

糖尿病性透析患者の代謝解明と透析治療法の確立

藤原正子*1 宍戸 洋*2 佐藤 博*3

*1 東北大学大学院薬学研究科・医薬開発構想寄付講座 *2 緑の里クリニック *3 東北大学大学院薬学研究科・臨床薬学分野

key words : 血液透析, 糖尿病, サイトカイン, 代謝物, 栄養障害

要 旨

血液透析が患者の代謝へ与える影響を透析中の血中代謝物定量によって動態を検討した。エネルギー代謝を中心として低分子代謝物はプロトン NMR 法を用いて定量し、サイトカインなどの蛋白の定量は外注検査によって行い、糖尿病患者と非糖尿病患者の代謝の比較をすることで、代謝異常をもつ糖尿病患者の特異な代謝応答を抽出した。これによって糖尿病患者の予後不良の改善に資する知見を得た。

1 目的と背景

本邦で血液透析を受ける患者のうち糖尿病を持つ患者 (DM) が増え続け、約 4 割を占める。糖尿病を持つ透析患者は 5 年生存率が 5 割と極端に予後が悪く、その死因の 1 位は心・血管障害、2 位は感染症である¹⁾。透析合併症のサルコペニア進行が予後に影響を与えることも指摘されている²⁾。

我々はすでに長町クリニック ((医) 宏人会, 仙台) で糖尿病を持たない患者 (non DM) 10 名の透析中の代謝変化を観察し報告している³⁾。透析液の糖濃度が 150 mg/dl, 4 時間透析である。透析時間を追った代謝物の観測で、乳酸、ピルビン酸、アラニンの血中の濃度は透析中 2~3 時間目に増加し、透析による

除去を上回る体内からの産生によって、血中濃度の透析による除去を補償する反応があることを示した。ところが長町クリニックでの DM 患者では、上記とまったく異なる代謝応答を示した。すなわち、乳酸などは透析中に増加せず減少の一途をたどり、血中濃度を保持しようとする補償する反応は起きない。透析後半にケトン体 (3 ヒドロキシ酪酸) が増加し、脂肪酸酸化が亢進した。嫌氣的解糖系が滞り同時に脂肪酸酸化が亢進するという飢餓状態様の代謝を示した⁴⁾。透析液の糖濃度が正常血糖値より高めであるのに飢餓代謝を示すのは奇妙であると考えられた。

近年、血液透析治療は低~中高分子量にわたる尿毒素を高効率に除去することを追求して来た。すなわち、この透析は分子量 33,000 の α_1 -microglobulin はじめ β_2 -microglobulin などを標的とするので、これ以下の分子量のビタミン、血管内皮増殖因子 (VEGF)、あるいはインスリンをはじめとするホルモンなどは、高効率で血中から除去され、代謝を擾乱するという新たな問題がある。これらの除去は、代謝異常をもつ DM 透析患者に各回の透析で深刻な影響を与え、ひいては合併症や予後にも関連することが予想される。上記の長町クリニックでは、維持透析を行うサテライトとして標準的な治療法を行うと考えられた^{3~5)}。

本研究では、別の透析条件を用い補液などの様々な

Metabolomic studies on diabetic patients during hemodialysis for development of the novel therapy

Department of Planning of Drug Development and Clinical Evaluation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

Masako Fujiwara

Midorinosato Clinic

You Shishido

Laboratory of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

Hiroshi Sato

工夫をした緑の里クリニックにおいて、新たにリクルートした患者、DM と non DM について透析中代謝応答を比較して検討することとした。ことに上に記したエネルギー代謝関連の代謝物血中濃度を定量し、透析中の時間変化をとらえ、DM 患者特有の代謝応答を抽出することでこのメカニズムを解明する。透析中の代謝応答を制御するという新たな発想で、糖尿病透析患者の予後改善に資する治療法を開発することなどを目的とした。

