慢性腎不全患者のインスリンレセプターに関する研究 —各種血液浄化法における変動—

入 谷 純 光

大阪市立大学泌尿器科

(昭和 61 年 2 月 8 日受付)

key word : glucose tolerance, CAPD, insulin receptor, lymphocyte, renal failure

〈要旨〉

慢性腎不全患者の耐糖能異常の原因を調べるために、リンパ球 insulin receptor assay を実施した。

その結果、HD、CAPD により耐糖能異常は改善するが、insulin の過分泌を伴っており、その改善は不完全なものであることが示された。非透析腎不全患者の insulin の特異的結合率は有意に低下していた。一方、HD および CAPD 患者の特異的結合率は正常対照群と有意差を認めなかった。しかし、比較的高い insulin 濃度において、健常人との差が拡大する傾向があり、HD および CAPD の insulin 過分泌を考慮に入れば、末梢の insulin 感受性は健常人よりも劣ると考えられる。

HD と CAPD の比較では、CAPD は透析液による糖負荷があるにもかかわらず、HD と同一レベルにあることより、CAPD の方が耐糖能の改善効果は優れていると考えられる。

Insulin receptor assay の材料として赤血球を用いた場合、慢性腎不全患者においては、insulin receptor 数が高値を示す場合があり、注意を要する。

Studies on insulin receptor in end stage renal disease —changes in glucose tolerance in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis—

Yoshiteru Iritani, M. D.

Department of Urology, Osaka City University Medical School

The lymphocyte insulin receptor assay was conducted to determine the causes of the abnormality in glucose tolerance in chronic renal failure patients. Hemodialysis (HD) and CAPD were found to improve glucose tolerance at the expense of hypersecretion of insulin. The insulin-specific binding ratio of lymphocytes in undialyzed (UD) patients was significantly low. On the other hand, the ratio in HD and CAPD patients was not different from that in the controls. However, at comparatively high insulin concentrations, the difference tended to be larger and their insulin activity seemed to be lower than in the controls, considering the hypersecretion of insulin. Although CAPD had a glucose load due to the glucose-containing dialysate, HD and CAPD were about the same, which indicates that CAPD caused greater improvement in glucose tolerance.

緒言

今日、各種血液浄化法の進歩に伴い、慢性腎不全患者の長期生存例が増加しつつある。それに伴って、慢性腎不全患者は単に腎機能が低下、消失するだけではなく、さまざまな代謝異常を伴うことが指摘されている。

糖代謝異常もその 1 つで、耐糖能をはじめとする、さ

まざまの異常が以前より指摘されている^{1,2)}。また、各種血液浄化法により耐糖能が改善するという報告も多い^{2~4)}。

Continuous ambulatory peritoneal dialysis (以下 CAPD) は 1976 年にアメリカの Moncrief & Popovich により始められた腹膜透析の一法である⁵⁾。そして、1978 年にカナダの Oreopoulos ら⁶⁾が 2l の透析液入りのプラスチックバッグを開発することにより世界的に普及した。すなわち、closed system を採用することで、腹膜

透析の大きな短所であった腹膜炎を激減させることが可能となったものである。

本法では透析液を腹腔内に貯留したまま自由に活動でき、循環系への負担が小さく、操作が簡単であり、さらに通院の必要がなく、自宅でも行い得ることなどの利点を有し、徐々に増加の傾向を示している⁷⁾。

その半面、浸透圧物質として、ブドウ糖(一般に1.5%または4.25%)を使用するため、体内への糖負荷が問題となってくる。したがって、CAPD患者の糖代謝は、腎不全による影響に加えて、透析液による糖負荷という新たな問題が加わり、より複雑な様相を呈することが予想される。そこで、まず血液透析患者およびCAPD患者の糖代謝の状態を把握するため、intravenous glucose tolerance test (以下 ivGTT) を実施した。

さて、慢性腎不全患者の糖代謝異常の原因はまだ十分には解明されていない。その原因の1つとして、末梢のinsulin感受性の低下が指摘されている^{8,9)}。Insulinの作用はinsulinがinsulin receptorに結合することで始まる。したがって、insulinの末梢感受性を調べるには、標的細胞のinsulin receptorの状態を調べるのが重要であり、標的細胞としての血球成分、とくに赤血球の使用が一般的となっている¹⁰⁾。そして、慢性腎不全患者においても、もっぱら赤血球を用いたinsulin receptor assayが行われており、他の細胞を用いては行われていない。なぜならば、リンパ球および単球を使用する場合、100~500 mlもの大量の採血を必要とすることになり、貧血状態にある腎不全患者に対しては実際的でないからである。しかし、一方では腎不全患者の赤血球は、強度の貧血という異常な状態で存在する無核細胞であり、蛋白合成機能も通常とは異なると考えられるので、insulin receptor assayに用いるのに適当か否か、疑問があるところである^{11,12)}。そこで、リンパ球および単球の使用を考慮する必要があるのではないかと考えた。

最近、すぐれた血球分離装置が開発され、少量の採血量でリンパ球が得られるようになったので、腎不全患者についてリンパ球採取を行い、そのinsulin receptorの質的、量的変化を検討した。さらに、赤血球のinsulin receptor assayも同時に実施し、リンパ球との比較を行ったので、その成績を報告する。

対象・治療法

1. 対象患者

対象は大阪市立大学付属病院および関連施設に通院中の慢性腎不全患者25名である。その内訳は非透析慢性腎不全患者(nondialysis patients 以下ND) 8名、血液透析患者(hemodialysis patients 以下HD) 10名、CAPD患者7名であった(Table 1)。なお、対象患者は以下の

条件を満たす者とした。

- 1) 腎不全の基礎疾患が慢性糸球体腎炎である。
- 2) 既往歴および家族歴に糖尿病がない。
- 3) 年齢は20歳から60歳の間にある。
- 4) 糖代謝に影響をおよぼす可能性があるとしていた薬剤、たとえばステロイドホルモン、 β ブロッカー等を、少なくとも2カ月間は投与されていない。
- 5) 過去1年以内に重症肝疾患、脾疾患に罹患していないこと。また、現在、重症感染症に罹患していない。
- 6) 肥満またははるい瘦のないこと。したがって、標準体重(身長-100)×0.9に対して、体重が80~115%である。
- 7) 検査当日より4カ月以内に輸血をうけていない。
- 8) 明らかな出血性疾患を認めない。

なお、ND群は透析導入直前のものを選んだ。その血清creatinine値は8.8 mg/dl以上であった。

2. 健常対照群

対照として、腎機能が正常で前記2)~8)の条件にあてはまるもの9例を選んだ。

3. 施行した血液浄化法

1) CAPD

腹膜カテーテルはテンコフのダブルカフタイプおよびゴアテックス・カテーテルを使用した。カテーテルは局所麻酔により、腹腔内に達し、直視下にダグラス窩に挿入した。透析液はDianeal 1.5および4.25であった。組成はDianeal 1.5が Na^+ 132 mEq/l, Ca^{++} 3.5 mEq/l, Mg^{++} 1.5 mEq/l, Cl^- 102 mEq/l, lactate 35 mEq/l, glucose 1.5 w/v %, pH 4.5~6.0, 総浸透圧 347 mOsm/lである。Dianeal 4.25はglucoseのみが4.25 w/v %と大きいだけで、他の組成は同じである。したがって、総浸透圧は486 mOsm/lである。すなわち、Dianeal 4.25は1.5と比較してより多量の除水が期待できる。

