血液透析中のリンパ球ロゼット形成細胞の動態

宮 沢 修 三 森 田 隆 久 上 村 伸 一 郎 原 田 隆 二 尾 辻 義 人

橋 本 修 治 二 宮 誠* 松 元 正** 浜 崎 泰 和***

鹿児島大学第2内科 同小児科* 同腫瘍研** 同第1内科***

(昭和56年11月20日受付)

Key words : lymphocyte subpopulation, hemodialysis, suppressor T cell, T γ cell, leukopenia

〈要旨〉

血液透析が免疫応答系, 特に末梢血リンパ球 subpopulation に及ぼす影響について検索した。対象は週3回の維持透析を受けている安定期の患者で, cuprophane 膜を用いて透析を行っている者10例と polycarbonate membrane (PCM) を用いている者2例とした。方法はこれらの症例で, 透析前, 透析開始後15分, 60分, 120分に採血を行い, 白血球算定, アナリーゼ, 補体価の測定, 及び矢田らの mixed rosette 法を用いてリンパ球 subpopulation の測定を行った。その結果, 1) 血液透析の初期(15分)に double-RFC は透析前値の $38.7 \pm 13.6\%$ に EA-RFC は $52.2 \pm 18.0\%$ に著明 ($P < 0.001$) に減少し, 60分には回復した。今回減少を示した double-RFC は T γ cell であり suppressor T cell 及び killer T cell の一部である。また EA-RFC は B cell, K cell を含む subsets である。2) 透析中に T 細胞の比率には変動は認められなかった。3) 透析中にリンパ球数は20%前後の減少を認めた。その主体は double-RFC および EA-RFC の減少と思われる。4) これら subsets の減少には IgG の Fc レセプターを介したメカニズムの関与の可能性が考えられる。5) 透析初期の好中球や単球の減少には補体の活性化を介さないメカニズムも存在すると思われる。

The changes of rosette forming cell of peripheral blood lymphocyte during hemodialysis

Shuzo Miyazawa, Takahisa Morita, Shinichiro Uemura, Ryuji Harada, Yoshito Otsuji

Shuzi Hashimoto, Makoto Ninomiya*, Tadashi Matsumoto**, Yasunaga Hamasaki***

The 2nd Department Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Pediatrics*, Institute of Cancer Research**, The 1st Department of Internal Medicine***

The effect of hemodialysis on the immune response, mainly on the peripheral blood lymphocyte subpopulation, was studied. Ten(10) patients on maintenance hemodialysis using cuprophane membrane and 2 patients using polycarbonate membrane had been subjected to our study and lymphocyte subpopulations had been made according to Yata's mixed rosette method. The blood was withdrawn from the patients at intervals of 15, 60 and 120 minutes in addition to predialysis. Results are as follows: 1) Percentages of subsets of double-RFC (T γ cells: suppressor T cells and a part of killer cells) and EA-RFC (B cells and K cells) decreased markedly in the peripheral blood within 15 minutes after starting of hemodialysis and thereafter returned to former figures after 60 minutes ($P < 0.001$). 2) There was no significant alteration of T cell count percentage in the peripheral blood. 3) There was about 20% decrease of lymphocytes in number during dialysis, which was considered to be attributed mainly to decreased numbers of double-RFC and EA-RFC. 4) A mechanism which might have affected those subsets through Fc receptors of IgG was appeared to be one of possible causes of the subsets decrease. 5) Decrease of the neutrophils was not solely attributed to complement activation mechanism. The other mechanism was suggested to be responsible for the phenomenon.

はじめに

近年, 人工透析療法の著しい進歩に伴い, 慢性腎不全患者の長期延命が可能となった。5年生存率はおおよそ

80%に達する施設もでてきており¹⁾, いまや最長生存期間は10年を越えている。しかし, 長期延命が可能になればなる程, 腎不全という病態が透析によって十分に改善

されないための障害と、透析することによって生ずる新しい病態とが問題になってきている。

血液透析が免疫応答系に及ぼす影響については多くの報告があり、なかでも白血球、特に、好中球や単球が、透析初期に著明に減少するとの報告がある²⁻⁴⁾。しかし、リンパ球についての詳細な研究報告はほとんどない。

