原 著

透析膜による好中球活性化に対する抗凝固剤
FUT-175 の抑制効果

内藤 毅郎 太田 博真 小林 健一 横山 仁*
友杉 直久* 高 昌 利一*
金沢大学血液浄化療法部 同第1内科*

key words : 血液透析, 好中球活性化, 活性酸素, 化学発光法, FUT-175

〈要旨〉

透析膜による好中球活性化に与える抗凝固剤 FUT-175 の効果について, 血液透析患者 6 例を対象に化学発光法 (chemiluminescence : CL) を用いて検討した。FUT-175 (50 mg+40 mg/hr) ないしヘパリン (2,000 u+1,000 u/hr) を用いた透析開始前, 15, 60 および 180 分後に静脈側回路内より採血し, 好中球を分離した。この好中球を phorbol myristate acetate (PMA) で刺激後, ルミノール依存性化学発光 (Lu-CL) をルミネッセンスリーダーにて測定し, 好中球 1×10^6 個あたりの最大発光値 (CL index) を活性酸素産生能とした。ヘパリン使用時の CL index は, 透析開始後 15 分で透析開始前値の $132 \pm 13\%$, 60 分で $165 \pm 20\%$ に上昇し, 180 分で $99 \pm 9\%$ と前値に復したが, FUT-175 使用時には各々 98 ± 14 , 96 ± 8 , $103 \pm 8\%$ と不変であった。なお透析入口部での FUT-175 の血中濃度は透析中 10^{-5} - 10^{-6} M であった。次に, 健康成人 5 例より得た好中球を PMA あるいは formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) で刺激した後のウミホタル・ルシフェリン誘導体 Cypridina luciferin analog (CLA) 依存性化学発光に与える FUT-175 添加の影響を検討した。PMA 刺激後の CL index は 10^{-4} - 10^{-7} M の各濃度の FUT-175 添加によっても不変であったが, fMLP 刺激後の CL index は 10^{-5} M の FUT-175 添加で 24.5 ± 1.3 kcpm, 10^{-4} M 添加で 9.9 ± 1.0 kcpm とコントロールの 35.0 ± 7.5 kcpm に比べともに有意に減少した。以上より, FUT-175 は臨床的使用濃度で透析膜による好中球活性化を抑制することが明らかとなった。また, この抑制効果は好中球細胞膜上のレセプターの活性化抑制による可能性が示唆される。

Inhibitory effect of serine protease inhibitor FUT-175 on neutrophil activation by dialysis membranes

Takero Naito, Hiromichi Ohta, Ken-ichi Kobayashi, Hitoshi Yokoyama*, Naohisa Tomosugi*, Toshikazu Takabatake*

Division of Blood Purification, First Department of Internal Medicine*, Kanazawa University

In order to clarify the effects of serine protease inhibitor FUT-175 on neutrophil activation by dialysis membranes, luminol-enhanced chemiluminescence (Lu-CL) after stimulation of dialysed polymorphonuclear neutrophils (PMN) by phorbol myristate acetate (PMA) was studied in 6 chronic hemodialysis (HD) patients. In HD with heparin (2,000 u+1,000 u/hr) as an anticoagulant, Lu-CL was increased to 132 ± 13 , $165 \pm 20\%$ of the control after 15 and 60 min of HD, respectively. On the other hand, Lu-CL remained unchanged with FUT-175 (50 mg+40 mg/hr), indicating that FUT-175 inhibited neutrophil activation by dialysis membranes during HD. The serum FUT-175 concentration at the inlet side of the dialyzer was maintained in a range of 10^{-5} - 10^{-6} M. Furthermore, as a parameter of superoxide anion (O_2^-) production, Cypridina luciferin analog (CLA)-enhanced CL (CLA-CL) was measured after stimulation of PMN from 5 healthy volunteers with either PMA or formyl-Met-Leu-Phe (fMLP). CLA-CL did not change with the addition of FUT-175 (10^{-4} - 10^{-7} M) after the stimulation with PMA,

内藤 毅郎 金沢大学血液浄化療法部 〒920 金沢市宝町 13-1 (0762-62-8151)

[受付: 平成 4 年 8 月 3 日, 受理: 平成 5 年 2 月 24 日]

but after the stimulation with fMLP, CLA-CL was 24.5 ± 1.3 , 9.9 ± 1.0 kcpm with FUT-175 at concentrations of 10^{-4} and 10^{-5} M, respectively, both of which were lower than in controls, 35.0 ± 7.5 kcpm. These results suggest that FUT-175 inhibits PMN activation by dialysis membranes during HD, and that this inhibitory effect is mediated not by the inhibition of protein kinase C, but by inhibiting the activation of an fMLP-sensitive receptor on PMN by dialysis membranes.

緒言

近年、血液透析療法を中心とする腎不全治療の進歩に伴い長期透析患者が増加し、患者の生命予後のみならず quality of life (QOL) の改善が透析医療の大きな課題となっている。透析患者の QOL を低下させる要因として、腎性骨異常栄養症に伴う骨関節痛や貧血に基づく諸症状に加えて動脈硬化の急速な進展や透析アミロイドーシスの関与が指摘されている。これらの合併症の成因は必ずしも明らかではないが、透析療法自体が関与する可能性も指摘されており、その際のメディエーターとして透析膜の刺激により好中球より産生放出される活性酸素が注目されている¹⁻⁴⁾。

好中球は細菌などの病原微生物の刺激により活性化され、活性酸素、蛋白分解酵素などを産生し、生体を防御する。しかし一方では、細胞外に放出された活性酸素が血管内皮細胞を傷害し、細胞膜脂質の過酸化による過酸化脂質の形成を介して動脈硬化の進展に関与すると考えられている。したがって血液透析の度ごとに好中球が活性化され活性酸素が細胞外に放出されるとすれば、慢性透析患者の透析回数を考えると生体に多大の悪影響をもたらすことが懸念される。

好中球の活性化機構、すなわち種々の刺激により活性酸素が産生される機構についてはいまだ不明の点が多い。しかし、サイトカラシンや formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) などの好中球に対する superoxide anion (O_2^-) 産生促進作用が⁵⁾, phenylmethylsulfonyl fluoride などのセリン蛋白分解酵素阻害剤によって抑制されると報告されており^{6,9)}, 蛋白分解酵素が好中球の活性化に重要な役割をもつことが考えられる。

FUT-175 (6-amidino-2-naphtyl-4-guanidino-benzoate dimethanesulfonate; 一般名 nafamostat mesilate) はセリン蛋白分解酵素阻害剤の一種であり^{7,8)}, 血液浄化療法においては体外循環時の抗凝固剤として用いられ、ヘパリンに比べ血中半減期が短いことから術後あるいは出血性合併症を有する症例に用いられている。この FUT-175 の好中球における O_2^- 産生に対する効果については動物実験では抑制するとの報告がある⁹⁾—一方で、ヒトでは抑制しないとの報告もあり¹⁰⁾, いまだ一定の見解はえられていない。また透析膜の好中球 O_2^- 産生刺激に与える影響については検討されてい

い。

そこで今回、慢性透析患者において臨床的に使用される濃度域の FUT-175 によって透析膜による好中球活性化が抑制されるか否かを化学発光法 (Chemiluminescence: CL) により *ex vivo* で検討するとともに、FUT-175 による抑制の機序についても *in vitro* で検討した。

対象および方法

1. 臨床例における検討

当院で維持血液透析療法をうけている慢性腎不全患者 6 例(男性 3 例, 女性 3 例, 年齢 38~72 歳, 平均 59 歳, 透析歴 2 か月~19 年, 平均 9 年 4 か月)を対象とした。腎不全の原因疾患は慢性糸球体腎炎が 4 例, 糖尿病性腎症および嚢胞腎が各 1 例であり、いずれの症例においても活動性の感染症, 悪性腫瘍あるいは慢性関節リウマチの合併は認められなかった。これらの症例に対し、抗凝固剤としてヘパリン (透析開始時 2,000 単位, 以後時間あたり 1,000 単位持続注入) あるいは FUT-175 (透析開始時 50 mg, 以後時間あたり 40 mg 持続注入) を使用し、血流量 150~200 ml/min で 4~6 時間の血液透析を行った。使用した透析器はいずれも膜面積が 0.9~1.3 m² の中空糸型透析器であり、膜素材はポリメチルメタクリレート (PMMA) が 2 例, キュプロアンモニウムレーヨン (Cu), セルローストリアセテート (CTA), ポリアクリロニトリル (PAN), ポリスルホン (PS) が各 1 例で、今回の検討中各症例で同一膜を使用した。透析開始前および開始後 15 分, 60 分, 180 分に回路静脈側から 2.5 ml 採血し、直ちに 6%デキストラン 0.8 ml と混和後 30 分間室温で静置して赤血球を沈降させた。得られた上清 1 ml を Ca^{++} および Mg^{++} を含まない Hanks' 液 (HBSS-Ca, Mg) 2 ml と混和して、この混合液 0.5 ml を 37°C, 30 分間 incubate した後、ルミノール依存性化学発光 (Lu-CL) をルミネッセンスリーダー (BLR-301, アロカ社) を用いて、以下の要領で測定した。すなわち、ルミノール溶液 10 μ l 添加と同時に化学発光強度の測定を開始し、測定開始 5 分後に刺激剤として phorbol myristate acetate (PMA) 10 μ l を添加 (測定試料中の最終濃度 40 ng/ml), 以後測定開始から 60 分間, 1 秒間隔で連続的に Lu-CL を測定した。これにより得られた発光強度曲線より、図 1 のごとく発光最大値から PMA 添加前のコントロール値を引いた最大発光強度 (CL

図1 Chemiluminescence (CL) pattern

max) を算出し、これを好中球 1×10^6 個あたりに換算した値 (CL index) をもって活性酸素産生能とした。加えて、FUT-175 の血中濃度を測定するため上記の採血時間に透析器入口部で、また透析開始 60 分後には透析器出口部でも採血を行い、FUT-175 の血清中濃度を HPLC 法により測定した。

2. 健康人白血球を用いた基礎的検討

健康成人 5 例 (男性 4 例, 女性 1 例, 年齢 24~38 歳, 平均 28.6 歳) より採取したヘパリン加静脈血 3.5 ml を、Ficoll-Hypaque (Monoply resolving medium, ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, USA) 3 ml 上に重層した後、300 G で 30 分間遠心し、多形核白血球を含む層を分離した。HBSS-Ca, Mg 2 ml と混和後さらに 250 G で 10 分間遠心して好中球を分離した。この方法により分離された細胞の約 96~99% が好中球であった。得られた好中球は化学発光測定まで HBSS-Ca, Mg 3 ml と混和し、4℃で保存した。化学発光はこの好中球浮遊液 0.5 ml に、測定試料中の最終濃度が 10^{-4} – 10^{-7} M になるように各濃度の FUT-175 を 50 μ l、あるいはコントロールとして同量の 5% グルコースを加えた後 37℃で 30 分間 incubate し、ウミホタル・ルシフェリン誘導体 Cypridina luciferin analog (CLA ; 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihy-

droimidazo [1, 2-a] pyrazin-3-one, 東京化成工業) 10 μ l を添加 (最終濃度 10^{-6} M) すると同時に、上記と同様に CLA 依存性化学発光 (CLA-CL) をルミネッセンスリーダーを用いて、1 秒間隔で 20 分間連続的に測定した¹¹⁾。この際、測定開始 5 分後に、好中球の刺激剤として PMA 10 μ l (最終濃度 40 ng/ml) あるいは formyl-Met-Leu-Phe (fMLP, 最終濃度 10^{-6} M) を加えた。こうして得られた CLA-CL 曲線より上記と同様に CL index を算出し、これを好中球の O_2^- 産生能として評価した。なお、今回の研究で測定に用いられた各試料中の好中球数は 1.0×10^5 – 5.0×10^6 個であった。CLA-CL の測定においては試料中に含まれる多形核白血球数が 1×10^6 個以下では化学発光強度と細胞数との間に直線関係が成立すると報告されている¹²⁾。

3. 実験データの推計処理

成績は平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、得られたデータの有意差判定には t 検定を用い、p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

結果

1. 臨床例における検討

全例において Lu-CL は PMA 添加前は低値であったが、PMA 添加直後より急速に増加し、約 20~30 分で最大値となった (図 1)。CL index は透析開始前で平均 7.2 ± 1.8 kcpm であった。ヘパリンを使用した時の CL index は透析開始前値に比し 15 分で $132 \pm 13\%$ 、60 分で $165 \pm 20\%$ に上昇したが、180 分で $99 \pm 9\%$ と前値に復した。一方、FUT-175 用いた透析時の CL index は、透析開始後 15 分、60 分、180 分で各々透析開始前値の 98 ± 14 、 96 ± 8 、 $103 \pm 8\%$ と変化は認められず、かつ透析開始後 15 分、60 分におけるヘパリン使用時の CL index の増加は FUT-175 使用時に比し大であった (図 2)。なお FUT-175 の血中濃度は、透析器入口部では透析開始後 15、60、180 分で各々 $3,445 \pm 571$ 、 $3,062 \pm 376$ 、 $2,458 \pm 450$ ng/ml であり、また透析開始後 60 分の透析器出口部での血中濃度は $1,427 \pm 289$ ng/ml であった (図 3)。

2. 健康人白血球を用いた基礎的検討

健康人の白血球を用いた *in vitro* の検討では、PMA 刺激後の CL index は 10^{-4} – 10^{-7} M の各濃度の FUT-175 でコントロール値と比べ差はなかった (図 4)。これに対し、fMLP 刺激後の CL index は 10^{-5} M の FUT-175 で 24.5 ± 1.3 kcpm とコントロールの 35.0 ± 7.5 kcpm に比べ減少し ($p < 0.05$)、 10^{-4} M では 9.9 ± 1.0 kcpm とさらに著明に低下していた ($p < 0.01$)。すなわち 10^{-5} M 以上の FUT-175 により、fMLP 刺激後の好中球の O_2^- 産生が抑制された。

図 2 Time course of luminol-enhanced CL index from PMA-stimulated dialysed PMN during hemodialysis (mean $\pm$ SE, * heparin vs. FUT-175, $p < 0.05$).

図 3 Serum FUT-175 concentration during hemodialysis (mean $\pm$ SE).

図 4 Influence of FUT-175 on (a) PMA-or (b) fMLP-stimulated PMN O_2^- production in vitro (mean $\pm$ SE, * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

考察

血液透析中に好中球の活性酸素産生能が増加することはすでに報告されている¹³⁾が、今回の検討によって、抗凝固剤としてヘパリンを使用した場合透析膜の刺激により好中球が活性化され、活性酸素産生能が増加することが確認された。PMA 添加前には Lu-CL の増大がみられなかったことは、透析膜による好中球に対する刺激がそ

れ自体は活性酸素の産生放出を惹起するものではなく、他の刺激に対する反応性を増大させること、すなわち好中球の priming 現象をもたらすことを示唆している。西川らは PMMA 膜を用いた検討で活性酸素産生能の増大は透析開始後 15 分で最大となり以後次第に減少したと報告している。今回我々の検討で透析開始後 60 分で最大となったが、この時間的経過に差異を生じた理由につい

ては不明であるが、あるいは使用した透析膜素材の違いに起因するのかもしれない。

本研究で使用した透析膜は多種にわたり、かつそれぞれの症例数が少ないため、各透析膜による好中球刺激作用に差異があるか否かについて比較検討することは困難であった。好中球活性化の指標の一つである顆粒球エラスターゼの透析後の上昇率は透析膜の素材により異なると報告されており¹⁴⁾、今後各種の透析膜素材別に好中球活性酸素産生能を検討し、かつ末梢血白血球数・補体などを含め他の生体適合性マーカーとの比較検討が必要と考えられる。

今回、透析膜による好中球の活性酸素産生能の増大が FUT-175 より抑制されることが初めて示された。吉田らはヒト多形核白血球を用いて、オプソニン化ザイモザン刺激後の好中球 O_2^- 産生に与える各種の蛋白分解酵素阻害剤の影響を検討し、 10^{-6} – 10^{-8} M 濃度の FUT-175 添加によっては活性酸素産生能は抑制されなかったと報告している¹⁰⁾。一方、織田らは 10^{-5} – 10^{-6} M 濃度の FUT-175 が NADH 存在下の concanavalin A ならびに cytochalasin B によるラット多形核白血球の活性酸素産生を濃度依存的に抑制したと報告し⁹⁾、FUT-175 の抑制効果については使用濃度ならびに刺激剤の種類によって異なるものと考えられる。今回、血液透析施行中の透析器内での FUT-175 の血中濃度はほぼ 10^{-5} – 10^{-6} M で推移しており、これは秋沢らの報告¹⁵⁾と同様であった。FUT-175 はこの濃度域で透析膜の刺激による好中球活性化を抑制するものと考えられる。

さらに健常人白血球を用いた検討で、上記の FUT-175 による好中球活性化抑制作用は好中球に対する刺激剤の種類によって異なることが判明した。PMA は好中球の活性酸素産生に関する情報伝達の second messenger であるとされる diacyl glycerol の構造的アナログであり、protein kinase C を活性化することにより活性酸素産生を促すとされている¹⁶⁾。一方、fMLP は好中球細胞膜上のレセプターを活性化するとされるが¹⁷⁾、FUT-175 はこの fMLP による活性酸素産生を抑制する一方で PMA による作用は抑制しなかったことから、好中球細胞膜上のレセプターの活性化を抑制する作用をもつことが示唆される。

前述したように臨床例では 10^{-5} – 10^{-6} M の血中濃度でほぼ完全に活性酸素産生能の増大を抑制したが、*in vitro* の検討では FUT-175 による fMLP 刺激後の活性酸素産生抑制率は 10^{-5} M で約 30%、 10^{-4} M では約 70%であった。両者で抑制効果の程度が異った原因については、まず第一に透析膜による刺激と 10^{-6} M の fMLP による刺激とはその程度が同等でないこと、つぎに臨床例では

血漿蛋白質により透析膜表面が被覆化され直接的な刺激が弱まる可能性があること⁴⁾、さらには今回透析開始時に 50 mg の FUT-175 を one shot で注入したため透析開始直後の FUT-175 濃度は透析開始 15 分後での測定値よりさらに高濃度であった可能性があることが考えられる。

近年、好中球活性化による活性酸素産生が慢性血液透析患者における動脈硬化症の進展や透析アミロイドシスの発症に関連するものとして注目されている^{18,19)}。透析膜による好中球の活性化が血液透析の度ごとに起こることは、体内に灌流される血液を介した細胞膜障害、とりわけ血管内皮細胞障害の原因となりうる点で重要と考えられる。今回の成績はこのような生体にとって好ましからざる影響が、抗凝固剤として使用されている FUT-175 によって抑制・防止され、血液透析患者の長期生存ならびに QOL の改善に寄与する可能性を示すものと考えられる。いずれにせよ今後透析膜の生体適合性については、抗凝固剤の影響をも考慮した上で、長期的に観察・評価する必要があるものと考えられる。

結論

FUT-175 は臨床的に使用される濃度で、透析膜による好中球活性化を抑制することが *ex vivo* による検討から明らかとなった。また、*in vitro* の検討からこうした抑制効果は好中球細胞膜上のレセプターの活性化抑制によることが示唆された。

文献

- 1) Maher ER, Wickens DG, Griffin JFA, Kyle P, Curtis JR, Dormandy TL : Increased free-radical activity during haemodialysis? Nephrol Dial Transplant 2 : 169-171, 1987
- 2) Maher ER, Wickens DG, Griffin JFA, Kyle P, Curtis JR, Dormandy TL : Neutropenia and plasma free radical reaction products during haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 3 : 277-283, 1988
- 3) Kuwahara T, Markert M, Wauters JP : Neutrophil oxygen radical production by dialysis membranes. Nephrol Dial Transplant 3 : 661-665, 1988
- 4) 増子早苗, 早坂俊太郎, 内田隆史, 丹沢 宏 : 医用材料とヒト好中球の接触による活性酸素放出の測定. 人工臓器 18 : 63-66, 1989
- 5) Kitagawa S, Takaku F, Sakamoto S : Possible involvement of proteases in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes. FEBS letters 99 : 275-278, 1979

- 6) Kitagawa S, Takaku F, Sakamoto S: Serine protease inhibitors inhibit superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes stimulated by various surface active agents. *FEBS letters* 107: 331-334, 1979
- 7) Ikari N, Sakai Y, Hitomi Y, Fujii S: New synthetic inhibitor to the alternative complement pathway. *Immunology* 49: 685-691, 1983
- 8) 越山良子, 尾関正之, 元吉明美, 藤田允信, 岩城正廣, 青山卓夫: FUT-175 (Nafamostat mesilate) の薬理学的研究 IV. 血液凝固系, 血小板, 線溶系に対する作用. *日薬理誌* 84: 417-428, 1984
- 9) 織田 実, 荻原まどか, 佐藤拓夫, 来海正輝, 岩城正廣: Nafamostat mesilate (FUT-175) のラット多形核白血球におけるスーパーオキシド (O_2^-) 産生抑制作用. *日薬理誌* 87: 521-526, 1986
- 10) 吉田憲正, 吉川敏一, 谷川 徹, 宮川晴雄, 杉野 成, 近藤元治: ヒト多形核白血球ウミホタルルシフェリン誘導体-依存性化学発光に対するプロテアーゼインヒビターの影響. *医学のあゆみ* 140: 765-766, 1987
- 11) Nakano M, Sugioka K, Ushijima Y, Goto T: Chemiluminescence probe with Cypridina luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo [1, 2-a] pyrazin-3-one, for estimating the ability of human granulocytes to generate O_2^- . *Analyt Biochem* 159: 363-369, 1986
- 12) 西田 朗: 白血球の O_2^- 産生能の測定, 活性酸素と発光(中野 稔, 吉川敏一編), p107-112, 日本医学館, 東京, 1990
- 13) 西川 恵, 佐中 孜, 佐藤孝子, 小俣正子, 樋口千恵子, 大岡弘之, 佐々木優里, 久保和雄, 早坂勇太郎, 二瓶 宏, 杉野信博: 透析中の oxygen metabolite をもつ好中球の増加について. *腎不全* 1: 75-80, 1989
- 14) 吉田 哲: 新しい生体適合性マーカーとしての顆粒球エラスターゼ. *人工臓器* 15: 1849-1856, 1986
- 15) 秋沢忠雄, 越川昭三, 岩本里美, 畔取政行, 小松信三: 血液透析における透析用抗凝固薬 FUT-175 およびその代謝物の動態. *腎と透析* 26: 145-151, 1989
- 16) Winterbourn CC: Neutrophil oxidants: production and reaction. In "Oxygen radicals: systemic events and disease processes." ed Das DK, Essman WB, p31-70, Basel, Karger, 1990
- 17) 内海耕造, 佐藤英介, 秋丸国広, 内海俊彦: 白血球の活性化と活性酸素種の生成機構. *SOD 基礎と臨床* (谷口直之, 勝部幸輝, 浅田浩二, 井上正康編), p 103-109, メディカルトリビューン社, 東京, 1992
- 18) 佐中 孜: 活性酸素仮説. (第 35 回日本透析療法学会教育講演 2) *透析会誌* 24: 283-287, 1991
- 19) 甲田 豊, 久保義広, 国井良彦, 湯浅保子, 酒井信治, 鈴木正司, 高橋幸雄, 平沢由平, 中島基雄: 透析アミロイド症患者の過酸化状態と白血球の関連について. *腎と透析別冊 透析アミロイド症はどこまで解明できたか*: 24-27, 1989