維持透析における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ パルス療法の 食食細胞機能に及ぼす影響について

徳田 倫章 明利 浩行 加野 資典 熊澤 淨一*
加野病院泌尿器科 九州大学泌尿器科*

key words : 血液透析, calcitriol, 活性酸素産生能, 食食能, HLA-DR 抗原

〈要旨〉

維持透析患者 12 名において、末梢血中の CD14 陽性単球の HLA-DR (DR) 抗原の発現量ならびに好中球の食食能と phorbol myristate acetate (PMA) 刺激による活性酸素産生能 (SOP) をフローサイトメトリー法で測定し、正常対照群 9 名と比較検討した。また活性型ビタミン D_3 , calcitriol, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,25\text{D}_3$) パルス療法前後でこれらの機能の変化を検討した。透析患者では、正常対照群に比し単球の DR 抗原の発現量 ($p < 0.05$) ならびに好中球の PMA 刺激による SOP ($p < 0.001$) は有意に増加していたが、好中球の食食能は低下傾向にあった。透析患者の $1,25\text{D}_3$ の血中濃度は、ビタミン D 製剤の休薬後は未検出レベルと低下していたが、 $1,25\text{D}_3$ パルス療法の $5 \mu\text{g}$ 経口投与後 4 時間以内に 200 pg/ml を超える血中濃度が認められた。 $1,25\text{D}_3$ 投与により、72 時間後の単球の DR 抗原の発現は有意に抑制され ($p < 0.001$)、また好中球の SOP は増強される傾向を示した。しかし好中球の食食能には一定の作用は認められなかった。

$1,25\text{D}_3$ が食食細胞の種々の機能に対して明らかな作用をもつことより、 $1,25\text{D}_3$ が生体防御機構に対しても何らかの役割を果たしており、腎不全における免疫不全状態に関与している可能性が示唆された。

Vitamin D_3 therapy modulates phagocyte functions in patients with renal failure

Noriaki Tokuda, Hiroyuki Meiri, Motonori Kano, Joichi Kumazawa*

Department of Urology, Kano Hospital ; Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyushu University*

Calcitriol, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,25\text{D}_3$) modulates several neutrophil and monocyte functions in vitro, including phorbol myristate acetate (PMA)-induced superoxide production (SOP), HLA-DR (DR) expression, and phagocytic activity. We therefore investigated SOP and phagocytic activity using peripheral blood neutrophils and DR expression using peripheral blood CD14⁺ monocytes from 12 patients on periodic hemodialysis (HD), before and after oral treatment with $1,25\text{D}_3$ ($5 \mu\text{g}$ twice a week). Both SOP by neutrophils and DR expression by monocytes were significantly higher in HD patients than in the normal control group ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Phagocytic activity by neutrophils in the HD patients was slightly reduced but not significantly different from that in the normal control group.

$1,25\text{D}_3$ therapy resulted in a marked increase in plasma $1,25\text{D}_3$ level ($> 200 \text{ pg/ml}$) within 4 hours after treatment. After 3 days of treatment, DR expression by monocytes was significantly reduced ($p < 0.01$). Treatment slightly enhanced PMA-induced SOP, but the effect was not significant. Phagocytic activity by peripheral blood neutrophils was not significantly affected by treatment. These findings suggest that $1,25\text{D}_3$ has a role in the regulation of monocytic function in HD patients.

緒言

末期腎不全は透析療法の進歩に伴い長期生存が可能となっている。しかしながら解決されるべき問題の1つに免疫不全状態の存在があり、結核などに対する易感染性、悪性腫瘍の発生率の増加などを引き起こすと考えられている¹⁾。一方、末期腎不全は腎におけるビタミン D₃ 1 α -OHase 活性が低下しており、慢性の活性型ビタミン D₃, 1,25(OH)₂D₃ (1,25D₃) 欠乏状態でもある。

近年、1,25D₃の生体防御機構における重要性に注目が集まっている。先天性1,25D₃欠乏症であるくる病や実験的に作られた1,25D₃欠乏マウスには種々の免疫異常が報告されている^{2,3)}。また1,25D₃はin vitroにおいてリンパ球、好中球さらに単球マクロファージ系の細胞の種々の機能に直接影響を与えることも報告されている⁴⁻⁸⁾。

しかしながら末期腎不全における慢性の1,25D₃欠乏状態と免疫不全状態との相互関係については、十分な解析がなされているとはいいがたい。今回、1,25D₃パルス療法前後で、維持透析患者の好中球の活性酸素産生能(SOP)と貪食能ならびに単球のHLA-DR(DR)抗原の発現量について検討した。

対象

原疾患が糖尿病でない透析患者12名〔男7名、女5名、平均年齢51.8 $\pm$ 13.1(36~67歳)、平均透析歴26 $\pm$ 19.2か月(6~62か月)]を対象とし、透析は週3回、透析時間4~5時間、血液流量150~200 ml/min、透析液流量500 ml/minにて施行している。これらの患者に3週間以上のビタミンD₃製剤の休薬期間ののち1,25D₃パルス療法を施行した。正常対照として9名〔男5名、女4名、平均年齢47.6 $\pm$ 8.5(36~60歳)]を用いた。透析患者群と正常対照群とで性別、年齢で有意差は認めない。なお、パルス療法施行期間中に使用ダイアライザーならびに透析条件の変更はなかった。

方法

1. 1,25D₃パルス療法

週2回(金、月)透析終了時に1,25D₃を5 μ g経口投与し、第2週より4 μ gとし、以後は患者により増減した。

2. 1,25D₃血中濃度の測定

1,25D₃パルス療法直前(0時間)、1,25D₃初回量5 μ g経口投与4時間後、24時間後、3日後の透析直前(68時間後)、2回目5 μ g経口投与4時間後(76時間後)、96時間後にHPLC法を用いて測定した。

3. CD14陽性単球のDR発現量ならびに好中球のSOPと貪食能の測定

1,25D₃5 μ g投与前後(金~月)で透析直前に採血し、末梢血CD14陽性単球のDR発現量ならびに好中球の貪食能とSOPを検討した。単球のDR発現量の測定は、FITC標識抗CD14抗体(Leu-M3, マウスIgG₂b, Becton dickinson immunocytometry systems)ならびにPE標識抗HLA-DR抗体(OKDR, マウスIgG₂a, Ortho diagnostic systems)を4 $^{\circ}$ C、20分間作用させ単球の特異的マーカーであるCD14陽性分画の細胞のDR発現量を2カラーフローサイトメトリー法にて解析した。なお、発現量は平均蛍光強度で表した(MFI; 細胞1個当たりのDR発現量を反映)。

SOP測定は、Bassらの方法に準じ⁹⁾、ヘパリン加静脈血0.1 mlに5 μ Mのdichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 2 mlを加え、37 $^{\circ}$ C15分間振盪加温する。その後ただちに氷水中に冷却しながら反応を止め、EDTA 0.5 mlを加える。さらに25 μ g/mlのphorbol myristate acetate (PMA)を添加し、再び37 $^{\circ}$ C20分間振盪加温したのち、フローサイトメトリー法にて解析し平均蛍光強度で表した(細胞1個当たりのSOPを反映)。好中球の貪食能に関しては、ヘパリン加静脈血0.1 mlに径2 μ mのFITC蛍光標識されたcarboxyl microsphere (Polyscience Inc.)を5 $\times$ 10⁶個加え、37 $^{\circ}$ Cで25分間振盪加温する。その後ただちに氷水中に冷却しながら反応を止め、フローサイトメトリー法にて好中球分画を解析した。

正常との比較ならびに1,25D₃投与前後の比較は正常対照群の平均値を100として解析した。

4. 統計処理

統計処理の方法としては、対応のある場合はWilcoxon signed rank testを、対応のない場合はMann-Whitney U testを用い、有意水準5%

図 1 パルス療法前後の血中 1,25(OH)₂D₃ 濃度

をもって有意差ありとした。

結果

1. 1,25D₃ の血中濃度の変化

パルス療法前においては、血中の 1,25D₃ レベルは未検出レベルと低下していた。1,25D₃ 経口内服後、血中 1,25D₃ レベルは急速に上昇し 4 時間以内に 200 pg/ml に達し、以後下降した。3 日後の経口内服後 300 pg/ml 近くまで再上昇した (図 1)。

2. パルス療法前後における末梢血 CD14 陽性単球の HLA-DR 抗原の発現量の変化

CD14 抗原は単球マクロファージ系の細胞表面に特異的に発現される抗原で¹⁰⁾、末梢血中のこの抗原をもった単球と考えられる細胞の DR 抗原の発現の解析を行った (図 2)。単球分画における CD14 抗原の発現に関しては、正常対照群と透析患者群とも約 80% の陽性率で明らかな差はなかった。透析患者では、正常対照群に比し末梢血 CD14 陽性単球の DR 抗原の発現量は有意に増加していた (MFI 100 vs 111; $p < 0.05$)。1,25D₃ 投与前とパルス療法 3 日後と比較すると、この増加した単球の DR 抗原の発現は有意に抑制された (MFI 111 → 96.7; $p < 0.001$)。なお、単球分画における CD14 抗原の発現に関しては、パルス療法前後でも明らかな変動は認めなかった (データ示さず)。

3. パルス療法前後における好中球機能の変化

図 2 末梢血 CD14 陽性単球における HLA-DR 抗原の発現。正常対照群と透析患者との比較 (A)。透析患者におけるパルス療法前後での変化 (B)。

今回の検討では SOP の解析には透析施行直前の全血を用いた。PMA 刺激後の好中球の SOP を、SOP によって生じた DCF の蛍光をフローサイトメトリー法にて解析した。透析患者では好中球の SOP は、正常対照群に比し 2 倍近く有意に高かった (MFI 100 vs 191.8; $p < 0.001$)。1,25D₃ 投与は、好中球の SOP を増強する傾向を示した (図 3)。好中球の貪食能は低い傾向にあったが、1,25D₃ 投与は好中球の貪食能に対しては明らかな作用は示さなかった (図 4)。

考察

1,25D₃ は Ca 代謝調節ホルモンとして古くから知られている。近年、1,25D₃ レセプターが、骨、腸管、腎といった Ca 代謝に関わる組織の細胞のみならず、Ca 代謝と関係のない種々の細胞に発現されていることが見出され、1,25D₃ が Ca 代謝

図 3 末梢血好中球における活性酸素産生能。正常対照群と透析患者との比較(A)。透析患者におけるパルス療法前後での変化(B)。

図 4 末梢血好中球の径 2 μ m の carboxyl microsphere に対する貪食能。正常対照群と透析患者との比較(A)。透析患者におけるパルス療法前後での変化(B)。

調節作用以外に、いろいろな細胞で他の機能に影響を与える可能性が指摘されている¹¹⁾。1,25D₃は、免疫系においてBリンパ球の抗体産生やTリンパ球の種々のリンフォカイン産生を抑制し⁴⁻⁷⁾、一方単球マクロファージ系の細胞の貪食能やSOPを増強することが報告されている^{12,13)}。

ビタミンD₃は通常正常の機能をもった腎組織でのみ活性化されるため、末期腎不全においては、ビタミンD₃活性化障害のため慢性のビタミンD₃欠乏状態の存在がある。我々の検討においても、ビタミンD₃製剤の3週間以上の休薬後、維持透析患者の1,25D₃の血中濃度をみると未検出レベルの低濃度であり、ビタミンD₃欠乏状態と考えられた。

末期腎不全患者における免疫異常については古くからいわれているが、透析療法のみでは正常化

は難しい。維持透析患者における免疫異常に関しては、とくに細胞性免疫の機能低下を指摘する報告が多いが、尿毒素、代謝異常、透析膜等の関与が疑われている¹⁴⁾。しかしながら末期腎不全における免疫異常へのビタミンD₃欠乏状態の関与についての解析は十分ではない。

我々は、免疫応答における抗原提示に必要不可欠である細胞表面上のclass II主要組織適合性抗原の発現を、1,25D₃が抑制することをラット甲状腺上皮細胞、マウス精巣Leydig細胞、ヒト末梢血単球において見出し、この1,25D₃のclass II主要組織適合性抗原に対する抑制作用が、RNAならびに蛋白レベルで認められること、プロスタグランジンE₂の産生を介さないこと、さらにはこの作用発現が濃度依存性で1,25D₃レセプター

