ダイライザーの生体適合性の検討 —IL-6, IL-8 および一酸化窒素の動態を中心に—

佐々木 信博 草野 英二* 大友 貴史 安藤 康宏*
浅野 泰*

福島県立南会津病院内科 自治医科大学腎臓内科*

key words: 生体適合性, 血液透析, インターロイキン 6, インターロイキン 8, 一酸化窒素

〈要旨〉

生体適合性は血液が透析膜と接触することで起こる生体の反応の総称であり, 好中球脱顆粒化, 補体活性化, サイトカインの放出などがある。最近, interleukin-6, 8 (IL-6, 8) などが顆粒球エラスターゼ (PMNE) の放出因子として注目されている。また, 内皮由来血管拡張物質である一酸化窒素 (NO) も透析低血圧に関連することが知られている。そこで今回我々は, これらの物質の透析中の動態を生体適合膜と非適合膜で比較し, 生体適合性の指標となりうるか否かを検討した。

慢性維持透析患者 5 人を対象に, 非適合膜として再生セルロース膜 (RC) および適合膜としてポリスルホン膜 (PS) をクロスオーバーで使用し, 透析前, 開始 15 分, 透析終了直前で WBC, Plt, PMNE, IL-6, IL-8, NO を測定した。

1) WBC の減少率は, 15 分値で PS 膜で 21% に対し, RC 膜で 71% と後者で有意に大きかった。2) PMNE は, 両膜とも 15 分では上昇せず透析後に上昇がみられたが, RC 膜で有意に上昇が大きかった。3) NO は, 両膜とも 15 分および透析後で減少したが, 両膜で差がなかった。4) IL-6 は, RC 膜の透析後において有意な上昇がみられ, PMNE と IL-6 の増加率には有意な正の相関が認められた。5) IL-8 は, 透析中有意な変動を示さず, 両膜で差を認めなかった。

今回の検討から生体適合性の指標として, WBC, Plt, PMNE に加えて, IL-6 もその指標として有用であると思われる。

Biocompatibility of hemodialysis membranes with special reference to changes in blood IL-6, IL-8, and nitric oxide

Nobuhiro Sasaki, Eiji Kusano*, Takashi Ootomo, Yasuhiro Ando*, Yasushi Asano*

Department of Medicine, Minamiaizu Hospital; Department of Nephrology, Jichi Medical School*

Biocompatibility involves numerous interactions among blood elements and the hemodialysis (HD) membrane, such as neutrophil degranulation, complement activation and release of cytokines during HD.

Recently, interleukin-6, 8 (IL-6, 8) was identified as a releasing factor of polymorphonuclear neutrophil elastase (PMNE). Furthermore, the production of cytokine-induced nitric oxide (NO), an endothelial derived relaxing factor, was suggested to be involved in HD hypotension.

Therefore, we investigated the changes in these substances during HD in two different kinds of dialysers membranes, namely the biocompatible membrane and bioincompatible membrane.

The subjects were five patients with chronic renal failure undergoing maintenance HD in our hospital. We compared the changes in the parameters between the regenerated cellulose (RC) membrane as a bioincompatible membrane and polysulfone (PS) membrane as a biocompatible membrane by the crossover maneuver. We determined blood levels of PMNE, IL-6, IL-8 and NO in addition to white blood cells (WBC) and platelet (Plt) counts, before, 15 min after the start, and just before the end of HD.

1) WBC count 15 min after starting HD decreased by 21% of pre-HD in PS and by 71% in RC. The decreasing rate was significantly higher in RC than that in PS. 2) Plasma levels of PMNE increased after HD, but not at 15 min in either membrane. The increasing rate, however, was significantly higher in RC than that in PS. 3) Serum levels of NO decreased at 15 min and after HD in both membranes. There was, however, no significant difference between RC and PS. 4) Serum levels of IL-6 increased significantly after HD in RC compared to that in PS. There was a significant positive correlation between IL-6 and PMNE. 5) Serum levels of IL-8 did not change during HD. There was no significant correlation between IL-8 and PMNE in either membrane.

These findings suggest that serum levels of IL-6, in addition to WBC, Plt, and PMNE, can be used as an index of biocompatibility of dialysis membranes.

