

腎不全腹膜透析ラットに対するピリドキサミン内服の腹膜機能保護作用の検討

森 良孝*¹ 角田隆俊*¹ 都川貴代*¹ 竹腰 進*² 湯澤公子*³ 小林広幸*⁴ 川上 純*⁵
宮田敏男*⁶ 深川雅史*¹

*1 東海大学医学部腎内分泌代謝内科 *2 東海大学医学部病態生理学 *3 東海大学医学部神経内科 *4 東海大学医学部臨床薬理学
*5 長崎大学大学院展開医療科学講座 *6 東北大学大学院分子病態治療学分野

key words : 腹膜, AGEs, GDPs, 血管新生, 腹膜機能

要 旨

【目的】 腹膜透析は血液透析に並ぶ腎代替療法であるが、透析液中のブドウ糖分解産物 (GDPs) などによる慢性的な刺激により腹膜機能が低下し、除水不全と腹膜硬化症への進展の懸念から数年で中止せざるをえないという問題点がある。我々は以前、ピリドキサミン (PM) の経腹腔投与で腹膜機能不全を抑制しうることを報告したが、PM 内服によっても改善しうるかどうか検討した。

【方法】 5週齢のSDラットをおよそ7匹ずつ、以下の5群に分けた。sham (腎摘 (-), 腹膜透析 (-)), Nx10 (腎摘 (+), 腹膜透析 (+) (メチルグリオキサール (MG) 10 mM 添加)), Nx10Pyr (Nx10にPM 15 mg/個体/日内服追加), Nx20 (腎摘 (+), 腹膜透析 (+) (メチルグリオキサール (MG) 20 mM 添加)), Nx20Pyr (Nx20にPM 15 mg/個体/日内服追加)。腎摘は5/6腎摘を左腎全摘, 右腎1/3摘出を1週間の間隔をおいて2回で行った。腹膜透析は埋没カテーテルより、1日2回、3週間行い、腹膜劣化を強めるためにMGを10 mM, 20 mM追加した。PM内服は連日1日1回ゾンデで強制内服投与した。各々の腹膜機能と、組織学的変化を比較検討した。

【結果】 透析液投与によって壁側腹膜の腹膜下層には線維化組織が生じ、かつ、MGの濃度に比例して肥厚が強くなった。PMに内服によって10 mM群にお

いてのみ有意に肥厚が改善した。免疫組織学的検討では、透析液投与群で腹膜下層のTGF β 1, FGF2, VEGF陽性細胞が増加した。VEGFA陽性細胞数はPM内服によってMG 20 mM群では有意に減少し、MG 10 mM群では減少の傾向があった。TGF β 1, FGF2陽性細胞には有意差は認めなかった。腹膜下層の血管の密度は10 mM群においてPM内服で有意に改善したが、VEGFAのmRNA発現の改善は認めなかった。腹膜機能はNx10でD/Pクレアチニン 1.03 ± 0.01 , Nx10PyrでD/Pクレアチニン 0.78 ± 0.03 と有意に改善した。MG 20 mMでも同様に改善が認められた。腹膜機能の改善と最も強い相関があった組織学的パラメーターは血管の密度であった ($R=0.60$, $p=0.01$)。

【結論】 PM内服によっても腹膜機能低下抑制を確認できた。腹膜機能低下抑制と最も強い相関を認めたのは壁側腹膜の、腹膜下層の血管の密度であった。すなわち、いわゆる有効血管床増加を抑制することによって腹膜機能低下を抑制したものと考えられる。

1 目 的

腹膜透析は血液透析に並ぶ腎代替療法であるが、透析液中のブドウ糖分解産物 (GDPs) や、それによって生じるペントシジンなどの最終糖化産物 AGEs などによる慢性的な刺激により腹膜機能が低下し、除水不全と腹膜硬化症への進展の懸念から数年で中止せざるをえないという問題点がある。我々は以前、ピリドキ

サミン (PM) の経腹腔投与で腹膜機能不全を抑制し
 うることを報告した (2005年, 角田ら). PM 内服に
 よっても腹膜機能悪化を抑制しうるかどうか検討した.

