

## guanidines誘導体の臨床的研究

## —慢性腎不全の長期透析例について—

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：加藤篤二教授）

山下 勲 世

CLINICAL SIGNIFICANCE OF GUANIDINE COMPOUNDS  
IN CHRONIC RENAL FAILURE PATIENTS  
UNDER MAINTENANCE HEMODIALYSIS

Akiyo YAMASHITA

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University**(Chairman: Prof. T. Katō, M.D.)*

The serum level of guanidine compounds was determined in the patients under maintenance hemodialysis for 1/2 to 5 years. The improved Yatzidis' method as well as column chromatography were adopted for the determination.

The serum concentration of the guanidine compounds was obviously high before dialysis. Out of Sakaguchi reaction positive substances, guanidinoacetic acid (GAA) and guanidinosuccinic acid (GSA) were abundantly detected, whereas arginine and methylguanidine (MG) were almost same as the normal control subjects. Because MG has been thought to be one of the important factors causing uremic symptoms, this result was unexpected.

Pre-dialysis level of guanidine bases showed significant correlation with that of BUN, uric acid and creatinine, the best correlation being with creatinine. GSA or GAA level showed no correlation with the levels of these three substances.

In the long term dialysis cases, the blood level of GAA was proved to be higher than GSA.

After 8 hours hemodialysis with Kiil dialyzer, GAA and GSA level remarkably diminished but arginine did not change. Thus, GAA and GSA were proved to be dialysable substances.

Hemorrhagic tendency is known to be one of the important uremic symptoms. In order to investigate the relationship between guanidine compounds and uremic bleeding, the platelet factor 3 availability (PF 3a) *in vivo* was evaluated by means of the ADP-Stypven time.

The ADP-Stypven time was found to be correlated well with GSA ( $r=0.86$ ) and GAA ( $r=0.66$ ). The ADP platelet aggregation was inhibited by high guanidine compounds level. *In vitro* study also proved inhibitory action of all of GSA, GAA, MG, urea and creatinine on the ADP-Stypven time as well as on the ADP-aggregation.

Hemolytic index, which is known to be often accelerated in the patients under the maintenance hemodialysis, correlated well with the serum guanidine level (GSA:  $r=0.92$ , GAA:  $r=0.79$ ). The life span of  $^{51}\text{Cr}$ -labeled erythrocytes was shortened by the high level of GSA and GAA probably through hemolytic action. The serum level of vitamin E was determined before and after hemodialysis because this vitamin is known to be antihemolytic. The serum level of vitamin E did not change by hemodialysis but was approximately 50% of the normal control level.

As the hemolytic index diminished after hemodialysis, uremic toxins, but not vitamin E, seemed to be closely related with uremic bleeding.

## 序 論

尿毒症患者の症状はきわめて多彩で、全身の諸臓器および組織に異常所見をきたすといっても過言ではあるまい。この原因にはさまざまな因子が想定されるが、その一つとして尿毒症を発現する物質、いわゆる uremic toxins が症状に関与していることは否定できない。

当初、尿毒症発現物質については、尿素が注目されていたが、uremic toxins の研究が進むにつれて、一般に高窒素血症の指標とされている血中尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN)、非蛋白性含窒素物質 (non-protein nitrogen, NPN)、クレアチニンおよび尿酸などが注目されるようになり、これらの増減が尿毒症症状の消長と一定の関連を有するものと解釈されて、臨床的に応用されていることは周知の事実である。近年 uremic toxins のうちグアニジン誘導体がとくに問題になってきたが、この物質は比較的多彩な臨床症状を惹起することが知られており、イヌにメチルグアニジン (methyl guanidine, 以下 MG と略す) を負荷する実験を試みた結果、消化管の出血傾向をきたし、一部の剖検例では胃潰瘍すら呈した報告があり、本物質が、出血傾向、溶血現象、貧血および赤血球寿命短縮を惹起せしめること、さらには中枢神経系統、末梢神経伝導速度の異常性に関与し、uremic-like syndrome をおこすことが推定されている<sup>1-6)</sup>。いっぽう正常時には、グアニジン誘導体は、尿、血液中に微量にしか検出されないが、尿毒症患者にのみ高いことが証明されている<sup>7,8)</sup>。そのほか uremic toxins として想定されている物質には、インドール、インジカンなど約 200 種に及ぶといわれている<sup>9)</sup>。なかんずくコハク酸グアニジン (guanidino-succinic acid, 以下 GSA と略す) は尿毒症患者に特異的に検出されること、さらに血小板機能障害、とくに血小板第 3 因子能 (PF 3a と以下略す) および ADP による血小板凝集能を阻害することが Horowitz<sup>10)</sup> によって指摘されている、uremic bleeding の誘因物質として、最近とくに注目されるに至った。

uremic toxins の研究は、諸家によって報告されてきたが、なお不明な点が多く uremic toxins の解明はいまだ充分とはいえない。その理由として、uremic toxins と尿毒症症状の因果関係を明確に証明しえないこと、さらに BUN, NPN, クレアチニン、尿酸などが比較的容易に測定されるのに反して、とくに尿毒症症状に関与すると考えられるグアニジン誘導体の測定や、定量化の困難であることが指摘されよう。著者

は本研究においてまずグアニジン誘導体の定量化に検討を加えると同時に uremic bleeding の発現に重要な役割を演ずるものと考えられる PF 3a, 血小板凝集能に対するグアニジン誘導体の影響を検討し、さらに貧血の原因としても無視しえない溶血と本物質の関連についても検索をおこない、とくに長期慢性腎不全透析患者を対象として尿毒症の病態に対するグアニジン誘導体の意義解明に資せんとした。

## 対象ならびに研究方法

京大人工腎室で、末期慢性腎不全症例中、6 カ月以上の血液透析をうけている患者を対象とした。透析開始前に患者の末梢血の採血をおこない、これを透析前の値とした。透析終了の翌朝、ふたたび患者の末梢血を採血しこれを透析後の値として、BUN, 血清クレアチニン、血清尿酸、および血清グアニジンの値をそれぞれ測定した。

血液透析療法：日機装製の Kiil 型人工腎および Milton Roy 社の Kiil 型人工腎を用いて、8 時間の透析をおこなった。透析液流量は平均 500 ml/min、透析圧は -50~-200 mmHg、灌流血液量は約 150~250 ml/min の条件で透析をおこなった。

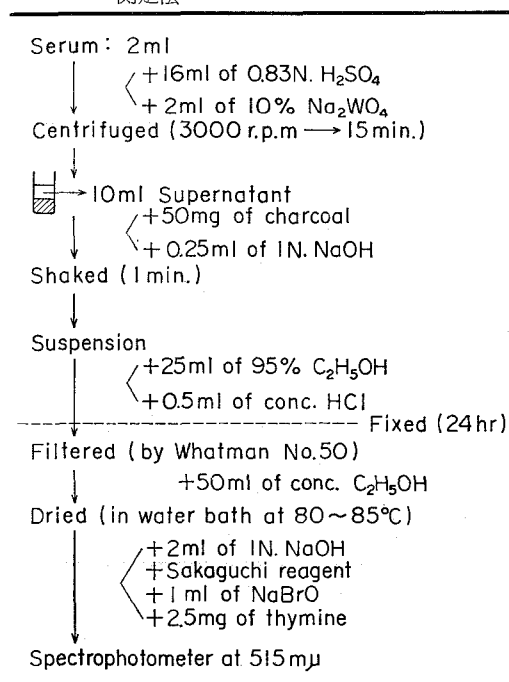
灌流液組成：灌流液の組成は  $\text{Na}^+$  132 mEq/L,  $\text{K}^+$  2 mEq/L,  $\text{Ca}^{++}$  2.5 mEq/L,  $\text{Cl}^-$  105 mEq/L,  $\text{Mg}^{++}$  1.5 mEq/L,  $\text{CH}_3\text{COO}$  33 mEq/L, glucose 200 mg/dl, 浸透圧 285 mOsm/L のものを使用した。

### (1) 血清中のグアニジン誘導体の測定法

血清中のグアニジン誘導体の測定は、Yatzidis ら (1966)<sup>10)</sup> の方法を改良しておこなった。静脈血 4 ml をヘパリン採血したのち、遠沈して血清 2 ml を分離採取した。この血清 2 ml に 0.83N の硫酸 16 ml および 10% タングステン酸ナトリウムを 2 ml 加えて 15 分間 3000 回転で遠心分離操作をおこなった。除蛋白された上澄を 10 ml とり、酸で活性化した charcoal 50 mg と 1N の水酸化ナトリウム 1 ml を用いて、1 分間振とうしたのち、Whatman No. 50 の濾紙を用いて濾過した。濾過にさいしては、millipore filter を用いて 2 回ないし 3 回同一操作をくり返した。その後 charcoal を蒸留水で洗浄し、95% のエチルアルコール 25 ml と濃塩酸 0.5 ml を加えてじゅうぶんかく拌をおこなって一昼夜固定した。翌日、この液を Whatman No. 50 の濾紙で millipore filter を用いて濾過した。この濾液を 100 ml 入りのフラスコに入れて、95% のエチルアルコール 50 ml を加えて water bath 80~85°C 中に浸して、真空ポンプで吸引しながら徐々に乾燥させた。乾燥させたのちフラスコの底に沈殿

した残留物に改良坂口試薬を用いて呈色させ、光電比色計で比色定量した。改良坂口法で用いた試薬は(a) 無水アルコール中 0.04 g/dl の  $\alpha$  ナフトールを 4°C で保存したもの、(b) 10% 水酸化ナトリウム中に 2 g/dl のチミンを加えたもの、(c) 0.26%の次亜塩素酸ソーダ溶液を 4°C で保存したもの、(d) 2%チオ硫酸ソーダ溶液の4種であった。比色にさいしては、検体に(a)を 0.5 ml、(b)を 0.5 ml ずつ加え、その(c)を 2.0 ml ずつ加え、振とうした。さらに(d)を 0.5 ml 加えて呈色度(ピンク)が最高色調に達するまで観察して(約10分間)、最大呈色度のピンク色調を示したチノン化合物であるグアニジン誘導体の吸光度を 515 m $\mu$  の波長の光電比色計を用いて測定した(Table 1)。標準検量曲線には 0.5, 1.0, 2.0 mg/dl および 2.5 mg/dl のメチルグアニジンの坂口反応による吸光度を測定して、この標準曲線を描き、この標準曲線の吸光度と検体の吸光度を対比させてグアニジン誘導体の血清レベル(mg/dl)を算出した。

Table 1. Yatizidis 法改良による血中グアニジンの測定法

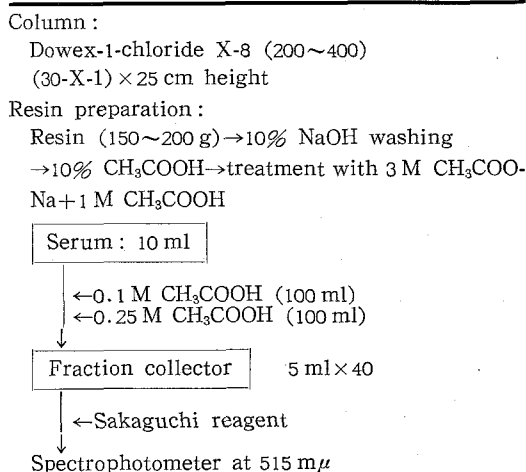


## (2) カラムクロマトグラフィによる長期血液透析例のグアニジン誘導体の分画法

カラムクロマトグラフィによって血清グアニジン誘導体の各成分を分画して、腎不全症例におけるグアニジン誘導体の血中レベルを分析するために本法を適用した。すなわち、Dowex イオン交換樹脂、1 × 8 型、

mesh 200~400 の resin を用いた<sup>8)</sup>。イオン交換樹脂をアセトン型に移転させる処理として、まず前記イオン交換樹脂を 150~200 g (カラム約10本分に相当)を最初10%の水酸化ナトリウム 100 ml、つぎに 3 M の酢酸ナトリウム 100 ml および 1 M の酢酸 100 ml を順次に加えて pH が均衡になるまで処理した。各溶液を交換するさいは蒸留水でじゅうぶんに洗浄した。カラムは高さ 30 cm, 直径 1 cm のものを用い、処理した resin は 25 cm の高さまで水平に均一につめたのち 0.1 M の酢酸を 100 ml 流して pH を一定にした。pH が安定化したことを確認したうえで、血清 10 ml を注意ぶかくカラムに流して検体が完全に resin を通過したのち、溶離は 0.1 M の酢酸 100 ml で始め、ついで 0.25 M の酢酸 100 ml を順次に流した。溶離物は 5 ml ずつ fraction collector を利用して試験管に採取した。この試験管は全部で 40 本に達したが、採取した試験管の順から番号をつけた。採取した溶離液に坂口試薬を滴下して発色させると、試験管番号の順から酢酸グアニジン (guanidino-acetic acid, 以下 GAA と略す)、アルギニンおよび GSA が検出された。これら坂口反応陽性物質を定量化するためには、本操作の手順で既知濃度の GAA, アルギニンおよび GSA を流して吸光度の値を check した (Table 2)。その種々のピークの確認を定量的におこなった。0.1 M 酢酸での溶離分画中に GAA とアルギニンが定量され、0.25 M の酢酸溶離分画中に GSA が改良坂口法で定量された<sup>11,12)</sup>。改良坂口試薬は Yatizidis の方法で使したものを用い、検体に添加して比色定量した。各グアニジン誘導体濃度は既知濃度のグアニジン誘導体濃度との面積比で算出し、濃度は mg/dl で表わした。

Table 2. カラムクロマトグラムによるグアニジン誘導体の分離法



### (3) 濾紙電気泳動法による GSA および GAA の分離法

坂口反応陽性分離溶液が電気泳動的に同質であるかを検定するために、この分離液を親媒性にして 50  $\mu$ l の蒸留水に溶かし、50  $\mu$ l を Whatman No. 1 電気泳動濾紙に塗り、電圧 4.5 V/cm の割合で定電圧にして、緩衝液 0.1M の酢酸ナトリウム液 pH 4.1 を用いて 20 時間電流を流した。比較のため第 2 の Whatman No. 1 に GSA を、第 3 の Whatman No. 1 に GAA を加えて同様に 4.5 V/cm の電圧で 20 時間電気泳動をおこなう。濾紙を乾燥させたのち、坂口スプレー法で Irreverre の方法<sup>13)</sup>に従って、発色させるとピンク色の色調に GAA は陰極で、GSA は陽極で検出された。本法で 5  $\mu$ g の微量でも坂口反応陽性を示すといわれる<sup>9)</sup>。

### (4) ADP-Stypven 時間の測定法

グアニジン誘導体の血小板機能に対する影響を検討する目的で、血小板機能のうち、とくに PF 3a に対する GAA, GSA の影響について検索した。対象は長期透析患者 15 例を選び、透析前の採血によって PF 3a を測定し、その時点の GSA, GAA の血清レベルの相関について検討を加えた。GSA, GAA は前述のカラムクロマトグラフィーによって定量した。さらに PF 3a にかんしては、Horowitz ら<sup>14)</sup>の方法に準じ ADP-Stypven 時間の測定をおこなった。すなわち被検多血小板血漿 (platelet rich plasma, 以下 PRP と略す) 0.9 ml と  $2 \times 10^{-4}$  M, ADP 0.1 ml を加えて (ADP 最終濃度は  $2 \times 10^{-5}$  M) 37°C に incubate し、incubate 前、30 分および 60 分後にそれぞれ混液 0.1 ml をとり、10  $\mu$ g/ml の Stypven 液 0.1 ml および 1/40 M 塩化カルシウム液 0.1 ml を加えて凝固時間で PF 3a を表現した。また透析前後において PF 3a と GSA, GAA の関係を追求しえたものは 5 例であったが、このさいは、Kaolin Stypven 時間も ADP-Stypven 時間とあわせて検討した。Kaolin Stypven 時間は Spaet and Cintron<sup>15)</sup>の方法に準じ、被検 PRP 0.9 ml に 5% カオリン懸濁液 0.1 ml を加えて 37°C に incubate 前、5 分、10 分、15 分および 20 分後に混液 0.1 ml をとり、10  $\mu$ g/ml の Stypven 液 0.1 ml および 1/40 M 塩化カルシウム液を加え、凝固時間の測定をおこない、最短時間でその値を表現した。

### (5) *in vitro* における uremic toxins (とくにグアニジン誘導体) 添加による PF 3a, および血小板凝集能測定法

uremic toxins と想定される GSA, GAA, MG らのグアニジン誘導体、クレアチニン、および尿素を正

常多血小板血漿 (PRP) に添加して、血小板機能、とくに PF 3a, 血小板凝集能におよぼす影響について検討を加えた。PF 3a にかんしては、カオリン Stypven 時間は incubation 前、5 分、10 分、15 分および 20 分後、また ADP-Stypven 時間は 30 分と 60 分におけるいずれも最短凝固時間で表現した。血小板凝集能の測定は Born<sup>16)</sup> および O'Brien<sup>17)</sup> の方法に準じておこない、安永ら<sup>18)</sup>の方法に従って ADP 凝集にかんしては ADP 添加 3 分以内の最終凝集率をもって表現し、コラーゲン凝集にかんしてはコラーゲン添加後、3 分 30 秒以内の最大凝集率をもって表現した。そしてコラーゲン凝集の状況から、血小板よりの ADP 放出の態度を推測した。uremic toxins の影響にかんしては、生理食塩水添加時の凝集能を基準として、それに対する薬剤添加時との比率で比較検討した。なお血小板凝集能における ADP 最終濃度は  $4 \times 10^{-6}$  M とした。uremic toxins のうち、GSA, MG および GAA は最終添加濃度を 4 mg/dl, 8 mg/dl および 16 mg/dl, クレアチニンは最終添加濃度を 3 mg/dl および 10 mg/dl, 尿素は最終濃度を 4 mg/dl, 8 mg/dl および 16 mg/dl として測定をおこなった。

### (6) 溶血率の測定方法

(a) 正常者および長期血液透析の慢性腎不全症例を選び、透析前、透析後の溶血率を Horowitz<sup>19)</sup>の変法によって測定した<sup>20)</sup>。試薬としては、

① クエン酸ナトリウム 5 g と塩化ナトリウム 4.5 g を 1,000 ml の蒸留水にとかしたもの

② 0.9% 食塩水

③ 0.5M のリン酸緩衝液 (pH 7.4)

を用いた。

方法：0.3 ml の血液を約 20 倍の①に加えて遠沈後、上澄を除去し②、③の等混合液を用いて 2.5% の血球浮遊液を作成し、37°C で 15 分間 incubate したのち、ふたたび遠沈して血球を集め、②で 5% の血球浮遊液とした。この血球浮遊液を 0.25 ml ずつ A, B, C 3 本の試験管に入れ、A の試験管に③を 0.25 ml, B, C の試験管に③で 2.5% に希釈した過酸化水素 (30%) を 0.25 ml ずつ加えて 3 時間 incubate し、そのご A, B の試験管に②③の等混合液を 5.0 ml 加え、C の試験管に蒸留水 5.0 ml 加えて混和し、遠沈をおこなった。遠沈後、上澄を 535 m $\mu$  の波長で光电比色計で吸光度を測定し、次式によって溶血率を測定した。

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{(B \text{ の吸光度}) - (A \text{ の吸光度})}{(C \text{ の吸光度}) - (A \text{ の吸光度})} \times 100$$

(b) *in vitro* において、正常人血液に GSA, GAA および MG をそれぞれ添加して添加前後の溶血率を (a) の方法で算出すると同時に長期透析症例血

Table 3. 正常例のカラムクロマトグラムによる BUN, クレアチニン, 尿酸, GSA, GAA およびアルギニンの血中レベル

| 症 例   | BUN<br>(mg/dl) | クレアチニン<br>(mg/dl) | 尿 酸<br>(mg/dl) | GSA<br>(mg/dl) | GAA<br>(mg/dl) | アルギニン<br>(mg/dl) |
|-------|----------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| 1     | 25.0           | 0.79              | 3.5            | 0.15           | 0.25           | 1.70             |
| 2     | 31.0           | 1.40              | 4.7            | 0.25           | 0.37           | 2.30             |
| 3     | 19.0           | 0.54              | 3.4            | 0.05           | 0.13           | 1.10             |
| 4     | 28.0           | 0.92              | 3.2            | 0.20           | 0.31           | 2.00             |
| 5     | 22.0           | 0.66              | 4.6            | 0.10           | 0.19           | 1.40             |
| 6     | 31.6           | 1.06              | 4.8            | 0.26           | 0.33           | 2.40             |
| 7     | 13.0           | 0.31              | 3.1            | 0.10           | 0.15           | 1.20             |
| 8     | 25.3           | 1.01              | 3.6            | 0.24           | 0.35           | 2.30             |
| 9     | 24.5           | 1.15              | 3.8            | 0.25           | 0.30           | 1.80             |
| 10    | 15.6           | 0.56              | 3.6            | 0.13           | 0.20           | 1.50             |
| 平均±SD | 23.5±5.9       | 0.84±0.32         | 3.8±1.9        | 0.17±0.07      | 0.26±0.08      | 1.80±0.40        |

