ラジオイムノアッセイ法を用いた慢性腎不全患者の 血漿エリスロポイエチン濃度

大 東 貴 志 橋 政 昭 出 口 修 宏 田 崎 寛

慶応義塾大学泌尿器科

(昭和 63 年 2 月 5 日受付)

key words : erythropoietin, chronic renal failure, radioimmunoassay

〈要旨〉

血液透析をうけている慢性腎不全患者の血漿エリスロポイエチン (EPO) 濃度を測定し、正常対照群と比較するとともに、様々な因子との関係を検討した。対象は 3 カ月以上血液透析を受けている慢性腎不全患者 67 例と、正常対照者 16 例で、測定は人精製 EPO を家兎に免疫して得られた抗 EPO 抗体を用いたラジオイムノアッセイ法により行なった。

正常対照群の血漿 EPO 濃度は 7.7-20.4 mU/ml であり、平均 13.3 ± 0.4 mU/ml (mean $\pm$ SEM) であったのに対し、血液透析群の血漿 EPO 濃度は 5.0-176 mU/ml で、平均 19.4 ± 3.0 mU/ml (mean $\pm$ SEM) と正常対照群に比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。血液透析群の年齢、性、末梢血ヘマトリット値、ヘモグロビン濃度と血漿 EPO 濃度との検討では、それぞれとの間に統計学的に有意な相関関係は得られなかったが、血液透析期間との間に正の相関が認められた ($r = 0.41$)。慢性腎不全の原因疾患と血漿 EPO 濃度との検討では、多嚢胞腎患者が他の原因によるものと比較して有意に高値であった ($p < 0.05$)。

以上のことから、慢性腎不全患者の血漿 EPO 濃度は対照群と比較してむしろ高値であり、また原因疾患によっても異なることから、その貧血の治療に際しては、血漿 EPO 濃度に基づいて治療方針を立てることが重要と思われた。

Plasma erythropoietin concentration in chronic renal failure measured by radioimmunoassay

Takashi Ohigashi, M. D., Masaaki Tachibana, M. D., Nobuhiro Deguchi M. D., Hiroshi Tazaki M. D.
Department of Urology, School of Medicine, Keio University

We studied plasma erythropoietin (EPO) concentration in patients with chronic renal failure who underwent regular hemodialysis. Plasma EPO concentration was measured in 67 hemodialysis patients and 16 normal controls by radioimmunoassay using anti-EPO antibody derived from rabbits immunized with human recombinant EPO.

Plasma EPO concentration in dialysis patients was 19.4 ± 3.0 mU/ml (mean $\pm$ S. E. M., range 5.0-176), significantly higher than the mean value of normal controls ; 13.3 ± 0.4 mU/ml [range 7.7-20.4] ($p < 0.05$). There was no significant difference in plasma EPO between male and female dialysis patients, and plasma EPO did not correlate with hematocrit, hemoglobin concentration or age. However, the length of hemodialysis showed a positive correlation with plasma EPO ($r = 0.41$). Polycystic kidney disease patients manifested higher plasma EPO concentration than other kidney disease patients ($p < 0.05$).

In conclusion, because plasma EPO concentration in hemodialysis patients was higher than in normal controls and showed differences in various diseases with renal failure, it is important that it be considered in the treatment of patients with anemia due to chronic renal failure.

緒言

慢性腎不全 (CRF) 患者の貧血、いわゆる腎性貧血の

原因は、主にエリスロポイエチン (EPO) 産生の減少と血中に存在する造血阻害物質によるものと考えられている¹⁾。近年まで純化 EPO の精製が困難であったために、ラジオイムノアッセイ (RIA) は限られた施設でのみしか行えず²⁻⁵⁾、血液中の EPO 濃度の測定は、感度の低く他の要因の影響を受けやすいバイオアッセイ法によることが多かった⁶⁻¹⁰⁾。これらの方法を用いた CRF 患者の EPO 活性に関する研究では、その値が必ずしも低値ではないとの報告も見られ、貧血との関係も明かではなかった⁸⁻¹⁰⁾。