2 方法

2-1 透析と注目する代謝物

緑の里クリニックの透析患者で DM 7 名と non DM 6 名について同意書を得た。各回の透析中に 6 点（前後、1, 2, 3, 4 時間目）の血漿と廃液を数 ml 採取した。透析液の糖濃度は 100 mg/dl であり、透析時間は 4.5 から 5 時間、補液などの透析中の治療もすでに試みている。この条件での治療効果を評価したうえで、DM に透析中の栄養の治療を検討し、その効果を代謝物変動や臨床情報の変化として考察する。

廃液はプロトン NMR 測定により低分子代謝物（乳酸、アラニン、バリン、クエン酸、3 ヒドロキシ酪酸など）を定量し、血漿はサイトカイン（TNF α , IL6, CRP）、VEGF, IRI, CPR, 血糖値などを外注検査で

定量値を得た。再現性をみるため各人 5 回以上の透析で検体を収集し、カルテ情報と連結して解析した。NMR 測定解析は東北大学薬学部にて行った。

2-2 NMR 分析法と特長

現在、日本では、メタボローム測定は LC, CE, GC などのクロマト質量分析の組み合わせで行うことが主流であるが、この方法は共存物によるイオンサプレッションが大きく、定量するには各々の同位体標品が必要となる。一方で NMR 法は混合物のまま分離せずに一斉分析が可能であり、簡単な前処理と合わせて医療応用には適している。NMR 法ではプロトンの感度は分子（極性ある、なしなどの）によらず一定であり、プロトン濃度として定量できる。非標的測定と解析により予期せぬマーカー発見が可能であり、これは NMR 法の大きな特徴である⁵⁾。血漿の NMR スペクトルはアルブミンのブロードなピークが低分子の定量を困難にするが、透析患者においては廃液という優れた材料がある（**図 1**）。血漿を除蛋白した形で低分子が得られるので、透析の液流と血流が与えられれば廃液中分子濃度は血中の濃度に換算できる⁶⁾。廃液は非侵襲で採取に制限がないことも大きな利点である。廃液は低分子のみ含むので NMR の感度もよく、NMR 分析に新規で強力な生体材料として使うことは我々のオリジ

