原 著

血液透析時の好中球 superoxide anion 産生に対する セファランチンの抑制効果についての検討

横田 武彦 横田 欣也 松浦 達雄* 志和 正明**
大樹会回生病院泌尿器科 同内科* 香川成人医学研究所**

key words : 好中球 superoxide anion 産生能, セファランチン, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-8

〈要旨〉

セファランチン (Cep) の有するサイトカイン抑制作用, 活性酸素消去作用に注目し, 血液透析時の投与が末梢白血球数, 好中球 O_2^- 産生能に及ぼす効果と, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-8 との関係について検討した。

まず in vitro で 1) recombinant human $\text{TNF-}\alpha$, recombinant human IL-8 が好中球 O_2^- 産生能を濃度依存性に亢進することと, 2) Cep が zymosan 刺激による好中球 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ 産生を抑制することを確認した。

次いで臨床試験として 3) Cep 投与量を 20 mg と設定し, 透析開始時に投与。投与前, 透析開始後 15 分, 4 時間の各パラメータをみた。

末梢白血球数は 15 分で投与前の $75.9 \pm 12.8\%$ に減少し, 4 時間で 103.8% に回復していた。これは非投与群の 15 分 $76.7 \pm 5.9\%$, 4 時間 $99.7 \pm 11.2\%$ と有意差はなかった。好中球 O_2^- 産生能は非投与群の 15 分が投与前の $184.2 \pm 43.4\%$ と著明に亢進, 4 時間でも $116.3 \pm 40.0\%$ であったのに対し, 投与群では 15 分で $54.3 \pm 23.1\%$ と著明に抑制, 4 時間でも $70.2 \pm 29.3\%$ とその効果は持続していた。 $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 , $\text{IL-1}\beta$ は個々の症例によってばらつきが多く, 一定の経時的変動は確認できなかった。

以上より Cep 20 mg の静注投与では透析中の白血球数減少を抑制することはできなかったが, 透析時の好中球 O_2^- 産生を 4 時間にわたり抑制することが明らかとなった。その機序については血清 $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 , $\text{IL-1}\beta$ 値の推移からは説明できなかったが, in vitro における結果より, Cep がサイトカインによる好中球の priming 効果を抑制したものと推測された。

Suppressive effects of Cepharanthin on the production of superoxide anion by neutrophils during hemodialysis

Takehiko Yokota, Kinya Yokota, Tatsuo Matsuura*, Masaaki Shiwa**

Department of Urology and Internal Medicine*, Taijukai Kaisei Hospital; Kagawa Adults Medical Science Research Foundation**

Attention was directed to Cepharanthin's inhibitory effects on cytokines and dismutating superoxide radicals. Its effects on leukocyte counts in peripheral blood, production of superoxide anions by neutrophils and concentrations of $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and IL-8 were studied during hemodialysis.

Preliminary studies confirmed that 1) production of superoxide anions by neutrophils was enhanced by recombinant human $\text{TNF-}\alpha$ and recombinant human IL-8 and 2) zymosan-induced production of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ by neutrophils was inhibited by Cepharanthin.

At the start of hemodialysis, 20 mg of Cepharanthin was administered, and various parameters were determined before administration, and 15 min and 4 hours following administration.

Cepharanthin was not effective in preventing hemodialysis leukopenia, but did inhibit the activity of neutrophils producing superoxide anions.

The mechanism of inhibition could not be explained by the clinical data of these cytokines. But from the results of preliminary studies, it was suggested that Cepharanthin suppressed the priming effect on neutrophils which was enhanced by these cytokines.

