

小児アレルギー疾患と糖化反応後期生成物の形成の関連性

戸塚隆太¹⁾ 吉原一博²⁾ 別府正敏²⁾¹⁾東京医科大学小児科学講座²⁾東京薬科大学公衆衛生学教室

(指導: 星加明德主任教授)

【要旨】 糖化反応後期生成物 (Advanced Glycation End Products (AGE)) は糖尿病だけでなく、酸化ストレスが関与する疾患での形成が指摘されている。中でも Pentosidine はその形成に酸化条件が必須な分子種である。我々は小児アレルギー疾患と生体内糖化反応との関連性について検討すべく、血漿中と赤血球膜中 Pentosidine 濃度の測定を試みた。結果、アトピー性皮膚炎や非アトピー型気管支喘息の Pentosidine 形成は、健常者との比較で有意差は認められなかった。一方、アトピー型気管支喘息患者では血清および赤血球膜 Pentosidine 濃度が有意に高値を示し、重症度に比例した。同時に測定した酸化ストレスの指標である血清 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 濃度は Pentosidine 濃度と有意な相関性を示した。このことよりアトピー型気管支喘息患者では疾患に基づく酸化ストレスが Pentosidine 形成を亢進させているものと推定した。

はじめに

糖化反応後期生成物 (Advanced Glycation End Products; 以下 AGE) は、糖尿病分野における合併症進展の一要因として近年注目されているタンパク質の修飾により形成される物質である。AGE の形成は二段階に分けられ、生体内のタンパク質のアミノ酸残基が還元糖と非酵素的に反応し、シッフ塩基を経てアマドリ化合物などを形成するまでの反応を前期反応と称する。この前期反応は 1912 年に食品化学者であるメイラード (Maillard) が、グルコースとアミノ酸を加熱すると黄褐色物質が生成するという報告¹⁾ を起点としているため Maillard 反応と呼ばれている。このような糖化反応は、1970 年代に発見されたヘモグロビン A1c (HbA1c) により、生体内でも実際に起こっていることが明らかにされ、その測定は糖尿病の治療指標として重要な役割を果たしている²⁻⁴⁾。前期反応生成物がさらに酸化・脱水・縮合などの複雑な後期反応段階を経た結果、AGE が形成される。現在、生体内に

存在する AGE 分子種として Pentosidine⁵⁻⁷⁾、Pyrroline^{8,9)} など 17 種がこれまでに構造決定されている。

AGE と疾患に関する研究は、還元糖が関与することから高血糖に係わる疾患に端を発しているが、次第に高血糖以外の疾患でも AGE 形成の亢進が報告され始めている。例えばリウマチ性疾患のような炎症性疾患で AGE 形成の亢進が認められ、活性酸素や酸化ストレスの関与が次第に取り上げられるようになってきた¹⁰⁾。これらの研究をもとに AGE 分子種の中にはその形成過程に酸化条件を要求するものがあることが次第に指摘されてきた。Pentosidine はその典型例であり、現在では酸化糖化反応生成物 (glycoxidation products) に位置づけられている¹¹⁾。Pentosidine の形成過程を Fig. 1 に示す。

アレルゲンの感作によって惹起されるアレルギー疾患は、急性もしくは慢性の炎症疾患である。抗原の刺激により開始するアレルギーの発症には、主として T 細胞や B 細胞、肥満細胞が関与し、種々のケミカル

2002 年 11 月 19 日受付、2002 年 12 月 24 日受理

キーワード: 小児アレルギー疾患、気管支喘息、糖化反応後期生成物、ペントシジン、酸化ストレス
(別刷請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学小児科学講座 戸塚隆太)

