

令和 3 年 10 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09653

研究課題名(和文)一酸化窒素放出材料により抗血栓性を制御する次世代型血液浄化器の開発

研究課題名(英文) Development of next-generation module for blood purification that can control antithrombotic properties by nitric oxide releasing material.

研究代表者

小久保 謙一 (Kokubo, Kenichi)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：20287965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1)ラットを用いた動物実験による抗凝固能を発揮するのに必要なNO濃度の検討、および2)一酸化窒素(NO)放出材料の開発を行った。

1)では、まず、ラットを用いて、4時間体外循環を行い、濃度の異なるNOガスを透析液に付加し、体外循環後のフィルタへの残血量を溶離液のヘモグロビン濃度および乳酸デヒドロゲナーゼ活性より評価し、適切なNO添加量を明らかにした。

2)では、NOドナーをマイクロカプセルに封入したNO放出材料を開発を試みた。使用するNOドナー、マイクロカプセル材料をいくつか検討し、抗血栓性を発揮するのに必要な濃度のNOを放出できるマイクロカプセルを作成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、透析膜と血液が接触する際の抗血栓性を向上させるために必要なNO濃度が明らかとなり、またその濃度のNOを放出可能なマイクロカプセルを作成できた。NOを透析膜表面から放出させることで、透析膜の生体適合性、抗凝固性の向上が期待できる。また、出血性病変を有して抗凝固剤が使いにくい患者に対しても抗血栓性を発揮でき、将来的には装着型や埋込型の人工腎臓の実現につながるモジュールにもつながる技術と考えられ、臨床的な意義も大きい。また本研究により得られた結果は、長時間血液と接触可能な材料の開発において、新たな材料設計のための指針を与えるものであり、他分野への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aims of the present study were 1) to examine appropriate NO concentration required to exert anticoagulant ability by a rat extracorporeal model, and 2) to develop nitric oxide (NO) releasing material.

1) Extracorporeal circulation was performed for 4 hours using rat, NO gas of different concentration was added to the dialysate, and the residual blood clots to the filter after extracorporeal circulation was evaluated by the hemoglobin content and lactate dehydrogenase activity in the eluent. Appropriate NO concentration added to the dialysate was determined.

2) We tried to develop an NO-releasing material in which an NO donor was encapsulated. By examining several NO donors and macrocapsule materials to be used, we created microcapsules capable of releasing NO at a concentration required to exert antithrombotic properties.

研究分野：臨床工学

キーワード：血液透析膜 生体適合性 一酸化窒素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

血液透析療法は、腎不全に陥った患者の生命を維持するために不可欠の治療である。しかし、血液透析治療それ自体が患者にさまざまな侵襲を与えている。例えば、血液透析により、炎症の惹起や免疫機能の低下が起き、それが長期透析患者の合併症の原因となっている可能性が高いなどの報告がある（Quinn et al., Proc Natl Acad Sci, 1987, Galli and Ronco, Nephron, 2000）。

一方で、透析時間の延長により、透析患者の死亡率が大きく低下するという結果も報告されており（Susantitaphong et al., Am J Kidney Dis, 2012）、主に溶質除去の観点から、長時間透析の有用性が示されている。しかし、長時間透析は、生体適合性の観点から見ると、異物との接触時間が長くなる点で不利である。また抗凝固薬により凝固を抑制している時間も長くなることから、血液が血液回路や透析器内を循環しているときのみ抗凝固を行う治療が望まれる。

血管内皮細胞は、一酸化窒素合成酵素により常に一酸化窒素（NO）を放出しており、NOは血小板活性化の抑制、白血球の接着抑制、単球の血管内への遊走抑制などに働いていることが知られている。また、糖尿病では血管内皮細胞が障害されてNOの産生が低下しており、炎症を起こしやすく、なおかつ血栓が形成されやすくなっているため、動脈硬化になりやすい（Farkas et al., Diabetes Nutr Metab, 2000）。NOは血液と血管内皮細胞の相互作用を正常に維持するのに重要な役割を担っていると考えられる。