緒言

血液が透析膜に接触すると補体が活性化されて白血球の走化性、凝集能が亢進し、肺血管内への粘着、集積がおこるため末梢血液中の白血球数が減少する。この現象はセルロース膜に顕著である¹⁾。EVAL 膜を用いた我々の成績ではこの時、好中球活性酸素産生の亢進がみられる。

ビスコクラウリン型アルカロイドであるセファランチン (Cep) は多彩な薬理学的作用を有する薬剤である。我々は Cep の有するサイトカイン抑制作用、活性酸素消去作用に注目し、透析時における本剤の投与が末梢白血球数、好中球 superoxide anion (O_2^-) 産生能に及ぼす効果と TNF- α , IL-1 β , IL-8 との関係を検討したので報告する。

対象と方法

1. TNF- α , IL-8 による好中球 O_2^- 産生刺激の確認 (in vitro)

TNF- α および IL-8 が好中球 O_2^- 産生能をどの程度刺激するかを確認するために、健康者の好中球 5×10^6 個にゼンザイム社の recombinant human TNF- α (rhTNF- α) あるいは recombinant human IL-8 (rhIL-8) を加えて 5 分間 preincubate したのち opsonized zymosan (OZ) で刺激し、FCLA 化学発光法にて好中球 O_2^- 産生能を測定した。数値は Luminescence Reader BLR-201 (アロカ社製) の最大発光強度を kcpm で示した。

2. Cep による TNF- α , IL-1 β 産生抑制効果の確認 (in vitro)

健康者の EDTA 血漿 0.9 ml に好中球 10^6 個を浮遊させ、これに zymosan 0.1 ml を加えて刺激し、1 時間後、4 時間後の TNF- α , IL-1 β 濃度を ELISA 法 (メトジェニックス社：東レ社キット使用) にて測定した。この時 zymosan を加えなかった場合と、逆に Cep をそれぞれ 10, 20, 40 μ g/ml 加えた場合の変化を検討した。

3. 臨床試験

本試験の実施に同意の得られた当院の維持透析患者を対象に、Cep 20 mg を透析開始時に静注投与し、15 分後、4 時間後の末梢血白血球数、好中球 O_2^- 産生、TNF- α , IL-1 β , IL-8 を測定し、投与前との変化をみた。 O_2^- 産生能は全血法を用い、前述の Luminescence Reader にて測定した。

表 rhTNF- α , rhIL-8 による好中球 O_2^- 産生能の変化

rhTNF- α	O_2^- 産生	rhIL-8	O_2^- 産生
0 pg/ml	136.3 kcpm	0 pg/ml	136.3 kcpm
5	391.3	15	198.6
15	407.4	20	242.7
50	484.3	60	353.6
150	541.2	120	421.7

リコンビナント TNF- α , IL-8 を加えて 5 分間プレインキュベートしたのち FCLA 化学発光法にて好中球 O_2^- 産生能を測定した。

結果

1. rhTNF- α , rhIL-8 を preincubate した場合の好中球 O_2^- 産生は濃度依存的に亢進した (表)。特に rhTNF- α は 5 pg/ml と極めて少量でも 136.3 kcpm から 391.3 kcpm へと O_2^- 産生を刺激することが分かった。

2. 好中球を zymosan で刺激したところ、IL-1 β は図 1 左側に示したように刺激前の 29.2 pg/ml から 1 時間後 128.5 pg/ml、4 時間後 245.6 pg/ml と増加し (⑤)、刺激しない場合 (①) の 1 時間後 51.1 pg/ml、4 時間後 75.8 pg/ml とは大きな差があった。これに Cep を 10 μ g/ml 加えた場合 (②) にはそれぞれ 73.2 pg/ml と 174.0 pg/ml、20 μ g/ml 加えた場合 (③) には 104.9 pg/ml と 176.1 pg/ml、40 μ g/ml 加えた場合 (④) には 97.4 pg/ml と 82.5 pg/ml となり、きれいな濃度依存的抑制とはいえないまでもその傾向はみられた。

図 1 右側の TNF- α も同様、zymosan 刺激前の 4.4 pg/ml から 1 時間後は 43.7 pg/ml、4 時間後は 123.8 pg/ml となり (⑤)、刺激しない場合の (①) 1 時間後 9.4 pg/ml、4 時間後 23.3 pg/ml とは大きな差があった。これに Cep を 10 μ g/ml 加えた場合 (②) にはそれぞれ 13.4 pg/ml と 74.0 pg/ml、20 μ g/ml 加えた場合 (③) には 24.7 pg/ml と 43.5 pg/ml、40 μ g/ml 加えた場合 (④) には 15.6 pg/ml と 53.5 pg/ml となり、やはりきれいな濃度依存的抑制とはいえないまでもその傾向はみられた。

