

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

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

STUDIES ON THE IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS
WITH CHRONIC RENAL FAILUREI. PPD, PHA SKIN TEST AND PHA-INDUCED BLASTOID TRANSFORMATION
OF PERIPHERAL LYMPHOCYTES IN UREMIC PATIENTS
MAINTAINED ON HEMODIALYSIS

Yoji MORIKAWA

From the Department of Urology, Osaka City University Medical School

(Chairman: Prof. M. Maekawa, M.D.)

The immune response in 55 uremic patients maintained on hemodialysis was measured with PPD, PHA skin test and PHA induced blastoid transformation of peripheral lymphocytes in *in vitro* system.

Positive rate of PPD skin test was 62% in uremic patients, which was low in general Japanese adults.

Mean diameter of erythema of skin reaction at 48 hours after the intradermal injection of 5 μ g PHA was 21.1 ± 11.8 (mean $\pm$ SD) mm in uremic patients and 36.6 ± 17.3 mm in normal control subjects. The difference between them was significant at $P < 0.001$.

Blastoid transformation of lymphocytes was determined with quantitation of tritium thymidine incorporation (cpm) and the ratio of blastogenesis was revealed as stimulation index (SI). SI was 32.1 ± 25.5 in uremic patients and 50.2 ± 27.2 in control subjects. The difference between them was significant at $P < 0.01$. SI was low in the uremic patients with high serum creatinine level.

On this investigation, cellular immune response was reduced in uremic patients and lymphocyte transformation using whole blood culture was useful method for evaluation of cellular immune competence in severe anemic patients.

I. 緒 言

慢性腎不全患者の免疫能低下については、1955年 Hume ら¹⁾ が腎移植患者の拒絶反応の低下を報告して以来数多くの研究がなされ、特に細胞性免疫能の低下は各種抗原による皮内反応および *in vitro* でのリンパ球幼若化能の測定により明らかにされてきた。一方、慢性腎不全患者では免疫能低下のために各種感染症の罹患率が高く、また重症となりやすいため腎不全患者

の管理上重要な問題となっている。しかしながら、免疫能低下の原因については未だ意見の一致はみず、低下した免疫能の改善に対する研究もあまり行なわれていないのが現状である。そこで、慢性腎不全患者の免疫能低下の原因を究明するとともに免疫能賦活化の研究を行なうことは有意義と考える。

まず今回は *in vivo* および *in vitro* での実験系により慢性腎不全患者の免疫能を測定し、これらの成績を比較するとともに、腎機能あるいは透析効果の指標と

されている血液尿素窒素（以下 BUN と略す）および血清クレアチニン（以下 S-Cr と略す）との関係について検討を加えた。

II. 対象および方法

1. 対象

対象は週3回の血液透析を受けている慢性腎不全患者55名で男35名、女20名、年齢は17歳から68歳、平均42歳である。透析期間は3か月から6年、平均3年間である。なお、担癌患者や免疫抑制剤の投与を受けている患者あるいは明らかな感染症を有する患者は除外した。

対照群は健康成人25名を選び、男18名、女7名、年齢は25歳から68歳、平均年齢45歳である。

2. 方法

1) PPD 皮内反応

0.5 μ g/dl の PPD（日本ビーシー製、一般診断用精製ツベルクリン液）0.1 ml を被検者の前腕屈側に皮内注射し48時間後の発赤の長径と短径を測定し、これらの相乗平均を PPD 皮内反応の測定値とした。

2) PHA 皮内反応

PHA-W（Wellcome 社製、purified phytohaemagglutinine HA 16）5 μ g を含む 0.1 ml の生食水溶液を前腕屈側に皮内注射し48時間後に発赤径を PPD 皮内反応と同様の方法で測定した。

3) 微量全血培養法によるリンパ球幼若化率の測定²⁾

血液透析開始前にヘパリン加（10 u/ml）末梢血を1 ml 採取した。その0.1 ml ずつを滅菌平底培養瓶に分注し、RPMI 1640 培養液（ペニシリン 100 u/ml、ストレプトマイシン 100 mg/ml 含有）を加え全量を1 ml とした。ついで各培養瓶に PHA-P（Difco 社製、1 バイアルを50倍希釈）を10 μ l ずつ添加し、5%炭

