

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究

所 属 テルモ株式会社研究開発センター
研究者 平原 一郎

要旨

SP/SEP は腹膜透析の最も重篤な合併症である。SP/SEP の診断法と治療法を検討した結果、新規診断マーカーとしてプロリン水酸化酵素の有効性が期待され、治療方法としてステロイドをリポソームで包含することにより患部へのデリバリーに成功した。

1. 研究目的

人工透析は、腎機能が低下もしくは喪失した患者に対し、本来腎臓が果たしている血液浄化作用を腎臓に代わって行う血液浄化療法であり、生体内から水を除去することによって体液の組成を一定に保つとともに、体液中の尿素等の老廃物を除去することを主な目的としている。現在の人工透析には、主に血液透析療法と腹膜透析療法 (Peritoneal Dialysis, PD) がある。

腹膜透析療法は、腹膜で囲まれた腹腔内に浸透圧の高い透析溶液を貯留することによって、生体内の余分な水と老廃物を取り除くことを基本とする。即ち腹膜毛細血管から腹腔内の透析溶液に水が移動することによって透析される。この時の水の移動は透析溶液と体液の間に生じる浸透圧格差によって起こる。透析溶液中の浸透圧調節物質はグルコースであり、腹膜透析に於ける除水のドライビングフォースの基である。しかし、腹腔内に非生理的な浸透圧の高い透析溶液を貯留するため、腹膜はダメージを受けやすい。さらに様々な原因が重なることにより、腹膜硬化症、硬化性腹膜炎 (SP) もしくは硬化性被嚢性腹膜炎 (SEP) (以後 SP/SEP と表記する) を発症することが多い。

腹膜透析はわが国で開始されてから 15 年以上経つが、その割合は全透析患者の 10%にも満たない。腹膜透析は血液透析と比べて、自宅で透析が行えて通院の頻度が少ないといったクオリティーオブライフ (QOL) に優れているだけでなく、循環系への影響や生体内部環境の変動が少なく、残腎機能の維持に優れているといった利点を持っている。腹膜透析がこのような特色を持つものにもかかわらず、広く普及しない理由の一つとして、さきに述べた SP/SEP といった合併症が挙げられる。SP/SEP 発症時には腹膜肥厚がおき、除水能の低下や溶質除去不全に陥る。このため透析効率が低下し、腹膜透析を中止せざる終えない場合が多い。特に SEP は重篤な合併症で、臨床的には食欲不振、悪心、嘔気、嘔吐、低栄養による痩せ、腹痛、下痢、便秘、腸管蠕動音低下など腸閉塞症状を示す。剖検時所見は、小腸は癒着して菌状の一塊となり、腹膜はフィブリン層で被われ、膠原性線維に富み厚く肥厚する。SEP の頻度は 1.4~7.3%と必ずしも高くはないが、2 年後の生存率は約 50%しかなく、致死率が非常に高い。SEP 患者の直接の死因は、被包により圧迫、癒着した腸管が循環障害、壊死をおこし、これが原因となって敗血症になるためと考えられる。SP/SEP の原因は未だによく分かっていないが、おそらくは複数の要因がかかり合って発症するものと考えられる。その原因として細菌や真菌感染による腹膜炎、可塑剤、particulate matter 等の異物、透析溶液中のグルコースやその反応産物である AGE (Advanced glycosylated endo-product)、透析液の pH、消毒剤などが考えられる。治療法としては SEP 発症初期ではステロイド剤の投与や被包した腹膜を剥離する外科的治療が有効であることもあるが、病状が進行した場合の効果的な治療法は無いため、早期診断による予防が重要である。現在、SEP の診断法としてはイレウス症状等の臨床所見のほか、腹部の触診 (塊状物の触知) がなされているが、客観的な基準ではない。さらに SP/SEP が進行した場合でも上述のような典型的症状を起こさない場合も多く、診断が遅れることが多い。一部では X 線や CT 検査、超音波検査等の画像診断もなされているが、ある程度 SEP が進行した場合でないと判断できず、初期診断には向かない。また、生化学マーカーとして C-reactive protein (CRP) がよく用いられている。このマーカーは一般に強い炎症症状が加わると 1000 倍にも増加し、6 時間程で血中濃度があがる一方、血中半減期は 19 時間と短く非常に鋭敏な炎症マーカーとして知られている。しかし、感染性腹膜炎でも増加するため、SP/SEP と感染性腹膜炎を区別して診断することはできないばかりか、SP/SEP では弱陽性しか示さない。SP/SEP 発症時には 1 型、3 型コラーゲンを主体とした腹膜肥厚が生じる。そこで 1 型、3 型コラーゲンの産生量に注目して、排液中の P-1-P や P-3-P の解析も試みられているが、SP/SEP と必ずしも相関がはっきりせず、有効な診断方法にはなっていない。また、線維化のマーカーとして注目されているヒアルロ

有効な診断方法にはなっていない。また、線維化のマーカーとして注目されているヒアルロン酸についても検討報告があるが、未だ診断マーカーとしては確立していない。

このように現在 SP/SEP の発症初期の確実な診断方法はないため手遅れとなり、患者の半数以上が死に至る。しかしこれら合併症を早期に診断できれば、前述のようにステロイド剤が有効であることが報告されており、必ずしも恐れる必要は無い。すなわち SP/SEP 対策として最も重要なことは早期に診断することである。そこで SP/SEP を早期に簡便にかつ客観的に診断できる方法の探索を行った。