Maillard Reaction Pathway for Formation of Pentosidine

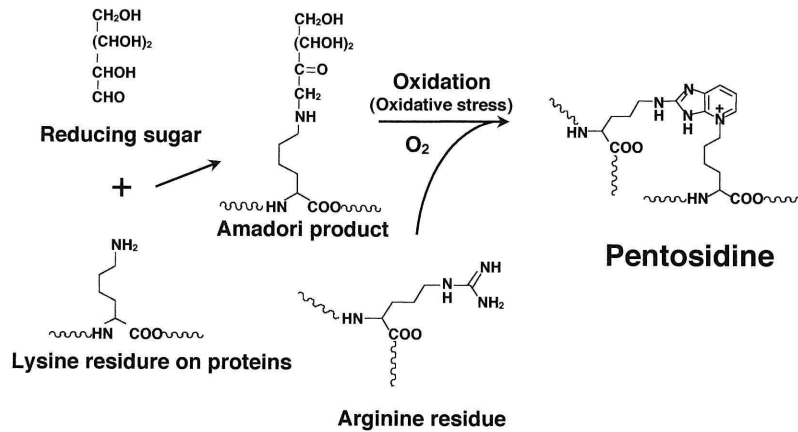


Fig. 1 Maillard reaction pathway for formation of pentosidine

メディエーターの放出により炎症が開始される。一方、ケミカルメディエーターはマクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球などを刺激し、炎症部位へ遊走させ炎症反応を増長させている。これらの細胞種は、気道や皮膚などの炎症部位で活性酸素種であるフリーラジカル類を生成・放出し、酸化ストレスが病態の悪化に関与していることが近年明らかとなった¹²⁻¹³⁾。従って、アレルギー疾患においても AGE 形成がされる可能性が充分考えられる。しかしながら、アレルギー性疾患と AGE 形成との関連性について調査した例、特に小児において AGE 測定例は無い。本研究ではアレルギー疾患患児の血漿 Pentosidine を測定し、健常小児の測定値と比較した。また恒常性の高い生体成分として赤血球の膜タンパク質に着目しその Pentosidine 量の測定も試みた。一方、酸化ストレスを評価する指標として 1986 年に Floyd らが提案した 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の測定がある¹⁴⁾。高コレステロール血症の患者では酸化ストレスが発生し、その結果タンパク質の AGE 化や Pentosidine の形成が亢進しており、その形成量は尿中 8-OHdG 測定値と正の相関関係があることが認められている¹⁵⁻¹⁷⁾。そこで本研究では酸化ストレスの指標として、アレルギー疾患患児の血漿 8-OHdG を測定し Pentosidine 形成の関連について考察を加えた。

研究材料および方法

1. 対象

平成 8 年から平成 13 年に世田谷下田総合病院および東京医科大学病院を受診した、0 歳から 10 歳のアレルギー疾患の患者のうちアトピー型気管支喘息患者

47 名 (4.7±3.6 歳)、アトピー性皮膚炎患者 22 名 (2.3±2.1 歳)、非アトピー型気管支喘息 (喘息様気管支炎) 患者 7 名 (2.0±1.6 歳) から、保護者に充分説明し了承を得た後に採血した。比較対照群としてアレルギー症状のない健常小児 6 名 (9.2±4.8 歳) から同様に採血した。喘息症状を認める患児は、IgE の上昇や CAP-RAST の陽性を認める者をアトピー型気管支喘息、認めない者を非アトピー型気管支喘息 (喘息様気管支炎) とした。また、赤血球膜タンパク質試料として、八王子医療センターを受診した 0 歳から 15 歳の気管支喘息 (アトピー型) 患者 22 名 (5.6±4.2 歳) から、保護者に充分説明し了承を得た後に採血した。比較対照群としてアレルギー症状のない小児 6 名 (5.8±3.8 歳) から同様に採血した。上記のいずれの患者も高血糖や腎機能障害を呈していなかった。コントロール、及び対象患者群間の年齢構成に有意差は無かった。

2. 実験材料

精密分析用 Hydrochloric Acid (HCl), Heptafluorobutyric Acid (HFBA), 精密分析用 25% アンモニア水、D (+)-Glucose、D (-)-Ribose、L (+)-Lysine、L (+)-Arginine (すべて和光純薬 株)。Bio-GelP-2 (Bio-Rad Laboratories)。OASIS™ MCX Extraction Cartridge (Waters Corporation)。Ultrafree-MC10000NMWL Filter Unit (Millipore Corporation)。高感度 8-OHdG Check (日本老化制御研究所)。

3. 実験方法

3-1. Pentosidine の調製

Pentosidine の合成は、Yoshihara ら¹⁸⁾ の方法を一部改変して用いた。すなわち、それぞれ 5 mmol の

Ribose, Lysine, Arginine を混合後、水で飽和溶液とし、80°C, 72 h 加温した。冷却後、10% 酢酸を溶出液とするゲルろ過クロマトグラフィー (Bio-Gel P-2, 50 mm (i. d.)×100 cm, 30 drop/min, 800 drop/tube) を行った。得られた各分画について蛍光 (Ex: 335 nm, Em: 385 nm) を測定し、Pentosidine を含む分画を収集し濃縮後、HPLC にて分取、精製した。分取 HPLC の条件を下記に示す。単離精製した Pentosidine は Mass スペクトルにて分子量を、NMR で構造を確認した。