Table 4. 長期透析例（透析前）の BUN, 尿酸, クレアチニンおよびグアニジン化合物の血中レベル

| 症 例 | BUN<br>mg/dl | 尿 酸<br>mg/dl | クレアチ<br>ニン<br>mg/dl | グアニジ<br>ン化合物<br>mg/dl |
|-----|--------------|--------------|---------------------|-----------------------|
| 1   | 47.0         | 5.0          | 5.2                 | 0.40                  |
| 2   | 60.1         | 6.0          | 6.0                 | 0.45                  |
| 3   | 55.2         | 10.0         | 7.0                 | 0.50                  |
| 4   | 67.2         | 12.0         | 7.5                 | 0.55                  |
| 5   | 63.3         | 11.0         | 7.5                 | 0.60                  |
| 6   | 88.4         | 12.3         | 8.0                 | 0.80                  |
| 7   | 75.3         | 11.5         | 8.5                 | 0.50                  |
| 8   | 80.1         | 7.7          | 8.5                 | 0.70                  |
| 9   | 87.2         | 10.6         | 8.6                 | 0.40                  |
| 10  | 60.0         | 10.7         | 8.7                 | 0.45                  |
| 11  | 44.5         | 10.6         | 9.6                 | 0.87                  |
| 12  | 78.5         | 12.7         | 8.8                 | 0.80                  |
| 13  | 85.2         | 10.9         | 10.0                | 0.81                  |
| 14  | 63.1         | 8.6          | 11.0                | 0.70                  |
| 15  | 88.2         | 12.0         | 9.6                 | 0.82                  |
| 16  | 75.1         | 9.6          | 11.0                | 0.80                  |
| 17  | 44.4         | 10.7         | 9.0                 | 0.87                  |
| 18  | 94.0         | 6.6          | 10.4                | 1.01                  |
| 19  | 72.1         | 11.7         | 12.0                | 1.00                  |
| 20  | 65.0         | 6.6          | 12.8                | 1.02                  |
| 21  | 90.2         | 9.6          | 13.0                | 1.10                  |
| 22  | 102.0        | 11.6         | 13.6                | 1.21                  |
| 23  | 99.1         | 12.0         | 13.0                | 1.50                  |
| 24  | 75.5         | 10.6         | 10.2                | 0.81                  |
| 25  | 72.5         | 10.5         | 10.2                | 0.84                  |
| 26  | 90.4         | 11.9         | 11.8                | 1.15                  |
| 27  | 52.0         | 7.9          | 7.3                 | 0.55                  |
| 28  | 63.8         | 9.2          | 8.5                 | 0.53                  |
| 29  | 90.5         | 12.2         | 7.3                 | 0.65                  |

|           |           |          |         |           |
|-----------|-----------|----------|---------|-----------|
| 30        | 72.0      | 10.5     | 9.6     | 0.78      |
| 31        | 52.0      | 8.3      | 7.4     | 0.66      |
| 32        | 103.1     | 13.2     | 15.6    | 1.65      |
| 平均<br>±SD | 76.4±16.7 | 10.1±2.0 | 9.6±2.4 | 0.82±0.30 |

液に GSA, GAA, MG を最終濃度 20 mg/dl 負荷してその溶血率を算定した。なお長期透析患者については、放射性同位元素  $^{51}\text{Cr}$  を用いて赤血球を標識したのち、赤血球放射性活性の経時減衰曲線を描き、赤血球寿命の測定を実施し、赤血球寿命の判定には half survival ( $T_{1/2}$ ) の値を求めて、それを参考にした。なおビタミンEの測定は、長期透析患者より採血した血液を直ちに遠沈して血清を分け、これを Emerin Engel 変法の Rindi 法<sup>21)</sup>を用いて定量した。

## 成 績

### (1) 改良 Yatzidis 法によるグアニジン誘導体の変化

正常人末梢静脈血における、改良 Yatzidis 法によって測定した10例の血漿グアニジン誘導体平均値は  $0.2 \pm 0.1$  mg/dl (平均値±SD 以下同様) であった (Table 3)。32透析症例の透析前の血漿グアニジン値は  $0.82 \pm 0.30$  mg/dl で対照群の値よりも高値を示した。32症例のグアニジン測定時における BUN, クレアチニン, 尿酸の血漿レベルもあわせて測定したが、それぞれの平均値は BUN  $76.4 \pm 16.7$  mg/dl, クレアチニン  $9.6 \pm 2.4$  mg/dl, 尿酸  $10.1 \pm 2.0$  mg/dl で、その結果は Table 4 に示したごとくであった。

つぎにグアニジン誘導体と BUN, 尿酸, クレアチニンのそれぞれの相関関係を求めた結果、① BUN については、 $r=0.62$  (Fig. 1), ②尿酸については、 $r=$

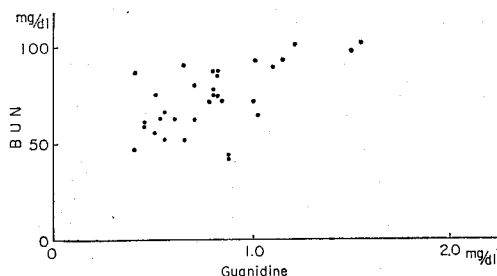


Fig. 1. BUN とグアニジンとの相関  
( $r=0.62$ ,  $p<0.05$ )

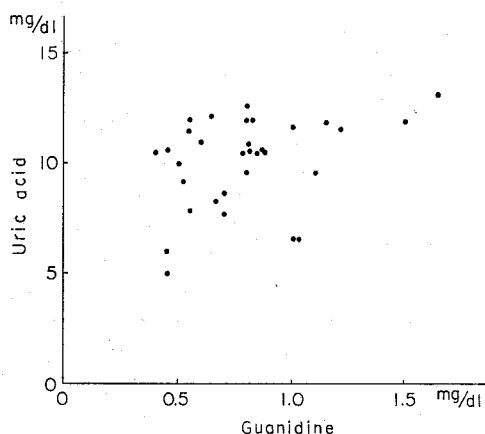


Fig. 2. 尿酸とグアニジンとの相関  
( $r=0.41$ ,  $p<0.05$ )

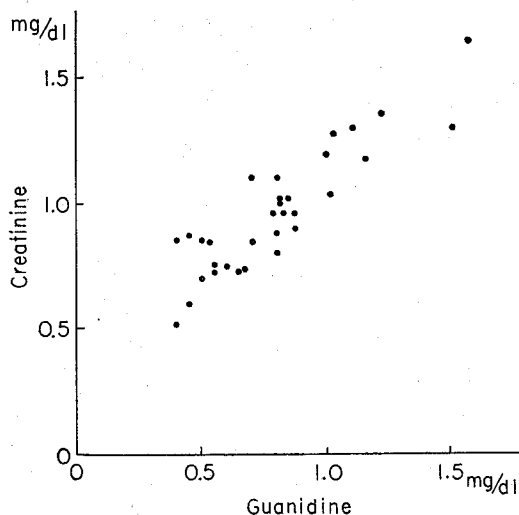


Fig. 3. クレアチニンとグアニジンとの相関  
( $r=0.81$ ,  $p<0.05$ )

0.41 (Fig. 2), ③ クレアチニンについては,  $r=0.81$  (Fig. 3) と, いずれも相関性がみとめられた。

透析前後でグアニジン誘導体の追跡をしえたものは

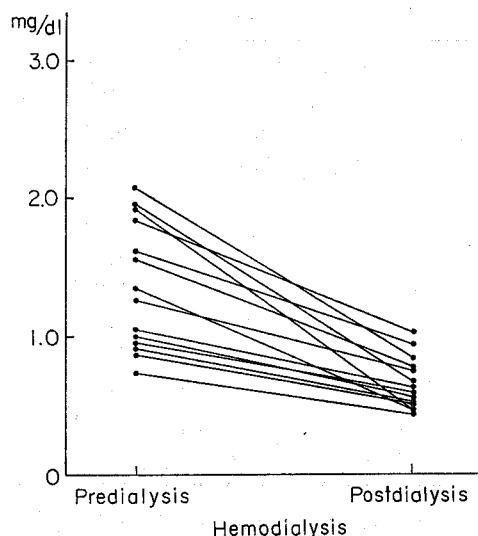


Fig. 4. 透析前後におけるグアニジン誘導体(血漿)の変化 mean $\pm$ SD before HD  $1.40\pm0.31$  after HD  $0.68\pm0.23$

14例で, いずれも透析後グアニジン血漿レベルは低下する傾向を示し, その平均値は  $0.68\pm0.23$  mg/dl であった。これは透析前の  $1.40\pm0.31$  mg/dl より, 明らかに低値を示し透析効果をみとめたが平均正常人のレベルまで下降するまでには至らなかった (Fig. 4)。

なお著者のおこなった改良 Yatzidis 法では既知濃度のメチルグアニジンで検索した結果, 回収率は  $80\pm15\%$  の成績を示した。

## (2) カラムクロマトグラムによるグアニジン誘導体の変化

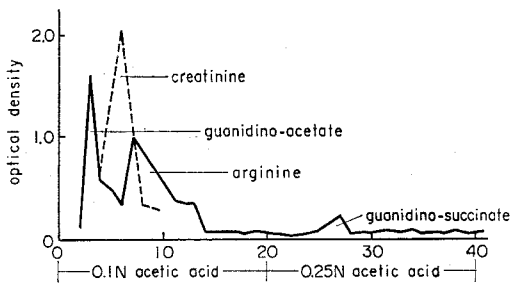
カラムクロマトグラムによる坂口反応陽性物質の検索をおこなった結果, 試験管番号順に GAA, アルギニン, GSA の検出をみた。このさい GAA とアルギニンにかんしては, ニンヒドリン反応を試みてその鑑別をおこなった。

対照として正常人10症例を選び, Table 4 のごとく GAA, GSA, アルギニンのそれぞれの値と対応する BUN, 尿酸, およびクレアチニン値も測定した。平均値は BUN  $23.5\pm5.9$  mg/dl, クレアチニン  $0.84\pm0.32$  mg/dl, 尿酸  $3.8\pm1.9$  mg/dl, GSA  $0.17\pm0.07$  mg/dl, GAA  $0.26\pm0.08$  mg/dl, アルギニン  $1.8\pm0.4$  mg/dl であった。

つぎに長期透析患者18名の透析前における測定結果は Table 5 に示したが, 平均値は, BUN  $90.4\pm17.4$  mg/dl, クレアチニン  $11.3\pm2.4$  mg/dl, 尿酸  $9.6\pm1.5$  mg/dl, GSA  $1.0\pm0.3$  mg/dl, GAA  $1.4\pm0.3$  mg/dl, アルギニン  $1.8\pm0.3$  mg/dl の値を得た。このことは

Table 5. 透析前のカラムクロマトグラムによる BUN, クレアチニン, 尿酸, GSA, GAA およびアルギニンの血中レベル

| 症 例    | BUN<br>mg/dl | クレアチニン<br>mg/dl | 尿酸<br>mg/dl | GSA<br>mg/dl | GAA<br>mg/dl | アルギニン<br>mg/dl |
|--------|--------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| 1      | 110          | 14.6            | 11.6        | 0.9          | 1.6          | 2.0            |
| 2      | 70           | 14.7            | 6.9         | 1.5          | 1.7          | 1.9            |
| 3      | 110          | 10.4            | 12.0        | 1.6          | 1.6          | 2.2            |
| 4      | 100          | 12.8            | 9.8         | 1.3          | 1.4          | 1.8            |
| 5      | 76           | 6.0             | 8.6         | 0.6          | 0.7          | 1.6            |
| 6      | 78           | 12.3            | 9.3         | 0.8          | 1.9          | 1.8            |
| 7      | 118          | 11.5            | 7.8         | 0.6          | 1.2          | 2.1            |
| 8      | 110          | 13.8            | 13.5        | 1.0          | 1.9          | 1.3            |
| 9      | 102          | 12.4            | 8.9         | 0.9          | 1.1          | 1.7            |
| 10     | 80           | 10.0            | 9.5         | 1.2          | 1.5          | 1.9            |
| 11     | 68           | 8.7             | 8.9         | 1.6          | 1.9          | 2.2            |
| 12     | 115          | 14.6            | 10.5        | 1.1          | 1.6          | 1.5            |
| 13     | 68           | 9.2             | 8.6         | 0.6          | 1.3          | 1.7            |
| 14     | 98           | 11.3            | 11.5        | 0.9          | 1.3          | 1.8            |
| 15     | 78           | 11.9            | 9.8         | 1.0          | 1.5          | 2.2            |
| 16     | 77           | 11.3            | 8.6         | 1.2          | 1.2          | 1.6            |
| 17     | 98           | 7.1             | 10.7        | 0.9          | 1.1          | 1.7            |
| 18     | 72           | 11.5            | 9.8         | 0.8          | 1.2          | 1.8            |
| 平均値±SD | 90.4±17.4    | 11.3±2.4        | 9.6±1.5     | 1.0±0.31     | 1.4±0.3      | 1.8±0.25       |

Fig. 5. カラムクロマトグラムによるグアニジン誘導体の測定例 ---Jaffe reaction  
——Sakaguchi reaction

当然とはいえ、長期透析症例がアルギニンを除き、いずれの物質も血漿濃度値が正常例と比して高値を示した。しかし GSA と BUN, 尿酸, クレアチニン, およびアルギニンとの相関関係を求めた結果、尿酸と GSA に  $r=0.42$  の相関度のみを求めたのみで、他の物質との相関性は得られなかった。GAA についても GSA と同様に他物質との相関度を求めたところ、クレアチニン  $r=0.73$ , 尿酸  $r=0.78$  とかなりの相関性を示したが、他物質との相関性はなく、Yatzidis 法でえられた所見とは一致しなかった。

相関係数 ( $r$ )  
BUN と GSA  $r=0.056$

BUN と GAA  $r=0.036$   
クレアチニンと GSA  $r=0.005$   
クレアチニンと GAA  $r=0.73$   
尿酸と GSA  $r=0.43$   
尿酸と GAA  $r=0.78$

アルギニンにかんしては対照群との差はほとんど認められなかった。

カラムクロマトグラムによる実際の分析症例を示すと Fig. 5 のごとく、GAA, アルギニン, GSA の順に坂口反応で呈色するが、Jaffe の試薬を用いるとグアニジンは呈色反応を示さず、クレアチニンは GAA とアルギニンのほぼ中間の位置に検出しうることが判明した。

長期透析症例のうち、透析前後の GAA, GSA, アルギニンの変化を追跡したものの 10 例を選んで Kiil 型人工腎 8 時間後の変化を求めると、いずれの物質も Table 6 に示したごとく透析後減少傾向を示したが、アルギニンは透析後上昇するもの 2 例をみとめ、他の物質と同一の動向を示さなかった。坂口陽性物質の透析前後の変化を追跡した結果、GSA は透析前  $1.34 \pm 0.40$  mg/dl であったが透析後  $0.80 \pm 0.13$  mg/dl まで下降した (Fig. 6)。GAA は透析前  $1.79 \pm 0.56$  mg/dl であったが、透析後  $1.04 \pm 0.37$  mg/dl まで改善した (Fig. 7)。しかし、アルギニンは透析後 2 例の上昇例

Table 6. 透析前後における各物質の血中レベルの変化

| 症 例   | BUN<br>mg/dl |              | クレアチニン<br>mg/dl |               | 尿酸<br>mg/dl  |             | GSA<br>mg/dl  |               | GAA<br>mg/dl  |               | アルギニン<br>mg/dl |               |
|-------|--------------|--------------|-----------------|---------------|--------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
|       | 透析前          | 透析後          | 透析前             | 透析後           | 透析前          | 透析後         | 透析前           | 透析後           | 透析前           | 透析後           | 透析前            | 透析後           |
| 1     | 105          | 35           | 14.00           | 7.53          | 9.8          | 4.7         | 0.87          | 0.50          | 2.45          | 1.25          | 2.12           | 1.78          |
| 2     | 85           | 45           | 7.65            | 5.54          | 12.0         | 6.2         | 1.52          | 0.70          | 1.70          | 0.95          | 1.78           | 1.34          |
| 3     | 90           | 40           | 13.50           | 9.53          | 8.7          | 3.7         | 1.47          | 0.82          | 1.72          | 1.27          | 2.08           | 2.10          |
| 4     | 95           | 50           | 11.30           | 6.84          | 9.5          | 5.2         | 1.23          | 0.70          | 2.12          | 1.50          | 1.75           | 1.95          |
| 5     | 80           | 40           | 7.56            | 5.25          | 12.0         | 6.2         | 1.16          | 0.85          | 1.65          | 1.30          | 1.65           | 1.60          |
| 6     | 115          | 55           | 12.50           | 6.25          | 11.3         | 5.9         | 1.20          | 0.72          | 2.49          | 1.40          | 1.35           | 1.20          |
| 7     | 120          | 60           | 13.50           | 7.28          | 8.6          | 3.5         | 1.05          | 0.65          | 1.68          | 0.92          | 2.18           | 1.25          |
| 8     | 105          | 55           | 9.20            | 4.25          | 13.5         | 4.5         | 0.95          | 0.30          | 1.20          | 0.45          | 1.68           | 1.28          |
| 9     | 80           | 62           | 16.50           | 12.00         | 8.9          | 2.4         | 0.87          | 0.46          | 1.65          | 0.52          | 2.20           | 1.50          |
| 10    | 98           | 60           | 10.20           | 4.80          | 13.5         | 4.8         | 1.02          | 0.93          | 1.20          | 0.80          | 1.93           | 1.80          |
| 平均±SD | 97.3<br>±3.9 | 50.2<br>±8.9 | 10.37<br>±2.85  | 5.85<br>±2.12 | 10.8<br>±5.4 | 4.8<br>±3.5 | 1.34<br>±0.40 | 0.80<br>±0.13 | 1.79<br>±0.56 | 1.04<br>±0.37 | 1.87<br>±0.34  | 1.08<br>±0.29 |

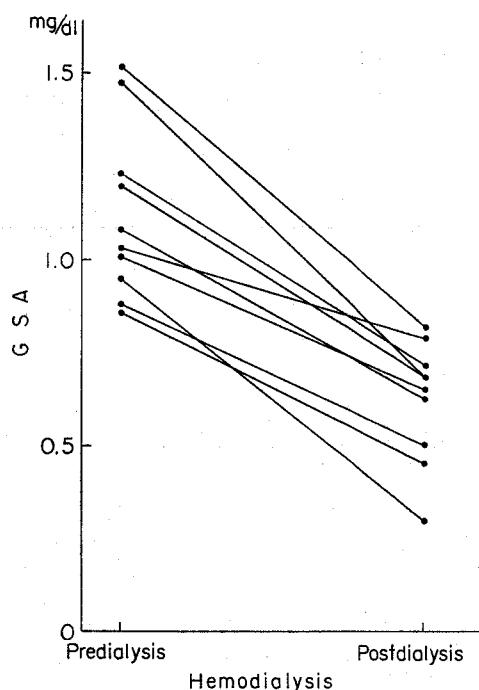


Fig. 6. GSA の透析前後の変化  
mean±SD  
before HD 1.34±0.40  
after HD 0.80±0.13

をみとめたが、他の8例は減少傾向を示し、10例の平均では透析前 1.87±0.34 mg/dl のものが、透析後 1.58±0.29 mg/dl と低下し、透析膜で除去された。しかしこの物質の除去率は他の物質に比してもっとも僅少であった (Fig. 8)。

Fig. 9 は、GSA のもっとも高値を示した症例2のカラムクロマトグラム例で GSA は透析前 1.52 mg/dl

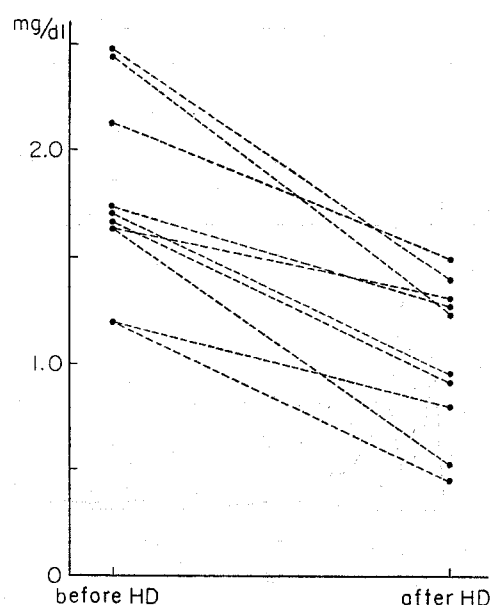


Fig. 7. 透析前後の GAA の変化  
mean±SD  
before HD 1.79±0.56  
after HD 1.04±0.37

であったが、透析後 0.70 mg/dl まで下降した。なお GAA, アルギニンも透析後減少傾向を示した。

Fig. 10 は症例1の GSA 血漿値がもっとも低かった症例のカラムクロマトグラムによる透析前後における変化を示したものであるが、透析前 GSA は 0.87 mg/dl であったが、透析後 0.50 mg/dl まで下降し、GAA, アルギニンも同様に低下現象をみとめた。Table 7 は透析前後で測定した10症例の平均値を総括したものであるが、BUN, クレアチニン, 尿酸, GSA, および GAA は8時間の透析では正常例より高値であっ

