

[研究助成論文]

維持透析患者におけるビタミンE固定化ダイアライザーを用いた酸化ストレス軽減作用に関する検討

高橋則尋* 福永 恵** 森脇久美子* 原 大雅* 松向寺孝臣* 細谷陽子* 人見浩史*
藤岡 宏* 安岐康晴* 清元秀泰* 石津 勉*** 秋山賢次*** 広畑 衛*** 河野雅和*

香川医科大学 *第二内科 **同総合診療部 ***三豊総合病院

はじめに

維持透析患者にみられる心・血管系合併症の成因に動脈硬化が深くかかわっており、その進展には糖尿病や高血圧などの原疾患、高脂血症や異所性石灰化の合併、尿毒素や透析療法の影響など様々な要因の関与が指摘されている^{1,2,3}。さらに新しい動脈硬化進展因子としてAGE (advanced glycation end products) や活性酸素、酸化LDLなどの関与による酸化ストレスが報告されており、これらの因子についての測定系が検討されている^{4,5,6}。生体内における酸化物質の定量は透析患者の酸化ストレスの状態を正確に把握し、動脈硬化進展を阻止する方法を確立するために重要である。一方、酸化ストレスを緩和する抗酸化剤としてビタミンEの有用性が従来からよく知られており、近年開発されたビタミンE固定化ダイアライザー (excebrane, EX膜) による良好な抗酸化効果が報告されている^{7,8}。研究代表者らは平成11年度本会研究助成により、維持透析患者における酸化ストレスを酸化LDLにより評価し、さらにはEX膜による抗酸化効果の可能性を明らかにした⁹。

今回の研究では、従来までの研究をさらに発展させ、酸化LDLを酸化ストレスの指標として、良好な抗酸化剤であるビタミンEを用いて開発されたダイアラ

イザーを長期に使用し、このダイアライザーによる抗酸化効果、ひいては維持透析患者における動脈硬化進展阻止の方法を確立することを目的とした。現在、維持透析患者の死因として、心不全、虚血性心疾患、脳血管障害が上位を占めている。これら心・血管系合併症の成因に関与する動脈硬化進展の抑制は患者の生命予後、QOLの改善のために大いに資するものと思われる。

1 対象および方法

三豊総合病院において外来維持透析療法中で、EX膜以外の従来型の透析膜が使用されている患者13例、男性4例、女性9例を対象とした。なお、本研究の開始にあたり、全例に研究に参加することへのインフォームド・コンセントを得た。基礎疾患として慢性糸球体腎炎11例、糖尿病性腎症1例、多発性嚢胞腎が1例であり、年齢は62.2±11.2 (mean ± S.D.) 歳、透析期間は158.8±85.4 (mean ± S.D.) ヶ月であった。

研究方法は従来型のダイアライザーを同面積のEX膜 (クリランスE, テルモ社製, 東京) に変更し、変更直前の数値を基礎値とし0ヶ月とする。0ヶ月と変更後1, 3, 6, 12ヶ月後の各月毎に、血液サンプリングを週始めの透析前および透析後に施行する。検査項目は末梢血液検査、血液生化学検査のほか、酸化スト

レスの指標として酸化 LDL を測定する。酸化 LDL は、血漿 1.5 ml に重層溶液 (0.15 M NaCl, 0.3 mM EDTA) 0.5 ml を添加し、10°C, 40,000 rpm, 2.5 時間、遠心分離後に、カイロミクロンと VLDL コレステロールを除去し、下層 1.5 ml に 521 mg/ml KBr 水溶液 0.3 ml を添加し、10°C, 45,000 rpm の条件で 16 時間、遠心分離して、採取した。この LDL 分画中の Ox-LDL は抗酸化フォスファチジルコリン抗体 (ベッセルリサーチ, 神奈川) を用いた ELISA 法にて測定した。

研究終了後に上記の検査項目の推移を比較し、EX 膜の抗酸化効果を検討する。血液透析は週 3 回、1 回 4 時間を原則とし、透析液はキンダリー AF-2 号液を使用、透析液流量は 500 ml/min であった。透析内容は原則として研究期間中に変更しないようにした。