酸ガスを含む空気を通じながら、高湿度細胞培養装置で37°Cで48時間培養した。培養終了24時間前に³H-thymidine（日本アイソトープ協会製、比活性5 Ci/mmol）を添加した。培養終了後、各培養瓶に蒸留水1 ml を加え30秒間攪拌振盪して赤血球を溶血させた後、millipore filter（Sartorius 社製、pore size 1.2 μ 、直径25 mm）上に注ぎ吸引濾過した。ついで氷冷生理食10 ml でフィルターを洗い、さらに氷冷5%三塩化酢酸で洗い酸可溶性物質を除いた。その後、フィルターを十分に自然乾燥させ counting vial（液体シンチレーション用バイアル瓶）に移し、10 ml のシンチレーター液（PFO 4.0 g および POPOP 0.1 g をトルエン1 l に溶かしたもの）を加え、液体シンチレーションカウンター（Nuclear Chicago 社製、Mark I 型）で放射活性を測定した。また PHA を添加せずに同様の実験を行ない、Fig. 1 に示す計算式にて、PHA 添加時の³H-thymidine のとりこみ（cpm）を PHA 非添加時のそれと除して比を求め、stimulation index（以下 SI 値と略す）としてリンパ球幼若化率を表現した。

III. 成績

1. PPD 皮内反応

患者群の平均発赤径は14.8 $\pm$ 10.8（mean $\pm$ SD）mm であり、10 mm 以上を陽性とするとき陽性率は62%となり、日本人一般成人の統計と比較して低率であった（Table 1）。PPD 皮内反応と BUN とは相関はなく（Fig. 2）、S-Cr ととも相関はみられなかった（Fig. 3）。

2. PHA 皮内反応

患者群の平均発赤径は21.2 $\pm$ 11.8 mm で、対照群では36.6 $\pm$ 17.3 mm であり、危険率0.1%以下で有意差を認めた（Table 1）。PHA 皮内反応と BUN と

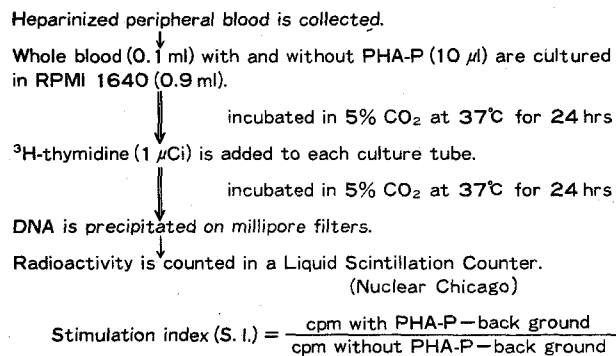


Fig. 1

Skin reaction to P.P.D. compared with BUN
in hemodialysis patients (n=55)

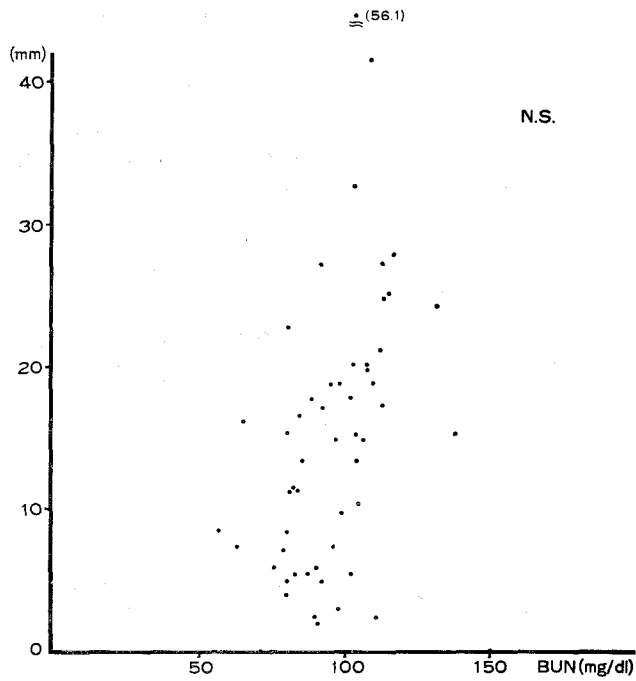


Fig. 2

Skin reaction to P.P.D. compared with serum
creatinin in hemodialysis patients (n=55)

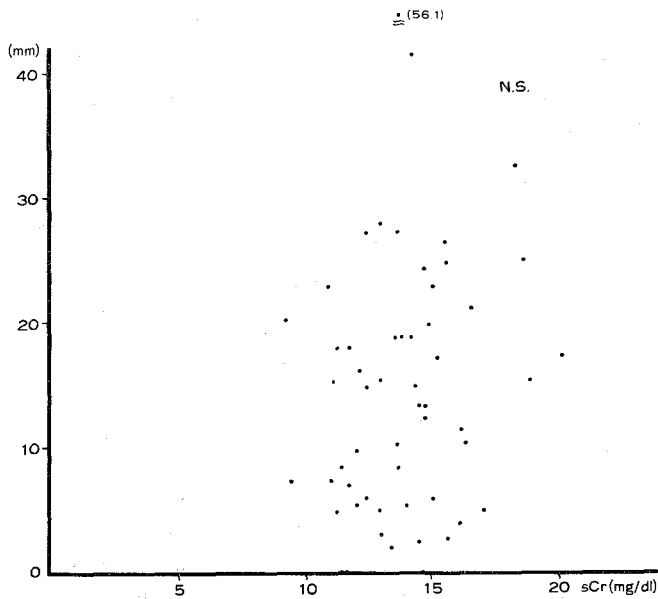


Fig. 3

Table 1
Skin reaction to PPD and PHA
in hemodialysis patients

PPD	Patients	
	n=55	
	+	34 (62%)
	-	21 (38%)

PHA	Patients	Control subjects
	n=55	n=14
	Average diameter (mm)	0~49.0
	Mean±SD	21.2±11.8
		36.6±17.3

Significance $P<0.001$

は相関はなく (Fig. 4), S-Cr とも相関はみられなかった (Fig. 5). なお, 患者群55名中15名と対照群25名中20名において, 発赤部位に軽度の掻痒感を訴えたが, 格別の治療対策を必要とするものではなかった.

3. PHA 刺激によるリンパ球幼若化率

SI 値は患者群では 32.1 ± 25.5 で, 対照群の 50.2 ± 27.2 と比較して低値であり, 危険率1%以下の有意差を認めた (Fig. 6). SI 値と BUN には何らの相関もみられなかった (Fig. 7) が, SI 値と S-Cr とは逆相関が認められた (Fig. 8).

IV. 考 察

慢性腎不全患者の細胞性免疫能の状態を調べるため 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検索したので, その成績について

Skin reaction to PHA compaired with BUN
in hemodialysis patients (n=55)

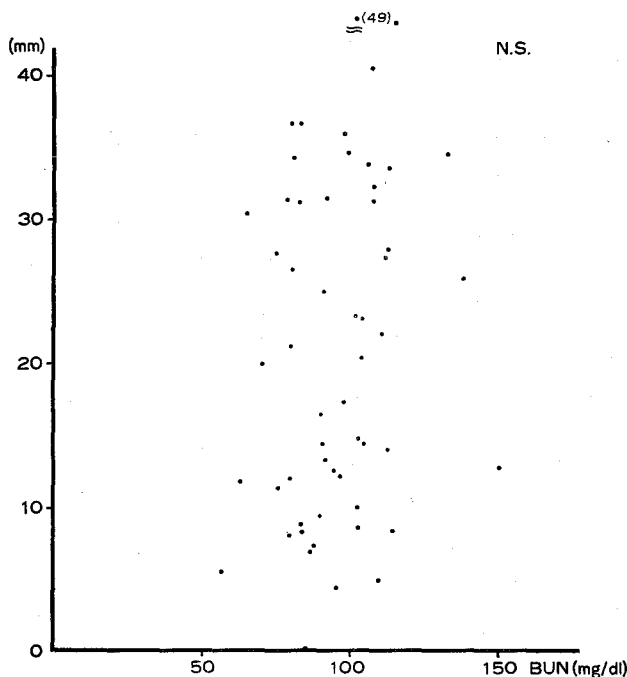


Fig. 4

考察を加えたい。

1. 皮内反応について

PPD 皮内反応は結核症の診断法として広く一般に行なわれている検査法である。そしてこの方法は慢性腎不全患者の細胞性免疫能の低下をみるのに利用され

ている。PPD 皮内反応陽性率は日本人一般成人で90%である³⁾のに対して慢性腎不全患者では一般に低下しており, 猪ら⁴⁾の成績では58%, 藤田ら⁵⁾は44%と報告しており, 著者の成績では62%であった。この反応性の低下は患者群全体としての細胞性免疫能の低下

Skin reaction to PHA compared with serum creatinine in hemodialysis patients (n=55)

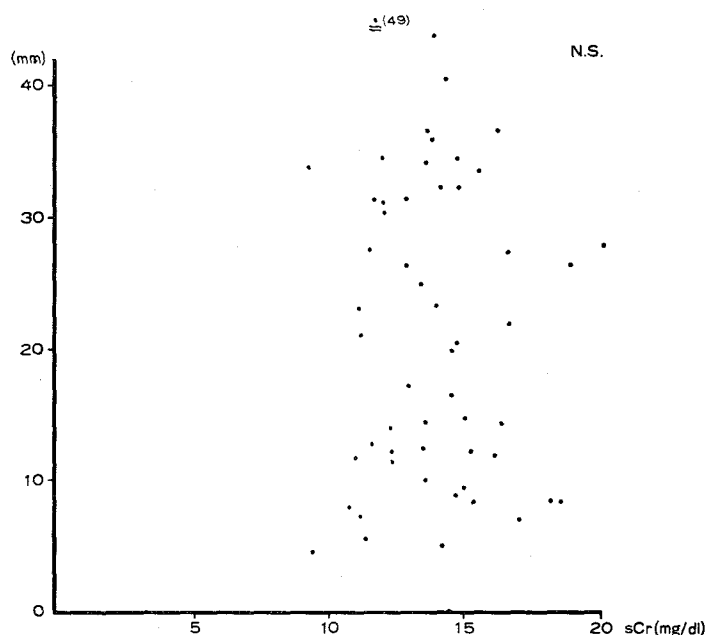


Fig. 5

Stimulation index in hemodialysis patients

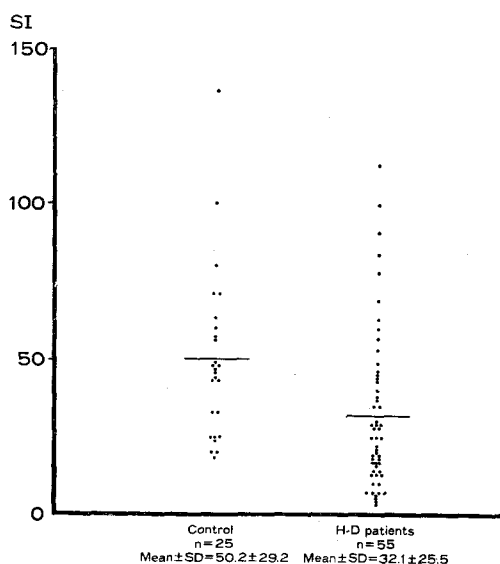


Fig. 6

を反映すると考えられるが、個々の患者についていうには1回のPPD皮内反応だけでは不十分であり、他の免疫能検査との総合的な判定が必要である。

PHA皮内反応はPPDその他の抗原による遅延型過敏反応とは異なるが、皮内注射により生ずる炎症像は組織学的には遅延型過敏反応の像に類似しているため、非特異的細胞性免疫能の指標として用いられている⁶⁾。または抗原ではないため、他の抗原による皮内反応と異なり前感作の必要がなく、既往歴にも影響されないなどの利点がある。今回は掻痒感などの副作用発現が比較的少ないPHA-Wを使用し、5 μ gを皮内注射し48時間後の発赤径の測定により⁷⁾、患者群での著明な反応の低下を認めた。この方法は通院透析患者を対象とするのに適している。今川ら⁸⁾はPHA-W 5 μ gを皮内注射し24時間後の発赤径は透析患者群では 12.2 ± 7.1 mm、正常者では 28.7 ± 10.5 mmであったと報告し、著者と同様に患者群での反応の低下を認めている。

