

維持血液透析患者におけるエリスロポエチン活性

— 第2報 —

CFU-E由来コロニー形成能に対するポリアミンの影響

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

吉田克法

ERYTHROPOIETIN ACTIVITY IN CHRONIC HEMODIALYTIC PATIENTS: EFFECT OF POLYAMINE ON COLONY FORMING UNIT OF ERYTHROID (CFU-E)

KATSUNORI YOSHIDA

Department of Urology, Nara Medical University

Received January 9, 1990

Summary: It has been thought that the pathogenesis of anemia in patients with chronic renal failure may be largely due to erythropoietin (EPO) deficiency. But recently there have been reports that uremic inhibitors may suppress the activity of EPO and reduce the maturation of erythropoiesis.

Polyamine is well known to be involved in the regulation of cellular proliferation and differentiation. The serum levels of polyamine are elevated in chronic hemodialytic patients, and lowered immediately by hemodialysis.

In this study the author first measured polyamine level (putrescine, spermidine, spermine) by high performance liquid chromatography (HPLC) in 20 chronic hemodialytic patients, and investigated the effect of polyamine on the erythropoiesis. Secondly, each polyamine is added directly to the medium of fetal mouse liver cell culture plates in order to confirm the direct inhibitory effect on the growth of CFU-E in the presence of recombinant human EPO (r-huEPO).

Each polyamine level in chronic hemodialytic patients was higher than normal, and there was significant negative correlation between polyamine and erythropoietic activity designed by CFU-E/log EPO. In the *in vitro* study, the growth of CFU-E under r-huEPO was substantially suppressed by polyamine in the manner of dose response.

These results suggest the conclusion that polyamine had an inhibitory effect on the proliferation or maturation of erythroid precursor cells and was intimately involved in the pathogenesis of the anemia in chronic hemodialytic patients.

However further study should be done for full interpretation of its clinical importance in anemia associated with hemodialytic patient.

Index Terms

polyamine, erythropoiesis, colony forming unit of erythroid (CFU-E), chronic hemodialytic patients

緒 言

末期腎不全患者に認められる貧血は赤芽球分化に最も重要な液性因子である Erythropoietin (EPO) の産生障害が重要な原因である¹⁾²⁾³⁾⁴⁾が、以下のいくつかの臨床事実より uremic inhibitors による赤血球寿命および赤芽球分化障害も末期腎不全患者での貧血の病態に関与していることが知られている⁵⁾。すなわち 1) 透析導入後の尿毒症状態の改善により貧血状態にも改善が認められること¹⁾³⁾⁶⁾⁷⁾。2) 腎機能が廃絶していると考えられる長期血液透析例においてもヘマトクリット値が30%前後を維持し得ている症例も少なくない。3) recombinant-human-EPO (r-huEPO) 投与による貧血状態の改善に際し非腎性貧血症の改善に必要な血中 EPO 濃度よりかなり高い非生理的濃度が必要とされている⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。4) 維持血液透析患者での r-huEPO 投与に対する反応性に関して個体差が大きく、かつ low responder と解釈される症例も少なくない⁹⁾。

前報(第1報)において、末期腎不全患者あるいは維持血液透析患者における血中 EPO 濃度は現在一般的に用いられている RIA 法¹¹⁾¹²⁾による抗原量(蛋白量)の測定では健常人に比較して低下傾向は認められず、むしろ高い傾向が認められる¹³⁾のに対し、fetal mouse liver cell を用いた in vitro bioassay 法による EPO 活性の測定では明らかに健常人より低い傾向を示していることを著者は確認した。

腎不全患者の血清に認められる uremic inhibitors はこれまで文献的には小分子物質から中分子物質まで多数の物質が報告されており¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾、これらが尿毒症にみられる種々の合併症の病態と深くかかわっていることが指摘されてきたが、その中で貧血症への病態に関与する uremic inhibitors の一つとして polyamine が知られている¹⁹⁾。しかしながら、これまでの報告では polyamine の造血抑制作用、ことに赤芽球系細胞への特異性については否定的な報告もあり、確認されていない⁶⁾²⁰⁾²¹⁾。また in vitro での抑制効果は容認されても臨床的意義については不明である。

そこで著者は、まず維持血液透析患者の造血機能に対する polyamine の影響を実証するために、1) RIA 法により EPO 抗原蛋白量を確認した上で、同一検体(血漿)で fetal mouse liver cell を用い colony forming unit of erythroid (CFU-E)由来コロニーを算定し、形成コロニー数/log EPO により表される患者血漿中の単位 EPO あたりの EPO 活性を確認し、2) 同一検体赤血球中 putrescine, spermidine, spermine の各 polyamine を

high performance liquid chromatography (HPLC) で測定し、3) 各 polyamine 濃度と形成コロニー数/log EPO 値と比較検討した。

更に、直接的造血抑制作用を確認するために4) in vitro で fetal mouse liver cell culture plate に polyamine を直接加え CFU-E 形成への抑制効果を確認した。

