

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790039

研究課題名（和文）超高齢化社会に向けて非侵襲的な臨床分析試料としての爪の有用性

研究課題名（英文）Advantage of using nail as the noninvasive analysis samples in clinic for the super aging society

研究代表者

閔 俊哲（MIN JUNZHE）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：10453060

研究成果の概要（和文）：慢性疾患診断の新たな臨床生体試料としての非侵襲的なヒト爪の有用性と可能性を検証した。ヒト爪中の 18 種類の D,L-アミノ酸の一斉高感度分析法と糖化反応中間体である 3-Deoxyglucosone (3-DG)、Methylglyoxal (MG)、Glyoxal(GO)の高感度分析法を確立した。ヒトの爪からは 15 種類の L-アミノ酸と初めて 5 種類の D-アミノ酸(Ala、Pro、Val、Leu、Ile)、糖化反応の中間体である 3-DG、MG、GO を検出することができた。また、糖尿病患者と健常人爪中の定量値を比較したところ、L-アミノ酸と MG、GO では殆ど差がなく、D/L-アミノ酸の比では Ala、Val、Leu、Ile ($p < 0.01$)、糖化反応の中間体では 3-DG の有意差 ($p < 0.001$) が認められた。今後、非侵襲的なヒト爪分析は糖尿病患者の病状診断と評価の一手段となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We inspected advantages and the possibility of using human nail as the new clinical bio sample for the chronic diseases. One new analysis method, which can determine 18 D, L-amino acids simultaneously with high sensitivity, and a new rapid analysis method which will be used to determine 3-Deoxyglucosone (3-DG), Methylglyoxal (MG) and Glyoxal (GO) in human nails are developed. As we know, for the first time, these five kinds of D-amino acids, which were D-Ala, D-Val, D-Pro, D-Ile and D-Leu, and three kinds of dicarbonyl intermediates in the formation of AGEs, which were 3-DG, MG and GO, were first found in human nail samples. Fifteen kinds of L-amino acids were also recognized from human nails. When comparing the index from diabetic patients to those from healthy volunteers, there is no significant difference in the quantity of the L-amino acids, MG and GO in the nails. However, a statistically significant correlation was observed between the D/L-amino acid concentrations ratios (Ala, Val, Ile, Leu, $p < 0.01$) and the 3-DG ($p < 0.001$). Therefore, this analytical technique could be a noninvasive technique to diagnose and assess in diabetic patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ヒト爪、生活習慣病、慢性疾患、非侵襲的、臨床分析試料、高齢化社会

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでヒトの唾液、毛髪を用いたメタボライトプロファイリングの手法により糖尿病等の生活習慣病を対象とした各病態におけるバイオマーカー分子の探索を行った。その結果、いくつかのバイオマーカー候補化合物が検出できたが、唾液では個人差が大きく、毛髪の場合にも同様に毛髪の状態により個人差が大きく、特に毛髪が薄い中年男性には抵抗感が強く、高齢者にも適していなかった。一方、ヒトの爪の中では、これまで有機物はほとんど含まれていないと考えられてきたが、申請者は爪から尿酸等の酸性物質やポリアミン等の塩基性物質などの検出に成功しており、爪中には様々な化合物が含まれている可能性が示唆された。また、昔から爪は健康のバロメータと言われ、健康な爪は半透明な薄いピンク色であざやかな艶があり、病気、体調の異常があれば爪の色や形が変形すると言われている。従って、非侵襲的な爪は疾病診断の新たな生体試料になる可能性が高い。しかし、科学的な検証はなく、疾病診断試料としての報告もない。そこで、申請者はヒトの爪に着目し、爪中成分と健康及び慢性疾患との関連性を調べることにした。

2. 研究の目的

現在、臨床検査に用いられる生体試料として主に尿や血液が汎用されているが、衛生面上の問題や採取に伴う苦痛、採取者の限定などの問題点があり、特に臨床検査への抵抗感が強い児童や高齢者の健康診断や疾病診断には向いていない。しかし、ヒトの爪は構造上の特徴から、数ヶ月以上の長期にわたる体内の栄養状態や過去の元素暴露量、薬物使用履歴が残されている。また、採取が容易で痛みを伴わず、長期保存が可能な優れた特徴を持っているため、体内健康状態を反映できる新規生体試料として適している。

