

各種 pH, 各種グルコース濃度条件下におけるヒト腹膜中皮細胞の動態と凝固・線溶系バランスについて

(平成八, 九年度日本透析医会研究助成報告書)

頼岡徳在* 邵金昌* 西田陽司* 山木戸道郎* 辰川自光**
原田知** 土谷晋一郎**

要約

CAPD においては限外濾過能低下などによる腹膜機能低下が未だ重要な問題点として残されており, CAPD を長期に継続するためにはその原因解明が急務である. 腹膜機能保持には中皮細胞が重要な役割を担っており, その傷害が限外濾過能, 透析効率の低下を引き起こす要因とされている. そこで今回われわれは, 各種 pH, 各種グルコース濃度条件下でヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) を培養し, HPMC の viability に対する影響を経時的に検討した. さらに培養上清中の凝固・線溶系因子を測定し, 凝固・線溶系バランスについても検討を加えた. その結果, pH 5.2 では pH 6.5 および pH 7.3 と比べ, 培養 4 時間後にはすでに細胞 viability の強い抑制がみられた. pH 6.5 および pH 7.3 ではグルコース濃度が 10 mM から 222 mM まで高くなるに従い, 濃度依存性に細胞 viability の抑制がみられた. 同様の結果は, 12, 24, 36, 48 時間後にもみられた. また, HPMC から分泌される TAT はグルコース濃度が高くなるに従って分泌亢進がみられた. t-PA/PAI-1 値は pH 5.2 ではいずれのグルコース濃度においても低値であったが, pH 6.5 および pH 7.3 ではグルコース濃度が高くなるに従って高値となる傾向を示した. 以上より, 低 pH および高グルコース濃度液が HPMC に cytotoxic に働き, 腹膜機能低下の一原因であることが明かとなった. さらに低 pH 条件では凝固・線溶系のバランスが崩れることも明かとなった.

はじめに

近年, CAPD は慢性腎不全の治療法の一つとして広く普及してきた. しかしながら, CAPD の長期継続例が増加するに従い, 限外濾過能低下などの腹膜機能低下のために CAPD から余儀なく脱落する例も少なくなく, この腹膜機能低下は早急に解決されなければならない問題点としてクローズアップされている. CAPD では腹膜組織が直接的そして継続的に低 pH および高浸透圧の腹膜透析液に曝されており, この状態は非生理的と考えられる¹⁾. ある報告によれば, CAPD 施行中の患者腹膜組織構築は変化しており^{2~4)}, 中皮細胞の脱落と再生が頻繁に繰り返されていると言われている⁵⁾. また長期 CAPD 患者の腹膜組織の変化として, 中皮細胞の微絨毛の減少, 細胞間隙の拡大, 中皮細胞の基底膜からの脱落, さらに腹膜の線維性肥厚が観察されている^{6,7)}. そして中皮細胞の傷害は限外濾過能, 透析効率の低下を引き起こすと言われており, 傷害の結果, 患者の CAPD 継続が困難になる場合が多い^{8,9)}. さらに *in vitro* の実験で低 pH および高グルコース濃度透析液が中皮細胞の viability を抑制することが報告されており^{10~15)}, 中皮細胞の傷害は主に透析液の毒性により引き起こされていると考えられる. そこで今回われわれは各種 pH, 各種グルコース濃度条件下でヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) を培養し, その増殖態を観察することにより各条件下での HPMC の viability に対する影響を検討した. さらに各条件下で HPMC から産生される凝固・線溶系

