維持透析患者での血管病変と一酸化窒素 (NO) —大動脈石灰化係数との関連について—

大山 信雄 本宮 善恢 杉原 清貴* 土肥 和紘*
岡島 英二郎** 米田 龍生** 吉田 克法** 大園 誠一郎**
平尾 佳彦** 岡島 英五郎**
翠悠会本宮医院 奈良県立医科大学第1内科学教室* 同泌尿器科学教室**

key words: 一酸化窒素, 亜硝酸イオン/硝酸イオン, 大動脈石灰化係数, 血液透析

〈要旨〉

我々は、維持透析患者において、一酸化窒素 (NO) の最終代謝産物である $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (NOx) を測定し、その血漿中濃度が、透析間欠期間での蓄積分を考慮してもなお高値を示す症例があることより、何らかの NO 産生亢進を伴う病態が存在することを明らかにし、報告した。また、生体内での NO 産生の最大の場合はマクロファージを含めた血管系組織であることから、今回、29 例の維持透析患者において血漿中 NOx 濃度と大動脈石灰化係数 (ACI) および Ankle Pressure Index (API) を比較し、透析患者特有の血管病変への NO の関与を検討した。

対象患者群での血漿中 NOx 濃度は 42.6~367.6, 平均 $160.1 \pm 87.28 \times 10^{-6}\text{M}$ であり、NOx 濃度と ACI との間に $r=0.701$ ($p<0.001$)、また、NOx 濃度と API との間に $r=-0.446$ ($p<0.02$) と、いずれも有意な相関が得られた。

今回の検討で、維持透析患者にみられる動脈石灰化病変を主体とする血管病変と血中 NOx 濃度が密接に関連していることが示唆された。

Comparative study of Nitric Oxide (NO) and atherosclerotic change in patients on maintenance hemodialysis—with special reference to Aortic Calcification Index—

Nobuo Ohyama, Yoshihiro Motomiya, Kiyotaka Sugihara*, Kazuhiro Dohi*, Eijiro Okajima**, Tatsuo Yoneda**, Katsunori Yoshida**, Seiichiro Ohzono**, Yoshihiko Hirao**, Eigoro Okajima**

Suiyukai Motomiya Clinic; First Department of Internal Medicine*, Department of Urology**, Nara Medical University

We previously reported that plasma levels of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (NOx) were distributed in a wide range, varying from normal to elevations as high as six times normal in patients on maintenance hemodialysis. Increased production, rather than intradialytic accumulation, was speculated to account for this elevation. According to our previous data, we proposed an underlying mechanism involving increased production of NO to be intimately associated with this progressive process reflecting certain complications of long term hemodialysis, such as atherosclerotic change.

The vascular system, including circulating macrophages, is primarily responsible for the generation of NO. Therefore, we measured plasma NOx levels in 29 hemodialysis patients and made comparisons with the Aortic Calcification Index (ACI) and Ankle Pressure Index (API) in order to investigate the effect of NO on atherosclerotic change in the characteristic setting of hemodialysis.

Plasma levels of NOx in hemodialysis patients varied from 42.6 to 367.6, $160.1 \pm 87.28 \times 10^{-6}\text{M}$ on average, and significantly correlated with ACI ($r=0.701$, $p<0.001$) and API ($r=-0.446$, $p<0.02$).

Consequently, we demonstrated herein a close relationship between the plasma NOx level and the degree of

calcified atherosclerotic change. However, the mechanism underlying NO production in accelerated atherosclerotic change in maintenance hemodialysis patients remains to be clarified in further studies.

