中性化腹膜透析液のグルコース分解物濃度について

山本 忠司 出雲谷 剛 奥野 仙二 山川 智之
仁真会白鷺病院

key words : 腹膜透析, 中性透析液, 酸性透析液, グルコース分解物

〈要旨〉

中性透析液 (N-PD) のグルコース分解物 (GDPs) 濃度および pH を同一条件で測定し比較検討した。

対象とした N-PD は平成 14 年 8 月までに薬価収載された 4 社の製品である。これら製品の内, N-PD, 1.5% および 2.5% 液に対し製造後 4 か月に GDPs 濃度を測定した。比較として製造後 4 から 12 か月の N-PD, 4.0% および製造後 12 か月の酸性透析液 (A-PD) についても測定した。また, 長期保存の影響をみるために製造後 1 年の GDPs 濃度も測定した。測定項目はグルコース室側 pH, 混合後 pH および GDPs 濃度で, GDPs については, 3-デオキシグルコソン (3-DG), グリオキサール, メチルグリオキサール, ホルムアルデヒド, アセトアルデヒド (AcA), 5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-HMF), フルフラール, ギ酸, およびレブリン酸とし, HPLC 法により 3 バッグを測定した。

N-PD のグルコース室側 pH は 2.90~6.04 であった。混合後 pH では 6.67~7.47 であった。A-PD は 5.17~5.25 であった。N-PD 各社の製品はギ酸とレブリン酸を除く GDPs のすべてに有意差を認めた。GDPs の総量 ($\mu\text{mol/L}$) は, 1.5% で 30.4~95.1, 2.5% で 51.4~136.5, 4.0% で 78.4~192.2 と製品間に差を認めた。また, その内訳は 3-DG と 5-HMF が平均 95% を占めていた。N-PD の低 GDPs 化には, 3-DG と 5-HMF の低減が必要であるが, 3-DG と 5-HMF はグルコース室側 pH 4.5 付近を境に鏡像的变化をするため, pH による調整は困難と思われた。A-PD の GDPs 総量では 1.5% で 324.9, 2.5% で 481.8, 4.0% で 594.2 と N-PD に比べ約 3 倍から 10 倍高値であった。

長期保存 (1 年間) による N-PD の GDPs 濃度 ($\mu\text{mol/L}$) の変化では, 1.5% 液で AcA のみが平均で 1.2 から 2.8 に増加し, 2.5% 液でも AcA のみが 1.4 から 2.7 と増加した。他の GDPs には変化なく, N-PD は A-PD に比べ長期保存でも安定していた。

各社 N-PD は pH を中性化し GDPs を低減させるということでは, その目的が達成されているといえる。しかし, 製剤設計の違いから GDPs 濃度に差があることが判明した。その影響を考察するためには, それぞれの GDPs の細胞障害性, 生体適合性についてさらに検討する必要がある。

Glucose degradation products in neutralized peritoneal dialysis solution

Tadashi Yamamoto, Tsuyoshi Izumotani, Senji Okuno, Tomoyuki Yamakawa
Kidney Center, Shirasagi Hospital

Four kinds of neutralized peritoneal dialysis solutions (N-PD) with a low level of glucose degradation products (GDPs) are currently marketed. The GDP concentrations of each N-PD have been confirmed in some reports, but the methods with which the levels have been measured are not uniform. We measured the concentration of GDPs and checked the pH of both the glucose chamber and after mixture of the N-PDs under the same methods and conditions, and compared these with an acid peritoneal dialysis solution (A-PD). The N-PDs studied were Midpeliq L[®] (Terumo), PD-solita[®] A[®] (Shimizu Medical), Perisate NL[®] (JMS) and Stay[®] safe balance[®] (Fresenius Medical Care). The concentrations of GDPs were measured 4 and 12 months after manufacture using high performance liquid chromatography (HPLC). The GDPs assayed were 3-deoxyglucosone (3-DG), glyoxal (Glx), methylglyoxal (M-Glx), formaldehyde (FoA), acetaldehyde (AcA), 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), furfural (2-FA), formic acid and levulinic acid.

The pH values of the N-PDs ranged from 2.90 to 6.04 in the glucose chamber, and from 6.67 to 7.47 after

山本 忠司 仁真会白鷺病院 〒546-0002 大阪市東住吉区杭全 7-11-23

Tadashi Yamamoto Tel : 06-6714-1661 Fax : 06-6719-6169 E-mail : yamamoto@shirasagi-hp.or.jp

〔受付 : 平成 16 年 4 月 8 日, 受理 : 平成 16 年 9 月 24 日〕

mixture, and in A-PD ranged from 5.17 to 5.25. The total amount of GDPs ($\mu\text{mol/L}$) in the N-PDs ranged from 30.4 to 95.1 at 1.5%, from 51.4 to 136.5 at 2.5% and from 78.4 to 192.2 at 4.0%. The concentrations of 3-DG and 5-HMF made up an average of 95% in the total GDPs. The total amount of GDPs in the A-PD at 1.5%, 2.5% and 4.0% was 324.9, 481.8 and 594.2, respectively and they were 3 to 10 times higher than N-PD. As for the change in the concentration of GDPs at a shelf life of 12 months in N-PD, only AcA increased from 1.2 to 2.8 at 1.5%, and from 1.4 to 2.7 at 2.5%, and other GDPs did not change significantly. In A-PD, only AcA decreased, and Glx, FoA and 5-HMF increased. The N-PD was more stable than A-PD during long-term storage.

