

## 透析液超清浄化による MDA-LDL, Ox-LDL および sCD-14 の低減効果

岡 良成\*<sup>1</sup> 宮崎 雅史\*<sup>1</sup> 高津 成子\*<sup>2</sup> 国友 桂一\*<sup>1</sup>  
国米 欣明\*<sup>1</sup>  
幸町記念病院外科\*<sup>1</sup> 同内科\*<sup>2</sup>

key words : 透析液清浄化, エンドトキシン, MDA-LDL, Ox-LDL, soluble CD-14

### 〈要旨〉

日本透析医学会では 1995 年に透析液の末端でのエンドトキシン (ET) 濃度の許容上限を 250 EU/L, 達成目標を 100 EU/L 以下と制定した。しかしこれらの数値の臨床的妥当性については, 制定当初より, 具体的なデータの裏付けがあったわけではない。達成目標値として 100 EU/L 以下で十分に安全なのか, 制定後にも十分な臨床的検討が加えられないまま容認されている現状である。今回われわれは, 達成目標値以下の ET レベルをさらに検出限界以下に清浄化して, この透析液の変化が生体に及ぼす影響を酸化ストレスの観点から検討したので報告する。対象は当院で 2 型ダイアライザーを用いた通常透析を行っている透析歴 1 年以上の患者 37 例。1999 年 12 月に透析液供給システムの全面的改修を行い, 透析液末端の ET 濃度は平均 39.0 から 1.0 以下 (EU/L) に改善した。改修前, 半年後, 1 年後での酸化 LDL (MDA-LDL, Ox-LDL), sCD-14, サイトカイン等の変動を検討した。改修前と 1 年後の透析前データを比較すると, MDA-LDL が  $5.7 \pm 1.5$  から  $4.7 \pm 1.3$  (nmol/mg LDL protein) に有意に低下した ( $p < 0.001$ )。Ox-LDL も  $2.39 \pm 1.00$  から  $1.54 \pm 1.03$  (ng/ $\mu$ g LDL protein) と有意に低下した ( $p < 0.001$ )。sCD-14 も  $6.4 \pm 1.1$  から  $5.4 \pm 0.9$  ( $\mu$ g/mL) と有意に低下した ( $p < 0.0001$ )。これらの結果は ET 濃度が 50 EU/L 以下の透析液であっても, マクロファージを刺激し, 酸化ストレスの要因となることを示している。これは低濃度の ET であっても透析患者の動脈硬化および透析アミロイドーシスの増悪因子となりうる可能性を示唆するものである。以上より, 末端透析液中 ET 濃度は治療モードのいかんを問わず可能な限り 1.0 EU/L 以下を目標にすべきであると考えられた。

## Ultrapure dialysate reduced serum levels of MDA-LDL, Ox-LDL and soluble CD-14 in hemodialysis patients

Yoshinari Oka\*<sup>1</sup>, Masashi Miyazaki\*<sup>1</sup>, Shigeko Takatsu\*<sup>2</sup>, Keiichi Kunitomo\*<sup>1</sup>,  
Yoshiaki Kokumai\*<sup>1</sup>

Saiwaicho-kinen Hospital, Department of Surgery\*<sup>1</sup>, Department of Medicine\*<sup>2</sup>

In 1995, the Japanese Society for Dialysis Therapy specified the highest acceptable level of endotoxin (ET) at the end of a dialysate as 250 EU/L and the target to be achieved was 100 EU/L or less. However, the clinical appropriateness of these values has not been concretely confirmed by data since they were specified. In the present study, a dialysate in which ET was below the target was further cleared so that the ET level was below the detection limit and the influence of such changes in the dialysate was assessed from the perspective of oxidation stress. The study subjects were 37 patients who had received the usual hemodialysis using a type 2 dialyzer for a year or longer at our hospital. In December 1999, the dialysate supply system was improved completely and as a result, the mean level of ET at the end of the dialysate decreased from 39.0 to 1.0 EU/L or less. The levels of oxidized LDL (MDA-LDL, Ox-LDL), and sCD-14 before improvement and 0.5 and 1 year after improvement were compared. Comparison of predialysis data between before improvement and 1 year

