

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462825

研究課題名(和文) EMPs制御から見た腎代替療法における新規膜素材の開発

研究課題名(英文) Targeting the control of EMPs: The development of new membrane materials for renal replacement therapy

研究代表者

後藤 孝治 (Goto, Koji)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：10363558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では重度の全身性炎症反応時における、血小板由来マイクロパーティクルの影響に関してラットを用いて検討した。LPS誘発全身性炎症反応モデルラットを用いて、体外循環施行時の膜素材の違いを検討するため、EVOH膜、APS-SA膜、VPS膜其々で検討を行った。正常ラットでは体外循環後の血液中PDMP濃度に変化はなかった。一方、炎症時にはAPS-SA膜で、透析直後よりPDMPが上昇したが、VPS膜では上昇しなかった。EVOH膜では、シャム群と同じ傾向を示した。重度の全身性炎症反応時において、膜素材の違いにより血液中のPDMP濃度に変化が生じており、治療効果に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study we examined what effect the selection of membrane materials for RRT had on the PDMP (platelet derived micro particles) level in SIRS (systemic inflammation response syndrome). We compared the effect between three different membrane materials, EVOH, APS-SA and VPS in LPS-induced SIRS rat model. In the result we found that any membrane didn't change the blood PDMP level after RRT in non-LPS treatment group. On the other hand in LPS treatment group, APS-SA increased the PDMP level immediately after RRT and VPS didn't change the PDMP level. EVOH showed the same variation pattern as the sham group. We conclude that the appropriate selection of membrane materials may produce the desired therapeutic effect in SIRS.

研究分野：集中治療

キーワード：急性腎不全 血液浄化療法 血小板 マイクロパーティクル 催炎症作用 臓器障害

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因の第一位であり、近年、その罹患率は増加傾向にある。その要因として考えられるのは、侵襲の大きい治療の増加やハイリスク患者の延命率の向上があげられる。これらの患者においては、免疫能に異常があることが多く、結果として敗血症を中心とした重症病態に罹患する。従って、敗血症性ショック等の重症病態に対する効果的治療法の開発は喫緊の課題といえる。敗血症性ショック等の重症病態において、臓器障害が発生するメカニズムについては、白血球を中心とした炎症細胞により TNF- α 、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生じ、結果として臓器障害に発展するとの考えが支持されている。近年、敗血症時の多臓器不全の病態形成に、DAMPs (damage associated molecular patterns) と称される一連の分子群が増悪化因子として重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。DAMPs は内因性の因子であり、好中球由来のヌクレオソームやヒストン、DNA といった細胞死関連物質として多数知られている。重症病態においては、DAMPs が RAGE 等のシグナルを刺激し、このことにより細胞内シグナルを活性化し、免疫担当細胞の活性化 (炎症性サイトカイン産生増大、活性酸素産生増大、細胞接着因子発現亢進、細胞遊走亢進など) をもたらし、敗血症病態を形成していくものと考えられている。各種ある DAMPs の中で、今回着目したのは血小板由来マイクロパーティクル (PDMP: Platelet Derived Micro Particles)

である。PDMP は、活性化された血小板の放出反応と共に膜小胞体として放出される粒子であり、血液凝固促進活性や、その他単球、血管内皮細胞活性化等の作用が報告されており、敗血症を中心とした重症病態のキーマediatorとしての重要性が報告されている。

一方で、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はいるが、DAMPs 制御に関する報告は少ない。そこで、血液浄化療法における DAMPs 中でも PDMP の変化に着目し検討することが、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

教室にて行ってきた基礎研究における成果の一つに、LPS 誘発全身性炎症反応モデルにおいて血液浄化療法の有効性を報告してきた。一方で、DAMPs が重症の臓器障害において重要な役割を担っており、その制御が敗血症治療戦略の一つとなってきた。

そこで、臨床にて使用されている膜素材として EVOH 膜、ポリスルホン膜 (APS-SA 膜)、ビタミン E 固定化ポリスルホン膜 (VPS 膜) による DAMPs への影響を検討することで、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

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

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 0.5mg/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、EVOH 膜、ポリスルホン膜 (APS-SA 膜)、ビタミン E 固定化ポリスルホン膜 (VPS 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	ビタミンE	ピロ亜硫酸Na
EVOH	エチレンビニルアルコール	(-)	過酸化水素水

対照群として、正常ラットに対して同様の検討をおこなった。

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) 透析膜付着タンパク量
- 2) 付着タンパク質の 2 次元電気泳動
- 3) 透析後の電子顕微鏡を用いた膜表面解

