



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖尿病性腎症と尿中低分子AGE(終末糖化産物, Advanced Glycation Endproduct)との関連について
Author(s)	三好, 秀明
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第5059号
Issue Date	2000-03-24
DOI	https://doi.org/10.11501/3168623
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51640
Type	doctoral thesis
File Information	000000353816.pdf



学 位 論 文

糖尿病性腎症と尿中低分子 AGE (終末糖化産物, Advanced Glycation Endproduct)との関連について

北 海 道 大 学

三 好 秀 明

学 位 論 文

糖尿病性腎症と尿中低分子 AGE (終末糖化産物, Advanced Glycation Endproduct)との関連について

北 海 道 大 学

三 好 秀 明

Glucose react non-enzymatically with amino groups of proteins to produce a diverse groups of protein-bound moieties with cross-linking properties called advanced glycation end-products (AGEs). A large number of studies suggest that tissue and circulating AGEs, especially those bound to small peptides, play an important role in the pathogenesis and development of diabetic complications. The aim of present study was to evaluate AGE-peptide levels in the urine in various stage of diabetic nephropathy and to analyze the structures of AGEs generated in vivo.

Urine samples were obtained from 100 type 2 diabetic patients with various stage of nephropathy, 39 non-diabetic patients with renal dysfunction, and 20 control subjects without diabetes or renal disease. Low molecular weight peptides (<10 kDa) were isolated from each samples and were used. Using size-exclusion HPLC monitored by AGE-specific fluorescence, three main fluorescence peaks were detected at molecular weights of 6,000 Da, 2,500 Da, and 300 Da. The fluorescence intensity of total and 6,000 Da peak increased together with the development of renal dysfunction in diabetic patients and strongly correlated with serum creatinine. There was no difference in total urinary AGE between diabetic and non-diabetic hemodialysis patients, suggesting that insufficient clearance during dialysis is more important than AGE production. A competitive ELISA using a polyclonal anti-AGE antibody, anion-exchange HPLC, and reversed-phase HPLC were performed on the peaks appearing in size-exclusive HPLC to further characterize the AGE composition. The 300 Da product was specific to diabetic patients with chronic renal failure and hemodialysis patients and may be a good marker to distinguish diabetic from non-diabetic renal failures. We also speculated that because of its low molecular weight, the 300 Da product might represent the final degradation product of AGE-peptides in the kidney.

key words; Diabetes, Complication, AGE

緒言

1993年、米国で行われた DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) の報告より、厳格な血糖コントロールが糖尿病慢性合併症の発症や進展を遅らせることは明らかになった¹⁾。しかし、現実には完全な血糖の正常化は現在の治療技術では必ずしも容易ではなく、厳格な血糖のコントロールでも合併症は完全には予防、阻止は出来ない。このことから、糖尿病慢性合併症の発症や進展の科学的メカニズムを解明することは重要である。現在、それらの原因として最も有力な説のうちの一つに、蛋白糖化反応を基とした advanced glycation end-products (AGE) 説がある^{2,3)}。

AGE は還元糖とアミノ酸の非酵素的蛋白糖化反応 (グリケーション) における最終産物で、生体内の比較的半減期の長いコラーゲンなどの蛋白の分子間、または分子内で架橋を形成することによって、また様々なサイトカインや成長因子の産生を介して、組織の障害を起こすといわれている⁴⁾。しかし、AGE 形成の詳細については未だ明らかではなく、生体内の主要 AGE 構造についても明らかにはされていない。これまで様々な AGE 候補物質が報告されているが、それら候補物質は *in vitro* で作製されたものがほとんどで、生体に存在する全 AGE の数%にすぎないと言われている。

生体内の AGE 量は、その産生と除去能力に依っており、産生のスピードは高血糖状態に規定され、除去能力はマクロファージの働きと腎機能に規定されていると考えられる^{5,6)}。流血中には、組織に蓄積した AGE がマクロファージや蛋白分解酵素により貪食、分解されてできた比較的小分子量の AGE (AGE-peptide) と、血清蛋白に蓄積している比較的大分子量の AGE (AGE-protein) の2種類の AGE が存在すると考えられており、特に血中 AGE-peptide の量は、健常者に比較し糖尿病患者群で有意な増加、また糖尿病性腎不全のため透析を行っている群では正常者に比べ約5倍の増加を認めたとされている⁷⁾。更に AGE-peptide は AGE-protein と比較し、それらの持つ AGE 活性、毒性が強いとされている⁸⁾。

本研究は AGE の持つ特性の一つとしての特異的蛍光波長 (Excitation 370nm/Emission 440nm) を利用して⁹⁾、尿中から AGE-peptide を分離精製し、更に糖尿病性腎症の進行と尿中 AGE-peptide についての関係を明解にするこ

とを目的とした。

対象と方法

1. 対象

北海道大学医学部附属病院第二内科, 札幌社会保険総合病院, 札幌萬田内科病院糖尿病センターに定期通院している, 2型糖尿病患者 100 人, 非糖尿病性の腎障害患者 39 人, また正常コントロールとして 20 人, 計 159 人についての来院時随時尿を対象とした。糖尿病患者 100 人は, 厚生省糖尿病調査研究班より提唱されている, 糖尿病性腎症病期分類に従い 5 群に分類した (N: 腎症前期群, Mi: 早期腎症期群, Ma: 顕性腎症期群, C: 腎不全期群, HD: 透析療法期群)。非糖尿病性の腎障害患者 39 人は, 透析療法導入の有無により 2 群に分類した (n-C: 非透析療法群, n-HD: 透析療法群)。各群別の臨床背景を Table 1 に示した。血清クレアチニンは Jaffe 法, HbA_{1c} は HPLC 法にて測定した。尿検体は全て 4 °C 保存後, 採取当日に Centriprep 10 (Amicon, Denvers, MA, USA) を用い, 遠心操作 (3,000 rpm, 45 min) にて分子量 1 万以上の分画と, 分子量 1 万以下の分画に分離を行い, -40 °C に保存した^{7,8,10)}。

2. high-performance liquid chromatography (以下 HPLC)

HPLC システムは脱気装置 (DG-300, Eicom, Kyoto, Japan), グラジエントミキサー (EG-300, Eicom, Kyoto, Japan), システムコントローラー (EP-300, Eicom, Kyoto, Japan), 蛍光検出器 (FLD-350, Eicom, Kyoto, Japan), フラクションコレクター (FC203B, Gilson, Middleton, WI, USA) を用いた。

Size-Exclusion HPLC (以下分子篩 HPLC) : カラムは親水性シリカゲルの Toso TSK-GEL G2000SWXL (7.8 × 300 mm), 展開液には 10mM カリウムリン酸バッファー (pH 7.4) を用いた。システムの流速は 0.5 ml/min で行った。各使用前に, カラムの洗浄とシステム内圧安定化を目的に, 30 分間の空流しを行った。-40 °C で保存していた分子量 1 万以下の低分子量の尿検体を解凍後, Millipore フィルター (0.45 μm, Bedford, MA, USA) にて不純粒子を取り除き, 50 μl を HPLC のサンプルループに添加した。60 分間の溶出液について, AGE 特異的な蛍光波長である Excitation 370nm/Emission 440nm を用いて, 尿中 AGE の検出を行った。³⁾ 溶出液の蛍光の結果を PowerChrom (MacLab, Castle

Hill, Australia)を通してパーソナルコンピュータで記録し、蛍光強度を解析した(Figure 1). 全 159 検体について同様の操作を繰り返した. また, 各検体尿中のクレアチニン濃度を測定し, クレアチニン濃度で蛍光強度を除し補正した値を, 比較検討に用いた. また, 分子量マーカーとしてインスリン (6,000), ビタミン B₁₂ (1,350), リボフラビン (379)の 3 種 を用いた.

