

ヒト硝子体中成熟架橋と advanced glycation end products 性架橋の定量

松本 行弘¹⁾, 高橋 正哲²⁾, 筑田 眞¹⁾, 新井 清美¹⁾¹⁾獨協医科大学越谷病院眼科, ²⁾浜松医科大学整形外科学教室

要 約

目 的：ヒト硝子体中の成熟架橋物質であるピリジノリン, デオキシピリジノリンと advanced glycation end products (AGEs) 性架橋物質であるペントシジンを定量し, 年齢および糖尿病との関係, 各物質間の関係を検討する。

方 法：硝子体手術を施行した 45 眼を糖尿病群 (32 眼) と全身疾患がない対照群 (13 眼) に分け, 酸加水分解後 SP-Sephadex C-25 で前処理し, 高速液体クロマトグラフィを用いて蛍光検出器で測定を行った。

結 果：硝子体中ペントシジン値は 27.3 ± 23.1 (平均値 \pm 標準偏差) pmol/ml ($n=45$), ピリジノリン値は 79.0 ± 40.2 (平均値 \pm 標準偏差) ng/ml ($n=43$) で, デオキシピリジノリン値は 54.0 ± 9.5 ng/ml ($n=32$) であった。糖尿病群のペントシジン値は対照群に比べて有意 ($p <$

0.05) に高値で, 成熟架橋物質は有意差がなかった。各架橋物質と年齢は有意な相関はなかった。各架橋物質間では, それぞれ有意な正の相関 ($p < 0.01$) があつた。

結 論：ヒト硝子体中のピリジニウム架橋の存在を確認した。さらに硝子体中コラーゲンでは, ピリジニウム架橋形成後にグリケーションにより AGEs 性架橋が形成された可能性が推察された。特に糖尿病患者では, AGEs 性架橋の増加が成熟架橋の代謝を低下させることが推定されたが, 成熟架橋の増加は伴っていなかった。(日眼会誌 106 : 9-15, 2002)

キーワード：ペントシジン, 後期反応糖化物質, 非酵素的糖付加反応, ピリジノリン, デオキシピリジノリン

Levels of Mature Cross-links and Advanced Glycation End Product Cross-links in Human Vitreous

Yukihiro Matsumoto¹⁾, Masaaki Takahashi²⁾, Makoto Chikuda¹⁾ and Kiyomi Arai¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine²⁾Department of Orthopedic Surgery, Hamamatsu University School of Medicine

Abstract

Purpose : To determine the levels of pyridinoline and deoxypyridinoline, two mature enzymatic cross-links, and pentosidine, an advanced glycation end product (AGE) cross-link, in human vitreous and to investigate the correlations among the cross-links and the effects of aging and diabetes mellitus (DM) on the levels of the cross-links.

Methods : Forty-five vitreous samples were collected from 32 eyes undergoing vitrectomy for diabetic retinopathy (DM group) and 13 eyes (control group) from age- and sex-matched patients with idiopathic macular hole or epiretinal membrane with no systemic conditions. The levels of the cross-links were determined using high-performance liquid chromatography after acid hydrolysis and pretreatment with SP-Sephadex.

Results : The levels of pentosidine, pyridinoline, and deoxypyridinoline were 27.3 ± 23.1 (mean \pm standard deviation) pmol/ml ($n=45$), 79.0 ± 40.2 (mean \pm standard deviation) ng/ml ($n=43$), and 54.0 ± 9.5 ng/ml ($n=32$), respectively. When the vitreous sam-

ples from DM and the controls were compared, a significant difference ($p < 0.05$) was found in the level of pentosidine but not in the levels of pyridinoline or deoxypyridinoline. No significant correlations were found between age and the cross-links. Significant correlations ($p < 0.01$) were found among the cross-links.

Conclusions : The results indicate that mature cross-link substances exist in human vitreous. The results also suggest that glycation may occur in the vitreous after mature cross-links form and result in the formation of AGE cross-links. In human vitreous from patients with DM, increased levels of AGE cross-links may stabilize the formation of mature cross-links but did not increase mature cross-links. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 9-15, 2002)

Key words : Pentosidine, Advanced glycation end products, Glycation, Pyridinoline, Deoxypyridinoline

別刷請求先：〒 343-8555 越谷市南越谷 2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 松本 行弘

(平成 12 年 10 月 31 日受付, 平成 13 年 6 月 25 日改訂受理)

Reprint requests to : Yukihiro Matsumoto, M.D. Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University, 2-1-50 Minami-Koshigaya, Koshigaya 343-8555, Japan

(Received October 31, 2000 and accepted in revised form June 25, 2001)

I 緒 言

ヒト硝子体の主要構成成分であるコラーゲンは、主に80%を占める軟骨コラーゲンに類似したII型と少量のIX型コラーゲンから成り、コラーゲン分子は各々架橋を形成してその弾性や性質を保持している¹⁾。正常状態で形成される非還元性成熟架橋物質であるピリジノリン²⁾、デオキシピリジノリン³⁾は、コラーゲン分子鎖間の安定化に寄与して線維構造の保持に重要な物質で⁴⁾、コラーゲン分解とともに腎臓から排出されることから、臨床的には整形外科領域において骨吸収を反映する骨代謝マーカーとして広く用いられている^{5)~8)}。