【HPLC による Pentosidine の分取条件】

Pump	HITACHI L-6200 Intelligent Pump
Detector	ADVANTEC UV-7500 (335 nm)
Integrator	HITACHI D-2500
Column oven	Shimazu CTO-2A (40°C)
Column	SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG80 10 mm (i.d.)×250 mm
Flow rate	4.5 ml/min
Mobile Phase	20% Acetonitrile with 2 ml/l HFBA

3-2. 血漿及び赤血球膜タンパク質の調製

血液をクエン酸加採血し、直ちに 1,400 rpm, 10 min 遠心分離し、上清部の血漿を採取した。Buffy coat を取り除き、沈降した赤血球を Ca²⁺, Mg²⁺ 不含の Dulbecco Phosphate buffered saline (DPBS (-)) で洗浄し、十分量 (赤血球容量の約 40 倍) の 5 mM Phosphate Buffer (pH 8.0) で溶血させ、12,000 rpm, 20 min 遠心分離を数回行い、ヘモグロビンなどの膜タンパク質以外の成分を十分洗浄除去し、赤血球膜タンパク質溶液 (Ghost) とした。得られた Ghost のタンパク質濃度は Lowry 法¹⁹⁾ で測定した。

3-3. 試料中の Pentosidine の定量

血漿 1 ml に濃塩酸 1 ml を加え、110°C で 18 h 加水分解した。Ghost はその 1 ml を凍結乾燥し、6N HCl 400 μl を加え、同じく 110°C で 18 h 加水分解した。加水分解物をロータリーエバポレーターで減圧乾固させた後、水 1 ml に再溶解させ、固相抽出カートリッジ OASIS™ MCX に注入した。0.1 N HCl 1 ml でカートリッジを洗浄し夾雑物を除いた後、7% アンモニア水溶液 3 ml で Pentosidine を溶出させ、再びロータリーエバポレーターで減圧乾固し、20% Acetonitrile に HFBA を 0.2 ml/l 含有する溶液 1 ml に再溶解し HPLC の試料とした。

【Pentosidine 定量における HPLC の条件】

Pump	HITACHI L-6200 Intelligent Pump
Detector	HITACHI F-1050 (Ex: 335 nm, Em: 385 nm)
Integrator	HITACHID-2500
Column oven	HITACHI L-5200 (40°C)
Column	Wakosil-II 5C18AR, 4.6 mm (i.d.)×250 mm
Flow rate	1.0 ml/min
Mobile Phase	20% Acetonitrile with 2 ml/l HFBA

3-4. 試料中の 8-OHdG の測定

血漿試料は分画分子量 10,000 の限外濾過膜である Ultrafree-MC10000NMWL Filter Unit で限外濾過後、その濾液を試料として測定キット (8-OHdG Check (高感度)) を用いて測定した。

3-5. 統計学的解析

血漿中の Pentosidine は濃度 (nM) で、赤血球膜タンパク質中の Pentosidine は単位タンパク量当たりの含有量で表した。各測定値間の関連性は Pearson の相関係数により求め、t 表の危険率 5% 未満を有意と判定した。

結 果

1. 血漿 Pentosidine 濃度と小児アレルギー疾患

小児において、酸化ストレスにより AGE 形成が亢進するかどうかを明らかにするため、小児アレルギー疾患患者を対象に血漿 Pentosidine を測定した。その結果を Fig. 2. A に示す。小児アレルギー患者を気管支喘息 (Bronchial Asthma, BA) 患者、アトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis, AD) 患者、非アトピー型気管支喘息 (Non-atopic Bronchial Asthma) 患者に分類し、また、気管支喘息患者はその重症度によってさらに分類し比較した。分類は日本アレルギー学会の気管支喘息重症度分類に従った。全ての小児アレルギー疾患患者の血漿 Pentosidine 量は健常者と比較して高い値を示した。その中でも気管支喘息患者の血漿 Pentosidine 量は特に高い値を示し、喘息重症度別に分類すると重症度が高くなるに従って血漿 Pentosidine 量は高い値を示した。特に Stage 3 では健常者と比較し、有意に高い値を示した。

2. 赤血球膜タンパク Pentosidine 濃度と気管支喘息

血漿 Pentosidine 量が気管支喘息患者で上昇してい

ることから、この疾患に限定し、新たに22名から採血し、赤血球膜タンパク質のPentosidine量を測定した。その結果をFig. 2. Bに示す。気管支喘息患者の赤血球膜タンパク質Pentosidine量は、血漿の場合と同様に重症度が高くなるに従い高い値を示した。