緒 言

血液透析療法の進歩、普及に伴い、透析療法の溶質除去、電解質酸塩基平衡是正などは別に、体外循環自体に起因する種々の反応が生体に生じることが明らかにされている。こうした反応は、多くの要因に規定され、これらの生体反応を指標に生体適合性という概念が注目されている。

従来、生体適合性は、白血球や血小板数の減少と補体活性を指標として検討されてきた。近年、血液透析により種々のサイトカインの産生が亢進することが報告され、それらが透析膜の生体適合性に大きく関係し、透析中の様々な合併症に関与する可能性が指摘されてきた^{1,2)}。現在、生体適合性や溶質の除去効率の向上を目的として種々の合成高分子膜が開発されている³⁻⁵⁾。

今回我々は、透析膜の生体適合性について顆粒球エラストーゼ (PMNE) の放出因子として注目されているインターロイキン-6, 8 (IL-6, 8), および透析低血圧に関連することが知られている内皮由来血管拡張物質である一酸化窒素 (NO) を中心に検討し、若干の知見を得たので文献的考察を加え報告する。

I. 対象と方法

当院における安定維持期の透析患者 5 例 (男性 2 名, 女性 3 名) を対象とした (表 1)。年齢は 54~81 歳 (平均 63.4 歳), 透析期間は 18 か月~198 か月 (平均 74.6 か月) だった。透析膜としては、非適合膜として再生セルロース膜 (クリランス-S, テルモ社製) および適合膜としてポリスルホン膜 (PS-UW 膜, 川澄社製) をクロスオーバーで使用し、透析前, 開始 15 分, 透析終了直前に白血球 (WBC), 血小板 (Plt), 血漿中 PMNE, 血清中 IL-6, IL-8, NO を測定して比較検討した。PMNE は EIA 法 [測定機器: イムノリーダー,

試薬キット: 血漿中顆粒球エラストーゼ測定キット (三和化学研究所)], IL-6 は CLEIA 法 (測定機器: ルミパルス 1200, 試薬キット: 無), IL-8 は ELISA 法 [測定機器: イムノリーダー, 試薬キット: ヒト IL-8 ELISA キット (富士レビオ)], NO はグリース法により, TCI-NOX 1000 (東京化成社製) にて行い、亜硝酸イオンと硝酸イオンのいずれも測定し Total NO (NOx) とした。

試験期間以前の使用透析膜は、症例 1 から 5, それぞれ, FB 130 P (CTA 膜, ニプロ社製), PS 1.3 UW (PS 膜, 川澄社製), PS 1.6 UW, FB 130 P, PAN 150 SF (PAN 膜, 旭メディカル社製) であった。

なお、両膜間において、採血日は週はじめの同じ曜日とし、RC 膜使用後 2 週間後に、PS 膜を使用して比較検討した。

透析条件に関しては、透析時間は 4 時間に統一し、透析液流量 500 ml/min, 血流量 150~200 ml/min (同一患者では一定), 抗凝固剤はヘパリンにて ACT 150 前後になるようにコントロールし、検討期間中は、透析条件の変更は行わなかった。

データはすべて平均±標準偏差 (mean±SD) で表した (表 2)。また、15 分値, 240 分値において、透析前値 (0 分) に対する百分率 (%) をグラフに示し (図 1~6), 統計学的検討は *t* 検定により行い, $p < 0.05$ を有意水準とした。

II. 結 果

1. 白血球数 (WBC) の変動

WBC の減少率は、15 分値で PS 膜で 21% に対し、RC 膜で 71% と後者で有意に大きかった ($p < 0.01$)。240 分値においては両膜ともほぼ前値に復しており、有意差はみられなかった (図 1)。

2. 血小板数 (Plt) の変動

Plt は、RC 膜の 15 分値において、前値に比べ有意な減少 ($p < 0.05$) がみられたが、両膜間で有意差はみら

表 1 患者プロフィール

症例	年齢 (歳)	性	原疾患	DW (kg)	透析回数	透析期間 (月)	使用ダイアライザー
1	81	M	腎硬化症	41.5	3回/週	43	CL-S 1.2*, PS 1.3
2	63	F	慢性糸球体腎炎	51.0	3回/週	198	CL-S 1.2, PS 1.3
3	54	M	腎硬化症	61.5	3回/週	90	CL-S 1.5, PS 1.6
4	64	F	慢性糸球体腎炎	44.5	3回/週	24	CL-S 1.2, PS 1.3
5	55	F	慢性糸球体腎炎	42.5	2回/週	18	CL-S 1.5, PS 1.6

*膜面積 (m²)

表 2 透析中の各種パラメーターの変動

使用膜	time (min)	WBC (/mm ³)	Plt (×10 ⁴ /mm ³)	PMNE (μg/l)	NO (nmol/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)
CL-S 膜	0	4900.0±628.5*	16.6±5.3	60.8±9.5	96.0±24.2	8.2±4.2	13.8±3.0
	15	1400.0±418.3	15.0±4.8	54.0±12.9	86.9±22.1	8.2±4.9	13.6±1.5
	240	5380.0±1697.6	16.3±5.3	251.2±85.7	60.9±21.9	15.1±5.8	15.7±4.9
PS 膜	0	5640.0±1128.3	16.0±5.1	58.4±13.8	119.2±43.6	16.5±17.7	14.8±4.0
	15	4380.0±1030.5	15.2±4.6	62.2±17.3	104.6±30.2	15.9±17.3	12.6±0.3
	240	5240.0±1110.4	16.9±5.1	118.8±69.1	59.8±19.0	14.9±11.8	12.5±0.1

*データは全て、mean±SD で表示

図 1 白血球数 (WBC) の変動
n=5, mean±SD, **p<0.01 vs time (0) 図 2 血小板数 (Plt) の変動
n=5, mean±SD, *p<0.05 vs time (0)

れなかった。240 分値においては、WBC 同様に両膜ともほぼ前値に復しており、有意差はみられなかった(図 2)。

3. 顆粒球エラスターゼ (PMNE) の変動

PMNE は、両膜とも 15 分値では上昇せず、240 分値に上昇がみられたが、PS 膜で 210.8% の上昇に対し、RC 膜では 427.3% の上昇と有意に大きかった (p<0.05) (図 3)。

4. 一酸化窒素 (NOx) の変動

NO は、両膜とも 15 分値において有意な減少を認め

たが (p<0.05)、両膜間で有意差はなかった。また、240 分値においては、さらに減少傾向がみられたが、両膜間で有意差はなかった (図 4)。

5. インターロイキン 6 (IL-6) の変動

IL-6 は、15 分値においては、両膜とも有意な変動を示さなかったが、RC 膜の 240 分値において 212.8% と前値に比べ有意な上昇がみられた (p<0.05)。しかし、両膜間では有意差は認められなかった (図 5)。

6. インターロイキン 8 (IL-8) の変動

IL-8 は、透析中有意な変動を示さず、一定の傾向を

図3 顆粒球エラスターゼ (PMNE) の変動
n=5, mean±SD, *p<0.05 vs time (0)

図5 インターロイキン6 (IL-6) の変動
n=5, mean±SD, *p<0.05 vs time (0)

図4 一酸化窒素 (NOx) の変動
n=5, mean±SD, **p<0.01 vs time(0),
*p<0.05 vs time (0)

図6 インターロイキン8 (IL-8) の変動
n=5, mean±SD

認めなかった (図6)。

7. 各種パラメータの相関

全症例に検討で、 Δ WBC (15分) と Δ PMNE (240分) の間には、負の一次相関が認められた (図7)。
 Δ PMNE (240分) と Δ IL-6 (240分) の間には、正の一次相関が認められた (図8)。

III. 考 察

血液透析領域で、生体適合性の問題が取りあげられるようになったのは、1977年 Craddock ら⁹⁾が透析中に起こる一過性白血球減少の発症機序として、透析膜により引き起こされた補体の活性化を考えたことに端を発している。また、1983年、Henderson ら¹⁾により

透析中に起こる発熱、低血圧、その他炎症反応を引き起こすものとして、透析膜により生じた活性化補体の刺激を受けて単核球から産生されたインターロイキン-1 (IL-1) が考えられ、インターロイキン仮説が提唱された。その後、透析治療によるサイトカイン産生はIL-1のみならず、腫瘍壊死因子(TNF)やIL-6, IL-8などの炎症性サイトカインも影響を受けることが明らかにされてきた⁷⁻⁹⁾。

RC膜は、補体の活性化による一過性の白血球減少、血小板の減少、初回透析症候群、サイトカインの産生刺激を起こし、長期的には透析アミロイドーシス、動脈硬化等をもたらす危険性が懸念されている。そのため、優れた生体適合性を有する種々の合成膜が開発されている。

図7 $\Delta WBC(15)$ と $\Delta PMNE(240)$ との相関
 $\Delta K(t) = K(t) - K(0)$. 任意の時間(t)における Δ 値($\Delta K(t)$)は、それぞれの時間の実測値 $K(t)$ から透析前値 $K(0)$ の差から算出した。