3. 透析開始時の Cep 20 mg 投与による各パラメータの変動は以下の結果であった。

末梢血白血球数は Cep 投与群 26 例と非投与群 10 例を比較した (図 2)。非投与群は前値の $4.925 \pm 1.215/\mu$ l に対し、15 分後は $3,800 \pm 1,016/\mu$ l と前値の $76.9 \pm 5.9\%$ に減少 ($P < 0.01$)、4 時間後には $4,913 \pm 1,396/\mu$ l と前

IL-8 も症例ごとのばらつきが大きかった (図 5). 投与群 10 例の平均は前値 28.6 ± 16.1 pg/ml から 15 分後

図3 Cep投与時の好中球 O_2^- 産生能の変化 図4 Cep投与時の透析中 $TNF-\alpha$ の変動

図5 Cep投与時の透析中 IL-8 の変動

には7例が高値を示したものの 34.8 ± 21.6 pg/ml と統計学的有意の上昇ではなかった。4時間後は 33.6 ± 28.4 pg/ml であった。非投与群10例ではそれぞれ 21.2 ± 12.1 pg/ml, 19.7 ± 9.3 pg/ml, 24.3 ± 12.0 pg/ml とほとんど変動はなかった。

なお、健常者の IL-8 値は 13.1 ± 5.8 pg/ml であり、透析者の平均 ($n=20$) 27.9 ± 17.0 pg/ml の方が高値であった ($P<0.05$)。

IL-1 β は投与、非投与群とも各7例の検討である (図6)。投与群の透析前値 8.6 ± 6.9 pg/ml, 15分後 6.4 ± 11.4 pg/ml, 4時間後 2.4 ± 3.5 pg/ml に対し、非投与群では

それぞれ 7.1 ± 16.8 pg/ml, 1.4 ± 3.6 pg/ml, 3.4 ± 7.4 pg/ml であり、健常者10例の平均は 1.4 ± 2.2 pg/ml であった。測定感度が低く非投与群および健常者には測定限界以下のものが多かった。それらは 0 pg/ml として処理した。投与群に偶然測定可能例が多かったので、健常者平均値と投与群透析前値との間に有意差 ($P<0.05$) を生じたが、非投与群も含めた透析者14症例の透析前値平均値とは差がなかった。

その後、高感度のアマシャム社製キットを用いて測定したところ、測定限界以下の症例はほとんどなく、透析者群 12.9 ± 8.2 pg/ml, 健常者群 12.4 ± 6.9 pg/ml と差が

図6 Cep 投与時の透析中 IL-1 β の変動

なかった。

考案

Henderson らの interleukin 仮説以降、透析膜と血液の接触による補体の活性化と、各種サイトカインや活性酸素の役割、膜素材に関する分野での成績が次々と発表されている。特にサイトカインにおいては interleukin だけでもすでに IL-12 まで知られている²⁾。しかしその詳細については未知な部分が多々あり、cytokine network がそれを一層複雑にしている。

Cep ($C_{37}H_{36}N_2O_6$) はビスコクラウリン型アルカロイドであり、活性型のままでの尿中排泄率は 10%以下と低く、半減期は 36 時間と長い。本剤には free radical 減少作用、脂質過酸化反応抑制作用、血小板凝集抑制作用、赤血球と細胞膜の安定化作用などのほか免疫機能賦活作用、副腎皮質ホルモン分泌増強作用、マクロファージ貪食作用の促進など実に多彩な薬理作用が報告されている³⁻⁵⁾。

我々は透析中の好中球 O_2^- 産生能が亢進することを認め、第 36 回日本透析療法学会総会、第 44 回日本泌尿器科学会西日本総会などで発表してきた。今回 Cep の有するサイトカイン抑制作用、活性酸素消去作用に注目し、透析時における本剤の投与が末梢白血球数、好中球 O_2^- 産生能に及ぼす効果と、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 との関係を検討した。腎不全に対しては現在まで透析アミロイドーシスによる手根管症候群への本剤の長期大量経口投与 (1 日量 30~120 mg) の報告はあるが^{3,4)}、透析時の静注投与と活性酸素、サイトカインとの関連での報告は見当らない。

