

# グルコースとアンモニアとの室温における 非酵素的反応

—その反応の生理的意味—

## Nonenzymatic Reaction of Glucose and Ammonia at Room Temperature —Physiological Significance of the Reaction—

菅 田 恵 子

Since Rahbar (1968) has found that HbA<sub>1c</sub>, which was later found to be glycosylated, increases in the blood of patients suffering from diabetes mellitus, the nonenzymatic glycosylation of biologically relevant molecules has become an increasingly important working hypothesis toward unraveling some of complications associated with diabetes mellitus and aging.

This study has begun when ninhydrin-reactive compound (NR compound) was found to be produced at room temperature as soon as glucose and dibasic ammonium phosphate solutions were mixed. The reaction seemed to be similar to Maillard reaction. The last report showed that the peak of the NR compound observed by amino acid analyzer is Amadori product of Maillard reaction, 1-amino-1-deoxyfructose.

Therefore, the experiments have been performed to purify the compound and examine if the compound plays any physiological role in mammals.

### A) *In vitro* experiments

- 1) Purification of NR compound: The reaction mixture of glucose and dibasic ammonium phosphate solutions was desalted in MicroAcilyzer and applied on cation-exchange resin, Dowex 50W-X8 column (H<sup>+</sup>) at pH2.0 to eliminate glucose. The NR compound adsorbed to the resin was eluted with 3.0N HCl solution. Finally, the residual salt in the eluent was removed by gel-filtration method with Sephadex G-10 column and the eluent containing NR compound thus obtained have no glucose and almost no salts. The peak of the NR compound was determined by amino acid analyzer.
- 2) Efficiency to produce ninhydrin-reactive compound of various sugars and various ammonium salts: In order to know the efficiency of various sugars and various ammonium salts to produce ninhydrin-reactive compound, the experiments were

performed in combination of dibasic ammonium phosphate with each one of the various sugars and of glucose with each one of the various ammonium phosphates. The ninhydrin-reactive compound formed was quantitatively determined in amino acid analyzer. The results indicate that dibasic ammonium phosphate was most reactive among the ammonium salts used and glucose was most reactive among the sugars used.

B) *In vivo* experiments

- 1) Effect of NR compound on bacteria: NR compound did not affect the growth rate of *Escherichia coli* K12, strain W3110 (prototroph,  $\lambda^-$ ,  $F^-$ ) and W4627 ( $F^-$ ,  $trpB^-$ ,  $lac^-$ ,  $Sm^r$ ).
- 2) Effect of NR compound on mice: NR compound injected into mice intraperitoneally did not show any recognizable effect on mice. Some of the mice was bled at 1 hr after injection, and the blood was subjected to amino acid analyzer. But no NR compound was detected.
- 3) Determination of NR compound in sera of patients: Analysis by amino acid analyzer showed that deproteinized serum of a patient who was suffering from hepatocirrhosis and hyperammonemia (twice of normal level), gave a small peak at the same retention time as that of NR compound. However, sera from two patients who was suffering from hepatocirrhosis, but not from hyperammonemia gave no such peak.

These results indicate that the compound has neither inhibitory effect nor accelerated effect on the bacterial growth and no toxic effect on the mice. Rather, the compound seems to be broken down rapidly in the mice. However, since apparent NR compound was found in a patient suffering from hepatic coma due to hyperammonemia caused by liver cirrhosis, NR compound is possibly formed in patients with hyperglycemia and/or hyperammonemia and can play some physiological role in the patients. Not only in patients but also in normal subjects, the level of ammonia in portal vein is rather high and NR compound is possibly formed in the vein that affects the liver function in an unknown way.

Key Words: maillard reaction, glycation, AGE (advanced glycosylation endproducts)

生体内でのタンパク質とグルコースによるメイラード反応の分野では、1968年 Rahbar<sup>1)</sup>が、糖尿病患者の血液中に HbA<sub>1c</sub>が増加していることを報告したのを契機として、HbA<sub>1c</sub>の化学構造が研究され、1977年 Cerami らによって、HbA<sub>1c</sub>は $\beta$ 鎖N末端のバリンにグルコースがアマドリ型として結合した糖化タンパク質であり<sup>2)</sup>、その反応は非酵素的に起こること<sup>3)</sup>が明らかに

されて以来、各種の生体タンパク質について分子レベルでの解析と生理的影響が研究されている。

生体内でのこのような反応は、“glycation” (“nonenzymatic glycosylation”) と呼ばれている。健康体では、約 10% 程度のヘモグロビン<sup>4)</sup>や血清アルブミン<sup>5)</sup>がグリコシル化されアマドリ生成物を形成する。さらに、その反応が進むと (advanced stage)、数箇月から数年のうちに脱水反応をおこして不可逆的なグルコース誘導体になる。Brownlee らは、この誘導体を AGE (advanced glycosylation endproducts) と称した<sup>6)</sup>。AGE は、黄褐色で蛍光を発し次第に不溶化し、近接するタンパク質と結合して架橋を形成し<sup>7-8)</sup>、組織の障害を生じると考えられている<sup>9)</sup>。また、種々の長寿命タンパク質についても、AGE 化による架橋形成反応が一生を通じて徐々に進行し<sup>10)</sup>老人性白内障や老人性動脈硬化症を引き起こす。さらに、DNA も AGE 化し、突然変異の誘発<sup>11)</sup>を引き起こしやすくするなどグリコシル化反応の影響は実に広範囲に及んでいる。

また、糖尿病患者の血液中では、高血糖を反映して多量のアマドリ生成物を生じ AGE への移行<sup>12)</sup>が見られるだけでなく、眼のレンズタンパク質クリスタリンのグリコシル化による白内障の発生<sup>13)</sup>、コラーゲンの AGE 化によるアテローム性動脈硬化症の発生<sup>14)</sup>、およびミエリンタンパク質の AGE 化による神経症の発生<sup>15)</sup>など、糖尿病性合併症の多くのものが AGE 化により説明されると考えられている。

現在、AGE としてカルボキシメチルリジン<sup>16)</sup>のほかピラリン<sup>17)</sup>とペントシジン<sup>18)</sup>が生体内で同定されているが、これらのほかにも多くの AGE が生成すると考えられる。

一方、生体は、メイラード反応を抑制したり反応生成物を除去する機構を有すると推測され、研究が行われている。その例として、生体内の AGE 化したタンパク質を除去または修復するための生物学的な処理過程の存在がある<sup>19)</sup>。そのうち、マクロファージは、AGE 化したタンパク質の除去や修復に特に重要な役割を演じている。老化によりこのマクロファージの機能が低下することが、AGE が蓄積する一つの原因となっているという考えもある。

また、Brownlee らは、アミノグアニジンがアマドリ生成物に結合して AGE への移行を妨害し、近接タンパク質との架橋形成を抑制することを示す<sup>20)</sup>など、グリケーション反応の抑制・調節機構に関する報告もある<sup>21-22)</sup>。

前述のように、グリケーションは健康なひとの場合にも一定レベルで起こっている。今後の高齢化社会にむけて、この装飾タンパク質がどのように代謝されるのか、食品由来のメイラード反応を起こしたタンパク質がどのように消化吸收され生体内でいかなる影響を与えるか、など多くの問題について検討せねばならない。

本研究は、グルコースと第二リン酸アンモニウムの混合溶液から形成されたニンヒドリン反応陽性物質 (NR 物質：1-アミノフルクトース)<sup>23)</sup>が、種々の組織でのグリコシル化反応のなかで、生体内で生理的に何らかの役割を担っているという可能性を検討することを目的とした。

## 実 験 方 法

1. NR 物質の調整と精製方法<sup>20)</sup>:

NR 物質の精製は Fig.1 のようにして行った。まず、グルコース 4.5g と第二リン酸アンモニウム 3.75g を蒸留水に溶解し全量を 50ml とした。この混合溶液は pH8.5 であり、溶液中の各試薬の濃度は 0.5M になる。30分放置後、この溶液はマイクロアシライザー（旭化成(株)）:

