

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592096
 研究課題名（和文） 超大孔径膜血液濾過による致死性メディエータ HMGB-1 除去についての研究
 研究課題名（英文） Removal of “Lethal mediator” HMGB-1 by super high-flux hemofiltration
 研究代表者
 中 敏夫 （NAKA TOSHIO）
 和歌山県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：00244757

研究成果の概要：

エンドトキシン刺激による HMGB-1 誘導血を用いた Ex vivo の灌流実験において超大孔径血液濾過 (Super High-Flux Hemofiltration: SHFH) により HMGB-1 は確かに濾過液中に濾過され (ふるい係数 15.5%, 対照で 1.2%) 除去可能であることが判明した。また臨床例において SHFH 施行により施行5日目まで対照と比較して有意に median HMGB-1 濃度が低くなり (22.0 vs. 37.5 ng/dl, $p < 0.05$), Kaplan-Meier 法による生存率も SHFH 群で良い傾向にあった (70% vs. 60%, $p = 0.35$)。したがって SHFH は敗血症において HMGB-1 を制御し生命予後を改善する可能性があることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000 円	540,000 円	2,340,000 円
2008 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：血液濾過透析・敗血症・HMGB-1・サイトカイン・メディエータ・血液濾過・多臓器不全

1. 研究開始当初の背景

敗血症およびそれに続発する多臓器不全は救急・集中治療領域において主要な死亡原因でその死亡率は40-60%にのぼる。

これまで敗血症・多臓器不全の病態生理に、TNF- α など炎症性サイトカインの重要性が示唆されてきた。しかし抗サイトカイン抗体など炎症性サイトカインを制御しようとする臨床試験はことごとく失敗に終わった。その理由としては、TNF- α など多くの炎症性サイトカインが敗血症など炎症病態の初期にしか高値を示さず、臨床の現場で治療を開始する時点ではすでにそれらのサイトカイン

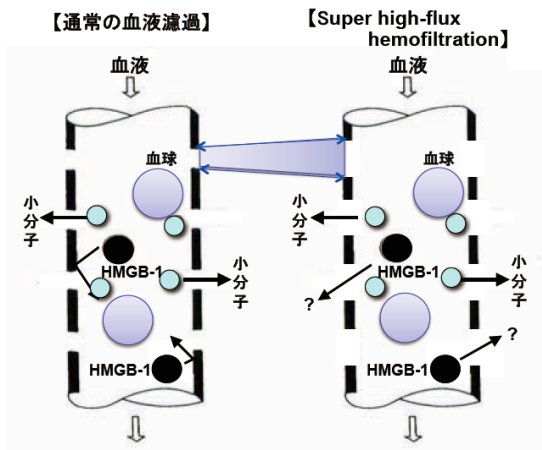
自体は制御する必要のないほど低下してしまっていること、抗サイトカイン抗体などの薬剤は多くがマウス由来などの異種蛋白であり、繰り返し生体内に投与できないことなどが挙げられる。

TNF- α などサイトカインの制御がいき詰まる中、敗血症の病態生理に最近 High mobility group box-1 protein (HMGB-1) が新たな炎症性マーカーとして注目を集めている。HMGB-1 は敗血症性ショック時において誘導され、生体にとって致死性因子として働く分子量が約30kd の中分子量物質で、その動態および制御・コン

トロールすることが、いまだ致死率の高い敗血症・多臓器不全の治療において急務であると考えられている

HMGB-1 を制御する方策としていくつかの方法が考えられているが、重症患者治療に用いられる血液浄化法もそのひとつである。ただし一般に血液浄化法に用いられる濾過膜には膜表面に小孔が空けられており、その小孔を通じて主に分子量が 1,000 (=1kd) 以下の小分子量物質を除去する。これら小孔には通常アルブミン (分子量 67kd) などのタンパク質や白血球などの細胞成分は通過せず血中に保持される。一方、敗血症の病因物質と考えられる炎症性サイトカインや HMGB-1 は比較的分子量の大きい中分子量物質 (炎症性サイトカインの分子量が 10-20kd、HMGB-1 の分子量が約 30kd) であるため、通常の血液濾過ではこれらは除去できない (図 1)。これに対して濾過膜の小孔を大型化し、分子量が 10-30kd 程度までの中分子量物質の除去を可能にしたものが超大孔径膜血液濾過 (Super high-flux hemofiltration: SHFH) である (図 1)。

図 1. 通常の血液濾過と Super high-flux hemofiltration



2. 研究の目的

超大孔径膜 (SHF) 膜を用いた超大孔径血液濾過により HMGB-1 が除去可能かどうかエンドトキシン刺激による HMGB-1 誘導血を用いた Ex vivo の灌流実験で検討する (2007 年度) とともに、除去可能であれば臨床的に効果があるかどうかを検討する (2008 年度)。

3. 研究の方法

3-1. 2007 年度研究

2007 年度にはエンドトキシンで HMGB-1 を誘導した血液を用いて Ex vivo の灌流実験を行い、HMGB-1 が SHF 膜により除去できるかどうか通常膜を対照として比較検討した。

実験の詳細は以下の通りである。

(1) 予備実験

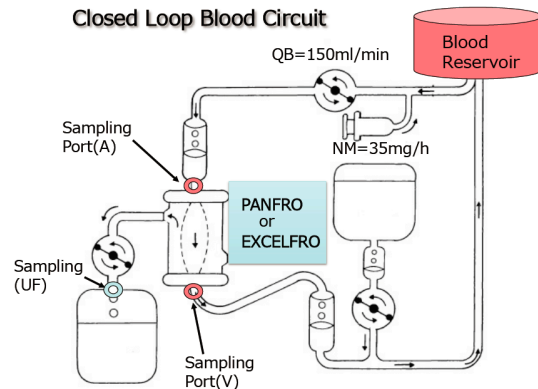
まず全血エンドトキシン刺激培養モデルで HMGB-1 が確かに誘導されているか予備実験を行った。健康ボランティア 6 名から得た新鮮血にエンドトキシンを加え 24 時間培養を行い、HMGB-1 と IL-6、IL-8 の血中濃度を経時的に測定した。

(2) 本実験 (灌流実験)

健康ボランティア 6 名を対象とし、対象から新鮮静脈血を 350-500ml 採血しリポポリサッカライド (LPS) を 1mg/500ml の割合で投与し 37°C で 8h 培養し、炎症性サイトカインおよび HMGB-1 誘導血を得た。

灌流実験は、まず通常膜 (PANFLO®) を接続した CHF 回路に LPS 刺激培養血液を還流させ、post-dilution で 1L/h のゼロバランス CHF を行い、開始後 5 分で IL-6、IL-8、HMGB-1、Alb に対するふるい係数 (sieving coefficient: SC) を測定した (図 2)。次に通常膜を SHF 膜 (EXCELFLO®) に交換し、同様に 1L/h、2L/h で同様に SC を測定した。

図 2. 閉鎖循環回路図



3-2. 2008 年度臨床研究

ICU に敗血症にて収容し、Super High-Flux 膜として (EXCELFRO®) を用い Super high-flux hemofiltration (SHFH) を施行した 10 例と APACHE-II スコアをもとに重症度が同程度の患者に対して通常膜での血液濾過 (PAN-CHF) を施行した 10 例を対象とし、(1) それぞれの群で HMGB-1 の血中濃度を経時的に測定し、SHFH による HMGB-1 の除去が、血中 HMGB-1 濃度を低下させることができるかを検討するとともに、(2) 両群での生存率に差があったかどうかを併せて検討した。

4. 研究成果

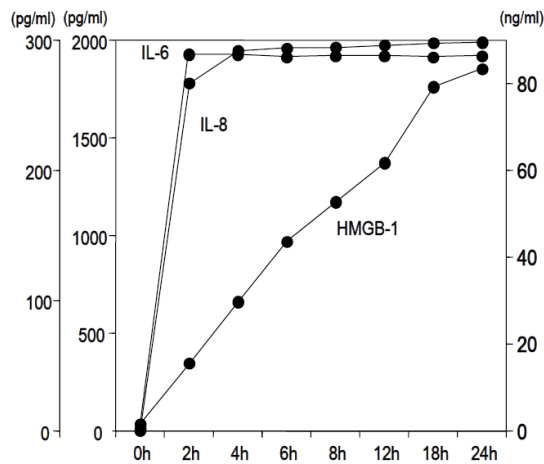
【2007 年度】

まず全血エンドトキシン刺激培養モデルで HMGB-1 が確かに誘導されているか予備実験を行った。健康ボランティア 6 名から得た新鮮

血にエンドトキシンを加え24時間培養を行い、HMGB-1とIL-6、IL-8の血中濃度を経時的に測定した。

その結果、HMGB-1は4h後から上昇し、その後24hまで連続的に増加した(図3)。IL-6、IL-8は培養2hで十分誘導されていた(図3)。12h以上培養すると溶血がひどくなるため本試験には8h培養血を用いることとした。この条件ではHMGB-1の濃度は50-60ng/mlと臨床的にも意味のある値となっていた。

図3. エンドトキシン刺激によるIL-6、IL-8およびHMGB-1の誘導



次に同様に健常人から得た新鮮血をエンドトキシンで刺激・HMGB-1を誘導した血液モデルを用いて、通常膜とsuper-high flux (SHF)膜でHMGB-1やIL-6、IL-8の除去とくにふるい係数(SC) (median (25th, 75th percentile) に差があったかを検討した。

表1. 通常膜(PANFLRO)とSHF膜(EXCELFLRO)によるIL-6、IL-8に対するふるい係数(%)

		IL-6	IL-8
PANFLRO	1L/h	5.6 (4.9, 7.1)	10.8 (8.3, 13.8)
	2L/h	79.5 (70.5, 79.6)*	68.1 (61.2, 73.4)*
EXCELFLRO	1L/h	79.5 (70.5, 79.6)*	68.1 (61.2, 73.4)*
	2L/h	79.8 (69.0, 80.1)*	63.4 (62.7, 68.9)*

Data are shown as median (25th, 75th percentile), *p<0.05

その結果IL-6のSCは通常膜で5.6% (4.9, 7.1), SHF膜で79.5% (70.5, 79.6)で有意にSHF膜でSCが高かった(p<0.05) (表1)。同様にIL-8のSCは通常膜で10.8% (8.3, 13.8), SHF膜で68.1% (61.2, 73.4)と有意にSHF膜で高かった(p<0.05) (表1)。

表2 通常膜(PANFLRO)とSHF膜(EXCELFLRO)によるHMGB-1、Albに対するふるい係数(%)

		HMGB-1	Alb
PANFLRO	1L/h	1.2 (0.9, 4.5)	0.3 (0.2, 0.3)
	2L/h	15.5 (13.1, 19.0)*	2.5 (1.9, 3.6)
EXCELFLRO	1L/h	15.5 (13.1, 19.0)*	2.5 (1.9, 3.6)
	2L/h	12.2 (10.1, 14.6)*	1.2 (1.1, 1.4)

Data are shown as median (25th, 75th percentile), *p<0.05

さらにHMGB-1のSCは通常膜で1.2% (0.9, 4.5)に対してSHF膜では15.5% (13.1, 19.0)で有意にSCが高かった(p<0.05) (表2)。このことからSHF膜でIL-6、IL-8およびHMGB-1のふるい係数が通常膜に比較して有意に増加することが判明した。これらのメディエータ除去効率の増加が臨床効果があるのかどうかは不明であるが、次年度に計画している臨床例での検討に対する基礎データとして大きな意義があるものと考えられた。

【2008年度】

ICUに敗血症にて収容し、Super High-Flux膜として(EXCELFLRO®)を用い、Super high-flux hemofiltration (SHF-CHF)を施行した10例を対象とした。

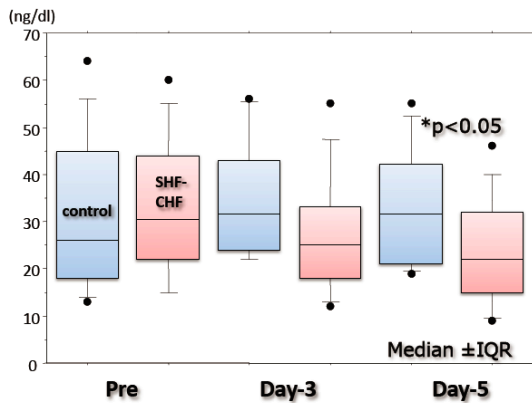
対象(SHF-CHF群)の平均APACHE-IIスコアは23.5で予測死亡率は46.5%であった。また同時期にICUに入室し通常膜(PAN膜)にて持続血液濾過(CHF)を施行し重症度を同程度にした10例をcontrol群(APACHE-II: 22.2, 予測死亡率:46.1%)を対照とした。

表3. 対照群(control)とSuper high-flux hemofiltration (SHF-CHF)群の背景因子

	Control	SHF-CHF	p
症例数	10	10	
原疾患			
Sepsis	6	6	
外傷	2	3	
心臓術後	2	1	
APACHE-II	22.2	23.5	n.s.
予測死亡率	46.1	46.5	n.s.