ピリジノリンは1977年にFujimotoら²⁾によりウシアキレス腱から、その構造アナログであるデオキシピリジノリンは1982年にOgawaら³⁾によりウシ骨から抽出された、3-ヒドロキシピリジニウム・ファミリーに属するピリジニウム架橋⁹⁾である。ピリジノリンは骨、軟骨、程度は少ないが、腱、筋膜、動脈などのほとんどの組織に存在し、主にIおよびII型コラーゲンに分布し、デオキシピリジノリンは主に骨、歯、他に少量ではあるが広範囲の組織に分布し、IおよびIX型コラーゲンに存在していることが知られている^{6)~8)}。しかし、我々の知る限りピリジノリン、デオキシピリジノリンをヒト硝子体から定量した報告はない。

コラーゲンは代謝回転が非常に遅く、リジン残基を多く含むために、蛋白質の非酵素的糖化反応における後期反応生成物質(advanced glycation end products, AGEs)の蓄積^{10)~13)}が起りやすく、AGEsの蓄積は無秩序な架橋を形成し、コラーゲンなどの性質を変化させることが知られている^{10)~14)}。糖尿病患者では非糖尿病患者に比較してグリケーションが強く生じるため、AGEsの蓄積量と糖尿病合併症発症、進行度が相関すること¹⁵⁾が指摘されている。また、硝子体においてもAGEsが生成、蓄積され無秩序なAGEs性架橋を形成する^{13)~14)}とともに、マクロファージ系細胞に存在するAGEsを特異的に認識する細胞膜受容体を介して、成長因子やサイトカインが誘導されること¹⁸⁾から、糖尿病網膜症の要因の一つと考えられている。

今回AGEsの中でも、酸耐性のある安定した蛍光物質で、蛋白質のリジン残基のε-アミノ基と還元糖により非酵素的に、かつ無秩序なAGEs性架橋を形成するペントシジン¹⁶⁾に着目した。ペントシジンは、糖尿病患者の組織では健常者に比べて高値であり^{11)~13)}、血清中ペントシジンと糖尿病網膜症の重症度が比例し¹⁷⁾、糖尿病網膜症の硝子体で高値であること¹³⁾が報告されている。ペントシジン、ピリジノリン、デオキシピリジノリンの測定方法は、Takahashiら^{5)~8)}が酸加水分解による同様の処理後、前処理としてSP-Sephadexカラムを用い、high performance liquid chromatography(HPLC)によ

り蛍光検出器で測定する方法を確立している。すなわち、これらの3物質がそれぞれ強い自発蛍光を発し、これをそのピークの溶出時間が異なることを利用して測定する方法である。

本研究においては、架橋構造という観点から、秩序に基づいて生成されるコラーゲンの成熟架橋成分であるピリジノリン、デオキシピリジノリンと、蛋白質の無秩序な架橋形成によりコラーゲンなどの性質を変え蓄積するペントシジンに着目し、その硝子体内における濃度を測定した。さらに、加齢や各物質間の関係、および架橋生成に影響すると考えられる糖尿病との関係についても検討したので報告する。

II 対象と方法

1. 対 象

硝子体手術を施行した際に得られたものを試料とし、硝子体手術を行う際、毛様体扁平部に3ポートを作製した後、眼内灌流を行う前に硝子体カッターを眼内に挿入し、硝子体中心部から硝子体ゲルを手術顕微鏡下で確認しながら、眼内灌流液の混入を避け採取した。手術中に水槽内に集め直ちに遠心分離(2,260×g, 4°C, 30分)を行い、血球ならびに切除した増殖組織を除去した後に、N₂ガスを充填して-40°Cで保存した。

硝子体試料45眼を、糖尿病網膜症に対して手術を施行した糖尿病群32眼および全身疾患のないage-およびsex-matchした対照群13眼に分類した。糖尿病群は年齢57.2±13.2(平均値±標準偏差, 38~76)歳, HbA_{1c} 7.84±1.64(平均値±標準偏差)mg/dl, 推定罹病期間10.3±7.3(平均値±標準偏差)年で、糖尿病網膜症の病態は、牽引性網膜剥離が3例3眼、硝子体出血が18例18眼、牽引性網膜剥離および硝子体出血の併発が6例6眼、糖尿病黄斑症が5例5眼であった。対照群は年齢64.7±10.1(44~77)歳, 特発性黄斑円孔が7例7眼, 特発性黄斑部網膜上膜が6例6眼であった。ペントシジンは腎症患者の生体試料では異常高値を示すことが知られていることから、腎症を併発している者を除外するために血清クレアチニン値が正常値以内(1.3 mg/dl以下)の者を対象とした¹²⁾。また、骨Paget病などの骨疾患、甲状腺疾患、副甲状腺疾患などのある症例は除外した¹⁹⁾。すべての材料採取に際しては、本研究の主旨を説明のうえ患者の同意を得て行った。