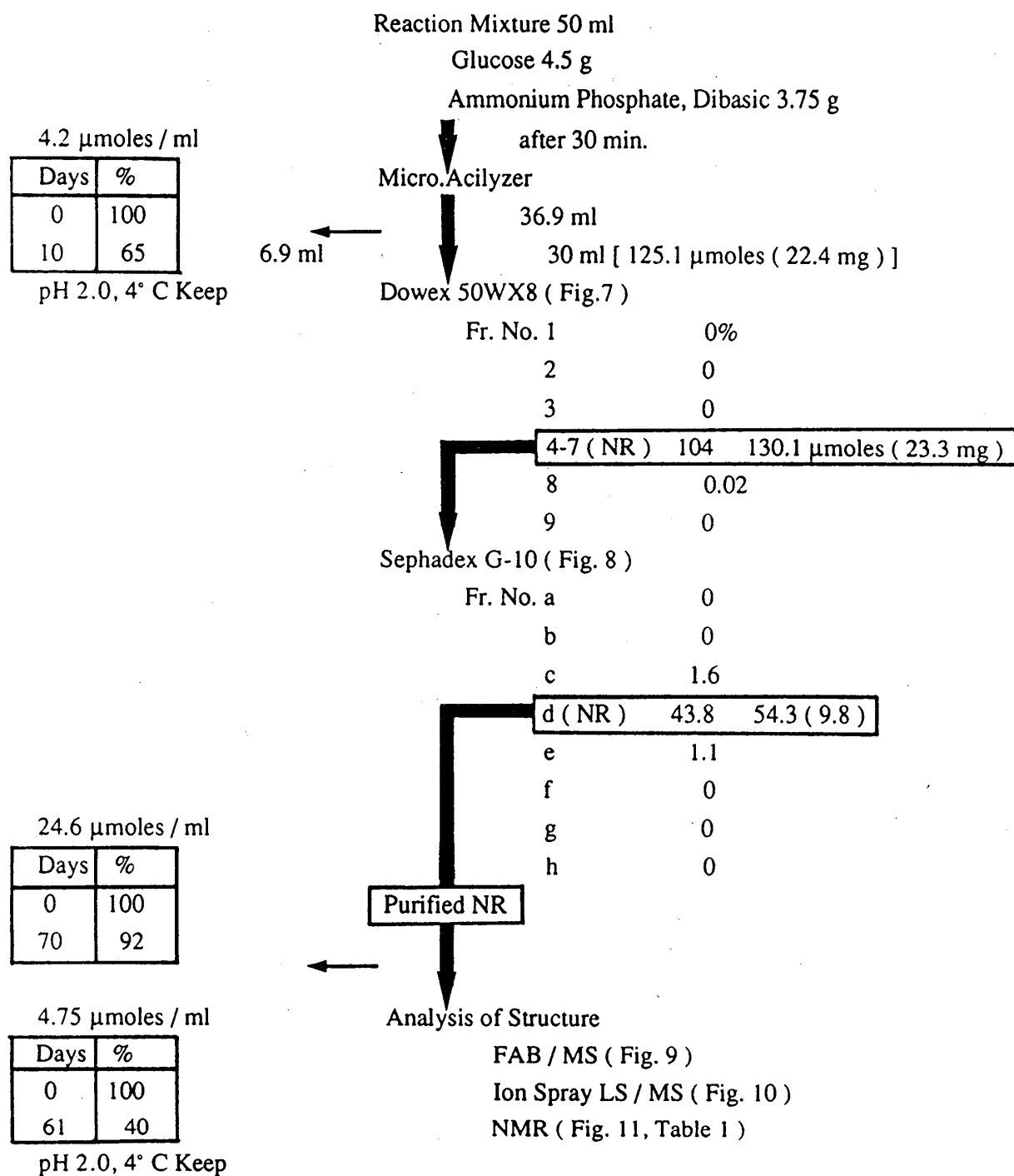


Fig. 1. Purification Process of NR Compound

G-1100 型) によって脱塩し、3N 塩酸を加えて pH2.0 に調整した。その溶液の一部を用いて、アミノ酸分析計 (ニンヒドリン反応法) (医理化 (株) 製 A-3300 型) により、ニンヒドリン反応陽性物質 (NR 物質) が形成されていることを確認した (Fig. 2)。次に、マイクロアシライザーで脱塩した反応液は、Dowex 50W-X8 (50-100Mesh) (米国ダウケミカル社製) を用いて陽イオン交換カラムクロマトグラフィー (カラムサイズ 2.5×40cm) を行い、0.01N 塩酸を流した後、蒸留水で洗浄することによりグルコースを除き、さらに、3N 塩酸を流して溶出した NR 物質の分画を集めた。イオン交換クロマトグラフィーで溶出した NR 物質分画を再度脱塩するために、Sephadex G10 カラムクロマトグラフィー (カラムサイズ 2.5×40cm) を行い、0.01N 塩酸で溶出し、NR 物質の精製試料を得た。

NR 物質の量は、アミノ酸分析計で検出されたピーク面積から、D-グルコサミンのニンヒドリン反応率をもとにして算出した (Fig. 3)。

## 2. 糖とアンモニウム塩の組み合わせによるニンヒドリン反応陽性物質の比較:

### 1) グルコースと各種アンモニウム塩の組み合わせによる反応液の調整

0.5M のグルコースと 0.5M の各種アンモニウム塩 (酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、ギ酸アンモニウム、モリブデン酸アンモニウム、第一リン酸アンモニウム、第二リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、第二クエン酸アンモニウムの 8 種類) および尿素、アンモニアの組み合わせについてそれぞれ混合溶液を作成した。実験に使用した D-グルコースおよびアンモニウム塩は、すべて和光純薬 (株) の特級試薬である。

### 2) 第二リン酸アンモニウムと各種の糖の組み合わせによる反応液の調整

0.5M の第二リン酸アンモニウムと 0.5M の各種糖 (D-グルコース、D-フルクトース、D-ガラクトース、D-マンノース、D-アラビノース、D-リボース、D-キシロースおよび D-グリセルアルデヒドの 8 種類) の組み合わせについて、それぞれ混合溶液を作成した。実験に使用した糖および第二リン酸アンモニウムは、すべて和光純薬 (株) の特級試薬である。

### 3) 糖とアンモニウム塩の組み合わせによるニンヒドリン反応陽性物質の比較

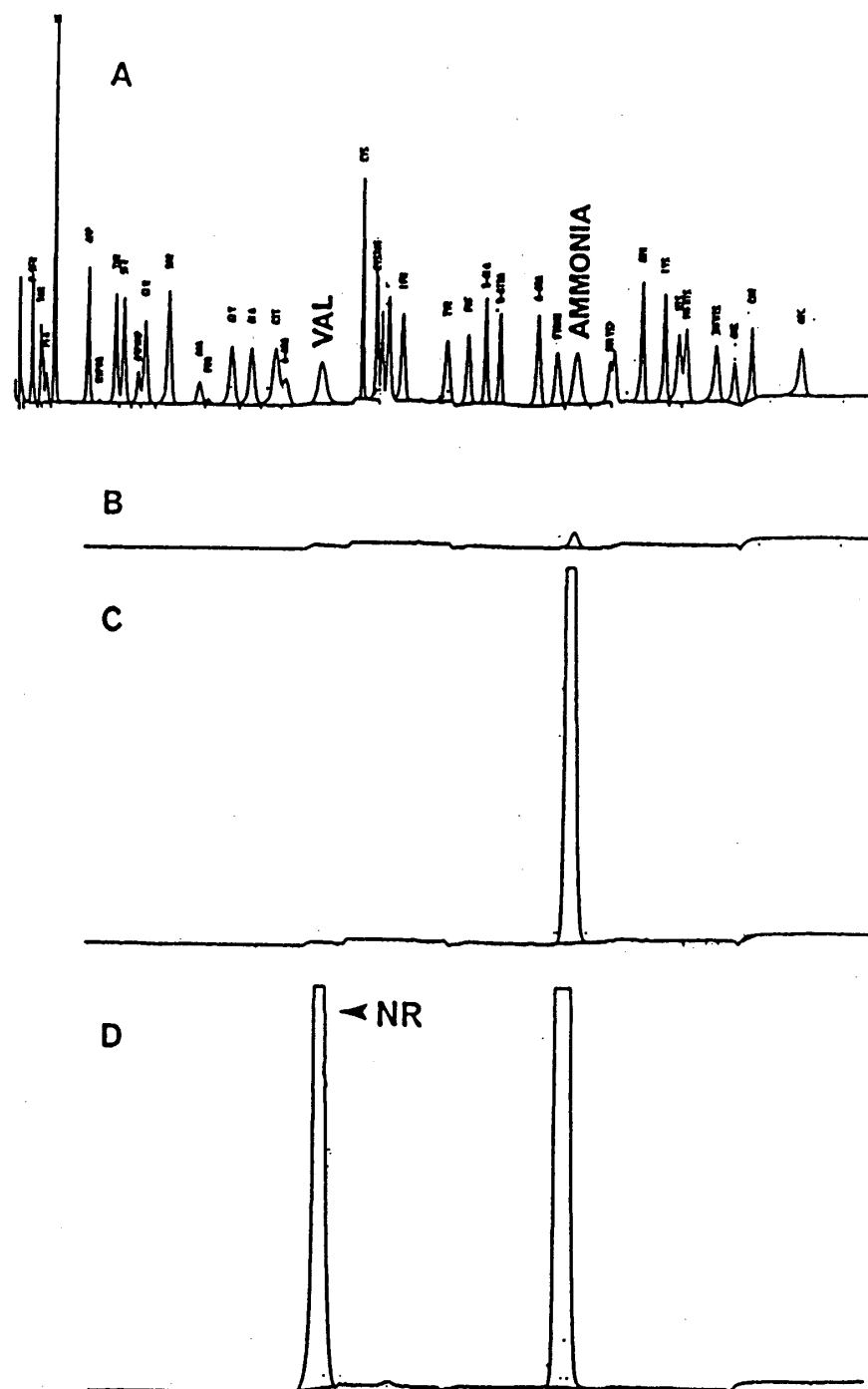
0.5M の糖および 0.5M アンモニウム塩の単独溶液を、それぞれ 1 種ずつ等量混合して全量を 10ml とする。糖とアンモニウム塩の混合溶液は、そのままアミノ酸分析計に注入すると塩の結晶が析出して分析計中のカラムを閉塞するので、マイクロアシライザーを用いて脱塩した後、3N 塩酸で pH2.0 に調整したものを試験溶液とした。試験溶液は、原液、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍希釈溶液を調整し、それぞれ 200 $\mu$ l をアミノ酸分析計に注入し、各々の保持時間とピーク面積から各ニンヒドリン反応陽性物質の分析を行った。

