

東海大学大学院 令和元年度 博士論文

病態進展に伴う AGEs の役割と天然物由来 AGEs 阻害化合物の効果検証

指導 永 井 竜 児 教授

東海大学大学院生物科学研究科
生物科学専攻

須 川 日 加 里

略語一覧表

- AGEs: Advanced glycation end-products (終末糖化産物)
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (酵素免疫標識法)
- HPLC: High performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
- HbA1c: ヘモグロビン A1c
- CML : N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine
- CMA: N^{ω} -(carboxymethyl) arginine
- CEA: N^{ω} -(carboxyethyl) arginine
- MG-H1-imidazolone: N^{δ} -(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl) ornithine
- CEL: N^{ω} -(carboxyethyl) lysine
- 3DG: 3-Deoxyglucosone
- GA: Glycolaldehyde
- MGO: Methylglyoxal
- PB: Phosphate buffer (リン酸緩衝液)
- PBS: Phosphate buffer saline

目次

要旨	1
緒言	3
第1章 <i>in vitro</i> における AGEs 生成阻害効果の評価系の確立	
1. 背景	8
1-1. CMA および CML について	8
1-2. 従来の AGEs 生成抑制効果の評価系について	9
1-3. トチュウとは	10
2. 実験方法	11
2-1. 各還元糖とゼラチン混合物における CML, CMA の生成速度の比較	11
2-1-1. サンプル調製	11
2-1-2. ELISA 法	11
2-1-3. Liquid Chromatography-tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いた CML, CMA の定量	12
2-2. トチュウの根、樹皮、葉の各部位の抽出物および葉由来単離成分による CMA、CML 生成阻害効果の評価	13
2-2-1 抽出ならびに精製・単離方法	13
2-2-2 ELISA 法を用いた CML、CMA 生成阻害効果の評価	14
3. 結果	16
3-1. ELISA 法を用いた CML, CMA の測定	16
3-2. Liquid Chromatography-tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いた CML, CMA の定量	16
3-3. トチュウの根、樹皮、葉の各部位の抽出物における CMA、CML 生成阻害効果の評価	17
3-4. トチュウ葉由来単離成分における CMA、CML 生成阻害効果の評価	18

4. 考察	20
5. 小括	21
第2章 STZ 誘発 1 型糖尿病マウスを用いた AGEs 生成抑制効果評価系の確立:	
1. 背景	22
1-1. STZ マウスを用いた AGEs 測定系の確立	23
1-2. スイゼンジノリとは	23
2. 実験方法	23
2-1. スイゼンジノリ含有エサの調製	23
2-2. 1 型糖尿病の誘発および飼育期間中の血糖値・体重、摂食量の測定	24
2-3. 水晶体白濁度の診断	25
2-4. LC-MS/MS によるマウス水晶体中 AGEs 測定	25
2-5. スイゼンジノリ抽出物における CMA、CML 生成抑制効果の評価	26
2-5-1. 抽出方法	26
2-5-2. ELISA 法を用いた CML、CMA 生成抑制効果の評価	26
2-6. 統計学的解析	26
3. 結果	27
3-1. 飼育期間中の血糖値・体重、摂食量の変化	27
3-2. 3 群間における水晶体白濁進行度の比較	29
3-3. LC-MS/MS によるマウス水晶体中 AGEs 測定	30
3-4. スイゼンジノリの熱水および 20%EtOH、100%EtOH、100%アセトン抽出物における CMA、CML 生成抑制効果	31
4. 考察	32
5. 小括	34
総括	35
使用した薬品	36
使用した器具・機器	38
謝辞	40
参考文献	41
本論文に関わる報告	46

要旨

メイラード反応後期生成物である Advanced glycation end-products (AGEs)の生体における蓄積レベルは、加齢や糖尿病・動脈硬化症などの加齢関連疾患で上昇することから、AGEs 生成を阻害する化合物を日常的に摂取することが可能になれば、加齢関連疾患の発症を抑制することが期待される。本研究では、(1) *in vitro* における AGEs 生成阻害効果の評価系の確立 (2) ストレプトゾトシン(STZ) 誘発 1 型糖尿病マウスを用いた AGEs 生成阻害効果評価系の確立を行った。

1) *in vitro*における AGEs 生成阻害効果の評価系の確立:

1986 年に世界初の AGEs 阻害化合物としてアミノグアニジン(AMG)が報告された。しかし、AMG は AGEs ではなく測定時の前処理で生成される人工産物を抑制しており、実際の生体 AGEs の阻害効果は低いため、世界的に新たな AGEs 生成阻害化合物が探索されている。数多くある天然物成分から AGEs 阻害効果を示す化合物を選定するためには、生体内に存在する AGEs を正確に測定するスクリーニング系の確立が必須である。そこで生体に存在することが確認されている N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine (CML)および N^{ω} -(carboxymethyl)arginine (CMA)に対するモノクローナル抗体を用いた Enzyme-linked immunosorbent assay 法による AGEs 阻害化合物の一次スクリーニング系確立を目的として実験を行った。5 種の 30 mM の還元糖 (Glucose、Ribose、Fructose、Mannose および Galactose) をそれぞれ 終濃度 2 mg/mL のゼラチンと混合し、1 週間 37°C でインキュベートして CMA、CML の生成量を比較した。その中で最も高値を示した Ribose-ゼラチンを用いて、*Eucommia ulmoides* Oliv. (和名：トチュウ) の各部位における抽出物、およびその中で最も阻害効果の高かったトチュウ葉から単離された化合物における CMA、CML の生成阻害評価を行った。その結果、CMA、CML の生成阻害化合物として Isoquercetin および Quercetin-3-O-sambubioside が同定された。これら化合物はフラボノイド骨格を持ち抗酸化作用を有することから酸化依存性の AGE である CMA、CML の生成を阻害したと考えられる。また、先行研究によってフラボノイドの 8 位はメチルグリオキサール (MG) やグリオキサール (GO) などの AGE 前駆体をトラップする作用も報告されていることから、アマドリ化合物の酸化による CMA、CML の生成を阻害しただけでなく、グルコースの自己酸化によって生成

された GO と蛋白質との反応も阻害したと考えられる。本結果より、本研究は従来のグルコースを使用した AGE 阻害評価系よりも 8 倍速く評価が可能となった。

2) STZ 誘発 1 型糖尿病マウスを用いた AGEs 生成抑制効果評価系の確立:

近年 AGEs 研究が進み、現在では液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて数種の AGEs 測定が可能となり、ラットやヒトにおいて健常者-糖尿病患者間で AGEs の蓄積量に差が認められている。ヒト介入試験は食習慣のない化合物の投与が安易にできないことや、条件に合った被験者を集めることが困難なことから、生体実験においてもスクリーニング系を確立する必要がある。現在、生体内試験における AGEs 蓄積抑制物質のスクリーニング系に動物モデルとしてラットが用いられている。しかし、ラットを用いたスクリーニングはコスト及び多大な人的労力を要するため大量飼育が困難である。そこでラットよりスケールの小さいマウスを用いて、AGEs 生成阻害物質のより簡便なスクリーニング系の確立を検討した。マウスはヒトやラットに比べ薬物などの代謝が早いことから、AGEs の蓄積も小さく、測定が困難であったが ^{13}C -Lys および ^{13}C -AGEs 等の内部標準と LC-MS/MS の併用によって生体組織および血清中 AGEs の定量が可能となった。また、マウスの水晶体における CML 蓄積量は、通常群に比べ STZ で誘発した 1 型糖尿病群 (DM 群) で有意に増加した。CML は酸化依存的に生成される AGEs であることから、抗酸化作用が報告されているラン藻類の *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada (*A. sacrum*) (和名: スイゼンジノリ) を用いた天然物投与による STZ 誘発 1 型糖尿病マウス水晶体中 AGEs 抑制効果の評価を行った。その結果、水晶体中の AGEs 蓄積量の比較においてスイゼンジノリ投与 DM 群は DM 群と比べ CML の蓄積を有意に抑制し、さらに糖尿病の発症によって進展した水晶体の白濁を有意に抑制した。スイゼンジノリ を日常的に摂取することで水晶体における酸化依存的な CML の生成を抑制し、水晶体の白内障進行を遅延したことからスイゼンジノリに含まれるゼアキサンチンなどの抗酸化作用によって酸化ストレスが減少した結果、酸化による水晶体の白濁を抑制した可能性が示唆された。以上のことから、生体内試験における AGEs 生成阻害物質のスクリーニング系に動物モデルとしてマウスが利用できることが明らかとなり、さらに、マウスではあるが白内障予防に対するスイゼンジノリの有効性も確認された。

緒言

世界の成人糖尿病有病者数は増加の一途をたどり、2030 年までに 4 億 7 千 2 百万人に達すると言われている⁽¹⁾。発症患者数の増加に伴い、網膜症、腎症、神経症といった動脈硬化を起因とする糖尿病合併症患者の数も増加することから、本疾患は深刻な社会問題となっている⁽¹⁾。ヘモグロビン β 鎖の N 末端のバリン残基がグルコースと結合した糖化蛋白質であるヘモグロビン A1c は糖尿病診断のマーカーとして世界中で測定されている⁽²⁻³⁾。これは、赤血球の寿命がおよそ 120 日といわれていることから、測定した日より約 1~2 か月前の平均的な血糖値の予測が可能であることや、測定直前に患者が過食または絶食状態であっても血糖値ような変動が生じないためである。しかし、ヘモグロビン A1c は糖尿病合併症やその他生活習慣病との相関性は現在認められておらず、これら疾患の進行を正確に評価するためには、本物質以外のマーカーの探索が重要である。その候補として蛋白質と還元糖との非酵素的反応であるメイラード反応の後期に生成する Advanced glycation end-products (AGEs) が注目されている。本反応は食品の加熱調理時に起こる褐変反応として発見され、食品の加熱調理時やコーヒー豆の焙煎等で進行しているが、同様の反応が生体でも進行していることが確認されている^(4,5)。コラーゲンや眼の水晶体、ヘモグロビン等の生体蛋白質を構成するアミノ酸の α 位および側鎖アミノ基と還元糖のカルボニル基が非酵素的に反応する前期反応によって、シッフ塩基、1,2-エナミノールを経てアマドリ転位生成物が形成される。先に述べたヘモグロビン A1c はこのアマドリ転位生成物の一種にあたる。前期反応は可逆反応であるが、さらに酸化反応や脱水、縮合、断片化等の後期反応を経て、褐色化や蛍光性、架橋形成等の特徴を有する AGEs へと不可逆的に変化する (Fig. 1)。AGEs は加齢に伴い生体に蓄積し^(6,7)、糖尿病の発症によってその蓄積速度が上昇する⁽⁸⁾。さらに腎症や網膜症などの糖尿病合併症患者における組織中 AGEs の蓄積は組織損傷の進展にも関与することが報告されていることから^(9,10)、AGEs は老化のマーカーだけでなく、糖尿病合併症の発症・進展における評価マーカーとしても注目されている。

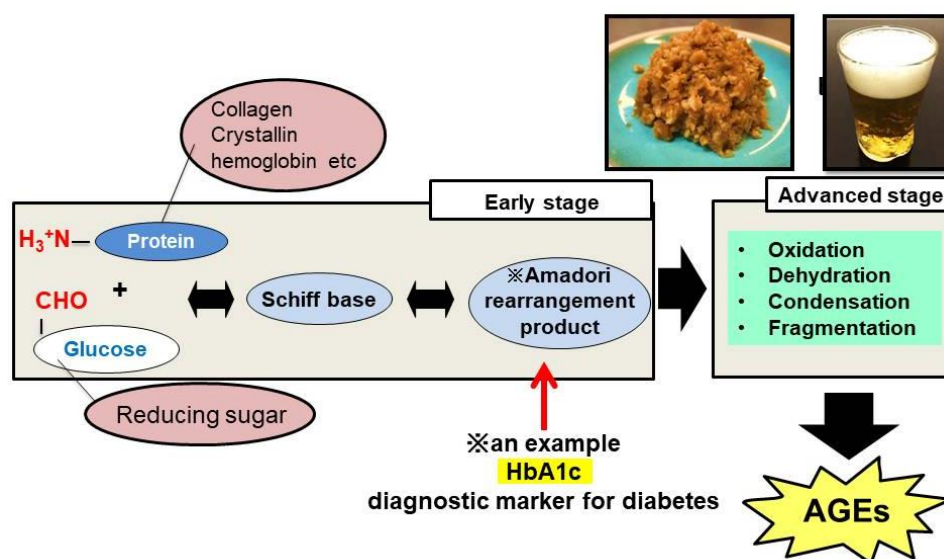


Fig. 1 糖と蛋白質の非酵素的な反応による AGEs 生成の一例:

本反応は可逆的な前期反応と不可逆な後期反応に分かれており、これら反応を経て、褐色化や蛍光性、架橋形成等の特徴を有する AGEs へと変化する。

また、AGEs の研究は病態マーカーとしての利用のみならず、病態の発症予防および進行遅延を目的とした創薬のターゲットとしても世界的に行われている。AGEs 阻害の種類としては、(1) AGEs 生成の阻害、(2) 生成された AGEs を分解することによる蓄積阻害 (AGE breaker)⁽¹¹⁾、(3) AGE 受容体の拮抗阻害⁽¹²⁾などが挙げられる。AGEs 阻害剤として初めて報告されたアミノグアニジン (AMG)⁽¹³⁾は、カルボニルと反応する求核反応性のヒドラジン反応基 ($-NHNH_2$) とグアニジン基 ($-NH-CNHNH_2$) を有する合成化合物である。AMG は糖尿病ラットへの投与実験において網膜症の進展を有意に抑制したことが報告されている⁽¹⁴⁾。しかしながら、マウスに AMG を投与すると、肝臓や腎臓で組織内 Pyridoxal phosphate (PLP) の低下を誘発し、炎症反応を引き起こす要因となることが報告されている⁽¹⁵⁾。また、ヒトでは糖尿病性腎症患者に 36 か月間 1 日 2 回 AMG 300 mg を投与する治験が行われたところ、網膜症の進展を抑制し、コレステロール値や中性脂肪値の改善が認められたが、抗核抗体や抗好中球細胞抗体の出現や、半月体形成糸球体腎炎の発症などの自己免疫疾患様の病態も認められ、AMG 150 mg 1 日 2 回の低用量投与によってもインフルエンザ様症状や貧血などの副作用が報告されている⁽¹⁶⁾。以上のことから、糖尿病モデル動物およびヒト糖尿病患者において、AMG による糖尿病合併症の進展抑制効果が報告されているものの、臨床応用には至っ

ていない。また、AMG が AGEs 生成阻害剤として報告された 1980 年代は、まだ AGEs 構造の大半が不明であり、AGEs 生成阻害剤の探索が困難であったと思われる。AMG は蛍光性 AGEs である FFI (2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole) を抑制することが報告されていたが、後に FFI は HPLC 測定の際に必要な前処理工程の酸加水分解によってアマドリ転位生成物の 1 種であるフロシンとアンモニアが反応し形成される人工産物であり、生体には存在しないことが報告された⁽¹⁷⁾。それ故、生体に存在する AGEs を確実に測定することが重要であると言える。近年になって AGEs 研究が進み、現在は生体に存在する AGEs 構造は約 40 種類同定されている。構造が明らかになってきたことで AGEs は冒頭に示した経路 (Fig. 1) 以外にもアマドリ転位生成物の開裂や、解糖系の glyceraldehyde-3-phosphate を経て生成される methylglyoxal (MG)⁽¹⁸⁾、またはアマドリ転位生成物やポリオール経路の活性化に伴いフルクトースから生成される 3-deoxyglucose (3-DG) など反応性の高いカルボニル基を 2 つ有するジカルボニル化合物と蛋白質の反応からも生成されることが分かり (Fig. 2)、各構造と病態との関連も明らかになってきた。Pentosidine は Lys と Arg の 2 つのアミノ酸から構成される蛍光性 AGE 構造であるため、ひとつの蛋白質内または異なる蛋白質間において架橋構造を形成する。例えばこの Pentosidine は健常者と比較して、骨粗鬆症患者の血清で増加することが報告されている⁽¹⁹⁾。また、糖代謝異常によって生成が促進されることが報告されている AGE である N^δ-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl) ornithine (MG-H1-imidazolone)⁽²⁰⁾は、健常者と比較してアルツハイマー病患者の脳脊髄液中で増加することが認められている⁽²¹⁾。以上のことから、AGEs は経路によって生成される構造が異なり、関連する病態も種々存在するため、AGEs 阻害剤の研究においても各種構造を明確に測定する必要があると考える。

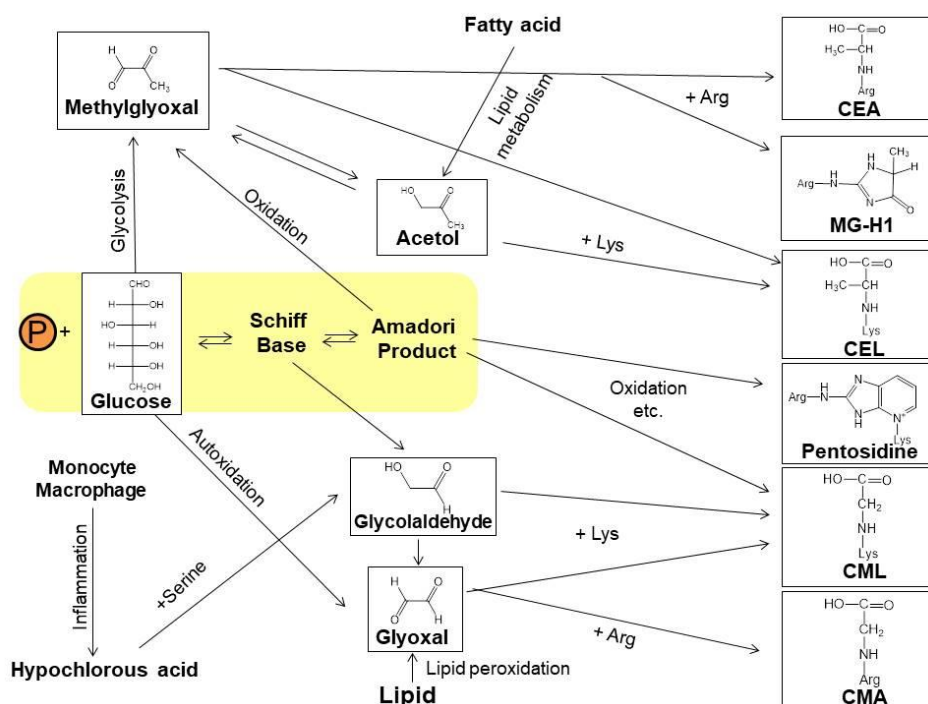


Fig. 2 生体内における AGEs 生成経路の一例:

P は蛋白質を示す。糖と蛋白質の非酵素的な反応経路以外にもアマドリ転位生成物の開裂や、解糖系の glyceraldehyde-3-phosphate を経て生成される MG やグルコースの自己酸化によって生成される GO などの AGE 前駆体と蛋白質との反応によっても AGEs は生成される。

近年になって、多くの AGE 構造が同定されたことにより、標準品を用いた機器分析による定量や AGEs 構造を特異的に認識する数種のモノクローナル抗体が開発されたことによって Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いた簡便な多検体分析が可能になった。本研究ではこれら手法を用いて実験を行った。第 1 章では糖尿病患者の血清において上昇が認められている AGEs の 1 種である

N^ε-(carboxymethyl)arginine (CMA)⁽²²⁾ および N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML)⁽²³⁾ それぞれのモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による *in vitro* における CMA および CML の生成抑制効果評価系の確立を目的とし実験を行った。CMA はコラーゲンに特異的、CML は酸化反応依存的に生成することが知られている。今回、数種類の糖と可溶性コラーゲンであるゼラチンを保温し、CMA、CML の生成阻害化合物を短期間に探索する系を検討した。その結果、リボースとゼラチンを 1 週間保温することによって、CMA、CML が経時的に生成することを確認した。本実験系を用いて、抽出物において AGEs

生成阻害作用の高かった *Eucommia ulmoides* Oliv. (和名：トチュウ)の葉における活性成分の探索を行った。

第2章では、*in vivo* における AGEs の生成抑制効果の評価について述べる。近年 AGEs 研究が進み、現在では Liquid Chromatography-tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いて数種の AGEs 測定が可能となり、ラットやヒトにおいて血糖値の差異に伴って AGEs 蓄積量に変化が生じることが認められている。ヒト介入試験は食習慣のない化合物の投与が安易にできないことや、条件に合った被験者を集めることが困難なことから、生体実験においてもスクリーニング系を確立する必要がある。現在、生体内試験における AGEs 蓄積抑制化合物の探索に動物モデルとしてラットが用いられているが、ラットを用いた機能性評価はコスト及び多大な人的労力を要するため大量飼育が困難である。そこで、より個体の小さいマウスを用い、さらに ^{13}C 標識 AGEs 等の内部標準と LC-MS/MS を用いて、糖尿病モデルマウスによる AGEs の蓄積評価を行った後、*Aphanothera sacrum* (Sur.) Okada (*A. sacrum*) (和名：スイゼンジノリ) を用いて AGEs 生成阻害効果の評価が可能であるかを検討した。

第1章 *in vitro*における AGEs 生成阻害効果の評価系の確立

1. 背景

1-1. CMA および CML について

CML はヒドロキシラジカル⁽²⁴⁾及びペルオキシナイトライト⁽²⁵⁾によるアマドリ転位生成物の酸化的切断によって産生することが報告されていることから、CML は生体内における重要な酸化ストレスのバイオマーカーと言われている。また、CMA は糖化したコラーゲンより見いだされた AGEs である⁽²⁶⁾(Fig. 3)。CMA はコラーゲンのアルギニン残基がカルボキシメチル化した構造を有しているが、コラーゲン同様にアルギニン残基を多く含むアルブミンと糖の反応では CML がどちらにおいても生産されたのに対し CMA はほとんど産生されないことから、CMA はコラーゲン特異的であることが示されている⁽²⁷⁾。コラーゲンは組織構造を支える役割だけでなく接着細胞の足場となって様々な機能の発現に関わっている。例えば糖化によってコラーゲンが変性するとコラーゲン自体の機能を失うだけでなく、周囲に存在する線維芽細胞に対しても影響を及ぼす。実際に線維芽細胞に AGEs 化コラーゲンを添加すると、アポトーシスを誘導させるシグナル伝達経路の一つであるシステインプロテアーゼのカスパーゼ3、カスパーゼ8 およびカスパーゼ9 が活性化することによって線維芽細胞がアポトーシスを引き起こすことが報告されている⁽²⁸⁾。コラーゲンは線維芽細胞から産生されることから、糖化コラーゲンの増加による線維芽細胞のアポトーシスはシワの発症にも寄与していることが考えられている。CMA はコラーゲンの GXR 配列に生成することも報告されている⁽²⁹⁾。本実験では天然物抽出物添加による CML、CMA の生成抑制効果についてモノクローナル抗体を用いた ELISA 法によって評価した。

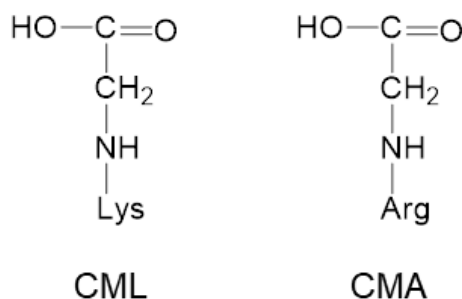


Fig. 3 CML および CMA の構造:

CML はリジン残基が、CMA はアルギニン残基がカルボキシメチル化した構造。

1-2. 従来の AGEs 生成抑制効果の評価系について

還元糖とは塩基性溶液中でアルデヒド基またはケトン基を形成する糖のことである。ELISA 法を用いた天然物由来抽出物の添加による従来の AGEs 生成抑制効果の評価系には、還元糖の中でも生体濃度が最も高いグルコースを用いていた。グルコース分子は、結晶状態において全て環状構造を有しているが、水溶液中では環状構造である α -アノマー型、 β -アノマー型と直鎖構造であるアルデヒド型の3つが平衡混合物として存在している。還元糖は直鎖構造においてアルデヒド基を有しているため、蛋白質のアミノ基と反応して AGEs が生成する。しかし、グルコース溶液において大半は環状構造である α -アノマー型もしくは β -アノマー型であり、アルデヒド型は約 0.003% と極微量な割合しか存在しない⁽³⁰⁾ (Fig. 4)。そのため、グルコースと蛋白質の混合液を 37°C で保温すると AGEs が生成されるまでに約 8 週間の時間を要する。そこで CMA、CML の生成阻害化合物をより短期間で探索する系を確立するため、グルコース、マンノース、ガラクトース、リボース、フルクトースの 5 種の還元糖と可溶性コラーゲンであるゼラチンを混合して保温した後に CMA、CML の生成度合を比較した。

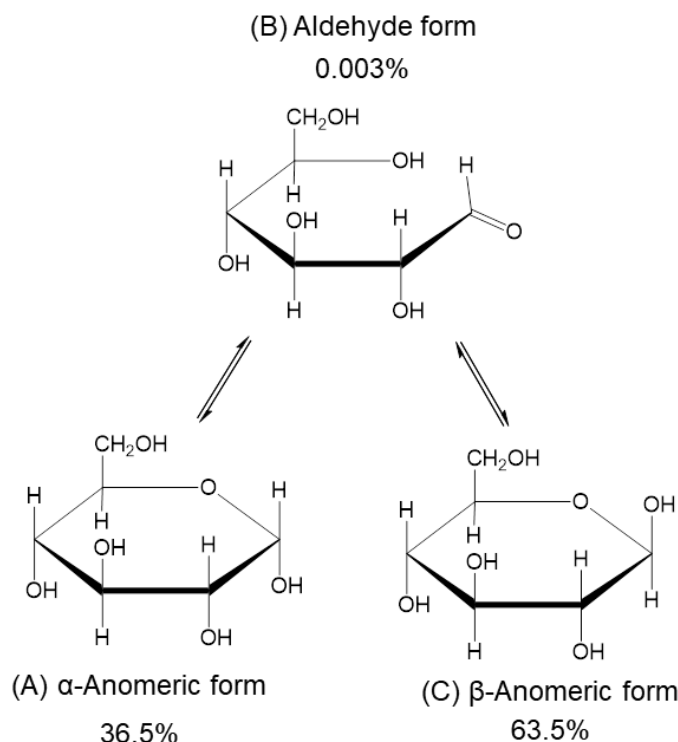


Fig. 4: 水溶液中における D-グルコース立体異性体の平衡状態

グルコースは溶液中において α -アノマー型 (A)、アルデヒド型 (B)、 β -アノマー型 (C) の 3 つの立体異性体に分かれ、それらが平衡状態で存在する。