そこで、本研究ではヒト爪に着目し、爪を用いた健康診断及び爪に症状が現れる生活習慣病を中心とした慢性疾患早期診断材料としての基礎研究を行ない、その有用性と可能性を検証することにした。まず爪中低分子化合物をターゲットとして、高分離、高分解能を持つ UPLC-ESI-TOF-MS による迅速且つ高感度な分析法を開発し、爪に存在する各成分の選択的な定量法を確立するとともに、爪に特異的に蓄積しやすい物質の分離同定を行う。さらに、糖尿病との関連性を調べ、生活習慣病早期診断の新規バイオマーカーの抽出を行い慢性疾患診断の新しい手法を提案する。

3. 研究の方法

(1) ヒト爪中のアミノ酸光学異性体の一斉高

感度分析法の開発

近年、ヒト血清中の複数のアミノ酸存在量の組み合わせを統計的に解析することで、健康状態の判断の可能性が報告された。従って、爪中のアミノ酸光学異性体の一斉分析を行うことは、生活習慣病診断や健康管理に重要な指標になり得ると考えた。そこで、アミノ酸の光学異性体の高感度分離検出試薬 *R,S*-DBD-PyNCS と 18 種類の *D,L*-アミノ酸を 55°C で 20 分間反応させ、得られた誘導体を UPLC-ESI-TOF-MS によって一斉分析を行った。実試料としては健康人と糖尿病患者男女各 20 人から得られた爪試料を用い抽出を行い、窒素ガスで溶媒を留去後、誘導体化を行った。

(2) ヒト爪中糖尿病早期診断の新規バイオマーカーの抽出

新たな糖尿病の新規バイオマーカーとして生体内のタンパク質とグルコースなど還元糖との間の非酵素メイラード反応の終末糖化産物 AGEs (advanced glycation end-products) やその中間体 3-Deoxyglucosone (3-DG)、Methylglyoxal (MG)、Glyoxal (GO) が糖尿病患者の血中濃度や腎組織の蓄積が健康人に比べて顕著な高値を示し、また血漿中グルコース及び HbA1c のレベルと良い相関を示すことが報告された。しかし、ヒト爪より検出された報告はまだされていない。そこで、本研究ではヒト爪中の 3-DG を初めとする糖化中間体をターゲットとし、高分解能を持つ UPLC-ESI-TOF-MS による迅速且つ高感度な糖化中間体の一斉分析法の開発を行った。糖化反応中間体である 3-DG、MG、GO と質量分析計用標識試薬として 4,5-dimethyl-1,2-phenylenediamine (DMPD) を 60°C で 2 時間反応させ、UPLC-ESI-TOF-MS による分析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト爪中のアミノ酸光学異性体の一斉高感度分析法の開発及び生活習慣病の早期診断への応用

アミノ酸光学異性体の分離分析法では、これまで HPLC-蛍光検出法、2D-HPLC 法などが報告されていたが、分析時間が長く、検出感度が不十分などの問題点があった。そこで、本研究ではジアステレオマーの UPLC-ESI-TOF-MS による 18 種類の *D,L*-アミノ酸の迅速、高感度一斉分析法を開発した。

本法を用いヒト爪試料に適用したところ、ヒトの爪からは 15 種類の *L*-アミノ酸と初めて 5 種類の *D*-アミノ酸 (Ala、Pro、Val、Leu、Ile) を検出することができた。さらに、糖尿病患者と健康人爪中の遊離アミノ酸定量値の *D/L* 比を比較したところ、Pro を除いた Ala、Val、Ile、Leu の 4 種類は有意差 ($p < 0.01$) が得られた (Fig.1)。また、詳細に男女別で比較

を行ったところ、男性は Ala、Pro、Val、Ile、Leu の 5 種類全てのアミノ酸で有意差が得られ、女性では Ala、Val、Leu のみに有意差が得られた。従って Ala、Val、Leu の D/L 比は糖尿病診断の一手段となる可能性が示唆された。

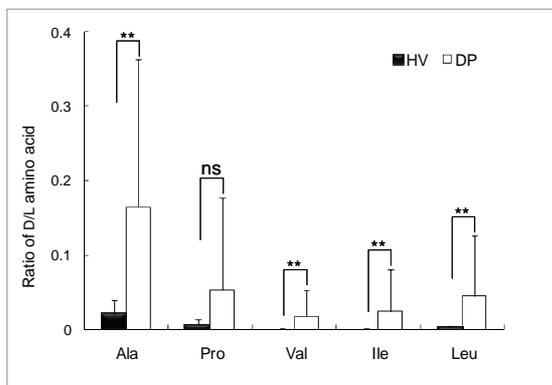


Fig.1 Statistical analysis of D/L-amino acid ratios in the healthy volunteers (n=20) and the diabetic patients (n=20).