CAPDの基本的な方法は、2 lの液を1日に4回交換するものである。交換の時間は早朝の6時、11時、午後4時そして10時である。1回の交換に要する時間は約30分である。そして、患者個々の除水量にあわせて、Dianeal 1.5およびDianeal 4.25を1:3または2:2の割合で使用している。

2) HD

HDは中央供給装置としてNikkiso NAP-2およびNipro NAKS-300を使用した。Patient stationはNipro NCB-1, Toray TR-700, Nikkiso DBB-11であった。Dialyserはcuprophane膜のhollow fiber typeのものであった。膜面積は1.0~1.5 m²のものとした。灌流液は酢酸透析がKindaly solution 3, 重曹透析がKindaly solution AF-1Pであった。いずれもR-O処理水で35倍希

Nondialysis patients								
Patients No	Sex	Diagnosis	Age	Treatment months	S-urea nitrogen (mg/dl)	S-creatinine (mg/dl)	Body weight (kg)	Height (cm)
1	M	CGN	45		136.8	8.8	55.0	160
2	F	CGN	50		125.2	14.0	60.1	156
3	F	CGN	38		142.8	9.2	51.2	156
4	M	CGN	55		105.8	13.8	61.4	165
5	M	CGN	41		119.0	14.5	63.7	167
6	M	CGN	43		110.3	13.1	67.5	165
7	F	CGN	52		96.7	9.2	52.0	150
8	M	CGN	21		128.4	12.9	59.3	165
mean±S.D.			43±9.9		120.6±14.7	11.9±2.3	58.8±5.3	161±5.6
Hemodialysis patients								
1	F	CGN	36	61	39.1	5.4	40.1	153
2	M	CGN	37	36	84.8	16.4	65.3	166
3	F	CGN	41	93	54.1	8.0	43.7	149
4	M	CGN	51	10	47.7	9.4	63.8	167
5	M	CGN	40	12	98.1	16.7	59.3	165
6	F	CGN	34	28	46.1	9.5	48.5	153
7	M	CGN	36	11	104.1	8.3	65.0	170
8	F	CGN	59	15	57.3	8.5	50.2	147
9	M	CGN	43	33	43.3	5.0	49.3	155
10	M	CGN	22	21	61.2	9.7	59.5	165
mean±S.D.			40±9.4	32.0±25.2	63.6±22.3	9.7±3.8	54.5±8.8	159±8.0
CAPD patients								
1	M	CGN	46	18	60.6	9.6	67.5	163
2	M	CGN	53	14	64.7	12.9	68.0	162
3	F	CGN	39	10	51.5	9.9	53.0	159
4	F	CGN	35	19	64.8	12.9	52.5	151
5	F	CGN	34	6	52.2	7.6	46.5	162
6	F	CGN	57	25	50.5	7.3	63.0	161
7	F	CGN	41	11	40.6	8.6	55.0	153
mean±S.D.			44±8.2	14.7±5.9	55.0±8.2	9.8±2.1	57.9±7.7	159±4.4
Normal subjects (N=9)								
mean±S.D.			33±7.0		12.3±1.6	0.9±0.1	58.8±5.5	163±5.4

CGN : chronic glomerulonephritis

Table 1 Patient profile

Whole blood

Subject	RBC($\times 10^6/\text{mm}^3$)	WBC($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Ht. (%)	Lymphocyte($\times 10^3$)	Reticulocyte (%)
Normal (N = 9)	4.37±0.40	6.15±1.53	44.5±4.7	1.66±0.83	10.3±4.6
ND pt (N = 8)	2.34±0.51	7.52±2.88	20.6±4.5	2.26±1.09	12.5±4.5
HD pt (N = 10)	2.42±0.20	6.01±1.50	23.0±2.3	2.34±0.58	13.3±4.1
CAPD pt (N = 7)	2.88±0.31	5.60±1.30	26.0±1.6	2.33±0.97	19.3±3.5

Lymphocytophoresis

Subject	RBC($\times 10^5/\text{mm}^3$)	WBC($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Ht. (%)	Lymphocyte (%)
Normal (N = 9)	6.34±1.54	20.88± 5.65	5.4±1.0	90.2±1.7
ND pt (N = 8)	7.03±0.48	17.78± 9.54	6.2±2.8	88.3±2.3
HD pt (N = 10)	6.17±2.52	15.57±10.46	6.3±0.9	92.3±3.5
CAPD pt (N = 7)	6.06±2.11	10.38± 2.47	5.3±2.6	85.4±4.3

mean±SD

Table 2 Blood count of whole blood and samples of lymphocytophoresis

釈して使用した。

35 倍希釈後の灌流液組成は Kindaly solution 3 が Na^+ 132 mEq/l, K^+ 2.0 mEq/l, Ca^{++} 3.5 mEq/l, Mg^{++} 1.5 mEq/l, Cl^- 104 mEq/l, CH_3COO^- 35 mEq/l, glucose 200 mg/dl である。Kindaly solution AF-1P の組成は Na^+ 135 mEq/l, K^+ 2.5 mEq/l, Ca^{++} 3.5 mEq/l, Mg^{++} 1.5 mEq/l, Cl^- 106.5 mEq/l, CH_3COO^- 8 mEq/l, HCO_3^- 30 mEq/l であった。透析方法は 1 回 5 時間、週 3 回である。血流量は 120~180 ml/min, 灌流量は 500 ml/min, heparin は 1 回の透析につき、6,000~10,000 単位を使用している。

方法

1. ivGTT

Lundbeak¹³⁾ の方法を用いて ivGTT を施行した。12~15 時間絶食後、早朝 9 時に採血を行った。続いて 50% glucose 溶液を使用して、0.5 g/kg の glucose を 3 分以内で静注した。注射後 3 分、5 分、10 分、20 分、30 分、40 分、50 分、60 分および 90 分で採血を行った。それぞれのサンプルについて、血糖値と immunoreactive insulin (IRI) 値を測定した。

得られた血糖値をもとにして、Lundbeak¹³⁾ の方法にしたがって K-value を求めた。すなわち、血糖値が 1/2 になる時間 ($t_{1/2}$) より次の計算式で求められる。

$$\text{K-value} = \log 2 / t_{1/2} \times 100 \quad \log 2 = 0.693$$

2. Insulin の標識化

^{125}I にて insulin の標識化を行った。方法は Hunter & Greenwood の原法を Freychet らが改変したものに準じた^{14,15)}。酸化剤として chloramine T を用いて以下のごとく行った。

まず、 $\text{Na } ^{125}\text{I}$ 2 mCi (450~550 mCi/ml, New England Nuclear 社製 NEZ-033H) の入っている容器の中に insulin 溶液 10 μl を添加する。この insulin 溶液は single peak pork insulin (清水製薬製) を pH 7.4 の 0.2 M phosphate buffer にて溶解し 2 ng/ml としたものである。さらに、0.2 M phosphate buffer を 20 μl 注入する。そして、0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) で溶解して 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした chloramine T 溶液を 10 μl 加え、insulin と ^{125}I を結合させる。30~40 秒反応させた後、2.5% bovine serum albumin (Sigma 社製 fraction V, 以下 BSA) を含む 0.2 M phosphate buffer にて反応をストップさせる。これを A 液とする。

あらかじめ cellulose powder (Merck 社製, Art 2331) をパスツールピペットに 3.8 cm の高さに充填して、cellulose column を作っておく。そしてこれを 0.05M veronal buffer にて洗浄しておく。A 液をこの cellulose

column に添加し、0.05 M veronal buffer を約 1.5 ml ずつ 4 回添加する。このようにして、 ^{125}I に結合しなかった insulin を流出させる。