析

4) 血液中 PDMP の変化

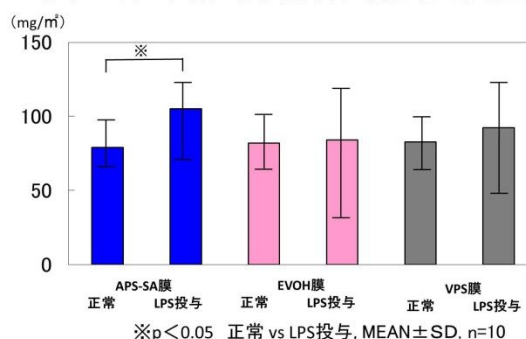
4. 研究成果

1) 透析膜付着タンパク量

初めに、透析後の付着したタンパク量の差異について検討を行った。

APS-SA 膜、EVOH 膜、VPS 膜との比較を示す。

ラット体外循環後膜付着蛋白質量



EVOH 膜では、炎症反応の有無によるタンパク付着量の変化が少ないが、APS-SA 膜においては、炎症反応を惹起した状態でのタンパク付着量が増加した。

ポリスルホン膜にビタミン E を定着させた VPS 膜においては、APS-SA 膜において認められた、炎症反応時における付着タンパク量の増加を認めなかった。

2) 付着タンパク質の 2 次元電気泳動

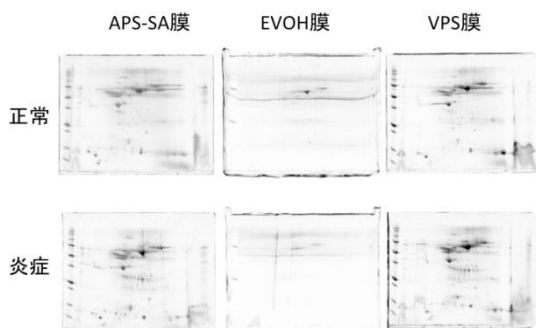
次に、付着したタンパクにおいて各膜間における差異があるか否かについて検討を加えた。

APS-SA 膜、EVOH 膜、VPS 膜ともに、付着タンパク質を認め、アルブミンを中心としたタンパク質が付着していた。

EVOH 膜は、他の膜素材に比べ、アルブミ

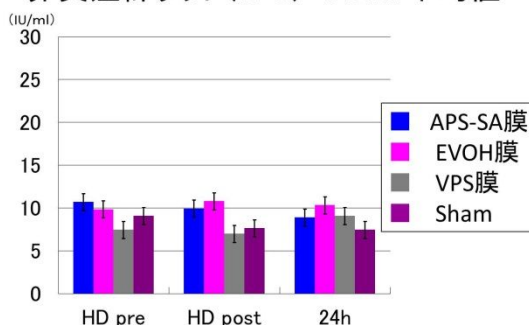
様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

ンの付着量が少ない傾向を認めた。

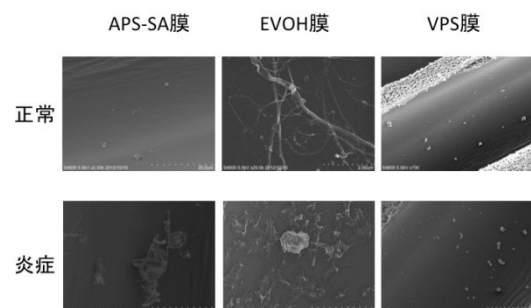


最後に、血液中の DAMPs 測定目的で、PDMP の測定を行った。

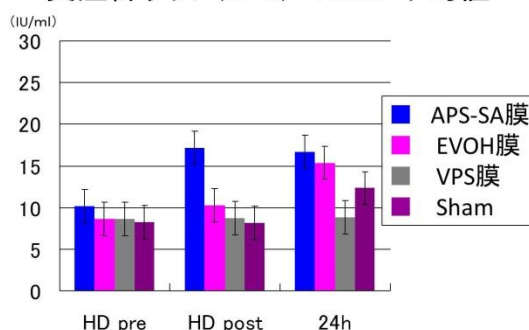
非炎症群ラット(N=6) PDMP平均値



3) 透析後の電子顕微鏡を用いた膜表面解析



炎症群ラット(N=6) PDMP平均値



更に、透析施行後の透析膜表面において、各膜間における差異があるか否かについて検討を加えた。

APS-SA膜, EVOH膜, VPS膜ともに、正常ラットにおいては、付着血球成分が少なかったが、炎症反応が惹起された状態においては、付着した血球成分を多数認めた。タンパク質付着量とは異なり、EVOH膜において付着血球成分を多数認めた。

4) 血液中 PDMP の変化

正常ラットにおいては、血液中の PDMP 増加を認めなかったが、炎症時には差異を認めた。APS-SA 膜では、透析直後より急激に上昇する傾向を認めたが、EVOH 膜やシヤム手術群では、透析後徐々に上昇することがわかった、また、VPS 膜においては、DAMPs である PDMP そのものの上昇を抑制しており、重症病態における有用性が示唆された。

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た

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

血液透析では、DAMPs の一部を制御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 2 件)

後藤孝治 . 心臓手術関連急性腎傷害 (CSA-AKI) に対する早期 CRRT 導入効果 . 第 26 回日本急性血液浄化学会学術集会 2015.10.10.東京

部亮, 古賀寛教, 後藤孝治, 他 . ラット全身性炎症反応症候群モデルにおけるビタミン E 固定化中空糸膜を使用した血液浄化療法の有効性検討 . 第 41 回日本集中治療医学会学術集会 2014.02.27.京都

[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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 孝治 (Goto Koji)
大分大学 医学部 講師

研究者番号: 10363558

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: