

維持血液透析患者におけるエリスロポエチン活性

— 第 1 報 —

CFU-E 由来コロニー形成能と血漿 EPO 濃度の比較

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 : A COMPARISON BY TWO INVESTIGATIVE METHODS OF AN *IN VITRO* BIOASSAY AND RADIOIMMUNOASSAY

KATSUNORI YOSHIDA

Department of Urology, Nara Medical University

Received January 9, 1990

Summary : We have simultaneously determined the plasma levels of erythropoietin (EPO) in 40 chronic hemodialytic patients by an *in vitro* bioassay and a radioimmunoassay (RIA) and have made a comparative study of the results.

In the *in vitro* bioassay, the EPO plasma titers were determined by a method of Sakata et al, using fetal mouse liver cells obtained from 12-day-old mice. The mean EPO level of the hemodialytic patients was revealed to be 74.4 ± 29.1 mU/ml in the bioassay and 17.1 ± 10.1 mU/ml in the RIA. In contrast, the normal level of the control subjects were 158.0 ± 33.4 mU/ml in the bioassay and 15.7 ± 1.3 mU/ml in the RIA. In the bioassay, in 27 (67.5%) of the 40 hemodialytic cases, the EPO titer levels were found to be lower than the normal lower limit (90 mU/ml). Conversely, in the RIA, the EPO levels were found to be higher than the normal lower limit in all cases, except for only one.

The plasma EPO value in the bioassay showed a positive correlation with the hemoglobin (Hb) concentration and the count of the reticulocytes, but no significant correlation in the RIA.

On the other hand, there is no correlation between the *in vitro* bioassay and the RIA, but in the comparative study limited to 21 cases who were did not show very low EPO levels in the bioassay, there was a significant relationship between the two methods.

Therefore, it is felt that plasma EPO level data obtained by the RIA do not necessarily reflect the true erythropoietic stimulatory activity in hemodialytic patients with chronic glomerulonephritis.

Index Terms

erythropoietin, chronic hemodialytic patients, *in vitro* bioassay, radioimmunoassay

緒 言

1957年にJacobsonら¹⁾がErythropoietin (EPO)の主たる産生部位が腎であることを報告して以来、慢性腎不全に認められる貧血は主にEPOの産生低下によるものと考えられてきた²⁾。

一方、EPOの測定は初期の段階においては飢餓マウスや多血症ラットなどを使用して生物学的測定がなされていたが、腎不全患者においては検出限界以下のことが多く、感度的にもまた再現性の点からも問題を残していた。1977年三宅ら³⁾がEPOの純化に成功して以来、遺伝子工学的手法の発達によりrecombinanthuman-EPO (r-huEPO)が大量に生産可能になり、臨床的にも応用されるようになった。1980年Garciaら⁴⁾によりRadioimmunoassay (RIA)法による測定法が報告されて以来、腎不全患者あるいは透析患者におけるEPO濃度も測定可能になり、現在ではほとんどの施設でRIA法により測定している状況である。しかし腎機能の廃絶していると考えられる維持透析患者において、RIA法によるEPO濃度が健常者との間にほとんど差が認められないとの報告⁵⁾もあり、腎性貧血とEPO値の関連性は未だ問題が残されている。

今回著者は、in vitro bioassay法としてfetal mouse liverを用いたCFU-E由来コロニー形成能によるEPO活性値およびRIA法によるEPO濃度を測定し、維持透析患者における腎性貧血と造血能に関し比較検討した。

対象および方法

対象症例は奈良県立医科大学付属病院人工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で、本人または親族者から承諾の得られた症例40例(男性24例、女性16例)、年齢は11歳から69歳、平均48.3±12.8歳、対象症例の透析期間は35ヵ月より151ヵ月、平均81.9±34.9ヵ月、過去3ヵ月間輸血量がなく、血清鉄、血清フェリチン値が正常である症例である。

