

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700392

研究課題名 (和文) 一酸化窒素計測の直接計測による腹膜透析患者の新規病態診断の開発

研究課題名 (英文) Development of new diagnostics and therapeutics of peritoneal dialysate patients by direct measurement of nitric oxide measurement.

研究代表者

高山 綾 (TAKAYAMA AYA)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師

研究者番号：60413514

研究成果の概要：長期の持続式携帯腹膜透析 (CAPD) 患者の腹膜機能障害の原因として、一酸化窒素 (NO) の関与が推測されているが、いまだ明らかではない。今回、CAPD 透析液排液中の NO 濃度について、NO センサによる直接計測を検討し安定した計測結果が得ることができた。結果、透析液中に計測され得るレベルで NO が存在すること、患者によって透析液中 NO 濃度に大きな差があることなどが明らかとなり、CAPD 透析液中 NO と計測した関連物質の面から、長期 CAPD 時の腹膜機能変化メカニズムにおける NO の関与の解明および CAPD 患者の腹膜機能の定量的評価が可能になり得るものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,500,000	210,000	2,710,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学

キーワード：生体工学・生体情報計測・腹膜透析 (CAPD)・一酸化窒素・NO センサ・透析液

1. 研究開始当初の背景

我が国では糖尿病をはじめとする生活習慣病の患者数の増加および人口構成の高齢化に伴い、慢性腎不全による透析患者数は年々増加傾向にある。血液透析患者が約 27 万人、持続式携帯腹膜透析 (CAPD) 患者が約 1 万人いるが、長期 CAPD 患者は、経年的な腹膜機能の低下のために、5～10 年程度で血液透析治療に移行するケースが多く、CAPD を維持するために、腹膜機能低下の原因の解明は、多くの CAPD 患者の治療効果の向上、さらには QOL の改善に貢献すると考えられる。

腹膜機能の低下、すなわち腹膜中皮細胞の障害の原因の一つとして、一酸化窒素

(nitric oxide: NO) の産生・代謝の異常が考えられている。NO は、正常な状態では血管弛緩作用、血小板凝集抑制など様々な生理学的な調節機能を果たしているが、生活習慣病などの病態において、活性酸素種の増加によって、NO の生理活性の低下が知られている。一方、炎症部位などにおいては、免疫的な防御反応として NO が過剰に産生されることもあり、こうした NO 産生・代謝の変動が腹膜機能を徐々に低下させる一因になっていると推測されている。しかし、NO はラジカル分子として非常に反応性が高く、実際の計測に基づく動態評価は極めて困難であり、NO の関与を解明・検証することは方法論的に困難で

あった。そこで本研究では、透析液中の NO 濃度のモニタリング方法を開発し、CAPD における NO の動態を明らかにして、腹膜機能の低下における NO の関与を解明し、機能維持あるいは改善を図りたいと考える。

2. 研究の目的

これまで NO の計測については、ラジカル分子としての高い反応性などのために、生体内における計測は、ほぼ不可能と考えられてきた。特に血中においては、酸化ヘモグロビンによって、NO は瞬時に酸化され、血中では NO は計測されないとみなされてきた。しかし、今回使用する in vivo 計測用 NO センサは、血中でも NO が計測され得るレベルで存在することが報告されたセンサーシステムである。

NO 動態の評価方法としては、従来、NO の酸化生成物である NO 酸化物 (NO_x)、亜硝酸イオン (NO₂⁻)、硝酸イオン (NO₃⁻) の濃度計測の結果から NO 動態の推測が主であり、CAPD や血液透析における NO 関連の研究においても同様の方法がとられてきた。しかし、NO₂⁻、NO₃⁻ は、食物中にも含まれ、また透析患者においては腎からの排泄機能がないために、そのデータから NO 動態を正確に推測することは極めて困難である。そこで、上記の NO センサが適用可能であれば、本研究では、透析液中の NO 濃度のモニタリング方法を開発し、CAPD 患者の透析液排液中の NO を直接計測し、NO の動態を明らかとすることを目的とする。結果、腹膜機能低下における NO 関与の解明、そして腹膜機能維持あるいは改善を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

