

博士論文

新しい抗血栓性ポリマーAN-MPCの開発

Development of a New Antithrombogenicity
Polymer AN-MPC

2021年 12月

堀 和芳

要旨

感染症より引き起こされる全身性の炎症性疾患、敗血症の治療には血液浄化療法である、持続緩徐式血液濾過透析（continuous hemodiafiltration : CHDF）が施行される。治療に用いられる血液浄化膜は炎症誘因物質である陽性荷電物質サイトカインに対し、陰性荷電による吸着除去を目的とした poly-acrylonitrile (PAN) 膜が有効であるが、長時間に及ぶ連続治療のため、血液凝固およびタンパク吸着による目詰まりが問題になっている。この問題を解決すべく血管内皮のリン脂質に類似した分子構造を持つ人工リン脂質 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) と acrylonitrile (AN) を重合し、新たな抗血栓性 AN-MPC ポリマーを開発した。この開発した AN-MPC ポリマーを既存の血液浄化 PAN 膜に被覆法によるコーティングを行うと分子構造内にある AN 同士の強い接着性が期待できる。本研究のコーティング濃度は先行研究により 1%、3% とした。コーティングした PAN 膜に対する抗血栓性の発現を確認すべく、ウサギ新鮮血にて浸漬を行い走査型電子顕微鏡（scanning electron microscope: SEM）を用いて観察を行ったところ 3%コーティング PAN 膜において血球やタンパクの付着が認められず良好な抗血栓性能が示された。また *in vitro* の検証として臨床治療と同様の条件下で 24 時間のウサギ新鮮血の血液循環を行い、血液ポンプのシェアストレスや灌流

接触に対して生体適合性効果発現の減少が認められないか観察を行った結果、良好な抗血栓性能とタンパク付着抑制効果が確認された。本研究は急性血液浄化療法のみならず慢性腎不全の人工透析療法にも応用が可能である。血液浄化療法は従来までの通院、入院による体外循環式治療から在宅治療を目指し、埋め込み型、携帯型人工腎臓、再生医療へシフトしていく過渡期に差し掛かっていると言える。本研究が進み臨床応用が進めば、次世代の腎代替療法の発展に応用でき本ポリマーはそのブリッジの役割を担う研究だと考える。本研究をまとめた論文は以下の構成とした。

第 1 章では血液浄化膜開発の歴史と本研究の目的と意義を述べた。

第 2 章では現在、臨床現場にて行なわれている血液浄化療法の原理と回路構成、臨床中のモニタリングを説明し、治療中の血液浄化膜の凝固や循環血液量を検知するモニタリングとして近赤外光の赤血球吸光量や回路内圧差を利用してセンシングを行う研究結果を示した。

第 3 章では CHDF で使用される血液浄化膜の特性と臨床評価方法を述べ、現在使用されている血液浄化膜の臨床評価として溶質除去性能と血液生体適合性を補体、凝固線溶因子の観点から検討した研究結果を示した。得られた結果により膜素材によって性能が大きく異なることが示され、膜の表面に行う修飾方法や膜素材の親水性、平滑性により抗凝固性能が向上すること示された。これらの知見をもとに新たな抗血栓性ポリマーを修飾

する血液浄化膜の選定をした。

第 4 章ではサイトカインの血液浄化療法による除去方法と治療効果に伴う生命予後について研究した結果を示し、開発した血液浄化膜のサイトカイン除去能力の指標とした。

第 5 章では新たな抗血栓性ポリマーとして選択した MPC について、血液浄化膜に対する修飾方法の先行研究をもとになぜ急性血液浄化膜に対する抗血栓性ポリマーとして適切であるか考察した。また既存の血液浄化膜の中からサイトカインの除去能力に優れ、かつ十分な抗血栓性の効果発現が得られるか MPC の先行研究と 4 章までの自身の臨床研究を鑑み検討を行った。その結果、陽性荷電物質のサイトカインの吸着性能として陰性荷電膜である PAN 膜を候補として選定した。

第 6 章では MPC に対し選定した PAN 膜にはどのような修飾を行うことが効率のよい生体適合性を示すか設計を行った。MPC ポリマーは膜に対する単純な被覆法では剥がれやすく、製膜時にブレンドする方法ではコストがかかることから、先に PAN 膜の分子構造にあるアクリロニトリルと MPC を重合し、AN-MPC ポリマーを合成した後、エタノール溶媒にて適切な濃度に希釈を行いコーティング溶液として被覆を行えば血液浄化 PAN 膜と AN-MPC の AN による強い接着が期待できると考え次の手順で生成した。MPC モノマーをエタノール溶媒にて溶解し AN と AIBN ラジ

カル重合を行い、AN-MPC ポリマーを回収した。回収した重合生成物の分析を行いその組成を確認した。

第 7 章では新たな抗血栓性コーティング剤の AN-MPC ポリマーの PAN 膜への表面修飾の方法を検討した。先行研究では被覆、ブレンド、グラフト重合などが行われているが、第 6 章における設計条件に基づいて、AN-MPC ポリマーを 1%と 3%に希釈し、既存の人工透析用の平膜 PAN に被覆法にてコーティングを行った。

第 8 章では AN-MPC ポリマーにて表面修飾を行った PAN 膜をウサギ新鮮血に 24 時間浸漬させ電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) にて観察を行った。その結果、3%コーティング PAN 膜は血球成分の付着が認められず良好な抗血栓性能が示された。

第 9 章では実際の臨床の条件に近づけるべく血液回路内に 3% AN-MPC コーティング PAN 膜をエアートラップチャンバー内に詰め、ウサギ新鮮血にて 24 時間灌流実験を行った。ウサギ新鮮血内の抗凝固剤であるクエン酸カルシウムは透析にて除去し、臨床における CHDF の条件下にて施行した。灌流後に観察を行った結果、第 8 章と同様、血小板、タンパク質の付着は認められなかった。

第 10 章では、本研究で得られた知見や結果を総括し、今後の展望について述べた。

目次

第 1 章 序論.....	1
1-1 血液浄化膜の歴史的背景と本研究の目的.....	1
第 2 章 血液浄化療法の原理.....	12
2-1 血液体外循環とは.....	12
2-2 拡散 (透析).....	13
2-3 限外濾過.....	15
2-4 吸着.....	16
2-5 血液体外循環中のモニタリング.....	16
2-5-1 循環血液量と回路内圧のモニタリング.....	18
2-6 結語.....	22
第 3 章 血液浄化器の臨床性能評価.....	24
3-1 血液浄化器の構造.....	24
3-1-1 中空糸型血液浄化器.....	24
3-1-2 積層型血液浄化器.....	25
3-2 血液浄化器の性能評価方法.....	26
3-2-1 溶質除去性能.....	26
3-2-2 生体適合性.....	30
3-2-3 血液凝固系.....	30
3-2-4 細胞因子の活性.....	32
3-2-5 血液浄化膜に用いられる凝固亢進マーカー.....	32
3-2-6 補体の活性.....	33
3-2-7 血液浄化膜に用いられる免疫反応マーカー.....	34
3-3 血液浄化膜の種類.....	35
3-3-1 セルロース系膜.....	35
3-3-2 合成高分子系膜.....	37
3-4 セルロース系膜の臨床評価.....	42
3-4-1 表面改質セルロース膜の臨床評価.....	42
3-4-2 ビタミン E コーティングセルロース膜の臨床評価.....	45
3-5 合成高分子膜の臨床評価 (PS 膜).....	47
3-5-1 目的.....	47
3-5-2 方法.....	47
3-5-3 結果.....	48
3-5-4 考察.....	53
3-5-5 結語.....	54

3-6	合成高分子膜の臨床評価 (PAN 膜).....	55
3-6-1	背景.....	55
3-6-2	目的.....	55
3-6-3	方法.....	56
3-6-4	結果.....	57
3-6-5	考察.....	64
3-6-6	結語.....	66
第4章	急性血液浄化療法におけるサイトカイン IL-6 の臨床予後の検討.....	75
4-1	急性血液浄化療法の背景.....	75
4-2	敗血症とは.....	76
4-3	サイトカインとは.....	78
4-4	敗血症におけるサイトカインストーム.....	79
4-5	敗血症に対する血液浄化療法.....	80
4-6	臨床研究：IL-6 から見る CHDF の施行基準と予後について-APACHE II スコア, SOFA スコアと比較して-.....	83
4-6-1	目的.....	83
4-6-2	対象と方法.....	83
4-6-3	結果.....	84
4-6-4	考察.....	87
4-6-5	結語.....	88
第5章	新しい抗血栓性ポリマーの開発.....	91
5-1	背景 -急性血液浄化膜の問題点-.....	91
5-2	理想的な急性血液浄化膜を考える.....	93
5-3	MPC (2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) とは.....	94
5-4	MPC を修飾する合成高分子系膜の選定.....	96
5-5	結語.....	98
第6章	新しい抗血栓性 AN-MPC ポリマーの重合.....	102
6-1	MPC とアクリロニトリルの重合方法.....	102
6-2	新規開発ポリマー重合の設計.....	103
6-3	実験機材.....	104
6-4	共重合実験.....	105
6-4-1	アクリロニトリルの精製.....	105
6-4-2	アクリロニトリルと MPC の重合.....	106
6-5	AN-MPC 共重合ポリマーの分析.....	111
6-5-1	AN-MPC ポリマー共重合物の分析結果.....	111
6-6	考察.....	112

6-7	結語.....	113
第7章	AN-MPC ポリマーの血液浄化 PAN 膜へのコーティング実験.....	116
7-1	血液浄化膜に MPC ポリマーを表面修飾する方法.....	116
7-1-1	化学的表面修飾 (後重合法).....	116
7-1-2	物理的表面修飾 (重合法).....	118
7-2	MPC 修飾を行った血液浄化膜の先行研究.....	119
7-2-1	再生セルロースと MPC の表面修飾.....	119
7-2-2	ポリスルホン膜と MPC ポリマーの修飾.....	122
7-3	血液浄化 PAN 膜に最適な MPC 表面修飾方法.....	123
7-3-1	PAN と MPC ブレンド法の長所と問題点.....	123
7-3-2	PAN と MPC 被覆法の長所と問題点.....	124
7-4	AN-MPC ポリマーの血液浄化膜に対する表面修飾実験.....	125
7-4-1	目的.....	125
7-4-2	実験機材.....	125
7-4-3	AN-MPC ポリマーの血液浄化膜表面修飾.....	126
7-5	コーティングした表面塗工の分析.....	128
7-5-1	赤外線吸収スペクトラム (FT-IR) の測定結果.....	128
7-5-2	コーティング状態解析 (TOF-SIMS) 飛行時間型二次イオン質量分析.....	128
7-6	考察.....	128
7-7	結語.....	129
8章	AN-MPC ポリマーコーティング人工腎臓 PAN 膜の実験-ウサギ新鮮血浸漬による血液適合性の検証.....	133
8-1	目的.....	133
8-2	実験方法.....	134
8-2-1	実験機材.....	134
8-2-2	血液浸漬.....	135
8-2-3	前固定.....	135
8-2-4	脱水.....	137
8-2-5	凍結乾燥.....	138
8-3	血液浸漬 AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜の SEM 観察.....	139
8-3-1	走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察における注意点.....	139
8-3-2	SEM 観察.....	139
8-4	考察.....	146
8-5	結語.....	147

9 章 AN-MPC ポリマーコーティング血液浄化膜の血液灌流実験.....	149
9-1 目的.....	149
9-2 方法.....	149
9-2-1 実験機材.....	150
9-2-2 血液循環回路の作製.....	151
9-2-3 ウサギ新鮮血からのクエン酸除去.....	154
9-3 血液灌流実験.....	156
9-3-1 血液灌流.....	156
9-3-2 灌流後の観察.....	158
9-3-3 試料の前処理.....	159
9-3-4 デジタルマイクロ顕微鏡による観察.....	162
9-4 考察.....	164
9-5 結語.....	166
10 章 総括.....	169
10-1 本研究の成果.....	169
10-2 今後の展望.....	169
10-3 結語.....	171
謝辞.....	173

第 1 章 序論

1-1 血液浄化膜の歴史的背景と本研究の目的

本邦における慢性腎不全患者は 34 万 4 千人 [1]にもおよび、生命を維持するための血液浄化療法は必要不可欠となっている。腎不全に対する人工的な解毒いわゆる尿毒素の除去の試みと、尿の排泄にあたる除水の試みを行う考えは 1854 年の Graham T. が最初であると言われている [2]。Graham T. は半透膜を仕切りとした溶媒中の溶質が濃度の高い方から低い方へ移動を行う拡散の原理と濃度の低いほうから高い方へ溶媒が移動する浸透の概念を牛の膀胱と羊皮で行った。1912 年になると Abel J. がコロジオン膜を用いて血液浄化実験を動物に行いこれが血液浄化膜としての原点であるとされている [3]。1940 年代には Kolff W.J. が半透膜チューブをドラムに巻きつけるコイル型人工腎臓を作成した [4]。1964 年ドイツの ENKA 社が透析用の再生セルローズ膜 Cuprophan®を開発し、透析膜の形状は平膜積層（キール）型であった。血液浄化膜性能向上の転機はダウコーニング社が中空糸膜を作製したことから始まる。中空糸膜はコイルや積層型に比べ、薄膜になり有効膜面積が飛躍的に向上し、小型でプライミングボリュームが少なく血液浄化膜の普及に大きく貢献した [5]。血液浄化膜の進化の歴史として欠かせないのは高い溶質除去性能と生体適合性である。溶質除去性能の主たるメカニズムは境膜モデルで説明される。透析による物質の拡散移動には膜の内外による 3 つの抵抗が存在し、血液側の境膜抵抗、透析膜自身の抵抗、透析液側境膜抵抗を受けている [6]。灌流下において血液側境膜抵抗を減少させるためには血液流路幅を減少させ膜厚を薄くすることが有効である [6]。コイル型は血液流路幅が大きく抵抗があり物質拡散能力は低かった。透

析膜を積み重ねる積層型は血液充填量が多い割には膜面積を増加できない。最後に登場した中空糸型は血液の通過する内腔がコイル型の $1000\mu\text{m}$ から $200\mu\text{m}$ 程度まで減少させることに成功し [6]、コイル、積層型の問題がクリアされた。また、薄膜化は拡散抵抗の減少による尿毒素の拡散速度も向上させた。1980年代より透析患者の増加とともに透析膜の開発が進み多くの膜素材が登場する。中空糸膜登場当初は、高い拡散能力と透水性、製膜の容易さから再生セルロースと酢酸セルロースが主流であった。しかしながら生体適合性としてはセルロースの分子構造にある水酸基が生体の補体の活性化を惹起し、白血球が肺に集積することによる呼吸障害を引き起こす白血球走化作用が問題となった [7]。そこで膜の表面修飾として水酸基をアセチル基に置換したアセテートセルロースとして改質する方法やポリエチレングリコール (polyethylene glycol: PEG) をグラフト重合してマスキングする表面修飾方法が開発された [8]。また被覆法として抗酸化物質であるビタミン E をコーティングする膜も開発された [9]。溶質除去性能に関しては Gejyo F. ら [10]により、透析患者の骨関節炎の誘因となる透析アミロイド原因物質が $\beta 2$ -マイクログロブリンであることが示された。その $\beta 2$ -マイクログロブリンの分子量が従来の尿毒素物質の 500 より大きな中分子量領域である 11,800 であることから、除去能力の向上のためには大きな細孔が設計可能でかつ強度の高い合成高分子膜が注目されるようになった。合成高分子膜は親水性のセルロースと異なり疎水性の素材が多く、補体の刺激は軽微だが血小板への刺激が強いため [11]血栓による膜の凝固が問題であり、抗血栓性を獲得するためには膜の親水性を高める工夫が必要であった。そこで親水性ポリマーとしてポリビニルピロリドン (poly-*N*-(vinylpyrrolidone): PVP) の配

合や膜の表面構造を平滑にすることにより血小板や凝固因子の刺激を低減させる工夫がなされた [12]。また透析器のハウジングや中空糸にフィン（羽）やスパーサー [13-14]を巻き付け血液の停留を軽減することにより血栓の発生を抑える流体力学を考慮した透析器のハウジング構造の設計・開発も盛んになった [15]。筆者はこれまで長年に渡り新たな透析膜に対し、チームとして臨床性能評価を行った [16-26]。研究した膜としては改質セルロース、ポリスルフォン (poly-sulfone: PS)、ポリメチルメタリレート (polymethyl- (methacrylate): PMMA)、ポリエステルポリマーアロイ (polyester-polymeralloy: PEPA[®])、エチレンビニールアルコール (ethylene-vinylalcohol-co-poly-mer: EVAL[®])、ポリアクリロニトリル (poly-acrylonitrile: PAN)、ポリエーテルスルフォン (polyether-sulfone: PES)、アシンメトリックトリアセテート (asymmetoric triacetate: ATA[®]) らが挙げられるが、次々に登場する透析膜の溶質除去性能、生体適合性は膜の改質により飛躍的に向上し、長年の課題であった抗血栓性の問題は、ヘパリンや低分子ヘパリンを代表とする抗凝固剤を使用することにより問題のないレベルに達してきたかに思われた。

しかしながら血液浄化療法の進歩とともに従来までは慢性維持透析患者に対する人工透析用として用いられてきた透析膜は 1980 年代ころより急性腎不全や心不全に対する急性期の治療にも用いられることが多くなった。1990 年代には急性腎不全以外の病態である敗血症に対する治療として、炎症性物質であるサイトカインを除去する持続的腎代替療法 (continues renal replacement therapy: CRRT) が盛んに行われるようになってきた [27-31]。敗血症の治療で用いられる血液浄化膜（透析以外の用途にも使用されるので血液浄化膜と表現

するには、治療ターゲットとなる陽性荷電を帯びたサイトカインを除去するために、膜の陰性荷電を利用した吸着療法が用いられているがその吸着能力を向上させるほど、膜に凝集する血小板や凝固因子、タンパク質の付着も多くなり目詰まりによる性能が劣化し治療が中断するという新たな問題が生じてきた [32]。また急性血液浄化療法を行う患者は全身性の炎症状態にあり、血液凝固カスケードが破綻し播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: DIC) を併発している。DIC は出血傾向であることから、従来まで使用されていた抗凝固剤のヘパリンが使用できなく、薬物半減期の短いメシル酸ナファモスタットを使用することになる。このメシル酸ナファモスタットはサイトカインと同じ陽性荷電であるため、血液浄化膜に付着し、膜の凝固を促進する。さらに急性血液浄化療法は治療時間が数時間で完結する人工透析療法と異なり数日、時には数週間におよぶ連続治療のため血液浄化膜の劣化も顕著である。治療の継続のためには血液浄化膜の交換が必要であり、昼夜問わず行われる治療は医療体制の逼迫も招き [33]、筆者の在籍した施設は医療事故を経験することとなった。これらの問題を解決すべく、既存の血液浄化膜にコーティングする抗血栓性に優れた新たな抗血栓性ポリマーを開発することにした。開発のコンセプトとして人工的なリン脂質として血管内皮と類似の構造を持つ MPC に注目した。MPC をポリマー化した MPC ポリマー修飾デバイスは血液と接触すると疑似血管内皮として振る舞い、血小板、タンパク質の吸着抑制効果が高いことから、すでに人工補助心臓 [34]、血管内ステント [35-36]などのコーティング剤として実績がある。この MPC ポリマーを現在、臨床実用されている血液浄化膜に表面修飾できれば急性血液浄化療法の治療効率の向上に繋がると考えた。

本研究は現状の血液浄化療法の問題点を解決するだけでなく再生医療を始めとした次世代の代替人工腎臓治療のブリッジとしての位置付けとも考えている。今、世界では従来の腎不全に対する血液浄化療法では生涯にわたり定期的な治療を必要とするため、患者の自由な日常生活が奪われるだけでなく、大量の透析液としての水の消費と人工腎臓や回路に使われるポリウレタンや塩化ビニルなどの医療廃棄物を生み出し、治療に対する多額の医療費を必要とすることが問題となっている。本邦の例で言えば日本透析医学会の統計調査 [1]および厚労省ホームページより試算すると、1回の治療にかかる水量は150L、透析は年間1人あたり156回施行するためこれを34万人分とすると約796万トンであり透析にかかる医療費は1.4~1.6兆円と試算される。またこれらの治療はアジアやアフリカの貧困な国では満足に供与できないことも事実である。2019年米国では腎臓移植を減少させウェアラブル透析や生体医工学移植の研究を推奨するKidney Xなるプロジェクトを米国腎臓病学会とともにスタートさせた [37]。この研究には2億5000万ドルが調達されており、毒素吸収材料を血液が再循環する携帯型人工腎臓や透析液を再生するコンパクト型腹膜透析、iPS細胞による腎臓の再生、バイオ尿細管、糸球体などの研究が盛んに行われている [38-44]。今回の研究にて報告する新たな抗血栓ポリマーは24時間の血液灌流までは高い抗血栓性能が示された。今後さらに長時間による抗血栓性能の継続性や尿毒素、炎症物質の除去性能の維持、滅菌に伴う品質担保の成果が示されれば将来、開発される腎臓代替療法における抗血栓性の問題の解決ツールになることを期待する。

参考文献

第1章

- 1) 統計調査委員会, (社) 日本透析医学会統計調査委員会: わが国の慢性透析療法
の現況 (2019年12月30日現在), 東京: 一般社団法人日本透析医学会,
2020.
- 2) Graham T: The Barkerian lecture: On osmotic force. *Philos Trans R Soc
Lond* **144**: 177-288,1854.
- 3) Abell JJ, Rowntree LG, *Trans R Soc Lond* 1854: On the removal of
diffusible substances from the circulating blood by means of dialysis.
Trans Assoc Am Physicians **2**: 51-54,1913.
- 4) Kolff, W.J: First clinical experimental with artificial kidney: *Ann. Int.
Med* **62**: 608-619,1965.
- 5) 酒井清孝: 血液浄化膜の誕生と進化・今後への期待: 日本急性血液浄化学会
誌 **10** (2): 73-88,2019.
- 6) 石川欣造: 最新高分子材料: 技術総覧 美巧社: 241-252,1988.
- 7) Craddock PR, Hammerschmidt D, White JG, Dalmaso AP, Jacob HS:
Complement (C5a)-induced granulocyte aggregation in in vitro: a possible
mechanism of complement-mediated leukocytosis and leukopenia. *Clin
Invest* **60**: 260-264,1977.
- 8) 木野恭子, 新倉一彦, 秋沢忠男ほか: New modified cellulose 膜透析器生体
適合性の評価. *人工臓器* **20** (1): 35-38,1991.

- 9) 猿橋誠, 渡辺秀樹, 佐々木正富 : ビタミン E 改質セルロース膜の生体適合性. 人工臓器 **24** : 631,1995.
- 10) Gejyo F, Yamada T, Odami S, Nakagawa Y, Arakawa M, Kunimoto T, Kataoka, Suzuki M, Harisawa Y, Shirahama T, Cohen A.S, Schmid K: A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as beta 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* **129**: 701-706,1985.
- 11) 伊藤 聡 : 血液透析膜の生体適合性に関する実験的研究. 阪中誌 **43**: 171-181,1994.
- 12) Hayama M, Yamamoto K, Kohori F, et al: How polysulfone dialysis membranes containing polyvinylpyrrolidone achieve excellent biocompatibility?. *J Memb Sci* **234**: 41-49,2004.
- 13) 大平整爾, 長山誠, 花井智司, 岩山清和, 榎本義雄, 似鳥嘉昭: 改良型 PAN-DX ダイアライザーの臨床評価. 人工臓器 **22** (1) : 3-7,1993.
- 14) 村本弘昭, 荒木英雄, 織田邦夫ほか : PAN-DX 膜における生体適合性の検討-抗血栓性を中心に. 腎と透析 別冊 : 99-104,1992.
- 15) 大須賀敏明, 石田等, 内藤秀宗, 酒井清孝ほか : テーパー構造における透析流の解析. 腎と透析 別冊 : 1-4,2009.
- 16) 堀 和芳, 井上雅裕, 廣田悠祐, 三上恵只ほか : 超高齢透析患者における積層型透析器使用時の栄養状態改善効果の検証-MIA 症候群の観点から-. 日本臨床工学技士会誌 No.44 : 28-31,2012.

- 17) 堀 和芳, 佐野元昭, 小出桂三ほか: ポリスルフォン膜透析器 APS-16 の臨床評価. 腎と透析 Vol.38 別冊 : 177-181,1995.
- 18) 飯塚智也, 堀 和芳, 寺本修ほか: II a 型 ATA 膜 FA-210Feco の溶質除去性能の臨床評価. 腎と透析 Vol.85 別冊 : 101-106,2018.
- 19) 飯塚智也, 堀 和芳, 井上雅裕, 三上恵只ほか: 膜素材から見る腹水濃縮時における炎症物質除去性能について. 千葉県臨床工学技士会誌 Vol.18 : 36-38,2012.
- 20) 山崎英隆, 堀 和芳, 小出桂三ほか: 透析と工学 New dialyzer (2) -PS 膜透析器. 臨床透析 Vol.8 No.13 : 69-74,1998.
- 21) 市川久志, 堀 和芳, 小出桂三ほか: ポリエステル系ポリマーアロイ膜 FLX-15G の臨床評価. 腎と透析 Vol.34 別冊 : 101-104,1993.
- 22) 山崎英隆, 堀 和芳, 小出桂三ほか: セルローストリアセテート膜透析器 FB-150F の臨床評価. 腎と透析 Vol.34 別冊 : 81-85,1993.
- 23) 山崎英隆, 堀 和芳, 小出桂三ほか: EVAL-CH 膜透析器 EV-15CH の臨床評価. 腎と透析 別冊 : 70-73,1994.
- 24) 斉藤晃, 堀 和芳, 小出桂三ほか: PEG 鎖グラフト再生セルロース膜 AM-BC-150P の臨床評価. 腎と透析 Vol.38 別冊 : 170-176,1995.
- 25) 古川康隆, 市川久志, 堀 和芳, 小出桂三ほか: 表面改質セルロース膜ダイアライザー CL-E-15N の臨床評価. 人工臓器学会会誌 人工臓器 25 (1) : 127-133,1996.

- 26) 市川久志, 堀和芳, 小出桂三ほか: 膜素材の異なる透析器の中分子量物質 (尿毒症性ピーク 2a) の除去について. 日本透析医学会 透析会誌 **28**(1): 51-57,1995.
- 27) 平澤博之, 菅井桂雄, 織田成人ほか: なぜ持続的血液浄化法なのか,なぜCHDFなのか. 集中治療 **8**(1): 1213-1220,1996.
- 28) Bellomo R, Ronco C, Mehta RL: Nomenclature for continuous renal replacement therapies. Am J Kidney Dis **28**: S2-7,1996.
- 29) Ronco C, Paganan L: Acute renal failure in infancy: Treatment by continuous renal replacement therapy. Intensive Care Med **21**: 490-499,1995.
- 30) Forni LG, Hilton PJ: Continuous hemofiltration in the treatment of acute renal failure. N Engl J Med **336**: 1303-1309,1997.
- 31) Kaplan AA: Continuous renal replacement therapy (CRRT) in the intensive care unit. J Intensive Care Med **13**: 85-105,1998.
- 32) 松田兼一, 平澤博之, 仲村将高ほか: PMMA 膜 hemofilter CHDF による cytokine modulation の適応, 有効性, 限界. ICU と CCU **27**(12): 1041-1047,2003.
- 33) 篠塚信子, 堀和芳, 井上雅裕ほか: 看護師による持続的血液濾過透析 (CHDF) の安全管理-3年間の歩み-. ICU と CCU Vol.31: S276-S277,2007.
- 34) Yamazaki K, Kihara S, Akimoto T, Tagusari O, Kawai A, Umezu M, Tomioka J, Kormos RL, Griffith B P and Kurosawa H: EVAHEART™: An Implantable Centrifugal Blood Pump for Long-Term Circulatory Support.

- Japan J. Thorac. Cardiovasc. Surg **50**: 461,2002.
- 35) Lewis AL, Furze JD, Small S, Robertson JD, Higgins BJ, Taylor S and Ricci D: Coronary stents: in these days of climate change should all stents wear coats?. J. Biomed. Mater Res **63**: 699,2002.
- 36) Lewis AL, Willis SL, Small SA, Hunt SR, O'Byrne V: Programmable elution profile coating for drug eluting stents. Stratford PW. Biomed. Mater. Eng **14**(4): 355-370, 2004.
- 37) Charlotte H: How artificial kidneys and miniaturized dialysis could save millions of lives. Nature Vol. **579**: 186-188, 2020.
- 38) Adiga SP, Jin C, Curtiss LA, et al: Nano porous membranes for medical and biological applications. Wiley Interdiscip Rev Nano med Nanobiotechnology **1**: 568-581,2009.
- 39) Fissel WH, Roy S: The implantable artificial kidney. Semin Dial **22**: 665-670,2009.
- 40) Aebischer P, Ip TK, Galletti PM: The bioartificial Kidney: progress toward an ultrafiltration device with renal epithelial cells processing. Life Support Syst **5**: 159-168,1987.
- 41) Humes HD, Buffington DA, Mackay SM, et al: Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. Nat Biotechnol **17**: 451-455,1999.
- 42) Inagaki M, Yokoyama T, Sawada K, et al: Prevention of LLC-PK (1) cell overgrowth in a biocompatible renal tubule device using a MEK inhibitor,

U0126. J Biotechnol 132: 57-64,2007.

43) Ueda H, Watanabe J, Konno T, et al: Asymmetrically functional surface properties on biocompatible phospholipids polymer membrane for bioartificial kidney. J Biomed Mater Res **77A**: 294-303,2006.

44) Vu DM, Masuda H, Yokoyama T, et al: CD133⁺endothelial progenitor cells as potential cell source for a bioartificial glomerulus, tissue. Eng Part **A15**: 3173-3182,2009.

第 2 章 血液浄化療法の原理

第 2 章では本研究の基礎となる血液浄化療法の基礎知識として血液浄化療法の回路構成と血液浄化器（血液浄化膜）内で行われる溶質除去の原理と臨床中のモニタリングについて解説する。2-5-1 節より自身の研究として赤血球の吸光度と膠質浸透圧をもとに循環血液量を推測するモニタリング研究と共同研究者として参加した回路内圧のモニタリングにより膜の回路内凝固や循環血液量が推定できる研究結果を示す。本章における研究結果をもとに開発したポリマーの血液灌流を行う実験の際の血液凝固感知モニタリングとして利用する。

2-1 血液体外循環とは

血液体外循環とは一般的に血液をローラ型ポンプや遠心ポンプを用いて体外に導出し、何らかの治療または生命維持管理を行うことであるが、血液の酸素化や二酸化炭素の排出、または心臓のポンプ機能を代行する人工心肺や補助人工心臓と血液の電解質補正、病因性物質の除去、余剰水分の除去を行う血液浄化療法に大別される。本研究の血液体外循環とは主に血液浄化療法を指すこととするが、その種類は 3 つに大別され、①慢性腎不全に対する恒久的な腎代替療法を行う血液透析。②自己免疫疾患、肝不全、脂質異常症などをはじめとする各種血液疾患に対して血漿分離・吸着、直接血液吸着の原理にてスポット治療を行うアフレスス療法。③感染症や全身の炎症性疾患である敗血症や急性腎不全に対して 24 時間連続的に数日～数週間の治療を行う持続的血液浄化療法に細分化される。特に持続的血液浄化療法は体外循環させる血液流量が血液透析では 200~300mL/min であるのに対し 60~80mL/min と非常に緩徐であり、施行時間も長時間におよぶため使用される血液浄化膜が頻回に凝固して管理に難渋する。

血液体外循環治療において目的とする治療を達成させるために重要なことは①体外循環中に血液を凝固させない適切な抗凝固療法 ②体外に血液を導出し、医療材料に接触することによる異物反応から引き起こされる免疫反応を最小限にすることである。両反応はいずれにおいても医療材料側の生体適合性が重要となり、医師、臨床工学技士はその材料の特性を理解し、設計者側は異物反応を最小限にする技術が必要となる。代表的な血液透析療法の回路図を示す

(図 2-1)。

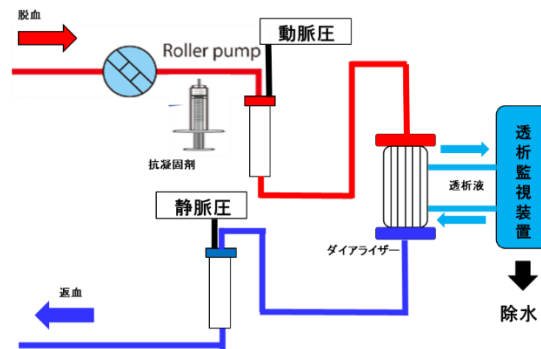
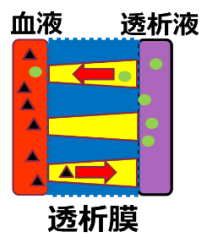


図 2-1 血液透析回路図

2-2 拡散（透析）

血液と透析液（細胞外液の組成液）を人工腎臓膜（半透膜）で仕切ると血液中の溶質（電解質、尿毒素）は濃度の高いほうから低い方へ移動し、溶媒は濃度を薄めるべく溶質とは逆の方向に移動する（図 2-2）。前者の分子拡散は粒子の熱運動の衝突であるブラウン運動によるものであり、後者は浸透力である。その推進力はいずれも濃度差による [1]。人工腎臓の膜には細孔がランダムに空いており、膜素材と製造工程の設計により孔径は異なる。拡散により通過する溶質は人

工腎臓膜間の濃度差と膜の孔径、抵抗に依存する。膜の形状に依存する拡散は孔径のサイズ、開孔率、膜厚、圧力損失、中空糸充填率など血液側、透析液側の抵抗を減少させる血液流路の設計が重要である。中空糸人工腎臓膜の除去効率は分子量が100前後の小分子量の尿毒素物質は拡散にて効率よく移動するが、分子量500~5000の中分子量物質は膜による抵抗の影響を受ける(図2-2)。



2-2 透析膜の拡散のイメージ

人工腎臓膜の拡散効率としては以下の式が模擬されている(図2-3)。

抵抗の総和=総括移動係数 (k)

R_b : 血液側抵抗 R_m : 膜の抵抗 R_d : 透析液側の抵抗

$$k = \frac{1}{R_b} + \frac{1}{R_m} + \frac{1}{R_d}$$

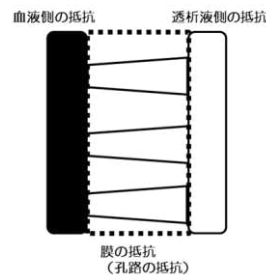


図2-3 透析中の拡散抵抗

2-3 限外濾過

血液と透析液を半透膜（血液浄化膜）で仕切り、膜の血液側と透析液側の両側に圧力を加え限外濾過圧（ultra-filtration: UF）を生じさせた時、血液側の圧力が高いと血液中の水分が透析液側に移動する。この現象を限外濾過という。限外濾過は膜間にかかる圧力差によって生じるが、種類の異なる透析膜に同じ UF を加えた場合、透水性の高い膜ほど水分の濾過量は多い。濾過により膜を通過するのは水分だけではなく細孔径と濃度に応じた尿毒素・電解質も移動する（図 2-4)[2]。また人工腎臓膜の透水性やハウジング設計による圧力分配によっては透析液側の圧力が高くなり透析液が血液内に流入する。この現象はバックフィルトレーションと呼ばれる。透析液が細菌などで汚染されているとバックフィルトレーションにより血液内に細菌が侵入し発熱や長期予後に影響を及ぼすため透析液並びにその精製に必要な逆浸透（Reverse Osmosis: RO）水の清浄化が重要視される。分子量 500 以上の中分子量物質は限外濾過による除去効率が高く、血液透析療法では腎不全によって尿として排泄できなくなった余剰水分を1回の治療にて限外濾過により 1,000～3,000mL 程度の除水を行う。

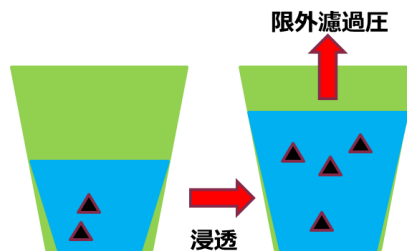


図 2-4 限外濾過と浸透のイメージ

2-4 吸着

膜に対して何らかの親和力を有すると物質が吸着する。血液浄化膜における吸着はファンデルワールス力、静電引力および疎水効果によっておこる物理吸着と化学的な結合である生物親和的吸着作用などの原理が利用されている[3]。物理吸着は材料と血液界面の物質のエネルギーがランダムな相互作用によって生じている。

- 1) イオン結合：血液タンパク質の陽・陰性荷電に医療材料側の陽・陰性荷電の静電作用を利用して結合させる。
- 2) 静電結合：分子構造内にある分極による静電的相互作用による結合。代表的な結合は水素結合。
- 3) 疎水結合：水分子は酸素分子にイオン分布が偏る状態（双極子分子）であるが無極性物質は親水性が低いため、水分子から反発し、無極性物質同士で集合し安定化しようとする結合。
- 4) 吸着の細孔制御：疎水的相互作用や静電的相互作用が行われる材料表面の細孔を制御した緻密な表面は細孔による篩分け作用により吸着する物質を分子量の大きさにコントロールする。