2 方法

5週齢のSDラットを以下の5群に分けた. sham
 (腎摘 (-), 腹膜透析 (-)) (n=6), Nx10 (腎摘
 (+), 腹膜透析 (+) (メチルグリオキサール (MG)
 10 mM 添加)) (n=6), Nx10Pyr (Nx10 に PM 15
 mg/個体/日内服追加) (n=7), Nx20 (腎摘 (+),
 腹膜透析 (+) (メチルグリオキサール (MG) 20 mM
 添加)) (n=5), Nx20Pyr (Nx20 に PM 15 mg/個体/
 日内服追加) (n=7). 腎摘は 5/6 腎摘を左腎全摘, 右
 腎 1/3 摘出を 1 週間, 間をおいて 2 回で行った. 腹膜
 透析は埋没カテーテルより, 1 日 2 回, 3 週間行い,
 腹膜劣化を強めるために MG を 10 mM, 20 mM 追加
 した. PM 内服は連日 1 日 1 回ゾンデで強制内服投与
 した. 概要を [図 1](#) に示す.

MG の濃度については, 他の研究をもとに, まず,
 5 mM で同様の試験を行ってみたものの, 腹膜透析液
 のみで行った場合とあまり差がなかったため, 10 mM
 と 20 mM を中心に実験を再度行った.

腹膜機能検査は最終日に, PM を内服させて 1 時間
 後に腹膜透析液を注入し, 30 分, 60 分時点での D/P
 クレアチニンと D/P 尿素窒素, G30/G0 グルコース,
 G60/G0 グルコースを行った. その後屠殺し, 組織の
 採取を行った.

腹膜の形態的变化・線維化等を見るために壁側腹膜,
 肝臓, 血管増生等の変化の観察のため, 腸間膜の HE
 染色, マッソントリクローム染色を行った (1 回目の

実験の結果, 腸管の腹膜は部位による変化のばらつき
 が大きい, 剥離しやすいなどの理由で評価に適さないと判断した).

線維化のマーカーである TGFβ1, FGF2, 血管のマ
 ーカーである VEGFA, Aminopeptidase P, リンパ管
 のマーカーである podoplanin 等の免疫組織学的検討
 を行った.

腸間膜組織の TGFβ1, FGF2, TNFα, VEGFA,
 VEGFC (リンパ系の増殖因子) の mRNA 発現を RT-
 PCR で検討したが, コントロールが強く発現してい
 るなど, 組織の選択に問題があると考え, 同じ遺伝子
 について Laser Microdissection (LCM) を用いてホ
 ルマリン固定, パラフィン包埋切片から採取した壁側
 腹膜の腹膜~腹膜下層組織で追加検討した.

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって血
 液, 60 分貯留後の腹膜透析液, 腸間膜組織のペント
 シジンの測定も行った.

3 結果と考察

ピリドキサミン内服 2 時間後には血中, 腹膜透析液
 中の pyridoxamine はともに 20,000 ng/ml まで上昇し
 た ([図 2](#), [図 3](#)).

透析液投与によって壁側腹膜の腹膜下層には線維化
 組織が生じ, かつ, MG の濃度に比例して肥厚が強
 くなった. PM に内服によって 10 mM 群においてのみ
 有意に肥厚が改善した ([図 4](#)).

免疫組織学的検討では, 壁側腹膜の腹膜下層の
 VEGFA 陽性細胞数が sham に比べて透析液投与群で
 は増加した. PM 投与によって MG 20 mM 投与群で
 は有意な改善を認めた ([図 5](#)). TGFβ1, FGF2 につい

Weeks	6	7	8	9	10	11	12	13	
Group1 (N=7)	tame period	5/6Nx	Standard Food	Rat-o-port	blood sampling, PET, peritoneal tissue biopsy				PD(-)
Group2 (N=7)									PD(+MG10mM)
Group3 (N=7)									PD(+MG10mMPyr50mg/body)
Group4 (N=7)									PD(+MG20mM)
Group5 (N=7)									PD(+MG20mMPyr50mg/body)

