
指尖蛍光発光測定機による血液透析患者の Advanced Glycation End Products (AGEs) 測定に関する検討

能登宏光、能登 舞、加藤 彩、嵯峨まゆ子、佐々木由美、佐藤啓子、佐々木佳奈、
金野裕介、若松公太郎、三浦麻由美、小林陽平、佐藤幸治、桜庭裕子、羽賀繁子
医療法人 秋田泌尿器科クリニック

Advanced Glycation End Products (AGEs) Measured Using a Finger-tip Fluorescence Reader in Hemodialysis Patients.

Hiromitsu Noto, Mai Noto, Aya Kato, Mayuko Saga, Yumi Sasaki, Keiko Sato,
Kana Sasaki, Yusuke Konno, Koutarou Wakamatsu, Mayumi Miura,
Youhei Kobayashi, Kouji Sato, Yuko Sakuraba and Shigeko Haga
Akita Urologic Clinic

<緒言>

Advanced Glycation End Products (AGEs) は終末糖化産物と訳され、グルコースのような還元糖とタンパク質との間の、非酵素的糖化反応（メイラード反応）の後期段階で生成する構造体の総称である¹⁾。慢性腎臓病（Chronic kidney disease: CKD）患者では、AGEsが排泄障害だけでなく産生増加のために増加するといわれており²⁾、AGEsは血管合併症の発現に深く関与していると考えられている³⁾。また、血液透析患者は一般住民と比べ、心・脳血管障害で死亡するリスクが著しく高いことも知られている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。私たちは、血液透析患者のAGEsを指尖から経皮的に測定する機会を得たので報告する。

<対象と方法>

対象は血液透析患者53例、年齢は 68.4 ± 10.4 (mean \pm S.D.) (42~94) 歳。男性34例、 67.5 ± 10.6 (42~90) 歳、女性19例、 70.0 ± 10.2 (54~94) 歳。透析歴は1ヶ月~29年。糖尿病（Diabetes Mellitus: DM）24例、脳血管障害（Cerebrovascular accidents: CVA）の既往11例、虚血性心疾患（Ischemic Heart Disease: IHD）の既往10例であった。

AGEs測定はAGEsセンサーRQ-AG01J（シャープ社製）を用い、血液透析前後に、非シャント指の中指先端で経皮的に測定した。励起光は365nmの近紫外線で、皮膚表面から1~2mmまで入る。測定値の単位はarbitrary units (a. u.)。

AGEs測定結果を年齢、性別、BMI、透析（hemodialysis: HD）期間、DMの有無、CVAやIHD

の既往、CAVI (Cardio Ankle Vascular Index) ・ABI (Ankle Brachial Index) ・TBI (Toe Brachial Index) 測定値との関係を検討した。また、Sevelamarの投与がAGEsを低下させたとの報告⁷⁾があり、SevelamarとAGEsとの関係も検討した。

検定にはEZ^R⁸⁾ (ver 1.33) を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

<結果>

(1) 血液透析前のAGEsと年齢、性別、HD期間、BMI、DMの有無、CVA ・IHD既往との関係
血液透析前のAGEsは 0.569 ± 0.136 (0.56 [0.48, 0.65]) (中央値 [四分位点]) であった。

AGEsと年齢およびBMIとの間に有意な相関関係はなかった (図1)。AGEsとHD期間との間にもSpearmanの順位相関係数 -0.0307 、P値0.827と相関はなかった。性別では、男性のAGEsは0.56 [0.45, 0.65]、女性は0.56 [0.52, 0.65] と差は無く、DMの有無でもDM (-) (55%) が0.56 [0.46, 0.63]、DM (+) (45%) が0.56 [0.49, 0.67] と差が無かった。また、CVAとIHDの既往の有無別でも、CVA (-) (79%) は0.56 [0.47, 0.65]、CVA (+) (21%) は0.60 [0.50, 0.68] と差が無く、IHD (-) (19%) は0.56 [0.47, 0.66]、IHD (+) (81%) は0.55 [0.48, 0.59] と差が無かった (図2)。

