Endotoxin fragments あるいは cytokine-inducing substances の high-flux 膜ダイアライザー通過に関する基礎的研究

横田 眞二 熊野 和雄 酒井 糾 南部 正人*
北里大学泌尿器科 北里大学病院腎センター*

key words : endotoxin fragments, cytokine-inducing substances, high-flux membrane dialyzers, monocytes, cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF α)

〈要旨〉

Endotoxin (ET) フラグメントあるいは cytokine-inducing substances (CIS, サイトカイン誘導物質) が high-flux 膜ダイアライザーを生物活性を有した形で通過し、末梢血単球を刺激するかどうかについて in vitro での基礎的検討を行った。

透析液供給システム内重炭酸ソーダ原液タンクより分離同定された *Pseudomonas (P.) aeruginosa* 臨床株を用いて、ET 濃度 621 pg/ml, 100 ng/ml, 8.92 μ g/ml の ET 汚染培養液を準備した。臨床環境で生じ得るような ET 汚染濃度 (621 pg/ml) 培養液については、3種類の high-flux 膜ダイアライザー (EVAL, PAN, PMMA) 内を灌流させ、backfiltrate を採取。高濃度 (100 ng/ml および 8.92 μ g/ml) ET 汚染培養液については、PAN 膜ダイアライザーからの backfiltrate を用いて、単球からのサイトカイン (IL-1 β , IL-6 と TNF α) 産生刺激を測定した。ET 濃度 621 pg/ml の培養液では、どの種のダイアライザーからの backfiltrate においても単球サイトカイン産生亢進は起こらなかったし、ET 濃度 100 ng/ml 培養液の PAN 膜ダイアライザーからの backfiltrate においても、サイトカイン産生刺激は認められなかった。極端な高濃度 (8.92 μ g/ml) ET 汚染液の PAN 膜ダイアライザーからの backfiltrate では、有意に単球からのサイトカイン産生を亢進させており、何らかの CIS が high-flux membrane を通過していることが証明された。

一方、末梢血の体外循環回路 (PAN 膜ダイアライザー) との接触だけでは、単球からのサイトカイン産生亢進は認められなかった。また、活性化補体成分でアナフィラトキシンである C5a (100 ng/ml) の存在だけでは、単球サイトカイン産生亢進を生じないが、lipopolysaccharide (LPS) との共存下で、サイトカイン産生が相乗的に刺激された。

今回の in vitro での基礎的検討からは、臨床の現場では起こり得ないような ET 汚染 (μ g/ml 以上の高濃度) の場合に限って CIS が PAN 膜ダイアライザーを通過することが証明されたが、実際の臨床の場で想定される ET 汚染 (600 pg/ml~100 ng/ml) の場合には、CIS が透析膜を通過していることは証明されなかった。透析液の浄化がどの程度必要なのか、再検討の余地があると思われる。

The transfer of cytokine-inducing substances across high-flux membrane dialyzers

Shinji Yokota, Kazuo Kumano, Tadasu Sakai, Masato Nanbu*

Department of Urology, School of Medicine, Kitasato University ; Kidney Center, Kitasato University Hospital*

The transfer of cytokine-inducing substances (CIS) or endotoxin (ET) fragments across high-flux membrane (EVAL, PAN, and PMMA) dialyzers was studied using culture media contaminated with *Pseudomonas aeruginosa* isolated from our dialysate delivery system. Production of cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF α) by peripheral blood monocytes was assayed during subsequent 20-hour culture in backfiltrate media prepared with selected high-flux membrane dialyzers. No penetration of CIS across high-flux membrane dialyzers was seen when culture media

containing clinically relevant or even higher concentrations of ET (621 pg/ml~100 ng/ml) were used as a challenge. Transfer of CIS was clearly demonstrated, however, only when a culture medium with irrelevant ET (8.92 μ g/ml) contamination was used as the challenge.

In another series of experiments, cytokine production by monocytes was studied before and after simple extracorporeal recirculation of whole blood for 3 hours, using a polyacrylonitrile (PAN) hollow-fiber high-flux hemodialyzer to see whether or not the ex vivo circulation itself might play some role as a cytokine-inducer. No change in cytokine production was seen before or after the extracorporeal circulation. The effect of C5a was also examined in terms of cytokine induction. No cytokine induction was demonstrated in the presence of C5a (100 ng/ml) alone, but C5a had a significant effect in terms of producing more cytokines when incubated with LPS.

