

*Original article***Anti-glycation effects of water-soluble vitamins**

Mashihiro Nakaguchi, Masayuki Yagi, Chieko Sakiyama, Yoshikazu Yonei

Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center,
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto.

Glycative Stress Research 2025; 12 (3): 114-127
(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

水溶性ビタミン類の抗糖化作用

中口真白、八木雅之、崎山智恵子、米井嘉一

同志社大学生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター / 糖化ストレス研究センター

要約

【目的】 生体内での糖化は、高血糖に続発する糖質由来アルデヒド生成及び脂肪酸の酸化による脂質由来アルデヒド生成に起因し、組織蛋白を AGEs (advanced glycation end products) 化させて蛋白の機能低下を引き起こす。本研究では、ビタミンの抗糖化作用を体系的に整理することを目的として、水溶性ビタミン類の抗糖化作用及び抗酸化作用を検証した。

【方法】 水溶性ビタミン類 7 種類 (L(+)-アスコルビン酸、ニコチン酸、ピリドキシン塩酸塩、D-ビオチン、ビタミン B1 塩酸塩、ニコチンアミド、D-パントテン酸ナトリウム) を試料とした。抗糖化作用は、ヒト血清アルブミン-グルコース糖化反応モデルを使用し、蛍光性 AGEs、ペントシジン、3-Deoxyglucosone (3DG)、Glyoxal (GO)、及び Methylglyoxal (MGO) に対する各生成抑制率を算出し評価した。アルデヒドトラップ作用は、3DG、GO、及び MGO に対する各トラップ率を算出し評価した。抗酸化作用は、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を算出し評価した。

【結果】 蛍光性 AGEs、ペントシジン、GO、及び MGO 生成抑制作用は、L(+)-アスコルビン酸、ニコチン酸、ピリドキシン塩酸塩、及び D-ビオチンに認められた。3DG 生成抑制作用は、本研究で対象とした水溶性ビタミン類 7 種類全てに認められなかった。DPPH ラジカル消去活性は、L(+)-アスコルビン酸にのみ認められた。

【結論】 本研究で対象とした水溶性ビタミン類 7 種類は、蛍光性 AGEs、ペントシジン、3DG、GO 及び MGO に対する各生成抑制作用、並びに DPPH ラジカル消去活性の有無により 4 つの群に分類され、水溶性ビタミン類は種類により、抗糖化作用の作用機序が異なる可能性が示唆された。

連絡先：教授 八木雅之
同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター / 糖化ストレス研究センター
〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3
TEL&FAX: 0774-65-6394 e-mail: myagi@mail.doshisha.ac.jp
共著者：中口真白 ctuk2017@mail4.doshisha.ac.jp;
崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp; 米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2025; 12 (3): 114-127
本論文を引用する際はここらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

KEY WORDS: 水溶性ビタミン、抗糖化、抗酸化、アルデヒドトラップ

はじめに

生体内での糖化は、高血糖に続発する糖質由来アルデヒド生成及び脂肪酸の酸化による脂質由来アルデヒド生成に起因し、組織蛋白をAGEs (advanced glycation end products) 化させて蛋白の機能低下を引き起こす^{1,2)}。糖化による蛋白の変性並びにAGEsの生成及び蓄積は、糖尿病、糖尿病合併症、動脈硬化、骨粗鬆症、癌、及びアルツハイマー病などの老化現象や老化関連疾患にも関与する³⁻⁵⁾。糖化ストレスは、生体内においてアルデヒドが過剰に生成された状態を示し、グルコースと脂肪酸の酸化により、新たなアルデヒドが生成されることから、酸化は糖化ストレスの促進要因の一つとされている。糖化ストレスの抑制方法（抗糖化）には、食後高血糖及びその後のアルデヒド生成の抑制、糖化反応の抑制、並びにAGEsの分解や排泄などがある⁶⁾。

アミノグアニジンはAGEs生成抑制作用を有し、腎症、網膜症、神経障害に対する予防及び進展抑制作用を有することが示されているが、貧血、肝障害、及びビタミンB6欠乏症などの副作用があり、実用化されていない^{7,8)}。複数の先行研究より、植物性食品に含まれるポリフェノール（フラボノイド、カテキン、アントシアニンなど）やカロテノイドなどのファイトケミカルも抗糖化作用を有することが示されている⁹⁻¹³⁾。また、先行研究より、茶、ハーブティー、野菜、ハーブ、及びフルーツなどの食品素材が抗糖化作用を有することが示されており、これらの抗糖化作用はポリフェノールやカロテノイドなどの物質に起因するとされている¹⁴⁻¹⁶⁾。

ビタミンは、食品に含まれる五大栄養素のうち、生体内では合成困難な生命維持に必須の有機化合物であり、代謝調節作用や抗酸化作用などの様々な生理作用を有している⁷⁾。先行研究より、ピリドキサミンは、糖化反応中間体を直接捕捉する他、抗酸化作用により酸化ストレスを低減することで、AGEsやALEs (advanced lipoxidation end products) の生成を抑制することが示されており、臨床試験においては、糖尿病性腎症患者の腎機能悪化の進行を遅延する可能性が示されている¹⁸⁻²²⁾。チアミン及びチアミン誘導体であるベンフォチアミンは、グルコース代謝経路の調整、すなわち、グルコースをペントースリン酸系へ振り分けることで、AGEs生成に必要な有害な中間代謝物の蓄積を低減する作用が確認されており、糖尿病性網膜症や腎症などの糖尿病合併症予防に寄与する可能性が示されている²³⁻²⁶⁾。また、アスコルビン酸は、活性酸素種やフリー

ラジカルを消去することで、酸化を伴う非酵素的糖化反応の進行を抑制し、結果としてAGEsの蓄積を防止する効果が示されている^{11,27)}。

一方で、ビタミンの抗糖化作用の具体的な作用機序、抗酸化作用との関連、及びビタミンの種類による作用の相違について、体系的に整理されてる例は限られている。本研究では、ビタミンの抗糖化作用を体系的に整理し、ビタミンが糖化ストレスに及ぼす影響を解明することを目的として、水溶性ビタミン類の抗糖化作用及び抗酸化作用を検証した。

方法

試薬

糖化反応のモデル蛋白は、ヒト血清アルブミン (human serum albumins : HSA, lyophilized powder, $\geq 96\%$, agarose gel electrophoresis) を使用した。HSAはSigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA) から購入した。その他の試薬は特級又はHPLCグレードのものを使用した。また、試薬は富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）又はナカライテスク株式会社（京都）から購入した。

試料の調製

本研究では、水溶性ビタミン類10種類 (L(+)-アスコルビン酸 (VC)、ニコチン酸 (NA)、ピリドキシン塩酸塩 (VB6)、D-ビオチン (VB7)、ビタミンB1塩酸塩 (VB1)、ニコチンアミド (NAM)、D-パントテン酸ナトリウム (VB5)、ビタミンB2 (VB2)、ビタミンB12 (VB12)、葉酸) を対象とした。

精製水に各試薬を溶解して濃度0.2 mol/Lの溶液を調製し、試料とした。NA及びVB7は精製水では溶解しなかったため、Dimethyl Sulfoxide (DMSO) で溶解した。また、VB2、VB12、及び葉酸は、精製水及びDMSOでは溶解しなかったため、上記3種類の試薬を除く合計7種類の試薬の溶液を試料とした。試薬の構造をFig. 1に示した。

抗糖化作用の検証

抗糖化作用の検証にはヒト血清アルブミン-グルコース糖化反応モデルを使用した²⁸⁾。0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)、40 mg/mL HSA溶液、2.0 mol/L Glucose溶液、及び試料を混合した溶液を調製し、60 °Cで40時間反応

