

Original article

A rapid pretreatment method for the determination of pentosidine in human plasma by high performance liquid chromatography

Chieko Sakiyama¹⁾, Masayuki Yagi¹⁾, Shota Miyazaki²⁾, Atsushi Sato²⁾, Kaori Ishizaki¹⁾, Yoshikazu Yonei¹⁾

1) Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan
2) GL Sciences Inc., Tokyo, Japan

Glycative Stress Research 2020; 7 (3): 211-219
(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によるヒト血中ペントシジン測定のための迅速な前処理法

崎山智恵子¹⁾、八木雅之¹⁾、宮崎将太²⁾、佐藤 睦²⁾、石崎 香¹⁾、米井嘉一¹⁾

1) 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、京都府京田辺市
2) ジーエルサイエンス株式会社、東京都新宿区

抄録

【目的】 血中ペントシジンのHPLC-蛍光測定において、多検体測定には検体前処理の煩雑さや測定時間といった課題がある。本研究では検体処理の簡便化を目的とし、スピнкаラムを用いた検体前処理法を検証した。

【方法】 血液試料(検体)は20～100歳未満の健康な男女から提供を受けた血漿を用いた。検体の前処理法の検証には50～80歳代の男女40名から提供を受けた血漿を混合し、均一化後使用した。検体は6N塩酸下で加水分解後、陽イオン交換基と疎水性基の混合基を担体として有するスピнкаラム(Monospin AG)に添加し溶出した。ペントシジンは逆相カラムを用いてHPLCにて蛍光検出した。血漿中ペントシジンは20～80歳代男女72名の被験者を対象とし、年齢および加齢マーカーとの相関性を検証した。本研究は同志社大学および、一般社団法人糖化ストレス研究会の「人を対象とする研究」に関する倫理審査委員会の審議・承認のもと実施した。

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：崎山智恵子, csakiyam@mail.doshisha.ac.jp; 宮崎将太, s-miyazaki@gls.co.jp;
小椋真理 m-ogura@po.kbu.ac.jp; 寺阪剛 t-terasaka@kyouwa-r.com;
佐藤 睦, a.sato@gls.co.jp; 石崎 香, ko-sei12@mail.doshisha.ac.jp;
米井嘉一, yyonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2020; 7(3): 211-219
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

【結果】 本前処理法による検体中のペントシジンの添加回収率は平均 116%であった。加水分解後の前処理に要する時間は 10 分以内であった。測定した被験者の血漿中のペントシジン値と年齢とは正の相関性が認められ、HbA1c とは弱い正の相関性が認められた。皮膚 AGEs の蓄積量と血漿中のペントシジン値に関しては、AGE Reader mu による測定値とは正の相関性が認められ、AGEs Sensor による測定値とは弱い正の相関性が認められた。

【結論】 血液検体の前処理時間は、陽イオン交換基と疎水性基の混合基を担体とするスピнкаラムを用いることで、イオンペア-HPLC 法の約 12 時間から約 10 分に短縮された。さらに本前処理により夾雑物を軽減したことによって HPLC 測定時間はクエン酸-HPLC 法の 1/3 に短縮することができた。本法は血中ペントシジンの多検体測定法として有用であることが検証された。

KEY WORDS: 血中ペントシジン、HPLC、糖化ストレス

はじめに

生体中の蛋白質とグルコース等の還元糖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) が生成する¹⁾。AGEs の生体内への蓄積は、糖尿病合併症、動脈硬化、骨粗鬆症等の発症や進展に関与する。このような糖化による生体への影響は糖化ストレスとよばれる²⁾。

ペントシジンは AGEs の一種で、1989 年にヒト脳硬膜コラーゲン中から単離された³⁾。ペントシジン分子はリジンとアルギニン側鎖のアミノ基間をペントースが架橋したイミダゾピリジニウム環を有し、蛍光性かつ蛋白架橋性を有する。生体においてペントシジンはヒトの滑膜や軟骨^{4,5)}、皮膚コラーゲン^{6,7)}などに存在し、加齢に伴い組織中の蓄積量が進行することが知られている。骨コラーゲン中ペントシジンの蓄積は骨質を低下させ、骨折リスクと関連する⁸⁾。また高濃度の血中ペントシジンは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⁾。さらに糖尿病患者¹⁰⁾、慢性腎不全患者^{11,12)}、関節リウマチ患者^{13,14)}、統合失調症患者¹⁵⁾などで血中ペントシジン濃度が高値を示すことが報告されている。このように血中ペントシジン量は、種々の疾病のバイオマーカーとなる可能性がある。

血中ペントシジンの測定法には、酵素免疫測定法 (ELISA 法)¹⁶⁾、HPLC-蛍光法 (イオンペア-HPLC 法^{17,18,19)}、クエン酸-HPLC 法^{20,21)}などが報告されている。これまでのペントシジンの HPLC 測定法では多検体測定への応用に課題があった。血液検体を塩酸加水分解後カラムクロマトグラフィーによる吸着溶出、試料の乾固といった前処理操作の煩雑さ、さらに HPLC 測定時間等が課題であった。スピнкаラムは生体試料などの微量サンプルをエバポレーションなどの濃縮・乾固操作をすることなく、遠心操作による迅速な濃縮・精製が可能な試料の前処理用の固相抽出カラムである。本研究では血中ペントシジンの HPLC 測定における前処理方法を簡便化することを目的とし、担体の