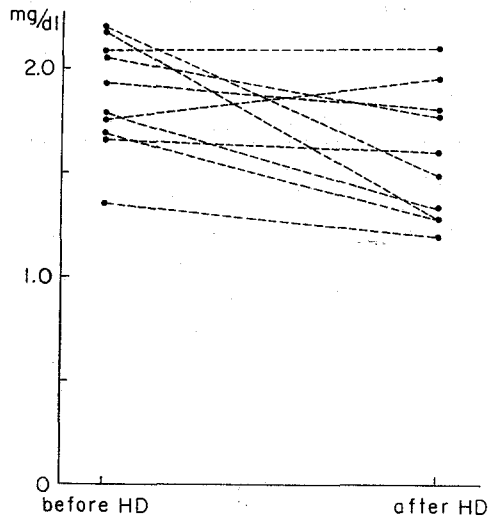


Fig. 8. 透析前後のアルギニンの変化  
mean  $\pm$  SD

before HD  $1.87 \pm 0.34$

after HD  $1.58 \pm 0.29$

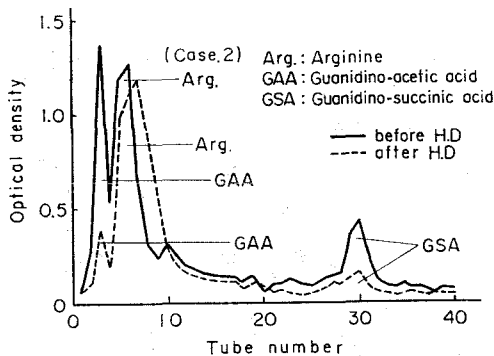


Fig. 9. 症例2のカラムクロマトグラムによる透析前後におけるGSA, GAAおよびアルギニンの変化

たが、アルギニンは透析前値は正常例より高く、透析後も正常域内の値を示した（正常人血漿アルギニン値  $1.5 \sim 2.5$  mg/dl）。なお著者のおこなったカラムクロマトグラフィによる回収率は既知濃度のグアニジン誘導体で検定した結果  $85 \pm 10\%$  であった。

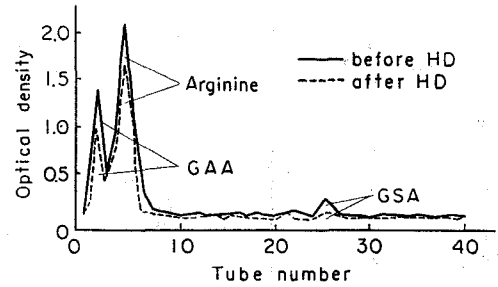


Fig. 10. 症例1のカラムクロマトグラムによる透析前後におけるGSA, GAAおよびアルギニンの変化

### (3) 濾紙電気泳動法によるGSA, およびGAAの分離

本法を用いてGSA, およびGAAの分離を試みたが、検体7例のうち、わずかに陰極で坂口反応陽性を示したものは、3例にすぎなかった。陰極に移行したGAAの検出には50%陽性データであったが、陽極に移行するはずのGSAの坂口反応陽性物質の検出は全例不可能であった。またGAAは定量可能な分布を示さず、定性のみにとどめた。

### (4) ADP-Stypven 時間

(a) 長期血液透析症例における透析前のADP-Stypven 時間、およびそれとGSA, GAA値との関連  
長期血液透析症例15例のカオリンおよびADP-Stypven時間の測定値はFig. 11に示したが、全例に延長がみとめられPF3aの低下を示した。ADP-Stypven 時間、およびGSA, GAAの血清レベル値はTable 8でまとめたごとく、ADP-Stypven 時間  $38.9 \pm 6.0$  sec GSA値は  $0.86 \pm 0.43$  mg/dl, GAAは  $1.50 \pm 0.46$  mg/dl であった。つぎにADP-Stypven 時間とGSA, ADP-Stypven 時間とGAAのそれぞれの相関関係を求めたところ、GSAは  $r=0.86$ , GAAは  $r=0.66$  と、いずれも相関関係がみとめられた (Fig. 12)。

(b) 長期血液透析症例における透析前後のカオリン Stypven 時間とADP-Stypven 時間、およびそれらとGSA, GAAとの関連

透析前後でカオリン Stypven 時間, ADP-Stypven 時間とGSA, GAAとの比較をおこないえた症例は5例であった。この5例の症例の一覧はTable 9にま

Table 7. 対照群と透析前後のBUN, クレアチニン, 尿酸, GSA, GAA およびアルギニンの比較

| 症 例           | BUN<br>(mg/dl)  | クレアチニン<br>(mg/dl) | 尿 酸<br>(mg/dl)   | GSA<br>(mg/dl)  | GAA<br>(mg/dl)  | アルギニン<br>(mg/dl) |
|---------------|-----------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 対 照 群 10      | $23.5 \pm 5.89$ | $0.84 \pm 0.32$   | $3.8 \pm 1.9$    | $0.17 \pm 0.07$ | $0.26 \pm 0.08$ | $1.76 \pm 0.44$  |
| 長期透析群 透析前値 10 | $97.3 \pm 13.9$ | $10.37 \pm 2.85$  | $10.78 \pm 5.39$ | $1.18 \pm 0.41$ | $1.69 \pm 0.56$ | $1.87 \pm 0.34$  |
| 透析後値          | $50.0 \pm 8.94$ | $5.85 \pm 2.12$   | $4.76 \pm 3.46$  | $0.65 \pm 0.13$ | $1.03 \pm 0.37$ | $1.58 \pm 0.29$  |

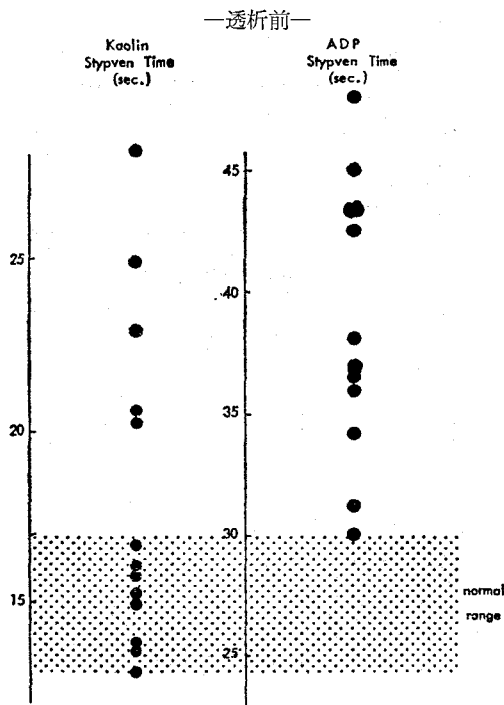


Fig. 11. 血液透析患者の血小板第3因子能

とめたごとく5例の平均値でカオリン Stypven 時間は 18.0 sec→16.0 sec と正常値に近づき、ADP-Stypven 時間も 41 sec→35 sec と改善傾向が著しく、前者が11%, 後者が15%程度の短縮をみた。同様に GSA, GAA も前者が透析前値 0.9 mg/dl が透析後 0.5 mg/dl に、後者が透析前値 1.6 mg/dl が透析後 0.8 mg/dl と前者が45%, 後者が50%程度の減少傾向を示した。すなわち症例2を除いては、いずれも透析後カオリン Stypven 時間, ADP-Stypven 時間とも短縮し, PF 3a の改善傾向がみとめられ (Fig. 13), GSA, GAA についてもいずれも減少傾向を示し透析による効果を示した (Fig. 14)。

(5) *in vitro* における uremic toxins (とくにグアニジン誘導体) 添加の PF 3a, 血小板

凝集能, および血小板 ADP 放出に対する影響

Table 8. 透析前の ADP-Stypven 時間と血清 GSA, GAA との関係

| 症 例         | ADP-Stypven 時間 (sec) | G S A (mg/dl) | G A A (mg/dl) |
|-------------|----------------------|---------------|---------------|
| 1           | 30                   | 0.50          | 1.3           |
| 2           | 34                   | 0.35          | 0.9           |
| 3           | 39                   | 0.90          | 1.0           |
| 4           | 30                   | 1.40          | 0.6           |
| 5           | 36                   | 1.05          | 0.6           |
| 6           | 39                   | 1.00          | 1.9           |
| 7           | 44                   | 0.90          | 1.6           |
| 8           | 43                   | 0.90          | 1.6           |
| 9           | 44                   | 1.15          | 2.1           |
| 10          | 45                   | 1.35          | 2.5           |
| 11          | 46                   | 1.52          | 2.5           |
| 12          | 48                   | 1.55          | 1.8           |
| 13          | 36                   | 0.60          | 1.05          |
| 14          | 37                   | 0.65          | 1.1           |
| 15          | 36                   | 0.60          | 1.4           |
| mean<br>±SD | 38.9±6.0             | 0.86±0.43     | 1.5±0.46      |

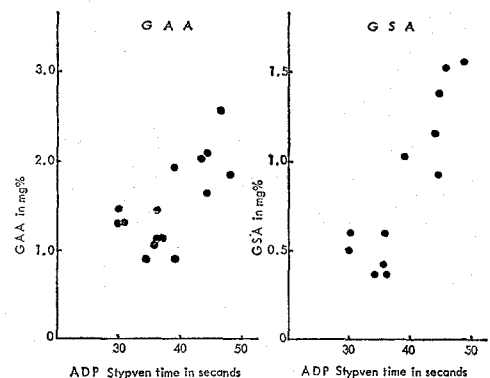


Fig. 12. Guanidino-succinic acid (GSA) ないし Guanidino-acetic acid (GAA) ADP-Stypven 時間との相関

Table 9. 透析前後における Kaolin-Stypven 時間, ADP-Stypven 時間, GSA および GAA の変化

|   | 症 例   | 年 令 | 性    | Kaolin-Stypven 時間 (sec) bef.~aft. | ADP-Stypven 時間 (sec) bef.~aft. | G S A bef.~aft. | G A A bef.~aft. |
|---|-------|-----|------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | N. K. | 31  | male | 23.0~15.0                         | 41.4~38.2                      | 1.4~0.6         | 2.0~1.2         |
| 2 | I. A. | 45  | male | 16.8~18.2                         | 35.5~40.5                      | 0.6~0.4         | 1.1~0.5         |
| 3 | H. Y. | 34  | male | 18.2~16.4                         | 47.0~31.4                      | 0.9~0.6         | 1.6~0.7         |
| 4 | S. Y. | 30  | male | 17.4~14.5                         | 37.0~28.0                      | 0.8~0.5         | 1.2~0.4         |
| 5 | J. N. | 41  | male | 14.8~14.1                         | 41.8~34.0                      | 1.0~0.5         | 1.9~1.3         |
|   | mean  |     |      | 18.0~16.0                         | 41.0~35.0                      | 0.9~0.5         | 1.6~0.8         |

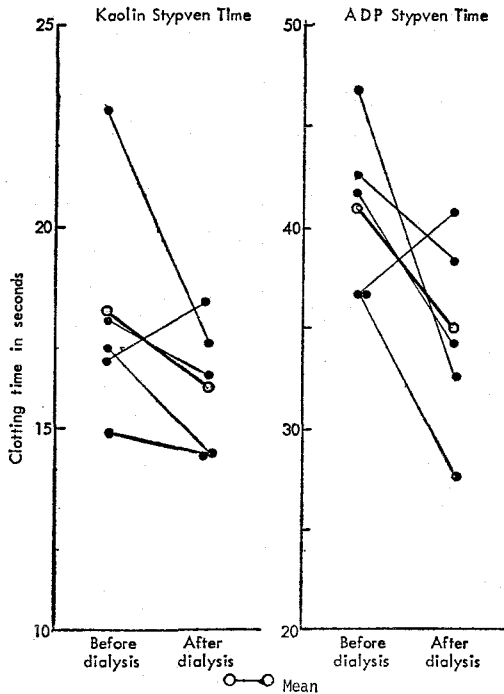


Fig. 13. 透析前後の PF 3a の変化

正常 PRP に GSA, MG および GAA, またグアニジン以外の uremic toxins と考えられるクレアチニン, 尿素を添加してカオリン Stypven 時間, および

ADP-Stypven 時間におよぼす影響をみると, カオリン Stypven 時間では PF 3a の抑制効果をもとめなかったが, ADP-Stypven 時間では, GSA, MG, GAA, ともに添加最終濃度 8 mg/dl で抑制効果がみとめられた。

ADP 凝集能に対する抑制効果は GSA, MG, および GAA の 8 mg/dl でおこり, クレアチニンは 10 mg/dl, 尿素では 4 mg/dl でその効果を示した。またコラーゲン添加による血小板凝集の態度から血小板 ADP 放出の状況を見ると, GSA, MG, GAA および urea の 16 mg/dl, クレアチニンの 3 mg/dl でその抑制現象が観察された (Table 10)。

Fig. 15 は, 血小板凝集能に対する uremic toxin とくにグアニジン誘導体の前記物質の抑制効果の実例を曲線で表示したものである。また Fig. 16 は PRP に対する凝集解離現象に対する抑制効果をもとめた現象を呈示したものである。

#### (6) 溶血率

##### (a) 正常人および長期血液透析患者の溶血率

対照群として, 正常人10例を選んで溶血率を前述の方法で測定した結果は Table 11 に示したごとくで溶血率の平均は  $12.1 \pm 5.9\%$  であった。さらに長期透析症16例における平均溶血率は同表に示したごとく  $54.0 \pm 19.6\%$  であった。

長期透析症例の透析前後の溶血率については, 透析

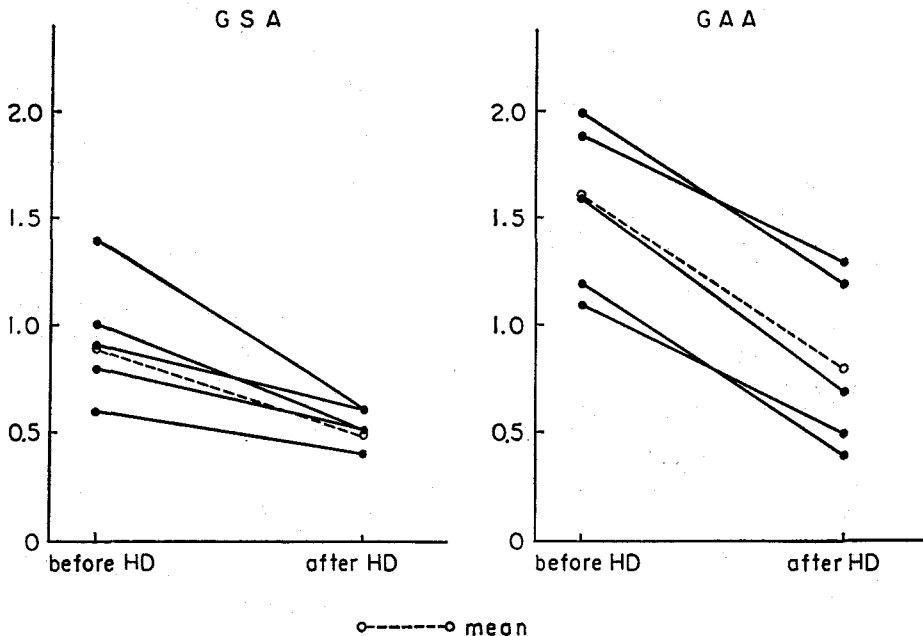
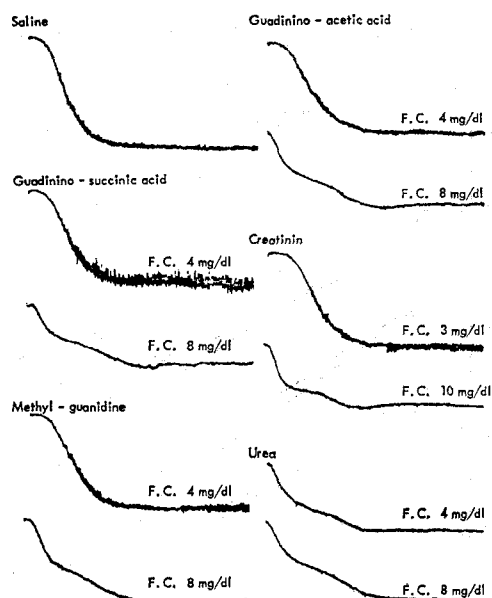


Fig. 14. 透析前後における GSA, GAA の変化

Table 10. 血小板第3因子能, 血小板凝集, 血小板 ADP の放出におよぼす uremic toxin, とくにグアニジン誘導体の影響

| Uremic Toxins<br>(mg/dl)<br>(F.C.) |    |    | Platelet Factor 3<br>Availability |                      | Platelet Aggregation<br>(ADP) |                | Platelet ADP Release<br>(Collagen) |                    |
|------------------------------------|----|----|-----------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------|------------------------------------|--------------------|
|                                    |    |    | Kaolin-<br>Stypven Time           | ADP-<br>Stypven Time | 1 min.<br>(%)*                | 3 min.<br>(%)* | 1 1/2 min.<br>(%)*                 | 3 1/2 min.<br>(%)* |
| Guadinino-<br>succinic acid        | 20 | 4  | 13.8                              | 27.1                 | 79.8                          | 83.0           | 88.3                               | 90.6               |
|                                    | 40 | 8  | 14.2                              | 32.3                 | 58.5                          | 47.3           | 82.5                               | 99.1               |
|                                    | 80 | 16 | —                                 | —                    | —                             | —              | 52.5                               | 97.4               |
| Methyl-<br>guanidine               | 20 | 4  | 14.1                              | 29.5                 | 78.7                          | 83.5           | 114.6                              | 97.4               |
|                                    | 40 | 8  | 13.6                              | 35.4                 | 76.6                          | 61.5           | 93.2                               | 94.0               |
|                                    | 80 | 16 | —                                 | —                    | —                             | —              | 55.3                               | 94.0               |
| Guadinino-<br>acetic acid          | 20 | 4  | 13.8                              | 28.8                 | 71.3                          | 80.2           | 98.1                               | 99.1               |
|                                    | 40 | 8  | 14.6                              | 35.5                 | 68.1                          | 54.9           | 85.4                               | 83.8               |
|                                    | 80 | 16 | —                                 | —                    | —                             | —              | 67.0                               | 84.4               |
| Creatinine                         | 15 | 3  | 13.0                              | 27.4                 | 41.5                          | 80.8           | 69.9                               | 96.8               |
|                                    | 50 | 10 | 13.5                              | 29.6                 | 81.9                          | 54.9           | 110.7                              | 98.5               |
| Urea                               | 20 | 4  | 15.0                              | 30.5                 | 64.9                          | 51.6           | —                                  | —                  |
|                                    | 40 | 8  | 15.1                              | —                    | 63.8                          | 61.5           | —                                  | —                  |
|                                    | 80 | 16 | —                                 | —                    | —                             | —              | 66.0                               | 86.1               |
| Control (saline)                   |    |    | 13.8                              | 24.6                 | 100.0                         | 100.0          | 100.0                              | 100.0              |

\*  $\frac{\text{Platelet aggregation added uremic toxins}}{\text{Platelet aggregation added saline}}$

Fig. 15. 血小板凝集におよぼす uremic toxin, とくにグアニジン誘導体の影響 (*in vitro*) (I)

前後で比較した症例は10例で, 透析前後の溶血率の変化とビタミンEの血清レベルを測定し, その一覧を Table 12 に示した. 対象とした症例の透析前値の溶

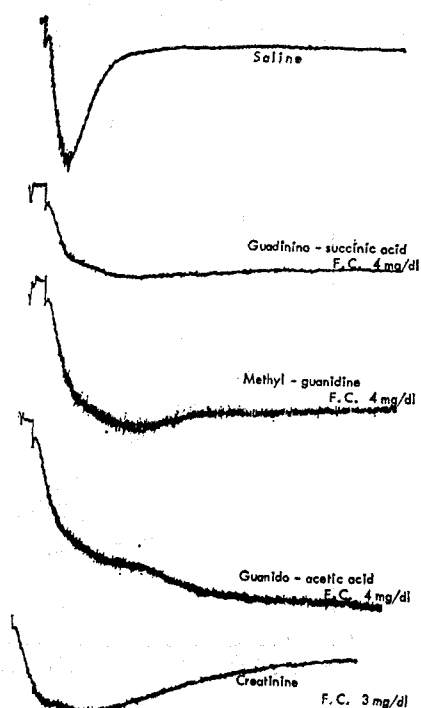
Fig. 16. 血小板凝集におよぼす uremic toxin, とくにグアニジン誘導体の影響 (*in vitro*) (II)

Table 11.  $H_2O_2$  による溶血率

| 対 照 群<br>症 例 | 溶 血 率<br>(%) | 長期透析群<br>症 例 | 溶 血 率<br>(%) |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1            | 7.0          | 1            | 26.6         |
| 2            | 15.5         | 2            | 76.8         |
| 3            | 3.0          | 3            | 72.5         |
| 4            | 9.0          | 4            | 51.1         |
| 5            | 19.4         | 5            | 73.3         |
| 6            | 4.4          | 6            | 53.7         |
| 7            | 11.9         | 7            | 44.2         |
| 8            | 15.5         | 8            | 19.5         |
| 9            | 6.2          | 9            | 34.5         |
| 10           | 22.2         | 10           | 75.0         |
| 11           | 18.0         | 11           | 49.0         |
| 12           | 12.5         | 12           | 48.1         |
| 13           | 13.0         | 13           | 25.1         |
| 14           | 9.8          | 14           | 65.7         |
| 15           | 20.1         | 15           | 83.7         |
| 16           | 18.7         | 16           | 65.7         |
| 平均±SD        | 12.1±5.9     | 平均±SD        | 54.0±19.6    |

Table 12. 透析前後の溶血率とビタミンEの変化

| 症例        | 溶 血 率 (%)      |           | ビタミンE (mg/dl) |                |
|-----------|----------------|-----------|---------------|----------------|
|           | 透 析 前          | 透 析 後     | 透 析 前         | 透 析 後          |
| 1         | 85.5           | 74.6      | 0.85          | 0.74           |
| 2         | 85.8           | 72.4      | 0.74          | 0.86           |
| 3         | 69.6           | 60.6      | 0.74          | 0.85           |
| 4         | 94.8           | 83.2      | 0.71          | 0.87           |
| 5         | 63.8           | 31.6      | 0.85          | 0.76           |
| 6         | 49.5           | 37.2      | 0.80          | 0.73           |
| 7         | 93.8           | 52.2      | 0.69          | 0.71           |
| 8         | 76.7           | 63.5      | 0.75          | 0.76           |
| 9         | 85.6           | 74.5      | 0.69          | 0.75           |
| 10        | 46.9           | 40.2      | 0.88          | 0.76           |
| 平均<br>±SD | 75.2<br>±16.38 | 59.0±7.02 | 0.71±0.30     | 0.78<br>±0.001 |

血率平均は  $75.2 \pm 16.4\%$  であったが、透析後溶血率は、 $59.0 \pm 7.0\%$  まで改善した (Fig. 17)。しかしビタミンEの血清レベルは透析前  $0.71 \pm 0.30$  mg/dl、透析後  $0.78 \pm 0.01$  mg/dl とほとんど変化を示さなかったが、長期透析患者のビタミンE血清レベルは正常の50%近くまで低下していることが判明した。

つぎに長期透析症例における透析前の溶血率、GSA、GAAの血清レベル、および $^{51}\text{Cr}$ による赤血球のlife span ( $T^{1/2}$ )の測定をおこなった成績をTable 13に総括した。その結果は、 $H_2O_2$  溶血率とGSAの相関は  $r=0.92$  で、かなりの相関度がみとめられた (Fig.

