

平成 26 年 2 月 28 日

平成 25 年度 公益財団法人静岡県産業振興財団 地域活性化事業
産学官連携研究開発助成事業
ヒト爪を用いた「かくれ糖尿病リスク者早期検出キット」に関する研究開発
完了報告書

住 所: 静岡市駿河区小鹿二丁目 2 番 1 号
氏 名: 静岡県公立大学法人
理事長 本庶 佑

課題番号: 13-306

課題名: ヒト爪を用いた「かくれ糖尿病リスク者早期検出キット」に関する研究開発

研究責任者所属: 静岡県立大学 薬学部薬学科 生体機能分子分析学分野

研究責任者氏名: 関 俊哲

研究実施期間 平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 2 月 28 日

上記の共同研究は平成 26 年 2 月 28 日をもって完了しましたので、共同研究契約書の規定により、完了報告書を提出します。

(別紙)

平成 25 年度 地域活性化事業 産学官連携研究開発助成事業

ヒト爪を用いた「かくれ糖尿病リスク者早期検出キット」に関する研究開発 完了報告書

1. 課題の名称 等

課題番号： 13-306
課題名： ヒト爪を用いた「かくれ糖尿病リスク者早期検出キット」に関する研究開発
研究責任者氏名： 関 俊哲
(所属・役職) 静岡県立大学 薬学研究科・助教
コーディネータ等または企業の研究開発関係者氏名： 久田 貴義
(株) テクノスルガ・ラボ 技術部 マネージャー
(所属・役職)
研究開発実施期間： 平成 25 年 4 月 1 日～平成 26 年 2 月 28 日

2. 研究開発の概要

本研究の目的は、ヒト爪を用いた「かくれ糖尿病リスク者」をターゲットとした非侵襲的な早期検出システムの確立、キットの開発である。また、各臨床検査機関などで本キットを用いた「来院することなく、爪を郵送することによる受託分析サービスを展開する。本課題では、その前段階としてヒト爪の粉碎と簡便・効率的な同時抽出法の確立、ヒト指爪を用いたかくれ糖尿病早期検出への実用化の検証を目標とした。ヒト爪乾燥、粉碎条件の最適化に始まり、ヒト爪中アミノ酸の抽出条件、抽出率の最適化、ヒト爪中アミノ酸の定量に適した指の選択、分析法のバリデーション(精度、正確度、感度)の検証、健常人、境界高血糖者、糖尿病患者との有意差の検証を行うことができ、当初の目標を概ね達成できた。今後は開発した方法による 35 歳以下の測定例数を増やし、データの蓄積と統計解析を行い、ヒト爪を用いたかくれ糖尿病リスク者の非侵襲的な早期検出キット化を進める。

3. 実施内容および研究開発成果

3-1 目標

従来の臨床検査試料である血液、尿、唾液とは異なり、ヒト手の爪は採取が容易で痛みを伴わず、長期保存が可能である。また、爪は数ヶ月以上の長期にわたる体内の栄養状態や過去の薬物使用履歴が残され、非侵襲的に採取が可能である。従来の血糖値の測定や尿検査と異なる新しい生体試料としてヒト手の爪を用いて、爪中 D/L-アミノ酸量を煩雑に定量することなく、シンプルにピーク面積比のみを分析することで糖尿病患者と健常者との間に有意差がみられたことである。そこで、「かくれ糖尿病リスク者」をターゲットとしてヒト爪を用いた非侵襲的な早期検出技術の実用化を検証するため、健常者、高血糖者(かくれ糖尿病リスク

者)、糖尿病患者(各約 150 名程度)で従来の判定方法(血糖値、HbA1c など)と結果を比較・検証し、D/L-アミノ酸比によるカテゴリ分けし、糖尿病リスクを判断する評価法を検討する。受託分析サービスを実現するため、多検体処理に適した手法の効率化、分析キットの開発およびリスク判定基準値による評価に基づく一連のシステムとして知財化を検討する。

3-2 実施内容

(1) ヒト爪の粉碎と簡便・効率的な同時抽出法の確立とキット化

従来のヒト爪粉碎には約 40℃の乾燥機で爪を 24 時間乾燥させ、Shake Master(細胞粉碎機)で粉碎した。爪中のアミノ酸の抽出には、メタノール溶媒で 50℃、12 時間を要しているが、多検体分析への実用化、受託分析サービスを行うには爪粉碎の効率化と粉碎粒度の均一化、抽出時間の短縮化が求められる。そこで、本研究では粉碎法としてマルチビーズショッカー多検体細胞破碎機を用いた短時間の粉碎、洗浄後濡れた爪を乾燥させることなく、液体窒素で凍らせステンレスなどのビーズによる粉碎を検討する。粉碎時間が長くなるにつれビーズ摩擦による熱が発生するため、アミノ酸化合物の安定性にも悪影響が及ぼすことを考慮し、ビーズの大きさ、ビーズの種類、粉碎震動数などを最適化し、3 分以内に粉碎可能な条件を確立する。また、抽出法としては、どの検査機関でも所有しているごく一般的な溶媒(メタノール、アセトニトリルなど)を使用することを前提に、粉碎した爪をそのまま抽出溶媒を追加することで、ビーズの入ったままのマイクロ粉碎抽出、短時間で繰り返し抽出可能超音波抽出を比較検討し、溶媒の種類、溶媒の量、抽出温度、時間など順次決定し、さらに、使用するヒト爪の量を 2.0 mg(中指の一回切る爪の量)を目標として再現性の良い効率的な新しい抽出法を確立する。次に、ヒト爪の粉碎・抽出の一体化、すなわち使用するビーズの量、粉碎時間、抽出時間、後処理法などを決定する。粉碎・抽出に必要な器具もリストアップし、粉碎・抽出の手順を整理する。最終的なキットには粉碎・抽出チューブのセットを計画しており、粉碎・抽出ビーズ入りのチューブキットを作成する。

