

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01425

研究課題名(和文) 癌性腹水症に対する腹水精製デバイスの作成と携行式連続腹水精製灌流法の確立

研究課題名(英文) Preparation of ascites purification device for cancerous ascites and establishment of portable continuous ascites purification perfusion method

研究代表者

大橋 篤(Ohashi, Atsushi)

藤田医科大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：30310585

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)：CARTを施行した悪性腹水中の還元型アルブミン(HMA)比率はヒト血清アルブミン製剤よりも有意に低値であった。我々は悪性腹水にシステイン製剤を添加し且つ透析を施してHMA率が高い状態で安定化させる条件を確立した。次に、悪性腹水は炎症性サイトカインが著高していた。そこで悪性腹水を透析治療用の2MG吸着体に灌流させるとIL-6が除去できる事を明らかにした。さらにヒト肝癌細胞HepG2株に未処理と吸着処理した悪性腹水を添加して24時間培養後にmRNAを抽出し、SAAとアルブミン遺伝子の発現倍率を比較したところ、吸着腹水はSAA発現を抑制する一方でアルブミンの発現を向上させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究で考案した悪性腹水に対する腹水精製技術をCARTの分離処理工程に応用すれば、酸化修飾した腹水アルブミンを還元型へ転換させ還元能を付加できる。さらに、CARTの濃縮工程の際、処理腹水をヘキサデシル基吸着デバイスに灌流させれば再静注後の炎症反応抑制とアルブミン合成能を向上させる効果が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The ratio of mercapto group (reduced form) of Cys-34 in albumin contained in malignant ascites was significantly lower than that in human serum albumin preparation. We have shown that L-cysteine can be administered to malignant ascites at an appropriate ratio and then dialyzed to stabilize the reduced albumin ratio at high levels. Second, IL-6 and serum amyloid A protein (SAA) levels in malignant ascites were significantly higher than in normal serum. We have shown that IL-6 contained in malignant ascites is removed by 2MG adsorbent, which is a therapeutic device for dialysis amyloidosis. Untreated or adsorbed malignant ascites was added to a human hepatoma cell line and incubated for 6 hours, after which the fold expression of SAA and albumin genes was compared. We demonstrated that the adsorbed malignant ascites suppressed SAA gene expression, while enhancing albumin gene expression.

研究分野：人間医工学

キーワード：難治性腹水症 腹水濃縮再静注法 低侵襲治療システム 癌性腹膜炎 酸化/還元型アルブミン 血漿アミロイドA蛋白質 炎症性サイトカイン ヘキサデシル基吸着デバイス

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍や肝硬変などによる難治性腹水症に対し、腹水穿刺で排液と膠質浸透圧維持の目的でアルブミン製剤が投与されるが、近年、中空糸デバイスを用いた腹水濾過濃縮再静注療法 (CART) が施行されている。しかしながら、CART は半透膜でタンパク質を回収する一方で、グルコースやビタミン群をはじめアミノ酸、ミネラルなど細胞代謝に不可欠な小分子量物質が破棄されてしまう。また、悪性腹水は癌細胞や活性化白血球により炎症性サイトカイン濃度が高く且つ好中球から産生される活性酸素などで蛋白質が酸化修飾されている可能性があり、再静注後の腹水中蛋白質の機能面や炎症反応が問題視されている。また、CART の腹水濃縮操作は分離デバイスと清潔操作などの専門的技術が必要不可欠であり、CART の有効性について一般的な難治性腹水症の対症療法である腹水穿刺とアルブミン製剤投与を比較する必要がある。

### 2. 研究の目的

難治性腹水症の CART 症例で分離抽出した処理腹水の品質を向上させるべく、癌細胞の浸潤や活性化白血球により酸化修飾された蛋白質の機能改善 (アルブミンの酸化/還元転換) 法の確立および、悪性腹水の炎症関連物質を血液浄化療法の分離技術を応用し選択的に除去して腹水成分の機能を正常化させる腹水精製デバイスを作成する。