糖尿病性腎症 C 群, HD 群, 非糖尿病性腎症 n-HD 群の各群から標準的なパターンを呈した検体それぞれ 1 検体を選択し, 上記の同操作を 30 回繰り返した. フラクションコレクターを利用して, 検出された蛍光ピーク毎に溶出物を回収し, それらを凍結乾燥機 (Freeze Dryer FDU-830, EYELA) にて乾燥, バッファーにて約 30 倍に濃縮溶解し, 以下の Anion-Exchange HPLC に供した (Figure 6A).

Anion-Exchange HPLC (以下イオン交換 HPLC) : カラムは弱陰イオン交換体の DEAE-5PW (Toso, Tokyo, Japan, 7.5×75mm), 展開液には 10mM カリウム燐酸バッファー (pH 7.4), 溶出液には 0.2M NaCl を用いた. 各使用前に 30 分間の空流しを行いシステムを安定させた後, Size-Exclusion HPLC で得た各ピークごとの濃縮検体について, Millipore フィルターにて濾過後, 100 μ l を HPLC のサンプルループに添加した. システムの流速は 1.0 ml/min で行い, グラジエントのスケジュールを Figure 6 に示すよう実施した. 120 分間の溶出液について, 同様に AGE 特異的な蛍光波長を利用してクロマトグラムを作製した (Figure 6B).

前記 3 群の各検体についてそれぞれ上記の操作を 10 回繰り返した後, フラクションコレクターにて, 検出された各蛍光ピーク毎に溶出物を回収し, それらを凍結乾燥機にて乾燥, 同バッファーにて約 60 倍に濃縮溶解し, 以下の Reversed-Phase HPLC に供した.

Reversed-Phase HPLC (以下逆相 HPLC) : カラムは Capcell-Pak C18 (Shiseido, Tokyo, Japan, 4.6×250mm), 展開液には 0.1%のトリフルオロ酢酸 (TFA) /脱イオン水, 0.1% の TFA /アセトニトリルを使用した. 各使用前に同様に 30 分間の空流しを行い, Anion-Exchange HPLC で得たピークの濃縮検体について, Millipore フィルターにて不純粒子を取り除いた後, 100 μ l を HPLC のサンプルループに添加した. システムの流速は 1.0 ml/min で行い, グラジエ

ントのスケジュールを Figure 6 に示すように実施した. 90 分間の溶出液について, 同様に AGE 特異的な蛍光波長を利用してクロマトグラムを作製した (Figure 6C).

Competitive AGE-ELISA : Size-Exclusion HPLC を行った際の各ピークの溶出液を, 純度を上げるために更に 2 度, 同 HPLC を行い検体として使用した. 検体は triplicate とし, 96 穴プレート (Costar, Cambridge, MA, USA) に AGE-bovine serum albumin (BSA) を固層化し, ブロッキングバッファー (Pierce, Rockford, IL, USA) でブロッキングを行い, Carboxy-methyl-lysine (CML) 以外の AGE を特異的に認識する, ポリクローナル抗 AGE 抗体を一次抗体¹¹⁾, アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体とした (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). 基質を加え発色後, マイクロプレートリーダーで 405nm の吸光度を測定し, その結果を元に AGE-BSA について標準曲線を作製し, 1 $\mu\text{g/ml}$ の AGE-BSA に相当する吸光度と同等の吸光度を 1 AGE 単位 (U) として表した. コントロールとして, Size-Exclusion HPLC の際のピークの認めなかった時間帯での溶出液を使用した²⁰⁾.

3. 統計処理

統計的評価は Stat View-J 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を使用して行い, 結果は全て平均値 \pm 標準誤差で表記した. 各群間のデータの比較は, 対応のない t 検定により行い, $p < 0.05$ をもって有意差とした.

結 果

1. 分子篩 HPLC

Figure 1. に糖尿病性腎不全期患者 (C; 実線), 糖尿病腎症前期患者 (N; 破線) での, 典型的な Size-Exclusion HPLC の蛍光クロマトグラムを示す. 両群とも時間 19 分, 22 分に 2 つの大きなピークといくつかの小さなピークを認め, 大きなピークについて, それぞれピーク 1, ピーク 2 とした. ピーク 1 は分子量 約 6,000 Da, ピーク 2 は分子量 約 2,500 Da であった. C 群にはさらに N 群には認められない大きなピークを時間 38 分に認め (ピーク 3), 分子量は約 300 Da であった. データは示していないが, 糖尿病透析療法期群 (HD), 非糖尿病透析療法期群 (n-HD) の 2 群は糖尿病性腎不全期群 (C) と類似した蛍光クロマト

グラムを示し、ピーク 3 が検出された。その他の糖尿病の早期腎症期群 (Mi)、顕性蛋白尿期群 (Ma)、非糖尿病性の腎不全期群 (n-C)、正常コントロール群にはピーク 3 は認められず、N 群と類似した蛍光クロマトグラムとなった。

各群の総 AGE-peptide 量は、クロマトグラムで検出された全てのピークの蛍光強度の総和を尿中クレアチニンで補正した値をもって表した。C 群, HD 群, n-HD 群の 3 群 (それぞれ, 25.53 ± 2.90 , 42.63 ± 4.84 , 39.65 ± 9.51 AU/gCr) は、他の正常コントロール群, N 群, Mi 群, Ma 群, n-C 群 (それぞれ, 16.01 ± 1.61 , 15.93 ± 1.63 , 16.08 ± 1.14 , 15.75 ± 1.30 , 15.90 ± 1.17 AU/gCr) に対して、有意な増加を認めた (Figure 2A)。ピーク 1 (分子量 6,000 Da の尿中 AGE 物質) についても同様に、C 群, HD 群, n-HD 群の 3 群 (それぞれ, 2.40 ± 0.26 , 6.72 ± 1.34 , 9.46 ± 3.18) は、他の正常コントロール群, N 群, Mi 群, Ma 群, n-C 群 (それぞれ, 0.81 ± 0.11 , 1.03 ± 0.16 , 0.49 ± 0.10 , 1.08 ± 0.19) に対して、有意な増加を認めた (Figure 3A)。ピーク 2 (分子量 2,500 Da の尿中 AGE 物質) については、全ての群に有意差は認めなかった (Figure 4A)。ピーク 3 (分子量 300 Da の尿中 AGE 物質) は、C 群, HD 群, n-HD 群の 3 群ではほぼ特異的に認められ、他群には殆ど認められず、n-C 群で血清クレアチニンの上昇している患者尿にも認めなかった (Figure 5A)。

