

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500532

研究課題名（和文） 酸化修飾代謝物質制御による維持透析患者の運動機能障害に対する改善

研究課題名（英文） The improving effect of the redox capacity control upon maintainance hemodialysis patietnts' disability of locomotive function.

研究代表者

大橋 篤（OHASHI ATSUSHI）

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号：30310585

研究成果の概要（和文）：ビタミンE被服透析膜（VPS）を用いた血液透析療法による血漿タンパク質の酸化修飾抑制作用とSF36を用いたQOLの改善効果を検証した。その結果、VPSは、アルブミンのカルボニル化修飾を抑制するが、活性酸素消去活性の抗酸化力を改善させるには至らない。QOL評価の結果、膜に固定されたビタミンEはHD患者に対し身体機能と体の痛みおよび活力を向上させないが、全身的健康観を改善させた。さらに、アルブミンの酸化修飾抑制率と全身的健康感の改善率は正の相関傾向が認められた。よって、VPSによるタンパク質の酸化修飾抑制はHD患者の健康感を改善させる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：Firstly we investigated inhibition effect of the emodialysis using vitamin E-coated polysulfone membrane (VPS-HD) to the carbonylation of patients' plasma protein. Secondary we evaluated its influence on patients' health-rerated quality of life (HQOL) using SF-36. VPS-HD suppressed the carbonylation of their serum albumin, but not improve albumin' s redox capacity. However VPS-HD gave no significant effect to physical functioning (PF), bodily pain (BP) or vitality (VT) of patient' s HQOL, it significantly improved general healthy perceptions (GH). In addition, we found marginally significant positive correlation between its improvement of GH and its inhibition for serum albumin modification. These findings may suggest that VPS-HD ameliorates patient' s GH through patietnt' s redox capacity improvement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：生体機能代行

1. 研究開始当初の背景

血液透析をはじめとする体外循環療法はダイアライザーなど人工的デバイス内へ血液を直接灌流させる。その際、血液成分は異

物との接触、可視光線や可塑剤などの溶出物の曝露、さらにずり応力など非生理的状況に曝され、好中球や単球など白血球を刺激する。刺激された活性好中球は、細胞内で産生する

NADPH オキシダーゼの活性化により 3 重項酸素からスーパーオキシドアニオンを発生させ、さらに血清中の SOD により過酸化水素を産生する。過酸化水素は 2 価鉄の存在下で、強力な活性酸素であるヒドロキシラジカルを産生する経路と、好中球のミエロペルオキシダーゼにより次亜塩素酸やさらに 1 重項酸素などの活性酸素種 (ROS) を大量に産生する。さらに、清浄化が不十分な透析液からは半透膜を介しエンドトキシン断片が侵入し補体や単核球の活性化による炎症性サイトカインの放出が誘発されるなど慢性的な炎症の状態になっており、心血管疾患、栄養失調、予後不良と低い生存率などの長期的な合併症に関連付けられている。HD 患者の血液の抗酸化力は ROS を除去すべく消耗し酸化ストレスの亢進状態にあり、動脈硬化や末梢循環障害および透析アミロイドーシスなどの合併症に関与すると言われている。さらに、ROS はタンパク質の構成アミノ酸残基であるアルギニンやリジン側鎖部分をグルタルセミアルデヒドなどのカルボニル化合物へ酸化修飾する。酸化修飾された蛋白質は細胞内のプロテアソームで分解処理されるが過剰な負荷により蛋白質の代謝回転が低下すると言われ、酸化ストレス亢進は HD 患者の栄養状態を低下させると推測される。今日、酸化ストレスに関する合併症の予防や改善効果を期待し抗酸化物質を膜面に固定した高価な HD 膜が臨床応用され有効性の検証が求められている。

2. 研究の目的

上記へ明記したように、HD 患者の酸化ストレスを抑制することにより、結果として透析患者の動脈硬化予防や運動機能障害など合併症の予防や改善効果が期待できる。本研究の目的は、血液成分の酸化修飾代謝産物や抗酸化力の測定法を構築して、ビタミン E (Vit. E) が固定されたポリスルホン (VPS) 膜を用いる HD 療法 (VPS-HD) が血漿成分の酸化修飾を抑制できるかを検証することにある。さらに、VPS-HD における健康関連 QOL の改善効果を検証し、酸化修飾抑制効果との関連性を検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) . 血漿成分の酸化ストレス評価系の構築

- ①. 血清脂質系の酸化ストレス度は FRAS-4 装置で酸化修飾物の hydroperoxide を測定する Reactive Oxygen Metabolites (d-ROM) 法を用い評価した。
- ②. 血清の抗酸化力は上記装置で Fe^{3+} から Fe^{2+} への還元力を測定する Biological antioxidant potential (BAP) 法の他に、食品の抗酸化力評価法として使用される

2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルに対する抗酸化物質の消去活性 (radical scavenging activity : DPPH-RSA) 法の液組成を血漿試料用に改良し測定した。

③. 蛋白質の酸化修飾度は血中半減期が長いアルブミン (Alb) に焦点を絞り、ゲル濾過クロマトグラフィーで血漿から Alb を単離し、その構成アミノ酸の 20% を占める塩基性アミノ酸の側鎖部分の ROS によるカルボニル化修飾部を ELISA 法で定量し且つ蛋白濃度で除して重量当たりのカルボニル含量 (Carbonyls/g Alb) を求めた。

④. 蛋白質の抗酸化力は Alb 画分を上記の DPPH-RSA 法で測定し蛋白濃度で除し、DPPH-RSA/g Alb を求めた。

⑤. Alb は 502N カラムを用いた HPLC 法により構成アミノ酸である Cys-34 の遊離 SH 基の有無で還元力を有する mercapto (HMA) 型と他の SH 化合物が S-S 結合し酸化された non-mercapto (HNA) 型に分離できる。我々は、mercapto 型の割合 (HMA%) を抗酸化力の指標とした。

(2) . VPS-HD 療法による蛋白質の酸化修飾抑制効果と QOL 改善効果の検証

我々は抗酸化物質の Vit. E の有無を血漿蛋白質の酸化修飾の制御法とした。

外来通院を受ける HD 歴 1 年以上の慢性維持透析患者 19 名を対象とした。

本邦の HD 療法で過半数を占めるポリスルホン (PS) 膜を用いた HD 療法 (PS-HD) を VPS-HD の対照とし、各膜を 3 ヶ月間クロスオーバーさせる介入研究を施行し以下の項目を比較検討した。

①. HD 前後の臨床検査値より算出した栄養摂取状況を表す蛋白摂取量 (n-PCR) や筋肉量の指標となるクレアチニン産生速度 (%クレアチニン) とヘマトクリット (Ht) 値の比較

②. Alb の抗酸化力 (DPPH-RSA/Alb と HMA%) の比較

③. 脂質系酸化修飾物 (d-ROM 法による hydroperoxide) と蛋白質酸化修飾物 (ELISA 法による Carbonyls/Alb) の比較

④. SF36-v2 を用いた QOL アンケート調査による身体機能 (Physical functioning : PF)、身体に関する日常役割機能 (Role physical : RP)、体の痛み (Bodily pain : BP)、全体的健康感 (General health : GH) および活力 (Vitality : VT) の改善効果の比較

4. 研究成果

(1). 血漿の抗酸化力の評価系の確立

①. 蛋白質の抗酸化力評価法としての DPPH-RSA 法の検討

DPPH-RSA 改良法が血漿の抗酸化力評価法として応用可能かを検討するため、PS-HD の HD 前後の変動を見たところ、DPPH-RSA は HD 前 $1442 \pm 167 \mu\text{mol/L}$ から HD 後 1346 ± 172