透析治療を行う際に、NOを含む透析液を使用して、透析膜の表面からNOを放出させることで、血小板や白血球の活性化を抑制する材料表面となるのではないかと着想し、平成21年度～23年度の科研費（研究題目：水素および一酸化窒素を用いた透析膜の生体適合性の改善）の補助を受け研究を始めた。それにより、次の結果を得ている。

1) 透析液にNOガスを供給速度20 nmol/min程度でガス交換器より導入できる血液透析システムを構築でき、それにより血液透析を行うと、血小板の活性化を抑制できた。

2) ヘパリンの持続投与無しで、4時間の間、凝固イベントを起こすことなく、ラットの血液透析が可能であった。

3) NOの有害事象と考えられるメトヘモグロビンの生成、血圧の低下は見られなかった。

これらの結果の重要な点は、①血液と接触する面をNO放出材料としなくても、透析液側からNOを供給するだけで、抗血栓性が得られること、②NOの半減期が非常に短く、透析膜近傍と血液回路内のみで作用していることを明らかにできたことである。前者は、材料開発において、血液と接触しない中空糸の外側に（透析液側）にNO放出材料を使用するだけで十分であるという、重要な示唆を与えている。後者は、長時間治療用の透析器の開発において、非常に大きい利点となる。

しかし、現在までの検討では、NOガスの最適濃度が明らかになっていないこと、ガス交換器を用いたシステムでは、ガスポンプやガス交換器などの新たに追加の設備が必要になるということが、実用化に向けて解決すべき課題であった。そこで、NO放出材料を透析液側にコーティングもしくは、透析液側に充填することで、それを解決できると着想し、小型動物を用いた実験までを計画した。それにより、装着型、可搬型といった用途に対しても、長時間の持続治療が可能な、次世代型の血液浄化器を開発できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、動物実験を用いたNOの最適濃度の検討とNO放出材料の評価を行い、(1)ラット血液透析システム用いた*in vivo*実験により、透析液に直接NOガスを供給したときの血液凝固抑制効果を検討し、有効なNO濃度範囲を明らかにすること、(2)適切なNO放出挙動を有する材料の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ラット血液透析システム用いた*in vivo*実験による有効なNO濃度範囲の検討

動物実験では、ラットを用いて検討した。ラットの頸動脈より脱血し、微静脈に返血する体外循環モデルにおいて、透析液には、ガス交換機を用いて、ガスを溶け込ませ、NOガスの効果を検討した。

まず、血液回路を、生理食塩液にヘパリン加生理食塩液、100単位/Lでプライミングする。透析液には、血液濾過用補充を使用して、プライミングした。麻酔を行い、仰臥位にして四肢を固定し、留置針（24G）を用いて、尾静脈に穿刺した。最後に、頸動脈に付いている筋肉および迷走神経をピンセットで剥離して露出させた後、頸動脈に穿刺し、脱血回路と接続して血液透析を開始した。

循環条件は、脱血流量0.5～1 mL/min、透析液流量3 mL/min、ガス交換器吹送ガス流量200 mL/minとし、抗凝固剤は、透析開始前にボラス投与とした（凝固により循環中止することなく、4時間の体外循環を行うことができ、ある程度の残血が発生する抗凝固剤を投与した）。ガス交換器の吹送ガスに濃度の異なるNOガス濃度を添加し実験を行った（図1）。NOガス濃度は、200 ppm、400 ppm、800 ppmとした。

循環実験中にはACTを測定し、血中メトヘモグロビン量を測定し、実験後、透析器の残血（血栓）を、界面活性剤を使って溶出し、その溶出液中の乳酸脱水素酵素（LDH）活性値、ヘモグロビン（Hb）量の測定を行い、透析液に残った残血中の血球細胞量比較し、有効なNOガス濃度を検討した。さらに、有害事象が起こらない安全限界のNOガス濃度についても、メトヘモ