成績はすべて mean ± S.D. で表示し、統計学的検討には、Student's t-test を用い、p < 0.05 を有意とした。

2 結果

図 1 および図 2 に変更前の 0 ヶ月と変更後 1, 3, 6,

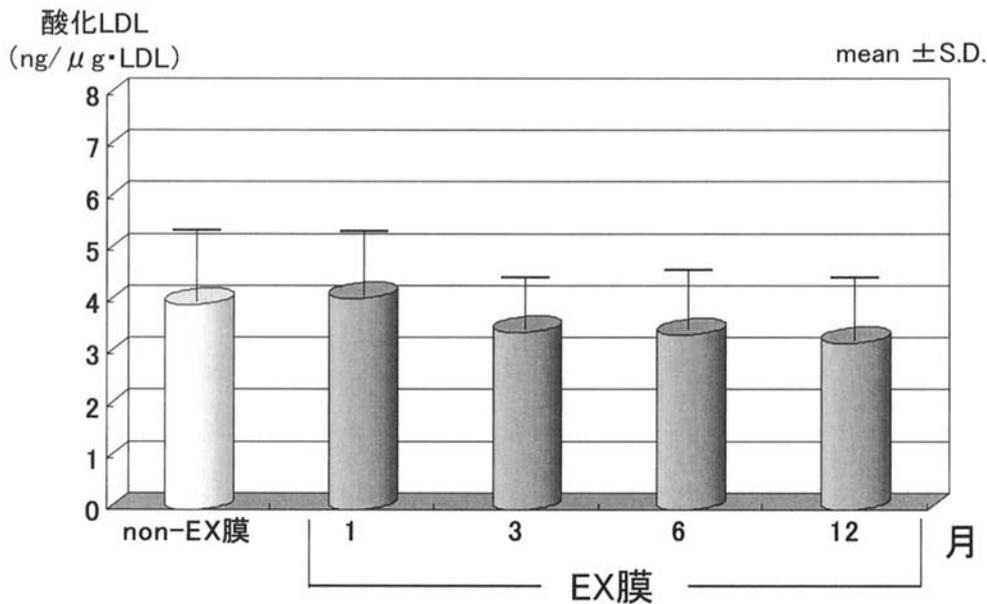


図 1 透析前の酸化 LDL (EX: Excebrane)

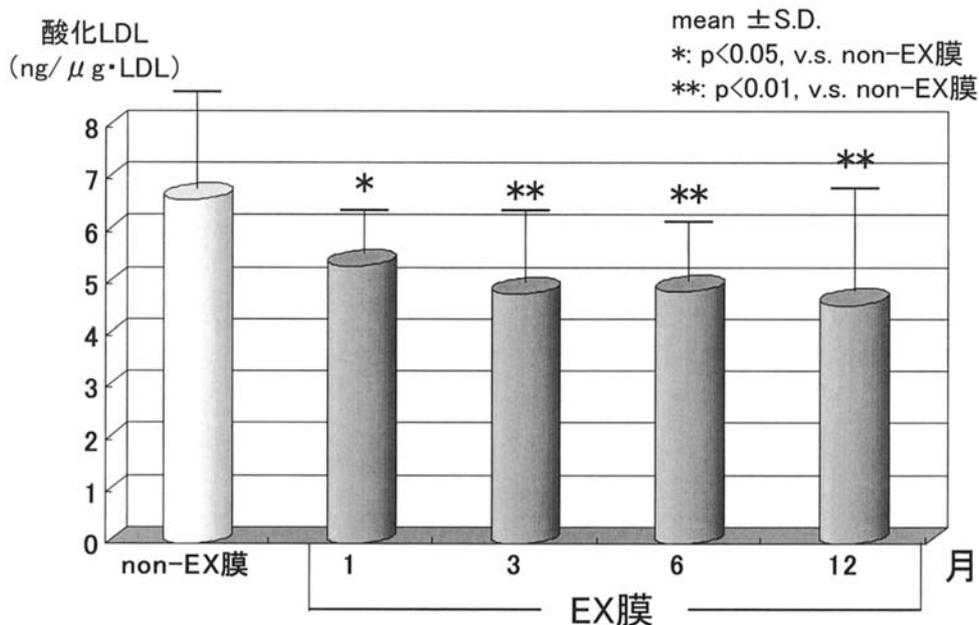


図 2 透析後の酸化 LDL (EX: Excebrane)