## 3. 大腸菌 K12 株を用いた増殖実験<sup>29)</sup>:

### 1) NR 物質の調製

NR 物質の大腸菌 K12 株の増殖におよぼす影響を調べるため、精製 NR 物質 49.2 $\mu$ moles/2ml (0.01N 塩酸溶液) の一部を用いて実験を行った。

NR 物質溶液は、精製 NR 物質を 0.1N-NaOH 溶液で pH7.0 にした後、蒸留水で希釈し最終



**Fig. 2.** Elution Patterns of Ninhydrin-positive compound (NR Compound) Produced in Mixed Solution of Glucose and Dibasic Ammonium Phosphate, Eluted from Amino Acid Analyzer

One hundred  $\mu$ l each of the desalted solutions of glucose and/or dibasic ammonium phosphate was applied on amino acid analyzer. (A) Standard amino acid; (B) 0.5 M glucose; (C) 0.5 M dibasic ammonium phosphate; (D) 0.5 M glucose+0.5 M dibasic ammonium phosphate.

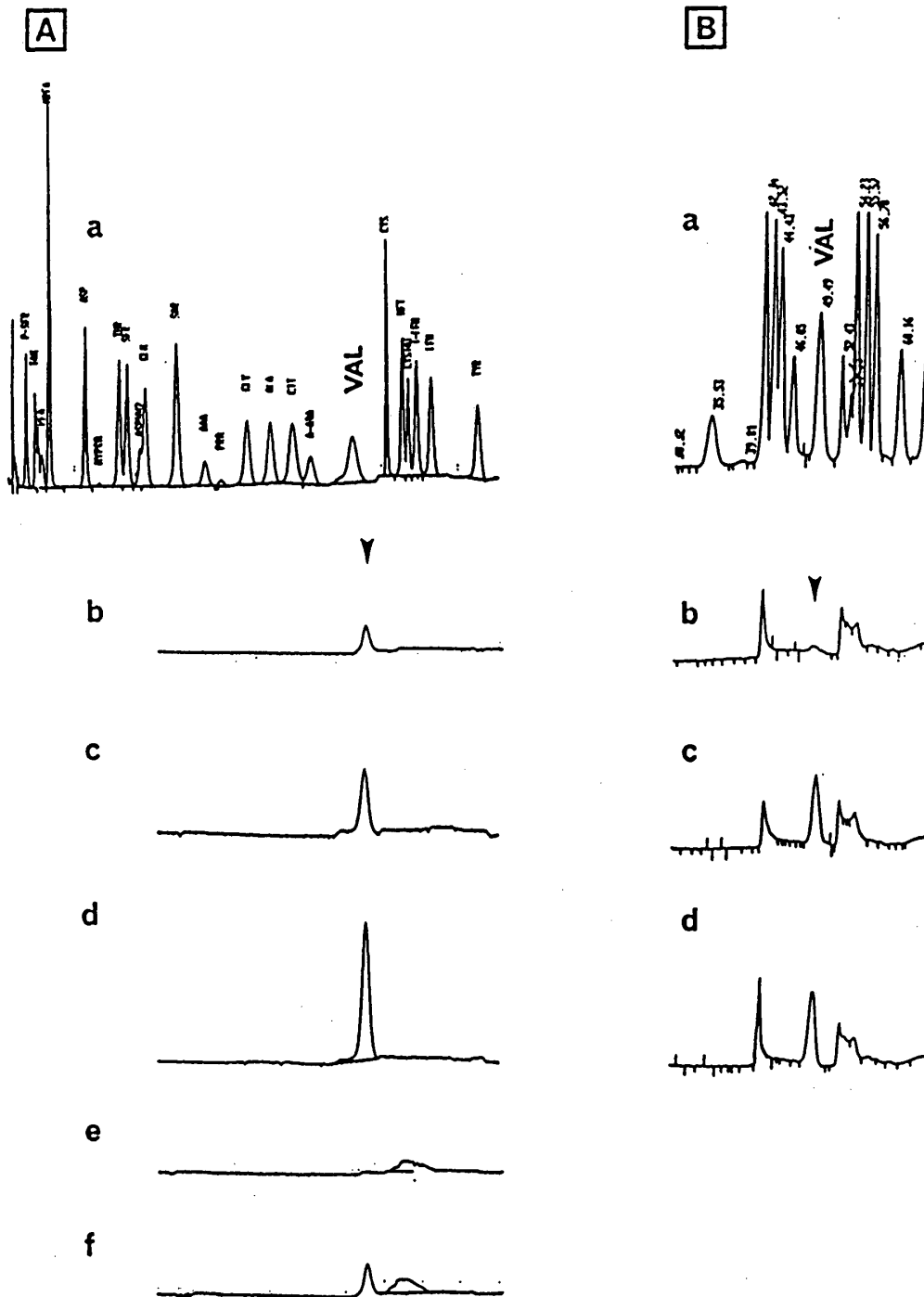


Fig. 3. Elution Patterns of NR Compound and/or D-Glucosamine or D-Galactosamine, Eluted from Amino Acid Analyzer and High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

One hundred  $\mu$ l each of the desalted solutions of 0.5 M glucose and 0.5 M dibasic ammonium phosphate and/or 0.1 mM D-glucosamine or D-galactosamine solutions was applied on amino acid analyzer (ninhydrin-staining method) and 25 ml of each of some solutions described above was applied on HPLC (fluorescence-staining method). Arrows (▼) indicate the elution site of NR compound. (A) Elution pattern from amino acid analyzer; (B) elution pattern from HPLC.

(a) Standard amino acid; (b) NR compound; (c) D-glucosamine; (d) NR compound+D-glucosamine; (e) D-galactosamine; (f) NR compound+D-galactosamine.