2-5 血液体外循環中のモニタリング

血液体外循環中のモニタリングは血圧や脈拍などの患者状態と体外循環に伴う機械側の監視事項があるが体外循環治療に対する重要なモニタリングとして回路内圧の監視がある。回路内圧は体外循環中の血液脱血不良や屈曲、返血側の針先の漏れや抜針、体外循環中の血液凝固による膜の目詰まりを監視することが可能となる。基本的な回路内圧の監視箇所として血液浄化器入口側の動脈（入

口) 圧、患者体内への返血管所である静脈 (返血) 圧、血液浄化膜外側の透析液圧がモニタリングされる (図 2-5) ①の箇所を示した動脈圧は血液浄化器の入口による回路内圧をモニタリングすることにより数値の上昇は膜内の血液凝固による目詰まりを監視することが可能となる。②の箇所は静脈 (返血) 圧であるが血液浄化器出口から針先の回路内圧を監視する。この動脈圧と静脈圧の差圧や上昇率の連動性を比較することにより血液浄化膜の目詰まりを監視することも可能である。また③の箇所でモニタリングする透析液圧は血液浄化膜の外側を流れる透析液の流れによって血液浄化膜にかかる圧力を示すため、動脈圧と静脈圧によってかかる透析器内圧 (平均圧) と透析液内圧の差を観察すれば膜間圧力差として血液浄化膜の目詰まりを知ることが可能となる。

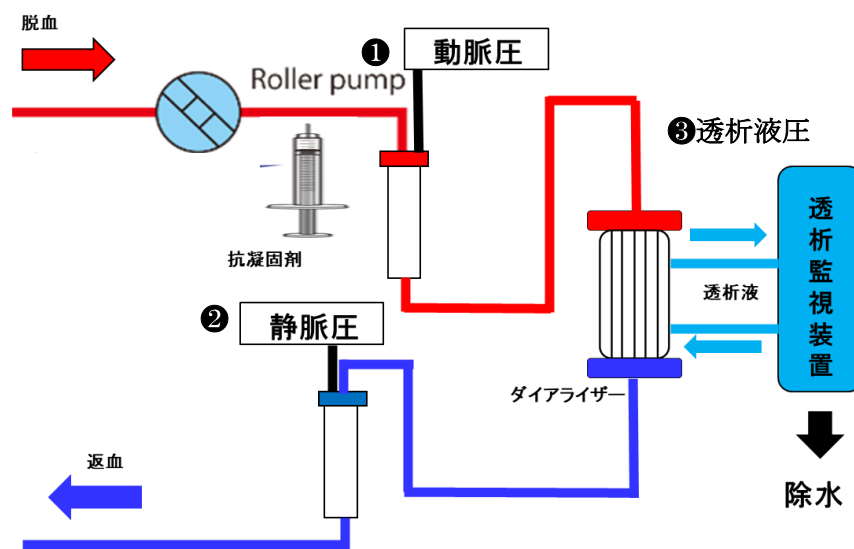


図 2-5 回路内圧のモニタリング

2-5-1 循環血液量と回路内圧のモニタリング

回路内の動脈（透析器入口）・静脈（透析器出口）圧差のモニタリングの応用例として循環血液量を知ることも可能となる。透析による除水に対して循環血液量が減少すれば回路内の血液が濃縮されるため回路内圧が上昇する。実際にその上昇率が循環血液量をどの程度反映するのか、赤血球の近赤外光に対する吸光量の変化から循環血液量の変化（ Δ Blood Volume: Δ BV）がモニタリングできるクリットライン[®]と比較した長見らの研究 [4-5]に共同研究者として参加した内容を以下に示す。

遠心分離機にて血球分離した遠心法によるヘマトクリット（hematocrit : Ht）と血液濃縮により変化する動静脈回路内圧力差（A-V 圧差）の関係（図 2-6）とクリットライン[®]によって測定された Ht 値および遠心法による Ht 値の関係は以下の結果であった。（図 2-7）。

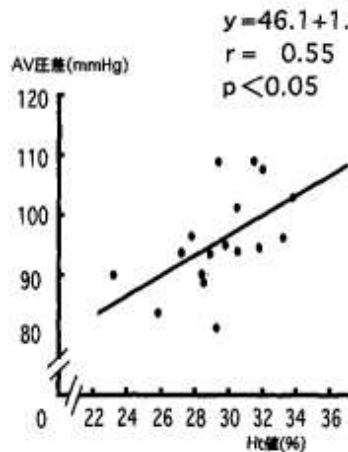


図 2-6 Δ A-V と Ht 値

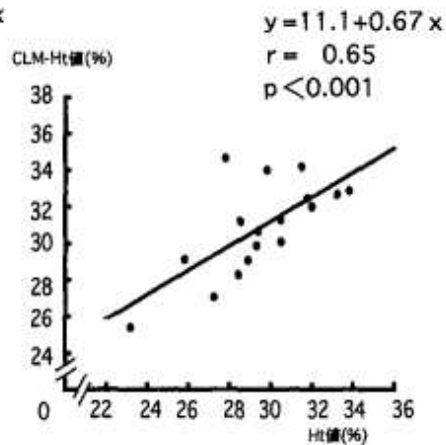


図 2-7 クリットライン[®]Ht と Ht 値

遠心法による Ht と A-V 圧差は有意に相関した。またクリットライン[®]の Ht 値と遠心法の Ht は有意に相関したため A-V 圧差のモニタリングは循環血液量を反映することが示された。次に実際の臨床における血液透析施行時の A-V 圧差とクリットライン[®]の関係を示した症例提示を行う。透析中の収縮期血圧 (systolic blood pressure: SBP) が安定している患者において A-V 圧差とクリットライン[®]Ht 値は連動しており、透析中の除水による循環血液量の減少を鋭敏に反応していることが読み取れる (図 2-8)。

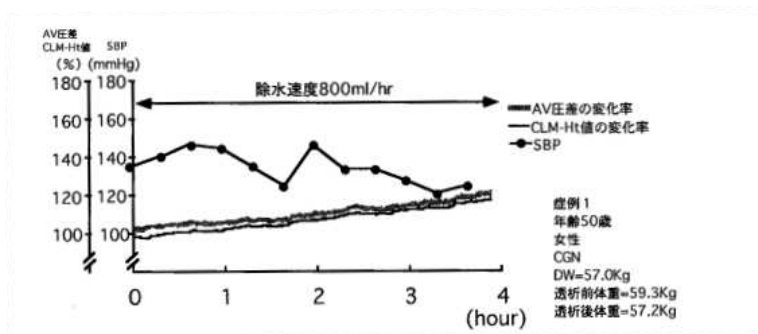


図 2-8 症例 1 : A-V 圧差とクリットライン[®]

次に透析中の SBP 低下している患者において A-V 圧差とクリットライン[®]を使用した症例を示す (図 2-9)。A-V 圧差とクリットライン[®]はほぼ同様の挙動を示している。ここでの両モニタと血圧低下の経過変化を観察すると透析中の除水に伴い循環血液量が減少し、血圧の低下が起こることが理解できる。A-V 圧差とクリットラインの血圧低下を示す閾値を患者ごとに規定することにより両モニタリングから血圧低下のポイントが予想可能となり血液体外循環中のモニタリングとして有効となる。

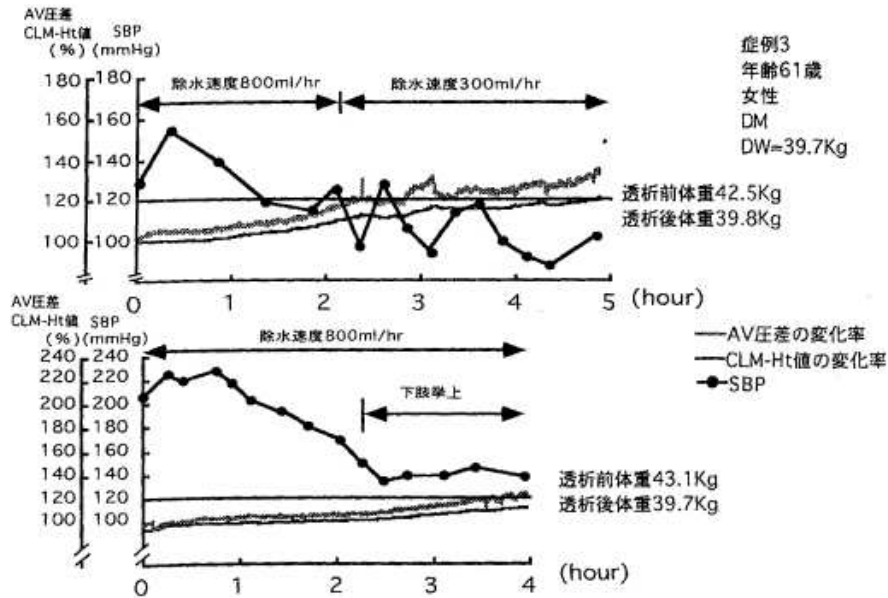


図 2-9 血液低下症例から診る A-V 圧差とクリットライン[®]

また、クリットライン[®]の精度としては体内の循環血液量減少に伴う細胞間質に貯留した水分移動が大きく影響を受けるが水分移動の推進力である膠質浸透圧に対して鋭敏に反応する。筆者は膠質浸透圧 (colloid osmotic pressure : COP) と循環血液量の関係を血液透析より 5 倍以上の血液量にて体外循環を行う心臓外科手術中の人工心肺体外循環にて明らかにした (図 2-10,11)[6]。

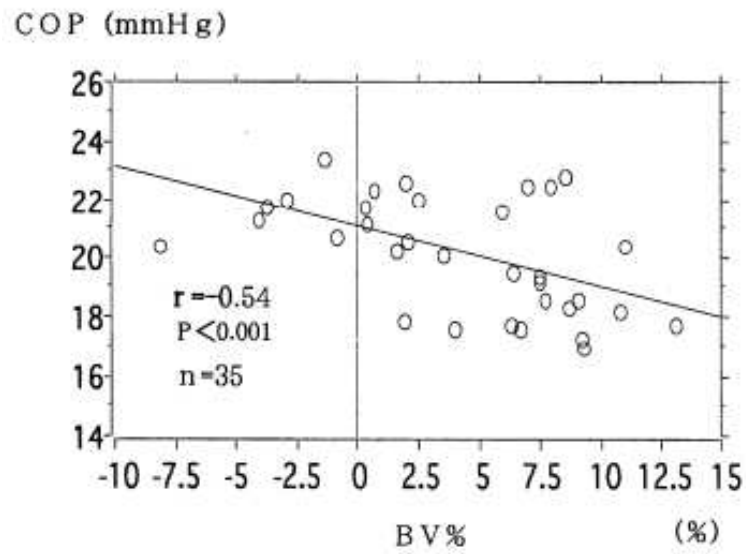


図 2-10 COP と BV% の関係

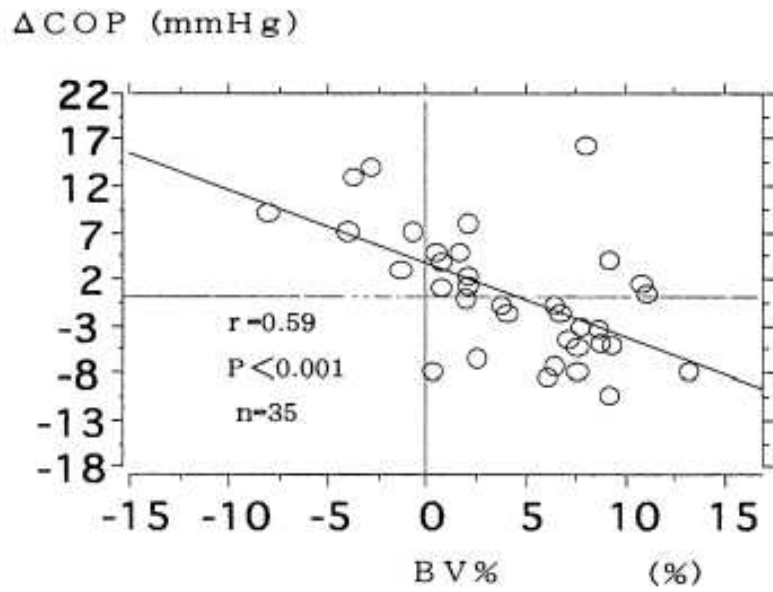


図 2-11 COP と Δ BV% の関係

2-6 結語

本章において本研究における血液浄化療法の基本的な治療方法である血液透析法の原理と方法を述べた。臨床における血液浄化療法中のモニタリング事項として回路離断や穿刺箇所のトラブルなど様々な項目があるがいずれの場合も回路内圧をモニタリングすることによって察知することが可能である。なかでも本研究のテーマである血液浄化膜の血液凝固による目詰まりは回路内圧の上昇や赤色光センサーによるヘマトクリット値の吸光度をモニタリングすることによって判別が可能となり、いずれのモニタリングも血液浄化膜の目詰まり以外にも除水に伴う循環血液量の減少による赤血球の濃縮を利用し、血压低下を事前予知するモニタリングになることを示した。本章の研究結果は抗血栓性ポリマー修飾血液浄化膜の血液灌流実験において血栓形成監視のモニタリングに利用できることを示している。

参考文献

第2章

- 1) 酒本勝之, 中島章夫, 氏平政伸: 生体物性・医用材料. 医歯薬出版 26・27, 2010.
- 2) 峰島三千男, 小野哲章, 堀川宗之, 渡辺敏: 臨床工学技士標準テキスト 第3版. 金原書院: 387-390, 2016.
- 3) 村林俊: 日本アフェレシス学会 アフェレシスマニュアル. Clinical Engineering 別冊 秀潤社: 107-113, 2010.
- 4) 長見英治, 斎藤晃, 堀和芳, 山崎英隆, 市川久志, 川崎忠行, 堀川哲彦, 犬丸達也, 新井貴士, 百瀬卓志, 生方英一, 守尾一昭, 渡部敏雄, 松崎健三, 佐野元昭, 小出桂三: 新しい透析監視装置システムの研究-血液回路内圧とクリットラインモニターを利用して-. 日本透析医学会 透析会誌**31** (9): 1259-1266, 1998.
- 5) 長見英治, 斎藤晃, 堀和芳, 山崎英隆, 市川久志, 川崎忠行, 堀川哲彦, 犬丸達也, 新井貴士, 百瀬卓志, 生方英一, 守尾一昭, 渡部敏雄, 松崎健三, 佐野元昭, 小出桂三: 新しい透析監視装置システムの研究 -第1報 動静脈回路内圧差から-. 人工臓器学会会誌 人工臓器**24** (3): 721-726, 1995.
- 6) 堀和芳, 安田剛, 皆川宗輝, 田中良昭, 堀見洋継, 外山雅章: 体外循環中における血漿膠質浸透圧の変動-連続的ヘマトクリット監視装置より-. 体外循環技術 第**27** 巻 1 号: 33-36, 2000.

第3章 血液浄化器の性能評価

第3章では本研究にて開発した抗血栓性ポリマーを修飾する血液浄化膜の選定と修飾方法および評価方法を検討するにあたり、実際に臨床使用されている血液浄化器の構造と膜種別の特性および性能評価方法を示す。性能評価方法としては、今後開発した抗血栓性ポリマーにより血液浄化膜に表面修飾した際に検証が必要な溶質除去性能、透水性能、生体適合性（凝固線溶系、免疫反応系）を述べる。3-4節よりポリマーの設計や修飾する膜素材を選定する過程で過去にどのような膜改質が行われ、それによりどのような溶質除去特性や生体適合性が示されているかを共同研究者として参加したセルロース系膜の臨床評価と合成高分子膜として筆者が行ったポリスルホン膜とポリアクリロニトリル膜の臨床性能評価の研究結果により示す。

3-1 血液浄化器の構造

3-1-1 中空糸型血液浄化器

ポリカーボネイト製のハウジング（外筒）にストロー状の中空糸膜が約数千～1万本程束ねられている。ポリウレタンの硬化性接着剤（ボンディング剤）によって中空糸膜束と円筒形のハウジング内面が上下で固定化されていて、血液側流入口の中空糸側と透析液側流入口の中空糸外側（透析液側）の流路に分かれている（図3-1）[1-2]。

以下に中空糸型血液浄化器の構造を示す。

血液浄化膜（中空糸）内径：約 $200\mu\text{m}$ 、膜厚：約 $10\sim 50\mu\text{m}$ 、約 10,000 本

中空糸有効長：約 $10\sim 30\text{cm}$ 、細孔半径：約 $0.002\sim 0.007\mu\text{m}$ （約 $20\sim 70\text{\AA}$ ）

膜面積： $0.2\sim 2.5\text{ m}^2 = (\text{中空糸内直径} \times \pi) \times \text{中空糸有効長} \times \text{中空糸本数}$

血液充填量（プライミングボリューム）：約 30~160mL

血液充填量 = (中空糸内径² × 有効長 × 中空糸本数) + ヘッダー内容量

耐使用圧力上限：500mmHg

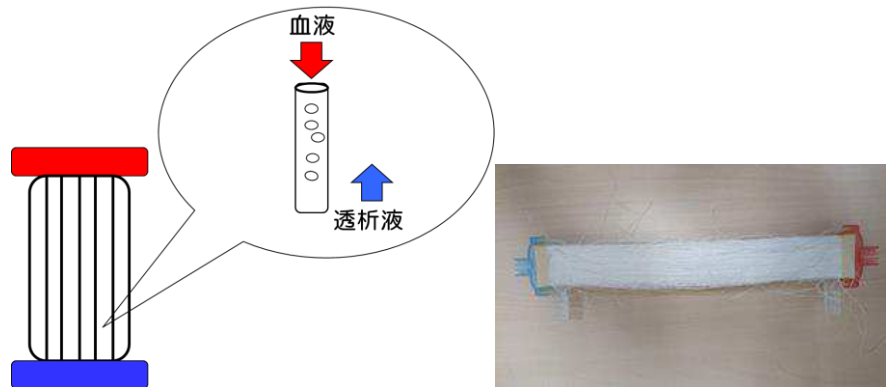


図 3-1 中空糸透析器の構造

3-1-2 積層型血液浄化器

上下の板で 2 枚の平膜血液浄化膜を挟み、これを何層も重ねることで必要な膜面積を確保する。血液浄化膜の血液流路間に血液を流し、膜と板の透析液流路間に透析液を流す（図 3-2）。

以下に積層型血液浄化器の構造を示す。

膜厚：約 19 μ m、有効長：27.4cm、血液層数：39~57 層

細孔半径：ゲル層のため規定されていない

膜面積：1.04~1.53 m²、血液充填量：126~173mL、耐使用圧力上限：450mmHg

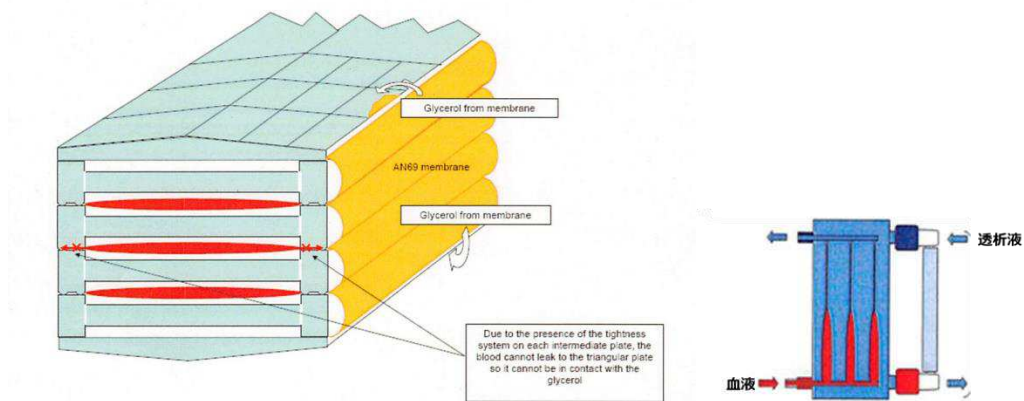


図 3-2 積層型の透析器の構造 [3] 一部改編

3-2 血液浄化器の性能評価方法

臨床における血液浄化器の性能評価として溶質除去性能と生体適合性の評価がある。溶質除去性能は尿毒素の除去効率と透水性によって示され、生体適合性としては凝固系と免疫系の活性が測定される。溶質除去性能は日本透析医学会により決められた測定方法に沿って行うが、生体適合性に関してはそれぞれの膜の特性に応じた効果検証を行うマーカーを選定して示すため研究報告により内容が異なる。

3-2-1 溶質除去性能

透析器の臨床評価方法は日本透析医学会の“血液浄化器の性能評価方法 2012” [4]により決められている。

患者条件：体重 50 ± 5 kg、ヘマトクリット値 $30 \pm 3\%$ 、総蛋白濃度 6.5 ± 0.5 g/dL、治療前 β_2 -MG 濃度 25 ± 10 mg/L の患者 5 症例以上。

(1) 溶質除去率

血液浄化療法において治療前後で対象物質が血中の何%が除去されたかを示

すために評価する。治療開始前と終了時の対象物質の血中濃度から算出するが、治療直後に細胞内外や間質より溶質が血液中に移行するリバウンド現象や治療中の除水による血液濃縮の影響を考慮して補正することが必要である。

対象物質に対する除去率は以下の算出式で求められる。

$$\text{除去率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{透析後血中濃度}}{\text{透析前血中濃度}}\right) \times 100 \dots (1)$$

体格が小さい患者ほど見かけ上、大きい数値となるため複数の血液浄化器を比較するには同一患者に対するクロスオーバーにて評価する必要がある。中・大分子量の溶質除去率を臨床で評価するためには除水による血液濃縮の影響を補正する必要がある。小分子量物質の除去率を表した (1) 式に対し、中分子量物質の除去率は血液中の赤血球の占める割合であるヘマトクリット値 (Ht) 補正除去率を考慮するため以下の式にて算出する。

$$\text{除去率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{透析前Ht} \left(1 - \frac{\text{透析後Ht}}{100}\right) \times \text{透析後血中濃度}}{\text{透析後Ht} \left(1 - \frac{\text{透析前Ht}}{100}\right) \times \text{透析前血中濃度}} \right\} \times 100 \dots (2)$$

(2) 溶質クリアランス

生体の腎臓の溶質除去クリアランスは、1分間の尿量 (V) とその尿中濃度 (U)、その時の血漿濃度 (P) から

$$\text{クリアランス} = U \times V / P$$

の計算式で求められるが血液浄化器の場合、血液が通過し、1分間に除去された物質の量は通過した血液の血漿中のどれくらいに相当するか (mL/min) の単位

を用いて表す。血液浄化器入口の血中濃度 CB_i と出口血中濃度 CB_o とその時の血液浄化器の入り口血流量 QB_i と出口血流量 QB_o から求める式は以下のようになる。

$$\text{クリアランス} = \frac{(CB_i \times QB_i - CB_o \times QB_o)}{CB_i} \quad (\text{mL/min})$$

中分子量以上の大きさの物質のクリアランス測定時 QB は血漿流量で求められ、(2) 式に示した除去率と同様に Ht 補正式を導入する。血液浄化器内で限外濾過による除水が行われた場合、血液浄化器入口流量と出口流量が異なってしまうため、厳密に測定するためには測定中の除水治療は停止する。

クリアランスを要約すると 1 分間に血液流量 200mL/min で血液浄化器を用いて透析を行った場合、200mL 中何 mL の血液中の溶質が除去されるかを表している。

(3) 溶質除去量

血液浄化器の排液の溶質濃度を測定し、1 回の血液浄化治療で除去された対象物質の実測量を測定する。溶質除去に関する絶対的な指標といえるが膜に吸着した分は含まれない。また除去量は、基本的に治療開始前値の濃度に依存する。すなわち、同じ血液浄化器で血液浄化治療を行っても対象物質の血中濃度が高いほど除去量は高値を示す。従って、除去量を治療前の前値で割って補正したクリアスペースが用いられる。体格によって補正を行うクリアスペース率が用いられることもある。測定方法として透析排液を全量貯留するかスポットで数時間ごとにサンプリングして総量を計算する方法がある [5][6]。

(4) ふるい係数 (sieving coefficient: SC)

透析膜の分子量に対する溶質除去性能を示す。血液浄化器を血液が通過した時の血液浄化器入口の血中濃度と出口側の血中濃度更に排液の溶質濃度の3点を同時にサンプリングして以下の計算式にて計算すると物質濃度1に対して除去できた割合がふるい係数として示される。ふるい係数が1.0とは血液浄化器を通過してすべての対象物質が除去されたことを表す。血液浄化器の場合、分子量500以下の物質除去は拡散に依存する部分が大きいため、ふるい係数は中分子量物質(分子量500)以上の濾過に対する除去性能を示す。横軸に分子量、縦軸にふるい係数としていくつかの分子量別に測定を行えば分子量分画曲線が描け、透析膜の溶質除去性能が可視化される。透過可能な最大分子量が評価血液浄化器の溶質除去カットオフポイントとされている [7]。

$$SC = \frac{2CF}{CB_i + CB_0} \quad CF: \text{濾液溶質濃度}$$

(5) 透水性 (ultrafiltration rate : UFR)

膜の透水性を表す指標である。1mmHgの限外濾過圧力あたりに1時間で何mL除水できるか以下の測定方法で示すことができ mL/hr/mmHg/で表現される。経時的な変化を観察することにより、膜の劣化を示すことができる。

$$UFR = \frac{QF \times 60}{TMP}$$

(trans membrane pressure: TMP) = 人工腎臓血液側圧力 - 透析液圧力

QF: 総除水量

3-2-2 生体適合性

人工臓器（材料）が血液に接触すると血液は、異物に対する生体防御の反応として、凝固亢進、免疫系の活性（補体など）、アレルギー、炎症など何らかの反応を起こす。異物反応は材料から受ける生体側の反応である。一方、生体適合性とはその人工臓器が生体側に異物反応を起こさずに順応し、本来の目的として機能しているかを示す表現となる。人工臓器が血液に接触するとその直後から、タンパク質・細胞の吸着・接着が起こる。最初に吸着する細胞性因子の種類によって生体反応の発現が異なってくる。細胞性因子として赤血球、白血球、血小板、タンパク質が挙げられるが、血小板が材料に最初に吸着されれば生体側の凝固系が活性化し、アルブミンなどの非活性化物質が吸着すれば生体側の反応は軽微である [8]。生体適合性が高い人工臓器として最も理想的なのは血球やタンパク質が材料に付着しないことであり、材料に対する付着物が少なくなるほど血小板や凝固因子の活性、補体の活性などの免疫反応が生じなくなり生体適合性が高い材料となる。特に血液浄化膜の抗血栓性に関してはその要因として接触する膜素材表面の平滑性、凝固免疫系を活性化させる官能基の存在、荷電状態、親・疎水性、水分子の運動性など多くの因子が複雑に相互作用の影響を及ぼし合うことが知られている [9]。人工臓器は生体に細胞レベルで異物と認識させないための工夫が必要であり、材料表面に接触する血液の細胞は刺激による反応が生じないことが重要である。

次の項に凝固系のメカニズムと血液浄化膜に対する細胞因子の活性を示す。

3-2-3 血液凝固系

血液はフィブリンが形成され凝固するまで 2 つのカスケードが存在する（図

3-3)。1つは外傷時に反応する外因系ともう1つは異物接触により反応する内因系である。血液が人工腎臓膜に接触すると反応する内因系は血漿タンパクの第XII因子が活性化してXIIa (active) に変化することから始まる。この時第XII因子に高分子キニノーゲンが結合しXIIaとして活性化するが高分子キニノーゲンは免疫系の活性化物質であるブラディキニンより産生されるため凝固系と免疫系の活性は重要に結びついている。活性化されたXIIaは第XI因子から第X因子と順次活性化させ第II因子であるプロトロンビンをトロンビンに活性化し第I因子であるフィブリノーゲンをフィブリンに変換してゲル化し血小板や赤血球を捉えた血餅となる [10]。また外因系は別経路が起点となり第X因子から合流する。材料接触による凝固活性の始点である第XII因子は活性化と同時に触媒因子であるプレカリクレインをカリクレインに変換させ第XII因子の活性を後押しする(ポジティブフィードバック) また凝固第IV因子はCa²⁺のため血液浄化療法においては透析液の成分であるCa²⁺濃度は凝固活性の重要な因子である。

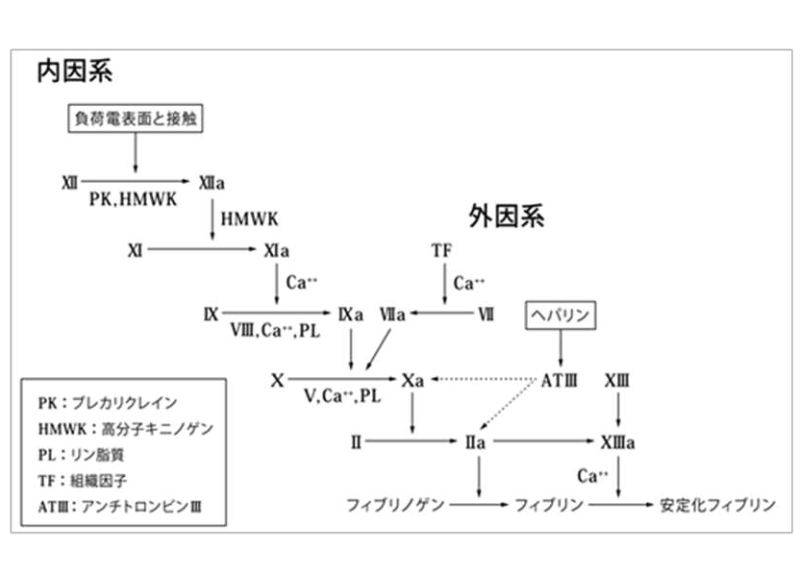


図 3-3 凝固カスケード [11] より

3-2-4 細胞性因子の活性

血液浄化膜に血液が接触すると様々な血漿タンパクが付着する。最初に付着するタンパク質は材料によって異なるが、中でも IgG、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、コラーゲンなどの分子構造にあるアミノ酸配列と結合しやすいレセプターを持つ血小板、白血球が付着する。特に RGB (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸) 配列を有するタンパク質は血小板が吸着しやすいとされ [12]、吸着した血小板顆粒からは β -トロンボグロブリン (β -TG)、血小板増殖因子 (PF-4) など様々な凝固促進因子が放出される。ゲル化されたフィブリンに血小板や赤血球は粘着し最終的に血餅となる。血小板はやがて収縮し、血餅の退縮とともに凝固する。血液浄化膜と活性化すると血小板表面に P-セレクトインが発現することを凝固亢進の指標としているとされた報告がある [13]。また血小板の活性は陽性荷電膜で強く活性化し、補体活性化の影響も受けるとも言われている [14]。

3-2-5 血液浄化膜の評価に用いられる凝固系亢進マーカー

(1) 血小板

透析中に血小板は血液ポンプの刺激や異物との接触により膜に付着または消費され開始前半に減少する。生体適合性が良好であるほどその挙動は少ない。

(2) トロンビンアンチトロンビンⅢ複合体

透析膜に接触した血液は、異物接触により活性化され凝固系が第Ⅻ因子より活性化して動き出す。凝固カスケードが進行しプロトロンビンからトロンビンに変化してフィブリノーゲンに進行していく過程で、トロンビンは血液に希釈されて失活するのに対し、一部のトロンビンはアンチトロンビンⅢと 1:1 の

モル比で結合し不活性化する [15]。トロンビンとともに生成されたトロンビンアンチトロンビンⅢ複合体 (Thrombin AntithrombinⅢ Complex: TAT) は血液中に半減期の長い安定した物質として存在し、透析中に凝固系が活性化した指標として示される。

(3) β -トロンボグロブリン

透析膜に粘着、凝集した血小板は放出因子を放出し凝固を進行させる。 β -Thromboglobulin (β -TG) は α 顆粒に存在する血小板第 4 因子 Plate Factor4 (PF-4) の 1 部として放出され血小板凝集の指標とされる [15]。

(4) 組織プラスミノゲンアクチベータ

組織プラスミノゲンアクティベータ (tissue plasminogen activator: t-PA) は生体内に血栓ができた際に血栓を溶かす線溶系の指標として示される。血液中に微小な血栓ができた場合、プラスミンを活性化して血栓を溶解するための役割があり、透析におけるシャントの血栓治療薬として用いられる。

3-2-6 補体の活性

補体の活性は異物や、細菌、ウィルスなどが生体に侵入したときの免疫反応である。凝固系と同じくカスケード反応を示すが抗体により活性化する古典的経路と抗体を介さない副経路、微生物表面のマンナン (多糖類) にマンナン結合蛋白が結合すると反応するレクチン経路の 3 つがある (図 3-4) 特に材料と血液接触で活性化するのは副経路であり起点は補体の酵素 C3 である。活性化された C3 は C3a と C3b に分解され C3a はアナフィラキシンを引き起こす。C3a は顆粒球を刺激して接着分子が発現し、血管内皮細胞への接着遊走が起こり、白血球が肺に集積して呼吸困難などの症状をおこす (白血球遊走作用)[16] 人工腎臓

膜では分子構造上の水酸基 (OH⁻) がトリガーとなる [17]。C3b は B 因子、D 因子と呼ばれる酵素と結合し C5 を産生し C5 は C5a、C5b に分解される。C5a はマクロファージを刺激し白血球遊走作用や炎症反応を誘発し C5b は膜侵襲複合体 (MAC) となり細菌を融解させる [18]。また IgG 抗体や凝固系の第 XII 因子は補体の古典回路の活性化を起こすとも言われ [19]、免疫系と凝固系は相互関係にある。

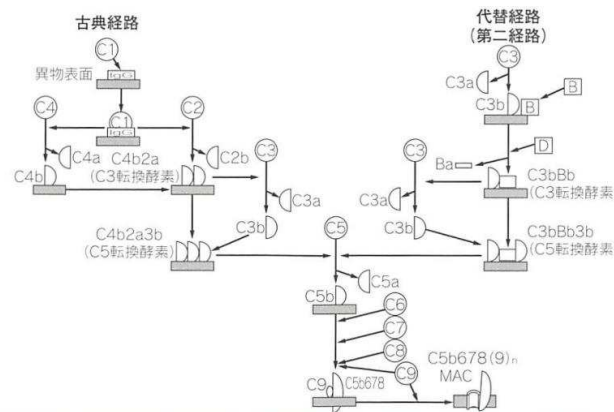


図 3-4 補体の活性経路 [18] より

3-2-7 血液浄化膜の評価に用いられる免疫反応系マーカー

(1) 白血球

透析膜の血液接触に最も影響を受ける。開始 15 分で中好性分葉白血球が急激に減少し最大減少率は 35%にも及ぶことがある [20]。膜には主に顆粒球が付着すると言われる [20]が免疫系の活性としてはセルロース膜を使用した際の補体の活性化が知られる。セルロースの水酸基が刺激の発端となり顆粒球、単球が肺の毛細血管の集積に寄与し、呼吸困難を引き起こす。性能評価としては開始 30

分後の減少量と骨髄から産生したリバウンド率を評価する。

(2) C3a、C5a

再生セルロースの水酸基が白血球の遊走と血圧を低下させることが Craddock [13]から報告されて以来、材料接触の補体活性の指標として酵素 C3、C5 の活性化した C3a と C5a の上昇率が膜の生体適合性として用いられる。血液浄化膜として活性化される因子として水酸基の数、陰性荷電、親水性、タンパク吸着が挙げられる [21]。

(3) 顆粒球エラストラーゼ

透析膜の接触に際し、好中球の活性に対し発現する脱顆粒酵素である。各種タンパク質を傷害し、タンパク異化を亢進させる [22]。補体活性経路に影響を受けないため C3a、C5a とは別のカスケードの異物反応を検出するために臨床評価にて使用される。

3-3 血液浄化膜の種類

前節までに血液浄化膜の構造と性能評価方法について述べたが、実際に急性血液浄化療法に使用されている膜素材の種類とその特徴を示し、本研究で開発したポリマーに対しどの膜素材を用いて表面修飾を行うか選定に対する基礎知識とする。また実際に我々が行った臨床における性能評価を示し、膜素材の選定を検討する指標とする。

3-3-1 セルロース系膜

血液浄化療法で用いられる血液浄化膜は慢性維持透析用と急性血液浄化用に大別されるが膜の構造としてはほぼ一緒である。炎症性のサイトカインを吸着する必要がある急性人工腎臓膜は膜自身に荷電を有し吸着性がある素材や、長

時間に渡り限外濾過が行われるため透水性の高い素材が選択されている。本節では本研究の目的である急性血液浄化用の膜素材の特徴について示す。現在、臨床にて使用されている膜素材はセルロース系と合成高分子系の2種類に分類できる(表3-1)。

表3-1 急性血液浄化用血液浄化膜の種類

	膜素材	略号	販売元	滅菌法
セルロース系膜	セルローストリアセテート	CTA	ニプロ	γ線
合成高分子系膜	ポリメチルメタクリレート	PMMA	東レ	γ線
	ポリアクリロニトリル	PAN	Baxter	γ線
	ポリスルフォン	PS	東レ	γ線
	ポリエーテルスルフォン	PES	旭化成 JUNKEN	γ線 EOG