グロビン量より検討した。

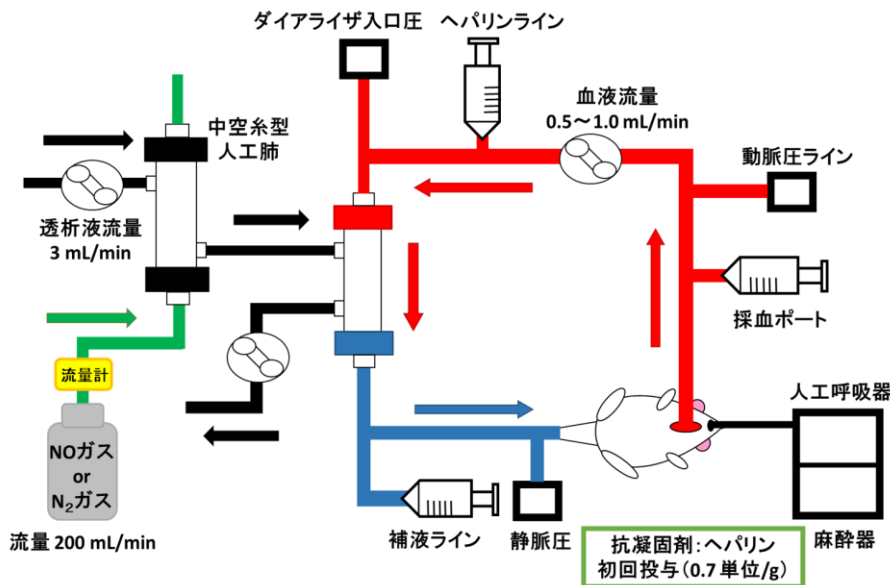


図1 ラットを用いた血液透析実験回路

(2) 適切な NO 放出挙動を有する材料の開発

NO ドナーをマイクロカプセルに内包した NO 放出材料を作成し、有効な NO 濃度と考えられた 4 μmol/L を目標値として、どの程度の時間、安定して放出できるかどうか検討した。

半減期 25 分の NOC5 (1-Hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene) を含有するマイクロカプセル、および半減期 100 分の NOC12 (1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-ethyl-2-aminoethyl)-3-ethyl-1-triazene) を含有するマイクロカプセルをカラムに詰め、NO 放出量をシングルパス回路で評価した。(図 2)。サンプルの採取時間は、10, 30, 50, 100, 150, 180 分とした。採取した透析液中の NO₂/NO₃ 濃度を測定し、NO 放出量を評価した。

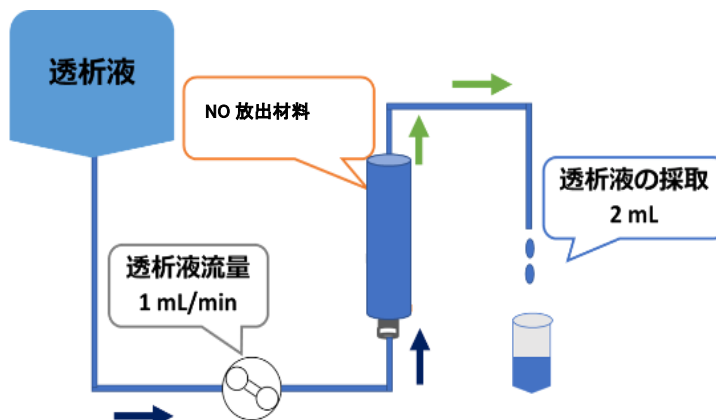


図2 NO 放出材料の NO 放出量測定回路

4. 研究成果

(1) ラット血液透析システム用いた *in vivo* 実験による有効な NO 濃度範囲の検討

循環開始時とその後 1 時間おきに採血を行い、ACT を測定した。ACT は Control 群および全ての NO 群において、循環開始から徐々に短縮していき、4 時間後で 150 s 程度まで低下した。各群において有意な差は見られなかった。

メトヘモグロビン濃度も、循環開始時とその後 1 時間おきに測定した。いずれの群においても、2% 程度の低い値であり、有害域といわれる 10% を超えることはなかった。

実験後の残血量を溶出液の Hb 量 (図 3)、LDH 活性値 (図 4) から調べた。濃度に関わらず、NO 群については、Hb 量、LDH 活性値のいずれも、control 群に比べて、低値となっていた。NO 濃度による差はなかった。残血を調べたフィルタはすべて 4 時間循環できたものであったが、ダイアライザ内凝固、回路内凝固により、ダイアライザ入口圧、静脈圧が大きく上昇したため、循環を途中で中止したのもあった。中止することなく、4 時間循環を達成した割合は、NO 濃度が高くなるほど高くなっており (図 5)、NO 濃度が高いほど、安定して循環できることがわかった。