(2) ヒト指爪を用いたかくれ糖尿病早期検出への実用化の検証

① これまでは、ヒト 10 本手指の爪を採集し、平均化試料として用いたが、10 本的手指の中でアミノ酸光学異性体の含量が最も多く、D/L 比が安定でかくれ糖尿病疾患診断に最適な指爪の選定が本シーズ課題の実用化に向けて望まれる。従って、最適なヒト指爪でのかくれ糖尿病診断への応用展開可能性の検証を行う。具体的には、健常人、糖尿病患者の各 10 本指の爪をそれぞれ採集し、指爪ごとの D/L-アミノ酸の抽出量、D/L-アミノ酸のピーク面積を測定し、得られたデータから統計比較を行い、疾患診断に最も適した指を選定する。

② ヒト爪の自動洗浄・粉碎抽出・誘導体化試薬などをパッケージング化し、それぞれキット開発を行う。即ち、上記の実施項目を組み合わせてヒト指爪を用いたかくれ糖尿病検出技術の製品化を行い、その性能(精度、正確度、感度)が実用化の目標(<10%)に達しているか、検証する。また、健常人、糖尿病患者、境界域(各約 150 名)の爪を確保し、かくれ糖尿病早期検出への本製品の実用性を精査する。製品の安全性とキット化製品に起因する異常値が得られないかなど見極める。

3-3 実施手順

本研究では具体的に以下のような手順で実験を行った。

(a) 試薬

アミノ酸標準品として D,L-Ala、D,L-Val、D,L-Leu 等 20 種類(SIGMA)を使用した。内標準物質(IS)として 6-Aminocaproic acid (東京化成)を使用した。誘導体化試薬として *R*(-), *S*(+)-4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole [*R*(-), *S*(+)-DBD-PyNCS] (東京化成)を使用し、その触媒として Triethylamine (TEA、東京化成)を使用した。移動相の検討には、Acetonitrile (CH₃CN、関東化学)、Methanol (CH₃OH、関東化学)、Tetrahydrofuran (THF、関東化学)、Ammonium acetate (酢酸アンモニウム CH₃COONH₄、関東化学)、Ammonium formate (ギ酸アンモニウム HCOONH₄、関東化学)、Formic acid (FA、和光純薬)、水は超純水装置(PWU-200, ADVANTEC)を用いて得られた純水を使用した。

(b)測定装置

UPLC システムとして Waters ACQUITY™ Ultra Performance LC (送液ポンプ、カラムオーブン、オートサンプラー、PDA)、TOF-MS システムとして Waters LCT Premier™ XE TOF-MS、MS/MS としては Xevo TQ-S MS/MS、自動解析ソフトとして MassLynx V 4.1 (Waters)を用い、測定はエレクトロスプレーイオン化(ESI)法の positive-ion mode (ESI⁺)の V 及び MRM mode で行い、測定範囲は m/z 100-1000 とした、カラムには ACQUITY UPLC™ BEH C18、CSH™ C18、CSH™ Fluoro-Phenyl (1.7 μm, 100 mm × 2.1 mm i.d.)を使用し、カラム温度は 40°C とした。ヒト爪乾燥の際には水分計を用い、ヒト爪の粉碎には株式会社バイオメディカルサイエンス社製 Shake Master、安井機器株式会社マルチビーズショッカーを使用した。

(c) D,L-アミノ酸の誘導体化

D, L-アミノ酸それぞれ 160 μM 水溶液を調製した。*R*(-)-DBD-PyNCS、*S*(+)-DBD-PyNCSをそれぞれ7.06 mg 秤量し、1 mL の CH₃CN に溶解し、20 mM を調整した。それぞれを 100 μL 採取し、300 μL の CH₃CN で希釈し、5 mM とした。TEA 30 μL を 970 μL の CH₃CN で希釈し、3 % TEA とした。内部標準物質として 6-Aminocaproic acid を 80 μM 水溶液を調製した。3 種類の各アミノ酸 10 μL 計 60 μL、80 μM 内標準物質 10 μL、5 mM *R*(-), *S*(+)-DBD-PyNCS 100 μL、3%TEA 120 μL をそれぞれ加え、遮光下、55°C で 20 分間反応させた。

(d) ヒト爪乾燥条件、粉碎条件の最適化

爪の乾燥では、水分計による爪からの水分蒸発量を測定し、40°C、45°C の 25 時間まで経時的に観察し。爪の破碎には、マルチビーズショッカー多検体細胞破碎機、Shake Master を用い、液体窒素による凍結により洗浄後濡れた爪の破碎と比較検討を行った。

(e) ヒト爪中アミノ酸の抽出条件、抽出率の最適化

破碎した爪中のアミノ酸の抽出は、これまで 50°C メタノール中で 12 時間抽出を行いました。40°C ~ 50°C のメタノール中で超音波処理、粉碎と抽出を同時に可能なマイクロ粉碎を行い、その抽出効率と再現性などの比較検討を行った。

(f) 検量線の作成

3種類のD,L-アミノ酸の標準品における検量線の作成を行った。R(-)-DBD-PyNCSによる誘導体化後、インジェクションの絶対量が0.05~100 pmol(n=5)となるよう調製し、測定を行った。検量線は生成物のピーク面積とISの面積比により得られた。

(g) 日内・日間変動の測定

3種類のD, L-アミノ酸に関して、標準品における日内・日間変動の測定を行った。UPLC-ESI-TOF-MSにて2 µL インジェクションして絶対量が0.1、1、10 pmolとなるよう調製し、測定を行った。この測定を1日5回、3日間行った。

(h) ヒト爪の採取

対象者には、文書ならびに口頭にて本研究の目的、内容、方法、起こりうる利益と不利益についての説明を行い、同意が得られた場合のみ本研究の被験者になっていただき、同意書に署名後も撤回の求めがあれば速やかにこれに応じるものとした。

健常人(161人)、境界高血糖者(238人)の爪は、公益財団法人SBS静岡健康増進センターで採取した爪を使用し、糖尿病患者(191人)の爪は茨城県那珂記念クリニックで採取した爪を用いた。

