

腹膜透析関連腹膜炎における排液中補体活性化産物測定による，腹膜炎の予後判定のためのバイオマーカーの可能性

水野正司*1,2 井口大旗*2 東出慶子*2 坂田史子*1,2 鈴木康弘*1,2 伊藤恭彦*1,2,3

*1 名古屋大学大学院医学系研究科腎不全総合治療学寄附講座 *2 同 腎臓内科 *3 愛知医科大学腎臓・リウマチ膠原病内科

key words : 腹膜透析, 補体, sC5b-9, 腹膜炎, 培養陰性腹膜炎

要 旨

腹膜炎は腹膜透析（PD）継続を妨げる重要な要因であり，Day 5 で腹膜炎の改善がない時は，カテーテル抜去が推奨される。しかし，臨床的に判断に悩む事もある。我々は，腹膜炎の PD 排液中補体活性化産物 sC5b-9 を測定し，腹膜炎の予後を推測する一助になるかどうかを検討するために，腹膜炎 104 件について，PD 排液検体の sC5b-9 を測定し，腹膜炎の予後との関係を調べた。離脱群（G1）と継続群（G2）で，Day1 では sC5b-9 に有意差はなかったが，Day5 で G1 が G2 より有意に高かった。特に培養陰性例に注目したとき，sC5b-9 が Day5 の G1 で有意に高く，PD 排液中の白血球数（PDWBC）に加えて sC5b-9 の測定を行うことで，カテーテル抜去の判断のひとつとして役立つことが示唆された。

緒 言

腹膜透析（PD）の予後を決める重大な合併症に腹膜炎がある，腹膜炎の合併は，世界的に PD 継続を妨げる原因の一つと考えられている。日本でも，我々の報告した東海地区 13 施設で行ったレジストリの結果でも，腹膜炎が長期 PD 施行を妨げるもっとも大きい要因であることを示した¹⁾。この PD 関連腹膜炎発症は，単に感染症にとどまらず，その後の腹膜障害につ

ながる可能性があり，一部では致死的な合併症であり，被嚢性腹膜硬化症（EPS）に進展していく可能性があることも知られている。

本研究のターゲットとしている補体系は自然免疫を中心に，生体の恒常性を保つため，重要な役割を担っていることが知られている。しかし，過剰な補体活性化が種々の病態を引き起こすことも知られていて，生体には多様な補体制御因子が存在している²⁾。これまでに，腹膜においても，補体系の産生や活性化産物の測定が少数報告されている。我々は，腹膜表層に膜補体制御蛋白（CReg）が豊富に存在していることをラットやヒト腹膜生検にて^{3,4)}，また，腹膜上の CReg の機能が妨げられると，補体活性系の制御異常による腹膜炎の炎症の惹起や腹膜炎の増悪が生じることを，実験動物モデルを用いて報告してきた^{4,5)}。ヒトにおいても，PD 患者の中皮細胞が補体系について修飾を受けている可能性を報告している⁶⁾。

PD 患者において腹膜炎が発生したときには，カテーテルの温存にとらわれすぎず，国際腹膜透析学会（ISPD）ガイドラインでも腹膜炎発症後 5 日間で改善を認めない場合には，積極的に留置カテーテルを抜去することを推奨している⁷⁾。しかし，一方で，カテーテル抜去は，すなわちシャント作製と血液透析移行を意味しており，患者・主治医等，判断に悩むことが少なくなく，これはかなりのストレスとなる。

To predict prognosis of PD-related peritonitis, especially culture negative peritonitis, measurement of the complement activation products in peritoneal dialysate may be useful

Division of Nephrology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Masashi Mizuno

Daiki Iguchi

Keiko Higashide

我々の注目している補体系は、病原体を排除する役割をもつため、腹膜炎の時には腹腔内（貯留 PD 液中）での補体活性化が進むことが予想される。また、感染が持続する場合には異常な補体活性化が持続すると考えられる。このため、腹膜炎患者の PD 排液中の補体成分や補体活性化産物の測定を行うことで、腹膜炎の予後の判定に寄与できる可能性を考え、本研究では腹膜炎の予後と PD 排液中の補体活性化産物濃度の検討を行った。