TNF- α と IL-1 β はともに炎症反応に関与するサイ

トカインで、発熱活性、肝細胞からの急性期反応物質の産生、線維芽細胞や滑膜細胞からのコラゲナーゼ、プロスタグランディンの産生誘導、血管内皮細胞からの CSF 誘導、好中球機能亢進など共通した作用を有しているが^{6,7)}、IL-1 β には好中球 O_2^- 産生増強作用はない⁸⁾。

一方、塩基性の低分子蛋白 (~8kDa) である IL-8 はマイトーゲン、IL-1、TNF などの刺激で単球、線維芽細胞、血管内皮細胞、角化細胞で産生される白血球走化性因子で、好中球や T-cell の走化性を亢進し⁹⁾、好中球から早期に O_2^- 産生を誘導する⁸⁾。また好中球細胞内遊離 Ca^{++} の上昇と細胞膜電位変化 (脱分極反応) も誘導する。これらの作用は低分子の炎症メディエーターである FMLP、PAF、 C_{5a} に極めて類似している⁸⁾。

これらのことを念頭に置いて、まず TNF- α 、IL-8 が好中球 O_2^- 産生をどの程度刺激するかをみるために in vitro で rhTNF- α 、rhIL-8 を好中球と preincubate したところ、いずれもごく低濃度で OZ 刺激 FCLA 化学発光法での O_2^- 産生が著明に亢進した。TNF- α 、IL-8 が好中球から O_2^- を直接誘導するためには相当高濃度が必要といわれている。特に IL-8 の O_2^- 産生能は TNF- α のそれに比して非常に弱いとされている⁹⁾にもかかわらずこの試験での O_2^- 産生が亢進していたのは、priming 効果¹⁰⁾ (前処置によって好中球表面の receptor に変化が生じ、少しの刺激にも O_2^- 産生能、細胞膜電位変化が著明に亢進する現象) によるものと思われる。我々の成績では Herbelin ら¹¹⁾佐藤ら¹²⁾と同様、透析患者はこの priming 効果を呈するに足る血中 TNF- α 、IL-8 濃度を示していることから、常に酸化的ストレスに晒されているといえる。

つぎに Cep が zymosan 刺激を受けた好中球の IL-1 β 、TNF- α 産生を抑制し得るか否かを in vitro で検討したところ、安田ら¹³⁾の結果ほどきれいな濃度依存性とはいえなかったが抑制効果は明らかに認められた。

以上の結果から我々は、透析時にみられる leukopenia や好中球 O_2^- 産生亢進にはサイトカイン、特に炎症性メディエーターである TNF- α 、IL-8、IL-1 β が深く関わっており、これらの働きを Cep で抑制することによって leukopenia や O_2^- 産生を抑えることができる、との仮説を立てて検討してきた。しかし透析開始時に Cep 20 mg を静注投与した程度では leukopenia は抑えられず、また好中球の O_2^- 産生は抑制できたもののそれを証明するだけの血清 TNF- α 、IL-8、IL-1 β 値の変動はみられなかった。

古賀ら¹⁴⁾はラットに 5 mg/kg のエンドトキシンを投与して補体を活性化することによって白血球凝集を引き起こし、その結果みられる末梢血白血球減少を 10 mg/

kg の Cep がどの程度抑制し得るかを検討したが、Cep 単独では全く抑制できなかった。しかしヘパリンとの併用によって有意に減少抑制効果を認めている。我々の試験でも透析中はヘパリンを使用しているので、刺激方法は異なるものの類似した条件と思われ、投与量をもっと増やせば異なる結果が得られたかも知れない。ただし Cep は半減期の長い薬剤なので腎不全患者にどの程度まで増量投与できるのかももう少し基礎的研究が必要であろう。

