

慢性腎不全患者におけるアルミニウムに関する研究 —造血能への影響—

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

新井邦彦

STUDIES ON ALUMINIUM ACCUMULATION IN THE PATIENT WITH CHRONIC RENAL FAILURE

—AN INHIBITORY EFFECT BY ALUMINIUM IN ERYTHROPOIESIS—

KUNIHICO ARAI

Department of Urology, Nara Medical University

Received July 29, 1994

Abstract: Among several inhibitory factors proposed in refractory anemia for rHuEPO, Aluminium (Al) is of most importance in the clinical setting, ruling out an iron deficiency. So, an evaluation of Al accumulation in the patient with chronic renal failure and an inhibitory effect by Al in erythropoiesis have been investigated in this study to infer some aspect of the pathogenesis of Al-induced anemia. An inhibitory effect by Al in erythropoiesis was assessed by in vitro culture method of CFU-E colony formation using fetal mouse liver cells.

1) Evaluation of Al accumulation: RBC-Al content in patients was apparently higher than that in healthy subjects and disclosed clear correlation with Δ Al ($r=0.540$, $p<0.05$). In addition, comparative analysis between RBC-Al and Hb concentration also showed significant correlation ($r=-0.400$, $p<0.001$) and RBC-Al value corresponding to Hb concentration of as low as 6 g/dl was to be $65 \mu\text{g}/10^{13}$ cells or so.

2) In vitro study of CFU-E: CFU-E colony count was significantly reduced by application of Al in all experimental conditions. Furthermore, inhibitory effect found in Al application preceding the addition of EPO was to be about double the degree found in other experiments.

3) Erythropoietic activity: CFU-E/logEPO of each patient correlated significantly with RBC-Al value ($r=-0.486$, $p<0.05$). Based upon the above three studies, the following conclusions could be proposed, which may substantially contribute to protecting patients with chronic renal failure from Al-intoxication more safely.

Conclusions: RBC-Al content is a precise parameter for prediction of Al-intoxication; 2) RBC-Al measured in patients showed that a patient on maintenance dialysis having a risk of Al is not uncommon, irrespective of current widely expanded prophylaxis measures; 3) Al inhibitory effect on CFU-E formation is confirmed by in vitro study as well as in vivo study; 4) RBC-Al value of $65 \mu\text{g}/10^{13}$ cells is proposed as the critical value to predict the risk of Al intoxication; 5) in the rHuEPO therapy of patients having an RBC-Al level higher than this level, removal therapy of Al should be considered.

Index Terms

chronic renal failure, Al, erythropoiesis, RBC-Al, CFU-E

緒言

Newcastle-bone disease¹⁾によって喚起された維持血液透析患者におけるアルミニウム(Al)汚染(蓄積)の問題は、1976年Alfrey²⁾がAl蓄積による透析脳症(剖検例)を報告したことを契機としてにわかに重視され、今日まで数多くの臨床研究報告がなされてきた³⁾。それらのデータの集積からAl蓄積の発症源として透析液及びAl製剤などが確認され水処理(RO水)、phosphate binderの見直しなどの対策がなされ、さらにAl蓄積の3大病態として骨症⁴⁾⁵⁾、脳症、そして貧血症⁶⁾⁷⁾の存在が明らかにされた。Al蓄積による貧血症は1978年Elliott⁸⁾の報告を嚆矢とするが、小球性貧血を特徴とし、これまで鉄代謝障害⁹⁾、ヘム合成系酵素障害¹⁰⁾などの機序が指摘されてきた。

Recombinant human erythropoietin(rHuEPO)導入前の1980年代までの血液透析患者のQOLの最大の障害要因であった腎性貧血症は、rHuEPOの臨床導入により画期的効果が得られ、維持血液透析患者における難治性合併症としては頻度のうえでは少ない。しかしながら、およそ10%の頻度でEPO低反応例や無反応例が報告され¹¹⁾、当然のことながらこれらの症例でのQOLは著しく低く、依然として現在の血液透析療法の抱える重要な臨床課題である。

既に述べたごとく、Al貧血症の機序として鉄代謝あるいはヘム合成系障害が知られてきたが、鉄補充やDFO治療によっても改善の得られぬ貧血症の存在は少なくない¹²⁾。これら治療抵抗性の症例の背景因子として(1)Al蓄積の正確な把握ができていないこと、及び(2)鉄代謝や、あるいはヘム合成以外の阻害機序の可能性の2点があげられる。後者については、骨髄中での赤血球分化過程における障害¹³⁾と末梢血赤血球の溶血亢進が考えられる。そこで著者は、本研究で血液透析患者におけるAl蓄積について、赤血球中Al濃度測定による臨床診断の有用性について検討し、さらに、赤血球分化過程におけるAlの抑制作用についても臨床検査的に、更に実験的にも検討したので報告する。

対象および方法

1) 対象症例および対照例：奈良県立医科大学付属病院泌尿器科ならびに人工透析室およびその教育関連施設

における保存期腎不全患者、男性8例、女性3例の計11例、導入期血液透析患者、男性8例、女性5例の計13例、維持血液透析患者、男性43例、女性26例の計69例を対象とし、これらはいずれも本試験に同意の得られた症例である。維持血液透析患者の年齢は16歳より69歳、平均48.8±11.2歳、透析期間は12カ月より223カ月、平均83.9±43.9カ月であった。

対照としては、同意の得られた健常人で男性10例、女性14例の計24例、年齢は20歳より52歳、平均38.3±11.2歳であった(Table. 1)。全例過去3カ月に輸血歴がなく、また血清鉄、血清Ferritin値は正常範囲であった。

2) 赤血球Al測定方法：山田ら¹⁴⁾の方法に準じ、ヘパリン加血液を3%デキストラン加生食水で3回洗浄した後、生食水で赤血球を再浮遊させ赤血球数を算定したうえで再度遠心し、上清の生食水を蒸留水で置換して溶血液をつくる。この溶血液のストローマを遠心除去したあと原子吸光法でAl濃度を測定し、先に測定した赤血球数で換算して赤血球10¹³個当りのAl濃度値を求めた。健常者24例で測定し得た赤血球Al値は全て2μg/10¹³ cells以下であった。

3) ΔAl算定方法：体重1Kg当り15mgのDesferal(Deferoxamine Mesilate, 日本チバガイギー社)(DFO)を透析終了時負荷して2日後の次回透析前の血清Al値を測定し、負荷後の血清Al値上昇分をΔAl値とした¹⁵⁾。

4) In vitro colony forming unit erythroid(CFU-E)形成法：

Erythropoietinの生物学的活性をマウス胎仔肝細胞を用いたCFU-E colony形成によって確認した。

4-1) 検体処理法：erslevら¹⁶⁾の方法を改良した坂田ら¹⁷⁾の方法に準じ、ヘパリン加血漿1.5mlと0.9% NaCl 0.5mlを混合してIN酢酸でPH 5.5に調整する。15分間静置後、正確に5分間沸騰水中に置いた後すぐに氷冷し、遠沈(12000 rpm, 20分間)後、上清をSeamless Cellophane Tubing(Size: 8/32, 和光純薬, 大阪)に入れて抗生物質(Penicillin G 10万U/l, Streptomycin 0.1g/l)を含むDulbecco-リン酸緩衝液(PBS)で一夜透析した後、Millipore Filter(孔径0.45μm)により濾過滅菌し、試料とした(Fig. 1)。

4-2) マウス胎仔肝細胞処理法：妊娠マウス(Slc:

Table 1. Patient's profile

	Number	Age (Y)	HD duration (M)
pre-dialysis	M(8)	57.0±7.2	(45~64)
	F(3)	62.0±8.2	(53~69)
	total(11)	58.4±7.5	(45~69)
HD (at initiation)	M(8)	54.5±10.8	3.3±2.1 (1~6)
	F(5)	58.0±10.5	4.2±2.9 (1~8)
	total(13)	55.8±10.4	4.0±3.1 (1~8)
HD (on maintenance)	M(43)	48.5±11.6	89.7±45.7 (13~223)
	F(26)	49.4±10.7	74.4±39.9 (12~135)
	total(69)	48.8±11.2	83.9±43.9 (12~223)
normal subjects	M(10)	34.8±11.4	(25~52)
	F(14)	40.9±10.8	(20~52)
	total(24)	38.3±11.2	(20~52)

primary disease : chronic glomerulonephritis (80 cases)
diabetes mellitus (12 cases) SLE (1 case)

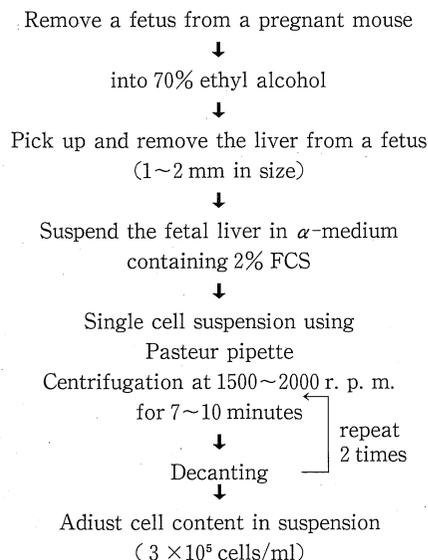
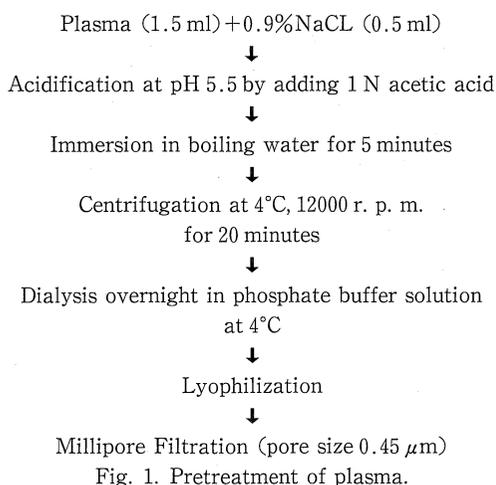


Fig. 2. Procedure for fetal mouse liver cell suspension.

ICR, 日本エスエルシー, 静岡)より在胎12日目の胎仔肝を無菌的に取り出し, α-medium(Flow Laboratories, Scotland)で単細胞浮遊液を作成した(Fig. 2).

4-3) CFU-E colony 形成法: 0.8% methylcellulose(信越化学, 東京), 30% 牛胎仔血清(Flow Laboratories, Australia), 10 mg/1 Nucleotides(和光純薬, 大阪), 10⁻⁴M α-thioglycerol(和光純薬, 大阪)を含む α-medium に, 上記マウス胎仔肝細胞を浮遊し(細胞数 3 × 10⁴/ml に調狼), 96 well の microplate(Corning, New York)に 100 μl ずつ採り, 標準 EPO(rHuEPO)(EPOGIN, 中外製薬, 東京)または試料(患者処理血漿) 10 μl を添加し, 充分に混和後, 37°C, 5% CO₂-95% 湿空気下で 45~48 時間培養し, 8 細胞以上からなるヘモグ

ロビン合成を伴う細胞集団を CFU-E 由来 colony とし全視野につき算定した¹³⁾(Fig. 3)(Fig. 4).

4-4) Al 添加実験: マウス胎仔肝細胞を用いた CFU-E 培養系において rHuEPO 濃度を 156, 313, 1250 mU/ml の 3 段階で設定し, 各培養系に Al を 0.05, 0.1, 0.2 ppm の濃度で添加して, CFU-E colony 数を算定した.

さらに, EPO 濃度 156, 313 U/ml で, EPO 添加 3 時間前, 同時, EPO 添加 3 時間後と時間差を設定して Al を添加し, 培養系への Al 添加の時間的影響を検討した

(Fig. 5). なお、培養系の環境条件による測定誤差をなくす為、測定は同一日に行い、対照実験として同様の条件にてクレアチニン(12 mg/ml)添加の影響も確認した。

4-5) rHuEPO 非存在下での Al の影響：生理学的濃

Preparation of culture medium

- 2% methylcellulose in α -medium 4 ml
- fetal calf serum 3 ml
- α -medium+nucleotides+ α -thioglycerol 1 ml

↓
Add 0.9 ml of a fetal mouse liver cell suspension (3×10⁶ cells/ml) into 8 ml of culture medium

↓
Put into microplate (100 μ l/well)

↓
Standard EPO or sample (10 μ l)

↓
37°C, 5% CO₂ in air (45~48 hours)

↓
Fixation of colony with 1.5% glutaraldehyde in α -medium (overnight)

↓
Colony count

Fig. 3. Method of CFU-E colony formation.

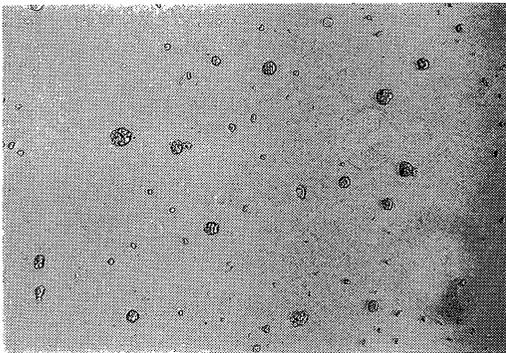


Fig. 4. CFU-E colony.

度である 0.05~0.2 ppm および高濃度である 0.5 ppm においても colony 形成の抑制は認められなかった(Fig. 6).

5) 血漿エリスロポエチン濃度：

血漿 EPO 濃度は、radio immunoassay 法(SRL 社, 八王子, 東京)により抗原蛋白量として測定した。

6) In vitro burst forming uniterythroid(BFU-E)形成法：

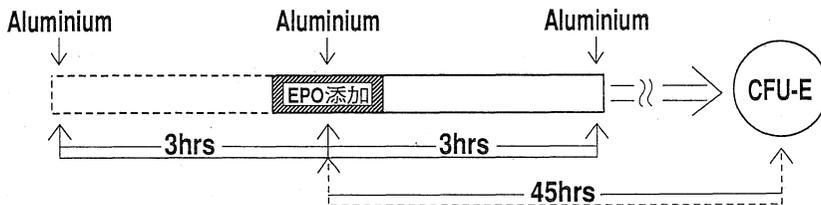
6-1) マウス胎仔肝細胞処理法：CFU-E 形成法に準ずる。

6-2) BFU-E colony 形成法：0.8% methylcellulose, 30% 牛胎仔血清, 1% 牛血清 albumin(Sigma, U. S. A.), 2 U/ml EPO, 100 U/ml IL-3(Genzyme, U. S. A.), 100 U/ml GM-CSF(Genzyme, U. S. A.), 10 mg/l Nucleotides, 10⁻⁴ M α -thio-glycerol を含む α -medium に、マウス胎仔肝細胞浮遊液を細胞数 1×10⁶/ml に浮遊したものを、直径 35 mm の suspension dish (Nunc, Denmark)に 1 ml ずつ採り、37°C, 5% CO₂-95% 湿空気下で 7~9 日間培養し、ヘモグロビン合成を伴う細胞集団を BFU-E 由来 colony として全視野につき算定する¹⁸⁾¹⁹⁾(Fig. 7).

