

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17960

研究課題名(和文)敗血症性急性腎傷害に有効な血液浄化膜の検討

研究課題名(英文)Evaluation of blood purification membrane effective for septic acute kidney injury

研究代表者

大地 嘉史(OHCHI, YOSHIFUMI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50649811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、LPSを添加したヒトの血液を用いて敗血症血液浄化モデルを作成し、polyethersulfoneを膜素材とした血液浄化器の、サイトカイン、HMGB-1、アルブミンの除去性能を評価した。その結果、使用した血液浄化器は、従来の血液浄化器と比較して高効率にサイトカインやHMGB-1を除去でき、かつアルブミンの喪失は最低限に抑えられていた。また、血液浄化器の膜面積が大きくなるほど、浄化効率は低下しにくいことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今研究で使用したpolyethersulfoneを膜素材とした血液浄化器は、従来の血液浄化器よりも炎症性サイトカインやHMGB-1を、アルブミンの喪失を抑えつつ効率的に除去できる可能性が示唆された。敗血症の主病態は、病原微生物によって生じた過剰炎症に伴う臓器障害であり、その重要な要素がサイトカインやHMGB-1である。今研究結果から、敗血症のような高サイトカイン状態に伴う腎傷害においては、今回使用した血液浄化器を使用すると、腎補助に加えて炎症の制御も期待できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In this study, a septic blood purification model was prepared using human blood to which LPS was added, and the removal performance of cytokines, HMGB-1 and albumin by a blood purification membrane using polyethersulfone was evaluated. As a result, this membrane was able to remove cytokines and HMGB-1 with higher efficiency than the conventional membranes, and the albumin loss was suppressed to the minimum. It was also found that the purification efficiency is less likely to decrease as the membrane area increases.

研究分野：集中治療

キーワード：敗血症 急性血液浄化療法 急性腎傷害 サイトカイン HMGB-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症や多発外傷といった全身性に炎症反応を生じる病態では、サイトカインや HMGB-1 が病態の形成に重要な役割を担っている。そこで、サイトカインや high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) の除去による病態の改善を期待して様々な方法が考案され、その一つが持続血液濾過である。近年、敗血症で血液浄化療法を用いて生存率や血行動態を改善したとの報告が認められ、その機序としてサイトカインをはじめとした有害物質の非特異的な除去が効果的であったと考えられている。サイトカインや HMGB-1 といった液性伝達物質の多くは 5~60 kilodalton (kDa) の中分子である。これらは血液浄化療法による除去が可能であることが様々な研究で示されている。以前にわれわれも人血を用いた血液浄化モデルを作成し、cellulose triacetate (CTA) を膜素材に用いた血液浄化器を使用し、血液濾過によって多種類の液性伝達物質が除去できることを報告した。

但し、種々のサイトカイン除去方法のなかで、最適な方法及び装置は未だ不明である。体外循環を用いてサイトカインを除去する方法に関する ex vivo data を対象に行われた systematic review では、血液浄化器の膜孔を大きくした high cut-off filter を用いる血液濾過が、サイトカイン除去に最も効率の良い方法であった。一方、装置としての high cut-off filter に関しても数々の報告があり、サイトカイン除去効率の高いものは、アルブミンの除去率も高い。近年、膜素材に polyethersulfone (PES) を用いた、膜構造を非対称の 2 層構造にすることで除去できる物質の分画を明敏にし、小から中分子までを効率よく除去できる血液浄化器が本邦で開発された。但し、この PES 膜を用いた持続血液濾過によるサイトカイン、HMGB-1 の除去については、現在まで報告が無かった。

2. 研究の目的

我々は、この二層構造 PES 膜は従来の血液浄化器よりもサイトカイン、HMGB-1 の除去性能が高く、かつアルブミン除去能は低いとの仮説を立てた。今研究の目的は、人血を用いた ex vivo 研究で、上記仮説を立証することである。