3. 血漿 8-OHdG と気管支喘息

生体内酸化ストレスの程度を血漿 8-OHdG の測定により評価し、酸化ストレスと喘息患者の重症度、血漿 Pentosidine 量との関連性について検討した。健常者では血漿 8-OHdG は検出されなかったが、気管支喘息患者では血漿 8-OHdG が検出され、重症度に対応し

て血漿 8-OHdG 値も高い値を示した (Fig. 3. A)。また、血漿 8-OHdG と血漿 Pentosidine 量の関連性を検討したところ、正の有意な相関関係 ($r=0.40$, $n=21$, $p<0.05$) が認められた (Fig. 3. B)。

4. 気管支喘息における好酸球数と血漿ペントジシン濃度

気管支喘息患者の血清 IgE、好酸球数と血漿ペントジシン濃度との関連について検討した。図には示さないが、血清 IgE と血漿ペントジシン濃度との間には有意な相関は認められなかった。また、好酸球数と血漿ペントジシン濃度の関連性について喘息患者を重症

Pentosidine Levels of Allergic Diseases in Children

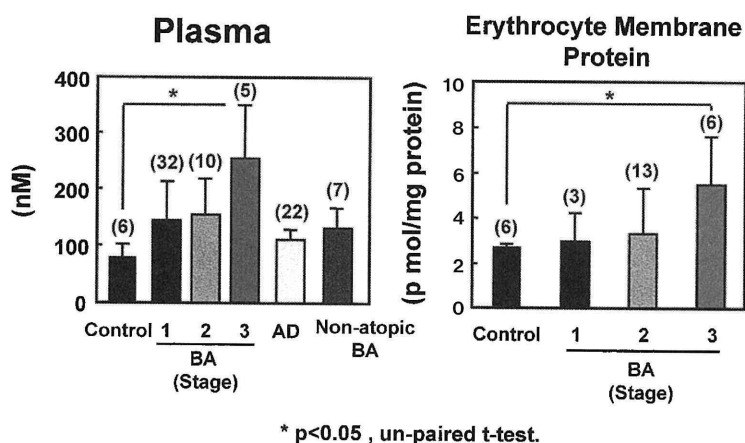


Fig. 2A

Fig. 2B

Fig. 2 Left side, Figure 2A : Plasma pentosidine levels of allergic disease in children
Right side, Figure 2 B: Erythrocyte membrane protein pentosidine levels in allergic disease in children

Plasma Level of 8-OHdG in Bronchial Asthma

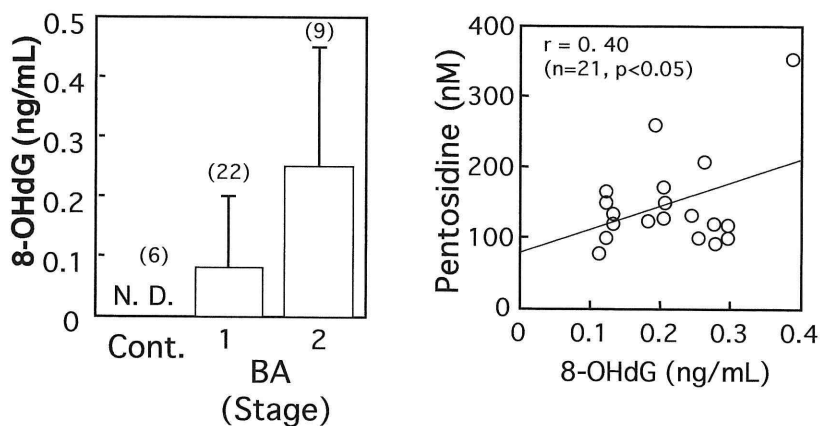


Fig. 3A

Fig. 3B

Fig. 3 Left side, Figure 3 A : Plasma level of 8-OHdG in bronchial asthma
Right side, Figure 3 B: Correlation between plasma level of 8-OHdG and plasma pentosidine level

