

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 ——

(平成 11 年度日本透析医学会学術研究助成報告書)

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

はじめに

維持透析患者の合併症として、とりわけ長期症例において心・血管系障害が多い。また、透析患者の死因として、心不全、虚血性心疾患、脳血管障害などが上位を占めており、これら心・血管系合併症の成因には動脈硬化が深く関わっていることが知られている¹⁾。一方、慢性腎不全における動脈硬化の進展には、糖尿病や高血圧などの原疾患の関与、高脂血症の合併、尿毒症毒素や透析療法自体の影響、異所性石灰化など様々な要因の関与が指摘されている²⁾。以上の点から、維持透析患者の QOL の改善や生命予後の向上のために、動脈硬化の進展抑制は不可欠であるが、十分な成果の得られる治療法がないのが現状である。

近年、新しい動脈硬化進展因子として、advanced glycation end-products (AGEs) や活性酸素をはじめとする、いわゆる酸化ストレスの関与が報告され、いくつかの検討がされている。この点についても維持透析患者は、基礎疾患や腎不全としての病態、さらには透析療法自体により、常に酸化状態に曝されているといわれている³⁾。

新しく酸化ストレスのマーカーとして low density lipoprotein (LDL) 分画中の酸化 LDL (Ox-LDL) や malondialdehyde (MDA) の測定が可能となり、動脈硬化あるいは酸化状態の評価において有用とされ始めている⁴⁾。一方、酸化ストレスを緩和する抗酸化薬としてビタミン E の有効性は従来より報告されて

いるが、近年さらに新しくビタミン E を固定化したダイアライザー (Excebrane, 以下 EX 膜) が開発され、すでに臨床応用された報告では、良好な抗酸化効果が認められている⁵⁾。今回われわれは、維持透析患者における酸化ストレスの状態を各種臨床検査や Ox-LDL 分画を用い、評価検討し、さらに動脈硬化進展抑制の一助として、酸化ストレス緩和の有効性を検討する目的で、EX 膜とほかのダイアライザーとの酸化ストレスへの影響を比較検討した。

1 対象および方法

対象は三豊総合病院において外来維持透析療法中の患者 47 例である。このうち男性が 12 例、女性が 35 例であり、全例に本研究に参加することのインフォームド・コンセントを得た。基礎疾患として非糖尿病性腎不全 42 例であり、糖尿病によるものが 5 例であった。平均年齢は 66.5 ± 13.4 (mean \pm S.D.) 歳、透析期間は平均 108.3 ± 86.1 (mean \pm S.D.) カ月で、ともに非糖尿病群と糖尿病群で有意な差は認めなかった。血液透析は週 3 回、1 回 4 時間を原則とし、透析液はキングリー AF-2 号液を使用、透析液流量は 500 ml/分であった。週始めの透析前後において血液サンプルを採取し、透析前の血清総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロールと透析前後の Ox-LDL 分画を測定した。LDL コレステロールについては、“LDL コレステロール” = “総コレステロール” - “HDL コレステロール” - “中性脂肪/5” として算出した。

LDL分画は、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、LDL 分画中の MDA-LDL は過酸化脂質テストワコー (和光純薬, 大阪) を用いた TBA 法にて測定した。

以上の測定結果をもとに、基礎疾患や年齢、透析歴と Ox-LDL および MDA-LDL の関係、透析前の各種血清脂質と Ox-LDL および MDA-LDL の関係、透析前後での Ox-LDL と MDA-LDL の推移について検討した。さらに透析前後での酸化 LDL 分画の変化を EX 膜 (クリランス E, テルモ社製, 東京) を使用している症例とそのほかの従来型のダイアライザーを使用している症例に群別して、比較検討した。

成績はすべて mean±SD で表示し、統計学的検討には、linear regression analysis および Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

2 結果

透析前に測定された血清総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロールおよびこれらより算出された LDL コレステロールと Ox-LDL, MDA-LDL の値を表 1 に示した。それぞれ基礎疾患による有意な差は認めず、男女間でも有意な差を認めなかった。

つぎに Ox-LDL 分画と年齢、透析歴との関係を検討したところ、Ox-LDL および MDA-LDL とともに、年齢、透析歴との間に有意な相関関係を認めなかった (図 1, 2)。また、Ox-LDL および MDA-LDL と血清総コレステロールや中性脂肪、HDL コレステロール、LDL コレステロールとの間にもいずれも有意な相関関係を認めなかった (図 3, 4)。