濃度 1mg/ml に調製した。

## 2) 使用菌株

大腸菌 K12 株より派生した突然変異株 W3110 (prototroph,  $\lambda^-$ ,  $F^-$ ) および W4627 ( $F^-$ ,  $trpB^-$ ,  $lac^-$ ,  $Sm^r$ ) を使用した。この2種類の菌は、バリンによって増殖が抑制されるが、その増殖抑制はイソロイシンにより回復することが明らかとなっている<sup>24)</sup>。

## 3) 使用培地

最少培地として、GS 培地 (Glucose-Simmonds medium) を使用した。GS 培地の組成は、蒸留水 1.0ℓ 中に、第二リン酸アンモニウム 2.5g、第一リン酸カリウム 1.5g、塩化ナトリウム 5g、20% 硫酸マグネシウム 0.5ml、クエン酸ナトリウム 2g、グルコース 3g である。W4627 株を使用するときは、GS 培地にトリプトファン 30 $\mu$ g/ml の濃度で加えたもの [GS (Trp) 培地] を使用した。

完全培地にはブイヨンを用いたが、その組成はエールリッヒ和光肉エキス 10g、ポリペプトン (和光) 10g、及び塩化ナトリウム 5g を蒸留水 1.0ℓ 中に溶かし、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に合わせたものである。以上の培地に寒天を 1.5% の割合で加えたものが普通寒天培地である。

## 4) 増殖実験

培養はすべて 37°C で行った。

実験 1 では、普通寒天培地上の新鮮分離コロニーをブイヨン 10ml に植菌し、一夜静置培養した後、その菌液をミリポアフィルター HA24 型 (pore size, 0.45 $\mu$ m) で濾過し、0.85% 食塩溶液で3回洗浄後、同量の GS 培地あるいは GS (Trp) 培地に懸濁し、菌懸濁液とした。Monod 式振盪培養器で培養するため、それぞれ L 型チューブ中の新鮮 GS 培地あるいは GS (Trp) 培地 6 に対しこの菌懸濁液をほぼ 1 の割合で加えた。対照として、GS 培地あるいは GS (Trp) 培地だけのものを用意し、GS 培地あるいは GS (Trp) 培地にバリンまたは NR 物質を加える場合には、バリン 10 $\mu$ g/ml、NR 物質 10 $\mu$ g/ml および 100 $\mu$ g/ml になるように調製した。菌増殖の経過は、光電比色計 (Bausch & Lomb Spectronic 20A 型) を用いて 660nm の波長で経時的に追跡した。

実験 2 では、普通寒天培地上の新鮮分離コロニーをブイヨン 10ml に植菌し、一夜静置培養した後、増殖した菌液をそれぞれ L 型チューブ中の同種の新鮮培地に 10 倍希釈し、660nm の濁度がほぼ 0.25 に達するまで、Monod 式振盪培養器で振盪しつつ培養した。この対数増殖期にある細胞は、ミリポアフィルター HA24 型 (pore size, 0.45 $\mu$ m) で濾過し、0.85% 食塩溶液で3回洗浄後、同量の GS 培地あるいは GS (Trp) 培地に懸濁し、菌懸濁液とした。この菌懸濁液を用いて、実験 1 と同様に 37°C で振盪しつつ経時的に菌の増殖を追跡した。

## 4. マウスに対する毒性実験：

### 1) NR 物質注射液の調製

NR 物質のマウスに対する毒性を調べるため、精製 NR 物質 49.2 $\mu$ moles/2ml (0.01N 塩酸



溶液)の一部を用いて実験を行った。

実験1および実験2のB群に用いたNR物質注射液は、精製NR物質(0.01N塩酸溶液)を0.1N-NaOH溶液でpH7.0にした後、滅菌生理食塩水で希釈して最終濃度を870 $\mu$ g/mlに調製した。また、実験2のC群に用いたNR物質注射液は、最終濃度を1.7mg/mlに調製した。希釈に用いた生理食塩水は、滅菌したものを使用した。

## 2) 実験動物および飼育方法

実験動物は、8週齢のddy系雄マウス40匹(体重30~32g、(株)三協ラボサービス)を用いた。予備飼育として固形飼料で7日間飼育した後、最長7日間飼育を行なった。マウスをポリカーボネート製の飼育籠1ケージに5匹ずつ入れ、室温25°Cの飼育室で12時間の明暗サイクル(8:00a.m.~8:00p.m.)で飼育した。飼育期間中、固形飼料および水は、自由に摂取させた。なお、本飼育開始時のマウスの平均体重が、各群ほぼ等しくなるように群分けを行った。

## 3) 実験方法

実験1(短期実験)では、マウスを7日間予備飼育した後、各群5匹ずつ5群に分け、1群をコントロールとして採血し、残りの4群のマウスに6mg/kg体重の割合でNR物質を腹腔内へ注射した。

NR物質溶液注射後、一定時間毎(1, 2.5, 5, 16hrs)にエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈を切開し、血液を採取した。

実験2(長期実験)では、マウスを7日間予備飼育した後、各群5匹ずつ3群に分け、A群生理食塩水、B群NR物質溶液(6mg/kg体重)、C群NR物質溶液(30mg/kg体重)を腹腔内へ注射した。生理食塩水は、B群NR物質溶液と同量を注射した。注射後7日目に、実験1と同様に採血した。なお、長期実験のマウスについては、3日に1度の割合で、体重の測定も行った。

## 4) 測定

採取した血液は、室温で約1時間静置した。血液が凝固したのち遠心分離(3000rpm 20min.)を行ない、血清を分離した。

血清は、微量用限外濾過システム8MC(グレースジャパン(株)アミコン事業部)を用いて除タンパクした後、その濾液をアミノ酸分析用の試験溶液とした。試験溶液は生理食塩水で2倍希釈し、その200 $\mu$ lをアミノ酸分析計に注入し、その保持時間とピーク面積からNR物質の定性、定量を行った。

また、血清中のグルコースの定量は、グルコースC-テストワコー(ムタロターゼ・GOD法)(和光純薬(株)製)を用いて、アンモニアの定量は、アンモニアテストワコー(藤井・奥田法変法)(和光純薬(株)製)を用いて行なった。尿素は、尿素窒素B-テストワコー(ウレアーゼ・インドフェノール法)(和光純薬(株)製)で定量した。

## 5. 肝硬変患者の血液中からの検出条件:

### 1) 対象

菅 田 恵 子

健常者10名、および肝硬変患者3名とした。肝硬変患者のうち2名は、血液中のアンモニア値が正常で、肝性脳症を起こしていない患者であり、残りの1名は、肝硬変による高アンモニア血症のため肝性脳症を起こした患者で、脳症発症時および改善時に採血した。

## 2) 方法

患者から採血した血液は、室温で約1時間静置した。血液が凝固したのち、3000rpm 20min. 遠心分離を行い、血清を分離した。

得られた血清は、微量用限外濾過システム 8MC を用いて除タンパクした後、その濾液をアミノ酸分析計用の試験溶液とした。試験溶液 100 $\mu$ l あるいは 200 $\mu$ l をアミノ酸分析計に注入し、NR 物質の検出を行った。

## 結 果

### 1. In vitro の実験

#### 1) 糖とアンモニア塩の組み合わせによる反応の相異

##### a) グルコースと各種のアンモニウム塩によるニンヒドリン反応陽性物質の生成 (Fig. 4)

本実験では、グルコースと第二リン酸アンモニウムとを用い、両者の混合溶液中に生じたニンヒドリン反応陽性物質を NR 物質と称し精製の対象物質としているが、この組み合わせ以外の混合溶液についても検討した。0.5M グルコースと 0.5M の各種アンモニウム塩とを混合し、マイクロアシライザーで脱塩後、アミノ酸分析計でニンヒドリン反応陽性物質を分析した。その結果、Fig.4 のように、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、ギ酸アンモニウム、モリブデン酸アンモニウム、第一リン酸アンモニウム、第二リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウムから形成された物質は、すべて NR 物質と同一の保持時間を示したので、それら全ての組み合わせで、NR 物質と同一の物質が形成されたと考えられる。しかも、その合成量は、グルコースと第二リン酸アンモニウムとの場合に一番多く、それ以外の組み合わせでは、すべてその 1/50 以下であって、特に、第一リン酸アンモニウムの場合は極めて少なく、クエン酸アンモニウムおよび尿素を用いた場合には認むべきピークが検出されなかった。