対象および方法

対象症例：対象症例は奈良県立付属病院透析室およびその関連病院において chronic glomerulonephritis を原疾患とする維持血液透析患者、男性14例、女性6例の合計20例で、年齢は11歳より69歳、平均46.3±14.2歳、透析期間は35ヵ月より151ヵ月、平均81.9±34.9歳であった。また過去3ヵ月に輸血歴がなく、血清鉄、血清フェリチン値が正常である症例につき検討した。

赤血球中 polyamine 測定：Fig. 1 に示すごとく、ヘパリン加全血を500gにて20分間遠心分離し、生理食塩水

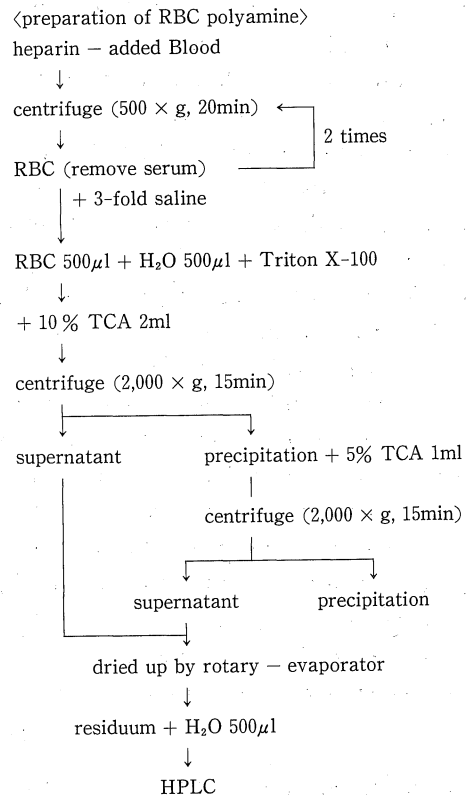


Fig. 1. Method for determination of polyamine in erythrocyte.

で2回洗浄し、充填赤血球を作成した。赤血球 polyamine 試料は、充填赤血球 500 μ l に蒸留水 500 μ l, Triton-X 一滴にて完全溶血させ、ついでトリクロル酢酸を加え、十分に除蛋白後、得られた上清をエチルエーテルで洗浄しロータリーエバポレーターを用いて蒸発乾固した後得られた試料を HPLC にて測定した。HPLC 装置は、高压溶媒ポンプ 2 台 (HCC 803 D, CCPD, 東洋ソーダ), オートサンプラー (AS 8000, 東洋ソーダ), polyamine 分析用充填カラム (TSK-Gel-aminopak, 東洋ソーダ), カラム用恒温装置 (CO-8, 東洋ソーダ), 蛍光検出器 (FS-8000, 東洋ソーダ), データ処理用コンピュータ (CP-8000, 東洋ソーダ) で構成した。オートサンプラーにより試料 20 μ l を HPLC に注入し、溶離液としてクエン酸緩衝液 (pH 5.3), 流速は 0.5 ml/min, カラム温度 55°C で溶離した。測定にはオルトフタルアルデヒド試薬による蛍光反応を用い励起波長 340 nm より 470 nm で検出した。赤血球中ポリアミン値は nmol/ml すなわち単位充填赤血球容積中の nmol で表現した。

Fetal mouse liver cell assay 法: fetal mouse liver cell を用いた in vitro bioassay 法による colony 形成能測定の操作概略は、前報 (第1報) のごとく、培地上に維持血液透析患者血清を混和し fetal mouse liver cell を分注し、臨床例による CFU-E 由来コロニー形成能を測定した後、まず fetal mouse liver cell 自体に対する polyamine の直接的影響を観察するために r-huEPO を加えない培地に各濃度の polyamine を混和し、8 個以上の後期赤芽球系前駆細胞コロニー数を算定し、その上で r-huEPO を加えた同じ assay 系で同様にコロニー数を算定し polyamine の EPO 活性に及ぼす影響を検討した。

また更に、対照実験として同様の条件にてクレアチンを 7 mg/ml (0.62 μ mol/ml) の濃度で培地に添加し比較した。

RIA 法: RIA 法による EPO 抗原量の測定は、前報のごとく、患者血清および標準試料に抗 EPO 血清を添加後、25°C で 20 時間反応後、標識 125 I-r-huEPO を加えて再度 20 時間反応させる非平衡法で測定した。

結 果

1) 維持血液透析患者における赤血球中 polyamine 濃度: putrescine が 1.48 ± 0.81 nmol/ml, spermidine が 25.6 ± 11.4 nmol/ml, spermine が 6.57 ± 3.87 nmol/ml であり、各 Polyamine において、正常値よりそれぞれ、4.1 倍、2.8 倍、1.2 倍と高値を示した (Fig. 2)。

