

# 連続携行式腹膜透析患者と血液透析患者における 自然免疫能の比較—単核球の外因刺激に対する サイトカイン産生反応からみた検討

澁谷あすか\*<sup>1</sup> 安藤 稔\*<sup>2</sup> 土谷 健\*<sup>1</sup> 秋葉 隆\*<sup>3</sup>  
二瓶 宏\*<sup>1</sup>

Innate immunity in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients:  
Impaired cytokine synthetic response to *ex-vivo* stimuli in mononuclear cells

Asuka SHIBUYA\*<sup>1</sup>, Minoru ANDO\*<sup>2</sup>, Ken TSUCHIYA\*<sup>1</sup>, Takashi AKIBA\*<sup>2</sup>, and Hiroshi NIHEI\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>Department of Medicine IV, \*<sup>3</sup>Department of Blood Purification, Tokyo Women's Medical University  
and Division of Nephrology, \*<sup>2</sup>Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, Tokyo, Japan

Dialysis patients are weak in immune host defense, which is associated with their high morbidity of infection. Polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) and mononuclear cells play a key role in innate host defense. PMNLs and monocytes have bactericidal activity through the process of phagocytosis. Monocytes and lymphocytes contribute to the development of innate immunity by their cytokine actions. We studied the intracellular cytokine syntheses in response to *ex-vivo* stimuli, which may reflect the potential reactivity of immune cells in cytokine syntheses when pathogens invade humans. Furthermore, phagocytic activity was assessed in granulocytes and monocytes. Twenty HD, 15 CAPD, and 10 age-matched controls were enrolled in this study. One milliliter of whole blood from each subject was incubated with lipopolysaccharides (LPS) or mitogens for 4 hours at 37°C. Monoclonal antibodies to CD14<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> were used for identifying monocytes and helper T cells, respectively. Intracellular cytokines were stained using FASTIMMUNE<sup>®</sup> staining kits. Interleukin-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  syntheses were examined in monocytes, which are the most important early-response cytokines in innate immunity. IFN- $\gamma$  and IL-4 syntheses were examined in helper T cells to observe their polarization into Th1 and Th2 cells. IFN- $\gamma$  is a key factor in establishing innate immunity. The percentage of cells that stained positive for each cytokine was analyzed using a flow cytometer.

The following results were obtained : 1) In CAPD patients, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  response to LPS in monocytes were significantly reduced, as compared to other subjects. Polarization of helper T cells was reduced, resulting in a significant decrease in Th1 cells. 2) In HD patients, monokine responses were not altered, but polarization of helper T cells was skewed toward a Th1 type. Phagocytic activities were not impaired in both dialysis groups. In conclusion, mononuclear cells from CAPD patients have the potential to exhibit failure of a cytokine response to *ex-vivo* stimuli in terms of innate immunity.

Jpn J Nephrol 2004 ; 46 : 700-708.

**Key words** : flow cytometry, intracellular cytokine, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$

## 緒 言

透析患者に関する医学統計調査の結果によると、感染症

およびそれに伴う合併症は、常に死亡原因の上位を占めている<sup>1,2)</sup>。この事実は、透析患者の免疫能、特に感染防御の観点からは自然免疫能に欠陥が存在する可能性を示唆し

ている。さらに、連続携行式腹膜透析(CAPD)患者の感染症罹患率および死亡率は血液透析(HD)患者に比較して統計的有意差をもって高いことも指摘されている<sup>2,3)</sup>。こうした CAPD 患者の感染症罹患率とそれに関連した死亡率の高さの原因としては、腹膜カテーテル留置の不利益性、貯液される腹膜透析液の腹腔免疫細胞毒性、小分子尿毒素クリアランス低値、低アルブミン血症などの栄養不良状態、透析導入前からの全身状態合併症の相違などが考えられるが、その根底には透析療法の方式(modality)の違いにより生じる生体防御機構の差が存在していることを推察させる。そこで、本研究は透析患者の自然免疫能の中心となる細胞機能を調べることを目的とした。特に、透析 modality によるそれらの相違に焦点を当てて検討を加えた。

高等生物は早期から作動する非特異的抗原に対する自然免疫と、自然免疫発現に誘導され遅れて作動してくる抗原特異的な獲得免疫の二つの機構を併せ持っている<sup>4,5)</sup>。自然免疫とは、非特異的な侵入病原体に対して最も早期から迅速に働く生体防御機構である。生体の自然免疫機構には、補体活性系、急性期蛋白系も含まれるが、免疫のネットワーク確立の側面からは、単球、顆粒球のもつ貪食能、殺菌能などと単核球が病原因子の侵入に対して反応的に分泌する炎症性サイトカインが中心的な役割を果たしている。これらサイトカインのなかでも、単球の産生する TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  および helper T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  が自然免疫成り立ちの主役を演じていることが知られている<sup>6-8)</sup>。

本研究では、透析患者の自然免疫能の主役とも言える、顆粒球・単球のもつ貪食能と生体外刺激に対する末梢血中の単球および helper T 細胞におけるサイトカイン産生の反応性を検討することとした。後者を的確に評価する方法として、細胞内サイトカイン染色/フローサイトメトリー解析の手法を用いた<sup>9,10)</sup>。今回の研究結果は、CAPD 患者の単核球は、HD 患者、健常成人のものに比べ、生体外刺激に対するサイトカイン産生反応の低下を示していた。

## 対象および方法

### 1. 対象

外来通院中で安定した HD を施行されている患者 20 名、CAPD を施行されている患者 15 名を対象とした。また年齢、性比を一致させた健常成人 10 名をコントロールとした。Table 1 に対象のまとめを示した。CAPD 患者の平均透析期間は HD 患者に比べ有意に短かった。急性お