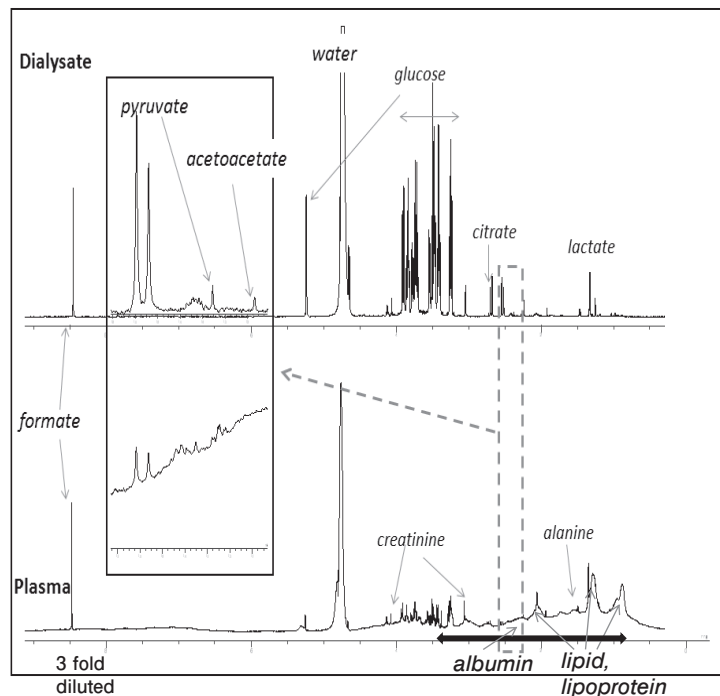


図 1 血漿と廃液の¹H NMR スペクトル（透析開始 1 時間目）

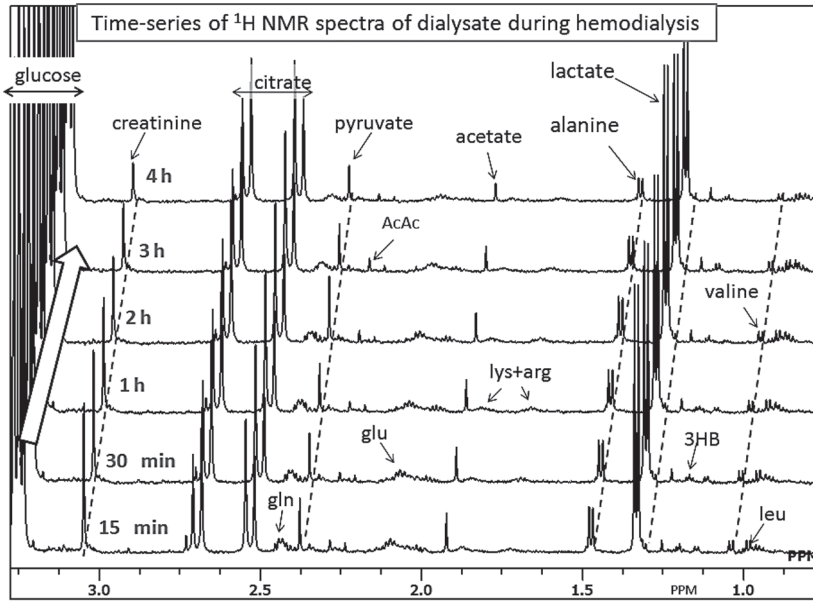


図2 クエン酸透析液を用いた透析廃液のスペクトル

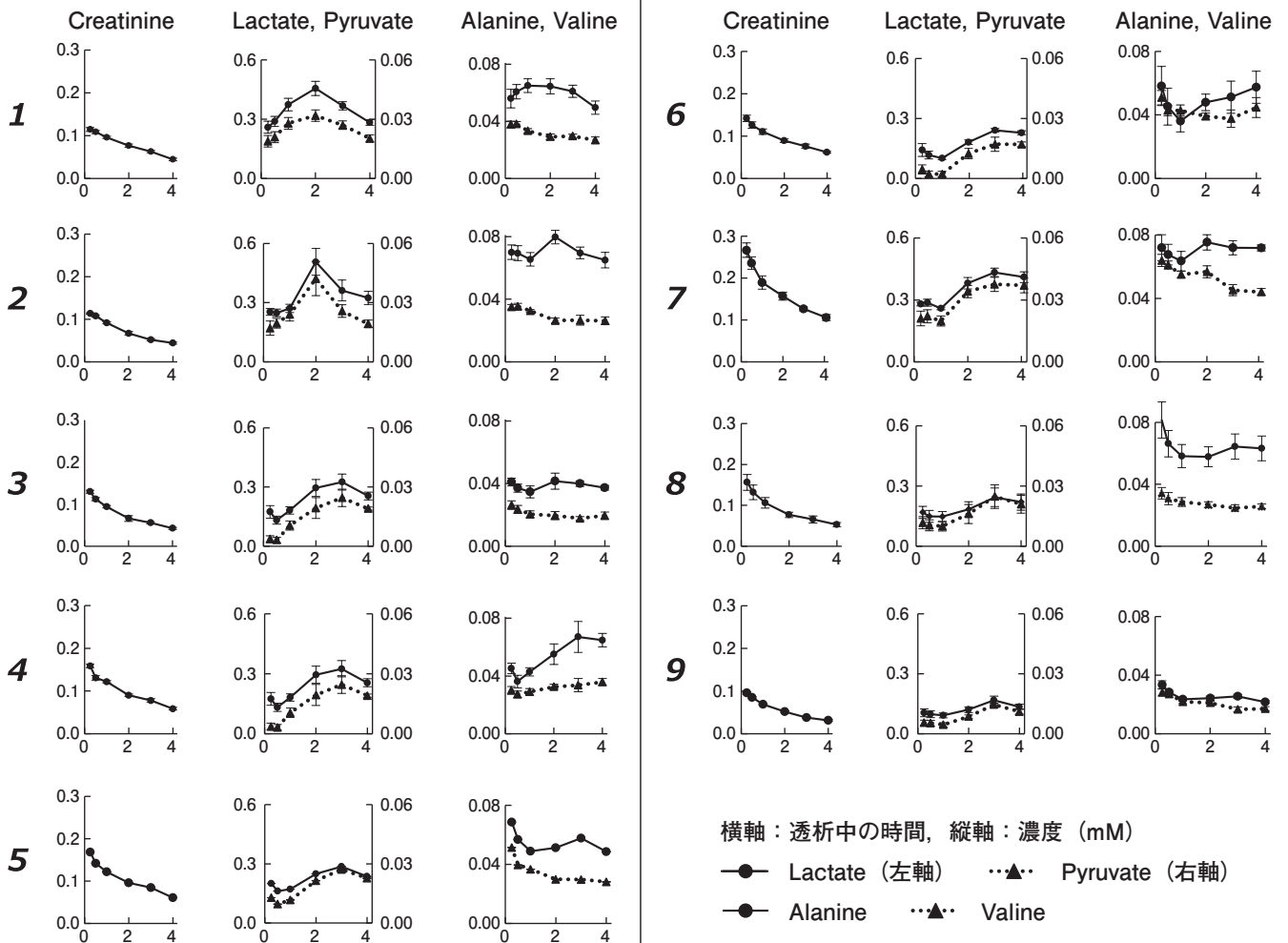


図3 廃液中代謝物濃度の透析中時間変化
non DM 患者 9 名.

ナルである。

廃液のプロトンスペクトル時間変化を図2に示す。1本のスペクトルで多種の代謝物がプロファイリングされる。透析経過時間とともにクレアチニンが減少するが乳酸のピークは大きくなっていることがわかる。クエン酸透析液を使う例であるのでクエン酸は一定値を保持している。

スペクトルの上でピークを定量することで各代謝物の濃度を定量できる。我々はすでに、non DMには高効率透析による除去に抗して透析中に乳酸、アラニン、ピルビン酸の血中値の増加、すなわち体内からの大量の生産によって除去を補う補償反応があることを発見している。またこの反応は同じnon DMの患者でも、患者の透析中の代謝応答に個性があり、各人の応答が再現することを明らかにした(図3)。これはNMR法による解析が個別化医療に用いられる可能性を持ち、本研究で糖尿病者の解析を行う基礎を与える。

さらにNMR法によって図3から透析中のアラニン、バリンの流出量を計算することができた。これによってアミノ酸分布を仮定して全アミノ酸の流出量を算定すると6~8g程度となった。近年の高効率透析膜を用いた文献と一致している⁷⁾。同じ方法を用い、本研究ではさらにDM患者やアミノ酸補充治療を行う患者について、アミノ酸流出量の算出を行い、栄養障害

の治療法を探る基礎的な知見を得る⁸⁾。

2-3 患者の背景と治療

緑の里クリニックの患者では、透析中の摂食で分類すると、non DM 6名のうち摂食のない患者は4名、摂食のある患者は2名、DM8名のうち食事ある、なしで患者は4名ずつであった。これら患者についてエネルギー代謝関連の代謝物の透析中の挙動を「2-1 透析と注目する代謝物」に示した時間で検討した。NMR法で廃液の定量解析を行い、2-1に示した蛋白やサイトカインについては外注検査で血漿中の定量値を得た。

DMのうち1名が途中から週3回のIDPN(経静脈輸液)治療(キドミン、50%ブドウ糖を各200mlとヒューマリンRを14単位、開始時から一定量で4.5時間)へ移行し、この治療を行う前半と行ってから半年の結果を観察比較した。

