

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592732

研究課題名(和文)敗血症ラット持続的血液濾過透析モデルにおける膜素材の検討とバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Examination of a different membranes on cytokine adsorption on circulating cytokine and search of a biomarker as a prognosticator in a sepsis rat continuous hemodiafiltration model

研究代表者

針井 則一 (HARII, Norikazu)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：80377522

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)：敗血症は細菌感染によって引き起こされる全身性炎症反応症候群であり、様々な感染症により生じ、時に致死的な多臓器不全となる。敗血症性多臓器不全の進展には、過剰に産生される炎症物質が関与している。血液浄化は腎の代替療法であるが、血中に存在する様々な物質の除去特性は血液浄化器の膜素材により様々であり、生命を脅かす過剰な炎症物質を効率的に除去しうる膜素材を探すことは、重症敗血症の治療の進歩に重要である。今回我々は、ラット敗血症/血液浄化療法のモデルを構築し、いくつかの膜素材における炎症物質の除去特性を検討し、重要な炎症物質であるインターロイキン6を効率的に吸着しうる膜素材としてPEPA膜を同定した。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is a systemic inflammatory response syndrome caused by several infections. Excessive production of inflammatory mediators like cytokines and chemokines may develop multiple organ failure leading to death. Although hemodiafiltration is used as a renal replacement therapy, it is often considered for the treatment of septic renal failure with the concept of modulating immune response and ameliorating failure of other organs. Various membranes for hemodiafiltration are commercialized and in each having their peculiar removal characteristics of the substance in blood. It is still unclear which membrane is suitable for the treatment of severe sepsis. We have been established hemodiafiltration system for endotoxin shock rat. We have studied the adsorption of influencing circulating levels of inflammatory mediators like cytokines for comparing several membranes and identified the polyarylate/polyethylsulfon(PEPA) membrane efficiently adsorbed the serum interleukin-6.

研究分野：集中治療医学

キーワード：血液浄化療法 敗血症性多臓器不全 ラットエンドトキシンショックモデル

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は細菌感染によって引き起こされる全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) であり、様々な感染症により生じうる。重症敗血症におけるショック、DIC、多臓器不全などの致命的な病態に進展には、SIRS の際に過剰に産生されるサイトカインや病因物質などのメディエーターが関与していることが知られており、予後不良である疾患の救命率を上げるうえでこれらの効率的な除去が重要な課題となっている。敗血症多臓器不全の治療においては原疾患の治療と感染巣のコントロールに加え、循環、呼吸など生体の恒常性の維持と障害臓器の代替の目的とした治療、すなわち薬物療法、様々な医療機器 (人工呼吸器、経皮の心肺補助装置、人工透析器、各種生体情報のモニタリング)、栄養管理などの集学的治療が必要である。血液浄化法は透析や濾過の原理で血液の量的・質的異常を是正する治療法であるが、原理的には腎臓を代償するのみならず、膜の材質や構造に起因する非選択的吸着性能 (adsorption) による炎症性サイトカインを含む中分子量物質の除去が可能である。敗血症性多臓器不全の治療においては SIRS の制御としてのメディエーター対策が重要であると考えられ、臨床応用を目的として基礎研究、すなわち最適な動物モデルを用いた膜素材を検討が必要である。

### 2. 研究の目的

血液浄化療法に使用される膜素材は様々であるが、慢性維持透析での使用を想定し、主に生体親和性、尿毒症物質の除去効率をコンセプトに開発されている。我々は小規模な観察研究ではあるが、敗血症多臓器不全の治療における膜素材の選択の重要性を報告 (Matsuda K et al.: Transfus Apher Sci, 2008) している。重症敗血症、敗血症性多臓器不全の生存率の向上に資するため、エビデンスレベルの高い臨床研究を発信することに加え、モデル動物を用いた基礎研究を行うことで、論理的根拠の補強および、最適な膜素材を探索することを目的とし、(1)超小型血液浄化器を用いた CHDF 治療モデルの構築として再現性のある実験系を作成することを第一とする。試作した超小型血液浄化器の結果に基づいてラットに最適な膜面積、形状を有する血液浄化器を決定する。(2)血液浄化器の膜素材による治療効果の比較として、異なる素材の膜を用いた血液浄化器ごとの、生存率を比較し、有意な結果を得た場合は、その要因を病理組織学的に評価する。さらには(3)敗血症を重症度や死亡率を予測するのに役立つバイオマーカーの探索として、各群の血液浄化療法で得られたろ過液に含

