慢性血液透析患者の貧血発生における catabolic enzymes の役割

和田 孝雄 青柳 高明* 安達 直** 河野 南雄***

稲本 元 出口 修宏 小西 孝之助 山吉 亘

慶応大学腎臓センター 微生物化学研究所* 生物統計** 目黒駅前クリニック***

(昭和 56 年 10 月 2 日受付)

Key words : anemia, enzyme, catabolism, hemodialysis, uremia

〈要旨〉

慢性血液透析患者の貧血の原因を代謝要因の立場から探るために本研究を行った。透析患者及び正常人の血清中の各種水解酵素、ことに 12 種類のアミノペプチダーゼ (AP)、5 種類のエンドペプチダーゼ、RNase などの活性を中心として調べた。その結果を各種の臨床的パラメータに関係づけ、多変量解析法を用いて統計学的に解析した。

AP に関する判別係数の値から見ると、セリンアミノペプチダーゼ (Ser-AP) が高くなればなるほど、また AP-B が低くなればなるほど、正常人の代謝からかけはなれる傾向が見られた。しかし貧血と最も関係の強い AP は Trp-AP, AP-A であった。これら AP 群以外に最も貧血と関係の強い酵素は中性 RNase であり、透析患者において正常人の 6 ~ 7 倍に及ぶ著明な上昇が見られ、貧血の程度と有意な相関を示した。

正準相関分析を用いて各種の代謝因子と貧血との関係を総合的に分析したところ、貧血促進因子としては、RNase, Trp-AP, BUN などが最も強く働いていた。逆に抑制因子としては血清クレアチニン値、血清総蛋白濃度、cathepsin C などが大きな因子であった。クレアチニン値は BUN と異なり、透析状態の不良を表わす因子としてよりは、筋肉代謝との関係によって、栄養良好状態を反映する因子として、働いていた可能性がある。これらの主な代謝因子の貧血発生における寄与率は約 60% を占め、重要な役割を演じていた。今後この面をより詳細に検討していくことが望ましいと考えられる。

Role of catabolic enzymes in pathogenesis of anemia in hemodialysis patients

Takao Wada, Takaaki Aoyagi*, Sunao Adachi**, Namio Kohno***, Hazime Inamoto, Nobuhiro Deguchi, Kohnosuke Konishi, Wataru Yamayoshi

Kidney Center, School of Medicine, Keio University, Institute of Microbialchemistry*, Biostatistics**, Meguro Clinic***

In order to investigate the pathogenesis of anemia in hemodialysis patients, various hydrolytic enzyme activities were measured in serum of 37 patients as well as of 18 control subjects. These activities were related to other clinical parameters and were analyzed with multivariate statistical methods. The results demonstrated the importance of neutral RNase, Tryptophan-aminopeptidase, BUN as accelerating factors of anemia. On the contrary, serum creatinine level, total serum protein concentration and cathepsin C were important inhibitory factors of anemia, suggesting that they are nutritional parameters of the hemodialysis patients. These metabolic factors, as a whole, proposed 60% statistical contribution in pathogenesis of anemia on the condition of the present study.

緒言

腎不全患者の代謝異常に関する研究のはじまりは、1827 年、Bostock¹⁾ が患者の血液中に尿素、あるいはそれに類似した物質が増加していることを指摘したことに端を発している。それ以来、150 年間の研究成果はめざましく、今日ではこの分野も、尿毒症トキシン、Ca 代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝をはじめとして大きな広がりを見

せている。

しかし、1 歩振返って見るに、代謝という研究領域そのものが、生化学の進歩に伴って、急速に広がっていることもまた事実である。したがって全体の領域から見れば、これまで腎臓病学者達が手がけてきた分野は非常に限られているといわざるを得ない。このような状況において、たとえば透析患者の貧血という様な問題に、伝統

的な方法のみで取り組んでいると、本質を見誤りかねないと思われる。

たまたま、和田は数年前から、微生物化学研究所（所長、梅沢浜夫博士）にて研究の一端に加わる機会を得た²⁻⁵⁾。その際に遭遇した梅沢、青柳による酵素阻害剤に関する研究⁶⁻⁸⁾が代謝全般に及ぶ幅広い分野に応用し得るものという感を深めた。そこで今回は青柳の協力を得て、透析患者におけるプロテアーゼインヒビターの応用につながる可能性を求めて、catabolic enzymesの動向を追究するに至ったものである。

目的

慢性血液透析患者における貧血の発生に関与する因子としては、溶血、失血、尿毒症トキシン、エリスロポエチン、栄養不良などが知られている。しかし、これらの因子がいかにかみ合っているかは必ずしも明らかでない。そこで、本研究では少し視点をかえて、透析患者の代謝異常に係る諸酵素の面から諸因子のつながりを探ることを目的として、統計学的手法を取り入れて検討を行う。

方法

慢性血液透析患者 37 名、健常被検者 18 名の計 55 名について、血清中の諸酵素活性を測定した。患者の血液は定時透析日の透析開始時に採取したものを主として解析の対象とした。

AP 活性の測定に関しては、各種アミノ酸のナフチル

アミド化合物を基質として用いた。すなわち AP-A に関しては L-glutamic acid β naphthylamide (Glu-NA)、AP-B に関しては L-Arg-NA を用いた。その他の基質は Gly-NA, L-Ala-NA, L-Ser-NA, L-Pro-NA, L-Leu-NA, L-Met-NA, Formyl-L-Met-NA, L-Phe-NA, L-Trp-NA, Gly-L-Pro-NA, Gly-L-Pro-L-Leu-NA, Gly-L-His-L-Lys-NA などである。またエンドペプチダーゼの活性測定には、trypsin-like enzyme に関して p-toluene sulfonyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME), chymotrypsin like enzyme に関して N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), elastase like enzyme に関しては, acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine methyl ester, cathepsin C に関しては L-Ser-Tyr-NA, cathepsin D に関しては、ヘモグロビンを基質として用いた。インキュベーションの pH 条件は cathepsin D に関して pH 2.0, RNase に関して pH 7.6 を用いた他は、pH 7.2 であった。測定法の詳細についてはすでに報告した通りである²⁾。

これらの方法によって得られた測定値を判別関数、正準相関分析などの多変量解析法を用いて解析した。

結果

まず 12 種類の AP に関して判別関数を用いて正常人と透析患者との差を見ると、図 1 のごとくなる。この図では左側に透析患者、右側に正常人というように明瞭に判別がなされている。この 2 群の判別に際して判別係

図1 透析患者と正常被験者の判別分析 ×印は正常被験者、*印は透析患者。両者は明瞭に判別される。

数の値を見ると、プラス側の要因としては、以下のものがあり、1. AP-B(0.095), 2. Gly-Pro-AP(0.038), 3. Met-AP(0.022), 4. Ala-AP(0.007), 5. Phe-AP(0.006)の順に並んでいる。マイナス側の要因としては1. Ser-AP(-0.308), 2. Leu-AP(-0.068), 3. AP-A(-0.052), 4. Gly-AP(-0.042), 5. Trp-AP(-0.033), 6. Gly-Pro-Leu-AP(-0.029), 7. Gly-His-Lys-AP(-0.018)の順であった。判別係数の値はマイナスの値が大きいほど、正常人から離れる傾向にあるので、マイナス側要因の高値は異常代謝を表わす。逆にプラス側の要因に関しては低値になればなるほど異常代謝を表わすことになる。すなわち、Ser-APの高値と、AP-Bの低値は異常代謝をきたす大きな要因となる。

しかし、貧血の発生因子という面から見ると、最も興味あるのはAP-Aである。図2にはこの酵素と患者の末梢血赤血球数との相関性が示されている。両者間には $r = -0.33$ ($P < 0.05$)と有意な逆相関関係が見られた。AP-Aは酸性アミノ酸をN末端より切り離す酵素であるが、これに反して従来貧血と関係して注目されてきたヒスチジンなどを含む塩基性アミノ酸を切り離す酵素はAP-Bである。AP-Bと赤血球数との間には有意な相関が見られなかった。

図2 AP-Aと赤血球数(RBC)の相関性

図3にはAP-Aと血清鉄レベルとの関係を示す。両者間には $r = 0.51$ と比較的高い相関関係があり、 $p < 0.01$ であった。これらの結果を総合して考えると、AP-Aは鉄の利用を介して貧血の生成に重要な役割を演じていると思われる。

図3 AP-Aと血清鉄(IRN)の相関性

	Activities $\pm$ SD*		Significance of Difference
	Patients (N)	Controls (N)	
Male	363.4 $\pm$ 44.0 (21)	58.6 $\pm$ 13.9 (9)	$P < 0.001$
Female	371.0 $\pm$ 56.4 (16)	57.6 $\pm$ 12.2 (9)	$P < 0.001$
All	363.6 $\pm$ 50.2 (37)	58.1 $\pm$ 12.7 (18)	$P < 0.001$

* All values are expressed as unit/ml.
1 unit is equivalent to the activity of 1 ng standard RNase from bovine pancreas.

表1 Neutral RNase activities in serum of haemodialysis patients and normal controls.

AP以外に貧血と関係して最も興味ある酵素は中性RNaseである。表1には血液透析患者と正常人の間における中性RNase活性の比較を示してある。この表に見ると、男女を問わず、透析患者においては正常人の6～7倍に及ぶ高度な活性上昇を認める。両者間の差は $p < 0.001$ において有意であった。

このRNaseの上昇と透析患者の残存腎機能との関係を見るために、患者の1日尿量との相関性を見たのが図4である。両者間には $r = -0.67$ というかなり高い逆相関関係が見られ $p < 0.01$ にて有意であった。

中性RNaseと血清クレアチニン値との相関性を見ると、図5に示すごとく $r = 0.41$ とやや低くはなるが、やはり有意な順相関関係が見られた($p < 0.05$)。これらを総合して考えると残存腎機能と逆比例してRNaseが上昇しているものと考えられる。

図4 中性 RNase と尿量 (URV) の相関性

図5 中性 RNase と血清クレアチニンの相関性

さて、この RNase と赤血球数との関係を見たのが図 6 である。 $r = -0.38$ と有意な逆相関関係を示し、貧血の発生と関係していると考えられた。しかし、この酵素と貧血の発生機序との結びつきを、より明らかにするために、もう 1 つのパラメータとして、平均赤血球容積 (MCV) との関係調べたのが図 7 である。両者間には $r = 0.35$ と有意な相関関係が見られ ($p < 0.05$)、赤血球の

図6 中性 RNase と赤血球数 (RBC) の相関性

図7 中性 RNase と平均赤血球容積 (MCV) の相関性

成長障害と何らかの関係の有すると考えられた。

また中性 RNase は赤血球数のみならず、血小板数との間にも $r = -0.32$ ($p < 0.05$) と、有意な逆相関関係が認められた。また白血球数との間には $r = -0.14$ 、好中球との間には $r = -0.25$ と弱い逆相関関係が見られ、恐らく骨髓の造血機能全体と何らかの関係の有するものと考えられる。

さて、これらの酵素以外にも大なり小なり貧血と関係する因子はかなりあると考えられる。それらをまとめて、

基準変数	Hemoglobin RBC (MCV)	正準変量係数		
		−0.143 1.126	−0.099 1.031 −0.083	−0.515 1.434
予測変数 (説明変数)	AP-A	−0.026	−0.016	−0.078
	Trp-AP	−0.361	−0.341	−0.295
	Trypsin	0.232	0.224	0.215
	Cathepsin C	0.319	0.289	0.326
	R Nase	−0.792	−0.796	−0.443
	BUN	−0.320	−0.358	−0.014
	CRTNN	0.792	0.767	0.578
	Iron	0.108	0.133	−0.063
	Tot. Prot (MCV)	0.486	0.484	0.312 −0.538
	正準相関係数	0.772170	0.773078	0.842406
χ^2 値		37.4068	43.7028	48.3221
自由度		18	27	20
有意水準		0.5%	2.2%	0%

表2 貧血と代謝因子

総合的な検討を行うために、正準相関分析を行った結果を表2に示す。

まずヘモグロビン値と赤血球数を基準変数として、また各種の代謝性因子を予測変数として選び、両変数群の相関関係を追究した。ここには3つのケースが示してあるが、まず最も左側のコラムに示したケースについて説明する。正準相関係数の値から見て、マイナス側の要因として重要な役割を演じているのは、RNase(−0.792)、Trp-AP(−0.361)、BUN(−0.320)などである。これに対してプラス側の要因としては、クレアチニン値(0.792)、血清総蛋白濃度(0.486)、cathepsin-C(0.319)などがあげられる。この時の正準相関係数は0.77とかなり高く、約60%の寄与率を示している。

次に1つの試みとして、基準変数の側に、MCVをつけ加えて見たのが中央のコラムに示したケースである。ここでは一連の正準相関係数は左側のコラムに比してほとんど変化していないことが一見してわかる。相関係数も0.77と不変である。つまりMCVを加えたことによって特別新しい情報が得られてはいない。そこで次に、右側のコラムのごとくMCVを逆の側すなわち予測変数の側に入れて検討を行った。興味あることにRNase、Trp-AP、血清総蛋白濃度などの変量係数がのきなみに低下し、MCVの係数が−0.538とかなり高い値をとっている。

すなわち、これら諸因子の役割がMCVによって吸い取られた形になっていることがわかる。最後に血清鉄の役割という面から、この表について検討を行った。まず血清鉄と相関の高いAP-Aについて見ると、その変量

係数は最も左側のコラムでは−0.026、中央のコラムでは0.078とかなり低い値を示した。また血清鉄自身の係数も、左から順に0.108、0.133、−0.063とあまり高い値を示してはいない。ただしMCVを予測変数の側に加えた時には、0.133から−0.063とプラスからマイナスの値に逆転していることから考えてみても、腎不全の場合といえどもMCVの中に血清鉄に関係した因子が入っていることは確かである。

考察

我々は、この数年間、透析患者のカタボリズムと酵素との関係についての一連の研究を行っている⁹⁻¹⁴⁾。従来この種の研究で多少とも行われてきたのは、中性RNaseに関連したものがほとんどであって¹⁵⁻¹⁷⁾、それ以外の蛋白異化作用に関係した研究はほとんど見当たらない。

蛋白異化作用に関係する酵素としては、第1にエンドペプチダーゼ群、第2にエキソペプチダーゼ群があげられる。第3には異化作用と均衡を保つ蛋白合成系の酵素群が関係してくる。前2者はことに直接的な作用を行っているために、各種のN物質を含む尿毒症トキシン群、中分子物質群などの形成に大きな役割を持っていることは、容易に推察されるところである。また一方では、貧血の発生と蛋白代謝との関係、尿毒症トキシンとの関係も多くの研究者の興味の対象となってきた。これらの事情を考えると、上記諸酵素が貧血とどう関りあっているかを知ることは、大変に重要なことと思われる。

エンドペプチダーゼ群の中で、貧血と関係して重視されるのは、cathepsin Cと trypsin-like enzyme の2種類であった。興味あることに、両者共に貧血を抑制する因子として働いていることが判明した。これらが体内で実際にどのような機序で抑制側の因子として機能するかは不明である。可能性としては、大分子の尿毒症トキシンの分解に関与することも考え得る。