The N-PD achieved the goal of neutralizing the pH and reducing the concentration of GDPs. However, even in the same N-PD, some differences in the concentrations of GDPs could be recognized. It remains necessary to clarify the cytotoxicity of GDPs and the biocompatibility of each NP-D.

緒 言

腹膜透析液の生体適合性の問題については、以前より透析液 pH や高浸透圧が指摘されてきた^{1,2)}。1989 年に Van Bronswijk ら³⁾により中性化した腹膜透析液でも中皮細胞に傷害性のあることが報告され、これは透析液の加熱滅菌による GDPs (glucose degradation products) に由来していることが指摘された⁴⁻⁶⁾。根本的な GDPs の低減には、非加熱による滅菌を行う必要があるが、その技術的な問題から 2 室構造と pH 調節による加熱滅菌、中性化・低 GDP 透析液の開発が行われてきた^{7,8)}。

本邦でも、腹膜透析液の生体適合性向上の目的から、低 GDPs 化と中性化に向けた中性化腹膜透析液（中性透析液）が開発され、平成 12 年 7 月以来、平成 14 年 8 月までに 4 社の製品（ステイセーフバランス®：フレゼニウス・メディカルケア・ジャパン、PD-ソリタ・A®：シミズメディカル、ペリセート NL®：ジェイ・エム・エス、ミッドペリック L®：テルモ）が薬価収載された。これら製品はすべて基本的に 2 室構造で混合後に中性となるよう各室が pH 調整され、特にグルコース室側を酸性にして、またグルコース室側の容量や含有電解質も調整して GDPs 生成を抑えるよう設計されている。しかし、これら中性透析液に関しては、pH と GDPs が調整されているものの製品による差があることが知られている。特に GDPs 濃度に関しては、各社の製品試験もしくは研究論文などにより確認することができるが、これは統一された分析法によるものではなく、正確な比較がなされていないのが現状である。

今回、各社製品の GDPs 濃度および pH を同一条件で測定することにより、その差を明らかにし、製剤設計による影響について言及する。

I. 対象と方法

測定対象とした 2 室中性透析液は平成 14 年 8 月までに薬価収載された 4 社（A～D 社）の 1.35% から 2.50% グルコース濃度液である。これら透析液に対し、製造後 4 か月にグルコース室側 pH、混合後 pH および GDPs 濃度を測定した。また、参考比較として中性透析液 3.86 から 4.00% の製造後 4 か月の A 社、製造後 12 か月の B 社、製造後 8 か月の C 社製品、および従来型酸性透析液 E 社の 1.35% から 4.00% グルコース液、製造後 12 か月も測定した。また、長期保存による GDPs 濃度の変化をみるために、中性透析液については 12 か月間、空調のない倉庫で保管され、酸性透析液は空調のある倉庫で保管された。各透析液のグルコース濃度は統一されていないが、グルコース濃度 1.35% から 1.60% のものを 1.5%、2.27% から 2.50% のものを 2.5%、3.86% から 4.00% のものを 4.0% とした。

測定 GDPs については、3-デオキシグルコソン (3-DG)、グリオキサール (Glx)、メチルグリオキサール (M-Glx)、ホルムアルデヒド (FoA)、アセトアルデヒド (AcA)、5-ヒドロキシメチルフフルール (5-HMF)、フルフルール (2-FA)、ギ酸、およびレブリン酸とし、3 バッグを測定した。

測定は以下に述べる HPLC 法により行った。試薬については、3-DG は同仁化学製、M-Glx は SIGMA 製、AcA は MERCK 製、5-HMF は Aldrich 製、Glx、FoA、2-FA、ギ酸、およびレブリン酸は関東化学製を標品として用いた。その他の試薬は、関東化学製または和光純薬製を用いた。

1. 3-DG, Glx, M-Glx

試料 3 mL に 0.4% フェニレンジアミンを 2 mL 加えて室温で 4 時間放置した後、HPLC 測定した。標準溶液をそれぞれの標品から同様に調製し、1 点検量線によりそれぞれの濃度を求めた。

カラムは Inertsil ODS-3 V (ジーエルサイエンス、

4.6 mm ϕ ×250 mm)を使用し、カラム温度室温、UV 検出波長 312 nm、流速 1 mL/min、移動相は、A：水/アセトニトリル=8/2、B：水/アセトニトリル=7/3 とし、移動相 B を 15 分まで 0%、15 分から 20 分にかけて 100%、30 分から 31 分にかけて 0%とするグラジェント条件で分析した。

2. FoA, AcA

試料 2 mL に DNPH 試液 (2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 0.15%、硫酸 5%、アセトニトリル 50%を含有)1 mL を加えて室温で 1 時間放置した後、HPLC 測定した。標準溶液は、それぞれの標品から 3 種類の濃度を同様に調製し、3 点検量線の一次回帰式よりそれぞれの濃度を求めた。