* 広島大学医学部第二内科

** 広島県透析連絡協議会

因子を測定し、そのバランスの変化が腹膜機能に及ぼす影響を検討した。

1 方法

1) HPMCの培養・同定

HPMCの単離は Stylianou らの方法に準じて行った¹⁶⁾。すなわち、腹部手術の際に約3~5 cm²の大網を切り出し、PBSにて3回洗浄した後、0.125% trypsin-EDTAにて37°C、15~20分間振盪させながらインキュベートした。その後、大網を取り出し、残りの液を4°Cにて10分間100 gで遠心分離させた。上清を捨て、残った沈殿物を1回洗浄後、type I collagenにてcoatingされた75 cm²の培養フラスコに分注し、10% FCS含有Ham's F-12 mediumにて培養した。分注24時間後、およびそれ以降3日ごとにmediumの交換を行った。細胞は同様のmediumにて37°C、5% CO₂ incubatorにより維持し、1~3継代目の細胞を使用した。HPMCは特徴的な敷石状増殖が観察でき、cytokeratinおよびvimentin抗体に陽性、第Ⅷ因子抗体に陰性であることをもって、それがHPMCであると判定した。

2) Test mediumの調整

Standard Ham's F-12 medium (グルコース濃度10 mM, pH 7.3)を標準液とみなした。Test mediumはF-12 mediumに各種濃度のグルコースを加え、各種pHに調整した。グルコースの濃度は10 mM, 30 mM, 75 mM, 140 mM, 222 mMに調整し、1 N水酸化ナトリウムおよび1 N塩酸を使用しpHは5.2, 6.5, 7.3の3種類を作製し、合計15種のmediumを用意した。すべてのmediumには1% FCSを加えたが、これについては前実験において、標準液に1% FCSを加えても中皮細胞は増殖性変化を起こさないことを確認している。

3) 細胞増殖実験

上記のように培養された1~3継代目のHPMCを96穴マイクロウェルに1穴あたり2×10⁴個の

割合で10% FCS含有Ham's F-12 mediumにて培養し、subconfluentになった時点で1% FCS含有Ham's F-12 mediumに置き換え、さらに48時間培養し静止期に近づけた後、以下の実験に使用した。

HPMCの増殖性変化は、各種mediumにて培養し、4, 12, 24, 36, 48時間後に検討した。cell counting法(WST-1 colorimetric assay)では、cell counting kit(和光純薬)を使用し、enzyme-linked immunosorbent assay readerにて測定した。さらに、³H-TdR取り込み試験法によっても同様の実験を行った。

4) 凝固・線溶系因子

各種mediumにてHPMCを48時間培養し、各種凝固・線溶系因子(thrombin-antithrombin III complex:TAT, tissue plasminogen activator:t-PA, plasminogen activator inhibitor-1:PAI-1)の培養上清中濃度をELISAにて測定した。

2 結果

低pH(5.2)では、pH 6.5およびpH 7.3に比べ、培養4時間後にはすでに細胞viabilityの強い抑制がみられた。そして、48時間後までこの強い抑制はみられた。一方、pH 6.5とpH 7.3の間には、有意な相違は認められなかった。pH 6.5およびpH 7.3では10 mMから222 mMまでグルコース濃度が高くなるに従い、濃度依存性に細胞viabilityの抑制がみられた。同様の結果は、12, 24, 36, 48時間後にもみられた(図1, 2)。なお、図には示していないが、³H-TdR取り込み試験法によってもほぼ同様の結果が認められた。

各条件下における凝固・線溶系因子産生に関しては以下の結果が認められた。まずTATについては、いずれのpH条件においてもmediumのグルコース濃度が高くなるに従って産生の亢進が認められた(図3)。t-PAについては、低pH(5.2)では他のpH条件に比べ、いずれのグルコース濃度にお