(1) セルローストリアセテート膜

綿などを加熱溶解した再生セルロースは透析黎明期より使用されている。親水性の性質のため水浸させると膨潤し膜厚が増加し拡散速度が減少するが限外濾過圧に対し機械的強度を示す。セルロースの分子構造にある水酸基は白血球の走化作用と補体の活性を引きおこし、生体適合性に悪影響を及ぼす作用 [13] があるため、水酸基をアセチル基に置換させたものがセルロースアセテート膜として使用されている。置換数が多いと疎水性が高まり膨潤化が抑制されるため、薄膜化が可能となる [23]。拡散距離が短くなると抵抗が減少するため拡散

速度が向上し、小分子物質の除去に対して有効である。3つの置換数のある膜をトリアセテートと呼んでいる。本来、セルロース膜自体は親水性のため合成高分子系膜に比べ、蛋白付着が生じにくく膜性能の経時劣化も少ない。中分子量物質除去性能はブロードで炎症性物質サイトカインのターゲット分子量30,000位までは除去可能であるが膜自身の密度が一定な均一層構造であるため細孔を大きくすると強度が保てなく、透析においてターゲットとされる分子量30,000以上の中分子量物質の除去効率を高めるのが難しかった。近年開発された、ATA膜は膜内外を均一層と多孔質層の非対称構造として強度を高め、膜厚を15 μm から25 μm に改良して中分子量領域の物質除去性能が向上されている [24]。急性血液浄化膜としては抗血栓性も含めた高い生体適合性と溶質除去性能に優れたバランスの良い膜としてセルローストリアセテート膜が使用されている

(図3-5)。

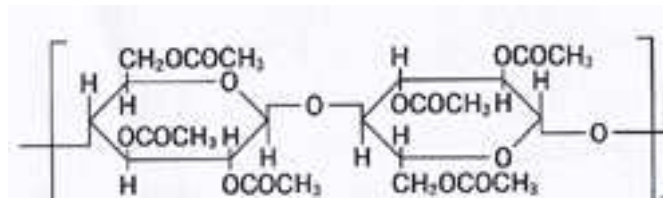


図3-5 セルローストリアセテートの分子構造 [1]

3-3-2 合成高分子系膜

(1) polymethyl - (methacrylate) (PMMA) 膜

PMMA膜はアセトキシ (-COOCH₃) 基が炭素鎖の片側だけ付いたアイソタクティック型 (螺旋状鎖) と、両側に付いたシンジオタクティック型 (直線状鎖)

[1]と異なる2つの構造体のPMMA樹脂を溶解させ70°C以下に冷却してゲル化した構造体を、透析膜として加工したものである(図3-6)[25]。本来、PMMA自体は疎水性であるため血液浄化膜を製膜する際の相分離時に加水してポアを形成させている。膜全体が緻密層からなる均一膜であるため[26]膜厚が厚く、溶質の拡散、溶媒の浸透に対し抵抗となり中分子量物質の物質透過性には限界がある。膜自身の陰性荷電は陽性荷電の炎症性物質サイトカインをイオン結合により吸着し緻密な膜表面は細孔内部へのはまり込みによる物質の吸着性能がある[27]。この緩徐な溶質除去性能や特異的な吸着性能は高齢者や重症患者に対し効果を発揮する考え方もある[28-29]。欠点としてはタンパク質、血小板や凝固因子を吸着する。特に凝固系の吸着としてフィブリノーゲンが多いため、血小板の吸着を促し抗血栓性に難がある。この問題を解決すべく中空糸内径を太くし、カラム入口圧の低減を行い、膜孔径を70Åから100Åに拡大することにより膜の目詰まりをコントロールする工夫がされている[30]。

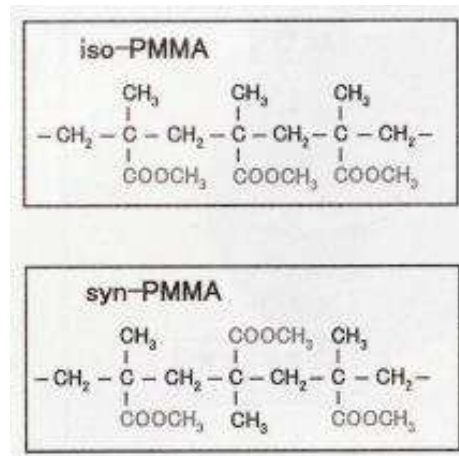


図 3-6 PMMA 膜の分子構造 [25]

(2) poly-sulfone (PS)、polyether-sulfone (PES) 系膜

現在、PS 膜は慢性維持透析用人工腎臓膜の主流であり本邦におけるシェアは 60%弱を占める [31]。中空糸内側から外側が緻密層と目の粗い粗密層の非対称構造（二層構造）となっており、機械的強度の担保と物質除去選択能力をもつ。PS は膜として加工がしやすく機械的強度が高い。耐熱性、耐 pH 性、耐 γ 線滅菌性にも優れる [32]。PS 膜自体は疎水性のためタンパク付着や抗凝固性能などの問題があるため膜内面の改質が必要である。一般的には親水性の PVP を紡糸工程にてブレンドし共有結合させている。PVP のブレンド量と分子量、架橋、紡糸するときの凝固温度の相分離で孔径がコントロールでき、除去ターゲットとされる物質の分子量に合わせ緻密に設計されている。PVP はブレンド量を増やせば親水性は増し、5%の濃度で表面に粒子が均一に被覆する。それ以上になると PVP 粒子が過剰となり表面が粗くなり、血小板の粘着数は変わらないがフィブリノーゲンの吸着量は低下するとされている [33]。また PVP は膜の平滑化の役割をする。血小板、凝固因子に対しクッションの役割となり活性化を惹起しないほかアルブミンやタンパク質の吸着抑制効果もある [34]。近年、PVP に加え新たな親水性ポリマー（NV ポリマー）が開発されポリマー周辺の吸着水が血小板の活動を抑制するとされ PS 膜にブレンドされている [35]。急性血液浄化用血液浄化膜として考えると膜表面にタンパク吸着に寄与する部分が少なく炎症性サイトカインの吸着は期待できないが透水性が高い特徴を利用して限外濾過によるサイトカイン除去や、心不全などの溢水状態の患者に対し、大量に除水を行う症例に対し頻用されている（図 3-7）。

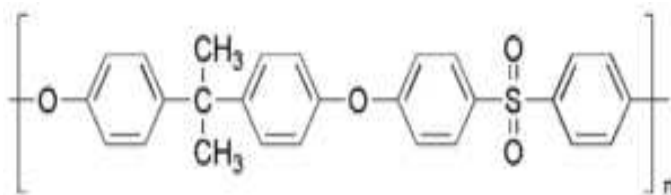


図 3-7 ポリスルフォンの分子構造 [1]

(3) poly-acrylonitrile (PAN) 膜

PAN 膜は合成高分子系膜として 1969 年から人工透析膜として使用されている。国産で慢性及び急性血液浄化膜として使用していた旭化成社 PAN 膜はアクリロニトリルに疎水性モノマーであるアクリル酸メチルと親水性モノマーであるアクリル酸を共重合したものであった [1]。膜構造は非均一構造で弱陰性荷電を有していたが現在は販売されていない。現在、人工透析膜として使用されている Baxter 社 PAN 膜は疎水性のアクリロニトリルに親水性のメタリルスルホン酸ナトリウムを共重合させている均一層質膜であり、中空糸型ではなく平膜積層構造である。PAN 自体は疎水性だが、親水化ゲルであるメタリルスルホン酸の割合を調整し含水率を 70%まで高め、高分子鎖を分散したハイドロゲル構造にすることにより、白血球や血小板の刺激を抑制し、生体適合性を高めていると言われている [36]。また、膜面はゲル層により平滑化されており一般の多孔質化された中空糸膜よりタンパク吸着面積が広いことも特徴である。親水化剤も PS 膜で使用される PVP は使用していないため PVP アレルギーの危険はない。Baxter 社 PAN 膜の溶質除去方法は膜表面に孔が存在せず、ゲル層の膜内を溶質が浸透除去されるメカニズムである。また膜内のゲル層は親水性が高く限外濾過性能が高い。分子構造のスルフォネート基が -70mV の強い陰性荷電を有し

ているため急性血液浄化療法で用いられている改良型 PAN 膜は陽性荷電の炎症性サイトカインを吸着し吸着領域は膜のバルク層まで及ぶ [37]。反面、タンパク吸着量が多いということはファウリングによる目詰まりの問題がある。サイトカインを吸着する強陰性荷電はカリクレイン・キニン系を刺激してブラダイキニンを産生し血管拡張作用や凝固系の第Ⅷ因子の活性化を引き起こす問題がある [38]ため、ポリエチレンイミンをスペーサーとして架橋し、ヘパリンをイオン結合させて膜表面は電氣的に中性化し抗凝固作用のある状態としている [39]。均質膜のため他の合成高分子に較べ溶質除去速度は穏やかであり。アミノ酸の温存能力に優れることから高齢透析患者に有効とされる [40-41]。耐 pH 性、耐薬品性に優れるが、耐熱性は低い [図 3-8][2]。



図 3-8 PAN (AN69® Baxter 社) の分子構造 [3]

以上急性血液浄化膜にて使用されている膜素材別の特徴を示した。急性血液浄化療法に用いる膜の選択基準としては、心不全などの大量の除水を行う症例や中分子量物質に対して限外濾過を利用して除去を行う症例に対しては透水性の高い PS 膜を使用することが有効であると言える。またサイトカインをはじめとする炎症性物質の除去を目的とする場合、膜に陰性荷電の分子構造を有す

る PMMA 膜や PAN 膜が有効である。次の項より実際に臨床研究を行い、その溶質除去性能と生体適合性を検討した研究結果を示す。

3-4 セルロース系膜の臨床評価

この節より本研究にて開発する抗血栓性ポリマーの基盤となる先行研究で多くの表面修飾の実績があるセルロース系透析膜の臨床性能について、共同研究者として参加し、抗凝固性能及び免疫系から見る生体適合性の評価を行った結果を示す。

3-4-1 表面改質セルロース膜の臨床評価

斉藤らは [42]再生セルロースの分子構造にある水酸基が補体 C3 の活性を起こすことを抑制するため、PEG 鎖をグラフト重合した表面改質セルロース膜 (BC 膜) と従来型の再生セルロース膜 (UP 膜) の血中の凝固亢進状態と膜表面のタンパク付着状態の比較を行った。被検者は安定維持透析患者 8 例。評価項目は白血球数、血小板数、顆粒球エラスターゼ、C3a、TAT、t-PA、 β -TG の経時変化と SEM による膜表面の観察および SDS-PAGE による透析排液をサンプルとしてのタンパクバンド解析を行った。SDS-PAGE は phastgel homogenous 20 (20%gel) の濃縮ゲル上に透析排液を $4\mu\text{L}$ を乗せ、バンド染色は銀染色、前処理はセロハンチューブを用いて脱イオン水で各検体を透析して凍結乾燥し、その後 10mM tris - HCl buffer (pH8.0) で 10 倍に濃縮したサンプル $100\mu\text{L}$ と 12.5% SDS 溶液 $20\mu\text{l}$ と 0.1% BPB 溶液 $5\mu\text{L}$ を混合したのちに SDS 処理を行った。結果は PEG 鎖表面処理のセルロース膜は白血球の一過性の減少、G-E の上昇は抑えられ、血小板、 β -TG、TAT、t-PA の変動も少なかった (図 3-9,10)。

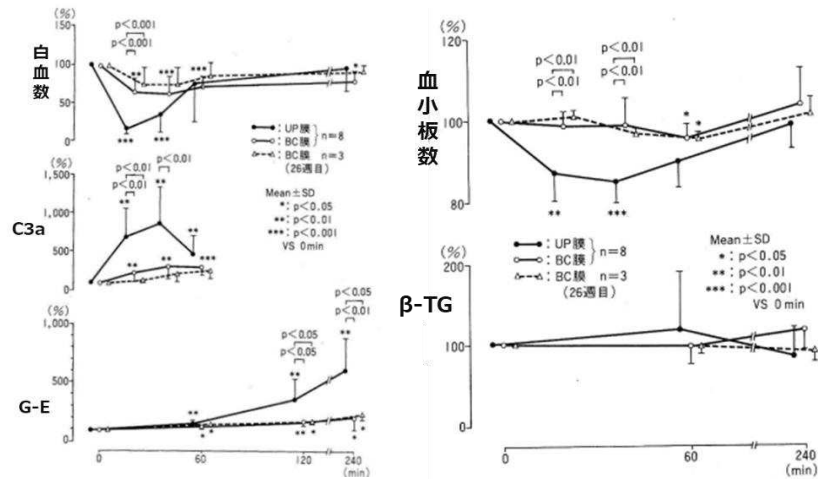


図 3-9 白血球、補体と血小板、凝固系の経時変化

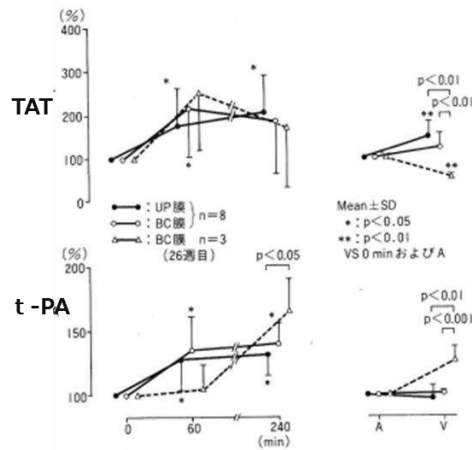


図 3-10 TAT、t-PA の経時変化

SDS-PAGE による膜表面の観察において、図 3-11 の左図から観察される透析器出口の濾液は両膜とも同じパターンであったが。図 3-11 中央の排液 PEG 鎖改質膜のバンドピークはアルブミン (67KD) とそれ以上の分子量領域で観察されたのに対し従来のセルロース膜 (図 3-11 右図) はそれ以外の分子量領域に

もバンドピークが認められた。SEM による表面観察はセルローズ膜（図 3-12 右図）に血球付着が認められたのに対し、PEG 改質膜（図 3-12 左図）には認められなかった。また膜付着フィブリン量も同様の結果であった（図 3-13）。斉藤は PEG 鎖遊離端の分子自由運動と水分子の相互作用にて形成する散漫層が血球やタンパクと膜表面との接触を減少させたと考察した。

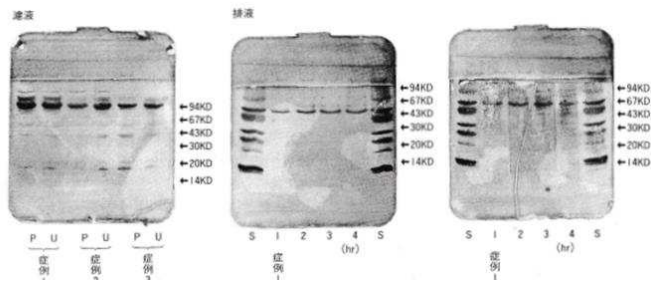


図 3-11 膜表面の SDS-PAGE

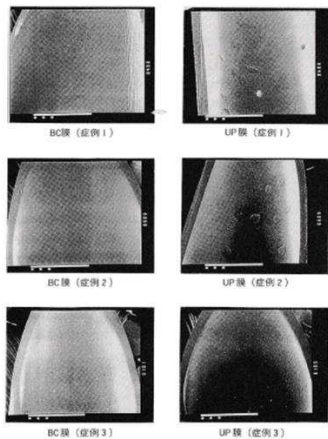


図 3-12 膜表面の SEM 観察
(左 PEG 改質セルローズ膜)

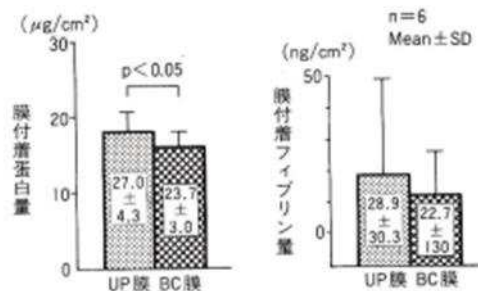


図 3-13 膜付着フィブリン量

3-4-2 ビタミン E コーティングセルロース膜の臨床評価

古川ら [43]は再生セルロースの膜表面に α -トコフェノール (ビタミン E) を固定化した改質セルロース膜 (E 膜) と改質前のセルロース膜 (S 膜) の血中の補体活性、凝固線溶系を評価した。結果は、ビタミン E コーティングセルロース膜は従来のセルロース膜と較べ白血球の減少および血小板の減少が有意に少なく (図 3-14)、補体 C3a、G-E、線溶系因子の組織プラスミノゲンアクチベータ (tissue plasminogen activator: t-PA)、TAT の上昇は有意に軽微であった (図 3-15)。また過酸化脂質の指標として酸化 LDL、MDA (Malone Dialdehyde) の上昇も抑制された (図 3-16)。

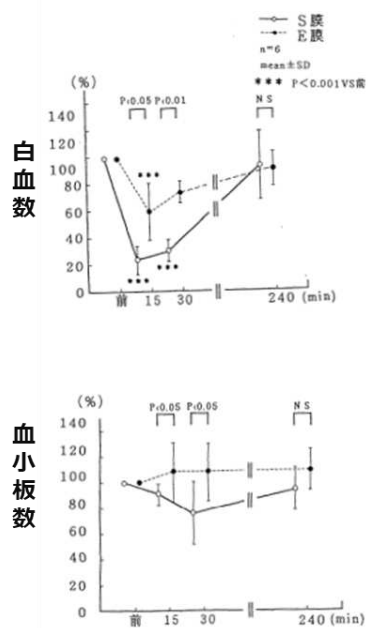


図 3-14 白血球・血小板数の推移

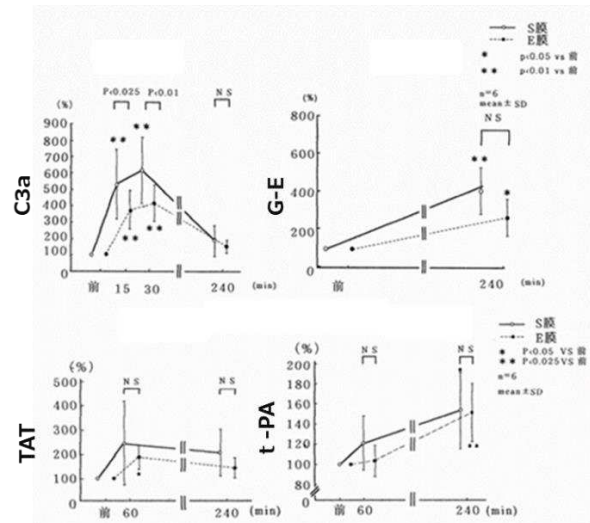


図 3-15 補体・凝固系の経時変化

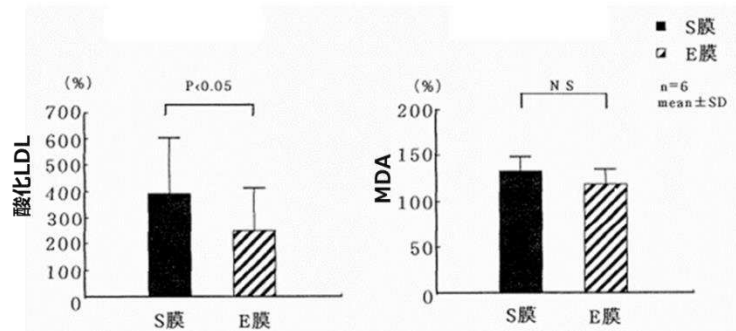


図 3-16 酸化 LDL および MDA の比較

SEM による観察も従来型のセルロース膜は血小板が凝集して擬足が延びているが改質セルロース膜は単体の血小板が散在しているのみである (図 3-17)。

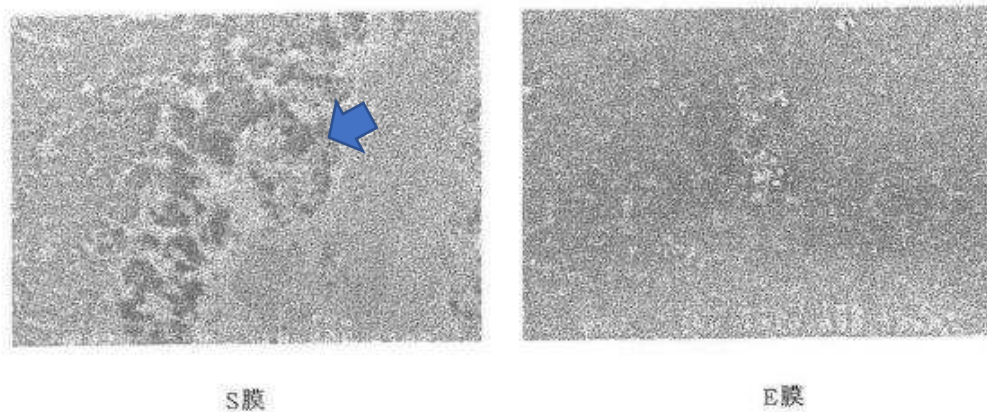


図 3-17 SEM 観察 (右図ビタミン E コート)

古川は抗酸化物質であるビタミン E の α -トコフェノールのコーティングにより遊離水酸基が減少し、生体適合性が高まり活性酸素の抑制が補体、凝固線溶系の活性抑制と抗酸化作用を高めたことを考察した。

3-5 合成高分子系膜の臨床評価 (PS 膜)

この節では新たに開発するポリマーの先行研究にて示されている PS 膜と強陰性荷電膜としてサイトカイン吸着能力が期待される PAN 膜に対し臨床評価を行い、その溶質除去性能と生体適合性を検討した筆者の研究結果を示し、新たな抗血栓性ポリマーの修飾膜として適正であるか考えた。

3-5-1 目的

B2-MG をはじめ低分子量タンパクの積極的な除去を目的としポアサイズを大孔径化し、生体適合性を向上させた PS 膜の溶質除去性能とアルブミンの漏出量および生体適合性を評価した。

3-5-2 方法

安定維持透析患者 5 例に対し、従来型 PS 膜 PS-1.6UW (川澄社製) と大孔径化 PS 膜 APS-16 (旭メディカル社製) を透析条件 (血液流量 200mL/min、透析液流量 500mL/min) を変更せずにクロスオーバーにて使用し以下の項目を測定し比較した。

- (1) 小分子物質の除去性能：尿素窒素、クレアチニン、尿酸、リンの除去率、除去量、透析 60 分、120 分のクリアランス
- (2) 低分子量タンパク質の除去性能：B2-microglobulin (NW 11,800)、ミオグロビン (NW 17,500)、プロラクチン (NW 22,000)、 α 1-マイクログロブリン (33,000)、アルブミン (69,000) の除去率、除去量、開始 60 分、210 分後のふるい係数を測定し分子量分画曲線を求めた。それぞれの計測式に関しては 3-2 章に示した通りである。
- (3) 生体適合性：白血球数、血小板数、免疫学的活性の指標として顆粒球エラス

ターゼ、C3a、凝固亢進能の指標として TAT の経時変化を測定した。白血球、血小板の表記は前値からの変化率として表し凝固亢進と免疫補体系は実測値で表した。統計学的検討は Student's *t*-test を用い危険率 5%未満を有意とした。

3-5-3 結果

(1) 小分子量物質の除去性能は両膜間にて差は認められなかった (図 3-18,19)。(表 3-2) 小分子量物質の拡散に関しては孔径には依存されない。血流量、透析液流量が同じ条件であるので差が認められなかったと考えられた。

(2) 低分子量タンパク質の除去率、除去量はいずれのマーカーも大孔径化 PS 膜が除去された (図 3-20,21)。特に分子量 11,800 である β 2-MG に関しては有意に除去されていた。ふるい係数からなる透析開始 60 分後の分子量分画曲線は小分子量物質から分子量 22,000 のプロラクチンまでの除去性能が高く、生体に必要な有用タンパクである分子量 69,000 のアルブミンの除去量は 0.2 g と温存され必要な毒素は十分に除去し有用なタンパク質は温存されるシャープでクリアカットな分子量分画曲線となっていた (図 3-22)。

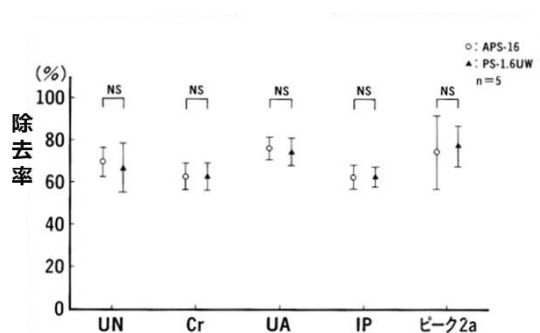


図 3-18 小・中分子物質除去率

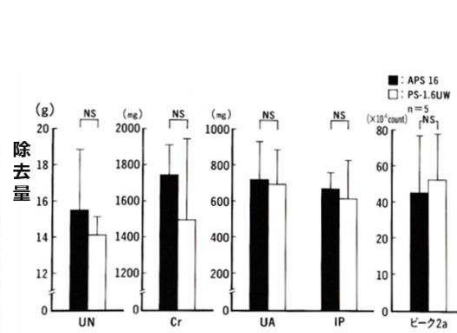


図 3-19 小分子物質の除去量

表 3-2 小分子量物質のクリアランス

mean±SD n=5

	60分		210分	
	APS-16	PS-1.6UW	APS-16	PS-1.6UW
UN	174.8±4.7	169.2±23.1	176.2±6.7	176.5±2.4
Cr	151.4±4.4	133.0±13.1	133.5±5.8	152.9±5.8
UA	151.9±3.0	133.1±17.0	148.6±21.2	155.5±9.4
IP	168.4±3.4	150.1±18.1	155.4±23.0	171.0±4.0

Q_D=200ml/min Q_D=500ml/min Q_F=0 (ml/min)

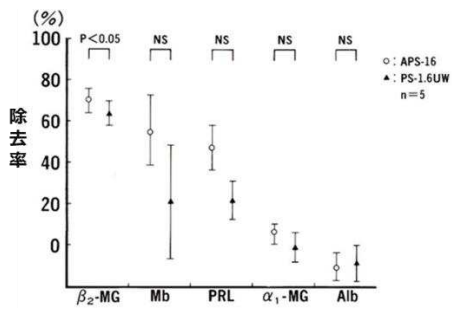


図 3-20 低分子量タンパクの除去率

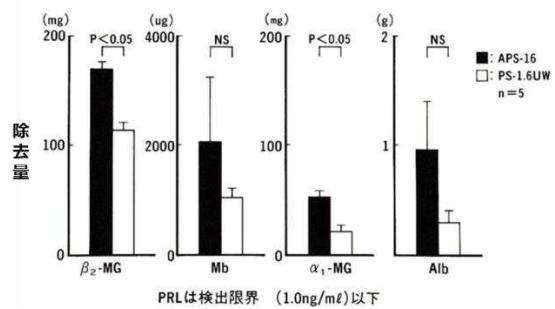


図 3-21 低分子量タンパクの除去量

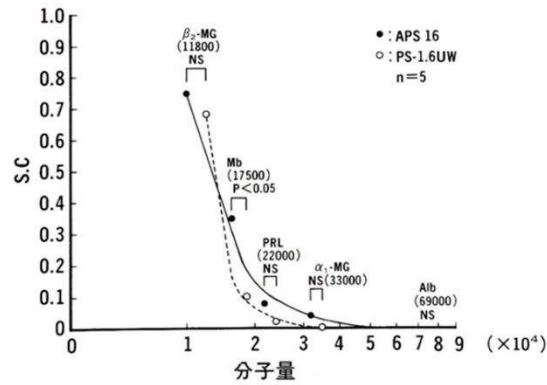


図 3-2 小分子量物質の溶質除去性能および分子量分画曲線

(3) 生体適合性に関しては白血球の開始 30 分後の減少率、血小板減少率は両膜とも軽度であった (図 3-23,24)。補体活性を示す C3a、顆粒球エラスターゼの経時変化は両膜ともに軽微であった (図 3-25)。特に APS 膜は C3a の上昇は 60 分でピークアウトした (図 3-26)。凝固亢進能を示す TAT は両膜ともに軽微な上昇を示し、開始 60 分でピークアウトした。血小板の減少の動態と同じ挙動で開始 60 分以内に凝固亢進反応は終了する結果が得られた (図 3-27)。

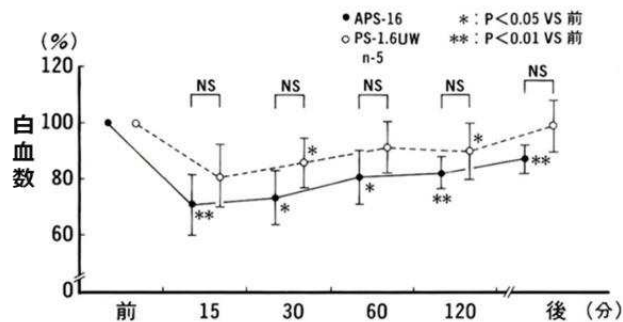


図 3-23 白血球の減少率

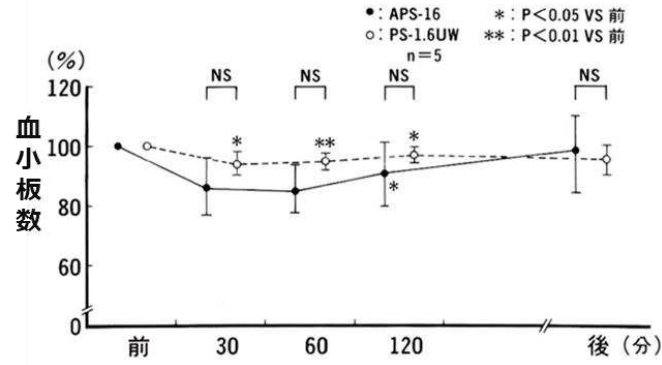


図 3-24 血小板の減少率

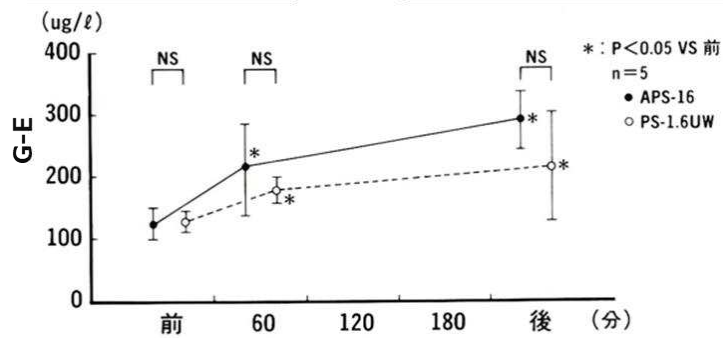


図 3-25 顆粒球エラスターゼの経時変化

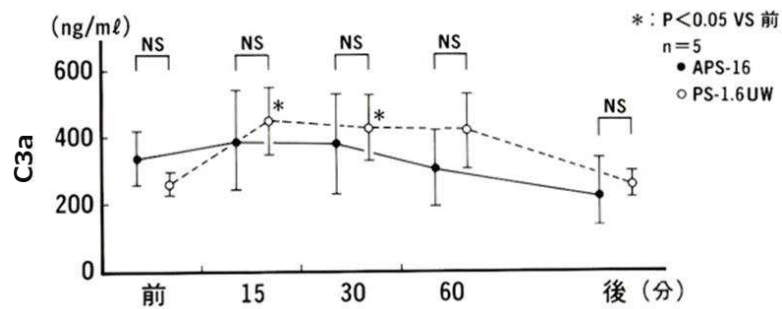


図 3-26 補体の活性化

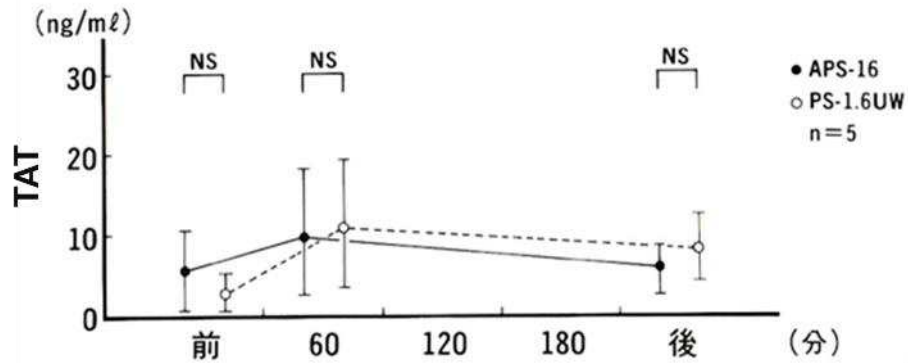


図 3-27 TAT の活性化

膜の劣化を示す UFR は有意差こそなかったものの大孔径化膜の UFR が維持されたことは膜に対するファウリング抑制効果が発揮されたことを示していた。両膜素材間に大きな差が認められるが観察されたサンプル数が非常に少ないため症例を増やすことにより統計学的有意差が得られるのではないかと考えられた (図 3-28)。

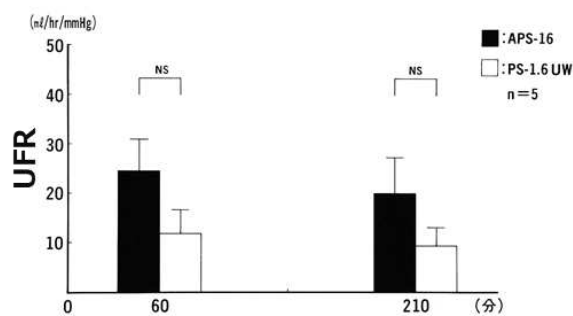


図 3-28 UFR の変化

3-5-4 考察

大孔径化された PS 膜は透析アミロイド症の誘因となる B2-MG (分子量 11,800) の除去率で 70%を示し、1 回透析当たりの除去量も $169.8 \pm 48.7 \text{mg}$ であった。災害時のクラッシュシンドロームや横紋筋融解症にて筋肉崩壊により高値を示すミオグロビンの除去性能も 60%近い除去率があり、急性血液浄化膜としても使用できる可能性 [44]が示唆された。低分子タンパク質の除去効率が従来までの PS 膜より高い結果は同様の膜で臨床評価を行った他の報告とも一致する [45-46]。従来型の PS 膜の低分子タンパク質除去方法は限外濾過圧を利用して除去するメカニズムであったが、大孔径化された PS 膜は従来膜のポアサイズでは拡散により通過しにくいサイズの低分子タンパク質も拡散され、除去効率の向上に繋がったと考えた。新たな PS 膜のポアサイズを分子量分画曲線から推測すると分子量 17,500 のミオグロビン、22,000 のプロラクチンのふるい係数が従来型 PS 膜より高い性能を示している結果より大孔径化 (80 Å) [32]されたことが理解できる。透析中のポアサイズが狭小化する変化に関しては、親水性ポリマーである PVP の偏在している隙間にタンパク質の吸着が起こることが原因とされているが [33]今回の結果から推察すると透析開始初期にタンパク質が付着したと考えられた。その証左として開始 60 分までに血小板が低下し凝固亢進マーカーの TAT もピークアウトしている。このことは透析を開始してまもなくタンパク質の膜面への吸着が開始され透析前半には終了していることを示している。このポアサイズの狭小化と粗密層、緻密層の非対称構造が小・中分子量物質の尿毒素は積極的に除去し、生体の有用タンパクである大分子物質であるアルブミンは温存するシャープなカットオフポイントを持つ特性の膜で

あることを示していた。このことより大孔径化された PS 膜は従来までの PS 膜の分子量分画曲線より右にシフトした曲線が特徴であると言える (図 3-32)。またタンパクの吸着量に関しては透析後半の UFR 低下がないことから性能を損なう大量の吸着はないと考えた。以上のことより PS 膜を急性血液浄化膜として利用した場合、中分子量鎖物質の炎症物質サイトカインの限外濾過による除去は期待できるが、吸着による除去は望めないことが予想された。また膜のタンパク付着に対する生体適合性の発現に関しては血液接触による膜の表面構造が重要となる。接触面を散漫層として表現すると血液が接触したときの水分により膜の表面が膨潤すれば散漫層内で膜に修飾した親水性のポリマーが自由に運動し、高い生体適合性を発揮する [47]。PVP が偏在化した局所にタンパク質が付着したと考えるても PVP が形成される散漫層の柔軟性や厚みが白血球数、血小板数、凝固機能、補体活性化の抑制に寄与したと考えられた。またこれらの因子に対して反応する官能基を持たないことも PS 膜の分子構造の特徴であることが示された。

3-5-5 結語

大孔径化され生体適合性を高めた PS 膜は従来型の PS 膜と較べ中分子量物質である低分子タンパクの除去性能に優れ、アルブミンは保持されるシャープな分子量分画曲線を持つ溶質除去性能と高い生体適合性を有する膜であることが示された。このことは急性血液浄化膜として使用した場合、限外濾過によるサイトカイン除去能力が期待できる結果といえるがタンパク吸着量は少ない膜特性であることが示された。

3-6 合成高分子系膜の臨床評価 (PAN 膜)