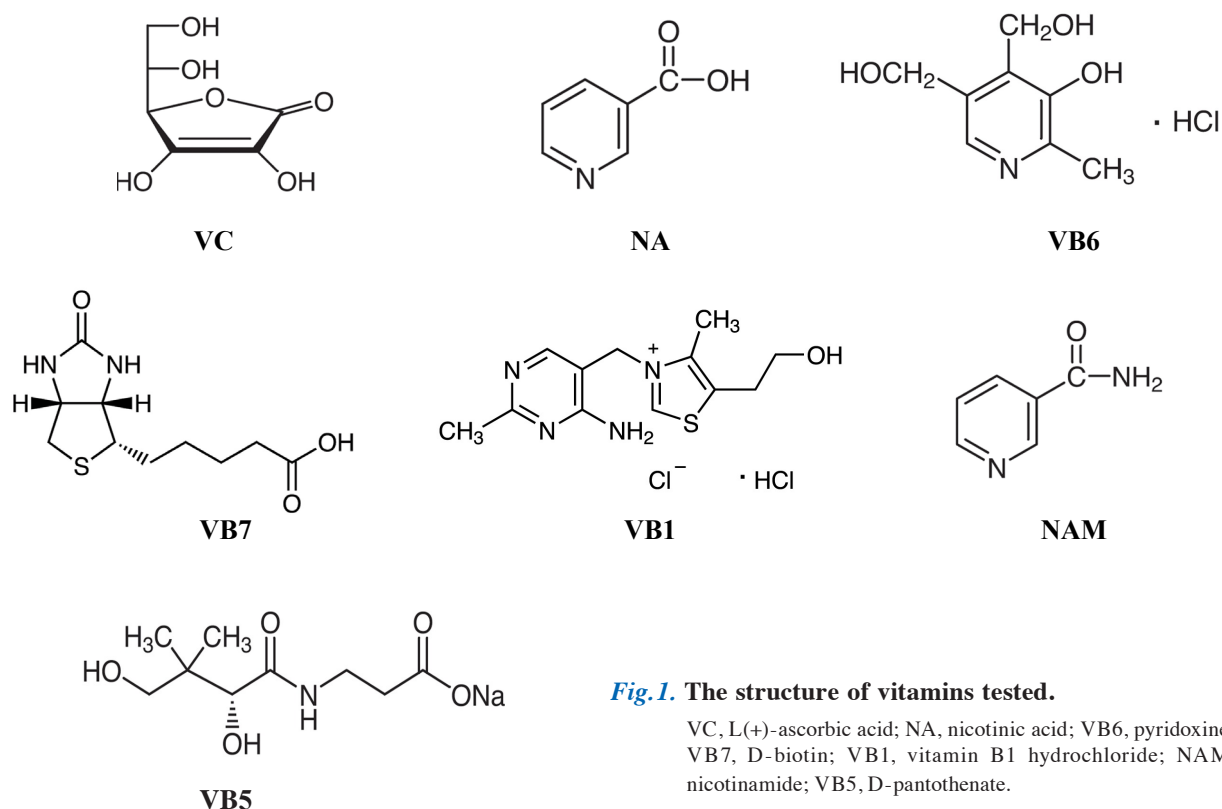


Fig.1. The structure of vitamins tested.

VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

させた。蛍光性AGEsは、マイクロプレートリーダーを使用して、AGEs由来蛍光値（励起波長 370 nm/蛍光波長 440 nm）を測定した。ペントシジン及び糖化反応中間体（3-Deoxyglucosone (3DG)、Glyoxal (GO)、Methylglyoxal (MGO))は、HPLC法により測定した²⁹⁻³²⁾。対照 (Reference: Ref) は、試料の代わりに等量の精製水又はDMSOを加え、同条件で反応させた。抗糖化作用の陽性対照には、AGEs生成阻害剤として知られているアミノグアニジン (AG)を使用した。蛍光性AGEs、ペントシジン、及び糖化反応中間体に対する生成抑制率(%)は下記の**Equation 1**に基づいて算出した。

本研究では、抗糖化作用は、生成抑制率が10%未満の場合は抑制作用なし、10%以上20%未満の場合は極めて弱い抑制作用あり、20%以上40%未満の場合は弱い抑制作用あり、40%以上60%未満の場合は中程度の抑制作用あり、60%以上80%未満の場合は強い抑制作用あり、80%以上の場合は極めて強い抑制作用ありと評価した。

$$\text{生成抑制率 (\%)} = \frac{100 - \{(\text{Sample Glucose (+)} - \text{Sample Glucose (-)}) / (\text{Ref Glucose (+)} - \text{Ref Glucose (-)})\} \times 100}{\text{Equation 1}}$$

Equation 1

アルデヒドトラップ作用の検証

アルデヒドトラップ作用は、八木らの方法で評価した³³⁾。リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に試料を溶解させ、同濃度のアルデヒドを添加して37℃で1時間インキュベートした後、TFA-アセトニトリル溶液を添加して反応を停止させた。反応停止後、反応液中に残った遊離アルデヒドをDBD-Hで誘導体化して、蛍光値（励起波長 450 nm/蛍光波長 565 nm）を測定した。同時に誘導体化した検量線を用いて残アルデヒド濃度を定量した。アルデヒドトラップ率は、Reference（試料溶媒のみ）溶液に対する試料添加溶液のアルデヒド濃度の減少率より算出した。

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性の検証

DPPHラジカル消去活性 (nmol-Trolox equivalent/ μmol) は、Troloxを標準物質としてその相当量を算出する方法で測定した^{34,35)}。

統計解析方法

測定値は、平均値 \pm 標準偏差 (n = 3) で示した。測定値の比較にはTukeyの多重比較検定を用いた。統計解析結果は、危険率5%未満を有意とした。

結果

1. 蛍光性 AGEs 生成抑制作用

水溶性ビタミン類 7 種類の蛍光性 AGEs 生成抑制率を [Table 1](#) 及び [Fig. 2](#) に示した。

VC は、蛍光性 AGEs 生成抑制率が 80 % 以上であり、極めて強い蛍光性 AGEs 生成抑制作用を有していた。また、VC は、本研究で対象とした他の水溶性ビタミン類 6 種類 (NA、VB6、VB7、VB1、NAM、VB5) より、蛍光性 AGEs 生成抑制率が有意に高かった ($p < 0.001$)。

NA、VB6、VB7、及び VB1 は、蛍光性 AGEs 生成抑制率が 60 % 以上 80 % 未満であり、強い蛍光性 AGEs 生成抑制作用を有していた。一方で、NAM 及び VB5 は、蛍光性 AGEs 生成抑制率が 10 % 未満であり、蛍光性 AGEs 生成抑制作用を有していなかった。

なお、VC の蛍光性 AGEs 生成抑制率は、AG (1.0 mg/mL) より高い値であった ([Fig. 3](#))。

2. ペントシジン生成抑制作用

水溶性ビタミン類 7 種類のペントシジン生成抑制率を [Table 2](#) 及び [Fig. 4](#) に示した。

VC、NA、VB6、及び VB7 は、ペントシジン生成抑制率が 80 % 以上であり、極めて強いペントシジン生成抑制作用を有していた。一方で、NAM 及び VB5 は、ペントシジン生成抑制率が 10 % 未満であり、ペントシジン生成抑制作用を有していなかった。VB1 は、ペントシジン生成抑制率が -1341.65 % であった。

なお、VC、NA、VB6、及び VB7 のペントシジン生成抑制率は、AG (1.0 mg/mL) より高い値であった ([Fig. 5](#))。

3. 中間体生成抑制作用

3-Deoxyglucosone(3DG) 生成抑制作用

水溶性ビタミン類 7 種類の 3DG 生成抑制率を [Table 3](#) 及び [Fig. 6](#) に示した。英語版の単位 [ng./mL] は誤りです。

Table 1. Inhibition rate of fluorescent AGE formation.

