

慢性腎不全患者における酸化LDLと動脈硬化進展

－介入試験－

福澤 純 [旭川医科大学／助手]

矢尾 尚之 [医療法人仁友会石田病院／医師]

板部 洋之 [昭和大学医学部／教授
(前帝京大学薬学部／助教授)]

菊池 健次郎 [旭川医科大学医学部第一内科／教授]

松谷Knox洋子 [Knox研究所／所長
(前旭川ストアー旭川電気軌道株式会社／アドバイザー)]

背景・目的

背景

生活習慣の欧米化に伴い、本邦でも心筋梗塞などの動脈硬化性疾患の罹患率が増加し、生命予後の悪さ、「生活の質」の低下が問題となり、その対策として近年その副作用が問題となっている薬物によるコレステロール低下療法以外に抗酸化および抗動脈硬化作用を有する機能性食品の摂取が注目されている。

機能性食品の抗動脈硬化効果の評価には、医薬品と同様に動脈硬化の「進展」がその評価項目になり、観察期間が長くなる介入試験の導入が必要である。

これらの製品の開発を促進するため短期間(ワンポイント)での評価が可能な動脈硬化進展予測マーカーの開発が求められている。

動脈硬化の進展が速い慢性腎不全患者は動脈硬化進展に対する評価期間を短縮可能なため、抗動脈硬化作用を有する機能性食品の効果を検討するには良い対象となることが考えられる。

最近、申請者らは酸化LDLが動脈硬化の関係する各種病態の急性期マーカーとして、他の臨床検査よりも有用であることを見出した(Fig1)。しかし、長期間の動脈硬化進展との関係は検討されていない。

EHara S, Itabe H, et al Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 103, 1955-60, 2001

Itabe H, et al. Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. Analysis by anti-oxidized low density lipoprotein monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 271, 33208-33217, 1996

さらに、申請者らは北海道を原産とするRibes nigrum L(黒カリン)に抗ウイルス作用があることを特許および論文で発表し、またこれが強力で持続的な抗酸化能を有することも見出した

(Fig2)。

Knox Y, et al. Activity of anthocyanins from fruit extract of Ribes nigrum L. against influenza A and B viruses. *Acta Virol.* 45: 209-215, 2001

Knox Y, et al. Anti-influenza virus activity of crude extract of Ribes nigrum L. *Phytother Res.* 17: 120-122, 2003.

特許：【発明者】Knox 洋子他【発明の名称】抗インフルエンザウイルス活性を有する馬鈴薯アントシアニン色素【公開番号】特開2001-316399【公開日】平成13年11月13日

特許出願：【発明者】Knox 洋子他【発明の名称】抗ウイルス剤【公開番号】特願2000-150042【出願日】平成13年5月22日
目的

本研究の目的は動脈硬化進展が速い慢性腎不全患者における酸化LDL値と臨床的な動脈硬化進展との関係を強力かつ持続的な抗酸化能を有する食品Ribes nigrum Lを介入させ検討し、酸化LDL値測定が評価に時間を要する動脈硬化進展の代用評価方法として有用であることを確認することである。

内容・方法

プロトコール

本研究への参加を書面にて同意した、血液透析患者400人を対象とする(5人/100人・年の死亡率が確認されている)。調整した強力かつ持続的な抗酸化能を有する黒カリンジュース(予備研究にてカリウム低減処理を行いその濃度を測定して、透析患者に対する安全性を確認している)を飲用群と非飲用群に無作為に分け、2年間フォローアップする。死亡および動脈硬化性疾患発症(非致死性心筋梗塞など)を1次エンドポイントとして、試験開始前、および後いくつかの時点で2次エンドポイントとしての各種動脈硬化の臨床指標(後述)および各種臨床検査値を評価する。以上の結果と各測定ポイントにおける酸化LDL値との関係を検討する。非介入の場合各群20人以上の死亡および動脈硬化性疾患発症数が予測され統計評価が可能である。

動脈硬化進展の評価

(1) エコードプラにより心筋の性状—陳旧性梗塞の有無などを判定する。(2) 運動負荷および薬物負荷で虚血性心疾患の合併する可能性の高い患者に対しては冠動脈造影などを用いて冠動脈硬化の程度を判定する。(3) 胸部および腹部CT撮影による腹部大動脈の動脈硬化の評価を行う。(4) 脳MRI撮影による脳梗塞病変の評価を行う。