透析前後の Ox-LDL および MDA-LDL の推移については、Ox-LDL が透析前 2.99 ± 2.00 ng/ μ g LDL protein より透析後 4.62 ± 2.41 ng/ μ g LDL protein と透析後において有意に増加した。健常コントロール群での Ox-LDL の正常値は 0.50 ng/ μ g LDL protein 以下とされており、今回対象となった透析患者において、透析前後の値はともに高値であった。MDA-LDL については、透析前 5.15 ± 1.14 nmol/mg LDL protein より透析後 5.53 ± 1.45 nmol/mg LDL protein と透析後において有意に増加した。

表 1 各種血清脂質および酸化 LDL 値

Patients (n=47)	T-Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-Chol (mg/dl)	HDL-Chol (mg/dl)	Ox-LDL (ng/ μ gLDLprotein)	MDA-LDL (nmol/mgLDLprotein)
Total	166.7±29.4	122.5±59.1	95.4±24.8	46.9±12.8	2.99±2.00	5.15±1.14
non-DM (n=42)	165.4±30.3	116.6±54.3	94.6±25.6	47.5±12.2	3.05±2.00	5.13±1.11
DM (n=5)	177.6±20.6	172.2±80.0	102.0±17.8	41.2±17.6	2.55±2.22	5.34±1.56