Sample	Inhibition rate of fluorescent AGE formation [%]	Sample Glucose (+)	Sample Glucose (-)	Reference Glucose (+)	Reference Glucose (-)
VC	108.65 ± 0.49	431.66 ± 3.77	467.75 ± 2.77	475.21 ± 6.03	57.77 ± 0.97
NA	74.30 ± 0.07	284.16 ± 0.60	59.19 ± 0.14	945.49 ± 33.80	70.01 ± 0.32
VB6	73.49 ± 0.36	690.72 ± 2.23	580.05 ± 1.41	475.21 ± 6.03	57.77 ± 0.97
VB7	72.62 ± 0.55	301.50 ± 6.29	61.77 ± 1.47	945.49 ± 33.80	70.01 ± 0.32
VB1	68.44 ± 4.75	874.61 ± 8.19	742.88 ± 17.03	475.21 ± 6.03	57.77 ± 0.97
NAM	4.72 ± 0.72	455.03 ± 3.19	57.28 ± 0.29	475.21 ± 6.03	57.77 ± 0.97
VB5	-6.11 ± 3.75	502.19 ± 14.04	59.25 ± 1.68	475.21 ± 6.03	57.77 ± 0.97

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. AGE, advanced glycation endproducts; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

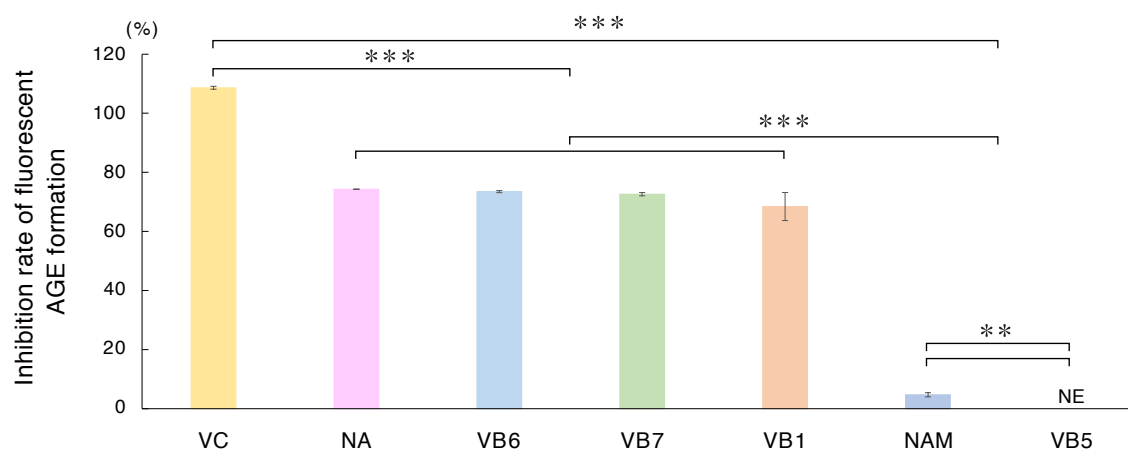


Fig. 2. Inhibition rate of fluorescent AGE formation.

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's multiple comparison test. Final concentration of each sample: 0.04 mol/L. AGE, advanced glycation endproduct; NE, no effect; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

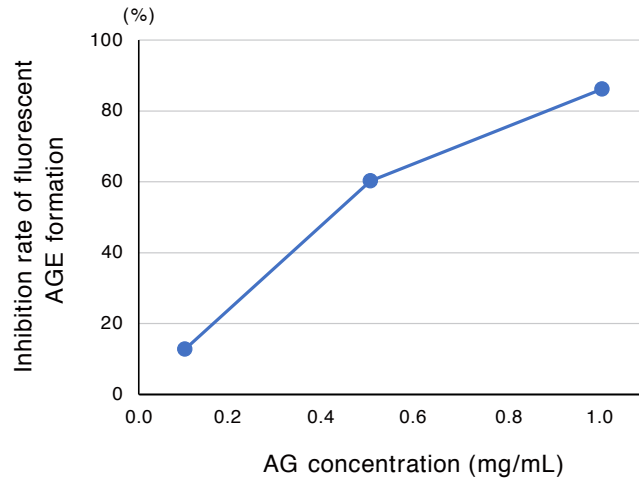


Fig. 3. Inhibition rate of fluorescent AGE formation by AG.

AGE, advanced glycation endproduct; AG, aminoguanidine.

Table 2. Inhibition rate of pentosidine formation.

Sample	Inhibition rate of pentosidine formation [%]	Sample Glucose (+) [ng/mL]	Sample Glucose (-) [ng/mL]	Reference Glucose (+) [ng/mL]	Reference Glucose (-) [ng/mL]
VC	84.30 ± 4.26	1.59 ± 0.21	0.83 ± 0.00	5.04 ± 0.00	0.18 ± 0.00
NA	90.65 ± 0.02	0.49 ± 0.00	0.16 ± 0.00	3.76 ± 0.03	0.21 ± 0.00
VB6	94.44 ± 0.07	0.45 ± 0.00	0.18 ± 0.00	5.04 ± 0.00	0.18 ± 0.00
VB7	92.84 ± 3.44	0.25 ± 0.12	0.00 ± 0.00	3.76 ± 0.03	0.21 ± 0.00
VB1	-1341.65 ± 94.22	70.22 ± 4.57	0.23 ± 0.01	5.04 ± 0.00	0.18 ± 0.00
NAM	1.65 ± 0.23	4.95 ± 0.01	0.17 ± 0.00	5.04 ± 0.00	0.18 ± 0.00
VB5	5.53 ± 0.07	4.77 ± 0.00	0.19 ± 0.00	5.04 ± 0.00	0.18 ± 0.00

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

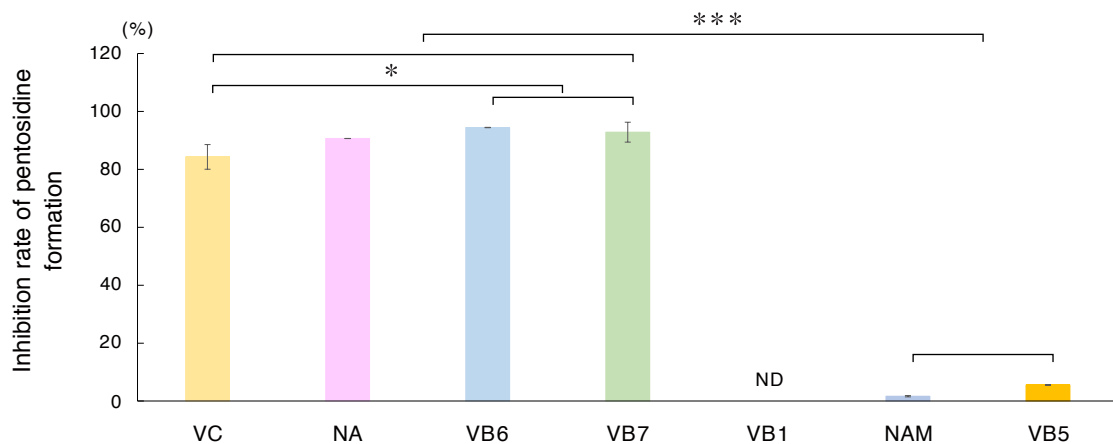


Fig. 4. Inhibition rate of pentosidine formation.

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. *p < 0.05, ***p < 0.001, Tukey's multiple comparison test. Final concentration of each sample: 0.04 mol/L. ND, not determined; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

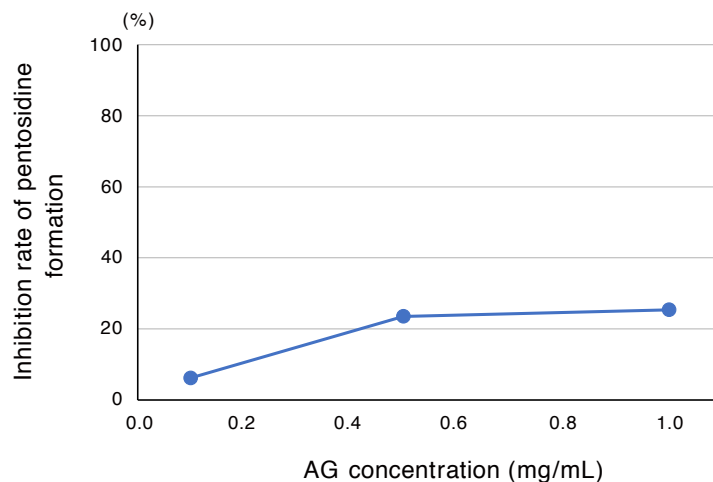


Fig. 5. Inhibition rate of pentosidine formation by AG.
AG, aminoguanidine.

Table 3. Inhibition rate of 3DG formation.