3. 研究の方法

8 人の健常ボランティアから 400ml の血液を採取し、lipopolysaccharide 30mg を添加して 39℃ で 12 時間保存することでサイトカインおよび HMGB-1 を惹起させた。その後に、膜面積 1.1 m² 及び 2.1 m² の PES 膜血液浄化器を組み込んだ血液濾過回路(図-1)に、濾過流量 2 l/h でそれぞれ循環させた。血液浄化器の前後の血液と濾液を 1h, 4h, 8h, 12h, 24h の 5 点で採取し、サイトカイン(IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α), HMGB-1, アルブミン濃度を測定して、ふるい係数とクリアランスを算出した。

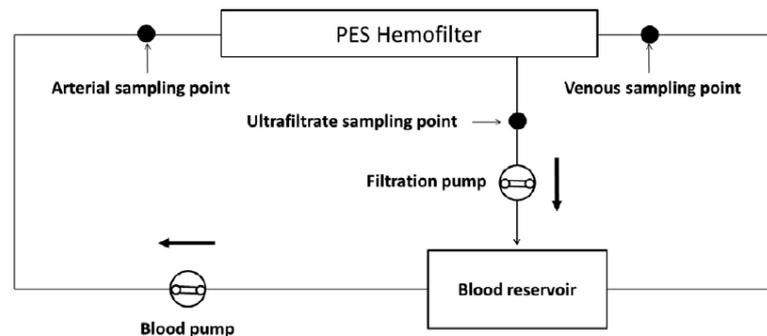


図-1 血液浄化回路

ふるい係数(SC)、クリアランス(CL)、吸着量(Ads)は、既存の報告をもとに、以下の式を用いて算出した。

$$SC = 2C_{uf} / (C_i + C_o)$$

$$CL = SC \times C_{uf}$$

$$Ads = \{ C_i \times Q_{pli} \} - \{ (C_o \times Q_{plo}) + C_{uf} \times Q_{uf} \}$$

$$Q_{pli} = Q_{bi} \times (1 - Ht/100)$$

$$Q_{plo} = Q_{pli} - Q_{uf} = Q_{bi} \times (1 - Ht/100) - Q_{uf}$$

C_i は filter inlet 側の上清の濃度(pg/ml), C_o は filter outlet 側の上清の濃度(pg/ml), C_{uf} は濾液の濃度(pg/ml)を表す。Q_{bi} は, filter inlet 側の blood flow rate を, Q_{uf} は, ultrafiltrate flow rate を表す(ml/min)。Q_{pli} は, filter inlet 側の plasma flow を, Q_{plo} は, filter outlet 側の plasma flow を表す。

サイトカインの分析には、the Bio-Plex system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を使用した。測定したサイトカインは、interleukin (IL)-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、tumor necrosis factor (TNF)- α であった。HMGB-1は、enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Shino-Test, Tokyo, Japan)を用いて測定した。血清 albumin は、multichannel biochemical analyzer で測定し、ろ液中中の albumin 測定には immunoturbidimetry を用いた。

4. 研究成果

TNF- α 以外のサイトカインは 0.8 以上の高いふるい係数を示す一方で、アルブミンのふるい係数は 0.04 未満にとどまっていた(図-2)。膜面積の違いによる影響を評価したところ、2.1 m²の血液浄化器では IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α で時間経過に伴うふるい係数の低下が緩徐であった。

