血液透析による血中顆粒球エラスターゼ値の変動

山木 万里郎 草野 英二 進藤 靖夫 細井 春久
永島 弘文 武藤 重明 鈴木 宗弥 浅野 泰
櫻林 郁之介*

自治医科大学透析センター 同臨床病理*

(平成1年2月16日受付)

key words : polymorphonuclear neutrophil elastase (PMN-E), hemodialysis, dialyzer membrane, serum calcium level

〈要旨〉

顆粒球エラスターゼ (PMN-E) の血液透析 (HD) 中の変動に及ぼす種々の因子について検討した。維持透析患者 37 例で HD 前後の PMN-E を酵素免疫法により測定し各条件で比較した。慢性腎不全の原因疾患の検討では DM 群と非 DM 群とでは有意差は認められなかった。HD 期間の検討では導入期群と安定期群とで有意差は認められなかった。透析膜の検討では同一症例 15 例について再生セルロース膜とポリメチルメタクリレート膜とを交互使用し比較したが有意差は認められなかった。抗凝固薬の検討では同一症例 18 例についてヘパリンと FUT-175 とを交互使用し比較したが有意差は認められなかった。カルシウム (Ca) 剤とビタミン D₃ 剤の影響をみたところ、両者を投与すると両者無投与ないしは Ca 剤投与のみの場合に比して有意に PMN-E 上昇率は抑えられた。HD 中の血清 Ca 濃度の変化と PMN-E の変化をみると全症例では全く相関が認められなかったが、一部の症例 (3 症例) では強い正の相関係がみられた。以上より HD 中にみられる PMN-E の上昇の機序として一部ビタミン D₃ 剤、Ca 剤や血清 Ca 濃度の変化が関与する可能性が示唆された。

Alteration of polymorphonuclear neutrophil elastase during hemodialysis

Mario Yamaki, M. D., Eiji Kusano, M. D., Yasuo Shindo, Haruhisa Hosoi, Hirofumi Nagashima, Shigeaki Muto, M. D., Muneya Suzuki, M. D., Yasushi Asano, M. D., Ikunosuke Sakurabayashi, M. D.*
Kidney Center, Department of Clinical Pathology*, Jichi Medical School

Polymorphonuclear neutrophil elastase (PMN-E) has been shown to increase during hemodialysis (HD). To determine the factors which influence the increment of PMN-E, 37 hemodialyzed patients were studied. PMN-E levels in plasma obtained before and after HD were measured by enzyme immunoassay. There was no significant difference between the DM Group (n=12) and non-DM Group (n=25), nor was there any significant difference between the short HD duration Group (less than 3 months, n=24) and the long HD duration Group (more than 5 months, n=13).

As far as the dialyzer membrane was concerned, there was no significant difference between 15 patients treated with regenerated cellulose membranes and polymethylmethacrylate (PMMA) membrans. Nor was there any significant difference between 18 patients treated with heparin and FUT-175 (nafamostat mesilate).

When the effects of vitamin D₃ (Vit D₃) and calcium bicarbonate on PMN-E levels were evaluated, combined use of Vit D₃ and calcium bicarbonate seemed to depress the PMN-E elevation rather than use of calcium bicarbonate alone or no usage of these agents at all.

There was no significant correlation between serum calcium levels and PMN-E levels in any of the cases. However, there were strong correlations between elevations in serum calcium and PMN-E in 3 of the cases.

From these results, it appears that alteration of serum calcium levels and certain agents, such as Vit D₃ and

calcium bicarbonate, might be involved in the mechanism of PMN-E elevation during HD.

表 1 対象症例

No	Age	Sex	Etiology	HD duration	No	Age	Sex	Etiology	HD duration
1	18	F	DN	16	21	45	F	CGN	2
2	42	F	CGN	101	22	51	M	CGN	2
3	54	M	DN	1	23	37	F	CGN	2
4	29	F	DN	34	24	38	M	DN	1
5	54	F	CGN	12	25	34	M	CGN	1
6	40	M	CGN	2	26	69	M	DN	1
7	17	M	CGN	1	27	27	M	CGN	1
8	39	F	CGN	105	28	62	F	DN	1
9	47	F	CGN	72	29	71	M	CGN	1
10	51	F	DN	2	30	72	F	CGN	1
11	55	F	CGN	107	31	54	F	Renal Tbc	1
12	52	M	DN	1	32	67	F	SLE	1
13	75	M	CGN	5	33	55	F	CGN	117
14	36	M	CGN	1	34	62	F	DN	9
15	33	F	CGN	1	35	31	F	CGN	186
16	31	F	CGN	1	36	30	M	CGN	196
17	53	M	DN	1	37	30	M	CGN	83
18	59	F	DN	1	平均	46.2±15.0 (M 17 F 20)		29.1±52.5	
19	52	M	DN	3					
20	38	M	CGN	3					

CGN : Chronic glomerulonephritis, DN : Diabetic nephropathy, SLE : Systemic lupus erythematosis

はじめに

顆粒球エラスターゼ (polymorphonuclear neutrophil elastase 以下 PMN-E) は顆粒球に含まれる中性プロテアーゼのひとつで、3つのアイソザイムから成る分子量約 30000 の糖蛋白である。多核顆粒球 (PMN) のアズール顆粒に含まれ、食細胞など炎症性の刺激を受けると細胞外へ放出される。

急性炎症、敗血症などにおいて放出された PMN-E は疾病促進因子として作用し、エラスチンやコラーゲン、フィブロネクチンなどの組織結合蛋白や、免疫グロブリン、補体因子 (C3, C4) などの血漿蛋白を分解するだけでなく他の中性プロテアーゼ (コラゲナーゼ、カテプシン G など) と協同して各種生理活性物質を産生するといわれる。血中では PMN-E は α_1 protease inhibitor (α_1 PI) に結合し不活性化されると共に複合体を形成して存在する。

最近、急性炎症のみならず、肺気腫や白血病で血中 PMN-E α_1 PI 複合体の上昇が認められ、血液透析 (HD) 中でも上昇が報告されている。HD 中の PMN-E の上昇は、各種透析器の生体適合性の指標の一つとして着目されつつある。しかし HD 中の PMN-E の上昇とその生理的意義は必ずしも明らかにされていない。従って今回我々はその上昇に影響する諸因子について検討を加えたので報告する。

対象

対象は自治医科大付属病院および関連病院で維持透析を行っている慢性腎不全 (CRF) 患者 37 例で年齢 46.1 ± 15.0 歳 (mean $\pm$ SEM), 男 17 例, 女 20 例である。平均透析期間は 29.1 か月 (range 1 ~ 196 か月) で CRF の原因疾患は慢性糸球体腎炎 (CGN) 23 例, 糖尿病性腎症 (DN) 12 例, 腎結核 1 例, SLE 1 例である (表 1)。

方法

透析膜は再生セルロース膜または合成高分子膜の polymethylmetacrylate (PMMA) 膜を用い、抗凝固薬としてはヘパリンカルシウム (900 ~ 1500 U/hour) または FUT-175 (30 ~ 35 mg/hour) を用いた。採血は HD 開始直前と終了時に施行し、EDTA-2K 添加試験管にとり 1000 rpm, 15 分間の遠心分離後 buffy coat を乱さぬように血漿成分を採取した。更に 1500 rpm, 8 分間の再遠心分離後に上清をとり、 -80°C で冷凍保存した。PMN-E は α_1 PI との複合体の形で酸素免疫法 (E. Merk 社製 kit)^{1,2)}にて測定し、求めた PMN-E 値は HD 前後で比をとり ΔE で表わした。なお HD による除水の影響を考慮して血清総蛋白値で補正を加えた (図 1)。白血球数, CRP も測定し炎症の時期でないことを確認した。

検討項目

1. CRF の原因疾患

PMN-E が CRF の原因疾患で差がでるかどうかを

図 1 PMN-E の測定法

DM 群と非 DM 群とで比較した。両群とも再生セルロース膜を使用し、ヘパリン投与の同条件下で検討した。

2. 透析期間

透析期間の長短が PMN-E に影響するかどうかをみるため、HD 導入期と HD 長期安定期とで比較した。前者は HD 歴 3 か月までの患者 24 例 (男 14, 女 10, DM 9, 非 DM 15,) で後者は HD 歴 5 か月以上の患者 13 例 (男 3, 女 10, DM 3, 非 DM 10,) である。再生セルロース膜、ヘパリン投与の条件下で検討した。

3. 透析膜

透析膜素材の差が PMN-E に影響するかどうかをみるため、再生セルロース膜と PMMA 膜を比較した。患者 15 例についてヘパリン投与下に再生セルロース膜と PMMA 膜を交互使用し検討した。

4. 抗凝固薬

ヘパリンカルシウムと FUT-175 (nafamostat mesilate) を比較した。患者 18 例について再生セルロース膜使用下にヘパリンと FUT-175 を交互使用し検討した。

5. 薬剤

PMN-E の上昇に患者の服用する薬剤が影響するかどうかをみるために、炭酸カルシウム (Ca) とビタミン D_3 (Vit D_3) について、両者を投与しない時期、Ca 剤のみを投与する時期、両者を投与する時期の 3 つの phase で検討した。この対象は 8 症例で表 1 の No. 24, 27, 29, 33,

図 2 CRF の原因疾患が及ぼす PMN-E の変動への影響

図 4 透析膜の差異が及ぼす PMN-E の変動への影響

図 3 透析期間の長短が及ぼす PMN-E の変動への影響

図 5 抗凝固薬の差異が及ぼす PMN-E の変動への影響

34, 35, 36, 37 である (男 5 例, 女 3 例, 年齢 43.0 ± 16.0 歳, DM 2 例, 非 DM 6 例, HD 歴 1 ~ 196 か月)。ヘパリン投与、再生セルロース膜使用の条件下で検討した。

6. 血清カルシウム濃度

血清 Ca 濃度の変化が PMN-E の上昇に影響するかどうかをみるために、血清 Ca 濃度の HD 前後の変化の絶対値の比 (ΔCa , 血清蛋白値で補正) と ΔE との相関関係を全 37 症例について検討した。

統計処理

結果は全て mean ± SEM で表示し、統計学的検定は Student's t test を用い、p 値 0.05 未満を有意とした。

結果

1. CRF 群の原因疾患

DM 群では ΔE (透析前後比) は 4.13 ± 2.28 であり、非 DM 群では 3.60 ± 2.24 と両群で有意差はみられなかった (図 2)。

2. 透析期間

HD 導入初期群の ΔE は 4.43 ± 2.62 であり、長期安

図6 薬剤が及ぼす PMN-E の変動への影響

図7 血清カルシウム濃度の変化と PMN-E の変動の相互関係

定期群では 4.16 ± 2.14 で両者に有意差はみられなかった (図3)。

3. 透析膜

再生セルロース膜使用時の ΔE は 4.57 ± 2.42 であり、PMMA 膜使用時の ΔE の 4.88 ± 2.86 に比べ若干低めであったが、有意差は認められなかった (図4)。

4. 抗凝固薬

FUT-175 使用時の ΔE は 4.15 ± 2.16 でありヘパリン使用時の ΔE の 4.72 ± 2.40 と比べ多少低めであったが、有意差は認められなかった (図5)。

5. 薬剤

Ca 剤と Vit D₃ 剤を投与しない第1の時期の ΔE は 4.44 ± 1.89 であり、Ca 剤を投与し約7日経た第2の時期の ΔE は 4.43 ± 1.16 で第1と第2の時期では有意差は認められなかったが、Vit D₃ 剤を Ca 剤に追加して約7日経た第3の時期の ΔE は 2.30 ± 1.18 と第1、第2の時期の ΔE より有意に ($p < 0.01$) 低かった (図6)。

6. 血清 Ca 濃度

血清 Ca 濃度の HD 前後の変化 ΔCa と ΔE とを全体

図8 血清カルシウム濃度と PMN-E の変動の相互関係

の37症例にわたって検討すると全く相関関係はみられなかった (図7)。しかし個々の症例については No. 19, 21, 29 の3症例で、相関係数 (r) がいずれも 0.9 以上の強い正の相関が認められた (図8)。

考察

ヒトの多核白血球には種々の中性 protease が豊富に含まれ、細菌や異物の細胞内での消化、分解に関わっている。急性炎症をおこした場合のように多核白血球が食細胞の刺激を受けたり、あるいは損傷を受けると多量に protease が放出される。従ってこれら中性 protease, 特に elastase を定量的に測定することは急性炎症などの疾病の大きさや治療効果に対する情報を与えると考えられ、血中 PMN-E α_1 PI 複合体は炎症のパラメーターであることが示唆されている¹⁻³⁾。近年 HD 中の血中 PMN-E の上昇が知られ、その臨床的意義が話題となっている。HD 中の PMN-E の上昇は透析膜に補体が接触することにより、alternative pathway が活性化されて肺内血管床に PMN がトラップされ、蓄積された PMN から elastase が放出されるという機序が推測されている¹⁾。従って、血液・膜表面の相互作用、または透析膜素材の生体適合性をみるのに PMN-E が有用な指標となると考えられている。これまで膜素材については cupurammonium rayon 膜、鹼化セルロース膜、PMMA 膜、エチレンビニールアルコール膜 (EVA 膜) について報告がある^{3,4)}。吉田ら³⁾によると PMN-E の上昇率は EVA 膜が最も小さく、次いで cupurammonium rayon 膜、鹼化セルロース膜の順に大きくなり PMMA 膜が4種の中で最も大きいという。一方、今回我々の成績では再生セルロース膜と PMMA 膜には有意差は見出せなかった (図4)。蟹由ら⁴⁾は cupurammonium rayon 膜、PMMA 膜、EVA 膜の3種の間に少なくとも HD 開始 330 分間に有意差を認めていない。このような相反する結果がでた理由としては PMN-E の値が個々の症例でかなりばら

つく点が挙げられる。事実我々の症例では HD 前の PMN-E 値が $67\sim 1359\ \mu\text{g/l}$ と大きな幅を示した。PMN-E の変動の個体差が大きい^{1,3,4)}ことも一因と考えられる。

今までの報告の中で PMN-E 値の上昇する疾患として急性炎症、白血病、肺気腫¹⁾の他に DM も挙げられており、PMN-E は DM 性血管障害と密接に関連することが示唆されている⁵⁾。それゆえ DM による CRF 群では、そうでない群に比し PMN-E の上昇が高いことが予想されたが今回の成績からは両群に有意差は見出せなかった (図 2)。CRF の原因疾患としては多発性嚢胞腎などもあり、今後症例を重ねて検討の必要があると考えられるが CRF の初期に DM 群、CGN 群など原因疾患の違いで PMN-E の値にたとえ差があるとしても HD を行う CRF 末期には有意差が現われなくなっている可能性がある。

HD 期間と PMN-E との関連性も検討したが、これも今回の成績では HD 導入期と安定期とで PMN-E の上昇率に有意差はみられなかった (図 3)。

近年、ヘパリンに比べ抗凝固作用時間の短い FUT-175 が開発され、特に出血傾向のある症例に臨床応用されている。これは FUT-175 が multiple protease inhibitor の一つであることから PMN-E の放出を抑制するか、あるいは α_1 PI に競合的に作用して PMN-E α_1 PI 複合体値を減少させるのではないかと予想された。しかし、今回の結果では FUT-175 使用時の PMN-E 上昇率はヘパリン使用時と同程度で有意差は認めなかった (図 5)。一方、ヘパリンを抗凝固薬として用い multiple protease inhibitor である urinastatin を HD 中に持続投与すると PMN-E の上昇が抑えられたとの報告⁶⁾もあり、multiple protease inhibitor の種類によっては PMN-E の増加を抑制し得ることを示唆するもので興味深い。Urinastatin は lysosome 膜安定化作用を持ち PMN-E など蛋白分解酵素の遊出を抑制すると考えられる。他方 FUT-175 には lysosome 膜安定化作用が確認されていないため PMN-E の遊出を抑制し得ないとも考えられるが、今回の FUT-175 投与量が $30\sim 35\ \text{mg/h}$ と抗凝固作用を及ぼす通常量であったため、この量では抑制し得なかったとも考えられ、量的な問題は今後の検討課題であろう。