(i) ヒト爪の前処理

ヒト爪試料に、0.1% SDS 1 mLを加え、ポルテックスミキサーで攪拌後、溶液を除去した。この操作を3回繰り返した。次に、精製水 1 mLを加え、ポルテックスミキサーで攪拌後、溶液を除去した。この操作を3回繰り返し洗浄した。

3-4 研究開発成果

3-4-1 ヒト爪の粉碎と簡便・効率的な同時抽出法の確立

① ヒト爪乾燥条件、粉碎条件の最適化

ヒト爪の乾燥条件の検討としては、各ヒトの爪からの水分蒸発量を水分計で測定し、40°C、45°Cにおいて25時間まで経時的に記録し、比較を行った。Fig. 1 に各温度における爪中の水分の蒸発量を示してある。そのグラフから分かるようにいずれの温度においても約10時間経過すれば、水分蒸発量は一定になり、安定していることが示された。そこで本研究では、ヒト爪の乾燥条件としてはヒトの体温に近い40°Cで10時間以上乾燥を行うことに決定した。

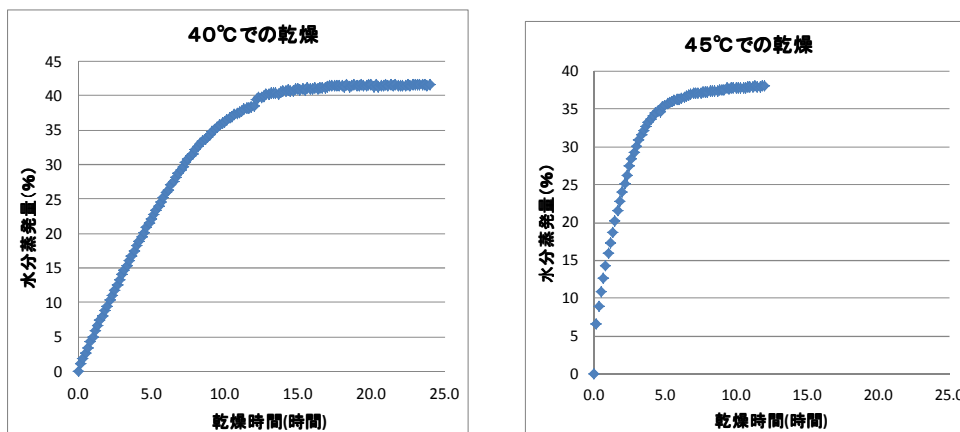


Fig.1 各温度（40℃、45℃）における爪中水分の蒸発量のグラフ

ヒト爪の粉碎条件の検討では、液体窒素による凍結により洗浄後濡れた爪を破碎させることも可能であったが、液体窒素の準備が煩雑であり、実用面を考慮し急ぎの検体検査の場合のみ採用し、通常の場合には爪を先に乾燥する方法を選択した。爪の破碎は、マルチビーズショッカー多検体細胞破碎機、3mlの破碎用チューブで、メタルコーンを用いて破碎条件を検討した結果、回転速度3000rpm、30秒間での破碎条件で、爪の粉碎粒度の均一化が最も良好であったため、爪の粉碎はマルチビーズショッカー多検体細胞破碎機で30秒間粉碎することにした。

② ヒト爪中アミノ酸の抽出条件、抽出率の最適化

ヒト爪等の固体生体試料から代謝物を抽出するには、血液、尿などに比べ非常に長時間の抽出時間がかかる。我々は初めてヒト爪からD,L-アミノ酸を抽出する目的として、CH₃OHによる抽出とHCl溶解、NaOH溶解の3種類溶媒による抽出方法の比較を行ったが、爪をHCl、NaOHに溶解したほうは目的ピークがほとんど検出されなかった。それは爪を90℃にてHCl、NaOHで溶解させることによって、爪中の遊離D,L-アミノ酸が壊れてしまったと考えられる。以上の結果より、強酸、強塩基の抽出条件は不適切であると判断した。

また、健康人の粉碎した爪サンプルを秤量し、CH₃OHを加え、4℃、50℃、60℃、室温(25℃)でそれぞれ5時間、8時間、12時間、24時間抽出を行い、経時抽出を行った。その結果をFig. 2に示したようにほとんど全ての温度で12時間を越えると、抽出量に変化がないという結果が得られた。また、すべてのアミノ酸で最も抽出効率が低かったのは、4℃の抽出条件であった。最も抽出効率の良かった抽出温度は、50℃によるものが最も抽出効率が良いという結果となった。さらに同じヒト爪サンプルを3回抽出し、抽出率の比較を行った結果、抽出1回で爪中のアミノ酸のほぼ抽出出来ていた。従って、50℃、12時間で一回の抽出で十分であると判断した。しかし、多検体を分析する場合には、より迅速・簡便な抽出法が求められる。そこで、我々は簡便・効率的に爪中の遊離D,L-アミノ酸の抽出を行うため、超音波及びマイクロ粉碎抽出法と現在の抽出法との比較を行った。その結果、Fig. 3に各抽出条件における抽出されたD,L-アミノ酸のピーク面積グラフからわかるようにステンレスなどのビーズによるマイクロ粉碎抽出法(30分間粉碎)ではD,L-アミノ酸が殆ど検出されないに対し、超音波の抽出では、50℃、12時間抽出したD,L-アミノ酸ピーク面積とほぼ同等に検出された。これはビーズによる粉碎時間が長くなるにつれてビーズ摩擦による熱が発生するため、アミノ酸化合物が壊れている可

能性があると考えられる。また、Fig. 4 に示したように各抽出条件における抽出された D, L-アミノ酸のピーク面積と内標準物質ピーク面積比でも超音波の抽出と 50°C、12 時間抽出した D, L-アミノ酸ピーク面積とほぼ同等に抽出された。さらに、同じ爪に等量の抽出溶媒を用い、15 分ずつ 5 回繰り返し超音波抽出を行った結果、Fig. 5 に示したように 3 回目からは D-アミノ酸のピークは殆ど検出されず、3 回の抽出で十分に爪中 D-アミノ酸が抽出されることが示唆された。