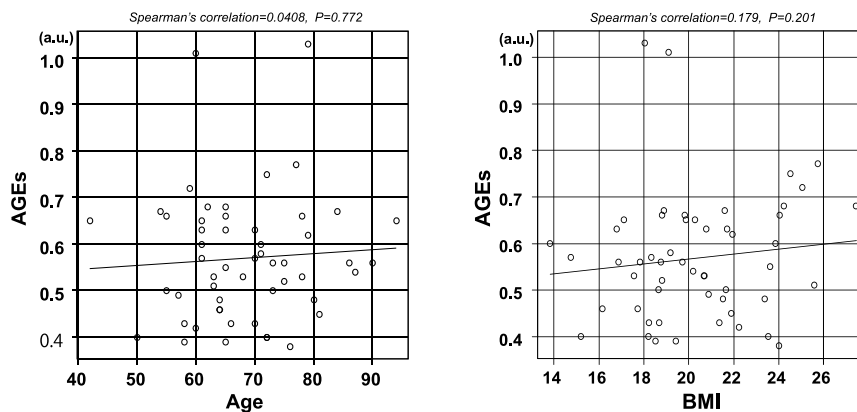


図1 AGEsと年齢およびBMIとの関係

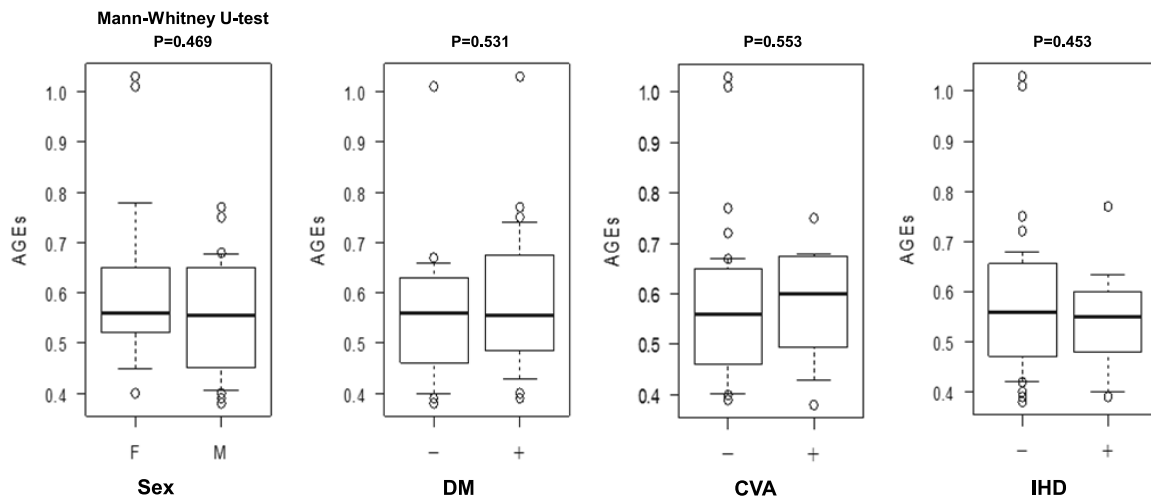


図2 AGEsと性別、DMの有無、CVAおよびIHDの既往との関係

(2) 血液透析前のAGEsとCAVI、ABIおよびTBIとの関係

動脈硬化の指標であるCAVIは、閉塞の指標ABIが0.9以下では正しく測定出来ないため、CAVIに関してはABIが0.9より高値の33例で検討した。同じく閉塞の指標であるTBIは、足病変のため測定不能の1例除く52例で検討した。また、左右の測定値で検討に用いた値は、CAVIは高い方、ABIとTBIは低い方とした。正常値はCAVI<8.0、ABI 1.00~1.29、TBI \geq 0.7と考えられている⁹⁾。

CAVIは 9.28 ± 1.91 (9.1 [8.0, 10.0])、ABIは 0.970 ± 0.205 (1.05 [0.84, 1.13])、TBIは 0.638 ± 0.244 (0.63 [0.44, 0.85])であった。血液透析前のAGEsとそれらとの関係を図3に示したが、AGEsと動脈硬化・閉塞の指数との間に、有意な相関関係はなかった。