次に、12% BSA を含有する 0.2 M phosphate buffer を 1.5 ml ずつ 4 回添加し、 ^{125}I -insulin を溶出させた。得られた ^{125}I -insulin の少量をとり、15% TCA 溶液を加えて、結合 insulin と非結合 insulin の比率を求めた。99% 以上の ^{125}I が insulin と結合しているものだけを採用し、1% BSA を含有する Krebs Ringer phosphate buffer (Na 154 mM, KCl 154 mM, KH_2PO_4 154 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 154 mM, 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) にて、 ^{125}I -insulin の濃度が 20 ng/ml となるように希釈し、 -20°C で凍結保存した。

3. 赤血球の調整

12~15 時間絶食後、早朝時に heparin 加シリンジで約 10 ml 採血を行った。HD 患者は HD 開始直前に採血を実施した。その後、直ちに CS-3000 にて、後述するようにリンパ球採取を実施した。

採取した血液は血漿成分と血球成分とに遠心分離 (4°C , $750 \text{ g} \times 10 \text{ min}$) した。得られた血漿成分は各種検査項目の測定に供した。残りの血漿成分および buffy coat を吸引除去し、血球成分を生理的食塩水で約 2 倍に希釈した。得られた浮遊液を Ficoll-Hypaque solution (Lymphoprep®, 第一薬品製) の上に静かに重層し、400 g にて 15 分間遠心分離した。赤血球は最下層となるため、上層を吸引除去した。得られた赤血球を buffer G¹⁶⁾ (組成は hepes 50 mM, tris 50 mM, ethylene-diamine tetraacetic acid 2 mM, NaCl 50 mM, MgSO_4 10 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 10 mM, glucose 10 mM, 1% BSA, pH 8.0) にて 2 回洗浄した。その後、buffer G にて赤血球数が $2.5 \sim 3.5 \times 10^6/\text{mm}^3$ となるように希釈した。赤血球浮遊液の正確な赤血球数は Coulter counter (model DN, 日科機製) にて測定した。

4. 赤血球 insulin receptor assay

赤血球 insulin receptor assay は Gambhir ら¹⁶⁾ の方法に準じて行った。

非標識 insulin 溶液として、single peak pork insulin (清水製薬提供) を buffer G で溶解して、濃度が約 2, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 ng/ml になるように調整し、 -20°C で冷凍保存した。Insulin 濃度は Sephadex 固相法で測定した。

続いて、赤血球浮遊液 400 μl に ^{125}I -insulin (2 ng/ml) を 50 μl 、次いで各濃度の非標識 insulin 溶液を 50 μl 加え、pH 8.0 で 3.5 時間 incubate した。

Beckman microfuge tube B に 4°C の buffer G を 180 μl 入れ、その上に dibutyl phthalate 90 μl を重層させ

Subject	Quantity		Affinity	
	sites cell	% of normal	$\overline{K_d}(10^{-11})$	% of normal
Normal (N = 9)	48,000	100	3.30	100
ND patients (N = 10)	21,700	45	4.75	144
HD patients (N = 8)	31,300	72	2.05	62
CAPD patients (N = 7)	35,000	73	2.80	85

Table 3 Lymphocytes insulin receptors : quantity and affinity

Subject	Quantity		Affinity	
	sites cell	% of normal	$\overline{K_d}(10^{-11})$	% of normal
Normal (N = 9)	381	100	0.43	100
ND patients (N = 10)	254	67	0.65	151
HD patients (N = 8)	331	87	0.38	88
CAPD patients (N = 7)	472	124	0.21	49

Table 4 Erythrocytes insulin receptors : quantity and affinity

た. この tube に 3.5 時間 incubate した試料を 150 μ l 重層させ, 3 分間 15,000 g にて遠心分離した. その結果 tube は上から buffer G (赤血球に結合しない 125 I-insulin を含む) dibutyl phthalate, 赤血球の 3 層となる. この dibutyl phthalate の部分で tube を切断し, 赤血球部分の radioactivity を測定した. 各濃度の非標識 insulin につき 2 本ずつ実施して, その radioactivity の平均値を採用した. その値を X とする. なお, radioactivity は島津製作所製の well type γ -counter AUTO AL-100 で 10 分間測定した. また, 赤血球に対する 125 I-insulin の非特異結合量を測定するため, 2 mg/ml の非標識 insulin 溶液を調整し同様の操作にて radioactivity を測定した (その値を Y とする). また, 125 I-insulin の total count として, incubate の溶液を 150 μ l 採取して radioactivity を測定した (その値を T とする).

5. リンパ球の調整

まず Fenwall 社の血球分離装置, CS-3000 にて lymphocytophoresis を実施した. リンパ球を採取するには, 回転数を 1,400 rpm とする. 最も効率的であるとされている血流量 50~60 ml/min にて, 全血処理量が 3,000 ml となるまで血液を処理した. 時間にして 1.0~1.5 時間である. 検体は 200 ml の bag に得られる. その検体の Ht 値, 赤血球数, 白血球数および白血球の分画を

測定した. 検体のうち約 100 ml のみを試験管にとり, 残りは患者に返血した. 以後の操作は Gavin ら¹⁷⁾の方法に準じて行った.

まず, 得られたリンパ球を 4°C, 750 g で 10 分間遠心分離した. buffy coat を集めて生理的食塩水にて約 2 倍に希釈する. 次に, Lymphoprep 約 1.5 ml の上に静かに重層し, その後 400 g で 15 分間遠沈した. その結果, 上から生食, リンパ球層, 赤血球層となった. リンパ球層のみをパスツールピペットでとりだし, buffer L¹⁸⁾(組成: HEPES 100 mM, NaCl 120 mM, MgSO₄ 1.2 mM, Na acetate 15 mM, glucose 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.8) にて, 2 回洗浄し, 最後に $6.5\sim7.5\times10^6$ /ml となるように buffer L にて希釈した. このリンパ球数も Coulter counter にて測定した. 単球の比率は Yam ら¹⁹⁾の方法にしたがい, esterase 染色にて測定した. なお, trypan blue にて染色後, リンパ球の viability が 97% 以上あることを確認した (Fig. 1).

6. リンパ球 insulin receptor assay

リンパ球 insulin receptor assay も赤血球と同様に行った. すなわち, 非標識 insulin および 125 I-insulin は赤血球の場合と同じものを使用する.

リンパ球浮遊液 400 μ l に 2 ng/ml の 125 I-insulin 50 μ l および各濃度の非標識 insulin 溶液 50 μ l を混入し, pH 7.4, 15°C で 1.5 時間 incubate した. 次に microfuge tube に 4°C の buffer L 180 μ l, dibutyl phthalate 90 μ l, 1.5 時間 incubate 後の試料 180 μ l を重層させて, Beckman Microfuge B を用いて 3 分間の遠沈を行う. 赤血球と同様に buffer L, dibutyl phthalate, リンパ球の 3 層にわかれるので, dibutyl phthalate の部分で tube を離断しリンパ球成分の radioactivity を測定した. この場合も赤血球と同様に 2 本の平均値を求めた (この値を X とする). また, total count として incubate 後の材料を 180 μ l 採取して radioactivity を求めた (この値を T とする, Fig. 1).

7. Data の解析

1) 赤血球, リンパ球に対する 125 I-insulin の特異的結合率

各 insulin 濃度における 125 I-insulin の特異的結合率 (Bn) は次の計算式で求められる.

