

食事中 AGE (CML) が食後の血中濃度および 炎症・酸化マーカーに与える影響

The Effects of Advanced Glycation Endproduct on Blood Inflammation and
Oxidation Markers after a Meal

食物学科 Dept. of Food and Nutrition	松井 貞子 Sadako Matsui	柏木 理恵子 Rieko Kashiwagi	阿部 かをり Kaori Abe
	金子 多喜子 Takiko Kaneko	宮崎 茉実 Mami Miyazaki	

抄 録 蛋白の非酵素的最終糖化産物 (AGEs) は、糖尿病患者の血管合併症の発症・進展に関与することが知られている。近年、血中 AGEs は食事由来の AGE が影響し、食事中 AGE が血管障害性に寄与することが明らかとなっていることから、若年健常者を対象に食事中 AGE 含有量の違いが短期血中 AGE や炎症マーカーに及ぼす影響を検討した。若年健常者 8 名を対象とし、日を変えて、高 AGE 食 [7,543 kU: フリッジパスタ, 鶏肉オープン焼き (胸皮付き+パン粉), バター] と低 AGE 食 [1,678 kU: 白飯, 木綿豆腐, 茹で卵 (白身), マヨネーズ] の食事負荷試験を実施し、空腹時, 摂取後 60, 120, 240 分に採血した。血清 AGE は、低 AGE 食において摂取後 60 分と 240 分で有意に低値を示した (60 分: 2.9 ± 0.6 vs. 2.5 ± 0.5 mU/ml, 240 分: 3.3 ± 0.7 vs. 2.9 ± 0.8 mU/ml, $p < 0.05$)。血清 IL-6 も同様に 240 分で低値を示した (1.7 ± 0.9 vs. 1.0 ± 0.3 pg/ml, $p < 0.05$)。若年健常者において、食事中 AGE 含有量の違いが血中 AGEs および IL-6 濃度に影響を及ぼすことが示唆された。

キーワード: 血中 AGEs, 食事中 AGE, 炎症マーカー, 食事負荷試験

Abstract The Advanced glycation endproducts (AGEs) are known to correlate with the onset and the progress of blood vessel complication in diabetic patients. Recently, it has become clear that dietary AGE contributes to vascular disorder. In this study, we investigated how the difference in the amount of AGE in a meal relates to the AGEs in the blood and the inflammatory marker over a short period. The subjects were eight healthy young people, we conducted the meal load tests with a high AGE meal (7,543 kU) and a low AGE meal (1,678 kU), evidence was taken 60, 120, and 240 minutes after subjects had eaten. In a low AGE meal, serum AGE was significantly lower than a high AGE meal at 60 and 240 minutes ($p < 0.05$ respectively). Serum IL-6 was also lower at 240 minutes ($p < 0.05$). These results suggest that the difference in the AGE content of a meal affected blood AGEs and IL-6 concentration in healthy young people.

Keywords: blood AGEs, dietary AGE, inflammatory marker, the meal load test

1. 目的

近年、日本では食習慣の変化に伴い糖尿病患者数が増加しており、同時に糖尿病性の血管合併症も増加している。糖尿病合併症の1つである糖尿病性腎

症の透析導入人数が、1998年にそれまでの第1位であった慢性糸球体腎炎を抜いたこと¹⁾は、このことを明確に示している。また、糖尿病患者の血管合併症には、体内における蛋白の非酵素的糖化産物 (Advanced glycation endproducts: AGEs) が動脈

硬化巢に蓄積して、その発症・促進に大きく関与することが明らかになっている^{2,3)}。AGEsは、グルコースなどの還元糖と蛋白質との間の非酵素的な反応を起点とした、メイラード反応と呼ばれる酸化的/非酸化的反応により形成される構造体の総称であり、これまでに構造が明らかとなっているAGEsとしては、カルボキシルメチルリジン (CML)、ペントシジン、ピラリン、イミダゾロンなどが知られている。AGEsは高血糖状態で促進的に形成され炎症状態の一因となり^{4,5)}、また、AGE形成には酸化ストレスが関与することも示唆されている^{3,6)}。

従来のAGEs生成系の研究は、体内の蛋白糖化機構のみに偏重していたが、最近、食事由来の外因性AGEが体内のAGEプールに作用し、血管障害性に寄与することが明らかとなっている⁷⁾。食物中のAGE含有量は栄養組成によって異なり、脂質やたんぱく質を多く含む食品ではAGE含有量が多くなる。また同じ食品でも生の状態と比較して加熱後ではAGE含有量は多くなり、調理方法や加熱時間の違いによっても大きく変化することが報告されている⁸⁾。しかしながら、AGE含有量の異なる食事を摂取した後の血中AGEsならびに炎症反応・酸化ストレスに及ぼす影響については明らかになっていない。

そこで今回我々は、食事に含まれるAGE含有量の違いが食後の血中AGEsおよび炎症・酸化マーカーの動態に与える影響を明らかにすることを目的に、若年健常者を対象として単回食事負荷試験を行った。

2. 対象および方法

対象は若年健常者8名(男性5名,女性3名)とした。なお、本研究は日本女子大学倫理委員会の承認を受け、研究に先立ち試験内容に関する十分な説明を行い、同意の得られた者のみを被験者とした。

1) 試験食の調製

試験食は高AGE食と低AGE食の2種類を用意し、それぞれの内容は、高AGE食[パスタ(フリッジパスタ 茹で)100g,鶏肉オープン焼き(鶏胸肉皮付き60g+パン粉3g),バター5g],低AGE食[白飯100g,木綿豆腐100g,茹で卵(白身)30g,マヨネーズ5g]とした。両試験食のAGE含有量は、高AGE食が7,543 kU,低AGE食が1,678 kUであり、

表1 試験食の栄養価およびAGE含有量

	高AGE食	低AGE食
エネルギー (kcal)	331	317
たんぱく質 (g)	18.6	15.9
脂質 (g)	12.7	10.5
炭水化物 (g)	32.2	37.4
AGE (kU)	7,543	1,678

高AGE食が低AGE食の約4倍となるよう調整した。両試験食のエネルギー、たんぱく質、脂質、炭水化物量はほぼ同一とした(表1)。

試験食の栄養価はエクセル栄養君 ver4.5により算出し、食事のAGE含有量はGoldbergらによって報告されている食品中のCML含有量⁸⁾をもとに算出した。

2) 試験スケジュール

食事負荷試験は各被験者に対し、低AGE食、高AGE食の順序で日を変えて1回ずつ行った。

試験日の3日前よりアルコール摂取を禁止とし、前日の夕食は脂質の多い食事を控えるよう指示した。当日は12時間絶食後の早朝空腹時に採血を行った後、いずれかの試験食を負荷し、負荷後60分、120分、240分で採血を行った。血液検査はAGE濃度(CML+ペントシジンの一部を測定)をEIA法、カルボニル修飾蛋白濃度(以下、血中CMLとする)をELISA法、IL-6濃度をCLEIA法、高感度CRP濃度をネフェロメトリー法、ラジカル生成能をDEPPD法にて測定した。

また、インスリン(IRI)、グルコース(PG)、総コレステロール(TC)、LDLコレステロール(LDL-C)、中性脂肪(TG)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cr)、AST、ALT、 γ -GTPを空腹時採血で測定した。なお、これらの測定は株式会社SRLに依頼した。

3) 食事摂取状況調査

各被験者には、両試験食負荷前の3日間の食事内容を写真撮影および秤量法により記録をしてもらい、試験当日に面接し内容を確認した後回収した。これらの食事記録からエクセル栄養君 ver4.5を用いてエネルギー、栄養素摂取量を算出した。

表 2 対象の背景 (n = 8)

