

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591060

研究課題名（和文） 水素および一酸化窒素による血液透析膜表面の生体適合性の改善

研究課題名（英文） Improvement of biocompatibility of dialysis membrane by nitric oxide or hydrogen

研究代表者

小久保 謙一 (KOKUBO KENICHI)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：20287965

研究成果の概要（和文）：本研究では、血液透析膜の透析液側に水素ガスや一酸化窒素(NO)ガスを流し、透析膜表面をそれらの溶存ガス放出表面とすることで、透析膜表面の生体適合性を改善することを目的とした。透析液にガス交換器を介してNOガスを付加するシステムを構築し、そのシステムにより、透析膜から十分にNOを付加できること、またメトヘモグロビンを過剰に生成することなく、血液中の血小板活性化を抑制できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to improve biocompatibility of dialysis membrane by releasing nitric oxide (NO) or hydrogen gas from the dialysate. The system we developed can release sufficient amount of NO from dialysate to blood. The NO released from the dialysis membrane surface suppressed platelet activation without formation of excess methemoglobin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：人工透析学、生体適合性

1. 研究開始当初の背景

血液透析療法は、腎不全に陥った患者の生命を維持するために不可欠の治療である。しかし、血液透析治療それ自体が患者にさまざまな侵襲を与えている。例えば、血液透析により、炎症の惹起や免疫機能の低下が起き、それが長期透析患者の合併症の原因となっている可能性が高いことなどの報告がある (Quinn *et al.*, Proc Natl Acad Sci, 1987, Galli and Ronco, Nephron, 2000)。

その原因の1つに、本来異物である透析膜等の材料表面との接触により、好中球、単球などの活性化が起こり、さまざまなサイトカインの放出や活性酸素の放出による酸化ストレスの亢進、また血小板の活性化が起こることが考えられる。

血管内皮細胞は、一酸化窒素合成酵素により常にNOを放出しており、NOは血小板活性化の抑制、白血球の接着抑制、単球の血管内への遊走抑制などに働いていることが知

られている。また、糖尿病では血管内皮細胞が障害されてNOの産生が低下しており、炎症を起こしやすく、なおかつ血栓が形成されやすくなっているため、動脈硬化になりやすい (Farkas *et al.*, Diabetes Nutr Metab, 2000)。NOは血液と血管内皮細胞の相互作用を正常に維持するのに重要な役割を担っていると考えられる。

水素は細胞障害を引き起こす酸化力の強いフリーラジカルを還元して消去することができる。マウスの脳梗塞の虚血再灌流モデル (Ohsawa *et al.*, Nat Med, 2007)、肝臓の虚血再灌流モデル (Fukuda *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2007) において、虚血再灌流時の臓器・組織障害を水素により低減できることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、血液透析膜の透析液側に水素ガスや一酸化窒素 (NO) ガスを流し、透析膜表面を溶存ガス放出表面とすることで、透析膜表面の生体適合性を改善することを目的とした。NOは血管内皮細胞において常時放出されているガスであり、血小板活性化の抑制、白血球の接着抑制や血管内への遊走抑制などの作用が期待できる。

NOは、ヘモグロビンと結合してメトヘモグロビンを形成したり、スーパーオキシドと反応して組織障害性の高いペルオキシナイトラートを生成するため、透析膜からNOを付加すると、細胞障害が起こる可能性がある。そこで、NOを付加したときに副作用があるかどうかを確認し、ある場合には、水素を併用使用することで、それを低減できるかどうか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

ブタ血液または多血小板血漿 (PRP) を用いて、TS-1.6UL (ポリスルホン膜, PS膜、東レ・メディカル社製) またはBG-1.6PQ (ポリメチルメタクリレート膜, PMMA膜、東レ・メディカル社製) のダイアライザで、血液透析を4時間行った。まず、NOの効果を確認するために透析液にNO供与体であるニトロプルシドナトリウムを投与した系で実験を行った。30分ごとにサンプリングを行い、ブタ血液を用いた実験からは血小板凝集率、血小板数を測定し、PRPを用いた実験からはcGMP濃度を測定した。血小板凝集率は、血小板凝集能測定装置を用い、サンプルに血小板凝集惹起物質であるアデノシン二リン酸 (ADP、濃度 1.0~8.0 mM) またはコラーゲン (濃度 0.125~1.0 mg/ml) を添加し、マイクロメッシュフィルタを通して吸引したときの吸引圧力を測定することにより、血小板凝集能を解析し評価した。血小板数は、動物用全自動血球計数器を用いて測定した。血小板内

のcGMP濃度は、0.1% TritonXを加えた0.1 M塩酸溶液に血小板に加えて血小板膜を破壊し、遠心分離した後の上清中のcGMP濃度をELISA法を用いて測定した。

次に、ガス交換器を透析液供給ラインに組み込んで、NOガスを透析液に付加するシステムを構築し、ブタ血液またはPRPを用いてPS膜ダイアライザで血液透析を行った。ブタ血液を用いた実験ではNOの代謝産物であるNO₂⁻、NO₃⁻濃度、副作用を引き起こすメトヘモグロビン濃度を測定した。PRPを用いた実験では血小板が活性化した際に発現するP-セレクチン発現率を測定した。NO₂⁻、NO₃⁻濃度はGriess法、メトヘモグロビン濃度はシアンメトヘモグロビン法により測定した。P-セレクチン発現率は、抗P-セレクチン抗体を用いて、フローサイトメトリーを用いて測定した。