赤血球:

$$Bn = \frac{X-Y}{T} \times 100 \times \frac{3.0 \times 10^6}{\text{赤血球数/mm}^3}$$

リンパ球:

$$Bn = \frac{X-Y}{T} \times 100 \times \frac{7.0 \times 10^6}{\text{リンパ球数/ml}}$$

2) Scatchard analysis

Fig. 1 Preparation of lymphocytes and ¹²⁵I-insulin binding studies

赤血球、リンパ球1個あたりの insulin receptor 数を求めるために、Scatchard analysis を試みた²⁰⁾。

横軸に血球に対して特異的に結合した insulin の量 (pg), 縦軸に BOUND/FREE 値, すなわち特異的結合率 (Bn) を非結合率 (100-Bn) で除した値をとる。各 insulin 濃度におけるこの値をプロットし, 得られた曲線と横軸との交点 (Ro) により, 血球1個あたりの insulin receptor 数を算出する。

$$\text{receptor} = \frac{\text{結合 insulin (mole)}/l}{\text{細胞数}/l} \times 6.03 \times 10^{23}$$

6.03×10^{23} : avogadro 数

3) Average affinity

Insulin と receptor の親和性を DeMeyts & Roth²¹⁾ の average affinity という概念で検討した。各 insulin 濃度で血球と結合した insulin の量を B とする。Scatchard analysis で求めた Ro と B/F 値を用いて次の計算式で得られる。

$$\text{average affinity} = \frac{\text{BOUND/FREE}}{\text{Ro} - \text{B}} (10^6 \text{M}^{-1})$$

M: mole

Fig. 2 Effect of pH on ¹²⁵I-insulin binding to human lymphocytes

8. 赤血球, リンパ球 insulin receptor assay 施行時に測定した各検査項目

1) 空腹時 immunoreactive insulin (FIRI), C-peptide, growth hormone (GH), parathyroid hormone (PTH)

FIRI は Sephadex 固相法で測定した。他のものはそれぞれ二抗体法で測定した。

2) serum urea nitrogen (SUN) および serum creatinine (SCr)

SUN は urease-indophenol 法で SCr は Follin-Wu 法でそれぞれ測定した。

なお, 測定した値は平均値 (mean) および標準偏差 (SD) で表わした。各群間の比較は Student's test を用いて危険率 (P) 0.05 以下を有意とした。

9. リンパ球 insulin receptor assay の予備実験とその成績

1) リンパ球 insulin receptor assay における至適 pH の検討

リンパ球 insulin receptor assay 時の至適 pH を検討するために buffer L に 2N HCl と 2N NaOH を添加し pH 6.5, 7.0, 7.4, 7.8, 8.3, 9.0 の 6 種類の溶液を作製した。各溶液を用いて insulin receptor assay を施行した。その結果は Fig. 2 に示すように, ¹²⁵I-insulin のリンパ球に対する特異的結合率は pH 7.4 から 8.3 の間で安定しており, 特に pH 7.8 で最高の結合率を示した。

2) リンパ球 insulin receptor assay 時の至適温度と時間の関係

リンパ球 insulin receptor assay における至適温度と至適 incubate 時間について検討するために, リンパ球と ¹²⁵I-insulin の incubate の温度を 4°C, 15°C, 23°C とし て時間経過を見た。その結果 Fig. 3 に示すように 23°C

Fig. 3 Effect of incubation temperature and duration on ^{125}I -insulin binding to human lymphocytes

Fig. 4 Fasting plasma glucose level and insulin concentration in 9 normal subjects, 8 ND, 10 HD and 7 CAPD patients. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Glucose: All groups were not significantly different from each other. IRI: HD and CAPD patients were significantly higher than normal subjects

では1時間で平衡に達したが4%と低い結合率であった。一方、4°Cでは最も高い結合率を示したが、3.5時間でも平衡に達しなかった。さて、15°Cにおいては1.5時間で平衡に達し、しかも4°Cの場合とほとんど差を認めなかった。

以上を考慮して、リンパ球 insulin receptor assay の条件は pH 7.8, 15°C, 1.5時間を採用した。なお、赤血球の条件については江崎²²⁾が詳細な検討をしており、それによって pH 8.0, 15°C, 3.5時間を採用した。

結果

1. 各種検査項目の成績

Table 1 に患者の data を表わした。各群の患者間に年齢、性差、体重/標準体重比に有意の差は認めなかった。

Fig. 5 Comparison of parathyroid hormone (PTH) and growth hormone (GH) in 9 normal subjects, 8 ND, 10 HD and 7 CAPD patients. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. PTH: The three renal failure groups were significantly higher than normal individuals. GH: All groups were statically not significantly different from each other

SUN は HD 群はND 群より有意 ($p < 0.001$) の低値を示した。また、CAPD 群も有意 ($p < 0.001$) の低値を示した。しかし、HD 群と CAPD 群の間には有意差は認めなかった。SCr は各患者群間に有意差を認めなかった。また、空腹時血糖も各群間に有意差を認めなかった (Fig. 4)。FIRI は正常対照群と比較して、ND 群は有意差を認めなかった。HD 群と CAPD 群は有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。しかし、各患者群間には有意差を認めなかった (Fig. 4)。PTH 値は各患者群ともに正常対照群より有意 (ND 群 $p < 0.01$, HD 群 $p < 0.02$, CAPD 群 $p < 0.01$) の高値を示した (Fig. 5)。GH 値は各群に有意差を認めなかった (Fig. 5)。C-peptide 値は各腎不全群において正常対照群より有意 (ND 群 $p < 0.01$, HD 群 $p < 0.001$, CAPD 群 $p < 0.001$) の高値を示した。しかし、各患者群間に有意差を認めなかった (Fig. 6)。

2. ivGTT の成績

ivGTT 施行時の glucose の消退曲線を Fig. 7 に示す。ND 群が最も消退が遅れるのがわかった。次いで CAPD 群であり、HD 群と健常人は前2者よりも消退が速かった。Disappearance constant (K-value) については Fig. 8 に示すように、ND 群は他の3群より有意 (正常対照群 $p < 0.02$, HD 群 $p < 0.02$, CAPD 群 $p < 0.05$) の低値を示した。また、正常対照群、HD 群および CAPD 群の間に有意差を認めなかった。ivGTT 時の IRI の response を Fig. 9 に示す。正常対照群と比べて腎不全群は3群とも IRI の過分泌傾向を認める。

3. リンパ球、赤血球 insulin receptor assay の成績

Fig. 6 Comparison of C-peptide in 9 normal subjects, 8 ND, 10 HD and 7 CAPD patients. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation

Fig. 7 Glucose disappearance in ivGTT (0.5 g/kg) in 6 normal subjects, 6 ND, 6 HD and 5 CAPD patients

1) 非標識 insulin 濃度

非標識 insulin の希釈系列は次のようになった。すなわち、2.1 ng/ml, 10.5 ng/ml, 50.3 ng/ml, 101 ng/ml, 209 ng/ml, 499 ng/ml, 998 ng/ml である。

2) リンパ球 insulin receptor assay の成績

(1) シンパ球の sample の血球数について

lymphocytapheresis で得られた材料の血球数は Table 2 のようになった。赤血球数 26~90 万/mm³, Ht 2.5~10%, 白血球数 5,800~36,000/mm³, リンパ球の比率は 80~93% の範囲であった。なお、いずれの検体においても、単球が 5~10% 程度含まれていた。その後の調整過程を経た後の比率はリンパ球が 85~88%, 単球 12~13%, 顆粒球は 0.1~0.2% 程度で各群間に有意差は見られなかった。