岡 良成 幸町記念病院外科 〒700-0903 岡山市幸町 9-1

Yoshinari Oka Tel: 086-233-3011 Fax: 086-225-1494

(受付: 平成 13 年 8 月 6 日, 受理: 平成 13 年 12 月 28 日)

after improvement showed a significant decrease in MDA-LDL from  $5.7 \pm 1.5$  to  $4.7 \pm 1.3$  nmol/mg LDL protein ( $p < 0.001$ ), Ox-LDL from  $2.39 \pm 1.00$  to  $1.54 \pm 1.03$  ng/ $\mu$ g LDL protein ( $p < 0.001$ ), and sCD-14 from  $6.4 \pm 1.1$  to  $5.4 \pm 0.9$   $\mu$ g/mL ( $p < 0.0001$ ). These results indicate that even a dialysate containing 50 EU/L or less of ET may stimulate macrophages and cause oxidation stress. This suggests that even low levels of ET may aggravate arteriosclerosis and dialysis amyloidosis in dialysis patients. Based on these results, the goal ET level at the end of the dialysate should be set at 1.0 EU/L or less, where possible.

## 緒 言

透析患者の QOL を左右する重大な合併症である透析アミロイドーシスを予防する目的で、 $\beta_2$ -MG の除去の必要性が指摘され数多くの試みがなされてきた。その一環としてダイアライザーの物質透過性を高めて  $\beta_2$ -MG を除去する目的で、ダイアライザーの大孔径化が進められた。その一方でダイアライザーの大孔径化に伴い、透析液中のエンドトキシン (ET) やそのフラグメントの生体への逆濾過、逆拡散の可能性が問題とされるようになってきている<sup>1-3)</sup>。さらに近年、透析アミロイドーシスの予防には  $\beta_2$ -MG の除去よりもむしろ透析液の清浄化そのものが有効であることが指摘<sup>4,5)</sup>されただけでなく、透析液清浄化により生命予後までもが改善することが期待されており<sup>6)</sup>、透析液清浄化の重要性は一層注目されることとなった。

すでに透析医学会により透析液の水質基準が提唱されている<sup>7)</sup>。しかし、その達成目標とされる ET 濃度 100 EU/L という数値についての臨床的妥当性を裏付ける根拠は当初より必ずしも十分ではなかった。すなわち透析液において、異物である ET がどの程度の濃度から臨床的に問題となるかは明らかではない。これを解明するためには ET 濃度 100 EU/L 以下の透析液をさらに清浄化し、検出限界である 1.0 EU/L 以下にしたとき (超清浄化) の生体への影響について検討されなくてはならない。しかし、上記の濃度での透析液清浄化単独の影響についての報告は現在までほとんどなされていない。この観点に立って今回われわれは、末端透析液中の ET 濃度を平均 39.0 EU/L から 1.0 EU/L 以下にまで清浄化し、その際の影響を検討したので報告する。

## I. 対象および方法

対象は当院にて 2 型ダイアライザーを用いた通常の慢性維持透析を受けている病状の安定した透析歴 1 年以上の患者 37 例である。残存腎機能の影響を避けるために透析導入後間もない症例は除いている。内訳は男

性 18 例、女性 19 例で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。年齢 44.0~76.5 歳 (平均 59.9 歳)、透析歴 1.2~26.6 年 (平均 11.0 年)。基礎疾患は慢性腎炎 29 例、糖尿病性腎症 8 例であった。透析は全例週 3 回で、一回あたりの透析時間は 3.5~5.0 時間であった。期間中、透析条件、ダイアライザーおよび投与薬の変更は行わなかった。

当院では 1999 年 12 月に透析液供給システムの全面的改修を行った。その内容を示す。① RO 装置の前にプレフィルター (PUF) を設置した。② 配管の全面改修、短縮化、簡略化を施行した。③ 多人数機ではセントラルの後ろにエンドトキシン・カットフィルター (モルセップ FF 03-FL-FUS 1041) を設置した。個人機ではダイアライザーの前にエンドトキシン・カットフィルター (カッター EF-01) を設置した。

