

学 位 論 文

Doctor's Thesis

新規AGE生成においてクレアチンが
タンパク質修飾剤として作用する
(Creatine plays a direct role as a protein modifier in the formation of
a novel advanced glycation end product)

宮崎 公德

Kiminori Miyazaki

指 導 教 官

堀内 正公 教授

熊本大学大学院医学研究科生化学第二

2002年3月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名 : 新規AGE生成においてクレアチンが
タンパク質修飾剤として作用する
(Creatine plays a direct role as a protein modifier
in the formation of a novel advanced glycation end product)

著 者 名 : 宮 崎 公 徳
Kiminori Miyazaki

指導教官名 : 生化学第二教授
堀内 正公

審査委員名 : 分子遺伝学担当教授	森 正敬
生化学第一担当教授	三浦 洸
微生物学担当教授	前田 浩
内科学第三担当教授	冨田公夫

2002年3月

目次

要旨		1
学位論文の骨格となる参考論文		3
謝辞		4
略語一覧		6
第1章	研究の背景と目的	8
1-1	背景	8
1-2	AGE構造体について	11
1-3	本研究の目的	14
第2章	実験方法	17
2-1	抗Pentosidine抗体の作製	17
2-1-1	試薬	17
2-1-2	Pentosidine抗原（Pentosidine結合-HSA）の調製	17
2-1-3	モノクローナル抗Pentosidine抗体の作製	19
2-1-4	Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）	19
2-1-5	抗Pentosidine抗体の免疫反応性とそのキャラクタライズ	21
2-2	抗Pentosidine抗体を用いたPentosidine生成モデル系の評価	22
2-2-1	リボース修飾BSAの作製	22
2-2-2	リボース修飾BSAの酸加水分解	22
2-3	C-pentosidineの検出	23
2-3-1	C-pentosidineの合成と精製	23
2-3-2	高速液体クロマトグラフィ（HPLC）	23
2-3-3	核磁気共鳴スペクトル（NMR）、質量分析（FAB-MS）	24
2-3-4	生理的条件下でのC-pentosidine生成	24
2-3-5	ヒト血漿中のC-pentosidineの検出	24

第 3 章	実験結果	26
3-1	抗Pentosidine抗体の作製	26
3-1-1	抗Pentosidine抗体の免疫反応性とそのキャラクタライズ	26
3-2	抗Pentosidine抗体を用いたPentosidine生成モデル系の評価	29
3-2-1	リボース-修飾およびグルコース修飾BSA上のPentosidineの検出	29
3-2-2	Pentosidine生成における尿素、クレアチン及びクレアチニンの効果	32
3-3	C-pentosidineの検出	35
3-3-1	HPLCによるC-pentosidineの検出	35
3-3-2	抗Pentosidine抗体のC-pentosidineに対する免疫反応性	36
3-3-3	NMR及びFAB-MSによるC-pentosidineの構造解析	38
3-3-4	生理的条件でのC-pentosidine生成	40
3-3-5	ヒト血漿中のC-pentosidineの検出	42
第 4 章	考察	45
4-1	抗Pentosidine抗体の作製	45
4-2	抗Pentosidine抗体を用いたPentosidine生成モデル系の評価	45
4-2-1	リボース修飾及びグルコース修飾BSA上のPentosidineの検出	45
4-2-2	Pentosidine生成における尿素、クレアチン及びクレアチニンの効果	45
4-3	C-pentosidineの検出	47
4-3-1	生理的条件でのC-pentosidine生成	47
4-3-2	ヒト血漿中のC-pentosidineの検出	50
4-3-3	C-pentosidineの生成機構について	50
第 5 章	結語	55
参考文献		57

要旨

【目的】平均寿命の上昇、社会の高齢化に伴って、糖尿病など生活習慣病の急増が社会問題となっている。糖尿病合併症の発症要因の一つとして、タンパク質の翻訳後修飾反応の一つであるメイラード反応が注目されている。本反応ではタンパク質がグルコースなどの還元糖と反応し、シッフ塩基を経てアマドリ生成物を生じる。これら前期反応生成物がさらに酸化、脱水、縮合、環化反応を受けて蛍光性、褐色化、架橋形成を特徴とするメイラード反応後期生成物（AGE: advanced glycation end product）が形成される。AGEは加齢や疾病の進行に伴って蓄積し、糖尿病患者で有意に高値を示すことが報告されている。Pentosidineはペントースと等モルのリジンとアルギニンが架橋した蛍光・架橋性のAGE構造体である。リジンとアルギニンを用いた *in vitro* の実験においては、Pentosidineの生成量は代表的なAGEの一つである *N*^ε-(carboxymethyl) lysine (CML)に比べて必ずしも多くないが、生体内では加齢や糖尿病合併症に伴って、Pentosidine蓄積が増大することから、生体内でPentosidine生成が増大するには、腎疾患に関連する何らかの内因性の物質が促進因子として作用している可能性が考えられた。

【方法・結果】まず、(1)Pentosidine検出に有用なモノクローナル抗体を作製し、(2)本抗体を用いた免疫化学的方法と高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法によって、BSAとリボースからPentosidineを生成する *in vitro* モデル系において、生成したPentosidineを検出する系を構築した。(3)これら2つの検出系を用いて、Pentosidine生成に関与する内因性物質の解析を行ったところ、内因性物質がPentosidine生成の増大をもたらすのではなく、Pentosidineと類似する新規なAGE構造体（以下C-pentosidineと省略）を生成することを見出した。(4)C-pentosidineを *in vitro* で合成・単離してNMRで構造を決定した。(5) *in vitro* の実験系では、C-pentosidineの経時的な生成量はPentosidineよりも速いことが明らかとなった。(6)C-pentosidineは透析患者の血漿及び尿サンプル中に検出された。以上のことから、C-pentosidineは以下の性質を持つことが明らかとなった。

【考察】C-pentosidineは1)Pentosidine類似の蛍光特性を有し、2)NMRではPentosidineと同一の芳香環構造と3)クレアチンの*N*-メチル基の存在を示した。4)さらに抗Pentosidine抗体に反応する。5)これらの結果を支持する構造として提唱した構造は質量分析において、矛盾しない分子量を与えた。よって、この

分子はクレアチンのグアニジノ基がリジン-リボースと反応して取り込まれた新規蛍光性 AGE 構造(C-pentosidine)であると推察された。このように、腎疾患において高値を示すクレアチンがタンパク質の修飾と C-pentosidine の生成を促進することが明らかとなり、AGE が関与する疾病に関する知見が得られた。

学位論文の骨格となる参考論文

①関連論文および、参考論文

1. Miyazaki, K., Nagai, R., Horiuchi, S., Creatine plays a direct role as a protein modifier in the formation of a novel advanced glycation end product.
Journal of Biochemistry 132: 543-550. 2002.

②その他の論文のリスト

1. Hayashi C.M., Nagai R., Miyazaki K., Hayase F., Araki T., Ono T., Horiuchi S., Conversion of Amadori products of the Maillard reaction to N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine by short-term heating: possible detection of artifacts by immunohistochemistry.
Laboratory Investigation 82: 795-808, 2002.

謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜り、本稿の作成に多大なる御教示、御援助を頂きました熊本大学医学部 堀内正公教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、終始御理解と経済的支援を賜りました株式会社 同仁化学研究所 上野景右社長に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、終始有益なる御指導、御助言、御討論を賜りました熊本大学医学部 宮崎章博士（現：昭和大学教授）、袴田秀樹博士（現：東京薬科大学助教授）、永井竜児博士（現：米国サウスカロライナ大学留学中）に深謝致します。

本研究を行うに際し、終始御理解と御支援、御助言を賜りました株式会社 同仁化学研究所 佐々本一美取締役技術本部長、日高三男生産技術部長、大瀬戸文夫研究部次長（現：生産技術部次長）に深謝致します。

本研究を行うに際し、血清 Pentosidine 測定法を御教示して頂きました東京薬科大学薬学部 吉原一博博士に深謝致します。

本研究を行うに際し、Diacetylpentosidine を恵与して頂きました明治乳業ライフサイエンス研究所 澤井保子博士、ならびに標準 Pentosidine を恵与して頂きました株式会社伏見製薬所 細川知良博士、水川暢彦氏に深謝致します。

本研究を行うに際し、血清試料を恵与して頂きました熊本市民病院 中村亨道医師、熊本泌尿器科病院 野尻明弘院長に深謝致します。

本研究を行うに際し、マウスモノクローナル抗体の作製技術を御教示頂きました株式会社トランスジェニック 坂本珠美氏、布田法子氏に深謝致します。

本研究に際し、終始御協力と御助言を頂きました熊本大学医学部生化学第二講座の大学院生、研究生諸氏に心から感謝致します。

本研究に際し、御協力を頂きました株式会社 同仁化学研究所 研究部並びに生産技術部の諸氏に心から感謝致します。

最後に終始私を支えてくれた妻、昭代に心から感謝致します。

略語一覽

AGE	advanced glycation end products
Boc	tert-butoxycarbonyl
BSA	bovine serum albumin
C-Pentosidine	Creatine-derived pentosidine analogue, 4-(5-Amino-5-carboxy-pentyl)-2-(carboxymethyl-methyl-amino)- 3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin-4-ium
CEL	<i>N</i> ^ε -(carboxyethyl)lysine
CML	<i>N</i> ^ε -(carboxymethyl)lysine
DOLD	3-Deoxyglucosone-derived lysine dimer, 1,4-Di(<i>N</i> ^ε -lysino)-4-(2,3,4-trihydroxybutyl)-imidazolium salt
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, hydrochloride
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAB-MS	fast atom bombardment mass spectrometry
GOLD	glyoxal-derived lysine dimer, 1,3-di(<i>N</i> ^ε -lysino)imidazolium salt
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRP	horse radish peroxidase
HSA	human serum albumin
KLH	keyhole limpet hemocyanin
MOLD	methylglyoxal-derived lysine dimer, 1,3-di(<i>N</i> ^ε -lysino)-4-methyl-imidazolium salt
MRX	Maillard reaction product X
NMR	nuclear magnetic resonance
OPD	1,2-diaminobenzene dihydrochloride
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	PBS containing 0.05% Tween 20
Pentosidine	2-(4-Amino-4-carboxy-butylamino)-4-(5-amino-5-carboxy-pentyl)- 1 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin-4-ium
Pent-HSA	Pentosidine-conjugated HSA

Pent-KLH	Pentosidine-conjugated KLH
pristane	2,6,10,14-tetramethylpentadecane
Rib-BSA	ribose-modified BSA
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hydroxysulfosuccinimide
TRIS	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
WSC	water soluble carbodiimide, EDC と同じ
WSC-HSA	WSC-treated HSA

第 1 章 研究の背景と目的

1-1 背景

日本の 65 歳以上の人口は 1970 年に 739 万人、高齢化率 7.1%であったが、2000 年には 2,187 万人、17.3%となり、この 30 年間に急速に高齢化が進行している。2001 年（H.13 年度）調査の日本人の平均寿命は、男性 78.07 才、女性 84.93 才と世界中で最も長寿国となっている一方で、少子化も進み、すでに 65 歳以上人口（2000 年度 2,200 万人）は、0～14 歳の年少人口（2000 年度 1,850 万人）を上回っている。今後は更に高齢者数と高齢化率は増加し、2020 年には 65 歳以上人口は 3,334 万人、高齢化率は 26.9%になると予想されている。

平均寿命の上昇は医療の進歩、国民生活の向上、社会保障の充実の成果であるが、このような社会状況において、加齢、生活習慣に関係する疾病、特に糖尿病患者の数も増加している。平成 5 年の調査で糖尿病患者は 157 万人、平成 8 年には 218 万人と言われていたが、現在では約 690 万人、その疑いを否定できない人を含めると 1,370 万人と推定されており、言い換えれば 60 才以上の 5 人に 1 人、国民の 9 人に 1 人の割合で糖尿病の素因を持っているということが出来る。このように日本人の生活様式の欧米化や人口の高齢化と共に、糖尿病患者数は著しい増加の一途をたどっている。これに対応するため、日本政府は平成 12 年に発足させた「ミレニアムプロジェクト」の「高齢化」に関する項目の中で、①痴呆等神経疾患、②癌、③糖尿病・高脂血症等代謝性疾患、④高血圧等循環器疾患、⑤気管支喘息等免疫アレルギー性疾患を、国として重点的に取り組む「ありふれた病気」と設定し、これらの疾患の a) 疾患関連・薬剤反応性関連遺伝子の発見、b) 治療成績の向上、c) 新薬開発を進める、といった遺伝的背景と治療法に取り組むことを打ち出している。またこれを受けて厚生労働省も平成 12 年度より「21 世紀における国民健康づくり運動（健康日本 21）」を掲げ、生活習慣の改善、危険因子の低減と検診の充実を通じて、癌、心臓病、糖尿病の低減を目標としているように、高齢化と食生活の変化に伴って糖尿病やそれに伴う合併症の急増が緊急な社会問題となっている。

糖尿病合併症の発症要因としては、①ポリオール経路の亢進、②メイラード反応、③PKC の活性化、④酸化ストレス説などが提唱されているが、病態の発症に

は、これらが互いに密接に関連して関与していると考えられる。

このうちメイラード反応（タンパク糖化反応）は 1912 年に Lois Camil Maillard がアミノ酸と還元糖を加熱すると黄褐色の色素が生成することを発見したことから命名された。この反応はタンパク質またはアミノ酸のアミノ基と還元糖のカルボニル基が非酵素的に反応し、シッフ塩基を経由してアマドリ転位生成物に至る前期反応と、さらに酸化、脱水、縮合、環化など反応を受け、分子間架橋形成や開裂など複雑な反応を経て、蛍光・褐色変化・分子架橋構造を特徴とする後期反応生成物（Advanced Glycation End products）にいたる 2 つの段階に大別される（図 1-1）。

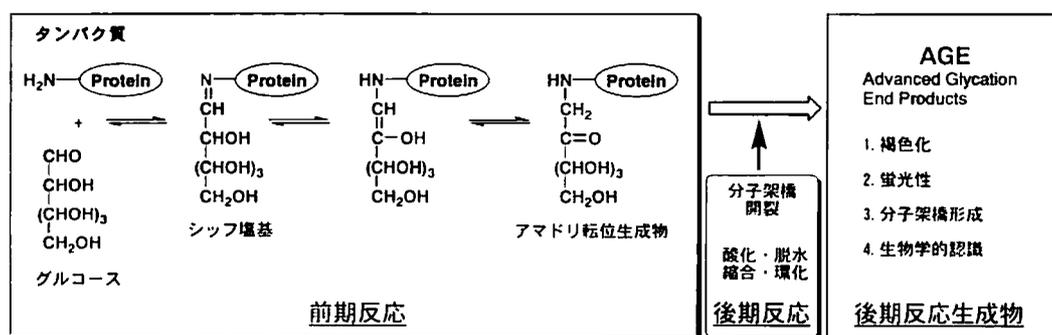


図 1-1 メイラード反応

メイラード反応は当初、食品の香りや、長期保存による栄養価低下に関連した反応であることから食品化学分野での研究が進んでいた。1968 年にヘモグロビン β 鎖の N 末端バリン残基にグルコースが結合したアマドリ転位産物である HbA1c が発見され、これが血糖コントロールの指標になると、生体反応としてのメイラード反応が注目されるようになった。さらに、1984 年に AGE の特徴の 1 つである蛍光性物質が脳硬膜(dura mater)のコラーゲンに加齢に伴って蓄積し、糖尿病患者で有意に高値を示すことが報告され、生体の AGE が注目されるようになった。近年、抗 AGE 抗体を用いた免疫組織化学的手法によって、種々の生体組織に AGE が蓄積し、この蓄積が加齢や糖尿病合併症や動脈硬化などの加齢関連疾患で有意に増加することが明らかとなった。（図 1-2）

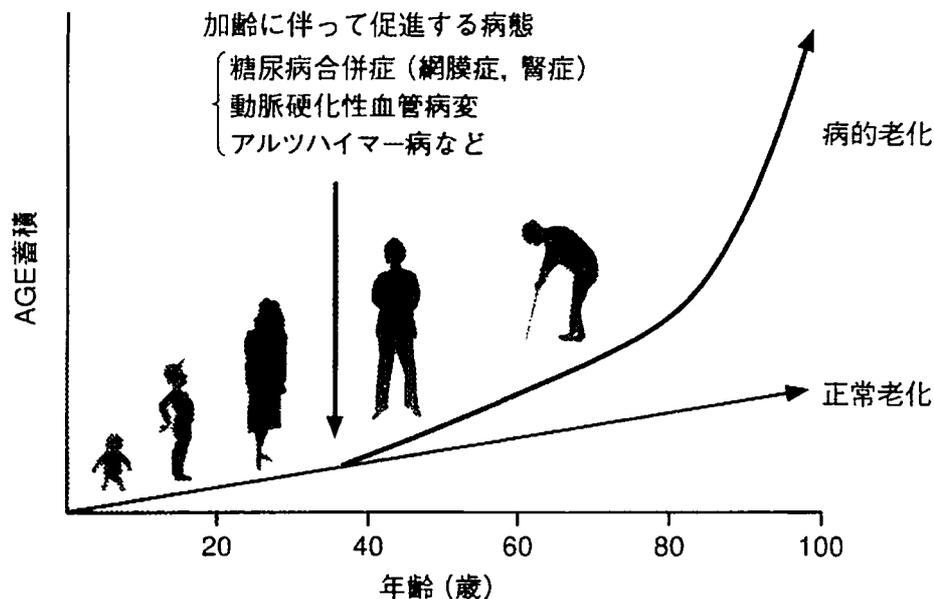


図 1-2 加齢に伴う生体内 AGE の蓄積

例えば、糖尿病腎症[1]や急性腎不全患者[2]の腎臓や、血管壁の動脈硬化性病巣[3]、透析性アミロイドーシスでのアミロイド繊維[4, 5]、光老化した皮膚のアミロイド日光弾力線維症[6]、脳神経の海馬 CA4 領域[7]など病的条件下での種々のヒト組織において AGE 修飾タンパクの存在を示している。これらの知見は老化関連疾病の病理において AGE 修飾の関わりの可能性を示唆している。