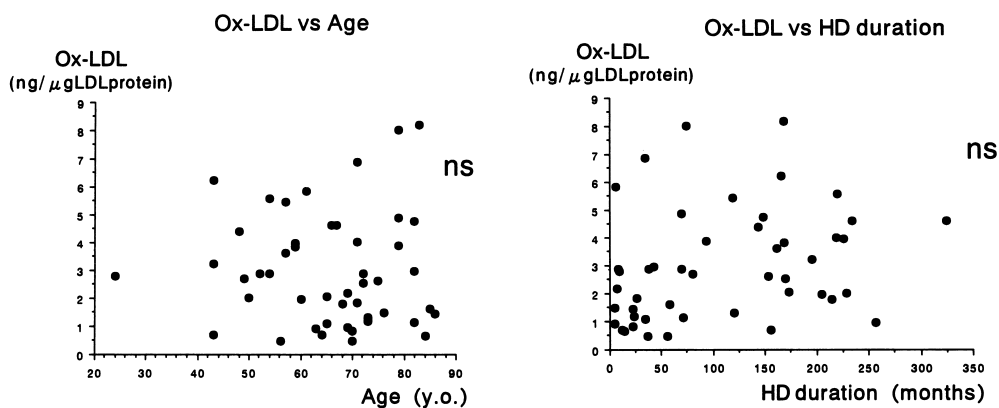


図 1 Ox-LDL と年齢および透析との関係

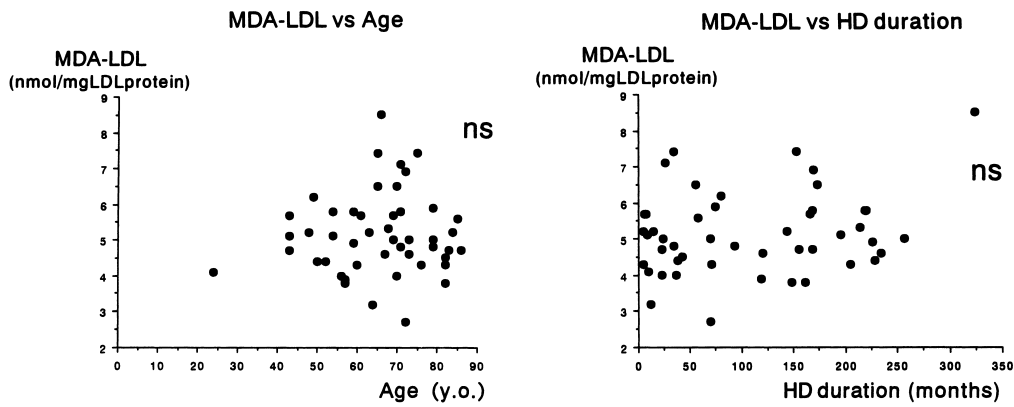


図2 MDA-LDL と年齢および透析歴との関係

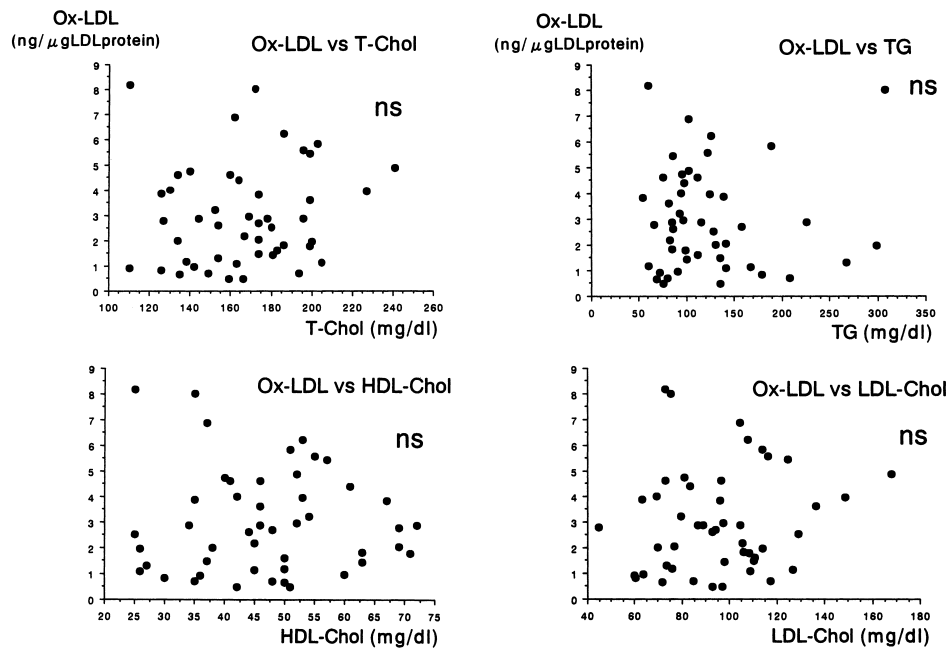


図3 Ox-LDL と各種血清脂質との関係

/mg LDL protein と透析後に有意に増加し、Ox-LDL と同様に健常コントロールの MDA-LDL の正常値は 3.80 nmol/mg LDL protein 以下であることから、ともに今回の結果は高値であった (図 5)。

つぎに新しく開発されたビタミン E 固定化ダイアライザー、EX 膜の抗酸化作用を評価する目的で、EX 膜使用症例と従来型のダイアライザーが使用されている症例の Ox-LDL および MDA-LDL を比較検討した。従来型のダイアライザーは、エバール膜 19 例、セルローストリアセート膜 7 例、ポリメチルメタクリレート膜 7 例、ポリスルホン膜 6 例が使用されており (計 39 例)、EX 膜は 8 例であった。透析前後での Ox-LDL および MDA-LDL のダイアライザーによる比較は、透析前において EX 膜の Ox-

LDL が 1.62 ± 0.83 ng/ μ g LDL protein であり、従来型の膜は 3.28 ± 2.06 ng/ μ g LDL protein と EX 膜のほうが有意に低値であった。透析後は EX 膜が 3.05 ± 1.43 ng/ μ g LDL protein であり、従来型の膜が 4.95 ± 2.45 ng/ μ g LDLprotein とやはり EX 膜において有意に低値であった。また、これらの数値は透析後において EX 膜、従来型の膜ともに透析前より有意に増加した。MDA-LDL については、透析前において EX 膜が 4.75 ± 1.27 nmol/mg LDL protein、従来型の膜が 5.23 ± 1.11 nmol/mg LDL protein であり、有意な差を認めなかった。透析後においても EX 膜が 5.18 ± 1.74 nmol/mg LDL protein、従来型の膜が 5.61 ± 1.41 nmol/mg LDL protein であり、有意な差を認めなかった。しかし、これらの数値は透