一方、SP/SEP の治療に関しては、前述のようにステロイド療法が期待されているが、ステロイドは副作用が多いだけでなく、感染性腹膜炎の誘発も危惧される。できるだけ少量のステロイドを標的細胞に特異的にデリバリーすることが望ましい。そこで SP モデル動物を用いてステロイドの病変部位へのドラッグデリバリーシステム (DDS) を検討した結果、ステロイドを腹膜患部の炎症細胞に特異的に集積させることに成功したので報告する。

2. 研究方法

[SP 動物モデルの作製]

動物は、SPF/VAP ラット (Crj:CD (SD) IGS, 6 週齢, n=6, オス) を用いた。

タルク投与群には、1g のタルクを 15ml の生理食塩水で懸濁したした後、オートクレーブ滅菌を行い、腹腔内投与した。投与はエーテル麻酔させた状態でを行い、なるべくラットに苦痛を与えない様に配慮した。投与前、1、3、7、14、30 日目に腹膜平衡試験を行った後、壁側腹膜をサンプリングした。グルコン酸クロルヘキシジン (CHX) 投与群には 3ml の 0.1% グルコン酸クロルヘキシジン/15% エタノール水溶液 (無菌的に調製した) を腹腔内に投与した後、投与前、1、3、7、14 日目に腹膜平衡試験、及び、腹膜のサンプリングをおこなった。また、コントロール群として無投与群を設けた。

壁側腹膜の採取は、ラットをエーテル麻酔下で脱血死させた後、左腹部から行った。腹膜採取部位は各ラットで同じ場所になるようにした。得られた腹膜は 10% ホルマリン/0.1M リン酸緩衝液 (pH7.2) で固定した後、パラフィンで包埋し、2-3um の厚さの組織切片を作成した。切片は腹膜の厚さが測定できる様に腹膜に対して垂直方向に作成した。各切片は、細胞の種類を解析するために hematoxylin-eosin (HE) 染色、膠原線維を確認するためにアザン染色を行い、光学顕微鏡で組織像を解析した。また腹膜の厚さは画像解析ソフト Win ROOF で測定した。解析する腹膜は異なった 3 箇所から採取し、それぞれ 0.5mm 間隔で 1.5cm にわたって測定し (30 箇所/腹膜 x2)、平均値を算出した。

本実験中、ラットには餌および水を十分量供給し、衛生環境にも十分留意し、細菌感染による腹膜炎が起きないように注意した。さらに腹膜平衡試験時に排液の無菌試験を行い、好気性菌、嫌気性菌、真菌が感染していないことを確認した。また本動物実験はテルモ株式会社研究開発センター動物委員会の倫理審査の後、施行した。

[腹膜平衡試験]

腹膜機能を解析する為、ラットに対して腹膜平衡試験を行った。腹膜平衡試験は Twardowski らが報告している peritoneal equilibration test (PET) を参考にして、ラットに応用した。即ち、ラットに対して 50ml/kg 体重の 2.5% グルコース含有透析溶液 (ペリトリック P250、テルモ社) を腹腔内に注射液し、90 分後に腹腔内残液を採取した。サンプリングした透析溶液は水中にて急冷し、遠心分離により不溶性物質を除去した後、 -20°C で保管した。グルコース濃度は Glucoroder-GXT (A&T 株式会社) で測定した。D/D0 Glucose 値は、採取した腹腔内残液中の糖濃度 (D) を 0 分時の排液中の糖濃度値 (D0) で除してを算出した。

$$D/D0 \text{ Glucose 値} = D / D0$$

腹膜機能の評価は D/D0 グルコース値をもとに行った。

[腹膜肥厚時のプロリン水酸化酵素の測定]

腹膜肥厚時の透析排液中の PH 濃度はサンドイッチ EIA 法により測定した。試験管に 0~1250ng/ml の濃度の PH 標準液または透析排液を 20 μl ずつ分注した。これに、ペルオキシダーゼ標識抗ラット PH モノクローナル抗体を 300 μl 加え、続いて抗ラット PH モノクローナル抗体結合ポリスチレンビーズを加えた。室温で 70 分間静置して抗原抗体反応を行った後、反応液をアスピレーターで吸引除去し、4ml の生理食塩水 (テルモ社) でビーズを 2 回洗浄した。次に洗浄したビーズを 300 μl の 2mg/ml o-フェニレンジアミンの入った新しい試験管に移して、室温で 30 分間発色反応させた。反応終了後、1.15N 硫酸を 2ml 加えて酵素反応を停止させた後、492nm で吸光度を測定した。得られた PH 標準液の吸光度をもとに検量線を作成して、透析排液中の PH 濃度を算出した。

光度をもとに検量線を作成して、透析排液中の PH 濃度を算出した。

[ヒト透析排液中のプロリン水酸化酵素濃度の測定]

SP/SEP 発症が危惧される腹膜透析患者の透析排液中の PH 濃度を測定した。PH の測定は SRL 株式会社に依頼した。また、コントロールとして健常な腹膜透析患者の検体も同様に測定した。測定検体の患者に対しては、解析の趣旨を説明してインフォームドコンセントを得た。

[抗プロリン水酸化酵素抗体による免疫染色]

SP/SEP の発症が危惧される患者のカテーテル抜去時に腹膜組織を採取した。腹膜はホルマリン固定した後、パラフィン包埋し、病理切片を作成した。得られた病理切片は、HE 染色により細胞像を、アザン染色によりコラーゲン線維を観察した。さらに抗 PH β 抗体（富士薬品工業社）により免疫染色を行った。免疫染色はヒストファインシンプルステイン P0（株式会社ニチレイ社）およびヒストファイン（株式会社ニチレイ社）を用いて行った。測定検体の患者に対しては、解析の趣旨を説明してインフォームドコンセントを得た。

[培養細胞における遺伝子発現]

ラット壁側腹膜からコラーゲナーゼにより、中皮細胞および線維芽細胞を調製した。これら細胞を 10%FCS（牛胎児血清）/DME（ダルベッコ変法）培地中で培養した後、RNeasy kit（キアゲン社）により RNA を調製して、RT-PCR 法にて遺伝子発現を調べた。ポジティブコントロールは腎臓由来線維芽細胞を用いた。細胞間の内部コントロール遺伝子はグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）とした。さらに 0~33ng/ml TGF- β 、0~10ng/ml IL-1 β 、0~10ng/ml TNF- α をそれぞれ添加した 1%FCS/DME 培地中で、腹膜中皮細胞を 2 日間培養した後、PH および I 型コラーゲン α 2 鎖遺伝子の発現量を RT-PCR 法にて解析した。また、透析液は pH が酸性でかつ糖濃度が高いため、pH と糖による PH 遺伝子の発現量の変化も解析した。pH は 5.5、6.5、7.0、7.5 で検討し、糖の影響は最終濃度が 0.1、1、4%になるように調整して 1%FCS/DME 培地中で検討した。コントロールは 10%FCS/DME 培地で培養した。線維芽細胞では、通常の培養シャーレ上での 2 次元培養のほか、コラーゲンコートシャーレ上での 2 次元培養、コラーゲンゲル（高研社）中での 3 次元培養を行い、RT-PCR 法にて PH 遺伝子の発現量変化を調べた。

[ステロイドリポソームの調製]

3ml の 100mM フォスファチジルコリン、2.54ml の 100mM コレステロール、4.6ml の 100mM 3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩を、クロロホルムを溶媒としてフラスコ中で混合させた。最終脂質濃度がモル濃度で 0.2%になるようにローダミンフォスファチジリエタノールアミンを加えた後、クロロホルムを留去させることにより、フラスコ内壁に脂質薄膜を形成させた。10ml の 150mM リン酸プレドニゾロン水溶液を加え、超音波処理してリポソームを作成した。これを 0.1 μ m のポリカーボネートフィルムで 10 回処理することによって平均粒子径が約 0.1 μ m になるように整粒した後、ゲル濾過によって未封入のリン酸プレドニゾロンを除去した。このリポソーム分散液に等量のポリエチレングリコール/生理食塩水を加え、60℃で 30 分間加温し、リポソームの表面をポリエチレングリコールで修飾した。

[SP モデルマウスへのステロイドリポソームの腹腔投与]

マウス（ICR、6 週齢、n=6、オス）に 0.3ml の 0.1%グルコン酸クロルヘキシジン/15%エタノール水溶液/生理食塩水（無菌的に調製した）を腹腔投与し、SP 発症を誘導した。コントロールマウスには 0.3ml 生理食塩水を投与した。2 日後に 0.3ml のステロイドリポソームを腹腔内に再投与し、さらに 2 日目に壁側腹膜を採取した後、凍結切片を作成した。得られた病理標本は蛍光顕微鏡で観察した。本動物実験はテルモ株式会社研究開発センター動物委員会の倫理審査の後、施行した。

3. 研究成果

[腹膜肥厚動物モデルにおける腹膜機能の経時的変化]

SP 動物モデルを用いて経時的な変化を解析した。炎症の発症を確認する為、透析排液中の CRP 濃度の測定を行った。この結果を Fig. 1A に示した。タルク投与群では投与 1 日目に既に CRP 濃度が著しく上昇し、平均約 2400ng/ml に達した。3 日後でも 1 日目同様に高値を示したがそれ以降は著しく低下した。CHX 投与群に関しても同様の解析を行った。CRP 値は投与開始 1 日後に最大値に達し、平均 560