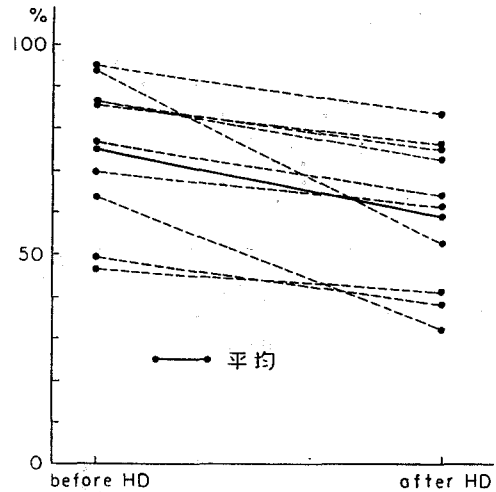


Fig. 17. 透析前後の溶血率の変化  
mean±SD  
before HD  $75.2 \pm 16.4$   
after HD  $59.0 \pm 7.0$

Table 13. 透析前の溶血率とGSA、GAAおよび赤血球寿命 ( $T^{1/2}$ ) の測定値

| 症例        | $H_2O_2$ による<br>溶 血 率<br>(%) | G S A<br>(mg/dl) | G A A<br>(mg/dl) | $^{51}\text{Cr}$ による<br>赤血球寿命<br>( $T^{1/2}$ )(days) |
|-----------|------------------------------|------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| 1         | 26.6                         | 0.8              | 1.2              | 19.5                                                 |
| 2         | 76.8                         | 1.2              | 1.8              | 10.0                                                 |
| 3         | 72.5                         | 1.3              | 2.0              | 12.0                                                 |
| 4         | 51.1                         | 0.9              | 1.2              | 14.0                                                 |
| 5         | 73.3                         | 1.2              | 2.0              | 12.5                                                 |
| 6         | 53.7                         | 0.8              | 1.4              | 14.0                                                 |
| 7         | 44.2                         | 0.7              | 1.5              | 14.0                                                 |
| 8         | 19.5                         | 0.6              | 1.3              | 18.0                                                 |
| 9         | 34.5                         | 0.5              | 0.9              | 16.0                                                 |
| 10        | 75.0                         | 1.4              | 2.1              | 15.0                                                 |
| 11        | 49.3                         | 0.7              | 1.3              | 16.0                                                 |
| 12        | 48.1                         | 0.9              | 1.2              | 14.0                                                 |
| 13        | 25.1                         | 0.5              | 0.9              | 21.0                                                 |
| 14        | 65.7                         | 1.1              | 1.9              | 12.0                                                 |
| 15        | 83.7                         | 1.5              | 2.1              | 10.3                                                 |
| 16        | 65.3                         | 0.9              | 1.7              | 11.5                                                 |
| 平均<br>±SD | 54.00<br>±19.58              | 0.94±0.30        | 1.53±0.79        | 14.4±3.0                                             |

18). GAA にかんしてもその相関度は  $r=0.79$  と高く、 $H_2O_2$  溶血率に関与していることが推定された (Fig. 19)。

また16例の長期透析症例の赤血球寿命について検討したところ、 $14.4 \pm 3.0$  日と正常人 (25~37 日) の半分近くまで短縮をみとめた。life span と  $H_2O_2$  溶血率も  $r=0.41$  と有意の相関があることを示唆した

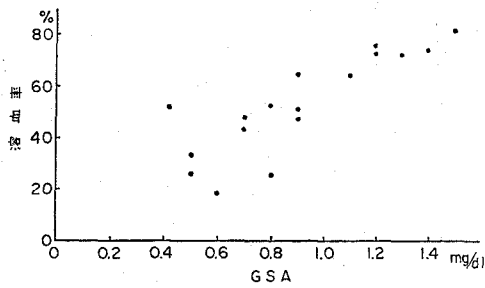


Fig. 18. 溶血率と GSA との関係  
( $r=0.92$ ,  $p<0.05$ )

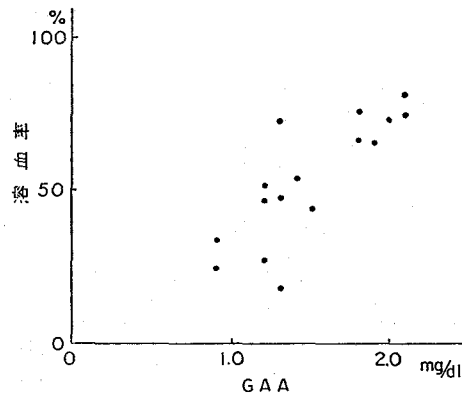


Fig. 19. 溶血率と GAA との関係  
( $r=0.79$ ,  $p<0.05$ )

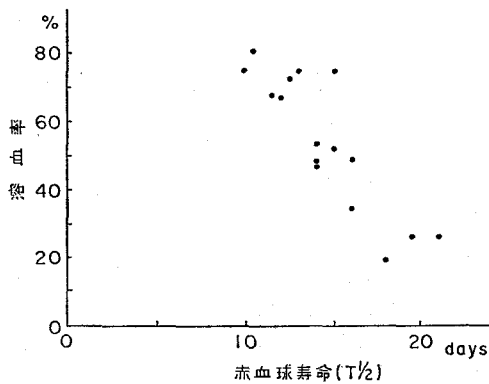


Fig. 20. 溶血率と赤血球寿命との関係  
( $r=-0.41$ ,  $p<0.05$ )

(Fig. 20).

さらに life span と GSA との相関を求めると  $r=-0.55$  (Fig. 21), GAA との相関は  $r=-0.33$  といずれも相関関係を示した (Fig. 22) が, GSA のほうが GAA より, より高い相関度を示した。

(b) *in vitro* におけるグアニジン誘導体添加の溶血に対する影響

6 例の正常血液に MG, GSA, GAA をそれぞれ 20

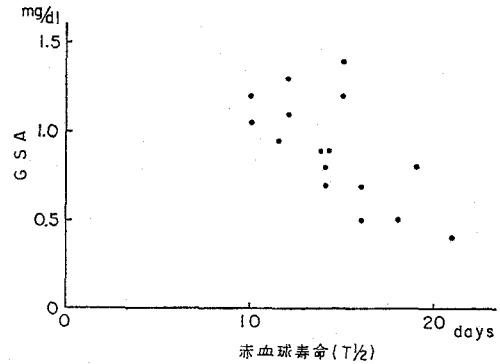


Fig. 21. GSA と赤血球寿命との関係  
( $r=-0.55$ ,  $p<0.05$ )

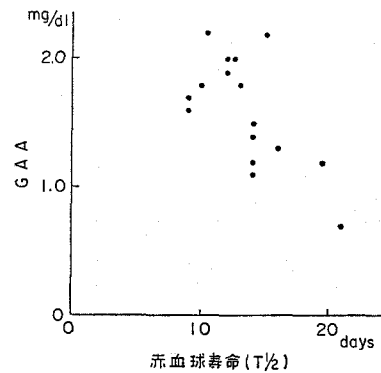


Fig. 22. GAA と赤血球寿命との関係  
( $r=-0.33$ ,  $p<0.05$ )

Table 14. 正常血液に対する各グアニジン誘導体 (20 mg/dl) 添加による溶血率の変化 (*in vitro*).

| 症例        | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>溶血率<br>(%) | GSA<br>(%) | GAA<br>(%) | MG<br>(%) |
|-----------|---------------------------------------------|------------|------------|-----------|
| 1         | 7.0                                         | 23.2       | 20.8       | 28.5      |
| 2         | 15.5                                        | 18.9       | 17.9       | 20.1      |
| 3         | 9.0                                         | 23.8       | 19.8       | 23.9      |
| 4         | 9.8                                         | 10.5       | 11.0       | 19.8      |
| 5         | 15.5                                        | 23.5       | 21.2       | 29.3      |
| 6         | 22.1                                        | 30.1       | 28.5       | 43.0      |
| 平均<br>±SD | 13.1±5.0                                    | 21.7±1.2   | 19.8±5.1   | 27.4±3.7  |

mg/dl の割合に添加して, 37°C で incubation をおこない, それぞれの *in vitro* における溶血率を算出した結果, MG の影響がもっとも強く, ついで GSA, GAA の順に溶血率が亢進することが判明した (Table 14). この成績は長期血液透析症例においても最終濃度 20 mg/dl の割合で添加した結果, 正常人血液と同様溶血率は亢進し, MG, GSA, GAA の順に影響力があることが判明した (Table 15).

Table 15. 長期透析例（透析前）血液に対する各グアニジン誘導体（20 mg/dl）添加による溶血率の変化（*in vitro*）.

| 症例        | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>溶血率<br>(%) | GSA<br>(%) | GAA<br>(%) | MG<br>(%) |
|-----------|---------------------------------------------|------------|------------|-----------|
| 1         | 76.8                                        | 93.8       | 92.1       | 96.2      |
| 2         | 51.1                                        | 55.8       | 60.2       | 68.5      |
| 3         | 44.2                                        | 51.2       | 53.2       | 60.1      |
| 4         | 19.5                                        | 28.6       | 27.3       | 35.6      |
| 5         | 83.8                                        | 94.8       | 92.1       | 96.2      |
| 6         | 65.7                                        | 72.8       | 69.8       | 83.2      |
| 平均<br>±SD | 50.9±21.6                                   | 66.1±23.6  | 65.8±22.6  | 73.3±21.6 |

## 考 察

1913年 Abel らが<sup>22)</sup> コロジオン膜を使用して血液透析の基礎的実験をおこなっていたの画期的なことは、1944年 Kolff らが<sup>23)</sup> 回転ドラムの twin coil 人工腎臓を発表したことであり、coil 型人工腎の典型として、現在まで使用されている。

いっぽう1960年 Scribner<sup>24)</sup> によって Skeggs (1948)<sup>25)</sup> の積層型人工腎が改良され、Kiil 型人工腎として現在臨床的に利用され、京大人工腎室においても Kiil 型人工腎を主体として透析をおこなっている現状である。もちろん透析膜についても現在種々の改良が加えられて、透析効果のよい膜の開発が進められていることは言をまたない。このほか多種の dialyzer が臨床的にも応用され、京大人工腎室でも Kiil 型 dialyzer 以外にも多種の機種 dialyzer が使用されているが、著者は対象ならびに研究方法の項目で述べたごとく、Kiil 型人工腎によって最短6カ月、最長4年半におよぶ症例を対象として、検討を加えた。したがって非透析症例の末期腎不全と著者の対象とした末期腎不全長期透析症例とでは長期透析導入前の病態や臨床症状には明らかに類似せるものを認めたととしても、透析という因子が導入されたことにより、尿毒症症状が改善されるようになったため、非透析群とではその病態生理において明白な相違点があることは否定できない。いわゆる尿毒症症状とは腎不全のため尿中物質、および腎不全のため代謝異常を生じた結果、異常代謝産物が血中に停滞し、中毒症状を惹起せしめ、きわめて多彩な臨床所見を呈する。そのおもなものとしては神経症状（たとえば集中力低下、情緒不安定、計算力の低下など）がもっとも早期に発症し、ついで貧血、溶血、血小板機能障害、凝固線溶系異常にともなう出血傾向、胃腸症状、代謝異常としてカルシウム代謝異常、糖脂質の異常、末梢神経伝導速度に

関与するトランスケトラーゼの異常、ナトリウム、カリウムの ATP-ase の転送障害などがあるが、そのほか呼吸系、循環系、筋・骨格系における病変などがあげられよう<sup>26,27)</sup>。これらの症状発現因子のひとつに uremic toxin が関与していることが想定されるが、人工腎の技術、操作が進歩し、かなりの延命効果がみられている現在においてもその本態については不明な点が多い。だが単一の toxin が貯留しているわけではなく、複合的に uremic toxin が関与してこれらの症状を発現していることは否定できない。

いわゆる uremic toxin のうち Olsen および Bas-set ら<sup>28)</sup> は尿素窒素、フェノール、グアニジン、クレアチニンをあげ、これらの物質の血清レベル上昇につれて尿毒症症状が多彩になると述べている。そのほか Douglas ら<sup>29)</sup> は尿素、窒素、フェノール、インジカン、尿酸、ロイシン、チロジン、およびプタミンなど200種の uremic toxin を想定している。そのほか従来より toxin として考えられていたものに、リン酸、硫酸、インドールなどがあげられるが、リン酸はカルシウム代謝と関連するものとして重視されるが、その他の役割については不明な点が多い。またフェノール、インジカン、インドールについては toxin として注目されているが、なかんずく、インドール、インジカン、インドール酢酸については Ludwig ら<sup>30)</sup> は uremic toxin として、重要な物質として強調し脱水、電解質アンバランス、アシドーシス、栄養障害に関与することを示唆しているが、インドールがトリプトファン代謝障害によって生成されることを意義づけていることは興味ぶかい (Fig. 23)。

現在までに尿毒症症状と明確に関連づけられた uremic toxins としてフェノール、およびその誘導体、芳香族アミン、ある種の陰イオン、ポリペプチド、 $\alpha$ -アミノニヒドリン反応陽性物質およびグアニジン誘導体はその代表的なものとして指摘されており、これらの臨床症状と uremic toxin との因果関係について追求がなされてきたが、その因果関係を証明しえたものは少数例にすぎず、大部分が測定方法上の困難性、とくに toxin の定量化と慢性腎不全動物の作成のむずかしさに起因していることもみのがせない事実である。いわゆる uremic toxin のうち尿毒症症状と比較的明確に関連づけられた物質の一部を Table 16 に示した。これらの uremic toxin のうち、とくに最近注目されてきたものがグアニジン化合物で、そのうちの GSA、GAA および MG は生体中に存在する uremic toxin として現在までその研究については数多くの報告がある。

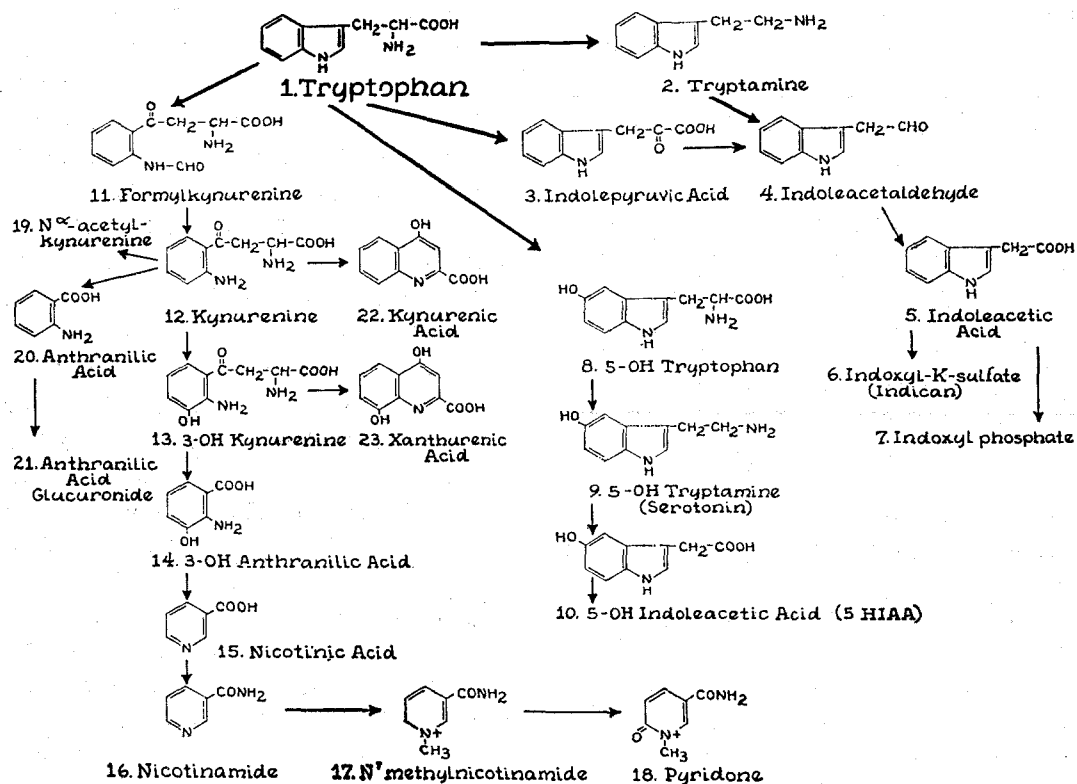
Fig. 23. Ludwig<sup>30)</sup> による尿毒症におけるインドールの生成過程

Table 16. Uremic toxins と尿毒症症状との関連 (Giovanetti より引用)

|                                                | Urea | Crea-<br>tinine | Methyl<br>guani-<br>dine | Guanidino-<br>succinic<br>acid | Urate | Acidosis | PO <sub>4</sub> | SO <sub>4</sub> | Phenols<br>indoles |
|------------------------------------------------|------|-----------------|--------------------------|--------------------------------|-------|----------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Gastrointestinal symptoms and<br>complaints    | +    | -               | +                        |                                |       |          |                 |                 |                    |
| Neurological symptoms and<br>complaints        | -    | -               | +                        |                                |       |          |                 |                 | +(?)               |
| Psychic symptoms                               | +    |                 |                          |                                |       |          |                 |                 | +(?)               |
| Reduced motility in experimental<br>animals    | +    | -               |                          |                                |       |          |                 | +               |                    |
| Hemostatic defect                              | +    |                 |                          | +                              |       |          |                 |                 |                    |
| Hemolysis                                      |      | +               | +                        |                                |       |          |                 |                 |                    |
| Impairment in red blood cell<br>product        |      |                 | +                        |                                |       |          |                 |                 |                    |
| Glucose intolerance                            | +    | +               |                          |                                |       |          |                 |                 |                    |
| Hypertriglyceridemia                           |      |                 | +                        |                                |       |          |                 |                 |                    |
| Impairment of intestinal calcium<br>absorption |      |                 | +                        |                                |       |          | +               | +(?)            |                    |
| Osteodystrophy                                 |      |                 |                          |                                |       | +        | +               |                 |                    |
| Metastatic calcification                       |      |                 |                          |                                |       |          | +               |                 |                    |
| Secondary gout                                 |      |                 |                          |                                | +     |          | +               |                 |                    |
| Protein catabolism                             |      |                 | +                        |                                |       |          |                 |                 |                    |
| Pruritus                                       |      |                 | +(?)                     |                                |       |          |                 |                 |                    |

+ indicates experimental or clinical evidence only; - indicates that negative results have been obtained.