Table 1. Subjects

	HD patients	CAPD patients	Controls
Subject number	20	15	10
Gender (M/F)	12/8	8/7	6/4
Age (years)	55.5 $\pm$ 2.3	52.8 $\pm$ 1.1	52.7 $\pm$ 3.9
Dialysis duration (years)	11.0 $\pm$ 4.3	3.8 $\pm$ 2.1*	~
Genesis of renal failure			
CGN	14	11	
PKD	1	0	
Nephrosclerosis	2	1	
Unknown	3	3	

Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*p < 0.05 vs. HD patients

よび慢性炎症性疾患、糖尿病、悪性疾患、自己免疫疾患、HCV-RNA 陽性、免疫系に影響をもつスタチン系抗高脂血症薬、免疫抑制剤内服中の患者は除外した。HD は全例、週 3 回、1 回 4 時間で施行し、抗凝固剤はヘパリンを用いた。ダイアライザーは 12 名がポリスルホン膜(PS-1.9 N<sup>®</sup> = 3, PS-1.9 UW<sup>®</sup> = 5, PS-1.6 UW<sup>®</sup> = 2: フレゼニウス川澄, APS-150 S<sup>®</sup> = 2: 旭メディカル)、8 名がセルローストリアセテート膜(FB-210 U<sup>®</sup> = 5, FB-150 E<sup>®</sup> = 3: ニプロ社)を使用していた。透析液は重曹透析液(AK ソリタ<sup>®</sup>: 扶桑薬品工業)を使用した。透析液中のエンドトキシン濃度は 0.66 $\pm$ 0.5 EU/l (エンドスピーシー法)であった。CAPD 患者は、1 回 1.5~2.0 l の腹膜透析液を 1 日 4~5 回交換していた。なお、すべての対象患者に研究の主旨を十分に説明し同意を得た。

### 2. 採血方法

血液は、HD 患者では週初めの透析時の開始時にシャント血管静脈側から、CAPD 患者は外来受診日に肘静脈から採取した。サイトカイン解析用にはヘパリン加採血管(5 ml)を用い、4 ml を単球細胞内サイトカイン測定に、1 ml を Phagotest<sup>®</sup> の測定に使用した。

### 3. 単球細胞内および helper T 細胞内サイトカインの測定

細胞内サイトカイン測定の原理は、LPS または mitogen の刺激により細胞内で産生されたサイトカインを brefeldin の働きによりすべて細胞内に封じ込め、それらを特異的抗サイトカイン抗体で細胞内染色し、フローサイトメトリーにより定量的に解析するものである<sup>9-11)</sup>。単球の刺激は LPS、helper T 細胞の刺激は phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) と ionomycin により行った。ヘパリン加採血をした全血 1,000  $\mu$ l に RPMI medium 1640 (GIBCO) を

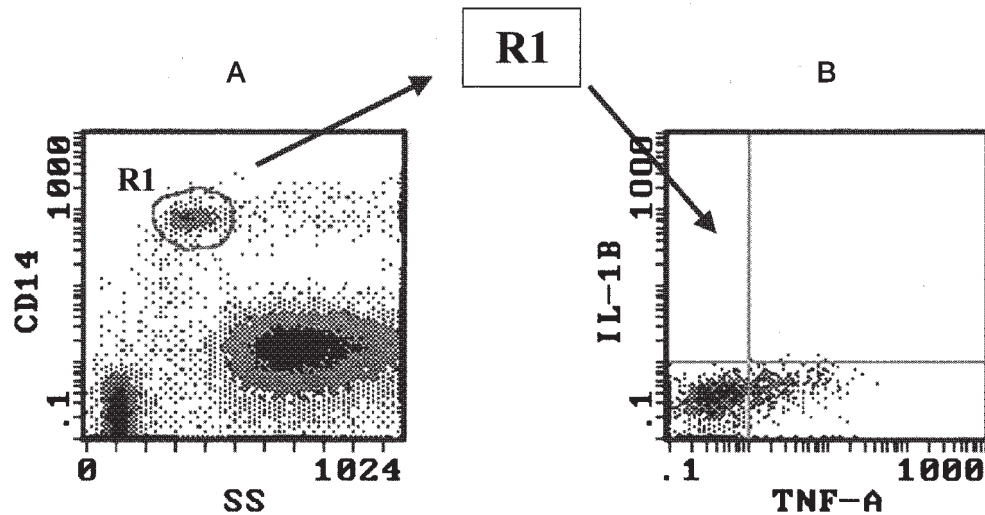


Fig. 1. Flow cytometric analysis of intracellular cytokine syntheses in response to *ex-vivo* stimuli in monocytes

Monocytes were stimulated by LPS. The representative data in a healthy subject are shown. Cells positive for anti-CD14<sup>+</sup> were gated as R1 on the diagram of SSC-FL3. Ten thousand monocytes within the R1 gate were targeted on cytokine analysis (A). The cells labeled with specific anti-TNF- $\alpha$  or anti-IL1 $\beta$  mAbs were profiled in the diagram of FL1-FL2. Cutoff markers were set individually for each measurement using a negative control (B). The percentage of cells positive for each cytokine antibody (% positive cells) was calculated on the quadrant diagram. Th1 and Th2 polarization of helper T cells after stimulation by PMA and ionomycin were analyzed by almost the same method.

1,000  $\mu$ l と LPS (0.1  $\mu$ g/ml : SIGMA CHEMICAL), brefeldin-A (15  $\mu$ g/ml : SIGMA CHEMICAL) または 40 ng/ml の PMA (SIGMA CHEMICAL) および 20  $\mu$ g/ml の ionomycin (SIGMA CHEMICAL) を加え 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 4 時間刺激した。刺激後, 検体を 750  $\mu$ l ずつに分注し, これに単球表面抗体である PC5 標識抗 CD14 抗体 (CD14-PC5 : IMMUNOTECH) または PC5 標識 CD4 抗体 (CD4-PC5 ; IMMUNOTECH) を 10  $\mu$ l 加え, 常温, 暗所にて 30 分染色した。

次に, FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) 4 ml を加え, 15 分間赤血球を溶血させ, 0.1%ウシ血清アルブミン (SIGMA CHEMICAL) 加 PBS で洗浄後 Permiabilizing solution (Becton Dickinson) 1.5 ml を添加し, 10 分間常温暗所に置き, 細胞膜の透過性を亢進させた。その後, 2 種類の抗ヒトサイトカイン抗体を 8  $\mu$ l ずつ加え, 室温, 暗所で 30 分間反応させた。特異抗体として FITC 標識抗 TNF- $\alpha$  抗体 (Anti-Human TNF- $\alpha$ -FITC), PE 標識抗 IL-1 $\beta$  抗体 (Anti-Human IL-1 $\beta$ -PE) と FITC 標識抗 IFN- $\gamma$  抗体 (Anti-Human IFN- $\gamma$ -FITC), PE 標識抗 IL-4 抗体 (Anti-Human IL-4-PE) を, 非特異抗体として FITC 標識抗 IgG1 抗体 (Anti-Mouse IgG1-FITC), PE 標識抗 IgG1 抗体 (Anti-Mouse IgG1-PE) を用い二重染色し

た。非特異抗体に関しては, 8 倍希釈で感度調整を行った。

最後に 0.1%ウシ血清アルブミン (SIGMA CHEMICAL) 加 PBS で洗浄後, 1%ホルムアルデヒド (Cell FixTM : Becton Dickinson) を 300  $\mu$ l 加え細胞を固定し, 直ちにフローサイトメトリー (EPICS XL/XL-MCL System II : Beckman Coulter) を用いて測定した。まず, CD14 陽性細胞または CD4 陽性細胞 5,000 個をターゲット細胞として SSC-FL3 画面上でゲートし (Fig. 1A, 健常者例), この細胞集団で, それぞれのサイトカインを発現している陽性細胞の割合を 4 分画図上で解析した (Fig. 1B)。解析には, 解析用ソフト EXPO32 (Beckman Coulter) を用いた。検体の測定はすべて 2 回ずつ施行した。Th1 細胞は, CD4 陽性・IFN- $\gamma$  陽性・IL-4 陰性とし, TH2 細胞は, CD4 陽性・IFN- $\gamma$  陰性・IL-4 陽性とした。Fig. 1 に健常者単球での測定図 (フローサイトメトリー画面) を示したが, helper T 細胞も同様のものである。

#### 4. 顆粒球および単球貪食能の測定

末梢血中の顆粒球・単球の貪食能 (phagocytic activity) を定量的に検討するため, 市販のキット Phagotest® (ORPEGEN Pharm 社, 和光) を使用した。まず, ヘパリン加採血をした全血 1,000  $\mu$ l を 10 分間氷中に置き, その

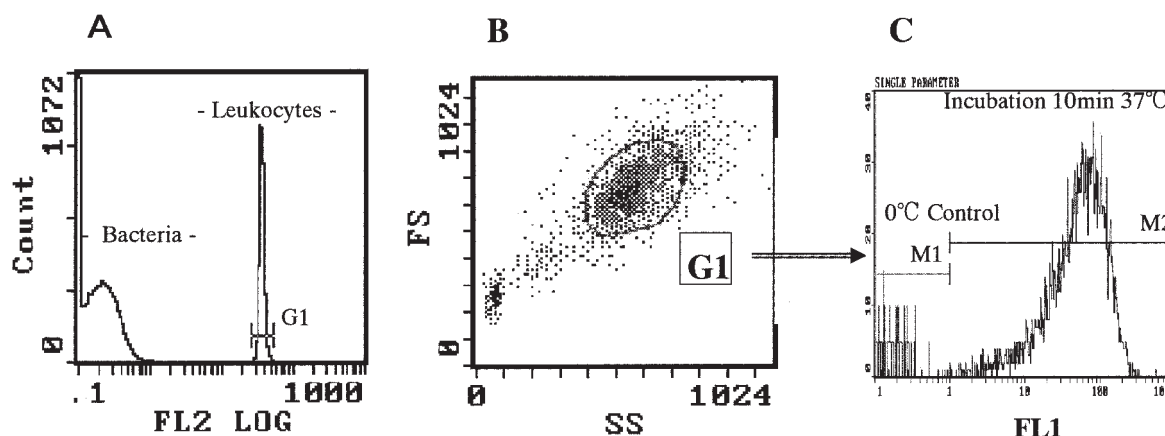


Fig. 2. Flow cytometric analysis of phagocytosis in granulocytes and monocytes

During data acquisition, a “live” cell gate is set in the FL2 fluorescence histogram on those events which have at least the same DNA content as a human diploid cell, to exclude bacterial aggregates having the same scatter light properties as leukocytes (A). Typical dot plots FSC/SS (B) and FL1 histograms of the phagocytosis test. Histograms for the 0°C control samples are presented on the left (as an M1 bar in C).