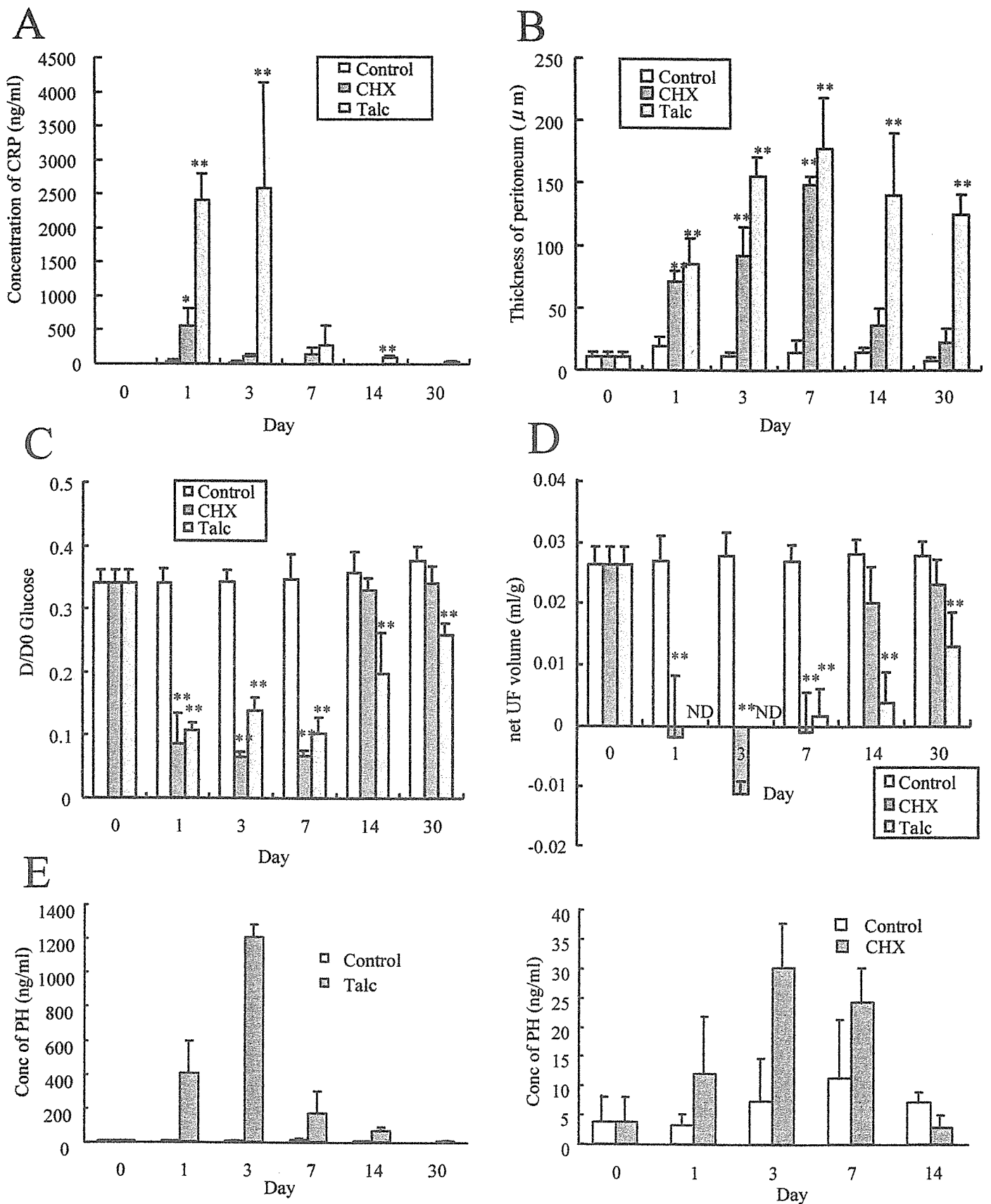


Fig. 1. Serial analysis of SP model rats. A) Conc of CRP. B) Thickness of peritoneum. C) D/D0 Glucose. D) net UF volume. E) Conc of PH. Data values are shown as means \pm SD.

g/ml まで上昇したが、3、7 日目では急激に減少した。この間コントロール群では CRP 濃度の有意な変化は見られなかった。ヒトではしばしば SP/SEP 診断時に、血清中の CRP 濃度を測定するが、ラットは個体が小さいために得られるサンプル量が少ない。そこで本実験では血清の代わりに透析排液中の濃度を測定したが、組織像から腹膜炎が発症していると確認されたタルク投与群および CHX 投与群では確かに CRP の濃度が上昇していることが確認され、排液中の CRP で腹膜炎の発症がモニターできることが分った。なお、透析排液の細菌検査の結果から、本モデルは感染性の腹膜炎ではないことを確認した。

次に壁側腹膜から作成した組織切片を観察した。タルク投与群では、投与 1 日目に中皮細胞が立方化したり脱落していた。またマクロファージを中心にリンパ球、多核白血球等の白血球が腹膜へ浸潤しており、浮腫もみられた。コントロール群に比べて有為に腹膜が肥厚していた。7 日目では腹膜にはマクロファージや線維芽細胞等の間質系細胞を中心に多核白血球、リンパ球の浸潤がみられ、部分的には浮腫や肉芽が観察された。腹膜は膠原性線維に富み、厚さは最大となり、コントロール群の約 20 倍に肥厚していた。14 日後以降は腹膜中に浸潤した白血球数は減少し、腹膜の厚さも退縮に向かった。30 日目では腹膜において浮腫や白血球は殆ど見られなかった。CHX 投与群では、投与 1 日後でタルク投与群と同様に膠原性線維に富んだ腹膜肥厚が起き、肥厚した腹膜にはマクロファージを中心として、リンパ球、多核白血球等の白血球の浸潤がみられた。中皮細胞の一部は脱落したり、残った細胞は立方化していた。7 日目には腹膜の厚さが最大になり、コントロール群に比べて 15 倍以上に肥厚した。この時既に中皮細胞の再生が始まっていたが、腹膜中には依然としてマクロファージを中心とした白血球の浸潤が観察された。14 日目には肥厚は退縮し、腹膜中には白血球は見られなかった。本実験期間中、コントロール群では腹膜肥厚や白血球の腹膜への浸潤は殆ど観察されなかった。以上腹膜肥厚の経時的变化の結果を Fig. 1B に示した。

腹膜機能の変化を調べるため、D/D0 グルコース値および net 限外濾過量の変化を解析した。これらの結果をそれぞれ Fig. 1C, D に示した。タルク投与群では、タルク投与 1 日目に既に D/D0 グルコース値が著しく低下した。30 日目では回復傾向がみられた。また net 限外濾過量も D/D0 グルコース値と同様に低下し、30 日目には回復の傾向がみられた。これら D/D0 グルコースと限外濾過量の変化は、腹膜肥厚と負の相関を示していた。なお 1、3 日目の net 限外濾過量は、腹腔に腹水が溜まっていたため正確に計測できなかったため、データは示していない。CHX 投与群についても同様の解析を行った。D/D0 グルコース値は、投与開始 1 日後から著しく低下し、7 日目まで低下していた。14 日目ではコントロール群と同程度まで回復していた。また限外濾過量も D/D0 グルコース値と同様の変化がみられ、試験開始後 1~7 日目までは著しく低下しており、14 日目には回復に向かった。本実験中のコントロール群では D/D0 グルコース値および net 限外濾過量の有意な変化は認められなかった (ANOVA で有意差なし)。

[腹膜肥厚動物モデルにおけるプロリン水酸化酵素の経時的变化]

タルク投与群及び CHX 投与群に対して PH の経時的变化を解析した。これらの結果を Fig. 1E に示した。

タルク投与群では、タルク投与 1 日後にすでに排液中の PH 濃度が上昇し、3 日後で最大に達した。それ以降 PH 濃度は減少し、30 日目ではコントロール群と同程度にまで下がった。PH 濃度の変化は CRP 濃度、腹膜肥厚や腹膜機能 (Fig. 1A, B, C, D) の変化と相関していた。

CHX 投与群では、投与開始 1 日後から排液中の PH 濃度の上昇がみられ、3 日後で最大に達した。それ以降 PH 濃度は減少し、14 日目ではコントロール群と同程度にまで下がった。PH の濃度変化はタルク投与群と同様に CRP 濃度の変化、腹膜肥厚や腹膜機能 (Fig. 1A, B, C, D) の変化と相関していた。本実験中のコントロール群では有意な変化は認められなかった (ANOVA で有意差なし)。

[SP/SEP 発症が危惧される腹膜透析患者の透析排液中のプロリン水酸化酵素]

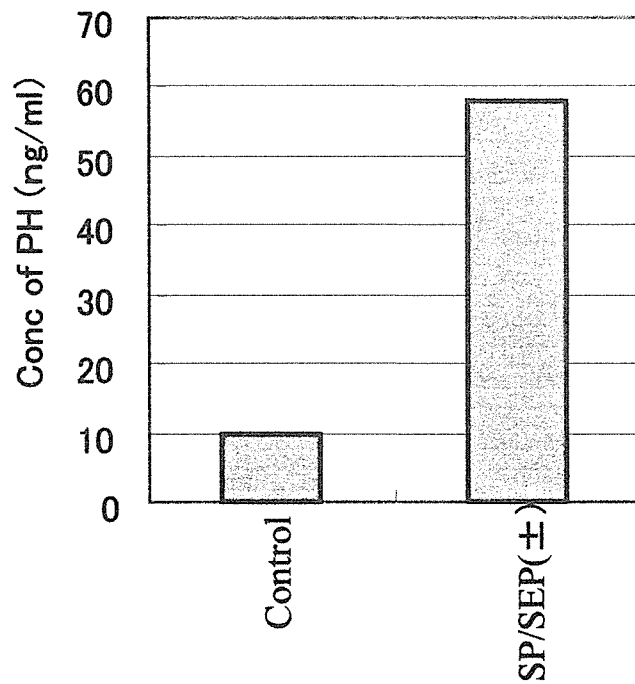
除水能が著しく低下したり、腹膜肥厚を起こした SP/SEP 発症が危惧される腹膜透析患者の透析排液中の PH 濃度を測定した。この結果、PH は健常な腹膜透析患者に比べて有意に高濃度であった。この結果を Fig. 2A に示した。

一方 SP/SEP 発症が危惧される患者の腹膜組織は、線維芽細胞やマクロファージの浸潤を伴ったコラーゲン主体の線維性腹膜肥厚が観察された。抗 PH 抗体による免疫組織解析では腹膜線維芽細胞が陽性シグナルを示した。この結果を Fig. 2B に示した。

[プロリン水酸化酵素の遺伝子発現の制御]