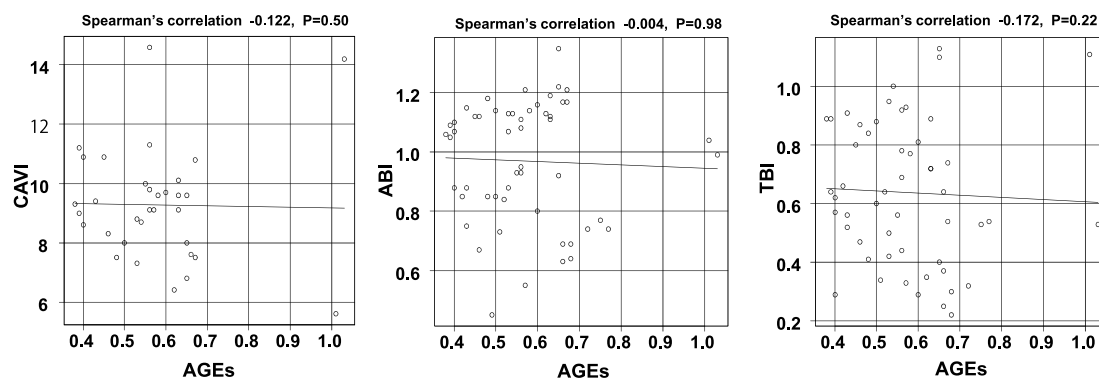


図3 AGEsとCAVI、ABIおよびTBIとの関係

(3) HD前後のAGEsの変化

AGEsはHD前が 0.569 ± 0.136 (0.56 [0.48, 0.65])、HD後が 0.530 ± 0.101 (0.53 [0.47, 0.94])で、HD後が有意に低値であった ($p < 0.01$)。AGEsがHD後に低値か同じであった36例 (68%)

(-) 群と、高値となった17例 (32%) (+) 群とを比較すると、HD前AGEsは、(-) 群が0.625 [0.530, 0.663]、(+) 群が0.480 [0.430, 0.550] で (-) 群が有意に高値 ($p < 0.0005$) であったのに対し、HD後AGEsは、(-) 群が0.53 [0.458, 0.583]、(+) 群が0.52 [0.480, 0.590] で、両群間に差は無かった。

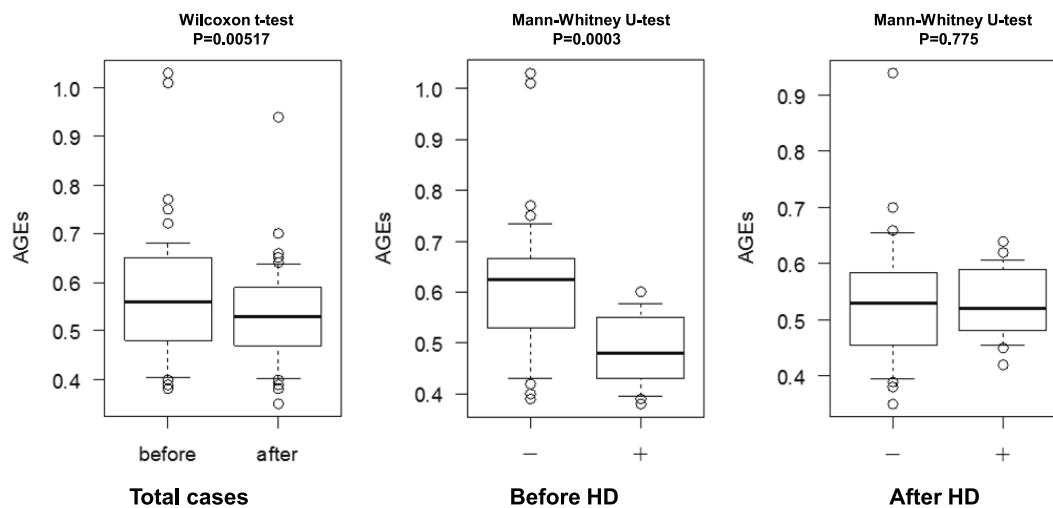


図4 AGEsがHD後に低値になる群と高値になる群のAGEsの比較

AGEs (-) 群と (+) 群に分けて、年齢、BMI、HD期間、DMの有無、CVAやIHDの既往、CAVI、ABI及びTBI等を比較したが、有意な差は無かった (表 1)。