3-6-1 背景

従来までの透析療法ではいかに透析効率を上げて体内の尿毒素を除去するか
に主眼が置かれていた。また透析膜質の向上や透析治療の進歩により長期透析
患者の増加と日本人の高齢化は透析による医原性の低栄養に陥りやすく新たな
問題となっている。アミノ酸は体内のタンパク質合成やホルモンバランスを保
つ、重要な物質であるが本来透析で除去すべきターゲットとなる尿毒素（尿素窒
素、クレアチニン、リン）と近似した分子量であるため、透析による除去能力を
向上させるほど除去されてしまう。また生体適合性の悪い透析膜を使用すると
微小な炎症反応により細胞の異化亢進が進行し、細胞内から遊出したアミノ酸
が大量に除去されてしまう [49-52]。特に食事制限や筋肉量の落ちた高齢透析患
者にとっては過剰な“痩せ”サルコペニアが問題となり [53-54]、筋力の低下は
転倒を引き起こし寝たきりの要因にもなっている。更に過剰な低栄養は炎症や
動脈硬化と相互作用し MIA (Malnutrition Inflammation Atherosclerosis) 症
候群として生命予後にも影響する。特に透析前後のクレアチニンから計算され
るクレアチニン産生速度 (%CGR) は生命予後の独立した因子 [55]であり、透
析効率を高めることとアミノ酸の除去のバランスを考慮することは高齢透析患
者の生命予後に大きく影響を及ぼしている [56]。

3-6-2 目的

親水性のハイドロゲル構造により高い生体適合性と緩徐な溶質除去性能が特
徴の PAN 膜が超高齢透析患者の栄養状態と炎症反応にどのような影響を与え
るか検証した。評価基準として、合成高分子膜の中で比較的穏やかな除去性能を

有する、セルローストリアセテート膜 (CTA) とアミノ酸温存能力と栄養状態の改善効果と炎症反応の変化を検討した。

3-6-3 方法

80歳以上の超高齢安定維持透析患者9例、平均年齢87.6±4.5歳。平均透析歴31.2±26.4か月。原疾患は慢性糸球体腎炎6例、糖尿病性腎症3例。透析器機能分類で分子量11800のβ2-MGのクリアランスが50mL/minであるIV型透析器 (IV型中空糸) の中で最も除去性能がマイルドであるセルローストリアセテート (CTA) 膜から積層型PAN膜 (PAN) に変更し、以下の項目の観察を行った。アミノ酸の除去率に関しては透析条件を一定としたクロスオーバーにて比較検討を行った。なお6か月を経過し、3例の脱落症例があったがその原因は肺炎、心不全であった。測定項目とその計算式を以下に示す。

(1) アミノ酸の温存能力

透析前後のアミノ酸の減少率

$$\text{減少率 (\%)} = \left(\frac{\text{透析前アミノ酸濃度} - \text{透析後アミノ酸濃度}}{\text{透析アミノ酸濃度}} \right) \times 100$$

(2) 栄養状態の変化

① 透析前血清アルブミン (Albumin: Alb) 値の推移、Geriatric Nutritional Risk Index (GNRI) の変化

$$\text{GNRI} = 1.489 \times \text{血清アルブミン (g/dL)} + 41.7 \times (\text{現体重/理想体重※}) [57]$$

$$\text{※理想体重 (kg)} = \text{身長 (cm)} \times 22$$

② ドライウェイト (Dry Weight: DW) の変化量、%CGR の変化

DW の変化量は前値を1として変化率にて示し、%CGR は週初めの透析後ク

レアチン濃度と翌透析前のクレアチニン濃度より Shinzato の式を用いた [58]。

③ rhu EPO (ヒトリコンビナントエリスロポエチン) 製剤使用量の推移と透析前へモグロビン (Hemoglobin : Hb) 濃度の変化。

④ 鉄製剤使用量の推移と血清フェリチン値の変化

(3) 炎症反応の変化

透析前後のサイトカイン IL-6 の変化率、血清 CRP の推移、炎症時に鉄の使用を阻害するヘプシジン-25 の除去率。変化率、除去率ともに透析前後の濃度を $100 \times (\text{透析前値} - \text{透析後値}) / (\text{透析前値})$ とした。

rhu EPO 製剤、鉄剤の投与量の変更は日本透析学会『慢性腎臓病患者における腎性貧血治療ガイドライン』に沿って行った [59]

統計学的検討は Student's *t*-test で行い危険率 5%未満を有意とした。

3-6-4 結果

(1) アミノ酸温存能力

透析前後のアミノ酸の血中減少率は CTA 膜と比べ、PAN 膜が有意に温存されている (表 3-3)。アミノ酸の減少率は総アミノ酸、必須アミノ酸、非必須アミノ酸、分岐鎖アミノ酸いずれも CTA 膜が多く除去され、総アミノ酸、非必須アミノ酸にて有意に除去された ($P < 0.05$) (図 3-29)。特に筋肉由来のアミノ酸である分岐鎖アミノ酸 (バリン、ロイシン、イソロイシン) が顕著であった (図 3-30)。筋肉由来のアミノ酸のなかでもグルタミン、リシンが統計学的に有意に温存された ($P < 0.05$) (図 3-30)。なお PAN 膜使用時にロイシン濃度が透析後に上昇しているデータに関し、透析による除去が少なく除水によって血液が濃縮し、見かけ上、血中濃度が上昇したため減少率がマイナスを示したと考える。

表 3-3 透析前後のアミノ酸濃度

(mmol/L)		バリン	ロイシン	イソロイシン	グルタミン	リジン
CTA膜	前	179.94±35.18	90.64±24.93	63.05±13.14	615.65±59.32	173.06±28.98
	後	130.73±31.47	93.69±26.73	56.04±18.07	467.54±72.44	110.36±15.53
PAN膜	前	171.06±25.47	85.72±19.44	56.23±8.22	596.93±73.05	154.72±26.97
	後	140.91±32.57	98.41±26.19	55.91±18.12	502.60±54.38	121.57±25.91

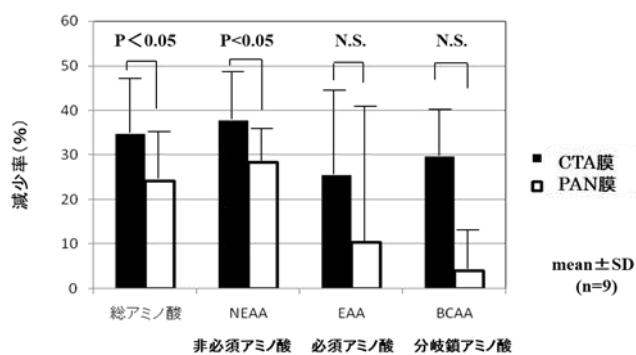


図 3-29 アミノ酸の減少率

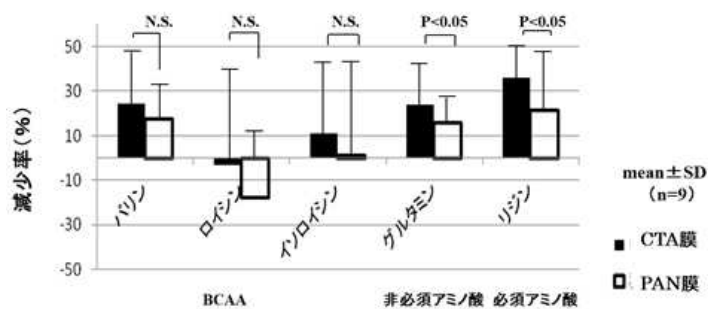


図 3-30 分岐鎖アミノ酸の減少率

(2) 栄養状態

透析前の血清 Alb 濃度は PAN 膜に変更後、有意に上昇した。筋肉の代謝産物

であるクレアチニン値から計算される GNRI は PAN 膜使用開始時が 85.26 ± 8.55 であったのに対し、変更後有意に上昇し続け 9 か月後にはリスク改善スコア 92 を上回る 92.49 ± 3.21 と約 7 ポイント増加した (図 3-31)。更に CTA 膜の使用時には下がり続けていた DW はいずれの患者も PAN 膜に変更後は下げ止まり、9 例中 4 例の症例で上昇に転じた。それに随伴して %CGR は PAN 膜に変更した 5 か月目から有意に上昇し ($P < 0.05$)、変更前の 63.3% から 9 か月後には 85.4% まで上昇した (図 3-32)。PAN 膜のアミノ酸温存効果によりアミノ酸の合成タンパクである Alb 値が上昇し、高齢透析患者の筋肉が保たれている結果を示した。

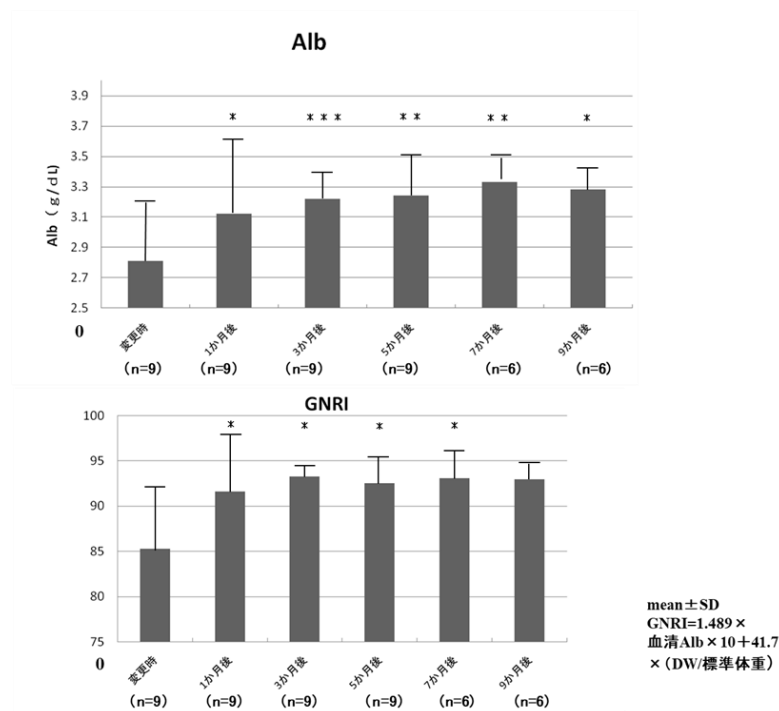


図 3-31 PAN 膜変更後 Alb、GNRI の推移

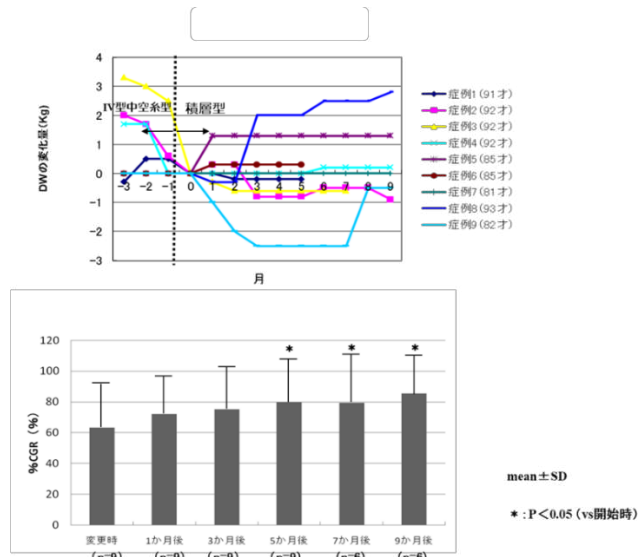


図 3-32 PAN 膜変更後の DW および %CGR の推移

赤血球の造血刺激を骨髄に対して行うホルモン剤である rhu EPO 製剤使用量と Hb 値の上昇程度を示す (図 3-33)。PAN 膜変更後、rhu EPO 製剤使用量が減少したにも関わらず、透析前 Hb 値が $8.99 \pm 1.64 \text{g/dL}$ から 9 か月後には $10.71 \pm 1.04 \text{g/dL}$ まで有意に上昇した ($P < 0.01$)。同時に鉄製剤使用量も PAN 膜開始後減少し、血清フェリチン値も有意に低下した ($P < 0.05$) (図 3-34)。

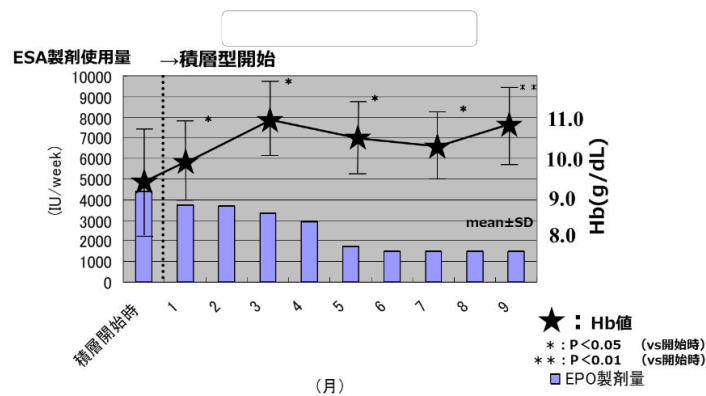


図 3-33 PAN 膜変更後エリスロポエチン製剤使用量の推移

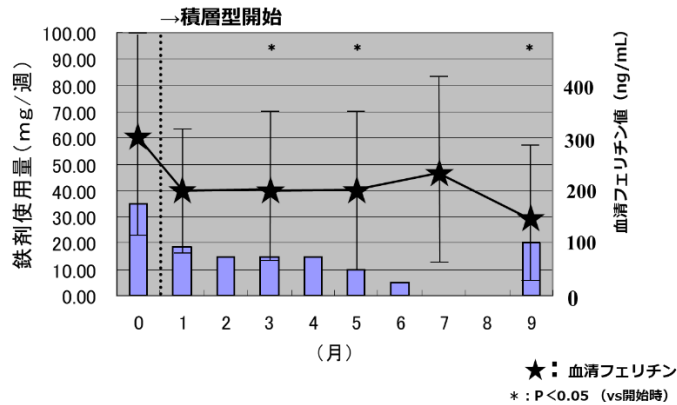


図 3-34 PAN 膜変更後鉄剤使用量の推移

(3) 炎症反応

透析前後の IL-6 濃度と PAN 膜変更後の CRP の経過は、IL-6 は両透析器間で有意な変化は認められなかった (図 3-35) が CRP は 3 か月後に 0.97mg/dL から 0.66mg/dl と有意に低下し (P<0.01)、6 か月後には 0.26mg/dL まで低下した (図 3-36)。また、ヘプシジン-25 濃度の透析前後の変化は PAN 膜が有意に低下した (P<0.05) (図 3-37)。

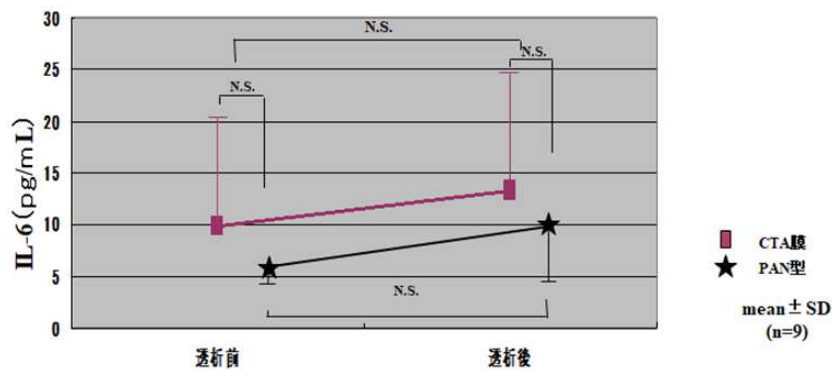


図 3-35 透析前後の IL-6 の変化

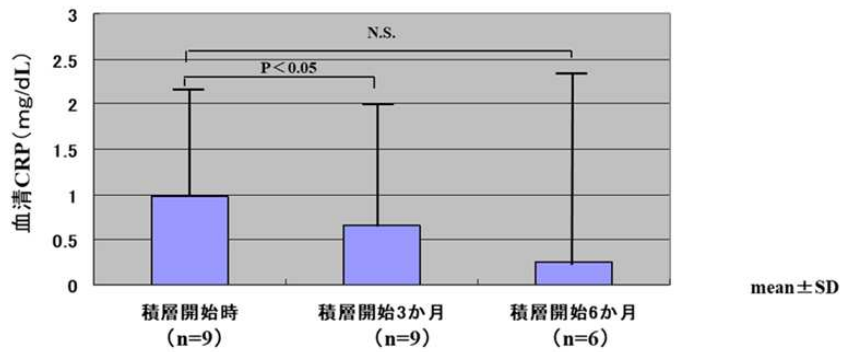


図 3-36 透析前後の血清 CRP の変化

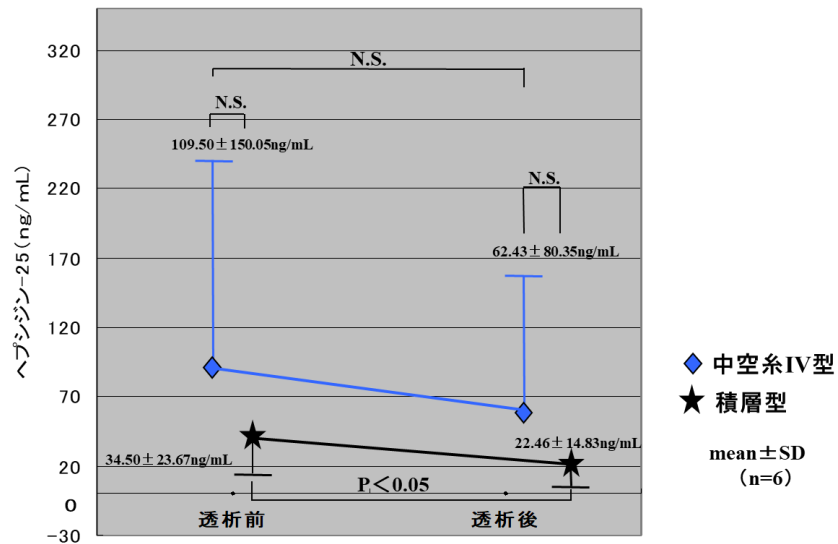


図 3-37 透析前後のヘプシジン-25 の変化

(4) アミノ酸温存効果の解明

積層型 PAN 膜がなぜアミノ酸の温存効果を示すのかその原因を明らかにするためにアミノ酸の分子量、荷電、親水性、疎水性に分類し除去効率を詳細に検討した。その結果、陰性荷電のアミノ酸、グルタミン酸、陽性荷電のリシン、ア

ルギニンいずれも CTA 膜が有意に除去されていた。PAN 膜の陰性荷電に影響を受ければ、陽性荷電のアミノ酸は PAN 膜が有意に除去されることが予想されたが荷電に影響は受けていない結果を示した (図 3-38)。

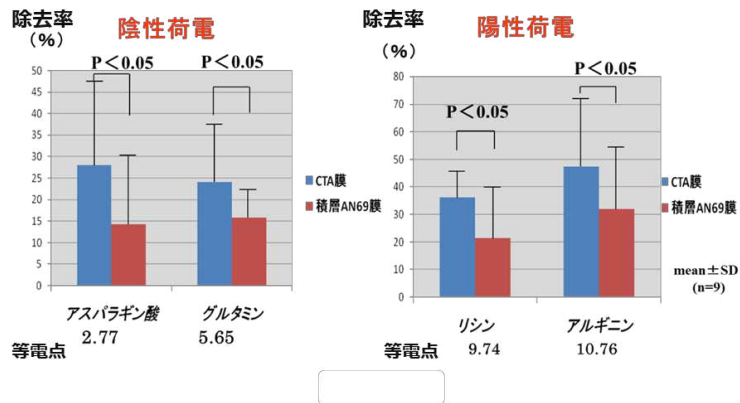


図 3-38 アミノ酸の荷電から見る除去率 [60]

また親水性、疎水性による膜とアミノ酸の荷電による分子間の相互作用は親水性のアミノ酸にて有意差のある結果となった (図 3-39)。

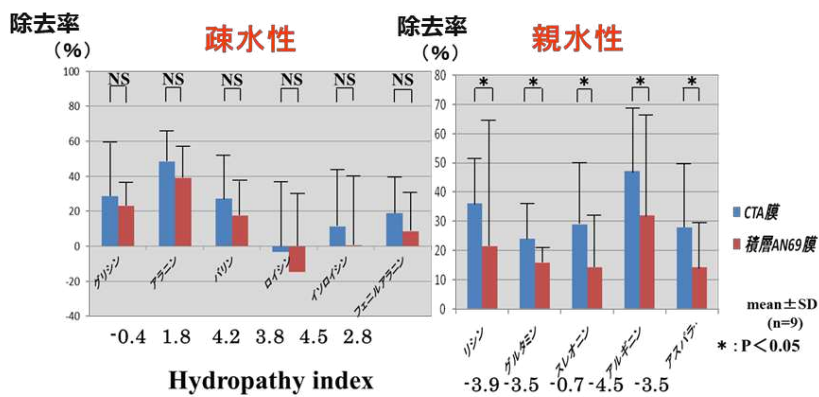


図 3-39 ハイドロパシーインデックスから見るアミノ酸の除去率 [60]

最後に、分子量別にアミノ酸の除去効率を比較するとグラフの下に示す分子量が小さいアミノ酸ほど CTA 膜にて有意に除去される結果となり拡散能力に優れる CTA 膜のアミノ酸除去能力の結果が顕著に示されている。PAN 膜はゲル層による緩徐な除去特性のため分子量が大きいアミノ酸ほど温存される傾向を示した (図 3-40)。

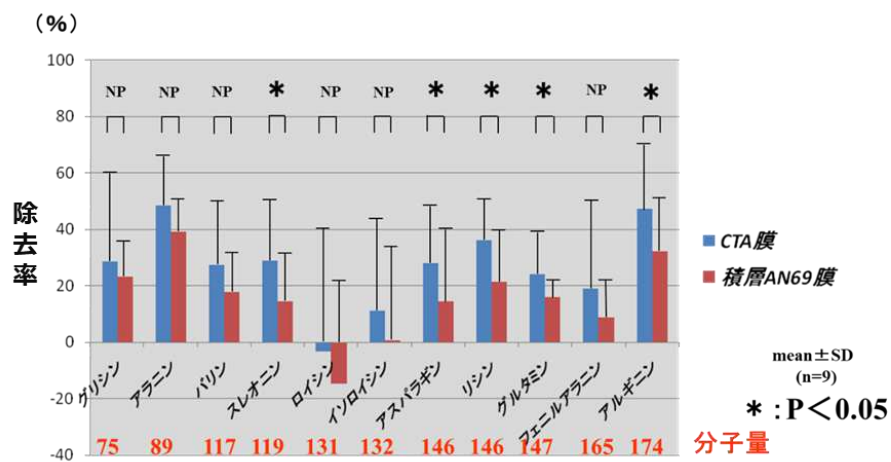


図 3-40 分子量から見るアミノ酸の除去率 [60]

3-6-5 考察

合成高分子系膜の普及によりポリスルホン系を始めとした高性能の透析器を超高齢透析患者に対して使用する機会は多いが、長期間施行していると DW が徐々に低下してくる症例を経験する。その原因としてアミノ酸を始めとした有用蛋白の漏出が指摘されており [50-52]、その漏出量はアミノ酸で透析 4 時間当たり 6~8g といわれている [61] また透析患者繰り返しの材料接触による酸化ストレスに起因する慢性炎症が [62-65] 栄養障害、動脈硬化と相互作用し MIA 症候群の状態であると言われ [65]、さらに透析患者の慢性的炎症は腸内細菌叢の過剰増殖又は腸

内透過性の亢進がサイトカインである IL-6, TNF- α を増加させ、乳酸アシドーシス、CRP の上昇に関係しているのではないかとされている [63]。そこで従来まで使用されていた高性能透析器がそれらを助長しているのではないかと考え、生体適合性がよく、マイルドな除去効率で知られる積層型 PAN 膜に変更したところ DW が増加し、著明な貧血の改善効果が認められた。PAN 膜は強い陰性荷電を有するため様々な物質の吸着が期待されている。ヘプシジン-25 は炎症時に上昇し、フェロポルチンと結合し、鉄の有効利用を阻害し貧血を助長すると言われている [66]が PAN 膜使用時のヘプシジン-25 濃度は有意に低下し、rhu EPO 製剤、鉄剤の使用量が減少したにも関わらず Hb の上昇を認めた。更にフェリチン値も下がったことは、効率の良い鉄代謝サイクルになっていることを意味する [66]。また、栄養状態の改善効果として Alb と%CGR が上昇し、高齢者の栄養スコアである GNRI が上昇した。GNRI は主観的要素の強い各種栄養評価の中で客観的に高齢者の栄養評価ができるスコアの一つであり、これらのパラメーターが上昇していることは PAN 膜が高齢透析患者の栄養状態改善になんらかの影響をあたえていることは明らかである。この結果を確認すべく CTA 膜と PAN 膜の透析前後のアミノ酸の減少率を比較すると PAN 膜は CTA 膜に比べ、アミノ酸が温存されていたことが示された。特に筋肉の構成に重要な役割を果たすグルタミン、リシンにて有意に温存されており栄養状態改善効果に寄与していると思われた。そこでどのようなメカニズムで PAN 膜がアミノ酸の温存効果が得られるのか確認するためにアミノ酸の種類を荷電別、親水性、疎水性、分子量別に検討を行った結果、分子量が小さいアミノ酸ほど PAN 膜で温存されることが解った。また、PAN 膜は膜の吸着作用により各種炎症物質の除去効果も報告されている [68]。本研究では

PAN 膜変更後 3 か月後には炎症反応である CRP 値は有意に低下していた。IL-6 の減少率に有意差は認められなかったが IL-6 濃度の前値が極めて低かったことが影響したと思われ、倉賀野らの報告 [68]によると透析中のサイトカインは PAN 膜にて吸着されるという結果が示されている。PAN 膜の陰性荷電により何らかの炎症物質を吸着するか、血液の透析膜接触に対する高い生体適合性が炎症反応の低下に影響していることが考えられた。以上の結果をふまえると PAN 膜の使用により炎症反応低下、アミノ酸の温存などの複数の効果が好循環に作用し MIA 症候群が改善され、栄養状態の改善効果に繋がる結果と考えられた。本研究結果を受けて他の研究チームも高齢者の栄養障害に対する PAN 膜の有効性を示している [69]。最後に PAN 膜を使用するにあたり、中分子物質の除去効率の低下が懸念されるが、80 歳以上の超高齢透析患者に対しては透析アミロイドなど中長期的な透析合併症の影響よりも現在の QOL を高めることが重要であると考えられる。MIA 症候群を軽減し、栄養状態の改善効果の認められる PAN 膜は高齢者に対し有用な透析膜であると思われた。

3-6-6 結語

超高齢透析患者に対し IV 型以上の高性能透析器を使用して DW の低下や栄養状態の不良が認められる症例に対し、PAN 膜に変更すると、DW の下げ止まりや貧血、栄養状態の改善効果が認められた。PAN 膜のマイルドな溶質除去性能と生体適合性により、アミノ酸の温存効果が得られ、炎症状態が抑制された結果によることが示された。PAN 膜を急性血液浄膜として使用する場合、敗血症などの炎症性物質の除去を目的とした症例に対しては高い生体適合性と陰性荷電によるサイトカイン除去が期待でき、抗炎症反応が期待できる膜といえる。

参考文献

第3章

- 1) 峰島三千男, 山下明泰, 福田誠, 中本雅彦, 佐中孜, 秋澤忠男: 透析療法事典. 医学書院第2版: 32-38, 2009.
- 2) 石川欣造: 最新高分子材料・技術総覧. 美巧社: 241-252, 1988.
- 3) 積層型 Gambro 社資料.
- 4) 川西秀樹, 峰島三千男, 平方秀樹, 秋澤忠男: 血液浄化器の性能評価法. 透析会誌 **45** (5): 435-445, 2012.
- 5) 飯塚智也, 堀和芳, 井上雅裕, 寺本修ほか: II a 型 ATA 膜 FA-210Feco の溶質除去性能の臨床評価. 腎と透析 Vol **85** 別冊: 101-106, 2018.
- 6) 石丸昌志, 内野順司, 吉田豊彦ほか: Continuous syringe extraction method II の考案. 腎と透析別冊: ハイパフォーマンスメンブレン 20-23, 2011.
- 7) 平沢由平, 甲田豊, 星野貢, 村山清己, : 腎透析マニュアル第2版. 医歯薬出版: 152, 1997.
- 8) 堀内孝雄, 村林俊: 医用工学. 日本生体医工学会監修: 62-77, 2006.
- 9) 川上浩良: 人工臓器用膜材料. 人工臓器: 189-192, 2006.
- 10) 福田誠, 中島章夫, 氏平政伸: 生体物性・医用材料工学. 医歯薬出版株式会社: 177-179, 2010.
- 11) 秋沢忠雄: 血液浄化療法ハンドブック. 協同医書出版社: 138, 1994.
- 12) Pierschbache M, Ruoslahti E: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature May 3-9; **309** (5963): 30-33, 1984.

- 13) Itou S, Suzuki C, Tuji T: Platelet activation through interaction with hemodialysis membranes induces neutrophils to produce reactive oxygen species. *J Biomed Mater Res* **77A**: 294-303,2006.
- 14) 森有一：血液適合性材料. 高分子論文集 Vol **42**. No10 : 601-615,1985.
- 15) 松尾武文：凝固・血小板マーカーによる血液回路内凝固物の検出. 臨床透析 Vol.5 no12 : 68-71,1989.
- 16) Hakim RM: Clinical implication of hemodialysis membrane biocompatibility. *Kidney Int* **44**: 484-94,1983.
- 17) Craddock PR, Fehr J, Dalmaso AP, Brigham KL, et al: Hemodialysis leucopenia, Pulmonary Vascular leucostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin invest* **59**: 879-888,1977.
- 18) 小久保謙一, 中島章夫, 氏平政伸：生体物性・医用材料工学. 医歯薬出版株式会社 : 186-188,2010.
- 19) 松井則明：血液浄化膜と膜付着物. 臨床透析 vol.9 **49** : 1457-1461,1993
- 20) 太田和夫：人工腎臓の実際改訂第4版. 南江堂 : 177-181.1993.
- 21) 川西秀樹, 内藤秀宗：透析膜の生体適合性. 東京医学社 : 1-6,2010.
- 22) 浅野泰, 草野英二：血液浄化療法ハンドブック 透析療法合同委員会編 協働医書出版社 : 256,1993.
- 23) 小久保謙一, 竹澤真吾, 出淵靖志：生体機能代行装置学 血液浄化療法装置. 医歯薬出版 : 58,2011.
- 24) 春原隆司：ATA膜ダイアライザーの基礎特性. 腎と透析 Vol **83** 別冊ハイパ

- フォーマンスメンブレン : 131-133,2017.
- 25) 小澤英俊 : Medical Science Digest **39** 卷 9 月号 : 34-37,2013
- 26) Sakai Y, Tsukamoto H, Fujii Y, Tanzawa H: Formation of poly (methyl methacrylate) membranes utilizing stereo complex phenomenon In Cooper AR, ed. Ultrafiltration Membranes and Applications. New York Plenum Publishing: 99-107,1980.
- 27) 山崎章夫, 坪敏人, 廣田和美 : PMMA 膜 : プタ敗血症 model を用いた PMMA 膜と AN69ST 膜の cytokine 除去比較. 日本急性血液浄化学会雑誌 **7** (1) : 44-49,2016.
- 28) Masakane I: High-quality dialysis a lesson from the Japanese experience. Nephrol Dial Transplant Plus **3** (Suppl. 1): 28-35,2010.
- 29) Masakane I, Esashi S, Yoshida A, Chida T, Fujieda H, Ueno Y, and Sugaya H: A new polymethyl methacrylate membrane improves the membrane adhesion of blood components and clinical efficacy. Real Replacement Therapy **3** (32),2017.
- 30) 松田兼一 : 新しい PMMA 大膜面積ヘモフィール CH-1.8W の特徴と使用経験. 東レメディカル冊子.
- 31) 福田誠, 酒井清孝 : 第 7 章 第 5 節 血液浄化に用いられる高分子構造因子と機能設計.次世代のポリマー・高分子開発, 新しい用途展開と将来展望. 情報技術協会 : 392-402,2019.
- 32) 旭化成メディカル社 APS 資料より
- 33) Matuda M, Yamamoto K, Yakushiji, T, et.al: Nanotechnological

- evaluation of protein adsorption on dialysis membrane surface hydrophilized with polyvinylpyrrolidone. *J Membrane Sci* **310**: 219-228,2008.
- 34) Teodorescu M, Bercea M: Poly (vinylpyrrolidone) -A versatile polymer for biomedical applications. *Polym Plast Technol Eng* **54**: 922-943,2015.
- 35) 菅谷博之：抗血栓性人工腎臓の研究開発. 生産と技術 第 **65** 巻 Vol 1: 63-67,2013.
- 36) Sirolli V, Ballone E, Amoroso L, Di Liberato L, Di Mascio R, Capelli P, Albertazzi A, Bonomini M: Leukocyte adhesion molecules and leukocyte-platelet interactions during hemodialysis: effects of different synthetic membranes. *Int J Artif Organs* **22**: 536-42,1992.
- 37) Lavaud S, Paris B, Maheut H, Randoux C, Renaux JL, Rieu P, Chanard J: Assessment of the heparin-binding AN69 ST hemodialysis membrane: II. Clinical studies without heparin administration. *ASAIO J.***51**:348-51,2005.
- 38) Tielemans C, Madhoun P, Lenares M: Anaphylactoid reactions during hemodialysis on AN69 membranes in patients receiving ACE inhibitors. *Kidney Int* **38**: 982-984,1990.
- 39) Thomas M, Moriyama K, Ledebro I: AN69 Evolution of the world's first high permeability membrane. *Cotrib Nephrol* **173**: 119-129,2011.
- 40) 人見泰正, 辻義弘, 今田聡雄ほか:高齢化透析時代における AN69 膜の臨床的意義-高齢透析患者の栄養状態と QOL の改善に対する多施設共同試験-

医工学治療 Vol 28 No1.14-23,2016.

- 41) 堀和芳, 井上雅裕, 勝俣雅夫, 廣田悠祐, 三上恵只ほか: 超高齢透析患者における積層型透析器使用時の栄養状態改善効果の検証-MIA 症候群の観点から. 日本臨床工学技士会誌 No.44: 28-31,2012.
- 42) 齊藤晃, 堀和芳, 川崎忠行, 小出桂三ほか; 表面改質セルロースの臨床評価. 腎と透析 Vol 38 別冊: 170-174,1995.
- 43) 古川康孝, 堀和芳, 市川久志, 小出桂三ほか: ビタミン E コーティングセルロースの臨床評価. 人工臓器 25 (1): 127-133,1996.
- 44) 栗田聡高, 林正則, 新藤光郎, 西 信一, 暇 治有登, 藤森 貢: ミオグロビン血症における持続的血液濾過の効果. 集中治療 vol.3(3) 1991.
- 45) 友雅司, 岡部英二, 畑田和男ほか: Polysulfone dialyzer APS-16 の除去性能の検討. 腎と透析 Vol 38 別冊: 142-146,1995.
- 46) 山崎英隆, 市川久志, 長見英治, 斎藤 晃, 川崎忠行, 新井貴士, 犬丸達也, 武田福治, 松崎健三, 佐野元昭, 小出桂三: ポリスルフォン膜透析器における溶質除去性能の検討. 人工臓器 21 (3) 1021-1024,1992.
- 47) 小泉智徳: 高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略. サイエンス&テクノロジー: 384-385,2014.
- 48) Gutierrez A, Anders A, John W, and Jonas B: Effect of in vivo contact between blood and dialysis membranes on protein catabolism in humans. Kidney Int Vol 38: 487-494.1990.
- 49) 牟田俊幸: 膜素材の違いにより透析中のアミノ酸漏出に差はあるだろうか. 腎と透析 (別冊) 59 ハイパフォーマンスメンブレン: 241-244,2005.

- 50) 牟田俊幸ほか：膜素材の違いにより透析中のアミノ酸漏出の差は単にダイアライザーの除去性能によるのだろうか. 腎と透析 (別冊) **63** ハイパフォーマンスメンブレン : 290-293,2007.
- 51) 牟田俊幸, 河上由加, 向誠 : アルブミン・アミノ酸喪失が引き起こす透析患者愁訴. *Clinical Engineering* Vol. **19** No12: 1234-1239,2008.
- 52) 熊谷悦子 : 透析療法によるサルコペニアの治療介入. 腎と透析 Vol **80**.No5: 735-739,2016.
- 53) 伊丹儀友 : 高齢透析患者の栄養と運動. 日本透析医会 Vol **32** No3 2017.
- 54) Kim J, C Kalantar -Zadeh K, and Koppe J.D: Frailty and protein-energy wasting in elderly patient with end stage kidney disease. *J.Am. Soc.Nephrol.***24**: 337-351,2013.
- 55) 維持血液透析ガイドライン : 血液透析処方. 透析医学会透析会誌 **46** (12) : 1107-1155,2013.
- 56) 佐野博之, 北川裕貴, 北浦圭介ほか : 高齢透析患者に透析量の減量が栄養状態の改善に功を奏した 1 例 -アミノ酸代謝による考察-. 透析会誌 **50** (8) : 519-526,2017.
- 57) Ymamada K, Furuya R, Kumagai H, et al: Simplified nutritional screening tools for patients on maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr* **87**: 106-113,2008.
- 58) Shinzato T, et al: Method to calculate creatinine generation rate using pre- and post-dialysis creatinine concentrations. *Artif Organs* **21**: 864-872,1997.