Sample	Inhibition rate of 3DG formation [%]	Sample Glucose (+) [μg/mL]	Sample Glucose (-) [μg/mL]	Reference Glucose (+) [μg/mL]	Reference Glucose (-) [μg/mL]
VC	-78.12 ± 0.38	23.40 ± 0.16	4.34 ± 0.14	10.71 ± 0.15	0.01 ± 0.00
NA	-30.82 ± 1.10	17.47 ± 0.12	0.02 ± 0.03	13.31 ± 0.23	-0.03 ± 0.00
VB6	13.48 ± 2.23	9.31 ± 0.24	0.06 ± 0.00	10.71 ± 0.15	0.01 ± 0.00
VB7	-52.57 ± 2.02	20.35 ± 0.27	0.00 ± 0.00	13.31 ± 0.23	-0.03 ± 0.00
VB1	-20.78 ± 11.55	12.92 ± 1.24	0.00 ± 0.00	10.71 ± 0.15	0.01 ± 0.00
NAM	-5.31 ± 0.64	11.28 ± 0.07	0.01 ± 0.00	10.71 ± 0.15	0.01 ± 0.00
VB5	-15.46 ± 0.03	12.35 ± 0.00	0.00 ± 0.00	10.71 ± 0.15	0.01 ± 0.00

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. 3DG, 3-deoxyglucosone; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

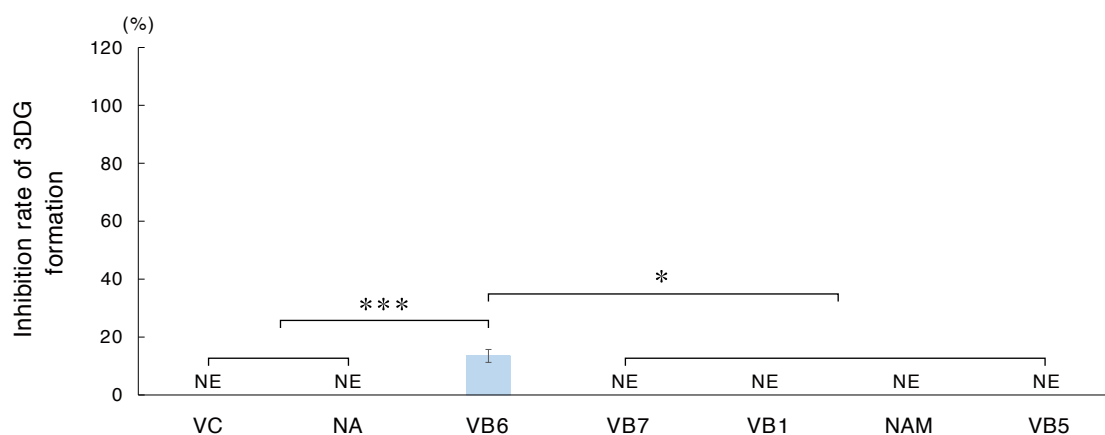


Fig. 6. Inhibition rate of 3DG formation.

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. * p < 0.05, *** p < 0.001, Tukey's multiple comparison test. Final concentration of each sample: 0.04 mol/L. 3DG, 3-deoxyglucosone; NE, no effect; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

VB6は、3DG生成抑制率が10 %以上20 %未満であり、極めて弱い3DG生成抑制作用を有していた。また、VB6は、本研究で対象とした他の水溶性ビタミン類6種類（VC、NA、VB7、VB1、NAM、VB5）より、3DG生成抑制率が有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。

一方で、VC、NA、VB7、VB1、NAM、及びVB5は、3DG生成抑制率が10 %未満であり、3DG生成抑制作用を有していなかった。

なお、VC、NA、VB7、VB1、NAM、及びVB5の3DG生成抑制率は、AG (0.1 mg/mL)より低い値であった (Fig. 7)。

Glyoxal(GO) 生成抑制作用

水溶性ビタミン類7種類のGO生成抑制率を Table 4 及び Fig. 8 に示した。

VCは、GO生成抑制率が80 %以上であり、極めて強

いGO生成抑制作用を有していた。また、VCは、本研究で対象とした他の水溶性ビタミン類6種類（NA、VB6、VB7、VB1、NAM、VB5）より、GO生成抑制率が有意に高かった（ $p < 0.001$ ）。

VB6は、GO生成抑制率が60 %以上80 %未満であり、強いGO生成抑制作用を有していた。NA及びVB7は、GO生成抑制率が40 %以上60 %未満であり、中程度のGO生成抑制作用を有していた。一方で、NAM及びVB5は、GO生成抑制率が10 %未満であり、GO生成抑制作用を有していなかった。VB1は、GO生成抑制率が181.26 %であった。

なお、VCのGO生成抑制率はAG (1.0 mg/mL) 以下、VB6のGO生成抑制率はAG (0.5 mg/mL) 以下の値であった (Fig. 9)。

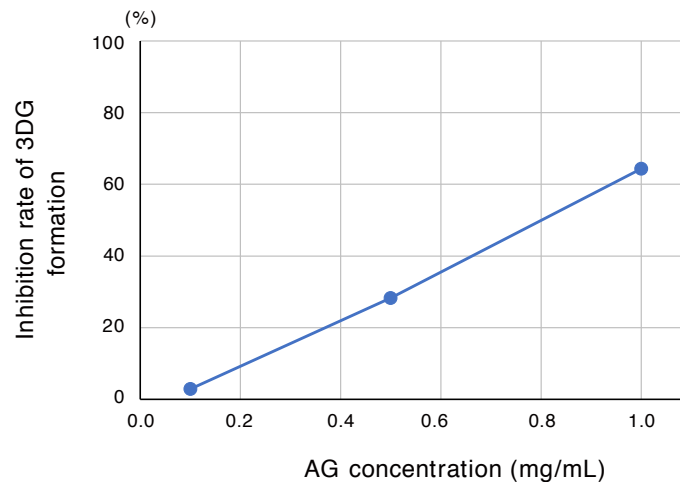


Fig. 7. Inhibition rate of 3DG formation by AG.

3DG, 3-deoxyglucosone; AG, aminoguanidine.

Table 4. Inhibition rate of GO formation.

Sample	Inhibition rate of GO formation [%]	Sample Glucose (+) [ng/mL]	Sample Glucose (-) [ng/mL]	Reference Glucose (+) [ng/mL]	Reference Glucose (-) [ng/mL]
VC	95.93 ± 0.02	-0.16 ± 0.00	-0.19 ± 0.00	0.64 ± 0.03	-0.21 ± 0.00
NA	43.57 ± 1.14	0.11 ± 0.00	-0.20 ± 0.00	0.34 ± 0.01	-0.21 ± 0.00
VB6	74.50 ± 0.03	0.01 ± 0.00	-0.21 ± 0.00	0.64 ± 0.03	-0.21 ± 0.00
VB7	48.77 ± 0.06	0.07 ± 0.00	-0.21 ± 0.00	0.34 ± 0.01	-0.21 ± 0.00
VB1	181.26 ± 43.32	30.95 ± 0.03	31.65 ± 0.39	0.64 ± 0.03	-0.21 ± 0.00
NAM	-19.78 ± 0.95	0.81 ± 0.01	-0.21 ± 0.00	0.64 ± 0.03	-0.21 ± 0.00
VB5	-17.04 ± 0.85	0.79 ± 0.01	-0.21 ± 0.00	0.64 ± 0.03	-0.21 ± 0.00

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. GO, glyoxal; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

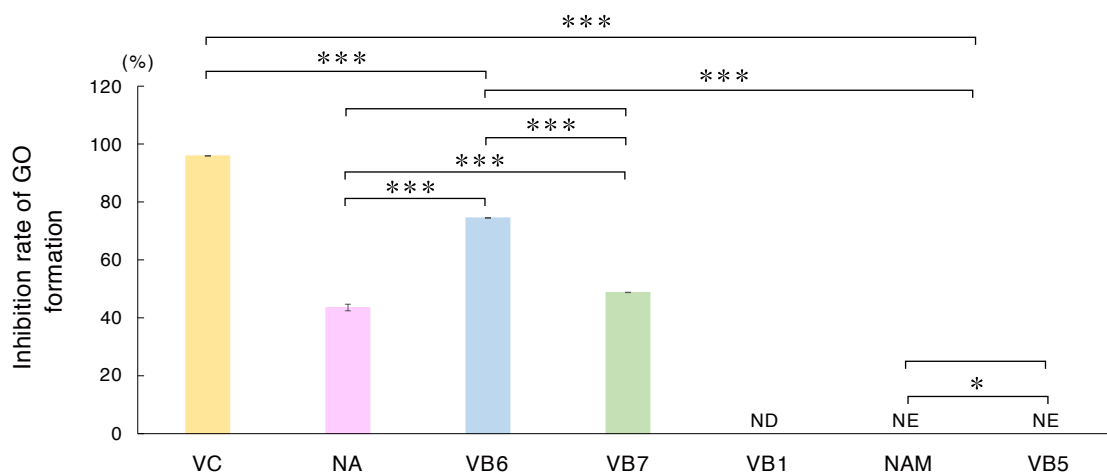


Fig. 8. Inhibition rate of GO formation.