倫理委員会の承諾を得た後に、腎臓内科の主治医から文書と口頭による説明を行い、インフォームドコンセントを頂けた CAPD 外来患者 32 名 (男性 22 名、女性 10 名; 年齢: 31~79 歳) を対象とした。各患者の計測時点での透析期間は、3 ヶ月から 4 年 7 ヶ月であった。

使用した透析液は、バクスター社のダイアニール-N PD-4 1.5 (ブドウ糖濃度: 1.36 g/dl)、またはダイアニール-N PD-4 2.5 (ブドウ糖濃度: 2.27 g/dl)、テルモ社のミッドペリック L135 (ブドウ糖濃度: 1.35 g/dl) の 3 種類 (表 1) であり、使用透析液量は 1000~2000 ml であった。

(1) 計測方法の基礎的検討

CAPD 外来患者を対象として、外来時に行なわれる CAPD 透析液バッグ交換終了直後に排液を採取し、その中の NO 濃度の速やかな計測を可能とするシステムを考案する。そして、

排液サンプルを採取し、そのサンプル中に NO が計測し得るレベルで存在するか、複数の患者からのサンプルを対象にして検討する。ノイズの問題がある場合は、電磁シールドなどの対応をする。また、温度変化による見かけの NO 濃度の変化については、温度補正のためのキャリブレーションを実験前に実施しておき、それに基づいて補正を行う。

なお、サンプル採取については、CAPD 患者に十分な説明・同意を得た上で、廃棄する使用済み透析液から採取させて頂く。(倫理規定については、川崎医科大学附属病院・腎臓内科との協力により対応。)

(2) CAPD 透析液排液中の NO の直接計測

CAPD 患者の透析液排液中 NO 濃度については、これまで計測の報告がなく、データベースも存在しないため、まず複数の CAPD 患者から透析液排液を採取して、排液中 NO 濃度を計測し、NO 関連物質や酸化ストレスマーカーなどのパラメータと対応させ、透析液中 NO 濃度の腹膜機能評価パラメータとしての妥当性を検証する。

(3) NO 酸化物濃度や関連物質の計測および比較検討

NO の動態については、上記の通り、溶液中に安定して存在する NO 酸化物 (NO_x) 濃度の変化から推測されてきた。そこで、NO 自体の濃度変化と NO 酸化物濃度の変化とを比較させ、動態の対応を検討する。具体的には採取した使用済み透析液を保存しておき、亜硝酸イオンとグリース試薬とが反応して生ずるアゾ色素濃度を吸光度法により計測する。吸光度計測は、所有する専用計測器を使用する。また関連物質の BH₄ 濃度は HPLC 法によって計測した。

(4) 同一患者の NO 産生変動の検討

同一の患者が、来院される毎に計測を行い、同一対象においても日時による違い (時間帯、季節など) の有無を評価する。

(5) 腹膜透析能と NO 産生能との相関関係の検討 (総合評価)

NO 関連物質と NO 濃度変化を対応することで、CAPD 機能低下における NO の役割を解明する。

4. 研究成果

(1) 計測方法の考案

① NO センサ

透析液中の NO 濃度計測には、NO センサ (amiNO-700) と専用 NO モニタ (inNO-T) を使用した (米国 Innovative Instruments 社)。攪拌した生理食塩水 (50 ml) に、NO センサの感知部を浸して安定させた後、標

準液であるNO飽和水溶液をマイクロシリンジで5 μ l 注入し、NO酸化電流値を計測した(NO濃度: 190 nmol/l)。この結果から、NO 1 nmol/lあたりの電流値(pA)を求め、NO濃度に換算した。また、温度変化などの影響による計測電流値の変動をキャンセルアウトするために、温度補正を行なった。

② サンプル採取及び計測方法

自宅での液交換後5~6時間経たところで、透析液交換、すなわち透析液(使用済透析液)を排出し(排液所要時間: 20~40分、排液量: 1000~2200 ml)、新しい透析液を腹腔内に注入した。その後、注入した液を直ちに注入用透析バッグに戻した(交換直後透析液)。カテーテルから2つのバッグを外し、それぞれから計測用サンプル(使用済、交換直後)を採取した。そして、システム(図1)を用いて、サンプルを攪拌しながら使用済、交換直後の順に透析液中のNO濃度を速やかに計測できるシステムを考案した(図2)。