- 59) 透析医学会『慢性腎臓病患者における腎性貧血治療のガイドライン』2008.
- 60) 堀 和芳 : GAMBRO Clinical Information vol.4 2012.
- 61) Juan F.N, Robert M, Jose L.T, Rafael M: Effect of different membranes on amino-acid losses during hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* **13**:113-117,1998.
- 62) Sanaka T: Reactive oxygen hypothesis. *Journal of Japan Dialysis Therapy*.**24**: 283-287 (in Japanese),1991.
- 63) Tetta C, Biasioli S, Schiavon R, Inguaggiato P, David S, Panichi V, Wratten ML: An overview of hemodialysis and oxidant stress. *Blood Purif.***17**: 118-125,1991.
- 64) Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Block G, Humphreys MH: A malnutrition-inflammation score is correlated with morbidity and mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* **38**: 1251-1263,2001.
- 65) Peter S, Olof H, Furcy P, Ulf D, Tao W, Lars B, Tomas J A: Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *kidney International* **55**: 1899-1911,1999.
- 66) 友杉直久 : ヘプシジン 25 と骨髄造血機能. *透析会誌* **42** (11) 821-822,2009.
- 67) Chanard J, Lavaud S, Paris B, et al: Assessment of heparin binding to the AN69 ST hemodialysis membrane; I preclinical studies. *ASIO J* **51**: 342-347,2005.
- 68) 倉賀野隆裕, 吉田穰, 木田有利, 中西健 : 高齢者透析症例に対して実施した

AN69 膜と PS 膜を用いたクロスオーバー試験から得られた知見. 腎と透析
Vol.69 No.4 : 516-518,2010.

- 69) Furuta M, Kuragano T, Kida A, Kitamura R, Nanami M, Otaki Y, Nonoguchi H, Matsumoto A, Nakanishi T: A Crossover Study of the Acrylonitrile-Co-Meth allyl Sulfonate and Polysulfone Membranes for Elderly Hemodialysis Patients The effect on Hemodynamic, Nutritional, and Inflammatory Condition. ASAIO Journal: 293-299,2011.

第4章 急性血液浄化療法におけるサイトカイン IL-6 の臨床予後の検討

第4章では急性血液浄化療法を行う病態である敗血症とその誘因物質であるサイトカインの血液浄化療法における除去方法について示し、実際に臨床現場にて持続的血液濾過透析を施行した際のサイトカイン IL-6 濃度とその予後について研究した結果を示す。本章の結果は将来、新たなポリマーを血液浄化膜に修飾した後にサイトカイン除去能力の検討を行う必要があるがその時の検証に生かす位置付けとなる。

4-1 急性血液浄化療法の背景

前章までは慢性腎不全に起因する慢性維持透析患者に対する人工透析療法の原理とモニタリング、血液浄化膜の性能について述べた。本研究の目的は人工透析より長時間の治療を行う急性血液浄化膜の抗血栓性の向上である。急性血液浄化療法は80年代頃より心不全や、急性腎不全、または心臓外科の人工心肺施行中における腎代替療法として行われてきた。特に心臓外科手術後においては手術中の過剰輸液や腎機能低下症例に対し、血液浄化療法を積極的に施行し除水を行うことは重要であり、血液浄化療法により膠質浸透圧 (COP) と肺胞気動脈血酸素分圧較差 (alveolar-to-arterial difference for oxygen: A-aDO₂) を改善させ予後を良好とする報告を示した(図 4-1)[1]。しかしこれらの血液浄化療法は除水と電解質の調整が目的であり、膜にかかる負担も少なく、従来までの抗凝固療法を併用し慢性維持透析用の血液透析膜を代用しても膜の凝固を起こすことなく施行が可能であった。90年代になると感染由来の全身性の炎症疾患に対し、炎症物質のサイトカインを血液浄化療法により吸着の原理を利用して

施行する症例が増加してきた。サイトカインは分子量の大きいタンパク質であり、従来までの血液浄化療法における血栓による膜凝固以外にファウリングによる目詰まりという新たな問題も生じ、慢性維持透析に用いる透析膜から更に改良した抗ファウリング性やサイトカイン吸着性の高い膜素材が必要とされる。本章では今回の研究目的である、急性血液浄化膜を使用する対象症例である敗血症とサイトカインについて述べ、血液浄化療法によりサイトカイン除去を行う重要性とその施行方法についての臨床研究結果を示す。

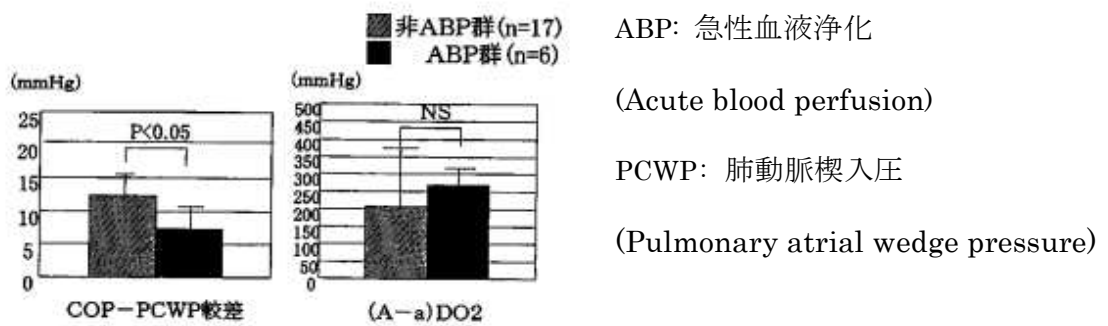


図 4-1 急性血液浄化施行群と非施行群の COP と A-a(DO₂)

4-2 敗血症とは

敗血症とは米国集中治療学会/欧州集中治療学会ほか 31 専門団体の賛同からなるガイドライン Sepsis3 にて『感染に対する宿主生体反応の調節不全で生命を脅かす臓器障害』と定義されている [2]。つまり何らかの感染により全身の臓器が機能不全となる多臓器不全の状態である。現在、世界で流行している SARS-CoV-2 いわゆる新型コロナウイルスが敗血症として蔓延しているが、敗血症自体はインフルエンザ、市中肺炎などの呼吸器疾患ほか蜂窩織炎、消化管外科疾患

など外部の細菌、ウイルス感染ほか体内の常在菌による日和見感染などさまざまな原因で発症し、診断基準は Sepsis3 にて規定された SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) スコアで 2 点以上となっている。SOFA スコアとは呼吸器、凝固能、肝機能、循環器、中枢神経、腎機能のそれぞれの検査数値が正常値を逸脱するごとに加点され点数化される基準値である (表 4-1)[3]。敗血症が重症化すると循環動態が維持できなくなり敗血性ショックに陥るが敗血症の定義は『実質的に死亡率を上昇させる重度の循環・細胞・代謝の異常』を呈するものとされている。診断基準として十分な輸液負荷にもかかわらず平均動脈圧 65mmHg 以上を維持するために血管作動薬を必要とし、かつ血清乳酸値が 2mmol/L を超えるものとされている [3]。実際の臨床においては敗血症の治療介入は生命予後に大きく影響をすることからより早期に診断をするために SOFA スコアを簡易化したクイック SOFA スコアが用いられている (表 4-2) [3]。

表 4-1 SOFA スコア [3]

スコア	0	1	2	3	4
意識 Glasgow coma scale	15	13-14	10-12	6-9	< 6
呼吸 PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 および呼吸補助	< 100 および呼吸補助
循環	平均血圧 ≥ 70mmHg	平均血圧 < 70mmHg	ドパミン < 5µg/kg/分 あるいはドブタミンの 併用	ドパミン 5-15µg/kg/分 あるいはノルアドレナ リン ≤ 0.1µg/kg/分ある いはアドレナリン ≤ 0.1µg/kg/分	ドパミン > 15µg/kg/分 あるいはノルアドレナ リン > 0.1µg/kg/分ある いはアドレナリン > 0.1µg/kg/分
肝 血漿ビリルビン値(mg/dL)	< 1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	≥ 12.0
腎 血漿クレアチニン値 尿量(mL/日)	< 1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 < 500	≥ 5.0 < 200
凝固 血小板数(×10 ³ µL)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20

表 4-2 クイック SOFA スコア [3]

意識変容
呼吸数 ≥ 22 回/分
収縮期血圧 ≤ 100 mmHg

感染症あるいは感染症を疑う病態で、quick SOFA(qSOFA)スコアの3項目中2項目以上が存在する場合に敗血症を疑う。

4-3 サイトカインとは

サイトカインは白血球や単球から産生される糖タンパクである。細胞に増殖、分化、アポトーシスなどの情報を伝える役割と免疫応答として抗炎症作用を行う役割がある [4]。リンパ球から産生される物質はリンホカイン、単球から産生されるとモノカインと呼ばれる [5]。分子量は 15,000~50,000 [6]とされている。

(1) Interleukin 6 (IL-6)

分子量 25,000 の糖タンパクで単球、マクロファージ、T 細胞、B 細胞など様々な細胞から産生され、B 細胞の細胞分化誘導、T 細胞増殖や活性化、肝細胞のタンパク誘導の役割を果たす。血液浄化膜の接触に対し、生体適合性のマーカーや慢性的な炎症反応の指標として用いられる報告もある [5]。また敗血症ショックの診断、治療のマーカーとして血液浄化療法 CHDF (continues hemodialysis filtration) のメルクマールとした報告がされている [7-9]。

(2) Interleukin 8 (IL-8)

分子量 8,000 [9]で単球、マクロファージ、気道平滑筋、血管内皮から産生され白血球の遊走作用を示す [10]。呼吸器系疾患にて高値を示し IL-6 とともに CHDF の除去対象となる [7-9]。

(3) Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α)

単球、マクロファージの活性化から産生される腫瘍壊死作用のあるサイトカインである。全身の炎症性疾患の制御を行うため抗 TNF- α 薬や治療効果の判定としてのサイトカインとして評価されているがその検証は立証されていない [4]。分子量は 17,000 である [9]。

4-4 敗血症におけるサイトカインストーム

感染症により PAMPs (pathogen associated molecular patterns) と呼ばれる病原性の物質が誘因となり体内で炎症が引き起こされると細胞からヒスタミンが遊離されるほか血小板の活性化や凝固系の活性、補体の活性などが引き起こされて炎症箇所に対して血流の増加や血管透過性の亢進が生じ全身に波及する [4]。炎症により刺激された白血球の単球は TNF- α とインターロイキン 1 β と呼ばれるサイトカインを放出する。このサイトカインは単球とマクロファージをさらに活性化させ IL-6、IL-8 と呼ばれる内因性の炎症物質を惹起するサイトカインを産生する。活性化したマクロファージ、NK 細胞からさらにサイトカイン HMGB1 を発生させ単球の刺激を繰り返す。一方炎症によって障害を受けた細胞はアポトーシスと呼ばれる細胞死を引き起こし、アナンダマイドと呼ばれる内因性マリファナを産生するが、このアナンダマイドが再び単球を刺激する。このように複数のカスケードが次々と炎症とサイトカインの産生を繰り返し全身の臓器を次々と障害していく病態をサイトカインストームと呼ぶ (図 4-1)。

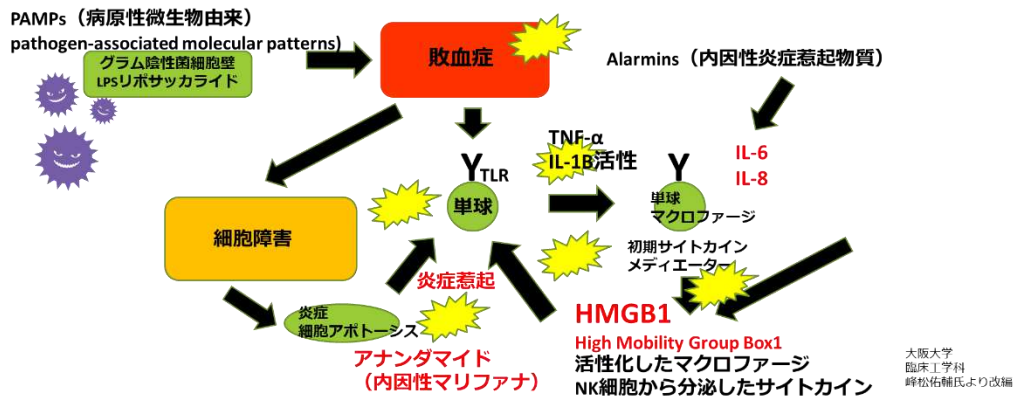


図 4-1 サイトカインストームの発生機序

4-5 敗血症に対する血液浄化療法

サイトカインストームによる敗血症ショックに陥った病態に対し血液浄化療法は有効な治療手段である。敗血症による腎実質の尿細管障害から引き起こされる腎不全に対して行われる血液浄化療法は腎代替療法として **Renal Indication** と呼ばれる。また 1990 年代ころより千葉大を中心として陽性荷電物質であるサイトカインを陰性荷電である PMMA 膜を用いて血液浄化療法を行う PMMA-持続的血液透析濾過法 (CHDF) が盛んに行われてきた [7-9]。この PMMA-CHDF は腎不全を呈さない重症肺炎などにも応用され、サイトカイン除去を目的とした全身性の炎症病態に対する治療を **Non Renal Indication** と呼ぶ [9]。

慢性腎不全に対する血液透析療法は動脈硬化、糖尿病、糸球体腎炎などが引き金となって、数年、数十年に渡り慢性的に罹患しつづけた腎機能障害が最終的に腎臓機能の廃絶をもたらしその代替療法として行われるものであるが集中治療領域で行なわれる CHDF の対象症例は急性腎不全や敗血症によって急激に腎

臓の機能不全に陥っている状態のため循環動態も極めて厳しい状況にある場合が多い。急激な血液からの尿毒素の除去は細胞内外液と血液の浸透圧較差を生み出し、細胞間と血管内の水分移動の恒常性が破綻し肺水腫や心不全を引き起こすことから治療は24時間連続でより緩徐な尿毒素、水分除去を行う。また感染により血液中に蔓延する炎症性物質のサイトカインを吸着することが必要であり治療方針としては人工透析で用いられる拡散、限外濾過に加えサイトカイン吸着性のある血液浄化膜が選択される。回路図は一般的な血液透析濾過法と同じ(図4-2)[11]であるがその操作条件は大きく異なる(表4-3)。

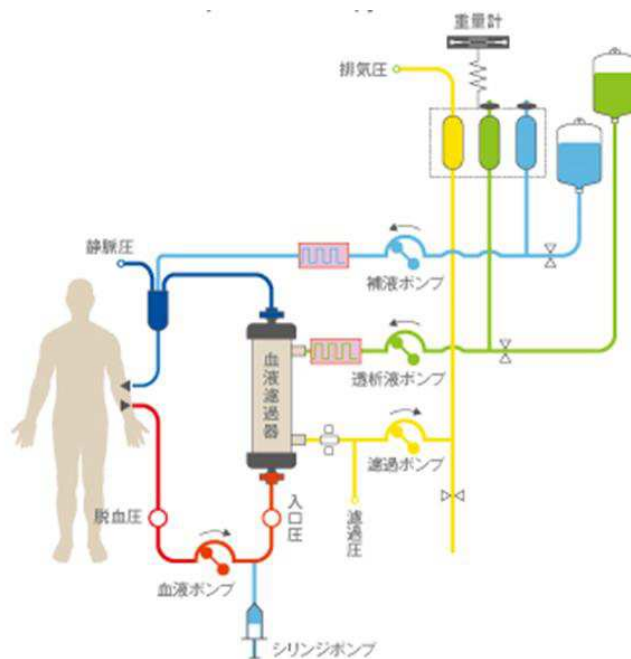


図 4-2 CHDF の回路図

表 4-3 血液透析と持続的血液濾過透析の操作条件の比較

	血液透析	CHDF
治療時間	3～5 時間	24 時間
治療間隔	週 3 回	数日～数週間
血液流量	200～300mL/min	50～100mL/min
透析液流量	500mL/min	500mL/hr
尿素クリアランス	198mL/min	5～10mL/min
目的	尿毒素除去、電解質 補正、除水	尿毒素除去、電解質補正、 除水、炎症物質除去

血液浄化療法を用いたサイトカインの積極的な治療はサイトカインストームのサイクルを断ち切るために IL-6、IL-8、TNF- α をターゲットとして除去することにより敗血症の予後の改善をもたらすとの報告は多い [7-9]。しかしその治療タイミングや離脱時期を明確にしたエビデンスは少なく施設によって大きく異なり、治療の遅れは生命予後にも大きく影響する。筆者が研究責任者として参加した施設は迅速 IL-6 測定器を導入し、血液浄化療法施行タイミングと離脱時の IL-6 濃度から生命予後を検証して適切な CHDF 開始基準の検討を行なった。

4-6 臨床研究：IL-6 から見る CHDF の施行基準と予後について -APACHE II スコア，SOFA スコアと比較して-

本節では IL-6 濃度から診る CHDF 療法開始、離脱基準による生命予後を検討した研究結果を示す。本研究の結果により将来、新たに開発した抗血栓性ポリマーを血液浄化膜に表面修飾した際のサイトカイン除去性能維持の基準と、血液浄化膜としてどの程度血中サイトカイン濃度を低下することができれば臨床的に有用であるかメルクマールとなる位置付けの研究となる。

4-6-1 目的

炎症性サイトカインの1つである IL-6 は敗血症治療の指標として多くの報告がある[7-9]。本研究では CHDF 開始時の患者重症度スコアである APACHE II スコアと SOFA スコアと IL-6 濃度変化を検討し IL-6 濃度から見る敗血症患者の生命予後を検討する。

4-6-2 対象と方法

国保小見川総合病院にて CHDF を施行した 82 例。平均年齢：73.9±12.1 歳、平均施行日：6.1±4.4 日。原疾患：Sepsis 34 例、心不全 23 例、ARDS (acute respiratory distress syndrome) 17 例、心肺停止 3 例、その他 5 例。CHDF の施行条件は血液流量 60～80mL/min、補液速度 300mL/hr、透析液流量 500mL/hr、透析液は重炭酸系細胞外液組成を使用、ヘモフィルターは心不全に対しては透水性 UFR の高い PS 膜、その他の疾患は炎症物質サイトカインを吸着する PMMA 膜を使用した。IL-6 の測定方法は富士レビオ社製ルミパレス J (化学発光酵素免疫法) を使用。統計学的検討は Student's *t*-test を用い危険率 5%未満を有意とした。

SOFA スコアは 4-1 を参照とし APACHE II スコアを以下に示す (表 4-4)[12]。

表 4-4 APACHE II スコア[12]

Physiological parameters	>normal					<normal			
	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Temperature rectal (°C)	≥41	39-40.9	-	38.5-38.9	36-38.4	34-35.9	32-33.9	30-31.9	≤29.9
Mean arterial pressure (mmHg)	≥160	130-159	110-129	-	70-109	-	50-69	-	≤49
Heart rate (/min)	≥180	140-179	110-139	-	70-109	-	55-69	40-54	≤39
Respiratory rate (/min)	≥50	35-49	-	25-34	12-24	10-11	6-9	-	≤5
A-aDO ₂ (FiO ₂ ≥0.5)	≥500	350-499	200-349	-	<200	-	-	-	-
PaO ₂ (FiO ₂ <0.5)	-	-	-	-	>70	61-70	-	55-60	<55
Arterial pH	≥7.7	7.6-7.69	-	7.5-7.59	7.33-7.49	-	7.25-7.32	7.15-7.24	<7.15
Na (mmol/l)	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149	-	120-129	111-119	≤110
K (mmol/l)	≥7	6.0-6.9	-	5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9	-	<2.5
Creatinine (mg/dl), double point score for ARF	≥3.5	2.0-3.4	1.5-1.9	-	0.6-1.4	-	<0.6	-	-
Ht (%)	≥60	-	50-59.9	46-49.9	30-45.9	-	20-29.9	-	<20
WBC (×1,000)	≥40	-	20-39.9	15-19.9	3-14.9	-	1-2.9	-	<1
15-GCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Venous HCO ₃ (If no A.B.G)	≥52	41-51.9	-	32-40.9	22-31.9	-	18-21.9	15-17.9	<15

ABG: arterial blood gas, ARF: acute renal failure, A-aDO₂: arterial alveolar oxygen gradient.

APACHE II score=A+B+C

A: acute physiology score=sum of 12 physiological parameters

B: age point: 0: ≤44 y/o, 2: 45-54 y/o, 3: 55-64 y/o, 5: 65-74 y/o, 6: ≥75 y/o

C: chronic condition (in the presence of immunosuppression or chronic organ insufficiency)

a: for nonoperative or emergency postoperative patients: 5

or

b: for elective operative patients: 2

<Definition of chronic condition>

Organ insufficiency or immuno-compromised state must have been evident prior to this hospital admission and conform to the following criteria:

Liver:

Liver cirrhosis, hepatic failure; NYHA class IV; chronic restrictive, obstructive, or vascular disease resulting in severe exercise restriction, or documented chronic hypoxia, hypercapnia, secondary polycythemia, severe pulmonary hypertension, or respirator dependency; immunosuppression; chronic renal failure with hemodialysis.

Cited from Ref. 12.

4-6-3 結果

(1) 迅速 IL-6 測定導入前の治療開始時の IL-6 濃度とスコア

CHDF 施行開始時の IL-6 の濃度は生存群 $1029.2 \pm 1210.5 \text{ pg/mL}$ に対し死亡群 $8948.0 \pm 1574.2 \text{ pg/mL}$ と死亡群が有意に高かった ($P < 0.05$)。それに伴い APACHE II スコアは生存群 13.7 ± 5.1 に対し死亡群 24.7 ± 6.8 といずれも死亡群が有意に高かった ($P < 0.05$) (図 4-3)。

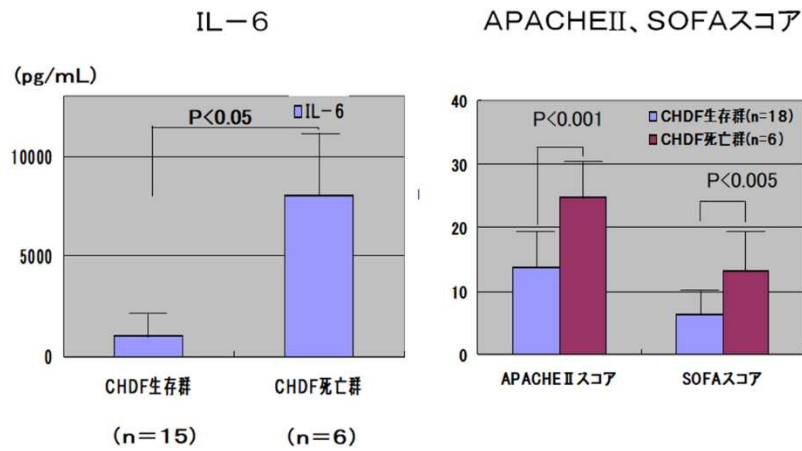


図 4-3 迅速 IL-6 測定導入前の治療開始時の IL-6 濃度およびスコア

(2) 迅速 IL-6 測定導入前後のスコア

従来までの IL-6 濃度の検査は結果が確定するまで数日を要したが迅速 IL-6 濃度測定器を導入することにより、数時間で測定結果が確定され早期に治療が開始される環境となった。迅速 IL-6 濃度測定器導入前後の CHDF の治療成績を検討した。

① CHDF 開始時のスコア

迅速 IL-6 測定器導入前 (Pre IL-6) は APACHE II スコア 16.0 ± 4.9 、SOFA スコア 6.3 ± 4.3 。導入後 (Post IL-6) は APACHE II スコア 12.5 ± 4.2 、SOFA スコア 6.4 ± 4.3 。APACHE II スコアが有意に低下した ($P < 0.05$) (図 4-4)。

② CHDF 生存率

PreIL-6 は APACHE II スコア 16.0 ± 4.9 、SOFA スコア 6.6 ± 3.2 。PostIL-6 は APACHE II スコア 12.5 ± 4.2 、SOFA スコア 6.3 ± 4.3 。APACHE II スコア

が有意に低下した ($P<0.05$)。また CHDF 施行前後の IL-6 濃度と APACHE II スコアをみると IL-6 は $1029.2\pm 1210.5\text{pg/ml}$ から $66.8\pm 59.1\text{pg/ml}$ へ有意に低下し ($P<0.05$)、APACHE II スコアも 16.0 ± 4.9 から 12.5 ± 4.2 へと有意に低下した ($P<0.05$) (図 4-5)。

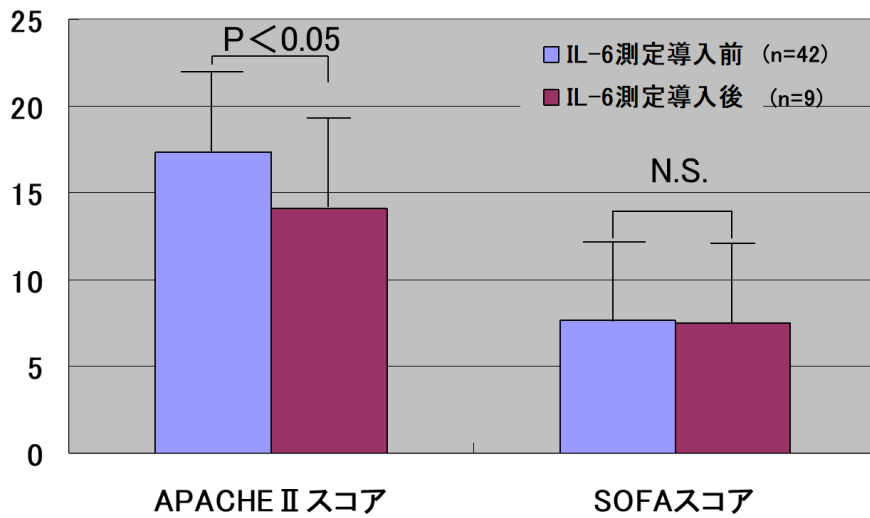


図 4-4 迅速 IL-6 測定器導入前後の APACHE II スコアおよび SOFA スコア

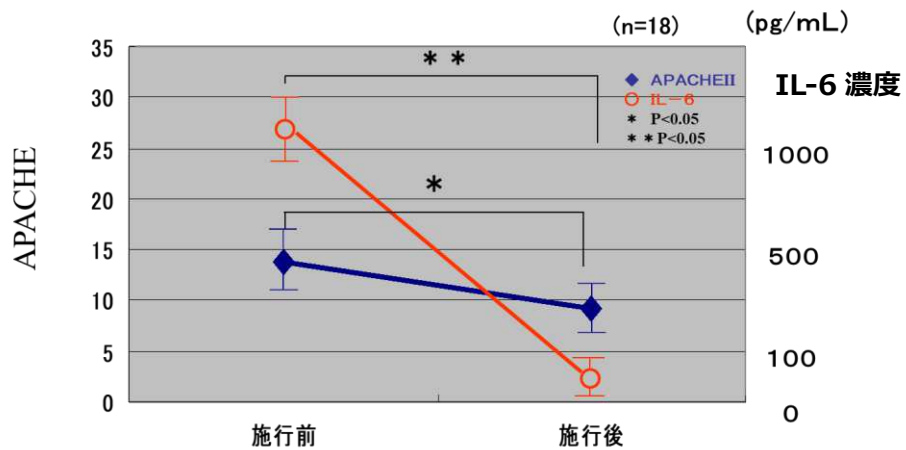


図 4-5 迅速 IL-6 測定器の導入前後の APACHE II スコアと IL-6 濃度

③ 迅速 IL-6 濃度測定器を導入後の CHDF 施行患者の死亡率は 45%から 25%に減少した (図 4-6)。

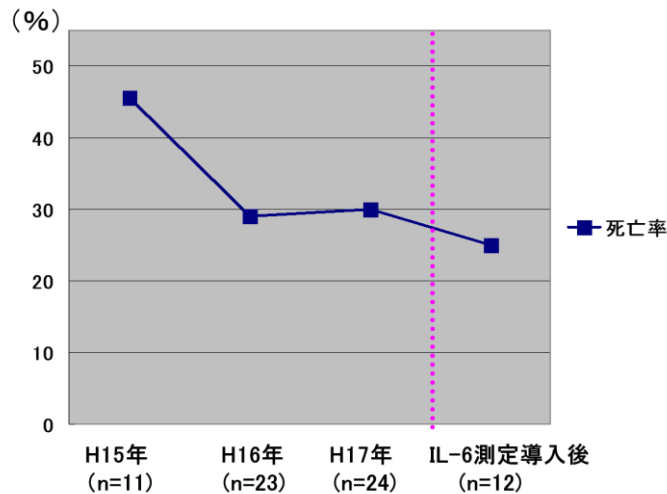


図 4-6 迅速 IL-6 濃度測定器導入前後の CHDF 患者死亡率

4-6-4 考察

急性血液浄化療法における CHDF の役割は従来までの急性腎不全に対する尿毒症性物質の除去と余剰水分の除去から炎症性物質であるサイトカインの除去へターゲットが変わりつつある。その流れの中で IL-6 は CHDF 治療を開始する重要なメディエーターとして各種報告がある [7-9]。しかしながら CHDF の治療の開始タイミングには明確な指標がなくその施設の経験で行われることが多い。我々の検証を行った施設においても従来までは敗血症、全身性炎症症候群 (Systemic Inflammatory Response Syndrome: SIRS) の定義を満たし、薬剤にて尿量と収縮期血圧が保てない症例としてきたが、迅速 IL-6 測定器を導入し、開始基準を千葉大学病院集中治療部で採用されている重症肺炎の CHDF 開始基

準“400pg/mL以上” [13]と規定して重症患者の指標である APACHE II スコアと SOFA スコアの変化を調べたところ、両スコアのうち CHDF 施行開始時の APACHE II スコアが著明に低下した。このことは IL-6 測定導入により当院の CHDF 施行開始時が従来に比べ早期にシフトしてきたことを意味する。また早期の施行が死亡率低下の結果に繋がったと考えられた。これは Sepsis に対する EGTA (Early Goal-Directed Therapy) や Sepsis 発症から 6 時間以内に治療を開始すれば生存率が向上するとされる Rivers [14]らの臨床試験結果とも一致する。また生存群の CHDF 離脱時の IL-6 濃度の結果から離脱基準を IL-6 濃度 100pg/mL 以下とした。

4-6-5 結語

本章により敗血症の治療において積極的に CHDF 療法を行うことの必要性和サイトカインを除去するためには適切な膜素材の選定が必要であることが示された。サイトカインの除去に関しては吸着除去が有効であることから、必然的に膜の抗血栓性と抗ファウリング性の高い素材が必要である。また表面修飾した血液浄化膜はサイトカイン濃度を 100pg/mL に低下させる能力が必要であることが示され、表面修飾によってサイトカイン除去能力が劣化することは抗血栓化する意義が薄れる。その意味においても本章の研究結果は重要であり、抗血栓性が高くタンパク付着が少ない抗ファウリング性と十分なサイトカイン除去能力を備えた抗血栓性ポリマー修飾血液浄化膜の開発が重要であると言える。

参考文献

第4章

- 1) 堀和芳, 安田剛, 皆川宗輝, 小林進, 栗生和幸, 堀見洋継, 外山雅章: 慢性維持透析患者に対する人工心肺後の急性血液浄化について. 体外循環技術 Vol.30. No.2: 108-112.2003.
- 2) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 315: 801-810,2016.
- 3) 日本版敗血症ガイドライン 2020: 日本救命救急学会, 日本集中治療医学会 s-22-24.
- 4) 原間大輔, 中尾篤人: 敗血症の概念, 疫学, 診断, 治療. 山梨医科学誌 30 (2): 37-45,2015.
- 5) 浅野泰, 草野俊二 血液浄化療法合同専門委員会編: 血液浄化療法ハンドブック. 協同医書出版社: 253-256,1994.
- 6) 土井研人, 野入英世, 花房規男: CRRT ポケットマニュアル. 医歯薬出版: 138-142,2011.
- 7) 松田兼一, 平沢博之, 織田成人ほか: Hyper-cytokinemias のおよぼす cytokine factory の診断とその対策. ICU と CCU 27 : 37-48,2003.
- 8) 服部憲幸, 渡邊栄三, 織田成人ほか: PMMA 膜: 敗血症多臓器不全に対する血液浄化療法. 日本急性血液浄化学会雑誌 7 (1) : 13-19,2016.
- 9) 平沢博之, 松田兼一, 菅井桂雄 ほか: 持続的血液 濾過透析 (CHDF) はサイトカインを除去するか; - Non-Renal indication - を目指して. 日本集中治

- 療学会誌 **5** : 345-355,1998.
- 10) 井上博雅: Interleukin-8 と気道炎症. 日本呼吸器学会誌 37 (9): 673-679,1999.
- 11) (株) 旭化成メディカル社パンフレットより
- 12) Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al: APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med: 13: 818-29,1985.
- 13) 渡邊栄三, 平澤博之, 織田成人, 志賀英敏, 中西加寿也, 上野博一, 北村伸哉: SAP (重症急性膵炎) に対する CHDF (持続的血液濾過透析) の適応決定における IL-6 血中濃度迅速測定システムの有用性. 日救急医学会誌 13 : 411-21,2002.
- 14) Revers E, Nguyen B, Havstad S, et al: Early Goal-directed therapy in the treatment of Sever Sepsis and Septic shock. N Eng J Med **345**: 1368-1377,2001.