Results are expressed as mean \pm standard deviation, $n = 3$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Tukey's multiple comparison test. Final concentration of each sample: 0.04 mol/L. GO, glyoxal; ND, not determined; NE, no effect; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

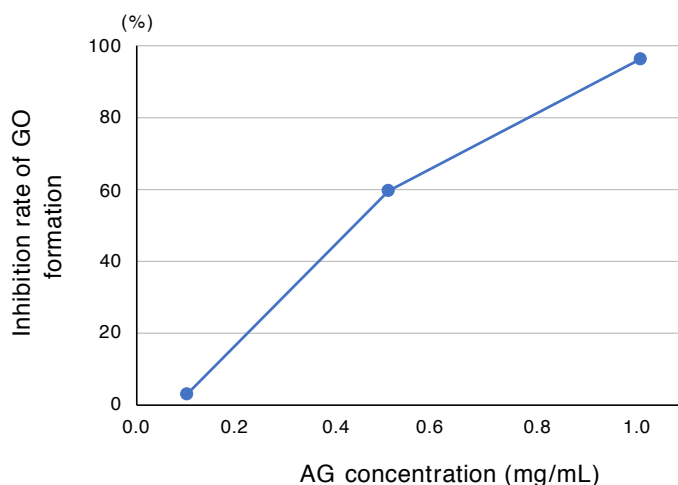


Fig. 9. Inhibition rate of GO formation by AG.

GO, glyoxal; AG, aminoguanidine.

Methylglyoxal(MGO) 生成抑制作用

水溶性ビタミン類7種類のMGO生成抑制率をTable 5及びFig. 10に示した。

VCは、MGO生成抑制率が80%以上であり、極めて強いMGO生成抑制作用を有していた。また、VCは、本研究で対象とした他の水溶性ビタミン類6種類(NA、VB6、VB7、VB1、NAM、VB5)より、MGO生成抑制率が有意に高かった($p < 0.001$)。

NA、VB6、及びVB7は、MGO生成抑制率が40%以上60%未満であり、中程度のMGO生成抑制作用を有していた。一方で、VB1、NAM、及びVB5は、MGO生成抑制率が10%未満であり、MGO生成抑制作用を有していなかった。

なお、VCのMGO生成抑制率は、AG (1.0 mg/mL) より高い値であった(Fig. 11)。

4. アルデヒドトラップ作用

水溶性ビタミン類7種類の3DGトラップ率をFig. 12、GOトラップ率をFig. 13、MGOトラップ率をFig. 14に示した。VB6及びNAMは、3DGトラップ率が10%以上であった。VB6、VB1、及びNAMは、GOトラップ率が10%以上であった。NA及びVB7は、MGOトラップ率が5%以上であった。

5. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) ラジカル消去活性

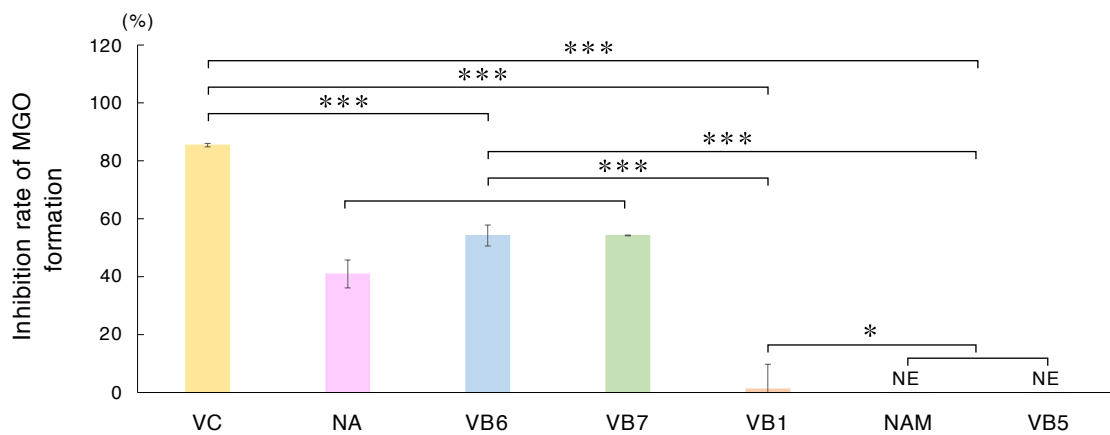
水溶性ビタミン類7種類のDPPHラジカル消去活性をFig. 15に示した。

水溶性ビタミン類7種類のうち、NA、VB7、及びVB5は、DPPHラジカル消去活性が低く、濃度依存性がみられなかったため、本研究の実験系では測定困難とした。

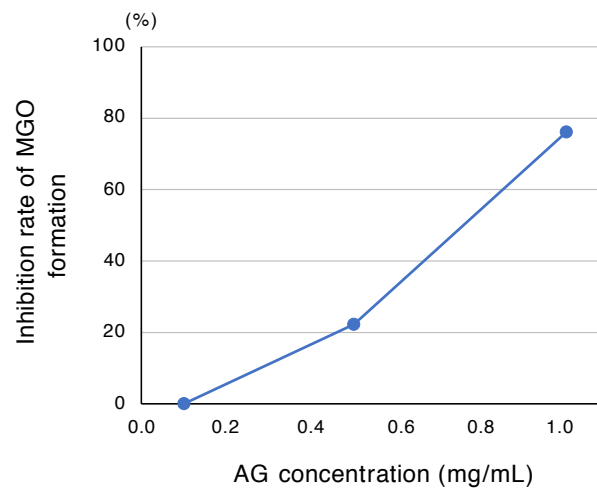
Table 5. Inhibition rate of MGO formation.

Sample	Inhibition rate of MGO formation [%]	Sample Glucose (+) [ng/mL]	Sample Glucose (-) [ng/mL]	Reference Glucose (+) [ng/mL]	Reference Glucose (-) [ng/mL]
VC	85.44 ± 0.59	0.07 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.12 ± 0.00	-0.09 ± 0.00
NA	40.94 ± 4.82	0.10 ± 0.01	-0.08 ± 0.01	0.21 ± 0.00	-0.09 ± 0.00
VB6	54.22 ± 3.62	0.00 ± 0.01	-0.09 ± 0.00	0.12 ± 0.00	-0.09 ± 0.00
VB7	54.25 ± 0.14	0.05 ± 0.00	-0.09 ± 0.00	0.21 ± 0.00	-0.09 ± 0.00
VB1	1.20 ± 8.55	0.26 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.12 ± 0.00	-0.09 ± 0.00
NAM	-15.57 ± 0.29	0.15 ± 0.00	-0.09 ± 0.00	0.12 ± 0.00	-0.09 ± 0.00
VB5	-15.37 ± 0.33	0.15 ± 0.00	-0.09 ± 0.00	0.12 ± 0.00	-0.09 ± 0.00

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. MGO, methylglyoxal; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, -D-pantothenate.

**Fig.10. Inhibition rate of MGO formation.**

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3. * p < 0.05, *** p < 0.001, Tukey's multiple comparison test. Final concentration of each sample: 0.04 mol/L. MGO, methylglyoxal; NE, no effect; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

**Fig.11. Inhibition rate of MGO formation by AG.**

MGO, methylglyoxal; AG, aminoguanidine.

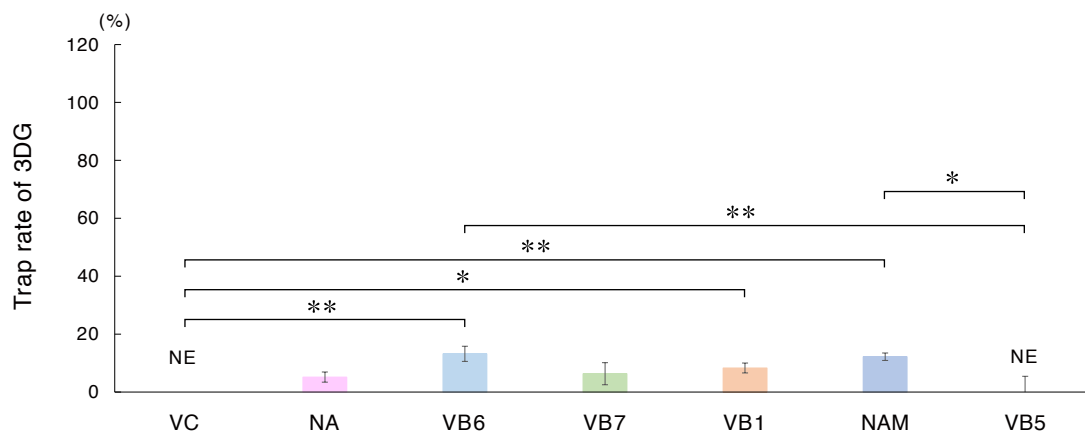


Fig. 12. 3DG trap effects.

Results are expressed as mean \pm standard deviation, $n = 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's multiple comparison test. 3DG, 3-deoxyglucosone; NE, no effect; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

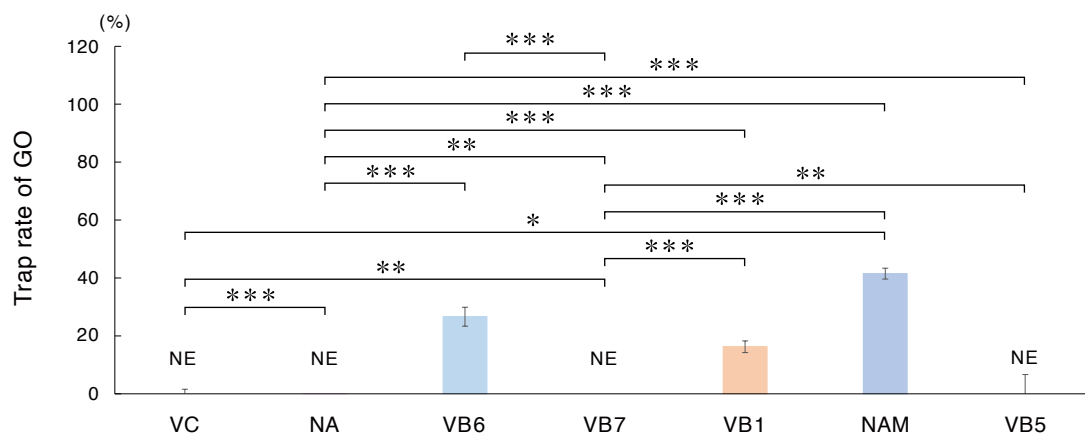


Fig. 13. GO trap effects.

Results are expressed as mean \pm standard deviation, $n = 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's multiple comparison test. GO, glyoxal; NE, no effect; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

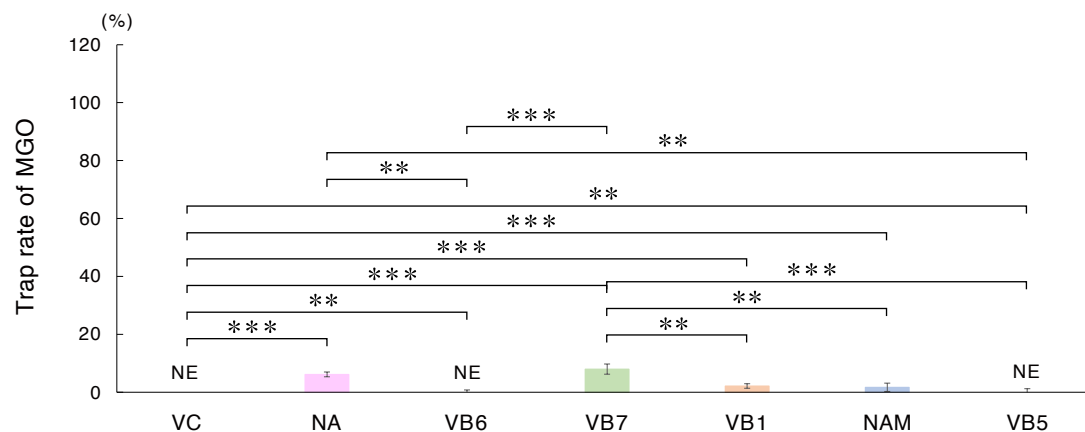


Fig. 14. MGO trap effects.

Results are expressed as mean \pm standard deviation, $n = 3$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's multiple comparison test. MGO, methylglyoxal; NE, no effect; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

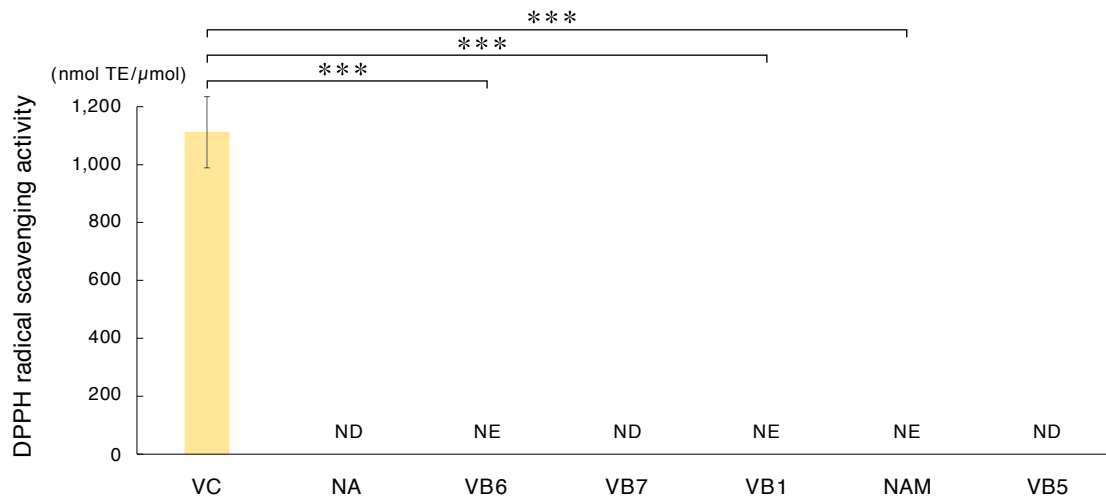


Fig. 15. DPPH radical scavenging activity.

