

## 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 26 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 21 年～平成 23 年

課題番号：21500701

研究課題名（和文） 尿中バイオマーカーによる糖尿病リスクプロファイリングと運動・栄養指導評価への応用

研究課題名（英文） Development of a diabetes risk profile using a urinary biomarker and its application in the assessment of nutrient status and exercise levels.

研究代表者

橋田 誠一（HASHIDA SEIICHI）

徳島文理大学・健康科学研究所・教授

研究者番号：10156268

研究成果の概要（和文）：

前糖尿病予備群の早期検出および生活変容のために、尿や乾燥濾紙血を試料とした新しい検査法を開発し、それを応用した運動・栄養指導法の開発を行った。その結果、尿中の遊離インスリン受容体 $\alpha$ 、レジスチンおよびインスリンは糖尿病患者で有意に高値を示し、尿中のこれらのバイオマーカーを組み合わせることにより、糖尿病リスクが推察できる様になった。また、運動と食物繊維を強化することにより、これらのバイオマーカーが改善されることを示した。

研究成果の概要（英文）：

The early detection of individuals with pre-diabetes and the subsequent modification of lifestyle is an important strategy in the prevention of diabetes. We have developed a new technique of detecting pre-diabetes using urine and a dry filter paper blood sample. We applied this novel technique to the assessment of nutrient status and exercise levels.

Urinary soluble insulin receptor, resistin, and insulin were significantly increased in diabetic patients. Thus, it is possible to assess diabetes risk using a combination of these urinary biomarkers. In addition, we showed that these biomarkers were improved by positive lifestyle changes, including an increase in exercise and consumption of dietary fiber.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
22 年度	900,000	270,000	1,170,000
23 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：糖尿病、早期診断、生理活性物質、バイオマーカー、リスクプロファイリング、機能性食品、栄養指導、運動指導

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の調査によると国内の「糖尿病が強く疑われる人」は約 890 万人と「糖尿病の可能性を否定できない人」の 1,320 万人と合わせると 2,120 万人いると推定されている

（2007 年国民健康・栄養調査）。ところが同じ調査で、その「糖尿病が強く疑われる人」のうち治療を受けているのは半数程度であると報告されている。つまり、糖尿病であることに気付かないでいる人や、気付いていて

も治療をしないでいる人が、いかに多いかがわかる。そのため、糖尿病による死亡者は年間で1万4千人ものぼっている。

糖尿病は自覚症状が少ないためにこのような状況となっているが、治療しないでいると、やがて全身にさまざまな障害（合併症）を起こすのがこの病気の特徴であり、糖尿病による腎臓障害で人工透析を始める人は、年間1万5千人ほどいるし、糖尿病が原因の視覚障害の発生も年間約3,000人もいる。

## 2. 研究の目的

前糖尿病患者（予備群）の発症を防ぎ、糖尿病予備群を増加させないことが急務である。そのためには予備群を早期に検出し、現状を認識させ、その後の適切な運動・栄養指導により発症を防ぐことが重要である。そこで、報告者らは、予備群の早期検出を目的に、家庭で自ら採取し提供できる尿や郵送可能な濾紙血を試料とした新しい検査法（数種類のバイオマーカー濃度を点数化した糖尿病リスク・プロファイリング法）を開発・導入した。この指標には、糖尿病発症リスクとなる生理活性物質（遊離インスリン受容体（sIR）やインスリン、さらに種々のアディポサイトカイン）を用いており、これらを組み合わせることにより糖尿病リスクのプロファイリングが可能となる。また、この指標を運動・栄養指導の評価に用いることにより、発症リスクを考慮した実効的な指導法の開発が行える。さらに、郵送が可能のため、定期的な観察や指導が容易となり、生活の変容を定着させる有効な指導法が確立できる。なお、この尿や濾紙血による上記バイオマーカーの測定は、ELISAを含めた従来の測定法では感度不足のため、測定は出来ない。報告者らは、既に、従来のELISAの数百倍の今度を有する超高感度測定法を開発しており、この測定法を応用することにより初めて可能となった。