The results show that the penetration of CIS across dialyzer membranes may be restricted to extreme situations such as clinically irrelevant ET contamination (μ g/ml range). Furthermore, C5a may act as a primer to stimulate cytokine production in the presence of ET, but neither extracorporeal circulation alone nor C5a itself seems to be enough to induce cytokine production and release from monocytes.

緒言および目的

血液透析患者における長期合併症として、透析アミロイドーシスによる骨関節症、手根管症候群などが、臨床問題となってきた。透析アミロイドーシスの原因物質は、 β_2 -microglobulin (β_2 -MG) であることがわかっており、腎不全による β_2 -MG の異常蓄積が発症の一因となっていると思われる¹⁾。 β_2 -MG の除去が可能なダイアライザーとして、high-flux 膜ダイアライザーの使用が普及してきている。さらに、酢酸バッファー透析液の代わりに、ブドウ糖添加の重炭酸バッファー透析液供給システムが一般化してくるとともに、透析液中での細菌増殖による endotoxin (ET) 汚染の問題が深刻化してきた²⁾。理論上は分子量 20,000 ダルトン程度の ET フラグメントや細菌由来の何らかの cytokine-inducing substances (CIS) が、逆拡散³⁾/逆濾過⁴⁾という現象を介して high-flux 膜ダイアライザーを通過して透析患者血中に侵入し、マクロファージや単球が刺激されて、IL-1 β , IL-6, TNF α など種々のモノカインあるいはサイトカイン産生を亢進させ、透析合併症の病因となっている可能性が指摘されてきた。このような仮説は、Henderson ら⁵⁾ (1983) によって“interleukin-1 hypothesis”として提出され、現在では一般に“monokine hypothesis”として知られているものである。

実際問題として、透析液供給システム内では、*Pseudomonas* 属を中心としたグラム陰性水生菌による汚染が起こっており⁶⁾、それらの細菌の細胞壁外膜に由来する ET およびそのフラグメント、あるいは exotoxins や muramyl peptides などが CIS としての生物活性を持つことが知られている²⁾。しかしながら、これらの ET フラグメントあるいは CIS が、実際の臨床血液透析の場において透析膜を通過し、生体内でのサイトカイン産生を亢進しているかどうかについては、方法論の相違

や実験デザインの違い等で解釈が定まらず、未だ議論のあるところである。

そこで、我々は末梢血単球培養によるサイトカイン産生能を指標としたバイオアッセイ系を用いて、ET 汚染培養液の high-flux 膜ダイアライザーからの back-filtrate 中に単球を刺激する CIS が存在するかどうかを観察し、細菌汚染の存在する培養液から、生物活性を持つ ET フラグメントあるいは CIS がダイアライザー膜を通過しているかどうかを検討した。また、他の単球刺激の原因となり得る血液透析体外循環回路 (含ダイアライザー) との接触、あるいは活性化補体 (C5a) の単球サイトカイン産生能に及ぼす影響を検討したので報告する。

方法

1. ET 汚染培養液の準備と backfiltrate の採取

我々の透析液供給システムにおける重炭酸ソーダ原液タンク内で分離・培養された *Pseudomonas (P.) aeruginosa* 臨床株を培養液 (RPMI MEDIUM 1640, GIBCO) 中にて、室温下 (約 25°C)、8 時間純培養した。0.22 μ m のフィルター (STERIVEX™-GS, MILLIPURE® CORPORATION) によって除菌後の培養液 (ET 濃度 = 621 pg/ml) を準備し、それを体外循環回路にかけて強制的に逆濾過をかけて backfiltrate を採取した。使用した high-flux 膜ダイアライザーは、polyvinylalcohol (EVAL) 膜製 (KF 201C1200, 膜厚 25 μ m, クラレ)、polyacrylonitrile (PAN) 膜製 (FILTRAL 16, 膜厚 45 μ m, ホスパル)、polymethylmethacrylate (PMMA) 膜製 (B2-1.6, 膜厚 20 μ m, 東レ) であった。

さらに、*P. aeruginosa* 臨床株を室温下 48 時間純培養した超高濃度 ET 含有培養液 RPMI (ET 濃度 = 8.92 μ g/ml) を得るとともに、希釈法により ET 濃度 100 ng/ml の培養液を準備した。両 ET 汚染培養液を PAN 膜