Results are expressed as mean \pm standard deviation, $n = 3$. *** $p < 0.001$, Tukey's multiple comparison test. DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; NE, no effect; ND, not determined; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

残りの水溶性ビタミン類4種類のDPPHラジカル消去活性は、降順に、VC、VB1、NAM、VB6であった。また、VCのDPPHラジカル消去活性は、VB6、VB1、及びNAMのDPPHラジカル消去活性より、1,000倍以上有意に高い値であった ($p < 0.001$)。

考察

1. 抗糖化作用及び抗酸化作用の有無による群分け

本研究では、水溶性ビタミン類7種類 (VC、NA、VB6、VB7、VB1、NAM、VB5) の抗糖化作用及び抗酸化作用を検証した。その結果、本研究で対象とした水溶性ビタミン類7種類は、蛍光性AGEs、ペントシジン、3DG、GO、及びMGOに対する各生成抑制作用、並びにDPPHラジカル消去活性の有無により4つの群に分類された (Table 6)。

第1群は、蛍光性AGEs生成抑制作用、ペントシジン生成抑制作用、GO生成抑制作用、MGO生成抑制作用、及びDPPHラジカル消去活性を有している群。第2群は、蛍光性AGEs生成抑制作用、ペントシジン生成抑制作用、GO生成抑制作用、及びMGO生成抑制作用を有している群。第3群は、蛍光性AGEs生成抑制作用のみを有している群。第4群は、全て有していない群である。つまり、本研究の結果から、水溶性ビタミン類は種類により、抗糖化作用及び抗酸化作用の有無、並びに抗糖化作用の作用機序が異なる可能性が示唆された。

糖化反応抑制作用及びAGEs生成抑制作用をはじめとする抗糖化作用は、主に6つの作用機序に大別され、1. 抗酸化作用 (糖化初期に生成される活性酸素種を消去し、酸化による糖化反応の促進及び反応性カルボニル化合物やジ

カルボニル化合物の生成を抑制する)、2. カルボニル補足作用 (還元糖、シッフ塩基、或いはアマドリ化合物などのカルボニル基又はジカルボニル基と結合して付加体を形成し、糖とタンパク質の架橋形成を阻害する)、3. 金属イオンキレート作用 (糖化反応の促進及びAGEs生成に関与する遷移金属イオンをキレートし、糖化反応及びAGEsの生成を抑制する)、4. 後期アマドリ化合物生成抑制作用 (アマドリ中間体からAGEsへの生成を阻害し、架橋構造及びヘテロ環化合物の生成を抑制する)、5. AGEs架橋切断作用 (既に形成されたAGEsの架橋結合を切断し、AGEsの機能的影響を減少させる)、6. RAGE遮断作用 (AGEs受容体との結合を妨げ、細胞内での酸化ストレスや炎症反応の発生を抑制する) に起因するとされている³⁶⁾。なお、上記の文献では、抗酸化作用により、糖化初期に生成されるヒドロキシラジカルやスーパーオキシドラジカルが消去されることで、反応性カルボニル化合物やジカルボニル化合物の生成を抑制するとされているが、この現象は、反応温度が高い *in vitro* 実験系では生じる可能性があるが、生体内でも同様の現象が生じるかは不明である³⁶⁾。一方で、抗酸化作用は、脂肪酸の酸化による脂質由来アルデヒドの生成を減少させる上では非常に重要であると推測する。

上記6つの作用機序のうち、1-4の作用機序は、主に自然食品が有する作用機序であり、5と6の作用機序は、医薬品などの薬理的抑制戦略に用いられる一部の作用機序とされている³⁶⁾。上述したように、本研究の結果から、水溶性ビタミン類は種類により、抗糖化作用の作用機序が異なる可能性が示唆された。従って、本研究で対象とした水溶性ビタミン類7種類は、主に1、2、3、及び4の機序を中心として、各ビタミン類固有の抑制作用の機序を有していると推測する。

Table 6. Anti-glycation and antioxidant activities of water-soluble vitamins tested.

Group	Sample	Fluorescent AGE inhibition	Pentosidine inhibition	3DG inhibition	GO inhibition	MGO inhibition	DPPH scavenging
1	VC	+	+	—	+	+	+
	VB6	+	+	—	+	+	—
2	NA	+	+	—	+	+	—
	VB7	+	+	—	+	+	—
3	VB1	+	—	—	—	—	—
	NAM	—	—	—	—	—	—
4	VB5	—	—	—	—	—	—

"+" indicates an inhibition rate of 40 % or more, meaning that it has an inhibition effect. "—" indicates an inhibition rate of 40 % or less, meaning that it has no inhibition effect. In this table, the water-soluble vitamins are arranged in descending order according to the number of inhibitory actions that achieve a suppression rate of 40 % or higher. AGEs, advanced glycation endproducts; 3DG, 3-deoxyglucosone; GO, glyoxal; MGO, methylglyoxal; DPPH, 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl; VC, L(+)-ascorbic acid; NA, nicotinic acid; VB6, pyridoxine; VB7, D-biotin; VB1, vitamin B1 hydrochloride; NAM, nicotinamide; VB5, D-pantothenate.

2. 抗糖化作用の作用機序の推定

L(+)- アスコルビン酸 (VC)

VCは、極めて強い蛍光性AGEs、ペントシジン、GO、及びMGO生成抑制作用を有していた。また、強い抗酸化作用を有していた。

糖化は酸化により促進されるため、ポリフェノールをはじめとする抗酸化能を有する物質は、酸化を抑制することで糖化を抑制する作用を有することが示されている³⁶⁾。VCは、多数のヒドロキシ基に起因する強い抗酸化作用を有することが示されており、本研究の結果でも強い抗酸化作用が認められた。また、VCは、カルボニル捕捉作用を有することが示されている²⁷⁾。

従って、VCは、強い抗酸化作用やカルボニル補足作用が主となり、AGEs生成を抑制することで、抗糖化作用を示す可能性が示唆された。

ピリドキシン塩酸塩 (VB6)

VB6は、強い蛍光性AGEs及びGO生成抑制作用、極めて強いペントシジン生成抑制作用、及び中程度のMGO生成抑制作用を有していた。一方で、VB6は、VCに匹敵する強い抗酸化作用を有していなかった。

ビタミンB6の一種であるピリドキサミンは、分子内に存在する求核性の官能基によるカルボニル補足作用、並びに、分子内に存在するヒドロキシ基、アミノ基、及びピリジン環の窒素が銅や鉄などの遷移金属イオンと強固な錯体を形成して、金属イオンが触媒する酸化反応を抑制することによる金属イオンキレート作用などに起因する抗糖化作用を有することが示されている²²⁾。VB6(ピリドキシン塩酸塩)は、分子内に求核性の官能基であるヒドロキシ基やピリジン環を有するため、ピリドキサミンと同様にカルボニル補足作用及び金属イオンキレート作用を有する可能性が高いと推測する。

従って、VB6は、直接的な抗酸化作用は示さないが、カルボニル補足作用や金属イオンキレート作用が主となり、

AGEs生成を抑制することで、抗糖化作用を示す可能性が示唆された。

ニコチン酸 (NA) 及びD-ビオチン (VB7)

NA及びVB7は、強い蛍光性AGEs生成抑制作用、極めて強いペントシジン生成抑制作用、中程度のGO及びMGO生成抑制作用を有していた。一方で、NA及びVB7は、VCに匹敵する強い抗酸化作用を有していなかった。

先行研究より、ピリドキサミンやポリフェノール類において、直接的な抗酸化能を示さない物質でも、カルボニル捕捉作用や金属イオンキレート作用に起因した抗糖化作用を有することが示されている^{22,37)}。つまり、同様の作用機序がNA及びVB7にも適用できる可能性があると推測する。

本研究の結果では、NA及びVB7は、抗酸化作用についてはDPPHラジカル消去活性が低く測定困難であったが、蛍光性AGEs、ペントシジン、GO、及びMGOに対して、中程度以上の生成抑制作用を有していた。

従って、NA及びVB7は、直接的な抗酸化作用は示さないが、カルボニル補足作用や金属イオンキレート作用が主となり、AGEs生成を抑制することで、抗糖化作用を示す可能性が示唆された。

ビタミンB1塩酸塩 (VB1)

VB1は、強い蛍光性AGEs生成抑制作用を有していた。一方で、VB1は、VCに匹敵する強い抗酸化作用を有していなかった。また、VB1のペントシジン生成抑制率は-1341.65%、GO生成抑制率は181.26%であり、その他の生成抑制率においても数値に大きなばらつきがみられた。

本研究では、各生成抑制率はEquation 1に基づいて算出した。すなわち、試料の影響によりSample Glucose (+)の値が高くなり、((Sample Glucose (+) - Sample Glucose (-))が著しく高い値になるなど、Referenceとの差に対する比率が1を超えた場合、計算上の生成抑制率は0%以下の

値となる。また、試料の影響により Sample Glucose (–) の値が高くなり、(Sample Glucose (+) – Sample Glucose (–)) が負の値となった場合、計算上の生成抑制率は100 %以上の値となる。つまり、得られた生成抑制率が0 %以下或いは100 %以上の値の場合、実際の抑制作用を正確に反映しているとは言えず、試料由来の影響を考慮する必要がある。