Al は最終濃度として、0.02 ppm, 0.2 ppm, 2 ppm となるように添加し、BFU-E colony 形成能に対する直接的影響をそれぞれ検討した。なお、rHuEPO は CFU-E 形成法の時と同様のものを使用した。また、培養系の環境条件による測定誤差をなくすために、測定は同一日を行った。

結 果

1) 赤血球 Al 値：対照の健常人では全例 2 μ g/10¹³ cells 以下であった。保存期腎不全患者群では平均 5.74±2.33 μ g/10¹³ cells, 導入期血液透析患者群では平均 13.82±6.57 μ g/10¹³ cells, 維持血液透析患者群では平均 54.58±31.68 μ g/10¹³ cells であり、各群間に明か



Aluminium : 0.2ppm

[EPO] : 156mU/ml, 313mU/ml

Fig. 5. Method (Time-lag).

な有意差を認めた(Fig. 8). また, 維持血液透析患者 69 例につき検討した赤血球 Al 値と血清 Al 値との相関で

は $r=0.438$ ($p<0.001$) と有意な正の相関が確認された (Fig. 9).

2) ヘモグロビン(Hb)濃度との比較: 血清 Al 値と Hb 値との間に相関はみられなかったが, 赤血球 Al 値と Hb 値の間には有意な負の相関を認めた ($r=-0.400$, $p<0.001$) (Fig. 10). 一般に rHuEPO の適応水準となっている Hb 値 6~6.5 g/dl に相当する赤血球 Al 値は $65 \mu\text{g}/10^{13}$ cells であったが, 69 例中 22 例が $65 \mu\text{g}/10^{13}$

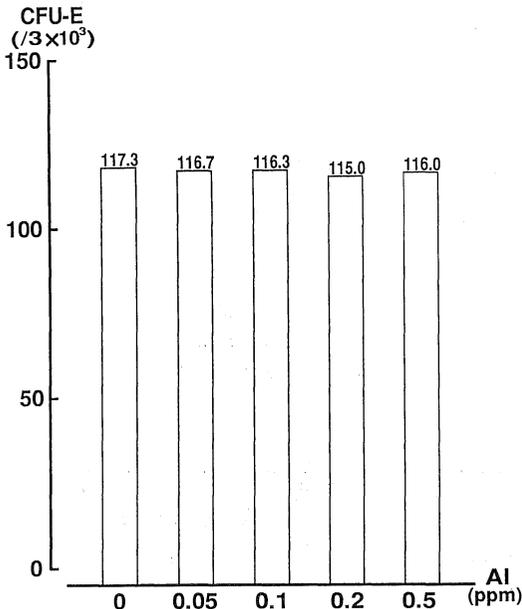


Fig. 6. Effect of each concentration of Aluminium on CFU-E without EPO.

2% Methylcellulose in α -medium	2 ml
Fetal calf Serum	1.5 ml
10% Bovine Serum Albumin	0.5 ml
EPO (200 U/ml)	50 μ l
IL-3 (2500 U/ml)	200 μ l
GM-CSF (2000 U/ml)	250 μ l
Cells (1×10^6 /ml)	0.5 ml

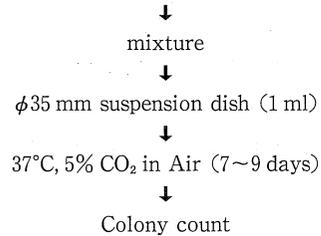


Fig. 7. Method of BFU-E colony formation.

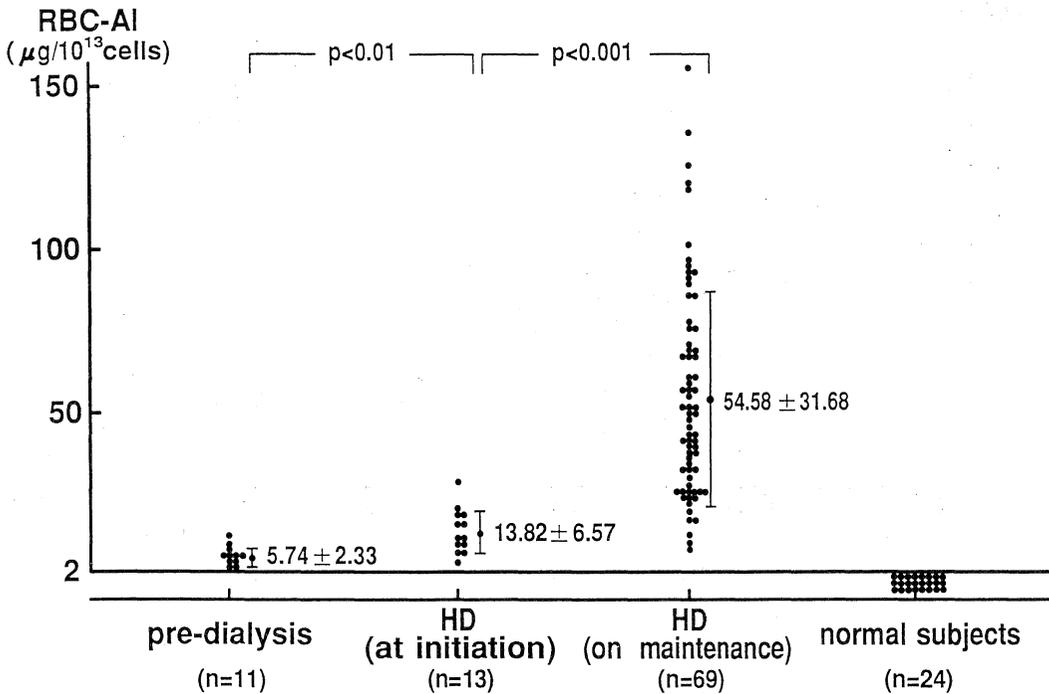


Fig. 8. Red Blood Cell-Aluminium (RBC-Al) levels in normal subjects and patients.

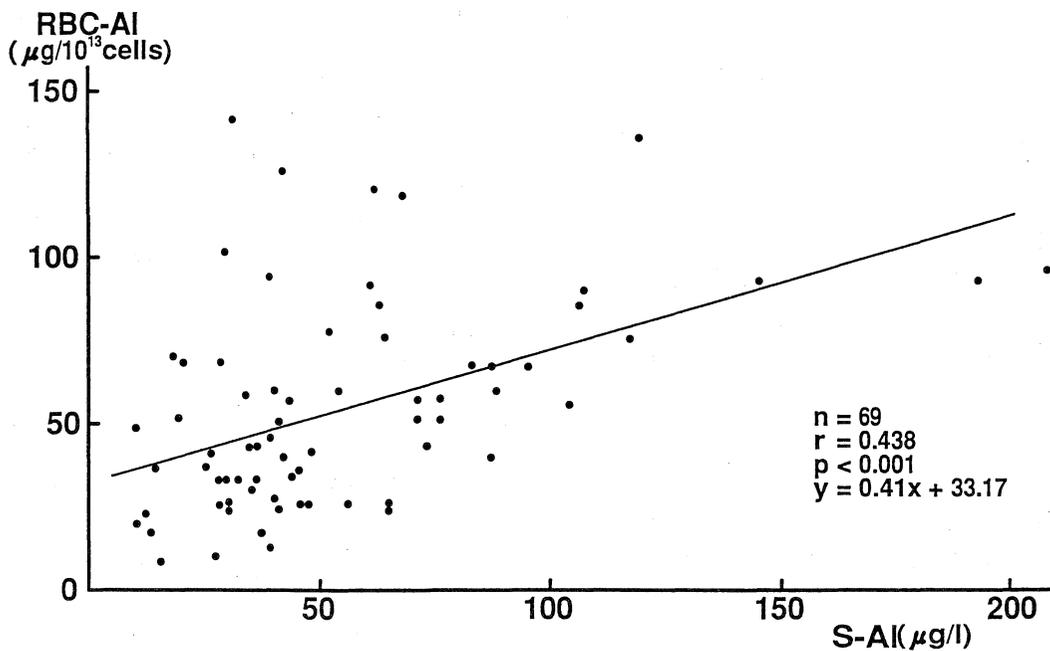


Fig. 9. Relationship between Red Blood Cell-Aluminium (RBC-Al) and Serum-Aluminium (S-Al) in patients with maintenance hemodialysis.

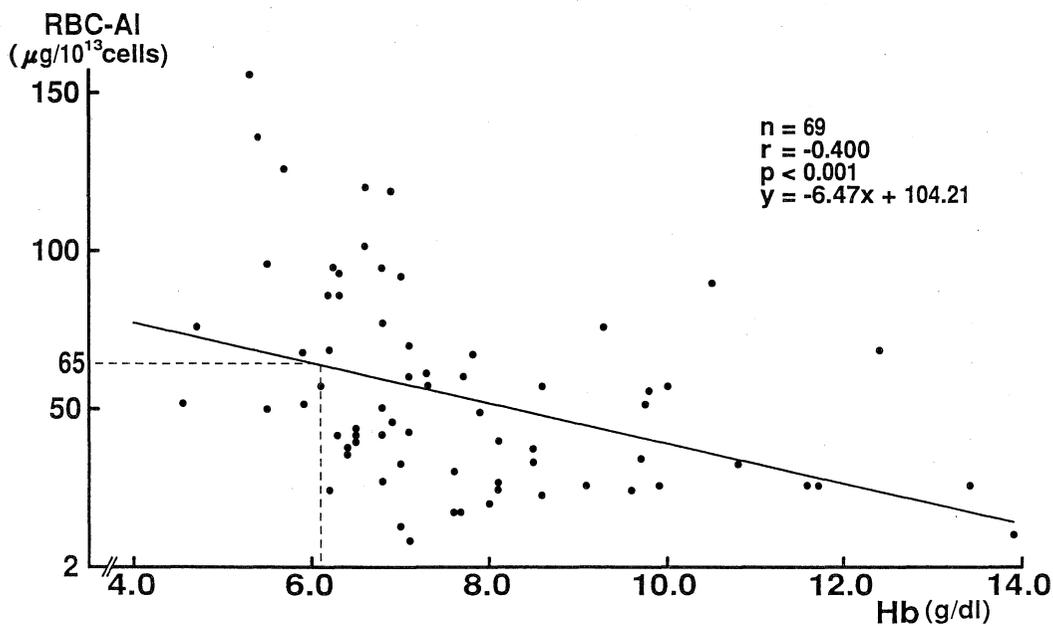


Fig. 10. Relationship between Red Blood Cell-Aluminium (RBC-Al) and Hb in patients with maintenance hemodialysis.

cellsより高値を示した。

3) Δ Al値との比較：DFO負荷による Δ Alを維持血液透析患者16例につき検討した。血清Al値と Δ Al値には相関は認められなかったが、赤血球Al値と Δ Al値には有意な正の相関を認めた($r=0.540$, $p<0.05$) (Fig. 11)。

4) マウス胎仔肝細胞を用いたCFU-E培養系へのAl添加の影響：0.5 ppmの高濃度のAl下では、78, 156, 313 および 1250 mU/mlのいずれのEPO濃度においても明らかなcolony形成の抑制が認められたが、その抑制効果は78 mU/mlで64.1%, 156 mU/mlで45.6%, 313 mU/mlで30.8%および1250 mU/mlでは16.5%とEPO濃度上昇につれて低下した(Fig. 12)。一方、156, 313 mU/mlの生理的EPO濃度下では、Al濃度が0.2 ppmにおいて有意なcolony形成の抑制効果が認められ、rHuEPO投与時の半減期濃度に相当する1250 mU/mlにおいては、有意な抑制はかからなかった(Fig. 13)。

5) Al時間差添加のCFU-E colony形成への影響：生理的EPO濃度である156 mU/ml下に、生理的Al濃度0.2 ppmを添加したところ、EPO添加3時間前で27.0%、同時添加で16.4%、EPO添加3時間後で13.4%と、明かにEPO添加3時間前で有意に強いcolony形成の抑制が確認された($p<0.01$)。同様に313 mU/mlのEPO濃度においてもEPO添加3時間前で有意に強い

colony形成の抑制が認められたが、その抑制効果は減弱した(Fig. 14)。

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。

6) 維持血液透析患者でのエリスロポエチン活性：維持血液透析患者20例について血漿を前述の如く処理してCFU-E colony数を算定し、同時検体にてRIA法により測定されたEPO濃度(抗原蛋白量)の対数値で補正したCFU-E/log(EPO)値を各患者でのエリスロポエチン活性とした。

CFU-E/log(EPO)と赤血球Al値の間には有意な負の相関が認められた($r=-0.486$, $p<0.05$) (Fig. 15)。

7) マウス胎仔肝細胞を用いたBFU-E培養系へのAl添加の影響：BFU-E colonyは、Alを含まないcontrol培地で平均 350.3 ± 13.7 のcolony数を形成した。Al添加培地では、0.02, 0.2, 2 ppmの濃度でそれぞれ 254.8 ± 12.3 , 251.5 ± 14.3 , 247.8 ± 9.4 のcolony数を形成し、有意差を認めなかった(Fig. 16)。Fig. 17はマウス胎仔肝細胞のBFU-E colony像である。なお、追試としてヒト末梢血単核球を用いて、BFU-E colony形成を行い同様の実験を施行したが、有意の抑制は認められなかった。Fig. 18はヒト末梢血単核球のBFU-E colony像を示す。

尚、本研究で赤血球溶血の亢進は血清ハプトグロビン値をもって間接的に否定した。

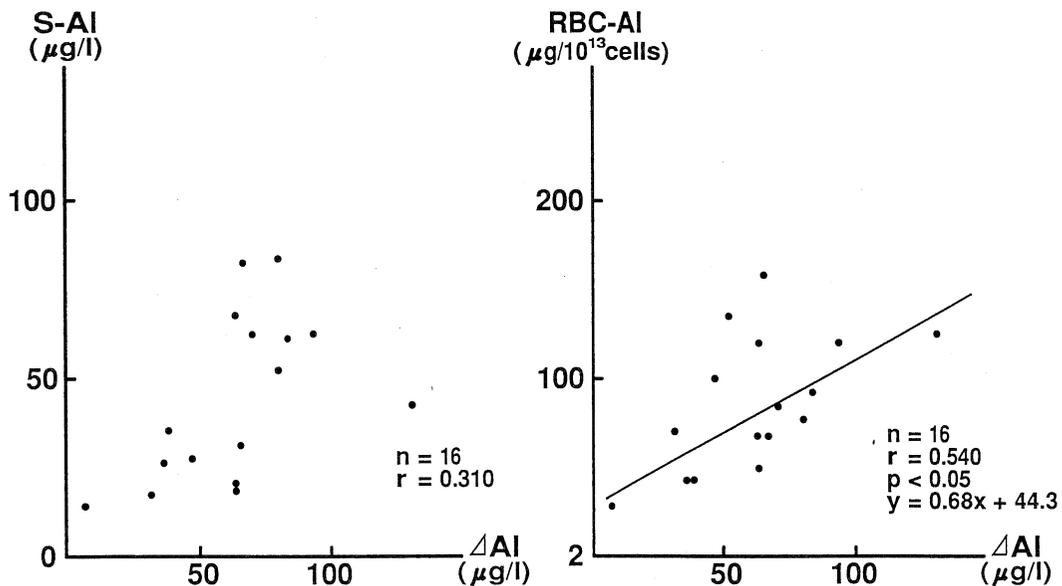


Fig. 11. Relationship between Δ Aluminum levels of serum and RBC in patient with maintenance hemodialysis.

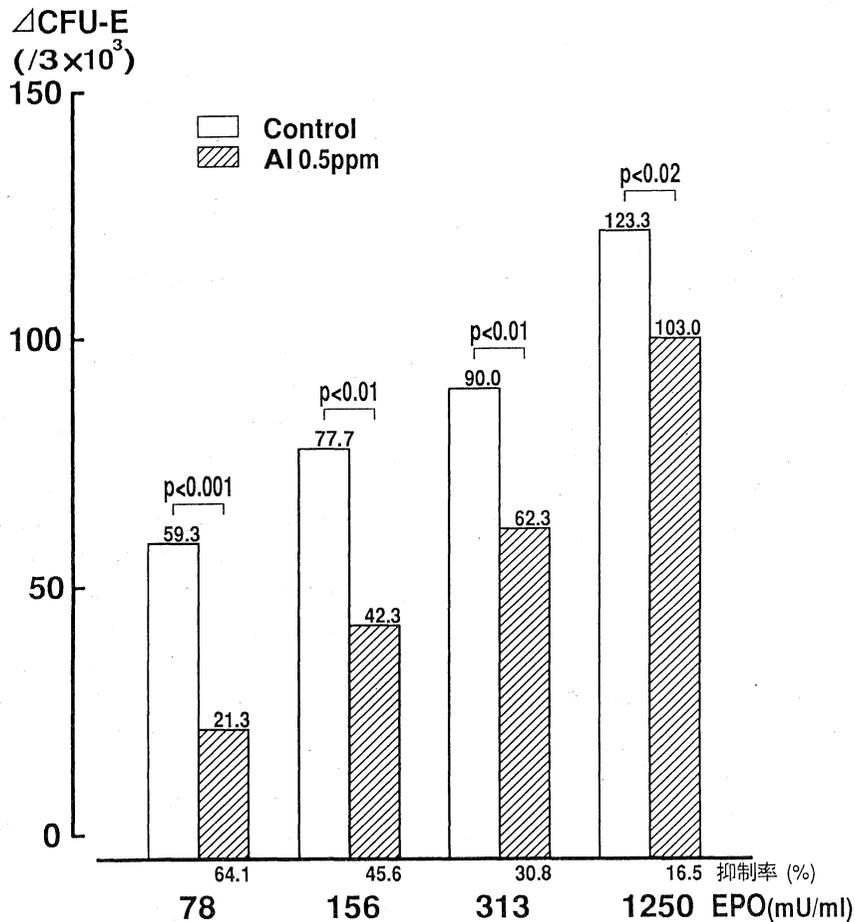


Fig. 12. Effect of Aluminium (0.5 ppm) on CFU-E with EPO.

考 察

健常者の体内Al分布は骨40%、筋肉41%、脳1%、肺12%、その他5%程度である²⁰⁾。Alの食品からの摂取量は2~3 mg/day、このうちわずかな部分(0.5~2%)が吸収され、尿中排泄は10~15 μg/day、体内総Alは35 mg以下といわれている²¹⁾²²⁾。Alの主要排泄経路は腎から尿中への排泄であり、胆汁中への排泄はごくわずかである。Alは血漿中では80~90%が蛋白と結合しているため透析性のあるAlはごく一部にすぎない。一方、透析液中ではほとんどのAlがイオン化し透析性があるため、透析液中の総Al濃度が血中濃度より低くても血中に移行しうる。従って透析患者におけるAlの体内蓄積の原因は、(1)腎不全による排泄の低下、(2)透析液からの移行、(3)食物Alの経口摂取、(4)Al含有制酸剤の内服などがあり、透析患者では健常者の10倍以上の体内蓄積が推定され

る。

これまでのAl骨症に関する報告から血中濃度50~100 μg/lがAl蓄積による病態発症の臨界値と考えられる²⁰⁾。しかしAlは血中ではほとんどtransferrin(Tf)と結合し、また生体のほとんどの細胞がTf receptorを有するためAlの組織沈着性は強く、その蓄積状態が病態に直結しているため、Chelator負荷によるAl蓄積量の推定がより正確な評価法と認識されてきた²³⁾。ことにChelatorとしてDFOを用いた負荷法は、Alへの比較的高い特異性から現在Al蓄積推定のgold standardとなっており、組織沈着量との相関も良好であることが確認されている²⁴⁾²⁵⁾。しかしながら、DFOには球後視神経障害²⁶⁾、聴力障害、アレルギー症状²⁷⁾などの重篤な副作用が指摘され、日常の透析現場では本法に代わる安全でより簡便なAl蓄積推定法の確立が望まれている。

循環血液中成熟赤血球はTf receptorを失っているが、

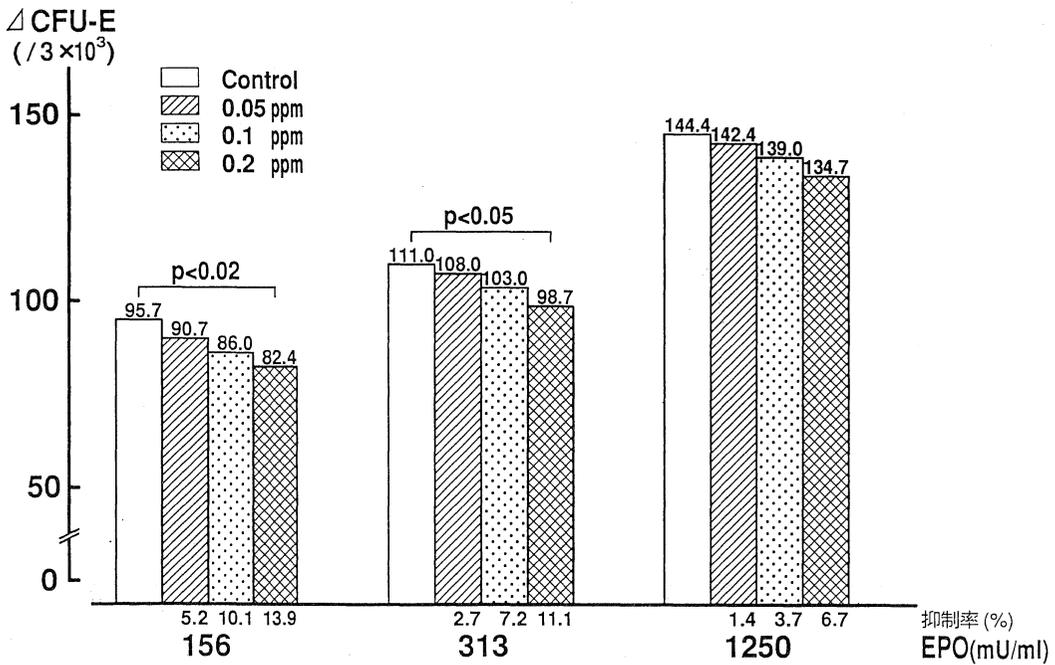


Fig. 13. Effect of each concentration of Aluminium on CFU-E with EPO.

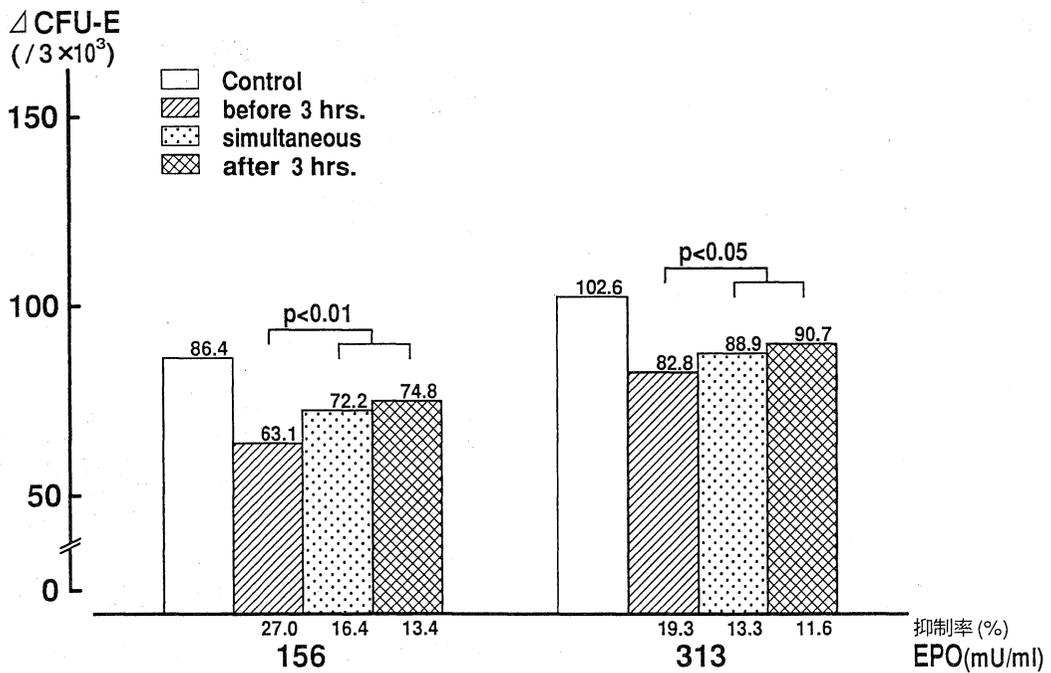


Fig. 14. Effect of Aluminium (0.2 ppm) on CFU-E at time-lag.

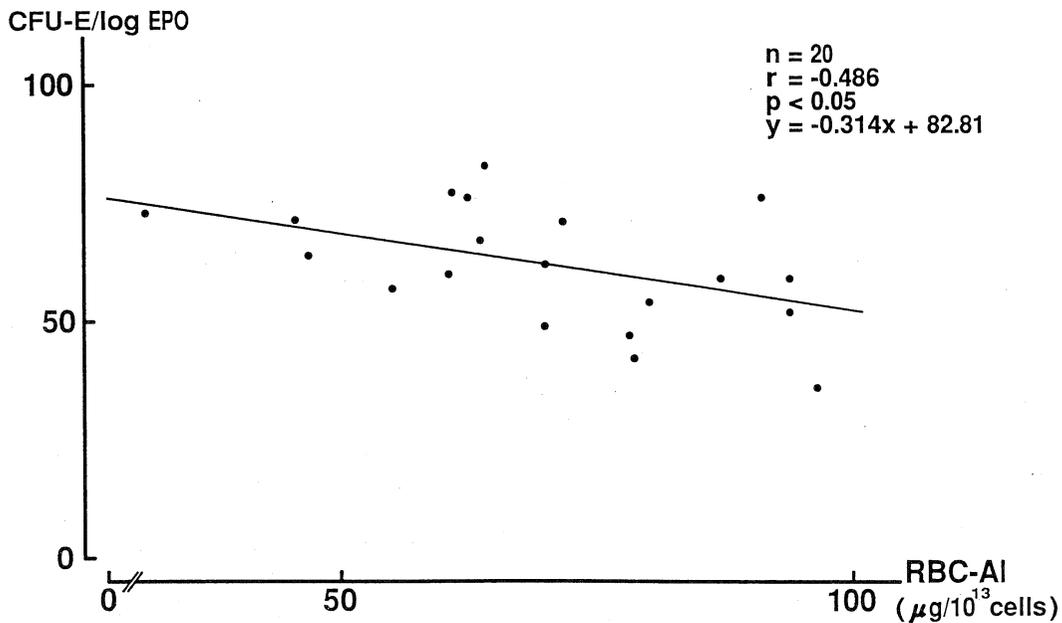


Fig. 15. Relationship between CFU-E/log EPO and Red Blood Cell-Aluminium (RBC-Al) in patients with maintenance hemodialysis.

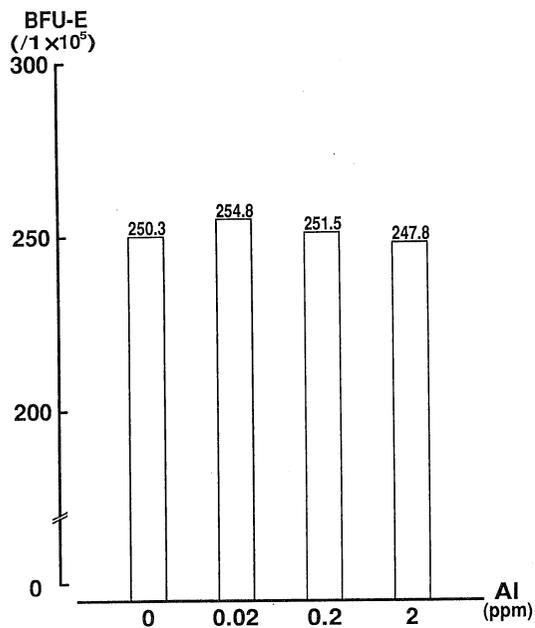


Fig. 16. Effect of each concentration of Aluminium on BFU-E.

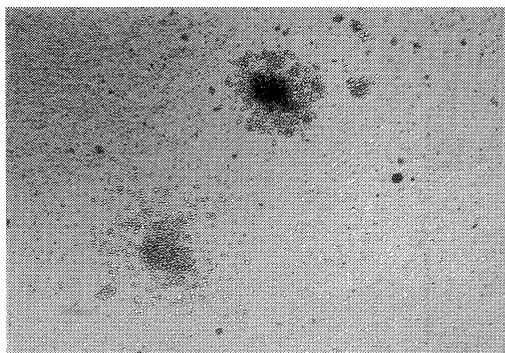


Fig. 17. BFU-E colony (fetal mouse liver cell).

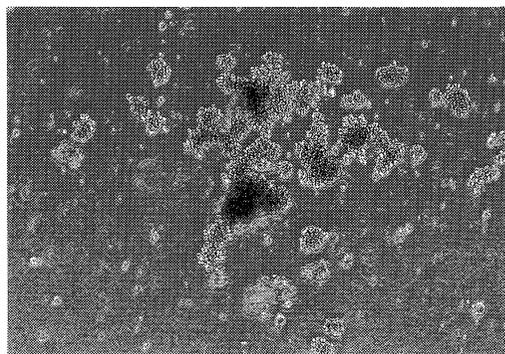


Fig. 18. BFU-E colony (human peripheral blood).

骨髄中の分化過程で赤芽球の段階までは Tf receptor を有しており、従って今回測定された赤血球 AI のほとんどは骨髄での分化過程で細胞内に入った AI と考えられる²⁸⁾。このことは赤血球 AI 値が骨髄組織中 AI 濃度を反映することを示しており、赤血球 AI 値が AI 蓄積量の情報源となる理論的根拠となっている。

本研究でも赤血球 AI 値は DFO 負荷 Δ AI 値と良好な相関を示し (Fig. 11)、赤血球 AI 測定の臨床的有用性の高いことが明かとなった。さらに今回 Fig. 8 に示された測定結果では RO 水による透析液水処理の改善や phosphate binder としての AI 含有薬剤の厳重な限定使用などの対策が広まった今日でも維持血液透析患者での AI 蓄積は少なくないことが示された。

AI 蓄積による貧血症は rHuEPO の臨床導入による画期的効果の得られている今日も、EPO 抵抗性貧血としてわずかながら認められ、また 150 U/kg/w 以上の比較的高単位の EPO 維持量を必要とする潜在的 EPO 不応例 (相対的 EPO 不応例、EPO 低反応例) の背景因子として広く認識されている²⁹⁾。これまでも維持血液透析患者での AI 蓄積と貧血発症については多くの文献で指摘され、臨床的にも DFO 治療による効果で実証されているが、AI 測定値との相関を直接に明かにした報告はみられていない。本研究では血清 AI では確認できなかったが、赤血球 AI 値と Hb 濃度には相関が確認された (Fig. 10)。既に述べたごとく、AI は Fe と同じく Tf を担送蛋白として骨髄を始め諸種の臓器に沈着するので、鉄代謝障害が AI 貧血症の最も重要な機序となっている。教室の生間らは維持血液透析患者における赤血球 AI 濃度と鉄パラメーターについて報告し、AI 蓄積における鉄代謝障害を確認している³⁰⁾。

しかしながら、EPO 高単位維持量を要する相対的不応例の中には、著者らが最近報告している赤血球 Ferritin 値を含めて臨床検査上鉄代謝障害が否定される症例も少なくない。鉄代謝障害以外の貧血発症の重要な機序としては赤血球分化過程での障害が挙げられる³¹⁾。尿毒症血漿による CFU-E 形成阻害については Adamson 一派の研究でかなり詳細に確認されているが³²⁾、AI に特定した赤血球分化過程の研究は Mladenovic の *in vitro* での報告が唯一のものである¹³⁾。Mladenovic らは今回同様の培養法で bone marrow 由来 CFU-E colony 形成が AI 添加により阻害され、かつその作用発現には Tf の存在が必要であることを報告した。今回の検討では臨床経験される AI 濃度 (0.1~0.5 ppm) で同様の抑制効果を確認した。さらに今回の検討で、EPO 濃度が高くなるほど抑制効果は弱まるものの、臨床での rHuEPO 投与時の半

減期濃度 ($T_{1/2max}$) (250~1250 mU/ml) に相当する濃度でも抑制が確認された³³⁾。本研究で用いた fetal mouse liver cell での CFU-E colony 形成については坂田ら¹⁷⁾により詳細な基礎的研究がなされ、bone marrow 由来 CFU-E colony 形成に比べ、より生理的濃度に近い EPO 低濃度でも CFU-E colony 形成が得られることから、本宮ら³⁴⁾により EPO 活性の臨床的確認法として優れていることが指摘されている。各症例での血漿中 EPO 単位濃度当りの CFU-E colony 数と赤血球 AI 値との比較でも良好な相関がみられ、*in vitro* での検討結果と一致するものであった (Fig. 15)。

今回確認された *in vitro* での AI 添加による 16.5~64.1% の CFU-E colony 形成の抑制が、*in vivo* でのどの程度の意義をもつかは、今回は CFU-E の測定例が少ないため明らかではない。しかしながら、Buchet³⁵⁾ らや岡島ら³⁶⁾は赤血球分化過程における CFU-E から前赤血芽球段階で現れるヘム合成系酵素への影響を指摘しており、今回の CFU-E 段階での抑制さらには鉄代謝障害と、AI の貧血発症への関与は多面的である。従って重度の AI 蓄積のない症例で、個々の抑制作用は軽度であっても、それらの相加的影響が表される臨床病態は軽視できない。

一般に、血清 AI 値 100 μ g/l が AI 蓄積の重症度の基準値と認識されているが、今回の研究でこれに相当する赤血球 AI 値は 75 μ g/10¹³ cells であった。従って本研究の結果から (1) 血清 AI 値 100 μ g/l 以上の症例においては赤血球 AI 値を確認すること、(2) 血清 AI 値 100 μ g/l 以下の症例でも貧血症などの AI 蓄積を疑う臨床所見があれば赤血球 AI 値の確認が必要であること、(3) 更に EPO 治療での相対的不応例を含めて低反応例は赤血球 AI 値の確認が必要であり、(4) 赤血球 AI 値 65 μ g/10¹³ cells 以上の症例では EPO 治療に先行して DFO 治療の検討が必要であることの 4 点が示唆された。

これまで維持血液透析患者の QOL を左右してきた貧血症に対する rHuEPO の適応は極めて広く、全透析患者の 70~80% に及ぶ。従ってその有効最少必要量の厳密な設定は単に副作用の面に留まらず、医療の経済性向上の面からも重要である。

本研究が明らかにした AI 蓄積への再認識とその対応によりもたらされる波及効果は、腎不全患者の QOL 向上につながるだけでなく、透析医療の経済性向上を約束するものとして評価できる。

AI の CFU-E 形成阻害の作用機序については、BFU-E に影響を及ぼさないことと time lag を設けた AI 添加実験結果から EPO-receptor の発現への関与が示唆され

るが²⁷⁾, BFU-E への抑制の報告もみられ¹³⁾, この点については今後に残された課題である。

結 語

奈良県立医科大学付属病院泌尿器科ならびに人工透析室およびその教育関連施設における保存期腎不全患者, 導入期血液透析患者, 維持血液透析患者を対象症例とし, 健常人を対照例として赤血球 AI を測定し, Δ AI 値, Hb 値と比較検討した。さらに, 赤血球分化過程における AI の抑制作用についても臨床検査的に, 更に *in vitro* 的に検討を行い以下の結果を得た。

1) 赤血球 AI 値は対照の健常人では全例 $2 \mu\text{g}/10^{13}$ cells 以下であったが, 保存期腎不全患者群では平均 $5.74 \pm 2.33 \mu\text{g}/10^{13}$ cells, 導入期血液透析患者群では, 平均 $13.82 \pm 6.57 \mu\text{g}/10^{13}$ cells, 維持血液透析患者群では平均 $54.58 \pm 31.68 \mu\text{g}/10^{13}$ cells であり, 各群間に明かな有意差を認めた。

2) 赤血球 AI 値と Hb 値の間には有意な負の相関を認め ($r = -0.400, p < 0.001$), rHuEPO の適応水準となっている Hb 値 $6 \sim 6.5 \text{ g/dl}$ に相当する赤血球 AI 値は $65 \mu\text{g}/10^{13}$ cells であった。

3) 赤血球 AI 値と Δ AI 値には有意な正の相関を認め ($r = 0.540, p < 0.05$), 赤血球 AI 測定 of AI 蓄積推定方法としての臨床的有用性の高いことが明かとなった。

4) マウス胎仔肝細胞を用いた CFU-E 培養系において, 0.5 ppm の高濃度の AI 下では, colony の抑制効果は 78 mU/ml で 64.1% , 156 mU/ml で 45.6% , 313 mU/ml で 30.8% , および 1250 mU/ml では 16.5% で, EPO 濃度上昇につれて低下したもののいずれの EPO 濃度においても抑制効果がみられた。

5) AI 時間差添加の CFU-E colony 形成への影響は, EPO 156 mU/ml 濃度下において, EPO 添加 3 時間前で, 27.0% , 同時添加で 16.4% , EPO 添加 3 時間後で 13.4% と明かに EPO 添加 3 時間前で有意に強い colony 形成の抑制が確認された ($p < 0.01$)。

6) 維持血液透析患者でのエリスポエチン活性であるが, CFU-E/log(EPO) と赤血球 AI 値の間には有意な負の相関が認められた ($r = -0.486, p < 0.05$)。

7) マウス胎仔肝細胞を用いた BFU-E 培養系への AI 添加の影響については, control 培地と AI 添加培地に有意差を認めなかった。

以上の結果より, AI 対策が広まった今日でも維持血液透析患者での AI 蓄積は少なくないことが判明し, また, AI による CFU-E 抑制作用が臨床検査的にも実験的にも証明され, EPO 治療での相対的不応例を含めて低反応

例は赤血球 AI 値の確認が必要であり, 赤血球 AI 値が $65 \mu\text{g}/10^{13}$ cells 以上の症例では EPO 治療に先行して DFO 治療施行の必要性が示唆された。

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤な御指導, 御校閲を賜りました恩師岡島英五郎教授, ならびに御校閲を賜りました第 2 生理学教室榎 泰義教授, 第 1 内科学教室土肥和紘教授に深甚なる感謝の意を表します。また, 本研究に際し, 直接御指導頂きました本宮善恢講師に深謝するとともに, 測定に御協力頂きました森澤正代女史ならびに別所直子女史に感謝いたします。

本論文の要旨は, 第 36 回日本腎臓学会総会(1993 年 12 月, 横浜)および第 39 回日本透析医学会総会(1994 年 7 月, 大阪)において発表した。

