

腹膜保護と透析効率増強効果を併せ持つ 腹膜透析用ナノ粒子の開発

平山 暁*¹ 長崎幸夫*² 植田敦志*³

*1 筑波技術大学東西医学統合医療センター *2 筑波大学数理物質系物質工学域 *3 筑波大学附属病院日立社会連携教育研究センター

key words : 被嚢性腹膜硬化症, 酸化ストレス, レドックスナノ粒子

要 旨

本研究では、被嚢性腹膜硬化症 (EPS) や腹膜劣化といった長期腹膜透析を阻害する問題の解決のため、酸化ストレス制御による腹膜保護とともに、尿毒症性物質を吸着させ透析効率を改善させる腹膜透析用ナノ粒子 (SiRNP) を開発することを目的とした。

抗酸化物質のナノ粒子化は、腹膜腔外への漏出を防止するとともに、腹膜透析液中での生体適合性を確保し、酸化ストレス部位特異性により、EPS へ至る過程における慢性炎症を局所的に制御する。我々が先に開発した、酸化ストレス亢進部位において特異的に抗酸化能を発揮するレドックスナノ粒子 (RNP) に、シリカを含有させ中小分子量物質に対する吸着能を創り込んだナノ粒子 (SiRNP) を合成した。EPS モデルラットに SiRNP を腹腔内投与したところ、非粒子化低分子抗酸化物質に比べ優れた腹膜肥厚の抑制効果がみられた。SiRNP は血中には漏出しなかった。SiRNP 含有腹膜透析 (PD) 液を腎不全モデルマウス腹腔内に投与したところ、SiRNP 非含有 PD 液に比べ血中 BUN、クレアチニン値の有意な低下がみられた。これらの結果により、本研究では酸化ストレス制御により腹膜を保護し尿毒症性物質を吸着させ透析効率を改善させる SiRNP の開発に成功した。

緒 言

腹膜透析 (PD) は QOL が高い優れた治療法であるが、腹膜劣化による透析効率低下や被嚢性腹膜硬化症 (EPS) のため、現状では長期 PD には制限がある¹⁾。EPS へ至る共通経路に腹膜での慢性炎症があり、そのコントロールが重要な治療戦略となりうる。慢性炎症の機序は急性炎症と比べ多様で不明な点も多いが、共通の病態進展過程として酸化ストレスがあり、これを標的とする治療法が試みられている。しかし、PD において、一般的な低分子抗酸化剤を腹腔内投与した場合、腹膜を介した体内への吸収のため有効性は限られ、また全身性の副作用が懸念される。さらに最近では、抗酸化剤投与による各種臨床試験の失敗から、抗酸化療法自体への疑問も投げかけられている²⁾。これらの克服のためには、腹膜腔内で安定でありかつ酸化ストレス部位で有効に働く部位特異的抗酸化機能が必要である。さらに長期 PD では透析効率低下に対する方策も必要となる。

このような背景のもと、本研究では申請者らが開発した、酸化ストレス亢進部位において特異的に抗酸化能を発揮するレドックスナノ粒子 (RNP)^{3,4)} を基に、酸化ストレス制御による腹膜保護とともに、シリカを含有させ中小分子量物質に対する吸着能を創り込み、

Development of silica-containing redox nano-particle for peritoneal dialysis

Center for Integrative Medicine, Tsukuba University of Technology

Aki Hirayama

Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

Yukio Nagasaki

Hitachi Medical Education and Research Center, Tsukuba University Hospital

Atsushi Ueda

尿毒症性物質を吸着させ、透析効率を改善させる腹膜透析用ナノ粒子 (SiRNP) を開発することを目的とした。

1 方法

1-1 SiRNP の合成および in vitro における特性評価

これまでの申請者らの報告^{3,4)}に基づき、TEMPO 含有 RNP を合成した。この RNP に疎水性コア中でゾルゲル法によりシリカを含有させ、SiRNP を作成した。

1-2 in vivo における生体内安定性評価

SiRNP をラット腹膜内に投与し、腹腔内での安定性および血中への移行を検討した。SiRNP 水溶液 (polymer concentration = 20 mg/mL, TEMPOL 含有量 42.6 mM ニトロキシドラジカル相当)、および同量のニトロキシドラジカル相当の非粒子化 TEMPOL を腹腔内投与し、血中におけるニトロキシドラジカル濃度変化を電子スピン共鳴法 (ESR) により測定した。

1-3 腹膜炎モデルにおける腹膜保護効果・

抗酸化ストレス効果の評価

Bozkurt らの報告に従い、クロルヘキシジン (CH) 投与によりラット EPS モデルを作製した⁵⁾。この EPS

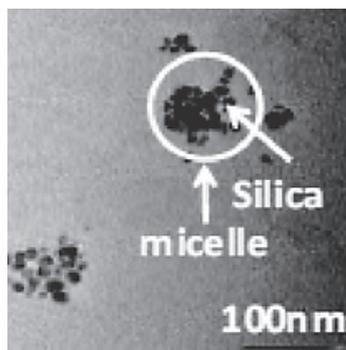


図1 SiRNP の透過電子顕微鏡像

モデルラットに、TEMPO 42.6 mM 相当の SiRNP もしくは非粒子化 TEMPO を生理食塩液に溶解し、1日1回、計7日間にわたり腹腔内投与した。試験後腹膜を摘出し組織学的評価を行った。また MPEC を用いた化学発光法により、腹膜からのスーパーオキシド産生能を評価した。

1-4 腎不全モデルにおける評価

マウス虚血再還流腎不全モデルを用い、SiRNP を 4.25% グルコース PD 液に溶解し腹腔内投与した。投与後 6~9 時間において血清 BUN, クレアチニン値の変動を評価した。