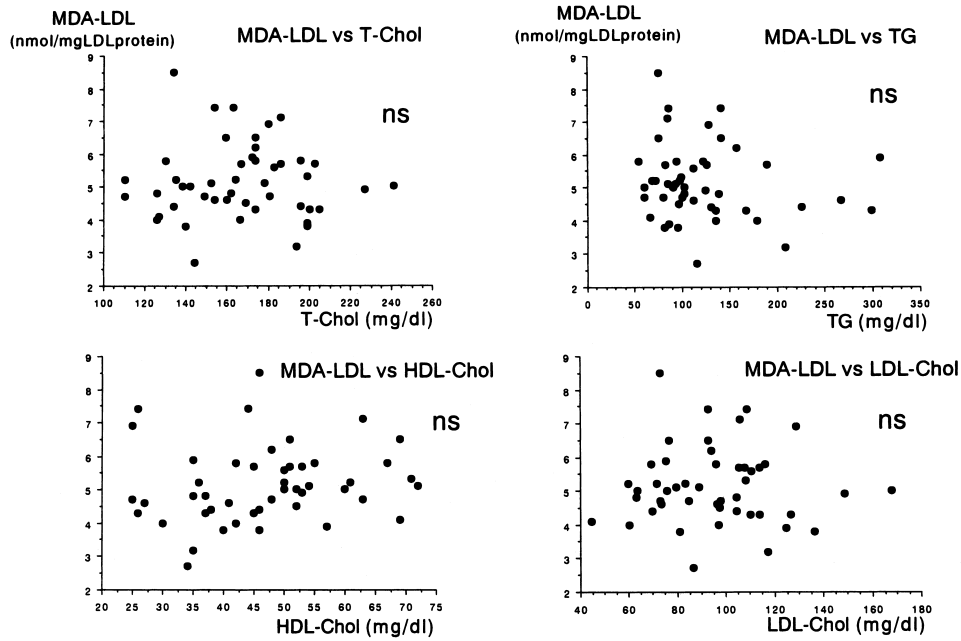


図4 MDA-LDLと各種血清脂質との関係

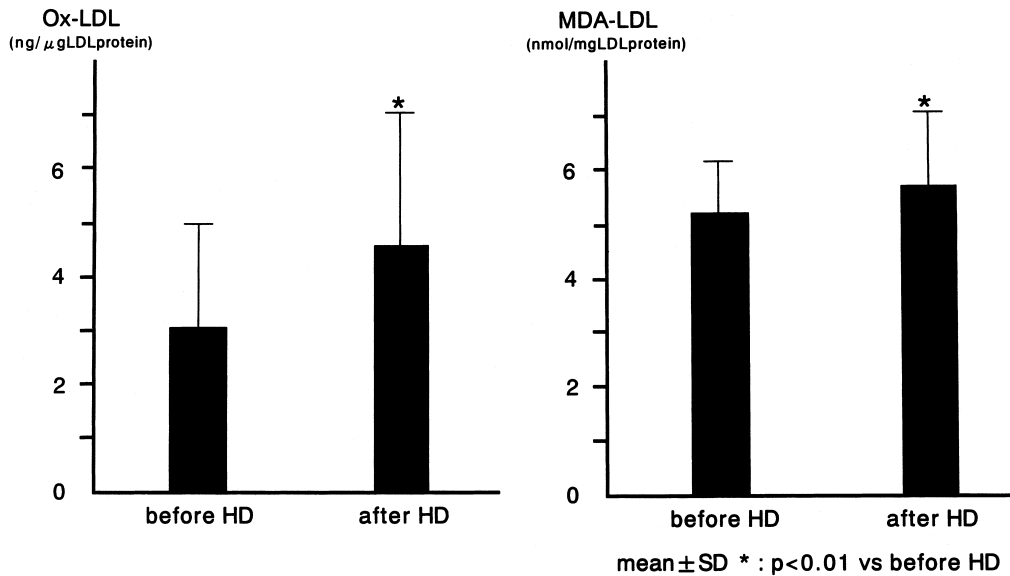


図5 Ox-LDLおよびMDA-LDLの透析による推移

析後においてEX膜、従来型の膜ともに透析前より有意に増加した(図6)。

3 考察

活性酸素により生成されたOx-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、泡沫細胞を形成する。これが動脈硬化の進展に影響すると考えられている^{3,6)}。したがって、Ox-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。板部らにより作製されたOx-LDLに

対するモノクローナル抗体を使用することで、Ox-LDLの測定が可能となった⁷⁾。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。しかし、動脈硬化進展の一つのマーカーである血清脂質について維持透析患者では栄養状態などから正常ないしは低下していることが多いといわれており、血清学的に動脈硬化を把握することは困難である。そこで今回われわれは、維持透析患者の動脈硬化および酸化ストレスを評価する目的でOx-