文 献

- 1) Ward, M. K., Feest, T. G., Ellis, H. A., Pakinson, I. S. and Kerr, D. N. N. : Osteomalacic dialysis osteodystrophy, *Lancet* 22: 841-845, 1978.
- 2) Alfrey, A. C., Legendre, G. R. and Kaehny, W. D. : The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminium intoxication. *N. England. J. Med.* 294: 184-188, 1976.
- 3) Pakinson, I. S., Ward, M. K. and Kerr, D. N. S. : Dialysis encephalopathy, bone disease and anemia: the aluminium intoxication syndrome during regular haemodialysis. *J. Clin. Pathol.* 34: 1285-1294, 1981.
- 4) Benno, U. I., Gavin, J. B. and Priscilla, S. K. S. : Clinical and biochemical features of aluminium-related bone disease. *Kidney. Int.* 29 Suppl. 18: 80-86, 1986.
- 5) Hartmut, H. M. and Marie, C. F. : Aluminium: toxin or innocent bystander in renal osteodystrophy. *Am. J. Kidney Dis.* 6: 336-341, 1985.
- 6) Macgonigle, R. J. S. and Parsons, V. : Aluminium-induced anemia in haemodialysis patients. *Nephron* 39: 1-9, 1985.
- 7) Druke, T. B., Lacour, B., Touam, M., Jucquel, J. P., Plachot, J. J., Witmer, G. C. and Galle, P. : Effect of aluminium on hematopoiesis. *Kidney. Int.* 29 Suppl. 18: 45-48, 1986.
- 8) Elliott, H. L., Dryburgh, F., Fell, G. S., Sabet,

- S. and Macdougall, A. I. : Aluminium toxicity during regular haemodialysis. *Br. Med. J.* **1** : 1101-1103, 1978.
- 9) Huber, C. T. and Frieden, E. : The inhibition of Ferroxidase by trivalent and other metal ions. *J. Biol. Chem.* **15** : 3979-3984, 1970.
- 10) Day, R. S., Eales, L. and Disler, P. B. : Porphyrias and the kidney. *Nephron* **28** : 261-267, 1981.
- 11) 平沢由平 : 腎性貧血のエリスロポエチンによる治療効果. *造血因子* **4** : 61-68, 1990.
- 12) Kaiser, L. and Schwartz, A. : Aluminium-induced anemia. *Am. J. Kidney Dis.* **6** : 348-352, 1985.
- 13) Mladenovic, J. : Aluminium inhibits erythropoiesis in vitro. *J. Clin. Invest.* **81** : 1661-1665, 1988.
- 14) Yamada, H. : Characterization of serum and red cell ferritin in hematological disorders. *Acta haematol. Jpn.* **41** : 1334-1338, 1978.
- 15) 守屋 昭, 本宮善恢, 上甲政徳, 丘田英人, 坂 宗久, 吉田克法, 金子佳照, 橋本政善, 丸山良夫, 大園誠一郎, 平尾佳彦, 岡島英五郎 : Al 蓄積症に対する Deferoxamine 少量負荷試験の診断的閾値について. *日腎誌.* **32** : 715-722, 1990.
- 16) Erslev, A. J., Caro, J., Kansu, E., Miller, O. and Cobbs, E. : Plasma erythropoietin in polycythemia. *Am. J. Med.* **66** : 243-247, 1979.
- 17) Sakata, S., Enoki, Y., Tomita, S. and Kohzuki, H. : In vitro erythropoietin assay based on erythroid colony formation in fetal mouse liver cell culture. *Br. J. Haematol.* **61** : 293-302, 1985.
- 18) 三浦恭定 : 赤芽球系コロニー, 血液幹細胞培養法. 中外医学社, 東京 p55-69, 1986.
- 19) Sonoda, Y., Yu-Chung, Y., Wong, G. G., Clark, S. C. and Ogawa, M. : Erythroid burst-promoting activity of purified recombinant human GM-CSF and interleukin-3 : studies with anti-GM-CSF and anti-IL-3 sera and studies in serum free cultures. *Blood* **72** : 1381-1386, 1988.
- 20) Van de Vyver, F. L., Silva, F. J. E. and Haese, P. C. : Aluminium toxicity in dialysis patients. *Contrib. Nephrol.* **55** : 198-220, 1987.
- 21) Ganrot, P. O. : Metabolism and possible health effects of aluminium. *Environ. Health. Respect.* **65** : 363-411, 1986.
- 22) Alfrey, A. C. : Aluminium intoxication. *N. Engl. J. Med.* **310** : 1113-1115, 1984.
- 23) Trapp, G. A. : Plasma aluminium in bound to transferrin. *Life Science* **33** : 311-316, 1983.
- 24) Marie, C. V., Sylvain, M., Gerard, L., Josette, B. P. C., Caroline, M. and Francisco, L. : Deferoxamine test and bone disease in dialysis patients with mild aluminium accumulation. *Am. J. Kidney Dis.* **14** : 124-130, 1989.
- 25) Molitoris, B. A., Alfrey, P. S., Miller, J. A., Hasbargen, J. A., Kaehney, W. K., Alfrey, A. C. and Smith, B. J. : Efficacy of intermuscular and intraperitoneal deferoxamine for aluminium Chelation. *Kidney Int.* **31** : 986-991, 1987.
- 26) Lakhnpal, V., Schocket, S. S. and Jiji, R. : Deferoxamine(Desferal)induced toxic tetinal pigmentary degeneration and presumed optic neuropathy. *Ophthalmology* **91** : 443-451, 1984.
- 27) Cartei, G., Bardui, T., Cazzavillan, M., Chisesi, T. and Dini, E. : Desferrioxamine B : Reversible side effects of high daily doses. *Blut* **31** : 11-16, 1975.
- 28) Kaye, M. : Bone marrow aluminium storage in renal failure. *J. Clin. Pathol.* **36** : 1288-1291, 1983.
- 29) Grutzmacher, P., Ehmer, B., Messinger, D., Kulbe, K. D. and Scigalla, P. : Effect of aluminium overload on the bone marrow response to recombinant human erythropoietin. *Contrib. Nephrol.* **76** : 315-323, 1989.
- 30) 生間昇一郎, 堀川直樹, 河田陽一, 永吉純一, 守屋昭, 佐々木憲二, 本宮善恢 : 維持透析患者における赤血球アルミニウム(RBC-Al)濃度と鉄パラメータについて. *透析会誌.* **25** : 989-993, 1992.
- 31) 岩田次郎, 高橋好夫, 藤岡博文, 郭 阿東 : 長期透析患者の造血能. *透析会誌.* **20** : 121-127, 1987.
- 32) Adamson, J. W., Eschbach, J. and Finch, C. A. : The kidney and erythropoiesis. *Am. J. Med.* **44** : 725-733, 1968.
- 33) 小出桂三, 田中孝司 : EPO のカイネティクス. *臨床透析* **54** : 809-818, 1989.
- 34) 本宮善恢, 佐々木憲二, 青山秀夫, 吉田克法, 金子佳照, 岡島英五郎 : In vitro colony forming unit-erythroid assay の基礎的研究—再現性ならびに検体処理法について. *日腎誌.* **33** : 225-230, 1991
- 35) Buchet, J. P., Lauwerys, R., Hassoun, A.,

- Dratwa, M., Wens, R., Collart, F. and Tielemans, C.** : Effect of aluminium on prothrin metabolism in hemodialyzed patients. *Nephron* 46: 360-363, 1987.
- 36) 岡島英五郎, 佐々木憲二, 小原壯一, 吉田克法, 金子佳照, 本宮善恢, 平尾佳彦: ヘム合成系へのアルミニウムの影響—赤血球ウロポロフィリンノーゲン1—合成酵素およびプロトポルフィリンとの関係. *日腎誌*. 33: 165-166, 1991.
- 37) 東條有伸: エリスロポエチン受容体. *造血因子* 2: 249-257, 1990.