著者は uremic toxin の尿毒症症状との関連性は血液透析の進歩した現在では、従来の保存的治療法が優先した時代の尿毒症の病態とは明らかに傾向が異なり、従来の尿毒症末期像に長期透析によって著しく病態が修飾される現象がおこり、いわゆる尿毒症の末期症状でみられた典型的な病態は必ずしも発症するものとは限らない。とくに著者の経験した長期生存例については本邦においても症例数が少なく未知の点も多い。したがって本邦においても長期生存例が増加するにつれて、なお不明とされている分野の解明がこんご検討されるものと考えているが、欧米においては比較的、透析例についての検討がなされ、血液透析によって一部の uremic toxin は除去されることが解明されている。以下グアニジン誘導体について著者のおこなった実験を中心に文献的な検討を含めて考察を加えることにする。

(a) 慢性腎不全時におけるグアニジンにかんする研究の歴史的過程について

グアニジンはグアニンの酸化によって生成され、グアニンは特殊の脱アミノ酵素の作用によってキサントシンに移行する。正常人の場合キサントシン酸化酵素の酸化作用によってグアニンはキサントシン、尿酸に移行する。またクモではグアニンがプリン代謝の最終産物であることが知られている。アンギオトニン、アルギニン、MG および GAA が坂口反応陽性物質であることが知られたのは坂口試薬が発見されていろいろのことであるが、グアニジンと尿毒症症状との関連については、すでに1914年いらい Foster が<sup>34,36,37)</sup> 尿毒症血液から分離した toxin (グアニジンと推定) をモルモットに注射して、呼吸困難、けいれん、こんすいを起こし、ついに死に至ることを報告している。Pfittner および Myers ら<sup>38)</sup> は BUN 高値(167 mg/dl)の慢性腎炎患者の胸水、および血液からそれぞれ 15 mg/dl, 10 mg/dl の MG を検出しえたことを報告し、また Mayor, および Weber ら<sup>40)</sup> は高窒素血症の腎炎患者の高血圧症例より、グアニジンの血清レベルが正常例の10倍近く増加したことを認めた。また塩酸グアニジンを実験動物に注射すると興奮状態となり、おちつきがなくなり、ふるえ、けいれんなどの症状を起こすことを観察し、同時に胃腸症状(嘔吐, 下痢), アシドーシス, 低血糖症を起こすことを報告した。1938年 Minot および Dodd<sup>42)</sup> はグアニジンの影響によって血中の乳酸値が上昇することを認め、Paton<sup>44)</sup> はグアニジンの大量負荷によって末梢神経がマヒすることを述べている。Burns<sup>32)</sup> および Sharpe<sup>43)</sup> はグアニジンが副甲状腺摘除により、テタニー現象をたかめるとい

う報告をした。

Mayor<sup>41)</sup> は高血圧で NPN の 90 mg/dl 以上でグアニジンの血清レベルはすべて高値を示したと述べ、Andes ら<sup>45)</sup> は腎不全初期にグアニジンレベルは上昇し、尿素、尿酸、およびクレアチニンとほぼ同一傾向を示すとした。Kleeberg ら<sup>47)</sup> は尿毒症の患者の尿を検索して尿毒症症状にグアニジンが重要な役割を演ずると結論した。

1937年 Andes ら<sup>31)</sup> は尿酸、尿素、クレアチニン、およびグアニジンの上昇が腎不全初期に上昇するが、腎不全末期になると BUN, 尿素窒素とグアニジンの上昇は必ずしも平行しないことを示唆した。

1937年 Harrison ら<sup>48)</sup> はイヌの脳内に直接無機リンを正常値量を注射しても著明な筋けいれんを起こし、実験的尿毒症犬の脳脊髄液におけるリン酸化合物の増加を観察した。同時にグアニジンの血清レベルが上昇するにつれて尿毒症症状が増加し、脳脊髄液中にもグアニジンが検出されることを報告した。さらにカルシウムがグアニジンと拮抗作用をもつことを推定し、グアニジンの薬理作用が尿毒症発現に重大な関係があることを示唆した。

1943年 Kolff ら<sup>23)</sup> が twin coil 人工腎を発明していろいろ、血液透析における腎不全のグアニジン誘導体の研究がなされるようになってきた。

それ以降の報告について述べると Olsen, および Basset ら<sup>28)</sup> は1951年、グアニジン、BUN, フェノール、およびクレアチニンをとりあげ、これらの物質の血中濃度が上昇するにつれて尿毒症症状が多彩になることを報告した。

1955年 Hollunger はグアニジン、および MG が呼吸に関与するある種の酵素に阻害的に働き<sup>50)</sup>、Lascells らおよび Rajagapalan らは酵素消費を障害することを示唆した<sup>51,52)</sup>。Krebs ら<sup>74)</sup> が1932年オルニチン回路を提唱していろいろ (Fig. 24), グアニジン誘導体のうち GAA は蛋白異化作用によって正常に生成される代謝産物であることが推定され、微量では toxin の作用がないとされた<sup>53)</sup>。また GSA は長いあいだ不明の産物と考えられていたが、1968年 Cohen ら<sup>7)</sup> はアルギニンコハク酸から異常代謝産物として生成することを示唆し (Fig. 25), Stein ら<sup>8)</sup> はアスパラギン酸とアルギニンとの結合によって生成されることを推定した (Fig. 26)。この根拠にアルギニンが GAA に移行するさいに negative feedback control 的に酵素が影響されるためであることを推論している。

すなわち GSA は尿毒症患者では血清中クレアチニン、クレアチンの前駆物質である GAA が増量してい

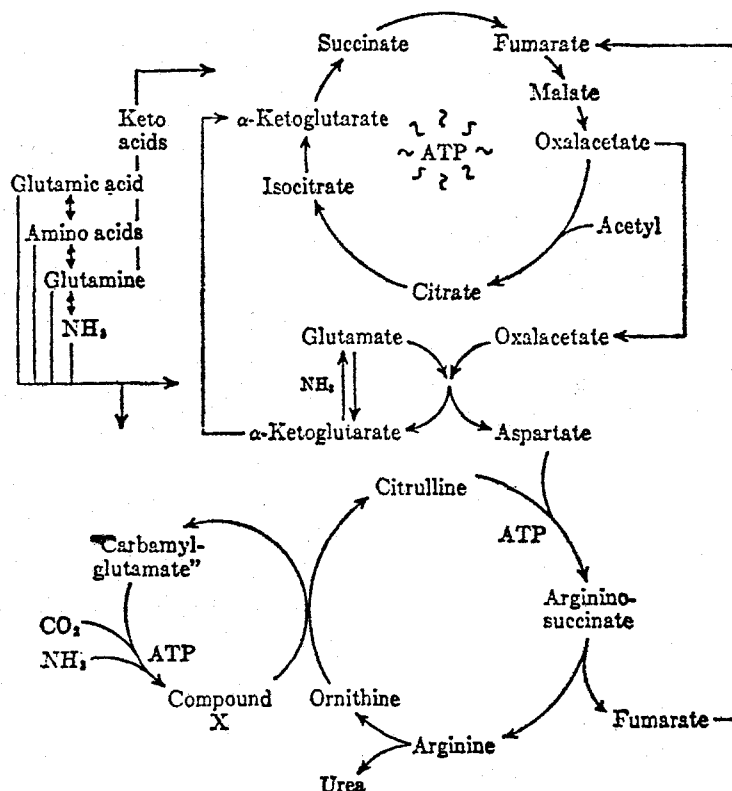
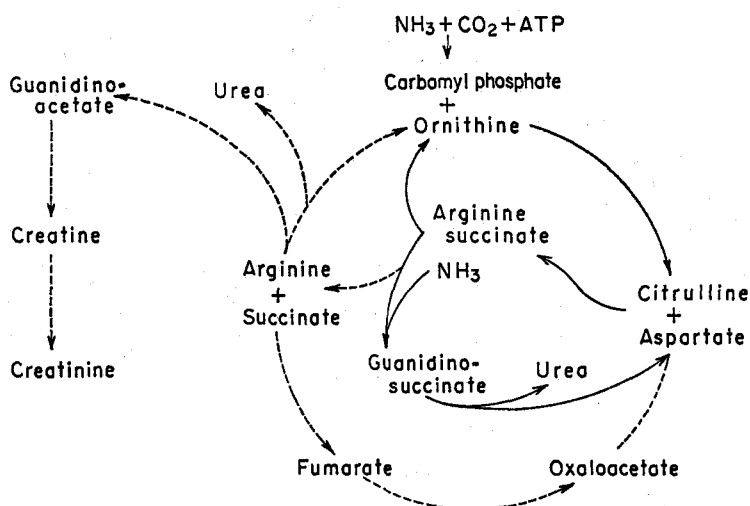
Fig. 24. 尿素サイクル (Rattner<sup>54)</sup>)

Fig. 25. Cohen の腎不全時における尿素サイクル

ることから Fig. 24, 25 のとき経路をとって GSA が生成するとしているが、腎不全時 GAA の血中濃度が増加してアルギニンからの GAA の生成が抑制されて、アルギニンのアミド基が、グリシンよりもアスパラギン酸に移行する傾向を示して GSA やオルニチン

が生成することを推定した。いっぽう GAA がメチオニンによるメチル基があたえられるとクレアチニンへ転換され GAA のレベルを低下することができると述べている。Stein ら<sup>55</sup> は GSA についてはアルギニン、尿素、クレアチニン、酢酸アンモニアなどをラットの

## Proposed pathway for production of GSA

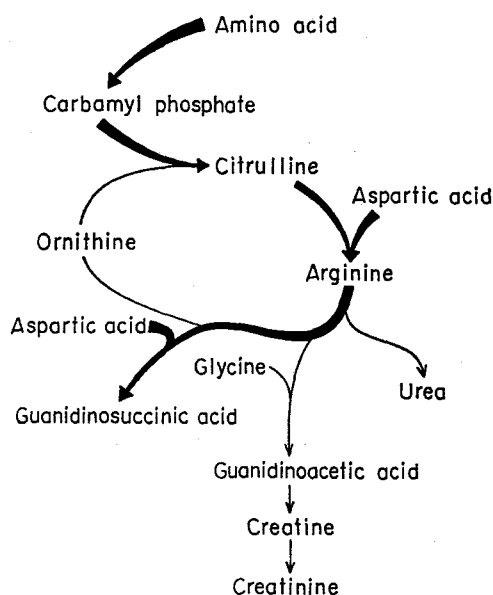


Fig. 26. GSA の生成過程 (Stein らによる)

腹腔内に注入して GSA の生成増加に関与する物質として尿素とアルギニンをあげている。1961年 Cohen ら<sup>53)</sup>は糖代謝異常、血糖値の上昇がグアニジン血清レベル高値に関係することを述べ、血液透析によって改善しうることを記載している。1967年 Horowitz ら<sup>54)</sup>は GSA が PF 3a に関与し、PF 3a の活性が GSA によって阻害されることを提唱した。1968年 Stein ら<sup>55)</sup>は GSA は血液透析によって低下することを検討し、それと平行して PF 3a も改善する傾向があることを検討した。1968年 Giovanetti らはクレアチニンが酸化されることによって MG と尿酸が生成されることを推定し<sup>56)</sup>、MG をイヌに負荷して、いわゆる尿毒症症状のほとんどの症状をみとめ、uremic-like

syndrome を起こした画期的な実験については緒言で述べたとおりである<sup>2,3)</sup>。

グアニジン誘導体はいずれも血液透析によって透析可能であるためにグアニジンレベルと尿毒症症状は相関性がなければならぬとしているが、現在その因果関係については、なお疑問な点が多いと Wilson<sup>57)</sup>は述べている。

Lonergan ら<sup>58)</sup>はトランスフェラーゼの活性に GSA が関与しチアミンの補酵素を阻害するために末梢神経のミエリン鞘に病変をきたすという報告をおこなっている。しかし、Jebsen ら<sup>59)</sup>はトランスフェラーゼの血中レベルは透析によって改善しても長期透析症例では末梢神経伝導速度の異常、および末梢性ニューロパチーはあまり認められないことを報告している。そのほか、Lascelles および Taylor<sup>58)</sup>はグアニジンが、*in vitro* の実験で脳皮質の酸素摂取率を阻害することを証明し、この酸素摂取率低下が uremic coma の原因となることを示唆した。この機構にかんしては解糖系酵素活性の低下、hexokinase 活性低下、およびミトコンドリア分画による TCA サイクルメンバーの酸化能力の低下が原因することを推定している。また森<sup>59)</sup>、陣内ら<sup>60)</sup>はアルギニン、グアニジノ酪酸、GAA などグアニジノ基を大脳内に注入すると、けいれんが起ることを観察し、グアニジノ基を有する物質（アルギニン以外の物質）が、アミジン基転移酵素を阻害して代謝異常をおこすために、けいれんを起こすことを主張している (Table 17)。さらに、Balestrin<sup>61)</sup>は尿毒症症状のうち、イヌの実験でカルシウムイオン腸内吸収が MG の長期経口投与で障害されること、骨の脱灰が起ることから、Ca の代謝異常に MG が関与すること、さらにはイヌの MG 長期投与により、脂質代謝異常が起り、高トリグリセリド血症、低コレステロール血症をおこすことを実証し、グアニジンの尿毒症における重要性を示唆すると同時に血液透

Table 17. 脳内に存在するグアニジノ化合物 (森より引用)

|                                 |                           | $\begin{array}{c} \text{NH} \qquad \qquad \text{NH}_2 \\ \parallel \qquad \qquad   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH} \end{array}$ |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Arginine                        | 0.1 ~ 0.2 $\mu$ moles/g   |                                                                                                                                                                                                   |
| $\gamma$ -Guanidinobutyric acid | 0.03 ~ 0.05 $\mu$ moles/g | $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$                                                               |
| Glycocyamine                    | 0.01 ~ 0.03 $\mu$ moles/g | $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NHCH}_2\text{COOH} \end{array}$                                                                                     |
| Taurocyamine                    | 0.01 ~ 0.03 $\mu$ moles/g | $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H} \end{array}$                                                                  |
| $\alpha$ -N-acetylarginine      | -0.02 $\mu$ moles/g       | $\begin{array}{c} \text{NH} \qquad \qquad \text{NHCOCH}_3 \\ \parallel \qquad \qquad   \\ \text{N}_2\text{N}-\text{C}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \end{array}$               |

析による症状の改善傾向については、生体内のグアニジン誘導体が dialyzable substance であること、また、比較的低分子物質に尿毒症発現物質が多いことなどを示唆した。以上グアニジンの研究が約半世紀にわたり分子生物化学的分析、酵素機能の面、臓器機能面など各種のレベルで探究されてきたにもかかわらず、なお未解決の点が多く残されている現状である。しかし尿毒症症状の各種の異常が単一な toxin の体内貯留では説明しがたい複雑な問題点を有していることは言をまたない。いっぽう本邦においては腎不全長期血液透析例におけるグアニジン誘導体の重要性に着目し研究が始められたのは1969年以降で、上田<sup>62,63</sup>、著者ら<sup>64,65</sup>の学会報告があるにすぎない現況である。

#### (b) グアニジン測定法について

Yatzidis法を改良してグアニジン誘導体を測定した結果、原法による測定法では70%以下の回収率であったため、著者は charcoal に吸収されたグアニジン誘導体の回収率を多くする目的で洗浄を少なくとも数回くり返し、濾紙よりの回収時間を節約する目的で millipore filterを使用することが効果的であることを確認した。原法では低温処理を必要としているが、著者は室温処理でもその吸光度に変化がないことを確認して、すべて室温において操作をおこなった。この改良によって回収率80±15%まで改善した。

グアニジン誘導体の検出原理は1921年坂口昌洋<sup>66</sup>がアルギニンの検出をおこなうためにグアニジル基  $\begin{matrix} \text{H}_2\text{N} \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix} \text{N} \rangle \text{C}-\text{NH}-$  に特異的作用を示す8-ヒドロキシキノリン ( $\alpha$ -ナフトール) が坂口反応で赤色となる呈色反応を示すことを利用した方法であり、著者のグアニジン検出はいずれも本法によった。本試薬に著者はチミンを添加することにより感度を10倍以上良好にすることが判明し、前述のごとくチミンを坂口試薬に添加して全例の測定をおこなった。著者は Yatzidis 法によるグアニジン誘導体の測定を試みたが、本法の

最大の利点は、貧血の強い透析患者から血清 2 ml で検査しうることである。したがって検査による失血をあまり考慮せずにすむことであろう。しかし欠点としては濾紙に付着した charcoal を100%回収することは技術的にまずむりなことがあげられよう。この点についてはこんご検討を加えたい。坂口試薬以外におけるグアニジン化合物の測定は Pffifner および Myers<sup>67</sup> の方法があり alkaline ferricyanide nitroprusside 法を利用したもので、本法による定量化は古くからおこなわれているが、グアニジン特異性の反応でなく、クレアチン、クレアチニンにも呈色反応を示すこと、Yatzidis の方法に比して操作が複雑で長時間要し、120°Cの高温処理を必要とする点 Yatzidis 法に劣るものと考えられる。Table 18 はおもに使用する試薬と toxin との反応関係についてまとめたものである。

Yatzidis の方法はグアニジン誘導体の測定を主目的としているために、各グアニジン誘導体の個々の解析には別個の測定法が必要であり、現在もっとも定量化に安定した結果が得られる方法にカラムクロマトグラムによる測定法がある。本法は Bonas<sup>68</sup>、Natelson<sup>69</sup> らによって実用化され、1969年 Stein ら<sup>80</sup>によってカラムクロマトグラムによる各グアニジン誘導体の定量的検出が確立された。しかし本法は 10 ml の血清を必要とするため貧血状態の強い透析患者から再三にわたる検査がためられるわけであるが、血清量を 5 ml としてその値を補正するならばこの問題は解決しうものとする。この血清量の多い点を除けば本法は自動的に fraction collector で検体分離液を採取でき、坂口試薬でグアニジン誘導体を検出し、定量化するうえではもっともすぐれた方法といえよう。本法で回収率を検討した結果、85±5%であった。

長期慢性腎不全の血清から坂口反応陽性物質の分離物は GAA、アルギニン、および GSA であったが、

Table 18. Uremic toxins に対する各試薬の呈色反応

|                                     | Arginine | Creatine | Creatinine | Guanidine | Methyl-guanidine | Guanidino-acetic acid | Guanidino-propionic acid | Guanidino-butyric acid | Guanidino-succinic acid |
|-------------------------------------|----------|----------|------------|-----------|------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| Sakaguchi                           | ++       | —        | —          | —         | ++               | ++                    | ++                       | ++                     | ++                      |
| Alcaline picrate                    | —        | —        | ++         | —         | —                | —                     | —                        | —                      | —                       |
| Ninhydrin                           | ++       | +        | +          | —         | —                | +                     | ++                       | ++                     | —                       |
| Alkaline ferricyanide-nitroprusside | —        | ++       | ++         | ++        | ++               | ++                    | ++                       | ++                     | ++                      |
| $\alpha$ -Naphthol-diacetyl         | ++       | ++       | —          | ++        | ++               | ++                    | ++                       | ++                     | ++                      |
| Pentacyano-amino-ferrate            | ++       | ++       | —          | ++        | ++               | ++                    | ++                       | ++                     | ++                      |

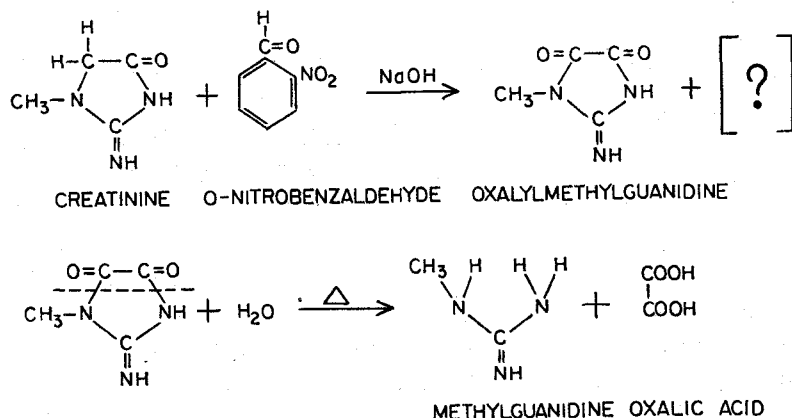
1963年 Bonas ら<sup>68)</sup>が室温で Dowex 50W-X-12, 100~200 mesh の resin を用いてカラムクロマトグラムを pH 4.1, 4.5, 6.3, 9.3, 11.3 の条件で腎不全の血清(尿)を流して分離液を坂口試薬, diacetyl 試薬, Jaffe 試薬, および ninhydrin 試薬で検体をそれぞれ呈色した結果, pH の低い順にクレアチン, GAA, クレアチニン, 不明の坂口陽性物質, アルギニンの検出をみたが, この不明の坂口反応物質が Natelson らによって GSA であることが証明されていらい, GSA に対する腎不全例との関連がさまざまな見地から検討されるようになってきた。著者も長期腎不全血清から GAA, アルギニン, GSA の3物質を坂口反応陽性物質として検出した。濾紙電気泳動法も著者は試みたが, GSA, GAA の鑑別については Stein らの報告のごとき満足すべき結果は得られなかった。この理由について濾紙電気泳動法が20時間を要し, しかも電圧が 4.5 V/cm の低電圧であるため拡散現象が起こり, Irrverre<sup>13)</sup> の用いた坂口改良試薬のスプレーでも検出は困難であると考えられた。Stein らも本法によって 5 µg 微量の GAA, GSA の検出が可能なことを記載しているが, その結果についての報告はない。この点著者の技術的な欠点に起因するか否かは不明であるが, 著者は高電圧で, 短時間の処理がこれらの物質には好適であると考えているがさらに検討を加えたい。

