

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592740

研究課題名(和文) 持続血液ろ過透析における新規膜開発の挑戦

研究課題名(英文) Challenge to development of a new blood purification membrane in continuous hemodiafiltration

研究代表者

安田 則久 (Yasuda, Norihisa)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90537101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 今回の研究で、現在上市されている透析膜において、急性期炎症反応の制御能に違いがあることが確認された。ビタミンEをコートした透析膜やエチレン-ビニルアルコール共重合体膜を用いることで急性期の生存率を改善できる可能性があることが考えられた。抗炎症効果や抗酸化効果を有した化合物を膜表面にコートすることで新たな血液浄化膜による治療法開発につながる可能性があることが成果として挙げられる。

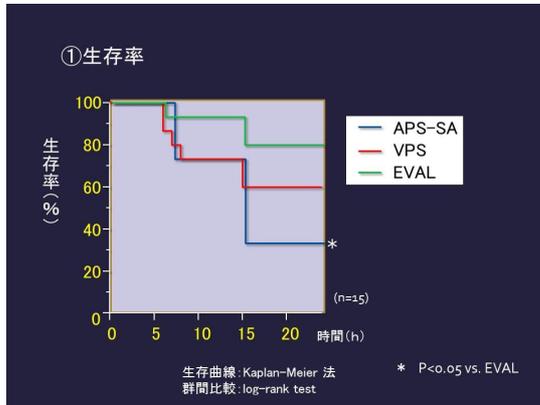
しかし、明らかにすべき課題も多数あり、引き続き研究を重ね、新規の治療法開発につなげていく予定である。

研究成果の概要(英文)： In this study, we proved that capacity to control acute inflammation response is different in various dialyzers and that vitamin E-coated dialyzer and Ethylene-co-vinyl-alcohol (EVAL) membrane dialyzer could improve survival. Therefore, coating substances that have anti-inflammatory and anti-oxidation effects on the surface of membrane could lead to development of a new treatment method. However, There are a lot of problems to be elucidated and we will continue our study in order to develop a new blood purification membrane more effective in continuous hemodiafiltration.

研究分野：集中治療医学

キーワード：急性血液浄化療法 血液浄化膜 ビタミンE

1. 研究開始当初の背景



敗血症性ショックは集中治療部における死亡の第一位であり、近年、劇的に増加しつつある。その要因として、ハイリスク患者の延命率の向上、侵襲の大きい治療の増加、および免疫能に異常がある宿主（化学療法、免疫抑制によって）が増加していることなどが挙げられる。従って、敗血症性ショックに対する効果的治療法の開発は喫緊の課題といえる。ほとんどの敗血症性ショックは、グラム陰性桿菌の産生するエンドトキシンによって引き起こされ、その本体は、細胞壁の lipopolysaccharide (LPS) である。これまで敗血症性ショックにおける臓器障害の発症メカニズムについては、LPS が白血球を中心とした炎症細胞に作用することで、TNF, IL-1, IL-6/IL-8 などの炎症性サイトカインが誘導され、さらに NO, PAF などの二次的因子の発現上昇が重要な働きをするとの考えが支持されている。他方、さらなる研究の中で、敗血症を中心とした急性炎症性臓器障害の一因に酸化ストレスの関与を明らかにしてきており、酸化ストレスの軽減が臓器傷害の進展を防ぎ生存率の向上に寄与できるかもしれないとの報告が散見される。

このような集中治療領域における治療法のスタンダードとして血液浄化療法が臨床にて使用されている。しかし、血液浄化療法の有効性が報告されているが、炎症のコントロールや酸化ストレスのコントロールといった観点での報告は少ない。そこで、血液浄化療法における炎症や酸化ストレスの変化を検討することが、新規のメディカルデバイス開発に不可欠であり、基礎的な検討として現在ある膜素材におけるこれらの特徴を検討することが重要ではないかとの発想に至った。