れる蛋白質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化法などの手法を用いて解析し、敗血症を重症度や死亡率を予測するのに役立つバイオマーカーを探索することとした。このモデルが確立された場合は、血液浄化条件の最適化に必要な知見が得られると予想される。また新たな膜素材の開発に貢献しうる可能性があり社会的な意義も深い。さらに、血液浄化療法に関わる各種薬剤や新たな治療法の研究に応用しうるモデルになると考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 超小型血液浄化器の開発

本研究で使用する超小型血液浄化器を作製した。また、膜面積は敗血症モデルラットに合わせ、臨床で使用されるフィルター膜面積の 1/100 程度になるよう設計した。フィルターは、慢性維持透析分野で非選択的なタンパク質吸着能を有することが知られているポリエステル系ポリマーアロイ (PEPA / 日機装, 東京) 膜と吸着能を有しないセルローストリアセテート (CTA / ニプロ, 大阪) 膜を選定した。主な仕様と概観は表 1 および図 1 に示した。

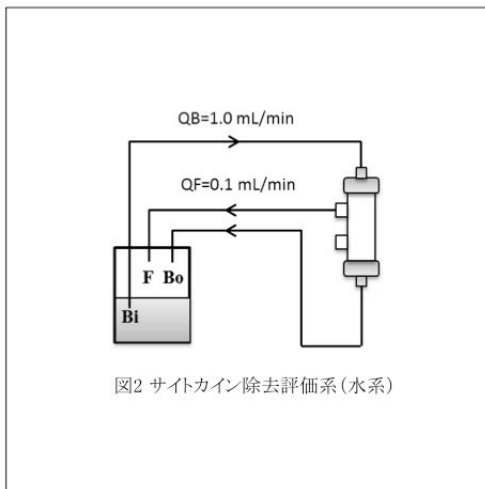
表1 超小型血液浄化器の仕様

仕様	PEPA	CTA
中空糸内径 / $\mu\text{m}$	210	200
中空糸膜厚 / $\mu\text{m}$	30	15
中空糸有効長 / mm	50	50
中空糸本数 / 本	200	210
膜面積 / $\text{m}^2$	0.0066	0.0066
PV / mL	0.35	0.33



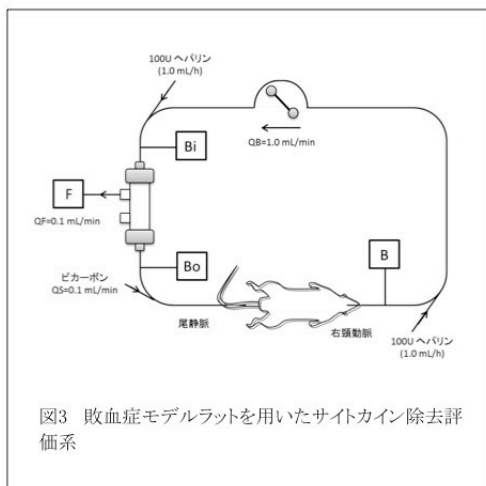
図1 超小型血液浄化器の概観

(2) 水系のサイトカイン除去評価系の構築  
 リコンビナントのサイトカインを用いて、水系のサイトカイン除去評価系の構築をおこなった。図 2 に循環回路図を示した。循環条件は血液循環速度 (QB)=1 mL/min, 濾過速度 (QF)=0.1 mL/min と定め、Bi, Bo, F をそれぞれサンプリングすることで、フィルターの除去特性を検討した。サイトカインは敗血症時の重要なメディエーターである IL-6 (Recombinant Rat IL-6 / R&D systems) を選定し、ELISA 測定 (Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit / R&D systems, MN USA) により濃度を求めた。



