

血液透析液の血管内皮細胞機能に及ぼす影響

樋口千恵子 佐中 孜 谷畑葉子 大塚邦明

東京女子医科大学東医療センター内科

key words : 血液透析液, 酢酸, クエン酸, 血管内皮細胞

要 旨

本邦において市販されている重曹透析液は酢酸含有(約 10 mEq/L)とクエン酸含有(約 2 mEq/L)の2種類がある。今回は酢酸およびクエン酸の血管内皮細胞に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の細胞活性に対する酢酸, クエン酸の影響について AlmarBlue 法で測定した。また酸化 LDL (Ox-LDL) 存在下における HUVEC の細胞活性に及ぼす影響についても同様の方法にて測定した。さらに receptor of advanced glycation endopoduct (RAGE) の mRNA 発現に及ぼす影響について RT-PCR 法を用いて測定した。酢酸 5~50 mEq/L, クエン酸 1~10 mEq/L の刺激により HUVEC の細胞活性は濃度依存的に低下した。各濃度の酢酸およびクエン酸と同じ pH の HCl 溶液でも同様に濃度依存的に細胞活性は低下した。クエン酸は同じ pH の HCl と同程度の細胞活性抑制を示したが, 酢酸 20 および 50 mEq/L では同じ pH の HCl 溶液より強い細胞活性抑制を示した。Ox-LDL 存在下での細胞活性はクエン酸 4 mEq/L で軽度の低下がみられたが, 酢酸 20 mEq/L では著明な低下が認められた。酢酸, クエン酸ともに RAGE mRNA 発現は濃度依存的に抑制したが, クエン酸のほうが RAGE mRNA 発現抑制効果は強かった。これらの結果より, 酢酸とクエン酸の血管内皮細胞への影響は異なり, 酢酸のほうが細胞障害性や動脈硬化促進

効果は高い可能性があると考えた。

1 緒 言

血液透析患者を含む CKD 患者では心血管疾患の合併が多く, 予後を左右することが知られている¹⁾。我々は慢性維持血液透析患者を性・年齢・血液透析歴・原疾患をマッチさせた2群において, 酢酸含有透析液と酢酸非含有クエン酸含有透析液を1年間使用し, 動脈硬化に及ぼす影響を検討した²⁾。この結果クエン酸含有透析液群は酢酸含有透析液群にくらべ有意に PWV, ABI の減少, 血中エンドセリン濃度の低下を認めた。これらの結果より酢酸やクエン酸の血管への影響は異なる可能性が考えられた。そこで今回は *in vitro* の系において, 血管内皮細胞における酢酸とクエン酸の影響を検討した。

2 方 法

2-1 細胞活性に対する影響

培養 HUVEC (三光純薬) を 5% fetal bovine serum 添加培養液 (EBM-2[®] + EGM-2[®]) を用いコンフルエントになるまで培養した。酢酸 5, 10, 20, 50 mEq/L, クエン酸 1, 2, 4, 10 mEq/L を添加し 48 時間刺激後, AlmarBlue 法 (Diagnostic system Inc.) を用いて細胞活性を測定した。細胞活性は ELIZA を用い, 560 nm および 600 nm の吸光度にて測定した。pH の影響をみるために, 酢酸 5, 10, 20, 50 mEq/L, クエン酸 1, 2, 4,

10 mEq/L 溶液と同等の pH (6.7, 5.9, 5.0, 4.3, 7.0, 6.7, 6.1, 4.3) の HCl 溶液を作成し, これらを添加し, 培養 48 時間刺激後の細胞活性も測定した. さらに Ox-LDL (コスモバイオ) 50 μ g/ml を加えた培養液にて 48 時間培養後, 酢酸 5, 10, 20 mEq/L, クエン酸 1, 2, 4 mEq/L を添加し 48 時間刺激後の細胞活性も測定した.

2-2 RAGE mRNA 発現に及ぼす影響

上記と同様に HUVEC をコンフルエントになるまで培養後, 酢酸 5, 10 mEq/L, クエン酸 1, 2 mEq/L にて 48 時間刺激し, RAGE mRNA 発現を RT-PCR を用いて測定した. RT-PCR 法は Rashid らの方法³⁾に準じて

行った.