を介する作用であることを報告している^{8,15)}。ヒト単球においては *in vitro* では 0.01~0.1 nM のレベルから DR 抗原の発現抑制が認められ（データ示さず）、これは正常の生理的血中 1,25D₃ 濃度レベルであることから、*in vivo* でも同様の効果が得られる可能性が考えられた。今回の検討ではこれらの *in vitro* のデータをふまえて 1,25D₃ の *in vivo* の作用をパルス療法前後で検討した。維持透析患者の貪食細胞機能について、1,25D₃ パルス療法前の 1,25D₃ 欠乏状態では、好中球の PMA 刺激による SOD はフローサイトメトリー法でみるかぎり正常群に比し約 2 倍と有意に高かった ($p<0.001$)。透析患者における好中球の SOP に関しては依然議論のあるところではあるが、概して亢進しているという報告が多い^{16,17)}。SOP は種々の刺激で誘導され、また SOP 測定法もさまざまである。今回の検討では、PMA 刺激後、DCFH-DA の酸化により細胞内に生じた蛍光物質である DCF を測定して好中球の SOP を解析したが、基礎疾患（糖尿病は除外）、使用している透析膜、各症例の病態等さまざまであるにもかかわらず、透析患者では SOP 亢進状態にあるという結果は興味深い。

径 2 μ m の calboxyl microsphere に対する好中球の貪食能をみてみると有意差はないものの低い傾向にあった。先天性ビタミン D₃ 欠乏症であるくる病においては、好中球貪食能の低下や呼吸器における易感染性が、また実験的ビタミン D₃ 欠乏マウスでは、マクロファージの貪食能や好中球の遊走能が障害されることが報告されている^{2,3)}。末期腎不全における好中球の貪食能に関しては低下しているという報告が多く尿毒症性物質の蓄積等の原因が考えられているが、ビタミン D₃ 欠乏状態の関与の可能性も今後検討の必要がある。

単球の HLA-DR 抗原の発現量は正常に比し有意に高かった ($p<0.05$)。 *in vitro* では 1,25D₃ に単球の HLA-DR 抗原の発現の抑制作用があることよりやはりビタミン D₃ 欠乏状態の関与の可能性が考えられる。

今回の検討では、1,25D₃ パルス療法開始後の

1,25D₃ の血中濃度をみると、1 回目の 5 μ g 経口投与後 4 時間以内に 200 pg/ml (0.48 nM) を超える十分な 1,25D₃ 濃度が得られている。パルス療法により直接影響をうける因子として PTH があり、パルス療法後に血中 PTH レベルの低下が認められたが、今回検討しなかったが、PTH が貪食細胞機能に影響を与えている可能性もある。1,25D₃ 投与 3 日後でみると、好中球の SOP は増強する傾向を示した。このことは、透析患者における SOP 亢進状態が 1,25D₃ 欠乏状態によるものではないこと、1,25D₃ には諸家の報告のごとく SOP に対し増強作用のある可能性を示唆する。貪食能に関しては明らかな作用は認めなかった。Venezio ら¹⁸⁾は、維持透析患者に対し、1,25D₃ の 0.25 μ g/日の 6 週間の経口投与を行い、好中球ならびに単球における遊走能が有意に改善されることを報告している。

1,25D₃ パルス療法前後で、単球の DR 抗原の発現は有意に抑制された ($p<0.001$)。背景がさまざまであるにもかかわらず、今回の検討では、正常群に比し単球の DR 抗原の発現は有意に高く、これが 1,25D₃ 投与後に有意に抑制されることは、1,25D₃ が単球の DR 抗原の発現の制御に関わっていることを強く示唆し、1,25D₃ の *in vitro* のデータを裏づけるものであった。今回 1,25D₃ パルス療法 3 日後で検討したが、2 日後、4 日後でも単球の DR 抗原の発現は有意に抑制される（データ示さず）。単球の DR 抗原の発現は CD4 ヘルパー T 細胞の抗原認識に必要不可欠で、この発現量の低下は抗原呈示能の抑制をもたらすと考えられるが生体内における意義に関しては依然として不明である。単球マクロファージ系の細胞の貪食能に関しては今回検討しなかったが、*in vitro* において 1,25D₃ はこれを増強することから *in vivo* での効果は現在解析中である。

今回 1,25D₃ パルス療法前後で貪食細胞機能を検討したが、症例数は少ないものの 1,25D₃ がこれらの機能に影響を与えうることがはじめて明らかになった。1,25D₃ の少量の補充療法による影響については検討していないが、今後の解析が待たれる。このような解析の報告は少なく、1,25D₃ の生

