泌尿紀要28巻11号
1982年11月

慢性腎不全患者の免疫態に関する研究

第2報：グアニジン化合物による免疫能抑制効果について

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室（主任：前川正信教授）
森　川　洋　二

STUDY ON THE IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE

2. INHIBITORY EFFECT OF GUANIDINE COMPOUNDS ON IMMUNITY

Yoji MORIKAWA
From the Department of Urology, Osaka City University Medical School
(Chairman: Prof. M. Maekawa, M.D.)

To study the inhibitory effect of guanidine compounds on cellular immunity, the PHA-induced blastoid transformation of lymphocytes of patients with chronic renal failure (CRF) on hemodialysis (HD) or hemofiltration (HF), was examined, and later the stimulation index (SI) was calculated. Serum concentration of guanidine compounds was concomitantly measured. The SI was 39.80±21.70, 60.27±22.05 and 61.09±16.32 for the HD, HF and healthy control groups, respectively. Although the value for the HD group was significantly lower than that for the HF group ($p<0.02$) or the control group ($p<0.001$), there was no difference between the HF and control groups. The serum methylguanidine (MG) concentration for the HD group was 38.97±18.83 μg/dl, which was significantly higher than the 23.92 11.05 μg/dl for the HF group. The SI and MG for the CRF patients were inversely correlated. From these results, MG is considered to be one of the uremic toxins that inhibit cellular immunity. Therefore, HF seems to be a better mode of therapy in that it improves the cellular immunity of CRF patients by reducing the MG.

Key words: Chronic renal insufficiency, Immunity, Uremic toxin, Methylguanine, Hemofiltration

緒　　言

慢性腎不全患者では免疫能が低下しており，その原因の1つとして uremic toxin による免疫担当細胞への阻害作用が考えられている[1]．しかしながら，免疫抑制効果を有する uremic toxin の同定あるいは作用機序については統一された結論はでていない．また，低下した免疫能を改善させる研究がほとんどなされていないのが現状である．今回，血液透析（以下 HD）あるいは血液濾過（以下 HF）を受けている慢性腎不全患者を対象として PHA によるリンパ球の反応を測定すると同時に，uremic toxin の一種であるグアニジン化合物の血中濃度を測定することにより，免疫能抑制効果を有する uremic toxin の解明を試みるとともに血液浄化法による免疫能改善効果について検討した．

対　　象

対象は週3回の HD あるいは HF を受ける3カ月以上経過した慢性腎不全患者である．HD 患者は男子16名，女子7名，計23名，年齢は27～68歳，平均43歳．HF 患者は男子5名，女子6名，計11名，年齢は25～58歳，平均40歳であり，免疫抑制剤の投与あるいは重篤な肝障害を有する患者は除外した．対照群は健常な男子22名，女子9名，計31名，年齢26～68歳，平均47歳である．

