

多種ラジカル消去活性測定法(MULTIS)による、慢性腎臓病患者酸化ストレス測定 の臨床評価 —先端スピン応用医学の東西医学への展開3—

筑波技術大学保健科学部附属東西医学統合医療センター¹⁾

筑波大学付属病院日立社会連携教育研究センター²⁾

あさおクリニック³⁾

平山 暁¹⁾, 青柳 一正¹⁾, 藤森 憲¹⁾, 片山 幸一¹⁾, 植田 敦志²⁾, 大和田 滋³⁾

キーワード：慢性腎臓病, 電子スピン共鳴, 酸化ストレス, スーパーオキシド, アルコキシラジカル

1. 研究背景

2010年代に入り、糖尿病、心・腎・脳血管疾患、がんなど生活習慣に起因し慢性の長期経過により死や重大な障害に至る非伝染性疾患(non-communicable diseases: NCD)が全世界の筆頭死因であることが国連総会で報告され、地球規模の医学課題となった[1]。がんから糖尿病に至る多彩なNCDの共通病態として慢性炎症があり、その反応過程における共通のプロセスである酸化ストレスの病態解明や制御が極めて重要となってきた。しかしながら、酸化ストレスを定量化し臨床的に評価する方法は依然として乏しく、研究発展のボトルネックとなっている。生体内酸化ストレスの起源となるものは活性酸素(ROS)であるが、これは電子軌道内に不対電子を有していることから、電子スピンを計測すればROS動態を評価することが可能である。この方法となる電子スピン共鳴法(ESR)は原理的にROSを個別かつ正確に同定できることから、潜在的に最も有用な酸化ストレス評価法となり得るが、その操作の煩雑さや生体応用が困難であったことから、未だ汎用性に乏しい。

これまで申請者は本競争的教育研究プロジェクト事業や科研費研究を通じ、臨床応用に通じる酸化ストレス研究を「先端スピン応用医学の東西医学への展開」と題し病態解析と治療応用という両面から進めてきた。病態解析としてはESRを用いた多種ラジカル検出法(MULTIS)を開発発展させてきた。これにより、これまで臨床的に検出不可能であった微小炎症状態における血清抗酸化バランスを検出し、和漢薬投与時の酸化ストレス変化を描出し示し、また酸化ストレス変動を規定する因子を分子レベルで解明した。治療応用としては、ドラッグデリバリーシステム(DDS)技術を用い、酸化ストレスの増大する炎症部位局所でのみスピンをコントロールし、全身に影響を与えない抗酸化ナノ粒子(RNP)を開発している[2]。本年度研究では、これまでの「先端スピン応用医学の東西医学への展開」を更に推し進め、MULTIS法を用い、慢性腎臓

病(CKD)ステージ5D患者における酸化ストレス動態を解析した。

2. 研究方法

酸化ストレス動態は昨年度本研究等にて開発してきたMULTIS法によった[3,4]。本法ではROS発生を紫外光もしくは可視光の照射により行うため、厳密な特定種のラジカル発生量を制御可能となる。測定対象はヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)、スーパーオキシド(O_2^-)、脂質アルコキシラジカル($\text{RO}\cdot$ (tert-BuO \cdot)), 脂質ペルオキシラジカル($\text{ROO}\cdot$ (tert-BuOO \cdot)), アルキルラジカル($\text{R}\cdot$ (CH_3))の5種のフリーラジカル及び一重項酸素($^1\text{O}_2$)である。実際の測定方法を表1に示す。これまでの改良により、昨年度等と比べ照射時間などに変更がある。ESR装置はラジカルリサーチ社製RRX-1X ESR装置を用い、リン酸バッファーを溶媒としたフローインジェクション系にて施行した。スピントラップ剤はラジカル種についてはCYPMPOを用いた。一重項酸素の検出はTEMPを用いた。

検体提供に同意を得られた健常者(n=8)および安定維持血液透析患者(CKD stage 5D, n=15)を対象とした。併せて炎症関連サイトカイン (TNF- α , IL-6, アデ

表 MULTIS法による活性酸素種測定

ROS	スピントラップ剤	ROS発生剤	光源	照射時間(sec)	抗酸化剤
$\cdot\text{OH}$	CYPMPO	H_2O_2 10mM	UV	5	GSH
O_2^-	CYPMPO	Riboflavin 20 μM	VL	60	SOD
$\text{RO}\cdot$	CYPMPO	AAPH 10mM	UV	5	Trolox
$\text{ROO}\cdot$	CYPMPO	tBHP 10mM	UV	5	a-lipoic acid
$\text{R}\cdot$ (CH_3)	CYPMPO	H_2O_2 100mM DMSO 10mM	UV	30	CYPMPO
$1\Delta\text{O}_2$	TMPO	Rosebengal 200 μM	VL	30	GSH