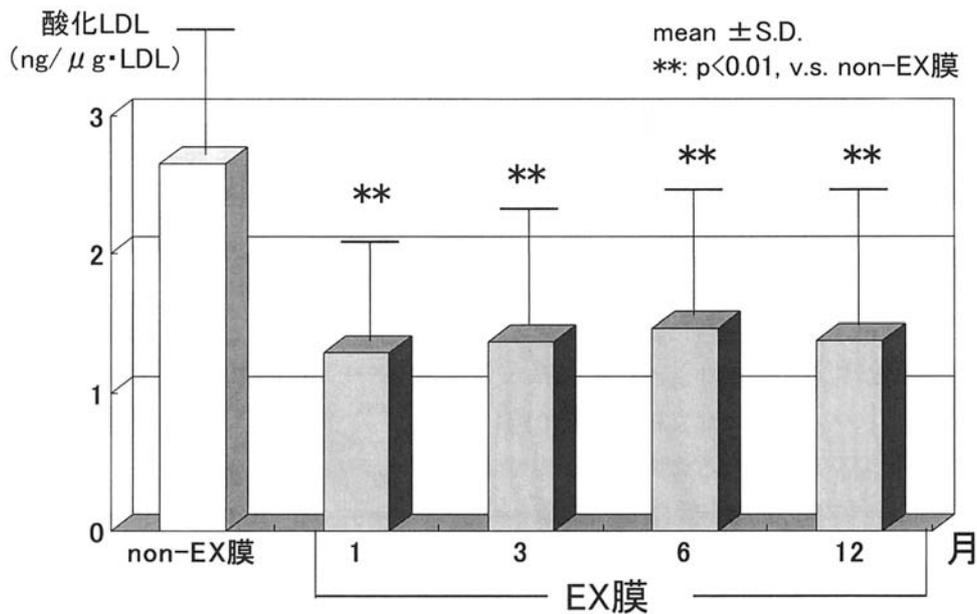


図3 透析による酸化LDLの増加量 (EX: Excebrane)

12ヵ月後における透析前後の酸化LDLの推移を示す。EX膜変更前および変更後のすべての期間において、透析後の酸化LDLは有意に増加した。

まず透析前のOx-LDLは、変更前 3.95 ± 1.18 ng/ μ g LDL proteinより、変更1ヵ月後 4.06 ± 1.11 ng/ μ g LDL proteinと微増するが、その後は徐々に減少し、変更12ヵ月後において 3.21 ± 1.23 ng/ μ g LDL proteinまで減少したが、統計学的に有意ではなかった(図1)。一方、透析後のOx-LDLは、変更前 6.61 ± 1.73 ng/ μ g LDL proteinより変更1ヵ月後 5.35 ± 0.94 ng/ μ g LDL proteinと減少し、変更12ヵ月後において 4.59 ± 1.66 ng/ μ g LDL proteinまで減少し、すべての期間において基礎値に対して統計学的に有意に減少した(図2)。

次に透析による酸化LDLの増加量をEX膜の変更前後において比較した。酸化LDLの増加量は変更前 2.66 ± 1.18 ng/ μ g LDL proteinより変更1ヵ月後には 1.29 ± 0.65 ng/ μ g LDL proteinと著減し、その後も増加量の減少は維持され、すべての期間において基礎値に対して統計学的に有意差を認めた(図3)。

なお、今回の研究期間中、末梢血検査および一般生化学検査の結果についてはすべて、有意な変動は認めなかった。

3 考察

研究代表者らは従来から酸化ストレスの評価におけ

る酸化LDLの有用性に着目してきた。活性酸素により生成された酸化LDLはマクロファージや変形した血管平滑筋細胞に取り込まれ、泡沫細胞を形成し、これが動脈硬化を進展させると考えられている¹⁰⁾。板部らにより作製された酸化LDLに対するモノクローナル抗体を使用することで、その測定が可能となった¹¹⁾。維持透析患者は合併症や死因の解析により、動脈硬化の進展が指摘されており、その進展抑制がQOLの改善や生命予後の向上のために重要である^{1, 2, 3)}。したがって、酸化LDLを評価することは動脈硬化や酸化ストレスの状態を把握する上で重要と思われる。われわれはすでに酸化LDLを用い、健常者、軽度ないし中等度腎不全患者、腹膜透析患者、血液透析患者の順に酸化LDLが高値であり、透析患者が酸化ストレスにさらされていることを明らかにした¹²⁾。さらに、平成11年度本会研究助成により、透析手技による酸化ストレスの侵襲とEX膜による抗酸化効果の可能性を明らかにした⁹⁾。

そこで今回われわれは、本研究においてこれまでの研究をさらに発展させ、良好な抗酸化剤であるビタミンEを用いて開発されたダイアライザーを長期に使用し、このダイアライザーによる抗酸化効果、ひいては維持透析患者における動脈硬化進展阻止の方法を確立することを目的とした。今回の検討で用いた酸化LDLの数値はEX膜変更前後のすべての期間において透析手技により増加したことより、透析療法自体が