官能基として陽イオン交換基と疎水性基 (オクタデシル基) を有するスピнкаラムを用いた血液検体の前処理法の適用性を検証した。

方法

試薬

血漿の加水分解には 35% 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 (acetonitril: ACN) は HPLC 用 (富士フィルム和光純薬、大阪府大阪市) を使用した。その他の試薬は特級グレードのものを富士フィルム和光純薬 (大阪府大阪市) またはシグマアルドリッチジャパン (東京都目黒区) より購入した。

装置

測定には HPLC システム (3-line degasser: DG-980-50, Ternary gradient unit: LG-1580-02, Intelligent HPLC pump: PU-980, Intelligent sampler: AS-2057-Plus, Fluorescence detector: FP-4020, Column oven: CO-4020) および ChromNAV データ解析システム (日本分光、東京八王子) を使用した。蛍光測定には Varioscan flash マイクロプレートリーダー (Thermo Scientific, 東京都港区) を用いた。

ペントシジン標準品

ペントシジン標準品はペプチド研究所 (大阪府茨木市) のペントシジン-トリフルオロ酢酸塩 (pentosidine-TFA salt) を購入した。Pentosidine-TFA salt を適量の蒸留水に溶解し、添付文書に記載のペントシジン含有量に基づきペントシジン濃度 (pmol/mL) を算出した (分子量: 378.43)。ペントシジン溶液は分注し、使用前まで -20°C にて保管した。

血漿の加水分解溶液の調製

加水分解処理中のペントシジン生成を防ぐため、あらかじめ水素化ホウ素ナトリウム溶液で血漿サンプルを還元した²¹⁾。血漿 50 μL に 200 mmol/L 水素化ホウ素ナトリウム溶液 (pH 9.2) を 50 μL 添加し、室温にて 30 分以上静置した。還元後、6N 無鉄塩酸を 100 μL 添加し、ブロッケンキューベーターを用いて 105°C で 18 時間加温し、加水分解を行った。

加水分解後、1.5 mol/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris (hydroxymethyl) amino-methane: Tris) 溶液を 200 μL 添加し、溶液中の塩酸を希釈した。加水分解溶液中の沈殿物は遠心ろ過フィルター (セントリカット超ミニ W-MR (PTFE 膜孔径 0.45 μm), クラボウ社、大阪市中央区) を用いて遠心分離 (5,000 \times g, 1 分, 4°C) により取り除いた。

血漿へのペントシジン標品の添加回収試験では、10 μL のペントシジン標準液を加水分解後の塩酸希釈溶液 (400 μL) に添加して用いた。

スピンカラムによるペントシジン HPLC 測定前処理法

スピンカラムによる HPLC 測定前処理には Monospin AG カラム (GLサイエンス社、東京都新宿区) を用いて行った。Monospin AG カラムはシリカモノリス (シリカ骨格に細孔を持つ表面積の大きい高純度シリカゲル) に陽イオン交換基と疎水性基 (オクタデシル基) の混合基が結合した担体を有するのが特徴である。前処理操作の各ステップは Monospin AG カラムに溶液を添加し、遠心分離 (5,000 \times g, 1 分, 4°C) にて通液した。溶液条件は次の 6 ステップとした: ①コンディショニング (0.1 mol/L クエン酸/ACN (990/10) 溶液 200 μL)、②平衡化 (0.1 mol/L クエン酸溶液 400 μL)、③試料の添加 (150 μL)、④洗浄 (0.1 mol/L クエン酸溶液 500 μL)、⑤溶出 1 (1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 75 μL)、⑥溶出 2 (1 mol/L ギ酸アンモニウム/ACN (50/50) 溶液 75 μL)。⑤と⑥のステップで得た溶出液を均一に混合し、測定試料とした。

HPLC によるペントシジン測定条件

HPLC 測定には逆相シリカゲルカラム InertSustain AG (3 μm , 100 mm \times 4.5 mm ID) (GLサイエンス社、東京都新宿区) を用いた。HPLC 測定条件は、カラム温度; 20°C、溶離液; A 液: 0.1% (v/v) ギ酸水溶液、B 液: 100% ACN、溶出条件: 0% B (0-10 min), 50% B (10-12 min), 0% B (12-18 min)、流速: 1.0 mL/min、検出: 蛍光 (励起波長 325 nm、検出波長 385 nm)、サンプル注入量; 20 μL とした。

被験者

本研究において検体は 20 歳以上 100 歳未満の健康な男女から提供を受けた血漿を用いた。被験者は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の研究に関係する人で、予め開催した本試験に関する試験説明会に参加し、本試験への参加を文書で同意した。