(2) ¹²⁵I-insulin の特異的結合率

既述の計算式を用いてリンパ球に対する ¹²⁵I-insulin

Fig. 8 Comparison of disappearance constant (K value) in 6 normal subjects, 6 ND, 6 HD and 5 CAPD patients

Fig. 9 Immunoreactive insulin (IRI) response in ivGTT (0.5 g/kg) in 6 normal subjects, 6 ND, 6 HD and 5 CAPD patients. ND, HD and CAPD patients showed hypersecretion of immunoreactive insulin

の特異的結合率を求めた。縦軸に ¹²⁵I-insulin に対する特異的結合率をとり、横軸に insulin 濃度をとり、各 insulin 濃度における結合率をプロットした (Fig. 10)。

正常対照群との比較では ND 群はすべての insulin 濃度において有意の低値を示した。HD 群は 0.2 ng/ml においてのみ正常対照群より高値を示し、他の濃度では若干低値を示した。しかし、各 insulin 濃度において有意の差は認められない。CAPD 群はすべての濃度で正常対照群より低い結合率を示した。しかし、いずれの濃度にも有意差はない。各患者群での比較では、ND 群はす

Fig. 10 ^{125}I -insulin binding to human lymphocytes from normal subjects, ND, HD and CAPD patients

Fig. 13 ^{125}I -insulin binding to human erythrocytes from normal subjects, ND, HD and CAPD patients

Fig. 11 Scatchard analysis of ^{125}I -insulin binding to human lymphocytes from normal subjects, ND, HD and CAPD patients

Fig. 14 Scatchard analysis of ^{125}I -insulin binding to human erythrocytes from normal subjects, ND, HD and CAPD patients

Fig. 12 Average affinity profile of ^{125}I -insulin binding to human lymphocytes from normal subjects, ND, HD and CAPD patients

Fig. 15 Average affinity profile of ^{125}I -insulin binding to human erythrocytes from normal subjects, ND, HD and CAPD patients

すべての insulin 濃度で HD 群, CAPD 群より有意の低値を示した。また HD 群と CAPD 群は 0.2 ng/ml の insulin 濃度を除いてほぼ同一の曲線を描き、いずれの濃度にも有意差は見られなかった。したがって、正常対照群, HD 群, CAPD 群は同じ傾向を示し、ND 群のみ低い結合を示した。

(3) Scatchard analysis

各群のリンパ球に対する特異的結合率を基に Scatchard analysis を実施した。Fig. 11 に Scatchard analysis の結果を示す。ND 群は他の 3 群と比較して最も低い値を示した。HD 群と CAPD 群はほぼ同一の曲線を描いている。そして、正常対照群は最も高い値を呈している。この Scatchard plot を基にして各群のリンパ球 1 個あたりの insulin receptor 数を計算した。その結果、リンパ球の insulin receptor 数は正常対照群が 48,000 sites/cell, ND 群が 21,700 sites/cell, HD 群が 34,300 sites/cell, CAPD 群が 35,000 sites/cell となった。

(4) Average affinity

既述したように、DeMeys & Roth の方法にしたがい各群の average affinity を算出した。すなわち、縦軸に average affinity ($10^8 M^{-1}$)、横軸に insulin receptor の占有率 (%) をとり average affinity profile とした (Fig. 12)。その結果、average affinity の高いものから順に ND 群, 正常対照群, CAPD 群, HD 群となった。各群での最も低い占有率での average affinity を $\overline{K_e}$ とすると $\overline{K_e}$ は正常対照群が 3.30, ND 群が 4.75, HD 群が 2.05 として CAPD 群が 2.85 であった。

3) 赤血球 insulin receptor assay の成績

(1) 赤血球の sample における血球数

赤血球の sample すなわち全血における血球数は Table 2 のようになった。赤血球数は ND 群が最も低く、HD 群, CAPD 群の順となった。なお、reticulocyte が成熟赤血球より高い結合を示すという報告があるが²³⁾、今回の実験においては CAPD 群のみが他の 3 群より有意の高値を示している。したがって、CAPD 群に対する評価は reticulocyte の影響を考慮する必要がある。

(2) ^{125}I -insulin の特異的結合率

赤血球に対する ^{125}I -insulin の特異的結合率もリンパ球と同様に算出した。その結果を Fig. 13 に示す。各患者群と正常対照群との比較は以下ようになった。すなわち、ND 群は正常対照群と比較してすべての insulin 濃度において有意の低値を示した。HD 群は正常対照群とほぼ同じ曲線を描くが全体に低い結合率を呈している。しかし、統計的に有意差を認めるのは 50.2 ng/ml の濃度においてのみであった。CAPD 群は 0.2~10.2 ng/ml の

濃度で正常対照群より低値を示し、25.2 ng/ml 以上の insulin 濃度において正常対照群よりも高い結合率を示す傾向にある。

各患者群間の比較は以下になっている。ND 群と HD 群, CAPD 群との比較では、ND 群は 0.2 ng/ml の濃度で CAPD 群と有意差を認めない他は、すべての insulin 濃度で有意の低値を示した。また、HD 群と CAPD 群との比較では、10.2 ng/ml 以下の insulin 濃度においては HD 群が高い結合率を示し、25.2 ng/ml 以上では逆に CAPD 群が高くなっている。統計的には 0.2 ng/ml, 1.2 ng/ml で HD 群が、50.2 ng/ml で CAPD 群が有意の高値を示していた。

(3) Scatchard analysis

各群の赤血球における Scatchard plot は Fig. 14 のようになった。ND 群は他の 3 群と比較して低値を示す。HD 群は正常対照群とほぼ同じカーブを描くが、全体に低値を示している。CAPD 群では 320 pg までは正常対照群, HD 群より低い値を示すが、それ以上の insulin 濃度では正常対照群よりも高い値を示した。この Scatchard plot をもとに得られた赤血球 1 個あたりの receptor 数は次のようになった。すなわち、正常対照群が 381 sites/cell, ND 群が 254 sites/cell, HD 群が 331 sites/cell, そして CAPD 群で 472 sites/cell となった。

(4) Average affinity

リンパ球と同様にして average affinity profile を作製した。その結果、average affinity の高いものから順に ND 群, 正常対照群, HD 群, そして CAPD 群となった (Fig. 15)。各群での最も低い占有率における average affinity, $\overline{K_e}$ は正常対照群が 0.43, ND 群が 0.65, HD 群 0.38, CAPD 群 0.21 であった。

4) 各患者群の insulin receptor 数と親和性の変化

Table 3, 4 に各群のリンパ球, 赤血球の insulin receptor 数と親和性を示した。また、正常対照群の receptor 数と親和性を 100 とした時の各腎不全群の比率を表わした。

リンパ球においては、receptor 数は ND 群で 55% の減少を示した。HD 群, CAPD 群で各々 28%, 27% の減少を認めた。親和性については ND 群で 44% の亢進を認めたが、HD 群, CAPD 群ではそれぞれ 38%, 15% の低下が見られた。

赤血球の成績では、receptor 数は ND 群で 33%, HD 群で 13% の低下を認めたが、CAPD 群では 22% の上昇を見た。親和性は ND 群で 55% の上昇を示すが、HD 群, CAPD 群では各々 12% および 51% の低下を見た。