	高 AGE 食	低 AGE 食
年齢 (歳)	21.4 ± 0.9	
BMI (kg/m ²)	20.5 ± 2.4	
IRI (μIU/ml)	5.3 ± 2.1	5.4 ± 2.0
PG (mg/dl)	91 ± 6	90 ± 5
TC (mg/dl)	172 ± 23	173 ± 17
LDL-C (mg/dl)	105 ± 21	107 ± 17
TG (mg/dl)	70 ± 39	60 ± 36
AST (U/l)	19 ± 5	18 ± 4
ALT (U/l)	18 ± 11	17 ± 7
γ-GTP (IU/l)	19 ± 6	18 ± 4
BUN (mg/dl)	13 ± 4	14 ± 3
Cr (mg/dl)	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1

mean ± S.D.

4) 統計処理

2 群間および経時変化の平均値の差はウィルコクソンの符号付き順位和検定を用いた。相関関係は回帰分析を行い、Pearson の相関係数を求めた。いずれも危険率 5% 未満を有意差ありとした。これらの統計処理は、SPSS Statistics Version17.0 にて行った。

3. 結果

1) 対象の背景 (表 2)

対象 8 名の背景を表 2 に示す。年齢は 21.4 ± 0.9 歳、BMI は 20.5 ± 2.4 kg/m² であった。

空腹時の IRI, PG, TC, LDL-C, TG, AST, ALT, γ-GTP, BUN, Cr は基準値の範囲内であり、糖・脂質代謝異常および肝・腎機能障害を示す者はいなかった。また、生化学検査項目において両試験食間で有意差はみられなかった。

2) 3 日間のエネルギー・栄養素摂取量 (表 3)

両試験食負荷前 3 日間の平均エネルギー・栄養素摂取量を表 3 に示す。エネルギー摂取量は、高 AGE および低 AGE 食負荷前でそれぞれ 1,809 ± 618 kcal, 1,609 ± 544 kcal と、両試験食間で有意差はなく、ほかの栄養素についても同様に有意差は認められなかった。なお、これらは平成 18 年の国民健康・栄養調査の 20 ~ 29 歳 (総数) の結果⁹⁾と比較して大差はなく、標準的な食事摂取状況であった。

表 3 試験食負荷前 3 日間のエネルギー・栄養素摂取量 (n = 8)

	高 AGE 食	低 AGE 食
エネルギー (kcal)	1809 ± 618	1609 ± 544
たんぱく質 (g)	64.0 ± 26.9	57.6 ± 20.4
脂質 (g)	53.9 ± 31.0	50.2 ± 24.2
炭水化物 (g)	257.8 ± 87.3	225.6 ± 70.6

mean ± S.D.

3) 血中 AGE 濃度および CML 濃度の変化 (図 1, 2)

血中 AGE は、負荷後 60 分で、高 AGE 食に対し低 AGE 食で有意に低値を示した (2.9 ± 0.6 vs. 2.5 ± 0.5 mU/ml, p < 0.05)。負荷後 240 分でも、高 AGE 食に対し低 AGE 食で有意に低値を示した (3.3 ± 0.7 vs. 2.7 ± 0.8 mU/ml, p < 0.05)。それぞれの推移をみると、高 AGE 食で、空腹時から負荷後 60 分、120 分にかけて低下し、その後、120 分から 240 分では有意に上昇した (2.8 ± 0.7 vs. 3.3 ± 0.7 mU/ml, p < 0.05)。一方、低 AGE 食では、空腹時から負荷後 60 分にかけて有意に低下し (3.0 ± 0.7 vs. 2.5 ± 0.5 mU/ml, p < 0.05)、120 分で上昇後、240 分で低下した。また、両試験食における血中 AGE 濃度の曲線下面積を比較した所、有意差はみられなかったが、高 AGE 食は低 AGE 食よりもわずかに高値を示した。

血中 CML については、いずれの時間においても、

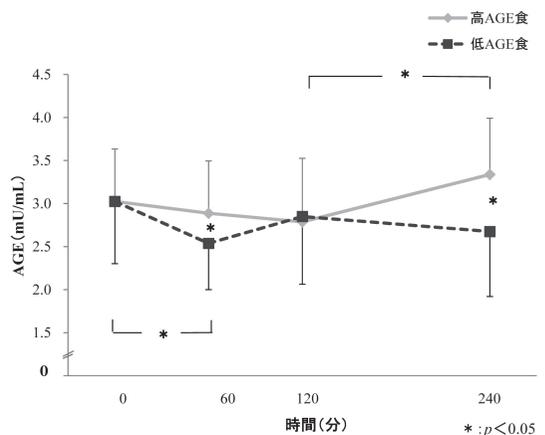


図 1 高 AGE 食および低 AGE 食負荷後の血中 AGE の変化

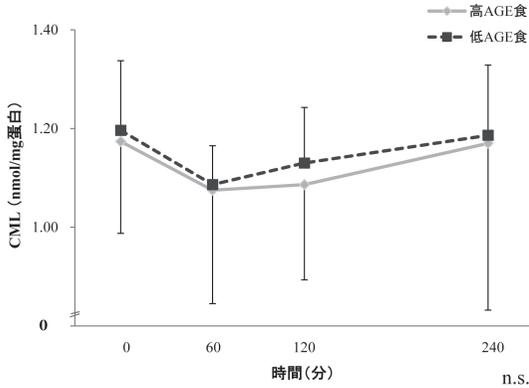


図2 高AGE食および低AGE食負荷後の血中CMLの変化

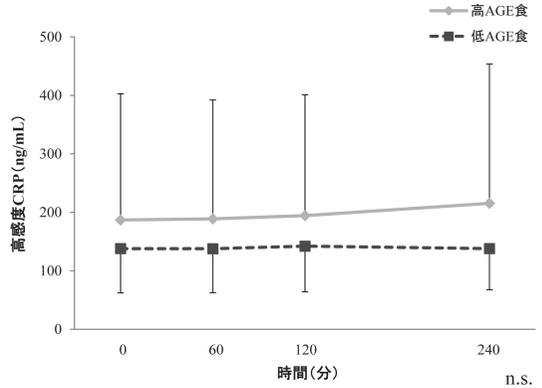


図5 高AGE食および低AGE食負荷後の血中高感度CRPの変化

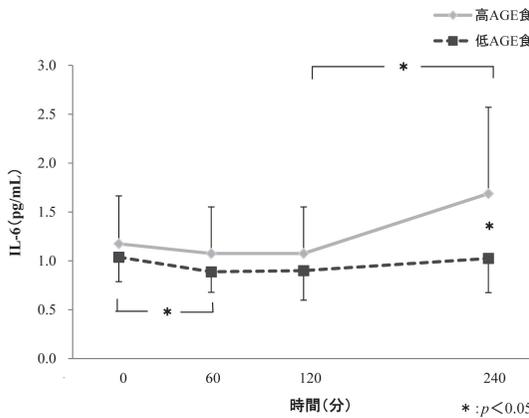


図3 高AGE食および低AGE食負荷後の血中IL-6の変化

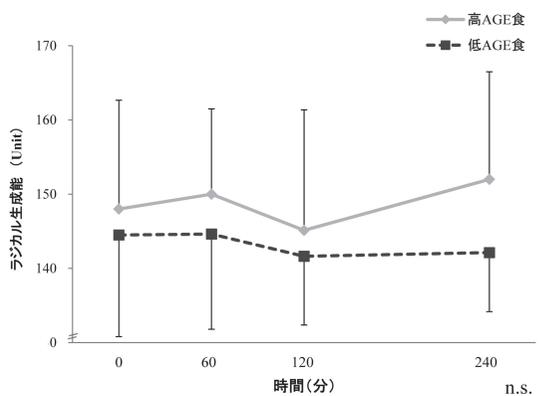


図6 高AGE食および低AGE食負荷後の血中ラジカル生成能の変化

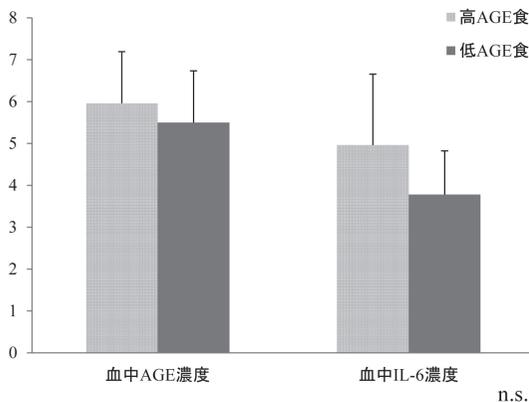


図4 高AGE食と低AGE食における血中AGEと血中IL-6の曲線下面積

両試験食間での有意差はみられなかった。また、両試験食ともに、空腹時から食後60分にかけて低下し、120分、240分にかけて上昇するという推移を示したが、全ての時間で空腹時との差はなかった。

4) 炎症・酸化マーカーの変化 (図3, 4, 5, 6)

血中IL-6は、負荷後240分で、高AGE食に対し低AGE食では有意に低値を示した (1.7 ± 0.9 vs. 1.0 ± 0.3 pg/ml, $p < 0.05$)。