カラムは STR ODS-M (島津テクノロジー、4.6 mm ϕ ×250 mm)を使用し、カラム温度 40°C、UV 検出波長 365 nm、移動相は、A：水/テトラヒドロフラン=8/2、B：アセトニトリルとし、流速 1 mL/min、移動相 B を 30%から 15 分で 50%、15 分から 20 分にかけて 100%、23 分から 25 分にかけて 30%とするグラジェント条件で分析した。

3. 5-HMF, 2-FA

試料をそのまま、HPLC 測定した。標準溶液はそれぞれの標品から調製し、1 点検量線によりそれぞれの濃度を求めた。

カラムは ULTORON PS-80 H (信和化工、8 mm ϕ ×300 mm)を使用し、カラム温度 60°C、UV 検出波長 284 nm、過塩素酸で pH 2.1 に調製した水を移動相として分析した。

4. ギ酸、レブリン酸

試料をそのまま、HPLC 測定した。標準溶液は、それぞれの標品から 3 濃度を調製し、3 点検量線の一次回帰式よりそれぞれの濃度を求めた。

カラムは ULTORON PS-80 H (信和化工、8 mm ϕ ×300 mm)を使用し、カラム温度 60°C、UV 検出波長 210 nm、過塩素酸で pH 2.1 に調製した水を移動相として分析した。

これらの測定法による誤差については、同一の標準溶液を連続して 6 回分析したときの併行精度は、3-DG は 2.16~138.49 μ M の範囲で 0.07~0.77%、Glx は 0.63~20.10 μ M の範囲で 0.29~1.04%、M-Glx は 0.64~10.26 μ M の範囲で 0.43~2.90%、FoA は 2.50~79.92 μ M の範囲で 0.19~1.37%、AcA は 2.58~165.38 μ M の範囲で 0.21~1.53%、5-HMF は 0.67~43.08 μ M の範囲で 0.16~2.43%、2-FA は 0.36~23.14 μ M の範囲で 0.26~5.19%であった。

統計学検討は two sample *t* test を用い、 $p < 0.05$ を

有意とした。測定結果は平均 $\pm$ SD (μ mol/L) で示した。

II. 結 果

製造後 4 か月の 1.5%および 2.5%の中性透析液および製造後 12 か月の酸性透析液のグルコース室側 pH、混合後 pH、GDPs 濃度を表 1、2 に示す。中性透析液の GDPs 総量比較を図 1 に示す。中性透析液グルコース室側 pH は 2.92~6.04 と大きな差を認め、最も低値は C 社 1.5%の 2.92、最も高値は A 社 2.5%の 6.04 であった。混合後 pH では最も低値は A 社 2.5%の 6.67、最も高値は B 社 2.5%の 7.47 であった。酸性透析液では、5.17 から 5.25 であった。

GDPs 濃度(μ mol/L)では中性透析液 1.5%で、AcA は A、C 社が B、D 社より高値を示し ($p < 0.0001$)、A 社と C 社の間にも有意差が認められた ($p = 0.0132$)。FoA は A 社が B、C、D 社より高値を示した ($p < 0.0001$)。M-Glx は A 社にのみ検出された。Glx は D 社が A 社 ($p = 0.0029$)、B 社 ($p = 0.0012$)、C 社 ($p = 0.0101$) より高値であった。3-DG は A 社が B、C、D 社より高値を示した ($p < 0.0001$)。5-HMF は C、D 社が A、B 社より高値を示し ($p < 0.0001$)、C 社と D 社の間にも有意差が認められた ($p = 0.0013$)。2-FA は C、D 社に検出されたが、この 2 社の間に有意差はなかった。ギ酸およびレブリン酸はすべてで検出限界以下であった。酸性透析液 (E 社) は製造後 12 か月の値であるが、5-HMF は C 社 ($p = 0.0098$) と D 社 ($p = 0.0445$) より低値を示し、A、B 社より高値であった ($p < 0.0001$)。他の GDPs では中性透析液の 6 倍から 110 倍程度高値を示した ($p < 0.0001$)。また、ギ酸が高濃度で検出された。GDPs の総量(μ mol/L)としては、A 社が 95.0 ± 3.4 、B 社が 30.5 ± 2.3 、C 社が 36.3 ± 0.1 、D 社が 45.3 ± 0.2 ですべての製品間に有意差を認めた ($p < 0.0001$)。総量の内、3-DG と 5-HMF の合計の占める割合は、A 社が 95.8%、B 社が 93.1%、C 社が 92.3%、D 社が 95.8%、さらに 3-DG と 5-HMF の内、3-DG の占める割合は、A 社が 98.5%、B 社が 97.5%、C 社が 75.2%、D 社が 82.8%であった。

中性透析液 2.5%で、AcA は A、C 社が B 社 ($p = 0.0013$) と D 社 ($p = 0.0015$) より高値を示し、A 社と C 社の間には有意差はなかった。FoA は A 社が B 社 ($p = 0.0006$)、C 社 ($p = 0.0001$) と D 社 ($p = 0.0002$) より高値を示した。M-Glx は A 社にのみ検出された。Glx は D 社が A 社 ($p = 0.0005$)、B 社 ($p < 0.0001$)、C 社 ($p < 0.0001$) より高値であった。3-DG は A 社が

表 1 Concentration of GDPs and pH of each peritoneal dialysis solution (1.5% glucose concentration)