2. 研究の目的

当教室にて行ってきた基礎研究における成果の一つに、強力な抗酸化能を有した各種新規合成ビタミン E 誘導体が全身性炎症反応モデルにおいて非常に有効である事を報告してきた。このことは、酸化ストレスと敗血症の病態が深く関わり合っていることを示しており、抗酸化物質を用いた抗酸化療法が、敗血症治療戦略の一つとなり得ると確信し

ている。

現在、臨床にて使用されている膜素材としてポリスルホン膜等がある。そこで、初めにポリスルホン膜やエチレン-ビニルアルコール共重合体膜、更にはポリスルホン膜に Vitamin E コートをされている透析膜を検討することで、それぞれの膜素材による血液浄化療法の臓器障害抑制効果の違いやそのメカニズムを明らかにする。最終的に、敗血症性ショックの臓器障害に対する治療法として適切な膜素材の基礎的検討を目的として実験を計画した。

3. 研究の方法

ラット急性全身性炎症モデルとしてリポポリサッカライドを静脈内に 10mg/kg 投与することでモデルを作成した。リポポリサッカライド投与 6 時間後に、セボフルレンを用いた全身麻酔下に大腿動静脈を確保したうえで、ヒト用の体外循環カラム 200 分の 1 スケールで作成したものをを用いて体外循環を 30 分間行った。使用した透析膜としては下図に示した、ポリスルホン膜、エチレン-ビニルアルコール共重合体膜、ポリスルホン膜上に Vitamin E をコートした透析膜を用意した。各膜を無作為に 3 群に分けて使用することで、膜素材における効果の違いを検証した。体外循環終了後は、返血を行い、創部を縫合したうえで全身麻酔から覚醒させ、その後の経過を観察した。

各カラムの透析膜の特徴

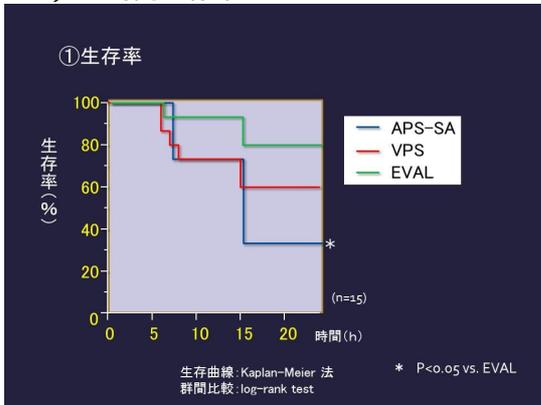
	膜素材	コーティング剤	充填液
APS-SA	ポリスルホン	—	ピロ亜硫酸Na
VPS	ポリスルホン	Vit.E	ピロ亜硫酸Na
EVAL	エチレンビニルアルコール	—	過酸化水素水

今回の研究における検証項目としては以下の通りである。

- 1) 24 時間生存率
- 2) 血中 IL-6 の経時的変化並びに尿中の除去量
- 3) 血清中 MDA (malondialdehyde) の経時的変化並びに肺・肝臓のタンパク中における濃度
- 4) PAO (Potential Anti Oxidant) の経時的変化
- 5) 肺の病理組織像