次にエキソペプチダーゼとしては、各種のAP群についての追究を行った。このうちで重要な役割を演じているのは、Trp-APとAP-Aであった。この両者は貧血の促進因子として働いている可能性が示唆された。特に後者は鉄の代謝と関係していると思われた。

一方、蛋白合成系との関係で注目されるのは中性RNaseである。この酵素に関する従来の報告は、この酵素自体が一種の尿毒症トキシンとして働く可能性を強調するもの^{15,16)}、栄養障害との関係を強調するものがある¹⁷⁾。

もし前者の見解をとれば、この酵素が貧血の原因的因子ということになり、後者の見解をとれば、栄養障害の結果としてこの酵素の活性上昇と貧血の両者が生じることになる。

我々の結果はこの2つの見解のいずれをも否定するまでには至らなかった。しかし、少なくとも腎機能の低下と中性RNaseの活性上昇が緊密に結びついていることが明らかにされた。したがって、栄養障害以外の因子がこの酵素活性の上昇の原因として参加していることは確かである。

筋ジストロフィーの領域ではMeyerらが、RNaseの過剰はメッセンジャーRNAを分解するために蛋白合成を阻害する可能性を指摘している¹⁸⁾。今回の研究では、この酵素活性は赤血球のみでなく、白血球数、血小板数とも逆相関している事実が明らかにされたが、これが蛋白合成系を介するものかどうか問題がある。真の結論を得るには、もう少し時間をかけて追究を行う必要がある。

これらの酵素以外にも貧血と関係する因子は多いと思われるが、今回の研究では代謝的因子の多くがMCVを介して貧血と結びついていることが示唆されたことは、今後の研究のために興味深い課題を提供するものである。当然のことながら、MCVは赤血球成長障害と関連を持つことが考えられるので、白血球、血小板についても、この点が究明される必要がある。

また、今後これら諸酵素活性に対して、梅沢、青柳らの開発した低分子性酵素阻害剤を用いて、*in vivo*においてその影響を見ることも必要となろう¹⁹⁾。

結論

貧血の発生に関して、catabolic enzymesを中心とする各種の代謝因子の役割を、多変量解析法を用いて検討した。これらは貧血の助長因子、抑制因子の両面から働いており、赤血球成長障害と関係している可能性が示唆された。これらの因子を追究することにより、透析患者の各種代謝異常を正常化するための治療法の開発にも役立つと思われる。そのような治療法の1つとして、低分子性酵素阻害剤の応用なども考えられる。

文献

- 1) Bostock, J.: Observations on the chemical properties of urine. Quoted by Bright, R. In Reports of Medical Cases, Selected with a View of Illustrating the Symptoms and Cure of Diseases by a Reference to Morbid Anatomy. Vol. 1. 75-85, Longman, Rees, Orme, Brown & Green, London, 1827.
- 2) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H.: Various enzyme activities in muscle and other organs of dystrophic mice. J. Clin. Invest. 67: 51-59, 1981.
- 3) Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H.: Intra-muscular enzyme abnormalities of dystrophic chicken compared to those of dystrophic mice. J. Pharm. Dyn. 4: 184-190, 1981.
- 4) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Hayashi, Y., Nagai, Y. and Umezawa, H.: Various enzyme activities in synovial fluid of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Biochemistry International. 2(6): 637-143, June, 1981.
- 5) Aoyagi, T., Wada, T., Iwabuchi, M., Yamamoto, A., Homma, J. Y. and Umezawa, H.: Variability of pattern of enzyme activities on bacterial surfaces-with special reference to aminopeptidases. Biochemistry International. : In press, 1982.
- 6) Umezawa, H.: Enzyme inhibitors of microbial origin. University of Tokyo Press: 1-52, 1972.
- 7) Aoyagi, T., and Umezawa, H.: Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. In Proteases and Biological Control. E. Reich, D. B. Rifkin, and E. Shaw, editors. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: 429-454, 1975.
- 8) 青柳高明：酵素阻害剤，共立出版：1977.
- 9) 和田孝雄，鈴木洋通，稲本元，山吉亘，山上恵一，大黒登美，黒田重臣，相沢紘，猪芳亮，小沢幸雄，加藤暎一：透析患者のカタボリズムに関する研究，第1報中性リボヌクレアーゼの役割，第11回腎臓学会東部部会，1981年5月。
- 10) Wada, T., Kohno, N., Inamoto, H. and Ohsawa, A.: Role of catabolic enzymes in metabolic abnormalities of hemodialysis patients. VIIIth International Congress of Nephrology: June. 1981.
- 11) 和田孝雄：シンポジウム，透析患者の貧血発生におけるcatabolic enzymesの役割，第26回透析研究会，1981年7月。
- 12) 和田孝雄，出口修宏，稲本元，小西孝之助，小沢幸雄，加藤暎一：透析患者のカタボリズムに関する研究，第2報，血清アミノペプチダーゼ・パターンについて，第24回腎臓学会総会，1981年10月。
- 13) 和田孝雄，稲本元：腎不全の透析療法に関する進歩と問題点，医学最近の歩み，第1巻腎臓病学，三越厚生事業団発行：179-210，1980年12月。
- 14) 和田孝雄，青柳高明，梅沢浜夫：正常及び病態時に

- おけるアミノペプチターゼの多変量解析の試み, 第 54 回日本生化学会大会, 1981 年 9 月.
- 15) Rabin, E. Z., Tattre, B., Algom, D., Freedman, M., Saunders, F. and Roncari, D. A. K. : Ribonuclease activity in renal failure : evidence for toxicity. 9th Annual Meeting American Society of Nephrology. 22.(abst.) 1976.
 - 16) Brunner, H., Brunner, A., Essers, U., and Heintz, R. : Inhibition of bone marrow cell proliferation by undialyzable fractions. In Hediland, A. Henne-mann, H. and Kult, J. (eds.) : Renal Insufficiency (Wurzburg Symposium 1974). Stuttgart, George Thieme Verlag. 90, 1976.
 - 17) Sommer, H., Gang, V. and Heidland, A. : Serum ribonuclease activity in patients during parenteral nutrition, chronic hemodialysis and acute pancreatitis. Klin. Wschr. 55 : 1019-1020, 1977.
 - 18) Meyer, D. H., Meyer, W. L. and Kakulas, B. A. : Studies on the physiological perturbation of the neutral ribonuclease II-inhibitor system. In Recent Advances in Myology. Bradley, W. G., Gardener-Medwin, D. and Walton, J. N., editors. Excerpta Medica, Amsterdam. 277-282. 1967.
 - 19) 青柳高明, 梅沢浜夫 : 微生物由来の蛋白分解酵素インヒビター, 阪大蛋白研セミナー, 「蛋白分解酵素インヒビターの生物学的意義と応用」, 1981 年 9 月.

日本バイオマテリアル学会 (JSB) 第 4 回総会および学術講演会御案内

日本バイオマテリアル学会第 4 回総会および学術講演会を下記の要領で開催いたします。多数のご発表とご参加をお願い申し上げます。

記

学 術 講 演 会

日	時	昭和57年11月27日(土), 28日(日)
場	所	東京慈恵会医科大学高木会館講堂
		〒105 東京都港区西新橋3-25-8
		TEL. 03-433-1111

演題募集要領

1. 内 容	バイオマテリアル (生体材料) およびその応用に関する医学, 歯学, 理学, 工学的研究ならびに学際的研究。
2. 申 込 方 法	申込用紙によりお申込みください。
3. 申込締切日	昭和57年 6 月30日(水)
4. 送 付 先	第 4 回日本バイオマテリアル学会大会
会 長 伊 丹 康 人
〒105 東京都港区西新橋3-25-8
東京慈恵会医科大学整形外科教室
第 4 回日本バイオマテリアル学会学術講演会実行委員会
事務局 富 田 泰 次
-