しかし 1985 年に、EPO のクローニングが成功し¹¹⁾ recombinant EPO (rEPO) の大量生産が可能となったため、これを用いた比較的簡易な RIA による EPO の測定が可能となってきた。

本研究では、CRF により血液透析 (HD) を受けている患者の血漿中の EPO 濃度を RIA により測定し、正常対照群と比較するとともに、慢性腎不全患者における貧血及び他の因子と EPO の関係につき検討を行なうことを目的とした。

方法

1. 対象

血液透析 (HD) 群：CRF で定期的に血液透析を受けている患者 67 人の血漿中 EPO 濃度を測定した。男性が 40 人、女性が 27 人で、年齢は 34 歳から 80 歳まで分布しており平均は 48.1 ± 1.2 歳 (mean $\pm$ SEM) であった。患者は、週に 2 回ないし 3 回の透析を受けており、測定時までの血液透析歴は 3 カ月から 132 カ月で平均 48.0 ± 8.4 カ月 (mean $\pm$ SEM) であった。CRF の原因疾患は、慢性腎炎 40 人、糖尿病性腎症 9 人、高血圧性腎症 6 人、多嚢胞腎 4 人、ループス腎炎 2 人、妊娠中毒症 1 人、薬剤性急性糸球体壊死 1 人、その他不明 4 人であった。輸血による影響を除外するために、測定前 3 カ月間に輸血をした者は含まれず、また自己腎を摘出しているものは 1 人もいなかった。

対照群：正常対照群 16 人の内訳は、男性 13 人、女性 3 人で、年齢は 12 歳から 77 歳まで分布しており平均 56.6 ± 4.9 歳 (mean $\pm$ SEM) であった。

2. RIA

HD 群では血液透析の直前に、対照群では早朝空腹時に採血した血液を EDTA-2 Na に添加し、血漿分離したものを -30°C で凍結保存した。RIA は、Garcia, Sherwood, Goldwasser の方法¹²⁾ に準じて行なった。今回の研究に用いた rEPO は、キリンビール株式会社より供与されたもので、濃度は 5,000 units/ml に調節されている。¹²⁵I-Na を用いた EPO のヨード化は、NEN 社のキットを用い、ラクトペルオキシダーゼ法により行なった。抗

図 1 Plasma erythropoietin concentrations in patients receiving hemodialysis treatment and healthy controls (values are mean $\pm$ S.E.M)

EPO 抗体は、rEPO を家兎に免疫して得られたもので、キリンビール株式会社より供与された。

血漿サンプルと抗血清を 25°C で 20 時間反応した後、¹²⁵I-EPO を加え、再度 25°C で 20 時間反応した。bound/free 分離をポリエチレングリコール法により行ない、free ¹²⁵I を除去した。あらかじめ濃度を調整した rEPO を用いて作成した標準曲線により、サンプルの EPO 濃度を測定した。

結果

両群の血漿 EPO 濃度の分布を図 1 に示した。HD 群の血漿 EPO 濃度の平均値は、 19.4 ± 3.0 mIU/ml (mean $\pm$ SEM) で、最低 5.0 mIU/ml、最高 176 mIU/ml であった。一方対照群の平均血漿 EPO 濃度は、 13.3 ± 0.4 mIU/ml であり、(範囲：7.7 mIU/ml-20.4 mIU/ml) HD 群で有意に高値であった ($P < 0.05$)。

HD 群の平均末梢血ヘマトクリット値は、 $25.2 \pm 0.7\%$ (mean $\pm$ SEM)、平均ヘモグロビン濃度は 7.8 ± 0.2 g/dl (mean $\pm$ SEM) で、対照群のそれぞれ $39.3 \pm 1.1\%$ 、 13.3 ± 0.4 g/dl と比較して低値であったが、血漿 EPO 濃度とヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度との間に有意な相関は得られなかった ($r = 0.14$, $r = 0.12$) (図 2, 図 3)。

HD 群の血漿 EPO 濃度は、男女間で差を認めず、(男性 19.2 ± 4.3 mIU/ml、女性 19.6 ± 4.1 mIU/ml (mean $\pm$ SEM)) 年齢との相関も得られなかった ($r = 0.17$) (図 4)。