対照症例として、ボランティアによる健康成人20例(男性10例、女性10例)年齢は19歳より39歳、平均28.7±7.34歳を用いた。

RIA法：RIA法による試料の測定概要は、Fig. 1に示すごとく標準試料および未知試料(検体血漿)をtris-緩衝液と混和し、抗EPO血清添加後25°Cで20時間反応後、標識¹²⁵I-r-huEPOを加えて再度20時間反応させ、25% polyethylene glycol (PEG)にてBound type/Free type分離を行い、同時に蛋白補正のために標準試料には

プール血清を、また未知試料の方には緩衝液を混和した。その後、4°Cで3000回転15分間遠沈しwell型 scintillation-counter ARC-950 (Aloka Co., Ltd. Tokyo)にて測定した。

標識¹²⁵I-r-huEPOはr-huEPO (Pharmaceutical Laboratory, Kirin Brewery Co., Ltd. Tokyo)を使用しLactoperoxidase法にて作成した。以上のようなRIA法による測定は、Special Reference Laboratory社(S. R. L. Co., Ltd. Tokyo)に依頼した。なお、正常値はS. R. L.にて健常者129例について測定した結果、8-30 mU/mlであった。

CFU-E法：坂田らの方法⁶⁾に準じ、未知試料および標準試料処理は、ヘパリン加血漿をErslevら⁷⁾の酸・煮沸処理法をFig. 2のごとく改良して施行した。すなわち試料作成は、血漿1.5 mlと0.9% NaCl 0.5 mlを混合して1N酢酸でpH 5.5に調整し、正確に5分間沸騰水中においた後、すぐに氷冷し遠沈(12000 rpm-10分)後の上清をViskingセルロースチューブ(size 8/32)にて最初の血漿量の40倍に濃縮し、抗生物質(ペニシリンG 100,000 u/l, ストレプトマイシン 0.1 g/l)を含むDulbecco-リン酸緩衝液(PBS)で24時間透析し試料とした。次に培地上に12日齢のfetal mouse liver cellとともにそれぞれ

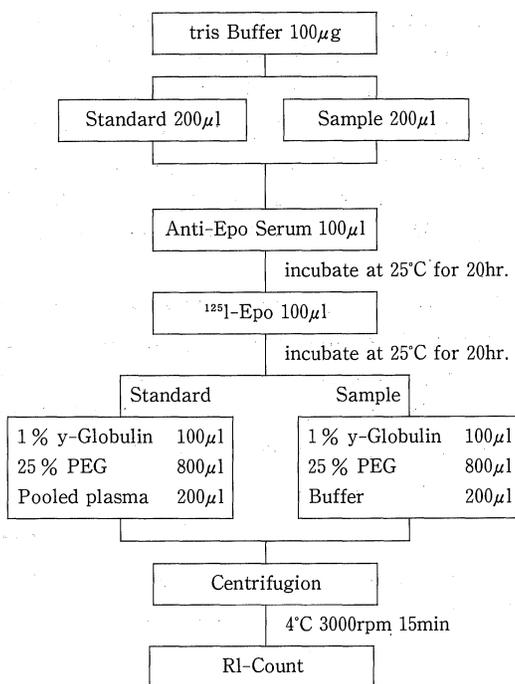


Fig. 1. Method for radioimmunoassay of EPO.

標準試料または未知試料 10 μ l を添加して 48 時間培養後 8 個以上の細胞集団からなる CFU-E 由来コロニー数を算定し、そのコロニー数から r-huEPO 無添加でのコロニー数 (ブランク値) を差し引き、これを更にブランク値で除して %コロニー数として表示した。それによりまず標準曲線を作成し、各々未知試料のコロニー形成法による EPO 活性値を測定した。

Fetal mouse liver を使用した 48 時間培養後の CFU-

〈Method〉

Medium adjustment

- 2% Methylcellulose in α -medium
- Fetal Calf Serum.....56°C, 30min
- α -medium + Nucleotides + α -thioglycerol