図 1 実験プロトコール

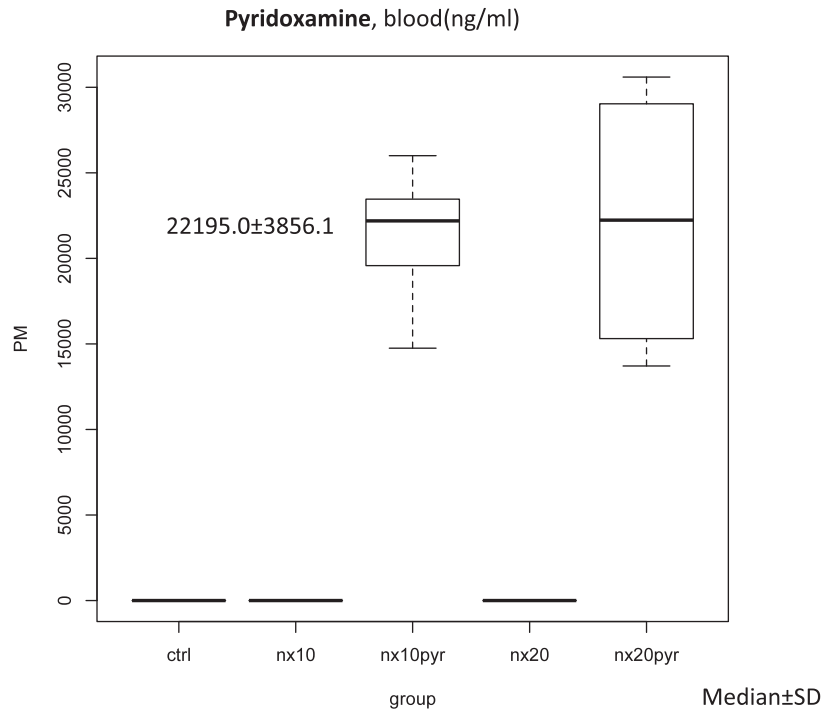


図2 ピリドキサミン内服2時間後の pyridoxamine 血中濃度
Ctrl = sham

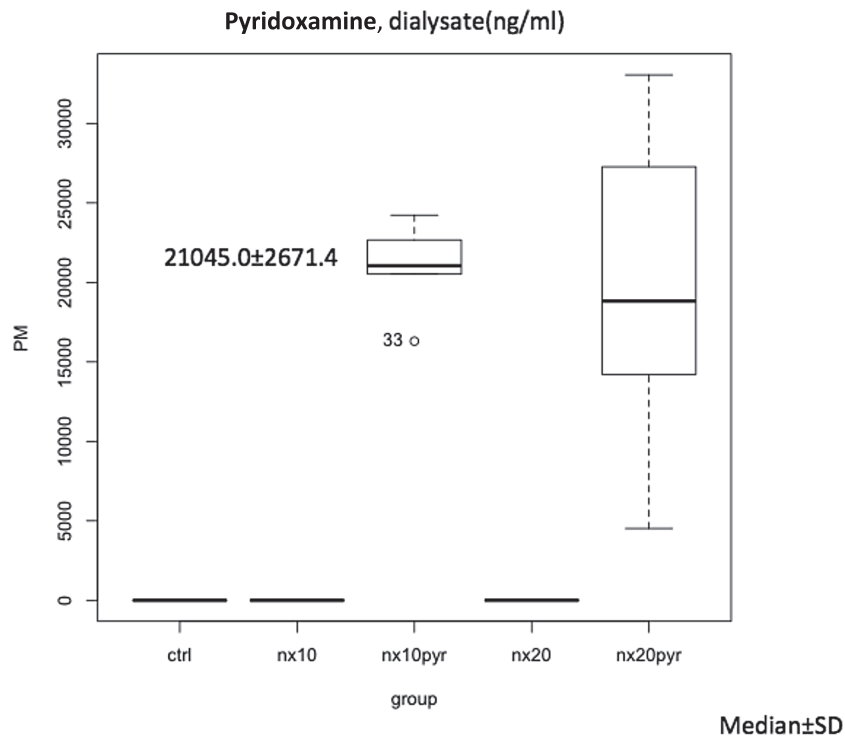


図3 ピリドキサミン内服2時間後の pyridoxamine の腹膜透析液排液中濃度
Ctrl = sham

では sham と比較して腹膜透析液投与群に陽性細胞数の増加を認めたが、PM 投与による改善は認めなかった。

腹膜下層中の血管数は腹膜透析液投与群は sham と

比較して増加を認めた。しかし PM 内服と非内服間に差は認めなかった。血管の断面積を腹膜下層の面積で除した密度においては MG 10 mM 群で PM 投与により有意に減少を認めた (図6)。腸間膜の位置面積あた