2) Fetal mouse liver cell assay 法による colony 形成

能に対する r-huEPO の影響: 培地上に加えられた r-huEPO の濃度に依存してコロニー数は増加し、片対数図上で、 $r = 0.994$ ($p < 0.0005$) の有意な標準曲線が得られた (Fig. 3)。

3) 維持血液透析患者における RIA 法による血中 EPO 濃度: 20 症例における EPO 濃度は 7.5 mU/ml より 59.0 mU/ml, 平均 18.2 ± 13.14 mU/ml であり、前報 (第1報) と同様に健常群に比較して有意差を認めなかった (Fig. 4)。

4) 維持血液透析患者血清によるコロニー形成能: 同症例の血清による CFU-E 系による Δ コロニー数は 50.8 個より 80.8 個、平均 68.7 ± 8.79 個で健常群に比較して有意に低下していた (Fig. 5)。

5) 維持血液透析患者における polyamine 濃度と造血能の関係: コロニー数と EPO 濃度の関係は、その標準曲線より単位 EPO 濃度 (log EPO) あたりの形成コロニー数、すなわち形成コロニー数/logEPO を eryth-

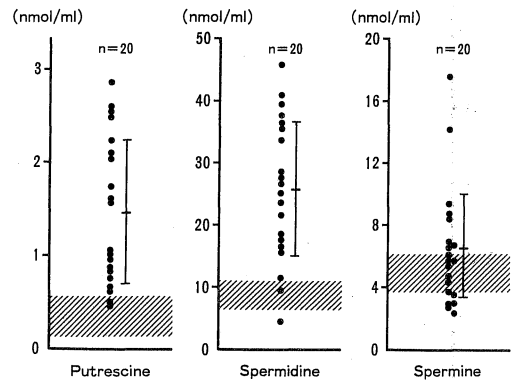


Fig. 2. Levels of polyamines in erythrocyte.

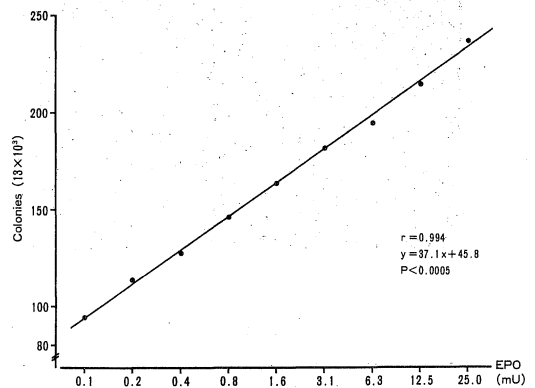


Fig. 3. log EPO dose-response standard curve.

ropoiesisの指標とすると、各Polyamine濃度とは putrescine: $r = -0.432$, spermidine: $r = -0.513$, spermine: $r = -0.501$ と有意な負の相関を示した (Fig. 6, 7, 8).

6) Fetal mouse liver cell 自体に対する polyamine の直接的影響: fetal mouse liver cell の培地に直接各 polyamine をそれぞれ 0.01 nmol/ml, 0.1 nmol/ml, 1.0 nmol/ml 加えた場合は、polyamine を加えないコントロールと比較してその減少率は putrescine で -0.90% , -2.59% , -1.94% , spermidine で -0.90% , -1.55% , -2.59% , spermine で -0.45% , -0.26% , -0.94% と各 polyamine でほとんど有意な抑制は認められなかった (Fig. 9).

7) 各濃度の r-huEPO 存在下での fetal mouse liver

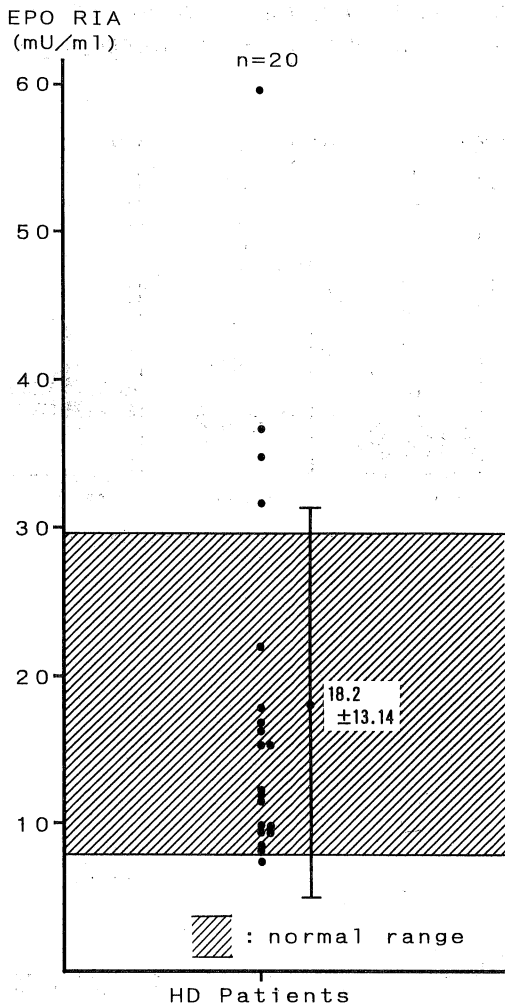


Fig. 4. EPO levels in the RIA.