図2 Relationship between hematocrit and plasma erythropoietin concentration in patients receiving regular hemodialysis

図4 Relationship between age and plasma erythropoietin concentration in patients receiving regular hemodialysis

図3 Relationship between hemoglobin and plasma erythropoietin concentration in patients receiving regular hemodialysis

図5 Relationship between periods of hemodialysis and plasma erythropoietin concentration

しかし、血液透析期間と血漿 EPO 濃度に関しては、透析期間の長い症例が、血漿 EPO 濃度が高値を示す傾向がみられた(図5, $r=0.41$, $Y=5.27+0.29X$, $r < 0.001$). 血液透析期間と末梢血ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度との間には有意な相関が得られなかった。

HD 群の原因疾患別に末梢血ヘマトクリット値および血漿 EPO 濃度を比較してみる(図6)と、多嚢胞腎(PCD)が原因となっている患者の血漿 EPO 濃度が、他群と比較して有意に高値であった($P < 0.05$). 慢性腎炎、糖尿病、高血圧が原因となっているものは、対照群と比較しても血漿 EPO 濃度に有意の差が得られなかった。末梢血ヘマトクリット値は各疾患の間で有意の差がみられなかった。

考察

慢性腎不全患者の貧血は、血液透析により改善の傾向が認められると報告されているが¹³⁾、多くの患者は血液透析導入後も依然として、貧血の状態にとどまっている。いわゆる腎性貧血の原因としては、血清中の造血阻害物質の存在¹⁴⁻¹⁷⁾や、赤血球寿命の短縮¹³⁾などが考えられているが、最大の要因は、EPO 産生の障害^{1,19,20)}であるとき

図6 Mean plasma erythropoietin concentration and mean hematocrit in patients at various causes of CRF and in healthy controls

れている。近年、EPOのクローニングにより大量生産されたrEPOの投与が、慢性腎不全患者の貧血の改善にきわめて有効であると報告されている^{21,22)}ことも、この事を裏付けていると思われる。しかし、一口に慢性腎不全といってもその病態、原因は様々であり、これらの貧血に対する治療方針をたてる上に、血液中のEPOの状態を知ることが重要であると思われる。

血液透析患者のEPOは、諸家により様々な方法で測定されている。Caroらは、血液透析中の腎摘患者及び非腎摘患者の双方の血清EPO活性を血清濃縮法を用いた多血マウス法により測定し、正常群と比較したが、腎摘患者では正常群より低値を示したのに対し、非腎摘患者では平均で正常群を上回るものの高値群と低値群の二群に分かれると報告している⁶⁾。Fetal mouse liver cell法(FMLC法)を用いた測定では、de Klarkら⁷⁾は、透析導入前慢性腎不全患者、血液透析患者共に、正常対照群より血清EPOが低値であったとしているが、他の報告では、血液透析患者において、EPO値が高いとしているものや^{8,9)}、両者の間で差が認められないとしているものもあり¹⁰⁾、一致を見ていない。RIAによる測定は最近までその知見に乏しく、検討している症例数も限られていたが²⁻⁴⁾、近年McGonigleら⁵⁾は46人の血液透析患者の血清EPO濃度を測定し、 31.9 ± 1.9 mU/mI (mean $\pm$ SEM)と正常群(23.1 ± 1.0 mU/mI)に比較して有意に高値であったことを報告している。今回のわれわれの研究においても、血液透析患者の平均血漿EPO濃度は、対照群と比較して有意に上昇していた。

各原因疾患別にみた貧血及びEPO濃度の検討においては、McGonigleら⁵⁾は、PCD患者は、他の原因の慢性腎不全患者より有意に末梢血ヘマトクリット値が高いと報告しており、またChandraら²³⁾は、12人のPCDが原因で血液透析中の患者と、24人の他の原因による血液透析患者を比較して、PCD患者の方が血清EPOが有意に高く、貧血の程度も軽度であると報告している。本研究でも、血漿EPO濃度はPCD患者のみが他の疾患が原因となっている慢性腎不全患者と比較して有意に高く、他疾患では対照群と比較しても有意な差が認められなかった。Chandraらは、この原因として、PCDでは腎組織が嚢胞による圧迫を受けることにより、組織中の酸素分圧が低下して、EPOの産生が増加すると述べている。我々の結果では、PCDと他疾患の間に末梢血ヘマトクリット値では差がみられなかったが、やはりPCD患者と他の患者では、腎臓のEPO産生に差があると考えられた。

一般の貧血症の場合、貧血が進行するとともに血中EPO濃度が増加する傾向が認められるが⁴⁾、今回の我々

の研究では、血液透析患者の末梢血ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度と血漿EPO濃度は、現在までの報告⁵⁻⁸⁾と同様に明らかな相関が認められなかった。このように血液透析を受けている慢性腎不全患者の血漿EPO濃度は、正常対照と比較して必ずしも低値ではないが貧血の程度に対して反応しないということから、慢性腎不全患者の相対的なEPO濃度の低下は、腎の荒廃によりEPOの産生機構が障害を受けるというよりも、血流状態等の変化によって組織内低酸素に対する反応性が低下することによって生じている可能性が示唆された。PCD患者では、この反応性が比較的良く保たれていると考えられる。

血液透析期間と血漿EPO濃度の間に正の相関が得られた理由は不明であるが、PCD患者が比較的長い血液透析歴を有していたということに関連があると思われた。

慢性腎不全患者の貧血の他の要因として血液中の造血阻害物質の存在が以前より言われており、現在まで慢性腎不全患者の血清が、赤血球の発育過程において、CFU-E (colony-foaming unit-erythroid) やBFU-E (burst-foaming unit-erythroid) の形成や、heme合成を抑制することが報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。また、これらの抑制は、むしろ二次的なもので、この阻害物質は直接EPOに作用して、これを抑制するという説も見られる²⁴⁾。しかし、その物質が何であるかは未だ完全には同定されておらず、血清中のPTHが類似の阻害効果を持つという報告や¹⁶⁾、ポリアミンの一種であるspermineが、in vitroでCFU-Eの形成を抑制するという報告がみられ¹⁵⁾、これらの物質である可能性が示唆されている。

現在、慢性腎不全患者に対するrEPO投与はその貧血の予防あるいは治療法として大きな期待が持たれている。しかし、以上のRIAによる慢性腎不全患者の血漿EPO濃度の測定結果は、必ずしもrEPO投与のみですべての貧血が改善されないことを示すものと考えられる。したがって、血中EPO濃度が高値の症例については、他の腎性貧血の原因と考えられているものに対する対応が、重要であると考えられる。