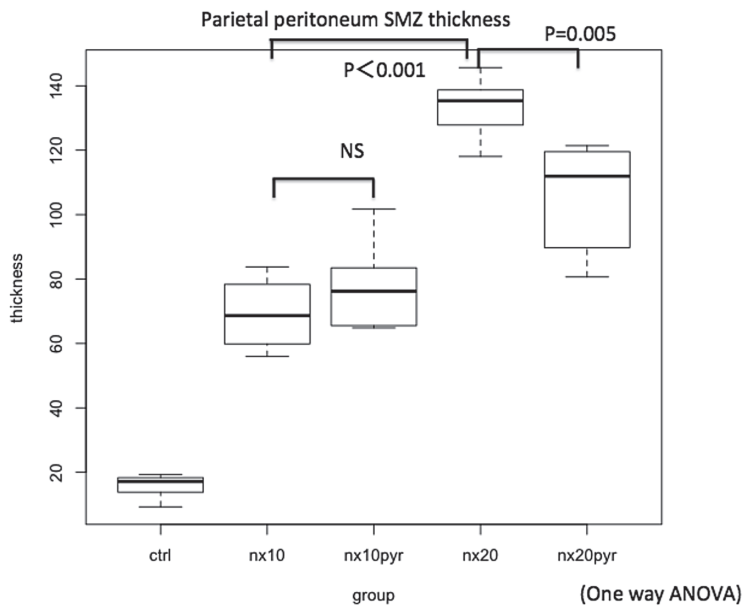


図4 腹膜下層の肥厚 (μm)
Ctrl = sham

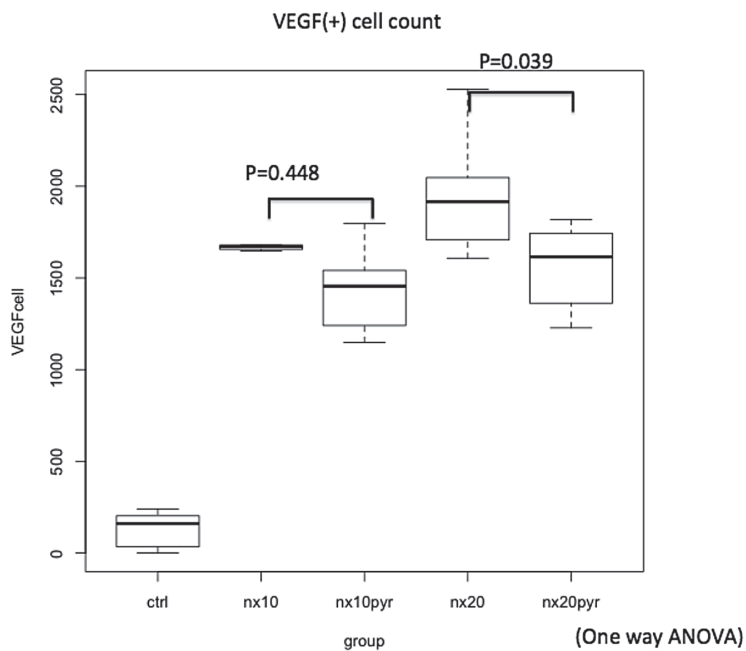


図5 腹膜下層中の VEGFA 陽性細胞数 (/mm²)
Ctrl = sham

りの血管数でも MG 10 mM 群で有意に減少を認めた。

LCM を用いてホルマリン固定，パラフィン包埋切片より採取した壁側腹膜 + 腹膜下層の mRNA 発現を確認したが，sham に比べて透析液投与群の発現上昇は認めるものの，PM による発現低下は認めなかった (図 7)。