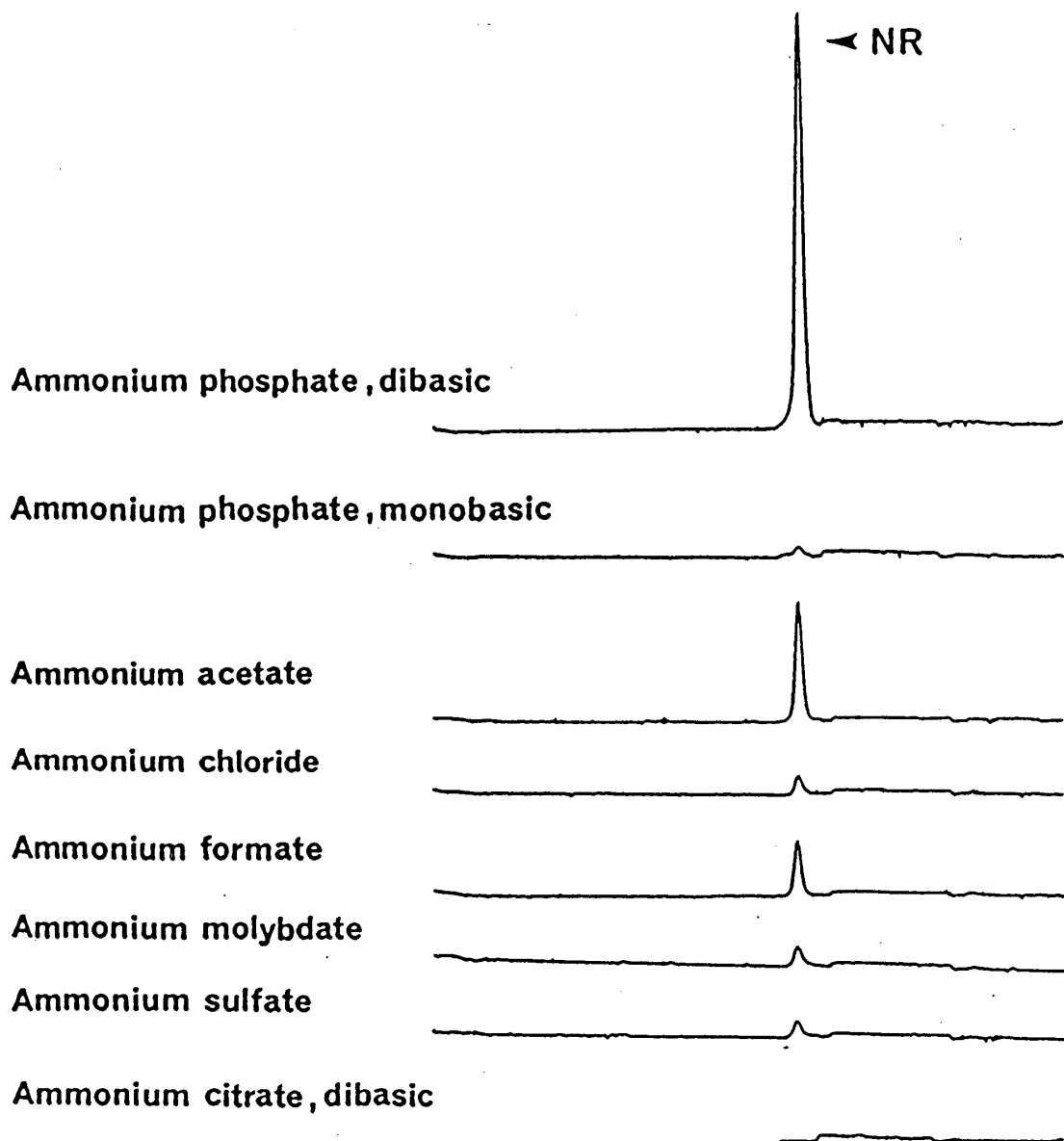
以上のように、グルコースと第二リン酸アンモニウムとの混合溶液が、実験に使用した糖とアンモニウム塩のうち最も反応性が高かった。

図には示していないが、0.5M グルコースと 0.5M のアンモニアとの混合溶液でも、アミノ酸分析計で NR 物質と同一と考えられるニンヒドリン反応陽性物質が検出された。

##### b) 第二リン酸アンモニウムと各種の糖によるニンヒドリン反応陽性物質の生成 (Fig. 5)

0.5M リン酸アンモニウムと 0.5M の各種の糖とを混合し、マイクロアシライザーで脱塩し、アミノ酸分析計でニンヒドリン反応陽性物質を分析した。その結果、Fig.5 のように、D-フルクトースを用いた場合だけが、D-グルコースと同一位置にピークを作った。D-ガラクトース、D-マントース、D-リボース、D-アラビノース、D-キシロース、D-グリセルアルデヒドは、ピークの保持時間が NR 物質より長いので、反応生成物は NR 物質とは異なると考えられる。しか

グルコースとアンモニアとの室温における非酵素的反応



**Fig. 4.** Elution Patterns of Ninhydrin-positive Compound Produced in the Mixed Solution of Glucose and Various Ammonium Salts, Eluted from Amino Acid Analyzer

Desalted mixture of 0.5 M glucose and 0.5 M ammonium salt was applied on amino acid analyzer without dilution, except for the mixture of glucose and dibasic ammonium-phosphate which was diluted 20-fold before applying on the analyzer. The other exceptional one was ammonium molybdate, the concentration of which was 0.021 M because of its low solubility.

も、糖によっては、単一の物質ではなく複数の物質を合成した。

生成量は、グルコースが最も多く、マンノースはグルコースの場合の約 2/3 であった。それ以外の糖を用いた場合は、さらに少なかった。

## 2. In vivo の実験

### 1) 大腸菌 K12 の突然変異株 W3110 および W4627 に対する影響

#### a) 完全培地増殖菌を最小培地で増殖させる (shift-down) 実験

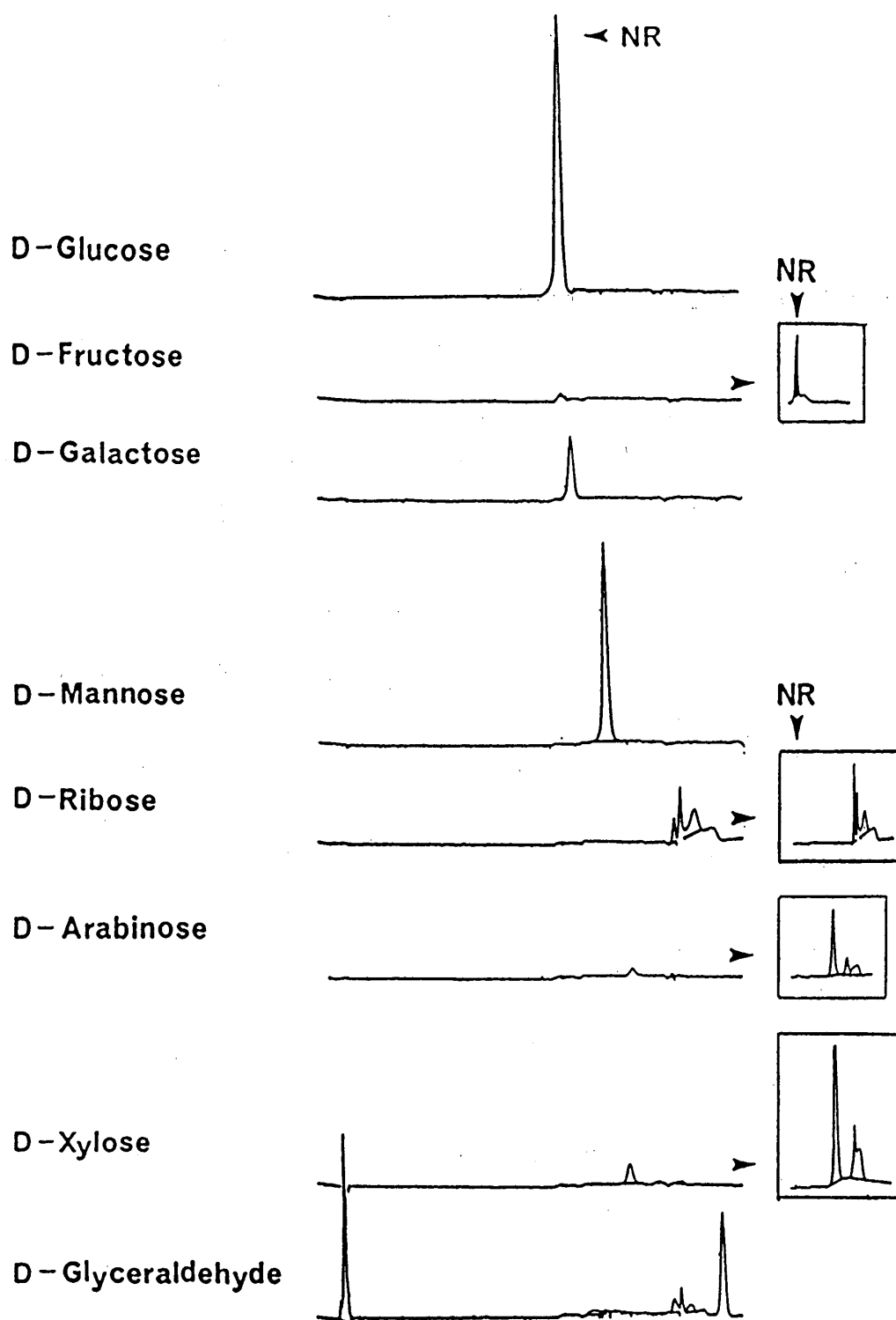


Fig. 5. Elution Patterns of Ninhydrin-positive Compound Produced in the Mixed Solution of Dibasic Ammonium Phosphate and Various Sugars Eluted from Amino Acid Analyzer

Each mixture of 0.5 M sugar and 0.5 M dibasic ammonium phosphate was desalted in MicroAcilyzer, the desalted mixture was diluted 20-fold and 200ml each of the diluted solutions were applied on amino acid analyzer. Figures in squares at right hand side showed peaks when higher concentrations of the solutions were used.