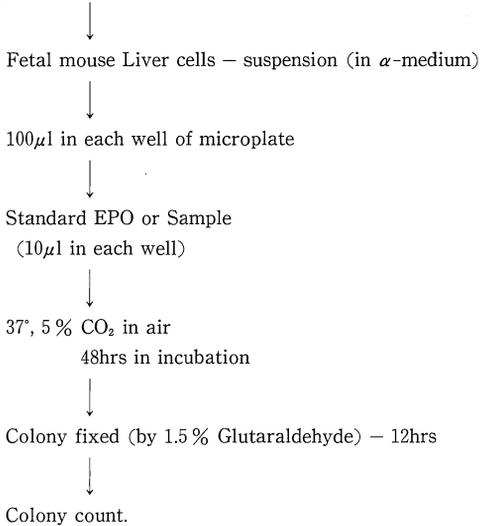


Fig. 2. Method for in-vitro bioassay of EPO.

E 由来コロニー集団は、Fig. 3 に示すごとくで、赤芽球系細胞 8 個以上の集団をコロニーとして算定した。なお、標準曲線作成に関しては中外製薬より提供された r-huEPO を使用した。また培養系の環境条件での測定誤差をなくするために測定は同一日に行った。

結 果

- 1) Δ コロニー数と標準 EPO 濃度との関係を中外製薬 r-huEPO を用いて確認した。培地中 EPO 濃度 0 mU/ml より 25 mU/ml において Δ コロニー数とは、Fig. 4 に示すごとく片対数図上に $Y=37.1 X+45.8$ ($r=0.994$, $p<0.0005$) の有意な一次回帰曲線がえられ、コロニー形成率は EPO 濃度に依存することが確認できたので、以下、コロニー形成法によるコロニー数を測定して EPO 活性値として表した。
- 2) コロニー形成法において対照群 20 例も同一日に同一条件で測定した。対照群の EPO 濃度は 90.0 mU/ml より 228.6 mU/ml, 平均 158 ± 33.4 mU/ml, 血液透析患者においては 25.7 mU/ml より 129.2 mU/ml, 平均 74.4 ± 29.1 mU/ml で対照群に比較して有意に低かった

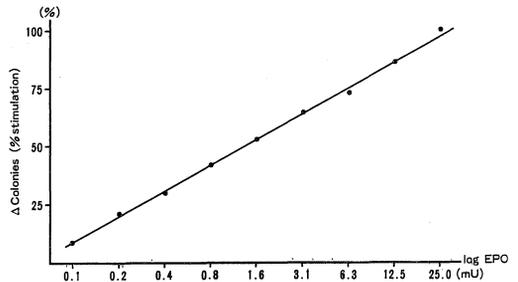
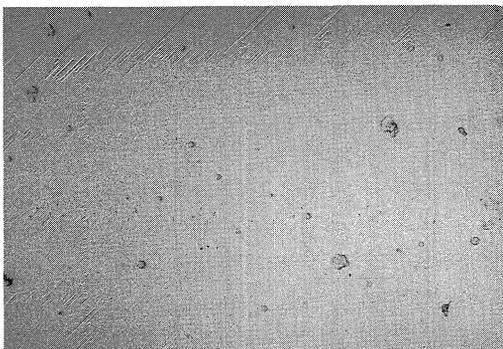
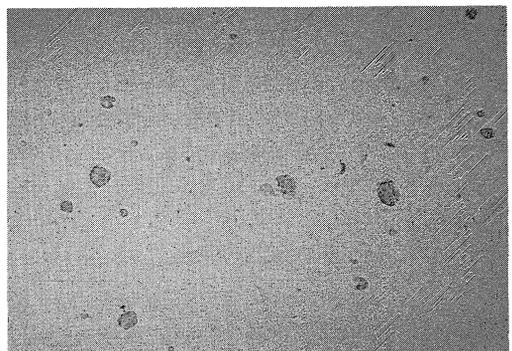


Fig. 4. log EPO dose-response standard curve.



EPO (-)



EPO (12.5mU/ml)

Fig. 3. CFU-E-derived colonies with or without EPO.

($P < 0.05$) (Fig. 5).

一方, RIA による測定結果は, 血液透析患者群において低値ではあるが, そのほとんどが正常範囲内にあり正常下限の 8 mU/ml 以下は 1 例に過ぎず, また 30 mU/ml 以上の高値例が 4 例に認められた (Fig. 5).