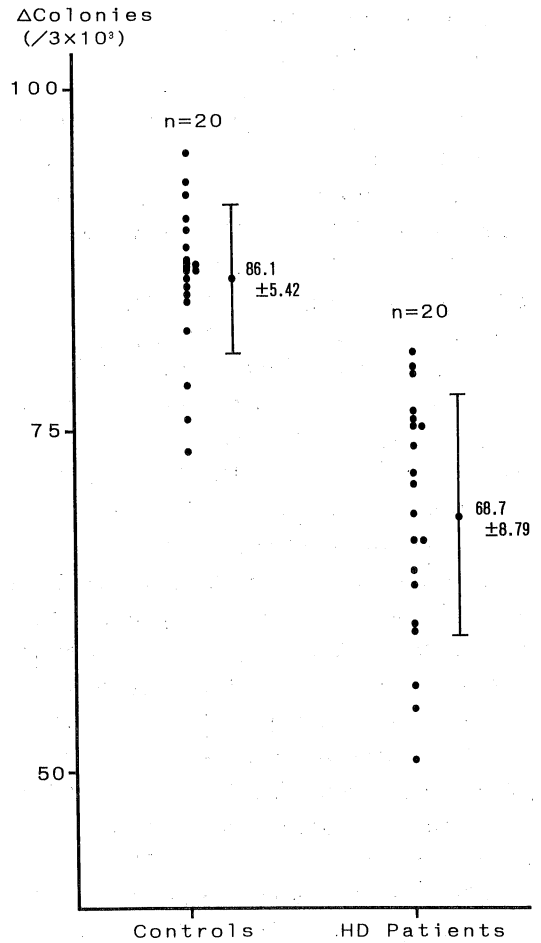


Fig. 5. ΔColonies in the bioassay.

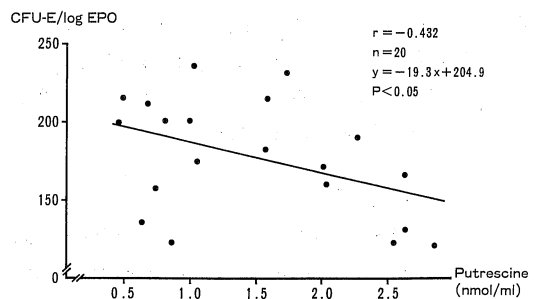


Fig. 6. CFU-E-derived colonies/log EPO in relation to putrescine in erythrocyte.

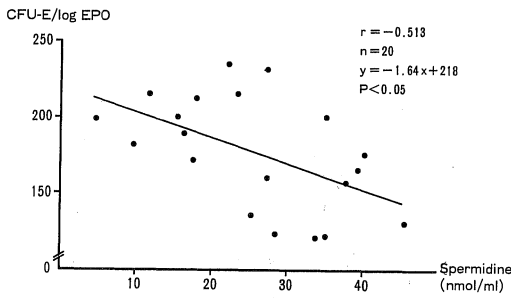


Fig. 7. CFU-E-derived colonies/log EPO in relation to spermidine in erythrocyte.

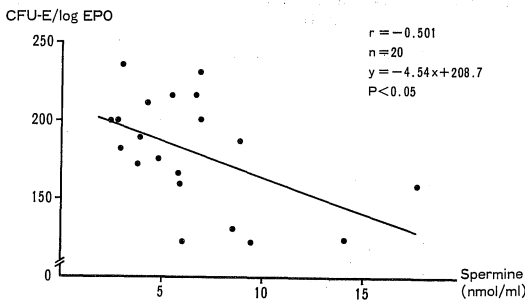


Fig. 8. CFU-E-derived colonies/log EPO in relation to spermine in erythrocyte.

cellの増殖能に対する polyamine の影響：培地に加えられた r-huEPO 濃度は、生理的 EPO 濃度と考えられる 156 mU/ml, 313 mU/ml および高濃度の 1250 mU/ml であり、そのコロニーの増加率で測定した。EPO 存在下においては polyamine の濃度に依存してコロニー形成能の抑制が認められたが、生理的 EPO 濃度存在下においては低濃度の polyamine では有意な差は認められなかった。しかし高濃度 EPO 存在下においては低濃度の polyamine でも有意な抑制傾向が認められ、EPO 濃度の上昇に伴い polyamine によるコロニー形成抑制作用は増加傾向が認められた (Fig. 10, 11, 12)。

また、同様の系における対照群としてのクレアチニン添加に関しては、ほとんど影響は認められなかった (Fig. 13.)。

考 察

EPO は主として腎で産生される分子量約 34,000 の糖鎖に富む酸性のポリペプチドホルモンであり、1977年三宅ら²²⁾によって初めて貧血患者尿より単離された。その後、遺伝子工学的手法の導入²³⁾²⁴⁾により純粋 EPO の大量生産が可能となり r-huEPO として基礎医学のみならず臨床医学の現場においても応用され画期的な臨床効果が得られつつある。