In vitro 実験での PMN-E の PMN からの遊出は Ca^{++} -calmodulin 系に依存していることが示唆されている⁷⁾。Calcium ionophore の A 23187 や protein kinase C の activator である phorbol myristate acetate をヒト全血に加えると PMN-E の遊出を促進させ、逆に calcium channel blocker の verapamil や calmodulin

blocker の trifluoperazine の投与、または EDTA で細胞外 Ca^{++} を除去することにより、PMN-E の遊出が抑制されることが知られている。今回我々の検討では血清 Ca 値の変動 (ΔCa) と ΔE を全例で plot したが、両者間に相関関係は見られなかった (図 7)。PMN-E の値が個々の症例でばらつくために、全症例では相関関係が見出されない可能性が考えられる。個々の症例について検討したところ、3 症例で正の相関を強く認め (図 8)、概ね ΔE と ΔCa は in vitro の実験結果と合致するものであった。

最近、PMN-E の持つ pathological な面も注目されつつある。すなわち PMN-E が透析アミロイドーシスに関与している⁸⁾という推測がある。これは HD を長期間施行されている患者では PMN-E が慢性的に高値になるため、血清中の amyloid A protein の degradation がおこり、amyloid formation につながるというもので、最近ではこれを裏付けるような報告⁹⁾も出始めてきている。ただし PMN-E は血中では α_1 antitrypsin や α_2 macroglobulin といった protease inhibitor と結合して不活性化された複合体の状態で存在するのでこの PMN-E inhibitor 複合体が直接組織破壊を来す可能性はうすく¹⁰⁾ HD による上昇がいかなる病因的意義を有しているのか今後検討されるべき課題であろう。

まとめ

HD 中の PMN-E の上昇において

1. CRF の原因疾患の検討では DM 群と非 DM 群とで有意差はみられなかった。
2. 透析期間の検討では導入期と安定期とで有意差はみられなかった。
3. 透析膜の検討では再生セルロース膜と PMMA 膜とでは有意差はみられなかった。
4. 抗凝固薬の検討ではヘパリンと FUT-175 とで有意差はみられなかった。
5. Ca 剤、Vit D 剤の検討では Vit D 剤を投与した時期に有意に低かった。
6. 一部の症例において血清 Ca 濃度の変化と正の相関がみられた。

謝辞：PMN-E α_1 PI 複合体測定 kit を提供頂いた関東化学(株)、ならびに測定に御協力頂いた同社伊藤弘美氏に深謝する。

文献

- 1) 櫻林郁之介、伊藤弘美、石井周一、本間寿美子、河合 忠：血漿中における顆粒球エラスターゼに関する研究。臨床病理 33：1113-1118, 1985

- 2) 櫻林郁之介, 伊藤弘美: III. 血球化学検査, 顆粒球エラスターゼ. 日本臨床 43: 732-735, 1985
- 3) 吉田 哲, 青木宏明, 山田多啓男, 吉川康行, 木内英則, 倉光 薫, 山本恵一郎, 北川 宏: 透析に関連する生体影響因子, XII顆粒球エラスターゼ, 臨床透析 2: 683-688, 1986
- 4) 蟹由 斉: 透析技術の再検討, I 透析器の選択, (3) 選択の実際. 臨床透析 3: 1863-1869, 1987
- 5) 石戸浩之, 工藤幹彦, 熊坂義裕, 中畑 久, 武部和夫: 糖尿病患者の血清および白血球中エラスターゼ活性. 糖尿病 26: 1057, 1983
- 6) 五味朋子, 桜井 淳, 戸谷義幸, 池田寿雄: 血液透析患者における urinastatin の蛋白分解酵素阻害作用の検討. 透析会 22: 1032-1033
- 7) Kokot K, Teschner M, Schaefer RM, Heidland A: Stimulation and inhibition of elastase release from human neutrophil-dependence on the calcium messenger system. Miner Electrolyte Metab 13: 189-195, 1987
- 8) Silverman SL, Cathcart ES, Skinner M, Cohen AS: The degradation of serum amyloid A protein by activated polymorphonuclear leukocytes: participation of granulocytic elastase. Immunology 46: 737-744, 1982
- 9) 水口 潤, 川島 周, 斉藤 明, 佐藤 厚, 名取靖郎: 血液透析と血清リソゾーム酵素活性: アミロイドーシスとの関連性 (抄録). 第31回日本腎臓学会総会予稿集 p. 205, 1988
- 10) 島貫公義, 浜田修三, 櫻林郁之介: 人工心肺使用時の白血球数, 及び顆粒球エラスターゼ値の変動. 胸外会誌 36: 83-91, 1988