3) 血液透析期間と EPO 濃度の間にはコロニー形成法および RIA 法ともに相関傾向は認められなかった. こと

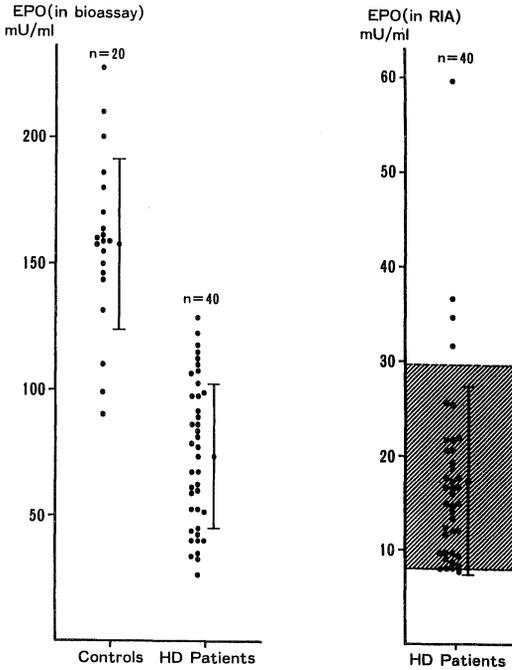


Fig. 5. Plasma EPO levels in the bioassay and the RIA.

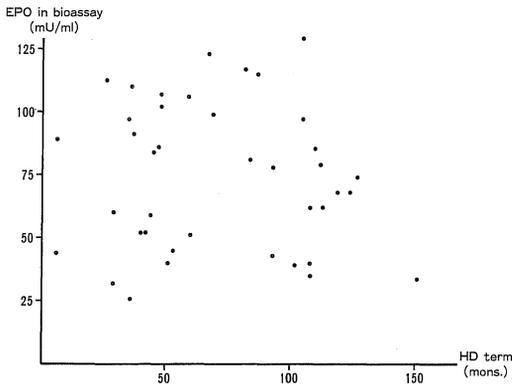


Fig. 6a. Plasma EPO levels (bioassay) in relevance to duration of hemodialysis.

に RIA 法による測定値に関しては全血液透析期間を通じて低値傾向にあった (Fig. 6a, b).

4) 網状赤血球数と EPO 濃度に関しコロニー形成法においては Fig. 7a. に示すごとく $r = 0.516$ ($p < 0.005$) と有意な正の相関を認めた. しかし, RIA 法においては $r = 0.052$ と相関は認められなかった (Fig. 7b).

5) Hemoglobin (Hb) 濃度と EPO 濃度に関しコロニー形成法においては $r = 0.212$ と正の相関傾向は認められたが有意ではなかった. また RIA 法においては $r = 0.168$ と相関は認められなかった (Fig. 8a, b).

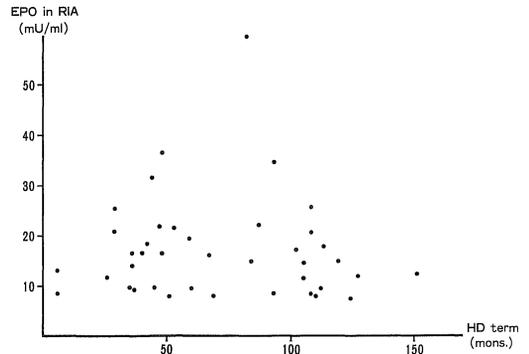


Fig. 6b. Plasma EPO levels (RIA) in relevance to duration of hemodialysis.