緒 言

維持透析患者では動脈石灰化病変に代表される重度の全身的血管病変が存在し、QOLのみならず、最大の予後決定因子となっている。一方、内皮由来弛緩因子の本体として注目されている一酸化窒素 (NO) の研究分野は近年、まさしく borderless の広がりを見せており、動脈硬化病変への関与についても種々の報告がなされている¹⁻³⁾。しかしながら、動脈硬化の発症・進展機序への NO の役割は不明な点が多く、ことに維持透析患者での全身的血管病変への NO の関与を検討した報告は見あたらない。

我々は前報⁴⁾において、NO の最終代謝産物である亜硝酸イオン/硝酸イオン ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, NOx) の血中濃度を測定し、維持透析患者では NO 産生亢進を伴う病態が存在すること、また重度の大動脈石灰化病変を有する症例において NOx 濃度が有意に高値であることを明らかにし、報告した。

本研究では、動脈硬化病変の程度を大動脈石灰化係数 (Aortic Calcification Index, ACI)⁵⁾を用いて定量化し、 NOx 濃度との比較を行うとともに、従来より動脈硬化性疾患への関与が指摘されている⁶⁻⁸⁾ Lipoprotein-a (Lp(a)) および閉塞性動脈病変の指標とされる Ankle Pressure Index (API)⁹⁾ との関連についても検討することにより、維持透析患者にみられる血管病変への NO の関与とその臨床的意義を明らかにした。

I. 対象および方法

1. 対 象

比較的安定した維持透析患者 29 例 (男性 15 例, 女性 14 例) を対象とした。平均年齢は 51 ± 9.6 歳 (36~67 歳) であり、平均透析期間は 90 ± 51.7 か月 (13~204 か月) であった。原疾患は全例、臨床的に慢性糸球体腎炎と診断されており、一日尿量 100 ml 以上の症例は認めなかった。なお、動脈石灰沈着に影響を及ぼすと考えられる因子を可能な限り除外するため、PTH-C 10 ng/ml 以上の高値例および 70 歳以上の高齢者は除外した。対象症例中、活性型ビタミン D_3 パルス療法施行例は含まれていなかったが、全例、 $1\alpha\text{-OH-D}_3$ 製剤 (0.25~0.5 $\mu\text{g}/\text{日}$) を服用しており、また、NO 産

表 Laboratory data of dialysis patients

		mean $\pm$ S. D.	min~max
Serum Ca	(mg/dl)	9.5 ± 0.72	(7.9~10.5)
Serum P	(mg/dl)	6.9 ± 1.21	(4.9~9.7)
Ca $\times$ P		65 ± 11.8	(45~93)
PTH-C	(ng/ml)	5.3 ± 2.86	(0.2~9.8)
Total ALP	(IU/l)	137 ± 50.0	(73~296)
Serum aluminium	($\mu\text{g}/\text{l}$)	30 ± 17.2	(2~58)
Serum ferritin	(ng/ml)	82.2 ± 130.7	(8.5~656.0)
Total cholesterol	(mg/dl)	161 ± 37.0	(93~223)
LDL cholesterol	(mg/dl)	98 ± 26.5	(51~145)
Lipoprotein-a	(mg/dl)	27 ± 20.6	(4~85)

生に影響すると考えられる¹⁰⁾ ACE 阻害剤使用例 3 例を含めた 11 例が降圧剤服用中であった。一方、対照群として健常成人 18 例 (男性 9 例, 女性 9 例, 平均年齢 41 ± 11.1 歳) についても同様に血漿中 NOx 濃度を測定し、検討した。なお、本研究の実施に際しては対象群、健常者群ともに研究の主旨を十分説明し、同意を得た上で行った。

2. 関連臨床検査

対象とした 29 例での臨床検査結果を表に示した。カルシウム・リン積 (Ca $\times$ P) 70 以上の症例が 29 例中 11 例 (37.9%) みられたが、臨床的に明らかな二次性上皮小体機能亢進症、アルミニウム骨症および鉄骨症を疑う症例は認めなかった。また、脂質関連検査では Lp(a) 24 mg/dl 以上の高値例が 13 例 (44.8%) みられたが、総コレステロール値および LDL-コレステロール値については、ほぼ基準値に一致した値であった。

3. NOx 濃度測定法

血漿中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度を Griess 反応^{11,12)}に基づいた自動分析装置 TCI-NOX1000 (東京化成工業, 東京) を用いて測定した。すなわち、検体中の NO_3^- をカドミウム・銅還元カラムにより NO_2^- に還元し、 NO_2^- と Griess 試薬との反応で得られたアゾ化合物量の 540 nm での吸光度を測定することにより、 NO_2^- と NO_3^- 濃度の総和を算出し、 NOx 濃度とした。