結論

1 人rEPOを家兎に免疫して得られた抗EPO抗体を用いたRIA法により、血液透析中のHD患者及び正常対照者の血漿EPO濃度を測定した。

2 正常対照者の血漿EPO濃度は、 13.3 ± 0.4 mU/mI (mean $\pm$ SEM)であった。

3 HD患者の血漿EPO濃度は、 19.4 ± 3.0 mU/mI (mean $\pm$ SEM)であり、正常対照者と比較して有意に高値であった。

HD患者の血漿EPO濃度と性、年齢、末梢血ヘマト

クリット値、ヘモグロビン濃度との間に明らかな関係はみられなかったが、血液透析期間が長いほど血漿 EPO 濃度が高い傾向が認められた。

4 HD 患者の原因疾患による血漿 EPO 濃度の比較では、PCD 患者が他の慢性腎不全患者よりも有意に高値を示した。

文献

- 1) Fisher JV : Mechanism of anemia of chronic renal failure. *Nephron* 25 : 106-111, 1980
- 2) Cotes PM : Immunoreactive erythropoietin in serum. *Br J Haematol* 50 : 427-438, 1982
- 3) Sherwood JB, Goldwasser E : A radio-immunoassay for erythropoietin. *Blood* 54 : 885-893, 1979
- 4) Zaroulis CG, Hoffman BJ, Kourides A : Serum concentrations of erythropoietin measured by radioimmunoassay in haematologic disorders and chronic renal failure. *Am J Haematol* 11 : 85-92, 1981
- 5) McGonigle RJS, Husserl F, Wallin JD, Fisher JW : Hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis effects on erythropoiesis in renal failure. *Kidney Int* 25 : 430-436, 1984
- 6) Garo J, Brown S, Miller O, Murray T, Erslev AJ : Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients. *J Lab Clin Med* 93 : 449-458, 1979
- 7) de Klerk G, Wilmink JM, Rosengarten PCJ, Vet RJWM, Goudsmit R : Serum erythropoietin (ESF) titers in anemia of chronic renal failure. *J Lab Clin Med* 100 : 720-734, 1982
- 8) Radtke HW, Claussner A, Erbes PM, Scheuermann EH, Schopeppa W, Koch KM : Serum erythropoietin concentration in chronic renal failure : Relationship to degree of anemia and excretory renal function. *Blood* 54 : 877-884, 1979
- 9) Fukushima Y, Fukuda M, Yoshida K, Yamaguchi A, Nakamoto Y, Miura AB, Harada T, Tsuchida S : Serum erythropoietin levels and inhibitors of erythropoietin in patients with chronic renal failure. *Tohoku J exp* 150 : 1-15, 1986.
- 10) Summerfield GP, Gyde HB, Forbes AMW, Goldsmith HJ, Bellingham AJ : Haemoglobin concentration and serum erythropoietin in renal dialysis and transplant patients. *Scand J Haematol* 30 : 389-400, 1983
- 11) Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R : Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313 : 806-810, 1985
- 12) Garcia JF, Sherwood J, Goldwasser E : Radioimmunoassay of erythropoietin. *Blood Cells* 5 : 405-419, 1979
- 13) Radtke HW, Frei U, Erbes PM, Shoenpe W, Koch KM : Improving anemia by hemodialysis : Effect on serum erythropoietin. *Kidney Int* 17 : 382-387, 1980
- 14) Delwiche F, Segal GM, Eschbach JW, Adamson JW : Hematopoietic inhibitors in chronic renal failure : Lack of in vitro specificity. *Kidney Int* 29 : 641-648, 1986.
- 15) Radtke HW, Rege AB, LaMarche MD, Bartos D, Barots F, Campbell RA, Fisher JW : Identification of spermine as an inhibitor of erythropoiesis in patients with chronic renal failure. *J Clin Invest* 67 : 1623-169, 1981
- 16) McGonigle RJS, Wallin JD, Husserl F, Deftos LJ, Rice JC, O'neil WJ, Fisher JW : Potential role of parathyroid hormone as an inhibitor of erythropoiesis in the anemia of renal failure. *J Lab Clin* 104 : 1016-1026, 1984
- 17) Moriyama Y, Rege A, Fisher JW : Studies on an inhibitor of erythropoiesis. II. Inhibitory effect of serum from uremic rabbit on heme synthesis in rabbit bone marrow culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 148 : 94-97, 1975
- 18) Shaw AB : Haemolysis in chronic renal failure. *Br Med J* 2 : 213-244, 1967
- 19) 高久史磨 : 腎不全とエリスロポイエチン. *日本臨床*, 32 : 528-534, 1974
- 20) Eschbach JW, Adamson JW : Anemia of end-stage renal disease (ESRD). *Kidney Int* 28 : 1-5, 1985
- 21) Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM : Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* : 1175-1178, 1986
- 22) Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW : Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human

- erythropoietin. N Eng J Med 316 : 73-78, 1987
- 23) Chandra M, Miller ME, Garcia JF, Mossey RT, McVicar M : Serum immunoreactive erythropoietin levels in patients with polycystic kidney disease as compared with other hemodialysis patients. Nephron 39 : 26-29, 1985
- 24) Mcgonigle RJS, Wallin JD, Shadduck RK, Fisher JW : Erythropoietin deficiency and inhibition of erythropoiesis in renal insufficiency. Kidney Int 25 : 437-444, 1984