100  $\mu$ l に FITC 標識されたオプソニン化 *E. coli* 20  $\mu$ l を加えてよく攪拌し、37°C の water bath で 10 分間培養した。またコントロールとして、0°C で FITC-*E. coli* を 10 分間培養した全血 100  $\mu$ l を用意した。培養終了時にすべての検体を同時に water bath より取り出し、反応を止めるため直ちに水中に冷却した。その後すべての検体に Quenching solution を 100  $\mu$ l ずつ加え、よく攪拌した。3 ml の Washing solution で 2 回洗浄後、Lysing solution 2 ml を加え、20 分間赤血球を溶血させた。最後に 3 ml の Washing solution で洗浄後、200  $\mu$ l の DNA Staining solution を加え 10 分間水中で培養し、60 分以内にフローサイトメトリー (EPICS XL/XL-MCL System II : Beckman Coulter) により *E. coli* の取り込みを測定した。Fig. 2 に健康者血球での測定図を示した。検体の測定はすべて 2 回ずつ施行した。まず、バクテリアや死細胞を区別するため、FL2 histogram (DNA 染色) 画面上で白血球をゲートし (Fig. 2A)、この細胞集団を FS-SS 画面上に展開し (Fig. 2B)、顆粒球または単球をゲートし (この例は顆粒球)、それら細胞中の FITC-*E. coli* 取り込みを FL1 histogram で解析した (Fig. 2C)。結果は取り込み陽性細胞の百分率 (%) と 1 細胞当たりの *E. coli* 取り込み活性を反映する Mean Fluorescence Intensity (MFI) により評価した。

### 5. 一般血液検査項目

血液透析患者において上記採血時に同時に採取した血液 (血清) より末梢血単球数、リンパ球数、ヘマトクリット、総蛋白、アルブミン値、尿素窒素値、クレアチニン値、C-reactive protein (CRP) を院内検査室にて測定した。

### 6. 統計学的解析

すべてのデータは平均値  $\pm$  標準偏差で示した。統計処理は StatView (SAS Institute) を用いた。2 群間の有意差検定は unpaired Student's *t* test により、3 群間の検定は ANOVA により行った。p < 0.05 をもって有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 一般血液検査データ

対象群および健康者群の一般検査所見を Table 2 に示した。総白血球数、単球数、リンパ球数は 3 群間に有意差はなかった。CRP 値は、CAPD 患者のなかに軽度陽性を呈する者もみられたが正常範囲内にとどまっていた。

### 2. LPS 刺激下での単球細胞内 TNF- $\alpha$ および IL-1 $\beta$ 陽性細胞率

HD 群、CAPD 群と健康者群の LPS 刺激により産生された単球内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  産生をサイトカインの陽性細胞率で評価した。結果を Fig. 3A, B に示した。なお、LPS 非刺激下では、両サイトカインとも細胞内測定量はきわめて微量であり、対象細胞群間の有意差は評価不能であった (これは、後述の helper T 細胞においても同様であった)。HD 群と健康者群の 2 群間では、いずれの細胞内サイトカイン陽性細胞率にも有意差は認められなかったが、CAPD 群では、HD 群、健康者群に比して有意に低下していた (TNF- $\alpha$  18.3  $\pm$  10.1 vs. 41.9  $\pm$  19.1 or 33.6  $\pm$  16.6 % ; IL-1 $\beta$  11.4  $\pm$  10.2 vs. 27.8  $\pm$  14.1 or 41.2  $\pm$  24.7 %)。サイトカイン陽性細胞絶対数 (陽性細胞率  $\times$  単球絶対数)

Table 2. Laboratory data

	HD patients (n=20)	CAPD patients (n=15)	Controls (n=10)
WBC counts (/μl)	5,399 ± 1,745	8,171 ± 1,865	5,388 ± 1,347
Monocytes (/μl)	338.6 ± 64.1	450.2 ± 306.9	335.4 ± 48.0
Lymphocytes (/μl)	1,323 ± 221	1,138 ± 785.1	1,523 ± 998
Hct (%)	31.6 ± 1.4	32.7 ± 6.7	43.5 ± 3.7
Serum data			
TP	6.8 ± 0.2	6.7 ± 0.5	7.3 ± 0.3
Alb (g/dl)	3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.3	4.4 ± 0.1
BUN	73.5 ± 10.4	54.9 ± 13.3	12.8 ± 2.2
Cr (mg/dl)	13.8 ± 1.5	12.6 ± 3.0	0.94 ± 0.1
TC	138.4 ± 18.9	196.4 ± 24.2	236.5 ± 66.9
TG (mg/dl)	79.4 ± 22.8	169.4 ± 137.9	84.5 ± 20.3
GRP (mg/dl)	0.0	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1

Data are expressed as mean ± SD.

WBC : white blood cell, TP : total protein, Alb : albumin, BUN : blood urea nitrogen, Cr : creatinin, TC : total cholesterol, TG : triglycerides, CRP : c-reactive protein

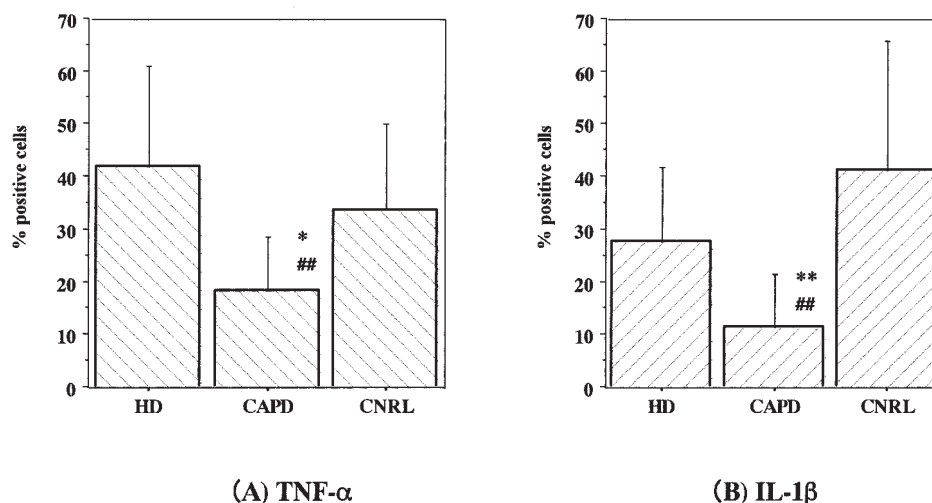


Fig. 3. Intracellular cytokine syntheses in response to *ex-vivo* LPS stimulation in monocytes from HD, CAPD, and controls