この改修の前後で酸化 LDL, soluble CD-14 (sCD-14), サイトカイン (IL-6, IL-10) 等、種々の検査を行い、1 年間のデータの推移をみた。採血は週始めの透析前後に、透析前は穿刺部から、透析後は回路の動脈側から行った。

ET の定量は SRL に外注しエンドスペース法で行った。Malondialdehyde (MDA)-LDL は TBA 法 (八木法) で、Ox-LDL は ELISA 法で行った。sCD-14 と IL-10 は EIA で、IL-6 は ELISA で測定した。

成績はすべて mean $\pm$ SD で表示し、統計解析ソフト Stat View-J 4.5 を用い、すべて paired t-test で検討した。いずれも  $p < 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

## II. 結 果

当院における回路末端での透析液中の ET 濃度の推移をグラフに示した (図 1)。改修前の ET 濃度平均は 39.0 EU/L であった。

そこで、ET 検出限界とされる 1.0 EU/L 以下とするために、1999 年 12 月に透析液の供給システムの全面的な改修を行った。

改修前後の酸化 LDL の推移をグラフに示した。MDA-LDL では、透析前の平均値は改修前の  $5.7 \pm$

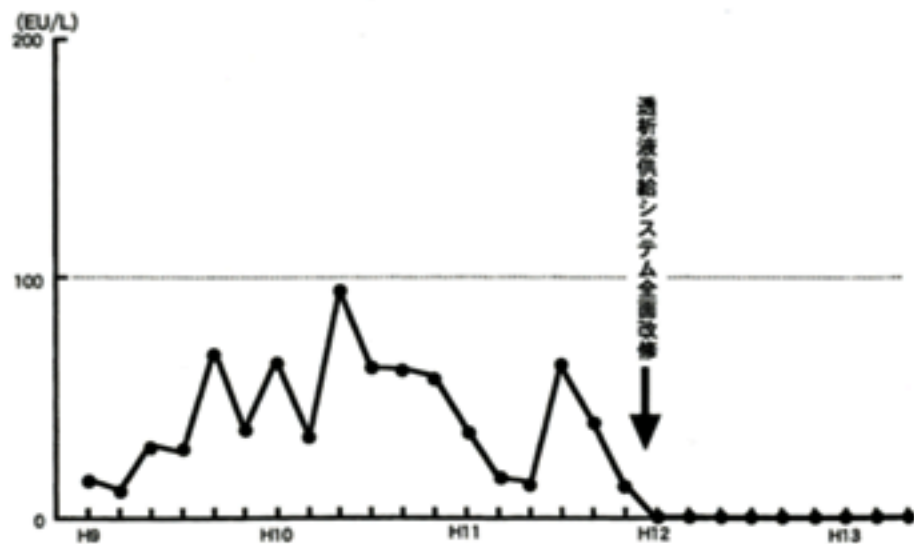


図 1 Level of ET at the end of a dialysate in our hospital.