第5章 新しい抗血栓性ポリマーの開発

第5章は臨床研究にて様々な血液浄化膜の特性を検証してきた経験と知識をもとに CHDF 療法に適する新たな抗血栓性ポリマーの設計とその概念を述べる。また5章で述べる基本設計より第6章以降は実際の実験による研究結果を示す。

5-1 背景 -急性血液浄化膜の問題点-

第4章では急性血液浄化療法適応の敗血症における炎症性サイトカイン除去の重要性を示した。サイトカインの吸着には血液浄化膜の吸着時における分子間の相互作用が有効である。平澤らは [1] (図 5-1) 陰性荷電膜の PMMA 膜による CHDF の臨床効果を示し治療成績の向上に大きく貢献した。その一方で疎水性である PMMA 膜は非極性分子間のタンパク、血小板吸着によるファウリングと血栓形成が課題であった (図 5-2)。2014 年に Baxter 社が透析膜として使用されていた強陰性荷電膜 AN69 膜の積層平膜を中空糸化した急性血液浄化膜を開発した。膜表面の陰性荷電は凝固系の活性を惹起するため、ポリエチレンイミンにて表面修飾を行い電氣的に中性化し、洗浄液のプライミング液中のヘパリンをポリエチレンイミンのフリーアミノ基と結合させ、表面被覆することにより抗凝固性を持たせた [2-3] (図 5-3)。膜の表面は電氣的に中性化されたためサイトカインは膜内部のバルク層の陰性荷電で吸着させ、吸着量を増やす構造となっている [4]。このバルク層内でのサイトカイン吸着量は膜表面のみの PS 膜、膜表面と孔径内の填まり込みによる PMMA 膜に較べ多いとされている (図 5-4) [4]。しかしながら、開発された新型 PAN 膜も血栓付着の問題の解決は十分ではなかった [5]。ポリエチレンイミンと PAN はイオンの結合されているが治療中に早期に凝固や目詰まりを起こすことを多く経験し、実際に臨床報告され

ている [5]。このことは血液に対する徐放性や、半減期による失活、限外濾過を行うための膜間圧力差により結合したポリエチレンイミンがヘパリンごと剥がれ落ち、陰性の膜表面が露出して血液凝固を促進していると思われる。

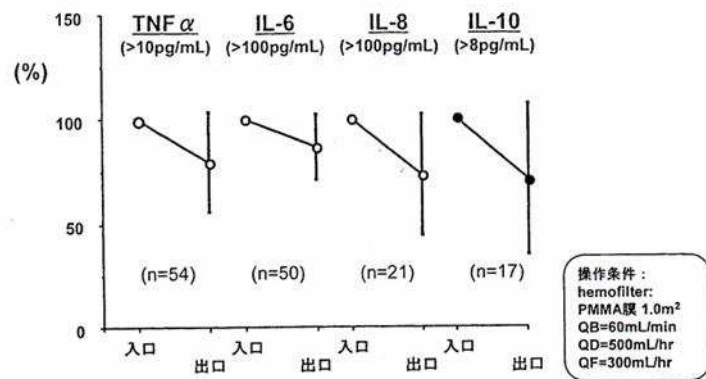


図 5-1 PMMA-CHDF のサイトカイン除去能力



図 5-2 CHDF 施行時のファウリング (左) 凝血 (右)

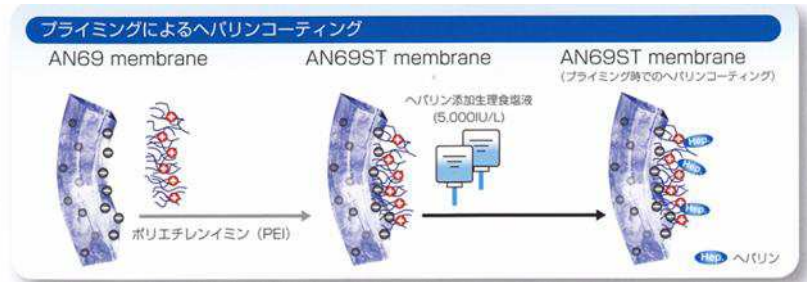


図 5-3 AN-69ST 膜のヘパリンコーティング法

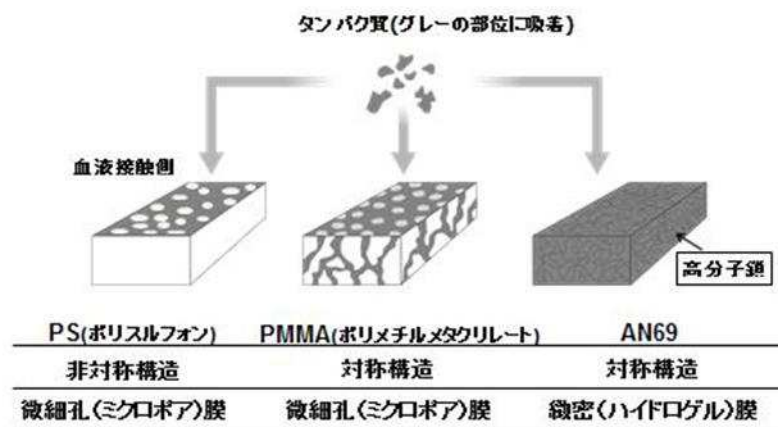


図 5-4 各種膜のタンパク除去メカニズム

5-2 理想的な急性血液浄化膜を考える

理想的な急性血液浄化療法の血液浄化膜はどのようなものか？慢性維持透析療法は治療時間が数時間と短時間であるため、適切に抗凝固薬を使用すれば、血栓、膜へのタンパク付着によるファウリングによる影響は临床上ほとんど問題にならない。急性血液浄化療法は長時間の治療であり用いる血液浄化膜は高い抗血栓性と耐久性が求められる。敗血症の治療ターゲットになるサイトカインを除去するためには従来の拡散および限外濾過に加え、吸着による除去が必要

となる。吸着のためには陽性荷電を帯びるサイトカインのアミノ基に対し、陰性荷電を有する膜を使用することが理想であるが、陰性荷電はブラディキニンの産生を刺激し、血管拡張により血圧の低下を引き起こすだけでなく血液凝固の第Ⅻ因子を活性させる [6]。血液凝固系を活性化させず効率よくサイトカインを除去し、高い透水性と抗ファウリング性が良好なことが望まれる。またサイトカインの分子量は 10,000 以上であるため、人工透析膜よりポアサイズの大孔径化が可能で滅菌に対して十分な強度も必要である。生産コストに関しては、透析患者の増加に伴う血液浄化分野の医療費抑制の影響で診療報酬が低く抑えられているため、低いほど望ましく医療と経済性のバランスは考慮する必要がある。また将来の腎代替療法の発展を考えると、無抗凝固剤による血液浄化療法の施行や携帯型人工腎臓、再生医療の発展への応用が可能であることが望まれる。

5-3 MPC (2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) とは

新たな抗血栓性ポリマーを開発するにあたり MPC を候補として検討した。MPC とは側鎖に生体膜の構成成分であるリン脂質を模倣した双性イオン型極性基 (ホスホリルコリン基) と重合性を有するメタクリロイル基を導入した、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) モノマー (図 5-5) であり東京医科歯科大学の中林らが設計した [7]。高い生体適合性を有する MPC は水への溶解性が高いため材料の表面に修飾するためには水に溶出しない不溶性の性質が必要となる。この問題を解決するために疎水性のメタクリル酸エステルを重合させたものが MPC ポリマーである。このポリマーは非常に高い生体適合性を示し血管内ステント、補助人工心臓などさまざまな人工臓器に対する抗血栓性ポリマーとして研究されてきた [8-9]。MPC ポリマーは陽イオンと陰

イオンを持つ双イオン性のメタクリル酸だが、血管内皮のリン脂質に似たホスホリルコリン基を有しているため、抗血栓性、抗ファウリング性に優れている。そのメカニズムとしてホスホリルコリン基が血液に対し疑似リン脂質の役割を果たし、血液中のリン脂質成分が先に材料表面に吸着し、材料表面が自己血管内皮のように同化してタンパク質の吸着や血小板の変性を抑制するのではないかとされている [10]。またホスホリルコリン基は分子内で電氣的に中性の安定したイオンの状態で存在する [11]。これは生体内において他のイオンと相互作用することが少ないことを意味し、陰性荷電により惹起される血液凝固反応にとっても都合が良い。また、新たな血液適合性のポリマーを作製する際の重合性に関しては、重合に対して自由度の高いメタクリロイル基を有するため、重合する分子や用途に応じたポリマーを作製することが可能である。血液浄化膜として使用する上で必要な透水性に関しても、疎水性と親水性を併せ持つ両親媒性であり、MPCに含まれる自由水含有率は他の血液浄化膜の親水化剤として用いられる PVP や PEG より高い [12]。この親水性により血液と材料の基質が接触する際に疎水性相互作用によって生じた結合水が散漫層として働き、タンパク質の吸着抑制と変性を生じにくくする [12]。検討する点としては柔軟な主鎖構造のため機械的強度、耐水、耐熱性を検討する必要がある。

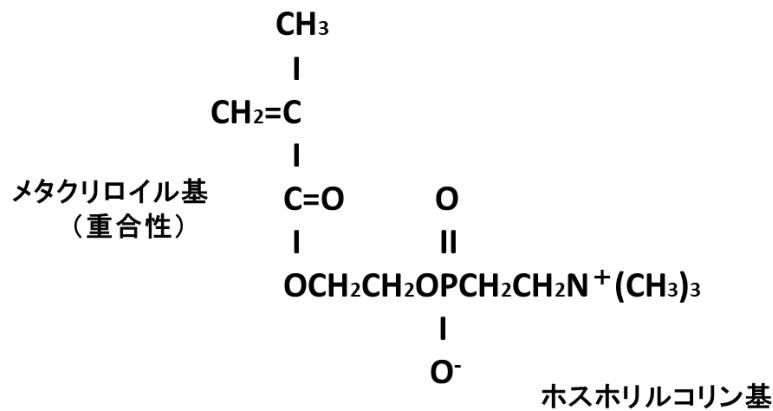


図 5-5 MPC の分子構造

5-4 MPC を修飾する合成高分子系膜の選定

現在、人工腎臓膜の市場は、セルロース系膜から合成高分子系膜に移行しており、合成高分子系膜のシェアが 80%以上を占める [13]。セルロース系膜は CTA 膜が主流となり安定した生体適合性と溶質除去性能で市場の 10% ~ 20%を占めている [13]。CTA 膜はタンパク吸着性能が弱いいためサイトカインを限外濾過で除去するためには孔径を大きく設計する必要があるが、薄膜のため機械的強度が保てない。MPC ポリマーの血液浄化膜に対する表面修飾は 90 年代に石原らの研究グループが [14-15]再生セルロースへの改質に成功したが、臨床使用には至っていない。2000 年代に非対称性トリアセテート膜の ATA 膜が誕生し、機械的強度が高まり大孔径化も可能となったがサイトカインの吸着除去性能がないことで急性血液浄化膜としては使用症例が限定されると考えた。

次にサイトカイン吸着性として重要な陰性荷電を有する膜として PMMA 膜を検討した。PMMA 膜はセルロース膜と同じく均一層の膜構造のため、薄膜化

と孔径コントロールに限界がある。膜表面には陰性荷電が付与され網目構造となっているため填まり込みによる炎症性サイトカインを吸着するとされている [16]がタンパク付着量も多く目詰まりも早い。PMMA 膜に MPC ポリマーを修飾した報告も見当たらず技術的に MPC を付与することは難しいと考えた。

PS 膜は Hasegawa T.らにより MPC ポリマーのブレンド製膜の実績があり、タンパク付着抑制能が確認されている [17]。高い透水性と緻密層と粗密層からなる非対称性の膜構造は、孔径コントロールが容易で物質除去選択能力が良く、フィブリノーゲンの吸着量も少ないことが報告されている [18](図 5-6)。しかし肝心のサイトカインの吸着能力が PMMA 膜より期待できない [19](図 5-7)。

最後に PMMA 膜と同じ陰性荷電を有する PAN 膜を検討した。PAN 膜の陰性荷電 (-70mV) は PMMA 膜の (-10~20mV) より更に強く [20]、多くのサイトカインを吸着するとされる [20]。PAN の持つ陰性荷電は、血液凝固系も活性化するが、リン脂質構造をもつ MPC と融合すれば弱陰性荷電を有するヒトの血管内皮と同様の構造となり、その擬似性による血液細胞の粘着、凝集の不活性化が期待できる。あらかじめ製膜されている血液浄化用 PAN 膜に何らかの方法で MPC ポリマーの表面修飾を行えば、血管の内皮細胞に近い膜になるのではないかと期待される。また血液浄化膜として臨床使用する際の滅菌に関しては PAN と MPC はいずれも耐熱性に問題がある。一般的な血液浄化膜の高圧蒸気滅菌では耐熱性、耐加水分解性、機械的強度の点で不安があるため γ 線滅菌や EOG 滅菌を利用すれば解決できると思われる。MPC と PAN が融合し、従来までの血液浄化 PAN 膜本来の溶質除去性能、サイトカイン吸着能を損なわなければ優れた抗血栓性、生体適合性を示す新たな急性血液浄化膜が完成すると考えた。

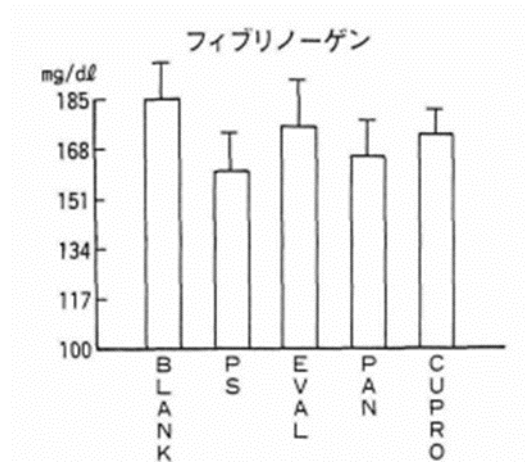


図 5-6 膜別フィブリンノーゲン吸着能

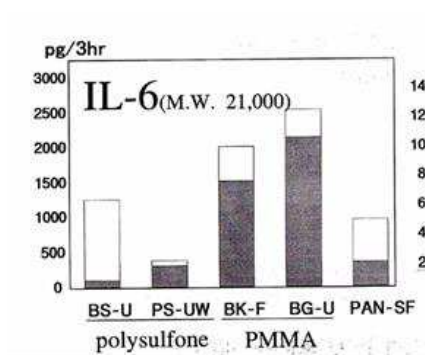


図 5-7 膜別 IL-6 の除去能

5-5 結語

新たに開発する抗血栓性ポリマーとして MPC を使用することとした。血液体外循環にとって究極の理想は“生体に異物接触したことを気が付かせない”ことである。MPC は血管内皮と類似構造を持ち、抗血栓性以外にもタンパクによるファウリングの予防も期待できる。修飾する膜は現存の血液浄化膜では最も強い陰性荷電を有しサイトカイン吸着能力の高い PAN 膜を選定した。

参考文献

第5章

- 1) Hirasawa H, Oda S, Nakamura M, Watanabe E, Shiga H, Matuda K: Continuous Hemodiafiltration with a Cytokine-Adsorbing Hemofilter for Sepsis. *Blood Purif* **34**: 164-170,2012.
- 2) Sylvie L, Bruno P, Herve M, et al: Assessment of the Heparin-Binding AN69 ST Hemodialysis Membrane: Clinical Studies Without Heparin Administration. *ASIO Journal*: 348,20005.
- 3) Lavaud S, Paris B, Maheut H, Randoux C, Renaux JL, Rieu P, Chanard J: Assessment of the heparin-binding AN69 ST hemodialysis membrane II. Clinical studies without heparin administration. *ASAIO J*.**51**:348-51,2005.
- 4) GAMBRO 社 AN-69ST 膜パンフレット
- 5) 志賀英敏, 平澤博之: 新しい cytokine-adsorbing hemofilter -セプザイリス CHDF の使用経験. *日本透析医会誌* Vol.**30** No1 : 134-138,2016.
- 6) Verresen L, Fink E, Lemke H, et al: Bradykinin is a mediator of anaphylactoid reaction during hemodialysis with AN69 membranes. *Kidney Int* **45**: 1497-503,1994.
- 7) 門磨義則, 中林宜男, 増原英一, 山内純一: ホスホリルコリン基を有するポリマーの合成と溶血性. *高分子論文集* **35** : 423-427,1978.
- 8) Lewis A , Furze J , Small S, Robertson J, Higgins B, Taylor S and Ricci D: Long-term stability of a coronary stent coating post-implantion. *J. Biomed.*

- Mater. Res **63**: 699,2002.
- 9) Yamazaki K, Kihara S, Akimoto T, Tagusari O, Kawai A, Umezu M, Tomioka J, Kormos R L, Griffith B P and Kurosawa H: EVAHEART™: An Implantable Centrifugal Blood Pump for Long-Term Circulatory Support Thorac. Cardiovasc. Surg **50** (in Japan): 461,2002.
 - 10) Ishihara K, Nomura H, Mihara T, Iwasaki Y, Nakabayashi N: Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption?. J Biomed Mater Vol **39**: 323-320,1998.
 - 11) 石原一彦: 人体になじむ MPC ポリマーの創製と医療器具への実装. 工業材料: Vol.8,2021.
 - 12) Ishihara K, Iwasaki Y, Ebihara S, Shindo Y, Nakabayashi N: Photoinduced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on polyethylene membrane surface for obtaining blood cell adhesion resistance. Colloids Surf B Biomaterials: 325-335,2000.
 - 13) 篠田俊男, 峰島三千男: クリニカルエンジニアリング別冊 透析のすべて. 学研メディカル秀潤社,東京,2001.
 - 14) 石原一彦, 篠塚拓也, 花崎香, 田中志信, 中林宜男: MPC ポリマーを表面に結合したセルロース膜の血液適合性. 第 16 回日本バイオマテリアル学会 予稿集: 162,1995.
 - 15) Ishihara K, Fukumoto A, Aoki K, Nakabayashi N: Improvement of blood compatibility on cellulose dialysis membrane. Grafting of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on to a cellulose membrane

- surface. *Biomaterial* **13** (3): 145-9,1992.
- 16) 森山和広, 加藤由布, 西田修ほか: Cytokine-adsorbing hemofilter によるサイトカイン吸着能の検討. *日本急性血液浄化学会誌* **10** (1) : 5-9,2019.
- 17) Hasegawa T, Iwasaki Y, Ishihara K: Preparation and performance of protein-adsorption-resistant asymmetric porous membrane composed of polysulfide /phospholipid polymer blend. *Biomaterials*,**22**: 243,2001.
- 18) 内藤秀宗, 宮崎哲夫, 末岡明伯, 犬飼雄一,ほか: 各種透析膜の血液凝固系に与える影響. *人工臓器* **16** (2) : 763-766,1987.
- 19) 川西秀樹: 急性血液浄化療法に用いられる治療条件と血液浄化器の選択: 集中治療 *Vo.12* : S7-8,2000.
- 20) 内藤秀宗: 透析膜の特性. *透析会誌* **25** (11) 43-50,1992.
- 21) Shiga H, Hirasawa H, Nishida O, Oda S, Nakamura M, Mashiko K, Matsuda K, Kitamura N, Kikuchi Y, Fuke N: Continuous hemodiafiltration with a cytokine-adsorbing hemofilter in patients with septic shock: A preliminary report. *Blood Purif.***38**: 211-218,2014.

第6章 新しい抗血栓性 AN-MPC ポリマーの重合

第6章では抗血栓性ポリマーとして選定した MPC とアクリロニトリルを重合すべくその重合方法を先行研究をもとに設計し実際に重合を行った。重合実験とその合成物の分析までの過程を述べる。

6-1 MPC とアクリロニトリルの重合方法

高分子物質を生成するための重合方法は反応により連鎖重合と逐次重合がある。連鎖重合はポリマー鎖末端に重合活性を行うごとに連鎖的に重合が行われる。逐次重合は重合反応の反応開始点がモノマー存在し重合することにより反応開始点が失われていく。連鎖重合は更に付加重合と開環重合に分類でき、それぞれラジカル、アニオン、カチオン、配位重合に分類される (図 6-1)[1]。

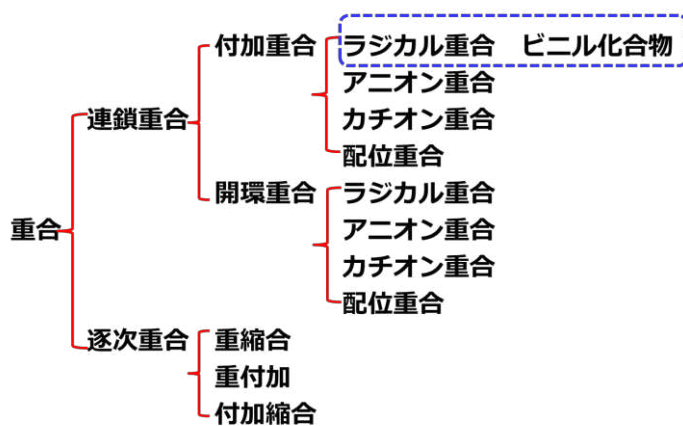


図 6-1 重合の種類 [1]より改編

本研究の重合方法は MPC のホスコリルコリン基含有のビニル系モノマーとアクリロニトリル系ビニルモノマーの重合であるためビニル化合物が反応する

連鎖重合のラジカル重合となる。MPCは分子内にメタクリロイル基を持つためフリーラジカル反応でポリマー化され [2]MPCのメタクリロイル基に存在する炭素分子とアクリロニトリルの炭素分子の炭素-炭素の結合が期待できる。この結合は $-(AN)_m-(MPC)_n-$ で表現される共有結合であり水素結合のような間接的な結合ではない。水素結合は水素原子と酸素原子の静電的結合のため直接的な結合ではなく弱い結合だが、AN-MPCポリマーはアクリロニトリルが高分子化され凝集力が強まり非常に強い結合となる。今回試みたラジカル共重合は重合物に添加された、開始剤の分解によってラジカルが生じ、反応したモノマーが更に新たなラジカル活性を生み出し連鎖的に反応する。問題点としては AN-MPCポリマーの分子量のコントロールを行うことが難しいとされているが近年、遊佐らが可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT 重合) により MPCの分子量制御に成功している [3]。

6-2 新規開発ポリマー重合の設計

本研究ではアクリロニトリルとホスホリルコリン基含有の MPCを共重合し、新たな抗血栓性ポリマーを作製してコーティング剤として既存の人工腎臓 PAN膜にコーティングした。ポリアクリロニトリルの側鎖ニトリル基の強い凝集力と親和性、MPCの生体適合性を有し、かつサイトカイン除去性能を持つ血液浄化膜を作製することとした。重合方法は MPCとアクリロニトリルモノマーをラジカル反応で重合した。重合にあたり重合障害を防ぐため、真空脱気および不活性化ガスを置換した。用いるガスとしては窒素、二酸化炭素、ヘリウムが可能であるが取り扱いが容易である窒素とした。重合反応として重合開始剤は AIBN2,2-アゾビス (イソブチロニトリル) を用いた重合反応とした。AIBNの

使用量はモノマーに対し 1mol%とした。MPC の重合溶媒として最初に考えたのは DMF 溶媒であったが DMF 溶液を使用すると MPC は極性が高く溶解しない。温度を 50°C にすると部分的に溶解するが、不均一な反応により界面重合のようになり、溶けた MPC が反応して重合反応したものが析出する。またコーティング剤として人工腎臓 PAN 膜を使用した場合、PAN 膜のメタリルスルホン酸と DMF が結合し、分子量が大きくなる可能性があることを放送大学名誉教授 東氏よりアドバイスされ DMF を溶媒として用いることは避けた。他の溶媒としてはアルコール系としてエタノール、メタノール、プロパノールなどが考えられるが医療用であることを勘案し、エタノールを選択した。アクリロニトリルと MPC の含有比率については MPC のモノマーユニットの含有率が低いと生体適合性、抗血栓性、親水性の発現が不足する [4-5]。一方、高すぎると、水に対する溶解性が高くなるが有機溶剤への溶解性が低くなる [5]。血液浄化膜から水の溶出度が増えると膜への接着性が低下されることが予想され、MPC による親水性の平衡含水率が急激に上昇し抗血栓性が発現するモル分率が 0.3 以上であった Ishihara K. [5-6]らの先行研究に従い MPC : アクリロニトリル = 3 : 7 のモル比とした。

6-3 実験機材

(1) 試薬

- ・ Lipidure[®]-PC (MPC モノマー): 日本油脂製
- ・ AIBN (重合開始剤) $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CN})\text{N} : \text{NC}(\text{CN})(\text{CH}_3)_2 = 164.2 : 2,2$ -アゾビス(イソブチロニトリル): 和光純薬製
- ・ アクリロニトリル CH_2CHCN : 和光純薬製

- ・エタノール (GPC 用) C_2H_5OH エチルアルコール 99.5 %: 和光純薬製
- ・アセトン $(CH_3)_2CO$ 、沸点 $56.5^{\circ}C$

(2) 実験機器

- ・マグネティックスタラー : HS3B: IUCHI 社
- ・温度コントローラー : THERMO EYE: IUCHI 社
- ・吸引ポンプ : RP60Z BOX: TOKUDA 社
- ・冷却装置 : CC-100 NEL: SAB 社
- ・真空乾燥装置 : MODEL VO4S: 清水理化学機器製作所

6-4 共重合実験

6-4-1 アクリロニトリルの精製

アクリロニトリル 300mL をフラスコに入れ、温度コントローラーにて加温しつつ、マグネティックスタラー (攪拌器) にアクリロニトリルを攪拌しながら真空脱気 (-760mmHg) を行い、不純物とアクリロニトリルとの重合を避け減圧蒸留した。アクリロニトリルの沸点は 77 から $78^{\circ}C$ (大気圧) であった。沸点到達までの初期の蒸留物 (30mL 程度) には沸点の低い不純物があると考え廃棄した。



図 6-2 蒸留装置

6-4-2 アクロロニトリルと MPC の共重合

(1) 真空脱気による窒素置換

MPC 4.45g、エタノール 15mL、重合開始剤 AIBN 0.085g とエタノール 25.875mL を混合した溶液に蒸留したアクリロニトリルを 1.879g 混ぜシュレンク重合用ガラス反応管に入れ、冷却アセトン溶液に浸した (図 6-3)。実験装置にて真空脱気 1 分間にて酸素を除去し、ラジカル失活による重合阻害を防ぐための不活性化ガスとして窒素置換を 50mL/min で 30 秒間行う工程を 3 回繰り返した (図 6-4)。この重合阻害工程はラジカル共重合の過程において酸素 1 分子に 2 つの不対電子があるために重合中にアクリロニトリルが酸素の反応する可能性があるために必要であった。



図 6-3 窒素置換

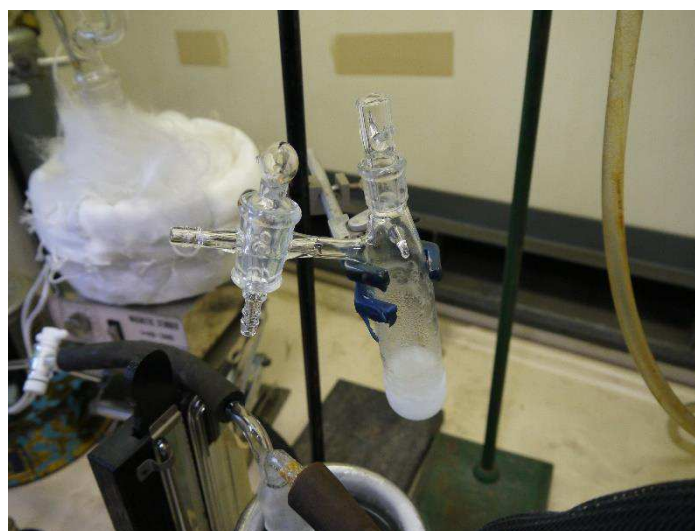


図 6-4 窒素置換後の AN と MPC および AIBN の混合溶液

(2) 重合

次にシリコンオイルバス（グリセリン）にて 50℃の漬け置き重合を開始した（図 6-5）。アクリロニトリルと AIBN が分解してアクリロニトリルが重合を始める温度が 50℃で反応漬置き時間は 60 時間であった。



図 6-5 AN-MPC ポリマー混合溶液共重合

(3) 重合反応の様子

当初反応液は、無色透明であったが反応の進行につれて黄色になり 30 時間後には濁りが生じ、不溶合成物が生じていた。この不溶合成物は白色で反応停止後に沈殿し、上澄み液は黄色透明であった。この白色沈殿生成物の量は黄色合成物に較べ少なかった（図 6-6）。



図 6-6 AN-MPC 共重合合成物

(2) AN-MPC ポリマーの共重合の分離濾過精製

アクリロニトリルと MPC の共重合合成物からエタノールを洗い流すため、反応溶液全量の 10 倍量のアセトン 500mL を混ぜ 30 分間攪拌した (図 6-7)。不溶物が完全に沈殿した後、上澄み液を G4 ガラスフィルターで濾過した。濾過方法はロートを用いてフラスコの上のビーカーにアセトンと AN-MPC 共重合合成物を注ぎ、落差滴下にてポリマーを沈殿し、濾別回収を行った (図 6-8)。



図 6-7 アセトンによるエタノールの分離 図 6-8 AN-MPC ポリマー濾別分離

(3) 減圧乾燥・生成

アセトンにて分離回収した合成物を1週間真空乾燥器にて減圧乾燥(-760 mmHg)を行いAN-MPC白色粉末ポリマーとした(図6-9,10)。ロートフィルター(3G-4)内のAN-MPCポリマー粉末をエタノールにて溶かしながら(図6-11)、フラスコにて収集(図6-12)するとAN-MPCポリマーはエタノール可溶性であった。エタノール反応溶合生成物は6.6g、うちエタノール可溶合成物6.360g、反応溶液から沈殿した不溶合成物0.240gであった。仕込み6.329gに対するAN-MPCポリマー回収は6.360gであった。エタノールに溶解したAN-MPCポリマー溶液を再びアセトンにて沈殿分離し、真空乾燥を行い3.02g AN-MPCポリマーを100mLのエタノールに溶解しAN-MPCポリマー溶液を作製した。



図6-9 減圧乾燥



図6-10 AN-MPCポリマー



図 6-11 AN-MPC ポリマーエタノール溶解

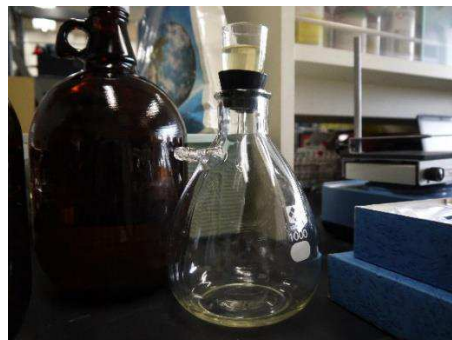


図 6-12 AN-MPC ポリマー回収

6-5 AN-MPC 共重合ポリマーの分析

6-5-1 AN-MPC 共重合物の分析結果

反応温度：50℃、反応時間：60 時間

モル比：MPC / AN= 3 / 7、モノマー濃度：2mol/L

開始剤と濃度 AIBN モノマーに対して 1mol%

反応溶媒：エタノール

【仕込み】

AN 1.879g + MPC 4.45g = 6.329g

AIBN 0.085g

エタノール 25.875mL

【回収】(エタノール中)

可溶性合成物 6.360g、不溶成生物 0.240g

(1) ^{13}C -NMR (核磁気共鳴) 分析

モル比：MPC / AN = 0.38 / 0.62

重量比：MPC / AN = 23% / 77%の結果であった。

(2) ゲル浸透クロマトグラフィー (Gel Permeation Chromatography: GPC)

分子量の確認は以下の測定条件にて GPC にて行った

GPC 測定条件

装置: Waters alliance システム

カラムオーブン : 40°C

分離カラム: Asahipak GF-7MHQ 2本直列+カラムガード

検出器 : 示差屈折計

移動相 : エタノール

移動速度: 1.0mL/分

試料濃度: 0.5w%

試料注入量: 100 μ L

標準物質 : ポリ酢酸ビニル (Mn: 5,000)、

ポリエチレングリコール (Mn: 950~1,050)、ビタミン E (分子量: 430)

以上の検量線の条件下の測定で重量平均分子量は 30,000~35,000 であった。

6-6 考察

重合したポリマーの仕込みの AN 1.879g と MPC 4.45g の合計 6.329g に対し、エタノール中の可溶合成物の回収は 6.36g、不溶合成物 0.24g であり、ほぼ十分量が回収されていた。しかし不溶合成物をあわせると仕込みの重量に対し回収重量 6.6g であり回収重量が仕込みを約 0.2g 上回るため、水などがポリマーに吸収され析出したかアセトンが含有したと思われる。また重合物を ^{13}C -NMR (核磁気共鳴) 分析にて解析した結果、仕込みモル比 MPC/AN = 3/7 であ

ったのに対し分析結果は 0.38/0.62 とほぼ予定通りの結果であった。また重量比 (wt%) は AN = 23%、MPC = 77%の結果であり重合は無事成功したと考えられた。合成された重合ポリマーの分子量は GPC による測定では 30,000 ~ 35,000 であった。この分子量は血液浄化療法のターゲット物質となる α 1-MG やサイトカインの分子量に近似する。第4章で示した大孔径 PS 膜の臨床研究では分子量 3,3000 の α 1-MG や分子量 2,2000 のプロラクチンに対しふるい係数として 0.1、除去率で 20%ほどの除去効率が得られた。この結果から考えると、AN-MPC ポリマーをコーティング剤として使用した場合、一部が血液浄化膜から拡散、濾過され網目状の偏在したコーティング状態が予想できる。またポリマー自身が膜のバルク層内に停留し抗血栓性能が発揮されることも期待できる。

6-7 結語

MPC と AN をモル比 3 : 7 でラジカル共重合を行い、AN-MPC ポリマーを作製した。作製したポリマーはエタノール可溶性であり、GPC から推測される重量平均分子量は 30,000~35,000 であった。

参考文献

第6章

- 1) 小林慎吾：高分子バイオマテリアルの設計・開発戦；サイエンス&テクノロジー. 124-136,2014.
- 2) Fukumoto K, Takayama R, Aoki J, Nakabayashi N: Improvement of blood compatibility on cellulose dialysis membrane I. Grafting of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on to a cellulose membrane surface. *Biomaterial* Vol.13: 145-149,1992.
- 3) Yusa S, Fukuda K, Yamamoto T, Ishihara K, Morishima Y: Synthesis of Well-Defined Amphiphilic Block Copolymers Having Phospholipid Polymer Sequences as a Novel Biocompatible Polymer Micelle Reagent Synthesis of well-defined Biomacromolecules.6: 663-670,2005.
- 4) Ishihara K, Miyazaki H, Kurosaki T, Nakabayashi N: Improvement of blood capability of cellulose dialysis membrane III Synthesis and performance of water-soluble cellulose grafted with phospholipid polymer as coating material on cellulose dialysis membrane. *J Biomed Mater Res* 29 (2): 18-8,1995.
- 5) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N: Preparation of Phospholipid Polymers and Their Properties as Polymer Hydrogel Membranes. *Polymer Journal* Vol.22, No.5: 355-360,1990.
- 6) Ueda T, Oshida H, Kurita, Ishihara K, Nakabayashi N: Preparation of 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Copolymers with Alkyl

Methacrylates and Their Blood Compatibility. *Polymer Journal* Vol. **24**

(II): 1259-1269, 1992.