	A	B	C	D	E
pH (glucose side)	5.98~6.04	4.67~4.68	2.92~2.96	3.81~3.89	—
pH (after mixture)	6.73~6.77	7.35~7.43	7.19~7.31	7.35~7.40	5.23~5.25
Acetaldehyde	1.5±0.1 ^a	0.7±0.1	1.7±0.1 ^a	0.7±0.1	77.1±5.0
Formaldehyde	1.8±0.1 ^b	1.2±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1	4.3±0.2
Methylglyoxal	0.51±0.01	<0.04	<0.04	<0.04	3.50±0.40
Glyoxal	0.17±0.01	0.13±0.01	0.16±0.01	0.31±0.04 ^c	2.36±0.10
3-DG	89.7±3.3 ^b	27.7±2.5	25.2±0.1	35.7±0.01	206.1±11.6
5-HMF	1.4±0.1	0.7±0.1	8.3±0.1 ^d	7.7±0.1 ^d	6.7±0.6
Furfural	<0.04	<0.04	0.11±0.01	0.08±0.01	0.69±0.10
Formic acid	<20	<20	<20	<20	24.1±1.2
Levulinic acid	<10	<10	<10	<10	<10
Total GDPs	95.0±3.4 ^e	30.5±2.3 ^e	36.3±0.1 ^e	45.3±0.2 ^e	324.9±13.1

GDPs and pH in neutralized solution (A-D) were measured 4 months after manufacture, and 12 months in acid solution (E). Data were expressed as mean±SD (μmol/L), N=3. ^ap<0.0001 (vs. B and D), ^bp<0.0001 (vs. B, C and D), ^cp<0.01 (vs. A, B and C), ^dp<0.0001 (vs. A and B), ^ep<0.0001 for each other.

表 2 Concentration of GDPs and pH of each peritoneal dialysis solution (2.5% glucose concentration)

	A	B	C	D	E
pH (glucose side)	6.00~6.04	4.60~4.67	2.93~2.94	3.84~3.85	—
pH (after mixture)	6.67~6.78	7.34~7.47	7.15~7.23	7.30~7.39	5.17~5.18
Acetaldehyde	1.9±0.1 ^a	0.8±0.1	1.9±0.1 ^a	1.0±0.1	120.5±7.8
Formaldehyde	1.9±0.1 ^b	1.2±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	3.7±0.2
Methylglyoxal	0.61±0.01	<0.04	<0.04	<0.04	4.50±0.80
Glyoxal	0.35±0.01	0.20±0.01	0.27±0.01	0.49±0.02 ^c	3.56±0.13
3-DG	130.1±2.5 ^b	47.6±1.4	43.4±1.0	50.8±0.8	307.1±10.3
5-HMF	1.6±0.1	1.6±0.1	14.7±0.6 ^d	11.8±0.3 ^d	11.3±1.2
Furfural	<0.04	<0.04	0.18±0.01	0.13±0.01	1.25±0.10
Formic acid	<20	<20	<20	<20	30.0±3.5
Levulinic acid	<10	<10	<10	<10	<10
Total GDPs	136.5±2.5 ^e	51.5±1.6 ^e	60.9±1.8 ^e	64.7±1.4 ^e	481.8±23.8

GDPs and pH in neutralized solution (A-D) were measured 4 months after manufacture, and 12 months in acid solution (E). Data were expressed as mean±SD (μmol/L), N=3. ^ap<0.002 (vs. B and D), ^bp<0.001 (vs. B, C and D), ^cp<0.01 (vs. A, B and C), ^dp<0.0001 (vs. A and B), ^ep<0.0001 for each other.

図 1 Comparison of total GDPs concentration in 1.5%, 2.5% and 4.0% solutions among four products. Data are mean±SD, N=3.

B, C, D 社より高値を示した ($p<0.0001$). 5-HMF は C, D 社が A, B 社より高値を示し ($p<0.0001$), C 社と D 社の間にも有意差が認められた ($p=0.0015$). 2-FA は C 社と D 社に検出され, この 2 社の間にも有意差が認められた ($p=0.0161$). ギ酸およびレブリン酸はすべてで検出限界以下であった. 酸性透析液は製造後 12 か月の値ではあるが, 5-HMF は A, B 社より高値を示し ($p<0.0001$), D 社とは差を認めず, C 社より低値を示した ($p=0.0105$). 他の GDPs では中性透析液より 7 倍から 150 倍程度高値を示し ($p<0.0001$), 特にギ酸が高濃度で検出された. GDPs の総量 (μmol/L) では, A 社が 136.5 ± 2.5 , B 社が 51.4 ± 1.6 , C 社が 60.9 ± 1.8 , D 社が 64.7 ± 1.4 ですべての製品間で有意差を認めた ($p<0.0001$). 総量の内, 3-DG と 5-HMF の占める割合は, A 社が 96.5%, B 社が 95.5%, C 社が 95.4%, D 社が 96.8%で, さ

表 3 Concentration of GDPs and pH of each peritoneal dialysis solution (4.0% glucose concentration)