考察

慢性腎不全患者の糖代謝異常、特に末梢 insulin 感受

性を探るために、リンパ球 insulin receptor assay を行った。その成績について、従来の報告と対比しながら若干の考察を加える。

1. 慢性腎不全の耐糖能

慢性腎不全患者が耐糖能異常を伴うことについては、多くの報告が見られる^{1,2)}。そして、各種血液浄化法により耐糖能異常が改善されるという報告も多い^{2~4)}。しかし、血液浄化法のうち CAPD はその歴史も新しく、糖代謝に関する報告も少ない²⁴⁾。そこで、ivGTT を実施した。まず、空腹時血糖は各腎不全患者群で正常範囲であった (Fig. 4)。ところが、CAPD 群では透析液による糖負荷が加わるので、空腹時といっても少し条件が異なる。

ivGTT における K-value の正常値を金田らの説²⁵⁾にしたがい 1.5 とした場合、ND 群の K-value は 1.19 ± 0.19 と低く耐糖能の低下を認める。それに対して、HD 群および CAPD 群においては耐糖能は正常値まで改善を示している (Fig. 8)。このことは従来の報告と一致し、CAPD においても透析液による糖負荷があるものの、耐糖能は改善することを示す。しかし、CAPD は正常対照群、HD 群と比べて有意差はないものの低値を示す。これは CAPD 群では透析液による糖負荷があるため、糖代謝が accelerate されていることが一因と考えられる。

さらに、血糖値と同時に IRI も測定した (Fig. 4, 9)。HD 群、CAPD 群ともに FIRI の分泌の亢進を認め、しかも ivGTT 時の IRI も高値を示す。すなわち、両群においては耐糖能の改善に insulin の過分泌を伴っていることを示している。これは従来の報告と同一の傾向である^{1,4)}。したがって、血液浄化法による耐糖能改善には insulin の過分泌を伴っており、改善は不十分であると考えられる。なお、C-peptide に関しては、腎不全群で高値を示し、insulin の分泌亢進を間接的に表わす。しかし、C-peptide は腎において代謝されるので、腎不全患者では体内に蓄積する傾向を示すので注意を要する。

2. リンパ球 insulin receptor assay の意義

以上のような耐糖能異常の原因は十分には解明されていない。Westervelt²⁶⁾ は腎不全患者に insulin を注入した成績より、外因性 insulin に対する感受性の低下を報告している。さらに、内因性 insulin に対して、組織の感受性の低下が認められるという報告も見られる^{8,27)}。すなわち、末梢での insulin 作用の低下が耐糖能障害の一因となっていると考えてよい。

Insulin の作用は insulin が標的細胞の insulin receptor に結合することから始まる。したがって、末梢 insulin 作用を見るためには、insulin receptor について検討することが必要となってくる。Insulin receptor assay に用いる材料としては、従来より、肝細胞や脂肪細胞を用

いるのが最適であるとされている。しかし、これらの細胞を採取するのは臨床上困難な点が多い。そこで、採血により採取が可能で、しかも単離の容易な血球成分が材料として用いられてきた。以上の点を考慮して、insulin receptor assay の材料として、従来より末梢循環単核球（主にリンパ球）が使用されてきた。しかし、リンパ球を材料としようとする 100~500 ml の採血が必要である。腎不全患者には貧血の傾向が強く 100 ml の採血は事実上困難である。

一方、Gambhir ら¹⁰⁾により報告された赤血球 insulin receptor assay は 10 ml 程度の採血量ですみ、しかも標的細胞の insulin receptor と赤血球の insulin receptor の性質はよく相関するとしている。そこで、慢性腎不全患者においては、もっぱら赤血球を使用して insulin receptor assay が行われてきた。しかし、450~500 万/mm³ 前後の値を示す正常者の赤血球と、200~300 万/mm³ と貧血状態にある慢性腎不全患者の赤血球を単純に比較して評価を下していかどうか疑問がある。また、赤血球は無核であり autoregulation の機能を持たない細胞である。したがって、どうしても有核細胞を用いて insulin receptor assay を行う必要がある。

今回の研究では、CS-3000 を使用してリンパ球採取を実施し、採血量という問題を克服した。

3. リンパ球 insulin receptor assay の成績の評価

1) CS-3000 を用いることについての問題点

今回の研究に使用した血球分離装置 CS-3000 については、遠心分離を基本原理としており、極めて血球の障害が少ないのが特色である。しかも、静脈から静脈への連続採血であり、被検者への影響が非常に少なくてすむ。事実、今回の実験で得られた検体はいずれも 97% 以上の viability を示していた。

また、極めて選択的にリンパ球採取ができるのも大きな特色である。すなわち、CS-3000 で処理された段階ですでに 80% 以上がリンパ球で、顆粒球はわずか 5% 程度である。さらに、最終段階まで処理されたサンプルにおいては、顆粒球は 0.1~0.2% と非常に低い比率を示していた。このことは従来の方法によるリンパ球の検体が 1.0% 程度の顆粒球を含んでいるのと比べて遜色のない値である。

さらに、前述したように binding study の至適条件は pH 7.8, 15°C, 1.5 時間となった。この成績は従来の報告とよく一致し、CS-3000 により採取されたリンパ球が従来の方法で処理されたリンパ球と同じ性質を有していることがわかる²⁸⁾。

2) リンパ球数について

Table 2 に示したように、各群のリンパ球数には有意

差が見られない。さらに、単核球における insulin の特異的結合はリンパ球にではなく、単球に対する結合の比率が高いとする報告が見られる²⁹⁾。それに関しても、今回の成績では単球の比率に4群間で有意差が認められない。したがって、血球数の相違に伴う影響は無視し得る。

3) Insulin の特異的結合率について

ND 群のリンパ球に対する ¹²⁵I-insulin の結合率はすべての insulin 濃度において、他の3群より有意の低下を示した。HD 群および CAPD 群は正常対照群と有意差を認めず、insulin の特異的結合率は正常値近くまで改善していることを示している。しかし、比較的高い insulin 濃度において、低い結合率を示す傾向にある。

Fig. 4 と Fig. 10 を対照しながら、各群の空腹時 insulin 濃度における結合率をみると次のようになる。

まず、ND 群では全 insulin 濃度で有意に低値を示すので、insulin 結合能の低下があるとみてよい。HD 群では、FIRI は 20~25 ng/ml であり、この insulin 濃度域では正常対照群と比べて有意差はないものの、より低濃度の部分と比較して正常対照群との差が大きい傾向にある。CAPD 群では FIRI は 25 ng/ml であり、この insulin 濃度範囲においてはかなり正常対照群より低い結合率である。すなわち、HD 群、CAPD 群では 5 ng/ml より低い濃度では健常人との差は小さい（HD 群では健常人を上まわる部分もある）が insulin 濃度が高くなると健常人との差が大きくなる。

In vitro での成績を単純に *in vivo* の状態にあてはめるわけにはいかない。しかし、insulin 濃度の高い範囲で正常対照群との差が大きいということは insulin の過分泌がマイナスの要因となっていることを示す。また、糖負荷により insulin 分泌量が増加すれば正常対照群との差が大きい範囲に入るので、耐糖能の改善は不完全である。

次に、receptor の性状を数の面と親和性にわけて検討を加えてみる。

4) Insulin receptor 数の変化

Scatchard analysis により得られた各群の receptor 数は Table 3 に示すとおりである。正常対照群との比較では、ND 群が 55% の減少を示している。また HD 群、CAPD 群がそれぞれ 29%、27% の低下を認める。したがって、慢性腎不全患者の耐糖能異常の原因の1つとして insulin receptor 数の減少が関与することがわかった。さらに、HD、CAPD による耐糖能改善には減少した insulin receptor 数の回復が関係することが示された。