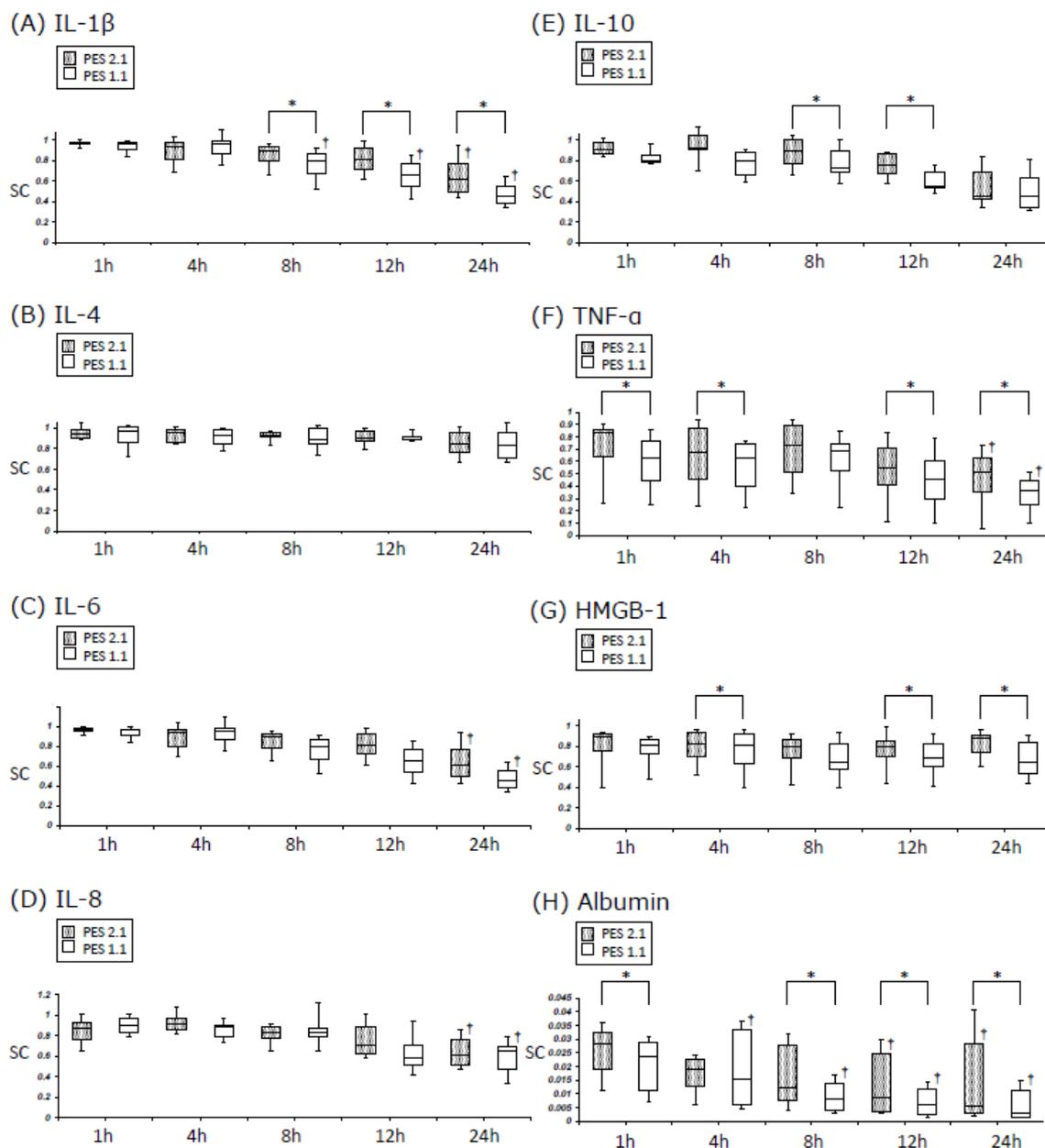


図-2 各種物質のふるい係数の経時変化

24 時間での各種物質の平均クリアランスを表-1 に示す。2.1 m² の血液浄化器では HMGB-1 と TNF- のクリアランスが有意に高値であった。

表-1 サイトカイン、HMGB-1、アルブミンの平均クリアランス

Molecular weight (kD)	Mean clearance (mL/min)				P value	
	Membrane area 2.1 m ²		Membrane area (1.1 m ²)			
IL-1 β	17	25.5	(23.9–28.5)	25.3	(23.3–25.4)	n.s
IL-4	20	30.4	(29.5–31.7)	29.9	(27.6–32.8)	n.s
IL-6	28	26.5	(23.0–27.0)	23.2	(22.0–25.6)	0.036
IL-8	8	25.6	(23.8–26.9)	24.9	(23.9–25.7)	n.s
IL-10	17	26.0	(25.0–27.3)	21.1	(19.7–23.9)	n.s
TNF- α	17	21.2	(17.2–25.1)	17.2	(13.8–21.2)	0.018
HMGB-1	30	26.3	(23.8–29.5)	21.7	(21.3–26.9)	0.028
Albumin	66	0.42	(0.28–0.92)	0.31	(0.15–0.61)	0.012

[†]Data displayed are medians (interquartile range). HMGB-1, high mobility group box chromosomal protein-1; IL, interleukin; TNF- α : tumor necrosis factor- α .