4. 研究成果

まずブタ血液を用いた*ex vivo*実験により、NO放出表面における血小板の活性化抑制効果を検討した。あらかじめ血液側のみ血液を灌流させて安定化させ、その後、透析液を流した。透析液には、NOドナーとしてニトロプルシドナトリウムを溶解させ、NOの有無による血小板活性化の違いをADPおよびコラーゲン刺激による血小板活性化能により測定した。いずれの透析膜を使用した場合も、NO放出表面では、血小板の活性化 (図1) が有意に低下しており、NO放出透析膜表面では、血小板の活性化が抑制されていると考えられた。

この結果が、NOの効果そのものであるかどうか、確認するために、同様に実験系で、PRPを用いて透析実験を行い、血小板内のcGMP濃度を測定した。その結果、NO放出膜表面と

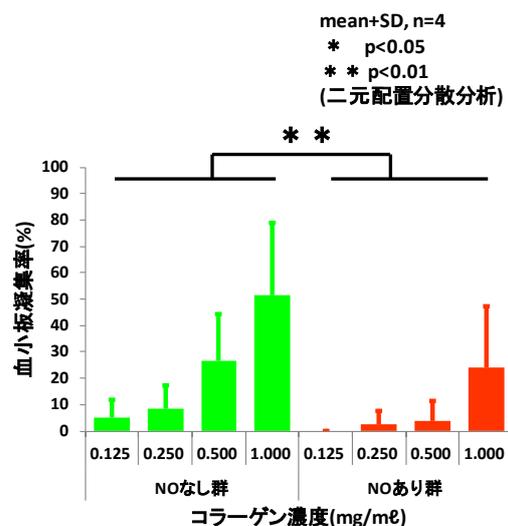


図1 NOを付加による血小板凝集率の低下 (透析30分後、コラーゲン惹起、PS膜)

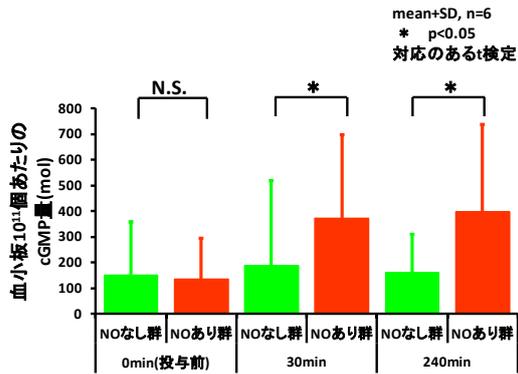


図2 NOを付加による 血小板内cGMP濃度の増加

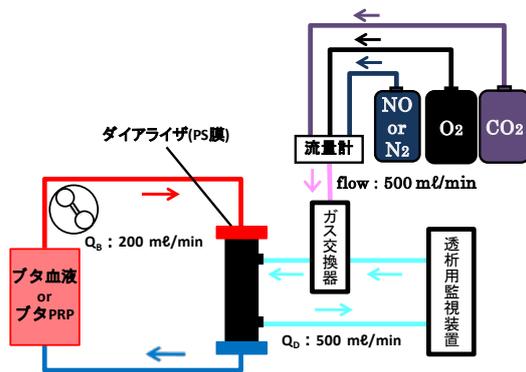


図3 NOガスを透析液に付加するための実験回路図

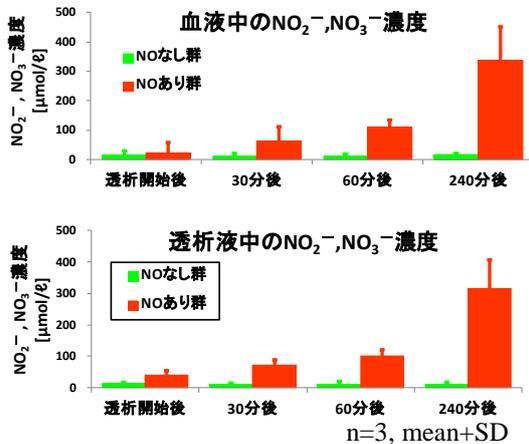


図4 NOガス付加システムにおける血液中および透析液中のNO₂⁻/NO₃⁻濃度

接触した血小板では、血小板内のcGMP濃度が有意に増加しており(図2)、NOによる血小板活性化抑制がグアニル酸シクラーゼを介したcGMPの産生によるものであることが確認できた。