ブイヨンで一夜培養後、最小培地である GS 培地あるいは GS (Trp) 培地を用いて増殖実験を行い、精製 NR 物質の、W3110 株および W4627 株の増殖におよぼす影響を調べた。最小培地に、バリンは  $10\mu\text{g/ml}$ 、NR 物質はバリンと同濃度 ( $10\mu\text{g/ml}$ ) あるいは、10倍濃度 ( $100\mu\text{g/ml}$ ) になるように加え、対照としてバリンも NR 物質も加えない GS 培地を用意し、各培地にそれぞれ W3110 株と W4627 株とを植菌し、各培地での各菌の増殖速度を比較した。その結果、図には示していないが、W3110 株では、バリンは強く増殖を抑制したが、NR 物質は、バリンと同濃度  $10\mu\text{g/ml}$  で菌の増殖に認むべき影響が見られず、 $100\mu\text{g/ml}$  の濃度では  $10\mu\text{g/ml}$  の濃度に比べわずかに抑制効果が認められた。W4627 では、コントロール、バリン、NR 物質のすべてに増殖抑制効果が認められた。

b) 完全培地増殖菌をさらに完全培地で対数増殖期まで培養し最小培地で増殖させる実験 (Fig. 6)

一夜培養、対数培養にブイヨン (完全培地) を用い、ブイヨンで対数増殖期にある細胞を洗浄後、最小培地に植菌して増殖実験を行った。その結果、Fig. 6 のように、バリンについては W3110 株および W4627 株ともに菌の増殖を強く抑制したが、NR 物質では W4627 株の  $100\mu\text{g/ml}$  に濃度でわずかに抑制が認められたのみで、これ以外には菌の増殖に認むべき影響が見られなかった。したがって、バリンとは異なり、NR 物質には増殖抑制効果がないと考え

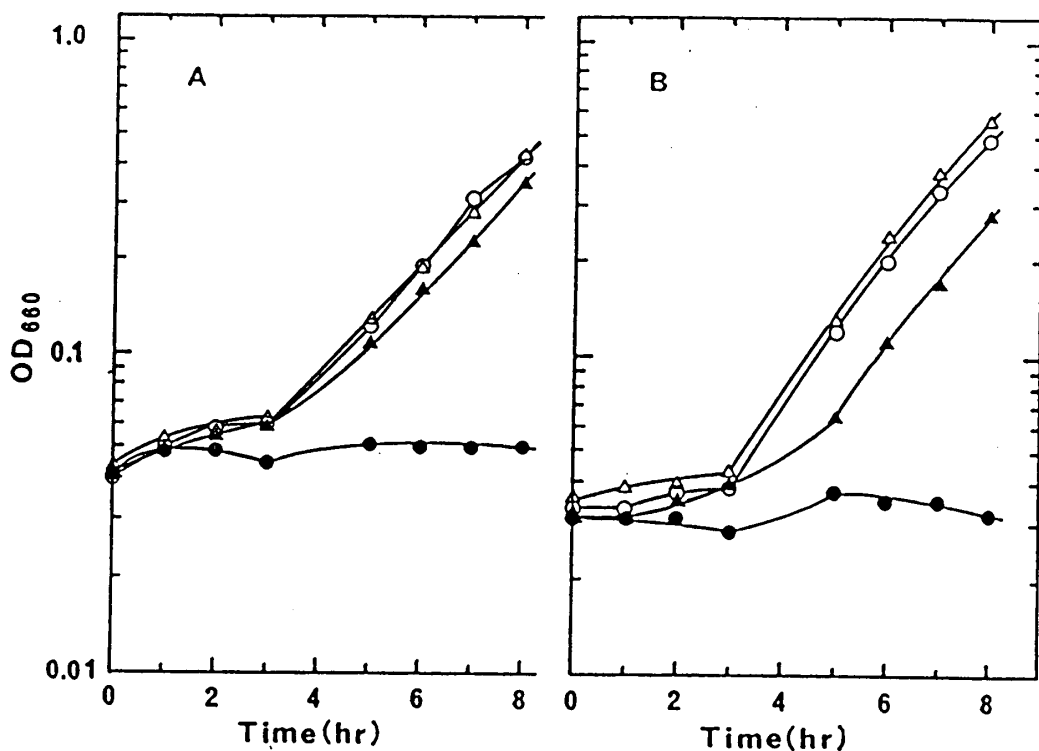


Fig. 6. Effect of NR compound and Valine on the Growth of Escherichia coli K12 Strain W3110 and W4627

(A) Strain W3110; (B) strain W4627. No addition of both NR compound and valine (○);  $10\mu\text{g}$  of valine/ml (●);  $10\mu\text{g}$  of NR compound/ml (△);  $100\mu\text{g}$  of NR compound/ml (▲).

菅 田 恵 子

られる。

2) マウスに及ぼす影響

マウスを用いた短期、長期の代謝実験の結果は、以下のとおりである。

NR 物質を腹腔内に注射後、その血清をアミノ酸分析計で測定した結果、全試料で NR 物質は検出されなかった。

また、血液中のグルコース、アンモニア、尿素の量も変化が見られず、長期実験で一週間の生存中、体重も異常なく増加した。

3) 肝硬変の患者の血液中における NR 物質の検出 (Fig. 7)

対照として、健常者の血清をタンパクした後、アミノ酸分析計で分析したが、NR 物質と考えられるピークは検出されなかった。

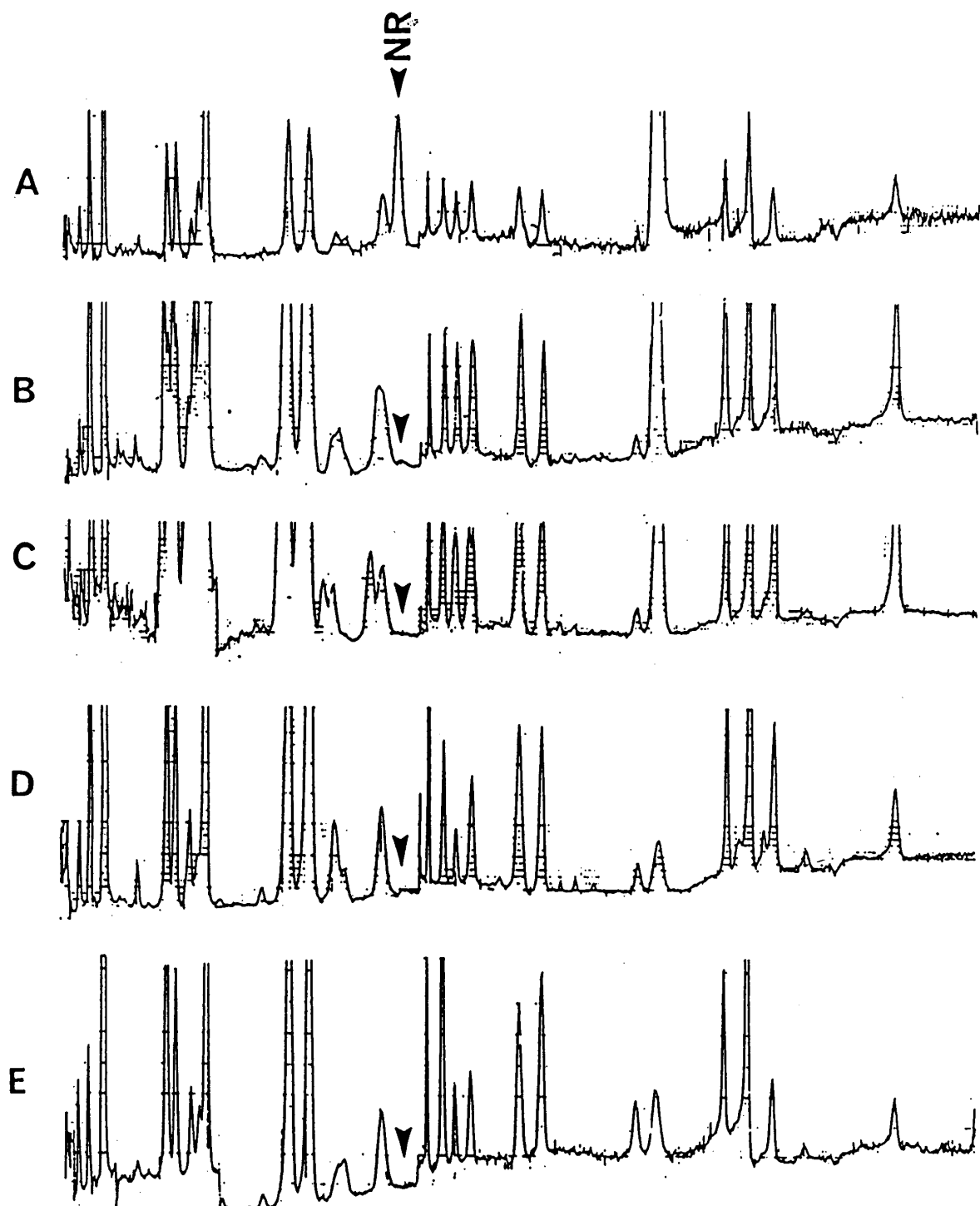
また、肝硬変であるが、血液中のアンモニア濃度が正常値 ( $34\sim133\mu\text{g}/\text{dl}$ ) を示す患者 A (肝硬変末期、 $56\mu\text{g}/\text{dl}$ ) と患者 B (肝硬変+肝癌、 $67\mu\text{g}/\text{dl}$ ) の血清からは、NR 物質は検出されなかった。