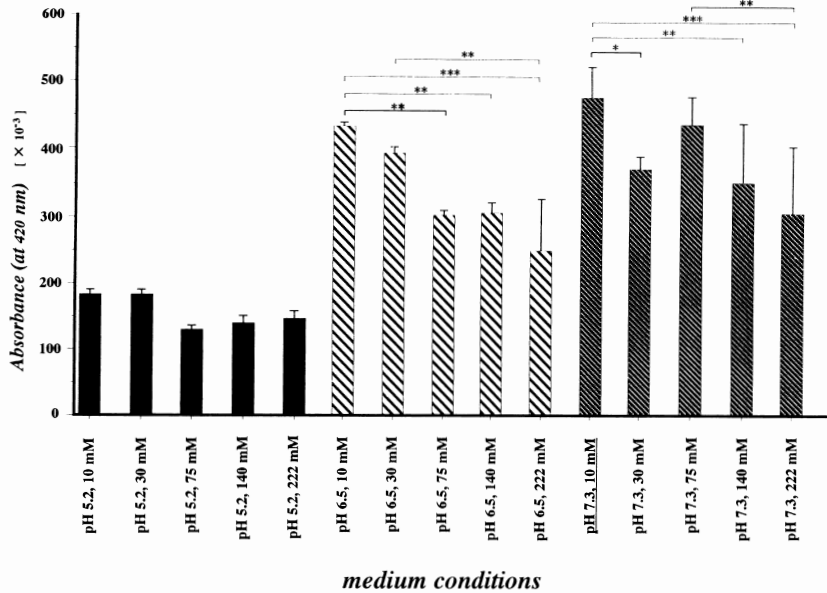


図1 培養4時間後の各種培養条件下における腹膜中皮細胞の viability
下線: 標準液, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (one way ANOVA)

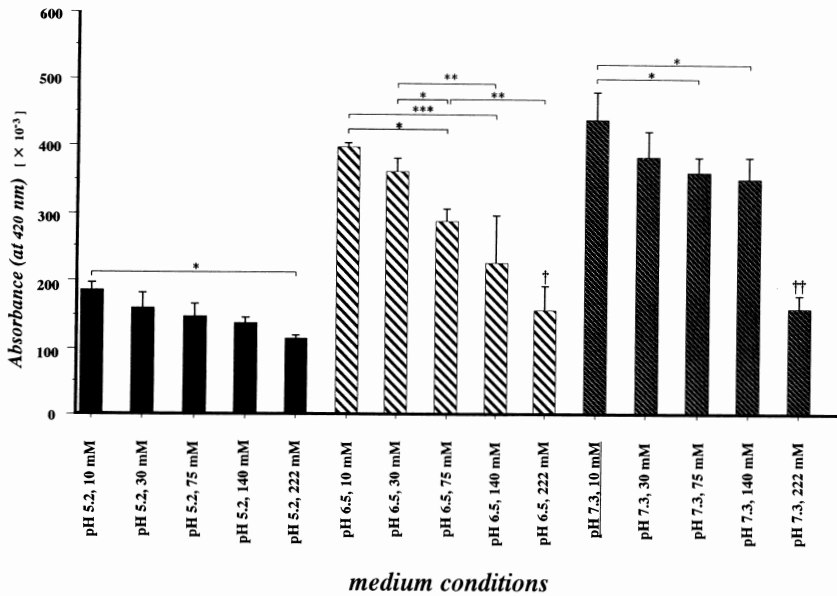


図2 培養48時間後の各種培養条件下における腹膜中皮細胞の viability
下線: 標準液, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$,
† $p < 0.0001$ vs. <75 mM, †† $p < 0.0001$ vs. <140 mM (one way ANOVA)

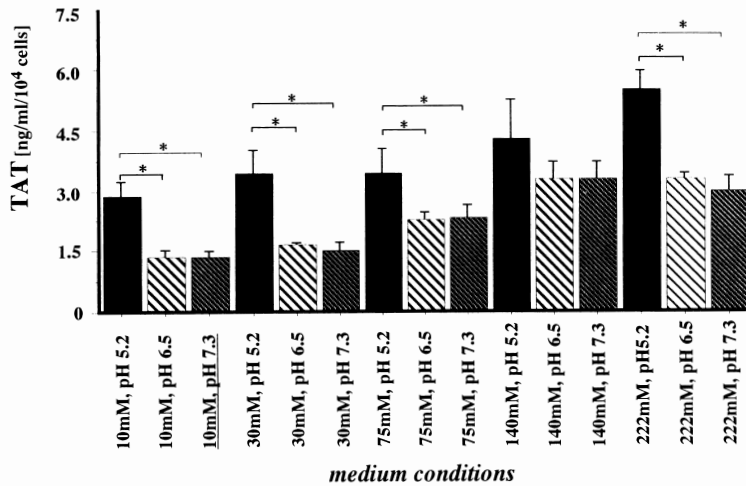


図3 培養48時間後の各種条件下における培養上清中のTAT濃度
下線: 標準液, * $p < 0.05$ (one way ANOVA)