HV= healthy volunteers; DP=diabetic patients. (** $p < 0.01$); ns: not significant.

(2) ヒト爪中糖尿病早期診断の新規バイオマーカーの抽出と慢性疾患リスク軽減への応用

ヒト爪中の 3-DG を初めとする糖化中間体をターゲットとし、高分解能を持つ UPLC-ESI-TOF-MS による迅速且つ高感度な糖化中間体の一斉分析法の開発を行った。糖化反応の中間体である 3-DG、MG、GO、内部標準品を含めた 4 種類を測定対象物質とし、標識試薬を用いて標識し、UPLC-ESI-TOF-MS において、高感度分析が可能な標識試薬のスクリーニングを行った。その結果、ESI-TOF-MS で高感度かつ迅速に分析可能な標識試薬 4,5-Dimethyl-1,2-phenylenediamine (DMPD) を見出すことができた。DMPD で標識された 3-DG、MG、GO は 7 分以内に良好に分離検出され、検出限界は 50 fmol 以下 ($S/N = 5$)、日内、日間変動は 5.28%、6.89% 以下と良好な値を示した。本法を実試料であるヒト爪に応用したところ、ヒト爪中から初めて糖化反応の中間体である 3-DG、MG、GO の検出に成功した。さらに健康者及び糖尿病患者の爪を用いて定量値を比較した結果、MG、GO では殆ど差が無く、3-DG では有意差 ($p < 0.001$) が認められた (Fig.2)。さらに、男女別に詳細に比較した結果、男女でも同様に MG、GO では殆ど差が無く、3-DG のみで有意差 ($p < 0.001$) が認められた。

これらの結果より、本分析法は非侵襲的な糖尿病診断の一手段となる可能性が示唆され、非侵襲的なヒト爪は糖尿病など慢性疾患

診断の新規臨床分析試料としての有用性が示唆された。

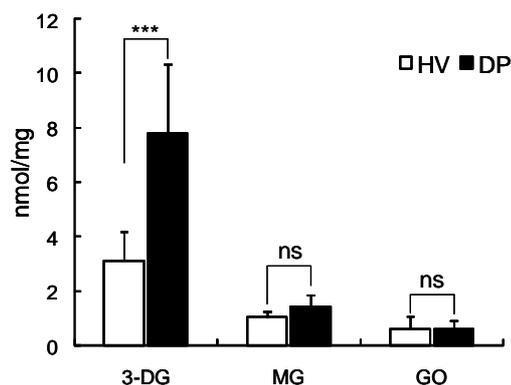


Fig. 2 Statistical analysis of the dicarbonyl compounds in the healthy volunteers (n=20) and the diabetic patients (n=20).

HV= healthy volunteers; DP=diabetic patients. (***) $p < 0.001$; ns: not significant.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Jun Zhe Min, Makoto Yamamoto, Hai-fu Yu, Tatsuya Higashi, Toshimasa Toyo'oka: Rapid and sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in human nail by UPLC-ESI-TOF-MS. *Anal. Biochem.*, (査読有) 2012, 424, 187-194.

DOI: 10.1016/j.ab.2012.02.025

② Jun Zhe Min, Suguru Hatanaka, Hai-fu Yu, Tatsuya Higashi, Shinsuke Inagaki, Toshimasa Toyo'oka: Determination of DL-amino acids in human nail, derivatized with R(-)-4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, by UPLC-ESI-TOF-MS. *J. Chromatogr. B*, (査読有) 2011, 879, 3220-3228.

DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.02.016

③ Jun Zhe Min, Hiroya Yano, Akihito Matsumoto, Hai-fu Yu, Qing Shi, Tatsuya Higashi, Shinsuke Inagaki, Toshimasa Toyo'oka: Simultaneous determination of polyamines in

human nail as 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives by nano-flow chip LC coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta.*, (査読有) 2011, 412, 98-106.

DOI: 10.1016/j.cca.2010.09.018

④ Jun Zhe Min, Suguru Hatanaka, Hai-fu Yu, Tatsuya Higashi, Shinsuke Inagaki and Toshimasa Toyo'oka: First detection of free D-amino acids in human nails by combination of derivatization and UPLC-ESI-TOF-MS. *Anal. Methods.*, (査読有) 2010, 2, 1233-1235.