しかし、肝硬変のため高アンモニア血症 ( $174\mu\text{g}/\text{dl}$ ) となり、肝性脳症を起こした患者 C の脳症発症時の血清から、NR 物質と考えられる小さなピークが検出された。しかし、その10日後、血中アンモニア濃度が  $107\mu\text{g}/\text{dl}$  と低下して、脳症が改善された時点では、そのピークは検出されなかった。

考 察

この研究は、大腸菌 K12 株の誘導株 W4627 を用いた実験<sup>20)</sup>から始まった。すなわち、ブイヨンで対数増殖期にある菌 (L 菌: logarithmic phase of cells) は、GS (Trp) 培地で増殖するにもかかわらず、ブイヨンで一夜静置培養した菌 (S 菌: stationary phase of cells) は、GS (Trp) 培地で増殖しないという現象を観察した。そこで、それぞれの培養液について高速液体クロマトグラフィーを用いてアミノ酸を分析したところ、L 菌に比し S 菌の培養液中により多くのバリンが検出されたので、S 菌が GS (Trp) 培地に増殖出来ないのは、S 菌がバリンを菌体内に蓄積したため、そのバリンによって増殖を抑制されたためであろうという結果を得た。ところが、対照として植菌していない GS (Trp) 培地についてアミノ酸分析計で測定したところ、バリンの位置にピークが出現したので、培地成分が培地作成時に反応してニンヒドリン反応陽性物質を形成したと考え、培地成分中にその原因物質を探したところ、グルコースと第二リン酸アンモニウムとの混合溶液を作成したときにのみピークが出現することがわかった。この反応は、室温で非酵素的におこる反応であるが、メイラード反応に類似した反応であると考え、前報告<sup>23)</sup>のようにこの物質の精製を行なった。その結果、グルコースと第二リン酸アンモニウムとから、常温で非酵素的にしかも速やかに Maillard 反応が進行しアマドリ生成物が形成されることが確認され、NR 物質は、1-アミノフルクトースであると結論した。

そこで本報告では、グルコース以外の種々の糖と第二リン酸アンモニウムの組み合わせにつ



**Fig. 7.** Determination of NR compound in Sera of Patients Suffering from Hepatocirrhosis, by Amino Acid Analyzer

Arrow (▼) indicate the elution site of NR compound. Figures show the elution patterns of amino acids and ninhydrin-positive compound in sera of patients suffering from hepatocirrhosis. (A) patient No. 1 having hyperammonemia+NR compound; (B) patient No. 1 having hyperammonemia and (C) patient No. 1 after the high ammonia concentration in the serum goes down to the normal level. (D) patient No. 2 and (E) patient No. 3, both of them have normal ammonia concentration in the serum.

いて、このニンヒドリン反応陽性物質が形成されるかどうかをアミノ酸分析計で測定したところ、ほとんどの場合ニンヒドリン反応陽性物質が形成されたが、使用した糖のなかでは、グルコースが一番反応性が高かった。しかも、グルコースと保持時間の同一の糖は、フルクトースのみで、それ以外の糖の場合は、異なる物質が形成されたと考えられる。グルコースと種々のアンモニウム塩との組み合わせでは、どのアンモニウム塩を用いても、その溶出位置が同じであったので、質的には同じニンヒドリン反応陽性物質が形成されたと考えられるが、量的には第二リン酸アンモニウムを用いた場合が、他のアンモニウム塩とは比較にならないほど多量のNR物質を形成した。これは、第二リン酸アンモニウムだけがアルカリ性塩であって、その溶液のpHが、マイクロアシライザーによって中性になったり、塩酸を加えて酸性にしたりすることによって、アンモニアが遊離し、それがグルコースと反応しやすいためであろう。

一般に、アミノ基と還元糖の非酵素的結合で始まるグリケーションの反応速度は、その還元糖の炭素数や化学構造上開環して存在する割合に影響され<sup>27-28)</sup>、その反応性を低い方から順に示すと、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、アラビノース、リボースの順で、グルコース-6-リン酸のようにリン酸化した糖は、より反応性が高いと言われている。しかし、この研究によるとグルコースの反応性が最も高かった。したがって、これは、第二リン酸アンモニウムに特異的な現象であるかもしれない。

また、NR物質の生理的意味を調べるため、NR物質が大腸菌 K12 株 (W4627, W3110) の増殖におよぼす影響を検討したところ、W4627 株を用いた場合に増殖の抑制がわずかに認められたのみで、増殖に及ぼす影響はないと考えられた。マウスに対する毒性実験として腹腔内注射を行なったが、有毒作用は認められなかった。

しかし、これら二つの実験結果には、NR物質の安定性について問題が残っており、その第一は、試料中のNR物質の濃度である。Fig.1 に示したとおり、高濃度のNR物質溶液中では、pH2、4℃の条件で70日間保存しても8%しか分解されなかったが、低濃度溶液中では、61日間に60%も分解されている。このことは、シッフ塩基の不安定性を示している。第二は、NR物質の安定性に及ぼすpHの影響についてである。精製NR物質(1.34 $\mu$ moles/2ml 0.01N HCl溶液)に水酸化ナトリウムを加え、pHを7と10とに調製して、室温で30分間放置後、塩酸10 $\mu$ lを加えて、pHを2にした。これらの試料をアミノ酸分析計で測定した結果、共に回収率が98%であった。しかし、マイクロアシライザーによる脱塩の途中で試料を一晩4℃に保存し(pH7~8.5の状態)、翌日再脱塩を続けて脱塩終了後、pHを2に調製した場合のNR物質の量は、1/2~3/2に減少した。また、マウスを使った毒性実験でも、注射用試料を調製するため、NR物質に水酸化ナトリウムを加えてpHを7にして、さらに、生理的食塩水(0.8-5%食塩)で希釈すると、酸性状態で希釈した場合に比べて、NR物質は1/3に減少した。グルコースとフルクトースは、アルカリ性(pH8.5)<sup>28-29)</sup>では糖自体が分解するため、時間の経過と共にNR物質も減少した可能性が強い。

以上のことから、NR物質は、希釈することによって不安定となり、pHに対しては酸性に比



べて中性やアルカリ性の方が不安定である。そのため、培地への添加時およびマウスへの腹腔内注射時の NR 物質は、生体内で非常に速やかにグルコースとアンモニアに分解することも考えられるので、その分解量についても考慮せねばならない。

一方、健常者や肝硬変患者（血中アンモニア値—正常）の血液中には、NR 物質は認められないが、肝硬変で肝性脳症を起こし、血中アンモニア濃度が正常の 2 倍を示す患者の血清から、アミノ酸分析計で、NR 物質と考えられるピークを検出した。このピークについては、さらに解析して物質の同定を行ない、肝硬変による高アンモニア血症（肝性脳症発症時）との関係について検討したいと考えている。一般に、血中アンモニアの濃度は、重症の肝細胞障害あるいは先天性代謝異常（高チトルリン血症）による尿素サイクルの障害、ならびに肝内外における間脈—大循環系の短絡により増加する。肝細胞の広範な壊死、または重篤な肝機能障害の結果出現する症候群を肝不全（hepatic failure）と呼ぶが、そのもっとも特徴的な臨床症状は肝性昏睡（hepatic coma）で、肝不全の重症度を判定する指標となる。肝硬変（liver cirrhosis）の経過中、および末期にも肝不全の症状が出現し、この時みられる肝性昏睡では、血中アンモニア濃度<sup>30</sup>がその症状の進行とともに高くなる。肝硬変になると、肝細胞の機能異常が進行するため肝臓の尿素サイクルの活性が低下するうえ、生じた門脈—大循環系短絡を経由して、腸管で産生されたアンモニアが直接大循環系に流入する。すると、血中アンモニア濃度が上昇し、血中 NR 物質の形成をうながす可能性が考えられる。また、肝不全により尿素サイクルが機能しないときは、肝臓中のアンモニア濃度が上昇し、そのため肝臓内で多量の NR 物質が生成される可能性がある。従って、この物質が、肝疾患あるいはその合併症に何らかの形で関与している可能性もある。