1 目的

今回、我々は、PD 関連腹膜炎における補体活性産物、特に sC5b-9 に注目して測定を行った。腹膜炎既存の PD 排液中の白血球数や炎症反応といった、これまでの指標に加えて、腹膜炎の予後判定に寄与する新たなマーカーとなりえるかどうかについて検討した。

2 方法

2-1 本研究の対象患者

名古屋大学附属病院と関連病院に通院中の PD 患者で、2008 年 5 月から 2013 年 12 月に発生した 104 例の腹膜炎について、腹膜炎発症 day 1, day 2, day 4 について over night 貯留の排液を回収し、遠心後 -70 度で測定時まで保存した。患者からの検体および臨床検査データの採取については、名古屋大学医学部附属病院の生命倫理委員会の承認を得たうえで、関連病院による倫理委員会承認を経て、各患者の承諾を得て行っ

た。

2-2 患者群分けについて

PD 患者に発生した腹膜炎を、完治して PD を継続できている群（グループ 2）と、最終的に腹膜炎のコントロールが医学的に困難なために PD カテーテル抜去を行った群（グループ 1）に分けて検討を行った。

2-3 ELISA 法による、PD 排液中の補体活性化産物濃度、および蛋白濃度の測定

PD 患者の腹膜透析腹腔内貯留排液から採取した検体を、ELISA 法にて、補体関連蛋白の中で C3 と C4 を、補体活性化産物の中で sC5b-9 の測定をそれぞれの ELISA キット（AssayMax Human Complement C3 ELISA kit, AssayMax Human Complement C4 ELISA kit (Assaypro LLC, St. Charles, MO), MicroVue™ sC5b-9 Plus EIA kit (Quidel Co., San Diego, CA)）を用いて行った。PD 排液中の蛋白量は BCA 蛋白アッセイ（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。各測定は、アッセイ方法に従って行った。

上記の各測定値は、透析排液中の蛋白濃度で補正值（補正 C3 値、補正 C4 値、補正 sC5b-9 値として記載）も合わせて検討を行った。腹膜炎原因菌との比較検討については、個々の病原体が表 1 のように多彩に富んでいて、個々起因菌の件数が少ないものが多かった。そのため、グラム陽性菌による腹膜炎、グラム陰性菌による腹膜炎、真菌による腹膜炎、培養陰性腹膜炎の

表 1 腹膜炎の起因菌と頻度

n (%)	原因微生物	グループ 1	グループ 2
グラム陽性菌	<i>Streptococcus sp.</i>	0 (0)	13 (16.5)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (8.0)	5 (6.3)
	CNS [†]	3 (12.0)	11 (13.9)
	<i>Enterococcus sp.</i>	1 (4.0)	6 (7.6)
	<i>Micrococcus sp.</i>	0 (0)	1 (1.3)
	分類不能	0 (0)	1 (1.3)
グラム陰性菌	<i>Escherichia coli</i>	2 (8.0)	2 (2.5)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (12.0)	0 (0)
	<i>Acinetobacter sp.</i>	0 (0)	6 (7.6)
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	1 (4.0)	1 (1.3)
	<i>Serratia sp.</i> その他	4 (16.0)	2 (2.5)
真菌	<i>Candida sp.</i>	4 (16.0)	0 (0)
	<i>Cryptococcus sp.</i>	1 (4.0)	0 (0)
培養陰性		4 (16.0)	31 (39.2)

† コアグララーゼ陰性ブドウ球菌

$$\begin{aligned} \text{sC5b-9, C3 or C4 (D2-D1)/D1} &= \{(\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day 2}) \\ &- (\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day1})\} / (\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day1}) \times 100 \\ \text{sC5b-9, C3 or C4 (D5-D1)/D1} &= \{(\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day 5}) \\ &- (\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day1})\} / (\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day1}) \times 100 \\ \text{sC5b-9, C3 or C4 (D5-D2)/D2} &= \{(\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day 5}) \\ &- (\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day2})\} / (\text{adjusted sC5b-9, C3 or C4 level in PDF on day2}) \times 100 \end{aligned}$$