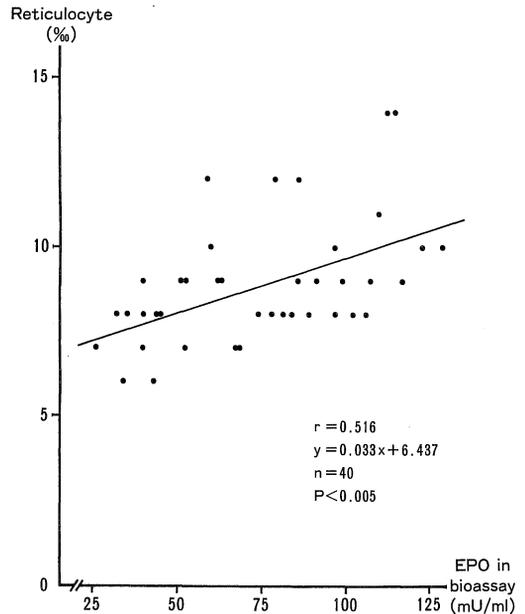


Fig. 7a. Correlation between reticulocyte and EPO levels (bioassay) in HD patients.

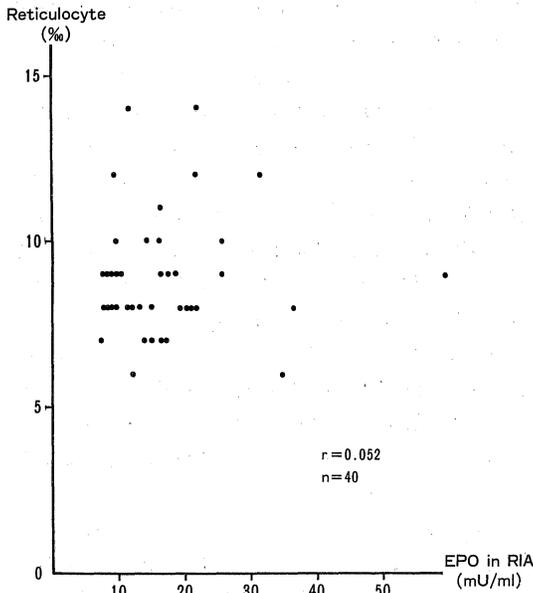


Fig. 7b. Correlation between reticulocyte and EPO levels(RIA) in HD patients.

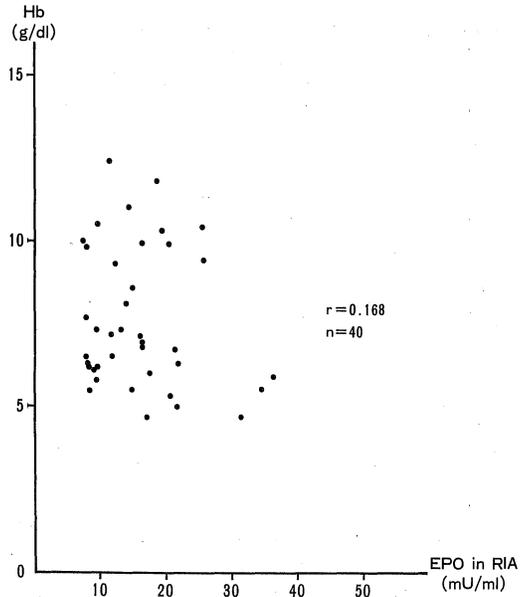


Fig. 8b. Correlation between Hb and EPO levels (RIA) in HD patients.

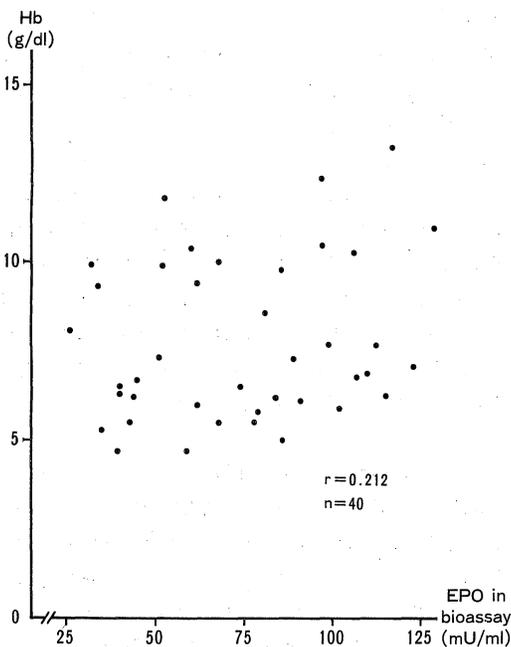


Fig. 8a. Correlation between Hb and EPO levels (bioassay) in HD patients.