特に糖尿病が動脈硬化症に対して促進的に作用するメカニズムとしては、LDL のグリケーションの観点から、1) LDL がメイラード反応前期で修飾を受けた glycated-LDL は、LDL と比して、LDL 受容体に対するリガンド活性が低下しており、血中消滅速度 (クリアランス) が遅延し、結果として血中コレステロール値上昇を惹起する。2) LDL が後期反応による修飾を受け AGE-LDL となり、AGE レセプターのリガンドとして、細胞に直接作用し、泡沫細胞を形成する という 2つが考えられている。現在最も受け入れられているのは、前者の糖化 LDL の代謝遅延説であり、LDL が糖化 (グリケーション) されると LDL 受容体に対する認識が低下し、クリアランス遅延が起こり血中 LDL コレステロール上昇し、動脈硬化症の発生、進展に促進的に作用するという考え方である。また、動脈硬化症巣の AGE-LDL は、マクロファージスカベンジャー受容体 (MSR) を介してマク

ロファージに取り込まれ、マクロファージを直接的に泡沫化し、動脈硬化の発症、進展に関与している可能性も示唆されている。

また、近年タンパクだけでなく、核酸、特にグアノシンのアミノ基も還元糖の存在下で非酵素的なグリコシル化を受けることが報告されている[8]。Leeらは高濃度のグルコース6リン酸に暴露したプラスミドを用いたモデル系で感染効率の減少と変異率の増大を示し [9]、さらに糖尿病マウスの transgenic embryo での変異率の増大はグルコースレベルの上昇と相関し[10]、AGEの形成がDNAの酸化傷害に関与していることを示唆している[11]。これまでに核酸のAGEとして

N^2 -[1-(1-carboxy)methyl]guanosine (CMG)[12]、

N^2 -[1-(1-carboxy)ethyl]guanosine (CEG)[13]、

N^2 -[1-(1-carboxy)ethyl]deoxyguanosine(CEdG)[14]、

N^2 -[2-(1-carboxy-3, 4, 5-trihydroxypentyl)guanosine (CTP)[15]が知られている。

このようにAGEに関係する研究は疾患の病理のみならず、DNAの酸化傷害や遺伝子変異の面からも注目を集めている。

1-2 AGE構造体について

現在まで生体タンパクに発現するAGEとして図1-4に挙げた構造体が知られている。これらは大きく2つのグループに大別され、1つは、蛍光性で架橋構造を有するもの(fluorescent/crosslinked)であり、もう一つは蛍光も架橋性もないもの(non-fluorescent/ non-crosslinked)である。前者に属するものとして、ペントシジン(Pentosidine)、クロスリン(Crossline)、フルオロリンク(Fluorolink)、ピロピリジン(Pyrrypyridine)、ベスパーリジン(Vesperlysine)、MRX(Maillard Reaction Product X)、GOLD(Glyoxal-derived lysine dimer)、MOLD(Methylglyoxal-derived lysine dimer)、DOLD (3-Deoxyglucosone-derived lysine dimer)、FFIがある。(このうちFFIについては、後に人工産物であることが明らかとなっている。) 後者としては、CML、CEL、ピラリン(Pyrraline)、アルグピリミジン(Argpyrimidine)、メチルグルオキサールイミダゾロン(MG-imidazolones)、3-デオキシグルコソニイミダゾロン(3DG-imidazolones)がある。

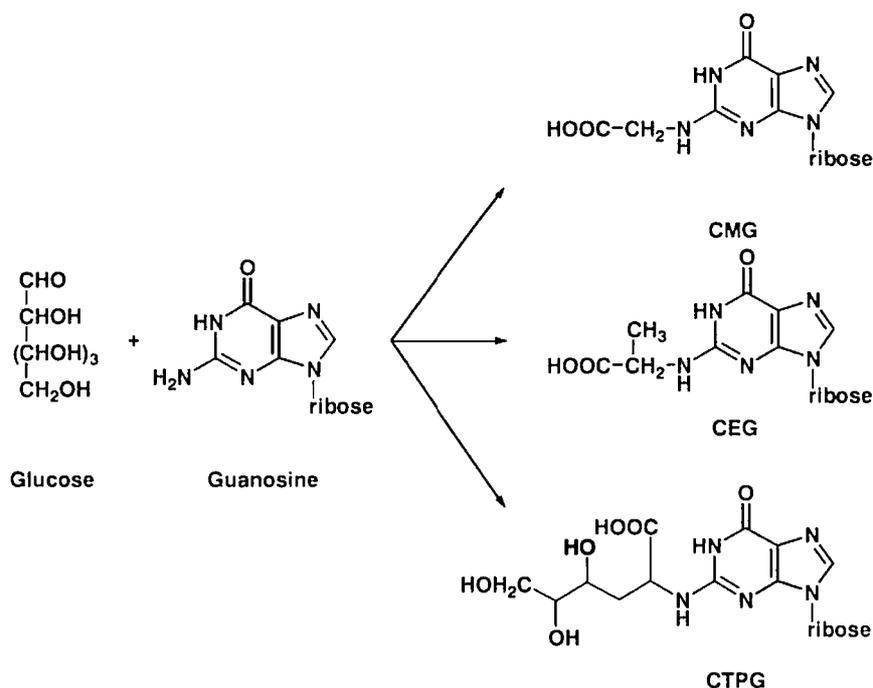
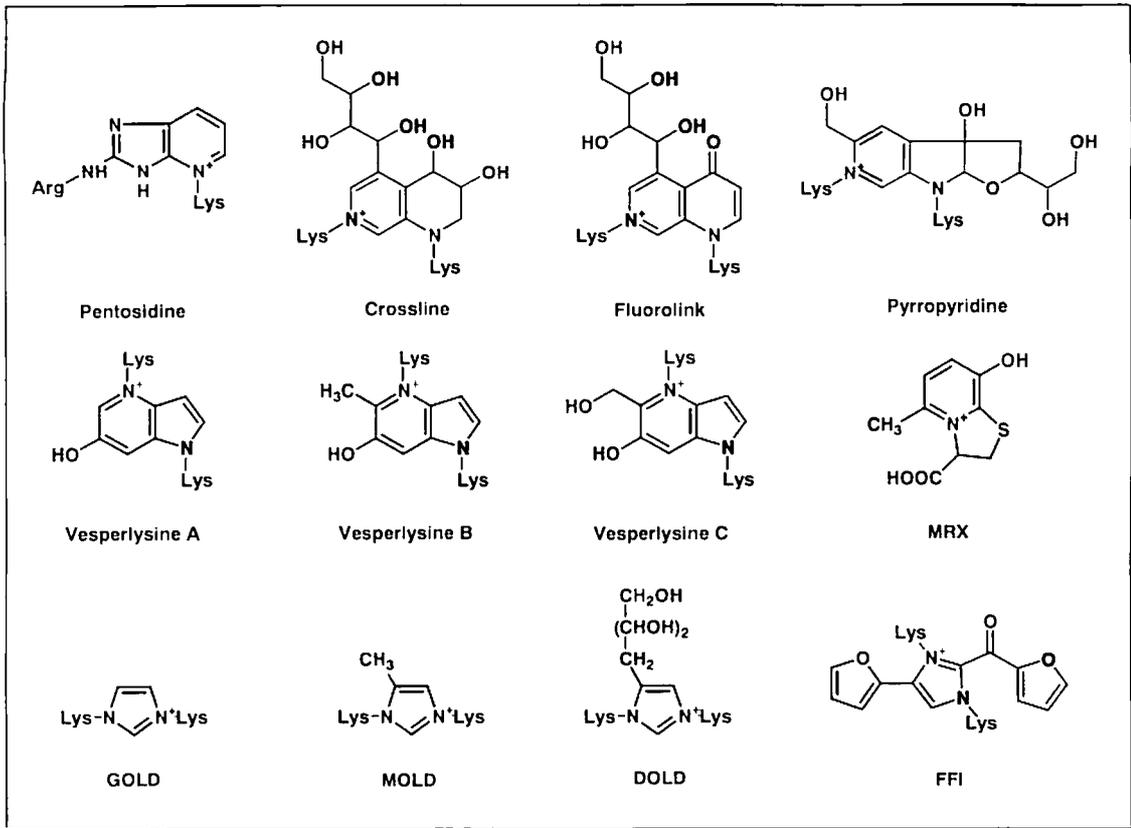


図 1-3 核酸塩基の AGE 化[12,13,15]

このうち酸加水分解に対して安定である Pentosidine や CML などの構造体は酸加水分解後に HPLC などの機器分析によって定量可能であるが、大部分の構造体は酸加水分解に対して不安定であり、個々の構造体に特異的な抗体を用いる免疫学的手段によって生体における存在が同定されてきた。

AGE と細胞の相互作用については、AGE タンパクが網膜血管内皮細胞に対しては血管新生を促進し周皮細胞に対して増殖抑制効果を示すことが知られている。血管平滑筋細胞は AGE タンパクを取り込み、分解する機能があるが、AGE タンパクによって細胞遊走が誘導され[16]、サイトカインの放出、DNA およびタンパク合成の促進が惹起されるなど、AGE が糖尿病性細小血管障害や粥状動脈硬化の原因の一つであることを示している。[17]

Fluorescent / Crosslinked



Non-fluorescent / Non-crosslinked

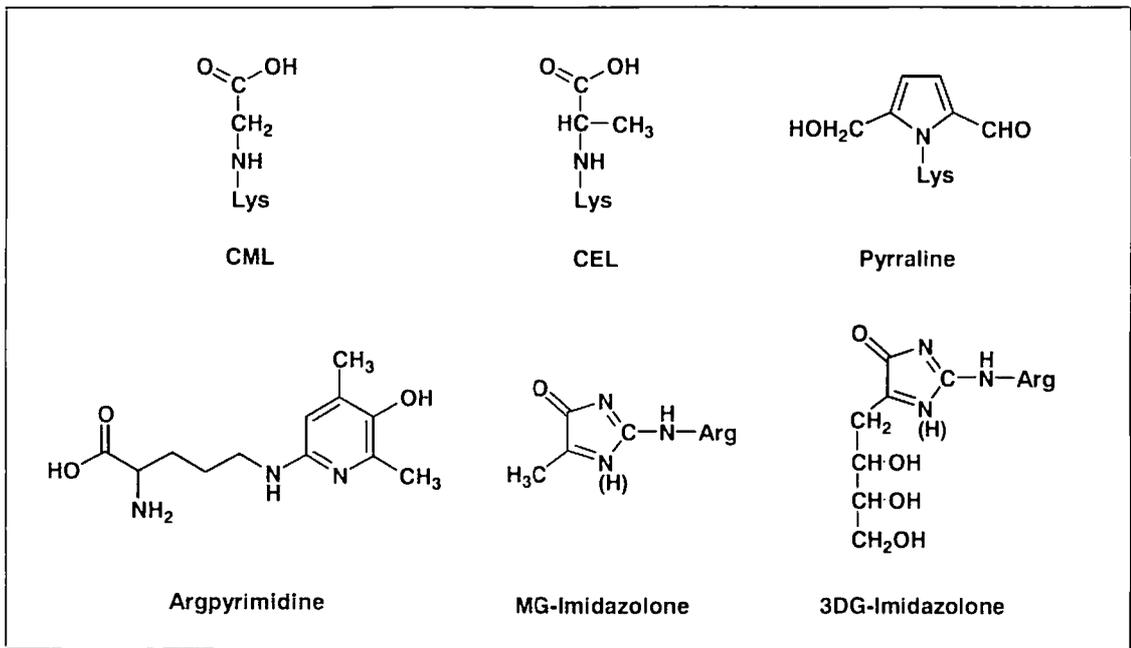


図 1-4 既知の AGE 構造体

Pentosidine は 1989 年に構造決定された AGE で、リジン残基とアルギニン残基が架橋した蛍光性物質である[18]。構造に関与している炭素は 5 個で五炭糖やビタミン C から容易に生成するが、六炭糖のグルコース、フルクトースなどからも生成する[19,20]。Pentosidine は酸加水分解に安定であるので、血漿や組織などタンパク質中の Pentosidine 含量は、タンパク質を酸加水分解した後に、その蛍光性を利用して HPLC で検出定量が可能である。またポリクローナル抗体を用いた免疫化学的な検出も行われている。例えば血漿 Pentosidine レベルは加齢[18,21]、糖尿病[22,23]の発症に相関してヒトの皮膚に蓄積し[24]、腎疾患[25-32]、急性リュウマチ性関節炎[33,34]で増大することが知られており、さらに加齢や糖尿病の発症に相関して皮膚に蓄積し、糖尿病性腎症では増加することが報告されている[24,35,36]。またアルツハイマー病の脳[37]や海馬 CA4 領域[7]、糖尿病関連アミロイドーシス[5]によっても蓄積することが見出されている。これらのデータは *in vivo* で Pentosidine と病態生理学的過程とが関連する可能性を示唆している。

1-3 本研究の目的

これまでに本教室では、代表的な AGE の一つである N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine (CML)を始めとして種々の AGE に対するモノクローナル抗体を作製し、AGE 生成と生体内の存在に関する研究を行ってきた。例えばグルコースと BSA をインキュベートして調製した AGE-BSA をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体 6D12 は主要な AGE 構造である CML を認識する重要な抗体であるが、その後の研究でこの抗体は CML の他に N^{ϵ} -(carboxyethyl)lysine (CEL)も認識することが明らかとなった[38]。すなわち BSA をグルコースなどによって AGE 化した AGE-BSA を用いて免疫した場合、AGE-BSA にはあらゆる構造の AGE が生成しており、たとえモノクローナル抗体作製段階でスクリーニングをしていったとしても、ある AGE 構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を選択する事は非常に難しい。すなわち構造未知の AGE との思わぬ交差反応を示す恐れがある。ましてポリクローナル抗体では、特定の構造に特異的な抗体を精製して得ることは非常に難しい。そこで、本教室では目的とする AGE 構造を化学的に合成しこれをハプテン抗原としてマウスに免疫することで目的抗原を高感度かつ特異的に認識するモノクローナル抗体を作製してきた。Pentosidine に対してはこれまでに

有用なモノクローナル抗体が作製されておらず、ポリクローナル抗体による報告に留まっていた[28,32,37]。そこで化学的に合成した Pentosidine をハプテン抗原として用いて免疫し、モノクローナル抗体を作製する必要がある。

一方で Pentosidine の生成過程については、前述のように Pentosidine はペントースと等モルのリジンとアルギニンが架橋した蛍光性 AGE であり、疾患に伴う存在の増大が Pentosidine の蛍光性を利用した HPLC 検出によって報告されている。リジンとアルギニンを用いた *in vitro* の実験においては、Pentosidine の生成量は、CML に比べて必ずしも多いとは言えないにも拘わらず、*in vivo* では上述のように加齢や糖尿病合併症に伴って、Pentosidine の蓄積が増大することが知られている。このため、*in vivo* で Pentosidine の生成が増大するのには、加齢や疾患に関連して増大する何らかの内因性の物質が Pentosidine 生成を促進しているのではないかと想定された。宮田らは、腎疾患患者のヒト血清を *in vitro* でインキュベートすると、血清中の Pentosidine 含量は正常血清に比べて高値を示すことから、腎疾患患者血清中に存在する分子量 5,000 以下の物質が Pentosidine 生成促進に寄与しているのではないかと提唱している[25]。そこで我々は Pentosidine に対するモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いて Pentosidine 生成過程の解析を行った。

まず(1) Pentosidine に対するモノクローナル抗体を作製し、(2) *in vitro* で BSA とリボースをインキュベートして Pentosidine を生成するモデル系を作り、モノクローナル抗 Pentosidine 抗体を用いた免疫化学的方法と HPLC によって、生成した Pentosidine を検出する系を構築した。(3) さらにこの検出系を用いて加齢や疾患で増大すると考えられ、Pentosidine 生成に関与する内因性物質の探索を行った。その結果内因性物質が関与して Pentosidine 生成の増大をもたらすのではなく、新規な AGE 構造体 (C-pentosidine) を生成することを見出した。(4) この C-pentosidine を *in vitro* で合成後単離して、構造解析を行い、モノクローナル抗 Pentosidine 抗体を用いて免疫化学的検討を行った。さらに HPLC によって生成量の時間変化を追跡したところ、同じ条件であれば Pentosidine より C-pentosidine の方が、生成速度が速いことが明らかとなった。また(5) 透析患者の血漿及び尿サンプル中から、C-pentosidine の検出定量を行ったが、検出できた試料数が少なく、疾患との因果関係を断定できるには至っていない。

このように内因性物質により、Pentosidine 類似の C-pentosidine を生成する可能性

が示唆され、酵素免疫測定法（EIA）によるタンパク中の Pentosidine 量測定に影響を与えている可能性が示唆された。

第2章 実験方法

2-1 抗 Pentosidine 抗体の作製

2-1-1 試薬

ヒト血清アルブミン (HSA)、Keyhole Limpet Hemocyanine (KLH) は Sigma から、L-lysine、L-arginine、creatine、creatinine、尿素、Dowex イオン交換樹脂 (50W x8 100-200mesh) は和光純薬工業 (株) から購入した。HP-20 陽イオン交換樹脂は三菱化学 (株) から購入した。ELISA に用いた 96 穴マイクロタイタープレートは Nalge Nunc International から、HRP 標識抗マウス IgG(γ)抗体は Kirkegaard & Perry Laboratories から購入した。Protein G Sepharose は生化学工業 (株) から購入した。SDS-PAGE に用いた 4-20%の密度勾配ポリアクリルアミドゲルは第一化学薬品 (株) から購入した。他の試薬は市販されている最良のグレードを用いた。

2-1-2 Pentosidine 抗原 (Pentosidine 結合-HSA) の調製

抗 Pentosidine 抗体の作製にあたっては、Pentosidine をキャリアタンパクであるアルブミンに結合して免疫を行う必要があるが、通常の Pentosidine は分子内に複数のアミノ基とカルボキシル基を持つので、WSCによって分子内でアミノ基とカルボキシル基が架橋してしまう可能性があり、アルブミンへの導入効率の低下が予想される (図 2-1-a)。そこで、今回抗原としては、Pentosidine のリジン残基及びアルギニン残基のアミノ基をともにアセチル基で保護した *N,N'*-Diacetyl-pentosidine を用いて抗原を調製した (図 2-1-b)。*N,N'*-Diacetylpentosidine は Monnier らの文献[19]を元に明治乳業ヘルスサイエンス研究所で合成されたものを供与して頂き使用した。以下にその調製法を示す。

D-ribose 2.19 g、*N*^α-acetyl-L-lysine 2.5 g、*N*^α-acetyl-L-arginine 3.69 g を 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 78 ml に溶解し、5 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 9.0 に調製し、これを 65℃で 48 時間攪拌しながらインキュベートした。反応液を超純水で 5 倍に希釈し Diaion HP-20, 800mL に通した。陽イオン交換カラムを 2L の超純水、5%、10%、20%のメタノールを含む超純水で洗浄し、40%メタノール水溶液 2L で溶出した。収量 267.1 mg。

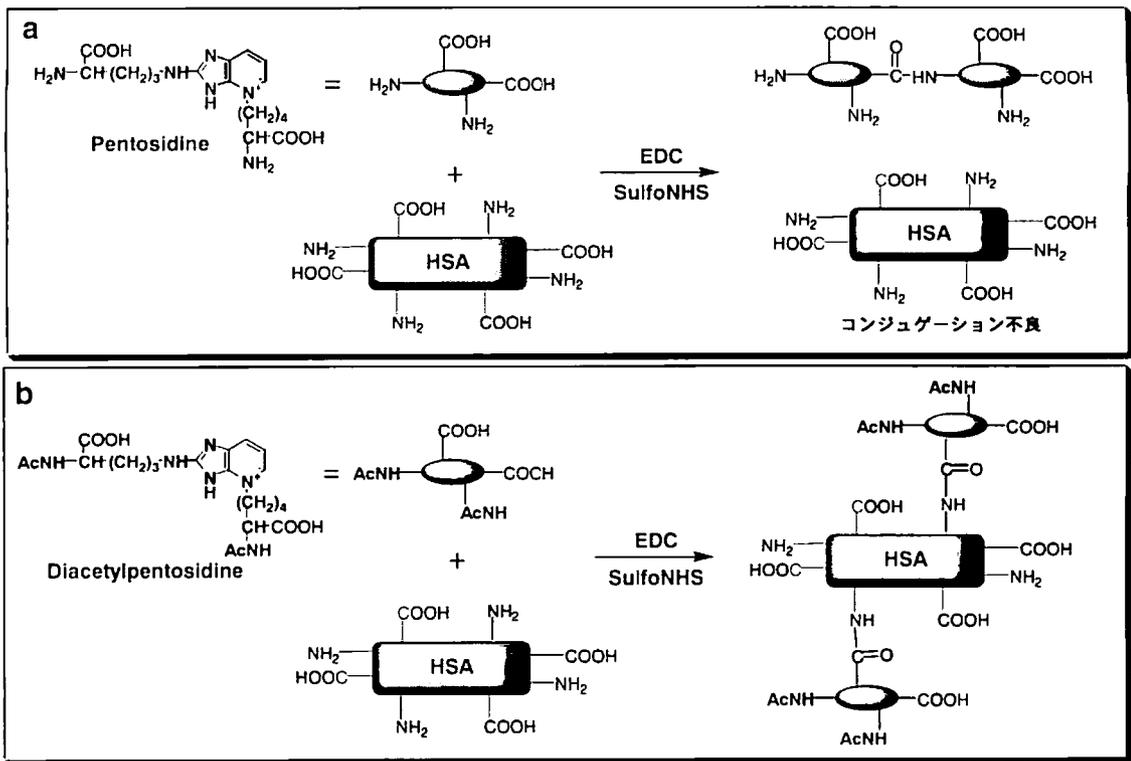


図 2-1 Pentosidine 結合 HSA の反応スキーム

粗生成物を Monnierらの方法[19]によってHPLCで精製し、*N,N'*-DiacetylpentosidineであることをNMRで確認した。収量40.6mg。

N,N'-Diacetylpentosidine 1.0 mg、HSA 2.0 mg を PBS 1.0 ml に溶解し、WSC 10 mg、Sulfo-NHS 0.5 mg を加えて室温で15分反応した。2-Mercaptoethanol 1 μ l を加えて反応を停止し、反応液を4℃でPBS 1.5 L に対して透析した。これを以後 Pent-HSA と略記する。ポリクローナル抗体の作製及びELISAによるスクリーニングで使用する Pentosidine 結合 KLH は HSA を KLH に代えて同様に調製した。これを Pent-KLH と略記する。また、Pentosidine を添加せずにWSC、Sulfo-NHS だけで反応した negative コントロールのWSC 処理 HSA も同様に調製した。これをWSC-HSA と略記する。

2-1-3 モノクローナル抗 Pentosidine 抗体の作製

120 μ l の Pent-HSA (2 mg/ml, 240 μ g) を PBS 230 μ l で希釈し、アジュバントとして同量の TiterMaxGold™ と混合して Balb/c マウス 3 匹に一回皮内注射した。(0.08 mg/匹) 6 週間後に免疫したマウス抗血清の Pent-HSA に対する抗体価を ELISA 法によって決定した。最初の免疫から 8 週間後、Pent-HSA に対して最も抗体価の高かったマウスに 50 μ g の Pent-HSA を腹腔内注射した。3 日後、マウスの脾臓リンパ細胞を取り出し、ミエローマ P3U1 細胞とポリエチレングリコールを用いて融合し[39]、3 日間アミノプテリン、ヒポキサンチン、チミジンを含む 10% ウシ胎児血清を含む培地中 (HAT 培地) で培養した。各培養上清を ELISA によって Pent-HSA と Pent-KLH に対する反応性でスクリーニングした。Pent-HSA と Pent-KLH に対して陽性で WSC-HSA に陰性であるいくつかの抗体産生細胞が見出された。これを限界希釈法でサブクローニングすることで 2 株の細胞系を樹立した。2 株のモノクローナル抗体は clone#1C12 と clone#4D7 と命名し、以下 1C12 及び 4D7 と略す。これらの抗体のアイソタイプは Zymed 社モノクローナル抗体アイソタイプングキットを用いた ELISA によって、いずれも IgG₁であることを確認した。これらのモノクローナル抗 Pentosidine 抗体は Pent-HSA と Pent-KLH に反応し、WSC-HSA には反応しなかった。結果を図 3-4 に示す。これらの抗体産生細胞をあらかじめ pristane 投与した Balb/c マウスの腹腔に移植した。得られた腹水から Protein G-Sepharose カラムを用いて各抗体(IgG₁)を精製した。以降の実験には 1C12 を使用した。

2-1-4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA は直接法 (非競合法、non-competitive) 及び間接法 (競合法、competitive) の 2 つの系で行った。

a) 直接法 ELISA

Pent-HSA、Pent-KLH、WSC-HSA を 50 mM carbonate buffer (pH 9.7) に溶解して各 5 μ g/ml とし、これを 0.1 ml ずつ 96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに入れ、室温で 1 時間インキュベートして固相化した。0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) 0.4 ml で 3 回洗浄した後、各ウェルに 0.5% gelatin を含む 50 mM carbonate buffer (pH 9.7) 0.2 ml を加え室温で 1 時間インキュベートし、以後の非特異的な抗

体の吸着を防いだ。各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄し、抗 Pentosidine 抗体（1 次抗体）を PBS-T で 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したものの 0.1 ml を加え、室温で 1 時間インキュベートした。ウェルを同様に PBS-T で 3 回洗浄し、HRP 標識抗マウス IgG 抗体（2 次抗体）を PBS-T で 5,000 倍希釈したものの 0.1 ml を加えてさらに 1 時間インキュベートした後、過酸化水素水 0.6 μl を含む 1,2-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 0.55 mg/ml クエン酸-りん酸カリウム緩衝液 (pH 5.0) 0.1 ml で発色させた。0.1 ml の 1 mol/l 硫酸を加えて反応を停止し、492 nm の吸光度を ELISA プレートリーダーで測定した。

b)間接法 ELISA

Pent-HSA を 50 mM carbonate buffer(pH 9.7)に溶解して各 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、これを 0.1 ml ずつ 96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに入れ、室温で 1 時間インキュベートして固相化した。0.05% Tween 20 を含む PBS(PBS-T)0.4 ml で 3 回洗浄した後、各ウェルに 0.5% gelatin を含む 50 mM carbonate buffer (pH 9.7)0.2 ml を加え室温で 1 時間インキュベートし、以後の非特異的な抗体の吸着を防いだ。各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄し、抗 Pentosidine 抗体（1 次抗体）を PBS-T で 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したものの 0.05 ml と適当な濃度に希釈した競合物質 0.05 ml を加え、プレートを振盪してウェルを攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートした。ウェルを同様に PBS-T で 3 回洗浄し、HRP 標識抗マウス IgG 抗体（2 次抗体）を PBS-T で 5,000 倍希釈したものの 0.1 ml を加えて 1 時間インキュベートした後、過酸化水素水 0.6 μl を含む 1,2-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 0.55 mg/ml 0.1 ml で発色させた。反応は 0.1 ml の 1 mol/l 硫酸を加えて停止させ、492 nm の吸光度を ELISA プレートリーダーで測定した。

免疫したウサギ及びマウス抗血清の抗体価の確認は、直接法では 1 次抗体として、抗血清を 500 倍から順次 5 倍希釈したものをを用い、2 次抗体は HRP 標識抗ウサギ抗体(10,000 倍希釈)あるいは HRP 標識抗マウス IgG 抗体(5,000 倍希釈)を用いた。

またモノクローナル抗体産生細胞（ハイブリドーマ）のスクリーニングでは、直接法の固相化に使用する Pent-HSA、Pent-KLH、WSC-HSA の量を 0.05 ml と半

分にし、1次抗体として培養上清 0.45 ml を用いた。

さらに得られたモノクローナル抗体のキャラクタライズは競合法で行い、Pentosidine 生成モデル系で生成した Pentosidine 及びその類似体の検出は直接法を用いて、リボース修飾 BSA (Rib-BSA) を固相化して行った。

2-1-5 抗 Pentosidine 抗体の免疫反応性とそのキャラクタライズ

モノクローナル抗 Pentosidine 抗体、1C12 及び 4D7 の反応性は直接法 ELISA によって決定した。ELISA 法の詳細は 2-1-4 で記述した通りである。直接法 ELISA では抗原として 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 $\mu\text{g/ml}$ の Pent-HSA を 100 $\mu\text{l/well}$ で ELISA プレートに固相化し、モノクローナル抗 Pentosidine 抗体 1C12 または 4D7 を 1.0, 0.2, 0.04, 0.008, 0.0016 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 0.1 ml/well 加えた。1 時間室温でインキュベートした後、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を加え、OPD 0.55 mg/ml 0.1 ml で発色させた。反応は 0.1 ml の 1 mol/l 硫酸を加えて停止させ、492 nm の吸光度を ELISA プレートリーダーで測定した。

これを基に競合法 ELISA の条件を決定した。競合法 ELISA では抗原として 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の Pent-HSA を 100 $\mu\text{l/well}$ で ELISA プレートに固相化し、gelatin でブロッキング後、次の競合物質を各 100 μM から 1/5 ずつ連続で希釈した溶液 0.05 ml を添加した。競合物質としては、Pentosidine の生成原料であるリジン及びアルギニンとその類似体である *N*-メチル-L-アルギニン (L-NMMA)、また代表的な AGE である CML (*N*^ε-(carboxymethyl)lysine)、Pentosidine と一部構造が類似している臭化 *N*-プロピルピリジニウムと 2-アミノベンズイミダゾール、標準物質として Pentosidine とそのキャリアタンパクである HSA を検討した。HSA は 2 mg/ml (30 μM) 1/5 ずつ連続で希釈した。競合物質溶液 0.05 ml とモノクローナル抗 Pentosidine 抗体、1C12 または 4D7 を 1.0 $\mu\text{g/ml}$ で 50 μl を加え、1 時間室温でインキュベートした。次に HRP 標識抗マウス IgG 抗体を加え、OPD 0.55 mg/ml 0.1 ml で発色させた。反応は 0.1 ml の 1 mol/l 硫酸を加えて停止させ、492 nm の吸光度を ELISA プレートリーダーで測定した。

2-2 抗 Pentosidine 抗体を用いた Pentosidine 生成モデル系の 評価

2-2-1 リボース修飾 BSA の作製

BSA 用いて *in vitro* で Pentosidine を生成するモデル系を調製した。リボース修飾 BSA は以下の a)の方法で調製し、これを元にさらに Pentosidine 生成における添加物の種類、添加物濃度、温度、pH の影響を以下の各条件で調製して、ELISA 用サンプルとした。

a) リボース修飾 BSA の作製

BSA(2 mg)を 0.5 mmol のリボースあるいはグルコースと共に 100 mM リン酸緩衝液 1 ml 中 60℃でインキュベートした。インキュベーション前に各サンプルの pH は 7.4 に調整した。1 週間、2 週間、4 週間、6 週間ごとにサンプルを取り出して -20℃で冷凍保存した。サンプルは 4℃で一夜 PBS に対して透析して、ELISA で Pentosidine 生成量を評価した。

b) Pentosidine 生成における添加物の効果

同様に BSA(2 mg)と 0.5 mmol のリボースを 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 1 ml に溶解したものに、10 mM になるようにそれぞれクレアチン、クレアチニン、尿素、3-ヒドロキシ酪酸、ピルビン酸ナトリウム、グリオキサール、メチルグリオキサール、グリコールアルデヒド、ヒダントイン、ヒダントイン酸、グリコール酸、シュウ酸、馬尿酸、乳酸、グリオキシル酸を加え、各サンプルの pH を 7.4 に調整して、60℃で 1 週間インキュベートした。サンプルを 4℃で一夜 PBS に対して透析し、ELISA で Pentosidine 生成量を評価した。

2-2-2 リボース修飾 BSA の酸加水分解

2-2-1 で調製したリボース修飾 BSA 中に生成した Pentosidine 量を HPLC で定量するため、以下のように塩酸加水分解を行った。0.1 mg のリボース修飾 BSA を、アスピレーターで減圧乾固し 0.05% 2-mercaptoethanol 存在下に 6 mol/l 無鉄塩酸 0.5 ml を加え、真空封管中で 110℃、24 時間加熱して加水分解した。溶液をアス

ピレーターで減圧乾固し、残渣を 0.5 ml の 20 mM 塩酸に溶解し 0.45 μ m millex filter (Millipore)を用いて濾過し、一部 (5 μ l) を 2-3-2 に記述した分析用 HPLC で分析した。

2-3 C-pentosidine の検出

2-3-1 C-pentosidine の合成と精製

C-pentosidine の調製は Monnier らの Pentosidine 合成の報告[19]と同様にして、アルギニンクレアチンを代えて、以下のように各 250 mM のクレアチン、Boc-リジンとリボースをインキュベートして行った。クレアチン(0.6 g)、Boc-リジン(1.0 g)とリボース(0.6 g)を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 16 ml に溶解し 5 M 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 9.0 に調整した後、60℃で 48 時間攪拌した。Dowex 50W カチオン交換樹脂 650 ml を詰めたガラスカラムに反応液をロードし、超純水、1 M ピリジン水溶液各 1 L で洗浄し、続いて 1 M ピリジン-酢酸(pH 6.0)水溶液 2 L で C-pentosidine を含むフラクションを溶出した。溶出液を TLC 上にスポットし、波長 366 nm の UV ランプを照射して蛍光を有し、同時にニンヒドリン陽性の成分を集めてエバポレータで濃縮乾固した。濃縮物を 10 ml の HPLC 溶離液(20% アセトニトリル-水)に溶解し、分取用 HPLC カラムを用いて精製した。分取用 HPLC の条件は以下に記述する。得られた 40 ml の精製画分を凍結乾燥して 6.4 mg の C-pentosidine (淡黄色粉末)を得た。

2-3-2 高速液体クロマトグラフィ (HPLC)

(1) 定量及び定性分析用 HPLC

Pentosidine または C-pentosidine の定性および定量分析は以下の HPLC 条件で行った。Shiseido Capcellpak C18 UG80 (5 μ m, 4.6 x 250 mm)を用い L-7100 ポンプ、L-7300 カラムオープン、L-7200 オートサンプラー、L-7485 蛍光検出器、DG660 脱気ユニット (GL Science)を接続した日立製作所製 HPLC D-7000 で分析し、Pentosidine あるいは C-pentosidine の自己蛍光($\lambda_{ex/em}$ =335/385 nm)によって検出した。カラム温度 40℃、流速 1 ml/min で移動相 A は 0.2% heptafluorobutyric acid (HFBA)を含む 20% アセトニトリル、移動相 B は 0.2% HFBA を含む 100% アセ

トニトリルを用い、0～20 min まで移動相 A 100%、20～40 min 移動相 B 100%、40～60 min 移動相 A 100%の step-wise グラジエントを用いた。

(2) 分取用 HPLC

C-pentosidine の精製は、関東化学 Mightysil RP-18 GP 250-20, 20 x 250 mm カラムを用いた。溶出は室温、流速 8 ml/min で行い、紫外可視検出器を用いて 335nm の吸収でモニターした。他の HPLC 条件は上記の分析用 HPLC 条件と同じである。目的物を含むフラクションの一部は分析用 HPLC を用いて確認した。

2-3-3 核磁気共鳴スペクトル (NMR)、質量分析 (FAB-MS)

NMR スペクトルは日本電子(JEOL)製 ECP-300 核磁気共鳴装置(300 MHz)を用いて測定した。0.5 ml の重水に約 3 mg の試料を溶解し 3-(Trimethylsilyl)-1-propane sulfonic acid を内部標準として測定した。測定は室温で行った。

質量分析は日本電子(JEOL)製 JMX-500、高速原子衝突法質量分析計(FAB-MS : fast atom bombardment mass spectrometry)を用いて行った。0.5 mg のサンプルを 0.01ml の DMSO に溶解し、マトリックスとして、等量のグリセリンと 2-ニトロベンジルアルコールを用いた。

