

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700464

研究課題名(和文) 蛋白結合尿毒素を高効率に除去する新規血液浄化システムの開発

研究課題名(英文) Development of blood purification system for the efficient removal of the protein-bound uremic toxins

研究代表者

山本 健一郎 (Yamamoto, Ken-ichiro)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00434316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、希釈効果、塩濃度、pH、温度変化など比較的簡便な手法により、蛋白結合性尿毒素(PBTx)を簡便かつ低コストで高効率に除去できる新規血液浄化システムの開発を目的とした。その結果、希釈効果やpH変化などによりアルブミンからのPBTx解離を促進することはできるものの時間を要する、もしくは通常透析でも希釈と同様の効果が得られており本手法による除去能の向上は困難であることが示唆された。PBTxと結合したAlbごと取り除き、喪失した分を補充するような治療モードにより、通常透析よりも効率的な蛋白結合性毒素の除去が可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Protein-bound uremic toxins (PBTx) are not efficiently removed by conventional hemodialysis techniques. In order to enhance the removal of protein-bound toxins, we performed an in vitro study to evaluate the effects of dilution and pH change on the dissociation of protein-bound toxins from albumin (Alb). As a result, PBTx dissociation from albumin was promoted by dilution and high level of NaCl aqueous solution, however it was insufficient to improve the removal ability of the present method. Removal of Alb combined with PBTx is may be effective in PBTx efficient removal compared to conventional hemodialysis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：蛋白結合性尿毒素 血液浄化

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白結合尿毒素 (PBTx) は、それ自身小分子溶質であるにもかかわらずアルブミンなどの蛋白質との結合により大分子状態で存在するため通常透析や慢性腎臓病患者の腎機能では除去されにくい。そのため、通常の血液透析 (HD) では除去が困難であり、透析患者や慢性腎臓病患者の体内では健康人に比べ数十倍もの高値となる。患者の生命予後に大きく影響を及ぼす心血管系疾患や、MIA (Malnutrition 低栄養, Inflammation 炎症, Atherosclerosis 動脈硬化) 症候群などの様々な透析合併症の原因物質として注目されている。通常、これらの PBTx は肝臓・腎臓において有機アニオントランスポーターなどを介して代謝・排泄されるが、異常時には PBTx はアルブミンから解離せず、組織への取り込みが進行しない場合がある。この場合、結合物質は血中を循環し体内に蓄積され、肝機能障害等の疾患を惹起したり、薬剤の各種組織への移行の低下を引き起こすため、アルブミンに結合するこれらの尿毒素は除去すべきであると考えられる。アルブミンは、肝臓で生合成されるタンパク質であり、血液中において浸透圧を保持したり、各組織へ種々の物質を運搬するなど生体内において重要な役割を担う有用な物質であるため、アルブミンから尿毒素のみを解離させ選択的に除去する効率的な方法が望まれる。PBTx に有効とされる治療方法として、血液透析・血液透析濾過、血液灌流・血液吸着 (Hemoperfusion: HP, Hemoabsorption: HA)、アルブミン透析・MARS (Molecular Absorbent Recirculating System) などが挙げられる。しかしこれらの治療では、専用の装置が必要であったり高価な新鮮凍結血漿 (FFP) アルブミン製剤を多量に使用するにもかかわらず、除去対象物質であるインドキシル硫酸やビリルビン等に関して十分な除去能が得られていない。PBTx 除去に有効とされる治療方法は、基本的にアルブミンと尿毒素との平衡関係を解離側に誘導してから除去することになるため、いかに効率よく PBTx を解離させ、それを取り除くかが問題となる。結合率の変化については pH 変化により結合率が変化することが報告されている。また、近年オンライン HDF (Hemodiafiltration, 血液透析濾過) などで大量希釈を行うことで PBTx の一つであるホモシステインの除去量が増加したという臨床報告もあるが、学術的な裏付けは不十分であり明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、希釈効果、塩濃度、pH、温度変化など臨床に適用し得る要素を図3に示すような前希釈 HDF への組込んだり、または新規な治療モードを開発することにより、PBTx を簡便かつ低コストで高効率に除去できる新規血液浄化システムの開発を目的とする。