2. 実験方法

1) 硝子体中ペントシジンの定量

硝子体試料と同量の12 mol/l塩酸を混合し、シールドグラスチューブを用いて脱気後、窒素ガス充填による無酸素状態下で110°C, 20時間の加水分解を行った。加水分解物をpore size 0.45 μmのシリンジフィルタ(DI-S-MIC-25 sc, 東洋濾紙)で濾過し、濾液から200 μlを採取し20 mlのイオン交換水で希釈して0.8×10 cm

SP-Sephadex C-25 カラム (Pharmacia LKB, Uppsala, スウェーデン) に添加した。カラムを 0.1 mol/l 塩酸 20 ml で洗浄した後, 1.0 mol/l 塩酸 5 ml により溶出画分を採取した。溶出液を TC-8 concentrator (タイテック社製) を用いて減圧乾固後, 残留物を 1.0% n-ヘプタフルオロ酪酸 (heptafluorobutyric acid, HFBA) 200 μ l で溶解し, その溶解液 160 μ l を用いて HPLC に注入しペントシジンを測定した。

HPLC での測定は, 島津高速液体クロマトグラフィシステム (SCL-6 A system controller, LC-6 A pump, SIL-10 auto injector, and RF-535 fluorescence HPLC monitor, 島津) を用いて行った。HPLC の条件は, 流速 1 ml/分, 移動層には 100% アセトニトリルと 40 mmol/l HFBA の混合液 (27 : 73 by vol.) を使用し, 反応温度は室温で 8 mm \times 10 cm column prepacked with Radial-Pack C 18 (10-mm particle size, type 8 C 1810 μ ; Waters, Milford, MA, 米国) を用いて, 蛍光検出器 (励起波長 335 nm, 蛍光波長 385 nm) で測定した。イオン交換水は Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, 米国) で精製したものを使用した。

2) 硝子体中ピリジノリン, デオキシピリジノリンの定量

前処理として SP-Sephadex カラムを用いた HPLC injection までの測定方法および HPLC の条件をペントシジンと同様に行い, 励起波長 297, 390 nm の蛍光波長で測定した⁵⁾⁸⁾。標準物質はピリジノリン/デオキシピリジノリン HPLC キャリープレート (Metra Biosystems Inc. Mountain View, CA, 米国) を用いた。

ピリジノリン, デオキシピリジノリンはペントシジンと至適波長は異なるが, ペントシジンと同様に蛍光性を有し強酸による加水分解に耐性がある。これらの架橋物質の HPLC による測定方法の利点は, 分離抽出した後に測定しているため, 確実に対象物質を測定していること²⁰⁾であり, ピリジノリン, デオキシピリジノリンは遊離型と結合型が存在するが, 酸加水分解を行っているため両型を総計した全ピリジノリン, デオキシピリジノリンを測定している。また, 各測定時に試料と同様の方法で種々の標準物質を測定し検量線を作成した。

統計解析は Mann-Whitney U test, 相関関係は Pearson の相関係数を用いて行い, すべて $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計処理結果の記載は平均値 \pm 標準偏差とした。

III 結 果

1. 硝子体中ペントシジン, ピリジノリン, デオキシピリジノリン値

硝子体中ペントシジン値は 27.3 ± 23.1 pmol/ml ($n = 45$), ピリジノリン値は 79.0 ± 40.2 ng/ml ($n = 43$) で, デオキシピリジノリン値は 54.0 ± 9.5 ng/ml ($n = 32$) で

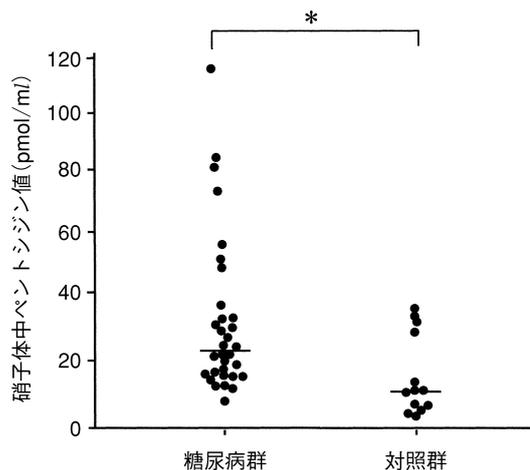


図 1 糖尿病の有無による硝子体中ペントシジン値。硝子体中ペントシジン値は糖尿病群では対照群に比較して有意に高値であった。* : $p < 0.05$

あった。

糖尿病との有無で分けると, ペントシジン値は糖尿病群 31.4 ± 25.2 pmol/ml ($n = 32$), 対照群 17.5 ± 13.0 ($n = 13$), ピリジノリン値は糖尿病群 79.9 ± 44.1 ng/ml ($n = 31$), 対照群 76.7 ± 21.3 ($n = 12$), デオキシピリジノリン値は糖尿病群 55.7 ± 10.4 ng/ml ($n = 20$), 対照群 51.3 ± 7.6 ($n = 12$) であった。ペントシジン値は糖尿病群と対照群で有意差 ($p < 0.05$) があったが (図 1), ピリジノリン, デオキシピリジノリン値はなかった (図 2 A, B)。