次に、N 群, Mi 群, Ma 群, C 群において、血清クレアチニンなど各種パラメーターに対する、各ピークとトータルの AGE-peptide 量の相関を検討した。トータル、ピーク 1、ピーク 3 は、患者血清クレアチニンと有意な相関を認めた (それぞれ, $r=0.236$ $p=0.0057$, $r=0.532$ $p<0.0001$, $r=0.324$ $p<0.0001$) (Figure 2B, 3B, 5B)。ピーク 2 との間には相関を認めなかった ($p=0.1581$) (Figure 4B)。データには示されていないが、年齢、性別、糖尿病罹病期間、空腹時血糖値、ヘモグロビン A_{1c}、総コレステロール、中性脂肪、肝機能など、他のパラメーターとのいずれの間にも有意な相関は認めなかった。同様に透析群 (HD) および非糖尿病性腎症患者 (n-C, n-HD) についても相関を検討したが、血清クレアチニンをはじめ全てのパラメーターとの間に有意な相関は認めなかった。

2. イオン交換 HPLC

Figure 6A は、C, HD, n-HD, 3 群におけるクロマトグラムである。前述のピーク 2 と 3 の溶出液を、イオン交換 HPLC に流した結果を Figure 6B の破線と実

線で示す。ピーク 2 の溶出液は、時間 5 分、50 分に大きなピークを認めた (破線)。ピーク 3 の溶出液は、時間 85 分に非常に大きなピークと、時間 5 分、50 分に小さなピークを認めた (実線)。上記各患者群から計 3 人の検体について施行したが、結果はいずれも同様であった。

3. 逆相 HPLC

Figure 6C は、更に Figure 6B の時間 50 分、85 分の各ピークの溶出液について、reversed-phase HPLC を行った際の、蛍光クロマトグラムである。時間 85 分のピークの溶出液は、時間 38 分に単一のピークしか認めなかった (実線)。時間 50 分のピークの溶出液は、時間 85 分のピークとは異なる時間帯にピークを認めた (破線)。上記各患者群から計 3 人の検体について施行したが、結果はいずれも同様であった。

4. Competitive AGE-ELISA

CML を認識しないポリクローナル抗 AGE 抗体を用いた競合 ELISA にても、ピーク 1 とピーク 2 の溶出液中に、AGE の存在が確認された。その AGE 量はそれぞれ、 9.81 ± 0.10 、 8.80 ± 0.36 AGEunits/ml であった。ピーク 3 の溶出液中には、コントロールと同様に殆ど検出されなかった (Figure 7)。

考 察

低分子量 AGE(AGE-peptide)は、生体内で AGE 化蛋白のマクロファージの貪食、もしくは蛋白分解酵素の働きで発生すると考えられており、比較的大きな分子量の AGE よりも、生理学的な活性が強いと考えられている¹²⁾。すでに AGE レセプターの存在がマクロファージ細胞膜表面上などに確認されており^{6,7)}、さらに、マクロファージスカベンジャーレセプター(MSR)も、AGE を認識すると報告されている⁸⁾。糖尿病性腎不全患者と正常腎機能患者の血清中 AGE-peptide について比較した成績では、とくに腎不全になると著明に高値になると報告されている^{7,13-15)}。Gugliucci らは、腎機能障害の進行に伴い AGE-peptide が血中に著明に増加する事実より、腎臓における AGE-peptide と AGE-protein の動態を電子顕微鏡にて明らかにした。この成績では、AGE-protein は、糸球体基底膜を通過せず尿中には検出されないが、AGE-peptide は、ほとんどが糸球体基底膜を通過し、近位尿細管で再吸収され、近位尿細管上皮

細胞のライソゾーム内に貯留するとされている¹⁰⁾。すなわち AGE-peptide の処理機構としては近位尿細管の介入が示唆され、ライソゾームに取り込まれた過剰の AGE-peptide は、近位尿細管障害の原因と考えられている。現在の透析療法では、最も除去効率の良い透析膜でも、AGE-peptide の除去は不十分であることも報告されている¹³⁾。

本研究において、糖尿病性腎症保存期腎不全患者群(C 群)の尿中 AGE-peptide の量は、他の群と比較し 2~3 倍に増加していた。C 群で増加を認め、非糖尿病性腎障害患者(n-C 群)で増加を認めなかった結果については、それぞれの群での AGE 産生量の差違が原因であると考えられた。また、糖尿病からの透析療法期患者群(HD 群)、非糖尿病からの透析療法期患者群(n-HD 群)でも同様に増加を認めたことは、これまでの血中 AGE-peptide 量に関する多くの報告と一致したものであった^{7, 13-15)}。糸球体からの排泄低下により高値となった血中 AGE、特に AGE-peptide の反映に加え、近位尿細管の再吸収障害などが、尿中 AGE-peptide 増加の原因になっているものと推測されるが、明確な解答は現在のところ不明である。しかし、腎機能廃絶による AGE 排泄能への影響が重要であろうことを示唆している一つの結果と考えられる。

一般的に糖尿病患者で腎障害を認めた際、その病因が高血糖のみによるものか、合併した高血圧によるものか、または他の腎臓病が合併したものなのかは、臨床データなどからある程度予想は出来ても、最終的な結論は腎生検を行わなければ判定は出来ない。しかし、腎生検は侵襲的な検査であり、重篤な合併症もあるため、必ずしもこの検査の実施は容易ではない。本研究で報告したピーク 3 は、糖尿病と非糖尿病の腎不全期群患者(C, n-C)を比較して見た際、糖尿病(C)では認めるが、非糖尿病(n-C)では殆ど認められなかった。すなわち、糖尿病患者に見られる腎機能障害に対する病因を明らかにする目的に、ピーク 3 は有効な臨床マーカーと成りうると思われる。

分子篩 HPLC で得られた 3 つのピークについて、それぞれイオン交換 HPLC を行い、ピーク 1 とピーク 2 はいくつかの peptide の混合であることがわかり、ピーク 3 はその後に追加した逆相 HPLC の結果からも単一の peptide で構成されていると考えられた。また、分子量が 300 Da と非常に小さいことから、AGE-peptide の生体内における分解産物、もしくは未だ主要構造の確定していない

AGE 物質そのものである可能性が示唆された。

ポリクローナル AGE 抗体を使用した競合 ELISA の結果からも、ピーク 1 とピーク 2 には AGE-peptide が含まれていることが証明されたが、ピーク 3 が既知の AGE 構造を含んでいるということは証明できなかった。しかし、検体に使用したピーク 3 溶出液中の AGE 物質の量が少なすぎた可能性などもあり、今回の ELISA の結果だけで、完全にピーク 3 の物質が AGE でないとは確定できない。

AGE 量を測定することは糖尿病合併症の治療のマーカーとしても、合併症出現のリスクのマーカーとしても有用である^{16,17)}。これまでの報告では使用する AGE 抗体によって、AGE 量の結果は異なっており^{11,18-21)}、多くの種類の AGE 抗体の分類と標準的な免疫学的測定法の確立が望まれている。さらに、AGE 抗体の epitope となる AGE の構造自体が不明であり、また、それが heterogeneous なものであることが報告されている。AGE 特異的蛍光測定法は最も代表的な測定法で、血中の低分子量の AGE について、ELISA 法と蛍光測定法を同時に比較検討した最近の報告では、強い相関が示されている¹⁵⁾。HPLC と蛍光モニターを組み合わせた本測定法は、簡便で更にピークごとの評価も可能である。生体内 AGE の臨床的意義を解明する最も有力な測定法として、応用できると考えられる。

結 語

尿中低分子 AGE が、糖尿病性腎不全患者と、非糖尿病透析患者で著しく増加することを明らかにした。分子篩 HPLC を応用し、腎不全患者に特異的なピークの存在を確認した。特に分子量 300 Da のピークは、生体内 AGE の最終分解産物である可能性が示唆された。また、このピークは非糖尿病性の保存期腎不全患者には認められないことから、糖尿病患者の腎機能障害における高血糖の因果を検索する上で、有用な検査と成りうる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の場を与えて下さり、ご指導とご高閲を賜りました北海道大学医学部内科第二講座 小池隆夫教授に深謝いたします。また、

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻頂きました北海道大学医学部内科学第二講座 牧田善二講師、市立小樽病院内科 柳沢克之先生に感謝いたします。また、検体採集に快く協力頂きました萬田内科病院 松橋尚生先生、社会保険総合病院内科 佐々木直美先生、抗体を提供いただきました北陸大学生化学教室 竹内正義先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1 McCarren M (1993): Intensive therapy reduces the risk of diabetes eye, kidney, and nerve disease. *Diabetes Forecast* 46: 46-51
- 2 Brownlee M, Vlassara H, Cerami A (1984): Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 101: 527-537
- 3 Monnier VM, Vishwanath V, Frank KF (1986): Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Eng J Med* 314: 403-408
- 4 Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A (1988): Cachetin/TNF α and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 240: 1546-1548
- 5 Vlassara H, Brownlee M, Cerami A (1985): High affinity receptor mediated uptake and degradation of glucose modified proteins: a potential mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5588-5592
- 6 Higashi T, Sano H, Horiuchi S (1997): The receptor for advanced glycation end products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes* 46: 463-472
- 7 Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H (1991): Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Eng J Med* 325: 836-841
- 8 Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H (1994): Modification of low density lipoprotein by advanced glycation endproducts contributes to the dislipidemia of diabetes and renal

- insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9441-9445
- 9 Andreassen TT, Oxlund H, Danielsen CC (1988): The influence of non-enzymatic glycosylation and formation of fluorescent reaction products on the mechanical properties of rat tail tendons. *Connect Tissue Res* 17:1-9
 - 10 Gugliucci A, Bendayan M: Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE) (1996): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* 39: 149-160
 - 11 Takeuchi M, Makita Z, Yanagisawa K, Kameda Y, Koike T (1999): Detection of non-carboxymethyllysine and carboxymethyllysine advanced glycation end-products. *Mol Med* 5:393-405
 - 12 Vlassara H (1996): Protein glycation in the kidney: Role in diabetes and aging. *Kidney Int* 49: 1795-1804
 - 13 Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, Barth RH, Winston JA, Fuh H, Manogue KR (1994): Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet* 343: 1519-1522
 - 14 Papanastasiou P, Grass L, Rodela H, Patrikarea A, Oreopoulos D, Diamandis EP (1994): Immunological quantification of advanced glycosylation end-products in the serum of patients on hemodialysis or CAPD. *Kidney Int* 46: 216-222
 - 15 Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fusegawa T, Kuwajima S, Takeuchi M, Koike T (1998): Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism* 47: 1348-1353
 - 16 Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, Cerami A, Bucala R (1992): Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycation. *Science*; 258: 651-653
 - 17 Soulis-Liparota T, Cooper ME, Jerums G (1995): The relative roles of advances glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the

development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia* 38: 387-394

18 Horiuchi S, Araki N, Morino Y (1991): Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 266: 7329-7332

19 Nakayama H, Taneda S, Mitsuhashi T, Kuwajima S, Aoki S, Kuroda Y, Misawa K, Yanagisawa K, Nakagawa S (1991): Characterization of antibodies to advanced glycosylation end products on protein. *J Immunol Methods* 140:119-25

20 Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R (1992): Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 267:5133-8

21 Munch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, Niwa T, Lemke HD, Schinzel R (1997): Determination of AGE in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Biochem* 35:669-677

Legends

Table 1. Characteristics of the subjects

N, normoalbuminuria; Mi, microalbuminuria; Ma, macroalbuminuria; C, chronic renal failure; HD, hemodialysis. Data are the mean \pm SE.

Figure 1. Elution profiles of AGE-peptides in urine by size-exclusion HPLC. The typical elution profile of diabetes with chronic renal failure and requiring hemodialysis is indicated by an unbroken line, while that of diabetes with normal renal function (N, Mi, and Ma) is shown by a broken line. There were three major peaks and some small peaks between Peaks 2 and 3. Peak 3 was only seen in the former two groups. Among non-diabetic groups, normal subjects and the n-C group were similar to the latter profile, while the n-HD group was similar to the former one. Peak 1 = 6,000 Da; Peak 2 = 2,500 Da; Peak 3 = 300 Da.

Figure 2-A. Total fluorescence intensity of small molecules in urine from various groups. Data are expressed as arbitrary units per g creatinine and represent the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ vs. all other groups except for C, HD, and n-HD.

Figure 2-B. Total fluorescence intensity was correlated with the serum creatinine level in diabetic patients ($r = 0.236$, $p = 0.0057$).

Figure 3-A. The fluorescence intensity of Peak 1 from various groups. Data are expressed as arbitrary units per g creatinine and represent the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ vs. all other groups except for C, HD, and n-HD.

Figure 3-B. The fluorescence intensity was correlated with the serum creatinine level in diabetic patients ($r = 0.532$, $p < 0.0001$).

Figure 4-A. The fluorescence intensity of Peak 2 from various groups. Data

are expressed as arbitrary units per g creatinine and represent the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ vs. all other groups except for C, HD, and n-HD.

Figure 4-B. The fluorescence intensity was not clearly correlated with the serum creatinine level in diabetic patients ($p = 0.1581$).

Figure 5-A. The fluorescence intensity of Peak 3 from various groups. Data are expressed as arbitrary units/g creatinine and represent the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ vs. all other groups except for C, HD, and n-HD. Peak 3 was almost specific to the C, HD, and n-HD groups.

Figure 5-B. The fluorescence intensity was correlated with the serum creatinine level in diabetic patients (\circ) ($r = 0.324$, $p < 0.0001$).

Figure 6-A. Elution profile of diabetes with chronic renal failure by size-exclusion HPLC.

Figure 6-B. Elution profiles of the eluates of Peak 2 (broken line) and Peak 3 (unbroken line) by anion-exchanged HPLC. The peak at a retention time of 85 min (RT 85) was only seen in the eluate of Peak 3.

Figure 6-C. Elution profiles of the eluates of RT 50 (broken line) and RT 85 (unbroken line) by reversed-phase HPLC.

Figure 7. Detection of AGE-peptides in the peaks from size-exclusion HPLC by a competitive AGE ELISA. Phosphate buffer was used as the control. One AGE unit was defined as the value for $1\mu\text{g}$ of AGE-BSA. Bars indicate the standard deviation.

Table 1.