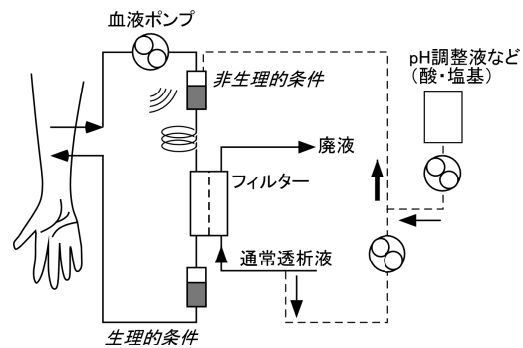


図1 PBTxの効率的除去法のイメージ

PBTx を高効率に除去する新規血液浄化システムの開発に必要な基礎的な知見を得ることとそれらを踏まえた基盤技術の創出を本研究課題の達成目標とした。また基礎的な検討にとどまらず、実際の治療に応用したときの有効性についても明らかにすることを目的とする。具体的には、以下の技術開発をめざした。

- 1) PBTx の結合-解離特性の評価
- 2) PBTx を高効率に除去する新規血液浄化システムの開発
- 3) 臨床に準じたヒト血漿評価系における新規血液浄化システムの有効性評価

### 3. 研究の方法

初年度は、システム構築に必要な PBTx の結合-解離特性の評価を主に行った。ウシ血清アルブミン (BSA) と代表的な PBTx として知られるインドキシル硫酸 (IS) を 0.9wt% 塩化ナトリウム水溶液 (NaCl aq.) に溶かしたものを擬似血漿とした。擬似血漿を 0.9wt% NaCl aq. で 1.5, 2, 3 倍希釈したもの、塩濃度や pH の異なる NaCl 水溶液で 1.5 倍に希釈した際の遊離率の変化を求め、希釈倍率や塩濃度が PBTx の結合解離に及ぼす影響を検討した。PBTx と蛋白質にはインドキシル硫酸 (IS) とウシ血清アルブミン (BSA) を用い、0.9wt% 塩化ナトリウム水溶液 (NaCl aq.) に溶解し擬似血液とした。擬似血液を 0.9wt% NaCl aq. で 1.5, 2, 3 倍希釈したものと、塩濃度の異なる 5 種類の NaCl aq. (1, 2, 3, 4, 5wt%) で 1.5 倍に希釈した際の遊離率 (= 遊離型 IS 濃度 / 試料溶液中 IS 濃度) の変化を求め、希釈倍率と塩濃度が PBTx の結合解離に及ぼす影響を検討した。ヒト廃棄血漿を用いて得られた結果を検証した。

初年度年度の検討により、希釈効果や pH 変化などによりアルブミンからの PBTx 解離を促進することはできるものの臨床への応用は困難であることが示唆された。そこで、PBTx と結合した Alb ごと取り除き、喪失した分を補充するような治療モードの評価を行った。具体的には、孔径の異なる二種類の選択的血漿分離膜 (EC-1A20 および EC-2A20, 川澄化学) を用い血液透析条件における溶質除去特性について評価した。

#### 4. 研究成果

図 2~4 に示したように、希釈と塩濃度の上昇により IS の遊離率は増加した。これは、希釈により BSA-IS の平衡が解離側へ移動するためである。また、塩濃度の上昇による遊離率の上昇は、IS と BSA 間の静電的な相互作用が阻害されるためである。以上より、希釈効果、塩濃度および pH 変化は、Alb と可逆的に結合している一部の PBTx に対して除去効率の向上に有効であると考えられたが、実際の臨床条件を模した系ではこれらの効果は認められなかった。この理由として、解離平衡に達するまでに時間を要することや希釈による拡散による除去効率低下が考えられた。

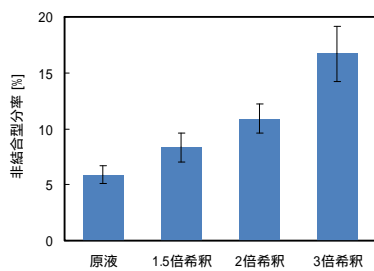


図 2 希釈率と IS 遊離率の関係

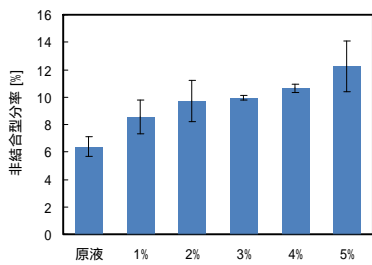


図 3 塩濃度と IS 遊離率の関係

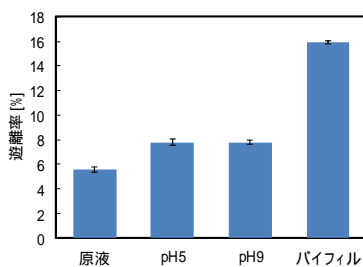
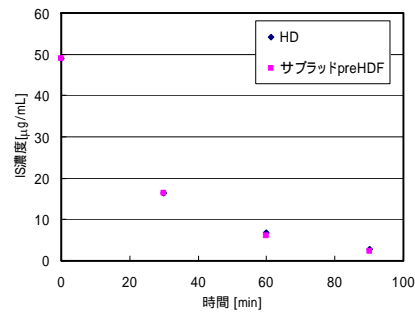


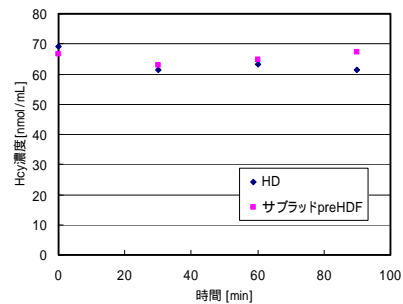
図 4 希釈液と IS 遊離率の関係

希釈効果や pH 変化などによりアルブミンからの PBTx 解離を促進することはできるものの時間を要する、もしくは通常透析でも希釈と同様の効果が得られており本手法による除去能の向上は困難であることが示唆された(図 5)。そこで本年度は、PBTx と結合した Alb ごと取り除き、喪失した分を補充するような治療モードの評価を行った。Plasma diafiltration (PDF) 用フィルターの細孔径は透析膜より大きく、アルブミン漏出量は増加

するが、アルブミン結合性尿毒素を効率的に除去できる可能性がある。



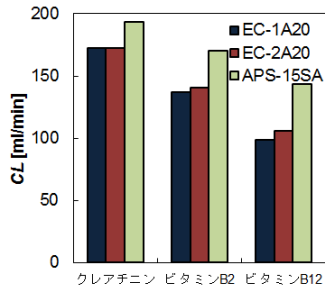
(a) インドキシル硫酸 (IS)



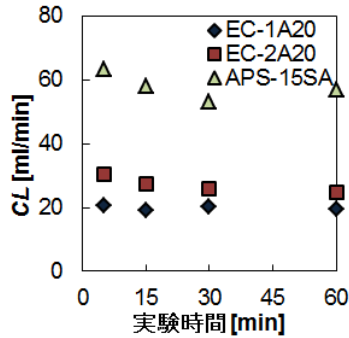
(b) ホモシステイン (Hcy)

図 5 前希釈 HDF による PBTx 除去促進の検討(上:インドキシル硫酸,下:ホモシステイン)