2. 硝子体中ペントシジン, ピリジノリン, デオキシピリジノリン値と年齢の関係

硝子体中ペントシジン, ピリジノリン, デオキシピリジノリン値は, 年齢とそれぞれ $r = 0.12$ ($p = 0.52$), $r = 0.16$ ($p = 0.39$), $r = -0.06$ ($p = 0.75$) で, 加齢との有意な相関はなかった。

糖尿病群では, ペントシジン, ピリジノリン, デオキシピリジノリン値は, 年齢とそれぞれ $r = 0.29$ ($p = 0.22$), $r = 0.28$ ($p = 0.24$), $r = 0.06$ ($p = 0.80$) で, ペントシジンおよびピリジノリン値と年齢の回帰式は加齢とともに緩やかに上昇していたが相関はなかった (図 3~5)。対照群では, それぞれ $r = 0.07$ ($p = 0.84$), $r = -0.28$ ($p = 0.38$), $r = -0.09$ ($p = 0.77$) で, ピリジノリン値は年齢とともにやや減少傾向があったが, 相関はなかった (図 4)。デオキシピリジノリン値は糖尿病群, 対照群ともに加齢の影響はなかった (図 5)。

3. 硝子体中ペントシジン, ピリジノリン, デオキシピリジノリン値の相関関係

ペントシジンとピリジノリン ($r = 0.54$, $p < 0.01$), ペントシジンとデオキシピリジノリン ($r = 0.46$, $p < 0.01$), ピリジノリンとデオキシピリジノリン ($r = 0.45$, $p < 0.01$) であった。

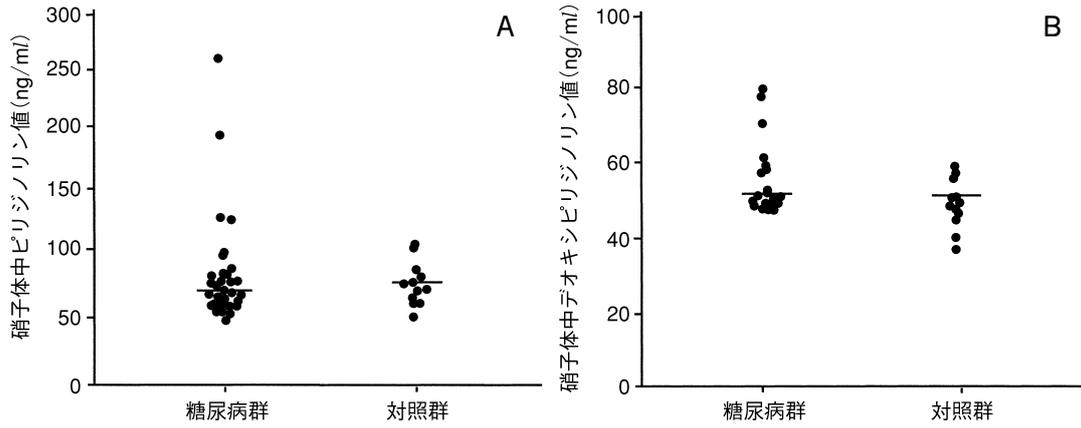


図 2 糖尿病の有無による硝子体中ピリジノリン，デオキシピリジノリン値。

A：ピリジノリン，B：デオキシピリジノリン

硝子体中ピリジノリン，デオキシピリジノリン値ともに，糖尿病群と対照群で有意差がなかった。

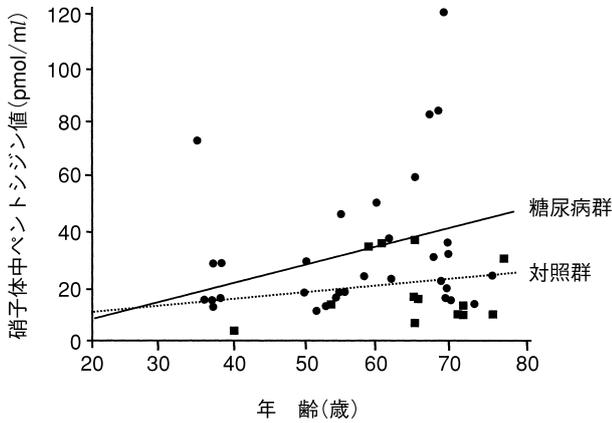


図 3 年齢と硝子体中ペンチジン値の関係。

糖尿病群(●)： $y=0.412x+7.84$ ($r=0.29$ ， $p=0.22$)
 対照群(■)： $y=0.099x+10.8$ ($r=0.07$ ， $p=0.84$)

