

試験報告書

依頼者 株式会社 リジュベネーションシステム

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木町52番1号



検 体 RETHE

表 題 Advanced Glycation Endproducts産生抑制試験

2020 年 09 月 23 日当センターに提出された上記検体について試験した結果をご報告いたします。

Advanced Glycation Endproducts産生抑制試験

1 依頼者

株式会社 リジュベネーションシステム

2 検体

RETHE

3 試験概要

最終糖化産物(Advanced Glycation Endproducts, 以下「AGEs」と略す。)は、グルコースをはじめとした還元糖が非酵素的にたんぱく質と結合する、いわゆる糖化反応により産生され、糖尿病合併症、動脈硬化、神経変性疾患などに関わっている可能性が示唆されている。本試験では、D-グルコース及びウシ血清アルブミン(以下「BSA」と略す。)の糖化反応により生成するAGEs由来の蛍光強度を指標とし、検体存在下での蛍光強度を測定することで、検体がAGEs産生に与える影響を調べた。

4 試験方法

1) 試験液の調製

検体に50 vol%エタノールを加え、振とう機を用いて10分間振とうした後、10分間超音波処理した。超音波処理後、遠心分離(3000 r/min, 10分間)し、上清を分取した。得られた上清を100 mg/mL試験液とした。100 mg/mL試験液を50 vol%エタノールで希釈し、表-2に示した検体濃度の試験液を調製した。

2) 試験操作

1.5 mL容マイクロチューブにBSA溶液100 μ L, D-グルコース溶液500 μ L, 試験液20 μ L及びリン酸緩衝液を380 μ L加えた後、60 $^{\circ}$ Cで48時間加温したものを反応溶液とした。試験液の代わりにリン酸緩衝液を加えたものを未処置対照、D-グルコース溶液の代わりにリン酸緩衝液を加えたものをブランクとして同様に試験を行った。反応溶液20 μ Lを96ウェルプレートに分取し、水200 μ Lを加えて混合した。主な試薬などは表-1に示した。

表-1 主な試薬など

BSA溶液	ウシ血清アルブミン[Sigma-Aldrich]をリン酸緩衝液で100 mg/mLとした溶液
D-グルコース溶液	D(+)-グルコース[関東化学株式会社]をリン酸緩衝液で200 mg/mLとした溶液
リン酸緩衝液	リン酸緩衝剤粉末(1/15 mol/L, pH7.2)[富士フイルム和光純薬株式会社]を水で1/15 mol/Lとした溶液

3) 測定方法

マイクロプレートリーダー[SpectraMax M2e, Molecular Devices, LLC.]を用い, AGEs由来の蛍光強度を測定した(励起波長370 nm, 蛍光波長440 nm)。

4) 算出方法

未処置対照の蛍光強度に対する各反応溶液の蛍光強度から, 次式によりAGEs産生抑制率を算出した。

$$\text{AGEs産生率 (\%)} = \frac{\text{反応溶液の蛍光強度}^*}{\text{未処置対照の蛍光強度}^*} \times 100$$

* ブランクの蛍光強度を差し引いた値

$$\text{AGEs産生抑制率 (\%)} = 100 - \text{AGEs産生率}$$

検体の終濃度は次式により算出した。

$$\begin{aligned} \text{終濃度 (mg/mL)} &= \text{検体濃度 (mg/mL)} \times \frac{S_a}{S_a + B_{sa} + G_{lc} + B_{uf}} \\ &= \text{検体濃度 (mg/mL)} \div 50 \end{aligned}$$

Sa : 試験液分注量 (20 μ L)

Bsa : BSA溶液分注量 (100 μ L)

Glc : D-グルコース溶液分注量 (500 μ L)

Buf : リン酸緩衝液分注量 (380 μ L)

また, 縦軸にAGEs産生抑制率, 横軸に検体濃度を配したグラフより対数近似曲線を作成し, IC₅₀値を算出した。

5 試験結果

AGEs産生抑制率の結果を表-2に示した。

表-2 AGEs産生抑制率

	検体濃度 (mg/mL)	終濃度 (mg/mL)	産生率 (%)	産生抑制率 (%)	IC ₅₀ 値	
					検体濃度 (mg/mL)	終濃度 (mg/mL)
未処置対照	-	-	100	0	-	-
検体	80	1.6	30	70	44.17	0.88
	60	1.2	41	59		
	50	1	49	51		
	30	0.6	61	39		
	25	0.5	68	32		
	20	0.4	73	27		

6 参考文献

- Lee, E.H. et al. : Biol. Pharm. Bull., **31**, 1626-1630 (2008).

以 上