上記のリスクプロファイリング法の開発と平行して、抗肥満、抗糖尿病を目的とした実践型の運動・栄養指導法の開発（一般ボランティア対象）を行い、その評価には上記リスクプロファイリング法を応用・活用する。

## 3. 研究の方法

### 1) 糖尿病リスク・プロファイリング法の構築

尿中のsIRやインスリンさらに種々のアディポサイトカイン（レジスチン、レプチン、アディポネクチンやPAI-1）そしてTNF- $\alpha$ やCRPの高感度測定法を開発し、その糖尿病リスク指標としての有用性を証明する。ついで、それぞれのカットオフ値を決定し、バイオマーカーのリスク度を5段階に分け点数化する。最終的には、これらを組み合わせ、尿による糖尿病リスク・プロファイリング法

を構築する。

### 2) 運動・栄養指導の評価法の開発

運動指導においては、有酸素運動とレジスタンス運動が糖尿病リスク軽減に有効であることは既知の事実である。そこで、生活活動強度記録計（ライフコーダー）を用い、個々の運動強度を把握しながら運動指導を行い、その効果は糖尿病リスク・プロファイリング法を用い評価するとともに、結果をフィードバックし指導法に反映させる。申請者らは、すでに、7,000歩/日以上歩行により、尿中レプチンやアディポネクチン濃度が変動することを見出しており（2008年度日本栄養食糧学会にて発表）、ライフコーダーにより運動強度を考慮した運動指導法を開発する

栄養指導においては、機能的食品成分の効果も上記尿中バイオマーカーを指標として評価する。申請者らは、すでに、高濃度茶カテキンの摂取により、尿中sIR $\alpha$ やレジスチン濃度が減少することを見出しておりその他の機能的食品成分（抗酸化、吸収阻害機能）についても同様に検討する。

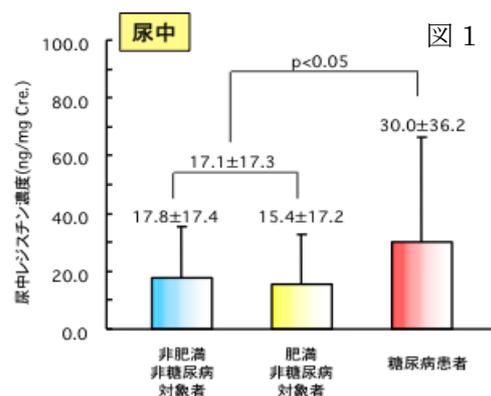
### 3) 運動・栄養指導の実践

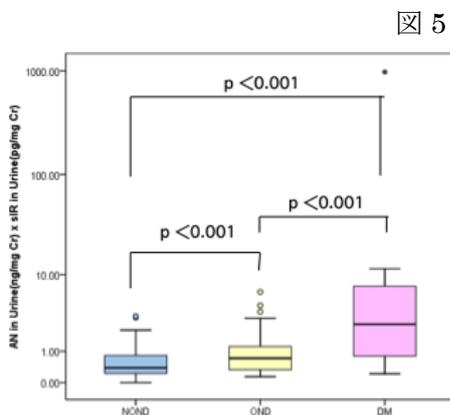
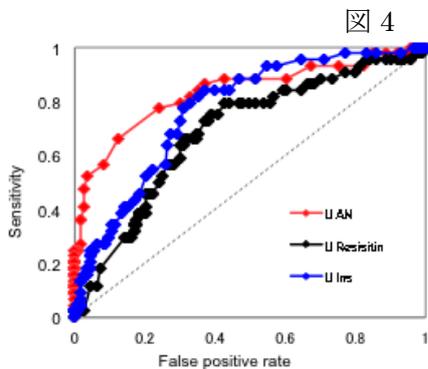
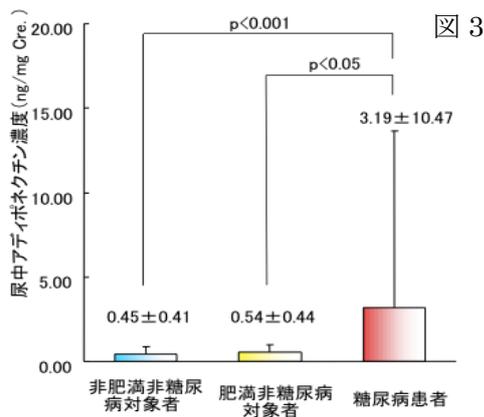
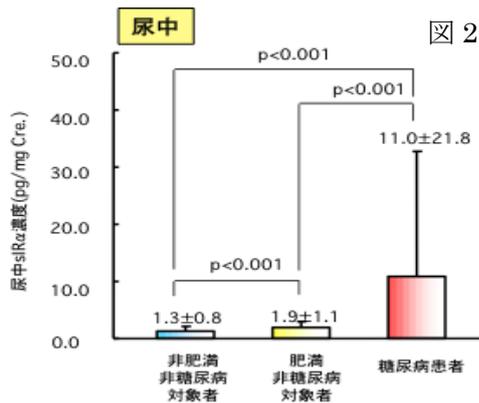
健常者や肥満非糖尿病患者（予備群）に対して平成21年度で得られた指導法を実践し、その糖尿病リスクを新しく開発した評価法により評価・解析し、より実践的な指導法を開発する。すでに、申請者らは、一般市民を対象とした「健康教室」や「メタボ予防教室」を開講しており、市中の管理栄養士や保健師の協力を得て運動・栄養指導を実践している。