2-3-4 生理的条件での C-pentosidine 生成

各 250 mM のクレアチン、Boc-リジンとリボースを 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、37℃で 1 週間インキュベートし、生成する C-pentosidine を HPLC で定量した。対照としてクレアチンの代りに同濃度の Boc-アルギニンを用いてインキュベートし、生成する Pentosidine を同様に定量した。HPLC の条件は上記の通りである。

2-3-5 ヒト血漿中及び尿中の C-pentosidine の検出

ヒト血漿中及び尿中の C-pentosidine の検出は、御協力頂いた医療機関に通院する透析患者からインフォームドコンセントを経て採取した血漿あるいは尿を用いて、吉原らの方法[40]に従って、以下の方法で行った。血漿あるいは尿のサンプル 0.25 ml を等量の濃塩酸と共に真空封管中 108℃で 18 時間加熱して加水分解し、以下のように調製したセルロース前処理カラムにかけた。

前処理カラムに必要なセルローススラリーは、Whatman 社製 CF11 繊維状セルロース粉末 5g を 100 ml の 1-ブタノール:酢酸:水 (8:1:1, v/v) に懸濁して調製した。15 ml の CF11 スラリーをガラスウールで栓をしたガラスカラム(8.0 mm ID x 24.0 mm) に詰め、加水分解物 0.5 ml に 0.5 ml の CF11 スラリー、0.5 ml の酢酸、4 ml の 1-ブタノールを加えて懸濁し前処理カラムにかけた。カラムを 30 ml の 1-ブタノール:酢酸:水 (8:1:1, v/v) で洗浄し、続いて 50 mM 塩酸 20 ml で Pentosidine とその誘導体を溶出した。溶出液をエバポレータで濃縮乾固した後、残渣を 0.5 ml の HPLC 溶離液(20 % アセトニトリル-水)に溶解し、その 5 μ l を分析用 HPLC で分析した。セルロースの固相吸着による前処理で夾雑物を除くことで、精度良く HPLC で検出、定量が可能となった。C-pentosidine の標準として、2-10 で合成した C-pentosidine を用いた。データは有意差 $P < 0.05$ の T 検定で評価した。

第3章 実験結果

3-1 抗 Pentosidine 抗体の作製

3-1-1 抗 Pentosidine 抗体の免疫反応性とそのキャラクタライズ

限界希釈法で樹立した2株のモノクローナル抗体 1C12 と 4D7 は Zymed 社モノクローナル抗体アイソタイプキットを用いた ELISA によって、いずれも IgG₁ であることを確認した。(データ省略) これらのモノクローナル抗 Pentosidine 抗体は Pent-HSA と Pent-KLH に反応し、WSC-HSA には反応しなかった。結果を図 3-4 に示す。

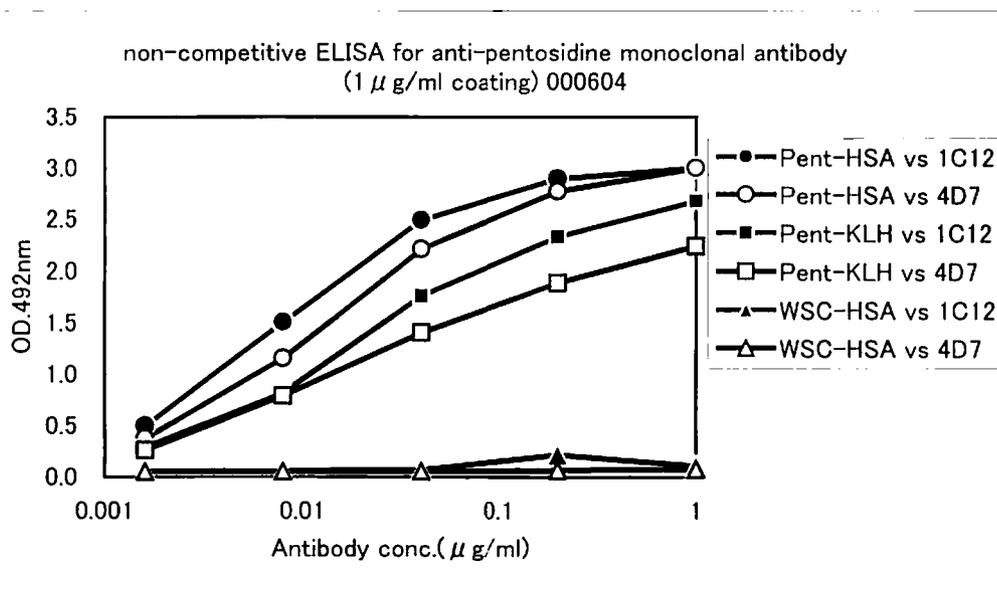
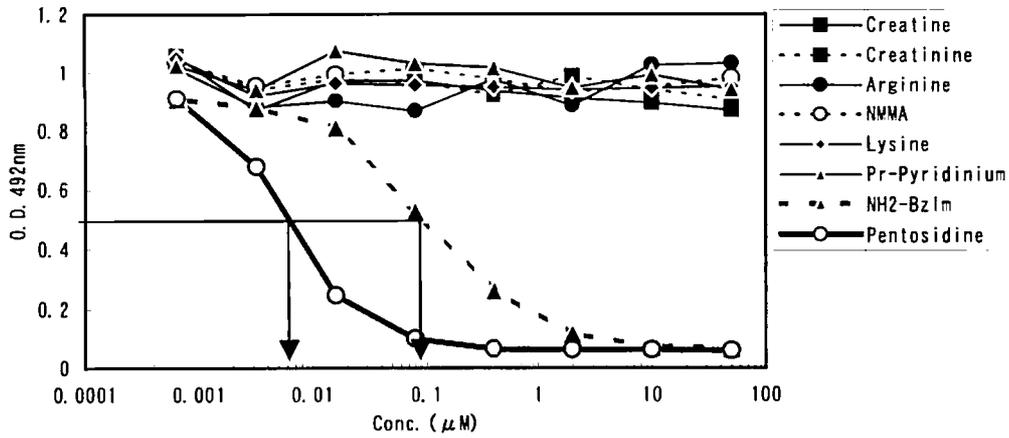


図 3-4 直接法 ELISA によるモノクローナル抗 Pentosidine 抗体の反応性

Pent-HSA、Pent-KLH、WSC-HSA を 1 μg/ml で ELISA プレートに室温で 1 時間コーティングし、得られた 2 株のモノクローナル抗 Pentosidine 抗体 1C12 と 4D7 を 1 μg/mL から順次 1/5 希釈して加えた。プレート上に結合した抗体量は HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて、OPD の発色で検出した。

(A) Competitive ELISA for anti-pentosidine Ab. (1C12 0.05 $\mu\text{g/ml}$)000115



(B) Competitive ELISA for anti-pentosidine Ab. (4D7 0.05 $\mu\text{g/ml}$)000115

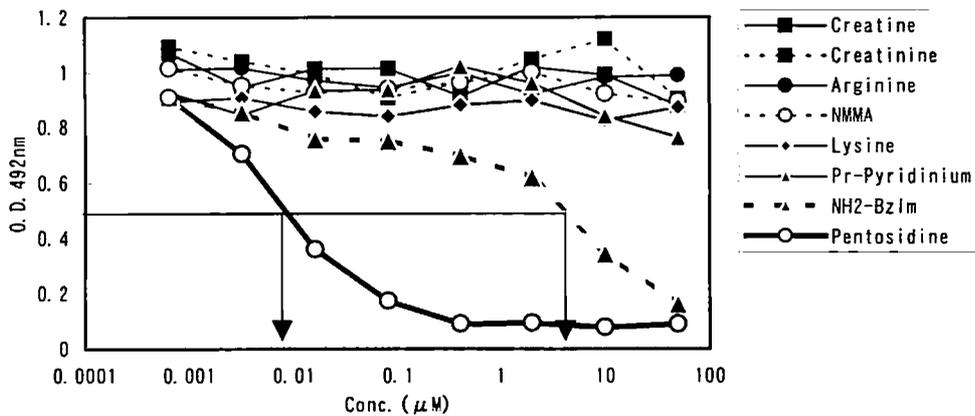
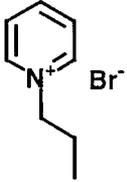
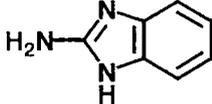
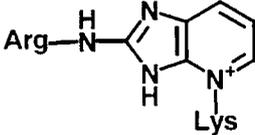


図 3-5 競合法 ELISA によるモノクローナル抗 Pentosidine 抗体の反応性

Pent-HSA を $1 \mu\text{g/ml}$ で ELISA プレートに室温で 1 時間コーティングし、表 3-1 に示した競合物質を $50 \mu\text{M}$ から順次 $1/5$ 希釈したもの 0.05 mL とモノクローナル抗 Pentosidine 抗体 ((A):1C12 または (B):4D7) $0.05 \mu\text{g/ml}$ 溶液、 0.05 mL を混合してインキュベートした。プレート上に結合した抗体量は HRP 標識抗マウス抗体を用いて、OPD の発色で検出した。

表 3-1 競合法 ELISA に用いた競合物質の構造

tryptophan	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Indole ring} \end{array}$	L-NMMA	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})=\text{NHCH}_3 \end{array}$
creatine	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H}_3)=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	L-lysine	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
creatinine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HN}=\text{C} \\ \\ \text{N}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	<i>N</i> -propyl pyridinium bromide	
CML	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	2-amino benzimidazole	
L-arginine	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}_2$	Pentosidine (free form)	

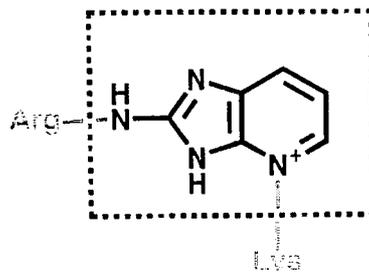


図 3-6 抗 Pentosidine 抗体に認識されると考えられる部位

次に競合法 ELISA によって 1C12 の免疫反応性を検討した。図 3-5 に示したように 1C12 の Pent-HSA に対する抗原抗体反応は Pentosidine によって強く阻害された。50% 阻害濃度(IC₅₀)は 6 nM であった。Pentosidine 生成の出発物質である L-

リジンや L-アルギニンやその類似体である N-モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA) はこれらの抗体と反応しなかった。さらに、例えばクレアチン、クレアチニン、臭化 N-プロピルピリジニウム(Pr-Pyridinium)はこの抗体と Pent-HSA との抗原抗体反応を阻害しなかった。しかしながら本抗体と Pent-HSA との抗原抗体反応は Pentosidine の場合と同様に 2-アミノベンズイミダゾール(NH₂-BzIm) によって阻害された。IC₅₀ は 90 nM であった。Pentosidine 構造の一部が類似している臭化 N-プロピルピリジニウムは反応しないが、2-アミノベンズイミダゾールは反応性を示したということから、これら抗 Pentosidine 抗体は Pentosidine と 2-アミノベンズイミダゾールの共通構造である、9 員環ヘテロ環状構造を認識する事が示唆された。以下の実験では力価の高い IC12 を使用した。

3-2 抗 Pentosidine 抗体を用いた Pentosidine 生成モデル系の評価

3-2-1 リボース-修飾およびグルコース修飾 BSA 上の Pentosidine の検出

BSA とリボースあるいはグルコースと共に 60℃ で 2 週間インキュベートしたサンプル中に生成した Pentosidine を IC12 を用いた直接法 ELISA によって検出した。リボース-修飾 BSA を Rib-BSA、グルコース修飾 BSA を glu-BSA と略記して、結果を図 3-7 に示す。

Pentosidine の生成は、リボースの方がグルコースに比べて有意に高いことが確認された。(図 3-7 A) さらに同じサンプルを抗 AGE 抗体 (clone#6D12)、抗 CEL 抗体 (clone#KNH30)、抗 CML 抗体 (clone#CMS10) 抗イミダゾロン抗体 (clone#JNH27) で分析した場合、リボースとグルコースでは有意な差は認められなかった。(図 3-7 B,C,D,E) 6D12 は CML と CEL、KNH30 は CEL を認識する抗体であることから、CML 及び CEL 生成にはリボースとグルコースでは大きな差がないことを示している。これは、CML や CEL の生成においては、BSA と糖から生じたアマドリ生成物が一旦、開裂して CML や CEL を生じるためであると考えられる。またイミダゾロンの生成量も大きな差がなかった。Pentosidine 生成に関してはリボースを用いた方が圧倒的に有利であるが、これはリボースの方がグルコースに比べて反応性の高いケトース構造の割合が高いことによるものである。

さらにリボースの場合 BSA と糖から生じたアマドリが、環化反応、酸化反応を受けて Pentosidine を生成する過程には、炭素鎖の脱離や、二量化反応を伴わないため、五炭糖であるリボースの方が有利であり、六炭糖のグルコースでは、上記の反応の過程が必要なためと考えられる。

Pentosidine はグルコースからも生成することが知られているが[20]、より効率的に Pentosidine を生成させるにはリボースを用いた方が良いことが明らかとなったので、以後の実験ではこのリボース修飾 BSA (Rib-BSA) の系を用いて、実験を行った。

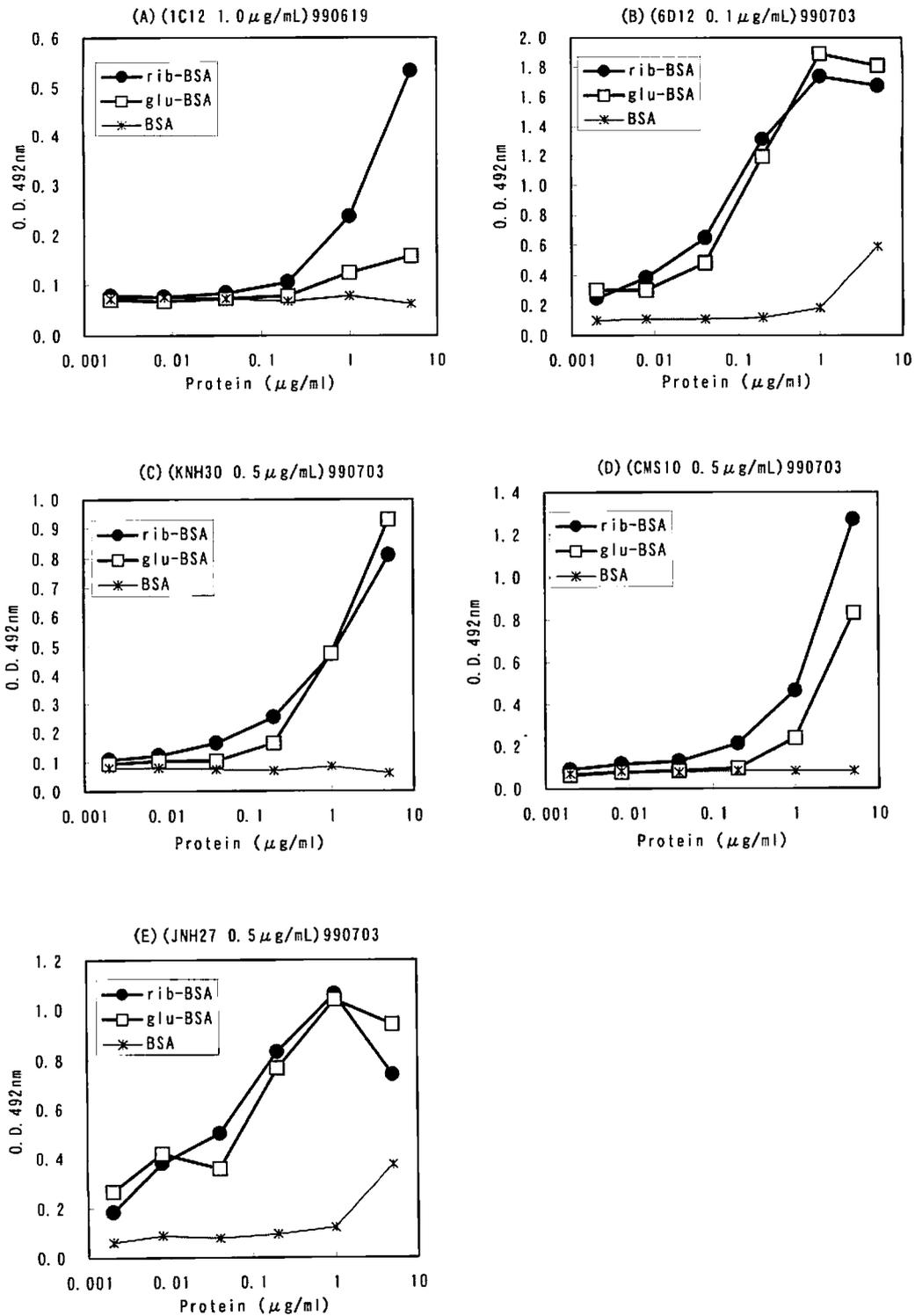
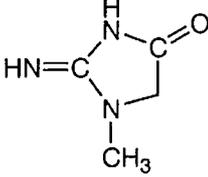
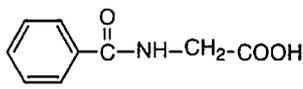
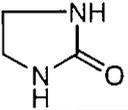


図 3-7 各種 AGE 抗体によるリボース修飾 BSA 及びグルコース修飾 BSA の直接法 ELISA 固相化タンパク濃度 5.0 μg/ml、各抗体濃度 (A) 1C12, 1.0 μg/ml (B) 6D12, 0.1 μg/ml (C) KNH30, 0.5 μg/ml (D) CMS10, 0.5 μg/ml (E) JNH27, 0.5 μg/ml

表 3-2 促進効果検討に使用した化合物

化合物名	構造	化合物名	構造
urea	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$	creatine	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{NH})-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{COOH}$
glyoxal	$\text{OHC}-\text{CHO}$	creatinine	
methyl glyoxal	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{CHO}$	3-hydroxy butyric acid	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{COOH}$
glycolaldehyde	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CHO}$	hippuric acid	
hydantoin		lactic acid	$\text{CH}_3-\text{C}(\text{OH})-\text{COOH}$
hydantoic acid	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	sodium pyruvate	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{COONa}$
glycolic acid	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	glyoxylic acid	$\text{HCO}-\text{COOH}$
oxalic acid	$(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		