Correlation Between Eos and Plasma Pentosidine Level

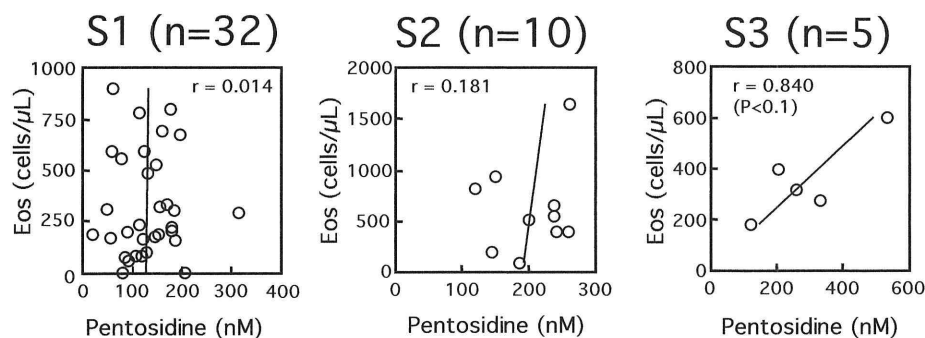


Fig. 4A

Fig. 4B

Fig. 4C

Fig. 4 Left side, Figure 4 A : Correlation between eosinophils and plasma pentosidine levels in bronchial asthma (Stage 1)
Middle, Figure 4 B : Bronchial asthma (Stage 2)
Right side, Figure 4 C : Bronchial asthma (Stage 3)

度別に分けて検討した。その結果、Fig. 4. A, B, C に示すように stage 1 及び 2 については相関性を認めなかったが、Stage 3 の重症患者に危険率 $p < 0.1$ ではあるが、有意な相関性を認めた。

考 察

1. 血漿 Pentosidine 濃度と小児アレルギー疾患

小児においては Pentosidine などの AGE の測定はほとんど行われていない。加齢の影響を受けにくいと思われる小児を対象としたところ、高血糖を呈していないアレルギー疾患において Pentosidine 形成が亢進していることが明らかとなった。炎症性疾患、例えば慢性関節リウマチなどでは AGE 形成は亢進する²⁰⁾が、小児アレルギー疾患において AGE 形成に関する報告はこれまでに例をみない。

アレルギー疾患別に見ると、気管支喘息患児に Pentosidine 形成の亢進している傾向が見られた。また、喘息の重症度に応じて血漿 Pentosidine 濃度が上昇していることから、疾患の重症化あるいは慢性化により Pentosidine 形成が増加したと考えられた。近年、気管支喘息が気道の炎症性疾患としてとらえられるようになり、気管支粘膜におけるマクロファージ、好中球、好酸球などの炎症細胞から産生される活性酸素種は、組織の障害、気道過敏性の増大、気道炎症の慢性化を引き起こし、難治化の要因の一つと考えられている²¹⁻²⁵⁾。測定結果は、アレルギー疾患、とくに気管支喘息の病態に活性酸素や酸化ストレスが大きく関与することを別の面から支持するものと思われる。こ

れらは Oxidative stress maker である 8-OHdG の測定結果が、血漿 Pentosidine 濃度に対応していることから推測される。

同じアレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎については、酸化的ストレスとの関連の報告はあるが²⁶⁾、Pentosidine 形成については正常コントロールとの有意差を見なかった。

大半の対象患児には、喘息治療薬としてテオフィリンと抗アレルギー剤が用いられていた。最近テオフィリン製剤には抗酸化剤としての効果があることが明らかになっており^{27,28)}、また、抗アレルギー剤の中でも活性酸素の生成を抑制するものがあることが報告されている²⁹⁾。従って、使用薬剤が対象とした小児喘息患者の Pentosidine 形成を多少は抑制していたのかも知れない。

2. 気管支喘息における好酸球数と血漿 Pentosidine 濃度

気管支喘息患者の好酸球は他のアトピー性疾患の患者の好酸球に比べ、より多くの活性酸素種を産生すると報告されている³⁰⁾。他のアトピー性疾患に比較し喘息において Pentosidine 形成が亢進した可能性の一つと考えられる。

気管支喘息患児の好酸球数と血清中 Pentosidine 濃度との検討では Stage 3 の重症喘息患児のみに有意な相関性 ($p < 0.1$) を認めた。Stage 3 のように慢性化している症例では、末梢血中の好酸球数はほとんどの例で上昇がみられたが、Stage 1, 2 では好酸球数にばらつきが見られた。このことから、Pentosidine 形成には病

態の慢性化が関与していることが示唆された。また、好酸球が有する組織障害性を考慮すると、喘息が慢性化している病態で炎症が増強され Pentosidine 形成が亢進した可能性が考えられた。好酸球は喘息において重要な炎症細胞であり、気道系アレルギー炎症反応の中心的役割を演じていると考えられているが、必ずしも末梢血中好酸球数の変動が喘息の病態動勢を示すものとは限らない。しかし、hypodense eosinophil³¹⁾ という考えを発端として、好酸球の活性化 (eosinophil hyperactivation) が喘息の病勢の指標となりうる可能性が生じている^{32,33)}。Pentosidine 形成と、eosinophil cationic protein (ECP), major basic protein (MBP), eosinophil peroxidase (EPO) など³⁴⁾との関連性についても検討が必要であろう。