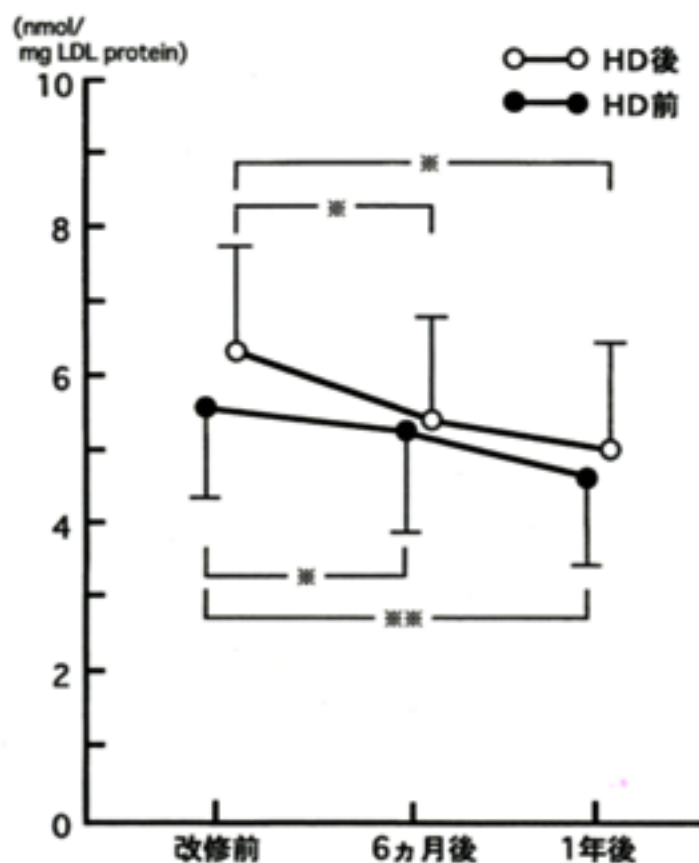


図 2 Serum MDA-LDL level Mean±SD  
 ※※ p<0.001, ※ p<0.01 n=36

1.5 nmol/mg LDL protein から 6 か月後には  $5.2 \pm 1.3$  nmol/mg LDL protein, 1 年後には  $4.7 \pm 1.3$  nmol/mg LDL protein とそれぞれ有意に低下した (正常値 5.0 nmol/mg LDL protein 以下) (図 2).

Ox-LDL についても, 透析前の平均値は改修前の  $2.39 \pm 1.00$  ng/ $\mu$ g LDL protein から 6 か月後には  $2.00 \pm 1.28$  ng/ $\mu$ g LDL protein, 1 年後には  $1.54 \pm 1.03$  ng/ $\mu$ g LDL protein とそれぞれ有意に低下した (正常値 2.0 ng/ $\mu$ g LDL protein 以下) (図 3).

sCD-14 の推移を示す. 透析前の平均値は改修前の  $6.35 \pm 1.10$   $\mu$ g/mL から 6 か月後には  $4.89 \pm 0.71$   $\mu$ g/mL, 1 年後には  $5.40 \pm 0.86$   $\mu$ g/mL とそれぞれ有意に低下した (正常値 2.1~4.3  $\mu$ g/mL) (図 4).

サイトカインの推移を示す. IL-6 の透析前の平均値は改修前の  $5.81 \pm 4.40$  pg/mL と比較して, 6 か月後に  $4.01 \pm 3.65$  pg/mL と有意に低下したが, 1 年後は  $6.81 \pm 5.17$  pg/mL と有意差はみられなかった (正常