3 結果

まず各人が5回以上の透析について代謝物測定を行ったが、短期間の測定の範囲ではよく再現性が得られたが、半年程度の時間をおいて採取した検体は患者の状態変化を反映して代謝物測定も再現できなかった。再現したものについて解析を行い、状態変化については別途考察を行った。

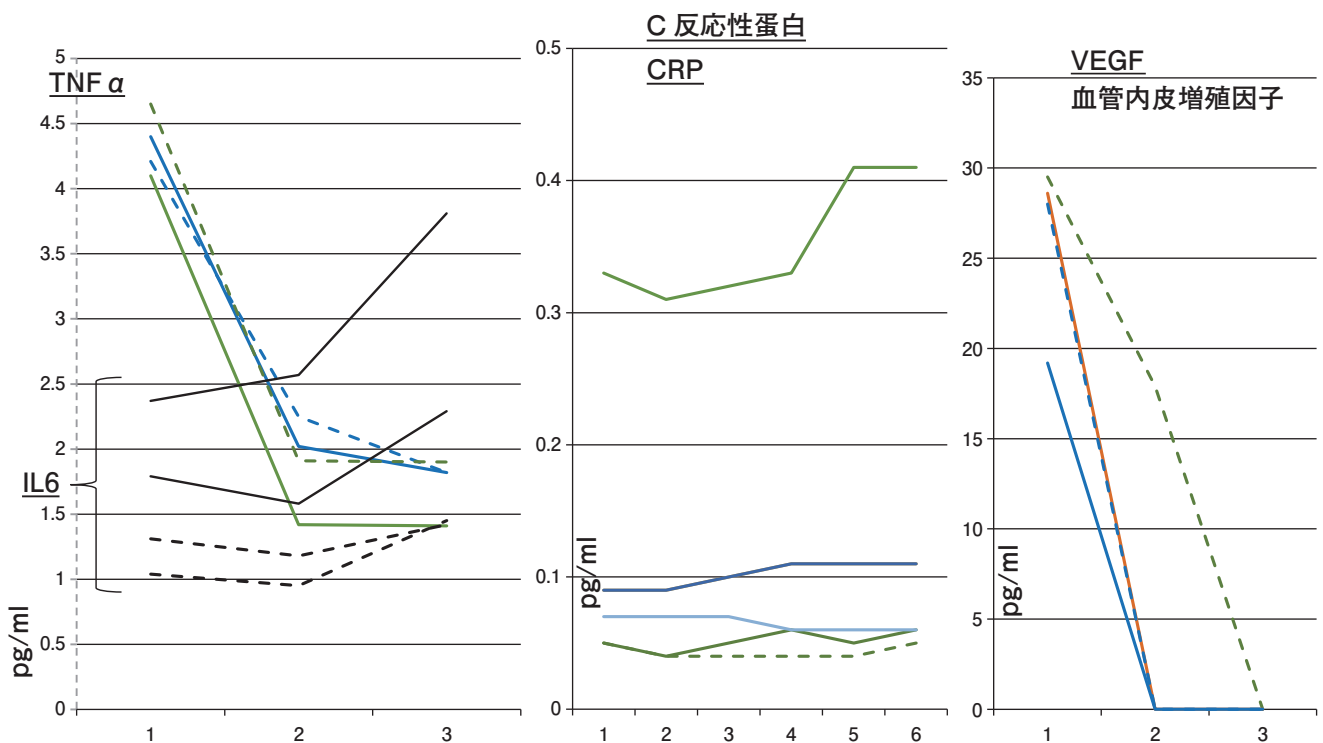


図4 血中サイトカイン濃度の透析中推移(緑の里クリニック患者例)