血中ペントシジンの前処理法の検証においては、50 ~ 80 歳代の男女 40 名から提供を受けた血漿を各 1 mL 混合し、均一化後使用した。血中ペントシジン濃度と糖化ストレス指標との相関性の検証においては、20 ~ 80 歳代の男女 72 名 (男性 13 名、女性 59 名) の被験者を対象とし、平均年齢は 48.3 \pm 18.6 歳 (平均値 \pm 標準偏差) であった。

血液検査

本試験では被験者から静脈採血した血液試料を用いて血液生化学検査を行った。検査項目は白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (Hb)、ヘマトクリット (Ht)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板 (TP)、血液像 (好中球: NEUTRO、リンパ球: LYMPHO、単球: MoC、好酸球: EOSINO、好塩基球: BASO)、総蛋白 (TP)、総コレステロール (TC)、HDL-コレステロール (HDL-C)、LDL-コレステロール (LDL-C)、血清尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、尿酸 (UA)、ヘモグロビン A1c (HbA1c/NGSP) とした。被験者採血は随時行われたため、血糖およびインスリンの測定は除外した。血液生化学検査は株式会社 LSI メディエンス (東京都千代田区) に依頼して測定した。

皮膚 AGEs 測定

皮膚 AGEs の蓄積量は非侵襲測定を行い、測定機器は AGE Reader mu (Diagn Optics, Groningen, Nederland) AGEs Sensor (Sharp, Osaka, Japan) の 2 機種を使用した。測定部位は AGE Reader mu が右前腕、AGEs Sensor が左手中指とした。

統計解析

各測定データは基本統計量 (平均値、標準偏差) を算出した。統計解析には統計解析ソフト BellCurve for Excel (社会情報サービス、東京都新宿区) を使用した。血漿中のペントシジン量との相関性はピアソンの積率相関係数を用いて評価した。相関係数 (r) が $0.4 < |r| \leq 1.0$ 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 (p value) 5% 未満を有意とし、10% 未満を傾向ありとした。

倫理審査

本研究は、ヘルシンキ宣言 (2013 年 WMA フォルタレザ総会で修正) および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省告示) を遵守し実施した。試験の倫理性および妥当性については同志社大学 (申請番号: 180003)、一般社団法人糖化ストレス研究会 (承認番号: 糖ス倫 2018 第 003 号) の「人を対象とする研究」に関する倫理審査委員会にて審議・承認された。

結果

血漿中ペントシジンHPLC前処理法の検証

0.1 mol/Lクエン酸溶液で調製した26.4 pmol/mL ペントシジン溶液を用いて、スピンカラム (Monospin AG) からのペントシジンの回収率を求めた。ペントシジンの回収率は添加溶液に対するカラム溶出液の蛍光強度 (励起波長325 nm, 測定波長385 nm) の比に100を乗じて算出した。Monospin AGカラムからのペントシジンの回収率は97%であった。

ペントシジン濃度0.08, 0.26, 0.79, 2.64, 7.93 pmol/mL におけるピーク面積値、signal/noise (S/N) 比、および保持時間を **Table 1** に示した。0.08 pmol/mL の S/N 比 (11.7) より見積もったペントシジンの検出限界値 (S/N 比:

3) は0.02 pmol/mLであった。ピーク面積値の変動係数 (coefficient of variation; CV) は0.26~7.93 pmol/ml において10%以下であり、0.08 pmol/mLでは11.8%であった。0.08~7.93 pmol/mLの濃度範囲に対してペントシジンのピーク面積値と濃度は良好な直線性 ($y = 423,054 x + 55,131$, $r = 0.9998$, $p < 0.001$) を示した。0.08 pmol/mLの面積値 (61,954 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$) はy切片の面積値 (56,150 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$) より高く、定量下限値は0.08 pmol/mLとした。各濃度4回測定における保持時間の平均値は 7.28 ± 0.15 分 (平均値 \pm 標準偏差)、CVは2.1%であった。

検体は50~80歳代の男女40名から提供を受けた血漿を均一化して用いた。前処理を行った検体のクロマトグラムを **Fig. 1** に示した。前処理により夾雑物が軽減され、ペントシジンピークの分離状態は良好であった。

Table 1. Pentosidine peak parameters measured by HPLC.

Concentration (pmol/mL)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	CV (%)	S/N	Retention time (min)
7.93	3,394,888 \pm 194,212	5.7	768.8 \pm 71.0	7.29 \pm 0.19
2.64	1,217,602 \pm 48,717	4.0	271.1 \pm 19.7	7.29 \pm 0.16
0.79	403,746 \pm 15,842	3.9	87.7 \pm 4.2	7.28 \pm 0.19
0.26	154,947 \pm 10,491	6.8	32.0 \pm 1.8	7.25 \pm 0.17
0.08	61,954 \pm 7,282	11.8	11.7 \pm 0.9	7.27 \pm 0.14

Parameters are expressed as mean \pm standard deviation, n = 4. HPLC was performed as follows: column, InertSustain AG (3 μm , 100 \times 4.6 mm I.D.); eluent, A solution : 0.1% (v/v) formic acid, B solution: 100% ACN; elution condition, 0%B (0-10 min), 50%B (10-12 min), 0%B (12-18 min); column temperature, 20 $^{\circ}\text{C}$; flow rate, 1.0 mL/min; detection, Ex 325 nm/Em 385 nm; injection volume, 20 μL . ACN, acetonitrile; CV, coefficient of variation; S/N, signal to noise ratio; HPLC, high performance liquid chromatography; Ex, excitation wavelength; Em, emission wavelength.

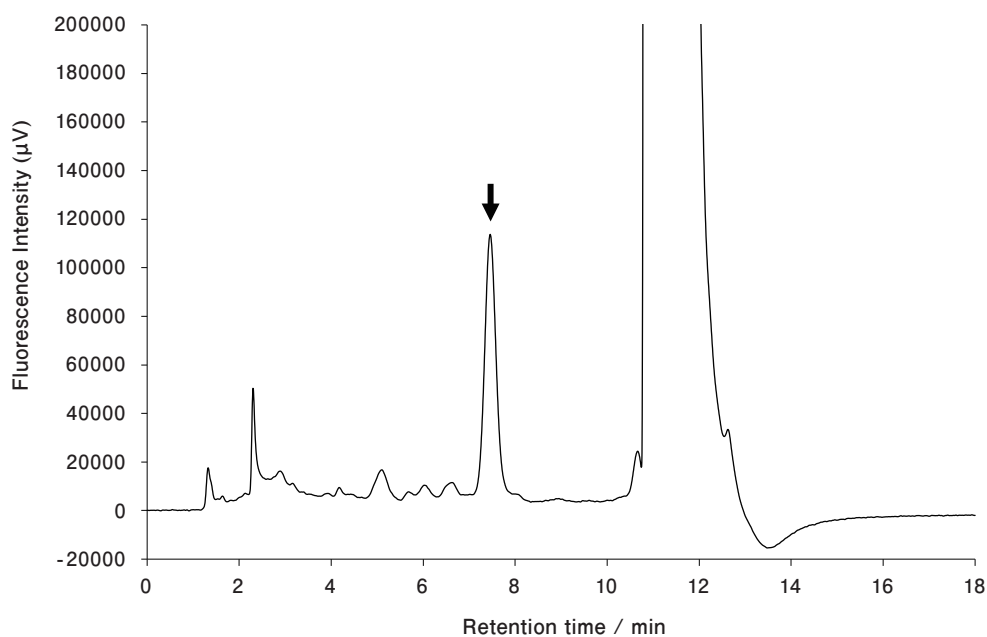


Fig. 1. The chromatograph of human plasma pretreated by spin column (Monospin AG).

50 μL plasma was hydrolyzed and pretreated by spin column (Monospin AG). The arrow shows the pentosidine peak. HPLC was performed as follows: column, InertSustain AG (3 μm , 100 mm \times 4.6 mm ID); flow rate, 1.0 mL/min; detection, Ex 325 nm/Em 385 nm; eluent, A solution : 0.1% (v/v) formic acid, B solution: 100% ACN; elution condition, 0%B (0-10 min), 50%B (10-12 min), 0%B (12-18 min); column temperature, 20 $^{\circ}\text{C}$; injection volume 20 μL . ACN, acetonitrile; HPLC, high performance liquid chromatography; Ex, excitation wavelength; Em, emission wavelength.

本前処理法による検体中のペントシジンの添加回収率を求めた (Table 2)。HPLC分析試料注入量 (20 μ L) あたりのペントシジン添加量 19.8、39.6、79.3 fmol に対する回収率はそれぞれ 113%、105%、131%であり、平均値は 116%であった。

前処理法による血中ペントシジン濃度と年齢および糖化ストレス指標との関係性

本法による血中ペントシジン値 (pmol/mL) と年齢、

HbA1c (糖代謝指標)、および皮膚AGEs蓄積量 (糖化ストレス指標) との関係性を検証した。本試験の被験者 72 名は、血液生化学検査において全ての検査項目が日本臨床検査医学会の共用基準範囲外²²⁾、かつ人間ドック学会判定区分 D (要治療)²³⁾ に該当せず、全て健康な成人であった (Table 3)。血中ペントシジン値は年齢に対して正の相関性 ($y = 0.631x + 33.851$, $r = 0.458$, $p < 0.01$) が認められた (Fig. 2)。HbA1c に対しては弱い正の相関性 (HbA1c: $y = 15.250x - 20.971$, $r = 0.330$, $p < 0.01$) が認められ

Table 2. Recovery of pentosidine in plasma sample.

Added amount per injection volume (fmol)	Measured amount per injection volume (fmol)	Recovery (%)
0.0	116 \pm 9	—
19.8	139 \pm 1	113 \pm 5
39.6	158 \pm 12	105 \pm 30
79.3	220 \pm 84	131 \pm 8

The values are expressed as mean \pm standard deviation, $n = 3$. The added volume of pentosidine was 10 μ L. HPLC was performed as follows: column, InertSustain AG (3 μ m, 100 \times 4.6 mm I.D.); eluent, A solution : 0.1% (v/v) formic acid, B solution: 100% ACN; elution condition, 0%B (0-10 min), 50%B (10-12 min), 0%B (12-18 min); column temperature, 20°C; flow rate, 1.0 mL/min; detection, Ex 325 nm/Em 385 nm; injection volume, 20 μ L. ACN, acetonitrile; HPLC, high performance liquid chromatography; Ex, excitation wavelength; Em, emission wavelength.

Table 3. Results of blood biochemistry and hemogram.

Items	Unit	Reference interval ¹⁾	Mean \pm SD
TP	g/dL	6.6 - 8.1	7.3 \pm 0.4
BUN	mg/dL	8 - 20	14.0 \pm 3.9
CRE	mg/dL	male: 0.65 - 1.07 female: 0.46 - 0.79	0.85 \pm 0.22 0.63 \pm 0.09
UA	mg/dL	male: 3.7 - 7.8 female: 2.6 - 5.5	5.2 \pm 0.9 4.2 \pm 0.8
HbA1c [NGSP]	%	4.9 - 6.0	5.6 \pm 0.6
TC	mg/dL	142 - 248	202 \pm 38
TG	mg/dL	male: 40 - 234 female: 30 - 117	107 \pm 69 75 \pm 35
HDL-C	mg/dL	male: 38 - 90 female: 48 - 103	72 \pm 24 80 \pm 15
LDL-C	mg/dL	65 - 143	103 \pm 30
RBC	10 ⁶ / μ L	male: 4.35 - 5.55 female: 3.86 - 4.92	4.54 \pm 0.41 4.41 \pm 0.36
MCV	fL	83.6 - 98.2	91.0 \pm 6.7
MCH	pg	27.5 - 33.2	29.8 \pm 2.3
MCHC	%	31.7 - 35.3	32.8 \pm 1.4
Hb	g/dL	male: 13.7 - 16.8 female: 11.6 - 14.8	14.2 \pm 1.7 13.0 \pm 1.3
Ht	%	male: 40.7 - 50.1 female: 35.1 - 44.4	44.0 \pm 3.3 39.4 \pm 3.4
WBC	10 ³ / μ L	3.3 - 8.6	5.1 \pm 1.6
Neutro	%	—	58.9 \pm 8.5
Lympho	%	—	32.3 \pm 7.9
Mono	%	—	5.2 \pm 1.6
Eosino	%	—	2.9 \pm 2.0
Baso	%	—	0.7 \pm 0.5
PLT	10 ⁴ / μ L	15.8 - 34.8	26.0 \pm 5.9

1) Guideline JSLM2018 of a clinical laboratory test. See text for abbreviations.

た (Fig. 3)。血中ペントシジン値と皮膚AGEs蓄積量は、AGE Reader muの測定値に対しては正の相関性 ($y = 23.586x + 10.095$, $r = 0.435$, $p < 0.01$) が認められ (Fig. 4)、AGEs Sensorの測定値に対しては弱い正の相関性 (y

$= 67.639x + 31.753$, $r = 0.254$, $p < 0.05$) が認められた (Fig. 5)。皮膚AGEs蓄積量の測定値はAGE Reader muとAGEs Sensorで相関性は認められなかった。

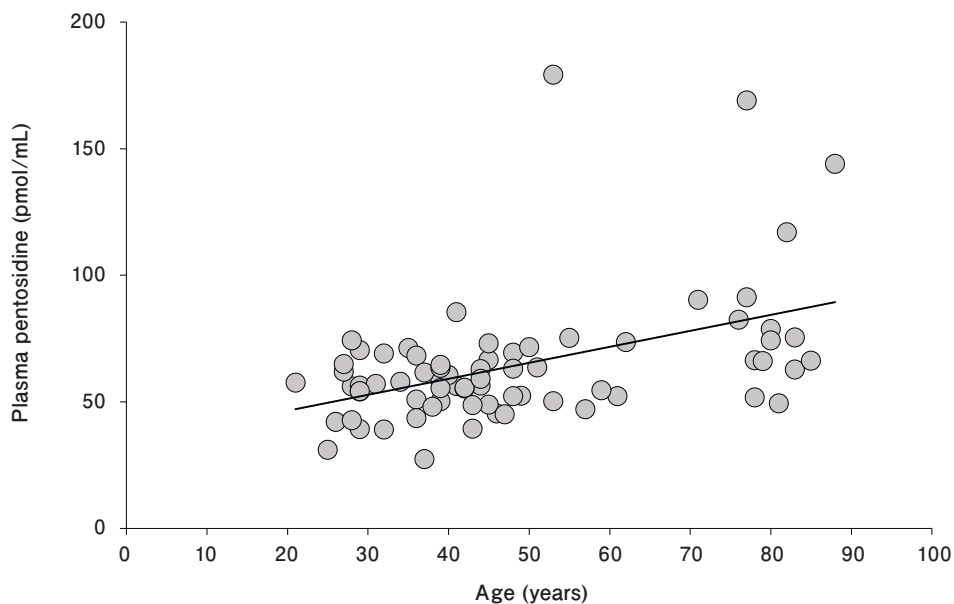


Fig. 2. Correlation between age and the plasma pentosidine concentration.