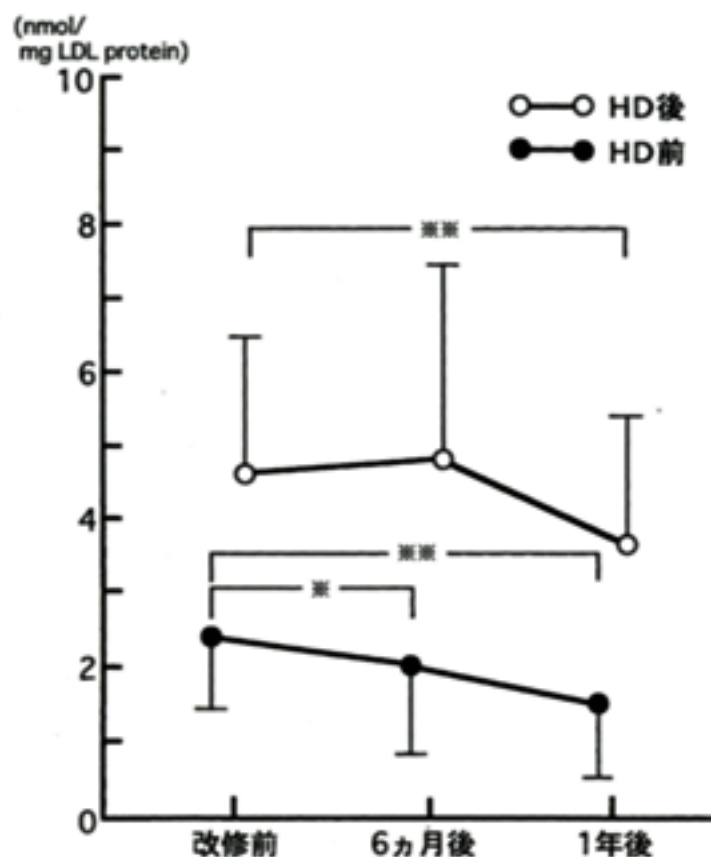


図 3 Serum Ox-LDL level Mean±SD  
 ※※ p<0.001, ※ p<0.01 n=36

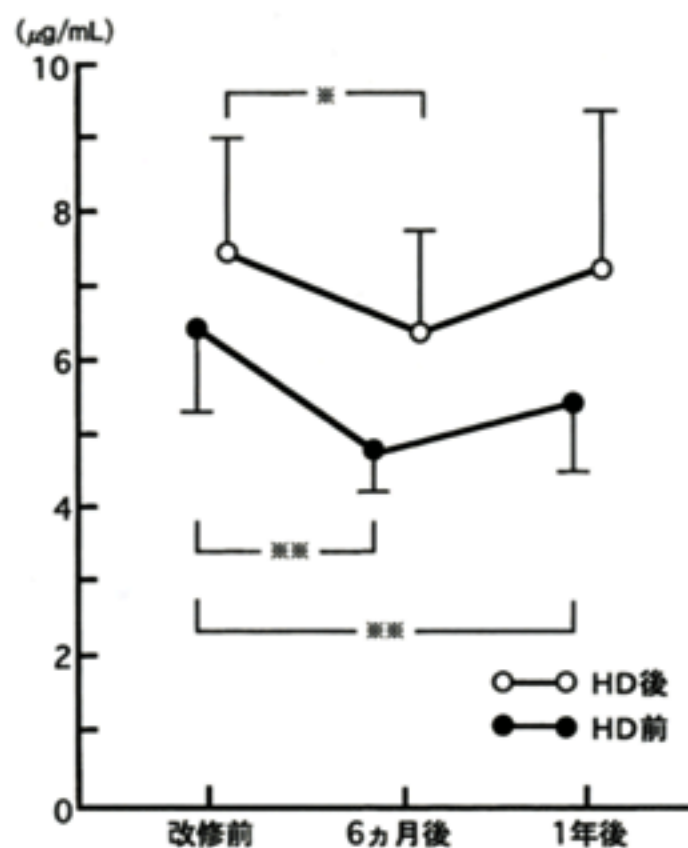


図 4 Serum sCD-14 level Mean±SD  
 ※※ p<0.0001, ※ p<0.01 n=29

値 0.38~10.09 pg/mL) (図 5).

IL-10 は, 透析前の平均値は改修前の  $2.1 \pm 2.3$  pg/mL から 6 か月後には  $2.8 \pm 2.7$  pg/mL, 1 年後には  $3.6 \pm 3.7$  pg/mL とそれぞれ有意に上昇した (正常値 7.05 pg/mL 以下) (図 6).

### III. 考 察

透析患者の QOL や生命予後に影響する因子として, 透析アミロイドーシスならびに動脈硬化は, 透析治療の長期化に伴いさらにその重要性を増している. QOL に大きく影響する透析アミロイドーシスの発症・増悪に関しては, 透析液中の ET<sup>4,5)</sup>がマクロ

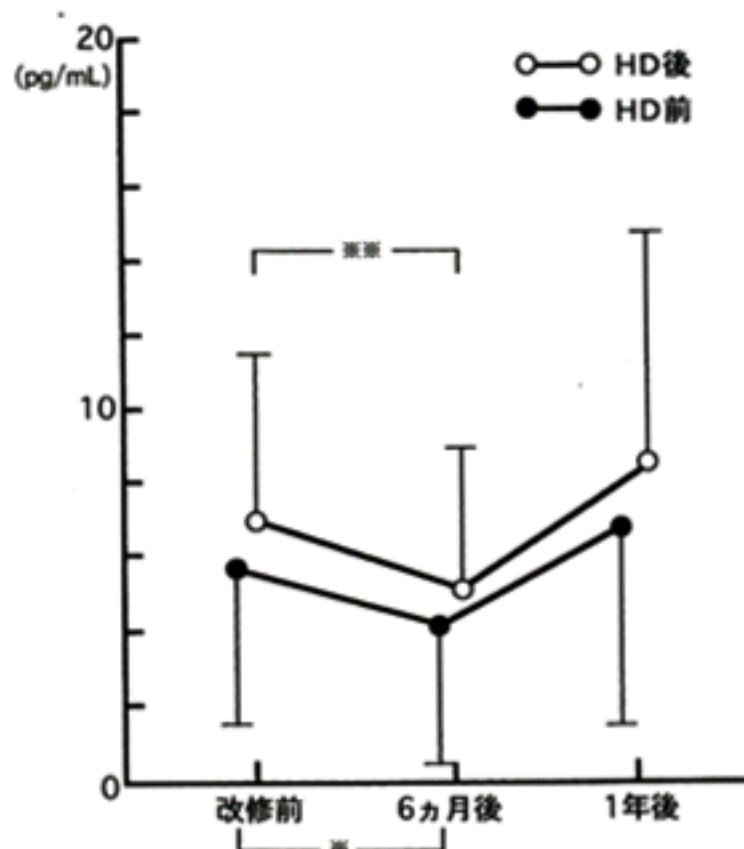


図5 Serum IL-6 level Mean±SD  
 ※※ p<0.001, ※ p<0.05 n=29

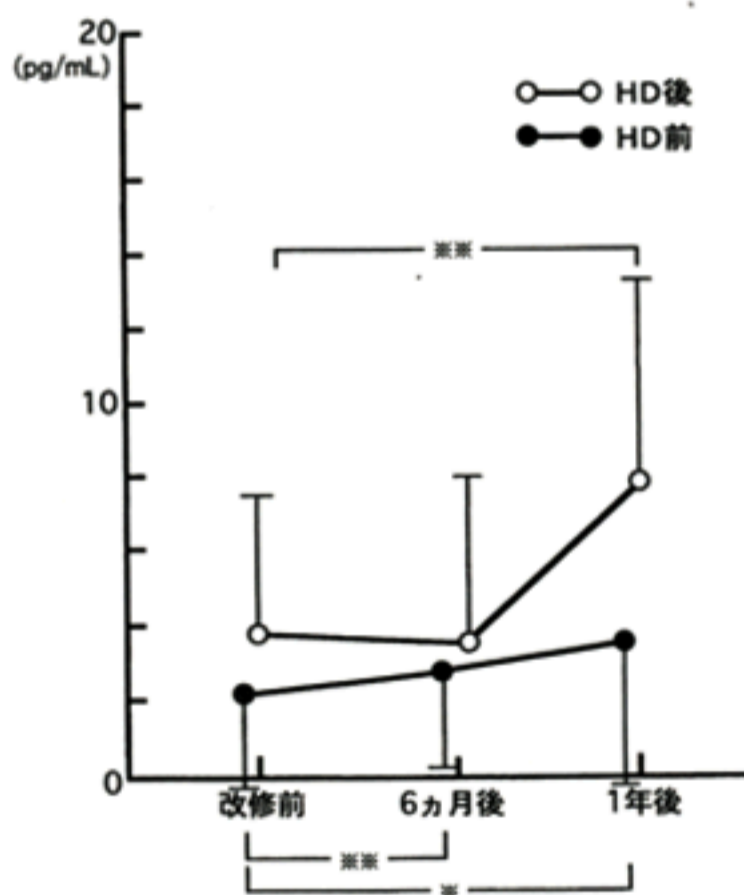


図6 Serum IL-10 level Mean±SD  
 ※※ p<0.0001, ※ p<0.01 n=27

ファージの活性化を引き起こすことによって重大な役割を担っていることが明らかとなった。

透析アミロイドーシスの発症には、単球の活性化と病変局所への浸潤が重要であることが指摘<sup>9)</sup>されている。ETの本体はLPSであり、単球を活性化する最も強力な因子の一つであることが知られている。単球が活性化された際その膜表面で発現したCD-14がsheddingされたものがsCD-14<sup>9,10)</sup>である。すなわちsCD-14は単球/マクローファージの活性化のマーカーであると同時に、透析液のET汚染の影響を定量的に判定するのに有用な指標といえる<sup>10)</sup>。