高AGE食では、空腹時から負荷後60分、120分にかけてほとんど変化を示さず、その後、120分から240分では有意に上昇した (1.1 ± 0.5 vs. 1.7 ± 0.9 pg/ml, $p < 0.05$)。一方、低AGE食では、空腹時から負荷後60分にかけて有意に低下し (1.0 ± 0.3 vs. 0.9 ± 0.2 pg/ml,

$p < 0.05$), その後 120 分, 240 分ではほとんど変化を示さなかった。両試験食の曲線下面積を比較すると, 有意差には至らなかったものの, 高 AGE 食は低 AGE 食よりも高値を示した (4.9 ± 1.6 vs. 3.7 ± 1.0)。

また, 血中高感度 CRP, 血中ラジカル生成能については, いずれの時間においても, 両試験食間および空腹時と各時間との比較において有意差はみられなかった。

5) 血中 AGE 濃度と炎症・酸化マーカーとの関係 (図 7, 8)

血中 AGE と炎症・酸化マーカーの関係について, 曲線下面積で検討した結果, 低 AGE 食では血

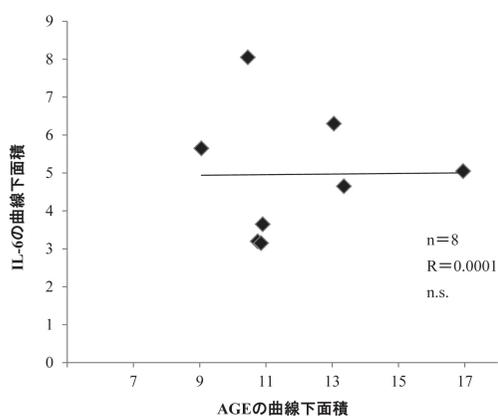


図 7 高 AGE 食における血中 AGE 濃度と血中 IL-6 濃度の曲線下面積の関係

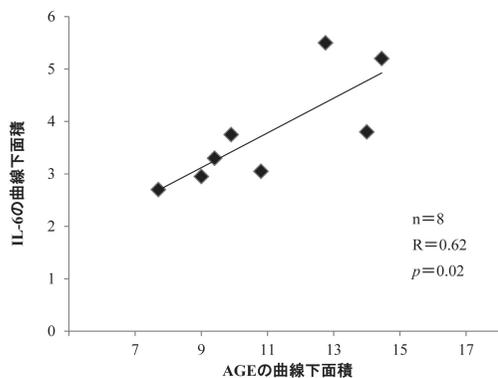


図 8 低 AGE 食における血中 AGE 濃度と血中 IL-6 濃度の曲線下面積の関係

中 AGE と血中 IL-6 の間で有意な正の相関を示した ($p = 0.02$) が, 高 AGE 食では相関関係は認められなかった。血中 AGE と高感度 CRP およびラジカル生成能との間でも相関は認められなかった。