2 結果

2-1 SiRNP の合成および in vitro における特性評価

動的光散乱法による計測では、得られた SiRNP は平均粒径 40 nm (湿重量約 5% のシリカ含有) であった (図1)。これはシリカ非含有 RNP (平均粒径 22 nm) に比べ若干サイズが増大していた。また、シリカ含有量の増加に伴い、平均粒径は増大した。

2-2 in vivo における生体内安定性評価

SiRNP を腹腔内投与したところ、投与後 60 分に至るまで血中移行は認められなかった。一方、非粒子化 TEMPO の腹腔内投与では、投与後 10 分をピークとし 60 分以上持続する血液中への移行が観察された。SiRNP 投与による毒性は認められなかった。

2-3 腹膜炎モデルにおける腹膜保護効果・

抗酸化ストレス効果の評価

EPS モデルラットにおいて、SiRNP の腹腔内投与は腹膜肥厚を有意に抑制するとともに、腹膜からのスーパーオキシド産生を CH 非投与群と同等レベルまで

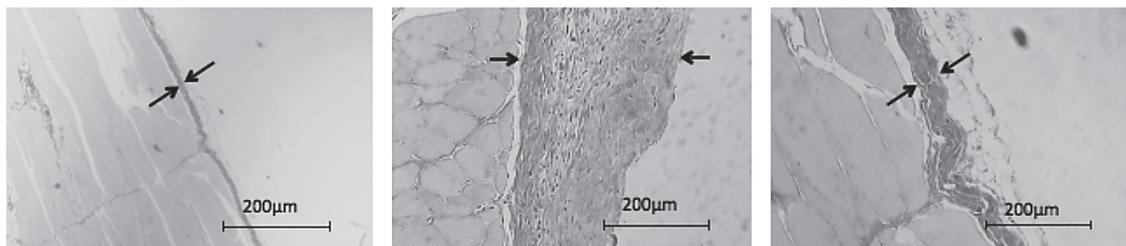


図2 EPS モデルにおける SiRNP の腹膜保護効果

クロルヘキシジン EPS モデル腹腔内に投与。左：コントロール (生理食塩水)、中：クロルヘキシジン投与、右：クロルヘキシジン + SiRNP

抑制した (図 2)。非粒子化 TEMPO にも改善効果が見られたが、SiRNP と比べ有意に弱いものであった。

2-4 腎不全モデルにおける評価

虚血再還流腎不全モデルにおいて、SiRNP の腹腔内投与は、PD 液単独およびシリカ非含有 RNP に比べ、投与後 9 時間後まで有意に血中 BUN、クレアチニン値を低下させた。

3 考察

本研究では、今回合成に成功したシリカ含有レドックスナノ粒子 SiRNP は、レドックスナノ粒子の部位特異的抗酸化作用により、腹膜酸化ストレスの効果的なコントロールを介して腹膜肥厚の抑制及び腹膜保護効果を示し、かつ腎不全において既存の PD よりも効率的に血中小分子量物質を低下させることを示した。

酸化ストレスは、現在多くの疾患において中心的な病態であることが報告されているが、抗酸化剤による病態改善を目指した大規模臨床試験は、1990 年代の CARET study 以来失敗例が相次いでおり^{2,6)}、その効果に強い疑問が投げかけられている。酸化ストレスに関与する還元反応はそもそも生体各所で持続的に進行しているものであり、抗酸化剤全身投与は不必要な抗酸化作用により悪影響を及ぼすことは想像に難しく、酸化ストレス亢進部位に特異的な抗酸化療法が必須である。我々はこのような考えの下、レドックスナノ粒子 RNP を開発し、その有用性を報告してきた。本研究でも、腹腔内で選択的に抗酸化作用を示す SiRNP の有用性が示された。SiRNP は PEG により構成されるため生体適合性が高く、PD 液中に容易に溶解しかつ安定なため、PD において EPS の発生予防と透析効率改善を期待できる。

謝 辞

本研究は、筑波大学数理物質系長崎研究室の池田豊博士、吉富徹博士、矢口達也博士、松村卓馬氏の協力を得ております。ここに深謝いたします。本研究報告の詳細は、*Biomaterials Science*, 2; 522-529, 2014 に発表しております。

この研究は平成 24 年度日本透析医会公募研究助成によってなされました。

文 献

- 1) Brown MC, Simpson K, Kerssens JJ, et al. : Encapsulating peritoneal sclerosis in the new millennium : a national cohort study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(7); 1222-1229, 2009.
- 2) Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud C : Meta-regression analyses, meta-analyses, and trial sequential analyses of the effects of supplementation with beta-carotene, vitamin A, and vitamin E singly or in different combinations on all-cause mortality : do we have evidence for lack of harm? *PloS one*, 8(9); e74558, 2013.
- 3) Yoshitomi T, Suzuki R, Mamiya T, et al. : pH-sensitive radical-containing-nanoparticle (RNP) for the L-band-EPR imaging of low pH circumstances. *Bioconjug Chem*, 20(9); 1792-1798, 2009.
- 4) Yoshitomi T, Hirayama A, Nagasaki Y : The ROS scavenging and renal protective effects of pH-responsive nitroxide radical-containing nanoparticles. *Biomaterials*, 32(31); 8021-8028, 2011.
- 5) Bozkurt D, Hur E, Ulkuden B, et al. : Can N-acetylcysteine preserve peritoneal function and morphology in encapsulating peritoneal sclerosis? *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 29(Suppl 2); S202-205, 2009.
- 6) Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. : Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 334(18); 1150-1155, 1996.