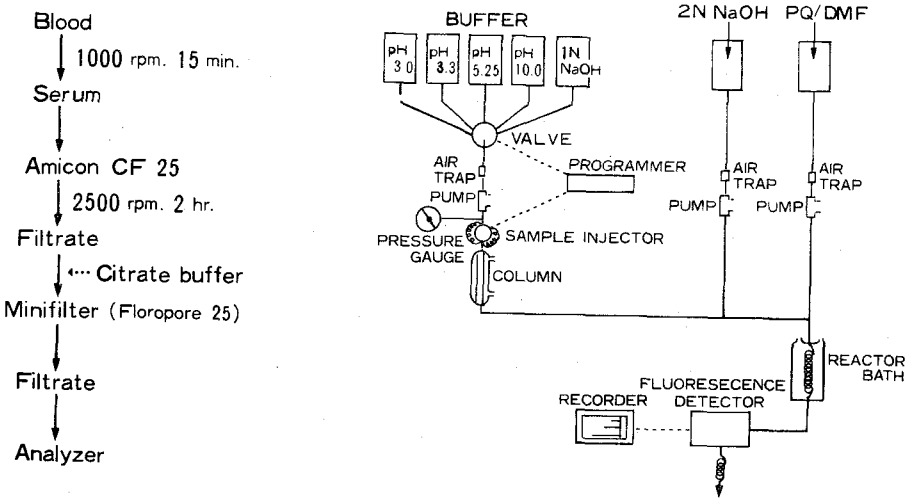

Fig. 1. Method of guanidinocompounds analysis

方　　法

血液浄化の開始直前に採血し，以下の測定に供した．

1. 患者リンパ球反応の測定

患者リンパ球の PHA 刺激に対する幼若化反応を測定するため微量全血培養法を用いて，^{3}H-thymidine の酸不溶性分画への取り込みを測定し，PHA 非添加群との比，すなわち stimulation index (以下 SI) を算出した．詳細は第1報にてすでに報告している[2]．

2. 血中グアニジン化合物濃度の測定

グアニジン化合物の分析には guanidinoanalyzer (520) (日本分光KK) を用いて guanidinosuccinic acid (GSA), guanidinoacetic acid (GAA), guanidine (G) および methylguanidine (MG) を測定した．Fig. 1 左のごとく血清を Amicon CF 25 で除蛋白したのち，クエン酸緩衝液にて pH 2.2 に調整した．Fig. 1 右は guanidinoanalyzer のシェーマであり，その原理は pH の異なる緩衝液によりグアニジン化合物がつぎつぎに分離され，つづいて強アルカリ下にて phenanthraquinon と反応し，生じた螢光物質を螢光検出器にて測定するものである[3]．

成　　績

1. SI

SI は HD 群では 39.80±21.70 (Mean±SD, 以下同様)，HD 群では 60.27±22.05 であり，対照群では 61.09±16.32 であった．HD 群は対照群に比し有意に ($P<0.001$) 低値であり，また HF 群に比しても有意に ($P<0.02$) 低値であるが，HF 群と対照群では有意な差は認められない (Fig. 2).

2. 血中グアニジン濃度

腎不全患者の血中グアニジン化合物濃度および BUN，血清クレアチニン値を Table 1 に示す．GSA は HD 群では 152.7±95.8 μg/dl, HF 群では 100.3±78.1 μg/dl で有意差はみられない．GAA は HD 群では 15.73±10.16 μg/dl, HF 群では 7.87±5.13 μg/dl，で危険率5％以下の有意差を認める．G は HD 群で 14.14±6.10 μg/dl, HF 群では 10.13±4.49 μg/dl であり，HD 群に高い傾向を認めるが有

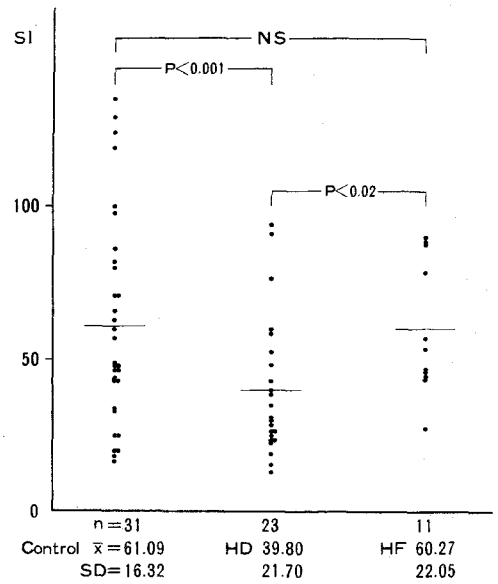

Fig. 2. Stimulation index in hemodialysis and hemofiltration patients

意差はない．MG は HD 群では 38.97±18.83 μg/dl, HF 群では 23.92±11.05 μg/dl であり，危険率5％以下の有意差を認める．BUN および血清クレアチニン値は HD 群と HF 群の間で差はみられない．

3. ST と血中グアニジン化合物との相関

SI と GSA あるいは GAA とは相関がみられなかった (Fig. 3, 4) が，SI と G および MG とは負の相関がみられ，相関係数はそれぞれ −0.455, −0.535 であった (Fig. 5, 6).