正常な人間の場合でも、門脈血は、消化官から吸収されるアンモニアを集め、そのアンモニア濃度は高い。従って、門脈内で NR 物質が形成され、それが肝臓に対し何らかの作用を及ぼしている可能性もあると考える。

## 要 約

グルコースと第二リン酸アンモニウムとの混合溶液で形成されたニンヒドリン反応陽性物質を精製し、生体におよぼす生理的影響をみることを目的として実験を行った。

In vitro の実験：

1. グルコースと第二リン酸アンモニウムの混合溶液を、Micro Acilyzer を用いて脱塩した。Dowex 50W-X8 を用いて、0.01N 塩酸でグルコースを除き、3.0N 塩酸で NR 物質を溶離した。この NR 物質を Sephadex G10 で再脱塩することにより、精製 NR 物質を得た。前報告のように、この物質は、1-アミノフルクトースと考えられる。
2. グルコースと各種アンモニウム塩の組み合わせと、各種の糖と第二リン酸アンモニウムの組み合わせで、混合溶液を作成し、生成したニンヒドリン反応陽性物質をアミノ酸分析計で測定すると、使用したアンモニウム塩のうち、第二リン酸アンモニウムのみが非

菅 田 恵 子

常に高い反応性を示し、それ以外のアンモニウム塩の反応性は極めて低かった。また、使用した糖のうち、グルコースが最も反応性が高かった。NR 物質は、グルコースと第二リン酸アンモニウムとの組み合わせで最も多量形成された。

In vivo の実験：

1. 大腸菌を用いた増殖実験で、NR 物質による増殖抑制効果は認められなかった。
2. マウスを用いた毒性実験では、短期・長期実験共に NR 物質の有害な作用は確認されなかった。
3. 肝硬変で肝性脳症を起こし高アンモニア状態の患者の血清から、NR 物質と考えられる物質が検出された。

以上の結果から、NR 物質は、生体内で形成され高アンモニア血症のマーカーとなりうる可能性が示された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導を賜った金沢医科大学学生化学岡田利彦教授に深謝致します。

また、御指導と御協力頂いた金沢医科大学消化器内科学の高田昭教授に慎んで感謝の意を表わします。

引 用 文 献

1. Rahbar, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin. Chim. Acta. 22, 296-298, 1968.
2. Koenig, R. J., Blobstein, S. H. and Cerami, A.: Structure of carbohydrate of hemoglobin A<sub>1c</sub>. J. Biol. Chem., 252, 2992-2997, 1977.
3. Stevens, V. J., Vlassara, H., Abati, A. and Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. J. Biol. Chem., 252, 2998-3002, 1977.
4. Monnier, V. M. and Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation and browning of protein in vivo. Proc. 2nd Int. Symp. on Maillard Reaction. Am. Chem. Soc. Symp. Series Vol. 215 The Maillard reactions in food and nutrition. (Waller, G. R. and Feather, M. S. eds), Am. Chem. Soc. (Washington D. C.), 431-449, 1983.
5. Day, J. F., Thorpe, S. R. and Baynes, J. W.: Nonenzymatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum. J. Biol. Chem., 254, 595-597, 1979.
6. Brownlee, M., Vlassara, H. and Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. Ann. Intern. Med., 101, 527-537, 1984.
7. Brownlee, M., Pongor, S. and Cerami, A.: Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosylated collagen. Role in the in situ formation of immune complexes. J. Exp. Med., 158, 1739-1744, 1983.
8. Kato, H., Hayase, F., Shin, D. B., Oimomi, M. and Baba, S.: 3-Deoxyglucosone, an intermediate product of the Maillard reaction. Prog. Clin. Biol. Res., 304, 69-84, 1989.
9. Cerami, A.: Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. J. Am. Geriatr. Soc., 33, 626-634, 1985.
10. Vlassara, H., Valinsky, J., Brownlee, M., Cerami, C., Nishimoto, S. and Cerami, A.: Advanced

- glycosylation endproducts on erythrocyte cell surface induce receptor-mediated phagocytosis by macrophage. A model for turnover of aging cells. *J. Exp. Med.*, 166, 539-549, 1987.
11. Lee, A. T. and Cerami, A.: Elevated glucose 6-phosphate levels are associated with plasmid mutations in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8311-8314, 1987.
  12. Hayase, F., Nagaraj, R. H., Miyata, S., Njoroge, F. G. and Monnier, V. M.: Aging of proteins. Immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction in vivo. *J. Biol. Chem.*, 263, 3758-3764, 1989.
  13. Monnier, V. M. and Cerami, A.: Detection of nonenzymatic browning products in the human lens. *Biochimica et Biophysica Acta*, 760, 97-103, 1983.
  14. Witztum, J. L. and Koschinsky, T.: Metabolic and immunological consequences of glycation of low density lipoproteins. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 304, 219-234, 1989.
  15. Monnier, V. M. and Cerami, A.: Non-enzymatic glycosylation and browning of proteins in diabetes. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 11, 431-452, 1982.
  16. Baynes, J. W., Watkins, N. G., et al: The Amadori product on protein. The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition, 43-67, Alan R Liss, New York, 1989.
  17. Miyata, S., Monnier, V. M.: Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J. Clin. Invest.*, 89, 1102, 1992.
  18. Monnier, V. M., Sell, D. R., et al: Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes*, 41, 36, 1992.
  19. Vlassara, H., Brownlee, M., Monogue, K. R., Dinarello, C. A. and Pasagian, A.: Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins. role in normal tissue remodeling. *Science*, 240, 1546-1548, 1988.
  20. Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. and Cerami, A.: Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*, 232, 1629-1632, 1986.
  21. Dunn, J. A., Patrick, J. S., Thorpe, S. R. and Baynes, J. W.: Oxidation of glycated proteins. Age-dependent accumulation of Nε-(carboxymethyl) lysine in lens proteins. *Biochemistry*, 28, 9464-9468, 1989.
  22. Oimomi, M., Hata, F., Igaki, N., Nakamichi, T., Baba, S. and Kato, H.: Purification of α-ketoaldehyde dehydrogenase from the human liver and its possible significance in the control of glycation. *Experientia*, 45, 463-466, 1989.
  23. 菅田恵子: グルコースとアンモニアとの室温における非酵素的反応—その反応機構—. 北陸学院短期大学紀要, 26, 143-165, 1994.
  24. Umbarger, H. E. and Brown, B.: Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VI. Antagonism between isoleucine and valine. *J. Bacteriol.* 70, 241-248, 1955.
  25. 岡田利彦, 菅田恵子, 足達綱三郎, 山口真潮, 吉田清三, 井上雅雄, 松野哲男: 大腸菌 K12 株の増殖因子に関する研究—L-グルタミン酸ナトリウム標品中に見出された抑制因子の分離・同定—. *J. Kanazawa Med. Univ.* 1 (1), 33-43, 1976.
  26. Okada, T., Sugata, K., Tanihara, K. and Jisaki, F.: *Escherichia coli* K12 strain W4627 growth overnight in nutrient broth releases more valine than cells growing logarithmically, after nutritional shift-down. *J. Kanazawa Med. Univ.*, 15, 180-189, 1990.
  27. Overend, W. G., Peacocke, A. R. and Smith, J. B.: Reductions at position 1 of carbohydrates Part I. The polarographic reduction of carbohydrates. *J. Chem. Soc.* 3487-3497, 1961.
  28. 川岸舜朗, 奥村烝司, 並木満夫: アミノカルボニル反応におよぼす放射線照射の影響. *農化*, 46, 459-465, 1972.

菅 田 恵 子

29. 土田広信, 河本正彦, 加藤博通, 藤巻正生: アルカリ性および弱酸性条件下グルコース, アンモニア反応によって生成する Pyrazine 誘導体の異同について. 農化, 50, 187-189, 1976.
30. Bunn, H. F. and Higgins, P. J.: Reaction of monosaccharides with proteins. Possible evolutionary significance. Science, 213, 222-224, 1981.