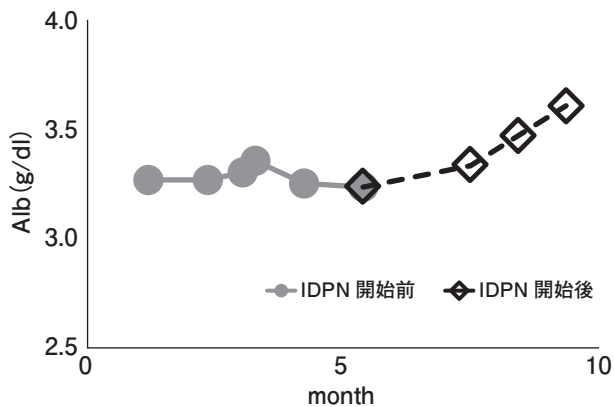


図5 IDPN 前後の血中アルブミン値変化

透析中に栄養治療も摂食も行わない患者はDM, non DM それぞれ4名ずつであったが、いずれも透析によって後半に乳酸, ピルビン酸, アラニンは時間とともに減少した。これらは解糖系の最終産物であり、これらが低値であることは解糖系が滞っていることを示した。同時に3ヒドロキシ酪酸値も上昇しており、飢餓様の代謝を示した。インスリン測定も行ったが透析後半に大きく除去され、インスリン低下が上記の代謝物変動と連動していることを示した。

これら4名のDMのうち3名は透析開始2時間目で摂食を行う治療に切り替えたが、この結果、乳酸やアラニンなど血中レベルの増加をみとめ、同時にケトン体値の減少を観測した。これは摂食が大きく代謝を回復させたことを意味した。インスリン分泌能のある患者は摂食だけで代謝を改善させることがわかった。

サイトカインについては、TNF α , VEGFについての測定は透析によって大きく除去されることがわかった。CRP (C反応性蛋白) とIL6は透析中もほぼ一定に保たれ、共に分子量が大きいので透析による除去は行われなかったと思われる。今後測定数を増やして、DM, non DMによる差異について統計的な数値を得る(図4)。

IDPNを試行したDM患者は透析開始と同時にインスリンとアミノ酸補液を行った。その結果、血糖値は高めではあるが保持され、乳酸やアラニンなどは血中濃度を維持していた。筋肉崩壊のマーカーと言われる3メチルヒスチジンは減少していた。IDPNを行う前の半年と行ってからの半年の比較ではアルブミン値は有意に上がっていた(図5)。

4 考察

緑の里クリニックの今回の結果では、non DMでもDMでもおおむね摂食の有無で代謝が分かれ、摂食により正常な代謝に戻り、食事が無いときは長町クリニックのDM患者の代謝に似た様相を呈した。これは透析液の糖濃度が100 mg/dlと長町クリニックより低いので摂食の影響が大きいと思われるが、さらに詳細に検討する必要がある。

VEGFについてはすでに長町クリニック患者の測定でデータを得ている。図6に示すが、non DMでは透析中に減少したものが透析後に回復しており、DMでは低値のままで回復していない。これも血管病変との関連が示唆される⁹⁾が、緑の里クリニックでの予備的知見ではいずれも透析後半にVEGF値の回復は得られなかった(図4)。今後患者数を集めて測定解析を行う。

IDPNは本研究ではDM患者1例だけであるが、透析中に代謝物濃度を保持する効果は大きく、その効果は栄養指標であるアルブミン値も半年で回復し(図5)、総コレステロール値も増加したことに現れた。DM患者は各回の透析において血圧や血糖値が安定しないなどの問題や、中長期においても栄養障害などの問題もあるとされる。代謝異常を持ちサルコペニアに結びつく要素も抱えるDMにとって、IDPNのような透析開始時からの栄養補給は大きな意味のある治療になると考えられる。今後、患者例を増やして検討する。投与したアミノ酸が体に吸収されたか、またそれ以外のアミノ酸の変動を見ることは重要でありアミノグラ