Table 1. Serum guanidinocompounds, BUN and s-Cr in hemodialysis and hemofiltration patients

	HD (n=23)	HF (n=11)	P
GSA (μg/dl)	152.7 ±95.8	100.3 ±78.1	NS
GAA (μg/dl)	15.73±10.16	7.87± 5.13	<0.05
G (μg/dl)	14.14± 6.10	10.13± 4.49	NS
MG (μg/dl)	38.97±18.83	23.92±11.05	<0.05
BUN (mg/dl)	77.28±24.15	83.72±15.00	NS
Cr (mg/dl)	13.16± 3.04	13.10± 3.36	NS

MEAN ± SD

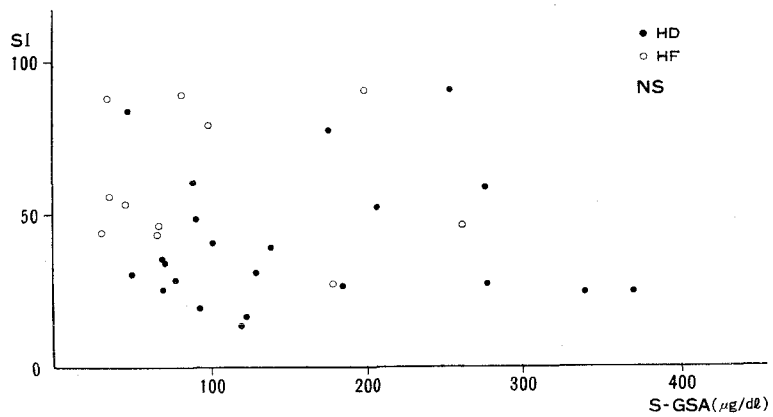

Fig. 3. Relation between serum guanidinosuccinic acid and stimulation index in hemodialysis and hemofiltration patients

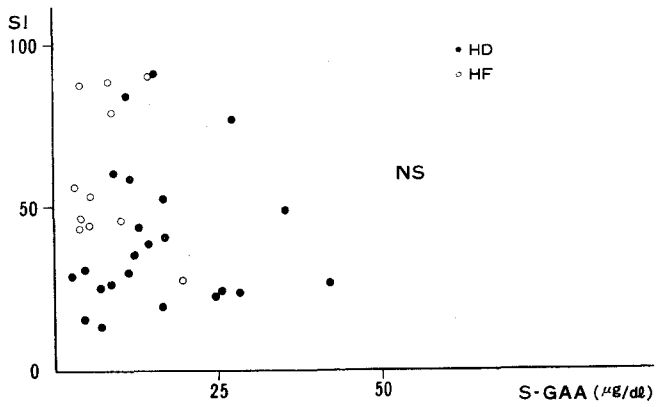

Fig. 4. Relation between serum guanidinoacetic acidd and stimulation index in hemodialysis and hemofiltration patients

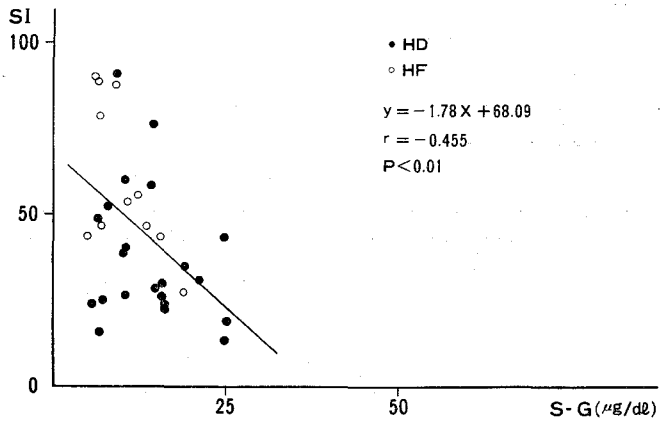

Fig. 5. Relation between serum methylguanidine and stimulation index in hemodialysis and hemofiltration patients