PPD皮内反応とPHA皮内反応の成績には相関は認められなかった。それはPPD皮内反応が特異的な遅延型過敏反応であるのに対し、PHA皮内反応が非特異的な反応であるためと思われるが、それゆえにこ

Stimulation index compared with BUN in
hemodialysis patients (n=55)

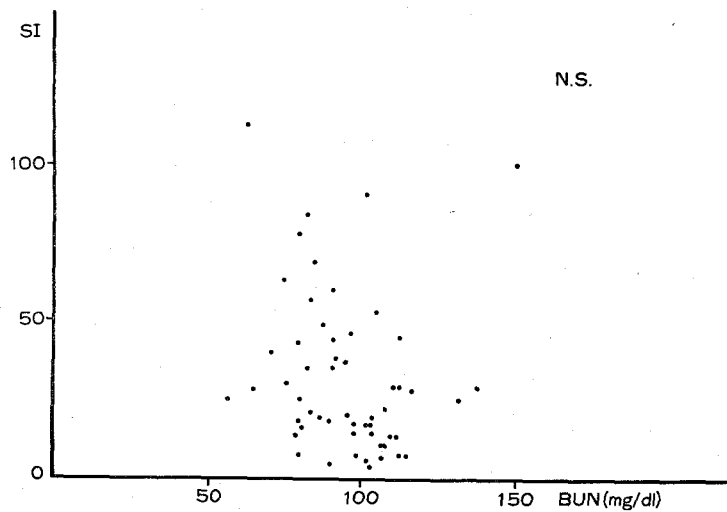


Fig. 7

Stimulation index compared with serum creatinine
in hemodialysis patients (n=55)

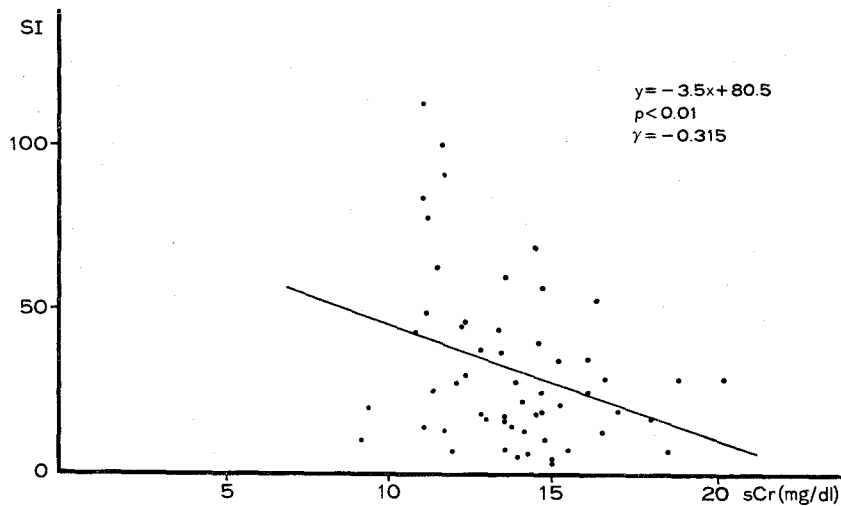


Fig. 8

これらの皮内反応を同時に行なうことは意義がある。すなわち PPD 皮内反応の強陽性者が結核症罹患を疑われるのは当然であるが、強陽性でなくても PHA 皮内反応が低下している患者では結核症罹患については要注意と考えられる。一方、PPD 皮内反応が弱く、PHA 皮内反応が強い患者では免疫記憶細胞の減少が