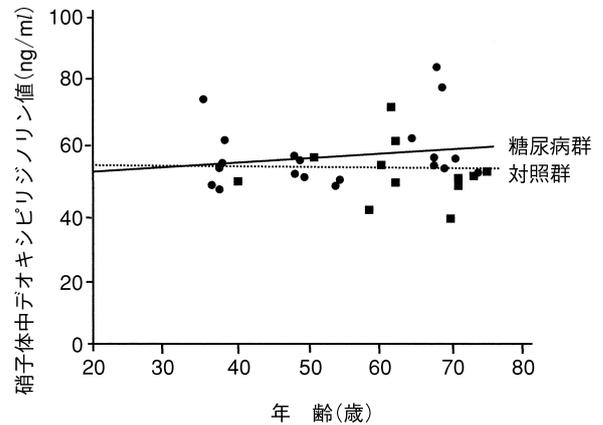


図 5 年齢と硝子体中デオキシピリジノリンの関係。

糖尿病群(●)： $y=0.043x+53.3$ ($r=0.06$ ， $p=0.80$)
 対照群(■)： $y=-0.068x+55.7$ ($r=-0.09$ ， $p=0.77$)

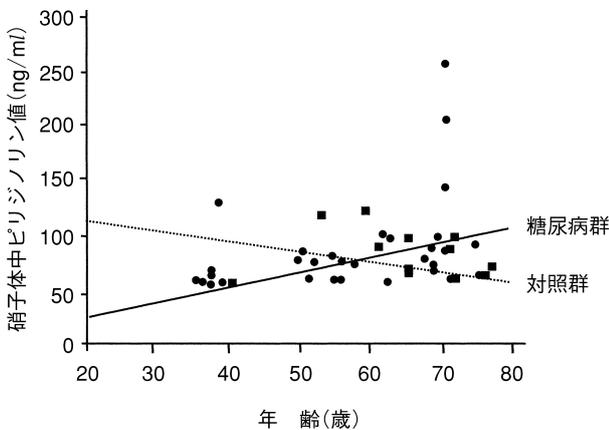


図 4 年齢と硝子体中ピリジノリン値の関係。

糖尿病群(●)： $y=0.975x+24.3$ ($r=0.28$ ， $p=0.24$)
 対照群(■)： $y=-0.582x+114.3$ ($r=-0.28$ ， $p=0.38$)

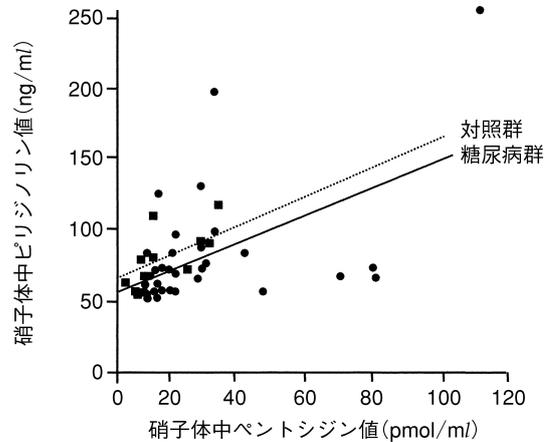


図 6 硝子体中ペンチジンとピリジノリンの関係。

糖尿病群(●)： $y=0.822x+54.7$ ($r=0.56$ ， $p<0.01$)
 対照群(■)： $y=0.869x+61.5$ ($r=0.56$ ， $p=0.06$)

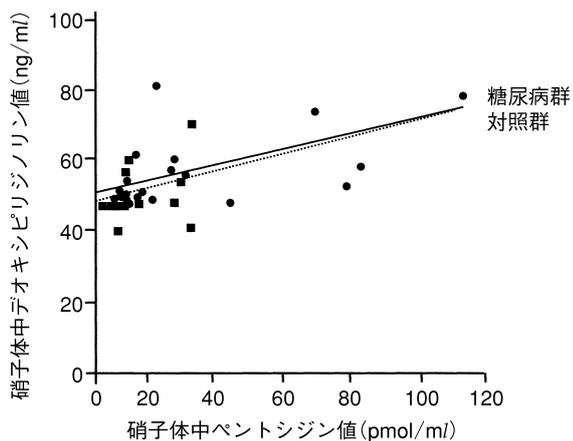


図 7 硝子体中ペントシジンとデオキシピリジノリンの関係。

糖尿病群(●)： $y=0.157x+50.4$ ($r=0.46$, $p<0.05$)

対照群(■)： $y=0.183x+48.1$ ($r=0.26$, $p=0.41$)

