

慢性腎不全患者血中の造血刺激・抑制因子の研究

(平成8年度日本透析医会研究助成報告書)

河野嘉文* 水口 潤** 水口 隆** 川原和彦** 川島 周**

はじめに

腎性貧血は慢性腎不全患者に認められる正球形正色素性貧血であり、その主因は腎の peritubular capillary endothelial cell で産生されるエリスロポエチン (Epo) の相対的欠乏であると考えられている。その他に、赤血球寿命の短縮やいわゆる尿毒症物質の造血抑制的な作用も関与することが論じられているが、その詳細な機序は解明されていない¹⁾。透析患者ではそれらに加えて透析回路への残血や体外循環による溶血も影響する。

リコンビナント Epo が腎性貧血の治療薬に認められて以来、貧血治療の改善に大きな効果を示し、ひいては腎不全患者の QOL 改善に寄与している²⁾。

しかしながら、Epo 投与効果は一様ではなく、投与後の貧血改善度は患者個々の要因が大きく関わると考えられる。われわれは Epo が臨床応用されてから、その投与効率の改善を目的として腎性貧血に関連する造血抑制因子について研究してきた。今回はその研究の総括としてこれまでの研究経過および結果を報告する。

1 対象と方法

対象は医療法人川島会川島病院、川島クリニックで、保存期慢性腎不全患者、血液透析あるいは CAPD を施行中の慢性腎不全患者で、悪性腫瘍、膠原病、肝硬変、難治性感染症の合併例および鉄欠乏が疑われた症例は除外した。血液、骨髓細胞の採取は患者の同意をえた上で、透析患者では透析開始

直前に、その他の患者では外来受診時に、入院患者では早朝空腹時に採血した。採血後 24 時間以内に徳島大学小児科の研究室で各種の処理を行い、細胞を対象とする操作は直ちに行い、血清あるいは血漿は -80°C の電気冷凍庫に凍結保存して後日まとめて使用した。

造血刺激因子についての検討は、患者あるいは健康人の末梢血単核球を PHA ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$) を含むイスコフ変法ダルベッコ培養液中で 72 時間培養してえられた培養上清を用いた³⁾。この培養上清中には各種の造血刺激因子が含まれており、メチルセルロース培地に添加して造血前駆細胞 (BFU-E, CFU-E) 由来のコロニー形成を促進する。このコロニー形成促進能を定量化して造血刺激因子活性 (burst promoting activity; BPA) 分泌能として評価した⁴⁾。

造血抑制因子の検討には、以下の血中サイトカインを測定した。macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) は通常造血刺激因子に分類されるが、後述するように早期の実験結果から赤血球造血抑制的に作用することを推測したため抑制因子として記載した。そのほか tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 α/β , interleukin-6 濃度を、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて測定した。

造血前駆細胞アッセイとしては、通常のメチルセルロース培養法を用いた。いずれも測定方法の詳細は既報の文献に示した^{3,5)}。M-CSF の造血抑制的な作用を検討するために、M-CSF 血中濃度が高い

* 徳島大学医学部小児科 ** (医) 川島会 川島病院

透析患者の骨髓細胞を採取して単核球に分離した後、メチルセルロース培地でIL-3 (20 ng/ml) を刺激因子とし、赤芽球系前駆細胞である burst forming unit for erythroid (BFU-E) を異なる濃度のM-CSFを添加して培養し、その数を算定した。

高度の腎性貧血患者にBK-F膜を使用して透析を行ったときの濾液を濃縮し、その中の蛋白分画の純化精製を試みた⁶⁾。予備実験で造血抑制的に作用する分画をKR4-0と名付け、その健常人骨髓中のCFU-Eに及ぼす影響を検討した。

1 結果

1) 末梢血単核球のBPA分泌能

透析患者 (n=26) の末梢血単核球から分泌されるBPAは、健常人 (n=10) のそれに比較して低値であった (57±21% vs 96±9%)。培養上清の添加濃度を上げていくと、濃度依存性にBFU-E由来のコロニー形成を抑制した。

2) サイトカイン血中レベル

98名の透析患者の血清中M-CSFレベルは6.9±2.1ng/mlであったのに対し、健常成人のそれは2.0±0.2ng/mlと有意に低かった。また患者の中で、Epo療法に迅速に反応した症例とそうでなかった症例では、各々6.39±2.14ng/ml、7.26±2.57ng/mlで差は認めなかった。また、個々の患者について透析前後で調べると、M-CSFレベルは透析後が有意に増加した。保存期慢性腎不全患者6名とCAPD施行中の腎不全患者5名では透析患者より低く、特に前者では透析患者より有意な低値で、透析によりM-CSFレベルが上昇することが示唆された (表1)。測定したその他のサイトカインにつ

表1 血中M-CSFレベルの比較

透析患者	保存期慢性腎不全患者	CAPD患者	健常人
6.9±2.14 (n=98)	4.5±1.9 (n=6)	5.6±1.2 (n=5)	2.0±0.2 (n=10)

いては有意な増加は認めなかった。

3) M-CSFの前駆細胞への影響

メチルセルロース培地にM-CSFを添加して異なる濃度のEpoで刺激すると、患者骨髓単核球中のコロニー形成細胞は健常人ドナーの骨髓細胞よりもコロニー形成が抑制された。この抑制効果はEpo濃度が高くなるにつれて著明であった (図1)。

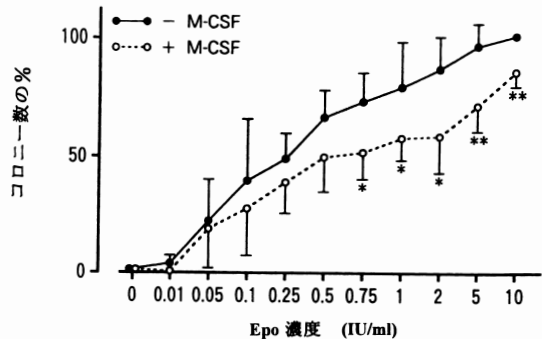


図1 M-CSFの赤血球造血抑制作用

透析患者の骨髓単核球を、メチルセルロース培地に播種してえられた赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) の、Epoに対するdose-response curve. 培地に10ng/mlのM-CSFを添加するとコロニー数は有意に低下した (*P<0.05, **P<0.01)。

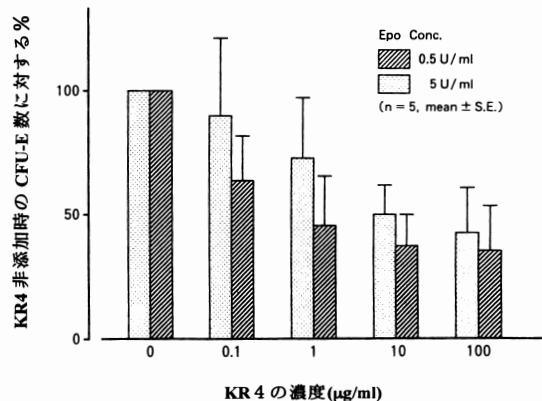


図2 透析濾液中の蛋白から精製された分画 (KR4-0) のCFU-E抑制効果

KR4-0を添加しない場合のCFU-E数を100%とし、添加したときのCFU-E数をそれに対する%で表した。結果は5名の健常人ドナー骨髓細胞を用いた検討結果として平均±標準誤差として表した。濃度依存的にCFU-Eによるコロニー形成を抑制した。

4) KR4-0

健常人ドナーから採取した骨髓単核細胞を標的細胞として、透析濾液を濃縮生成してえられた KR4-0 の添加濃度を変えながらメチルセルロース法で CFU-E を培養した。Epo を 0.5U/ml と 5.0u/ml で行ったが、図 2 に示したように濃度依存性に CFU-E の増殖を抑制した。また、それは高濃度の Epo 存在下で抑制が少ない傾向を示した。

3 考案

腎性貧血は慢性腎不全患者において腎機能の低下に従って進行する貧血である。従来から腎臓で産生されるべき Epo が腎機能の廃絶とともに産生されなくなることが主因であると考えられてきた。Epo の臨床応用は貧血による QOL の低下を著明に改善したが、一方で高血圧等の副作用の発現が観察されたり、予想外に効果が現れない患者の存在が明らかになり、腎性貧血に関わる要因の多様性があらためて証明された。また、内因性 Epo の血中レベルは貧血の程度を相関せず、腎移植後であっても Epo 濃度と腎機能の間に関係を見いだせないことは、この病態の複雑さの反映であると思われる⁷⁾。

