透析患者における末梢血単核球の造血因子 (BPA, GM-CSA) 分泌能の検討—腎性貧血との関連—

河野 嘉文 高上 洋一 阿部 孝典 渡辺 力
二宮 恒夫 黒田 泰弘 水口 潤* 川島 周*
徳島大学小児科 川島病院*

(昭和 63 年 12 月 17 日受付)

key words : burst promoting activity (BPA), BFU-E, colony stimulating factor (CSA), 腎性貧血

〈要旨〉

透析患者の末梢血単核球の造血因子 (BPA, GM-CSA) 分泌能を検討した。末梢血単核球を PHA で刺激して得られた培養上清 (CM) を用いた分析で、透析患者では健常人に比較して BPA の低下と GM-CSA の亢進が認められた。この CM は、赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) によるコロニー形成に対し、濃度依存性の抑制作用を示し、顆粒球・単球系前駆細胞 (CFU-GM) によるコロニー形成には抑制作用を示さなかった。このことより透析患者では赤芽球系細胞に対する選択的抑制物質が分泌されている可能性が示唆された。

透析導入前後の変化を見ると、透析導入とともに GM-CSA の分泌が亢進したが、BPA の分泌は変化しないか低下傾向にあった。同時に末梢血中の CFU-GM 数は増加し、BFU-E 数が減少し、造血因子分泌能の変化と相関していた。一方、腎移植により透析を離脱した患者では移植後 BPA 分泌能が改善し、それとともに末梢血中 BFU-E 数の増加と貧血の改善が認められた。

以上の結果より、腎性貧血の一因として造血因子 (BPA) の活性低下が考えられ、それは赤芽球系にのみ作用する抑制因子の存在が関与していると思われる。

Production of hemopoietic colony-stimulating factors by blood mononuclear cells from chronic uremic patients

Yoshifumi Kawano, M. D., Yoichi Takaue, M. D., Takanori Abe, M. D., Tsutomu Watanabe, M. D., Tsuneo Ninomiya, M. D., Yasuhiro Kuroda, M. D., Jun Minakuchi, M. D.*, Shuh Kawashima, M. D.*
Department of Pediatrics, Tokushima University ; Kawashima Hospital*

Conditioned media (CM) of PHA-stimulated lymphocytes from chronic uremic patients were tested for colony-stimulating activities, using methylcellulose hematopoietic progenitor cultures with normal bone marrow cells as a target population.

CMs from uremic patients undergoing hemodialysis were shown to lack potential to support the full growth of early erythroid progenitors (BFU-E) due to the presence of suppressive factors or poor production of burst promoting activity (BPA), or both. However, the stimulatory activity for CFU-GM was increased, particularly among patients on hemodialysis. Disappearance of anti-BPA activities preceded the normalization of hemoglobin levels after the termination of hemodialysis by kidney transplantation.

Based upon the results, disturbance of the regulation of erythropoiesis through leukocyte-derived factor (s) may play a part in the development of anemia in chronic uremic patients.

緒言

慢性腎不全に認められる腎性貧血は、エリスロポエチ

河野 嘉文 徳島大学小児科

〒770 徳島市蔵本町3 (0886-31-3111)

ン (EPO) 産生低下が強く関与しているといわれている¹⁾。そのために最近では、リコンビナント EPO (rEPO) が腎性貧血の治療薬として慢性腎不全患者に投与され、好成績が報告^{2,3)}されている。しかし、EPO 以外の要因も

腎性貧血に関与していることは知られており⁴⁾、EPOの効果を十分に得るためにもそれらの解明が重要になってくると思われる。EPOは主に後期赤芽球系前駆細胞(CFU-E)に作用するといわれているため⁵⁾、その段階に至るまでの過程が障害されているとEPOの効果は十分でないと考えられる。我々は慢性腎不全患者では末梢血単核球からの前期赤芽球系前駆細胞(BFU-E)の成熟因子であるburst promoting activity(BPA)の分泌が低下し、BFU-Eまでの段階で成熟が障害されている可能性を報告した⁶⁾。今回はこの事実に基づいて、慢性腎不全患者における赤芽球系前駆細胞分化成熟障害の原因究明を目的として、透析導入前後さらに腎移植による透析離脱前後の患者末梢血単核球より分泌される赤芽球系および単球・顆粒球系コロニー刺激因子(BPAとGM-CSA)分泌能の変化を調べ、腎性貧血との関連を検討したので報告する。

対象

慢性腎不全のため定期的に血液透析を受けている成人患者29名(男15名、女14名)である。対照として健康成人10名の末梢血を用いた。透析患者のヘモグロビン値は6.0~14.0 g/dl(Ht 17~39%)で、定期的な輸血を必要としている患者は5名であった。これらの透析患者の中で4名は透析導入前後で、また2名は腎移植による透析離脱前後で観察比較した。

方法

対象者の末梢血をヘパリンを加えて採取し、Ficoll-Hypaque(d=1.077)による比重遠心法で単核球(PBMC)を分離した。リン酸緩衝液加生食水(PBS:ダルベッコPBS(-)、ニッスイ)で3回洗浄後、イスコフ変法ダルベッコ培養液(IMDM)に再浮游し、種々の実験に用いた。透析患者は毎回透析直前の血液を採取した。透析導入前後の経過を追った患者については、導入前と導入後3か月、6か月に採血した。腎移植を受けた患者は移植前と移植後10週まで毎週採血した。

1. BPAとGM-CSAの測定

PBMCを 5×10^5 個/mlに浮游し、10%胎児ウシ血清(FBS)とPHA-P(Sigma社)5 μ g/mlとを加え、5%CO₂の存在下37°Cで7日間培養した。この培養上清をconditioned medium(CM)として採取し、BPAとGM-CSAの測定に用いた。標的細胞として 10^5 個の健康人骨髓単核細胞と10%被検査CMを含む1mlのメチルセルロース培地を35mmペトリ皿(Falcon #1008)に入れ、37°C、5%CO₂存在下で14日間培養し、倒立顕微鏡でBFU-EおよびCFU-GM数を測定した。メチルセルロース培地は20%FBS、1%脱イオン化ウシ血清アルブミン(BSA:Sigma社)、鉄飽和ヒトトランスフェリ

ン(Sigma社)400 μ g/mlを含み、メチルセルロースの最終濃度は1%とした。結果は当研究室の標準CMで得られるコロニー数を100%とし、これに対するコロニー数を%で表現し、BPAおよびGM-CSAとした。培養はduplicateで行い、異なる標的細胞を用いた3回の実験結果を平均した。また、一部のCMについて5~25%の濃度でdose-response curveを作製した。

2. 末梢血中前駆細胞の測定

2×10^5 個のPBSCを標準CMを含む上記のようなメチルセルロース培地中で、14日間の培養し、BFU-EおよびCFU-GMにより形成されるコロニー数を観察した。培養はtriplicateで行い、結果は末梢血1ml当りの数に換算して示した。

結果

透析患者のBPAは $57 \pm 21\%$ (mean $\pm$ SD, n=26)であり、健康人($96 \pm 9\%$, n=10)に比較して有意に低値であった($p < 0.01$)。一方、GM-CSAは透析患者で $161 \pm 48\%$ を示し、健康人(112 ± 34)に比較して有意に亢進していた($p < 0.01$)。しかし、透析導入前の4名のBPA、GM-CSAの値はそれぞれ $76 \pm 17\%$ 、 $83 \pm 11\%$ であり、健康人と有意な差は認められなかった。

次に、健康人3例と種々のBPA活性を示す透析患者3名のCMのdose-response curveを図1に示した。健康人CMは10%で最もコロニー形成を刺激したが、透析患者(図中CRF)ではBPAの高低とは無関係に、また程度の差はあるものの濃度依存性の抑制効果が観察された(図1上)。同様にして得られたGM-CSAのdose-response curveでは、図1下のごとく濃度依存性の抑制作用は認められなかった。図には示さなかったが、透析導入前の患者より作製したCMでは、GM-CSAは健康人と同様であり、BPAは濃度依存性の抑制効果は明らかではなかった。

透析導入前から観察し得た患者においては、図2に示したように透析導入後に末梢血単核球のGM-CSAが亢進してくるにもかかわらず、BPAは変化しないか低下していた。この間、末梢血の前駆細胞数の動きは表のごとく、BFU-Eは減少傾向にあり、CFU-GMは増加していた。

腎移植を受けた2例の患者について、移植前から移植後10週まで経時的に観察した。移植前BPA 70%、末梢血BFU-E 52個/mlと共に低値であった例では図3に示すように、10週後に貧血はまだ正常に戻っていないが、まずBPAが増加し、BFU-E数も続いて増加している。もう1例はBPAが77%であったが、BFU-Eが194個/mlと高値であり、図に示していないがBPA、BFU-Eとも移植後高値を維持し、6週目でヘモグロビ

図1 BFU-E に対する CM の dose-response curve. 透析患者 3 名 (CRF), 正常対照 3 名 (normal) の CM の BFU-E コロニー形成能を示している。図には代表例を示したが、透析患者では CM 濃度の増加によって BFU-E が抑制される傾向がみられた (上図)。CFU-GM に対する CM の dose-response curve. 透析患者 (CRF), 健常人 (normal) とともに濃度依存性の抑制は認めなかった (下図)。

表 透析導入前後における末梢血前駆細胞数の変化

		導入前	導入 3 か月後	6 か月後
BFU-E	Pt 1	110±15	71±7	54±5
	2	73±5	74±3	58±9
	3	16±3	40±6	6±5
	4	149±25	103±18	ND
CFU-GM	Pt 1	9±3	12±5	46±12
	2	2±1	8±4	14±5
	3	20±9	66±23	28±8
	4	15±3	0	ND

結果は triplicate culture の平均値±標準偏差で示した。ND は実施しなかったことを示す。BFU-E は全例で、CFU-GM は 2 例で、6 か月後の値が有意に変化していた。

図2 透析導入前後の患者末梢血単核球の BPA と GM-CSA の変化。Non HD は透析導入前、HD は透析導入後 6 か月での値。GM-CSA は導入後著増したが、BPA は低値のままであった。

図3 腎移植後の BPA, 末梢血中 BFU-E 数, 血中ヘモグロビン値の変化。影の部分はそれぞれの正常域を表す。ヘモグロビンの改善に先行して BPA, BFU-E 数が増加した。

ンが正常化した。

考察

腎性貧血の主な成因は EPO 産生低下によると考えられている。最近腎性貧血患者に臨床投与され始めた rEPO の効果は著しく、補充療法としての意義は大きい。腎機能が廃絶した場合、腎で産生される EPO が低下することは容易に理解できる。ところが、慢性腎不全患者

の血中 EPO 活性は、貧血の程度にかかわらず低下を示す⁷⁾といわれ、また貧血のある長期透析患者の中には血中 EPO 値が正常である者もあり⁸⁾、これらの事実は EPO だけが慢性腎不全患者における貧血の原因ではないことを示している。したがって、今後は EPO 以外の要因がより検討されることが必要になってくる。すでに、尿毒症性蓄積物質⁹⁾や副甲状腺ホルモン¹⁰⁾、血中アルミニウム¹¹⁾などが腎性貧血に悪影響を与えていることも検討されている。本研究は、従来の腎から排泄されない物質の造血能への直接的関与という従来の視点から離れ、尿毒症状態の中でリンパ球・単球のような造血支持細胞がどのように変化しているかを観察することを目的としたものである。

我々はすでに慢性腎不全患者リンパ球の培養上清 (CM) 中の BPA 活性が健常人と比較して低下していることを報告した⁶⁾。本研究の結果から、透析患者末梢血単核球から得た CM には BFU-E 由来のコロニー形成を選択的に抑制する物質が存在することが示唆された。これは尿毒症性物質が存在しない条件下で分泌されたものであり、腎不全あるいは透析 (体外循環) により、単核球 (mononuclear cell) が何らかの変化をきたしていることを推測させるものである。BPA は T cell から分泌される造血因子であるが、その分泌には単球が深く関与していることが知られている¹⁴⁾。透析患者の末梢血中の単球 (monocyte) は活性化されているので¹²⁾、従来より知られている単球の持つ潜在的な BFU-E 形成に対する抑制作用¹³⁾が強く発現したものと考えられる。これらの細胞の相互作用が BPA の低下として現れてきているものと考えられる。透析療法中 BPA が低下している例で、腎移植により尿毒症状態を脱却すると末梢血単核球から分泌される BPA が経時的に上昇し、貧血が改善されることが示されたが、このことは BPA と腎性貧血の関係を示唆している。したがって、何が BPA の分泌に最も影響を与えているかを解明していくことが、腎性貧血の治療に役立つものと思われる。

一方、透析患者のリンパ球では GM-CSF の産生が亢進しているという結果が得られたが、これは透析 (体外循環) により tumor necrosis factor (TNF) の増加をきたし¹⁵⁾、それが GM-CSF の産生を刺激したためと考えられる¹⁶⁾。また、TNF は直接的な造血抑制作用もあるとされ¹⁷⁾、刺激と抑制が混在する結果が BPA の低下、GM-CSF の増加となった可能性もある。

本研究で示した BPA についてもあるいは末梢血中 BFU-E 数にしても症例間のばらつきは大きく、腎性貧血に関わる要因の多彩さを示している。したがって、BPA の低下あるいは造血抑制因子の分泌だけで腎性貧

血の原因がすべて解決するわけではないが、臨床的に腎性貧血の患者を治療していく上で、これらの諸問題をひとつひとつ解決し、rEPO の効果が 100% 発揮できるようにすることが重要である。

謝辞：rEPO (EPOCH) を提供いただきました中外製薬に感謝いたします。

文献

- 1) Eschbach JW, Adamson JW : Anemia of end-stage renal disease (ESRD). *Kidney Int* 28 : 1-5, 1985
- 2) Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM : Effect of erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic hemodialysis. *Lancet* ii : 1175-1177, 1986
- 3) Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW : Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 316 : 73-78, 1987
- 4) Caro J, Erslev AJ : Uremic inhibitors of erythropoiesis. *Sem Nephrol* 5 : 128-132, 1985
- 5) 浦部晶夫, 高久史磨 : エリスロポエチン. 医学の歩み 127 : 592-597, 1983
- 6) 河野嘉文 : リンパ球由来液性因子の造血前駆細胞に及ぼす影響について I. 慢性腎不全患者リンパ球の赤芽球系前駆細胞成熟因子 (BPA) 分泌能の検討. *日血会誌* 52 : 831-834, 1989
- 7) 浦部晶夫 : リコンビナント・ヒト型エリスロポエチンの第一相試験および腎性貧血への応用. *日血会誌* 50 : 407, 1987
- 8) 鈴木好夫, 大坪 修 : 透析患者の貧血 IV. 輸血 臨床透析 4 : 87-90, 1988
- 9) Navarro J, Contreras P, Tourranie JL, Freyria AM, Later R, Traeger J : Are "middle molecules" responsible for toxic phenomena in chronic renal failure? *Nephron* 32 : 301-307, 1982
- 10) Meytes D, Bogin E, Ma A, Dukes PP : Effect of parathyroid hormone on erythropoiesis. *J Clin Invest* 67 : 1263-1269, 1981
- 11) Altman P, Plowman D, Marsh F, Cunningham J : Aluminium chelation therapy in dialysis patients : Evidence for inhibition of haemoglobin synthesis by low levels of aluminium. *Lancet* i : 1012-1015, 1988

- 12) Dinarello CA, Lonnemann G, Bingel M, Koch KM, Shaldon S : Biological consequences of monocyte activation during hemodialysis. *Contr Nephrol* 59 : 1-9, 1987
- 13) Mangan KF, Desforjes JF : The role of T lymphocytes and monocytes in the regulation of human erythropoietic peripheral blood burst forming units. *Exp Hematol* 8 : 717-727, 1980
- 14) Reid CDL, Bartista LC, Chanarin I : Erythroid colony growth on vitro from human peripheral blood null cells : Evidence for regulation by T lymphocytes and monocytes. *Br J Haematol* 48 : 155-164, 1981
- 15) Lonnemann G, van der Meer JWM, Cannon JG, Dinarello CA, Koch KM, Granolleras C, Desschodt G, Schldon S : Induction of tumor necrosis factor during extracorporeal blood purification. *N Engl J Med* 317 : 963, 1987
- 16) Le J, Vilcek J : Biology of disease tumor necrosis factor and interleukin 1 : Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 36 : 234-248, 1987
- 17) Guigon M, Najamn A : The inhibitors of hematopoiesis. *Int J Cell Clon* 6 : 69-75, 1988