表2 PD 排液中の sC5b-9 値, C3 値, C4 値の変化率の計算式

四つに分類して、PD 排液中の C3 値, C4 値, sC5b-9 値についてそれぞれ検討を行った。また、表2に示すように、それぞれの値の変化率についても同時に検討した。

2-4 統計解析

多群間比較は、Kruskal-Wallis test を用い、有意差があった場合、さらに2群間で Mann-Whitney U test と Bonferroni correction で解析を行った。また、2群間比較の統計解析は、Mann-Whitney U test と Bonferroni correction を施行した。各データは平均±SD で表記し、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

3 結果

3-1 グループ1とグループ2の背景の比較

腹膜炎の治療後にPDを継続できている群（グループ2）と、最終的に腹膜炎のコントロールが医学的に困難なためにPDカテーテル抜去を行った群（グループ1）の2群間では、PD治療を受けている期間についてグループ2で有意に長かったが、男女差、DMの有無、年齢に有意差はなかった。また、血清中のC3値、C4値、CH50についても両群で有意差は認めなかった（表3）。

3-2 PD 腹膜炎のPD 排液中の sC5b-9 値, PD 排液中の蛋白量, および PD 排液中の白血球数の検討

腹膜炎を起因为菌からグラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌、培養陰性の4群に分けたとき、4群の中でDay1ではPD排液中のsC5b-9濃度、蛋白量、白血球数に有意差を認めなかった、しかし、Day5では、PD排液中のsC5b-9値は真菌で特に高値を示し、グラム陰性菌でも高値を示した（図1）。Day5では、PD排液中の蛋白量でも、同様に真菌で高値であったが、グラム陰性菌でも差は大きくなかった。排液中の白血球数はsC5b-9と類似した傾向を示した（図1）。

3-3 腹膜炎発症後の排液中の白血球数, 補正 sC5b-9 値, 補正 C3 値, 補正 C4 値を, グループ1とグループ2の間で, Day 1, 2, 5で検討

グループ1とグループ2の間で、排液中の補正sC5b-9値と排液中は、腹膜炎発症Day1, Day2では有意差はなかった。しかし、Day5に $p < 0.001$ とグループ1で有意に高値であった。排液中の補正C3値、補正C4値についても同様にday5で $p < 0.05$ で高値を示した。このため、Day5について以下の検討を行った。

表3 グループ1とグループ2の患者背景の比較

	グループ1	グループ2	
腹膜炎件数 (n)	25	79	ns.
年齢 (歳)	67.0 ± 12.4	65.6 ± 9.4	ns.
性別 (男/女)	22/3	59/20	ns.
DM/非 DM	11/13	39/40	ns.
PD 歴 (月)	48.4 ± 34.2	30.9 ± 28.7	$p < 0.05$
血清 C3 値 (mg/dL)	88.1 ± 16.3	95.2 ± 20.0	ns.
血清 C4 値 (mg/dL)	28.0 ± 6.7	30.0 ± 5.8	ns.
血清 CH50 (IU/dL)	43.7 ± 12.5	44.9 ± 9.0	ns.

値は平均±SD

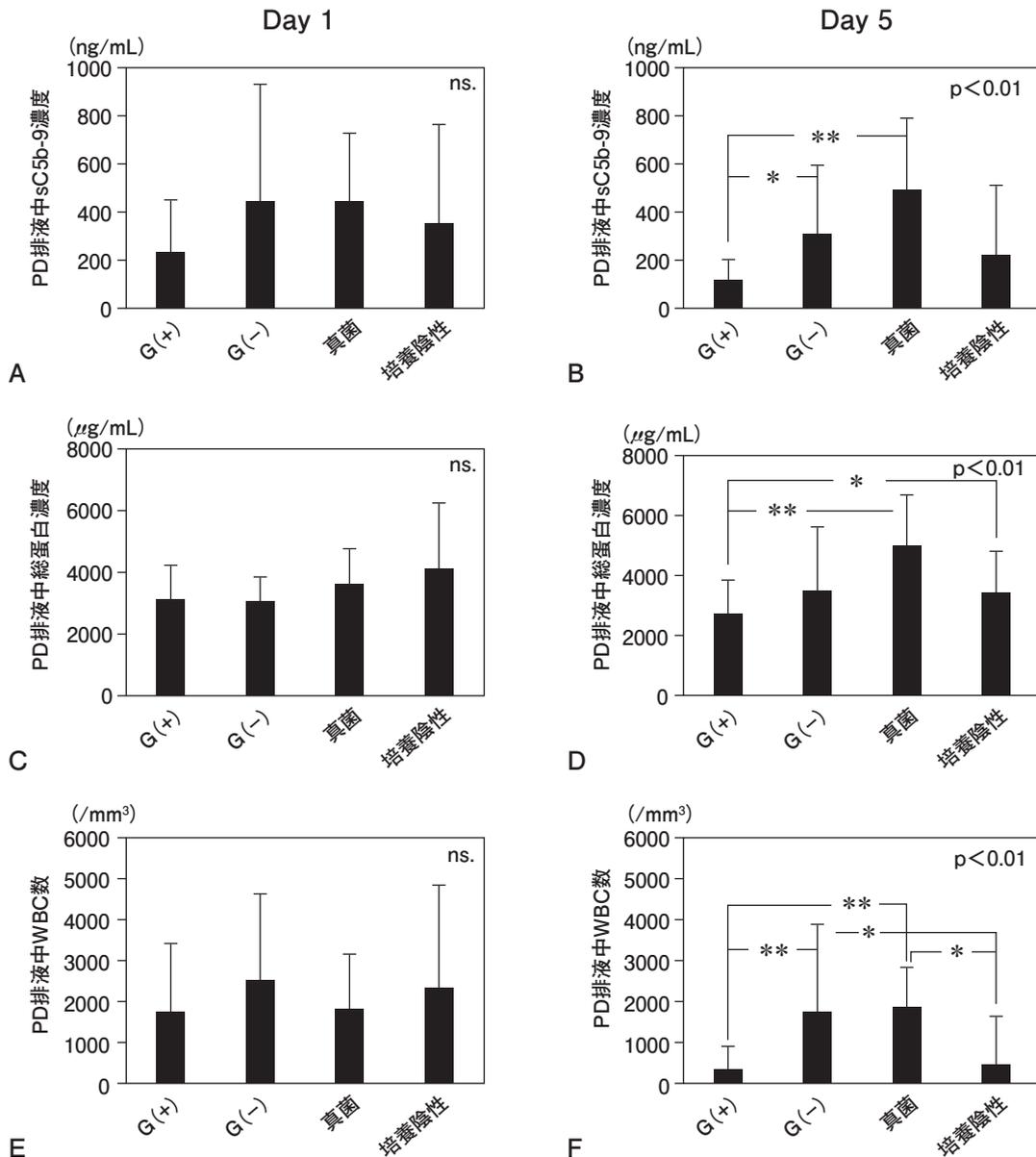


図1 腹膜炎発症 Day 1と Day 5の PD 排液中の sC5b-9 値, 総蛋白濃度, 白血球数の測定
 腹膜炎の起原因菌を4つのカテゴリー, グラム陽性菌, グラム陰性菌, 真菌, 培養陰性に分類し, それぞれの Day 1と Day 5について, PD 排液中の sC5b-9 値 (A,B), 総蛋白濃度 (C,D), 白血球数 (E,F) について, 比較検討した. * p<0.05; ** p<0.01

3-4 腹膜炎発症後 Day 5 について, グループ 1 とグループ 2 の間の PD 排液中の補正 sC5b-9 値, 補正 C3 値, 補正 C4 値を四つの群分けした起原因菌について検討

結果を図 2 に示す. 腹膜炎を起原因菌からグラム陽性菌, グラム陰性菌, 真菌, 培養陰性の 4 群に分けて比較すると, Day 5 ではグラム陽性菌と培養陰性でグループ間の PD 排液中の補正 sC5b-9 値に有意差を, グラム陰性菌は補正 C4 値に有意差を認めた. 真菌も高値を示したが, 全例離脱のため統計的比較は不能であった.