Regression line: $y = 0.631x + 33.851$, $r = 0.458$, $n = 72$, $p < 0.01$. Pearson's product moment correlation coefficient was used for statistical analysis.

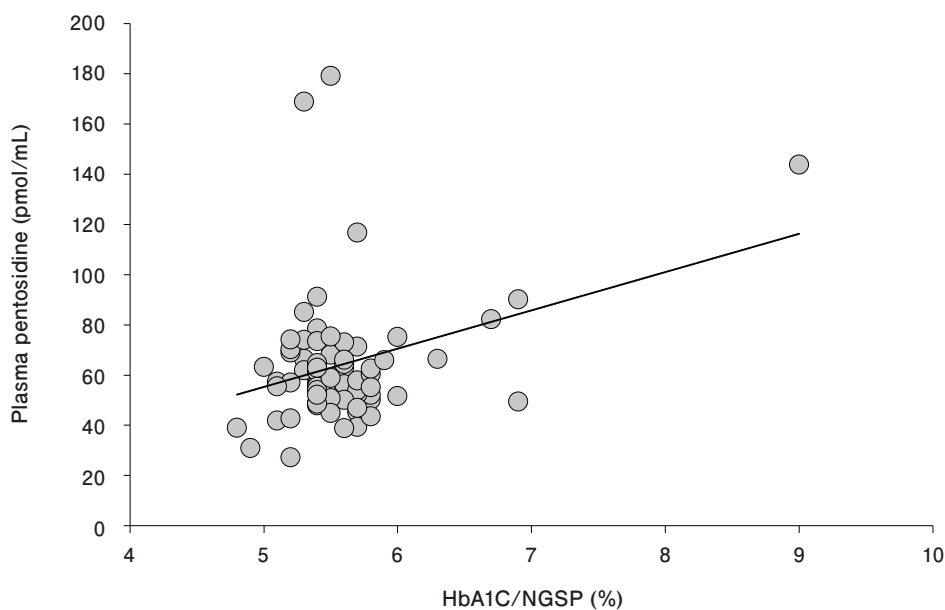


Fig. 3. Correlation between HbA1c and the plasma pentosidine concentration.

Regression line: $y = 15.250x - 20.971$, $r = 0.330$, $n = 72$, $p < 0.01$. Pearson's product moment correlation coefficient was used for statistical analysis.

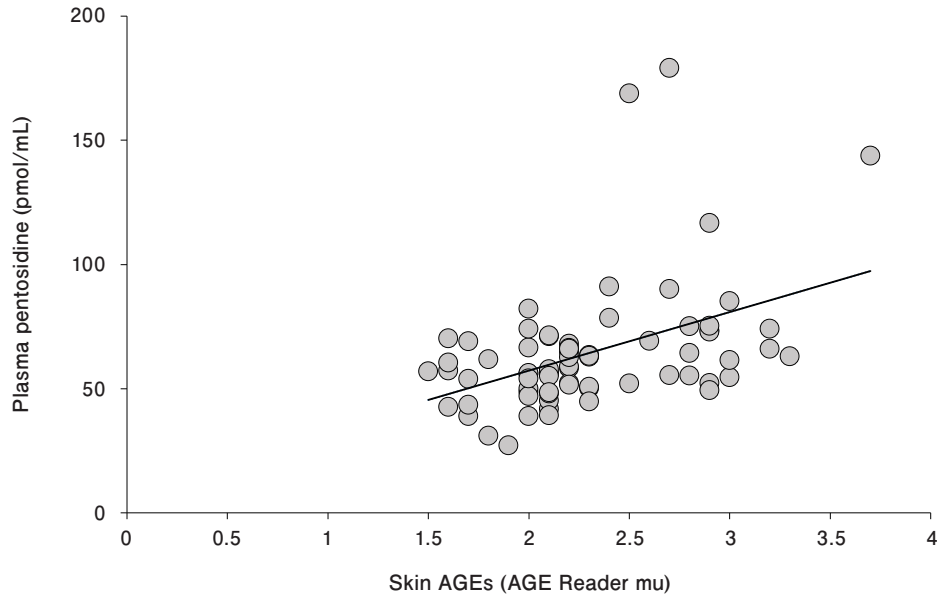


Fig. 4. Correlation between skin AGEs content measured by AGE Reader mu and the plasma pentosidine concentration.

Regression line: $y = 23.586x + 10.095$, $r = 0.435$, $n = 72$, $p < 0.01$. Pearson's product moment correlation coefficient was used for statistical analysis. AGEs, advanced glycation end products.

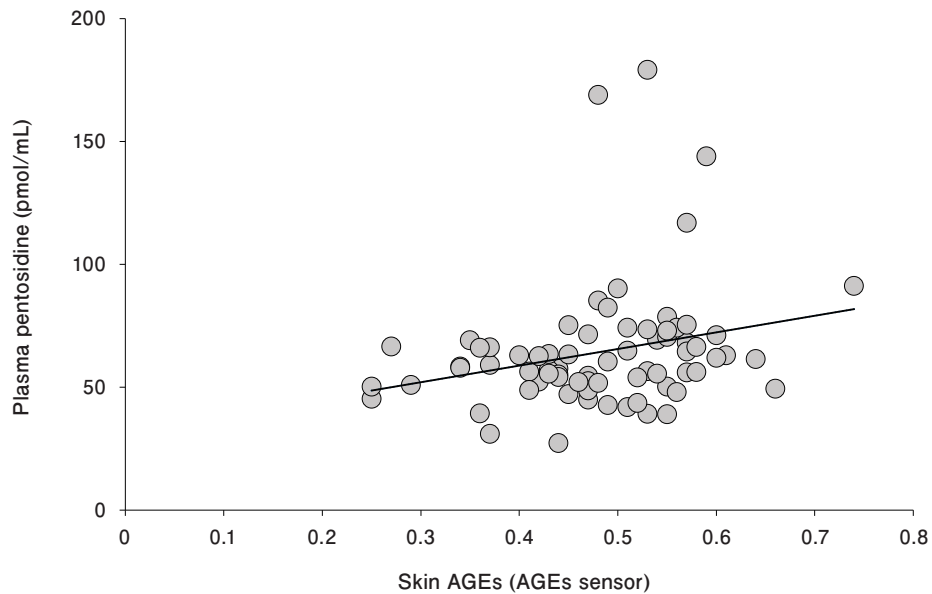


Fig. 5. Correlation between skin AGEs content measured by AGEs Sensor and the plasma pentosidine concentration.

Regression line: $y = 67.639x + 31.753$, $r = 0.254$, $n = 72$, $p < 0.05$. Pearson's product moment correlation coefficient was used for statistical analysis. AGEs, advanced glycation end products.

考察

血中ペントシジンHPLC測定におけるMonospin AGカラムを用いた前処理法の適用性

本法で前処理に用いた Monospin AGカラムに 26.4 pmol/mL ペントシジン標準液を 150 μ L (3.96 pmol) 添加したところ、回収率は 97% であった。血漿 50 μ L は加水分解過程で希釈 (8倍希釈) され、Monospin AGカラムの添加量 (150 μ L) 中の血漿量は 18.75 μ L である。血中ペ

ントシジンの検査基準値は ELISA 法においては 0.00915 ~ 0.0431 μ g/mL (24.2 ~ 113.9 pmol/mL) と示されている。本法により検査基準値上限量 (2.13 pmol) を処理するには十分に保持可能であると考えられる。また本法では 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を 75 μ L で溶出後、1 mol/L ギ酸アンモニウム/ACN (50/50) 溶液 75 μ L で溶出し、両溶出液を混合したところ良好な回収率が得られた。血漿中のペントシジンの添加回収試験においても添加回収率の平均値は 116% と良好であった。しかしペントシ

ジンを79.3 fmol添加した条件では回収率が他の濃度より高値(131%)となった。わずかにみられる前後の夾雑物のピークがペントシジンのピーク面積値に影響した可能性がある。HPLC測定におけるペントシジンの分離条件についてはさらに最適化の余地がある。

ペントシジン HPLC 前処理法の処理時間

本法では塩酸加水分解後、時間を要する遠心濃縮器等での塩酸除去を行わず、1.5 mol/L Tris 溶液添加により塩酸を希釈するだけでスピカラムによる前処理過程に進めた。このため前処理に要する時間を大幅に削減することができた。また塩酸除去のための特別な設備は不要となった。さらに Monospin AG カラムにより1ステップ1分間の遠心分離操作で通液が可能である。スピカラムのコンディショニングからペントシジン溶出までの操作は6ステップであった。

これまでイオンペア-HPLC法の前処理ではカラムクロマトグラフィーによる試料の溶出および乾固等の操作により約12時間を要する¹⁸⁾。クエン酸-HPLC法では前処理は不要であるが、加水分解後の塩酸除去に約4時間を要する²¹⁾。またクエン酸-HPLC法ではHPLC測定時間は試料の溶出、カラム洗浄および平衡化に1検体当たり60分を要する。本法は血漿の塩酸加水分解反応終了後からHPLC測定試料を調製するまでの操作が10分以内に終了した。本法は操作が簡便なため24検体を同時に処理することが可能であった。またHPLCによるペントシジン測定時間は1検体当たり18分であり、1日(24時間)当たり約80検体を測定することが可能であった。本法により血漿ペントシジンHPLC測定における前処理操作を簡便化し、操作時間の短縮化を推し進めることが可能になったと考える。

本法による血中ペントシジン値と加齢変化との関連性

これまでに血中ペントシジン量は年齢、糖化ストレス指標である皮膚AGEs蓄積量、および糖代謝指標となるHbA1c値との相関性が報告されている²¹⁾。本法により測定した血漿ペントシジン値との相関性を検証したところ、20~80歳代の健康な男女72名の被験者に対して、血漿ペントシジン値と年齢および皮膚AGEs蓄積量(AGE Reader mu)とは正の相関性があり、HbA1c値とは弱い正の相関性が認められた。年齢53歳から88歳の4名の被験者に血漿ペントシジン値と各項目との回帰直線から乖離した値が認められた。今回の血液生化学検査ではその理由は明らかではなかったが、血糖は生活習慣により影響を受け変動することが報告されている²⁾。これらが血漿ペントシジンの高値化となる要因になった可能性がある。

血漿ペントシジン値と皮膚AGEs蓄積量の相関性は2機種種の測定値に対して検証した。AGE Reader muの測定値とは正の相関性が認められ、AGEs Sensorの測定値とは弱い正の相関性が認められた。これまでにAGE Reader muとAGEs Sensorの皮膚AGEs蓄積量の測定値には相関性が認められないことが報告されており、両機種種の測定部位の

違い(AGE Reader mu: 前腕、AGEs Sensor: 指先)により、測定意義が異なると考えられている²⁴⁾。本研究において測定意義を明らかにすることはできなかったが、血中ペントシジンは両機種それぞれの測定意義と相関する可能性がある。

ペントシジン標品中のトリフルオロ酢酸量の影響

本研究で用いたペントシジン標品の元素分析結果は、炭素(C)、水素(H)、窒素(N)比は38.47%、4.10%、12.00%であった(試薬メーカーの添付資料に記載)。ペントシジンはトリフルオロ酢酸(TFA)塩として精製後乾固されるため、標品の固形物にはペントシジンとTFAが含まれる。元素分析結果のC、H、Nのモル比とペントシジンの分子式から本研究で使用したペントシジンには2.7分子のTFAが含まれることになる。ペントシジンの分子量は378.43であるが2.7分子のTFAが結合したTFA塩では分子量は686.28となり、ペントシジン含量は55.1%となる。本研究では1バイアル全量を溶解し、この値に基づいてペントシジン濃度を決定した。ペントシジン濃度は物質濃度やモル濃度等、論文ごとに表記が異なるが、互いの測定値を比較する際には標品としたペントシジンのTFA分子の結合数の違いを検証する必要がある。

結語

陽イオン交換基と疎水性基を有するスピカラムを用いた前処理法は血中ペントシジンHPLC測定において前処理および測定時間を短縮し、多検体測定における操作の簡便化と時間短縮を可能にした。

利益相反申告

本研究の遂行にあたり、ジーエルサイエンス株式会社(東京都新宿区)より研究支援を受けた。

謝辞

本研究の一部は第18回糖化ストレス研究会(2019年8月31日、京都)および第20回日本抗加齢医学会総会(2020年9月25~27日、東京)にて発表した。

参考文献

- 1) Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, et al. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. *Anti-Aging Med.* 2010; 7: 112-119.
- 2) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med.* 2011; 8: 23-29.
- 3) Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem.* 1989; 264: 21597-21602.
- 4) 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.
- 5) Verzijl N, DeGroot J, Bank RA, et al. Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: The use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover. *Matrix Biol.* 2001; 20: 409-417.
- 6) Sell DR, Monnier VM. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest.* 1990; 85: 380-384.
- 7) Sternberg M, M'bemba J, Urios P, et al. Skin collagen pentosidine and fluorescence in diabetes were predictors of retinopathy progression and creatinemia increase already 6 years after punch-biopsy. *Clin Biochem.* 2016; 49: 225-231.
- 8) 齊藤 充. 新しい骨質マーカーとしてのペントシジンおよびホモシステイン測定の有用性. *臨床病理.* 2009; 57: 876-883.
- 9) Kerkeni M, Weiss IS, 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) Kerkeni M, Saïdi A, Bouzidi H, et al. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res.* 2012; 10: 239-245.
- 11) Machowska A, Sun J, Qureshi AR, et al. Plasma pentosidine and its association with mortality in patients with chronic kidney disease. *PLoS One.* 2016; 11: e0163826.
- 12) 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.
- 13) Chen JR, Takahashi M, Suzuki M, et al. Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology.* 1999; 38: 1275-1278.
- 14) Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, et al. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 244: 45-49.
- 15) Arai M, Miyashita M, Kobori A, et al. Carbonyl stress and schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2014; 68: 655-665.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Shimode A, Yagi M, Naito J, et al. Hair protein glycation reduces hair breaking strength. *Glycative Stress Res.* 2014; 1: 37-45.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Yagi M, Issiki K, Takabe W, et al. Measurement of pentosidine in human plasma by the high performance liquid chromatography. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 119-128.
- 22) Ichihara K, Yomamoto Y, Hotta T, et al. Collaborative derivation of reference intervals for major clinical laboratory tests in Japan. *Ann Clin Biochem.* 2016; 53: 347-356.
- 23) Japan Society of Ningen Dock, Criteria category (Revised on April 1, 2018). <https://www.ningen-dock.jp/en/other/inspection>, 2019/5/1.
- 24) Morita Y, Yagi M, Ishizaki K, et al. Evaluation of the glycation stress by non-invasive skin AGEs measurement devices. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 92-102.