## 4. 研究成果

### 1) 糖尿病リスク指標として有効な生理活性物質の探索とその高感度測定法の開発

尿を用いた糖尿病リスク・プロファイリング法を導入し、前病者の糖尿病リスクの早期検出法を可能できる見通しが得られた。特に、糖尿病リスク指標として、sIR、レジスチン、インスリン、レプチン及びアディポネクチンの尿中及び血液ろ紙中の測定の有効性が実証された。その結果、尿中のレジスチン、sIR、およびインスリンは糖尿病患者で有意に高値を示し（図1-4）、尿中のこれらのバイオマーカーを組み合わせることにより、糖尿病リスクが推察できる様になった（図5）。





一方、血中のアディポネクチンは糖尿病患者で低下するにも関わらず、尿中アディポネクチンは有意に増加していた。一般に腎機能障害の初期マーカーとしては、糸球体濾過量 (eGFR 値) と尿中微量アルブミン値が使われている。そこで、健常者、肥満者および糖尿病患者の内、尿中にアルブミンが検出されない (微量アルブミン値も除く) 対象者中の尿中アディポネクチンを測定した所、糖尿病患者尿中で有意に高値を示した。また、この尿中アディポネクチンは高分子重合体 (500KD) であった。これらのことから、単に糸球体の濾過障害に起因するとは考えがたく、アディポネクチンのこれまでの機能から考え、初期障害が起こった腎による糖尿病予防ホルモンとしてのアディポネクチン分泌の可能性も示唆された。

## 2) 糖尿病リスク指標を用いた運動・栄養指導法の開発とその実践

平成 21 年から 3 ヶ年、3 回に渡り 4 ヶ月から 6 ヶ月間の「糖尿病予防教室」を開催し、糖尿病予備群に対する運動・栄養指導を行って来た。一般募集した肥満気味の対象者を予備健診し、HbA1c を基準 (5.2 以上) に、指導群を設定した。この対象者をさらに、HbA1c を測定し、この平均がほぼ同じになるように 2 群に分け、一定のエネルギー量の基、運動と食物繊維の強化指導を行った。またこの教室では、食事調査をはじめ活動記録計による運動の記録、および体格指標、生化学データ等を測定することより、1 人 1 人に合ったテーラーメイドの栄養・運動指導を行った。

活動記録計により消費エネルギー量を測定し、適正な摂取エネルギー量下で、運動や食物繊維の効果について、糖尿病リスク指標を用い検討を行った。その結果、減量するに従い、レプチンは減少した。しかし、アディポネクチンの増加は少なく、期間を要することが示唆された。また、HbA1c の変動に比べ、インスリン値の変動は緩やかでこれも期間を要することが示唆された。さらに、指導 2 ヶ月後にはリバウンド現象が認められ、継続した指導の重要性が示された。このことから、血糖の改善に対し、糖尿病リスク指標の改善は遅く、長期間に渡る指導が必要であり、その際には非侵襲的測定法を用いたモニタリングの必要性が示された。