### (3) 敗血症モデルラットを用いた血液循環評価系の構築

ラットにリポポリサッカリド (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0127:B8 / シグマルドリッチ) を 0.1 mg/kg 投与することで敗血症モデルラットを作製し、体外循環回路と接続することで体外循環評価系を構築した (図 3). 脱血部直後およびモジュール入口でヘパリン加生食 (100U/mL) を 1.0 mL/h, モジュール出口直後で重炭酸リンゲル液 (ビカーボン / 味の素) を 6.0 mL/h を注入した. 返血部直前で麻酔薬であるプロポフォール 1% を 1.0 mL/h で注入した. ろ過 (HF) 試験は, 循環および濾過速度をそれぞれ  $QB=1\text{ mL/min}$ ,  $QF=0.1\text{ mL/min}$  で行った. ターゲットとなるサイトカインは IL-6 を選定し, ELISA 測定によって血中濃度を求めた.

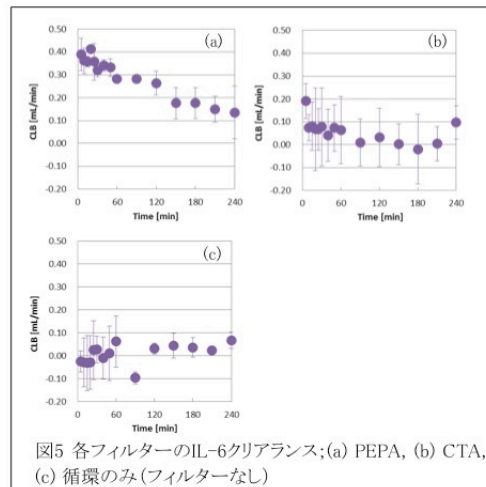
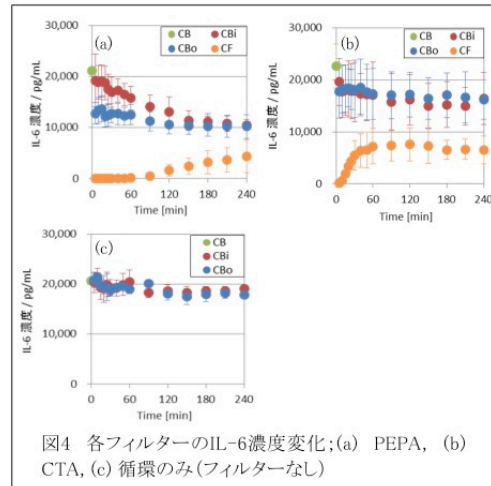


## 4. 研究成果

### (1) 水系のサイトカイン除去評価系の構築

図 4 に各水準の平均結果 ( $n=3$ ) を示した. PEPA 膜において循環初期では濾液中の IL-6 は検出されなかった. 一方, CTA 膜では循環初期から濾液中の IL-6 は検出された. 本濾液の挙動は水系と同様の挙動であった. 本検討で PEPA 膜は敗血症モデルラットを用いた系でも IL-6 吸着能を有することが示唆された. また, PEPA 膜は循環時間全体を通して血中 IL-6 濃度が他に比して低く, また IL-6 クリアランス値も高かった (図 7).

から濾液中の IL-6 は検出された. PEPA 膜の濾液側濃度の挙動はフィルターに溶質の吸着が生じているときに観察される挙動である. 本検討により PEPA 膜は IL-6 吸着能を有することが示唆された. また, 図 5 の対象物質のフィルターによる除去性能 (クリアランス) を示した結果から IL-6 吸着能を有する PEPA 膜は CTA 膜に比して IL-6 クリアランス値も高いことも示された.