	A	B	C	E
pH (glucose side)	5.86~5.97	4.54~4.58	2.90~2.93	—
pH (after mixture)	6.65~6.70	7.11~7.17	7.22~7.28	5.18~5.21
Acetaldehyde	1.6±0.1	0.4±0.1	2.9±0.1	116.0±2.4
Formaldehyde	1.7±0.1	1.0±0.1	1.4±0.1	3.7±0.2
Methylglyoxal	0.61±0.01	<0.04	0.09±0.01	5.23±0.60
Glyoxal	0.41±0.01	0.31±0.02	0.66±0.01	3.41±0.17
3-DG	186.2±3.1	71.5±0.8	65.3±1.4	421.4±24.9
5-HMF	1.7±0.1	5.1±0.1	36.0±1.0	13.1±1.3
Furfural	<0.04	0.06±0.01	0.51±0.01	1.37±0.10
Formic acid	<20	<20	<20	26.5±1.4
Levulinic acid	<10	<10	<10	<10
Total GDPs	192.3±2.9	78.3±1.0	106.8±2.5	594.2±21.4

GDPs and pH of A, B, C and E solutions were measured 4, 12, 8 and 12 months after manufacture, respectively. Data were expressed as mean±SD ($\mu\text{mol/L}$), N=3.

に 3-DG と 5-HMF の内、3-DG の占める割合は、A 社が 98.8%，B 社が 96.7%，C 社が 74.7%，D 社が 81.2%であった。

製造後 4 から 12 か月後の中性透析液 4.0%および酸性透析液 4.0%のグルコース室側 pH、混合後 pH、GDPs 濃度を表 3 に示す。中性透析液の GDPs 総量比較を図 1 に示す。製造後の期間が相違するため単純に比較はできないが、中性透析液で Glx、3-DG、5-HMF は 1.5%、2.5%液より高値を示した ($p<0.0001$)。pH、GDPs 濃度分布は 1.5%、2.5%中性透析液と同様の傾向を示したが、5-HMF の占める割合は増加する傾向にあった。総量においても 1.5%、2.5%中性透析液より高値を示した。

長期保存 (1 年間) による中性透析液の GDPs 濃度の変化では、1.5%液で AcA が平均で 1.2 ± 0.5 から 2.8 ± 0.6 に増加 ($p=0.0022$)、2.5%液でも AcA で 1.4 ± 0.6 から 2.7 ± 0.9 と増加 ($p=0.0148$) したが、その他の GDPs には有意な変化は認めなかった。酸性液では 1.5%で、AcA が 77.1 ± 5.0 から 54.8 ± 1.5 に低下 ($p=0.0216$)、Glx が 2.4 ± 0.1 から 4.0 ± 0.1 に増加 ($p=0.0007$)、5-HMF も 6.7 ± 0.6 から 9.7 ± 0.4 に増加 ($p=0.0059$) した。2.5%では、AcA が 120.1 ± 7.8 から 82.3 ± 3.0 に低下 ($p=0.0233$)、FoA が 3.7 ± 0.4 から 5.8 ± 0.5 に増加 (0.0431)、Glx が 3.6 ± 0.1 から 6.0 ± 0.1 に増加 ($p<0.0001$)、5-HMF も 11.3 ± 1.2 から 18.6 ± 2.0 に増加 ($p=0.0475$) した。

III. 考 察

腹膜透析液におけるグルコースの分解については、dehydration による還元酸やフラン化合物 (3-DG、5-

HMF、2-FA など) の分解と、fragmentation によるケトン類やアルデヒド類 (Glx, FoA, M-Glx, AcA など) への分解があり、この二つの反応系は pH と滅菌条件 (温度、時間) に依存的である^{9,10)}。特に pH については、dehydration は低 pH で、fragmentation は高 pH で促進されるとされ^{11~14)}、dehydration と fragmentation の反応を同時に抑制することは困難とされている (図 2)。2 室構造中性透析液では、グルコース室側の pH (G 室 pH) でこれらの反応が調節される。実際に、C 社と D 社は G 室 pH を 2.92 から 3.89 に調節して fragmentation による分解を抑制する方法がとられ、A 社は G 室 pH を 5.98 から 6.04 に調節し、dehydration による分解を抑制する方法がとられている。また B 社は、4.60 から 4.68 と中間型で調節されている。今回測定された GDPs でも、C 社と D 社では、5-HMF 濃度は A 社 B 社よりも高値を示し、A 社ではアルデヒド類の上昇がみられ、これら分解系による反応が進んでいることが示された。酸性透析液では、その pH は 5.2~5.3 付近に調節されており、A 社と B 社の中間の値である。pH のみを問題にするならば、酸性透析液で GDPs 濃度が中性透析液より高値を示すことは矛盾するが、これは加熱滅菌時にブドウ糖と電解質 (特に NaCl)、有機酸が共存していることが理由とされている^{5,15,16)}。中性透析液では 2 室構造でこれら共存イオンと乳酸をわけることにより低 GDPs 化が図られている。

今回の分析結果では、総 GDPs 濃度の内、3-DG と 5-HMF の占める割合は 92.3%から 96.8%と大部分であり、さらに 3-DG と 5-HMF の内、5-HMF の占める割合は、A 社と B 社が 1.2%から 3.3%と低値であったが、C 社と D 社は 17.7%から 25.3%と高値で

図 2 Glucose degradation, scheme for weak or strong acidic condition (H^+) and weak acidic or alkaline condition (OH^-) in peritoneal dialysis solution. Dehydration reaction occurs under both acidic and alkaline conditions and fragmentation reaction does under alkaline condition.