腹膜機能検査では貯留後 30 分後の D/P クレアチニン (図 8)，D/P 尿素窒素で有意に PM による改善を

認めた。60 分貯留では MG 10 mM 群のみ，PM 投与による改善が有意であった。

D/P クレアチンと最も強く相関するのは組織学的パラメーターのうち，腹膜下層血管密度であった (R = 0.603, p = 0.0003) (図 9)。

HPLC としては，血中のペントシジン量は MG 10 mM 群において有意に PM 内服群で減少したが，MG 20 mM 群では有意差がつかず，腸間膜のペント

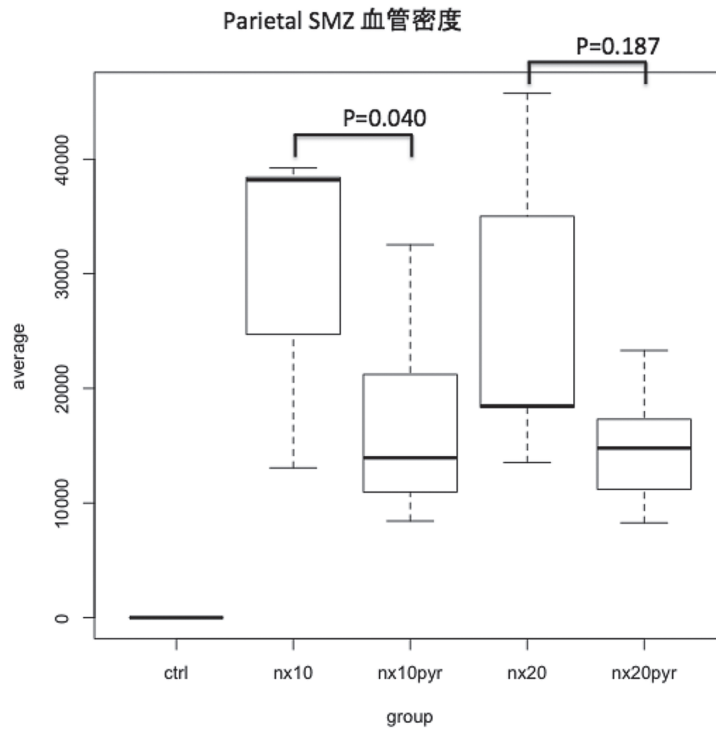


図6 腹膜下層中の血管の密度 (nm²)
Ctrl = sham

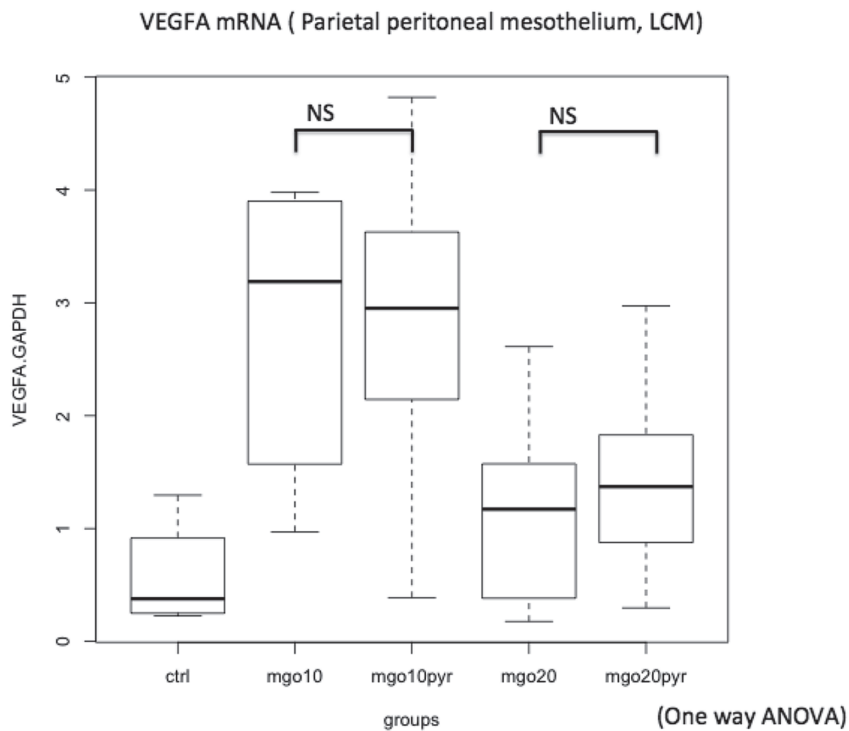


図7 壁側腹膜の腹膜下層の VEGFA/GAPDH mRNA 発現
Ctrl = sham

シジン量も PM 内服の有無で差がつかなかった。
まとめると、PM 内服によって腹膜透析液腹腔内投与によって障害された腹膜機能が改善した。線維化や炎症の評価では PM 内服の有無による差は少なく、血