われわれは慢性腎不全患者末梢血単核球の BPA の分泌能が低下していることや、患者の骨髓細胞中の赤血球系造血前駆細胞 (CFU-E, BFU-E) 数が健常人に比較して少ないこと、またそれらの Epo 感受性が低下していることなどを報告してきた⁸⁾。また erythroid differentiation factor (EDF; Activin と同一物質) が Epo 感受性を高める可能性があることなどを報告した⁹⁾。しかしながら、これらの条件が腎性貧血の病因あるいは治療成績の向上に直接的につながるわけではなかった。そのような環境下で、透析方法、特に膜の改良で貧血の改善あるいは Epo 療法の効率化が可能かどうかを知る必要があった。実際には透析膜を変えるだけで貧血が改善した患者の透析廃液中の造血抑制因子を検討した¹⁰⁾。結果としては、in vitro で造血抑制的に作用する物

質が精製できるものの、その分子を正確に同定できていない。長時間かかってある程度の成果は示せたものの、治療方法の変革には至らなかった。腎不全という病態の奥深さを痛感させられたのである。

血液透析を前提とすると、貧血はある程度理にかなった病態であることも事実である。体外循環で血漿中の尿毒症物質を透析する場合に、赤血球が少なく血液の粘稠度が低いことや血漿量が相対的に多いことは利点である。したがって、保存期腎不全患者や CAPD の患者の目標ヘモグロビン値は異なっても不思議ではない。Epo の副作用が高血圧症を除いて目立たないことは確かであるが、生理的状态に比較して異常高値に保つことによる他のサイトカインへの影響は解明されていない。したがって、長期間そのような状態に保った場合の悪性腫瘍の合併率や脳血管障害の頻度などは追跡観察する必要があると考えている。

数多くの研究者が慢性腎不全患者の治療のために研究を重ね、現在血液浄化法として最も進んでいる透析療法である。しかし、Epo の登場で不必要な輸血を回避できるようになったものの、未だ完成されたものではない。今後のこの分野の研究の進展には従来と発想の異なるアプローチが必要であると思う。

文 献

- 1) 斎藤明：腎性貧血と QOL. 治療, 75;129, 1992.
- 2) 若狭幹雄, 牧田東陽, 関口高, 他：エリスロポエチン投与によって改善する QOL. 日常診療と血液, 2;33, 1992.
- 3) 河野嘉文：リンパ球由来液性因子の造血前駆細胞に及ぼす影響について. I. 慢性腎不全患者リンパ球の赤芽球系前駆細胞成熟因子 (BPA) 分泌能の検討. 日血会誌, 52;831, 1989.
- 4) 河野嘉文, 高上洋一, 阿部孝典, 他：透析患者における末梢血単核球の造血因子 (BPA, GM-CSA) 分泌能の検討—腎性貧血との関連—. 透析会誌, 23;567, 1990.
- 5) Kawano Y, Takaue Y, Motoyoshi K, et al.:

- Measurement of serum levels of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in patients with uremia. *Exp Hematol*, 21;220, 1993.
- 6) 河野嘉文, 高上洋一, 黒田泰弘, 他: ハイパフォーマンスメンブレン (BK-F) 透析による腎性貧血改善効果—赤芽球系造血抑制因子除去の検討—. *腎と透析*, 36 (suppl);200, 1994.
- 7) 鈴木智史, 浅野友彦, 辻 明, 他: 腎移植患者におけるエリスロポエチン値の変動. *腎移植・血管外科*, 8;47, 1998.
- 8) Kawano Y, Takaue Y, Minakuchi J, et al.: Impaired production of burst promoting activity by blood mononuclear cells from chronic uremic patients: Possible role in the pathogenesis of anemia. *Am J Hematol*, 36;9, 1991.
- 9) Shimizu T, Kawano Y, Takaue Y, et al.: Diminished erythropoietin-induced erythroid growth in patients with renal anemia is restored by recombinant human erythroid differentiation factor. *Am J Hematol*, 47;178, 1994.
- 10) Yamada S, Kataoka H, Kobayashi H, et al.: Identification of an erythropoietic inhibitor from the dialysate collected in the hemodialysis with PMMA membrane (BF-F) and its clinical effects. In: *Polymethylmethacrylate. A Flexible Membrane for a Tailored Dialysis*. *Contib Nephrol. Basel, Karger*, vol. 125; p.159, 1998.