4. ACI 測定法

湯川ら⁵⁾の方法に準じ、腹部 CTscan での大動脈石灰化係数を次の式により算出した。

$$\text{大動脈石灰化係数 (ACI)} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Ni}}{12} \times \frac{1}{n} \times 100$$

$\frac{\text{Ni}}{12}$: 石灰化度数 n: スライス数

すなわち、横隔膜下より総腸骨動脈分岐部までの

図1 Plasma NOx level in patient group and control group

1 cm 間隔で撮影した各スライスにおいて、大動脈断面の12分割中の石灰化を有する分割数 ($\frac{Ni}{12}$) を石灰化度数とし、これらを合計した値をスライス数 (n) で除し、百分率 (0~100) で表した。

5. API 測定法

超音波血流計 ES-1000SP (林電気, 川崎) を用いた Doppler 法により、足関節部収縮期血圧 (a) と非シャント側上腕収縮期血圧 (b) を測定し、(a) ÷ (b) により算出した⁹⁾。

6. 透析方法

全例、抗凝固法として全身ヘパリン化法を用いたバイカーボネート透析施行例であり、使用ダイアライザーは再生セルロース膜2例、改良セルロース膜8例、合成高分子膜19例であった。

7. 統計学的処理

各測定値は平均値±標準偏差 (S. D.) で表し、群間の有意差検定には unpaired *t*-test を、各測定値の相関は student's *t*-test を用いて統計学的検索を行い、危険率 (P) 5%未満を有意水準とした。

II. 結 果

1. NOx 濃度測定結果

健常者18例での血漿中 NOx 濃度は20.5~116.3, 平均 $59.3 \pm 30.42 \times 10^{-6} \text{M}$ であった。また、患者群29例での血漿中 NOx 濃度 (透析前) は42.6~367.6, 平均 $160.1 \pm 87.28 \times 10^{-6} \text{M}$ と、健常対照群での測定値に比べ有意に高値であった ($p < 0.001$) (図1)。なお、性別、年齢および透析歴と NOx 濃度との間に明らか

な関連は見られなかった。

2. ACI 測定結果

患者群での ACI は1~67, 平均 23 ± 19.4 であり、年齢、透析期間の増加に伴う ACI の有意な上昇は見られなかったが、ACI と NOx 濃度との間に $r = 0.701$ ($p < 0.001$) と正相関が認められた (図2)。また、NOx 濃度が今回の平均値に相当する $160 \times 10^{-6} \text{M}$ 以上であった12例中、ACI が平均値23未満を示した解離例は2例 (16.7%) のみであった。

3. API 測定結果

API 測定値は0.90~1.23, 平均 1.063 ± 0.086 であり、NOx 濃度との間に $r = -0.442$ ($p < 0.02$)、ACI との間に $r = -0.446$ ($p < 0.02$) と、いずれも有意な負の相関が得られた (図3, 4)。

4. カルシウム・リン代謝との関連

異所性石灰沈着の直接の関連因子である $\text{Ca} \times \text{P}$ が70以上の高値群 (11例) と70未満の低値群 (18例) で ACI を比較したところ、高値群で平均 25 ± 14.5 , 低値群で平均 22 ± 22.1 と両群間に差はなかった。しかしながら、NOx と ACI との相関をみると、 $\text{Ca} \times \text{P}$ 高値群では $r = 0.627$ ($p < 0.05$)、 $\text{Ca} \times \text{P}$ 低値群では $r = 0.715$ ($p < 0.001$) と、いずれの群においても NOx 濃度と ACI との間に正相関がみられた (図5)。

5. 脂質関連物質との関係

総コレステロール、LDL コレステロールおよび Lp (a) と ACI との間に有意な関連は得られなかった。しかしながら湯川¹³⁾の報告に基づき、Lp (a) 24 mg/dl 以上を高値群、24 mg/dl 未満を低値群としたところ、Lp (a) 高値群では ACI と NOx 濃度との間に $r =$