さて、リンパ球にはT細胞、B細胞があり、B細胞は抗体産生能を有し、T細胞は移植拒絶反応、遅延型アレルギー反応、抗体産生細胞に対する helper や suppressor などがあり、それらを担当する機能別 subsets の存在が知られている。IgG の Fc 部分に対するレセプターをもつ T細胞 (T γ cell) は suppressor T cell 及び killer T cell の一部に一致すると報告されている⁵⁻⁷⁾。我々はすでに慢性腎不全の患者の末梢血リンパ球 subpopulation について検討し、T細胞、B細胞比率には変化はないものの T γ cell が患者群で有意に増加していることを発見し、腎不全患者における免疫不全とのかわりあいについて報告した^{8,9)}。今回はこれらリンパ球 subpopulation が血液透析中にどのような影響を受けるかについて検索した¹⁰⁾。

実験方法

(1) 対象：教室の関連施設で1週3回5時間の維持透析を行っている安定期の患者で、cuprophane 膜 dialyzer 使用者10例と polycarbonate membrane (PCM) dialyzer 使用者2例を対象とした。

(2) Blood sampling：採血は血液透析開始前、開始後15分(HD 15分)、60分、120分にそれぞれヘパリン加血として採取した。透析開始前はA-Vシャント部の静脈から、その他は血液回路の静脈側から各々13 ml 採取した。採取したsampleは小わけにし、1 ml は白血球の算定及びアナリーゼに用い、2 ml は補体価の測定に、また10 ml はリンパ球 subpopulation の測定に供した。

(3) リンパ球の分離：採取した10 ml のヘパリン加血に1 ml の carbonyl iron を加え、37°C で60分間 incubate し、十分に phagocytosis させた後、Ficoll Hypaque 比重遠心法 (3000 rpm : 25分) により monocyte を除去したリンパ球を分離した¹¹⁾。この方法による末梢血からのリンパ球回収率は86.0%であり、リンパ球純度99.9% (monocyte のリンパ球への混入率は0.1%以下) であった。

(4) リンパ球 subpopulation の測定：矢田ら¹²⁾の mixed rosette 法を用いて行った。前述の方法で得たリンパ球 5×10^5 個を0.1 ml の phosphate buffered saline (PBS) の下に抗ニワトリ赤血球・ウサギ IgG で coating したニワトリ赤血球 (EA : 1×10^8 個/ml PBS) を0.1 ml 加え、4°C で6時間 incubation した後、静かに上清を捨

て、非働化した胎児ウシ血清 fetal calf serum (FCS) 0.1 ml を加え、さらに FCS に1%濃度に浮遊させたヒツジ赤血球 (E : 5×10^8 個/ml FCS) 0.1 ml 加え混和後200 G、5分間遠心し、0°C over night に反応させスライドグラスにのせ、プリリアントで染色し、光顕的にロゼット形成性を観察した。この方法によるロゼット形成細胞はヒツジ赤血球とのロゼット形成細胞 (E-RFC)、ニワトリ赤血球とのロゼット形成細胞 (EA-RFC)、またヒツジ赤血球 (E) 及びニワトリ赤血球 (EA) と同時にロゼット形成するダブルロゼット形成細胞 (double-RFC, E+EA-RFC) の3種類であった。また、いずれともロゼット形成しない null cell も観察された。E-RFC はヒツジ赤血球3個以上と結合しているものを、EA-RFC はニワトリ赤血球2個以上と結合しているものを陽性とし、これらを250個以上数え、それぞれの百分率を求めた。以上の方法で検出された E-RFC はT細胞であり、IgG の Fc 部分に対するレセプターを保有しないもの、double-RFC はT細胞であり、かつ IgG の Fc 部分に対するレセプターを保有するもの (T γ cell) と評価した。またT細胞は E-RFC と double-RFC (T γ cell) の総和として求めた。EF-RFC は IgG の Fc 部分に対するレセプターを保有する non T cell fraction である。