1-3. トチュウについて

近年 World Health Organization (WHO) の調査で、医療的な治療における生薬の利用の増加が記録されていることから⁽³¹⁾、予防医学においても生薬や天然物由来成分の効能について研究がなされている。*Eucommia ulmoides* (和名：トチュウ) はトチュウ科トチュウ属の植物で中国に自生している(Fig. 5)。トチュウの樹皮は古くから漢方として、葉は茶として利用されており、薬効は利尿作用⁽³²⁾や血圧降下⁽³³⁻³⁴⁾作用などが報告されている。



Fig. 5: トチュウ

Eucommia ulmoides Oliv. (和名：トチュウ) はトチュウ科トチュウ属の植物。中国に自生しており、漢方として古くから利用されている。

さらにトチュウは、1型糖尿病マウスを用いた動物試験において、アンジオテンシンI変換酵素(ACE)を阻害することが報告されていることから⁽³⁵⁾、糖尿病に有効な治療薬としても注目されている。また、トチュウの持続的な投与によって酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド(MDA)の増加を阻害したことも報告されている⁽³⁵⁾。AGEsの1種であるCMLおよびCMAは糖尿病患者の血清中において上昇することが報告されており、さらにこれらAGEsは酸化によって生成することから、本実験ではトチュウの根、樹皮、葉の各部位の抽出物によるCML、CMAの生成抑制効果を測定し、トチュウがAGEsの観点からも糖尿病を含む生活習慣の治療に有効であるかどうかELISA法を用いて評価した。さらに活性成分を同定するために単離を行った。

2. 実験方法

2-1. 各還元糖とゼラチン混合物における CML、CMA の生成速度の比較

2-1-1 サンプル調製

濃度が 60 mM となるように、グルコース、マンノース、ガラクトース、リボース、フルクトースの 5 種の還元糖を 200 mM Phosphate buffer (pH 7.2) (ページ 36 参照) で調製した。また、ゼラチン (4 mg/mL) も同様に 200 mM Phosphate buffer (pH 7.2) 調製し、クリーンベンチ内で各還元糖とゼラチンを 1:1 で混合させたものを 0.45 μ m 滅菌フィルターに通した。その後、混合した還元糖ゼラチン溶液を 37°C インキュベーターで 7 日間反応させた。その他に、ネガティブコントロール(0 日間反応液: Day 0) として各還元糖ゼラチン溶液 (2 mg/mL) を調製した。Day 0 に関しては調製後すぐに -20°C で保管した。

2-1-2 ELISA 法

(1) コーティング

サンプルの蛋白質濃度が 1 μ g/mL、10 μ g/mL になるように Phosphate buffer saline (PBS) (ページ 36 参照) で希釈し、96 well ELISA プレート (F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE) に 100 μ L ずつ添加した。その後ラップをして、2 時間室温に静置した。

(2) ブロッキング

抗体の反応特異性を上げるためにブロッキングを行った。0.5% ゼラチン溶液を PBS で調製し、各 well に 200 μ L ずつ添加後、1 時間室温に静置した。

(3) 1 次抗体添加

1 次抗体はそれぞれ Tween 20 を 0.05% になるように添加した PBS (Washing buffer) (ページ 36 参照) で希釈した。anti-CML antibody (6D12) (0.5 μ g/mL)、または anti-CMA antibody (3F5) (0.1 μ g/mL) を各 well に 100 μ L 加え、1 時間室温に置いた。

(4) 2 次抗体添加

HRP-anti mouse IgG (γ) を Washing buffer で希釈し (0.1 μ g/mL)、各 well に 100 μ L ずつ添加し、1 時間室温に静置した。

(5) 発色

室温に戻した Substrate buffer (ページ 36 参照) 10 mL に α -フェニレンジアミン二塩酸

塩タブレット (OPD tablet) 1 錠を溶かし、ここに過酸化水素溶液 6 μ L を加え発色液を調製した。そして 8 連ピペッターを用いてプレートの 1 列ごとに 10 秒間隔で発色液を 100 μ L ずつ添加した。発色を確認した後、2M H_2SO_4 を 10 秒間隔で 100 μ L ずつ加え、反応を停止した。

※1~5 の各工程間は、毎回プレート内の溶液を捨てて Washing buffer (200 μ L/well) で 3 回洗浄した。

(6) 測定

TECAN SPECTRA FUOR (Wako) を用いて、492 nm の波長で吸光度を測定した。

2-1-3. Liquid Chromatography-tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いた CML、CMA の定量

① 酵素処理

各還元糖-ゼラチン混合液は、先行研究を参考に酵素処理を行った⁽³⁶⁾。初めに各還元糖-ゼラチン混合液中のリン酸を除去するために、超純水で一晩透析後、蛋白定量を行った。その後、各標準品および $^{13}\text{C}_6$ CMA、 $^2\text{H}_2$ CML (PolyPeptide Laboratories, Strasbourg, France) および $^{13}\text{C}_6$ リジン (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA, USA) を混合液に添加し、遠心濃縮によって乾固した。乾固したサンプルを 20 mM 塩酸 100 μ L で溶解し、ペプシン溶液 (2 mg/mL in 20 mM 塩酸) を添加し 24 時間 37°C でインキュベートした。次に中和剤として 500 mM 水酸化カリウムと 0.5 M リン酸カリウム buffer (pH 7.4) をサンプルに加え、プロナーゼ E を添加した後 24 時間 37°C でインキュベートした。その後、アミノペプチダーゼおよびプロリダーゼをサンプルに添加し、48 時間 37°C でインキュベートした。全ての酵素処理中のインキュベートにおいて何度か混和した。酵素処理完了後、全てのサンプルを乾固させた。

② 陽イオン交換カラム

乾固したサンプルに超純水 1.0 mL を加え、サンプルを溶媒に溶かした。バキュームマニホールドに陽イオン交換カラムである Strata-X-C をサンプルと同数セットし 100 % MeOH 1.0 mL, 超純水 1.0 mL の順にカラムに通液し平衡化させた。その後カラムにそれぞれ超純水に溶解させたサンプル 1.0 mL 全量をロードし通液させ、次に 2 % ギ酸 3.0 mL を通液することで洗浄した後 7 % アンモニア水 3.0 mL で溶出させた。溶

出液は回収し、2.0 mL エッペンドルフチューブに分注し、吹き付け式濃縮機にて NH_3 を除去し、乾固させた。

③ LC-MS/MS による測定

乾固したサンプルに 20 %アセトニトリル 0.1 %ギ酸溶液を 100 μL 加え、よく攪拌してサンプルを溶媒に溶かした。サンプル全量を 0.2 μm Centrifugal Filters にて 10000 rpm, 4 min, 20°Cで遠心ろ過した。通過液にさらに 20 %アセトニトリル 0.1 %ギ酸溶液を 900 μL 加え攪拌後、測定用バイアルに移し LC-MS/MS による測定を行った。測定条件はページ 39 に記載した。

2-2. トチュウの根、樹皮、葉の各部位の抽出物および葉由来単離成分による CMA、CML 生成阻害効果の評価

2-2-1 抽出ならびに精製・単離方法

① 抽出

トチュウ葉は 2005 年 8 月に中国四川省成都で採取されたものを使用した。採取後迅速に 100~110°Cの蒸気で短時間処理した。一部を標本として真空パックし、崇城大学薬草園の植物標本室に保管した。トチュウの根および樹皮も同様に中国で採取されたものを使用した。乾燥させたトチュウの根、樹皮、葉を 60°Cの水で 10 時間抽出し、トチュウ根抽出物 (ERE) およびトチュウ樹皮抽出物 (EBE) そしてトチュウ葉抽出物 (ELE) を得た。

② トチュウ葉抽出物の精製・単離

崇城大学池田教授より ELE の単離物を供与いただいた。ELE の精製・単離の方法は ELE を Diaion HP-20P (三菱化学株式会社、東京、日本) を充填したカラムに付し、 H_2O 、30% MeOH、50% MeOH、80% MeOH および MeOH のグラジエントによって分画した (Fr. 1-5)。50% MeOH で溶出した Fr. 3 の一部 (2.0 g) を Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bioscience Co., Uppsala, Sweden) を充填したカラムに付した後、MeOH で溶出し、isoquercetin (134 mg) と Fr. 3a を得た。Fr. 3a (441 mg) を Chromatorex ODS (フジシリシア、春日井、日本) を充填したカラムに付した後、 H_2O -MeOH (3 : 7 から 1 : 1) のグラジエントで溶出し、quercetin 3-O-sambubioside (155 mg) と Fr. 3a-1 を得た。次に、

Fr. 3a-1 (12 mg) を Cosmosil AR-II カラム (5 μ m, 10.0 $\times$ 250 mm、ナカライテスク、京都、日本) と 50% MeOH を使用した High Performance Liquid Chromatography (HPLC) によって精製・分取し、kaempferol 3-*O*-rutinoside (6 mg) を得た。また、Diaion HP-20 のクロマトグラフにおいて 80% MeOH で溶出した Fr. 4 (2.4 g) を Sephadex LH-20 を充填したカラムに付し、MeOH 溶出によって得られた Fr. 4a をさらに Chromatorex ODS を充填したカラムに付し、H₂O–MeOH (6 : 4 から 4 : 6) のグラジエントで溶出し、rutin (40 mg), astragalin (117 mg), and 6''-*O*-acetyl-astragalin (8 mg) を得た。また、quercetin および kaempferol はそれぞれ isoquercetin と astragalin の酸加水分解によって調製された。ELE から得られたこれらすべての化合物は参考文献と比較した ¹H および ¹³C の Nuclear Magnetic Resonance (NMR) データによって確認した⁽³⁷⁻³⁹⁾。ELE の精製・単離のフローチャート (Fig. 6) を下記に示した。

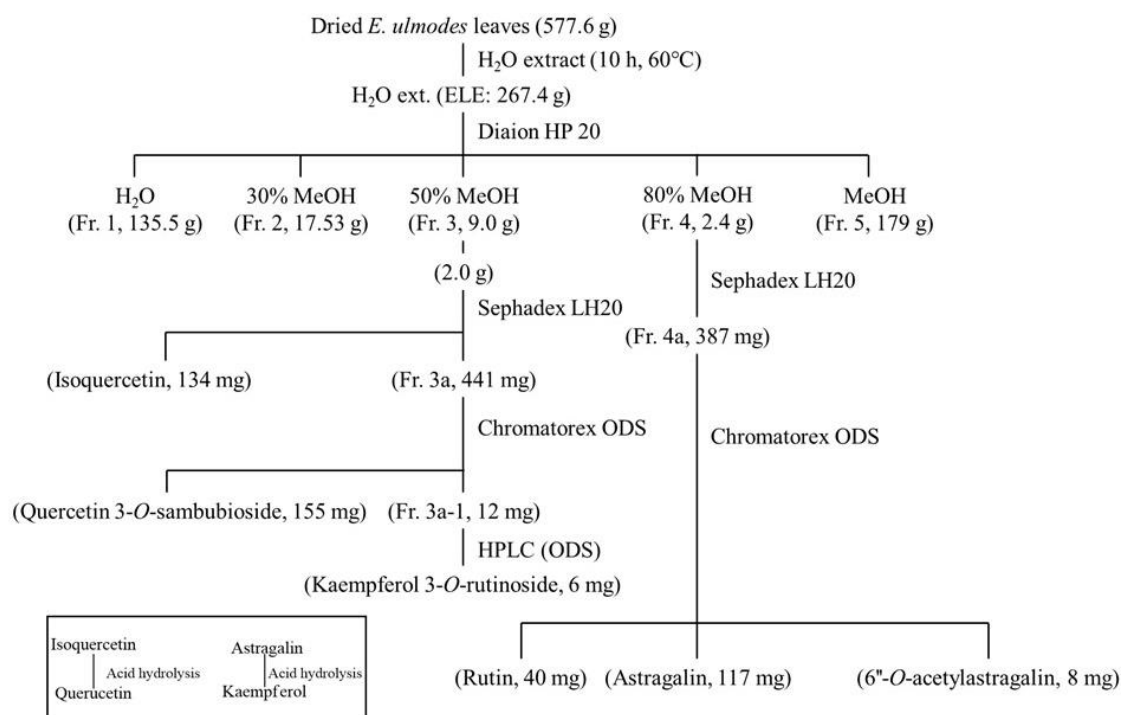


Fig. 6: トチュウ葉成分の精製・単離におけるフローチャート

トチュウ葉の熱水抽出物に含まれる成分として 6 つの化合物と酸加水分解によって得られる 2 つの化合物の計 8 つが同定された。

2-2-2 ELISA 法を用いた CML、CMA 生成阻害効果の評価

各抽出・単離サンプルによる CML, CMA の生成阻害効果を確認するため ELISA 法を用いた生成抑制試験を行った。

① サンプル調製

濃度がリボース 60 mM およびゼラチン (4 mg/mL) となるように 200 mM Phosphate buffer (pH 7.2) で調製した。次に各抽出・画分サンプルをエッペンドルフチューブに 10 mg 測りとり、ジメチルスルホキシド (DMSO) 1.0 mL に溶解して 10 mg/mL とし、その後 DMSO で希釈して 0.1 mg/mL、1 mg/mL とした。希釈後、クリーンベンチ内でリボースとゼラチンを混合させたものを 0.45 μ m 滅菌フィルターに通した。その後、混合したリボースゼラチン溶液にそれぞれ 0.1 mg/mL、1 mg/mL、10 mg/mL に希釈した各抽出・単離サンプルを添加しそれぞれの最終濃度が 0.1 mg/mL、0.01 mg/mL、0.001 mg/mL になるように調製した。その他に、ポジティブコントロール(7 日間反応液: Day 7) およびネガティブコントロール(0 日間反応液: Day 0) としてリボースゼラチン溶液 (2 mg/mL) を作製した。Day 7、day 0 に関しては各抽出・画分サンプルの溶媒である DMSO を加えた。これらのサンプルを 37°C インキュベーターで 7 日間反応させた。