(c) 長期透析症例における GSA, GAA, アルギニン, および MG の血清レベルについて

慢性長期血液透析症例における GAA, GSA の血清レベルは透析によって透析前, 正常人に比していずれも高値を示したが透析後は低下することが証明された。とくに Yatzidis 法によって測定したグアニジン誘導体は透析前クレアチニン, BUN, 尿酸の順に相関を

有した。このことはグアニジン誘導体が BUN, クレアチニンなどと同様高窒素血症のひとつの指標たりうることを示すものと考えるが測定法にさらに敏感になされる方法がくふうされなければならないこともこんどの課題であろう。とくにクレアチニンと相関性が高い理由としてクレアチニンは筋肉のクレアチンより生じ, 産生量もほぼ一定であるため外因性の因子の影響をうけがたいことを Dossetor<sup>70)</sup> はあげているが, MacFate<sup>71)</sup> がグアニジンをイヌに負荷すると筋組織と血中におけるクレアチニンとグアニジン誘導体が増加すると述べ, また古川<sup>72)</sup>はクレアチンがアルギニン, グリシン, およびメチオニンの3つのアミノ酸よりつくられ, 生成されたクレアチンはリン酸クレアチンと平衡をもっており creatine phosphokinase (CPK) によって触媒され, クレアチンよりクレアチニンが生成されると述べている。Van Pilsum ら<sup>46)</sup>はグリシンとアルギニンにtransamidaseが働き, GAA を合成すること, さらにリン酸クレアチンに GAA が作用してクレアチンを生じ, このクレアチンに o-nitrobenzaldehyde が作用して蓚酸メチルグアニジンを生じ, これが加水分解によって MG と蓚酸を生成するため (Fig. 27), クレアチンがクレアチニン合成, GAA, MG に関与していることを推定しているがクレアチニンとグアニジン誘導体の相関性もよく示したものととして注目される。

カラムクロマトグラムについての著者の症例は, Dobbstein<sup>73)</sup>, Stein<sup>18)</sup>, Cohen<sup>75)</sup> らの報告と異なり, 透析前 GAA の血清レベルが全症例において, GSA の血清レベルより高値を示した。この成績の解釈については腎不全時には, 当然クレアチン, クレアチニンの前駆物質である GAA が高く含まれているが,



Mechanism of conversion of creatinine to methylguanidine

Fig. 27. メチルグアニジンの生成過程の推定

Cohen の説<sup>7)</sup>のごとく GAA の血清レベルが高いため、enzyme retroinhibition によるアルギニンからの GAA の生成が抑制され、アルギニンのアミド基がグリシンよりもアスパラギン酸に移りやすくなるため、オルニチンや GSA の生成を増加せしめると同時に GAA はメチオニンによるメチル基が与えられてクレアチニンへ転換されるとしているが、このメチオニンの影響が、はたして長期腎不全透析症例にどの程度のものかがこの GAA の増減の説明の焦点となる。著者は腎におけるメチオニンおよび ATP の活性が腎不全時には低下するために GAA の血中濃度が高くなりうると考えたい（このメチオニンの活性については、メチオニンがアデノシルメチオニンに移行するかいかなお研究の余地があろう。著者はメチオニンの透析前後の血中レベルを測定したが、透析前後でほとんど変化なく正常人よりやや低値を示す程度であったことからメチオニンの活性化より、間接的に ATP アデノシルメチオニンおよび ATP の低下によって、GAA の血清レベルが高値を示したと推論したい）。

このほか GSA にかんする Cohen<sup>7)</sup>の説として注目すべき点をあげるなら、アルギニンの前駆物質であるアスパラギン酸、チトルリンなどを大量に与えると動物で GSA の排泄は増加しえないこと、アルギニン生成過程でのオルニチンサイクルの先天性酵素活性欠乏によっておこる先天性アミノ酸代謝異常病のうち、高アンモニア血症、オルニチン血症、チトルリン血症、アルギニンコハク酸尿症はいずれも GSA の尿中排泄が少ないこと、またオルニチンサイクルが肝臓でおこなわれ、GSA が肝で生成される証拠として、肝障害を合併した腎不全患者には、GSA の血中レベルは必ずしも高くないことを指摘しているが、長期透析症例についてもこれらの見解が適応されうるか、なお検索の余地があるものとする。

Dobbelstein は BUN と GSA の相関関係  $r=0.86$  と報告し、クレアチニンとの相関関係はなかったと述べている。著者の成績では、BUN と GSA の相関関係はみとめなかったが、尿酸との相関関係で  $GSA\ r=0.42$  を示した。とくにクレアチニンと GAA の相関性は  $r=0.78$  とかなりの相関性を示した。GAA とクレアチニンについては前述の推論である程度説明することは可能であるが、尿酸と GSA, GAA との相関については尿酸自体の日内変動も、ばらつきもあり、また体蛋白の異化が促進されて上昇するため BUN, クレアチニンほど高窒素血症の指標として必ずしも適切ではない。しかし腎不全時における含窒素成分上昇に先行すると主張している大野らの説<sup>6)</sup>とグアニジン

が前述の Andes ら<sup>46)</sup>の腎不全初期にまず上昇するという説を採用するなら、血液透析によって高窒素血症が是正され、BUN の透析前の平均値が  $76.4 \pm 16.7$  mg/dl 程度にコントロールされている現状では、この相関性も Olsen および Basset<sup>28)</sup> の分類では尿毒症症状の軽症群にはいり、いちがいに否定しうるものではなく、血液透析という因子が一つの要素となったため成立した相関と考えられなくもない。

アルギニンは腎不全末期にはグリシン、プロリンなどと同様に血中濃度は上昇するという Murphy ら<sup>77)</sup>の説がある。著者の例では透析前値は血清レベルはいずれも正常域にあり、透析後 2 例を除いては減少傾向を示した。

著者の症例はいずれも 6 カ月以上の血液透析をうけている末期腎不全の症例を対象としているため、透析をおこなわなかった場合、高窒素血症は亢進し、いわゆる末期尿毒症の病像を本来ならば呈するわけであるが、頻回の血液透析のために透析前の平均 BUN は 80 mg/dl 以下に維持され、高窒素血症の index は一般によい状態にコントロールされ、電解質のアンバランスも是正され、社会復帰が可能な状態を維持している。したがって透析によって修飾された病像は生化学データを中心に解析するなら、むしろ腎不全の初期に該当しうるものであろう。反面、人工透析による治療は cuprophane 膜をかいしてのみの是正であるために、たとえば腎によるホルモンの生成や erythropoietin による赤血球形成調節などの生体内の homeostasis の状態を維持する総合的な役割は演じていない。このことはあくまでも血液透析が腎臓にかわる役割を果たしているわけではなく、膜のみでは、生体調節を果しえない多くの問題点が存在することを意味する。したがって透析可能な物質にのみ論点をしぼることは、腎不全の病態の一部を説明しているにすぎないわけで、血液透析によって腎不全の病態の全ぼうを論ずることは不可能であることはいうまでもない。

同時に dialyzer の種類、対象とした症例の透析期間などを考慮に入れないかぎり、腎不全の病態比較論はあまり意味のあるものとはいえないと考える。この点、著者は血液透析の限界を前提として、長期透析例を論ずるべきであると考えると同時に、非透析群と明らかに病像の解明は区別されるべきものであることを強調したい。かかる観点にたつなら、当然 Dobbelstein の Urtra-Flo-100 による透析の結果と Kiil 型の dialyzer によって長期透析をおこなっている著者の例と成績は異なってもなんら矛盾点はないと考える。また Babb ら<sup>78)</sup>によれば分子量によって、透析率は変

化することを検討しているが、低分子のものほど透析率はよく、高分子になるほど透析率が減少することを記載しているが、その透析効果について低分子のものは、Kiil 型人工腎においては、血流速度、透析速度はあまり影響しないが、高分子のものについては 0.35 sq. meter dialyzer のみが透析率を良好にすることを述べている。たとえば尿素の分子量は60.1、クレアチニン、尿酸の分子量はそれぞれ113.1、168.1であり、GAA は117.0、GSA は175.0である。

dialysance は Kiil 型人工腎の場合、 $D=a\left(1-\frac{R}{A}\right)$  という式であらわされる。

ここに  $a$ =血流速度

$A$ =dialyzer にはいる前の

各物質の血清レベル (mg/dl)

$R$ =dialyzer を出たときの

各物質の血清レベル (mg/dl)

であるが、血流量を一定と考えると除去率 ( $D$ ) は次式によって測定される。

$$D=1-\frac{R}{A} \text{ (ml/min)}$$

この式によって著者の症例の各物質の8時間後の除去率を求めると

BUN=0.47 (ml/min)

クレアチニン=0.47 (ml/min)

尿酸=0.54 (ml/min)

GSA=0.51 (ml/min)

GAA=0.53 (ml/min)

となり、尿酸と GSA、および GAA の除去率がほぼ近似した値を示した。この関係は、Babb の dialysance とほぼ同一の傾向を示し、尿酸と GSA、GAA の相関関係がみとめられるひとつの裏づけとなりえよう (しかし人工的に頻回に血液透析をくりかえしてい

る長期透析例においては、透析条件、透析回数、透析機種などの相違があり、前述のごときいわゆる高窒素血症の指標となる各物質の相関関係が非透析例のごとく尿毒症の状態をそのまま反映した指標とは考えがたい)。Giovanetti は MG の重要性を強調していることは再三説明したが、著者は1971年、Stein<sup>79)</sup> のおこなった方法に準じて、イオン交換樹脂 CG-50、100~200 mesh のものを用いて測定を試みた。長期透析患者の血清 2 ml を流したのち、0.2N カ性ソーダ 75 ml を流して、fraction collector で 5 ml ずつ採取し、前述の坂口反応を試みた結果、試験管番号 2~7、および 20~25 にそれぞれピークをみとめたが、メチルグアニジンは 1 N のカ性ソーダの領域に検出されたが、定量した結果 5 例の平均は 0.2 mg/dl 前後で正常群とほとんど差を示さなかった (Fig. 28)。この結果は Stein らの報告と一致し、Menichini ら<sup>80)</sup> も同様の結果を得ている。しかしかれらによると尿中には正常例よりはるかに大量の MG を検出した結果をえていることから血清中の MG の濃度が低い成績については検出法に問題があることもじゅうぶん考えられ、MG に対する慎重な検索を必要としよう。

(d) グアニジン誘導体の血小板におよぼす影響について

慢性腎不全末期において、高度の腎障害をともない尿毒症症状の強い高窒素血症例に、出血傾向が発現した報告は Riesman<sup>81)</sup> のほか数多くの人によってなされてきたが<sup>82~88,101)</sup>、その発現機序に関しては決定的な定説を得るに至っていない。著者は京大第一内科、安永幸二郎講師の指導を得て、長期透析症例の血小板、凝固線溶能について13例につき検討を加えた結果 Table 19 のごとき成績を得た。著者の透析症例を中心に非透析の尿毒症例の出血傾向について比較検討を

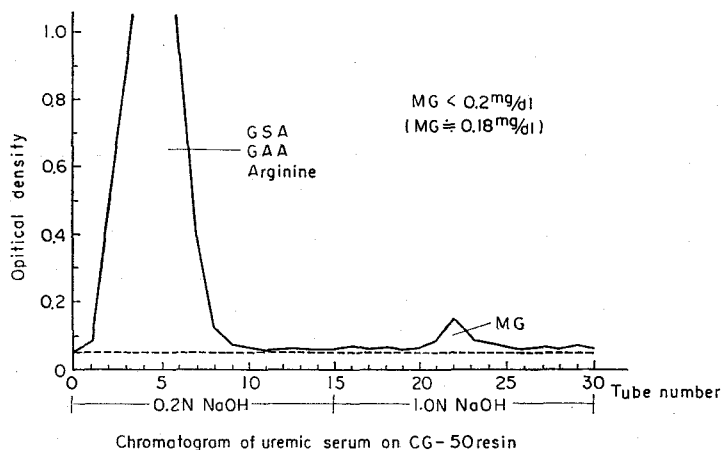


Fig. 28. カラムクロマトグラムによるメチルグアニジンの測定値

Table 19-1. 長期透析例における止血，凝固，線溶系の測定値（透析前）—その1

| 症 例       | 尿量          | 血 圧     | 透析回数<br>W | Ht<br>(%) | 血 小<br>板<br>( $\times 10^4$<br>/cm) | 血餅<br>退縮<br>(%) | プロト<br>ロンビ<br>ン消費<br>(sec) | 血小<br>板第3<br>因子能<br>Stypven<br>時 間<br>(sec) | ADP<br>Stypven<br>時 間<br>(%) | 血小<br>板<br>粘着能<br>(%) | T E G             |            |            |           |
|-----------|-------------|---------|-----------|-----------|-------------------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------|------------|------------|-----------|
|           |             |         |           |           |                                     |                 |                            |                                             |                              |                       | $\gamma$<br>(min) | K<br>(min) | ma<br>(mm) | me<br>(%) |
| K. S. 54M | 0           | 170/ 90 | 3         | 26        | 10.5                                | 73              | 33.1                       | 13.8                                        | 34.3                         | 28.6                  | 16.0              | 6.8        | 68         | 213       |
| S. Y. 30M | 0           | 160/120 | 3         | 19        | 16.2                                | 75              | 36.8                       | 16.1                                        | 36.9                         | 21.6                  | 18.0              | 5.0        | 70         | 233       |
| M. U. 32M | 500         | 130/ 90 | 2         | 20        | 10.5                                | 91              | 35.5                       | 13.7                                        | 31.1                         | 25.7                  | 12.5              | 4.0        | 60         | 150       |
| T. O. 59M | 1000        | 100/ 68 | 1         | 20        | 10.9                                | 80              | 48.9                       | 15.9                                        | 38.7                         | 77.1                  | 17.5              | 6.0        | 78         | 355       |
| N. N. 54M | 1000        | 150/110 | 1         | 16        | 9.2                                 | 67              | 37.0                       | 28.1                                        | 45.0                         | 4.3                   | 7.0               | 2.5        | 72         | 257       |
| M. Y. 33M | 0           | 180/110 | 3         | 16        | 12.9                                | 57.1            | 24.5                       | 20.3                                        | 43.4                         | 34.9                  | 20.0              | 4.0        | 74         | 285       |
| N. K. 31M | 0           | 190/120 | 3         | 12        | 9.4                                 | 66              | 26.2                       | 22.9                                        | 42.6                         | 37.2                  | 14.5              | 4.0        | 67         | 203       |
| A. H. 38M | 1500        | 120/ 60 | 2         | 21        | 15.3                                | 43              | 34.1                       | 15.3                                        | 35.8                         | 17.6                  | 12.5              | 3.5        | 69         | 223       |
| I. A. 45M | 300~<br>500 | 138/ 86 | 3         | 14        | 9.9                                 | 70              | 15.1                       | 16.7                                        | 36.7                         | 20.3                  | 15.0              | 3.0        | 81         | 426       |
| S. H. 33M | 0           | 132/ 80 | 3         | 14        | 26.4                                | 63              | 32.2                       | 13.0                                        | 30.1                         | 29.5                  | 13.5              | 3.5        | 74         | 285       |
| T. S. 27M | 1000        | 140/ 80 | 2         | 15        | 16.7                                | 42              | 37.1                       | 15.0                                        | 36.6                         | 24.0                  | 14.5              | 3.5        | 75         | 300       |
| I. I. 30M | 0           | 160/ 90 | 3         | 18        | 6.5                                 | 83              | 29.0                       | 24.9                                        | 48.0                         | 27.7                  | 13.5              | 3.0        | 63         | 170       |
| H. Y. 32M | 0           | 160/110 | 3         | 22        | 10.2                                | 85              | 23.7                       | 20.6                                        | 43.4                         | 4.9                   | 15.0              | 4.0        | 60         | 150       |
| mean      |             |         |           | 17.9      | 12.7                                | 68.9            | 31.8                       | 18.2                                        | 38.7                         | 27.2                  | 14.6              | 4.1        | 70.1       | 250.0     |

Table 19-2. 長期透析例における止血，凝固，線溶系の測定値（透析前）—その2

| 血 小 板 凝 集 |      |       |       |       |       | 出血時間<br>(min) | 凝固時間<br>(min) | プロトロン<br>ビン時<br>間<br>(sec) | 活性化部<br>分<br>トロンボ<br>プラスチ<br>ン時間<br>(sec) | ヘパリン<br>抵 抗<br>(%) | フィブリ<br>ノーゲン<br>(mg/dl) | ユーグレ<br>ン溶<br>解 時 間<br>(hrs) |
|-----------|------|-------|-------|-------|-------|---------------|---------------|----------------------------|-------------------------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------------|
| A D P     |      |       | コラーゲン |       |       |               |               |                            |                                           |                    |                         |                              |
| 1min      | 3min | 10min | 1min  | 3min  | 10min |               |               |                            |                                           |                    |                         |                              |
| 34.0      | 62.2 | 73.4  | 48.4  | 98.1  | 100.0 | 3             | 11            | 14.9                       | 33.3                                      | 84.6               | 422                     | 11                           |
| 41.5      | 64.0 | 69.9  | 13.5  | 100.0 | 100.0 | 2 1/2         | 11 1/2        | 15.9                       | 47.7                                      | 78.1               | 307                     | —                            |
| 38.1      | 56.5 | 48.8  | 31.9  | 57.8  | 68.1  | 4             | 9 1/2         | 17.2                       | 45.8                                      | 32.9               | 165                     | —                            |
| 29.5      | 61.1 | 70.5  | 30.6  | 62.6  | 74.8  | 2 1/2         | 12 1/2        | 23.4                       | 47.7                                      | 95.8               | 407                     | —                            |
| 25.4      | 30.5 | 28.4  | 6.7   | 30.3  | 68.5  | 3             | 12            | 19.2                       | 35.3                                      | 92.6               | 440                     | 8                            |
| 50.0      | 92.7 | 100.0 | 28.0  | 70.7  | 85.4  | 18            | 12 1/2        | 16.1                       | 44.2                                      | 88.0               | 274                     | 13                           |
| 25.5      | 18.5 | 7.0   | 15.2  | 60.3  | 72.2  | 3             | 9 1/2         | 16.4                       | 36.0                                      | 66.7               | 348                     | 18                           |
| 45.1      | 67.7 | 75.6  | 49.6  | 64.5  | 100.0 | 2 1/2         | 8 1/2         | 15.8                       | 31.9                                      | 92.0               | 274                     | 19                           |
| 31.4      | 20.9 | 8.1   | 26.4  | 80.6  | 93.8  | 2 1/2         | 9 1/2         | 13.9                       | 38.1                                      | 115.8              | 516                     | 15                           |
| 41.9      | 81.7 | 82.9  | 38.5  | 96.2  | 100.0 | 7 1/2         | 13            | 16.1                       | 39.9                                      | 110.0              | 313                     | 14                           |
| 30.8      | 55.6 | 62.6  | 15.8  | 51.7  | 60.0  | 7             | 9 1/2         | 15.4                       | 38.3                                      | 74.2               | 333                     | 17                           |
| 12.9      | 18.2 | 10.0  | 3.3   | 6.6   | 18.4  | 4             | 15            | 19.4                       | 42.1                                      | 91.2               | 289                     | —                            |
| 33.5      | 39.9 | 18.0  | 1.0   | 59.9  | 90.6  | 2             | 9 1/2         | 17.1                       | 35.2                                      | 62.0               | 168                     | —                            |
| 33.8      | 51.5 | 50.4  | 23.8  | 64.6  | 79.4  | 4.7           | 9.3           | 17.0                       | 39.7                                      | 83.4               | 327.4                   | —                            |

加えてみた。

同時施行の凝固線溶能に関する成績についてはさらに検討を加えて別の機会に報告する予定であり，本研究においては血小板機能を中心に考察することにした。出血性素因の原因は大別して血管，凝固および血小板の異常に分けられるが，そのうち血小板の異常は，その量的，質的異常が問題となる。尿毒症における血小板の量的異常については Kuhlback<sup>85)</sup>，O'Grady<sup>86)</sup>，水川<sup>91)</sup>，広瀬<sup>92)</sup>，加々美ら<sup>93)</sup>，安部<sup>94)</sup>，板倉<sup>97)</sup>らが指

摘している。いっぽう，Lewis<sup>83)</sup>，Gross<sup>85)</sup>らは血小板の減少はあるとしても軽度であるか正常であるとして，質的異常に重点をあげている。著者の場合も6例に10万程度の減少例をみたが，他はいずれも10万以上，もしくは正常であった (Fig. 29)。つまり骨髓における血小板生成は抑制されないか，抑制されているとしても軽度であることを意味しているものと考えられる。また骨髓穿刺をおこなった著者の長期透析例では，正常例に比してあまり変化が著明であるものを