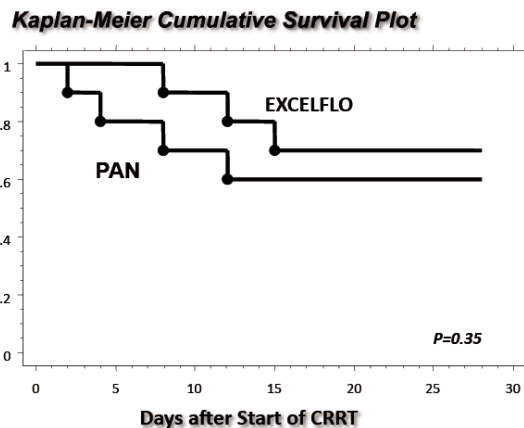
施行前のHMGB-1濃度: median (25th-75th percentile)はSHF-CHF群:30.5 (22.8-42.0) vs. control群: 26.0 (19.8-42.8) ng/dlで両群に差はなかった。しかし施行5日目のHMGB-1濃度はSHF-CHF群:22.0 (15.8-31.5) vs. control群: 37.5 (22.8-43.8) ng/dlとSHF-CHF群で有意に低かった(p<0.05) (図4)

図 4. Control 群と SHF-CHF 群での HMGB-1 の推移



さらに生存率については、Kaplan-Meier 法にて有意差はなかったが(p=0.51)、SHF-CHF 群で生存率が良い傾向にあった(28 日生存率: SHF-CHF 群 70% vs. control 群 60%)(図 5)。

図 5. Control 群と SHF-CHF 群での生存率の推移



また SHF-CHF 施行により予測死亡率が 46.5%であったが実死亡率は 30%にとどまったが、control 群では予測死亡率 46.1%に対して実死亡率が 40%とほぼ同程度であった。これらから SHFH は敗血症において HMGB-1 を制御し生命予後を改善する可能性があることが示唆された。

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 3 件)

1. 中 敏夫, 篠崎正博, 重松 隆: 急性腎不全に対する血液浄化法について. 救急・集中治療 2009; 21: 201-206.
2. 中 敏夫, 篠崎正博, 重松 隆: ICU nephrology. Annual Review 腎臓 2008; pp135-40.
3. 中 敏夫, 篠崎正博, 重松 隆: 重症肺炎に伴う敗血症性呼吸不全に対する血液浄化法. 化学療法の領域 2008; 24: 1799-1806.

[学会発表] (計 8 件)

1. 中 敏夫, 島幸宏, 篠崎真紀, 足川財啓, 橋本忠浩, 米満尚史, 岩崎安博, 篠崎正博: Super high-flux hemofiltration - 中分子物質の除去増加を目指して - 第 36 回日本集中治療医学会総会 2009.2.27 大阪
2. 中 敏夫: 急性腎不全および敗血症性多臓器不全に対する血液浄化法 第 42 回岩手腎不全研究会 2008.10.26, 盛岡
3. 中 敏夫, 篠崎正博, 重松 隆, 島幸宏, 篠崎真紀, 米満尚史, 橋本忠浩, 足川財啓: 急性血液浄化法の therapeutic target とするメディエータは? 第 19 回日本急性血液浄化学会総会 2008.9.19 東京
4. 中 敏夫: 敗血症と急性血液浄化法. 第 2 回秋田県アフェレーシス研究会 2008.4.19 秋田
5. 中 敏夫: CRRT によるサイトカイン除去と HMGB-1 制御. 第 44 回腹部救急医学会総会 2008.3.15 横浜
6. 中 敏夫: HMGB-1 と急性血液浄化法. 横浜市立大学地域医療連携研修会 2008.3.5. 横浜
7. 中 敏夫, 島 幸宏, 足川財啓, 橋本忠浩, 金家智世, 米満尚史, 篠崎真紀, 岩崎安博, 篠崎正博, 重松 隆: Super high flux hemofiltration による HMGB-1 の除去について: an ex vivo study. 第 35 回日本集中治療医学会総会 2008.2.16. (東京)
8. 中 敏夫: CRRT によるサイトカイン除去と HMGB-1 制御. 第 18 回日本急性血液浄化学会 2007.10.6 (大分)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中 敏夫 (NAKA TOSHIO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00244757

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし