



Quantification of the Gross-Link Pentosidine in Serum from Normal and Uremic Subjects

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 正哲 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1454

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 177号	学位授与年月日	平成 6年 3月 8日
氏 名	高 橋 正 哲		
論文題目	Quantification of the Gross-Link Pentosidine in Serum from Normal and Uremic Subjects (健常者及び尿毒症患者における血清中の架橋ペントシジンの測定)		

医学博士 高橋正哲

論文題目

Quantification of the Cross-Link Pentosidine in Serum from Normal and Uremic Subjects

(健常者及び尿毒症患者における血清中の架橋ペントシジンの測定)

論文の内容の要旨

コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分の蛋白質である。コラーゲンは加齢とともにその弾力性は失われ、プロテアーゼに対する抵抗性が増し、黄色の蛍光物質が蓄積される。こうしたコラーゲンの変化は、分子内あるいは分子間に形成される架橋結合によりもたらされると考えられる。ピリジノリンはコラーゲンの成熟により形成される非還元性の成熟架橋の一つであり、コラーゲン線維の安定化に寄与している。一方、老化にともなう架橋の変化は今だ明らかではないが、近年、Maillard 反応と呼ばれる糖化還元反応により生成された架橋物質が注目されている。1989年に Sell らにより単離同定されたペントシジンはこれらの老化架橋の一つであり、加齢にともない、また、糖尿病により組織に蓄積される。本研究は、血清中のペントシジンを測定する方法を確立し、健常者および透析患者における血清ペントシジン値につき検討した。

陽イオン交換である SP-Sephadex C-25 を前処理法に用い、逆相高速液体クロマトグラフィーにより血清加水分解物中のペントシジンを測定する方法を確立した。すなわち、血清を同量の濃塩酸にて加水分解した後、フィルターを通し、125ul の加水分解物を 10ml の蒸留水で希釈し、前もって水で平衡化しておいた 0.8X1.0cm の SP-Sephadex C-25 カラムにのせた。0.1M の塩酸で洗った後、1M の塩酸で溶出した。コンセントレーターにて減圧乾固後、200ul の *n*-heptafluorobutyric acid (HFBA) にて溶解し、160ul を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入した。HPLC は Model CCPM ポンプ、Model FS-8010 蛍光検出器、Model AS-8010 オートサンプラー、Model SC-8010 システムコントローラーを用いた。カラムとして Radial-Pak C18 (8mmX10cm) を用い、移動相を 27% の acetonitril と 73% の 40mM HFBA とし、流速を 1 ml/min とした。335nm の励起波長で 385nm の蛍光を測定した。

血清中の蛋白質を perchloric acid (PCA) を沈澱させ、その上清と沈澱中のペントシジンを測定したところ、上清中にはペントシジンは存在せず、沈澱中のペントシジンのクロマトグラムは PCA 処理をしない血清とほぼ同一であったため、以後の測定は PCA 処理をせず行なった。本測定法の回収率は 95.5%、intraassay CV は 3.6%、interassay CV は 6.3% であった。ペントシジン濃度 40pmol から 4nmol において $r=0.999$ の直線関係が得られた。

健常者 33 人と透析患者 98 人の血清ペントシジン値を測定した結果、健常者で $77 \pm 40 \text{ nmol/L}$ (mean $\pm$ SD) であり、透析患者で $1267 \pm 695 \text{ nmol/L}$ と著明な高値を示した。健常者において血清ペントシジン濃度は加齢と有意な正の相関を示し ($r=0.453, p<0.01$)、加齢により血清ペントシジンが増加すると考えられた。透析患者においては血清ペントシジン濃度と年齢との間に相関はなかったが、透析期間との間に、弱い、有意な正の相関 ($r=0.272, p<0.05$) を認めた。

ペントシジンはこれまで皮膚の目のレンズに加齢とともに蓄積されること、また、糖尿病状態や尿毒症により組織に蓄積されることが報告されているが、その生成機序については明らかではない。高血糖状態により生体内の蛋白質が非酸素的な Maillard 反応などにより糖化され、さらに長期間を経て種々の

リアレンジメントを受けることにより、advanced glycated end-products といわれる安定した物質が形成されることが、糖尿病の血管障害などの合併症の原因となると考えられている。しかしながら、透析患者における血清ペントシジン濃度は糖尿病患者に比べかなり高く、透析患者においてはペントシジン生成の亢進に加え、排泄されないことが血清ペントシジン高値の原因と考えた。

論文審査の結果の要旨

細胞外マトリックスの主要蛋白質成分であるコラーゲンは、加齢と共に弾力性を失い、プロテアーゼに対する抵抗性を増す。黄色蛍光物質の蓄積もみられる。こうしたコラーゲンの変化は、分子内あるいは分子間に形成される架橋結合によりもたらされると考えられる。ピリジノリンはコラーゲンの成熟により形成される非還元性の成熟架橋の一つであり、コラーゲン線維の安定化に寄与している。一方、1989年に Sell and Monnier によりヒト硬膜コラーゲンから単離同定されたペントシジン（構造は lysylribosylarginine）は、加齢にともない、また糖尿病において組織に蓄積されることから、老化架橋候補物質として近年注目されている。

申請者も、ヒト関節軟膏コラーゲン中にピリジノリンとは別の蛍光物質（最大励起波長：335nm、最大蛍光波長：385nm）が存在すること、およびその量が加齢にともないほぼ直線的に増加することを独自に観察していたが、この蛍光物質がペントシジンであることが明らかになった。そこで申請者は本研究において、陽イオン交換体である SP-Sephadex C-25 による前処理と逆相 HPLC の組み合わせにより簡便にして信頼性のあるペントシジン測定法を確立し、加齢および各種症病にともなう尿と血清中のペントシジンの変動を研究した。得られた主な結果は次のとおりである。

1. 尿のペントシジンはほとんど（約90%）が遊離型で存在する。その排泄量は、クレアチニン排泄量との比で表すと小児期から67歳くらいまではほぼ一定であるが、70歳を過ぎると急激に著しく増加する。糖尿病患者でも尿中ペントシジンは有意に増加している。
2. 血清中のペントシジンは酸不溶性分画に検出される。すなわち、蛋白と結合した形で存在すると思われる。しかし、尿毒症患者では、全量の約4.7%（平均値）のペントシジンが酸可溶性分画にも検出される。血清中のペントシジンは、60歳くらいまで加齢により徐々に増加する。尿毒症患者では著しく増加しており、尿毒症患者の中では血液透析の期間が長いほど血清ペントシジン値も高いという傾向にある。

以上の内容の本研究は、審査委員会において、興味深く、且つ将来の発展が期待されると高く評価された。本論文の内容と関連して次の試問を行った。

1. ペントシジンは架橋物質か、それとも advanced glycated end-products の一つとみなすべき物質か
2. ペントシジンの生成機構、ペントシジン生成を規定している要因、血清のペントシジンの由来、血清中でペントシジンと結合している蛋白の本態等
3. 尿のペントシジンの由来、すなわち蛋白結合型からの切断部位、機構、切断を受けるのは血中の蛋白結合型ペントシジンか等
4. 70歳以上における尿へのペントシジン排泄の急激な増加の理由、および尿毒症における血清ペントシジンの著しい増加の理由
5. ペントシジンの体内分布、動態、すなわち組織分布と出来たペントシジンはどれだけ組織に残り、どれだけ血中へ放出されるか、更に尿に排出されるか等。

6. 赤血球のペントシジン結合蛋白について
7. 高年齢層で血中ペントシジン値のバラツキが大であることと関連している要因
8. SP-Sephadex C-25を前処置に用いた理由、他に考えられる臨床目的のための簡便なペントシジン検出法
9. 骨の成熟の分子的機構について
10. 動物における実験系の可能性について
11. 架橋構造の分子モデルと安定配座について

これらの質問に対する申請者の応答は適切であり、本論文が博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市	山	新				
	副査	教授	菅	野	剛	史	副査	教授	藤 瀬 裕
	副査	教授	吉	見	輝	也	副査	助教授	菱 田 明