

*Original article***Measurement of pentosidine in human plasma by the high performance liquid chromatography**

Masayuki Yagi, Kana Isshiki, Wakako Takabe, Kaori Ishizaki, Yoshikazu Yonei

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

Glycative Stress Research 2018; 5 (2): 119-128

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるヒト血漿中ペントシジンの測定

八木雅之、一色香那、高部稚子、石崎 香、米井嘉一

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

抄録

【目的】 糖化ストレス評価法として血中の成分を正確でかつ操作し易い測定法がない。本研究では血漿中の糖化最終生成物 (advanced glycation end product; AGEs) の一つであるペントシジンの測定方法として、クエン酸を溶離液とした逆相 HPLC 法により測定する方法 (クエン酸 HPLC 法) を最適化することを目的とした。

【方法】 HPLC には逆相カラムを使用し、カラム温度による分離の改善、サンプルの前処理条件、添加回収率を検討した。その後、最適化した測定系を用いて、20 ~ 90 歳代のアンチエイジングドック (Anti-Aging Medical Checkup) 受診者 83 名の血漿ペントシジン濃度を測定し、年齢、各種評価マーカーとの関係から測定の有用性を検証した。

【結果】 血漿の前処理方法には、水素化ホウ素ナトリウム処理の後、トリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿による蛋白精製後、無鉄塩酸で加水分解する方法が最適であった。HPLC のカラム温度は 20°C で、ペントシジンが血漿中のマイナーピークと分離した。最適化したクエン酸 HPLC 法のペントシジン添加回収率は 91.8 ~ 109.7% で良好であった。アンチエイジングドック受診者の血漿ペントシジン濃度は、年齢、HbA1c、皮膚 AGEs と正の相関性、DHEA-s、超音波骨強度測定器による踵骨スティフネス値と負の相関性が認められた。

【結論】 クエン酸 HPLC 法による血漿ペントシジンの測定方法を最適化した。本方法による血漿ペントシジン測定値は、加齢および糖化ストレスの指標となり得ると考えられた。

KEY WORDS: 糖化ストレス評価法、糖化最終生成物 (advanced glycation end product : AGEs)、ペントシジン、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

はじめに

生体内で蛋白とグルコースが非酵素的に反応すると、組織内には糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs) が生成、蓄積する^{1,2)}。AGEsの生体内での蓄積は、糖尿病、炎症、動脈硬化などの発症、進展に関与している。このため AGEsの生体への影響は糖化ストレス (glycative stress) とよばれる³⁾。生体内に存在する AGEs には様々な種類がある。このうちペントシジン (pentosidine) は、分子量が 379 で、分子内にリジン残基、アルギニン残基およびイミダゾピリジニウム環 (imidazopyridinium ring) を持ち、蛍光性 (励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm) かつ蛋白架橋性を有する AGEs の一種である⁴⁾。

ペントシジンはヒトの滑膜や軟骨⁵⁾、皮膚コラーゲン^{3,5,6)}などに存在し、加齢により組織に蓄積することが知られている。また、糖尿病患者⁷⁾、慢性腎不全患者^{3,6,8)}、関節リウマチ患者^{1,6)}などの血中ペントシジン濃度は高いことが報告されている。さらに、血中のペントシジン濃度が高いと冠動脈疾患の発症や進行につながると考えられている⁹⁾。骨コラーゲン中ペントシジンの蓄積は骨質の低下に関与するため、骨折リスクと関連する¹⁰⁾。このためペントシジンは糖尿病の合併症や腎不全などのバイオマーカーとしての応用が研究されている^{2,7,11)}。このように生体の糖化ストレス評価を目的に血中ペントシジンを定量することは非常に大きな意義がある。

生体の糖化ストレス評価を行うためには、正確でかつ操作しやすい測定法の準備が必要である。現在、血中ペントシジンの測定方法はいくつかあるものの、さまざまな課題がある。例えば現在ヒト血中ペントシジン測定用に販売されている酵素免疫測定法 (enzyme-linked immuno sorbent assay; ELISA) による測定キット¹²⁾は、前処理段階において加熱処理があるため、熱処理によって人為的に生成したペントシジンの影響により、測定値が高値化する可能性がある^{13,14)}。また、血液サンプルを加水分解した後、イオン交換カラムで夾雑物を除去し、サンプルをイオンペア法による高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC) で測定する方法 (イオンペア HPLC 法)^{15,16,17)}は、実験操作が煩雑でサンプルの前処理において長い時間が必要であり、測定値がサンプル回収率の影響を受け易い。一方、血液サンプルを加水分解の後、クエン酸を溶離液とした逆相 HPLC 法によりペントシジンを測定する方法 (クエン酸 HPLC 法)¹⁸⁾は、前処理時のカラム精製が不要なため、測定時間の短縮、サン

プル回収率の安定化による分析精度向上の可能性がある。

本研究では生体の糖化ストレス評価法の一つとして、クエン酸 HPLC 法による血漿ペントシジン測定法を最適化することを目的に、サンプル前処理、カラム温度による分離の改善、添加回収率を検討した。さらに最適化した測定系を用いて、20～90歳代のアンチエイジングドック受診者の血漿ペントシジン濃度を測定し、年齢や各種評価マーカーとの関係から測定の有用性を検証した。

方法

試薬

ペントシジンの標準物質には Polypeptide Laboratories France 社 (Strasbourg, France) の pentosidine- TFA salt を使用した。イオンペア HPLC 法のイオンペア試薬にはヘプタフルオロ酢酸 (heptafluorobutyric acid; HFBA) (Sigma-Aldrich Japan、東京都目黒区) を使用した。血液サンプルの加水分解には 35% 塩酸 (和光純薬工業、大阪府大阪市) または無鉄塩酸 (hydrochloric Acid (35%), Fe free; ナカライテスク、京都府京都市) を使用した。アセトニトリル (acetonitrile; ACN)、メタノール (methanol; MeOH) は HPLC 用を使用した。*in vitro* 糖化蛋白の作成にはヒト血清アルブミン (human serum albumins, lyophilized powder, ≥ 96% (agarose gel electrophoresis); HSA) (Sigma-Aldrich Japan、東京都目黒区) を使用した。その他の試薬は特級グレードのものを和光純薬工業 (大阪府大阪市) から購入して使用した。

装置

測定には HPLC Prominence システム (on-line degassing unit; DGU20A3, pump unit with low-pressure gradient unit; LC20AT, auto-sampler; SIL20AC, column oven; CTO20AC, fluorescence detector; RF20Axs) およびデータ解析システム (LC solution; 島津製作所、京都府京都市) を使用した。試料の蒸発乾固には遠心エバポレーター (CC-105; トミー精工、東京都練馬区) を使用した。サンプルの加水分解時の加熱にはブロックインキュベーター (BI-516S; Astec、福岡県糟屋郡) を使用した。試料の溶解、分散、懸濁には超音波洗浄機 (VS-150; As one、大阪府大阪市) を使用した。

カラム

HPLC 測定用のカラムは Cadenza CD-C18 (3 μ m, 75 $\times$ 4.6 mm I.D) または Unison US-C18 (5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm I.D) (Imtakt、京都府京都市) を使用した。

in vitro 糖化 HSA

In vitro 糖化 HSA (G-HSA) は既報の通り¹⁹⁾、40 mg/mL HSA、2.0 mol/L glucose、100 mmol/L リン酸緩衝液 (PBS) (pH 7.4) を 2 : 1 : 7 の比率で混合し、60℃、40 時間反応させて作成した。

ヒト血漿サンプル

ヒト血漿サンプルは同志社大学抗加齢医学研究室が実施したアンチエイジングドック (Anti-Aging Medical Checkup) 受診者に、試験の説明を行い、同意が得られた男女 83 名 (男性 37 名、女性 46 名、20 ~ 90 歳代; 59.9 $\pm$ 21.4 歳) の肘静脈から採血して使用した。

イオンペア HPLC 法によるペントシジン測定条件

イオンペア HPLC によるペントシジン測定条件 (イオンペア HPLC 法) は既法の通り¹⁶⁾、カラム: Cadenza CD-C18、溶離液: ACN / MeOH / water / HFBA (16 / 4 / 76 / 0.2)、流速: 1.0 mL/min、カラム温度: 30℃、蛍光検出 (励起波長 [excitation wavelength; ex] 335 nm、検出波長 [emission wavelength; em] 385 nm)、サンプル注入量: 20 μ L とした。イオンペア HPLC 法による血漿中ペントシジンの測定は LSI メディエンス (東京都千代田区) に依頼した。

クエン酸 HPLC 法によるペントシジン測定条件

クエン酸を溶離液とした逆相 HPLC を用いてペントシジンを測定する方法 (クエン酸 HPLC 法) の測定条件を最適化するために、カラム温度とサンプルの前処理条件を検討した。HPLC カラムには Cadenza CD-C18、Unison US-C18 の 2 種類を使用した。その他の HPLC 測定条件は、溶離液: 100 mmol/L クエン酸 / ACN (99.5 / 0.5)、流速: 1.0 mL/min、検出: 蛍光 (励起波長 335 nm、検出波長 385 nm)、サンプル注入量: 20 μ L とした。

前処理条件の検討は、血液サンプルの水素化ホウ素ナトリウムによる前処理時の高値化防止処理 (前処理 A)²⁰⁾、トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid; TCA) による蛋白沈殿処理 (前処理 B)、塩酸による加水分解処理 (前処理 C)、無鉄塩酸による加水分解処理 (前処理 D) を実施した。詳細については以下に示した。

前処理 A ; サンプル 50 μ L、蒸留水 25 μ L、200 mmol/L 水素化ホウ素ナトリウム溶液 (pH 9.2) 250 μ L を混合し、30 分以上室温に静置した。

前処理 B ; サンプル 50 μ L、蒸留水 275 μ L を加え、20% TCA 1.0 mL を混合し、十分に攪拌後、15 分間水冷し、遠心分離を行った (4,500 $\times$ g、10

分、4℃)。その後、上清を除去し、残った沈殿物に 5% TCA を 1.0 mL 加え遠心分離した。その後、上清を除去し、残った沈殿物に蒸留水 100 μ L を添加し、超音波洗浄機内で 1 分間、固形物を分散懸濁させた。

前処理 C ; サンプル 50 μ L、蒸留水 50 μ L を混合し、6 N 塩酸 100 μ L を加えた。

前処理 D ; サンプル 50 μ L、蒸留水 50 μ L を混合し、6 N 無鉄塩酸 100 μ L を加えた。

前処理 A, B を実施した後のサンプル溶液には 6 N 塩酸 100 μ L 加え、前処理 C, D を実施したサンプル溶液はそのまま、105℃ で 18 時間ブロックインキュベーターを用いて加温し、加水分解した。加水分解後のサンプルは遠心エバポレーター を用いて 4 時間 (加温なし) で蒸発乾固した。乾固物はクエン酸 HPLC 法の溶離液 400 μ L で分散懸濁し、遠心分離 (13,200 $\times$ g、10 分間、4℃) した後の上清を HPLC 測定サンプルとして使用した。

統計解析

ペントシジンの測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。測定値の群間比較には 2 群の場合マンホイットニーの U 検定 (Mann-Whitney U test)、3 群以上の場合テューキーの多重比較検定 (Tukey's test) を用いた。測定値間の相関性解析にはピアソンの積率相関係数を用いた。相関性は $0.4 < |r| \leq 1.0$ を相関性あり、 $0.2 < |r| \leq 0.4$ を弱い相関性ありとした。統計解析結果は危険率 5% 未満を有意とした。

倫理基準

本研究はヘルシンキ宣言 (2004 年東京総会で注釈追加) に基づく倫理原則及び個人情報保護法を遵守し、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (GCP)」(平成 9 年 3 月 27 日厚生省令第 28 号) 並びに厚生労働省・文部科学省の「疫学研究に関する倫理指針」を参考にして実施した。本研究は同志社大学「人を対象とする研究」に関する倫理審査委員会を開催し、試験の倫理性及び妥当性について審議を行い、承認のもとに実施した (申請番号: 14089)。

結果

イオンペア HPLC 法とクエン酸 HPLC 法によるペントシジン標準物質の測定比較

測定には使用する HPLC カラムを Cadenza CD-C18 とし、イオンペア HPLC とクエン酸 HPLC 法で 9 濃度 (0.00625 ng/mL, 0.0125 ng/mL, 0.025 ng/mL, 0.05 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.25 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1.0 ng/mL, 2.0 ng/mL) のペントシジン標準液のピーク面積値を測定した。サンプル注入量は 20 μ L とし、各濃度 3 回測定した。クエ

ン酸 HPLC 法におけるカラム温度は 20℃とした。

イオンペア HPLC 法により測定したペントシジン標準液の各濃度のピーク面積値の変動係数 (coefficient of variation; CV) 値は、0.0125 ~ 2.0 ng/mL まで 5% 未満であった。しかし、0.00625 ng/mL では CV 値が 25% 以上に増加した。ペントシジンのピーク高さの signal / noise (S/N) 比は、0.00125 ng/mL で 7.4 あり、0.00625 ng/mL で 3.0 になって 2.5 倍低下した。ペントシジンのピーク面積とペントシジン濃度は 0.00125 ~ 2.0 ng/mL まで良好な直線性を示した ($y = 13771x + 282.23$, $r = 0.999$, $p < 0.001$)。このときの定量検量線範囲は 0.0125 ~ 2.0 ng/mL であった。

クエン酸 HPLC 法ではペントシジン濃度が 0.0125 ~ 2.0 ng/mL で、CV 値が 5% 未満であった。しかし 0.00625 ng/mL では S/N 比が 2.2 となり、検出下限であった。ペントシジン濃度 0.0125 ng/mL の S/N 比は 5.2 であった。ペントシジンのピーク面積とペントシジン濃度は 0.0125 ~ 2.0 ng/mL で良好な直線性を示した ($y = 13150x + 918.87$, $r = 1.000$, $p < 0.001$)。このときの定量検量線範囲は 0.0125 ~ 2.0 ng/mL であった。

9 濃度のペントシジン標準液のイオンペア HPLC 法とクエン酸 HPLC 法によるピーク面積測定値は良好な直線相関関係 ($y = 1.047x - 585.35$, $r = 0.999$, $p < 0.01$) を示した (Fig. 1)。また、近似直線相関式は、傾き 1.047、切片 585.35 で、クエン酸 HPLC 法の定量下限である 0.0125 ng/mL のピーク面積 (3397) よりも小さかった。

よって同濃度のペントシジンはイオンペア HPLC 法とクエン酸 HPLC 法で、ほぼ同じ面積値として測定できることがわかった。

クエン酸 HPLC 法による血漿中ペントシジン測定条件の最適化

1) サンプル前処理方法の検討

20 歳代の健康な女性の血漿サンプルを使用し、サンプルの水素化ホウ素ナトリウムによる前処理時の高値化防止処理、TCA による蛋白沈殿処理、塩酸による加水分解処理、無鉄塩酸による加水分解処理について比較した (Table 1)。

水素化ホウ素ナトリウム処理を行った時 (前処理 A) と処理を行なわなかった時 (前処理 B) のピーク面積は、A の方が B よりも 1.3 倍大きかった。また、加水分解処理に塩酸を使用した時 (前処理 C) と無鉄塩酸を使用した時 (前処理 D) のピーク面積は、C が D よりも 1.1 倍大きかった。しかし、その差は有意でなかった。ペントシジンのピーク面積値の変動係数 (CV) 値は D が最も小さかった。

TCA 処理を行った時 (A, B) と、TCA 処理を行わなかった時 (C, D) のクロマトグラムを比べると、C と D のクロマトグラムにペントシジンのピーク溶出の後 (16 ~ 20 分) に夾雑物質ピークが複数見られた。以上の結果から、血漿サンプルは前処理 A を無鉄塩酸で実施した場合 (水素化ホウ素ナトリウム処理、TCA による蛋白沈殿処理、無鉄塩酸による加水分解処理)、測定値の変動が少なく、夾雑物質の少ないペントシジン測定が可能と推定された。

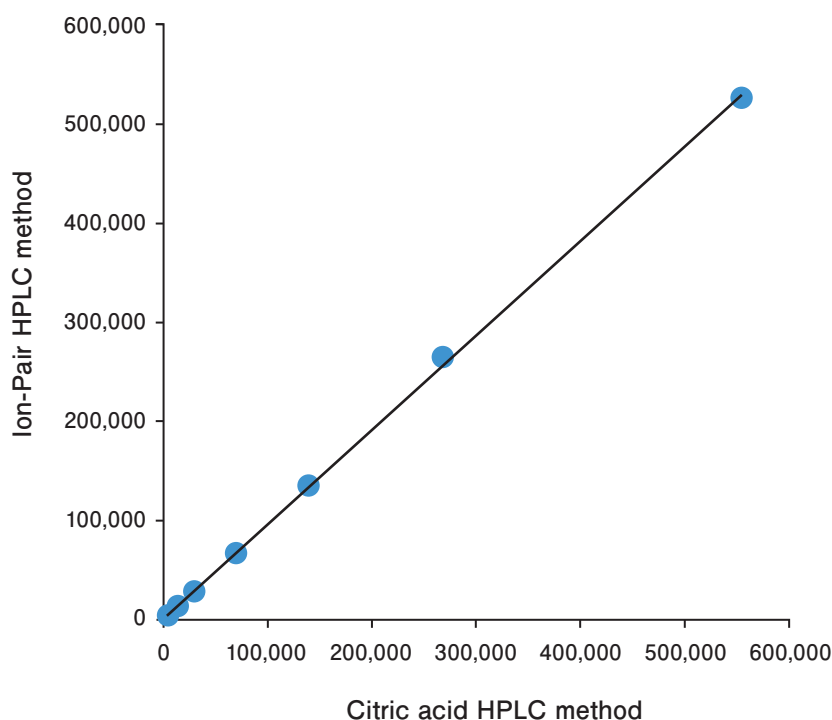


Fig. 1. Correlation of the two methods in measurement of a pentosidine standard.

Regression line: $y = 0.9548x + 602.71$, $r = 0.999$, $p < 0.01$. Injection volume; 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 40 pg/20 μ L. Method: column; Cadenza CD-C18 (3 μ m, 75 $\times$ 4.6 mm I.D), flow rate; 1.0 mL/min, detection; ex 335 nm / em 385 nm. Ion-pair HPLC method: eluent; ACN / MeOH / water / HFBA (16/4/76/0.2), column temperature; 30°C. Citric acid HPLC method: eluent; 100 mmol/L citric acid / ACN (99.5/0.5), column temperature; 20°C. ACN, acetonitrile; MeOH, methanol; HFBA, heptafluorobutyric acid; HPLC, high performance liquid chromatography; ex, excitation wavelength; em, emission wavelength.

Table 1. The preparation method comparison to plasma sample.

Preparation method	Pentosidine peak area	CV (%)
A	72,601 ± 1,885	2.6
B	58,061 ± 2,442**	4.2
C	64,212 ± 6,876	10.7
D	59,726 ± 2,752*	4.6

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 3, ** p < 0.01 vs A, * p < 0.05 vs A by Tukey's test. Plasma sample: 50 µL (collected from healthy 20 years-old woman). Preparation method A-C; The details of the method were indicated in the text, measured by citric acid HPLC method: column; Unison US-C18 (5 µm, 150×4.6 mm I.D), eluent; 100 mmol/L citric acid/ACN (99.5/0.5), column temperature; 20 °C, flow rate; 1.0 mL/min, detection; ex 335 nm/em 385 nm, injection volume; 20 µL. CV, coefficient of variation; ACN, acetonitrile; HPLC, high performance liquid chromatography; ex, excitation wavelength; em, emission wavelength.

2) カラム温度の検討

80歳代の男性 (HbA1c : 7.0%) の血漿サンプルを、水素化ホウ素ナトリウム処理、TCAによる蛋白沈殿処理、無鉄塩酸による加水分解処理で前処理した後、クエン酸 HPLC 法のカラム温度を5条件 (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C) で変化させてペントシジンピークの分離を比較した。

各温度条件の測定クロマトグラムを比較した結果、ペントシジンと8～12分にあるピークの溶出時間がカラム温度の上昇に伴って早くなった。また、カラム温度の上昇とともに4～8分にベースラインの乱れが見られた。一方、35 °Cと40 °Cではペントシジンピークと他の夾雑ピークの分離が出来なかった。ペントシジンのピーク面積値は20 °C, 25 °C, 30 °Cのいずれにおいても同等の値になった。しかしペントシジンのピーク周辺にはピークⅠ～Ⅲの小ピークが見られた (Fig. 2)。これらの小ピークの各温度における溶出挙動を調べた結果、30 °CではピークⅠとペントシジンのピークが重なっていることがわかった (Fig. 3)。一方、20 °Cと25 °Cではペントシジンのピークが単離出来ていることがわかった。30 °Cでペントシジンのピーク面積が僅かに大きかったのは、このピークⅠの混入が原因と推定された。25 °Cにおいては、わずかにピークⅠとペントシジンのピークが重なっていた。

以上のことから、クエン酸 HPLC 法による血漿ペントシジンのカラム温度条件は20 °Cが最適とした。

3) クエン酸 HPLC 法の測定性能

HSA、G-HSAおよび血漿サンプル (20歳代女性、70歳代女性、HbA1c : 5.6%) を使用して、前処理方法に水素化ホウ素ナトリウム処理、TCAによる蛋白沈殿処理、無鉄塩酸による加水分解処理した後 (最適化した前処理条件)、ペントシジン標準物質の添加回収率を求めた。各サンプルへのペントシジンの添加量は、前処理後サンプルのHPLCへの注入力 (20 µL) あたり HSA; 10 pg、G-HSA; 40 pg、20歳代女性血漿; 5 pg、70歳代女性血漿; 20 pgとした。各サンプルへのペントシジン添加回収率はHSA;

109.7%、G-HSA; 91.8%、20歳代女性血漿; 96.3%、70歳代女性血漿; 101.5%と、いずれも良好であった。

4) イオンペア HPLC 法とクエン HPLC 酸法による血漿中ペントシジン測定値の比較

同志社大学抗加齢医学研究室が実施したアンチエイジングドック受診者男女54名 (男性23名、女性31名、20～90歳代; 66.8 ± 22.6歳) の肘静脈から採血した血漿を用い、イオンペア HPLC 法 (LSIメディエンスに委託) と最適化したクエン酸 HPLC 法の2法でペントシジン値 (ng/mL) を測定した。血漿中ペントシジンの測定値はイオンペア HPLC 法とクエン酸 HPLC 法に相関関係が認められた ($y = 1.3028x + 7.7983$, $r = 0.746$, $n = 54$, $p < 0.01$, Fig. 4)。しかしイオンペア HPLC 法により測定された血漿ペントシジン値は、クエン酸 HPLC 法により測定されたペントシジン値よりも大きく測定された。

5) クエン HPLC 酸法によるヒト血漿中ペントシジン量と年齢や加齢マーカーとの関係

最適化したクエン酸 HPLC 法による血漿ペントシジン値 (ng/mL) と同志社大学抗加齢医学研究室が実施したアンチエイジングドック受診者男女83名 (男性37名、女性46名、20～90歳代; 59.9 ± 21.4歳) の年齢や各種加齢マーカー測定値との関係を検証した。

血漿ペントシジン値は男性が 5.4 ± 3.1 ng/mL、女性が 4.8 ± 2.7 ng/mLであった ($p = 0.360$)。また血漿ペントシジン値は年齢との相関性が認められた ($y = 0.06713x + 1.084$, $r = 0.489$, $n = 83$, $p < 0.01$, Fig. 5)。しかし60歳以上の年代では測定値の個人差が大きかった。

血漿ペントシジン値とアンチエイジングドックにおいて評価マーカーとされる踵骨ステイフネス値 (骨密度の指標)、中性脂肪 (triglyceride) 値、高密度リポ蛋白コレステロール (high-density-lipoprotein-cholesterol; HDL-C)、低密度リポ蛋白コレステロール (low-density-lipoprotein-cholesterol; LDL-C) (脂質代謝の指標)、血中デヒドロエピアンドロステロン-サルフェート

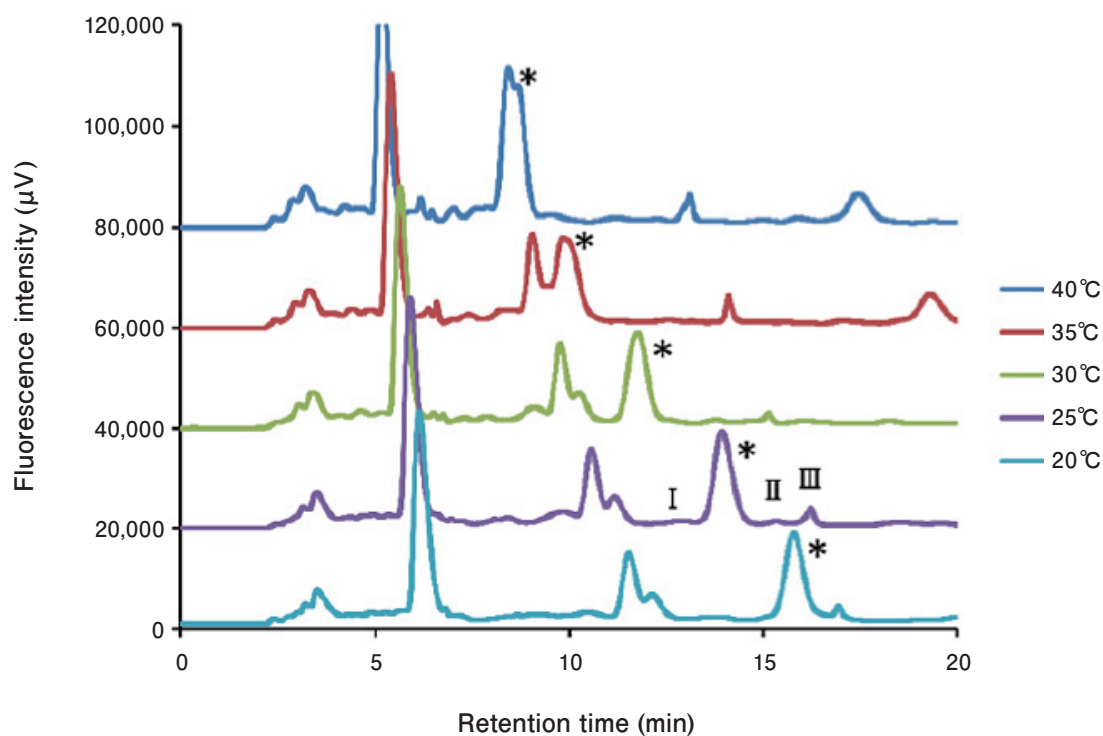


Fig. 2. Optimization of column temperature.

Plasma sample; 50 μ L (collected from healthy 80 year-old man). Measured by citric acid HPLC method: column; Unison US-C18 (5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm I.D), eluent; 100 mmol/L citric acid/ACN (99.5/0.5), flow rate; 1.0 mL/min, detection; ex 335 nm/em 385 nm, injection volume; 20 μ L, *, pentosidine peak, minor peak; I ~ III. ACN, acetonitrile; HPLC, high performance liquid chromatography; ex, excitation wavelength; em, emission wavelength.

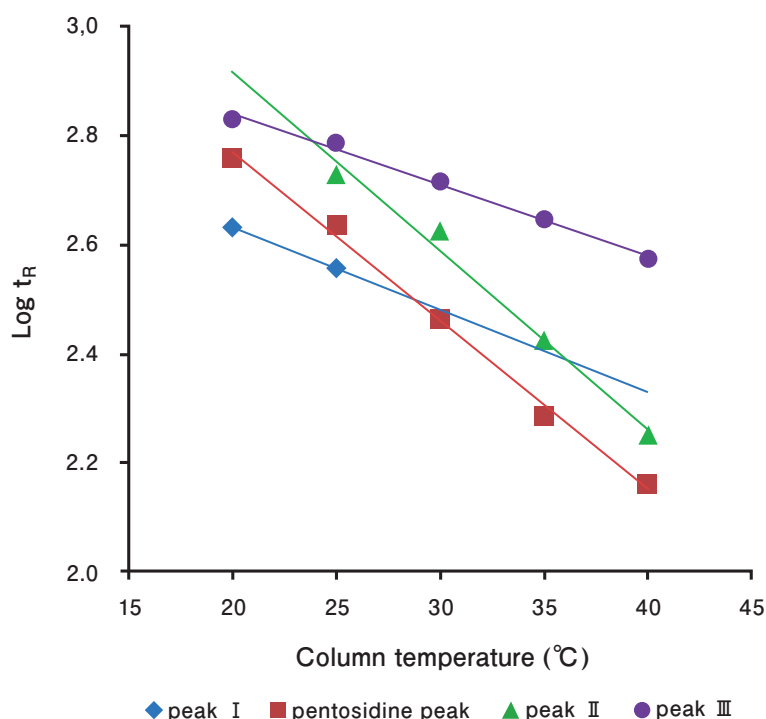


Fig. 3. The separation position of a minor peak I ~ III.

Plasma sample; 50 μ L (collected from healthy 80 year-old man). Measured by citric acid HPLC method: column; Unison US-C18 (5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm I.D), eluent; 100 mmol/L citric acid/ACN (99.5/0.5), flow rate; 1.0 mL/min, detection; ex 335 nm/em 385 nm, injection volume; 20 μ L, t_R; retention time (min); ACN, acetonitrile; HPLC, high performance liquid chromatography; ex, excitation wavelength; em, emission wavelength.

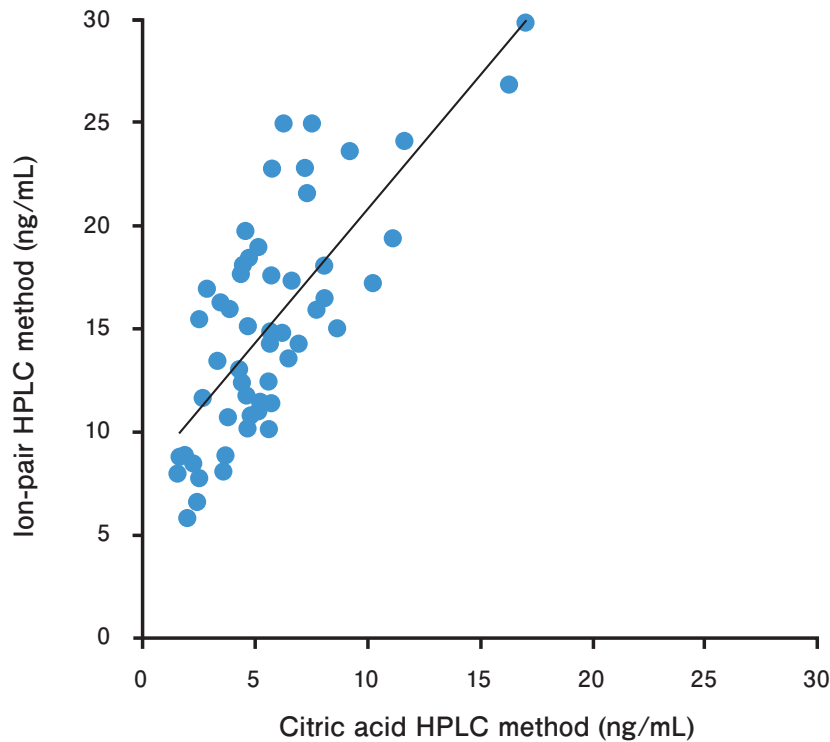


Fig. 4. Correlation of the two methods in measurement of a pentosidine in plasma.

Regression line: $y = 1.3028x + 7.7983$, $r = 0.746$, $n = 54$, $p < 0.01$. Ion-pair HPLC method; measured by LSI Medience. Citric acid HPLC method: column; Unison US-C18 (5 μm , 150 $\times$ 4.6 mm I.D), eluent; 100 mmol/L citric acid/ACN (99.5 / 0.5), flow rate; 1.0 mL/min, detection; ex 335 nm / em 385 nm, column temperature; 20 $^{\circ}\text{C}$, injection volume; 20 μL . ACN, acetonitrile; HPLC, high performance liquid chromatography; ex, excitation wavelength; em, emission wavelength.

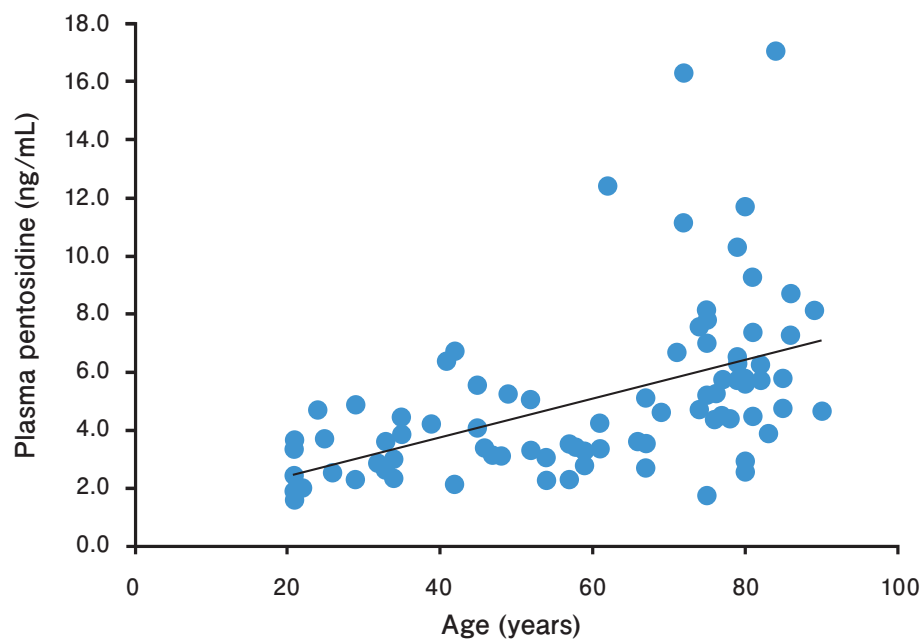


Fig. 5. Amount of pentosidine in plasma measured by citric acid HPLC method.

Regression line: $y = 1.3028x + 7.7983$, $r = 0.746$, $n = 54$, $p < 0.01$. Method: column; Unison US-C18 (5 μm , 150 $\times$ 4.6 mm I.D), eluent; 100 mmol/L citric acid / ACN (99.5 / 0.5), flow rate; 1.0 mL/min, detection; ex 335 nm/em 385 nm, column temperature; 20 $^{\circ}\text{C}$, injection volume; 20 μL . ACN, acetonitrile; HPLC, high performance liquid chromatography; ex, excitation wavelength; em, emission wavelength.

(dehydroepiandrosterone-sulfate; DHEA-s) 値 (老化関連ホルモンの指標)、血糖値、HbA1c 値 (糖代謝の指標)、血中コルチゾール値 (心身ストレスの指標)、皮膚中 AGEs 値 (糖化ストレス指標) との関係性を検証した (Table 2)。

血漿ペントシジン値と HbA1c 値 ($y = 2.0016x - 6.3391$, $r = 0.433$, $p < 0.01$)、皮膚中 AGEs 値 ($y = 3.1256x - 1.8185$, $r = 0.488$, $p < 0.01$) には正の相関性が認められた。また血漿ペントシジン値と DHEA-s 値 ($y = -0.0078x + 6.3181$, $r = -0.341$, $p < 0.01$)、踵骨スティフネス値 ($y = -0.0411x + 8.8501$, $r = -0.235$, $p = 0.02$) には弱い負の相関性が認められた。その他の評価項目については相関性が

認められなかった。

一方、アンチエイジングドックにおいて測定された評価マーカーと年齢との相関性は、HbA1c 値 ($y = 0.015x + 4.8178$, $r = 0.510$, $p < 0.01$)、皮膚中 AGEs 値 ($y = 0.0185x + 1.1009$, $r = 0.670$, $p < 0.01$) に正の相関性、血中 DHEA-s 値 ($y = -4.2041x + 406.54$, $r = -0.699$, $p < 0.01$)、踵骨スティフネス値 ($y = -0.5602x + 120.43$, $r = -0.556$, $p < 0.01$) に負の相関性が認められた (Table 3)。血糖値には年齢と弱い相関性 ($y = 0.2541x + 74.676$, $r = 0.347$, $p < 0.01$) が認められた。その他の項目には年齢との相関性が認められなかった。

Table 2. Correlation with the pentosidine concentration in plasma, and each measurement item.

Measurement item	Unit	Regression line	correlation coefficient (r)	p value
Blood glucose	mg/dL	$y = 0.0385x + 1.6785$	0.209	0.06
HbA1c [NGSP]	%	$y = 2.0016x - 6.3391$	0.433	< 0.01
Skin AGEs	afu	$y = 3.1256x - 1.8185$	0.488	< 0.01
Triglyceride	mg/dL	$y = -0.0001x + 5.1075$	0.001	0.50
HDL-C	mg/dL	$y = -0.0021x + 5.2446$	-0.014	0.45
LDL-C	mg/dL	$y = -0.0114x + 6.5352$	-0.113	0.16
Cortisol	μg/dL	$y = 0.1318x + 3.764$	0.164	0.14
DHEA-s	μg/dL	$y = -0.0078x + 6.3181$	-0.341	< 0.01
Stiffness value	—	$y = -0.0411x + 8.8501$	-0.235	0.02

Subject: 20 ~ 80 year-old women and men, n = 83. Plasma pentosidine measured by citric acid HPLC method. NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program; AGEs, advanced glycation end products; HDL-C, high-density-lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low-density-lipoprotein-cholesterol; DHEA-s, dehydroepiandrosterone-sulfate; HPLC, high performance liquid chromatography.

Table 3. Correlation with the measurement items and age.

Measurement item	Unit	Regression line	Correlation coefficient (r)	p value
Pentosidine	ng/mL	$y = 1.3028x + 7.7983$	0.746	< 0.01
Blood glucose	mg/dL	$y = 0.2541x + 74.676$	0.347	< 0.01
HbA1c [NGSP]	%	$y = 0.015x + 4.8178$	0.510	< 0.01
Skin AGEs	afu	$y = 0.0185x + 1.1009$	0.679	< 0.01
Triglyceride	mg/dL	$y = 0.7389x + 51.707$	0.249	0.98
HDL-C	mg/dL	$y = -0.0073x + 65.839$	-0.020	0.44
LDL-C	mg/dL	$y = 0.0619x + 121.11$	0.039	0.64
Cortisol	μg/dL	$y = -0.0123x + 10.934$	-0.063	0.29
DHEA-s	μg/dL	$y = -4.2041x + 406.54$	-0.699	< 0.01
Stiffness value	—	$y = -0.5602x + 120.43$	-0.556	< 0.01

Subject: 20 ~ 80 year-old women and men, n = 83. Plasma pentosidine measured by citric acid HPLC method. NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program; AGEs, advanced glycation end products; HDL-C, high-density-lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low-density-lipoprotein-cholesterol; DHEA-s, dehydroepiandrosterone-sulfate; HPLC, high performance liquid chromatography.

考察

クエン酸 HPLC 法による血漿ペントシジン測定法

ペントシジン標準液を用いてイオンペア HPLC 法とクエン酸 HPLC 法のペントシジン測定面積値を比較した結果、二法それぞれの検量線に極めて高い直線性が認められた ($r = 0.999 \sim 1.000$)。さらに二法のピーク面積値相関式は $y = 1.047x - 585.35$, $r = 1.000$, $p < 0.01$ であり、二法の定量値はほぼ同等になることがわかった。血漿サンプルの前処理方法の検討結果では、水素化ホウ素ナトリウムが測定値の高値化を抑制し、TCA による蛋白沈殿処理が夾雑物の減少に作用した。またクエン酸 HPLC 法の *in vitro* 糖化 HSA および血漿サンプルのペントシジン添加回収率は 91.8 ~ 109.7% であり、本測定法が良好な測定性能を有することがわかった。

以上の結果、クエン酸 HPLC 法による血漿ペントシジンの測定最適条件は以下の通りとした。前処理、血漿 50 μL を前処理 B の後、6 N 無鉄塩酸 100 μL を添加し加水分解処理後、HPLC サンプル作成。HPLC 条件、カラム；Unison US-C18 (5 μm , 150 $\times$ 4.6 mm I.D.)、溶離液；100 mmol/L クエン酸 / ACN (99.5 / 0.5)、流速；1.0 mL/min、検出；蛍光 (励起波長 335 nm、検出波長 385 nm)、カラム温度；20 $^{\circ}\text{C}$ 、サンプル注入量；20 μL 。最適化したクエン酸 HPLC 法の前処理から HPLC 測定終了までの測定時間は、24 サンプルの測定を想定した場合、イオンペア HPLC 法¹⁶⁾と比べて約 12 時間短縮することができる可能性があり、測定作業の時間短縮に貢献できると考えられた。

しかし血漿サンプルの測定結果は、イオンペア HPLC 法で測定されたペントシジン値 (LSI メディエンスで測定) が高値を示した。血漿サンプルのイオンペア HPLC 法とクエン酸 HPLC 法による測定値の相関式は $y = 1.3028x + 7.7983$, $r = 0.746$, $p < 0.01$ であり、相関性が認められたが、傾き、切片ともに高値であった。イオンペア HPLC 法の高値化の原因には、ペントシジンの測定ピークに夾雑物が混入している可能性、検量線に使用している標準物質の純度の違いなどが考えられた。

血中ペントシジン値と加齢変化との関連

被験者とした 20 ~ 90 歳代の男女 83 名のアンチエイジングドック評価項目は、HbA1c 値、皮膚 AGEs 値、血漿ペントシジン値が年齢と正の相関性を示した。血糖値は年齢と弱い相関性を示した。また、踵骨スティフネス値と DHEA-s は年齢と負の相関性を示した。しかし、その他の測定項目は年齢との相関性を示さなかった。

血漿中ペントシジン値は男女間で違いがなく、年齢との相関性が認められた。しかし 60 歳以上では血漿ペントシジン値の個人差が大きかった。糖化ストレスは食事や運動、睡眠などの生活習慣による血糖値変動の影響を受ける³⁾。このため血漿ペントシジン値の増加要因には、加齢と各被験者の生活習慣の違いが影響している可能性があった。

生体内においてペントシジンは血中グルコースと蛋白

の糖化反応に伴う生成物の一つである。しかし血漿ペントシジン値は HbA1c 値、皮膚 AGEs 値と相関性を示したが、血糖値との相関性を示さなかった。この理由には測定した血糖値が空腹時血糖であること、およびペントシジンが血糖値の影響を反映している期間に違いがある可能性を推定した。HbA1c は過去 1 ~ 2 ヶ月の平均血糖値を反映する。また HbA1c や皮膚中 AGEs 値は 2 ~ 3 ヶ月間の糖化反応抑制素材の摂取^{21, 22, 23)}や食習慣の改善²⁴⁾で変化する。これらのことから血漿ペントシジン値は、過去数ヶ月間の血糖値変動を含む生活習慣による糖化ストレスの影響を反映している可能性があった。

血漿ペントシジン値は踵骨スティフネス値と弱い負の相関性を示し、踵骨スティフネス値の減少とともに増加した。骨質の低下は骨コラーゲン中に生成したペントシジンによる無秩序な架橋形成が影響していることが報告されている¹⁰⁾。このため血漿ペントシジン値の測定は被験者の骨質変化に伴う骨折リスクの指標としての可能性があった。同様に血漿ペントシジン値と血中 DHEA-s 値は弱い負の相関性を示し、DHEA-s 値の減少とともに増加した。DHEA-s は男性ホルモンの中間代謝産物であり、主に副腎皮質から分泌され、加齢とともに分泌量が低下することが報告されている²⁵⁾。このため血漿ペントシジン値は糖化ストレスによるホルモン分泌の低下を評価する指標としての可能性があった。

一方、血漿ペントシジン値は中性脂肪、HDL-C、LDL-C 値と相関性を示さなかったため、血漿ペントシジンの生成と脂質の代謝との関連性は低いと推定された。

これらの結果から、血漿ペントシジン値は加齢および糖化ストレスの指標となり得ると考えられた。

結語

クエン酸 HPLC 法による血漿ペントシジンの測定方法を最適化した。本方法による血漿ペントシジン測定値は、加齢および糖化ストレス指標となり得ると考えられた。

謝辞

本研究の概略は第 9 回糖化ストレス研究会 (2015 年 9 月、京都) にて発表した。本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP (戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号 145335679) 「次世代農林水産業創造技術」(農研機構生研センター委託研究) および文部科学省研究助成 (#17K01880) からの研究費により実施した。

利益相反申告

該当事項なし。

参考文献

- 1) Yazaki K, Nagai R, Horiuchi S. Creatine plays a direct role as a protein modifier in the formation of a novel advanced glycation end product. *J. Biochem.* 2002; 132: 543-550.
- 2) Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, et al. Formation of pentosidin during nonenzymatic browning of proteins by glucose. *J Biol Chem.* 1991; 266: 11654-11660.
- 3) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Medicine.* 2011; 8: 23-29.
- 4) Spacek P, Adam M. Pentosidine in osteoarthritis: HPLC determination in body fluids and in tissues. *Rheumatol Int.* 2006; 26: 923-927.
- 5) Sivan SS, Tsitoron E, Wachtel E, et al. Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs. *J. Biochem.* 2006; 399: 29-35.
- 6) Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, et al. Relation between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology.* 1997; 36: 637-642.
- 7) Kerkeni M, Saïdi A, Bouzidi H, et al. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes & Vascular Disease Research.* 2012; 10: 239-245.
- 8) Furuya R, Kumagai H, Miyata T, et al. High plasma pentosidine level is accompanied with cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol.* 2012; 16: 421-426.
- 9) Kerkeni M, Santos-Weiss IC, Jaisson S, et al. Increased serum concentrations of pentosidine are related to presence and severity of coronary artery disease. *Thrombosis Research.* 2014; 134: 633-638.
- 10) Saito M. Bone quality markers: pentosidine, homocysteine, and MTHFR polymorphism. *Rinsho Byori.* 2009; 57: 876-883.
- 11) Sugiyama S, Miyata T, Ueda Y, et al. Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: An advanced glycation end product. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9: 1682-1688.
- 12) Sanaka T, Funaki T, Tanaka T, et al. Plasma pentosidine levels measured by a newly developed method using ELISA in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 2002; 91: 64-73.
- 13) Nakano M, Kubota M, Owada S, et al. The pentosidine concentration in human blood specimens is affected by heating. *Amino Acids.* 2013; 44: 1451-1456.
- 14) Miyata T, Ueda Y, Yamada Y, et al. Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine, an advanced glycation end product: Carbonyl stress in uremia. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9: 2349-2356.
- 15) Spacek P, Adam M. HPLC method for pentosidine determination in urine, serum, and tissues as a marker of glycation and oxidation loading of the organism. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2002; 25: 1807-1820.
- 16) Shimode A, Yagi M, Naito J, et al. Hair protein glycation reduces hair breaking strength. *Glycative Stress Res.* 2014; 1: 37-45.
- 17) 大野礼一, 永井竜児. HPLCを用いた血清 Pentosidine の測定について. *JMARS News Letter.* 2015; 15: 6-8.
- 18) Scheijen JL, 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. *Journal of Chromatography B.* 2009; 877: 610-614.
- 19) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Med.* 2012; 9: 125-134.
- 20) Frantzen F, Grimsrud K, Heggli DE, Sundrehagen E. Protein-boronic acid conjugates and their binding to low-molecular-mass cis-diols and glycated hemoglobin. *J Chromatogr B.* 1995; 670: 37-45.
- 21) Yonei Y, Miyazaki R, Takahashi Y, et al. Anti-glycation effect of mixed herbal extract in individuals with pre-diabetes mellitus: A double-blind, placebo-controlled, parallel group study. *Anti-Aging Medicine.* 2010; 7: 26-35.
- 22) Takabe W, Yagi M, Ogura M, et al. Effect of mangosteen pericarp extract-containing black vinegar drink on skin quality through anti-glycative actions. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 158-171.
- 23) Takeshita S, Ishioka Y, Tomohiro Uemura T, et al. Reducing effect of the long term intake of water chestnut (*Trapa bispinosa* Roxb.) pericarp extract on glycation stress in the placebo-controlled double blinded clinical trial and in vitro inhibitory actions on low-density lipoprotein (LDL) glycation. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 299-316.
- 24) Imai S, Michiaki Fukui M, Kajiyama S. Effect of eating vegetables before carbohydrates on glucose excursions in patients with type 2 diabetes. *J Clin Biochem Nutr.* 2014; 54: 7-11.
- 25) Nomoto K, Arita S, Yonei Y. Development of a model of functional endocrine age in Japanese people: Serum dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-s) concentration as an index of Aging. *Anti-Aging Medicine.* 2011; 8: 69-74.