### (2) 敗血症モデルラットを用いた血液循環評価系の構築

図 6 に各水準の平均結果 ( $n=5$ ) を示した. PEPA 膜において循環初期では濾液中に IL-6 は検出されなかった. 一方, CTA 膜では循環初期から濾液中の IL-6 は検出された. 本濾液の挙動は水系と同様の挙動であった. 本検討で PEPA 膜は敗血症モデルラットを用いた系でも IL-6 吸着能を有することが示唆された. また, PEPA 膜は循環時間全体を通して血中 IL-6 濃度が他に比して低く, また IL-6 クリアランス値も高かった (図 7).

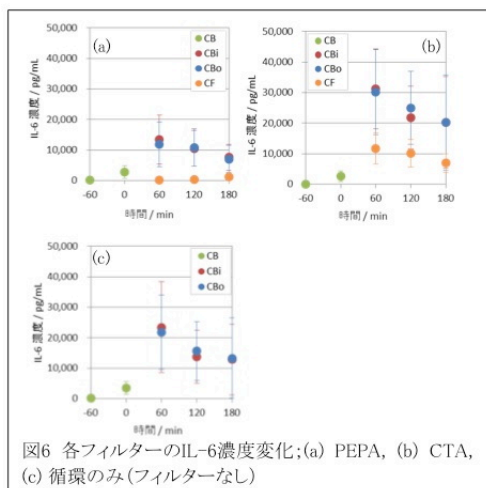


図6 各フィルターのIL-6濃度変化;(a) PEPA, (b) CTA, (c) 循環のみ(フィルターなし)

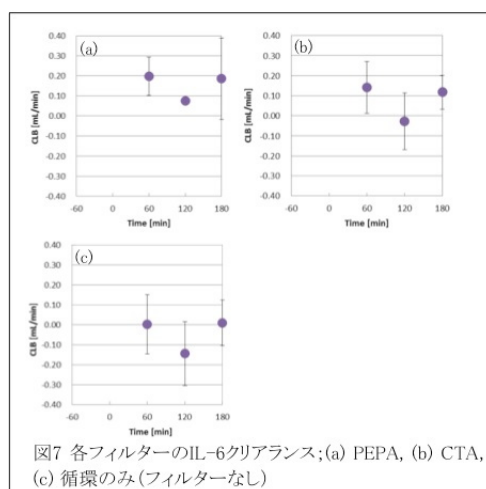


図7 各フィルターのIL-6クリアランス;(a) PEPA, (b) CTA, (c) 循環のみ(フィルターなし)

本研究で水系および敗血症ラットモデルを用いた循環実験系を確立した。また、その確立した系を用いて、フィルターのサイトカイン吸着の検討をおこなった。その結果、慢性維持透析用のフィルターである PEPA 膜がサイトカイン吸着能を有することが示された。これらの結果は PEPA 膜が急性血液浄化分野において有用である可能性が示すものであった。

今後は、本研究で確立した系を用いて血液浄化による生存率改善の検討やプロテオミクス技術を用いたフィルター付着タンパクの網羅的解析など詳細な検討を続け、敗血症とメディエーターの関係性を明らかとしたい。さらには、同系をさらに改良し、血液浄化を必要とする他疾患モデル動物を用いて、その疾患に対して特に有用なフィルターの特定および関係するメディエーターの特定などの検討もおこなっていきたい。

## 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 1 件)

① 針井 則一, 松田 兼一, 森口 武史, 後藤 順子, 柳沢 政彦, 青木 順子, エンドトキシン投与ラット血液浄化モデルにおける polyarylate / polyethylsulfon (PEPA) 膜の interleukin (IL)-6 除去能の検討  
第 34 回日本アフェリシス学会学術大会  
2013 年 11 月 1 日～3 日, 軽井沢プリンスホテルウエスト (長野県北佐久郡軽井沢町軽井沢)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

針井 則一 (HARII, Norikazu)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号: 80377522

(2) 研究分担者

松田 兼一 (MATSUDA, Kenichi)  
山梨大学・総合研究部・教授  
研究者番号: 60282480

後藤 順子 (GOTO, Junko)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号: 60530102

柳沢 政彦 (YANAGISAWA, Masahiko)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号: 90597022

(3) 連携研究者

なし