3 結果

3-1 細胞活性に対する効果

酢酸, クエン酸ともに容量依存性に細胞活性を抑制した. HCl 刺激では pH 依存性に細胞活性は低下した. クエン酸はいずれの濃度においても, 同じ pH に調整した HCl の細胞活性抑制効果と同等であった. これに対し, 20 および 50 mEq/L の酢酸刺激では, 同じ pH に調整した HCl に比べ細胞活性抑制作用は強く認められた (図 1).

Ox-LDL 存在下における酢酸およびクエン酸の刺激

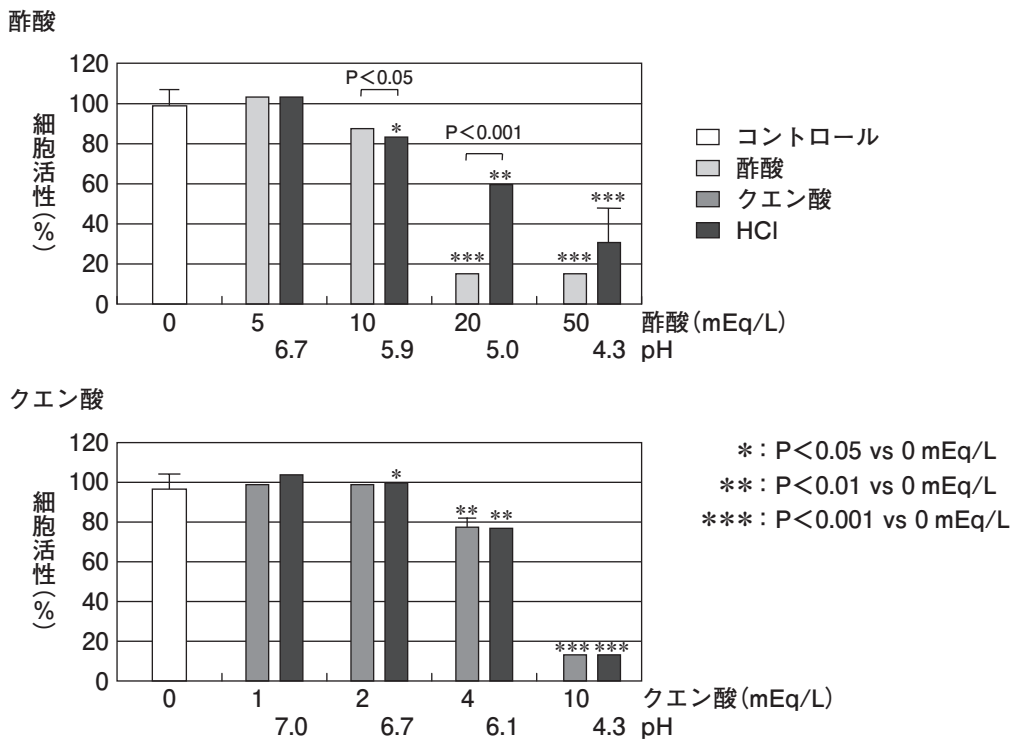


図 1 酢酸, クエン酸および pH の HUVEC 活性に及ぼす影響

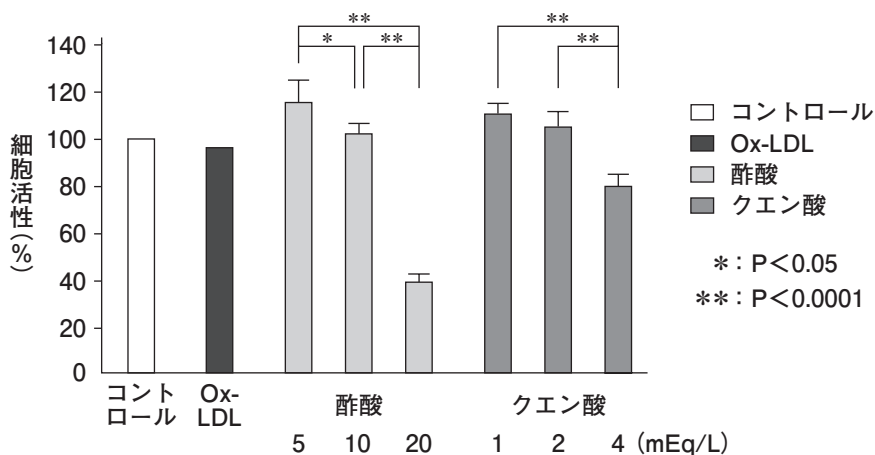


図 2 Ox-LDL 存在下における酢酸およびクエン酸の HUVEC 活性に及ぼす影響

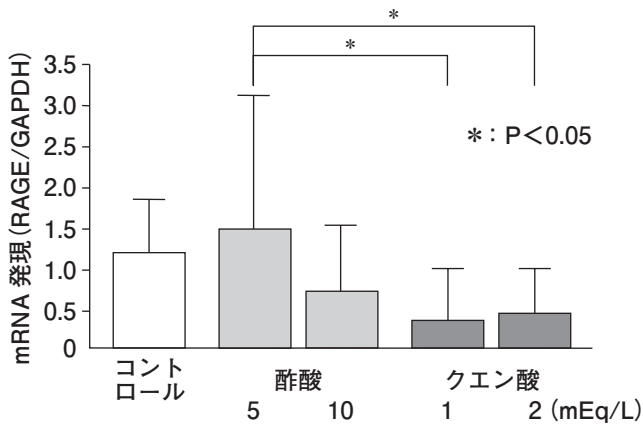


図3 酢酸およびクエン酸のHUVEC RAGE mRNA発現に及ぼす影響

では、Ox-LDL非存在下と同様に濃度依存性に活性抑制がみられた(図2)。

3-2 RAGE mRNA発現に及ぼす影響

無刺激培養HUVECにおけるRAGE mRNA発現(比GAPDH mRNA)は1.14であった。これに対し、酢酸5, 10 mEq/Lおよびクエン酸1, 2 mEq/Lでの刺激によるmRNA発現は各々1.49, 0.77, 0.39, 0.4であり(図3)、クエン酸は酢酸に比べRAGE mRNA発現を抑制した。