いても産生が抑制された。一方、他のpH条件(6.5, 7.3)ではmediumのグルコース濃度が高くなるに従って産生の亢進が認められた(図4)。PAI-1については、低pH(5.2)ではmediumのグルコース濃度が高くなるにつれ産生の亢進が認められたが、他のpH条件(6.5, 7.3)では逆にグルコース濃度が高くなるに従って産生の低下が認められた(図5)。t-PA/PAI-1値は、低pH(5.2)ではいずれのグルコース濃度においても低値であったが、他のpH(6.5, 7.3)ではグルコース濃度が高くなるに従って高値になる傾向がみられた。そして140, 222 mMのグルコース濃度ではpH 5.2に比べ有意に高値であった(図6)。

3 考察

CAPDの長期継続は腹膜機能低下により制限される。CAPD患者の腹膜中皮細胞は透析を開始した時点からすでに構造的変化をきたすが、これらの変化は単に感染に起因するのみでなく、腹膜炎が発症しなくても起こり得ることが知られている^{2,3,17}。CAPDでは、腹膜表面に位置する中皮細胞は透析

液に繰り返し連続的に曝露されており、細胞の形態的、機能的変化が起こり易いと考えられる^{2,3,18}。腹膜機能に影響を及ぼす因子については、未だ不明な点が多いが、これまでの報告によれば透析液の低pHと高グルコース濃度など非生理的な性質の透析液が重要な因子であることが解明されている^{1,10}。

本研究ではHPMCに対する低pHと高グルコース濃度の影響について両者を同時に検討した。その結果、低pHおよび高グルコース濃度液がHPMCにcytotoxicに働くことが明らかとなった。そしてその影響力としてはグルコース濃度よりpHの影響の方がより即時的で強力であることも明らかとなった。

CAPDの腹膜組織における細胞外基質の増加、蓄積される機序は未だ不明であるが、腹膜硬化は細胞外基質の合成と分解のアンバランスが一因子であることが示唆されている¹⁹。また、t-PA活性などの線溶系活性がフィブリンの蓄積および腹膜線維性硬化の発症を防止するために重要であることも報告されている²⁰。今回の実験の結果、低pH(5.2)ではt-PAの産生低下がみられた。一方、中、高

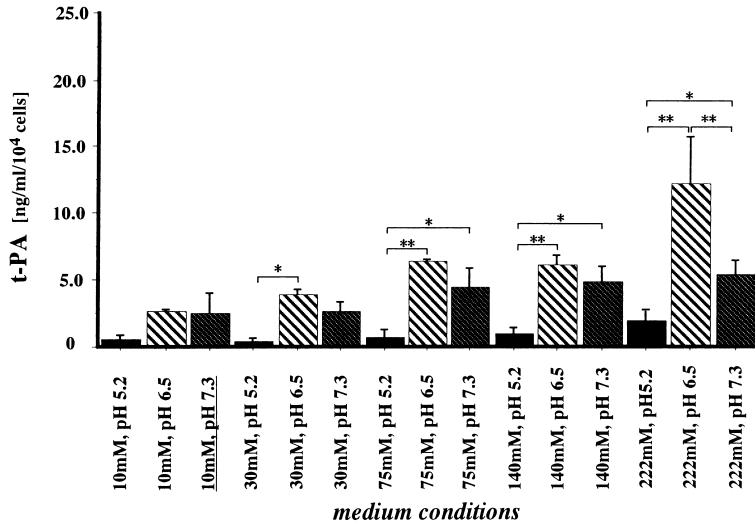


図4 培養48時間後の各種条件下における培養上清中のt-PA濃度
下線:標準液, * $p<0.05$, ** $p<0.001$ (one way ANOVA)