以上より 800ppm の NO ガスを含有させた透析液では、メトヘモグロビンを生成することなく、最も高い抗凝固性を示すことが明らかとなった。このときの透析液中の NO 濃度は 4 $\mu\text{mol/L}$ であった。

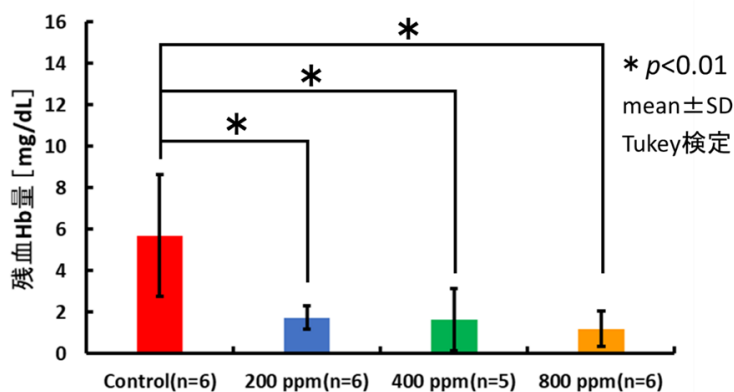


図 3 残血 Hb 量

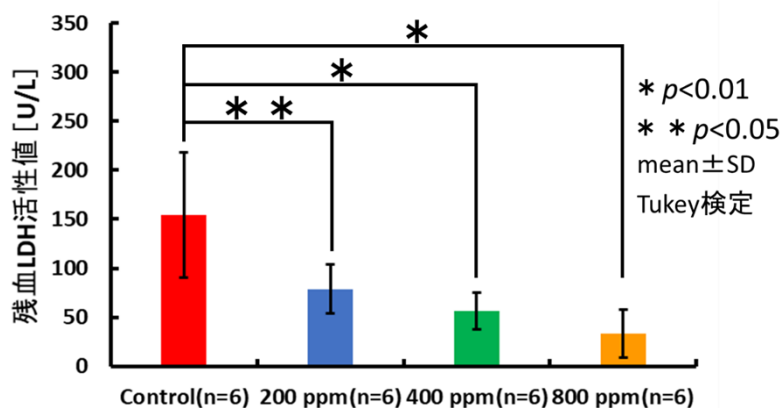


図 4 残血 LDH 活性値

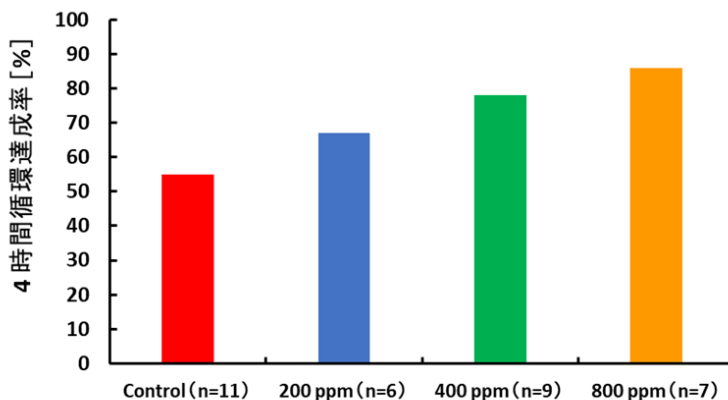


図 5 4 時間循環を達成できた割合

(2) 適切な NO 放出挙動を有する材料の開発

NOC5 および NOC12 を含有するマイクロカプセルからの NO 放出量を測定した。NOC5 含有マイクロカプセルから放出された NO_2/NO_3 濃度は経時的に減少した。指数回帰して得られた近似式より、半減期をしたところ、87 分となっており、マイクロカプセルに包含することで、NOC5 の半減期である 25 分を大幅に上回る徐放性を得ることができた。また、マイクロカプセルが透析液と接触してから 100 分間では、目標濃度である 4 $\mu\text{mol/L}$ 以上の NO が放出可能であった。また半減期 100 分の NOC12 を含有させたマイクロカプセルも半減依 587 分とマイクロカプセルに包含することで徐放性を得ることができた。理論的には、600 分程度の間、目標濃度である 4 $\mu\text{mol/L}$ を超えた NO_2/NO_3 濃度の NO が理論的には放出可能であると予想された。