4 考察

我々は以前、性・年齢・血液透析歴・原疾患をマッチさせた患者2群において、酢酸含有透析液と酢酸非含有クエン酸含有透析液を1年間使用し、動脈硬化に及ぼす影響を検討した。この結果、クエン酸含有透析液群は有意にPWV, ABIの減少、血中エンドセリン濃度の低下を認めた。Norisら⁴⁾は、5 mmol/Lの酢酸含有透析液と酢酸非含有透析液において透析前後の血圧差を比較すると、酢酸含有透析液のほうが有意に大きかったと述べている。また酢酸含有透析液で行った患者血清と酢酸フリー透析液で行った患者血清を用いてHUVECに添加刺激をすると、一酸化窒素の産生量は前者のほうが大きかったと報告している。彼らはこれらの結果より、酢酸は少量においても血管内皮細胞に影響を与え、心血管の安定性を悪化させる可能性があると考えしている。Amoreら⁵⁾も、4 mmol/Lの酢酸含有透析液は血管内皮細胞からの一酸化窒素活性の亢進、TNFの産生増加、内皮細胞増殖の抑制作用を認めるとしている。

我々の今回の結果では、HUVECに酢酸、クエン酸にて刺激をすると、濃度依存的に細胞活性を抑制した。同じpHに調整したHClによる刺激でも同様に細胞活性は低下し、酢酸・クエン酸の細胞活性抑制作用はpHによる可能性が考えられた。しかし、クエン酸は同じpHのHClと同程度の抑制効果であったが、酢酸はHClより強い抑制作用を示し、酢酸のほうがクエン酸より強い細胞活性抑制作用を持ち、その細胞活性抑制作用はpHによる作用以外にもある可能性が考えられた。