あった。つまり、中性透析液の低 GDPs 化にはこの 3-DG と 5-HMF の濃度を下げることが重要となる。3-DG と 5-HMF 生成はともに図 2 に示すように dehydration 下での反応で複雑に関連している。グルコースは dehydration により 1,2-enediol から 3-DG を生成し、この反応は弱酸性からアルカリ条件の幅広い範囲で促進される。しかし、3-DG から 5-HMF への生成は弱酸性から強酸性下で促進され、3-DG と 5-HMF の生成をともに抑制することは困難となる。また、水素イオン濃度による 3-DG の keto 型と enol 型への *cis-trans* 構造変化も影響している。3-DG は酸性下およびアルカリ下で keto 型もしくは enol 型の異性体を形成しており、酸性下では keto 型 3-DG が形成される傾向にあり、これは直ちに 5-HMF に変化する。アルカリ下では enol 型が形成されるものの他の GDPs への生成経路は限られており、アルカリ下では enol 型 3-DG が蓄積傾向となることが推測される⁹⁾。実際に今回測定した各製品の G 室 pH で比較すると、3-DG と 5-HMF の濃度の変化は、pH 4.5 付近を境に鏡像的な変化をしており(図 3)、pH 4.5 以下ではグルコースから 3-DG の生成が抑制され、逆に 5-HMF の生成が亢進していることを示している。この結果からは、5-HMF の生成を抑制する G 室の至適 pH は 4.5 付近であるといえる。今回の研究では、A 社は 3-DG 生成型、C 社と D 社は 5-HMF 生成型であり、B 社の G 室 pH は 4.60 から 4.68 という結果で、最も理想的といえた(図 3)。しかし、この製品の本来の規格は 3.9 から 4.4 であり今回の pH は偶然であった可能性が強

図 3 Changes of 3-DG and 5-HMF concentration in 1.5% solution with pH in glucose chamber. The pH of 2.9, 3.8, 4.6 and 6.0 are product C, D, B and A, respectively. Data are mean $\pm$ SD, N=3.

い。また、このことは製造上、G 室 pH の厳密な調整は困難であることも示している。

3-DG と 5-HMF のどちらの生成を抑制するかは、3-DG と 5-HMF の toxicity により判断されなければならない。3-DG に関しては AGE 形成における重要な物質となっているが¹⁷⁾、生体内ではアルデヒド還元酵素である 3-DG reductase によって速やかに、3-deoxyfructose に転換され無毒化されることが知られている¹⁸⁻²⁰⁾。実際に CAPD 患者では、3-DG が常時負荷されているにもかかわらず、HD 患者と比べて血中 AGE 濃度には差がないことが報告されている²¹⁾。3-DG などのアルデヒド類に関しては生体は防御システムをもっており、実際の toxicity に関しては不明な部分が多い。5-HMF に関しては、ブドウ糖注射液の混在物を

調べる純度試験の主要マーカーであり、日本薬局方通則で規定されている。5-HMF は加熱滅菌時の温度と時間に比例して増加することが判っており、加熱による変化の目安として設けられている。UV 吸光度による純度試験では、波長 284 nm で吸光度 0.80 以下と規定されており、品質管理の基準として用いられている指標である²²⁾。5-HMF は *in vitro* の研究でアルデヒド類に比べ toxicity は少ないとされており^{8,23~25)}、また Wieslander ら⁸⁾は、5-HMF が高値であることはそれ以下のより toxicity の高いギ酸やレブリン酸に分解されないためであり問題ないとしている。実際にグルコースの分解の初期段階では 5-HMF が生成され、ギ酸、レブリン酸への分解も進行するが、後期段階では 5-HMF の分解は抑制され、5-HMF が蓄積するとされる²⁶⁾。今回の測定結果でも、C 社と D 社では酸性透析液よりも高濃度の 5-HMF が検出されていたが、ギ酸およびレブリン酸はすべての中性透析液において検出感度以下であり、中性透析液では 5-HMF で分解が抑制されているものと推測された。酸性透析液では、この分解は抑制されておらず、高濃度のギ酸を検出している。また、5-HMF は 3-DG と比較してその濃度は 1/10 程度であることから、濃度的にもその toxicity は低いことが推測されるが、5-HMF の前駆物質である不飽和炭素類は低濃度でも強い toxicity をもつとされており^{27,28)}、中性透析液における pH 調整については 3-DG と 5-HMF の toxicity および分解系についてのさらなる研究が必要であると思われる。

透析液における GDPs の分解については、pH 以外に滅菌時の加熱温度、加熱時間も影響する。加熱滅菌時における熱量と滅菌効果の関係は、 F_0 値というパラメータで示され、一般的には 121°C、20 分で F_0 値は 20 という値をとる。 F_0 値は加熱時間と直線的増加関係、加熱温度と指数増加関係をとるが、同じ F_0 値であれば、加熱時間が短いほど GDPs の生成量は少ないとされ、加熱温度 10°C 上昇毎に、加熱時間は 90% 少なくすることができる^{16,29)}。このことから、バッグ滅菌は高温で、短時間で行われるべきであるが、バッグは大容量であり、またバッグ素材の熱伝導、熱抵抗により制限がかかり、一定した熱負荷をかけることは困難とされる。この滅菌条件に関しては各社製造上の非公開事項となっており明らかにされていないのが現状である。今回の測定では、この滅菌条件による比較を行うことができなかったが、今後、可能であればこの問題についても明らかにしたいと考えている。