以上の結果から、ヒト爪中 D, L-アミノ酸の抽出には従来 50°C、12 時間抽出より、超音波抽出法を用いれば 45 分以内に従来法と同等の抽出効果が得られるため、本法は従来法より 16 倍の抽出時間を短縮することができ、多検体分析に応用可能であると判断した。そこで、ヒト爪中のアミノ酸の抽出には、メタノール溶媒中で超音波処理を行いながら 15 分間を 3 回くり返し抽出することにした。

(特許出願済み：特許願 2013-094556)

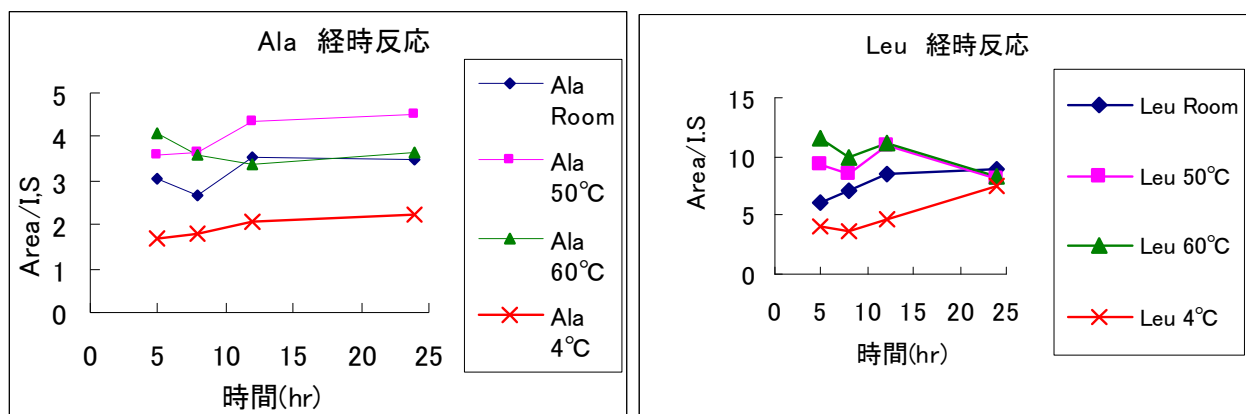


Fig.2 各抽出温度における爪中アミノ酸の経時抽出変化グラフ

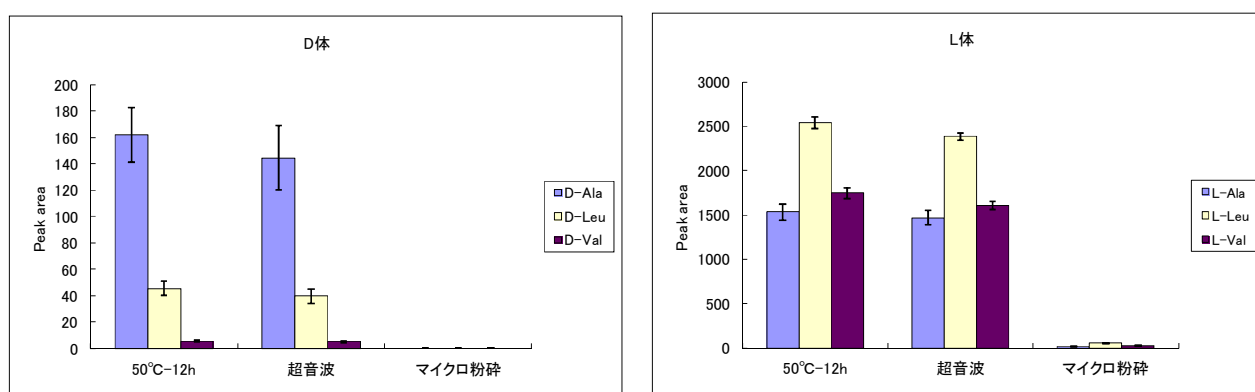


Fig.3 各抽出条件における抽出された D, L-アミノ酸のピーク面積グラフ

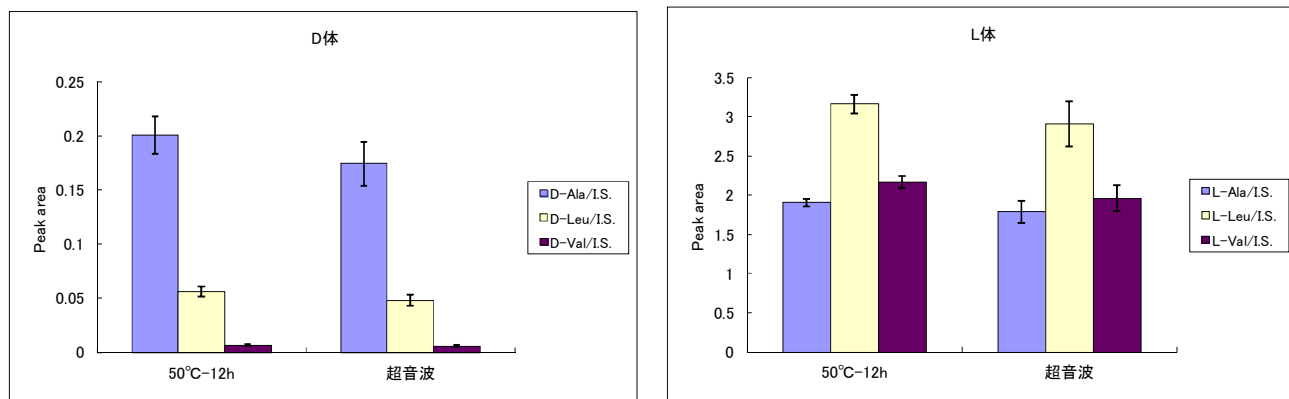


Fig.4 各抽出条件における抽出されたD, L-アミノ酸のピーク面積と内標準物質ピーク面積比のグラフ

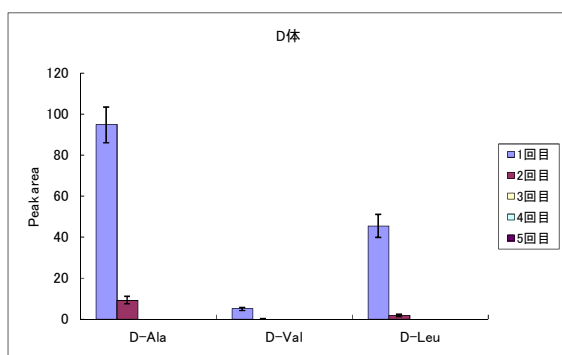


Fig.5 各抽出条件におけるD-アミノ酸の抽出回数の検討グラフ

3-4-2 ヒト指爪を用いたかくれ糖尿病早期検出への実用化の検証

① ヒト爪中アミノ酸の定量に適した指の選択

ヒト爪を糖尿病早期診断の新規生体試料として用いる場合、両手の指10本のうち、どの指の爪を用いるのが最も有用であるかを男女各3名の爪を用い検討した。

Fig. 6 に健常人男女の指ごとの爪中アミノ酸定量値の結果を示した。アミノ酸の含量には個人差があるため、標準偏差も大きくなってしまった。また、男性、女性ともに母指中のアミノ酸は他の指に比べて含量が少ない傾向にあるということが示唆された。さらに、Table 1 には、D-アミノ酸の含量の最も多い爪と、2番目に多い爪の結果を示した。男性では、D-Ala、D-Leu 以外は、両手共に、薬指が最も含量が多いという結果が得られた。D-Ala、D-Leu は、最も含量が多かったのは右手の中指、左手の薬指という結果であった。また、女性は、全てのD-アミノ酸で右手は示指が最も多く、左手はD-Ala 以外は薬指が最も多いという結果であった。しかし、男性、女性ともに右手、左手の間で大きな差は無いという結果が得られた。

また、Fig. 7 に、健常人男女の指ごとの爪中アミノ酸定量値のD/L比の結果を示した。こちらも、標準偏差が非常に大きくなってしまった。また、Table 2 には、D/Lアミノ酸の最も多い爪と、2番目に多い爪の結果を示した。男性は、右手のD/L Ala、左手のD/L Val 以外はすべて薬指が最も多いと

いう結果であった。女性は男性に比べて結果がばらばらであったが、ほとんどが中指、薬指が最も多いという結果であった。しかし、アミノ酸含量、D/L 比共に、男性、女性ともに右手、左手の間で大きな差は無いという結果が得られた。

また、小指に関しては採取量が少なく、1 mg しか秤量出来なかった。検量線は同一の物を用いているが、全体として小指のばらつきが最も大きいのは秤量による誤差の可能性もあると考えられる。

以上を考慮した結果、糖尿病など慢性疾患患者の臨床分析試料として爪を用いる際、左右どちらの手でも有用であり、人差し指、中指、薬指のいずれかを用いることが最適であると判断した。

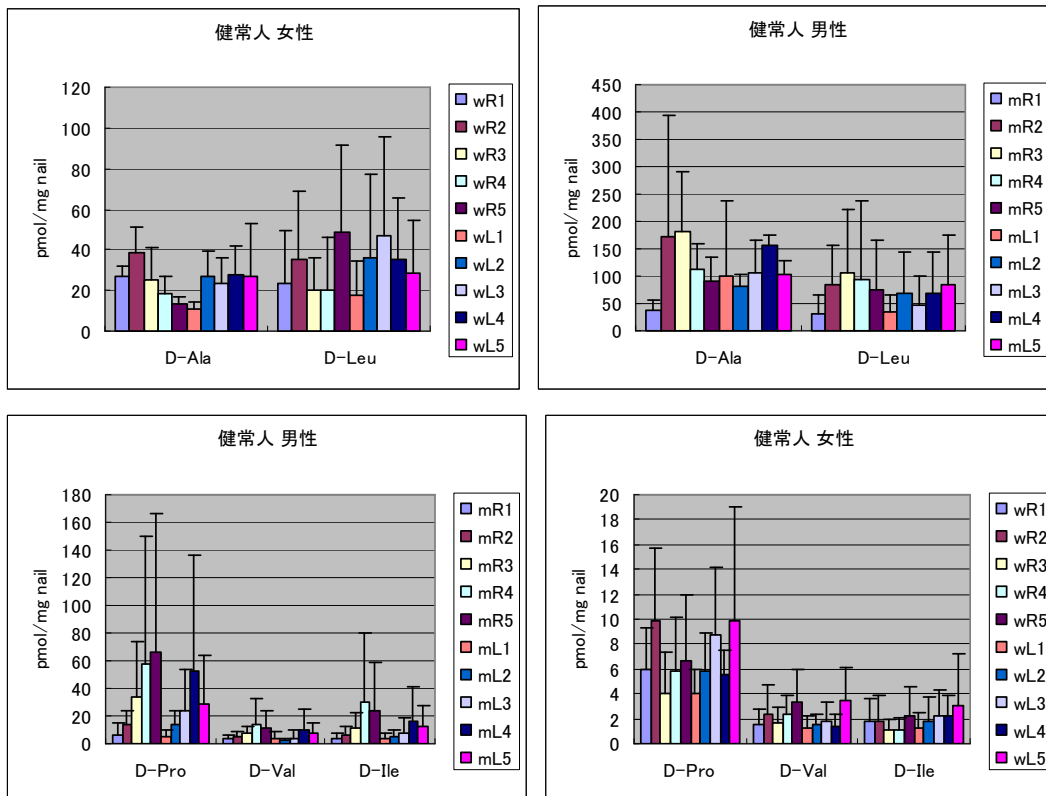


Fig. 6 健常人男性、女性の指ごとの爪中アミノ酸定量値の平均値と標準偏差
(m:男性、w:女性、R:右手、L:左手、1:母指、2:示指、3:中指、4:薬指、5:小指)