表 1 AGEsがHD後に低値になる群と高値になる群の比較
 Δ AGEs : AGEsのHD前値-HD後値

Median[IQR] or No.(%)	Δ AGEs (0 or minus)	Δ AGEs (plus)	p Value
AGEs (Before HD)	0.625 [0.530, 0.663]	0.480 [0.430, 0.550]	0.0003
AGEs (After HD)	0.530 [0.458, 0.583]	0.520 [0.480, 0.590]	0.775
Age (years)	69 [61, 77]	65 [64, 73]	0.916
BMI	20.05 [18.66, 21.68]	19.73 [17.85, 23.60]	0.873
HD duration (years)	5 [2, 9]	8 [3, 9]	0.264
BUN (mg/ml)	55.5 [46.8, 66.3]	58.0 [54.0, 72.0]	0.290
Creatinine (mg/ml)	8.89 [7.91, 11.23]	10.33 [8.97, 11.18]	0.156
CAVI	9.1 [7.7, 9.6]	9.7 [8.7, 10.9]	0.141
ABI	1.06 [0.82, 1.12]	1.05 [0.85, 1.12]	0.826
TBI	0.64 [0.46, 0.89]	0.62 [0.44, 0.89]	0.539
DM	(-) 21 (58)	8 (47)	0.557
	(+) 15 (42)	9 (53)	
CVA	(-) 28 (78)	14 (82)	1.000
	(+) 8 (22)	3 (18)	
IHD	(-) 31 (86)	12 (71)	0.260
	(+) 5 (14)	5 (29)	

(4) Sevelamar投与とAGEsとの関係

HD前後における、Sevelamar投与の有無別のAGEsを図5に示した。HD前のAGEsは非投与群(41例)が0.56 [0.50, 0.66] だったのに対し、投与群(12例)は0.49 [0.45, 0.59] と低かったが有意ではなかった。また、HD後のAGEsも非投与群が0.53 [0.48, 0.60]、投与群が0.49 [0.46, 0.55] と有意な差はなかった。

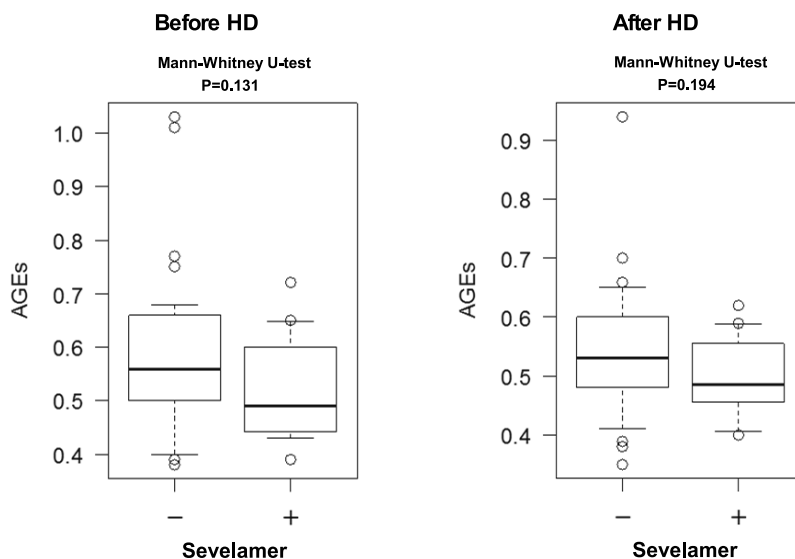


図 5 Sevelamar投与群と非投与群のAGEs

<考察>

AGEsには多くの構造が知られており¹⁰⁾¹¹⁾、測定法としてはAGEsが有する蛍光性を利用した方法、抗AGE抗体を用いた免疫学的測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法などがある¹¹⁾。