今回われわれの調査ではsCD-14の有意な低下がみられた。このことは、ET濃度が50 EU/L未満の透析液であっても、単球を刺激しうることを示しており、ひいては透析アミロイドーシスの発症・増悪因子となりうる可能性を示唆するものである。

また、予後を大きく左右する動脈硬化についても、ダイアライザーとの接触による酸化ストレス<sup>11)</sup>の影響が指摘されているが、ETによる酸化ストレスの影響も予測されている。

動脈硬化の促進因子としては従来よりLDLコレステロールが知られているが、実際にはnativeのLDLコレステロールそのものではなく、酸化LDLがその主体であると考えられている<sup>12)</sup>。現在では血液中の酸化LDLとして、Ox-LDLおよびMDA-LDLが測定可能となっており、この両者が冠疾患に密接に関連することが指摘されている<sup>13)</sup>。すなわち酸化LDLは酸化ストレスの重要な指標であるとともに、動脈硬化の発症に重要な役割を果たすものであるということができる<sup>11,12,14)</sup>。

今回われわれが透析液中ET濃度低減1年後の効果を検討したところOx-LDL, MDA-LDLいずれも有意な低下がみられた。このことはET濃度が50 EU/L未満の透析液であっても動脈硬化の促進因子となりうる可能性を示唆するものである。

近年、種々の炎症反応の主役としてサイトカインが注目されており、特に透析領域ではインターロイキン仮説<sup>15)</sup>により、IL-1をはじめとするサイトカインの影響が重視されている。今回の調査では透析アミロイドーシスで代表的な炎症性サイトカインとして働くIL-6、IL-6と拮抗的に変動する「サイトカイン産生抑制因子」として知られる抑制性サイトカインの一種であるIL-10<sup>16)</sup>について検討した。その結果、IL-6では1年後で有意差が認められなかったものの、IL-10では1年後有意な上昇を認めた。

炎症性のサイトカインであるIL-6は、透析中の一過性のエンドトキシンとの接触に対して極めて反応性の高いものであり、短時間で上昇した後急速に正常化するため、急性炎症反応の指標としては有用であるが、今回の検討のように慢性的な反応をみる指標としての意義はやや低いと考えられる。

通常の透析における透析医学会の基準では、末端透析液中のETの安全基準濃度を日本薬局方における注射用水と同じ250 EU/Lとし、さらに安全率を考慮して100 EU/L以下が達成目標値として推奨されてきた<sup>7)</sup>。しかし、この基準はあくまでも急性の炎症反応を惹起しないことを目標としたものであり、慢性維持血

液透析のように長期治療を前提としたときの安全性が問題である。この点については、基準制定以来、客観的なデータによる裏付けがなされてきたとは言い難い。

今回のわれわれの報告は透析液清浄化の臨床的重要性を示す客観的なデータを示すものである。しかも、治療モードの変化を伴わない、透析液清浄化単独の影響を酸化ストレス<sup>17)</sup>の変動を指標として評価し、有意差を示したことは注目に値する。現在までのところ、酸化 LDL の観点からダイアライザーの影響を検討した報告はみられるが<sup>11)</sup>、同様の観点から透析液清浄化の効果を評価した報告は、われわれの検索し得た限りでは見出し得なかった。

このレベルの酸化 LDL の変化が実際に動脈硬化の進行に影響を与えるかどうかは現時点では確証はないが、MDA-LDL や Ox-LDL が透析液の清浄化のみで低下することは重要な事実である。すなわち透析液中の ET は微量であっても生体に何らかの影響を及ぼしており、それが QOL と予後に関連するのではないかとということが示唆される。さらに本論文で報告した清浄化前の透析液 ET レベルはこれまでの報告の中で最も低いレベルの報告であり、今後の透析液清浄度の基準値設定に重要な示唆を与えられよう。