また、NO_x濃度は専用測定器、NOに関連する物質であるBH₄濃度はHPLC法によって計測した。

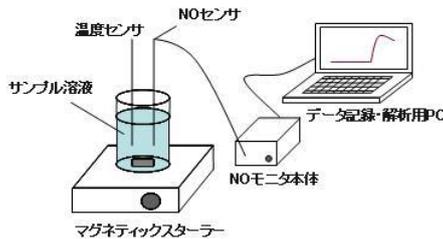


図1 透析液中NO計測システム

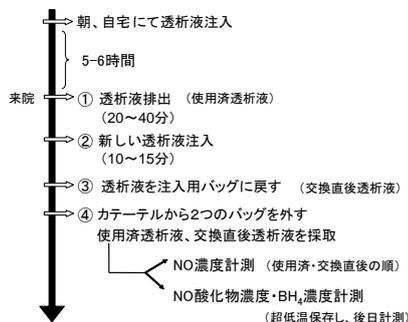


図2 サンプル採取からNO計測プロトコール

(2) CAPD透析液排液中のNO濃度の直接計測、および関連物質との比較検討

① NOセンサによって透析液中NO濃度の安

定した計測が可能であった。そして、サンプル中に計測され得るレベルでNOが存在することが明らかとなった(図3)。

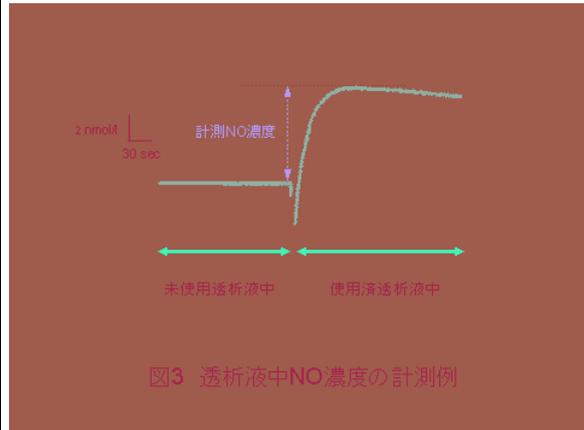


図3 透析液中NO濃度の計測例

② 使用済透析液中NO濃度は、交換直後透析液中NO濃度に比べて有意な高値を示した(図4) (5.0 \pm 0.7 vs. 1.9 \pm 0.3 nmol/l; $p < 0.01$)。以下の式に従ってNO濃度を補正し、基準化したNO量を求めた。

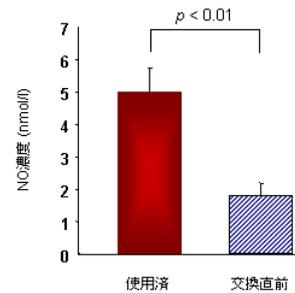


図4 交換前後の透析液中NO濃度

③ このNO量においても、使用済液と交換直後液との間には有意差が存在し (5.5 \pm 0.8 nmol/m² vs. 1.8 \pm 0.3 nmol/m²; $p < 0.01$)、両者の間には、正の相関関係が存在した ($r^2 = 0.62$; $p < 0.01$) (図5)。

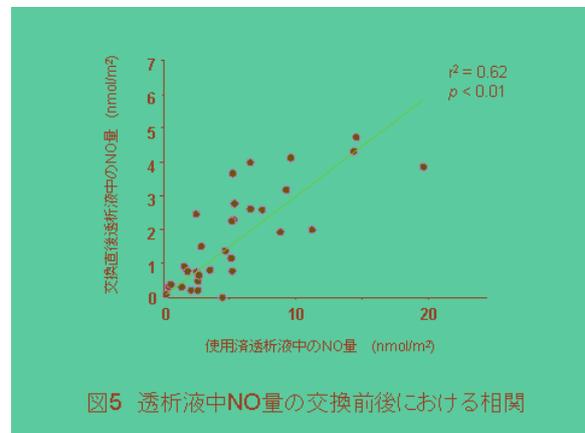


図5 透析液中NO量の交換前後における相関

④ NO量と透析期間の間には有意な相関関

係は見られず、また患者によってはNOとNOxの動態が異なるケースもあった(図6)。

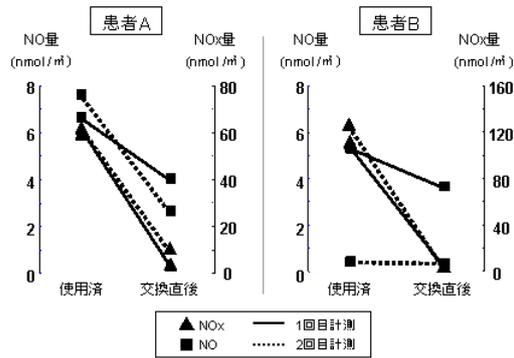


図6 透析液中NOおよびNOx量の液交換前後の比較

⑤ BH₄濃度についても使用済液の方が有意に高値であり(4.1±0.7 vs. 0.3±0.2 μg/ml; p<0.01)、基準化したBH₄量においても同様であった(4.7±0.9 vs. 0.3±0.2 μg/m²; p<0.01)。そして、BH₄とNOとの両者の間には有意な正の相関が見られた(図7)(r²=0.47; p<0.05)。

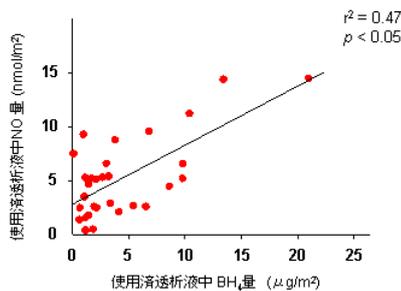


図7 使用済透析液中のNO量とBH₄の相関

(3) 同一患者のNO産生変動の検討

研究期間中の2年間にわたり、NOの直接計測を実施した患者6名における経時変化を示す(図8)。CAPD療法初期においては、NO量は低下傾向が見られたが、長期期間に及ぶに従って再び増加する傾向が見られた。

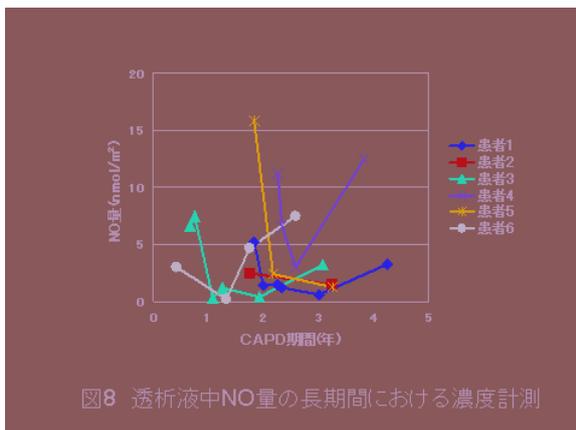


図8 透析液中NO量の長期間における濃度計測

(4) 考察

- ① 攪拌状態の透析液中のNOが安定して計測可能であり、計測され得るレベルでNOが存在することが明らかとなり、臨床レベルでの評価方法として適用可能であると考えられた。
- ② CAPD透析液中NO濃度は、腹腔内の滞留時間が長いほど高値を示したことから、腹膜組織およびその周辺組織からのNO産生が示唆された。
- ③ 透析年数によるNOの変動が報告されているが、本研究の患者群では有意な相関は見られなかった。各患者の病態や年齢などの影響が推測されるが、データ数が少ないことも関係していたと考えられる。
- ④ 図6に示された通り、CAPD患者によっては、NOとNOxの動態が異なる場合が見られた。NOは血圧・血流調節因子として全身的なホメオスタシスを保持するため、経時的にその産生が変化していると考えられ、図6に見られるように、患者Bの使用済透析液(2回目)のようにサンプルを採取した時点では、NOの産生が少なかった可能性が考えられる。また、その時点で、この患者体内の酸化ストレスが亢進していて、NOがROSと反応し、NOの有効濃度が低下した可能性も推測される。一方、いずれの患者も使用済透析液中のNOx濃度が高値を示したことから、CAPD中に産生されたNOが蓄積されていたと考えられる。しかし、NOxは食物や飲料水中にも含まれており、対象とした患者はNOx摂取量をコントロールした食事制限もしていないため、計測された全てのNOxがCAPD中に産生されたNOを反映したものとは言い難い。さらに、CAPD施行中のどの時点で産生されたNOであるかを推測することも困難である。したがって、従来からのNOx濃度に比べ、NOセンサによって計測されたNO濃度の方が、NO動態を評価する上でより正確な情報を与えてくれるものと考えられた。
- ⑤ NOとBH₄両者の間に正の相関が存在したことから、CAPDにおけるNO産生がBH₄の変動によって影響されていることが示唆された。CAPDにおけるNO産生が、BH₄のavailability(有効なBH₄量)の変動によって影響されていることが示唆された。BH₄はNO合成酵素(NOS)の補酵素としてNOの産生に関わっている。一方、BH₄の産生に関わる酵素群のGTP cyclohydrolase Iが、BH₄産生速度の律速段階となっていることが知られているが、この酵素の活性や発現量が患者毎に異なっていたことが推測される。また、BH₄は還元物質としての側面も持ってい