組織の蛍光発光 (autofluorescence: AF) は、AGEsの蓄積と関連し、DMの慢性合併症や末期腎疾患 (end-stage renal disease: ESRD) の進行と関係しているといわれている¹²⁾。Meerwaldtら¹³⁾ は、前腕皮膚表面から非侵襲的に皮膚蛍光発光 (skin autofluorescence: skin AF or SAF) を測るAF reader¹⁴⁾¹⁵⁾ の測定結果が、皮膚生検組織のコラゲン架橋の蛍光発光 (collagen-linked AF) や皮膚の蛍光発光するAGEの一つであるpentosidineと関連し、蛍光を発しないAGEであるN^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) やN^ε-(carboxyethyl) lysine (CEL) とも関連したと報告している。

また、Meerwaldtら¹³⁾ はHD患者109名の検討で、skin AFは心血管病変既往、CRP、血清アルブミンと同様、HD患者の総死亡率や心血管疾患死亡率の独立した予測因子であると述べており、Gerritsら¹⁶⁾ もHD患者105名の検討で、skin AFは血清アルブミン値や心血管病変既往と共に、総死亡率の予測因子であると報告している。Nongnuchら¹⁷⁾ は、HD患者332名の検討から、AGEsが平均値以上患者の死亡リスクは高く、skin AFが高くなるほど死亡率が増大すると報告している。これに対し、Shchwedlerら¹⁸⁾ は、312名のHD患者で血清CMLと血清fluorescent AGEs (AGE-fl) を測定し、両者とも健康コントロール群よりも高値 (3.2倍、3.8倍) で、中央値よりも高い患者群が低い群よりも、32ヶ月の経過観察では生存率が良かったことを示し、高い血清AGEsは血清AGS-flとCMLでみる限りは、死亡率の高さとリンクしなかったと述べている。

日本人HD患者のAGEs関する報告では、Tanakaら¹⁹⁾ はskin AFは年齢、糖尿病、頸動脈IMT (intima-media thickness)、高感度CRPおよび血漿pentosidineと関連したと報告しており、Kimuraら²⁰⁾ も、skin AFはHD患者ですべての原因による死亡には影響しなかったが、心血管病変による死亡の独立した予測因子であったと述べている。またFuruyaら²¹⁾ は、HD患者64名を3年間観察し、21名が心血管イベントを発症して10名が死亡したが、初回測定skin AFがDMの有無にかかわらずde novo心血管イベント発症の独立したリスクであったと報告している。

これまでのskin AF測定は、上肢皮膚での測定であったが、Yamanakaら²²⁾ は指先のskin AFを測定し、2型糖尿病の合併症の増加とともにその強さは有意に増加し、AGEsの一つであるN^δ-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1) の血清中濃度とも関連したと報告している。Ito²³⁾ らは、血清MG-H1濃度増加とeGFR低下が強く関連することを示しており、今回の検討で用いた指尖でのskin SAF測定は、HD患者のAGEs検討に有用と考えられた。

今回の検討では、HD患者のAGEsは年齢、性別、BMI、HD期間、DMの有無、CVAやIHDの既往等との間に有意な相関関係はなく、動脈硬化や閉塞の指標であるCAVI、ABI及びTBIとの間にも有意な関係はなかった。

Uenoら²⁴⁾ は、120名の末期腎臓病 (end-stage renal disease: ESRD) 患者と年齢・性別を合わせた対象患者で検討し、skin AFは対照群では年齢と関連したが、ESRD患者では関連しなかったと報告している。小山²⁵⁾ やKoyamaら²⁶⁾ は、HD患者389名の検討から、血漿pentosidine濃度

はDMの有無で差が無かったと述べているが、非DM289名とDM94名のskin AFを比較すると、DM群が有意 ($P = 0.006$) に高値であったと報告している。Skin AFと脈波速度 (pulse wave velocity: PWV) との関係に関しては、Uenoら²⁴⁾ はESRD患者では、skin AFとPWVは正の相関関係にあったと報告しており、小山²⁵⁾ は非DM群もDM群もskin AFとPWVは、年齢に独立して有意な正の相関を示したが、血漿pentosidine値はPWVと有意な関連がなく、頸動脈IMTとの関係はpentosidine値もskin AFも非常に弱かったという。