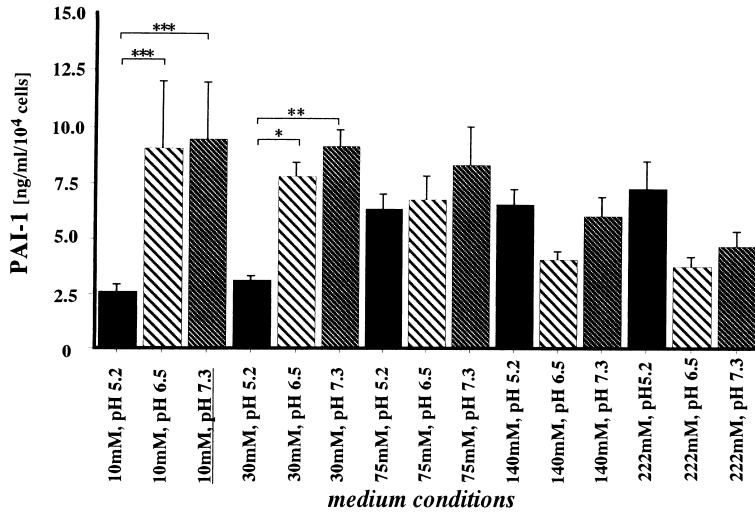


図5 培養48時間後の各種条件下における培養上清中のPAI-1濃度
下線:標準液, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (one way ANOVA)

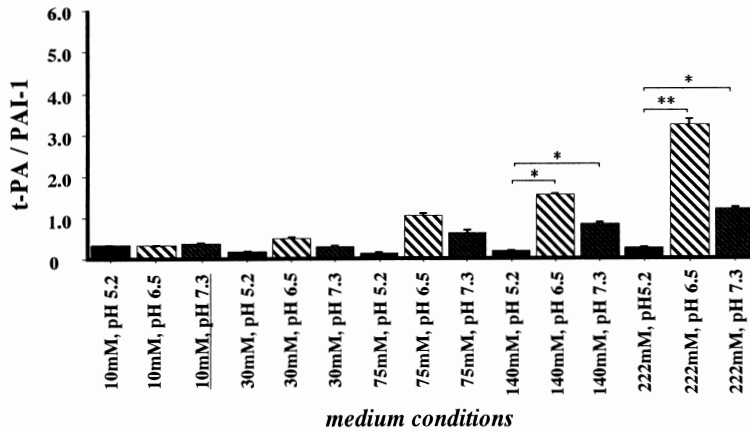


図6 培養48時間後の各種条件下における培養上清中のt-PA/PAI-1値
下線:標準液, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (one way ANOVA)

pH (6.5, 7.3) では高グルコース濃度になるに従い TAT の産生亢進とともに t-PA/PAI-1 値が上昇し、凝固・線溶のバランスを保つように変動しているように思われた。すなわち中、高 pH 液においては高グルコース濃度条件になると凝固活性が亢進するとともに線溶活性も亢進し、そのストレスに対する防衛機能をうかがい知ることができる。しかしながら、低 pH では高糖濃度になるに従い TAT の産生亢進が認められるにもかかわらず、t-PA/PAI-1 値の低下傾向がみられた。この結果から、低 pH ではグルコース濃度刺激による凝固・線溶系のバランスが崩れ、フィブリンの蓄積、さらには細胞外基質の増生による腹膜硬化をもたらすことが予想される。以上より、CAPD 液 pH の腹膜への影響は多大なものであることが推測された。

HPMC は腹膜機能を維持し、腹膜組織を直接透析液に曝露させないように保護する重要な細胞と考えられているが、腹膜硬化が進めば中皮細胞の変性、脱落がみられ、腹膜機能は低下する。従って HPMC を保護するような透析方法が望まれ、現在、中性 pH 液や、グルコースに代わる浸透圧物質を使