ダイヤライザー (FILTRAL 16, 膜厚 45 μm , ホスパル) を含む体外循環回路にかけてそれぞれの backfiltrate を採取した。

2. 末梢血および末梢血単球の採取および培養

体外循環用の血液は、健常ボランティア ($n=3$) より採血された。また、単球分離用の血液は健常ボランティア ($n=5$, 男性, 平均年齢 36.4 歳) より採血された。培養液としては RPMI Medium 1640 (GIBCO) を日本薬局方蒸留水 (実測 ET 濃度 $<1.0 \text{ pg/ml}$) にて調製し 0.22 μm のフィルターを通過させたものを用いた。以下の操作はすべて無菌的に行った。

Percoll (Pharmacia 社製) をリン酸バッファーを用いることで 65%, 55%そして 40%に調製して、各々を 1 本の遠沈管にその順に各層がはっきりと境界面を作るように重層して “Percoll Preparation” を準備した。ボランティアよりヘパリン加血液約 40 ml を採取し、遠心分離 (1,500 rpm, 5 分, 25°C)。Buffy coat を丁寧にパストゥール・ピペットにて取り出し、準備しておいた “Percoll Preparation” 上に静かに載せ、これを遠心機にかけ (3,200 rpm, 10 分, 25°C), 界面となって見える単球バンドを吸引採取することによって、末梢血単球を分離・採取した。培養液にて 2 回遠沈洗浄後、細胞数を算定し、各種培養実験での最終単球密度を $1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ となるように調整した。また、非働化 FBS (GIBCO) を 10% 濃度になるように加えた。単球培養は、5% CO_2 培養器中にて 20 時間行われた。反応を停止させるため検体を直ちに -70°C 冷凍庫内に入れ凍結。その後急速解凍・凍結を計 3 回繰り返し細胞破壊を施行後、各検体をキュベットに移して、IL-1 β , IL-6, TNF α の測定まで -70°C 冷凍庫で保存した。

3. 末梢血体外循環のサイトカイン産生における影響

健常ボランティア ($n=3$, 男性, 平均年齢 39.3 歳) からのヘパリン加血液 (約 300 ml) を PAN 膜ダイヤライザー (FILTRAL 16) にて 3 時間再循環させ、その前後での血漿中各種サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF α) の測定、および体外循環前後に分離・採取された末梢血単球による各種サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF α) 産生量を測定した。

4. サイトカイン産生における活性化補体の影響

アナフィラトキシンとしても知られている活性化補体である C5a (C5a, recombinant, human, SIGMA) のサイトカイン産生に及ぼす影響を観察するために、健常ボランティア ($n=5$) から採取された末梢血単球を C5a (100 ng/ml) 存在下で培養し、各種条件下での IL-1 β , IL-6, TNF α の産生量を測定した。

Monocyte Stimulation by LPS

図 1 Dose-response relationship in cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α) produced by monocytes. Monocytes were incubated for 20 hours with *Pseudomonas aeruginosa*-derived LPS.

5. 検体測定法

ET の測定は、Endospecy 法 (ES-test, 生化学工業) によって行った。測定感度限界は 1.0 pg/ml であった。

サイトカインの測定では、凍結保存検体を解凍, 1,500 rpm, 10 分間遠沈後、IL-1 β , IL-6, TNF α の測定を各々、RIA IRMA 法 (メトジェニック, ベルギー), ELISA 法 (富士レビオ-SRL-大阪大学), ELISA 法 (大塚製薬) で測定した。なお、予備実験にて、市販の lipopolysaccharide (*P. aeruginosa* 由来, SIGMA. LPS.) を用いて、LPS 10 pg/ml 存在下での各サイトカイン産生 (IL-1 β ; 64.2 ± 13.8 , IL-6; 75.0 ± 15.8 , TNF α ; 5 以下, 単位は pg/ml/20 hrs, $n=4$) は対照群 (IL-1 β ; 58.3 ± 11.0 , IL-6; 62.8 ± 13.0 , TNF α ; 5 以下, $n=4$) に比較して各々有意差がなく、LPS 50 pg/ml 存在下では明らかに各パラメータ (IL-1 β ; 117.0 ± 14.5 , IL-6; 637.5 ± 137.7 , TNF α ; 37.5 ± 10.4 , $n=4$) が有意 ($p < 0.01$) に増加していることを観察した。つまり、この単球バイオアッセイ系における測定感度限界が、LPS 10 pg/ml ~ 50 pg/ml

図2 Cytokine production by monocytes. No increase of cytokine production in the backfiltrate medium (from the *Pseudomonas aeruginosa*-contaminated culture medium ([ET]=621 pg/ml) through 3 different high-flux membrane dialyzers (EVAL, PAN, PMMA)).