### 3. 研究の方法

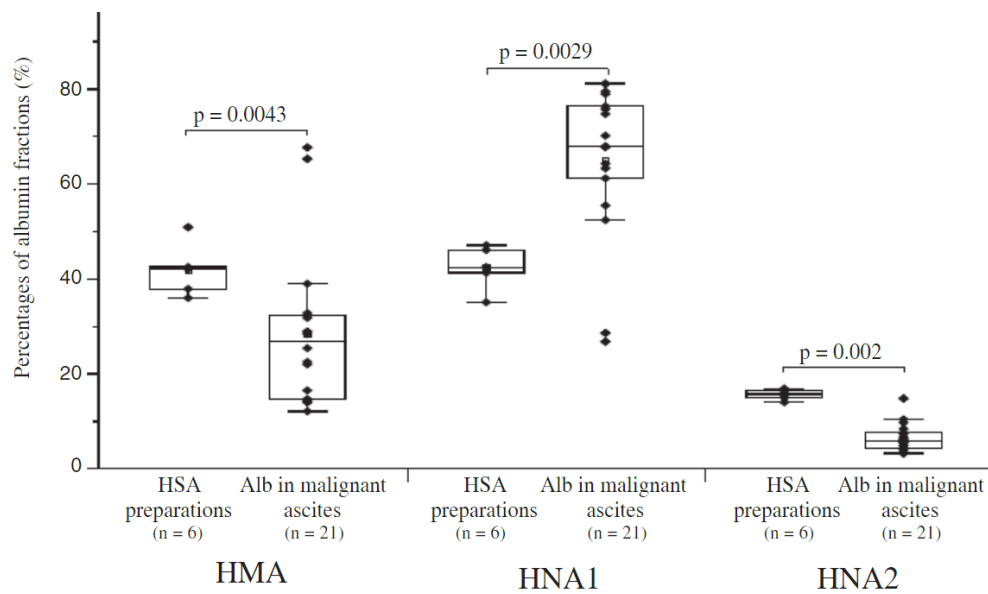
悪性腹水患者における無細胞および濃縮腹水再注入療法中に還元型アルブミンの比率を安定させる方法：難治性の CART 症例を対象に腹水濃縮工程で分離膜内に残存する廃腹水を試料とした。まず、腹水試料について、アルブミン分子上の Cys-34 のメルカプト (HMA 還元型) / ノンメルカプト (HNA 酸化型) の比率を高速液体クロマトグラフィーで分析する。HNA が優位な腹水アルブミンに対し還元剤を添加し HMA 率が向上するか、その状態はどれだけ継続するのかを評価する。安定性が得られない場合は試料の透析処理を追加し、本精製工程を施した腹水アルブミンとアルブミン製剤の質的評価を行う。

血液浄化用吸着装置を使用した悪性腹水の炎症反応抑制法：CART 症例の腹水資料中の炎症性サイトカインと急性相反応蛋白質を測定する。悪性腹水で IL-6 など炎症性サイトカインが著高する腹水を選択し、透析アミロイドーシス治療に適応されるキサデシル基吸着カラムで 2MG を選択的に除去するデバイスで炎症性サイトカインの除去を試みる。更に、未処理の腹水と本処理で精製した腹水試料をヒト肝癌細胞 HepG2 株へ添加・培養し、mRNA を抽出し急性相蛋白質 SAA およびアルブミンの遺伝子発現倍率を qRT/PCR で比較し吸着処理による悪性腹水精製処理の効果を検証する。