本邦においてもすでに r-huEPO phase 2 の治験段階を終了し、秋沢らの報告²⁵⁾によりその有用性が高く評価

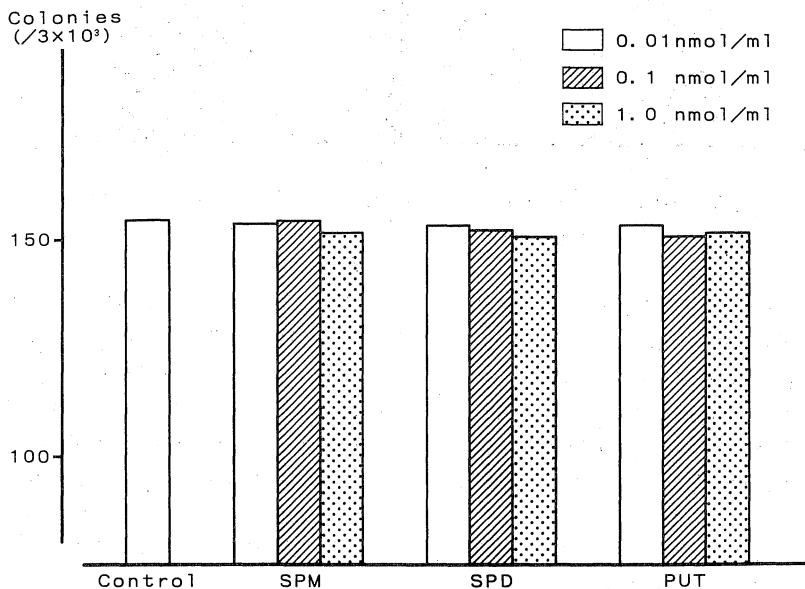


Fig. 9. Effect of polyamine on erythroid colony formation without EPO.

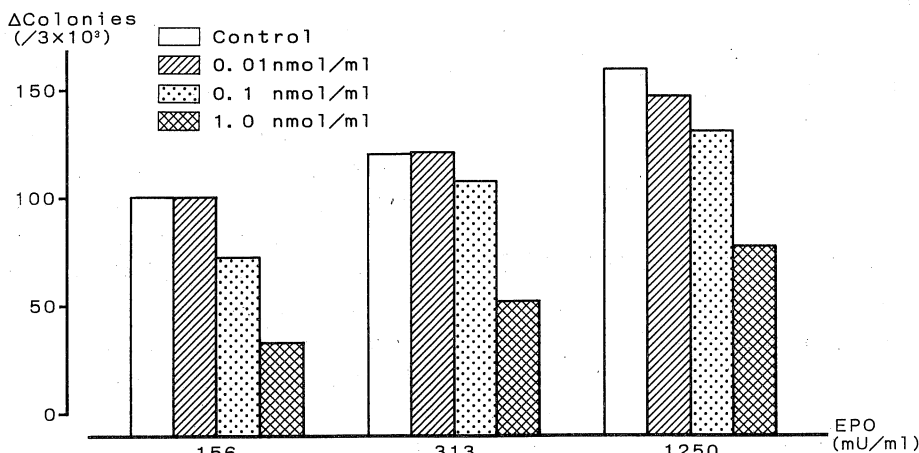


Fig. 10. Effect of putrescine on erythroid colony formation in medium with EPO.

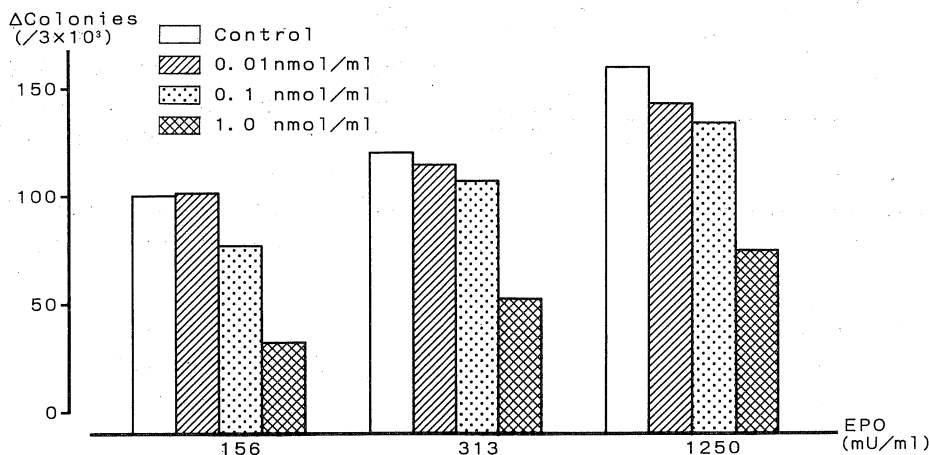


Fig. 11. Effect of spermidine on erythroid colony formation in medium with EPO.