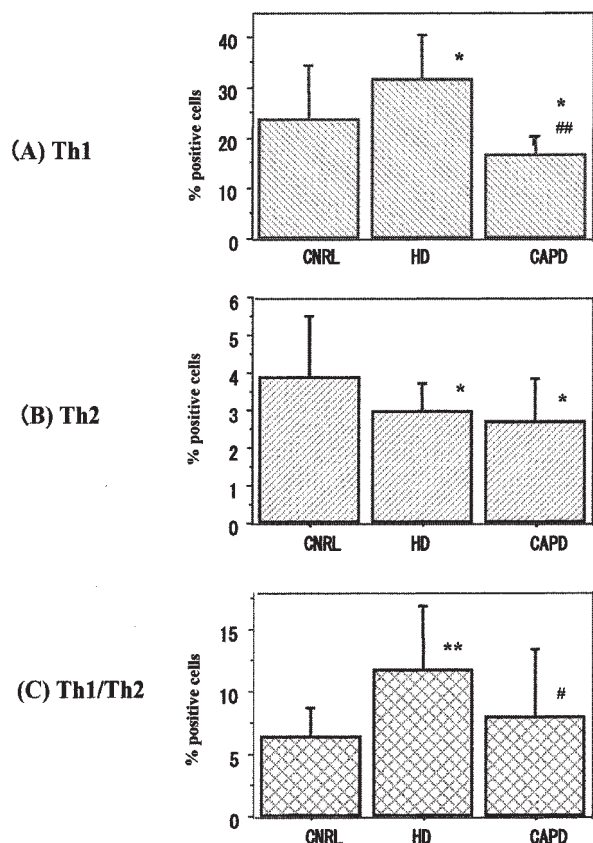
Data of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are shown in (A) and (B), respectively. Intracellular cytokine syntheses were assessed by the percentage of cells positive for each cytokine antibody (% positive cells). Data are shown as mean and standard deviation. p values are for comparisons between the HD patients, the CAPD patients, and the controls. \*p < 0.05 vs. controls, \*\*p < 0.01 vs. controls, and ## p < 0.01 vs. HD patients.

においても同様の結果が得られた。また、HD群、CAPD群いずれにおいても血中尿素窒素、クレアチニン、アルブミン、ヘマトクリットとサイトカイン産生反応の間には有意な相関関係は得られなかった。

### 3. Mitogen (PMA と ionomycin) 刺激下での helper T 細胞内 IFN- $\gamma$ および IL-4 陽性細胞率

Fig. 4 に測定結果を示した。CAPD 群では刺激に対する

helper T 細胞の Th1, Th2 への分化は両者とも有意に低下していた (naive T 細胞の増加を意味する)。一方、HD 群では、helper T 細胞の Th1 への分化は有意に亢進しており、Th1/Th2 バランスは Th1 優位に傾いていた。HD 群、CAPD 群いずれにおいても血中尿素窒素、クレアチニン、アルブミン、ヘマトクリットとこれら helper T 細胞の分化能との間に一定の相関関係は認められなかった。



**Fig. 4. Polarization of helper T cells in response to *ex-vivo* mitogen stimulation in HD, CAPD, and controls**

Data of Th1, Th2, and Th1/Th2 ratio are shown in (A), (B), and (C), respectively. Intracellular syntheses of IFN- $\gamma$  and IL-4 were assessed to differentiate helper T cell subsets (Th1 and Th2) by the percentage of cells positive for each cytokine antibody (% positive cells). Data are shown as mean and standard deviation. p values are for comparisons between the HD patients, the CAPD patients, and the controls. \*p < 0.05 vs. controls, \*\*p < 0.01 vs. controls, # p < 0.05 vs. HD patients, and ## p < 0.01 vs. HD patients.

#### 4. 顆粒球および単球の貪食能

HD群, CAPD群, 健常者群における末梢血顆粒球の貪食能(貪食細胞陽性率および取り込み活性)の結果を

Table 3にまとめた。HD群の顆粒球貪食能のうち, 取り込み活性(MFI値)は健常者群に比べ有意に亢進していた(123.9 $\pm$ 25.6 vs. 102.5 $\pm$ 20.3)が, CAPD群のそれは健常者群と差はなかった。HD群とCAPD群間には顆粒球の貪食能に有意差は認められなかった。単球の貪食能に関しては, HD群, CAPD群, 健常者群に差はなかった。

### 考 察

本研究は, 透析患者の自然免疫能を評価するという観点から, 外的刺激に対する単球および helper T細胞の炎症性サイトカイン産生の反応性と顆粒球および単球のバクテリア貪食能の2点について検討を加えた。今回得られた結果から, これら自然免疫に関わる各細胞の機能は, HD患者では健常者と同程度に保たれているものの, CAPD患者では健常者, HD患者に比べて減弱していることがわかった。これは, CAPD患者のもつ自然免疫機構上の一つの弱点であるかもしれない。