3-5 グループ 1 とグループ 2 の間における, PD 腹膜炎 (day 5) の PD 排液中の補正 sC5b-9 値, 補正 C3 値, 補正 C4 値の変化率検討

グループ 1 とグループ 2 の間の変化率は, 補正 sC5b-9 値で大きな差を示した (図 3). 起原因菌を 4 群に分けると, グラム陽性菌と培養陰性のグループ間で有意差があった (図 3). 培養陰性腹膜炎に注目して, PD 排液中の補正 sC5b-9 値, 補正 C3 値, 補正 C4 値の変化率を調べると, この中では, PD 排液中の補正 sC5b-9 値の変化率が最も有意な変化を示した.

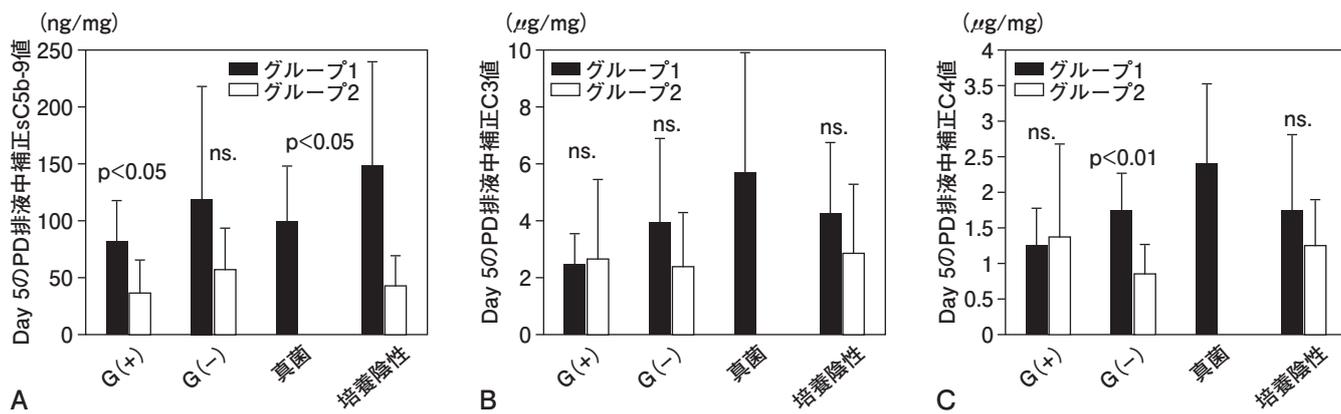


図2 腹膜炎の起原因菌を4つに分類したときの、PD 排液中の補正 sC5b-9 値、補正 C3 値、補正 C5 値
 腹膜炎発症 day 5 における、PD 排液中の補正 sC5b-9 値、補正 C3 値、補正 C4 値について、起原因菌の各カテゴリーで、グループ1とグループ2について比較検討を行った。