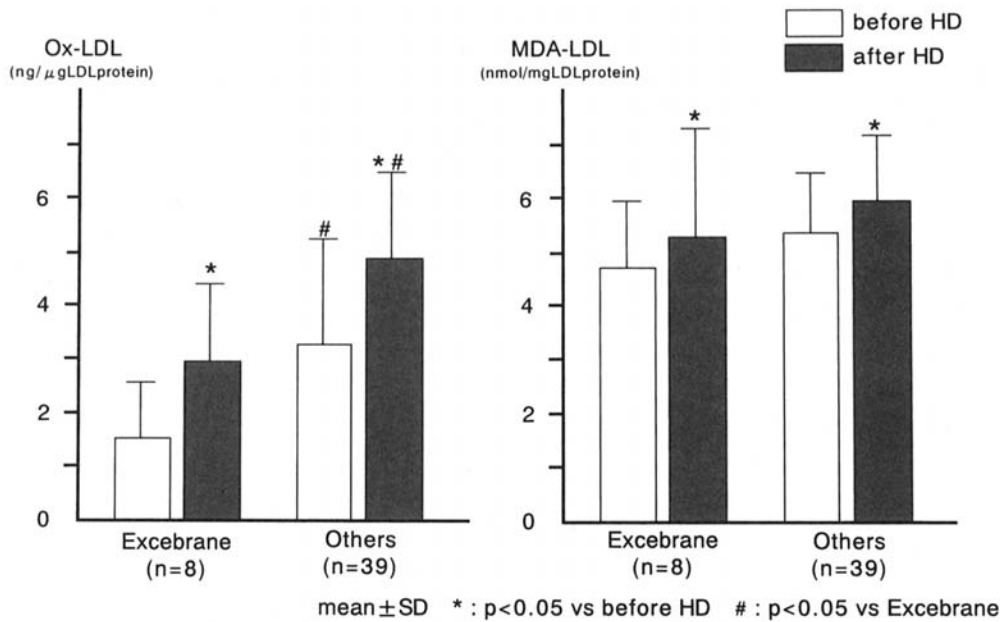


図6 Ox-LDL および MDA-LDL の透析膜による変動の比較

LDL および MDA-LDL を測定した。今回測定された Ox-LDL は LDL 分画中の約 20% を占めるリン脂質の中に含まれており、また MDA-LDL も従来より測定されている血漿中の MDA ではなく、LDL 分画中の MDA を測定した。

今回対象となった維持透析患者の血清脂質はすべて正常範囲内であったが、Ox-LDL および MDA-LDL ともに健常コントロール群で報告されている正常上限値より高値であった。47 症例中、18 例において過去に心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化によると思われる血管障害を併発しており、これらの病態が Ox-LDL および MDA-LDL に反映されたものと考えられた。さらに、これらの数値は透析によりさらに増加したことより、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る。一方、Ox-LDL および MDA-LDL は各種血清脂質とは相関せず、動脈硬化を評価する上で独立した因子であるといえる。また、性別、年齢、基礎疾患、透析歴とも相関関係を認めなかった。Ox-LDL および MDA-LDL が健常コントロールより高値であり、さらに透析により増加するにもかかわらず、年齢や透析歴とは相関しなかった理由は、今回の検討からは明らかでない。しかし、症例の選定にあたって、抗酸化薬といわれているビタミン E および C、プロブコールなどの服用歴は確認されておらず、今後の検討を要するものと思われた。

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 E などの抗酸化薬の有用性が報告されている^{8,9)}。また、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より指摘されており、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。近年開発された EX 膜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おり、抗酸化能が期待されている⁵⁾。今回の成績より、ほかの従来型のダイアライザーと比較し、EX 膜の長期使用において、Ox-LDL は透析前後において有意に低値であり、EX 膜による抗酸化能が確認された。しかし、抗酸化能による動脈硬化進展抑制については不明であり、今後の検討を要する。また、今回はあくまでも後ろ向き調査であり、今後はクロスオーバー試験を含めたさらなる検討を予定している。

4 結 語

- ① 維持透析患者において Ox-LDL および MDA-LDL ともに健常コントロールに比し有意に高値であり、透析によりさらに上昇した。
- ② Ox-LDL および MDA-LDL ともに性別、年齢、基礎疾患、透析歴、各血清脂質との間には相関関係は認めなかった。
- ③ ダイアライザーによる比較では、Ox-LDL においては、ほかの従来型の膜に比し、EX 膜で有意に低値であったが、MDA-LDL では透析膜に

よる差を認めなかった。

本論文の要旨は、第45回日本透析療法学会学術集会において発表した。

文 献

- 1) わが国の慢性透析療法の現況. 日本透析医学会, 1997.
- 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, p55, 1994.
- 3) Tetta C, Biasioli S, Schiavon R, et al: An overview of hemodialysis and oxidant stress. *Blood Purif*, 17; 118, 1999.
- 4) Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, et al: Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res*, 37; 45, 1996.
- 5) 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.
- 6) Holvoet P, Perez G, Zhao Z, et al: Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest*, 95; 2611, 1995.
- 7) 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.
- 8) 大谷晴久, 湯川 進: 腎疾患と抗酸化物質. 臨床栄養, 92; 381, 1998.
- 9) 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.