疑われ、これらの患者に BCG 接種後に PPD 皮内反応を再検すると異なった成績がえられる可能性があり、今後検討していきたい。

2. PHA 刺激によるリンパ球幼若化反応について

PHA は *in vitro* において特異的に T-cell を幼若化させることが知られており、この反応を用いて腎不

全患者における細胞性免疫能の状態や、免疫能低下の原因を調べるため多くの研究がなされている。Silk⁹⁾、早原¹⁰⁾およびTouraineら¹¹⁾は正常者のリンパ球はuremic plasma中で幼若化能が低下することを示している。そして、Touraineら¹¹⁾は腎不全患者のリンパ球は正常者のplasma中では幼若化能は低下しないと報告し、免疫能低下の原因がuremic plasma中にあることを示唆している。しかしながら早原¹⁰⁾とKauffmanら¹²⁾は患者リンパ球が正常者のplasma中では幼若化能が低下したままであると報告し、Touraineら¹¹⁾と異なった成績を示しており、リンパ球側の要因も無視できない。

今回、著者は微量全血培養法によりリンパ球幼若化率を測定した。この方法の有効性はすでに多くの実験により確かめられている^{13,14)}。全血培養法ではリンパ球とplasma側の要因を同時にみることになるが、今回対象とした慢性腎不全患者の多くは強度の貧血があり、検査用の採血はできる限り少量であることが望まれ、このような患者を対象として反覆して行なう場合に適した方法である。成績は先に述べたごとく患者群のSI値は対象群に比較して低値であり、uremic plasma中での患者リンパ球のPHAに対する反応の低下が示された。SI値とPPD、PHA両皮内反応は相関を認めず、mitogenの違い、あるいは*in vivo*と*in vitro*の条件の差によると考えられる。

3. BUN および S-Cr と SI 値, PPD, PHA 皮内反応の相関について

Huberら¹⁵⁾は尿毒症患者では autologous plasma 中での PHA 刺激によるリンパ球幼若化能は低下し、特に BUN が 100 mg/dl 以上の患者において著明に低下していると報告している。Nakhlaら¹⁶⁾は逆に blood urea が 200 mg/dl 以上の患者の方が低値の患者よりもリンパ球幼若化率が高いと報告している。また、Silk⁹⁾やTouraineら¹¹⁾は*in vitro*での urea 添加によるリンパ球反応の抑制は認めていない。著者の成績では BUN と今回行った 3 種の検査成績とは何ら相関を示さず、urea と免疫能とは直接の関係はないと考える。

つぎに creatinine (Cr) については、Touraineら¹¹⁾は*in vitro*での Cr の添加はリンパ球幼若化能に影響しないが、methylguanidine (MG) の添加では幼若化能の低下を認め、Harrisら¹⁷⁾も同様に MG によるリンパ球幼若化能の低下を認めたが、guanidinosuccinic acid (GSA) は影響しなかったと報告している。一方、腎不全患者の血中グアニジン化合物の定量が最

近盛んに行なわれるようになり BUN と GSA および S-Cr と MG がそれぞれ相関することが知られている¹⁸⁾。以上より、著者の成績で S-Cr が高値になるほど SI の低下を認めたことは Cr の直接の作用と考えるよりも Cr とともに増加している MG あるいは未知の uremic toxin の影響によると推測される。また、PPD および PHA 皮内反応と S-Cr とは相関せず、SI のみが S-Cr と相関を示したことは*in vitro*での反応の方が uremic toxine の影響を鋭敏に反映するためと考えられる。

今後*in vitro*によるリンパ球培養法を用いて、免疫能に影響する uremic toxin の究明と免疫能賦活化物質の研究に努力していきたい。

V. 結 語

1. 血液透析を受けている慢性腎不全患者55例について PPD, PHA 皮内反応および PHA 刺激によるリンパ球幼若化能を測定し、細胞性免疫能の明らかな低下を認めた。