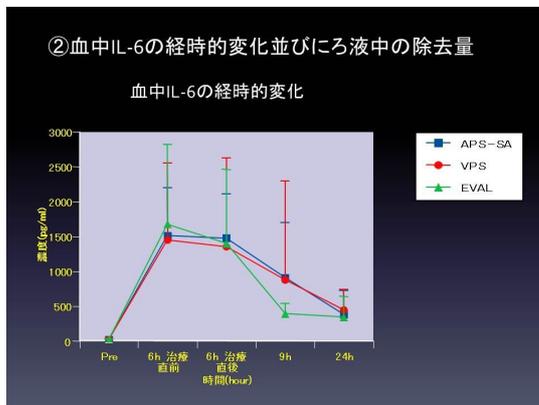
4. 研究成果

1) 24時間生存率

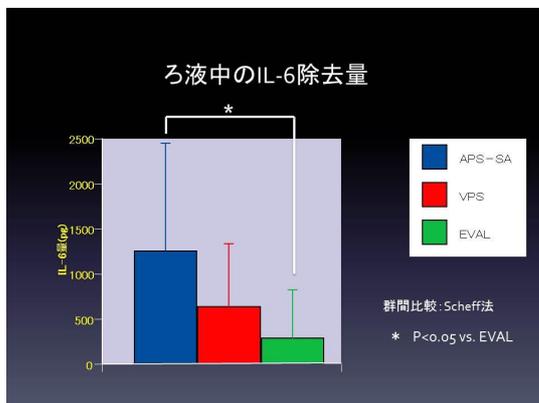


24時間生存率を示す。ポリスルホン膜にて血液透析を行った群は施行直後より死亡するラットを認めたが、ビタミンE誘導体コートしたポリスルホン膜を用いることで、生存率は改善する傾向を認めた。また、エチレン-ビニルアルコール共重合体膜を用いた群においては生存率の有意な上昇を認めた。

2) 血中 IL-6 の経時的変化並びにろ液中の除去量



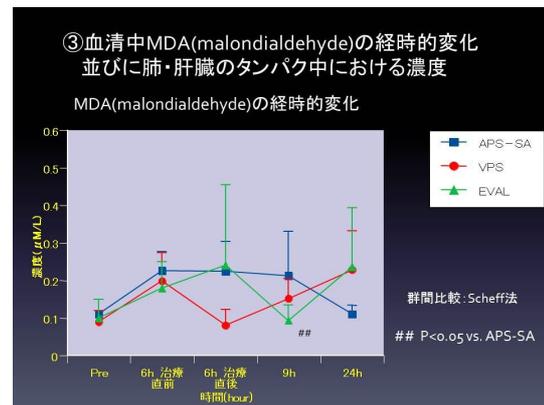
初めに、炎症反応の経過を確認するために、血液中サイトカインの一つである IL-6 濃度について測定した。今回の結果では、ポリスルホン膜とポリスルホン膜上に Vitamin E をコートした群との間で差を認めなかった。一方、エチレン-ビニルアルコール共重合体膜を使用した群では、透析終了3時間後において、IL-6 が低下していた。



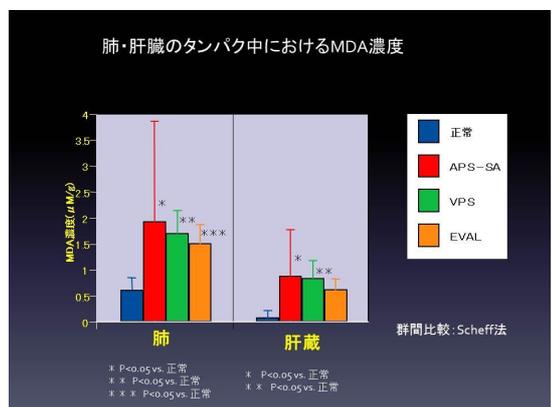
更なる検討として、30分間施行された濾過透析における IL-6 の除去量について検討を加えた。すると、ポリスルホン膜群、ポリスルホン膜上に Vitamin E をコートした透析膜群、エチレン-ビニルアルコール共重合体膜群の順で濾過された IL-6 量は少なかった。

これらのことから、ポリスルホン膜に Vitamin E をコートした膜やエチレン-ビニルアルコール共重合体膜は、サイトカインの全体としての産生量を低下できる可能性が示唆されたと考えられた。