6) コロニー形成法と RIA 法の比較においては、今回得られたすべての成績からは有意な相関は認められなかったが、コロニー形成法により EPO 活性値 70 mU/ml 以上の値を示したものについて比較してみると、双方の成績において $r=0.404$ ($p<0.05$) の有意な相関が認められた (Fig. 9).

考 察

慢性腎不全末期および透析患者の腎障害程度と貧血の関連性は以前より指摘されていたが、1953年 Erslev ら⁸⁾は瀉血した家兎の大量血漿を正常家兎に静注し、正常家兎の網状赤血球が増加したことを報告し、Erythropoiesis の重要な regulating factor として EPO の存在が確認され、また腎が主な産生部位であることが報告⁹⁾されて以来、腎不全患者にとって腎性貧血症は免れ得ない合併症として認識されてきた。近年透析機器および透析膜の進歩により維持血液透析患者の予後は飛躍的に向上をとげ、一方では透析液の処理方法の進歩および蛋白同化ステロイド剤の投与⁹⁾により貧血症に関してもある程度の改善が得られているが、今日でも未だヘマトクリット 30% 以下の症例が大半を占めており、依然として腎不全患者の quality of life は著しい制約を余儀なくされているのが現状である。

一般に血液透析患者の腎性貧血の成因として 1) 赤

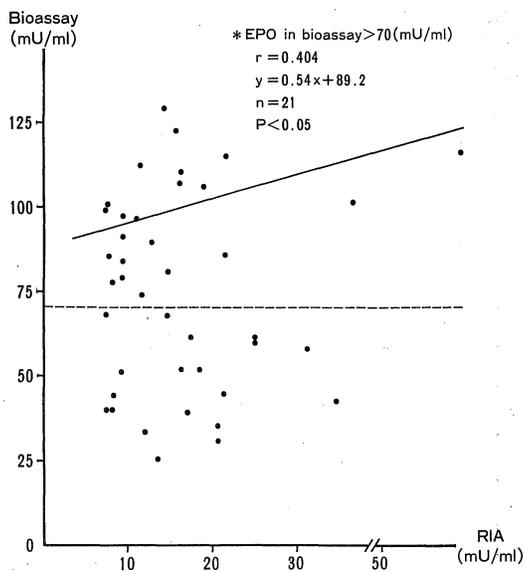


Fig. 9. EPO levels in comparison of the bioassay with the RIA.

血球寿命の短縮, 2) 腎における EPO の相対的産生低下, 3) 造血抑制因子の存在, 4) 鉄欠乏などの因子¹⁰⁾ が知られているが, 血液透析期間が長期に及び維持安定期になると, 腎よりの EPO の相対的産生低下と造血抑制物質による EPO 活性発現抑制が主因となっていると考えられる。

今回の対象症例の維持血液透析患者における Hb 値に対して, 文献的に鉄欠乏性の非腎性貧血症例では, EPO 濃度は 100 mU/ml 以上の上昇が期待されるにもかかわらず¹¹⁾, 今回の測定結果では 17.2 ± 10.1 mU/ml とほとんどが正常範囲内にあり, また同様な報告¹²⁾ も認められることにより維持血液透析患者での EPO 産生は '絶対的' EPO 産生低下ではなく '相対的' 産生低下であると考えられる。

一方, 維持血液透析患者での EPO 活性の低下は諸家により報告されているが, EPO 活性発現状態は臨床的には網状赤血球数および Hb 濃度に表現され, in vitro では bone marrow cell もしくは fetal liver cell 培養による Fe の取り込みおよび赤血球系コロニー形成能として確認されている。De Klerk ら¹³⁾ も同様の fetal mouse liver cell を用いて維持血液透析患者での EPO 活性低下を報告しており, 今回, 著者の結果においてもコロニー形成法では RIA 法と異なり明かな低下を認めた (Fig. 5)。