$\mu\text{mol/L}$ へ有意($p=0.001$)に低下した。また、BAP は HD 前 $2941\pm 248\ \mu\text{mol/L}$ から HD 後 $2666\pm 293\ \mu\text{mol/L}$ へ有意($p<0.001$)に低下した。

DPPH-RSA と BAP の関連性を検討した結果、HD 前値に有意差を認めない(図 1 左)が、HD 後値は有意な相関 ($y=0.346x + 424.03$, $r=0.5926$, $p=0.008$)を認めた。(図 1 右)

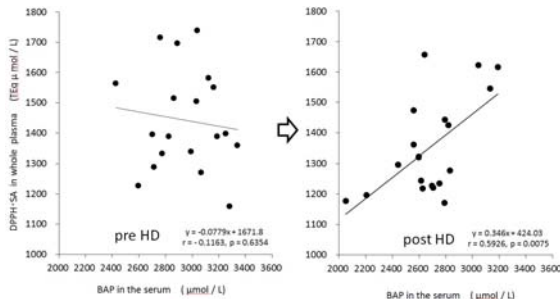


図 1. HD 前, 後の BAP と DPPH-RSA 法の相関

②. HD 患者血漿の DPPH-RSA の分布と動態

同一患者の HD 前および HD 後の血漿 $200\ \mu\text{L}$ を pH7.20 の PBS を移動相とするゲル濾過(流速: 1.0mL/分)法で $500\ \mu\text{L}$ 毎に分離し画分試料を得、全画分の DPPH-RSA を測定して分布を確認したところ、蛋白質領域と尿酸領域にラジカル捕捉活性の局在を認めた。(図 2 左)

HD 前, 後のクロマトグラム(OD: 280nm)と DPPH-RSA を対比させると、UA 画分の DPPH-RSA は尿酸濃度と平行に減少したが、Alb 画分の DPPH-RSA は HD 前に比し HD 後で上昇することが判明した。(図 2 右)

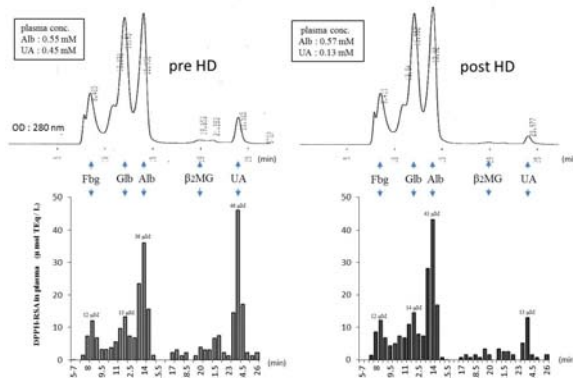


図 2: HD 患者血漿の抗酸化力の分布と動態

以上を小括すると、HD 患者の血漿においては排泄不全ゆえ多量の小分子物質が存在し、HD で急激に除去される。小分子量の抗酸化物質と DPPH の窒素ラジカルの転換率には基質特異性が存在するとの報告がある。HD 前の血漿で BAP と DPPH-RSA が乖離した原因として両反応液と小分子の抗酸化物質との基質特異性の差異が考えられる。しかし、HD 後の血漿は小分子物質が除去されるため、DPPH-RSA

と BAP 反応液の基質は主に蛋白質となり、基質が蛋白質の場合は両法の反応性は類似すると考えられる。すなわち DPPH の窒素ラジカルに対する物質の捕捉活性は BAP 法が測定する Fe^{3+} に対する物質の Fe^{2+} への還元力と同様に血漿蛋白質の抗酸化力評価に応用できると判断した。

③. DPPH-RSA/Alb と HMA%の相関

PS 膜を使用する HD 患者($n=19$)における治療前後の血漿で、PH-RSA/Alb を測定したところ、HD 前 10.4 ± 2.7 から HD 後 13.3 ± 2.5 へ有意($p=0.001$)に上昇した。(図 3 左) 次に、同試料で HMA%を測定したところ、HD 前: $40.8\pm 10.8\%$ から HD 後: $63.1\pm 6.9\%$ へ有意に上昇した。(図 3 右)