喘息を含めた肺疾患、とくに慢性肺気腫では好中球の産生する活性酸素が病態の悪化に関与することが知られている^{35,36)}。さらに、気管支喘息患者の好酸球は好中球に比べて高い活性酸素産生能を持ち³⁷⁾、産生された過酸化水素 (H₂O₂) は eosinophil peroxidase (EPO) の基質となり気道上皮細胞を障害することが知られている³⁸⁾。このことから気管支喘息患児の好酸球から放出される活性酸素が glycoxidation product である Pentosidine 形成に関与したのではないかと推定される。

3. 赤血球膜タンパク Pentosidine 濃度と気管支喘息

赤血球は約 120 日の寿命を有し、その後マクロファージ等の貪食細胞に捕捉され、やがて脾臓で分解される。従って赤血球は極めて恒常性が高く、かつ老化等の影響を受けにくい生体成分であると考えられる。今回の測定結果において赤血球膜タンパク質 Pentosidine 量は、血漿の場合と同様にやはり重症度に従い高い値を示したことから、赤血球膜タンパク質 Pentosidine が、気管支喘息のような慢性炎症性疾患の病態を表わす新たな指標としての可能性が示唆された。

今回の測定では同年齢群の健常者から同時に試料を得て比較検討を行っている。血漿もしくは赤血球膜タンパク質 Pentosidine の小児における健常者レベルは未だ確立されていない。臨床において健常者から採血する機会は乏しく試料の数は少ないが、本研究によりそのレベルが明らかになった。これらの結果を Yoshihara ら¹⁸⁾の成人健常者の測定レベルと比較すると、小児の血漿 Pentosidine は有意差はないものや

や低値を示し、赤血球膜タンパク質 Pentosidine はほぼ同レベルであった。従って健常者の場合、高血糖や酸化ストレスにあまり曝されていないならば、赤血球膜タンパク質に形成される Pentosidine 量は加齢の影響を受けず、ほぼ一定レベルを示す可能性が推測される。

赤血球膜タンパク質 Pentosidine のような AGE 化タンパク質は、マクロファージのスカベンジャーレセプターの種類である Receptor for AGE (RAGE) が認識捕食し、防御機能の中心的な役割を担っている^{39,40)}。これにより高血糖による動脈硬化の発症に AGE 化タンパク質と RAGE が関与している可能性が報告されている^{39,40)}。そして現在、AGE 形成阻害剤が動脈硬化などの糖尿病合併症進行に対し遅延効果があることが臨床的にも証明されている⁴¹⁾。

一方、酸化ストレスに曝されると AGE は 1 時間～数日でも生成されることが *in vitro* ではあるが確認されており⁴²⁾、AGE の生成-除去という一連の流れは生体において生理的に起こっていると考えられる。しかし AGE 化赤血球膜タンパク質のように、生体タンパク質が AGE 化された場合、非酵素的結合は赤血球寿命を通じて起きており、慢性的な酸化ストレス状態を反映する指標としての可能性が示唆された。

4. 総括

アレルギー疾患の病態にとって AGE はどのように関与するのだろうか。マクロファージは AGE 化タンパク質を認識・捕食する作用があること、AGE 受容体 (RAGE) がこの中心的な役割を担っている^{39,40)}ことは前述した通りである。この時、同時にマクロファージは RAGE を介して TNF- α 、GM-CSF などを発現し^{43,44)}、これらのサイトカインは組織障害性に働くことが知られている。したがってマクロファージや RAGE による AGE 化タンパク質の除去という生体防御機能は、同時に組織障害性サイトカイン産生による組織の炎症を起こすことで、アレルギー病態にとって悪化傾向に働く一因子になりうる可能性が示唆される。つまりここでマクロファージは、生体防御と組織障害性という相対性をもって働いていると考えられる。

アレルギー疾患において、病態で生じた酸化ストレスによって AGE 形成が形成される。そして、その AGE 形成過程においても酸化ストレスを生じ⁴⁵⁾、それによる組織の炎症とさらなる AGE 形成促進とが相

俟って、マクロファージによる AGE 除去というスカベンジャー機構は、さらに病態を悪化させる可能性が考えられる。

結 論

本研究においてアレルギー疾患、特に小児気管支喘息で Pentosidine 形成の増加が明らかになり、酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。また、AGE の一つである Pentosidine の測定によりこれらの病態に関する新たな情報を得られる可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東京医科大学小児科学講座 星加明德教授、聖マリアンナ医科大学呼吸器感染症内科学教室 中川武正教授、故丸山寛迪助教授、高橋悟助教授、長山義明博士、ならびに試料提供にて御協力頂いた世田谷下田総合病院 細部裕子博士、各教室員各位に心より深謝致します。また測定に御協力頂いた東京薬科大学公衆衛生学教室員各位に心より深謝致します。