我々の以前行った臨床検討で、酢酸含有透析液のほうが動脈硬化促進作用は強く認められたことから、動脈硬化促進効果を持つOx-LDL存在において酢酸、クエン酸の内皮細胞への影響についても検討した。この結果ではOx-LDL存在による変化は認められず、非存在時と同様に酢酸、クエン酸は容量依存的に内皮細胞活性抑制効果を示した。Kamiyamaら⁶⁾は、Ox-LDL 50 μg/mlによりHUVECのapoptosisが惹起されると報告しているが、今回の我々の結果ではOx-LDLの刺激による細胞活性低下は見られなかった。この理由として、使用したOx-LDLの過酸化の程度が異なる可能性が考えられた。内皮細胞刺激作用がより強い状態での酢酸、クエン酸の影響について、さらに検討をする必要があると考えた。

RAGEはOx-LDLをはじめとする過酸化物のリセプターであり、これに作用することにより動脈硬化は進行していくと考えられている⁷⁾。今回の検討では、酢酸、クエン酸ともに濃度依存的にRAGE mRNA発現を抑制した。今回検討した酢酸およびクエン酸の濃度は臨床使用の透析液含有濃度の2倍まで検討したが、クエン酸のほうが酢酸に比べその抑制作用は強く認められた。RAGE mRNA発現抑制という観点からみると、酢酸よりクエン酸のほうが望ましいと思われた。

クエン酸の血管または循環系への影響についての報告はあまり多くない。Changら⁸⁾は、Ox-LDLによる血管内皮細胞障害に対しクエン酸は抑制的な効果を持つことを報告している。Gritterら⁹⁾は、血液透析中の血小板第4因子、ミエロペルオキシダーゼやOx-LDLの増加をクエン酸は抑制すると報告している。今回の我々の検討では、クエン酸は酢酸よりは作用は弱いものの血管内皮細胞活性抑制作用は濃度依存的に認められ、透析液中の含有についてはさらに検討を要すると

思われた。

5 結 論

今回の結果では酢酸、クエン酸ともに臨床使用の濃度では細胞活性抑制効果は有意ではなかったが、容量依存的に血管内皮細胞の活性抑制作用を認めた。今回の刺激は48時間のみであったが、臨床で行われている血液透析はこの刺激が繰り返しおこっていることを考えると、血管内皮細胞へなんらかの影響を与えている可能性は否定できないと思われた。

本研究の内容は第54回日本透析医学会学術集会・総会にて発表した。この研究は日本透析医学会平成21年度公募助成事業による。

文 献

- 1) Roberts MA, Hare DL, Ratnaik S, et al. : Cardiovascular biomarkers in CKD : Pathophysiology and implications for clinical management of cardiac disease. *Am J Kidney Dis*, 48; 341-360, 2006.
- 2) 樋口千恵子, 芝田正道, 海野純子, 他 : 酢酸フリー透析液の動脈硬化への影響. *透析会誌*, 42(suppl. 1); 579, 2009.
- 3) Rashid G, Bernheim J, Green J, et al. : Parathyroid hormone stimulates endothelial expression of atherosclerotic parameters through protein kinase pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292; F1215-1218, 2007.
- 4) Noris M, Todeschini M, Casiragi F, et al. : Effect of acetate, bicarbonate dialysis, and acetate-free biofiltration on nitric oxide synthesis : Implications for dialysis hypotension. *Am J Kidney Dis*, 32; 115-124, 1998.
- 5) Amore A, Cirina P, Mitola S, et al. : Acetate intolerance is mediated by enhanced synthesis of nitric oxide by endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 8; 1431-1436, 1997.
- 6) Kamiyama M, Kishimoto Y, Tani M, et al. : Effects of Equol on oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*, 16; 239-249, 2009.
- 7) Cipollone F, Iezzi A, Fazio M, et al. : The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques : role of glycemic control. *Circulation*, 108; 1070-1077, 2003.
- 8) Chang C, Chen J, Wong H : Protective effects of organic acids on human vascular endothelial cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 35; 79-82, 2001.
- 9) Gritters M, Grooteman MPC, Schoorl M, et al. : Citrate anticoagulation abolishes degranulation of polymorphonuclear cells and platelets and reduces oxidative stress during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 21; 153-159, 2006.