されている。しかし 1988 年の腎臓学会において取り上げられたごとく phase study の治験例の検討が進むにともない治療効果の個人差が認められ無効例は皆無に近いものの投与初期より low response の症例あるいは治療途中より再度貧血の出現してくる症例が少数ながら認められており⁸⁾、尿毒症状態での造血抑制物質の存在が改めて認識されている。

著者も前報において、維持血液透析患者では RIA 法により測定される血漿 EPO 抗原蛋白量と CFU-E 由来コロニー形成に反映される生理学的活性値とは必ずしも一致せず、EPO 活性発現に対する uremic toxins による

抑制作用を確認した。これまで種々の uremic toxins が確認され、維持血液透析患者における貧血に対する uremic toxins の影響も報告されている²⁾¹⁷⁾²⁶⁾。

Polyamine もその一つで、spermine とその precursor である putrescine, cadaverine, spermidine よりなるが、分子量は 88-202 dalton と低分子物質ながら透析により十分除去できないため腎不全患者の赤血球、血清いずれにおいても健常者より有意に上昇することが確認されている¹⁹⁾²⁰⁾²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾。

Radtke²⁶⁾らは尿毒症患者の血清より Bio-Gel により分離した fraction の一部が健常者に比較し有意に上昇

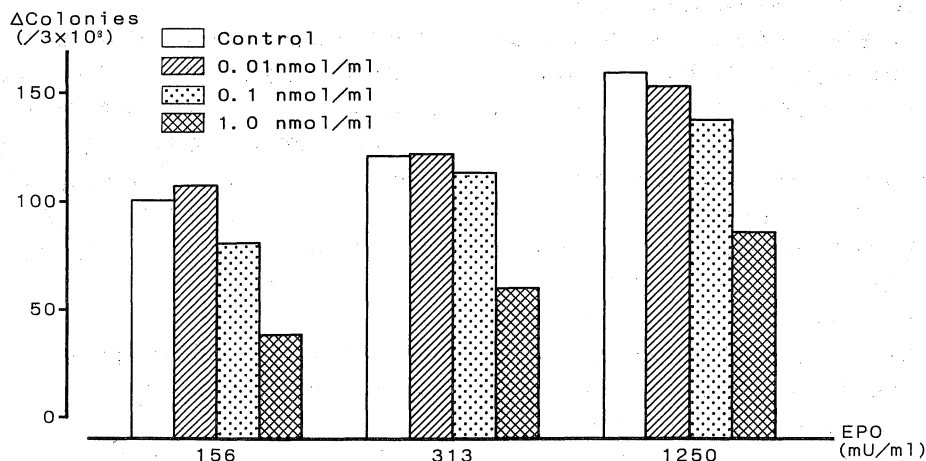


Fig. 12. Effect of spermine on erythroid colony formation in medium with EPO.

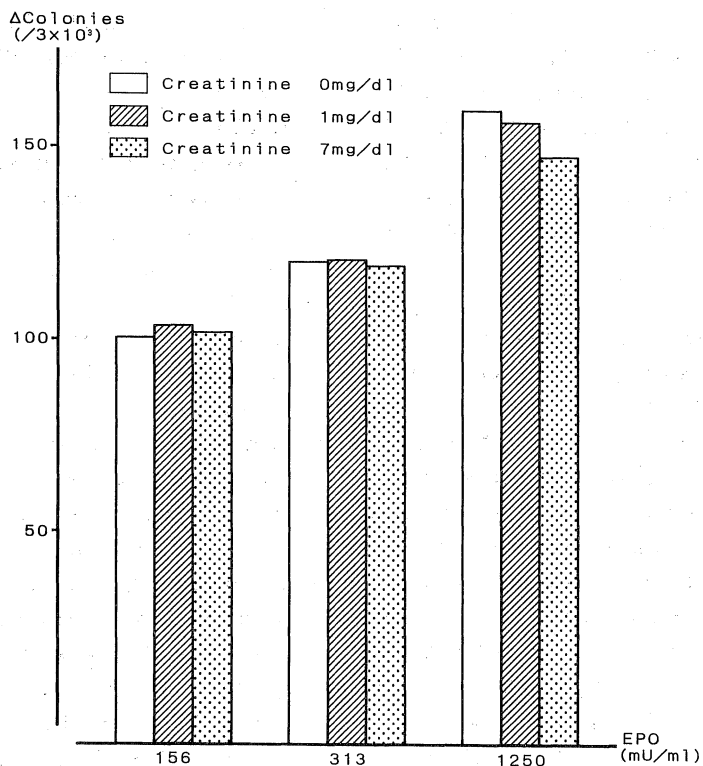


Fig. 13. Effect of creatinine on erythroid colony formation in medium with EPO.