EPO 濃度と腎性貧血の関連性はその臨床検査値との

比較においては, 関連は認めなかったとの報告¹⁴⁾ がみられるが, 今回, 著者の結果においても RIA 法により確認された EPO 濃度と網状赤血球および Hb の関係は認められなかった。一方, in vitro において Radtke ら¹⁵⁾ は, 今回と同様に fetal mouse liver を使用した EPO 活性値を測定し, Ht と負の相関を認めたと報告しているが, 今回, 著者の結果においてはコロニー形成法による EPO 活性値と臨床検査値とは正の相関を認め, また同時に EPO 活性値に依存する形成コロニー数と臨床検査値と正の相関が認められ, EPO の尿毒症環境での活性発現状態が, 透析患者における貧血症の key-factor として明らかに関与していることを示したといえる。また RIA 法による EPO 濃度が臨床検査値と相関がみられなかったことは, RIA 法では抗原性を有した EPO-related-substance も同時に測定している可能性が十分考えられる。

非腎性貧血症例ではコロニー形成法と RIA 法による測定結果は一致しているが¹⁶⁾¹⁷⁾, Sherwood ら¹⁸⁾ は腎性貧血症例においては相関は確認できなかったと報告している。しかし一方では, 透析患者においてもこの二方法に関連性が認められるとの報告¹⁹⁾ もあり, 一定していない。今回全症例では二方法による測定値の比較においても一致は認められなかったが, コロニー形成法で 70 mU/ml 以上の 21 症例について比較すると, 両方法には高い相関が認められた。このことは uremic toxin が造血能抑制物質として EPO 活性発現に深く関与している可能性を強く示唆している。

EPO の測定法としてこれまで 1) 飢餓マウスや多血症マウスを用いる in vivo bioassay 法 2) 骨髓細胞や fetal mouse liver cell などの培養細胞を用いる in vitro bioassay 法が行われてきたが, 近年遺伝子工学の医学分野への導入により, EPO の radioimmunoassay が可能となり, 現在では RIA 法による測定が一般的になりつつある。RIA 法による EPO の測定は, 感度においても再現性においても簡便で, 日常検査として広く用いられている。

一方, fetal mouse liver cell 培養系を用いたコロニー形成法による測定は, 生物学的活性を直接反映する有用な測定方法であるが, 検査手技に関し熟練と時間を要するため日常検査としては不適である。しかし透析患者を含めた腎性貧血に対して r-huEPO の投与の効果に個体差が認められている今日²⁰⁾²¹⁾²²⁾, 造血抑制物質との絡みを含めて適応症例, 至適投与量の決定および効果判定において RIA 法による測定のみではなく, 生理学的活性のパラメーターとしてコロニー形成法による測定法につい

ても再評価する必要があると考える。

結 語

- 1) 維持血液透析患者40症例および対照例としてボランティアによる健康成人20例の血漿EPO値について fetal mouse liver cell 培養系によるコロニー形成法およびRIA法の二方法を用いて測定した。
- 2) コロニー形成法によるEPO測定値は、ほとんどが正常値以下で、50 mU/ml以下の異常低値が10例認められた。
- 3) RIA法によるEPO測定値は正常値以下は1例にすぎず、ほとんどが正常値内にあり、また30 mU/ml以上の高値例が4例に認められた。
- 4) 網状赤血球およびHbとはコロニー形成法による測定値で正の相関を認めたが、RIA法では相関は認めなかった。
- 5) 両測定法に一致は認められなかったが、uremic toxinの造血抑制物質の影響のないと考えられる症例については有意な相関が認められた。
- 6) EPOの生理学的活性の点からRIA法とともにコロニー形成法による測定も再認識する必要がある。

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致します。

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第2生理学教室坂田 進博士に感謝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お礼申し上げます。