Cep による多核白血球の O_2^- 産生抑制効果については多くの報告があり、我々もそれを確認した。その機序に関しては主に O_2^- 産生そのものの抑制説^{13,15)}とスカベンジャー説¹⁶⁾とがある。また、我々の in vitro の成績では高橋ら³⁾、二木ら⁴⁾の実験成績と同様、Cep がある濃度範囲以内で $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ の産生をほぼ濃度依存性に抑制するという結果が得られている。従って臨床試験においては Cep が $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$ の濃度に変化を起こさせるほどの効果は示さなかったが、サイトカインの好中球に対する priming 効果には十分に抑制的に作用し、その結果として透析時に亢進する好中球 O_2^- 産生を抑制し得たものと推測された。

結論

1. 好中球をごく少量の rhTNF- α 、rhIL-8 と preincubate すると OZ 刺激 FCLA 化学発光法での O_2^- 産生が著明に亢進したが、これは priming 効果によるものと思われた。

2. Cep には in vitro で好中球 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 産生抑制作用がみられた。

3. Cep 20 mg を透析直前に静注投与しても、hemodialysis leukopenia を抑制できなかった。

4. 一方、同量で透析時の好中球 O_2^- 産生は著明に抑制できたが、血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$ 濃度の変動からは説明できなかった。

5. Cep がこれらサイトカインの priming 効果に対し抑制的に作用したことが透析時に亢進する好中球 O_2^- 産生を抑制したものと推測された。

本論文の要旨は第 35 回日本腎臓学会総会で発表した。

文献

- 中西 功：補体系の異常。腎と透析 29：191-196, 1990
- 宮坂信之：透析療法とサイトカイン。透析会誌 25：1301-1305, 1992
- 高橋 寿，鈴木一之，下田 明：手根管症候群患者に対するセファランチン大量投与の有効性とその作用機序への一考察。透析会誌 25：256-259, 1992
- 二木 源，田熊淑男，黒沢孝成，鈴木一之，堀田 修，松原光伸，石崎 允，高橋 寿：透析アミロイドシスによる手根管症候群患者へのセファランチン大量投与の試み。新薬と臨床 39：789-794, 1990
- 山崎 昇：生体膜障害とフリーラジカル。第 16 回アルカロイド研究会報告集 p 3-10, 1990
- 笠倉新平：炎症とサイトカイン。炎症 10：9-16, 1990
- 宮坂信之：サイトカインと臨床。腎不全 2：7-14, 1990
- 湯尾 明：炎症とサイトカイン。臨床医 17：2026-2029, 1991
- 松島綱治：IL1 と TNF によって誘導される新しいサイトカイン；IL-8。Medicai Immunology 18：9-16, 1989
- 住本英樹，竹重公一朗，水上茂樹：好中球の superoxide 生成。フリーラジカルの臨床 1：15-23, 1987
- Herbelin A, Nguyen T, Zingraff J, Urena P, Descamps-Latscha B：Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor α . Kidney Int 37：116-125, 1990
- 佐藤元美，小川洋史，小野正孝，外山幹樹，斉藤 明，小谷博子：維持血液透析患者における O_2^- 産生と $IL-1\beta$ 産生との関連について。腎と透析別冊 p 167-170, 1990
- 安田光徳，吉川敏一，内藤裕二，吉田憲正，高野裕久，田崎直宏，杉野 成，近藤元治：セファランチンのスーパーオキシド (O_2^-) 産生系に及ぼす影響について。臨床薬理 20：155-156, 1989
- 古賀 震，岡嶋研二，井上正康，岡部紘明，高月 清：Endotoxin 投与による白血球減少と血液凝固障害に対するセファランチン (Ceph.) の効果。第 14 回アルカロイド研究会報告集 p 73-76, 1988
- 鈴木真理子，佐藤静生，田崎理子，沢村大輔，野村和夫，橋本 功，帷子康雄：多核白血球の活性酸素産生におよぼす Cepharanthin の効果。西日皮膚 48：278-283, 1986
- Akamatsu H, Komura J, Asada Y, Niwa Y：Effects of cepharanthin on neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and reactive oxygen species generation. J Dermatology 18：643-648, 1991

3) 高橋 寿，鈴木一之，下田 明：手根管症候群患者