の間にあることを確認している。

6. 統計処理

各データは、原則として mean±SD で表した。有意差検定には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

1. LPS とサイトカイン産生の用量反応関係

市販の LPS を用いた単球バイオアッセイ系における用量反応関係について、IL-1β, IL-6, TNFα の各データを図1に示す。各パラメータともに用量依存性の反応を示している。

2. ET フラグメントあるいは CIS の high-flux 膜ダイアライザー通過の有無について

P. aeruginosa の培養液 (ET 濃度=621 pg/ml) の各種 high-flux 膜ダイアライザー (EVAL 膜, PMMA 膜, PAN 膜) からの backfiltrate における単球の各種サイトカイン産生刺激の結果を図2に示す。サイトカイン産生の結果は、対照群 (IL-1β; 58.1 ± 10.1 , IL-6; 62.5 ± 12.5 , TNFα; 5 以下, $n = 5$, 単位は pg/ml/20 hrs), EVAL 膜 backfiltrate (IL-1β; 55.0 ± 13.1 , IL-6; 59.6 ± 12.4 , TNFα; 5 以下, $n = 5$), PMMA 膜 backfiltrate (IL-1β; 61.2 ± 8.8 , IL-6; 57.8 ± 15.5 , TNFα; 5 以下, $n = 5$), PAN 膜 backfiltrate (IL-1β; 56.1 ± 15.4 , IL-6; 65.4 ± 16.3 , TNFα; 5 以下, $n = 5$) であった。対照群に比較して、いずれのダイアライザーからの backfiltrate においても単球のサイトカイン産生は亢進しなかった。以上のことから、実際の臨床現場で起こりそうな ET 濃度 621 pg/ml 程度の汚染では、いかなる種類の ET フラグメントあるいは CIS も high-flux 膜

ダイアライザーを生物活性を持った形では通過していないと推定される。

一方、超高濃度 ET 汚染培養液 (ET 濃度=8.92 μg/ml) の PAN 膜ダイアライザー (FILTRAL 16) からの backfiltrate 中における単球の各種サイトカイン産生刺激の結果を図3に示す。IL-1β, IL-6 および TNFα のすべての産生が有意 ($p < 0.01$) に亢進しており、μg/ml オーダーでの ET 汚染を伴った場合、生物活性を持った ET フラグメントあるいは何らかの CIS が PAN 膜を通過していることを示している。Endospecy 法によるこの backfiltrate 中の ET 濃度は 1.8 pg/ml と低値であり、非汚染培養液中の ET 濃度 1.6 pg/ml と同程度であった。

3. 体外循環および補体のサイトカイン産生に及ぼす影響について

PAN 膜ダイアライザー (FILTRAL 16) を含む体外循環回路と末梢血単球が接触しただけで、単球からのサイトカイン産生が刺激されるのかどうかを観察した結果を表に示した。体外循環の前後でその血漿中の各種サイトカインはいずれも変化を示さず、さらに、体外循環前後での単球自体のサイトカイン産生能にも有意な変化は観察されなかった。

また、活性化補体 (C5a 濃度=100 ng/ml) 存在下で、単球サイトカイン産生がどのような影響を受けるかを観察したが、結果は図4に示すごとくで、C5a だけの存在下では単球サイトカイン産生は亢進せず、C5a のみでは必要十分な刺激となり得ていない。しかし、LPS (1.0 ng/ml) と C5a をともに 20 時間培養した場合には、各種サイトカイン産生が有意に亢進した。

図 3 Cytokine production was stimulated in the backfiltrate through PAN membrane dialyzer from ET-contaminated medium ([ET] = 8.92 μg/ml). But it was not stimulated in the backfiltrate from less-contaminated medium ([ET] = 100 ng/ml).

表 Plasma levels of cytokines (IL-1β, IL-6, TNFα) and monocyte-producing cytokines before and after extracorporeal circulation (PAN, FILTRAL 16, Hospal, France).