さて、この insulin receptor 数の変化の原因については、まずいわゆる「down regulation」ということを考える必要がある。すなわち、insulin 濃度と receptor 数は

逆相関するとされている^{30,31)}。本研究においても、HD 群と CAPD 群の FIRI は正常対照群より有意の高値を示し、ND 群も有意差は認めないものの高い傾向にある。しかし、down regulation のみではなぜ ND 群のみが有意に receptor 数の減少を示すのか説明しきれない。すなわち、down regulation の影響だけなら、HD、CAPD 群が ND 群より低い receptor 数を示すはずである。Gambhir らの報告では、ND 群と正常対照群との間に IRI の差を認めないが、ND 群で insulin receptor 数の低下が見られる³²⁾。したがって、一部 down regulation による影響はあるにせよ、別の原因を考慮しておく必要がある。Soman ら³³⁾は 90% nephrectomy し4週間経過したラットの腎不全モデルで、IRI の高値と insulin receptor 数の低下を示した。そして、insulin receptor 数の減少は溶質の蓄積による可能性を指摘している。このことは HD、CAPD で insulin receptor 数が増加するの、溶質除去による体内環境の改善が関与することを示唆する。

5) Insulin receptor の質的变化

Insulin receptor の減少している疾患においては親和性が亢進しており、その変化は可逆的なものとされている^{31,34)}。本研究の成績でも、ND 群は insulin receptor 数は減少しているが、親和性は亢進している。HD 群、CAPD 群では receptor 数は改善しているが、親和性の低下を認める。したがって、ND 群の耐糖能異常の原因としては、親和性よりも receptor 数の関与が大きいことがわかる。むしろ親和性は代償性に亢進しているとみるべきである。

HD、CAPD 群で親和性の低下を認めるので、耐糖能改善が不完全である原因の1つとして親和性の低下がある程度関与している可能性がある。しかし、receptor 占有率が大きくなると、各群の親和性の差は小さくなる。つまり、insulin 分泌の亢進を考慮に入れば、親和性が与える影響は小さいとみてよい。

さて、この親和性の変動の原因についてであるが、親和性を亢進させる因子としては、GH 値の上昇や acidosis がある。今回の実験では GH 値は正常対照群と患者群で有意差はなかった。しかし、慢性腎不全患者では acidosis は必然的に存在する。したがって、慢性腎不全患者の親和性の変化には receptor 数の影響に加えて、酸塩基平衡異常の影響があると考えられる。

6) 治療法の差に関する検討

HD と CAPD の最も大きな相違点は溶質除去効率の違いである。HD は低分子量領域の物質の除去に優れている。それに対して、CAPD は腹膜透析の性質をそのまま受けつぎ、中分子量領域の物質の除去にも優れている。

そこで、HD 群と CAPD 群の糖代謝を比較することにより、耐糖能異常の原因が低分子領域に存在するのか、中分子領域にあるのかをある程度推定できる。

今回の実験では、HD 群、CAPD 群は全く同様の成績を示し、耐糖能の改善状態には差がない。しかし、CAPD では糖負荷があるので、それを考慮に入れば CAPD の方がより改善していると見られる。すなわち、中分子領域の方に、耐糖能異常をきたす物質が存在する可能性がある。江崎²²⁾も、HD と血液濾過法（以下、HF）の比較において HF が HD より耐糖能改善が良好で、その一因として中分子領域の除去能が HF において優れていることを指摘している。また、insulin 拮抗物質とされる PTH³⁶⁾ に関して、今回の成績では各腎不全群間に有意差は見られないが、CAPD において PTH が低下するという報告もあり³⁷⁾、CAPD の溶質除去特性が耐糖能改善に関係していることを示唆する。しかし、慢性腎不全患者においては、腎よりのリンの排出障害が存在し、高 P 血症をきたす。それによっても、二次性副甲状腺機能亢進症が誘発され得る。今回の対象では、血清 Ca 値は CAPD 群>正常対照群>ND 群>HD 群の順であった。また、血清 P 値は ND 群>HD 群>CAPD 群>正常対照群の順となった。すなわち、CAPD では血清 P の値は低く、Ca 値は高値を示し、PTH の分泌が HD より少ないと考えられる。したがって、CAPD においては溶質除去特性に加えて、血清 Ca、P の値の正常化により PTH 値が低く抑えられ、末梢 insulin 感受性が改善すると考えられる。

さて、透析液の糖負荷については、Oren ら³⁵⁾は浸透圧物質としてアミノ酸を用いた透析液で、CAPD を 4 週間施行した結果を報告しているが、glucose および insulin については、糖を用いたものと差を認めておらず、透析液による糖負荷の影響については結論は出せない。

HD と CAPD のもう 1 つの相違点は、CAPD が持続的な透析方法であることである。

透析液交換の直前と直後では溶質除去率は異なるが、Popovich ら³⁸⁾の成績では、透析液と血漿の溶質濃度の比較において、尿素窒素は 6 時間で平衡に達している。そして、creatinine は 8 時間では平衡に達していないが、6～9 時間毎に透析液を交換する CAPD は、週 3 回、1 回 5 時間の HD に比し、より安定した優れた透析方法と言える。

さらに、持続的な透析は血糖値の安定化をももたらす。すなわち、CAPD においては、透析毎に糖が除去される HD とくらべて、血糖値が一定であり、糖代謝の変動が少ない。生体腎は 24 時間働き続けており、CAPD はその点で腎臓の働き方に近い透析方法であると考えられる。

4. リンパ球と赤血球の比較

Table 4 に赤血球の receptor 数と親和性を示す。まず、CAPD 群が健常人よりも receptor 数が大きくなっている。今回の成績では、Table 2 に示すように、網状赤血球数が CAPD 群で他の 3 群より高値である。網状赤血球は成熟赤血球よりも receptor 数が高くでるとされており²³⁾、CAPD 群においては他の群との比較には注意を要する。

ND 群は正常対照群より 33%、HD 群は 13%の低下を示している。CAPD 群は別にして、ND 群と HD 群ではリンパ球の成績と比べて、順序は変わらず良く似た傾向であるが、ともに減少の比率が小さい。これは血球数による影響が関与していることを示唆する。すなわち、腎不全群ではいずれも貧血を認めるが、単位体積あたりの代謝効率を考慮すれば、血球 1 個あたりにかかる負担が大きくなる可能性がある。したがって、各群で数に差のないリンパ球に比べて赤血球では receptor 数は大きめにでると考えられる。

結論

慢性腎不全患者の耐糖能異常の原因を解明するため、リンパ球 insulin receptor assay を実施し以下の成績を得た。

1. HD、CAPD により耐糖能異常は改善するが、insulin の過分泌を伴っており、その改善は不完全なものである。

2. ND 群では insulin receptor 数は減少しており、receptor の親和性は亢進していた。HD 群、CAPD 群ではほぼ同一の成績であり、insulin の特異的結合率は正常対照群と差を認めない。しかし、比較的高い insulin 濃度で正常対照との差が大きくなる傾向にあり、insulin 過分泌を考慮すれば、正常対照群よりは insulin 感受性は劣ると見られる。