(5) 補体価の測定：Mayer の方法を用いて測定した。
成績

血液透析中の白血球の動態：cuprophane 膜使用時の白血球の変化について図1に示した。好中球は透析開始直後から著明に減少し、HD 15分にはHD前値の26.0 $\pm$ 28.0%まで減少し、HD 60分には回復している。一方リンパ球は透析初期より減少傾向を示すが、最大値でも80.4 $\pm$ 19.6%までの減少であった。PCM 使用時の白血球の変化は図2に示した。好中球は cuprophane 膜使用時と同様、透析初期に著明に減少した。リンパ球は70%までの減少を示した。

リンパ球 subpopulation の動態：cuprophane 膜使用時の末梢血リンパ球 subpopulation の動態を図3に示した。すなわち、末梢血中での各々のリンパ球 subsets の比率が透析中どのように変動したかを透析前値に対する比率として求め示したものである。double-RFC は HD 15分に38.7 $\pm$ 13.6%にまた EA-RFC も同様に HD 15分には52.2 $\pm$ 18.0%に有意 ($p < 0.001$) に減少し、60分には回復している。これとは逆に E-RFC は HD 15分に118.4 $\pm$ 21.3%と増加し、また null cell も143.7 $\pm$ 72.9%と著明に増加し、60分以降次第に回復してきている。しかし、一方、E-RFC と double-RFC の和として算出されるT細胞のHD前値に対する比率はHD 15分102.2 $\pm$ 7.5%、HD 60分100.7 $\pm$ 7.8%、HD 120分99.0 $\pm$ 4.

図1 The changes of total complement activity and leukocyte counts in patients during hemodialysis using cuprophane membrane dialyzer.

図2 The changes of leukocyte counts in patients during hemodialysis using poly-carbonate membrane (PCM) dialyzer.

3%と推移し、HD 前値とほぼ同じ比率を示した。

次にこれら各 subsets の末梢血での実数が、HD 中にどのような変動を示すかを図4に示した。Double-RFC は実数でも同様に HD 15 分に $32.9 \pm 15.5\%$ と有意 ($p < 0.001$) に減少した。EA-RFC も HD 15 分には $42.8 \pm 19.6\%$ と著明に減少 ($p < 0.001$) し、両者共に HD 60 分には回復している。E-RFC はリンパ球実数が減少傾向にあったにもかかわらず、HD 15 分には $107.5 \pm 47.5\%$ と増加したが 60 分では $85.5 \pm 24.8\%$ 、120 分は $86.8 \pm 16.9\%$ と減少の傾向を示した。null cell は HD 15 分に

図3 The changes of the proportions of lymphocyte subpopulations in uremic patients during hemodialysis using cuprophane membrane dialyzer.

$2 \pm 60.2\%$ と増加し、以後減少している。T cell は HD 15 分には $84.5 \pm 30.3\%$ 、HD 60 分では $83.0 \pm 20.0\%$ 、HD 120 分では $90.4 \pm 13.2\%$ と推移した。

図5、6は今回 HD 初期に著明に減少を示した double-RFC、EA-RFC の subsets が個々の症例で末梢血中の比率がどのように推移したかを示したものである。Double-RFC は HD 15 分には全例が HD 前値の 60% 以下に著明に減少した。1 例は HD 15 分に 8.9% まで著明に減少し、HD 60 分では逆に 377.4% と強い rebound を示し、HD 120 分に正常化した。他の 1 例では、HD 15 分に 56.5%、HD 60 分に 26.1% と更に減少したが HD 120 分には 70% と回復してきた。EA-RFC は 9 例で HD 15 分に著明に減少している。しかし 1 例は HD 15 分に 84% まで軽度減少し、HD 60 分には 201.7% と強い rebound が起こり、120 分値は sampling したリンパ球数が少なかったため測定できなかったが、HD 終了時(300分)には HD 前値のレベルまで回復していた。いずれにしても double-RFC、EA-RFC は HD 中に程度の差はあるが、全例が HD 初期に減少し、HD 120 分には回復している。

図4 The changes of the absolute number of each lymphocyte subpopulation in uremic patients during hemodialysis using cuprophane membrane dialyzer.

図5 Individual changes of EARFC using cuprophane membrane dialyzer

PCM 使用時のリンパ球 subpopulation を図7に示した。2例とも cuprophane 膜使用時と同様の傾向を示したが、減少率はやや軽度であった。HD 中の補体価は図1, 8に示したが、cuprophane 膜使用時には HD 初期より、CH 50 の低下が起こっている。しかし、PCM 使用時には

図6 Individual changes of double-RFC using cuprophane membrane dialyzer.

図7 The changes of the proportions of lymphocyte subpopulations in uremic patients during hemodialysis using polycarbonate membrane (PCM) dialyzer.

CH 50 の有意の低下は認められなかった。

考察

今回、我々の検索で、血液透析の初期にリンパ球のある subsets (double-RFC 及び EA-RFC) が著明に減少することを観察した。

血液透析が白血球系に及ぼす影響については古くから多くの報告がある。Kaplow ら²⁾により血液透析の early phase に好中球が著明に減少することが初めて報告された。彼らは好中球の動員の場合は dialyzer ではなく、患者

図8 The changes of total complement activity (CH50) in patients during hemodialysis using polycarbonate membrane (PCM) dialyzer.

体内であるとするものの、その原因は患者血液が dialyzer を通過することにより惹起されるとしている。Craddock ら³⁾ は血液透析中に同様の白血球減少を観察し、その主体は好中球と単球であるとしている。さらに彼らは、ウサギを用いた実験で、dialyzer の cellophane membrane により、factor B、補体 C₃ が活性化され、いわゆる alternate pathway の活性化が起こり、その結果、好中球や単球が肺毛細血管に leukostasis を起こし、末梢血での好中球や単球の減少が起こることをつきとめ、ヒトでも同様のメカニズムで起こるだろうとしている。Nusbacher ら¹³⁾ は nylatron fibre でも同様の補体活性化と顆粒球の減少が起こるとしている。しかし Aljama ら¹⁴⁾ は cuprophane 膜の他に PAN (polyacrylonitrile) 膜、polycarbonate membrane (PCM) dialyzer を用いて実験を行い、cuprophane 膜では補体の活性化と同時に好中球の減少が起こるが、PAN 膜では補体の活性化は起こるものの、好中球の減少はみられず、また PCM では補体の活性化は起こらず、好中球の減少のみを認めるとして、好中球の減少には多くの原因があり、補体の活性化が主因でないとしている。我々の今回の実験でも cuprophane 膜では補体の活性化と同時に好中球の減少を認めたが、PCM では補体の活性化は起こらず、好中球の減少のみを認め、好中球減少には補体の活性化とは別の因子の存在の可能性が示唆された。さて血液透析中のリンパ球の動態についての報告はほとんどない。Kaplow, Craddock らはそれぞれ独自に透析中にリンパ球実数が 10~20% 減少するとし、中林ら¹⁵⁾ は透析初期にリンパ球は 30~50% の減少を認めたが、T 細胞、B 細胞の比率には変化は認められなかったとしている。今回の我々の観察でも、透析中 T 細胞の末梢血中での比率は HD 前 79.8±7.4%、HD 15 分 81.3±7.4%、HD 60 分 80.1±7.5%、HD 120 分 79.5±7.0% と推移し、T 細胞比率に変動は認められなかった。しかし、double-RFC (T γ 細胞) 及び EA-RFC (B 細胞 K 細胞を含む fraction) は透析初期に著明に減少し、これとは逆に E-RFC (T γ 細胞を除く T 細胞)、null cell は増加を示した。

今回減少を示した double-RFC (T γ cell) はヒトでは

Moretta ら⁷⁾ により機能的解析がなされ、poke weed mitogen (PWM) により誘導される B 細胞の polyclonal differentiation を suppress すること、また K cell activity を有することなどにより、マウスにおける^{5,6)} と同様に suppressor T cell 及び killer T cell の一部との相関が確認されている。また EA-RFC は IgG の Fc 部分に対するレセプターを保有する non T cell fraction であること、さらに Ficoll-Hypaque 比重遠心法でリンパ球層に contaminate すると考えられる monocyte を除去してあることにより、B 細胞及び K cell を含む subset と考えられる。従って今回の実験結果は suppressor T cell, killer T cell, B cell, K cell の減少と受けとられる。しかし、今回の測定法ではリンパ球のヒツジ赤血球に対するレセプターと IgG の Fc 部分に対するレセプターの検出であることを考えれば、血液が dialyzer を通過する時何らかのメカニズムで Fc レセプターが mask され、その結果 double-RFC の減少は E-RFC の増加に、EA-RFC の減少は null cell 分画の増加に変換された可能性も否定できない。しかしながら、リンパ球実数が透析中 20% 前後の減少を示していること、また、各サブセットの実数の変動 (図 4) でも T 細胞数が減少している事実は、レセプターが mask されたためだとするだけでは説明できない。Fc レセプターが mask された細胞が体内であるいは dialyzer 内で entrap されたか、あるいは mask とは無関係に Fc レセプターの関与した別のメカニズムの体内のどこかでまたは dialyzer 内で entrap された可能性が強い。また好中球の減少が補体の活性化によるものとする Craddock らと同様の機序で起こるとする可能性は cuprophane 膜では考えられても、PCM では補体の活性化は起こっていないにもかかわらず double-RFC, EA-RFC は減少していることから否定的である。また、かりに補体が活性化され、補体レセプターが関与したと仮定しても EA-RFC は B 細胞、K 細胞であり、C-receptor が存在するが、double-RFC は (suppressor T cell 及び一部 killer T cell であり) この subsets に含まれる killer T cell の一部に C-receptor が存在するだけで suppressor T cell には C-receptor は存在せず、この点からも、補体の関与は否定的である。いずれにしても、リンパ球 subsets の減少には IgG の Fc receptor を介したメカニズムの関与の可能性がより考えられる。今回減少したリンパ球は suppressor T cell や移植拒絶反応をつかさどる killer T cell, ADCC を担当する K cell, 抗体を産生する B cell を含む subsets である。この様に免疫応答系で重要な役割を担当する細胞が、血液透析を受ける度に患者末梢血中でダイナミックに変化することは、何を意味するかは不明であるが、生体にとって好ましい

こととは考えられない。従来 BUN, creatinine の clearance や ultrafiltration などの面から dialyzer への評価がなされていたが、最近各種 parameter を用いて dialyzer の生体適合性への研究がなされつつある。このような観点から、リンパ球 subpopulation の測定は有力な parameter の 1 つとなりうると考える。

結論

(1) 血液透析初期に末梢血中のリンパ球 subsets double-RFC (T γ cell, suppressor T, killer T), EA-RFC (B cell, K cell) の比率が著明に減少し、HD 60 分には回復する ($p < 0.001$)。

(2) 透析中、末梢血中の T cell percentage は変動しない。

(3) 透析中、リンパ球実数は 20% 前後の減少を認める。その主体は double-RFC 及び EA-RFC の減少と思われる。

(4) これら subsets の減少には IgG の Fc レセプターを介したメカニズムの関与の可能性が考えられる。

(5) 透析初期の好中球の減少には補体の活性化だけが原因とは考えられず、他のメカニズムの存在の可能性も考える必要がある。

本論文の要旨は第 8 回国際腎臓学会 (ATHENS 1981 年)、第 23 回日本腎臓学会総会 (東京、1980 年)、第 23、26 回人工透析研究会 (大阪 1979 年、横浜 1981 年) で発表した。なお今回使用した polycarbonate membrane (PCM) は米国より取り寄せ、plate 型に成型したものを使用した。

文献

- 1) 三村信英、原茂子、二瓶宏、南方保：系統疾患の透析、腎と透析 8 (1) : 79-89, 1980.
- 2) Kaplow, L.S., Goffinet, J.A. : Profound neutrophilopenia during the early phase of hemodialysis. JAMA., 203 : 133-135, 1968.
- 3) Craddock, P. R., Fehr, J., Dalmasse, A.P., Brigham, K.L., Jacob, H.S. : Hemodialysis leukopenia : Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. J. Clin. Invest., 59 : 879-883, 1977.
- 4) Toren, M., Goffinet, J.A., Kaplow, L.S. : Pulmonary bed sequestration of neutrophils during hemodialysis. Blood, 36 (3) : 337-340, 1970.
- 5) Yoshida, T.O., Anderson, B. : Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse

thymus lymphocyte. Scand. J. Immunol., 1 : 401-406, 1972.

- 6) Herzenberg, L.A., Okumura, K., Cantor, H., Sato, V.L., Shen, F.W., Boyse, E.A. : T cell regulation of antibody responses : Demonstration of allo type-specific helper T cells and their specific removal by suppressor T cell. J. Exp. Med., 144 : 330-344, 1976.
- 7) Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P. M. : Functional analysis of two human T-cell subpopulation : Help and Suppression of B-cell responses by T-cells bearing receptors for IgM or IgG. J. Exp. Med., 146 : 184-200, 1977.
- 8) 松元正, 宮沢修三, 上村伸一郎, 尾辻義人, 橋本修治 : 人工透析患者の Fc レセプター陽性 T リンパ球の動態について, Acta. Heam. Jap. 40 : 726, 1977.
- 9) 松元正, 宮沢修三, 上村伸一郎, 尾辻義人, 橋本修治, 松元実, 柚木一雄 : 慢性腎不全患者における IgG-Fc receptor 陽性 T リンパ球の動態. 医学のあゆみ 103 : 752-753, 1977.
- 10) 宮沢修三 : 透析患者の細胞性免疫能, 末梢血リンパ球 subpopulation の側面から, 人工透析研究会会誌 12 : 629-630, 1979.
- 11) 安保徹, 熊谷勝男 : Carbonyl iron と Ficoll Isopaque 法によるリンパ球の純分離, 医学のあゆみ 97 : 336-337, 1976.
- 12) 新保敏和, 矢田純一, 中川俊郎, 漆畑修, 松元正 : ヒト IgG-Fc receptor 陽性 T リンパ球の検出法と各種疾患における変動, 臨床免疫 9 (2) : 141-145, 1977.
- 13) Nusbacher, J., Rosenfeld, S.I., MacPhersan, J.L., Thiem, P.A., Leddy, J.P. : Nylon fiber leukapheresis : Associated complement changes and granulocytopenia. Blood 51 : 359-365, 1978.
- 14) Aljama, P., Bird, P.A., Ward, M.K., Fest, T.G., Walker, W., Tanboga, H., Sussman, M., Kerr, D. N.S. : Hemodialysis induced leukopenia and activation of complement : Effects of different membranes. EDTA 15 : 144-153, 1978.
- 15) 中林公正, 長沢俊彦, 高橋裕子, 木村常雄, 小林由美, 大高宏 : Cuprophane 膜コイルによる血液透析時の白血球数, その百分率, リンパ球 subpopulation の変動とその成因についての考察, 腎と透析 7 : 177-182, 1979.
- 16) 芝本隆, 松井則明, 小沢潔, 中村義弘, 秋葉隆, 吉出直樹, 中川成之輔, 根本毅志, 北岡建樹 : Dialyzer

の生体適合性評価の示標としての beta-thromboglobulin に関する検討, 人工臓器 10 (1): 98-101, 1981.

17) 志戸本宗徳, 尾辻省悟: 慢性腎不全における各種グ

アニジン誘導体の変動, 日腎誌 21: 33-49, 1979.

18) Akizawa, T., Nishiyama, H., Koshikawa, S.: Plasma β -thromboglobulin levels in chronic renal failure patients, ISAO 5: 54-58, 1981.

いま、拓かれた抗血小板療法

ミズクラゲのエイラ幼生 *Aurelia aurita*
直径が2.5mm位で、成体とはかなり違う形をしています。成体のメデューサ(自由遊泳型
水母・Medusa)では、傘の大きさが100mm前後になります。
「水の中の生命」 竹村嘉夫著より

血栓・塞栓の治療と
阻血症状の改善に

抗血小板剤

パナルジン®

Panaldine® 健保適用

一般名: 塩酸チクロピジン Ticlopidine hydrochloride

パナルジンは、抗血小板療法の治療薬として開発された、はじめての抗血小板剤です。

〔特性〕

- 血小板内c-AMP濃度を上昇させることにより
血小板凝集を持続的に抑制します
- 血液粘度を低下させ、微小循環を改善します。
- 優れた抗血栓効果が臨床で認められています。

※ 適応症・用法・用量および使用上の注意等は
製品に添付の説明書をご参照ください。

第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋區三丁目14番10号