用した透析液の開発が進行中である。また、腹膜に休息を与えながらの透析方法も推奨されている。今後、さらに新しい生体に適合した透析液の開発が待たれるところである。

結 語

今回われわれは、透析液の HPMC への影響を検討した。その結果、低 pH および高グルコース濃度液が HPMC に cytotoxic に働くことが明らかとなった。さらに低 pH では凝固・線溶系のバランスが崩れやすく、腹膜機能低下に導かれることが推測された。

文 献

- 1) Jorres A, Gahl GM, Frei U: Peritoneal dialysis fluid biocompatibility: Does it really matter? *Kidney Int*, 46 (Suppl 48); S79, 1994.
- 2) Dobbie JW, Zaki M, Wilson L: Ultrastructural studies on the peritoneum with special reference to chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Scott Med J*, 26; 213, 1981.
- 3) Di Paolo N, Sacchi G, De Mia M, et al:

- Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron*, 44 ; 204, 1986.
- 4) Pollock CA, Ibels LS, Echstein RP, et al : Peritoneal morphology on maintenance dialysis. *Am J Nephrol*, 9 ; 198, 1989.
 - 5) Gotloib L, Shostack A, Bar-Sella P, et al : Continuous mesothelial injury and regeneration during long term peritoneal dialysis. *Perit Dial Bull*, 7 ; 148, 1987.
 - 6) Dobbie JW, Lloyd JK, Gall CA : Categorization of ultrastructural changes in peritoneal mesothelium, stroma and blood vessels in uremia and CAPD patients. *Adv Perit Dial*, 6 ; 3, 1990.
 - 7) Dobbie JW : Morphology of the peritoneum in CAPD. *Blood Purif*, 7 ; 74, 1989.
 - 8) Gotch FA : Adequacy of peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis*, 21 ; 96, 1993.
 - 9) Quarello F, Bonello F, Boero R, et al : CAPD in a large population : A 7-years experience. *Adv Perit Dial*, 5 ; 56, 1989.
 - 10) van Bronswijk H, Verbrugh HA, Bos HJ, et al : 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, 1989.
 - 11) Topley N, Mackenzie R, Petersen MM, et al : *In vitro* testing of a potentially biocompatible continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid. *Nephrol Dial Transplant*, 6 ; 574, 1991.
 - 12) Jorres A, Topley N, Gahl GM : Biocompatibility of peritoneal dialysis fluids. *Int J Artif Organs*, 15 ; 79, 1992.
 - 13) Breborowicz A, Rodela H, Oreopoulos DG : Toxicity of osmotic solutes on human mesothelial cells *in vitro*. *Kidney Int*, 41 ; 1280, 1992.
 - 14) Holmes CJ : Biocompatibility of peritoneal dialysis solutions. *Perit Dial Int*, 13 ; 88, 1993.
 - 15) Witowski J, Breborowicz A, Knapowski J, et al : *In vitro* culture of human peritoneal mesothelium for investigation of mesothelial dysfunction during peritoneal dialysis. *J Physiol Pharmacol*, 45 ; 271, 1994.
 - 16) Stylianou E, Jenner LA, Davies M, et al : Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 37 ; 1563, 1990.
 - 17) Verger C, Luger A, Moore HL, et al : Acute changes in peritoneal morphology and transport properties with infectious peritonitis and mechanical injury. *Kidney Int*, 23 ; 823, 1983.
 - 18) Slater ND, Cope GH, Raftery AT : Mesothelial hyperplasia in response to peritoneal dialysis fluid : A morphometric study in the rat. *Nephron*, 58 ; 466, 1991.
 - 19) Fairbairn S, Gilbert R, Ojakian G, et al : The extracellular matrix of normal chick embryo fibroblasts, its effect on transformed chick fibroblasts and its proteolytic degradation by the transformants. *J Cell Biol*, 101 ; 1790, 1985.
 - 20) Dobbie JW : Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 12 ; 14, 1992.