糖尿病の発症を防ぐ為に、非侵襲的測定法を用いた糖尿病リスク・プロファイリング法の有用性が示されたが、さらに精度や特異性を高める為には、有効なバイオマーカーの探索や開発が必要である。また、その実用化に向け、自動化はもちろん企業化が必須である。このプロファイリング法が実用化すれば、より有効な機能性食品の探索や開発も容易

に行うことが可能となる。一方、糖尿病の発症を防ぐ為には、実際に指導する方向性や方法論の確立も必須である。単に、目標を設定し指導するだけでは改善が認められないのは自明の事実である。その為には、発症を防ぐ為の変容と継続をサポートする為の新しい指導法の確立が必要である。そのためには、継続して「糖尿病予防教室」を開催し、その指導方法論の開発を続けて行く必要がある。

#### 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 14 件)

- ①沼田聡、梅原麻子、片上秀喜、井上忍、橋田誠一：高感度測定法による自己抗体の早期検出と栄養指導への応用 -インスリン自己抗体の場合-、徳島文理大学研究紀要、査読有、77号(2009)29-43
- ②宮澤友輔、梅原麻子、平島由絵、林しの、塩田洋、橋田誠一：高感度インスリン測定法の開発と尿中及び乾燥ろ紙血中インスリンによる糖尿病リスク指標の構築、徳島文理大学研究紀要、査読有、77号(2009)19-28
- ③Umehara A., Nishioka M., Obata T., Ebina Y., Shiota H. and Hashida S.: A novel ultra-sensitive enzyme immunoassay for soluble human insulin receptor ectodomain and its measurement in urine from healthy subjects and patients with diabetes mellitus. Clin Biochem、査読有、42: (2009)1468-1475
- ④兼松直毅、梅原麻子、沼田聡、中野泰子、津田とみ、橋田誠一：高感度アディポネクチン測定法の開発とその運動・栄養指導への応用、徳島文理大学研究紀要、査読有、78号(2009)7-23
- ⑤沼田聡、梅原麻子、片上秀喜、井上忍、橋田誠一：高感度測定法による自己抗体の早期検出と栄養指導への応用 -インスリン自己抗体検出法の開発- (第2報)、徳島文理大学研究紀要、査読有、78号(2009)25-35
- ⑥Ogawa N, Takahashi M, Ishidoh K, Katunuma N.: Inhibition of collagenolytic cathepsins by beta-lactoglobulin in milk and its suppressive effect on bone resorption. J Nutr Sci Vitaminol. 、査読有、55(3) (2009)264-270.
- ⑦Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T.: Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. Mol

Cell Biol. 、査読有、29(17) (2009)4798-4811.