本論文の要旨は第39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) Jacobson, L. O., Goldwasser, E., Fried, W. and Plzak, L.: Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* **179**: 633-634, 1957.
- 2) Pavlovic-Kentera, V., Clemons, G. K., Djukanović, L. and Biljanović-Paunović, L.: Erythropoietin and anemia in chronic renal failure. *Exp. Hematol.* **15**: 785-789, 1987.
- 3) Miyake, T., Kung, Ch. K. H. and Goldwasser, E.: Purification of human erythropoietin. *J.*

- Biol. Chem.* **252**: 5558-5564, 1977.
- 4) Garcia, J. F., Sherwood, J. and Goldwasser, E.: Radioimmunoassay of erythropoietin. *Blood cells* **5**: 405-419, 1979.
- 5) Segal, G. M., Eschbach, J. W., Egrie, J. C., Stueve, T. and Adamson, J. W.: The anemia of end-stage renal disease: Hematopoietic progenitor cell response. *Kidney Int.* **33**: 983-988, 1988.
- 6) Sakata, S., Enoki, Y., Tomita, S. and Kohzaki, H.: In vitro erythropoietin assay based on erythroid colony formation in fetal mouse liver cell culture. *Br. J. Haematol.* **61**: 293-302, 1985.
- 7) Erslev, A. J., Caro, J., Kansu, E., Miller, O. and Cobbs, E.: Plasma erythropoietin in polycythemia. *Am. J. Med.* **66**: 243-247, 1979.
- 8) Erslev, A.: Humoral regulation of red cell production. *Blood* **8**: 349-357, 1953.
- 9) Richardson, J. R. Jr. and Weinstein, M. B.: Erythropoietic response of dialyzed patients to testosterone administration. *Ann. Intern. Med.* **73**: 403-407, 1970.
- 10) 高久史麿: 腎と造血制御機構. *日腎誌.* **30**: 452-454, 1988.
- 11) 浦部晶夫: 造血と貧血の成り立ち. *臨床透析* **4**: 43-47, 1988.
- 12) 梅津道夫, 多川 斉, 齊藤恒博, 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.
- 13) De Klerk, G., Wilmink, J. M., Rosengarten, P. C. J., Vet, R. J. W. M. and Goudsmit, R.: Serum erythropoietin (ESF) titers in anemia of chronic renal failure. *J. Lab. Clin. Med.* **100**: 720-734, 1982.
- 14) 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.
- 15) Radtke, H. W., Claussner, 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.

- 16) **Cohen, R. A., Clemons, G. and Ebbe, Sh. :** Correlation between bioassay and radioimmunoassay for erythropoietin in human serum and urine concentrates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **179** : 296-299, 1985.
- 17) **Birgegard, G., Miller, O., Caro, J. and Erslev, A. :** Serum erythropoietin levels by radioimmunoassay in polycythaemia. *Scand. J. Haematol.* **29** : 161-167, 1982.
- 18) **Sherwood, J. B. and Goldwasser, E. :** A radioimmunoassay for erythropoietin. *Blood* **54** : 885-893, 1979.
- 19) **Naets, J. P., Garcia, J. F., Tousaint, Ch., Buset, M. and Waks, D. :** Radioimmunoassay of erythropoietin in chronic uraemia or anephric patients. *Scand. J. Haematol.* **37** : 390-394, 1986.
- 20) **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 I and II clinical trial. *N. Engl. J. Med.* **316** : 73-78, 1987.
- 21) **Winearls, Ch. G., Oliver, D. O., Pippard, M. J., Reid, C., Downing, M. R. and Cotes, P. M. :** Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* **2** : 1175-1178, 1986.
- 22) 高久史麿, 三村信英, 前田貞亮, 清水直容, 越川昭三, 秋山暢夫, 太田和夫, 溝口秀昭, 大坪 修, 二瓶 宏, 丸茂文昭, 浦部晶夫, 川口良人, 秋沢忠男, 鈴木好夫, 久保和雄, 大坪公子, 赤羽清彬, 関口 孝, 小路 良 : 腎性貧血に対する recombinant human erythropoietin 製剤 KRN 5702 の効果. *腎と透析* **24** : 1009-1025, 1988.