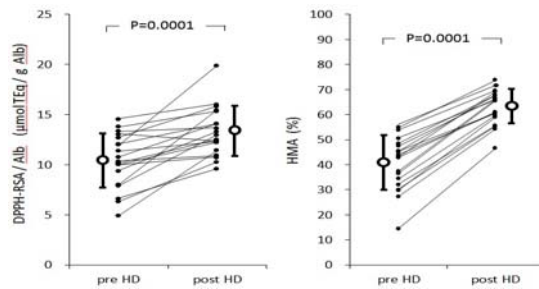


図 3. HD による DPPH-RSA/Alb と HMA%の変動

DPPH-RSA と HMA(%) の関連性は、HD 前: $y=1.697x + 23.17$ ($r=0.423$, $p=0.072$)、HD 後: $y=1.115x + 48.22$ ($r=0.401$, $p=0.089$) で、共に正相関の傾向があった。HMA%は、動脈硬化などと関連性があり、HD 患者は著しく低値で HD 後一過性に上昇するが、低値群は心血管イベントリスクが高いとの報告がある。Alb の還元部位は主に Cys34 の遊離 SH であり、その他は分子サイトに結合する Bi1 や FFA などであり、HMA は Cys-34 の還元状態を示すが DPPH は還元部位全体を反映するため、HMA%と若干乖離すると考えられる。我々は Vit. E が還元部位の酸化を抑制し抗酸化能を上昇させると考え以下の介在研究を行った。

(2). VPS-HD による蛋白質の酸化修飾抑制効果と QOL 改善効果の検証 (PS 膜と VPS 膜のクロスオーバー研究)

①. PS-HD に対する VPS-HD の臨床検査値による栄養状態と筋肉量および貧血改善効果

PS-HD と VPS-HD の臨床検査成績を比較したところ、CRP や白血球数に有意差は認められなかった。また、栄養状態としての血清 Alb や尿素窒素 (sUN) および蛋白質摂取量 (nPCR)、さらに、筋肉量の指標である血清クレアチニンおよびクレアチニン産生速度 (%CGR) は有意差が認められなかった。(表)

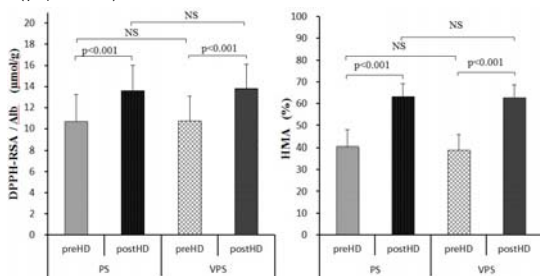
	PS	VPS	paired T test (p value)
CRP (mg/dL)	0.21±0.17	0.16±0.19	0.121
WBC (×10 ³ /μL)	5.1±1.3	5.2±1.5	0.391
Ht (%)	33.5±2.4	32.5±3.5	0.210
β2MG (mg/L)	24.0±4.1	23.8±3.8	0.334
ferritin (ng/mL)	57.0±33.3	92.5±57.0	0.011*
TSAT (%)	22.1±11.1	28.4±11.0	0.031*
Alb (g/dL)	4.04±0.34	3.98±0.34	0.080
UA (mg/dL)	8.3±1.5	8.0±1.1	0.241
sUN (mg/dL)	66.8±12.0	63.2±10.2	0.099
nPCR (g/kg/day)	1.01±0.13	1.00±0.12	0.315
Cr (mg/dL)	10.9±2.1	10.6±2.1	0.101
%CGR	102.8±19.4	103.6±21.0	0.381

Values are expressed mean ± SD. (n=19)

表. PS-HD と VPS-HD における臨床検査値

②. PS-HD と VPS-HD による HD 前後の Alb の抗酸化力の変動

PS-HD による HD 前後の DPPH-RSA/Alb の変動は有意(p<0.001)に 27%上昇した。また、VPS-HD も同様に有意(p<0.001)に 29%上昇した。しかしながら、PS-HD と VPS-HD の HD 前値と HD 後値はともに有意差を認めなかった。(図 4. 左)