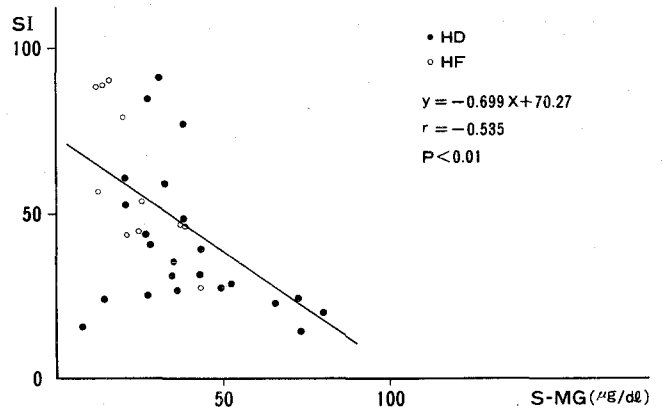

Fig. 6. Relation between serum guanidine and stimulation index in hemodialysis and hemofiltration patients

考　　察

慢性腎不全患者では遅延型皮内反応の低下，PHA 皮内反応低下および *in vitro* での PHA 刺激によるリンパ球幼若化反応が低下している患者が多くみられることを第1報[2]において報告した．今回，慢性腎不全患者における免疫能低下の原因と改善策を究明する目的で，uremic toxin の一種であるグアニジン化合物の免疫能抑制効果について検討したので，その成績につき考察を加える．

1. グアニジン化合物のリンパ球反応阻害作用について

グアニジン化合物は guanidine base を有する物質の総称であり，食物中に含まれるほか，アミノ酸代謝の過程で体内で産生されるが，その経路は解明されていない．腎不全患者においては血中および血球内濃度が健常者よりも著明に増加していることはすでに報告されている[4]．グアニジン化合物としては今回測定した GSA, GAA, G, MG のほかに guanidino propionic acid (GPA), guanidino butilic acid (GBA) などがあるが，これらのうち，uremic toxin として認められているのは MG と GSA である[5]．Giovannetti ら[6]は犬に MG を投与し，尿毒症類似の症状を呈し死にいたることを報告している．*in vitro* での実験では MG は LDH 阻害[7]，ATPase 阻害[8]，酸化的リン酸化阻害[9]などの毒性を示し，また GSA は血小板第三因子阻害[10]，血小板凝集能阻害[11]，transketolase 阻害などの毒性のあることが証明されている．免疫能に関しては健常者リンパ球を用いた *in vitro* の実験で Slavin ら[12]は GSA が PHA 刺激に対するリンパ球の反応を抑制すると報告しているが，Harris ら[13]および Ku ら[14]は GSA では抑制されず，MG で抑制

されると報告している．しかしこれらの実験では培養液中に添加された MG あるいは GSA の濃度腎不全患者の血中濃度よりもはるかに高く，実際に患者の免疫能低下の原因になっているとは断言できないと考える．今回，微量培養法を用いて患者リンパ球の PHA 刺激に対する反応を測定すると同時に血中グアニジン濃度を測定することにより，実際の生体内に近い条件下でのグアニジン化合物のリンパ球反応への影響を検討し，血中 MG 濃度の高い患者では SI が低下していることを認めた．このことは MG が腎不全患者の免疫能低下に関与していることを示唆するものであると言える．しかしながら，血中 MG 濃度が低くても SI が低値の患者も認められ，免疫能低下の原因が MG だけによるものでなくほかの多くの要因が関与していると考えねばならない．今回の実験では血中 GSA 濃度と SI とは相関を示さず，GSA は腎不全患者の通常の濃度ではリンパ球の PHA 反応抑制効果はないと思われる．また血中 G 濃度と SI は負の相関を示したが，G の毒性は一般に認められておらず，今後正常リンパ球を用いた実験系によってリンパ球反応抑制効果の有無を確かめたい．なお，MG についてもリンパ球反応抑制の作用機序について検討する必要がある．