② ELISA 法

2-1-2 ELISA 法 (ページ 11) と同様の方法で行った。

2-3. 統計学的解析

n=3 の結果は平均 $\pm$ 標準偏差 ($\pm$ SD) として表記した。トチュウ葉から単離された化合物における CMA、CML の生成阻害効果の有意差検定は t 検定を用いて解析した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結果

3-1. ELISA 法を用いた CML、CMA の測定

全ての還元糖-ゼラチン混合液において時間依存的な CMA、CML の生成が認められた。また、5 種の還元糖の中で最もリボース-ゼラチンの吸光度が高く生成速度が高いことが認められた。

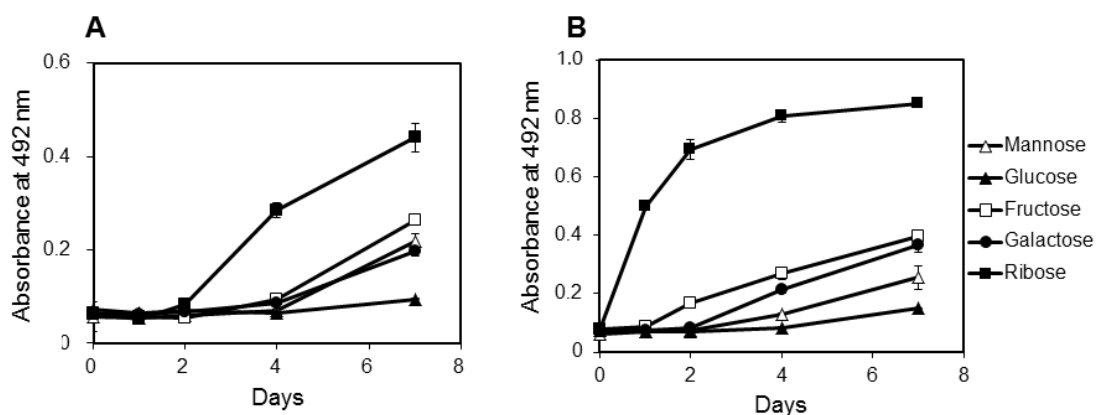


Fig. 7 各還元糖-ゼラチン混合液における CMA、CML 生成抑制効果:

蛋白質コーティング濃度 1 µg/mL (A, B)。モノクローナル抗 CMA 抗体添加濃度 1 µg/mL (A)、モノクローナル抗 CML 抗体添加濃度 0.5 µg/mL (B)。 (n=3)。

3-2. Liquid Chromatography-tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いた CML、CMA の定量

LC-MS/MS を用いた絶対定量においても全ての還元糖-ゼラチン混合液は CMA、CML の生成が認められた。また ELISA 法の結果同様にリボース-ゼラチン混合液が最も CMA、CML が高含量であった (Fig. 8)。

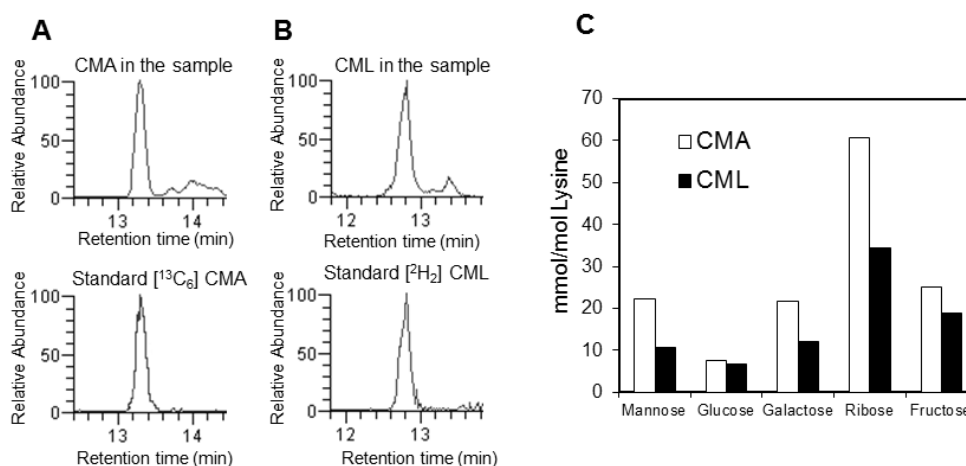


Fig. 8 LC-MS/MS を用いた各還元糖-ゼラチン混合液中 CML、CMA の定量:

リボース-ゼラチン混合液中の CMA 標準品および内部標準のクロマトグラム (A) と CML 標準品および内部標準のクロマトグラム (B)。各還元糖-ゼラチン中 CMA、CML 量の比較 (C)。(n=1)

3-3. トチュウの根、樹皮、葉の各部位の抽出物における CMA、CML 生成阻害効果の評価

トチュウの各部位抽出物において最も葉抽出物 (ELE) が高い CMA、CML 生成阻害効果が認められた (Fig. 9)。また、既知の AGEs 生成阻害剤であるピリドキサミン (px) よりも阻害効果が高いことが認められた。

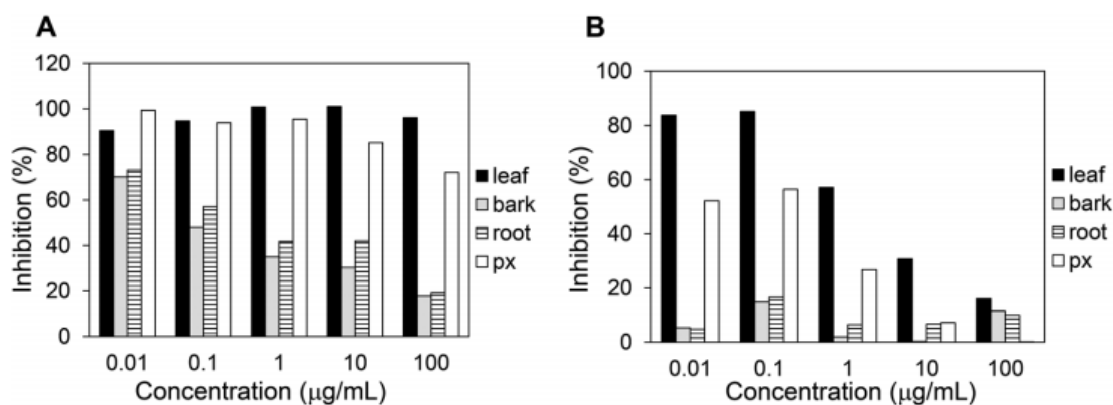


Fig. 9 トチュウの根、樹皮、葉の各部位の抽出物における CMA、CML 生成阻害効果:

トチュウの根、樹皮、葉各部位の抽出物における CMA、CML 生成阻害効果を阻害率で示した。横軸は蛋白質コーティング濃度。モノクローナル抗 CMA 抗体添加濃度 1 μg/mL (A)、モノクローナル抗 CML 抗体添加濃度 0.5 μg/mL (B)。(n=1)

3-4. トチュウ葉由来単離成分における CMA、CML 生成阻害効果の評価

CMA、CML 生成阻害効果が最も高かった ELE の成分を特定する為に崇城大学の池田教授が ELE より単離した化合物を供与していただき(Fig. 10)、これら単離化合物における CMA、CML 生成阻害効果の評価を行った。その結果、AGEs 生成阻害剤である AMG は添加濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ ではほぼ CMA、CML の生成阻害効果は認められなかったのに対し Kaempferol-3O-rutinoside を除くほぼ全ての化合物で AMG よりも高い CMA、CML の生成阻害効果が認められた(Fig. 11)。

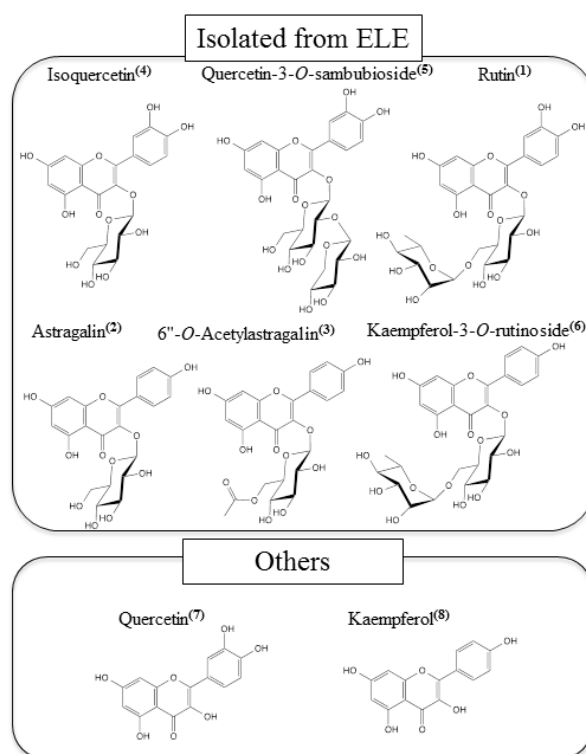


Fig. 10 トチュウ葉抽出物より単離された化合物構造:

Rutin (1)、Astragalin (2)、6''-O-Acetyastragalin (3)、Isoquercetin (4)、Quercetin-3-O-sambubioside (5)、Kaempferol-3O-rutinoside (6)、Quercetin (7)、Kaempferol (8)

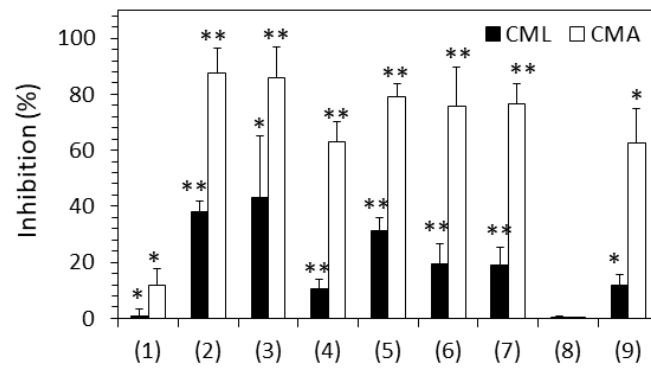


Fig. 11 トチュウ葉由来単離成分における CMA、CML 生成阻害効果:

AMG (1)、Isoquercetin (2)、Quercetin-3-O-sambubioside (3)、
 6"-O-Acetylastragal (4)、Kaempferol (5)、Quercetin (6)、Rutin (7)、
 Kaempferol-3-O-rutinoside (8)、Astragal (9)蛋白質コーティング濃度 10 µg/mL、
 サンプル添加濃度 10 µg/mL。モノクローナル抗 CMA 抗体添加濃度 1 µg/mL、
 モノクローナル抗 CML 抗体添加濃度 0.5 µg/mL。*p< 0.05 vs. control, **p<
 0.01 vs. control。 (n=3)

4. 考察

時間短縮を目的とした AGEs 生成の検討においてリボース-ゼラチンが7日間で最も CMA、CML を生成した。グルコース-ゼラチンが CMA、CML を生成するには8週間の時間を要するが、リボース-ゼラチンはその8倍の速度で CMA、CML を生成した。これは、リボースが溶液中で分解されやすいことから、AGEs 前駆体であり、かつ反応性の高い GO をグルコースよりも多く生成し、その結果 CMA、CML を生成した可能性が挙げられる。実際にグルコースとリボースの GO 生成速度を測定した結果、リボースはグルコースの約 40 倍多く GO を生成した(data not shown)。また、グルコースおよびリボース本体と蛋白質の反応性を比較するために、グルコースおよびリボース-ゼラチン中のアマドリ転位生成物を実際にフェントン反応で酸化させ、CML 生成を比較した。その結果、リボースはグルコースの約 2 倍 CML を生成した(data not shown)。したがって、リボースはグルコースよりもタンパク質との反応性が高く、かつ分解物である GO 生成が多いため、わずか一週間で CMA、CML を生成したと考える。この生成速度の速さから、本研究ではリボース-ゼラチンを用いてトチュウにおける CMA、CML の生成阻害効果を評価した。その結果、トチュウの根 (ERE)、樹皮 (EBE)、葉 (ELE)の抽出物において最も ELE が CMA、CML の生成を阻害した。樹皮や根の主成分はリグナンであることから⁽³⁹⁾、CMA、CML の生成阻害効果を有する活性成分は本研究で単離された ELE に含まれるフラボノイド類である可能性が高いと言える。また、ELE にはイリドイド配糖体も主要な成分として挙げられるが⁽⁴⁰⁾、イリドイド配糖体である Geniposidic acid や Aucubin が含まれる Fr. 1 および Fr. 2 の活性を検討した際、顕著な活性は認められなかった (池田ら未発表データ)。また、実際にトチュウの葉単離成分を用いた CMA、CML 生成阻害効果の評価によって特に効果の高かった阻害化合物として Isoquercetin と Quercetin-3-O-sambubioside が同定された。これら化合物はフラボノイド骨格を持ち抗酸化作用を有することから酸化依存性の AGE である CMA、CML の生成を阻害したと考えられる。先行研究によってフラボノイドの 8 位がメチルグリオキサール (MG)のアルデヒド基と結合し、MG と蛋白質の反応を競合的に阻害する作用も報告されていることから⁽⁴¹⁾、グルコースの自己酸化によって生成された GO と蛋白質との反応も阻害したと考えられる。また、化合物の中でもフェノール性水酸基を2つ有するカテコール骨格を持つ化合物がより AGE 生成阻害効果が高い傾向を示した。過去にフェノール性水酸基を1つ有する *p*-ヒドロキシ安息香酸よりもカテコー