Table 1 D-アミノ酸含量の最も多い爪と2番目に多い爪

	D-Ala		D-Pro		D-Val		D-Ile		D-Leu	
	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L
m	2,3	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	2,4
w	1,2	2,4	2,4	2,3	2,4	2,3	1,2	3,4	1,2	2,3

(m:男性、w:女性、R:右手、L:左手、1:母指、2:示指、3:中指、4:薬指、5:小指)

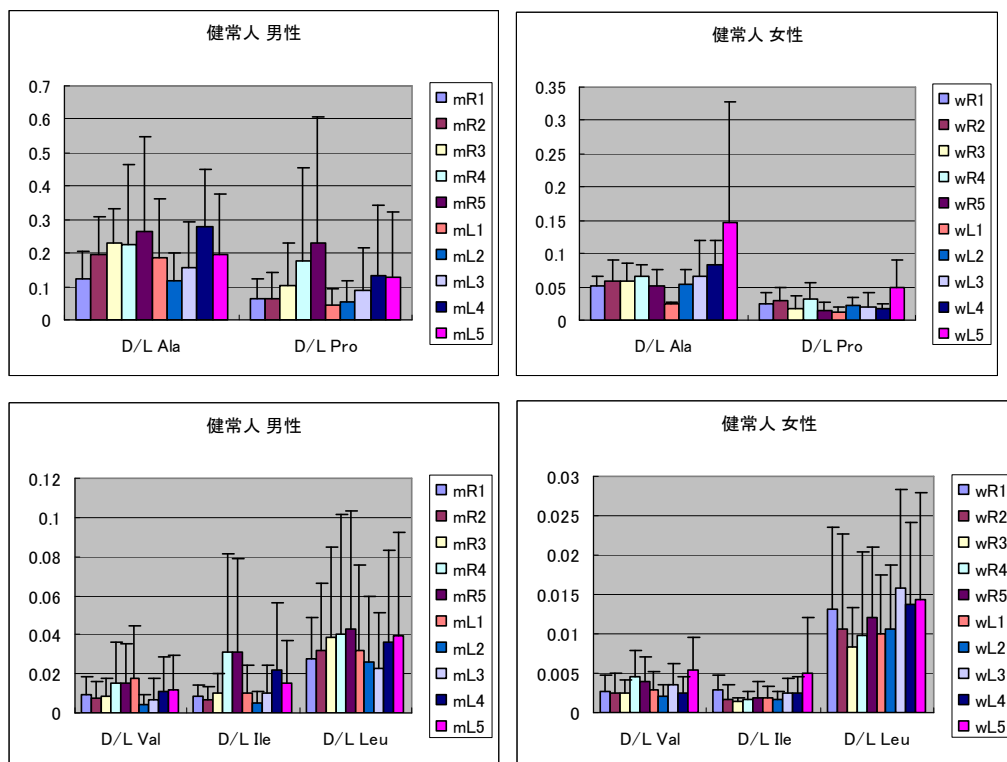


Fig. 7 健康人男性3名、女性3名の指ごと爪中アミノ酸D/L比の平均値と標準偏差

Table 2 アミノ酸D/L比の最も大きい爪と2番目に大きい爪

	D/L Ala		D/L Pro		D/L Val		D/L Ile		D/L Leu	
	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L
m	3,4	1,4	3,4	3,4	1,4	1,4	3,4	3,4	3,4	1,4
w	2,4	3,4	2,4	2,3	1,4	1,3	1,4	3,4	1,2	3,4

(m:男性、w:女性、R:右手、L:左手、1:母指、2:示指、3:中指、4:薬指、5:小指)

② 本法の分析法のバリデーション（精度、正確度、感度）の検証

本法の有用性を検証するため、分析法のバリデーションの確認を行った。Fig.8に標準品を用いたマスキロマトグラムを示してある。8分以内に内部標準品(IS)を含むD,L-Ala、D,L-Val、D,L-Leuが良好に分離検出できた。Table 3には3種類のD,L-アミノ酸の検量線(0.05-100 pmol)データを示した。検量線は7つの異なる濃度から得られ、一つの濃度に対しては5回繰り返し分析を行った、Table 3から分かるように検量線は良い直線性を示し、全てのD,L-アミノ酸において R^2 は0.996以上が得られた。また、検出限界($S/N = 3$)はそれぞれ5.0-10 fmolと良好であった。異なる3種類の濃度での日内・日間変動では日内のCV%は0.65%-8.89%、精度は94.16%-107.30%で、日間のCV%は2.20%-7.18%、精度は92.41%-109.10%であった。いずれ(精度、正確度、感度)の面においても最終目標を達成し、良好な再現性と精度が得られた。従って、本法は十分にヒト爪試料中のD,L-アミノ酸の定性定量分析に応用可能であると判断した。