るが、酸化ストレスのレベルの違いにより、BH₄の酸化の割合が異なっていた可能性などが推測される。既往研究として、慢性腎不全患者においてBH₄の代謝の変化も報告されている。BH₄量が適当、つまり生理的な範囲にある場合には、生体内で適当な量のNOが産生されるが、BH₄量が不足するとNOSはNOSのsubunit同士の乖離状態、すなわちuncouplingとなり、NOではなく・O₂-を生成し、NOの不足、そして高酸化ストレス状態となる。その結果、腹膜の障害が進み易い状況になるものと考えられる。つまり、CAPD患者においてもBH₄濃度を生理的な範囲に保持しておくことが、肝要であると考えられた。

- ⑥ 以上の結果から、NOセンサによってCAPD透析液中のNO量の変動が評価可能であり、その変動にBH₄が関与していることが示された。NOセンサによるNO濃度の直接計測、BH₄濃度の計測は、腹膜機能の定量的評価、腹膜機能の変化へのNOの関与の解明などの有効な評価手段になり得ると考えられた。

(5) 今後の展望

今後は、同一患者において、より高頻度なNO計測や長期にわたるNO計測を行うことで、より詳細なNO動態を評価し、腹膜機能変動へのNOの関与をより掘り下げて検討していく必要があると考える。さらにCAPD患者に見られる、病態に関係していると推測されるNO以外の様々な関連因子(酸化ストレス・マーカー、NOSの阻害物質など)との関係の検討も必要となるであろう。その他、本研究のNOセンサが、血液透析(HD)など他の透析療法分野における新たな生体機能モニタリング法としての適用可能であるとも考えられ、今後の検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Seichi Mochizuki, Aya Takayama, Tamaki Sasaki, *et al.* "Direct measurement of nitric oxide concentration in CAPD dialysate," *Perit. Dial. Int.*, 29(1): 111-114 (2009), 査読有
- ② 高山綾、望月精一、矢田豊隆、小笠原康夫、他、“腹膜透析液中NOと関連物質の動態評価”、電子情報通信学会技術研究報告 IEICE Technical Report MBE2007-42, vol.107, No.154, pp.87-90 (2007)、査読無

[学会発表] (計4件)

- ① 高山綾、望月精一、矢田豊隆、佐々木環、

ほか、“CAPD透析液中NO濃度の直接計測と関連物質の関与の検討”、第53回日本透析医学会学術集会総会、2008.6.21、神戸国際会議場

② TAKAYAMA AYA, Mochizuki Seiichi, Sasaki Tamaki, *et al.* "Direct Measurement of Nitric Oxide and Tetrahydrobiopterin Levels in Peritoneal Dialysate", The 3rd Asian Chapter Meeting of the International Society for Peritoneal Dialysis, 2007.11.23, 広島国際会議場

③ 高山綾、望月精一、矢田豊隆、小笠原康夫ほか、“腹膜透析液中NOと関連物質の動態評価”、2007 Joint Congress of "the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and the 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs, 2007.10.28, 大阪国際会議場

④ 高山綾、望月精一、矢田豊隆、小笠原康夫、ほか、“腹膜透析液中NOと関連物質の動態評価”、日本生体医工学会MEとバイオサイバネティクス研究会、2007.7.21、徳島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 綾 (TAKAYAMA AYA)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師

研究者番号：60413514