DOI: 10.1039/c0ay00373e

[学会発表] (計 15 件)

① 関 俊哲、矢野裕也、豊岡利正、石 清、稲垣真輔：ヒト爪のメタボローム解析を指向としたNano-HPLC-Chip-QTOF-MS/MSを用いたポリアミンの高感度分析法の開発、日本薬学会第129年会（京都）、要旨集4、p.101、2009年3月26日

② 関 俊哲、矢野裕也、豊岡利正、石 清、稲垣真輔：Nano-flow chip LC/Q-TOF-MSを用いたヒト爪中ポリアミンの高感度分析法の開発、第16回クロマトグラフィーシンポジウム（長崎）、講演要旨集、pp.11-12、2009年5月29日

③ 畠中 俊、関 俊哲、豊岡利正、東 達也：慢性疾患の臨床分析試料としてのヒト爪の有用性—D,L-アミノ酸の測定—、日本薬学会第130年会（岡山）、要旨集4、p.96、2010年3月30日

④ 関 俊哲、矢野裕也、松本暁人、東 達也、稲垣真輔、豊岡利正：非侵襲的な臨床分析試料としてのヒト爪の有用性—ポリアミンの一斉分析—、第56回日本薬学会東海支部大会（岐阜）、要旨集、p.53、2010年7月3日

⑤ 山本 誠、関 俊哲、于 海英、東 達

也、稲垣真輔、豊岡利正：慢性疾患の非侵襲的な臨床分析試料としてのヒト爪の有用性—爪中糖化産物の分析—、第23回バイオメディカル分析科学シンポジウム（松島）、講演要旨集、pp.182-183、2010年7月22日

⑥ 畠中 俊、関 俊哲、東 達也、稲垣真輔、豊岡利正：ヒト爪中D,L-アミノ酸の一斉分析及び慢性疾患診断への非侵襲的な臨床分析試料として有用性、日本分析化学会第59年会（仙台）、講演要旨集、p.281、2010年9月17日

⑦ Jun Zhe Min, Toshimasa Toyo'oka: Usefulness of the human nail as the noninvasive biological sample for diagnosis of the chronic disease. International Symposium for Advanced Analytical Techniques and Bioscience (Changwon, Korea)、講演要旨集、pp.8-10、2010年10月27日

⑧ 山本 誠、関 俊哲、東 達也、稲垣真輔、豊岡利正：非侵襲的なヒト爪中糖化産物の分析及び慢性疾患診断への可能性、日本薬学会第131年会（静岡）、要旨集4、p.142、2011年3月29日

⑨ 関 俊哲、畠中 俊、東 達也、稲垣真輔、豊岡利正：非侵襲的なヒト爪中DL-アミノ酸の分析及び慢性疾患診断への可能性、日本薬学会第131年会（静岡）、要旨集4、p.141、2011年3月29日

⑩ 関 俊哲、畠中 俊、東 達也、豊岡利正：慢性疾患診断試料としてのヒト爪の有用性と可能性、第18回クロマトグラフィーシンポジウム（福岡）、要旨集 pp.81-82、2011年6月3日

⑪ 山本 誠、関 俊哲、東 達也、豊岡利正：慢性疾患診断を目標としたヒト爪中糖化産物の高感度分析、第18回クロマトグラフィーシンポジウム（福岡）、要旨集 pp.49-50、2011年6月4日

⑫ 関 俊哲、畠中 俊、東 達也、豊岡利正：ヒト爪中 DL-アミノ酸の高感度分析法の開発及び糖尿病診断試料としての可能性、第57回日本薬学会東海支部 総会・大会（名古屋）、要旨集 p.79、2011年7月9日

⑬ 関 俊哲、諸田有佳、保坂大樹、轟木堅一郎、豊岡利正：ヒト毛髪中D,L-アミノ酸の迅速分析、第24回バイオメディカル分析科学シンポジウム（大山）、講演要旨集、p.97、2011年9月1日

⑭ 松本暁人、関 俊哲、東達也、轟木堅一郎、豊岡利正：健常人及び癌患者の爪中ポリアミンの分析、第9回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム（PPF2011）（箱根）、講演要旨集、p.53、2011年9月13日

⑮ Jun Zhe Min, Suguru Hatanaka, Tatsuya Higashi, Kenichiro Todoroki, Toshimasa Toyo'oka: Determination of DL-amino acids, derivatized with R(-)-DBD-PyNCS, in nail of diabetic patients by UPLC-ESI-TOF-MS. 37th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2011 Dalian, China)、 p.514、2011年10月11日

[その他]
ホームページ等
<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/analchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 俊哲 (MIN JUNZHE)

研究者番号：10453060