感染症に対する宿主防御機構(因子)は, 種々のものが知られており, また患者の年齢, 栄養状態, 透析効率, 合併症の有無も関係しているであろう。しかし, われわれは生体が侵入病原体に曝露した際に真っ先に作動する非特異的免疫系である自然免疫力がかなりの部分で重要な意義を持つものと考えた。多くの因子が自然免疫の成立に関わっているが, 特に単球/マクロファージ系細胞の産生する炎症性サイトカインが生体防御上中心的な役割を果たしている<sup>4,6,7)</sup>。自然免疫はまず病原因子が血中の単球由来の樹状細胞に発現する Toll-like receptor (TLR)に認識されることから始まる。樹状細胞ではそのTLRにスイッチ(病原体認識)が入ると, そのシグナルは細胞内NF- $\kappa$ Bの活性化を介して, 自然免疫システム構築に必須な多くのサイトカインを分泌させる<sup>4,6)</sup>。分泌されたサイトカイン, 特に

**Table 3. Phagocytic activity in granulocytes and monocytes**

Subjects	G(%)	G(MFI)	M(%)	M(MFI)
Controls	84.0 $\pm$ 7.86	102.5 $\pm$ 20.3	48.2 $\pm$ 8.78	57.6 $\pm$ 17.6
HD patients	81.8 $\pm$ 12.9	123.9 $\pm$ 25.6*	50.1 $\pm$ 14.6	59.2 $\pm$ 20.7
CAPD patients	89.8 $\pm$ 6.27	114.4 $\pm$ 31.6	47.5 $\pm$ 14.2	68.6 $\pm$ 21.9

Data are expressed as mean $\pm$ SD.

\*p < 0.05 vs. Controls and CAPD patients.

G(%) : % phagocytizing cells in granulocytes, M(%) : % phagocytizing cells in monocytes, G(MFI) : mean fluorescence intensity in granulocytes, M(MFI) : mean fluorescence intensity in monocytes.

TNF- $\alpha$  と IL-1 は他の多くの免疫細胞(単球, マクロファージ, リンパ球)に働きそれらを活性化させる。この活性化された免疫細胞が多彩なサイトカインを分泌することで自然免疫が成立する。また, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  は, 直接病原体に働き, 迅速で強力な病原体排除活性を持っている点でも重要であり<sup>12,13)</sup>, この2つのサイトカインは自然免疫最前線で最も生体防衛的に働くサイトカインである<sup>6,7)</sup>。

今回の研究の大きな目的は, 宿主の自然免疫機能の中心となる免疫細胞におけるサイトカイン産生反応を評価することである。そのため, 外的刺激に対する個々の細胞の持つサイトカイン分泌反応を精緻に知る必要があるであり, その方法として細胞内サイトカイン測定に基づく解析法を採択した。細胞内サイトカインの測定は, 最近, 免疫学の分野で確立された方法であり, 現時点では, 最も生体内に近い形で個々の細胞における外因刺激に対するサイトカイン分泌の潜在能力を推定できる実験方法であるとされている<sup>9-11)</sup>。さらに, 血中濃度や培養実験とは異なり, 体液増加による希釈の影響, 透析膜からの除去(特に分子量が20,000 Da 以下の IL-1 $\beta$ , IL-8 では考慮されるべきである)の影響や少数の高濃度サイトカイン産生細胞クローンの存在による修飾などを受けにくいことが利点である。こうした点は透析患者を対象とした研究においては好都合である。また, 複数のサイトカインを単一細胞で同時に多重染色することが可能であり, 個々の細胞が同一条件で産生するサイトカイン発現の様相を同時に解析できるという利点を持つ。

本研究結果においては, CAPD 患者の持つ単球は, HD 患者由来単球, 健常者由来単球に比べて, TLR-4 の特異抗原である LPS 刺激に対する TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  産生反応が低下していた。細胞内サイトカイン染色の方法で HD 患者の単球サイトカイン産生能を調べた報告は幾つかある<sup>14,15)</sup> が, CAPD 患者血中の単球での産生を調べたものはない。われわれの検討は, 樹状細胞を直接用いたものではないが, 末梢単球は樹状細胞の元細胞であり, TLR-4 を発現するなど類似性が高いことから, しばしばそのアナログとして利用されている<sup>16,17)</sup>。本研究で単球を用いたのはそのためであるが, もちろん単球そのものとしてのサイトカイン産生反応も自然免疫上重要な因子であることは上記の通りである。われわれの結果は, CAPD 患者が自然免疫系の中心をなす単球系細胞のサイトカイン反応性の面で弱点を持っていることを十分推察させるものである。