今研究で、2つの重要な知見を見出した。第一に、PES膜を用いた持続血液濾過では、サイトカイン、HMGB-1のふるい係数はいずれも高値を達成できる一方で、アルブミンのふるい係数は0.04未満と低値にとどまっていた。この結果は、今までの類似の研究で示されたどの報告よりも高いサイトカイン除去性能とアルブミン除去の抑制を達成している(表-2)。

表-2 これまでに報告された各種血液浄化器とサイトカイン、アルブミンのふるい係数

Author	Device	Filter size (m ²)	Qbi (mL/min)	Quf (mL/h)	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α	Albumin
Uchino et al.	Polyamide	1.27	300	1000	0.77	0.7	0.3	0.29	0.08
		1.27	300	6000	0.73	0.33	0.19	0.1	0.003
Uchino et al.	cellulose triacetate	1.1	300	1000	0.71	0.57	0.25	0.32	0.06
		1.1	300	6000	0.46	0.25	0.15	0.11	0.01
Morgera et al.	Polyamide	1.27	150	1000	no data	0.998	no data	0.785	0.513
		1.27	150	3000	no data	0.648	no data	0.495	0.173
Morgera et al.	Polyamide	0.6	150	1000	no data	0.82	no data	0	0.026
Mariano et al.	Polysulfone	1.4	150	1800	0.78	0.49	0.42	0.81	0.13
Yasuda et al.	cellulose triacetate	1.1	150	2000	0.58	0.21	0.21	0.01	0.004
		2.1	150	2000	0.72	0.29	0.21	0.01	0.004
Atan et al.	Polyethersulfone	1.12	250	25 mL/kg/h	0.04	1.2	0.68	0.28	no data
The present study	Polyethersulfone	1.1	150	2000	0.96	0.88	0.89	0.72	0.03
		2.1	150	2000	0.96	0.92	0.89	0.85	0.03

IL, interleukin; Qbi, blood flow rate on the filter inlet side; Quf, ultrafiltration flow rate; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

第二に、膜面積の違いによる影響を評価したところ、2.1 m² の血液浄化器では HMGB-1 と TNF- の平均クリアランスが有意に高値であり、いくつかの物質で時間経過に伴うふるい係数の低下も緩徐であった。膜面積が大きいと、それだけ物質が透過する孔も増加するため、物質の除去効率は増加すると予想できる。一般的に、持続血液濾過では時間経過と共に血球やタンパク成分が膜に付着していくことで、ふるい係数は徐々に減少していくと考えられる。よって、膜面積が大きいほど孔の数が多いため、血球やタンパク成分の付着による影響が少なくなり、ふるい係数が低下しにくかったと推測された。

結論として、今研究で我々は、PES膜血液浄化器を用いた持続血液濾過では、サイトカイン、HMGB-1のふるい係数はいずれも高値を達成できる一方で、アルブミンのふるい係数は0.04未満と低値にとどまっていた。加えて、膜面積が大きい方が HMGB-1 と TNF- の平均クリアランスが有意に高値であり、いくつかの物質で時間経過に伴うふるい係数の低下も緩徐であった。今研究は ex vivo study による生化学的な評価のみであるため、より明瞭な評価を行なうためには、実際の臨床状況で、形態学的な評価を加えて、確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohchi Yoshifumi, Goto Koji, Yasuda Norihisa, Koga Hironori, Kitano Takaaki	4. 巻 23
2. 論文標題 High Efficiency Removal of Cytokines and HMGB 1 by Continuous Hemofiltration With a Dual Layered Polyethersulfone Membrane: An Ex Vivo Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 173 ~ 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1744-9987.12767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大地 嘉史
2. 発表標題 新規血液浄化器(PES膜)の中分子除去性能に関する基礎的検討
3. 学会等名 第45回 日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大地 嘉史
2. 発表標題 ヒト血液を用いたPES膜血液浄化器の濾過性能評価
3. 学会等名 第28回 日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----