ル (1,2-ジヒドロキシベンゼン)の方が DPPH ラジカル消去活性試験によって抗酸化活性が高いことが報告されていることから⁽⁴²⁾、本研究に用いた化合物の CMA、CML 生成阻害効果の違いは抗酸化活性の高さによるものである可能性が高い。以上のことから、リボースを用いることでグルコースより 8 倍速く CML、CMA 生成阻害効果を評価することが可能となった。

5. 小括

本研究によって ELE が *in vitro* 試験において CMA、CML 抑制効果を有することが明らかとなった。過去の論文でマンゴスチン(*Garcinia mangostana* L.)果皮抽出物および単離化合物において、AGEs の 1 種であり酸化反応で生成するペントシジンの生成を阻害し、さらに肌の弾性および保湿力に改善効果が認められている⁽⁴³⁾。それ故、AGEs 阻害効果を有する食品成分は普段の食生活から老化や生活習慣病の予防が可能になると期待されている。また、ERE および EBE は漢方や生薬として利用されているが、ELE はトチュウ茶として飲用され、食品の扱いである。また、トチュウは糖尿病の治療薬としても期待されている天然物であるが、本研究において ELE は糖尿病で増加する CML、CMA の生成を阻害したことから、トチュウ茶の日常的な摂取は糖尿病の治療だけでなく、糖尿病の発症予防においても有効なことが期待される。本研究によって同定された Isoquercetin と Quercetin-3-O-sambubioside はケルセチン配糖体である。ケルセチン配糖体は投与後、腸内細菌によって摂取量の大部分が糖鎖アグリコンとなることが考えられるが、Isoquercetin と Quercetin-3-O-sambubioside のアグリコンである Quercetin も依然としてアミノグアニジンよりも高い CMA、CML の生成阻害効果を有している(Fig. 11)。また、先行研究において血中の Quercetin 濃度は Quercetin 投与後 約 0.5-3 時間で最大値に到達し、その後減少しながら 24 時間後まで残ることや、Quercetin 摂取量の 5-20%が体内へ吸収されることが報告されている⁽⁴⁴⁾。それ故、トチュウ茶が生体においても CMA、CML の生成阻害効果を有する可能性は高いと考える。

第2章 STZ 誘発 1 型糖尿病マウスを用いた AGEs 生成抑制効果評価系の確立

1. 背景

1-1. STZ マウスを用いた AGEs 測定系の確立

近年 AGEs 研究が進み、現在では LC-MS/MS を用いて数種の AGEs 測定が可能となり、ラットやヒトにおいて血糖値の差に伴って AGEs 蓄積量に変化が生じることが認められている⁽⁴⁵⁾。ヒト介入試験は食習慣のない化合物の投与が安易にできないことや、条件に合った被験者を集めることが困難なことから、生体実験においてもスクリーニング系を確立する必要がある。現在、生体内試験における AGEs 蓄積抑制化合物の探索に動物モデルとしてラットが用いられているが、ラットを用いた機能性評価はコスト及び多大な人的労力を要するため大量飼育が困難である。そこで、本実験の前試験としてより個体の小さいマウスを用い、さらに ^{13}C 標識 AGEs 等の内部標準と LC-MS/MS を用いて、糖尿病モデルマウスによる AGEs の蓄積評価を行った結果、正常群と比べ、1 型糖尿病を誘発したマウスは飼育期間 2 か月で水晶体中 CML 含量が有意に上昇し、さらに飼育期間 3 ヶ月では水晶体において 1 型糖尿病を誘発したラットと同様の AGEs 蓄積傾向が認められた (Fig. 12)。以上のことから飼育期間を 3 ヶ月に設定し、1 型糖尿病マウスを用いてスイゼンジノリ摂食による水晶体中 AGEs 蓄積抑制効果の評価を行った。

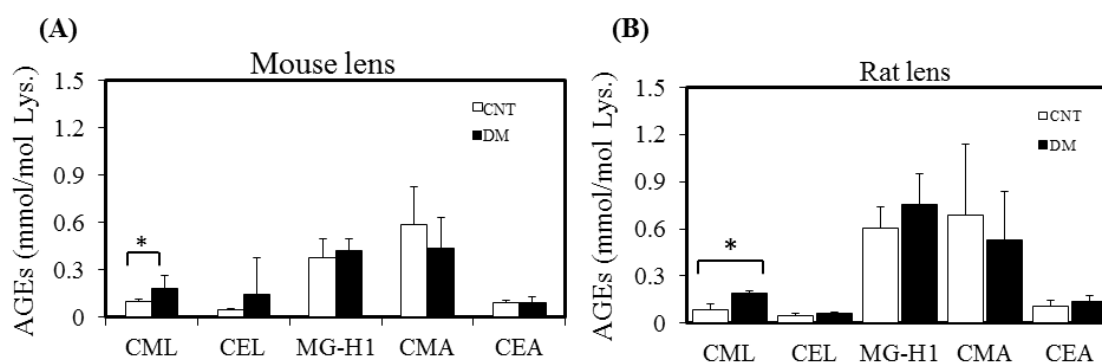


Fig. 12 ラット水晶体とマウス水晶体中 AGEs 含量の比較:

3 ヶ月間飼育した 1 型糖尿病マウスは水晶体中において正常群と比べ、CML 含量が有意に上昇し、さらに 1 型糖尿病ラットと同様の AGEs 変動が認められた。* $p < 0.05$ vs. control. (CNT: 正常群、DM: 1 型糖尿病群)。

1-2. スイゼンジノリとは

スイゼンジノリ (*Aphanothece Sacrum* (Sur.) Okada) は清澄な水域でのみ増殖する日本固有の淡水産ラン藻である。外観は、キクラゲを思わせる緑褐色にないし茶褐色の寒天のような塊で、寒天質の中には、多数のマユ型単細胞が散在し、常時、2分裂しながら、同時に細胞外に粘性物質を分泌して増殖する (Fig. 13)。1872 年に、オランダの植物学者スリンガーが、本種を生物学的に藍色植物門 藍藻綱 クロオコックス目 クロオコックス科に分類した。また、日本の九州地方では、学術的に同定される前から、保護・育成され、高級郷土料理の素材として利用されていた⁽⁴⁶⁾。しかし 250 年以上前から食習慣があるにも関わらず、スイゼンジノリは分布範囲が限定され、実験材料の入手が困難なことから、その生理・生態や機能性に関する報告は少ない。本実験では、生体におけるスイゼンジノリの機能性評価を目的として、AGEs 蓄積の抑制効果を評価した。

(A)



(B)

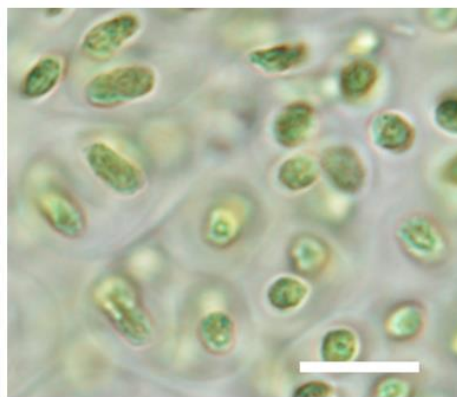


Fig. 13 スイゼンジノリの外観 (A) と細胞 (B) :

洗浄したスイゼンジノリの外観(A)と光学顕微鏡で観察したスイゼンジノリの細胞 (B)。スケールバー は 1 cm (A) と 10 μ m (B)。

2. 実験方法

2-1. スイゼンジノリ含有エサの調製

スイゼンジノリを食素材としての新規機能性を明らかにするために、1%スイゼンジノリ含有エサの調製を行った。東海大学で養殖したスイゼンジノリを凍結乾燥し、粉末状にした (以下 Asa と表記)。Asa を 30 g 量り取り、2970 g の粉末エサ(粉末状の CE-2)に混ぜ、水を加えながらこねた後、直径 2 cm のシリンダーに詰め成形した。3~4 cm 程度に包丁で 3 等分に切り 80°Cに設定したオーブンで水分が蒸発するまで加熱した。同様の調製を飼育期間中、3 回行った。

2-2. 1 型糖尿病の誘発および飼育期間中の血糖値・体重、摂食量の測定

ストレプトゾトシン (STZ) を 150 mg/kg の濃度となるように 0.05 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) (ページ 36 参照)に溶解したものをマウス (Sea:ddY (♂)) 25 匹中 19 匹に腹腔注射し、β細胞を破壊することによって 1 型糖尿病を誘発させた。19 匹すべてのマウスの血糖値が 200 mg/dL 以上となったことを確認した日よりマウスを正常群 (Normal 群) (n=6)、糖尿病群 (DM-C 群) (n=9)、Asa 摂食 DM 群 (DM-Asa 群) (n=10) の 3 群に分けて 3 ヶ月間の飼育を開始した (Table 1)。スイゼンジノリを摂食したことによる効果を評価するため、マウスの空腹時血糖値 (6 時間絶食) を簡便測糖 G チェッカーによって毎月測定し、体重および摂食・摂水量は 2 週間毎に計量した。

	Normal 群	DM-C 群	DM-Asa 群
餌の種類	CE-2	CE-2	1 %Asa 含有エサ

Table 1 マウス各群および投与したエサの種類:

正常群 (Normal 群) (n=6)および糖尿病群 (DM-C 群) (n=9) は CE-2 (通常エサ)を与え、Asa 摂食 DM 群 (DM-Asa 群) (n=10) は 1 %Asa 含有エサ与えて 3 ヶ月間の飼育を行った。

2-3. 水晶体白濁度の診断

飼育 3 ヶ月後、30%イソフルラン(v/v)麻酔下においてマウスから水晶体を摘出した後、水晶体白濁進行度を 4 段階に分けて評価し (グレーディング法)、3 群間で白濁度を比較した^(47,48)。また、ウェスタンブロット法や免疫染色法で行われる Densitometry 法 (解析ソフト: imageJ) を用いて白濁度を数値化し⁽⁴⁹⁾、グレーディング法同様に 3 群間の水晶体白濁度を比較した。

2-4. LC-MS/MS によるマウス水晶体中 AGEs 測定

① 還元処理

水晶体サンプルをホモジナイズして蛋白定量を行った後、蛋白量が 0.3 mg となるようエッペンドルフチューブに分取して、Sodium Borate Buffer (0.2 M ホウ酸、2 mM diethylaminetriaminepentaacetic acid (DTPA)、pH 9.1) (ページ 36 参照)をサンプルと同量加えた。さらに、NaBH₄ 溶液 (2 mM NaBH₄, 0.1 M NaOH) (ページ 36 参照)をサンプルの 10 分の 1 量加え 4 時間放置した。その後、20 % Trichloroacetic Acid (TCA) 溶液を加え、攪拌し、遠心分離機 (12000 rpm, 5 min, 4°C) によって蛋白質を沈殿させた。その後、上清を破棄した。

② 塩酸加水分解

サンプルにそれぞれ 1 μM の CML、CEL、CEA、MG-H1 内部標準液を 10 μL (0.01 nmol) 1 mM の Lysine 内部標準液を 5.0 μL (5 nmol) ずつ添加し、6 M HCl で 1.0 mL までフイルアップし、100 °C で 18 時間ヒートブロックで加温した。その後、遠心濃縮機を用いて塩酸を除去した。

③ 陽イオン交換カラム

乾固したサンプルに超純水 1.0 mL を加え、サンプルを溶媒に溶かした。バキュームマニホールドに陽イオン交換カラムである Strata-X-C をサンプルと同数セットし 100 % MeOH 1.0 mL、超純水 1.0 mL の順にカラムに通液し平衡化させた。その後カラムにそれぞれ超純水に溶解させたサンプル 1.0 mL 全量をロードし通液させ、次に 2 % ギ酸 3.0 mL を通液することで洗浄した後 7 % アンモニア水 3.0 mL で溶出させた。溶出液は回収し、2.0 mL エッペンドルフチューブに分注し、吹き付け式濃縮機にてアンモニアを除去し、乾固させた。

④ LC-MS/MS による測定

乾固したサンプルに 20 %アセトニトリル 0.1 %ギ酸溶液を 100 μ L 加え、よく攪拌してサンプルを溶媒に溶かした。サンプル全量を 0.2 μ m Centrifugal Filters にて 10000 rpm, 4 min, 20°Cで遠心ろ過した。通過液にさらに 20 %アセトニトリル 0.1 %ギ酸溶液を 900 μ L 加え攪拌後、測定用バイアルに移し LC-MS/MS による測定を行った。測定条件はページ 39 に記載した。

2-5. スイゼンジノリ抽出物における CMA、CML 生成抑制効果の評価

2-5-1. 抽出方法

Asa を 1 g ずつ量り取り、50 mL の熱水および 20%EtOH、100%EtOH、100%アセトンにそれぞれ加え、よく混合した。3 日間室温で静置後、ろ紙を用いてろ過を行った。抽出後、エバポレーターを用いて減圧下濃縮し、凍結乾燥で乾固し、熱水抽出物 (121.6 mg)、20% EtOH 抽出物 (52.4 mg)、100%EtOH 抽出物 (25.2 mg)、100%アセトン抽出物 (6.5 mg) を得た。

2-5-2. ELISA 法を用いた CML、CMA 生成抑制効果の評価

ページ 11 に記載した第 1 章 2-1-2 と同様に行った。

2-6. 統計学的解析

結果は平均 $\pm$ 標準偏差 ($\pm$ SD) として表記した。体重・血糖値および LC-MS/MS による AGEs 定量の有意差検定は one-way repeated ANOVA を用いた。多重検定にはダネット検定を用いた⁽⁴⁷⁾。また、水晶体の白濁度における有意差検定クラスカルウォリス検定を行った後、マンホイットニーの U 検定を用いて解析した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 飼育期間中の血糖値・体重、摂食量の変化

試験期間中の血糖値測定において、糖尿病群 (DM-C 群、DM-Asa 群) は非糖尿病群 (Normal 群) に比べ血糖値が高値を示し、すべての糖尿病マウスで 300 mg/dl 以上の血糖値が観察された (Fig. 14 A)。また、1 型糖尿病を誘発したマウスの体重は、Normal 群と比較して減少した (Fig. 14 B)。しかし、糖尿病群間では大きな血糖値の変動および体重の増減は認められなかった。

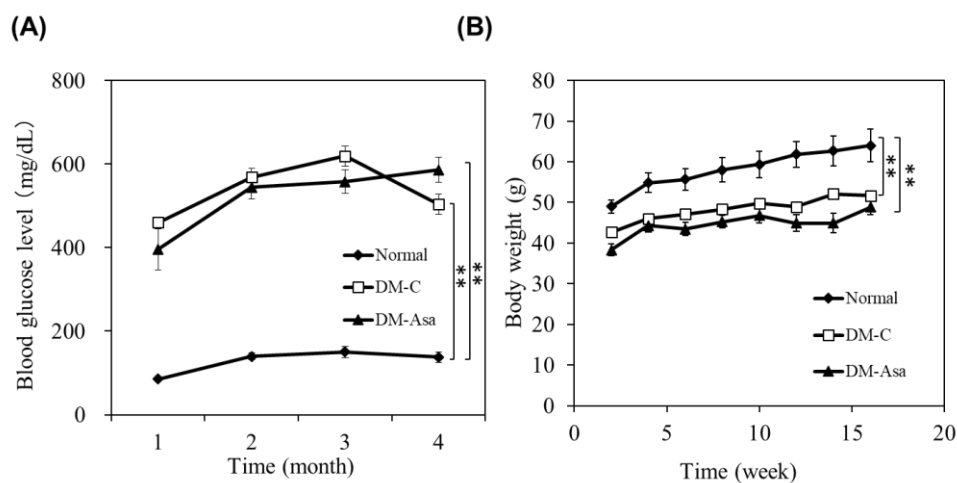
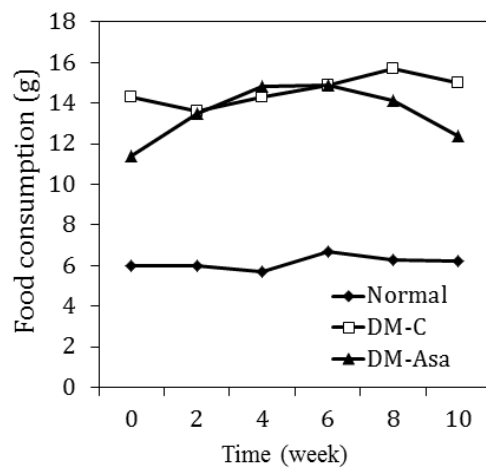


Fig. 14 血糖値および体重変動:

STZ によって 1 型糖尿病を誘発したマウスの血糖値変動 (A) と体重 (B)。Normal: 正常群 (n = 6)、DM-C: 糖尿病群 (n = 9)、DM-Asa: 1% スイゼンジノリ摂食 DM 群 (n = 10)。*P 値 < 0.05 vs DM-C ; **P 値 < 0.01 vs DM-C。

また、DM-C 群、DM-Asa 群は正常群と比べ、摂食量と摂水量が増加したが (Fig. 15)、血糖値や体重同様にスイゼンジノリを摂食したことによる摂食量と摂水量の大きな変化は認められなかった。

(A)



(B)

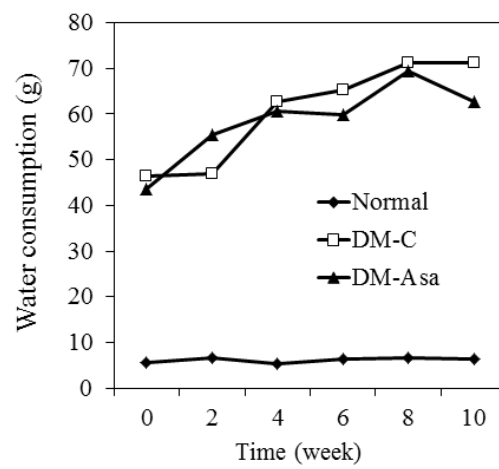


Fig. 15 摂食量および摂水量の変動:

マウスのエサ摂食量 (A) と摂水量 (B)。Normal: 正常群 (n = 6)、DM-C: 糖尿病群 (n = 9)、DM-Asa: 1% スイゼンジノリ摂食 DM 群 (n = 10)。

3-2. 3 群間における水晶体白濁進行度の比較

摘出したマウス水晶体を永井らの論文を参考に 4 つのグレードに分けた (Fig. 16 A)⁽⁴⁸⁾。DM-C 群は正常群と比較して、水晶体白濁値が有意に増加した。そして、DM-Asa 群は DM-C 群と比べ、白濁進行遅延傾向を示した (Fig. 16 B)。さらに、ウェスタンブロット法や免疫染色法で行われる Densitometry 法を用いて白濁度を数値化した結果、DM-Asa 群は DM-C 群と比較し有意差に水晶体の白濁を抑制した (Fig. 16 C)。

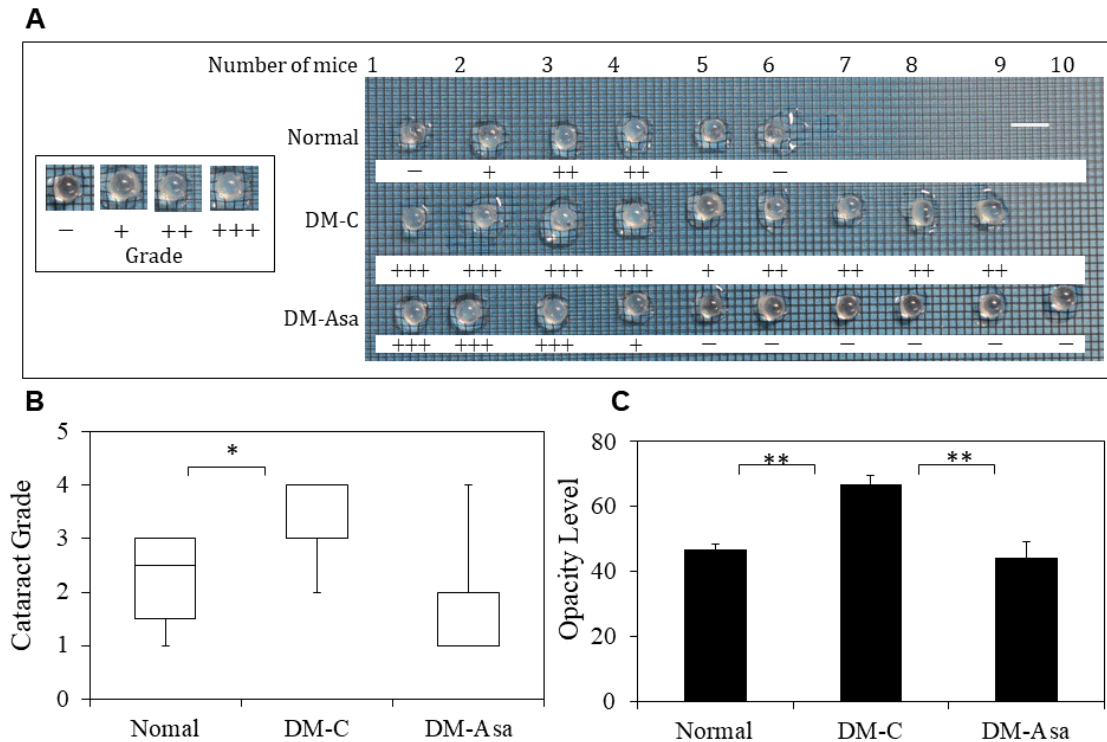


Fig. 16 白濁進行度の比較:

グリッド線を引いたシート上に水晶体を並べ、水晶体の白濁度を 4 段階でグレーディングした。スケールバーは 5 mm を示す (A)。3 群間の水晶体白濁度の比較結果 (B)。Densitometry 法を用いた水晶体白濁度の評価 (C) Normal: 正常群 (n = 6)、DM-C: 糖尿病群 (n = 9)、DM-Asa: 1% スイゼンジノリ摂食 DM 群 (n = 10)。*P 値 < 0.05 vs DM-C; **P 値 < 0.01 vs DM-C。

3-3. LC-MS/MS によるマウス水晶体中 AGEs 測定

各群の水晶体中の AGEs 量を測定した結果、DM-C 群は正常群と比較し、CML 蓄積量が有意に増加し、さらに DM-Asa 群は DM-C 群と比べ CML 蓄積を有意に抑制した (Fig. 17)。

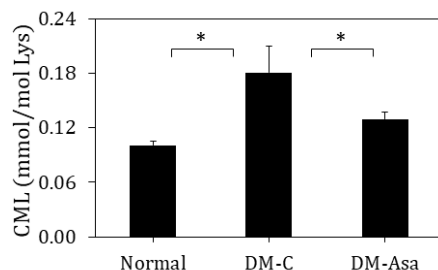


Fig. 17 水晶体中 CML 含量の比較:

LC-MS/MS によって測定した水晶体中 CML 含量の比較。Normal: 正常群 (n = 6)、DM-C: 糖尿病群 (n = 9)、DM-Asa: 1% スイゼンジノリ摂食 DM 群 (n = 10)。*p 値 < 0.05 vs DM-C。

しかし、3 群間のその他の水晶体中 AGEs 含量の比較では MG-H1、CEA、CMA、CEL の 4 種全てにおいて有意な変化は認められなかった (Fig. 18)。また、CML と白濁度は正の相関傾向を示した(|r|=0.36, p < 0.08) (Fig. 19)。

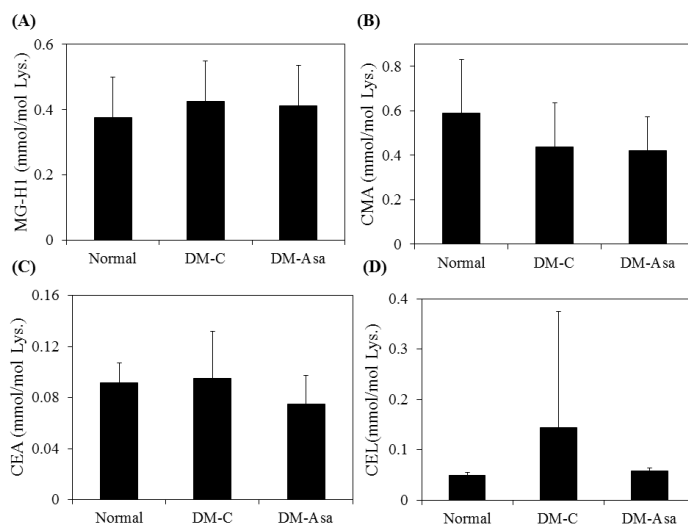


Fig. 18 その他 4 種の水晶体中 AGEs 含量の比較:

LC-MS/MS によって測定した水晶体中のその他 4 種の AGEs 含量の比較。Normal: 正常群 (n = 6)、DM-C: 糖尿病群 (n = 9)、DM-Asa: 1% スイゼンジノリ摂食 DM 群 (n = 10)。 (A) MG-H1、(B) CMA、(C) CEA、(D) CEL の含量を示す。

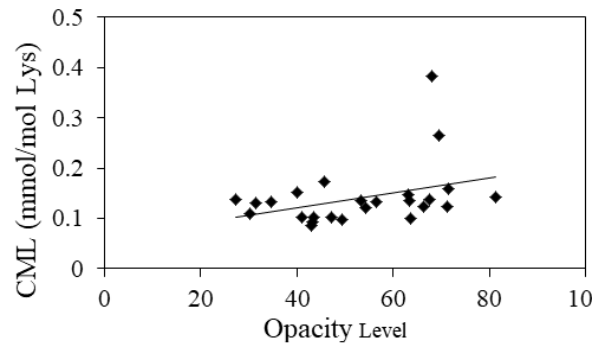


Fig. 19 水晶体中 CML 含量と白濁度の相関:

Normal: 正常群 (n = 6)、DM-C: 糖尿病群 (n = 9)、DM-Asa: 1% スイゼンジノリ摂取 DM 群 (n = 10)。|r|=0.36, p < 0.08。

3-4. スイゼンジノリの熱水および 20%EtOH、100%EtOH、100%アセトン抽出物における CMA、CML 生成抑制効果

スイゼンジノリの熱水および 20%EtOH、100%EtOH、100%アセトン抽出物全てのサンプルにおいてポジティブコントロールの luteolin よりも CMA・CML 生成抑制活性が低く、抑制効果が認められなかった (Fig. 19)。

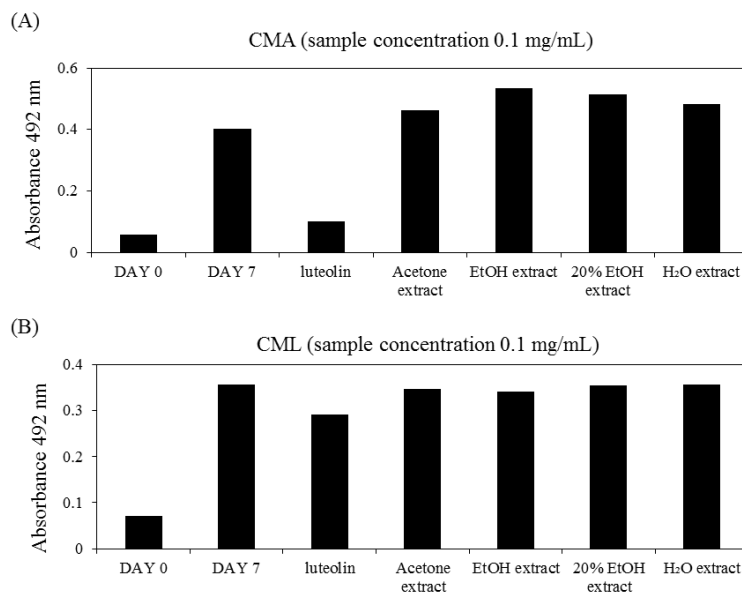


Fig. 20 ELISA 法を用いた各スイゼンジノリ抽出物における CMA、CML 生成抑制効果:

CMA は蛋白質コーティング濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ 、CML は蛋白質コーティング濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ 、サンプル添加濃度はともに 0.1 mg/mL 。モノクローナル抗 CMA 抗体添加濃度は 1 $\mu\text{g/mL}$ 、モノクローナル抗 CML 抗体添加濃度は 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。(n=1)

4. 考察

1 型糖尿病を誘発したマウスは DM-Asa 群および DM-C 群のどちらにおいても血糖値が 300 mg/dl 以上であり、かつ Normal 群と比較して体重増加が停滞していたことから糖尿病を発病していることが確認された (Fig. 14)。また、摂食量測定においてスイゼンジノリ摂食による極端な摂食量の増減がなかったことから、スイゼンジノリ摂取には毒性がないことが考えられる (Fig. 15)。LC-MS/MS を用いた水晶体中 AGEs 含量の測定では DM-C 群は正常群と比べ、水晶体中 CML 蓄積量が有意に上昇し、その蓄積がスイゼンジノリを摂食したことによって有意に抑制した (Fig. 17)。さらにスイゼンジノリはまた、1 型糖尿病マウス水晶体の白内障を有意に抑制した (Fig. 16)。蛋白質変性の要因の一つには AGE 化が挙げられている⁽⁵¹⁾。下記の図に示すように、Lys を例に挙げると、正常な蛋白質の立体構造を構成している Lys は側鎖のアミノ基によって正の電荷を帯びている。この Lys がグルコース等の還元糖と反応し AGE 化すると、末端がカルボキシル基に変わることによって負の電荷を帯びる。その結果、蛋白質電荷の変化によって蛋白質の立体構造も変化し、正常な機能が失活する (Fig. 21)。

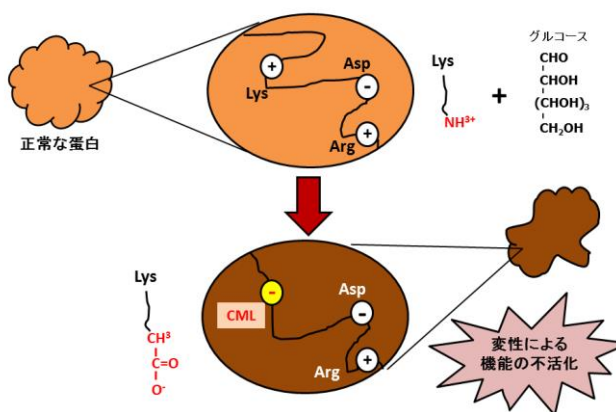


Fig. 21 AGEs 化による蛋白質の変性例:

蛋白質の立体構造を構成する Lys と還元糖が反応し、AGEs の 1 種である CML を形成すると電荷が変化し構造が変化し、正常な蛋白質の機能が失活する。

このように蛋白質の AGE 化は変性に深く関わっている。CML は水晶体を構成する主要な蛋白質であるクリスタリンにおいて加齢依存的に蓄積する主要な抗原性 AGE 構造として知られている^(51,52)。また、CML は第 1 章の背景で述べたように、ヒドロキシラジカル⁽²⁴⁾及びペルオキシ亜硝酸⁽²⁵⁾によるアマドリ転位生成物の酸化的切断によっ

て產生することが証明されていることから、生体内における重要な酸化ストレスのバイオマーカーであることが示されている。一方、本研究では、水晶体中 AGEs 含量測定においてケトン体異常や糖代謝異常によって生成される CEL 及び MG-H1 等の AGEs に大きな変化は認められなかった (Fig. 18)。これらのことから、スイゼンジノリに含まれる抗酸化成分がフリーラジカルを補足し、酸化ストレスの亢進を抑制したことによって酸化依存性の CML 形成を抑え、水晶体蛋白質の変性による白濁進行を遅延したことが考えられる。過去に 1 型糖尿病ラットを用いたクエン酸投与実験において CEL の蓄積抑制効果および白内障の抑制効果が証明されている⁽⁴⁸⁾。1 型糖尿病を発症すると、インスリンの分泌不全によって細胞内にグルコースが取り込まれなくなり、ATP を生産するためにケトン体の生成が促進される。ケトン体の生成が促進されることにより、CEL の生成も亢進する⁽⁴⁸⁾。クエン酸は細胞膜間を通過することが可能なので、クエン酸を摂取するとクエン酸がミトコンドリア隔膜から TCA 回路に入り ATP が生産され、ケトン体生成が抑制される。これにより CEL の蓄積が抑制される可能性が示されている。しかし、スイゼンジノリ摂食実験において、CEL 蓄積に大きな変化が認められなかったことから、クエン酸とは異なるメカニズムが関わっていることが考えられる。網膜に蓄積する食物カロテノイドであるルテインには白内障の改善効果が報告されており⁽⁵³⁾、スイゼンジノリにはルテインの構造異性体であるゼアキサントシンが成分として含まれている⁽⁵⁴⁾。そこで、第一章で述べた方法同様に ELISA 法を用いた *in vitro* 実験によってスイゼンジノリ粗抽出物における CML 抑制効果の検討を行った。抽出物は、熱水および 20%EtOH、100%EtOH、100%アセトンによってそれぞれ抽出した。しかしながらゼアキサントシンを含む脂溶性抽出物 (100%EtOH、100%アセトン) だけでなく水溶性抽出物においても CML の生成抑制効果は *in vitro* 実験では認められなかった (Fig. 20)。そのため、ゼアキサントシンは直接的に CML 生成を抑制しているのではなく、生体における代謝を介し、間接的に CML 生成を抑制した可能性が挙げられる。スイゼンジノリにはまた、巨大分子多糖類であるサクランが含まれている。オオバナオケラの根茎に含まれる多糖類は還元糖を消化する腸内細菌の能力を促進し、腸内細菌叢を調整・改善することが報告されていることから⁽⁵⁵⁾、サクランにおいても腸内細菌叢を改善したことによって炎症作用が抑えられ、その結果 CML の生成を抑制した可能性も挙げられる。

5. 小括

以上の結果から白内障を抑制するというスイゼンジノリの新規機能性が初めて実証された。今後明確なメカニズム解明のためにゼアキサンチンやサクランなどの単離物を用いた研究を行う必要がある。また、本研究によって 1%スイゼンジノリ含有エサを摂食することでマウス水晶体の白内障が有意に抑制されたことから、1日に新鮮重量で約 15 g のスイゼンジノリを日々摂取することによって白内障を抑制する可能性が示唆された。この量は実行可能な量であり、発症すると治療が困難な糖尿病白内障などの糖尿病合併症の新たな予防法として期待できる。しかし、ヒトとマウスでは代謝経路や代謝速度が異なるため、ヒト介入試験によって実際のヒトに対する効果も評価を行う必要がある。また、本研究によって STZ 誘発 1 型糖尿病マウスを用いた AGEs 生成抑制効果評価系が確立された。よって、本研究によりラットの代わりにマウスを用いることが可能になったことから、AGEs 研究における *in vivo* 試験が今後より活発になることが期待される。

総括

現代ではガンや動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病患者の増加から機能性食品の開発が注目されているが、実際に消費者の手に渡っている機能性食品は *in vitro* 試験のみで効果が提唱されているものも少なくない。数多くある食品の中から機能性を有する成分を探索するために *in vitro* 試験は重要であるが、食品が体内に取り入れられた時にその機能性成分が実際に生体内で吸収されているか評価するためには段階的に *in vivo* 試験や臨床試験が必須であると考えられる。本研究では AGEs 生成阻害効果の評価における新たな *in vitro* および *in vivo* 試験の評価系を確立した。第 1 章の *in vitro* における AGEs 生成阻害効果の評価系の確立では、グルコースの代わりにリボースを用いることでより効率的に数多くある食品の中から機能性を有する成分の探索が可能となった。また、第 2 章の STZ 誘発 1 型糖尿病マウスを用いた AGEs 生成抑制効果評価系の確立では、これまで AGEs 研究ではラットを用いた *in vivo* 試験がメジャーであったものの、本研究によって STZ 誘発 1 型糖尿病マウスを用いた AGEs 生成抑制効果の評価系が確立されたことで、ラットと比較して低コストでかつ大量飼育が容易な *in vivo* 試験が可能となった。したがって、本研究は、従来よりも効率的に AGEs 抑制効果を持つ天然物や化合物のスクリーニングする手法を確立し、本研究分野における新たな基盤を構築したと言える。

その他に、第 2 章における *in vitro* 試験 (ELISA 法) によるスイゼンジノリ抽出物の CMA、CML 生成抑制効果の評価に気になる点を見出した。スイゼンジノリは *in vitro* 試験において CML の阻害効果を示さなかったにも関わらず *in vivo* 試験において水晶体中 CML 蓄積の抑制効果を示し、さらに白内障の進行遅延効果も認められた。過去に CEL の蓄積抑制効果および白内障の抑制効果が報告された 1 型糖尿病ラットを用いたクエン酸投与実験においても⁽⁴⁷⁾、クエン酸は *in vitro* 試験 (ELISA 法) において直接的な CEL 生成抑制効果を示していない。これらのことから、AGEs 研究において現在の ELISA 法のための *in vitro* 試験では、実際に生体内で効果のある成分や機能性食品を検出できない可能性がある。反対に、ELISA 法で効果を示した食品でもラットやマウスを用いた *in vivo* 試験では効果を示さない場合も存在することが考えられる。したがって ELISA 法よりも生体条件に近く、マウスよりも簡便な細胞実験などの AGEs 抑制系効果の評価系を確立することが今後の課題である。

使用した薬品

< 200mM phosphate buffer (pH 7.2) >

- 200 mM disodium hydrogenphosphate 12-water ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (M.W: 358.14) [Wako, 196-02835]
- 200mM sodium dihydrogenphosphate dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (M.W: 156.01) [関東化学, 37239-00]

< substrate buffer (pH 5.0)>

- citric acid [Wako, 030-05525]
- disodium hydrogenphosphate 12-water ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

< phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水) (10×PBS) (pH 7.0) >

- sodium chloride (NaCl) [nacalai tesque, 31320-34]
- potassium chloride (KCl) [nacalai tesque, 28514-75]
- potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) [nacalai tesque, 28721-55]
- disodium hydrogenphosphate 12-water ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) [nacalai tesque, 31723-64]

< Washing buffer >

- 1×PBS
- polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate(Tween 20) [Wako, 167-11515]

< 0.05M Citrate buffer (クエン酸ナトリウム緩衝液) (pH 4.5)>

- citric acid monohydrate (クエン酸 1 水和物) [関東化学株式会社, 07380-00]
- trisodium citrate (クエン酸三ナトリウム) [Wako, 203-13605]

- ethanol [nacalai tesque, 14713-24]
- methanol [Wako, 139-01827]
- acetone [Wako, 011-00357]
- chloroform [nacalai tesque, 08402-55]
- pyridine [Wako, 166-05316]

- dimethyl sulfoxide [Wako, 043-07216]
- gelatin from porcine skin, type A, [SIGMA ALDRICH, G2500]
- D-(-)-Ribose [東京化成工業株式会社, R0025]
- GELATIN HYDROLYSATE [SIGMA ALDRICH, G-0262]
- 3',4',5',7',-tetrahydroxyflavone [東京化成工業株式会社, T2682]
- sulfuric acid [Wako, 195-04706]
- 過酸化水素(H₂O₂) [関東化学株式会社, 18084-00]
- α-フェニレンジアミン二塩酸塩 5 mg/錠 (OPD・2HCl 5 mg/tablet) [Wako, 158-02151]
- HRP-anti mouse IgG (γ) [KPL (kirkegaard&perry Laboratories) 074-1802]
- monoclonal anti-CML antibody (6D12) 2 % sorbitol 0.1 % procrin 952 μg/mL
- monoclonal anti-CMA antibody (3F5) 2 % sorbitol 0.1 % procrin 736 μg/mL
- 20 % hydrochloric acid [Wako, 088-01805]
- MeOH : methanol CH₃OH 32.04[Wako, 139-01827]
- ammonia solution (28 %) [nacalai tesque, 02512-95]
- Triton X : *t*-octylphenoxyethoxyethanol , 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol[SIGMA-ALDRICH,118K01602]
- distilled water [nacalai tesque, 14029-33]
- acetonitrile [nacalai tesque, 00430-83]
- formic acid[nacalai tesque, 08965-82]
- 2-propanol [nacalai tesque,29128-73]
- sodium tetrahydroborate (NaBH₄) [Wako, 192-01472]
- sodium deoxycholate [Wako, 190-08313]

使用した器具・機器

-ELISA-

- ・ インキュベーター：INCUBATOR [井内盛栄堂, IC-450]
- ・ 0.45 μm フィルター：[Cellulose Acetate 0.45]
- ・ 5 mL シリンジ：テルモシリンジ 5 mL [TERUMO, ss-05Sz]
- ・ ELISA リーダー：SPECTRA Fluor Plus [TECAN,]
- ・ エバポレーター：ROTARY EVAPORATOR [IWAKI, REN-1000]
- ・ 分析天秤：分析天秤 [SHIMADZU, AUX120]
- ・ 吹付け式試験管濃縮装置：[MGS-2200]

-LC-MS/MS システム-

- ・ システムコントローラー[CBM-20A]SHIMADZU
- ・ LC 部：Accela pump + Thermo PAL[Thermo Scientific]
- ・ カラム：ZIC-HILIC 150 $\times$ 2.1 mm, 5 μm [Merck Millipore]
- ・ MS 部：高感度定量分析用トリプル四重極質量分析計 TSQ Vantage[Thermo Scientific]

-LC-MS/MS 設定-

- ・ 移動相：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
- ・ 流速：200 $\mu\text{L}/\text{min}$
- ・ イオン化法：Positive ESI
- ・ スプレー電圧：3500 V
- ・ ベポライザー温度：200 $^{\circ}\text{C}$
- ・ イオントランスファーチューブ温度：300 $^{\circ}\text{C}$
- ・ コリジョンガス、圧力：Argon, 1.2 mTorr

- ・ ヒートブロック：Dry Bath Incubator [major science, MD-02N]
- ・ バキュームマニホールド：SUPELCO VISIPREPTM24
- ・ 遠心分離機：HIGH SPEED MICRO CENTRIFUGE MC-150 [TOMY]
- ・ 遠心濃縮器：[EYELA, UT-1000]
- ・ 0.20 μm フィルター付きエッペンドルフチューブ：Low-binding hydrophilic polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane 0.20 μm 100PK [MILLIPORE, UFC30LG00]

- Strata-X-C : Strata-X-C 33 μ Polymeric Strong Cation 30 mg/1mL [phenomenex, 8B-S029-TAK]

謝辞

本研究を遂行する際に終始ご指導して頂きました永井竜児教授ならびに白河潤一先生、永井美芽先生、古澤知里先生、そして栂田聖孝先生に心より感謝申し上げます。

また、博士論文作成にあたり、ご指導して頂きました主査の山口浩准教授、副査の小野政輝教授、星良和教授、安田伸教授に心よりお礼申し上げます。

食品生体調節学研究室一同

永井竜児教授

スタッフ: 井陽太、白河潤一、永井美芽

大学院生: 鈴木隆介、大野礼一、山口広子、勝田奈那、砂掛詩織、田中誠太郎、富永悠希

学部生: 朝倉隆成、川島悠暉、高橋基秀、飛松佳秀美、伴郁穂、溝上大樹、谷地亜祐佳、岩崎紫音、小野綾也伽、古賀律紀、平岡良隆、卷千恵、柳井俊、山崎理予

共同実験者

松田志織 (東海大学農学部応用生物学科動物資源科卒業生)

参考文献

1. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet* 2012; **379**(9833): 2279–2290.
2. Koenig RJ, Blobstein SH, Cerami A. Structure of carbohydrate of hemoglobin A1c. *J Biol Chem* 1977; **252**: 2992-2997.
3. 糖尿病診断基準に関する調査検討委員会, 糖尿病の分類と診断基準に委員会報告, 糖尿病 2010; **53**: 450-467.
4. Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning *in vivo*: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981; **211**: 491-434.
5. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984; **101**: 527-537.
6. Araki N, Ueno N, Chakrabarti B, Morino Y, Horiuchi S. Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem* 1992; **267**: 10211–10214.
7. Nagaraj RH, Sell DR, Prabhakaram M, Ortwerth BJ, Monnier VM. High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(22): 10257-10261.
8. Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**(2):583-587.
9. Makino H, Shikata, K, Hironaka K, Kushiro M, Yamasaki Y, Sugimoto H, Ota Z, Araki N, Horiuchi S. Ultrastructure of nonenzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1995; **48**(2): 517-526.
10. Murata T, Di 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**(7): 764-769.
11. Vasan S, Zhang X, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J, Ulrich P. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 1996; **382**(6588): 275-278.
12. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM. RAGE blockade stabilizes established

- atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2002; **106**(22): 2827-2835.
13. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986; **232**(4758): 1629-1632.
 14. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M, Glycation. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(24): 11555-11558.
 15. Taguchi T, Sugiura M, Hamada Y, Miwa I. *In vivo* formation of a Schiff base of aminoguanidine with pyridoxal phosphate. *Biochem Pharmacol* 1998; **55**(10): 1667-1671.
 16. 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. ACTION I Investigator Group. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2004; **24**(1): 32-40.
 17. Njoroge FG, Fernandes AA, Monnier VM. Mechanism of formation of the putative advanced glycosylation end product and protein cross-link 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole. *J Biol Chem* 1988; **263**(22): 10646-10652.
 18. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 1999; **344**(1): 109-116.
 19. Hein G, Wiegand R, Lehmann G, Stein G, Franke S. Advanced glycation end-products pentosidine and N epsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; **42**(10): 1242-1246.
 20. Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**(12): 5287-5292.
 21. Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer GA, Munch G. Protein glycation, oxidation and nitration marker residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J Neurochem* 2004; **92**: 255-263.
 22. Odani H, Iijima K, Nakata M, Miyata S, Kusunoki H, Yasuda Y, Hiki Y, Irie S, Maeda K, Fujimoto D. Identification of N(omega)-carboxymethylarginine, a new advanced glycation endproduct in serum proteins of diabetic patients: possibility of a new marker of aging and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**(5): 1232-1236.

23. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997; **99**(3): 457-468.
24. Nagai R, Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Araki T, Horiuchi S. Hydroxyl radical mediates N^ε-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **234**(1): 167-172.
25. Nagai R, Unno Y, Hayashi MC, Masuda S, Hayase F, Kinae N, Horiuchi S. Peroxynitrite induces formation of N^ε-(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; **51**(9): 2833-2839.
26. Iijima K, Murata M, Takahara H, Irie S, Fujimoto D. Identification of N(omega)-carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochem J* 2000; **347**(1): 23-27.
27. Iijima K, Fujimoto D, Irie S. Amount of N(omega)-(Carboxymethyl)arginine generated in collagen and bovine serum albumin during glycation reactions is significantly different. *Connect Tissue Res* 2007; **48**(5): 271-276.
28. Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem* 2005; **280**(13): 12087-12095.
29. Kinoshita S, Mera K, Ichikawa H, Shimasaki S, Nagai M, Taga Y, Iijima K, Hattori S, Fujiwara Y, Shirakawa JI, Nagai R. N^ω-(Carboxymethyl)arginine Is One of the Dominant Advanced Glycation End Products in Glycated Collagens and Mouse Tissues. *Oxid Med Cell Longev* 2019; in press.
30. 奥田 潤, 田口 忠緒. D-グルコース α -および β -アノマーとそのアルデヒド型の生化学. *化学と生物* 1988; **26**(6): 364-373.
31. Julsing M, Quax W, Kayser O. "The Engineering of medicinal plants: prospects and limitations of medicinal plant biotechnology," in *Medicinal Plant Biotechnology from Basic Research to Industrial Applications* 2007; 1–8.
32. Hong, ND, Rho YS., Kim JW., Won DH., Kim, N. J. and Cho, B. S.: Studies on the general pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor J Pharmacogn* 1988; **19**: 102.

33. Lee MK, Kim MJ, Cho SY, Park SA, Park KK, Jung UJ, Park HM, Choi MS. Hypoglycemic effect of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; **67**(1):22-28.
34. Choi MS, Jung UJ, Kim HJ, Do GM, Jeon SM, Kim MJ, Lee MK. Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaf extract mediates hypolipidemic action in hamsters fed a high-fat diet. *Am J Chin Med* 2008; **36**(1):81-93.
35. He K, Li X, Chen X, Ye X, Huang J, Jin Y, Li P, Deng Y, Jin Q, Shi Q, Shu H. Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 2011; **137**(3):1135-1142.
36. Ahmed N, Dobler D, Dean M, Thornalley PJ. Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J Biol Chem* 2005; **280**(7):5724-5732.
37. Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, Tanaka C, Yahara S, Nohara T. Twelve phenolics from leaves of *Eucommia ulmoides*, *Nat Med* 1998; **52**(5): 460.
38. Takamura T, Hirata T, Yamaguchi Y, Ono M, Miyashita H, Ikeda T, Nohara T. Studies on the chemical constituents of green leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv, *J Nat Med* 2007; **61**: 220–221.
39. Simoyama A, Yamadaki M, Nakazawa Y, Yahara S, Nohara T. Studies on the Constituents of the Leaves of *Eucommia ulmoides*. *Shoyakugaku Zasshi* 1993; **47**(1): 56-59.
40. Hirata T, Ikeda T, Fujikawa T, Nishibe S. The chemistry and bioactivity of *Eucommia ulmoides* olive leaves. *Stud Nat Prod Chem* 2014; **41**: 225-260.
41. Lo CY, Li S, Tan D, Pan MH, Sang S, Ho CT. Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol Nutr Food Res* 2006; **50**(12):1118-1128.
42. Sawai Y, Oki T, Nishida Y, Okuno S, Suda I, Yamato Y. 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Components of Leaf Lettuce. 九州沖縄農業センター報告 2014; 第 61 号.
43. 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.
44. Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH,

- Katan MB. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 1997; **418**(1-2):152-156.
45. 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.
 46. Kabata K, Okamoto C, Sasada N, Ono M, Igoshi K, Kobayashi C, Masuoka C, Ito Y. Studies on the analysis of cultivation conditions and constitutive monosaccharides, and function for food in Suizenjinori (*Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada) indigenous to Japan. *Proc Fac Agric Kyushu Tokai Univ* 2005; **24**: 37-43.
 47. Dong X, Ayala M, Löfgren S, Söderberg PG. Ultraviolet radiation-induced cataract: age and maximum acceptable dose. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**(3):1150-1154.
 48. 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.
 49. Fujiwara Y, Kiyota N, Hori M, Matsushita S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Takeya M, Ikeda T, Nohara T, Nagai R. Esculeogenin A, a new tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**(11):2400-2406.
 50. Dunnett C. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Amer Statist Assoc* 1955; **50**: 1096-1121.
 51. 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.
 52. Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baines JW. Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N^ε-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* 1989; **28**(24): 9464-9468.
 53. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Vaquero M. Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition* 2003; **19**(1): 21-24.
 54. Kabata K, Okamoto C, Odahara T, Nakazono T, Kikuchi M. Studies on the General Analysis and Cultivation Methods of Freshwater Cyanobacterium Suizenjinori (*Aphanothece sacrum*

- (Sur.) Okada). *Proc Fac Agric Kyushu Tokai Univ* 1997; **16**: 47–53.
55. Wang R, Zhou G, Wang M, Peng Y, Li X. The Metabolism of Polysaccharide from *Atractylodes macrocephala* Koidz and Its Effect on Intestinal Microflora. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 926381.

本論文にかかわる報告

本論文は下記に発表した論文を基礎としてまとめたものである。

Sugawa H, Ohno R, Shirakawa J, Nakajima A, Kanagawa A, Hirata T, Ikeda T, Moroishi N, Nagai M, Nagai R. *Eucommia ulmoides* extracts prevent the formation of advanced glycation end products. *Food Funct* 2016; **7**(6): 2566-2573.

Matsuda S, Sugawa H, Shirakawa JI, Ohno RI, Kinoshita S, Ichimaru K, Arakawa S, Nagai M, Kabata K, Nagai R. *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada Prevents Cataractogenesis in Type 1 Diabetic Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2017; **63**(4):263-268.