HD前後のAGEsに関しては、Agalouら²⁷⁾ が血漿中と透析液中のfree AGEsを測定して報告している。それによると、HD前はMG-H1が 4824 ± 429 (nM) と最も高値で、健常者 122 ± 15 の約40倍あり、HD後は 1511 ± 211 に低下したが12倍だったという。一方、pentosidineは 4.22 ± 0.59 と最も低値であったが、健常者 0.92 ± 0.46 の4.6倍で、HD後には 1.30 ± 0.27 と健常者と差が無かった。また、free AGEs はHD開始からすぐに血漿と透析液の濃度が等しくなるものが多かったが、MG-H1とmethylglyoxal-derived lysine dimer (MOLD) は濃度に差があった。一方、Graaffら²⁸⁾ は、35名を対象としたpilot studyではあるが、HD前後に皮膚と血漿のAFを測定し、HD後にplasma AFは14%低下 ($p < 0.001$) したが、skin AFには変化が無かったと報告している。今回の検討では、skin AFはHD後に低下していた ($p < 0.01$)。しかし、HD後に高値となった例があり、低下群と非低下群に分けてskin AFをみると、HD前は低下群が有意 ($p < 0.005$) に高く、HD後には差が無かった。AGEsにはHDで除去され易いものとされにくいものがある可能性がある。

村本ら³⁾ は、リン吸着薬であるセベラマー塩酸塩によるAGEs吸着効果を報告している。彼らは血清AGEsを特異抗体を用いたenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で、glucose由来のGlc-AGEsとglyceraldehyde由来のGlycer-AGEsを測定し、セベラマー塩酸塩投与24週後には、両者とも有意に低下したと報告している。また、村本ら²⁹⁾ はセベラマー塩酸塩を1.5g/dayの少量投与を行ったところ、Glc-AGEsは12週後に有意に低下したのに対し、Glycer-AGEsには変化が無かったが、投与前Glycer-AGEsの平均値で分けると、平均値以上の患者では12週に有意に低下していたと報告し、少量投与でもAGEs吸着除去効果があると述べている。今回の検討では、HD前skin AFは、セベラマー塩酸塩投与群が非投与群よりも有意ではないが低くかった。同一症例による投与前後の検討ではないので、村本ら^{3), 29)} の結果と直接比較出来ないが、セベラマー塩酸塩のAGEs吸着除去の可能性が推測される。

<結語>

- (1) 血液透析患者で、指尖skin AF測定によりAGEsの評価を行った。
- (2) AGEsは、年齢、性別、BMI、透析期間、DMの有無、CVA・IHDの既往、CAVI・ABI・TBI等と、有意な相関関係はなかった。
- (3) AGEsは全症例で検討するとHD後に有意に低下したが、高値となった例があった。HDで除去されないAGEsが濃縮されて透析後に高値になった可能性がある。
- (4) Severamer投与群のAGEsは、非投与群と比べると、有意ではなかったが低値であった。
- (5) 経時的变化を含めた、更なる検討が必要と考えられた。

(倫理的配慮)