さらに自然免疫上重要な細胞として, 単球以外には helper T 細胞があげられる。特にその分泌する IFN- $\gamma$

の活性は重要である。helper T 細胞は抗原認識された樹状細胞の分泌する IL-12, IL-18 の作用などにより, Th1 (IFN- $\gamma$  分泌細胞) と Th2 (IL4 分泌細胞) の2つのサブセットに分化することが知られている<sup>18)</sup>。今回の研究から, CAPD 患者では helper T 細胞レベルにおいても刺激に低反応を示し, 宿主免疫の維持に不可欠な IFN- $\gamma$  分泌細胞(Th1)の発現が HD 患者, 健常者に比較して有意に低下していることが示された。これまでの幾つかの報告のなかには, HD 患者では Th1 の上昇により Th1/Th2 バランスは Th1 寄りになるとするもの<sup>19,20)</sup>, そうでないとするもの<sup>21)</sup>, CAPD 患者の Th1/Th2 バランスは Th2 の有意な上昇により Th2 側に偏位しているとするものがある<sup>19,22)</sup>。このうち HD 患者の報告はわれわれの結果と基本的には矛盾していない。Th1/Th2 バランスは, いわゆる Th1 病と呼ばれるもののように極端な偏位に至らなければ, 宿主免疫の側面からは好ましいと考えてよかる。CAPD 患者に関する他者の報告では, 有意な Th1 の低下が示されていない点でわれわれの結果とは異なる。CAPD 患者のリンパ球(CD3 陽性細胞)で Th2 サイトカインの産生反応が低下していることを示した論文<sup>23)</sup> もあるが, われわれのデータでは, CAPD 患者の helper T 細胞の分化は Th1, Th2 両者とも低下しており, Th1/Th2 比には有意な変化がみられていなかった。これらの結果の相違についての明確な理由づけは困難であるが, 患者の選択, 細かい実験手技の違いなどが一部関係しているかもしれない。例えば, これまでの報告の多くは糖尿病患者を含んでいるが, 糖尿病自体が細胞の免疫機能に影響している可能性がある<sup>24)</sup>。また, 透析患者に多い C 型肝炎ウイルス保有者は免疫細胞の活性に異常を持つことが知られており<sup>25,26)</sup>, 厳格に研究対象から除かれるべきである。しかし, 他者の論文ではこれらの点が明瞭にされていない。さらに, 細胞内サイトカインの染色手技は精緻であるため, データのばらつきが出やすい。われわれの実験は duplicate で行われ, データ測定間の変動(CV 値)は, intra-, inter-assay とも 10%未満であったことから, より信頼性の高いデータを呈示できたと思われる。代表的 Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  は, マクロファージ, 好中球の活性化, それらの貪食能の賦活をはじめ, いわゆる特異的細胞性免疫への橋渡しもするなど, 自然免疫, 獲得免疫両面にわたって中心的役割を担う重要なサイトカインである<sup>4,8,18)</sup>。CAPD 患者の helper T 細胞が外的刺激に対して Th1 への分化が不良であることは, 少なくとも CAPD 患者の持つ自然免疫の確立および獲得免疫への移行の面で不利益があると考えられる。

CAPD患者とHD患者では、単球、helper T細胞のサイトカイン産生反応に違いがあったが、今回の実験結果からは、この理由を明確にすることはできなかった。今回の対象としたHD、CAPD患者間では透析前の血中尿素窒素値、クレアチニン値などの臨床データに有意差は認められていない。また、血中尿毒素値、ヘマトクリット値、アルブミン値とサイトカイン反応性に相関関係は得られなかった。しかし、HD患者ではHD後にこうした尿毒素値はCAPD患者に比べ確実に低下しているはずである。こうしたmodalityの違いから生まれる透析効率、尿毒素変動の差が長期的に細胞機能に影響している可能性はあるかもしれない。また、今回の研究ではCAPD患者の透析期間はHD患者に比べ有意に短期間であり、透析期間と細胞機能との関連性についても検討の余地を残している。われわれは、すでに1回のHD操作では単球のTNF- $\alpha$ の産生能がやや亢進するが、その他の単球サイトカインやhelper T細胞のサイトカイン産生反応には影響が出ないことを報告している<sup>26,27)</sup>。しかし、HD中の単球、リンパ球と透析膜など異物との接触、各種サイトカイン分泌の増減と相互作用や、HD中に入出入りする微量のLPSやそのfragmentが、長期的には単球、リンパ球の性格に影響を与えていることは否定できない。例えば、単球の持つTLR4はLPS刺激による単球のTNF- $\alpha$ 産生に大きく関わりを持つが<sup>6,28)</sup>、その発現やそのシグナル伝達を慢性的なHD治療が刺激している可能性があるかもしれない。しかし、今のところTLR発現とHDの関与についての情報は皆無であり、HD前後でTLR4の発現が変化しているかどうか、透析効率の低下した患者やCAPD患者でTLR4の発現の低下が認められるかについては、現在われわれが行っている研究の結果を待たねばなるまい。

顆粒球および単球の貪食能はサイトカインと同様自然免疫における生体防御機構の要をなしている<sup>29)</sup>。顆粒球、単球の持つ貪食作用は大きく4つの過程に分かれる。すなわち、貪食細胞の標的への遊走、接着、取り込み、そして殺菌処理である。さらに、血清因子である補体(C3b)や免疫グロブリン(Fc)による細菌のオプソニン化の働きが修飾的に関与する。今回の研究では、顆粒球、単球の貪食能を定量的に評価するため、市販のPhagotest<sup>®</sup>を用いた。このキットは、オプソニン化された大腸菌をFITCラベルしたものを標的にして、その大腸菌を取り込んだ貪食細胞の陽性比率と活性(1細胞当たりのバクテリア数)を評価するものであり、生体のもつ細菌オプソニン化能や貪食後の殺菌処理能力については評価できていない。したがって、

今回の結果はHD、CAPD患者とも貪食細胞の遊走、接着、取り込み能に関しては、ほぼ健常者なみに保たれていたことを示していた。むしろ、HD患者では、顆粒球のこうした機能はやや亢進傾向にあり(Table 3中のMFI値)、HD患者のTh1が高かったこととの関連を疑わせた。測定法の異なる従来の報告でも、細菌取り込み能は保たれるが、その後の殺菌活性が障害されていることを示したものが<sup>30)</sup>。今後は、腎不全患者の血清オプソニン化能、取り込み後の殺菌処理能の面からも検討を加える必要が残されている。

## 結 語

CAPD患者では、単球、helper T細胞とも生体外刺激に対するサイトカイン産生反応は、HD患者、健常者に比べて低下している。HD患者ではこれらの機能はほぼ正常に保たれている。顆粒球、単球の細菌貪食能はHD、CAPD患者ともに障害されていない。CAPD患者単核球のサイトカイン分泌反応の低下は、CAPD患者がHD患者に比し、自然免疫機構の一面において弱点を持っている可能性を示唆するものである。