	Control subjects			Diabetic patients					Non-diabetic patients	
	N	Mi	Ma	C	HD	n-C	n-HD			
Number (male : female)	20 (11:9)	20 (12:8)	20 (8:12)	20 (10:10)	20 (10:10)	15 (8:7)	28 (17:11)	11 (5:6)		
Age (years)	42.5±3.6	51.7±2.9	57.6±3.3	54.3±2.9	60.4±2.2	60.8±2.8	49.8±2.6	53.3±4.9		
Duration of diabetes (years)	-	12.8±1.6	13.8±2.1	13.6±1.3	16.6±1.7	15.5±2.2	-	-		
HbA1c (%)	-	8.6±0.3	7.8±0.3	9.1±0.5	7.5±0.4	6.6±0.3	-	-		
FBPG (mg/dl)	-	161.2±8.4	155.4±9.6	195.5±19.2	138.5±10.4	118.0±8.5	95.3±2.6	105.1±6.8		
Cr (mg/dl)	-	0.63±0.04	0.64±0.03	0.80±0.07	3.32±0.40	7.81±0.82	2.47±0.38	8.41±1.33		
T-Chol (mg/dl)	-	196.7±9	189±8	227±9	231±14	168±11	218±14	178±14		
T-G (mg/dl)	-	144±24	103±14	183±32	187±19	139±15	158±14	132±17		

Fig. 1.

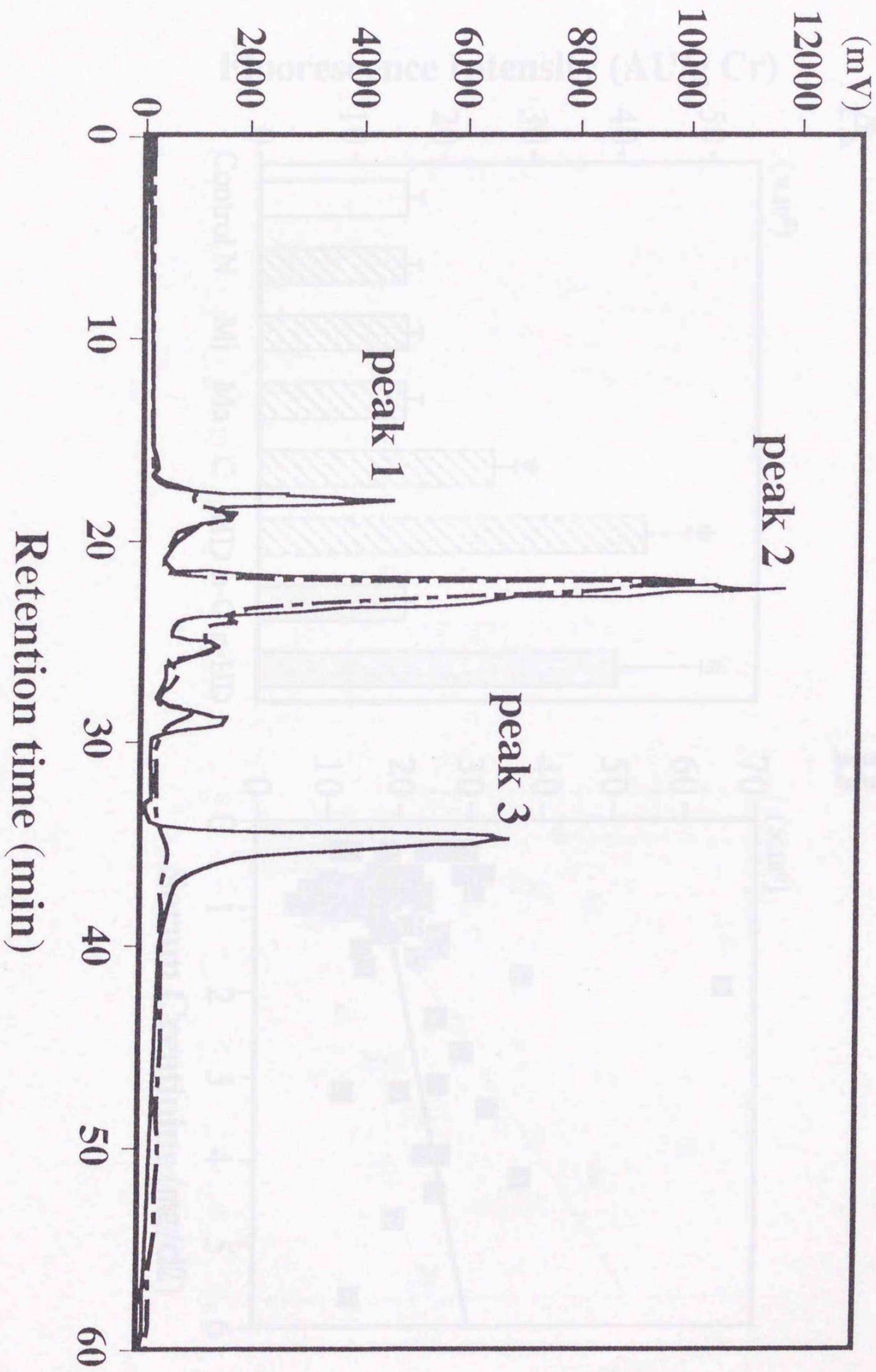


Fig. 2.