第7章 AN-MPC ポリマーの血液浄化 PAN 膜へのコーティング実験

第7章では重合した AN-MPC ポリマーを既存の PAN 膜にどのような方法で表面修飾を行うか検討する。検討するにあたり、MPC を開発し MPC ポリマーを再生セルロース膜やポリスルホン膜に修飾した Ishihara K.らの先行研究を参考として、実際に人工腎臓 PAN 膜に AN-MPC ポリマーの表面修飾を行った。コーティング後、表面修飾された PAN 膜の表面塗工の状態を分析した結果を示す。

7-1 血液浄化膜に MPC ポリマーを表面修飾する方法

医療用材料の機能や強度を生かしつつ新たな機能を表面修飾する方法には化学的修飾法と、物理的修飾方法の2種類がある [1]。本研究にて応用可能な表面修飾方法について以下に述べる。

7-1-1 化学的修飾法

既存の高分子材料に何らかの機能を修飾するために化学的に結合させて目的の機能を付与させる。化学的結合を得るために後重合方法を用いる場合、何らかの方法にて活性種であるイオンやラジカルを発生させ重合を長時間におよび進行させる。活性種を発生するために高エネルギーである放射線を用い、放射線の作用を除去した後で成長反応が進行する [2]。

材料表面に対する高分子グラフト鎖を用いた化学的修飾方法として (1) Grafting from 法 (2) Grafting onto 法 (3) Grafting through 法の3つが代表的に挙げられる。なかでも高分子鎖をポリマーブラシのように結合させて機能を付与する方法は分子鎖長、密度に効果発現が影響されるためそれらを制御する

方法（リビング重合）が重要となってくる [1]。

(1) Grafting from 法

医療用マテリアルの表面に重合できる箇所を形成させ、その材料の表面から血液適合性ポリマーの重合を開始し、高分子鎖ブラシを材料表面から植物（血液適合ポリマー）のように伸ばして効果を発現させる。グラフト鎖長は反応濃度、時間により調整できる。修飾密度は官能基が多いほど高められるがグラフト鎖長が長くなると修飾が安定しないため医療材料ではあまり応用されていない。

(2) Grafting onto 法

あらかじめ重合にて合成しておいた血液適合性ポリマーの高分子鎖末端に活性種を反応させ医療用マテリアルの表面に結合させる方法。植物（血液適合ポリマー）を材料表面に植えつけるような状態で効果を発現させる。リビング重合にてグラフトを制御するが反応が進むほどグラフト鎖長や密度が障害となり、効果発現の減弱性を示すため高密度に修飾できない [1]。グラフトの分子量を含めた厳密な制御が重要となる。MPC に対しては Iwasaki Y.らが側鎖に反応基を持つコモノマーとブロック状に共重合した MPC ポリマーを予め作成した[3]方法や AKKHAT P.らにより末端反応性の MPC の研究が行われている [4]。

(3) Grafting through 法

医療用マテリアルの表面に重合性官能基を導入しておき、血液適合性ポリマー側にも重合性官能基のモノマーを重合させておく。材料と血液適合性ポリマーを互いに共重合させて植物（血液適合性ポリマー）を材料表面に絡み付けるような状態で効果を発現させる。重合性官能基は疎・親水、酸・塩基性の側鎖を用いれば簡便である。分子量によりポリマー鎖長が決められるが高密度の表面

修飾が難しい [1]。

7-1-2 物理的表面修飾（重合法）

目的とする機能を発現する官能基を導入したモノマーを合成しておき、適用可能な重合反応を経由して高分子材料に被膜（コーティング）する方法や疎水性・親水性の相互作用を活用したラングミュア-ブロッジェット法、静電的相互作用などを利用した物理的表面修飾法が行われている [1]。

(1) 被覆法

材料表面に水に不溶なポリマーを単純塗布する（被覆法）。また静電結合や水素結合、共有結合などを用いて材料表面に薄膜固定化する。ポリマーと材料の間に結合が存在しないと安定しないため、被覆層を維持するには材料との親和性ユニットが必要である。単純で簡便、汎用性が高いが剥離の可能性がある。高熱滅菌時の機能維持や臨床使用による被覆の維持の検証が必要である。Ishihara K.らは MPC と n-ブチルメタクリレート (PMB) のラジカル重合によるコポリマーを作成し、エタノールに溶解してセルロース人工腎臓膜に浸漬被膜した。重合比は MPC 30mol% : PMB 70mol% (PMB37) であり MPC の溶解濃度が 30mol%で最も効果が発現することを発表した [5]。

(2) ブレンド法

透析膜材料溶液に MPC ポリマーを混合し、湿式法により紡糸することにより製膜する。凝固浴温度と MPC の混紡率により細孔径と親水性が制御できる。ポリマーを大量に使用する必要がある。

7-2 MPC 修飾を行った血液浄化膜の先行研究

7-2-1 再生セルロースと MPC の修飾

MPC を開発した Ishihara K.らは人工透析治療のヘパリンの減量、透析膜の残血を減少させる抗血栓性を目指し、再生セルロース人工腎臓膜への MPC を表面修飾することを試みた。その表面修飾方法は、直接グラフト法、表面共有結合法、被覆法である。

(1) 直接グラフト重合法 [7]

MPC と重合開始剤（硫酸セリウムアンモニウム）を溶解した水溶液にセルロース膜を浸透による漬け置きにして膜表面のラジカル反応にてグラフト重合（Graft from 法）をさせた（図 7-1）後、乾燥化したのちにミニモジュールにて無抗凝固薬にて血液循環後、表面の SEM 観察を行った（図 7-2）[6-7]。

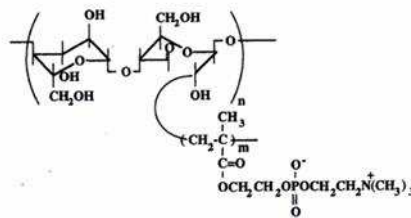


Figure 2. Chemical structure of cellulose grafted with MPC

図 7-2 セルロース-グラフト MPC 分子構造式 [7]

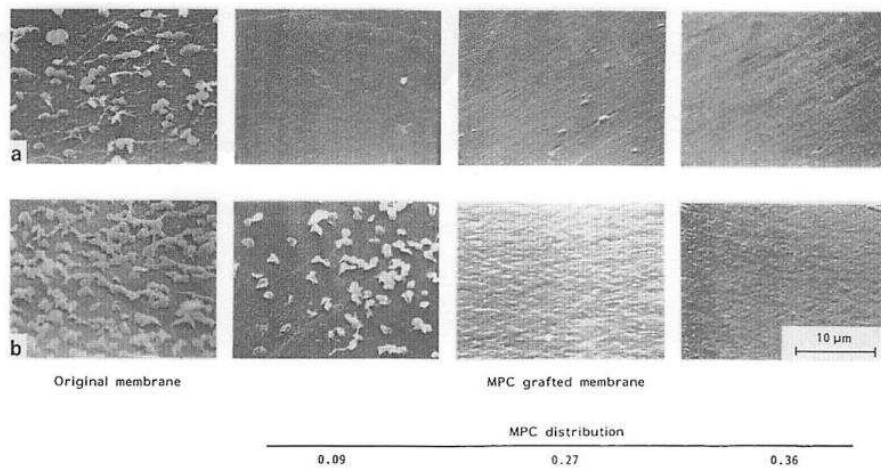


図 7-1 セルロース-MPC グラフト重合の血液灌流後の表面

また膜に接触した際の補体の消費率を測定し赤外分光計にて表面が修飾されていると確認したところ修飾膜からのグラフトポリマーの溶離はほとんど認められなかった。血液を通過させた後の未処理のセルロース膜では多くの血小板が粘着し、活性化・凝集しているが、MPC グラフトポリマーで処理すると血小板の粘着が全く認められなかった。ただ、グラフト鎖長が長くなると修飾の安定性や透析膜の溶質除去性能そのものに影響を与えると考えられるほか、セルロース膜に直接グラフトして透析器に組み上げることは煩雑であり透析膜としての性能が担保しにくいことから次に述べる被覆法へ研究は進んでいった。

(2) 共有結合法 [8]

MPC とカルボキシル基を有するモノマーと疎水性アルキルメタクリレート の三元共重合体を作製し、塩化メチレンに可溶性のある重合体として膜の水酸基と MPC のエステル化反応により固定化を行う方法を設計した。生体適合性発現の良好であった、MPC、メタクリル酸、2-エチルヘキシルメタクリレート

の共重合体を塩化メチルに脱水剤を加えた溶液に溶解し、再生セルロース膜を浸透させ、セルロースの水酸基と MPC ポリマーのメタクリル酸エステルとエステル反応をさせて膜の表面に共有結合による固定化を行った [8]。

(3) 被覆法 [9-10]

製膜後に表面改質する直接グラフト法に対して簡便な方法で行える被覆法は MPC のグラフト化セルロース溶液（低分子量化セルロース）にセルロース透析膜を浸し、自然真空乾燥させる方法で行われた。同じセルロース同士の水素結合による親和性を利用した。ウサギ新鮮血にて灌流し SEM にて表面観察を行うとタンパク付着は認められなかった。また MPC (含量 0.5-1.0 重量%) のグラフト化メチルセルロース溶液の被覆コーティングに対しウサギ血液の灌流を行い、タンパクの吸着を観察した結果も同様であった (図 7-3)[9-10]。この方法は修飾方法が容易で汎用性が高く MPC の表面修飾の代表的な方法となったが MPC の重合制御による分子設計は別の技術による工夫必要がある。

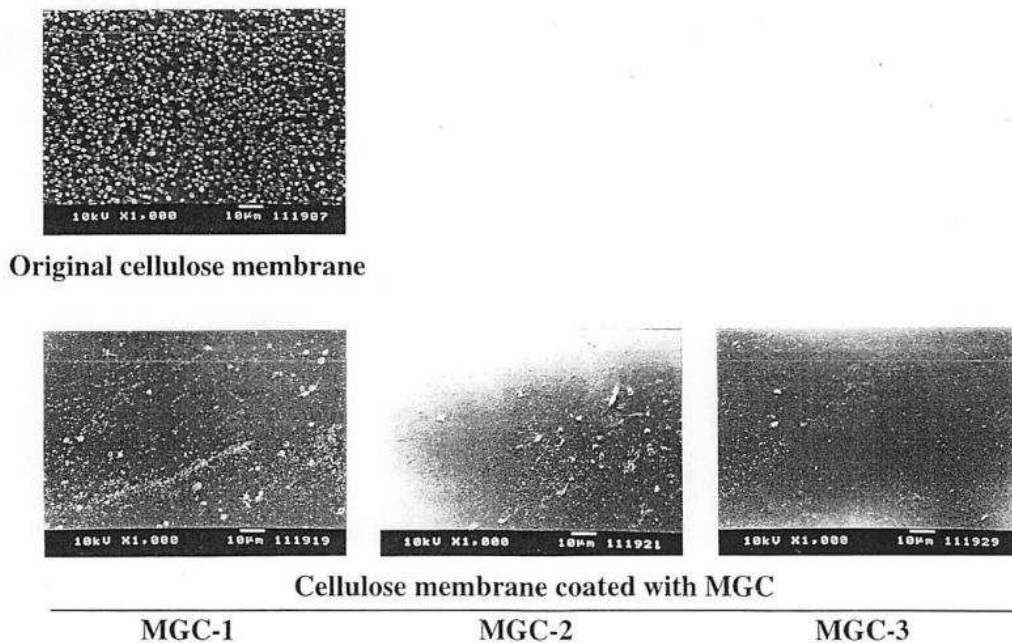


Figure 6. SEM pictures of the original cellulose membrane and that coated with MGC after contact with PRP for 180 min.

図 7-3 セルロース-MPC 被覆法血液灌流後の表面

以上、いずれの方法もセルロース膜に MPC を修飾方法する方法として研究が進められたが市場規模としての人工腎臓膜の開発は膜孔径をコントロールしやすく、多彩な溶質除去能力を獲得できる合成高分子膜にシフトされた。MPC の人工腎臓膜に対する研究は以下に述べるポリスルフォンへの修飾へと引き継がれた。

7-2-2 ポリスルフォン膜と MPC ポリマーの修飾

人工透析膜は再生セルロースから孔径設計が容易で中分子量物質除去性能に優れる合成高分子に注目が集まり、Hasegawa T.らは疎水性合成高分子であるポリスルフォン（以下 PS）膜の MPC による改質を試みた [11]。従来の PS 膜の親水化剤には PVP が用いられているが PVP 自身のアレルギー性 [12]の問題

があるため、PVP に変わり MPC ポリマーを PS とのブレンド溶液から製膜すると、MPC ポリマーが膜表面に濃縮固定され、7 重量%の MPC ポリマー添加でタンパク質、血小板吸着が抑制された [11] (図 7-4)。

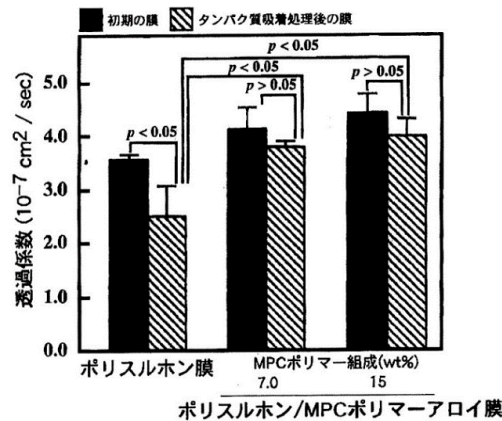


図 7-4 PS-MPC の蛋白付着量

7-3 血液浄化 PAN 膜に最適な MPC 表面修飾方法

血液浄化膜に対する表面修飾方法は先に述べたように化学的修飾方法と物理的修飾方法があるが、化学的修飾方法は血液適合性ポリマー、血液浄化膜に対する重合によるグラフト鎖、分子量、表面修飾の密度の厳密な制御が必要となり設備、技術的に困難であると判断し、物理的修飾方法である被膜法、ブレンド法のいずれかの方法にて行うこととした。

7-3-1 PAN と MPC ブレンド法の長所と問題点

MPC はメタクリル酸エステルであるために共重合反応性も良好で、様々な重合相手を選択でき新たなポリマーが創出可能である。PAN 膜はアクリロニトリルの疎水性を改善すべく親水性のメタリルスルホン酸ナトリウムを共重合させ

たものであるが、親水性を有するスルホン酸の度合いを調整することで蛋白吸着量を少なくすることができる。しかしながらその量を減らしすぎると親水性が落ちる。そこで PAN 膜の製膜時の溶液の中に MPC ポリマーをブレンドして製膜すれば MPC の抗血栓性効果が発現するのではないかと考えた。同様の方法としては PS 膜に対して 7%の MPC ポリマー添加で抗血栓性が示された報告がある [11]。問題点として製膜溶媒にブレンドして製膜すると高価な MPC を大量に必要とするため適切ではないと考えた。

7-3-2 PAN と MPC 被覆法の長所と問題点

従来の MPC ポリマーの表面修飾は MPC 溶解液を利用した単純被覆法が最も簡便で、コスト的にも安価であり、血液浄化膜として製膜する際に有利である。PAN 膜に MPC ポリマーを被覆することを考えると、共重合して製膜されている既存の PAN 膜には MPC ポリマーの結合する反応基が存在しないため、被覆した MPC ポリマーと PAN 膜の間に結合が得られない。単純に MPC ポリマーを被覆するだけでは含水した MPC ポリマーが血流により剥離してしまうことが予想される。被覆に使用する MPC ポリマーが強く人工腎臓膜と相互作用を行うことが必要であり、血液と接触して膜の状態が変化した場合や滅菌をした際に安定な被覆層が維持できるか問題が残る。そこで本研究で開発した抗血栓性コーティング剤はあらかじめ AN と MPC を重合させて、血液浄化膜の PAN 膜に接着させる設計とした。AN-MPC ポリマーは重合により単量体から重量体となり高分子化によって凝集力が強まっている。血液浄化膜の PAN と同じアクリロニトリル同士の強い接着力により単純な被覆法によるコーティングでも生体適合性の効果が発現できるとの着想に至った。

7-4 AN-MPC ポリマーの血液浄化膜に対する表面修飾実験

7-4-1 目的

ブレンド法、単純被覆法の欠点を補うべく Ishihara K. [9][10]らの研究を参考に、最初に主基材である膜素材のアクリロニトリルと MPC を共重合した新規の AN-MPC ポリマーを作製した。作製したポリマーを希釈したコーティング溶液として既存の平膜 PAN 膜の表面に被覆することとした。重合したアクリロニトリルの炭素基と MPC のメタクリロイル基の炭素-炭素間の共有結合で結合したアクリロニトリルと MPC の共重合体は安定したコーティングポリマーとなり、PAN の分子構造にある側鎖ニトリル基の強い凝集力と接着性は血液と接触しても剥がれにくく新たな生体適合性の高い PAN 膜が構築されると予想した。コーティング濃度は Ishihara K. [9][10]らによる MPC とメチルセルロース重合溶液を 0.5~1.0 重量%の濃度で被覆法にてコーティングを行い、セルロース透析膜に対する高い生体適合性を発現させた先行研究に従い、1%にすることにした。先の共重合実験で得られた 3.02w/v%の AN-MPC ポリマー溶液をエタノールにてさらに希釈を行い 1%のコーティング溶液の作製をした。また 3% AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜も比較対象として検証することとした。

7-4-2 実験機材

(1) 試薬

- ・ AN-MPC ポリマー溶液 (1%および 3%)
- ・ エタノール (GPC 用) C₂H₅OH エチルアルコール 99.5 %: 和光純薬製
- ・ 滅菌精製水

(2) 実験機器

- ・ 透析装置 TR-3000S: 東レ社
- ・ 人工腎臓 PAN 膜 (積層型): Baxter 社

7-4-3 AN-MPC ポリマーの血液浄化膜表面修飾

(1) 人工腎臓膜の洗浄・乾燥

未使用の血液浄化膜は、膜の不可逆的変化の防止と保存のためにグリセリンにてコーティングされているため、添付文書を基に血液ポンプ（血流量 200mL/min）を用いて生理食塩水 1,300mL にて洗浄を行った。生理食塩水を使用した理由として生理的 pH、浸透圧に整えるために臨床にて行われている手技を踏襲した。洗浄した PAN 膜を短冊状（2×5cm）程度に医療用クーパーでカットし(図 7-5)、ペアンにて両端を挟み乾燥器にて 1 週間乾燥させた。この後、1% と 3% AN-MPC ポリマーをコーティングしたところ PAN 膜の白濁が認められた。テスト観察にて SEM を行ったところ、観察像のなかに NaCl の結晶が写りこんでいた (図 7-6)。これは生理食塩水で洗浄した際に残存したと思われ、膜の表面に NaCl が凝集したことが疑われた。再び新たな PAN 膜を切り出し生理食塩水は用いずに蒸留水 1,000mL で洗浄し直した。再びエタノールで浸し、観察を行うと PAN 膜は透明のフィルム状であり、SEM にて確認を行うと NaCl の存在は認められなかった。また 1 部試料に薄い黄色が認められたものがあつたが AN であると推察された。



図 7-5 人工腎臓膜の切り出し



図 7-6 SEM による NaCl

(2) PAN 膜に AN-MPC ポリマー溶液を被覆法コーティング

①カットした PAN 膜をシャーレに乗せた。

②第 6 章の実験にて作製した 3.02w/v% AN-MPC ポリマー溶液 20mL とエタノール 40mL にて希釈を行い 1%の濃度とした、AN-MPC ポリマー溶液をシャーレに 10mL 注ぎ 10 分間浸した (3 枚)。また同様に 3% AN-MPC ポリマー溶液も準備し PAN 膜 (3 枚)をシャーレに浸漬させた(図 7-7)。

③シャーレより浸した PAN 膜をピンセットにて取り出し室温にて一晩放置して溶媒離散による乾燥を行った (図 7-8)。

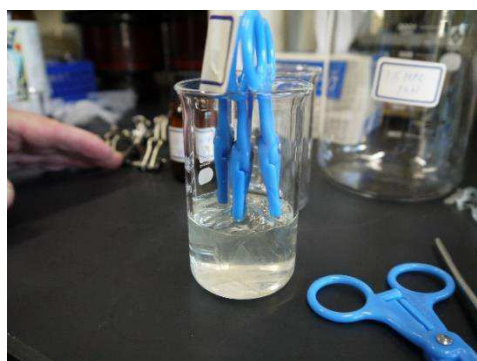


図 7-7 被覆法コーティング



図 7-8 溶媒離散

7-5 コーティングした表面塗工の分析

AN-MPC ポリマーにてコーティングした PAN 膜の表面を以下の方法で分析した。

7-5-1 赤外線吸収スペクトル FT-IR の測定結果

ノンコーティングの人工腎臓膜を比較対象としてマクロ Attenuated Total Reflection 法にて測定した結果、1%、3%濃度ともに 966、1230、1270 cm^{-1} に MPC および AN-MPC ポリマー特有のピークが認められ、コーティング膜全面に AN-MPC ポリマーがコーティングされていることが確認された（付録参照）。また両膜ともに水分由来のピークが確認され空気中の水分が吸収されたか、生理食塩水が紛れ込んでいる可能性があった。測定範囲は約 70 μm (1 画素 1.1 μm / 64 \times 64 画素)、積算回数 64 回であった。

7-5-2 コーティング状態解析（飛行時間型二次イオン質量分析 Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry : TOF-SIMS）

100 μm 、500 μm の面積にて表面イメージ分析 1%濃度、3%濃度の両膜ともに薄膜の塗工状態が確認された。コーティングの分布は海島状ではなかった。1%濃度膜は付着物のようなコーティング状態、3%濃度膜は深さ方向分析にて PO_3^- が観察され層になっていることが示された。デプスプロファイルでのエッチングレートより、 Al_2O_3 蒸着層換算で約 25nm の薄膜層であった。

7-6 考察

今回のコーティング方法によって分析された結果は 25nm の薄膜層が偏在したコーティング状態であった。現在、臨床使用されている急性血液浄化膜である PAN 膜のサイトカイン吸着原理は表面のみがポリエチレンイミン架橋によるへ

パリンにて抗血栓性を保ち、分子量 20,000~30,000 ダルトンであるサイトカインはコーティングの偏在した隙間からバルク層の内部に拡散し吸着するとされている [13]。この考え方によれば AN-MPC 共重合体コーティング液を偏在させて被覆することにより同じ効果が得られることが期待できる。すでに Ishihara K.らの先行研究 [14]では膜表面に MPC を偏在させるためには表面に保持する MPC 共重合体の分子量と膜の開孔率を調整することにより可能とされており、薄膜層のコーティングであれば MPC 自体に分子量 10^4 程度の分子量の物質透過性がある [14]とされている。また MPC をポリマーブラシマイクロパターンとしたときのポリマー厚が 5nm 以上になった時に細胞接着とタンパク吸着抑制効果の効果が発現するとされているが [1]、膜自身の陰性荷電によるサイトカイン吸着能と MPC ポリマーの生体適合性発現性能が共存した状態がどのようなコーティング厚や濃度、偏在性が適切であるか今後の血液浸漬、灌流実験にて確認していく必要がある。

また 1%コーティング膜の結果で示された塗工状態の不十分さや剥がれに関しては、エタノールでの試料固定時の剥がれ、AN-MPC ポリマー溶液の浸漬時間（本実験では 10 分間）、乾燥方法（本実験ではペアンによる吊り下げ）等による影響であったか再検証する必要がある。

7-7 結語

1%および 3% AN-MPC ポリマー溶液を人工腎臓 PAN 膜に単純被覆コーティングを行い FT-IR、TOF-SIMS 質量分析にて表面観察を行ったところ、1%コーティング膜は薄膜の偏在による分布が確認され、3%コーティング膜は 25nm の偏在された薄膜層の塗工状態が確認された。

参考文献

第7章

- 1) 小林慎吾：高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略；サイエンス&テクノロジー. 133-139,1994.
- 2) 高分子学会辞典：高分子学会、高分子辞典編集委員会.朝倉書店：7,1988.
- 3) Iwasaki Y, Matumoto A, Yusa S: Optimized molecular structure of photoreactive biocompatible block copolymers for surface modification of metal substrate; ACS Appl, Mater. Interfaces Vol 4: 325,2012.
- 4) AKKHAT P, Kitakamjornwong S, Yusa S, Hoven V.P, Iwasaki Y: Development of a Novel Antifouling Platform for Biosensing Probe Immobilization from Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine-Containing Copolymer Brushes. *Langmuir*, **28**: 5872-5881,2012.
- 5) Iwasaki Y and Ishihara K: Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications Anal. Bioanal. Chem: 534-546,2005.
- 6) Fukumoto K, Ishihara K, Takayama R, Aoki J, Nakabayashi N: Improved of Improvement of blood compatibility of cellulose dialysis membrane.2. Blood compatibility of cellulose dialysis membrane grafted with phospholipid polymer. *Biomaterial* **13**: 145-149,1992.
- 7) 石原一彦：血液透析膜の抗血栓性化. 人工臓器 **25** 卷 4 号：778-784,1996.
- 8) Ishihara K, Shinozuka T, Hanazaki Y, Iwasaki Y, Nakabayashi N: The effect of the chemical structure of the phospholipid polymer on fibronectin adsorption and fibroblast adhesion on the gradient phospholipid surface.

- J.Biomater.scipolym. Ed **10**: 271,1999.
- 9) Ishihara K, Fukumoto K, Miyazaki H, Nakabayashi N: Improvement of the hemocompatibility on a cellulose hollow fiber with a novel biomedical polymer having a phospholipid polar group. *Artif Organs* **18**:559,1994.
 - 10) Ishihara K, Miyazaki H, Kurosaki T, Nakabayashi N: Improvement of blood compatibility of cellulose dialysis membrane. III. Synthesis and performance of water-soluble cellulose grafted with phospholipid polymer as coating material on cellulose dialysis membrane. *J Biomed Mater Res* **29** (2) :18-8,1995.
 - 11) Hasegawa T, Iwasaki Y, Ishihara K: Preparation of blood-compatible hollow fibers from a polymer alloy composed of polysulfide and 2-Methacryloyloxyethyl-Phosphorylcholine polymer. *Biomaterials* Vol.**63**: 333-341,2002.
 - 12) Bacelar M ID, Pinheiro KF, de Freitas do Carmo LP, Costa MC, Abensur H: Anaphylactic reaction induced by a poly-sulfone/polyvinylpyrrolidone membrane in the 10th session of hemodialysis with the same dialyzer. *Hemodial Int* **15**: 399-403,2011.
 - 13) 森山和広, 小野塚紀子, 綱島英人: Cytokine-adsorbing Hemofilter. *人工臓器学会誌* **43** (3): 233-237,2014.
 - 14) 石原一彦: タンパク質の吸着を抑制するポリマーの合成と医用膜への応用. *MEMBRANE* **18** (2): 107-116,1993.
 - 15) Inoue Y, Nakanishi T, and Ishihara K: Elucidation of protein adsorption

behavior based on molecular dynamics around polymer brush surface.
Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials Orland, USA
4:13-16,2011.

第 8 章 AN-MPC ポリマーコーティング血液浄化 PAN 膜の実験 -ウサギ新鮮血浸漬による血液適合性の検証-

8 章では AN-MPC ポリマー溶液コーティング PAN 膜をウサギ新鮮血に浸して表面観察を行った実験結果を示す。

8-1 目的

人工腎臓膜に AN-MPC ポリマーをコーティングして高い生体適合性、抗血栓性の発現が得られるか血液を浸漬させて確認する必要がある。AN-MPC ポリマーでコーティングした PAN 膜とノンコーティング PAN 膜を実験用ウサギ新鮮血に 3 時間および 24 時間浸漬させ、SEM による観察にて血小板、フィブリノーゲンの粘着・凝集を観察し、将来、血液浄化膜として臨床応用が可能であるか基礎データとした。浸漬させる動物血液は、先行研究である MPC-セルロース透析膜の血液適合性の実験を参考とし、ウサギの新鮮血とした [1][2]。添加抗凝固剤についてヘパリンとクエン酸があるが、実際の臨床の血液浄化療法で行われる。ヘパリンはアンチトロンビンⅢと結合し、凝固カスケードをブロックするため血小板凝集には影響を及ぼさないと考えた。一方、クエン酸はカルシウムと拮抗し、血小板放出の遊離カルシウムとの相互作用の動態が予想できない。今回使用した日本バイオテスト研究所のウサギ新鮮血はクエン酸ナトリウムが含有されている。石原ら [3][4]の先行研究では同じクエン酸ナトリウムが使用されており条件は同一であった。また試料処理の際のオスミニウムによる後固定はオスミニウムの毒性が強いことと SEM では後固定を省いても、撮像の観察画像の画質に違いはない [5]とのことで省略することにした。

8-2 実験方法

8-2-1 実験機材

(1) 試薬

- ・ AN-MPC ポリマー (1%及び 3%) コーティング人工腎臓 PAN 膜 Baxter 社
- ・ エタノール C_2H_5OH エチルアルコール 99.5 % : 和光純薬製
- ・ 0.1mol/%リン酸緩衝液 : 和光純薬製
- ・ 蒸留水 : 大塚製薬製
- ・ 25%グルタルアルデヒド $C_5H_8O_2$: 和光純薬製
- ・ *t* (ターシャリー)-ブチルアルコール $(CH_3)_3COH$: 和光純薬製
- ・ ウサギ新鮮血 : 日本バイオテスト (アルセバー液 pH6.1 : 血液=1 : 1 の含有)

(2) 実験機器

- ・ マグネティックスタラー : HS3B: IUCHI 社
- ・ 温度コントローラー : THERMO EYE: IUCHI 社
- ・ 吸引ポンプ : RP60Z BOX: TOKUDA 社
- ・ 冷却装置 : CC-100 NEL: SAB 社
- ・ 真空乾燥装置 : MODEL VO4S: 清水理化学機器製作所
- ・ 透析装置 TR-3000S: 東レ社
- ・ 医療用冷温水槽 HHC-51: 泉医科工業
- ・ 電子顕微鏡 SEM VE-8800 KEYENCE 社

8-2-2 血液浸漬

1%および3% AN-MPC ポリマーコーティングを行った PAN 膜とノンコーティング PAN 膜をそれぞれ 2 枚ずつ計 6 枚の試料をビーカーに入れ、膜全体が浸るように実験用ウサギ新鮮血 10mL を入れた。血液浸漬のビーカーを恒温槽に浸し先行研究 [6]と同じく 3 時間浸漬を行った。また同様に臨床における CHDF は 24 時間連続治療であることと Ishihara K [2]らの蛋白付着観察は 24 時間血液浸漬を行っているため 24 時間浸漬の PAN 膜も仕込んだ。また血液を浸漬させる際は人体と同じ条件にするためオイルバスにて 36°C で保温した (図 8-1)。

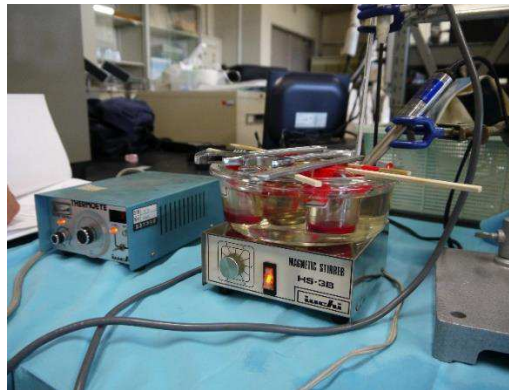


図 8-1 ウサギ新鮮血浸漬

8-2-3 前固定

SEM 観察の前に血球や細胞の不可逆的変性を防止し、細胞破壊が生じないようにグルタルアルデヒドで固定を行い強固な細胞構造とした。前固定はオスミニウム酸によるものとグルタルアルデヒドによるものがあるが各種先行研究に習い、細胞内部への瞬間的な固定能力に優るグルタルアルデヒドとした。

(1) 25%グルタルアルデヒド 10mL と 0.1mol% リン酸緩衝液 50mL、蒸留

水 40mL をビーカーにて混和させ 2%グルタルアルデヒド入りリン酸緩衝液 100mL (pH7.4) を作成した (図 8-2)。リン酸緩衝液は pH7.2 であったが固定液の pH は組織の pH7.4 に調整しないと蛋白質の構造や性質が変化し、微細構造が変化したり液性成分が不溶化して沈殿が生じそれが微細構造に付着したりするため厳密に調整を行った [5]。

(2) SEM 観察を行うにあたり、汚染されたタンパクや粘液も不透明な障害物となることを防止するため、3 時間血液浸漬の AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜及びノンコーティング PAN 膜の付着血液を 2 %グルタルアルデヒド入りリン酸緩衝液 20 mL で 2 回、試験管内で洗浄を行った。

(3) 医療用恒温槽に氷水を入れ、2%グルタルアルデヒド入りリン酸緩衝液 20 mL に 1%、3% AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜、ノンコーティング PAN 膜をそれぞれ浸して前固定を行い、4°Cの恒温槽 2 時間、浸漬固定のために浸した (図 8-3)。

(4) 試験管内にて AN-MPC ポリマーコーティング人工腎臓 PAN 膜が浸るまで注ぎ 3 回 10 分間で洗浄 (攪拌) を行った [3]。



図 8-2 リン酸緩衝液作成



図 8-3 前固定浸漬

8-2-4 脱水

生物試料を SEM 観察するためには真空内にて測定するため完全に乾燥しガスを放出しないように配慮が必要である。試料に含まれる水分は観察像に影響を及ぼすために完全に脱水する必要がある [5]。急速な脱水は試料の縮みを招くためエタノールを蒸留水にて徐々に希釈し 50%、70%、80%、90%、無水 100%にて各 15 分試験管内で揺り動かし脱水を行った。尚、24 時間血液浸漬の AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜に対してはエタノール洗浄からの t-ブチルアルコール置換の処理は行わなかった。これは AN-MPC の共重合を行った際、エタノールを使用しているのでコーティングが剥がれる可能性があることを危惧してのことであるが仮に AN-MPC ポリマーと人工腎臓膜の間で強固な架橋があればそのあとのエタノール処理には影響は及ぼさないと思われ、今後の検討課題である。実際、本実験の参考研究論文である Ishihara K.らは蒸留水の洗浄のみの金蒸着にて SEM 観察を行っている報告がある [4] (図 8-4)。



図 8-4 脱水

8-2-5 凍結乾燥

脱水した試料を完全に乾燥させるために *t*-ブチルアルコールを用いた凍結乾燥を行った。凍結乾燥は *t*-ブチルアルコールの高い凝固温度点 (25°C) と蒸気圧 (25 mmHg) の性質を利用しているが、室温下では *t*-ブチルアルコールが凍結しているため 40~60°C の温湯で融解した後、試料と *t*-ブチルアルコールを混和して、15 分間室温による浸漬置換を行った。浸漬液は 3 回交換して最後のブチルアルコールは試料が浸る程度とした。試料を冷蔵庫に入れると *t*-ブチルアルコールの凝固温度は 25°C と高いため 1 時間くらいで白く凍結した。その後、真空乾燥器にて一晩真空乾燥 (-760 mmHg) を行い凍結した *t*-ブチルアルコールを昇華させた (図 8-5)。



図 8-5 凍結乾燥

8-3 血液浸漬 AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜の SEM 観察

8-3-1 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察における注意点

加速された電子を試料の 1 点に照射すると試料から発生する 2 次電子または反射電子を発生し、その電子を検出する。電子が当たる場所をスキャンすることで像を結ぶ。金属などの導電性の試料では当てた電子をすぐに逃がすことができるが不導体の場合は逃げ場がないため電子試料の表面に滞留する。検出器が電子の過剰な状態を 2 次電子が多いと誤認するとその部位は明るい像になる。また照射された電子が滞留する電子に反発して方向を変えるため像が歪んで見える。電子が滞留した状態をチャージアップ (帯電) と呼ぶ。不導体試料のチャージアップを防ぐためには試料表面に金属を薄くコーティングする蒸着またはスパッタリングが必要である。

8-3-2 SEM による観察

AN-MPC ポリマーコーティング膜を医療用クーパーにて 5×5mm 程度に切り出し、試料を真鍮製試料台に固定マウントした。マウント物と飼料台の高さを平行に合わせ真空ポンプで吸引した。SEM は 2 次電子像にて観察できるキーエンス社 VE-8800 (図 8-6) を使用した。当機種は (+) に帯電した気体を注入し (-) の電子を中和する除電機能が付いているため蒸着やスパッタリングが不要であった。観察条件は血小板 2~4 μm の大きさに対し、血球観察の各種先行研究に習い、倍率 1,500~2,000 倍とした。



図 8-6 VE-8800 KEYENCE 社 SEM

(1) 観察手順

- ① 試料台の端でフォーカスを合わせた。
- ② 倍率 500 倍で万遍なく試料を観察し、観察ポイントを見つけたらフォーカス、ポジションを合わせながら倍率を上げた
- ③ 倍率 2500 倍にしてフォーカス、明るさを合わせ、1,500~2,000 倍にした。

(2) 3 時間血液浸漬の SEM 観察

① ノンコーティング PAN 膜

試料の至ると箇所血小片や血球と思われる付着物が観察された (図 8-7)。

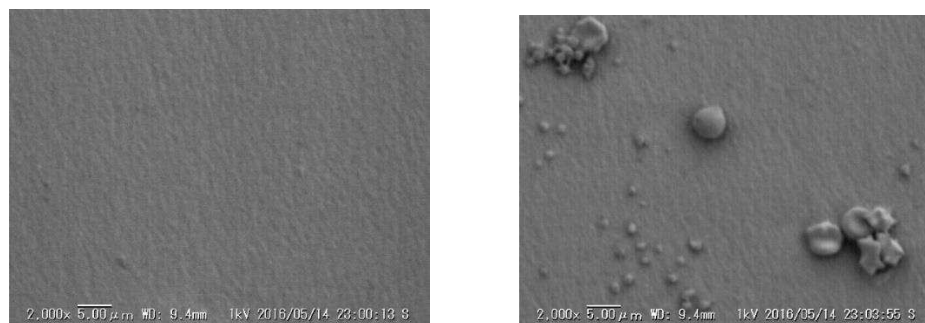


撮像条件：スポットサイズ 8mm、倍率 2,000 倍、加速電圧 2kV

図 8-7 3 時間血液浸漬ノンコート PAN 膜

② 1% AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜 (1%コーティング膜)

血小板の凝集が散在している箇所とまったく血球が付着せずに平滑な箇所が混在して観察された (図 8-8)。



1%コーティング膜の血球付着のない部位

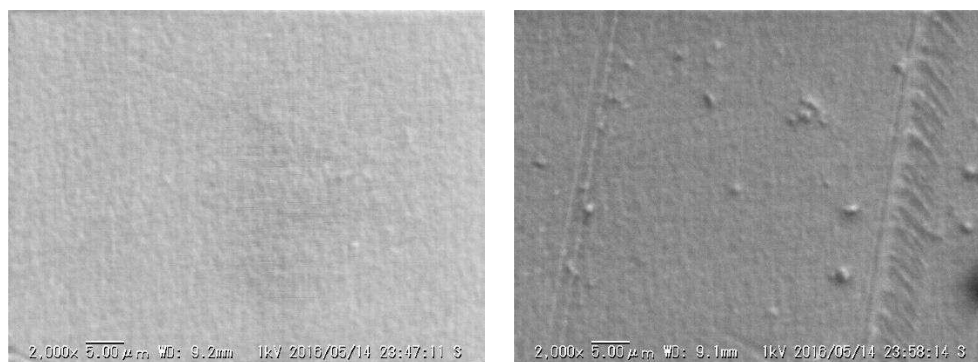
1%コーティング膜の血球付着部

撮像条件：スポット径 8mm、倍率 2,000 倍、加速電圧 1kV

図 8-8 3 時間血液浸漬 1 %コーティング PAN 膜

③ 3% AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜 (3%コーティング膜)

数か所に付着物が認められたが (図 8-9 右図) 1%のコーティング膜ほど血小板は付着していなかった。それ以外の試料のほとんどの観察面積にて血球が付着せずに平滑な箇所が確認された (図 8-9 左図)。観察中に 1%コーティング膜では認められなかったチャージアップが何度か出現した。



撮像条件：スポット径 8mm、倍率 2,000 倍、加速電圧 1kV

図 8-9 3 時間血液浸漬 3%コーティング PAN 膜

(3) 24 時間血液浸漬の SEM 観察

24 時間血液浸漬を行った試料は更に詳細に観察すべく、万遍なく切り出し観察を行うこととした。図 8-10 の左図が観察部位を示すが、1%、3%、ノンコーティング膜のそれぞれ 6 箇所から 5×5mm 角程度（黒色正方形）に切り出し、SEM 真鍮台に両面テープで貼りつけ観察を行った。

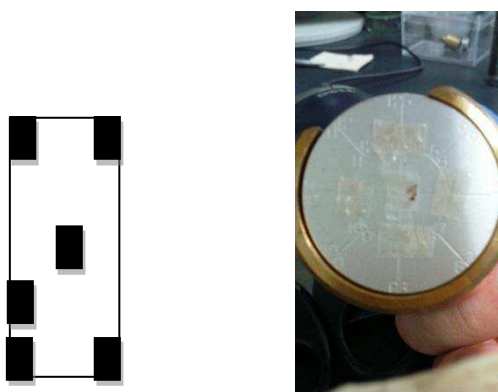


図 8-10 観察試料

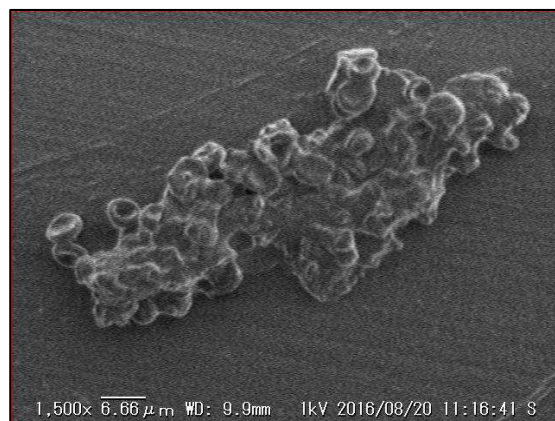
① ノンコーティング PAN 膜

ノンコーティング膜の試料は至る所に血球が付着している様子が観察された。観察場所によっては血球が凝集しフィブリンの形成が疑われた (図 8-11,12)。



撮像条件：倍率 1,500 倍、加速電圧 1kV

図 8-11 24 時間血液浸漬ノンコーティング PAN 膜



撮像条件：倍率 1,500 倍、加速電圧 1kV

図 8-12 24 時間血液浸漬ノンコーティング膜

② 1% AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜

1%コーティング膜は3時間血液浸漬時と同様に血小板が粘着している場所と付着していない箇所が混在して観察された。場所によっては血小板が散在し大ききさ形からして赤血球 ($7.7\mu\text{m}$) が疑われた (図 8-13,14)。