2. 血液浄化方式による免疫能への影響

今回，HD 患者および HF 患者について免疫能を比較したところ，HF 患者の SI は HD 患者よりも高値であるだけでなく，正常者とも差がみられなかった．この成績から HF は慢性腎不全患者の免疫能を改善するのに有利な血液浄化法と考えられる．前回の報告[15]では HD 群と HF 群の間に有意差が認められなかったが，これは HF 導入後3カ月未満の病態の安定していない患者が含まれているためと考えられる．HF で免疫能が改善される理由としては血中 MG 濃度が HF 群では HD 群よりも低値であることから，リンパ球反応抑制効果を有する MG が減少しているために SI が上昇していると考えられるが，そのほかの免疫抑制効果を持つ未知の uremic toxin が HF 患者で減少している可能性もあり，今後さらに検討を要する．

結　　語

1．PHA に対するリンパ球反応が低下している慢性腎不全患者では，血中 MG 濃度が高値であることから，MG は免疫抑制効果を有する uremic toxin の1つと考えられる．

2．HF 患者では血中 MG 濃度が低下し SI の上昇がみられ，HF は慢性腎不全患者の免疫能を改善するのに有利な血液浄化法と考えられる．

稿を終わるにのぞみ，御高閲を賜わった恩師前川正信教授に深謝いたします．なお本論文の要旨は第31回泌尿器科中部連合総会において発表した．

文　　献

1) 早原信行：末期腎不全患者の免疫機能に関する研究．日泌尿会誌 **64**: 615～628, 1973
2) 森川洋二：慢性腎不全患者の免疫能に関する研究．第1報：慢性血液透析患者における PPD, PHA 皮内反応および PHA 刺激によるリンパ球幼若化能について．泌尿紀要 **26**: 805～812, 1980
3) 大山武司：慢性腎不全患者における Guanidine 誘導体についての研究 —Hemofiltration と Hemodialysis の比較—．市大医誌 **30**：531～541, 1982
4) 安東明夫・中田一洋・椿原美治・田中敏博・阿部裕：尿毒症の病態と Uremic Toxin-Guanidine 誘導体．最新医学 **31**: 1695～1706, 1976
5) Bergstrom J and Furst P: Uremic toxins. Replacement of renal function by dialysis. P.344～368, 1979
6) Giovannetti S, Biagini M, Balestri PL, Navelesi R, Giagnoni P, deMattels A, Ferro-Milone P and Perfetti C: Uremia-like syndrome in dogs chronically intoxicated with methylguanidine and creatinine. Clin Sci **36**: 445～452, 1969
7) Rjagapolan KV, Fridovich I and Handler P: Inhibition of enzyme activity by urea. Fed Proc **19**: 49, 1960
8) Hollunger G: Guanidines and oxidative phosphorylation. Acta Pharmacol **11**: 7, 1955
9) Horowitz HI, Cohen BD, Martinez P and Papayoanou M: Defective ADP-induced platelet factor 3 activation in uremia. Blood **30**: 331～340, 1967
10) Stein IM, Cohen BD and Horowitz HI: Guanidinosuccinic acid; X factor in uremic bleeding? Clin Res **16**: 397, 1968
11) Lange K and Lonergan ET: Transketolase activity in uremia. Arch Intern Med **126**: 851～854, 1970
12) Slavin RG and Fitch CD: Inhibition of lymphocyte transformation by guanidinosuccinic acid,

a surplus metabolite in uremia. Experientia **11**: 1240～1341, 1971

13) Harris JE, Page D, Posen G and Stewart T: Suppression of in vitro lymphocyte function by uremic toxin. J Urol **108**: 312～313, 1972

14) Ku G, Hird VM, Varghese Z, Ahmed KY, Fiter M, Ng CM and Moorhead JF: Inhibition of DNA synthesis by guanidine compound in uraemia. Proc Eur Dial Transpl Assoc **11**: 427～432, 1974

15) 森川洋二・堀井明範・川喜多順二・西島高明・西尾正一・早原信行・前川正信・水谷洋子・山川真・山上征二・吉本 忍：血液透析患者と血液濾過患者の細胞性免疫能の比較．昭和54年度特定疾患調査研究結果報告書 P.83～88, 1980

(1982年5月24日受付)