## 結 論

透析液中の ET は、たとえ微量であっても単球を刺激し、酸化ストレスの原因となりうる可能性がある。この観点から、末端透析液中のエンドトキシン濃度は可能な限り 1.0 EU/L 以下を目標にすべきであると考えられた。

なお本研究の要旨は第 46 回日本透析医学会学術集会(大阪, 2001 年 6 月)において発表した。

謝辞：本研究にあたり、MDA-LDL および Ox-LDL の測定に多大な御助力を頂いた株式会社テルモに深謝致します。

## 文献

- 1) Stiller S, Mann H, Brunner H: Backfiltration in hemodialysis with highly permeable membranes. *Contrib Nephrol* 46: 23-32, 1985
- 2) Schmidt M, Baldamus CA, Schoeppe W: Backfiltration in hemodialysis with highly permeable membranes. *Blood Purif* 2: 108-114, 1984
- 3) Baurmeister U, Travers M, Vienken J, Harding G, Million C, Klein E, Pass T, Wright L: Dialysate contamination and back filtration may limit the use of high-flux dialysis membranes. *ASAIO Transactions* 35: 519-522, 1989
- 4) Bazz M, Durand C, Ragon A, Jaber K, Andrieu D, Merzouk T, Purgus R, Olmer M, Reinier JP, Berland Y: Using ultrapure water in hemodialysis delays carpal tunnel syndrome. *Int J Artif Organs* 14: 681-685, 1991
- 5) Schwarze S, Holzhauer M, Schaeffer J, Galanski M, Koch KM, Floege J:  $\beta$  2-microglobulin associated amyloidosis: A vanishing complication of long-term hemodialysis? *Kidney Int* 52: 1077-1083, 1997
- 6) 政金生人, 佐藤幸一, 矢吹清一: 透析液清浄化の臨床効果. *透析医会誌* 16: 17-22, 2001
- 7) 山上征二: 透析液安全基準策定報告. *透析会誌* 28: 1487-1493, 1995
- 8) 宮坂信之: 透析療法とサイトカイン. *透析会誌* 25: 1301-1305, 1992
- 9) Bazil V, Strominger JL: Shedding as a mechanism of down-modulation of CD 14 on stimulated human monocytes. *J Immunol* 147: 1567-1574, 1991
- 10) 山崎浩子, 川端研治, 西 宏行, 林 恭子, 渡辺千史, 河本紀一, 長宅芳男, 榎野博史: 血液透析が単球膜表面 CD 14 発現量と血清中可溶性 CD 14 濃度を与える影響. *ハイパフォーマンスメンブレン 腎と透析 別冊* 1998: 136-140, 1998
- 11) 福永 恵, 高橋典尋, 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, 松山賢次, 広畑 衛, 河野雅和: 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—. *透析医会誌* 15: 419-424, 2000
- 12) 川上正舒, 河野幹彦: サイトカインと長期透析症候群 (4) サイトカインと動脈硬化. *臨床透析* 12: 715-722, 1996
- 13) Tsimikas S, Witztum JL: Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation* 103: 1930-1932, 2001
- 14) 永吉純一, 丸山良夫, 本宮善恢, 平尾佳彦, 松村典彦, 杉原清孝, 重松 貴: 維持透析患者での腹部大動脈石灰化係数の有用性—脂質代謝関連因子との関係について—. *透析会誌* 32: 1233-1238, 1999
- 15) Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldon S: Hemodialysis hypotension: the interleukin hypothesis. *Blood Purif* 1: 3-8, 1983
- 16) 石田 博: サイトカインとそのレセプター—インターロイキン 10. *臨床免疫* 27: 97-106, 1995
- 17) 樋口千恵子, 佐中 孜, 安藤 稔, 篠部道隆, 松沢 史, 庭山 淳, 小俣正子, 小俣百世, 二瓶 宏, 杉野信博, 中沢速和: 透析患者における活性酸素仮説のその後の展開. *人工臓器* 26: 835-839, 1997