### 4. 研究成果

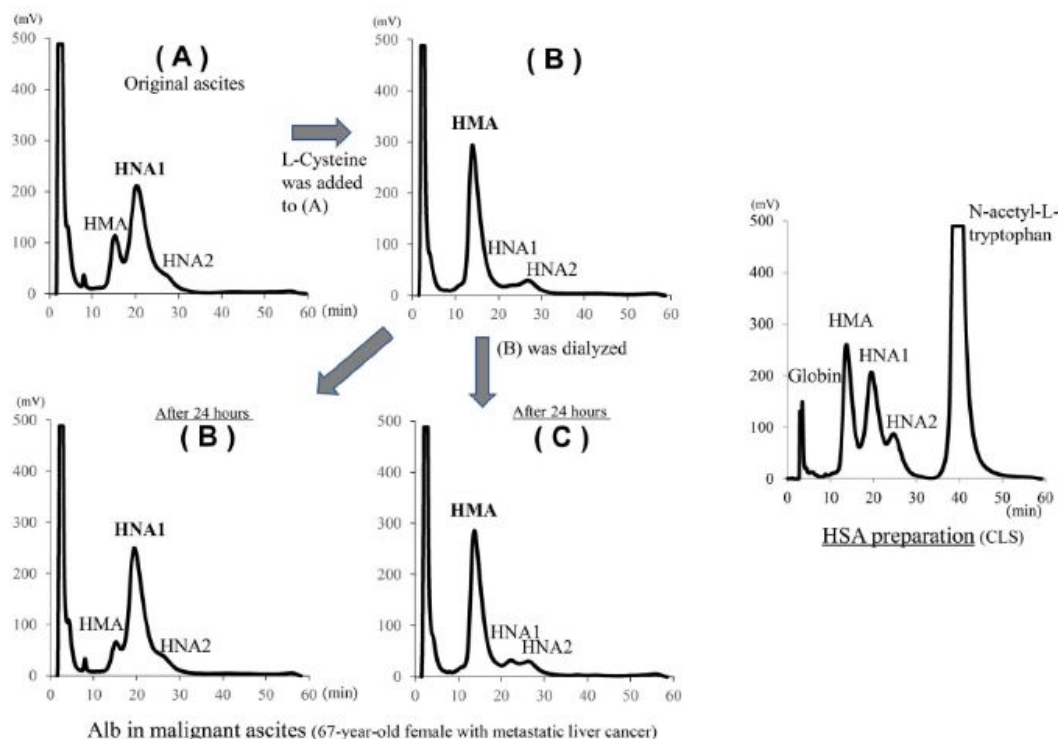
悪性腹水患者における無細胞および濃縮腹水再注入療法中に還元型アルブミンの比率を安定させる方法：CART を受けた 21 人の患者を対象に悪性腹水中の還元型アルブミン (HMA) と酸化型アルブミン (HNA) の割合を分析し、その還元率をヒト血清アルブミン (HAS) 製剤と比較し

たところ、HMA 率は HSA 製剤が 42.2% に対し、悪性腹水中のアルブミンは 22.5% で有意に低かった(図 1)。



**FIG. 1.** The percentages of HMA, HNA1, and HNA2 of HSA preparation and malignant ascites. Nonparametric data presented in box plots with median, inter-quartile range (middle 50%), and range.

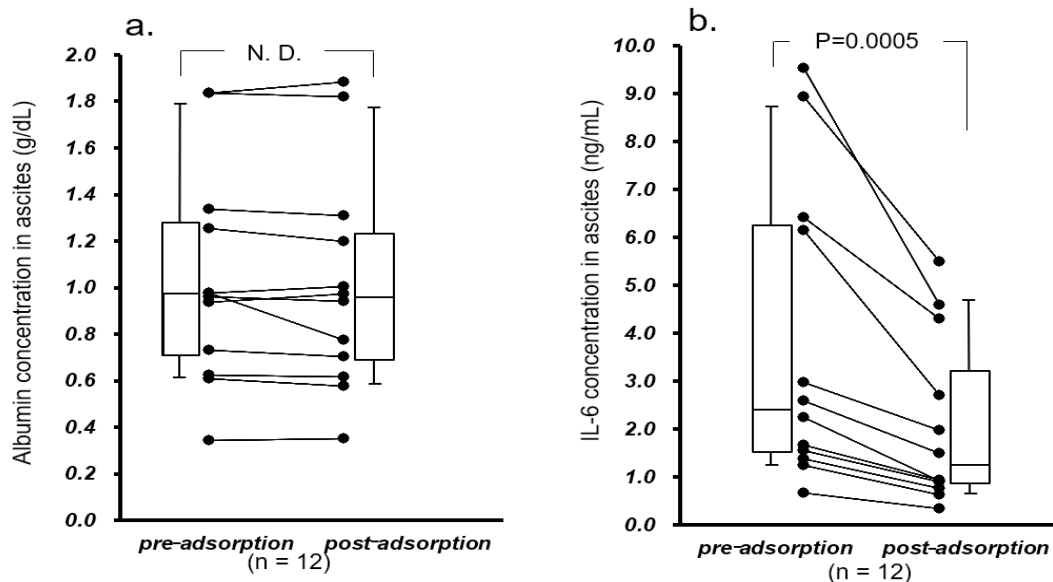
我々は、悪性腹水のアルブミンの還元機能を高く安定化させるべく、原腹水蛋白量の 2 倍の mol 比で L-システイン製剤を添加したところ一過性に 80% 前後へ上昇するも 24 時間後に初期値に復した。そこで、システイン製剤と腹水を 1 時間反応させた後に透析を施したところ、HMA 率は 60% 程度で約 2 週間程度効果を持続させる事を明らかにした(図 2C)。この技術「還元型ア



**FIG. 2.** HPLC chromatograms of HSA preparation and ascites from a patient with metastatic liver cancer, with L-cysteine addition, processed by dialysis. (a) HPLC chromatogram of the original malignant ascites samples. (b) HPLC chromatogram of the ascites solution 1 h after the addition of L-cysteine to the original malignant ascites sample; the transformation from HNA1 to HMA can be observed. Chromatogram of (b) below left obtained 24 h after the addition of L-cysteine; the peak of HMA decreased to the level observed in the original ascites sample (a). (c) HMA changes over time of the dialyzed ascites sample (b) and the stability of the HMA peak after 24 h, similar to the case in (b). The right side is a HPLC chromatogram of the HSA preparation.

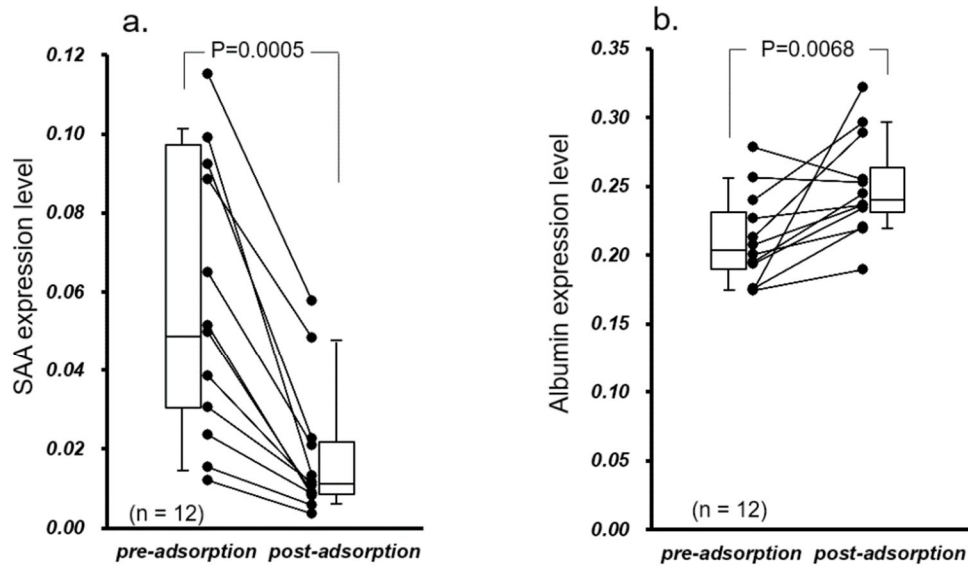
ルブミンの割合が増加した溶液の製造方法及び装置」を特許出願し、さらに欧文誌に論文発表した。

血液浄化用吸着装置を使用した悪性腹水の炎症反応抑制法：悪性腫瘍由来の悪性腹水症の腹水試料は TNF , IL-6 また CRP、SAA が著高していた。IL-6 は炎症の惹起やタンパク合成抑制作用があり、悪液質や異化を促進させる。そこで、血液浄化療法で使用する吸着デバイスによる腹水中サイトカインの吸着効果を検討したところ、ヘキサデシル基吸着体は腹水のアルブミンを吸着しない反面、IL-6 は高率に吸着され除去率は 43.2%であった（図 3）。



**FIG.3** Albumin and IL-6 concentrations in non-adsorbed ascites and Lixelle-adsorbed ascites  
 a. Comparison of albumin concentrations in non-adsorbed ascites and Lixelle-adsorbed ascites.  
 b. Comparison of IL-6 concentrations in non-adsorbed ascites and Lixelle-adsorbed ascites. Non-parametric data presented in box plots with median, inter-quartile range (middle 50%), and range.

そこで、吸着処理の効果をヒト肝細胞で確認するため、未吸着腹水を対照として吸着腹水を肝癌細胞 HepG2 株に添加して 24 時間培養後に mRNA を抽出し、炎症反応指標として血清アミロイド A 蛋白質 SAA 遺伝子とタンパク合成能指標としてアルブミン遺伝子の発現解析を定量 RT/PCR 法で確認したところ、吸着処理した腹水は未吸着腹水に比し HepG2 細胞の SAA 遺伝子発現を有意に抑制した（図 4 a）一方、アルブミン遺伝子発現は、吸着処理した腹水が未吸着腹水に比し有意に上昇した（図 4 b）。炎症性サイトカインの分子量は 20~30 kDa であるため、悪性腹水症に対する CART 処理工程の限外濾過では除去できず逆に濃縮されるが、細胞分離した腹水を 2 次膜で濃縮する行程間でリクセル吸着デバイスを組み込むことで、処理腹水を再静注後に生じる炎症反応の抑制と肝臓における蛋白合成能を向上させられる可能性があることを明らかにした。



