

氏名(本籍)	伊野充洋(島根県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1,922号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	血液透析時に透析膜上に見出される吸着物質とサイトカイン産出に関する研究		
主査	筑波大学教授	医学博士	林英生
副査	筑波大学教授	医学博士	入江勇治
副査	筑波大学教授	医学博士	赤座英之
副査	筑波大学教授	医学博士	深尾立
副査	筑波大学助教授	医学博士	長澤俊郎

## 論文の内容の要旨

### (目的)

血液透析法は透析装置の高性能化, 透析条件の適正化, 透析膜の材質の開発などにより, 今日ではルーチン化した安全な医療技術として定着している。しかし, 長期の透析医療を続けた場合, その副作用ないし合併症の発生はなお深刻な問題である。透析による合併症には血清に含まれる微量な有効成分が透析外液へ漏出したり, 透析膜に吸着して減少することに起因するものもあると推察される。本研究では透析中に患者の血清内微量成分, 特にサイトカイン類などが透析膜に吸着するのではないかと考え, 使用済みの透析膜から吸着成分を抽出し, 特にサイトカイン活性を指標に吸着性分の物性を解析した。

### (材料および方法)

使用済み透析膜を使用後直ちに回収し, 生理食塩水と蒸留水で洗浄し, 凝固血液, 付着血清蛋白などを完全に除去した後, 溶媒可溶成分を10%CH<sub>3</sub>CN/0.1%Trifluoroacetic acid, 60%CH<sub>3</sub>CN/0.1%Trifluoroacetic acidで溶出した。溶出画分をプレパラティブCNカラムクロマトグラフィーにて分画し, 73%CH<sub>3</sub>CN/0.1%Trifluoroacetic acidで溶出した画分を, さらにディスクプレパラティブSDS-PAGEで分画, 分子量8-11 kDa画分を回収した。回収画分をCNカラムクロマトグラフィーによるHPLCで分画し回収し部分精製標品とした。精製標品をアルカリ分解し, lysylendopeptidaseによりペプチドをフラグメント化したのち, N-末端, C-末端のアミノ酸分析を行い, 全アミノ酸配列を決定した。

コロニー形成能の測定はマウス大腿骨から骨髓細胞を採取し, 非付着性細胞画分を分離し, 軟寒天重層法により培養し, 細胞数50個以上からなるコロニー数をカウントした。既知のサイトカインの測定には市販のELISAキットを用いて定量した。顆粒球コロニー刺激因子の定量はNSG-60細胞により, エリスロポエチンはUT-7 Epo細胞により測定し, ヒトマクロファージ刺激因子は中和抗体による活性中和で測定した。

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1のlipoprotein I (OprI) 遺伝子は*大腸菌*を宿主としたベクター系でクローニングし, 塩基配列の解析はサブクローンをdye primer PCR法により増幅し, 自動シーケンサーによって行った。

*P. aeruginosa*のOprIの精製は, Muller Hinton Brothで振とう培養して集菌した菌体から細胞壁を遠心法により分画し, 2%SDSで処理し, 粗抽出液を得た。これをプレパラティブODSカラムにより分画し, 活性画分を

さらにディスクプレパラティブSDS-PAGE, CN カラムクロマトグラフィーによる HPLC で分画し精製標品とした。

#### (結果)

使用済みの透析膜から有機溶媒により抽出し、精製した分画を電気泳動法で調べた結果、健常者の血漿や血清に認められないタンパク分子であり、マウス骨髄細胞のコロニー形成を促進することが判明した。その活性はプロナーゼにより失活しトリプシンにより部分的に失活することから活性本体がペプチドであることが推察されたが、アルカリ分解により分子量が変わることから脂質のエルテル結合物であることが示唆された。精製物の質量分析では7,774付近に強いバンドが得られた。部分分解したペプチドのアミノ酸配列を解析し、さらに全アミノ酸配列を決定したところ、アミノ酸64残基よりなりN-末端システイン側鎖にグリセロール脂肪酸がエステル結合した構造であることがわかった。ペプチド部分のホモロジー検索をしたところ、アミノ酸64基よりなりN-末端のシステイン側鎖にグリセロール脂肪酸がエステル結合した構造であることがわかった。ペプチド部分のホモロジー検索をしたところ、精製物は *Pseudomonas aeruginosa* の外膜リポタンパクである lipoprotein I (OprI) と同一であることが判明した。

*P. aeruginosa* から OprI 遺伝子をクローン化し塩基配列を調べたところアミノ酸配列では透析膜から得られた分画物質と同一であるが脂肪酸の分子種は異なっていることが確認された。透析膜由来と緑膿菌由来の精製 OprI の生物活性を比較したところ、コロニー形成能は緑膿菌由来のものが7倍強い活性をしめした。OprI のサイトカイン産生刺激性をしらべたところ、IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF 等の産出を誘導することがわかり、OprI のコロニー形成能すなわち、未分化細胞を分化誘導する作用はこれらサイトカインによることが明らかとなった。この作用はLPSとは異なることも確認した。

#### (考察)

長期透析医療の合併症には血清に含まれる微量な有効成分が透析外液へ漏出したり、透析膜に吸着して減少することに起因するものがあると推察し、本研究では透析中に患者の血清内微量成分、特にサイトカイン類などが透析膜に吸着するのではないかと考え、使用済みの透析膜から付着成分を溶媒にて抽出し、とくにサイトカイン活性を指標に吸着成分を精製し、その物性を解析した。マウス骨髄細胞のコロニー形成刺激能を指標に、使用後透析膜から溶媒抽出画分を精製したところ、精製物質は緑膿菌のリポタンパク、OprI と類似物質であることが判明した。この物質はマウス骨髄細胞を刺激し、IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF などの産生を誘導することがわかった。しかし、透析膜に吸着した本物質の由来は不明で、ヒト体内に微量ながら存在するものか、透析外液からの混入したものであるかは現時点では不明である。このような物質がサイトカインとして作用していることは、長期透析治療を行う場合には十分に考慮されなければならないとともに、細胞側のレセプターを同定することでこのような物質の特性がより明確になると考える。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

血液透析膜に吸着し、溶媒により抽出される生体微量分子を精製し、その物性と生物活性を同定している。研究の着眼点は新しいサイトカインの発見にあったが、精製物は緑膿菌のリポタンパクと類似性の高い分子量7,774のリポタンパク分子であることが判明した。生物活性としては骨髄細胞を刺激しIL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF などの産生を誘導することを明らかにしている。物性の検定は極めて詳細にかつ精緻に行われており、透析膜にこのような活性物質が吸着していることを示した意義は大きく啓蒙的であり、質の高い医学研究論文である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。