長期保存による影響では、中性透析液は空調のない倉庫で 1 年間保管され、環境温度は -1°C から 36°C ま

で変化し、実際の施設が経験する最悪の条件に近いものが再現された。酸性透析液は日本薬局方における基準の室温 (1°C から 30°C) で保管された。酸性透析液における長期保存については、保存温度が高いほど GDPs 生成は増大し、25°C と 40°C では倍程度増加するとされている²⁹⁾。中性透析液 1.5%、2.5% では AcA のみが平均で 2.1 倍増加し、他の GDPs には有意な変化はなかった。増加量についても、1~2 $\mu\text{mol/L}$ 程度のわずかな増加であり、長期保存による GDPs の変化については過酷な条件下でも大きな影響はなく、中性透析液は長期保存での安定性にも優れていることが示された。酸性透析液は AcA が平均 0.7 倍低下、Glx, FoA, 5-HMF は平均 1.7 倍増加し、酸性透析液の長期保存では中性透析液ほどの安定性が得られない傾向にあった。この AcA の低下については、他の GDPs へ再合成などが推測されるが詳細は不明である¹⁴⁾。また、以上の事実は、腹膜透析液における GDPs、特に AcA 濃度を比較する場合には、製造後期間が統一されている必要性を示唆したものであり、測定には注意が必要である。今回の研究では、中性透析液の 1.5% および 2.5% 液については製造後期間を統一することができたが、4.0% 液については、その需要の問題から製造が計画的に行われていないため、また、酸性透析液についても製造時期の問題のため、製造後期間を統一することができなかった。このようなことから今回の測定データは、最も使用頻度の高い中性透析液 1.5% および 2.5% 液が中心となった。

現在、発売されている中性透析液は pH を中性化し、GDPs を低減させるということではその目的が達成されているといえる。しかし、加熱滅菌法を使用するかぎり、中性透析液といえどもすべての GDPs 種を低減させることは不可能である。今回測定した 4 社の GDPs 濃度の差は製造設計の差によるものであるが、製造設計には実際の使用における安全性も考慮されており、特に A 社は混合ミスがあっても極端な低 pH 液が腹腔内に注入されないよう工夫されている。また、GDPs の toxicity の問題に関しては多くの *in vitro* の研究がなされているが³⁰⁾、その標的細胞や条件等による差、また GDP のコンビネーションによる問題²⁵⁾などがあり、明らかにはなっていないのが現状である。実際の臨床的有用性についてもその評価方法、基準が明らかではなく、最終的には長期使用による結果を待たねばならないと考える。

結 語

中性透析液の GDPs 濃度は酸性透析液の 3 分の 1 から 10 分の 1 と低値を示したが、製剤設計の違いから製品により差が認められた。総 GDPs 濃度の 92% 以上は 3-DG と 5-HMF であり、さらにその内 75% 以上は 3-DG であった。このことから、中性透析液の低 GDPs 化には 3-DG と 5-HMF を低減させることが重要である。しかし、3-DG と 5-HMF はグルコース室側 pH 4.5 付近で鏡像的变化をするため、pH による調整は困難である。3-DG と 5-HMF の toxicity については不明であり、中性透析液によっては GDPs による影響に差がでてくることが示唆された。今後、非加熱滅菌による無 GDPs 化が必要である。