酸化LDL測定法

酸化ストレスが動脈硬化性疾患に関与している報告がいくつかなされているが、酸化度の測定は間接的な方法(酸

化の結果もたらされる最終産物や、抗酸化物質の減少の測定など)で行われているのが現状であり、実際の酸化LDLを測定していないことが欠点であった。申請者グループはLDLなどの酸化修飾部分を認識する抗体を作製し、これとLDLの成分であるApoBを認識する抗体をあわせて用いた酸化LDLの直接的な測定法であるサンドイッチELISAシステムを開発し、現在その測定法のスタンダードなシステムとなりつつある。いずれも既存の方法を用いているため実現の可能性については特に問題点はない(Fig3)。

結果・成果

黒カリン含有ジュースの製造

黒カリンおよび黒豆(黒大豆)を原料として飲料(ジュース)を作製した。当初は黒カリン単独の飲料の作製を予定していたが、その後、近隣で採取可能な黒豆が抗酸化能力の高い原料であることが分かり追加して加えることとした。長期間の摂取が可能なように「味」、「風味」を調節して作製した。

血中酸化LDL値測定法の開発

共同研究者の板部が作製した酸化LDLの酸化修飾部位(フォスファチジルコリン)に対する抗体(DLH3)を固相化して、血液サンプルを超遠心して得られたLDL画分をアプライして、LDLの構成成分であるApoBに対する抗体と二次抗体によるサンドイッチELISA法を開発した。現在、その測定法のスタンダードなシステムとなっている。測定には標準曲線を得るためのスタンダード酸化LDLの作製が必要となる。当初は共同研究者(板部)の施設からの提供に依存していたが、本研究開発期間中に当施設(旭川医科大学)での作製が可能となった。

血液透析患者における血中酸化LDL値測定

介入前の血液透析患者における血中酸化LDL値を求めるため(正常対照よりも高値をとるかどうか)、約100人の患者および正常対照43人においてパイロットスタディとして血中酸化LDL値を測定した。血液透析患者(透析セッション前に測定)の血中酸化LDL値は予想とおり正常対照に比べ有意に高値を呈していた。また、以前に書面による同意を得て行ったメチレンテトラハイドロ葉酸還元酵素(MTHFR)遺伝子多型検査の結果によって群分けして比較したところ、酸化ストレスがかかりやすいことが知られているVV多型群がその他の多型であるAAおよびAV多型のnon-VV多型群よりも高値を呈することを見出した。また、この結果は各透析セッションの間に酸化LDL値が上昇することによることが判明した。さらに喫煙群は非喫煙群に比べて血中酸化LDL値が高く、それぞれの結果を今後の検討に生かせることがわかった。MTHFRは酸化促進物質であるホモシステインの代謝に重要な役割をはたしており、そのVV型多型は酵素活性が低くな

る(MTHFR血中濃度が高くなる)ことが知られている。すなわち、VV型多型患者においては血中ホモシステイン濃度が高い(確認済み)。本研究のパイロットスタディにおいて血中酸化LDL値はこのホモシステイン濃度と相関があることが判明して、血中酸化LDL値が酸化ストレスのマーカーであることが証明された。現在は健康ボランティア(喫煙者を含む)に上記で作製したジュースを飲んでもらい定期的な測定を行い、黒カリンジュースの効果がどの時点であるかを検討する(Fig4)。

今後の展望

2001年の保健機能食品制度の創設以降、従来から行われていた各種機能性食品の開発が急速に進められ、乱立の様相を呈している。開発した機能性食品の他製品との差別化にはそのアイデンティティ(摂取したことによる標的器官の機能調節と、その結果としての疾患リスク低減効果)をどのように強調して表示するかが重要である。

理論上ある種の脂肪酸摂取が抗動脈硬化作用を有し結果的に心疾患発症率と死亡率を低下させることが予想されたが、介入試験の結果は予想とは異なっていた。このことから*in vitro*試験の結果などから予想される機能性食品の効果についてではその安全性も含め介入試験による評価が必要である。すなわち、*in vitro*系における抗酸化作用をもつ機能性食品を開発し、その抗動脈硬化機能を検討する場合「介入試験」を行い1次エンドポイント(死亡、非致死的心筋梗塞発症など)を評価する必要がある。しかし、これらの1次エンドポイントを評価するには多額の予算および完成に長期間を要し、現状では実施が困難である。

target function marker(生体の標的機能の調節に寄与)としての各種のバイオマーカーが動脈硬化進展の予測因子として考えられているが総、LDL-コレステロールを含め完全なものは今のところない。

intermediate end-point marker(疾病を当面回避したとみなす)としての本研究の2次エンドポイント評価項目を経時に測定することは介入試験における評価法として有用である可能性があるが評価の長期化を招く。

target function markerである酸化LDLの測定が本研究の結果、有用であることが示されれば、1次エンドポイント評価の代用となるため製品化(他製品との差別化)までの大幅な時間短縮が可能となる。

この研究の成果は(1)他製品との本道由來の機能性食品(特定保健用食品)の差別化に寄与するばかりではなく、(2)動脈硬化進展評価法としての研究モデルの提示:ビジネスモデルの可能性、(3)この測定法自体の高速化および大量化すなわち商業化、製品化に結びつくため、各種研究開発、産業化的シーズとして期待される。

血中酸化LDL値測定の他分野への応用

動脈硬化加速化モデルである血液透析患者において(確認必要)、また、酸化ストレスがより多くある状態と思われるMTHFR遺伝子VV型多型群で血中酸化LDL値が高いことが確認できた場合、この測定方法および結果が臨床的に重要な意義をもつことになり他の分野への応用が可能となる。

血中酸化LDL値測定の簡便法の開発

本研究で用いる血中酸化LDL測定法は、超遠心を行う、簡便性を欠いている。血中酸化LDL値測定に臨床的意義があることが分かった場合には正確かつ簡便法を開発するきっかけとなりえる。

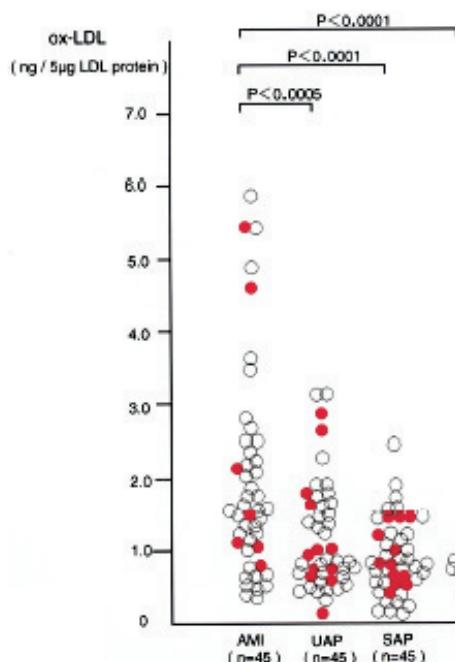


Fig1 Graph showing ox-LDL levels in patients with AMI, UAP, and SAP. Solid circles indicate patients with hypercholesterolemia; open circles, patients without hypercholesterolemia; and n, number of patients and controls analyzed

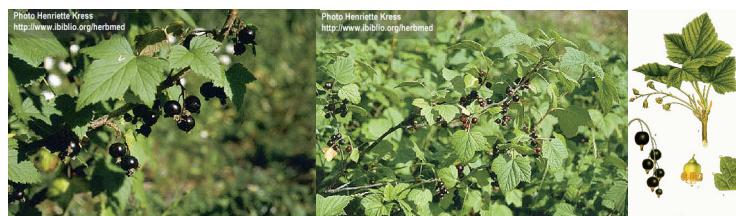


Fig2

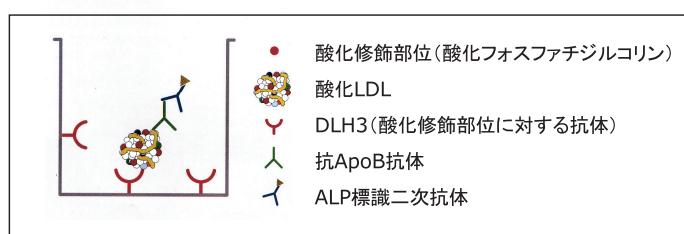


Fig3

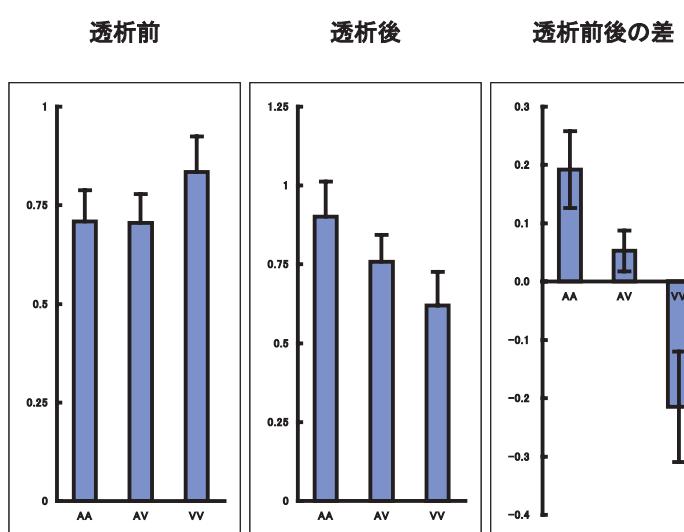


Fig4