## 謝 辞

血液検体の採取にあたりご協力をいただきました平塚胃腸病院内科安藤洋子先生に深謝致します。また、実験手技をご指導いただきました東京女子医科大学の東尚子先生、安田雅子先生に感謝の意を表します。

本研究の内容の一部は、第36回米国腎臓学会(サンディエゴ市)、第41回欧州腎・透析・移植学会(リスボン市)において発表した。

## 文 献

1. 日本透析医学会統計調査委員会, 同小委員会. わが国の慢性透析療法の現況(2002年12月31日現在). 透析会誌 2004; 37: 1-24.
2. Bloembergen WE, Port FK. Epidemiological perspective on infections in chronic dialysis patients. *Adv Renal Replacement Ther* 1996; 3: 201-207.
3. Bloembergen WE, Port FK, Mauger EA, Wolfe RA. A comparison of cause of death between patients treated with hemodialysis and peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 184-191.
4. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-344.
5. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C Jr. A human



- homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997 ; 388 : 394-397.
6. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 699-705.
  7. Netea M, van der Meer JM, van Deuren M, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome : not enough, or too much of a good thing? *Trends in immunology* 2003 ; 24 : 254-258.
  8. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986 ; 136 : 2348-2357.
  9. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Immunol Methods* 1993 ; 159 : 197-207.
  10. De Caestecker MP, Telfer BA, Hutchinson IV. The detection of intracytoplasmic interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha expression in human monocytes using two colour immunofluorescence flow cytometry. *J Immunol Methods* 1992 ; 154 : 11-20.
  11. Carter LL, Swain SL. Single cell analyses of cytokine production. *Curr Opin Immunol* 1997 ; 9 : 177-182.
  12. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996 ; 87 : 2095-2147.
  13. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor  $\alpha$ -neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001 ; 348 : 1098-1104.
  14. Meur YL, Lorgeot V, Aldigier J-C, Wijdenes J, Leroux-Robert C, Praloran V. Whole blood production of monocytic cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , sIL-6R, IL-1Ra) in haemodialysed patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999 ; 14 : 2420-2426.
  15. Rousseau Y, Haeffner-Cavaillon N, Poignet J-L, Meyrier A, Carreno M-P. *In vivo* intracellular cytokine production by leukocytes during haemodialysis. *Cytokine* 2000 ; 12 : 506-517.
  16. Tamandl D, Bahrami M, Wessner B, Weigel G, Ploder M, Furst W, Roth E, Boltz-Nitulescu G, Spittler A. Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6 : tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. *Shock* 2003 ; 20 : 224-229.
  17. Mirlashari MR, Lyberg T. Expression and involvement of Toll-like receptors (TRL) 2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF- $\alpha$  production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit* 2003 ; 9 : BR316-324.
  18. 成内秀雄. Th1 と Th2 の活性化機構と分化. *実験医学* 1999 ; 17 : 34-38.
  19. Sester U, Sester M, Hauk M, Kaul H, Kohler H, Girndt M. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000 ; 15 : 1217-1223.
  20. Nitta K, Akiba T, Kawashima A, Kimata N, Miwa N, Nishida E, Uchida K, Honda K, Yumura W, Nihei H. Characterization of Th1/Th2 profile in uremic patients. *Nephron* 2002 ; 91 : 492-495.
  21. Libetta C, Rampino T, Canton AD. Polarization of T-helper lymphocytes toward the Th2 phenotype in uremic patients. *Am J Kidney Dis* 2001 ; 38 : 286-295.
  22. Klinger J, Enriquez J, Arturo JA, Delgado M, Avila G, Ceballos O. Cytokines and peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis : Immunodeviation and immunodeficiency. *Adv Peritoneal Dialysis* 2002 ; 18 : 170-176.
  23. Zamauskaite A, Perez-Cruz I, Yaqoob MM, Madrigal JA, Cohen SA. Effect of renal dialysis therapy modality on T cell cytokine production. *Nephrol Dial Transplant* 1999 ; 14 : 49-55.
  24. Pickup JC, Mattock MB. Activation of the innate immune system as a predictor of cardiovascular mortality in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2003 ; 20 : 723-726.
  25. Martin J, de Sequera P, Quiroga JA, Rico M, Fernandez M, Arocena C, Caramelo C, Carreno V. Role of hemodialysis and hepatitis C virus infection in spontaneous and induced cytokine production of patients with chronic renal disease. *Cytokine* 2000 ; 12 : 1248-1252.
  26. 東 尚子, 安藤 稔, 土谷 健, 秋葉 隆, 二瓶 宏. 血液透析患者における helper T 細胞サブセットの解析. *透析会誌* 2002 ; 35 : 1549-1555.
  27. 安田雅子, 安藤 稔, 土谷 健, 秋葉 隆, 二瓶 宏. 血液透析患者における単球細胞内でのサイトカイン産生能の解析—サイトカイン仮説の再評価—. *透析会誌* 2003 ; 36 : 185-181.
  28. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TRL4 receptor in patients with Gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002 ; 162 : 1028-1032.
  29. Sawyer DW, Donowitz GR, Mandell GL. Polymorphonuclear neutrophils : An effective antimicrobial force. *Rev Infect Dis* 1989 ; 11 : S1532-S1544.
  30. Iida T, Umezawa K, Tanaka K, Koga K, Nakazawa H, Satoh T. Polymorphonuclear cells in chronic hemodialysis patients have intact phagocytotic and impaired bactericidal activities. *Nephron* 1997 ; 75 : 41-47.