管密度の増加抑制が最も相関があった。PM の腹膜機能劣化抑制はこのモデルにおいては血管新生、血管拡張の抑制が最も考えられた。ただし、VEGFA の mRNA 発現には差を認めず、NOS など、その他の考

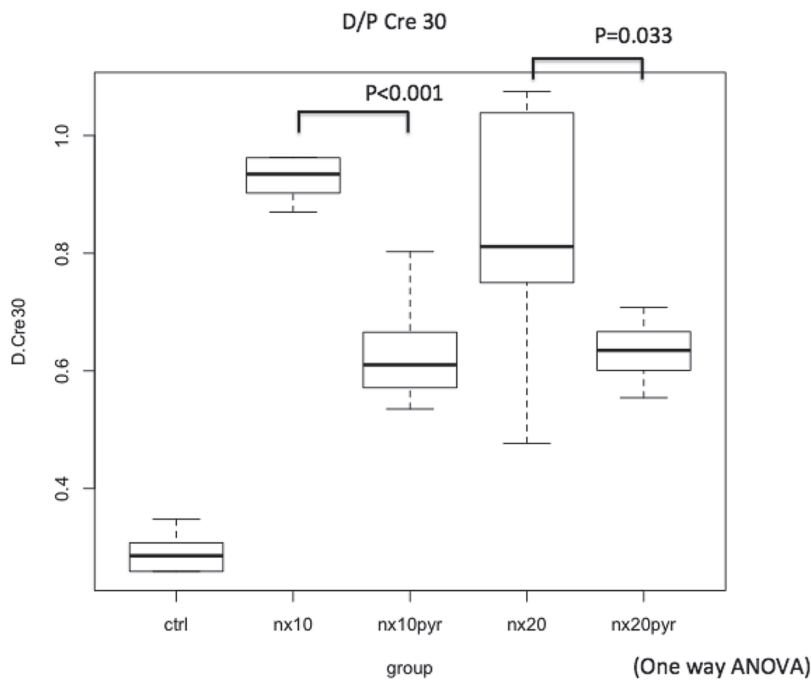


図8 30分貯留でのD/Pクレアチニン
Ctrl = sham

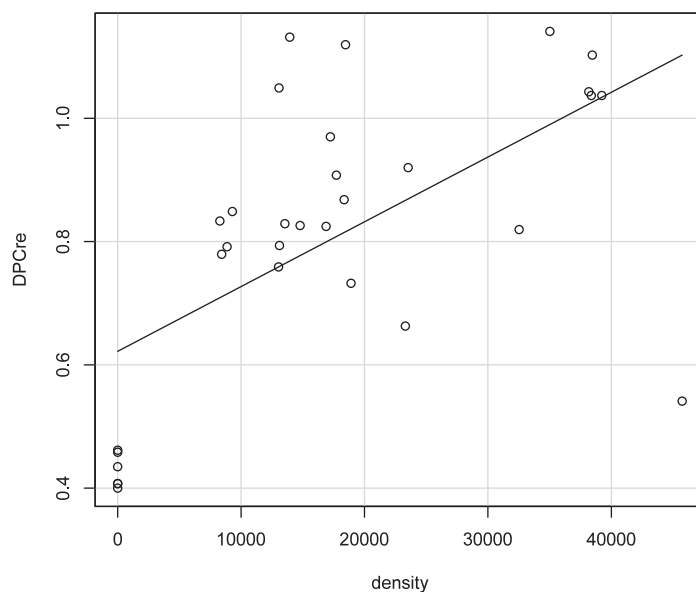


図9 D/Pクレアチニンと腹膜下層の血管密度の相関図

えられる機序についても、今回の実験では評価できていない。

4 結論

PM内服によっても腹膜機能低下抑制を確認できた。腹膜機能低下抑制と最も強い相関を認めたのは壁側腹膜の、腹膜下層の血管の密度であった。すなわち、いわゆる有効血管床増加を抑制することによって腹膜機能低下を抑制したものと考えられる。その機序につい

ては、さらなる検討が必要である。

この研究は平成23年度日本透析医学会公募研究助成によってなされました。

なお、本研究報告の詳細は、Mori Y, Kakuta T, Miyakogawa T, et al. : Effect of scavenging circulating reactive carbonyls by oral pyridoxamine in uremic rats on peritoneal dialysis, Ther Apher Dial 2016; 20(6) : 645-654 において掲載済みです。