2. リンパ球幼若化率と S-Cr とは相関を認めた。

3. 慢性腎不全患者は通常強い貧血状態にあり、これらを対象として免疫能の検査をする場合微量全血培養法によるリンパ球幼若化率の測定は少量の採血で十分な成績が得られる点で優れており、反覆して行なう場合に適した方法である。

稿を終るに臨み、御校閲を賜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21回人工透析研究会、第21回日本腎臓学会総会において発表した。

文 献

- 1) Hume, D.M., Merrill, J.P., Miller, B.F. and Thorn, G.W.: Experience with renal homotransplantation in the human: Report of nine cases. J. Clin. Invest., 34: 327~382, 1955.
- 2) 川喜多順二：実験的膀胱腫瘍発生に及ぼす BCG および BCG-GWS 投与の影響について。日泌尿会誌, 70: 1259~1277, 1979.
- 3) 泉 孝英：ヒトの皮膚反応。臨床免疫, 5: 629~639, 1973.
- 4) 猪 芳亮・稲本 元・稲本伸子・甘 慶華・相沢 紘・北本 清・和田孝雄・小川 勝・山吉 亘・加藤英夫：透析患者における遅延型皮膚反応の低下。腎と透析, 3: 333~339, 1977.
- 5) 藤田嘉一・井上聖士・森頼太郎・宮本 孝・依藤良一・有本保文・石神申二：慢性透析患者の免疫

- 能・腎と透析, 5: 281~287, 1978.
- 6) Bonforte, R.J., Topilsky, M., Silzbach, L.E. and Glade, P.R.: Phytohemagglutinin skin test: A possible in vivo measure of cell-mediated immunity. *J. Pediatr.*, **81**: 775~780, 1972.
 - 7) Blaese, R.M., Weiden, P., Oppenheim, J.J. and Waldmann, T.A.: Phytohemagglutinin as a skin test for the evaluation of cellular immune competence in man. *J. Lab. Clin. Med.*, **81**: 538~548, 1973.
 - 8) 今川章夫・海部泰夫・滝川 浩: 透析患者の Phytohaemagglutinin 皮内テスト. 腎と透析, **4**: 43~47, 1978.
 - 9) Silk, M.R.: The effect of uremic plasma on lymphocyte transformation. *Invest. Urol.*, **5**: 195~199, 1967.
 - 10) 早原信行: 末期腎不全患者の免疫能に関する研究. 日泌尿会誌, **64**: 615~628, 1973.
 - 11) Touraine, J.L., Touraine, F., Revillard, J.P., Brochier, J. and traeger, J.: T-lymphocytes and serum inhibitors of cell-mediated immunity in renal insufficiency. *Nephron*, **14**: 195~208, 1975.
 - 12) Kauffman, C.A., Manzler, A.D. and Phair, J.P.: Cell-mediated immunity in patients on longterm haemodialysis. *Clin. Exp. Immunol.*, **22**: 54~61, 1975.
 - 13) Party, D.W. and Hughs, D.: Lymphocyte transformation using whole blood cultures on analysis of responses. *J. Immunol. Method*, **2**: 99~114, 1972.
 - 14) Park, B.H. and Good, R.A.: A new micro-method for evaluating lymphocyte responses to phytohemagglutinin.: Quantitative analysis of the function of thymus-dependent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 371~373, 1972.
 - 15) Huber, H., Pastner, D., Dittrich, P. and Braunteiner, H.: In vitro reactivity of human lymphocytes in uremia - A comparison with the impairment of delayed hypersensitivity. *Clin. Exp. Immunol.*, **5**: 75~82, 1969.
 - 16) Nakhla, L.S. and Goggin, M.J.: Lymphocyte transformation in chronic renal failure. *Immunology*, **24**: 229~235, 1973.
 - 17) Harris, J.E., Page, D., Posen, G. and Stewart, T.: Suppression of in vitro lymphocyte function by uremic toxins. *J. Urol.*, **108**: 312~313, 1972.
 - 18) 桜井健治・高橋裕一郎: 透析患者のグアニジン誘導体測定の臨床的意義について—各種検査値との相関—. 腎と透析, **5**: 676~679, 1978.

(1980年1月24日受付)