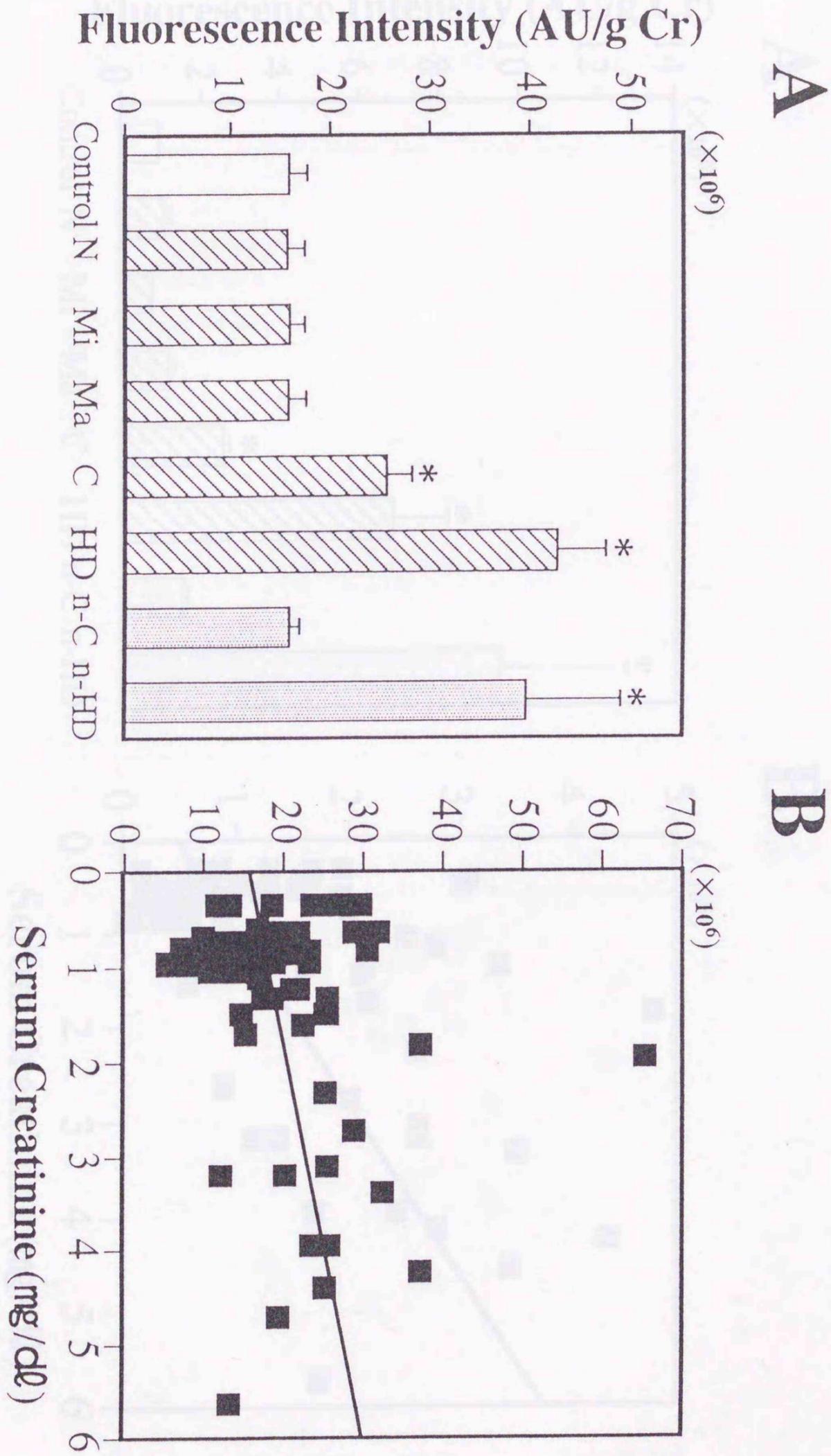


Fig. 3.

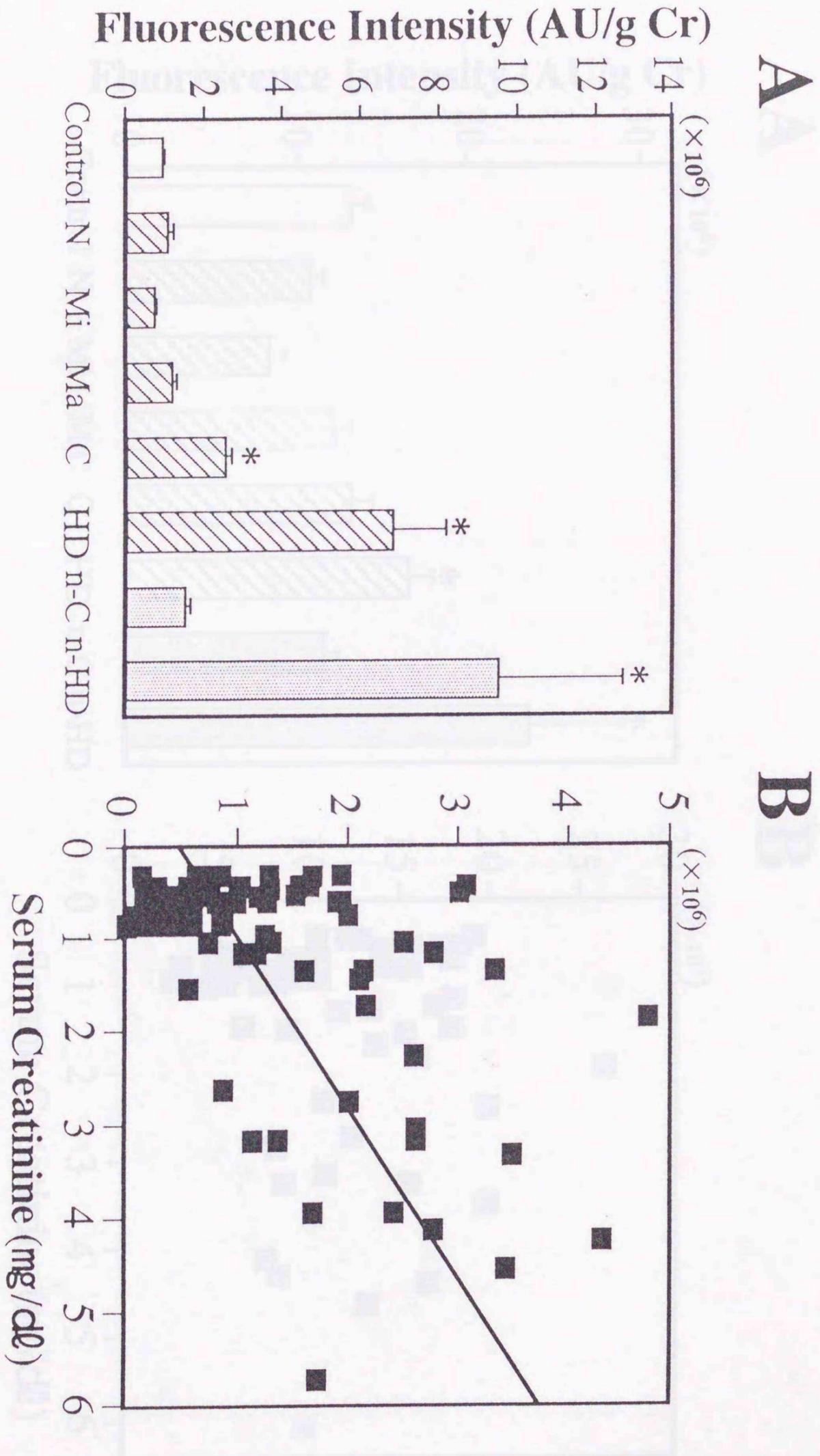


Fig. 4.