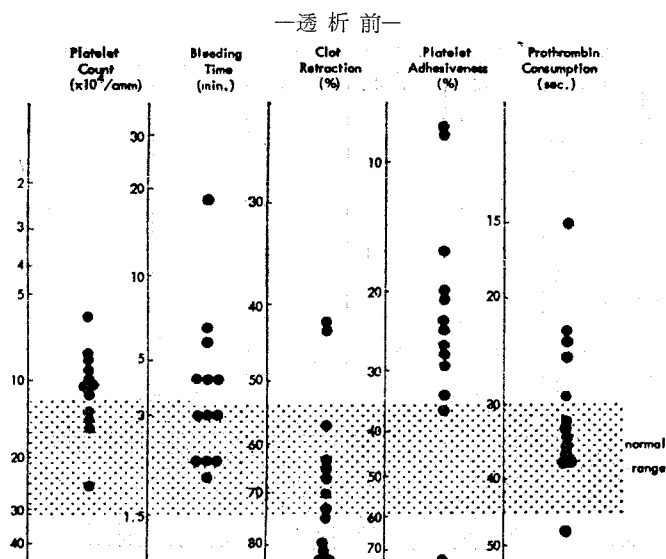


Fig. 29. 血液透析患者の止血, 凝固, 線溶検査成績 (I)

経験していない。血餅退縮率にかんしては広瀬<sup>92)</sup>, 板倉<sup>87)</sup>, 安部<sup>94)</sup>らが軽度の減弱傾向を示すと報告したのに対して Lewis<sup>83)</sup> は正常であるとしたが, 著者の場合 2 例に異常をみとめたにすぎず, あまり血小板数には影響がないことを示唆した。出血時間は延長をみとめたとする広瀬<sup>92)</sup>, 加々美<sup>93)</sup>, 安部<sup>94)</sup>, 板倉<sup>87)</sup>らの報告と, 正常とする Lewis<sup>83)</sup>, Kuhlback<sup>85)</sup> らの報告がある。著者の症例では著明な出血傾向をみたものは 3 例であったが, いずれも BUN は 100 mg/dl と高値を示した。

血小板の質的異常として Salzman ら<sup>90)</sup> は, 血小板の粘着能低下を強調しているが, 著者の成績でも 1 例を除いてほとんどが減少傾向を示した。そのほかプロトロンビン消費の異常については, Larrai<sup>96)</sup>, Rath<sup>97)</sup> ら, Ekonoyan<sup>98)</sup> らの報告があり, 著者の症例においても 13 例中 5 例の異常をみとめている。そのほかトロンビン時間<sup>99)</sup>, トロンボプラスチン形成試験<sup>100)</sup> などの異常をみとめた報告もある。著者の透析症例では, 活性化部分トロンボプラスチン時間に 13 例中 9 例の異常をみ, またプロトロンビン時間は 13 例中 5 例に異常をみとめたが, 全血凝固時間は全例正常値を示した (Fig. 30)。

さらに尿毒症の血小板機能異常所見のうちもっとも重要な因子として血小板粘着能とともに PF 3a および血小板凝集能があげられる。PF 3a の異常を最初に指摘したのは 1956 年 Lewis<sup>83)</sup> であったが, そのご Rath<sup>97)</sup>, Cahalane<sup>102)</sup> ら, Castaldi<sup>103)</sup> ら, Horowitz ら, Rabiner ら<sup>104)</sup> によって研究が進められ uremic toxins と PF 3a の関連が注目されるようになってき

た。とくに 1970 年 Horowitz ら<sup>105)</sup> らが GSA の PF 3a 抑制効果, 血小板凝集能に対する研究を発表して以来, GSA の PF 3a に対する影響が検討されるようになってきた。そのほか Prage<sup>106)</sup> らは MG が血小板機能障害を有することをもとめ, uremic toxins と uremic bleeding の関連が指摘されるようになってきた。血小板凝集能に対する uremic toxins の影響を *in vitro*, および *in vivo* で検討する実験も諸家によっておこなわれるようになってきた。とくに各種グアニジン誘導体を *in vitro* で血小板に作用させ, ADP による血小板凝集能について検索し, 1,4-diguanidinodiphenylsulfone (DGPS) がもっとも強力な障害物質であることが確認された<sup>108)</sup>。Rabiner および Molinas<sup>107)</sup> は *in vitro* でフェノール, parahydroxyl, phenacetic acid を PRP に作用させて PF 3a の異常をみとめ, *p*-hydroxyphenyl acetic acid の濃度がフェニール酸, フェノール, フェノール酸の腎不全時における血小板凝集能障害を起こす程度の濃度で PRP 凝集能異常が起こることをみとめ, 18 例の腎不全症例でフェノールと PF 3a の相関性を検索し, その相関性はみとめなかったが, フェノール酸には PF 3a 障害に相関性があったことを報告すると同時に, フェノールもフェノール酸も透析可能物質であるために透析によって血小板凝集能, PF 3a が改善することをみとめた。これらのことは Horowitz ら<sup>105)</sup> の透析による GSA の低下, PF 3a の改善と一致する成績であった。しかし Horowitz は *in vitro* で GSA, アセチルサリチル酸 (ASA) を作用させると PF 3a, および血小板凝集能に異常をおこすが, GAA, 尿素, クレアチニン

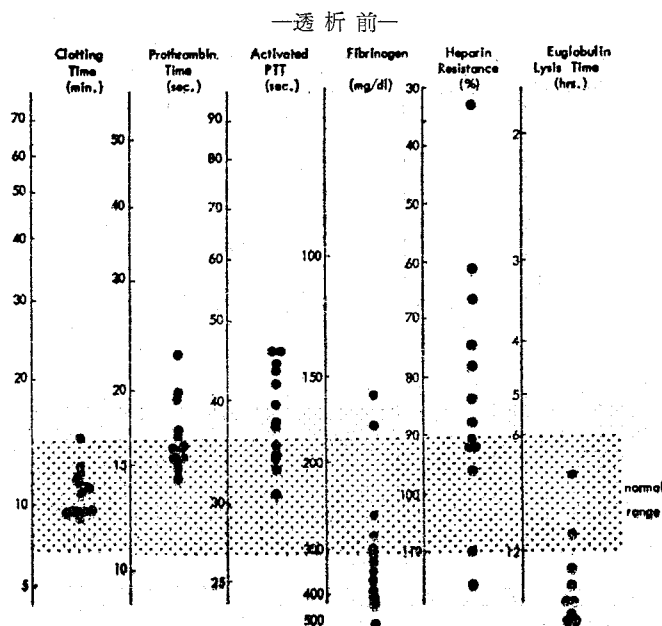


Fig. 30. 血液透析患者の止血，凝固，線溶検査成績（Ⅱ）

には抑制効果がないことをみとめている。さらにGSAは血小板の dense tubular system に働いて、ADP放出障害をおこすために凝集能低下を招来すること、GSAの血清レベルが高いほどこの異常性が亢進してuremic bleedingの原因となることを推論した。

著者はこれら諸家の報告を確認する目的で長期透析患者のGSA, GAAとPF 3aの相関性を検討し、GSA  $r=0.86$ , GAA  $r=0.66$  といずれも高い相関性をみとめ、GAAとの相関性を確認し、Horowitzの報告と一部相反した成績を得た。これをさらに *in vitro* において検索したが、PF 3aの抑制効果に関しては、MG, GSA, GAA いずれもADP-Stypven時間に抑制効果を示すこと、カオリン Stypven 時間にはあまり影響のないことをみとめると同時に、ADP凝集能、およびADP放出に対しては、前記のMG, GSA, GAAはもちろん、他のtoxinたとえばクレアチニン、尿素にもその効果があることを確認した。Horo-

witzと自験例との相違はTable 20に示した。また著者の症例でADP添加による血小板凝集能は、透析前値は13例中10例が異常を示していた (Fig. 31)。さらに透析前後で血小板関係について比較しえた著者の5症例の平均では、血小板関係ではADP-Stypven時間、カオリン Stypven 時間、プロトロンビン消費時間などが透析前後でADP凝集能を除いて改善がみとめられた (Fig. 32)。さらに透析前の自験例15例の値と比較すると改善の傾向は明白であった。

HorowitzおよびPapayanon<sup>108)</sup>はPF 3aとBUNの相関性を否定し、PRPに尿素50, 100 mg/dl添加によってもPF 3a低下をみとめなかったこと、GAA, アルギニン, GSA, を *in vitro* で添加してADP-Stypven時間を測定し、GSAのみが抑制効果を示したが、 $Ca^{++}$ を負荷した場合PF 3a抑制効果の起こらなかったことを述べている。

血小板障害に血小板のADP放出障害が重要な関連を有することはよく知られており、ATPならびにATP-ase活性の障害がおこれば当然PF 3a, 血小板凝集能異常を示すことが考えられる。

Rajagopalanら<sup>109)</sup>は、xanthine oxidaseの活性を尿素の0.2Mで阻害したのに対して、グアニジンが0.006Mで同一の酵素活性化を阻害することを述べ、グアニジンが尿素よりも阻害作用が強く、たとえば1-6-diphosphatase, alkaline phosphatase, peroxidaseおよびcytochrome oxidaseにたいしても同様の活性阻害が起こると報告した。このことはグアニジンが

Table 20. Horowitzと著者との相異点

| Toxin      | Increased in uremia | Platelet Aggregation | PF 3a (ADP) |
|------------|---------------------|----------------------|-------------|
| Urea       | +                   | ± (+)                | - (+)       |
| Creatinine | +                   | - (+)                | - (±)       |
| MG         | +                   | - (+)                | - (+)       |
| GSA        | +                   | +                    | +           |
| GAA        | NT (+)              | NT (+)               | NT (+)      |

( ) は自験例を示す

NT: 検索をおこなっていないことを示す

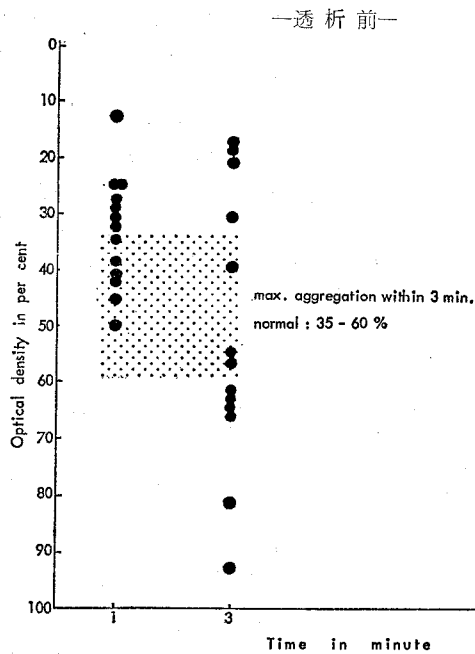


Fig. 31. 血液透析患者の血小板凝集 (ADP 添加)

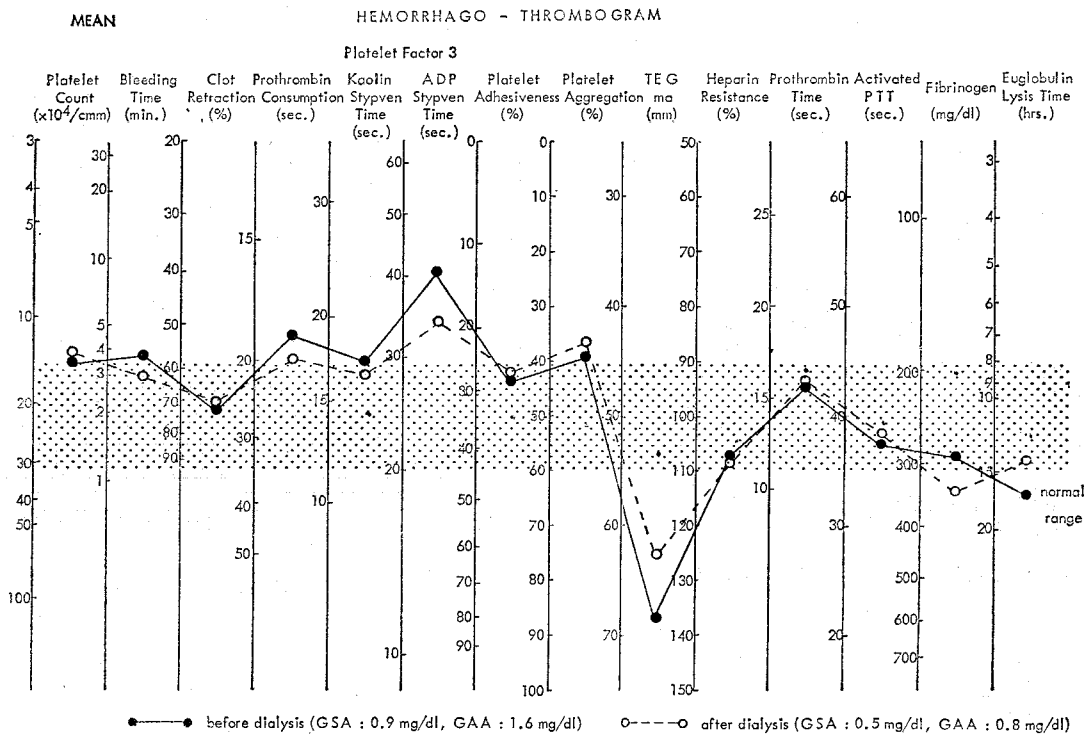


Fig. 32. 透析前後における止血、凝固線溶能の変化 (5例の平均)

酵素活性に強く働くことを示唆しているものといえよう。

Jeruschalurg<sup>110)</sup> は血小板の ADP 凝集能に対して

は、DGPS がもっとも強力な抑制作用をもち、GSA が酸化性リン酸化 (oxidative phosphorylation) を阻害するために ADP 凝集能の抑制が起こることを主

張している。したがって Horowitz らの主張するとく、生体内で GSA のみが特異的に血小板の ADP 凝集に阻害的に作用することの見解はただちには肯定しがたいものがある。

著者が追跡しえた腎不全症例は、透析後 ADP 凝集能、PF 3a (ADP-Stypven 時間) が透析後改善されると同時に GSA, GAA の血清レベルも低下していることから、これらの物質が関与していると断定してもまちがいないものと考え、Ekonoian<sup>98)</sup> は尿素の関与を示唆し、Rabiner<sup>107)</sup> は既述のごとくフェノール、フェノール誘導体をあげているが、著者は GSA 以外の uremic toxins も複合的に血小板機能異常に関与する見解をとりたいと思う。なおカオリン Stypven 時間において ADP-Stypven 時間ほどの uremic toxins の影響がみられないのは血小板から PF 3a を放出させる機序にカオリンと ADP では若干の差異があり、カオリンのほうは放出作用が強力なために PF 3a 放出の微妙な差異を表現するには適当でないものと考えられる。腎不全と血小板機能異常についての報告としては、このほか1968年には高マグネシウム血症が血小板の自然凝集の障害を起し、この原因は ADP の凝集能阻害によるものと推定した報告があり<sup>111)</sup> また Kamoun ら (1970)<sup>112)</sup> は腎不全時における血小板のセロトニン摂取量不足が凝固障害に重要な役割を演ずる可能性を指摘している。そのほか未知の透析可能物質を示唆した報告<sup>104)</sup>や、既述外の uremic toxins<sup>107)</sup>

をあげているものもある (Table 21)。

そしてその機序としては、uremic toxins の増加にともなう、血小板 ATP 代謝において ATP-ase の活性、ATP 酸化性リン酸代謝の抑制がおり、それにともなう糖消費能、血小板生成抑制などをきたすものと考えられる。著者の実験成績と上述の諸家の報告から、uremic toxin が ADP 放出ないし ADP の作用そのものに阻害的にはたらくことが推論されてよいものと思われる。

#### (e) 溶血にかんする影響

長期腎不全透析症例における溶血については、まず dialyzer による物理的因子によって透析後の溶血率が亢進する懸念が考えられる。しかし Hyde および Sadler<sup>128)</sup> は血球の破壊は twin coil 型 dialyzer に hemolysis index ( $0.765 \pm 0.296$ ) の成績を示したが、Kiil 型 dialyzer は ( $0.204 \pm 0.147$ ) であるため、Kiil 型 dialyzer では物理的因子の影響は比較的すくない。

したがって以下 dialyzer の物理的因子を除外して考察を加える。著者はこれらの長期透析患者に対する溶血を検討する目的で、過酸化水素溶血 (hydrogen peroxide hemolysis) 試験法で測定をおこなった結果、透析症例はいずれも溶血が亢進していることが判明した。この溶血機序は Horowitz<sup>113)</sup> はか多数の報告があり<sup>125, 126)</sup>、赤血球膜のリン脂質中の不飽和脂肪酸が過酸化の状態となるため、脆弱化した赤血球を  $H_2O_2$  が傷害するために起こるものと解釈されている。しかし溶血の詳細な機序についてはなお不明な点も多く、赤血球中の脂酸構成の変化、SH (sulfhydryl compounds) の防御機序関与が推定される。赤血球の脂酸構成のうち、phosphatidylethanolamine の選択的減少がみられ  $H_2O_2$  溶血は赤血球膜の脂肪酸の変化と SH の役割が重要である。とくに SH は  $H_2O_2$  の障害をさけるために、つぎのごとき防御機構を示すという<sup>129-132)</sup>。すなわち赤血球の catalase による水と酸素の分解であり、他のひとつは還元グルタチオン (GSH) が GSH peroxidase による酸化グルタチオン (GSSG) に変化する機序である ( $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$ )。この GSSG は glutathione reductase により、ふたたび GSH に還元されて reversible にこの防御機序を維持している。溶血の場合はおもに後者が関係するが、このような SH による防御機構が不飽和脂肪酸の過酸化と密接な関係を有している。著者が溶血率の測定において過酸化水素溶血試験を用いた理由は長期透析患者の血清ビタミンEのレベルが正常に比して、かなりの低下を示しているためで、前述のビタミンE欠乏によ

Table 21. 尿毒症の血小板機能に対する病理的因子の文獻的考察

|                                                                                       |                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Urea                                                                                  | Hellem et al. 1964<br>Fantl 1966<br>Somer et al. 1968<br>Ekonoian et al. 1969 |
| Guanidinosuccinic acid (GSA)                                                          | Horowitz et al. 1967                                                          |
| Magnesium                                                                             | Davies et al. 1968                                                            |
| Phenol & Phenolic compounds                                                           | Rabiner & Molinas 1970                                                        |
| other uremic toxins or substances                                                     | Salzman & Neri 1966                                                           |
| separate or combined effects of a chemical change and the altered osmolar environment | Castaldi et al. 1966<br>Stewart & Castaldi 1967                               |
| unknown dialysable substances                                                         | Kaulla et al. 1966<br>Stewart & Castaldi 1967<br>Rabiner & Hrodek 1968        |
| Serotonin ?                                                                           | Kamoun et al. 1970                                                            |

る赤血球膜の不飽和脂肪酸で過酸化され、同時に SH の破壊が増加する環境下におかれるために当然溶血率が亢進することを予想したためである。また 1965 年 Giovanetti ら<sup>114)</sup> は Selwyn および Dacie の方法<sup>115)</sup> を用いて *in vitro* における尿毒症患者の 24 時間、48 時間のそれぞれの溶血率を検査して、48 時間のほうが溶血率の亢進をみとめた。また GSA, GAA などのグアニジン誘導体を添加すると濃度に比例して溶血率の亢進することを報告している。これらの赤血球膜構成成分に変化をおよぼして赤血球をこわし赤血球寿命が短縮するわけであるが、これらの因子として、つぎのものが考えられる (Fig. 33)<sup>116~119)</sup>。

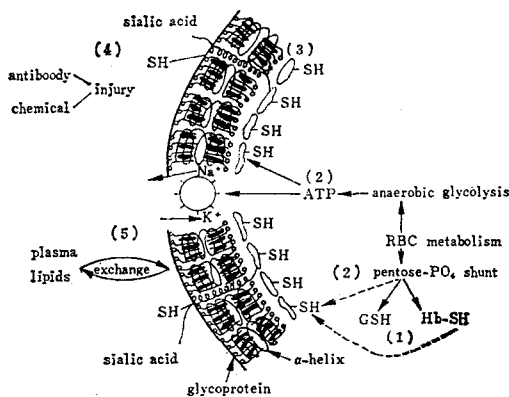


Fig. 33. 赤血球膜の構造のモデルと溶血に導く因子 (宮地<sup>119)</sup>による)

1) 赤血球膜の SH 基の活動を阻害し、溶血をひき起こすものとして、ヘモグロビン異常やリン酸回路、とくにブドウ糖リン酸脱水酵素欠乏やグルタチオン還元酵素欠乏症。

2) 赤血球膜に存在する酵素の欠如

3) 赤血球の Na<sup>+</sup> や K<sup>+</sup> の通過膜の透過性を維持するに必要な ATP 供給変化

4) 赤血球膜の表面における糖質の toxin や抗体の変化

5) 赤血球中の脂質組成の変化

この 5 つの因子のどれかが単独原因として腎不全症例が溶血率亢進を示したものと考えるが、著者は長期腎不全時はこれらの因子が複合的に関与して腎不全の溶血を示したものと推測したい。とくに Na-K に関与する ATP-ase の酵素障害は重要で、Giovanetti ら<sup>121)</sup> や相馬<sup>120)</sup> は、血球 K が腎不全時に減少することを報告したが、Giovanetti は血球中の K<sup>+</sup> の減少、また Villam ら<sup>113)</sup> は膜の Na の透過性亢進が溶血を増加せしめると述べている。