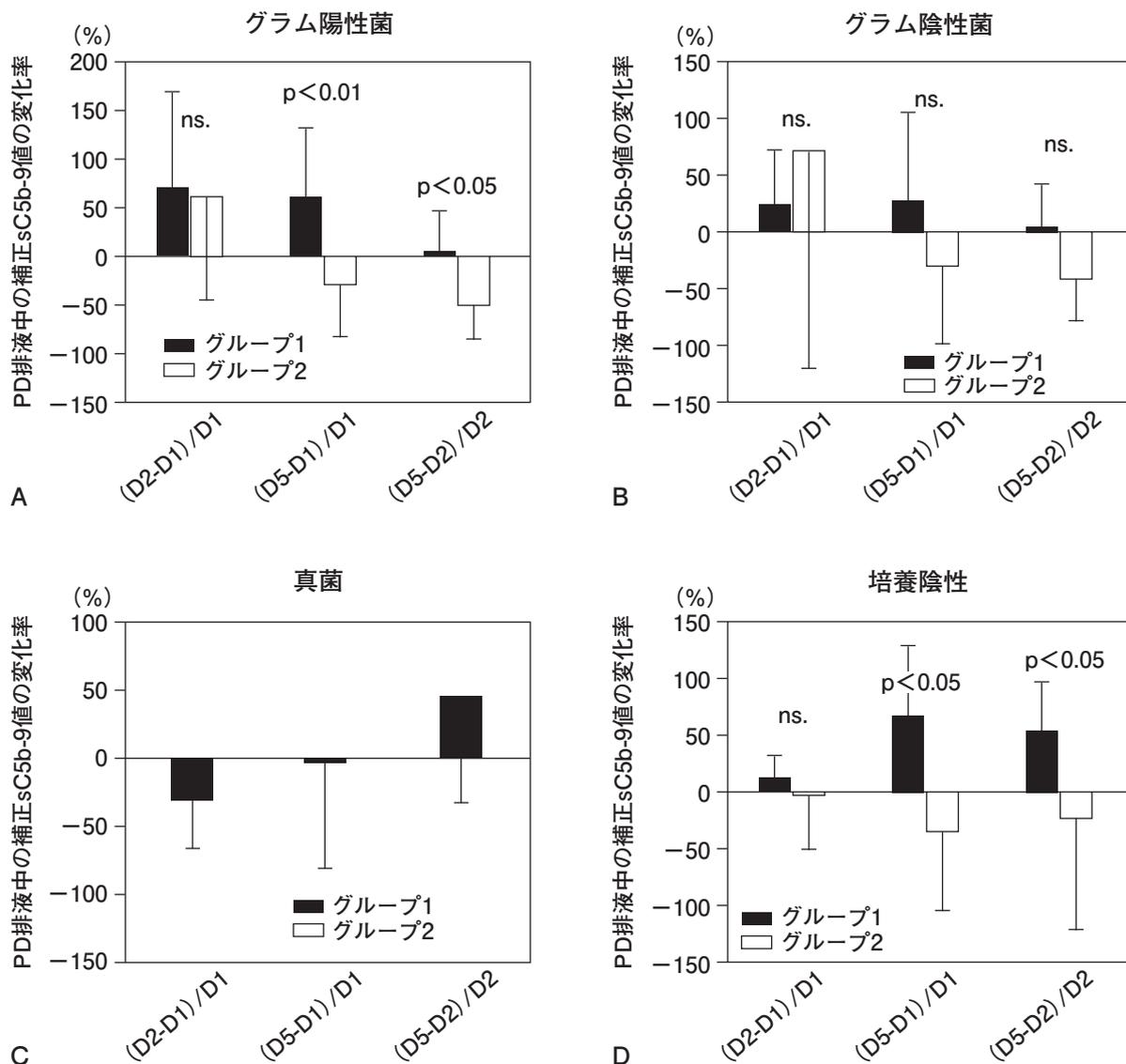


図3 PD 排液中 sC5b-9 値の変化率と、腹膜炎起原因菌との関係
 腹膜炎起原因菌をグラム陽性菌 (A)、グラム陰性菌 (B)、真菌 (C)、培養陰性 (D) の4つに分類して、それぞれグループ1とグループ2の間の比較を行った。なお、真菌はすべて離脱しているため、グループ1のみとなり、統計的検討は行っていない。

4 考察

PD 離脱群 (グループ 1) と継続群 (グループ 2) において, Day 1, 2 では補体関連蛋白に有意差はなかったが, Day 5 でグループ 1 がグループ 2 より有意に高かった. 特に培養陰性症例に注目すると, sC5b-9 が Day 5 のグループ 1 で有意に高く, これは, Day 2, 5 の変化率では, より顕著になった. 離脱症例の多くの場合は, PD 排液中の補正 sC5b-9 値と PD 排液中の WBC 数は同様の動きを見せたが, PD 排液中 WBC 数が一部の症例で PD 排液中の sC5b-9 値が Day 5 で上昇する例もあり, PD 排液中 WBC 数測定に PD 排液中 sC5b-9 値の測定を加えることで, カテーテル抜去の判断の一助になる可能性が示唆された.

末期腎不全の患者の PD 療法において, 腹膜炎は重要な合併症の一つであるが, 感染症治療が奏効しなかった場合に, どの時点で PD カテーテルの抜去に踏み切るのかという判断は医療現場では迷うことが少なくない. これは, 抜去や, 血液透析の準備・移行に伴う患者への物理的・精神的負担が多く, また患者の了解を得られるまでの時間が必要で, これまでの判定材料に加え, より多くの指標で判断できることが望まれる. 本研究では, 我々の測定した PD 排液中の sC5b-9 値が, 微生物の種類によって, また予後で異なり, PD 継続するかどうかの予想因子の一つとして使用できる可能性が示唆された.

結語

我々は, 腹膜炎発症後の PD 排液中の補体活性化産物 sC5b-9 の測定が, 腹膜炎, 特に培養陰性腹膜炎の予後の予測因子のひとつとして役立つ可能性を示した.

謝辞

本研究の一部は, 日本透析医会のご好意による平成 26 年度日本透析医会公募研究助成によって施行された. 研究内容の一部, もしくはすべてを, 日本透析医学会学術集会, 日本補体シンポジウム, The XXV In-

ternational Complement Workshop にて発表した. 平成 26 年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は, 原著論文として『PlosOne』に投稿したため, 二重投稿となることを避け, 本報告書ではその概要を記載した. なお, 原著論文は 2017 年 1 月に下記論文として公表された.

Mizuno M, Suzuki Y, Higashide K, Sei Y, Iguchi D, Sakata F, Horie M, Maruyama S, Matsuo S, Morgan BP, Ito Y. High level of soluble C5b-9 complex in dialysis fluid is a predictor of poor prognosis in peritonitis in peritoneal dialysis patients. PLoSOne 12:e0169111, 2017.

文献

- 1) Mizuno M, Ito Y, Tanaka A, et al. : Peritonitis is still an important factor for withdrawal from peritoneal dialysis therapy in the Tokai area of Japan. Clin Exp Nephrol 2011; 15 : 727-737.
- 2) Mizuno M, Morgan BP : The possibilities and pitfalls for anti-complement therapies in inflammatory diseases. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2004; 3 : 85-94.
- 3) Mizuno M, Ito Y, Mizuno T, et al. : Zymosan, but not LPS, developed severe and progressive peritoneal injuries accompanied with complement activation in peritoneal dialysate fluid in a rat peritonitis model with mechanical scraping. J Immunol 2009; 183 : 1403-1412.
- 4) Mizuno T, Mizuno M, Okada N, et al. : Specific collaboration between rat membrane complement regulators Crry and CD59 protects peritoneum from damage by autologous complement activation in peritoneal dialysate fluid. Nephrol Dial Transplant 2011; 26 : 1821-1830.
- 5) Mizuno M, Ito Y, Mizuno T, et al. : Membrane complement regulators protect against fibrin exudation in a severe peritoneal inflammation model in rats. Am J Physiol Renal Physiol 2012; 302 : F1245-F1251, 2012.
- 6) Sei Y, Mizuno M, Suzuki Y, et al. : Expression of membrane complement regulators, CD46, CD55 and CD59, in mesothelial cells of patients on peritoneal dialysis therapy. Mol Immunol 2015; 65 : 302-309.
- 7) Li PK, Szeto CC, Piraino B, et al. : ISPD peritonitis recommendations : 2016 update on prevention and treatment. Perit Dial Int 2016; 9-10 : 481-508.