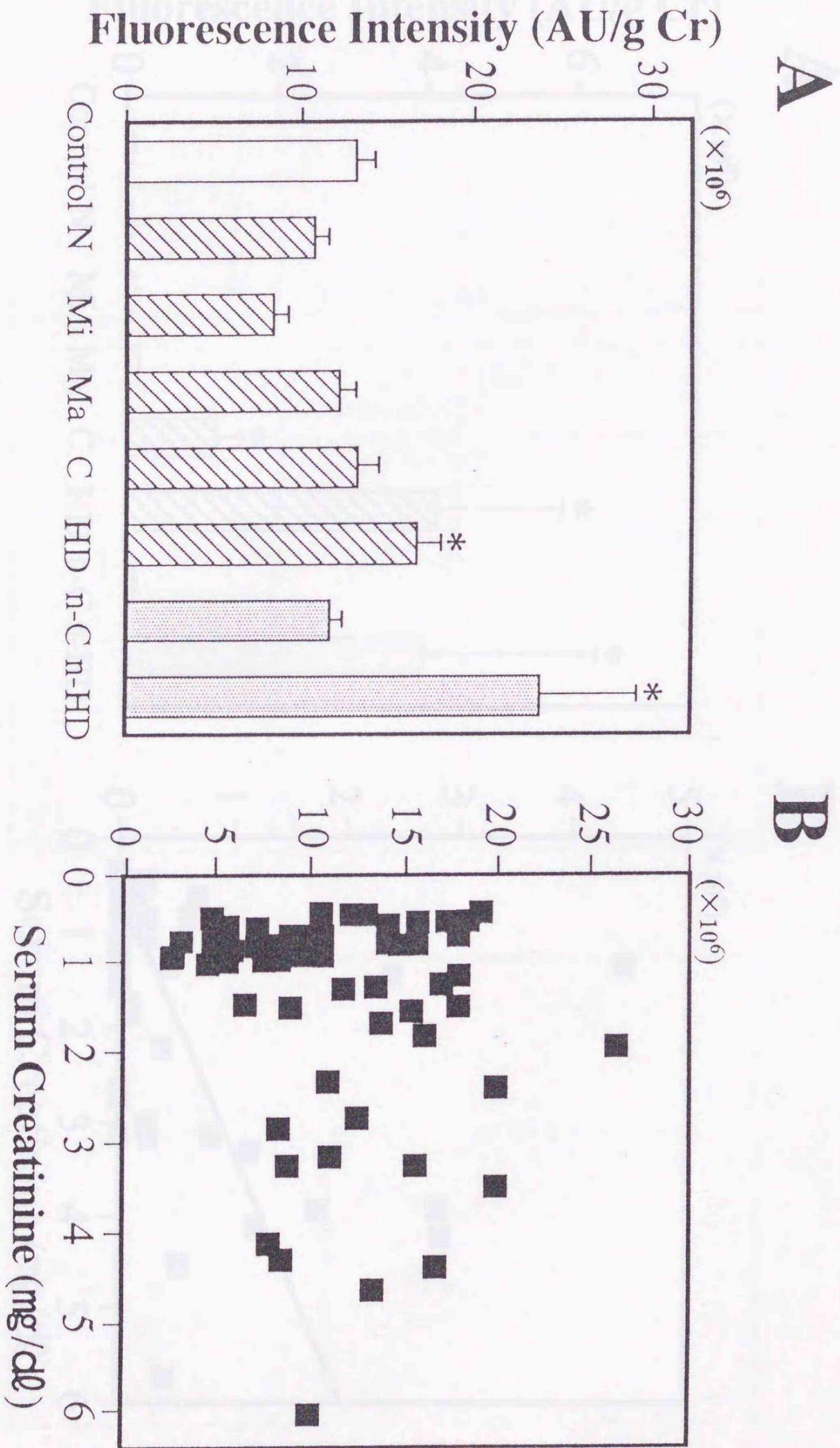


Fig. 5.

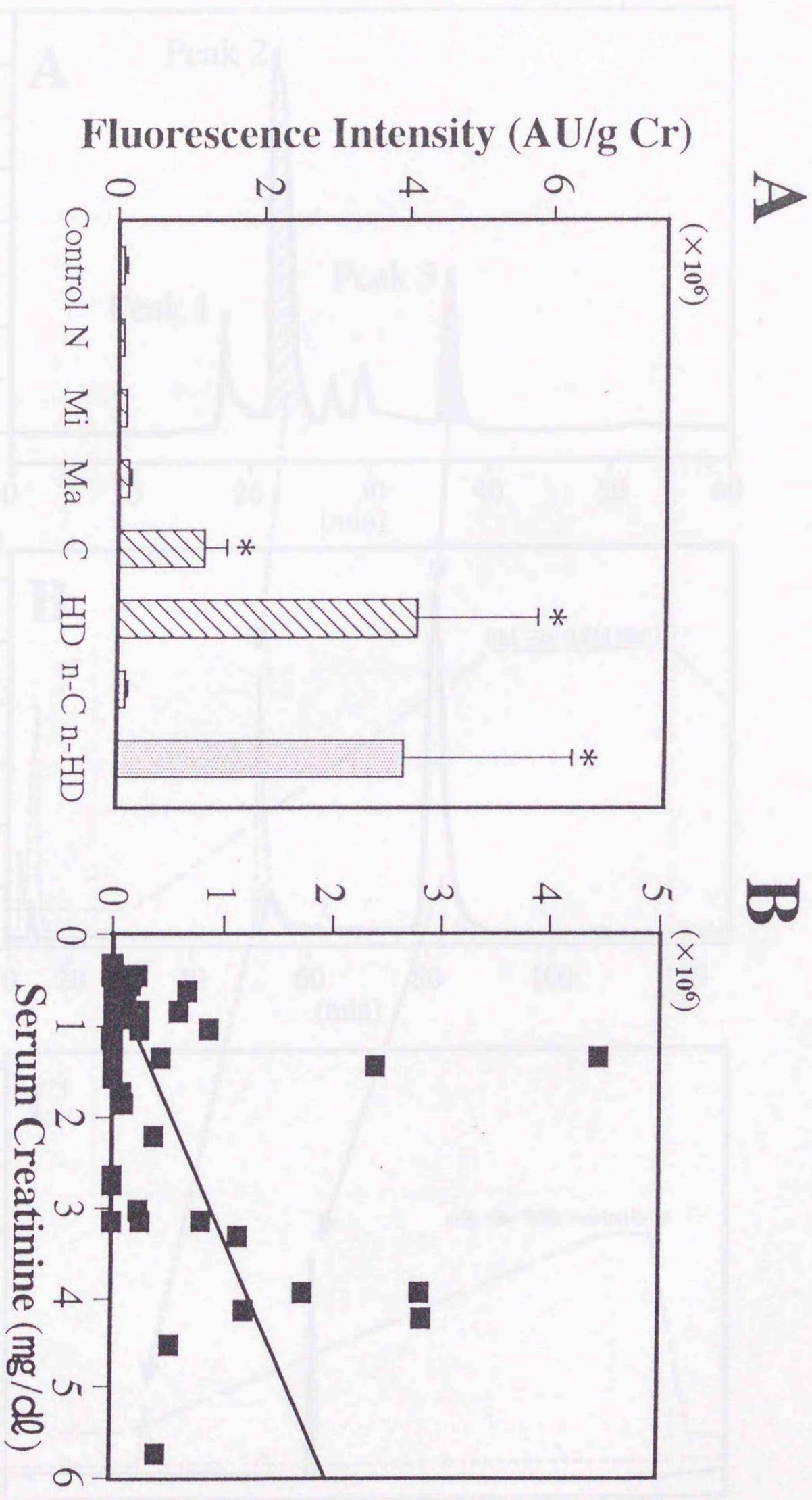


Fig. 6.