しかし、NO供与体は半減期が長く、血液と透析膜が接触した血液に対してだけでなく、

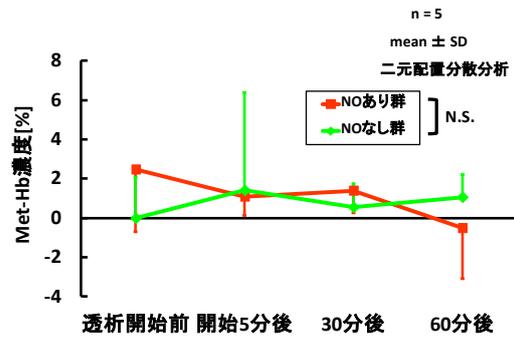


図4 メトヘモグロビン濃度の経時変化

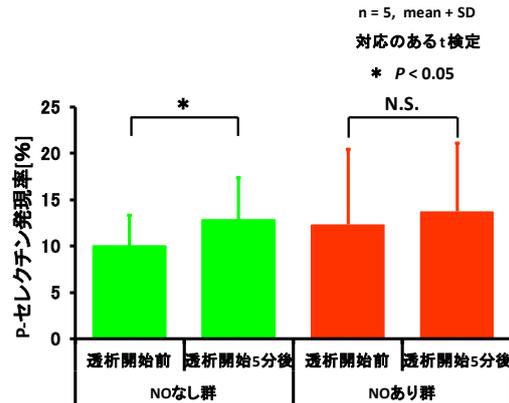


図5 NOガスによる透析開始直後の血小板活性化の抑制

全身に作用してしまう可能性があり、実際には使用できない。透析膜と接触している間だけに作用する半減期の短いNOガスを用いる必要があると考えられた。次に、ガス交換機を用いて、NOガスを透析液に付加するシステムを構築した(図3)。このシステムを用いると、NOの副作用であるメトヘモグロビンを生成することもなく、透析液にガス交換器を介してNOが十分に付加できた(図4)。さらに、血小板活性化を調べたところ、透析膜から付加したNOガスの効果により、透析膜との接触による初期の血小板活性化を抑制できることが明らかになった(図5)。

本研究により、透析膜と血液が接触する際にNOを使用すると、血小板の活性化が起きにくくなることが明らかとなった。この方法は、大がかりな装置改造をすることなく、現在の血液透析治療に組み込むことが、可能である。したがって、多くの透析患者に適用することが可能であると考えられる。透析患者の合併症の原因となっている酸化ストレスや血小板や白血球の活性化を低減できる可能性も高く、現在、透析治療を受けている約30万人の透析患者に対して多大な恩恵を与えることが期待できる。

また本研究により得られた結果は、生体適合性材料を開発するという観点において、表面からのNO放出という生体の動的な機能を模倣するという新しい観点から生体適合性を向上させるという方法が可能であることを示している。生体適合性材料の設計指針に新たな視点を与える結果が得られたと考えられる

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)

[学会発表] (計5件)

- ① Kokubo K, Urabe S, Hanada S, Ebine T, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Dialysate containing nitric oxide suppresses platelet activation on the surface of dialysis membrane. (7th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2012.7.22-26, Edinburgh, UK)
- ② Urabe S, Kokubo K, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Suppression of platelet activation on the surface of dialysis membrane using nitric oxide containing dialysate. (47th ERA-EDTA Congress, 2011.6.23-26, Prague, Czech republic) [Nephrol Dial Transplant Plus, 4 (Suppl 2), doi:10.1093/ndtplus/4.s2.37, 2011]
- ③ 浦辺俊一郎, 小久保謙一, 塚尾浩, 新保年弘, 廣瀬稔, 小林弘祐. 一酸化窒素供与体を用いた血液透析における血小板凝集の抑制. (日本医工学治療学会第27回学術大会, 2011.4.22-24, 岡山)
- ④ Urabe S, Kokubo K, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Suppression of platelet Activation on the surface of dialysis membrane releasing nitric oxide from the dialysate. (47th ERA-EDTA Congress, 2010.6.25-28, Munich) [Nephrol Dial Transplant Plus, 3 (Suppl 3), iii455(Su438), 2010]
- ⑤ Kokubo K, Urabe S, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Dialysis membrane releasing nitric oxide from dialysate side increases cyclic guanosine monophosphate in platelets and suppresses the activation of platelets on the surface. (6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010.6.14-18, Kyoto, Japan) [Nitric Oxide 22(Suppl), S92, 2010]

[図書] (計3件)

- ① 小久保謙一. 各種治療モードとその特徴. 酒井清孝, 峰島三千男編 わかりやすい透析工学 南江堂 東京, pp115-121, 2012
- ② 小久保謙一. 血液透析の原理と構成. 竹澤慎吾, 出淵靖志編 臨床工学講座 生

体機能代行装置(代謝), 医歯薬出版 東京, pp39-50, 2010

- ③ 小久保謙一. 生体と医用材料の相互作用. 氏平政伸, 中島章夫編 臨床工学講座 生体物性・医用材料工学, 医歯薬出版, 東京, pp119-138, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小久保謙一 (KOKUBO KENICHI)
北里大学・医療衛生学部・准教授
研究者番号：20287965

(2) 研究分担者

小林弘祐 (KOBAYASHI HIROSUKE)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：70153632

新保年弘 (SHINBO TOSHIHIRO)
北里大学・医療衛生学部・助教
(現 東京工科大学・医療保健学部・助教)
研究者番号：10406910