Cytokine	Plasma cytokine levels (pg/ml plasma) (3-hour extracorporeal circulation)			Cytokine production by monocytes (pg/ml medium) (20-hour incubation)		
	Before (n = 4)	After (n = 4)		Before (n = 4)	After (n = 4)	
IL-1β (pg/ml)	75.7±7.5	71.0±11.3	NS	47.7±3.5	40.8±8.9	NS
IL-6 (pg/ml)	< 4	< 4	NS	59.2±11.5	62.2±10.8	NS
TNFα (pg/ml)	< 5	< 5	NS	< 5	< 5	NS

(NS : not significant)

考察

在来の ET 測定法で正確に評価できる LPS は、分子量 10⁵~10⁶ダルトン以上にも及ぶ巨大分子であり、これがそのままの形で透析膜を通過する可能性はないに等しい。しかし、ET は溶液中での存在環境によっては、より小分子のフラグメントに解離することが知られている²⁾。分子量が 10³~10⁴ダルトン程度の生物活性を持った ET フラグメントの存在も確認されている⁷⁾。また、ET 以外にもグラム陰性水生菌に由来する muramyl peptides⁸⁾ (分子量 10³ダルトン程度) などのサイトカイン産生刺激物質の存在することが知られており、これらの CIS が一般的には、パイロジェンと総称されてきた。

透析膜を通過する可能性のある大きさの ET フラグメントあるいはその他のパイロジェンは在来の ET 測定法では測定不能である。また、仮に ET フラグメントが生体内に侵入したとしても、それが生物活性を有しない分子であれば、臨床上問題とならない。現在、何らかの ET フラグメントあるいはパイロジェンが生物活性を持って

いるかどうかを検定する最も鋭敏な方法は、単球培養を利用したサイトカイン産生量をバイオアッセイする方法だけである⁹⁾。しかし、目下のところ透析液の質を管理していく上で、ET による透析液汚染評価法としては、通常の ET 濃度測定法 (Endospecy 法など) を利用する以外に実用的な評価法は見当たらない。ET フラグメントが簡便かつ正確に測定できるような方法、また、その他の CIS をも検知できる簡便なアッセイ法の開発が待たれているゆえんである。

“Monokine hypothesis” によれば、血液透析中にさまざまな要因により単球刺激が起り、IL-1, IL-6, TNF などのモノカインあるいはサイトカインの産生亢進が惹起され、これらの持つ種々の生物活性のために透析アミロイドーシスをはじめとした血液透析の慢性合併症が生じてくると説明される¹⁰⁾。単球刺激要因としては、活性化補体¹¹⁾、透析液バッファーとしての酢酸¹²⁾、透析液細菌汚染に由来する ET およびそのフラグメント、muramyl peptides などの CIS が関与する可能性がある。High-

図4 The effects of recombinant C5a (100 ng/ml) in cytokine production by monocytes. C5a alone did not stimulate cytokine production even when incubated with ET backfiltrate (through PAN, [ET] = 621 pg/ml). C5a, however, acted as a potentiator when used with LPS (1.0 ng/ml).

flux 膜ダイアライザーの使用により時として逆濾過や逆拡散の起こることが理論的に証明されており^{3,4)}、特に逆濾過では大きな分子量物質の通過を可能にすると考えられ、ET そのもの、あるいは ET フラグメントなどの CIS による透析液汚染が注目されてきた。

In vivo での研究では、Yamagami ら¹³⁾は high-flux 膜で治療された患者の方が low-flux 膜で治療された患者に比較して、血中抗 ET 抗体値が有意に高値であったと報告している。また、臨床における ET の透析膜透過の可能性については、透析時発熱との関係での報告がある¹⁴⁾。

In vitro の疑似透析実験系では、Bommer ら¹⁵⁾は ET がダイアライザーを通過している証拠はないと結論しているが、Lonnemann ら¹⁶⁾は透析液に高濃度 *E. coli* 由