腹膜由来線維芽細胞および中皮細胞に対して PH の遺伝子発現量を解析した。この結果、ポジティブ

A



B

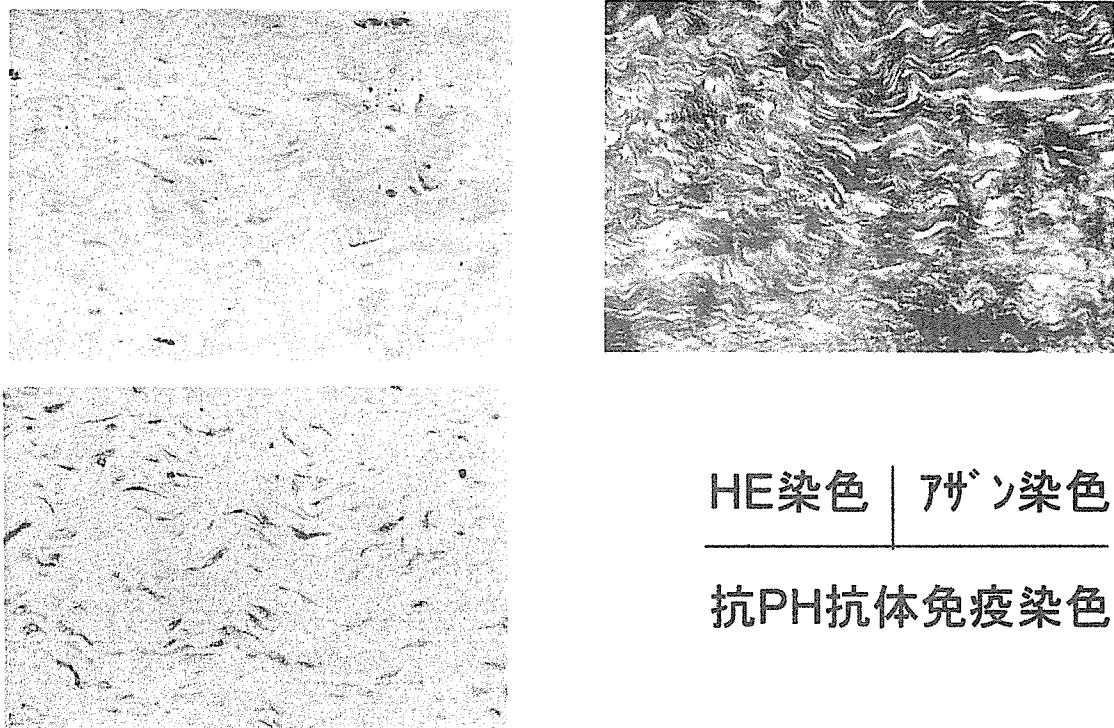


Fig. 2. Analysis of PH in human PD patients. A) Conc of the PH in the drained dialysate in Human PD patients. B) Production of PH in human parietal peritoneum. Production of PH in parietal peritoneum was analyzed immunohistologically. Fibroblasts were observed positive signals.