3-2-2 Pentosidine 生成における、尿素、クレアチン及びクレアチニンの効果

3-2 で明らかとなったように、Pentosidine 生成においてはグルコースよりもリボースを用いた方が、Pentosidine の生成量が多いことから Rib-BSA の生成系を用いて実験を行った。

まず BSA をリボースと 10 mM の種々の添加物の存在下にインキュベートし、生成する Pentosidine を直接法 ELISA によって検出した。添加物としては、グリオキサール(glyoxal)、メチルグリオキサール(methylglyoxal)、グリコールアルデヒド(glycolaldehyde)、ヒダントイン(hydantoin)、ヒダントイン酸(hydantoic acid)、グリコール酸(glycolic acid)、シュウ酸(oxalic acid)、クレアチン(creatine)、クレアチ

ニン(creatinine)、3-ヒドロキシ酪酸(3-hydroxybutyric acid)、馬尿酸(hippuric acid)、乳酸(lactic acid)、ピルビン酸ナトリウム(sodium pyruvate)、グリオキシル酸(glyoxylic acid)を使用した。(表 3-2) グリコールアルデヒド、ヒダントイン、ヒダントイン酸、グリコール酸、シュウ酸、クレアチン、クレアチニン、3-ヒドロキシ酪酸、馬尿酸、乳酸、ピルビン酸、グリオキシル酸は生体内に存在する物質であり、グリオキサールはグルコースの自己酸化によって、メチルグリオキサールはアマドリ化合物から 2,3-enediol を介して生成することが知られている。3-ヒドロキシ酪酸は血中ケトン体の一つであるアセト酢酸の等価体である。尿素、クレアチンまたはクレアチニンの存在下、60℃で1週間インキュベートし、反応混合物中に生成した Pentosidine 量は直接法 ELISA によって決定した。

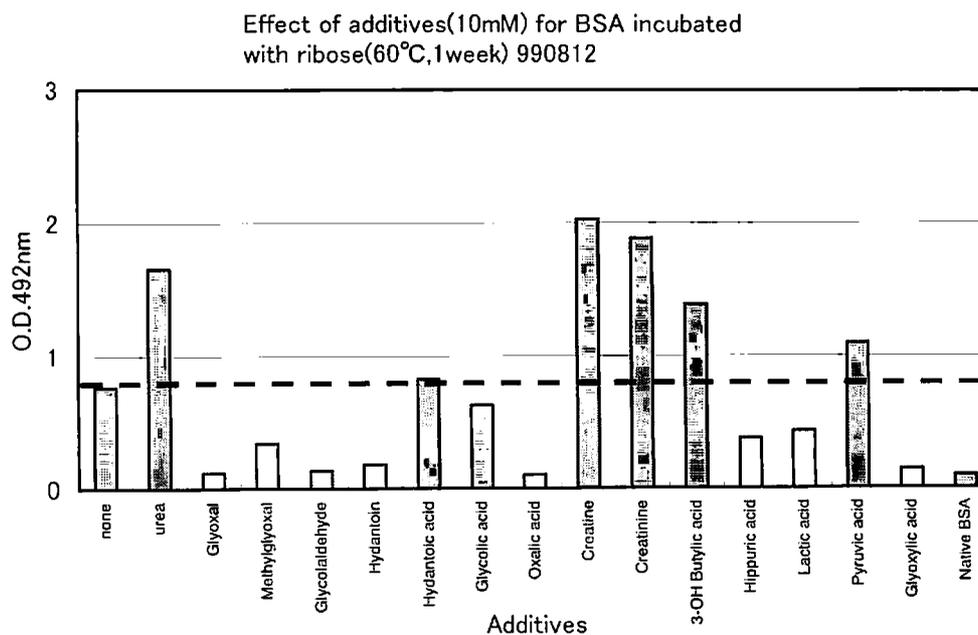


図 3-8 *in vitro* での Pentosidine 生成における各種化合物の効果

図 3-8 に示したように、抗 Pentosidine 抗体 1C12 によって検出した Pentosidine 生成量はクレアチン、クレアチニン、3-ヒドロキシ酪酸、ピルビン酸ナトリウムの存在下でインキュベートした系では、これら添加物を添加しない系と比べて、ELISA の発色が顕著に高く、Pentosidine の生成が促進されていることを示唆した。これらの化合物の中でクレアチンが最も効果的で、クレアチンによる増大は無添

加のコントロールに比べて 2.5 倍であった。これらの結果は BSA とリボースとの反応中において、尿素、クレアチン、クレアチニンが Pentosidine または Pentosidine 類似化合物の生成を増大させる可能性を示唆した。他の白抜き棒グラフで表した、グリオキサール、メチルグリオキサール、グリコールアルデヒド、ヒダントイン、ヒダントイン酸、グリコール酸、シュウ酸、馬尿酸、乳酸、グリオキシル酸の系では BSA が変性し不溶化して沈殿した。このため ELISA プレートに十分固相化できず、非添加の系よりも発色が低下した。(図 3-8)

リボースと BSA による Pentosidine の生成は、クレアチンなどの添加によって促進され、その効果は濃度及び温度依存的で高 pH 側でより加速される。(データ省略) これは添加物によって BSA 上のリジン、アルギニンとリボースによる Pentosidine 生成が促進されているか、あるいはこれらの添加物が直接 Pentosidine 生成反応に関与し Pentosidine と類似の構造を生成し、これが抗体と反応することで ELISA での検出が増大していることが示唆された。クレアチンは構造中にアルギニンと同様のグアニジノ基を有していることから、クレアチンがアルギニンと同じようにリボースとリジンから生成した Schiff 塩基と反応して Pentosidine の骨格に取り込まれた構造体(C-pentosidine)が生成するのではないかと考えた。クレアチニンはクレアチンの 2 量体であり、中性～アルカリ側 pH ではクレアチンとクレアチニン間には化学的には平衡が存在するため、クレアチンと同様に反応すると考えられる。

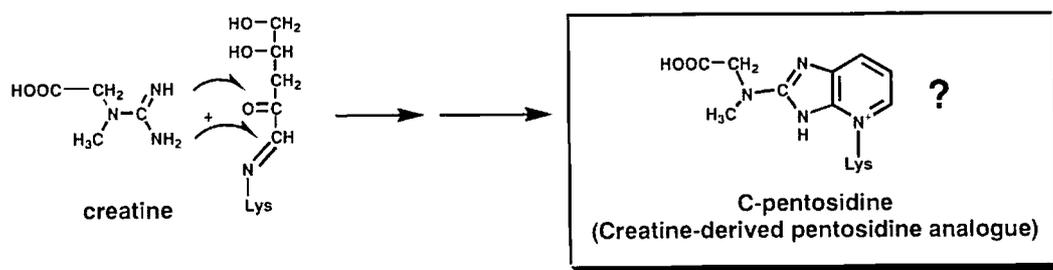


図 3-13 C-pentosidine の生成

尿素、3-ヒドロキシ酪酸、ピルビン酸はいずれもカルボニル炭素を有していることから、カルボニルがリジンのアミノ基あるいは、Schiff 塩基と反応すればカルボニル炭素が、構造中に取りこまれる可能性もある。この可能性を検証するた

め、リボースとリジンを ^{13}C 標識の尿素と共に 60°C で 2 週間インキュベートした。もし ^{13}C 標識の尿素が Pentosidine 構造に取り込まれれば、 ^{13}C -NMR を用いて ^{13}C 標識の炭素を検出することができると考えたが、尿素は化学的に極めて安定な物質であり、残念ながら尿素が取り込まれた AGE 構造は得られなかった。

そこで上記の仮説を検証するため、アルギニンを用いずに、リボースとリジンをクレアチンと共に 60°C でインキュベートし、クレアチンが Pentosidine 構造に取り込まれた物質ができるか確認し、それを単離することを計画した。以下にその結果を示す。

3-3 C-pentosidine の検出

3-3-1 HPLC による C-pentosidine の検出

クレアチン、Boc-リジンとリボース各 250 mM を 60°C でインキュベートしたサンプルを HPLC で分析した。HPLC 分析は Pentosidine に特徴的である励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm の蛍光を利用して行った。

対照として Boc-リジンとリボース、Boc-アルギニンを用いてインキュベートしたサンプルでは Pentosidine に特徴的な蛍光ピークが 12.27 min に検出され(図 3-14 A)、これは通常の Pentosidine と一致した。(図 3-14 C)

同じ HPLC 条件下で Boc-リジンとリボース、クレアチンの反応混合物は通常の Pentosidine とは異なるリテンションタイムを持つピークを生じた。(図 3-14 B) これは、Pentosidine と同じ励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm で検出される蛍光特性を持ちながら、リテンションタイムが異なる成分であることを示している。蛍光特性は化合物の芳香環の骨格に由来するので、この新規な成分の蛍光特性が類似しているということは同じ芳香環構造を有していることを示している。また HPLC のリテンションタイムは分子の極性構造や、分子の大きさに依存するので、この場合 Pentosidine より早いリテンションタイムを持つということは、Pentosidine よりも極性の高い構造あるいは、分子量が小さいと考えられる。そこでこの蛍光性ピークをさらに HPLC で精製しリテンションタイム 8.16 min に純度 99.2% を与える成分を得た。(図 3-14 D)

これらの結果より Boc-リジンとリボース、クレアチンのインキュベーション混

化合物の中に Pentosidine 類似構造が存在することを示している。この化合物を以後、クレアチン由来 Pentosidine (C-pentosidine)と呼ぶ。

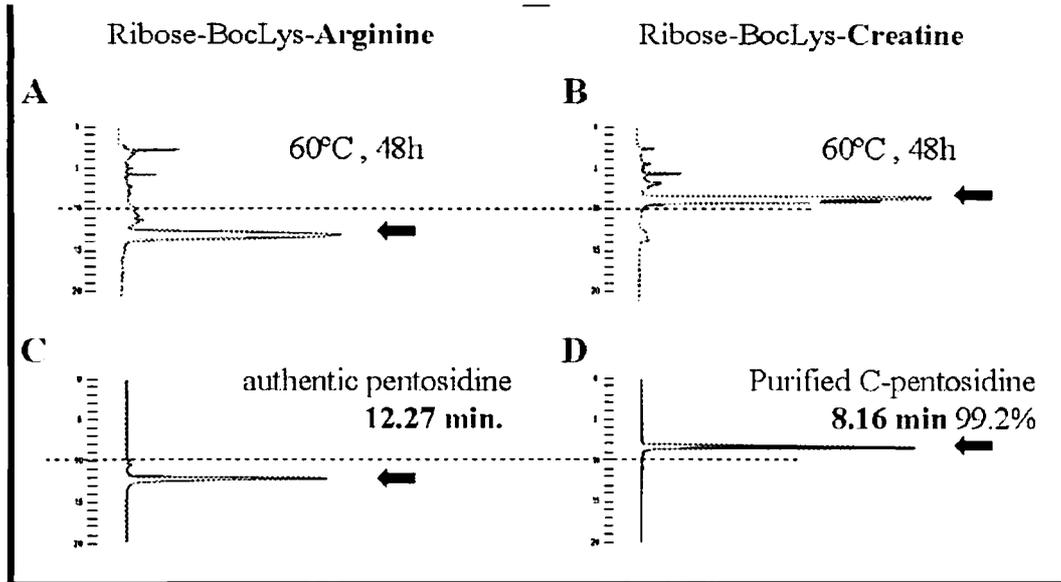


図 3-14 C-pentosidine の HPLC による検出

(A)リボース、Boc-リジン、Boc-アルギニンのインキュベートサンプル、(B) リボース、Boc-リジン、クレアチンのインキュベートサンプル、(C) Pentosidine 標準品、(D) B のサンプルを精製して得た C-pentosidine

3-3-2 抗 Pentosidine 抗体の C-pentosidine に対する免疫反応性

クレアチン、Boc-リジンとリボース各 250 mM を 60°C でインキュベートしたサンプルを競合法 ELISA で分析した。競合法 ELISA (図 3-15) は、Pent-HSA を固相化したプレートに、インキュベートしたサンプルを段階的に希釈したものと抗 Pentosidine 抗体を添加して行った。対照として Boc-リジンとリボース、Boc-アルギニン を用いてインキュベートしたサンプルは濃度依存的な発色の低下を示し、系内に Pentosidine が生成していることが示された。

一方クレアチンを用いてインキュベートしたサンプルでも、濃度依存的な発色の低下が見られ、抗 Pentosidine 抗体と反応する物質が生成していることが示唆された。クレアチンを用いた場合も、Boc-アルギニンを用いた場合でもインキュベート前のサンプルでは、このような発色の低下は見られず、クレアチン、Boc-アルギニン、Boc-リジン、リボース自身は抗 Pentosidine 抗体と反応しないことを示

している。横軸はインキュベート初期の各成分の濃度（250 mM）からの希釈で表しているため、対照の Boc-アルギニンを用いた系とクレアチンを用いた系での IC₅₀ の濃度差は約 100 倍あるが、これは生成した物質の抗体との親和性が弱いためか、あるいは生成量そのものが少ないためかはわからない。そこで、上記の HPLC によって、この C-pentosidine 成分を精製し、同様に抗 Pentosidine 抗体への免疫反応性を競合法 ELISA で評価した。抗体の Pent-HSA に対する免疫反応性は濃度依存的に C-pentosidine によって阻害され IC₅₀ は 1 μM であった。

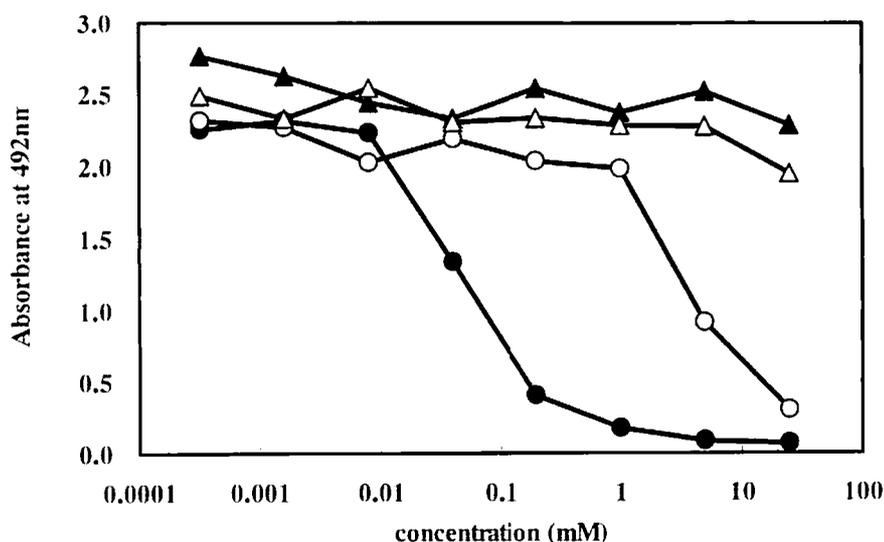


図 3-15 競合法 ELISA による Pentosidine 及び Pentosidine 類似構造体の検出
Boc-リジンとリボースを 0.25 mmol のクレアチン (○) または Boc-アルギニン (●) と共に 50 mM リン酸緩衝液 (pH 9.0) 1.0 mL 中で 60℃ で 48 時間インキュベートした。Pentosidine または Pentosidine 類似構造体は図 3-5 と同様に競合法 ELISA で検出した。対照としてインキュベートしていない同じサンプル(クレアチン (△)又は Boc-アルギニン (▲))を同条件で ELISA を行った。

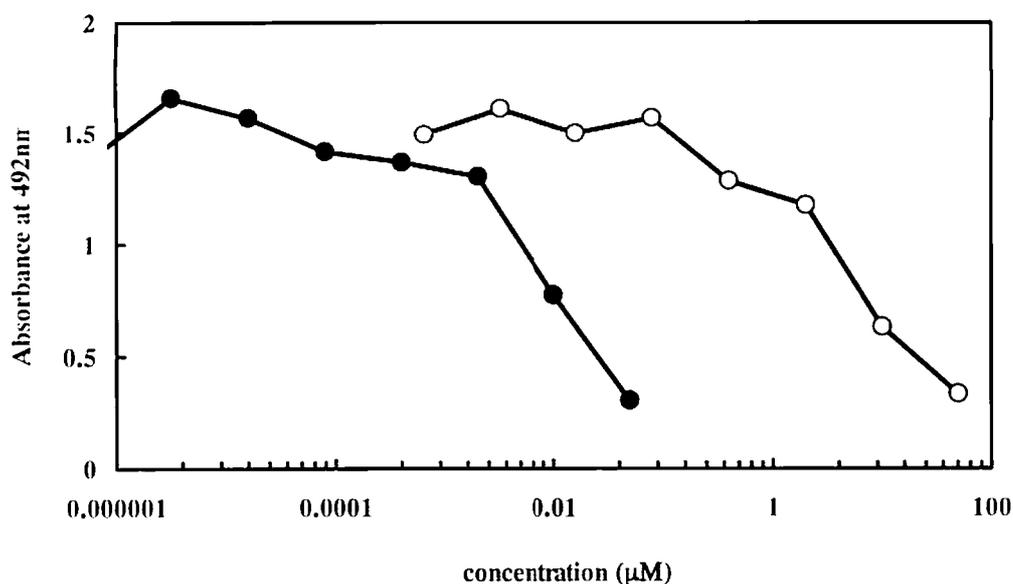


図 3-16 C-pentosidine の抗 Pentosidine 抗体に対する免疫反応性

C-pentosidine (○) 及び Pentosidine (●) の抗 Pentosidine 抗体に対する反応性を図 3-5 と同様に競合法 ELISA で決定した。

一方、通常の Pentosidine の IC_{50} は 6 nM であり、C-pentosidine の方が 1,000 倍低い(図 3-16)。抗体の C-pentosidine に対して反応性を示したということは、C-pentosidine が Pentosidine や 2-アミノベンズイミダゾール同様に、9員環ヘテロ環状構造を持っていることを示している。(図 3-5)

3-3-3 NMR 及び FAB-MS による C-pentosidine の構造解析

精製単離した C-pentosidine のプロトン NMR スペクトルを図 3-17 に、各ピークの帰属をを表 3-3 に示した。芳香族領域に現れた 3 組のピークは、通常の Pentosidine の芳香族領域のピークとケミカルシフト、カップリングパターンとも一致した。従って、この化合物は 4 級窒素原子を含むヘテロ環構造を持ち、Pentosidine と同じ芳香環骨格を持つことが示唆された。さらに 3.3 ppm のピークはクレアチン由来の *N*-メチル、1.4 ppm のピークは Boc-リジンの Boc 基のメチルピークと帰属された。このことから C-pentosidine の構造は Boc-リジンとクレアチンが構造に取り込まれた Pentosidine 類似構造であると考えられる。

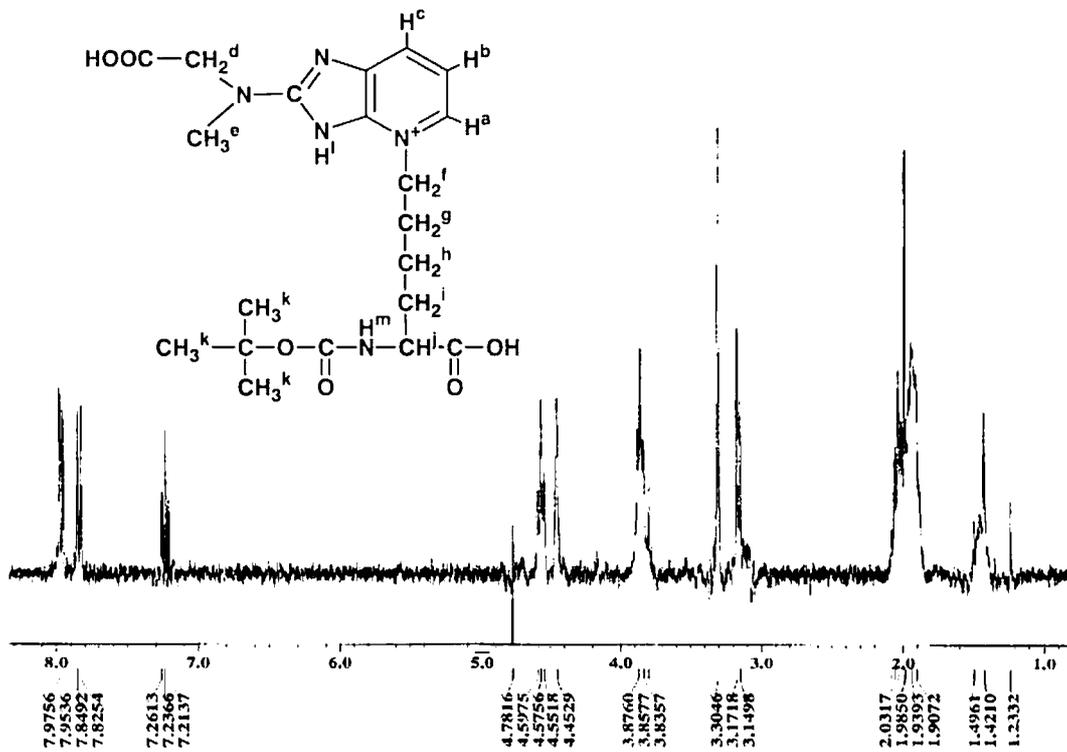


図 3-17 C-pentosidine の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

表 3-3 C-pentosidine の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル解析。

δ (ppm)	Assignment	Integration	δ (ppm)	Assignment	Integration
1.42-1.49 (m)	h	2H	4.45 (t)	j	1H
1.98 (s)	k	9H	4.55-4.59 (t)	f	2H
1.90-2.0 (m)	g, i	4H	7.21-7.26 (t)	b	1H
3.30 (s)	e	3H	7.82-7.84 (d)	c	1H
3.85-3.87	d	2H	7.95-7.97 (d)	a	1H

δ は、内部標準 (DSS) からの化学シフト、s: singlet, d: doublet, t: triplet. m: multiplet.
Integration はピーク積分値から得られたプロトン数。

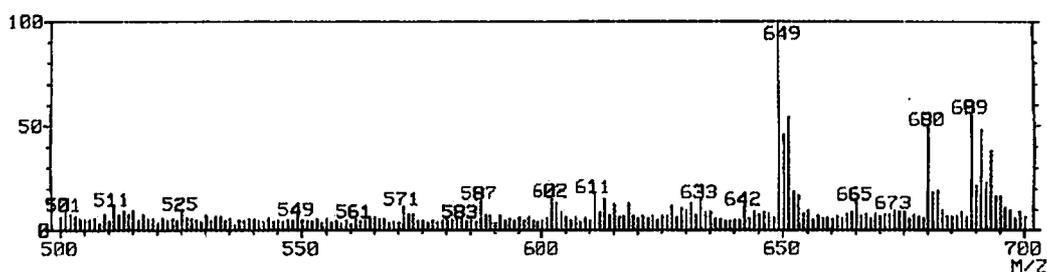


図 3-18 C-pentosidine の FAB-MS スペクトル

次に FAB-MS による質量分析の結果を図 3-18 に示す。C-pentosidine の分子イオンピークが $m/z=649$ に検出された。C-pentosidine の分子式は $C_{20}H_{30}N_5O_6=436.48$ であり、一方 HPLC での精製の際にイオン対分析の対アニオンとして使用した HFBA の分子式は $C_4F_7O_2=213.03$ である。従って HFBA を対アニオンとして伴って現れたと推定すると、その合計の分子量は 649 となり、実験的に得られた結果を支持する。また対アニオンの HFBA にはプロトンは存在しないので、先のプロトン NMR では HFBA は検出されない。

これらの結果より、クレアチンが Pentosidine 骨格に取り込まれた C-pentosidine は 1) Pentosidine と類似の蛍光特性を持ち、Pentosidine と類似の芳香環構造を持つ、2) Pentosidine とは異なるリテンションタイムを持つ、3) 抗 Pentosidine 抗体に対して反応性をもつ、4) NMR で芳香環領域の構造は Pentosidine と同じである、5) 構造中にクレアチンの *N*-メチル基が存在する、6) これらの結果を支持する構造として提唱した構造は質量分析において、矛盾しない分子量を与えた。よって、我々はこの分子がクレアチンの Guanidino 基がリジン-リボースと反応して取り込まれた構造であると考えた。

3-3-4 生理的条件下での C-pentosidine 生成

等モルの Boc-リジンとリボースをリン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解して、等モルのクレアチンを用いて 37°C で 1 週間インキュベートした。クレアチンの代わりに Boc-アルギニンを用い Pentosidine を生成する系を対照とした。

生成した C-pentosidine と Pentosidine は分析用 HPLC で決定した。図 3-19 に示したように、Boc-アルギニンではごくわずかしか Pentosidine が生成しないのに比べ

て、クレアチンによる C-pentosidine の生成は生理的条件下でも著しく速く進行した。サンプルの外観の褐色化も HPLC の結果と同じように進行し、クレアチンを用いた系ではインキュベート翌日から褐色化が進むのに対し、アルギニンを用いた系では 1 週間後も殆ど褐色化は起こっていなかった。この結果より、クレアチンとアルギニンが同濃度で存在する場合には、クレアチンによる C-pentosidine の生成の方が速いことが示された。

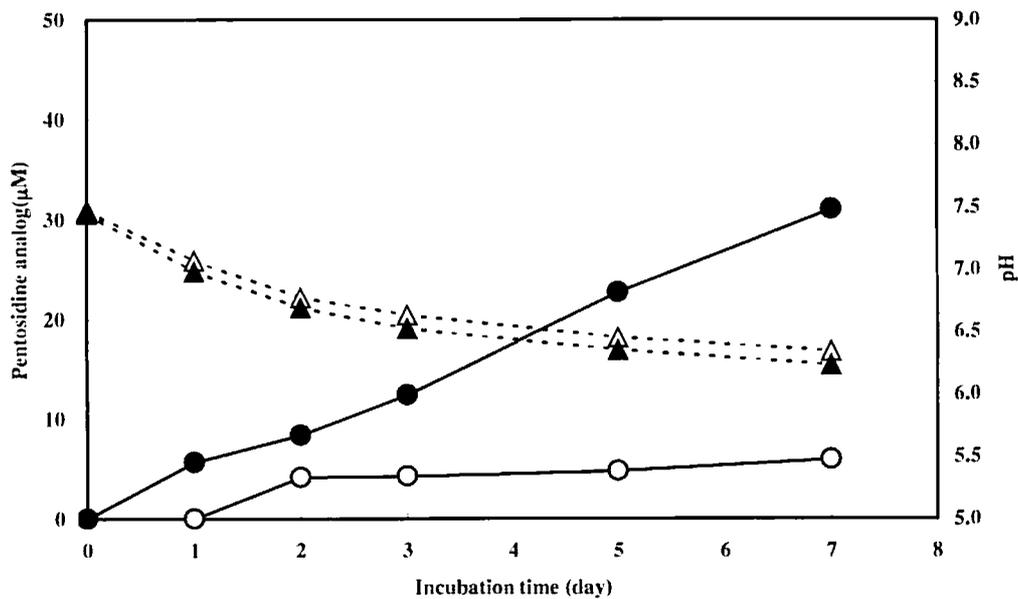


図 3-19 *in vitro* での C-pentosidine のタイムコース

Boc-リジンとリボースをクレアチン (●、▲) または Boc-アルギニン (○、△) と共にリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、37°C で一週間インキュベートした。サンプルの一部を取り、pH (▲、△) 及び生成した C-pentosidine (●) と Pentosidine (○) の量を図 3-14 と同様の分析用 HPLC で測定した。

血漿中のアルギニン濃度は、44~120 nmol/mL、クレアチン濃度は 24~84 nmol/mL であることが知られており [41]、正常な状態では血液中のクレアチンとアルギニン濃度は 20~120 nmol/mL とほぼ同じ濃度域にある。従って 図 3-19 で示したようにアルギニンとクレアチンが同濃度であった場合は、クレアチンが反応した C-pentosidine の方が大量に生成すると考えられる。まして、疾患によって

クレアチン濃度が上昇した場合には、さらに C-pentosidine の生成が促進され、蓄積していることが考えられる。

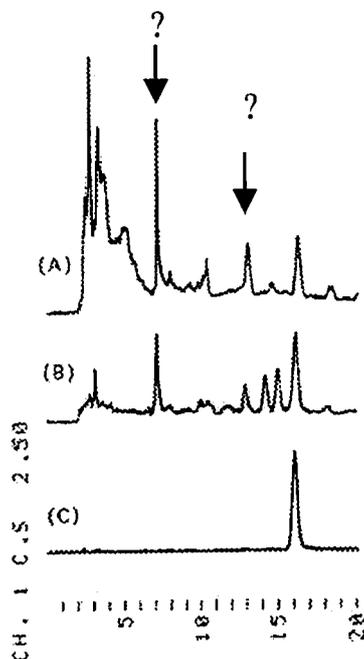


図 3-20 尿中及び血清中の Pentosidine の検出
(A) Urine, (B) Serum, (C) Standard pentosidine [40]

透析患者の血清あるいは尿中の Pentosidine を測定した吉原らの報告[40]においても、図 3-20 に示したように Pentosidine とされるピークよりも早いリテンションタイムに、Pentosidine と同様の蛍光を有するピークがいくつか検出されているが、彼らはこのピークに関しては何も言及していない。我々はこれが C-pentosidine ではないかと考え、以下のように実際の透析患者あるいは健常者の血漿を用いて、C-pentosidine 検出を試みた。

3-3-5 ヒト血漿中及び尿中の C-pentosidine の検出

透析を受けている腎不全患者 5 名から得た血漿と正常者 5 名の血漿を加水分解し、HPLC で分析した。メジャーピークは図 3-14 に示したそれぞれに特徴的なリテンションタイムから C-pentosidine または通常の Pentosidine と帰属した。我々の HPLC で決定した通常の Pentosidine の血漿中のレベルは健常者で 0.43 ± 0.20

nmol/mL 透析患者で 1.46 ± 0.85 nmol/mL であった (表 3-4)。これらの値は伊豆原らが報告した値とほぼ同じである[28]。さらに健常者及び透析患者の血漿中の C-pentosidine を検出定量した。健常者の血漿 C-pentosidine レベルは無視できるか、現在のシステムでは検出限界以下であるのに対し、透析患者の血漿 C-pentosidine レベルは、健常者よりも顕著に高かった。透析患者での C-pentosidine の最大レベルは 0.38 nmol/mL でこれは透析患者の通常の Pentosidine の値(1.46 nmol/mL)より小さい。しかしながらこれは、健常者での通常の Pentosidine のレベル(0.43 ± 0.20 nmol/mL)と同程度である。

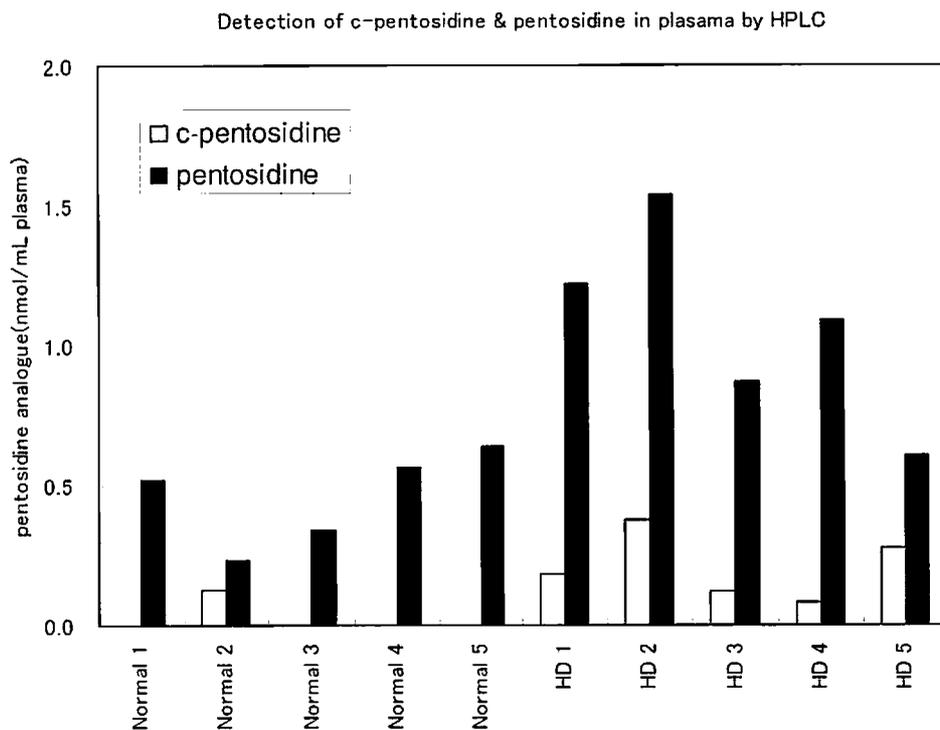


図 3-21 ヒト血漿中の Pentosidine、C-pentosidine の検出

表 3-4 ヒト血漿中の Pentosidine、C-Pentosidine の検出

	C-pentosidine (nmol/ml plasma)	Pentosidine (nmol/ml plasma)
Normal subjects(n=5)	0.06 ± 0.06	0.43 ± 0.20
HD patients (n=5)	0.19 ± 0.19	1.46 ± 0.85

測定値は5検体の平均±誤差で示している。図 3-14 に示したように、各サンプルのピークをリテンションタイムより C-ペントシジンあるいはペントシジンとして帰属し、算出した。

これらの結果では、C-pentosidine は健常者においても検出できる場合があり、また透析患者においても検出できた例は多くない。図 3-19 ではアルギニンとクレアチンが同濃度であった場合には、クレアチン由来の Pentosidine 類似構造である C-pentosidine の方が生成速度が速いことを示したが、実際の血漿サンプルでは C-pentosidine は Pentosidine よりも少ない。これは、Pentosidine がタンパク中のリジン残基とアルギニン残基の架橋生成物であるので、リジンと糖によって生じた Schiff 塩基は、血漿中のクレアチンと反応するよりも、タンパク中の近傍に存在するアルギニンと反応する方が有利であるためと考えられる。

第4章 考察

4-1 抗 Pentosidine 抗体の作製

今回作製したモノクローナル抗 Pentosidine 抗体 1C12 及び 4D7 は、図 3-5 に示したように Pentosidine とは強く反応する一方で、Pentosidine 生成の出発物質である L-リジン、L-アルギニンやその類似体である *N*-モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA)、クレアチン、クレアチニンとは全く反応しなかった。一方、構造が Pentosidine の一部と類似している 2-アミノベンズイミダゾール(NH₂-BzIm)は反応したが、同様に類似している臭化 *N*-プロピルピリジニウム (Pr-Pyridinium) は反応を示さなかった。以上の結果から、本抗体は Pentosidine と 2-アミノベンズイミダゾールの共通構造である 9 員環ヘテロ環状構造を認識すると考えられた。

4-2 抗 Pentosidine 抗体を用いた Pentosidine 生成モデル系の評価

4-2-1 リボース修飾及びグルコース修飾 BSA 上の Pentosidine の検出

Pentosidine の生成は、リボースの方がグルコースに比べて有意に多いことが確認された。これはリボースの方がグルコースに比べて反応性の高いケトース構造の割合が高いことによるものである。BSA と糖から生じたアマドリが、環化反応、酸化反応を受けて Pentosidine を生成する過程には、炭素鎖の脱離や、二量化反応を伴わないため、五炭糖であるリボースの方が六炭糖であるグルコースより有利であると考えられる。Pentosidine の生成にはリボースを用いた方が、より効率的であることが明らかとなった。

4-2-2 Pentosidine 生成における、尿素、クレアチン及びクレアチニンの効果

リボースと BSA による Pentosidine の生成は、クレアチンなどを添加することで促進され、その生成反応は濃度依存的であり、高温、高 pH 側でより加速されることが明らかとなった。pH による促進効果は糖の構造的平衡のうち、ケトース構造の割合の増大によるものと考えられる。

添加物による Pentosidine 生成増大の原因としては、添加物によって BSA 上のリジン、アルギニンとリボースによる Pentosidine 生成が促進された場合、及び、添

加物が直接 Pentosidine 生成反応に関与し Pentosidine と類似の構造を生成した場合の 2 通りが考えられた。添加物を加えてインキュベートした BSA 上の Pentosidine を HPLC で分析した結果、Pentosidine のピークの増大も確認されたので、前者の可能性も考えられたが、3-3 で述べたようにクレアチンとリジン、リボースだけでも Pentosidine と同様の蛍光性を持つ構造が得られたことから、後者の可能性について実験を行った。クレアチンは構造中にアルギニンと同様のグアニジノ基を有していることから、アルギニンと同様にリボースとリジンから生成したシッフ塩基とクレアチンが反応して Pentosidine の骨格に取り込まれた構造体が生成することが明らかとなった。すなわちリジンとリボース、クレアチンの反応混合物から Pentosidine と同じ励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm で検出される蛍光特性を持ちながら、Pentosidine とはリテンションタイムが異なる成分として検出された。蛍光特性は化合物の芳香環の骨格に由来するので、この新規な成分の蛍光特性が類似しているということは同じ芳香環構造を有していることを示し、また HPLC のリテンションタイムは分子の極性構造や、分子の大きさに依存するので、この場合 Pentosidine よりも幾分極性の高い構造あるいは、分子量が小さいと考えられた。この蛍光性ピークを精製単離し、C-pentosidine と命名した。

今回作製したモノクローナル抗 Pentosidine 抗体が、クレアチンやアルギニンのような単純な構造には反応せず、2-アミノベンズイミダゾールのような 9 員環ヘテロ環状構造や C-pentosidine と有意に反応性を示したことは、C-pentosidine が Pentosidine や 2-アミノベンズイミダゾール同様に、9 員環ヘテロ環状構造を有することを示唆し、これは NMR や FAB-MS による構造解析の結果と一致した。すなわち C-pentosidine はクレアチンが Pentosidine 構造に取りこまれた構造であることが明らかとなった。

4-3 C-pentosidine の検出

4-3-1 生理的条件下での C-pentosidine 生成

pH 7.4、37℃の生理的条件下ではクレアチンとアルギニンが同濃度で存在する場合には、クレアチンによる C-pentosidine の生成の方が速いことが示された。

表 4-1 に、血清あるいは血漿中のクレアチンとアルギニン濃度を示した。これらの数値は各臨床検査会社の基準値から算出し、モル濃度 (nmol/mL) で表している[41]。血漿中のアルギニン濃度は、HPLC によるアミノ酸分析であるから、タンパク中のアルギニンすべての濃度を意味している。この表からわかるように、正常な状態では血液中ではクレアチンとアルギニンの血中濃度は 20~120 nmol/mL とほぼ同じ濃度域にある。従って図 3-19 で示したようにアルギニンとクレアチンが同濃度であった場合は、クレアチンが反応した C-pentosidine の方が大量に生成すると考えられ、生体内でも C-pentosidine の生成が促進され、蓄積していることが考えられる。

吉原らの報告[40]においても、図 3-19 に示したように Pentosidine とされるピークよりも早いリテンションタイムに、Pentosidine と同様の蛍光を有するピークがいくつか検出されており、これらのピークは Pentosidine と同じ蛍光特性を有していることから、C-pentosidine である可能性は高い。

表 4-1 生体成分の臨床検査基準値[41]

クレアチン MW=131.15	会社	血清 (mg/dl)		血清クレアチン
	SRL	0.31-1.10		平均
	シオノギ	0.4-0.8		24-84(nmol/ml)
	住友	0.3-1.3		
	BML	0.3-1.2		
会社	血清 (mg/dl)		血清クレアチニン	
クレアチニン MW=113.12	SRL	0.6-1.3		平均
	大塚	男:0.6-1.1、女:0.4-0.8		64-120(nmol/ml)
	シオノギ	男:0.8-1.2、女:0.6-0.9		
	住友	男:0.7-1.3、女:0.5-1.0		
	BML	男:0.8-1.3、女:0.6-1.0		
	三菱	男:0.8-1.3、女:0.6-1.1		
会社	血漿	(nmol/ml)	血漿アルギニン	
アルギニン MW=174.20	BML	0.55-2.60(mg/dl)	31.8-149.5	平均
	三菱	64.6-97.8(nmol/ml)	64.6-97.8	44-120(nmol/ml)
	SRL	54-130(nmol/ml)	54-130	
	大塚	46-110(nmol/ml)	46-110	
	シオノギ	20.4-100(nmol/ml)	20.4-100.	
	住友	3.9-14.4(i mol/dl)	39-144	
	会社	血漿	(nmol/ml)	
リジン MW=146.11	BML	1.86-3.94(mg/dl)	127-270	
	三菱	142.5-208.3(nmol/ml)	142.5-208.3	115-240(nmol/ml)
	SRL	110-240(nmol/ml)	110-240	
	大塚	110-220(nmol/ml)	110-220	
	シオノギ	113.6-238.8(nmol/ml)	113.6-238.8	
	住友	8.8-26.6(i mol/dl)	88-266	

表 4-2 血清 Pentosidine 濃度

	Pentosidine (nmol/mL)	
	Group	Mean ± SD
Miyata [25]	Normal	5.78 ± 0.69
	HD	17.77 ± 2.55
Miyata [28]	Normal	0.14 ± 0.07
	DM-HD	1.54 ± 0.63
Sanaka [42]	Normal	0.071 ± 0.01
	HD	0.64 ± 0.14
Yoshihara [40]	Normal	0.35 ± 0.08
Kato [22]	Normal	0.19 ± 0.05
	DM	0.21 ± 0.06
Oikawa [43]	Normal	0.16 ± 0.07
Miyazaki	Normal	0.43 ± 0.20
	HD	1.46 ± 0.85

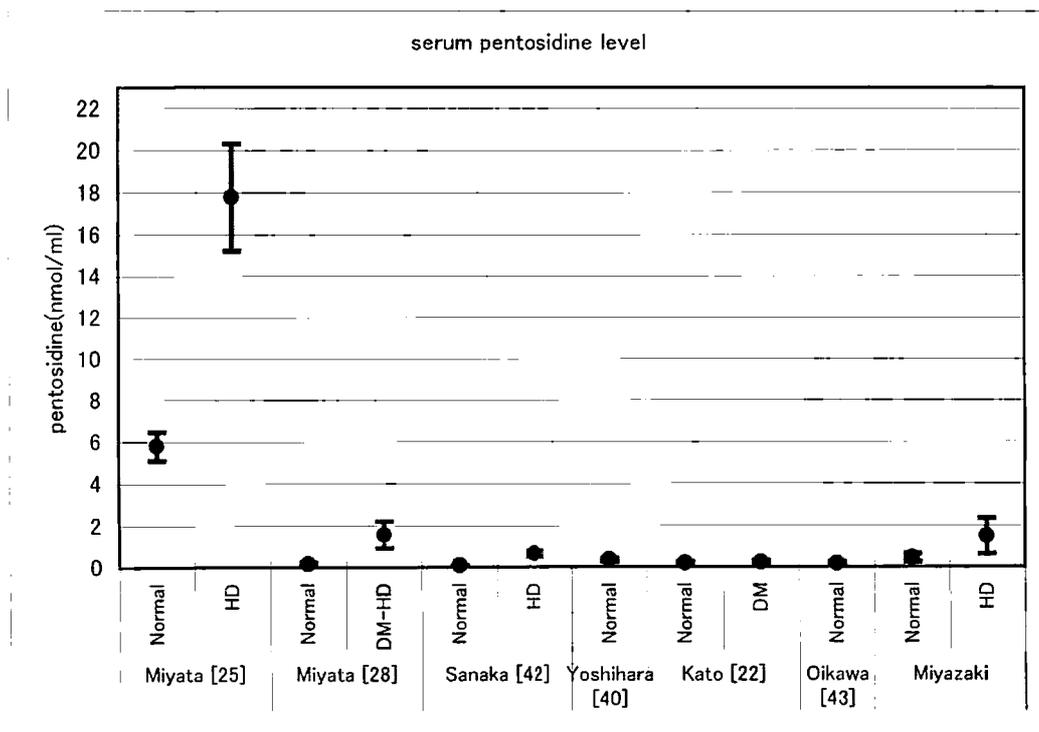


图 4-1 血清 Pentosidine 濃度

4-3-2 ヒト血漿中及び尿中の C-pentosidine の検出

表 4-2 と図 4-1 は、これまでの血清 Pentosidine 濃度の報告をまとめたものである。血清 Pentosidine 濃度は論文によってばらつきがあり、正確な濃度は未定である。今回得られた透析患者（HD）の血清 Pentosidine レベルは Miyata らの報告[28]における、糖尿病透析患者（DM-HD）のそれとほぼ等しい。また健常者の血清 Pentosidine レベルも他の報告とほぼ同じである。これまでの報告においても血清 Pentosidine のレベルは、報告によって異なっている場合があり、正確な数値を決定すべく現在も多くの研究がなされている。

今回我々が得た Pentosidine の値は宮田らの報告[28]とほぼ同じで数値域であり、妥当な結果と思われる。

4-3-3 C-pentosidine の生成機構について

C-pentosidine は Pentosidine のアルギニンがクレアチンに置換した構造的類似点を有しているので、その生成機構を考える上では、まず Pentosidine の生成機構を理解する必要がある。最近 Pentosidine の生成機構に関して、興味ある報告がなされた。Lederer らは n-butylamine がグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンと反応してシッフ塩基を形成し、引き続きそれがクレアチンと反応して、“glucosepane”あるいは“pentosinane”と呼ばれるイミダゾール誘導体を生成し、この pentosinane が酸化されることで Pentosidine が生成することを示している [44-47]。(図 4-2)

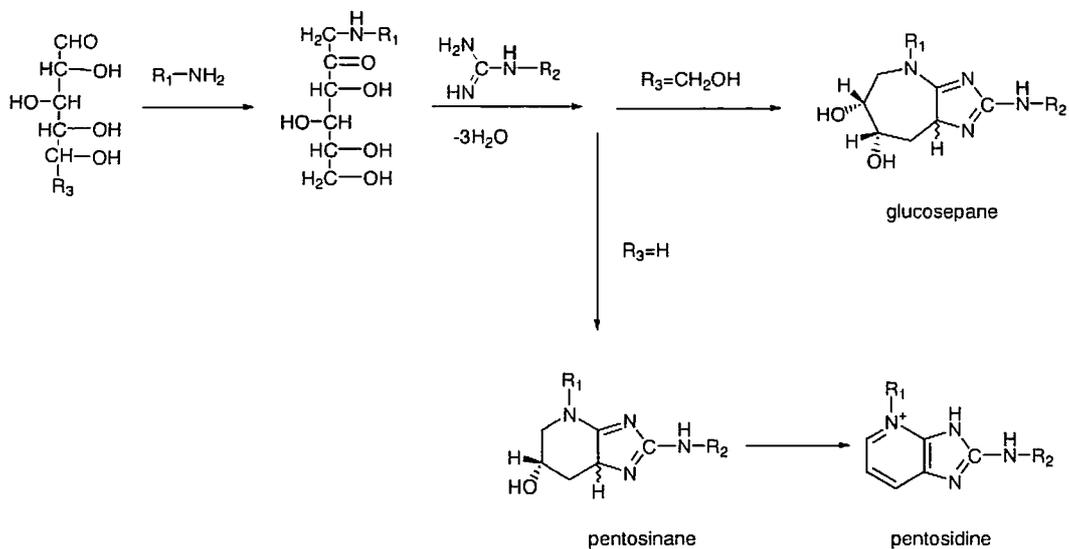


図 4-2 リジン-アルギニン架橋形成の反応経路[47]

Lederer らの仮説を引用すると図 4-3 に示した反応経路が C-pentosidine の生成機構として考えることができる。すなわち、メイラード反応の前期段階で、リボースがタンパク質のリジン残基と反応し、 Schiff 塩基 (compound I) を形成し、compound I はクレアチンのグアニジノ基と反応し compound II を生成する。これは通常の Pentosidine 生成においてアルギニンのグアニジノ基と compound I が反応するのと同様の機構である。次に compound II は環化、脱水素化、縮合反応を受けて compound III を経て C-pentosidine を生成すると考えられる。

HPLC を用いた血漿中の Pentosidine の検出において吉原らは、Pentosidine ピークよりも早いリテンションタイムを持つ成分を検出している。HPLC の検出は本研究と同じく Pentosidine に特長的な蛍光波長で行っており、この成分は Pentosidine と類似の蛍光特性を持つと考えられるが、彼らはこの成分についての説明はない。吉原らも検出しているこの成分が C-pentosidine であったと考えることができる。

以上のようにクレアチンがアルギニンと同様に反応して Pentosidine 類似の AGE 構造である C-pentosidine を生成すると考えるには矛盾がない。特にクレアチンが高値を示す疾患においては、C-pentosidine の生成はより亢進していると考えられ、C-pentosidine が今後、新たな AGE として注目されると期待される。

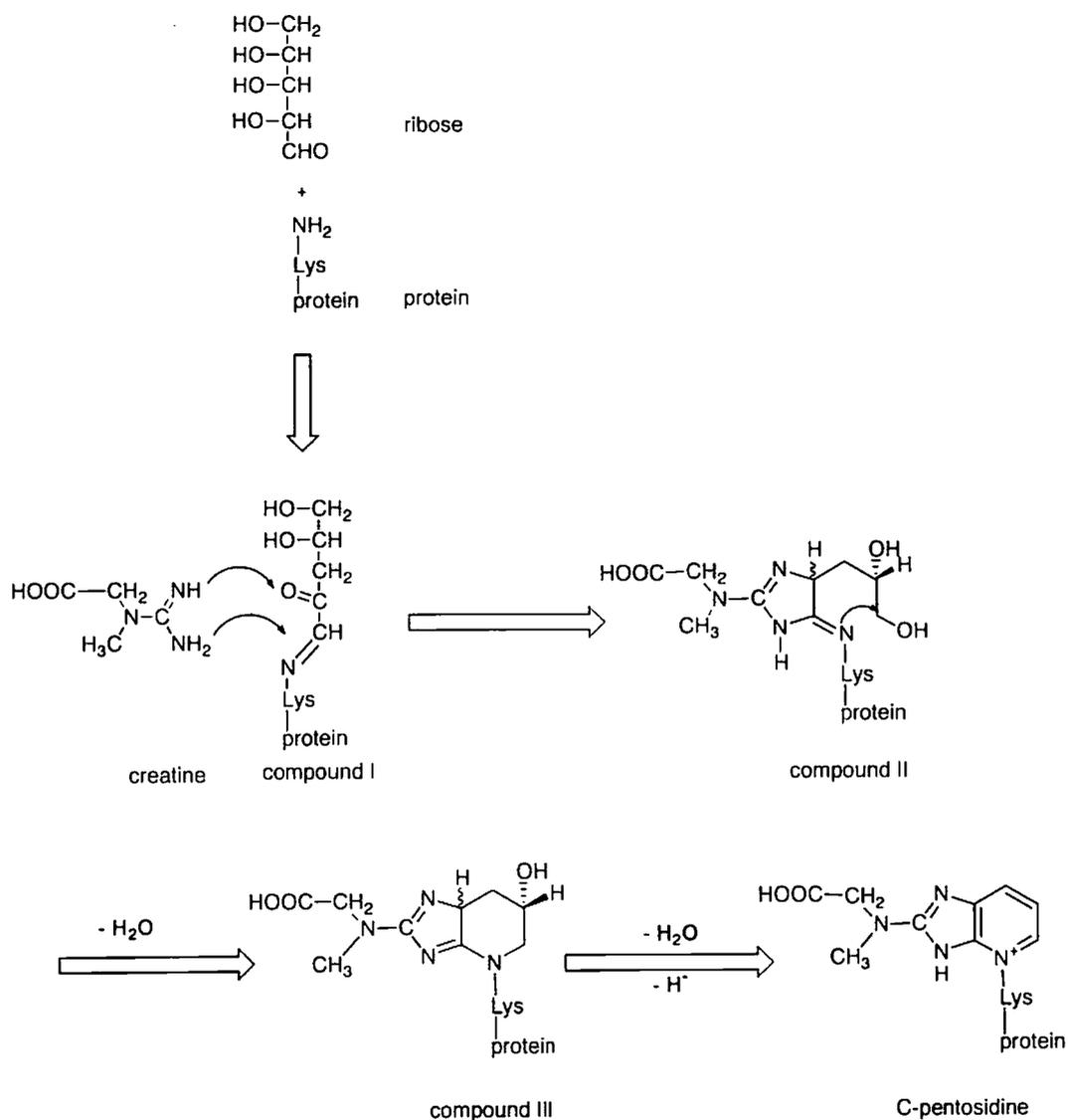


図 4-3. 予想される C-pentosidine の生成経路

リジンとアルギニン残基の架橋構造である Pentosidine は代表的な AGE 構造の一つであり、種々の疾病との関連が報告されている。本研究では 1) リジンとリボース、アルギニンのインキュベーションは通常の Pentosidine を生じる一方で、リジンとリボース、クレアチンのインキュベーションでは C-pentosidine の生成をもたらした。2) この化合物の構造解析では通常の Pentosidine のアルギニン部分がクレアチンで置換された構造であることが明らかとなった。3) 透析患者血漿で

C-pentosidine が検出され、クレアチンがタンパク質の修飾と C-pentosidine の生成を促進していることが明らかとなった。

Pentosidine の生成に関してはこれまでに幾つかの報告がある。宮川らは[25]腎症患者から得た血漿を *in vitro* で 37℃、24 時間インキュベートした場合、Pentosidine 濃度は正常患者の血漿中のそれよりも 3.4 倍と顕著に高いことを報告している。彼らは、腎症患者の血漿中に存在して Pentosidine 生成を増大させる化合物の分子量は 5,000 以下であると提唱している[25]。この化合物の同定は未知であるが、彼らの知見は本研究の知見と矛盾していない。なぜなら *in vitro* での BSA とリボースによる Pentosidine 生成はクレアチンの存在によって 2.5 倍以上と顕著に増大した (図 3-8)。さらに、杉山ら[48]は血漿 Pentosidine レベルが血漿クレアチンレベルと著しく相関していることを報告している。上述の知見と現在の我々の結果は、クレアチンがこの内因性の促進物質かその前駆体の一つであるという考えを示唆している。

クレアチンはクレアチン pathway でグリシンとアルギニンから S-adenosyl-methionine によって生じるグアニジノ酢酸のメチル化によって生成する。その 98% は筋に取りこまれ、筋肉内ではクレアチンリン酸に合成されてエネルギー源となっている。クレアチンは血清中には 1 mg/dl (76 nmol/mL) 程度以下しかなく、尿細管で吸収されるので尿中には微量にしか存在しない。しかしその代謝産物であるクレアチニンは腎糸球体から濾過された後、ほとんど再吸収されずに尿中に排出される。そのため腎機能障害、腎不全では血中クレアチニンが高値を示すことが知られている。一方でクレアチンは筋肉で消費されるので、筋ジストロフィー症、筋萎縮性側索硬化症のような筋疾患において、血清、尿中クレアチン値が高値を示すとされている。筋疾患時にクレアチンが高値を示す機序はわかっていないが、筋崩壊や膜異常に伴う筋肉へのクレアチンの取り込みの異常、筋中への保持の異常などが考えられている。腎機能障害においては、血中クレアチニン値は高値を示すが、クレアチンは影響されないと考えられる。今回腎不全患者の血漿サンプルを用いて血中 C-pentosidine の生成を確認しようとしたが、その検出検体数は少なく、十分な結果を得ることはできなかった。別の腎不全患者のグループでは透析前クレアチニン値は 7.0~12.6 mg/dl (= 618~1,113 nmol/mL) と正常

の 10 倍もの高値を示していたので、Pentosidine、C-pentosidine との相関を検討したが、C-pentosidine が十分検出できず、また Pentosidine 生成量との有意な相関を見出すことができなかった。

前述のように血中クレアチンは正常では微量 (1 mg/dl) である。*in vitro* の実験では、クレアチン、クレアチニン共に、BSA とリボースによる C-pentosidine 生成の増大を示し、さらにクレアチンはクレアチニンの代謝物であるから、腎不全によってクレアチニンが増大していれば、C-pentosidine の生成も増大していると予想されたが C-pentosidine を検出した検体数は多くなかった。

表 4-1 に示したように平均すると正常状態では血清クレアチンレベルは 24~84 nmol/mL であり、一方、血漿遊離アルギニンは、44~120 nmol/mL である。従ってクレアチンレベルと、アルギニンレベルは共に正常では 100 nmol/mL 前後であり大きな差がないことがわかる。従ってこれらの条件下ではクレアチン濃度がさらに高まることで、C-pentosidine は Pentosidine に比較して *in vivo* でもより効率的に生成すると期待される。我々の *in vitro* の実験は C-pentosidine の生成が Pentosidine のそれよりも速いことを示したが(図 3-19)、透析患者での血漿 C-pentosidine レベルは Pentosidine のそれよりも 30%しかない(表 3-4)。これは、血漿中では Pentosidine の大部分は、血漿タンパクとして多量に存在するアルブミンのアルギニン残基とリジン残基から生成すると考えられるので、通常の Pentosidine の方が C-pentosidine よりも多量に存在すると考えられる。実際血漿サンプル中の Pentosidine 類を HPLC で測定した場合にも、Pentosidine の方が顕著に多かった。

血漿 Pentosidine レベルは多くの報告では HPLC 分析[18,22,25,26,28-30,36,40,48]とポリクローナル抗 Pentosidine 抗体を用いた ELISA[5, 32]で決定されている。C-pentosidine の構造は通常の Pentosidine に非常に似ており、事実、我々のモノクローナル抗体によっても認識され (図 3-16)、また HPLC 分析では通常の Pentosidine と近いリテンションタイムを与えた(図 3-14)。それ故、血漿 Pentosidine レベルは C-pentosidine によって過大評価されている可能性も考えられる。

第5章 結語

加齢や糖尿病に対する AGE の寄与について、AGE が疾病の要因であるのか、あるいは痕跡であるのかを検討する上では、AGE の生成機構の解明が重要である。本研究では (1) モノクローナル抗 Pentosidine 抗体を作製し、(2) *in vitro* で Pentosidine を生成し ELISA 法で、検出するモデル系を作成した。(3) さらにこの検出系を用いて疾患で増大し、Pentosidine 生成に関与する内因性物質の探索を行い、(4) 内因性物質が関与する Pentosidine 類似の新規な AGE 構造体 (C-pentosidine) を単離し、構造解析を行った。また (5) 透析患者の血漿及び尿サンプル中から、この新規な C-pentosidine の検出定量を行った。

in vitro で、BSA とリボースを用いるモデル系において生成する Pentosidine を、モノクローナル抗 Pentosidine 抗体を用いる ELISA によって検出すると、Pentosidine 生成量はクレアチン、クレアチニン、3-ヒドロキシ酪酸、ピルビン酸ナトリウムの存在下でインキュベートした系で ELISA の発色が顕著に高く、Pentosidine の生成が促進されている現象を示した。これらの化合物の中でクレアチンが最も効果的で、クレアチンによる増大は無添加のコントロールに比べて 2.5 倍であった。またその効果は、濃度依存的に増大し、また反応温度が高いほど増大した。これらの結果は BSA とリボースとの反応中において、尿素、クレアチン、クレアチニンが Pentosidine または Pentosidine 類似化合物を生成している可能性を示唆した。中でも最も効果の大きかったクレアチンについて詳細にその生成機構を検討した。

Pentosidine はアルギニンとリジン、リボースから生成する AGE であるが、アルギニンの代わりにクレアチンを用い、Boc-リジンとリボースでインキュベートしたサンプルを HPLC で分析したところ、Pentosidine と同じ励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm で検出される蛍光特性をもちながら、リテンションタイムが異なる C-pentosidine が生成していることが示され、また競合法 ELISA でも、C-pentosidine は抗 Pentosidine 抗体に反応した。(IC₅₀=1 μM) (通常の Pentosidine の IC₅₀=6 nM)

C-pentosidine をプロトン NMR で解析したところ、Boc-リジンとクレアチンが構造に取り込まれた構造であると考えられ、質量分析によっても C-pentosidine が対アニオンとして HFBA を伴って現れたと思われる分子イオンピークが検出された。

これらの結果より、C-pentosidine 以下の性質を持つことが明らかとなった。

1) Pentosidine と類似の蛍光特性を持つ、2) Pentosidine とは異なるリテンションタイムを持つ、3) 抗 Pentosidine 抗体に対して反応性をもつ、4) NMR で芳香環領域の構造は Pentosidine と同じである、5) 構造中にクレアチンの *N*-メチル基が存在する、6) これらの結果を支持する構造として提唱した構造は質量分析において、矛盾しない分子量を与えた。よって、我々はこの分子がクレアチンのグアニジノ基がリジン-リボースと反応して取り込まれた構造であると考えた。

in vitro でリボースと Boc-リジンをクレアチンまたは Boc-アルギニンと生理的条件下 (37°C、pH 7.4) でインキュベートし、生成する Pentosidine 類を HPLC で検出した場合、クレアチンから生じる C-pentosidine の生成が速いことが明らかとなった。またヒト血漿中においても Pentosidine と並んで C-pentosidine が検出された。

このように、生体内でクレアチンがタンパク質の修飾に関与し C-pentosidine の生成を促進することが明らかとなり、AGE が関与する疾病に関する知見が得られた。

参考文献

- 1) Makino, H., Shikata, K., Hironaka, K., Kushiro, M., Yamasaki, Y., Sugimoto, H., Ota, Z., Araki, N. and Horiuchi, S., Ultrastructure of nonenzymatically glycated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 48: 517-526, 1995.
- 2) Yamada, K., Miyahara, Y., Hamaguchi, K., Nakayama, M., Nakano, H., Nozaki, O., Miura, Y., Suzuki, S., Tsuchida, H., Mimura, N., Araki, N., Horiuchi, S., Immunohistochemical study of human advanced glycosylation end-products (AGE) in chronic renal failure. *Clin. Nephrol.* 42: 354-361, 1994.
- 3) Kume, S., Takeya, M., Mori, T., Araki, N., Suzuki, H., Horiuchi, S., Kodama, T., Miyauchi, Y. and Takahashi, K., Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am. J. Pathol.* 147: 654-667, 1995.
- 4) Miyata, T., Oda, O., Inagi, R., Iida, Y., Araki, N., Yamada, N., Horiuchi, S., Taniguchi, N., Maeda, K. and Kinoshita, T., β 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J. Clin. Invest.* 92: 1243-1252, 1993.
- 5) Miyata, T., Taneda, S., Kawai, R., Ueda, Y., Horiuchi, S., Hara, M., Maeda, K., and Monnier, V. M., Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in β 2-microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2353-2358, 1996.
- 6) Mizutani, K., Ono, T., Ikeda, K., Kayashima, K. and Horiuchi, S., Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J. Invest. Dermatol.* 108: 797-802, 1997.
- 7) Jono, T., Kimura, T., Takamatsu, J., Nagai, R., Miyazaki, K., Yuzuriha, T., Kitamura, T., Horiuchi, S., Accumulation of imidazolone, pentosidine and N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine in hippocampal CA4 pyramidal neurons of aged human brain. *Pathology International* 52: 563-571, 2002.
- 8) Bucala, R., Model, P. and Cerami A., Modification of DNA by reducing sugars: A possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc. Natl. Am. Soc. USA* 81: 105-109, 1984.
- 9) Lee, A. T. and Cerami, A., Induction of gamma-delta transposition in response to elevated glucose-6-phosphate levels. *Mutat. Res.* 249: 125-133, 1991.
- 10) Lee, A. T., Plump, A., DeSimone, C., Cerami, A. and Bucala, R., A role for DNA mutations in diabetes-associated teratogenesis in transgenic embryos. *Diabetes* 44: 20-24, 1995.

- 11) Lee, A. T., DeSimone, C., Cerami, A. and Bucala, R., Comparative analysis of DNA mutations in lacI transgenic mice with age. *FASEB J.* 8: 545-550, 1994.
- 12) Seidel, W. and Pischetsrieder, M... Reaction of guanosine with glucose under oxidative conditions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 2017-2022, 1998.
- 13) Larisch, B., Pischetsrieder, M. and Severin, T.. Formation of guanosine adducts from L-ascorbic acid under oxidative conditions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7: 2681-2686, 1998.
- 14) Seidel, W. and Pischetsrieder, M... DNA glycation leads to depurination by the loss of N²-carboxyethylguanine in vitro. *Cell. Mol. Biol.* 44: 1165-1170, 1998.
- 15) Nissl, J., Ochs, S. and Severin, T., Reaction of guanosine with glucose, ribose, and glucose 6-phosphate. *Carbohydr. Res.* 289: 55-65, 1996.
- 16) Higashi, T., Sano, H., Saishoji, T., Ikeda, K., Jinnouchi, Y., Kanzaki, T., Morisaki, N., Rauvala, H., Shichiri, M., Horiuchi, S., The receptor for advanced glycation end products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes* 46: 463-72, 1997.
- 17) 佐野裕之, 堀内正公, AGE と糖尿病合併症. 最新内科学大系プロGRESS 2: 116-122, 1997.
- 18) Sell, D.R., and Monnier, V. M., Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 264: 21597-21602, 1989.
- 19) Grandhee, S. K., and Monnier, V. M.. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J. Biol. Chem.* 266: 11649-11653, 1991.
- 20) Dyer, D.G., Blackedge, J. A., Thorpe, S. R., Baynes J. W., Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. *J. Biol. Chem.* 266 (18): 11654-11660, 1991.
- 21) Chen, J. R., Takahashi, M., Kushida, K., Suzuki, M., Suzuki, K., Horiuchi, K., and Nagano, A., Direct detection of crosslinks of collagen and elastin in the hydrolysates of human yellow ligament using single-column high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 278: 99-105, 2000.
- 22) Daimon, M., Ono, Y., Saito, T., Yamaguchi, H., Hirata, A., Ohnuma, H., Igarashi, M., Eguchi, H., Manaka, H., and Kato, T., Increased serum levels of pentosidine, but not carboxymethyl lysine, in type 2 diabetes without obvious diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 22: 877-878, 1999.
- 23) Weiss, M. F., Rodby, R. A., Justice, A. C., and Hricik, D. E., Free pentosidine and neopterin as markers of progression rate in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 54: 193-202, 1998.

- 24) Sell, D. R., Lapolla, A., Odetti, P., Fogarty, J., and Monnier, V. M., Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* 41: 1286-1292, 1992.
- 25) Miyata, T., Ueda, Y., Yamada Y., Izuhara Y., Wada, T., Jadoul, M., Saito, A., Kurokawa, K., and Strihou, C. Y., Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine. an advanced glycation end product: carbonyl stress in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 2349-2356, 1998.
- 26) Odetti, P., Fogarty, J., Sell, D.R., and Monnier, V. M., Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subject. *Diabetes* 41: 153-159, 1992.
- 27) Takahashi, M., Hoshino, H., Kushida, K., Murata, H., Baba, S., and Inoue, T., The advanced glycation endproduct, pentosidine, in the carpal ligament in patients with carpal tunnel syndrome undergoing hemodialysis: comparison with idiopathic carpal tunnel syndrome. *Nephron* 80: 444-449, 1998.
- 28) Izuhara, Y., Miyata, T., Ueda, Y., Suzuki, D., Asahi, K., Inagi, R., Sakai, H., and Kurokawa, K., A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14: 576-580, 1999.
- 29) Floridi, A., Trizza, V., Paolotti, P., and Lucarelli, C., Analytical strategy for the assessment of the protein glycation status in uremic patients by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 846: 65-71, 1999.
- 30) Stein, G., Franke, S., Sperschneider, H., Vienken, J., Ueda, Y., Miyata, T., and Kurokawa, K., Decrease in serum pentosidine levels of ESRD patients during polysulfone haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14: 1606-1608, 1999.
- 31) Jadoul, M., Ueda, Y., Yasuda, Y., Saito, A., Robert, A., Ishida, N., Kurokawa, K., Strihou, C. Y., and Miyata, T., Influence of hemodialysis membrane type on pentosidine plasma level. a marker of "carbonyl stress." *Kidney Int.* 55: 2487-2492, 1999.
- 32) Taneda, S., and Monnier, V. M., ELISA of pentosidine. an advanced glycation end product. in biological specimens. *Clin. Chem.* 40: 1766-1773, 1994.
- 33) Chen, J. R., Takahashi, M., Suzuki, M., Kushida, K., Miyamoto, S., and Inoue, T., Pentosidine in synovial fluid in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: Relationship with disease activity in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 25: 2440-2444, 1998.
- 34) Chen, J. R., Takahashi, M., Suzuki, M., Kushida, K., Miyamoto, S., and Inoue, T., Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology* 38: 1275-1278, 1999.

- 35) Dyer, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Bailie, K. E., Lyons, T. J., McCance, D. R., and Baynes, J. W., Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* 91: 2463-69, 1993.
- 36) McCance, D. R., Dyer, D. G., Dunn, J. A., Karen E. Bailie, Thorpe, S. R., Baynes, J. W., and Lyons, T. J., Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 91: 2470-2478, 1993.
- 37) Smith, M. A., Taneda, S., Richey, P. L., Miyata, S., Yan, S. D., Stern, D., Sayre, L. M., Monnier, V. M., and Perry, G., Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5710-5714, 1994.
- 38) Nagai, R., Johnno, T., Miyazaki, K., Horiuchi, S., Preparation of specific antibodies against CML, one of major AGE-structures. *Diabetes* 49 SUPPL 1: A144, 2000.
- 39) Galfre G., Milstein C., Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods in Enzymol.* 73(Pt.B): 3-46, 1981.
- 40) Yoshihara, K., Nakamura, K., Kanai, M., Nagayama, Y., Takahashi, S., Saito, N., and Nagata, M., Determination of urinary and serum pentosidine and its application to elder patients. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 1005-1008, 1998.
- 41) 河合忠、水島裕監修「今日の臨床検査 2001/2002」(南江堂(東京) 2001) .
- 42) 佐中 孜, 庭山 淳, 塩見智子, 木村伸俊, 西村英樹, 篠部道隆, 樋口千恵子, 中村和徳, 競合 ELISA 法による血漿ペントシジンの測定法の確立と慢性腎不全患者における血漿ペントシジンの濃度. *腎と透析*, 47: 867-872, 1999.
- Sanaka, T., Funaki, T., Tanaka, T., Hoshi, S., Niwayama, J., Taitoh, T., Nishimura, H., Higuchi, C., Plasma pentosidine levels measured by newly developed method using ELISA in patients with chronic renal failure. *Nephron* 91: 64-73, 2002.
- 43) Takahashi, M., Oikawa, M. and Nagano, A., Effect of age and menopause on serum concentration of pentosidine, an advanced glycation end product. *J. Gerontology* 55: M137-140, 2000.
- 44) Lederer, M. O., and Bühler, H. P., Cross-linking of proteins by Maillard processes--characterization and detection of a lysine-arginine cross-link derived from D-glucose. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 1081-1088, 1999.
- 45) Lederer, M. O., Gerum, F., and Severin, T., Cross-linking of proteins by Maillard processes- model reactions of D-glucose or methylglyoxal with butylamine and guanidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 6: 993-1002, 1998.
- 46) Lederer, M. O., and Kläiber, R. G., Cross-linking of proteins by Maillard processes: characterization and detection of lysine-arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2499-2507, 1999.

- 47) Biemel, K. M., Reihl, O., Conrad, J., Lederer, M. O., Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes: Unraveling the structure of a pentosidine precursor. *J. Biol. Chem.* 276: 23405-23412, 2001.
- 48) Sugiyama, S., Miyata, T., Ueda, Y., Tanaka, H., Maeda, K., Kawashima, S., Strihou, C. Y., and Kurokawa, K., Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: An advanced glycation end product. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 1681-1688, 1998.