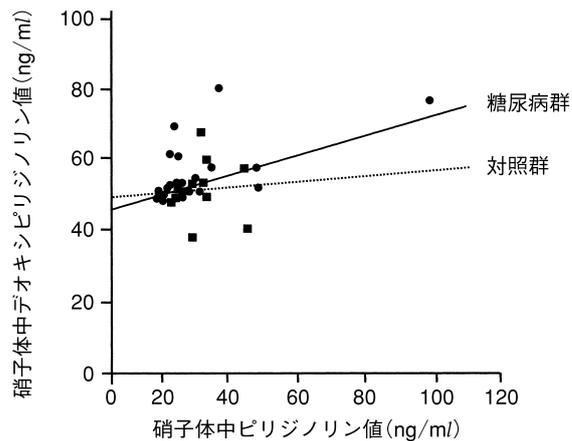


図 8 硝子体中ピリジノリンとデオキシピリジノリンの関係。

糖尿病群(●)： $y=0.118x+46.2$ ($r=0.54$, $p<0.05$)

対照群(■)： $y=0.027x+49.2$ ($r=0.08$, $p=0.82$)

糖尿病群では、ペントシジンとピリジノリン($r=0.56$, $p<0.01$)、ペントシジンとデオキシピリジノリン($r=0.46$, $p<0.05$)、ピリジノリンとデオキシピリジノリン($r=0.54$, $p<0.05$)であった(図 6~8)。対照群では、それぞれ $r=0.56$ ($p=0.06$)、 $r=0.26$ ($p=0.41$)、 $r=0.08$ ($p=0.82$) で有意な相関はなかったが、ペントシジンとピリジノリンは糖尿病群と同程度の正の相関があった(図 6)。

IV 考 按

ヒト硝子体中ペントシジン値は、増殖糖尿病網膜症および全身疾患のない特発性黄斑円孔と眼外傷の各 7 眼において、それぞれ 105.6 ± 56.1 , 40.4 ± 23.8 pmol/vitreous と糖尿病群で有意に高値であり¹³⁾、ヒト白内障水晶体においては糖尿病患者で 169 ± 101 、非糖尿病患者で 96.7 ± 73.6 pmol/lens で、白内障発症要因の一つであることも推定されている¹³⁾。本研究においても、糖尿病群が対照群に比較して有意に高値を示したことから(図 1)、糖尿病群ではコラーゲンなどの蛋白質が、硝子体中の豊富なグルコースなどの還元糖にグリケーションを受けるとともに、血管透過性亢進などで血漿蛋白質が硝子体内に流入すること²¹⁾による、硝子体内におけるグリケーションの進行が確認された。また、同一試料から成熟架橋物質であるピリジノリンおよびデオキシピリジノリンを定量し、これら 2 物質がヒト硝子体中に存在することが判明した。そして、成熟架橋物質は糖尿病群でやや高値であったが、対照群の間に有意差はなかった(図 2 A, B)。

ピリジノリン、デオキシピリジノリンはヒト組織中で成長期以降は加齢と無関係であり^{6)22)~24)}、マウス組織中においても同様のことが報告²⁵⁾されている。本研究においても加齢との相関はなかったことから(図 4, 5)、硝

子体のピリジニウム架橋形成にも加齢の影響は少ないことが推定された。そして、糖尿病の有無においても有意な相関はなかったが、ピリジノリンは糖尿病群では硝子体内に蓄積する傾向、対照群では年齢とともにやや減少傾向にあった(図 4)。対照群で減少傾向であったのは、硝子体コラーゲン量は 30 歳以降ではほとんど加齢変化が生じず¹⁾、通常リシルオキシダーゼ活性が加齢とともに低下する²⁶⁾ためかも知れない。一方、ペントシジンは加齢とともにヒト組織中⁸⁾²⁷⁾や血清中¹²⁾で増加することが報告され、今回、ペントシジンは糖尿病群、対照群ともに年齢に伴い緩やかな上昇傾向を示したが、年齢と各架橋物質の間には有意な相関がなかった(図 3)。その理由としては、対象群全体として糖尿病患者が多かったことが考えられ、今後 60 代以下の対照群の症例数を増加し、さらに検討する必要があると思われる。

細胞により新生されたコラーゲンは、細胞外基質に取り込まれた後にコラーゲン線維間に架橋が形成される。コラーゲンに最初に形成される架橋は、不安定な還元性のシッフ塩基様架橋で、成熟とともに非還元性成熟架橋であるピリジニウム架橋に変換される。ピリジニウム架橋は、細胞外コラーゲン線維にのみ存在し、成熟基質に由来し、線維を形成できない新しい単独のトロポコラーゲン、成熟前のコラーゲンには存在せず、成熟したコラーゲンに形成される⁷⁾。また、秩序の基に形成される正常な架橋であり、ピリジノリンとデオキシピリジノリンは 3 つのアミノ基を有し、それを介して隣接のコラーゲンの分子内および分子間の安定性に寄与している。すなわち、ピリジニウム架橋形成には、リシルオキシダーゼの基質であるコラーゲン分子内、分子間のリジン、ヒドロキシリジン残基が重要で、成熟したコラーゲンのリジン残基の ϵ -アミノ基がリシルオキシダーゼによりアルデヒド基に置換されることが架橋形成の開始である。し

かし、リジン残基の ϵ -アミノ基は、硝子体コラーゲンなどの蛋白質がグリケーションを受ける標的部位でもあるため、コラーゲン成熟過程においてリシルオキシダーゼが反応する前にリジン残基がグリケーションを受けると、アマドリ化合物へ移行する確率が高くなり、正常な架橋形成が阻害される可能性²²⁾が考えられる。そして、これが糖尿病患者における創傷治癒遅延や神経微小管形成阻害の原因であることも推定²⁸⁾されている。その一方で、糖尿病患者の皮膚においては、AGEs 性架橋とともにピリジノリンもまた増加していることが指摘²⁹⁾されている。よって、糖尿病患者の硝子体中各架橋物質間の関係は、以下の2つの仮説が考えられた。① 正常なコラーゲン合成のためのリジン残基の ϵ -アミノ基がピリジニウム架橋形成前の段階で還元糖のグリケーションを受けることで、AGEs 性架橋が増加し、ピリジニウム架橋の生成が減少している。② ピリジニウム架橋形成後に、その架橋形成に関与していないリジン残基がグリケーションの影響を受け後期反応が進行し、ペントシジンなど AGEs 性架橋の生成が増加し、ピリジニウム架橋は不変あるいは増加傾向となる。

今回、対象群全体での硝子体中ピリジニウム架橋と AGEs 性架橋の間に、各々有意($p < 0.01$)な正の相関があったことから、AGEs 性架橋とピリジニウム架橋が相互に密接に関与し、その変動が連動している可能性²⁹⁾が判明した。そして、硝子体における AGEs 性架橋形成増加は、仮説①のピリジニウム架橋形成途中段階でのグリケーションによるものではなく、仮説②のピリジニウム架橋形成後に生じている確率が高いことが考えられた。そして、グリケーションの部位は、ピリジニウム架橋を形成していない部分のリジン残基に新たに形成されることが考えられた。

糖尿病群では、ペントシジンとピリジノリン($r = 0.56$, $p < 0.01$)、ペントシジンとデオキシピリジノリン($r = 0.46$, $p < 0.05$)、ピリジノリンとデオキシピリジノリン($r = 0.54$, $p < 0.05$)と各間質間に有意な相関関係があった(図6~8)。一方、対照群においても有意差がなかったが、ペントシジンとピリジノリンは $r = 0.55$ と相関係数が糖尿病群とほぼ同値で正の相関を示し、糖尿病群では両架橋物質がより高値まで広がっているのに対し、対照群はより原点に近い位置にあるが、その回帰式は非常に類似していた(図6)。そして、デオキシピリジノリンにおいても同様の傾向が得られたことから(図7)、糖尿病の有無にかかわらず、ペントシジンとピリジニウム架橋の形成の過程は類似していることが推定された。さらに、糖尿病群の硝子体中ピリジニウム架橋がやや高値を示し、ペントシジンだけでなくピリジノリンも対照群よりもやや高値に分布したのは、糖尿病群ではサイトカインなどの関与によりリシルオキシダーゼ活性が上昇することが推定されていることや³⁰⁾、糖尿病群では

対照群と比較して、前述したピリジニウム架橋形成後に AGEs 性架橋が増加する頻度が多いため、本来正常なピリジニウム架橋までもが代謝されにくくなったために、その半減期が長くなったことが理由として考えられた。

本研究から、糖尿病患者の硝子体では、ピリジニウム架橋形成後にグリケーションを受け、AGEs 性架橋が増加する頻度がより高かったことから、無秩序な AGEs 性架橋の多いコラーゲン線維が出現することで、蛋白質の不溶化亢進やプロテアーゼに対する抵抗が増加し¹⁸⁾³¹⁾、硝子体内でのピリジノリンの代謝回転が遅延し、その半減期がさらに延びる確率が高くなり、硝子体内に蓄積したことが類推された。そして、硝子体中コラーゲンなどの蓄積は、グリケーションの影響をより受ける機会が高まるために、その後期反応が進行し、AGEs 性架橋がさらに増加するという悪循環が惹き起こされていることも考えられた。

貴重なご意見をいただきご協力下さいました、つくば橋本眼科橋本浩隆先生、ペントシジン測定方法のご指導をいただきました浜松医科大学整形外科学教室星野裕信先生に深謝申し上げます。

本論文の要旨は第104回日本眼科学会総会(京都)で発表した。

文 献

- 1) **Sebag J** : The Vitreous. Springer-Verlag, New York, 17-58, 1989.
- 2) **Fujimoto D, Akiba K, Nakamura N** : Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 76 : 1124-1129, 1977.
- 3) **Ogawa T, Ono T, Tsuda M, Kawanishi Y** : A novel fluor in insoluble collagen : A crosslinking moiety in collagen molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 107 : 1252-1257, 1982.
- 4) **Eyre DR, Wu JJ, Woods PE** : The cartilage collagens : Structure and metabolic studies. *J Rheumatol* 18 : 49-51, 1991.
- 5) **Takahashi M, Ohishi T, Aoshima H, Kushida K, Inoue T, Horiuchi K** : Pre-fractionation with cation exchanger for determination of intermolecular crosslinks, pyridinoline, and pentosidine, in hydrolysate. *J Liquid Chromatogr* 16 : 1355-1370, 1993.
- 6) **Hoshino H, Takahashi M, Kushida K, Ohishi T, Kawana K, Inoue T** : Quantitation of the crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline and pentosidine, in human aorta with dystrophic calcification. *Atherosclerosis* 112 : 39-46, 1995.
- 7) **高橋正哲** : 尿中ピリジノリン, デオキシピリジノリン. 福永仁夫, 他(編) : 骨代謝マーカー, メディカルビュー社, 東京, 94-102, 1995.

- 8) **Takahashi M, Hoshino H, Kushida K, Inoue T** : Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 232 : 158–162, 1995.
- 9) **Beardworth LJ, Eyre DR, Dickson IR** : Changes with age in the urinary excretion of lysyl and hydroxyllysylphridinorine, two new markers of bone collagen turnover. *J Bone Mineral Res* 5 : 671–676, 1990.
- 10) **Monnier VM, Kohn RR, Cerami A** : Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci* 81 : 583–587, 1984.
- 11) **Brownlee M** : Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43 : 836–841, 1994.
- 12) **Takahashi M, Kushida K, Kawana K, Ishihara C, Denda M, Inoue T, et al** : Quantification of cross-link pentosidine in serum from normal and uremic subjects. *Clin Chem* 39 : 2162–2165, 1989.
- 13) **橋本浩隆** : 網膜症の病期別糖コントロール目標—眼科の立場より—. *眼紀* 49 : 981–988, 1998.
- 14) **Stitt AW, Moore JE, Sharkey JA, Murphy G, Simpson DA, Bucala R, et al** : Advanced glycation end products in vitreous : Structural and functional implications for diabetic vitreopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 2517–2523, 1998.
- 15) **Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, et al** : Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 325 : 836–842, 1991.
- 16) **Sell DR, Mennier VM** : Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J Biol Chem* 264 : 21597–21602, 1989.
- 17) **橋本浩隆, 新井清美, 佐藤洋子, 小原喜隆** : ペントシジンと糖尿病網膜症 : *眼紀* 47 : 1231–1235, 1996.
- 18) **佐野裕之, 堀内正公** : 蛋白質のグリケーション. 井村裕夫他編, *糖尿病*, 第7巻. 中山書店, 東京, 204–210, 1995.
- 19) **Uebelhart D, Gineyt SE, Chapuy MC, Delmas PD** : Urinary excretion of pyridinium crosslinks : A new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Mineral* 8 : 87–96, 1990.
- 20) **大石 強, 串田一博** : ピリジノリン, デオキシピリジノリン. *ホルモンと臨床* 44 : 1151–1155, 1996.
- 21) **Shires TK, Faeth JA, Pulido JS** : Nonenzymatic glycosylation of vitreous proteins *in vitro* and in the streptozotocin-treated diabetes rat. *Retina* 10 : 153–158, 1990.
- 22) **Shuyu Shen WL, Robertson GA, Khatami M, Rockey JH** : Increased solubility of newly synthesized collagen in retinal capillary pericyte cultures by nonenzymatic glycosylation. *Ophthalmic Res* 16 : 315–321, 1984.
- 23) **Takahashi M, Kushida K, Ohishi T, Kawana K, Hoshino H, Uchiyama A, et al** : Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders. *Arthritis Rheum* 37 : 724–728, 1994.
- 24) **Chen JR, Takahashi M, Kushida K, Suzuki M, Suzuki K, Horiuchi K, et al** : 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.
- 25) **Reiser KM** : Influence of age and long-term dietary restriction on enzymatically mediated crosslinks and nonenzymatic glycation of collagen in mice. *J Gerontol* 49 : B 71–B 79, 1994.
- 26) **Fornieri C, Quaglino D, Mori G** : Role of the extracellular matrix in age-related modification of the rat aorta. *Arteriosclerosis Thrombosis* 12 : 1008–1016, 1992.
- 27) **Monnier VM** : Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process. *J Gerontol Biol Sci* 45 : B 105–B 111, 1990.
- 28) **加藤博通** : 生体内メイラード反応と疾患. *ファルマシア* 28 : 466–470, 1992.
- 29) **Buckingham B, Reiser KM** : Relationship between the content of lysyl oxidase-dependent cross-links in skin collagen, Nonenzymatic glycosylation, and long-term complications in type I diabetes mellitus. *J Clin Invest* 86 : 1046–1054, 1990.
- 30) **Stokkan KA, Reiter RJV, Nanaka KO, Lerchi A** : Endocrine and metabolic effects of life-long food restriction in rats. *Acta Endocrinol* 125 : 93–100, 1991.
- 31) **Cloos C, Wahl P, Hasslacher C, Traber L, Kistner M, Jurkuhn K, et al** : Urinary glycosylated, free and total pyridinoline and free and total deoxypyridinoline in diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 48 : 317–323, 1998.