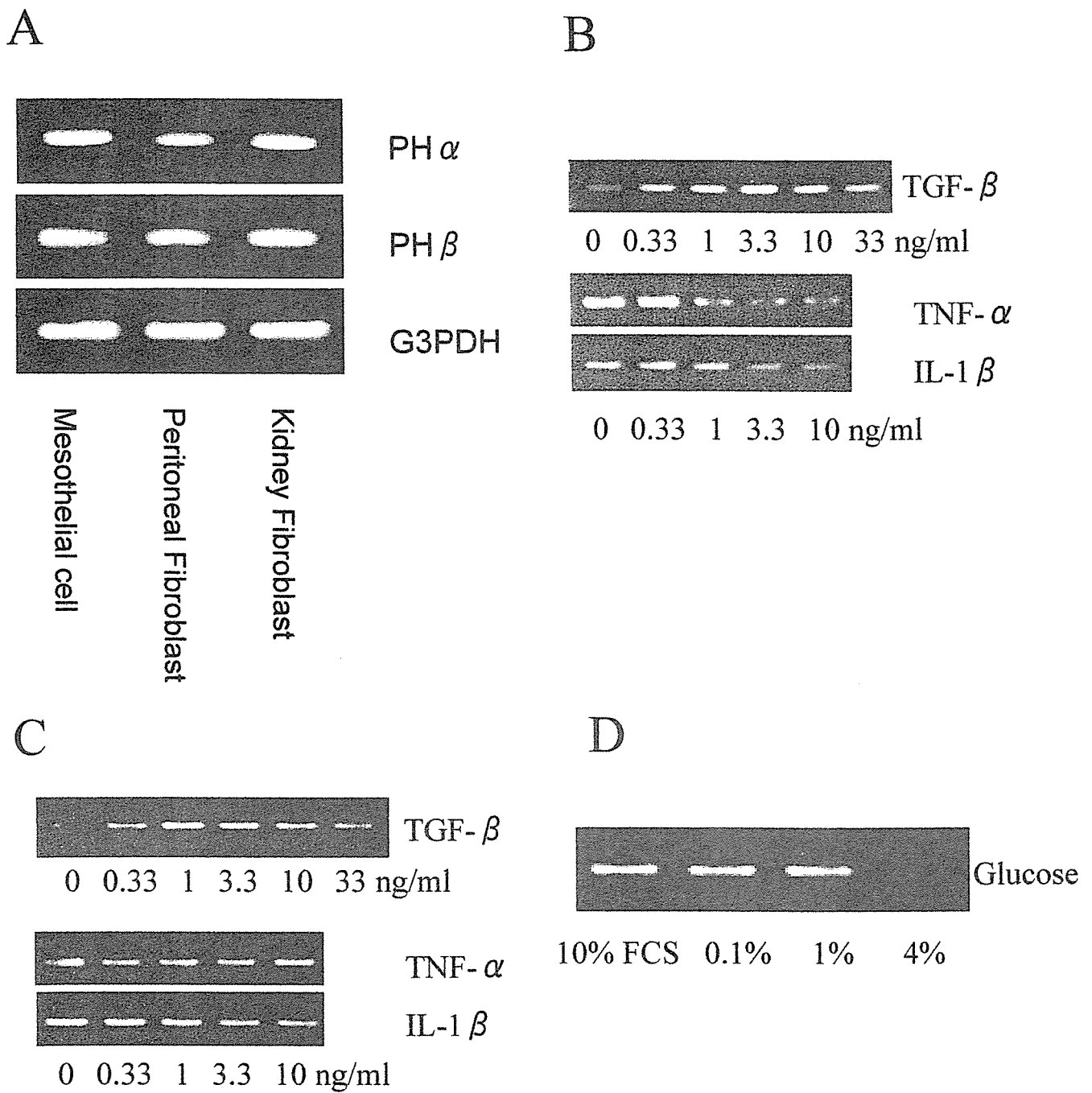


Fig. 3. Expression of PH gene in mesothelial cells

A) Expression of PH gene in peritoneum derived cells Expression of PH gene.
 B) Expression of Col α 2 (I) gene. C) Regulation of PH gene expression with glucose.

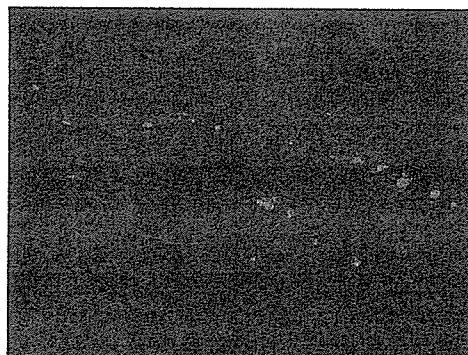
コントロールである腎臓線維芽細胞と同レベルの高発現が確認された (Fig. 3A)。

腹膜中皮細胞を用いて、様々なサイトカインによる PH 遺伝子の発現制御について検討した。TGF- β は 3.3ng/ml までは濃度依存的に PH 遺伝子の発現を促進したが、それ以上の濃度では、逆に PH 遺伝子発現を抑制した。TNF- α や IL-1 β は濃度依存的に PH 遺伝子の発現を抑制した (Fig. 3B)。タイプ I コラーゲン $\alpha 2$ 鎖もこれらサイトカインにより PH と同様の発現量の制御が見られた (Fig. 3C)。またグルコース濃度が、4%以上で PH 遺伝子の発現抑制が見られたが (Fig. 3D)、pH の影響は確認できなかった (データ示さず)。線維芽細胞は、実際の腹膜ではコラーゲン基質中に存在するため、コラーゲンをを用いた 3 次元培養を検討したが、コラーゲン基質による PH 遺伝子の発現量の変化は確認できなかった (データ示さず)。

[ステロイドの炎症患部へのデリバリー]

SP モデルマウスにリポソームで包含したステロイドを腹腔内に投与した。その結果、腹膜炎患部に浸潤してきた炎症細胞に特異的に取り込まれた。一方、コントロールマウスにはステロイドリポソームの腹膜への集積は認められなかった。これらの結果を Fig. 4 に示した。

a) SP model



b) control

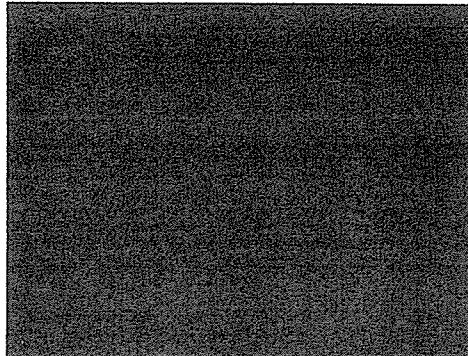


Fig.4. Delivery of steroid with liposome

4. 考察

SP/SEP の早期診断を目的として、有効な診断マーカーの探索を行うために、SP 動物モデルの作成を試みた。前述した様に SP/SEP の原因には様々な Factor が考えられる。さらに一般に動物病態モデルはヒトの臨床を必ずしも反映しているとは言えない。そこで 2 つの異なる原因により SP 動物モデルを作成し、これら両モデルで共通に確認できるマーカーの探索を行った。第一の SP 動物モデルは異物投与により作成した。腹腔内に異物であるタルクを投与することにより SP を誘発させた。第 2 のモデルは消毒剤である CHX を用いた化学的刺激 (chemical irritation) によるものである。これら SP 動物モデルを用いて、病態の進展に伴って透析排液中の濃度が増加する指標物質の探索を行った。