以上より、NO 放出材料をマイクロカプセル化することにより、目標とする徐放性を有する NO 放出材料を作成できることが明らかとなった。

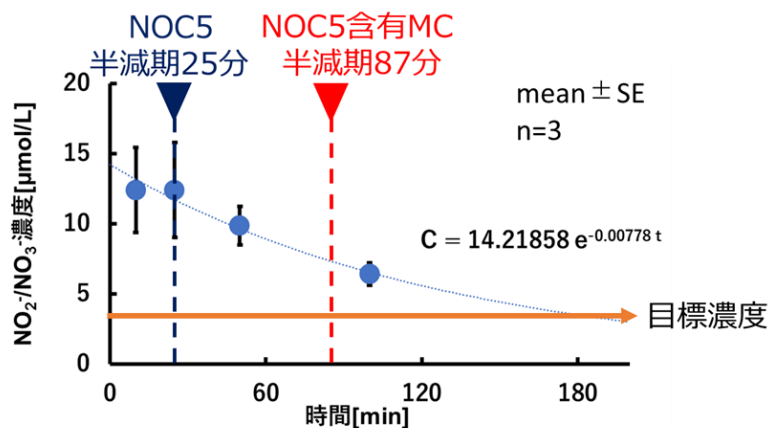


図 6 NOC5 含有マイクロカプセルから放出された NO₂/NO₃⁻濃度

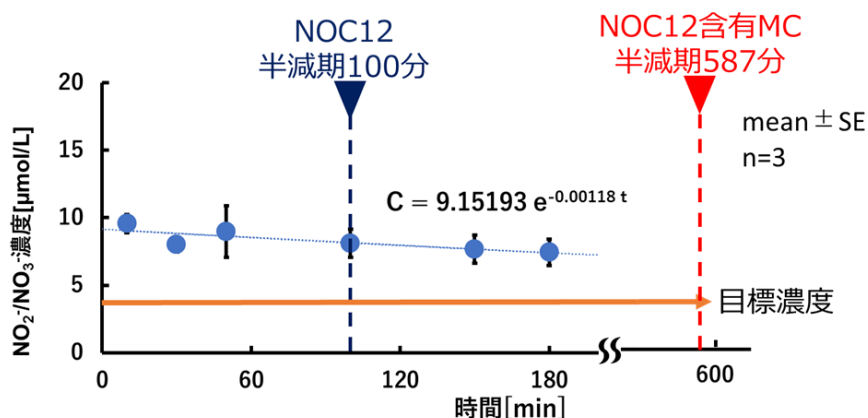


図 7 NOC12 含有マイクロカプセルから放出された NO₂/NO₃⁻濃度

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

1. Kenichi Kokubo, Kozue Kobayashi, Kenya Kohagura, Yuhei Yoshida, Hirosuke Kobayashi. SUPPRESSION OF BLOOD COAGULATION ON THE SURFACE OF A DIALYSIS MEMBRANE USING A NITRIC OXIDE-CONTAINING DIALYSATE. 56th Congress of the European Renal Association (ERA) and European Dialysis and Transplant Association (EDTA), 2019 Budapest, Hungary
2. 古波蔵賢弥, 吉田裕平, 小林こず恵, 小久保謙一, 小林弘祐. 透析液に付加した一酸化窒素による血液透析膜の表面の抗血栓性の改善. 第 45 回日本血液浄化技術学会学術大会・総会, 2018, 名古屋

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 弘祐

ローマ字氏名：Hirosuke Kobayashi

所属研究機関名：北里大学

部局名：医療衛生学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：70153632

研究分担者氏名：小林 こず恵

ローマ字氏名：Kozue Kobayashi

所属研究機関名：北里大学

部局名：医療衛生学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60448975

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。