- ⑧犬伏知子、一色加奈子、鴨田麻衣子、梅原麻子、橋田誠一、松本博次：女子大生の踵骨骨量に影響を及ぼす要因、徳島文理大学研究紀要、査読有、79号(2010)25-34
  - ⑨Kido, H and Ishidoh K:Nobuhiko Katunuma: An Outstanding Scientist in the field of Proteolysis and Warm-Hearted 'Kendo Fighter' Biochemist. J. Biochem. 、査読有、148 (2010) 527-531.
  - ⑩Ishidoh K, Kamemura N, Imagawa T, Oda M, Sakurai J, Katunuma N: Quinolate Phosphoribosyl Transferase. a key enzyme in de novo NAD+ synthesis, suppress spontaneous cell death by inhibiting overproduction of active-caspase-3. Biochim Biophys Acta 、査読有、1803(2010)527-533.
  - ⑪山本真弓、梅原麻子、沼田聡、吉村英悟、橋田誠一：超高感度CRP測定法の開発と運動・栄養指導への応用、徳島文理大学研究紀要、査読有、81号(2011)55-62
  - ⑫Matsugaki T, Shiba N, Kohno S, Nikawa T, Hirasaka K, Okumura Y, Ishidoh K, Soejima T, Yoshimitsu K, Nagata K.:Hybrid exercise" prevents muscle atrophy in association with a distinct gene expression pattern. Kurume Med J. 、査読有、57(4) (2011) 101-108.
  - ⑬Hashida S., Miyazawa Y., Hirajima Y., Umehara A., Yamamoto M., Numata S. Development of ultra-sensitive enzyme immunoassay for insulin and application to evaluation of the diabetic risk by urine in the morning. In Eltayb Abuelzein ed. Trends in Immunolabelled and Related Techniues. 、査読有、(2012) pp83-100, In Teck d.o.o, Croatia. (ISBN; 978-953-51-0570-1)
  - ⑭Numata S., Umehara A., Katakami H., Inoue S. and Hashida S: Development of a novel and ultra-sensitive enzyme immunoassay for human insulin autoantibodies. Clin Biochem 、査読有、(2012) in press
- [学会発表] (計 34 件)
- ①片上秀喜. ACTH単独欠損症におけるACTH分泌：ヒトACTHに対する新規超高感度測定法の開発と臨床応用. 第82回日本内分泌学会学術総会, 2009年4月23日-25日, 前橋(群馬).
  - ②梅原麻子. 食物繊維および魚摂取強化によるメタボリックシンドローム発症リスク軽減効果の検討、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月20日-22日、長崎.
  - ③平島由絵. 高感度インスリン測定法の開発とインスリン測定による食後インスリン分泌能の解析、第63回日本栄養・食糧学会大

会、2009年5月20日-22日、長崎。

④東山加奈依. 魚および食物繊維の積極的な摂取指導による HDL-コレステロールへの影響と意識変容の検討、第 63 回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月20日-22日、長崎。

⑤沼田聡. 高感度測定法によるインスリン自己抗体の早期検出と栄養指導への応用、第 56 回日本栄養改善学会学術総会、2009年9月2日-4日、札幌。

⑦梅原麻子. 食品成分取強化によるメタボリックシンドローム発症リスクへの影響-食物繊維及び DHA・EPA の場合-、第 56 回日本栄養改善学会学術総会、2009年9月2日-4日、札幌。

⑧平島由絵. 食物繊維摂取による食後高血糖及びインスリン抵抗性の改善効果についての検討、第 56 回日本栄養改善学会学術総会、2009年9月2日-4日、札幌。

⑨内田悦子. 継続的食物繊維摂取による生体への影響~3ヶ月間の追跡調査~、第 56 回日本栄養改善学会学術総会、2009年9月2日-4日、札幌。

⑩梅原麻子. 食物繊維摂取強化指導による遊離インスリン受容体  $\alpha$  濃度の変化、第13回日本病態栄養学会学術集會、2010年1月9日-10日、京都(京都)。

⑪秋山真敏. 尿中成長ホルモンを指標とした運動評価の検討、第 64 回日本栄養・食糧学会大会、2010年5月21日-23日、徳島。

⑫梅原麻子. 尿中遊離インスリン受容体  $\alpha$  の高感度測定法の開発と肥満者に対する栄養指導への応用、第53回日本糖尿病学会学術集會、2010年5月27日-30日、岡山(岡山)。

⑬片上 秀喜. 糖尿病研究における超高感度測定法の開発と臨床応用(その3) : インスリン自己抗体に対する新規測定法の改良、第53回日本糖尿病学会学術集會、2010年5月27日-30日、岡山(岡山)。

⑭梅原 麻子. 尿中アディポネクチン測定法の開発と腎機能評価への応用、第57回日本栄養改善学会学術総会、2010年9月10日-12日、川越(埼玉)。

⑮秋山真敏. 尿中成長ホルモンを指標とした運動評価の検討、第57回日本栄養改善学会学術総会、2010年9月10日-12日、川越(埼玉)。

⑯山本真弓. 超高感度免疫測定法による CRP 測定法の開発と栄養・運動指導への応用、第 57 回日本栄養改善学会学術総会、2010年9月10日-12日、川越(埼玉)。

⑰梅原麻子. 肥満者および糖尿病患者における尿中アディポネクチンと腎機能評価の検討、第 31 回日本肥満学会、2010年10月1日-2日、前橋(群馬)。

⑱山本真弓. 超高感度免疫測定法による CRP 測定法の開発と栄養・運動指導への応用、第 14 回日本病態栄養学会学術集會、2011年1月15日、16日、横浜(神奈川)。

⑲梅原麻子. 尿中アディポネクチンによる腎機能評価の検討、第 14 回日本病態栄養学会学術集會、2011年1月15日、16日、横浜(神奈川)。

⑳片上秀喜. 内分泌代謝領域における超高感度測定法の開発と臨床応用(その8) : ヒトサイログロブリン(Tg) 超高感度測定法による甲状腺分化癌術後再発予知ならびに新生児甲状腺機能低下症の鑑別診断、第 108 回日本内科学会講演会、2011年

㉑犬伏知子. 糖尿病予防教室参加者の踵骨骨量の変化と食事内容の関係、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011年5月13日-15日、東京

㉒小川直子. 糖尿病予防教室における栄養指導高価の検討~アンケート調査から~、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011年5月13日-15日、東京

㉓山本真弓. 肥満者及び糖尿病予備群に対する栄養・運動指導 : 血中 CRP 濃度の変動について、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011年5月13日-15日、東京

㉔梅原麻子. 尿中高分子アディポネクチンの糖尿病患者における早期腎変異指標としての検討、第 54 回日本糖尿病学会大会、2011年5月19日-21日、札幌

㉕山本真弓. 肥満者及び糖尿病予備軍に対する栄養・運動指導 : 血中アディポサイトカインの変動、第 58 回日本栄養改善学会学術総会、2011年9月8日-10日、広島(広島)。

㉖平部香菜子. 糖尿病予防教室での食事・運動指導による血中レプチンおよびアディポネクチン濃度の変化、第 58 回日本栄養改善学会学術総会、2011年9月8日-10日、広島(広島)。

㉗秋山真敏. カテキンによる尿中成長ホルモン動態への影響、第 58 回日本栄養改善学会学術総会、2011年9月8日-10日、広島(広島)。

㉘犬伏知子. 糖尿病予防教室参加者の血清骨型アルカリフォスファターゼ活性の変化、第 58 回日本栄養改善学会学術総会、2011年9月8日-10日、広島(広島)。

㉙松下純子. 糖尿病予防教室における唾液中分泌型 IgA と測定データとの関連、第 58 回日本栄養改善学会学術総会、2011年9月8日-10日、広島(広島)。

㉚中川利津代. 糖尿病予防教室参加者の目標設定が行動変容およびメタボリックシンドローム指標の改善効果に及ぼす影響、第 58 回日本栄養改善学会学術総会、2011年9月8日-10日、広島(広島)。

㉛山本真弓. 肥満者及び糖尿病予備軍に対する栄養・運動指導 : 血中アディポサイトカインの変動、第 32 回日本肥満学会、2011年9

月 23 日、24 日、淡路（兵庫）

㊸平部香菜子. 糖尿病予防教室での食事・運動指導による血中レプチンおよびアディポネクチン濃度の変化、第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 23 日、24 日、淡路（兵庫）

㊹秋山真敏. カテキンによる尿中成長ホルモン動態への影響、第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 23 日、24 日、淡路（兵庫）.

㊺山本真弓. 肥満者及び糖尿病予備群に対する栄養・運動指導；血中アディポサイトカインの変動、第 15 回日本病態栄養学会、2012 年 1 月 14、15 日、（京都）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋田 誠一 (HASHIDA SEIICHI)

徳島文理大学・健康科学研究所・教授

研究者番号：10156268

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

石堂 一巳 (ISHIDO KAZUMI)

徳島文理大学・健康科学研究所・教授

研究者番号：40212906

梅原 麻子 (UMEHARA ASAKO)

徳島文理大学・人間生活学部・助手

研究者番号：60441599