し、その fraction が polyamine であることを確認した上で、spermine につき fetal mouse liver cell による培養コロニー法を用いて尿毒症患者の血清あるいは spermine 抗血清添加後の CFU-E 由来コロニー形成能への影響を比較し造血抑制物質としての polyamine を報告している。

また、Saito ら²⁸⁾ は HPLC を用い維持血液透析患者の polyamine を測定して、健常者に比較して有意に上昇していること、血清尿素窒素およびクレアチニンと有意な正の相関が認められ、また spermine に関してはヘマトクリットと有意な負の相関が認められることを報告し、同様に polyamine の造血抑制作用を報告している。

一方、Segal ら²⁰⁾ は bone marrow cell を用いて CFU-E, CFU-granulocyte-macrophage (CFU-GM), および CFU-megakaryocyte (CFU-Meg) への spermine および spermidine の影響を $5 \times 10^{-7}M$ より $5 \times 10^{-5}M$ 濃度で比較し、polyamine は CFU-E のみならず CFU-GM, CFU-Meg も同様に抑制し erythroid colony のみを特異的に抑制しないと報告している。

今回の著者の in vitro 実験系においても spermine については Radtke らの報告とほぼ同程度の polyamine 濃度でコロニー形成の抑制が確認され、これらの抑制は Segal の報告と同じく培地中 EPO 濃度を上昇させても解消されなかった。また更に、臨床検体においても血漿中単位 EPO 抗原量あたりのコロニー形成と血中 polyamine 濃度は負の相関を示し、臨床的にもこれらの polyamine が貧血症の病態発現に関与していることが確認された。

一方、putrescine については in vitro 実験系では spermine および spermidine と同程度の抑制をみたが、臨床検体では抑制傾向は spermine ならびに spermidine に比較して低かった。文献的にもこれまで putrescine については uremic toxin としての報告はなく、また維持透析患者における erythropoiesis に関しても報告はみられず、今回 in vitro 実験系での結果も培地中の fetal calf serum もしくは fetal mouse liver cell そのものに含まれる polyamine 代謝酵素により putrescine が培養中に spermidine および spermine に交換された結果である可能性は否定できない。²⁹⁾³⁰⁾ また最近 Gahl ら³¹⁾ は fetal calf serum 自体に含まれている polyamine oxidase の影響により、種々の細胞に対し毒性を有する aminoaldehyde が形成される可能性を指摘しており、この点については polyamine oxidase 阻害剤を用いた上での再確認が必要である。

謝 辞

稿を終えるに臨み、懇切なる御指導と御校閲を賜りました恩師岡島英五郎教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御校閲を頂きました本学第2生理学教室榎 泰義教授、第1内科学教室石川兵衛教授に感謝いたします。

また本研究に直接御指導を賜った本宮善恢講師ならびに技術的御指導を賜った化学教室井手 武先生に謝意の意を表すると共に御協力下さいました教室の諸兄に厚く御礼を申し上げます。

本論文の要旨は第38回日本泌尿器科学会中部総会、第32回日本腎臓学会総会にて報告した。

文 献

- 1) Caro, J. and Erslev, A. J.: Uremic inhibitors of erythropoiesis. *Seminars in Nephrology* 5: 128-132, 1985.
- 2) McGonigle, R. J. S., Husserl, F., Wallin, J. D. and Fisher, J. W.: Hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis effects on erythropoiesis in renal failure. *Kidney Int.* 25: 430-436, 1984.
- 3) Radtke, H. W., Clausner, A., Erbes, P. M., Scheuermann, E. H., Schoeppe, W. and Koch, K. M.: Serum erythropoietin concentration in chronic renal failure: Relationship to degree of anemia and excretory renal function. *Blood* 54: 877-884, 1979.
- 4) Adamson, J. W., Eschbach, J. and Finch, C. A.: The kidney and erythropoiesis. *Am. J. Med.* 44: 725-733, 1968.
- 5) Paganini, E. P.: Overview of anemia associated with chronic renal disease: Primary and secondary mechanisms. *Seminars in Nephrology* 9 (suppl. 1): S3-S8, 1989.
- 6) Delwiche, F., Segal, G. M., Eschbach, J. W. and Adamson, J. W.: Hematopoietic inhibitors in chronic renal failure: Lack of in vitro specificity. *Kidney Int.* 29: 641-648, 1986.
- 7) Radtke, H. W., Frei, U., Erbes, P. M., Schoeppe, W. and Koch, K. M.: Improving anemia by hemodialysis: Effect on serum erythropoietin. *Kidney Int.* 17: 382-387, 1980.
- 8) 鈴木正司: r-HuEPO の投与量: 短期投与と長期投