一方、それに伴い、透析液中エンドトキシンの逆濾過、逆拡散が問題となり、それによるサイトカインの産生も注目されている。特に、合成高分子膜では、エンドトキシンフラグメントの通過は従来の膜よりさらに容易となり、体内への侵入を示唆する報告もある¹⁰⁾。

生体適合性という点から最も古くより注目されてきたのが、白血球減少作用である。今回の検討においても、RC膜では体外循環開始後15分値で前値の29%と著明な減少を示したのに対し、PS膜では79%と軽度であった。この白血球の減少(hemodialysis leukopenia)は補体の活性化によって引き起こされると考えられており、ポリアクリルニトリル(PAN)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、エパール(EVAL)膜などの合成高分子膜でも、PS膜同様に、白血球の減少は軽度であるとの報告がなされている¹¹⁾。

血小板に関しても、15分値において、RC膜で減少の程度が大きく、PS膜で減少の程度が小さかったが、これは白血球の変化に比べ軽度であった。

PMNEは、透析において、好中球の脱顆粒化によって放出され、以前より、生体適合性の指標として使用しうるものとして注目されてきた¹²⁾。今回の検討においても、両膜で透析後に上昇がみられ、特にRC膜で有意に上昇しており、従来の報告通り、生体適合性の指標として有用と思われた。

また、 $\Delta PMNE(240)$ と $\Delta WBC(15)$ の間に負の一次相関が認められ、白血球の減少に伴って白血球からPMNEが放出されると推測される。時相のずれは白血球が刺激されてからPMNEの放出までに時間がかかることを意味し、単なる放出刺激ではなく蛋

図8 $\Delta IL-6(240)$ と $\Delta PMNE(240)$ との相関

白合成を介する可能性も考えられる。

NOは、最近、透析時の低血圧に関連するとの報告^{13,14)}がなされているが、生体適合性の指標としての報告は少ない。今回の検討でも、両膜において、時間の推移とともに、減少傾向を示したが、両膜間には有意差はみられず、血液透析中の生体適合性の指標としてはあまり有用ではない。しかし、Amoreら¹⁵⁾は生体適合膜のPMMAと生体不適合膜のクプロファン膜で刺激した血液を血管内皮細胞に添加して6時間インキュベーションして、以下の結果を得ている。すなわち、PMMAはNOやサイトカイン産生を刺激しないが、クプロファン膜はNOやサイトカイン産生を刺激したとしている。つまり、通常の透析時間(4~5時間)ではNOやサイトカイン産生は変化しないが、もっと長時間ではそれら変動する可能性があることを意味している。

IL-6は、最近、生体適合性の指標として有用との報告がなされているが、我々はすでにRC膜がPAN膜に比べて明らかにIL-6産生を刺激することを報告している¹⁶⁾。また、鈴木ら¹⁷⁾は透析前後におけるIL-6の変化は、PMMA膜よりもCTA膜で増加の程度が大きいと報告した。今回の検討においては、240分値において、RC膜で有意な上昇を示し、有意差は認めないものの、PS膜では上昇の程度が小さく、生体適合性の指標として有用と思われた。一方、 $\Delta PMNE(240)$ と $\Delta IL-6(240)$ の間には、正の一次相関が認められることから、PMNEとIL-6は同じ方向で変動する可能性が示唆され、両者に何らかの因果関係があると推察される。

IL-8は、IL-6同様、生体適合性の指標として有用との報告¹⁸⁾がみられ、宮崎ら¹⁹⁾はRC膜、PMMA膜に比

べPS膜, PAN膜ではIL-8の変動が少なく生体適合性に優れているとしている。我々の検討では, 透析中有意な変動を示さなかったが, 今後の検討が必要であろう。

結 論

WBC, PMNEなどの従来の生体適合性の他に, 最近では, IL-1, IL-6, IL-8などのサイトカインがその指標として注目を集めている。

今回の我々の検討では, 生体適合性の指標として, WBC, PMNEが優れていることが確認されたのに加え, IL-6も生体適合性の指標として有用であると思われた。