**FIG.4.** Comparison of gene expression levels when pre-adsorption and post-adsorption ascites on Lixelle were added to HepG2 cells. a. Comparison of SAA gene expression when non-adsorbed and Lixelle-adsorbed ascites were added to HepG2 cells. b. Comparison of albumin gene expression when non-adsorbed and Lixelle-adsorbed ascites were added to HepG2 cells. Data are shown by  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ . Non-parametric data presented in box plots with median, inter-quartile range (middle 50%), and range.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Atsushi Ohashi, Shigeru Nakai Sachie Yamada Masao Kato Midori Hasegawa	4. 巻 23
2. 論文標題 A Method for Stabilizing the Proportion of the Reduced Form of Albumin During Cell Free and Concentrated Ascites Reinfusion Therapy in Patients with Malignant Ascites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 242-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1744-9987.12827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sachie Yamada, Norio Nii Masao Kato Atsushi Ohashi Ryota Suzuki Masakazu Komatsu Kosei Abe Yosuke Hata Kazuo Takahashi Hiroki Hayashi Shigehisa Koide Naotake Tsuboi Daijo Inaguma Yukio Yuzawa	4. 巻 23
2. 論文標題 Comparison Between the Internal and External Pressure Filtration Method of Cell Free and Concentrated Ascites Reinfusion Therapy Using the Same Cancerous Ascites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 237-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1744-9987.12821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Atsushi Ohashi, Shigeru Nakai, Hideo Hori, Sachie Yamada, Masao Kato, Shigehisa Koide, Hiroki Hayashi, Naotake Tsuboi, Daijo Inaguma, Midori Hasegawa, Yukio Yuzawa	4. 巻 impress
2. 論文標題 Suppression of inflammation during cell-free concentrated ascites reinfusion therapy (CART) using a blood purification device	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 impress
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1744-9987.13540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大橋篤、中井滋、山田幸恵、加藤政雄、長谷川みどり
2. 発表標題 悪性腹水症患者の腹水中アルブミンの酸化/還元状態と還元型を高率かつ安定化させる試み
3. 学会等名 第39回日本アフェレシス学会(岡山)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋篤、中井滋、山田幸恵、加藤政雄、長谷川みどり
2. 発表標題 腹水濃縮再静注療法における腹水中酸化型アルブミンに対する還元型転換法の確立
3. 学会等名 第61回日本透析医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大橋篤、堀秀生、川口和紀、中井滋、北口暢哉、比企能之、小出滋久、長谷川みどり、湯澤由紀夫
2. 発表標題 アルブミンに対する酸化還元型転換法の検討
3. 学会等名 第61回日本透析医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Atsushi Ohashi, Shigeru Nakai, Kazunori Kawaguchi, Hideo Hori, Yoshiyuki Hiki, Nobuya Kitaguchi, Shigehisa Koide, Midori Hasegawa, Yukio Yuzawa
2. 発表標題 A simple method to stabilize the reduced albumin state for human serum albumin preparation
3. 学会等名 34th Congress of the International Society of Blood Purification (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Atsushi Ohashi, Shigeru Nakai, Hideo Hori, Sachie Yamada, Masao Kato, Midori Hasegawa, Yukio Yuzawa
2. 発表標題 Suppression of inflammation during cell-free concentrated ascites reinfusion therapy (CART) using a blood purification device.
3. 学会等名 12th World Congress of the International Society for Apheresis and the 40th Annual Meeting of Japanese Society for Apheresis (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 国際出願	発明者 大橋篤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PTC/JP2016/84088	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中井 滋  (Nakai Shigeru)  (20345896)	藤田医科大学・保健学研究科・教授   (33916)	
研究 分担者	長谷川 みどり  (Hasegawa Midori)  (40298518)	藤田医科大学・医学部・教授   (33916)	
研究 協力者	加藤 政雄  (Kato Masao)	藤田医科大学病院・臨床工学部・課長	
研究 協力者	山田 幸恵  (Yamada Sachie)	藤田医科大学病院・臨床工学部・主任	