来 LPS (500 ng/ml) が添加された時、血液サイドに血漿が存在する場合に限って、IL-1-inducing substances が再生セルロース膜ダイアライザーを通過していることを報告している。Evans ら¹⁷⁾や我々の結果 (図3) では、超高濃度 ET (*P. aeruginosa* 培養由来) 汚染培養液を用いた場合に限って、その培養液中に蛋白や血漿が存在しなくとも CIS が PAN 膜を通過していることが示されている。Lonnemann らは実際の水汚染ではあまり発生しない菌種である *E. coli* を使用し、我々や Evans らは *P. aeruginosa* を使用していることなど方法論の違いが結果の違いの原因かも知れない。ところで、本邦での透析液の ET 濃度は、十分な水処理が行われた場合には、一般に 100 pg/ml 以下である^{6,18)}。臨床で想定される ET 汚染 (ET 濃度 600 pg/ml 程度) 下で、透析液中の ET が強制逆濾過にてダイアライザーを通過できるような条件下での実験を行ったが、ET 汚染培養液の各種合成膜からの backfiltrate は、単球を刺激せず、サイトカイン産生を亢進させなかった。また、ET 濃度 100 ng/ml の汚染培養液の PAN 膜ダイアライザーからの backfiltrate でも単球サイトカイン産生は亢進しなかった。

In vivo での TNF α における検討でも、Davenport ら¹⁹⁾や秋澤ら²⁰⁾は、血液透析前後、透析間とも患者血清中の TNF α 濃度に有意な変化を認めていない。これらの in vivo 研究の結果と今回の我々の in vitro の実験結果とを考え合わせると、実際の臨床の条件下では、透析液中の ET またはその他の CIS が透析膜を通過して末梢血単球を刺激しているとはいえないと考えられる。CIS あるいは ET フラグメントが透析膜を通過して生物活性を持つためには、透析液水処理の現場では起こり得ないような、極めて異常な ET 汚染発生時に限られると解釈すべきであろう。

一方、単球サイトカイン産生能に対する補体の影響では、我々の結果 (図4) は、recombinant C5a だけでは単球からのサイトカイン産生刺激となっていないことを示しており、C5a だけで IL-1 や TNF 産生亢進が起こったとする Okusawa らの報告¹¹⁾とは異なった結果になった。Schindler ら²¹⁾は、recombinant C5a で末梢血単球を刺激した場合 IL-1 β , TNF α の mRNA の“転写”だけは起こっても“蛋白への翻訳”はされず、合成されるまでには至らないことを報告している。我々は、C5a と LPS の共存がサイトカイン産生において、相乗的な作用を有することを観察した。図4に示すように、LPS (1.0 ng/ml) に C5a (100 ng/ml) を添加した場合に、各種サイトカインの産生は有意に増加している。単独では生物活性を持たないレベルの ET フラグメントと活性化補体が、共存することによってはじめて生物活性を示す可能

性はあるが、補体の活性化のみでは、単球からのサイトカイン産生刺激の主役とはなり得ないことが証明されたと思われる。

実際の透析液の質を管理する場合、ET 汚染の最大許容値として、患者コンソール部における透析液中の ET 濃度を 50 pg/ml 程度以下にしておけばよいのではないかと推測する。この目標値は、従来の透析液供給システムにおける透析液ラインの洗浄・消毒を徹底し ET 供給源たる細菌増殖を阻止することによって到達できる現実的な値である。透析液の ET-free 化のために透析液供給システム内に ET 除去用 UF filter を組み込むような方法⁹⁾は高価かつ不完全さの面で必ずしも最良の選択とは思えない。透析液の浄化法やその浄化基準等に関して再検討の余地があると思われる。

結論

1. 体外循環回路 (PAN 膜ダイアライザー) との接触だけでは、末梢血単球のサイトカイン産生は刺激されなかった。

2. 活性化補体 C5a (100 ng/ml) の存在だけでは、単球からのサイトカイン産生は亢進しなかったが、LPS 1.0 ng/ml との共存培養条件下では、相乗的にサイトカイン産生が亢進した。

3. 現実には考えられないような極端に高濃度 (8.92 μ g/ml) の ET 汚染存在下では、生物活性のある ET フラグメントあるいは CIS (cytokine-inducing substances) が backfiltration によって PAN 膜ダイアライザーを通過して単球サイトカイン産生を刺激することが証明された。

4. しかし、臨床の場で想定される ET 汚染 (600 pg/ml $\sim$ 100 ng/ml) の場合には、生物活性を持った ET フラグメントあるいは CIS が high-flux 膜ダイアライザーを通過して単球サイトカイン産生を亢進させる可能性は低いと結論された。

以上より、透析液の浄化はどの程度必要なのか、透析液の ET 汚染最大許容値等について、再検討する必要があると思われる。

謝辞：稿を終るにあたり、御指導御校閲を賜りました北里大学泌尿器科小柴 健教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の要旨の一部は第 37 回日本透析療法学会総会 (1992 年、横浜) にて発表した。