以上 2 つのモデルでは、病態の進展に伴って透析排液中の CRP 濃度が上昇し (Fig. 1A)、マクロファージを中心とした炎症性の白血球の浸潤が伴ったコラーゲンに富んだ線維性腹膜肥厚が生じた (Fig. 1B)。また腹膜のグルコース透過性の亢進 (Fig. 1C) や net 限外濾過量の減少 (Fig. 1D) も確認され、ヒト SP/SEP を反映した動物モデルを作成することができた。

SP 動物モデルの解析から、病態の進展に伴い腹膜がコラーゲン線維に富んだ線維性肥厚を起こすこ

とが確認された。このことから診断マーカーとして特にコラーゲン関連物質、若しくはコラーゲンの産生に関与している物質が期待された。コラーゲンの形成を担っている重要な因子の一つとしてプロリン水酸化酵素 (PH) がある。PH は、プロリンの水酸化によりコラーゲンたんぱく質を構成している主要アミノ酸であるヒドロキシプロリンを合成する酵素である。コラーゲンはプロリンが水酸化されないと線維を形成することができず、従って腹膜肥厚も生じないと考えられる。そこで、SP 動物モデルを用いて透析排液中の PH を解析した結果、病態の進展に伴って PH 濃度が増加し、さらに腹膜肥厚の退縮とともに PH 濃度が低下することが明らかになった (Fig. 1E)。さらにヒトでも SP/SEP 発症が危惧される患者の透析排液中の PH は、健常な腹膜透析患者に比べて有意に高濃度であった (Fig. 2)。以上の結果から透析排液中の PH の濃度変化を解析することで、SP/SEP を早期診断できる可能性が期待される。また腹膜の線維化には線維芽細胞や中皮細胞が深く関与していると考えられているが、これらの細胞で PH も産生されていた (Fig. 2B, 3A)。PH 遺伝子の発現は、TGF- β や IL-1 β 、TNF- α によって制御されており、基質であるコラーゲンも同様の遺伝子発現パターンがみられた (Fig. 3B, C)。一方透析液は 1.2~4% の高濃度のグルコースを含んでいるが、4% グルコースでは PH の発現が抑制されたことから (Fig. 3D)、透析液自体も PH を介して腹膜の線維化に何らかの影響を与えていると推察される。

今回の検討により、PH が SP/SEP の早期診断マーカーになりうる可能性が示されたが、診断に用いる検体は、患者の透析排液が適当であると考えられる。患者の透析排液を検体として用いた場合、透析排液は透析の度に回収されるので、サンプリングの手間が省けるだけでなく、患者に対して非侵襲で、かつ自宅でも容易にサンプリングすることができる。また検査に必要な量は数十 μ l と極めて微量で済む。試験紙のような診断薬にすれば、自宅でも診断が可能であり、腹膜透析療法が在宅で可能な治療法であることを合わせて考えると、極めて高い医療経済性が期待できる。

本成果は腹膜透析療法の重篤な合併症である SP/SEP の早期診断が期待されるだけでなく、非侵襲でかつ検体量が微量で済むといった特色を持つ診断方法としての可能性を秘めている。現在、様々な症例の SP/SEP 発症が危惧される患者に対して該診断法の臨床応用を試みている。

SP/SEP の治療に関しては、前述のようにステロイド療法が期待されているが、ステロイドは副作用が多いだけでなく、免疫力を低下させるため感染性腹膜炎の発症も危惧される。できるだけ少量のステロイドを効率よく患部へ特異的にデリバリーすることが望ましい。今回ステロイドの腹膜炎細胞へのデリバリー方法を検討した。この結果、ステロイドをリポソームで包含することにより、SP マウスの腹膜炎部位に浸潤してきた炎症細胞へ特異的に集積させることができた。本 DDS を使えば最小量のステロイドを効率よく炎症細胞に特異的に作用させることが期待できる。さらに腹膜透析は腹腔内に透析液を注排液させるため、カテーテルを留置している。ステロイドリポソーム液を腹腔内に注液した後、一定時間後に排液、さらに腹腔内を高張な透析液等で洗浄すれば、患部の炎症細胞に取り込まれなかったステロイドが除去され、ステロイドの副作用の危険性が軽減されると期待される。

5. 結論

SP/SEP の早期診断マーカーの探索を行った結果、PH の可能性が期待された。本成果の PH による診断法は、SP/SEP を早期に非侵襲でかつ簡便に診断できる方法になりうる可能性がある。一方治療に関しては、ステロイドが SP/SEP に有効と期待されているものの副作用が懸念される。今回、ステロイドをリポソームで包含することにより腹膜炎細胞に特異的にデリバリーすることに成功した。これらの成果は、血液透析よりも QOL に優れた腹膜透析の普及に貢献できるものと期待される。

6. 研究発表

平原一郎、金昌雄。腹膜肥厚におけるプロリン水酸化酵素の産生。腎と透析 (投稿中)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社