なお本研究の要旨は第 51 回日本アレルギー学会総会 (2001、福岡) において発表した。

文 献

- 1) Maillard LC: Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique. *CR Acad Sci* **154**: 66, 1912
- 2) Rajbar, S: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* **22**: 296-298, 1968
- 3) Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A: Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* **295**: 417-420, 1976
- 4) Jovanovic L, Peterson CM: The clinical utility of glycosylated hemoglobin. *Am J Med* **70**: 331-338, 1981
- 5) Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW: Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine *in vivo*. *J Biol Chem* **266**: 11654-11660, 1991
- 6) Monnier VM, Sell DR, Miyata S, Nagaraj RH, Odetti P, Grandhee S, Ibrahim S A: Maillard reaction-mediated molecular matrix and other tissue proteins in diabetes, again, and uremia. *Diabetes* **41**: 36-41, 1992
- 7) Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM: Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* **41**: 153-159, 1992
- 8) Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, Njoroge FG, Monnier VM: Aging of proteins; immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction *in vivo*. *J Biol Chem* **264**: 3758-3764, 1989
- 9) Miyata S, Monnier V: Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrroline. *J Clin Invest* **89**: 1102-1112, 1992
- 10) Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T: Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **36**: 637-642, 1997
- 11) Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**: 405-412, 1991
- 12) Picardo M, Zompetta C, Marchese C, De Luca C, Faggioni A, Schmidt RJ, Santucci B: Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress and ICAM-1 expression in human keratinocytes. *Br J Dermatol* **126**: 450-455, 1992
- 13) Dworski R, Roberts LJ, 2nd Murray JJ, Morrow JD, Hartert TV, Sheller JR: Assessment of oxidant stress in allergic asthma by measurement of the major urinary metabolite of F2-isoprostane, 15-F2t-IsoP (8-iso-PGF2alpha). *Clin Exp Allergy* **31**: 387-390, 2001
- 14) Floyd RA, Watson JJ, Wong PK: Hydroxyl free radical adduct of formation. *Free Radic Res Commun* **1**: 163-172, 1986
- 15) Kouda K, Nakamura H, Fan W, Horiuchi K, Takeuchi H: The relationship of oxidative DNA damage marker 8-hydroxy-guanosine and glycoxidative damage maker pentosidine. *Clin Biochem* **34**: 247-250, 2001
- 16) Mizutani K, Ikeda K, Nishikata T, Yamori Y: Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **18**: 1833-1840, 2000
- 17) Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y: Biomechanical properties and chemical composition of the aorta in genetic hypertensive rats. *J Hypertens* **17**: 481-487, 1999
- 18) Yoshihara K, Kiyonami R, Shimizu Y, Beppu M: Determination of urinary pyrroline by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Biol Pharm Bull* **24**: 863-866, 2001
- 19) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951
- 20) Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T: Relationship between pentosidine levels