撮像条件：倍率 1,500 倍、加速電圧 1kV

図 8-13 24 時間血液浸漬 1%コーティング膜

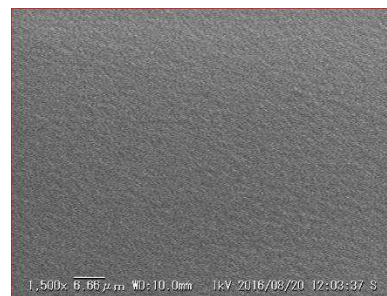
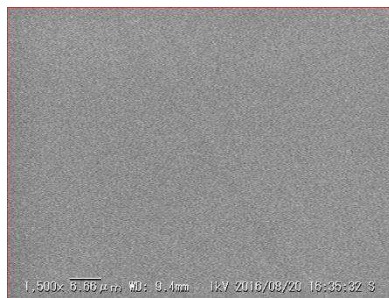


撮像条件：倍率 1,500 倍、加速電圧 1kV

図 8-14 24 時間血液浸漬 1%コーティング膜

③ 3% AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜

3%コーティング膜はどの試料にも血小板、タンパクなどの付着物が観察されず高い生体適合性と抗血栓性が示された (図 8-15,16)。



撮像条件：倍率 1,500 倍、加速電圧 1kV

図 8-15 24 時間血液浸漬 3%コーティング膜

図 8-16 左図と別の箇所

8-4 考察

AN-MPC ポリマー溶液を被覆法にてコーティングした PAN 膜 (コーティング膜) とノンコーティング PAN 膜 (ノンコーティング膜) をウサギ新鮮血にて 3 時間及び 24 時間の血液浸漬を行い SEM にて観察を行った結果、ノンコーティング膜、(図 8-7, 図 8-11, 8-12)、1%コーティング膜 (図 8-8 右図,8-13, 8-14) はいずれも血小板凝集、粘着は認められた。しかしながら、ノンコーティング膜は試料にまんべんなく血小板凝集が認められたのに対し、1% コーティング PAN 膜は血小板が凝集していない部分も認められた (図 8-8 左図、図 8-13)。更に、24 時間血液浸漬の 3 %コーティング膜に至っては、どの部分にもまったく血小板の粘着・凝集が認められなかった (図 8-15,16)。本実験により AN-MPC ポリマーのコーティングは 1%より 3%の濃度にて高い有効性が示された。本研究で 1% コーティング膜で血小板凝集が認められる場所と認められない場所が混在し、そのコーティング溶液の濃度でも差異が認められたことは AN-MPC 共重合溶液の表面被覆に偏在性や剥離があったことも予想された。このことは被覆法によるコーティングの後に行った TOF-SIMS 飛行時間型二次イオン質量分析による表面観察では 1%濃度の AN-MPC ポリマーコーティング膜はコーティング剤の塗工状態は付着程度であったのに対し 3%濃度のコーティングはナノスケールの層状にコーティングされた状態だったことが血球の付着量の差で表れていると考えられた。また、観察中に 3%コーティング膜は 1%コーティング膜に比べ、チャージアップした場所が多く存在した。今回使用した SEM は負に帯電した試料を正帯電の気体注入により中和する機能を備えてチャージアップを防ぐ機能を備えているが、ここで考えられるのが加速電圧や時間に影響され

るとはいえ AN-MPC ポリマーの表面導電性が SEM の中和能力により更に低いことが想定できた。チャージアップが AN-MPC ポリマーの導電性に影響していると仮定すると 3% AN-MPC ポリマーは 1% AN-MPC ポリマーと比べ導電性が低いということになる。このことは MPC 濃度が高い場所は表面の導電性が低く帯電しやすいことが考えられた。この性質を利用して AN-MPC ポリマーのコーティング濃度または塗工状態の偏在性の確認を行うためにはチャージアップした場所と血小板凝集の箇所が一致すれば AN-MPC ポリマーのコーティング状態がある程度把握できると予想できると考えられた。チャージアップにより血小板凝集の観察が行えるか否かについてはチャージアップの程度にもよるが手動にて除電の機能を調整するなどの工夫が必要であると考えられた。いずれにせよ今回の実験において 3%コーティング膜にて血小板の凝集が認められなかったため今後の検討課題ではあるが MPC のコーティング濃度と血小板の凝集が関連したチャージアップの出現が確認できればコーティングの偏在性が証明され、新たな知見になると言える。

8-5 結語

AN-MPC ポリマー溶液でコーティングされた人工腎臓 PAN 膜をウサギ新鮮血に 3 時間および 24 時間浸漬させ SEM により表面観察を行った結果、3%濃度 AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜で血球付着物が少なく高い抗血栓性と抗ファウリング性能が示された。

参考文献

- 1) 中林宣男：21 世紀の血液浄化膜. 透析会誌 **31**: 1365-1372,1998.
- 2) 宮野龍之介, 岩崎泰彦, 栗田公夫, 石原一彦, 中林宣男ほか：MPC ポリマーをグラフト化したメチルセルロースの合成と抗血栓性. 第 24 回医用高分子講演会要旨集 **81**,1995.
- 3) 岩崎泰彦, 栗田公夫, 田中志信, 石原一彦, 中林宣男：リン脂質極性基を有するポリマーの *ex vivo* における血液適合性の評価. 生体材料 Vol.**13** No2 52-70,1995.
- 4) 石原一彦, 渡辺明彦, 中林宣男：MPC ポリマー修飾抗血栓性セルロース中空糸膜. 人工臓器 **23** 卷 3 号：654 - 659,1994.
- 5) 出野卓也：走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた生物試料の観察.
- 6) 宮野龍之介, 栗田公夫, 石原一彦, 渡辺昭彦, 田中志信, 中林宣男ほか：MPC ポリマーによる血液透析膜の表面修飾. 医機材報 Vol.**9**：9-19,1995.

9章 AN-MPC ポリマーコーティング血液浄化膜の血液灌流実験

第9章ではコーティングした PAN 膜を血液回路内に詰め、24 時間の血液循環を行い、血液ポンプや回路の異物接触や血流によるシェアストレスに対し、AN-MPC ポリマーの発現効果が抑制されないか *in vitro* 実験を行い、将来の臨床使用に応用が可能であるか検討した。

9-1 目的

第8章にて新しく開発した AN-MPC ポリマーを既存の血液浄化膜 PAN 膜にコーティングして、ウサギ新鮮血に単純浸漬を行い血小板やタンパクの付着が大幅に抑制されたことが SEM により確認された。実際の CHDF 療法では治療が 24 時間に渡り連続的に行われ血液浄化膜には血液ポンプによる血液側の圧力と透析液側の圧力である膜間圧力差 (Trans Membrane Pressure: TMP) が加わる。また、血液はポンプによる血球のすり潰し、ずり応力の刺激や回路などの異物接触により、凝固亢進状態となっている [1]。本章では実際の臨床と同様に血液ポンプを用いたウサギ新鮮血の血液灌流を 24 時間行い、AN-MPC コーティングの人工腎臓膜の血小板、タンパク付着程度を確認した結果を述べる。

9-2 方法

はじめにウサギ新鮮血の血液灌流実験にあたり、血液製剤の節減のため、低プライミングボリューム回路を製作した。従来の臨床治療で用いられるエアートラップチャンバー内に 3% AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜片とノンコーティング PAN 膜片を詰め込み、同条件下のもとに血液灌流を行う。ウサギ新鮮血は抗凝固剤としてクエン酸が含有されているため事前に新鮮血に対して

透析を行い、クエン酸を除去した。臨床条件に近づけるため血液流量は 60mL/min とし循環する回路内にはメシル酸ナファモスタットの持続投与を行った。体外循環中は回路の一部を温水に浸し、血液循環に伴う血液の冷却を可能な限り抑制した。灌流時間は 24 時間とした。灌流時間の根拠として臨床の CHDF は 1 日に 1 本の血液浄化膜の保険請求が可能になるため血液浄化膜のライフタイムが 24 時間担保できれば、新しい膜を計画的に交換ができ、効率の良い治療が可能になることを想定した。

9-2-1 実験機材

(1) 試薬

- ・ 3% AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜片
- ・ ノンコーティング PAN 膜片
- ・ エタノール C_2H_5OH エチルアルコール 99.5%: 和光純薬製
- ・ 0.1mol% リン酸緩衝液 pH7.2: 和光純薬製
- ・ 蒸留水: 大塚製薬製
- ・ 25 % グルタルアルデヒド $C_5H_8O_2$: 和光純薬製
- ・ ウサギ新鮮血: ジャパンラム ヘマトクリット値 20%
- ・ 生理食塩水: 大塚製薬製
- ・ 人工透析液 (キンダリー4号): 扶桑薬品
- ・ 人工腎臓 PMMA 膜 (BK-0.8U) 膜面積 0.8 m^2 : 東レメディカル社
- ・ メシル酸ナファモスタット $C_{19}H_{17}N_5O_2 \cdot 2CH_4O_3S$: 日医工製
- ・ 5%ブドウ糖液: 大塚製薬製

(2) 実験機器

- ・ 透析装置 : JMS 社 GC-110N
- ・ シリンジポンプ TE-311: テルモ社
- ・ 補液ポンプ JMS 社
- ・ 恒温槽 : Iso Temp Fisher Scientific
- ・ 凍結乾燥器 : FDM-2100: EYELA 社
- ・ デジタルマイクロ顕微鏡 : VHX-S-50F: キーエンス社

9-2-2 血液循環回路の作製

従来使用されている血液回路は 100~150mL の充填血液量 (プライミングボリューム) がある。また血液浄化膜自身のプライミングボリュームは 200mL ほどあるため、合計 350mL 程度の血液が必要となる。in vitro 実験の段階では大量の血液製剤を必要とすることは経済的にも手技的にも妥当ではないと考え、短縮された血液回路を自作することとした。臨床において用いられる回路図は以下のとおりである。自作前の回路は無可塑軟質性ポリ塩化ビニル製チューブ、ニプロ社製を用いた。

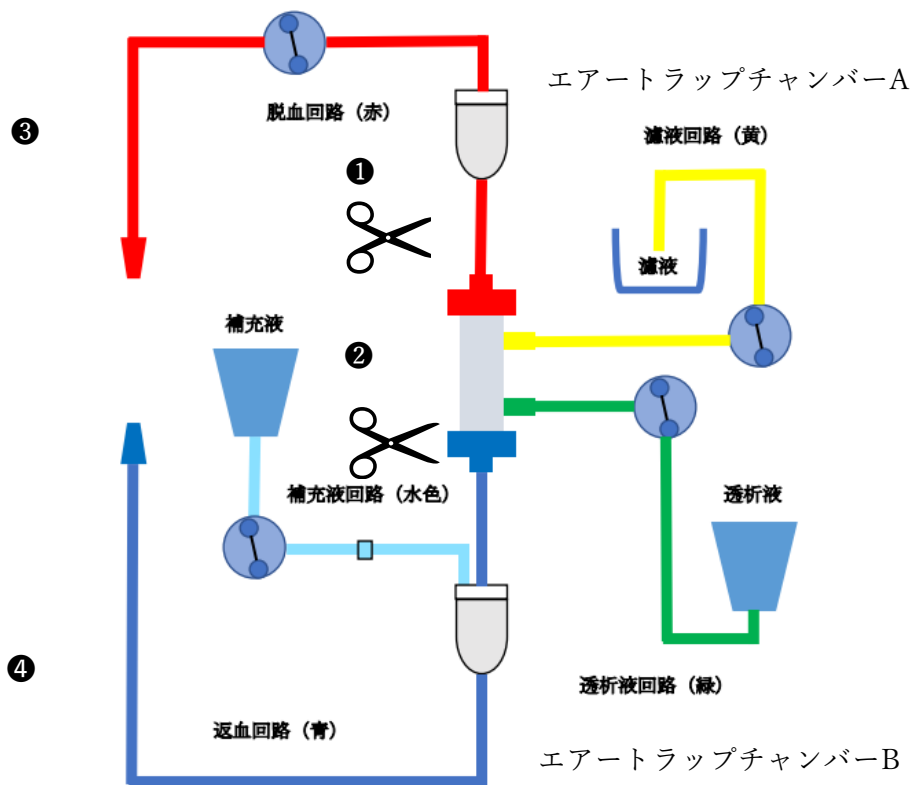


図 9-1 持続的血液浄化療法の標準回路 Ver2.0 [2]

①と②の箇所をカットして接続を行い、③と④の箇所は短くカットし、バイパスしてループとした。次にエアートラップチャンバーA、Bの部分はパラレル回路として血液が同条件でチャンバー内に流入する形とした(図9-1)。チャンバー内には回路作製時にコーティング人工腎臓 PAN 膜片およびノンコーティング片を短冊状(2×5 cm)程度に医療用クーパーでカットしそれぞれ3サンプルずつ詰めた。またポンプの手前からは抗凝固薬としてメシル酸ナファモスタットを持続投与できる形とした最終的な回路図は図9-2に示す。この自作回路により血液プライミングボリュームは83.5mLに節減できた(図9-3,4)。

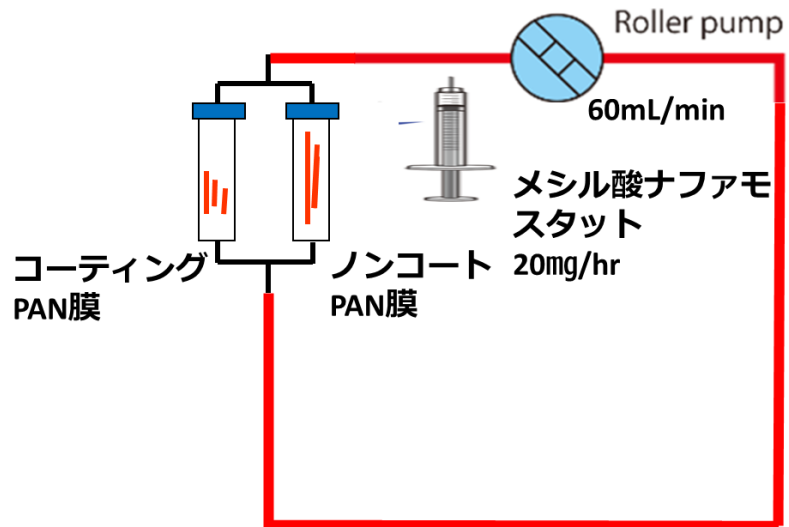


図 9-2 実験用血液浄化回路図



図 9-3 実験用血液浄化回路図の実際

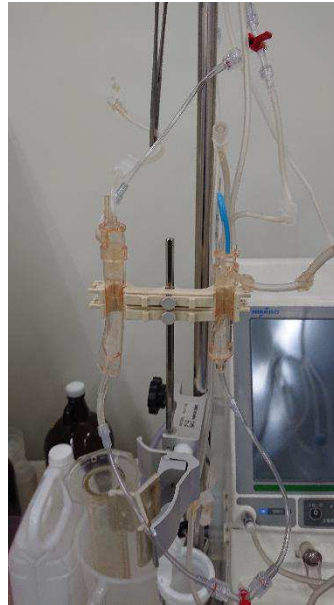


図 9-4 実験用血液浄化回路をセットした状態

9-2-3 ウサギ新鮮血からのクエン酸除去

ウサギ新鮮血内には血液保存と抗凝固のため、クエン酸が混入されている。カルシウムは血液凝固カスケードの触媒因子であるためクエン酸にてその作用を拮抗させているが、より臨床に近い実験を目指すコンセプトからクエン酸は除去した方が望ましいと考えた。先行研究においては、処理せずに実験を行っているが臨床工学の技術ではウサギ新鮮血を血液浄化膜に通血し透析膜の外部に透析液を還流すれば拡散によりクエン酸が除去できると考えた。透析原液（表 9-1）であるキンダリーAF4 号液の原液 A と緩衝液 B と RO 水を 1:1.26:32.74 の比率にて希釈し透析液を調剤し表 9-2 の組成とした [3]。

表 9-1 キンダリー4号透析原液の組成表

	A 原液	B 緩衝液
NaCl	1306.8g/6L	
KCl	31.32g/6L	
CaCl ₂ /2H ₂ O	42.42g/6L	
MgCl ₂ /6H ₂ O	21.36g/6L	
CH ₃ COONa	103.2g/6L	
C ₆ H ₁₂ O ₆	262.5g/6L	
NaHCO ₃		485.1 g /7.56L

表 9-2 調整後の透析液組成

	(mEq/L)
Na ⁺	140
K ⁺	2
Ca ²⁺	2.75
Mg ²⁺	1
Cl ⁻	112.25
CH ₃ COO ⁻	8
HCO ₃ ⁻	27.5
C ₆ H ₁₂ O ₆	125

次に透析用血液浄化膜 (PMMA 膜:0.8 m²) を生理食塩水 1,000mL で洗浄し、ウサギ新鮮血にて血液プライミングを行った。血液プライミング置換の際に生理食塩水は血液ポンプを用いて破棄した。補液ポンプにて透析液流量 400mL/min のシングルパス方式にて血液浄化膜の外部を還流させながら、血液流量 60mL/min にてウサギ新鮮血の透析を行い、クエン酸を除去したウサギ新鮮血は血液バックに回収した。



図 9-5 透析による新鮮血からのクエン酸 Ca 除去

9-3 血液灌流実験

9-3-1 血液灌流

血液ポンプ流量 80mL/min、抗凝固剤として血中薬物半減期が 8 分程度 [4] であるメシル酸ナファモストを 5%ブドウ糖にて希釈し 20mg/min の速度にて持続注入する条件下のもとに血液灌流を開始した。設定条件は臨床の CHDF 療法と同様である。血液循環を行うと血液が外気温に左右される。血液温度が低下すると血液粘度が高まり [5]非生理的になるため、回路の 1 部をビーカーの水に

浸し恒温器を 40℃に設定し保温した。回路内の目詰まりを監視するためにチャンバーの圧力モニターラインより透析患者監視装置にてモニタリングを行った。循環中の回路内圧は 60~160mmHg であった。灌流は 24 時間行い回路内圧が急激に上昇し、回路内が凝血の徴候を示すことはなかった。



図 9-5 恒温器による保温



図 9-6 エアートラップチャンバー



図 9-7 血液灌流の実際

9-3-2 灌流後の観察

24 時間灌流後、血液を空気にて排除したチャンバー内の PAN 膜の観察結果を示す (図 9-8)。○印で囲まれた中に PAN 膜が詰められていた。左チャンバー内はノンコーティング PAN 膜である。右チャンバー内が AN-MPC ポリマーコーティング膜である。目視においても明らかにコーティングされた PAN 膜に血液由来の物質が付着していないことが観察された (図 9-9,9-10)。

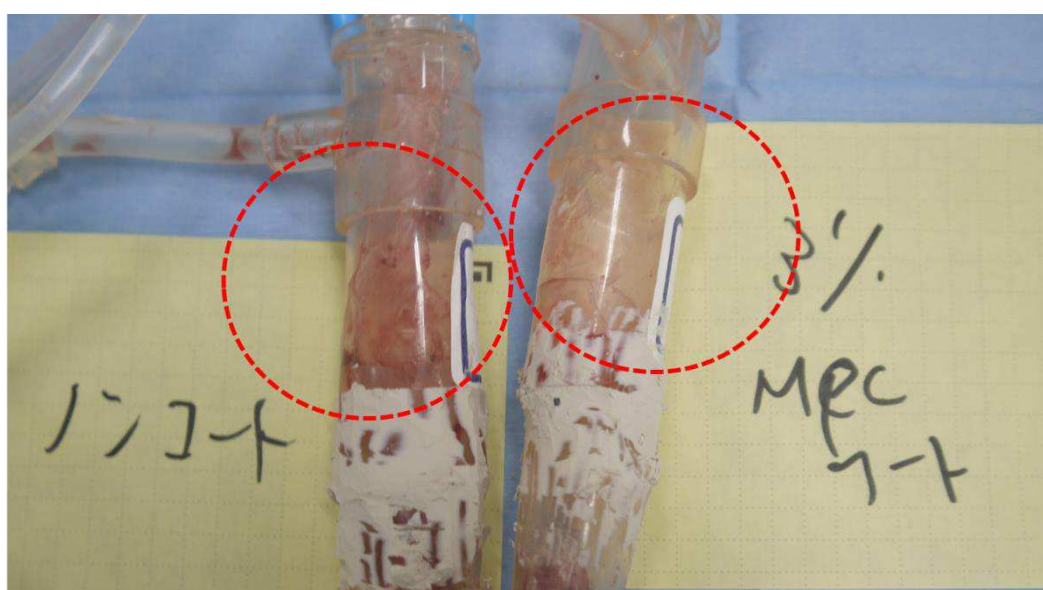


図 9-8 血液灌流後の PAN 膜 (左：ノンコーティング PAN 膜、右：3%PAN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜)



図 9-9 ノンコート PAN 膜



図 9-10 コーティング PAN 膜

9-3-3 試料の前処理

(1) 前固定

7章の手技と同様に、顕微鏡で観察するにあたり、サンプルした PAN 膜を pH を調整したリン酸緩衝液で洗浄を行った。洗浄に先立ち 25% グルタルアルデヒド 10mL と 0.1mol% リン酸緩衝液 (pH7.2) 50mL、蒸留水 40mL をビーカー内にて混和させ 2%グルタルアルデヒド入りリン緩衝液 100mL (pH7.4) を作製した (図 9-11)。

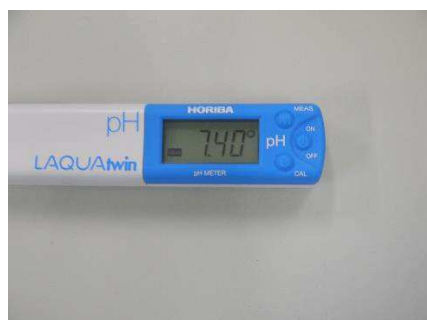


図 9-1 リン酸緩衝液の pH

作製したリン酸緩衝液をチャンバー内に 20mL 投入し洗浄を行う工程を 2 回繰り返した。洗浄した PAN 膜は蓋付きの容器に詰め、PAN 膜が浸る程度のリン酸緩衝液を注入し、実験用低温冷蔵庫に 2 時間 4℃保管浸漬固定を行った。図 9-12 に示すようにこの段階においても目視にて右のノンコート PAN 膜には血液付着物が観察できるが、左のコーティング PAN 膜にはほとんど付着物が見受けられないことが観察できた。



図 9-12 リン酸緩衝液による固定

冷蔵による固定後、再び容器内にてリン酸緩衝液を 20mL 注入し 10 分間攪拌による洗浄する工程を 3 回繰り返した。

(2) 脱水

リン酸緩衝液を破棄し、低温冷蔵庫 4℃下にて 2 週間ほど乾燥、脱水を行った。

(3) 真空凍結乾燥

脱水が終了した後、真空乾燥用のガラス管内にコーティング PAN 膜、ノンコート PAN 膜を詰めた凍結乾燥器 EYELA FDU-2100 を用いて真空凍結乾燥を行った (図 9-13)。条件は-40℃になった後、真空状態となり 15Pa 以下になったところで凍結乾燥が開始された。乾燥後の PAN 膜を示す。ここでも目視にてコーティング膜の無色透明のフィルム状の膜とノンコーティング膜の血液付着物のあるフィルム状膜の様子が観察された。



図 9-13 凍結乾燥



図 9-14 コーティング PAN 膜



図 9-15 ノンコーティング PAN 膜

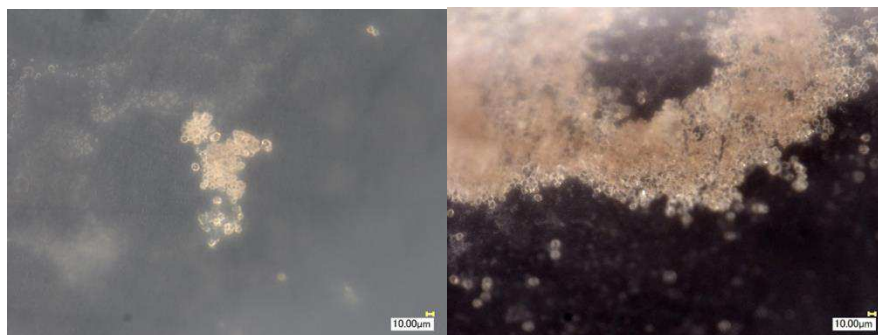
9-3-4 デジタルマイクロ顕微鏡による観察

完全に乾燥させた PAN 膜をデジタルマイクロ顕微鏡にて観察を行った。観察条件は赤血球 $7.7\mu\text{m}$ 、血小板 $2\sim 4\mu\text{m}$ の大きさに対し、倍率 $1,000\sim 2,000$ 倍とした。

(1) 観察手順

- ① 試料台の端でフォーカスを合わせた。
- ② 倍率 500 倍で万遍なく試料を観察し、観察ポイントを見つけたらフォーカス、ポジションを合わせながら倍率を上げた。
- ③ 倍率 $1,000\sim 2,000$ 倍にしてフォーカス、照度を合わせた。
- ④ 観察はすべてのサンプル PAN 膜に対し万遍なく行った。ノンコート膜は血液付着物が目視でも確認できるため観察は容易であった。

(1) ノンコーティング PAN 膜



撮像条件：1,000 倍

図 9-16 ノンコート PAN

試料は血液浸漬のときのように *t*-ブチルアルコールによる凍結乾燥ではなく真空凍結乾燥を行ったため多少縮みが認められたが観察に問題はなかった。スケール、形状から血小板らしき血球が粘着して凝集していることが観察された。

(2) 3%AN-MPC ポリマーコーティング PAN 膜



撮像条件：倍率 1,000 倍

図 9-17 コーティング PAN 膜



撮像条件：倍率 2,000 倍

図 9-18 コーティング PAN 膜

観察試料は目視では何も観察されなかった。デジタルマイクロ顕微鏡にて観察された付着物は血液成分とは認識できず、塵や不純物と思われた。AN-MPC ポリマーを被覆することにより血小板やタンパクの付着を抑制することが示された。

9-4 考察

3%AN-MPC ポリマー溶液を被覆法にてコーティングした PAN 膜（以下コーティング膜）とノンコーティング PAN 膜（以下ノンコーティング膜）をウサギ新鮮血にて 24 時間の血液循環を行い、デジタルマイクロ顕微鏡で観察を行った結果、ノンコーティング膜は血球の付着が認められたのに対し（図 9-15）、AN-MPC コーティング PAN 膜は血球の粘着・凝集が認められなかった（図 9-16,17）。この結果は、第 8 章の血液浸漬と同様の結果であり、24 時間血液ポンプで循環を行い、回路に対する異物接触や血液ローラポンプによるすり潰しによる刺激など様々な血液のシェアストレスの大きい条件下でも AN-MPC ポリマーコー

ティング溶液の抗血栓性、抗ファウリング性能の効果発現が証明されたといえる。実際の臨床の CHDF と同じ施行時間と血流量、抗凝固剤の投与方法の条件下にて施行された本実験結果は血液ポンプの脈動や血流に対して AN-MPC ポリマーは血液浄化 PAN 膜からは剥離されない結果と言える。また、長時間にわたる抗血栓性性能の維持に関しては、MPC の分子構造が血管内皮の構造と類似するため血漿中のリン脂質が MPC ポリマーで被覆した PAN 膜に優先的に吸着され、MPC ポリマーのスルホン酸エステルにあるリン脂質と自己組織化して血管内皮と同じ環境になり、血小板が非活性化されたと考えられた[6]。さらに先行研究として Iwasaki Y.らは活性化血小板内の Ca 濃度を測定し MPC に接触した血小板は Ca 濃度が低値であったとしている[7]また MPC のポリマーブラシ構造の厚さによりタンパク質やフィブリノーゲンの吸着を抑制することや[8]MPC 表面のマクロファージのメッセンジャーRNA より放出される IL-1 濃度を測定し異物反応の非活性状態も確認されている [9]。いずれにしても MPC の血小板、タンパク質の吸着抑制効果は何らかの機序で働いていることは確かであろう。またこのことを血液体外循環に対してこの効果を十分に確認するためには凝固線溶系のマーカーを経時的に測定し、血液の凝固亢進状態が抑制されていることの観察が必要になると言える。

AN-MPC ポリマー溶液の被覆が十分な濃度とコーティング厚で行われれば、抗血栓効果を発揮することが示された。また、MPC を製膜段階で混紡するブレンド法による生体適合性発現濃度 [10]より低濃度 MPC ポリマー溶液で本研究の結果が得られたことは非常に高価な MPC ポリマーの節減にも意義がある。

9-5 結語

3% AN-MPC ポリマーにてコーティングされた PAN 膜は 24 時間の血液循環に対して剥離することなく十分な抗血栓性、抗ファウリング性能が維持できることが示された。

参考文献

第9章

- 1) 阿部稔雄,上田裕一：最新人工心肺 理論と実践 第3版. 241-242,2007.
- 2) 公益社団法人 日本臨床工学技士会 透析関連安全委員会 持続的血液浄化療法
の安全基準についての提言 Ver2.0 2018.
- 3) 扶桑薬品：キンダリー4E号添付文書.
- 4) 虎戸寿浩,野入英世,花房規男：CRRT ポケットマニュアル. 医歯薬出版
50,2011.
- 5) 草川實 体外循環の実際；南江堂：133-136,1991.
- 6) Kojima M, Ishihara K, Watanabe A, Nakabayashi N: Interaction between
phospholipids and biocompatible polymers containing a
phosphorylcholine moiety. *Biomaterials* vol.12: 1100-1110,1991.
- 7) Iwasaki Y, Mikami A, Kurita K, Ishihara K and Nakabayashi N:
Reduction of surface-induced platelet activation on phospholipid polymer.
J Biomed Mater Res 36: 508-15,1997.
- 8) Feng W, Brash J L and Zhu: Non-biofouling materials prepared by atom
transfer radical polymerization grafting of 2-methacryloxyethyl
phosphorylcholine: Separate effects of graft density and chain length on
protein repulsion. *Biomaterials* 27 847-855,2006.
- 9) Iwasaki Y, Sawada S, Ishihara K, Khang G and Lee HB:
Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications.
Biomaterials 23 3897,2002.

- 10) Hasegawa T, Iwasaki Y, Ishihara K: Preparation and performance of protein-adsorption-resistant asymmetric porous membrane composed of poly-sulfone /phospholipid polymer blend *Biomaterials* **22**: 243,2001.

第 10 章 総括

10-1 研究の成果

急性血液浄化療法において問題となる血液浄化膜の血液凝固とタンパクフェウリングに対し新たな抗血栓性ポリマーを開発した。開発したポリマーは人工リン脂質 MPC とアクリロニトリルを重合し AN-MPC ポリマーとした後に既存の人工腎臓 PAN 膜に被覆法にてコーティングを行った。重合のモル比は MPC : AN = 3 : 7 とし、コーティング溶液濃度は 3% にすることによりウサギ新鮮血に対する高い抗血栓性作用の発現が認められた。その効果の持続性は 24 時間の血液循環を行う実験によっても証明された。発明したポリマーは *in vitro* の基礎実験においては有効性が認められた。

10-2 今後の展望

本研究により新たに開発した抗血栓性 AN-MPC ポリマーコーティング溶液は単純被覆法にて既存の人工腎臓 PAN 膜にコーティングが可能であった。

今後、臨床応用するに当たり、コーティングによって肝心のサイトカイン除去能力が損なわれていないか考慮する必要がある。開発者の中林らは中空糸膜の MPC のコーティングに対しては偏在させるべきとしている [1]。その理由として血液浄化膜にコーティングする際に、血液浄化膜の多孔質膜の細孔が完全に閉塞すると、尿毒素の除去やサイトカインの吸着を妨げるからである。また、MPC 自体に溶質透過性が存在するため、陰性荷電膜の分子間相互作用が得られる程度の薄膜層であれば十分に血液浄化膜の機能を発揮しながら、生体適合性が発現されることも考えられる [2]。理想的には膜表面に至適な濃度で AN-MPC コーティングが存在し、血栓の付着を抑制しながら、偏在した隙間と細孔内部の

陰性荷電が保たれサイトカインを吸着する構造が必要である。中林らは膜表面の MPC 共重合体のバルク濃度が 0.05~0.5wt% が好ましい [1]とし、熱分解ガスクロマトグラフィーで MPC 由来のフラグメントより、その至適濃度を解析している。今回われわれの SEM 観察時に確認された MPC 濃度によって導電性が異なり、AN-MPC コーティング部分のチャージアップの状況で偏在性と濃度が簡易的に推定できれば新たな膜の塗工状態の確認に生かされる。また今後、コーティングした膜の表面を原子間力電子顕微鏡 (Atomic Force Microscope: AFM) を用いてナノサイズ程度の膜面状態を確認後、X線光電子分析装置 (X-ray Photoelectron Spectroscopy: ESCA) を用いて結合状態や表面被覆率の解析を行えばより詳細な塗工状態の分析が確認できると考える。MPC が偏在されたコーティング状態で薄いコーティング厚であればその隙間からサイトカインの吸着能力が保持され、抗血栓性が共存できるが、MPC 共重合体の分子量が小さすぎると脱落や拡散にて膜内部に浸透されてしまうため、膜内細孔を拡散で通過できない分子量 5,000 ダルトン以上が必要 [1]とされている。今回開発した AN-MPC ポリマーの平均分子量は 30,000~35,000 と十分な分子量を有している。従って AN-MPC ポリマーコーティングを行ったときの被覆状態が重要な条件となる。孔径の狭小化も考慮しながら、効率良くサイトカインを吸着するスペースを確保することが重要となる。また、サイトカイン吸着に対する PAN 膜の陰性荷電による作用は長距離相互作用のため、ナノメートルオーダーの薄膜である今回のコーティングでは問題にならないと考える。最終的にはサイトカイン試薬などでクリアランスの測定による確認が必要である。今後の展開としてサイトカインクリアランスの測定と AFM または FT-IR にて開孔率、化学結合、

膜厚などの塗工状態の表面観察を必要であると考え。さらにこの血液浄化膜を中空糸化し、滅菌を行った際に AN-MPC ポリマーのコーティングが剥がれず、孔径、強度が保たれサイトカイン吸着能力が維持され抗血栓性などの生体適合性が維持されることを検証することが重要である。

10-3 結語

血液浄化膜の研究を 30 年行い様々な膜素材の表面修飾、孔径設計による臨床性能と生体適合性の特徴を学んできた。また急性血液浄化療法に対して血液浄化膜を使用し、炎症性サイトカインの除去効率と血中濃度による生命予後、血液浄化療法の開始、離脱タイミングを研究してきた。それらの知識を融合し、今回、急性血液浄化膜に対する新たな抗血栓性 AN-MPC ポリマーを開発した。手探りながら自ら重合し、血液浄化膜に被覆した後に血液浸漬、血液循環を行い血球、血小板、タンパク付着のない高い生体適合性を示すことが証明された。このポリマーは従来までの問題点であった血液浄化療法中の血液凝固、ファウリングによる目詰まりに対する、血液損失と治療の中断を解決するものと考え。また従来までの病院に通院することによる治療形態から在宅医療に移行する次世代の腎代替医療である携帯型人工腎臓、植込み型人工腎臓などの人工臓器の進化に大きく貢献する可能性があることが本論文の成果である。

参考文献

第 10 章

- 1) 中林宣男, 石原一彦, 宮崎真司: 改質された中空糸膜. 特許公開番号 WO20003009857.
- 2) 中林宣男: 21 世紀の血液浄化膜. 透析会誌 **31**: 1365-1372, 1998.

謝辞

本論文を執筆するにあたり 帝京科学大学 内田恭敬 教授、永沼充 教授、斉藤幸喜 教授、辻本敬 准教授、日本医療科学大学 石田等 教授にご助言、ご指導いただきました。特に石田等 教授は臨床工学技士の先輩であり大学院時代から実験指導、教員としての心構えを教授していただきました。そして研究協力者として難病でありながら放送大学大学院在籍当時から実験の発案、指導を昼夜伴走してくれた東千秋 放送大学名誉教授、安池智一 教授、並木陽一 工学博士、共重合物の解析のために尽力して下さった、藤村秀夫さま、小口清さま、及川清さま、また臨床工学技士として社会に出て何もわからぬ状態から研究、臨床指導をして頂いた帝京大学医学部附属市原病院 故小出桂三 教授 以下、第3内科医局の先生方、臨床工学技士として社会人として人格、品格、技術すべてを教えていただいた日本臨床工学技士会 川崎忠行 名誉会長 以下臨床工学技士の諸先輩方、本大学に着任するにあたりご理解いただいた香取おみがわ医療センター井上雅裕 内科部長、また仕事を行いながら大学院にて学ぶことをサポートし臨床、研究の手伝いをしてくれた香取おみがわ医療センター臨床工学科の同志、本研究の発端であった医療事故をともに乗り越えていただいた香取おみがわ医療センター篠塚信子 看護部長 以下看護師の皆さん、ほか臨床工学技士としての30年間をともに協力、励まし、時には未熟な部分を叱咤、ご指導していただいたすべての皆様と人生を支えて頂いている家族に感謝の意を表します。