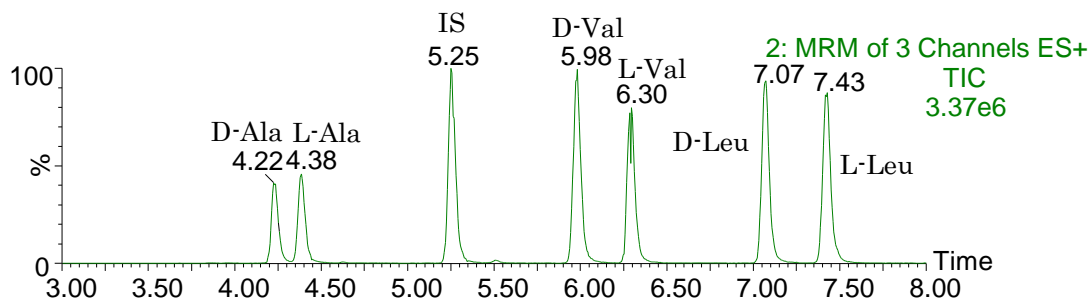


Fig.8 標準品を用いた MS/MS クロマトグラム

Table 3 本分析法によるバリデーションデータ

Amino acids	Calibration range (pmol)	Linear equation	Linearity (R^2)	CV (%) (n=5)	Detection limit (fmol)
D-Ala	0.05 - 100	$y = 2878.1x + 822.33$	0.999	0.82-5.41	5.0
L-Ala	0.05 - 100	$y = 3022.4x + 1569.3$	0.999	2.03-6.56	5.0
D-Val	0.05 - 100	$y = 5818.3x + 6870$	0.998	0.67-7.76	5.0
L-Val	0.05 - 100	$y = 5275.5x + 7742.6$	0.997	1.52-7.21	5.0
D-Leu	0.05 - 100	$y = 5950.4x + 12064$	0.996	1.10-7.04	10.0
L-Leu	0.05 - 100	$y = 6768.7x + 13200$	0.996	1.09-7.51	10.0

③ ヒト指爪を用いたかくれ糖尿病早期検出への実用化の検証

本法の有用性を検証するため、実際に採集された健常人（161人）、境界高血糖者（238人）、糖尿病患者（191人）の爪の粉碎を行い、測定を試みた。しかし、粉碎の過程で予想外に、チューブ内部に細かな傷が付き、そこに破碎された爪が付着し、回収できないと問題点があった。そこで、今回は回収できた健常人（男女、47人）、境界域高血糖患者（男女、87人）、糖尿病患者（男女、144人）の爪を用いて測定を行った。また、健常人、境界高血糖者、糖尿病患者との統計解析を行い、その有意性について検討した。その代表的なマスクロマトグラムを Fig. 9 に示してある。マスクロマトグラムから分かるように健常人、境界高血糖者、糖尿病患者の爪より D, L-Ala、D, L-Val、D, L-Leu が良好に検出され、標品との溶出時間とマススペクトル(m/z)より確認を行った。また、健常人、境界高血糖者、糖尿病患者の定量値を統計解析した結果を Fig. 10 に示してある。Fig. 10 から分かるように今回測定した3種類の DL-アミノ酸の中で Val、Leu では健常人、境界高血糖者、糖尿病患者において有意差がなかったものの、DL-Ala のピーク面積の比においては健常人と境界高血糖者、健常人と糖尿病患者の間に有意差 ($p < 0.01$) が確認できた。また、男女別に詳細に解析した結果、Fig. 11 に示したように男性、女性とも健常人と境界高血糖者、健常人と糖尿病患者の間に有意差 ($p < 0.01$) が確認できた。従って、今回の結果からヒト指爪中の D, L-Ala のピーク面積比は境界高血糖者の早期検出可能なバイオマーカーとしての有用性が示唆され、本技術を用いたかくれ糖尿病リスク者早期検出キットは、中高齢者のかくれ糖尿病の非侵襲的な予防と早期診断の有効な手段になると期待される。

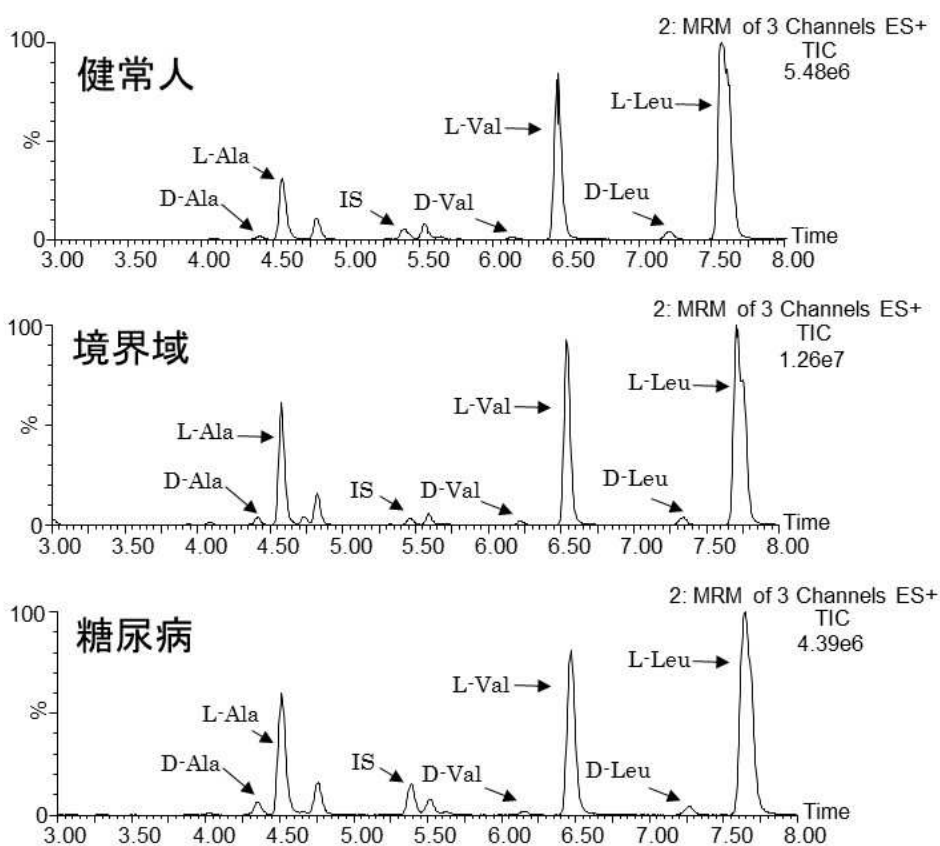


Fig. 9 健康人、境界高血糖者、糖尿病患者爪中光学アミノ酸の MS/MS クロマトグラム

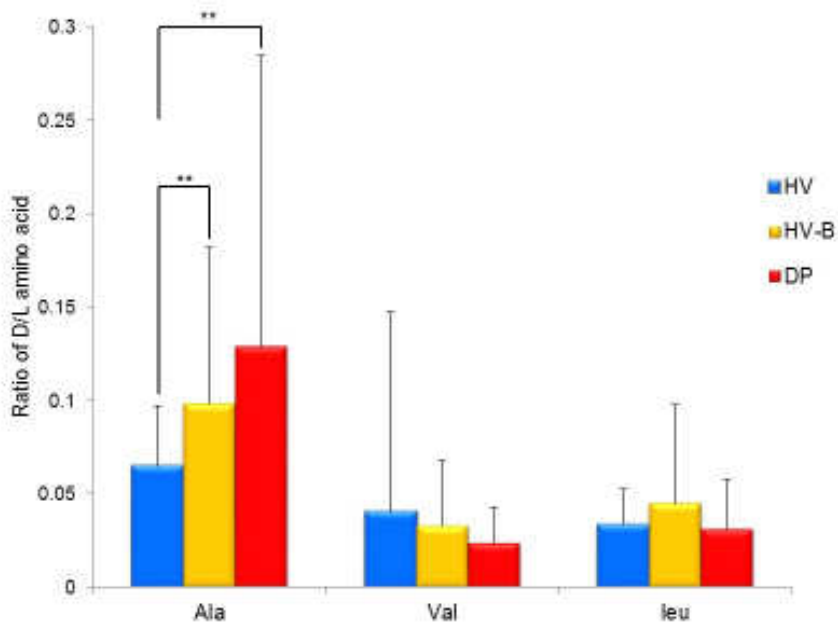


Fig. 10 健康人、境界高血糖者、糖尿病患者爪中光学アミノ酸のピーク面積比の統計解析グラフ

HV: healthy volunteers; HV-B: border of healthy volunteers; DP: diabetic patients; $***P < 0.01$

HV:(n=47), HV-B:(n=87), DP:(n=144).

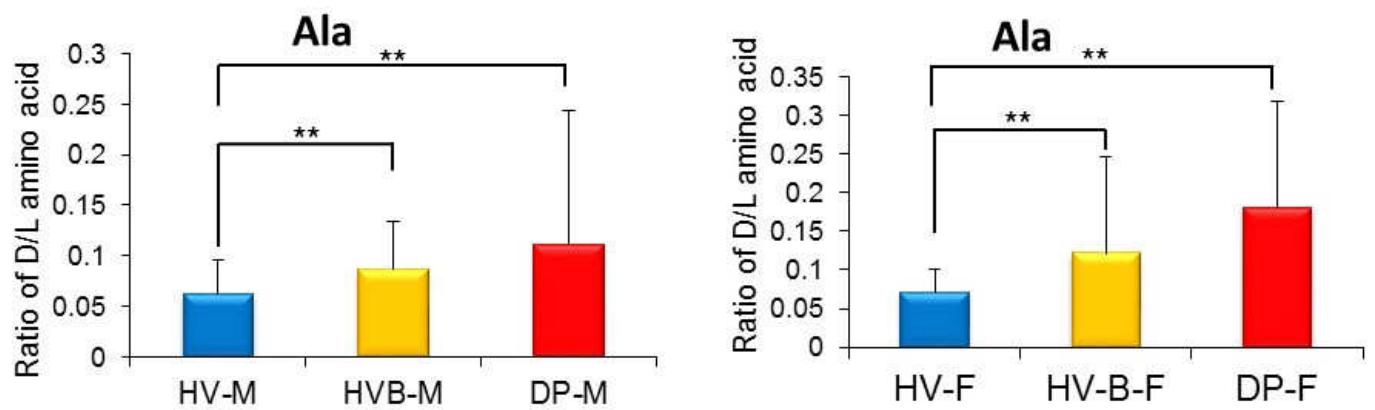


Fig. 11 男女別健常人、境界高血糖者、糖尿病患者爪中光学アミノ酸のピーク面積比の統計解析グラフ
M: Man; F: Female; ** $P < 0.01$

4. 今後の展開

今後は、ヒト爪を用いた「かくれ糖尿病リスク者早期検出キット」の製品化のため、小中高生を含んだ35歳以下の健常人、境界高血糖者、糖尿病患者の基礎データの蓄積を行い、その有用性を検証することが必要である。また、測定データのバラツキを最小限に抑えるため、ヒト爪は人差し指、中指、薬指のみを使用し、分析を行う。さらに、株式会社テクノスルガ・ラボと共同でより一般的な検査法としての実用化に向けた種々の課題に挑戦していき、その成果を社会に還元する。

5. 成果一覧

知的財産権				
No.	特許等の名称 及び技術概要	出願番号 (出願日)	出願人	発明者
1	爪からのアミノ酸光学異性体の抽出方法	特願 2013-94556 (2013. 4. 26)	静岡県公立 大学法人、株 式会社テクノ スルガ・ラボ	関 俊哲、豊岡 利正、 株式会社テクノスルガ・ラ ボ
学会発表				
No.	タイトル	学会名	日付	発表者
1	ヒト爪中低分子代謝物の高感度分析法の開発及び慢性疾患診断への応用	第 59 回 日本 薬学会東海支 部総会・大会 (名古屋)	2013.7.6	関 俊哲
2	生体微量成分の高感度分離分析法の開発と慢性疾患診断への展開	第 24 回クロマ トグラフィー科 学会議(東京)	2013.11.12	関 俊哲
展示会参加				
No.	タイトル	展示会名	日付	発表者
1	糖尿病早期診断における非侵襲的なヒト爪の有用性と可能性	静岡県立大学 「産・学・民・官 の連携を考える つどい 2013」	2013.11.22	関俊哲
新聞・雑誌記事				
No.	新聞・雑誌名	日付・掲載面		
1	検査と技術 「ヒト爪を用いた糖尿病リスク診断」 関 俊哲*、豊岡利正	2013, 41,432-434.		
受賞等				
No.	賞名	機関名	日付	対象者
1	日本薬学会東海支部 学術奨励賞	日本薬学会	2013.7.6	関俊哲
2	日本クロマトグラフィー科学会 奨励賞	日本クロマトグ ラフィー科学 会	2013.11.12	関俊哲