- in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **36**: 637-642, 1997
- 21) Clunzel M, Damon M, Bousquet J: Enhanced alveolar cell luminol dependent chemiluminescence in asthma. *J Allergy* **80**: 195-201, 1987
 - 22) Owens S, Pearson D, O'Driscoll R, Woodcock A: Evidence of free-radical activity in asthma. *N Engl J Med* **325**: 586-587, 1991
 - 23) Brigham KL: Role of free radicals in lung injury. *Chest* **89**: 859-863, 1986
 - 24) 荏原順一、保川 淳、山本高宏: 好酸球および好酸球性細胞株 (EoL-3) の活性酸素産生能への Oxatamide の抑制作用。アレルギー **40**: 689-694, 1991
 - 25) 高木健三、鈴木賢司、滝 文男、金子路江、古井秀彦: 各種肺疾患と活性酸素、気管支喘息。J Act Oxyg Free Rad **3**: 172-179, 1992
 - 26) 杉浦功人、飯田芳樹、大越 尚、上田 宏、平野和行、足立哲夫: ヒト皮膚中の superoxide dismutase に関する研究第3報 アトピー性皮膚炎患者皮膚中の superoxide dismutase と過酸化脂質含量。日皮会誌 **93**: 165-170, 1986
 - 27) Kato M, Morikawa A, Kimura H, Shimizu T, Nakano M, Kuroume T: Effects of antiasthma drugs on superoxide anion generation from human polymorphonuclear leukocytes or hypoxanthine-xanthine oxidase system. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **96**: 128-133, 1991
 - 28) Lapenna D, De Gioia S, Mezzetti A, Ciofani G, Festi D, Cuccurullo F: Aminophylline could it act as an antioxidant in vivo. *Eur J Clin Invest* **25**: 464-470, 1995
 - 29) Kaneko M, Suzuki K, Furui H, Takagi K, Satake T: Effect of the new anti-allergic compound methyl 2-(4-carboxy-benzamide)-4-propior-amido-benzoate sodium salt on human neutrophil superoxide production. *Arzneim Forsch* **40**: 91-94, 1990
 - 30) Shult PA, Graziano FM, Busse WW: Enhanced eosinophil luminol-dependent chemiluminescence in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* **77**: 702-708, 1986
 - 31) Fukuda T, Dunnette SL, Reed CE, Steven JA, Margot SP, Gerald JG: Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* **132**: 958-981, 1985
 - 32) Chihar J, Nakajima S: Induction of hypodense eosinophils and nuclear hypersegmentation of eosinophils by various chemotactic factors and lymphokines *in vitro*. *Allergy Proc* **10**: 27-32, 1989
 - 33) Gleich G J, Adolphson CR: The eosinophilic leukocyte; Structure and function. *Adv Immunol* **39**: 177-253, 1986
 - 34) 加藤政彦、森川昭広、黒梅恭芳: 小児気管支喘息における好中球活性酸素生成能に関する検討。アレルギー **37**: 992-998, 1988
 - 35) MacNee W, Irfan R: Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med Suppl* **160**: 58-65, 1999
 - 36) 大類 孝、山内睦雄、矢内 勝、佐々木英忠: 慢性閉塞性肺疾患 (COPD); 診断と治療の進歩。日内会誌 **90**: 35-41, 2001
 - 37) Weiss SJ, Test ST, Eckman CM, Roos D, Regiani S: Brominating oxidants generated by human eosinophils. *Science* **234**: 200-202, 1986
 - 38) Agosti JM, Altman LC, Ayars GH, Loegering, DA, Gleich GJ: The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxidase, and halides on pneumocytes *in vitro*. *J Allerg Clin Immunol* **79**: 496-504, 1987
 - 39) Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, Kodama T, Miyauchi Y, 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**: 654-67, 1995
 - 40) Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D: RAGE, a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* **45**: 577-580, 1996
 - 41) Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H: Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest* **108**: 261-268, 2001
 - 42) Nagai R, Ikeda K, Higashi T: Hydroxyl radical mediates N ϵ -(carboxymethyl) lysine formation from Amadori products. *Biochem Biophys Res Commun*, in press, 1997
 - 43) Vlassar H, Bucala R, Striker L: Biology of disease; Pathogenic effects of advanced glycosylation; Biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* **70**: 138-151, 1994
 - 44) Saishoji T, Higashi T, Ikeda K: Advanced glycation end products stimulate plasminogen activator activity via GM-CSF in RAW 267 7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **217**: 278-285, 1995
 - 45) Skurai T, Tsuchiya S: Superoxide production from non-enzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett* **236**: 406-410, 1988

Relationship between allergic disease in children and advanced glycation end products (AGE) formation

Ryuta TOTSUKA¹⁾ Kazuhiro YOSHIHARA²⁾ Masatoshi BEPPU²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Tokyo Medical University

²⁾Department of Public Health, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences
(Director: Prof. Akinori HOSHIKA)

abstract

Accumulation of advanced glycation end products (AGE) occurs not only in diabetes but also in diseases related to oxidative stress. Pentosidine, one of the AGEs, requires oxidative conditions in its formation process. We determined pentosidine levels of plasma and erythrocyte membrane protein in order to investigate the relationship between allergic disease in children and AGE formation. As a result, pentosidine levels in atopic dermatitis and non atopic bronchial asthma showed similar levels compared with healthy children. On the other hand, atopic bronchial asthma patients revealed high levels of pentosidine in plasma and erythrocyte membrane protein. These levels of pentosidine strongly correlated with the severity of the bronchial asthma. Plasma 8-OHdG levels, one of the oxidative stress marker simultaneously determined, showed significant correlation with plasma pentosidine levels. These results suggested that in atopic bronchial asthma patients suffered oxidative stress, leading to the formation of AGE, especially pentosidine.

<Key words> Allergic disease in children, Bronchial asthma, Advanced glycation end products (AGE), Pentosidine, Oxidative stress