本研究では、VB1のペントシジンのピーク面積値は、Referenceのペントシジンのピーク面積値より、約14倍高い値であった。また、VB1のGOのピーク面積値は、Sample Glucose (+)よりSample Glucose (–)の方が高い値であった。従って、VB1のペントシジン生成抑制率は–1341.65%、GO生成抑制率は181.26 %となった。つまり、本研究の実験系において、VB1は、ペントシジンやGOの生成、或いは、ペントシジンやGOと類似したピーク面積値を示す物質の生成を誘発した可能性が示唆された。

以上の結果から、先行研究において、ビタミンB1は抗糖化作用を有するとされているが、本研究の実験系では、VB1のペントシジン及びGO生成抑制作用を正確に評価するには至らず、VB1の抗糖化作用については、本研究の実験系におけるVB1の影響を考慮し、再検証する必要があると考える²³⁻²⁶⁾。

ニコチンアミド (NAM)

及び D-パントテン酸ナトリウム (VB5)

NAM及びVB5は、蛍光性AGEs、ペントシジン、3DG、GO、及びMGO、全てに対する生成抑制作用、並びにVCに匹敵する強い抗酸化作用を有していなかった。従って、NAM及びVB5は、単独では十分な抗糖化作用を有していない可能性が示唆された。

一方で、実際の生体内では、単独の物質では抗糖化作用を示さないが、他の成分との相乗効果により抗糖化作用が示される例もあるため、NAM及びVB5においても、他の因子との組み合わせにより、抗糖化作用を示す可能性が

ある¹¹⁾。従って、NAM及びVB5の抗糖化作用については、他の因子を考慮した実験系や *in vivo* での検証を行い、総合的に判断する必要があると考える。

3. アルデヒドトラップ作用

本研究で対象とした水溶性ビタミン類7種類については、アルデヒドトラップ作用と各種生成抑制作用には関連がみられなかった。一方で、3DGトラップ作用についてはVB6及びNAMが10 %以上、GOトラップ作用についてはVB6が20 %以上、NAMが40 %以上のトラップ率を示した。従って、これらの値の意義については、今後、検討する必要があると考える。

結語

本研究で対象とした水溶性ビタミン類7種類 (VC、NA、VB6、VB7、VB1、NAM、VB5) は、蛍光性AGEs、ペントシジン、3DG、GO、及びMGOに対する各生成抑制作用、並びにDPPHラジカル消去活性の有無により4つの群に分類され、水溶性ビタミン類は種類により、抗糖化作用の作用機序が異なる可能性が示唆された。

謝辞

本研究の結果の一部は、第25回日本抗加齢医学会総会 (2025年6月13日–15日、大阪) で発表した。

Z

利益相反申告

本研究に関して、開示すべき利益相反はない。

参考文献

- 1) Ogura M, Yagi M, Sakiyama C, et al. The function of amino acid mix foods in women with skin aging concerns: An exploratory study. *Glycative Stress Res.* 2025; 12: 39-54.
- 2) Yonei Y, Yagi M, Sato K, et al. Glycative stress: Molecular impacts and defense mechanisms. *Glycative Stress Res.* 2023; 10: 145-158.
- 3) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 1. What is glycative stress? *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 152-155.
- 4) Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, et al. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. *Anti-Aging Medicine.* 2010; 7: 112-119.
- 5) Rungratanawanich W, Qu Y, Wang X, et al. Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury. *Exp Mol Med.* 2021; 53: 168-188.
- 6) 八木雅之, 高部稚子, 石崎 香, 他. 糖化ストレスと抗糖化作用の評価. *Oleosience.* 2018; 18: 67-73.
- 7) Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986; 232: 1629-1632.
- 8) Bolton WK, Catran DC, Williams ME, et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2004; 24: 32-40.

- 9) Matsuda H, Wang T, Managi H, et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg Med Chem.* 2003; 11: 5317-5323.
- 10) Wu CH, Yen GC. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 3167-3173.
- 11) Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Prevention of protein glycation by natural compounds. *Molecules.* 2015; 20: 3309-3334.
- 12) Chinchansure AA, Korwar AM, Kulkarni MJ, et al. Recent development of plant products with anti-glycation activity: A review. *RSC Adv.* 2015; 5: 31113-31138.
- 13) Otake Kenichiro, Yagi M, Takabe W, et al. Effect of tea (*Camellia sinensis*) and herbs on advanced glycation endproduct formation and the influence of post-fermentation. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 156-162.
- 14) Hori M, Yagi Y, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Medicine.* 2012; 9: 135-148.
- 15) Ishioka Y, Yagi M, Ogura M, et al. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advanced glycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 22-34.
- 16) Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. *Anti-Aging Medicine.* 2013; 10: 70-76.
- 17) 太田好次. ビタミン総論. *Farumashia.* 2015; 51:187-192.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/faruawpsj/51/3/51_187/_pdf
- 18) Onorato JM, Jenkins AJ, Thorpe SR, et al. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of pyridoxamine. *J Biol Chem.* 2000; 275: 21177-21184.
- 19) Metz TO, Alderson NL, Thorpe SR, et al. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: A novel therapy for treatment of diabetic complications. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 419: 41-49.
- 20) Williams ME, Bolton WK, Khalifah RG, et al. Effects of pyridoxamine in combined Phase 2 Studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy. *Am J Nephrol.* 2007; 27: 605-614.
- 21) Chen JL, Francis J. Pyridoxamine, advanced glycation inhibition, and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23: 6-8.
- 22) Ramis R, Ortega-Castro J, Caballero C, et al. How does pyridoxamine inhibit the formation of advanced glycation end products? The role of its primary antioxidant activity. *Antioxidants (Basel).* 2019; 8, 334.
- 23) Hammes HP, DU X, Edelstein D, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med.* 2003; 9: 294-299.
- 24) Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, et al. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. *Acta Diabetol.* 2008; 45: 131-141.
- 25) Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, et al. The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacol Res.* 2010; 61: 482-488.
- 26) Abdullah KM, Arefeen A, Shamsi A, et al. Insight into the *in vitro* antiglycation and *in vivo* antidiabetic effects of thiamine: Implications of VB1 in controlling diabetes. *ACS Omega.* 2021; 6, 12605-12614.
- 27) Vinson JA, Howard TB III. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J Nutr Biochem.* 1996; 7, 659-663.
- 28) Hori M, Yagi M, Komoto K, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Medicine.* 2012; 9: 125-134.
- 29) Yagi M, Isshiki K, Takabe W, et al. Measurement of pentosidine in human plasma by the high performance liquid chromatography. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 119-128.
- 30) Scheijen JL, van de Waarenburg MP, Stehouwer CD, et al. Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877: 610-614.
- 31) Kusunoki H, Miyata S, Ohara T, et al. Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy. *Diabetes Care.* 2003; 26: 1889-1894.
- 32) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging; 2. The Evaluation of Glycative Stress: Measurement of blood glucose, glycated proteins and intermediates. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 205-209.
- 33) Sakiyama C, Yagi M, Komatsu T, et al. Aldehyde trap effect of amino acids on endogenous aldehydes. The 31st Meeting of Society of Glycative Stress Research, September 6, 2025, Kyoto. (abstract in Japanese)
- 34) Oki T, Osame M, Masuda M, et al. Simple and rapid spectrophotometric method for selecting purple-fleshed sweet potato cultivars with a high radical-scavenging activity. *Breed Sci.* 2003; 53: 101-107.
- 35) Oki T, Masuda M, Furuta S, et al. Radical scavenging activity of fried chips made from purple-fleshed sweet potato. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 2001; 48: 926-932.
https://www.researchgate.net/publication/276213214_Radical_Scavenging_Activity_of_Fried_Chips_made_from_Purple-Fleshed_Sweet_Potato
- 36) Wu CH, Huang SM, Lin JA, et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct.* 2011; 2, 224-234.
- 37) Pashikanti S, de Alba DR, Boissonneault GA, et al. Rutin metabolites: Novel inhibitors of nonoxidative advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48, 656-663.