本研究は、医療法人秋田泌尿器科クリニック理事会の承認を得、研究協力者に目的・意義・概要等を文書で説明し、文書で同意を得た上で行った。

<文献>

- 1) 竹内正義：生活習慣病におけるTAGE (toxic AGEs) 病因説、北陸大学紀要 28：33-48、2004.
- 2) Arsov S, Graaff R, van Oevern W, et al.: Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. Clin Chem Lab Med 52: 11-20, 2014.
- 3) 村本弘昭、北田欽也、武藤寿生、他：透析患者における血清終末糖化産物（AGEs）濃度—セバラマー塩酸塩投与の効果—、透析会誌 44：1015-1021、2011.
- 4) Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. J Am Soc Nephrol 9: S16-S23, 1998.
- 5) 福本真也、庄司哲雄、小山秀則、他：透析患者の動脈硬化、透析患者の合併症とその対策、日本透析医会・合併症対策委員会編、P1-12、日本透析医会、東京、2005.
- 6) 日本透析医学会：「血液透析患者における心血管合併症の評価と治療に関するガイドライン」第1章 脂質異常症・動脈硬化、透析会誌 44：347-357、2011.
- 7) 村本弘昭、北田欽也、武藤寿生、他：透析患者における血清終末糖化産物（AGEs）濃度—セバラマー塩酸塩投与の効果—、透析会誌 44：1015-1021、2011.
- 8) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. Bone Marrow Transplantation 48, 452-458, 2013.
- 9) 能登宏光、加藤 彩、能登 舞、他：慢性透析患者のCardio Ankle Vascular Index、Ankle Brachial Index及びToe Brachial Indexの経年変化に関する検討、秋田腎不全研究会誌 20：152-161、2017.
- 10) Niwa T: Mass spectrometry for the study of protein glycation in disease. Mass Spec Rev 25: 713-723, 2006.
- 11) 白河潤一、永井竜児：生体におけるメイラード反応の影響、化学と生物 53：299-304、2015.
- 12) Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, et al.: Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. N Engl J Med 314: 403-408, 1986.
- 13) Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, et al.: Skin Autofluorescence, a Measure of Cumulative Metabolic Stress and Advanced Glycation End Products, Predicts Mortality in Hemodialysis Patients. J Am Soc Nephrol 16: 3687-3693, 2005.
- 14) Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, et al.: Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. Diabetologia 47: 1324-1330, 2004.
- 15) Meerwaldt R, Links T, Graaff R, et al.: Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. Ann N Y Acad Sci 1043: 290-298, 2005.

-
- 16) Gerrits EG, Lutgers HL, Smeets GHW, et al.: Skin Autofluorescence: A Pronounced Marker of Mortality in Hemodialysis Patients. *Nephron Extra* 2: 184-191, 2012.
 - 17) Nongnuch A, Davenport A: Skin autofluorescence advanced glycosylation end products as an independent predictor of mortality in high flux haemodialysis and haemodialysis patients, *Nephrology* 20: 862-867, 2015.
 - 18) Schwedler SB, Metzger T, Schinzel R, et al.: Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 62: 301-310, 2002.
 - 19) Tanaka K, Katoh T, Asai J, et al.: Relationship of Skin Autofluorescence to Cardiovascular Disease in Japanese Hemodialysis Patients. *Ther Apher Dial* 14: 334-340, 2009.
 - 20) Kimura H, Tanaka K, Kanno M, et al.: Skin Autofluorescence Predicts Cardiovascular Mortality in Patients on Chronic Hemodialysis. *Ther Apher Dial* 18: 461-467, 2014.
 - 21) Furuya F, Shimura H, Takahashi K, et al.: Skin autofluorescence is a predictor of cardiovascular disease in chronic kidney disease patients. *Ther Apher Dial* 19: 40-44, 2015.
 - 22) Yamanaka M, Matsumura T, Ohno R, et al.: Non-invasive measurement of skin autofluorescence to evaluate diabetic complications, *J Clin Biochem Nutr* 58: 135-140, 2016.
 - 23) Ito K, Sakata N, Nagai R, et al.: High serum level of methylglyoxal-derived AGE, N δ -(5-hydroxy-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine, independently related to renal dysfunction, *Clin Exp Nephrol* 21: 398-406, 2017.
 - 24) Ueno H, Koyama H, Tanaka S, et al.: Skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation, is associated with arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Metabolism* 57: 1452-1457, 2008.
 - 25) 小山英則：慢性腎臓病における心血管リスクとAGE/RAGE、医学のあゆみ 244：653-658、2013.
 - 26) Koyama H, Nishizawa Y: AGEs/RAGE in CKD: irreversible metabolic memory road toward CKD? *Eur J Clin Invest* 40: 623-635, 2010.
 - 27) Agalou S, Ahmed N, Babaei-Jadidi R, et al.: Profound Mishandling of Protein Glycation Degradation Products in Uremia and Dialysis. *J Am Soc Nephrol* 16: 1471-1485, 2005.
 - 28) Graaff R, Arsov S, Ramsauer B, et al.: Skin and plasma autofluorescence during hemodialysis: a pilot study. *Artif Organs* 38: 515-518, 2014.
 - 29) 村本弘昭、武藤寿生、竹内正義：透析患者における血清終末糖化産物（AGEs）濃度—セベラマー塩酸塩少量投与の効果—、透析会誌 46：467-473、2013.