文献

- 1) Zingraff J, Drüeke T : Can the nephrologist prevent dialysis-related amyloidosis?. *Am J Kidney Dis* 18 : 1-11, 1991
- 2) 岸本武利, 山上征二, 和田誠次 : 内毒素 (エンドトキシン, ET). *透析会誌* 24 : 1041-1047, 1991
- 3) Hosoya N, Sakai K : Backdiffusion rather than backfiltration enhances endotoxin transport through highly permeable dialysis membranes. *ASAIO Trans* 36, M311-313, 1990
- 4) Stiller S, Mann H, Brunner H : Backfiltration in hemodialysis with highly permeable membranes. In "Contrib Nephrol 46" ed Streicher E, Seyffart G, p 23-32, Karger, Basel, 1985
- 5) Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldon S : Hemodialysis hypotension : The interleukin hypothesis. *Blood Purif* 21 : 3-8, 1983
- 6) 中澤一, 石関忠一 : 透析装置の洗浄・消毒の実例 (1) 事例—国立佐倉病院の場合. *臨床透析* 6 : 1761-1765, 1990
- 7) Takahashi I, Kotani S, Takada H, Shiba T, Kusumoto S : Structural requirements of endotoxin lipopolysaccharides and bacterial cell walls in induction of interleukin-1. *Blood Purif* 6 : 188-206, 1988
- 8) Dinarello CA, Krueger JM : Induction of interleukin 1 by synthetic and naturally occurring muramyl peptides. *FASEB Federation proc* 45 : 2545-2548, 1986
- 9) Schindler R, Dinarello CA : A method for removing interleukin 1-and tumor necrosis factor-inducing substances from bacterial cultures by ultrafiltration with polysulfone. *J Immunol Meth* 116 : 159, 1989
- 10) 中澤一 : High flux 膜透析器とエンドトキシン逆濾過. *臨床透析* 6 : 405-411, 1990
- 11) Okusawa S, Dinarello CA, Yancey KB, Endres S, Lawley TJ, Frank MM, Burke JF, Felfand JA : C5a induction of human IL-1 : Synergistic effect with LPS or interferon- γ . *J Immunol* 139 : 2635-2642, 1987
- 12) Bingel M, Koch KM, Lonnemann G, Dinarello CA, Shaldon S : Enhancement of in-vitro human interleukin-1 production by sodium acetate. *Lancet* ii : 14-16, 1987
- 13) Yamagami S, Adachi T, Sugimura T, Wada S, Kishimoto T, Maekawa M, Yoshimura R, Niwa M, Terano Y, Shaldon S : Detection of endotoxin antibody in long-term dialysis patients. *Int J Artif Organs* 13 : 205-210, 1990

- 14) Raij L, Shapiro F, Michael A : Endotoxemia in febrile reactions during hemodialysis. *Kidney Int* 4 : 57-60, 1973
- 15) Bommer J, Becker KP, Urbaschek R, Ritz E, Urbaschek B : No evidence for endotoxin transfer across high flux polysulfone membranes. *Clin Nephrol* 27 : 278-282, 1987
- 16) Lonnemann G, Bingel M, Floege J, Koch FK, Shaldon S, Dinarello DA : Detection of endotoxin-like interleukin-1-inducing activity during in vitro dialysis. *Kidney Int* 33 : 29-35, 1988
- 17) Evans RC, Holmes CJ : In vitro study of the transfer of cytokine-inducing substances across selected high-flux hemodialysis membranes. *Blood Purif* 9 : 92-101, 1991
- 18) 南部正人：透析液のパイロジェンフリーは可能か、(5) ハイパフォーマンスメンブレン (HPM) と液ラインの汚れ. *臨床透析* 6 : 1749-1754, 1990
- 19) Davenport A, Crabtree J, Andojna C, Will EJ, Davison AM : Tumor necrosis factor does not increase during routine cuprophane haemodialysis in healthy well-nourished patients. *Nephrol Dial Transplant* 6 : 435-439, 1991
- 20) 秋澤忠男, 高橋淳子, 米 賢二：透析患者の血清 $\text{TNF}\alpha$ —透析療法の影響について—. *人工臓器* 20 : 420-424, 1991
- 21) Schindler R, Lonnemann G, Shaldon S, Koch KM, Dinarello CA : Transcription, not synthesis, of interleukin-1 and tumor necrosis factor by complement. *Kidney Int* 37 : 85-93, 1990