体防御機構への関わり，末期腎不全における1,25D₃欠乏状態の骨代謝のみならず他の病態との関わりについての解析の重要性が示唆された。

結論

維持透析における活性型ビタミンD₃パルス療法前後で食細胞機能について検討した。ビタミンD₃製剤の3週間以上の休薬後活性型ビタミンD₃の血中濃度は，パルス療法前は未検出レベルと低かった。維持透析患者12名においては，正常対照群に比しCD14⁺単球のDR抗原の発現量ならびに好中球のPMA刺激による活性酸素産生能は有意に高かったが，好中球の食食能は低い傾向にあった。活性型ビタミンD₃5 μg経口投与後は4時間以内に200 pg/mlを超え，投与3日後では単球のDR抗原の発現量は有意に抑制され，また好中球のSOPは増強される傾向を示した。しかし好中球の食食能には明らかな作用は認めなかった。

1,25D₃が生体防御機構に対しても何らかの役割を果たしており，腎不全における免疫不全状態に関与している可能性が示唆された。

本論文の要旨は第39回日本透析医学会総会にて発表した。

文献

- 1) Miller TE, Stewart E : Host immune status in uremia. I. Cell mediated immune mechanisms. Clin Exp Immunol 41 : 115-122, 1980
- 2) Stroder J : Immunity in vitamin D deficient rickets. In "Vitamin D and problems related to uremic bone disease." ed Norman AW, Schaefer K, Grigoleit H-G, von Herrath D, Ritz E, Berlin, Walter de Gruyter, p 675, 1975
- 3) Gavison R, Bar-Shavit Z : Impaired macrophage activation in vitamin D₃ deficiency : differential in vitro effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on mouse peritoneal macrophage functions. J Immunol 143 : 3686-3690, 1989
- 4) Provvendini DM, Tsuoka CD, Deftos LJ, Manolagas SC : 1α, 25-Dihydroxyvitamin D₃-binding macromolecules in human B lymphocytes : Effects on immunoglobulin production. J Immunol 136 : 2734-2740, 1986
- 5) Rigby WFC, Denome S, Fanger MW : Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. J Clin Invest 79 : 1659-1664, 1987
- 6) Reichel H, Koeffler HP, Tobler A, Norman AW : 1α, 25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits γ-interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 3385-3389, 1987
- 7) Tobler A, Miller C, Norman AW, Koeffler HP : 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates the expression of a lymphokine (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) post-transcriptionally. J Clin Invest 81 : 1819-1823, 1988
- 8) Tokuda N, Mizuki N, Kasahara M, Levy RB : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ down-regulation of HLA-DR on human peripheral blood monocytes. Immunology 75 : 349-354, 1992
- 9) Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M : Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : A graded response to membrane stimulation. J Immunol 130 : 1910-1917, 1983
- 10) Griffin JD, Ritz J, Nadler LM, Schlossman SF : Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. J Clin Invest 68 : 932-941, 1981
- 11) Reichel H, Koeffler HP, Norman AW : The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. N Engl J Med 320 : 980-981, 1989
- 12) Xu H, Soruri A, Gieseler RKH, Peters JH : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. Scand J Immunol 38 : 535-540, 1993
- 13) Cohen MS, Mesler DE, Snipes RG, Gray TK : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ activates secretion of hydrogen peroxide by human monocytes. J Immunol 136 : 1049-1053, 1986
- 14) Descamps-Latscha B : The immune system

- in end-stage renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2 : 883-891, 1993
- 15) Tokuda N, Mano T, Levy RB : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ antagonizes interferon-gamma-induced expression of class II major histocompatibility antigens on epithelial and interstitial cells. *Endocrinology* 127 : 1419-1427, 1990
 - 16) 上田雄一郎：透析患者における食細胞の活性酸素放出能の検討. *感染症学雑誌* 63 : 997-1006, 1989
 - 17) Rhee MS, McGoldrick MD, Meuwissen HJ : Serum factor from patients with chronic renal failure enhances polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism. *Nephron* 42 : 6-13, 1986
 - 18) Venezio FR, Kozeny GA, DiVincenzo CA, Hano J : Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on leukocyte function in patients receiving chronic hemodialysis. *J Infect Dis* 158 : 1102-1105, 1988