酸化ストレスになっているものと思われた。一方、酸化 LDL の透析による増加量は EX 膜への変更により有意に減少した。

一般に慢性腎不全、維持透析患者は抗酸化能が低下していると指摘されており、ビタミン C や E などの抗酸化剤の有用性が報告されている^{13, 14)}。近年開発された EX 膜（クリランス E, テルモ社）は血液と接触する内面に α トコフェロールが疎水結合により固定化されている。今回の結果からも明らかなように、透析手技は血液回路や透析膜といった外的な素材と血液の接触により、酸化ストレスを亢進させるものであり、EX 膜においてはこのような外的要因を緩和し、抗酸化能が期待されている^{7, 8)}。今回の成績より、透析による酸化 LDL の増加量はほかの従来型のダイアライザーと比較し、EX 膜の使用により有意に低下し、さらに長期使用においても抗酸化能が維持され、EX 膜の抗酸化作用の有用性が確認された。しかしながら、今回の成績では透析前の酸化 LDL は EX 膜への変更によっても低下傾向を認めるものの有意ではなく、その原因として、二つの点が考えられた。ひとつは今回の検討よりさらに長期に使用することにより透析前値の酸化 LDL が有意に低下し、十分な抗酸化作用が得られる可能性である。もう一点は、EX 膜では透析手技による酸化ストレスは軽減しうるが、体内における酸化ストレスの亢進には影響を及ぼさないものと考えられた。

以上、今回の検討でも明らかになった透析療法、特に透析膜による酸化ストレスが従来から指摘されており、酸化ストレスを軽減しうる透析療法の開発が動脈硬化進展抑制のためにも重要である。しかし、抗酸化能による動脈硬化進展抑制については今回の検討でも十分に明らかにされたとは云えず、今後もさらなる検討を要する。

まとめ

- 13 例の維持透析患者において EX 膜の抗酸化作用について、酸化 LDL を用いて評価した。
- 従来膜使用時、EX 膜変更時のどの時点においても透析により酸化 LDL は有意に増加した。しかし、その増加量は EX 膜の使用により、従来膜に比較し有意に減少した。
- EX 膜使用 12 ヶ月間に、使用中止を余儀なくされ

るような副作用、問題は認めなかった。

なお、本論文の要旨については、第 45 回日本腎臓学会学術集会において発表した。また本研究は、平成 13 年度日本透析医会学術研究助成によってなされたものである。

文 献

- 1) Boaz M, Green M, Fainauru M, et al: Oxidative stress and cardiovascular disease in hemodialysis. *Clin Nephrol*, 55; 93, 2001.
- 2) 浦 信行, 米倉修二: 動脈硬化症・大動脈瘤. 透析療法における合併症; 越川昭三編, 医薬ジャーナル社, 大阪, P 55, 1994.
- 3) Ritz E, Koch M: Morbidity and mortality due to hypertension in patients with renal failure. *Am J Kidney Dis*, 21 (suppl 2); 113, 1993.
- 4) Tetta C, Biasioli S, Schiavon R, et al: An overview of hemodialysis and oxidant stress. *Blood Purif*, 17; 118, 1999.
- 5) Miyata T, Sugiyama S, Saito A, et al: Renal carbonyl compounds related uremic toxicity ("carbonyl stress"). *Kidney Int*, 59; s-25, 2001.
- 6) 大谷晴久, 湯川 進: 腎疾患と抗酸化物質. *臨床栄養*, 92; 381, 1998.
- 7) 猿橋 誠, 佐々木正富: ビタミン E 固定ダイアライザー CL-EE の抗酸化作用に関する基礎検討. *人工臓器*, 29; 161, 2000.
- 8) 佐中 孜, 庭山 淳, 小俣百世, 他: ビタミン E による改質膜と過酸化脂質. *腎と透析*. 別冊 1998; 15, 1998.
- 9) 福永 恵, 高橋則尋, 森脇久美子, 他: 維持透析患者における酸化 LDL 分画を用いた酸化ストレスの検討—ダイアライザーによる比較—. *日透医誌*, 15; 419, 2000.
- 10) Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, et al: Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *Journal of Lipid Research*, 37; 45, 1996.
- 11) 板部洋之, 竹島栄志, 岩崎仁美, 他: 泡沫細胞を認識する抗酸化 LDL モノクローナル抗体. *動脈硬化*, 22; 275, 1994.
- 12) Hitomi H, Takahashi N, Kiyomoto H, et al: Hemodialysis per se increases in oxidized low density lipoprotein (OX-LDL) in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 12; 330A, 2001.
- 13) Ando M, Sanaka T, Nihei H: Eicosapentanoic acid reduces plasma levels of remnant lipoproteins and prevents in vivo peroxidation of LDL in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 10; 2177, 1999.
- 14) 高宮登美, 葛西一峰: クリランス E にビタミン C を投与しての試み. *腎と透析*. 別冊 1998; 144, 1998.