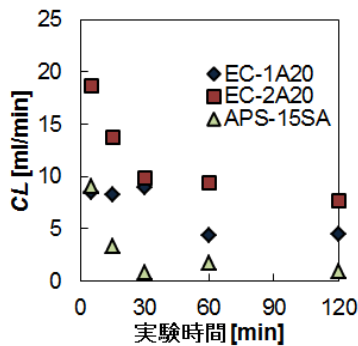
そこで、孔径の異なる 2 種類の PDF フィルターを各種モードで使用した際の溶質除去特性を明らかにすることを目的とした。孔径の異なる二種類の選択的血漿分離膜 (EC-1A20 および EC-2A20) における  $\beta$ 2-MG 以下の分子量の溶質のクリアランスは、透析に使用されるダイアライザーである APS-15SA に比べて著しく低値となった。これは選択的血漿分離膜が均質膜であり膜抵抗が大きく拡散性能に劣ることによる。しかし、孔径が大きいため  $\alpha$ 1-MG および BSA のクリアランスは、APS-15SA より大きくなった。また、タンパク結合性尿毒素としてインドキシル硫酸を想定した際の、HD モードにおける除去量を推算した結果、EC-2A20 では APS-15SA より増加したが、EC-1A20 では少なくなった。その結果、純水濾過係数およびクレアチニン、ビタミン B12 および  $\beta$ 2-MG のクリアランスは透析器に比して低値となるものの、アルブミン漏出は多くなるため、治療条件によっては通常透析よりも効率的な蛋白結合性毒素の除去が可能であると推測された。



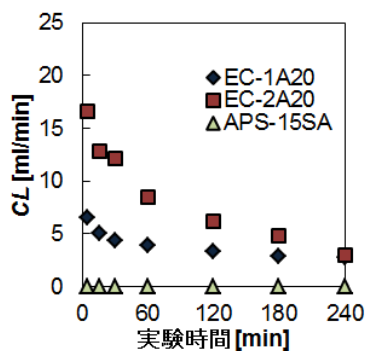
(a) 小分子量溶質 (15 分値)



(b) beta2-MG



(c) alpha1-MG



(d) BSA

図 6 HD 条件における溶質クリアランス

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ken-ichiro Yamamoto, Kei Eguchi, Iwakazu Kaneko, Takashi Akiba and Michio Mineshima, In vitro study of removal of protein-bound toxins, Blood Purif 35 (suppl. 1): 51–54 (2013) (査読無)  
DOI: 10.1159/000346373

〔学会発表〕(計 6 件)

Ken-ichiro Yamamoto, Eguchi Kei, Iwakazu Kaneko, Takashi Akiba, Michio Mineshima, Evaluation of a novel plasma exchange using a selective plasma separator, 34th Annual Dialysis Conference, Feb 9-11, 2014, Atlanta, Georgia, USA

山本健一郎, 江口圭, 金子岩和, 秋葉隆, 峰島三千男, 選択的血漿分離器エバキュア 4A を用いた新しい血漿交換法の基礎的分離特性, 第 34 回日本アフェリシス学会学術大会, 軽井沢, 2013 年 11 月

江口圭, 金子岩和, 山本健一郎, 松嶋哲哉, 峰島三千男, 清浄化された透析液をどう使うか?, 第 40 回日本血液浄化技術学会学術大会・総会, 大宮, 2013 年 4 月

Ken-ichiro Yamamoto, Takashi Akiba and Michio Mineshima, Solute Removal Characteristics of Plasma Fractionator using as Hemodialyzer/Hemodiafilter, 33rd Annual Dialysis Conference, Seattle, Washington, USA, March, 2013

山本健一郎, 江口圭, 金子岩和, 秋葉隆, 峰島三千男, 蛋白結合毒素の効率的除去に向けた基礎的検討, 第 21 回日本次世代人工腎臓研究会, 東京, 2012 年 9 月

山本健一郎, 江口圭, 金子岩和, 秋葉隆, 峰島三千男, 蛋白結合毒素の解離促進に関する基礎的検討, 第 39 回日本血液浄化技術学会学術大会, 福岡, 2012 年 4 月

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 健一郎 (YAMAMOTO, Ken-ichiro)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00434316