文献

- 1) Duwe AK, Vas SI, Weatherhead JW : Effects of the composition of peritoneal dialysis fluid on chemiluminescence, phagocytosis, and bactericidal activity in vitro. *Infect Immun* 33 : 130-135, 1981
- 2) Yamamoto T, Sakakura T, Yamakawa M, Horiuchi N, Hirata S, Iritani Y, Nishitani H, Kim M, Kishimoto T, Chiku T, Matsumoto T, Horio T : Clinical effects of long-term use of neutralized dialysate for continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 60 : 324-329, 1992
- 3) Van Bronswijk H, Verbrugh HA, Bos HJ, Heezius ECJM, Oe PL, Van der Meulen J, Verhoef J : Cytotoxic effects of commercial continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) fluids and of bacterial exoproducts on human mesothelial cells in vitro. *Perit Dial Int* 9 : 197-202, 1989
- 4) Wieslander AP, Nordin MK, Kjellstrand PTT, Boberg UC : Toxicity of peritoneal dialysis fluids on cultured fibroblasts, L-929. *Kidney Int* 40 : 77-79, 1991
- 5) Martinson E, Wieslander A, Kjellstrand P, Boberg U : Toxicity of heat sterilized peritoneal dialysis fluids is derived from degradation of glucose. *ASAIO Journal* 38 : M 370-M 372, 1992
- 6) Nilsson-Thorell CB, Muscalu N, Andrén AHG, Kjellstrand PTT, Wieslander AP : Heat sterilization of fluids for peritoneal dialysis gives rise to aldehydes. *Perit Dial Int* 13 : 208-213, 1993
- 7) Wieslander AP, Deppisch R, Svensson E, Forsbäck G, Speidel R, Rippe B : In vitro biocompatibility of a heat-sterilized, low-toxic, and less acidic fluid for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 15 : 158-164, 1995
- 8) Wieslander A, Lindén T : Glucose degradation and cytotoxicity in PD fluids. *Perit Dial Int* 16 (Suppl 1) : S 114-8, 1996
- 9) Anet EFLJ : 3-Deoxyglycosuloses (3-deoxyglycosones) and the degradation on carbohydrates. *Adv Carbohydr Chem* 19 : 181-218, 1964
- 10) Feather MS, Harris JF : Dehydration reactions of carbohydrates. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 28 : 161-237, 1973
- 11) Okada S, Iga S, Ueoka S, Isaka H : Studies on physico-chemical examination of glucose injection. *Bull Natl Inst Hyg Sci Japan* 89 : 87-90, 1971
- 12) Taylor RB, Jappy BM, Neil JM : Kinetics of dextrose degradation under autoclaving conditions. *J Pharm Pharmacol* 23 : 121-129, 1971
- 13) Anet EFLJ : Degradation of carbohydrates. *Aust J Chem* 15 : 503-509, 1962
- 14) Jellum E, Børresen HC, Eldjarn L : The presence of furan derivatives in patients receiving fructose-containing solutions intravenously. *Clin Chim Acta* 47 : 191-201, 1973
- 15) Trzeciak M, Zakrzewski Z, Siedlecka E, Furmańczyk Z : Studies on dependence of stability of glucose in solutions applied to peritoneal dialysis upon their electrolyte composition. *Acta Polon Pharm* 51 : 174-178, 1989
- 16) Kjellstrand P, Martinson E, Wieslander A, Holmquist B : Development of toxic degradation products during heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis : Influence of time and temperature. *Perit Dial Int* 15 : 26-32, 1995
- 17) Nakamura S, Miyazaki S, Sakai S, Morita T, Hirasawa Y, Niwa T : Localization of imidazolone in the peritoneum of CAPD patients : a factor for a loss of ultrafiltration. *Am J Kidney Dis* 38 (Suppl 1) : S 107-S 110, 2001
- 18) Kato H, Van Chuyen N, Shinoda T, Sekiya F, Hayase F : Metabolism of 3-deoxyglucosone, an intermediate compound in the Maillard reaction, administered orally or intravenously to rats. *Biochim Biophys Acta* 1035 : 71-76, 1990
- 19) Kanazu T, Shinoda M, Nakayama T, Deyashiki Y, Hara A, Sawada H : Aldehyde reductase is a major protein associated with 3-deoxyglucosone reductase activity in rat, pig and human livers. *Biochem J* 279 : 903-906, 1991
- 20) Sato K, Inazu A, Yamaguchi S, Nakayama T, Deyashiki Y, Sawada H, Hara A : Monkey 3-deoxyglucosone reductase : Tissue distribution and purification of three multiple forms of the kidney enzyme that are identical with dihydrodiol dehydrogenase, aldehyde reductase, and aldose reductase. *Arch Biochem Biophys* 307 : 286-294, 1993

- 21) Ateshkadi A, Johnson CA, Founds HW, Zimmerman SW : Serum advanced glycosylation end-products in patients on hemodialysis and CAPD. *Nephrol Dial Transplant* 15 : 129-133, 1995
- 22) ブドウ糖注射液. 第十四改正日本薬局方解説書, p C2433-C2435, 廣川書店, 東京, 2001
- 23) Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA : A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam Appl Toxicol* 4 : 843-853, 1984
- 24) Wieslander AP, Andrén AHG, Nilsson-Thorell C, Muscalu N, Kjellstrand PTT, Rippe B : Are aldehydes in heat-sterilized peritoneal dialysis fluids toxic in vitro ? *Perit Dial Int* 15 : 348-352, 1995
- 25) Witowski J, Korybalska K, Wisniewska J, Breborowicz A, Gahl GM, Frei U, Passlick-Deetjen J, Jörres A : Effects of glucose degradation products on human peritoneal mesothelial cell function. *J Am Soc Nephrol* 11 : 729-739, 2000
- 26) Taher AM, Cates DM : A spectrophotometric investigation of the yellow color that accompanies the formation of furan derivatives in degraded-sugar solutions. *Carbohydr Res* 34 : 249-261, 1974
- 27) Kato F, Mizukoshi S, Aoyama Y, Matsuoka H, Tanaka H, Nakamura K, Tsukamoto M : Immunosuppressive effects of 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene, an intermediate in the Maillard reaction. *J Agric Food Chem* 42 : 2068-2073, 1994
- 28) Linden T, Cohen A, Deppisch R, Kjellstrand P, Wieslander A : 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE) : A cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. *Kidney Int* 62 : 697-703, 2002
- 29) Ledebø I, Wieslander A, Kjellstrand P : Can we prevent the degradation of glucose in peritoneal dialysis solutions ? *Perit Dial Int* 20 (Suppl 2) : S 48-S 51, 2000
- 30) Witowski J, Wisniewska J, Korybalska K, Bender TO, Breborowicz A, Gahl GM, Frei U, Passlick-Deetjen J, Jörres A : Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 12 : 2434-2441, 2001