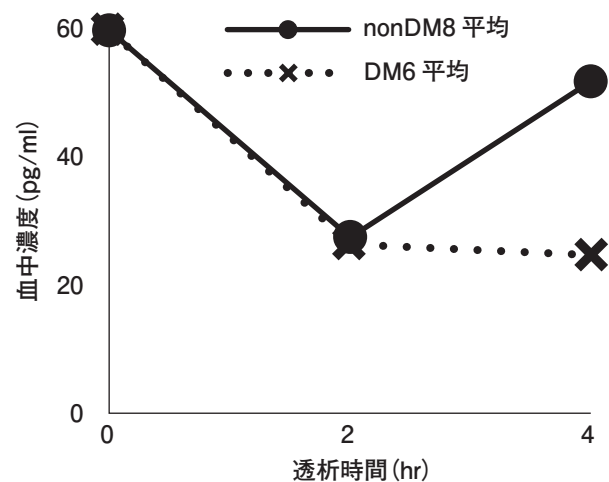


図6 血中 VEGF 時間変化

ム検討の必要があるだろう¹⁰⁾。

5 結 論

透析終了後や透析後半の補充でなく、透析開始時からインスリンと栄養補給を行う IDPN が効果を上げたことを考察すると、本法はサルコペニアを未然に防ぐ質の良い透析として糖尿病患者の予後改善に寄与する可能性を示した。

透析の合併症としての栄養障害については栄養素そのものの補給に限らず、各回の透析中において代謝系全体の恒常性を維持することを主眼とすることがよいと思われた。特にインスリン分泌能を欠いた DM 患者で透析は代謝系の大きな擾乱をもたらすため、除去される有用物質を速やかに補充を行うことで、代謝を常に正常な範囲に制御しておく透析治療が DM の予後改善の目標となることがわかった。

平成 27 年度日本透析医会公募助成により得られた成果は、今後原著論文として『腎と透析』誌に投稿予定であるため、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

文 献

1) 日本透析医学会統計調査委員会：図説 わが国の慢性透析

治療法の現況 2015. 日本透析医学会, 2016.

- 2) 小田巻真理, 吉田卓矢, 遠藤佑季乃: 血液透析患者におけるサルコペニアの成因と予後について. 透析会誌 2013; 46(1): 91-92.
- 3) Fujiwara M, Ando I, Takeuchi K, et al.: Metabolic responses during hemodialysis determined by quantitative ¹H NMR spectroscopy. J Pharm Biomed Anal 2015; 111: 159-162.
- 4) Fujiwara M, Ando I, Sato H, et al.: RECENT HAEMODIALYSIS INDUCES FASTING STATE DURING HAEMODIALYSIS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS. Nephrol Dial Transplant 2016; 31(suppl 1): i559.
- 5) Fujiwara M, Kobayashi T, Jomori T, et al.: Pattern recognition analysis for ¹H NMR spectra of plasma from hemodialysis patients. Anal Bioanal Chem 2009; 394: 1655-1660.
- 6) Ando I, Takeuchi K, Oguma S, et al.: ¹H NMR spectroscopic quantification of plasma metabolites in dialysate during hemodialysis. Magn Reson Med Sci 2013; 12: 129-135.
- 7) 椿原美治: 透析患者に対する薬の使い方. 蛋白・アミノ酸代謝異常. 腎と透析 2013; (増刊号): 619-625.
- 8) Ward RA, Shirlow MJ, Hayes JM, et al.: Protein catabolism during hemodialysis. Am J Clin Nut 1979; 32: 2443-2449.
- 9) 松原光伸, 真田 覚, 佐藤 博, 他: VEGF 刺激による特異的な腎血管病変. 腎と透析 2007; 63: 91-95.
- 10) 高井麻央, 山野内亘, 小川輝之, 他: IDPN 施行症例に於けるアミノ酸分析 (41 種類)—血漿アミノ酸濃度の変化とアミノ酸漏出量の検討—. 札幌社会保険病院誌 2010; 19(1): 36-40.