イポネクチン) およびNO代謝産物(NO_x)を測定し、MULTISの結果と比較した。

3. 結果および考察

これまで腎不全患者では一般に酸化ストレスが亢進するとされている。透析患者血清では健常群に比べ、O₂⁻に対する消去活性は著増し、OH[•]、RO[•]に対する消去活性は増強していた。一方で、R[•]、ROO[•]、¹O₂に対する消去活性は減弱していた。MULTIS法の原論文ではROO[•]に対する消去活性は増強しており、本研究結果とは異なっているが、他のラジカルに関してはおおむね一致する結果となった。

われわれはOH[•]に対する消去活性が血液透析患者では減弱していることを以前に報告した[5]。しかしこの報告後、透析患者血中に含有される尿毒症物質(uremic toxin)によりOH[•]発生に使用していた酵素系が失活する懸念が生じたため、MULTISでは非酵素系によるラジカル発生を用いている。このため既報と一部異なる結果を呈している。

一方本研究では、各種ROSに対する消去活性相関を用い、ラジカル連鎖反応を描出することを試みた。この結果、健常群ではO₂⁻消去活性と一部ROSに対する消去活性および血清NO_x濃度の間に正相関が認められたが、透析患者群ではこの連関は消失していた。このことは血液透析患者において透析患者ではラジカル連鎖・相互反応過程が変質しており、細胞応答を惹起する酸化ストレス刺激そのものが健常者と異なっていると考えられる。加えて生体内の酸化抗酸化平衡システムのひとつとして概念的に示唆されているO₂⁻-NOバランスが、健常者血清において実在していることの証左となりうる。

一方、各ROS消去活性と炎症性サイトカインとの間に関連は認められなかった。

本研究の結果推測される、血液透析患者におけるラジカル連鎖反応解析を図に示す。

4. 謝辞

本研究の遂行に関し、伊藤紘氏・松井裕史博士(筑波大学大学院人間総合科学研究科)ならびに真明正志氏(ラジカルリサーチ(株))の協力を得ました。ここに深謝致します。本研究の一部は「腎とフリーラジカル 第12集」(東京医学社、ISBN 978-4-88563-239-6)に記載されています。本稿は研究成果報告書です。

5. 参考文献

- [1] Prevention and control of non-communicable diseases. Report of the Secretary-General. United Nations General Assembly 19 May, 2011.

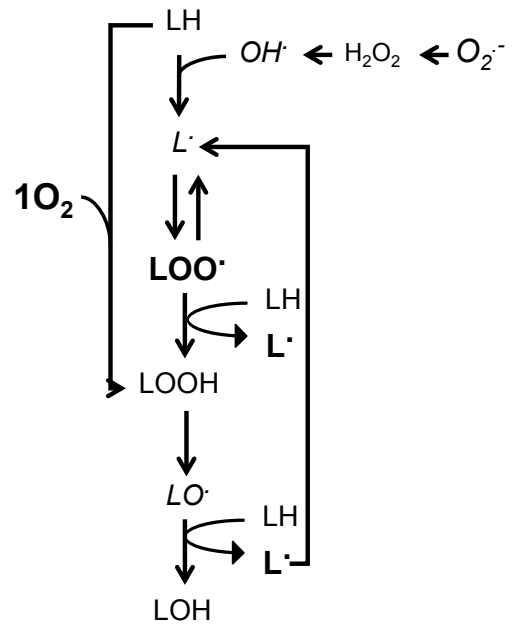


図 推測される血液透析患者における血液中のラジカル連鎖反応状態。太字：消去活性が減弱しROSが増加、斜字：消去活性が増強しROSが減少。

- [2] 長崎幸夫、平山 暁、他 高分子環状ニトロキンドラジカル化合物とシリカの有機—無機ハイブリッド複合体 PCT/JP2013/052769 2013.2.6, WO2013/118783 A1 2013.8.15.
- [3] 平山 暁、大和田滋、青柳一正、他、MULTIS法による微小炎症病態の検出 筑波技術大学テクノレポート 2013;21(1): p108-109.
- [4] Oowada S, Endo N et al. Multiple free-radical scavenging capacity in serum. J Clin Biochem Nutr. 2012;51(2): 117-21.
- [5] Nagase S, Aoyagi K, Hirayama A, et al. Favorable effect of hemodialysis on decreased serum antioxidant activity in hemodialysis patients demonstrated by electron spin resonance. J Am Soc Nephrol 1997;8: p1157-1163.

6. 関連発表等

- [1] 平山 暁、伊藤 紘、松井裕史、他、多種ラジカル消去活性測定法(MULTIS)による網羅的抗酸化能評価 第14回日本抗加齢医学会総会 2014.6 (北区、大阪市、大阪府)
- [2] Nagasaki Y, Ueda A, Hirayama A et al. Nano-kidney Possessing Oxidative Stress Suppression Character. Kidney Week 2014 (Philadelphia, PA), abstract in J Am Soc Nephrol 2014:326A.