Fig. 20. The measurement of glycoalbumin and acetoacetic acid in rats**

The glycoalbumin (A) and acetoacetic acid (B) levels of normal rats (open bar, n=8) and all of the diabetic rat groups (closed bar, n=8, each) were measured. The data are presented as the means  $\pm$  SD. \*, P < 0.05 vs. normal rats.

### 3-3. LC-MS/MS によるラット血清中の CML 濃度測定

Fig.21. -A に CML と  $[^2\text{H}_2]$  CML (10 pmol)のペアレントイオンを示す。それぞれ 205 (m/z)と 207 (m/z)で、130 (m/z)のフラグメントイオンとして、CML と $[^2\text{H}_2]$  CML が検出された。

典型的な CML と $^{2}\text{H}_2$  CML のフラグメントイオンクロマトグラフィーを Fig.21. -B に示す。Fig.21. -C に示す通り、クエン酸や STE を給餌したラットでは、CML の濃度が有意に低下する様子が確認された。

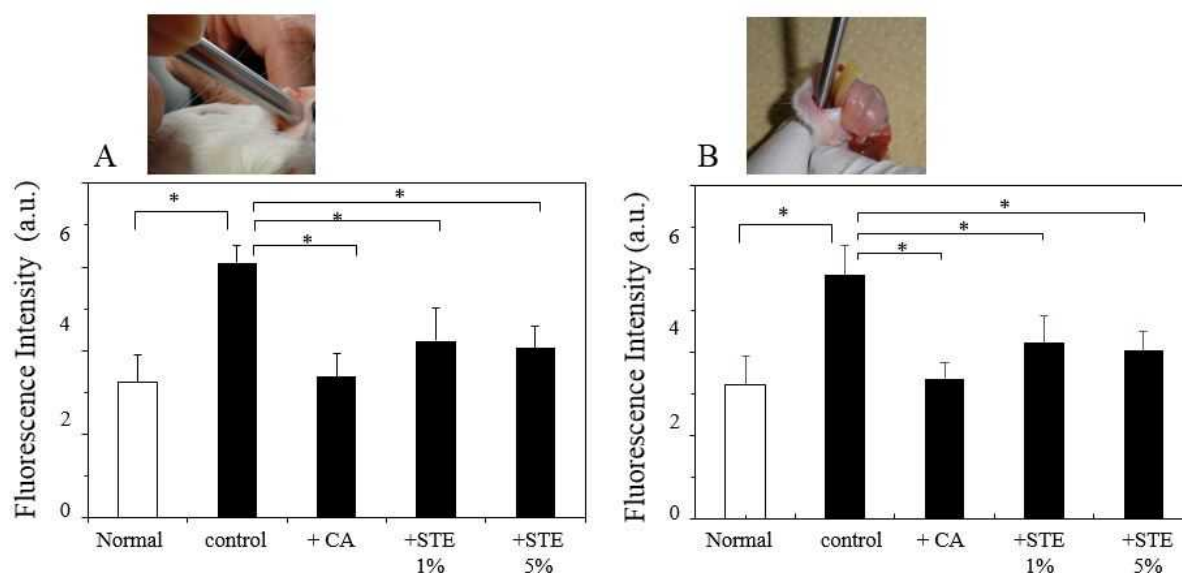


**Fig. 21. The measurement of CML levels in rat sera by LC-MS/MS.** Fragment ions of 130 ( $m/z$ ) were detected to measure CML and  $^{2}\text{H}_2$  CML (A). Peaks of the fragment ions of CML and  $^{2}\text{H}_2$  CML (10 pmol) were detected in diabetic rat sera (B). The CML levels in normal rat sera (open bar,  $n=8$ ) and the sera of all of the diabetic rat groups (closed bar,  $n=8$ , each) were measured by LC-MS/MS (C), as described in Materials and Methods. CA, citric acid. Data are presented as the means  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.01$  vs. normal rats.

### 3-4. ラット耳介と歯茎（下顎）の蛍光強度測定

皮膚や下顎の様な固い組織における AGEs 量を蛍光強度評価にて推定した。耳介の皮膚における蛍光強度は、糖尿病の進行により有意に増加するが、クエン酸や 1%, 5% の STE の投与により、その強度が有意に低減した(Fig. 22. -A)。

同じ傾向は歯茎（下顎）でも確認され、STE およびクエン酸の投与により、組織中の AGEs の蓄積は有意に阻害された(Fig. 22. -B)。



**Fig. 22. The measurement of fluorescence intensity of the auricle skin and lower gums in rats.** The fluorescence intensity of the auricle skin (A) and the lower gums (B) of normal rats (open bar, n=8) and in all of the diabetic rats groups (closed bar, n=8, each) was measured as described in the Materials and Methods. CA, citric acid. The data are presented as the means  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.01$  vs. normal rats.

#### 4. 考察

STE は滋養強壮や生活習慣病予防を目的に摂取されているものの、科学的な効果が不明な点が多い。そこで生活習慣病との関連が指摘されている AGEs に対して、その阻害効果を、糖尿病発症モデルラットを用いた *in vivo* で検討した。AGEs の生成は加齢と共に進行し、その結果、構造タンパク質や酵素の変性を起こしてしまうことは知られているが(32)、生体 AGEs は分析が煩雑で時間も要し、生体における AGEs 阻害効果を示した食品の報告は少ない。AGEs には、CML の他 GA-pyridine (33)、MG-H1 (34)、Pyrraline (35) など様々存在するが(Fig. 23)、今回酸化依存的 AGEs であり、動脈硬化や急性腎症など炎症性疾患(36, 37)で増加する CML の抑制効果を測定した。

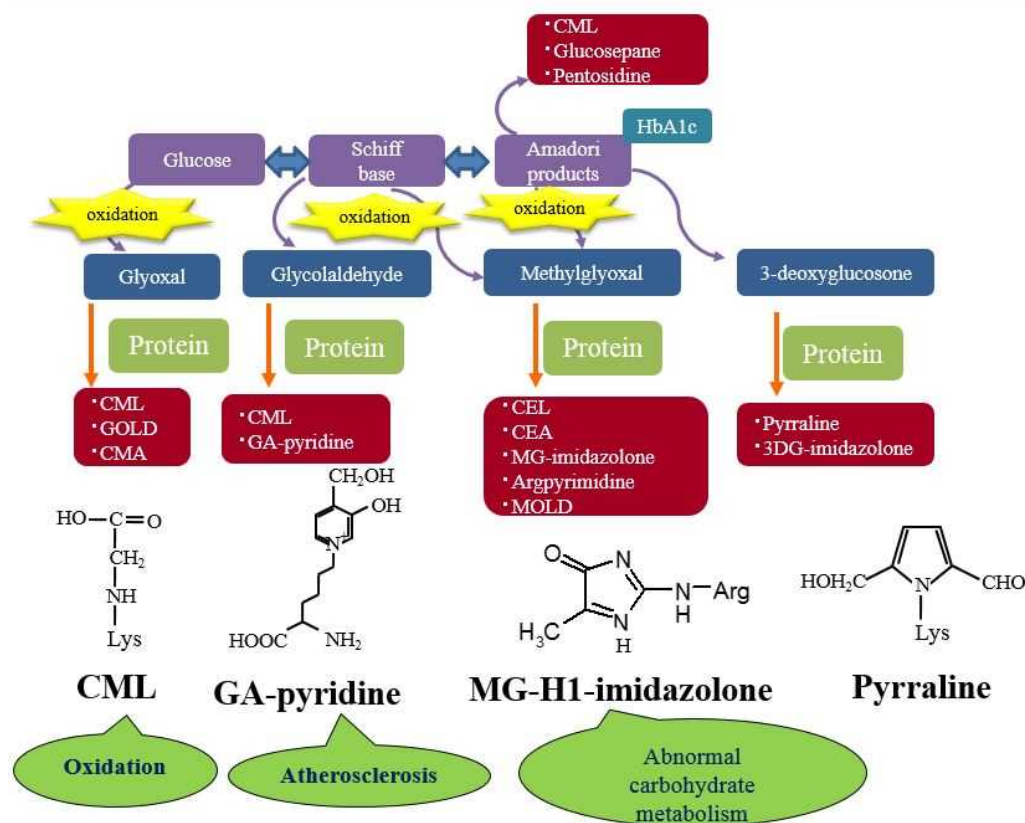


Fig.23. A scheme of the complex Maillard reaction and formation of some AGEs

これまで AGEs 阻害効果の確認については、ほとんどのエビデンスは *in vitro* の試験であった。糖尿病ラットに経口投与される STE は体重増加や空腹時血糖 (Fig. 19-A, -B)、グリコアルブミンやケトン体の増加は改善しなかったが (Fig. 20-A, -B)、血清中の CML の生成を阻害した (Fig. 21. -C)。また耳介 (Fig. 22- A) や歯茎 (下顎) (Fig. 22-B) での蛍光強度は、STE の投与により低減した。Nagai らの以前の研究において、クエン酸の経口投与により糖尿病ラットにおける AGEs 生成が抑制されることが明らかとなっている (38)。そこで本研究では、クエン酸をポジティブコントロールとして用いた (Fig. 21. -C)。クエン酸は *in vivo* でケトン体代謝の改善により、AGE 生成が抑えられるものの、*in vitro* 試験管実験における AGEs の生成は阻害できない (38)。一方 STE は、試験管実験でも AGEs の生成阻害効果を示す (未報告測定結果)。試験管における AGEs 生成阻害実験は、閉鎖系に糖質とタンパク質を混合して 37°C で 1 週間保温するが、本閉鎖系に STE を加えると、STE 由来のタンパク質や遊離アミノ酸によって反応系のアミノ基濃度が上昇し、結果的にタンパク質一分子上の AGEs 生成量が見かけ上低下したためと考えられる。しかし、ラットに STE を経口投与しても血中タンパク濃度の上昇にはつながらず、糖尿病ラットでの AGEs 生成阻害効果は STE 中のタンパク質やアミノ酸以外の成分が関与していることが示唆された。また、STE はクエン酸と異なりケトン体の生成を抑制しないことから、STE とクエン酸の AGEs 生成阻害メカニズムは異なっていることが考えられる。

ラット組織に蓄積した AGEs 含量は蛍光強度にて推定される (28)。糖尿病を発症すると歯茎の炎症と乾皮病の発症率が上昇するため、今回の試験では耳介と歯茎を AGEs の測定場所として選択した。クエン酸投与と同様に、耳介や歯茎での AGEs の蓄積は、STE の給餌により有意に阻害された (Fig. 22- A, -B)。事実上、耳介と歯茎での経皮

蛍光測定プロファイルは非常に類似しており、歯茎測定が難しい場合、耳介定でも代替できる可能性が高いと思われる。

結論として、本研究は STE の経口投与が糖尿病における AGEs の生成を阻害できる最初の報告であり、STE が何故健康促進に良いかを理解する一つのメカニズムを見出した。そしてその機序として、STE のもつミネラル等の成分が相加的または相乗的に作用して、生体で AGEs の生成を阻害していることが示唆された。



## 総括

本研究により、これまで具体的な臨床マーカーとして利用されていなかった AGEs を、非侵襲で簡便に測定できることにより、糖尿病合併症の進行にフォーカスした臨床応用の可能性を見出した。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。

また、本技術を用いることで、生活習慣病を予防する目的で探索・開発される抗糖化素材について、その「迅速な効果の見える化」を実現した。健康寿命に対する食事の影響は、運動と並んで非常に大きく、結果として、病気になる前の未病の段階での生活習慣の見直しに繋がるため、生活水準の維持に対しても大きな影響を与えることとなる。

## 謝辞

本研究を遂行し、この研究分野の最前線でご活躍されている国内外の数多くの研究者の意見交換の場を与えて下さり、数々の成果を学位論文として纏めるにあたり、終始多大なるご指導とご鞭撻を賜りました東海大学農学部准教授 永井竜児先生に深甚の謝意を表します。また本論文を作成するにあたり、ご校閲並びにご助言を賜りました東海大学農学部教授 荒木朋洋先生、東海大学農学部准教授 安田伸先生、東海大学農学部准教授 米田一成先生、東海大学清水教養教育センター教授 須田斎先生に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたり、臨床実験を通じた数々のご指導ご鞭撻を頂きました、熊本大学医学部附属病院 糖尿病・代謝・内分泌内科教授 荒木栄一先生、講師 松村剛先生、熊本大学大学院生命科学研究部 細胞病理学分野講師 藤原章雄先生、熊本大学医学部附属病院 糖尿病・代謝・内分泌内科医員 木下博之先生、福岡大学病院病理部・病理診断科教授 坂田則行先生、福岡大学医学部腎臓・膠原病内科 助教 伊藤建二先生に謹んで厚く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、各種実験や学会発表のサポート、示唆に富んだディスカッションに夜遅くまでお付き合いいただいた東京慈恵会医科大学整形外科学講座 助教 荒川翔太郎先生、東海大学農学部永井研究室の博士研究員 白河潤一様、技術員 古澤知里様、技術員 永井美芽様、大学院生 大野礼一様、品川雅敏様、畑野孝太様、須川日加里様、学部4年生の 織畠郁也様、河内直輝様、伊藤孝輔様、市丸健太様、後藤憲太郎様、木下奨様、坂本衛様、丸山祐也様、渡邊瑞季様他研究室の皆様がこの場を借りてお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 門脇 孝 「医療の現在と早期診断の課題」、2013 年度第 1 回未病社会の診断技術研究会 講演会・研究会
- 2) Nagai R, Shirakawa J, Fujiwara Y, Ohno R, Moroishi N, Sakata N, Nagai M. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. *J Clin Biochem Nutr.* 2014 **55**(1) 1-6.
- 3) Nagai R, Horiuchi S, Unno Y. Application of monoclonal antibody libraries for the measurement of glycation adducts. *Biochem Soc Trans.* 2003 **31**(Pt 6):1438-1440.
- 4) Nagai R, Matsumoto K, Ling X, Suzuki H, Araki T, Horiuchi S. Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes.* 2000 **49**(10):1714-23.
- 5) Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, Kodama T, Miyauchi Y, Takahashi K. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol.* 1995 **147**, 3, 654-667.
- 6) John A. Dunn, David R. McCance, Suzanne R. Thorpe, Timothy J. Lyons, John W. Baynes, Age-dependent accumulation of N. epsilon.-(carboxymethyl) lysine and N. epsilon.-(carboxymethyl) hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry,* 1991 **30** (5), 1205–1210.
- 7) Buongiorno AM, Morelli S, Sagratella E, Cipriani R, Mazzaferro S, Morano S,

- Sensi M., Immunogenicity of advanced glycation end products in diabetic patients and in nephropathic non-diabetic patients on hemodialysis or after renal transplantation. *J Endocrinol Invest.* 2008 **31**(6):558-562.
- 8) Beisswenger P J, Moore L L, Brinck-Johnsen T, and Curphey T J, Increased collagen-linked pentosidine levels and advanced glycosylation end products in early diabetic nephropathy. *J Clin Invest.* 1993 **92**(1): 212–217.
- 9) Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis.* 1999, **142** (1):67-77.
- 10) Miki Hayashi C, Nagai R, Miyazaki K, Hayase F, Araki T, Ono T, Horiuchi S., Conversion of Amadori products of the Maillard reaction to N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine by short-term heating: possible detection of artifacts by immunohistochemistry. *Lab Invest.* 2002, **82** (6):795-808.
- 11) Nakano M, Kubota M, Owada S, Nagai R. The pentosidine concentration in human blood specimens is affected by heating. *Amino Acids.* 2013 **44**(6):1451-6.
- 12) Meerwaldt R, Links T, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Hartog J, Gans R, Smit A. Simple noninvasive measurement of skin. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 **1043**:290-298.
- 13) Meerwaldt R, Lutgers HL, Links TP, Graaff R, Baynes JW, Gans RO, Smit AJ. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care.* 2007 **30**(1):107-12.

- 14) Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, Adler SG, Appel GB, Cartwright K, Foiles PG, Freedman BI, Raskin P, Ratner RE, Spinowitz BS, Whittier FC, Wuerth JP; Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2004 **24** (1):32-40.
- 15) Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomuta H, Ikeda K, Horiuchi S. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia*. 1997 **40** (8):764-769.
- 16) World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes. Geneva: World Health Org; 1999:1–59.
- 17) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 **18** (6):499-502.
- 18) Seino Y, Nanjo K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, Ito C, Inagaki N, Iwamoto Y, Kasuga M, Hanafusa T, Haneda M, Ueki K. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*. 2010 **1** (5):212-228.
- 19) Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kambik A, Pararajasegaram R, Verdaguer JT; Global Diabetic Retinopathy

- Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* **110**: 2003. 1677-1682.
- 20) Katayama S, Moriya T, Tanaka S, Tanaka S, Yajima Y, Sone H, Iimuro S, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N; Japan Diabetes Complications Study Group. Japan Diabetes Complications Study Group Low transition rate from normo- and low microalbuminuria to proteinuria in Japanese type 2 diabetic individuals: the Japan Diabetes Complications Study (JDACS). *Diabetologia* **54**, 2011, 1025–1031.
- 21) Yasuda H, Sanada M, Kitada K, Terashima T, Kim H, Sakaue Y, Fujitani M, Kawai H, Maeda K, Kashiwagi A. Rationale and usefulness of newly devised abbreviated diagnostic criteria and staging for diabetic polyneuropathy. *Diabetes Res Clin Pract* **77**, Suppl 1, 2007 S178-S183.
- 22) Nagai R, Brock JW, Blatnik M, Baatz JE, Bethard J, Walla MD, Thorpe SR, Baynes JW, Frizzell N., Succination of protein thiols during adipocyte maturation: a biomarker of mitochondrial stress., *J Biol Chem.* **282** (47), 2007 34219-34228.
- 23) Khan MW, Qadrie ZL, Khan WA., Antibodies against gluco-oxidatively modified human serum albumin detected in diabetes-associated complications, *Int Arch Allergy Immunol.* **153**,(2) 2010 207-214.
- 24) Nagai R, Nagai M, Shimasaki S, Baynes JW, Fujiwara Y. Citric acid inhibits development of cataracts, proteinuria and ketosis in streptozotocin (type 1) diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 **393** (1):118-122.
- 25) Nagai R, Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Araki T, Horiuchi S. Hydroxyl radical mediates N epsilon-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product.

*Biochem Biophys Res Commun.* 1997 **234**(1):167-172.

- 26) Nagai R, Unno Y, Hayashi MC, Masuda S, Hayase F, Kinae N, Horiuchi S. Peroxynitrite induces formation of N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose: novel pathways for protein modification by peroxynitrite. *Diabetes*. 2002 Sep; **51**(9):2833-2839.
- 27) Nagai R, Shirakawa J, Fujiwara Y, Ohno R, Moroishi N, Sakata N, Nagai M. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. *J Clin Biochem Nutr.* 2014 **55** (1):1-6.
- 28) Ohno R, Moroishi N, Sugawa H, Maejima K, Saigusa M, Yamanaka M, Nagai M, Yoshimura M, Amakura Y, Nagai R. Mangosteen pericarp extract inhibits the formation of pentosidine and ameliorates skin elasticity. *J Clin Biochem Nutr.* 2015 **57**(1):27-32.
- 29) Huanling Y, Yong L, Junbo W, Liping Z, Weixing Y. Chinese soft-shelled turtle egg powder lowers serum cholesterol, increases faecal neutral steroids and bile acid excretion, and up-regulates liver cytochrome P450 mRNA level in rats. *Br J Nutr.* 2005 **94** (3); 315-320.
- 30) Rawendra RD, Aisha, Chen SH, Chang CI, Shih WL, Huang TC, Liao MH, Hsu JL. Isolation and characterization of a novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory tripeptide from enzymatic hydrolysis of soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) egg white: in vitro, in vivo, and in silico study. *J Agric Food Chem.* 2014; **62** (50) :12178-12185.

- 31) Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, et al: Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993 **91**(6); 2463–2469.
- 32) Nagai R, Shirakawa J, Fujiwara Y, Ohno R, Moroishi N, Sakata N, Nagai M. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. *J Clin Biochem Nutr.* 2014 **55** (1):1-6.
- 33) Nagai R, Hayashi CM, Xia L, Takeya M, Horiuchi S. Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins. *J Biol Chem.* 2002 **277**(50):48905-48912.
- 34) Thornalley PJ, Rabbani N. Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry--a user's perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2014 **1840**(2):818-829
- 35) Miyata S, Liu BF, Shoda H, Ohara T, Yamada H, Suzuki K, Kasuga M. Accumulation of pyrroline-modified albumin in phagocytes due to reduced degradation by lysosomal enzymes. *J Biol Chem.* 1997 **272**(7):4037-4042.
- 36) Wang Z, Jiang Y, Liu N, Ren L, Zhu Y, An Y, Chen D. Advanced glycation end-product Nε-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis.* 2012 **221** (2):387-396.
- 37) Coughlan MT, Forbes JM. Temporal increases in urinary carboxymethyllysine correlate with albuminuria development in diabetes. *Am J Nephrol.* 2011; **34**(1):9-17.
- 38) Nagai R, Nagai M, Shimasaki S, Baynes JW, Fujiwara Y. Citric acid inhibits development of cataracts, proteinuria and ketosis in streptozotocin (type 1) diabetic



rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 **393**(1):118-122.