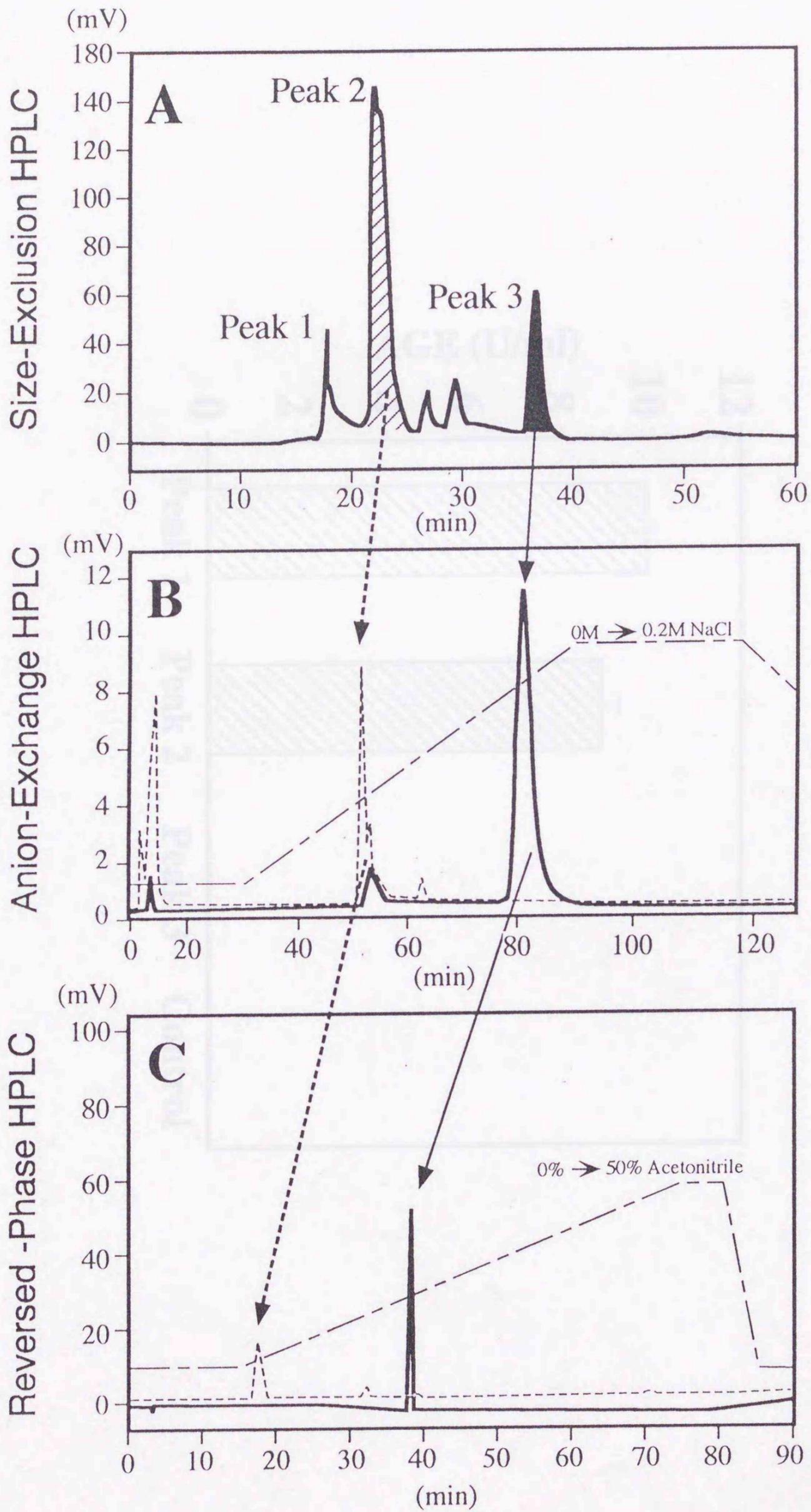
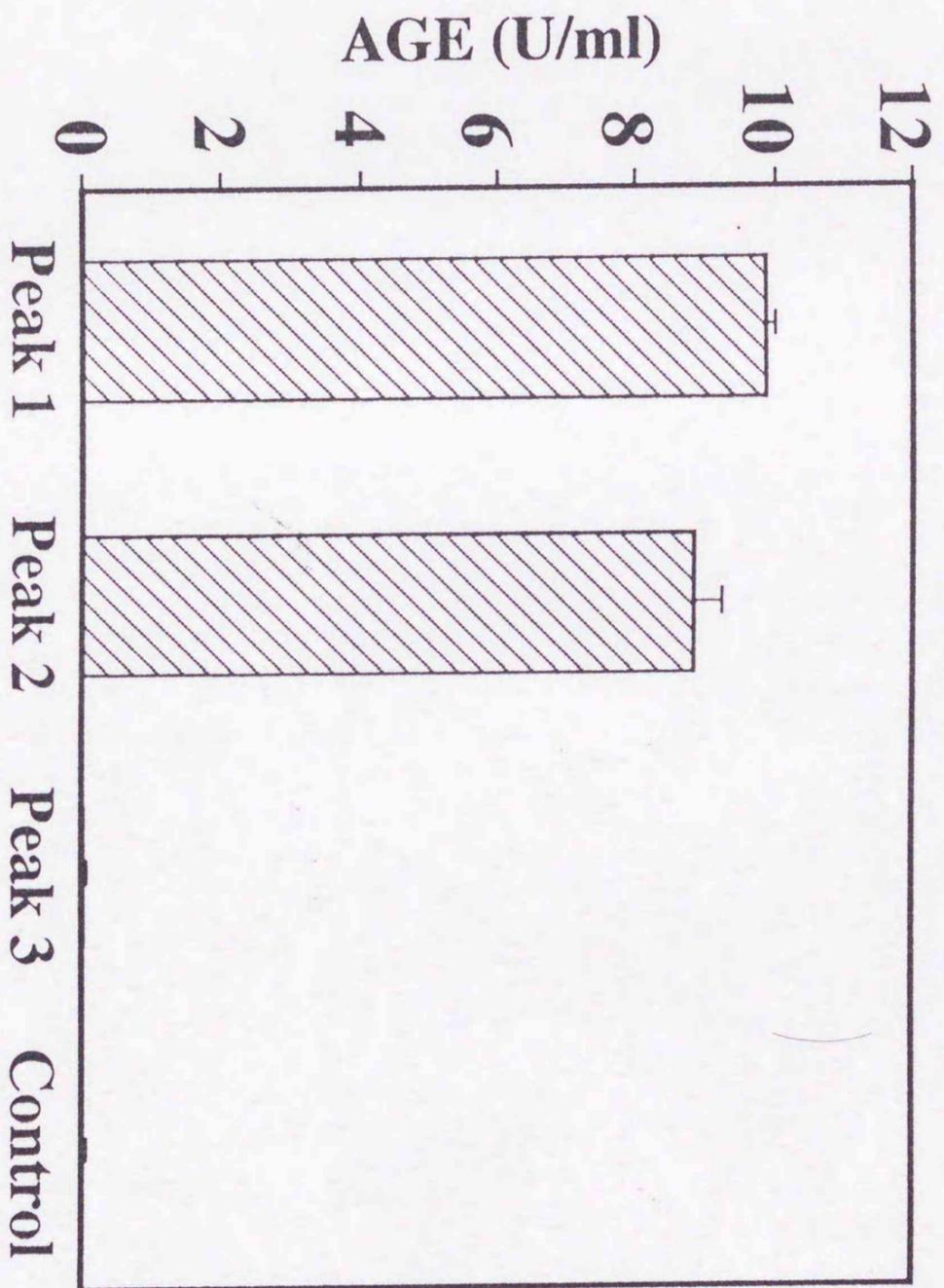


Fig. 7.





inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