謝辞：本論文の要旨は第43回日本透析医学会総会において発表した。また, 本研究は平成9年度福島県立病院医学研究補助金により実施された。

文献

- Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldon S: Hemodialysis hypotension: The interleukin hypothesis. *Blood Purif* 1: 3-8, 1983
- Dinarello CA: Cytokines: Agents provocateurs in hemodialysis? *Kidney Int* 41: 683-694, 1992
- 土田康博, 後藤邦広, 上野幸司, 久野宗寛, 赤井洋一, 田部井薫, 草野英二, 浅野 泰: 各種改良型PS膜の性能評価。腎と透析45別冊ハイパフォーマンスマンブレン'98: 80-83, 1998
- 当間茂樹: 新しいPMMA膜(BG-1.6U)の性能評価(vs FB-170U, BK-1.6U, BK-1.6P)。腎と透析43別冊ハイパフォーマンスマンブレン'97: 132-134, 1997
- 藤森 明, 吾妻眞幸, 内藤秀宗, 宮崎哲夫, 川島 周, 水口 潤, 川原和彦: ビタミンE固定化ポリスルホン膜透析器の臨床評価。腎と透析43別冊ハイパフォーマンスマンブレン'97: 135-138, 1997
- Craddock PR, Fehr J, Dalmaso AP, Brigham KL, Jacob HS: Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membrane. *J Clin Invest* 59: 879-888, 1977
- 永井哲士, 中島 豊, 鍋島邦浩, 金森直明, 高山公洋, 秋沢忠男, 北岡建樹, 越川昭三: 透析膜が培養血管内皮細胞, 滑膜細胞のサイトカイン産生に与える影響。腎と透析別冊1991: 25-29, 1991
- 丹羽利充, 宮崎高志, 前田憲志: 血液透析膜の生体適合性の指標としての血漿IL-8濃度および末梢血単核球IL-8 mRNAの発現。人工臓器23: 391-394, 1994
- 志和正明, 横田武彦, 横田欣也, 松浦達雄: 血液透析患者の好中球Superoxide anion産生能と血漿TNF- α ・IL-8濃度との関連性についての検討。透析会誌27: 41-46, 1994
- Yamagami S, Adachi T, Sugimura T: Bacterial contamination of the dialysate and its biological effects. *人工臓器* 19: 757-759, 1990
- 上野幸司, 田部井薫, 後藤邦広, 土田康博, 久野宗寛, 丹波嘉一郎, 草野英二, 浅野 泰: 各種HPMの性能評価。腎と透析43別冊ハイパフォーマンスマンブレン'97: 74-78, 1997
- 山木万里郎, 草野英二, 進藤靖夫, 細井春久, 永島弘文, 武藤重明, 鈴木宗弥, 浅野 泰, 櫻林郁之介: 血液透析による血中顆粒球エラスターゼ値の変動。透析会誌22: 1195-1200, 1989
- Yokokawa K, Mankus R, Mohammed G, Saklayen MD, Kohno M, Yasunari K, Minami M, Kano H, Horio T, Takeda T, Mandel AK: Increased nitric oxide production in patients with hypotension during hemodialysis. *Ann Intern Med* 123: 35-37, 1995
- Kusano E: Possible roles of nitric oxide in the blood pressure regulation with special reference to hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 1: 12-19, 1997
- Amore A, Bonaudo R, Ghigo D, Arese M, Costamagna C, Cirina P, Gianoglio B, Perugini L, Coppo R: Enhanced production of nitric oxide by blood-dialysis membrane interaction. *J Am Soc Nephrol* 6: 1278-1283, 1995
- 宮田幸雄, 草野英二, 坂入康則, 石原島繁彦, 浅野 泰, 伊藤喜久, 上野幸司, 小藤田敬介: 透析膜によるインターロイキン6産生の検討。腎と透析別冊ハイパフォーマンスマンブレン'92: 148-150, 1992
- 鈴木利昭, 長沼信治, 寺岡 慧, 太田和夫: 血液透析膜の生体適合性の指標としてのインターロイキン6の有用性。腎と透析別冊ハイパフォーマンスマンブレン'91: 17-21, 1991
- 丹羽利充, 宮崎高志, 森田博之, 前田憲志: 血液透析による血漿IL-6, IL-8濃度への影響。人工臓器22: 1055-1057, 1993
- 宮崎高志, 丹羽利充, 佐藤元美, 都築徹哉, 上間寛治, 筑紫さおり, 妹尾久雄, 前田憲志: Interleukin-8の遺伝子発現および血漿濃度に対する血液透析の影響からみた透析膜の生体適合性。透析会誌28: 59-64, 1995