著者の成績では、正常群と透析群ではその溶血率亢進度はかなりの差をみとめるが、透析後改善傾向をみることから、赤血球膜におよぼす uremic toxin の影響が著しいものと考えている。この成績は Giovanetti らと一致するもので、とくにグアニジン誘導体では MG がもっとも強く、ついで GSA, GAA の順であり、それぞれ相関性を有することも前述のごとくである。また GSA, GAA が赤血球寿命にもあるていどの相関性を示し、赤血球寿命と溶血率の相関性も、Giovanetti の  $r = -0.698$  ほど高くはなかったが、 $r = -3.1$  という成績を得ている。このほかに、Rees ら<sup>122)</sup>、Loge ら<sup>123)</sup> は尿毒症による溶血因子として尿素をあげ、これを環境因子と考えたが、相関性は得られず、Joske ら<sup>124)</sup> も同様の結論を得ている。Rosen ら<sup>125)</sup> は、血小板粘着能、ADP による血小板凝集能の低下が溶血に平行した症例報告をおこなっている。

著者は Horowitz, 池畑ら、藤井<sup>127)</sup> などの溶血率の測定法に準じ 3 時間 incubate した。溶血亢進例は 2 時間以後はほぼ反応は一定するため、incubation 3 時間による本法によれば溶血率測定にはじゅうぶんだと考えられる (本法による透析前後で溶血率が改善傾向を示したことは uremic toxins がもっとも大きな因子であることを示唆したものと考えられた)。

また著者の検討した症例はいずれも血清ビタミン E が低下していたことから、Jacob ら<sup>133)</sup> の主張している赤血球膜のリン脂質中の phosphatidylethanolamine の減少が著明となり、赤血球膜中の SH は、この脂質の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の過酸化によって生じた毒性を防御するために消費されて膜の脆弱化が起こり、溶血を促進することが考えられる。とくに uremic toxin とビタミン E の血清レベルの低下による影響は、SH および赤血球膜脂質異常をいっそう亢進せしめ、Na, K, ATP に関係する酵素作用を阻害して溶血に影響を与えると同時に、赤血球膜脂質異常が ATP-ase 作用に障害を与えることが推定される。したがって血液透析によってグアニジン誘導体などの uremic toxin の影響はある程度軽減されうるとしても、ビタミン E 欠乏による溶血機序が存在しているために、正常には回復しえないことは当然予想されうるので、ビタミン E 投与によって溶血因子を除去する対策が必要であろう。

## 総 括

6 カ月以上の長期血液透析患者を対象として、血中グアニジン誘導体の測定、その血中濃度、血小板機能および溶血に対するグアニジン誘導体の影響を中心に検討を加えた。その結果

はつぎのごとくであった。

(1) Yatzidis の改良法で長期慢性腎不全患者血清のグアニジン化合物の透析前の値は( $n=32$ )  $0.88 \pm 0.30$  mg/dl であり、透析前のグアニジン誘導体と、クレアチニン、BUN、尿酸との相関関係を検討した結果、相関係数はそれぞれ  $r=0.81, 0.62, 0.49$  でいずれも相関関係を有したが、クレアチニンとの相関度がもっとも高かった。なお Yatzidis 改良法による回収率は  $80 \pm 15\%$  であった。

(2) Yatzidis 改良法におけるグアニジン誘導体の透析後の値は  $0.68 \pm 0.23$  mg/dl で、本物質は透析可能な物質であることが判明した。

(3) カラムクロマトグラムによる慢性長期透析患者血清の坂口反応陽性物質の分画を試みた結果、酢酸グアニジン (GAA)、アルギニン、およびコハク酸グアニジン (GSA) の順にそれぞれの物質を検出した。なおカラムクロマトグラムによる回収率は  $85 \pm 10\%$  であった。対象例の透析前の血清 GAA  $1.79 \pm 0.56$  mg/dl、アルギニン  $1.87 \pm 0.34$  mg/dl および GSA  $0.87 \pm 0.62$  mg/dl で、これを正常人の GAA  $0.26 \pm 0.08$  mg/dl、アルギニン  $1.8 \pm 0.4$  mg/dl、GSA  $0.17 \pm 0.07$  mg/dl と比較するとアルギニンを除いてはいずれも高値を示したが、諸家の報告のごとく GSA が GAA より高い値は示さなかった。また GAA、GSA、アルギニンの透析後のそれぞれの値は  $1.04 \pm 0.37, 0.80 \pm 0.13, 1.58 \pm 0.29$  mg/dl と低下傾向を示した。

(4) 濾紙電気泳動法による GAA、GSA の微量定量は不可能であった。

(5) メチルグアニジン (MG) の長期透析症例の血清レベルについてカラムクロマトグラム法による測定を試みたが、透析例と正常人との差はほとんど認められなかった。

(6) 血小板機能を慢性腎不全長期透析例について検討した結果、血小板粘着能、血小板第3因子能 (PF 3a) および ADP 凝集能にとくに強い障害がみられた。PF 3a については、ADP-Stypven 時間で全例に異常をみとめた。PF 3a のうち ADP-Stypven 時間と血清 GSA、血清 GAA の相関関係がみとめられ、相関係数は GSA  $r=0.86$ , GAA  $r=0.66$  であった。

(7) 透析前後で ADP-Stypven 時間、カオリン Stypven 時間、GSA、GAA の値を追跡したものは5例であった。カオリン Stypven 時間は 18.0 sec から 16.0 sec と若干の改善がみとめられ ADP-Stypven 時間は 41.0 sec から 35.0 sec とかなりの改善がみとめられた。

(8) *in vitro* における uremic toxins とくに GSA、GAA、MG のグアニジン誘導体添加実験ではカオリン Stypven 時間にはあまり影響をみなかったが、ADP-Stypven 時間に延長がみとめられ、最終濃度はグアニジン誘導体で、それぞれ 8 mg/dl でその効果をみとめ、クレアチニン、尿素でも ADP-Stypven 時間でクレアチニン 10 mg/dl、尿素 4 mg/dl でその抑制効果をみとめた。

(9) *in vitro* の ADP による血小板凝集でもグアニジン誘導体はそれぞれ 8 mg/dl で抑制効果をみとめ、クレアチニン 8 mg/dl、尿素 4 mg/dl でその効果を示した。血小板の ADP 放出は、コラーゲンによる血小板の凝集態度から推定したが、GSA、GAA、MG、それぞれ 16 mg/dl でその効果をみとめ、尿素では 16 mg/dl で、はじめてその効果が著明となった。

(10) 溶血率測定については過酸化水素法で測定したが、正常人  $12.1 \pm 5.9\%$  であるのに対して長期透析症例では  $54.8 \pm 19.6\%$  と亢進を示し、さらに透析前  $75.2 \pm 16.4\%$  の溶血率を示したものが、透析8時間後  $5.9 \pm 7.0\%$  まで低下した。慢性長期透析患者における血清ビタミンE値は正常値の50%程度の値を示したが(透析前値  $0.71 \pm 0.30$  mg/dl、透析後値  $0.78 \pm 0.01$  mg/dl)、透析前後でほとんど変化を示さなかった。なお $^{51}\text{Cr}$ による赤血球寿命( $T^{1/2}$ )は平均  $14.4 \pm 3.0$  日と正常に比してかなりの低下をみとめた。

(11) *in vitro* のグアニジン誘導体添加による溶血率の変化測定ではMGがもっとも溶血率が高く、ついで GSA、GAA の順であった。

(12) 長期透析症例の溶血率と GSA、GAA の相関関係は、いずれのグアニジン誘導体についてもみとめられ GSA  $r=0.92$ , GAA  $r=0.79$  で明らかな相関をみとめた。また  $^{51}\text{Cr}$  による赤血球の life span ( $T^{1/2}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$  による溶血率の相関がみられ  $r=-0.31$  さらに life span と

GSA, GAA についても, それぞれ GSA  $r=-0.55$ , GAA  $r=-0.33$  と負の関係がみとめられた。

(13) 尿毒症の臨床症状とグアニジン誘導体との関連についても若干の文献的考察を加えた。

稿を終るにあたり, 終始ご懇篤なるご指導と, ご校閲をたまわった恩師, 加藤篤二教授に深く感謝いたします。また, ご指導, ご鞭撻くださいました沢西謙次講師, 第一内科安永幸二郎講師に深甚な謝意を捧げるとともに, 惜しみなく協力くださいました川村寿一助手はじめ腎不全グループの諸先生, 樋口房子嬢に厚くお礼申しあげます。

なお本論文の内容の要旨は, 第59回, 第60回日本泌尿器科学会総会, 第14回, 第15回日本腎臓学会総会, および第2回西日本腎臓学会で発表した。

## 文 献

- Giovanetti, S. : *Experientia*, **24** : 341, 1968.
- Giovanetti, S. et al. : *Proc. 4th int. Cong. Nephrol. Stockholm*, **2** : 253, 1969.
- Giovanetti, S. et al. : *Clin. Sci.*, **36** : 445, 1969.
- Horowitz, H. I. et al. : *Blood*, **30** : 331, 1967.
- Mason, M. F. et al. : *Arch. Inter. Med.*, **60** : 312, 1937.
- Mayor, R. H. et al. : *Arch. Inter. Med.*, **64** : 988, 1939.
- Cohen, B. D. et al. : *Amer. J. Med.*, **45** : 63, 1968.
- Stein, I. M. et al. : *New. Eng. J. Med.*, **280** : 926, 1969.
- Hicks, J. M. et al. : *Clin. Chiw. Acta.*, **7** : 623, 1962.
- Yatzidis, H. et al. : *Nature*, **24** : 1498, 1966.
- Pfiffner, J. I. & Myers, V. C. : *J. Biol. Chem.*, **87** : 345, 1930.
- Van Pilsum, J. F. : *J. Biol. Chem.*, **222** : 225, 1956.
- Irrverre, F. : *Biochem. Biophys. Acta.*, **111** : 151, 1965.
- Horowitz, H. I. et al. : *Amer. J. Med.*, **49** : 336, 1970.
- Spaet, T. H. & Cintron, J. : *Brit. J. Haemat.*, **11** : 269, 1965.
- Born, G. V. R. : *Nature*, **194** : 927, 1962.
- O'Brien, J. R. : *J. Clin. Path.*, **15** : 464, 1962.
- 安永幸二郎 : *Medzin von Heute*, **41** : 15, 1970.
- Horowitz, M. K. et al. : *Amer. J. Clin. Nutr.*, **4** : 408, 1956.
- 池畑秀夫・ほか : *ビタミン*, **37** : 37, 1968.
- Rindi, G. : *Intern. z. Vitaminoforsch.*, **28** : 225, 1958.
- Abel, J. J. et al. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **5** : 275, 1913.
- Kolff, W. J. et al. : *Acta Med. Scandinav.*, **117** : 121, 1944.
- Scribner, B. H. et al. : *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Org.*, **6** : 88, 1960.
- Skeggs, L. T. et al. : *Science*, **108** : 212, 1948.
- Teschen, P. E. : *Proc. 4th. int. Congr. Nephrol. Stockholm*, **2** : 242, 1969.
- Teschen, P. E. : *Amer. J. Med.*, **48** : 671, 1970.
- Olsen, N. S. & Bassett, J. W. : *Amer. J. Med.*, **10** : 52, 1951.
- Douglas, A. K. et al. : *Arch. Intern. Med.*, **126** : 906, 1970.
- Ludwig, G. D. et al. : *Amer. J. Clin. Nutrition*, **21** : 436, 1968.
- Andes, J. E. et al. : *J. Lab. Clin. Med.*, **22** : 1209, 1937.
- Burms, D. M. : *Biochem. J.*, **23** : 840, 1929.
- Stein, I. M. & Bonas, J. E. : *Amer. J. Med.*, **45** : 63, 1968.
- Foster, N. B. : *Trans. Ass. Amer. Physicians*, **30** : 305, 1915.
- Cohen, B. D. et al. : *Ann. Int. Med.*, **57** : 204, 1962.
- Foster, N. B. : *Harvey Lect.*, **16** : 52, 1920.
- Foster, N. B. : *J. A. M. A.*, **76** : 281, 1921.
- Pfiffner, J. J. & Myers, V. C. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **23** : 830, 1926.
- Pfiffner, J. J. & Myers, V. C. : *J. Biol. Chem.*, **87** : 345, 1930.
- Mayor, R. H. & Weber, C. T. : *Arch. Intern. Med.*, **40** : 891, 1927.
- Mayor, R. H. : *Arch. Intern. Med.*, **62** : 946, 1938.
- Minot, A. S. & Dodd, K. : *Amer. J. Physiol.*, **124** : 569, 1938.
- Burns, D. & Sharpe, J. S. : *Quart. J. Exp. Physiol.*, **10** : 345, 1916.

- 44) Paton, D. N. : Glasgow Med. J., **104** : 297, 1925.
- 45) Andes, J. E. & Emerson, G. A. : Arch. Int. Pharmacodyn., **60** : 30, 1938.
- 46) Van Pilsum, J. F. et al. : J. Biol. Chem., **222** : 225, 1956.
- 47) Kleeberg, J. & Shlapp, W. : Z. Psychol., **188** : 81, 1930.
- 48) Harison, T. R. et al. : J. Clin. Invest., **15** : 463, 1936.
- 49) Harison, T. R. & Mason, M. F. : Medicine, **16** : 1, 1937.
- 50) Hollunger, G. : Acta Pharmacol., **11** : Suppl. 1, 1955.
- 51) Lascelles, P. T. & Taylor, W. H. : Clin. Sci., **31** : 403, 1966.
- 52) Rajagapalan, K. V. et al. : Fed. Proc., **19** : 49, 1960.
- 53) Wilson, D. M. : Med. Clinics of North America, **55** : 1381, 1971.
- 54) Ratner, S. : Enzymol., **15** : 319, 1954.
- 55) Stein, I. M. et al. : Clin. Res., **16** : 397, 1968.
- 56) Lonergan, E. T. et al. : Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs, **16** : 269, 1970.
- 57) Jebsen, R. H. et al. : New Eng. J. Med., **277** : 327, 1967.
- 58) Lascelles, R. T. & Taylor, W. H. : Clin. Sci., **31** : 403, 1966.
- 59) 森 昭胤 : 第17回日本医学会総会講演集, **1** : 396, 1967.
- 60) 陣内伝之助・ほか : Nature, **212** : 617, 1966.
- 61) Balestrin, P. L. : Arch. Intern. Med., **126** : 843, 1970.
- 62) 上田 泰・ほか : 日腎誌, **13** : 145, 1971.
- 63) 上田 泰・ほか : 日腎誌, **14** : 130, 1972.
- 64) 山下喬世・ほか : 日腎誌, **14** : 130, 1972.
- 65) 山下喬世・ほか : 日泌尿会誌, **63** : 761, 1972.
- 66) Sakaguchi, S. : J. Biochem. (Tokyo), **5** : 25, 1921.
- 67) Pffifner, J. J. & Myers, V. C. : J. Biol. Chem., **87** : 345, 1930.
- 68) Bonas, J. E. et al. : Microchem. J., **7** : 63, 1963.
- 69) Natelson, S. et al. : Microchem. J., **8** : 371, 1964.
- 70) Dossetor, J. B. : Ann. Int. Med., **65** : 1287, 1966.
- 71) MacFate, R. P. : J. Lab. Clin. Med., **28** : 50, 1942.
- 72) 古川哲雄・杉田秀夫 : 日本臨床, **29** : 245, 1971.
- 73) Dobbstein, H. et al. : Klin. Wsch., **49** : 348, 1971.
- 74) Krebs, H. A. & Henseleit, K. Z. : Physiol. Chem., **210** : 33, 1932.
- 75) Cohen, B. D. : Arch. Intern. Med., **126** : 846, 1970.
- 76) 大野函二・ほか : 日腎誌, **9** : 103, 1967.
- 77) Murphy, E. A. et al. : J. Clin. Invest., **36** : 1227, 1957.
- 78) Babb, A. L. et al. : Amer. Soc. Artif. Intern. Organs, **17** : 81, 1971.
- 79) Stein, I. M. et al. : J. Lab. Clin. Med., **77** : 1020, 1971.
- 80) Menichini, G. C. et al. : Specialia, **15** : 1157, 1971.
- 81) Riesman, D. : Amer. J. Med. Ass. Sci., **134** : 709, 1907.
- 82) Cheny, K. & Bonnin, J. A. : Brit. J. Haematol., **8** : 215, 1962.
- 83) Lewis, J. H. et al. : J. Blood, **11** : 1073, 1956.
- 84) Stewart, J. H. & Castaldi, P. A. : Quarterly J. of Med., **37** : 409, 1967.
- 85) Kuhlback, B. : Acta Med. Scand., **157** : 173, 1957.
- 86) Willoughby, M. L. N. & Crouch, S. T. : Brit. J. Haematol., **7** : 315, 1961.
- 87) 板倉 宰 : 米子医誌, **21** : 23, 1970.
- 88) Chalane, S. F. et al. : Amer. J. Clin. Path., **30** : 507, 1958.
- 89) O'Grady, J. A. : J. Amer. Med. Ass., **169** : 1727, 1959.
- 90) Salzman, E. W. : J. Lab. Clin. Med., **62** : 72, 1964.
- 91) 水川求礼雄 : 東邦医誌, **8** : 310, 1961.
- 92) 広瀬憲治 : 日血学誌, **25** : 100, 1962.
- 93) 加々美光安・ほか : 臨床血液, **6** : 402, 1965.
- 94) 安部 英 : 綜合臨床, **15** : 216, 1966.
- 95) Gross, R. et al. : Klin. Wsch., **36** : 107, 1958.
- 96) Larrai, C. & Langdell, R. D. : Blood, **11** : 1059, 1956.
- 97) Rath, C. E. et al. : New Eng. J. Med., **257** : 808, 1957.
- 98) Ekonoyan, G. et al. : New Eng. J. Med., **280** : 677, 1969.

- 99) Kaulla, K. N. et al. : Arch. Surg., **92** : 184, 1966.
- 100) Chalan, S. F. et al. : Amer. J. Clin. Path., **30** : 507, 1958.
- 101) Hesse, V. E. et al. : New York State J. Med., **15** : 1851, 1970.
- 102) Chalan, S. F. et al. : Amer. J. Clin. Path., **30** : 507, 1958.
- 103) Castaldi, R. A. et al. : Lancet, **2** : 66, 1966.
- 104) Rabiner, S. F. & Herdodek, O. : J. Clin. Invest., **47** : 901, 1968.
- 105) Horowitz, H. I. et al. : Amer. J. Med., **49** : 336, 1970.
- 106) Prage, C. & Poglian, E. : IV th International Cong. Nephrol. Abstract, **1** : 29, 1969.
- 107) Rabiner, S. F. & Molinas, F. : Amer. J. Med., **49** : 346, 1970.
- 108) Horowitz, H. I. & Papayanon, M. F. : Thromb. Diath. Hæmorrh., **19** : 18, 1968.
- 109) Rajagopalan, K. V. et al. : J. Biol. Chem., **236** : 1059, 1961.
- 110) Jeruschalurg, Z. et al. : Biochem. Pharmacology, **15** : 1791, 1966.
- 111) Davies, D. T. P. et al. : Lancet, **1** : 301, 1968.
- 112) Kamoun, P. et al. : Lancet, **1** : 782, 1970.
- 113) Horowitz, M. K. : Am. J. Clin. Nutr., **8** : 451, 1960.
- 114) Giovanetti, S. et al. : Clin. Sci., **29** : 407, 1965.
- 115) Selwyn, T. G. & Dacie, J. V. : Blood, **9** : 414, 1954.
- 116) Weed, R. I. et al. : Am. J. Med., **41** : 681, 1966.
- 117) Neerhout, R. C. : Clin. Pediat., **7** : 451, 1968.
- 118) Casson, P. E. & Tavlov, A. R. : Ann. Rev. Med., **13** : 105, 1962.
- 119) 宮地隆興：代謝, **7** : 660, 1970.
- 120) 相馬隆臣：泌尿紀要, **12** : 724, 1965.
- 121) Giovanetti, S. et al. : Experientia, **22** : 739, 1966.
- 122) Rees, S. B. et al. : Blood, **9** : 414, 1954.
- 123) Loge, J. B. et al. : J. Clin. Invest., **29** : 830, 1950.
- 124) Joske, R. A. et al. : Clin. Sci., **15** : 511, 1956.
- 125) Rosen, S. et al. : A. J. C. P., **54** : 33, 1970.
- 126) Bourgoignie, J. et al. : J. Clin. Invest., **50** : 303, 1971.
- 127) 藤井高明：臨血, **13** : 1, 1972.
- 128) Hyde, S. E. & Sadler, J. E. : Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organ, **15** : 50, 1969.
- 129) Jacob, H. S. & Jandle, J. H. : J. Clin. Invest., **41** : 779, 1962.
- 130) Jacob, H. S. & Jandle, J. H. : J. Clin. Invest., **41** : 1514, 1962.
- 131) Gross, R. T. et al. : Blood, **29** : 481, 1967.
- 132) Millis, G. C. & Randall, H. P. : J. Biol. Chem., **232** : 589, 1958.
- 133) Jacob, H. S. & Luy, S. F. : Blood, **32** : 549, 1968.

(1972年11月7日超特別掲載受付)