- 与. 臨床透析 5: 89-108, 1989.
- 9) **Eschbach, J. W.**: The anemia of chronic renal failure: Pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney Int.* 35: 134-148, 1989.
 - 10) **Eschbach, J. W., Egrie, J. C., Downing, M. R., Browne, J. K. and Adamson, J. W.**: Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: Results of a combined phase 1 and 2 clinical trial. *N. Engl. J. Med.* 316: 73-78, 1987.
 - 11) **Garcia, J. F., Sherwood, J. and Goldwasser, E.**: Radioimmunoassay of erythropoietin. *Blood Cells* 5: 405-419, 1979.
 - 12) 大東貴志, 橘 政昭, 出口修宏, 田崎 寛: ラジオイムノアッセイ法を用いた慢性腎不全患者の血漿エリスロポエチン濃度. 透析会誌. 21: 913-918, 1988.
 - 13) 梅津道夫, 多川 斉, 斉藤 恒博, 山門 実, 浦部 晶夫, 高久史麿, 桑木知朗, 佐々木透, 高梨直樹: 血中エリスロポエチン濃度測定用の新しい放射免疫測定法の開発と透析患者における臨床検討. 透析会誌. 21: 913-918, 1988.
 - 14) **Hicks, J. M., Young, D. S. and Wootton, I. D. P.**: Abnormal blood constituents in acute renal failure. *Clin. Chim. Acta* 7: 623-633, 1962.
 - 15) **Bergstrom, J. and Furst, P.**: Uremic toxins. *Kidney Int.* 13 (Suppl. 8): S9-S12, 1978.
 - 16) 斉藤 明: 中分子量物質 (低分子量蛋白) の分析. 腎と透析 23: 581-586, 1987.
 - 17) **Solangi, K., Lutton, J. D., Abraham, N. G., Ascensao, J. L., Goodman, A. and Levere, R. D.**: Isolation and purification of erythropoiesis inhibitory activity from uremic sera. *Nephron* 48: 22-27, 1988.
 - 18) **Kopple, J. D., Tam, Ch. F., Wang, M. and Swendseid, M. E.**: Diamine oxidase in renal failure. *Kidney Int.* 13 (Suppl. 8): S20-S25, 1978.
 - 19) **Campbell, R., Talwalkar, Y., Bartos, D., Bartos, F., Musgrave, J., Harner, M., Puri, H., Grettie, D., Dolney, A. M. and Logan, B.**: Polyamine, uremia, and hemodialysis. *in* *Advances in Polyamine Research* (Campbell, R. A., et al. eds.). Vol 2, Raven Press, New York, p319-343, 1978.
 - 20) **Segal, G. M., Stueve, T. and Adamson, J. W.**: Spermine and spermidine are non-specific inhibitors of in vitro hematopoiesis. *Kidney Int.* 31: 72-76, 1987.
 - 21) **Kushner, D. S., Beckman, B. S. and Fisher, J. W.**: Editorial Review: Do polyamines play a role in the pathogenesis of the anemia of end-stage renal disease?. *Kidney Int.* 36: 171-174, 1989.
 - 22) **Miyake, T., Kung, Ch. K. H. and Goldwasser, E.**: Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558-5564, 1977.
 - 23) **Jacobs, K., Shoemaker, Ch., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F., Kawakita, M., Shimizu, T. and Miyake, T.**: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810, 1985.
 - 24) **Lin, F. K., Suggs, S., Lin, Ch. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stanbinsky, Z., Badrawi, S. M., Lai, P. H. and Goldwasser, E.**: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7580-7584, 1985.
 - 25) **Akizawa, T., Koshikawa, S., Takaku, F., Urabe, A., Akiyama, N., Mimura, N., Otsubo, O., Nihei, H., Suzuki, Y., Kawaguchi, Y., Ota, K., Kubo, K., Marumo, F. and Maeda, T.**: Clinical effect of recombinant human erythropoietin on anemia associated with chronic renal failure: A multi-institutional study in Japan. *Int. J. Artif. Organs* 11: 343-350, 1988.
 - 26) **Radtke, H. W., Rege, A. B., LaMarche, M. B., Bartos, D., Bartos, F., Campbell, R. A. and Fisher, J. W.**: Identification of spermine as an inhibitor of erythropoiesis in patients with chronic renal failure. *J. Clin. Invest.* 67: 1623-1629, 1981.
 - 27) **Tam, Ch. F., Kopple, J. D., Wang, M. and Swendseid, M. E.**: Alterations of monoamine oxidase activity in uremia. *Kidney Int.* 7: 328-332, 1975.
 - 28) **Saito, A., Takagi, T., Chung, T. G. and Ohta, K.**: Serum levels of polyamines in patients with

- chronic renal failure. *Kidney Int.* **24**: 234-237, 1983.
- 29) 井上秀夫, 竹田義朗: ポリアミンの生合成—オルニチン脱炭酸酵素を中心に. 蛋白質・核酸・酵素 **26**: 402-210, 1981.
- 30) 岡田昌人, 川島誠一, 今堀和友: ポリアミン酸化酵素. 蛋白質・核酸・酵素 **26**: 411-419, 1981.
- 31) Gahl, W. A. and Pitot, H. C.: Polyamine degradation in foetal and adult bovine serum. *Biochem. J.* **202**: 603-611, 1982.