3. HD 群と CAPD 群との比較で、CAPD 群は透析液による糖負荷があるにもかかわらず、HD 群と同一のレベルにあることから、CAPD の方が耐糖能の改善効果はすぐれていると考えられる。両者の物質除去特性を考えると、中分子領域に耐糖能異常をもたらす物質が存在する可能性がある。

4. リンパ球と赤血球はともに、insulin receptor assay の材料として使用できるが、慢性腎不全患者においては、赤血球を用いた場合 insulin receptor 数が高値を示すことがあり、注意を要する。

本論文の一部は、第 14 回日本腎臓学会西部部会、第 27 回日本腎臓学会総会、第 245 回大阪市医学例会、および第 73 回日本泌尿器科学会総会において発表した。

稿を終えるに臨み、終始御懇切な御指導ならびに御校閲を賜った、恩師前川正信教授に深謝致します。本研究に対し数々の御助言と御鞭達をいただいた岸本武利助教授、山上征二講師に感謝致します。

文献

- Horton, E. S., Johnson, C. and Lebovitz, H. E. : Carbohydrate metabolism in uremia. *Ann. Intern. Med.*, 68 : 63-74, 1968.
- Hampers, C. L., Lowrie, E. G., Soeldner, J. S. and Merrill, J. P. : The effect of uremia upon glucose metabolism. *Arch. Intern. Med.*, 126 : 870-874, 1970.
- Bagdage, J. D. : Disorders of carbohydrate and lipid metabolism in uremia. *Nephron*, 14 : 153-162, 1975.
- 山上征二：血液濾過法における糖代謝異常の改善について。 *阪市医誌*, 30 : 763-777, 1981.
- Nolph, K. D., Popovich, R. P. and Moncrief, J. W. : Theoretical and practical implications of continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron*, 21 : 117-122, 1978.
- Oreopoulos, D. G., Robson, M., Izatt, S., Clayton, S. and DeVeber, A. : A simple and safe technique for continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 24 : 484-489, 1978.
- 高橋 進：CAPD の現況。 *臨床医*, 10 : 862-864, 1984.
- DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., Rowe, J. W. and Andres, R. : Glucose intolerance in uremia. Quantification of pancreatic beta cell sensitivity to insulin. *J. Clin. Invest.*, 62 : 425-435, 1978.
- Hampers, C. L., Soeldner, J. S., Gleason, R. E., Bailey, G. L., Diamond, J. A. and Merrill, J. P. : Insulin glucose relationships in uremia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 21 : 414-422, 1968.
- Gambhir, K. K., Archer, J. A. and Carter, L. : Insulin radioreceptor assay for human erythrocytes. *Clin. Chem.*, 23 : 1590-1595, 1977.
- 小林 正：インスリン。馬場茂明，戸部隆吉 編集：p. 362-368, 金原出版，東京，1983.
- 葛谷英嗣：レセプタの測定，総論。馬場茂明，戸部隆吉編集：レセプタ。p. 355-361, 金原出版，東京，1983.
- Lundbeak, K. : Intravenous glucose tolerance as a tool in identification of diabetes mellitus. *Br. Med. J.*, 2 : 1507-1513, 1962.
- Hunter, W. M. and Greenwood, F. G. : Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194 : 495-496, 1962.
- Freychet, P., Roth, J. and Neville, D. M. Jr. : Monoiodoinsulin : demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43 : 400-408, 1971.
- Gambhir, K. K., Archer, J. A. and Bradley, C. J. : Characteristics of human erythrocyte insulin receptors. *Diabetes*, 27 : 701-708, 1978.
- Gavin, J. R., III, Roth, J., Jen, P. and Freychet, P. : Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69 : 747-751, 1972.
- Böyum, A. : A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21 : 51-76, 1968.
- Yam, L. T., Li, C. Y. and Crosby, W. H. : Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Path.*, 55 : 283-290, 1971.
- Scatchard, G. : The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51 : 660-672, 1949.
- DeMeyts, P. and Roth, J. : Cooperativity in ligand binding : a new graphic analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66 : 1118-1126, 1975.
- 江崎和芳：慢性腎不全の insulin receptor に関する研究。 *透析会誌*, 19 : 183-197, 1986.
- Eng, J., Lee, L. and Yallow, R. S. : Influence of the age of erythrocytes on their insulin receptors. *Diabetes*, 29 : 164-166, 1980.
- Yamagami, S., Iritani, Y., Ezaki, K. and Iwai, Y. : Improvement of abnormality in glucose metabolism in CAPD. Abstract of 4th ISAO official satellite symposium on CAPD. Kyoto, 1983.
- 金田 浩，村田豊明，三村信英：慢性透析患者の糖代謝異常一特に長期透析患者の問題点一。 *日本臨床*, 38 : 2337-2344, 1980.
- Westervelt, F. B., Jr. : Uremia and insulin response. *Arch. Intern. Med.*, 126 : 865-869, 1968.
- Carletty, J. M. and Engbring, H. H. : Azotemia

- and glucose intolerance. *Ann. Intern. Med.*, 66 : 1097-1108, 1967.
- 28) Archer, J. A., Gorden, P., Gavin, J. R., III, Lesniak, M. A. and Roth, J. : Insulin receptors in human circulating lymphocytes : application to the study of insulin resistance in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36 : 627-633, 1973.
- 29) Schwartz, R. H., Bianco, A. R., Handwerger, B. S. and Kahn, C. R. : Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes : implications for studies of insulin-resistant states in man. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72 : 474-478, 1975.
- 30) Bar, R. S., Gorden, P., Roth, J. and Siebert, C. W. : Insulin receptors in patients with insulinomas : changes in receptor affinity and concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44 : 1210-1213, 1977.
- 31) Wachslight-Rodbard, H., Gross, H. A., Rodbard, D., Ebert, M. H. and Roth, J. : Increased insulin binding to human erythrocytes in anorexia nervosa. *N. Eng. J. Med.*, 16 : 882-887, 1979.
- 32) Gambhir, K. K., Archer, J. A., Nerurkar, S. G., Cruz, I. A. and Sanders, M. : Erythrocytes insulin receptors in chronic renal failure. *Nephron*, 28 : 4-10, 1981.
- 33) Soman, V. and Felig, P. : Glucagon and insulin binding to liver membrane in a partially nephrectomized uremic rat model. *J. Clin. Invest.*, 60 : 224-232, 1977.
- 34) Bar, R. S. and Roth, J. : insulin receptor status in disease states of man. *Arch. Intern. Med.*, 137 : 474-481, 1977.
- 35) Oren, A., Wu, G., Anderson, G. H., Marliss, E., Khanna, R., Pettit, J., Mupas, L., Rodella, H., Brandes, L., Roncari, D. A., Kakis, G., Harrison, J., McNeil, K. and Oreopoulos, D. G. : Effective use of amino acid dialysate over four weeks in CAPD patients. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 24 : 604-610, 1983.
- 36) Kim, H. J., Kahlhoff, R. K., Constrini, N. V., Cerletty, J. M. and Jacobson, M. : Effect of parathormone on plasma insulin responses and pancreatic islet secretion of insulin. *J. Lab. Clin. Med.*, 75 : 891, 1969.
- 37) Moncrief, J. W., Nolph, K. D., Rubin, J. and Popovich, R. P. : Additional experience with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 24 : 476-483, 1978.
- 38) Popovich, R. P., Moncrief, J. W., Nolph, K. D., Ghods, A. J., Twardowski, Z. J. and Pyle, W. K. : Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann. Intern. Med.*, 88 : 449-456, 1978.