3) 血清中 MDA (malondialdehyde) の経時的変化並びに肺・肝臓のタンパク中における濃度



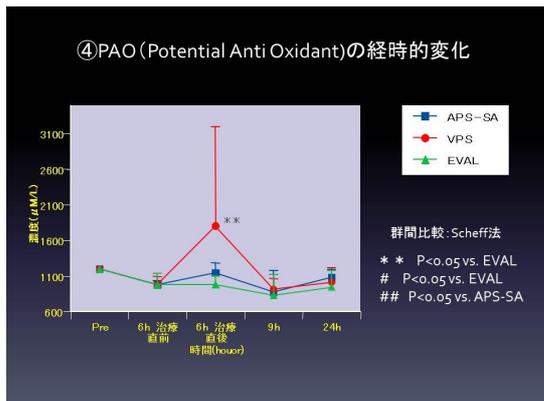
これら Vitamin E をコートしたポリスルホン膜やエチレン-ビニルアルコール共重合体膜の抗炎症効果がなぜ生じているかを明らかにするために、酸化ストレスの観点から、検討を加えることとした。初めに、血液中の酸化ストレスの指標として血中 MDA の測定を行った。高い抗酸化能を有したポリスルホン膜上に Vitamin E をコートした透析膜群において、透析終了直後の時点において MDA の有意な低下を認めた。一方、エチレン-ビニルアルコール共重合体膜群ではポリリサッカライド投与9時間後の時点において、有意に血中 MDA 濃度の低下を認めた。



主要臓器である肺並びに肝臓の酸化ストレスを MDA にて評価すると、ポリスルホン膜群、ポリスルホン膜上に Vitamin E をコートした透析膜群、エチレン-ビニルアルコール共重合体膜群の順で低下傾向を認めた。

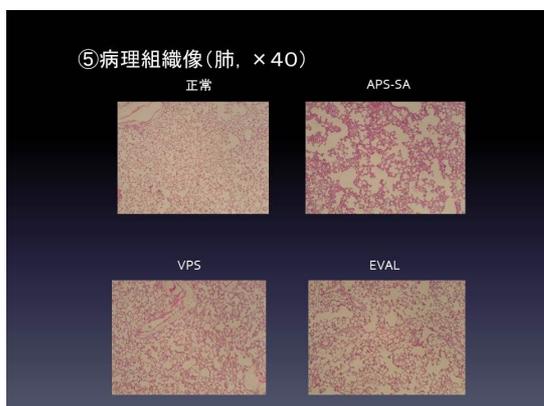
これらのことから、ポリスルホン膜上に Vitamin E をコートした透析膜群やエチレン-ビニルアルコール共重合体膜群では、炎症反応時の酸化ストレスを軽減できることが示された。

4) PAO (Potential Anti Oxidant) の経時的変化



血液中の抗酸化能がどの程度変化したかを検討するために、血中 PAO を用いた評価系を用いて検討した。リポポリサッカライドの投与により全身性に炎症を生じると、酸化ストレスの増大から PAO の低下を招く。このことは、ポリスルホン膜群やエチレン-ビニルアルコール共重合体膜群において、低値で経過していることから示された。一方、抗酸化能を有しているポリスルホン膜上に Vitamin E をコートした透析膜群においては、体外循環後に有意差を持って PAO 値が上昇しており、抗酸化能が一過性に増強していることが示された。これらのことから Vitamin E をコートしたポリスルホン膜にて血液透析を行うことで、酸化ストレスの制御を行うことが出来た理由と考えられた。

5) 肺の病理組織像



主要臓器である肺のリポポリサッカライド投与 24 時間後における組織像を示す。ポリスルホン膜群では間質への炎症細胞の浸潤や肥厚等を認め急性肺障害の像を呈していたが、Vitamin E をコートしたポリスルホン膜群やエチレン-ビニルアルコール共重合体膜群ではこれらの炎症に伴う肺の

変化を最小限に留めることができた。

今回の研究において、

- ・現在上市されている透析膜において、急性期炎症反応の制御に違いがあること
 - ・Vitamin E をコートした透析膜やエチレン-ビニルアルコール共重合体膜を用いることで急性期の生存率を改善できる可能性があること
 - ・抗炎症効果や抗酸化効果を有した化合物を膜表面にコートすることで、新たな治療法開発につながる可能性があることが成果としてあげられる。
- しかし、明らかにすべき課題も多数あり、引き続き研究を重ね、新規の治療法開発につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田則久

大分大学医学部 助教

研究者番号：90537101

(2)研究分担者

後藤孝治

大分大学医学部 講師

研究者番号： 10363558

(3)連携研究者

()

研究者番号：