図 2 Correlation between plasma NOx level and ACI in dialysis patients

図 4 Correlation between ACI and API in dialysis patients

図 3 Correlation between plasma NOx level and API in dialysis patients

0.853 ($p<0.001$) と、全症例での比較に比べ、より高い相関係数が得られたのに対し、Lp(a) 低値群では ACI と NOx 濃度との間に有意な相関は得られなかった (図 6)。

6. 血圧との関係

対象症例 29 例中、降圧剤服用中の 11 例と降圧剤服用歴のない 18 例で NOx および ACI を比較した。降圧剤服用群での NOx 濃度は平均 $162.1 \pm 99.6 \times 10^{-6}$ M, ACI は 27 ± 24.6 に対し、非服用群では $158.9 \pm 81.9 \times 10^{-6}$ M と 21 ± 15.7 であり、有意差は得られなかった。

7. 心虚血性変化との関連

安静時心電図上、虚血性変化を認める症例または虚血性心疾患の既往があり、定期的に冠拡張剤を服用している症例は 29 例中 11 例 (37.9%) であった。これらの 11 例と他の 18 例で NOx 濃度、ACI, API を比較したが、いずれも有意差は得られなかった。

8. 内シャント閉塞例での検討

動脈石灰化病変の程度と内シャント閉塞との関連を確認するため、過去 5 年間に再シャント造設術を要し

た 8 例と他の 21 例で NOx 濃度および ACI を比較したが、両群間に有意な差はみられなかった。

III. 考 察

NO の最終代謝産物である NOx はすでに報告したごとく⁴⁾、透析によりほぼ完全に除去されるにもかかわらず、血液透析患者での血中濃度は症例間のばらつきが大きく、健常者平均値の約 6 倍もの高値を示す症例もあり、何らかの NO 産生亢進を伴う病態が存在するものと考えられる。

我々はすでに重度の大動脈石灰化を有する症例において血中 NOx 濃度が有意に高値であることを明らかにし報告した⁴⁾。今回、維持透析患者での血管病変と NO の関連をより詳細に検討するため、高齢者、糖尿病、PTH 高値例および活性型ビタミン D₃ パルス療法施行例など、動脈石灰化に影響を及ぼすと考えられる要因をできるだけ除外した症例について ACI を測定し NOx 濃度と比較したところ、 $r=0.701$ ($p<0.001$) と有意な正相関が得られ、NO と透析患者での動脈石灰化との関連が再確認された (図 2)。

ACI は単に大動脈の肉眼的石灰化を定量化したものであるため、病理学的な動脈硬化病変を反映するかという点については疑問が残るが、渡辺ら¹⁴⁾は 42 例の剖検例での動脈硬化占有面積と ACI との比較で、高い正相関が得られたと報告している。また、Fishbane ら¹⁵⁾は 177 例の透析患者での検討で、脳血管病変、心血管病変および末梢動脈病変を有する患者群で API 値はいずれも有意に低値であり、API は全身的動脈硬化病変を反映すると結論している。したがって、今回、図 4 に示したように ACI と API との間に有意な負の相関が得られたことから、ACI 測定は全身の動脈硬化病変の指標として簡便かつ極めて有用であると考え

図 5 Correlations between plasma NOx level and ACl according to $\text{Ca} \times \text{P}$ in dialysis patients

図 6 Correlations between plasma NOx level and ACl according to Lp(a) in dialysis patients

られる。さらに図3のごとく NOx 濃度と API との間にも同様に負の相関が得られたことは、単に異所性石灰沈着としての動脈石灰化という事象のみならず、全身の血管病変と NO の関連を示唆できるものといえる。

動脈硬化の発症・進展機序への NO の関与については、血管内皮への白血球接着障害²⁾や血管平滑筋増殖抑制¹⁶⁾により動脈硬化発症に予防的に働くとする報告もあるが、一旦、動脈硬化が発症すると病巣に浸潤したマクロファージや多核白血球より誘導型 NO 合成酵素 (i-NOS) が誘導され、これにより産生された NO は、それ自身が細胞障害性を有している¹⁷⁾だけでなく、心筋虚血・再灌流時にみられるように、パーオキシナイトライト (ONOO^-) やヒドロキシルラジカ

ル ($\cdot\text{OH}$) といった、より強力な細胞毒性をもつラジカル種となり、一層、動脈硬化を促進することも考えられる¹⁸⁾。さらに構成型 NO 合成酵素 (c-NOS) に比べて i-NOS 由来の NO 産生がはるかに大量である¹⁹⁾ことを考えても、NOx 濃度高値の症例では、マクロファージを含めた血管系組織での i-NOS 由来 NO 産生が関与している可能性が大きいといえる。

上皮小体機能異常を抱える透析患者での動脈石灰化についてはカルシウム・リン代謝の影響を考慮しなければならないが、今回、 $\text{Ca} \times \text{P}$ が 70 以上の高値群と 70 未満の低値群での比較では ACl に差はみられなかった。しかしながら、ACl と NOx 濃度の相関をみると (図 5), $\text{Ca} \times \text{P}$ 高値群、低値群いずれにおいても ACl と NOx 濃度の間に正相関が得られており、その相関

係数は $\text{Ca} \times \text{P}$ 低値群においてむしろ高いことより、単なるカルシウム・リン代謝異常による ACI への影響は否定的である。

また、加齢現象の進む透析患者では脂質代謝異常は広く認められており、動脈硬化病変の進展にはこの点に関する考慮も必要である。なかでも従来より Lp(a) は動脈硬化、特に冠動脈疾患との関連が文献上指摘されている⁶⁻⁸⁾。今回の検討では Lp(a) 高値群と低値群で NOx 濃度および ACI に有意な差は認められなかったが、 Lp(a) 低値群では NOx 濃度と ACI との間に有意な相関は得られなかったのに対し、 Lp(a) 高値群での NOx 濃度と ACI の相関は全症例での相関より鮮明であり、 Lp(a) による動脈硬化病変助長に NO が関与している可能性が示唆された(図6)。文献的に Lp(a) は血管内皮上の plasminogen receptor との拮抗作用²⁰⁾および plasminogen activator 活性の阻害作用²¹⁾により線溶能を抑制し、結果として動脈硬化病変を促進すると考えられている。また、 Lp(a) は年齢や食事・環境に左右されない独立の危険因子とされている²²⁾ことから、 Lp(a) 高値例では継続的に血栓性のベクトルを有しており、動脈硬化発症の risk が高い状態にあると考えられる。したがって図6の結果は、 Lp(a) 高値のような易血栓形成状態下において、一旦、動脈硬化病変が発症した場合には、前述のごとく i-NOS 由来の NO 産生亢進により、病巣の加速度的進展をきたすことが考えられる。

日常の透析現場で経験される加速された全身的血管病変は一般的な risk factor (高血圧、脂質代謝異常、喫煙等)に腎不全によるカルシウム・リン代謝異常という要因を加えても十分な説明はなされておらず、依然として長期透析患者の抱える最重要課題である。今回の検討により、維持透析患者の動脈硬化性病変において、 NO 産生亢進という新たな側面が明らかとなり、その背景に血管内皮細胞のみならずマクロファージや血管平滑筋細胞での i-NOS の発現もしくは活性化の関与が示唆された。

IV. 結 語

1. 維持透析患者 29 例において血漿中 NOx 濃度および動脈硬化性病変の指標として ACI を測定し、比較検討した。

2. 患者群での NOx 濃度は $160.1 \pm 87.28 \times 10^{-6} \text{M}$ 、ACI は 23 ± 19.4 であり、両者の間に $r = 0.701$ ($p < 0.001$) と有意な正相関が得られた。

3. また、全身の血管病変を反映するとされる API

と NOx 濃度との間に $r = -0.442$ ($p < 0.02$) と負の相関が得られた。

4. 以上より、維持透析患者の血管病変への NO の関与が強く示唆された。

本論文の要旨は第 14 回尿毒症病態研究会 (1995 年：名古屋) において、また本論文の一部は第 40 回日本透析医学会総会 (1995 年：横浜) において発表した。

文献

- 1) 川原康洋, 中山一郎, 奥田正則: 血管平滑筋細胞における誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現調節. 血管と内皮 4 : 573-579, 1994
- 2) Kubes P, Suzuki M, Granger DN : Nitric oxide : An endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 4651-4655, 1991
- 3) Cook JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME : Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. J Clin Invest 90 : 1168-1172, 1992
- 4) 大山信雄, 益田真理, 久我由紀子, 新井邦彦, 本宮善恢, 土肥和紘, 岡島英五郎: 維持透析患者における一酸化窒素 (NO) 代謝産物の測定. 透析会誌 29 : 29-35, 1996
- 5) 湯川 進, 西川 治, 日比野彰, 園部美弥彦, 刀禰佳典, 西川紀子, 西出 巖, 野本 拓: 動脈硬化症. 臨牀透析 4 : 233-238, 1988
- 6) Pepin JM, O'Neil JA, Hoff HF : Quantification of apo [a] and apo b in human atherosclerotic lesions. J Lipid Res 32 : 317-327, 1991
- 7) Schreiner PJ, Morrisett JD, Sharrett AR, Patsch W, Tyroler HA, Wu K, Heiss G : Lipoprotein [a] as a risk factor for preclinical atherosclerosis. Arterioscler Thromb 13 : 826-833, 1993
- 8) Cressman MD, Heyka RJ, Paganini EP, O'Neil J, Skibinski CI, Hoff HF : Lipoprotein(a) is an independent risk factor for cardiovascular disease in hemodialysis patients. Circulation 86 : 475-482, 1992
- 9) Yao ST : Haemodynamic studies in peripheral arterial disease. Brit J Surg 57 : 761-768, 1970
- 10) 並木 温, 諸井雅男: アンジオテンシン変換酵素阻害剤と NO . 医学のあゆみ 170 : 462-465, 1994
- 11) Griess P : Bemerkungen zu der abhandlung der H. H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen". Ber Deutsch Chem Ges 12 : 426-428, 1879
- 12) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR : Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochem 126 : 131-138, 1982
- 13) 湯川 進: 透析患者の脂質代謝異常—最近の知見を中

- 心に－. 透析会誌 25 : 87-92, 1992
- 14) 渡辺弘美, 窪田和雄, 伊藤健吾, 小野修一, 松沢大樹 :
腹部大動脈硬化のX線 CT による定量化. 動脈硬化
11 : 463-465, 1983
- 15) Fishbane S, Youn S, Kowalski EJ, Frei GL :
Ankle-arm blood pressure index as a marker for
atherosclerotic vascular diseases in hemodialysis
patients. Am J Kidney Dis 25 : 34-39, 1995
- 16) Garg UC, Hassid A : Nitric oxide-generating
vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine mono-
phosphate inhibit mitogenesis and proliferation of
cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin
Invest 83 : 1774-1777, 1989
- 17) Palmer RMJ, Bridge L, Foxwell NA, Moncada S :
The role of nitric oxide in endothelial cell damage
and its inhibition by glucocorticoids. Br J Phar-
macol 105 : 11-12, 1992
- 18) Matheis G, Sherman MP, Buchberg GD, Haybron
DM, Young HH, Ignarro LJ : Role of L-arginine-
nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation
injury. Am J Physiol 262 : 616-620, 1992
- 19) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : Nitric
oxide : physiology, pathophysiology, and pharma-
cology. Pharmacol Rev 43 : 109-142, 1991
- 20) Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL :
Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell sur-
face fibrinolysis and its potential role in atheroscler-
osis. Nature 339 : 303-305, 1989
- 21) Edelberg JM, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV :
Lipoprotein(a) inhibition of plasminogen activation
by tissue-type plasminogen activator. Thromb Res
57 : 155-162, 1990
- 22) 楠美嘉晃, 桜井 勇 : Lp (a) と動脈硬化症. 病理と臨
床 12 : 121-126, 1994