次に、PS-HD の HD 前後の HMA%の変動は有意(p<0.001)に 56%上昇した。VPS-HD も同様に有意(p<0.001)に 60%上昇した。しかしながら、DPPH-RSA/Alb と同様に PS-HD と VPS-HD の HD 前値および HD 後値はともに有意差を認めなかった。(図 4. 右)

以上の結果より、Alb の抗酸化力は HD で上昇するが、Vit. E による抗酸化力の改善効果は確認できなかった。これは、PS 膜自体の生体適合性が VPS 膜と僅差であり本抗酸化力評価法の感度では両膜の差を分別出来ないか VPS 膜に固定された Vit. E 量の過不足などが原因と考えられる。

図 4. Alb の抗酸化力の変動 (DPPH-RSA/Alb と HMA%による評価)

③. PS-HD と VPS-HD による HD 前後の脂質と蛋白質の酸化修飾の変動

ROS の脂質への影響を d-ROM 法で検討したところ、PS-HD は HD 前: 307.4±45.5 (U. CARR) より HD 後: 368.2±76.4 (U. CARR) へ有意に上昇した。VPS-HD も PS 膜とほぼ程度で上昇した。さらに両膜間の HD 前値と後値の比較においても有意差は無く d-ROM 法で VPS-HD

の脂質酸化修飾抑制効果は確認できなかった。(図 5. 左)

次に、Carbonyls/Alb は、PS-HD の HD 前: 4.4±1.5 μmol/g から HD 後: 5.1±2.1 μmol/g Alb へ有意(p<0.001)に 16%上昇した。一方、VPS-HD は HD 前: 3.7±0.5 μmol/g から HD 後: 4.1±0.5 μmol/g へ上昇 10%したが有意差は無かった。(図 5. 右) さらに、PS-HD と VPS-HD の HD 前値を比較すると VPS-HD は PS-HD に比し有意(p=0.016)に低値であり、HD 後値においても有意(p=0.034)に低下しており HD 膜に固定された Vit. E が Alb の酸化修飾を抑制する事を明らかにした。

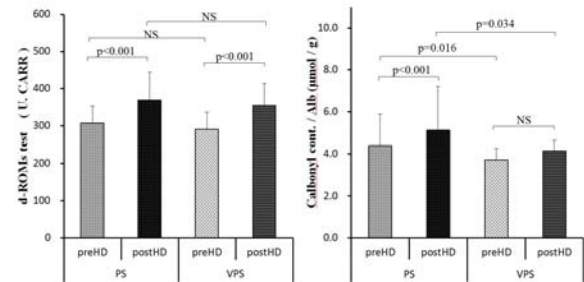


図 5. PS-HD と VPS-HD による脂質と蛋白質の酸化修飾量の比較

④. SF36 を用いた健康関連 QOL の改善効果

PS-HD と VPS-HD の観察期間終了時点の QOL を比較した結果、身体機能(PF)、身体に関する日常役割機能(RP)、体の痛み(BP)および活力(Vitality: VT)の 4 項目に有意差は認められなかった。しかし、全体的健康感(GH)は PS-HD が 48±19 (%) に対し VPS-HD は 54±19 (%) へ有意(p=0.006)に改善した。(図 6)

さらに、PS-HD から VPS-HD への変更による GH の改善率と Carbonyls/Alb の抑制率の関係を見たところ $y=0.512x+7.397$ の相関傾向 ($r=0.467, p=0.080$) が認められた。(図 7)

総括として、HD 膜に Vit. E を付加した結果、蛋白摂取率、筋肉量、貧血、血漿蛋白質の抗酸化力および身体機能の改善は確認できないが、蛋白質の酸化修飾の抑制と全身健康感の改善効果を有する事を明らかにした。

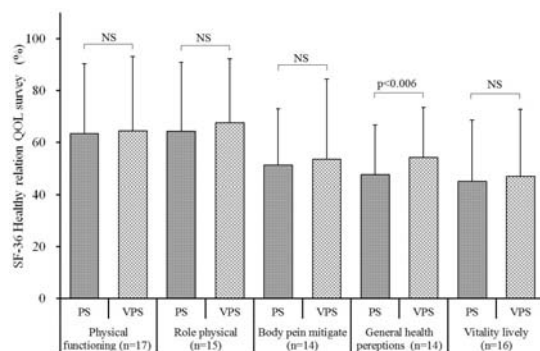


図 6. SF36 による健康関連 QOL の比較

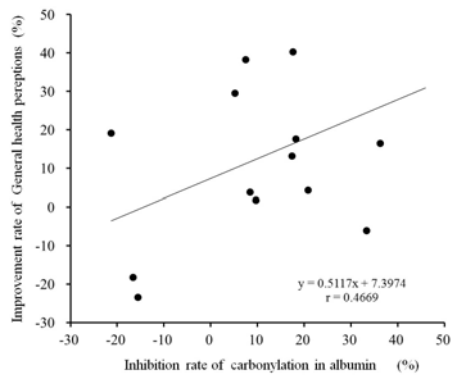


図7. GHの改善率と Carbonyls/Albの抑制率の相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Kanayama K, Ohashi A, Hasegawa M, Kondo F, Yamamoto Y, Sasaki M, Hayashi H, Kato K, Hattori R, Yamashita H, Arai J, Ishii J, Emi N, Yuzawa Y. 2011 Comparison of Free Light Chain Removal by Four Blood Purification Methods. Therapeutic Apheresis and Dialysis 査読有, 15(4) p394-399
- ② Hasegawa M, Kondo F, Yamamoto K, Murakami K, Tomita M, Nabeshima K, Nakai S, Kato M, Ohashi A, Arai J, Hiki Y, Ishii J, Emi N, Sugiyama S, Yuzawa Y. 2010 Evaluation of blood purification and bortezomib plus dexamethasone therapy for the treatment of acute renal failure due to myeloma cast nephropathy. Therapeutic Apheresis and Dialysis. 査読有, 14 (5), p451-456.
- ③ 新 典雄、村上和隆、石川正敏、橋詰英明、山田幸恵、加藤政雄、大橋 篤、杉山 敏 2010 ニプロ社製ダイアライザー PES-Seαeco の溶質除去特性とビスフェノールAの溶出に関する検討. 腎と透析, 査読無, Vol.69 : 87-91
- ④ Hasegawa M, Nishii C, Ohashi A, Tomita M, Nakai S, Murakami K, Nabeshima K, Fujita Y, Ishii J, Hiki Y, Sugiyama S. 2009 Expression of Tumor Necrosis Factor Receptors on Granulocytes in Patients with Myeloperoxidase Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody- Associated Vasculitis. Nephron Clin Pract. 査読有, 113(3) : 222-233.

〔学会発表〕(計2件)

- ① 大橋 篤, 堀 秀生, 川口和紀, 中井 滋, 北口暢哉, 比企能之, 村上和隆, 鍋島邦浩, 富田 亮, 長谷川みどり, 杉山 敏 透析患者の血漿成分におけるDPPHラジカル捕捉能と酸化/還元型アルブミンによる抗酸化能の動態 2010年6月17日、日本透析

医学会 (神戸)

- ② 大橋 篤, 堀 秀生, 中井 滋, 村上和隆, 杉山 敏 維持透析患者における血清成分の窒素ラジカル供与物質に対する抗酸化能の評価 2009年6月5日、日本透析医学会 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 篤 (OHASHI ATSUSHI)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号 : 30310585

(2) 研究分担者

村上 和隆 (MURAKAMI KAZUTAKA)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号 : 30267950

(3) 連携研究者

中井 滋 (NAKAI SHIGERU)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号 : 20345896