4. 考察

これまで, 食事中 AGE による生体への影響として, 糖尿病や糖尿病性腎症の患者に対する長期的な AGE の負荷が, 血中 AGE および炎症⁴⁾・酸化マーカー³⁾ の上昇をもたらすことが報告されている。しかし食事による AGE 負荷後の短時間の血中動態を経時的に追った研究は少なく, 長期負荷における血中 AGE 濃度の上昇が毎回の食事によるものなのかどうかはほとんど検討されていない。そこで今回はその基礎研究として, 食後短期間における食事中 AGE の影響を明らかにするべく, グリケーションや排泄障害^{10, 11)}, 加齢¹²⁾ など血中 AGE や炎症・酸化マーカー濃度の上昇に関与する因子が少ないと考えられる若年健常者を対象とし, 単回食事負荷試験を実施した。

血中 AGE は, 高 AGE 食において負荷後 60 分と 240 分で低 AGE 食よりも有意に低値を示した。しかし, 血中 CML ではいずれの時間においても両試験食間で有意差は認められなかった。血中 AGE については, CML 以外にペントシジンを含めて測定されているため, 今回, 食事中 AGE 含有量の違いが影響を及ぼしたのは, 多数ある AGE の中でも CML ではなくペントシジンである可能性が推察された。

これらのことから食後短時間において, 食事中の AGE 含有量の違いが一部の血中 CML に影響を及ぼす可能性が示唆された。

次に炎症マーカーについては, 血中 IL-6 のみ負荷後 240 分で低 AGE 食が高 AGE 食と比較して有意に低値を示した。両試験食の血中 IL-6 濃度曲線下面積を比較すると, 有意差には至らなかったものの, 低 AGE 食の方が高 AGE 食よりも小さかった。Vlassara らは糖尿病患者を対象として長期的に AGE を負荷した所, 食事中 AGE が血中 CML およびメチルグリオキサール (MG) 濃度に影響を与え, 血中 AGE と IL-6 などの炎症マーカーは正の相関があると報告している⁴⁾。そこで, 血中 AGE と IL-6 の関係について, 曲線下面積を用いて検討した結果, 低 AGE 食でのみ血中 IL-6 と血中 AGE で有意

な正の相関がみられたが、高 AGE 食ではこれらの相関をみるができなかった。両試験食負荷前の食事摂取状況に差異はなかったため、この違いは負荷試験前の食事内容の相違によるものではないと考えられる。血中 AGE と炎症マーカーの関係については、さらなる検討が必要であると思われる。血中高感度 CRP については、標準偏差の大きさから元々個人間での値のばらつきが大きく、両試験食間で有意差がみられなかったものと思われる。

さらに酸化マーカーとして血中ラジカル生成能を測定した結果、両試験食間で有意差は認められなかった。Vlassara らは慢性腎臓病 (CKD) 患者を対象とし、長期的に AGE 含有量の異なる試験食を負荷したところ、両試験食間で酸化マーカーに有意差がみられたと報告している¹³⁾。われわれの検討では若年健常者を対象としたこと、また食後短時間の血中動態をみたことから、酸化ストレスが生じるに至らなかったと考えられる。

AGE 負荷による生体内への影響については以上のことが考察されるが、本研究で対象とした被験者は若年健常者であり 8 名と少数であったことを考慮しなければならない。また、多数存在する AGEs の中でも強力な細胞障害活性をもつことが報告されている⁶⁾ グリセルアルデヒド (GA) 由来の AGEs など、生体にとって悪影響を及ぼすことが明らかとなっている AGEs についても今後検討する必要がある。

糖尿病や糖尿病性腎症の患者に対して同様の食事負荷試験を行った場合は、グリケーションの亢進や排泄障害などが重なり、食事中 AGE による血中 AGEs の増加や停滞などのさらなる影響が推測される。今後、これらの疾患を有する患者において、食事中 AGE 含有量と血中 AGEs や炎症マーカーとの関連がより明らかになれば、食事中 AGE に考慮して食事療法を行うことが、糖尿病血管合併症の発症・進展を抑えることにつながるだろう。とくに糖尿病性腎症において、食事療法はたんぱく質制限が基本である¹⁴⁾。AGE はたんぱく質性食品に多く含まれるため、その制限は、同時に AGE 摂取量を抑えることになる。よって、今まで明らかでなかった低たんぱく食による腎機能低下抑制効果の機序は AGE の摂取量を抑えることに起因している可能性も考えられる。また、AGE 含有量は必ずしもたんぱく質で決まるものではなく、食品の種類や調

理法によっても異なる。したがって、AGE 含有量に考慮してこれらの選択をすれば、摂取たんぱく質量を保った低 AGE 食が可能となり、糖尿病性腎症の食事療法の問題を解決する一助となるかもしれない。

謝辞

本研究は、MEXT 研究費 20700544 の助成を受けたものです。なお、本研究にあたり、負荷試験にご協力いただきました被験者の方々、およびご指導いただきました東京慈恵会医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科 宇都宮一典先生に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 日本腎臓学会：CKD 診療ガイド，東京医学社，東京，16-17 (2009)
- 2) Makita Z., Radoff S., Rayfield E. J., Yang Z., Skolnik E., Delaney V., Friedman E. A., Cerami A., and Vlassara H.: Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy, *N. Engl. J. Med.*, **325**, 836-842 (1991)
- 3) 永井竜児，堀内正公：AGE と糖尿病合併症—AGE 阻害剤を用いた合併症の予防および治療の戦略—，*医学のあゆみ*，**207**，663-667 (2003)
- 4) Vlassara H., Cai W., Crandall J., Goldberg T., Oberstein R., Dardaine V., Peppas M., and Rayfield E.: Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 15596-15601 (2002)
- 5) Suliman M. E., Heimbürger O., Bárány P., Anderstam B., Pecoits-Filho R., Rodríguez Ayala E., Qureshi A. R., Fehrman-Ekholm I., Lindholm B., and Stenvinkel P.: Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in end-stage renal disease patients starting on dialysis therapy, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1614-1622 (2003)
- 6) 竹内正義，佐藤 隆，瀧野純一，小林由佳，古野理美，山岸昌一：AGEs (終末糖化産物) にはどのようなものがあるか—毒性終末糖化産物仮説—，*生体の科学*，**58**，502-511 (2007)
- 7) Koschinsky T., He C. J., Mitsuhashi T., Bucala R., Liu C., Buening C., Heitmann K., and Vlassara

- H.: Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 6474-6479 (1997)
- 8) Goldberg T., Cai W., Peppas M., Dardaine V., Baliga B., Uribarri J., and Vlassara H.: Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods, *J. Am. Diet. Assoc.*, **104**, 1287-1291 (2004)
- 9) 健康栄養情報研究会：国民健康・栄養の現状—平成 18 年厚生労働省国民健康・栄養健康調査報告より—, 第一出版, 東京, 80 (2009)
- 10) 今澤俊之, 宮田敏男, 黒川 清：糖尿病性腎症における AGE の役割, 腎と透析, 124-127 (2001)
- 11) 斎藤亮彦, 飯野則昭, 竹田徹朗, 下條文武：腎臓による AGE の代謝機構：近位尿細管上皮細胞の役割, 生体の科学, **58**, 540-542 (2007)
- 12) Uribarri J., Cai W., Peppas M., Goodman S., Ferrucci L., Striker G., and Vlassara H.: Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **62**, 427-433 (2007)
- 13) Vlassara H., Cai W., Goodman S., Pyzik R., Yong X., Zhu L., Neade T., Beerli M., Silverman J. M., Ferrucci L., Tansman L., Striker G. E., and Uribarri J.: Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 4483-4491 (2009)
- 14) 日本糖尿病学会：科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン [改訂第 2 版], 南江堂, 東京, 82-83 (2007)